



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118638789 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 13

(21) 申请号 202410808113.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2019.05.14

C12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/713 (2006.01)

62/671,094 2018.05.14 US

A61P 9/00 (2006.01)

62/727,141 2018.09.05 US

62/816,996 2019.03.12 US

(62) 分案原申请数据

201980042428.3 2019.05.14

(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·福斯特 G·辛克尔

M·K·施莱格尔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 徐志明

权利要求书2页 说明书134页
序列表(电子公布) 附图23页

(54) 发明名称

血管紧张素原(AGT) iRNA组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向AGT基因的RNAi剂,例如,双链RNA(dsRNA)剂。本发明还涉及使用这类RNAi剂以抑制AGT基因表达的方法及预防与治疗AGT相关障碍(例如,高血压)的方法。

1. 一种用于抑制血管紧张素原 (AGT) 表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 剂, 其中该 dsRNA 剂包含形成双链区的正义链及反义链, 其中该正义链包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303 或 2282-2304 的任一核苷酸序列中的至少 19 个连续核苷酸, 及该反义链包含 SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列中的至少 19 个连续核苷酸。

2. 如权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中该正义链包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303 或 2282-2304 的任一核苷酸序列中的至少 21 个连续核苷酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 dsRNA 剂, 其中该反义链包含 SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列中的至少 21 个连续核苷酸。

4. 如权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中该反义链包含选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列中的至少 19 个连续核苷酸: AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374 和 AD-133385。

5. 如权利要求 4 所述的 dsRNA 剂, 其中该正义链包含选自以下的双链体的任一正义链核苷酸序列中的至少 19 个连续核苷酸: AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374 和 AD-133385。

6. 如权利要求 1 所述的 dsRNA 剂, 其中该正义与反义链包含选自以下的任一双链体的核苷酸序列: AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374 和 AD-133385。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的 dsRNA 剂, 其中该 dsRNA 剂包含至少一个修饰的核苷

酸。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的dsRNA剂,其中该正义链的基本上所有核苷酸及该反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。

9. 如权利要求1至7中任一项所述的dsRNA剂,其中该正义链的所有核苷酸及该反义链的所有核苷酸包含修饰。

10. 如权利要求7至9中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一个该修饰的核苷酸选自:脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、非锁核苷酸、构象限制的核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基的核苷酸、包含甲基膦酸酯基的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、热失稳核苷酸、二醇修饰的核苷酸(GNA)和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸;及其组合。

血管紧张素原 (AGT) iRNA 组合物及其使用方法

[0001] 本发明是申请日为2019年5月14日和发明名称为“血管紧张素原 (AGT) iRNA 组合物及其使用方法”的201980042428.3号发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请与美国临时申请号62/671,094 (申请日2018年5月14日)、美国临时申请号62/727,141 (申请日2018年9月5日) 和美国临时申请号62/816,996 (申请日2019年3月12日) 相关。上述各申请的完整内容以引用的方式并入本文中。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含的序列表以ASCII格式电子提交且其整体以引用的方式并入本文中。于2019年5月3日生成的该ASCII拷贝名称为12130108620SL.txt且大小为272,488字节。

背景技术

[0006] 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 在血压调节中起着关键作用。RAAS级联始于肾脏的近肾小球细胞将肾素分泌至循环中。肾素分泌受到几个因素的刺激,包括远端小管中的Na⁺负荷、 β -交感神经刺激和/或降低的肾灌注。血浆中的活性肾素将血管紧张素原 (由肝脏产生) 分裂成血管紧张素I,其随后通过循环和局部表达的血管紧张素-转化酶 (ACE) 转化成血管紧张素II。血管紧张素II对RAAS的大部分作用是通过其与血管紧张素II 1型受体 (AT₁R) 的结合来发挥的,从而导致动脉血管收缩、肾小管和肾小球效应,如增强的Na⁺重吸收或肾小球滤过率的调节。此外,与其他刺激物 (如促肾上腺皮质激素、抗-利尿激素、儿茶酚胺、内皮素、血清素) 以及Mg²⁺和K⁺水平一起,AT₁R刺激导致醛固酮释放,其随后促进肾远端曲小管中的Na⁺和K⁺排泄。

[0007] 导致例如过度血管紧张素II产生和/或AT₁R刺激的RAAS失调引起高血压,其可以导致例如提高的氧化应激,心脏、肾脏和动脉中炎症、肥大和纤维化的促进,并且导致例如左心室纤维化、动脉重建和肾血管球硬化症。

[0008] 高血压是发达国家中最普遍的、可控的疾病,影响20-50%的成年人群体。高血压是各种疾病、失调和病症的主要风险因素,如,缩短的预期寿命、慢性肾病、中风、心肌梗塞、心力衰竭、动脉瘤 (例如,主动脉瘤)、外周动脉疾病、心脏损伤 (例如,心脏扩张或肥大) 和其他心血管相关疾病、失调和/或病症。此外,已经表明高血压是心血管发病和死亡的重要风险因素,占据或构成全部中风的62%和所有心脏病病例的49%。在2017年时,发生了高血压诊断、预防 and 治疗的准则的变化,从而提供了用于甚至更低的血压以进一步降低发生高血压相关疾病及障碍的风险的目标 (参见例如,Reboussin等人, Systematic Review for the 2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi:10.1016/j.jacc.2017.11.004; 及 Whelton等人 (2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline

for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006)。

[0009] 尽管可用于治疗高血压的抗高血压药数量大,但超过三分之二的受试者用一种抗高血压药不能得到控制并且需要两种或更多种选自不同药物类别的抗高血压药。由于随着用药增加依从性降低和副作用增加,这进一步降低了具有受控血压的受试者的数量。

发明内容

[0010] 本发明提供了iRNA组合物,其实现RNA诱导沉默复合体(RISC)-介导的编码血管紧张素原(AGT)的基因的RNA转录物的切割。AGT基因可以在细胞内,例如,受试者(如人类受试者)体内的细胞。

[0011] 在一个方面中,本发明提供一种抑制血管紧张素原(AGT)表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的正义链与反义链,其中正义链包含来自SEQ ID NO:1的核苷酸635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303或2282-2304中任一核苷酸序列的至少19个连续核苷酸,及反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少19个连续核苷酸。

[0012] 在某些实施方式中,正义链包含SEQ ID NO:1的核苷酸635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303或2282-2304中任一核苷酸序列的至少21个连续核苷酸。在某些实施方式中,反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少21个连续核苷酸。

[0013] 在某些实施方式中,反义链包含选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列的至少19个连续核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。在某些实施方式中,正义链包含选自以下的双链体的任一正义链核苷酸序列的至少19个连续核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-

133362、AD-133374和AD-133385。在某些实施方式中,正义和反义链包含选自以下的双链体的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

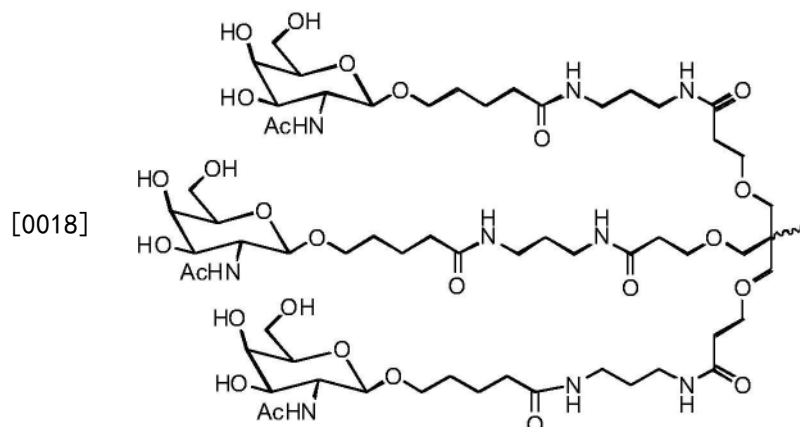
[0014] 在某些实施方式中,反义链包含来自AD-85481的反义链的核苷酸序列(5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO:9))的至少19个连续核苷酸。在某些实施方式中,正义链包含来自AD-85481的正义链的核苷酸序列(5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO:10))的至少19个连续核苷酸。在某些实施方式中,正义和反义链包含AD-85481的正义和反义链核苷酸序列(5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO:9)和5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO:10))。

[0015] 在某些实施方式中,dsRNA剂包含至少一个修饰的核苷酸。在某些实施方式中,正义链的基本上所有核苷酸及反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。在某些实施方式中,正义链的所有核苷酸及反义链的所有核苷酸包含修饰。在某些实施方式中,至少一个修饰的核苷酸选自脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、非锁核苷酸、构象限制的核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、N-吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基的核苷酸、包含甲基磷酸酯基的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、热失稳核苷酸、二醇修饰的核苷酸(GNA)和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,及其组合。在某些实施方式中,核苷酸的修饰选自:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基、GNA及其组合。在某些实施方式中,核苷酸上的修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰。在某些实施方式中,至少一个修饰的核苷酸选自:脱氧-核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、二醇修饰的核苷酸(GNA)和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,及其组合。在某些实施方式中,至少一个核苷酸修饰为热失稳核苷酸修饰。在某些实施方式中,该热失稳核苷酸修饰选自:无碱基修饰;与双链体中相对核苷酸的错配;及失稳糖修饰、2'-脱氧修饰、无环核苷酸、非锁核酸(UNA)和甘油核苷酸(GNA)。

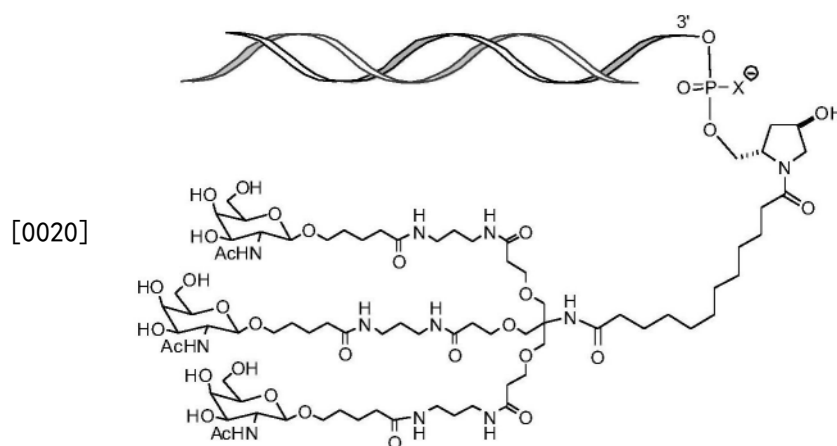
[0016] 在某些实施方式中,双链区长度为19-21个核苷酸。在某些实施方式中,双链区长度为21个核苷酸。在某些实施方式中,dsRNA剂的各链长度独立地为不超过30个核苷酸。在某些实施方式中,dsRNA剂的至少一条链包含具有至少1个核苷酸或至少2个核苷酸的3'突出端。

[0017] 在某些实施方式中,dsRNA剂进一步包含配体。在某些实施方式中,该配体缀合于dsRNA剂正义链的3'端。在某些实施方式中,该配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物,

例如,其中该配体为



[0019] 在某些实施方式中,dsRNA剂如下式所示缀合于配体



[0021] 且其中X为O或S,例如,其中X为O。

[0022] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中该反义链包含与编码人AGT的mRNA互补的区域,其中该互补的区域包含选自以下的双链体的一个反义链序列的至少19个核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。在某些实施方式中,反义链包含与编码人AGT的mRNA互补的区域,其中该互补的区域包含选自以下的双链体的任一反义链序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。在某些实施方式中,互补的区域由选自以下的双链体的任一反义链序列组成:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-

84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0023] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中反义链包含选自以下的双链体的化学修饰的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0024] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中反义链包含双链体AD-85481的化学修饰的核苷酸序列(5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3'(SEQ ID NO:11)),其中a、c、g和u分别为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸;Af、Cf、Gf和Uf分别为2'-0-氟腺苷-3'-磷酸、2'-0-氟胞苷-3'-磷酸、2'-0-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-0-氟尿苷-3'-磷酸;dT为脱氧-胸腺嘧啶;s为硫代磷酸酯连接;及(Tgn)为胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体。

[0025] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中反义链和正义链包含选自以下的双链体的化学修饰的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0026] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中反义链和正义链包含双链体AD-85481的化学修饰的核苷酸序列(5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3'(SEQ ID NO:11)及5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3'(SEQ ID NO:12)),其中a、c、g和u分别为2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸;Af、Cf、Gf和Uf分别为2'-0-氟腺苷-3'-磷酸、2'-0-氟胞苷-3'-磷酸、2'-0-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-0-氟尿苷-3'-磷酸;dT为脱氧-胸腺嘧啶;s为硫代磷酸酯连接;及(Tgn)为胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体;且其中正义链的3'-端任选地缀合于N-[三(GalNAc-烷基)-酰氨基十二烷酰基]-4-羟基脯胺醇(L96)配体。

[0027] 在某些实施方式中,本发明提供dsRNA剂,其中反义链和正义链由双链体AD-85481的化学修饰的核苷酸序列组成(5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3'(SEQ ID NO:11)和5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3'(SEQ ID NO:12)),其中正义链的3'-端缀

合于N-[三(GalNAc-烷基)-酰氨基十二烷酰基]-4-羟基脯胺醇(L96)配体,其中a、c、g和u分别为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;Af、Cf、Gf和Uf分别为2'-O-氟腺苷-3'-磷酸、2'-O-氟胞苷-3'-磷酸、2'-O-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-O-氟尿苷-3'-磷酸;dT为脱氧-胸腺嘧啶;s为硫代磷酸酯连接;及(Tgn)为胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体。

[0028] 在某些实施方式中,dsRNA剂的双链区长度为约19-30个核苷酸对、约19-25个核苷酸对、约23-27个核苷酸对、约19-23个核苷酸对、约21-23个核苷酸对。

[0029] 在某些实施方式中,dsRNA剂的各链长度独立地为19-30个核苷酸。

[0030] 在某些实施方式中,配体是通过单价、二价或三价分支接头附接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0031] 在某些实施方式中,dsRNA剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接。在某些实施方式中,硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接在一条链的3'-末端。在某些实施方式中,该链为反义链。在某些实施方式中,该链为正义链。在某些实施方式中,硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接在一条链的5'-末端。在某些实施方式中,该链为反义链。在某些实施方式中,该链为正义链。在某些实施方式中,硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接在一条链的5'-和3'-末端。在某些实施方式中,该链为反义链。

[0032] 在某些实施方式中,dsRNA剂在双链体反义链5'-端的1位包含的碱基对为AU碱基对。

[0033] 在某些实施方式中,dsRNA剂包含具有共21个核苷酸的正义链及具有共23个核苷酸的反义链。

[0034] 在一个方面中,本发明提供包含本发明的dsRNA剂的细胞。

[0035] 在一个方面中,本发明提供一种用于抑制编码AGT的基因表达的药物组合物,其包含本发明的dsRNA剂。在某些实施方式中,该药物组合物包含dsRNA剂和脂质制剂。

[0036] 在一个方面中,本发明提供一种抑制细胞中AGT基因表达的方法,该方法包括:

[0037] (a) 使细胞与本发明的dsRNA剂或药物组合物接触;和

[0038] (b) 维持步骤(a)中产生的细胞足以获得AGT基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制细胞中AGT基因的表达。

[0039] 在某些实施方式中,细胞是在受试者内。在某些实施方式中,受试者为人类。在某些实施方式中,受试者诊断为患有AGT相关障碍。

[0040] 在某些实施方式中,AGT相关障碍选自:高血压病、高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、孤立性收缩期或舒张期高血压、妊娠相关高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏(Goldblatt)高血压、眼高血压、青光眼、肺高血压、门脉高血压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压;高血压性心脏病、高血压性肾病变、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病变、糖尿病性肾病变、糖尿病性视网膜病变、慢性心力衰竭、心肌病变、糖尿病性心肌病变、肾小球硬化症、主动脉狭窄、主动脉瘤、心室纤维化、心力衰竭、心肌梗塞、心绞痛、中风、肾疾病、肾衰竭、系统性硬化症、宫内发育迟缓(IUGR)、胎儿生长受限、肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD);葡萄糖耐受不良、2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征。

[0041] 在某些实施方式中,受试者的收缩压为至少130mmHg或舒张压为至少80mmHg。在某些实施方式中,受试者的收缩压为至少140mmHg及舒张压为至少80mmHg。在某些实施方式中,受试者为对盐敏感易感的人群的部分、超重、肥胖或是妊娠的。

[0042] 在某些实施方式中,使细胞与dsRNA剂接触抑制AGT表达至少50%、60%、70%、80%、90%、95% (例如,与细胞第一次接触dsRNA剂之前(例如,对受试者施用第一剂量dsRNA剂之前)的AGT表达水平相比)。在某些实施方式中,抑制AGT表达使受试者血清样品中的AGT蛋白质水平降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%,例如,与细胞第一次接触dsRNA剂之前的AGT表达水平相比。

[0043] 在一个方面中,本发明提供一种治疗受试者的AGT相关障碍的方法,其包括对受试者施用本发明的dsRNA剂或药物组合物,从而治疗受试者的AGT相关障碍。在某些实施方式中,受试者的收缩压为至少130mm Hg或舒张压为至少80mm Hg。在某些实施方式中,受试者的收缩压为至少140mmHg及舒张压为至少80mmHg。在某些实施方式中,受试者为人类。在某些实施方式中,受试者为对盐敏感易感的人群的部分、超重、肥胖或妊娠的。

[0044] 在本发明的某些实施方式中,dsRNA剂的施用剂量为约0.01mg/kg至约50mg/kg。在某些实施方式中,dsRNA剂皮下施用于受试者。在某些实施方式中,AGT水平在受试者中测量。在某些实施方式中,受试者中的AGT水平为受试者血液样品、血清样品或尿液样品中的AGT蛋白质水平。

[0045] 在某些实施方式中,对受试者施用用于治疗高血压的另外的治疗剂。在某些实施方式中,该另外的治疗剂选自:利尿剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、 β -阻滞剂、血管扩张剂、钙通道阻滞剂、醛固酮拮抗剂、 α 2-激动剂、肾素抑制剂、 α -阻滞剂、外周作用肾上腺素能剂、选择性D1受体部分激动剂、非选择性 α -肾上腺素能拮抗剂、合成的和甾体抗盐皮质激素剂;或上述任何的组合,及配制成药剂组合的高血压治疗剂。在某些实施方式中,该另外的治疗剂包括血管紧张素II受体拮抗剂,例如,氯沙坦(losartan)、缬沙坦(valsartan)、奥美沙坦(olmesartan)、依普沙坦(eprosartan)和阿齐沙坦(azilsartan)。在某些实施方式中,该另外的治疗剂为血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂(angiotensin receptor-neprilysin inhibitor,ARNi),例如,Entresto®、沙库比曲(sacubitril)/缬沙坦;或内皮素受体拮抗剂(ERA),例如,西他生坦(sitaxentan)、安贝生坦(ambrisentan)、阿曲生坦(atrasentan)、BQ-123、齐泊腾坦(zibotentan)、波生坦(bosentan)、马昔腾坦(macitentan)和替唑生坦(tezosentan)。

[0046] 本发明也提供本文提供的dsRNA剂和药物组合物治疗AGT相关障碍的用途。在某些实施方式中,该用途包括本发明提供的任何方法。

[0047] 本发明提供包含本发明的dsRNA剂的试剂盒。在某些实施方式中,本发明提供用于实施本发明的方法的试剂盒。

[0048] 特别地,本申请涉及以下各项:

[0049] 1.一种用于抑制血管紧张素原(AGT)表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的正义链及反义链,其中该正义链包含SEQ ID NO:1的核苷酸635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303或2282-2304的

任一核苷酸序列中的至少19个连续核苷酸,及该反义链包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列中的至少19个连续核苷酸。

[0050] 2.如第1项所述的dsRNA剂,其中该正义链包含SEQ ID NO:1的核苷酸635-658、636-658、642-667、642-664、645-667、1248-1273、1248-1272、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303或2282-2304的任一核苷酸序列中的至少21个连续核苷酸。

[0051] 3.如第1或2项所述的dsRNA剂,其中该反义链包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列中的至少21个连续核苷酸。

[0052] 4.如第1项所述的dsRNA剂,其中该反义链包含选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列中的至少19个连续核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0053] 5.如第4项所述的dsRNA剂,其中该正义链包含选自以下的双链体的任一正义链核苷酸序列中的至少19个连续核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0054] 6.如第1项所述的dsRNA剂,其中该正义与反义链包含选自以下的任一双链体的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD-133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0055] 7.如第1至6项中任一项所述的dsRNA剂,其中该dsRNA剂包含至少一个修饰的核苷酸。

[0056] 8.如第1至7项中任一项所述的dsRNA剂,其中该正义链的基本上所有核苷酸及该反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。

[0057] 9.如第1至7项中任一项所述的dsRNA剂,其中该正义链的所有核苷酸及该反义链的所有核苷酸包含修饰。

[0058] 10. 如第7至9项中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一个该修饰的核苷酸选自:脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、非锁核苷酸、构象限制的核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基的核苷酸、包含甲基磷酸酯基的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、热失稳核苷酸、二醇修饰的核苷酸(GNA)和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸;及其组合。

[0059] 11. 如第7至10项中任一项所述的dsRNA剂,其中该核苷酸上的修饰选自:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基和GNA;及其组合。

[0060] 12. 如第11项所述的dsRNA剂,其中该核苷酸上的修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰。

[0061] 13. 如第7至9项中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一个该修饰的核苷酸选自:脱氧-核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、二醇修饰的核苷酸(GNA)和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸;及其组合。

[0062] 14. 如第7至9项中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一个该核苷酸上的修饰为热失稳核苷酸修饰。

[0063] 15. 如第14项所述的dsRNA剂,其中该热失稳核苷酸修饰选自:无碱基修饰;与双链体中相对核苷酸的错配;及失稳糖修饰、2'-脱氧修饰、无环核苷酸、非锁核酸(UNA)和甘油核酸(GNA)。

[0064] 16. 如第1至15项中任一项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为19-21个核苷酸。

[0065] 17. 如第1至16项中任一项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为21个核苷酸。

[0066] 18. 如第1至17项中任一项所述的dsRNA剂,其中各链的长度独立地为不超过30个核苷酸。

[0067] 19. 如第1至18项中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

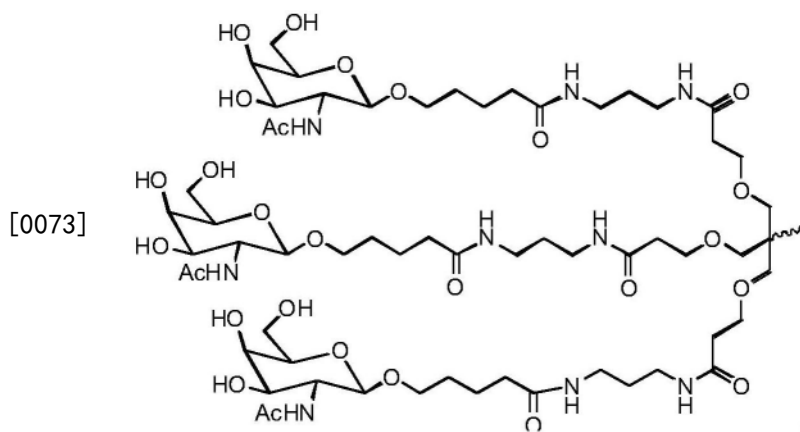
[0068] 20. 如第1至18项中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一条链包含具有至少2个核苷酸的3'突出端。

[0069] 21. 如第1至20项中任一项所述的dsRNA剂,其进一步包含配体。

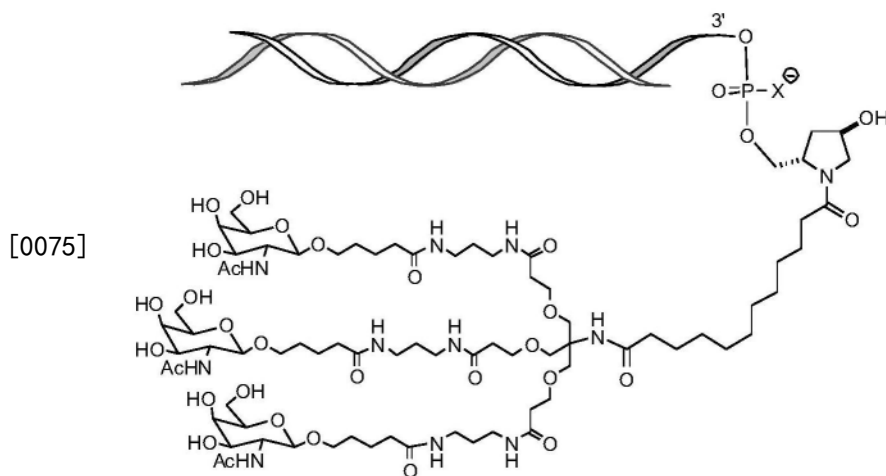
[0070] 22. 如第21项所述的dsRNA剂,其中该配体缀合于所述dsRNA剂的正义链的3'端。

[0071] 23. 如第21或22项所述的dsRNA剂,其中该配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

[0072] 24. 如第23项所述的dsRNA剂,其中该配体为



[0074] 25. 如第24项所述的dsRNA剂, 其中该dsRNA剂如下式所示缀合于配体:



[0076] 且其中X为0或S。

[0077] 26. 如第25项所述的dsRNA剂,其中X为0。

[0078] 27. 如第1至5项中任一项所述的dsRNA剂,其中该反义链包含与编码人类AGT的mRNA互补的区域,其中该互补区包含选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列中的至少19个核苷酸:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0079] 28. 如第27项所述的dsRNA剂,其中该反义链包含与编码人类AGT的mRNA互补的区域,其中该互补区包含选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-

126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0080] 29. 如第28项所述的dsRNA剂,其中该互补区由选自以下的双链体的一个反义链核苷酸序列组成:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0081] 30. 如第27至29项中任一项所述的dsRNA剂,其中该反义链包含选自以下的双链体的化学修饰的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0082] 31. 如第27至29项中任一项所述的dsRNA剂,其中该反义链和该正义链包含选自以下的双链体的化学修饰的核苷酸序列:AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637、AD-85655、AD-126306、AD-126307、AD-126308、AD-126310、AD133360、AD-133361、AD-133362、AD-133374和AD-133385。

[0083] 32. 如第1至31项中任一项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为19-30个核苷酸对。

[0084] 33. 如第32项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为19-25个核苷酸对。

[0085] 34. 如第32项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为23-27个核苷酸对。

[0086] 35. 如第32项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为19-23个核苷酸对。

[0087] 36. 如第32项所述的dsRNA剂,其中该双链区的长度为21-23个核苷酸对。

[0088] 37. 如第1至36项中任一项所述的dsRNA剂,其中各链的长度独立地为19-30个核苷酸。

[0089] 38. 如第21项所述的dsRNA剂,其中该配体为通过单价、二价或三价分支接头附接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0090] 39. 如第1至38项中任一项所述的dsRNA剂,其中该dsRNA剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接。

[0091] 40. 如第39项所述的dsRNA剂,其中该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接在一条链的3'-末端。

- [0092] 41. 如第40项所述的dsRNA剂,其中该链为反义链。
- [0093] 42. 如第40项所述的dsRNA剂,其中该链为正义链。
- [0094] 43. 如第39项所述的dsRNA剂,其中该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接在一条链的5'-末端。
- [0095] 44. 如第43项所述的dsRNA剂,其中该链为反义链。
- [0096] 45. 如第43项所述的dsRNA剂,其中该链为正义链。
- [0097] 46. 如第39项所述的dsRNA剂,其中该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接在一条链的5'-末端和3'-末端。
- [0098] 47. 如第46项所述的dsRNA剂,其中该链为反义链。
- [0099] 48. 如第1至47项中任一项所述的dsRNA剂,其中该双链体反义链5'-端的1位的碱基对为AU碱基对。
- [0100] 49. 如第1至48项中任一项所述的dsRNA剂,其中该正义链具有总共21个核苷酸及该反义链具有总共23个核苷酸。
- [0101] 50. 一种细胞,其包含如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂。
- [0102] 51. 一种用于抑制编码AGT的基因的表达的药物组合物,其包含如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂。
- [0103] 52. 一种药物组合物,其包含如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂和脂质制剂。
- [0104] 53. 一种抑制细胞中AGT基因的表达的方法,该方法包括使所述细胞与如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂或如第51或52项所述的药物组合物接触,从而抑制所述细胞中AGT基因的表达。
- [0105] 54. 如第53项所述的方法,其中该细胞在受试者内。
- [0106] 55. 如第54项所述的方法,其中该受试者为人类。
- [0107] 56. 如第55项所述的方法,其中该受试者诊断为患有AGT相关障碍。
- [0108] 57. 如第56项所述的方法,其中该AGT相关障碍选自:高血压病、高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、孤立性收缩期或舒张期高血压、妊娠相关高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、低血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压、眼高血压、青光眼、肺动脉高血压、门静脉高血压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压;高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病变、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、心力衰竭、心肌梗塞、心绞痛、中风、肾疾病、肾衰竭、系统性硬化症、宫内发育迟缓(IUGR)、胎儿生长受限、肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD);葡萄糖耐受不良、2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征。
- [0109] 58. 如第56项所述的方法,其中该受试者的收缩压为至少130mmHg或舒张压为至少80mmHg。
- [0110] 59. 如第56项所述的方法,其中该受试者的收缩压为至少140mmHg及舒张压为至少80mmHg。
- [0111] 60. 如第56项所述的方法,该受试者是对盐敏感易感人群的部分、是超重的、是肥胖的或是妊娠的。

- [0112] 61. 如第53至60项中任一项所述的方法,其中使所述细胞与所述dsRNA剂接触抑制AGT的表达至少50%、60%、70%、80%、90%、95%。
- [0113] 62. 如第53至60项中任一项所述的方法,其中抑制AGT的表达使所述受试者的血清中的AGT蛋白质水平降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。
- [0114] 63. 一种治疗受试者的AGT相关障碍的方法,其包括对所述受试者施用如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂或如第51或52项所述的药物组合物,从而治疗所述受试者的AGT相关障碍。
- [0115] 64. 如第63项所述的方法,其中所述受试者的收缩压为至少130mmHg或舒张压为至少80mmHg。
- [0116] 65. 如第63项所述的方法,其中所述受试者的收缩压为至少140mmHg及舒张压为至少80mmHg。
- [0117] 66. 如第63项所述的方法,其中所述受试者为人类。
- [0118] 67. 如第63项所述的方法,所述受试者是对盐敏感易感人群的部分、是超重的、是肥胖的或是妊娠的。
- [0119] 68. 如第56至67项中任一项所述的方法,其中该dsRNA剂以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量施用于所述受试者。
- [0120] 69. 如第56至67项中任一项所述的方法,其中该dsRNA剂皮下施用于所述受试者。
- [0121] 70. 如第56至69项中任一项所述的方法,其进一步包括测定来自所述受试者的样品中的AGT水平。
- [0122] 71. 如第70项所述的方法,其中所述受试者样品中的AGT水平为血液样品、血清样品或尿液样品中的AGT蛋白质水平。
- [0123] 72. 如第56至71项中任一项所述的方法,其进一步包括对所述受试者施用用于治疗高血压的另外的治疗剂。
- [0124] 73. 如第72项所述的方法,其中该另外的治疗剂选自:利尿剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、 β -阻滞剂、血管扩张剂、钙通道阻滞剂、醛固酮拮抗剂、 α_2 -激动剂、肾素抑制剂、 α -阻滞剂、外周作用肾上腺素能剂、选择性D1受体部分激动剂、非选择性 α -肾上腺素能拮抗剂、合成的甾体抗盐皮质激素剂、血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂(ARNi)、Entresto®、沙库比曲/缬沙坦;或内皮素受体拮抗剂(ERA)、西他生坦、安贝生坦、阿曲生坦、BQ-123、齐泊腾坦、波生坦、马昔腾坦和替唑生坦;上述任何治疗剂的组合;及配制成药剂组合的高血压治疗剂。
- [0125] 74. 如第72项所述的方法,其中该另外的治疗剂包括血管紧张素II受体拮抗剂。
- [0126] 75. 如第74项所述的方法,其中该血管紧张素II受体拮抗剂选自:氯沙坦、缬沙坦、奥美沙坦、依普沙坦和阿齐沙坦。
- [0127] 76. 一种如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂或如第51或52项所述的药物组合物用于治疗AGT相关障碍的用途。
- [0128] 77. 如第76项所述的用途,其用于如第54至75项中任一项所述的方法中。
- [0129] 78. 一种试剂盒,其包含如第1至49项中任一项所述的dsRNA剂或如第51或52项所述的药物组合物。

附图说明

[0130] 图1A为示出用单一3mg/kg剂量的指定siRNA处理的食蟹猴(n=3/组)中血清AGT蛋白水平的图。AGT水平显示为处理前AGT水平的百分比。

[0131] 图1B为示出第1天用单一0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg剂量的AD-85481或AD-67327处理的食蟹猴(n=3/组)的血清AGT蛋白水平的图。AGT水平显示为处理前AGT水平的百分比。

[0132] 图1C为示出每四周一次施用1mg/kg剂量的AD-85481或AD-67327共3个剂量的食蟹猴(n=3/组)的血清AGT蛋白水平的图。AGT水平显示为处理前AGT水平的百分比。

[0133] 图2A至2G示出在用媒介物、缬沙坦(31mg/kg/天)、大鼠特异性AGT-siRNA(10mg/kg q2w)、卡托普利(captopril)(100mg/kg/天)、缬沙坦和卡托普利或者缬沙坦和AGT-siRNA处理的自发性高血压大鼠(n=9/组)试验中各种不同参数的结果。

[0134] 图2A示出(四周时)试验在开始(实心条)及结束(斜纹条)时的血浆AGT水平。

[0135] 图2B示出与基线值比较的每天血压读数。

[0136] 图2C为示出心脏重量:胫骨长度比率的图。

[0137] 图2D为示出(四周时)试验在开始(实心条)及结束(斜纹条)时的血浆肾素活性水平的图。

[0138] 图2E为心脏重量:胫骨长度相对于平均动脉压(MAP)(以mmHg计)绘制的图。

[0139] 图2F为心肌细胞大小的图。

[0140] 图2G为N末端前b型利钠肽(NT-proBNP)水平的图。

[0141] 图3为示出自发性高血压大鼠研究中的尿AGT水平的图。

[0142] 图4A为示出自发性高血压大鼠研究中血液Ang I水平的图。

[0143] 图4B为示出自发性高血压大鼠研究中血液Ang II水平的图。

[0144] 图4C为示出自发性高血压大鼠研究中血液Ang II与血液Ang I的比率的图。

[0145] 图5A为示出自发性高血压大鼠研究中肾Ang I水平的图。

[0146] 图5B为示出自发性高血压大鼠研究中肾Ang II水平的图。

[0147] 图5C为示出自发性高血压大鼠研究中肾Ang II与肾Ang I的比率的图。

[0148] 图6A为示出自发性高血压大鼠研究中肾皮质和髓质的血管紧张素受体1a水平的图。

[0149] 图6B为示出自发性高血压大鼠研究中肾皮质和髓质的血管紧张素1b受体水平的图。

[0150] 图6C为示出自发性高血压大鼠研究中肾皮质和髓质的ACE水平的图。

[0151] 图7为示出自发性高血压大鼠研究中,在基线时和在处理开始后4周时的尿量的图。

[0152] 图8A为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂饲料饮食诱导肥胖(DIO)小鼠或正常饲料饲养小鼠(n=5/组)的平均体重的图。

[0153] 图8B为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂饲料饮食诱导肥胖(DIO)小鼠或正常饲料饲养小鼠的终末肝脏、脂肪和肌肉重量(n=5/组)的图。

[0154] 图9A为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪饲料饮食诱导肥胖(DIO)小鼠或正常饲料饲养小鼠(n=5/组)在第一处理剂量前第0周的血浆葡萄糖水平(mg/dL)变化的图。

[0155] 图9B为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪饲料饮食诱导肥胖(DIO)小鼠或正常饲料饲养小鼠(n=5/组)在实验第6周时的血浆葡萄糖水平(mg/dL)的图。

[0156] 图9C为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪饲料饮食诱导肥胖(DIO)小鼠或正常饲料饲养小鼠(n=5/组)在实验第12周时的血浆葡萄糖水平(mg/dL)的图。

[0157] 图10A为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠或者正常饲料饲养(LFD)小鼠的平均体重的图。

[0158] 图10B为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠,或者正常饲料饲养(LFD)小鼠的平均累积体重增加的图。

[0159] 图11A至11C为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠,或正常饲料饲养(LFD)小鼠的血清肝酶的图。

[0160] 图11A为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠,或正常饲料饲养(LFD)小鼠的丙氨酸转氨酶(ALT)水平的图。

[0161] 图11B为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠,或正常饲料饲养(LFD)小鼠的天冬氨酸转氨酶(AST)水平的图。

[0162] 图11C为示出用AGT dsRNA剂或PBS处理的高脂肪高果糖(HF HFr)饲养小鼠,或正常饲料饲养(LFD)小鼠谷氨酶脱氢酶(GLDH)水平的图。

具体实施方式

[0163] 本发明提供实现AGT基因RNA转录物的RNA诱导沉默复合物(RISC)介导的切割的iRNA组合物。该基因可以在细胞内,例如,受试者(如人类)体内的细胞。利用这些iRNA使得能够靶向降解哺乳动物中相应基因(AGT基因)的mRNA。

[0164] 本发明的iRNA设计用于靶向人类AGT基因,包括在其他哺乳动物物种的AGT直系同源物中保守的基因部分。不意图受理论的限制,据信上述性质与这些iRNA中的特定目标位点或特定修饰的组合或子组合对本发明的iRNA赋予改善的效力、稳定性、效能、持久性和安全性。

[0165] 因此,本发明提供使用实现AGT基因RNA转录物的RNA诱导沉默复合物(RISC)介导切割的iRNA组合物治疗和预防AGT相关障碍(例如,高血压)的方法。

[0166] 本发明的iRNA包括具有长度最多约30个或更少的核苷酸的区域(RNA链(反义链)),例如,19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸长度,该区域与AGT基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。

[0167] 在某些实施方式中,本发明的双链RNAi剂中一条链或两条链长度至多66个核苷酸,例如,长度36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸,其具有与AGT基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补的至少19个连续核苷酸的区域。在一些实施方式中,具有较长长度反义链的这类iRNA剂优选可包括20-60个核苷酸长度的第二RNA链(正义链),其中该正义与反义链形成18-30个连续核苷酸的双链体。

[0168] 使用本发明的iRNA能够实现哺乳动物中相应基因(AGT基因)的mRNA的靶向降解。采用体外与体内分析,本发明人已证明靶向AGT基因的iRNA可以介导RNAi,导致显著抑制

AGT表达。在这种受试者中抑制AGT表达将预防或治疗AGT相关障碍(例如,高血压)的发展。因此,包括这些iRNA的方法和组合物可用于预防及治疗易患或已诊断患AGT相关障碍(例如,高血压)的受试者。本文的方法和组合物可用于降低受试者中的AGT水平。

[0169] 下列详细说明公开了如何制备和使用包含iRNA的组合物来抑制AGT基因的表达,以及用于治疗因AGT基因表达降低而受益的受试者的组合物、用途和方法,例如,易患或已诊断患AGT相关障碍(例如,高血压)的受试者。

[0170] I. 定义

[0171] 为了更容易了解本发明,首先定义某些术语。此外应注意,不论何时示出的参数值或值范围,其均指所述值中间的值和范围也是本发明一部分。

[0172] 本文所采用冠词“一种”和“一个”指该冠词的语法主体的一个(种)或超过一个(种)(即至少一个(种))。例如,“一个元素”指一个元素或超过一个元素,例如,复数个元素。

[0173] 本文所采用术语“包括”意指短语“包括但不限于”,并可与其交换使用。

[0174] 本文所采用术语“或”意指“和/或”,并可与其交换使用,除非文中另有说明。例如,“正义链或反义链”应理解为“正义链或反义链,或者正义链和反义链”。

[0175] 本文所采用术语“约”意指在本领域的典型容差范围内。例如,“约”可理解为平均值的约2个标准偏差。在某些实施方式中,“约”意指 $\pm 10\%$ 。在某些实施方式中,“约”意指 $\pm 5\%$ 。当“约”出现在一系列数字或范围之前时,应理解,“约”可修饰该系列或范围内的每一个数字。

[0176] 应理解,数字或一系列数字之前的术语“至少”包括与该术语“至少”相邻的数字,及逻辑上包括在内的所有后续数字或整数,如从上下文中明确的。例如,核酸分子中的核苷酸数目必需为整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子中的至少19个核苷酸”意指19、20或21个核苷酸具有所指示的性质。当“至少”出现在一系列数字或范围之前时,应理解“至少”可修饰该系列或范围中每一个数字。

[0177] 应理解本文中采用的“不超过”或“低于”指与该短语相邻且逻辑上较低的值或整数,如从上下文逻辑而言,至零。例如,具有“不超过2个核苷酸”的突出端的双链体具有2、1或0个核苷酸的突出端。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,应理解,“不超过”可修饰该系列或范围内每个数字。本文所采用范围同时包括上限与下限。

[0178] 若序列与其在转录物或其他序列上的指定位点之间有矛盾时,以本说明书中指示的核苷酸序列为准。

[0179] 本文所用“血管紧张素原”可以与术语“AGT”交换使用,指公知的基因及多肽,本领域中也称为Serpina1A8;血管紧张素原;抗胰蛋白酶;SERPINA8;血管紧张素I;Serpina1A8;血管紧张素II; α -1抗蛋白酶血管紧张素原;抗胰蛋白酶;前血管紧张素原2;ANHU;丝氨酸蛋白酶抑制剂;及半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

[0180] 术语“AGT”包括人类AGT,其氨基酸和完整编码序列可见于例如,GenBank登录号GI:188595658(NM_000029.3;SEQ ID NO:1);食蟹猴AGT,其氨基酸与完整编码序列可见于例如,GenBank登录号GI:90075391(AB170313.1;SEQ ID NO:3);小鼠(Mus musculus)AGT,其氨基酸与完整编码序列可见于例如,GenBank登录号GI:113461997(NM_007428.3;SEQ ID NO:5);及大鼠AGT(Rattus norvegicus)AGT,其氨基酸与完整编码序列可见于例如,GenBank登录号GI:51036672(NM_134432;SEQ ID NO:7)。

[0181] AGT mRNA序列的其他实例容易利用已公开的数据库取得,例如,GenBank、UniProt、OMIM和猕猴(Macaca)基因组计划网站。

[0182] 本文所用术语“AGT”亦指AGT基因的天然存在的DNA序列变异,如AGT基因中的单核苷酸多态性(SNP)。示例性SNP可在www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp-ref.cgi?geneId=183得到的dbSNP数据库中发现。AGT基因内序列变异的非限制性实例包括例如,于美国专利号5,589,584中描述的那些,其完整内容以引用的方式并入本文中。例如,AGT基因内的序列变异可包括位置-532(相对于转录起始位点)的C→T;位置-386的G→A;位置-218的G→A;位置-18的C→T;位置-6和-10的G→A和A→C;位置+10(非翻译)的C→T;位置+521(T174M)的C→T;位置+597(P199P)的T→C;位置+704(M235T)的T→C;(也参见例如,Reference SNP(refSNP)Cluster Report:rs699,来自www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP);位置+743(Y248C)的A→G;位置+813(N271N)的C→T;位置+1017(L339L)的G→A;位置+1075(L359M)的C→A;和/或位置+1162(V388M)的G→A。

[0183] 本文所用“靶序列”指在AGT基因转录期间所形成mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括作为主要转录产物的RNA加工产物的mRNA。序列的靶部分应至少足够长以作为在AGT基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的该部分位置处或附近iRNA指导的切割的底物。在一个实施方式中,该靶序列在AGT的蛋白质编码区内。

[0184] 靶序列可为约19-36个核苷酸的长度,例如,优选约19-30个核苷酸的长度。例如,靶序列可为约19-30个核苷酸、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸的长度。上述范围和长度中间的范围和长度也包括为本发明的部分。

[0185] 本文所采用术语“包含序列的链”指包含通过采用标准核苷酸命名法所指的序列描述的核苷酸链的寡核苷酸。

[0186] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常代表核苷酸链中包含作为碱基的鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。然而,应理解,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指修饰的核苷酸,如下文中进一步说明的,或代理的替代部分(参见例如,表2)。本领域技术人员很清楚,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可在不实质上改变该包含带有这类替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对性质的情况下用其他部分替代。例如但不限于,包含肌苷作为其碱基的核苷酸可与包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此,在本发明所述的dsRNA的核苷酸序列中包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可被包含例如,肌苷的核苷酸替代。在另一个实施方式中,寡核苷酸中的任何位置的腺嘌呤与胞嘧啶可分别被鸟嘌呤与尿嘧啶替代以与靶mRNA形成G-U摇摆碱基配对。包含这类替代部分的序列适合如本发明所述的组合物和方法。

[0187] 本文所采用术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”、“RNA干扰剂”可交换使用,其意指包含如本文术语所定义的RNA的药剂,且其可通过RNA诱导沉默复合物(RISC)途径介导RNA转录物的靶向切割。iRNA经由称为RNA干扰(RNAi)的过程指导mRNA的序列特异性降解。iRNA调控(例如,抑制)AGT基因在细胞(例如,受试者如哺乳动物受试者中的细胞)中的表达。

[0188] 在一个实施方式中,本发明的RNAi剂包括与靶RNA序列(例如,AGT靶mRNA序列)相互作用以指导靶RNA的切割的单链RNA。在不希望受到理论限制下,据信引入细胞中的长双

链RNA通过被称为Dicer的III型内切核酸酶分解成siRNA(Sharp等人(2001)Genes Dev.15:485)。Dicer,一种核糖核酸酶-III样酶,将dsRNA加工成19-23个碱基对的短干扰RNA,其具有特征性的两碱基3'突出端(Bernstein等人(2001)Nature 409:363)。siRNA随后并入RNA诱导沉默复合物(RISC)中,其中一种或多种解螺旋酶解开siRNA双链体,使得互补反义链能够指导靶识别(Nykanen等人(2001)Cell 107:309)。当与适当靶mRNA结合时,RISC内的一种或多种内切核酸酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir等人(2001)Genes Dev.15:188)。因此在一个方面中,本发明涉及一种在细胞内产生的单链RNA(siRNA),其促进形成RISC复合物以实现靶基因(即AGT基因)沉默。因此,本文所用术语“siRNA”亦指上述iRNA。

[0189] 在某些实施方式中,RNAi剂可为引入细胞或生物体中来抑制靶mRNA的单链siRNA(ssRNAi)。单链RNAi剂结合RISC内切核酸酶Argonaute 2,其然后切割靶mRNA。单链siRNA一般为15至30个核苷酸且经化学修饰。单链siRNA的设计和测试说明于美国专利号8,101,348及Lima等人(2012)Cell 150:883-894中,其各自的完整内容以引用的方式并入本文中。本文所述的任何反义核苷酸序列均可用作本文所述的或通过Lima等人(2012)Cell 150:883-894中说明的方法进行化学修饰的单链siRNA。

[0190] 在某些实施方式中,本发明组合物、用途与方法所使用的“iRNA”是双链RNA,且本文中称为“双链RNAi剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”指核糖核酸分子的复合物,其具有包含两个反向平行且基本上互补的核酸链的双链体结构,称为具有相对于靶RNA(即AGT基因)的“正义”和“反义”取向。在本发明的一些实施方式中,双链RNA(dsRNA)通过转录后基因沉默机制(本文中称为RNA干扰或RNAi)触发靶RNA(例如,mRNA)的降解。

[0191] 通常,dsRNA分子的各链的大多数核苷酸为核糖核苷酸,但如本文详细说明书的,各链或两条链也可包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核苷酸或修饰的核苷酸。此外,本说明书所用“iRNA”可包括具有化学修饰的核糖核苷酸;iRNA可在多个核苷酸处包括实质修饰。本文所用术语“修饰的核苷酸”意指独立地具有修饰的糖部分、修饰的核苷酸间连接或修饰的核碱基,或其任何组合的核苷酸。因此,术语“修饰的核苷酸”涵盖对核苷酸间连接、糖部分或核碱基的例如官能团或原子的置换、添加或移除。适用于本发明药剂的修饰包括本文所公开或本领域已知的所有类型的修饰。针对本说明书与权利要求的目的,“iRNA”或“RNAi剂”包括任何这类修饰,如用于siRNA型分子中的。

[0192] 双链体区域可为容许所需的靶RNA通过RISC途径的特异性降解的任何长度,且可在约19至36碱基对的长度范围内,例如,约19-30碱基对的长度,例如,约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碱基对的长度,如约19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22碱基对的长度。上述范围与长度中间的范围与长度也包括为本发明的部分。

[0193] 形成双链体结构的两条链可为一个较大RNA分子的不同部分,或其可为分开的RNA分子。若这两条链为一个较大分子的部分,且因此在形成该双链体结构的一条链的3'-端与另一条链的5'-端之间通过未中断的核苷酸链连接的情况中,该连接RNA链称为“发夹环”。发夹环可包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施方式中,发夹环可包含至少2、3、4、5、

6、7、8、9、10、20、23个或更多个未配对的核苷酸。在一些实施方式中,发夹环可为10个或更少个核苷酸。在一些实施方式中,发夹环可为8个或更少个未配对的核苷酸。在一些实施方式中,发夹环可为4-10个未配对的核苷酸。在一些实施方式中,发夹环可为4-8个核苷酸。

[0194] 在dsRNA的两个基本上互补的链包含在分开的RNA分子的情况中,那些分子不必需但可以共价连接。在两条链通过在形成双链体结构的一条链的3'-端与另一条链的5'-端之间未中断的核苷酸链以外的方式共价连接的情况中,连接结构称为“接头”。RNA链可能具有相同或不同数量的核苷酸。碱基对的最高数量为dsRNA的最短链的核苷酸数减去双链体中任何突出端。除了双链体结构外,RNAi可包含一个或多个核苷酸突出端。

[0195] 在某些实施方式中,本发明的iRNA剂为各链包含19-23个核苷酸的dsRNA,其与靶RNA序列(例如,AGT基因)相互作用以指导靶RNA的切割。

[0196] 在一些实施方式中,本发明的iRNA为24-30个核苷酸的dsRNA,其与靶RNA序列(例如,AGT靶mRNA序列)相互作用以指导靶RNA的切割。

[0197] 本文所用术语“核苷酸突出端”指从双链iRNA的双链体结构突出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA一条链的3'-端延伸超出另一条链5'-端,或反之亦然时,具有核苷酸突出端。dsRNA可包含含有至少一个核苷酸的突出端;或者,该突出端可包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个或更多个核苷酸。核苷酸突出端可包含核苷酸/核苷类似物或其组成,包括脱氧核苷酸/核苷。突出端可位于正义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可存在于sRNA的反义或正义链的5'-端、3'-端或两端。

[0198] 在某些实施方式中,dsRNA的反义链在3'-端或5'-端具有1至10个核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸)的突出端。在某些实施方式中,正义链或反义链或二者的突出端可包括超出10个核苷酸的延长的长度,例如,1-30个核苷酸、2-30个核苷酸、10-30个核苷酸、10-25个核苷酸、10-20个核苷酸或10-15个核苷酸的长度。在某些实施方式中,延长的突出端在双链体的正义链上。在某些实施方式中,延长的突出端存在于双链体正义链的3'端上。在某些实施方式中,延长的突出端存在于双链体正义链的5'端上。在某些实施方式中,延长的突出端存在于双链体的反义链上。在某些实施方式中,延长的突出端存在于双链体反义链的3'端上。在某些实施方式中,延长的突出端存在于双链体反义链的5'端上。在某些实施方式中,延长的突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替代。在某些实施方式中,突出端包括自身互补部分,使得该突出端能够形成在生理条件下稳定的发夹结构。

[0199] “钝”或“平端”意指在双链RNA剂的该端没有未配对核苷酸,即没有核苷酸突出端。“平端的”双链RNA剂在整个长度上为双链的,即该分子的任一端没有核苷酸突出端。本发明RNAi剂包括在一端不具有核苷酸突出端的RNAi剂(即具有一个突出端和一个平端的剂)或任一端均没有核苷酸突出端的RNAi剂。最常见的是这种分子在其整个长度上为双链的。

[0200] 术语“反义链”或“指导链”指iRNA(例如,dsRNA)的包括与靶序列(例如,AGT mRNA)基本上互补的区域的链。本文所使用的术语“互补区”指反义链上与本文中定义的序列(例如,靶序列,例如,如本文定义的AGT核苷酸序列)基本上互补的区域。在互补区不与靶序列完全互补时,错配可能在分子的内部或末端区域。通常,最耐受的错配是在末端区域,例如,iRNA的5'-或3'-端的5、4或3个核苷酸内。在一些实施方式中,本发明的双链RNA剂包括反义链中的核苷酸错配。在一些实施方式中,本发明的双链RNA剂包括正义链中的核苷酸错配。在一些实施方式中,核苷酸错配是例如iRNA 3'-端的5、4、3个核苷酸内。在另一个实施方式

中,核苷酸错配是在例如iRNA的3'-末端核苷酸中。

[0201] 本文所用术语“正义链”或“过客链”指iRNA的包括与如本文术语所定义的反义链区域基本上互补的区域的链。

[0202] 本文所用“基本上所有核苷酸被修饰”是大部分,但并非全部进行修饰,且可包括不超过5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0203] 本文所用术语“切割区”指位置紧邻切割位点的区域。切割位点是在发生切割的靶标上的位点。在一些实施方式中,切割区在切割位点的任一端且紧邻切割位点包含三个碱基。在一些实施方式中,切割区在切割位点的任一端且紧邻切割位点包含两个碱基。在一些实施方式中,切割位点具体地存在于被反义链的核苷酸10和11结合的位点,且切割区包含核苷酸11、12和13。

[0204] 如本文所用,且除非另有说明,术语“互补”在用于描述第一核苷酸序列与第二核苷酸序列的关系时,如所属技术者所理解的,指包含该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并形成双链体结构的能力。这类条件可为例如,严格性条件,其中严格性条件包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA,50℃或70℃下12-16小时,然后洗涤(参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。可采用其他条件,如生物体内部可能遇到的生理相关条件。本领域技术人员可依据杂交核苷酸的最终用途确定一组最适合测试两个序列的互补性的条件。

[0205] iRNA(例如,本文所述的dsRNA)内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两个核苷酸序列的整个长度上的碱基配对。这类序列在本文中可称为彼此“完全互补”。然而,在本文中第一序列相对于第二序列称为“基本上互补”时,则这两个序列可以完全互补,或对于多达30个碱基对的双链体,其可在杂交时形成一个或多个,但通常不超过5、4、3或2个错配碱基对,而仍保留在与其最终用途(例如,经由RISC途径抑制基因表达)最相关的条件下杂交的能力。然而,在两个寡核苷酸设计用于在杂交时形成一个或多个单链突出端时,这类突出端不应在确定互补性时视为错配。例如,包含一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸与另一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA,其中较长寡核苷酸包含与较短寡核苷酸完全互补的21个核苷酸序列,对于本发明所述目的,仍可称为“完全互补”。

[0206] 本文所用“互补”序列也可包括非沃森-克里克(Watson-Crick)碱基对或由非天然与修饰的核苷酸形成的碱基对,或完全由其组成,只要符合上述关于其杂交能力的要求即可。这类非沃森-克里克碱基对包括(但不限于):G:U摇摆或Hoogsteen碱基配对。

[0207] 本文中术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可用于dsRNA的正义链与反义链之间或双链RNA剂的反义链与靶序列之间碱基区配,如可由其使用的上下文理解的。

[0208] 本文所用与信使RNA(mRNA)的“至少一部分基本上互补”的多核苷酸指与目的mRNA(例如,编码AGT基因的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,若该序列与编码AGT基因的mRNA的非中断部分基本上互补时,则该多核苷酸与AGT mRNA的至少一部分互补。

[0209] 因此,在一些实施方式中,本文所公开正义链多核苷酸及反义链多核苷酸与靶AGT序列完全互补。其他实施方式中,本文所公开正义链多核苷酸或反义链多核苷酸与靶AGT序列基本上互补,且包含与SEQ ID NO:1和2任一的核苷酸序列等同区域的整个长度或SEQ ID

N0:1和2任一的片段至少约80%互补,如至少90%、或95%互补;或100%互补的连续核苷酸序列。

[0210] 因此,在一些实施方式中,本文所公开的反义链多核苷酸与靶AGT序列完全互补。其他实施方式中,本文所公开的反义链多核苷酸与靶AGT序列基本上互补,且包含与SEQ ID N0:1的核苷酸序列的等同区域在整个长度上或与SEQ ID N0:1的片段至少约90%互补的连续核苷酸序列,如至少约90%、或约95%互补。在某些实施方式中,SEQ ID N0:1的片段选自SEQ ID N0:1的核苷酸632-658、635-658、636-658、1248-1273、1248-1270、1250-1272、1251-1273、1580-1602、1584-1606、1587-1609、1601-1623、1881-1903、2074-2097、2074-2096、2075-2097、2080-2102、2272-2294、2276-2298、2281-2304、2281-2303或2282-2304。在优选的实施方式中,该双链体不是由uscsucccAfc CfUfUfuucuucuaauL96 (SEQ ID N0:13)组成的正义链和由asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu (SEQ ID N0:14)组成的反义链所组成。

[0211] 在一些实施方式中,本发明的iRNA剂包括与靶AGT序列基本上互补的反义链,且包含与表3、表5或表6中任一正义链的核苷酸序列的等同区域在整个长度上或与表3、表5或表6中任一正义链的片段至少约90%互补的连续核苷酸序列,如约90%、95%或100%互补。

[0212] 在一些实施方式中,本发明的iRNA包括与反义多核苷酸基本上互补的正义链,该反义多核苷酸再与靶AGT序列互补,且其中该正义链多核苷酸包含与表3、表5或表6中任一反义链的核苷酸序列的等同区域在整个长度上或与表3或表5中任一反义链的片段至少约90%互补的连续核苷酸序列,如约90%、95%或100%。

[0213] 在某些实施方式中,表3或表5中的正义与反义链选自双链体AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637和AD-85655。

[0214] 通常,“iRNA”包括具有化学修饰的核糖核苷酸。这类修饰可以包括本文公开或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书及权利要求的目的,如dsRNA分子所采用的任何这类修饰均包括在“iRNA”内。

[0215] 本发明的一个方面中,本发明的方法和组合物所采用的药剂为经由反义抑制机制来抑制靶mRNA的单链反义寡核苷酸分子。单链反义寡核苷酸分子与靶mRNA内的序列互补。单链反义寡核苷酸可通过与mRNA碱基配对和物理阻碍翻译机构以化学计量方式抑制翻译,参见Dias,N.等人(2002)Mol Cancer Ther 1:347-355。单链反义寡核苷酸分子的长度可为约14至约30个核苷酸,且具有与靶序列互补的序列。例如,单链反义寡核苷酸分子可包含来自本文所述任一种反义序列的至少约14、15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的序列。

[0216] 本文所用短语“将细胞与iRNA (如dsRNA) 接触”包括通过任何可能的方式接触细胞。细胞与iRNA的接触包括使细胞于体外与iRNA接触或使细胞于体内与iRNA接触。该接触可直接或间接进行。因此,例如,可由执行该方法的个体将iRNA与细胞进行物理性接触,或者,可将iRNA置于容许或导致其随后与细胞接触的情况中。

[0217] 体外接触细胞可例如,通过使细胞与iRNA一起孵育而进行。体内接触细胞可例如,

通过注射iRNA至该细胞所在的组织内或附近,或注射iRNA至另一区域,例如,血流或皮下空间,使得该药剂随后到达待接触的细胞所在处的组织而进行。例如,iRNA可包含或可与配体,例如,GalNAc缀合,其指导iRNA至目标位点,例如,肝脏。组合体外与体内接触方法也是可能的。例如,细胞也可于体外与iRNA接触,且随后移植到受试者中。

[0218] 在某些实施方式中,细胞与iRNA接触包括通过促进或实现摄取或吸收至细胞内而“引入”或“递送iRNA至细胞中”。iRNA的吸收或摄取可通过无辅助扩散或主动细胞过程,或通过辅剂或装置进行。iRNA引入至细胞中可以是体外或体内。例如,对于体内引入,iRNA可注射至组织位点或全身性施用。体外引入至细胞中包括本领域已知方法,如电穿孔和脂质转染法。其他方法说明于下文或是本领域已知的。

[0219] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”为包含包封药理活性分子(如核酸分子,例如,iRNA或iRNA从其转录的质粒)的脂质层的囊泡。LNP描述于例如,美国专利号6,858,225、6,815,432、8,158,601和8,058,069中,其完整内容以引用方式并入本文中。

[0220] 本文所用“受试者”为内源或异源地表达靶基因的动物,如哺乳动物,包括灵长类(如人类)、非人类灵长类(例如,猴子和黑猩猩)、非灵长类(如牛、猪、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠或小鼠)或鸟类。在一个实施方式中,该受试者为人类,如接受治疗或评估如本文所述受益于AGT表达降低的疾病或障碍的人类;处于患受益于AGT表达降低的疾病或障碍风险的人类;患受益于AGT表达降低的疾病或障碍的人类;或正接受治疗受益于AGT表达降低的疾病或障碍的人类。AGT相关障碍(例如,高血压)的诊断标准提供于下文中。在一些实施方式中,受试者为女性人类。其他实施方式中,受试者为男性人类。在某些实施方式中,受试者是对盐敏感易感的人群的部分,例如,黑人或老年人(≥ 65 岁)。在某些实施方式中,受试者为超重或肥胖的,例如,患中央型肥胖的受试者。在某些实施方式中,该受试者久坐不动。在某些实施方式中,该受试者是怀孕的。

[0221] 本文所采用术语“治疗”或“处理”指以下有利或所需的结果,如降低受试者的AGT相关障碍(例如,高血压)的至少一种征兆或症状。治疗也包括降低与不期望的AGT表达相关的一种或多种征兆或症状,例如,血管紧张素II 1型受体激活(AT₁R)(例如,高血压、慢性肾病、中风、心肌梗塞、心力衰竭、动脉瘤、外周动脉疾病、心脏病、增加的氧化压力,例如,增加的超氧化物形成、炎症、血管收缩、钠水潴留、钾镁流失、肾素抑制、肌细胞和平滑肌肥大、增加的胶原蛋白合成、血管刺激、心肌和肾纤维化、增加的肝脏收缩率和收缩力、心率改变,例如,增加心律不齐、血纤溶酶原活化剂抑制剂1(PAI1)刺激、交感神经系统激活和增加的内皮素分泌)、妊娠相关高血压的症状(例如,先兆子痫和子痫),包括但不限于宫内发育迟缓(IUGR)或胎儿生长受限、恶性高血压相关的症状、高醛固酮症相关的症状;减轻不需要的AT₁R激活程度;稳定(即不恶化)慢性AT₁R激活的状态;减缓或缓解不需要的AT₁R激活(例如,高血压、慢性肾病、中风、心肌梗塞、心力衰竭、动脉瘤、外周动脉疾病、心脏病、增加的氧化压力,例如,增加的超氧化物形成、炎症、血管收缩、钠水潴留、钾镁流失、肾素抑制、肌细胞和平滑肌肥大、增加的胶原蛋白合成、血管刺激、心肌和肾纤维化、增加的肝脏收缩率和收缩力、改变的心率,例如,增加的心律不齐、血纤溶酶原活化剂抑制剂1(PAI1)刺激、交感神经系统激活和增加的内皮素分泌),不论可检测或不可检测。AGT相关障碍也可包括肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝,例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、葡萄糖耐受不良、2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征。在某些实施方式中,高血压

包括与低的血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压。“治疗”也可意指比没有治疗的情况下的预期存活相比延长的存活。

[0222] 在受试者中AGT基因表达或AGT蛋白产生,或者疾病标志物或症状的水平的情况中使用的术语“较低”指这中水平统计学显著的降低。该降低可以是例如,至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或低于该检测方法在相关细胞或组织(例如,肝细胞、或其他受试者样品,例如,其所衍生的血液或血清、尿液)中的检测水平。

[0223] 本文所用“防止”或“预防”用于受益于AGT基因表达或AGT蛋白产生降低的疾病或障碍时,例如,在由于例如老化、遗传因素、激素改变、饮食和久坐不动的生活方式而易患AGT相关障碍的受试者中。在某些实施方式中,该疾病或障碍为例如,不期望的AT₁R激活的症状,如高血压、慢性肾病、中风、心肌梗塞、心力衰竭、动脉瘤、外周动脉疾病、心脏病、增加的氧化压力,例如,增加的超氧化物形成、炎症、血管收缩、钠水潴留、钾镁流失、肾素抑制、肌细胞和平滑肌肥大、增加的胶原蛋白合成、血管刺激、心肌和肾纤维化、增加的心脏收缩率和收缩力、心率改变,例如,增加的心律不齐、血纤溶酶原活化剂抑制剂1 (PAI1) 刺激、交感神经系统激活和增加的内皮素分泌。AGT相关障碍也可包括肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝,例如,非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 及非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、葡萄糖耐受不良、2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征。在某些实施方式中,高血压包括与低的血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压。发生例如高血压的可能性降低,例如,当具有一个或多个高血压的风险因子的个体未发生高血压或相对于具有相同风险因子但未接受本文所述治疗的群体以较低严重性发生高血压时。未发生AGT相关障碍(例如,高血压)或高血压发生延迟数月或数年均视为有效的预防。预防可能需要施用超过一剂的iRNA剂。

[0224] 本文所用术语“血管紧张素原相关疾病”或“AGT相关疾病”是指因肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活导致或与其相关的疾病或障碍,或其症状或进展响应于RAAS失活的疾病或障碍。术语“血管紧张素原相关疾病”包括因AGT表达降低而受益的疾病、障碍或病症。这类疾病通常与高的血压相关。血管紧张素原相关疾病的非限制实例包括高血压,例如,临界性高血压(也称为高血压前期)、原发性高血压(也称为本态性高血压或特发性高血压)、继发性高血压(也称为非本态性高血压)、孤立性收缩期或舒张期高血压、妊娠相关高血压(例如,先兆子痫、子痫和产后先兆子痫)、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压(也称为肾高血压)、戈德布拉特氏高血压、眼高压、青光眼、肺动脉高血压、门静脉高血压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压;高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病变(包括外周血管疾病)、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、睡眠呼吸暂停、心力衰竭(例如,左心室收缩功能障碍)、心肌梗塞、心绞痛、中风、肾疾病(例如,慢性肾脏病或糖尿病性肾病,任选地在妊娠的情况中)、肾衰竭(例如,慢性肾衰竭)和全身性硬化(例如,硬皮病肾危象)。在某些实施方式中,AGT相关疾病包括宫内发育迟缓(IUGR)或胎儿生长受限。在某些实施方式中,AGT相关障碍也包括肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝,例如,非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 及非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、葡萄糖耐受不良、2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征。在某些实施方式中,高血压包括与低的血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压。

[0225] 高血压的阈值及高血压的分期详细说明于下文中。

[0226] 在一个实施方式中,血管紧张素原相关疾病为原发性高血压。“原发性高血压”为环境或遗传原因的结果(例如,没有明显基础医学原因导致的)。

[0227] 在一个实施方式中,血管紧张素原相关疾病为继发性高血压。“继发性高血压”具有可识别的基础障碍,其可为多病因的,包括肾、血管和内分泌病因,例如,肾实质疾病(例如,多囊肾、肾小球或间质性疾病)、肾血管疾病(例如,肾动脉狭窄、纤维肌发育不良)、内分泌系统障碍(例如,肾上腺皮质激素或盐皮质激素过多、嗜铬细胞瘤、甲状腺功能亢进或甲状腺机能低下、生长激素过多、副甲状腺功能亢进)、主动脉缩窄或口服避孕药使用。

[0228] 在一个实施方式中,血管紧张素原相关疾病为妊娠相关高血压,例如,妊娠慢性高血压、妊娠期高血压、先兆子痫、子痫、慢性高血压叠加的先兆子痫、HELLP综合征和妊娠性高血压(也称为妊娠的短暂性高血压、在妊娠后半期鉴别的慢性高血压和妊娠诱发的高血压(PIH))。妊娠相关高血压的诊断标准提供于下文中。

[0229] 在一个实施方式中,血管紧张素原相关疾病为顽固性高血压。“顽固性高血压”为尽管已同时使用三种不同类别的抗高血压剂,其中一种为噻嗪类利尿剂,仍高于目标值(例如,高于130mmHg收缩压或高于90舒张压)的血压。使用四种或更多种药物控制血压的受试者亦视为患有顽固性高血压。

[0230] “治疗有效量”或“预防有效量”也包括RNAi剂在适用于任何治疗的合理的利益/风险比下产生一些所需效应时的量。本发明方法所采用iRNA可以足以产生适用于这类治疗的合理的利益/风险比的量施用。

[0231] 本文所用短语“药学上可接受的”指那些在合理的医学判断下适合与人类受试者和动物受试者的组织接触,而与合理的利益/风险比相应没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物或剂型。

[0232] 本文所用短语“药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如,润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或者硬脂酸)或溶剂包封材料,其参与从一个器官或身体部分携带或转运所述化合物至另一器官或身体部分。各载体必需在可与制剂中其他成份相容且对接受治疗的受试者无害的意义上为“可接受的”。这类载体是本领域已知的。药学上可接受的载体包括通过注射施用的载体。

[0233] 本文所用术语“样品”包括从受试者分离的类似流体、细胞或组织的集合,及受试者内存在的流体、细胞或组织。生物流体的实例包括血液、血清和浆膜液、血浆、脑脊液、眼流体、淋巴液、尿液、唾液等等。组织样品可包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如,样品可源自特定器官、器官部分或那些器官内的流体或细胞。在某些实施方式中,样品可源自肝脏(例如,全肝脏或肝脏的某些节段或肝脏中某些细胞类型,如例如,肝细胞)。在一些实施方式中,“源自受试者的样品”指从该受试者得到的尿液。“源自受试者的样品”可指来自该受试者的血液或由血液衍生的血清或血浆。

[0234] I. 本发明的iRNA

[0235] 本发明提供抑制AGT基因表达的iRNA。在优选的实施方式中,iRNA包括用于抑制在细胞中,如受试者(例如,哺乳动物,如易于发生AGT相关障碍例如高血压的人)的细胞中,AGT基因的表达式的双链核糖核酸(dsRNA)分子。该dsRNAi剂包括反义链,其具有与在AGT基因的表达中所形成mRNA的至少一部分互补的互补区。该互补区为约19-30个核苷酸长度(例

如,约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20或19个核苷酸长度)。当与表达AGT基因的细胞接触时,iRNA抑制AGT基因(例如,人类、灵长类、非灵长类或大鼠AGT基因)的表达至少约50%,如由例如,PCR或基于分支DNA(bDNA)的方法,或由基于蛋白质的方法,如免疫荧光分析法,使用例如,蛋白质印迹法或流式细胞分析技术测定的。在优选的实施方式中,表达的抑制通过实施例(尤指实施例2)中提供的qPCR方法,在本文提供的适当生物体细胞系中使用10nM浓度的siRNA测定。在优选的实施方式中,体内表达的抑制通过在表达人类基因的啮齿动物(例如,表达人类靶基因的小鼠或AAV感染小鼠)中敲减人类基因测定,例如,在RNA表达最低时施用单一剂量的3mg/kg时。肝中的RNA表达采用实施例2提供的PCR方法测定。

[0236] dsRNA包括两个RNA链,其可在dsRNA使用的条件下互补并杂交形成双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括与靶序列基本上互补且通常完全互补的互补区。靶序列可源自AGT基因表达期间形成mRNA的序列。另一条链(正义链)包括与反义链互补的区域,使得在合适条件下组合时,两条链可杂交并形成双链体结构。如本文所述及本领域中已知的,dsRNA的互补序列也可包含为单一核酸分子的自身互补区,与在分开的寡核苷酸上相反。

[0237] 通常,双链体结构的长度为19至30个碱基对。类似地,与靶序列的互补区的长度为19至30个核苷酸。

[0238] 在一些实施方式中,dsRNA为约19至约23个核苷酸长度,或约25至约30个核苷酸长度。通常,dsRNA的长度足以用作Dicer酶的底物。例如,本领域公知,长度大于约21-23个核苷酸的dsRNA可用作Dicer的底物。本领域技术人员也了解,被靶向切割的RNA的区域最常为较大RNA分子(通常mRNA分子)的部分。在相关时,mRNA靶的“一部分”为mRNA靶的连续核苷酸,其长度足以允许其为RNAi指导切割(即经由RISC途径的切割)的底物。

[0239] 本领域技术人员也应理解,双链体区为dsRNA的主要功能部分,例如,约19至约30碱基对的双链体区,例如,约19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22碱基对。因此在一个实施方式中,为了达到其供处理成为靶向所需RNA进行切割的功能性双链体(例如,15-30碱基对)的程度,具有超过30碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子的复合物为dsRNA。因此本领域技术人员应理解,在一个实施方式中,miRNA为dsRNA。在另一个实施方式中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施方式中,可用于靶向AGT基因表达的iRNA剂不在靶细胞中通过较大dsRNA的切割产生。

[0240] 本文所述dsRNA可进一步包括一个或多个单链核苷酸突出端,例如,1-4、2-4、1-3、2-3、1、2、3或4个核苷酸。具有至少一个核苷酸突出端的dsRNA具有比其平端的对应物优异的抑制性质。核苷酸突出端可包含核苷酸/核苷类似物或其组成,包括脱氧核苷酸/核苷。该突出端可在正义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可存在于dsRNA的反义或正义链的5'-端、3'-端或两端。

[0241] dsRNA可通过本领域已知标准方法合成。本发明的双链RNAi化合物可采用两步骤过程制备。首先,单独制备双链RNA分子的单个链。然后组分链退火。siRNA化合物的单个链可采用溶液相或固相有机合成或二者制备。有机合成提供的优点为容易制备包含非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸链。类似地,可以采用溶液相或固相有机合成或二者制备本发明的单链寡核苷酸。

[0242] 在一个方面中,本发明的dsRNA包括至少两个核苷酸序列:正义序列与反义序列。正义链选自表3、5和6所提供序列的组,及该正义链的对应反义链选自表3、5和6的序列的组。在此方面中,两个序列之一与该两个序列的另一个互补,其中一个序列与AGT基因表达中所产生mRNA的序列基本上互补。因此,在此方面中,dsRNA包括两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸描述为表5或6中的正义链所,及第二个寡核苷酸描述为表3、5或6中正义链的对应反义链。在某些实施方式中,dsRNA的基本上互补序列包含在分开的寡核苷酸上。其他实施方式中,dsRNA的基本上互补序列包含在单一寡核苷酸上。在某些实施方式中,来自表3或5的正义或反义链选自AD-85481、AD-84701、AD-84703、AD-84704、AD-84705、AD-84707、AD-84715、AD-84716、AD-84739、AD-84741、AD-84746、AD-85432、AD-85434、AD-85435、AD-85436、AD-85437、AD-85438、AD-85441、AD-85442、AD-85443、AD-85444、AD-85446、AD-85447、AD-85482、AD-85485、AD-85493、AD-85496、AD-85504、AD-85517、AD-85519、AD-85524、AD-85622、AD-85623、AD-85625、AD-85626、AD-85634、AD-85635、AD-85637和AD-85655。

[0243] 应理解,虽然表3中的序列未说明为修饰或缀合的序列,但本发明的iRNA(例如,本发明dsRNA)的RNA可包含表3所示的任何一个序列、或经修饰的表5或6的序列、或缀合的表5或6的序列。换言之,本发明涵盖如本文所述的未修饰的、未缀合的、修饰的或缀合的表3、5和6的dsRNA。

[0244] 本领域技术人员很清楚,具有约20至23碱基对,例如,21碱基对的双链体结构的dsRNA已经被推崇为特别有效地诱导RNA干扰(Elbashir等人,EMBO 2001,20:6877-6888)。然而,其他人已发现更短或更长的RNA双链体结构也有效(Chu和Rana (2007) RNA 14:1714-1719;Kim等人(2005) Nat Biotech 23:222-226)。上述实施例中,根据表3、5和6任一个中提供的寡核苷酸序列的性质,本文所述的dsRNA可包括至少一条长度至少21个核苷酸的链。可以合理地预期,由表3、5和6中一个序列在一端或两端减去几个核苷酸的较短双链体与止述dsRNA相比可以类似地有效。因此,具有源自表3、5和6中一个序列的至少19、20或更多个连续核苷酸的序列且在抑制AGT基因表达的能力方面与包含全序列的dsRNA的差异不超过约5、10、15、20、25或30%的抑制的dsRNA均包括在本发明范围内。

[0245] 此外,表3、5和6提供的RNA识别了在AGT转录物中易发生RISC介导的切割的位点。因此,本发明的进一步特征在于靶向这类位点之一内的iRNA。如果iRNA促进转录物在该特定位点内任何位置的切割,则如本文所用iRNA被称为靶向RNA转录物的该特定位点内。这种iRNA通常包括来自表3、5和6中提供的一个序列的至少约19个连续核苷酸,与来自邻接AGT基因中所选定序列的区域的额外核苷酸序列偶联。

[0246] II. 本发明的修饰iRNA

[0247] 在某些实施方式中,本发明的iRNA(例如,dsRNA)的RNA未修饰,且不包含例如,本领域已知及本文所述的化学修饰或缀合。在其他实施方式中,本发明的iRNA(例如,dsRNA)的RNA经化学修饰以加强稳定性或其他有利特性。在本发明的某些实施方式中,本发明的iRNA的基本上所有核苷酸经修饰。本发明的其他实施方式中,本发明的iRNA的所有核苷酸或基本上所有核苷酸被修饰,即iRNA的链存在不超过5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0248] 如本发明所述的核酸可采用本领域上公知的方法合成和/或修饰,如那些描述于“Current protocols in nucleic acid chemistry”,Beaucage,S.L.等人(编辑),John

Wiley&Sons, Inc., New York, NY, USA中的, 其以引用方式并入本文中。修饰包括例如, 末端修饰, 例如, 5'-端修饰 (磷酸化、缀合、反向连接) 或 3'-端修饰 (缀合、DNA 核苷酸、反向连接等); 碱基修饰, 例如, 使用稳定化碱基、失稳碱基或用与扩展的伴体库碱基配对的碱基替代、移除碱基 (无碱基核苷酸) 或缀合碱基; 糖修饰 (例如, 2'-位或 4'-位) 或糖的替代; 或主链修饰, 包括磷酸二酯连接的修饰或替换。适用于本文所述实施方式的 iRNA 化合物的具体实例包括 (但不限于): 包含修饰的主链或没有天然核苷间连接的 RNA。具有修饰的主链的 RNA 特别包括主链中没有磷原子的那些。对于本说明书的目的且如本领域中有时提及的, 核苷间主链中没有磷原子的修饰 RNA 也可视为寡核苷。在一些实施方式中, 修饰的 iRNA 在其核苷间主链中具有磷原子。

[0249] 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、磷酸的甲基酯和其他烷基酯 (包括磷酸 3'-亚烷基酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯 (包括 3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常 3'-5' 连接的硼代磷酸酯、这些的 2'-5' 连接的类似物和具有反向极性的那些 (其中相邻的核苷单元对 3'-5' 至 5'-3' 连接或 2'-5' 至 5'-2' 连接。也包括各种不同的盐、混合盐和游离酸形式。

[0250] 教导上述含磷连接的制备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; 及美国专利 RE39464, 其各自的完整内容以引用的方式并入本文中。

[0251] 其中不包括磷原子的修饰 RNA 主链具有由短链烷基或环烷基核苷间连接、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间连接、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接形成的主链。这类包括具有 N-吗啉基连接 (部分地从核苷的糖部分形成); 硅氧烷主链; 硫醚、亚砷和砷主链; 甲酰乙酰基 (formacetyl) 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; 含烯烃主链; 胺磺酸酯主链; 亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链; 磺酸酯和磺酰胺主链; 酰胺主链; 及其他具有混合 N、O、S 和 CH_2 组成部分的那些。

[0252] 教导上述寡核苷制备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; 及 5,677,439, 其完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0253] 包括用于本文所提供的 iRNA 的合适 RNA 模拟物, 其中核苷酸单元的糖与核苷之间连接 (即主链) 二者均被新基团替代。碱基单元维持与适当核酸靶化合物的杂交。其中 RNA 模拟物显示具有优异的杂交性质的一种这类寡聚化合物称为肽核酸 (PNA)。PNA 化合物中, RNA 的糖主链被包含酰胺的主链 (特别地氨基乙基甘氨酸主链) 替代。核碱基则保留并直接或间接结合主链的酰胺部分的氮杂氮原子。教导 PNA 化合物制备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;及5,719,262,其完整内容分别以引用的方式并入本文中。适用于本发明的iRNA的其他PNA化合物说明于例如,Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500中。

[0254] 本发明所述的一些实施方式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,且特别地上述美国专利号5,489,677的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [称为亚甲基(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由 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 表示],及上述美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施方式中,如本文所述的RNA具有上述美国专利号5,034,506的吗啉基主链结构。

[0255] 修饰的RNA也可包含一个或多个替代的糖部分。如本文所述的iRNA(例如,dsRNA)可包括在2'-位的下列其中一项: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,其中该烷基、烯基和炔基可为取代或未取代的 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基和炔基。示例性的合适修饰包括 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$,其中n与m为1至约10。其他实施方式中,dsRNA在2'-位包括下列其中一项: 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、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报导基团、嵌入剂、用于改善iRNA的药代动力学性质的基团或用于改善iRNA的药效学性质的基团和具有类似性质的其他取代基。在一些实施方式中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即烷氧-烷氧基。另一种示例性修饰为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(也称为2'-DMAOE,其说明于下文实施例)和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂。其他示例性修饰包括:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(这三个家族中的R与S两种异构体);2'-烷氧基烷基;及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0256] 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)。也可在iRNA的RNA的其他位置进行类似修饰,特别地在3'末端核苷酸上或2'-5'连接的dsRNA中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可具有糖模拟物(如环丁基部分)替代呋喃戊糖基糖。教导这类经修饰糖结构的制备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;及5,700,920,其中某些专利成为本申请共同拥有。上述专利的完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0257] iRNA也可包括核碱基(本领域中通常简称“碱基”)修饰或取代。本文所采用“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成的和天然核碱基,如脱氧-胸腺嘧啶(dT)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、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-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶

氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基及其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基(特别地5-溴)、5-三氟甲基及其他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-去氮杂鸟嘌呤与7-去氮杂腺嘌呤及3-去氮杂鸟嘌呤和3-去氮杂腺嘌呤。其他核碱基包括那些公开于美国专利号3,687,808、那些公开于Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. 编辑, Wiley-VCH, 2008; 那些公开于The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, p.858-859, Kroschwitz, J.L. 编辑 John Wiley & Sons, 1990; 这些公开于Englisch等人, Angewandte Chemie, 国际版, 1991, 30, 613中, 及那些公开于Sanghvi, Y. S., 第15章, dsRNA Research and Applications, p.289-302, Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编辑, CRC Press, 1993。这些核碱基中的某些特别适用于提高如本发明所述的寡聚化合物的结合亲和性。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示使核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编辑, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278) 且是示例性的碱基取代, 甚至更特别地当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0258] 教导上述某些修饰的核碱基及其他修饰的核碱基制备的代表性美国专利包括(但不限于)以上所述的美国专利号3,687,808; 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; 5,750,692; 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; 及7,495,088, 其完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0259] iRNA的RNA也可修饰以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸为具有修饰的核糖部分的核苷酸, 其中该核糖部分包含连接2'与4'碳的额外桥。此结构有效地“锁定”核糖在3'-内结构构形内。添加锁核酸至siRNA中已显示提高siRNA在血清中的稳定性, 并降低脱靶效应(Elmen, J. 等人(2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. 等人(2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. 等人(2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。

[0260] iRNA的RNA也可以被修饰来包括一个或多个双环糖部分。“双环糖”是通过两个原子的桥接修饰的呋喃基(furanosyl)环。“双环核苷”(“BNA”)是具有糖部分的核苷, 所述糖部分包含连接糖环的两个碳原子的桥, 由此形成双环系统。在特定实施方案中, 桥连接糖环的4'-碳和2'-碳。因此, 在一些实施方案中, 本发明的药剂可以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸, 其中核糖部分包含连接2'和4'碳的额外桥。换句话说, LNA是包含双环糖部分的核苷酸, 所述糖部分包含4'-CH₂-O-2'桥。这个结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。将锁核酸添加至siRNA已经显示出提高siRNA在血清中的稳定性, 并且降低脱靶效应(Elmen, J. 等, (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. 等, (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. 等, (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。用于本发明的多核苷酸中的双环核苷的实例包括但不限于在4'和2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在特定实施方案中, 本发明的

反义多核苷酸剂包含一个或多个双环核苷,其包含4'-2'桥。这样的4'-2'桥接的双环核苷的实例,包括但不限于4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'(也称为“约束乙基”或“cEt”)和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利No.7,399,845);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利No.8,278,283);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利No.8,278,425);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见,例如,美国专利公开No.2004/0171570);4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R是H、C1-C12烷基或保护基团(参见,例如,美国专利No.7,427,672);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见,例如,Chattopadhyaya等,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);和4'-CH₂-C(-CH₂)-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利No.8,278,426)。将上述每篇的完整内容按引用并入本文中。

[0261] 其他教导锁核酸核苷酸制备的代表性美国专利及美国专利公开包括(但不限于)下列:美国专利号6,268,490;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,034,133;7,084,125;7,399,845;7,427,672;7,569,686;7,741,457;8,022,193;8,030,467;8,278,425;8,278,426;8,278,283;US2008/0039618;及US 2009/0012281,其完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0262] 可以制备具有一个或多个立体化学糖构象上述任一双环核苷,包括,例如, α -L-核糖呋喃糖和 β -D-核糖呋喃糖(参见WO 99/14226)。

[0263] iRNA的RNA也可以修饰来包括一个或多个约束乙基核苷酸。如本文中使用的,“约束乙基核苷酸”或“cEt”是包含双环糖部分的锁核酸,所述糖部分包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥。在一个实施方案中,约束乙基核苷酸是S构象,在本文中称为“S-cEt”。

[0264] 本发明的iRNA还可以包括一个或多个“构象限制核苷酸”(“CRN”)。CRN是具有连接核糖的C2'和C4'碳或核糖的C3和-C5'碳的接头的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定成稳定的构象并且提高与mRNA的杂交亲和性。接头足够长以将氧置于对于稳定性和亲和性的最佳位置而导致较少核糖环折叠。

[0265] 教导上述特定CRN制备的代表性公开包括,但不限于,美国专利公开No.2013/0190383和PCT公开WO 2013/036868,将每篇的完整内容按引用并入本文中。

[0266] 在一些实施方式中,本发明的iRNA包含一个或多个单体,其为UNA(非锁核酸)核苷酸。UNA为非锁的无环核酸,其中移除糖的任一键,从而形成非锁的“糖”残基。在一个实施例中,UNA也包括移除C1'-C4'之间键的单体(即C1'与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一个实施例中,移除糖的C2'-C3'键(即C2'与C3'碳之间的共价碳-碳键)(参见Nuc.Acids Symp.Series,52,133-134(2008)和Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,以引用方式并入本文中)。

[0267] 教导UNA制备的代表性美国公开包括(但不限于)美国专利号8,314,227;及美国专利公开号2013/0096289;2013/0011922;及2011/0313020,其完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0268] RNA分子末端的可能稳定化修饰可以包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸)(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸)(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二碳酰基-尿苷-3'-磷酸、反向碱基dT(idT)和其他。这个修饰的公开可以在PCT公开No.WO 2011/005861中找到。

[0269] 本发明的iRNA的核苷酸的其他修饰包括5'磷酸或5'磷酸模拟物,例如,iRNA的反义链上的5'-末端磷酸或磷酸模拟物。合适的磷酸模拟物公开于例如美国专利公开No.2012/0157511中,将其完整内容按引用并入本文中。

[0270] A.包含本发明基序的修饰的iRNA

[0271] 本发明的某些方面中,本发明的双链RNA剂包括具有如例如,W02013/075035中公开的化学修饰的药剂,其完整内容分别以引用的方式并入本文中。W02013/075035提供在dsRNAi剂的正义链或反义链(特别地在切割位点处或附近)在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序。在一些实施方式中,dsRNAi剂的正义链与反义链可另外完全修饰。引入这些基序中断正义链或反义链的修饰模式(如果存在)。dsRNAi剂可任选地例如在正义链上与GalNAc衍生物配体缀合。

[0272] 更具体地,当双链RNA剂的正义链与反义链经过完全修饰而在dsRNAi剂的至少一条链的切割位点处或附近具有一个或多个在三个连续核苷酸上有三个相同修饰的基序时,观察到dsRNAi剂的基因沉默活性。

[0273] 因此,本发明提供能够体内抑制靶基因(即AGT基因)表达的双链RNA剂。该RNAi剂包含正义链及反义链。RNAi剂的各链可为例如,17-30个核苷酸长度、25-30个核苷酸长度、27-30个核苷酸长度、19-25个核苷酸长度、19-23个核苷酸长度、19-21个核苷酸长度、21-25个核苷酸长度或21-23个核苷酸长度。

[0274] 正义链及反义链通常形成双链体双链RNA("dsRNA"),本文中也称为"dsRNAi剂"。dsRNAi剂的双链体区域可为,例如,双链体区域可为27-30核苷酸对长度、19-25核苷酸对长度、19-23核苷酸对长度、19-21核苷酸对长度、21-25核苷酸对长度或21-23核苷酸对长度。在另一个实施例中,双链体区域选自19、20、21、22、23、24、25、26和27个核苷酸长度。

[0275] 在某些实施方式中,dsRNAi剂可在一条链或两条链的3'-端、5'-端或两端包含一个或多个突出端区域或封端基团。该突出端可独立地为1-6个核苷酸的长度,例如,2-6个核苷酸长度、1-5个核苷酸长度、2-5个核苷酸长度、1-4个核苷酸长度、2-4个核苷酸长度、1-3个核苷酸长度、2-3个核苷酸长度或1-2个核苷酸长度。在某些实施方式中,该突出端区域可包括如上述提供的延长突出端区域。该突出端可由一条链长于另一条链所造成,或由相同长度的两条链交错造成。该突出端可与靶mRNA形成错配或其可与所靶向的基因序列互补或可为另一个序列。第一与第二链也可以例如通过附加的碱基或通过其他非碱基接头接合以形成发夹。

[0276] 在某些实施方式中,dsRNAi剂的突出端区域的核苷酸可各自独立地是修饰或未修饰的核苷酸,包括,但不限于,2'-糖修饰的,如,2'-F、2'-O甲基、胸苷(T)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)及其任意组合。例如,TT可以是任一条链上任一端的悬端序列。悬端可以与靶mRNA形成错配或者其可以与靶向的基因序列互补或可以是另一个序列。

[0277] dsRNAi剂的正义链、反义链或两条链的5'-或3'-突出端可磷酸化。在一些实施方式中,突出端区域包含两个核苷酸,在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中这两个核苷酸可相同或不同。在一些实施方式中,突出端存在于正义链、反义链或两条链的3'-端。在一些实施方式中,此3'-突出端存在于反义链中。在一些实施方式中,此3'-突出端存在于正义链中。

[0278] dsRNAi剂可以只含有单一突出端,其可以增强RNAi的干扰活性,而不影响其整体稳定性。例如,单链突出端可以位于正义链的3'-端,或可选地,在反义链的3'-端。RNAi还可以具有平端,位于反义链的5'-端(或正义链的3'-端),反之亦然。通常,RNAi的反义链在3'-端具有核苷酸突出端,而5'-端是平端。尽管不希望受到理论的束缚,反义链的5'-端的不对称平端和反义链的3'-端突出端有利于引导链载入RISC过程中。

[0279] 在某些实施方式中,该dsRNAi剂是19个核苷酸长的双端平端体(bluntmer),其中正义链含有至少一个从5'端的位置7、8、9处三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个从5'端的位置11、12、13处三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0280] 其他实施方式中,该dsRNAi剂是20个核苷酸长的双端平端体,其中正义链含有至少一个从5'端的位置8、9、10处三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个从5'端的位置11、12、13处三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0281] 在其他实施方式中,该dsRNAi剂是21个核苷酸长的双端平端体,其中正义链含有至少一个从5'端的位置9、10、11处三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序。反义链含有至少一个从5'端的位置11、12、13处三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0282] 在某些实施方式中,该dsRNAi剂包含21个核苷酸的正义链和23个核苷酸的反义链,其中正义链含有至少一个从5'端的位置9、10、11处三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序;反义链含有至少一个从5'端的位置11、12、13处三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序,其中RNAi剂的一端是平端,而另一端包含2个核苷酸的突出端。优选,这2个核苷酸的突出端在反义链的3'-端。

[0283] 当2个核苷酸的突出端位于反义链的3'-端时,在末端三个核苷酸之间可以存在两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,而第三个核苷酸是挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。在一个实施方式中,RNAi剂另外在正义链的5'-端和反义链的5'端的末端三个核苷酸之间具有两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团。在某些实施方式中,dsRNAi剂的正义链和反义链中的每个核苷酸,包括是基序的部分的核苷酸,是修饰的核苷酸。在某些实施方式中,用2'-O-甲基或3'-氟独立修饰各个残基,例如,在交替基序中。任选地,dsRNAi剂进一步包含配体(优选GalNAc₃)。

[0284] 在某些实施方式中,该dsRNAi剂包含正义和反义链,其中正义链是25-30个核苷酸残基长,其中从5'末端核苷酸(位置1)开始,第一条链的位置1至23包含至少8个核糖核苷酸;反义链是36-66个核苷酸残基长,并且从3'末端核苷酸开始,在与正义链的位置1-23配对形成双链体的位置中包含至少8个核糖核苷酸;其中反义链的至少3'末端核苷酸与正义链未配对,并且多达6个连续的3'末端核苷酸与正义链未配对,由此形成1-6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包含10-30个连续核苷酸,其与正义链未配对,由此形成10-30个核苷酸的单链5'突出端;其中将正义链和反义链为了最大互补性比对时,至少正义链5'末端和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸是碱基配对的,由此在正义链和反义链之间形成基本上双链的区域;并且在将双链核酸引入哺乳动物细胞中时,反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补以降低靶基因表达;并且其中正义链含有至少一个在三个连续核苷酸上三个2'-F修饰的基序,其中至少一个基序出现在切割位点处或附近。反义链在切割位点处或附近含有至少一个在三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0285] 在某些实施方式中,该dsRNAi剂包含正义与反义链,其中dsRNAi剂包含长度为至少25个且至多29个核苷酸的第一链和长度为至多30个核苷酸的第二链,其具有至少一个自5'端起位置11、12、13处的三个连续核苷酸上三个2'-O-甲基修饰的基序;其中第一链3'端与第二链5'端形成平端,且第二链在其3'端比第一链长1至4个核苷酸,其中双链体区的长度为至少25个核苷酸,且第二链与靶mRNA沿着第二链长度的至少19个核苷酸充分互补以在该RNAi剂引入哺乳动物细胞中时降低靶基因表达,且其中dsRNAi剂的Dicer切割优先产生包含第二链3'端的siRNA,从而降低哺乳动物中的靶基因表达。任选地,该dsRNAi剂还包含配体。

[0286] 在某些实施方式中,dsRNAi剂的正义链包含至少一个在三个连续核苷酸具有三个相同修饰的基序,其中一个基序出现在正义链的切割位点处。

[0287] 在某些实施方式中,dsRNAi剂的反义链也可包含至少一个在三个连续核苷酸具有三个相同修饰的基序,其中一个基序出现在反义链的切割位点处或附近。

[0288] 对于具有19-23个核苷酸长的双链区的RNAi剂,反义链的切割位点通常大约在从5'-端的10、11和12位置。因此,三个相同修饰的基序可以出现在反义链的9、10、11位置;10、11、12位置;11、12、13位置;12、13、14位置;或13、14、15位置,计数从反义链的5'-端的第1个核苷酸开始,或计数从反义链的5'端在双链体区域内的第1个配对核苷酸开始。反义链中的切割位点也可以根据从5'-端起的dsRNAi剂双链体区域的长度而改变。

[0289] dsRNAi剂的正义链可以在链的切割位点处含有至少一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序;和反义链可以在链的切割位点处或附近具有至少一个三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序。当正义链和反义链形成dsRNA双链体时,正义链和反义链可以如此对齐以使得正义链上的三个核苷酸的一个基序和反义链上的三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠,即,正义链中基序的三个核苷酸中的至少一个与反义链中基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。或者,至少两个核苷酸可以重叠,或全部三个核苷酸可以重叠。

[0290] 在一些实施方式中,dsRNAi剂的正义链可以含有超过一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序。第一基序可以出现在链的切割位点处或附近和其他基序可以是翼修饰(wing modification)。本文中的术语“翼修饰”是指与相同链的切割位点处或附近的基序分开的链的另一个部分出现的基序。翼修饰可以邻接第一基序或隔开至少一个或多个核苷酸。在基序彼此直接邻接时,那么基序的化学性质彼此不同,并且在基序隔开一个或多个核苷酸时,那么化学性质可以相同或不同。可以存在两个或更多个翼修饰。例如,存在两个翼修饰时,每个翼修饰可以出现在相对于第一基序的一端,其在切割位点处或附近或者在前导基序的任一侧。

[0291] 如同正义链,dsRNAi剂的反义链可以含有超过一个在三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序,其中至少一个基序出现在链的切割位点处或附近。该反义链也可以含有与正义链上存在的翼修饰相似对齐的一个或多个翼修饰。

[0292] 在一些实施方式中,dsRNAi剂的正义链或反义链上的翼修饰通常不包括链的3'-端、5'-端或两端的前一个或两个末端核苷酸。

[0293] 其他实施方式中,dsRNAi剂的正义链或反义链上的翼修饰通常不包括链的3'-端、5'-端或两端处双链体区域内头一个或头两个配对的核苷酸。

[0294] 当dsRNAi剂的正义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时,翼修饰可以落在双链体区域的相同末端上,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0295] 当dsRNAi剂正义链和反义链各自含有至少两个翼修饰时,正义链和反义链因此可以如何对齐以使得各自来自一条链的两个修饰落在双链体区域的一端上,从而具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;各自来自一条链的两个修饰落在双链体区域的另一端上,从而具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;一条链上的两个修饰落在前导基序的每一侧,从而在双链体区域中具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0296] 在一些实施方式中,dsRNAi剂的正义链和反义链中的每个核苷酸,包括是基序部分的核苷酸,可以是修饰的。每个核苷酸可以用相同或不同修饰来进行修饰,其可以包括非连接磷酸氧的一个或两个或连接磷酸氧的一个或多个的一个或多个改变;核糖的组分的改变,例如,核糖上2' 羟基的改变;磷酸部分被“去磷酸”接头整体替代;天然产生的碱基的修饰或替代;和核糖-磷酸主链的替代或修饰。

[0297] 因为核酸是亚单元的聚合物,许多修饰出现在核酸内重复的位置,例如,碱基的修饰,或磷酸部分,或磷酸部分的非连接O。在一些情况中,修饰将出现在核酸的全部所述位置,但在许多情况中,它不会。例如,修饰可以只出现在3' -或5' 末端位置,可以只出现在末端区域,例如,末端核苷酸上的位置或在链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中。修饰可以出现在双链区、单链区或两者中。修饰可以只出现在RNA的双链区中或可以只出现在RNA的单链区中。例如,非连接O位置的硫逐磷酸酯修饰可以只出现在一个或两个末端,可以只出现在末端区域中,例如,末端核苷酸的位置或链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中,或可以出现在双链和单链区中,特别在末端。一个或多个5' 端可以是磷酸化的。

[0298] 有可能例如为增强稳定性,在突出端中包括特定碱基,或在单链突出端中,例如,在5' -或3' -突出端或两者中,包括修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,可能希望在突出端中包括嘌呤核苷酸。在一些实施方式中,3' -或5' -突出端中的全部或一些碱基可以是修饰的,例如,具有本文中所述的修饰。修饰可以包括,例如,在具有本领域已知的修饰的核糖的2' 位置的修饰,例如,使用脱氧核糖核苷酸、2' -脱氧-2' -氟(2' -F)或2' -O-甲基修饰的而非核碱基的核糖,以及磷酸基团中的修饰,例如,硫逐磷酸酯修饰。突出端不需要与靶序列是同源的。

[0299] 在一些实施方式中,用LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2-甲氧基乙基、2' -O-甲基、2' -O-烯丙基、2' -C-烯丙基、2' -脱氧、2' -羟基或2' -氟来独立地修饰正义链和反义链的每个残基。链可以含有超过一个修饰。在一个实施方式中,用2' -O-甲基或2' -氟独立地修饰正义链和反义链的每个残基。

[0300] 通常至少两个不同的修饰存在于正义链和反义链上。那两个修饰可以是2' -O-甲基或2' -氟修饰,或其他。

[0301] 在某些实施方式中, N_a 或 N_b 包含交替模式的修饰。如本文中使用的术语“交替基序”是指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰出现在一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每三个核苷酸一个,或相似的模式。例如,如果A、B和C各自表示一种类型的核苷酸修饰,交替基序可以是“ABABABABABAB...”、“AABBAABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0302] 交替基序中含有的修饰类型可以相同或不同。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸

上的一种类型的修饰,交替模式,即,每隔一个核苷酸上的修饰,可以相同,但正义链或反义链各自可以选自交替基序内的几种修饰可能性,如“ABABAB…”、“ACACAC…”、“BDBDBD…”或“CDCDCD…”等。

[0303] 在一些实施方式中,本发明dsRNAi剂包含正义链上的交替基序的修饰模式,相对于反义链上的交替基序的修饰模式是偏移的(shifted)。所述偏移可以使得正义链的核苷酸的修饰基团对应于反义链的核苷酸的不同修饰的基团,且反之亦然。例如,正义链在dsRNA双链体中与反义链配对时,正义链中的交替基序可以在双链体区域内从链的5'-3'自“ABABAB”开始并且反义链中的交替基序可以从链的5'-3'自“BABABA”开始。作为另一个实例,正义链中的交替序列可以在双链体区域内从链的5'-3'自“AABBAABB”开始并且反义链中的交替基序可以从双链区的5'-3'自“BBAABBAA”开始,使得正义链和反义链之间存在修饰模式的完全或部分偏移。

[0304] 在一些实施方式中,dsRNAi剂包含正义链上2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序的模式,最初具有相对于反义链上最初的2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序模式的偏移,即,正义链上的2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链上的2'-F修饰的核苷酸碱基配对,且反之亦然。正义链的1位可以从2'-F修饰开始,而反义链的1位可以从2'-O-甲基修饰开始。

[0305] 将三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个或多个基序引入正义链或反义链中断了正义链或反义链中存在的初始修饰模式。通过将三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个或多个基序引入正义或反义链上的这种正义或反义链修饰模式的中断可加强针对靶基因的基因沉默活性。

[0306] 在一些实施方式中,在将三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序引入任一条链时,紧接着基序的核苷酸的修饰是不同于基序修饰的修饰。例如,含有基序的序列部分是“…N_aYYYN_b…”,其中“Y”表示三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序的修饰,而“N_a”和“N_b”表示紧接着基序“YYY”的核苷酸的修饰,其不同于Y的修饰,并且其中N_a和N_b可以是相同或不同的修饰。或者,当存在翼修饰时,N_a或N_b可以存在或不存在。

[0307] iRNA可以进一步包含至少一个硫逐磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接基团。硫逐磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接基团修饰可以在任何链位置出现在正义链、反义链或两条链的任一核苷酸上。例如,核苷酸间连接基团修饰可以出现在正义链或反义链上的每一个核苷酸上;每个核苷酸间连接基团修饰可以以交替模式出现在正义链或反义链上;或正义链或反义链可以含有交替模式的两种核苷酸间连接基团修饰。正义链上的核苷酸间连接基团修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且正义链上的核苷酸间连接基团修饰的交替模式可以相对于反义链上核苷酸间连接基团修饰的交替模式具有偏移。在一个实施方式中,双链RNAi剂包含6-8个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团。在一些实施方式中,反义链包含5'端的两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团和3'端的两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团,而正义链包含5'-端或3'-端的至少两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团。

[0308] 在一些实施方式中,dsRNAi剂在突出端区中包含硫逐磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接基团合修饰。例如,突出端区可以含有两个在两个核苷酸之间具有硫逐磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接基团的核苷酸。还可以形成核苷酸间连接基团合修饰来连接突出端核苷酸与双链区内末端配对的核苷酸。例如,至少2、3、4或全部突出端核苷酸可以通过硫逐

磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接基团来连接,并且任选,存在连接突出端核苷酸与突出端核苷酸挨着的配对核苷酸的其他硫逐磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间连接基团。例如,在末端三个核苷酸之间存在至少两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。这些末端三个核苷酸可以在反义链的3'-端、正义链的3'-端、反义链的5'-端或反义链的5'端。

[0309] 在一些实施方式中,该具有2个核苷酸的突出端是在反义链的3'-端,并且在末端三个核苷酸之间存在两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。任选地,dsRNAi剂可以在正义链的5'-端和反义链的5'-端的末端三个核苷酸之间另外具有两个硫逐磷酸酯核苷酸间连接基团。

[0310] 在一个实施方式中,dsRNAi剂包含与靶标的错配,在双链体内的错配,或其组合。错配可以出现在突出端区或双链体区域中。可以基于其促进解离或熔化的倾向,将碱基对分级(例如,基于特定配对的缔合或解离的自由能,最简单的方法是基于单个对检查该对,尽管也可以使用次近邻或相似分析)。就促进解离而言,A:U优于G:C;G:U优于G:C;和I:C优于G:C(I=肌苷)。错配例如非标准的或标准配对以外的(如本文中别处所述的)优于规范的(A:T、A:U、G:C)配对;并且包括通用碱基的配对优于标准的配对。

[0311] 在某些实施方式中,dsRNAi剂包含独立地选自:A:U、G:U、I:C和错配的对(例如,非标准或标准以外的配对或包括通用碱基的配对)的从反义链的5'-端的双链体区域内前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个,以促进反义链在双链体的5'-端解离。

[0312] 在某些实施方式中,从反义链的5'-端的双链体区域内1位的核苷酸选自A、dA、dU、U和dT。或者,从反义链的5'-端的双链体区域内的头1、2或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从反义链的5'-端的双链体区域内的头一个碱基对是AU碱基对。

[0313] 在其他实施方式中,正义链3'-端的核苷酸为脱氧-胸腺嘧啶(dT)或反义链3'-端的核苷酸为脱氧-胸腺嘧啶(dT)。例如,有一个短的脱氧-胸腺嘧啶核苷酸序列,例如,在正义链、反义链或两条链的3'-端上的两个dT核苷酸。

[0314] 在某些实施方式中,正义链序列可以由式(I)来表示:

[0315] $5' n_p - N_a - (X \ X \ X)_i - N_b - Y \ Y \ Y - N_b - (Z \ Z \ Z)_j - N_a - n_q \ 3' \text{ (I)}$

[0316] 其中:

[0317] i和j各自独立地为0或1;

[0318] p和q各自独立地为0-6;

[0319] 每个 N_a 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0320] 每个 N_b 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸;

[0321] 每个 n_p 和 n_q 独立地表示突出端核苷酸;

[0322] 其中 N_b 和Y不具有相同修饰;和

[0323] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。优选地,YYY全部是2'-F修饰的核苷酸。

[0324] 在一些实施方式中, N_a 或 N_b 包含交替模式的修饰。

[0325] 在一些实施方式中,YYY基序出现在正义链的切割位点处或附近。例如,当dsRNAi

剂具有17-23个核苷酸长度的双链体区时,该YYY基序可出现在正义链的切割位点处或附近(例如,可出现在位置6、7、8;7、8、9;8、9、10;9、10、11;10、11、12;或11、12、13处),其从5'-端的第一个核苷酸开始计数;或任选地从5'-端双链体区内的第一个配对核苷酸开始计数。

[0326] 在一个实施方式中,i是1和j是0,或i是0和j是1,或i和j都是1。正义链因此可以通过以下式来表示:

[0327] $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Ib);

[0328] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ic);或

[0329] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Id)。

[0330] 在正义链由式(Ib)表示时, N_b 表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地可以表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0331] 在正义链由式(Ic)表示时, N_b 表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 可以独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0332] 在正义链由式(Id)表示时,每个 N_b 独立地表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 是0、1、2、3、4、5或6。每个 N_a 可以独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。X、Y和Z中的每个可以彼此相同或不同。

[0333] 在其他实施方式中,i是0和j是0,并且正义链可以由下式来表示:

[0334] $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ia)。

[0335] 在正义链由式(Ia)表示时,每个 N_a 可以独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0336] 在一个实施方式中,RNAi的反义链序列可以由式(II)来表示:

[0337] $5' n_q - N_a' - (Z' Z' Z')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (X' X' X')_l - N_a' - n_p' 3'$ (II)

[0338] 其中:

[0339] k和l各自独立地为0或1;

[0340] p' 和 q' 各自独立地为0-6;

[0341] 每个 N_a' 独立地表示包含0-25个修饰核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0342] 每个 N_b' 独立地表示包含0-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列;

[0343] 每个 n_p' 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸;

[0344] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同修饰;和

[0345] $X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ 和 $Z' Z' Z'$ 各自独立地表示三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0346] 在一些实施方式中, N_a' 或 N_b' 包含交替模式的修饰。

[0347] $Y' Y' Y'$ 基序出现在反义链的切割位点处或附近。例如,当dsRNAi剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区时,该 $Y' Y' Y'$ 基序可出现在反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15处,其从5'-端的第一个核苷酸开始计数;或任选地从5'-端双链体区内的第一个配对核苷酸开始计数。优选 $Y' Y' Y'$ 基序出现在位置11、12、13处。

[0348] 在某些实施方式中, $Y' Y' Y'$ 基序均为2'-OMe修饰的核苷酸。

[0349] 在某些实施方式中, k 为 1 且 l 为 0, 或 k 为 0 且 l 为 1, 或 k 与 l 二者均为 1。

[0350] 反义链因此可以由以下式来表示:

[0351] $5' n_q - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_p 3'$ (IIb);

[0352] $5' n_q - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - n_p 3'$ (IIc); 或

[0353] $5' n_q - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - N_a' - n_p 3'$ (IIId)。

[0354] 在反义链由式 (IIb) 来表示时, N_b' 表示包含 0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包含 2-20、2-15 或 2-10 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0355] 当反义链由式 (IIc) 来表示时, N_b' 表示包含 0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包含 2-20、2-15 或 2-10 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0356] 当反义链由式 (IIId) 来表示时, 每个 N_b' 独立地表示包含 0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 或 0 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包含 2-20、2-15 或 2-10 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 是 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0357] 在其他实施方式中, k 是 0 和 l 是 0 并且反义链可以由以下式来表示:

[0358] $5' n_p - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q 3'$ (Ia)。

[0359] 当反义链由式 (IIa) 来表示时, 每个 N_a' 独立地表示包含 2-20、2-15 或 2-10 个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。 X' 、 Y' 和 Z' 中的每个可以彼此相同或不同。

[0360] 正义链和反义链的每个核苷酸可以独立地用 LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-甲基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或 2'-氟来修饰。例如, 正义链和反义链的每个核苷酸独立地用 2'-0-甲基或 2'-氟来修饰。特别地, 每个 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 和 Z' 可以表示 2'-0-甲基修饰或 2'-氟修饰。

[0361] 在一些实施方式中, 当双链体区域为 21nt 时, RNAi 剂的正义链可以含有在链的 9、10 和 11 位置出现的 YYY 基序, 计数从 5'-端的第 1 核苷酸开始, 或任选地, 计数从 5'-端在双链体区域内的第 1 个配对核苷酸开始; 并且 Y 表示 2'-F 修饰。正义链可以另外含有 XXX 基序或 ZZZ 基序作为双链体区域相对端的翼修饰; 并且 XXX 和 ZZZ 各自独立地表示 2'-OMe 修饰或 2'-F 修饰。

[0362] 在一些实施方式中, 反义链可以含有在链的位置 11、12、13 存在的 $Y' Y' Y'$ 基序, 计数从 5'-端的第 1 个核苷酸开始, 或任选地, 计数从 5'-端在双链体区域内的第 1 个配对核苷酸开始; 并且 Y' 表示 2'-0-甲基修饰。反义链可以另外含有 $X' X' X'$ 基序或 $Z' Z' Z'$ 基序作为在双链体区域相对端的翼修饰; 并且 $X' X' X'$ 和 $Z' Z' Z'$ 各自独立地表示 2'-OMe 修饰或 2'-F 修饰。

[0363] 通过以上式 (Ia)、(Ib)、(Ic) 和 (Id) 中的任一个表示的正义链分别与通过式 (IIa)、(IIb)、(IIc) 和 (IIId) 中的任一个表示的反义链形成双链体。

[0364] 因此, 本发明方法所使用的 dsRNAi 剂可以包含正义链和反义链, 每条链具有 14 至 30 个核苷酸, iRNA 双链体由式 (III) 来表示:

[0365] 正义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0366] 反义: $3' n_p - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q 5'$

[0367] (III)

[0368] 其中:

[0369] i 、 j 、 k 和 l 各自独立地为0或1;

[0370] p 、 p' 、 q 和 q' 各自独立地为0-6;

[0371] 每个 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0372] 每个 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0373] 其中每个 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q ,其各自可以存在或不存在,独立地表示突出端核苷酸;和

[0374] XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0375] 在一个实施方式中, i 是0和 j 是0;或 i 是1和 j 是0;或 i 是0和 j 是1;或 i 和 j 都是0;或 i 和 j 都是1。在另一个实施方式中, k 是0和 l 是1;或 k 是1和 l 是0;或 k 是0和 l 是1;或 k 和 l 都是0;或 k 和 l 都是1。

[0376] 形成iRNA双链体的正义链和反义链的示例性组合包括以下式:

[0377] $5'n_p-N_a-Y Y Y-N_a-n_q 3'$

[0378] $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'n_q 5'$

[0379] (IIIa)

[0380] $5'n_p-N_a-Y Y Y-N_b-Z Z Z-N_a-n_q 3'$

[0381] $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'n_q 5'$

[0382] (IIIb)

[0383] $5'n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_a-n_q 3'$

[0384] $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q 5'$

[0385] (IIIc)

[0386] $5'n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_b-Z Z Z-N_a-n_q 3'$

[0387] $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q 5'$

[0388] (IIId)

[0389] 当dsRNAi剂由式(IIIa)表示时,每个 N_a 独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0390] 当dsRNAi剂由式(IIIb)表示时,每个 N_b 独立地表示包含1-10、1-7、1-5或1-4个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0391] 当dsRNAi剂由式(IIIc)表示时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0392] 当dsRNAi剂由式(IIId)表示时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列。

[0393] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中 X 、 Y 和 Z 的每一个可以彼此相同或不同。

[0394] 当dsRNAi剂由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示时,Y核苷酸中的至少一个可以与Y'核苷酸中的一个形成碱基对。或者,Y核苷酸中的至少两个与相应的Y'核苷酸形成碱基对;或全部三个Y核苷酸都与相应的Y'核苷酸形成碱基对。

[0395] 当dsRNAi剂由式(IIIb)或(IIId)表示时,Z核苷酸中的至少一个可以与Z'核苷酸中的一个形成碱基对。或者,Z核苷酸中的至少两个与相应的Z'核苷酸形成碱基对;或全部三个Z核苷酸都与相应的Z'核苷酸形成碱基对。

[0396] 当dsRNAi剂由式(IIIc)或(IIId)表示时,X核苷酸中的至少一个可以与X'核苷酸中的一个形成碱基对。或者,X核苷酸中的至少两个与相应的X'核苷酸形成碱基对;或全部三个X核苷酸都与相应的X'核苷酸形成碱基对。

[0397] 在某些实施方式中,Y核苷酸上的修饰不同于Y'核苷酸上的修饰,Z核苷酸上的修饰不同于Z'核苷酸上的修饰,或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0398] 在某些实施方式中,当dsRNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰。在其他实施方式中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰,并且 $n_p' > 0$ 和至少一个 n_p' 通过硫逐磷酸酯连接基团连接相邻核苷酸。在其他实施方式中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 和至少一个 n_p' 通过硫逐磷酸酯连接基团连接相邻核苷酸,并且正义链与通过二价或三价分支接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合(以下描述)。在其他实施方式中,当RNAi剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 和至少一个 n_p' 通过硫逐磷酸酯连接基团连接相邻核苷酸,正义链包含至少一个硫逐磷酸酯连接基团,并且正义链与通过二价或三价分支接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0399] 在一些实施方式中,当dsRNAi剂由式(IIIa)表示时, N_a 修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 和至少一个 n_p' 通过硫逐磷酸酯连接基团连接相邻核苷酸,正义链包含至少一个硫逐磷酸酯连接基团,并且正义链与通过二价或三价分支接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0400] 在一些实施方式中,dsRNAi剂是含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚体,其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割或不可切割的。任选地,多聚体进一步包含配体。每个双链体可以靶向相同基因或两个不同基因;或每个双链体可以在两个不同靶位点靶向相同基因。

[0401] 在一些实施方式中,dsRNAi剂是含有三个、四个、五个、六个或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚体,其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割或不可切割的。任选地,多聚体进一步包含配体。每个双链体可以靶向相同基因或两个不同基因;或每个双链体可以在两个不同靶位点靶向相同基因。

[0402] 在一个实施方式中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中至少一个表示的两个dsRNAi剂在5'端和在一个或两个3'端彼此连接,且任选地与配体缀合。各剂可靶向相同基因或两个不同基因;或各剂可在两个不同靶位点靶向相同基因。

[0403] 在某些实施方式中,本发明RNAi剂可包含少量含2'-氟修饰的核苷酸,例如,10个或更少的含2'-氟修饰的核苷酸。例如,该RNAi剂可包含10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个含2'-氟修饰的核苷酸。在具体实施方式中,本发明RNAi剂包含10个含2'-氟修饰的核苷酸,例如,在正义链中4个含2'-氟修饰的核苷酸和在反义链中6个含2'-氟修饰的核苷酸。在另一具体

实施方式中,本发明RNAi剂包含6个含2'-氟修饰的核苷酸,例如,在正义链中4个含2'-氟修饰的核苷酸和在反义链中2个含2'-氟修饰的核苷酸。

[0404] 其他实施方式中,本发明RNAi剂可包含超少量的含2'-氟修饰的核苷酸,例如,2个或更少的含2'-氟修饰的核苷酸。例如,该RNAi剂可包含2、1或0个含2'-氟修饰的核苷酸。在一个具体实施方式中,该RNAi剂可包含2个含2'-氟修饰的核苷酸,例如,正义链中0个含2'-氟修饰的核苷酸和反义链中2个含2'-氟修饰的核苷酸。

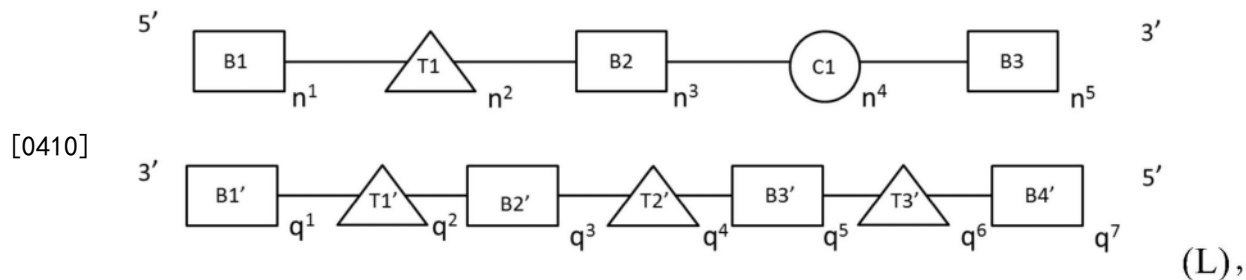
[0405] 各种不同公开文献说明可用于本发明方法的多聚体iRNA。这类文献包括W02007/091269、美国专利号7,858,769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887和W02011/031520,其完整内容各自以引用的方式并入本文中。

[0406] 如以下更详细地描述的,含有一个或多个碳水化合物部分与iRNA缀合的iRNA可以优化iRNA的一种或多种特性。在许多情况中,碳水化合物部分将连接于iRNA的修饰亚基。例如,iRNA的一个或多个核糖核苷酸亚基的核糖可以被另一个部分替代,例如,碳水化合物配体与其连接的非碳水化合物(优选环状)载体。其中亚基的核糖因此被替代的核糖核苷酸亚基在本文中称为核糖替换修饰亚基(RRMS)。环状载体可以是碳环系统,即,所有环原子是碳原子,或杂环系统,即一个或多个环原子可以是杂原子,例如,氮、氧、硫。环状载体可以是单环系统,或可以含有两个或多个环,例如,稠合环。环状载体可以是完全饱和的环系统,或其可以含有一个或多个双键。

[0407] 配体可以通过载体连接于多核苷酸。载体包括(i)至少一个“主链连接点”,优选两个“主链连接点”,和(ii)至少一个“栓系连接点”。如本文中使用的“主链连接点”是指官能团,例如,羟基,或通常,可用于并且适用于将载体结合至核糖核酸主链中的键,例如,磷酸主链或修饰磷酸主链,例如含硫主链。“栓系连接点”(TAP)在一些实施方式中是指连接选定部分的环状载体的组成环原子,例如,碳原子或杂原子(不同于提供主链连接点的原子)。所述部分可以是例如碳水化合物,例如,单糖、双糖、三糖、四糖、寡糖或多糖。任选地,选择的部分通过中间栓系连接于环状载体。因此,环状载体通常包括官能团,例如,氨基基团,或通常,提供键,其适用于结合或栓系另一化学实体,例如,将配体结合或栓系于组成环。

[0408] iRNA可以通过载体与配体缀合,其中载体可以是环状基团或无环基团;优选地,环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢糠基和萘烷;优选地,无环基团是丝氨酸主链或乙二醇胺主链。

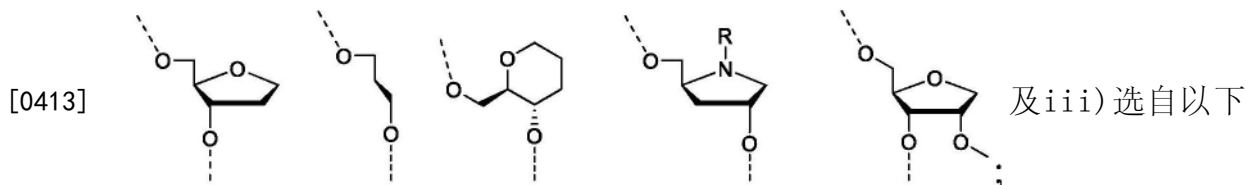
[0409] 本发明的另一实施方式中,iRNA剂包含正义链和反义链,各链具有14至40个核苷酸。该RNAi剂可由式(L)代表:



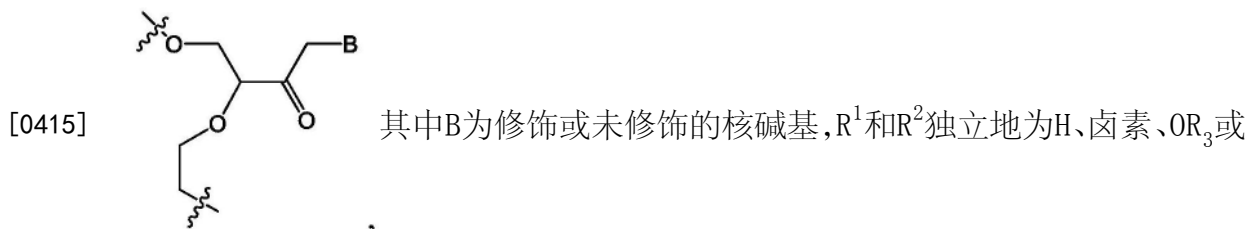
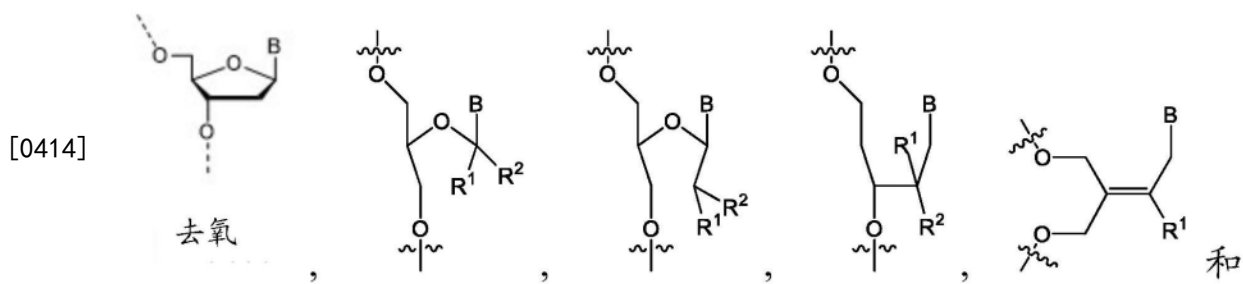
[0411] 式(L)中,B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'和B4'各自独立地为包含选自以下的修饰的核苷酸:2'-O-烷基、2'-取代的烷氧基、2'-取代的烷基、2'-卤代、ENA和BNA/LNA。在一个实施方

式中, B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' 和 B4' 各自包含 2'-OMe 修饰。在一个实施方式中, B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' 和 B4' 各自包含 2'-OMe 或 2'-F 修饰。在一个实施方式中, B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' 和 B4' 中至少一个包含 2'-O-N-甲基乙酰氨基 (2'-O-NMA) 修饰。

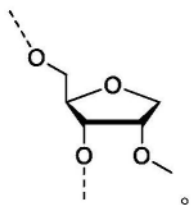
[0412] C1 为置于与反义链种子区域 (即反义链 5'-端的位置 2-8) 相对的位点的热失稳核苷酸。例如, C1 位在正义链的与反义链 5'-端位置 2-8 处的核苷酸配对。在一个实施例中, C1 位在正义链 5'-端的位置 15 处。C1 核苷酸带有热失稳修饰, 其可包括无碱基修饰; 与双链体中相反核苷酸的错配; 及糖修饰, 如 2'-脱氧修饰或无环核苷酸, 例如, 非锁核酸 (UNA) 或甘油核酸 (GNA)。在一个实施方式中, C1 具有选自以下的热失稳修饰: i) 与反义链中相反核苷酸的错配; ii) 选自以下的无碱基修饰:



的糖修饰:



烷基; 及 R₃ 为 H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖。在一个实施方式中, C1 中热失稳修饰为选自以下的错配: G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T 和 U:T; 且任选地错配对中至少一个核碱基为 2'-脱氧核碱基。在一个实施例中, C1 中的热失稳修饰为 GNA 或



[0416] T1、T1'、T2' 和 T3' 各自独立地代表包含修饰的核苷酸, 该修饰为该核苷酸提供小于或等于 2'-OMe 修饰的立体位阻效应。立体位阻效应指修饰的立体效应的总和。测定核苷酸修饰的立体效应的方法是本领域技术人员已知的。该修饰可在核苷酸的核糖的 2' 位置、或对非核糖核苷酸、无环核苷酸或核苷酸主链的类似或等同于核糖的 2' 位置并为核苷酸提供小于或等于 2'-OMe 修饰的立体位阻的修饰。例如, T1、T1'、T2' 和 T3' 各自独立地选自 DNA、RNA、LNA、2'-F 和 2'-F-5'-甲基。在一个实施方式中, T1 为 DNA。在一个实施方式中, T1' 为

DNA、RNA或LNA。在一个实施方式中，T2' 为DNA或RNA。在一个实施方式中，T3' 为DNA或RNA。

[0417] n^1 、 n^3 和 q^1 独立地为4至15个核苷酸的长度。

[0418] n^5 、 q^3 和 q^7 独立地为1-6个核苷酸的长度。

[0419] n^4 、 q^2 和 q^6 独立地为1-3个核苷酸的长度；或者， n^4 为0。

[0420] q^5 独立地为0-10个核苷酸的长度。

[0421] n^2 和 q^4 独立地为0-3个核苷酸的长度。

[0422] 或者， n^4 为0-3个核苷酸的长度。

[0423] 在一个实施方式中， n^4 可为0。在一个实施例中， n^4 为0，及 q^2 和 q^6 为1。在另一个实施例中， n^4 为0，及 q^2 和 q^6 为1，在正义链(从正义链5' -端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰，且在反义链(从反义链5' -端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0424] 在一个实施方式中， n^4 、 q^2 和 q^6 各为1。

[0425] 在一个实施方式中， n^2 、 n^4 、 q^2 、 q^4 和 q^6 各为1。

[0426] 在一个实施方式中，当正义链为19-22个核苷酸长度且 n^4 为1时，C1在正义链5' -端的位置14-17。在一个实施方式中，C1在正义链5' -端的位置15处。

[0427] 在一个实施方式中，T3' 在反义链5' 端起的位置2开始。在一个实施例中，T3' 在反义链5' 端起的位置2且 q^6 等于1。

[0428] 在一个实施方式中，T1' 在反义链5' 端的位置14开始。在一个实施例中，T1' 在反义链5' 端起的位置14且 q^2 等于1。

[0429] 在一个示例实施方式中，T3' 从反义链5' 端起的位置2开始及T1' 从反义链5' 端起的位置14开始。在一个实施例中，T3' 从反义链5' 端起的位置2开始且 q^6 等于1，及T1' 从反义链5' 端起的位置14开始且 q^2 等于1。

[0430] 在一个实施方式中，T1' 和T3' 间隔11个核苷酸长度(即不计算T1' 和T3' 核苷酸)。

[0431] 在一个实施方式中，T1' 在反义链5' 端的位置14。在一个实施例中，T1' 在反义链5' 端的位置14且 q^2 等于1，且在2' 位置或在非核糖、无环或主链中的位置的修饰提供小于2' -OMe核糖的立体位阻。

[0432] 在一个实施方式中，T3' 在反义链5' 端的位置2。在一个实施例中，T3' 在反义链5' 端的位置2且 q^6 等于1，且在2' 位置或在非核糖、无环或主链中的位置的修饰提供小于或等于2' -OMe核糖的立体位阻。

[0433] 在一个实施方式中，T1在正义链的切割位点处。在一个实施例中，当正义链为19-22个核苷酸长度且 n^2 为1时，T1在正义链5' 端的位置11。在示例性实施方式中，当正义链为19-22个核苷酸长度且 n^2 为1时，T1在正义链5' 端位置11的正义链切割位点处。

[0434] 在一个实施方式中，T2' 在反义链5' 端的位置6开始。在一个实施例中，T2' 在反义链5' 端的位置6-10且 q^4 为1。

[0435] 在示例性实施方式中，T1在正义链的切割位点处，例如，当正义链为19-22个核苷酸长度且 n^2 为1时，在正义链5' 端的位置11；T1' 在反义链5' 端的位置14且 q^2 等于1，及对T1' 的修饰在核糖的2' 位置或在非核糖、无环或主链中的位置，其提供小于2' -OMe核糖的立体位阻效应；T2' 在反义链5' 端的位置6-10且 q^4 为1；及T3' 在反义链5' 端的位置2且 q^6 等于1，及对T3' 的修饰在2' 位置或在非核糖、无环或主链的位置中，其提供小于或等于2' -OMe核糖的

立体位阻效应。

[0436] 在一个实施方式中, T2' 在反义链5' 端的位置8开始。在一个实施例中, T2' 在反义链5' 端的位置8开始且 q^4 为2。

[0437] 在一个实施方式中, T2' 在反义链5' 端的位置9开始。在一个实施例中, T2' 在反义链5' 端的位置9且 q^4 为1。

[0438] 在一个实施方式中, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为9, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为1, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为6, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1; 在正义链 (从正义链5' -端起计数) 位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链 (从反义链5' -端起计数) 位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰和在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0439] 在一个实施方式中, n^4 为0, B3为2' -OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为9, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为1, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为6, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1; 在正义链 (从正义链5' -端起计数) 位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链 (从反义链5' -端起计数) 位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0440] 在一个实施方式中, B1为2' -OMe或2' -F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2' -OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为9, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为2, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为5, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1。

[0441] 在一个实施方式中, B1为2' -OMe或2' -F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2' -OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' -OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为9, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为2, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为5, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1; 在正义链 (从正义链5' -端起计数) 位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链 (从反义链5' -端起计数) 位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0442] 在一个实施方式中, B1为2' -OMe或2' -F, n^1 为6, T1为2' F, n^2 为3, B2为2' -OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为7, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为2, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为5, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1。

[0443] 在一个实施方式中, B1为2' -OMe或2' -F, n^1 为6, T1为2' F, n^2 为3, B2为2' -OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' -OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为7, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为2, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为5, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1; 在正义链 (从正义链5' -端起计数) 位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链 (从反义链5' -端起计数) 位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0444] 在一个实施方式中, B1为2' -OMe或2' -F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2' -OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2' -OMe或2' -F, q^1 为9, T1' 为2' -F, q^2 为1, B2' 为2' -OMe或2' -F, q^3 为4, T2' 为2' -F, q^4 为1, B3' 为2' -OMe或2' -F, q^5 为6, T3' 为2' -F, q^6 为1, B4' 为2' -OMe, 及 q^7 为1。

[0445] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为1,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为6,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链5'-端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0446] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为5,T2'为2'-F, q^4 为1,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;任选地在反义链3'-端具有至少2个另外的TT。

[0447] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为5,T2'为2'-F, q^4 为1,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;任选地在反义链3'-端具有至少2个另外的TT;在正义链(从正义链5'-端起计数)位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链5'-端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0448] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1。

[0449] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;在正义链(从5'-端起计数)位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从5'-端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

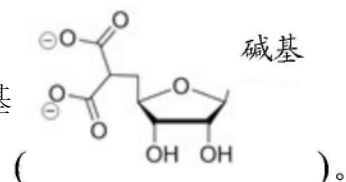
[0450] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。

[0451] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链5'-端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

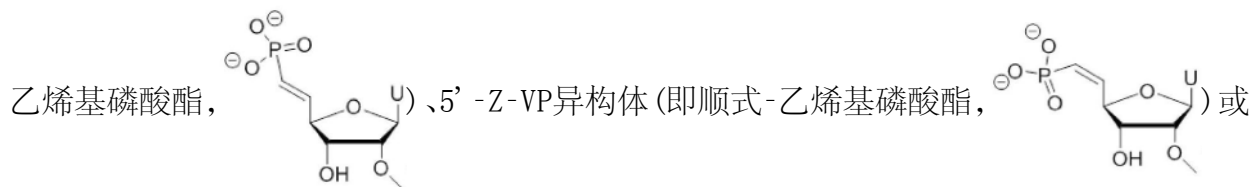
[0452] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。

[0453] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2'-F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1'为2'-F, q^2 为1, B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0, B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7, T3'为2'-F, q^6 为1, B4'为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链5'-端起计数)位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

[0454] RNAi剂可在正义链或反义链的5'-端包含含磷基团。该5'-端含磷基团可为5'-端磷酸酯(5'-P)、5'-端硫代磷酸酯(5'-PS)、5'-端二硫代磷酸酯(5'-PS₂)、5'-端乙烯基磷酸酯(5'-VP)、5'-端甲基磷酸酯(MePhos)或5'-脱氧-5'-C-丙二酰基



当5'-端含磷基团为5'-端乙烯基磷酸酯(5'-VP)时,该5'-VP可为5'-E-VP异构体(即反式-



其混合物。

[0455] 在一个实施方式中,该RNAi剂在正义链的5'-端包含含磷基团。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链的5'-端包含含磷基团。

[0456] 在一个实施方式中,该RNAi剂包含5'-P。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-P。

[0457] 在一个实施方式中,该RNAi剂包含5'-PS。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-PS。

[0458] 在一个实施方式中,该RNAi剂包含5'-VP。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-VP。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-E-VP。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-Z-VP。

[0459] 在一个实施方式中,该RNAi剂包含5'-PS₂。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-PS₂。

[0460] 在一个实施方式中,该RNAi剂包含5'-PS₂。在一个实施方式中,该RNAi剂在反义链中包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0461] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2'-F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1'为2'-F, q^2 为1, B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2'为2'-F, q^4 为2, B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3'为2'-F, q^6 为1, B4'为2'-OMe, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0462] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2'-F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1'为2'-F, q^2 为1, B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2'为2'-F, q^4 为2, B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3'为2'-F, q^6 为1, B4'为2'-

OMe, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-P。

[0463] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0464] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0465] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2' OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0466] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1; 在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰和反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P。

[0467] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1; 在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0468] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1; 在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0469] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-OMe, 及 q^7 为1; 在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含

5'-PS₂。

[0470] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0471] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1。该RNAi剂也包含5'-P。

[0472] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1。该dsRNA剂也包含5'-PS。

[0473] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0474] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0475] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0476] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P。

[0477] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在

位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0478] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0479] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0480] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-OMe,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0481] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-P。

[0482] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0483] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0484] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该dsRNAi RNA剂也包含5'-PS₂。

[0485] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2' OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或

2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0486] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P。

[0487] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0488] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0489] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0490] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, T2' 为2'-F, q^4 为2, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为5, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0491] 在一个实施方式中, B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8, T1为2' F, n^2 为3, B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0, B3为2'-OMe, n^5 为3, B1' 为2'-OMe或2'-F, q^1 为9, T1' 为2'-F, q^2 为1, B2' 为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0, B3' 为2'-OMe或2'-F, q^5 为7, T3' 为2'-F, q^6 为1, B4' 为2'-F, 及 q^7 为1。该

RNAi剂也包含5'-P。

[0492] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0493] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0494] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0495] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0496] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P。

[0497] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS。

[0498] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP。该5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0499] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正

义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂。

[0500] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-F,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0501] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-P在反义链的5'-端,及该靶向配体在正义链的3'-端。

[0502] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS在反义链的5'-端,及该靶向配体在正义链的3'-端。

[0503] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合),和靶向配体。

[0504] 在一个实施方式中,该5'-VP在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0505] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。

酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS₂在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0506] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-脱氧-5'-C-丙二酰基在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0507] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-P在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0508] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0509] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-VP在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0510] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂和靶向配体。

在一个实施方式中,该5'-PS₂在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0511] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,q⁴为0,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为7,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-OMe,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-脱氧-5'-C-丙二酰基在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0512] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-F,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-P在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0513] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-F,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0514] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-F,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-VP在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0515] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F,n¹为8,T1为2' F,n²为3,B2为2'-OMe,n³为7,n⁴为0,B3为2'-OMe,n⁵为3,B1'为2'-OMe或2'-F,q¹为9,T1'为2'-F,q²为1,B2'为2'-OMe或2'-F,q³为4,T2'为2'-F,q⁴为2,B3'为2'-OMe或2'-F,q⁵为5,T3'为2'-F,q⁶为1,B4'为2'-F,及q⁷为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS₂在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0516] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4,T2'为2'-F, q^4 为2,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为5,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-脱氧-5'-C-丙二酰基和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-脱氧-5'-C-丙二酰基在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0517] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-P和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-P在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0518] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0519] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-VP在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0520] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或2'-F, q^3 为4, q^4 为0,B3'为2'-OMe或2'-F, q^5 为7,T3'为2'-F, q^6 为1,B4'为2'-F,及 q^7 为1;在正义链(从正义链5'-端起计数)的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰,及在反义链(从反义链的5'-端起计数)的位置1和2具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该RNAi剂也包含5'-PS₂和靶向配体。在一个实施方式中,该5'-PS₂在反义链的5'-端,和靶向配体在正义链的3'-端。

[0521] 在一个实施方式中,B1为2'-OMe或2'-F, n^1 为8,T1为2' F, n^2 为3,B2为2'-OMe, n^3 为7, n^4 为0,B3为2'-OMe, n^5 为3,B1'为2'-OMe或2'-F, q^1 为9,T1'为2'-F, q^2 为1,B2'为2'-OMe或

2'-F, q^3 为 4, q^4 为 0, B3' 为 2'-OMe 或 2'-F, q^5 为 7, T3' 为 2'-F, q^6 为 1, B4' 为 2'-F, 及 q^7 为 1; 在正义链 (从正义链 5'-端起计数) 的位置 1-5 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰, 及在反义链 (从反义链的 5'-端起计数) 的位置 1 和 2 具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰及在位置 18-23 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间连接修饰。该 RNAi 剂也包含 5'-脱氧-5'-C-丙二酰基和靶向配体。在一个实施方式中, 该 5'-脱氧-5'-C-丙二酰基在反义链的 5'-端, 和靶向配体在正义链的 3'-端。

[0522] 特定实施方式中, 本发明 RNAi 剂包含:

[0523] (a) 正义链, 其具有:

[0524] (i) 21 个核苷酸的长度;

[0525] (ii) 附接于 3'-端的 ASGPR 配体, 其中该 ASGPR 配体包含通过三价分支接头附接的三个 GalNAc 衍生物; 及

[0526] (iii) 在位置 1、3、5、7、9 至 11、13、17、19 和 21 的 2'-F 修饰, 及在位置 2、4、6、8、12、14 至 16、18 和 20 的 2'-OMe 修饰 (从 5' 端起计数);

[0527] 及

[0528] (b) 反义链, 其具有:

[0529] (i) 23 个核苷酸的长度;

[0530] (ii) 在位置 1、3、5、9、11 至 13、15、17、19、21 和 23 的 2'-OMe 修饰, 及在位置 2、4、6 至 8、10、14、16、18、20 和 22 的 2' F 修饰 (从 5' 端起计数); 及

[0531] (iii) 在核苷酸位置 21 和 22 之间及在核苷酸位置 22 和 23 之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接 (从 5' 端起计数);

[0532] 其中该 dsRNA 剂具有在反义链 3'-端的两核苷酸突出端, 及在反义链 5'-端的平端。

[0533] 在另一特定实施方式中, 本发明 RNAi 剂包含:

[0534] (a) 正义链, 其具有:

[0535] (i) 21 个核苷酸的长度;

[0536] (ii) 附接于 3'-端的 ASGPR 配体, 其中该 ASGPR 配体包含通过三价分支接头附接的三个 GalNAc 衍生物;

[0537] (iii) 在位置 1、3、5、7、9 至 11、13、15、17、19 和 21 的 2'-F 修饰, 及在位置 2、4、6、8、12、14、16、18 和 20 的 2'-OMe 修饰 (从 5' 端起计数); 及

[0538] (iv) 在核苷酸位置 1 和 2 之间及核苷酸位置 2 和 3 之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接 (从 5' 端起计数);

[0539] 及

[0540] (b) 反义链, 其具有:

[0541] (i) 23 个核苷酸的长度;

[0542] (ii) 在位置 1、3、5、7、9、11 至 13、15、17、19 和 21 至 23 的 2'-OMe 修饰, 及在位置 2、4、6、8、10、14、16、18 和 20 的 2' F 修饰 (从 5' 端起计数); 及

[0543] (iii) 在核苷酸位置 1 和 2 之间、在核苷酸位置 2 和 3 之间、在核苷酸位置 21 和 22 之间和在核苷酸位置 22 和 23 之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接 (从 5' 端起计数);

[0544] 其中该 RNAi 剂具有在反义链 3'-端的两核苷酸突出端, 及在反义链 5'-端的平端。

[0545] 在另一特定实施方式中, 本发明 RNAi 剂包含:

- [0546] (a) 正义链,其具有:
- [0547] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0548] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;
- [0549] (iii) 在位置1至6、8、10和12至21的2'-OMe修饰,在位置7和9的2'-F修饰和在位置11的脱氧-核苷酸(例如,dT)(从5'端起计数);及
- [0550] (iv) 在核苷酸位置1和2之间及在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0551] 及
- [0552] (b) 反义链,其具有:
- [0553] (i) 23个核苷酸的长度;
- [0554] (ii) 在位置1、3、7、9、11、13、15、17和19至23的2'-OMe修饰,及在位置2、4至6、8、10、12、14、16和18的2'-F修饰(从5'端起计数);及
- [0555] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0556] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。
- [0557] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:
- [0558] (a) 正义链,其具有:
- [0559] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0560] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;
- [0561] (iii) 在位置1至6、8、10、12、14和16至21的2'-OMe修饰和在位置7、9、11、13和15的2'-F修饰;及
- [0562] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0563] 及
- [0564] (b) 反义链,其具有:
- [0565] (i) 23个核苷酸的长度;
- [0566] (ii) 在位置1、5、7、9、11、13、15、17、19和21至23的2'-OMe修饰,及在位置2至4、6、8、10、12、14、16、18和20的2'-F修饰(从5'端起计数);及
- [0567] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0568] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。
- [0569] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:
- [0570] (a) 正义链,其具有:
- [0571] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0572] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;
- [0573] (iii) 在位置1至9和12至21的2'-OMe修饰,及在位置10和11的2'-F修饰;及

[0574] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0575] 及

[0576] (b) 反义链,其具有:

[0577] (i) 23个核苷酸的长度;

[0578] (ii) 在位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19和21至23的2'-OMe修饰,及在位置2、4、6、8、10、14、16、18和20的2'-F修饰(从5'端起计数);及

[0579] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0580] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。

[0581] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:

[0582] (a) 正义链,其具有:

[0583] (i) 21个核苷酸的长度;

[0584] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0585] (iii) 在位置1、3、5、7、9至11和13的2'-F修饰,及在位置2、4、6、8、12和14至21的2'-OMe修饰;及

[0586] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0587] 及

[0588] (b) 反义链,其具有:

[0589] (i) 23个核苷酸的长度;

[0590] (ii) 在位置1、3、5至7、9、11至13、15、17至19和21至23的2'-OMe修饰,及在位置2、4、8、10、14、16和20的2'-F修饰(从5'端起计数);及

[0591] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0592] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。

[0593] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:

[0594] (a) 正义链,其具有:

[0595] (i) 21个核苷酸的长度;

[0596] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0597] (iii) 在位置1、2、4、6、8、12、14、15、17和19至21的2'-OMe修饰,及在位置3、5、7、9至11、13、16和18的2'-F修饰;及

[0598] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0599] 及

[0600] (b) 反义链,其具有:

[0601] (i) 25个核苷酸的长度;

- [0602] (ii) 在位置1、4、6、7、9、11至13、15、17和19至23的2'-OMe修饰、在位置2、3、5、8、10、14、16和18的2'-F修饰和在位置24和25的脱氧-核苷酸(例如,dT)(从5'端起计数);及
- [0603] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0604] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的四核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。
- [0605] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:
- [0606] (a) 正义链,其具有:
- [0607] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0608] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;
- [0609] (iii) 在位置1至6、8和12至21的2'-OMe修饰,及在位置7和9至11的2'-F修饰;及
- [0610] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0611] 及
- [0612] (b) 反义链,其具有:
- [0613] (i) 23个核苷酸的长度;
- [0614] (ii) 在位置1、3至5、7、8、10至13、15和17至23的2'-OMe修饰,及在位置2、6、9、14和16的2'-F修饰(从5'端起计数);及
- [0615] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0616] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。
- [0617] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:
- [0618] (a) 正义链,其具有:
- [0619] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0620] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;
- [0621] (iii) 在位置1至6、8和12至21的2'-OMe修饰,及在位置7和9至11的2'-F修饰;及
- [0622] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0623] 及
- [0624] (b) 反义链,其具有:
- [0625] (i) 23个核苷酸的长度;
- [0626] (ii) 在位置1、3至5、7、10至13、15和17至23的2'-OMe修饰,及在位置2、6、8、9、14和16的2'-F修饰(从5'端起计数);及
- [0627] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置21和22之间和在核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);
- [0628] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两个核苷酸的突出端,及在反义链5'-端的平端。
- [0629] 在另一特定实施方式中,本发明RNAi剂包含:

[0630] (a) 正义链,其具有:

[0631] (i) 19个核苷酸的长度;

[0632] (ii) 附接于3'-端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包含通过三价分支接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0633] (iii) 在位置1至4、6和10至19的2'-OMe修饰,及在位置5和7至9的2'-F修饰;及

[0634] (iv) 在核苷酸位置1和2之间和在核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0635] 及

[0636] (b) 反义链,其具有:

[0637] (i) 21个核苷酸的长度;

[0638] (ii) 在位置1、3至5、7、10至13、15和17至21的2'-OMe修饰,及在位置2、6、8、9、14和16的2'-F修饰(从5'端起计数);及

[0639] (iii) 在核苷酸位置1和2之间、在核苷酸位置2和3之间、在核苷酸位置19和20之间和在核苷酸位置20和21之间的硫代磷酸酯核苷酸间连接(从5'端起计数);

[0640] 其中该RNAi剂具有在反义链3'-端的两核苷酸突出端,及在反义链5'-端的平端。

[0641] 在某些实施方式中,本发明方法所使用的iRNA选自表3、表5、或表6所列的药剂。这些药剂可进一步包含配体。

[0642] III. 与配体缀合的iRNA

[0643] 本发明iRNA的RNA的另一种修饰涉及将iRNA与一或多个配体、部分或缀合物化学连接,其增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,例如,到细胞中。这类部分包括(但不限于)脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acid.Sci.USA,1989,86:6553-6556)。在其他实施方式中,该配体为胆酸(Manoharan等人,Biorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053-1060)、硫醚,例如,beryl-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306-309;Manoharan等人,Biorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765-2770)、硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533-538)、脂族链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J,1991,10:1111-1118;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259:327-330;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75:49-54)、磷脂,例如,二十六烷基-消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油基-3-磷酸三乙基铵(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969-973)、或金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229-237)、或十八烷基胺或己基氨基-羰氧基胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923-937)。

[0644] 在某些实施方式中,配体改变向其中并入该配体的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在优选的实施方式中,与例如不存在配体的物种相比,这种配体提供针对所选靶(例如分子、细胞或细胞类型、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。优选的配体不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0645] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(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、N-

乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺或透明质酸)；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。聚胺的实例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟聚胺、树枝状聚合物聚胺、精氨酸、胍、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0646] 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、脂质或蛋白质，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、表面活性蛋白质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。在某些实施方式中，该配体为多价半乳糖，例如，N-乙酰基-半乳糖胺。

[0647] 配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂((例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德卟啉(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-苾丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(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、放射标记的标记物、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、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环类的Eu³⁺络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0648] 配体可以是蛋白质，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肝细胞结合的抗体。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，如脂质、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。该配体可以是例如脂多糖，p38 MAP激酶的活化剂或NF- κ B的活化剂。

[0649] 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、微丝或中间丝)增加iRNA剂摄入细胞中的物质，例如药物。药物可以例如是紫杉醇、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。

[0650] 在一些实施方式中，与如本文所述的iRNA连接的配体充当药物代谢动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂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。包含许多硫代磷酸酯连接基团的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合，因此骨架中包含多个硫代磷酸酯连接基团的短寡核苷酸，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，也服从于本发明作

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本文所述的实施例中的PK调节配体。

[0651] 本发明的配体-缀合iRNA可以通过使用具有侧接反应性官能团的寡核苷酸合成,例如衍生自连接分子附接到该寡核苷酸上(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体、携带多种保护基中的任一种的合成的配体或具有连接部分附接于其上的配体发生反应。

[0652] 本发明缀合物所使用的寡核苷酸可以通过固相合成的公知技术方便且常规地制备。用于这类合成的设备由多个供应商,包括例如Applied Biosystems® (Foster City, Calif.) 销售。可另外地或替代地使用本领域中已知的用于这类合成的任何其他方法。使用相似的技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化衍生物)也是已知的。

[0653] 本发明的配体-缀合iRNA以及带有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,寡核苷酸和寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体、或已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已经带有配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合物前体或带非核苷配体的构件块在适合的DNA合成仪上组装。

[0654] 当使用已经带有连接部分的核苷酸-缀合物前体时,通常完成序列特异性连接的核苷的合成,并且然后配体分子与该连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方式中,除了可商购以及寡核苷酸合成中常规使用的标准亚磷酰胺以及非标准亚磷酰胺之外,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过自动合成仪使用衍生自配体-核苷缀合物的亚磷酰胺合成。

[0655] A. 脂质缀合物

[0656] 在某些实施方式中,配体或缀合物是一种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)。HSA结合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抗性,(b)增加靶向或转运至靶细胞或细胞膜中,或(c)可以用于调节与血清蛋白(例如HSA)的结合。

[0657] 基于脂质的配体可用于抑制(例如,控制)缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA的结合性较强的脂质或基于脂质的配体较不可能靶向肾脏,且因此较不容易从身体清除。与HSA结合强度较低的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾脏。

[0658] 在某些实施方式中,基于脂质的配体结合HSA。优选地,其以足够的亲和力与HAS结合使得缀合物优先分布至非肾脏组织。然而,优选亲和性力不会强到使得无法逆转HSA-配体结合。

[0659] 在其他实施方式中,基于脂质的配体与HSA结合弱或完全不结合,使得缀合物优先分布至肾脏。替代基于脂质的配体或在基于脂质的配体之外,也可使用靶向肾脏细胞的其他部分。

[0660] 在另一方面中,配体为被靶细胞(例如,增殖细胞)摄取的部分,例如,维生素。这些特别适用于治疗特征在于不期望的细胞增殖的障碍,例如,恶性或非恶性类型的,例如,癌细胞。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他例示性维生素包括B族维生素,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或被靶细胞(如肝细胞)摄取的其他维生素或营养素。也包括

HAS和低密度脂蛋白(LDL)。

[0661] B. 细胞渗透剂

[0662] 在另一方面中,配体为细胞渗透剂,优选为螺旋细胞渗透剂。该药剂优选为两亲性的。示例性的药剂为肽,如tat或触角足肽。若该药剂为肽,其可经修饰,包括肽基模拟物、反转异构体、非肽或伪肽连接及使用D-氨基酸。该螺旋剂优选为 α -螺旋剂,其优选具有亲脂性相和疏脂性相。

[0663] 配体可为肽或肽模拟物。肽模拟物(本文也称为寡肽模拟物)为可以折叠成类似于天然肽的限定三维结构的分子。及肽模拟物附接到iRNA剂肽可以例如通过增强细胞识别与吸收来影响iRNA的药代动力学分布。肽或肽模拟物部分的长度可为约5至50个氨基酸,例如,长度约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。

[0664] 肽或肽模拟物可为例如,细胞渗透肽、阳离子性肽、两亲性肽或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可为树枝状肽、约束肽或交联肽。或者,肽部分可包括疏水性膜转位序列(MTS)。示例性的含疏水性MTS肽为具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:15)的RFGF。包含疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:16))也可作为靶向部分。肽部分可为“递送”肽,其可携带大的极性分子(包括肽、寡核苷酸与蛋白质)跨越细胞膜。例如,已发现来自HIV Tat蛋白质(GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:17))和果蝇触角足肽蛋白质(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:18))的序列能够用作递送肽。肽或肽模拟物可由DNA的随机序列编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库(Lam等人,Nature,354:82-84,1991)识别的肽。为了细胞靶向目的通过并入的单体单元与dsRNA剂系链的肽或肽模拟物实例为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽、或RGD模拟物。肽部分的长度范围可为约5个氨基酸至约40个氨基酸。该肽部分可具有结构修饰,例如以提高稳定性或指导构象性质。可采用下文说明的任何结构修饰。

[0665] 本发明组合物和方法使用的RGD肽可为线性或环状的,且可经过修饰,例如,糖基化或甲基化,以促进靶向于特定组织。包含RGD的肽和肽模拟物可包括D-氨基酸及合成RGD模拟物。除了RGD外,可使用靶向整合蛋白配体的其他部分。此配体的优选缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0666] “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,如人类细胞。微生物细胞渗透肽可为例如, α -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如, α -防御素(defensin)、 β -防御素或牛抗菌肽(bactenecin)),或仅包含一种或两种主要氨基酸的肽(例如,PR-39或indolicidin)。细胞渗透肽也可包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可为双组分两亲性肽,如MPG,其衍生自HIV-1gp41与SV40大T抗原的NLS的融合肽结构域(Simeoni等人,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

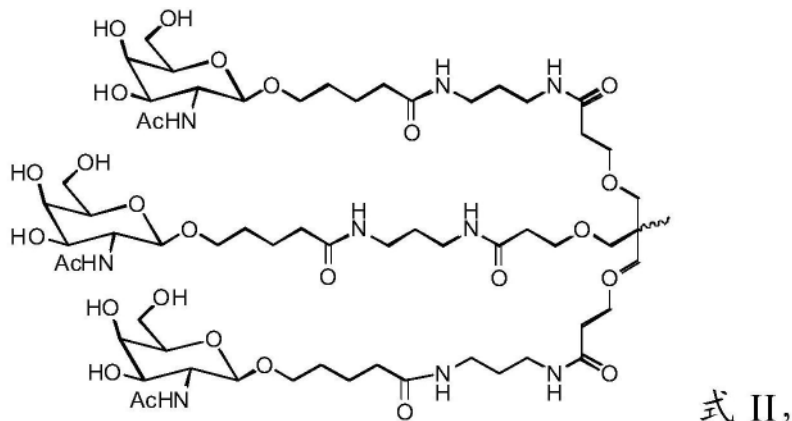
[0667] C. 碳水化合物缀合物

[0668] 在本发明组合物和方法的一些实施方式中,iRNA进一步包含碳水化合物。碳水化合物缀合的iRNA有利于核酸以及适合体内治疗用途的组合物的体内递送,如本文所述。本文所用“碳水化合物”指其为由一个或多个具有至少6个碳原子(其可为线性、分支或环状的)与在各碳原子上键合的氧、氮或硫原子的单糖单元所组成碳水化合物本身的化合物;或具有由一个或多个各具有至少6个碳原子(其可为线性、分支或环状的)与在各碳原子上键合的氧、氮或硫原子的单糖单元所组成的碳水化合物部分作为其一部分的化合物。代表性

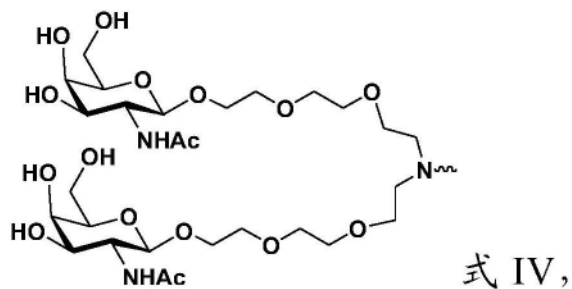
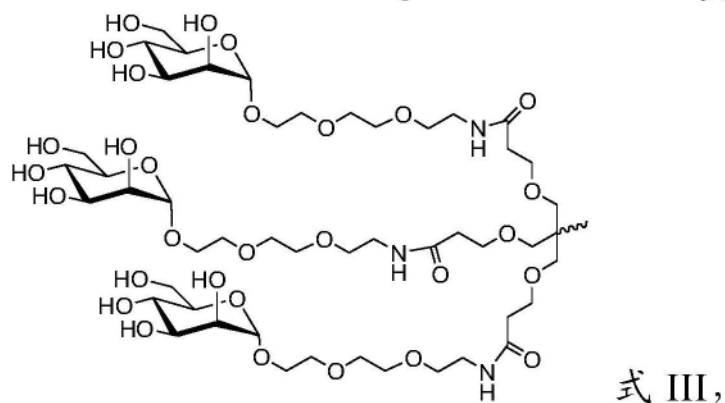
碳水化合物包括糖类(单糖、二糖、三糖和包含约4、5、6、7、8或9个单糖单元的寡糖),和多糖,如淀粉、糖元、纤维素与多糖胶。具体的单糖包括C5和以上(例如,C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单元(例如,C5、C6、C7或C8)的糖。

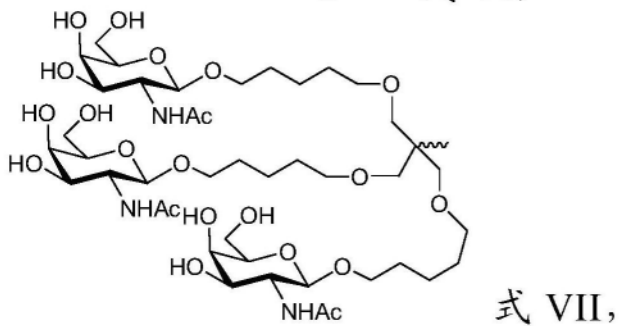
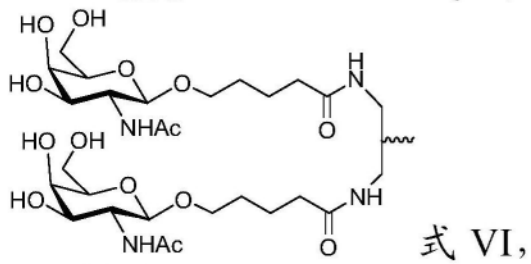
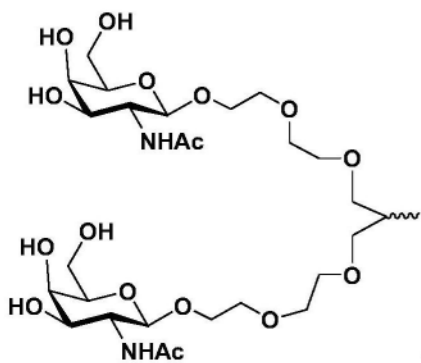
[0669] 在某些实施方式中,本发明组合物和方法所使用的碳水化合物缀合物为单糖。

[0670] 在一个实施方式中,本发明组合物和方法所使用的碳水化合物缀合物选自:

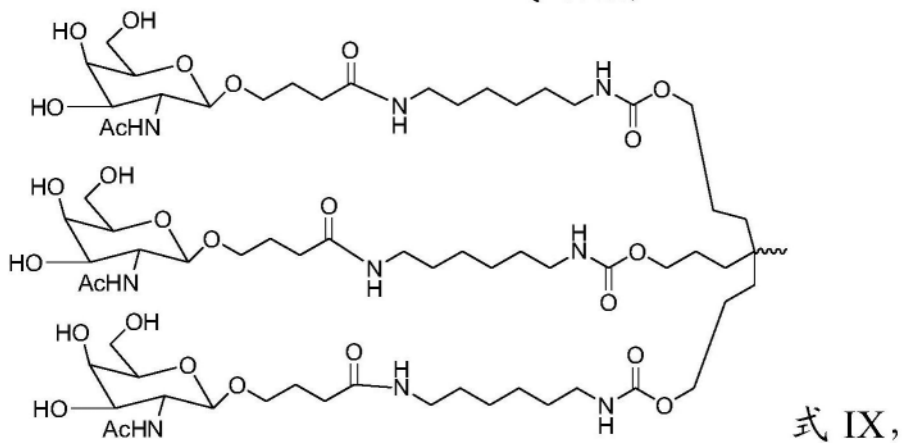
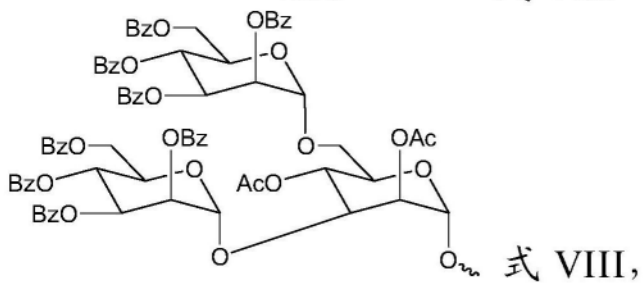


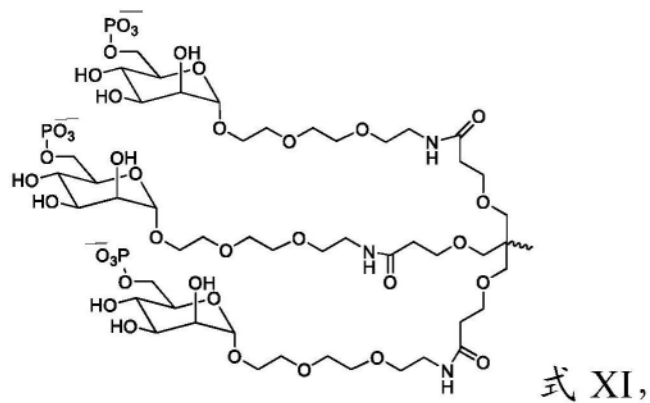
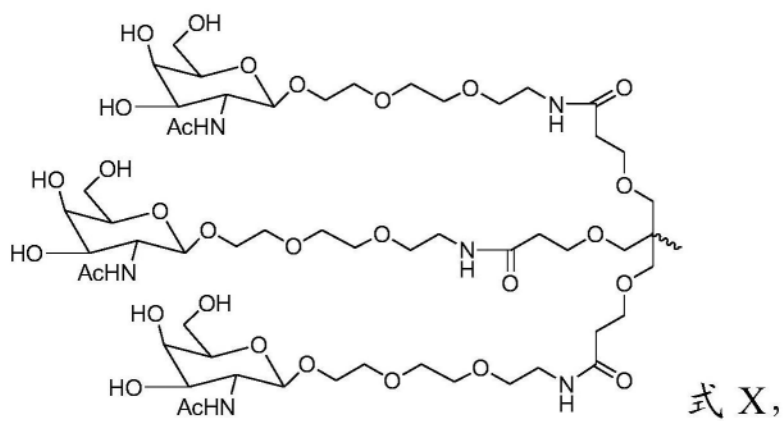
[0671]



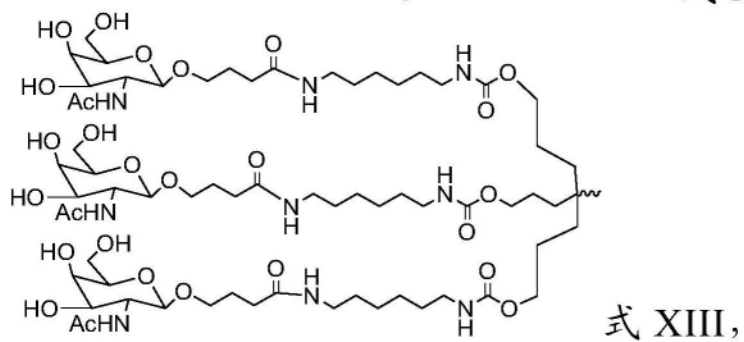
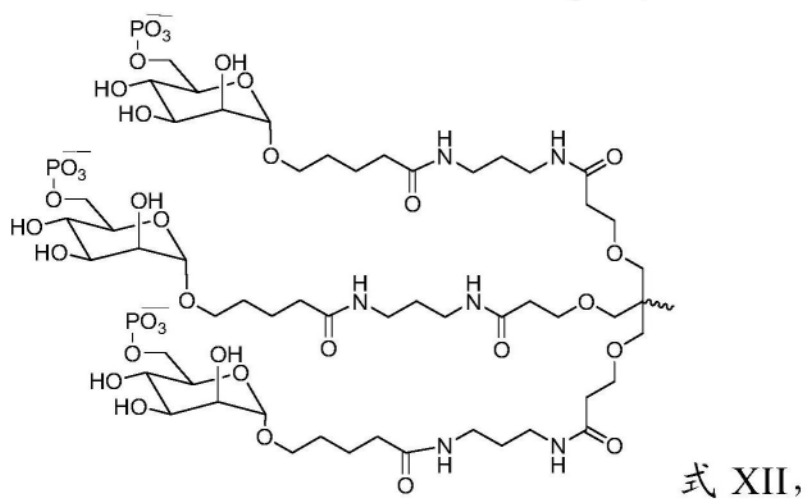


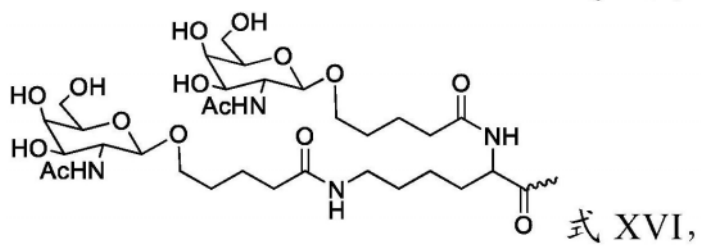
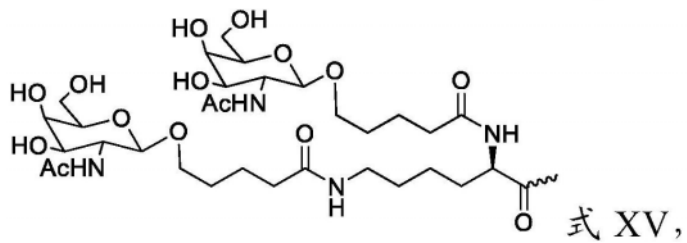
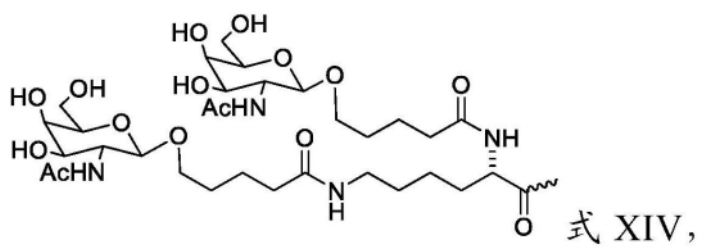
[0672]



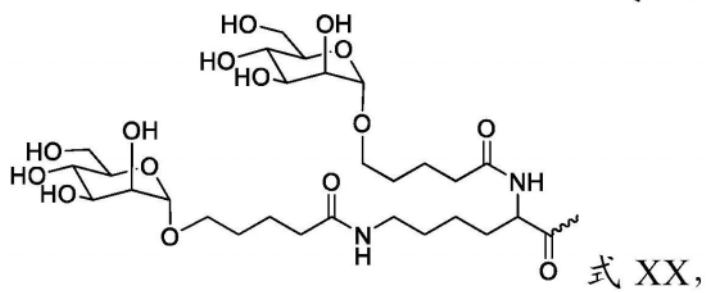
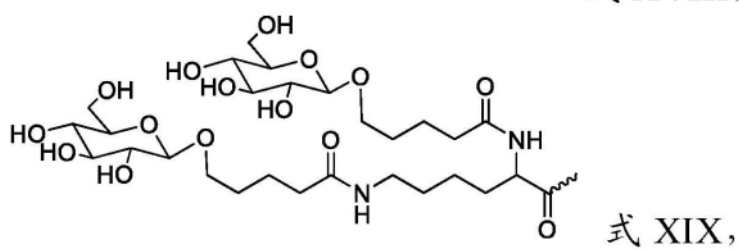
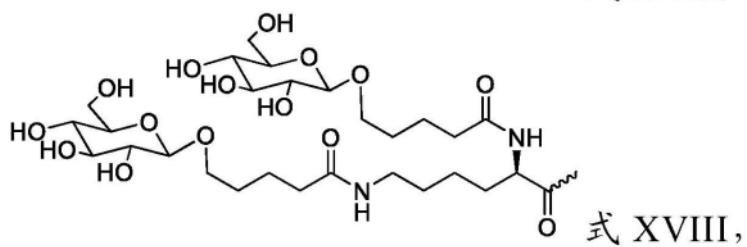
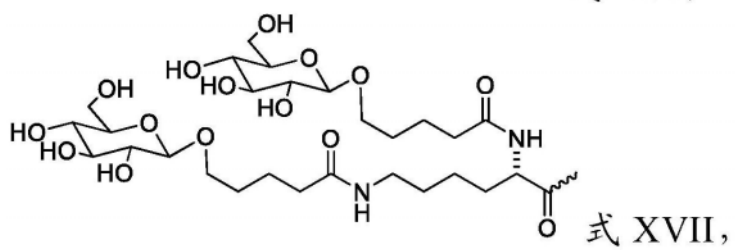


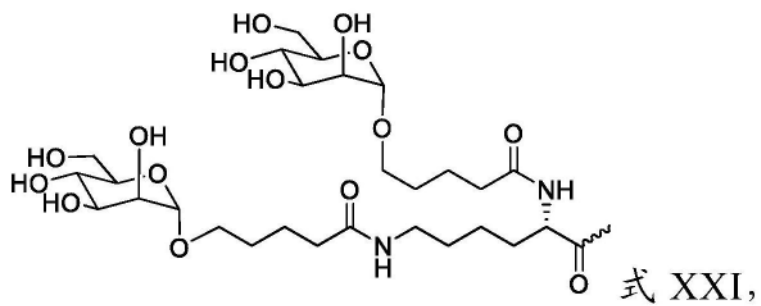
[0673]



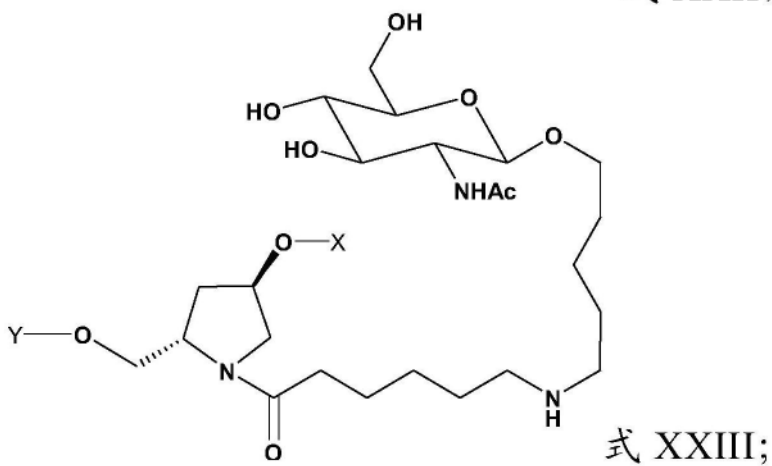
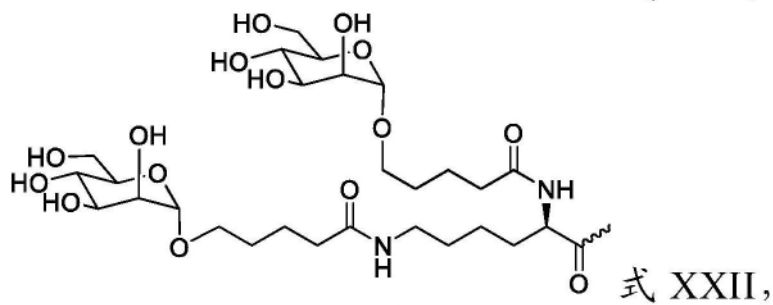


[0674]

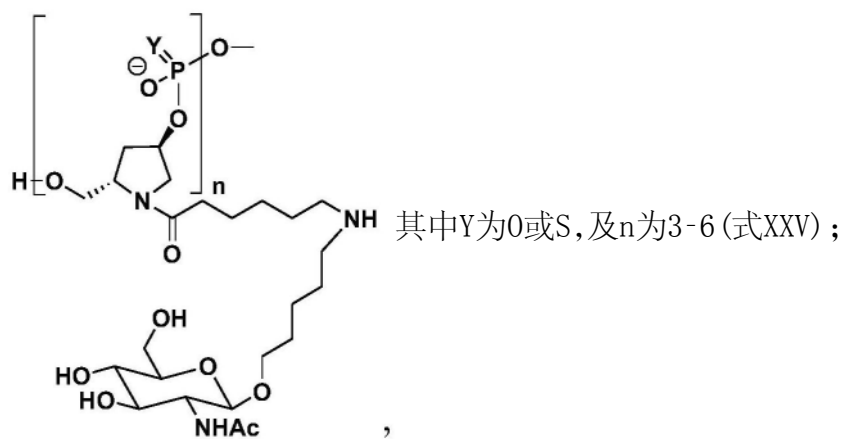
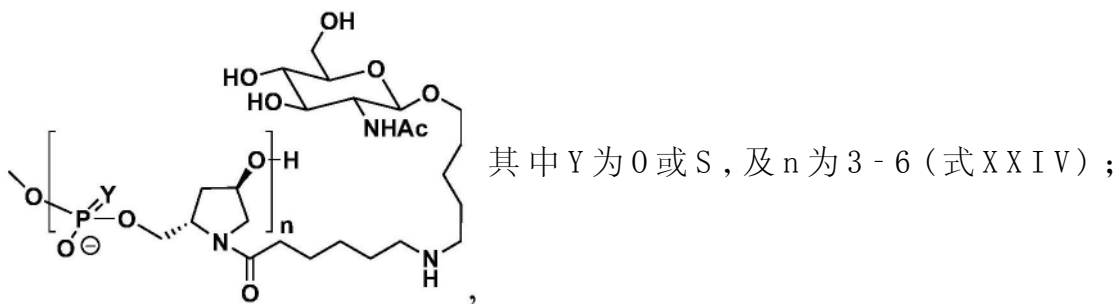




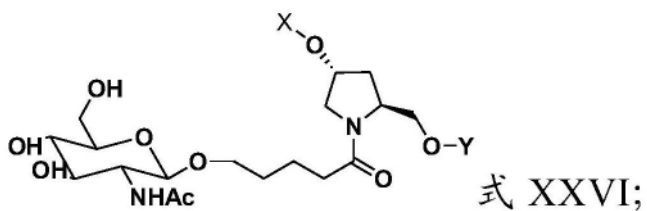
[0675]



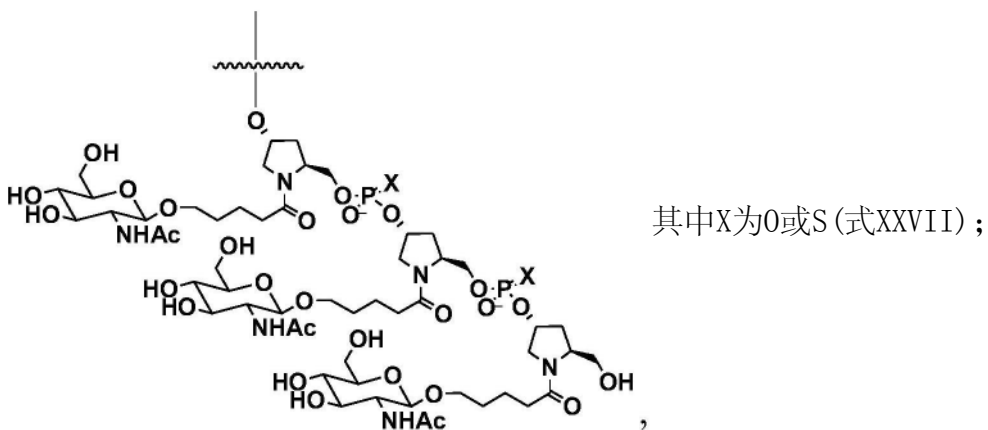
[0676]



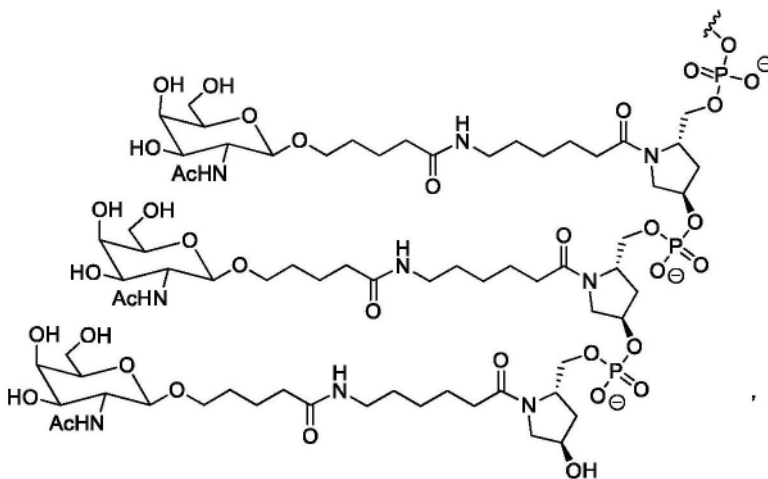
[0677]



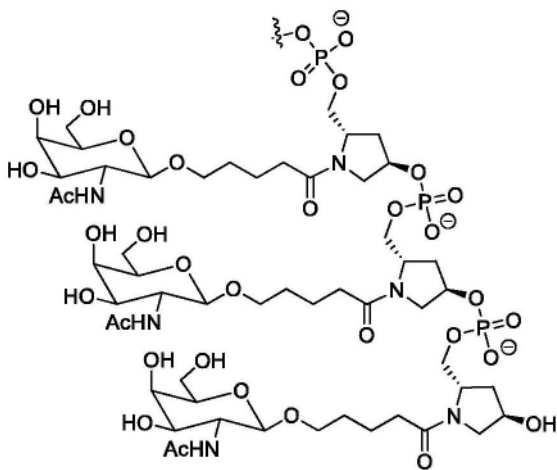
[0678]



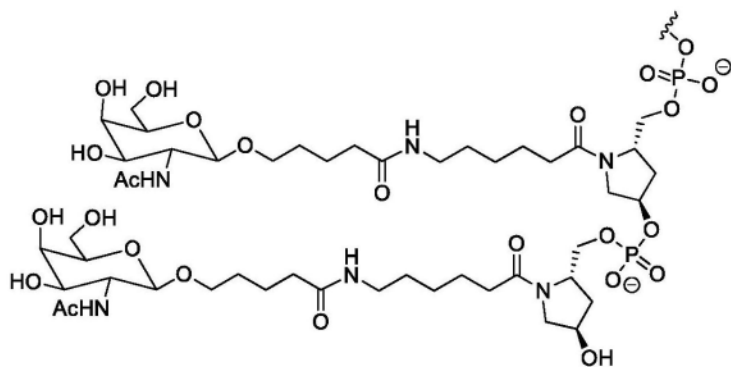
[0679]



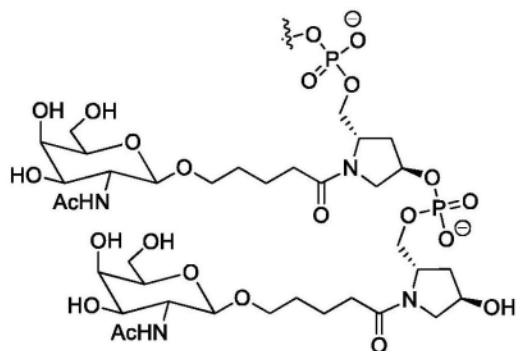
[0680]



式 XXVII; 式 XXIX;

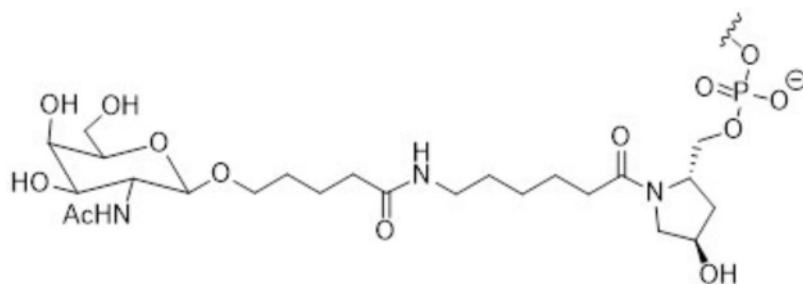


[0681]



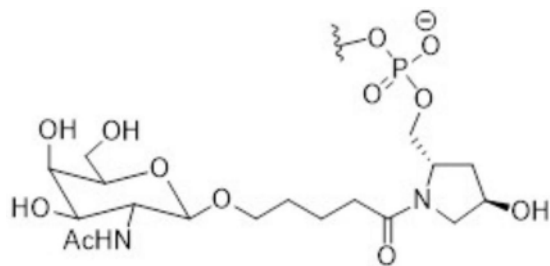
式 XXX; 式 XXXI;

[0682]



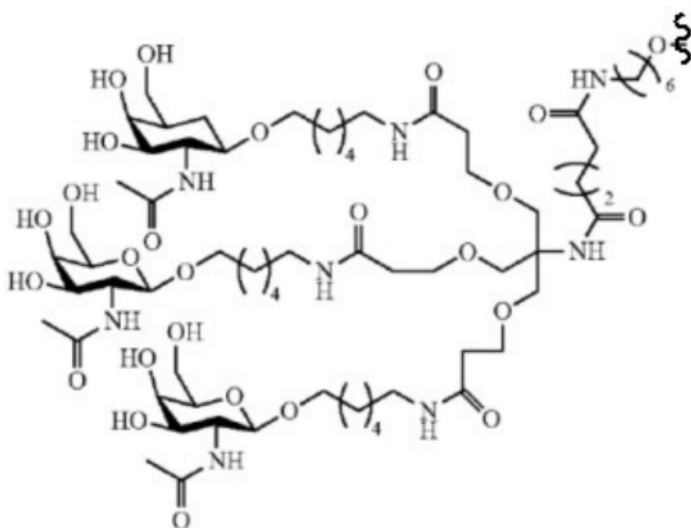
及

[0683]



式 XXXII; 式 XXXIII。

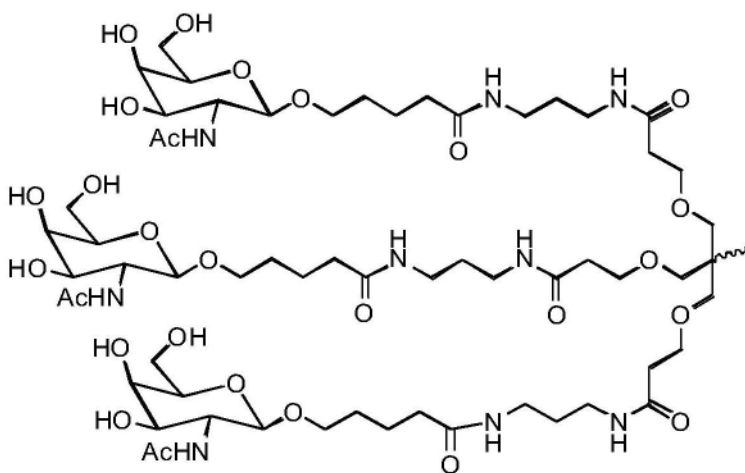
[0684]



式 XXXIV。

[0685] 在另一个实施方式中,本发明组合物和方法所使用的碳水化合物缀合物为单糖。在一个实施方式中,该单糖为N-乙酰基半乳糖胺,如:

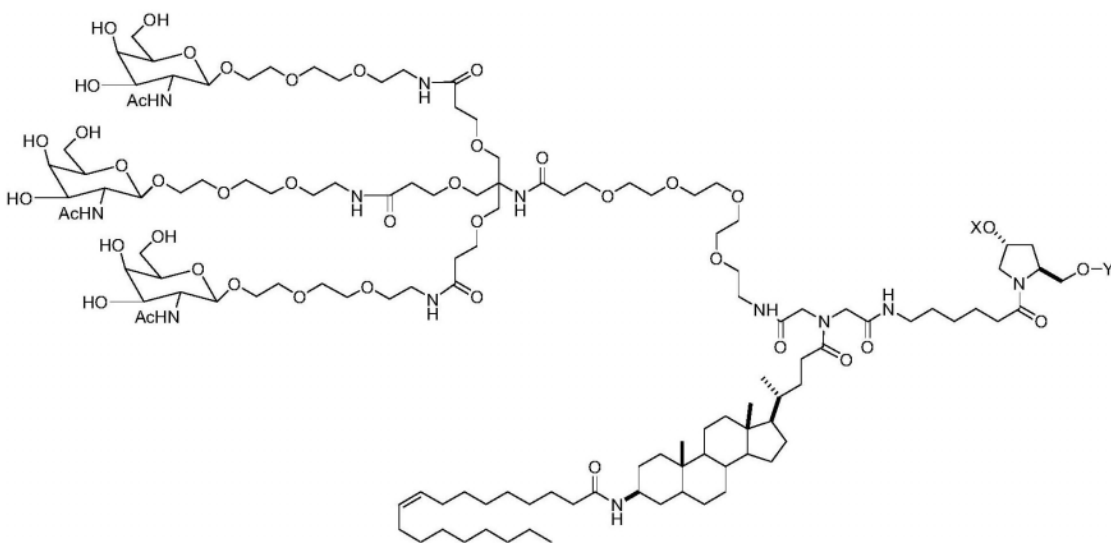
[0686]



式 II。

[0687] 用于本文所述实施方式的另一种代表性碳水化合物缀合物包括(但不限于):

[0688]



(式 XXXVI),

[0689] 当X或Y之一为寡核苷酸时,另一个为氢。

[0690] 在本发明的某些实施方式中, GalNAc或GalNAc衍生物经由单价接头附接于本发明的iRNA剂。在一些实施方式中, GalNAc或GalNAc衍生物经由二价接头附接于本发明的iRNA剂。在本发明的另一个实施方式中, GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头附接于本发明的iRNA剂。

[0691] 在一个实施方式中, 本发明的双链RNAi剂包含附接于iRNA的一个GalNAc或GalNAc衍生物, 例如, dsRNA剂的正义链5'端或本文所述双重靶向RNAi剂的一个或两个正义链的5'端。在另一个实施方式中, 本发明的双链RNAi剂包含多个(例如, 2、3、4、5或6个)GalNAc或GalNAc衍生物, 每一个独立地经由多个单价接头附接于双链RNAi剂的多个核苷酸。

[0692] 在一些实施方式中, 例如, 当本发明的iRNA剂的两条链为利用其中一条链的3'-端与另一条链的5'-端之间的未中断核苷酸链连接形成包含多个未配对的核苷酸的发夹环的一个较大分子的部分时, 发夹环内的每一个未配对的核苷酸可以独立地包含经由单价接头附接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0693] 在一些实施方式中, 碳水化合物缀合物进一步包含一个或多个如上所述的配体, 如但不限于, PK调节剂或细胞渗透肽。

[0694] 适用于本发明的其他碳水化合物缀合物和接头包括那些说明于PCT公开号W0 2014/179620和W0 2014/179627中的, 其完整内容分别以引用方式并入本文中。

[0695] D. 接头

[0696] 在一些实施方式中, 本文所述的缀合物或配体可利用可以切割或不可切割的各种不同接头附接于iRNA寡核苷酸。

[0697] 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, 例如, 共价附接化合物的两个部分。接头通常包含直接键结或者原子(如氧或硫)、单元(如NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH或原子链), 如(但不限于): 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、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、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通过O、S、S(O)、SO₂、N(R₈)、C(O)、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、或取代或未取代的杂环中断或封端; 其中R₈为氢、酰基、脂族或取代的脂族。在一个实施方式中, 接头为约1-24个原子, 2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18、7-17、8-17、6-16、7-17或8-16个原子。

[0698] 可切割的连接基团为在细胞外足够稳定的基团, 但其在进入靶细胞内时被切割以释放被接头保持在一起的两个部分。在优选的实施方式中, 可切割的连接基团在靶细胞中或在第一参考条件(其可例如选择为模拟或代表细胞内条件)下切割比在受试者血液中或在第二参考条件(其可例如选择为模拟或代表血液或血清中存在的条件)至少快约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多倍, 或至少快约100倍。

[0699] 可切割的连接基团对切割剂易感,例如,pH、氧化还原电位或降解性分子的存在。通常,切割剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或以更高含量或活性存在。这类降解剂的实例包括:针对特定底物选择的或没有底物特异性的氧化还原试剂,包括例如,存在于细胞中的氧化性或还原性酶或还原剂,如硫醇类,其可通过还原作用降解氧化还原可切割的连接基团;酯酶;核内体或可产生酸性环境的试剂,例如,造成pH 5或更低的那些试剂;可以作为一般酸发挥作用而水解或降解酸可切割的连接基团的酶、肽酶(其可为底物特异性的)和磷酸酶。

[0700] 可切割的接合基团(如二硫键)可对pH敏感。人类血清的pH为7.4,而平均细胞内pH稍低,在约7.1-7.3的范围内。核内体具有更酸性的pH,在5.5-6.0的范围内,且溶酶体具有甚至更酸性的约5.0的pH。有些接头具有可切割的连接基团,其在优选pH下切割,从而在细胞内从配体释放阳离子脂质,或进入所需的细胞隔室中。

[0701] 接头可包括可被特定酶切割的可切割连接基团。并入接头中的可切割连接基团的类型可取决于所靶向的细胞。例如,肝靶向的配体可通过包括酯基的接头连接阳离子脂质。肝细胞富含酯酶,因此该接头在肝细胞中的切割效率高于在不富含酯酶的细胞类型中的效率。其他富含酯酶的细胞类型包括肺、肾皮质和睾丸的细胞。

[0702] 当靶向富含肽酶的细胞类型(如肝细胞和滑液细胞)时,可使用包含肽键的接头。

[0703] 通常,可通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评估候选可切割连接基团的适用性。还需要也测试候选可切割连接基团在血液中或当与其他非靶组织接触时抗切割的能力。因此,可以决定第一和第二条件之间对切割的相对易感性,其中选择第一条件为指示靶细胞中的切割,和选择第二条件为指示其他组织或生物液体(例如,血液或血清)中的切割。该评估可在无细胞系统、细胞、细胞培养物、器官或组织培养物或完整动物体中进行。其可用于在无细胞或培养条件下进行初始评估,和通过在完整动物体内进一步评估来确认。在优选的实施方式中,适用的候选化合物在细胞中(或在选择模拟细胞内条件的体外条件下)切割比在血液或血清中(或在选择模拟细胞外条件的体外条件下)快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。

[0704] i. 氧化还原可切割连接基团

[0705] 在某些实施方式中,可切割连接基团为在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连接基团。还原可切割连接基团的实例为二硫化物连接基团(-S-S-)。可参见本文所述的方法来确定候选可切割连接基团是否为合适的“还原可切割连接基团”,或例如,是否适用于特定iRNA部分和特定靶向剂。例如,可通过与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂一起孵育,使用本领域已知的模拟细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率的试剂来评估候选物。候选物也可在选择为模拟血液或血清的条件下评估。在一个实例中,候选化合物在血液中至多切割约10%。其他实施方式中,适用的候选化合物在细胞中(或在选择模拟细胞内条件的体外条件下)切割比在血液中(或在选择模拟细胞外条件的体外条件下)快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。候选化合物的切割速率可采用标准酶动力学分析法在选择为模拟细胞内介质条件下测定,并与选择为模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0706] ii. 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0707] 其他实施方式中,可切割接头包含基于磷酸酯的可切割连接基团。基于磷酸酯的可切割连接基团被降解或水解磷酸酯基的试剂切割。在细胞中切割磷酸酯基的试剂的实例

为酶,如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为-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-。优选的实施方式为-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-和-O-P(S)(H)-S-。优选的实施方式为-O-P(O)(OH)-O-。这些候选物可采用类似上述的方法评估。

[0708] iii. 酸可切割连接基团

[0709] 在其他实施方式中,可切割接头包含酸可切割连接基团。酸可切割连接基团为在酸性条件下切割的连接基团。在优选的实施方式中,酸可切割连接基团在pH约6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境下切割,或通过如同一般酸发挥作用的试剂(如酶)切割。在细胞中,特定的低pH细胞器(如核内体和溶酶体)可提供用于酸可切割连接基团的切割环境。酸可切割连接基团的实例包括(但不限于)腈类、酯类和氨基酸的酯。酸可切割基团可具有通式-C=NN-、C(O)O-或-OC(O)-。优选的实施方式是当附接酯的氧(烷氧基)的碳为芳基、取代的烷基或三级烷基(如二甲基戊基或叔丁基)时。这些候选物可采用类似上述那些的方法评估。

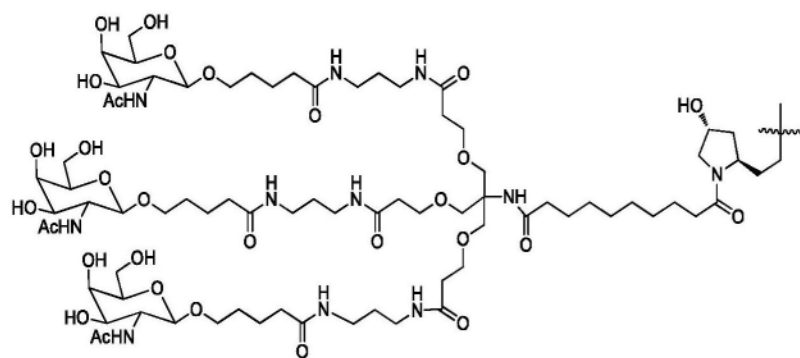
[0710] iv. 基于酯的连接基团

[0711] 在其他实施方式中,可切割接头包含基于酯的可切割连接基团。基于酯的可切割连接基团被细胞中的酶如酯酶和酰胺酶切割。基于酯的可切割连接基团的实例包括(但不限于):亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可切割连接基团具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。这些候选物可采用类似上述那些的方法评估。

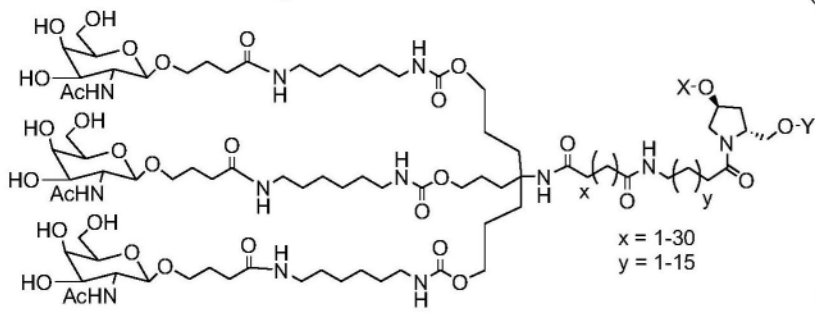
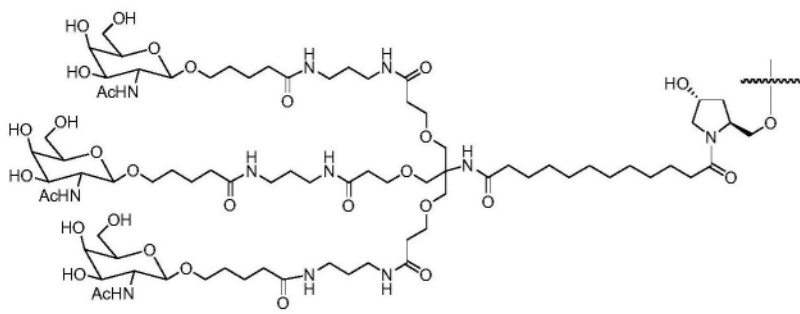
[0712] v. 基于肽的切割基团

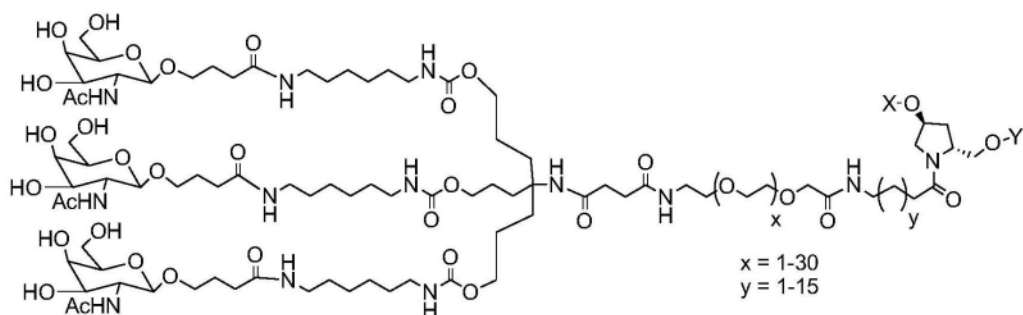
[0713] 在再其他的实施方式中,可切割接头包含基于肽的可切割连接基团。基于肽的可切割连接基团可被细胞中酶如肽酶和蛋白酶切割。基于肽的可切割连接基团为在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包括酰氨基(-C(O)NH-)。酰氨基可在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键为在氨基酸之间形成以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于在氨基酸之间形成而产生肽和蛋白质的肽键(即酰胺键),且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有通式-NHCH(RA)C(O)NHCH(RB)C(O)-,其中RA与RB为两个相邻氨基酸的R基团。这些候选物可采用类似上述那些的方法评估。

[0714] 在一些实施方式中,本发明的iRNA经由接头缀合于碳水化合物。具有本发明组合物和方法的接头的iRNA碳水化合物缀合物的非限制实例包括(但不限于):

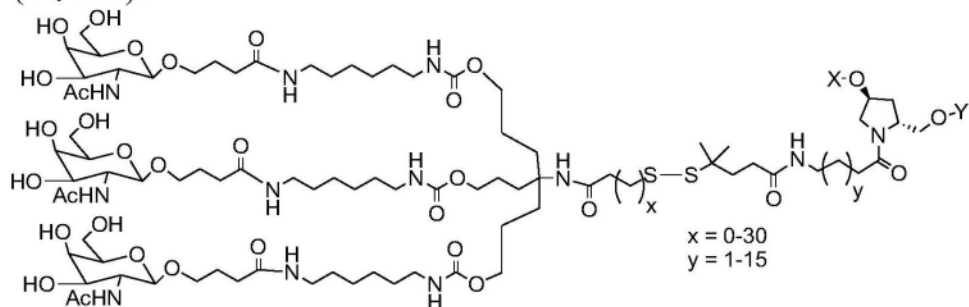


[0715]

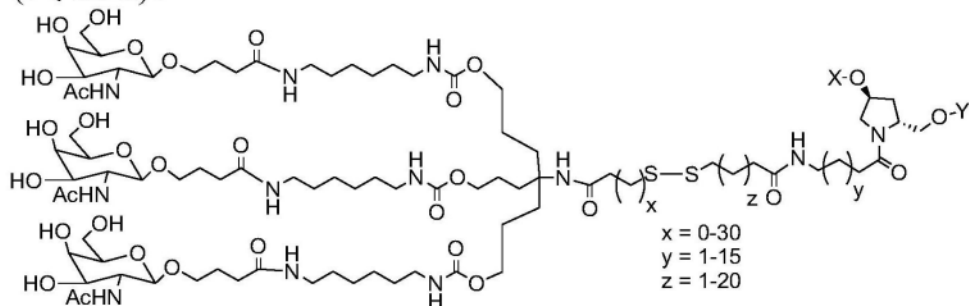




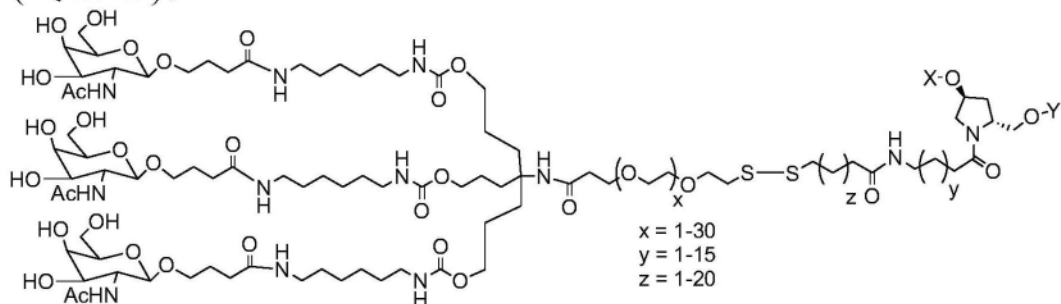
(式 XL),



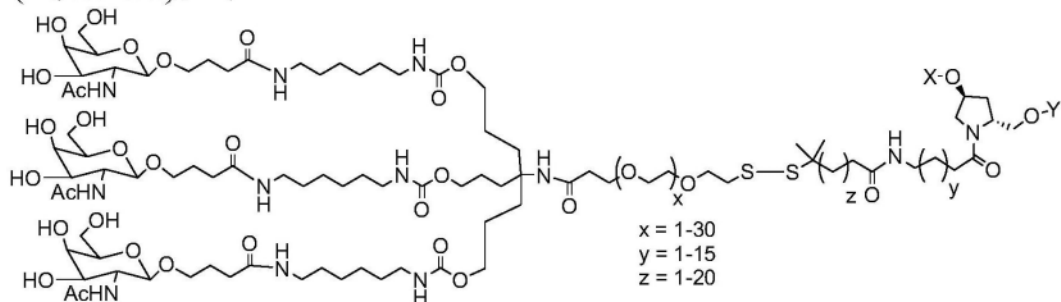
(式 XLII),



(式 XLIII),



(式 XLIII), 和



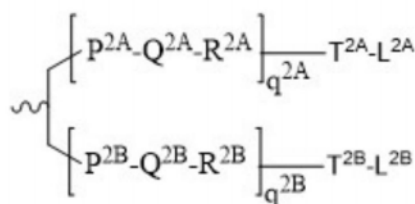
[0717] (式 XLIV), 当X或Y之一为寡核苷酸时, 另一个为氢。

[0718] 在本发明组合物和方法的某些实施方式中, 配体是经由二价或三价的分支接头附

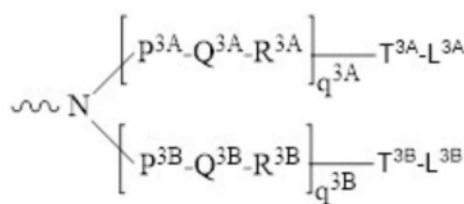
接的一个或多个“GalNAc” (N-乙酰基半乳糖胺) 衍生物。

[0719] 在一个实施方式中, 本发明的dsRNA缀合于二价或三价的分支接头, 其选自式 (XLV) - (XLVI) 中任一所示结构:

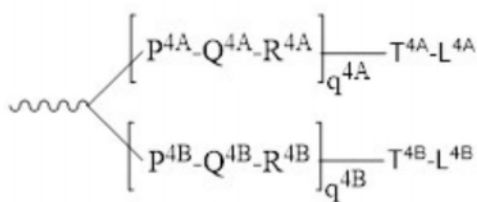
式 XXXXV



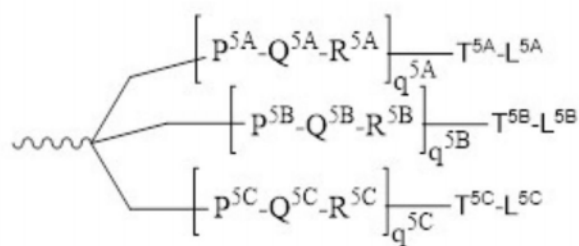
式 XLVI



[0720]



式 XLVII



式 XLVIII

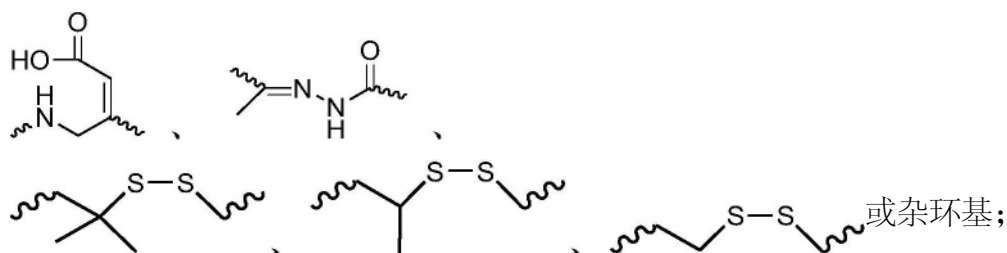
[0721] 其中:

[0722] $\text{q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{q}^{5\text{B}}$ 和 $\text{q}^{5\text{C}}$ 每次出现时独立地代表0至20, 且其中重复单元可相同或不同;

[0723] $\text{P}^{2\text{A}}$ 、 $\text{P}^{2\text{B}}$ 、 $\text{P}^{3\text{A}}$ 、 $\text{P}^{3\text{B}}$ 、 $\text{P}^{4\text{A}}$ 、 $\text{P}^{4\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{A}}$ 、 $\text{P}^{5\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{C}}$ 、 $\text{T}^{2\text{A}}$ 、 $\text{T}^{2\text{B}}$ 、 $\text{T}^{3\text{A}}$ 、 $\text{T}^{3\text{B}}$ 、 $\text{T}^{4\text{A}}$ 、 $\text{T}^{4\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{A}}$ 、 $\text{T}^{5\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{C}}$ 每次出现时各自独立地为不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 CH_2 、 CH_2NH 或 CH_2O ;

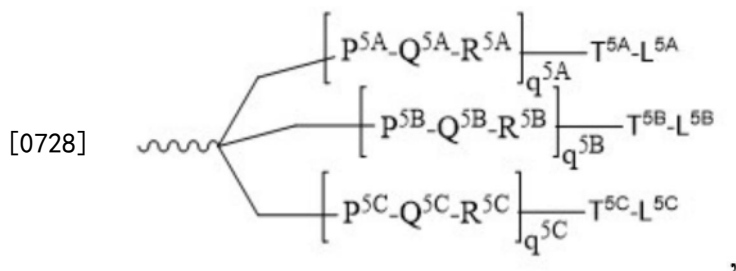
[0724] $\text{Q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{C}}$ 每次出现时独立地为不存在、亚烷基、取代的亚烷基, 其中一个或多个亚甲基可通过O、S、S(O)、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}\equiv\text{C}$ 或 $\text{C}(\text{O})$ 中的一个或多个中断或封端;

[0725] $\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ 每次出现时各自独立地为不存在、NH、O、S、 CH_2 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、CO、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、



[0726] $\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 及 $\text{L}^{5\text{C}}$ 代表配体; 即每次出现时各自独立地为单糖 (如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖; 及 R^{a} 为H或氨基酸侧链。三价缀合GalNAc衍生物特别适合用于RNAi剂来抑制靶基因的表达, 如式 (XLIX) 的那些:

[0727] 式 XLIX



[0729] 其中 L^{5A} 、 L^{5B} 及 L^{5C} 代表单糖,如GalNAc衍生物。

[0730] 合适的二价和三价分支连接基团缀合GalNAc衍生物的实例包括(但不限于)如上式II、VII、XI、X和XIII所述的结构。

[0731] 教导RNA缀合物制备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;5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;及8,106,022,其完整内容分别以引用的方式并入本文中。

[0732] 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。

[0733] 本发明的情况中,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”为包含两个或更多个化学上不同的区域的iRNA化合物,优选dsRNAi剂,各区域由至少一个单体单元组成,即dsRNA化合物的情况中的核苷酸。这些iRNA通常包含至少一个其中RNA系经修饰以赋予iRNA提高的对核酸酶降解的抗性、提高的细胞摄取或提高的对靶核酸的结合亲和力的区域。iRNA的另外的区域可用作能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂合体的酶的底物。例如,RNase H为细胞内切核酸酶,其切割RNA:DNA双链体的RNA链。因此RNase H活化导致切割RNA靶,从而大幅增强iRNA抑制基因表达的效力。结果,相比于与相同靶区域杂交的硫代磷酸酯脱氧dsRNA,当采用嵌合dsRNA时,通常采用较短的iRNA得到相当的结果。RNA靶的切割可常规地通过凝胶电泳,且若必要时,本领域已知的相关核酸杂交技术检测。

[0734] 在某些情况中,iRNA的RNA可通过非配体基团修饰。多种非配体分子与iRNA缀合以增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,且进行这类缀合的程序可从科学文献中取得。这类非配体部分包括脂质部分,如胆固醇(Kubo,T.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,365(1):54-61;Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553)、胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765)、硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂族链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO

J., 1991, 10:111; Kabanov等人, FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk等人, Biochimie, 1993, 75:49)、磷脂, 例如, 二-十六碳烷基-消旋-甘油或1,2-二-0-十六碳烷基-消旋-甘油基-3-H-磷酸三乙基铵 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、多胺或聚乙二醇链 (Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969) 或金刚烷乙酸 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、棕榈基部分 (Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229) 或十八烷基胺或己氨基-羧基氧胆固醇部分 (Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)。教导这类RNA缀合物制备的代表性美国专利已如上述。典型缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置带有氨基接头的RNA。氨基然后采用适当偶联或活化试剂与准备缀合的分子反应。缀合反应可在RNA仍结合在固体支持物上进行或可在切割RNA后、在溶液相中进行。通常通过HPLC法纯化RNA缀合物产生纯缀合物。

[0735] IV. 本发明的iRNA的递送

[0736] 可采用许多不同方式递送本发明的iRNA至细胞, 例如, 受试者, 如人类受试者 (例如, 有此需要的受试者, 如容易患或诊断为患有AGT相关障碍 (例如, 高血压) 的受试者) 中的细胞。例如, 可通过使细胞与本发明的iRNA在体外或体内接触来进行递送。也可通过施用包含iRNA (例如, dsRNA) 的组合物给受试者直接耗体内递送。或者, 可通过施用编码并指导iRNA表达的一个或多个载体间接进行体内递送。这结替代方式更进一步于下文中说明。

[0737] 一般, 任何递送核酸分子的方法 (体外或体内) 可适应本发明的iRNA (参见例如, Akhtar S. 和 Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 及 W094/02595, 其完整内容以引用的方式并入本文中)。对于体内递送, 为递送iRNA分子要考虑的因素包括例如, 所递送分子的生物稳定性、预防非特异性效应及所递送分子在靶组织中的累积。RNA干扰也显示通过直接注射法成功局部递送至CNS (Dorn, G. 等人 (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH. 等人 (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H. 等人 (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT. 等人 (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER. 等人 (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y. 等人 (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602)。RNA或药用载体的修饰也可以允许将iRNA靶向靶组织, 并避免不期望的脱靶效应。iRNA分子可通过化学缀合于亲脂性基团 (如胆固醇) 进行修饰以增强细胞摄取并防止降解。例如, 与亲脂性胆固醇部分缀合的针对ApoB的iRNA系统注射至小鼠中, 并导致肝和空肠中apoB mRNA的敲减 (Soutschek, J. 等人 (2004) Nature 432:173-178)。

[0738] 在替代的实施方式中, 可使用药物递送系统 (如纳米颗粒、树状聚合物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统) 递送iRNA。带正电价的阳离子递送系统促进iRNA分子 (带负电) 的结合, 且也增强在带负电的细胞膜上的相互作用以允许细胞有效摄取iRNA。阳离子脂质、树状聚合物或聚合物可与iRNA结合或诱导形成包裹iRNA的囊泡或胶束 (参见例如, Kim SH. 等人 (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。囊泡或胶束形成进一步防止全身施用iRNA的降解。制备和施用阳离子-iRNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内 (参见例如, Sorensen, DR. 等人 (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, UN. 等人 (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS. 等人 (2007) J. Hypertens. 25:197-205, 其完整内容以引用的方式并入本文中)。适用于全身性递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP (Sorensen, DR. 等人 (2003), 同上; Verma, UN. 等人 (2003), 同上)、“固

体核酸脂质颗粒”(Zimmermann,TS.等人(2006)Nature 441:111-114)、心磷脂(Chien,PY等人(2005)Cancer Gene Ther.12:321-328;Pal,A等人(2005)Int J.Oncol.26:1087-1091)、聚乙烯亚胺(Bonnet ME.等人(2008)Pharm.Res.8月16日电子出版;Aigner,A.(2006)J.Biomed.Biotechnol.71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu,S.(2006)Mol.Pharm.3:472-487)和聚酰氨胺(Tomalia,DA等人(2007)Biochem.Soc.Trans.35:61-67;Yoo,H.等人(1999)Pharm.Res.16:1799-1804)。在一些实施方式中,iRNA与环糊精形成复合物用于全身性施用。iRNA环糊精的施用方法和药物组合物可参见美国专利号7,427,605,其全文以引用的方式并入本文中。

[0739] A. 编码本发明的iRNA的载体

[0740] 靶向AGT基因的iRNA可由插入DNA或RNA载体中的转录单元表达(参见例如,Couture,A.等人,TIG.(1996),12:5-10;Skillern,A.等人的国际PCT公开号WO 00/22113;Conrad的国际PCT公开号WO 00/22114;及Conrad的美国专利号6,054,299)。表达可为瞬时的(大约数小时至数周)或持续的(数周至数月或更久),取决于采用的特定构建体和靶组织或细胞类型。这些转基因可作为线性构建体、环状质体或病毒载体引主,其可为整合或非整合载体。转基因也可构建以允许其作为染色体外质体遗传(Gassmann等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1995)92:1292)。

[0741] 可用于本文所述方法和组合物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、莫洛尼氏鼠白血病病毒等;(c)腺相关病毒载体;(d)单纯疱疹病毒载体;(e)SV 40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头状瘤病毒载体;(h)微小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体,如正痘病毒,例如,牛痘病毒载体,或禽痘病毒,例如,金丝雀痘或鸡痘病毒;和(j)辅助病毒依赖性(helper-dependent)或无肠(gutless)腺病毒。复制缺陷病毒也可能是有利的。不同载体会或不会整合到细胞基因组中。需要时,构建体可包括用于转染的病毒序列。或者,构建体可并入能够进行游离型复制的载体中,例如,EPV和EBV载体。用于重组表达iRNA的构建体通常需要调控元件,例如,启动子、增强子等,以确保iRNA于靶细胞中表达。对于载体和构建体考虑的其他方面是本领域已知的。

[0742] V. 本发明的药物组合物

[0743] 本发明也包括包含本发明的iRNA的药物组合物和制剂。在一个实施方式中,本文提供包含本文所述的iRNA和药学上可接受的载体的药物组合物。包含iRNA的药物组合物可用于预防或治疗AGT相关障碍,例如,高血压。这类药物组合物依据递送模式配制。一个实例为配制用于以肠胃外递送全身性施用的组合物,例如,皮下(SC)、肌内(IM)或静脉内(IV)递送。本发明的药物组合物可以足以抑制AGT基因表达的剂量施用。

[0744] 本发明的药物组合物可以足以抑制AGT基因表达的剂量施用。通常,本发明的iRNA的合适剂量在每天每千克接受者体重约0.001至约200.0毫克的范围内,通常在每天每千克体重约1至50mg的范围内。通常,本发明的iRNA的合适剂量在约0.1mg/kg至约5.0mg/kg的范围内,优选约0.3mg/kg至约3.0mg/kg的范围内。重复剂量方案可包括规律地施用治疗量的iRNA,如每月、每3-6个月一次或每年一次。在某些实施方式中,iRNA约每个月一次至约每6个月一次施用。

[0745] 在初始治疗方案后,可以较低的频率施用治疗。可依据疾病严重性确定治疗持续

时间。

[0746] 在其他实施方式中,单一剂量的药物组合物可以为长效的,使得剂量以不超过1、2、3或4个月的间隔施用。在本发明的一些实施方式中,本发明的药物组合物的单一剂量约每月施用一次。在本发明的其他实施方式中,本发明药物组合物的单一剂量按季(即约每3个月)施用。在本发明的其他实施方式中,本发明药物组合物的单一剂量每年施用2次(即约每6个月一次)。

[0747] 本领域技术人员应理解,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和施用时间,包括(但不限于):受试者中存在的突变、之前的治疗、受试者的一般健康或年龄和存在的其他疾病。此外,按照需要以预防或治疗有效量的组合物治疗受试者可包括单次治疗或一系列治疗。

[0748] iRNA可以靶向特定组织(例如,肝细胞)的方式递送。

[0749] 本发明的药物组合物包括(但不限于)溶液、乳液和包含脂质体的制剂。这些组合物可由多种组分产生,包括(但不限于)预形成液体、自乳化固体和自乳化半固体。制剂包括靶向肝脏的那些。

[0750] 可以单位剂型方便地存在的本发明药物制剂可依据医药业公知的常规技术制备。这类技术包括将活性成分与药用载体或赋形剂结合的步骤。通常,制剂通过均匀且密切使活性成分和液体载体结合来制备。

[0751] A.另外的制剂

[0752] i.乳液

[0753] 本发明组合物可制备和配制成乳液。乳液通常为一种液体以直径通常超过0.1 μ m的液滴形式分散在另一种液体中的典型非均相系统(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.199; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 与 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 与 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第2册, p.335; Higuchi 等人, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p.301)。乳液通常为双相系统,其包含两个彼此密切混合和分散的不可混溶的液体相。一般地,乳液可为油包水(w/o)型或水包油(o/w)型种类。当水相细分成且分散为在大体积油相中的小液滴时,所得组合物称为油包水(w/o)乳液。或者,当油相呈小液滴均匀分布且分散在大体积的水相中时,所得组合物称为水包油性(o/w)乳液。除了分散相外,乳液可包含其他组分,且活性药物可作为溶液存在于水相、油相或单独相的本身中。需要时,乳液中也可存在药用赋形剂,如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药用乳液也可为由超过两个相组成的多相乳液,如例如,油包水包油(o/w/o)及水包油包水(w/o/w)乳液。这类复合制剂通常提供简单二元乳液没有的优点。其中o/w乳液的单个油滴包裹小水滴的多相乳液构成w/o/w乳液。同样地,由油滴包裹于在油连续相中稳定化的水滴中的系统提供o/w/o乳液。

[0754] 乳液特征在于很低或没有热力学稳定性。通常,乳液的分散相或不连续相良好

分散在外相或连续相中,并通过乳化剂或制剂的粘度的方式维持在此形式中。其他稳定乳液的方式利用可并入乳液的任一相中的乳化剂。乳化剂可广义地分为四类:合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和均匀分散的固体(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.199)。

[0755] 合成表面活性剂,也称为表面活性试剂,广泛用于乳液的制剂,且已于文献中综述(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.285; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第1册, p.199)。表面活性剂通常为两亲性的,且包含亲水性和疏水性部分。表面活性剂的亲水性对疏水性性质的比值称为亲水/亲脂平衡(HLB),且是在制剂制备时用于分类及选择表面活性剂的有价值的工具。表面活性剂可依据亲水性基团的性质分成不同种类:非离子性、阴离子性、阳离子性和两亲性(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.285)。

[0756] 多种不同的非乳化材料也可包括在乳液制剂中,且赋予乳液性质。这些包括脂肪、油类、蜡类、脂肪酸、脂肪醇类、脂肪酯类、保湿剂、亲水性胶体、防腐剂与抗氧化剂(Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.335; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.199)。

[0757] 乳液制剂通过皮肤、口和肠胃外途径的应用及其制造方法已有文献说明(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.199)。

[0758] ii. 微乳液

[0759] 在本发明的一个实施方式中, iRNA 与核酸的组合物配制成微乳液。微乳液可定义为水、油与两亲性物质的系统,其形成单一的光学上各向同性且热动力学稳定的液体溶液(参见例如,Ansel's Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1册, p.245)。通常微乳液为通过首先使油分散在水性表面活性剂溶液中和然后添加足量的第四组分(通常中链长醇类)以形成透明系统所形成的系统。因此,微乳液也描述为两种不混溶液体的动力学稳定的各向同性透明分散液,其通过表面活

性分子的界面膜稳定化 (Leung和Shah, Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate System, Rosoff, M, 编辑, 1989, VCH Publishers, New York, p.185-215)。

[0760] iii. 微粒

[0761] 本发明的iRNA可以并入颗粒, 例如, 微粒中。微粒可通过喷雾干燥产生, 但也可通过其他方法产生, 包括冷冻干燥、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这类技术的组合。

[0762] iv. 渗透增强剂

[0763] 在一个实施方式中, 本发明使用各种不同渗透增强剂以实现核酸 (特别地iRNA) 有效递送至动物皮肤。大多数药物在溶液中以离子化与非离子化两种形式存在。然而, 通常仅有脂溶性或亲脂性药物容易跨过细胞膜。已发现, 若要跨过的膜用渗透增强剂处理, 甚至非亲脂性药物可跨过细胞膜。除了协助非亲脂性药物跨细胞膜扩散外, 渗透增强剂也增强亲脂性药物的渗透性。

[0764] 渗透增强剂可分类为属于5大类之一, 即表面活性剂、脂肪酸类、胆汁盐类、螯合剂和非螯合性非表面活性剂 (参见例如, Malmsten, M. 的 Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee等人, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92)。上述各渗透增强剂种类及其用于制造药物组合物及药剂的递送的用途是本领域技术人员已知的。

[0765] v. 赋形剂

[0766] 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、悬浮剂或任何其他药学上惰性的媒介物。赋形剂可为液体或固体, 并考虑计划的施用方式进行选择, 以在与核酸及给定药物组合物中的其他组分组合时提供所需的体积、稠度等。这类试剂是本领域技术人员已知的。

[0767] vi. 其他组分

[0768] 本发明的组合物可另外以本领域上已建立的用量包含药物组合物中常规存在的其他辅助组分。因此例如, 组合物可包含另外的可相容的药物活性材料, 如例如, 止痒剂、收敛剂、局部麻醉药或抗炎剂, 或可包含可用于物理性配制本发明组合物的各种不同剂型的另外的材料, 如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而, 当添加时, 这类材料不应不当干扰本发明组合物的组分的生物活性。制剂可灭菌, 且如果需要, 与不会与制剂的核酸不利地相互作用的辅助剂混合, 例如, 润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、影响渗透压的盐类、缓冲剂、着色剂、调味剂或芳香物质等等。

[0769] 水性悬浮液可包含提高悬浮液粘度的物质, 包括例如, 羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液也可包含稳定剂。

[0770] 在一些实施方式中, 如本发明所述的药物组合物包括 (a) 一种或多种iRNA和 (b) 一种或多种通过非iRNA机制发挥功能且可用于治疗AGT相关障碍 (例如, 高血压) 的药剂。

[0771] 这类化合物的毒性与预防效力可通过标准药理学程序在细胞培养或实验动物中测定, 例如, 测定LD50 (对50%群体致死的剂量) 和ED50 (在50%群体中预防有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数, 且其以LD50/ED50比率表示。表现高治疗指数的化合物是优选的。

[0772] 可采用从细胞培养分析和动物研究得到的数据来配制用于人类的剂量范围。本文所述的组合物的剂量通常落在极低毒性或无毒性的包括ED50 (优选ED80或ED90) 的循环浓

度范围内。剂量可依所采用剂型及所利用的施用途在此范围内变化。对于本发明所述的方法中使用的任何化合物,预防有效剂量可初始从细胞培养分析估计。剂量可在动物模式中配制以实现化合物或(适当时)靶序列的多肽产物的循环血浆浓度(例如,实现降低的多肽浓度),其包括在细胞培养中确定的IC₅₀(即,实现症状的半最大抑制的测试化合物浓度)或更高抑制水平。这种信息可用于更精确地确定可用的人类剂量。可通过例如高效液相色谱测量血浆中的浓度。

[0773] 除了如上所述的施用外,本发明所述的iRNA可与其他已知用于预防或治疗AGT相关障碍(例如,高血压)的其他已知药剂组合施用。在任何情况下,施用医师可依据采用本领域已知或本文所述标准效力量度观察的结果来调整iRNA的施用量与时间。

[0774] VI. 用于抑制AGT表达的方法

[0775] 本发明也提供抑制细胞中AGT基因表达的方法。该方法包括使细胞与有效抑制细胞中的AGT表达的量的RNAi剂(例如,双链RNA剂)接触,从而抑制细胞中的AGT表达。

[0776] 细胞与iRNA(例如,双链RNA剂)可于体外或体内接触。iRNA在体内接触细胞包括使受试者(例如,人类受试者)内的细胞或细胞群与iRNA接触。也可能体外和体内接触细胞的方法的组合。如上所述,细胞接触可以是直接或间接的。此外,可通过靶向配体(包括本文所述或本领域已知的任何配体)完成细胞接触。在优选的实施方式中,该靶向配体为碳水化合物部分(例如,GalNAc₃配体)或任何其他指导RNAi剂到所需部位的配体。

[0777] 本文所用术语“抑制”可与“降低”、“沉默”、“下调”、“压制”及其他类似术语交换使用,且包括任何抑制水平。

[0778] 短语“抑制AGT表达”意指抑制任何AGT基因(如例如,小鼠AGT基因、大鼠AGT基因、猴AGT基因或人类AGT基因)及AGT基因的变体或突变体的表达。因此,在遗传操作的细胞、细胞群或生物体情况下,AGT基因可为野生型AGT基因、突变体AGT基因或转基因AGT基因。

[0779] “抑制AGT基因的表达”包括AGT基因的任何抑制水平,例如,至少部分抑制AGT基因的表达。AGT基因的表达可依据与AGT基因表达相关的任何变量的水平或水平变化来评价,例如,AGT mRNA水平或AGT蛋白水平。这一水平可在单个细胞中或细胞群中(包括例如,源自受试者的样品)中分析。应理解,AGT主要在肝脏表达,但也在脑、胆囊、心脏和肾脏中表达,且存在于循环中。

[0780] 可通过与AGT表达相关的一种或多种变量与对照水平比较的绝对或相对水平的下降来评价抑制。对照水平可为本领域上采用的任何类型的对照水平,例如,给药前基线水平或从未处理或接受对照(如例如,仅缓冲剂对照或无活性剂对照)处理的类似受试者、细胞或样本测得的水平。形状

[0781] 在本发明方法的一些实施方式中,AGT基因表达抑制至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%、或至分析检测水平以下。在优选的实施方式中,AGT基因表达抑制至少70%。还应了解,可能需要在某些组织(例如,肝脏)中抑制AGT表达而不会显著抑制在其他组织(例如,脑)中的表达。在优选的实施方式中,采用实例2提供的分析方法,使用10nM siRNA浓度,于物种匹配的适当细胞系中测定表达水平。

[0782] 在某些实施方式中,体内表达抑制通过在表达人类基因的啮齿类(例如,表达人类靶基因(即AGT)的感染AAV小鼠)人类基因的敲减测定,例如,在RNA表达最低时施用单剂3mg/kg时。也可测定模型动物系统中内源基因的表达敲减,例如,在RNA表达最低时施用单

一剂量的3mg/kg后。这类系统适用于当人类基因和模型动物基因的核酸序列充分接近使得人类iRNA提供模型动物基因的有效敲减时。采用实施例2提供的PCR方法测定肝中RNA表达。

[0783] AGT基因表达的抑制可通过其中AGT基因被转录且已处理(例如,通过一个或多个细胞与本发明的iRNA接触,或通过施用本发明的iRNA于其中存在该细胞的受试者)使得抑制AGT基因表达的第一细胞或细胞群(这类细胞可例如存在于源自受试者的样品中)表达的mRNA量与基本上与该第一细胞或细胞群相同但未如此处理的第二细胞或细胞群(未用iRNA处理或未用靶向目的基因的iRNA处理的对照细胞)相比的降低来表现。在优选的实施方式中,抑制通过实施例2提供的方法使用10nM siRNA浓度在物种匹配的细胞系中评价,并采用下列公式将处理细胞中的mRNA水平表示为对照细胞中mRNA水平的百分比:

$$\frac{(\text{对照细胞的 mRNA}) - (\text{处理细胞的 mRNA})}{(\text{对照细胞的 mRNA})} \times 100\%$$

[0785] 在其他实施方式中,AGT基因表达的抑制可通过功能上与AGT基因表达相关的参数的降低来评价,例如,受试者血液或血清中的AGT蛋白水平。AGT基因沉默可在任何表达AGT的细胞(内源性或来自表达构建体的外源性)中且通过本领域已知的任何分析法测定。

[0786] AGT蛋白质表达的抑制可由细胞或细胞群或受试者样品表达的AGT蛋白水平(例如,源自受试者的血液样品中的蛋白质水平)的降低来表现。如上所述,对于mRNA抑制的评价,处理细胞或细胞群的蛋白质表达水平的抑制可类似地表示为对照细胞或细胞群的蛋白质水平的百分比,或受试者样品(例如,血液或其衍生的血清)中的蛋白质水平的变化。

[0787] 可用于评价AGT基因抑制的对照组细胞、细胞群或受试者样品包括未与本发明RNAi剂接触的细胞、细胞群或受试者样品。例如,对照细胞、细胞群或受试者样品可源自于用RNAi剂治疗前的单个受试者(例如,人类或动物受试者)或适当匹配的群体对照。

[0788] 细胞或细胞群表达的AGT mRNA水平可采用本领域已知用于评价mRNA表达的任何方法测定。在一个实施方式中,样品中AGT表达水平通过检测转录的多核苷酸或其部分,例如,AGT基因的mRNA测定。RNA可采用RNA萃取技术,包括例如,使用酸性酚/胍异硫氰酸酯萃取(RNAzol B; Biogenesis) RNeasyTM RNA制备试剂盒(Qiagen®)或PAXgeneTM (PreAnalytixTM, Switzerland)从细胞提取。利用核糖核酸杂交的典型分析方式包括核连缀分析、RT-PCR、RNase保护分析法、RNA印迹、原位杂交和微阵列分析。

[0789] 在一些实施方式中,使用核酸探针测定AGT表达水平。本文所用术语“探针”指能够选择性结合特定AGT的任何分子。探针可由本领域技术人员合成,或衍生自适当的生物制剂。探针可特别设计为标记的。可用为探针的分子的实例包括(但不限于)RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0790] 分离的mRNA可用于杂交或扩增分析,其包括(但不限于)DNA或蛋白质印迹、聚合酶链反应(PCR)分析和探针阵列。用于测定mRNA水平的一种方法涉及将分离的mRNA与可与AGT mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。在一个实施方式中,mRNA固定在固体表面上并与探针接触,例如,通过在琼脂糖凝胶上运行分离的mRNA和将mRNA从凝胶转移至膜(如硝基纤维素)。在替代实施方式中,探针固定在固体表面上,且mRNA与探针接触,例如,在Affymetrix®基因芯片阵列上。本领域技术人员可以容易地采用已知的mRNA检测法来测定AGT mRNA水平。

[0791] 用于测定样品中AGT表达水平的替代方法涉及例如样品中mRNA的核酸扩增和/或逆转录酶(以制备cDNA)的过程,例如,通过RT-PCR(Mullis,1987,美国专利号4,683,202中示出的实验实施方式)、连接酶链反应(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自持续序列复制(Guatelli等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q- β 复制酶(Lizardi等人(1988)Bio/Technology 6:1197)、滚环复制(Lizardi等人,美国专利号5,854,033)或任何其他核酸扩增方法,然后采用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子存在量极低时,这些检测方案特别适用于检测这类核酸分子。在本发明的特别方面中,通过定量产荧光RT-PCR(即TaqMan™系统)测定AGT表达水平。在优选的实施方式中,通过实施例2提供的方法使用10nM siRNA浓度在物种匹配的细胞系中测定表达水平。

[0792] 可使用膜印迹(如用于杂交分析中,如蛋白质、DNA、斑点等等),或微孔、样品管、凝胶、珠粒或纤维(或任何包含结合的核酸的固体支持物)监测AGT mRNA的表达水平。参见美国专利号5,770,722、5,874,219、5,744,305、5,677,195和5,445,934,其以引用的方式并入本文中。测定AGT表达水平也可包括使用溶液中的核酸探针。

[0793] 在优选的实施方式中,使用分支DNA(bDNA)测定法或实时PCR(qPCR)分析mRNA表达水平。这些方法的使用于本文所示出的实施例中描述和举例说明。在优选的实施方式中,通过实施例2提供的方法使用10nM siRNA浓度在物种匹配的细胞系中测定表达水平。

[0794] 可采用本领域已知用于测定蛋白质水平的任何方法测定AGT蛋白质表达水平。这类方法包括例如,电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、高扩散性色谱、流体或凝胶沉淀素反应、吸收光谱分析、比色分析、分光光度分析、流式细胞分析、免疫扩散(单向或双向)、免疫电泳、蛋白质印迹、放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫荧光分析、电化学发光分析等等。

[0795] 在一些实施方式中,通过AGT mRNA或蛋白质水平(例如,肝脏活检中)的下降来评价本发明方法的效力。

[0796] 在本发明方法的一些实施方式中,对受试者施用iRNA,使得iRNA递送至受试者内的特定部位。可在源自受试者内特定部位(例如,肝脏或血液)的流体或组织的样品中AGT mRNA或AGT蛋白水平或变化的测量来评价AGT表达的抑制。

[0797] 本文所用术语检测或测定分析物水平理解为指进行测定物质(例如,蛋白质、RNA)是否存在的步骤。如本文所用的,检测或测定方法包括检测或测定低于所用方法的检测水平的分析物水平。

[0798] VII. 本发明的预防和治疗方法

[0799] 本发明也提供使用本发明的iRNA或包含本发明的iRNA的组合物来抑制AGT表达的方法,从而预防或治疗AGT相关障碍,例如,高的血压,例如,高血压。

[0800] 在本发明方法中,细胞可在体外或体内与siRNA接触,即细胞可在受试者内。

[0801] 适合使用本发明方法处理的细胞可为任何表达AGT基因的细胞,例如,肝脏细胞、脑细胞、胆囊细胞、心脏细胞或肾脏细胞,但优选为肝脏细胞。适合用于本发明方法的细胞可为哺乳动物细胞,例如,灵长类细胞(如人类细胞,包括嵌合非人类动物中的人类细胞、或非人类灵长类细胞,例如,猴细胞或黑猩猩细胞)或非灵长类细胞。在某些实施方式中,细胞为人类细胞,例如,人类肝脏细胞。在本发明方法中,细胞中的AGT表达抑制至少50、55、60、

65、70、75、80、85、90或95,或低于测定法的检测水平。

[0802] 本发明的体内方法可包括对受试者施用包含iRNA的组合物,其中该iRNA包括与接受施用RNAi剂的哺乳动物的AGT基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。组合物可采用本领域已知的任何方式施用,包括(但不限于):经口、腹膜内或肠胃外途径,包括颅内(例如,脑室内、脑实质内和鞘内)、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气雾剂)、经鼻、直肠和局部(包括颊内及舌下)施用。在某些实施方式中,组合物通过静脉内输注或注射施用。在某些实施方式中,组合物通过皮下注射施用。在某些实施方式中,该组合物通过肌内注射施用。

[0803] 在一个方面中,本发明还提供在哺乳动物中抑制AGT基因表达的方法。该方法包括对哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中AGT基因的dsRNA的组合物,并维持该哺乳动物足以达到降解AGT基因的mRNA转录物的一段时间,从而抑制细胞中的AGT基因表达。可采用本领域中已知的任何方法及本文中例如实施例2中描述的方法,例如,qRT-PCR,评价基因表达的降低。可通过本领域中已知的任何方法,例如,ELISA,评价蛋白质产生的降低。在某些实施方式中,穿刺肝脏活检样品用作监测AGT基因或蛋白质表达降低的组织材料。其他实施方式中,血液样品用作监测AGT蛋白质表达降低的受试者样品。

[0804] 本发明进一步提供在需要的受试者(例如,诊断为患有高血压的受试者)中治疗的方法。

[0805] 本发明进一步提供需要的受试者中的预防方法。本发明治疗方法包括以预防有效量的靶向AGT基因的iRNA或包含靶向AGT基因的iRNA的药物组合物对受试者(例如,受益于AGT表达降低的受试者)施用本发明的iRNA。

[0806] 本发明的iRNA可作为“游离iRNA”施用。游离iRNA是在没有药物组合物的存在下施用。裸iRNA可在合适缓冲液中。缓冲液可包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任何组合。在一个实施方式中,缓冲液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调整包含iRNA的缓冲液的pH和渗透压,以便适合施用于受试者。

[0807] 或者,本发明的iRNA可作为药物组合物施用,如dsRNA脂质体制剂。

[0808] 受益于AGT基因表达抑制的受试者为易患或诊断患高血压的受试者。

[0809] 在一个实施方式中,该方法包括施用本文所述的组合物,使得降低靶AGT基因表达,如每剂约1、2、3、4、5、6、1-6、1-3或3-6个月。在某些实施方式中,该组合物每3-6个月施用一次。

[0810] 优选地,可用于本文所述的方法和组合物的iRNA特异性靶向靶AGT基因的RNA(原始或加工的)。使用iRNA抑制这些基因表达的组合物及方法如本文所述制备和进行。

[0811] 根据本发明方法施用iRNA可以导致预防或治疗AGT相关障碍(例如,血压高),例如,高血压。各种不同类型高血压的诊断标准提供如下。

[0812] 可对受试者施用治疗有效量的iRNA,如约0.01mg/kg至约200mg/kg。

[0813] iRNA优选皮下施用,即皮下注射。可以采用一次或多次注射来递送所需剂量的iRNA给受试者。可以在一段时间内重复注射。

[0814] 施用可规律地重复。在某些实施方式中,在初始治疗方案后,以较少的频率施用治疗。重复剂量方案可包括规律地施用治疗量的iRNA,如每月一次至一年一次。在某些实施方式中,iRNA约每月一次至约每三个月一次施用,或约每三个月一次至约每六个月一次施用。

[0815] VIII. 高血压的诊断标准、风险因子和治疗

[0816] 最近预防及治疗高血压的操作指南已经修订。详细报告由RebouSSin等人 (Systematic Review for the 2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNAGuideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004.) 和Whelton等人 (2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006) 公开。下文提供新指南的一些重点。然而, 应理解该指南仅对本领域技术人员提供在本申请提出的时间点时相关高血压诊断和监测标准及治疗的知识, 且以引用的方式并入本文中。

[0817] A. 诊断标准

[0818] 虽然较高血压与心血管疾病风险升高之间一直存在有相关性, 但将血压水平分类以供临床及公共卫生决策是有用的。血压可以依据在医疗保健中测定的平均血压 (公订血压) 分类成4个水平: 正常、升高和1或2期高血压, 如下表所示 (来自Whelton等人, 2017)。

[0819]	血压分类	收缩压		舒张压
	正常	<120 mm Hg	和	<80 mm Hg
	升高	120-129 mm Hg	和	<80 mm Hg
	高血压*			
	1 期	130-139 mm Hg	或	80-89 mm Hg
	2 期	≥140 mm Hg	或	≥ 90 mm Hg

[0820] *具有2个分类的收缩压和舒张压的个体应诊断为较高血压分类。

[0821] 血压指示基于在≥2个场景获得的≥2个细心读数的平均的血压。获得小心血压读数的最佳操作详细说明于Whelton等人, 2017中, 且是本领域已知的。

[0822] 此分类法不同于之前JNC 7报告 (Chobanian等人; the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003; 42: 1206-52) 中推荐的, 1期高血压现在定义为收缩压 (SBP) 130-139或舒张压 (DBP) 80-89mmHg, 且该文献中2期高血压对应于JNC 7报告中的1和2期。此分类法的原理依据有关于SBP/DBP与心血管疾病风险之间相关性的观察数据、为较低血压的生活模式改变的随机化临床试验和为预防心血管疾病使用抗高血压药物治疗的随机化临床试验。

[0823] 在患2期高血压的成人中确立升高的心血管疾病风险。越来越多个体试验及观察数据的荟萃已报告从正常血压到升高血压及1期高血压的渐进式升高的心血管疾病风险的梯度。在多个这些荟萃分析中,冠状动脉心脏病和中风的风险比对于SBP/DBP 120-129/80-84mmHg相对于<120/80mmHg的比较在1.1至1.5之间,及对于SBP/DBP 130-139/85-89mmHg相对于<120/80mmHg的比较在1.5至2.0之间。此风险梯度在按照性别及人种/种族界定的亚组上一致。与较高血压相关的心血管疾病风险的相对提高已减弱,但仍存在于较老的成人中。建议对于具有血压升高及1和2期高血压的受试者改变生活方式及抗高血压药物治疗。甚至如果血压无法通过治疗正常化,也可通过降低升高的血压的分期来得到临床益处。

[0824] B. 风险因子

[0825] 高血压为由包括(但不限于)遗传学、生活方式、饮食和继发风险因子等因素的组合造成的复杂疾病。高血压也可与妊娠相关。应理解,由于高血压的复杂性质,可能需要多重干预措施来治疗高血压。此外,非药物干预(包括改变饮食及生活方式)可适用于预防及治疗高血压。此外,干预措施可提供临床效益而不需要让个体完全恢复正常血压。

[0826] 1. 遗传风险因子

[0827] 已鉴别几种单基因型高血压,如糖皮质激素可治疗的高醛固酮症、李德尔氏综合征(Liddle's syndrome)、戈登综合征(Gordon's syndrome)和其中单基因突变完全解释高血压病理生理的其他,这类障碍是罕见的。造成血压和高血压的已知遗传变体的目前列表包括超过25种罕见突变及120种单核苷酸多态性。然而,虽然遗传因素可能在有些个体中造成高血压,但据估计遗传变异仅占血压变异性的约3.5%。

[0828] 2. 饮食及饮酒

[0829] 导致高血压常见环境及生活方式风险因子包括不良饮食、体能活动不足和过量饮酒。这些因子可能造成一个人变得超重或肥胖,进一步提高高血压发生或恶化的可能性。升高的血压甚至与提高的腰臀比或中央脂肪分布的其他参数更强相关。年轻时的肥胖与持续肥胖与晚年高血压强烈相关。达到正常体重可以让发生高血压的风险降至未曾肥胖的人的程度。

[0830] 钠、钾、镁和钙的摄入也可显著影响血压。钠摄入与血压有正相关性,且造成许多年龄相关的血压升高。某些族群对钠摄取量增加的敏感性高于其他族群,包括黑人及老年人(>65岁以上),及那些血压水平较高或有共病者,如慢性肾脏病、糖尿病或代谢综合征。合计,这些族群占有美国成人一半以上。盐敏感性可能是独立于血压的心血管疾病和总死亡率增加的标志物。目前识别盐敏感性的技术在临床情况中是不实用的。因此,最好将盐敏感性视为族群特征。

[0831] 钾摄入与血压和中风逆相关,且较高钾水平似乎钝化钠对血压的影响。与钠或钾本身的相应水平观察到的相比,较低的钠-钾比与较低血压相关。也在心血管疾病风险上有类似的观察。

[0832] 长久以来,饮酒即与高血压相关。在美国,估计饮酒造成约10%族群患高血压,其中男性高于女性。

[0833] 应理解,饮食或饮酒改变可以成为预防或治疗高血压的方面。

[0834] 3. 体力活动

[0835] 已经确立体力活动/健身与血压水平之间逆相关。即使最适度的体力活动也证实

有益于降低高血压。

[0836] 应理解,增加身体活动可以成为预防或治疗高血压的方面。

[0837] 4. 继发风险因子

[0838] 继发性高血压可成为血压严重升高、药物抗性高血压、高血压突然发作、之前药物治疗控制高血压的患者的血压升高、老年人舒张期高血压发作和与高血压的持续时间或严重性不成比例的靶器官伤害的基础因素。虽然继发性高血压应疑似发生在血压升高的年轻患者(<30岁),但在较年轻时出现原发性高血压并非罕见,尤其在黑人中,且有些继发性高血压形式,如肾血管性疾病,更常见于老年人(≥65岁)。许多继发性高血压的原因与指示特定障碍的临床发现或发现组强烈相关。这类情况中,基础病症治疗可能不需要施用通常用于治疗高血压的药剂即可解决血压升高的问题。

[0839] 5. 妊娠

[0840] 妊娠为高血压的风险因子,且妊娠期间的高血压为晚年心血管疾病与高血压的风险因子。有关妊娠与高血压的相关性的报告公布于2013年,由美国妇产科医学会(American College Obstetrics and Gynecology) (ACOG) (American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol. 2013;122:1122-31) 中。下文提供该报告的一些重点。然而,应理解该报告为本领域技术人员提供在本申请提交时有关妊娠时高血压的诊断和监测标准及治疗的知识,且以引用的方式并入本文中。

[0841] 先兆子痫的诊断标准示于下表中(2013年ACOG报告的表1)。

[0842]	血压	- 过去之前血压正常的妇女在妊娠 20 周后间隔至少 4 小时 2 次测量, ≥ 140 mmHg 舒张压或 ≥ 90 mmHg 舒张压 - ≥ 160 mmHg 收缩压或 > 110 mmHg 舒张压, 高血压可在短时间(几分钟)内确认以利于及时的抗高血压治疗
	和	
	蛋白尿	- 每 24 小时收集尿液 ≥ 300 mg(或此量对于定时收

[0843]		集外推), 或 - 蛋白质/肌酸酐比 ≥ 0.3 (各测定为 mg/dL)
	或在没有蛋白尿的情况下, 具有新发作的下列一项的高血压新发作:	
	血小板减少症	- 血小板计数 $\leq 100,000$ /微升
	肾功能不足	- 在没有其他肾疾病的情况下, 血清肌酸酐浓度 ≥ 1.1 mg/dL 或血清肌酸酐浓度翻倍
	肝功能受损	- 如果肝转氨酶达两倍正常浓度, 则血浓度升高
	肺水肿	
	脑或视觉症状	

[0844] 妊娠期间的血压控制因为许多种常用的抗高血压剂(包括ACE抑制剂和ARB)由于可能伤害到胎儿而成为妊娠的禁忌的事实复杂化。妊娠期间抗高血压治疗的目标包括预防严重高血压及延长妊娠的可能性以让胎儿有更多时间在分娩之前成熟。妊娠相关严重高血压治疗的综述仍没有充分证据推荐特定的药剂;相反,此情况下由临床经验推荐(Duley L, Meher S, Jones L. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. 2013;7:CD001449)。

[0845] C. 治疗

[0846] 高血压的治疗方法复杂,因为常存在他共病,经常包括肾功能下降,受试者也可能对其正在接受治疗。管理患高血压成人的临床医生应聚焦于患者的总体健康,特别着重降低将来不良心血管疾病后果的风险。所有患者风险因素需要以非药物与药物策略的复杂集合的整合方式处理。由于患者血压与将来心血管疾病事件风险升高,应加强血压管理。

[0847] 虽然仅依据血压水平使用降血压药物治疗高血压被认为具有成本效益,但采用绝对心血管疾病风险与血压水平的组合来指导这类治疗在降低心血管疾病风险上比仅利用血压水平时更有效且更具成本效益。许多以单一药剂开始的患者后来需要 ≥ 2 种来自不同药物种类的不同药剂以达到其血压目标。了解每一种药剂的药物作用机制很重要。具有互补活性的药物方案(其中使用第二抗高血压剂来阻断初始药剂的补偿反应或影响不同的升压机制)可以造成血压的加性降低。例如,噻嗪类利尿剂可以刺激肾素-血管紧张素-醛固酮系统。通过向噻嗪类添加ACE抑制剂或ARB,可能获得加性血压降低效应。采用组合疗法也可能改善依从性。抗高血压药物疗法的几种2-和3-固定剂量药物组合是可用的,组分之间具有互补作用机制。

[0848] 列出口服抗高血压药物的来自Whelton等人2017的表18提供如下。提供治疗高血压的治疗剂种类及属于这些种类的药物。也提供剂量范围、频率和注释。

[0849]

种类	药物	常用剂量， 范围 (mg/d)*	日频率	注释
主要药剂				
噻嗪或噻 嗪型利尿 剂	氯噻酮	12.5-25	1	• 氯噻酮基于延长半衰期和证实的试验 CVD 降低优选使用。 • 监测低钠血症及低钾血症、尿酸及钙水平。 • 具有急性痛风病史的患者应小心使用，除非患者正接受降尿酸疗法。
	氢氯噻嗪	25-50	1	
	吲达帕胺	1.25-2.5	1	
	美托拉宗	2.5-10	1	
ACE 抑制 剂	贝那普利	10-40	1 或 2	• 不可与 ARB 或直接肾素抑制剂组合使
	卡托普利	12.5-150	2 或 3	

[0850]

	依那普利	5-40	1 或 2	用 • 有提高高钾血症的风险,尤其在患有 CKD 的患者及服用 K⁺补充剂或 K⁺保留药物的那些。 • 在具有严重两侧肾动脉狭窄的患者中有急性肾衰竭的风险 • 如果患者有使用 ACE 抑制剂的血管性水肿史时不可使用。 • 妊娠中避免使用。
	福辛普利	10-40	1	
	赖诺普利	10-40	1	
	莫昔普利	7.5-30	1 或 2	
	培哌普利	4-16	1	
	喹那普利	10-80	1 或 2	
	雷米普利	2.5-10	1 或 2	
	群多普利	1-4	1	
ARB	阿齐沙坦 (Azilsartan)	40-80	1	• 不可与 ACE 抑制剂或直接肾素抑制剂组合使用。 • 在 CKD 中或服用 K⁺补充剂或 K⁺保留药物的那些中有提高的高钾血症风险。 • 在患有严重两侧肾动脉狭窄的患者中有急性肾衰竭的风险。 • 如果患者有 ARB 的血管性水肿史则不使用。有 ACE 抑制剂的血管性水肿史的患者可在停止 ACE 抑制剂后 6 周开始接受 ARB。 • 妊娠中避免使用。
	坎地沙坦	8-32	1	
	依普沙坦	600-800	1 或 2	
	厄贝沙坦	150-300	1	
	氯沙坦	50-100	1 或 2	
	奥美沙坦	20-40	1	
	替米沙坦	20-80	1	
	缬沙坦	80-320	1	

[0851]

CCB-二氢吡啶类	氨氯地平	2.5-10	1	- 在患有 HfrEF 的患者中避免使用；若需要时可以使用氨氯地平或非洛地平 - 它们与剂量相关性足水肿相关，这在女性中比男性更常见。
	非洛地平	5-10	1	
	伊拉地平	5-10	2	
	尼卡地平 SR	5-20	1	
	尼非地平 LA	60-120	1	
	尼索地平	30-90	1	
CCB-非二氢吡啶类	地尔硫卓 SR	180-360	2	- 避免例行使用 β 阻滞剂，因为提高的心动过缓和心传导阻滞的风险。 - 不用于患 HfrEF 的患者。 - 具有与地尔硫卓和维拉帕米(CYP3A4 主要底物和中度抑制剂)的药物相互作用。
	地尔硫卓 ER	120-480	1	
	维拉帕米 IR	40-80	3	
	维拉帕米 SR	120-480	1 或 2	
	维拉帕米-延迟发作 ER (各种形式)	100-480	1 (夜间)	
次要药剂				
环利尿剂	布美他尼	0.5-4	2	患有症状性 HF 的患者中的优选利尿剂。它们在患有中度至重度 CKD (例如，GFR <30 mL/min)的患者中优于噻嗪类。
	呋塞米	20-80	2	
	托塞米	5-10	1	
利尿剂-保钾	阿米洛利	5-10	1 或 2	- 这些是单一疗法药剂和最低效力抗高血压剂。 - 保钾性利尿剂与噻嗪类的组合疗法可以考虑用在具有噻嗪类利尿剂单一疗法的低
	氨苯蝶啶	50-100	1 或 2	

[0852]

				钾血症的患者。 避免用在患有重度 CKD (例如, GFR <45 mL/min) 的患者中。
利尿剂-醛固酮拮抗剂	依普利酮	50-100	12	- 这些是原发性高醛固酮症及顽固性高血压的优选药剂。 - 相较于依普利酮, 螺内酯与男性乳房发育和阳痿的较高风险相关。 - 这是常见的顽固性高血压的外加疗法。 - 避免用于 K⁺补充剂、其他 K⁺-保留性利尿剂或重度肾功能障碍。 - 依普利酮通常需要一天两次给药用于充分 BP 降低。
	螺内酯	25-100	1	
β 阻滞剂-心脏选择性	阿替洛尔	25-100	12	- β 阻滞剂不推荐为一线药剂, 除非患者具有 IHD 或 HF。 - 这些优选用于患有支气管痉挛性呼吸道疾病而需要 β 阻滞剂的患者 - 比索洛尔和美托洛尔琥珀酸盐优选用于患有 HFrEF 的患者。 - 避免突然停药。
	倍他洛尔	5-20	1	
	比索洛尔	2.5-10	1	
	美托洛尔酒石酸盐	100-400	2	
	美托洛尔琥珀酸盐	50-200	1	

[0853]

β 阻滞剂- 心脏选择 性和血管 舒张性	奈比洛尔	5-40	1	- 奈比洛尔诱发一氧化氮诱导的血管扩张。 - 避免突然停药。
β 阻滞剂- 非心脏选 择性	纳多洛尔	40-120	1	- 避免用于患有反应性气道疾病的患者 - 避免突然停药。
	普萘洛尔 IR	160-480	2	
	普萘洛尔 LA	80-320	1	
β 阻滞剂- 内丰拟交 感神经活 性	醋丁洛尔	200-800	2	- 通常避免，尤其患有 IHD 或 HF 的患者。 - 避免突然停药。
	卡替洛尔	2.5-10	1	
	喷布洛尔	10-40	1	
	吲哚洛尔	10-60	2	
β 阻滞剂- 组合 α 和 β 受体	卡维地洛	12.5-50	2	- 卡维地洛优选用于患有 HFrEF 的患者。 - 避免突然停药。
	卡维地洛磷酸盐	20-80	1	
	拉贝洛尔	200-800	2	
直接肾素 抑制剂	阿利吉仑	150-300	1	- 不与 ACE 抑制剂或 ARB 组合使用。 - 阿利吉仑为非常长效的。 - 在 CKD 或服用 K⁺ 补充剂或 K⁺ 保留药物的那些中有提高的高钾血症风险。 - 阿利吉仑可在患有严重两侧肾动脉狭窄的患者中导致急性肾衰竭。 - 妊娠中避免使用。
α-1 阻滞剂	多沙唑嗪	1-8	1	这些与直立性低血

[0854]

	哌唑嗪	2-20	2 或 3	压相关, 尤其是老年人。 • 它们在伴发 BPH 的患者中视为二线药剂。
	特拉唑嗪	1-20	1 或 2	
中枢 α -1 激动剂及其他中枢作用药物	可乐定, 口服	0.1-0.8	2	• 这些类通常保留作为最后一线, 因为有严重 CNS 副作用, 尤其是老年人。 • 避免突然停药可乐定, 其可能诱发高血压危象; 可乐定必需渐进以避免高血压反弹。
	可乐定, 贴片	0.1-0.3	1/周	
	甲基多巴	250-1000	2	
	氯苯醋胺肟	0.5-2	1	
直接血管扩张剂	胍屈嗪	250-200	2 或 3	• 这些与钠水潴留和反射性心动过快相关; 与利尿剂和 β 阻滞剂一起使用。 • 胍屈嗪在较高剂量下与药物诱导的狼疮样综合征相关。 • 米诺地尔与多毛症相关, 且需要袪利尿剂。米诺地尔可诱导心包膜积液。
	米诺地尔	5-100	1-3	

[0855] * 剂量可与由 FDA 核准的标签所列的那些剂量不同 (可参见 <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/>)。ACE 指血管紧张素-转化酶; ARB, 血管紧张素受体阻断剂; BP, 血压; BPH, 良性前列腺肥大; CCB, 钙通道阻滞剂; CKD, 慢性肾病; CNS, 中枢神经系统; CVD, 心血管疾病; ER, 延长释放; GFR, 肾小球滤过率; HF, 心力衰竭; HfrEF, 低射出分数心力衰竭; IHD, 缺血性心脏病; IR, 立即释放; LA, 长效; 及 SR, 持续释放。

[0856] 来自 Chobanian 等人 (2003) The JNC 7 Report. JAMA 289(19):2560。

[0857] 本发明通过下列实施例进一步说明, 其不应解释为限制。整个本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请及序列表的内容以引用的方式并入本文中。

[0858] 实施例

[0859] 实施例 1. iRNA 合成

[0860] 试剂来源

[0861] 若本文中未明确说明试剂来源时, 这类试剂可以从任何分子生物学试剂供应商以

应用于分子生物学的标准质量/纯度获得。

[0862] siRNA设计

[0863] 采用订制的R和Python脚本设计一组靶向人类AGT基因的siRNA(人类:NCBI refseqID NM_000029.3;NCBI GeneID:183)。人类NM_000029REFSEQ mRNA,第3版,具有2587个碱基长度。

[0864] 未修饰AGT正义及反义链核苷酸序列的详细列表示于表3。修饰的AGT正义及反义链核苷酸序列的详细列表示于表5。

[0865] siRNA合成

[0866] siRNA采用本领域已知的常规方法合成和退火。

[0867] 实施例2.体外筛选方法

[0868] 细胞培养和384-孔转染

[0869] Hep3b细胞(ATCC,Manassas,VA)于37℃与5%CO₂气氛下,在补充10%FBS(ATCC)的伊格氏基本培养基(Eagle's Minimum Essential Medium)(Gibco)中生长至接近汇合,然后使用胰蛋白酶处理从平板释放。

[0870] 通过添加每孔4.9μL Opti-MEM加0.1μLLipofectamine RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad CA.目录编号13778-150)至384-孔平板的单个孔的5μLL各siRNA双链体进行转染。混合物然后于室温下孵育20分钟。然后添加50μL完全生长培养基(包含5,000个Hep3b细胞)至siRNA混合物中。细胞孵育24小时,之后进行RNA纯化。以10 nM和0.1nM终双链体浓度进行单剂量实验,并使用在10 nM至37.5fM范围内的8点6倍连续稀释进行剂量反应实验。

[0871] 靶向AGT mRNA的另外的dsRNA剂描述于PCT公开号WO 2015/179724,其完整内容以引用的方式并入本文中。

[0872] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(Invitrogen™,部件编号:610-12)的总RNA分离

[0873] 细胞于包含每孔3μL珠的75μL裂解/结合缓冲液中裂解,并在静电式振荡器上混合10分钟。洗涤步骤在Biotek EL406上使用磁性平板支架自动进行。珠于缓冲液A中洗涤(90μL)一次,于缓冲液B中洗涤一次,和于缓冲液E中洗涤2次,其间有抽吸步骤。在最后抽吸后,向各孔添加完整10μL RT混合物,如下所述。

[0874] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems,Foster City,CA,目录编号4368813)的cDNA合成:

[0875] 每孔添加每个反应1μL 10X缓冲液、0.4μL 25X dNTP、1μL随机引物、0.5μL逆转录酶、0.5μL RNase抑制剂与6.6μL H₂O的主混合物。密封平板,在静电式振荡器上搅拌10分钟,和然后在37℃下孵育2小时。之后,平板于80℃下搅拌8分钟。

[0876] 实时PCR:

[0877] 添加2μL cDNA至384孔板(Roche,目录编号04887301001)中每孔包含0.5μL人GAPDH TaqMan探针(4326317E)、0.5μL人类AGT(Hs00174854m1)、2μL无核酸酶水和5μL Lightcycler 480探针主混合物(Roche目录编号04887301001)的主混合物中。于LightCycler480Real Time PCR系统(Roche)中进行实时PCR。

[0878] 为计算相对倍数变化,使用ΔACT法分析数据并针对使用10nM AD-1955转染的细胞或伪转染的细胞进行的分析标准化。使用XLfit采用4参数拟合模型计算IC₅₀,并针对AD-

1955转染或伪转染的细胞标准化。AD-1955的正义及反义序列为：正义链：cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:19) 和反义链：UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:20)。筛选的结果示于表4。

[0879] 表2.核酸序列表示中所采用的核苷酸单体的缩写。应理解这些单体当存在于寡核苷酸中时通过5'-3'磷酸二酯键互相连接。

[0880]

缩写	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸
Ab	β -L-腺苷-3'-磷酸
Abs	β -L-腺苷-3'-硫代磷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸
As	腺苷-3'-硫代磷酸
C	胞苷-3'-磷酸
Cb	β -L-胞苷-3'-磷酸
Cbs	β -L-胞苷-3'-硫代磷酸
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸
G	鸟苷-3'-磷酸
Gb	β -L-鸟苷-3'-磷酸
Gbs	β -L-鸟苷-3'-硫代磷酸
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸

[0881]

Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
U	尿苷-3'-磷酸
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸
Us	尿苷-3'-硫代磷酸
N	任何核苷酸，修饰或未修饰
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
s	硫代磷酸酯连接

[0882]

L96	N-[三(GalNAc-烷基)-酰氨基癸酰基)]-4-羟基脯胺醇 (Hyp-(GalNAc-烷基)3)
Y34	2-羟甲基-四氢呋喃-4-甲氧基-3-磷酸(无碱基 2'-OMe 呋喃糖)
Y44	反向无碱基 DNA (2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸)
(Agn)	腺苷-二醇核酸(GNA)
(Cgn)	胞苷-二醇核酸(GNA)
(Ggn)	鸟苷-二醇核酸(GNA)
(Tgn)	胸苷-二醇核酸(GNA) S-异构体
P	磷酸
VP	乙烯基-磷酸
(Aam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-磷酸
(Aams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-硫代磷酸
(Gam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-磷酸
(Gams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-硫代磷酸
(Tam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-磷酸
(Tams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-硫代磷酸
dA	2'-脱氧腺苷-3'-磷酸
dAs	2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸
dCs	2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸
dG	2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸
dGs	2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸

[0883]

dT	2'-脱氧胸苷-3'-磷酸
dTs	2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸
dU	2'-脱氧尿苷
dUs	2'-脱氧尿苷-3'-硫代磷酸
(Aeo)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸
(Aeos)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸
(Geo)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-磷酸
(Geos)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-硫代磷酸
(Teo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
(Teos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
(m5Ceo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-磷酸
(m5Ceos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸
(A3m)	3'-O-甲基腺苷-2'-磷酸
(A3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基腺苷-2'-磷酸
(G3m)	3'-O-甲基鸟苷-2'-磷酸
(G3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基鸟苷-2'-磷酸
(C3m)	3'-O-甲基胞苷-2'-磷酸
(C3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基胞苷-2'-磷酸
(U3m)	3'-O-甲基尿苷-2'-磷酸
(U3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基尿苷-2'-磷酸
(m5Cam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-磷酸
(m5Cams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸

[0884]

(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸
(Uhds)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸
(pshe)	羟基乙基硫代磷酸

[0885]

表 3. AGT dsRNA 剂的未修饰正义和反义链序列

双链体名称	正义寡核苷酸名称	正义序列 5'-3'	SEQ ID NO:	NM_000029.3 中的范围	反义寡核苷酸名称	反义序列 5'-3'	SEQ ID NO:	NM_000029.3 中的范围
AD-84704	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	21	644-664	A-168478	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	205	642-664
AD-84705	A-168479	GUCUCCACCUUUUCUUCUAA	22	2076-2096	A-168480	UUAGAAAGAAAAGGUGGGAGACUG	206	2074-2096
AD-84706	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	23	1586-1606	A-168482	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAAGUGA	207	1584-1606
AD-84707	A-168483	CCUCAACUGGAAGAAGAACU	24	1603-1623	A-168484	AGUUUCUUCAUCCAGUUUGAGGGA	208	1601-1623
AD-84708	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	25	1889-1909	A-168486	UUGAUCAUACACACAGCAAAACAGGA	209	1887-1909
AD-84709	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAGA	26	1892-1912	A-168488	UCUUUGAUCAUACACAGCAAAACA	210	1890-1912
AD-84710	A-168489	CCGACCAGCUUUGUUGUGAAA	27	2283-2303	A-168490	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	211	2281-2303
AD-84711	A-168491	UCCAAACCAGCAGCUUGUUUA	28	2278-2298	A-168492	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	212	2276-2298
AD-84712	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	29	1883-1903	A-168494	AUACACAGCAAAACAGGAUUGGGC	213	1881-1903
AD-84713	A-168495	CACCUUUUCUUAUAGAGUA	30	2082-2102	A-168496	UACUCAUUAAGAAGAAAAGGUGGG	214	2080-2102
AD-84714	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	31	1891-1911	A-168498	UUUUGAUCAUACACAGCAAAACAG	215	1889-1911
AD-84715	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	32	1250-1270	A-168500	UAACCUUCAUUCUUCACAGCAG	216	1248-1270
AD-84716	A-168501	UUCAGCAAAACUCCCUCAAA	33	1589-1609	A-168502	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	217	1587-1609
AD-84717	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	34	1249-1269	A-168504	AACCUUCAUUCUUCACAGCAGC	218	1247-1269
AD-84718	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	35	1582-1602	A-168506	UAGUUUUGCUGGAAAAGUGAGACC	219	1580-1602
AD-84719	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUGUA	36	642-662	A-168508	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	220	640-662
AD-84720	A-168509	CCACCUCUGUCAUCCACAAUGA	37	631-651	A-168510	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	221	629-651
AD-84721	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	38	1584-1604	A-168512	UGGAGUUUUGCUGGAAAAGUGAGA	222	1582-1604
AD-84722	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	39	1601-1621	A-168514	UUUCUUCAUCCAGUUUGAGGGAGU	223	1599-1621
AD-84723	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGCAGCUA	40	650-670	A-168516	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	224	648-670
AD-84724	A-168517	AGAAUUCCAACCGACCAGCUU	41	2273-2293	A-168518	AAGCUGGUGGUGGAAUUCUUU	225	2271-2293

[0886]

AD-84725	A-168519	CAUUCUGUUUUGCUGUGUAUA	42	1884-1904	A-168520	UAUACACAGCAAAACAGGAUUGGG	226	1882-1904
AD-84726	A-168521	GAUUCCAACCGACCAGCUUA	43	2274-2294	A-168522	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	227	2272-2294
AD-84727	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	44	640-660	A-168524	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	228	638-660
AD-84728	A-168525	CCCAUUCUGUUUUGCUGUGUA	45	1882-1902	A-168526	UACACAGCAAAACAGGAUUGGGCG	229	1880-1902
AD-84729	A-168527	CUGGUUUUAUUUUAGAGAAUA	46	2202-2222	A-168528	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	230	2200-2222
AD-84730	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	47	2201-2221	A-168530	AUUUCUAAAAUAAACCCAGCAA	231	2199-2221
AD-84731	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	48	861-881	A-168532	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUUU	232	859-881
AD-84732	A-168533	GAGAGAGCCACAGAGUCUAA	49	1816-1836	A-168534	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	233	1814-1836
AD-84733	A-168535	GCAAGAACAGUGUUUAGCGA	50	2234-2254	A-168536	UCGCUAAACACUGGUUUCUUGCCU	234	2232-2254
AD-84734	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	51	1591-1611	A-168538	UAGUUAGAGGGAGUUUUGCUGGAA	235	1589-1611
AD-84735	A-168539	CACCUUGUCAUCCACAAUGAA	52	632-652	A-168540	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	236	630-652
AD-84736	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	53	637-657	A-168542	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	237	635-657
AD-84737	A-168543	CUCCACGCUCUCUGGACUUA	54	1211-1231	A-168544	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	238	1209-1231
AD-84738	A-168545	AACUCCUCAACUGGAUGAAA	55	1598-1618	A-168546	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	239	1596-1618
AD-84739	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	56	1252-1272	A-168548	AUGAACCCUGUCAAUUCUCAGC	240	1250-1272
AD-84740	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	57	634-654	A-168550	UUCUCAUUUGUGGAUGACGAGGUG	241	632-654
AD-84741	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	58	1253-1273	A-168552	UAUGAACCCUGUCAAUUCUCUCAG	242	1251-1273
AD-84742	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	59	841-861	A-168554	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAUUU	243	839-861
AD-84743	A-168555	UCCACCUCGUAUCCACAAUA	60	630-650	A-168556	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	244	628-650
AD-84744	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	61	1257-1277	A-168558	UCUGAUGAACCCUGUCAAUUCUUC	245	1255-1277
AD-84745	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	62	1600-1620	A-168560	UUCUUAUCCAGUUGAGGGAGUU	246	1598-1620
AD-84746	A-168561	AAUGAGAGUACCUUGAGCAA	63	647-667	A-168562	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	247	645-667
AD-85431	A-168469	CCACCUUUUCUUAUUAUGAGU	64	2081-2101	A-170464	ACUCAUUAGAGAAAAAGGUGGA	248	2079-2101
AD-85432	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUAAAA	65	2284-2304	A-170465	UUUUCACAAAAACAGCUGGUCGGU	249	2282-2304
AD-85433	A-168473	ACCUUUUCUUAUUAUGAGUCA	66	2083-2103	A-170466	UGACUCAUUAAGAAAAAGGUGG	250	2081-2103

[0887]

AD-85434	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	67	638-658	A-170467	UGUACUCUCAUUUGUGGAGACGA	251	636-658
AD-85435	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUUGAGAA	68	644-664	A-170468	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	252	642-664
AD-85436	A-168479	GUCUCCACCUUUUUCUUA	69	2076-2096	A-170469	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	253	2074-2096
AD-85437	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	70	1586-1606	A-170470	UAGGGAGUUUUGUCUGGAAAGUGA	254	1584-1606
AD-85438	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	71	1603-1623	A-170471	AGUUUCUUAUCCAGUUGAGGGA	255	1601-1623
AD-85439	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	72	1889-1909	A-170472	UUGAUCAUACACAGCAAAACAGGA	256	1887-1909
AD-85440	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	73	1892-1912	A-170473	UCUUUGAUCAUACACAGCAAAACA	257	1890-1912
AD-85441	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	74	2283-2303	A-170474	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	258	2281-2303
AD-85442	A-168491	UCCAAACGACCAGCUUGUUUA	75	2278-2298	A-170475	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	259	2276-2298
AD-85443	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	76	1883-1903	A-170476	AUACACAGCAAAACAGGAUUGGGC	260	1881-1903
AD-85444	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUAGUA	77	2082-2102	A-170477	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	261	2080-2102
AD-85445	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	78	1891-1911	A-170478	UUUUGAUCAUACACAGCAAAACAG	262	1889-1911
AD-85446	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	79	1250-1270	A-170479	UAACCUUGUCAAUUCUUCACAGCAG	263	1248-1270
AD-85447	A-168501	UUCACGAAAACUCCCUCAAA	80	1589-1609	A-170480	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	264	1587-1609
AD-85448	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	81	1249-1269	A-170481	AACCUGUCAAUUCUUCACAGCAGC	265	1247-1269
AD-85449	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	82	1582-1602	A-170482	UAGUUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	266	1580-1602
AD-85450	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUUGUA	83	642-662	A-170483	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	267	640-662
AD-85451	A-168509	CCACCUUGUCAUCCACAAUGA	84	631-651	A-170484	UCAUUGUGGAUGACAGGUGGAA	268	629-651
AD-85452	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	85	1584-1604	A-170485	UGGAGUUUUUGCUGGAAAGUGAGA	269	1582-1604
AD-85453	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	86	1601-1621	A-170486	UUUCUUAUCCAGUUUGAGGGAGU	270	1599-1621
AD-85454	A-168515	GAGAGUACCUUGUGAGCAGCUA	87	650-670	A-170487	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	271	648-670
AD-85455	A-168517	AGAAUCCAAACCGACCAGCUU	88	2273-2293	A-170488	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	272	2271-2293
AD-85456	A-168519	CAUUCUGUUUGCUGUGUAUA	89	1884-1904	A-170489	UAUACACAGCAAAACAGGAUUGGG	273	1882-1904
AD-85457	A-168521	GAAUUCCAAACCGACCAGCUUA	90	2274-2294	A-170490	UAAACUGGUCGGUUGGAAUUCUU	274	2272-2294
AD-85458	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	91	640-660	A-170491	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	275	638-660

[0888]

AD-85459	A-168525	CCCAUCCUGUUUGCUGUGUA	92	1882-1902	A-170492	UACACAGCAAAACAGGAUUGGGCG	276	1880-1902
AD-85460	A-168527	CUGGGUUUAUUUAGAGAAUA	93	2202-2222	A-170493	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	277	2200-2222
AD-85461	A-168529	GCUGGGUUUAUUUAGAGAAU	94	2201-2221	A-170494	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	278	2199-2221
AD-85462	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGACUAU	95	861-881	A-170495	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUAU	279	859-881
AD-85463	A-168533	GAGAGAGCCACAGAGUCUAA	96	1816-1836	A-170496	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	280	1814-1836
AD-85464	A-168535	GCAAGAACACAGUGUUUAGCGA	97	2234-2254	A-170497	UCGCUAAACACUCUGGUUUCUUGCCU	281	2232-2254
AD-85465	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	98	1591-1611	A-170498	UAGUUAGAGGGAGUUUUGCUGGAA	282	1589-1611
AD-85466	A-168539	CACCUCGUAUCCACAAUGAA	99	632-652	A-170499	UUCAUUUGUGGAUGACGAGGUGGA	283	630-652
AD-85467	A-168541	CGUAUCCACAAUGAGAGUAA	100	637-657	A-170500	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	284	635-657
AD-85468	A-168543	CUCCACGCUCUCUGGGACUUA	101	1211-1231	A-170501	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	285	1209-1231
AD-85469	A-168545	AACUCCCUCAACUGGAUAAA	102	1598-1618	A-170502	UUUCAUCCAGUUUGAGGGAGUUUU	286	1596-1618
AD-85470	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	103	1252-1272	A-170503	AUGAACCUUGUCAAUUCUUCAGC	287	1250-1272
AD-85471	A-168549	CCUCGUAUCCACAAUGAGAA	104	634-654	A-170504	UUCUCAUUUGUGGAUGACGAGGUG	288	632-654
AD-85472	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	105	1253-1273	A-170505	UAUGAACCUUGUCAAUUCUUCUCAG	289	1251-1273
AD-85473	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	106	841-861	A-170506	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAUUU	290	839-861
AD-85474	A-168555	UCCACCUCGUAUCCACAAUA	107	630-650	A-170507	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	291	628-650
AD-85475	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	108	1257-1277	A-170508	UCUGCAUGAACCUUGUCAAUUCUUC	292	1255-1277
AD-85476	A-168559	CUCCUCAACUGGAUGAAGAA	109	1600-1620	A-170509	UUCUUAUCCAGUUUGAGGGAGUU	293	1598-1620
AD-85477	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	110	647-667	A-170510	UUGCUCACAGGUACUCUCUAUUGU	294	645-667
AD-85478	A-168469	CCACCUUUUUCUUAUAAUGAGU	111	2081-2101	A-170511	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	295	2079-2101
AD-85479	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUAAAAA	112	2284-2304	A-170512	UUUUCACAAAACAAAGCUGGUCGGU	296	2282-2304
AD-85480	A-168473	ACCUUUUUCUUAUUGAGUCA	113	2083-2103	A-170513	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	297	2081-2103
AD-85481	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	114	638-658	A-170514	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	298	636-658
AD-85482	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	115	644-664	A-170515	UUCACAGGUACUCUCUAUUGGGA	299	642-664
AD-85483	A-168479	GUCUCCACCUUUUCUUAUUA	116	2076-2096	A-170516	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	300	2074-2096

[0889]

AD-85484	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	117	1586-1606	A-170517	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAAGUGA	301	1584-1606
AD-85485	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	118	1603-1623	A-170518	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGGGA	302	1601-1623
AD-85486	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	119	1889-1909	A-170519	UUGAUCAUACACAGCAAAACAGGA	303	1887-1909
AD-85487	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	120	1892-1912	A-170520	UCUUUGAUCAUACACAGCAAAACA	304	1890-1912
AD-85488	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	121	2283-2303	A-170521	UUUCACAAACAAGCUGGUGCGGUU	305	2281-2303
AD-85489	A-168491	UCCAAACCGACCAGCUUGUUUA	122	2278-2298	A-170522	UAAAACAAGCUGGUGCGUUGGAAU	306	2276-2298
AD-85490	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	123	1883-1903	A-170523	AUACACAGCAAAACAGGAAUGGGC	307	1881-1903
AD-85491	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUAGUA	124	2082-2102	A-170524	UACUCAUUAGAAAGAAAAGGUGGG	308	2080-2102
AD-85492	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	125	1891-1911	A-170525	UUUUGAUCAUACACAGCAAAACAG	309	1889-1911
AD-85493	A-168499	GCUGAGAGAAUUGACAGGUUA	126	1250-1270	A-170526	UAACCGUGCAAUUCUUCACAGCAG	310	1248-1270
AD-85494	A-168501	UUCAGCAAAACUCCCUCAAA	127	1589-1609	A-170527	UUUGAGGGAGUUUUUGCUGGAAAG	311	1587-1609
AD-85495	A-168503	UGCUGAGAGAAUUGACAGGUU	128	1249-1269	A-170528	AACCGUGCAAUUCUUCACAGCAGC	312	1247-1269
AD-85496	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	129	1582-1602	A-170529	UAGUUUUGCUGGAAAAGUGAGACC	313	1580-1602
AD-85497	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUUGA	130	642-662	A-170530	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	314	640-662
AD-85498	A-168509	CCACCUCGUCAUCCACAAUGA	131	631-651	A-170531	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	315	629-651
AD-85499	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	132	1584-1604	A-170532	UGGAGUUUUUGCUGGAAAAGUGAGA	316	1582-1604
AD-85500	A-168513	UCCUCAACUGGAUGAAGAAA	133	1601-1621	A-170533	UUUCUUCAUCCAGUUUGAGGGAGU	317	1599-1621
AD-85501	A-168515	GAGAGUACCUUGUGAGCAGCUA	134	650-670	A-170534	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	318	648-670
AD-85502	A-168517	AGAAUCCAAACGACCAGCUU	135	2273-2293	A-170535	AAGCUGGUGGUUGGAAUUCUUU	319	2271-2293
AD-85503	A-168519	CAUUCUGUUUGCUGUGUAUA	136	1884-1904	A-170536	UAUACACAGCAAAACAGGAAUGGG	320	1882-1904
AD-85504	A-168521	GAAUUCCAAACCGACCAGCUUA	137	2274-2294	A-170537	UAAGCUGGUGCGGUUGGAAUUCUU	321	2272-2294
AD-85505	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	138	640-660	A-170538	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	322	638-660
AD-85506	A-168525	CCCAUCCUGUUUUGCUGUGUA	139	1882-1902	A-170539	UACACAGCAAAACAGGAAUGGGCG	323	1880-1902
AD-85507	A-168527	CUGGGUUUAUUUUUAGAGAAUA	140	2202-2222	A-170540	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	324	2200-2222
AD-85508	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUUAGAGAAU	141	2201-2221	A-170541	AUUUCUAAAAUAAACCCAGCAA	325	2199-2221

[0890]

AD-85509	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	142	861-881	A-170542	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUU	326	859-881
AD-85510	A-168533	GAGAGAGCCACAGAGUCUAA	143	1816-1836	A-170543	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	327	1814-1836
AD-85511	A-168535	GCAAGAACAGUGUUAGCGA	144	2234-2254	A-170544	UCGCUAAACACUGGUUCUUGCCU	328	2232-2254
AD-85512	A-168537	CCAGCAAAACUCCUCAACUA	145	1591-1611	A-170545	UAGUUAGGGAGUUUUGCUGGAA	329	1589-1611
AD-85513	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	146	632-652	A-170546	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	330	630-652
AD-85514	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	147	637-657	A-170547	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	331	635-657
AD-85515	A-168543	CUCCACGCUCUCUGGACUUA	148	1211-1231	A-170548	UAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	332	1209-1231
AD-85516	A-168545	AACUCCUCAACUGGAUAAA	149	1598-1618	A-170549	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	333	1596-1618
AD-85517	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	150	1252-1272	A-170550	AUGAACCCUGUCAAUUCUCACG	334	1250-1272
AD-85518	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	151	634-654	A-170551	UUCUCAUUGUGGAUGACGAGGUG	335	632-654
AD-85519	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	152	1253-1273	A-170552	UAUGAACCCUGUCAAUUCUCUCAG	336	1251-1273
AD-85520	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	153	841-861	A-170553	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	337	839-861
AD-85521	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	154	630-650	A-170554	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	338	628-650
AD-85522	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	155	1257-1277	A-170555	UCUGCAUGAACCCUGUCAAUUCU	339	1255-1277
AD-85523	A-168559	CUCCUCAACUGGAUGAAGAA	156	1600-1620	A-170556	UUCUUAUCCAGUUGAGGGAGUU	340	1598-1620
AD-85524	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	157	647-667	A-170557	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	341	645-667
AD-85619	A-168469	CCACCUUUUCUUAUUGAGU	158	2081-2101	A-170558	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	342	2079-2101
AD-85620	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUAAAA	159	2284-2304	A-170559	UUUUCACAAAACAGCUGGUCGGU	343	2282-2304
AD-85621	A-168473	ACCUUUUCUUCUUAUUGAGUCA	160	2083-2103	A-170560	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	344	2081-2103
AD-85622	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	161	638-658	A-170561	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	345	636-658
AD-85623	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	162	644-664	A-170562	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	346	642-664
AD-85624	A-168479	GUCUCCACCUUUUCUUCUAA	163	2076-2096	A-170563	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	347	2074-2096
AD-85625	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	164	1586-1606	A-170564	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAAGUGA	348	1584-1606
AD-85626	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	165	1603-1623	A-170565	AGUUUCUUAUCCAGUUGAGGGA	349	1601-1623
AD-85627	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	166	1889-1909	A-170566	UUGAUCAUACACAGCAAAACAGGA	350	1887-1909

[0891]

AD-85628	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAAGA	167	1892-1912	A-170567	UCUUUGAUCAUACACAGCAAACA	351	1890-1912
AD-85629	A-168489	CCGACCAGCUGUUGUGUGAAA	168	2283-2303	A-170568	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	352	2281-2303
AD-85630	A-168491	UCCAACCGACCAGCUGUUUA	169	2278-2298	A-170569	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAU	353	2276-2298
AD-85631	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	170	1883-1903	A-170570	AUACACAGCAAAACAGGAUUGGC	354	1881-1903
AD-85632	A-168495	CACCUUUUCUUAUAGAGUA	171	2082-2102	A-170571	UACUCAUUAGAAAGAAAAGGUGG	355	2080-2102
AD-85633	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	172	1891-1911	A-170572	UUUUGAUCAUACACAGCAAAACAG	356	1889-1911
AD-85634	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	173	1250-1270	A-170573	UAACCUUGUCAAUCUUCACAGCAG	357	1248-1270
AD-85635	A-168501	UUCACGAAAAACUCCCUCAAA	174	1589-1609	A-170574	UUUGAGGGAGUUUUUGCUGGAAAG	358	1587-1609
AD-85636	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	175	1249-1269	A-170575	AACCUGUCAAUCUUCACAGCAGC	359	1247-1269
AD-85637	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	176	1582-1602	A-170576	UAGUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	360	1580-1602
AD-85638	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUUA	177	642-662	A-170577	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	361	640-662
AD-85639	A-168509	CCACCUCUGUUAUCCACAAGA	178	631-651	A-170578	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	362	629-651
AD-85640	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	179	1584-1604	A-170579	UGGAGUUUUGCUGGAAAGUGAGA	363	1582-1604
AD-85641	A-168513	UCCUCUAAACUGGAUGAAGAAA	180	1601-1621	A-170580	UUUCUUAUCCAGUUGAGGGAGU	364	1599-1621
AD-85642	A-168515	GAGAGUACCUUGUGAGCAGCUA	181	650-670	A-170581	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	365	648-670
AD-85643	A-168517	AGAAUCCAACCGACCAGCUU	182	2273-2293	A-170582	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	366	2271-2293
AD-85644	A-168519	CAUUCUGUUUUGCUGUGUAUA	183	1884-1904	A-170583	UAUACACAGCAAAACAGGAUUGGG	367	1882-1904
AD-85645	A-168521	GAUUCCAACCGACCAGCUUA	184	2274-2294	A-170584	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	368	2272-2294
AD-85646	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	185	640-660	A-170585	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	369	638-660
AD-85647	A-168525	CCCAUUCUGUUUUGCUGUGUA	186	1882-1902	A-170586	UACACAGCAAAACAGGAUUGGGCG	370	1880-1902
AD-85648	A-168527	CUGGGUUUAUUUUUAGAGAAUA	187	2202-2222	A-170587	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	371	2200-2222
AD-85649	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUUAGAGAAU	188	2201-2221	A-170588	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	372	2199-2221
AD-85650	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	189	861-881	A-170589	AUAGCUCACUGUGCAUUGCCAUU	373	859-881
AD-85651	A-168533	GAGAGAGCCACAGAGUCUJAA	190	1816-1836	A-170590	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	374	1814-1836
AD-85652	A-168535	GCAAGAACACAGUGUUUAGCGA	191	2234-2254	A-170591	UCGCUAAACACUGGUUUCUUGCCU	375	2232-2254

[0892]

AD-85653	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	192	1591-1611	A-170592	UAGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAA	376	1589-1611
AD-85654	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	193	632-652	A-170593	UUCAUUGUGGAGACGAGGUGGA	377	630-652
AD-85655	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	194	637-657	A-170594	UUACUCUCAUUUGGGAUGACGAG	378	635-657
AD-85656	A-168543	CUCCACGCUCUCUGGACUUA	195	1211-1231	A-170595	UAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	379	1209-1231
AD-85657	A-168545	AACUCCUCAACUGGAUGAAA	196	1598-1618	A-170596	UUUCAUCCAGUUUGAGGGAGUUU	380	1596-1618
AD-85658	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	197	1252-1272	A-170597	AUGAACCUUGUCAUUCUCACG	381	1250-1272
AD-85659	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	198	634-654	A-170598	UUCUCAUUGUGGAGACGAGGUG	382	632-654
AD-85660	A-168551	GAGAAGAUUUGACAGGUUCAUA	199	1253-1273	A-170599	UAUGAACCUUGUCAUUCUCACG	383	1251-1273
AD-85661	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	200	841-861	A-170600	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	384	839-861
AD-85662	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	201	630-650	A-170601	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	385	628-650
AD-85663	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	202	1257-1277	A-170602	UCUGCAUGAAACCUUGUCAUUC	386	1255-1277
AD-85664	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	203	1600-1620	A-170603	UUCUUAUCCAGUUGAGGGAGUU	387	1598-1620
AD-85665	A-168561	AAUGAGAGUACCUUGUGAGCAA	204	647-667	A-170604	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	388	645-667

[0893] 表4.Hep3B细胞中的AGT单一10nM和0.1nM剂量筛选

[0894]

双链体 ID	10 nM 平均	10 nM SD	0.1 nM 平均	0.1 nM SD
AD-67327	6.2	1.5	30.1	5.9
AD-84700	14.5	5.7	127.9	53.6
AD-84701	8.7	6.5	59.7	5.5
AD-84702	11.4	4.2	95.1	14.6
AD-84703	6.7	4.2	36.7	2.4
AD-84704	7.2	4.3	54.9	5.5
AD-84705	7.8	2.3	52.7	10.3
AD-84706	6.3	4.3	65.0	13.0
AD-84707	10.2	9.2	52.2	2.6
AD-84708	10.1	4.1	98.7	24.6
AD-84709	19.0	4.3	102.7	18.5
AD-84710	11.3	7.9	65.9	19.0
AD-84711	10.4	6.5	66.5	13.8
AD-84712	7.5	6.4	66.4	13.9
AD-84713	9.7	5.9	66.4	5.6
AD-84714	13.7	2.0	89.0	28.9
AD-84715	7.7	5.3	59.0	2.7
AD-84716	7.4	2.4	45.9	15.0
AD-84717	14.6	4.2	102.9	15.8
AD-84718	6.8	0.7	66.9	8.3
AD-84719	21.1	4.0	92.5	19.6
AD-84720	11.3	0.4	96.0	22.1
AD-84721	14.7	5.2	88.4	12.7

[0895]

AD-84722	35.9	14.8	106.6	21.2
AD-84723	13.4	6.5	83.7	25.9
AD-84724	20.8	6.7	108.0	17.6
AD-84725	17.4	1.2	100.5	22.3
AD-84726	9.7	0.6	73.1	9.0
AD-84727	16.5	5.0	102.4	20.5
AD-84728	17.6	2.6	103.6	12.8
AD-84729	11.6	3.4	78.9	16.1
AD-84730	11.2	1.5	77.6	8.7
AD-84731	11.4	2.9	80.4	15.9
AD-84732	26.9	2.6	88.2	19.5
AD-84733	21.4	2.2	101.5	13.9
AD-84734	20.4	1.9	92.8	20.5
AD-84735	11.4	1.9	85.0	6.0
AD-84736	8.4	2.5	68.0	20.7
AD-84737	22.9	4.0	80.0	13.1
AD-84738	16.0	1.8	98.3	29.5
AD-84739	6.6	2.1	40.5	6.8
AD-84740	10.2	1.8	78.9	32.7
AD-84741	6.3	1.0	37.0	9.7
AD-84742	14.1	2.0	86.9	7.4
AD-84743	80.9	9.9	97.6	16.5
AD-84744	23.1	5.8	93.4	18.9
AD-84745	27.8	5.0	79.2	25.3
AD-84746	7.5	1.2	48.0	14.4

[0896]

AD-85431	12.3	3.9	61.8	29.6
AD-85432	10.1	6.6	50.5	19.8
AD-85433	11.5	4.0	61.4	25.4
AD-85434	5.8	2.5	37.2	20.4
AD-85435	7.3	1.8	44.9	17.8
AD-85436	8.2	4.9	35.2	12.8
AD-85437	7.2	6.3	30.4	18.6
AD-85438	10.4	7.5	41.8	18.1
AD-85439	15.4	3.8	62.1	25.9
AD-85440	26.1	5.1	85.5	34.7
AD-85441	9.9	7.4	50.6	19.3
AD-85442	8.4	5.2	52.4	20.4
AD-85443	11.5	12.9	59.0	25.0
AD-85444	8.4	4.4	48.6	24.9
AD-85445	21.7	6.8	63.2	36.1
AD-85446	14.7	11.5	59.0	27.5
AD-85447	8.4	2.9	52.8	15.5
AD-85448	12.6	4.0	89.5	25.2
AD-85449	8.3	1.5	72.7	14.2
AD-85450	35.3	6.3	91.4	30.0
AD-85451	17.7	2.3	80.7	20.8
AD-85452	21.5	5.2	73.3	27.4
AD-85453	60.5	32.6	69.0	33.9
AD-85454	21.8	8.6	63.2	23.6
AD-85455	34.0	12.4	88.8	23.4

[0897]

AD-85456	21.6	1.4	91.9	18.1
AD-85457	12.1	2.6	85.6	28.0
AD-85458	29.8	7.1	98.1	25.4
AD-85459	23.8	2.0	101.2	34.7
AD-85460	9.9	1.8	69.0	12.7
AD-85461	11.0	3.7	60.1	13.4
AD-85462	25.7	4.1	78.5	6.8
AD-85463	56.6	13.1	89.7	20.5
AD-85464	21.8	6.3	99.8	34.4
AD-85465	25.2	6.2	99.2	24.6
AD-85466	35.3	8.4	104.2	31.5
AD-85467	12.7	2.7	82.2	8.4
AD-85468	30.9	6.5	93.0	31.2
AD-85469	44.7	8.0	82.1	13.4
AD-85470	7.9	4.6	66.7	11.2
AD-85471	15.8	3.7	95.3	14.0
AD-85472	9.3	3.3	71.3	15.1
AD-85473	21.5	3.9	102.2	22.4
AD-85474	100.2	24.5	110.4	21.9
AD-85475	28.7	8.6	105.2	31.1
AD-85476	35.5	10.2	81.4	13.1
AD-85477	10.1	2.2	76.9	30.6
AD-85478	15.1	1.9	94.6	27.5
AD-85479	18.7	5.8	92.1	26.6
AD-85480	11.8	4.1	68.8	16.7

[0898]

AD-85481	5.3	1.1	32.9	8.7
AD-85482	7.1	3.4	52.7	11.5
AD-85483	7.9	3.0	61.1	15.3
AD-85484	11.5	3.3	84.6	8.8
AD-85485	11.6	5.5	58.9	19.7
AD-85486	25.3	6.2	94.8	21.4
AD-85487	40.5	10.2	101.0	24.4
AD-85488	32.8	7.4	97.6	24.2
AD-85489	12.8	4.0	87.2	20.9
AD-85490	7.6	0.8	78.5	20.2
AD-85491	12.5	4.5	92.3	19.0
AD-85492	89.7	17.7	112.3	20.2
AD-85493	6.3	2.6	51.0	14.5
AD-85494	11.0	2.4	79.8	24.0
AD-85495	10.4	2.8	70.1	23.2
AD-85496	6.8	2.2	55.0	20.8
AD-85497	72.4	18.6	108.5	36.5
AD-85498	7.3	2.3	85.3	26.5
AD-85499	94.7	6.8	104.2	24.5
AD-85500	63.1	21.9	98.4	21.4
AD-85501	38.3	12.3	129.0	47.3
AD-85502	27.2	8.3	92.0	21.9
AD-85503	36.2	11.5	108.3	25.4
AD-85504	9.2	3.7	56.1	9.4
AD-85505	50.3	12.2	111.6	15.5

[0899]

AD-85506	40.8	8.7	109.4	31.6
AD-85507	7.7	2.2	64.3	22.6
AD-85508	82.0	21.9	100.9	29.0
AD-85509	20.9	5.5	101.5	23.0
AD-85510	104.0	28.6	90.1	42.0
AD-85511	14.1	2.6	84.2	9.3
AD-85512	50.6	14.7	98.5	30.7
AD-85513	35.0	9.0	78.5	24.4
AD-85514	13.0	0.9	80.3	27.9
AD-85515	69.1	5.7	72.5	35.1
AD-85516	54.0	16.1	88.4	38.9
AD-85517	7.4	1.3	47.9	7.0
AD-85518	12.0	4.6	79.4	42.4
AD-85519	8.9	2.5	54.6	6.2
AD-85520	10.9	3.0	81.3	19.1
AD-85521	79.1	15.6	108.4	35.4
AD-85522	51.3	10.1	114.7	27.9
AD-85523	23.6	2.9	91.3	26.6
AD-85524	9.9	2.8	46.9	10.8
AD-85619	20.7	1.0	114.4	53.5
AD-85620	20.0	5.8	96.8	25.7
AD-85621	8.9	6.9	80.4	20.3
AD-85622	6.4	3.7	50.2	12.9
AD-85623	7.6	6.0	38.0	4.6
AD-85624	9.2	3.7	81.0	15.9

[0900]

AD-85625	6.0	2.4	58.9	8.7
AD-85626	7.6	6.3	43.8	3.9
AD-85627	25.5	8.3	103.0	20.0
AD-85628	39.0	7.3	114.5	19.9
AD-85629	23.6	18.5	86.1	14.8
AD-85630	17.2	15.9	83.0	22.5
AD-85631	10.1	6.2	79.0	18.2
AD-85632	10.2	4.3	67.5	10.8
AD-85633	42.1	19.9	95.1	4.5
AD-85634	7.5	2.9	54.6	11.7
AD-85635	8.2	2.6	53.5	24.0
AD-85636	11.4	2.2	96.0	23.7
AD-85637	9.9	5.9	58.2	17.0
AD-85638	53.1	6.2	112	31.1
AD-85639	13.7	2.1	96.9	19.6
AD-85640	72.8	11.7	106.9	7.2
AD-85641	47.2	19.8	89.6	9.5
AD-85642	15.3	3.5	86.7	24.5
AD-85643	35.4	12.9	494.9	779.7
AD-85644	79.0	7.2	110.6	23.5
AD-85645	7.8	1.2	63.6	13.1
AD-85646	33.6	8.6	105.6	28.1
AD-85647	19.4	3.1	102.3	9.7
AD-85648	49.0	6.6	106.0	10.7
AD-85649	18.5	2.9	82.4	10.1

[0901]

AD-85650	69.4	19.0	87.2	15.6
AD-85651	90.4	17.3	106.9	31.9
AD-85652	31.3	8.5	90.0	37.7
AD-85653	47.6	2.8	104.1	20.6
AD-85654	66.7	3.7	97.5	17.8
AD-85655	10.4	0.8	55.4	6.9
AD-85656	96.7	4.3	98.6	23.4
AD-85657	83.6	3.3	86.6	31.4
AD-85658	7.6	1.8	65.4	9.2
AD-85659	14.1	4.2	76.0	33.0
AD-85660	40.9	6.5	95.8	24.0
AD-85661	63.6	10.4	93.0	34.1
AD-85662	83.4	11.5	87.3	17.2
AD-85663	23.0	5.3	79.1	30.8
AD-85664	44.8	2.9	112.2	19.9
AD-85665	13.5	2.5	81.0	25.4

[0902]

表 5. hAGT dsRNA 剂的修饰正义和反义链序列

双链体名称	修饰的正义序列 5'-3'	SEQ ID NO:	修饰的反义序列 5'-3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'-3'	SEQ ID NO:
AD-84704	csascaauGfGfAfGfuaccugugaaL96	389	usUfscacAfGfUfacucUfcAfuugsgsa	573	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	757
AD-84705	gsuscuccCfGfCfUfuuuuuccuaaL96	390	usUfsagaAfGfAfaaggUfgGfagacsug	574	CAGUCUCCACCACCUUUUUCUUA	758
AD-84706	ascsuuucCfGfCfAfaaacuccuaL96	391	usAfsgggAfGfUfuugcUfgGfaaugsas	575	UCACUUUCCAGCAAAACUCCUC	759
AD-84707	cscsucaaCfGfAfugaagaacuaL96	392	asGfsuuCfuUfCfauccAfGfUfagsgsa	576	UCCUCAACUGGAAGAAACU	760
AD-84708	csusguuuGfCfUfgfugaaucaL96	393	usUfsgauCfUfAfcaCfGfAfaacagsa	577	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	761
AD-84709	ususugcuGfuGfUfafugaucuaaL96	394	usCfsuuGfUfCfauacAfGfcaaaascsa	578	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAGC	762
AD-84710	cscsgaccAfGfCfUfguuuguaaL96	395	usUfsucaCfAfAfcaagCfUfgucggsu	579	AACCGACCAGCUUUGUUGGAAA	763
AD-84711	uscsgaacCfGfCfGfagcuuguaaL96	396	usAfsaacAfGfCfugguCfGfUfuggasasu	580	AUUCCAAACCGACCAGCUUUGUUG	764
AD-84712	cscsaauCfGfUfUfgucuguguaL96	397	asUfsacaCfGfCfaaacAfGfGfaauggsgc	581	GCCCAUUCUGUUUGCUGUGUAU	765
AD-84713	csasccuuUfuCfuUfucuaugaguaL96	398	usAfscucAfUfUfAfgaagAfAfaaggsgsg	582	CCCACCUUUUCUUCUAUAGAGUC	766
AD-84714	gsusuugcUfgUfgUfugaucuaaL96	399	usUfsuugAfUfCfAuaCfGfcaaaacsag	583	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAG	767
AD-84715	gscsugagAfGfAfUfugacagguuaL96	400	usAfsaccUfgUfCfaaUfUfCfucagcsag	584	CUGCUGAGAGAAUUGACAGGUUC	768
AD-84716	ususcagCfAfAfAfcuccuccaaL96	401	usUfsugaGfGfAfguuuUfgCfuggaasag	585	CUUUCAGCAAAACUCCUCAAC	769
AD-84717	usgscugaGfAfGfAfugacagguuL96	402	asAfsccUfUfCfAfaUfUfCfagcagsgc	586	GCUGCUGAGAGAAUUGACAGGUU	770
AD-84718	uscscuacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	403	usAfsuuUfuGfCfuggaAfAfgfagagcsc	587	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	771
AD-84719	uscscacaAfUfGfAfGfaguaccuaL96	404	usAfsacGfUfCfucucAfUfUfguggsug	588	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	772
AD-84720	cscsaccUfGfUfCfAfuccaacaugaL96	405	usCfsauUfUfGfGfauaCfGfAfguggsasa	589	UUCCACCUCGUCUCCACAAUGA	773
AD-84721	uscscuuUfCfAfGfcaaaacuccaL96	406	usGfsgagUfUfUfGfucGfAfAfgugagsa	590	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	774
AD-84722	uscscucAfAfCfUfGfugaagaagaL96	407	usUfsucUfCfAfUfCfagUfUfGfaggsasu	591	ACUCCCUCAACUGGAAGAAAGAA	775
AD-84723	gsasgaguAfCfUfGfugagcagcuaL96	408	usAfsucGfUfCfagcagGfUfUfcucscasu	592	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	776
AD-84724	asgsaaUfCfAfCfGfagccagcuL96	409	asAfsucGfUfCfGfuuGfUfauuucsu	593	AAAGAAUCCCAACCGACGAGCUU	777

[0903]

AD-84725	csasuuccUfgUfuUfgcuguguaualL96	410	usAfsuacAfcAfGfcaaaCfaGfgaauugsgsg	594	CCCAUCCUGUUUUGCUGUGUAUG	778
AD-84726	gsasaauucCfaAfCfGfagaccagcuualL96	411	usAfsagcUfgGfUfgggUfgGfaauucsuu	595	AAGAAUUCCAAACCGACCAGCUUG	779
AD-84727	csasuccaCfaAfUfgfagaguaccuaL96	412	usAfsggUfCfUfCuauUfgUfggaugssasc	596	GUCAUCCACAAGAGAGAGUACCUG	780
AD-84728	cscscauUfCfUfgfUfugcuguguaL96	413	usAfscaAfcAfAfaaCfaGfAfaugggsgsg	597	CGCCAUUCCUGUUUUGCUGUGUA	781
AD-84729	csusggguUfuAfuUfuuaagagaaualL96	414	usAfsuucUfCfUfAfaaaUfAfaAfcaccagcsa	598	UGCUGGGUUUUUUUAGAGAAUG	782
AD-84730	gscsugggUfuUfAfuUfuuaagagaaualL96	415	asUfsucuCfuAfaaauaAfaCfcagcsasa	599	UUGCUGGGUUUUUUUAGAGAAU	783
AD-84731	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuualL96	416	asUfsagcUfCfUfgugCfaUfgccausasu	600	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	784
AD-84732	gsasgagaGfcCfAfCfagagagucuaalL96	417	usUfsagaCfuCfUfgugGfcUfcucucsu	601	GAGAGAGAGCCACACAGAGUCUAC	785
AD-84733	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaaL96	418	usCfsgcuAfaAfCfagugGfuUfcuugcscsu	602	AGGCAAGAACACAGUGUUUAGCGC	786
AD-84734	cscsagcaAfaAfCfUfcccuaaualL96	419	usAfsguUfGfGfagagUfuUfgcuggsasa	603	UCCAGGCAAAACUCCCUCAACUG	787
AD-84735	csasccuGfuCfAfUfccaagaaL96	420	usUfscuUfgUfgfagagAfcGfagggsgsa	604	UCCACCUUGUCAUCCACAAUGAG	788
AD-84736	csgsucauCfCfAfCfagagagaaL96	421	usUfsacuCfuCfUfuUfgUfgAfcagcsasg	605	CUCGUCAUCCACAAGAGAGUAC	789
AD-84737	csusccaCfGfCfUfCfucuggacuaalL96	422	usAfsaguCfCfAfGfagagCfGfagggsgsa	606	UCCUCCACGCUCUCUGGACUUC	790
AD-84738	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaL96	423	usUfsucaUfCfAfAfguuUfgGfaguuusu	607	AAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	791
AD-84739	usgsagaaGfaUfUfgfacagguucaulL96	424	asUfsgaaCfCfUfgfuaaUfCfUfucagsgsc	608	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	792
AD-84740	cscsugcuCfaUfCfCfacaagagaaL96	425	usUfscuAfuUfgfuggaUfgAfcagggsgsg	609	CACCUCGUCAUCCACAAGAGAG	793
AD-84741	gsasgaagAfuUfgfAfCagguucaualL96	426	usAfsugaAfcCfUfgucaAfuCfuucucsasg	610	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	794
AD-84742	csusucuUfgGfCfUfuccguuaualL96	427	usAfsuauAfcGfGfagagCfCfagaaugsuu	611	AACUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	795
AD-84743	uscsaccUfCfUfCfauccacaualL96	428	usAfsuugUfgGfAfuagacGfGfagggasagsg	612	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	796
AD-84744	asgsauugAfcAfcGfGfuaugcagaaL96	429	usCfsugAfuGfAfcuUfCfuaucusc	613	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	797
AD-84745	csuscccuCfaAfCfUfggaugaaL96	430	usUfscuuCfaUfCfagUfgAfcagggsgsuu	614	AACUCCUCAACUGGAUGAAGAA	798
AD-84746	asasugagAfgUfAfcfugugagcaalL96	431	usUfsgcuCfaAfAfgguCfuCfuaauugsu	615	ACAAUGAGAGUACCUUGAGCAG	799
AD-85431	cscsaccUfuUfCfUfucuaugagaaL96	432	asCfsucauuaagaaAfaAfcguggsaga	616	UCCACCUUUUUUCUUAUAGAGU	800
AD-85432	csgsaccaGfcUfUfgfuuuguaaL96	433	usUfsuuaaacaagaaGfcUfggucsgsu	617	ACCGACAGCUUGUUUGUGAAAC	801
AD-85433	ascscuuUfCfUfCfuaaagagaaL96	434	usGfsacucauuaagaaGfaAfaagggsgsg	618	CCACCUUUUUUCUUAUAGAGUCG	802

[0904]

AD-85434	gsuscaucCfaCfaFafugagagauacaL96	435	usGfsuacucuaauugUfgGfaugacsusa	619	UCGUCAUCCACAUAUGAGAGUJACC	803
AD-85435	csascaauGfaGfaGfuaccugugaalL96	436	usUfscacagguacuUfcAfuugugsgsa	620	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	804
AD-85436	gsusuccCfaCfCfuuuuucuaalL96	437	usUfsagaagaagaaggUfgGfagacsusg	621	CAGUCUCCACCACUUUUUCUUA	805
AD-85437	ascsuuucCfaGfCfaaaccuccuaL96	438	usAfsgggaguuuugcUfgGfaaagugsga	622	UCACUUUCCAGCAAAACUCCUC	806
AD-85438	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaacuaL96	439	asGfsuuuucuauccAfgUfugagsgsa	623	UCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	807
AD-85439	csusguuuGfcUfgUfguaugaucaalL96	440	usUfsgaucauacacaGfcAfaacagsgsa	624	UCCUGUUUGCUGUGUUAUGAUCAA	808
AD-85440	ususugcuGfuGfUfAfugaucuaaagaL96	441	usCfsuuugaucauacAfcAfgcaaaacsa	625	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAAGC	809
AD-85441	cscsgaccAfgCfuUfguuuuguaalL96	442	usUfsucaaaacaagCfuGfgucggsusu	626	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	810
AD-85442	uscscaacCfGfCfCfagcuuguuuaL96	443	usAfsaacaagcugguUfgGfuggsasasu	627	AUCCAAACCGACCAGCUUGUUUG	811
AD-85443	cscsaauucCfuGfuUfgucuguguaulL96	444	asUfsacacagcaaacAfgGfaauggsgsc	628	GCCCAUCCUGUUUGCUGUGUAU	812
AD-85444	csasccuuUfuCfuUfcuaauggagualL96	445	usAfsuccauuagaagaAfaAfauggsgsg	629	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	813
AD-85445	gsusuuugUfgUfgUfaugaucuaaalaL96	446	usUfsuuugaucuaacaCfaGfcaaacasg	630	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAAG	814
AD-85446	gsusugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	447	usAfsaccuguaaauUfcUfcagcsasg	631	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	815
AD-85447	ususcagCfaAfaAfcuccuccuuaaL96	448	usUfsugagggaguuuUfgCfuggaasasg	632	CUUCCAGCAAAACUCCCUCAAC	816
AD-85448	usgscugaGfaGfAfUfugacagguulL96	449	asAfsccuguaaauUfcUfcagcsasgsc	633	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	817
AD-85449	uscsucacUfuUfcCfagcaaaacuaL96	450	usAfsguuuuugcuggaAfaGfugagascsc	634	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	818
AD-85450	uscsacaAfuGfAfGfaguaccuguaL96	451	usAfsagguaucucAfuUfguggsasusg	635	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	819
AD-85451	cscsaccuUfcUfcAfuccaauugaL96	452	usCfsauuuguggaugaCfGfagguugsasa	636	UUCCACCUCGUCAUCCACAAUGA	820
AD-85452	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	453	usGfsgaguuuugcugGfaAfaugagsgsa	637	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	821
AD-85453	uscsccuAfaCfuUfgfugaagaagaalL96	454	usUfsuucuauccagUfuGfagggagsgsu	638	ACUCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	822
AD-85454	gsasgaguAfcCfuUfgfugagcagcuaL96	455	usAfsugcugcucacagGfuAfcucucasu	639	AUGAGAGUACCUGUGAGAGCAGCUG	823
AD-85455	asgsaaauCfcAfaCfagaccagcuuL96	456	asAfsugcugguccguuGfgAfaucucusu	640	AAAGAAUUCCAACCCAGCAGCUU	824
AD-85456	csasuuccUfgUfuUfgucuguguaualL96	457	usAfsuacacagcaaaCfaGfgaugsgsg	641	CCCAUCCUGUUUGCUGUGUAUG	825
AD-85457	gsasaauucCfaAfcCfagaccagcuuaL96	458	usAfsagcugguccguUfgGfaaauucusu	642	AAGAAUUCCAACCCAGCAGCUUG	826
AD-85458	csasuccaCfaAfuGfagaguaaccuaL96	459	usAfsgguaucucuaUfgUfggaugasc	643	GUCAUCCACAUAUGAGAGUACCUG	827

[0905]

AD-85459	cscscauuCfcUfgUfuugcugugualL96	460	usAfscaagcaaaGfGfAfauggsgsg	644	CGCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	828
AD-85460	csusggguUfuAfuUfuuaagagaualL96	461	usAfsuucuaaaaaUfaAfccagcsa	645	UGCUGGUUUUUUUUJAGAGAAUG	829
AD-85461	gscsuggguUfuUfaUfuuaagagaualL96	462	asUfsucucuaaaaaUfaCfccagcsa	646	UUGCUGGUUUUUUUUJAGAGAAU	830
AD-85462	asusgggaUfgCfAfcfagugagcuuL96	463	asUfsagcucacugugCfaUfgccaas	647	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	831
AD-85463	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	464	usUfsagacucuguggGfcUfcucusc	648	GAGAGAGAGCCACAGAGUCUAC	832
AD-85464	gscsaagaAfcCfAfcfuguuuagcgalL96	465	usCfsgcuuaaacacugGfuUfcuugscsu	649	AGGCAAGAAACAGUGUUUJAGCGC	833
AD-85465	cscsagcaAfaAfcUfcccuaacuaL96	466	usAfsuugaggggagUfuUfgcuggsa	650	UUCAGAGAAAACUCCUCAACUG	834
AD-85466	csasccucGfuCfAfuUfccacaauaL96	467	usUfscuuugugaugAfcGfagggsgsa	651	UCCACUCGUAUCCACAAUGAG	835
AD-85467	csuscauUfcAfcAfaugagagaaL96	468	usUfsacucucuuuguGfGfAfcagcsasg	652	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	836
AD-85468	csuscccaCfGfcUfcucugagacuaL96	469	usAfsaguccagagagCfGfGfaggsa	653	UCCUCCACGCUCUCUGGACUUC	837
AD-85469	asascuccCfuCfAfcUfcugagaaL96	470	usUfscuaucagagugAfcGfagaguuusu	654	AAAACUCCCAACUGGGAUGAAG	838
AD-85470	usgsagaaGfaUfuUfgfacagguucaL96	471	asUfsgaacuguaaUfcUfcuacsgsc	655	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	839
AD-85471	cscsugcuCfaUfcCfacaauagagaaL96	472	usUfscuaucuuuggaUfgAfcaggsusg	656	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	840
AD-85472	gsasgaagAfuUfgAfcagaguucauL96	473	usAfsugaacuguaAfcUfcuucscasg	657	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	841
AD-85473	csusucuuGfGfcUfuccguaauaL96	474	usAfsuaucaggaagCfcAfcagaguuusu	658	AACUUCUUGGGCUUCCCGUAUAUA	842
AD-85474	uscscaccUfcGfUfcuaucacaualL96	475	usAfsuuguggaugagCfGfGfaggsasg	659	CUUCCACCUCGUAUCCACAAUG	843
AD-85475	asgsauuGfAfcAfcGfuaucagagaaL96	476	usCfsgcaugaacuuGfuCfaucuuusc	660	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	844
AD-85476	csuscccuCfaAfcUfaggagaagaaL96	477	usUfscuaucacagUfgAfcaggsusu	661	AACUCCUCAACUGGAUGAAGAA	845
AD-85477	asasugagAfgUfaCfcugugagaaL96	478	usUfsgcucacagguCfcUfcuaucsgsu	662	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	846
AD-85478	cscsaccuUfuUfcUfcuaaagagaaL96	479	asCfsuca(Tgn)uagaagaAfaAfcguggsa	663	UCCCACCUUUUUUUUAAUAGAGU	847
AD-85479	csgsaccaGfcUfuUfgfuugugaaL96	480	usUfscuuC(Agn)caaacaaGfcUfggucgsgsu	664	ACCGACCAAGCUUUGUUUGUGAAAC	848
AD-85480	ascscuuUfcUfuUfcuaaagagaaL96	481	usGfsacu(Cgn)auuagaaGfaAfaaggsusg	665	CCACCUUUUUUUUUUAAUAGAGUCG	849
AD-85481	gsuscaucCfaCfAfcagagagaaL96	482	usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfagacsgsa	666	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	850
AD-85482	csascauuGfAfcGfuaaccugagaaL96	483	usUfscac(Agn)gguaucUfcAfuugugsgsa	667	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	851
AD-85483	gsusuccCfaCfCfuuuuucuaaL96	484	usUfsaga(Agn)gaaagUfgGfagagacsgsu	668	CAGUCUCCACCUUUUUUUCUUA	852

[0906]

AD-85484	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccuaL96	485	usAfsggg(Agn)guuuugcUfgGfaagugsgsa	669	UCACUUUCAGCAAAACUCCUC	853
AD-85485	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaculL96	486	asGfsuuu(Cgn)uucuccAfgUfugagsgsa	670	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	854
AD-85486	csusguuuGfcUfgUfguaucaalL96	487	usUfsgau(Cgn)auacacaGfcafaacsgsa	671	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	855
AD-85487	ususugcuGfuGfUfAfugaaucaagalL96	488	usCfsuuu(Ggn)aucauacAfcAfgcaaacscsa	672	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAGC	856
AD-85488	cscgaccAfgCfUfUfguuuguaalL96	489	usUfsuca(Cgn)aaacaagCfuGfugcggsusu	673	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	857
AD-85489	uscscaacCfGfCfCfagcuuguuaalL96	490	usAfsaac(Agn)agcugggUfGfuuuggasasu	674	AUUCCAAACCGACCAGCUUUGUUUG	858
AD-85490	cscsauucCfuGfUfUfgcuuguuaalL96	491	asUfsaca(Cgn)agcaaacAfgGfaaugsgsc	675	GCCCAUUCUGUUUGCUGUGUAU	859
AD-85491	csasccuuUfuCfUfUfuaauggagualL96	492	usAfsuc(Cgn)uugaagAfaAfggugsgsg	676	CCCACUUUUUCUUAUAGAGUC	860
AD-85492	gsusuuugCfUfgUfgUfauucaaaaL96	493	usUfsuuu(Ggn)ucauacaCfaGfcaaacscsg	677	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAAG	861
AD-85493	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaalL96	494	usAfsacc(Tgn)gucaauCfuCfucagcsasg	678	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	862
AD-85494	ususcagCfaAfAfAfcuccuccuaalL96	495	usUfsuga(Ggn)ggaguuUfGfuggaasasg	679	CUUUCAGCAAAACUCCUCAAC	863
AD-85495	usgscugaGfaGfAfAfcuagacagguulL96	496	asAfsccu(Ggn)ucauucuUfcUfcagcsasg	680	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	864
AD-85496	uscsucacUfuUfcCfCfagcaaaaL96	497	usAfsuuu(Tgn)ugcuggaAfaGfugagascsc	681	GGUCACUUUCCAGCAAAACUC	865
AD-85497	uscscacaAfuGfAfGfaguaccugualL96	498	usAfsacg(Ggn)uacucAfuUfugggasug	682	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	866
AD-85498	cscsaccuUfcUfCfAfuccacaaugualL96	499	usCfsauu(Ggn)uggaugaCfGfuggggsasa	683	UUCACCUCUGUCAUCCACAAUGA	867
AD-85499	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaaacuccaL96	500	usGfsgag(Tgn)uuugcuGfAfaugagsgsa	684	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	868
AD-85500	uscscucAfaCfUfGfugaagaagaalL96	501	usUfsucu(Tgn)cauccagUfuGfagggasgsu	685	ACUCCUCAACUGGAUGAAGAAA	869
AD-85501	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcualL96	502	usAfsuuc(Ggn)cucacagGfuAfcucucsasu	686	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	870
AD-85502	asgsaaauCfcAfaCfagaccagcuuL96	503	asAfsuuc(Ggn)ugcguuGfGfaauucusu	687	AAAGAAUCCAACCGACCAGCUU	871
AD-85503	csasuuccUfgUfUfUfgcuuguuaalL96	504	usAfsuac(Agn)agcaaaaCfaGfagaugsgsg	688	CCCAUUCUGUUUGCUGUGUAUG	872
AD-85504	gsasauucCfaAfCfCfagcagcuuL96	505	usAfsagc(Tgn)ggucggUfGfGfaauucusu	689	AAGAAUCCAACCGACCAGCUUG	873
AD-85505	csasuuccAfaUfGfagaguaccuaL96	506	usAfsagc(Agn)cucucaUfGfGfauggsasc	690	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	874
AD-85506	cscscuuCfcUfGfUfugcuugualL96	507	usAfsac(Agn)gcaacaGfGfagggscsg	691	CGCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	875
AD-85507	csusggguUfuAfuUfuuaagagaalL96	508	usAfsuuc(Tgn)cuaaaaAfaAfcacagcsa	692	UGCUGGGUUUAUUUJAGAGAAUG	876
AD-85508	gscsuggguUfuUfaUfUfuuaagagaalL96	509	asUfsucu(Cgn)uaaaaaAfaCfcagcsasa	693	UUGCUGGGUUUAUUUJAGAGAAU	877

[0907]

AD-85509	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	510	asUfsagc(Tgn)cacugugCfaUfgccaususu	694	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	878
AD-85510	gsasgagaGfcCfAfCfagagagucuaaL96	511	usUfsaga(Cgn)ucugugggGfcUfcucusc	695	GAGAGAGAGCCACAGAGUCUAC	879
AD-85511	gscsaagaAfcCfAfCfuguuuagcgaaL96	512	usCfsgcu(Agn)aacacugGfuUfcuugcscsu	696	AGGAAGAACACAGUGUUUAGCGC	880
AD-85512	cscsagcaAfaAfcUfcccuaacuaL96	513	usAfsugu(Ggn)agggaguuUfuUfgcuggsasa	697	UUCGAGCAAAACUCCUCAACUG	881
AD-85513	csasccucGfuCfAfUfccacaauagaaL96	514	usUfscuu(Tgn)guggaugAfcGfaggugsgsa	698	UCCACUCGUAUCCACAAUGAG	882
AD-85514	csgsucuuCfcAfcAfauagagaguaaL96	515	usUfsacu(Cgn)ucauuuguGfgAfcgagcsasg	699	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	883
AD-85515	csuscccaCfcUfCfucugggacuuaL96	516	usAfsagu(Cgn)cagagagCfcUfgggagsgsa	700	UCCUCCACGCUCUCUGGACUUC	884
AD-85516	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaL96	517	usUfsuca(Tgn)ccaguuuGfgGfaguuusuu	701	AAACUCCUCAACUGGAUGAAG	885
AD-85517	usgsagaaGfaUfuGfagagguucauL96	518	asUfsgaa(Cgn)cugucaaaUfcUfcucasgsc	702	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	886
AD-85518	cscsucguCfaUfCfcfacaauagagaaL96	519	usUfscuc(Agn)uuguggaUfgAfcgaggsusg	703	CACCUUGUAUCCACAAUGAGAG	887
AD-85519	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	520	usAfsuga(Agn)ccugucaAfuCfuucucsaag	704	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	888
AD-85520	csusucuuGfgGfcUfuccguauauaL96	521	usAfsuau(Agn)cgggaagCfcAfaagaagsusu	705	AACUUCUUGGGCUCCGUAUAUA	889
AD-85521	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL96	522	usAfsuug(Tgn)ggauagacGfgAfggagasaag	706	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	890
AD-85522	asgsauuugAfcAfcGfGfucauagcagaL96	523	usCfsugc(Agn)ugaaccuGfuCfaauusc	707	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	891
AD-85523	csuscccuCfaAfcUfGggaugaagaaL96	524	usUfscuu(Cgn)auccaguuUfgAfggaggsusu	708	AACUCCUCAACUGGAUGAAGAA	892
AD-85524	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaalL96	525	usUfsgcu(Cgn)acagguaCfuCfuaauusgu	709	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	893
AD-85619	cscsaccuUfuUfCfUfucuaauagauL96	526	asCfsucau(Tgn)agaagaAfaAfgguggsasa	710	UCCCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	894
AD-85620	csgsaccaGfcUfUfGfuuuugugaaaaL96	527	usUfssuua(Cgn)aaacaaGfcUfggucgsgsu	711	ACCGACCGCUUGUUUGUGAAAC	895
AD-85621	ascscuuuUfcUfuUfCfuuaauagagualL96	528	usGfsacuc(Agn)uuaagaaGfaAfaaggsusg	712	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGUCG	896
AD-85622	gsuscaucCfaCfAfAfcagagaguaaL96	529	usGfsuacu(Cgn)ucauuuUfgGfaugacsgsa	713	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	897
AD-85623	csascauuGfaGfAfcfuaccugugaaL96	530	usUfscaca(Ggn)guacucUfcAfuugugsgsa	714	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	898
AD-85624	gsuscuuccCfaCfCfUfuuuuucuaaL96	531	usUfsgaa(Ggn)aaagggUfgGfagacsgsu	715	CAGUCUCCACCUCUUCUUCUAA	899
AD-85625	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccuaL96	532	usAfsggga(Ggn)uuuuuUfgGfaaagugsa	716	UCACUUCCAGCAAAACUCCUC	900
AD-85626	cscsucaaCfuGfGfAfcagagaaaculL96	533	asGfsuuuc(Tgn)ucauccAfcUfugaggsasa	717	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	901
AD-85627	csusguuuGfcUfGfUfguauagaucaalL96	534	usUfsgauc(Agn)uacacaGfcAfaacagsgsa	718	UCCUGUUUGCUGUGUGUAUGAUCAA	902

[0908]

AD-85628	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaaagaL96	535	usCfsuung(Agn)ucauacAfcAfgcaaaasca	719	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAAGC	903
AD-85629	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaalL96	536	usUfsuac(Agn)aaacagCfuGfgucggsusu	720	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	904
AD-85630	uscscaacCfGfCfagcuuguuuuaL96	537	usAfsaaca(Agn)jcuugguCfGfguggasasu	721	AUUCCAAACCGACCAGCUUGUUUG	905
AD-85631	cscsauuucCfuGfUfUfgcuguguuaL96	538	asUfsacac(Agn)gcaaacAfgGfaauggsgsc	722	GCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	906
AD-85632	csasccuUfuCfUfUfuaaungagualL96	539	usAfsucca(Tgn)uagaagAfaAfggugsag	723	CCCACUUUUUCUUAUAGAGUC	907
AD-85633	gsusuugcUfgUfGfUfauagaucaaaalL96	540	usUfsuuga(Tgn)cauacaCfaGfcaaacasag	724	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAAG	908
AD-85634	gscsugagAfaGfAfUfgacagguuaL96	541	usAfsaccu(Ggn)ucauucUfuCfucagcsasg	725	CUGCUGAGAAAGAUUGACAGGUUC	909
AD-85635	ususccagCfaAfAfAfcuccuccaaalL96	542	usUfsugag(Ggn)gaguuuUfgCfuggaasasg	726	CUUUCGACAAAACUCCCUCAAC	910
AD-85636	usgscugaGfaAfGfAfugacagguuL96	543	asAfsccug(Tgn)cauucUfcUfcagcsagsc	727	GCUGCUGAGAAAGAUUGACAGGUU	911
AD-85637	uscsucacUfuUfcCfagcaaaacuaL96	544	usAfsguu(Tgn)gcuggaAfaGfugagascsc	728	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	912
AD-85638	uscscacaAfuGfAfGfaguaccugualL96	545	usAfsccag(Tgn)acucucAfuUfguggasusg	729	CAUCCACAAUGAGAGUACCUUG	913
AD-85639	cscsaccuCfGfUfCfAfuccaauaL96	546	usCfsauug(Tgn)ggauagCfGfagggsasa	730	UUCCACCUGUCUCCACAAUGA	914
AD-85640	uscscuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	547	usGfsgagu(Tgn)uugcugGfaAfaugsgsa	731	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	915
AD-85641	uscscucAfaCfUfGfgaugaagaalL96	548	usUfsuuc(Cgn)uaccagUfuGfagggsasg	732	ACUCCUCAACUGGGAUGAAGAAA	916
AD-85642	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	549	usAfsugcu(Cgn)ucacagGfuAfcucuasau	733	AUGAGAGUACCUUGUGAGCAGCUG	917
AD-85643	agsaauuCfcAfaCfagaccagcuuL96	550	asAfsugcu(Cgn)ucgguuGfgAfaucucusu	734	AAAGAAUUCCAAACCGACCAGCUU	918
AD-85644	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguuaL96	551	usAfsuaca(Cgn)agcaaaCfaGfgauggsg	735	CCCAUCCUGUUUGCUGUGUAUG	919
AD-85645	gsasaauucCfaAfcCfagaccagcuuL96	552	usAfsagcu(Cgn)gucguUfgGfaauucusu	736	AAGAAUCCAAACCGACCAGCUUG	920
AD-85646	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	553	usAfsguu(Cgn)ucucuuUfgUfggugsasc	737	GUAUCCACAAUGAGAGUACCUUG	921
AD-85647	cscscuuCfcUfGfUfugcugugualL96	554	usAfsacca(Cgn)caaaacAfgAfaugggsag	738	CGCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	922
AD-85648	csusggguUfuAfuUfuuaagagaalL96	555	usAfsuuc(Cgn)uaaaauAfaAfcagcsa	739	UGCUGGGUUUAUUUJAGAGAAUG	923
AD-85649	gscsugggUfuUfAfUfuuaagagaalL96	556	asUfsucuc(Tgn)aaaauaAfaCfcagcsasa	740	UUGCUGGGUUUAUUUJAGAGAAU	924
AD-85650	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuuL96	557	asUfsagcu(Cgn)acugCfAfgccauasau	741	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	925
AD-85651	gsasgagaGfcCfAfagagagucuaL96	558	usUfsagac(Tgn)ucugggGfcUfcucusc	742	GAGAGAGAGCCACAGAGUCUAC	926
AD-85652	gscsaagaAfcCfAfuguuuagcgagL96	559	usCfsgcu(Agn)acacugGfuUfcuugcsusu	743	AGGCAAGAACAGUGUGUUUAGCGC	927

[0909]

AD-85653	cscsagcaAfaAfcUfccucuaacuaL96	560	usAfsuug(Agn)gggagauUfuUfgcuggsasa	744	UUCCAGCAAAACUCCCUCAACUG	928
AD-85654	csasccucGfuCfaUfccacaauaL96	561	usUfscuu(Cgn)uggaugAfcGfaggugsgsa	745	UCCACCUCGUAUCCACAAUGAG	929
AD-85655	csgsucauCfaCfaUgagagauaL96	562	usUfsacuc(Tgn)cauuguGfgAfgacgsasg	746	CUCGUCAUCCACAAUAGAGAUAC	930
AD-85656	csusccaCfcCfuCfucuggacuuaL96	563	usAfsaguc(Cgn)agagagCfgUfgggagsgsa	747	UCCUCCACGCUCUCUGGACUUC	931
AD-85657	asascuccCfuCfaAfcUggaugaaL96	564	usUfsucau(Cgn)caguugAfgGfgaguuusuu	748	AAAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	932
AD-85658	usgsagaaGfaUfUfgfacagguucaL96	565	asUfsgaac(Cgn)ugucuaUfcUfucucasgsc	749	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	933
AD-85659	cscsucguCfaUfcCfacaauagaaL96	566	usUfscuca(Tgn)uguggaUfgAfcgaggusug	750	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	934
AD-85660	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	567	usAfsugaa(Cgn)cugucaAfuCfuucucsasg	751	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	935
AD-85661	csusucuuGfgGfcUfuccguauuaL96	568	usAfsuaua(Cgn)gggaagCfcAfgaagsusu	752	AACUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	936
AD-85662	uscsaccUfcGfuCfaUccacaauaL96	569	usAfsuugu(Ggn)gaugacGfaGfguggasasg	753	CUUCCACCUCGUAUCCACAAUG	937
AD-85663	asgsauugAfcAfcGfGfuucaugcagaL96	570	usCfsugca(Tgn)gaaccuGfuCfaauucusuc	754	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	938
AD-85664	csuscccuCfaAfcUfggaugaagaL96	571	usUfscuuc(Agn)uccagauUfgAfgggagsusu	755	AACUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	939
AD-85665	asasugagAfgUfAfcUfcugugagcaL96	572	usUfsgcuu(Cgn)cagguaCfuCfucauusgsu	756	ACAAUGAGAGUAACCUUGUGAGCAG	940

[0910] 实施例3. 用表达人类AGT的AAV转导的小鼠中的dsRNA双链体内筛选

[0911] 为了表达人类血管紧张素原, 先用表达人类AGT转录物的AAV (腺相关病毒) 载体转

导C57/BL6小鼠。从引入AAV起至少两周后,从小鼠获得血液用于基线循环人类AGT水平,然后动物接受单一3mg/kg皮下剂量的表5和6中所提供的dsRNA剂亚组之一(N=3/组)。再次于dsRNA剂给药后14天从动物获得血液。使用对人类血管紧张素原特异性的ELISA根据制造商的方案(IBM America#27412)定量人类AGT水平。数据表示为基线值的百分比,并以平均值+标准偏差呈现。选择某些dsRNA双链体进行进一步分析。

[0912] 表7.AAV-人类AGT转导的小鼠中的AGT单一3mg/kg剂量筛选

[0913]

双链体 ID	平均值	SD
AD-67327	13.2	4.5
AD-85110	97.0	3.6
AD-85117	86.7	10.8
AD-85118	107.2	14.2
AD-85434	18.4	0.6
AD-85435	25.7	1.7
AD-85438	12.6	2.7
AD-85446	8.4	1.0
AD-85481	27.0	11.5
AD-85482	64.2	13.0
AD-85482	48.5	5.9
AD-85483	38.9	4.6
AD-85485	63.6	3.0
AD-85493	35.7	20.5
AD-85496	78.5	10.3

[0914]

AD-85517	93.8	4.6
AD-85524	90.4	14.7
AD-85622	38.1	10.6
AD-85623	28.0	8.4
AD-85625	87.6	13.7
AD-85626	29.9	14.0
AD-85634	27.7	4.5
AD-85635	87.1	13.5
AD-126306	12.4	1.4
AD-126307	21.6	9.0
AD-126308	15.7	1.8
AD-126310	38.3	1.1
AD-126343	65.5	13.4
AD-133360	50.6	7.5
AD-133361	23.2	12.4
AD-133362	12.2	4.1
AD-133374	26.2	3.3
AD-133385	33.8	8.7

[0915] 实施例4.食蟹猴中dsRNA双链体的体内筛选

[0916] 在食蟹猴中评估从上述小鼠研究中鉴定的目的双链体。第1天,动物(N=3/组)接受单一3mg/kg皮下剂量的dsRNA剂(AD-85481、AD-126306、AD-126307、AD-126308或AD-133362)。在给药后第1、6、14、8、15、22、29、32、35、43、57、71、85和99天获得血液。采用对人类血管紧张素原特异性的(和与猕猴交叉反应性)的ELISA根据制造商的方案(IBM America#27412)定量循环AGT水平。数据以基线值的百分比表示,并呈现为平均值 $\pm$ 标准偏差。结果示于图1A。AD-85481、AD-126306和AD-133362之间的表观差异在非人类灵长类的典型试验-试验间变异的范围内。

[0917] 进行剂量-反应研究以评价AD-67327和AD-85481的活性。虽然实验单独进行,但所用的方法基本上均相同,且结果一起呈现于图1B中。食蟹猴在第1天接受单一0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg皮下剂量的dsRNA剂。在AD-67327给药后第1、6、1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71和78天及AD-85481给药后第1、6、1、4、8、15、22、29、32、35、43、57、71、85和99天获

得血液。采用对人类血管紧张素原特异性的(和与猕猴交叉反应性的)的ELISA根据制造商的方案(IBM America#27412)定量循环AGT水平。数据以基线值的百分比表示,并呈现为平均值+标准偏差。结果示于图1B中。这些数据证明AD-85481的效力及持续时间比AD-67327改善约3倍。

[0918] 进行多剂量研究以测定AD-67327和AD-85481的效力和持久性。虽然实验单独进行,但所用的方法基本上相同,且结果一起示于图1C中。食蟹猴皮下施用1mg/kg剂量的AD-67327或AD-85481,每4周一次,共3周(q4w给药)(第一剂后第1、29和57天)。在第一剂AD-67327后第6、1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71和78天及在第一剂AD-85481后第8、1、4、8、15、22、29、36、43、57、64、71、85、99天获得血液用于评估循环AGT。这些数据证明,AD-85481的靶沉默的效力和持久性比AD-67327提高。

[0919] 实施例5. 自发性高血压大鼠模型中使用AGT dsRNA治疗高血压

[0920] 设计大鼠特异性dsRNA以在自发性高血压大鼠模型中测试AGT敲低的效应。自发性高血压大鼠(N=9只/组)皮下施用10mg/kg剂量的大鼠特异性AGT dsRNA,每2周一次(10 mg/kg q2w),或每天口服剂量的ARB缬沙坦(31mg/kg/天),或每天口服剂量的ACE抑制剂卡托普利(100mg/kg/天)。也评估选择的组合(大鼠特异性dsRNA剂加缬沙坦或卡托普利加缬沙坦),如上所述给药。在4周期间通过遥测技术测量平均动脉压。4周治疗后,动物通过i.p.戊巴比妥注射进行麻醉,并从肝门静脉收集血液用于测量血浆AGT、血浆肾素、血浆血管紧张素II、血浆醛固酮、血浆K⁺和血浆肾素活性。也获得心脏重量和胫骨长度(用于心脏重量的标准化)。

[0921] 使用大鼠特异性dsRNA剂治疗在单独或与缬沙坦组合施用相对于治疗前水平降低血浆AGT水平超过98%(图2A)。缬沙坦和卡托普利组合治疗也显示显著降低血清AGT水平。所有治疗提高肾素水平,接受缬沙坦和dsRNA剂组合治疗的动物具有最大提高,接着为仅dsRNA剂治疗组有大幅提高。仅缬沙坦和dsRNA剂组合治疗发现降低循环血管紧张素II水平。在dsRNA剂治疗后,观察到尿AGT降低的趋势,表明dsRNA剂治疗未显著抑制肾中AGT蛋白水平(图3)。仅缬沙坦和dsRNA剂组合治疗发现显著降低尿AGT。没有治疗改变醛固酮水平。所有组血浆K⁺倾向提高,仅缬沙坦+siRNA组合治疗组达到显著性。

[0922] 图2B示出在整个实验中通过遥测技术测定的平均动脉压水平,并相对于初始血压水平作图。每一种治疗导致血压比未处理组动物在统计上显著降低。统计学比较(p<0.05)相对于基线(#)或缬沙坦+卡托普利(\$)标注。在降低平均动脉压上,使用缬沙坦+大鼠特异性dsRNA剂治疗显著优于使用卡托普利+缬沙坦的治疗。

[0923] 图2C示出相对于胫骨长度标准化的心脏重量以提供心脏肥大的测量。缬沙坦+卡托普利及缬沙坦+dsRNA剂两种治疗相对于对照有效减轻心脏肥大(p<0.05),缬沙坦+dsRNA剂相对于缬沙坦+卡托普利也降低心脏肥大(p<0.05)。图2E将相同数据显示为心脏重量比胫骨长度相对于MAP的散点图。在心脏肥大与MAP之间观察到线性关系,以缬沙坦+dsRNA剂提供心脏肥大的最大降低。所有组(除了缬沙坦),心肌细胞大小相对于媒介物减小(图2F),而卡托普利+缬沙坦组中NT-proBNP减少,且在缬沙坦+dsRNA组中观察到减少的趋势(图2G)。

[0924] 图2D示出在4周时相对于基线的相对肾素活性水平。血浆肾素活性(PRA)(其反映下降的血管紧张素信号传导)表示dsRNA剂处理显著提高PRA(p<0.05,相对于基线与对照

组,对于单独dsRNA剂及缬沙坦+siRNA两者)。PRA分析法通过在过量血管紧张素原存在下定量血液样品中肾素产生的血管紧张素I的量测定肾素活性。这些数据证明AGT-dsRNA剂治疗后血管紧张素II信号传导降低,且该效应通过用缬沙坦共同治疗增强。由于上调,甚至当AGT水平几乎完全调减时,循环血管紧张素II仍然保持完整。这些数据证明AGT-dsRNA剂导致类似缬沙坦和卡托普利的抗高血压效果。在不受理论限制下,据提议仅当组合dsRNA剂+缬沙坦时血管紧张素II水平瓦解,造成血压协同下降。

[0925] 探讨在4周治疗后各种治疗对血液和肾AngI及AngII水平的影响。图4A至4C示出缬沙坦和卡托普利治疗,单独或组合,相较于媒介物对照显著提高血液AngI水平(图4A)。单独dsRNA剂不显著改变血液AngI水平,但缬沙坦与dsRNA剂的组合相较于媒介物对照及dsRNA剂单独治疗显著降低血液AngI。已发现单独缬沙坦比媒介物对照显著提高血液AngII(图4B)。已发现缬沙坦与dsRNA剂的组合比媒介物对照显著降低血液AngII。在卡托普利和卡托普利+缬沙坦治疗动物中,这些变化造成AngII/AngI比率显著下降。卡托普利和缬沙坦的数据与其作用机制一致,而单独dsRNA的数据显示对血液中AngII/I的影响很小。

[0926] 图5A至5C示出dsRNA剂减少肾AngI,而不明显影响肾AngII,造成肾AngII/I比率上调。图5A示出缬沙坦和卡托普利各自显著提高肾AngI,而该药剂的组合不显著影响AngI水平。肾AngI通过dsRNA剂及dsRNA剂与缬沙坦的组合显著降低。此外,相较于单独dsRNA剂的治疗,该组合治疗显著降低肾AngI水平。图5B示出在用除了卡托普利以外的任何单一疗法(即单独缬沙坦或dsRNA剂)治疗后,肾AngII没有显著变化。然而,卡托普利与缬沙坦的组合及缬沙坦与dsRNA剂的组合表现出显著降低肾Ang II。卡托普利和缬沙坦的数据与其作用机制一致,而单独dsRNA的数据显示对肾中AngII很少的明显效应。施用单独AGT dsRNA剂后,肾AngII/AngI比率提高4倍(图5C)。相反,缬沙坦、卡托普利和缬沙坦+卡托普利组合治疗后,发现Ang II/Ang I比率下降超过70%。在缬沙坦+AGTdsRNA剂处理后观察到AngII/AngI比率没有显著变化。已证实肾AngII的提高并非肾皮质或髓质中肾血管紧张素受体水平或ACE mRNA表达改变所致。图6A至6C示出在任何治疗条件下(其中一种除外),肾中AT 1a受体、AT 1b受体或ACE mRNA水平均没有显著变化。卡托普利治疗显著提高肾髓质中AT 1b受体水平。还评价了治疗方案对肾功能的影响。没有观察到肾小球滤过率(GFR)、钠尿和白蛋白尿的变化。这表明这些治疗不损伤肾功能。

[0927] 在实验期间监测尿量和尿钠。缬沙坦+dsRNA剂、缬沙坦+卡托普利和单独卡托普利的治疗在基线至4周之间使组内的尿量显著增加(图7)。在4周时比较组间尿量显示卡托普利治疗动物的尿排出量比所有其他处理组显著提高。在4周时,缬沙坦+dsRNA剂治疗导致尿排出量比单独缬沙坦或媒介物治疗显著提高。实验过程中,组间或组内的尿钠没有观察到显著变化。

[0928] 这些数据证明,ACEi和ARB二者期间降低的肾Ang II/I比确认了肾ACE产生Ang II,且组织Ang II代表AT 1R-内化的Ang II(van Esch等人,Cardiovasc Res 201086(3): 401-409)。此外,在肝靶向AGTsiRNA治疗后肾Ang I下降证明肾Ang的产生依赖于肝AGT。虽然尿AGT是部分肾来源的,但这一肾AGT不导致肾Ang产生,如同之前提示(Matsusaka等人,JASN 201223:1181-1189)。AGT dsRNA治疗后提高的肾Ang II/I比(其允许肾Ang II水平保留完整)表明加强的Ang II内化,尽管没有AT 1b受体上调。与此观念一致,加性的ARB暴露最终消除肾Ang II。肝特异性AGT dsRNA剂治疗在与原有的RAS阻断剂组合时协同降低动脉

压,且降低肾Ang产生而不会显著负面影响肾功能。

[0929] 实施例6.高盐大鼠模型中使用AGT dsRNA治疗高血压

[0930] 乙酸脱氧皮质酮(DOCA)-盐大鼠模型为一种建立的高盐水平情况中的高血压的模型,且被视为由中枢和外周神经系统的影响导致的神经性高血压的模型(Basting T& Lazartigues E, Cur Hypertension Rep 2017)。

[0931] Sprague-Dawley大鼠在送达时允许适应7天。随后,在异氟烷麻醉下将遥测传输器植入大鼠腹部内腹主动脉中。大鼠在此程序后恢复10天。之后,通过遥测技术测量血压、心率和高血压的其他指标7周时间。前4周期间,动物皮下植入200mg DOCA丸粒并长期接受0.9%盐的饮水(自由摄取)以诱导高血压。在高血压开始的这段时间后,启动3-周治疗期。大鼠接受以下治疗:

[0932] 1) 媒介物;

[0933] 2) 缬沙坦,31mg/kg/天,加至饮水中;

[0934] 3) AGT dsRNA剂,10 mg/kg,每2周一次,皮下;

[0935] 4) 螺内酯,50mg/kg/天,皮下;AGT dsRNA剂(10mg/kg,每2周一次,皮下)与缬沙坦(31mg/kg/天,加至饮水中)的组合;

[0936] 5) AGT dsRNA剂,10mg/kg,每2周一次,皮下,及螺内酯,50mg/kg/天,皮下;

[0937] 6) 缬沙坦,31mg/kg/天,加至饮水中,及螺内酯,50mg/kg/天,皮下;或

[0938] 7) AGT dsRNA剂,30mg/kg,每2周一次,皮下。此外,不接受DOCA且不在饮水中加盐的一组大鼠作为对照组以评估治疗对血压正常化的影响。

[0939] 实施例7.在饮食诱导肥胖(DIO)的高脂肪饲料饲养小鼠模型中使用AGT dsRNA剂治疗肥胖

[0940] 购买16周龄高脂肪饲养(HFF)肥胖小鼠(饮食诱导肥胖(DIO))及正常体重对照动物,分别保持其高脂肪饲料(60%热量为脂肪)或正常饲料饲养。适应后,动物分成4组:正常体重+PBS;正常体重+AGTdsRNA;DIO+PBS;及DIO+AGT dsRNA(n=5/组)。动物从第0周开始每隔一周接受10mg/kg小鼠特异性dsRNA或PBS,共12周。动物每两周称体重及取得血液。通过ELISA测定血清AGT水平。在给药前、第一剂量后6周和第一剂量后12周进行空腹葡萄糖耐量试验。在试验结束时测定器官重量。

[0941] 在高脂肪及正常饲料两组动物中,施用AGT dsRNA剂有效沉默AGT,从第一时间点开始,第一次施用dsRNA剂后2周,AGT dsRNA剂处理组持续敲减约93%。

[0942] 在第一剂量后2周开始且在整个实验中保持,如通过DIO小鼠中的双向重复测量ANOVA确定的,AGT dsRNA剂治疗与PBS治疗DIO小鼠相比有效地显著降低体重增加(图8A)。在比较初始体重的分析中,DIO+AGT dsRNA组相对于初始体重没有体重增加直到最终时间点。在最终时间点之前,小鼠的体重相对于初始体重下降(第2、4、6周),或没有体重差异(第8、10周)。直到试验第10周及第12周,PBS和AGT dsRNA剂饲料饲养小鼠之间体重没有观察到显著差异。

[0943] 在试验结束时测定器官重量以评价AGT dsRNA剂治疗对脂肪沉积部位的影响。AGT dsRNA剂处理DIO小鼠的肝重量显著低于PBS处理DIO小鼠(图8B)。AGT dsRNA剂和PBS处理正常饲料饲养小鼠之间的肝重量没有观察到显著差异。DIO+AGT siRNA组的脂肪组织(附睾)重量统计学高于DIO+PBS,而正常体重组动物则相反。所有四组之间腓肠肌重量没有显著差

异。

[0944] 在第0周(给药前)、第6周和第12周使用标准方案进行葡萄糖耐量试验。在给药前、腹腔内推注葡萄糖剂量施用后30、60、90和120分钟采用 **ATRAK®2** 血糖计 (Abbott Animal Health) 测定血糖。结果示于图9A至9C。在第0周, DIO小鼠的葡萄糖耐量比饲料饲养对照下降。6周时, 在AGT dsRNA剂治疗DIO小鼠与PBS治疗DIO小鼠之间的多重比较后测试中观察到显著差异。12周时且排除值高于血糖计上限的一个DIO+PBS动物, AGT dsRNA剂治疗DIO小鼠与PBS治疗DIO小鼠之间仍然有显著差异。此外, 在6周或12周时, 来自DIO+AGT siRNA组的数据与对照组 (AGT dsRNA剂治疗或PBS治疗饲料饲养小鼠) 没有差异。

[0945] 实施例8. 高脂肪高果糖小鼠模型中使用AGT dsRNA剂治疗NASH

[0946] 采用高脂肪-高果糖 (HF HFr) 饲养小鼠NASH模型 (Softic等人, J Clin Invest 127 (11): 4059-4074, 2017, 其以引用方式并入本文中) 证明AGT siRNA治疗NASH及代谢性障碍的征兆的效力。

[0947] 从Jackson Laboratories实验室获得的6至8周龄C57BL/6雄性小鼠以含60%热量的脂肪加水30%果糖的高脂肪饮食 (Hf Hfr饮食) 饲养12周, 然后用AGT dsRNA剂或PBS (对照) 处理以诱导NASH, 或饲养标准饲料与水饮食。食物与水自由提供。第12周开始, 每隔一周对HF HFr饲养小鼠皮下施用10mg/kg剂量的靶向AGT的dsRNA剂, 共4个剂量。在最后一剂后2周 (第20周), 收获肝脏, 分离RNA, 且采用上述说明的方法通过RT-qPCR测定肝中的AGT敲减。在AGT dsRNA剂治疗Hf Hfr饲养小鼠中与PBS治疗HF HFr饲养小鼠相比观察到肝AGT mRNA下降93%。

[0948] 如所预期的, HF HFr饲养对照组小鼠在所有时间点的体重 (图10A)、累积体重增加 (图10B) 和终末肝重量均显著高于饲料饲养对照小鼠。使用AGT dsRNA剂治疗在HFHFr小鼠中从第12周起至第20周体重下降, 其导致终末体重比对照处理小鼠显著降低 ($p=0.0023$)。终末肝重量没有观察到显著差异。

[0949] 评价血清和肝脂质和葡萄糖及血清胰岛素以测定dsRNA剂在HF HFr模型中的影响。在第20周时, 所有三个组 (正常饲料、HF HFrdsRNA、HF HFr对照) 的血清甘油三酯和葡萄糖水平基本上相同。两个HF HFr组的血清胆固醇和胰岛素水平大致相同, 且在饲料饲养组中显著较高, 如所预期的。AGT dsRNA剂治疗显示显著降低血清非酯化脂肪酸 (NEFA) ($p=0.01$)。在肝中, 两个HF HFr组的胆固醇比正常饲料对照升高, 但再次AGT dsRNA剂治疗未观察到显著下降。在AGT dsRNA剂治疗组中观察到肝甘油三酯 ($p=0.017$) 和游离脂肪酸 ($p=0.001$) 比对照治疗组显著降低。在AGT dsRNA治疗组中观察到硫代巴比妥酸 (TBA) (脂质氧化的指标) 下降的可能趋势。

[0950] 相较于饲料饲养小鼠, 在对照治疗Hf Hfr小鼠中血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 和谷氨酰转氨酶 (GLDH) 水平的显著升高指示肝损伤。相较于对照治疗Hf Hfr小鼠, AGT dsRNA剂治疗导致ALT显著降低 ($p=0.01$) (图11A), 具有AST (图11B) 及GLDH (图11C) 降低的趋势。

[0951] 还通过组织病理学和NAS得分来评价肝损伤。如所预期的, HFHFr饮食诱导显著脂肪变性、气球样变性和肝小叶炎症, 造成总体NAS得分比饲料饲养小鼠升高。相较于对照治疗HF HFr饲养动物, 在AGT dsRNA剂处理的HF HFr饲养动物中, AGT dsRNA剂治疗造成气球样变性的显著下降 ($p=0.04$), 具有降低肝小叶炎症的倾向, 造成总体NAS得分显著下降 (p

=0.01)。

[0952] 这些数据证明,AGT dsRNA剂治疗有效减缓NASH的某些征兆。值得注意的是,AGT dsRNA剂治疗有效降低体重和肝损伤酶,具有ALT显著降低及AST和GLDH轻微降低。还观察到肝小叶炎症和气球化得分下降,使得总体NAS得分下降。

[0953] 等同

[0954] 本领域技术人员应认识到,或能够仅使用常规实验确定本文所述具体实施方式和方法的许多等效物。这类等效物意图包括在下列权利要求的范围中。

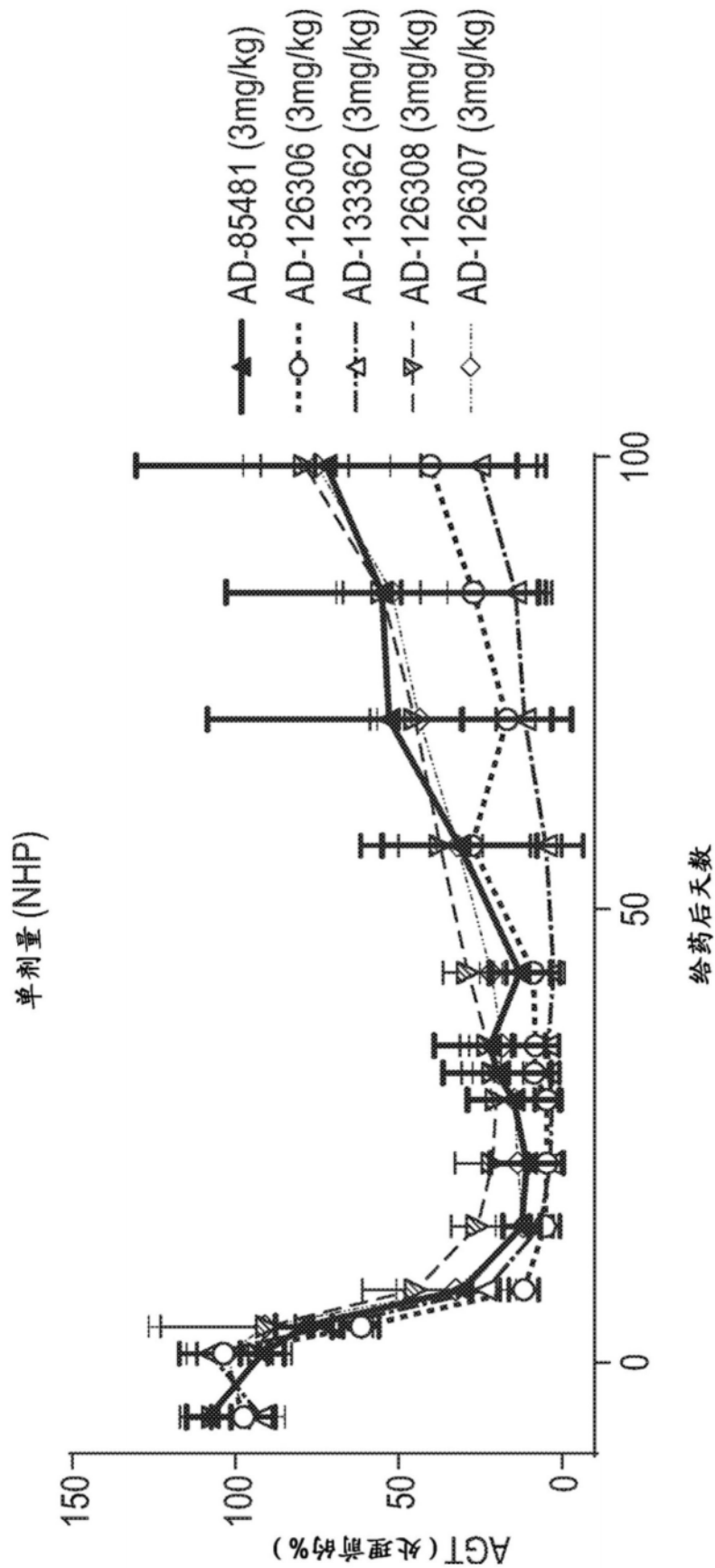


图1A

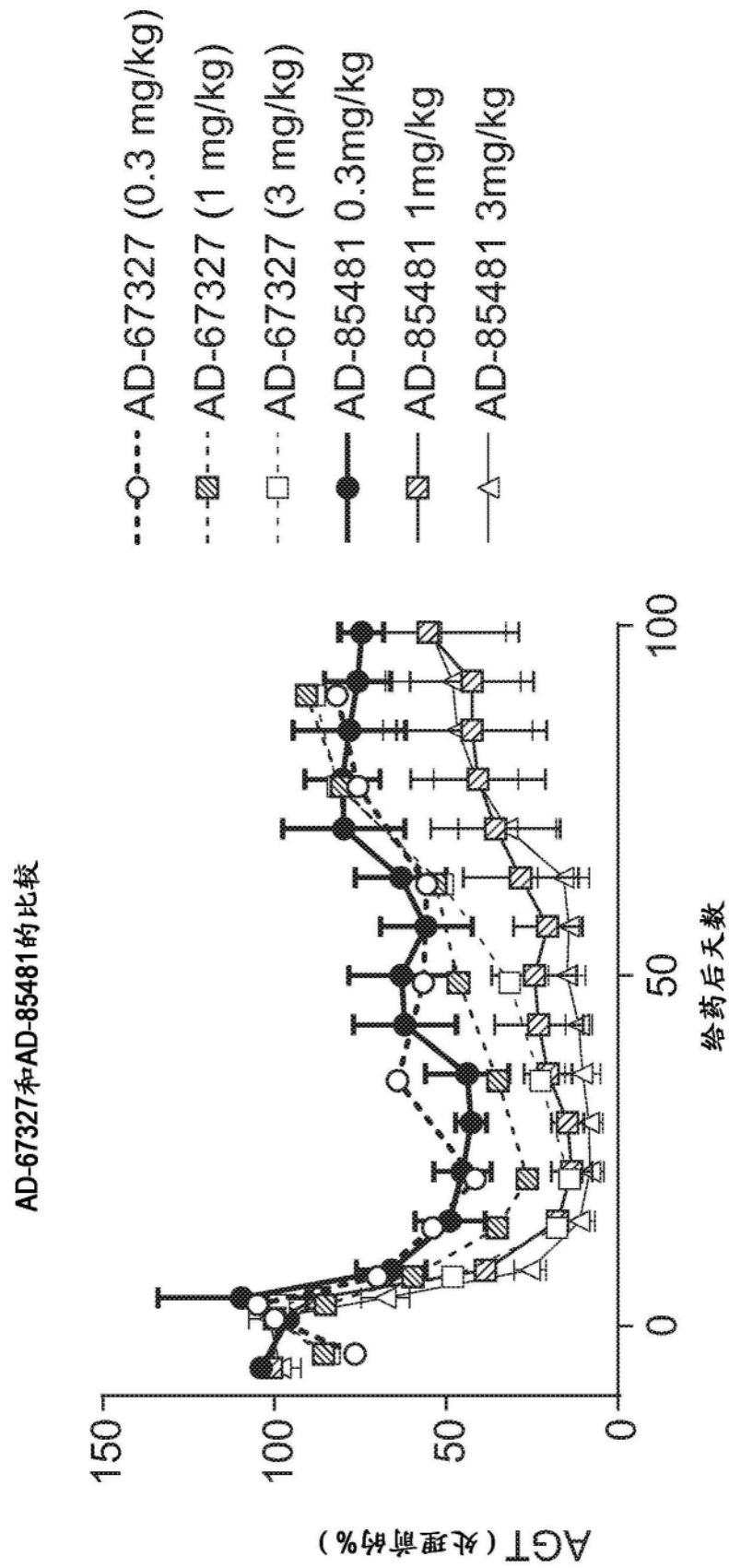


图1B

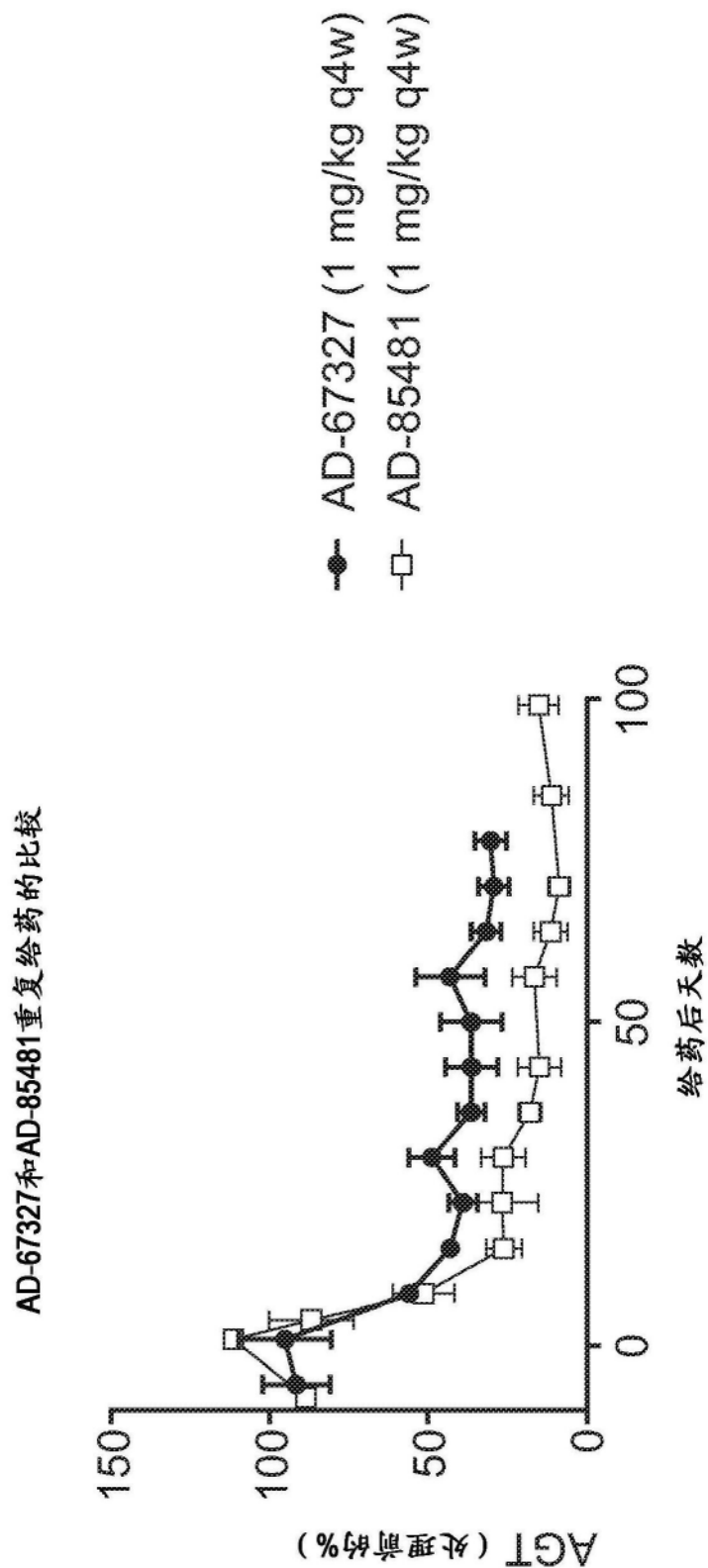


图1C

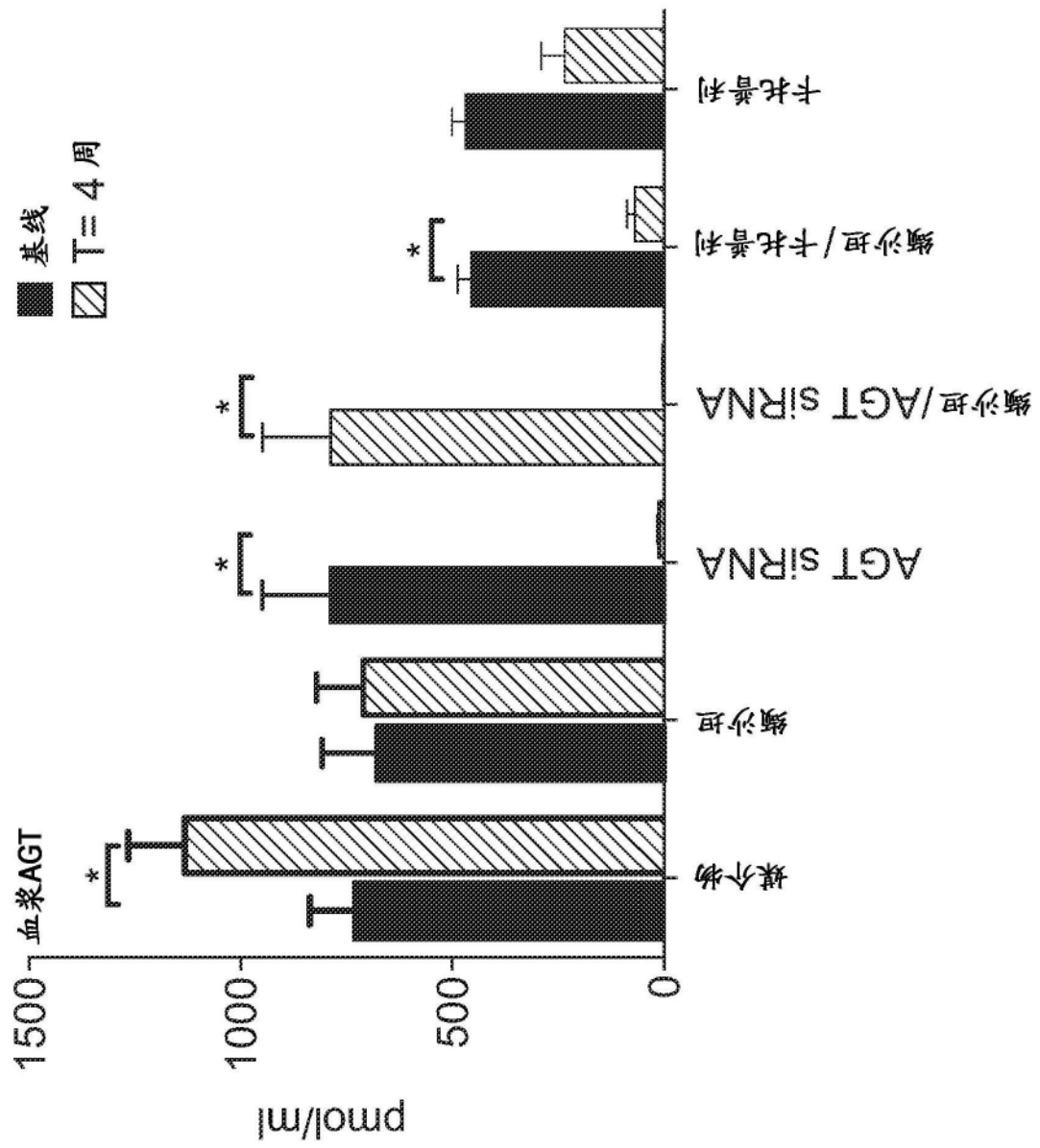


图2A

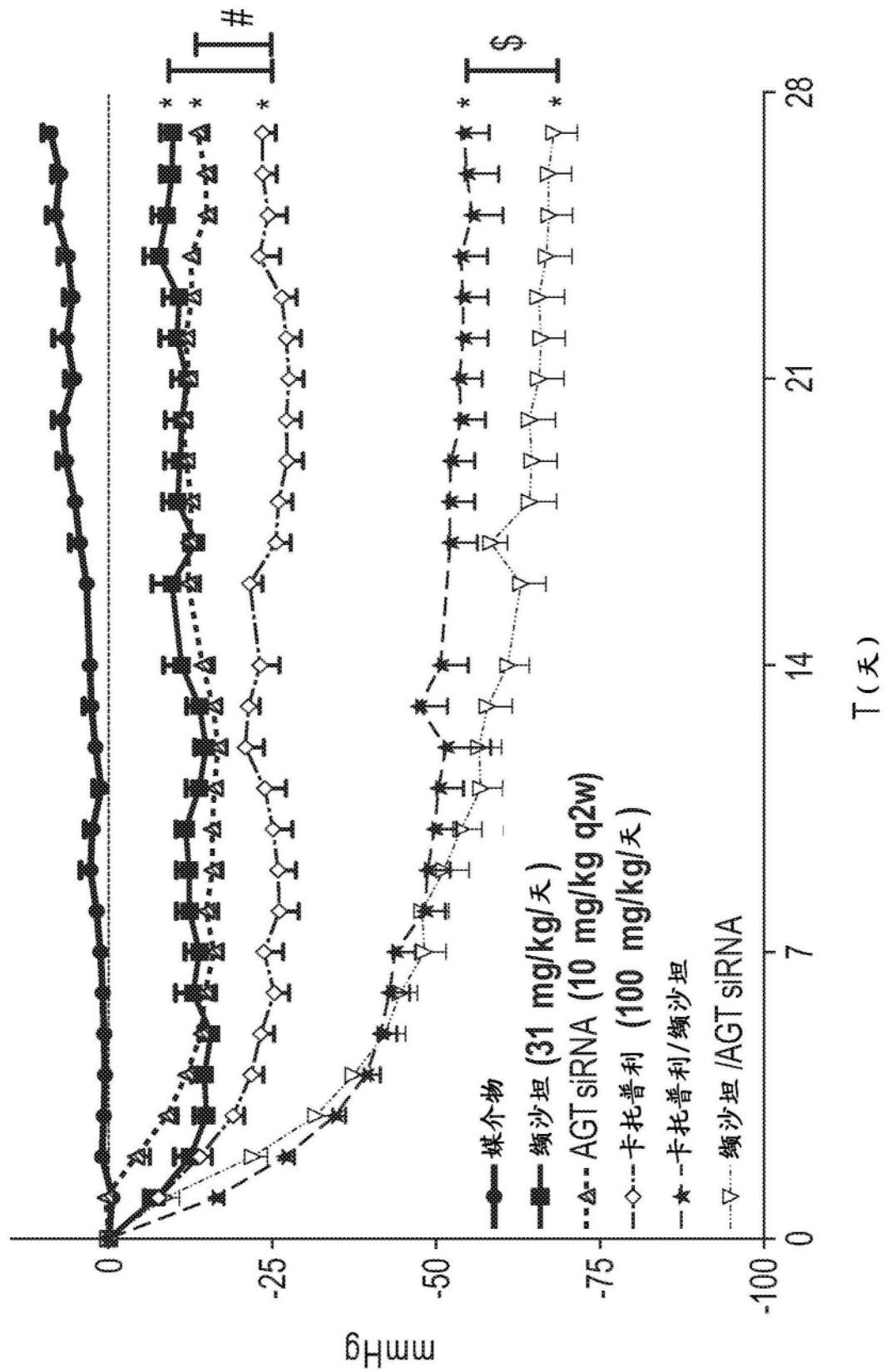


图2B

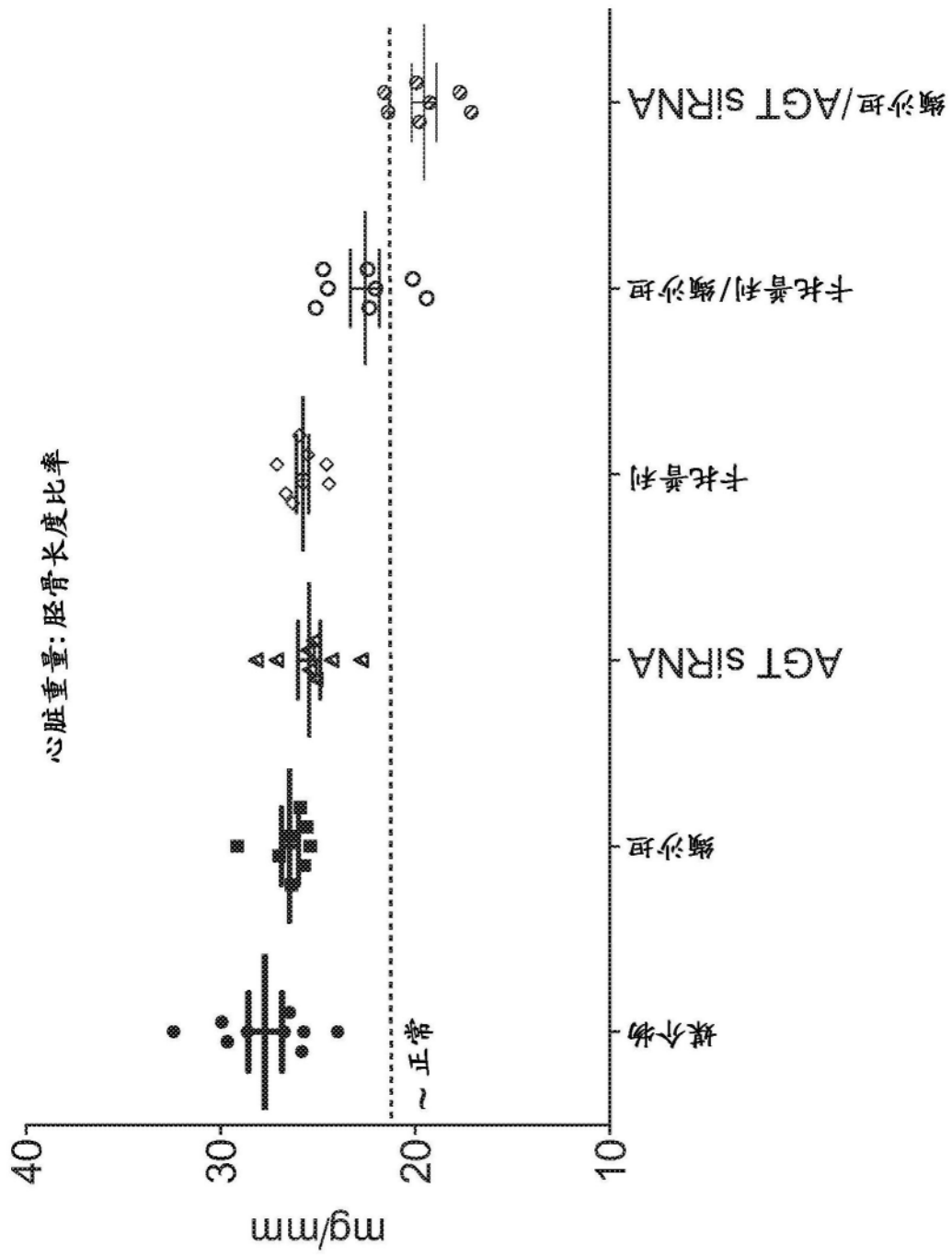


图2C

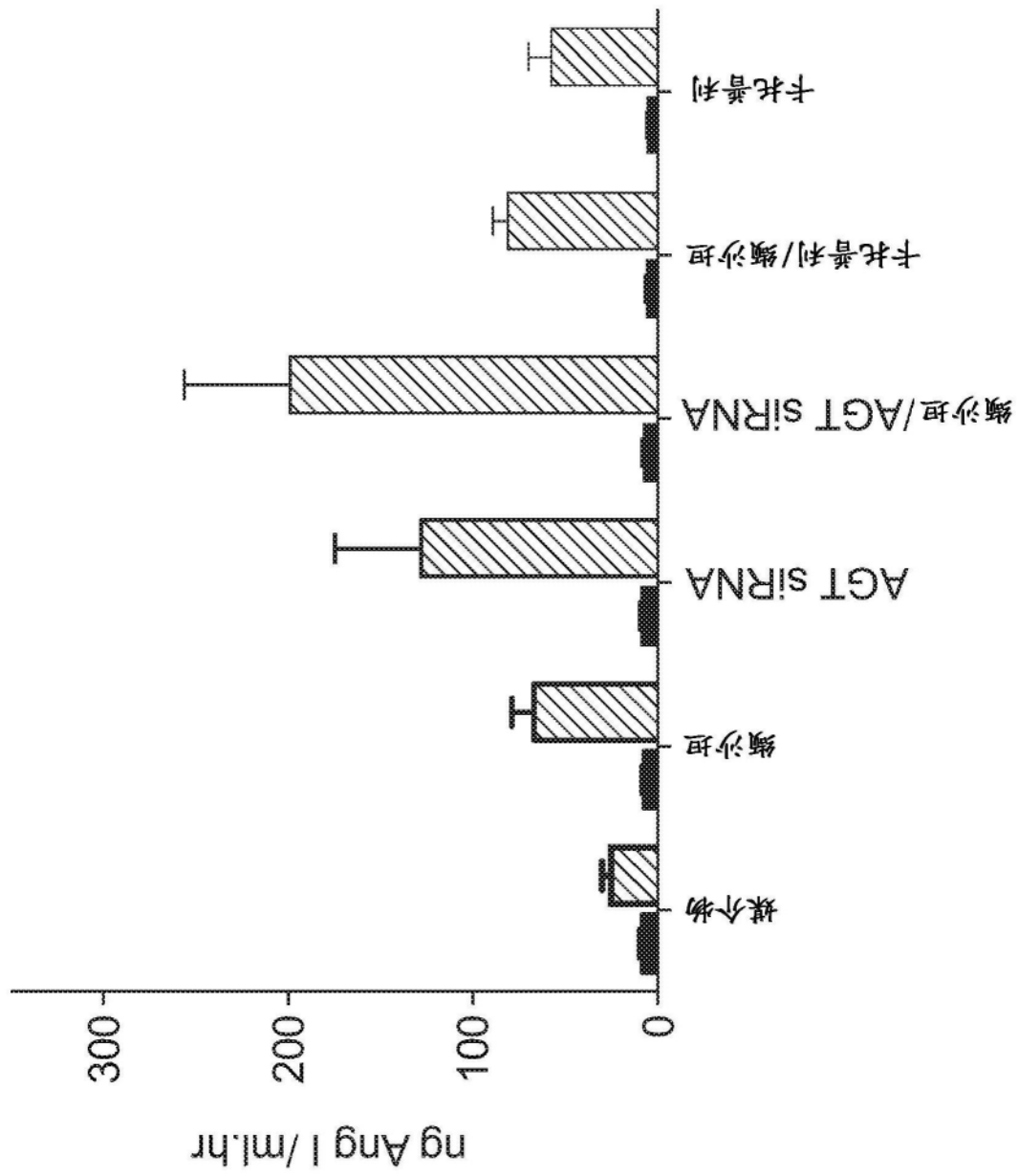


图2D

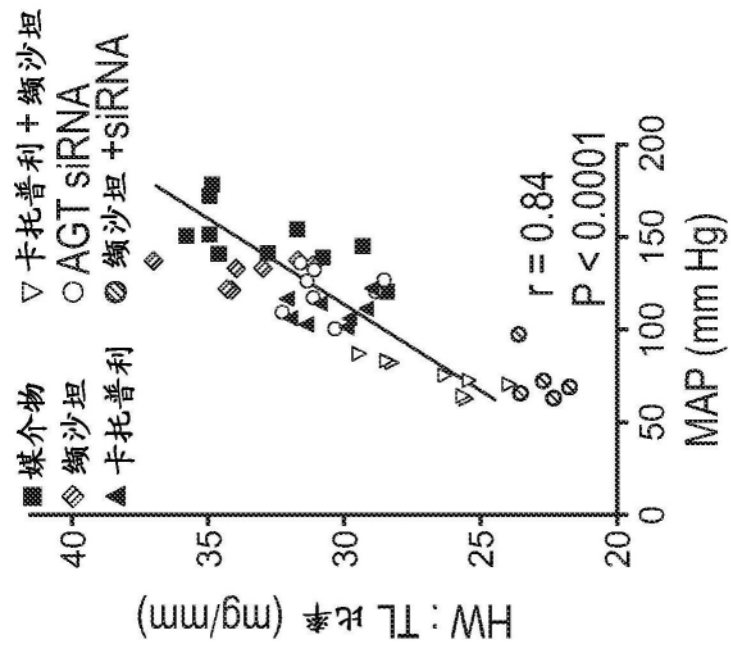


图2E

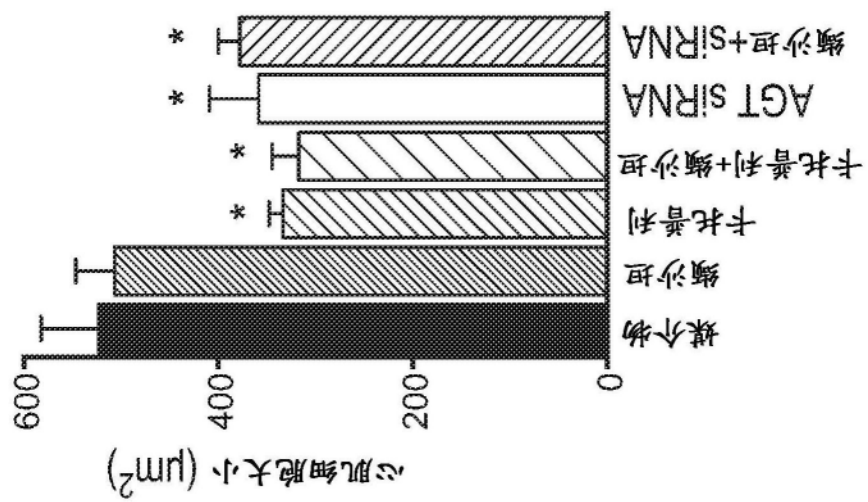


图2F

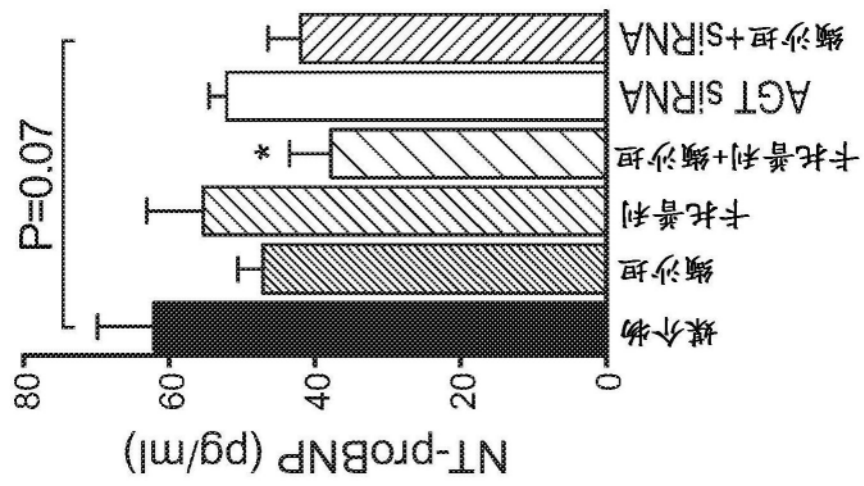


图2G

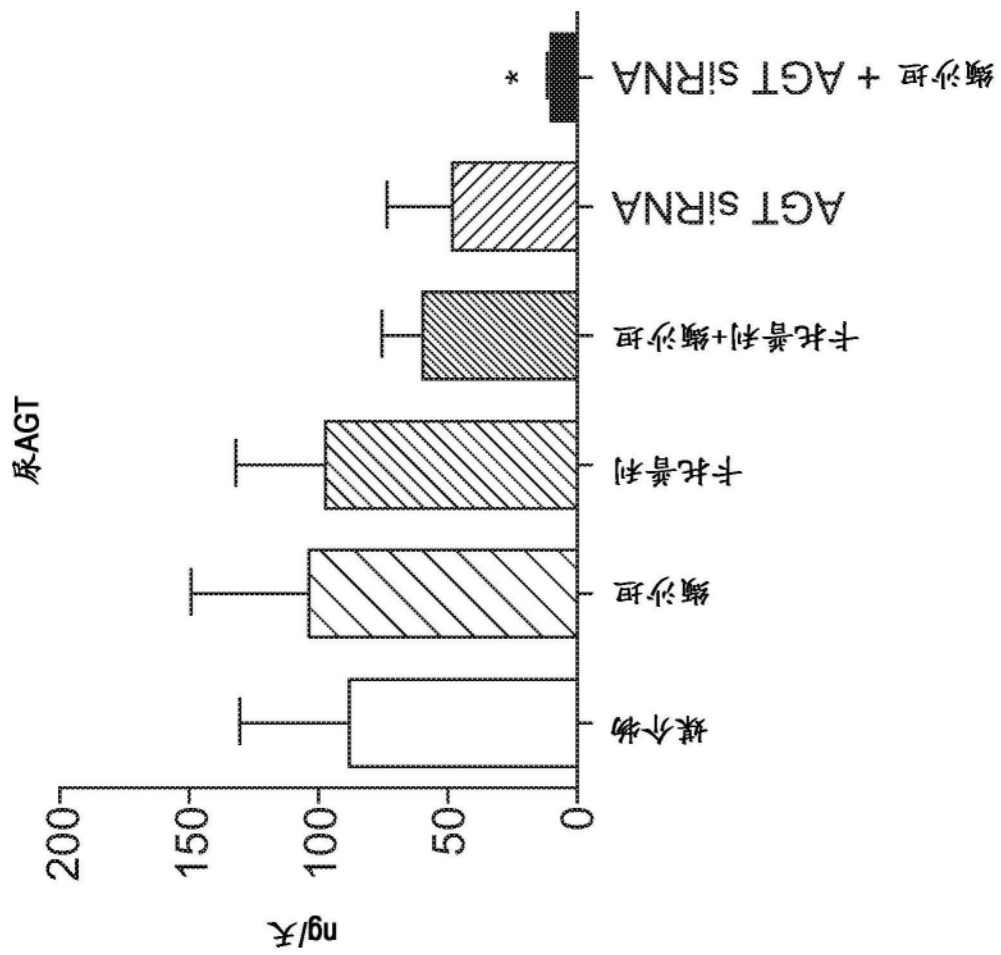


图3

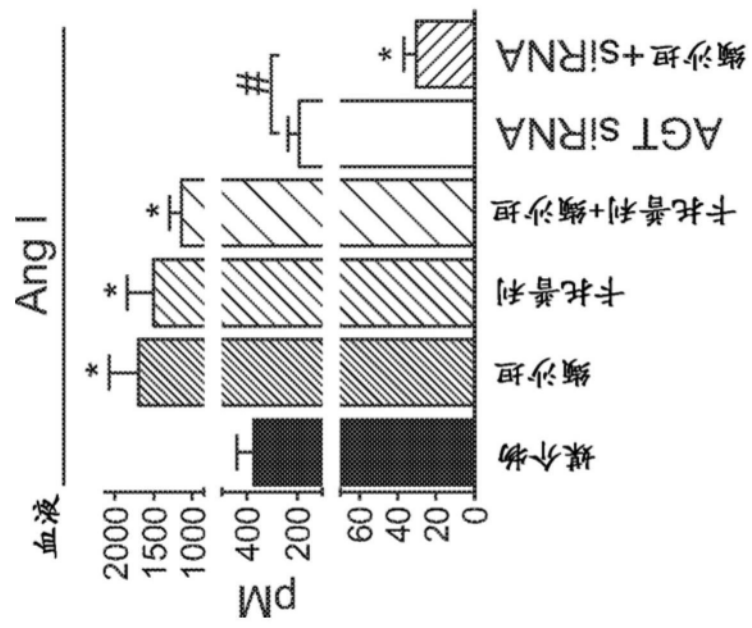
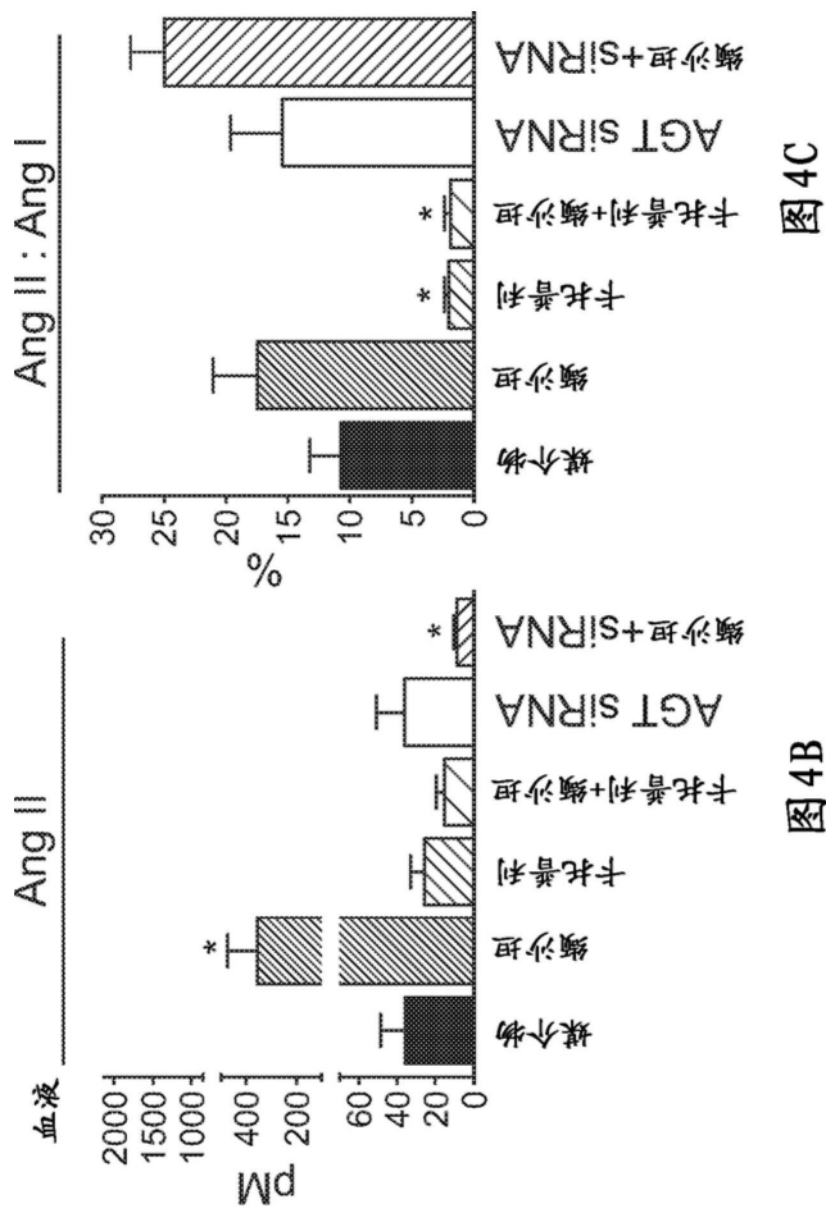
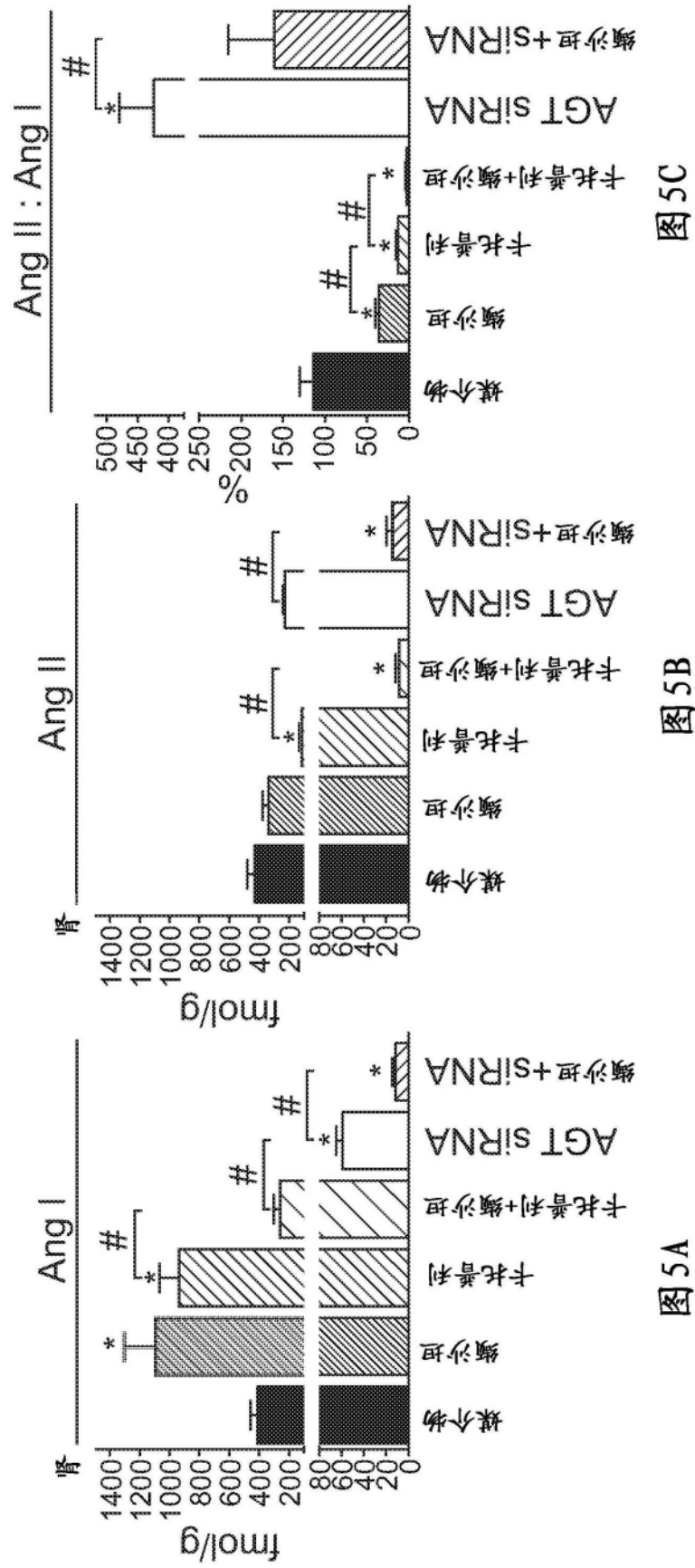


图4A





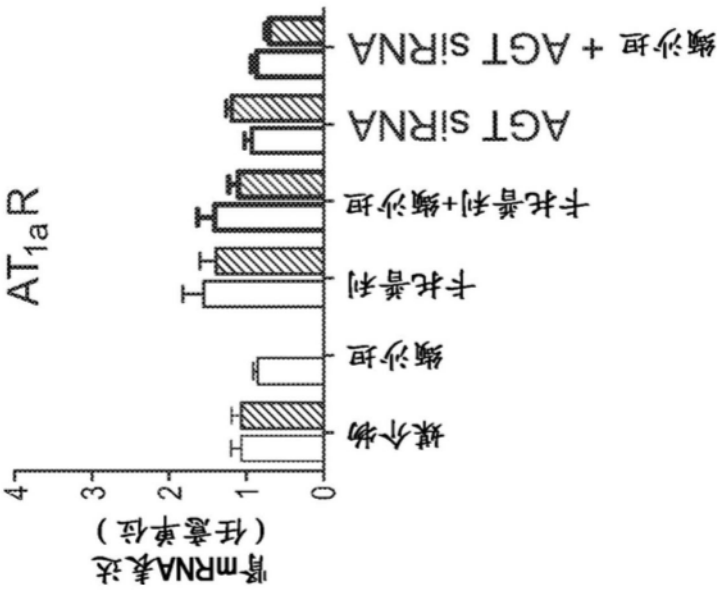


图6A

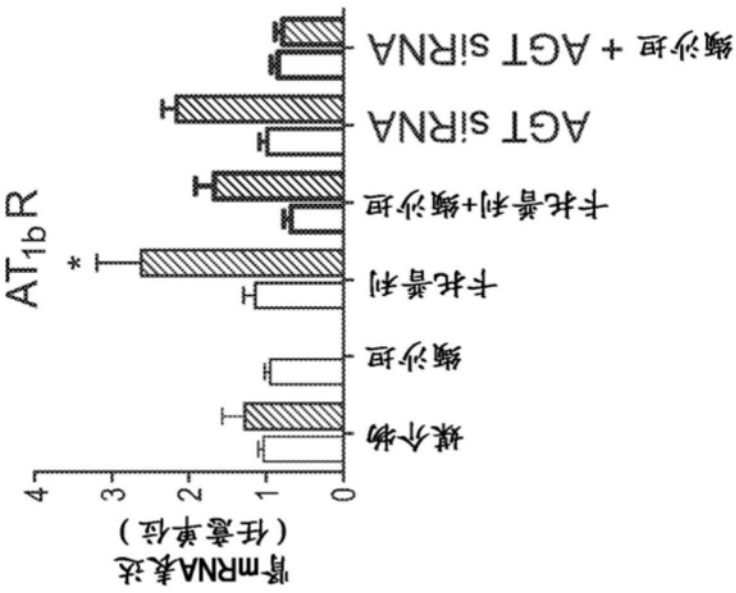


图6B

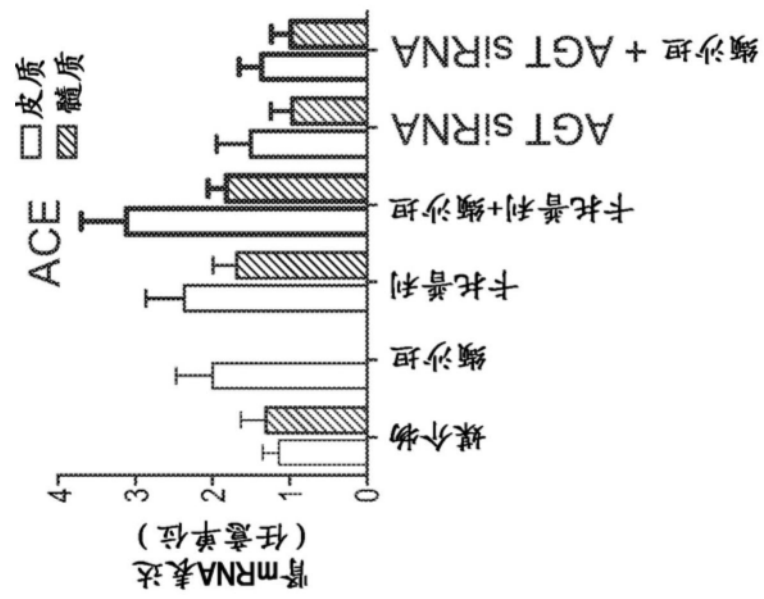


图6C

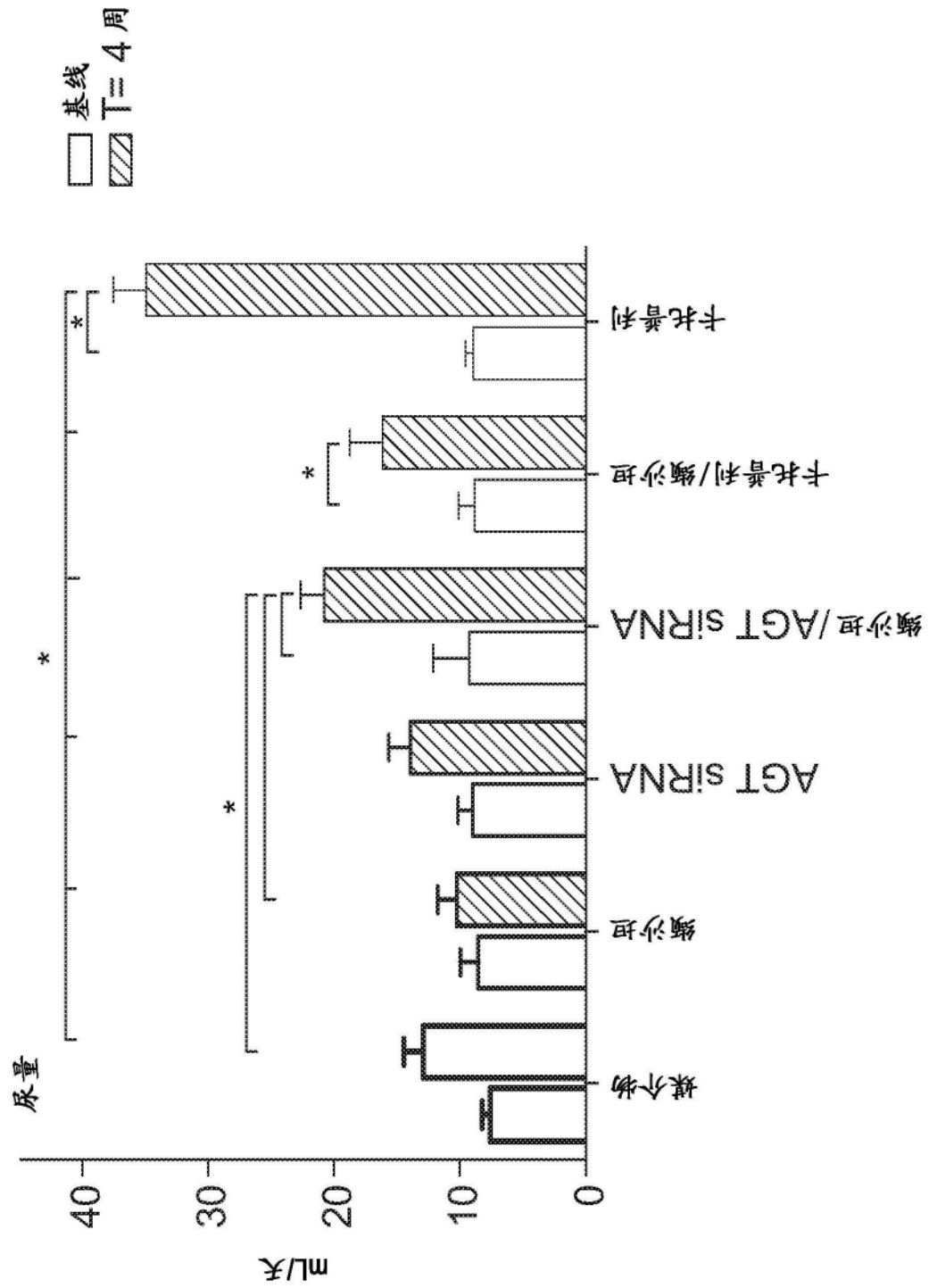


图7

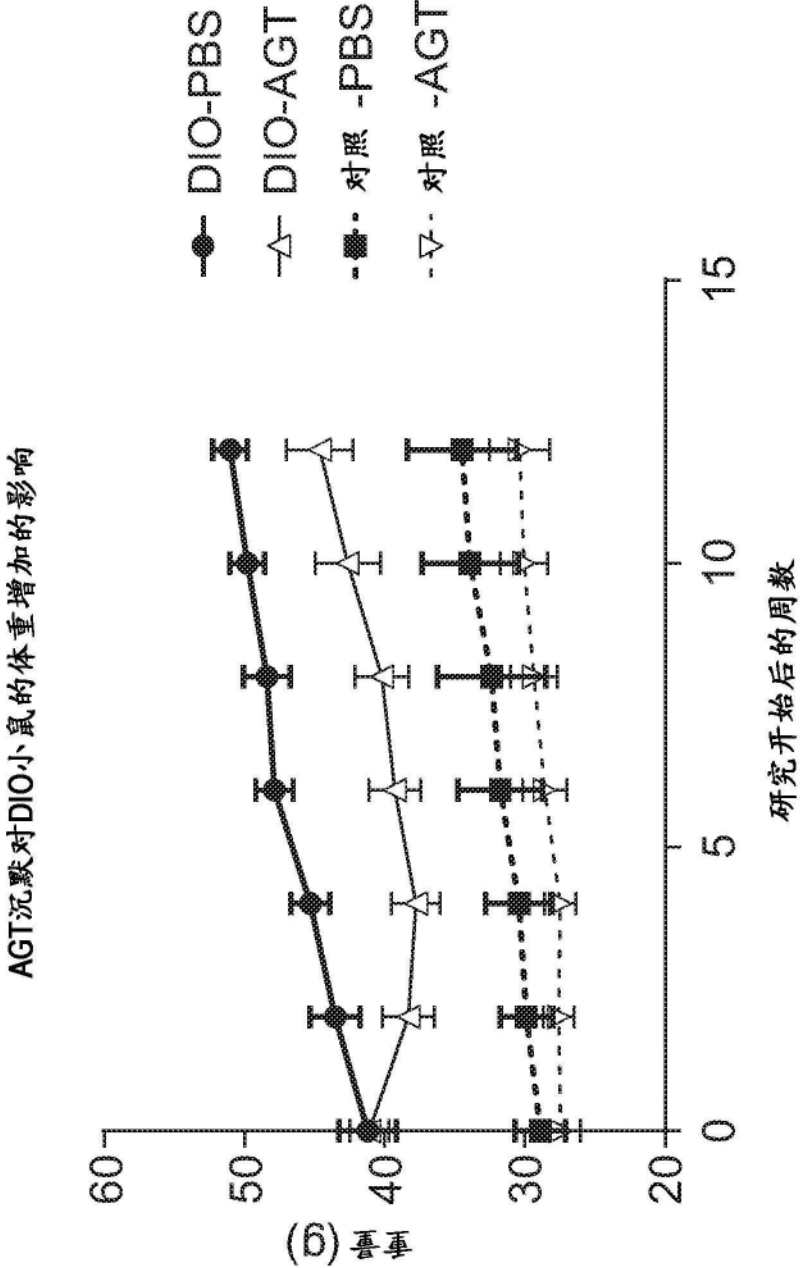


图8A

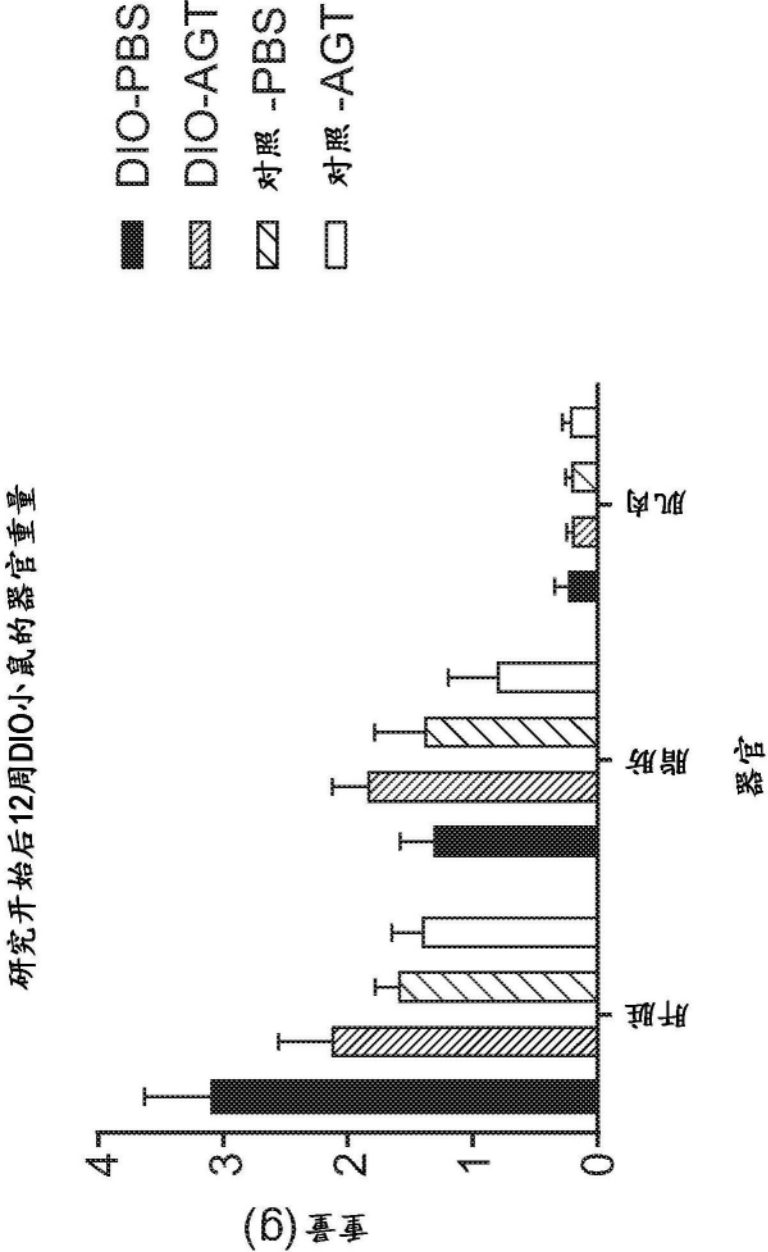


图8B

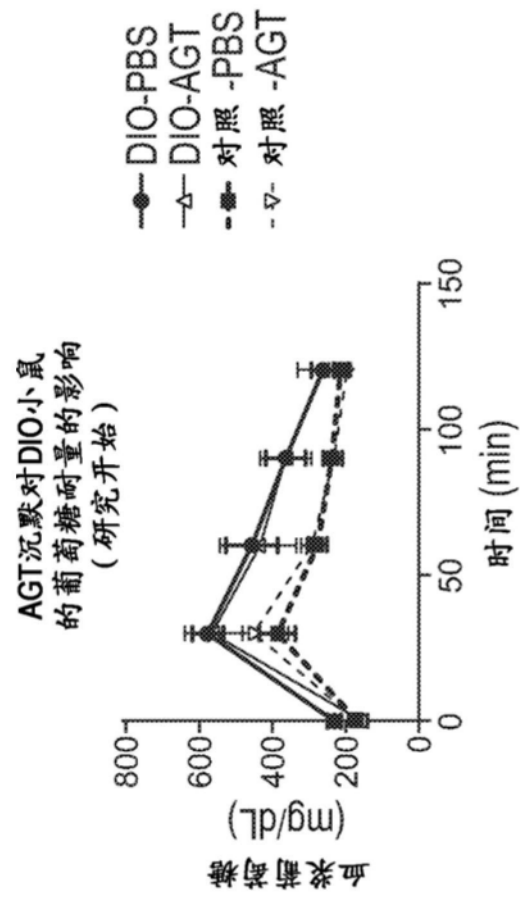


图9A

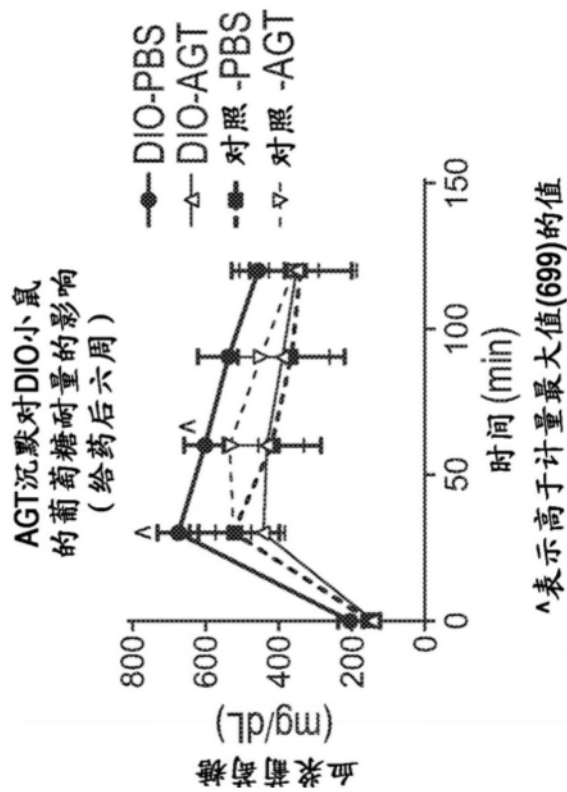


图9B

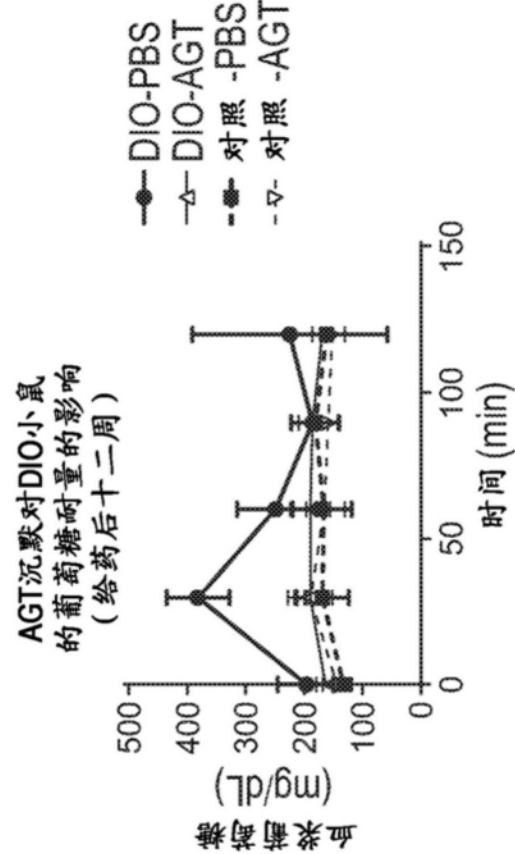


图9C

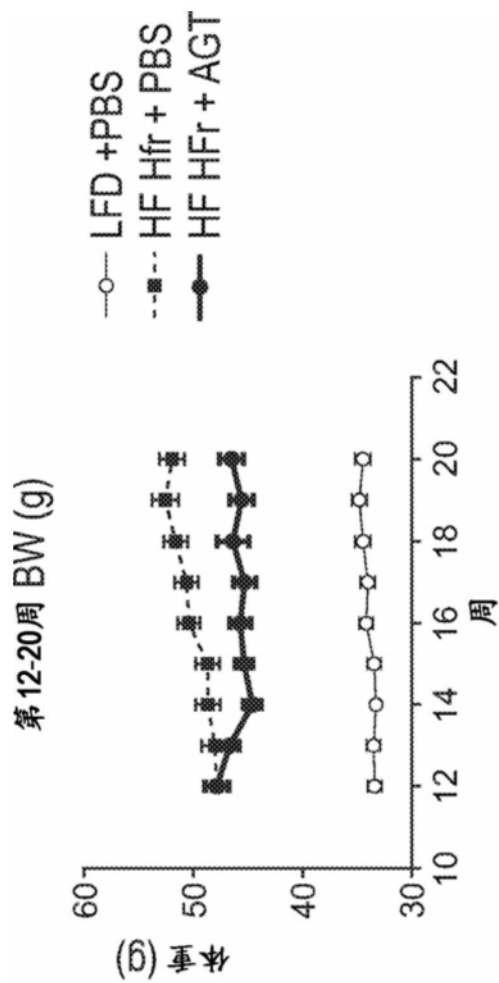


图10A

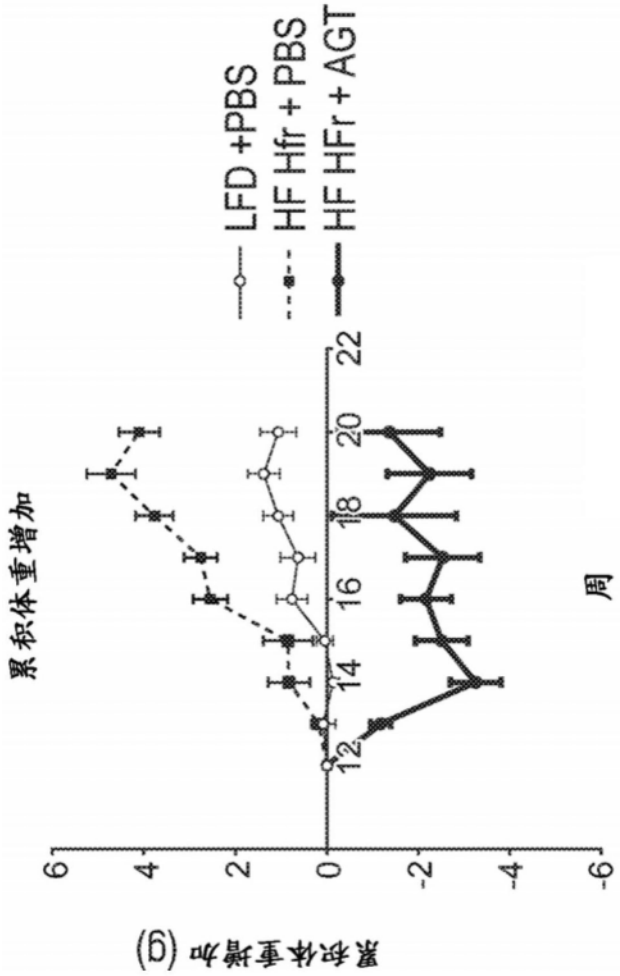


图10B

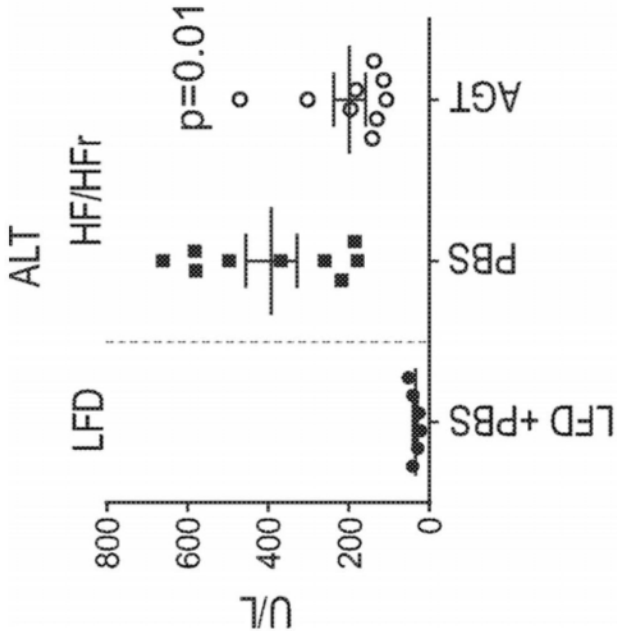


图 11A

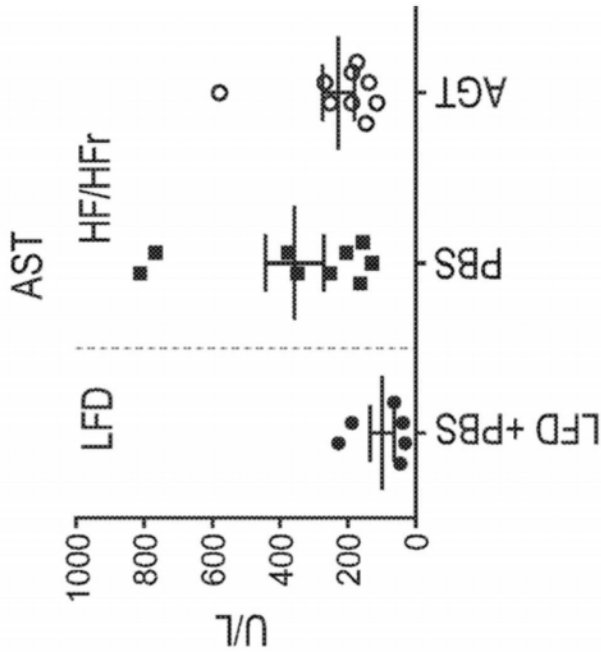


图 11B

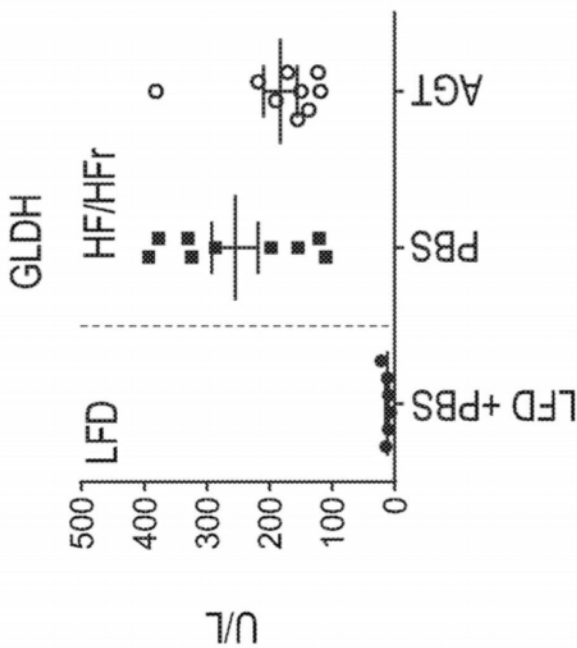


图 11C