(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119907856 A
(43)申请公布日 2025.04.29

(21)申请号 202380066434.9
(22)申请日 2023.09.14
(30)优先权数据
63/406,894 2022.09.15 US
63/434,581 2022.12.22 US
63/521,752 2023.06.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/032680 2023.09.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/059165 EN 2024.03.21
(71)申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司
地址 美国
(72)发明人 P·巴德里 R·麦克杜格尔 J·李 J·弗里德曼
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波
(51)Int.Cl.
*C12N 15/113*(2006.01)

权利要求书9页 说明书199页 附图10页

(54)发明名称

第13型17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B13)iRNA组合物及其使用方法

(57)摘要

本发明关于使用靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)组合物来治疗将得益于该HSD17B13表达降低的个体的方法,所述个体诸如患有HSD17B13相关疾病、病症或病状,例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体。本发明还提供用于预防患有HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如NASH)的个体的至少一种症状的方法。

CN 119907856 A

1.一种降低个体的HSD17B13 mRNA水平的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此降低所述个体的HSD17B13 mRNA水平。

2.一种治疗罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此治疗所述罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体。

3.一种预防患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的至少一种症状的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此预防患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的至少一种症状。

4.一种降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此降低所述患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险。

5.一种抑制罹患脂肪变性的个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此抑制所述个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎。

6.一种抑制罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的肝脏中的脂滴积聚的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且所述反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此抑制所述罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的肝脏中的脂肪积聚。

7.如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中在首次施用所述dsRNA剂之后6个月,所述个体的HSD17B13 mRNA水平降低至基线水平的至少约70%、65%、60%、55%或50%。

8.如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中向所述个体施用所述dsRNA剂引起个体肝脏中HSD17B13酶活性降低、HSD17B13蛋白质积聚减少,和/或脂肪积聚和/或脂滴膨胀减少。

9.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述个体为人类个体。

10.如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述个体为肥胖的。

11.如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂包含至少一个经修饰的核苷酸。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述有义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。

13.如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述反义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。

14.如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述有义链的实质上所有核苷酸及所述反义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。

15.如权利要求11至14中任一项所述的方法,其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自由以下组成的组:脱氧核苷酸、3'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、解锁核苷酸、构形受限核苷酸、限制性乙基核苷酸、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-吗啉基核苷酸、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-无水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、二醇修饰的核苷酸及2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,以及其组合。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述核苷酸修饰为2'-O-甲基和/或2'-氟修饰。

17.如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂的各链的长度不超过30个核苷酸。

18.如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂的各链的长度独立地为19至30个核苷酸。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述dsRNA剂的各链的长度独立地为19至25个核苷酸。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述dsRNA剂的各链的长度独立地为21至23个核苷酸。

21.如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂的至少一个链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

22.如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂的至少一个链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

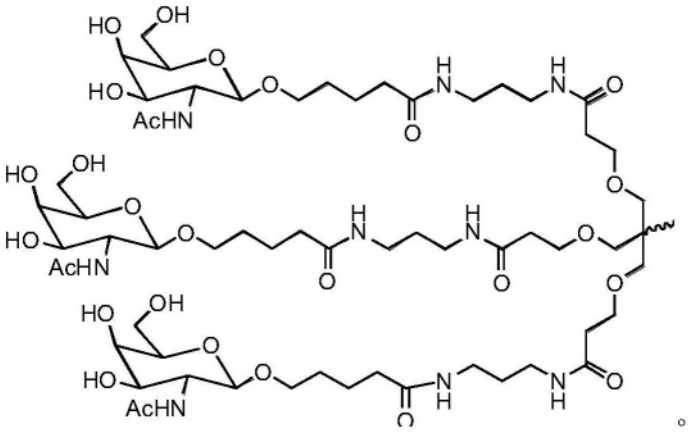
23.如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂进一步包含配体。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述配体与所述dsRNA剂的所述有义链的3'端共轭。

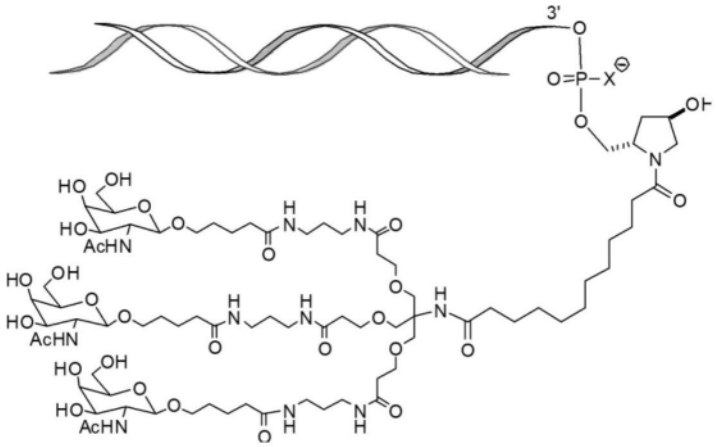
25.如权利要求23或24所述的方法,其中所述配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生

物。

26.如权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述配体为



27.如权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂与所述配体共轭,如以下示意图中所示



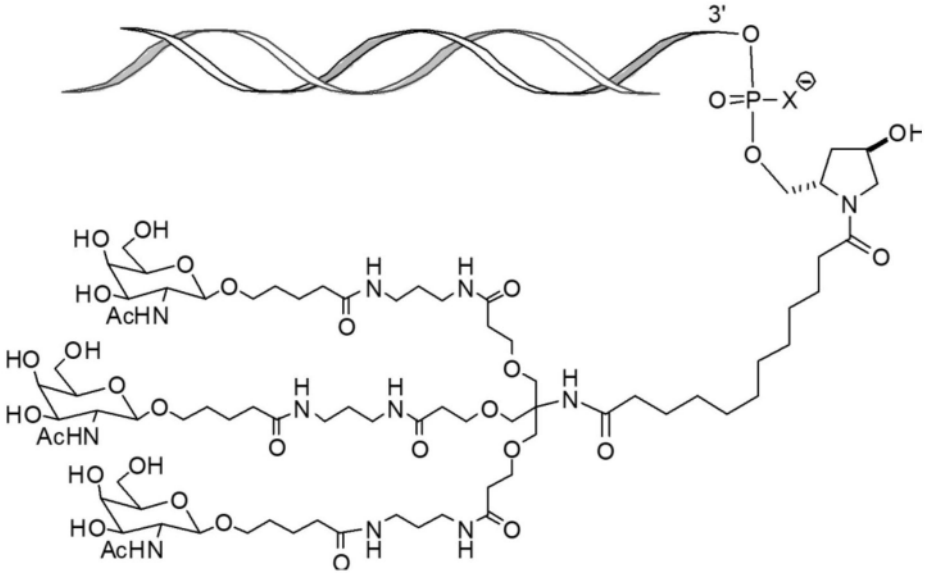
且其中X为O或S。

28.如权利要求27所述的方法,其中X为O。

29.如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述dsRNA剂与所述配体共轭,如以下示意图中所示



且其中X为O。

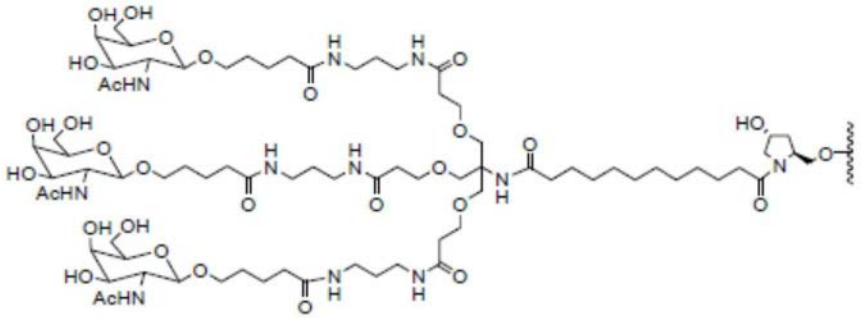
31.一种治疗罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,

其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;

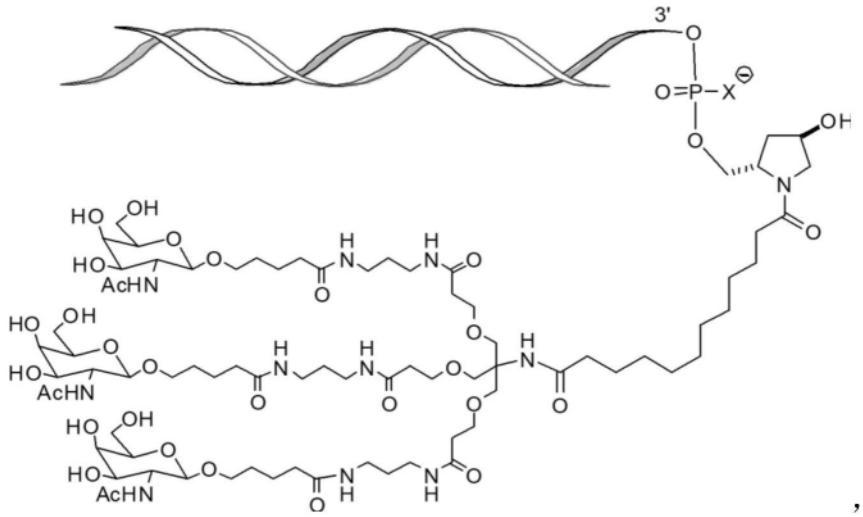
其中所述dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭



且

,

其中所述配体与所述有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示



其中X为O。

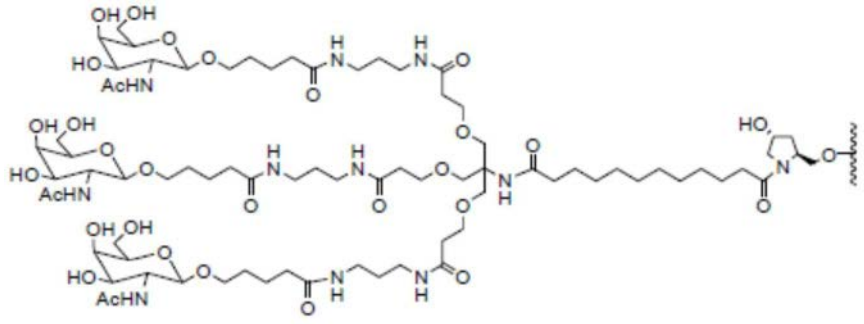
32.一种预防患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的至少一种症状的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,

其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ IDNO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

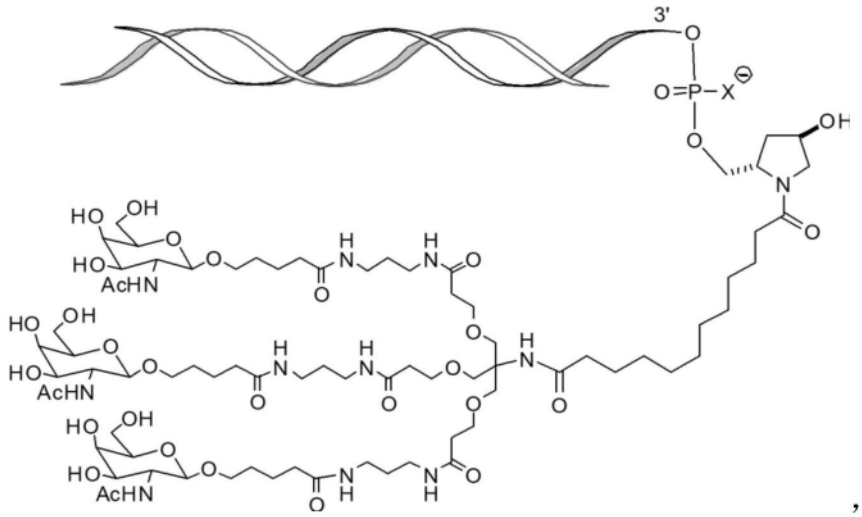
其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;

其中所述dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭



且

其中所述配体与所述有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示



其中X为O。

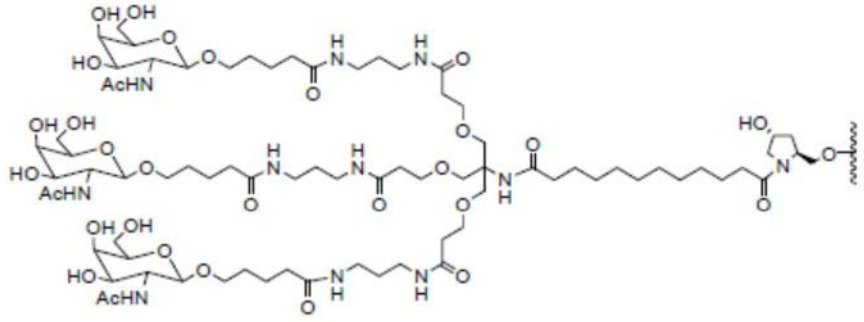
33.一种降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,

其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

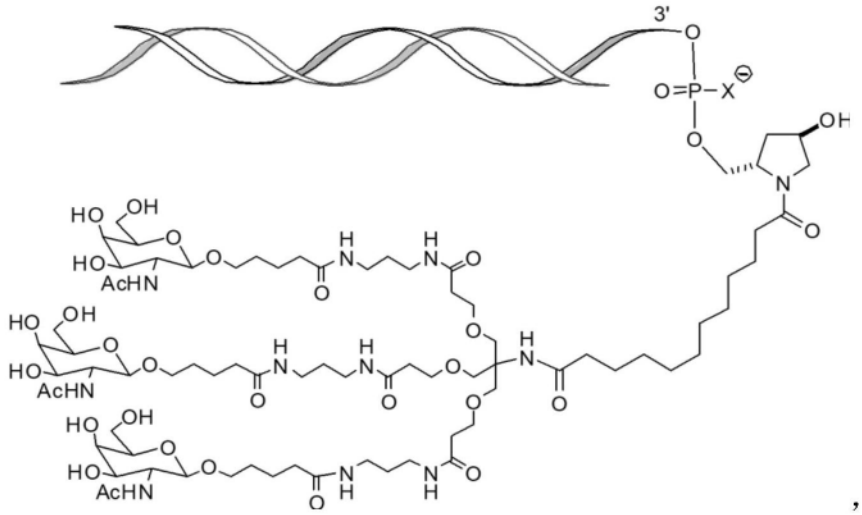
其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;

其中所述dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭



且

其中所述配体与所述有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示



其中X为O。

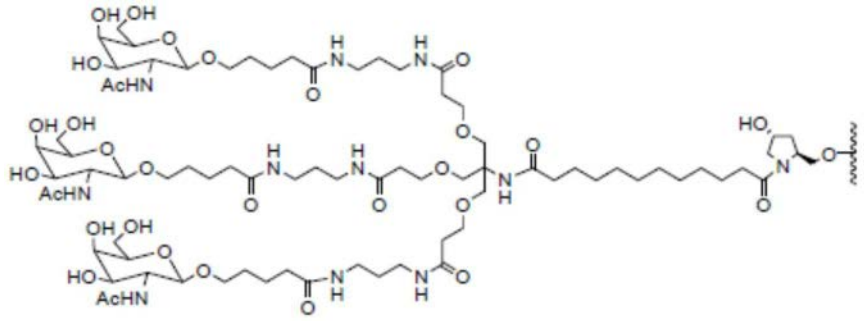
34.一种抑制罹患脂肪变性的个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,

其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

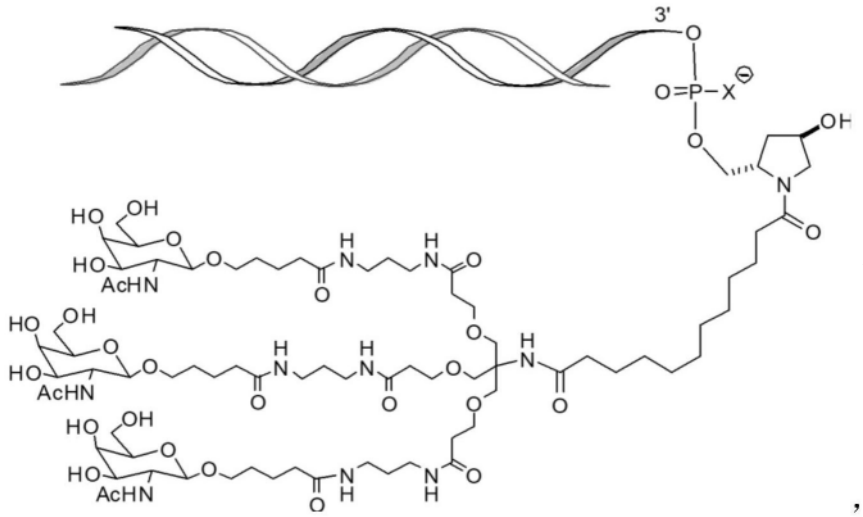
其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;

其中所述dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭



且

其中所述配体与所述有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示



其中X为O。

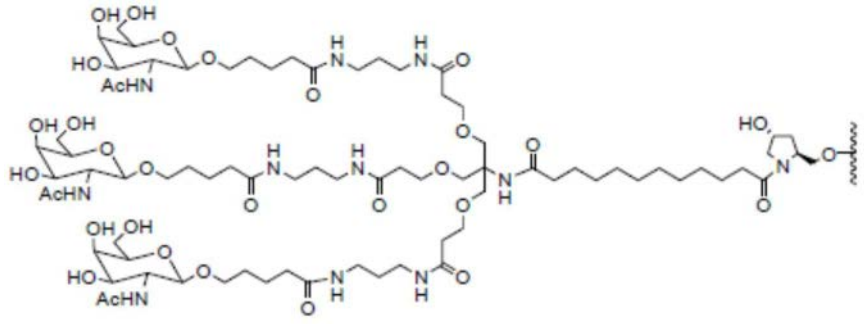
35.一种抑制罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的肝脏中的脂滴积聚的方法,所述方法包含向所述个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,

其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,

其中所述有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且所述反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),

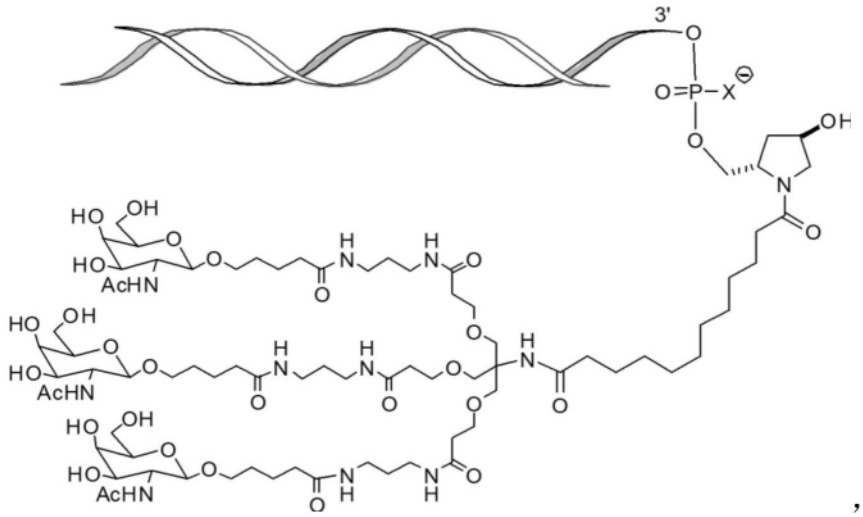
其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;

其中所述dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭



且

其中所述配体与所述有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示



其中X为O。

36.如权利要求1至35中任一项所述的方法,其进一步包含向所述个体施用额外治疗剂。

37.如权利要求1至36中任一项所述的方法,其进一步包含确定所述个体的NAFLD活动度评分(NAS)、气球样变评分、小叶发炎评分、脂肪变性评分和/或纤维化评分。

38.如权利要求1至37中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂以约25mg、约100mg、约200mg、约400mg或约800mg的剂量向所述个体施用。

39.如权利要求1至38中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每月、每2个月、每3个月、每4个月、每5个月、每6个月或每12个月向所述个体施用。

40.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每月以约25mg的剂量向所述个体施用。

41.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每月以约200mg的剂量向所述个体施用。

42.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每月以约400mg的剂量向所述个体施用。

43.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每三个月以约25mg的剂量向所述个体施用。

44.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每三个月以约200mg的剂量向所述个体施用。

45.如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂每三个月以约400mg的剂量向所述个体施用。

46.如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述dsRNA剂经静脉内、肌肉内或皮下向所述个体施用。

# 第13型17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B13)iRNA组合物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求涉及2022年9月15日提交的美国临时申请号63/406,894,2022年12月22日提交的美国临时申请号63/434,581和2023年6月19日提交的美国临时申请号63/521,752的优先权的权益。前述申请的每一个的全部内容通过引用并入本文。

## 背景技术

[0003] 第13型17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B13)为17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B)酶家族的成员,该家族的成员具有各种功能,包括例如性激素、脂肪酸及胆汁酸的活体内还原或氧化(Moeller及Adamski(2009)Mol Cell Endocrinol 301:7)。HSD17B家族的成员的组织分布、次细胞定位、催化优先性有所差异,且由于其还催化类固醇以外的其他底物(例如脂质及类视色素)的转化而具有不同的底物特异性(Marchais-Oberwinkler等人,(2011)J Steroid Biochem Mol Biol 125(1-2):66-82)。已证明,HSD17B13增强正常小鼠肝脏中及经培养的人类肝细胞中的肝脏脂肪生成(Su等人,(2014)Proc Natl Acad Sci USA 111:11437)。

[0004] 肝细胞形成肝脏的实质组织,负责动员脂质获取能量且以脂滴(LD)的形式储存多余的脂质,使得肝脏成为负责脂质稳态的主要器官。

[0005] LD现在被公认为参与脂质代谢、膜运输及信号转导的生物活性细胞器。LD通常由中性脂质(诸如三酸甘油酯(TG)及胆固醇酯的核心及环绕该核心的磷脂/胆固醇单层构成。许多LD特异性蛋白质与LD膜缔合,且起到例如控制分子进出LD的通量的作用。主要的肝细胞LD相关蛋白质为围脂滴蛋白(perilipin)家族的成员,但非围脂滴蛋白,诸如缺氧诱导蛋白2(HIG2)、含patanin样磷脂酶域蛋白3(PNPLA3)及HSD17B13,还经鉴别为LD相关蛋白质(Carr及Ahima(2016)Exp Cell Res 15:187;Su等人,(2014)Proc Natl Acad Sci USA 111:11437)。

[0006] LD积聚增加与许多代谢疾病及慢性纤维发炎性肝病有关,诸如肝纤维化、NASH及NAFLD。HSD17B13已经鉴别为表达最丰富的LD蛋白质之一,其特异性定位于患有NAFLD的人类个体及小鼠的LD表面。在患有NAFLD的患者及小鼠的肝脏中,HSD17B13的表达量还显示上调。HSD17B13的过度表达造成LD的数目及大小的增加。C57BL/6小鼠中HSD17B13的肝脏过度表达显著增加肝脏中的脂肪生成及TG含量,导致脂肪肝表型。

[0007] 目前,尚无对于慢性纤维发炎性肝病的治疗。目前对于患有慢性纤维发炎性肝病的个体的标准护理包括生活方式修正以及管理相关合并症,例如高血压、高脂血症、糖尿病、肥胖等。因此,由于慢性纤维发炎性肝病的盛行在过去10年中逐渐增加且预期仍将增加,因此在本领域中需要对于患有慢性纤维发炎性肝病的个体的替代治疗。

## 发明内容

[0008] 本发明至少部分基于以下发现:向患有NASH的个体施用(例如皮下施用)靶向

HSD17B13基因的RNAi剂(例如AD-288996)降低HSD17B13 mRNA的水平且在六个月内降低肝酶及活检获得的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)活动度评分(NAS)。

[0009] 因此,在一个方面中,本发明提供一种降低个体中的HSD17B13 mRNA水平的方法。该方法包括向该个体施用治疗有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此降低该个体中的HSD17B13 mRNA水平。在一些实施例中,该个体罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状。此外,在一些实施例中,该个体罹患至少一种选自以下的病状:慢性纤维发炎性肝病、与肝脏中脂滴的积聚和/或膨胀相关的慢性纤维发炎性肝病、肝脏发炎、肝纤维化、脂肪肝病(脂肪变性)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死及肥胖。

[0010] 在另一方面中,本发明提供一种治疗罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体的方法。该方法包括向该个体施用治疗有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此治疗罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体。

[0011] 在一个实施例中,在治疗6个月之后,HSD17B13 mRNA水平至少降低至基线水平的约70%、65%、60%、55%或50%。

[0012] 在另一方面中,本发明提供一种预防患有将得益于HSD17B13基因表达降低的疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体的至少一种症状的方法。该方法包括向该个体施用预防有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此预防患有将得益于HSD17B13基因表达降低的疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体的至少一种症状。

[0013] 在另一方面中,本发明提供一种降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险的方法。该方法包括向该个体施用治疗有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险。

[0014] 在又另一方面中,本发明提供一种抑制罹患脂肪变性的个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法。该方法包括向该个体施用治疗有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此抑制个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎。

[0015] 在一个方面中,本发明提供一种抑制罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体的肝脏中的脂滴积聚的方法。该方法包括向该个体施用治疗有效量(例如约25mg至约800mg的剂量)的dsRNA剂或其医药组合物,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且该反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27),藉此抑制罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))的个体的肝脏中的脂肪积聚。

[0016] 在一个实施例中,向个体施用该dsRNA剂或该医药组合物引起个体肝脏中HSD17B13酶活性的降低、HSD17B13蛋白质积聚的减少,和/或脂肪积聚和/或脂滴膨胀的减少。

[0017] 在一个实施例中,该HSD17B13相关疾病、病症或病状为慢性纤维发炎性肝病。

[0018] 在一个实施例中,该慢性纤维发炎性肝病选自由以下组成的组:肝脏中脂肪积聚、肝脏发炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤及肝细胞坏死。

[0019] 在一个实施例中,该慢性纤维发炎性肝病为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0020] 在一个实施例中,该个体为人类个体。

[0021] 在一些实施例中,该个体为肥胖的。

[0022] 在一些实施例中,该dsRNA剂包含至少一个经修饰的核苷酸。

[0023] 在一些实施例中,该有义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。在一些实施例中,该反义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。在一些实施例中,该有义链的实质上所有核苷酸及该反义链的实质上所有核苷酸均包含修饰。

[0024] 在一些实施例中,所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自由以下组成的组:脱氧核苷酸、3'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、解锁核苷酸、构形受限核苷酸、限制性乙基核苷酸、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-吗啉基核苷酸、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-无水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、二醇修饰的核苷酸及2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,以及其组合。

[0025] 在一些实施例中,所述核苷酸修饰为2'-O-甲基和/或2'-氟修饰。

[0026] 在一些实施例中,该dsRNA剂的各链的长度不超过30个核苷酸。在一些实施例中,该dsRNA剂的各链的长度独立地为19至30个核苷酸。在一些实施例中,该dsRNA剂的各链的长度独立地为19至25个核苷酸。在一些实施例中,该dsRNA剂的各链的长度独立地为21至23个核苷酸。

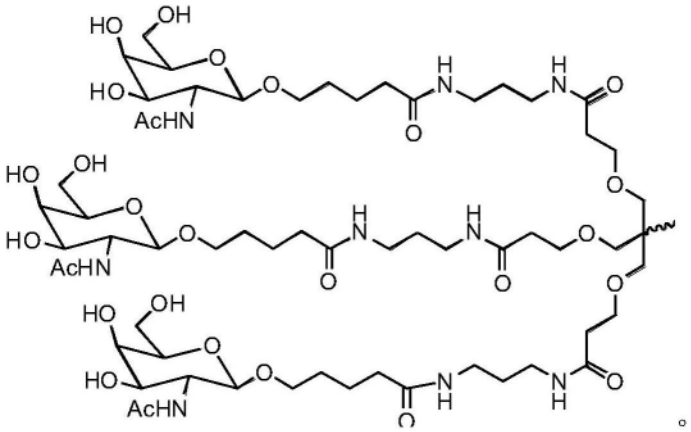
[0027] 在一些实施例中,该dsRNA剂的至少一个链包含至少1个核苷酸的3'突出端。在一些实施例中,该dsRNA剂的至少一个链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

[0028] 在一些实施例中,该dsRNA剂进一步包含配体。在一些实施例中,该配体与该dsRNA

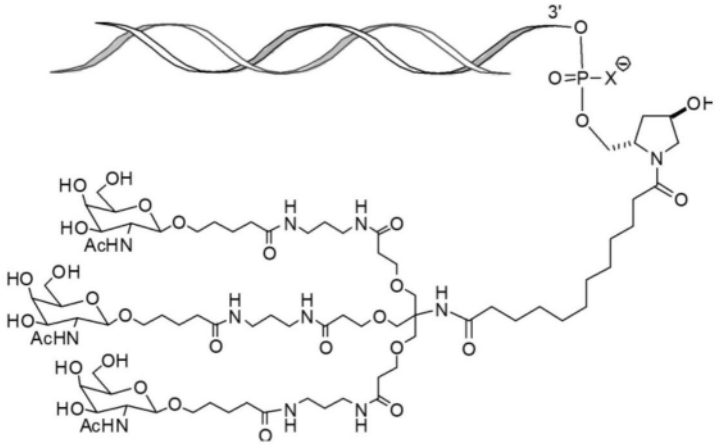
剂的该有义链的3'端共轭。

[0029] 在一些实施例中,该配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

[0030] 在一些实施例中,该配体为

[0031] 

[0032] 在一些实施例中,该dsRNA剂与配体共轭,如以下示意图中所示

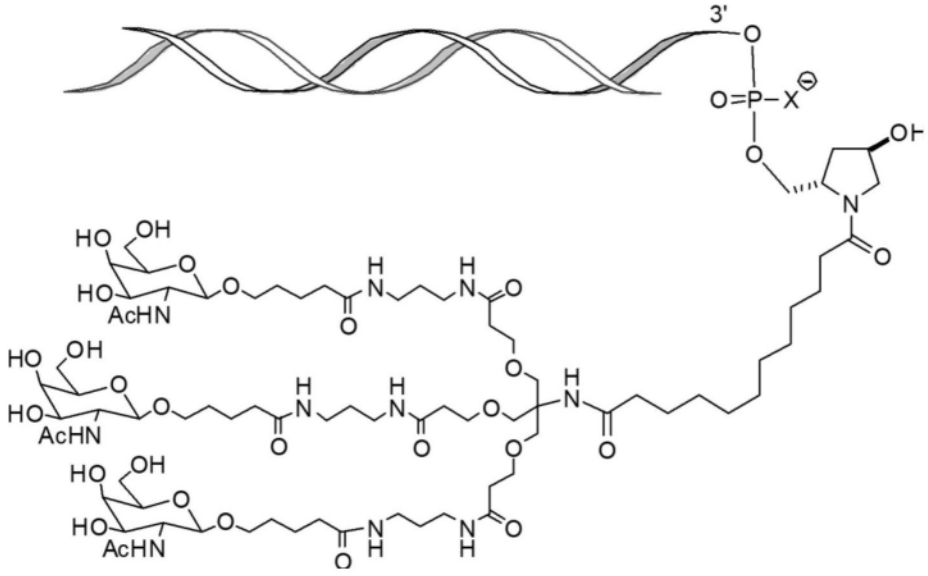
[0033] 

[0034] 且其中X为O或S。

[0035] 在一些实施例中,X为O。

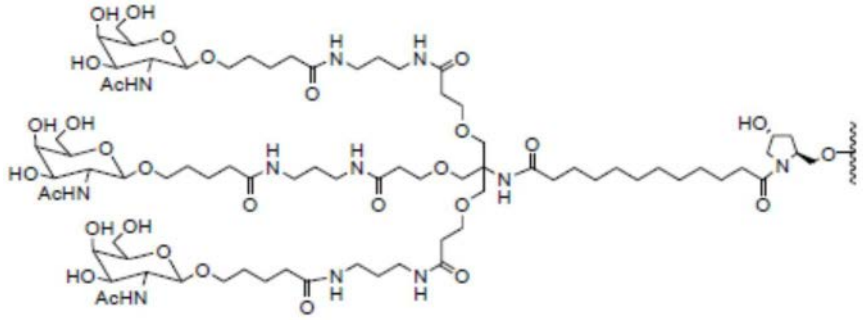
[0036] 在一些实施例中,该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联。

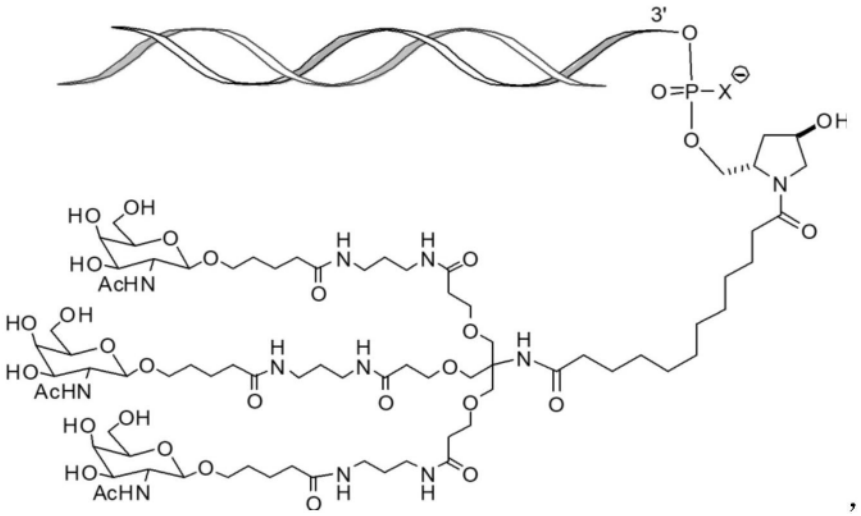
[0037] 在一些实施例中,该dsRNA剂与配体共轭,如以下示意图中所示

[0038] 

[0039] 且其中X为O。

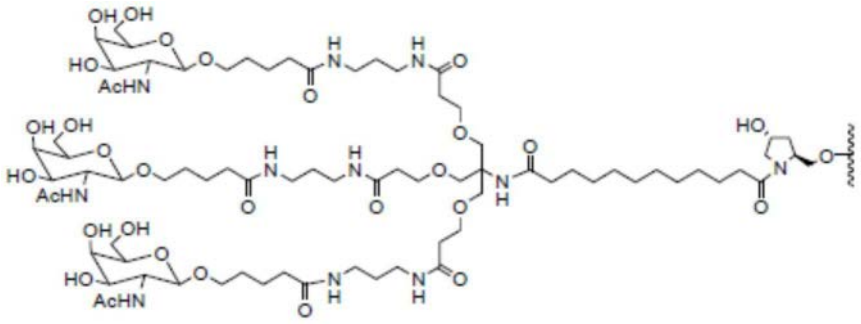
[0040] 在一个方面中,本发明提供一种治疗罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的方法,该方法包含向该个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;其中该dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭

[0041]  ,且其中该配体与该有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示

[0042] 

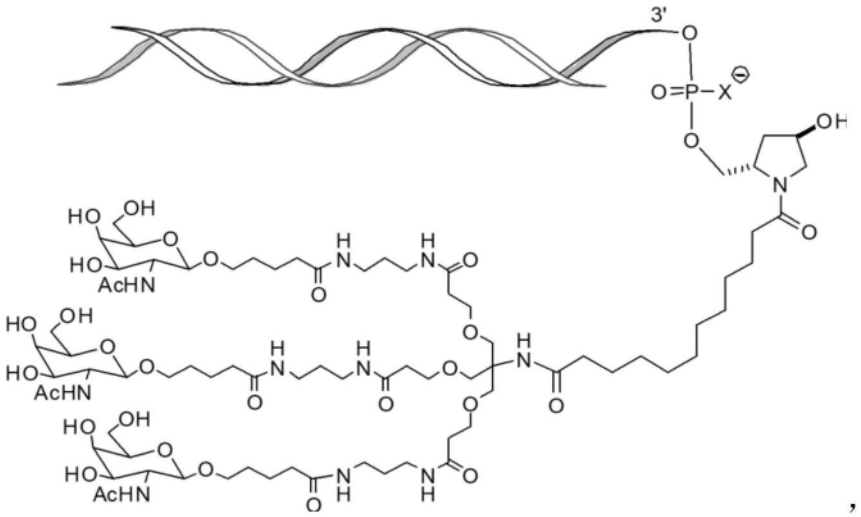
其中X为O。

[0043] 在一个方面中,本发明提供一种预防患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的至少一种症状的方法,该方法包含向该个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;其中该dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭

[0044] 

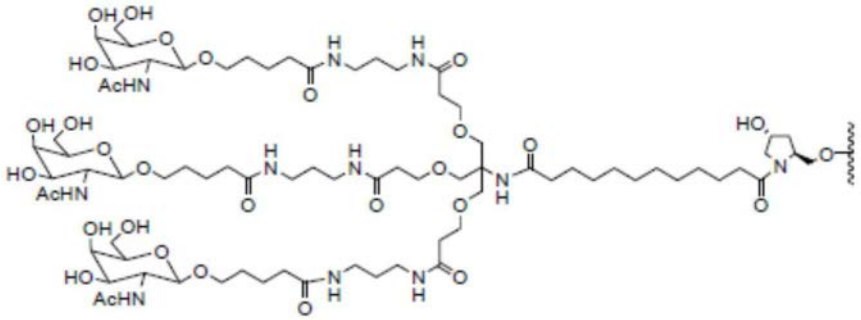
且其中该配体

与该有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示

[0045] 

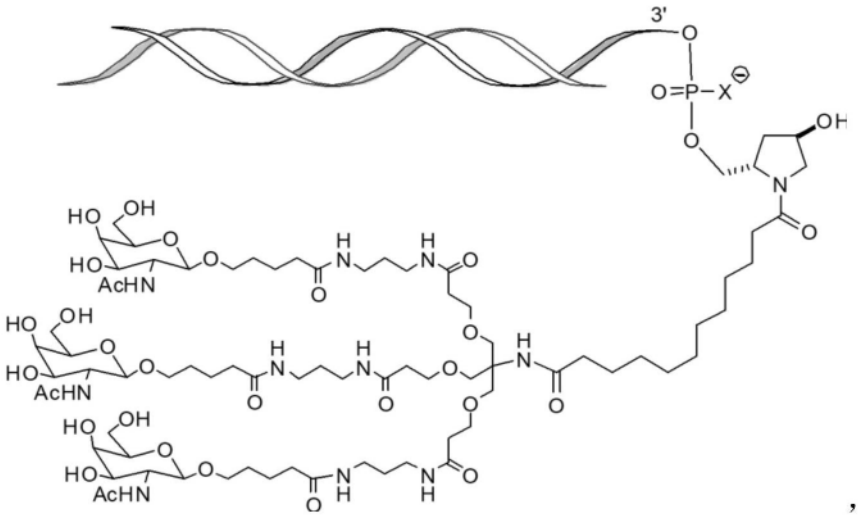
其中X为O。

[0046] 在一个方面中,本发明提供一种降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险的方法,该方法包含向该个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;其中该dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭

[0047] 

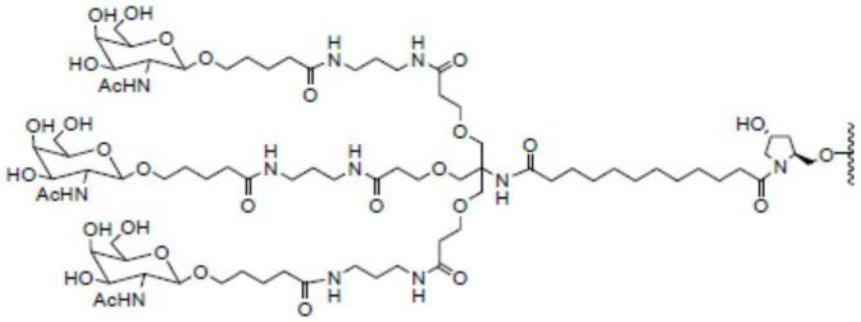
且其中该配体

与该有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示

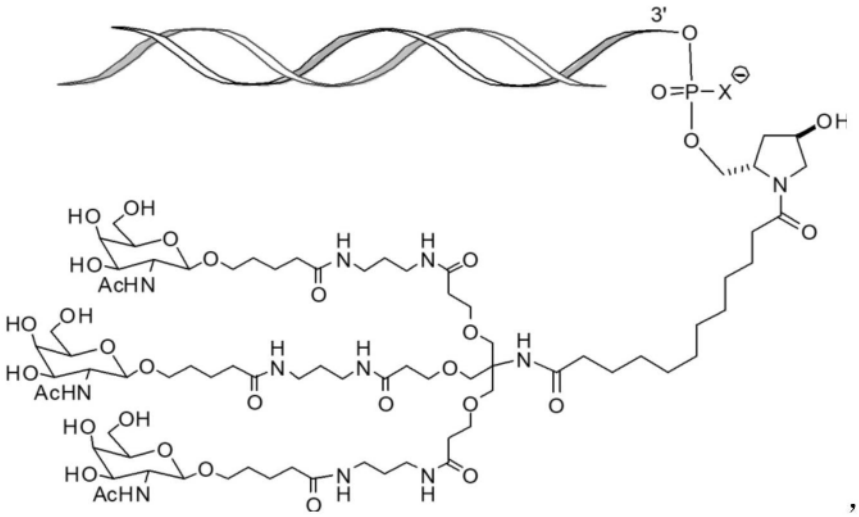
[0048] 

其中X为O。

[0049] 在一个方面中,本发明提供一种抑制罹患脂肪变性的个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法,该方法包含向该个体施用约25mg至约800mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQ ID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQ ID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;其中该dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭

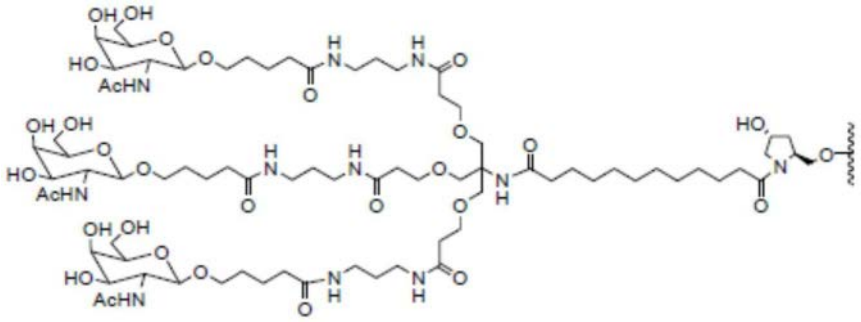
[0050] 

且其中该配体与该有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示

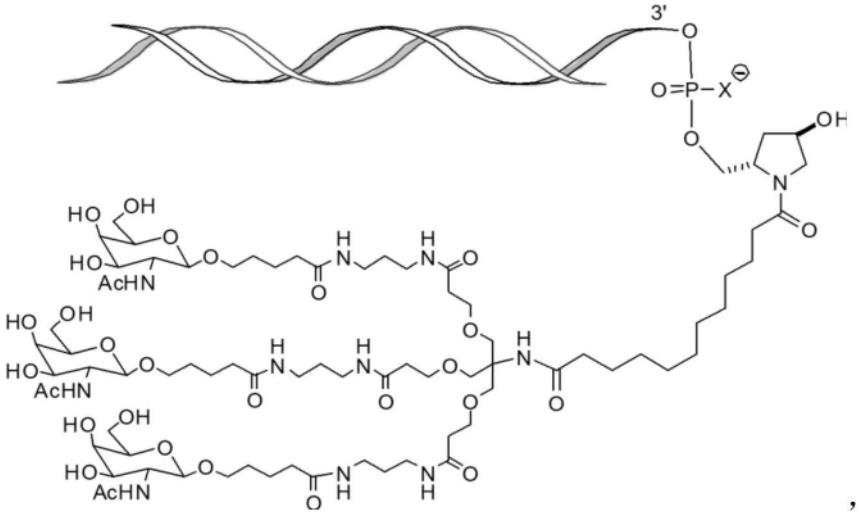
[0051] 

其中X为O。

[0052] 在一个方面中,本发明提供一种抑制罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体的肝脏中的脂滴积聚的方法,该方法包含向该个体施用约25 mg至约800 mg的剂量的靶向HSD17B13基因的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中该dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中该有义链包含核苷酸序列5'-asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucu-3'(SEQID NO:24)且该反义链包含核苷酸序列5'-asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc-3'(SEQID NO:25),其中Af为2'-氟腺苷-3'-磷酸酯;Cf为2'-氟胞苷-3'-磷酸酯;Gf为2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯;Gfs为2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯;U为尿苷-3'-磷酸酯;Uf为2'-氟尿苷-3'-磷酸酯;a为2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯;as为2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯;c为2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯;cs为2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯;g为2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯;gs为2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯;u为2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯;us为2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯;Tgn为胸苷-二醇核酸(GNA)S异构物;且s为硫代磷酸酯键联;其中该dsRNA剂与具有以下结构的配体共轭

[0053] 

且其中该配体与该有义链的3'端共轭,如以下示意图中所示

[0054]  其中X为O。

[0055] 在一个实施例中,本发明的方法进一步包括向个体施用另外的治疗剂。

[0056] 在一些实施例中,本发明的方法进一步包含确定个体的NAFLD活动度评分(NAS)、气球样变评分、小叶发炎评分、脂肪变性评分和/或纤维化评分。

[0057] 在一些实施例中,dsRNA剂以约25mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg或约800mg的剂量向个体施用。

[0058] 在一些实施例中,dsRNA剂每月、每2个月、每3个月、每4个月、每5个月、每6个月或每12个月向个体施用。

[0059] 在一些实施例中,dsRNA剂每月以约25mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每月以约200mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每月以约400mg的剂量向个体施用。

[0060] 在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约25mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约200mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约400mg的剂量向个体施用。

[0061] 在一些实施例中,dsRNA剂经静脉内、肌肉内或皮下向个体施用。

[0062] 附图简述

[0063] 图1示意性地描绘AD-288996(ALN-HSD)的I期研究设计A部分。

[0064] [a]队列按顺序入选。[b]包括专门的日本队列。

[0065] 缩写:AE,不良事件;AUC,浓度-时间曲线下面积;BMI,身体质量指数;$C_{max}$,最大血浆浓度;ECG,心电图;PK,药物动力学;QTcF,Fridericia校正后QT间期;SAD,单次递增剂量;SC,皮下。

[0066] 图2为提供入选AD-288996(ALN-HSD)的I期研究A部分的个体的基线人口统计资料的表。

[0067] [a]ALT正常范围:10-35U/L(女性),10-50U/L(男性)。[b]AST正常范围:0-31U/L(女性),0-37U/L(男性)。

[0068] 缩写:ALT,丙氨酸转氨酶;AST,天冬氨酸转氨酶;BMI,身体质量指数;SD,标准偏差。

[0069] 图3示意性地描绘AD-288996(ALN-HSD)的I期研究设计B部分。

[0070] [a]队列按顺序入选。安慰剂患者在6或12个月时进行活检。[b]活检在12个月时进行,而

非6个月。[c]1个患者因肝功能检查结果升高(由于E型肝炎)而中止。[d]退出研究的主要原因:失访。NCT04565717。

[0071] 缩写:AE,不良事件;BMI,身体质量指数;CRN,临床研究网络;M,月;mRNA,信使核糖核酸;NAFLD,非酒精性脂肪肝病;NAS,NAFLD活动度评分;NASH,非酒精性脂肪性肝炎;PK,药物动力学;Q12W,每12周;SC,皮下。

[0072] 图4为提供入选AD-288996(ALN-HSD)的I期研究B部分的个体的基线人口统计资料的表。

[0073] [a]ALT正常范围:≤33U/L(女性),≤41U/L(男性)。[b]AST正常范围:≤31U/L(女性),≤37U/L(男性)。[c]所使用的等位基因:rs62305723:A、rs72613567:TA及rs80182459:G。

[0074] 缩写:ALT,丙氨酸转氨酶;AST,天冬氨酸转氨酶;BMI,身体质量指数;NAFLD,非酒精性脂肪肝病;SD,标准偏差。

[0075] 图5为描绘单次皮下给药25mg、100mg、200mg、400mg或800mg ALN-HSD后指定时间点的ALN-HSD平均血浆浓度的图。

[0076] 图6A以图形方式描绘在I期研究中以25mg每12周一次(Q12w)×2、200mg Q12w×2或400mg Q12w×2的剂量施用安慰剂或AD-288996的NASH个体在指定时间点的丙氨酸转氨酶(ALT)水平的改善趋势。

[0077] 缩写:ALT,丙氨酸转氨酶;BL,基线;D,天;SEM,平均值标准误差;W-7/PRE,7天内/给药前。

[0078] 图6B以图形方式描绘在I期研究中施用安慰剂或AD-288996的个体在指定时间点的天冬氨酸转氨酶(AST)水平的改善趋势。

[0079] 图7为描绘以25mg每12周一次(Q12w)×2、200mg Q12W×2或400mg Q12w×2的剂量皮下施用AD-288996的NASH个体在首次给药后6个月时肝脏中的HSD17B13mRNA表达降低的表。

[0080] [a]仅接受第一次ALN-HSD给药的患者观测到相对于基线的变化百分比为-53.7%。[b]在12个月时未进行评估。没有患者具有3种HSD17B13变异体中的任一种的纯合保护性等位基因。

[0081] 缩写:M,月;mRNA,信使核糖核酸;N/A,不适用;SD,标准偏差。

[0082] 图8A及图8B为描绘施用ALN-HSD的个体的组织学参数相对于基线的分类变化的图。

[0083] 图8A为描绘在施用ALN-HSD后在6或12个月[a]时活检获得的NAFLD活动度评分相对于安慰剂的数值降低的图。

[0084] [a]仅在一个200mg队列中进行了12个月活检。[b]NAFLD总活动度评分的子分量。[c]ALN-HSD组36个患者中有一个患者取消了第二次活检就诊。

[0085] 恶化:相对于基线的变化>0。改善:相对于基线的变化<0。缩写:NAFLD,非酒精性脂肪肝病。

[0086] 图8B为描绘在施用ALN-HSD后在6或12个月[a]时活检获得的纤维化阶段相对于安慰剂的数值降低的图。

[0087] [a]仅在一个200mg队列中进行了12个月活检。[b]ALN-HSD组36个患者中有一个患者取消了第二次活检就诊。

[0088] 恶化:相对于基线的变化>0。改善:相对于基线的变化<0。

[0089] 发明详述

[0090] 本发明至少部分基于以下发现:向患有NASH的个体施用(例如皮下施用)靶向HSD17B13基因的RNAi剂(例如AD-288996)降低HSD17B13 mRNA的水平且在六个月内降低肝酶及活检获得的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)活动度评分(NAS)。

[0091] 本发明提供iRNA组合物,其实现HSD17B13基因的RNA转录物的RNA诱导型沉默复合物(RISC)介导裂解。HSD17B13基因可在细胞内,例如个体(诸如人类)内的细胞中。本发明还提供使用本发明的iRNA组合物来抑制HSD17B13基因表达以及治疗将得益于抑制或降低HSD17B13基因表达的个体的方法,该个体例如将得益于肝脏发炎减少的个体,例如罹患或易于罹患HSD17B13相关疾病、病症或病状的个体,诸如罹患或易于罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体。

[0092] 以下详细描述揭示如何制备及使用含有iRNA的组合物以抑制HSD17B13基因的表达,以及用于治疗患有将得益于抑制和/或降低此基因表达的疾病及病症的个体的组合物及方法。

[0093] I.定义

[0094] 为了可更容易理解本发明,首先定义了某些术语。此外,应注意,每当叙述参数的值或值的范围时,意欲使介于所叙述值之间的值及范围还意欲成为本发明的部分。

[0095] “一”及“一个”在本文中用于指该物品的文法对象中的一个或超过一个(即,至少一个)。举实例而言,“一元素”意指一个元素或超过一个以上的元素,例如,多个元素。

[0096] 术语“包含”在本文中用于意指词组“包含但不限于”,且彼此可互换使用。

[0097] 除非上下文另有明确指示,否则术语“或”在本文中用于意指术语“和/或”,且彼此可互换使用。

[0098] 术语“约”在本文中用于意谓在本领域中典型容忍范围内。例如,“约”可理解为距平均值约2个标准偏差。在某些实施例中,约意谓±10%。在某些实施例中,约意谓±5%。当约存在于一系列数字或范围之前时,应理解“约”可修饰在系列或范围中的每一个数字。

[0099] 术语“HSD17B13”还称为“羟基类固醇17-β脱氢酶13”、“短链脱氢酶/还原酶家族16C成员”、“短链脱氢酶/还原酶9”、“17-β-HSD 13”、“17β-HSD13”、“SDR16C3”、“SCDR9”、“短链脱氢酶/还原酶家族16C,成员3”、“羟基类固醇(17-β)脱氢酶13”、“17-β-羟基类固醇脱氢酶13”、“17-β羟基类固醇脱氢酶”、“HMFN0376”及“NIIL497”,其指编码来自任何脊椎动物或哺乳动物来源的第13型17β-羟基类固醇脱氢酶蛋白质的众所周知的基因,该来源包括(但不限于)人类、牛、鸡、啮齿动物、小鼠、大鼠、猪、绵羊、灵长类动物、猴及天竺鼠,除非另有说明。

[0100] 该术语还指保持天然HSD17B13的至少一种活体内或活体外活性的天然HSD17B13的片段及变异体。该术语涵盖HSD17B13的全长未加工前驱体形式以及由信号肽的转译后裂解产生的成熟形式及由蛋白水解加工产生的形式。

[0101] 先前已鉴别出人类HSD17B13基因的两种变异体:变异体A(或转录物A)及变异体B(或转录物B)。转录物A包括HSD17B13基因的所有七个外显子,而外显子2在转录物B中经跳过。人类HSD17B13变异体A的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:NM_178135.4;SEQ ID NO:1);且人类HSD17B13变异体B的核苷酸及氨基酸序列可见于例如

GenBank参考序列:NM_001136230.2;SEQ ID NO:2。如2018年1月19日申请的美国专利申请案第15/875,514号及2018年1月19日申请的PCT申请案第PCT/US2018/014357号(所述申请案中的各者的全部内容以引用的方式并入本文中)中所描述,已鉴别出另外六种表达的HSD17B13转录物(C至H,分别为SEQ ID NO:17、18、19、20、21及22)。在转录物C中,与转录物A相比外显子6经跳过。在转录物D中,与转录物A相比存在外显子6的鸟嘌呤3'的插入,导致外显子7出现移码及过早截短。在转录物E中,与转录物A相比外显子3与4之间存在额外的外显子。在仅在HSD17B13 rs72613567变异体载体中表达的转录物F中,与转录物A相比存在自外显子6至内含子6的通读。在转录物G中,与转录物A相比外显子2经跳过,且存在外显子6的鸟嘌呤3'的插入,导致外显子7出现移码及过早截短。在转录物H中,与转录物A相比外显子3与4之间存在额外的外显子,且存在外显子6的鸟嘌呤3'的插入,导致外显子7出现移码及过早截短。

[0102] 还鉴别出另外一种以低水平表达的HSD17B13转录物(F',SEQ ID NO:23)。与转录物F一样,转录物F'与转录物A相比还包括外显子6至内含子6的通读,但不同于转录物F,该通读不包括存在于HSD17B13 rs72613567变异基因中的插入胸腺嘧啶。下文提供各转录物的HSD17B13基因内的外显子的核苷酸位置。

[0103] SEQ ID NO:15为HSD17B13野生型基因组序列(人类基因组组装GRCh38)的核苷酸序列,且SEQ ID NO:16为HSD17B13基因组序列变异体:位置12666处插入T(人类基因组组装GRCh38;rs72613567-chr4:87310241-87310240处插入T)的核苷酸序列。

[0104] 在野生型HSD17B13基因纯合的个体中更为普遍的HSD17B13转录物的外显子在SEQ ID NO:15中的核苷酸位置。

[0105]

| | 转录物A | 转录物B | 转录物E | 转录物F' |
|---|---|---|---|---|
| 外显子1 | 1-275 | 1-275 | 1-275 | 1-275 |
| 外显子2 | 4471-4578 | 跳过 | 4471-4578 | 4471-4578 |
| 外显子3 | 5684-5815 | 5684-5815 | 5684-5815 | 5684-5815 |
| 外显子3' | 不存在 | 不存在 | 6210-6281 | 不存在 |
| 外显子4 | 7308-7414 | 7308-7414 | 7308-7414 | 7308-7414 |
| 外显子5 | 8947-9084 | 8947-9084 | 8947-9084 | 8947-9084 |
| 外显子6 | 12548-12664 | 12548-12664 | 12548-12664 | 12548-13501* |
| 外显子7 | 17599-19118 | 17599-19118 | 17599-19118 | 跳过 |

[0106] *包括自外显子6至内含子6的通读;通读=位置12665-13501

[0107] 在rs72613567 HSD17B13变异基因(位置12666处插入T)纯合的个体中更为普遍的HSD17B13转录物的外显子在SEQ ID NO:16中的核苷酸位置。

[0108]

| | 转录物 C | 转录物 D | 转录物 F | 转录物 G | 转录物 H |
|---|---|---|---|---|---|
| 外显子 1 | 1-275 | 1-275 | 1-275 | 1-275 | 1-275 |
| 外显子 2 | 4471-4578 | 4471-4578 | 4471-4578 | 跳过 | 4471-4578 |
| 外显子 3 | 5684-5815 | 5684-5815 | 5684-5815 | 5684-5815 | 5684-5815 |
| 外显子 3' | 不存在 | 不存在 | 不存在 | 不存在 | 6210-6281 |
| 外显子 4 | 7308-7414 | 7308-7414 | 7308-7414 | 7308-7414 | 7308-7414 |
| 外显子 5 | 8947-9084 | 8947-9084 | 8947-9084 | 8947-9084 | 8947-9084 |
| 外显子 6 | 跳过 | 12548-12665^ | 12548-13502* | 12548-12665^ | 12548-12665^ |
| 外显子 7 | 17600-19119 | 17600-19119 | 跳过 | 17600-19119 | 17600-19119 |

[0109] ^与转录物A相比在3'端包括额外残基12665

[0110] *包括自外显子6至内含子6的通读;通读=位置12665-13502

[0111] 存在两种小鼠HSD17B13基因变异体;小鼠Hsd17b13转录物变异体1的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:NM_001163486.1;SEQ ID NO:3);且小鼠Hsd17b13转录物变异体2的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:NM_198030.2;SEQ ID NO:4。大鼠Hsd17b13基因的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:NM_001009684.1;SEQ ID NO:5)。恒河猕猴(Macaca mulatta)HSD17B13基因的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:XM_015138766.1;SEQ ID NO:6)。食蟹猕猴(Macaca fascicularis)HSD17B13基因的核苷酸及氨基酸序列可见于例如GenBank参考序列:XM_005555367.2;SEQ ID NO:7)。

[0112] HSD17B13 mRNA序列的其他实例可易于使用公开可用的数据库获得,例如GenBank、UniProt及OMIM。

[0113] 如本文所用,术语"HSD17B13"还指藉由HSD17B13基因的天然存在的DNA序列变化(诸如HSD17B13基因中的单核苷酸多型性)在细胞中表达的特定多肽。已鉴别出HSD17B13基因内的许多SNP,且其可见于例如NCBI dbSNP(参见例如www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)。

[0114] 如本文所用,"目标序列"指在HSD17B13基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括作为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。在一个实施例中,序列的目标部分将至少足够长,以在HSD17B13基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的该部分处或附近作为iRNA导向裂解的底物。

[0115] HSD17B13基因的目标序列的长度可为约9至36个核苷酸,例如长度为约15至30个核苷酸。举例而言,目标序列的长度可为约15至30个核苷酸、15至29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个核苷酸。在上述所述的范围和长度之间的中间范围和长度还预期为本发明的部分。

[0116] 如本文所用,术语"包括有序列的链"指包括有核苷酸链的寡核苷酸,其由使用标准核苷酸命名法所指的序列描述。

[0117] “G”、“C”、“A”、“T”及“U”各自通常代表分别含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷及尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,应理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可指经修饰核苷酸,如下文进一步详述,或替代的置换部分(参见例如表1)。本领域技术人员熟知鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤及尿嘧啶可经其他部分置换,而不实质上改变包括有携带此类置换部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。举例而言,但不限于,包括有肌苷作为其碱基的核苷酸可与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸形成碱基对。因此,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可在本发明中表征的dsRNA核苷酸序列中置换为含有例如肌苷的核苷酸。在另一实例中,寡核苷酸中任一处的腺嘌呤及胞嘧啶可分别置换为鸟嘌呤及尿嘧啶,以与目标mRNA形成G-U波纹碱基配对。含有此类置换部分的序列适用于本发明中表征的组合物及方法。

[0118] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”、“RNA干扰剂”指含有RNA的药剂,该术语在本文中定义,且其介导RNA转录物经由RNA诱导型沉默复合物(RISC)路径的靶向裂解。iRNA经由称为RNA干扰(RNAi)的过程引导mRNA的序列特异性降解。iRNA调节例如抑制HSD17B13基因在细胞中,例如在个体(诸如哺乳动物个体)内的细胞中的表达。

[0119] 在一个实施例中,本发明的RNAi剂包括单链RNA,其与目标RNA序列(例如HSD17B13目标mRNA序列)相互作用以引导该目标RNA的裂解。不希望受理论束缚,据信引入细胞中的长双链RNA藉由称为Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(Sharp等人,(2001)Genes Dev.15:485)。Dicer,一种类似核糖核酶III的酶,将dsRNA加工成19-23个碱基对短干扰RNA,具有特征性的两个碱基3’突出端(Bernstein等人,(2001)Nature 409:363)。接着将siRNA并入至RNA诱导型沉默复合物(RISC)中,其中一种或多种解旋酶展开siRNA双螺旋,使得互补反义链能够引导目标识别(Nykanen等人,(2001)Cell 107:309)。当结合至适当目标mRNA后,RISC内的一种或多种核酸内切酶裂解目标,以诱导沉默(Elbashir等人,(2001)Genes Dev.15:188)。因此,在一个方面中,本发明关于在细胞内产生的单链RNA(sssiRNA),且其促进RISC复合物的形成以实现目标基因(还即HSD17B13基因)的沉默。因此,术语“siRNA”在本文中还用于指如上文所描述的RNAi。

[0120] 在另一实施例中,RNAi剂可为被引入细胞或生物体中以抑制目标mRNA的单链RNAi剂。单链RNAi剂(ssRNAi)结合至RISC核酸内切酶Argonaute 2,其随后裂解目标mRNA。单链siRNA一般为15至30个核苷酸且经化学修饰。单链RNAi剂的设计及测试描述于美国专利第8,101,348号及Lima等人,(2012)Cell 150:883-894中,其中的每一个的全部内容特此以引用的方式并入本文中。本文所描述的反义核苷酸序列中的任一个可用作如本文所描述的单链siRNA,或如藉由Lima等人,(2012)Cell150;:883-894中所描述的方法化学修饰。

[0121] 在另一实施例中,用于本发明组合物和方法的“iRNA”为双链RNA,且在本文中称为“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,所述糖核酸分子具有双螺旋结构,该双螺旋结构包含两个反向平行且实质上互补的核酸链,其被称为相对于目标RNA(还即HSD17B13基因)具有“有义”及“反义”定向。在本发明的一些实施例中,双链RNA(dsRNA)经由转录后基因沉默机制触发目标RNA(例如mRNA)降解,在本文中称为RNA干扰或RNAi。

[0122] 一般而言,dsRNA分子的各链的大部分核苷酸为核糖核苷酸,但如本文详细描述,各链或两链还可包含一个或多个非核糖核苷酸,例如脱氧核糖核苷酸和/或经修饰的核苷酸。此外,如本说明书中所用,“RNAi剂”可包含具有化学修饰的核糖核苷酸;RNAi剂可包含

在多个核苷酸的实质修饰。如本文所用,术语“经修饰核苷酸”指具有独立地经修饰的糖部分、经修饰的核苷酸间键联和/或经修饰的核碱基的核苷酸。因此,术语经修饰的核苷酸涵盖核苷间键、糖部分或核碱基取代、添加或移除例如官能基团或原子。适用于本发明的药剂中的修饰包含本文所揭示或本技术领域中已知的所有类型的修饰。任何如siRNA型分子中所使用的此类修饰涵盖于“RNAi剂”中,以用于本说明书及申请专利范围的目的。

[0123] 双螺旋区可具有允许经由RISC路径特异性降解所需目标RNA的任何长度,且长度可在约9至36个碱基对的范围内,例如长度为约15至30个碱基对,例如长度为约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个碱基对,诸如长度为约15至30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个碱基对。在上述所述的范围和长度之间的中间范围和长度还预期为本发明的部分。

[0124] 形成双螺旋结构的两链可为一个较大RNA分子的不同部分,或其可分别为单独RNA分子。其中两链是较大分子的一部分,且因此由一链的3’端和形成双螺旋结构的相应另一链的5’端之间的核苷酸不中断链连接时,该连接RNA链被称为“发夹环”。发夹环可包括至少一个未配对的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可包括至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少20、至少23个或更多个未配对核苷酸。

[0125] 其中在dsRNA的两个实质上互补链由单独RNA分子构成的情况下,那些分子无需但可共价连接。其中在两链之间的连接通过共价连接的手段,而不是通过一条链上的核苷酸从一条链的3’-端到分别另一条链形成双螺旋结构的5’-端之间的核苷酸不中断链,该连接结构称为“接头”。RNA链可具有相同或不同数目的核苷酸。碱基对的最大数目为dsRNA的最短链中核苷酸数目减去存在于双螺旋中的任何突出端。除了双螺旋结构之外,RNAi可包括一个或多个核苷酸突出端。

[0126] 在一个实施例中,本发明的RNAi剂为dsRNA,其中各链包含少于30个核苷酸,例如17至27、19至27、17至25、19至25或19至23个核苷酸,其与目标RNA序列(例如HSD17B13目标mRNA序列)相互作用以引导该目标RNA的裂解。在另一实施例中,本发明的RNAi剂为dsRNA,其中各链包含19至23个核苷酸,其与目标RNA序列(例如HSD17B13目标mRNA序列)相互作用以引导该目标RNA的裂解。在一个实施例中,有义链的长度为21个核苷酸。在另一实施例中,反义链的长度为23个核苷酸。

[0127] 如本文所用,术语“核苷酸突出端”指至少一个未配对的核苷酸突出于iRNA的双螺旋结构,例如dsRNA。举例而言,当一条链dsRNA的3’端延伸超出另一条链的5’端,或反之亦然,则有核苷酸突出端。dsRNA可包含至少一个核苷酸的突出端;或者,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、至少五个核苷酸或更多个核苷酸。核苷酸突出端可包括核苷酸/核苷类似物或由核苷酸/核苷类似物组成,包含脱氧核苷酸/核苷。多个突出端可在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的多个核苷酸可存在于dsRNA的反义链或有义链的5’端、3’端或两端上。

[0128] 在一实施例中,dsRNA的反义链具有1-10个核苷酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10

个核苷酸,在3'端和/或5'端处突出。在一实施例中,dsRNA的有义链具有在3'端和/或5'端处突出的1至10个核苷酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在另一实施例中,突出端中的核苷酸中的一个或多个经硫代磷酸核苷置换。

[0129] 在某些实施例中,有义链或反义链或两条上的突出端可包含长度超过10个核苷酸的延伸长度,例如长度为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。在某些实施例中,延伸突出端位于双螺旋的有义链上。在某些实施例中,延伸突出端存在于双螺旋的有义链的3'端上。在某些实施例中,延伸突出端存在于双螺旋的有义链的5'端上。在某些实施例中,延伸突出端在双螺旋的反义链上。在某些实施例中,延伸突出端存在于双螺旋的反义链的3'端上。在某些实施例中,延伸突出端存在于双螺旋的反义链的5'端上。在某些实施例中,延伸突出端中的核苷酸中的一个或多个经硫代磷酸核苷置换。

[0130] 如本文关于dsRNA所使用的术语"钝端(blunt)"或"钝端(blunt ended)"指在dsRNA的给定末端没有未配对的核苷酸或核苷酸类似物,即没有核苷酸突出端。dsRNA的一端或两端可为钝的。在dsRNA的两端为钝的情况下,该dsRNA被称为钝端。为清楚起见,"钝端"dsRNA为在两端处呈钝的dsRNA,即分子两端无核苷酸突出端。通常,此类分子将在其全长上为双链。

[0131] 术语"反义链"或"引导链"指iRNA(例如dsRNA)中包括与目标序列例如HSD17B13 mRNA实质上互补的区域的链。

[0132] 如本文所用,术语"互补区"指反义链上与本文所定义的序列(例如目标序列,例如HSD17B13核苷酸序列)实质上互补的区域。当互补区与目标序列不完全互补时,该错配可在分子的内部或末端区中。一般而言,最耐受的错配在末端区域中,例如在iRNA的5'端和/或3'端的5、4、3或2个核苷酸的中。

[0133] 如本文所用,术语"有义链"或"乘客链"指iRNA的链,其包含与如本文所定义的反义链的区域实质上互补的区域。

[0134] 如本文所用,术语"裂解区域"指紧邻裂解位点定位的区域。裂解位点为发生裂解的靶点上的位点。在一些实施例中,裂解区包括在裂解位点的任一端上且紧邻裂解位点的三个碱基。在一些实施例中,裂解区包括位于裂解位点的任一端且紧邻裂解位点的两个碱基。在一些实施例中,裂解位点特异性地在反义链的核苷酸10及11结合的位点处发生,且该裂解区包括核苷酸11、12及13。

[0135] 如本文所用,除非另有说明,否则术语"互补的"当用于描述与第二核苷酸序列有关的第一核苷酸序列时,如技术人员将理解的,指包括有第一核苷酸序列的寡核苷酸或聚核苷酸在特定条件下与包括有第二核苷酸序列的寡核苷酸或聚核苷酸杂交并形成双螺旋结构的能力。此类条件可为例如严格条件,其中严格条件可包含:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50℃或70℃持续12-16小时,随后洗涤(参见例如Molecular Cloning: ALaboratory Manual,Sambrook等人(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。可适用其他条件,诸如生物体内部可能遇到的生理相关条件。本领域技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合于测试两个序列的互补性的一组条件。

[0136] iRNA内的互补序列,例如在如本文所述的dsRNA内,包含在一个或两个核苷酸序列的全长上将包括有第一核苷酸序列的寡核苷酸或聚核苷酸碱基配对至包括有第二核苷酸序列的寡核苷酸或聚核苷酸。此类序列在本文中可彼此称为"完全互补"。然而,当第一序列

在本文中称为“实质上互补”于第二序列时,两个序列可完全互补,或其可在当至多30个碱基对的双螺旋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,同时保留在与其最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如经由RISC路径抑制基因表达。然而,当两个寡核苷酸经设计以在杂交后形成一个或多个单链突出端时,此类突出端不应被视为关于互补性测定的错配。举例而言,出于本文所描述的目的,包括有长度为21个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA及包括有长度为23个核苷酸的另一寡核苷酸的dsRNA,其中较长寡核苷酸包括与较短寡核苷酸完全互补的21个核苷酸序列,可仍称为“完全互补”。

[0137] 如本文所用,“互补的”序列还可包含、或完全由非华森-克里克碱基对形成和/或由非天然及经修饰的核苷酸形成的碱基对形成,只要上述与他们杂交能力有关的需求被实现。此类非华森-克里克碱基对包含但不限于G:U摇摆或胡斯坦碱基配对。

[0138] 如从其使用上下文将理解的,术语“互补的”、“完全互补的”和“实质上互补的”可用于dsRNA的有义链和反义链之间、或iRNA剂的反义链和目标序列之间的碱基匹配方面。

[0139] 如本文所用,与信使RNA(mRNA)“的至少一部分实质上互补”的聚核苷酸指与所关注mRNA(例如编码HSD17B13的mRNA)的连续部分实质上互补的聚核苷酸。举例而言,若聚核苷酸与编码HSD17B13的mRNA的不间断部分实质上互补,则该序列与HSD17B13 mRNA的至少一部分互补。

[0140] 因此,在一些实施例中,本文所揭示的反义链聚核苷酸与目标HSD17B13序列完全互补。在其他实施例中,本文所揭示的反义链聚核苷酸与目标HSD17B13序列实质上互补,且包含在其整个长度上与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的片段的核苷酸序列的等效区域至少约80%互补,诸如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约%91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%互补的连续核苷酸序列。

[0141] 在一个实施例中,本发明的RNAi剂包括与反义聚核苷酸实质上互补的有义链,该反义聚核苷酸又与目标HSD17B13序列互补,且其中该有义链聚核苷酸包含在其整个长度上与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:8中任一个的片段的核苷酸序列的等效区域至少约80%互补,诸如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约%91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%互补的连续核苷酸序列。

[0142] 在一些实施例中,本发明的iRNA包括与目标HSD17B13序列实质上互补的反义链,且包含在其整个长度上与表2中任一有义链或表2中任一有义链的片段的核苷酸序列的等效区域至少约80%互补,诸如约约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%互补、或100%互补的连续核苷酸序列。

[0143] 如本文所用,术语“抑制(inhibiting)”可与“降低”、“沉默”、“下调”、“压制(suppressing)”和其他类似术语互换使用,且包含任何抑制程度。

[0144] 如本文所用,词组“抑制HSD17B13基因的表达”包括抑制任何HSD17B13基因(诸如小鼠HSD17B13基因、大鼠HSD17B13基因、猴HSD17B13基因或人类HSD17B13基因)以及编码HSD17B13蛋白质的HSD17B13基因变异体或突变体的表达。

[0145] “抑制HSD17B13基因的表达”包括任何程度的HSD17B13基因抑制,例如至少部分压制HSD17B13基因的表达,诸如抑制至少约20%。在某些实施例中,抑制至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约

92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、或至少约99％。

[0146] HSD17B13基因的表达可基于与HSD17B13基因表达相关的任何变量的水平进行评估,例如HSD17B13 mRNA水平或HSD17B13蛋白质水平。HSD17B13基因的表达还可基于例如组织样品(诸如肝脏样品)中循环丙氨酸转氨酶(ALT)的水平或HSD17B13的酶活性而间接地评估。抑制可藉由与对照组水平相比这些变数中的一个或多个的绝对或相对水平降低来评估。对照水平可为本技术领域中所用的任何类型的对照水平,例如,给药前基线水平、或由未经治疗或经对照(诸如,例如仅缓冲液对照或非活性剂对照)治疗的类似个体、细胞或样品确定的水平。

[0147] 在一个实施例中,HSD17B13基因表达的至少部分压制藉由可自第一细胞或细胞群分离或可在第一细胞或细胞群中侦测的HSD17B13 mRNA量相比于第二细胞或细胞群的降低来评估,在该第一细胞或细胞群中HSD17B13基因经转录且其已经处理使得HSD17B13基因的表达得到抑制,该第二细胞或细胞群与第一细胞或细胞群实质上相同但其未进行该处理(对照细胞)。

[0148] 抑制程度可用下式表示:

[0149] $$\frac{\text{(对照细胞中的mRNA)-(经处理细胞中的mRNA)}}{\text{(对照细胞中的mRNA)}} \cdot 100\%$$

[0150] 如本文所用,词组“使细胞与RNAi剂接触”,诸如dsRNA,包含藉由任何可能方式接触细胞。使细胞与RNAi剂接触包含使细胞活体外与iRNA接触或使细胞活体内与iRNA接触。接触可以直接或间接地进行。因此,例如,该RNAi剂可藉由进行该方法的个体与细胞物理接触,或者,该RNAi剂可置于允许或使其随后与细胞接触的情形中。

[0151] 活体外接触细胞可例如藉由将细胞与RNAi剂一起培育来进行。活体内接触细胞可例如藉由将RNAi药剂注射至细胞所在的组织中或附近、或藉由将RNAi剂注射至另一区域,例如血流或皮下空间,使得药剂将随后到达待接触的细胞所在的组织。举例而言,RNAi剂可含有和/或耦接至配体,例如GalNAc3,其将RNAi剂导引至所关注位点,例如肝脏。活体外及活体内接触方法的组合也有可能。举例而言,还可使细胞活体外与RNAi剂接触且随后移植至个体中。

[0152] 在一实施例中,使细胞与iRNA接触包含“引入”或“将iRNA递送至细胞中”,其藉由促进或影响对细胞的摄取或吸收。iRNA的吸收或摄入可经由自发扩散或主动细胞过程、或藉由辅助剂或装置发生。可活体外和/或活体内将iRNA引入细胞中。举例而言,为了活体内引入,iRNA可注射至组织位点中或全身性施用。活体内递送还可藉由β-葡聚糖递送系统进行,诸如美国专利第5,032,401号及第5,607,677号及美国公开案第2005/0281781号中所描述的此类递送系统,其全部内容特此以引用的方式并入本文中。活体外引入细胞中包含本技术领域中已知的方法,诸如电穿孔及脂质转染。下文描述其他方法和/或为本技术领域中已知的方法。

[0153] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”为包括有囊封医药活性分子的脂质层的囊泡,诸如核酸分子,例如iRNA或自其转录iRNA的质体。LNP描述于例如美国专利第6,858,225号、第6,815,432号、第8,158,601号及第8,058,069号中,其全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0154] 如本文所用,“个体”为动物,诸如哺乳动物,包含灵长类动物(诸如人类、非人类灵长类,例如猴及黑猩猩)、非灵长类(诸如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、天竺鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马及鲸)、或鸟类(例如,鸭或鹅)。

[0155] 在一实施例中,个体为人类,诸如对将得益于HSD17B13表达降低的疾病、病症或病状进行治疗或评估的人类;具有将得益于HSD17B13表达降低的疾病、病症或病状风险的人类;患有将得益于HSD17B13表达降低的疾病、病症或病状的人类;和/或对将得益于HSD17B13表达降低的疾病、病症或病状进行治疗的人类,如本文所描述。

[0156] 在一个实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因是纯合的。在另一实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因是杂合的。在又另一实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因及编码HSD17B13功能丧失型变异体的基因是杂合的。在另一实施例中,个体并非HSD17B13 rs72613567变异体,例如HSD17B13 rs72613567:TA的携带者。

[0157] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指有益或期望的结果,包括(但不限于)缓解或改善与HSD17B13基因表达和/或HSD17B13蛋白质产生相关的一种或多种症状,例如HSD17B13相关疾病,诸如慢性纤维发炎性肝病,例如肝脏发炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死和/或肝细胞癌。与在缺乏治疗的情况下的预期存活期相比,“治疗”还可意谓延长存活期。

[0158] 在HSD17B13相关疾病的情况下,术语“降低(lower)”指此类水平的统计学上显著降低。降低可为例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多。在某些实施例中,降低为至少20%。在个体中的HSD17B13水平的情况下,“降低”优选降至公认为无此类病症的个体的正常范围内的水平。

[0159] 如本文所用,“预防(prevention)”或“预防(preventing)”在关于将得益于HSD17B13基因表达降低的疾病、病症或病状使用时指降低个体发展出与此类疾病、病症或病状相关的症状的可能性,该症状例如HSD17B13基因表达的症状,诸如肝脏发炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死和/或肝细胞癌。未能发展出疾病、病症或病状,或与此类疾病、病症或病状相关的症状的发展减少(例如按照该疾病或病症的临床公认量表,减少至少约10%),或延迟症状(例如肝脏中的脂质积聚和/或肝脏中的脂滴膨胀减少)延迟(例如数天、数周、数月或数年)的展现被视为有效预防。

[0160] 如本文所用,术语“HSD17B13相关疾病”为由HSD17B13基因表达或HSD17B13蛋白质产生引起或与其相关的疾病或病症。术语“HSD17B13相关疾病”包括将得益于HSD17B13基因表达或蛋白质活性降低的疾病、病症或病状。

[0161] 在一个实施例中,“HSD17B13相关疾病”为慢性纤维发炎性肝病。“慢性纤维发炎性肝病”为与慢性肝炎和/或纤维化相关的任何疾病、病症或病状。慢性纤维发炎性肝病的非限制性实例包括例如肝脏发炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死和/或肝细胞癌。

[0162] 如本文所用,“治疗有效量”意欲包括当向患有HSD17B13相关疾病、病症或症状的个体施用时足以有效治疗该疾病(例如藉由减缓、改善或维持现有疾病或一种或多种疾病症状)的RNAi剂的量。“治疗有效量”可视RNAi剂、药剂如何施用、疾病及其严重程度以及待治疗个体的病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗的类型(若有的话)及其他个别特征而变化。

[0163] 如本文所用,“预防有效量”意欲包括当向患有HSD17B13相关疾病、病症或症状的个体施用时足以预防或改善该疾病或该疾病的一种或多种症状的iRNA的量。改善疾病包含减缓疾病病程或降低之后发展疾病的严重程度。“预防有效量”可视iRNA、如何施用药剂、疾病风险程度、病史、年龄、体重、家族病史、基因组成、先前或伴随治疗的类型,若有的话,以及待治疗的患者的其他个人特征而变化。

[0164] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括以适用于任何治疗的合理益处/风险比产生一些所需局部或全身性效果的RNAi剂的量。本发明方法中所用的iRNA可以足够量施用,以产生适用于此类治疗的合理益处/风险比。

[0165] 在本文中使用的词组“医药学上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理医学判断的范围内,适合与人类个体和动物个体的组织接触使用,而没有过量毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比例一致。

[0166] 如本文所用,词组“医药学上可接受的载体”指医药学上可接受的材料、组合物或载体,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造辅助剂(例如润滑剂、滑石镁、钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或囊封材料的溶剂,其参与将该本发明化合物从身体的一个器官或部分携带至身体的另一个器官或部分。每个载体必须在与调配物的其他成分兼容是意义上“可接受的”,且不会对所治疗的个体造成伤害。可充当医药学上可接受的载体的材料的一些实例包含:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉及马铃薯淀粉;(3)纤维素,及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末状黄蓍;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,诸如镁状态、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,诸如可可脂及栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油及大豆油;(10)二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯及月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁及氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等张盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;(22)增积剂,诸如多肽及氨基酸;(23)血清组分,诸如血清白蛋白、HDL及LDL;以及(22)医药调配物中所用的其他无毒兼容物质。

[0167] 如本文所用,术语“样品”包含自个体分离的一组相似流体、细胞或组织,以及存在于个体内的流体、细胞或组织。生物流体的实例包含血液、血清及精液、血浆、脑脊髓液、眼液、淋巴、尿液、唾液及其类似者。组织样本可包含来自组织、器官或局部区域的样本。举例而言,样品可衍生自特定器官、器官的部分或这些器官内的流体或细胞。在某些实施例中,样品可衍生自肝脏(例如,整个肝脏或某些肝脏区段或肝脏中的某些类型细胞,诸如(例如)肝细胞)。在一些实施例中,“衍生自个体的样品”指从个体抽取的血液或血浆。

[0168] II.本发明方法

[0169] 本发明提供用于治疗或预防罹患将得益于HSD17B13表达降低的病症的个体的至少一种症状的方法,该病症例如HSD17B13相关疾病,例如慢性纤维发炎性疾病,例如非酒精

性脂肪性肝炎(NASH)。

[0170] 本发明还提供用于降低患有脂肪变性的个体发展出慢性肝病的风险的方法、用于抑制罹患脂肪变性的个体的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法、或用于抑制罹患非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体肝脏中的脂滴积聚的方法。

[0171] 所述方法包括向个体施用约25mg至约800mg的剂量的本发明的dsRNA剂。在一些实施例中,该dsRNA剂以约25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700或800mg的剂量向个体施用。

[0172] 在一个实施例中,HSD17B13相关疾病、病症或病状为慢性纤维发炎性肝病。慢性纤维发炎性肝病的非限制性实例包括癌症(例如癌症,例如肝细胞癌)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化、肝脏发炎、肝细胞坏死、肝纤维化及非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。

[0173] 在一个方面中,本发明还提供本发明的抑制HSD17B13表达的iRNA剂(例如dsRNA)或包含抑制HSD17B13表达的dsRNA的医药组合物的用途,其与靶向PNPLA3基因的dsRNA或包含此类药剂的医药组合物组合用于治疗个体,例如将得益于HSD17B13表达降低和/或抑制的个体,例如患有HSD17B13相关疾病,例如患有慢性纤维发炎性疾病,例如患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体。

[0174] 在一个方面中,本发明还提供本发明的靶向HSD17B13基因的iRNA剂(例如dsRNA)或包含靶向HSD17B13基因的iRNA剂的医药组合物的用途,其与靶向PNPLA3基因的dsRNA或包含此类药剂的医药组合物组合用于预防患有将得益于HSD17B13表达降低的病症的个体的至少一种症状,该病症例如慢性纤维发炎性疾病,例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0175] 本发明的用于治疗患有HSD17B13相关疾病、病症或病状(诸如慢性纤维发炎性肝病,例如NASH)的个体(例如人类个体)的组合方法可用于治疗此类个体,因为PNPLA3的沉默减少脂肪变性(也即肝脏脂肪),而使HSD17B13沉默减少炎症及纤维化。举例而言,全基因组关联研究已证实,使PNPLA3及HSD17B13沉默对减少NASH病理具有累加效应。实际上,在具有致病性PNPLA3等位基因的个体中,发现保护性功能丧失型HSD17B13等位基因与较低的NASH盛行率相关。在具有NASH风险较低的野生型PNPLA3等位基因的个体中,增加功能丧失型HSD17B13等位基因的存在甚至带来更大保护。

[0176] 因此,在一个方面中,本发明提供治疗患有将得益于HSD17B13表达降低的病症的个体的方法,该病症例如HSD17B13相关疾病,诸如慢性纤维发炎性肝病,例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、癌症(例如肝细胞癌)、肝硬化、肝脏发炎、肝细胞坏死、肝纤维化及非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。在一个实施例中,该慢性纤维发炎性肝病为NASH。

[0177] 本发明的组合治疗方法(及用途)包括向个体(例如人类个体)施用治疗有效量的抑制HSD17B13表达的dsRNA剂或包含抑制HSD17B13表达的dsRNA的医药组合物以及抑制PNPLA3表达的dsRNA剂或包含抑制PNPLA3表达的dsRNA的医药组合物,藉此治疗该个体。

[0178] 在一个方面中,本发明提供预防患有将得益于HSD17B13表达降低的病症的个体的至少一种症状的方法,该病症例如慢性纤维发炎性疾病,例如NASH。所述方法包括向个体施用预防有效量的抑制HSD17B13表达的dsRNA剂或包含抑制HSD17B13表达的dsRNA的医药组合物以及抑制PNPLA3表达的dsRNA剂或包含抑制PNPLA3表达的dsRNA的医药组合物,藉此预防该个体的至少一种症状。

[0179] 另外,本发明提供抑制细胞,诸如个体的细胞,例如肝细胞中的脂滴积聚和/或膨

胀的方法。所述方法包括使细胞与本发明的RNAi剂或包含iRNA剂的医药组合物以及靶向PNPLA3基因的iRNA剂和/或包含靶向PNPLA3的iRNA剂的医药组合物接触。在一些实施例中，将细胞维持足够的时间以获得HSD17B13基因及PNPLA3基因的mRNA转录物的降解。

[0180] 靶向PNPLA3基因的适合药剂描述于例如美国专利公开案第2017/0340661号中，其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0181] 在本发明的方法中，细胞可在活体外或活体内接触，也即，该细胞可在个体内。

[0182] 适合于使用本发明的方法治疗的细胞可为表达HSD17B13基因(及在一些实施例中PNPLA3基因)的任何细胞。适用于本发明的方法的细胞可为哺乳动物细胞，例如，灵长类细胞(诸如人类细胞或非人类灵长类细胞，例如，猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类细胞(诸如牛细胞、猪细胞、骆驼细胞、美洲驼细胞、马细胞、山羊细胞、兔子细胞、绵羊细胞、仓鼠、天竺鼠细胞、猫细胞、狗细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、狮细胞、虎细胞、熊细胞、或水牛细胞)、鸟细胞(例如，鸭细胞或鹅细胞)、或鲸细胞。在一实施例中，该细胞为人类细胞，例如人类肝细胞。

[0183] 细胞中的HSD17B13表达被抑制至少约5％、6、7、8、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、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99％或约100％。在优选实施例中，HSD17B13表达被抑制至少20％。

[0184] 在一些实施例中，细胞中的PNPLA3表达还被抑制至少约5％、6、7、8、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、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99％或约100％。在优选实施例中，PNPLA3表达被抑制至少20％。

[0185] 在一个实施例中，本发明的活体内方法可包括向个体施用含有iRNA的组合物，其中该iRNA包括与欲治疗的哺乳动物的HSD17B13基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。

[0186] 在另一实施例中，本发明的活体内方法可包括向个体施用含有第一iRNA剂及第二iRNA剂的组合物，其中该第一iRNA包括与欲治疗的哺乳动物的HSD17B13基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列，且该第二iRNA包括与欲治疗的哺乳动物的PNPLA3基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。

[0187] 当待治疗的生物体为诸如人类的哺乳动物时，组合物可藉由本领域中已知的任何方式施用，包括但不限于经口、腹膜内或非经肠途径，包括颅内(例如脑室内、实质内及鞘内)、静脉内、肌肉内、皮下、经皮、呼吸道(气雾剂)、经鼻、经直肠及局部(包含经颊及舌下)施用。在某些实施例中，组合物藉由静脉内输注或注射施用。在某些实施例中，组合物藉由皮下注射施用。

[0188] 在一些实施例中，施用经由积存注射。积存注射可长期以一致方式释放iRNA。因此，积存注射可降低获得所需效果所需的给药频率，例如HSD17B13的所需抑制，或治疗或预防效果。积存注射还可提供更一致的血清浓度。积存注射可包含皮下注射或肌肉内注射。在

优选实施例中,积存注射为皮下注射。

[0189] 在一些实施例中,施用经由泵。泵可为外部泵或手术植入泵。在某些实施例中,该泵为皮下植入的渗透泵。在其他实施例中,泵为输注泵。输注泵可用于静脉内、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施例中,输注泵为皮下输注泵。在其他实施例中,泵为将iRNA递送至肝脏的经手术植入泵。

[0190] 本发明的iRNA可存在于医药组合物中,诸如在适合缓冲溶液中。缓冲溶液可包括乙酸盐、柠檬酸盐、丙胺、碳酸盐或磷酸盐、或其任何组合。在一实施例中,缓冲液溶液为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可调整含有iRNA的缓冲溶液的pH及渗透压,使其适合于向个体施用。

[0191] 或者,本发明的iRNA可作为医药组合物施用,诸如dsRNA脂质体调配物。

[0192] 施用模式可基于是否需要局部或全身性治疗且基于待治疗面积来选择。施用途径及部位可经选择以增强靶向。

[0193] 在一个方面中,本发明还提供用于抑制哺乳动物中HSD17B13基因的表达的方法。所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中的HSD17B13基因的dsRNA的组合物,藉此抑制该细胞中HSD17B13基因的表达。

[0194] 在一些实施例中,所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中的HSD17B13基因的dsRNA的组合物,藉此抑制该细胞中HSD17B13基因的表达。在另一实施例中,所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中的HSD17B13基因的dsRNA剂的医药组合物。

[0195] 基因表达的降低可藉由本领域中已知的任何方法及藉由本文所描述的方法(例如qRT-PCR)来评估。蛋白质产生的减少可藉由本领域中已知的任何方法及藉由本文所描述的方法(例如ELISA、酶活性)来评估。举例而言,HSD17B13表达的降低可藉由以下方式确定:使用对于本领域普通技术人员而言常规的方法,例如北方墨点法、qRT-PCR来测定HSD17B13的mRNA表达量;使用对于本领域普通技术人员而言常规的方法,诸如西方墨点法、免疫技术来测定HSD17B13的蛋白质水平。HSD17B13表达的降低还可藉由测量血浆或组织样品中HSD17B13生物活性的降低,例如HSD17B13酶活性的降低和/或脂质、三酸甘油酯、胆固醇(包括LDL-C、HDL-C、VLDL-C、IDL-C及总胆固醇)或游离脂肪酸中的一个或多个的降低,和/或肝脏中脂肪积聚和/或脂滴膨胀的减少来间接地评估。

[0196] 在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体的HSD17B13和/或PNPLA3的基因型。

[0197] 在一个实施例中,个体的编码含patatin样磷脂酶域蛋白3(PNPLA3)I148M变异的基因或PNPLA3:rs738409:G等位基因是杂合的。在另一实施例中,个体的编码PNPLA3I148M变异的基因或PNPLA3:rs738409:G等位基因是纯合的。在一个实施例中,个体的编码含patatin样磷脂酶域蛋白3(PNPLA3)I144M变异的基因是杂合的。在另一实施例中,个体的编码PNPLA3 I144M变异的基因是纯合的。

[0198] 在一个实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因是纯合的。在另一实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因是杂合的。在又另一实施例中,个体的编码功能性HSD17B13蛋白质的基因及编码HSD17B13功能丧失型变异体的基因是杂合的。在另一实施例中,个体并非HSD17B13 rs72613567变异体的携带者。在一些实施例中,个体的HSD17B13:rs72613567:T等位基因、HSD17B13:rs62305723:G等位基因和/或HSD17B13:

rs80182459:GG等位基因是纯合的。在一些实施例中,个体的HSD17B13:rs72613567:T等位基因、HSD17B13:rs62305723:G等位基因和/或HSD17B13:rs80182459:GG等位基因是杂合的。

[0199] 在本发明的某些实施例中,所述方法可包括鉴别将得益于HSD17B13表达降低的个体。所述方法通常包括确定来自个体的样品是否包含编码PNPLA3Ile148Met变异体或PNPLA3Ile144Met变异体的核酸。所述方法还可包括藉由以下方式将个体分类为藉由抑制HSD17B13表达来治疗或抑制肝病的候选者:确定来自个体的样品是否包含编码包含I148M变异的PNPLA3蛋白质的第一核酸及编码功能性HSD17B13蛋白质的第二核酸,和/或包含I148M变异的PNPLA3蛋白质及功能性HSD17B13蛋白质;以及当侦测到第一及第二核酸时和/或当侦测到两种蛋白质时,将该个体分类为藉由抑制HSD17B13来治疗或抑制肝病的候选者。

[0200] 变异体PNPLA3 Ile148Met变异体或PNPLA3 Ile144Met变异体可为本文所描述的PNPLA3 Ile148Met变异体及PNPLA3 Ile144Met变异体中的任一种。PNPLA3 Ile148Met变异体或PNPLA3 Ile144Met变异体可藉由任何适合手段来侦测,诸如ELISA分析、RT-PCR、测序。

[0201] 在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体的PNPLA3 Ile148Met变异体或PNPLA3 Ile144Met变异体为纯合抑或杂合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3Ile148Met变异体或PNPLA3 Ile144Met变异体为纯合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3 Ile148Met变异体或PNPLA3 Ile144Met变异体为杂合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3 Ile148Met变异体为纯合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3 Ile148Met变异体为杂合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3 Ile144Met变异体为纯合的。在一些实施例中,个体的PNPLA3 Ile144Met变异体为杂合的。

[0202] 在一些实施例中,个体不包含编码HSD17B13蛋白质的功能丧失型变异的任何基因。据信,HSD17B13蛋白质的功能丧失型变异,包括本文及2017年10月11日申请的美国临时申请案第62/570,985号中所描述的此类功能丧失型变异带来肝病保护作用,且进一步据信此保护作用在变异体PNPLA3 Ile148M变异的存在下增强。

[0203] 在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体是否肥胖。在一些实施例中,若个体的身体质量指数(BMI)超过30kg/$m^2$,则其为肥胖的。肥胖可为患有肝病或有发展肝病的风险的个体的特征。在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体是否具有脂肪肝。脂肪肝可为患有肝病或有发展肝病的风险的个体的特征。在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体是否肥胖且具有脂肪肝。

[0204] 在一些实施例中,所述方法进一步包含确定个体的NAFLD活动度评分(NAS)、气球样变评分、小叶发炎评分、脂肪变性评分和/或纤维化评分。NAFLD活动度评分(NAS)、气球样变评分、小叶发炎评分、脂肪变性评分和/或纤维化评分可藉由本领域中已知的任何方法及本文所描述的方法来确定。

[0205] 如本文所用,“非酒精性脂肪肝病”可与术语“NAFLD”互换使用,其指由在每天饮酒量少于20gm的情况下出现大血管脂肪变性所定义的疾病。NAFLD在美国为最常见的肝病,且通常与胰岛素抗性/2型糖尿病及肥胖相关。NAFLD表达为脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化及有时肝细胞癌。关于NAFLD的综述,参见Tolman及Dalpiaz(2007)Ther.Clin.Risk.Manag.,3(6):1153-1163,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0206] 如本文所用,术语“脂肪变性”、“肝脂肪变性”及“脂肪肝病”指肝脏细胞中三酸甘油酯及其他脂肪的积聚。

[0207] 如本文所用,术语“非酒精性脂肪性肝炎”或“NASH”指由肝脏中脂肪的堆积引起的肝炎及损伤。NASH为被称为非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的一系列病状的一部分。NASH与酒精性肝病类似,但发生在很少饮酒或不饮酒的人中。NASH的主要特征为肝脏中的脂肪,以及发炎及损伤。大多数患有NASH的人感觉良好且没有意识到其具有肝脏问题。然而,NASH可为严重的且可引起肝硬化,其中肝脏受到永久性损伤且留下疤痕,并且不再能够正常工作。通常首先怀疑发现肝脏检查结果升高的个人患有NASH,所述检查包括在常规血液检查组中,诸如丙氨酸转氨酶(ALT)或天冬氨酸转氨酶(AST)。当进一步评估显示没有明显的肝病原因(诸如药物、病毒性肝炎或过量饮酒)时且当肝脏的x射线或成像研究显示脂肪时,则怀疑为NASH。证明NASH诊断及将其与单纯脂肪肝区分开的唯一手段为肝脏活检。

[0208] 如本文所用,术语“肝硬化”在组织学上定义为弥漫性肝脏过程,其特征在于纤维化及正常肝脏架构转变为结构异常节结。

[0209] 如本文所用,术语“血清脂质”指血液中存在的任何主要脂质。血清脂质可以游离形式或作为蛋白质复合物(例如脂蛋白复合物)的一部分存在于血液中。血清脂质的非限制性实例可包括三酸甘油酯(TG)、胆固醇,诸如总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)及中间密度脂蛋白胆固醇(IDL-C)。

[0210] 在一个实施例中,将得益于HSD17B13(及在一些实施例中PNPLA3)表达降低的个体为例如患有2型糖尿病及前驱糖尿病或肥胖症的个体;血液中脂肪(诸如胆固醇)水平较高或患有高血压的个体;患有某些代谢病症,包括代谢症候群的个体;体重快速下降的个体;患有某些感染,诸如C型肝炎感染的个体;或已暴露于一些毒素的个体。在一个实施例中,将得益于HSD17B13(及在一些实施例中PNPLA3)表达降低的个体为例如中年或更大年龄的个体;为西班牙裔、非西班牙裔白人或非洲裔美国人的个体;服用某些药物,诸如皮质类固醇及癌症药物的个体。

[0211] 在本发明的方法(及用途)中,其包含向个体施用靶向HSD17B13的第一dsRNA剂及靶向PNPLA3的第二dsRNA剂,第一及第二dsRNA剂可调配于同一组合物或不同组合物中,且可在同一组合物或分开的组合物中向个体施用。

[0212] 在一实施例中,用于本发明方法中的“iRNA”为“双重靶向RNAi剂”。术语“双重靶向RNAi剂”指包含第一dsRNA剂的分子与包含第二dsRNA剂的分子的共价连接物,该第一dsRNA剂包含核糖核酸分子的复合物,所述核糖核酸分子具有双螺旋结构,该双螺旋结构包含两个反向平行且实质上互补的核酸链,其被称为相对于第一目标RNA(还即HSD17B13基因)具有“有义”及“反义”定向;该第二dsRNA剂包含核糖核酸分子的复合物,所述核糖核酸分子具有双螺旋结构,该双螺旋结构包含两个反向平行且实质上互补的核酸链,其被称为相对于第二目标RNA(还即PNPLA3基因)具有“有义”及“反义”定向。在本发明的一些实施例中,双重靶向RNAi剂经由转录后基因沉默机制触发第一及第二目标RNA(例如mRNA)降解,在本文中称为RNA干扰或RNAi。

[0213] iRNA可藉由本领域中的任何已知方法施用。在一些实施例中,iRNA经静脉内、肌肉内或皮下向个体施用。

[0214] iRNA可藉由静脉内输注在一段时间内定期施用。在某些实施例中,在初始治疗方案之后,所述治疗可以较低频率施用。

[0215] iRNA的施用可使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的HSD17B13水平降低至少约5%、6、7、8、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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、39、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98%、或至少约99%或更多。在一优选实施例中,iRNA的施用可使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的HSD17B13水平降低至少20%。

[0216] iRNA的施用可使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的PNPLA3水平降低至少约5%、6、7、8、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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、39、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98%、或至少约99%或更多。在一优选实施例中,iRNA的施用可使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的PNPLA3水平降低至少20%。

[0217] 在施用全剂量的iRNA之前,可向患者施用较小剂量,诸如5%输注反应,且监测不良作用,诸如过敏反应。在另一实例中,可监测患者的非所需免疫刺激作用,诸如细胞介素(例如TNF-α或INF-α)水平增加。

[0218] 或者,iRNA可皮下施用,也即藉由皮下注射。注射一次或多次可用于向个体递送每日所需剂量的iRNA。注射可重复一段时间。可定期重复施用。在某些实施例中,在初始治疗方案之后,所述治疗可以较低频率施用。重复给药方案可包含定期施用治疗量的iRNA,诸如每隔一天一次或每年一次。在某些实施例中,iRNA约每周一次、每7至10天一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次、每10周一次、每11周一次、每12周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次(每季度一次)、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。如权利要求1至45中任一项的方法,其中dsRNA剂每月、每2个月、每3个月、每4个月、每5个月、每6个月或每12个月向个体施用。

[0219] 在一些实施例中,dsRNA剂每月以约25mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每月以约200mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每月以约400mg的剂量向个体施用。

[0220] 在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约25mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约200mg的剂量向个体施用。在一些实施例中,dsRNA剂每三个月以约400mg的剂量向个体施用。

[0221] 在一个实施例中,该方法包括施用本文特性化的组合物,使得目标HSD17B13基因的表达降低,诸如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24个小时、28、32或约36个小时。在一个实施例中,目标HSD17B13基因的表达降低延长的持续时间,例如至少约两天、三天、四天或更多天,例如约一周、两周、三周、或四周、或更长时间。

[0222] 在另一实施例中,该方法包括施用本文特性化的组合物,使得目标PNPLA3基因的表达降低,诸如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24个小时、28、32或约36个小时。在一个

实施例中,目标PNPLA3基因的表达降低延长的持续时间,例如至少约两天、三天、四天或更多天,例如约一周、两周、三周、或四周、或更长时间。

[0223] 优选地,适用于本文特性化的方法及组合物的iRNA特异性地靶向目标HSD17B13基因(及在一些实施例中PNPLA3基因)的RNA(初级RNA或加工后RNA)。使用iRNA抑制此类基因表达的组合物及方法可如本文所描述制备及进行。

[0224] 根据本发明的方法施用dsRNA可引起患有脂质代谢病症的患者的此类疾病或病症的严重程度、病征、症状和/或标记物降低。在此上下文中,"降低"意谓此类水平的统计学上显著降低。降低可为例如至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0225] 治疗或预防疾病的功效可例如藉由测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活质量、维持治疗作用所需的药物剂量、疾病标记物的水平或适合于治疗或靶向预防的给定疾病的任何其他可测量参数来评定。本领域技术人员藉由测量此类参数中的任一种或任何参数组合来监测治疗或预防的功效的能力良好。举例而言,可例如藉由周期性监测一种或多种血清脂质水平,例如三酸甘油酯水平来评估脂质代谢病症的治疗功效。随后读数与初始读数的比较,以提供医师治疗是否有效的指示。本领域技术人员藉由测量此类参数中的任一种或任何参数组合来监测治疗或预防的功效的能力良好。关于iRNA或其医药组合物的施用,"针对"脂质代谢病症"有效"表示,以临床上适当的方式进行施用对至少统计学上显著分数(fraction)的患者产生有益效果,诸如改善症状、治愈、疾病减轻、延长生命、改善生活质量,或熟悉脂质代谢病症及相关病因的治疗的医生通常认为积极的其他效果。

[0226] 当疾病状态的一个或多个参数存在统计学上显著改善,或由于未恶化或发展原本预期的症状时,即明显出现治疗或预防作用。作为一实例,可测量疾病参数中至少10%的有利变化可指示有效治疗,且优选为至少20%、30%、40%、50%或更多。对于给定iRNA药物或该药物的调配物的功效还可使用如本领域中已知的给定疾病的实验动物模型来确定。

[0227] 本发明进一步提供使用本发明的iRNA剂或医药组合物来例如治疗将得益于HSD17B13表达或HSD17B13降低和/或抑制的个体,例如患有HSD17B13相关疾病、病症或病状的个体的方法,其与其他药物和/或其他治疗方法组合,例如与已知药物和/或已知治疗方法,诸如目前用于治疗此类病症的已知药物和/或已知治疗方法组合。在一些实施例中,本发明提供使用本发明的iRNA剂或医药组合物及靶向PNPLA3的iRNA剂来例如治疗将得益于HSD17B13表达及PNPLA3表达降低和/或抑制的个体,例如患有HSD17B13相关疾病、病症或病状(例如NASH)的个体的方法,其与其他药物和/或其他治疗方法组合,例如与已知药物和/或已知治疗方法,诸如目前用于治疗此类病症的已知药物和/或已知治疗方法组合。举例而言,在某些实施例中,本发明的iRNA剂或医药组合物与例如以下组合施用:吡哆醇、ACE抑制剂(血管收缩素转化酶抑制剂),例如降低血压的贝那普利(benazepril)药剂,例如利尿剂、β-阻断剂、ACE抑制剂、血管收缩素II受体阻断剂、钙离子通道阻断剂、α阻断剂、α-2受体拮抗剂、组合型α及β阻断剂、中心促效剂、周边肾上腺素抑制剂及血管扩张剂;或降低胆固醇的药剂,例如他汀类药物(statins)、选择性胆固醇吸收抑制剂、树脂;脂质降低疗法;胰岛素敏化剂,诸如PPAR γ 促效剂吡格列酮(pioglitazone);glp-1r促效剂,诸如利拉伐他汀(liraglutatide);维生素E;SGLT2抑制剂;或DPPIV抑制剂;或前述中的任一个的组合。在一

个实施例中,本发明的iRNA剂或医药组合物与抑制跨膜6超家族成员2(TM6SF2)基因的表达和/或活性的药剂,例如抑制TM6SF2基因表达的RNAi剂组合施用。

[0228] iRNA剂及额外治疗剂和/或治疗可同时和/或以相同组合施用,例如皮下,或额外治疗剂可作为单独组合物的一部分或单独时间和/或藉由本领域中已知或本文所描述的另一方法施用。

[0229] III.本发明的iRNA的递送

[0230] 将本发明的iRNA递送至细胞可以多种不同方式达成,该细胞例如个体内的细胞,该个体诸如人类个体(例如有需要的个体,诸如患有脂质代谢病症的个体)。举例而言,递送可藉由使细胞活体外或活体内与本发明的iRNA接触来进行。活体内递送还可藉由向个体施用包括有iRNA(例如dsRNA)的组合物而直接进行。或者,活体内递送可藉由施用编码及引导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行。这些替代方案将在下方进一步讨论。

[0231] 一般而言,本发明iRNA可采用任何传递核酸分子的方法(活体外或活体内)(参见例如,Akhtar S.及Julian RL.,(1992)Trends Cell.Biol.2(5):139-144与WO94/02595,其完整揭示内容已以引用的方式并入本文中)。用于活体内传递时,要传递iRNA分子的考虑因素包含,例如,所传递分子的生物稳定性、预防所传递分子在标靶组织中的非特异性效应及累积。iRNA的非特异性作用可藉由局部施用来最小化,例如藉由直接注射或植入至组织中或局部施用制剂。局部施用至治疗位点时,可使该药剂达最大局部浓度,限制该药剂曝露在可能会受到药剂伤害且使药剂降解的全身组织,并可以降低iRNA分子的总施用剂量。若干研究已显示当局部施用iRNA时基因产物的成功阻断。举例而言,在马来猴玻璃体内注射(Tolentino,MJ.等人,(2004)Retina 24:132-138)及在小鼠视网膜下注射(Reich,SJ.等人(2003)Mol.Vis.9:210-216),以经眼内传递VEGF dsRNA时,均显示可在老年性黄斑部病变的实验模式中预防新血管形成。另外,在小鼠中直接瘤内注射dsRNA降低肿瘤体积(Pille,J.等人(2005)Mol.Ther.11:267-274)且可延长携带肿瘤的小鼠的存活期(Kim,WJ.等人,(2006)Mol.Ther.14:343-350;Li,S.等人,(2007)Mol.Ther.15:515-523)。RNA干扰还成功地藉由直接注射局部递送至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)Neuroscience129:521-528;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)且藉由鼻内施用局部递送至肺部(Howard,KA.等人,(2006)Mol.Ther.14:476-484;Zhang,X.等人,(2004)J.Biol.Chem.279:10677-10684;Bitko,V.等人,(2005)Nat.Med.11:50-55)。全身施用iRNA以治疗疾病时,RNA可经修饰或改用药物传递系统传递;这两种方法均可预防dsRNA于活体内被内切-与外切-核酸酶快速降解。修饰RNA或医药载体还可让iRNA组合物靶向目标组织,并避免不期望的脱靶效应。iRNA分子可藉由与亲脂性基团(诸如胆固醇)化学共轭而经修饰,以增强细胞吸收且防止降解。举例而言,将与亲脂性胆固醇部分共轭的针对ApoB的iRNA全身性注射至小鼠中,且引起肝脏及空肠两者中的apoB mRNA的阻断(Soutschek,J.等人,(2004)Nature 432:173-178)。在前列腺癌小鼠模型中,已证明iRNA与适体的共轭抑制肿瘤生长且介导肿瘤消退(McNamara,JO.等人,(2006)Nat.Biotechnol.24:1005-1015)。在一替代实施例中,iRNA可使用药物递送系统递送,诸如纳米颗粒、树枝状聚合物、聚合物、脂质体、或阳离子递送系统。带正电价的阳离子

性传递系统可促进iRNA分子(带负电价)的结合性,还加强在带负电价的细胞膜上的交互作用,以使细胞有效吸收iRNA。阳离子性脂质、树枝状聚合物、或聚合物可与iRNA结合,或经诱导以形成包覆iRNA的囊泡或微胞(参见例如Kim SH.等人,(2008)Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。当全身性施用时,囊泡或微胞的形成还预防iRNA降解。制造及施用阳离子-iRNA复合物的方法完全在熟习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,其以全文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),见上文;Verma,UN.等人,(2003),见上文)、寡染胺(Oligofectamine)、“固体核酸脂质粒子”(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)、聚乙亚胺(Bonnet ME.等人,(2008)Pharm.Res.8月16日电子版提前出版;Aigner,A.(2006)J.Biomed.Biotechnol.71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu,S.(2006)Mol.Pharm.3:472-487)、及聚酰胺基胺(Tomalia,DA.等人,(2007)Biochem.Soc.Trans.35:61-67;Yoo,H.等人,(1999)Pharm.Res.16:1799-1804)。在一些实施例中,iRNA和环糊精形成复合物以用于全身性施用。iRNA与环糊精的施用方法与医药组合物可参见美国专利案第7,427,605号,其完整揭示内容已以引用的方式并入本文中。

[0232] A.载体编码的本发明iRNA

[0233] 靶向HSD17B13基因的iRNA可由插入DNA或RNA载体中的转录单位表达(参见例如Couture,A等人,TIG.(1996),12:5-10;Skillern,A.等人的国际PCT公开案第WO 00/22113号、Conrad的国际PCT公开案第WO 00/22114号、及Conrad的美国专利第6,054,299号)。表达可为短暂性(数小时至数周)或持续性(数周至数个月或更久),依所采用的特定构建体与目标组织或细胞类型而定。此等转基因可被引入作为线性构建体、环状质体或病毒载体,其可为整合或非整合载体。还可构筑这些转基因,使其得以呈染色体外质体遗传(Gassmann等人,(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1292)。

[0234] iRNA的个别链或多链可由在表达载体上的启动子转录。当希望这两个单独链可以表达产生例如dsRNA时,可以将两个单独的表达载体共同引进(例如转染或感染)至目标细胞中。或者,dsRNA的各个别链可藉由位于同一表达质体上的两个启动子转录。在一实施例中,dsRNA表达为藉由接头聚核苷酸序列接合的反向重复聚核苷酸,使得dsRNA具有茎及环结构。

[0235] iRNA表达载体通常为DNA质体或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体,优选为那些与脊椎动物细胞兼容的表达载体,可用于产生用于表达如本文所描述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体为本技术领域中所熟知且可自许多商业来源获得。通常,此类载体被提供,其含有用于插入所需核酸区段的便利限制位点。iRNA表达载体的递送可以为全身性的,诸如藉由静脉内或肌肉内施用,藉由向自患者移植的目标细胞施用,随后再引入至患者中,或藉由允许引入至所需目标细胞中的任何其他方式。

[0236] 本文所说明方法与组合物可利用的病毒载体系统包含但不限于(a)腺病毒载体;(b)反转录病毒载体,包括含但不限于慢病毒载体、莫罗尼氏白血病病毒等;(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)乳突状瘤病毒载体;(h)

微小RNA病毒载体;(i)痘病毒载体,诸如正痘,例如,牛痘病毒载体或鸟痘,例如金丝雀痘或禽痘;及(j)辅助病毒依赖性或无肠腺病毒。复制缺陷型病毒也可以是有利的。不同的载体将会或将不会被并入细胞的基因组中。若需要,构建体可包含用于转染的病毒序列。或者,构建体可被并入至能够进行游离复制的载体中,例如EPV及EDV载体。用于iRNA重组表达的构建体将通常需要调节组件,例如启动子、增强子等,以确保iRNA在目标细胞中的表达。其他考虑载体及构建体的方面为本技术领域中已知的。

[0237] IV.用于本发明方法中的iRNA

[0238] 本文描述用于本发明方法中的iRNA。iRNA为双链核糖核酸(dsRNA)分子。在一个实施例中,dsRNA剂靶向HSD17B13基因且抑制HSD17B13基因的表达。在一个实施例中,iRNA剂包括用于抑制细胞中的HSD17B13基因表达的dsRNA分子,该细胞诸如肝细胞,诸如个体内的肝细胞,该个体例如哺乳动物,诸如患有慢性纤维发炎性肝病、病症或病状,例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或与非酒精性脂肪性肝炎(NASH)相关的疾病、病症或病状,例如肝脏中脂滴的积聚和/或膨胀和/或肝脏的纤维化的人类。

[0239] 用于本发明方法中的dsRNA包括具有互补区的反义链,该互补区与在HSD17B13基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补。互补区的长度为约30个核苷酸或更少(例如长度为约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18个核苷酸或更少)。在与表达目标基因的细胞接触后,iRNA将目标基因(例如人类、灵长类动物、非灵长类动物或鸟类目标基因)的表达抑制至少约10%,藉由例如基于PCR或分支DNA(bDNA)的方法,或藉由基于蛋白质的方法,诸如藉由免疫荧光分析,使用例如西方墨点法或流式细胞测量技术所分析。

[0240] dsRNA包含两个互补且杂交的RNA链,以在将使用dsRNA的条件下形成双螺旋结构。dsRNA(反义链)的一条链包含与目标序列实质上互补且大致完全互补的互补区。目标序列可来源于在HSD17B13基因表达期间形成的mRNA的序列。另一条链(有义链)包含与该反义链互补的区,使得当在适当条件下组合时,该两链杂交且形成双螺旋结构。如本文其他地方所描述且如本技术领域中已知,dsRNA的互补序列也可含有为单一核酸分子的自互补区,而非位于单独寡核苷酸上。

[0241] 一般而言,双螺旋结构的长度在15与30个碱基对之间,例如长度在15至29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个碱基对之间。在上述所述的范围和长度之间的中间范围和长度还预期为本发明的部分。

[0242] 类似地,目标序列的互补区的长度在15与30个核苷酸之间,例如长度在15至29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个核苷酸之间。在上述所述的范围和长度之间的中间范围和长度还预期为本发明的部分。

[0243] 在一些实施例中,dsRNA的有义链及反义链的长度各自独立地为约15至约30个核苷酸,或长度为约25至约30个核苷酸,例如各链的长度独立地在15至29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个核苷酸之间。在一些实施例中,dsRNA的长度在约15个与约23个核苷酸之间,或长度在约25个与约30个核苷酸之间。一般而言,dsRNA足够长,以作为Dicer酶的底物。举例而言,在本技术领域中熟知dsRNA长于约21-23个核苷酸可充当Dicer的底物。如同普通技术人员还将认识到,靶向用来裂解的RNA区域将最常为较大RNA分子的一部分,通常为mRNA分子。在相关情况下,mRNA目标的“一部分”为具有足够长度以允许其作为RNAi引导的裂解(还即经由RISC路径的裂解)的底物的mRNA目标的连续序列。

[0244] 本领域技术人员还将认识到,双螺旋区为dsRNA的主要功能部分,例如约9至36个碱基对,例如约10至36、11-36、12-36、13-36、14-36、15-36、9-35、10-35、11-35、12-35、13-35、14-35、15-35、9-34、10-34、11-34、12-34、13-34、14-34、15-34、9-33、10-33、11-33、12-33、13-33、14-33、15-33、9-32、10-32、11-32、12-32、13-32、14-32、15-32、9-31、10-31、11-31、12-31、13-32、14-31、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、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至23或21至22个碱基对的双螺旋区。因此,在一个实施例中,在其被加工成靶向所需RNA以进行裂解的例如15至30个碱基对的功能性双螺旋的程度上,具有多于30个碱基对的双螺旋区的RNA分子或RNA分子复合物为dsRNA。因此,普通技术人员将认识到,在一实施例中,miRNA为dsRNA。在另一实施例中,dsRNA并非天然存在的miRNA。在另一实施例中,适用于靶向HSD17B13表达的iRNA剂并非藉由裂解较大dsRNA而在目标细胞中产生。

[0245] 如本文所描述的dsRNA还可包括一个或多个单链核苷酸突出端,例如1、2、3或4个核苷酸。具有至少一个核苷酸突出端的dsRNA相对于它们的钝端对应物可具有出乎意料的优良抑制特性。核苷酸突出端可包括核苷酸/核苷类似物或由核苷酸/核苷类似物组成,包含脱氧核苷酸/核苷。多个突出端可在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的多个核苷酸可存在于dsRNA的反义链或有义链的5’端、3’端或两端上。

[0246] dsRNA可藉由如下文进一步讨论的本领域中已知的标准方法合成,例如藉由使用自动化DNA合成器,诸如可商购自例如Biosearch、Applied Biosystems公司。

[0247] 本发明的iRNA化合物可使用两步骤工艺制备。首先,单独制备双链RNA分子的个别链。接着,对组分链进行退火。siRNA化合物的个别链可使用溶液相或固相有机合成或两者制备。有机合成提供可容易制备包括有非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链的优点。本发明的单链寡核苷酸可使用溶液相或固相有机合成或以上两者来制备。

[0248] 在一个方面中,本发明的dsRNA包含至少两个核苷酸序列、有义序列及反义序列。有义链序列选自表2中提供的序列的组,且有义链的对应反义链选自表2的序列的组。在此

方面中,两个序列中的一个与两个序列中的另一个互补,其中所述序列中的一个与在HSD17B13基因表达中产生的mRNA的序列实质上互补。因此,在此方面中,dsRNA将包括两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸描述为表2中的有义链(乘客链),且第二寡核苷酸描述为表2中的有义链的对应反义链(引导链)。在一实施例中,dsRNA实质上互补的序列包含在分开的寡核苷酸上。在另一实施例中,dsRNA实质上互补的序列包含在单一寡核苷酸上。

[0249] 应理解,尽管表2中的序列描述为经修饰、未经修饰、未经共轭和/或共轭的序列,但本发明的iRNA(例如本发明的dsRNA)的RNA可包含未经修饰、未经共轭和/或与其中所描述不同地经修饰和/或经共轭的表2中所阐述的任一序列。

[0250] 本领域技术人员充分了解,具有介于约20及23个碱基对(例如21个碱基对)之间的双螺旋结构的dsRNA已经被誉为在诱导RNA干扰尤其有效(Elbashir等人,(2001)EMBO J.,20:6877-6888)。然而,其他人已发现较短或较长的RNA双螺旋结构也可有效(Chu及Rana(2007)RNA 14:1714-1719;Kim等人(2005)Nat Biotech 23:222-226)。在上文所描述的实施例中,通过本文提供的寡核苷酸序列的性质,本文所描述的dsRNA可包含长度为最少21个核苷酸的至少一条链。可合理预期,与上文所描述的dsRNA相比,较短的双螺旋减去在一端或两端上的仅几个核苷酸可同样有效。因此,如下dsRNA涵盖在本发明的范畴内:所述dsRNA具有来源于本文所提供的任一序列的至少15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的序列,且其抑制HSD17B13基因表达的能力与包含完整序列的dsRNA相差不超过约5%、10%、15%、20%、25%或30%抑制。

[0251] 另外,表2中所描述的RNA识别HSD17B13转录物中易进行RISC介导的裂解的位点。因此,本发明进一步表征在于靶向此多个位点内的iRNA。如本文所用,如果iRNA促进转录物在该特定位点内任一处裂解,则iRNA被称为在RNA转录物的特定位点内进行靶向。此类iRNA通常将包含来自本文所提供的序列中的一个的至少约15个连续核苷酸,所述序列与基因中所选定序列相邻的区获取的额外核苷酸序列耦合。

[0252] 虽然目标序列的长度通常为约15-30个核苷酸,但在此范围内的用于引导任何给定目标RNA的裂解的特定序列的适合性有广泛变化。本文所阐述的各种软件套件和指南提供了用于识别任何给定基因目标的最佳目标序列的指南,但还可采用经验方法,其中给定尺寸(作为非限制性实例,21个核苷酸)的“窗口”或“屏蔽”是经文字地或象征性地(包含,例如,在计算机中进行)放置在目标RNA序列上,以识别可充当目标序列的尺寸范围内的序列。通过在初始目标序列位置的上游或下游逐渐移动序列“窗口”一个核苷酸,可识别下一个潜在目标序列,直到针对所选的任何给定目标大小识别可能序列完整组。此过程与所识别序列(使用如本文所描述或如本技术领域中已知的分析)的系统化合成及测试耦合以识别最佳表达的可识别此等RNA序列的那些序列,当iRNA剂靶向所述序列时介导对目标基因表达的最佳抑制。因此,虽然本文中所识别的序列表示有效目标序列,但预期进一步优化抑制效率可藉由在给定序列的上游或下游逐渐地“移动窗口”一个核苷酸以识别具有相等或优选抑制特征的序列来达成。

[0253] 此外,预期对于本文所识别的任何序列,可通过系统性添加或移除核苷酸以产生较长或较短序列来达成进一步优化,且测试藉由自该点沿目标RNA向上或向下移动较长或较短大小的窗口所产生的那些序列。再次,耦合产生新候选目标的方法与基于如本技术领域中已知和/或如本文所描述的抑制分析中的这些目标序列的iRNA的有效性测试,可导致

进一步改良抑制效率。此外还有,这种经优化序列可藉由以下调整:例如,引入如本文所描述或如本技术领域中已知的经修饰核苷酸、在突出端的增加或变化、或如本技术领域中已知和/或本文所讨论的其他修饰以进一步优化该分子(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默路径酶的相互作用、增加胞内体的释放)作为表达抑制剂。

[0254] 如本文所描述的iRNA剂可含有与目标序列的一个或多个错配。在一实施例中,如本文所描述的iRNA含有不超过3个错配。若iRNA的反义链与目标序列含有错配,则最好不要将错配区域位于互补区的中心。若iRNA的反义链与目标序列含有错配,则优选地,该错配被限制在自互补区的5'端或3'端算起的最后5个核苷酸内。举例而言,对于23个核苷酸的iRNA剂,与HSD17B13基因的区域互补的链在中心13个核苷酸内通常不含有任何错配。本文所描述的方法或本领域中已知的方法可用于确定含有与目标序列错配的iRNA是否有效抑制HSD17B13基因的表达。考虑具有错配的iRNA抑制HSD17B13基因表达的功效很重要,尤其在已知HSD17B13基因中的特定互补区在群体内具有多态序列变异时。

[0255] 在一些实施例中,dsRNA剂包含形成双链区的有义链及反义链,其中有义链包含核苷酸序列5'-AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU-3'(SEQ ID NO:26)且反义链包含核苷酸序列5'-AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC-3'(SEQ ID NO:27)。

[0256] 在一些实施例中,dsRNA包含例如国际专利申请案第PCT/US2019/023079号中所描述的任一dsRNA剂,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0257] i.本发明的经修饰iRNA

[0258] 在一个实施例中,用于本发明方法中的iRNA(例如dsRNA)未经修饰,且不包含例如本领域中已知及本文所描述的化学修饰和/或共轭。在另一实施例中,用于本发明方法中的iRNA(例如dsRNA)经化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。在本发明的某些实施例中,实质上本发明的iRNA的所有核苷酸经修饰。在本发明的其他实施例中,本发明的iRNA的所有核苷酸经修饰。本发明的iRNA其中"实质上所有核苷酸经修饰"主要但不完全修饰,且可包含不超过5、4、3、2或1个未经修饰核苷酸。

[0259] 在本发明的一些方面中,本发明的iRNA的实质上全部核苷酸经修饰且iRNA剂包括不超过10个包括有2'-氟修饰的核苷酸(例如,不超过9个2'-氟修饰、不超过8个2'-氟修饰、不超过7个2'-氟修饰、不超过6个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过3个2'-氟修饰、或不超过2个2'-氟修饰)。举例而言,在一些实施例中,有义链包含不超过4个包含有2'-氟修饰的核苷酸(例如不超过3个2'-氟修饰,或不超过2个2'-氟修饰)。在其他实施例中,反义链包括不超过6个包括有2'-氟修饰的核苷酸(例如不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、或不超过2个2'-氟修饰)。

[0260] 在本发明的其他方面中,本发明的iRNA的所有核苷酸经修饰且iRNA剂包括不超过10个包括有2'-氟修饰的核苷酸(例如,不超过9个2'-氟修饰、不超过8个2'-氟修饰、不超过7个2'-氟修饰、不超过6个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过3个2'-氟修饰、或不超过2个2'-氟修饰)。

[0261] 在一实施例中,本发明的双链RNAi剂在反义链的5'核苷酸处还包括5'-磷酸酯或5'-磷酸酯模拟物。在另一实施例中,双链RNAi剂还包括在反义链的5'核苷酸处的5'-磷酸

酯模拟物。在一特定实施例中,5'-磷酸酯模拟物为5'-磷酸乙烯酯(5'-VP)。

[0262] 本发明中表征的核酸可藉由本领域中熟知的方法合成和/或修饰,诸如那些描述于"Current protocols in nucleic acid chemistry",Beaucage,S.L.等人(编),John Wiley&Sons公司,纽约,NY,USA,其以引用的方式并入本文中。修饰包含:例如:末端修饰,例如,5'-端修饰(磷酸化、共轭、反向键联)或3'端修饰(共轭、DNA核苷酸、倒置的连接等);碱基修饰,例如,以稳定碱基置换、使碱不稳定、或与扩展的合作伙伴碱基配对的碱基、碱基的移除(脱碱基核苷酸)、或共轭碱基;糖修饰(例如,在2'-位置或4'-位置)或糖置换;和/或主链修饰,包含磷酸二酯键的修饰或置换。适用于本文中所描述的实施例的iRNA化合物的特定实例包括(但不限于)含有经修饰主链或无天然核苷间键联的RNA。具有经修饰主链的RNA尤其包含在主链中不具有磷原子的RNA。出于本说明书的目的,且如本技术领域中有时提及,在他们核苷间主链中不具有磷原子的经修饰RNA还可视为寡核苷酸。在一些实施例中,经修饰iRNA在其核苷间主链中将具有磷原子。

[0263] 经修饰的RNA主链包含,例如:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯,包含3'-亚烷基磷酸酯及手性磷酸酯、磷酸盐、包含有3'-氨基磷酸酰胺酸及氨基烷基磷酸酰胺酸的磷酸酯、亚硫酰磷酸酯、亚硫烷基磷酸酯、亚硫烷基磷酸三酯、及具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸盐、那些的2'-5'-链结的类似物、及具有相反极性的那些,其中相邻核苷单元对以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。还包含各种盐类、混合盐类及游离酸形式。在本发明的一些实施例中,本发明的dsRNA剂呈游离酸形式。在本发明的其他实施例中,本发明的dsRNA剂呈盐形式。在一实施例中,本发明的dsRNA剂呈钠盐形式。在某些实施例中,当本发明的dsRNA剂呈钠盐形式时,该药剂中存在钠离子作为该药剂中存在的实质上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的相对离子。药剂中实质上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键联具有钠相对离子,在无钠相对离子的情况下包含不超过5、4、3、2或1个磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键联。在一些实施例中,当本发明的dsRNA剂呈钠盐形式时,药剂中存在钠离子作为存在于药剂中的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的相对离子。

[0264] 教导上述含磷键联的制备的代表性美国专利包括(但不限于):美国专利第3,687,808号;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;第7,321,029号;及美国专利RE39464,其中各者的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0265] 其中不包含磷原子的经修饰RNA主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子及烷基或环烷基核苷间键联、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键联形成的主链。那些包含那些具有吗啉基键(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷主链;硫化物、亚砜及砜主链;甲酰基及硫甲酰基主链;亚甲基甲酰基及硫甲酰基主链;含有主链的烯烃;磺酸盐主链;亚甲基亚胺基及亚甲基肼基主链;磺酸盐及磺酰胺主链;酰胺主链;及其他具有混合N、O、S及$CH_2$组分的部分。

[0266] 教导上述寡核苷的制备的代表性美国专利包括(但不限于):美国专利第5,034,506号;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;第5,677,437号;及第5,677,439号,其中各者的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0267] 在其他实施例中,预期适合的RNA模拟物用于iRNA中,其中核苷酸单元的糖及核苷间键联(即主链)被新基团置换。维持碱基单元以与适当的核酸目标化合物杂交。一种此类寡聚化合物,其为已展示具有优异杂交特性的RNA模拟物,称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖主链经含有酰胺的主链置换,具体而言氨基乙基甘氨酸主链。保留核碱基且直接或间接地与主链的酰胺部分的杂氮原子结合。教导制备PNA化合物的代表性美国专利包含但不限于:美国专利第5,539,082号、第5,714,331号及第5,719,262号,其中的每一个的全部内容特此以引用的方式并入本文中。适用于本发明的iRNA的额外PNA化合物描述于例如Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500中。

[0268] 本发明表征的一些实施例包含具有硫代磷酸酯主链的RNA及具有杂原子主链的寡核苷酸,且具体而言,--$CH_2$--NH--$CH_2$-、--$CH_2$--N($CH_3$)--O--$CH_2$--[已知为亚甲基(甲基亚胺基)或MMI主链]、--$CH_2$--O--N($CH_3$)--$CH_2$--、--$CH_2$--N($CH_3$)--N($CH_3$)--$CH_2$--及--N($CH_3$)--$CH_2$--$CH_2$--[其中天然磷酸二酯主链表示为上述引用美国专利第5,489,677号的--O--P--O--$CH_2$--]、及上述引用美国专利第5,602,240号的酰胺主链中。在一些实施例中,本文表征的RNA具有上述引用美国专利第5,034,506号的吗啉基主链结构。

[0269] 经修饰RNA还可含有一个或多个经取代的糖部分。在2'-位置,本文中表征的iRNA(例如dsRNA)可包含以下中的一个:OH;F;O-、S-或者N-烷基;O-、S-或者N-烯基;O-、S-或者N-炔基;或者O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基及炔基可为经取代或者未经取代的$C_1$至$C_{10}$烷基或者$C_2$至$C_{10}$烯基及炔基。例示性合适修饰包含O[$(CH_2)_nO]_mCH_3$、$O(CH_2)._nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、及$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$,其中n及m是自1至约10。在其他实施例中,dsRNA在2'位置包含以下中的一个:$C_1$至$C_{10}$低级烷基、经取代的低级烷基、烷烃、芳烷基、O-烷烃或O-芳烷基、SH、$SCH_3$、OCN、Cl、Br、CN、$CF_3$、$OCF_3$、$SOCH_3$、$SO_2CH_3$、$ONO_2$、$NO_2$、$N_3$、$NH_2$、杂环烷基、杂环烷烃、氨基烷基氨基、聚烷氨基、经取代的硅烷基、RNA裂解基团、报导子基团、嵌入剂(intercalator)、用于改良iRNA的药物动力学特性的基团或用于改良iRNA的药效学特性的基团,及具有类似特性的其他取代基。在一些实施例中,修饰包含2'-甲氧基乙氧基(2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$,还称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),还即,烷氧基-烷氧基。另一例示性修饰为2'-二甲基氨基氧基乙氧基,还即,$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基团还称为2'-DMAOE,如下文实例中所描述,且2'-二甲基氨基乙氧基(本技术领域中还称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),还即2'-O--$CH_2$--O--$CH_2$--$N(CH_2)_2$。其他例示性修饰包含:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(此等三个家族中的R及S异构物两者);2'-烷氧基烷基;及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0270] 其他修饰包含2'-甲氧基(2'-$OCH_3$)、2'-氨基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)及2'-氟(2'-F)。类似修饰还可在iRNA的RNA上的其他位置进行,具体而言,在3'端核苷酸上或2'-5'连接的dsRNA上的糖的3'位置及5'端核苷酸的5'位置中。iRNA也可具有糖模拟物,诸如环丁

基部分代替呋喃戊糖基糖。教导制备此类经修饰糖结构的代表性美国专利包含但不限于美国专利第4,981,957号;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;第5,670,633号;及第5,700,920号,其中某些与本申请案共同拥有。前述各者的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0271] 本发明的iRNA还可包含核碱基(通常在本技术领域中简称为“碱基”)修饰或取代。如本文所用,“未经修饰”或“天然”核碱基包含嘌呤碱基腺嘌呤(A)及鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包含其他合成及天然核碱基,诸如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、腺嘌呤及鸟嘌呤的6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤及鸟嘌呤的2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代亚胺及2-硫代胞嘧啶、5-氟脲嘧啶及胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶及胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶及胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基及其他8-取代的腺嘌呤及鸟嘌呤、5-卤基,特别是5-溴、5-三氟甲基及其他5-取代的尿嘧啶及胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤及7-甲基腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤及8-氮杂腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤及7-去氮腺嘌呤及3-去氮胞嘧啶及3-去氮腺嘌呤。其他核碱基包含那些揭示于美国专利第3,687,808号中者,那些揭示于Modified Nucleosides in Biochemistry,Biotechnology and Medicine,Herdewijn,P.编,Wiley-VCH,2008中者;那些揭示于The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.L编,John Wiley&Sons,1990中者,那些由Englisch等人,(1991)Angewandte Chemie,国际版,30:613所揭示,及那些由Sanghvi,Y S.,第15章,dsRNAResearch and Applications,第289-302页,Crooke,S.T.及Lebleu,B.编,CRC Press,1993所揭示。这些核碱基中的某些尤其适用于增加本发明中所表征的寡聚化合物的结合亲和力。这些包含5个经取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶及N-2、N-6及O-6个经取代的嘌呤,包含2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。已显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双螺旋稳定性增加0.6-1.2℃(Sanghvi,Y.S.、Crooke,S.T.及Lebleu,B.编,dsRNA研究及应用,CRC Press,Boca Raton,1993,276-278页)且为例示性碱基取代,甚至更具体而言,当与2’-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0272] 教导上文所提及的某些经修饰核碱基以及其他经修饰核碱基的制备的代表性美国专利包括(但不限于)上文所提及的美国专利第3,687,808号;4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,681,941;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;第7,427,672号;及第7,495,088号,其中各篇的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0273] 本发明的iRNA还可经修饰以包含一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸为具有经修饰核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包括连接2’及4’碳的额外桥。此结构在3’-内结构构形中有效地“锁住”核糖。已显示将锁核酸添加至siRNA中会增加血清中的siRNA稳定性,且降低脱靶作用(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)。

[0274] 本发明的iRNA还可经修饰以包含一个或多个双环糖部分。“双环糖”为藉由桥接两个原子修饰的呋喃酰基环。“双环核苷”(“BNA”)为具有糖部分的核苷,该糖部分包含连接糖环的两个碳原子的桥,藉此形成双环系统。在某些实施例中,桥连接糖环的4'-碳及2'-碳。因此,在一些实施例中,本发明的药剂可包含一个或多个锁住的核酸(LNA)。锁核酸为具有经修饰核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包括连接2'及4'碳的额外桥。换言之,LNA为包括有双环糖部分的核苷酸,该双环糖部分包括有4'-$CH_2$-O-2'桥。此结构在3'-内结构构形中有效地“锁住”核糖。已显示将锁核酸添加至siRNA中会增加血清中的siRNA稳定性,且降低脱靶作用(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)。用于本发明的聚核苷酸中的双环核苷的实例包含但不限于包括有4'与2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施例中,本发明的反义聚核苷酸包含一个或多个双环核苷,其包括有4'至2'桥。此类4'至2'桥联双环核苷的实例包含但不限于4'-(CH2)—O-2'(LNA);4'-(CH2)—S-2';4'-(CH2)2—O-2'(ENA);4'-CH(CH3)—O-2'(还称为“受限乙基”或“cEt”)及4'-CH(CH2OCH3)—O-2'(及其类似物;参见例如美国专利第7,399,845号);4'-C(CH3)(CH3)—O-2'(及其类似物;参见例如美国专利第8,278,283号);4'-CH2—N(OCH3)-2'(及其类似物;参见例如美国专利第8,278,425号);4'-CH2—O—N(CH3)-2'(参见例如美国专利公开案第2004/0171570号);4'-CH2—N(R)—O-2',其中R为H、C1-C12烷基、或保护基(参见例如美国专利第7,427,672号);4'-CH2—C(H)(CH3)-2'(参见例如Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);及4'-CH2—C(=CH2)-2'(及其类似物;参见例如美国专利第8,278,426号)。前述各者的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0275] 教示制备锁核酸核苷酸的额外代表性美国专利及美国专利公开案包含但不限于以下:美国专利第6,268,490号;第6,525,191号;第6,670,461号;第6,770,748号;第6,794,499号;第6,998,484号;第7,053,207号;第7,034,133号;第7,084,125号;第7,399,845号;第7,427,672号;第7,569,686号;第7,741,457号;第8,022,193号;第8,030,467号;第8,278,425号;第8,278,426号;第8,278,283号;US2008/0039618以及US2009/0012281,前述每一个的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0276] 前述双环核苷中的任一个可制备为具有一种或多种立体化学糖组态,包含例如α-L-呋喃糖及β-D-呋喃糖(参见WO 99/14226)。

[0277] 本发明的iRNA还可经修饰以包含一个或多个受限乙基核苷酸。如本文所用,“受限的乙基核苷酸”或“cEt”为包括有双环糖部分的锁核酸,该双环糖部分包括有4'-CH(CH3)-O-2'桥。在一实施例中,受限乙基核苷酸在本文中称为“S-cEt”的S构形中。

[0278] 本发明的iRNA还可包含一个或多个“构型受限核苷酸(“CRN”)”。CRN为核苷酸类似物,其具有连接核糖的C2'及C4'碳或核糖的C3及-C5'碳的接头。CRN将核糖环锁定至稳定构形中且增加对mRNA的杂交亲和力。接头具有足够长度以将氧置于最佳位置以获得稳定性及亲和力,导致较少的核糖环皱折。

[0279] 教导制备上述所指的某些CRN中的代表性公开案包含但不限于美国专利公开案第2013/0190383号;及PCT公开案WO 2013/036868,其中的每一个的全部内容在此以引用的方

式并入本文中。

[0280] 在一些实施例中,本发明的iRNA包括一个或多个单体,其为UNA(未锁定核酸)核苷酸。UNA是经解锁非环状核酸,其中该糖的任一键已被移除,形成经解锁的“糖”残基。在一实例中,UNA还涵盖在C1'-C4'之间具有键的单体(即,在C1'与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)已被移除。在另一实例中,已移除糖的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)及Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,于此以引用方式并入本文中)。

[0281] 教导制备UNA的代表性美国公开案包含但不限于美国专利第8,314,227号;及美国专利公开案第2013/0096289号;第2013/0011922号;及第2011/0313020号,其每一个的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0282] 对RNA分子端的潜在稳定修饰可包含N-(乙酰胺基己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6-氨基)、2-二十烷酰基-尿苷-3″-磷酸酯、倒位碱基(inverted base)dT(idT)及其他。此修饰的公开可见于PCT公开案第WO 2011/005861号中。

[0283] 本发明的iRNA的其他修饰包含5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物,例如RNAi剂的反义链上的5'端磷酸酯或磷酸酯模拟物。适合的磷酸盐模拟物揭示于例如美国专利公开案第2012/0157511号中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0284] 在某些特定实施例中,本发明的RNAi剂为抑制HSD17B13基因的表达的药剂,其选自表2中所列或PCT/US2019/023079中所揭示的药剂的组。这些药剂中的任一个可进一步包含配体。

[0285] A.包括有本发明基序的经修饰iRNA

[0286] 在本发明的某些方面中,本发明的双链RNAi剂包含具有化学修饰的药剂,例如揭示于2012年11月16日申请的WO 2013/075035中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0287] 因此,本发明提供能够在活体内抑制目标基因(也即HSD17B13基因)的表达的双链RNAi剂。RNAi剂包括有义链及反义链。RNAi剂的各链长度可在12-30个核苷酸范围内。举例而言,各链的长度可介于14-30个核苷酸、长度为17-30个核苷酸、长度为25-30个核苷酸、长度为27-30个核苷酸、长度为17-23个核苷酸、长度为17-21个核苷酸、长度为17-19个核苷酸、长度为19-25个核苷酸、长度为19-23个核苷酸、长度为19-21个核苷酸、长度为21-25个核苷酸或长度为21-23个核苷酸。在一个实施例中,有义链的长度为21个核苷酸。在一个实施例中,反义链的长度为23个核苷酸。

[0288] 有义链和反义链通常形成双链RNA(“dsRNA”),在本文中也称为“RNAi剂”。RNAi剂的双螺旋区的长度可为12-30个核苷酸对。举例而言,双螺旋区的长度可介于14-30个核苷酸对、长度为17-30个核苷酸对、长度为27-30个核苷酸对、长度为17-23个核苷酸对、长度为17-21个核苷酸对、长度为17-19个核苷酸对、长度为19-25个核苷酸对、长度为19-23个核苷酸对、长度为19-21个核苷酸对、长度为21-25个核苷酸对或长度为21-23个核苷酸对。在另一实施例中,双螺旋区的长度选自15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26及27个核苷酸。

[0289] 在一实施例中,RNAi剂可在一条链或两条链的3'端、5'端或两端处含有一个或多个突出端区域和/或封端基团。突出端的长度可为1-6个核苷酸,例如长度为2-6个核苷酸、

长度为1-5个核苷酸、长度为2-5个核苷酸、长度为1-4个核苷酸、长度为2-4个核苷酸、长度为1-3个核苷酸、长度为2-3个核苷酸或长度为1-2个核苷酸。突出端可为一条链较另一条链长的结果,也可为相同长度的两链相互交错而成的结果。突出端可与目标mRNA形成错配,或其可与所靶向的基因序列互补或可为另一序列。第一链及第二链还可例如藉由额外碱基接合形成发夹,或藉由其他非碱性接头接合。

[0290] 在一实施例中,RNAi剂的突出端区中的核苷酸可各自独立地为经修饰或未修饰的核苷酸,包含但不限于经2'-糖修饰的核苷酸,诸如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)、及其任何组合。举例而言,TT可为任一链上的任一端的突出序列。突出端可与目标mRNA形成错配,或其可与所靶向的基因序列互补或可为另一序列。

[0291] RNAi剂的有义链、反义链或两链处的5'-或3'-突出端可经磷酸化。在一些实施例中,多个突出端区域含有两个核苷酸,其在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中该两个核苷酸可相同或不同。在一实施例中,突出端存在于有义链、反义链或两链的3'端。在一实施例中,此3'-突出端存在于反义链中。在一实施例中,此3'-突出端存在于有义链中。

[0292] RNAi剂可仅含有单一突出端,其可增强RNAi的干扰活性,而不影响其整体稳定性。例如,单链突出端可位于有义链的3'端,或者,位于反义链的3'端。RNAi还可具有平端,其位于反义链的5'端(或有义链的3'端),或反之亦然。一般而言,RNAi的反义链在3'端处具有核苷酸突出端,且其5'端为钝端。虽然不希望受理论束缚,反义链的5'端及反义链的3'端突出端处的非对称钝端有利于引导链加载至RISC制程中。

[0293] 在一实施例中,RNAi剂为长度为19个核苷酸的双端钝聚体,其中有义链在自5'端位置7、8、9处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在距5'端位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0294] 在另一实施例中,RNAi剂为长度为20个核苷酸的双端钝聚体,其中有义链在自5'端位置8、9、10处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在距5'端位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0295] 在又另一实施例中,RNAi剂为长度为21个核苷酸的双端钝聚体,其中有义链在自5'端位置9、10、11处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在距5'端位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0296] 在一实施例中,该RNAi剂包括21个核苷酸有义链及23个核苷酸反义链,其中该有义链在自5'端位置9、10、11处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序;该反义链在自5'端位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序,其中该RNAi剂的一端为钝的,而另一端包括2个核苷酸突出端。优选地,2个核苷酸突出端位于反义链的3'端处。

[0297] 当2个核苷酸突出端位于反义链的3'端时,末端三个核苷酸之间可有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中三个核苷酸中的两个为突出核苷酸,且第三个核苷酸为突出核苷酸附近的配对核苷酸。在一实施例中,RNAi剂另外在有义链的5'端处及反义链的5'端处在末端三个核苷酸之间具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一实施例中,RNAi剂的有义链及反义链中的每个核苷酸,包含作为基序的一部分的核苷酸为经修饰的核苷酸。在一实施例中,各残基独立地经2'-O-甲基或3'-氟修饰,例如以交替基序修饰。视情况,RNAi剂还包

括配体(优选为$GalNAc_3$)。

[0298] 在一实施例中,该RNAi剂包括有义链及反义链,其中该有义链的长度为25-30个核苷酸残基,其中自第一链的5'端核苷酸(位置1)位置1至23开始包括至少8个核糖核苷酸;该反义链的长度为36-66个核苷酸残基,且自3'末端核苷酸开始在与有义链的位置1至23配对以形成双螺旋的位置处包括至少8个核糖核苷酸;其中反义链的至少3'末端核苷酸与有义链不成对,且至多6个连续3'末端核苷酸与有义链不成对,从而形成1-6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包括与有义链不成对的10-30个连续核苷酸,从而形成10-30个核苷酸单链5'突出端;其中当有义链和反义链对齐的最大互补性时,至少该有义链5'末端和3'末端核苷酸为与反义链的核苷酸配对的碱基,从而在有义链与反义链之间形成实质上双螺旋的区域;以及反义链沿着至少19个反义链长度的核糖核苷酸与目标RNA充分互补,以在当该双链核酸被引入哺乳动物细胞中时降低目标基因表达;且其中该有义链在三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序,其中基序中的至少一个出现在裂解位点处或附近。反义链在裂解位点处或附近的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0299] 在一个实施例中,RNAi剂包含有义链及反义链,其中RNAi剂包含长度为至少25且至多29个核苷酸的第一链及长度为至多30个核苷酸的第二链,其在自5'端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序;其中第一链的3'端及第二链的5'端形成钝端,且第二链在其3'端比第一链长1至4个核苷酸,其中双螺旋区的长度为至少25个核苷酸,且当将RNAi剂引入哺乳动物细胞中时,第二链沿第二链长度的至少19个核苷酸与目标mRNA充分互补以降低目标基因表达,且其中RNAi剂的dicer裂解优选产生包含第二链的3'端的siRNA,藉此降低哺乳动物中目标基因的表达。视情况,RNAi剂进一步包含配体。

[0300] 在一实施例中,RNAi剂的有义链在三个连续核苷酸上含有三个相同修饰的至少一个基序,其中基序中的一个出现在有义链中的裂解位点处。

[0301] 在一实施例中,RNAi剂的反义链还可在三个连续核苷酸上含有三个相同修饰的至少一个基序,其中基序中的一个出现在反义链中的裂解位点处或附近。

[0302] 对于具有长度17-23个核苷酸的双螺旋区的RNAi剂,反义链的裂解位点通常在距5'端10、11及12个位置附近。因此,三个相同修饰的基序可发生在反义链的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,自反义链的5'端的第1个核苷酸开始计数,或自反义链的5'端的双螺旋区内的第1个配对核苷酸开始计数。在反义链中的裂解位点还可根据RNAi的双螺旋区自5'端的长度而改变。

[0303] RNAi剂的有义链可在链的裂解位点处的三个连续核苷酸上含有三个相同修饰的至少一个基序;且反义链可在链的裂解位点处或附近的三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当有义链及反义链形成dsRNA双螺旋时,该有义链及该反义链可如此对准,使得有义链上的三个核苷酸中的一个基序及反义链上的三个核苷酸中的一个基序具有至少一个核苷酸重迭,即有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,至少两个核苷酸可重迭,或所有三个核苷酸可重迭。

[0304] 在一实施例中,RNAi剂的有义链可在三个连续核苷酸上含有超过一个具有三个相

同修饰的基序。第一基序可发生在链的裂解位点处或附近,且其他基序可为翼形修饰。本文中的术语“翼形修饰”指发生于链的另一部分处的基序,其与在相同链的裂解位点处或附近的基序分离。该翼形修饰邻近于该第一基序或由至少一个或更多个核苷酸分开。当基序彼此紧邻时,基序的化学性质彼此不同,且当基序由一个或多个核苷酸分开时,化学性质可为相同或不同的。可存在两个或多个翼片修饰。举例而言,当存在两个翼形修饰时,每一翼形修饰可相对于在裂解位点处或附近的第一基序或在引导基序的任一侧上的一端发生。

[0305] 如同有义链,RNAi剂的反义链可在三个连续核苷酸上含有超过一个具有三个相同修饰的基序,其中基序中的至少一个出现在链的裂解位点处或附近。此反义链还可含有一个或多个翼形修饰,其以类似于可能存在于有义链上的翼形修饰的比对方式呈现。

[0306] 在一实施例中,RNAi剂的有义链或反义链上的翼形修饰通常不包含链的3’端、5’端或两端处之前一个或两个末端核苷酸。

[0307] 在另一实施例中,RNAi剂的有义链或反义链上的翼形修饰通常不包含链的3’端、5’端或两端处的双螺旋区内的前一个或两个配对核苷酸。

[0308] 当RNAi剂的有义链及反义链各自含有至少一个翼形修饰时,该翼形修饰可落在双螺旋区的同一端上,且具有一个、两个或三个核苷酸的重迭。

[0309] 当RNAi剂的有义链及反义链各自含有至少两个翼形修饰时,该有义链及该反义链可如此对齐,使得自每条链两个修饰各自落在该双螺旋区的一端上,具有重迭的一个、两个或三个核苷酸;自每条链两个修饰各自落在双螺旋区的另一端,具有重迭的一个、两个或三个核苷酸;每条链两个修饰落在该引导基序的各侧上,具有重迭的一个、二个或三个核苷酸。

[0310] 在一实施例中,RNAi剂的有义链及反义链中的每个核苷酸,包含作为基序的一部分的核苷酸,可经修饰。各核苷酸可经相同或不同修饰来修饰,其可包含以下一个或多个改变:非连接磷酸酯氧中的一个或两个和/或连接磷酸酯氧中的一个或多个;改变核糖的糖成分,例如,该核糖的糖上的2’个羟基中的成分;以“去磷”接头进行磷酸盐部分的整个置换;修饰或置换天然存在的碱;以及该核糖-磷酸酯主链的置换或修饰。

[0311] 由于核酸为次单元的聚合物,因此许多修饰发生在核酸内重复的位置处,例如碱基或磷酸部分的修饰,或磷酸部分的非连接氧。在一些情况下,修饰将发生在核酸中的所有目标位置处,但在许多情况下不会发生。举例而言,修饰可仅发生在3’或5’端位置处、可仅发生在末端区中,例如在末端核苷酸上的位置或在链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中发生。修饰可发生在双链区、单链区或两者中。修饰可仅在RNA的双链区中发生或可仅在RNA的单链区中发生。举例而言,在非连接氧位置处的硫代磷酸酯修饰可仅在一个或两个末端处发生、可仅在末端区中发生,例如在末端核苷酸上的位置或在链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中发生、或可出现在双链及单链区中,尤其在末端区。5’端或末端可经磷酸化。

[0312] 其可能例如增强稳定性、在突出端中包含特定碱基、或包含经修饰的核苷酸或核苷酸替代物、在单链突出端中(例如在5’或3’突出端中、或在两者中)。举例而言,可能需要包含在突出端中的嘌呤核苷酸。在一些实施例中,3’或5’突出端中的全部或一些碱基可被修饰,例如用本文所描述的修饰。修饰可包括例如使用核糖的2’位置处的修饰以及本领域中已知的修饰,例如使用经修饰的脱氧核糖核苷酸、2’-脱氧-2’-氟(2’-F)或2’-O-甲基代替核碱基的核糖,及磷酸酯基团的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出端不需要与目标序列同

源。

[0313] 在一实施例中,有义链及反义链的各残基独立地经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'-氟修饰。所述链可含有超过一个修饰。在一实施例中,有义链及反义链的各残基独立地经2'-O-甲基或2'-氟修饰。

[0314] 有义链及反义链上通常存在至少两个不同修饰。这两个修饰可为2'-O-甲基或2'-氟修饰或其他修饰。

[0315] 在一实施例中,$N_a$和/或$N_b$包括交替图案的修饰。如本文所用,术语"替代基序"指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰发生在一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可指每隔一个核苷酸或每三个核苷酸的一个,或类似的模式。举例而言,若A、B及C各自表示一种类型的核苷酸修饰,则交替基序可为"ABABABABABAB…"、"AABBAABBAABB…"、"AABAABAABAAB…"、"AAABAAABAAAB…"、"AAABBBAAABBB…"或"ABCABCABCABC…"等。

[0316] 交替基序中所含的修饰类型可为相同或不同的。举例而言,若A、B、C、D各自表示在核苷酸上的一类修饰,则交替模式,即每隔一个核苷酸上的修饰,可相同,但有义链或反义链中的每一个可选自交替基序内修饰的若干可能性,诸如"ABABAB…"、"ACACAC…"、"BDBDBD…"或"CDCDCD…,"等。

[0317] 在一实施例中,本发明的RNAi剂包括在有义链上的交替基序的修饰图案相对于在反义链上的交替基序的修饰图案偏移。偏移可为使得有义链的经修饰的核苷酸基团对应于反义链的经不同修饰的核苷酸基团,且反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双螺旋中的反义链配对时,有义链中的交替基序可从链的5'-3'"ABABAB"开始,反义链中的交替基序可从双螺旋区内链的5'-3'"BABABA"开始。作为另一实例,有义链中的交替基序可自链的5'-3'"AABBAABB"开始,且反义链中的交替基序可自双螺旋区内的链的5'-3'"BBAABBAA"开始,使得有义链与反义链之间存在修饰模式的完全或部分偏移。

[0318] 在一实施例中,RNAi剂包括有义链上的2'-O-甲基修饰及2'-F修饰的交替基序的图案,最初相对于反义链上的2'-O-甲基修饰及2'-F修饰的交替基序的图案具有偏移,也即有义链碱基对上的2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链上的2'-F修饰的核苷酸,且反之亦然。有义链的位置1可以从2'-F修饰开始,反义链的位置1可以从2'-O-甲基修饰开始。

[0319] 在有义链和/或反义链的三个连续核苷酸上引入三个相同修饰的一个或多个基序中断存在于有义链和/或反义链中的初始修饰模式。此藉由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有义和/或反义链中而进行的有义和/或反义链的修饰模式的中断意外地促进对目标基因的基因沉默活性。

[0320] 在一实施例中,当将在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的基序引入至链中的任一个中时,基序旁边的核苷酸修饰与基序的修饰不同。例如,含有基序的序列的部分为"…$N_a$YYY$N_b$…",其中"Y"表示对三个连续核苷酸上三个相同修饰的基序的修饰,而"$N_a$"和"$N_b$"表示与Y的修饰不同的基序"YYY"旁边的核苷酸的修饰,且其中$N_a$和$N_b$可以是相同或不同的修饰。或者,当存在翼形修饰时,$N_a$和/或$N_b$可存在或不存在。

[0321] RNAi剂可还包括至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联。硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联修饰可在有义链或反义链的任何核苷酸或链的任何位置上的两条链发生。举例而言,核苷酸间键联修饰可发生在有义链和/或反义链上的每一核苷酸上;

各核苷酸间键联修饰可发生在有义链和/或反义链上的交替图案中;或者有义链或反义链可含有呈交替模式的两种核苷酸间键联修饰。在有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可与反义链相同或不同,且在有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可相对于在反义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式具有偏移。在一个实施例中,双链RNAi剂包含6至8个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一实施例中,反义链在5'端处包括两个硫代磷酸酯核苷酸间键联且在3'端处包括两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,且有义链在5'端或3'端处包括至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0322] 在一实施例中,RNAi在突出端区中包括硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联修饰。举例而言,突出端区可含有两个核苷酸,所述核苷酸在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联。也可以进行核苷酸间键联修饰以将突出核苷酸与双螺旋区内的末端配对核苷酸连接。举例而言,至少2、3、4个或所有突出核苷酸可经由硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联连接,且视情况可有将突出核苷酸与旁边突出核苷酸的经配对核苷酸连接的额外硫代磷酸酯或甲基磷酸酯间核苷酸键。举例而言,末端三个核苷酸之间可有至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中三个核苷酸中的两个为突出核苷酸,且第三个为突出核苷酸旁边的配对核苷酸。这些末端三个核苷酸可在反义链的3'端、有义链的3'端、反义链的5'端和/或反义链的5'端处。

[0323] 在一实施例中,2个核苷酸突出端位于反义链的3'端,且在末端三个核苷酸之间有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中三个核苷酸中的两个为突出端核苷酸,且第三个核苷酸为突出端核苷酸附近的成对核苷酸。视情况,RNAi剂可另外在有义链的5'端处及反义链的5'端处在末端三个核苷酸之间具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0324] 在一实施例中,RNAi剂包括与目标的错配、在双螺旋内或其组合。错配可发生在突出端区或双螺旋区中。碱基对可基于其促进解离或熔化(例如,基于特定配对的缔合或解离的自由能量,最简单的方法是基于个别对检查该对,虽然还可使用下一相邻或类似分析)的倾向进行评级。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例如非典型或除了非典型配对(如本文其他地方所描述)优于典型(A:T,A:U,G:C)配对;且包含通用碱基的配对优于典型配对。

[0325] 在一实施例中,RNAi剂包括来自反义链的5'端的双螺旋区内独立地选自以下所组成的组的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个:A:U、G:U、I:C及错配对,例如非典型或除了非典型配对或包含通用碱基的配对,以促进反义链在双螺旋的5'端处解离。

[0326] 在一实施例中,在反义链中5'端的双螺旋区内位置1处的核苷酸选自由以下所组成的组:A、dA、dU、U及dT。或者,来自反义链的5'端的双螺旋区内之前1、2或3个碱基对中的至少一个为AU碱基对。举例而言,来自反义链的5'端的双螺旋区内的第一碱基对为AU碱基对。

[0327] 在另一实施例中,有义链的3'端处的核苷酸为脱氧胸腺嘧啶(dT)。在另一实施例中,反义链的3'端处的核苷酸为脱氧胸腺嘧啶(dT)。在一实施例中,存在短序列的脱氧-胸腺嘧啶核苷酸,例如,在有义链和/或反义链的3'端上的两个dT核苷酸。

[0328] 在一实施例中,有义链序列可由式(I)表示:

[0329] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (I)

[0330] 其中:

[0331] i及j各自独立地为0或1;

[0332] p及q各自独立地为0-6;

[0333] 各$N_a$独立地表示包括0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,各序列包括至少两个不同经修饰的核苷酸;

[0334] 各$N_b$独立地表示包括0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0335] 各$n_p$及$n_q$独立地表示突出核苷酸;

[0336] 其中Nb及Y不具有相同修饰;及

[0337] XXX、YYY及ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。优选地,YYY为全部2'-F修饰的核苷酸。

[0338] 在一实施例中,$N_a$和/或$N_b$包括交替图案的修饰。

[0339] 在一实施例中,YYY基序发生在有义链的裂解位点处或附近。举例而言,当RNAi剂具有长度为17至23个核苷酸的双螺旋区时,YYY基序可发生在有义链的裂解位点处或附近(例如:可发生在位置6、7、8;7、8、9;8、9、10;9、10、11;10、11、12;或11、12、13处),自5'端开始第1个核苷酸开始计数;或视情况自5'端开始自双螺旋区内的第1个配对核苷酸开始计数。

[0340] 在一实施例中,i为1且j为0、或i为0且j为1、或i及j两者为1。有义链可因此由以下式表示:

[0341] 5'$n_p$-$N_a$-YYY-$N_b$-ZZZ-$N_a$-$n_q$ 3' (Ib);

[0342] 5'$n_p$-$N_a$-XXX-$N_b$-YYY-$N_a$-$n_q$ 3'(Ic);或

[0343] 5'$n_p$-$N_a$-XXX-$N_b$-YYY-$N_b$-ZZZ-$N_a$-$n_q$ 3'(Id)。

[0344] 当有义链由式(Ib)表示时,$N_b$表示包括0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各$N_a$独立地可表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0345] 当有义链表示为式(Ic)时,$N_b$表示包括有0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各$N_a$可独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0346] 当有义链表示为式(Id)时,各$N_b$独立地表示包括0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地,$N_b$为0、1、2、3、4、5或6。各$N_a$可独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0347] X、Y及Z中的每一个可彼此相同或不同。

[0348] 在其他实施例中,i为0且j为0,且有义链可由下式表示:

[0349] 5'$n_p$-$N_a$-YYY-$N_a$-$n_q$ 3' (Ia)。

[0350] 当有义链由式(Ia)表示时,各$N_a$独立地可表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0351] 在一实施例中,RNAi的反义链序列可由式(II)表示:

[0352] 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)

[0353] 其中:

[0354] k及l各自独立地为0或1;

[0355] p'及q'各自独立地为0-6;

[0356] 各$N_a$'独立地表示包括0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,各序列包括至少两个不同经修饰的核苷酸;

[0357] 各$N_b$'独立地表示包括0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0358] 各$n_p$'及$n_q$'独立地表示突出核苷酸;

[0359] 其中$N_b$'及Y'不具有相同修饰;及

[0360] X'X'X'、Y'Y'Y'及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0361] 在一实施例中,$N_a$'和/或$N_b$'包括交替图案的修饰。

[0362] Y'Y'Y'基序出现在反义链的裂解位点处或附近。举例而言,当RNAi剂具有长度为17至23个核苷酸的双螺旋区时,Y'Y'Y'基序可发生在反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15处,自5'端开始第1个核苷酸开始计数;或视情况自5'端开始自双螺旋区内的第1个配对核苷酸开始计数。优选地,Y'Y'Y'基序发生在位置11、12、13处。

[0363] 在一实施例中,Y'Y'Y'基序为全部2'-OMe修饰的核苷酸。

[0364] 在一实施例中,k为1且l为0、或k为0且l为1、或k及l两者皆为1。

[0365] 反义链因此可由以下式表示:

[0366] 5'$n_q$,-$N_a$'-Z'Z'Z'-$N_b$'-Y'Y'Y'-$N_a$'-$n_p$,3' (IIb);

[0367] 5'$n_q$,-$N_a$'-Y'Y'Y'-$N_b$'-X'X'X'-$n_p$,3' (IIc);或

[0368] 5'$n_q$,-$N_a$'-Z'Z'Z'-$N_b$'-Y'Y'Y'-$N_b$'-X'X'X'-$N_a$'-$n_p$,3' (IId)。

[0369] 当反义链由式(IIb)表示时,$N_b$'表示包括0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各$N_a$'独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0370] 当反义链表示为式(IIc)时,$N_b$'表示包含0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各$N_a$'独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0371] 当反义链表示为式(IId)时,各$N_b$'独立地表示包括0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各$N_a$'独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地,$N_b$为0、1、2、3、4、5或6。

[0372] 在其他实施例中,k为0且l为0,且反义链可由下式表示:

[0373] 5'$n_p$,-$N_a$,-Y'Y'Y'-$N_a$,-$n_q$,3' (Ia)。

[0374] 当反义链表示为式(IIa)时,各$N_a$'独立地表示包括2至20个、2至15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0375] X'、Y'及Z'中的每一个可彼此为相同或不同。

[0376] 有义链及反义链的各核苷酸可独立地经LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟修饰。举例而言,有义链及反义链的各核苷酸独立地经2'-O-甲基或2'-氟修饰。各X、Y、Z、X'、Y'及Z'尤其可表示2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0377] 在一实施例中,当双螺旋区为21nt时,RNAi剂的有义链可含有在链的9、10及11个位置处发生的YYY基序,自5'端的第1个核苷酸开始计数,或视情况自5'端的双螺旋区内的

第1个配对核苷酸开始计数;且Y表示2'-F修饰。有义链可另外含有XXX基序或ZZZ基序作为在双螺旋区的相对端处的翼形修饰;且XXX及ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0378] 在一实施例中,反义链可含有发生在链位置11、12、13的Y'Y'Y'基序、从5'端的第1个核苷酸开始计数,或可选地从5'端的双螺旋区内的第1个配对核苷酸开始计数;且Y'表示2'-O-甲基修饰。反义链可另外含有X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为在双螺旋区相对端处的翼形修饰;且X'X'X'及Z'Z'Z'各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0379] 由以上式(Ia)、(Ib)、(Ic)及(Id)中的任一个表示的有义链分别与由式(IIa)、(IIb)、(IIc)及(IId)中的任一个表示的反义链形成双螺旋。

[0380] 因此,用于本发明的方法中的RNAi剂可包括有义链及反义链,每一链具有14至30个核苷酸,该RNAi双螺旋由式(III)表示:

[0381] 有义:5'np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'

[0382] 反义:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq'5'

[0383] (III)

[0384] 其中:

[0385] i、j、k及l各自独立地为0或1;

[0386] p、p'、q及q'各自独立地为0至6;

[0387] 各Na及Na'独立地表示包括0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,各序列包括至少两个不同经修饰的核苷酸;

[0388] 各Nb及Nb'独立地表示包括0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0389] 其中各np'、np、nq'及nq,其中的每个可存在或可不存在,独立地表示突出核苷酸;以及

[0390] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0391] 在一实施例中,i为0且j为0;或i为1且j为0;或i为0且j为1;或i及j两者为0;或i及j两者皆为1。在另一实施例中,k为0且l为0;或k为1且l为0;k为0且l为1;或k及l两者为0;或k及l两者为1。

[0392] 形成RNAi双螺旋的有义链及反义链的例示性组合包含下式:

[0393] 5'np-Na-Y Y Y-Na-nq 3'

[0394] 3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Na'nq'5'

[0395] (IIIa)

[0396] 5'np-Na-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

[0397] 3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'nq'5'

[0398] (IIIb)

[0399] 5'np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Na-nq 3'

[0400] 3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq'5'

[0401] (IIIc)

[0402] 5'np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

[0403] 3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na-nq'5'

[0404] (IIId)

[0405] 当RNAi剂由式(IIIa)表示时,各Na独立地表示包括有2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0406] 当RNAi剂由式(IIIb)表示时,各Nb独立地表示包括1至10个、1至7个、1至5个或1至4个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各Na独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0407] 当RNAi剂由式(IIIc)表示时,各Nb、Nb'独立地表示包括0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各Na独立地表示包括2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0408] 当RNAi剂表示为式(IIId)时,各Nb、Nb'独立地表示包含0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰核苷酸的寡核苷酸序列。各Na、Na'独立地表示包括有2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。Na、Na'、Nb及Nb'中的每者独立地包括交替图案的修饰。

[0409] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)及(IIId)中的X、Y及Z中的每者可彼此相同或不同。

[0410] 当RNAi剂由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)及(IIId)表示时,Y核苷酸中的至少一个可与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对应Y'核苷酸形成碱基对;或Y核苷酸中的全部三个均与对应Y'核苷酸形成碱基对。

[0411] 当RNAi剂由式(IIIb)或(IIId)表示时,Z核苷酸中的至少一个可与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对应Z'核苷酸形成碱基对;或Z核苷酸中的全部三个与对应Z'核苷酸全部形成碱基对。

[0412] 当RNAi剂表示为式(IIIc)或(IIId)时,X核苷酸中的至少一个可与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对应X'核苷酸形成碱基对;或X核苷酸中的全部三个与对应X'核苷酸全部形成碱基对。

[0413] 在一实施例中,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,和/或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0414] 在一实施例中,当RNAi剂由式(IIId)表示时,Na修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰。在另一实施例中,当RNAi剂由式(IIId)表示时,Na修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰且np'>0且至少一个np'经由硫代磷酸酯键连接至相邻核苷酸。在又一实施例中,当RNAi剂由式(IIId)表示时,Na修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰,np'>0且至少一个np'经由硫代磷酸酯键联连接至相邻核苷酸,且有义链与经由二价或三价支链接头连接的一个或多个GalNAc衍生物共轭(下文所描述)。在另一实施例中,当RNAi剂由式(IIId)表示时,Na修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰,np'>0且至少一个np'经由硫代磷酸酯键联连接至相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联,且有义链与经由二价或三价支链接头连接的一个或多个GalNAc衍生物共轭。

[0415] 在一个实施例中,当RNAi剂由式(IIIa)表示时,Na修饰为2'-O-甲基或2'-氟修饰,np'>0且至少一个np'经由硫代磷酸酯键联连接至相邻核苷酸,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联,且有义链与经由二价或三价支链接头连接的一个或多个GalNAc衍生物共轭。

[0416] 在一个实施例中,RNAi剂为含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)及(IIId)表示的双螺旋的多聚体,其中双螺旋由接头连接。接头可为可裂解的或不可裂解的。

视情况,多聚体还包括配体。所述双螺旋中的每一个可靶向相同基因或两个不同基因;或所述双螺旋中的每一个可在两个不同目标位点靶向相同基因。

[0417] 在一实施例中,RNAi剂为含有三个、四个、五个、六个或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)及(IIId)表示的双螺旋的多聚体,其中所述双螺旋由接头连接。接头可为可裂解的或不可裂解的。视情况,多聚体还包括配体。所述双螺旋中的每一个可靶向相同基因或两个不同基因;或所述双螺旋中的每一个可在两个不同目标位点靶向相同基因。

[0418] 在一个实施例中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)及(IIId)表示的两个RNAi剂在5'端彼此连接,且一个或两个3'端视情况与配体共轭。药剂中的每一个可靶向相同基因或两个不同基因;或药剂中的每一个可在两个不同目标位点靶向相同基因。

[0419] 在某些实施例中,本发明的RNAi剂可含有少量含2'-氟修饰的核苷酸,例如具有2'-氟修饰的10个或更少个核苷酸。举例而言,RNAi剂可含有10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个具有2'-氟修饰的核苷酸。在一特定实施例中,本发明的RNAi剂含有10个具有2'-氟修饰的核苷酸,例如4个在有义链中具有2'-氟修饰的核苷酸及6个在反义链中具有2'-氟修饰的核苷酸。在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂含有6个核苷酸,具有2'-氟修饰,例如4个在有义链中具有2'-氟修饰的核苷酸,及2个在反义链中具有2'-氟修饰的核苷酸。

[0420] 在其他实施例中,本发明的RNAi剂可含有超低数目的含有2'-氟修饰的核苷酸,例如2个或更少个含有2'-氟修饰的核苷酸。举例而言,RNAi剂可含有具有2'-氟修饰的2、1、0个核苷酸。在一特定实施例中,RNAi剂可含有具有2'-氟修饰的2个核苷酸,例如在有义链中具有2-氟修饰的0个核苷酸及在反义链中具有2'-氟修饰的2个核苷酸。

[0421] 各种公开案描述可用于本发明的方法中的多聚RNAi剂。此类公开案包含WO2007/091269、美国专利第7858769号、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887及WO2011/031520,所述公开案中的每一个的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

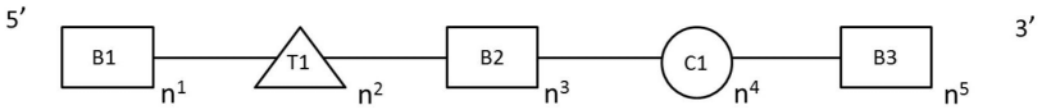
[0422] 如下文更详细描述,与含有一个或多个碳水化合物部分的共轭物的RNAi剂的RNAi剂可优化RNAi剂的一个或多个特性。在许多情况下,碳水化合物部分将附接至RNAi剂的经修饰次单元。举例而言,dsRNA剂的一个或多个核糖核苷酸亚单元的核糖的糖可经另一部分置换,例如附接至碳水化合物配体的非碳水化合物(优选为环状)载体。其中次单元的核糖已经如此置换的核糖核苷酸次单元在本文中称为核糖置换修饰次单元(RRMS)。环状载体可为碳环系统,即所有环原子为碳原子、或杂环系统,也即一个或多个环原子可为杂原子,例如氮、氧、硫。环状载体可为单环系统,或可含有两个或更多个环,例如稠环。环状载体可为完全饱和环系统,或其可含有一个或多个双键。

[0423] 配体可经由载体附接至聚核苷酸。载体包含(i)至少一个"主链附接点",优选为两个"主链附接点"及(ii)至少一个"系留附接点"。如本文所用,"主链附接点"指官能基团,例如羟基,或通常,可用于且适用于将载体并入主链的键,例如磷酸盐,或经修饰的磷酸盐,例如,含硫的核酸骨架。在一些实施例中,"系留附接点"(TAP)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(不同于提供主链附接点的原子)。该部分可为例如碳水化合物,例如单糖、双糖、三糖、四糖、寡糖及多糖。可选地,所选择部分藉由介入连接物与环状载体相连接。因此,环状载体通常将包括官能基,例如氨基,或通常提供适合于并入或系留另一化学实体的键,例如配体至组成环。

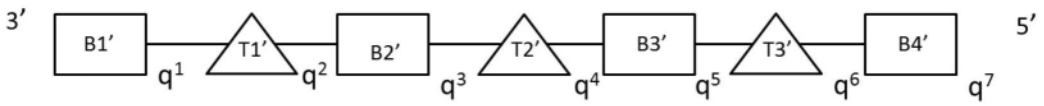
[0424] RNAi剂可经由载体与配体共轭,其中该载体可为环状基团或非环状基团;优选地,

该环状基团选自吡咯啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧杂环戊烷、噁唑啶基、异噁唑啶基、吗啉基、噻唑啶基、异噻唑啶基、喹喏啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基及十氢萘;优选地,该非环状基团选自丝氨醇主链或二乙醇胺主链。

[0425] 在本发明的另一实施例中,iRNA剂包括有义链及反义链,各链具有14至40个核苷酸。RNAi剂可由式(L)表示:




[0426]

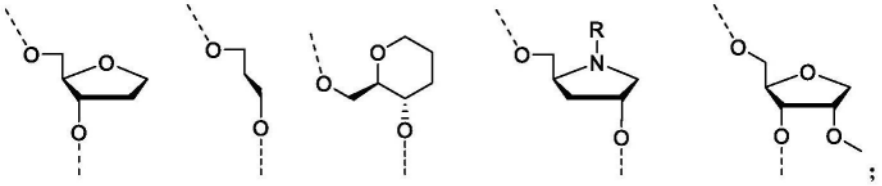



(L),

[0427] 在式(L)中,B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’及B4’各自独立地为含有选自由以下所组成的组的修饰核苷酸:2’-O烷基、2’取代烷氧基、2’取代烷基、2’-卤基、NA及BNA/LNA。在某些实施例中,B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’及B4’各自含有2’-OMe修饰。在某些实施例中,B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’及B4’各自含有2’-OMe或2’-F修饰。在某些实施例中,B1、B2、B3、B1’、B2’、B3’及B4’中的至少一个含有2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰。

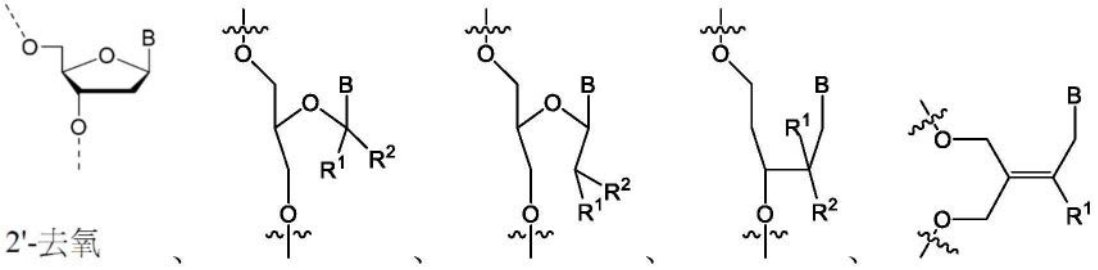
[0428] C1为置放于与反义链的种子区(即,在反义链的5’端位置2-8处)相对的位点处的热不稳定核苷酸。例如,C1位于有义链的位置处,该有义链与在反义链的5’端位置2-8处的核苷酸配对。在一实例中,C1在有义链的5’端的位置15处。C1核苷酸带有热不稳定修饰,其可包含无碱基修饰;与双螺旋中的相对核苷酸错配;及糖修饰,诸如2’-脱氧修饰或非环核苷酸,例如解锁核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)。在某些实施例中,C1具有选自由以下所组成的组的热不稳定修饰:i)与反义链中的相对核苷酸错配;ii)选自由以下所组成的组的无碱基修饰:

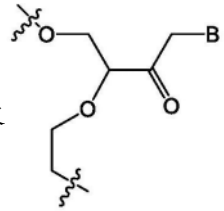
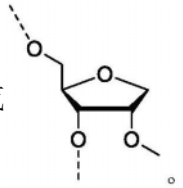
[0429]



及iii)糖修饰,其选自由以下所组成的组:

[0430]



及  其中B为经修饰或未经修饰的核碱基,$R^1$及$R^2$独立地为H、卤素、$OR_3$或烷基;且$R_3$为H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖。在某些实施例中,C1中的热解稳定修饰为选自由以下所组成的组的错配:G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T及U:T;且视情况该错配对中的至少一个核碱基为2'-脱氧核碱基。在一实例中,C1内的热不稳定修饰为GNA或 。

[0431] T1、T1'、T2'及T3'各自独立地表示包括有修饰的核苷酸,该修饰提供核苷酸小于或等于2'-OMe修饰的空间体积的空间体积。空间体积指修饰的空间效应的总和。用于测定核苷酸修饰的空间效应的方法为本领域技术人员已知的。修饰可在核苷酸的核糖的2'位置处,或与核糖的糖的2'位置相似或等效的非核糖核苷酸、非环状核苷酸、或核苷酸的主链的修饰,且向核苷酸提供小于或等于2'-OMe修饰的空间体积的空间体积。举例而言,T1、T1'、T2'及T3'各自独立地选自DNA、RNA、LNA、2'-F及2'-F-5'-甲基。在某些实施例中,T1为DNA。在某些实施例中,T1'为DNA、RNA或LNA。在某些实施例中,T2'为DNA或RNA。在某些实施例中,T3'为DNA或RNA。

[0432] $n^1$、$n^3$及$q^1$的长度独立地为4至15个核苷酸。

[0433] $n^5$、$q^3$及$q^7$的长度独立地为1-6个核苷酸。

[0434] $n^4$、$q^2$及$q^6$的长度独立地为1-3个核苷酸;或者,$n^4$为0。

[0435] $q^5$的长度独立地为0-10个核苷酸。

[0436] $n^2$及$q^4$的长度独立地为0-3个核苷酸。

[0437] 或者,$n^4$的长度为0-3个核苷酸。

[0438] 在某些实施例中,$n^4$可为0。在一实施例中,$n^4$为0,且$q^2$及$q^6$为1。在另一实例中,$n^4$为0,且$q^2$及$q^6$为1,其中有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰,且在反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自反义链的5'端计数)。

[0439] 在某些实施例中,$n^4$、$q^2$及$q^6$各自为1。

[0440] 在某些实施例中,$n^2$、$n^4$、$q^2$、$q^4$及$q^6$各自为1。

[0441] 在某些实施例中,当有义链的长度为19-22个核苷酸且$n^4$为1时,C1在自有义链的5'端的位置14-17处。在某些实施例中,C1位于有义链的5'端位置15处。

[0442] 在某些实施例中,T3'在自反义链的5'端位置2处开始。在一实例中,T3'在自反义链的5'端位置2处,且$q^6$等于1。

[0443] 在某些实施例中,T1'自反义链的5'端位置14开始。在一实例中,T1'在自反义链的5'端位置14处,且$q^2$等于1。

[0444] 在一例示性实施例中,T3'自反义链的5'端位置2开始,且T1'自反义链的5'端位置

14开始。在一实例中,T3'自反义链的5'端位置2开始且$q^6$等于1,且T1'自反义链的5'端位置14开始且$q^2$等于1。

[0445] 在某些实施例中,T1'及T3'相隔11个核苷酸长度(也即不计数T1'及T3'核苷酸)。

[0446] 在某些实施例中,T1'在自反义链的5'端位置14处。在一实例中,T1'在自反义链的5'端的位置14处且$q^2$等于1,且在2'位置的修饰或在提供比2'-OMe核糖较小的空间体积的非核糖、非环状或主链中的位置处的修饰。

[0447] 在某些实施例中,T3'在自反义链的5'端位置2处。在一实例中,T3'在自反义链的5'端的位置2处且$q^6$等于1,且在非核糖、非环状或主链中的2'位置或位置处的修饰提供2'-OMe核糖较少或等于的空间体积。

[0448] 在某些实施例中,T1在有义链的裂解位点处。在一实例中,当有义链的长度为19-22个核苷酸且$n^2$为1时,T1在自有义链的5'端位置11处。在一例示性实施例中,当有义链的长度为19-22个核苷酸且$n^2$为1时,T1在自有义链的5'端位置11处位于有义链的裂解位点。

[0449] 在某些实施例中,T2'自反义链的5'端位置6处开始。在一实例中,T2'在自反义链的5'端位置6-10处,且$q^4$为1。

[0450] 在一例示性实施例中,T1位于有义链的裂解位点处,例如,在自有义链5'端的位置11处,当该有义链的长度为19-22个核苷酸时,且$n^2$为1;T1'在自反义链的5'端的位置14处,且$q^2$等于1,且对T1'的修饰在核糖的糖的2'位置处或在提供比2'-OMe核糖较小空间体积的非核糖、非环状或主链的位置处;T2'在自反义链的5'端的位置6-10处,且$q^4$为1;且T3'位于自反义链的5'端的位置2处,且$q^6$等于1,且对T3'的修饰在2'位置处或在比2'-OMe核糖提供较少或等于的空间体积的非核糖、非环状或主链的位置处。

[0451] 在某些实施例中,T2'自反义链的5'端位置8开始。在一实例中,T2'自反义链的5'端位置8开始,且$q^4$为2。

[0452] 在某些实施例中,T2'自反义链的5'端位置9开始。在一实例中,T2'在反义链的5'端的位置9,且$q^4$为1。

[0453] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0454] 在某些实施例中,$n^4$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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0455] 在某些实施例中,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。

[0456] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0457] 在某些实施例中,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。

[0458] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0459] 在某些实施例中,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。

[0460] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0461] 在某些实施例中,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;视情况在反义链的3'端具有至少2个额外TT。

[0462] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;视情况在反义链的3'端处具有至少2个额外TT;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处

具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0463] 在某些实施例中,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。

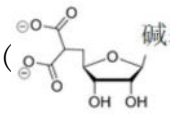
[0464] 在某些实施例中,B1为2'-OMe或2'-F,$n^1$为8,T1为2'F,$n^2$为3,B2为2'-OMe,$n^3$为7,$n^4$为0,B3为2'-OMe,$n^5$为3,B1'为2'-OMe或2'-F,$q^1$为9,T1'为2'-F,$q^2$为1,B2'为2'-OMe或2'-F,$q^3$为4,$q^4$为0,B3'为2'-OMe或2'-F,$q^5$为7,T3'为2'-F,$q^6$为1,B4'为2'-OMe,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。

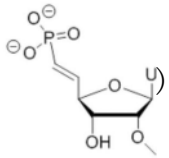
[0465] 在某些实施例中,B1为2'-OMe或2'-F,$n^1$为8,T1为2'F,$n^2$为3,B2为2'-OMe,$n^3$为7,$n^4$为0,B3为2'OMe,$n^5$为3,B1'为2'-OMe或2'-F,$q^1$为9,T1'为2'-F,$q^2$为1,B2'为2'-OMe或2'-F,$q^3$为4,T2'为2'-F,$q^4$为2,B3'为2'-OMe或2'-F,$q^5$为5,T3'为2'-F,$q^6$为1,B4'为2'-F,及$q^7$为1。

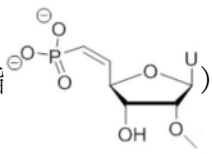
[0466] 在某些实施例中,B1为2'-OMe或2'-F,$n^1$为8,T1为2'F,$n^2$为3,B2为2'-OMe,$n^3$为7,$n^4$为0,B3为2'-OMe,$n^5$为3,B1'为2'-OMe或2'-F,$q^1$为9,T1'为2'-F,$q^2$为1,B2'为2'-OMe或2'-F,$q^3$为4,T2'为2'-F,$q^4$为2,B3'为2'-OMe或2'-F,$q^5$为5,T3'为2'-F,$q^6$为1,B4'为2'-F,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0467] 在某些实施例中,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。

[0468] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

[0469] RNAi剂可在有义链或反义链的5'端包括含磷基团。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'-$PS_2$)、5'端乙烯基膦酸酯(5'-VP)、5'端甲基膦酸酯(MePhos)或5'-脱氧-5'-C-丙二酰基(

)。当5'端含磷基团为5'端乙烯基膦酸酯(5'-VP)时,该5'-VP可为5'-E-VP异构物(也即反式乙烯基磷酸酯

)、5'-Z-VP异构物(也即顺式乙烯基磷酸酯

)或其混合物。

[0470] 在某些实施例中,RNAi剂在有义链的5'端处包括含磷基团。在某些实施例中,RNAi剂在反义链的5'端处包括含磷基团。

[0471] 在某些实施例中,RNAi剂包括5'-P。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-P。

[0472] 在某些实施例中,RNAi剂包括5'-PS。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-PS。

[0473] 在某些实施例中,RNAi剂包括5'-VP。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-VP。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-E-VP。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-Z-VP。

[0474] 在某些实施例中,RNAi剂包括5'-$PS_2$。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-$PS_2$。

[0475] 在某些实施例中,RNAi剂包括5'-$PS_2$。在某些实施例中,RNAi剂在反义链中包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0476] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-PS。

[0477] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-P。

[0478] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0479] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0480] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0481] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计

数)。RNAi剂还包括5'-P。

[0482] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS。

[0483] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0484] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0485] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0486] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-P。

[0487] 在某些实施例中,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。dsRNA剂还包括5'-PS。

[0488] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0489] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0490] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0491] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P。

[0492] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS。

[0493] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0494] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0495] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链

的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0496] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-P。

[0497] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-PS。

[0498] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0499] 在某些实施例中,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。dsRNA RNA剂还包括5'-$PS_2$。

[0500] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0501] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P。

[0502] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS。

[0503] 在某些实施例中,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,

且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0504] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0505] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0506] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-P。

[0507] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-PS。

[0508] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0509] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0510] 在某些实施例中,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。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0511] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P。

[0512] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS。

[0513] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP。5'-VP可为5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0514] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$。

[0515] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基。

[0516] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反

义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P及目标配体。在某些实施例中,5'-P位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0517] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS及目标配体。在某些实施例中,5'-PS在反义链的5'端,且目标配体在有义链的3'端。

[0518] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP(例如5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)及目标配体。

[0519] 在某些实施例中,5'-VP位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0520] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$及目标配体。在某些实施例中,5'-$PS_2$位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0521] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基及目标配体。在某些实施例中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰基位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0522] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链

的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P及目标配体。在某些实施例中,5'-P位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0523] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS及目标配体。在某些实施例中,5'-PS在反义链的5'端,且目标配体在有义链的3'端。

[0524] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP(例如5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)及目标配体。在某些实施例中,5'-VP位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0525] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$及目标配体。在某些实施例中,5'-$PS_2$位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0526] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数),且在该反义链的位置1及2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基及目标配体。在某些实施例中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰基位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0527] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。

RNAi剂还包括5'-P及目标配体。在某些实施例中,5'-P位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0528] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS及目标配体。在某些实施例中,5'-PS在反义链的5'端,且目标配体在有义链的3'端。

[0529] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP(例如5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)及目标配体。在某些实施例中,5'-VP位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0530] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$及目标配体。在某些实施例中,5'-$PS_2$位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0531] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基及目标配体。在某些实施例中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰基位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0532] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-

23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-P及目标配体。在某些实施例中,5'-P位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0533] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-PS及目标配体。在某些实施例中,5'-PS在反义链的5'端,且目标配体在有义链的3'端。

[0534] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-VP(例如5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)及目标配体。在某些实施例中,5'-VP位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0535] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-$PS_2$及目标配体。在某些实施例中,5'-$PS_2$位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0536] 在某些实施例中,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,且$q^7$为1;在有义链的位置1-5内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自有义链的5'端计数),且在该反义链的位置1及位置2处具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰及在该反义链的位置18-23内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键联修饰(自该反义链的5'端计数)。RNAi剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰基及目标配体。在某些实施例中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰基位于反义链的5'端,且目标配体位于有义链的3'端。

[0537] 在一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0538] (a)具有以下的有义链:

[0539] (i)长度为21个核苷酸;

[0540] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;及

[0541] (iii)位置1、3、5、7、9至11、13、17、19及21处的2'-F修饰,及位置2、4、6、8、12、14至

16、18及20处的2'-OMe修饰(自5'端计数);

[0542] 及

[0543] (b)具有以下的反义链:

[0544] (i)长度为23个核苷酸;

[0545] (ii)位置1、3、5、9、11至13、15、17、19、21及23处的2'-OMe修饰,及位置2、4、6至8、10、14、16、18、20及22处的2'F修饰(自5'端计数);及

[0546] (iii)核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0547] 其中所述dsRNA药剂在该反义链的3'端处具有双核苷酸突出端,且该反义链的5'端处具有平端。

[0548] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0549] (a)具有以下的有义链:

[0550] (i)长度为21个核苷酸;

[0551] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0552] (iii)位置1、3、5、7、9至11、13、15、17、19及21处的2'-F修饰,及位置2、4、6、8、12、14、16、18及20处的2'-OMe修饰(自5'端计数);及

[0553] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0554] 及

[0555] (b)具有以下的反义链:

[0556] (i)长度为23个核苷酸;

[0557] (ii)位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19及21至23处的2'-OMe修饰,及位置2、4、6、8、10、14、16、18及20处的2'F修饰(自5'端计数);及

[0558] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0559] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0560] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0561] (a)具有以下的有义链:

[0562] (i)长度为21个核苷酸;

[0563] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0564] (iii)位置1至6、8、10及12至21处的2'-OMe修饰、位置7及9处的2'-F修饰,以及位置11处的脱氧核苷酸(例如dT)(自5'端计数);以及

[0565] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0566] 及

[0567] (b)具有以下的反义链:

[0568] (i)长度为23个核苷酸;

[0569] (ii)位置1、3、7、9、11、13、15、17及19至23处的2'-OMe修饰,及位置2、4至6、8、10、12、14、16及18处的2'-F修饰(自5'端计数);以及

[0570] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0571] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0572] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0573] (a)具有以下的有义链:

[0574] (i)长度为21个核苷酸;

[0575] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0576] (iii)位置1至6、8、10、12、14及16至21处的2'-OMe修饰,及位置7、9、11、13及15处的2'-F修饰;以及

[0577] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0578] 及

[0579] (b)具有以下的反义链:

[0580] (i)长度为23个核苷酸;

[0581] (ii)位置1、5、7、9、11、13、15、17、19及21至23处的2'-OMe修饰,及位置2至4、6、8、10、12、14、16、18及20处的2'-F修饰(自5'端计数);及

[0582] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0583] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0584] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0585] (a)具有以下的有义链:

[0586] (i)长度为21个核苷酸;

[0587] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0588] (iii)位置1至9及12至21处的2'-OMe修饰,位置10及11处的2'-F修饰;以及

[0589] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0590] 及

[0591] (b)具有以下的反义链:

[0592] (i)长度为23个核苷酸;

[0593] (ii)位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19及21至23处的2'-OMe修饰,及位置2、4、6、8、10、14、16、18及20处的2'-F修饰(自5'端计数);以及

[0594] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷

酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0595] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0596] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0597] (a)具有以下的有义链:

[0598] (i)长度为21个核苷酸;

[0599] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0600] (iii)位置1、3、5、7、9至11及13处的2'-F修饰,及位置2、4、6、8、12及14至21处的2'-OMe修饰;以及

[0601] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0602] 及

[0603] (b)具有以下的反义链:

[0604] (i)长度为23个核苷酸;

[0605] (ii)位置1、3、5至7、9、11至13、15、17至19及21至23处的2'-OMe修饰,及位置2、4、8、10、14、16及20处的2'-F修饰(自5'端计数);及

[0606] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0607] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0608] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0609] (a)具有以下的有义链:

[0610] (i)长度为21个核苷酸;

[0611] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0612] (iii)位置1、2、4、6、8、12、14、15、17及19至21处的2'-OMe修饰,及位置3、5、7、9至11、13、16及18处的2'-F修饰;以及

[0613] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0614] 及

[0615] (b)具有以下的反义链:

[0616] (i)长度为25个核苷酸;

[0617] (ii)位置1、4、6、7、9、11至13、15、17及19至23处的2'-OMe修饰、位置2、3、5、8、10、14、16及18处的2'-F修饰及位置24及25处的脱氧核苷酸(例如dT)(自5'端计数);以及

[0618] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0619] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有四核苷酸突出端,且该反义链的5'端处具有平端。

[0620] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0621] (a)具有以下的有义链:

[0622] (i)长度为21个核苷酸;

[0623] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0624] (iii)位置1至6、8及12至21处的2'-OMe修饰,及位置7及9至11处的2'-F修饰;及

[0625] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0626] 及

[0627] (b)具有以下的反义链:

[0628] (i)长度为23个核苷酸;

[0629] (ii)位置1、3至5、7、8、10至13、15及17至23处的2'-OMe修饰,及位置2、6、9、14及16处的2'-F修饰(自5'端计数);以及

[0630] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0631] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0632] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0633] (a)具有以下的有义链:

[0634] (i)长度为21个核苷酸;

[0635] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0636] (iii)位置1至6、8及12至21处的2'-OMe修饰,及位置7及9至11处的2'-F修饰;及

[0637] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0638] 及

[0639] (b)具有以下的反义链:

[0640] (i)长度为23个核苷酸;

[0641] (ii)位置1、3至5、7、10至13、15及17至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、6、8、9、14及16处的2'-F修饰(自5'端计数);以及

[0642] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0643] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0644] 在另一特定实施例中,本发明的RNAi剂包括:

[0645] (a)具有以下的有义链:

[0646] (i)长度为19个核苷酸;

[0647] (ii)附接至该3'端的ASGPR配体,其中该ASGPR配体包括经由三价支链接头附接的三个GalNAc衍生物;

[0648] (iii)位置1至4、6及10至19处的2'-OMe修饰,及位置5及7至9处的2'-F修饰;以及

[0649] (iv)核苷酸位置1与2之间及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0650] 及

[0651] (b)具有以下的反义链:

[0652] (i)长度为21个核苷酸;

[0653] (ii)位置1、3至5、7、10至13、15及17至21处的2'-OMe修饰,及位置2、6、8、9、14及16处的2'-F修饰(自5'端计数);及

[0654] (iii)核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置19与20之间及核苷酸位置20与21之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联(自5'端计数);

[0655] 其中所述RNAi药剂在该反义链的3'端处具有二核苷酸突出端,且在该反义链的5'端处具有平端。

[0656] 在某些实施例中,用于本发明方法中的iRNA为选自表2中所列或PCT/US2019/023079中所揭示的药剂的药剂。在一个实施例中,该药剂为AD-288996。此类药剂可进一步包括配体。

[0657] V.与配体共轭的iRNA

[0658] 用于本发明方法中的iRNA的另一修饰涉及将增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个配体、部分或共轭物化学连接至RNA。此类部分包含但不限于脂质部分,诸如胆固醇部分(Letsinger等人,(1989)Proc.Natl.Acid.Sci.USA,86:6553-6556)、胆酸(Manoharan等人,(1994)Biorg.Med.Chem.Let.,4:1053-1060)、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,(1992)Ann.N.Y.Acad.Sci.,660:306-309;Manoharan等人,(1993)Biorg.Med.Chem.Let.,3:2765-2770)、硫基胆固醇(Oberhauser等人,(1992)Nucl.Acids Res.,20:533-538)、脂族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,(1991)EMBO J,10:1111-1118;Kabanov等人,(1990)FEBS Lett.,259:327-330;Svinarchuk等人,(1993)Biochimie,75:49-54)、磷脂质,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-H-膦酸酯(Manoharan等人,(1995)Tetrahedron Lett.,36:3651-3654;Shea等人,(1990)Nucl.Acids Res.,18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,(1995)Nucleosides&Nucleotides,14:969-973)、或金刚烷乙酸(Manoharan等人,(1995)Tetrahedron Lett.,36:3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等人,(1995)Biochim.Biophys.Acta,1264:229-237)、或十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分(Crooke等人,(1996)J.Pharmacol.Exp.Ther.,277:923-937)。

[0659] 在一实施例中,配体改变并入其中的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在优选实施例中,例如与不存在此类配体的物种相比,配体对所选择目标(例如分子、细胞或细胞类型、隔室)提供增强的亲和力,隔室例如身体的细胞或器官隔室、组织、器官或区域。优选配体将不会参与双螺旋核酸中的双螺旋配对。

[0660] 配体可包含天然存在的物质,诸如蛋白质(例如人类血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如葡聚糖、普鲁兰多糖、几丁质、壳聚糖、胰岛素、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。配体还可为重组或合成分子,诸如合成聚合物,例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、

聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-乳交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚马来酸酐共聚物、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膦嗪。聚胺的实例包含: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、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的四级盐或α螺旋肽。

[0661] 配体还可包含结合至特定细胞类型(诸如肾细胞)的靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如抗体。靶向基团可为促甲状腺素、促黑素、凝集蛋白、糖蛋白、界面活性剂蛋白A、糖黏蛋白糖类、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、多价果糖、糖化聚氨基酸、多价半乳糖、运铁蛋白、双膦酸盐类、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸盐、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸盐、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0662] 配体的其他实例包括染剂、嵌入剂(例如吖啶类)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、撒卟啉(Sapphyrin))、多环芳香烃类(例如啡、二氢啡)、人工合成的核酸内切酶或螯合剂(例如EDTA)、亲脂性分子,例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾固酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基团、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基团、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、或啡及肽共轭物(如触角足肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射标定标志物、酶、半抗原(如生物素)、运输/吸收辅助剂(例如阿斯匹林、维生素E、叶酸)、合成的核糖核酸酶(例如咪唑、二咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑共轭物、四氮杂大环Eu3+复合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0663] 配体可为结合至特定细胞类型(诸如肝细胞)的蛋白质,例如糖蛋白或肽、例如对共配体或抗体具有特异性亲和力的分子、例如抗体。配体还可包含激素及激素受体。其还可包含非肽物种,诸如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可为例如脂多糖、p38 MAP激酶的活化子或NF-κB的活化子。

[0664] 配体可为物质,例如药物,其可增加iRNA剂向细胞中的摄取,例如藉由破坏细胞的细胞骨架,例如藉由破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝状物。该药物可为例如泰素、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵蛋白A、类天冬酰胺、蝇虎蕈碱、海洋苔藓素A、吲达诺欣或迈尔素。

[0665] 在一些实施例中,如本文所描述附接至iRNA的配体作为药物动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包含亲脂性、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。例示性PK调节剂包含但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、神经鞘脂质、甲氧萘丙酸、布洛芬、维生素E、生物素等。还已知包括多个硫代磷酸酯键联的寡核苷酸结合血清蛋白,因此包括有主链中的多个硫代磷酸酯键联的短寡核苷酸(例如约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸)也适合于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。另外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适体也适用于在本文所描述的实施例中用作PK调节配体。

[0666] 本发明的配体共轭的寡核苷酸可藉由使用具有侧接反应性功能性的寡核苷酸来

合成,诸如衍生自连接分子附接至寡核苷酸上的寡核苷酸(如下所述)。此反应性寡核苷酸可直接与市售配体、携带各种保护基中的任一种的合成配体或具有附接至其的连接部分的配体反应。

[0667] 用于本发明的共轭物中的寡核苷酸可方便且常规地经由熟知的固相合成技术制造。用于此类合成的设备由若干供货商销售,包含例如Applied Biosystems(Foster City, Calif.)。本技术领域中已知的用于此类合成的任何其他手段可被另外或替代地实施。还已知使用类似技术制备其他寡核苷酸,诸如硫代磷酸酯及烷基化衍生物。

[0668] 在本发明的配体共轭寡核苷酸及带有序列特异性连接的核苷的配体分子中,该寡核苷酸及寡核苷可利用标准核苷酸或核苷前驱体、或已带有该连接部分的核苷酸或核苷共轭物前驱体、已带有该配体分子的配体-核苷酸或核苷-共轭前驱体、或带有非核苷配体的建构组组装于适合的DNA合成器上。

[0669] 当使用已带有连接部分的核苷酸共轭前驱体时,通常完成序列特异性连接的核苷的合成,且随后使配体分子与连接部分反应以形成配体共轭寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷藉由自动合成器来合成,其使用了除市售且常规用于寡核苷酸合成的标准磷酰胺及非标准磷酰胺以外来源于配体-核苷共轭物的亚磷酰胺。

[0670] A.脂质共轭物

[0671] 在一实施例中,配体或共轭物为脂质或基于脂质的分子。此类脂质或基于脂质的分子优选结合血清蛋白质,例如人类血清白蛋白(HSA)。HSA结合配体允许将共轭物分布至目标组织,例如,身体的非肾脏目标组织。举例而言,目标组织可为肝脏,包含肝脏的薄壁细胞。还可使用可结合HSA的其他分子作为配体。例如,可以使用脯氨酸或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可(a)增加对共轭物降解的抗性,(b)增加靶向或转运至目标细胞或细胞膜中,和/或(c)可用于调整与血清蛋白例如HSA的结合。

[0672] 基于脂质的配体可用于抑制,例如控制共轭物与目标组织的结合。例如,较强力地结合至HSA的脂质或基于脂质的配体较不可能靶向肾脏,因此较不可能从体内清除。较不强力地结合至HSA的脂质或基于脂质的配体可用于靶向与肾脏的共轭物。

[0673] 在一优选实施例中,基于脂质的配体结合HSA。优选地,其以足够亲和力与HSA结合,使得共轭物将优选分布至非肾脏组织。然而,优选地,其亲和力不那么强,使得HSA配体结合不可逆。

[0674] 在另一优选实施例中,基于脂质的配体弱结合HSA或几乎不结合HSA,使得共轭物更佳被分布至肾脏。还可使用靶向肾脏细胞的其他部分替代基于脂质的配体或除了基于脂质的配体以外。

[0675] 在另一方面中,配体为例如维生素的部分,其由目标细胞,例如增生细胞吸收。这些尤其适用于治疗表征为不需要的细胞增殖的病症,例如恶性或非恶性类型,例如癌细胞。例示性维生素包含维生素A、E及K。其他例示性维生素包含B类维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡啶氧化或其他被诸如肝细胞的目标细胞吸收的维生素或营养素。还包含HSA及低密度脂蛋白(LDL)。

[0676] B.细胞渗透剂

[0677] 在另一方面中,该配体为细胞渗透剂,优选为螺旋细胞渗透剂。优选地,药剂为两亲性的。例示性药剂为肽,诸如tat或者触足肽。若药剂为肽,则其可经修饰,包含肽模拟物、

反向异构物、非肽或假肽键联及使用D-氨基酸。螺旋剂优选为α螺旋剂,其优选具有亲脂性及疏水性相。

[0678] 配体可为肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中还称为寡肽模拟物)为能够折叠成类似于天然肽的定义三维结构的分子。肽及肽模拟物与iRNA剂的附接可影响iRNA的药物动力学分布,诸如藉由增强细胞识别及吸收。肽或肽模拟部分可为约5-50个氨基酸长,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0679] 肽或肽模拟物可为例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽、或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可为树枝状聚合物肽、限制性肽或交联肽。在另一替代例中,肽部分可包含疏水性膜易位序列(MTS)。例示性含有疏水性MTS的肽为具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:28)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:29))还可为靶向部分。肽部分可为"递送"肽,其可在细胞膜上携带大极性分子,包括肽、寡核苷酸及蛋白质。举例而言,已发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:30))及果蝇触角足(Drosophila Antennapedia)蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:31))的序列能够充当递送肽。肽或肽模拟物可由DNA随机序列编码,诸如自噬菌体展示库、或一珠一化合物(one-bead-one-compound;OBOC)组合库(Lam等人,Nature,354:82-84,1991)识别的肽。为了靶向细胞目的而经由并入的单体单元与dsRNA剂系链的肽或肽模拟物的实例为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可在约5个氨基酸至约40个氨基酸范围内。肽部分可具有结构修饰,诸如增加稳定性或直接构形特性。可使用下述结构修饰中的任一个。

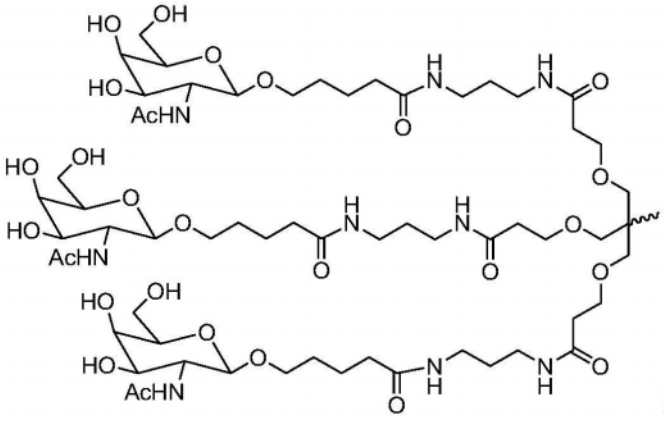
[0680] 用于本发明的组合物及方法中的RGD肽可为线性或环状的,且可经修饰,例如经糖基化或甲基化,以促进靶向多个特定组织。含RGD的肽及肽模拟物可包含D-氨基酸以及合成RGD模拟物。除了RGD以外,可使用靶向整合素配体的其他部分。此配体的优选共轭物靶向PECAM-1或VEGF。

[0681] "细胞渗透肽"能够渗透细胞,例如微生物细胞,诸如细菌或真菌细胞、或哺乳动物细胞,诸如人类细胞。可通透微生物细胞的肽可为例如:α-螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、包含二硫键的肽(例如,α-防御素、β-防御素、或制菌肽)、或仅包含一个或两个主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吲哚抗生肽)。细胞渗透肽还可包含核定位信号(NLS)。举例而言,细胞渗透性肽可为二部组合的两亲性肽,诸如MPG,其衍生自HIV-1gp41与SV40大型T抗原的NLS的稠合肽功能域(Simeoni等人,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

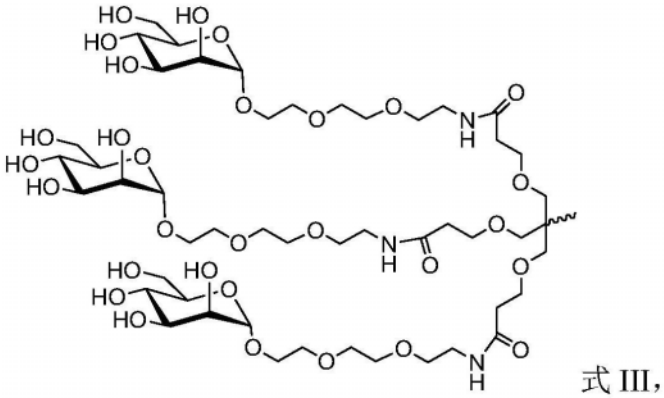
[0682] C.碳水化合物共轭物

[0683] 在本发明的组合物及方法的一些实施例中,iRNA寡核苷酸还包括碳水化合物。如本文所描述,碳水化合物共轭的iRNA有利于核酸的活体内递送,以及适用于活体内治疗用途的组合物。如本文所用,"碳水化合物"指其本身即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)且在各碳原子上键结氧、氮或硫原子的单糖单位所组成碳水化合物的化合物;或具有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)且在各碳原子上键结氧、氮或硫原子的单糖单位所组成的碳水化合物作为其中一部分的化合物。代表性碳水化合物包含糖(含有约4、5、6、7、8或9个单糖单元的单糖、二糖、三糖及寡糖),及多糖诸如淀粉、肝糖、纤维素及多糖胶。特定的单糖包含C5及以上(例如C5、C6、C7或C8)糖;二糖及三糖包含具有两个或三个单糖单元(例如,C5、C6、C7或C8)的糖。

[0684] 在一实施例中,用于本发明的组合物及方法中的碳水化合物共轭物选自由以下所组成的组:

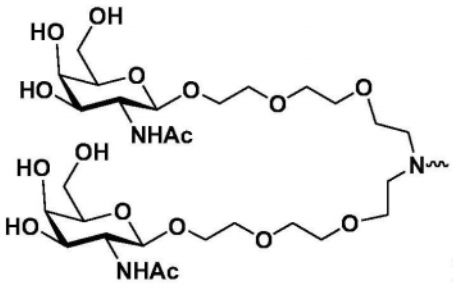


式 II,

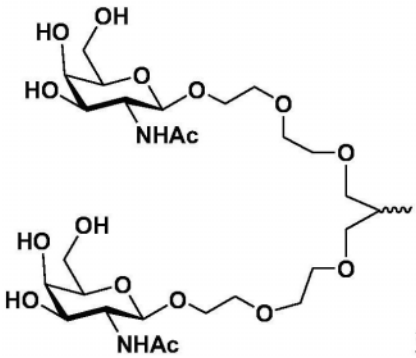


式 III,

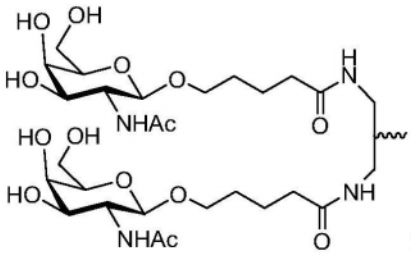
[0685]



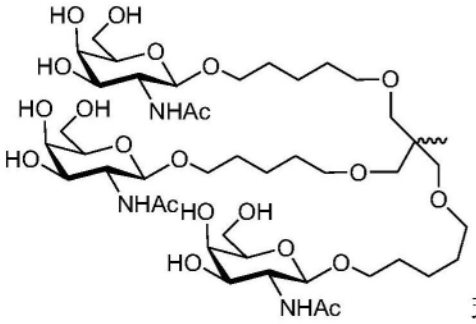
式 IV,



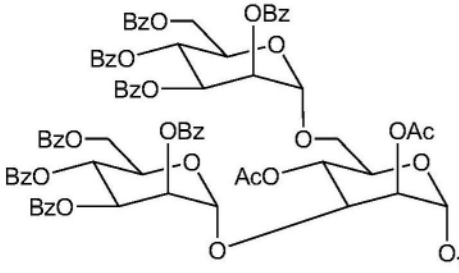
式 V,



式 VI,

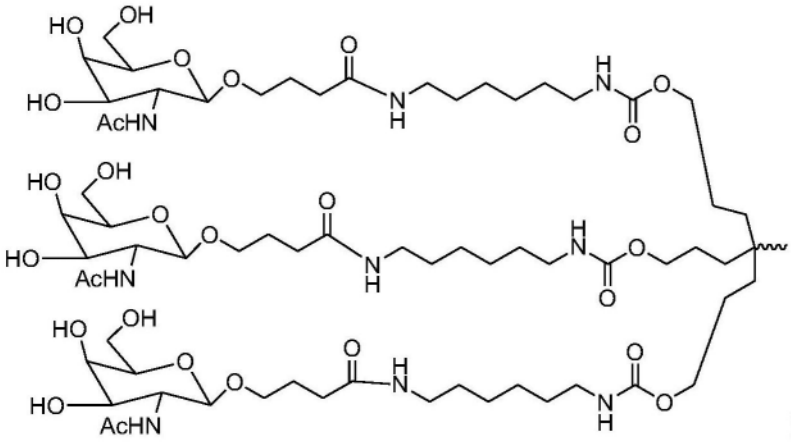


式 VII，

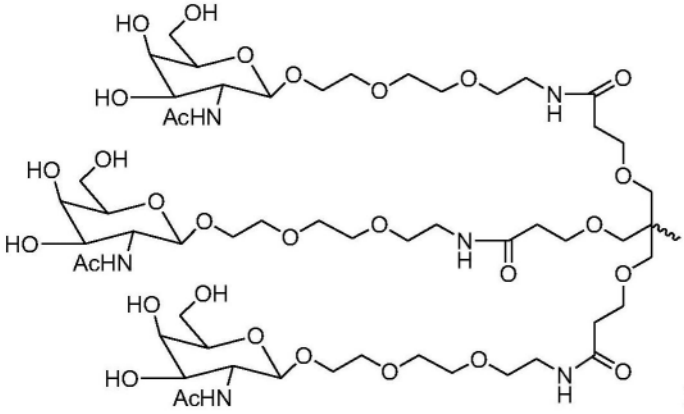


式 VIII，

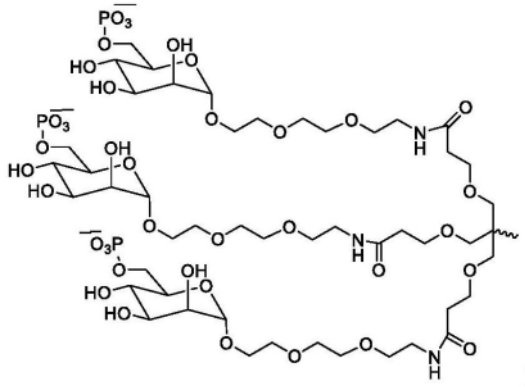
[0686]



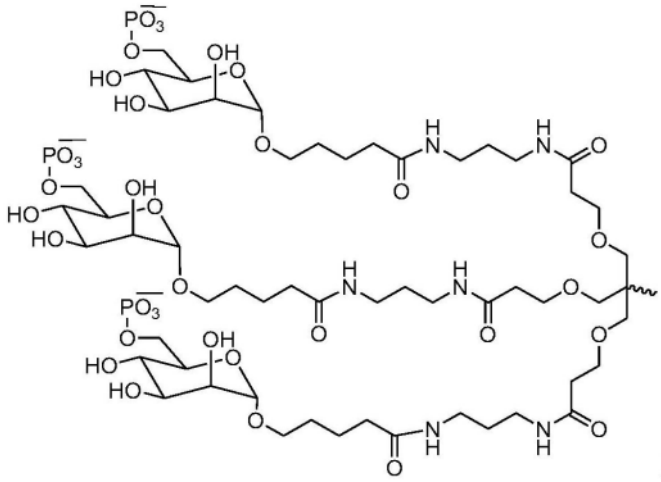
式 IX，



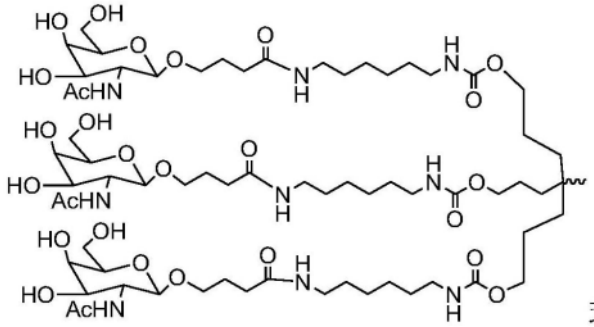
式 X，



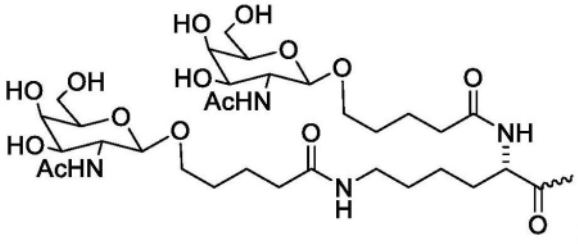
式 XI，



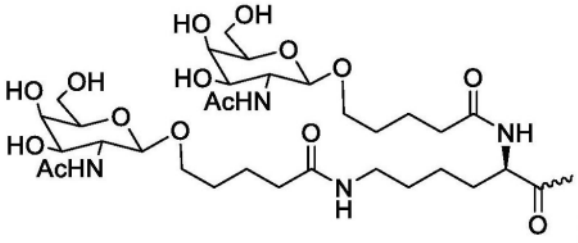
[0687] 式 XII，



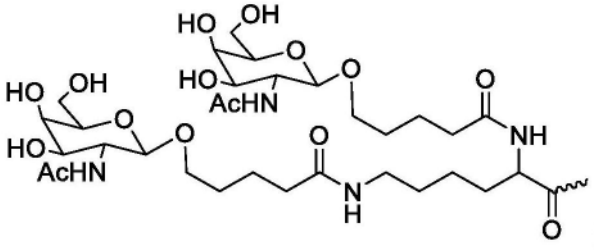
式 XIII，



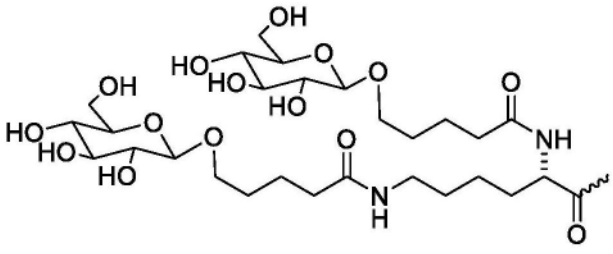
式 XIV，



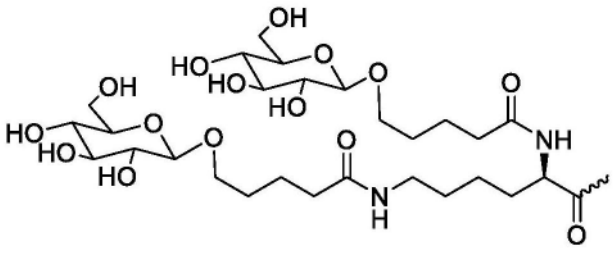
式 XV，



式 XVI，

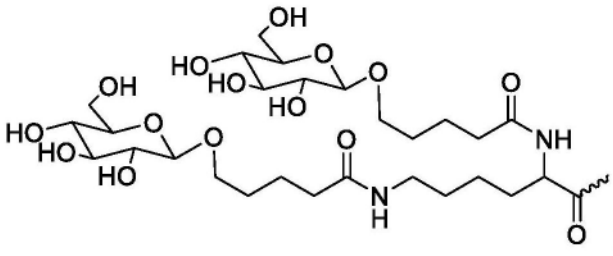


式 XVII，

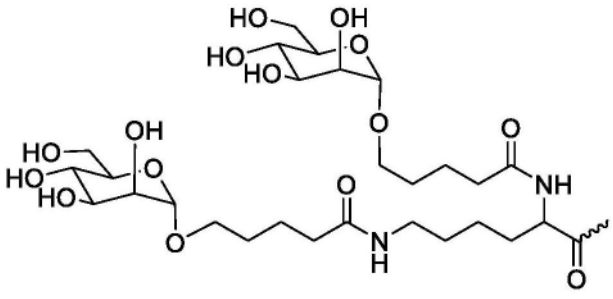


式 XVIII，

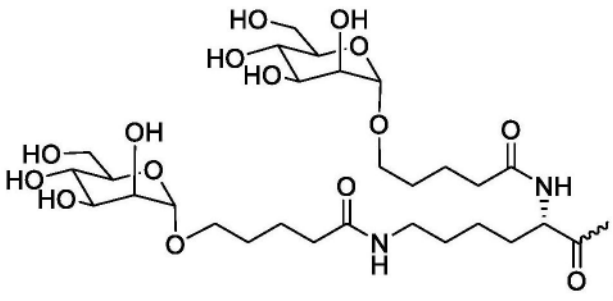
[0688]



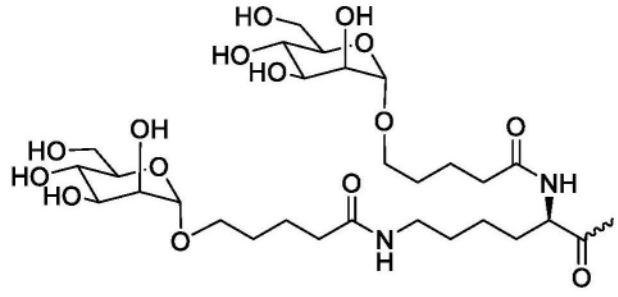
式 XIX，



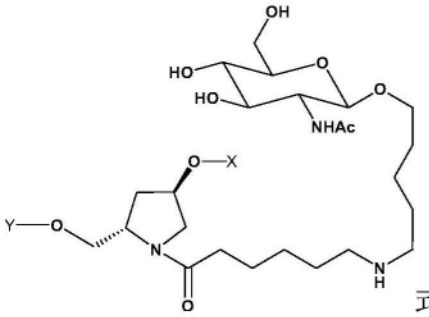
式 XX，



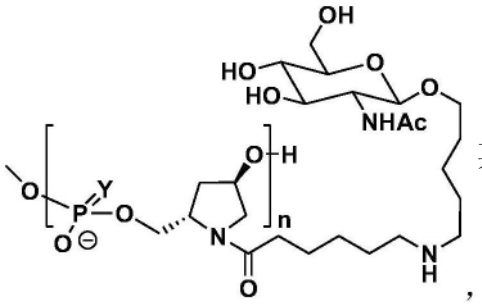
式 XXI，



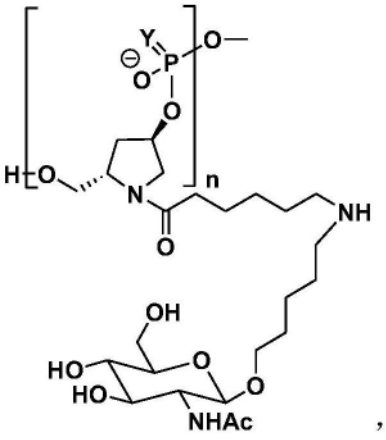
式 XXII，

[0689] 

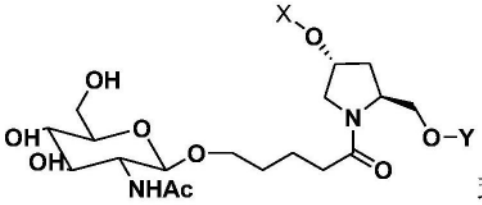
式 XXIII；

[0690] 

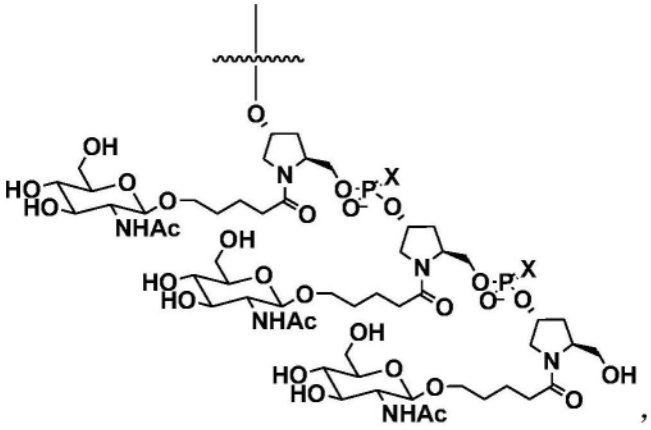
其中Y为O或S且n为3-6(式XXIV)；

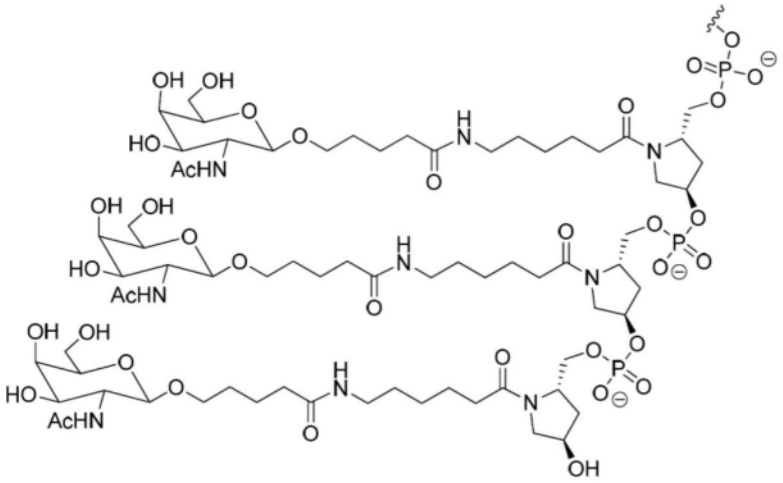
[0691] 

其中Y为O或S且n为3-6(式XXV)；

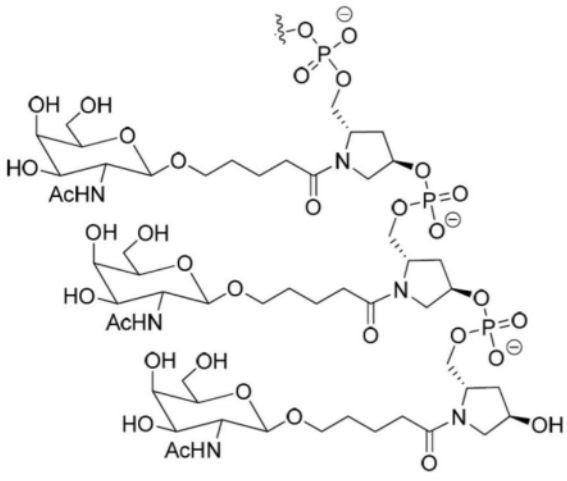
[0692] 

式 XXVI；

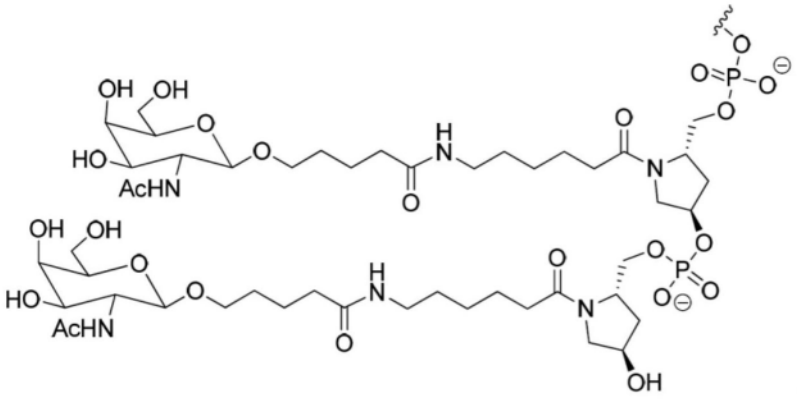
[0693]  其中X为O或S(式XXVII)；



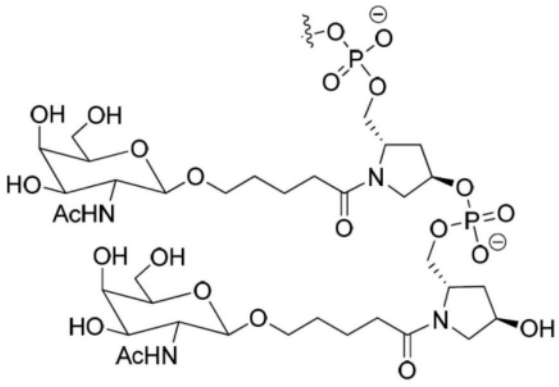
式 XXVIII；

[0694] 

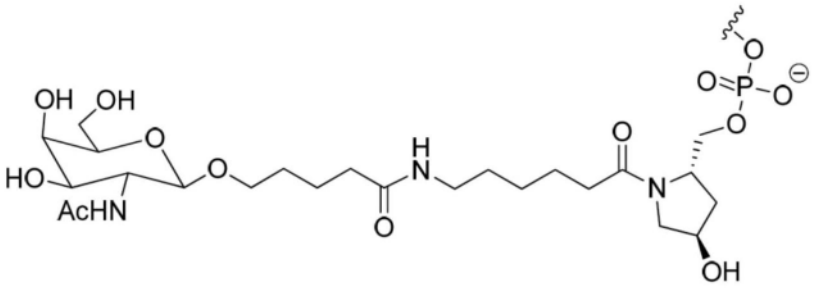
式 XXIX；

[0695] 

式 XXX；

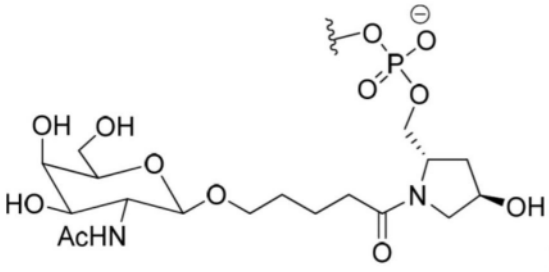
[0696] 

式 XXXI；

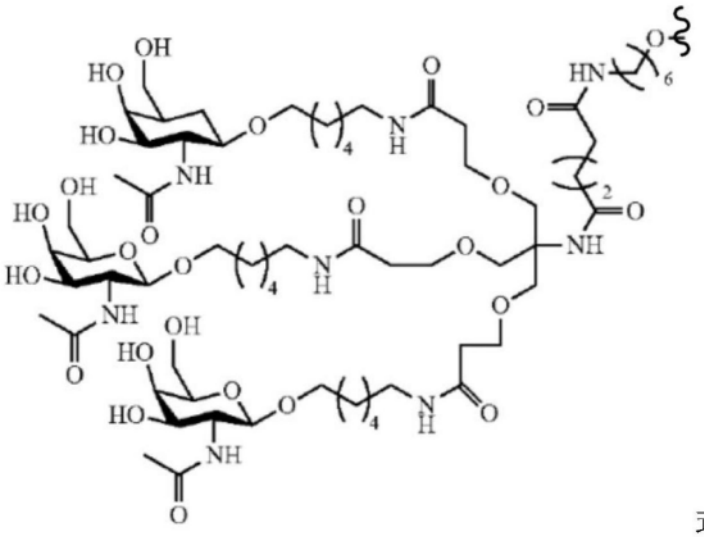


式 XXXII；

及

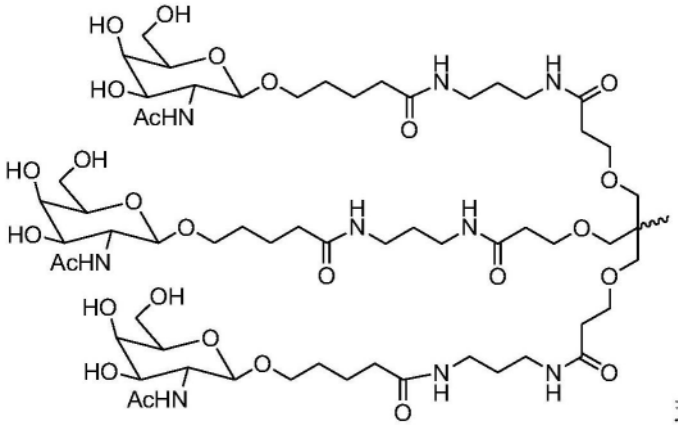
[0697] 

式 XXXIII；

[0698] 

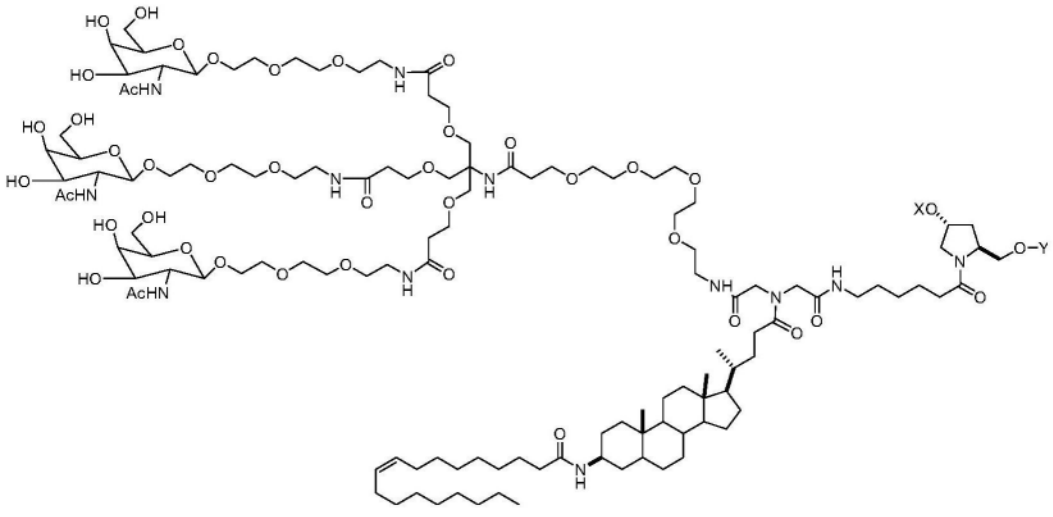
式 XXXIV。

[0699] 在另一实施例中,用于本发明的组合物及方法中的碳水化合物共轭物为单糖。在一实施例中,该单糖为N-乙酰半乳糖胺,诸如

[0700] 

式 II。

[0701] 用于本文所描述的实施例中的另一代表性碳水化合物共轭物包含但不限于:

[0702] 

(式 XXXVI),

[0703] 当X或Y中的一个为寡核苷酸时,则另一个为氢。

[0704] 在本发明的某些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物经由单价接头附接至本发明的iRNA剂。在一些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物经由二价接头附接至本发明的iRNA剂。在

本发明的又其他实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物经由三价接头连接至本发明的iRNA剂。

[0705] 在一实施例中,本发明的双链RNAi剂包括连接至iRNA剂的GalNAc或GalNAc衍生物,例如如本文所描述的dsRNA剂的有义链的3'或5'端。在另一实施例中,本发明的双链RNAi剂包括多个(例如,2、3、4、5或6个)GalNAc或GalNAc衍生物,其各自经由多个单价接头独立地连接至双链RNAi剂的多个核苷酸。

[0706] 在一些实施例中,例如,当本发明的iRNA剂的两链为由形成发夹环的一链的3'端与各别另一链5'端之间的核苷酸链不中断而连接的较大分子的一部分时,在发夹环内的多个未配对核苷酸每者可独立地包括经由单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0707] 在一些实施例中,碳水化合物共轭物还包括如上文所描述的一个或多个额外配体,诸如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

[0708] 适用于本发明的额外碳水化合物共轭物(及接头)包含那些描述于PCT公开案第WO 2014/179620及WO 2014/179627中的,所述文献中的每一个的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0709] D.接头

[0710] 在一些实施例中,本文所描述的共轭物或配体可藉由可裂解或不可裂解的各种接头连接至iRNA寡核苷酸。

[0711] 术语"接头"或"连接基团"指连接化合物的两个部分的有机部分,例如共价连接化合物的两个部分。接头通常包括直接键结或原子(如:氧或硫)、单位(如:NR8、C(O)、C(O)NH、SO、$SO_2$、$SO_2$NH或原子链),如,但不限于经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的炔基、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穿插或末端为O、S、S(O)、$SO_2$、N(R8)、C(O)、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的杂环;其中R8为氢、酰基、脂肪族的或经取代的脂肪族的。在一实施例中,接头在约1至24个原子、2至24个原子、3至24个原子、4至24个原子、5至24个原子、6至24个原子、6至18个原子、7至18个原子、8至18个原子、7至17个原子、8至17个原子、6至16个原子、7至17个原子或8至16个原子之间。

[0712] 可裂解的连接基团为在细胞外具有充分稳定性,但当进入目标细胞内时即会裂解而释出其所共同固定的两个部分的接头。在一优选实施例中,可裂解的连接基团在目标细胞中或在第一参考条件(其可为例如选择模拟或代表细胞内条件)的裂解比在个体血液中或在第二参考条件(其可为例如选择模拟或代表血液或血清中的条件)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。

[0713] 可裂解连接基团容易受裂解剂的影响,例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在。一般而言,裂解剂比在血清或血液中更普遍或在细胞内发现更高水平或活性。此类降解剂

的实例包含:针对特定底物选择或没有底物专一性的氧化还原剂,包含例如存在于细胞中的氧化性或还原性酶或还原剂,如氢硫醇,其可利用还原作用降解可经氧化还原性裂解的连接基团;酯酶;核内体或可产生酸性环境的制剂,例如,那些导致pH 5或更低的制剂;可水解或降解酸可裂解连接基团的酶,其作用为一般酸类、肽酶(其可为底物专一性)以及磷酸酶。

[0714] 可裂解键联基团,诸如二硫键可容易受pH影响。人类血清的pH值为7.4,而平均细胞内pH值略低,范围为约7.1至7.3。胞内体具有在5.5至6.0范围内的酸性pH,且溶酶体在约5.0下具有甚至更酸性pH。一些接头将具有在优选pH下裂解的可裂解连接基团,藉此自细胞内部的配体释放阳离子脂质,或进入细胞的所需隔室中。

[0715] 接头可包含可由特定酶裂解的可裂解连接基团。并入接头中的可裂解连接基团的类型可视待靶向的细胞而定。举例而言,肝目标配体可经由包含酯基的接头连接至阳离子脂质。肝细胞富含酯酶,且因此与不富含酯酶的细胞类型相比,该接头在肝细胞中将更有效地裂解。其他富含酯酶的细胞类型包含肺细胞、肾皮质细胞及睾丸细胞。

[0716] 当靶向富含肽酶的细胞类型(诸如肝细胞与滑液膜细胞)时,可使用包含肽键的接头。

[0717] 一般而言,可藉由测试降解剂(或条件)裂解候选连接基团的能力,以分析该候选的可裂解连接基团的合适性。还期望还测试候选可裂解连接基团在血液中或与其他非目标组织接触时抵抗裂解的能力。因此,可确定第一与第二条件之间对裂解作用的相对易感性,其中所选择的第一条件是其于标靶细胞中的裂解指标,所选择的第二条件是其于其他组织或生物液体(例如:血液或血清)中的裂解指标。评估可在无细胞系统、细胞、细胞培养、器官或组织培养或全动物中进行。其适用于在无细胞或培养条件下进行初次分析,并进一步在完整动物体内确认。在优选实施例中,适用的候选化合物在细胞(或在选择模拟细胞内条件的活体外条件下)的裂解比在血液或血清(或在选择模拟细胞外条件的活体外条件下)至少快约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或约100倍。

[0718] i.氧化还原可裂解连接基团

[0719] 在一个实施例中,可裂解连接基团为在还原或氧化后裂解的氧化还原可裂解连接基团。还原性可裂解连接基团的实例为二硫键连接基团(-S-S-)。为确定候选可裂解连接基团是否为适合的“还原性可裂解连接基团”,或例如适合与特定iRNA部分及特定靶向剂一起使用,可查看本文所描述的方法。举例而言,可藉由与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂培养,使用本技术领域上已知模拟细胞(例如:标靶细胞)中所观察到的裂解速率的药剂来分析候选物。候选物还可在经选择以模拟血液或血清条件的条件下评估。在一实施例中,候选化合物在血液中裂解至多约10%。在其他实施例中,相较于血液(或在所选以模拟细胞外条件的活体外条件下),适用的候选化合物在细胞中(或在所选以模拟细胞内条件的活体外条件下)降解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。在所选择模拟细胞内培养基的条件下且与所选择模拟细胞外培养基的条件下相比,候选化合物的裂解速率可使用标准酶动力学分析来测定。

[0720] ii.基于磷酸酯的可裂解连接基团

[0721] 在另一实施例中,可裂解接头包含基于磷酸酯的可裂解连接基团。基于磷酸酯的可裂解连接基团藉由降解或水解磷酸酯基团的药剂裂解。在细胞中裂解磷酸基团的药剂的

实例为酶,诸如细胞中的磷酸酶。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-。优选实施例为-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-、-O-P(S)(H)-S-。优选实施例为-O-P(O)(OH)-O-。这些候选物可使用与类似上文所描述那些方法来评估。

[0722] iii.酸可裂解连接基团

[0723] 在另一实施例中,可裂解接头包括酸可裂解连接基团。酸可裂解连接基团为在酸性条件下裂解的连接基团。在优选实施例中,酸可裂解连接基团在pH为约6.5或更低(例如约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的酸性环境中裂解,或藉由诸如可充当一般酸的酶的药剂来裂解。在细胞中,特定低pH胞器,诸如胞内体及溶酶体,可为该酸可裂解连接基团提供裂解环境。酸可裂解连接基团的实例包含但不限于氨基酸的肼、酯及酯。酸可裂解基团可具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。优选实施例为当附接至酯(烷氧基)的氧的碳为芳基、经取代烷基或三级烷基诸如二甲基戊基或三级丁基时。这些候选物可使用与类似上文所描述那些方法来评估。

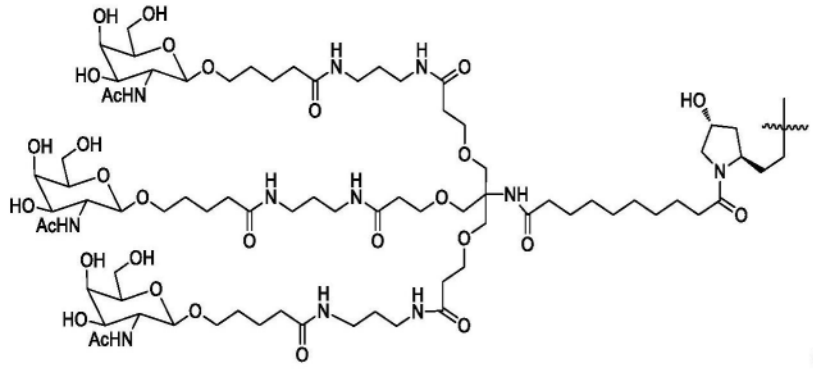
[0724] iv.基于酯的连接基团

[0725] 在另一实施例中,可裂解接头包含基于酯的可裂解连接基团。基于酯的可裂解连接基团由细胞中的酶诸如酯酶及酰胺酶裂解。基于酯的可裂解连接基团的实例包含但不限于亚烷基、亚烯基及亚炔基的酯。酯可裂解连接基团具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。这些候选物可使用与类似上文所描述那些方法来评估。

[0726] v.基于肽的裂解基团

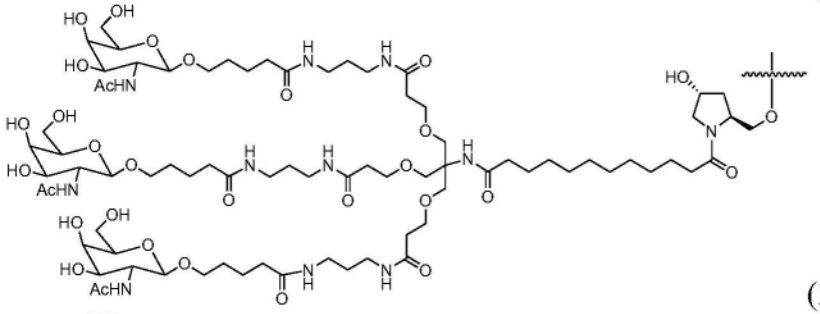
[0727] 在又另一实施例中,可裂解接头包括基于肽的可裂解连接基团。基于肽的可裂解连接基团由细胞中的酶(诸如肽酶及蛋白酶)裂解。基于肽的可裂解连接基团为形成于氨基酸之间的肽键,以产生寡肽(例如双肽、三肽等)及多肽。基于肽的可裂解基团不包含酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可在任何亚烷基、亚烯基或炔烯之间形成。肽键为形成于氨基酸之间以产生肽及蛋白质的特殊类型酰胺键。基于肽的裂解基团一般限于在产生肽及蛋白质的氨基酸之间形成的肽键(也即,酰胺键),且不包含整个酰胺官能基团。基于肽的可裂解连接基团具有通式-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-,其中RA及RB为两个相邻氨基酸的R基团。这些候选物可使用与类似上文所描述那些方法来评估。

[0728] 在一实施例中,本发明的iRNA经由接头与碳水化合物共轭。具有本发明的组合物及方法的接头的iRNA碳水化合物共轭物的非限制性实例包含但不限于:

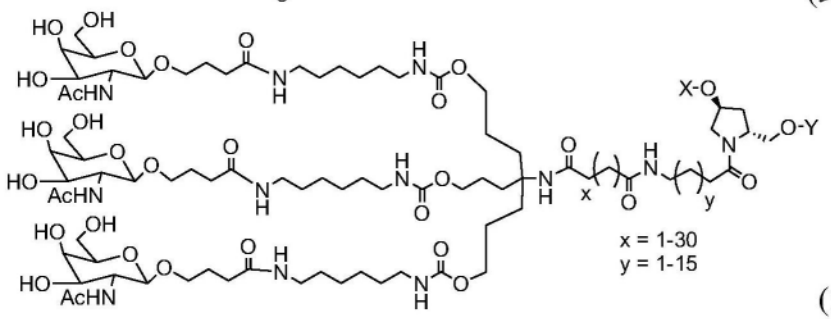


(式 XXXVII),

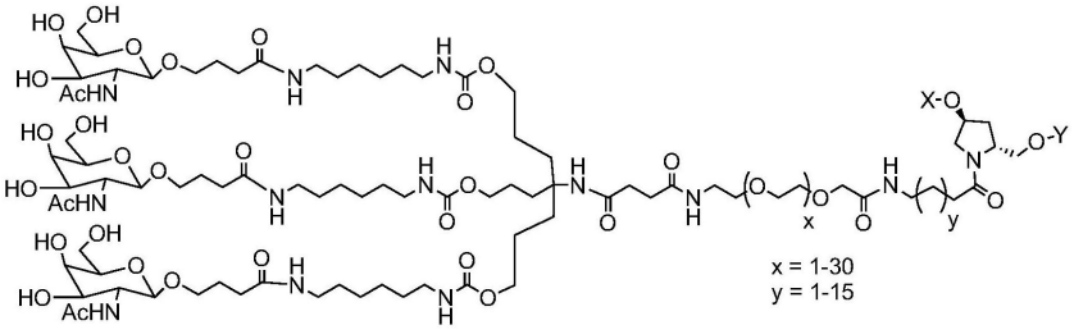
[0729]



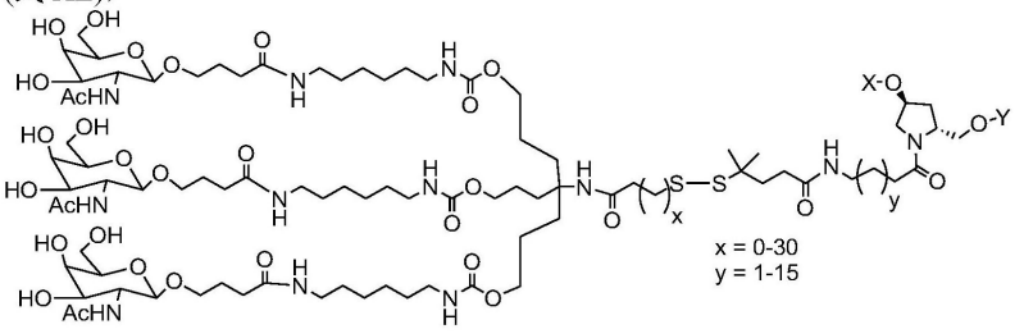
(式 XXXVIII),




(式 XXXIX),

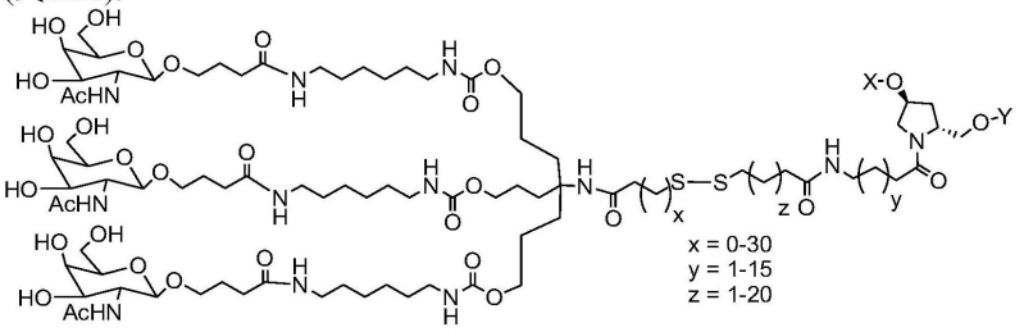



(式 XL),

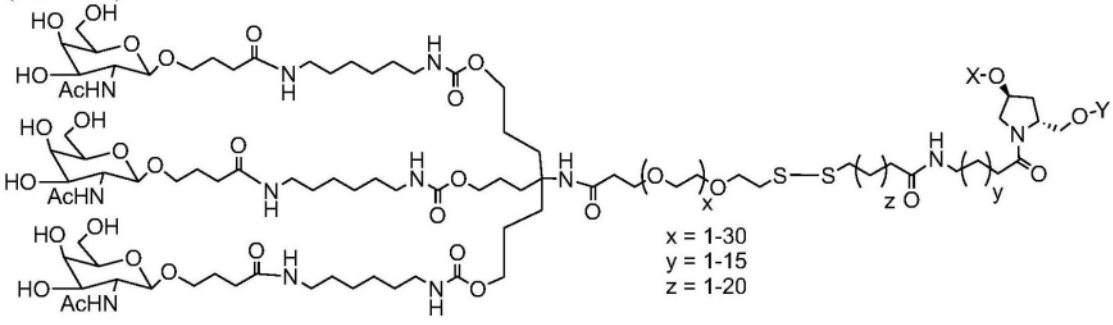



[0730]

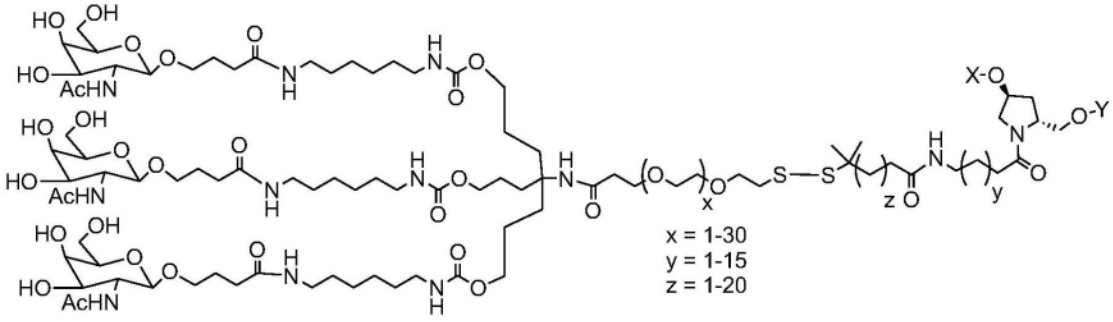
(式 XLI),




(式 XLII),




[0731] (式 XLIII),及

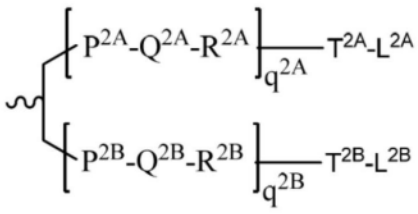
[0732] 


[0733] (式XLIV),当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

[0734] 在本发明的组合物及方法的某些实施例中,配体为经由二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc(N-乙酰半乳糖胺)衍生物。

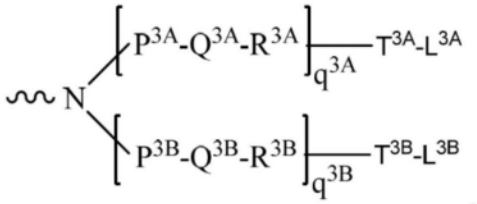
[0735] 在一个实施例中,本发明的dsRNA与选自式(XLV)至(XLVI)中任一个中所示的结构的组的二价或三价支链接头共轭:

式 XXXXV

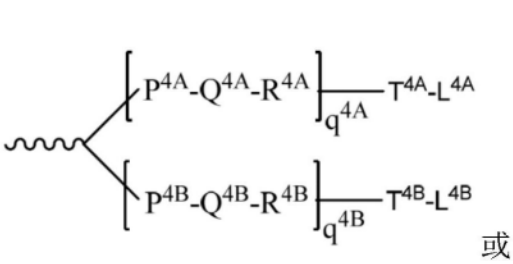



、

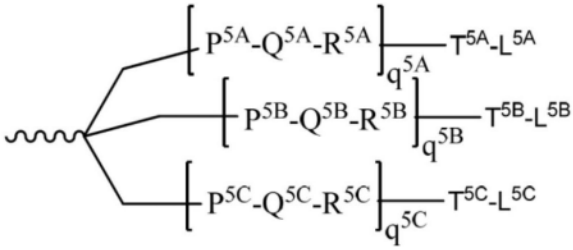
式 XLVI




、

[0736] 


或




;

式 XLVII

式 XLVIII

[0737] 其中:

[0738] q2A、q2B、q3A、q3B、q4A、q4B、q5A、q5B及q5C在每次出现时独立地表示0-20,且其中该重复单元可为相同或不同;

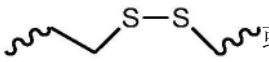
[0739] $P^{2A}$、$P^{2B}$、$P^{3A}$、$P^{3B}$、$P^{4A}$、$P^{4B}$、$P^{5A}$、$P^{5B}$、$P^{5C}$、$T^{2A}$、$T^{2B}$、$T^{3A}$、$T^{3B}$、$T^{4A}$、$T^{4B}$、$T^{4A}$、$T^{5B}$、$T^{5C}$在每次出现时各自独立地为不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、$CH_2$、$CH_2NH$或$CH_2O$;

[0740] $Q^{2A}$、$Q^{2B}$、$Q^{3A}$、$Q^{3B}$、$Q^{4A}$、$Q^{4B}$、$Q^{5A}$、$Q^{5B}$、$Q^{5C}$在每次出现时各自独立地为不存在、亚烷基、经取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可被O、S、S(O)、$SO_2$、$N(R^N)$、C(R')=C(R")、C≡C或C(O)中的一个或多个间杂或封端;

[0741] $R^{2A}$、$R^{2B}$、$R^{3A}$、$R^{3B}$、$R^{4A}$、$R^{4B}$、$R^{5A}$、$R^{5B}$、$R^{5C}$在每次出现时各自独立地为不存在、NH、O、S、$CH_2$、C(O)O、C(O)NH、NHCH($R^a$)C(O)、-C(O)-CH($R^a$)-NH-、CO、

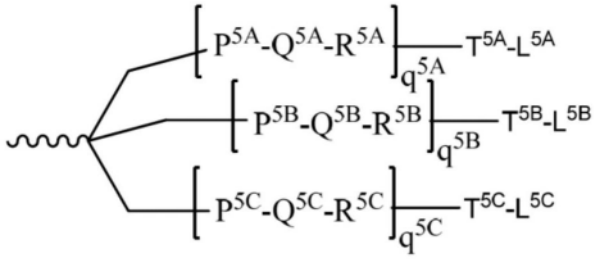
[0742] 


、

[0743] 或杂环基;

[0744] $L^{2A}$、$L^{2B}$、$L^{3A}$、$L^{3B}$、$L^{4A}$、$L^{4B}$、$L^{5A}$、$L^{5B}$及$L^{5C}$代表配体;也即,在每次出现时各自独立地为单糖(诸如GalNAc)、双糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;且$R^a$为H或氨基酸侧链。三价共轭的GalNAc衍生物特别适用于与RNAi剂一起使用以抑制目标基因的表达,诸如式(XLIX)的那些GalNAc衍生物:

式 XLIX

[0745] 

[0746] 其中$L^{5A}$、$L^{5B}$及$L^{5C}$表示单糖,诸如GalNAc衍生物。

[0747] 与GalNAc衍生物共轭的合适的二价及三价支链接头基团的实例包含但不限于上文所列举为式II、VII、XI、X及XIII的结构。

[0748] 教导制备RNA共轭物的代表性美国专利包含但不限于美国专利第4,828,979号;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 and 5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;第8,106,022号,其中每个的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

[0749] 所给定化合物中的全部位置不必经均匀修饰,且实际上可将超过一种前述修饰并入单一化合物中,或甚至在iRNA内的单一核苷处。本发明还包含为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0750] 在本发明的上下文中,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”为包含两个或更多个化学上独立区的iRNA化合物,优选为dsRNA,该各区分别由至少一个单体单位组成,也即以dsRNA化合物为例,为由核苷酸组成。这些iRNA通常包含至少一个区,其中RNA经修饰,以致提高iRNA对抗核酸酶降解的抗性,提高细胞吸收性,和/或提高对目标核酸的结合亲和性。iRNA的额外区域可充当能够裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂合物的酶的底物。举例而言,RNase H为裂解RNA:DNA双螺旋的RNA链的细胞核酸内切酶。因此,RNase H的活化导致RNA目标的裂解,藉此大幅提高iRNA抑制基因表达的效率。因此,当采用嵌合性dsRNA时,经常可以采用较短的iRNA得到相较于硫代磷酸酯脱氧dsRNA与相同目标区杂交后得到的可比较的结果。RNA目标的裂解可藉由凝胶电泳常规地侦测,且必要时,藉由本技术领域中已知的相关核酸杂交技

术。

[0751] 在某些实例中,iRNA的RNA可藉由非配体基团修饰。许多非配体分子已与iRNA共轭以增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,且用于进行此类共轭的程序可用于科学文献中。此类非配体部分已包含脂质部分,诸如胆固醇(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.Let.,1993,3:2765)、硫胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂族链,例如十二碳二醇或十一碳残基(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,例如二-十六碳基-消旋性-甘油或1,2-二-O-十六碳基-消旋性-甘油基-3-膦酸三乙基铵盐(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777)、多元胺或聚乙二醇链(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)、或十八碳基胺或己基氨基-羰基氧胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923)。上文已列出教导制备此类RNA共轭物的代表性美国专利。典型的共轭方案涉及在该序列的一个或多个位置合成多个携带氨基接头的RNA。氨基基团随后使用适当耦合或活化药剂与将共轭的分子反应。共轭反应可在溶液相中用仍结合至固体支撑件的RNA或在RNA裂解之后进行。通过HPLC纯化RNA共轭物通常得到纯共轭物。

[0752] VI.本发明的医药组合物

[0753] 本发明还包含包括本发明的iRNA的医药组合物及调配物。因此,在一个实施例中,本文提供医药组合物,其包含:双链核糖核酸(dsRNA)剂,其抑制细胞(诸如肝细胞)中第13型17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B13)的表达,其中该dsRNA剂包含有义链及反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,且该反义链包含与SEQ ID NO:7的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;及医药学上可接受的载体。在一些实施例中,dsRNA剂包含有义链及反义链,其中该有义链包含来自SEQ ID NO:1的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,且该反义链包含来自SEQ ID NO:7的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0754] 在另一实施例中,本文提供医药组合物,其包含:dsRNA剂,其抑制细胞(诸如肝细胞)中17β-羟基类固醇脱氢酶(HSD17B13)的表达,其中该dsRNA剂包含有义链及反义链,该反义链包含互补区,该互补区包含与表2中所列的任一反义序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;及医药学上可接受的载剂。在一些实施例中,dsRNA剂包含有义链及反义链,该反义链包含互补区,该互补区包含来自表2中所列的任一反义序列的至少15个连续核苷酸。

[0755] 含有本发明的iRNA的医药组合物适用于治疗与HSD17B13基因的表达或活性相关的疾病或病症,例如慢性纤维发炎性疾病,例如NASH。

[0756] 此类医药组合物基于递送模式而调配。一种调配成以非经肠式传递而全身性投药

的组合物,例如藉由静脉内(IV)、肌肉内(IM)或用于皮下递送全身施用的组合物。另一实例为经调配以直接递送至肝脏中的组合物,例如藉由输注直接递送至肝脏中,诸如藉由连续泵输注。本发明的医药组合物可以足以抑制HSD17B13基因表达的剂量施用。一般而言,本发明iRNA的合适剂量将在每天每公斤接受者体重施用约0.001至约200.0毫克的范围,通常在每天每公斤体重约1至50毫克。通常,本发明的iRNA的适合剂量将在约0.1mg/kg至约5.0mg/kg、优选为约0.3mg/kg及约3.0mg/kg的范围内。重复给药方案可包含定期施用治疗量的iRNA,诸如每隔一天至一年一次。在某些实施例中,iRNA约每周一次、每7至10天一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次、每10周一次、每11周一次、每12周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次(每季度一次)、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。

[0757] 在初始治疗方案之后,该治疗可以较低频率施用。

[0758] 本领域技术人员应了解,某些因素可影响有效治疗个体所需的剂量及时间,包含但不限于疾病或病症的严重程度、先前治疗、个体的一般健康状况和/或年龄及存在的其他疾病。此外,以治疗有效量的组合物治疗个体可包含单一治疗或一系列治疗。本发明所涵盖的个别iRNA的有效剂量及活体内半衰期的估计可使用常规方法学或基于使用适当动物模型的活体内测试来制备,如本文其他地方所描述。

[0759] 小鼠遗传学的进步已产生多种小鼠模型以用于研究各种人类疾病,诸如将得益于HSD17B13表达降低的HSD17B13相关疾病、病症或病状。此类模型可用于iRNA的活体内测试,以及用于测定治疗学上有效剂量。此类模型可用于iRNA的活体内测试,以及用于测定治疗学上有效剂量。适合的小鼠模型为本领域中已知的,且包括例如喂食高脂肪饮食(HFD;也称为西方饮食)、甲硫氨酸胆碱缺乏(MCD)饮食或高脂肪(15%)高胆固醇(1%)饮食(HFHC)的小鼠及大鼠;含有肥胖(ob)基因突变的肥胖(ob/ob)小鼠(Wiegman等人,(2003)Diabetes,52:1081-1089);含有LDL受体纯合基因剔除的小鼠(LDLR-/-小鼠;Ishibashi等人,(1993)J Clin Invest 92(2):883-893);饮食诱发的动脉粥样硬化小鼠模型(Ishida等人,(1991)J.Lipid.Res.,32:559-568);杂合脂蛋白脂肪酶基因剔除小鼠模型(Weistock等人,(1995)J.Clin.Invest.96(6):2555-2568);喂食缺乏胆碱、L-氨基酸限定的高脂肪饮食(CDAHFD)的小鼠及大鼠(Matsumoto等人(2013)Int.J.Exp.Path.94:93-103);喂食高反式脂肪、胆固醇饮食(HTF-C)的小鼠及大鼠(Clapper等人(2013)Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.305:G483-G495);喂食高脂肪、高胆固醇、胆汁盐饮食(HF/HC/BS)的小鼠及大鼠(Matsuzawa等人(2007)Hepatology 46:1392-1403);及喂食高脂肪饮食+果糖(30%)水的小鼠及大鼠(Softic等人(2018)J.Clin.Invest.128(1)-85-96)。

[0760] 本发明的医药组合物可视是否需要局部或全身性治疗及视待治疗的区域而以多种方式施用。投药可为局部(例如藉由经皮贴片)、经肺,例如藉由吸入或吹入粉末或气溶胶,包含藉由喷雾器;气管内、鼻内、表皮及经皮、经口或非经肠。非经肠施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;皮下,例如经由植入装置;或颅内,例如藉由实质内、鞘内或心室内施用。

[0761] iRNA可以靶向特定细胞或组织的方式递送,诸如肝脏(例如肝脏的肝细胞)。

[0762] 在一些实施例中,本发明的医药组合物适用于向个体肌肉内施用。在其他实施例中,本发明的医药组合物适用于向个体静脉内施用。在本发明的一些实施例中,本发明的医

药组合物适用于例如使用29g或30g针头皮下施用个体。

[0763] 本发明的医药组合物可包含于无缓冲溶液(诸如生理食盐水或水)中的本发明的RNAi剂,或于缓冲溶液(诸如包含乙酸盐、柠檬酸盐、丙胺、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合的缓冲溶液)中的本发明的RNAi剂。

[0764] 在一实施例中,本发明的医药组合物(例如,诸如适合皮下施用的组合物)包括在磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液中的本发明的RNAi剂。适合浓度的PBS包含例如1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、6.5mM、7mM、7.5mM、9mM、8.5mM、9mM、9.5mM、或约10mM PBS。在本发明的一个实施例中,本发明的医药组合物包含溶解于约5mM PBS溶液(例如0.64mM $NaH_2PO_4$、4.36mM $Na_2HPO_4$、85mM NaCl)中的本发明的RNAi剂。介于上述所述范围和数值之间的数值也倾向于为本发明的一部分。此外,意欲包含使用上述引用值中的任一个的组合作为上限和/或下限的值范围。

[0765] 本发明的医药组合物的pH可在约5.0至约8.0、约5.5至约8.0、约6.0至约8.0、约6.5至约8.0、约7.0至约8.0、约5.0至约7.5、约5.5至约7.5、约6.0至约7.5、约6.5至约7.5、约5.0至约7.2、约5.25至约7.2、约5.5至约7.2、约5.75至约7.2、约6.0至约7.2、约6.5至约7.2或约6.8至约7.2之间。本发明也包括介于上述所述范围和数值之间的范围和数值。

[0766] 本发明的医药组合物的渗透浓度可适合于皮下施用,诸如不超过约400mOsm/kg,例如在50与400mOsm/kg之间、在75与400mOsm/kg之间、在100与400mOsm/kg之间、在125与400mOsm/kg之间、在150与400mOsm/kg之间、在175与400mOsm/kg之间、在200与400mOsm/kg之间、在250与400mOsm/kg之间、在300与400mOsm/kg之间、在50与375mOsm/kg之间、在75与375mOsm/kg之间、在100与375mOsm/kg之间、在125与375mOsm/kg之间、在150与375mOsm/kg之间、在175与375mOsm/kg之间、在200与375mOsm/kg之间、在250与375mOsm/kg之间、在300与375mOsm/kg之间、在50与350mOsm/kg之间、在75与350mOsm/kg之间、在100与350mOsm/kg之间、在125与350mOsm/kg之间、在150与350mOsm/kg之间、在175与350mOsm/kg之间、在200与350mOsm/kg之间、在250与350mOsm/kg之间、在50与325mOsm/kg之间、在75与325mOsm/kg之间、在100与325mOsm/kg之间、在125与325mOsm/kg之间、在150与325mOsm/kg之间、在175与325mOsm/kg之间、在200与325mOsm/kg之间、在250与325mOsm/kg之间、在300与325mOsm/kg之间、在300与350mOsm/kg之间、在50与300mOsm/kg之间、在75与300mOsm/kg之间、在100与300mOsm/kg之间、在125与300mOsm/kg之间、在150与300mOsm/kg之间、在175与300mOsm/kg之间、在200与300mOsm/kg之间、在250与300之间、在50与250mOsm/kg之间、在75与250mOsm/kg之间、在100与250mOsm/kg之间、在125与250mOsm/kg之间、在150与250mOsm/kg之间、在175与350mOsm/kg之间、在200与250mOsm/kg之间,例如约50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、295、300、305、310、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395或约400mOsm/kg。本发明也包括介于上述所述范围和数值之间的范围和数值。

[0767] 包括有本发明的RNAi剂的本发明的医药组合物可存在于含有约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或约2.0mL医药组合物的小瓶中。本发明的医药组合物中的RNAi剂的浓度可为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、130、125、130、135、140、145、150、175、180、185、190、

195、200、205、210、215、230、225、230、235、240、245、250、275、280、285、290、295、300、305、310、315、330、325、330、335、340、345、350、375、380、385、390、395、400、405、410、415、430、425、430、435、440、445、450、475、480、485、490、495或约500mg/mL。在一实施例中,本发明的医药组合物中的RNAi剂浓度为约100mg/mL。介于上述所述范围和数值之间的数值也倾向于为本发明的一部分。

[0768] 本发明的医药组合物可包括呈游离酸形式的本发明的dsRNA剂。在本发明的其他实施例中,本发明的医药组合物可包括呈盐形式的本发明的dsRNA剂,诸如钠盐形式。在某些实施例中,当本发明的dsRNA剂呈钠盐形式时,该药剂中存在钠离子作为该药剂中存在的实质上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的相对离子。药剂中实质上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键联具有钠相对离子,在无钠相对离子的情况下包含不超过5、4、3、2或1个磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键联。在一些实施例中,当本发明的dsRNA剂呈钠盐形式时,药剂中存在钠离子作为存在于药剂中的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的相对离子。

[0769] 用于局部施用的医药组合物及调配物可包含经皮贴片、软膏、乳液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体及粉末。常规医药载体、水剂(aqueous)、粉末或油性碱、增稠剂及其类似物可为必需的或合乎需要的。涂覆式避孕套(condom)、手套及类似者也可使用。适合的局部调配物包含那些由如本发明所表征的iRNA与局部传递剂(诸如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯类、类固醇、螯合剂与界面活性剂)混合者。适当的脂质及脂质体包含中性(例如二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)带负电(例如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)及带正电(例如二油酰四甲基氨基丙基DOTAP及二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明的iRNA表征为可囊封于脂质体内或可形成复合物,尤其囊封于阳离子脂质体。或者,iRNA可与脂质复合,尤其是与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸及酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、花生酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚麻油酸、月见草油酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油酸甘油酯、甘油二月桂酸酯、甘油1-单癸酸、1-十二烷基吖环庚基-2-酮、酰肉碱、酰胆碱、或$C_{1-20}$烷基酯(例如肉豆蔻酸异丙酯IPM)、单酸甘油酯、二酸甘油酯或其医药学上可接受的盐。局部调配物详细描述于美国专利第6,747,014号中,其以引用的方式并入本文中。

[0770] A.包括膜分子组装体的iRNA调配物

[0771] 用于本发明的组合物及方法中的iRNA可经调配以用于在膜分子组装体中递送,例如脂质体或微胞。除了已研究且用于药物调配的微乳液之外,还有许多组织性界面活性剂结构。这些包含单层、微胞、双层及囊泡。诸如脂质体的囊泡由于其特异性及其自药物递送的标准点所提供的作用持续时间而受到极大关注。如本发明中使用的,术语“脂质体”指由配置在球形双层或双层中的两亲脂质构成的囊泡。

[0772] 脂质体包含单层或多层囊泡,其具有自亲脂性材料形成的膜及水性内部。水性部分含有待递送的组合物(例如,iRNA)。亲脂性材料将水性内部与水性外部隔离,其通常不包含iRNA组合物,但在一些实例中,其可包含。阳离子脂质体拥有能够融合至细胞壁的优点。非阳离子脂质体虽然不能与细胞壁高效融合,但活体内藉由巨噬细胞吸收。

[0773] 为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在合适的经皮梯度影响下穿过一系列细孔,各细孔直径小于50纳米。因此,需要使用高度可变形且能够穿过此类细孔隙的脂质体。

[0774] 脂质体适用于将活性成分转化至作用部位及将其递送至作用部位。由于脂质体膜在结构上类似于生物膜,当将脂质体应用于组织时,脂质体开始与细胞膜合并,且随着脂质体及细胞的合并进展,将脂质体内含物被排放至活性剂可起作用的细胞中。

[0775] 脂质体调配物作为许多药物的递送模式而已成为广泛调查的重点。有不断增长的证据表明,对于局部施用,脂质体与其他调配物相比呈现若干优点。此类优点包含与全身性高度吸收所施用药物有关的副作用降低、所施用药物在所需目标下的累积量增加、及向皮肤施用亲水性及疏水性两者的广泛多种药物的能力。

[0776] 若干报导已详述脂质体将包含高分子量DNA的药剂递送至皮肤中的能力。已将包含镇痛剂、抗体、激素及高分子量DNA的化合物施用至皮肤。大多数应用导致靶向上表皮。

[0777] 含有iRNA剂的脂质体可藉由多种方法制备。在一实例中,脂质体的脂质组分溶解于洗涤剂中,使得微胞与脂质组分形成。举例而言,脂质组分可为两亲阳离子脂质或脂质共轭物。界面活性剂可具有高临界微胞浓度且可为非离子的。例示性洗涤剂包含胆盐、CHAPS、辛基葡萄糖苷、脱氧胆酸盐及月桂酰肌胺酸。接着将iRNA剂制备添加至包含脂质组分的微胞中。脂质上的阳离子基团与iRNA剂相互作用且围绕iRNA剂冷凝以形成脂质体。在冷凝之后,例如藉由透析移除界面活性剂,以产生iRNA剂的脂质体制备。

[0778] 必要时,可在冷凝反应期间添加辅助冷凝的载体化合物,例如藉由受控添加。举例而言,载体化合物可为核酸(例如精胺或亚精胺)以外的聚合物。pH还可经调节以有利于冷凝。

[0779] 用于产生将聚核苷酸/阳离子脂质复合物并入作为递送媒剂的结构组分的稳定聚核苷酸递送媒剂的方法进一步描述于例如WO 96/37194中,其全部内容以引用的方式并入本文中。脂质体形成还可包含描述于以下示例方法的一个或多个方面:Felgner,P.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA8:7413-7417,1987;美国专利第4,897,355号;美国专利第5,171,678号;Bangham等人,M.Mol.Biol.23:238,1965;Olson等人,Biochim.Biophys.Acta 557:9,1979;Szoka等人,Proc.Natl.Acad.Sci.75:4194,1978;Mayhew等人,Biochim.Biophys.Acta 775:169,1984;Kim等人,Biochim.Biophys.Acta 728:339,1983;及Fukunaga等人,Endocrinol.115:757,1984。用于制备用作递送媒剂的适当大小的脂质聚集体的常用技术包含音波处理及冻融加挤出(参见例如Mayer等人,Biochim.Biophys.Acta 858:161,1986)。当始终如一地小(50至200纳米)且需要相对均匀的聚集物时,可使用微氟化(Mayhew等人,Biochim.Biophys.Acta 775:169,1984)。这些方法易于适合于将iRNA剂制备物封装至脂质体中。

[0780] 脂质体分成两个广泛的类别。阳离子脂质体为带正电荷的脂质体,其与带负电荷的DNA分子相互作用以形成稳定复合物。带正电DNA/脂质体复合物结合至带负电荷的细胞表面且内化于胞内体中。由于胞内体内为酸性pH,脂质体被破坏,将其内容物释放至细胞质中(Wang等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.,1987,147,980-985)。

[0781] pH值敏感或带负电荷、截留DNA而非与其复合的脂质体。由于DNA及脂质两者皆带类似电荷,因此发生排斥而非复合物形成。尽管如此,一些DNA截留于那些脂质体的水性内部中。pH敏感性脂质体已用于将编码胸苷激酶基因的DNA递送至培养物中的细胞单层。在目标细胞中侦测到外源性基因的表达(Zhou等人,Journal of Controlled Release,1992,19,269-274)。

[0782] 一种主要类型的脂质体组合物包含除了天然衍生的磷脂酰胆碱以外的磷脂。中性脂质体组合物,例如,可由二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由双十四酰磷脂酰甘油形成,而阴离子膜融合脂质体主要由二油基磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)形成,诸如大豆PC及卵PC。另一类型由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物形成。

[0783] 将脂质体活体外及活体内引入细胞中的其他方法的实例包含美国专利第5,283,185号及第5,171,678号;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;Felgner,J.Biol.Chem.269:2550,1994;Nabel,Proc.Natl.Acad.Sci.90:11307,1993;Nabel,Human Gene Ther.3:649,1992;Gershon,Biochem.32:7143,1993;及Strauss EMBO J.11:417,1992。

[0784] 还已检查非离子脂质体系统以确定其在将药物递送至皮肤中的效用,具体而言,包括有非离子界面活性剂及胆固醇的系统。使用包括有Novasome™ I(甘油基二月桂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)及Novasome™II(甘油基二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子脂质体调配物被用于将环孢素-A递送至小鼠皮肤的真皮中。结果表明,此类非离子脂质体系统有效促进环孢素-A沉积至不同皮肤层中(Hu等人,S.T.P.Pharma.Sci.,1994,4,6,466)。

[0785] 脂质体还包含“空间稳定”脂质体,如本文所用,该术语指当并入脂质体中时包括有一种或多种特殊脂质的脂质体,相对于缺乏此类特殊脂质的脂质体,导致循环寿命增强。空间上稳定的脂质体实例为那些在脂质体形成囊泡的脂质部分中,(A)包括一种或多种配糖脂,如:单唾液酸神经节苷脂$G_{M1}$,或(B)经过一种或多种亲水性聚合物衍化,诸如聚乙二醇(PEG)部分。尽管不希望受任何特定理论束缚,但本领域中认为,至少针对包含神经节苷脂、鞘磷脂或PEG-衍生的脂质的空间上稳定的脂质体,增强这些空间上稳定的脂质体的循环半衰期可以减少吸收进入细胞的网状内皮系统(RES)(Allen等人,FEBS Letters,1987,223,42;Wu等人,Cancer Research,1993,53,3765)。

[0786] 包括有一种或多种糖类的各种脂质体为本技术领域中已知的。Papahadjopoulos等人(Ann.N.Y.Acad.Sci.,1987,507,64)报导了单唾液酸神经节苷脂$G_{M1}$、半乳糖脑苷硫酸盐及磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半衰期的能力。此等发现由Gabizon等人(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1988,85,6949)详细阐述。美国专利的第4,837,028号及WO 88/04924号(皆为Allen等人)中皆公开包括有(1)神经鞘磷脂及(2)神经节苷酸$G_{M1}$或半乳糖脑苷硫酸酯的脂质体。美国专利第5,543,152号(Webb等人)公开包括有神经鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱的脂质体揭示于WO 97/13499(Lim等人)中。

[0787] 在一些实施例中,使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优势。非阳离子脂质体尽管不能与浆膜高效融合,但活体内藉由巨噬细胞吸收且可用于将iRNA剂递送至巨噬细胞。

[0788] 脂质体的其他优点包含:获自天然磷脂的脂质体为生物兼容性且可生物降解的;脂质体可并入广泛范围的水及脂质溶性药物;脂质体可保护其内部隔室中的囊封iRNA免于代谢及降解(Rosoff,在"Pharmaceutical Dosage Forms,"Lieberman,Rieger及Banker(编辑),1988,第1卷,第245页)。制备脂质体调配物的重要考虑为脂质表面电荷、囊泡大小及脂质体的水性体积。

[0789] 带正电的合成性阳离子脂质:N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可用于形成小脂质体,其与核酸自发性交互反应,形成脂质-核酸复合物,其可再与组织培养细胞的细胞膜的带负电的脂质融合,造成传递RNAi剂(有关DOTMA及其使用DNA的方法的说明可参见例如:Felgner,P.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA8:7413-7417,1987与美国专利案第4,897,355号)。

[0790] DOTMA类似物1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基铵)丙烷(DOTAP)可与磷脂组合使用,以形成复合DNA的囊泡。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories,Gaithersburg,Md.)为将高阴离子核酸递送至包括带正电DOTMA脂质体的活组织培养细胞中的有效药剂,其与带负电聚核苷酸自发地相互作用以形成复合物。当使用带足够正电荷的脂质体时,在所得复合物上的净电荷还为正电。以此方式制备的带正电荷复合物自发地附接至带负电荷的细胞表面,与电浆膜融合,且将功能性核酸有效地递送至例如组织培养细胞中。另一市售阳离子脂质,1,2-双(油基氧基)-3,3-(三甲基铵)丙烷(“DOTAP”)(Boehringer Mannheim,印第安纳波利斯,印第安纳州)不同于DOTMA,因为油基部分藉由酯而非醚键联连接。

[0791] 其他所报导的阳离子脂质化合物包含那些已共轭各种不同部分的,包含例如羧基精胺,其已共轭两种脂质中的一种,且包含化合物如:5-羧基精胺基甘氨酸二-十八碳基酰胺(“DOGS”)(Transfectam™,Promega,麦迪逊,威斯康星州)与二棕榈酰基磷脂酰基乙醇胺5-羧基精胺基-酰胺(“DPPES”)(参见例如,美国专利案第5,171,678号)。

[0792] 另一阳离子脂质共轭物包含脂质与胆固醇的衍生化(“DC-Chol”),其已与DOPE组合调配成脂质体(参见Gao,X.及Huang,L.,Biochim.Biophys.Res.Commun.179:280,1991)。有报导提出由聚赖氨酸共轭DOPE制成的脂聚赖氨酸可以在血清的存在下有效转染(Zhou,X.等人,Biochim.Biophys.Acta 1065:8,1991)。对于某些细胞株,据称这些含有共轭阳离子脂质的脂质体展现较低毒性且提供比含DOTMA的组合物更有效的转染。其他市售阳离子脂质产物包含DMRIE及DMRIE-HP(Vical,La Jolla,加州)及Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology公司,盖瑟斯堡,马里兰州)。适用于递送寡核苷酸的其他阳离子脂质描述于WO 98/39359及WO 96/37194中。

[0793] 脂质体调配物尤其适用于局部施用,脂质体相对于其他调配物存在若干优点。此类优点包含与所施用药物的高全身性吸收相关的副作用降低、所施用药物在所需目标下的累积增加及向皮肤施用iRNA剂的能力。在一些实施方案中,脂质体用于将iRNA剂递送至表皮细胞,且还增强iRNA剂穿透至皮肤组织中,例如至皮肤中。举例而言,可以局部施加脂质体。药物调配成脂质体局部传递至皮肤的作用已有文献说明(参见例如,Weiner等人,Journal of Drug Targeting,1992,第2卷,405-410及du Plessis等人,Antiviral Research,18,1992,259-265;Mannino,R.J.及Fould-Fogerite,S.,Biotechniques 6:682-690,1988;Itani,T.等人,Gene 56:267-276.1987;Nicolau,C.等人,Meth.Enz.149:157-176,1987;Straubinger,R.M.及Papahadjopoulos,D.Meth.Enz.101:512-527,1983;Wang,C.Y.及Huang,L.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA84:7851-7855,1987)。

[0794] 还已检查非离子脂质体系统以确定其在将药物递送至皮肤中的效用,具体而言,包括有非离子界面活性剂及胆固醇的系统。使用包含Novasome™ I(甘油基二月桂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)及Novasome™II(甘油基二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子脂质体调配物将药物递送至小鼠皮肤的真皮中。此类具有iRNA剂的调

配物适用于治疗皮肤病病症。

[0795] 包含iRNA的脂质体可高度变形。此类变形性可使得脂质体能够穿透小于脂质体的平均半径的孔。举例而言,转移体为一类可变形脂质体。转移体可藉由将表面边缘活化剂,通常为界面活性剂,添加至标准脂质体组合物中来制备。包含iRNA的转移体可例如藉由感染皮下递送,以便将iRNA递送至皮肤中的角质细胞。为了跨越完整哺乳动物皮肤,脂质媒剂必须在适当经皮梯度影响下穿过一系列精细孔隙,各孔隙直径小于50纳米。另外,由于脂质特性,此等转移体可为自优化的(适应孔隙形状,例如在皮肤中)、自我修复且可频繁地达到其目标而无片段化,且通常自负载。

[0796] 适用于本发明的其他调配物描述于WO 2008/042973中。

[0797] 转移体为又另一类型的脂质体且为高度可变形的脂质聚集体,其为药物递送媒剂的有吸引力的候选物。转移体可描述为脂质液滴,其为高度可变形,使得其能够容易穿透小于液滴的孔隙。转移体可适应其使用环境,例如其自优化(适应皮肤中的孔隙的形状)、自我修复、通常达成其目标而无碎片,且通常自负载。为了制造转移体,有可能将表面边缘活化子,通常为界面活性剂,添加至标准脂质体组合物中。转移体已用于将血清白蛋白递送至皮肤。已显示出血清白蛋白的转移体介导的递送与皮下注射含有血清白蛋白的溶液一样有效。

[0798] 在诸如乳液(包含微乳液)及脂质体的调配物中发现界面活性剂的广泛应用。对许多不同类型界面活性剂的特性进行分类和排序最常见的方式,在天然及合成两者中,为使用亲水性/亲脂性平衡(HLB)。亲水性基团(还称为“头部”)的性质提供用于分类调配物中所使用的不同界面活性剂的最有用方法(Rieger,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,1988,第285页)。

[0799] 若界面活性剂分子未经离子化,则将其分类为非离子性界面活性剂。发现非离子型界面活性剂在医药及化妆品中广泛应用且可用于广泛范围的pH值。一般而言,其HLB值在2至约18范围内,视其结构而定。非离子界面活性剂包含非离子酯,诸如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、山梨糖醇酯、蔗糖酯及乙氧基化酯。非离子烷酰胺及醚,诸如脂肪醇乙氧基酸酯、丙氧基醇及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物还包含在此类别中。聚氧乙烯界面活性剂为非离子界面活性剂类别中最受欢迎的成员。

[0800] 若当界面活性剂分子在溶解或分散于水中时携带负电荷,则界面活性剂被分类为阴离子。阴离子界面活性剂包含羧酸盐,诸如肥皂、酰基乳酰乳酸盐、氨基酸的酰胺类、硫酸的酯类如烷基硫酸盐及氧乙烯基烷基硫酸酯、磺酸盐,诸如如烷基苯磺酸盐、酰基羟乙磺酸盐、酰基牛磺酸盐及磺基琥珀酸盐及磷酸盐。阴离子界面活性剂类别中的最重要成员为烷基硫酸盐及肥皂。

[0801] 若该界面活性分子携带正电荷,当其溶解或分散于水中时,则该界面活性剂分类为阳离子。阳离子界面活性剂包含四级铵盐及乙氧基化胺。四级铵盐是此类别中最常使用的成员。

[0802] 若界面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,则该界面活性剂被分类为两性。两性界面活性剂包含丙烯酸衍生物、经取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱及磷化物。

[0803] 已评论界面活性剂在药品、调配物及乳液中的用途(Rieger,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,1988,第285页)。

[0804] 用于本发明的方法中的iRNA还可被提供为微胞调配物。“微胞”在本文中定义为特定种类的分子组装体由两性分子排列为球状结构,其分子的疏水性部分朝内,留下亲水性部分与周围水相接触。如果环境为疏水性的,则存在相反的配置。

[0805] 适合透过经皮薄膜递输混合微胞制剂可利用混合iRNA水溶液、$C_8$至$C_{22}$烷基硫酸碱金族盐类及微胞成型化合物来制备。例示性微胞形成化合物包含卵磷脂、玻尿酸、医药学上可接受的玻尿酸盐类、甘醇酸、乳酸、洋甘菊萃取物、小黄瓜萃取物、油酸、亚麻油酸、次亚麻油酸、单油酸甘油酯、单油酸酯类、单月桂酸酯类、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基侧氧基胆烷甘氨酸及其医药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚及其类似物、聚多卡醇烷基醚类及其类似物、鹅脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐及其混合物。可同时或在添加碱金属烷基硫酸盐之后添加微胞形成化合物。混合微胞将会形成于基本上任何种类的组成成分混合时,但剧烈混合是为了提供较小尺寸的微胞。

[0806] 在一方法中,制备含有RNAi及至少碱金属烷基硫酸盐的第一微胞组合物。第一个微胞组合物接着与至少三种微胞成型化合物混合以形成混合微胞组合物。在另一方法中,微胞组合物藉由混合RNAi、碱金属烷基硫酸盐及微胞形成化合物中的至少一种,随后在剧烈混合下添加剩余微胞形成化合物来制备。

[0807] 可将酚或间-甲酚添加至混合微胞组合物中以稳定调配物且预防细菌生长。或者,酚或间对甲酚可与微胞形成成分一起添加。还可在形成混合微胞组合物之后添加等张剂,诸如甘油。

[0808] 为了以喷雾形式递送微胞调配物,可将调配物放入气溶胶分配器中且向分配器装填推进剂。在压力下,推进剂在分配器中为液体形式。调整成分的比率,使得水相及推进剂相变成一个,也即有一个相。若有两个相,则必需在分配一部分内容物之前振荡分配器,例如通过计量阀。所分配的医药剂剂量以细雾自计量阀推进。

[0809] 助剂可包含含氢氯氟碳、含氢氟碳、二甲基醚及二乙醚。在某些实施例中,可使用HFA134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0810] 基本成分的特定浓度可藉由相对简单的实验来测定。对于通过口腔的吸收,通常希望增加例如至少两倍或三倍的剂量,以通过胃肠道注射或施用。

[0811] B.脂质颗粒

[0812] 本发明的iRNA例如dsRNA剂可完全囊封于脂质调配物中,例如LNP或其他核酸-脂质颗粒中。

[0813] 如本文所用,术语“LNP”指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质及防止颗粒聚集的脂质(例如PEG-脂质共轭物)。LNP对于全身性应用非常有用,因为其在静脉内(i.v.)注射之后展现延长的循环寿命且积聚在远程位点(例如,与施用位点物理上分离的位点)。如本文所用,术语“SPLP”指包括有囊封于脂质囊泡内的质体DNA的核酸-脂质颗粒。LNP包含“pSPLP”,其包含如PCT公开案第WO 00/03683号中所阐述的囊封缩合剂-核酸复合物。本发明的颗粒通常具有约50纳米至约150纳米的平均直径,更通常约60纳米至约130纳米,更通常约70纳米至约110纳米,最通常约70纳米至约90纳米,且基本上无毒。此外,当存在于本发明的核酸-脂质颗粒中时,核酸在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。核酸-脂质颗粒及其制备方法揭示于例如美国专利第5,976,567号;第5,981,501号;第6,534,484号;第6,586,410号;第6,815,432号;及PCT公开案第WO 96/40964号中。

[0814] 在某些实施例中,脂质与药物比率(质量/质量比率)(例如脂质与dsRNA比率)将在约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。还考虑将中间至上述范围的范围视为本发明的一部分。

[0815] 阳离子脂质可为例如,N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(I-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基)丙基胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油基胺甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-吗啉基)丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基-N-哌基)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基侧氧基-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸盐)(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二碳烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二碳基)氨基)乙基)哌-1-基)乙基氮烷二基(azanediyl))十二碳-2-醇(Tech G1)、或其混合物。阳离子脂质可包括占颗粒中存在的总脂质约20mol%至约50mol%或约40mol%。

[0816] 在某些实施例中,化合物2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷可用于制备脂质-siRNA纳米颗粒。2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷的合成描述于2008年10月23日申请的美国临时专利申请案第61/107,998号中,其以引用的方式并入本文中。

[0817] 在某些实施例中,脂质-siRNA颗粒包含40%2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷:10%DSPC:40%胆固醇:粒度为63.0±20纳米及0.027siRNA/脂质比率的10%PEG-C-DOMG(摩尔百分比)。

[0818] 非阳离子脂质可为阴离子脂质或中性脂质,包含但不限于:二硬脂酰基磷脂酰基胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰基胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰基胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰基甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰基甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰基乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰基胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰基乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰基乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环已烷-1-羧酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、16-O-单甲基PE、16-O-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰基乙醇胺(SOPE)、胆固醇、或其混合物。若包含胆固醇的话,非阳离子脂质可占颗粒中存在的总脂质的约5mol%至约90mol%、约10mol%、或约58mol%。

[0819] 抑制颗粒聚集的共轭脂质可为例如聚乙二醇(PEG)-脂质,包含但不限于PEG-甘油

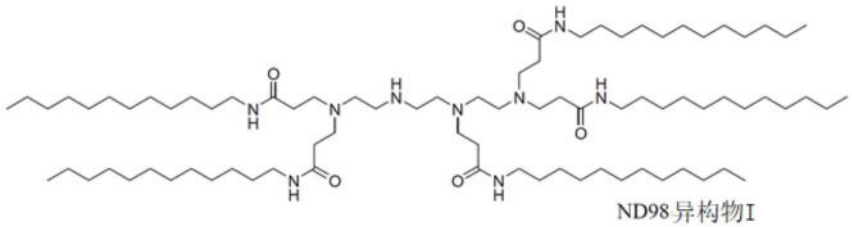
二酯(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂质、PEG-神经酰胺(Cer)、或其混合物。PEG-DAA共轭物可为例如PEG-二月桂酸辛烯基($Ci_2$)、PEG-二肉豆蔻氧基丙基($Ci_4$)、PEG-二棕榈基辛烯基($Ci_6$)或PEG-二硬脂酰辛烯基(C]$_8$)。预防颗粒聚集的共轭脂质可为占颗粒中存在的总脂质的0mol％至约20mol％或约2mol％。

[0820] 在一些实施例中,核酸-脂质颗粒还包含胆固醇,例如占颗粒中存在的总脂质的约10mol％至约60mol％或约48mol％。

[0821] LNP01

[0822] 在某些实施例中,可使用类脂质ND98·4HCl(MW 1487)(参见美国专利申请案第12/056,230号(申请日2008年3月26日,其揭示内容已以引用的方式并入本文中)、胆固醇(Sigma-Aldrich)、与PEG-神经酰胺C16(Avanti Polar Lipids)制备脂质-dsRNA纳米粒子(也即LNP01粒子)。乙醇中各者的原液可如下制备:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml,PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。ND98、胆固醇及PEG-神经酰胺C16原液溶液可随后以例如42:48:10摩尔比组合。组合的脂质溶液再与dsRNA水溶液(例如,乙酸钠溶液,pH 5)混合,使最终乙醇浓度为约35-45％,最终乙酸钠浓度为约100-300mM。脂质-dsRNA纳米颗粒通常在混合后自发形成。视所需粒度分布而定,所得纳米粒子混合物可使用,例如,热桶挤压机,诸如Lipex Extruder(Northern Lipids公司),经过聚碳酸酯膜(例如,截断值100纳米)挤压。在一些情况下,可略过挤出步骤。乙醇移除及同时缓冲液交换可藉由例如透析或切向流过滤来完成。缓冲液可在约pH 7下与例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)交换,例如约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3、或约pH 7.4。

[0823]




式 1

[0824] LNP01调配物描述于例如国际申请公开案第WO 2008/042973号中,其以引用的方式并入本文中。

[0825] 额外例示性脂质-dsRNA调配物提供于下表中。

[0826] 表A:例示性脂质调配物

[0827]

| | 阳离子脂质 | 阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质共轭物<br>脂质:siRNA 比率 |
|---|---|---|
| SNALP | l,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA) | DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4)<br>脂质:siRNA 约 7:1 |
| S-XTC | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷(XTC) | XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4<br>脂质:siRNA 约 7:1 |
| LNP05 | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷(XTC) | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5<br>脂质:siRNA 约 6:1 |
| LNP06 | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷(XTC) | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5<br>脂质:siRNA 约 11:1 |
| LNP07 | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基- | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG |

[0828]

| | | |
|---|---|---|
| | [1,3]-二氧戊烷(XTC) | 60/7.5/31/1.5,<br>脂质:siRNA 约 6:1 |
| LNP08 | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷(XTC) | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>60/7.5/31/1.5,<br>脂质:siRNA 约 11:1 |
| LNP09 | 2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷(XTC) | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA 10:1 |
| LNP10 | (3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊醚-5-胺(ALN100) | ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA 10:1 |
| LNP11 | (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七基-6,9,28, 31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸盐(MC3) | MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA 10:1 |
| LNP12 | 1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)二十二-2-醇(C12-200) | C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA 10:1 |
| LNP13 | XTC | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：33:1 |
| LNP14 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>40/15/40/5<br>脂质:siRNA：11:1 |
| LNP15 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG<br>50/10/35/4.5/0.5<br>脂质:siRNA：11:1 |
| LNP16 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：7:1 |
| LNP17 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：10:1 |
| LNP18 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：12:1 |
| LNP19 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG<br>50/10/35/5<br>脂质:siRNA：8:1 |
| LNP20 | MC3 | MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DPG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：10:1 |
| LNP21 | C12-200 | C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5 |

[0829]

| | | |
|---|---|---|
| | | 脂质:siRNA：7:1 |
| LNP22 | XTC | XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DSG<br>50/10/38.5/1.5<br>脂质:siRNA：10:1 |

[0830] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0831] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱

[0832] PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰甘油(C14-PEG或PEG-C14)(PEG平均分子量为2000)

[0833] PEG-DSG:PEG-苯乙烯甘油(C18-PEG或PEG-C18)(PEG平均分子量为2000)

[0834] PEG-cDMA:PEG-氨甲酰基-1,2-二肉豆蔻氧基丙基胺(PEG平均分子量为2000)

[0835] 包括有调配物的SNALP(1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))描述于2009年4月15日申请的国际公开案第WO2009/127060号中,其以引用的方式并入本文中。

[0836] 包括有调配物的XTC描述于例如2009年1月29日申请的美国临时案序号第61/148,366号;2009年3月2日申请的美国临时案序号第61/156,851号;2009年6月10日申请的美国临时案序号第61/185,712号;2009年7月24日申请的美国临时案序号第61/228,373号;2009年9月3日申请的美国临时案序号第61/239,686号;及2010年1月29日申请的国际专利申请案第PPCT/US2010/022614号,其以引用的方式并入本文中。

[0837] 包括有调配物的MC3描述于例如2009年9月22日申请的美国临时案序号第61/244,834号、2009年6月10日申请的美国临时案序号第61/185,800号及2010年6月10日申请的国际申请案第PCT/US10/28224号中,其以引用的方式并入本文中。

[0838] 包括有调配物的ALNY-100描述于例如,于2009年11月10日申请的国际专利申请案第PCT/US09/63933号,其以引用的方式并入本文中。

[0839] 包括有调配物的C12-200描述于2009年5月5日申请的美国临时案序号第61/175,770号及2010年5月5日申请的国际申请案第PCT/US10/33777号中,其以引用的方式并入本文中。

[0840] 用于经口施用的组合物及调配物包含粉末或颗粒、微粒、纳米微粒、悬浮液或水溶液或非水性介质、胶囊、凝胶胶囊、药囊、锭剂或微锭。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或黏合剂可为预期的。在一些实施例中,口服调配物为其中本发明表征的dsRNA与一种或多种渗透增强子界面活性剂及螯合剂共轭施用的那些调配物。合适的界面活性剂包含脂肪酸和/或其酯类或盐类、胆酸和/或其盐类。合适胆酸/盐类包含鹅脱氧胆酸(CDCA)与熊脱氧鹅脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡胆酸、甘胆酸、脱氧甘胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-褐霉酸钠与糖二氢褐霉酸钠。合适脂肪酸包含花生四烯酸、十一碳烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、甘油二月桂酸酯、甘油1-单癸酸酯、1-十二碳烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、或单酸甘油脂、二酸甘油脂或其医药上可接受的盐(例如:钠盐)。在一些实施例中,渗透加强子的组合与胆酸/盐组合使用,例如脂肪酸/盐。一种例示性组合为月桂酸、辛酸及UDCA的钠盐。其他渗透加强子包含聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-乙酰基醚。本发明中特征的DsRNA可经口递送,呈包含喷雾干燥颗粒的颗粒形式,或复合以形成微颗粒或纳米颗粒。DsRNA复合剂包含聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯;聚氧杂环丁烷;聚烷基氰基丙烯酸酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)及淀粉;聚烷基氰基丙烯酸酯;DEAE衍生的聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素及淀粉。合适复合剂包含几丁聚糖、N-三甲基几丁聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组胺酸、聚鸟胺酸、聚精胺、鱼精蛋白,聚乙烯吡啶、聚硫二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如:对氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸

酯)、聚(异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白与DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻酸盐、与聚乙二醇(PEG)。用于dsRNA的口服调配物及其制备详细描述于美国专利第6,887,906号、美国公开案第20030027780号及美国专利第6,747,014号中,其中的每一个以引用的方式并入本文中。

[0841] 供非经肠式、(脑)实质内、鞘内、脑室内或肝内投药的组合物与调配物可包含无菌水溶液,其中还可包含缓冲剂、稀释剂与其他合适添加剂,如,但不限于,渗透加强剂、载剂化合物与其他医药上可接受的载剂或赋形剂。

[0842] 本发明的医药组合物包含但不限于溶液、乳液及含脂质体的调配物。此等组合物可由包含但不限于预成型液体、自乳化固体及自乳化半固体的多种组分产生。尤其优选为当治疗诸如肝癌的肝病症时靶向肝脏的调配物。

[0843] 可方便地以单位剂型呈现的本发明的医药调配物可根据医药产业中熟知的常规技术制备。此类技术包含使活性成分与多个医药载体或多个赋形剂缔合的步骤。一般而言,调调配物的制法为均匀且密切组合活性成份液态载剂或细碎固态载剂或二者,然后若必要时,使产物成型。

[0844] 本发明的组合物可调配成许多可能剂型中的任一种,诸如但不限于锭剂、胶囊、明胶囊、液态糖浆、软明胶、栓剂与灌肠剂。本发明的组合物还可调配为水性、非水性或混合介质中的悬浮液。悬浮液可进一步含有增加悬浮液黏度的物质,包含例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮液还可含有稳定剂。

[0845] 包括有一种或多种亲水性聚合物衍生的脂质的许多脂质体及其制备方法为本领域中已知的。Sunamoto等人(Bull.Chem.Soc.Jpn.,1980,53,2778)描述包括有PEG部分的非离子界面活性剂$2C_{1215G}$的脂质体。Illum等人(FEBS Lett.,1984,167,79)注意到,将聚苯乙烯颗粒与聚乙二醇进行亲水性涂覆可显著增强血液半衰期。藉由附接聚亚烷基二醇的羧酸基(例如PEG)修饰的合成磷脂由Sears描述(美国专利第4,426,330号及第4,534,899号)。Klibanov等人(FEBS Lett.,1990,268,235)描述实验,其表明包括有以PEG或PEG硬脂酸酯衍生的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质体在血液循环半衰期中具有显著增加。Blume等人(Biochimica et Biophysica Acta,1990,1029,91)将此类观测结果延伸至由二硬脂酰基磷脂酰基乙醇胺(DSPE)与PEG的组合形成的其他PEG衍生的磷脂,例如DSPE-PEG。在其外表面上具有共价结合的PEG部分的脂质体描述于授予Fisher的欧洲专利第EP 0 445 131 B1号及WO 90/04384中。含有1至20摩尔百分比的以PEG衍生的PE的脂质体组合物及其使用方法描述于Woodle等人(美国专利第5,013,556号及第5,356,633号)及Martin等人(美国专利第5,213,804号及欧洲专利第EP 0 496 813 B1号)。包括有多种其他脂质聚合物共轭物的脂质体揭示于WO 91/05545及美国专利第5,225,212号(皆为Martin等人)中及在WO 94/20073(Zalipsky等人)中。包括有经PEG修饰的神经酰胺脂质的脂质体描述于WO 96/10391(Choi等人)中。美国专利第5,540,935号(Miyazaki等人)及美国专利第5,556,948号(Tagawa等人)描述可进一步用其表面上的功能部分衍生的含PEG脂质体。

[0846] 包括有核酸的多种脂质体为本技术领域中已知的。Thierry等人的WO 96/40062揭示在脂质体中囊封高分子量核酸的方法。美国专利Tagawa等人的第5,264,221号公开与蛋白质结合的脂质体,并主张此类脂质体的内含物可包含dsRNA。美国专利Rahman等人的第5,

665,710号描述在脂质体中囊封寡脱氧核苷酸的某些方法。Love等人的WO 97/04787揭示了包含靶向raf基因的dsRNA的脂质体。

[0847] C.额外调配物

[0848] i.乳液

[0849] 本发明的组合物可制备且调配为乳液。乳液通常为液相匀散在另一种直径通常不超过0.1μm的液滴形式中的典型不均相系统(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Idson,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第199页;Rosoff,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,New York,N.Y.,第1卷,第245页;Block,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第2卷,第335页;Higuchi等人,于Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing公司,Easton,Pa.,1985,第301页)。乳剂通常为双相系统,其包括有两个紧密混合且彼此分散的不可转移液相。一般而言,乳液可为油包水(w/o)或水包油(o/w)的变体。当水相呈小液滴均匀分布且分散在大体积的油相中时,所得组合物称为油包水性(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。乳液中除了分散相外,可再包含其他组分,且活性药物可呈溶液存在于水相、油相或本身另呈一相。视需要,医药赋形剂诸如乳化剂、稳定剂、染料及抗氧化剂还可存在于乳剂中。医药乳液还可为由超过两相组成的多相乳液,诸如例如,以油包水包油性(o/w/o)与水包油包水性(w/o/w)乳液为例。这些复合调配物通常提供简单二元乳液不具有的某些优点。多种乳液,其中油/水乳液的个别油滴围封小水滴构成水/油/水(w/o/w)乳液。同样,封闭于在油性连续相中稳定的水液珠中的小油滴系统提供o/w/o乳液。

[0850] 乳液表征为在于热力学稳定性极少或无热力学稳定性。通常,乳液的分散相或不连续相均匀分布在外相或连续相内,并利用乳化剂或调配物的黏度维持此型式。乳液的任一相可以为半固体或固体,如:乳液型油膏基质与乳霜。其他稳定乳液方式可以使用乳化剂,引进乳液的任一相中。乳化剂可广义分为四类:合成性界面活性剂、天然乳化剂、吸收基质、与均匀分散的固体(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Idson,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第199页)。

[0851] 合成界面活性剂,也称为界面活性剂,已广泛用于乳液的调配物,且已于文献中说明(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Rieger,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第285页;Idson,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,1988,第1卷,第199页)。界面活性剂通常为两亲的且包括亲水性及疏水性部分。亲水性与界面活性剂的疏水性性质的比率已称为亲水性/亲脂性平衡(HLB)且在调配物的制备中分类及选择

界面活性剂是有价值的工具。界面活性剂可依据亲水性基团性质分成不同类型:非离子性、阴离子性、阳离子性、与两亲性(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY Rieger,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第285页)。

[0852] 用于乳液调配物中的天然发生乳化剂包含羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂及阿拉伯胶。吸收碱具有亲水性特性,使得其可吸收水以形成水/油乳液,但仍保留其半固体组成性,诸如无水羊毛脂及亲水性凡士林。细粉状固体还用作良好乳化剂,尤其与界面活性剂及黏性制剂组合使用。这些物质包含极性无机固体,诸如重金属氢氧化物、不膨胀黏土,诸如膨润土、膨润土、硅藻土、高岭土、蒙脱石、硅酸胶体铝及硅酸胶体镁铝;颜料及非极性固体,诸如碳或甘油三硬脂酸酯。

[0853] 乳液调配物中还包含多种非乳化材料且有助于乳液的特性。那些包含脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、保湿剂、亲水性胶体、防腐剂及抗氧化剂(Block,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第335页;Idson,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第199页)。

[0854] 亲水性胶体或水胶体包含天然存在的胶体和合成聚合物,诸如多糖(例如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、卡拉胶、瓜尔胶、刺梧桐胶和黄芦荟胶)、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成聚合物(例如碳聚体、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。此等分散或膨胀于水中以形成胶体溶液,其藉由在分散相液滴周围形成强界面膜且藉由增加外部相的黏度来稳定乳液。

[0855] 由于乳液通常含有许多可容易支持微生物生长的成分,诸如碳水化合物、蛋白质、固醇及磷化物,因此那些调配物通常含有防腐剂。包含在乳液调配物中的常用防腐剂包含对羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、四级铵盐、苯苄基氯化铵、对羟基苯甲酸的酯及硼酸。抗氧化剂还通常添加至乳液调配物中,以预防调配物劣化。所使用的抗氧化剂可为自由基清除剂,诸如生育酚、烷基丙二醇、丁基化羟基大茴香醚、丁基化羟基甲苯或还原剂,诸如抗坏血酸及焦亚硫酸钠,及抗氧化剂协同剂,诸如柠檬酸、酒石酸及卵磷脂。

[0856] 乳液调配物经由皮肤病学、经口及非经肠途径的应用及其制造方法已在文献中综述(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Idson,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第199页)。用于经口传递的乳液调配物因为容易调配,且从吸收效力与生体可用率观点,已极广泛使用(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Rosoff,述于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第245页;Idson,于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第199页)。矿物油碱性缓释剂、油溶性维生素及高脂肪营养制剂为通常以油/水乳液形式经口服施用的材料之一。

[0857] ii.微乳液

[0858] 在本发明的一个实施例中,iRNA及核酸的组合物经调配为微乳液。微乳液可定义为由水、油与两亲物形成单一的光学上各向同性且热动力学上稳定的液体溶液的系统(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Rosoff,于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第245页)。通常,微乳液为藉由以下方式制备的系统:先让油分散在水性界面活性剂溶液中,然后添加足够量的第四组分(通常为中等链长的醇)以形成透明系统。因此,微乳液还称为两种不混溶液体的动力学上稳定的各向同性透明分散液,其利用表面活性分子的界面膜稳定化(Leung及Shah,于Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate Systems,Rosoff,M.编,1989,VCH Publishers,纽约,第185-215页)。微乳液通常经由包含油、水、界面活性剂、共界面活性剂及电解质的三至五个组分的组合来制备。微乳液为油包水(w/o)或水包油(o/w)型取决于所使用油及界面活性剂的性质及界面活性剂分子的极性头端与烃尾端的结构与几何堆栈而定(Schott,于Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing公司,Easton,Pa.,1985,第271页)。

[0859] 利用相态图的现象学方法已有深入研究,且已产生大量知识,让本领域技术人员了解如何调配微乳液(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,及Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),纽约,NY;Rosoff,于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,纽约,N.Y.,第1卷,第245页;Block,于Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger及Banker(编),1988,Marcel Dekker公司,New York,N.Y.,第1卷,第335页)。与常规乳液相比,微乳液提供溶解自发形成的热力学稳定液滴调配物中的非水溶性药物的优点。

[0860] 用于制备微乳液的界面活性剂包含但不限于,离子性界面活性剂、非离子性界面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚类、聚甘油脂肪酸酯类、单月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(MO310)、单油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、单癸酸十甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(MO750)、倍半油酸十甘油酯(SO750)、十油酸十甘油酯(DAO750),其可单独使用或与辅界面活性剂组合使用。共界面活性剂,通常为短链醇,如乙醇、1-丙醇、与1-丁醇,其藉由渗透表面膜,在界面活性剂分子之间产生空隙,因此造成无序膜,而提高界面流动性。然而,可在不使用共界面活性剂及无酒精自乳化微乳液系统的情况下制备微乳液为本领域中已知。水相通常可为但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇及乙二醇衍生物。油相可包含但不限于材料,诸如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中链(C8-C12)单、二及三酸甘油酯、聚氧乙基化甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚甘油化甘油酯、饱和聚乙二醇化C8-C10甘油酯、植物油及聚硅油。

[0861] 从药物溶解和增强药物吸收的角度来看,微乳液特别受关注。已提出基于脂质的微乳液(o/w与w/o两者)来加强药物(包含肽)的口服生物可用率(参见例如:美国专利案案第6,191,105号;第7,063,860号;第7,070,802号;第7,157,099号;Constantinides等人,Pharmaceutical Research,1994,11,1385-1390;Ritschel,Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.,1993,13,205)。微乳液提供的优点为改善药物溶解性、

保护药物免于酶水解、可能基于界面活性剂诱发改变膜流动性与通透性而加强药物吸收性、容易制备、比固态剂型容易经口投药、改善临床效力、及降低毒性(参见例如:美国专利案第6,191,105号;第7,063,860号;第7,070,802号;第7,157,099号;Constantinides等人,Pharmaceutical Research,1994,11,1385;Ho等人,J.Pharm.Sci.,1996,85,138-143)。通常,微乳液可在当其组分在环境温度下聚集在一起时自发地形成。当调配热稳定性药物、肽或iRNA时,这尤其有利。微乳液还有效在化妆品及医药应用中经皮递送活性组分。预期本发明微乳液组合物与调配物将可促进胃肠道提高iRNA与核酸的全身吸收性,并改善局部细胞吸收iRNA与核酸。

[0862] 本发明的微乳液还可含有额外组分及添加剂,诸如山梨糖醇酐单硬脂酸酯(Grill3)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)与渗透加强子,以改善调配物性质,及加强本发明iRNA与核酸的吸收性。用于本发明的微乳液中的渗透加强子可分为属于以下五种广泛类别之一:界面活性剂、脂肪酸,胆汁盐类、螯合剂与非螯合性非界面活性剂(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页)。上文已讨论这些类别中的每一种。

[0863] iii.微粒

[0864] 本发明的RNAi剂可并入颗粒中,例如微粒。微粒可藉由喷雾干燥产生,但还可藉由其他方法产生,包含冻干、蒸发、流体床干燥、真空干燥或此等技术的组合。

[0865] iv.渗透强化子

[0866] 在一实施例中,本发明采用各种渗透加强子以对动物的皮肤有效递送核酸,尤其iRNA。大部分药物以离子化及非离子化形式两者存在于溶液中。然而,通常只有脂质可溶性或亲脂性药物容易跨越细胞膜。已发现若待杂交的膜经渗透增强子处理,即使非亲脂性药物还可跨越细胞膜。除了帮助非亲脂性药物扩散于细胞膜之外,渗透增强子还增强亲脂性药物的渗透性。

[0867] 渗透增强子可分为属于五种广泛类别之一,也即界面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂及非螯合性非界面活性剂(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,纽约,NY,2002;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页)。下文更详细地描述上述提及的渗透加强子类别中的每一种。

[0868] 界面活性剂(或“表面活性剂”)是化学实体,当溶解于水溶液中时,其可以降低溶液的表面张力或水溶液与另一种液体之间的界面张力,从而增强iRNA通过黏膜的吸收。除了胆盐及脂肪酸之外,这些渗透增强子包含例如,月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚与聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,纽约,NY,2002;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页);与全氟化学乳液,诸如FC-43。Takahashi等人,J.Pharm.Pharmacol.,1988,40,252)。

[0869] 充当渗透增强子的各种不同脂肪酸与其衍生物包含例如:油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯(1-单油基-消旋性-甘油)、甘油二月桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二碳基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其$C_{1-20}$烷基酯(例如:甲基酯、异丙基酯与第三丁基

酯)、及其单酸-与二酸甘油酯(也即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等等)(参见例如,Touitou,E.等人,Enhancement in Drug Delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;El Hariri等人,J.Pharm.Pharmacol.,1992,44,651-654)。

[0870] 胆汁的生理性作用包含促进脂质与脂溶性维生素分散与吸收(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,纽约,NY,2002;Brunton,第38章:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第9版,Hardman等人编辑,McGraw-Hill,纽约,1996,第934-935页)。各种天然胆盐及其合成衍生物作为渗透加强子。因此,术语"胆盐"包含胆汁的任何天然存在的组分以及其任何合成衍生物。合适的胆盐包含例如,胆酸(或其医药上可接受的钠盐、胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡胆酸(葡胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、脱氧甘胆酸(脱氧甘胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢-褐霉酸钠(STDHF)、甘胺二氢褐霉酸钠与聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,纽约,NY,2002;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Swinyard,第39章:Remington'sPharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro编辑,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990,第782-783页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Yamamoto等人,J.Pharm.Exp.Ther.,1992,263,25;Yamashita等人,J.Pharm.Sci.,1990,79,579-583)。

[0871] 如与本发明结合使用,螯合剂可定义为可让溶液中金属离子与其形成复合物而藉以排除的化合物,结果可以藉此加强iRNA通过黏膜的吸收性。螯合剂在本发明中作为渗透增强子的相关用法中,其附加价值在于还可作为DNase抑制剂,因为大多数已判断特征的DNA核酸酶均需要二价金属离子,供进行催化作用,因此可被螯合剂抑制(Jarrett,J.Chromatogr.,1993,618,315-339)。合适的螯合剂包含但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(例如:水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐与高碳香兰酸盐)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、月桂基醚-9与β-二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺类)(参见例如,Katdare,A.等人,Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Buur等人,J.Control Rel.,1990,14,43-51)。

[0872] 如本文所用,非螯合性非界面活性剂渗透加强化合物可定义为已证实没有显著螯合剂或界面活性剂,但仍可加强iRNA通过消化道黏膜吸收的化合物(参见例如,Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33)。此类别的渗透增强子包含例如不饱和环状脲类、1-烷基-与1-烯基氮杂环-烷酮类衍生物(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页);及非类固醇消炎剂,诸如双氯芬酸钠、吲哚美辛与苯丁吡唑酮(Yamashita等人,J.Pharm.Pharmacol.,1987,39,621-626)。

[0873] 增强在细胞水平下iRNA的摄取的药剂还可添加至本发明的医药及其他组合物中。举例而言,阳离子脂质,诸如微脂体(Junichi等人,美国专利第5,705,188号)、阳离子甘油衍生物及多阳离子分子,诸如聚赖氨酸(Lollo等人,PCT申请号WO 97/30731)还已知增强dsRNA的细胞摄取。市售转染试剂的实例包括例如Lipofectamine™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Lipofectamine 2000™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、293fectin™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Cellfectin™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、DMRIE-C™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、FreeStyle™MAX(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Lipofectamine™2000CD(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Lipofectamine™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、RNAiMAX(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Oligofectamine™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、Optifect™(Invitrogen;Carlsbad,CA)、X-tremeGENE Q2转染试剂(Roche;Grenzacherstrasse,瑞士)、DOTAP脂质体转染试剂(Grenzacherstrasse,瑞士)、DOSPER脂质体转染试剂(Grenzacherstrasse,瑞士)、或Fugene(Grenzacherstrasse,瑞士)、Transfectam®试剂(Promega;Madison,WI)、TransFast™转染试剂(Promega;Madison,WI)、Tfx™-20试剂(Promega;Madison,WI)、Tfx™-50试剂(Promega;Madison,WI)、DreamFect™(OZ Biosciences;Marseille,法国)、EcoTransfect(OZ Biosciences;Marseille,法国)、TransPassa D1转染试剂(New England Biolabs;Ipswich,MA,USA)、LyoVec™/LipoGen™(Invitrogen;San Diego,CA,USA)、PerFectin转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、NeuroPORTER转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、GenePORTER转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、GenePORTER 2转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、Cytofectin转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、BaculoPORTER转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、TroganPORTER™转染试剂(Genlantis;San Diego,CA,USA)、RiboFect(Bioline;Taunton,MA,USA)、PlasFect(Bioline;Taunton,MA,USA)、UniFECTOR(B-Bridge International;Mountain View,CA,USA)、SureFECTOR(B-Bridge International;Mountain View,CA,USA),或HiFect™(B-Bridge International,Mountain View,CA,USA)等。

[0874] 可利用其他药剂来增强所施用核酸的穿透,包含诸如乙二醇及丙二醇的甘醇、诸如2-吡咯的吡咯、臭氧及诸如柠檬烯及薄荷酮的三萜。

[0875] v.载体

[0876] 本发明的某些组合物还将载体化合物并入调配物中。如本文所用,“载体化合物”或“载体”可指核酸或其类似物,其为惰性的(即,本身不具有生物活性),但其在活体内过程被识别为核酸,藉由降低具有生物活性的核酸的生物可用性,例如降解生物活性核酸或促进其从循环中移除。核酸及载体化合物的共施用通常与过量后者物质共同施用,可导致肝脏、肾脏或其他循环外储集器中回收的核酸量显著减少,此可能归因于载体化合物与用于常见受体的核酸之间的竞争。例如,在肝组织中,当部分硫代磷酸酯dsRNA与聚肌胞苷酸、硫酸葡聚糖、多胞苷酸或4-乙酰胺基-4'-异硫氰基-芪-2,2'-二磺酸同时施用时,部分硫代磷酸酯dsRNA的恢复可能会减少(Miyao等人,DsRNARes.Dev.,1995,5,115-121;Takakura等人,DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.,1996,6,177-183。

[0877] vi.赋形剂

[0878] 与载体化合物相比,“医药载体”或“赋形剂”为药学可接受的溶剂、悬浮剂或任何

其他用于将一种或多种核酸输送至动物的药理学惰性媒剂。赋形剂可为液体或固体且经选择的,其中考虑到所规划的施用方式,以便在与核酸及给定医药组合物的其他组分组合时提供所需体积、一致性等。典型医药载体包含但不限于黏合剂(例如,预糊化的玉米淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填料(例如,乳糖及其他糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、氧化硅、胶体二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、醋酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟基乙酸淀粉钠等);以及,润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0879] 适用于非经肠胃施用且不会与核酸有害地反应的医药学上可接受的有机或无机赋形剂还可用于调配本发明组合物。合适的医药学上可接受的载体包含但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉糖、硬脂酸镁、滑石、硅酸、黏性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯啶酮及其类似物。

[0880] 用于局部施用核酸的调配物可包含无菌及非无菌水溶液、常见溶剂中的非水性溶液,诸如醇,或核酸于液体或固体油碱中的溶液。溶液还可含有缓冲液、稀释剂及其他适合添加剂。可使用适用于非经肠施用且不会与核酸有害地反应的医药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0881] 合适的医药学上可接受的赋形剂包含但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉糖、硬脂酸镁、滑石、硅酸、黏性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯啶酮及类似物。

[0882] vii.其他组分

[0883] 本发明的组合物可另外含有在医药组合物中常规的其他辅助组分,其为其本领域所确立的使用量。因此,例如,组合物可含有额外、兼容的医药活性材料,如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可含有可用于物理上调配的本发明的组合物的多种剂型的额外材料,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂、及稳定剂。然而,此类物质在添加时不应过度干扰本发明组合物的组分的生物活性。所述调配物可经无菌化,且若需要,与不与该调配物的核酸进行有害相互作用的助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐类、缓冲剂、着色剂、芳香剂和/或芳族物质及其类似物混合。

[0884] 悬浮液可含有增加悬浮液黏度的物质,包含例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮液还可含有稳定剂。

[0885] 在一些实施例中,本发明特性化的医药组合物包括(a)一种或多种iRNA化合物及(b)一种或多种藉由非RNAi机制起作用且适用于治疗HSD17B13相关疾病、病症或病状的药剂。此类药剂的实例包括但不限于:吡哆醇、ACE抑制剂(血管收缩素转化酶抑制剂),例如贝那普利(洛汀新(Lotensin));血管收缩素II受体拮抗剂(ARB)(例如氯沙坦钾(losartan potassium),诸如Merck&Co.的Cozaar®),例如坎地沙坦(Candesartan)(坎地沙坦酯(Atacand));HMG-CoA还原酶抑制剂(例如他汀);钙黏合剂,例如纤维素磷酸钠(卡西本德(Calcibind));利尿剂,例如噻嗪(thiazide)利尿剂,诸如氢氯噻嗪(麦口嗪(Microzide));胰岛素敏化剂(诸如PPARγ促效剂吡格列酮)、glp-1r促效剂(诸如利拉伐他汀)、维生素E、SGLT2抑制剂、DPPIV抑制剂及肾脏/肝脏移植物;或前述中的任一个的组合。

[0886] 此类化合物的毒性及治疗功效可藉由细胞培养物或实验动物中的标准医药程序来测定,例如用于测定$LD_{50}$(对50%群体致死的剂量)及$ED_{50}$(对50%群体治疗有效的剂量)。

毒性与治疗作用之间的剂量比率为治疗指数且其可表示为$LD_{50}/ED_{50}$的比率。展现高治疗指数的化合物为优选的。

[0887] 自细胞培养分析及动物研究获得的数据可用于调配供人类使用的剂量范围。本发明表征的组合物的剂量一般在包含具有极小毒性或无毒性的$ED_{50}$的循环浓度范围内。该剂量可视所用剂型及所用施用途径而在此范围内变化。对于用于本发明中表征的方法中的任何化合物,治疗学上有效剂量可最初由细胞培养分析来估计。可调配用于动物模型以达成循环血浆浓度范围的化合物剂量,或当适宜时,目标序列的多肽产物的剂量(如,达成降低多肽浓度),该剂量包含于细胞培养物中测定的$IC_{50}$(也即,测试化合物达成对症状的半数最大抑制的浓度)。此信息可用于更准确地确定在人类中的适用剂量。可藉由例如高效液相层析法测量血浆中的水平。

[0888] 除其施用以外,如上文所论述,本发明特性化的iRNA可与有效治疗由HSD17B13表达介导的病理过程的其他已知药剂组合施用。无论如何,施用医师可基于使用本领域中已知或本文所描述的功效标准测量所观测到的结果来调整iRNA施用的水平及时间。

[0889] 合成阳离子脂质:

[0890] 用于本发明表征的核酸-脂质颗粒中的化合物中的任一个,例如阳离子脂质及其类似物可藉由已知有机合成技术制备。除非另外指示,否则所有取代基如下文所定义。

[0891] “烷基”意指含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状饱和脂族烃。代表性饱和直链烷基包含甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及其类似者;而饱和支链烷基包含异丙基、二级丁基、异丁基、三级丁基、异戊基及其类似者。代表性饱和环状烷基包含环丙基、环丁基、环戊基、环己基及类似物;而不饱和环状烷基包含环戊烯基及环己烯基及类似物。

[0892] “烯基”指如上所定义的烷基,其在相邻的碳原子之间含有至少一个双键。烯基包含顺式及反式异构体两者。代表性直链及支链烯基包含乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及其类似者。

[0893] “炔基”意指任何如上所定义的烷基或烯基,其另外在相邻碳之间含有至少一个三键。代表性直链及支链炔基包含乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1丁炔基及其类似者。

[0894] “酰基”意指任何烷基、烯基或炔基,其中在连接点处的碳经侧氧基取代,如下所定义。举例而言,-C(=O)烷基、-C(=O)烯基及-C(=O)炔基为酰基。

[0895] “杂环”意指5至7元环、或7至10元双环、杂环,其为饱和、不饱和或芳族,且其含有1或2个独立地选自于氮、氧及硫的杂原子,且其中氮及硫杂原子可选择地被氧化,且氮杂原子可视情况经四元化,包含上述杂环中的任一种与苯环融合的双环。杂环可经由任何杂原子或碳原子附接。杂环包含如下文所定义的杂芳基。杂环包含吗啉基、吡咯啶酮基、吡咯啶基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、氧杂环丙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢硫苯基、四氢噻喃基及其类似者。

[0896] 术语“任选经取代的烷基”、“任选经取代的烯基”、“任选经取代的炔基”、“任选经取代的酰基”及“任选经取代的杂环”意指当经取代时,至少一个氢原子经取代基置换。在侧

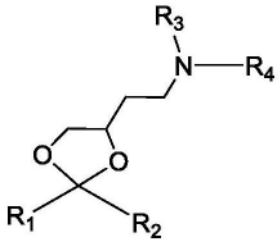
氧基取代基(=O)的情况下,置换两个氢原子。就此而言,取代基包含侧氧基、卤素、杂环、-CN、-$OR^x$、-$NR^xR^y$、-$NR^xC(=O)R^y$、-$NR^xSO_2R^y$、-$C(=O)R^x$、-$C(=O)OR^x$、-$C(=O)NR^xR^y$、-$SO_nR^x$及-$SO_nNR^x$ $R^y$,其中n为0、1或2,$R^x$及$R^y$相同或不同且独立地为氢、烷基或杂环,且所述烷基及杂环取代基中的每一个可进一步经侧氧基、卤素、-OH、-CN、烷基、-$OR^x$、杂环、-$NR^xR^y$、-$NR^xC(=O)R^y$、-$NR^xSO_2R^y$、-$C(=O)R^x$、-$C(=O)OR^x$、-$C(=O)NR^xR^y$、-$SO_nR^x$及-$SO_nNR^xR^y$中的一个或多个取代。

[0897] “卤素”指氟、氯、溴及碘。

[0898] 在一些实施例中,本发明中表征的方法可能需要使用保护基。保护基团方法学为本领域技术人员所熟知(参见例如,PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,Green,T.W.等人,Wiley-Interscience,纽约市,1999)。简言之,本发明内文中的保护基团为降低或消除官能基的不期望反应性的任何基团。可将保护基添加至官能基以在某些反应期间掩蔽其反应性,然后接着移除以显露原始官能基。在一些实施例中,使用“醇保护基”。“醇保护基”为降低或消除醇官能基团的不期望反应性的任何基团。可使用本技术领域中熟知的技术添加及移除保护基。

[0899] 合成式A:

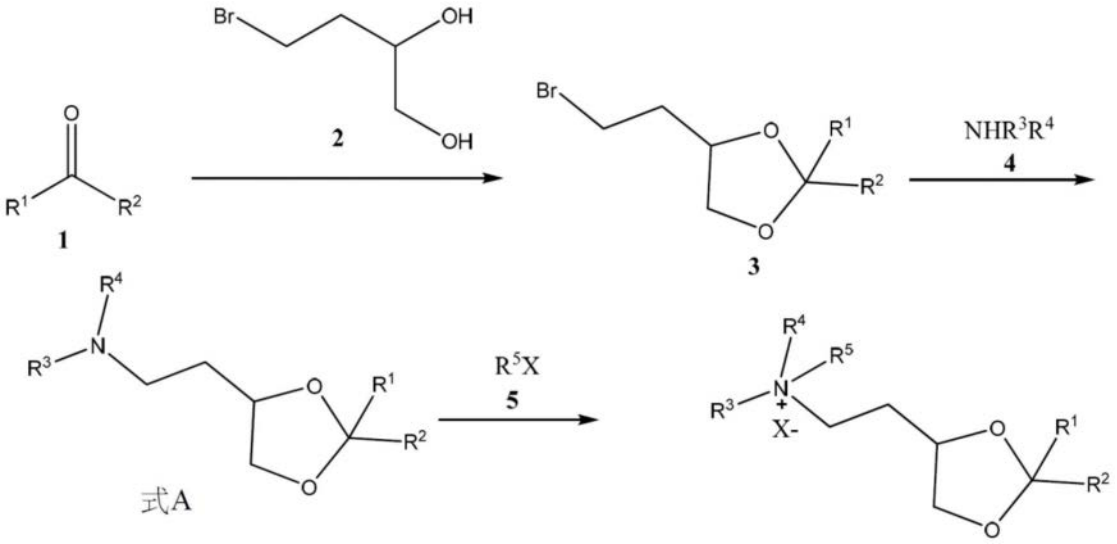
[0900] 在某些实施例中,本发明表征的核酸-脂质颗粒使用式A的阳离子脂质调配:

[0901] 

,

[0902] 其中R1及R2独立地为烷基、烯基或炔基,各自可任选经取代,且R3及R4独立地为较低烷基,或R3及R4可一起形成任选经取代的杂环。在一些实施例中,阳离子脂质为XTC(2,2-二亚麻基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷)。一般而言,上文式A的脂质可藉由以下反应流程1或2制备,其中除非另外指示,否则所有取代基如上文所定义。

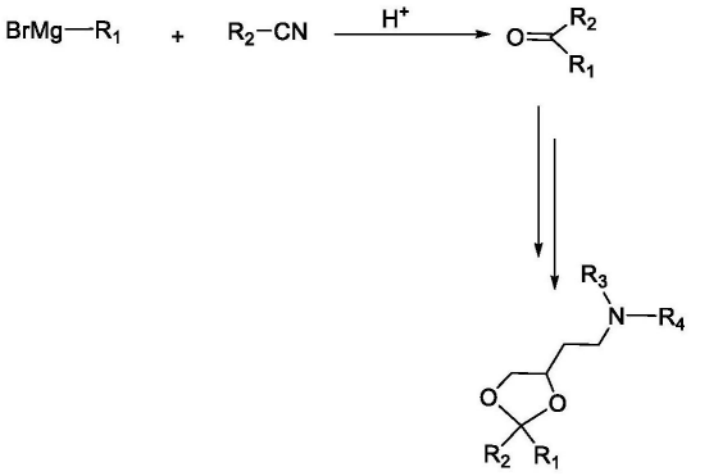
[0903] 方案1

[0904] 


[0905] 脂质A,其中$R_1$及$R_2$独立地为烷基、烯基或炔基,各自可选择地经取代,且$R_3$及$R_4$独

立地为低级烷基,或者$R_3$及$R_4$可一起形成选择地经取代的杂环,可根据流程1来制备。酮1及溴化物2可根据本领域普通技术人员已知的方法购买或制备。反应1及2产生酮3。用胺4处理酮3产生式A的脂质。式A的脂质可用式5的有机盐转化为对应铵盐,其中X为选自卤素、氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐或其类似物的阴离子相对离子。

[0906] 方案2

[0907] 

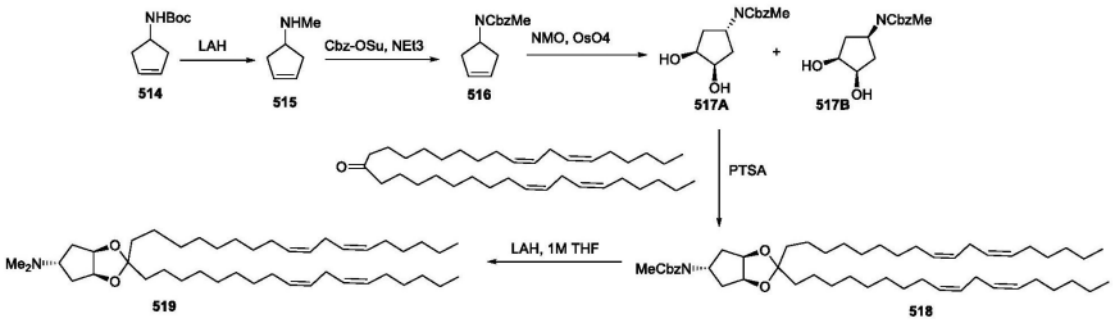

[0908] 或者,可根据方案2制备酮1起始材料。格氏药剂6及氰化物7可根据本领域普通技术人员者已知的方法购买或制备。反应6及7产生酮1。酮1转化为式A的对应脂质如方案1中所描述。

[0909] 合成MC3:

[0910] 制备DLin-M-C3-DMA(也即,(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸盐)如下。在室温下搅拌(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七基-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53克)、4-N-二甲基氨基丁酸盐酸盐(0.51克)、4-N-二甲基氨基吡啶(0.61克)及1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(0.53克)于二氯甲烷(5毫升)中的溶液至隔夜。溶液用稀释盐酸洗涤,随后用稀释碳酸氢钠水溶液洗涤。有机部分经无水硫酸镁干燥、过滤且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1-5%甲醇/二氯甲烷溶离梯度使残余物通过硅胶管柱(20g)。合并含有纯化产物的部分且移除溶剂,得到无色油(0.54g)。

[0911] 合成ALNY-100:

[0912] 使用以下方案3进行酮519[ALNY-100]的合成:

[0913] 


[0914] 合成515:

[0915] 于0℃在氮气气氛下向双颈RBF(1升)中的LiAlH4(3.74克,0.09852摩尔)于200毫升无水THF中的搅拌悬浮液中缓慢添加514(10克,0.04926摩尔)于70mL THF中的溶液。在添加完成之后,使反应混合物升温至室温且接着加热至回流持续4小时。藉由TLC监测反应进

程。反应完成后(藉由TLC),将混合物冷却至0℃且藉由谨慎添加饱和Na2SO4溶液淬灭。在室温下搅拌反应混合物4小时且过滤掉。用THF充分洗涤残余物。将滤液及洗涤液混合且用400毫升二噁烷及26mL浓HCl过滤且在室温下搅拌20分钟。在真空下剥除挥发性,得到呈白色固体状的515的盐酸盐。产量:7.12g 1H-NMR(DMSO,400MHz):δ=9.34(宽峰,2H),5.68(s,2H),3.74(m,1H),2.66-2.60(m,2H),2.50-2.45(m,5H).

[0916] 合成516:

[0917] 向250mL双颈RBF中的100mL干DCM中的化合物515搅拌溶液添加NEt3(37.2毫升,0.2669摩尔)且在氮气氛围下冷却至0℃。在将N-(苯甲氧基-羰基氧基)-琥珀酰亚胺(20克,0.08007摩尔)缓慢添加于50mL无水DCM中后,使反应混合物升温至室温。反应完成后(藉由TLC的2-3小时),将混合物依序用1N HCl溶液(1x 100mL)及饱和$NaHCO_3$溶液(1x 50mL)洗涤。接着,在无水条件下干燥有机层。$Na_2SO_4$及溶剂蒸发,得到粗材料,该粗材料藉由硅胶管柱层析纯化,得到516为黏性块状物。产量:11克(89%)。1H-NMR(CDCl3,400MHz):δ=7.36-7.27(m,5H),5.69(s,2H),5.12(s,2H),4.96(br.,1H)2.74(s,3H),2.60(m,2H),2.30-2.25(m,2H).LC-MS[M+H]-232.3(96.94%).

[0918] 合成517A及517B:

[0919] 在单颈500mL RBF中将环戊烯516(5g,0.02164mol)溶解于220mL丙酮及水(10:1)的溶液中,且在室温下向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g,0.06492mol),随后添加于三级丁醇中的4.2mL的7.6% OsO4(0.275g,0.00108mol)溶液。反应完成后(约3小时),藉由添加固体$Na_2SO_3$来淬灭混合物且在室温下搅拌所得混合物1.5小时。反应混合物用DCM(300mL)稀释且用水(2x 100mL)洗涤、接着用饱和$NaHCO_3$(1x 50mL)溶液、水(1x 30mL)洗涤且最后用盐水(1x 50mL)洗涤。有机相经$Na_2SO_4$干燥,且在真空中移除溶剂。以硅胶管柱层析纯化粗制材料,得到非对映异构体混合物,其藉由制备型HPLC分离。产量:-6克粗制517A-峰-1(白色固体),5.13克(96%)。1H-NMR(DMSO,400MHz):δ=7.39-7.31(m,5H),5.04(s,2H),4.78-4.73(m,1H),4.48-4.47(d,2H),3.94-3.93(m,2H),2.71(s,3H),1.72-1.67(m,4H).LC-MS-[M+H]-266.3,[M+NH4+]-283.5存在,HPLC-97.86%.藉由X射线确认立体化学。

[0920] 合成518:

[0921] 使用化合物505的合成中所述的类似程序,得到呈无色油状的化合物518(1.2g,41%)。1H-NMR(CDCl3,400MHz):δ=7.35-7.33(m,4H),7.30-7.27(m,1H),5.37-5.27(m,8H),5.12(s,2H),4.75(m,1H),4.58-4.57(m,2H),2.78-2.74(m,7H),2.06-2.00(m,8H),1.96-1.91(m,2H),1.62(m,4H),1.48(m,2H),1.37-1.25(br m,36H),0.87(m,6H)。HPLC-98.65%。

[0922] 合成化合物519的通用程序:

[0923] 将化合物518(1eq)于己烷(15mL)中的溶液以逐滴方式添加至于THF(1M,2eq)中的LAH冰冷溶液中。在完全添加之后,在40℃下加热混合物0.5小时,接着在冰浴上再次冷却。将混合物小心以饱和水性$Na_2SO_4$水解,接着通过Celite®过滤并还原成油状物。管柱层析获得呈无色油状的纯519(1.3克,68%)。13C NMR=130.2,130.1(x2),127.9(x3),112.3,79.3,64.4,44.7,38.3,35.4,31.5,29.9(x2),29.7,29.6(x2),29.5(x3),29.3(x2),27.2(x3),25.6,24.5,23.3,226,14.1;电喷雾MS(+ve):C44H80NO2(M+H)+的分子量计算值654.6,实验值654.6。

[0924] 藉由标准或无挤出方法制备的调配物可以类似方式来表征。举例而言,调配物通常藉由目视检查表征。他们应为白色半透明溶液,无聚集物或沉淀物。脂质-纳米颗粒的粒度及粒度分布可藉由使用例如Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern,美国)的光散射来测量。颗粒大小应为约20-300纳米,诸如40-100纳米。粒度分布应是单峰的。使用染料排阻分析预估调配物中的总dsRNA浓度以及截留部分。经调配dsRNA的样品可与RNA结合染料一起培育,诸如RiboGreen® (Molecular Probes),在存在或不存在破坏界面活性剂的调配物,例如0.5% Triton-X100。调配物中的总dsRNA可藉由来自含有界面活性剂的样品相对于标准曲线的信号来测定。截留部分藉由自总dsRNA水平减去"游离"dsRNA水平(如藉由在缺界面活性剂下的信号所测量)来测定。截留dsRNA的百分比通常>85%。对于SNALP调配物,粒度为至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm及至少120nm。该合适范围通常约至少50纳米至约至少110纳米、约至少60纳米至约至少100纳米、或约至少80纳米至约至少90纳米。

[0925] VII.套组

[0926] 本发明还提供用于进行本发明方法中的任一个的套组。此类套组包括一钟或多种RNAi剂及使用说明书,例如藉由使细胞与有效抑制HSD17B13表达的量的本发明的RNAi剂或医药组合物接触来抑制细胞中的HSD17B13表达的说明书。套组可视情况进一步包含用于使细胞与RNAi剂(例如,注射装置)接触的构件,或用于测量HSD17B13抑制的构件(例如,用于测量HSD17B13 mRNA和/或HSD17B13蛋白质抑制的构件)。用于测量HSD17B13抑制的此类构件可包含用于自个体获得样品,诸如血浆样品的构件。本发明的套组可视情况进一步包括用于向个体施用RNAi剂的构件或用于测定治疗有效或预防有效量的构件。

[0927] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术及科学术语具有与本发明所属的本领域普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管与本文所描述的方法及材料类似或等效的方法及材料可用于实践或测试本发明表征的iRNA及方法,但合适方法及材料描述于下文中。本文提及的所有公开案、专利申请案、专利及其他参考文献均以全文引用的方式并入本文中。如发生冲突情形下,本说明书将为主,包含定义。此外,材料、方法及实例仅为说明性的且不意欲为限制性的。

[0928] 实例

[0929] 实例1.健康成人个体中单次剂量ALN-HSD及非酒精性脂肪性肝炎(NASH)成人患者中多次剂量ALN-HSD的1期、随机、双盲、安慰剂对照、2部分研究

[0930] 在研究的A部分中,向健康个体施用单次递增剂量(SAD)的AD-288996(ALN-HSD)。在研究的B部分中,向NASH患者施用多次剂量(MD)的ALN-HSD。

[0931] 研究的目标包括评估ALN-HSD的安全性及耐受性、表征ALN-HSD的血浆及尿液PK、评估ALN-HSD的PD效应及在施用ALN-HSD后对NASH活动度及纤维化的影响。

[0932] AD-288996的未经修饰及经修饰序列包括于下表2中。

[0933] 表2.AD-288996的序列

[0934]

| 链 | 经修饰序列(5'-3') | SEQ ID NO: | 未经修饰序列(5'-3') | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|---|
| 有义 | asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucuL96 | 24 | AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU | 26 |
| 反义 | asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc | 25 | AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC | 27 |

[0935] 背景

[0936] 非酒精性脂肪肝病(NAFLD)为肝脏相关死亡率及发病率的最快速增长原因,影响全球25%的成人群体。NAFLD与肥胖症、代谢症候群、胰岛素抗性及2型糖尿病有很强的流行病学关联。

[0937] NAFLD经定义为基于肝脏组织的组织学分析存在至少5%脂肪变性。NASH为NAFLD的亚型,其定义为在未摄入有毒水平的酒精的个体中,除了大泡性脂肪变性以外,还出现肝细胞损伤或气球样变及小叶发炎的组织学发现。NASH通常伴有纤维化,其可进展为肝硬化及肝细胞癌(HCC),且纤维化的严重程度是总体及肝脏相关死亡率的最强预测因子。

[0938] 在美国(US)、欧洲及其他发达国家中,NASH的盛行率在1.5%与6.5%之间,且估计有7%至30%的NAFLD患者进展为NASH。肥胖群体中NASH的中值盛行率为33%,介于10%至56%的范围内。在美国等待肝脏移植的患者中,NASH目前为第二最常见肝病。到2030年,NAFLD预计将成为美国肝脏移植最常见的原因,而在西方及亚洲国家,NASH导致的终末期肝病负担预计将增加2至3倍。

[0939] 减肥可有效减少甚至逆转NASH炎症及纤维化,但很难实现及维持。肝脏移植为NASH患者的另一种治疗选择,但除了手术风险外,还需要终生免疫抑制。在许多地区,肝脏移植的可获得性有限或根本不存在。在没有治疗选择的情况下,许多患者继续经历与进行性纤维化、门静脉高血压、肝硬化及肝细胞癌相关的显著发病率及死亡率。

[0940] 尽管负担不断上升且NASH盛行率不断增加,但目前尚无批准的针对NASH的药理学治疗。奥贝胆酸(OCA)(一种法尼醇X受体促效剂)在临床研究中显示出良好的前景。然而,在最近的一项3期研究中,一些接受OCA治疗的NASH患者获益有限,18%至23%的NASH患者达成纤维化的改善且无NASH(肝细胞气球样变或炎症活动)恶化,且11%至12%的NASH患者达成NASH消退(无肝细胞气球样变且炎症活动极小/无炎症活动)且无纤维化恶化。维生素E可减少肝损伤的标记物,但其对肝脏组织学只有轻微影响且并未改善纤维化。噻唑啶二酮吡格列酮可促进NASH消退,但其与心脏衰竭风险恶化、骨矿物质密度降低、体重增加及液体滞留相关。尽管正在进行多项针对NASH的研究药物的临床试验,但对具有更高功效的NASH治疗的需求仍然未得到满足。

[0941] NAFLD或NASH的病因是多因素的,其中经由全基因组及全外显子体关联研究鉴别出多种易感基因,包括调节脂质代谢及脂滴生物学的基因,包括含patatin样磷脂酶域蛋白3(PNPLA3)-rs738409及跨膜6超家族成员2(TM6SFM2)-rs58542926。

[0942] HSD17B13基因编码17B-类固醇脱氢酶家族的成员;其主要在肝脏中表达,在其他组织中表达很少。其内源性底物为未知的。在来自一般群体的大型队列中,HSD17B13(rs72613567:TA)中编码剪接变异体的单核苷酸变异(SNV,以前称为单核苷酸多型性[SNP])与预防NAFLD及NAFLD肝硬化有关;在NAFLD或NASH患者中,此变异体及第二种错义变异体与肝损伤、炎症及纤维化水平降低有关。这种变异体导致HSD17B13蛋白质表达和/或功能丧失;HSD17B13的功能丧失型变异体纯合的个体的预期出现频率表明对此目标的药理学抑制可能为安全且耐受良好的。生物化学分析表明,HSD17B13变异体与肝脏中多种磷脂酰胆碱及磷脂酰乙醇胺物质的水平增加有关。然而,这种生物化学变化与预防NAFLD或NASH之间的因果关系尚未确定。

[0943] 研究设计概况

[0944] 此系一项随机、双盲、安慰剂对照的SAD及MD 1期研究,其经设计以分别评估皮下(SC)施用的ALN-HSD在健康个体及NASH患者中的安全性、耐受性、PK及PD效应。

[0945] 此研究分2个部分进行:

[0946] • A部分:健康成人个体中的SAD部分

[0947] • B部分:成年NASH患者中的MD部分

[0948] 在A部分中施用单次剂量的研究药物。在B部分中,相隔12周(在第1天及第85天)施用2次剂量的研究药物。

[0949] A部分中各个体的预计总研究时间长达5.5个月,包括长达60天的筛选时间、研究药物施用的住院期以及3个月的给药后随访期。B部分中各患者的预计总研究时间长达14.5个月,包括长达60天的筛选时间、相隔12周的2天研究药物施用以及9个月的给药后随访期。

[0950] A部分

[0951] A部分有7个队列,以及一个安慰剂队列;4个队列包含SAD阶段以评估单次剂量的研究药物,如图1中所指示(25mg、100mg、200mg、400mg或800mg)。200mg及400mg组还包含专门的日本队列(参见图1)。各队列以3:1比例随机分配以接受单次剂量的ALN-HSD或安慰剂。

[0952] 在筛选期间(第-60天与第-2天之间)确定个体资格。在第-1天,符合条件的个体获准进入临床研究中心以确认资格且进行给药前评估。成功完成资格要求的个体在接下来的2晚或3晚留在研究中心,随后在第2天或第3天离开。

[0953] 各队列的入选个体数目及个体的基线人口统计资料提供于图2中。额外个体可入选A部分的队列,其中每队列最多12个个体,25mg队列除外,其最多具有8个个体。

[0954] 在第1天,个体经随机分配以接受单次剂量的研究药物(ALN-HSD或安慰剂)。在第1天进行给药前研究评估,且在第1天及第2天进行给药后研究评估。个体在第2天在完成24小时给药后随访评估之后或在第3天在完成48小时给药后随访评估之后自临床研究中心离开。在第2天离开的情况下,个体第二天返回临床研究中心以进行48小时给药后随访评估。

[0955] 在给药后随访期中,个体每两周一次返回临床研究中心门诊以进行安全性、耐受性、PK及PD监测,直至第2个月,随后在第3个月进行最后一次随访就诊。

[0956] 若个体由于2019年冠状病毒疾病(COVID-19)大流行影响临床研究中心的活动或个体进入该地点的能力或意愿而无法完成研究就诊,且研究评估无法在方案规定的窗口期间在家完成,则尝试在下一次预定研究就诊的3天内完成预定评估。

[0957] 可在A部分中增加至多3个视情况存在的队列,以更好地了解ALN-HSD的安全性、耐受性、PK及PD。

[0958] B部分

[0959] 存在4个队列,各队列包含10个NASH患者,所述患者以4:1比例随机分配以接受两次剂量的ALN-HSD 25mg Q12Wx2、200mg Q12Wx2或400mg Q12Wx2或者安慰剂,如图3中所指示。有两个队列的个体接受200mg Q12Wx2剂量的ALN-HSD;一个队列在6个月时进行肝脏活检,且第二队列在12个月时进行肝脏活检(参见图3及下文)。还存在一个安慰剂队列。额外患者入选B部分的队列,其中每队列最多15个患者。

[0960] NASH患者在筛选期间(第-60天与第-1天之间)进行确认性肝脏活检。患者在第1天经随机分配以接受ALN-HSD或安慰剂。在第1天及第3个月(第85天)施用研究药物治疗,且患者在完成4小时给药后随访评估之后自研究中心离开。

[0961] 在第1天初次研究药物施用后,NASH患者每两周一次返回研究中心门诊以进行安全性、耐受性、生物标记物及PD监测,直至第2个月。在第3个月(第85天)研究就诊时施用第二次剂量的研究药物。

[0962] 在给药后随访期中,患者在第二次剂量的研究药物后2周返回研究中心门诊以进行安全性、耐受性、生物标记物及PD监测,且随后以图3中所指示的时间间隔进行,直至第12个月。

[0963] 若个体由于COVID-19大流行影响临床研究中心的活动或个体进入该地点的能力或意愿而无法完成研究就诊,且研究评估无法在方案规定的窗口期间在家完成,则尝试在下一次预定研究就诊的3天内完成预定评估。

[0964] 在基线时及给药后第6个月或第12个月进行肝脏活检,如图3中所指示。各队列进行第二次肝脏活检的时间安排意欲捕获一系列剂量及时间点处mRNA及蛋白质阻断及恢复的动力学。每次肝脏活检后3(±1)天都会进行后续安全性电话呼叫。

[0965] 各队列的入选个体数目及个体的基线人口统计资料提供于图4中。

[0966] 可在B部分中增加至多2个视情况存在的队列,每个视情况存在的队列可包括2次肝脏活检,以便更好地了解ALN-HSD的安全性、耐受性、PK及PD。

[0967] 纳入标准

[0968] 参与者在符合以下所有标准时才有资格纳入研究中:

[0969] 年龄及性别

[0970] 1.男性或女性,年龄18至65岁(含)

[0971] 知情同意书

[0972] 2.能够理解并且愿意且能够遵守研究要求并提供书面知情同意书。

[0973] 仅A部分

[0974] 3.身体质量指数(BMI)218kg/$m^2$及:S30 kg/$m^2$

[0975] 4.12导联ECG在正常限度内或研究者认为没有临床显著异常,其中男性的Fridericia校正后QT间期(QTcF)<450毫秒或女性的Fridericia校正后QT间期(QTcF)<470毫秒

[0976] 仅A部分的日本个体队列

[0977] 5.日本个体必须在日本出生,其亲生父母及祖父母必须为日本血统,且在筛选前不得在日本境外超过5年。

[0978] 仅B部分

[0979] 6.BMI 218kg/$m^2$及:S40 kg/$m^2$

[0980] 7.患者病史中记录有NASH诊断,或基于在筛选时满足以下2个标准而临床怀疑NASH:

[0981] a.代谢症候群的两个或更多个要素定义为:

[0982] 女性腰围>35英寸(89公分),或男性腰围>40英寸(102公分)

[0983] 空腹三酸甘油酯水平>150mg/dL(1.7mmol/L)

[0984] 血压>130/85毫米mmHg或更高,或正在服用处方抗高血压药物

[0985] 男性空腹高密度脂蛋白(HDL)胆固醇<40mg/dL(1.04mmol/L)或女性空腹高密度脂蛋白(HDL)胆固醇<50mg/dL(1.3mmol/L),或正在服用处方降胆固醇药物

[0986] 空腹血糖>100mg/dL(5.6mmol/L),或正在服用处方糖尿病药物

[0987] b.筛选前6个月内藉由以下中的一个确定的脂肪变性或脂肪性肝炎的证据:

[0988] 磁共振成像估计的质子密度脂肪分数(MRI-PDFF)>8.0%

[0989] 振动控制瞬时弹性成像(VCTE)受控衰减参数(CAP)>288dB/m

[0990] ALT>1×ULN表明肝损伤

[0991] 8.根据NASH临床研究网络(CRN)标准NAS评分3分或更高(包括3个关键NASH组织学特征每项至少1分)且纤维化评分F0至F3的筛选肝脏活检。

[0992] 9.研究者认为过去4周饮食稳定。

[0993] 排除标准

[0994] 研究参与者在符合以下任一标准时被排除在研究之外:

[0995] 实验室评估

[0996] 1.研究者认为临床上显著且不可接受的任何临床安全性实验室结果

[0997] 2.已知患有活动性人类免疫缺乏病毒(HIV)感染、目前或慢性B型肝炎病毒(HBV)感染的证据、或目前或慢性C型肝炎病毒(HCV)感染,除非有证据表明在筛选前至少12个月存在对HCV疗法的持续病毒反应。

[0998] 先前/伴随疗法

[0999] 3.在筛选前最近30天或5个半衰期(以较长者为准)内接受过研究性药剂,或正在进行另一项涉及介入治疗的临床研究的随访。

[1000] 医学病状

[1001] 4.在筛选前12个月内已知有药物滥用史或临床证据。药物滥用定义为强迫性、重复性和/或长期使用药物或其他物质,且存在与其使用相关的问题和/或停止或减少剂量会导致戒断症状。

[1002] 5.其他形式的已知慢性肝病的证据,包括:

[1003] a.任何原因(包括NASH)引起的肝硬化

[1004] b.原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、自体免疫肝炎或重迭症候群

[1005] c.酒精性肝病

[1006] d.威尔森氏病(Wilson's disease)、血色素沉着症或铁过载

[1007] e.藉由肝脏组织学诊断特征定义的α-1-抗胰蛋白酶(A1AT)缺乏症(藉由A1AT水平低于正常值下限[LLN]确认,或根据研究者的判断排除)

[1008] f.筛选前5年内既往已知有药物诱导的肝损伤

[1009] g.已知或疑似肝细胞癌

[1010] h.肝脏移植病史、目前在肝脏移植名单上、或终末期肝病模型(MELD)评分>12

[1011] 6.研究者认为可能干扰临床研究参与或资料解释或者危及参与者的安全的任何不受控或严重疾病、医疗或手术病状(包括精神疾病、肝硬化或任何出血性病症)。

[1012] 7.多种药物过敏史或对研究药物中的任何组分或赋形剂有过敏反应史。

[1013] 8.SC注射不耐受史,或可能妨碍研究药物施用或局部耐受性评估的明显腹部疤痕。

[1014] 9.在筛选时无行为能力或限制行为能力。

[1015] 避孕、怀孕及哺乳

[1016] 10.在研究时段期间不愿意遵守章节5.6.1中所描述的避孕要求。

[1017] 11.女性参与者已怀孕、计划怀孕或正在哺乳。

[1018] 饮酒

[1019] 12.在筛选前过去几年间过量饮酒持续23个月

[1020] (男性>3单位/天且女性>2单位/天通常被认为过量的(单位:1玻璃杯葡萄酒[大约125mL]=1量器白酒[大约1液量盎司]=$^{1}/_{2}$品脱啤酒[大约284mL])。

[1021] A部分特定排除标准

[1022] 13.在筛选时坐位或仰卧位10分钟后收缩压>140mm Hg和/或舒张压>90mmHg(根据研究者判断可重复测量一次)。

[1023] 14.在筛选前14天或5个半衰期(以较长者为准)内使用过处方药物,以下除外:

[1024] a.激素替代疗法(例如雌激素、甲状腺)

[1025] b.口服避孕药、可注射孕酮及皮下植入物

[1026] c.质子泵抑制剂

[1027] d.组胺H2受体拮抗剂

[1028] e.NSAID

[1029] 15.在筛选前7天内使用过非处方药物(不包括常规维生素),除非研究者确定与临床无关。

[1030] 16.在筛选时估计肾小球滤过率(GFR)<90mL/min/1.73m2(计算将基于肾病饮食改良[MDRD]公式(参见章节10.1))。

[1031] 17.在筛选时具有以下实验室参数评估中的任一个:

[1032] a.ALT或AST>ULN

[1033] b.总胆红素>ULN

[1034] c.INR>1.2

[1035] d.血小板计数<140×10^9/L

[1036] B部分特定排除标准

[1037] 18.研究者认为临床上显著且不可接受的异常ECG。

[1038] 19.在筛选前30天内改变(也即开始、停用或改变剂量)以下处方药物/治疗:

[1039] a.抗高血压处方药物

[1040] b.降胆固醇处方药物

[1041] c.糖尿病处方药物(胰岛素调整除外)

[1042] d.维生素E治疗

[1043] 20.在筛选前14天或5个半衰期(以较长者为准)内使用过单胺氧化酶抑制剂。

[1044] 21.在筛选时估计GFR<45mL/min/1.73m$^{2}$(计算将基于MDRD公式(参见章节10.1)。

[1045] 22.在筛选时具有以下实验室参数评估中的任一个:

[1046] a.ALT>5×ULN

[1047] b.INR>1.2

[1048] c.红血球蛋白A1c(HbA1c)>9.5%

[1049] d.血小板计数<140×10$^{9}$/L

[1050] 结果

[1051] 在此I期研究的A部分中,向健康人类志愿者皮下施用单次25mg、100mg、200mg、400mg或800mg剂量的AD-288996(ALN-HSD)。总共44个健康人类志愿者入选,且按3:1随机分配以接受单次皮下施用剂量的AD-288996(ALN-HSD)或安慰剂。

[1052] 在A部分中,所有不良事件(AE)的严重程度均为轻度或中度,且与研究药物无关(包括5/44(11%)注射部位反应(ISR),严重程度均为轻度且持续时间短暂);以及1例轻度的治疗出现不良事件(TEAE)扁桃体炎,其被认为与研究药物无关。未发生死亡或导致中断/中止的AE。没有临床关注的TEAE,包括ALT或AST升高。

[1053] 如图5中所描绘,ALN-HSD的血浆浓度在给药后24小时迅速下降,且大多数个体在48小时之后侦测不到,其中终末半衰期在4.2至6.7小时之间。ALN-HSD显示各剂量的暴露量略高于剂量比例增加。ALN-HSD $AUC_{last}$(自给药时间至最后可测量浓度的浓度-时间曲线下面积)及$C_{max}$(最大血浆浓度)的幂模型斜率(β)(90%CI)估计值分别为1.33(1.23至1.44)及1.26(1.15至1.37)。在各剂量中,ALN-HSD显示17-37%在尿液中排出。

[1054] 在B部分中,总共46个NASH个体入选,且按4:1随机分配以在第1天及第85天(相隔12周)接受皮下施用的25、200或400mg剂量的AD-288996或安慰剂。个体为F0-F3纤维化且NAS评分>=3(包括三个NASH组织学特征每项至少1分)(参见下表)的个体。

[1055] 在基线时及第169天或第337天进行肝脏活检。

[1056] 在B部分中,在至少10%所有患者中发生的唯一TEAE为COVID-19感染(13.9%),全部视为与研究药物无关。发生三例治疗出现的重度或严重AE,且评估为与研究药物无关(牙齿感染且两个个体患有阑尾炎)。存在一例与急性E型肝炎感染相关的临床关注不良事件(AECI),AST为5.5×ULN且ALT为3.4×ULN。没有药物诱导的肝损伤的证据,且没有患者符合海氏定律(Hy's Law)标准(ALT>3×ULN且伴随黄疸(胆红素>2.5mg/dL))。没有与研究药物相关的中止或中断,且无死亡。

[1057] 图6A显示所有施用ALN-HSD的个体中丙氨酸转氨酶(ALT)水平的改善趋势。ALN-HSD的施用与随时间推移ALT水平相较于安慰剂的数值降低相关。安慰剂的基线平均(SD)ALT值为57.6(33.9),且总ALN-HSD的基线SD ALT值为49.6(23.5)。

[1058] 类似地,图6B显示基线AST水平高于正常值上限(ULN)的25mg Q12W×2及200mg Q12W×2队列中的个体中天冬氨酸转氨酶(AST)水平的改善趋势。

[1059] 如图7中所描绘,在首次给药后6个月时个体的肝脏活检中,AD-288996(ALN-HSD)的皮下施用强力抑制HSD17B13的表达。图7还显示ALN-HSD的施用与HSD17B13 mRNA水平的剂量依赖性降低相关。

[1060] 此外,如图8A及图8B中所描绘,ALN-HSD的施用与6或12个月时活检获得的NAFLD活动度评分相对于安慰剂的数值降低(图8A;12个月活检仅在一个200mg队列中进行)及6或12个月时纤维化阶段相对于安慰剂的数值降低(图8B;12个月活检仅在一个200mg队列中进行)相关。

[1061] 总而言的,在此1期研究中,ALN-HSD在健康成人及NASH患者中表达出令人鼓舞的安全性及耐受性概况。大部分AE为轻度或中度的,且在研究持续时间期间未报告治疗相关的严重或重度AE。在A部分中,ALN-HSD显示暴露量略高于剂量比例增加。在各剂量中,ALN-HSD显示17-37%在尿液中排出。在B部分中,ALN-HSD在肝脏活检中显示出HSD17B13 mRNA表达的稳健剂量依赖性降低

[1062] ALN-HSD还与6或12个月时肝酶、活检获得的NAFLD活动度评分及纤维化阶段相对于安慰剂的数值降低相关。

[1063] 下表概述NAS评分组成部分及得分解释。

[1064]

| 项目 | 评分 | 程度 | 定义及注释 |
|---|---|---|---|
| 脂肪变性 | 0 | <5% | 指经由低至中倍镜检查评估的脂肪变性所涉及的表面积量；最小脂肪变性(<5%)得分为 0，以避免在脂肪变化很少的情况下给予活检过多权重 |
| | 1 | 5-33% | |
| | 2 | >33-66% | |
| | 3 | >66% | |
| 小叶发炎 | 0 | 无病灶 | 此评估中不包括嗜酸性小体，还不包括门静脉发炎 |
| | 1 | <2 个病灶/200× | |
| | 2 | 2 至 4 个病灶/200× | |
| | 3 | >4 个病灶/200× | |
| 肝细胞气球样变 | 0 | 无 | |
| | 1 | 少量气球样细胞 | 术语“少量”意谓极少但明确的气球样变肝细胞，以及诊断上处于临界状态的病例 |
| | 2 | 许多细胞/显著气球样变 | 大多数具有显著气球样变的病例还具有马洛里玻璃样变(Mallory's hyalin)，但 NAS 并未单独对马洛里玻璃样变进行评分 |

[1065]

| 纤维化阶段(与 NAS 分开评估) | | | |
|---|---|---|---|
| 纤维化 | 0 | 无 | |
| | 1 | 窦周或门静脉周 | |
| | 1A | 轻度，3 区，窦周 | “纤细(delicate)”纤维化 |
| | 1B | 中度，3 区，窦周 | “密集(dense)”纤维化 |
| | 1C | 门静脉/门静脉周 | 包括此类别以考虑具有门静脉和/或门静脉周纤维化但不伴有细胞周/窦周纤维化的病例 |
| | 2 | 窦周及门静脉/门静脉周 | |
| | 3 | 桥接纤维化 | |
| | 4 | 肝硬化 | |

[1066] 总NAS评分表示脂肪变性、小叶发炎及气球样变的评分总和,且在0至8范围内。

[1067] 表1。核酸序列表示中所用的核苷酸单体的缩写。应理解,这种单体当存在于寡核苷酸中时藉由5’-3’-磷酸二酯键互相连接;且应理解,当核苷酸含有2’-氟修饰时,则氟置换亲本核苷酸中该位置处的羟基(也即,其为2’-脱氧-2’-氟核苷酸)。应进一步理解,表中的核苷酸缩写省略位于寡核苷酸的3’端位置处的3’-磷酸酯(也即,其为3’-OH)。

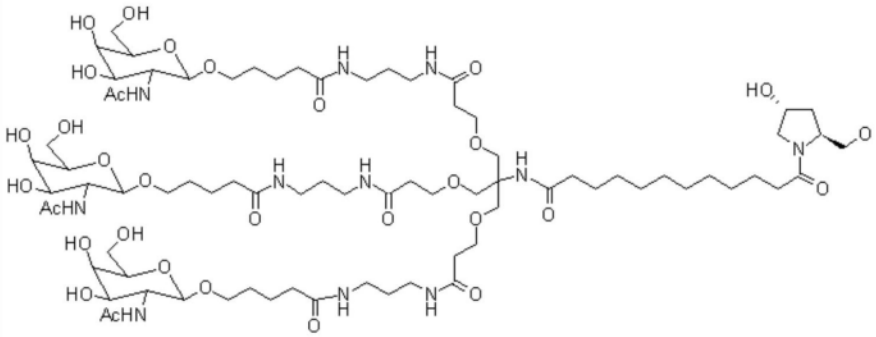
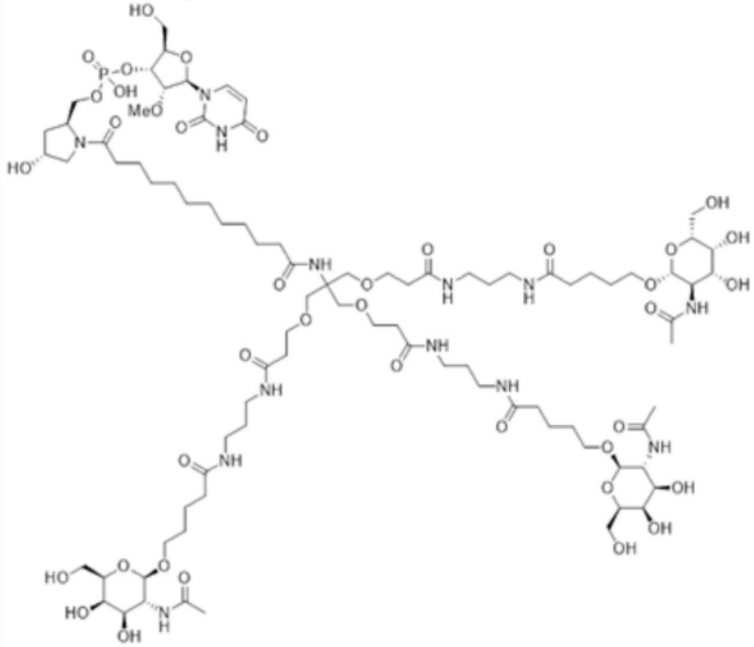
[1068]

| 缩写 | 核苷酸 |
|---|---|
| A | 腺苷-3'-磷酸酯 |
| Ab | β-L-腺苷-3'-磷酸酯 |
| Abs | β-L-腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Af | 2'-氟腺苷-3'-磷酸酯 |
| Afs | 2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| As | 腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| C | 胞苷-3'-磷酸酯 |
| Cb | β-L-胞苷-3'-磷酸酯 |

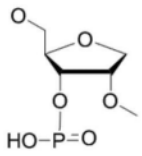
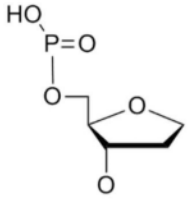
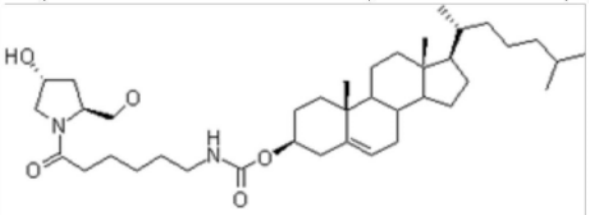
[1069]

| 缩写 | 核苷酸 |
|---|---|
| Cbs | β-L-胞苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Cf | 2'-氟胞苷-3'-磷酸酯 |
| Cfs | 2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Cs | 胞苷-3'-硫代磷酸酯 |
| G | 鸟苷-3'-磷酸酯 |
| Gb | β-L-鸟苷-3'-磷酸酯 |
| Gbs | β-L-鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Gf | 2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯 |
| Gfs | 2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Gs | 鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| T | 5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯 |
| Tf | 2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯 |
| Tfs | 2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Ts | 5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| U | 胸苷-3'-磷酸酯 |
| Uf | 2'-氟尿苷-3'-磷酸酯 |
| Ufs | 2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| Us | 尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| N | 任何经修饰或未经修饰的核苷酸 |
| a | 2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯 |
| as | 2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| c | 2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯 |
| cs | 2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯 |
| g | 2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯 |
| gs | 2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| t | 2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯 |
| ts | 2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| u | 2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯 |
| us | 2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| s | 硫代磷酸酯键 |

[1070]

| 缩写 | 核苷酸 |
| --- | --- |
| L96 | N-[参(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基)]-4-羟基脯胺醇<br><br>(Hyp-(GalNAc-烷基)3)<br><br>(2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰胺基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰胺基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-侧氧基戊基]氨基]丙基]氨基]-3-侧氧基丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四侧氧基-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-羟甲基吡咯啶<br> |
| uL96 | 2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯((2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰胺基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰胺基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-侧氧基戊基]氨基]丙基]氨基]-3-侧氧基丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四侧氧基-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-吡咯啶基)甲酯<br> |
| Y34 | 2-羟甲基-四氢呋喃-4-甲氧基-3-磷酸酯(无碱基 2'-OMe 呋喃糖) |

[1071]

| 缩写 | 核苷酸 |
|---|---|
| |  |
| Y44 | 反相无碱基 DNA (2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯)  |
| L10 | N-(胆固醇基羧酰胺基己酰基)-4-羟基脯胺醇(Hyp-C6-Chol)  |
| (Agn) | 腺苷-二醇核酸(GNA) S 异构物 |
| (Cgn) | 胞苷-二醇核酸(GNA) S 异构物 |
| (Ggn) | 鸟苷-二醇核酸(GNA) S 异构物 |
| (Tgn) | 胸苷-二醇核酸(GNA) S 异构物 |
| P | 磷酸酯 |
| VP | 乙烯基膦酸酯 |
| dA | 2'-脱氧腺苷-3'-磷酸酯 |
| dAs | 2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| dC | 2'-脱氧胞苷-3'-磷酸酯 |
| dCs | 2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸酯 |
| dG | 2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯 |
| dGs | 2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| dT | 2'-脱氧胸苷-3'-磷酸酯 |
| dTs | 2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸酯 |
| dU | 2'-脱氧尿苷 |
| dUs | 2'-脱氧尿苷-3'-硫代磷酸酯 |
| (C2p) | 胞苷-2'-磷酸酯 |

[1072]

| 缩写 | 核苷酸 |
|---|---|
| (G2p) | 鸟苷-2'-磷酸酯 |
| (U2p) | 尿苷-2'-磷酸酯 |
| (A2p) | 腺苷-2'-磷酸酯 |
| (Ahd) | 2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯 |
| (Ahds) | 2'-O-十六烷基-腺苷-3'-硫代磷酸酯 |
| (Chd) | 2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-磷酸酯 |
| (Chds) | 2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-硫代磷酸酯 |
| (Ghd) | 2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸酯 |
| (Ghds) | 2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-硫代磷酸酯 |
| (Uhd) | 2'-O-十六烷基-尿嘧啶-3'-磷酸酯 |
| (Uhds) | 2'-O-十六烷基-尿嘧啶-3'-硫代磷酸酯 |
| s | 硫代磷酸酯 |

[1073] 非正式序列表

<210> 1

<211> 2397

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540

tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaaggga 600

ttccttacct catcccatat tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660

tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720

tttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag attatggcct gtattggaga 780

cagatgaagt cgtaagaagt ctgatagatg gaatacttac caataagaaa atgatttttg 840

ttccatcgta tatcaatatc tttctgagac tacagaagtt tcttcctgaa cgcgcctcag 900

cgattttaaa tcgtatgcag aatattcaat ttgaagcagt ggttggccac aaaatcaaaa 960

tgaaatgaat aaataagctc cagccagaga tgtatgcatg ataatgatat gaatagtttc 1020

[1074] gaatcaatgc tgcaaagctt tatttcacat tttttcagtc ctgataatat taaaaacatt 1080

ggtttggcac tagcagcagt caaacgaaca agattaatta cctgtcttcc tgtttctcaa 1140

gaatatttac gtagtttttc ataggtctgt ttttcctttc atgcctctta aaaacttctg 1200

tgcttacata aacatactta aaaggttttc tttaagatat tttatttttc catttaaagg 1260

tggacaaaag ctacctccct aaaagtaaat acaaagagaa cttatttaca cagggaaggt 1320

ttaagactgt tcaagtagca ttccaatctg tagccatgcc acagaatatc aacaagaaca 1380

cagaatgagt gcacagctaa gagatcaagt ttcagcaggc agctttatct caacctggac 1440

atattttaag attcagcatt tgaaagattt ccctagcctc ttcctttttc attagcccaa 1500

aacggtgcaa ctctattctg gactttatta cttgattctg tcttctgtat aactctgaag 1560

tccaccaaaa gtggaccctc tatatttcct ccctttttat agtcttataa gatacattat 1620

gaaaggtgac cgactctatt ttaaatctca gaattttaag ttctagcccc atgataacct 1680

ttttctttgt aatttatgct ttcatatatc cttggtccca gagatgttta gacaatttta 1740

ggctcaaaaa ttaaagctaa cacaggaaaa ggaactgtac tggctattac ataagaaaca 1800

atggacccaa gagaagaaaa ggaagaaaga aaggtttttt ggtttttgtt ttgttttgtt 1860

ttgttttttg ttttttttgag atggagtctc actctttcgc ccaggctgga gtgcagtggt 1920

atgatctcag ctcactgcaa gctccacctc ccgggttcac gccattctcc tgcctcagcc 1980

tcctgagtag ctgggactac aggcgcccgc caccacaccc ggctaatttt ttgtatttttt 2040

tgtagagacg gggtttcacc atgttagcca agatggtctc gatctcctga cctcgtgatc 2100

cacctgcctc ggcctcccaa agtgctggga ttacgggtgt gagccaccgt gcccagcctt 2160

ttttttttta atagaaaaaa taatccgact cccactacat caagactaat cttgttttgt 2220

gtgtttttca catgtattat agaatgcttt tgcatggact atcctcttgt ttttattaaa 2280

aacaaatgat ttttttaaaa gtcacaaaaa caattcacta aaaataaata tgtcattgtg 2340

ctttaaaaaa ataacctctt gtagttataa aataaaacgt ttgacttcta aactctg 2397

[1075] <210> 2

<211> 2289

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataaggtgaa gaaagaagtg ggtgatgtaa 300

caatcgtggt gaataatgct gggacagtat atccagccga tcttctcagc accaaggatg 360

aagagattac caagacattt gaggtcaaca tcctaggaca tttttggatc acaaaagcac 420

ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 480

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attgttccag caaatttgcc gctgttggct 540

ttcacagagg tctgacatca gaacttcagg ccttgggaaa aactggtatc aaaacctcat 600

gtctctgccc agtttttgtg aatactgggt tcaccaaaaa tccaagcaca agattatggc 660

ctgtattgga gacagatgaa gtcgtaagaa gtctgataga tggaatactt accaataaga 720

aaatgatttt tgttccatcg tatatcaata tctttctgag actacagaag tttcttcctg 780

aacgcgcctc agcgatttta aatcgtatgc agaatattca atttgaagca gtggttggcc 840

acaaaatcaa aatgaaatga ataaataagc tccagccaga gatgtatgca tgataatgat 900

atgaatagtt tcgaatcaat gctgcaaagc tttatttcac atttttcag tcctgataat 960

attaaaaaca ttggtttggc actagcagca gtcaaacgaa caagattaat tacctgtctt 1020

cctgtttctc aagaatattt acgtagtttt tcataggtct gtttttcctt tcatgcctct 1080

[1076] taaaaacttc tgtgcttaca taaacatact taaaaggttt tctttaagat attttatttt 1140

tccatttaaa ggtggacaaa agctacctcc ctaaaagtaa atacaaagag aacttattta 1200

cacagggaag gtttaagact gttcaagtag cattccaatc tgtagccatg ccacagaata 1260

tcaacaagaa cacagaatga gtgcacagct aagagatcaa gtttcagcag gcagctttat 1320

ctcaacctgg acatatttta agattcagca tttgaaagat ttccctagcc tcttcctttt 1380

tcattagccc aaaacggtgc aactctattc tggactttat tacttgattc tgtcttctgt 1440

ataactctga agtccaccaa aagtggaccc tctatatttc ctccctttt atagtcttat 1500

aagatacatt atgaaaggtg accgactcta ttttaaatct cagaatttta agttctagcc 1560

ccatgataac ctttttcttt gtaatttatg ctttcatata tccttggtcc cagagatgtt 1620

tagacaattt taggctcaaa aattaaagct aacacaggaa aaggaactgt actggctatt 1680

acataagaaa caatggaccc aagagaagaa aaggaagaaa gaaaggtttt ttggtttttg 1740

ttttgttttg ttttgttttt tgttttttttg agatggagtc tcactctttc gcccaggctg 1800

gagtgcagtg gtatgatctc agctcactgc aagctccacc tcccgggttc acgccattct 1860

cctgcctcag cctcctgagt agctgggact acaggcgccc gccaccacac ccggctaatt 1920

ttttgtattt tttgtagaga cggggtttca ccatgttagc caagatggtc tcgatctcct 1980

gacctcgtga tccacctgcc tcggcctccc aaagtgctgg gattacgggt gtgagccacc 2040

gtgcccagcc ttttttttttt taatagaaaa aataatccga ctcccactac atcaagacta 2100

atcttgtttt gtgtgttttt cacatgtatt atagaatgct tttgcatgga ctatcctctt 2160

gtttttatta aaaacaaatg atttttttaa aagtcacaaa aacaattcac taaaaataaa 2220

tatgtcattg tgctttaaaa aaataacctc ttgtagttat aaaataaaac gtttgacttc 2280

taaactctg 2289

<210> 3

<211> 1284

[1077] <212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 3

gcagcagccc ataatacctg acagggctct ctgtggagct ctgagcagag gtgtctgttg 60

tgagaacaga gccatgaacc tcatcctgga atttctcctt ctggtgggcg tcatcatcta 120

ctcctacctg gagtcactgg taaagttctt cattccccgg agaaggaaat ctgtgaccgg 180

gcagaccgtt ctcatcacgg gggccggaca cggaataggc aggctgactg catatgaatt 240

tgcaaagcag aaaagcagac tggttctatg ggatatcaat aagcgtggtg ttgaggaaac 300

cgcggacaaa tgcaggaaac tgggggccgt cgtgcacgtg tttgtggtgg actgcagcaa 360

ccgggccgag atttacaact ctgtggatca ggtaaagaga gaagtaggtg atgtcgagat 420

cgtggtaaac aacgccgggg cgatatatcc agcagacctt cttagtgcca aggacgagga 480

gatcaccaag acctttgagg tcaatatcct cggacatttt tggatcataa aagcactcct 540

tccatcgatg ctgagaagaa actctggcca cattgtcaca gtggcttcgg tgtgcggcca 600

tggagtgatt ccttatctca tcccttattg ctccagcaag tttgctgctg tgggcttcca 660

ccgagcactg accgcagaac tggacacctt ggggaaaacc ggtatccaaa cctcgtgtct 720

ctgccctgtg ttcgtgaata ctggcttcac caaaaacccg agtacaaggt tatggcctgt 780

attagagccg gaagaagttg caaggagtct gatcaatgga atacttacca acaagaaaat 840

gatcttcgtt ccatcctata tcaatatttc tctgatcctg gaaaagtttc ttcctgagcg 900

tgccttaaaa gcgatcagtc gtatacagaa cattcaattt gaagcaattg tgggccacaa 960

aaccaagatg aagtagtgca tgcagagacg tgtggacacc aatgatgtga agccaagttt 1020

agaggggaca cacagctttc tttcacatgt tttaagtgtt ccacatgttt aaaatgtagg 1080

cttgacccta gcagccatcg agtgcataag cgtggtcaac tgtccttcta gtttcctata 1140

cttatagatg tctcagctcc tggtagtggg ttctggcaat ggatatgtaa aggagggaaa 1200

[1078] aggcaatcca tgtgttttta taaaataaat tactaaatag aaatgtgggc aaaagggcaa 1260

gataataaag tcttgggcaa atgt 1284

<210> 4

<211> 1730

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 4

gcagcagccc ataatacctg acagggctct ctgtggagct ctgagcagag gtgtctgttg 60

tgagaacaga gccatgaacc tcatcctgga atttctcctt ctggtgggcg tcatcatcta 120

ctcctacctg gagtcactgg taaagttctt cattccccgg agaaggaaat ctgtgaccgg 180

gcagaccgtt ctcatcacgg gggccggaca cggaataggc aggctgactg catatgaatt 240

tgcaaagcag aaaagcagac tggttctatg ggatatcaat aagcgtggtg ttgaggaaac 300

cgcggacaaa tgcaggaaac tgggggccgt cgtgcacgtg tttgtggtgg actgcagcaa 360

ccgggccgag atttacaact ctgtggatca ggtaaagaga gaagtaggtg atgtcgagat 420

cgtggtaaac aacgccgggg cgatatatcc agcagacctt cttagtgcca aggacgagga 480

gatcaccaag acctttgagg tcaatatcct cggacatttt tggatcataa aagcactcct 540

tccatcgatg ctgagaagaa actctggcca cattgtcaca gtggcttcgg tgtgcggcca 600

tggagtgatt ccttatctca tcccttattg ctccagcaag tttgctgctg tgggcttcca 660

ccgagcactg accgcagaac tggacacctt ggggaaaacc ggtatccaaa cctcgtgtct 720

ctgccctgtg ttcgtgaata ctggcttcac caaaaacccg agtacaaggt tatggcctgt 780

attagagccg gaagaagttg caaggagtct gatcaatgga atacttacca acaagaaaat 840

gatcttcgtt ccatcctata tcaatatttc tctgatcctg gaaaaaggac ctggattcag 900

ttccaagcac ccacatggtg gttctcaaca gcctgttact ccaatcccag gggatttgac 960

[1079] accctcttca gactttctca aacactaggc actcgtgggg tacgcatacg tcattcaggc 1020

aagccctcat acacataaaa tagaataagc acatatttta aatgtgctac tattactgat 1080

gttttaagcc agttaaatta tgtgattttc ttaacagcaa taaaatattg tagataatgt 1140

catcatgcta gctgcatcac tctgactgta taaacccaag agaatttcac tccatctcct 1200

tctgccaaaa tatttacaac acttaagaaa taagggctga tttttatttt ttttaacata 1260

aaatatatga gacagttgta tcctgtcagc taaaaatgtt ttctctggcc tgtgagttgg 1320

ctcagtagat gaagacactt gctgccaagc ctaacaacct gaattcaact cccagaaccc 1380

atgtaatggg aagacagatg ggattcagag aaattgtcct ctgatcattg tacccatgcc 1440

ttggtatatg agtatctgtg atggtttgta tatgctcagt ccagggagtg gcactactag 1500

aaggtgtggt cctgttggag tagatgtatc actgtgggtg tgggctttaa taacctcatc 1560

ctagctgcct ggaagccagt attctgctag cagccttcat atgaagatac agaactctca 1620

gctgtgtttg caccatgcct gcatgaacgc tgccatgctc ccaccttgat gataatggac 1680

tgaacctctg aacctgtaag ccagccccga ttaaatgttg tcacttataa 1730

<210> 5

<211> 1323

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 5

tctctgtgga gctccgtgcg ggggcatctg ctaggagaac agagtccaag ggagagagca 60

gctcagagcc atgaacctca tcctggagct tctcttgctg gtgggcatca tcatctactc 120

ctacctggag tcactggtaa agttcttcat tccccagaga agaaagtctg tggccggaca 180

gactgttctc atcacaggag ctggacacgg aataggcagg ctgacggctt atgaatttgc 240

aaagcagaaa agcagattgg tcctgtggga tattagtaag cacggtgttg aggaaaccgc 300

[1080] agccaaatgc aggaaactgg gggctgtcgt gcacgtgttt gtggtggact gcagcaaccg 360

ggcagagatt tacaagtctg tggatcaggt aaagaaagaa gttggtgaca tagagattgt 420

ggtaaacaac gctggggcaa tttatccagc cgaccttctt agcaccaagg atgaggagat 480

caccaagacc ttcgaggtca acatcctagg acatttttgg atcataaaag cactccttcc 540

atcgatgctg agaagaaact ctggccacat tgtcacagtg gcttcagtgt gtggccacag 600

agtgattcct tatctcatcc catattgctc cagcaagttc gctgctgtgg gcttccacag 660

agcactgact gcagaactgg acaccttggg gaaaaccggt atcaaaacct cctgtctctg 720

ccctgtgttc gtgaatactg gcttcaccaa aaacccaagt accaggttat ggcctgtgtt 780

agagccggat gaagttgcaa ggagtctgat cgatgggata cttaccaaca agaaaatgat 840

cttcgttccg tcctatatca atatctctct aatagtggaa atgtttttc ctgaacgtgt 900

cttaaaagct ataaaccgta tacagaatat tcagtttgaa gcgattgtgg gccacagaac 960

caagaggaag taacatcttg cgtgcagaga cgtgtggacg ccaatgacgc gaagccaagt 1020

ttagagcgga cgcgaggctt tctttcgccc gttttagaag tgttccttgt gtttaaaatg 1080

taggtttggc cctagtagcc atcgagcaaa cgagagtggt caactgtcct tctggtttct 1140

tatacttaaa ctctcagccc ctggtattgg gttctggaaa tggagctgta gtaagacaat 1200

gcctgtcgca cagccgagtg aaaagtcatt tggtgtgttt ttactaaaca gaaatgtggg 1260

agaaagggta agacaataaa atcttggaca aatgctgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320

aaa 1323

<210> 6

<211> 2529

<212> DNA

<213> 恒河猕猴

<400> 6

[1081] cttcaaaaac ctgaggtgtt tccaacacct taggacacgt gaacaaggcc tgcttccaaa 60

gctggcttct atctggtagt cccattaaca ccggggcaca cctcttccct ggagctctgt 120

gtacagagta cctcctccct aggactatac aaggactgaa ccagaaggaa gaggacaggg 180

cagagccatg aacatcatcc tggaaatcct tctgcttctg atcaccatca tctactccta 240

cttggagtcg ttggtaaagt ttttcattcc tcggaggaga aaatctgtgg ctggggagat 300

tgttttcatt actggagctg ggcacggaat aggcaggcgg actgcctatg aatttgcaaa 360

acaacagagc atactggttc tgtgggatat taataagcgt ggtgtggagg aaactgcagc 420

tgagtgccga aaactaggcg tcactgcgca tgcgtacgtg gtagactgca gcaacagaga 480

agaaatctat cgctctctaa atcaggtgaa gaaagaagtg ggtgatgtga caattgtggt 540

gaataatgct gggacagtat atccagccga tcttcgcagc accaaggatg aagagattac 600

caaaacattt gaggtcaaca tcctaggaca tttttggatc acaaaagcac ttcttccatc 660

gatgatagag agaaatcatg gccacatcgt cacggtggct tcagtgtgtg gccacgaagt 720

gattccttac ctcatccctt attgttccag caaatttgct gctgttggct ttcacagagg 780

tctgacatca gaacttcaag ctttgggaaa aactggtatc aaaacctcat gtctctgccc 840

agtttttgtg aatactgggt tcaccaaaaa tccaagcaca agattatggc ctgtattgga 900

gacagatgaa gttgtaagaa gtctgataga tggaatactt accaataaga aaatgatttt 960

tgttccatca tatatcaata tctttctgat actaaagaag tttcttcctg aacgcgcctc 1020

agcattttta aatcgtatgc agaatattca atttgaagca gtggttggca acaaaatcaa 1080

aatgaaatga ataaataagc tctagccagc gttgtatgca tgataatgat attaatagtt 1140

tagaatcaat gctgcaaagc tttatttcac atttttcag tcctgttaat atgaaaaaca 1200

ttggtttggc actaacagca gtgaaatgat caagattaat tacctgtctt cctgtttctc 1260

aagaatatta atgtagtttt taataggtct gtttttcctt tcatgcctct taaaaacgtc 1320

tgtgcttaca taagcatact taaaaggttt tctttaagat attttatttt tccatttaaa 1380

[1082] ggtggacaaa actacctccc taagagtaaa tacaaagata cttatttaca cagggaaggt 1440

ttaagactgt tcaagtagca ttccaatctg tagccacgcc acggaatatc aacaagaaca 1500

cagaatgagt gcacagctaa gacaacaagc ttcagcaagc agctttatct caacctggac 1560

agactttaag attcagcatt tgaaagattt ccctagcctc ttccttttc atcagcctga 1620

aacggtgcaa ctctattctg gactttatta cttgaatctg tcttctgtat aactcttaag 1680

tccaccaaaa gtggaccctc tatatttcct ccctttttat aatcttataa gatacattac 1740

gaaaggtgac cgactgtatt ttaaatctga gaattttaag ttctagtccc atgataacct 1800

ctttctttgt agtttatgct tacatatatc cttggtccca gagctgttta gacaatttta 1860

ggctcaaaaa ttaaagctaa cacaggaaaa ggaactgtac tggctattac gtaactaaca 1920

atggatccaa gagaaggaag ggaagaaaga aaaggttttt ttggtttttg ttgttttttg 1980

ttttttgttt tttgtttgtt tggttggttt gagatggagt ctcgctctgt ctcccaggct 2040

ggagtgcagt ggtgcaatct cagctcactg caagctccgc ctcccgggtt catgccattc 2100

tcctgcctca acctcccgag ttgctaacac tacaggcgcc cgccaccacg cccggctaat 2160

ttttttgtat ttttcctaga gacagggttt cactatgtta gccaagatag tctctatctc 2220

ctgatcgtga tccaccctcc tcggcctccc aaagtggtag gattacaggc gtgagccacc 2280

gtcccagccg ttttttttttt ttttttaaca gaaagaataa tctgactccc actacatcaa 2340

gactaatctt gttctgtgtg tttttcacat gtattataga atgcttttgc atggactatc 2400

ctcttgtttt tattaaaaac aaatgatttt ttaaaagtca ctaacaaaaa caattcacta 2460

aaaataaatg tcattatgct ttaaaaaagt aacctcttgt agttataaaa taaaatgttt 2520

gacttctaa 2529

<210> 7

<211> 2457

<212> DNA

[1083] <213> 食蟹猕猴

<400> 7

tctggtagtc ccattaacac cggggcacac ctcttccctg gagctctgtg tacagagtac 60

ctcctcccta ggactataca aggactgaac cagaaggaag aggacagggc agagccatga 120

acatcatcct ggaaatcctt ctgcttctga tcaccatcat ctactcctac ttggagtcgt 180

tggtaaagtt tttcattcct cggaggagaa aatctgtggc tggggagatt gttttcatta 240

ctggagctgg gcacggaata ggcaggcgga ctgcctatga atttgcaaaa caacagagca 300

tactggttct gtgggatatt aataagcgtg gtgtggagga aactgcagct gagtgccgaa 360

aactaggcgt cactgcgcat gcgtacgtgg tagactgcag caacagagaa gaaatctatc 420

gctctctaaa tcaggtgaag aaagaagtgg gtgatgtgac aattgtggtg aataatgctg 480

ggacagtata tccagccgat cttcgcagca ccaaggatga agagattacc aaaacatttg 540

aggtcaacat cctaggacat ttttggatca caaaagcact tcttccatcg atgatagaga 600

gaaatcatgg ccacatcgtc acggtggctt cagtgtgtgg ccacgaagtg attccttacc 660

tcatcccata ttgttccagc aaatttgctg ctgttggctt tcacagaggt ctgacatcag 720

aacttcaagc tttgggaaaa actggtatca aaacctcatg tctctgccca gtttttgtga 780

atactgggtt caccaaaaat ccaagcacaa gattatggcc tgtattggag acagatgaag 840

ttgtaagaag tctgatagat ggaatactta ccaataagaa aatgattttt gttccatcat 900

atatcaatat ctttctgata ctaaagaagt ttcttcctga acgcgcctca gcatttttaa 960

atcgtatgca gaatattcaa tttgaagcag tggttggcaa caaaatcaaa atgaaatgaa 1020

taaataagct ctagccagcg ttgtatgcat gataatgata ttaatagttt agaatcaatg 1080

ctgcaaagct ttatttcaca ttttttcagt cctgttaata tgaaaaacat tggtttggca 1140

ctaacagcag tgaaatgatc aagattaatt acctgtcttc ctgtttctca agaatattaa 1200

tgtagttttt aataggtctg tttttccttt catgcctctt aaaaacgtct gtgcttacat 1260

[1084] aagcatactt aaaaggtttt ctttaagata ttttatttt ccatttaaag gtggacaaaa 1320

ctacctccct aagagtaaat acaaagatac ttatttacac agggaaggtt taagactgtt 1380

caagtagcat tccaatctgt agccacgcca cggaatatca acaagaacac agaatgagtg 1440

cacagctaag acaacaagct tcagcaagca gctttatctc aacctggaca gactttaaga 1500

ttcagcattt gaaagatttc cctagcctct tccttttca tcagcctgaa acggtgcaac 1560

tctattctgg actttattac ttgaatctgt cttctgtata actcttaagt ccaccaaaag 1620

tggaccctct atatttcctc ccttttata atcttataag atacattacg aaaggtgacc 1680

gactgtattt taaatctgag aattttaagt tctagtccca tgataacctc tttctttgta 1740

gtttatgctt acatatatcc ttggtcccag agctgtttag acaattttag gctcaaaaat 1800

taaagctaac acaggaaaag gaactgtact ggctattacg taactaacaa tggatccaag 1860

agaaggaagg gaagaaagaa aaggtttttt tggtttttgt tgttttttgt ttttgttttt 1920

tgtttgtttg tttggtttga gatggagtct cgctctgtct cccaggctgg agtgcagtgg 1980

tgcaatctca gctcactgca agctccgcct cccgggttca tgccattctc ctgcctcaac 2040

ctcccgagtt gctaagacta caggcgcccg ccaccacgcc cggctaattt ttttgtattt 2100

ttcgtagaga cagggtttca ccatgttagc caagatagtc tctatctcct gatcgtgatc 2160

caccctcctc ggcctcccaa agtggtagga ttacaggcgt gagccaccgt cccagccgtt 2220

ttttttttt ttttaacaga aagaataatc tgactcccac tacatcaaga ctaatcttgt 2280

tctgtgtgtt tttcacatgt attatagaat gcttttgcat ggactatcct cttgttttta 2340

ttaaaaacaa atgatttttt aaaagtcact aacaaaaaca attcaccaaa aataaatgtc 2400

attatgcttt aaaaaagtaa cctcttgtag ttataaaata aaatgtttga cttctaa 2457

<210> 8

<211> 2397

<212> DNA

[1085] <213> 智人

<400> 8

cagagtttag aagtcaaacg ttttatttta taactacaag aggttatttt tttaaagcac 60

aatgacatat ttatttttag tgaattgttt ttgtgacttt taaaaaaatc atttgttttt 120

aataaaaaca agaggatagt ccatgcaaaa gcattctata atacatgtga aaaacacaca 180

aaacaagatt agtcttgatg tagtgggagt cggattattt tttctattaa aaaaaaaaag 240

gctgggcacg gtggctcaca cccgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcaggtggat 300

cacgaggtca ggagatcgag accatcttgg ctaacatggt gaaaccccgt ctctacaaaa 360

aatacaaaaa attagccggg tgtggtggcg ggcgcctgta gtcccagcta ctcaggaggc 420

tgaggcagga gaatggcgtg aacccgggag gtggagcttg cagtgagctg agatcatacc 480

actgcactcc agcctgggcg aaagagtgag actccatctc aaaaaaacaa aaaacaaaac 540

aaaacaaaac aaaaaccaaa aaacctttct ttcttccttt tcttctcttg ggtccattgt 600

ttcttatgta atagccagta cagttccttt tcctgtgtta gctttaattt ttgagcctaa 660

aattgtctaa acatctctgg gaccaaggat atatgaaagc ataaattaca aagaaaaagg 720

ttatcatggg gctagaactt aaaattctga gatttaaaat agagtcggtc acctttcata 780

atgtatctta taagactata aaaagggagg aaatatagag ggtccacttt tggtggactt 840

cagagttata cagaagacag aatcaagtaa taaagtccag aatagagttg caccgttttg 900

ggctaatgaa aaaggaagag gctagggaaa tctttcaaat gctgaatctt aaaatatgtc 960

caggttgaga taaagctgcc tgctgaaact tgatctctta gctgtgcact cattctgtgt 1020

tcttgttgat attctgtggc atggctacag attggaatgc tacttgaaca gtcttaaacc 1080

ttccctgtgt aaataagttc tctttgtatt tacttttagg gaggtagctt ttgtccacct 1140

ttaaatggaa aaataaaata tcttaaagaa aacctttttaa gtatgtttat gtaagcacag 1200

aagtttttaa gaggcatgaa aggaaaaaca gacctatgaa aaactacgta aatattcttg 1260

[1086] agaaacagga agacaggtaa ttaatcttgt tcgtttgact gctgctagtg ccaaaccaat 1320

gtttttaata ttatcaggac tgaaaaaatg tgaaataaag ctttgcagca ttgattcgaa 1380

actattcata tcattatcat gcatacatct ctggctggag cttatttatt catttcattt 1440

tgattttgtg gccaaccact gcttcaaatt gaatattctg catacgattt aaaatcgctg 1500

aggcgcgttc aggaagaaac ttctgtagtc tcagaaagat attgatatac gatggaacaa 1560

aaatcatttt cttattggta agtattccat ctatcagact tcttacgact tcatctgtct 1620

ccaatacagg ccataatctt gtgcttggat ttttggtgaa cccagtattc acaaaaactg 1680

ggcagagaca tgaggttttg ataccagttt ttcccaaggc ctgaagttct gatgtcagac 1740

ctctgtgaaa gccaacagcg gcaaatttgc tggaacaata tgggatgagg taaggaatcc 1800

cttcgtggcc gcacactgaa gccactgtga cgatgtggcc atgatttctc tccatcatcg 1860

atggaagaag tgcttttgtg atccaaaaat gtcctaggat gttgacctca aatgtcttgg 1920

taatctcttc atccttggtg ctgagaagat cggctggata tactgtccca gcattattca 1980

ccacgattgt tacatcaccc acttctttct tcacctgatt tagagagcga tagatctctt 2040

ctctgttgct gcagtctacc acatacgcat gcgcagtgac gcctagtttt cggcactcag 2100

ctgcagtttc ctccacaccg cgcttattaa tatcccacag aaccaatatg ctctgtcgtt 2160

ttgcaaattc ataagtagtc tgcctgccta ttccatgccc agctccagta atgagaacaa 2220

tctccccagc cacagatttt ctcctctgag gaatgaaaaa cttcaccaac gactccaagt 2280

aggagtagat gatggtgatc agaagcagaa ggatttctag gatgatgttc atggctttgc 2340

tctgtcctct tccttctggt tcagtccttg tgtagtccta gggaggaggt actgtct 2397

<210> 9

<211> 2289

<212> DNA

<213> 智人

[1087] <400> 9

cagagtttag aagtcaaacg ttttatttta taactacaag aggttatttt tttaaagcac 60

aatgacatat ttatttttag tgaattgttt ttgtgacttt taaaaaaatc atttgttttt 120

aataaaaaca agaggatagt ccatgcaaaa gcattctata atacatgtga aaaacacaca 180

aaacaagatt agtcttgatg tagtgggagt cggattattt tttctattaa aaaaaaaaag 240

gctgggcacg gtggctcaca cccgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcaggtggat 300

cacgaggtca ggagatcgag accatcttgg ctaacatggt gaaaccccgt ctctacaaaa 360

aatacaaaaa attagccggg tgtggtggcg ggcgcctgta gtcccagcta ctcaggaggc 420

tgaggcagga gaatggcgtg aacccgggag gtggagcttg cagtgagctg agatcatacc 480

actgcactcc agcctgggcg aaagagtgag actccatctc aaaaaaacaa aaaacaaaac 540

aaaacaaaac aaaaaccaaa aaacctttct ttcttccttt tcttctcttg ggtccattgt 600

ttcttatgta atagccagta cagttccttt tcctgtgtta gctttaattt ttgagcctaa 660

aattgtctaa acatctctgg gaccaaggat atatgaaagc ataaattaca aagaaaaagg 720

ttatcatggg gctagaactt aaaattctga gatttaaaat agagtcggtc acctttcata 780

atgtatctta taagactata aaaagggagg aaatatagag ggtccacttt tggtggactt 840

cagagttata cagaagacag aatcaagtaa taaagtccag aatagagttg caccgttttg 900

ggctaatgaa aaaggaagag gctagggaaa tctttcaaat gctgaatctt aaaatatgtc 960

caggttgaga taaagctgcc tgctgaaact tgatctctta gctgtgcact cattctgtgt 1020

tcttgttgat attctgtggc atggctacag attggaatgc tacttgaaca gtcttaaacc 1080

ttccctgtgt aaataagttc tctttgtatt tacttttagg gaggtagctt ttgtccacct 1140

ttaaatggaa aaataaaata tcttaaagaa aacctttaa gtatgtttat gtaagcacag 1200

aagtttttaa gaggcatgaa aggaaaaaca gacctatgaa aaactacgta aatattcttg 1260

agaaacagga agacaggtaa ttaatcttgt tcgtttgact gctgctagtg ccaaaccaat 1320

[1088] gtttttaata ttatcaggac tgaaaaaatg tgaaataaag ctttgcagca ttgattcgaa 1380

actattcata tcattatcat gcatacatct ctggctggag cttatttatt catttcattt 1440

tgattttgtg gccaaccact gcttcaaatt gaatattctg catacgattt aaaatcgctg 1500

aggcgcgttc aggaagaaac ttctgtagtc tcagaaagat attgatatac gatggaacaa 1560

aaatcatttt cttattggta agtattccat ctatcagact tcttacgact tcatctgtct 1620

ccaatacagg ccataatctt gtgcttggat ttttggtgaa cccagtattc acaaaaactg 1680

ggcagagaca tgaggttttg ataccagttt ttcccaaggc ctgaagttct gatgtcagac 1740

ctctgtgaaa gccaacagcg gcaaatttgc tggaacaata tgggatgagg taaggaatcc 1800

cttcgtggcc gcacactgaa gccactgtga cgatgtggcc atgatttctc tccatcatcg 1860

atggaagaag tgcttttgtg atccaaaaat gtcctaggat gttgacctca aatgtcttgg 1920

taatctcttc atccttggtg ctgagaagat cggctggata tactgtccca gcattattca 1980

ccacgattgt tacatcaccc acttctttct tcaccttatt aatatcccac agaaccaata 2040

tgctctgtcg ttttgcaaat tcataagtag tctgcctgcc tattccatgc ccagctccag 2100

taatgagaac aatctcccca gccacagatt ttctcctctg aggaatgaaa aacttcacca 2160

acgactccaa gtaggagtag atgatggtga tcagaagcag aaggatttct aggatgatgt 2220

tcatggcttt gctctgtcct cttccttctg gttcagtcct tgtgtagtcc tagggaggag 2280

gtactgtct 2289

<210> 10

<211> 1284

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 10

acatttgccc aagactttat tatcttgccc ttttgcccac atttctattt agtaatttat 60

[1089] tttataaaaa cacatggatt gccttttccc tcctttacat atccattgcc agaacccact 120

accaggagct gagacatcta taagtatagg aaactagaag gacagttgac cacgcttatg 180

cactcgatgg ctgctagggt caagcctaca ttttaaacat gtggaacact taaaacatgt 240

gaaagaaagc tgtgtgtccc ctctaaactt ggcttcacat cattggtgtc cacacgtctc 300

tgcatgcact acttcatctt ggttttgtgg cccacaattg cttcaaattg aatgttctgt 360

atacgactga tcgcttttaa ggcacgctca ggaagaaact tttccaggat cagagaaata 420

ttgatatagg atggaacgaa gatcattttc ttgttggtaa gtattccatt gatcagactc 480

cttgcaactt cttccggctc taatacaggc cataaccttg tactcgggtt tttggtgaag 540

ccagtattca cgaacacagg gcagagacac gaggtttgga taccggtttt ccccaaggtg 600

tccagttctg cggtcagtgc tcggtggaag cccacagcag caaacttgct ggagcaataa 660

gggatgagat aaggaatcac tccatggccg cacaccgaag ccactgtgac aatgtggcca 720

gagtttcttc tcagcatcga tggaaggagt gcttttatga tccaaaaatg tccgaggata 780

ttgacctcaa aggtcttggt gatctcctcg tccttggcac taagaaggtc tgctggatat 840

atcgccccgg cgttgtttac cacgatctcg acatcaccta cttctctctt tacctgatcc 900

acagagttgt aaatctcggc ccggttgctg cagtccacca caaacacgtg cacgacggcc 960

cccagtttcc tgcatttgtc cgcggtttcc tcaacaccac gcttattgat atcccataga 1020

accagtctgc ttttctgctt tgcaaattca tatgcagtca gcctgcctat tccgtgtccg 1080

gcccccgtga tgagaacggt ctgcccggtc acagatttcc ttctccgggg aatgaagaac 1140

tttaccagtg actccaggta ggagtagatg atgacgccca ccagaaggag aaattccagg 1200

atgaggttca tggctctgtt ctcacaacag acacctctgc tcagagctcc acagagagcc 1260

ctgtcaggta ttatgggctg ctgc 1284

<210> 11

<211> 1730

[1090] <212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 11

ttataagtga caacatttaa tcggggctgg cttacaggtt cagaggttca gtccattatc 60

atcaaggtgg gagcatggca gcgttcatgc aggcatggtg caaacacagc tgagagttct 120

gtatcttcat atgaaggctg ctagcagaat actggcttcc aggcagctag gatgaggtta 180

ttaaagccca cacccacagt gatacatcta ctccaacagg accacacctt ctagtagtgc 240

cactccctgg actgagcata tacaaaccat cacagatact catataccaa ggcatgggta 300

caatgatcag aggacaattt ctctgaatcc catctgtctt cccattacat gggttctggg 360

agttgaattc aggttgttag gcttggcagc aagtgtcttc atctactgag ccaactcaca 420

ggccagagaa aacattttta gctgacagga tacaactgtc tcatatattt tatgttaaaa 480

aaaataaaaa tcagccctta tttcttaagt gttgtaaata ttttggcaga aggagatgga 540

gtgaaattct cttgggttta tacagtcaga gtgatgcagc tagcatgatg acattatcta 600

caatatttta ttgctgttaa gaaaatcaca taatttaact ggcttaaaac atcagtaata 660

gtagcacatt taaaatatgt gcttattcta ttttatgtgt atgagggctt gcctgaatga 720

cgtatgcgta ccccacgagt gcctagtgtt tgagaaagtc tgaagagggt gtcaaatccc 780

ctgggattgg agtaacaggc tgttgagaac caccatgtgg gtgcttggaa ctgaatccag 840

gtccttttc caggatcaga gaaatattga tataggatgg aacgaagatc attttcttgt 900

tggtaagtat tccattgatc agactccttg caacttcttc cggctctaat acaggccata 960

accttgtact cgggtttttg gtgaagccag tattcacgaa cacagggcag agacacgagg 1020

tttggatacc ggttttcccc aaggtgtcca gttctgcggt cagtgctcgg tggaagccca 1080

cagcagcaaa cttgctggag caataaggga tgagataagg aatcactcca tggccgcaca 1140

ccgaagccac tgtgacaatg tggccagagt ttcttctcag catcgatgga aggagtgctt 1200

[1091] ttatgatcca aaaatgtccg aggatattga cctcaaaggt cttggtgatc tcctcgtcct 1260

tggcactaag aaggtctgct ggatatatcg ccccggcgtt gtttaccacg atctcgacat 1320

cacctacttc tctctttacc tgatccacag agttgtaaat ctcggcccgg ttgctgcagt 1380

ccaccacaaa cacgtgcacg acggccccca gtttcctgca tttgtccgcg gtttcctcaa 1440

caccacgctt attgatatcc catagaacca gtctgctttt ctgctttgca aattcatatg 1500

cagtcagcct gcctattccg tgtccggccc ccgtgatgag aacggtctgc ccggtcacag 1560

atttccttct ccggggaatg aagaacttta ccagtgactc caggtaggag tagatgatga 1620

cgcccaccag aaggagaaat tccaggatga ggttcatggc tctgttctca caacagacac 1680

ctctgctcag agctccacag agagccctgt caggtattat gggctgctgc 1730

<210> 12

<211> 1323

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 12

tttttttttt tttttttttt ttttttcagc atttgtccaa gattttattg tcttaccctt 60

tctcccacat ttctgtttag taaaaacaca ccaaatgact tttcactcgg ctgtgcgaca 120

ggcattgtct tactacagct ccatttccag aacccaatac caggggctga gagtttaagt 180

ataagaaacc agaaggacag ttgaccactc tcgtttgctc gatggctact agggccaaac 240

ctacatttta aacacaagga acacttctaa aacgggcgaa agaaagcctc gcgtccgctc 300

taaacttggc ttcgcgtcat tggcgtccac acgtctctgc acgcaagatg ttacttcctc 360

ttggttctgt ggcccacaat cgcttcaaac tgaatattct gtatacggtt tatagctttt 420

aagacacgtt caggaaaaaa catttccact attagagaga tattgatata ggacggaacg 480

aagatcattt tcttgttggt aagtatccca tcgatcagac tccttgcaac ttcatccggc 540

[1092] tctaacacag gccataacct ggtacttggg tttttggtga agccagtatt cacgaacaca 600

gggcagagac aggaggtttt gataccggtt ttccccaagg tgtccagttc tgcagtcagt 660

gctctgtgga agcccacagc agcgaacttg ctggagcaat atgggatgag ataaggaatc 720

actctgtggc cacacactga agccactgtg acaatgtggc cagagtttct tctcagcatc 780

gatggaagga gtgcttttat gatccaaaaa tgtcctagga tgttgacctc gaaggtcttg 840

gtgatctcct catccttggt gctaagaagg tcggctggat aaattgcccc agcgttgttt 900

accacaatct ctatgtcacc aacttctttc tttacctgat ccacagactt gtaaatctct 960

gcccggttgc tgcagtccac cacaaacacg tgcacgacag cccccagttt cctgcatttg 1020

gctgcggttt cctcaacacc gtgcttacta atatcccaca ggaccaatct gcttttctgc 1080

tttgcaaatt cataagccgt cagcctgcct attccgtgtc cagctcctgt gatgagaaca 1140

gtctgtccgg ccacagactt tcttctctgg ggaatgaaga actttaccag tgactccagg 1200

taggagtaga tgatgatgcc caccagcaag agaagctcca ggatgaggtt catggctctg 1260

agctgctctc tcccttggac tctgttctcc tagcagatgc ccccgcacgg agctccacag 1320

aga 1323

<210> 13

<211> 2529

<212> DNA

<213> 恒河猕猴

<400> 13

ttagaagtca aacattttat tttataacta caagaggtta ctttttaaa gcataatgac 60

atttattttt agtgaattgt ttttgttagt gacttttaaa aaatcatttg tttttaataa 120

aaacaagagg atagtccatg caaaagcatt ctataataca tgtgaaaaac acacagaaca 180

agattagtct tgatgtagtg ggagtcagat tattctttct gttaaaaaaa aaaaaaaaac 240

[1093] ggctgggacg gtggctcacg cctgtaatcc taccactttg ggaggccgag gagggtggat 300

cacgatcagg agatagagac tatcttggct aacatagtga aaccctgtct ctaggaaaaa 360

tacaaaaaaa ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgtag tgttagcaac tcgggaggtt 420

gaggcaggag aatggcatga acccgggagg cggagcttgc agtgagctga gattgcacca 480

ctgcactcca gcctgggaga cagagcgaga ctccatctca aaccaaccaa acaaacaaaa 540

aacaaaaaac aaaaaacaac aaaaaccaaa aaaacctttt ctttcttccc ttccttctct 600

tggatccatt gttagttacg taatagccag tacagttcct tttcctgtgt tagctttaat 660

ttttgagcct aaaattgtct aaacagctct gggaccaagg atatatgtaa gcataaacta 720

caaagaaaga ggttatcatg ggactagaac ttaaaattct cagatttaaa atacagtcgg 780

tcacctttcg taatgtatct tataagatta taaaaaggga ggaaatatag agggtccact 840

tttggtggac ttaagagtta tacagaagac agattcaagt aataaagtcc agaatagagt 900

tgcaccgttt caggctgatg aaaaaggaag aggctaggga aatctttcaa atgctgaatc 960

ttaaagtctg tccaggttga gataaagctg cttgctgaag cttgttgtct tagctgtgca 1020

ctcattctgt gttcttgttg atattccgtg gcgtggctac agattggaat gctacttgaa 1080

cagtcttaaa ccttccctgt gtaaataagt atctttgtat ttactcttag ggaggtagtt 1140

ttgtccacct ttaaatggaa aaataaaata tcttaaagaa aacctttaa gtatgcttat 1200

gtaagcacag acgtttttaa gaggcatgaa aggaaaaaca gacctattaa aaactacatt 1260

aatattcttg agaaacagga agacaggtaa ttaatcttga tcatttcact gctgttagtg 1320

ccaaaccaat gtttttcata ttaacaggac tgaaaaaatg tgaaataaag ctttgcagca 1380

ttgattctaa actattaata tcattatcat gcatacaacg ctggctagag cttatttatt 1440

catttcattt tgattttgtt gccaaccact gcttcaaatt gaatattctg catacgattt 1500

aaaaatgctg aggcgcgttc aggaagaaac ttctttagta tcagaaagat attgatatat 1560

gatggaacaa aaatcatttt cttattggta agtattccat ctatcagact tcttacaact 1620

[1094] tcatctgtct ccaatacagg ccataatctt gtgcttggat ttttggtgaa cccagtattc 1680

acaaaaactg ggcagagaca tgaggttttg ataccagttt ttcccaaagc ttgaagttct 1740

gatgtcagac ctctgtgaaa gccaacagca gcaaatttgc tggaacaata agggatgagg 1800

taaggaatca cttcgtggcc acacactgaa gccaccgtga cgatgtggcc atgatttctc 1860

tctatcatcg atggaagaag tgcttttgtg atccaaaaat gtcctaggat gttgacctca 1920

aatgttttgg taatctcttc atccttggtg ctgcgaagat cggctggata tactgtccca 1980

gcattattca ccacaattgt cacatcaccc acttctttct tcacctgatt tagagagcga 2040

tagatttctt ctctgttgct gcagtctacc acgtacgcat gcgcagtgac gcctagtttt 2100

cggcactcag ctgcagtttc ctccacacca cgcttattaa tatcccacag aaccagtatg 2160

ctctgttgtt ttgcaaattc ataggcagtc cgcctgccta ttccgtgccc agctccagta 2220

atgaaaacaa tctccccagc cacagatttt ctcctccgag gaatgaaaaa ctttaccaac 2280

gactccaagt aggagtagat gatggtgatc agaagcagaa ggatttccag gatgatgttc 2340

atggctctgc cctgtcctct tccttctggt tcagtccttg tatagtccta gggaggaggt 2400

actctgtaca cagagctcca gggaagaggt gtgccccggt gttaatggga ctaccagata 2460

gaagccagct ttggaagcag gccttgttca cgtgtcctaa ggtgttggaa acacctcagg 2520

tttttgaag 2529

<210> 14

<211> 2457

<212> DNA

<213> 食蟹猕猴

<400> 14

ttagaagtca aacattttat tttataacta caagaggtta ctttttaaa gcataatgac 60

atttattttt ggtgaattgt ttttgttagt gacttttaaa aaatcatttg tttttaataa 120

[1095] aaacaagagg atagtccatg caaaagcatt ctataataca tgtgaaaaac acacagaaca 180

agattagtct tgatgtagtg ggagtcagat tattctttct gttaaaaaaa aaaaaaaaac 240

ggctgggacg gtggctcacg cctgtaatcc taccactttg ggaggccgag gagggtggat 300

cacgatcagg agatagagac tatcttggct aacatggtga aaccctgtct ctacgaaaaa 360

tacaaaaaaa ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgtag tcttagcaac tcgggaggtt 420

gaggcaggag aatggcatga acccgggagg cggagcttgc agtgagctga gattgcacca 480

ctgcactcca gcctgggaga cagagcgaga ctccatctca aaccaaacaa acaaacaaaa 540

aacaaaaaca aaaaacaaca aaaaccaaaa aaacctttтc tttcttccct tccttctctt 600

ggatccattg ttagttacgt aatagccagt acagttcctt ttcctgtgtt agctttaatt 660

tttgagccta aaattgtcta aacagctctg ggaccaagga tatatgtaag cataaactac 720

aaagaaagag gttatcatgg gactagaact taaaattctc agatttaaaa tacagtcggt 780

caccttтcgt aatgtatctt ataagattat aaaaagggag gaaatataga gggtccactt 840

ttggtggact taagagttat acagaagaca gattcaagta ataaagtcca gaatagagtt 900

gcaccgtttc aggctgatga aaaaggaaga ggctagggaa atctttcaaa tgctgaatct 960

taaagtctgt ccaggttgag ataaagctgc ttgctgaagc ttgttgtctt agctgtgcac 1020

tcattctgtg ttcttgttga tattccgtgg cgtggctaca gattggaatg ctacttgaac 1080

agtcttaaac cttccctgtg taaataagta tctttgtatt tactcttagg gaggtagttt 1140

tgtccacctt taaatggaaa aataaaatat cttaaagaaa acctttttaag tatgcttatg 1200

taagcacaga cgtttttaag aggcatgaaa ggaaaaacag acctattaaa aactacatta 1260

atattcttga gaaacaggaa gacaggtaat taatcttgat catttcactg ctgttagtgc 1320

caaaccaatg tttttcatat taacaggact gaaaaaatgt gaaataaagc tttgcagcat 1380

tgattctaaa ctattaatat cattatcatg catacaacgc tggctagagc ttatttattc 1440

atttcatttt gattttgttg ccaaccactg cttcaaattg aatattctgc atacgattta 1500

[1096] aaaatgctga ggcgcgttca ggaagaaact tctttagtat cagaaagata ttgatatatg 1560

atggaacaaa aatcattttc ttattggtaa gtattccatc tatcagactt cttacaactt 1620

catctgtctc caatacaggc cataatcttg tgcttggatt tttggtgaac ccagtattca 1680

caaaaactgg gcagagacat gaggttttga taccagtttt tcccaaagct tgaagttctg 1740

atgtcagacc tctgtgaaag ccaacagcag caaatttgct ggaacaatat gggatgaggt 1800

aaggaatcac ttcgtggcca cacactgaag ccaccgtgac gatgtggcca tgatttctct 1860

ctatcatcga tggaagaagt gcttttgtga tccaaaaatg tcctaggatg ttgacctcaa 1920

atgttttggt aatctcttca tccttggtgc tgcgaagatc ggctggatat actgtcccag 1980

cattattcac cacaattgtc acatcaccca cttctttctt cacctgattt agagagcgat 2040

agatttcttc tctgttgctg cagtctacca cgtacgcatg cgcagtgacg cctagttttc 2100

ggcactcagc tgcagtttcc tccacaccac gcttattaat atcccacaga accagtatgc 2160

tctgttgttt tgcaaattca taggcagtcc gcctgcctat tccgtgccca gctccagtaa 2220

tgaaaacaat ctccccagcc acagattttc tcctccgagg aatgaaaaac tttaccaacg 2280

actccaagta ggagtagatg atggtgatca gaagcagaag gatttccagg atgatgttca 2340

tggctctgcc ctgtcctctt ccttctggtt cagtccttgt atagtcctag ggaggaggta 2400

ctctgtacac agagctccag ggaagaggtg tgccccggtg ttaatgggac taccaga 2457

<210> 15

<211> 19118

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

[1097] tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataaggtaat gtatacatct tccaactttt 300

taaagtcaca gagtaagata tgtattttaa gaattatttg acttaccatc tacttatctt 360

tgtatttttg tttttcaaag tttgataaat tccctggtcc cttagtctgt atatgtgtca 420

ggttagttag atgaagggaa tgtaattaag aactaagcag cgatttttat gacatggtgt 480

gcaggttgat agaaagactc aggagccagt ctccttccaa gctgctaaat gaggcaagtc 540

acatattatc tctcagcctg ttttcttggc tctgaagtgg ggataataac ttaggggatg 600

ggcaagaacg ggatctgaaa attacagcta caaacaaaag tcaaacgaag aacttgcaac 660

agaaaccttt agtgcctccc ctcatgcaca agcaacacag ttctaaaata tttactgtct 720

gacccttac agaaaatgtt tgccagtccg tagtcaaaag gattaaataa gtaatatttt 780

cagcacttag catatgataa acgatacgtg gcacatgata aacaataact gtgttaaata 840

aaatatgtgc gcagtgagtc aggcttttcc ttggacatta gtatttttcc tgtgttctta 900

cttgtaaaca ctacattaac aaccccaaat aaaactgaag gaactgaaat cttgtatcat 960

tttctctaaa cttgtaaatt ctggtaaggc catgaaaata tatgcagaga agtgtttaca 1020

ggattttagg attggaaaaa ttgtgaagta ctccttgaga atcacatttt ctgcaaatta 1080

cagtggtttt aattaccatt atattattac tttctcatgt tctttgctgt catgtttagt 1140

tgaaacctaa aatgtctctt acacttagag aactaattct tttctgtttt ttttctgaat 1200

agtgaagaat actatacaaa aaagctacta cattttatt taacagatat gagcatttat 1260

ataatagagg agttgatgta tataaaaatg atttgccatc tttttggtct ttgaagaaat 1320

tcgaatgaac tttctggaag atagcaagaa tttacaaata gagaaaattg ttgcctgctg 1380

ttctcaggca tttgtccaaa aatataaata agtataaatc tatgaaaagg gcttgatgaa 1440

atctaacctt caaatctctt tccagatgtg tatttttggg gaaagggcta tatttattaa 1500

[1098] gtttttttta aattttaaaa tttccagaga caagagaaaa gtaaattaga aggaagtcgt 1560

attaaaaatg acttaagggc gggtgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttggga 1620

gacggaggtg ggcagattgc tggagcccag gagttcaaga ccagcctggg cagcacagca 1680

aaacccccaa ctctacaaaa aatacaaaaa ttagctgggt gcgggggtgc acacccgtag 1740

tcccagctac tcgggaggct gaggtgggag gatcgtttca gttcaggaag ccaaggctgc 1800

aatgagctat gatggcatca ttgcactcca agctgggcaa tagagccagg ctctgtctca 1860

aaaaaaataa aaaaagactt aagaaaaata ggtaacccaa cctcaaaaat tctctttgaa 1920

tcattaaatt tcatggttaa acatttaagc tactgaatga ttcactctaa ggctgtaatg 1980

taactcagat ctcctttagg cgaggaagat gctggctgag ttttcatcat aactggctcc 2040

ttttgccctg tgagatgaga gacacagtag cagtttggct cttatgcaat ctaaactgtt 2100

gcgttgggaa tacggttcaa aaaacacatt ggagtttaag ctaaagcaag tgttttgcta 2160

acaaaaagac aaggcatcac attttgcaat tgtctagctc agttataaaa cagaagaata 2220

ggccggacgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga gacgggcgga 2280

tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gataacacag tgaaaccccg tctctactaa 2340

aaatacaaaa aaattagcca ggcgtagtgg cgggcgcctg tagtcccagc tactcgggag 2400

gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aggcggagct tgcagtgagc cgagatgacg 2460

ccactgcact ccagcctggg cgacagagcg agactccgtc tcaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2520

aaaactgaag aataattaat tcttcaatca aaacatctga tgaatgctct ggtaacttat 2580

gctctctact gacctagaaa caaatgagag agtatggtgt ggtttgtgca atctggcagt 2640

gagcaagcta ccaactaaat cagtgaaaga ctctcctatt ctttttttac tcttctgcaa 2700

tcccacaaaa ggctatttga ggggatactg actttgagac tgggtcctaa catccatgtt 2760

tggggagttc aggctgctgc tccagggttt agcctacagt agcgaaatac aaaggaccca 2820

gagaccactc attcaaggtt tgccctaaat agcagcaaca ccactgtcat ctcaatacac 2880

[1099] gaagaatagg gcttttcagg tatccttgcc tctttgtcac agagaagagt ttacagattg 2940

tgagacggaa aagtataatt tttaaaacct tataatattt tctataaaag tcacctgagg 3000

tgaaaacttg aaaagaatta taattttcca gaatgtgagt caagaaacat tagagcaatt 3060

ttatcttagg aaagaggtct ttgaatttag gctgaaagta aattgctctg tctccatgtc 3120

ctatggttat gggcaagttt ggtacataaa tgagaaatcc atccagtggc cttgcccatc 3180

tcactcccaa acacctgaag aatgtaatgt tatatctcct agagtagcag catggtctcc 3240

ctatgaaagt ccttcttctt taaggagact tctttccctt ccctcctagg aggatgagtc 3300

agaatcatca agaaaaatat gatgggcaga ggcatacagt ttaccattac cactagttta 3360

gaattactac ttagcacttt actgcctatt acatagttgg tgctcaacaa atgtatgata 3420

aattaatggt tgagtttttc tttcttctcc atattcatct tccatgacac cacgaagagc 3480

aatgtttttc aagaatgttc ttcaaggttt gaaagtagcc tgctttagag aaactgccta 3540

ctgtacagcc tccaaccaag aggaaaagct gaaaaaagca tgaagggatt ttgttttgtt 3600

ttgtttgttt tggttttaat atgagcattc cctggcagaa aagccagggg taatctcatt 3660

gcaactaggc aatcactctc aagaaatttt ctaacaaata aggaggccaa tttttatttt 3720

attttgagac gaagtcccac tctgtcaccc aggttggagt gcaatggaat gatttcagct 3780

cactgcaacc tccgcctccc gggttcaagt gattctcctg tctaaacttc ccgagtagct 3840

gggattacag gctcccacca ccacgcccag ctaatttttt gtatttttag tagagatggg 3900

gtttcaccat tttggccaga ctggtctcaa actcctgacc tcaagtgatc caccctcctc 3960

ggcctcctaa agtgctggga ttacaggcgt gagccaccac acctgaccca ggaggccaat 4020

ttttaaaagg ttaactaatc ttcatgtcca aaatgaatgt taattgttca ttttggacat 4080

gaatgttaat ttttttttt ttttttttg agacagagtc tcactctgtt gcccaggctg 4140

gagtccagtg gcactatctc cactcactgc aacttcctcc tcccaggttc aagcaattat 4200

cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaggcccac accatcaggc ctggctaatt 4260

[1100] tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac catgttggcc aggctggtct tgaactcctg 4320

acctcgtgat ccgccctcct cggccaacca aagtgctggg attacaggcg tgagccaccg 4380

cgcctagccg aatgttaatt gtctaaaaat ttttcttctc caatgtcttc tcctccactt 4440

ttttcggaat ttgtttcttc ctaattacag cgcggtgtgg aggaaactgc agctgagtgc 4500

cgaaaactag gcgtcactgc gcatgcgtat gtggtagact gcagcaacag agaagagatc 4560

tatcgctctc taaatcaggt gagactgcag gttcacaaat ttcttcagat tattttgttt 4620

cctaggacgc tgacgtggaa aatgagaaag gtctttatga ctgcctgatt taaattggat 4680

tttagctgct aactgaagta gttatgtcac caaggaagga tatatacttt ttttcttgta 4740

tgtaatccac tcagctctgc ccattattat tgttcatatt attaatcaat ttcattctga 4800

tcagaagtgt gagcagtggc acagagtgac tgacaaaaga tttatcatca gggaatatgg 4860

atcacttcct agttttgttt tagtcctatt aactttgcag taattccagc ttctctttaa 4920

ttatttccct tgtgagattt tattttggtg ttaatgtagt cttctgtaga aaatgtaata 4980

ttaataatta ttatcacaat tattttaaaa gagtaaatac caaataatca caatgaacta 5040

agcactctaa caaactttac atttttttaat tcaatcccta caataactct gtaaacttca 5100

ttttacagat aagcaaatta tgactcagag aggttaagcc agacccaggt catgtagtta 5160

ttaggttatg aaaccaggat ttctcaacca gcactttaga ccaggtgcgg tggttcacac 5220

atgtaatccc agcactttgt gaggccaagg tggaaggatc acatgagacc aagagttcaa 5280

gaccagccca ggcaacatag tgagacccta tctctaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5340

aaagtttaaa gaaaaacaca tttttaaaaa atgaacactt taaaaatatt tggtcagaat 5400

ttatatagga atttatcaac ataaatgtta atttcacttt actgataaac ttgcaaaaca 5460

tgatgtgctg ggtactgaaa tttagatgtt aaaagaacag tttatcccac ctttatgaca 5520

gtgttccctt ggcctccacg atttgagctc aacagtctgt cttgcctgaa ctctgagaga 5580

cctcatacaa tagaagaaag actctcatct ttggattata ttggtcccaa aactttgagt 5640

[1101] ttgaataata cacccagtga aagtgttctt tcaatttcaa aaggtgaaga aagaagtggg 5700

tgatgtaaca atcgtggtga ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac 5760

caaggatgaa gagattacca agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttgggtgag 5820

tgtgagtcag aaacatttct gatttgtgca ccttctctta agatacatga aacttataac 5880

ggagttcaca tacttctgga caggaaactg gccagatctt tgccttaatc aagaatcatt 5940

aaatttgttt gagtagaaga gccacagagt ctctgacaca aggacacaga attcaagtgg 6000

acacaacaca ccagaatgta agctacttgg tctgtcttgt ccaccagtat ctgacacaaa 6060

gcttggcatg taccaggagc tcaacaaatg tttgtggagg tttgttaagg gttgtcagtg 6120

tacatctttt caatgctgtc acttgtgact tcatttttt ccctccacac catgattttg 6180

taatgtgtcc tcattttgtg gaattttaga atggaaagga catcagaagt aattacttgg 6240

atgtatatag gatcgaggac acttttggac gagactctga ggcaagtgtt ctagatccat 6300

ggggtgctgg aactgagaaa tgcagctata cagacctcat ataattggtt agttttgtgg 6360

gagatggaaa tatcaacttc aactgccttt gtatagaaat ttttatgatt aatcttccag 6420

tgcctcaata ttagtgtaga atctagggca gatctggatt ctagaagaaa gaagaaaaaa 6480

aagagatgtg tccccttac ctttaccagc tcttcacata tgtgaattgg ctcccatgcc 6540

caccaaacta cacggagacc tcatacatta gctacctata gctgcataac aaattataca 6600

aaacttagtg gtttaaagca acaatgtatg ttcactatcc tctcacagtt tctatgggtt 6660

gggaatttgg aggtagcttg ggttgggagt tctagttcta tgaatttgca taggatttat 6720

taaattctta taaaatttta ttgatgtttc tcacaaaaga ggtttttgga aaaaaagaaa 6780

gacttgtttt ctgtaacatc aacatataat atacaatatt acaaataggg agatagtgaa 6840

ttcaatcatg attcattagt gtggtgtaga actctcagct tacactactc aactgtctta 6900

atacagttac acaagatttc actcttttaa ttagaatgat aaagccccaa accaaaaaat 6960

tatatgacac caaattatca taaggaataa ttttagttct gaaaactctg aatttttccc 7020

[1102] ttaatattgt ttagatgaca tatccaaaaa aggatctatt tgattccttc tgaagggaag 7080

gagggggagt actgagatta gtgttggcat ggggcttacc ataccaataa atttgtatct 7140

ttatttctat catttgtaaa gaattaatca tggaatgctt ggaagtattt tatttcattg 7200

tataagttct ctcaaatgcc tttctgtctt aacaaaaata aaactacctg atttggaaac 7260

ctaacgtcta tgtcattgtc tttcttcttt ctgcaatgat ccttaagatc acaaaagcac 7320

ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 7380

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attggtaagt atcacatgcc agccatgtta 7440

tatatttta tactttgaag ggagcattac acttcaaatt gttaccactg gagagtcctg 7500

gttcttggca tcttgaacaa agaattggac aaaactcacc aacaaagcca ggaaagaatg 7560

aagcaacaaa agcagagatt tattgaaaat gaaagtacgc tttacagggt gggagtgggc 7620

ccaagcacag gggctcaaga gccaattaca gaattttctg gggtttaaat acccccctaga 7680

ggtttccact ggttacttgg tgtacgccct atgtaaatga agaggatgaa ttaaagttac 7740

agagtcgttt actcagtgta caccatatgt aaatggagag gatatttcct gtcatagctg 7800

gagtgtttcc atttgattta gttctaggaa gtcagcatga atcggcctta tgttccctgc 7860

ctccagaccc tgttctcctg cctcaagatt acaatgctga gagcagagtg atttggattt 7920

acagaattta aatttatagt agtttagaat gatttttaa atgacttttt ctaaaacaat 7980

gaaaccaggt tgtaattata tttaagatat ttttagattt ctgcaaactc ctctgtagaa 8040

caatgagaga aaacagtaat gccaagcatg tttccattgt ttcctggaat aagaaacaga 8100

aaccccacag actgagaagc aaaacctaca gaagctaaaa tgaacacatg tctatgtcat 8160

ggccttggtg cccaagataa gacaatcaga gtggtccctg gatcaaaaca ttttacagtg 8220

tgcttgtgcc atgaaagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgagaga gagagagaga 8280

gagaaaacga ctctacctga ctaaaagttg cagataccac actccatgca ccaccaaaga 8340

cataaaggga aggaggtgag aggcgttaag gatgtactgc tgtatttgcc aaatatcctt 8400

[1103] tcctgtaaac tcttctccag atcctcataa taaaattaag aggccaaagt ggcaaccatt 8460

gtcaagagaa aaactatcaa ccattgtcaa gagaataact cagttattga gagagagagg 8520

agaaatgagc agagtcctac agaagtctgt caacacagat accagttttg tagaatttct 8580

aaatgtattt ttcctgattc atatttttca aaataaaagc agcaataaaa actgattaga 8640

aaacagtttg aagattcaat ggaaaaacct tacatgtagg atggaaaact gaacattaag 8700

ccaatcaata gagttatttt tgttcttttg ttatcattgt tgtttaagaa atgagatacg 8760

ttcacaattc tgcttaatca tgtaagaaaa tgaaaatgaa ttgccattta tactctcaga 8820

aaaatcacaa gtggctgatt tttggcttcc acttgttctt aagccaaatg ataccgcctt 8880

ctcacagaaa gctgaggatt ggtttcactc tcccttagct aacaatgctt aataattctc 8940

ttacagttcc agcaaatttg ccgctgttgg ctttcacaga ggtctgacat cagaacttca 9000

ggccttggga aaaactggta tcaaaacctc atgtctctgc ccagtttttg tgaatactgg 9060

gttcaccaaa aatccaagca caaggtaagg tcaaaatcaa gttagaatgg gtatgtggta 9120

tgataaattg atatgaaaac taatgagaaa tgtttaggca ggccaactaa tagaagaaaa 9180

tgaagaagga aaaataattt ttcttattat tattattatc ttgaaattaa aggaataaag 9240

ggggaaaaca cattagggac tagcaggaat gatcagccac cgatgaactg ggatatttat 9300

ttgtgtccgg gagaaagcac atacatttga tcaccgttac caccctgtct ttaaaatgca 9360

aatgttccaa ggaccagcaa ataaattgag tatctagctc cttagtcaag gtgaatttct 9420

gcaagaactc ttgtctctgg tgagacagga tttgagacca caagagaaga aaaattagtc 9480

ctgaaaggag aagaaaaaag caggaaggtg tggataagaa cccgaaaatt aagccatctg 9540

cttaacaaat ttttctaatc ctagtatata ttctgctgca ggttaacaaa atatactaag 9600

cttaatgatt cgaaaccaat tttttactgg aagggaatta atcctaaata tattcattca 9660

aaagaactaa acaattctct gttgagtgcc gcctcatttg aggatactga ctcttacagc 9720

ctgagttagc tatgtggtct ctgcagctgg aatcactccc tgccactgga gtccttcatg 9780

[1104] gtgttagacc ataggtactg ttgactaaag aaaaaaaaaa gtttttgttt ttatttttgt 9840

tttttttgag acagagtctc actctgtcac ccaggctgga gtacagtggc gcgatctcag 9900

ctcaccgcaa cctccgcctt tctgggttca agcaattctc cttcctcagc ctcctgagta 9960

tttggattac aggcgcccac caccacgcct ggctaatttt tgtatttta gtagagacgg 10020

ggtttcacca tgttggccag gctggtctca aactcctgac ctcaggtgtc ctacctgcct 10080

tggcctccta aaatgctggg attacaggag tgagccacca tgcccggcca aaaaaataag 10140

tttttaaaga attaaaggtc atcctggcta acacagtgaa accccgtctc tactaaaaaa 10200

cacaaaaaaa ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgtag tcccagctgc gcgggaggct 10260

gaggcaggag aatggcgtga acccgggagg cggagcttgc agtgagccga gatcgcgcca 10320

ctgcactcca gcctgggcga cagagcgaga ctccgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 10380

aaaaaaaaga attaaaggtg ttaattttat ttagaagcct tactgaagac tacagtcgga 10440

ggcctatagc ctgagagcag ccctttagag aggttcagtt gaactgttct gatagtgggg 10500

gccatgtgct ctatcctgta ttgtcttcaa agcatctttc cagagagctg cacattgtca 10560

cagagtcagg gactttgtga aattatgctg acaaccagaa gtgagtaaac gtggcttctt 10620

acatttgcta cgttgtctca cagtacttaa taagtatgca atatgtaagt aaatactata 10680

gtactattgc aactcctgat tgttttctta gacaaggaat tgggcccaat aaaaaccctc 10740

ttggtaggca ttcaggcttc gtgtaccatg agctttccta agggtatcct gccactcttg 10800

gggaaggcat gatagatgag gggagtaagg ataatggaac tctgggtaca gggttcctgg 10860

gggctaactt agaggtagac acaggcaatg ctaaatattt gggattgatt ttatagaggt 10920

tgctagattg tgaatttcct tagtaagggc taaggcattg atatgtaatg tcacacttgg 10980

ctccgaggct gggttgttgg atccatgtag atgaaatcag ggagagaaag ggcagaacgg 11040

agtaatttag aaatgtattg atttgtatta ctctctgttg gcttgctatt caaggcagtg 11100

gagaactcaa tcacataata atctgcagca aaccacagat catcccaggg aatgaagttt 11160

[1105] taacattcgc tggctcccta actcctcacc cagcctttac attcactggc tgttcagtcc 11220

atgcctggac atcttaattt gaatacaaca ttttaaatcc atttttctgt catcatcttg 11280

cactaacaga caattctaca ctaagcctat gtttatgaat atttctcaag agtacatgta 11340

cacagccttc agtataagga aaactggaag tatgacatac ctccagttgt catactcctt 11400

gggcccctct taaattctca ttaaactgca ggataggcaa gtcagaggtg aatctcaaat 11460

acgaaattct taccggaaag gggttccaat ccagacccca agagagggtt cttagatttc 11520

tcgcaagaaa taattcgggg caaggccaca gtgcaaagca aaagcaagtt tattaggaaa 11580

gtaaaggagt agagaacagc tactccatgg agaagaatgg cttgagctgc tccaccaagg 11640

gtatttagag ttacttcttg attatatgct aaacaagggg tggattattc atgagttttc 11700

cgggaaaagg gtgagcaatt cccagaactg agatttcctc ccctttttag gccatatagg 11760

gtaacttcct gccattgcca tggtatttgt aaactgtcat agtgctggtg gaagtgtctc 11820

ttagcttgct aatgtattat agttagctta taatgagcag tgaggacaac cagaggtcac 11880

tttcatcacc atcttggttt tggtgggttt tggccggctt ctttactgca ccctatttta 11940

tcaacaaggt ctttatgacc tgaatcttgt gccaacctcc tatctcatcc tgtgacaaag 12000

aatgccttaa cttcctggga atgcagccca gtaggtgtca gccttatttt acccagaccc 12060

tattcaagat ggagttgctc tgatttaaac gcctctgaca aaatgacgac ctcaaaacaa 12120

tccagcttta tggaatacct ccacaagaaa gaaagtatac ttagctatag aattttctcc 12180

ttgcatccaa caggctttga gatgtcagat gtttccttcc tgtcccatga ttaatcctag 12240

ccattcctct ttcttgtctg gctccactac tccttaccat ctaatgcctc gccaccattt 12300

tgatattttg actaagtgag ctatgaaaca cacctactgg atatgaaagt ataagtttct 12360

gataacaaaa catcaacatg ggatgtggag gaagtgggta gggtggcatt aatgcagcaa 12420

atcctggaat attttaaatc ttcattctaa atttagtaaa aatataggat aattttcctg 12480

ccatcattta cttataaaat taaaatttta gaaaataaaa ataatatttt cctcttttta 12540

[1106] atcacagatt atggcctgta ttggagacag atgaagtcgt aagaagtctg atagatggaa 12600

tacttaccaa taagaaaatg atttttgttc catcgtatat caatatcttt ctgagactac 12660

agaagtaagt acagcacaga acacccaaat actaaaacac caatagagct ttttttttg 12720

ctttttttt ttttagacag agtctcactc tgtcaccctg gctggattgc ggtggttgca 12780

gtggcatgat cttggctcac tgcaacctcc gcctcctggg ttcaagcaat tctcatgcct 12840

cagaccccca agtaactggg attataggtg tgtgctgcca cactacaccc agctaatttt 12900

tgtatttttt gatagagaca ggtttcccca tgttggccag gctggactcg aactcctgac 12960

ctcaagttat cctcctgtct cggcctccca aagtgctggg attacagtca tgagccacca 13020

tgcctggccc aatagagcta ttattatgga gcatctttca gttgtgaaaa ttggcatgga 13080

aactctccat ccctggggag aacagttatt tcctctgtta ttttcctacc cagtctataa 13140

aaagagagtg attcattttc tctaccaaat ctactgtctc tgcccaaact ttgctgaaga 13200

ctattctaac taaaggaaac acagtttaaa aagaatgcaa tatagtgaag tagttaataa 13260

taaagactcc atttttaaaa gtctgctgga agtttggttg ggattgcact gaatctatag 13320

agcaattggg gagtattgac atatcaacaa tattgagttt tctaatccaa gaacataata 13380

tctattttta aaatcttctt caaaatcttt aaatctttaa attgtatttt gtagtttttg 13440

gtgtttaagt cttgcacata ttttgtcaga tttattccaa agtatttcac gggttctttt 13500

ttttttttt ttttttttt ttgagacaga gtttcaccct tgttgcccag gctggagtgc 13560

agtggcgtga tcttggctca ctgcagcttc tgcctcctgg cttcaagtga ttctcctgcc 13620

tcagcctccc aagtagctgg gattacaggc acctgccccc tcgcccaact aacttttgt 13680

gtttgtagta gagacagggt ttcaccatgt tggccaggct ggtctcgaac tcctgacctc 13740

atgtgatcca cctgcctcag cctcccaaag tgctgggatt acaggcatga gccatcatgc 13800

ccagccctat ttgacggttt ttgacgctaa tgcaagtggc attttaaaaa attttatatt 13860

tcccattgtt tgttgtcagt atatattgga tttttgtaat ttgatctcat attttgcagt 13920

[1107] cttgctaaat tgctaaacct ctttttgcta aactcgataa gctttttttt ttttggtaga 13980

ttcctgggcc tctaattttc tttatgggaa agttttaat tacaaattta atttctttaa 14040

tagctacatg gctattcaat ttacttatta attcttggta atgtgtgtct ttcaaggaat 14100

ttgtccattt catctaagtt gtagaatttc tttggcataa atttgtacat aacattccct 14160

tattatcctt ttaatgtctt tagaatgtct tatttattta tttatttatt tttattatat 14220

ttttttgaga cagagtctcg ctctgttgcc caggctggag tgcagtggca caatcttggc 14280

tcactgcaag ctccgccttc tgggttcatg ccattctcct gcctcagcct ccctagttgc 14340

tgggactaca ggcgcctgca accatgccca gcttatttttt ttttttttt ttttttttt 14400

ttttttttt ttttttttt tagtagagac ggggtttcac cctgttagcc aggatggtct 14460

cgatctcctg acctggtgat ccgcccgcct cagcctccca aagtgctggg attacaggcg 14520

tgagccacca agcccagcct atttatttat ttagtagaga cagtctcact ttgctgccca 14580

ggcaacaaag gttttgaatg cctggcctca agcagtcctc ctgccttggc ctcccaaagt 14640

gctgggatta caggcatgag ccactgcacc tggccaaatg aatatgctga taatatcttc 14700

tttataagga tgacataaga ataaaataat gtaatacaaa caaagcccct gtcactgaaa 14760

atgtatagac ttcaaatgtt aaagtcttag agaacagaat ttatatgaaa tagcaacagc 14820

aacaatttcc cagaggaaat actctctcag ctttcttctg aggagcagtt tctaaattga 14880

aattgtatca gtgagaagat aactatacta acttcataag ccttgggcct ttttgaaaca 14940

aatccatata aactatgaac aaacttgaaa tagaacaatt tgagaacagg gtacaaactg 15000

cattggtgta tcaatttcag tatttggttt tagcttaaat agactgactt gagataacat 15060

aaggagaacc ttgaccccca agcaacatca tctcgcgagt tgactaggcc gggtgtggtg 15120

tctcacgcct gtaattccag cactttggga ggccacagca ggcagatcac ttgaggtcag 15180

gcattcgaga ccagcctggc caacatggtg aaacctcagc tctactaaag atacgaaaat 15240

tagcaggcat agtggcctgc acctgtaata ccaggcactc gcaggagaat cccttgaacc 15300

[1108] cggaaggcgg agattgcagt aaaccatgat tgtgccactg cactccagcc tgggcaacag 15360

gagactctgt ctcggaaaaa taaatttttt aaaaaaatga aaaaaaataa aagttgacta 15420

aattagtgtc ttggtactaa gcactgtagg aagtgagttt catggaaccc caactctctt 15480

ggggcccaaa gcaagtcata ttaatattga aaattacatg catatacatg catatgacca 15540

aggtgataaa aacaattatt ctgcctgagt tggagaatag tatcccagta aaataaacaa 15600

gagtctcaaa gtcttttgta tcctttgaag ctgtcatggt ggtttgtaac taggcaacag 15660

gtatatattg ttaatcttct ttgcatttaa ttccttttat agagagacac aattttacga 15720

gcagatgcaa ttactagcat gaaggtttct ttgtgagggt agttaaaagg cccacatgag 15780

ctctcttctt atccttgtcc ttctttcagc cagatcttcc ctgccccttt gctcattcca 15840

tctttcaccc acctaccccc aaaacaagga agtaaatctt gcattagtca acaataccaa 15900

agtgattttc aatatgactt tctctgcaga atgttattat ttctgcctct ttacattcac 15960

atactgtctt cctttttttt ttttttttttt ttttttttttt tagattgggt ctcactctgt 16020

tgcccaggct ggagtgcagt ggcttgatct cagctcactg taacctccac ctcctgagtt 16080

caagcaattc tcctgcctca gcctcctgag tagctgggat tacaggcatg tgccaccaca 16140

cctggctagt ttttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg gtcaagctgg 16200

tctcgaactc ctgacctcat gatctgacca cctgtgcctc tcaaagtgct gggattacag 16260

gcgtgagcca ccgggccagc cactctcttc ctttcagttg cctactcatc tcttatgcat 16320

tcctggacat cagttgtcct tttgaagctt tcctccacta tcccagccca tgtgaatcct 16380

ccttccagtt atagccctta attctagatg gctgatattt ttcaataatt gttttaagat 16440

gaccatttta gcctatcagc taaacaatat caaagacaat agctattttt caagtacttt 16500

agtttacctt attatagagt gcataataga tattcagtaa atagtaaagg agaggtgaag 16560

gcttgcatag aatggattct ggtggtgtct cttggtgagc ttttagcatc aagattaatc 16620

agcagtttca gcaatgagct cagaccttca gttttagatc tttactcata tcagataaga 16680

[1109] gagtgagaag agtggtatgt atcagtgctt tatttatatt tgcatccaat ttgaactatg 16740

aatattacaa aggtgcacac ataggttcag acagattgat ttaaaatgac caaagatgac 16800

ctgtcgtaag caacctgggt atcttaagat gcactccttg gagagggaat gttcctaaaa 16860

acattttcag agggacgaac tgtatgaaat tcagtaaaac ataaatcatg aggaaaactg 16920

attactctct ttttgacatg aaatgagagt tttaatgcat ggttacgatt attaacgtac 16980

tccgctgcaa gacgttaata aagttactgt tttgcaggct agaatgtctt gatgctgtaa 17040

tcagaacaca ctttttcccc tttcttccag cttcaaatgc agattcataa ttgggctgac 17100

ttctaataac tgcaatgttt tctgccttgg gcttgcagca gaagcctgac aaaatagtgt 17160

ttgtttaggc aataatttat ttatttattt attgagatgg agtttcattc ttgtcgccca 17220

ggctggagtg caatggcgtg atctcggctc actgcaacct ctgtgttcag gcaataattt 17280

agactttacc ttacttgtga ttactatagc aattactata gccacaaggc ataattttac 17340

tgtctcattt caattttatg aatttgaatg tttttacact tttcctaatg aagtccacta 17400

tgaagttatg tcaaaaaaaa aaaagaaaaa gaaagatgca cacgtaaaag agaggtggtt 17460

gcaagagaag aaaagaacgg aggaaagtta aacgcaaacc agataactct cagcgtattc 17520

taaatgacca aaaacagaac tctgttgtca aagattttaa atggaaaatt tttcaatttt 17580

ttttttcttt ttgtacaggt ttcttcctga acgcgcctca gcgattttaa atcgtatgca 17640

gaatattcaa tttgaagcag tggttggcca caaaatcaaa atgaaatgaa taaataagct 17700

ccagccagag atgtatgcat gataatgata tgaatagttt cgaatcaatg ctgcaaagct 17760

ttatttcaca ttttttcagt cctgataata ttaaaaacat tggtttggca ctagcagcag 17820

tcaaacgaac aagattaatt acctgtcttc ctgtttctca agaatattta cgtagttttt 17880

cataggtctg tttttccttt catgcctctt aaaaacttct gtgcttacat aaacatactt 17940

aaaaggtttt ctttaagata ttttatttt ccatttaaag gtggacaaaa gctacctccc 18000

taaaagtaaa tacaaagaga acttatttac acagggaagg tttaagactg ttcaagtagc 18060

[1110] attccaatct gtagccatgc cacagaatat caacaagaac acagaatgag tgcacagcta 18120

agagatcaag tttcagcagg cagctttatc tcaacctgga catattttaa gattcagcat 18180

ttgaaagatt tccctagcct cttccttttt cattagccca aaacggtgca actctattct 18240

ggactttatt acttgattct gtcttctgta taactctgaa gtccaccaaa agtggaccct 18300

ctatatttcc tccctttta tagtcttata agatacatta tgaaaggtga ccgactctat 18360

tttaaatctc agaattttaa gttctagccc catgataacc tttttctttg taatttatgc 18420

tttcatatat ccttggtccc agagatgttt agacaatttt aggctcaaaa attaaagcta 18480

acacaggaaa aggaactgta ctggctatta cataagaaac aatggaccca agagaagaaa 18540

aggaagaaag aaaggttttt tggtttttgt tttgttttgt tttgtttttt gttttttga 18600

gatggagtct cactctttcg cccaggctgg agtgcagtgg tatgatctca gctcactgca 18660

agctccacct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcctgagta gctgggacta 18720

caggcgcccg ccaccacacc cggctaattt tttgtatttt ttgtagagac ggggtttcac 18780

catgttagcc aagatggtct cgatctcctg acctcgtgat ccacctgcct cggcctccca 18840

aagtgctggg attacgggtg tgagccaccg tgcccagcct ttttttttt aatagaaaaa 18900

ataatccgac tcccactaca tcaagactaa tcttgttttg tgtgtttttc acatgtatta 18960

tagaatgctt ttgcatggac tatcctcttg tttttattaa aaacaaatga tttttttaaa 19020

agtcacaaaa acaattcact aaaaataaat atgtcattgt gctttaaaaa aataacctct 19080

tgtagttata aaataaaacg tttgacttct aaactctg 19118

<210> 16

<211> 19119

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

[1111] agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataaggtaat gtatacatct tccaactttt 300

taaagtcaca gagtaagata tgtattttaa gaattatttg acttaccatc tacttatctt 360

tgtatttttg tttttcaaag tttgataaat tccctggtcc cttagtctgt atatgtgtca 420

ggttagttag atgaagggaa tgtaattaag aactaagcag cgatttttat gacatggtgt 480

gcaggttgat agaaagactc aggagccagt ctccttccaa gctgctaaat gaggcaagtc 540

acatattatc tctcagcctg ttttcttggc tctgaagtgg ggataataac ttaggggatg 600

ggcaagaacg ggatctgaaa attacagcta caaacaaaag tcaaacgaag aacttgcaac 660

agaaaccttt agtgcctccc ctcatgcaca agcaacacag ttctaaaata tttactgtct 720

gacccttac agaaaatgtt tgccagtccg tagtcaaaag gattaaataa gtaatatttt 780

cagcacttag catatgataa acgatacgtg gcacatgata aacaataact gtgttaaata 840

aaatatgtgc gcagtgagtc aggcttttcc ttggacatta gtatttttcc tgtgttctta 900

cttgtaaaca ctacattaac aaccccaaat aaaactgaag gaactgaaat cttgtatcat 960

tttctctaaa cttgtaaatt ctggtaaggc catgaaaata tatgcagaga agtgtttaca 1020

ggattttagg attggaaaaa ttgtgaagta ctccttgaga atcacatttt ctgcaaatta 1080

cagtggtttt aattaccatt atattattac tttctcatgt tctttgctgt catgtttagt 1140

tgaaacctaa aatgtctctt acacttagag aactaattct tttctgtttt ttttctgaat 1200

agtgaagaat actatacaaa aaagctacta cattttatt taacagatat gagcatttat 1260

ataatagagg agttgatgta tataaaaatg atttgccatc tttttggtct ttgaagaaat 1320

tcgaatgaac tttctggaag atagcaagaa tttacaaata gagaaaattg ttgcctgctg 1380

[1112] ttctcaggca tttgtccaaa aatataaata agtataaatc tatgaaaagg gcttgatgaa 1440

atctaacctt caaatctctt tccagatgtg tatttttggg gaaagggcta tatttattaa 1500

gtttttttta aattttaaaa tttccagaga caagagaaaa gtaaattaga aggaagtcgt 1560

attaaaaatg acttaagggc gggtgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttggga 1620

gacggaggtg ggcagattgc tggagcccag gagttcaaga ccagcctggg cagcacagca 1680

aaacccccaa ctctacaaaa aatacaaaaa ttagctgggt gcgggggtgc acacccgtag 1740

tcccagctac tcgggaggct gaggtgggag gatcgtttca gttcaggaag ccaaggctgc 1800

aatgagctat gatggcatca ttgcactcca agctgggcaa tagagccagg ctctgtctca 1860

aaaaaaataa aaaaagactt aagaaaaata ggtaacccaa cctcaaaaat tctctttgaa 1920

tcattaaatt tcatggttaa acatttaagc tactgaatga ttcactctaa ggctgtaatg 1980

taactcagat ctcctttagg cgaggaagat gctggctgag ttttcatcat aactggctcc 2040

ttttgccctg tgagatgaga gacacagtag cagtttggct cttatgcaat ctaaactgtt 2100

gcgttgggaa tacggttcaa aaaacacatt ggagtttaag ctaaagcaag tgttttgcta 2160

acaaaaagac aaggcatcac attttgcaat tgtctagctc agttataaaa cagaagaata 2220

ggccggacgc ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga gacgggcgga 2280

tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gataacacag tgaaaccccg tctctactaa 2340

aaatacaaaa aaattagcca ggcgtagtgg cgggcgcctg tagtcccagc tactcgggag 2400

gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aggcggagct tgcagtgagc cgagatgacg 2460

ccactgcact ccagcctggg cgacagagcg agactccgtc tcaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2520

aaaactgaag aataattaat tcttcaatca aaacatctga tgaatgctct ggtaacttat 2580

gctctctact gacctagaaa caaatgagag agtatggtgt ggtttgtgca atctggcagt 2640

gagcaagcta ccaactaaat cagtgaaaga ctctcctatt ctttttttac tcttctgcaa 2700

tcccacaaaa ggctatttga ggggatactg actttgagac tgggtcctaa catccatgtt 2760

[1113] tggggagttc aggctgctgc tccagggttt agcctacagt agcgaaatac aaaggaccca 2820

gagaccactc attcaaggtt tgccctaaat agcagcaaca ccactgtcat ctcaatacac 2880

gaagaatagg gcttttcagg tatccttgcc tctttgtcac agagaagagt ttacagattg 2940

tgagacggaa aagtataatt tttaaaacct tataatattt tctataaaag tcacctgagg 3000

tgaaaacttg aaaagaatta taattttcca gaatgtgagt caagaaacat tagagcaatt 3060

ttatcttagg aaagaggtct ttgaatttag gctgaaagta aattgctctg tctccatgtc 3120

ctatggttat gggcaagttt ggtacataaa tgagaaatcc atccagtggc cttgcccatc 3180

tcactcccaa acacctgaag aatgtaatgt tatatctcct agagtagcag catggtctcc 3240

ctatgaaagt ccttcttctt taaggagact tctttccctt ccctcctagg aggatgagtc 3300

agaatcatca agaaaaatat gatgggcaga ggcatacagt ttaccattac cactagttta 3360

gaattactac ttagcacttt actgcctatt acatagttgg tgctcaacaa atgtatgata 3420

aattaatggt tgagtttttc tttcttctcc atattcatct tccatgacac cacgaagagc 3480

aatgtttttc aagaatgttc ttcaaggttt gaaagtagcc tgctttagag aaactgccta 3540

ctgtacagcc tccaaccaag aggaaaagct gaaaaaagca tgaagggatt ttgttttgtt 3600

ttgtttgttt tggttttaat atgagcattc cctggcagaa aagccagggg taatctcatt 3660

gcaactaggc aatcactctc aagaaatttt ctaacaaata aggaggccaa tttttatttt 3720

attttgagac gaagtcccac tctgtcaccc aggttggagt gcaatggaat gatttcagct 3780

cactgcaacc tccgcctccc gggttcaagt gattctcctg tctaaacttc ccgagtagct 3840

gggattacag gctcccacca ccacgcccag ctaatttttt gtatttttag tagagatggg 3900

gtttcaccat tttggccaga ctggtctcaa actcctgacc tcaagtgatc caccctcctc 3960

ggcctcctaa agtgctggga ttacaggcgt gagccaccac acctgaccca ggaggccaat 4020

ttttaaaagg ttaactaatc ttcatgtcca aaatgaatgt taattgttca ttttggacat 4080

gaatgttaat ttttttttttt ttttttttttg agacagagtc tcactctgtt gcccaggctg 4140

[1114] gagtccagtg gcactatctc cactcactgc aacttcctcc tcccaggttc aagcaattat 4200

cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaggcccac accatcaggc ctggctaatt 4260

tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac catgttggcc aggctggtct tgaactcctg 4320

acctcgtgat ccgccctcct cggccaacca aagtgctggg attacaggcg tgagccaccg 4380

cgcctagccg aatgttaatt gtctaaaaat ttttcttctc caatgtcttc tcctccactt 4440

ttttcggaat ttgtttcttc ctaattacag cgcggtgtgg aggaaactgc agctgagtgc 4500

cgaaaactag gcgtcactgc gcatgcgtat gtggtagact gcagcaacag agaagagatc 4560

tatcgctctc taaatcaggt gagactgcag gttcacaaat ttcttcagat tattttgttt 4620

cctaggacgc tgacgtggaa aatgagaaag gtctttatga ctgcctgatt taaattggat 4680

tttagctgct aactgaagta gttatgtcac caaggaagga tatatacttt ttttcttgta 4740

tgtaatccac tcagctctgc ccattattat tgttcatatt attaatcaat ttcattctga 4800

tcagaagtgt gagcagtggc acagagtgac tgacaaaaga tttatcatca gggaatatgg 4860

atcacttcct agttttgttt tagtcctatt aactttgcag taattccagc ttctctttaa 4920

ttatttccct tgtgagattt tattttggtg ttaatgtagt cttctgtaga aaatgtaata 4980

ttaataatta ttatcacaat tattttaaaa gagtaaatac caaataatca caatgaacta 5040

agcactctaa caaactttac atttttttaat tcaatcccta caataactct gtaaacttca 5100

ttttacagat aagcaaatta tgactcagag aggttaagcc agacccaggt catgtagtta 5160

ttaggttatg aaaccaggat ttctcaacca gcactttaga ccaggtgcgg tggttcacac 5220

atgtaatccc agcactttgt gaggccaagg tggaaggatc acatgagacc aagagttcaa 5280

gaccagccca ggcaacatag tgagacccta tctctaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5340

aaagtttaaa gaaaaacaca tttttaaaaa atgaacactt taaaaatatt tggtcagaat 5400

ttatatagga atttatcaac ataaatgtta atttcacttt actgataaac ttgcaaaaca 5460

tgatgtgctg ggtactgaaa tttagatgtt aaaagaacag tttatcccac ctttatgaca 5520

[1115] gtgttccctt ggcctccacg atttgagctc aacagtctgt cttgcctgaa ctctgagaga 5580

cctcatacaa tagaagaaag actctcatct ttggattata ttggtcccaa aactttgagt 5640

ttgaataata cacccagtga aagtgttctt tcaatttcaa aaggtgaaga aagaagtggg 5700

tgatgtaaca atcgtggtga ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac 5760

caaggatgaa gagattacca agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttgggtgag 5820

tgtgagtcag aaacatttct gatttgtgca ccttctctta agatacatga aacttataac 5880

ggagttcaca tacttctgga caggaaactg gccagatctt tgccttaatc aagaatcatt 5940

aaatttgttt gagtagaaga gccacagagt ctctgacaca aggacacaga attcaagtgg 6000

acacaacaca ccagaatgta agctacttgg tctgtcttgt ccaccagtat ctgacacaaa 6060

gcttggcatg taccaggagc tcaacaaatg tttgtggagg tttgttaagg gttgtcagtg 6120

tacatctttt caatgctgtc acttgtgact tcatttttt ccctccacac catgattttg 6180

taatgtgtcc tcattttgtg gaattttaga atggaaagga catcagaagt aattacttgg 6240

atgtatatag gatcgaggac acttttggac gagactctga ggcaagtgtt ctagatccat 6300

ggggtgctgg aactgagaaa tgcagctata cagacctcat ataattggtt agttttgtgg 6360

gagatggaaa tatcaacttc aactgccttt gtatagaaat ttttatgatt aatcttccag 6420

tgcctcaata ttagtgtaga atctagggca gatctggatt ctagaagaaa gaagaaaaaa 6480

aagagatgtg tccccccttac ctttaccagc tcttcacata tgtgaattgg ctcccatgcc 6540

caccaaacta cacggagacc tcatacatta gctacctata gctgcataac aaattataca 6600

aaacttagtg gtttaaagca acaatgtatg ttcactatcc tctcacagtt tctatgggtt 6660

gggaatttgg aggtagcttg ggttgggagt tctagttcta tgaatttgca taggatttat 6720

taaattctta taaaatttta ttgatgtttc tcacaaaaga ggtttttgga aaaaaagaaa 6780

gacttgtttt ctgtaacatc aacatataat atacaatatt acaaataggg agatagtgaa 6840

ttcaatcatg attcattagt gtggtgtaga actctcagct tacactactc aactgtctta 6900

[1116] atacagttac acaagatttc actcttttaa ttagaatgat aaagccccaa accaaaaaat 6960

tatatgacac caaattatca taaggaataa ttttagttct gaaaactctg aatttttccc 7020

ttaatattgt ttagatgaca tatccaaaaa aggatctatt tgattccttc tgaagggaag 7080

gagggggagt actgagatta gtgttggcat ggggcttacc ataccaataa atttgtatct 7140

ttatttctat catttgtaaa gaattaatca tggaatgctt ggaagtattt tatttcattg 7200

tataagttct ctcaaatgcc tttctgtctt aacaaaaata aaactacctg atttggaaac 7260

ctaacgtcta tgtcattgtc tttcttcttt ctgcaatgat ccttaagatc acaaaagcac 7320

ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 7380

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attggtaagt atcacatgcc agccatgtta 7440

tatattttta tactttgaag ggagcattac acttcaaatt gttaccactg gagagtcctg 7500

gttcttggca tcttgaacaa agaattggac aaaactcacc aacaaagcca ggaaagaatg 7560

aagcaacaaa agcagagatt tattgaaaat gaaagtacgc tttacagggt gggagtgggc 7620

ccaagcacag gggctcaaga gccaattaca gaattttctg gggtttaaat acccccctaga 7680

ggtttccact ggttacttgg tgtacgccct atgtaaatga agaggatgaa ttaaagttac 7740

agagtcgttt actcagtgta caccatatgt aaatggagag gatatttcct gtcatagctg 7800

gagtgtttcc atttgattta gttctaggaa gtcagcatga atcggcctta tgttccctgc 7860

ctccagaccc tgttctcctg cctcaagatt acaatgctga gagcagagtg atttggattt 7920

acagaattta aatttatagt agtttagaat gatttttaa atgacttttt ctaaaacaat 7980

gaaaccaggt tgtaattata tttaagatat ttttagattt ctgcaaactc ctctgtagaa 8040

caatgagaga aaacagtaat gccaagcatg tttccattgt ttcctggaat aagaaacaga 8100

aaccccacag actgagaagc aaaacctaca gaagctaaaa tgaacacatg tctatgtcat 8160

ggccttggtg cccaagataa gacaatcaga gtggtccctg gatcaaaaca ttttacagtg 8220

tgcttgtgcc atgaaagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgagaga gagagagaga 8280

[1117] gagaaaacga ctctacctga ctaaaagttg cagataccac actccatgca ccaccaaaga 8340

cataaaggga aggaggtgag aggcgttaag gatgtactgc tgtatttgcc aaatatcctt 8400

tcctgtaaac tcttctccag atcctcataa taaaattaag aggccaaagt ggcaaccatt 8460

gtcaagagaa aaactatcaa ccattgtcaa gagaataact cagttattga gagagagagg 8520

agaaatgagc agagtcctac agaagtctgt caacacagat accagttttg tagaatttct 8580

aaatgtattt ttcctgattc atatttttca aaataaaagc agcaataaaa actgattaga 8640

aaacagtttg aagattcaat ggaaaaacct tacatgtagg atggaaaact gaacattaag 8700

ccaatcaata gagttatttt tgttcttttg ttatcattgt tgtttaagaa atgagatacg 8760

ttcacaattc tgcttaatca tgtaagaaaa tgaaaatgaa ttgccattta tactctcaga 8820

aaaatcacaa gtggctgatt tttggcttcc acttgttctt aagccaaatg ataccgcctt 8880

ctcacagaaa gctgaggatt ggtttcactc tcccttagct aacaatgctt aataattctc 8940

ttacagttcc agcaaatttg ccgctgttgg ctttcacaga ggtctgacat cagaacttca 9000

ggccttggga aaaactggta tcaaaacctc atgtctctgc ccagttttg tgaatactgg 9060

gttcaccaaa aatccaagca caaggtaagg tcaaaatcaa gttagaatgg gtatgtggta 9120

tgataaattg atatgaaaac taatgagaaa tgtttaggca ggccaactaa tagaagaaaa 9180

tgaagaagga aaaataattt ttcttattat tattattatc ttgaaattaa aggaataaag 9240

ggggaaaaca cattagggac tagcaggaat gatcagccac cgatgaactg ggatatttat 9300

ttgtgtccgg gagaaagcac atacatttga tcaccgttac caccctgtct ttaaaatgca 9360

aatgttccaa ggaccagcaa ataaattgag tatctagctc cttagtcaag gtgaatttct 9420

gcaagaactc ttgtctctgg tgagacagga tttgagacca caagagaaga aaaattagtc 9480

ctgaaaggag aagaaaaaag caggaaggtg tggataagaa cccgaaaatt aagccatctg 9540

cttaacaaat ttttctaatc ctagtatata ttctgctgca ggttaacaaa atatactaag 9600

cttaatgatt cgaaaccaat tttttactgg aagggaatta atcctaaata tattcattca 9660

[1118] aaagaactaa acaattctct gttgagtgcc gcctcatttg aggatactga ctcttacagc 9720

ctgagttagc tatgtggtct ctgcagctgg aatcactccc tgccactgga gtccttcatg 9780

gtgttagacc ataggtactg ttgactaaag aaaaaaaaaa gtttttgttt ttatttttgt 9840

ttttttgag acagagtctc actctgtcac ccaggctgga gtacagtggc gcgatctcag 9900

ctcaccgcaa cctccgcctt tctgggttca agcaattctc cttcctcagc ctcctgagta 9960

tttggattac aggcgcccac caccacgcct ggctaatttt tgtattttta gtagagacgg 10020

ggtttcacca tgttggccag gctggtctca aactcctgac ctcaggtgtc ctacctgcct 10080

tggcctccta aaatgctggg attacaggag tgagccacca tgcccggcca aaaaaataag 10140

tttttaaaga attaaaggtc atcctggcta acacagtgaa accccgtctc tactaaaaaa 10200

cacaaaaaaa ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgtag tcccagctgc gcgggaggct 10260

gaggcaggag aatggcgtga acccgggagg cggagcttgc agtgagccga gatcgcgcca 10320

ctgcactcca gcctgggcga cagagcgaga ctccgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 10380

aaaaaaaaga attaaaggtg ttaattttat ttagaagcct tactgaagac tacagtcgga 10440

ggcctatagc ctgagagcag ccctttagag aggttcagtt gaactgttct gatagtgggg 10500

gccatgtgct ctatcctgta ttgtcttcaa agcatctttc cagagagctg cacattgtca 10560

cagagtcagg gactttgtga aattatgctg acaaccagaa gtgagtaaac gtggcttctt 10620

acatttgcta cgttgtctca cagtacttaa taagtatgca atatgtaagt aaatactata 10680

gtactattgc aactcctgat tgttttctta gacaaggaat tgggcccaat aaaaaccctc 10740

ttggtaggca ttcaggcttc gtgtaccatg agctttccta agggtatcct gccactcttg 10800

gggaaggcat gatagatgag gggagtaagg ataatggaac tctgggtaca gggttcctgg 10860

gggctaactt agaggtagac acaggcaatg ctaaatattt gggattgatt ttatagaggt 10920

tgctagattg tgaatttcct tagtaagggc taaggcattg atatgtaatg tcacacttgg 10980

ctccgaggct gggttgttgg atccatgtag atgaaatcag ggagagaaag ggcagaacgg 11040

[1119] agtaatttag aaatgtattg atttgtatta ctctctgttg gcttgctatt caaggcagtg 11100

gagaactcaa tcacataata atctgcagca aaccacagat catcccaggg aatgaagttt 11160

taacattcgc tggctcccta actcctcacc cagcctttac attcactggc tgttcagtcc 11220

atgcctggac atcttaattt gaatacaaca ttttaaatcc atttttctgt catcatcttg 11280

cactaacaga caattctaca ctaagcctat gtttatgaat atttctcaag agtacatgta 11340

cacagccttc agtataagga aaactggaag tatgacatac ctccagttgt catactcctt 11400

gggcccctct taaattctca ttaaactgca ggataggcaa gtcagaggtg aatctcaaat 11460

acgaaattct taccggaaag gggttccaat ccagacccca agagagggtt cttagatttc 11520

tcgcaagaaa taattcgggg caaggccaca gtgcaaagca aaagcaagtt tattaggaaa 11580

gtaaaggagt agagaacagc tactccatgg agaagaatgg cttgagctgc tccaccaagg 11640

gtatttagag ttacttcttg attatatgct aaacaagggg tggattattc atgagttttc 11700

cgggaaaagg gtgagcaatt cccagaactg agatttcctc ccctttttag gccatatagg 11760

gtaacttcct gccattgcca tggtatttgt aaactgtcat agtgctggtg gaagtgtctc 11820

ttagcttgct aatgtattat agttagctta taatgagcag tgaggacaac cagaggtcac 11880

tttcatcacc atcttggttt tggtgggttt tggccggctt ctttactgca ccctatttta 11940

tcaacaaggt ctttatgacc tgaatcttgt gccaacctcc tatctcatcc tgtgacaaag 12000

aatgccttaa cttcctggga atgcagccca gtaggtgtca gccttatttt acccagaccc 12060

tattcaagat ggagttgctc tgatttaaac gcctctgaca aaatgacgac ctcaaaacaa 12120

tccagcttta tggaatacct ccacaagaaa gaaagtatac ttagctatag aattttctcc 12180

ttgcatccaa caggctttga gatgtcagat gtttccttcc tgtcccatga ttaatcctag 12240

ccattcctct ttcttgtctg gctccactac tccttaccat ctaatgcctc gccaccattt 12300

tgatattttg actaagtgag ctatgaaaca cacctactgg atatgaaagt ataagtttct 12360

gataacaaaa catcaacatg ggatgtggag gaagtgggta gggtggcatt aatgcagcaa 12420

[1120] atcctggaat attttaaatc ttcattctaa atttagtaaa aatataggat aattttcctg 12480

ccatcattta cttataaaat taaaatttta gaaaataaaa ataatatttt cctcttttta 12540

atcacagatt atggcctgta ttggagacag atgaagtcgt aagaagtctg atagatggaa 12600

tacttaccaa taagaaaatg atttttgttc catcgtatat caatatcttt ctgagactac 12660

agaagttaag tacagcacag aacacccaaa tactaaaaca ccaatagagc ttttttttt 12720

gctttttttt tttttagaca gagtctcact ctgtcaccct ggctggattg cggtggttgc 12780

agtggcatga tcttggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcaa ttctcatgcc 12840

tcagaccccc aagtaactgg gattataggt gtgtgctgcc acactacacc cagctaattt 12900

ttgtattttt tgatagagac aggtttcccc atgttggcca ggctggactc gaactcctga 12960

cctcaagtta tcctcctgtc tcggcctccc aaagtgctgg gattacagtc atgagccacc 13020

atgcctggcc caatagagct attattatgg agcatctttc agttgtgaaa attggcatgg 13080

aaactctcca tccctgggga gaacagttat ttcctctgtt attttcctac ccagtctata 13140

aaaagagagt gattcatttt ctctaccaaa tctactgtct ctgcccaaac tttgctgaag 13200

actattctaa ctaaaggaaa cacagtttaa aaagaatgca atatagtgaa gtagttaata 13260

ataaagactc cattttaaa agtctgctgg aagtttggtt gggattgcac tgaatctata 13320

gagcaattgg ggagtattga catatcaaca atattgagtt ttctaatcca agaacataat 13380

atctattttt aaaatcttct tcaaaatctt taaatcttta aattgtattt tgtagttttt 13440

ggtgtttaag tcttgcacat attttgtcag atttattcca aagtatttca cgggttcttt 13500

ttttttttt ttttttttt tttgagacag agtttcaccc ttgttgccca ggctggagtg 13560

cagtggcgtg atcttggctc actgcagctt ctgcctcctg gcttcaagtg attctcctgc 13620

ctcagcctcc caagtagctg ggattacagg cacctgcccc ctcgcccaac taacttttg 13680

tgtttgtagt agagacaggg tttcaccatg ttggccaggc tggtctcgaa ctcctgacct 13740

catgtgatcc acctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcatg agccatcatg 13800

[1121] cccagcccta tttgacggtt tttgacgcta atgcaagtgg cattttaaaa aattttatat 13860

ttcccattgt ttgttgtcag tatatattgg atttttgtaa tttgatctca tattttgcag 13920

tcttgctaaa ttgctaaacc tctttttgct aaactcgata agctttttt tttttggtag 13980

attcctgggc ctctaatttt ctttatggga aagtttttaa ttacaaattt aatttcttta 14040

atagctacat ggctattcaa tttacttatt aattcttggt aatgtgtgtc tttcaaggaa 14100

tttgtccatt tcatctaagt tgtagaattt ctttggcata aatttgtaca taacattccc 14160

ttattatcct tttaatgtct ttagaatgtc ttatttattt atttatttat ttttattata 14220

ttttttgag acagagtctc gctctgttgc ccaggctgga gtgcagtggc acaatcttgg 14280

ctcactgcaa gctccgcctt ctgggttcat gccattctcc tgcctcagcc tccctagttg 14340

ctgggactac aggcgcctgc aaccatgccc agcttatttt ttttttttt ttttttttt 14400

ttttttttt ttttttttt ttagtagaga cggggtttca ccctgttagc caggatggtc 14460

tcgatctcct gacctggtga tccgcccgcc tcagcctccc aaagtgctgg gattacaggc 14520

gtgagccacc aagcccagcc tatttattta tttagtagag acagtctcac tttgctgccc 14580

aggcaacaaa ggttttgaat gcctggcctc aagcagtcct cctgccttgg cctcccaaag 14640

tgctgggatt acaggcatga gccactgcac ctggccaaat gaatatgctg ataatatctt 14700

ctttataagg atgacataag aataaaataa tgtaatacaa acaaagcccc tgtcactgaa 14760

aatgtataga cttcaaatgt taaagtctta gagaacagaa tttatatgaa atagcaacag 14820

caacaatttc ccagaggaaa tactctctca gctttcttct gaggagcagt ttctaaattg 14880

aaattgtatc agtgagaaga taactatact aacttcataa gccttgggcc tttttgaaac 14940

aaatccatat aaactatgaa caaacttgaa atagaacaat ttgagaacag ggtacaaact 15000

gcattggtgt atcaatttca gtatttggtt ttagcttaaa tagactgact tgagataaca 15060

taaggagaac cttgaccccc aagcaacatc atctcgcgag ttgactaggc cgggtgtggt 15120

gtctcacgcc tgtaattcca gcactttggg aggccacagc aggcagatca cttgaggtca 15180

[1122] ggcattcgag accagcctgg ccaacatggt gaaacctcag ctctactaaa gatacgaaaa 15240

ttagcaggca tagtggcctg cacctgtaat accaggcact cgcaggagaa tcccttgaac 15300

ccggaaggcg gagattgcag taaaccatga ttgtgccact gcactccagc ctgggcaaca 15360

ggagactctg tctcggaaaa ataaattttt taaaaaaatg aaaaaaaata aaagttgact 15420

aaattagtgt cttggtacta agcactgtag gaagtgagtt tcatggaacc ccaactctct 15480

tggggcccaa agcaagtcat attaatattg aaaattacat gcatatacat gcatatgacc 15540

aaggtgataa aaacaattat tctgcctgag ttggagaata gtatcccagt aaaataaaca 15600

agagtctcaa agtcttttgt atcctttgaa gctgtcatgg tggtttgtaa ctaggcaaca 15660

ggtatatatt gttaatcttc tttgcattta attcctttta tagagagaca caattttacg 15720

agcagatgca attactagca tgaaggtttc tttgtgaggg tagttaaaag gcccacatga 15780

gctctcttct tatccttgtc cttctttcag ccagatcttc cctgcccctt tgctcattcc 15840

atctttcacc cacctacccc caaaacaagg aagtaaatct tgcattagtc aacaatacca 15900

aagtgatttt caatatgact ttctctgcag aatgttatta tttctgcctc tttacattca 15960

catactgtct tcctttttt ttttttttt ttttttttt ttagattggg tctcactctg 16020

ttgcccaggc tggagtgcag tggcttgatc tcagctcact gtaacctcca cctcctgagt 16080

tcaagcaatt ctcctgcctc agcctcctga gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac 16140

acctggctag ttttttttgta tttttagtag agacagggtt tcaccatgtt ggtcaagctg 16200

gtctcgaact cctgacctca tgatctgacc acctgtgcct ctcaaagtgc tgggattaca 16260

ggcgtgagcc accgggccag ccactctctt cctttcagtt gcctactcat ctcttatgca 16320

ttcctggaca tcagttgtcc ttttgaagct ttcctccact atcccagccc atgtgaatcc 16380

tccttccagt tatagccctt aattctagat ggctgatatt tttcaataat tgttttaaga 16440

tgaccatttt agcctatcag ctaaacaata tcaaagacaa tagctatttt tcaagtactt 16500

tagtttacct tattatagag tgcataatag atattcagta aatagtaaag gagaggtgaa 16560

[1123] ggcttgcata gaatggattc tggtggtgtc tcttggtgag cttttagcat caagattaat 16620

cagcagtttc agcaatgagc tcagaccttc agttttagat ctttactcat atcagataag 16680

agagtgagaa gagtggtatg tatcagtgct ttatttatat ttgcatccaa tttgaactat 16740

gaatattaca aaggtgcaca cataggttca gacagattga tttaaaatga ccaaagatga 16800

cctgtcgtaa gcaacctggg tatcttaaga tgcactcctt ggagagggaa tgttcctaaa 16860

aacattttca gagggacgaa ctgtatgaaa ttcagtaaaa cataaatcat gaggaaaact 16920

gattactctc tttttgacat gaaatgagag ttttaatgca tggttacgat tattaacgta 16980

ctccgctgca agacgttaat aaagttactg ttttgcaggc tagaatgtct tgatgctgta 17040

atcagaacac actttttccc ctttcttcca gcttcaaatg cagattcata attgggctga 17100

cttctaataa ctgcaatgtt ttctgccttg ggcttgcagc agaagcctga caaaatagtg 17160

tttgtttagg caataattta tttatttatt tattgagatg gagtttcatt cttgtcgccc 17220

aggctggagt gcaatggcgt gatctcggct cactgcaacc tctgtgttca ggcaataatt 17280

tagactttac cttacttgtg attactatag caattactat agccacaagg cataatttta 17340

ctgtctcatt tcaattttat gaatttgaat gtttttacac ttttcctaat gaagtccact 17400

atgaagttat gtcaaaaaaa aaaaagaaaa agaaagatgc acacgtaaaa gagaggtggt 17460

tgcaagagaa gaaaagaacg gaggaaagtt aaacgcaaac cagataactc tcagcgtatt 17520

ctaaatgacc aaaaacagaa ctctgttgtc aaagatttta aatggaaaat ttttcaattt 17580

ttttttcttt tttgtacagg tttcttcctg aacgcgcctc agcgatttta aatcgtatgc 17640

agaatattca atttgaagca gtggttggcc acaaaatcaa aatgaaatga ataaataagc 17700

tccagccaga gatgtatgca tgataatgat atgaatagtt tcgaatcaat gctgcaaagc 17760

tttatttcac atttttcag tcctgataat attaaaaaca ttggtttggc actagcagca 17820

gtcaaacgaa caagattaat tacctgtctt cctgtttctc aagaatattt acgtagtttt 17880

tcataggtct gtttttcctt tcatgcctct taaaaacttc tgtgcttaca taaacatact 17940

[1124] taaaaggttt tctttaagat attttatttt tccatttaaa ggtggacaaa agctacctcc 18000

ctaaaagtaa atacaaagag aacttattta cacagggaag gtttaagact gttcaagtag 18060

cattccaatc tgtagccatg ccacagaata tcaacaagaa cacagaatga gtgcacagct 18120

aagagatcaa gtttcagcag gcagctttat ctcaacctgg acatatttta agattcagca 18180

tttgaaagat ttccctagcc tcttcctttt tcattagccc aaaacggtgc aactctattc 18240

tggactttat tacttgattc tgtcttctgt ataactctga agtccaccaa aagtggaccc 18300

tctatatttc ctccctttt atagtcttat aagatacatt atgaaaggtg accgactcta 18360

ttttaaatct cagaatttta agttctagcc ccatgataac ctttttcttt gtaatttatg 18420

ctttcatata tccttggtcc cagagatgtt tagacaattt taggctcaaa aattaaagct 18480

aacacaggaa aaggaactgt actggctatt acataagaaa caatggaccc aagagaagaa 18540

aaggaagaaa gaaaggtttt ttggtttttg ttttgttttg ttttgttttt tgttttttg 18600

agatggagtc tcactctttc gcccaggctg gagtgcagtg gtatgatctc agctcactgc 18660

aagctccacc tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcctgagt agctgggact 18720

acaggcgccc gccaccacac ccggctaatt ttttgtattt tttgtagaga cggggtttca 18780

ccatgttagc caagatggtc tcgatctcct gacctcgtga tccacctgcc tcggcctccc 18840

aaagtgctgg gattacgggt gtgagccacc gtgcccagcc ttttttttt taatagaaaa 18900

aataatccga ctcccactac atcaagacta atcttgtttt gtgtgttttt cacatgtatt 18960

atagaatgct tttgcatgga ctatcctctt gtttttatta aaaacaaatg atttttttaa 19020

aagtcacaaa aacaattcac taaaaataaa tatgtcattg tgctttaaaa aaataacctc 19080

ttgtagttat aaaataaaac gtttgacttc taaactctg 19119

<210> 17

<211> 2280

<212> DNA

[1125] <213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

<222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (516)..(622)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(760)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

[1126] <222> (761)..(2280)

<223> /注释=“外显子 7”

<400> 17

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540

tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaaggga 600

ttccttacct catcccatat tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660

tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720

tttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag gtttcttcct gaacgcgcct 780

cagcgatttt aaatcgtatg cagaatattc aatttgaagc agtggttggc cacaaaatca 840

aaatgaaatg aataaataag ctccagccag agatgtatgc atgataatga tatgaatagt 900

ttcgaatcaa tgctgcaaag ctttatttca catttttca gtcctgataa tattaaaaac 960

attggtttgg cactagcagc agtcaaacga acaagattaa ttacctgtct tcctgtttct 1020

caagaatatt tacgtagttt ttcataggtc tgtttttcct ttcatgcctc ttaaaaactt 1080

ctgtgcttac ataaacatac ttaaaaggtt ttctttaaga tattttattt ttccatttaa 1140

aggtggacaa aagctacctc cctaaaagta aatacaaaga gaacttattt acacagggaa 1200

[1127] ggtttaagac tgttcaagta gcattccaat ctgtagccat gccacagaat atcaacaaga 1260

acacagaatg agtgcacagc taagagatca agtttcagca ggcagcttta tctcaacctg 1320

gacatatttt aagattcagc atttgaaaga tttccctagc ctcttccttt ttcattagcc 1380

caaaacggtg caactctatt ctggacttta ttacttgatt ctgtcttctg tataactctg 1440

aagtccacca aaagtggacc ctctatattt cctccctttt tatagtctta taagatacat 1500

tatgaaaggt gaccgactct attttaaatc tcagaatttt aagttctagc cccatgataa 1560

ccttttttctt tgtaatttat gctttcatat atccttggtc ccagagatgt ttagacaatt 1620

ttaggctcaa aaattaaagc taacacagga aaaggaactg tactggctat tacataagaa 1680

acaatggacc caagagaaga aaaggaagaa agaaaggttt tttggttttt gttttgtttt 1740

gttttgtttt ttgtttttttt gagatggagt ctcactcttt cgcccaggct ggagtgcagt 1800

ggtatgatct cagctcactg caagctccac ctcccgggtt cacgccattc tcctgcctca 1860

gcctcctgag tagctgggac tacaggcgcc cgccaccaca cccggctaat tttttgtatt 1920

ttttgtagag acggggtttc accatgttag ccaagatggt ctcgatctcc tgacctcgtg 1980

atccacctgc ctcggcctcc caaagtgctg ggattacggg tgtgagccac cgtgcccagc 2040

ctttttttt ttaatagaaa aaataatccg actcccacta catcaagact aatcttgttt 2100

tgtgtgtttt tcacatgtat tatagaatgc ttttgcatgg actatcctct tgtttttatt 2160

aaaaacaaat gatttttta aaagtcacaa aaacaattca ctaaaaataa atatgtcatt 2220

gtgctttaaa aaaataacct cttgtagtta taaaataaaa cgtttgactt ctaaactctg 2280

<210> 18

<211> 2398

<212> DNA

<213> 智人

<220>

[1128] <221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

<222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (516)..(622)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(760)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (761)..(878)

<223> /注释=“外显子 6v2 - 3'端包括额外残基 878”

[1129] <220>

<221> misc_feature

<222> (879)..(2398)

<223> /注释=“外显子 7”

<400> 18

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540

tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaaggga 600

ttccttacct catcccatat tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660

tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720

tttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag attatggcct gtattggaga 780

cagatgaagt cgtaagaagt ctgatagatg gaatacttac caataagaaa atgatttttg 840

ttccatcgta tatcaatatc tttctgagac tacagaaggt ttcttcctga acgcgcctca 900

gcgattttaa atcgtatgca gaatattcaa tttgaagcag tggttggcca caaaatcaaa 960

atgaaatgaa taaataagct ccagccagag atgtatgcat gataatgata tgaatagttt 1020

cgaatcaatg ctgcaaagct ttatttcaca ttttttcagt cctgataata ttaaaaacat 1080

[1130] tggtttggca ctagcagcag tcaaacgaac aagattaatt acctgtcttc ctgtttctca 1140

agaatattta cgtagttttt cataggtctg tttttccttt catgcctctt aaaaacttct 1200

gtgcttacat aaacatactt aaaaggtttt ctttaagata ttttatttt ccatttaaag 1260

gtggacaaaa gctacctccc taaaagtaaa tacaaagaga acttatttac acagggaagg 1320

tttaagactg ttcaagtagc attccaatct gtagccatgc cacagaatat caacaagaac 1380

acagaatgag tgcacagcta agagatcaag tttcagcagg cagctttatc tcaacctgga 1440

catattttaa gattcagcat ttgaaagatt tccctagcct cttccttttt cattagccca 1500

aaacggtgca actctattct ggactttatt acttgattct gtcttctgta taactctgaa 1560

gtccaccaaa agtggaccct ctatatttcc tccctttta tagtcttata agatacatta 1620

tgaaaggtga ccgactctat tttaaatctc agaattttaa gttctagccc catgataacc 1680

tttttctttg taatttatgc tttcatatat ccttggtccc agagatgttt agacaatttt 1740

aggctcaaaa attaaagcta acacaggaaa aggaactgta ctggctatta cataagaaac 1800

aatggaccca agagaagaaa aggaagaaag aaaggttttt tggtttttgt tttgttttgt 1860

tttgtttttt gttttttga gatggagtct cactctttcg cccaggctgg agtgcagtgg 1920

tatgatctca gctcactgca agctccacct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc 1980

ctcctgagta gctgggacta caggcgcccg ccaccacacc cggctaattt tttgtatttt 2040

ttgtagagac ggggtttcac catgttagcc aagatggtct cgatctcctg acctcgtgat 2100

ccacctgcct cggcctccca aagtgctggg attacgggtg tgagccaccg tgcccagcct 2160

ttttttttt aatagaaaaa ataatccgac tcccactaca tcaagactaa tcttgttttg 2220

tgtgtttttc acatgtatta tagaatgctt ttgcatggac tatcctcttg tttttattaa 2280

aaacaaatga ttttttaaa agtcacaaaa acaattcact aaaaataaat atgtcattgt 2340

gctttaaaaa aataacctct tgtagttata aaataaaacg tttgacttct aaactctg 2398

<210> 19

[1131] <211> 2469

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

<222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (516)..(587)

<223> /注释=“外显子 3' “

<220>

<221> misc_feature

<222> (588)..(694)

<223> /注释=“外显子 4”

[1132] <220>

<221> misc_feature

<222> (695)..(832)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (833)..(949)

<223> /注释=“外显子 6v1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (950)..(2469)

<223> /注释=“外显子 7”

<400> 19

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggaatgg aaaggacatc agaagtaatt 540

acttggatgt atataggatc gaggacactt ttggacgaga ctctgagatc acaaaagcac 600

[1133] ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 660

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attgttccag caaatttgcc gctgttggct 720

ttcacagagg tctgacatca gaacttcagg ccttgggaaa aactggtatc aaaacctcat 780

gtctctgccc agtttttgtg aatactgggt tcaccaaaaa tccaagcaca agattatggc 840

ctgtattgga gacagatgaa gtcgtaagaa gtctgataga tggaatactt accaataaga 900

aaatgatttt tgttccatcg tatatcaata tctttctgag actacagaag tttcttcctg 960

aacgcgcctc agcgatttta aatcgtatgc agaatattca atttgaagca gtggttggcc 1020

acaaaatcaa aatgaaatga ataaataagc tccagccaga gatgtatgca tgataatgat 1080

atgaatagtt tcgaatcaat gctgcaaagc tttatttcac atttttcag tcctgataat 1140

attaaaaaca ttggtttggc actagcagca gtcaaacgaa caagattaat tacctgtctt 1200

cctgtttctc aagaatattt acgtagtttt tcataggtct gtttttcctt tcatgcctct 1260

taaaaacttc tgtgcttaca taaacatact taaaaggttt tctttaagat attttatttt 1320

tccatttaaa ggtggacaaa agctacctcc ctaaaagtaa atacaaagag aacttattta 1380

cacagggaag gtttaagact gttcaagtag cattccaatc tgtagccatg ccacagaata 1440

tcaacaagaa cacagaatga gtgcacagct aagagatcaa gtttcagcag gcagctttat 1500

ctcaacctgg acatatttta agattcagca tttgaaagat ttccctagcc tcttcctttt 1560

tcattagccc aaaacggtgc aactctattc tggactttat tacttgattc tgtcttctgt 1620

ataactctga agtccaccaa aagtggaccc tctatatttc ctccctttt atagtcttat 1680

aagatacatt atgaaaggtg accgactcta ttttaaatct cagaatttta agttctagcc 1740

ccatgataac ctttttcttt gtaatttatg ctttcatata tccttggtcc cagagatgtt 1800

tagacaattt taggctcaaa aattaaagct aacacaggaa aaggaactgt actggctatt 1860

acataagaaa caatggaccc aagagaagaa aaggaagaaa gaaaggtttt ttggtttttg 1920

ttttgttttg ttttgttttt tgtttttttg agatggagtc tcactctttc gcccaggctg 1980

[1134] gagtgcagtg gtatgatctc agctcactgc aagctccacc tcccgggttc acgccattct 2040

cctgcctcag cctcctgagt agctgggact acaggcgccc gccaccacac ccggctaatt 2100

ttttgtattt tttgtagaga cggggtttca ccatgttagc caagatggtc tcgatctcct 2160

gacctcgtga tccacctgcc tcggcctccc aaagtgctgg gattacgggt gtgagccacc 2220

gtgcccagcc ttttttttttt taatagaaaa aataatccga ctcccactac atcaagacta 2280

atcttgtttt gtgtgttttt cacatgtatt atagaatgct tttgcatgga ctatcctctt 2340

gtttttatta aaaacaaatg atttttttaa aagtcacaaa aacaattcac taaaaataaa 2400

tatgtcattg tgctttaaaa aaataacctc ttgtagttat aaaataaaac gtttgacttc 2460

taaactctg 2469

<210> 20

<211> 1715

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

[1135] <222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (516)..(622)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(760)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (761)..(1715)

<223> /注释=“外显子 6v3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (878)..(1715)

<223> /注释=“自外显子 6 至内含子 6 的通读”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1716)..(1715)

<223> /注释=“自外显子 6 至内含子 6 的通读”

<400> 20

[1136] agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540

tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaaggga 600

ttccttacct catcccatat tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660

tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720

ttttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag attatggcct gtattggaga 780

cagatgaagt cgtaagaagt ctgatagatg gaatacttac caataagaaa atgatttttg 840

ttccatcgta tatcaatatc tttctgagac tacagaagtt aagtacagca cagaacaccc 900

aaatactaaa acaccaatag agctttttttt tttgcttttt tttttttttag acagagtctc 960

actctgtcac cctggctgga ttgcggtggt tgcagtggca tgatcttggc tcactgcaac 1020

ctccgcctcc tgggttcaag caattctcat gcctcagacc cccaagtaac tgggattata 1080

ggtgtgtgct gccacactac acccagctaa tttttgtatt ttttgataga gacaggtttc 1140

cccatgttgg ccaggctgga ctcgaactcc tgacctcaag ttatcctcct gtctcggcct 1200

cccaaagtgc tgggattaca gtcatgagcc accatgcctg gcccaataga gctattatta 1260

tggagcatct ttcagttgtg aaaattggca tggaaactct ccatccctgg ggagaacagt 1320

tatttcctct gttatttttcc tacccagtct ataaaaaagag agtgattcat tttctctacc 1380

[1137] aaatctactg tctctgccca aactttgctg aagactattc taactaaagg aaacacagtt 1440

taaaaagaat gcaatatagt gaagtagtta ataataaaga ctccattttt aaaagtctgc 1500

tggaagtttg gttgggattg cactgaatct atagagcaat tggggagtat tgacatatca 1560

acaatattga gttttctaat ccaagaacat aatatctatt tttaaaatct tcttcaaaat 1620

ctttaaatct ttaaattgta ttttgtagtt tttggtgttt aagtcttgca catattttgt 1680

cagatttatt ccaaagtatt tcacgggttc ttttt 1715

<210> 21

<211> 2290

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(407)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (408)..(514)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

[1138] <221> misc_feature

<222> (515)..(652)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (653)..(770)

<223> /注释=“外显子 6v2 - 3'端包括额外残基 770”

<220>

<221> misc_feature

<222> (771)..(2290)

<223> /注释=“外显子 7”

<400> 21

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataaggtgaa gaaagaagtg ggtgatgtaa 300

caatcgtggt gaataatgct gggacagtat atccagccga tcttctcagc accaaggatg 360

aagagattac caagacattt gaggtcaaca tcctaggaca tttttggatc acaaaagcac 420

ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 480

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attgttccag caaatttgcc gctgttggct 540

ttcacagagg tctgacatca gaacttcagg ccttgggaaa aactggtatc aaaacctcat 600

gtctctgccc agtttttgtg aatactgggt tcaccaaaaa tccaagcaca agattatggc 660

[1139] ctgtattgga gacagatgaa gtcgtaagaa gtctgataga tggaatactt accaataaga 720

aaatgatttt tgttccatcg tatatcaata tctttctgag actacagaag gtttcttcct 780

gaacgcgcct cagcgatttt aaatcgtatg cagaatattc aatttgaagc agtggttggc 840

cacaaaatca aaatgaaatg aataaataag ctccagccag agatgtatgc atgataatga 900

tatgaatagt ttcgaatcaa tgctgcaaag ctttatttca catttttca gtcctgataa 960

tattaaaaac attggtttgg cactagcagc agtcaaacga acaagattaa ttacctgtct 1020

tcctgtttct caagaatatt tacgtagttt ttcataggtc tgtttttcct ttcatgcctc 1080

ttaaaaactt ctgtgcttac ataaacatac ttaaaaggtt ttctttaaga tattttattt 1140

ttccatttaa aggtggacaa aagctacctc cctaaaagta aatacaaaga gaacttattt 1200

acacagggaa ggtttaagac tgttcaagta gcattccaat ctgtagccat gccacagaat 1260

atcaacaaga acacagaatg agtgcacagc taagagatca agtttcagca ggcagcttta 1320

tctcaacctg gacatatttt aagattcagc atttgaaaga tttccctagc ctcttccttt 1380

ttcattagcc caaaacggtg caactctatt ctggacttta ttacttgatt ctgtcttctg 1440

tataactctg aagtccacca aaagtggacc ctctatattt cctccctttt tatagtctta 1500

taagatacat tatgaaaggt gaccgactct attttaaatc tcagaatttt aagttctagc 1560

cccatgataa ccttttttctt tgtaatttat gctttcatat atccttggtc ccagagatgt 1620

ttagacaatt ttaggctcaa aaattaaagc taacacagga aaaggaactg tactggctat 1680

tacataagaa acaatggacc caagagaaga aaaggaagaa agaaaggttt tttggttttt 1740

gttttgtttt gttttgtttt ttgttttttt gagatggagt ctcactcttt cgcccaggct 1800

ggagtgcagt ggtatgatct cagctcactg caagctccac ctcccgggtt cacgccattc 1860

tcctgcctca gcctcctgag tagctgggac tacaggcgcc cgccaccaca cccggctaat 1920

tttttgtatt ttttgtagag acggggtttc accatgttag ccaagatggt ctcgatctcc 1980

tgacctcgtg atccacctgc ctcggcctcc caaagtgctg ggattacggg tgtgagccac 2040

[1140] cgtgcccagc ctttttttttt ttaatagaaa aaataatccg actcccacta catcaagact 2100

aatcttgttt tgtgtgtttt tcacatgtat tatagaatgc ttttgcatgg actatcctct 2160

tgtttttatt aaaaacaaat gatttttttta aaagtcacaa aaacaattca ctaaaaataa 2220

atatgtcatt gtgctttaaa aaaataacct cttgtagtta taaaataaaa cgtttgactt 2280

ctaaactctg 2290

<210> 22

<211> 2470

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

<220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

<222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

[1141] <222> (516)..(587)

<223> /注释=“外显子 3'“

<220>

<221> misc_feature

<222> (588)..(694)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (695)..(832)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (833)..(950)

<223> /注释=“外显子 6v2 - 3'端包括额外残基 950”

<220>

<221> misc_feature

<222> (951)..(2470)

<223> /注释=“外显子 7”

<400> 22

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

[1142] gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggaatgg aaaggacatc agaagtaatt 540

acttggatgt atataggatc gaggacactt ttggacgaga ctctgagatc acaaaagcac 600

ttcttccatc gatgatggag agaaatcatg gccacatcgt cacagtggct tcagtgtgcg 660

gccacgaagg gattccttac ctcatcccat attgttccag caaatttgcc gctgttggct 720

ttcacagagg tctgacatca gaacttcagg ccttgggaaa aactggtatc aaaacctcat 780

gtctctgccc agtttttgtg aatactgggt tcaccaaaaa tccaagcaca agattatggc 840

ctgtattgga gacagatgaa gtcgtaagaa gtctgataga tggaatactt accaataaga 900

aaatgatttt tgttccatcg tatatcaata tctttctgag actacagaag gtttcttcct 960

gaacgcgcct cagcgatttt aaatcgtatg cagaatattc aatttgaagc agtggttggc 1020

cacaaaatca aaatgaaatg aataaataag ctccagccag agatgtatgc atgataatga 1080

tatgaatagt ttcgaatcaa tgctgcaaag ctttatttca catttttca gtcctgataa 1140

tattaaaaac attggtttgg cactagcagc agtcaaacga acaagattaa ttacctgtct 1200

tcctgtttct caagaatatt tacgtagttt ttcataggtc tgtttttcct ttcatgcctc 1260

ttaaaaactt ctgtgcttac ataaacatac ttaaaaggtt ttctttaaga tattttattt 1320

ttccatttaa aggtggacaa aagctacctc cctaaaagta aatacaaaga gaacttattt 1380

acacagggaa ggtttaagac tgttcaagta gcattccaat ctgtagccat gccacagaat 1440

atcaacaaga acacagaatg agtgcacagc taagagatca agtttcagca ggcagcttta 1500

tctcaacctg gacatatttt aagattcagc atttgaaaga tttccctagc ctcttccttt 1560

ttcattagcc caaaacggtg caactctatt ctggacttta ttacttgatt ctgtcttctg 1620

[1143] tataactctg aagtccacca aaagtggacc ctctatattt cctccctttt tatagtctta 1680

taagatacat tatgaaaggt gaccgactct attttaaatc tcagaatttt aagttctagc 1740

cccatgataa ccttttttctt tgtaatttat gctttcatat atccttggtc ccagagatgt 1800

ttagacaatt ttaggctcaa aaattaaagc taacacagga aaaggaactg tactggctat 1860

tacataagaa acaatggacc caagagaaga aaaggaagaa agaaaggttt tttggttttt 1920

gttttgtttt gttttgtttt ttgtttttttt gagatggagt ctcactcttt cgcccaggct 1980

ggagtgcagt ggtatgatct cagctcactg caagctccac ctcccgggtt cacgccattc 2040

tcctgcctca gcctcctgag tagctgggac tacaggcgcc cgccaccaca cccggctaat 2100

tttttgtatt ttttgtagag acggggtttc accatgttag ccaagatggt ctcgatctcc 2160

tgacctcgtg atccacctgc ctcggcctcc caaagtgctg ggattacggg tgtgagccac 2220

cgtgcccagc ctttttttttt ttaatagaaa aaataatccg actcccacta catcaagact 2280

aatcttgttt tgtgtgtttt tcacatgtat tatagaatgc ttttgcatgg actatcctct 2340

tgtttttatt aaaaacaaat gatttttta aaagtcacaa aaacaattca ctaaaaataa 2400

atatgtcatt gtgctttaaa aaaataacct cttgtagtta taaaataaaa cgtttgactt 2460

ctaaactctg 2470

<210> 23

<211> 1714

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(275)

<223> /注释=“外显子 1”

[1144] <220>

<221> misc_feature

<222> (276)..(383)

<223> /注释=“外显子 2”

<220>

<221> misc_feature

<222> (384)..(515)

<223> /注释=“外显子 3”

<220>

<221> misc_feature

<222> (516)..(622)

<223> /注释=“外显子 4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(760)

<223> /注释=“外显子 5”

<220>

<221> misc_feature

<222> (761)..(1714)

<223> /注释=“外显子 6v4”

<220>

<221> misc_feature

<222> (878)..(1714)

[1145] <223> /注释=“自外显子 6 至内含子 6 的通读”

<400> 23

agacagtacc tcctccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60

aagccatgaa catcatccta gaaatccttc tgcttctgat caccatcatc tactcctact 120

tggagtcgtt ggtgaagttt ttcattcctc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180

ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240

gacagagcat attggttctg tgggatatta ataagcgcgg tgtggaggaa actgcagctg 300

agtgccgaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360

agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420

ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480

agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540

tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaaggga 600

ttccttacct catcccatat tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660

tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720

tttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag attatggcct gtattggaga 780

cagatgaagt cgtaagaagt ctgatagatg gaatacttac caataagaaa atgatttttg 840

ttccatcgta tatcaatatc tttctgagac tacagaagta agtacagcac agaacaccca 900

aatactaaaa caccaataga gctttttttt ttgctttttt ttttttaga cagagtctca 960

ctctgtcacc ctggctggat tgcggtggtt gcagtggcat gatcttggct cactgcaacc 1020

tccgcctcct gggttcaagc aattctcatg cctcagaccc ccaagtaact gggattatag 1080

gtgtgtgctg ccacactaca cccagctaat ttttgtattt tttgatagag acaggtttcc 1140

[1146] ccatgttggc caggctggac tcgaactcct gacctcaagt tatcctcctg tctcggcctc 1200

ccaaagtgct gggattacag tcatgagcca ccatgcctgg cccaatagag ctattattat 1260

ggagcatctt tcagttgtga aaattggcat ggaaactctc catccctggg gagaacagtt 1320

atttcctctg ttatttttcct acccagtcta taaaaagaga gtgattcatt ttctctacca 1380

aatctactgt ctctgcccaa actttgctga agactattct aactaaagga aacacagttt 1440

aaaaagaatg caatatagtg aagtagttaa taataaagac tccatttta aaagtctgct 1500

ggaagtttgg ttgggattgc actgaatcta tagagcaatt ggggagtatt gacatatcaa 1560

caatattgag ttttctaatc caagaacata atatctattt ttaaaatctt cttcaaaatc 1620

tttaaatctt taaattgtat tttgtagttt ttggtgttta agtcttgcac atattttgtc 1680

agatttattc caaagtattt cacgggttct tttt 1714

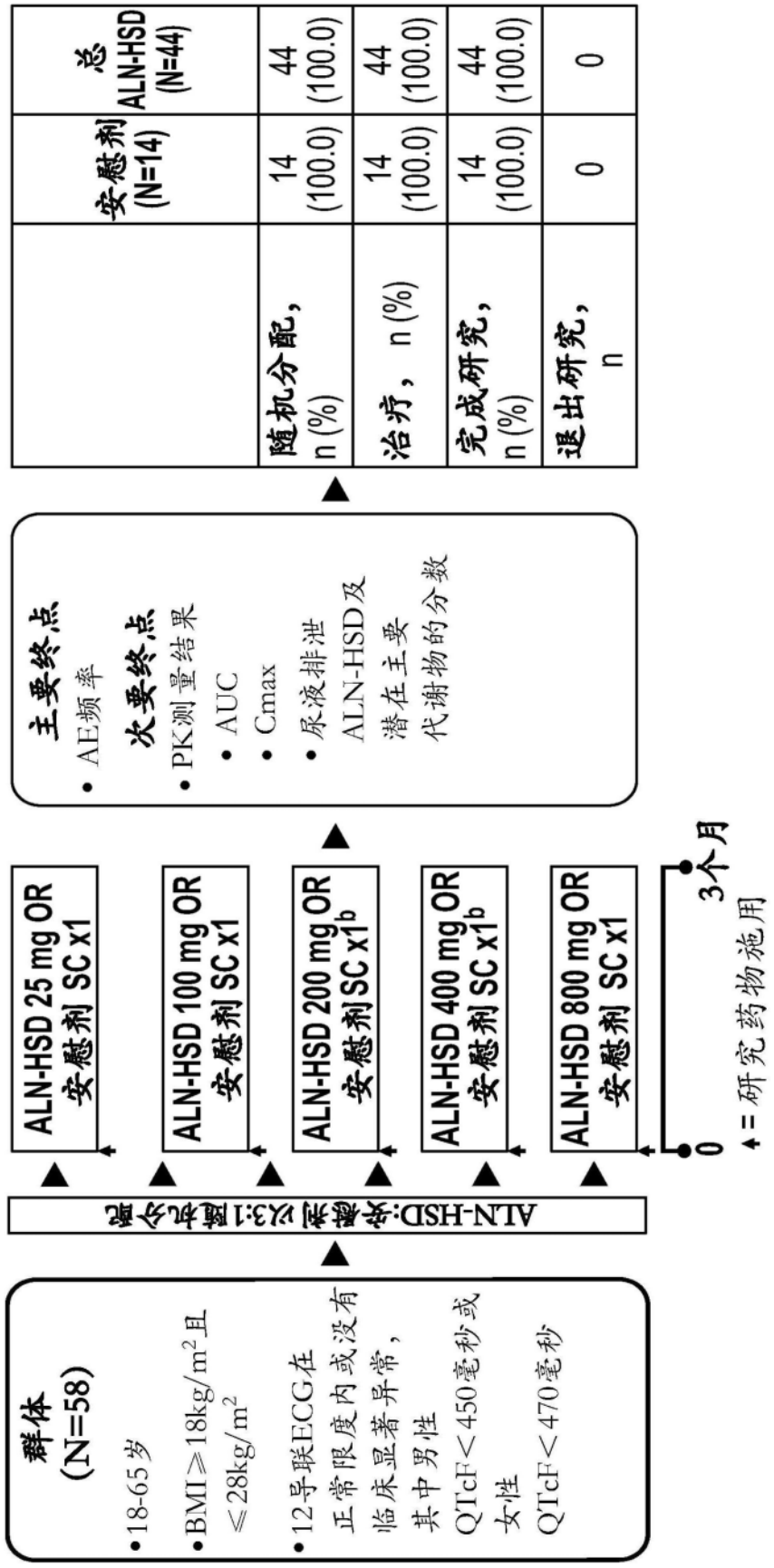

ALN-HSD 1期设计及参与者处置-A部分
• 健康成人中的双盲、安慰剂对照、单次递增剂量研究
群体
(N=58)
•18-65岁
•BMI≥18kg/m²且
≤28kg/m²
•12导联ECG在
正常限度内或没有
临床显著异常，
其中 男性
QTcF＜450毫秒或
女性
QTcF＜470毫秒
ALN-HSD:安慰剂以3:1随机分配
ALN-HSD 25 mg OR
安慰剂 SC x1
ALN-HSD 100 mg OR
安慰剂 SC x1
ALN-HSD 200 mg OR
安慰剂 SC x1b
ALN-HSD 400 mg OR
安慰剂 SC x1b
ALN-HSD 800 mg OR
安慰剂 SC x1
0
3个月
▲= 研究药物施用
主要终点
• AE频率
次要终点
• PK测量结果
• AUC
• Cmax
• 尿液排泄
ALN-HSD及
潜在主要
代谢物的分数
安慰剂 (N=14)
总 ALN-HSD (N=44)
随机分配，n (%) 14 (100.0) 44 (100.0)
治疗，n (%) 14 (100.0) 44 (100.0)
完成研究，n (%) 14 (100.0) 44 (100.0)
退出研究，n 0 0

图1

基线人口统计资料及特征-A部分

• 安慰剂与ALN-HSD队列之间具有可比性

| | 安慰剂 (N=14) | ALN-HSD | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 25 mg (N=3) | 100 mg (N=7) | 200 mg (N=6) | 400 mg (N=7) | 200 mg (日本) (N=7) | 400 mg (日本) (N=7) | 800 mg (N=7) | 总 ALN-HSD (N=44) |
| 年龄，平均值(范围)，岁 | 27.2 (19–43) | 24.0 (23–25) | 33.6 (23–38) | 30.2 (26–34) | 27.4 (22–38) | 29.9 (23–39) | 32.9 (24–41) | 25.1 (20–35) | 29.4 (20–41) |
| 男性，n (%) | 8 (57.1) | 2 (66.7) | 4 (57.1) | 3 (50.0) | 4 (57.1) | 4 (57.1) | 4 (57.1) | 4 (57.1) | 25 (56.8) |
| 白种人，n (%) | 8 (57.1) | 2 (66.7) | 6 (85.7) | 6 (100.0) | 5 (71.4) | 0 | 0 | 6 (85.7) | 25 (56.8) |
| BMI，平均值(SD)，$kg/m^2$ | 22.1 (1.9) | 22.9 (2.3) | 22.0 (1.9) | 22.3 (1.4) | 22.6 (1.8) | 21.5 (1.5) | 21.4 (1.6) | 22.0 (2.0) | 22.0 (1.7) |
| ALT，平均值(SD)，U/L[a] | 18.1 (6.6) | 15.3 (4.2) | 22.7 (15.4) | 17.5 (7.7) | 21.0 (11.3) | 18.0 (4.7) | 14.7 (3.9) | 18.3 (5.6) | 18.5 (8.7) |
| AST，平均值(SD)，U/L[b] | 16.1 (2.4) | 16.0 (1.7) | 20.6 (5.8) | 16.7 (4.0) | 19.7 (5.4) | 17.6 (2.3) | 13.1 (1.1) | 20.6 (5.7) | 17.9 (4.8) |

图2

| 处置 | 安慰剂 (N=9) | 总 ALN-HSD (N=37) |
|---|---|---|
| 随机分配，n (%) | 9 (100.0) | 37 (100.0) |
| 治疗，n (%) | 9 (100.0) | 36 (97.3) |
| 第1次给药(第1天)，n (%) | 9 (100.0) | 36 (97.3) |
| 第2次给药(第85天)，n (%) | 9 (100.0) | 35 (94.6) |
| 完成治疗，n (%) | 9 (100.0) | 35 (94.6) |
| 中断治疗，n (%) | 0 | 1 (2.7)[c] |
| 完成研究，n (%) | 8 (88.9) | 36 (97.3) |
| 退出研究，n (%) | 9 (11.1)[d] | 1 (2.7) |

图3

基线人口统计资料及疾病特征-B部分

• 安慰剂与ALN-HSD队列之间具有可比性

| | 安慰剂 (N=9) | ALN-HSD | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 25 mg (N=8) | 200 mg (N=8) | 200 mg (较晚活检) (N=12) | 400 mg (N=8) | 总 ALN-HSD (N=36) |
| 年龄，平均值(范围)，岁 | 52.3 (35–64) | 56.1 (43–64) | 56.8 (42–64) | 54.8 (38–64) | 55.0 (34–64) | 55.6 (34– 64) |
| 男性，n (%) | 4 (44.4) | 3 (37.5) | 6 (75.0) | 6 (50.0) | 5 (62.5) | 20 (55.6) |
| 白种人，n (%) | 7 (77.8) | 8 (100.0) | 4 (50.0) | 10 (83.3) | 6 (75.0) | 28 (77.8) |
| BMI,平均值(SD), $kg/m^2$ | 34.9 (4.6) | 34.5 (4.0) | 33.1 (5.1) | 33.6 (3.4) | 33.0 (2.5) | 33.5 (3.7) |
| ALT,平均值(SD), U/L[a] | 57.6 (33.9) | 56.8 (26.9) | 60.3 (29.1) | 44.2 (18.8) | 39.9 (17.1) | 49.6 (23.5) |
| AST,平均值(SD), U/L[b] | 41.0 (21.9) | 47.6 (25.4) | 41.1 (21.9) | 30.6 (8.9) | 31.3 (9.7) | 36.9 (17.9) |
| 胆固醇，平均值 (SD), mmol/L | 5.47 (1.23) | 5.35 (1.11) | 4.78 (0.87) | 4.73 (1.17) | 4.58 (1.09) | 4.84 (1.07) |
| 三酸甘油酯，平均值(SD), mmol/L | 2.85 (1.38) | 1.81 (0.71) | 1.69 (0.80) | 1.55 (0.66) | 2.47 (1.81) | 1.84 (1.07) |
| 红血球蛋白A1C，平均值(SD), % | 6.5 (0.9) | 6.2 (1.2) | 7.4 (1.2) | 5.9 (0.9) | 6.2 (0.9) | 6.4 (1.2) |
| NAFLD活动度评分，平均值 (SD) | 4.2 (0.8) | 4.3 (0.9) | 4.0 (0.9) | 4.6 (1.1) | 4.5 (1.1) | 4.4 (1.0) |
| 纤维化阶段，平均值 (SD) | 1.6 (0.7) | 1.9 (0.6) | 1.5 (0.9) | 1.7 (0.9) | 1.6 (0.7) | 1.7 (0.8) |

• 没有患者具有3种HSD17B13变异体中的任一个的纯合保护性等位基因[C]

• 安慰剂及ALN-HSD组中PNPLA3 I148M风险等位基因杂合或纯合的患者比例相似

图4

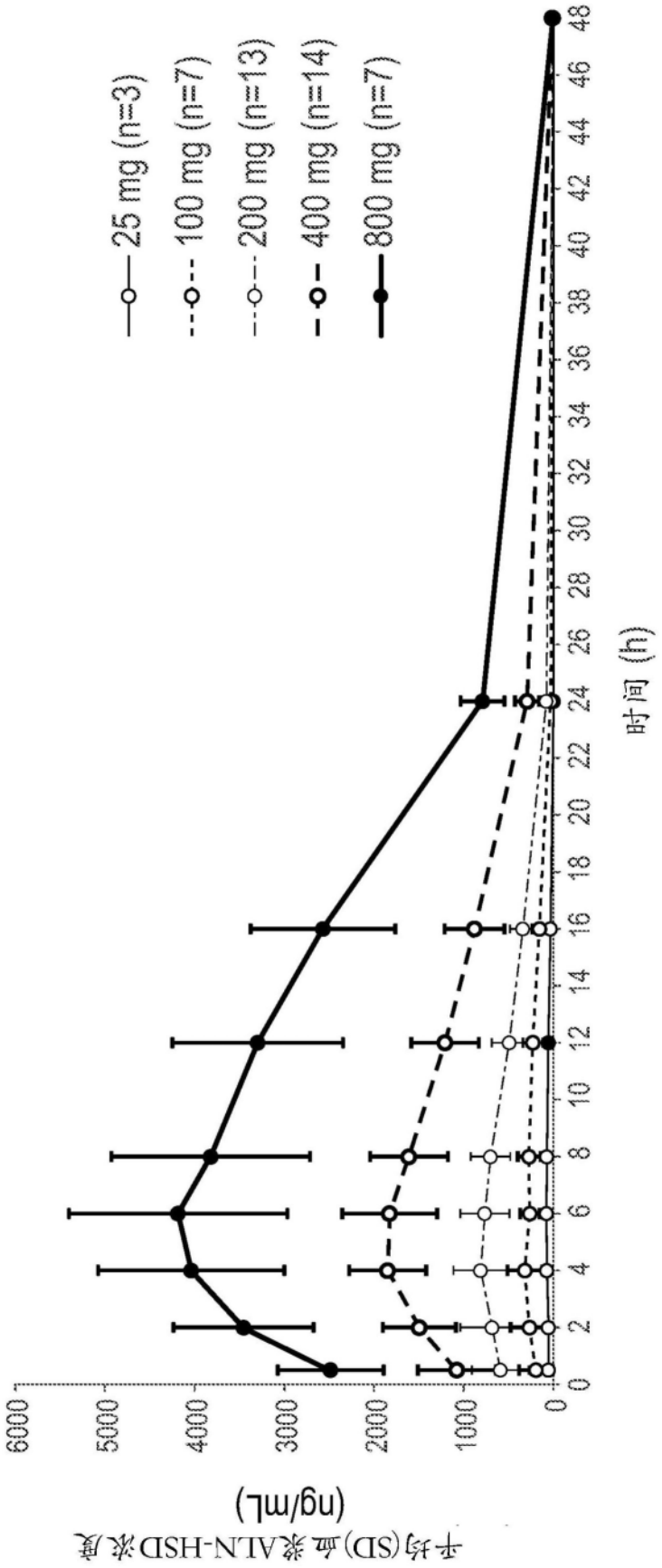

平均(SD)血浆ALN-HSD浓度
(ng/mL)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48
时间 (h)
25 mg (n=3)
100 mg (n=7)
200 mg (n=13)
400 mg (n=14)
800 mg (n=7)

图5

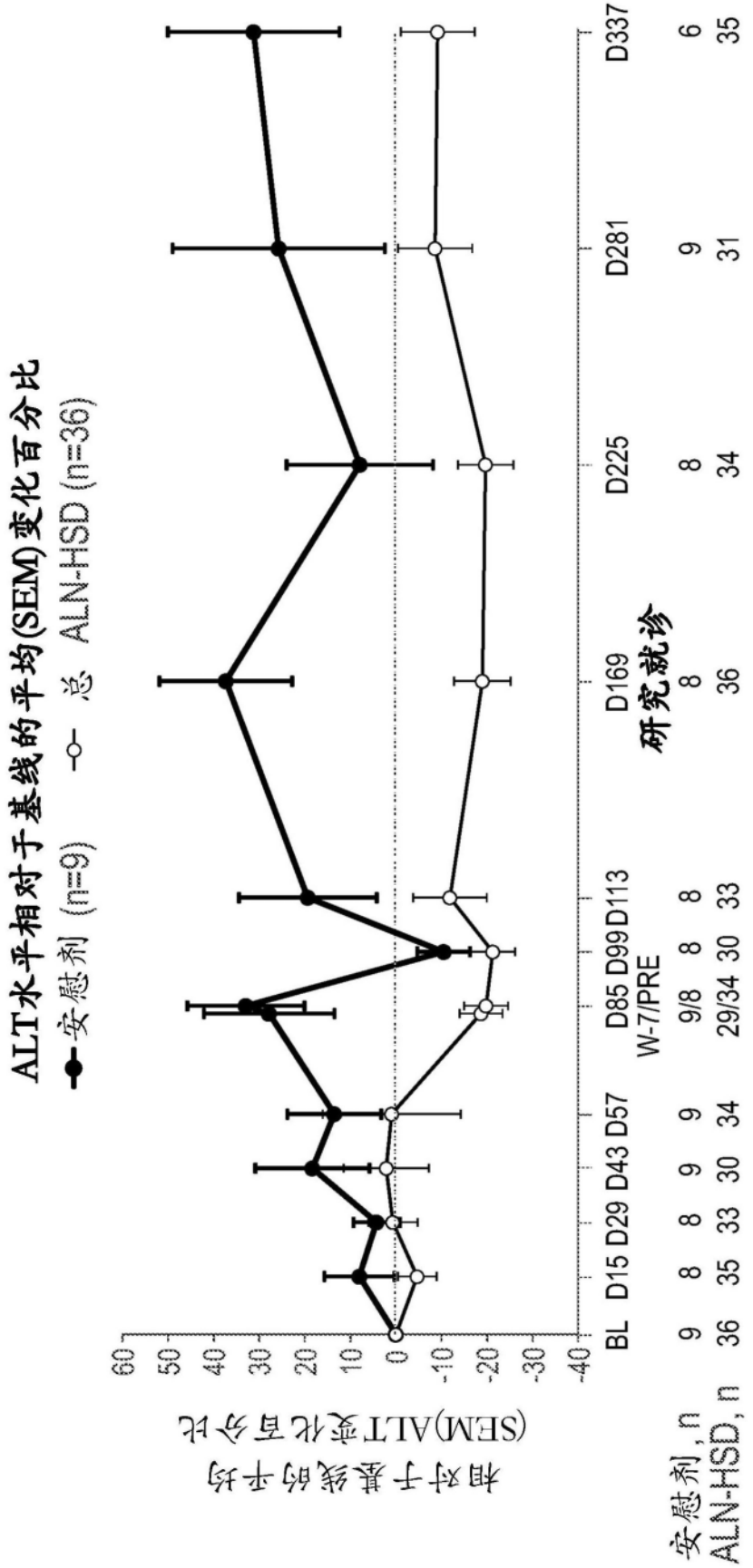

ALT水平相对于基线的平均(SEM)变化百分比
安慰剂 (n=9)
总 ALN-HSD (n=36)
相对于基线的平均(SEM)ALT变化百分比
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
BL D15 D29 D43 D57 D85 D99 D113 D169 D225 D281 D337
W-7/PRE
研究就诊
安慰剂, n 9 8 8 9 9 9/8 8 8 8 8 9 6
ALN-HSD, n 36 35 33 30 34 29/34 30 33 36 34 31 35

图6A

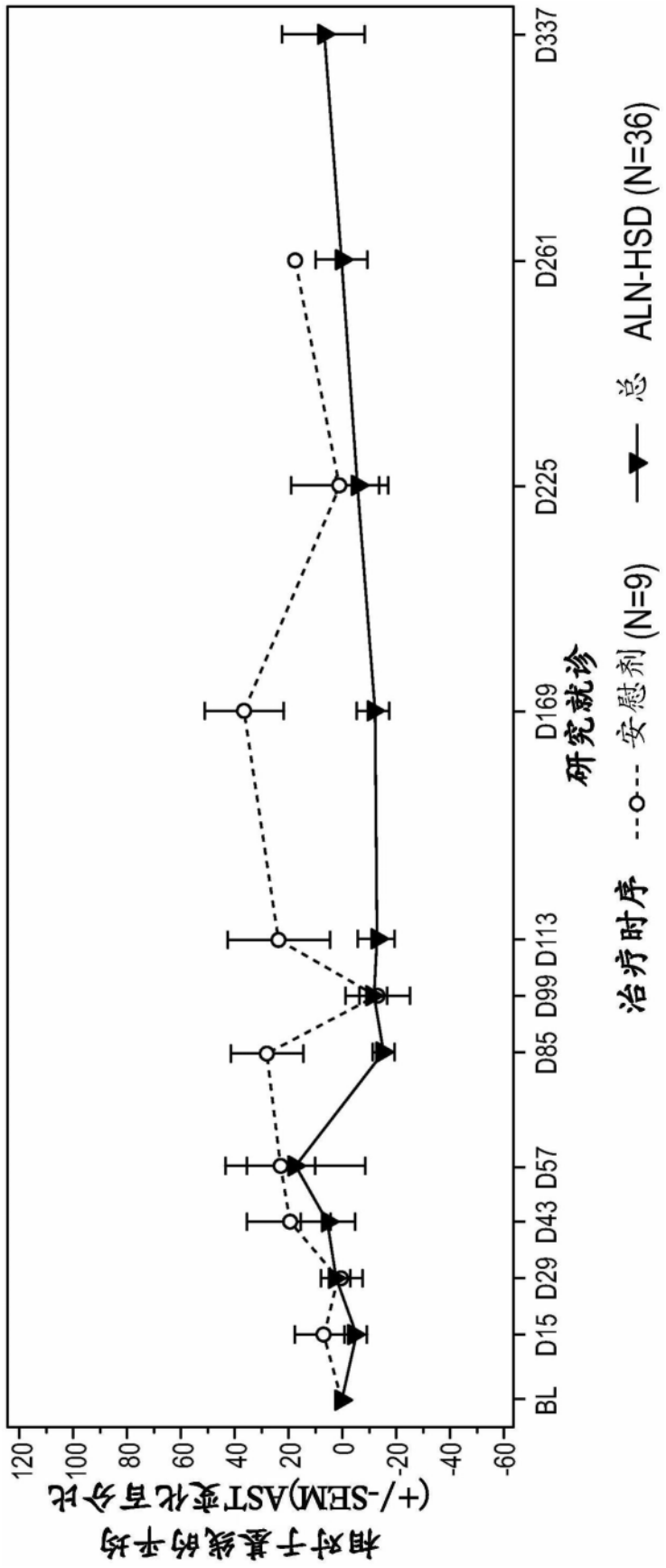

相对于基线的平均
(+/-SEM)AST变化百分比
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
BL
D15
D29
D43
D57
D85
D99
D113
D169
D225
D261
D337
研究就诊
治疗时序
安慰剂 (N=9)
总 ALN-HSD (N=36)

图6B

M6或M12时肝脏活检中的HSD mRNA降低-B部分

| | 安慰剂 (N=9) | ALN-HSD | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 25 mg (N=8) | 200 mg (N=20) | 400 mg (N=7) |
| 第6个月相对于基线的变化百分比 | | | | |
| N | 5 | 8 | 9 | 7[a] |
| 平均值 | 4.6 | -38.7 | -68.5 | -73.2 |
| 中值 | 4.7 | -39.8 | -71.4 | -78.3 |
| 范围 | -11.7, 18.1 | -67.2, -4.5 | -79.3,-55.8 | -80.9,-53.7 |
| 第12个月相对于基线的变化百分比 | | | | |
| n | 3 | 0[b] | 10 | 0[b] |
| 平均值 | -0.4 | N/A | -34.3 | N/A |
| 中值 | -1.1 | N/A | -30.6 | N/A |
| 范围 | -3.0, 3.0 | N/A | -64.4, 4.0 | N/A |

图7

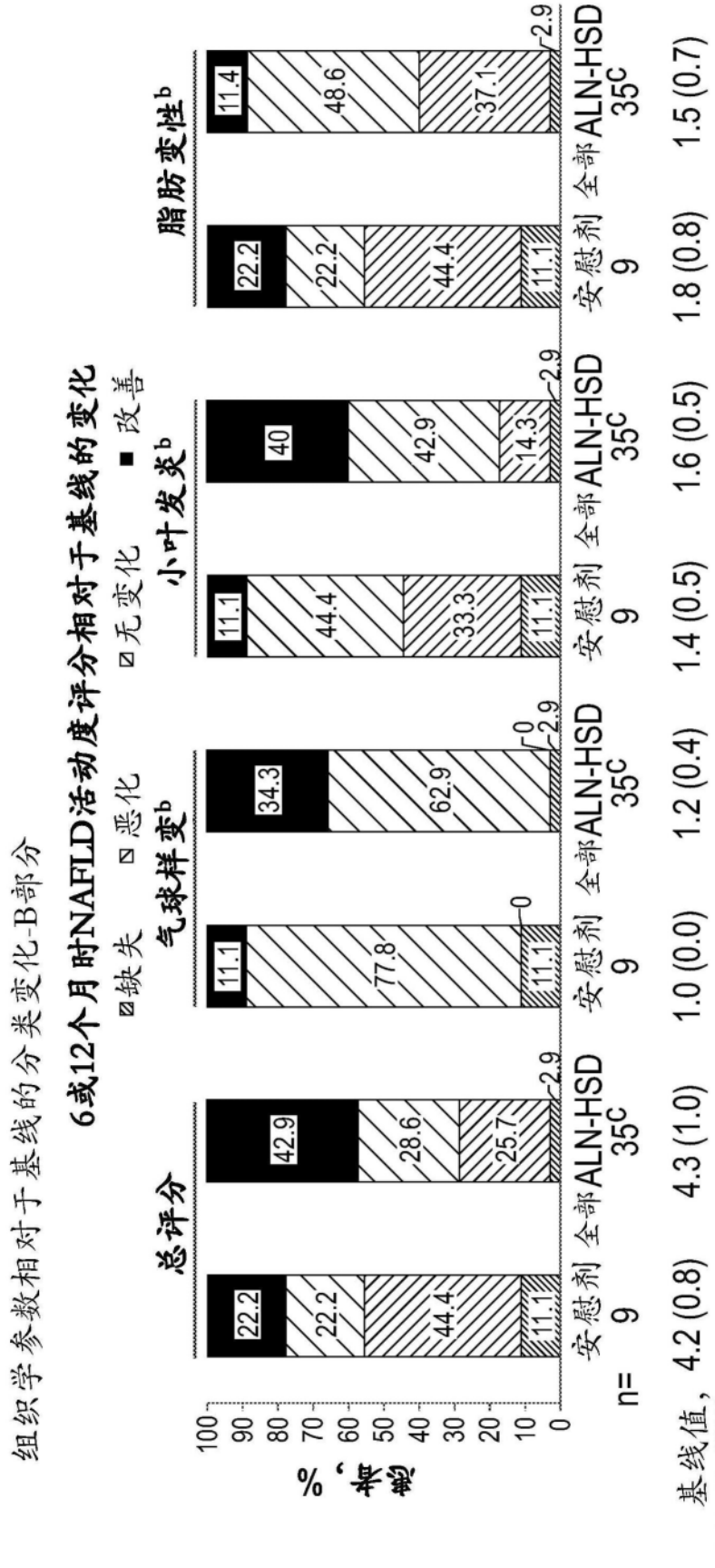

组织学参数相对于基线的分类变化-B部分
6或12个月时NAFLD活动度评分相对于基线的变化
缺失
恶化
无变化
改善
总评分
气球样变b
小叶发炎b
脂肪变性b
患者，%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
22.2
42.9
28.6
25.7
2.9
11.1
77.8
0
34.3
62.9
0
2.9
11.1
44.4
33.3
11.1
40
42.9
14.3
2.9
22.2
22.2
44.4
11.1
11.4
48.6
37.1
2.9
n= 9 9 35c 9 35c 9 35c 9 35c
安慰剂 全部 ALN-HSD 安慰剂 全部 ALN-HSD 安慰剂 全部 ALN-HSD 安慰剂 全部 ALN-HSD
基线值，平均值 (SD) 4.2 (0.8) 4.3 (1.0) 1.0 (0.0) 1.2 (0.4) 1.4 (0.5) 1.6 (0.5) 1.8 (0.8) 1.5 (0.7)

图8A

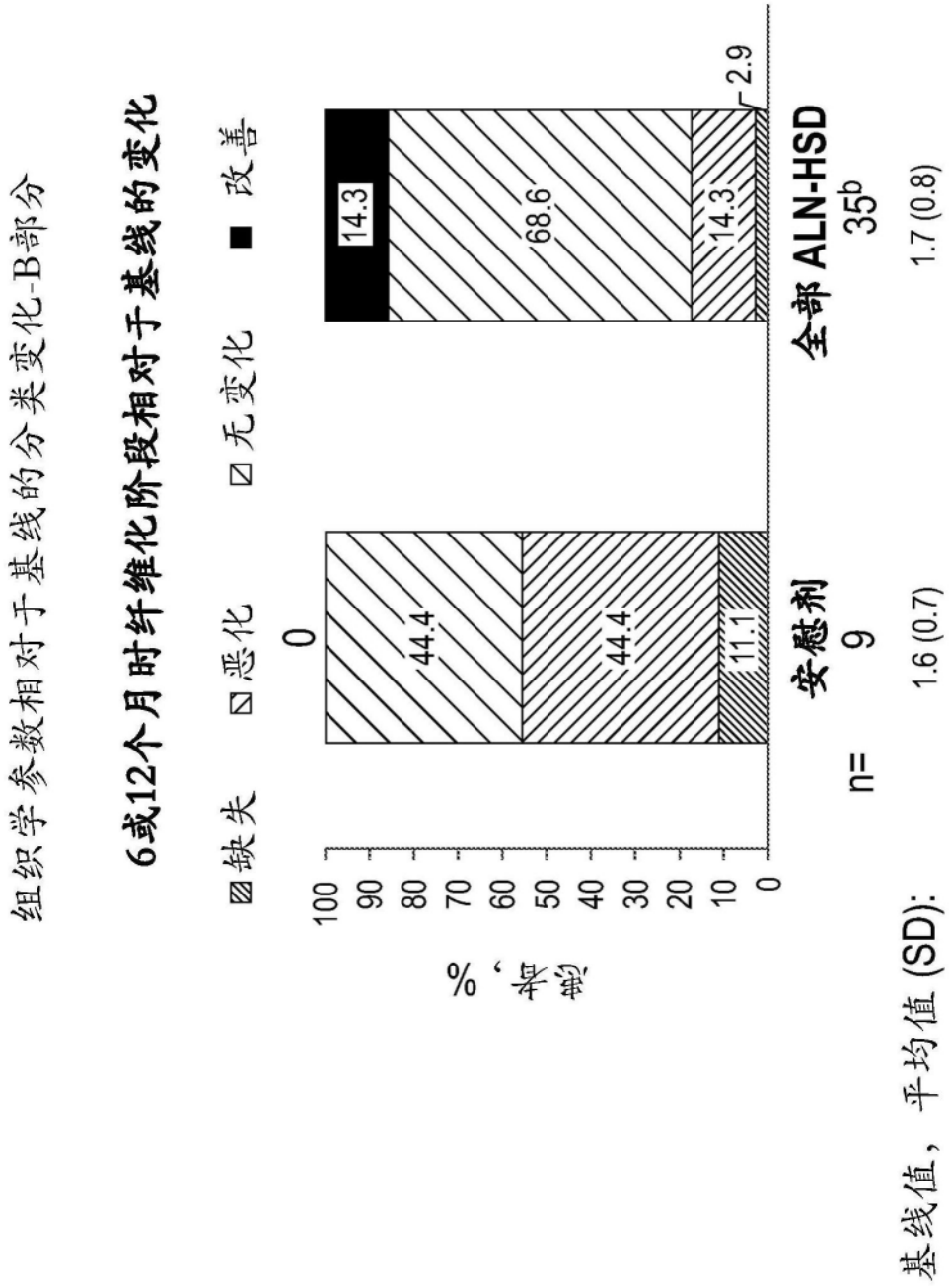

组织学参数相对于基线的分类变化-B部分
6或12个月时纤维化阶段相对于基线的变化
缺失
恶化
无变化
改善
0
44.4
44.4
11.1
14.3
68.6
14.3
2.9
患者，%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
安慰剂
全部 ALN-HSD
n= 9 35b
基线值，平均值 (SD): 1.6 (0.7) 1.7 (0.8)

图8B