(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105980559 B
(45)授权公告日 2020.11.06

(21)申请号 201480062979.3

(22)申请日 2014.10.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105980559 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(30)优先权数据
61/887,288 2013.10.04 US
61/983,720 2014.04.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/059160 2014.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/051318 EN 2015.04.09

(73)专利权人 阿尔尼拉姆医药品有限公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 西奈山伊坎医学院

(72)发明人 B·贝腾考特 K·菲茨杰拉德
W·奎贝斯 R·J·德斯尼克
M·亚苏达

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

审查员 艾超仁

权利要求书6页 说明书197页 附图50页

(54)发明名称

用于抑制ALAS1基因表达的组合物与方法

(57)摘要

本发明涉及靶向ALAS1基因的双链核糖核酸(dsRNA)组合物,和使用这类dsRNA组合物来改变(例如,抑制)ALAS1的表达的方法。

1.一种用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的区域,该反义链由usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161)的至少20个连续核苷酸组成,其中c、a、g、u＝2'-OMe核糖核苷;Af、Cf、Gf、Uf＝2'F核糖核苷;s＝硫代磷酸酯。

2.如权利要求1所述的dsRNA,其还包括由csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160)的至少20个连续核苷酸组成的有义链。

3.如权利要求1或2所述的dsRNA,其中所述ALAS1 RNA转录物如SEQ ID NO:1所示。

4.如权利要求1或2所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是17-23个核苷酸对。

5.如权利要求4所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是21-23个核苷酸对。

6.如权利要求5所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是21个核苷酸对。

7.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中至少一条链包括具有至少2个核苷酸的3'突出端。

8.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中每条链长度是不多于26个核苷酸。

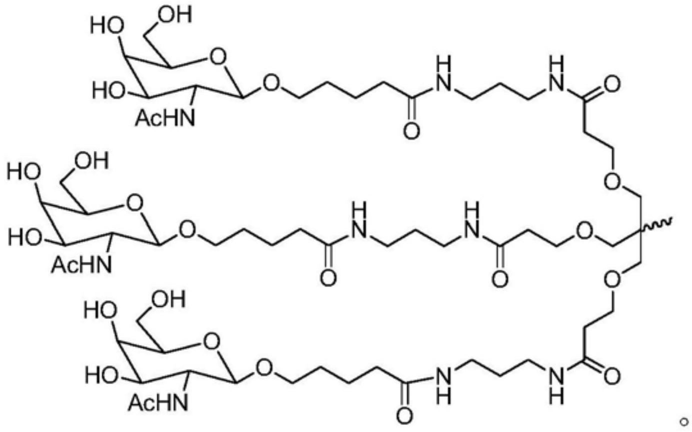
9.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,进一步包括配体。

10.如权利要求9所述的dsRNA,其中该配体共轭至该dsRNA的有义链的3'端。

11.如权利要求9所述的dsRNA,其中该配体包括碳水化物。

12.如权利要求11所述的dsRNA,其中该配体是GalNAc配体。

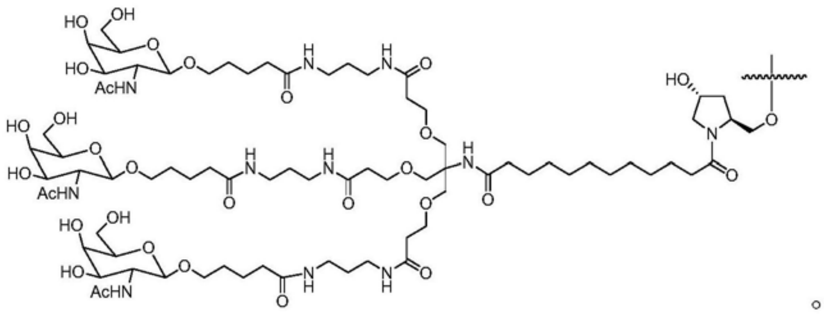
13.如权利要求11所述的dsRNA,其中该配体是



。

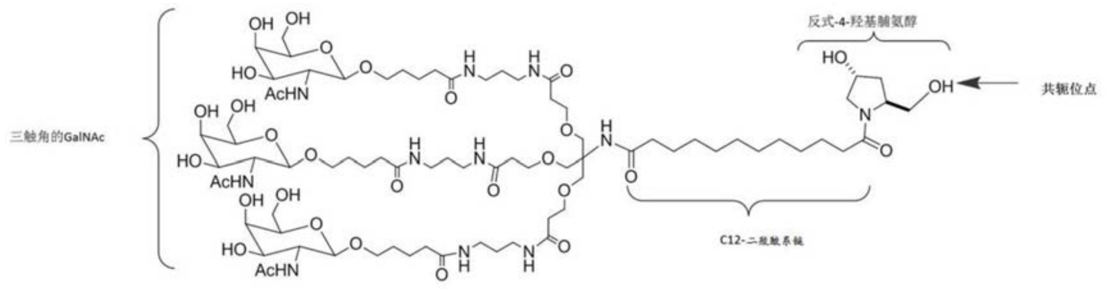
14.如权利要求9-13中任一项所述的dsRNA,其中该配体是经由二价或三价分支接头而附接。

15.如权利要求14所述的dsRNA,其中该配体和接头是如式XXIV所示的:



。

16.如权利要求9所述的dsRNA,其中该dsRNA经由如以下所示的接头共轭至配体L96



。

17.如权利要求9至16中任一项所述的dsRNA,其中该配体将该dsRNA靶向肝实质细胞。

18.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于1nM的IC_{50}。

19.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于0.05nM的IC_{50}。

20.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于0.02nM的IC_{50}。

21.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于0.01nM的IC_{50}。

22.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于10mg/kg的单剂量ED50。

23.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有低于5mg/kg的单剂量ED50。

24.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA与AD-58632或AD-60489相比显示出改进的活性。

25.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中:

(i)该反义链包括usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161);

(ii)该反义链由usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161)组成;

(iii)该有义链包括csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160);

(iv)该有义链由csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160)组成;

(v)该有义链包括csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160),并且该反义链包括usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161),或

(vi)该有义链由csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160)组成,并且该反义链由usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161)组成。

26.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA具有以下中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或所有:

(i)是化学合成的;

(ii)dsRNA中的所有核苷酸是经修饰的;

(iii)所有的核苷酸通过3’-5’磷酸二酯键连接;

(iv)该有义链包括21个核苷酸,或由其组成;

(v)该反义链包括23个核苷酸,或由其组成;

(vi)在有义链的3’-端具有平端;

(vii)具有3’-突出端;

(viii)共价地附接到包含三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分的配体上;

(ix)将有义链的3’-端共轭至三触角的GalNAc部分;

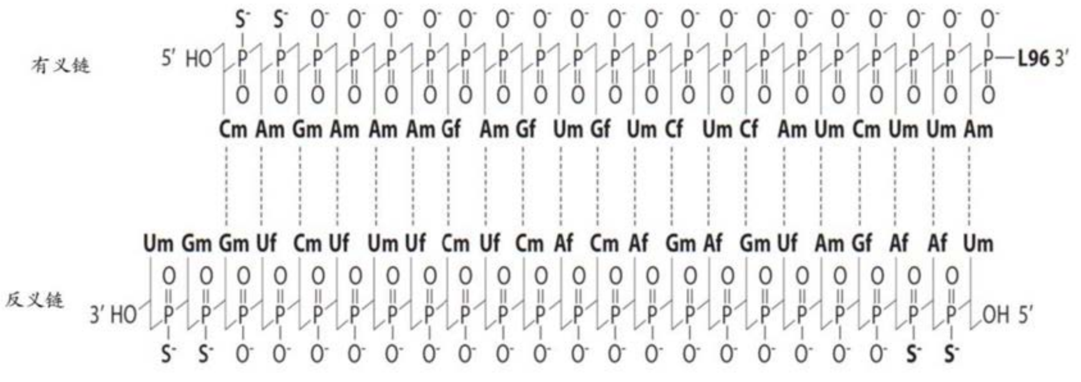
(X)具有包括一个或多个硫代磷酸酯键的反义链;

(xi)有义链的21个核苷酸杂交至反义链的互补的21个核苷酸；

(xii)在反义链的3'-端形成了21个核苷酸碱基对和二碱基突出端;或

(xiii)包括具有csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160)的有义和具有usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161)的反义链,或由其组成。

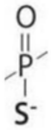
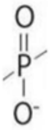
27.如前述权利要求中任一项所述的dsRNA,其中该dsRNA是处于具有以下结构的共轭物的形式：



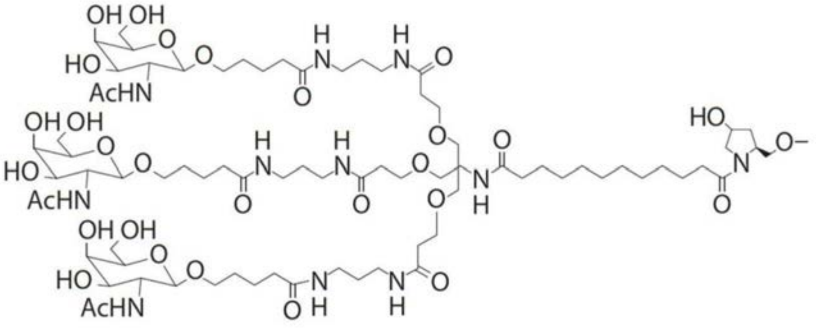
，

或其药学上可接受的盐，

其中Af、Cf、Gf、Uf＝2'F核糖核苷；Am、Cm、Gm、Um＝2'-OMe核糖核苷；

 =硫代磷酸酯；  ＝磷酸二酯，且

其中L96 =

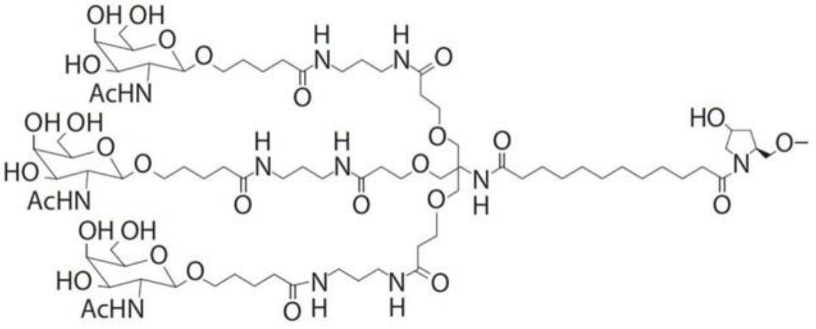

。

28.一种用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的区域,

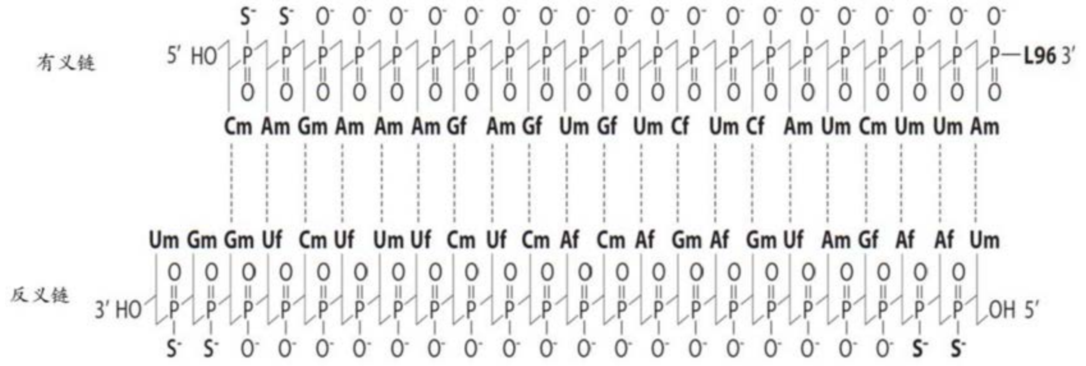
其中该有义链包括csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160),和其中该反义链包括usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161),

其中c、a、g、u＝2'-OMe核糖核苷;Af、Cf、Gf、Uf＝2'F核糖核苷;s＝硫代磷酸酯,且

其中L96 =


。

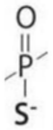
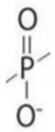
29.一种用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中所述dsRNA包括有义链和反义链，该反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的区域，其中所述dsRNA是处于具有以下结构的共轭物的形式：



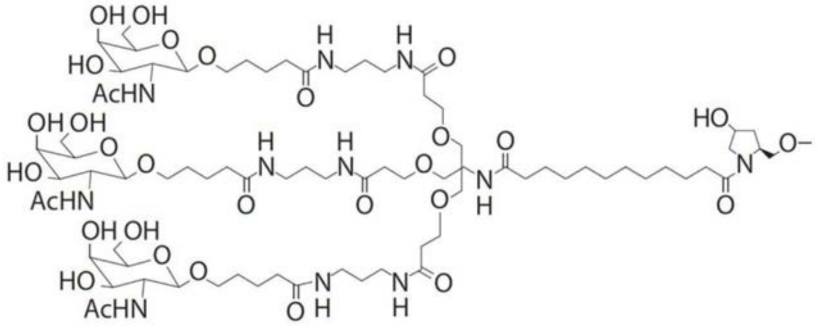
，

或其药学上可接受的盐，

其中Af、Cf、Gf、Uf＝2’F核糖核苷；Am、Cm、Gm、Um＝2’-OMe核糖核苷；

 =硫代磷酸酯；  = 磷酸二酯，且

其中L96 =

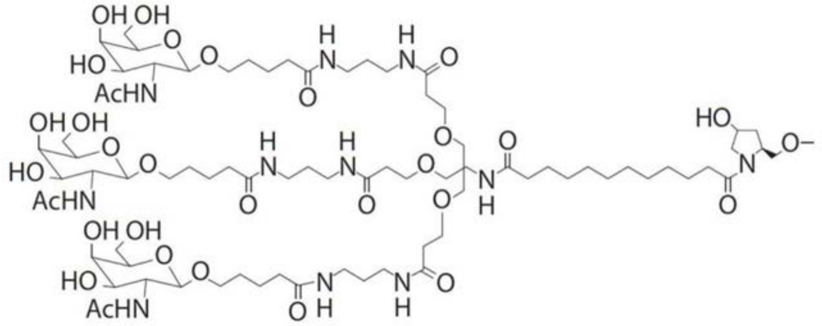

。

30.如权利要求1所述的dsRNA，其中所述dsRNA包括有义链和反义链，该反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的区域，

其中该有义链包括csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96(SEQ ID NO:4160)，和其中该反义链包括usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO:4161)，

其中c、a、g、u＝2’-OMe核糖核苷；Af、Cf、Gf、Uf＝2’F核糖核苷；s＝硫代磷酸酯，且

其中L96 =


。

31.一种细胞，该细胞包括如权利要求1至30中任一项所述的dsRNA。

32.一种用于抑制ALAS1基因表达的药物组合物，该组合物包括如权利要求1至30中任一项所述的dsRNA。

33.如权利要求32所述的药物组合物,其中所述组合物包括注射用水。

34.如权利要求32或33所述的药物组合物,其中所述组合物适用于皮下给予。

35.如权利要求32或33所述的药物组合物,其中所述组合物包括约200mg/mL的所述dsRNA。

36.如权利要求32或33所述的药物组合物,其中所述组合物具有6.0-7.5的pH。

37.如权利要求32或33所述的药物组合物,其中所述组合物具有约7.0的pH。

38.一种体外抑制细胞中ALAS1表达的方法,该方法包括:

(a)向该细胞中引入如权利要求1至30中任一项所述的dsRNA或如权利要求32至37中任一项所述的药物组合物,并且

(b)维持步骤(a)的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录物的降解,由此抑制该ALAS1基因在该细胞中的表达。

39.如权利要求38所述的方法,其中ALAS1的表达被抑制至少20%。

40.如权利要求38所述的方法,其中ALAS1的表达被抑制至少30%。

41.如权利要求38所述的方法,其中在所述细胞中所述ALAS1表达在10nM的dsRNA下被抑制至少80%,如通过如分支DNA(bDNA)在转染后24小时测定的。

42.如权利要求41所述的方法,其中所述细胞是Hep3B细胞。

43.一种用于在体外降低细胞中卟啉或卟啉前体的水平的方法,该方法包括将该细胞与如权利要求1至30中任一项所述的dsRNA或如权利要求32至37中任一项所述的药物组合物按以下量进行接触,该量有效降低该细胞中该卟啉或该卟啉前体的水平。

44.如权利要求43所述的方法,其中所述卟啉前体是ALA或PBG,和所述细胞是肝实质细胞。

45.如权利要求1至30中任一项所述的dsRNA或如权利要求32至37中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的卟啉症的药物中的用途。

46.如权利要求45所述的用途,其中该受试者处于发展卟啉症的风险中,或被诊断为患有卟啉症。

47.如权利要求45或46所述的用途,其中该卟啉症是急性间歇性卟啉症或ALA-脱水酶缺乏性卟啉症。

48.如权利要求45至47中任一项所述的用途,其中该卟啉症是急性肝性卟啉症。

49.如权利要求45至48中任一项所述的用途,其中(i)在卟啉症的急性发作后给予该dsRNA或组合物,(ii)将该dsRNA或组合物在卟啉症的急性发作过程中给予,或(iii)预防性地给予该dsRNA或组合物以预防卟啉症的急性发作。

50.如权利要求45至49中任一项所述的用途,其中以0.05mg/kg至50mg/kg该受试者体重的剂量给予该dsRNA。

51.如权利要求45至49中任一项所述的用途,其中以0.01mg/kg至5mg/kg该受试者体重的剂量给予该dsRNA。

52.如权利要求50所述的用途,其中该dsRNA以5mg/kg或更少的剂量给予。

53.如权利要求50所述的用途,其中该dsRNA以2.5mg/kg或更少的剂量给予。

54.如权利要求50所述的用途,其中该dsRNA以1-2.5mg/kg的剂量给予。

55.如权利要求52至54中任一项所述的用途,其中该dsRNA皮下给予。

56.如权利要求45至55中任一项所述的用途,其中该药物(i)降低了该受试者中卟啉或卟啉前体的水平;和/或(ii)抑制该受试者中的ALAS1表达。

57.如权利要求56所述的用途,其中所述水平降低至少30%。

58.如权利要求56所述的用途,其中所述水平降低至少40%。

59.如权利要求56所述的用途,其中所述卟啉前体是ALA或PBG。

60.如权利要求45至59中任一项所述的用途,其中所述药物(i)改善与ALAS1相关失调有关的症状,(ii)减少与该受试者的卟啉症有关的症状的急性发作的频率,和/或(iii)当该受试者暴露于诱发因素时,减少与该受试者的卟啉症有关的症状的急性发作的发生率。

61.如权利要求60所述的用途,其中所述与ALAS1相关失调有关的症状是卟啉症。

62.如权利要求60所述的用途,其中(iii)中的所述受试者处于经前期。

63.如权利要求45至62中任一项所述的用途,其中根据剂量方案给予该dsRNA或组合物。

64.如权利要求63所述的用途,其中每周、每两周、或每月一次给予该dsRNA或组合物。

65.如权利要求63所述的用途,其中该dsRNA以2.5mg/kg该受试者体重的剂量每月给予。

66.如权利要求45至65中任一项所述的用途,其中该dsRNA是在卟啉症急性发作之前给予的。

67.如权利要求66所述的用途,其中该dsRNA在前驱症状过程中给予。

68.如权利要求45至67中任一项所述的用途,其中该受试者具有升高水平的ALA和/或PBG。

69.如权利要求68所述的用途,其中该受试者患有慢性疼痛。

70.如权利要求68所述的用途,其中该受试者具有升高血浆或尿水平的ALA和/或PBG。

71.如权利要求45至70中任一项所述的用途,其中该药物降低ALA和/或PBG的升高的水平。

72.如权利要求45至71中任一项所述的用途,其中该药物减少或预防疼痛、神经病变、和/或神经损伤。

73.如权利要求45至72中任一项所述的用途,其中该药物预防卟啉症的急性发作。

74.如权利要求45至73中任一项所述的用途,其中重复给予该dsRNA或组合物。

用于抑制ALAS1基因表达的组合物与方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2013年10月4日提交的美国临时申请号61/887288以及2014年4月24日提交的美国临时申请号61/983720的优先权。前述申请的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此通过引用以其全文结合的序列表。创建于2014年10月2日的所述ASCII拷贝被命名为A2038-7202WO_SL.txt,大小为1,107,486字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及特异性抑制ALAS1基因的表达。

[0006] 发明背景

[0007] 遗传性卟啉症是血红素生物合成途径(在此还称作卟啉途径)中特异性酶的活性缺乏导致的一类失调。卟啉途径中酶的缺乏导致血红素的不充分生产并且导致卟啉前体和卟啉的累积,高浓度的卟啉前体和卟啉对组织是有毒的。

[0008] 遗传性卟啉症中,急性间歇性卟啉症(AIP,例如,常染色体显性AIP)、杂斑卟啉症(variegate porphyria,VP,例如,常染色体显性VP)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症或HCP,例如,常染色体显性HCP)、以及5'氨基乙酰丙酸(还称作δ-氨基乙酰丙酸或ALA)脱水酶缺乏性卟啉症(ADP,例如,常染色体隐性ADP)被分类为急性肝性卟啉症并且表现为可能危及生命的急性神经性发作。这些急性发作特征是自主神经、外周神经和中枢神经症状,包括急性腹痛、高血压、心动过速、便秘、运动无力、瘫痪、以及抽搐。如果治疗不得当,接着可能发生四肢瘫痪、呼吸道受损、以及死亡。多种因素,包括细胞色素P450-诱导药物、饮食、以及激素变化可能通过增加肝5'-氨基乙酰丙酸合酶1(ALAS1,血红素生物合成途径的第一以及限速酶)的活性促成急性发作。在急性卟啉症,例如,AIP、VP、HCP以及ADP中,各自的酶缺乏导致肝产生并累积一种或多种物质(例如,卟啉和/或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG),这种或这些物质可能是神经毒的并且可能导致发生急性发作。参见,例如,巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.),血液(Blood),120:4496-4504,2012。

[0009] 目前用于急性神经性发作的疗法是静脉给药氯化血红素(Panhematin®,灵北公司(Lundbeck)或Normosang®,科懋公司(Orphan Europe)),这为ALAS1的负反馈抑制提供了外源血红素,并且由此降低了ALA和PBG产生。氯化血红素用于在急性发作期间进行治疗或用于预防发作,特别是对于患有急性卟啉症并在她们的月经周期中伴随激素变化经历频繁发作的女性。虽然患者总体上响应良好,但是它的效果缓慢,典型地花费二到四天或更久来使得ALA和PBG浓度朝向正常水平归一化。因为静脉内氯化血红素代谢迅速,通常需要三至四次输注以有效治疗或预防急性发作。此外,重复输注可能导致铁超负荷以及静脉炎,这可能危害外周静脉通路。尽管通过原位肝移植可治愈,这一手术具有显著的发病率和死亡率并且可用的肝供体是受限的。因此,需要更有效、作用快速且安全的替代性治疗方案。

如果此类治疗可以通过皮下给药而递送，将是特别有益的，因为这将排除对输注和旷日持久的住院治疗的需求。

[0010] AIP，还称作胆色素原脱氨酶(PBGD)缺乏，或羟甲基胆色烷合酶(HMBS)缺乏，是最常见的急性肝性卟啉症。AIP的患病率估计为100,000人中5-10人，其中5％-10％患者是有症状的。AIP是由HMBS基因突变引起的一种常染色体显性失调，这一突变将导致该酶的活性降低，例如，正常活性的一半。预先通过同源重组产生具有约30％野生型HMBS活性的AIP小鼠模型。如同人类患者一样，当给予生卟啉药(porphyrinogenic drugs)，如苯巴比妥时，这些小鼠增加肝ALAS1活性并且累积大量的血浆和尿ALA与PBG。因此，将它们用作对用于急性肝性卟啉症的新颖疗法的效力进行评估的优异模型。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明描述了用于调节ALAS1基因表达的方法和iRNA组合物。在某些实施例中，使用ALAS1-特异性iRNA降低或抑制ALAS1基因的表达。这样的抑制可以有用于治疗与ALAS1表达相关的失调，如卟啉症。

[0013] 因此，在此描述的是多种组合物和方法，如在细胞或在受试者中(例如，在哺乳动物如人类受试者中)，实现ALAS1基因RNA转录本的RNA-诱导的沉默复合体(RISC)-介导的切割。还描述了多种组合物和方法，用于治疗与ALAS1基因的表达相关的失调，像卟啉症，例如，X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症或ADP)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症(CEP)、迟发性皮肤卟啉症(PCT)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症、或HCP)、杂斑卟啉症(VP)、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在一些实施例中，该失调是急性肝性卟啉症，例如，ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、AIP、HCP、或VP。在某些实施例中，该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)或AIP。

[0014] 在实施例中，该卟啉症是肝性卟啉症，例如，是选自以下各项的卟啉症：急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如，纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是双卟啉症。

[0015] 如在此使用的，术语“iRNA”、“RNAi”、“iRNA剂”、“RNAi剂”、或“iRNA分子”是指包含如在此定义的术语RNA的一种药剂，并且其例如经由RNA-诱导的沉默复合物(RISC)路径介导RNA转录物的靶向切割。在一个实施例中，如在此所述的iRNA实现ALAS1在细胞或哺乳动物中表达的抑制。

[0016] 包含在在此表征的组合物中的iRNA包含具有RNA链(反义链)的dsRNA，该RNA链具有一个区域，例如，该区域是30个或更少个核苷酸，通常是19-24个核苷酸的长度，该区域基本上与ALAS1基因(例如，小鼠或人ALAS1基因)的mRNA转录本(在此还称作“ALAS1-特异性iRNA”)的至少一部分互补。可替代地，或组合地，iRNAs包含具有RNA链(反义链)的dsRNA，该RNA链具有一个区域，该区域是30个或更少个核苷酸，通常是19-24个核苷酸的长度，该区域基本上与ALAS1基因(例如，人ALAS1基因的变体1或2)的mRNA转录本的至少一部分互补(在此还称作“ALAS1-特异性iRNA”)。

[0017] 在实施例中，在此描述的iRNA(例如dsRNA)包括一个反义链，该反义链具有基本上与人ALAS1的一个区域互补的一个区域。在实施例中，人ALAS1具有序列NM_000688.4(SEQ ID NO:1)或NM_000688.5(SEQ ID NO:382)。在实施例中，该人类ALAS1具有NM_199166.1的

序列。

[0018] 在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)的反义序列靶向ALAS1转录物NM_000688.4上的区域871至895(在5'和/或3'端上,以单向或双向,加或减5、4、3、2、或1个核苷酸)内。在实施例中,该反义序列靶向ALAS1转录物NM_000688.4上的核苷酸871至893、871至892、或873至895。在实施例中,该反义序列包括与ALAS1转录物NM_000688.4上的核苷酸871至893、871至892、或873至895完全互补或基本上互补的序列,或由其组成。

[0019] 在一方面,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括ALAS1 RNA转录物的互补区域,该反义链包括与UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU(SEQ ID NO:4153)或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU(SEQ ID NO:4154)的序列相差不超过3、2或1个核苷酸的至少15(例如,至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中,该反义链包括UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU(SEQ ID NO:4153)或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU(SEQ ID NO:4154)的序列。在实施例中,该有义链包括CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA(SEQ ID NO:4155)的序列。在实施例中,反义链和/或有义链中的一个或多个核苷酸如在此描述的进行修饰。在实施例中,该dsRNA包括(i)包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的反义序列的,或由其组成的反义链和/或(ii)包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的有义序列的,或由其组成的有义链(包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的反义链和/或有义链的修饰中的一种或多种(例如,所有))。

[0020] 在一方面,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括ALAS1 RNA转录物的互补区域,该反义链包括与表21至40中任一个所列出的反义序列,或表21至40中任一个所列出的未修饰版的反义序列(例如,除了一些或所有核苷酸是未修饰的之外,具有相同的核苷酸序列的版本)相差不超过3(例如,相差不超过0、1或2)个核苷酸的至少15(例如,至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在一个实施例中,该反义序列包括与(i)AD-60489、AD-60519、或AD-61193的反义序列或(ii)这些序列中任一个的未修饰版相差不超过3(例如,相差不超过0、1或2)个核苷酸的至少15(例如,至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中,该反义序列包括与UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU(SEQ ID NO:4153)或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU(SEQ ID NO:4154)的序列相差不超过3(例如,相差不超过0、1或2)个核苷酸的至少15(例如,至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中,该反义序列靶向NM_000688.4(SEQ ID NO:1)的位置871-893。在实施例中,该有义链包括CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA(SEQ ID NO:4155)的序列。在实施例中,反义链和/或有义链中的一个或多个核苷酸如在此描述的进行修饰。

[0021] 在一些实施例中,该dsRNA不是表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中任一个列出的有义和/或反义序列。

[0022] 在一个实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括ALAS1 RNA转录物的互补区域,该反义链包括与AD-60519的反义序列相差不超过3、不超过2、或不超过1个核苷酸的至少15(例如,至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中,如在此描述的修饰一个或多个核苷酸。

[0023] 在一个实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述

dsRNA包括有义链和反义链，该反义链包括ALAS1 RNA转录物的互补区域，该反义链包括与如在此描述的AD-60489的反义序列，或AD-60489的衍生物相差不超过3(例如，相差不超过0、1或2)个核苷酸的至少15(例如，至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中，如在此描述的修饰一个或多个核苷酸，例如，如在此描述的修饰)AD-60489的一个或多个(或所有核苷酸。在实施例中，该AD-60489衍生物是AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、或AD-60901。在实施例中，该AD-60489的衍生物是AD-60519。在实施例中，该AD-60489的衍生物是AD-61193。

[0024] 在一个实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中所述dsRNA包括有义链和反义链，该反义链包括ALAS1 RNA转录物的互补区域，该反义链包括与在此描述的AD-58632的衍生物相差不超过3(例如，相差不超过0、1或2)个核苷酸的至少15(例如，至少16、17、18、19、20、21、22、或23)个连续核苷酸。在实施例中，如在此描述的修饰一个或多个核苷酸，例如，如在此描述的修饰AD-58632的一个或多个(或所有)核苷酸。在实施例中，该AD-58632的衍生物是AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、和AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。在实施例中，该AD-58632的衍生物是AD-60819。

[0025] 在一些实施例中，该dsRNA具有小于1nM的IC_{50}。在一些实施例中，dsRNA具有在0.01-1nM范围内的IC_{50}。在实施例中，该dsRNA具有小于0.05nM的IC_{50}。在实施例中，该dsRNA具有小于0.02nM的IC_{50}。在实施例中，该dsRNA具有小于0.01nM的IC_{50}。在实施例中，该IC_{50}是如在本文实例中所描述的进行确定。

[0026] 在一些实施例中，该dsRNA具有小于约10mg/kg的单剂量ED50。在一些实施例中，该dsRNA具有小于约5mg/kg的单剂量ED50。在实施例中，该EC50是如在本文实例中所描述的进行确定。

[0027] 在一些实施例中，与AD-58632相比，该dsRNA显示出改进的活性。在一些实施例中，与AD-60489相比，该dsRNA显示出改进的活性。在一些实施例中，与AD-58632和AD-60489相比，该dsRNA显示出改进的活性。

[0028] 在实施例中，该dsRNA是AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。在实施例中，该dsRNA包括反义链，该反义链包括选自以下各项的反义序列(和/或一种或多种(例如，所有)修饰)，或由其组成:AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。在实施例中，该dsRNA包括有

义链，该有义链包括选自以下各项的有义序列(和/或一种或多种(例如，所有)修饰)，或由其组成：AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。

[0029] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU(SEQ ID NO:4153)或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU(SEQ ID NO:4154)的序列，或由其组成，和/或(ii)有义链，该有义链包括CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA(SEQ ID NO:4155)的序列，或由其组成。在实施例中，反义链和/或有义链中的一个或多个核苷酸如在此描述的进行修饰。

[0030] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括AD-60489的反义序列，或由其组成，和/或(ii)有义链，该有义链包括AD-60489的有义序列，或由其组成(其中该有义和/或反义序列包括AD-60489的有义链和/或反义链的修饰中的一种或多种(例如，所有))。

[0031] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括AD-60519的反义序列，或由其组成，和/或(ii)有义链，该有义链包括AD-60519的有义序列，或由其组成(其中该有义和/或反义序列包括AD-60519的有义链和/或反义链的修饰中的一种或多种(例如，所有))。

[0032] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括AD-61193的反义序列，或由其组成，和/或(ii)有义链，该有义链包括AD-61193的有义序列，或由其组成(其中该有义和/或反义序列包括AD-61193的有义链和/或反义链的修饰中的一种或多种(例如，所有))。

[0033] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括AD-60819的反义序列，或由其组成，和/或(ii)有义序列，该有义序列包括AD-60819的有义序列，或由其组成(其中该有义和/或反义序列包括AD-60819的有义链和/或反义链的修饰中的一种或多种(例如，所有))。

[0034] 在实施例中，提供了用于抑制ALAS1的dsRNA，其中该dsRNA包括(i)反义链，该反义链包括AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的反义序列(或对应的未修饰的反义序列)，或由其组成，和/或(ii)有义链，该有义链包括AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的有义序列(或对应的未修饰的反义序列)，或由其组成。在实施例中，该dsRNA包括(i)反义链，该反义链由AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的反义序列组成，和/或(ii)有义链，该有义链由AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的有义序列组成，除了该dsRNA的反义链和/或有义链与AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的对应反义和/或有义序列相差1、2、或3个核苷酸之外。

[0035] AD-60489、AD-60519、AD-61193、和AD-60819的序列和修饰示于下表44中。

[0036] 表44：AD-60489、AD-60519、AD-61193、AD-60819的序列和修饰

[0037]

反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	对应的未修饰的有义序列	对应的未修饰的反义序列
871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96 (SEQ ID NO: 4156)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4157)	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4158)	UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4159)
871-893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96 (SEQ ID NO: 4160)	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161)	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4162)	UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4163)
871-893	AD-61193	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96 (SEQ ID NO: 4164)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4165)	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4166)	UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4167)
873-895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96 (SEQ ID NO: 4168)	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg (SEQ ID NO: 4169)	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU (SEQ ID NO: 4170)	AAGAAGAUGAGACACUCUUUCUG (SEQ ID NO: 4171)

[0038] 其中c、a、g、u＝2'-OMe核糖核苷;Af、Cf、G、Uf＝2'F核糖核苷;S＝硫代磷酸酯;L96具有在表1中描绘的结构。

[0039] 在实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中该dsRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的反义序列,或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的有义序列,或由其组成(包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的有义链和/或反义链的核苷酸序列和修饰中的一种或多种(例如,所有))。

[0040] 在实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中该dsRNA是AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819。在实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中该dsRNA是AD-60489、AD-60519、或AD-61193(例如,包括AD-60489、AD-60519、或AD-61193的核苷酸序列和/或修饰中的一种或多种(例如,所有))。

[0041] 在实施例中,该dsRNA包括AD-60489,或由其组成(例如,包括AD-60489的核苷酸序列和/或修饰的一种或多种(例如,所有))。

[0042] 在实施例中,该dsRNA包括AD-60519,或由其组成(例如,包括AD-60519的核苷酸序列和/或修饰的一种或多种(例如,所有))。

[0043] 在实施例中,该dsRNA包括AD-61193,或由其组成(例如,包括AD-61193的核苷酸序列和/或修饰的一种或多种(例如,所有))。

[0044] 在实施例中,该dsRNA包括AD-60819,或由其组成(例如,包括AD-60819的核苷酸序列和/或修饰的一种或多种(例如,所有))。

[0045] 在实施例中,该dsRNA(例如,AD-60489、AD-60519、AD-61193、AD-60819、或在表21至40中任一个中在此披露的另一种dsRNA)有效抑制ALAS1 mRNA的肝水平,例如,实现了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、或80%的沉默(例如,这样使得ALAS1 mRNA水平降低至肝ALAS1 mRNA的对照水平的90%或更少、80%或更少、70%或更少、60%或更少、50%或更少、40%或更少、30%或更少、或20%或更少,例如,在未治疗的个体或个体组中的水平,例如,仅用PBS治疗的个体或个体组)。在实施例中,使用非人类灵长动物模型评估dsRNA在抑制ALAS1 mRNA的肝水平方面的效力,例如,如在本文实例中所描述的。

[0046] 在实施例中,该dsRNA(例如,AD-60489、AD-60519、AD-61193、AD-60819、或在表21至40中任一个中在此披露的另一种dsRNA)有效抑制ALAS1 mRNA的循环水平,例如,以实现至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、或80%的沉默(例如,这样使得ALAS1 mRNA水平降低至循环ALAS1 mRNA的对照水平的90%或更少、80%或更少、70%或更少、60%或更少、50%或更少、40%或更少、30%或更少、或20%或更少,例如,用dsRNA治疗前的水平,或未治疗的个体或个体组的水平)。在实施例中,使用非人类灵长动物模型评估dsRNA在抑制ALAS1 mRNA的循环水平方面的效力,例如,如在本文实例中所描述的。在实施例中,使用循环性细胞外RNA检测(cERD)测定来评估ALAS1 mRNA的循环水平,例如,如在此所描述的或在塞加尔(Sehgal),A.等人,使用循环RNA定量组织特异性靶基因调控(Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA)(海报于2012年2月9日在基本原理基因沉默,由小型RNA讨论会出品)或塞加尔A.等人,在循环RNA中组织特异性基因沉默(Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA),RNA,20:1-7,与2013年12月9日在线发布。

[0047] 可以将cERD方法应用至任何适当的生物样品。在实施例中,使用血液样品,例如,血清样品,评估ALAS1 mRNA的循环水平。在实施例中,使用尿液样品评估ALAS1 mRNA的循环水平。

[0048] 在实施例中,该dsRNA是在此披露的,例如,在本文的表中的任何一项中披露的AD-60489的衍生物。在实施例中,与AD-60489相比,该dsRNA显示出改进的活性。在一些此类实施例中,该dsRNA是AD-60519。

[0049] 在实施例中,该dsRNA是在此披露的,例如,在本文的表中的任何一项中披露的AD-58632的衍生物。在实施例中,与AD-58632相比,该dsRNA显示出改进的活性。

[0050] 在实施例中,改进的活性是由更低的IC50来指示,例如,如基于体外测定所确定的,例如,在此所描述的,例如,在实例中的。

[0051] 在实施例中,改进的活性是由更低的有效剂量来指示。有效剂量可以基于单剂量或多个重复剂量的给予来确定。在实施例中,该有效剂量是基于单剂量ED50来确定的。在实施例中,该有效剂量或单剂量ED50是基于体内测定来确定的。在实施例中,该体内测定是在非人类动物中进行的,例如,在大鼠中,在非人类灵长动物中,或在小鼠中。

[0052] 在实施例中,该有效剂量是基于获得ALAS1 mRNA水平降低所需要的剂量来确定的(例如,ALAS1 mRNA的肝水平和/或ALAS1 mRNA的循环水平),例如,如在本文实例中所描述的。在实施例中,使用cERD测定来评估循环mRNA。

[0053] 在实施例中,该有效剂量是基于获得ALA和/或PBG的水平(例如,尿和/或血浆水平)的降低所需要的剂量来确定。

[0054] 在实施例中,该有效剂量是基于获得在此描述的具体治疗效果所需要的剂量来确定的,例如,预防或减轻与卟啉症有关的症状。

[0055] 在实施例中,该改进的活性是由实现dsRNA的更高肝水平来指示的。在实施例中,在单剂量的dsRNA(例如,1、2.5、3、5、或10mg/kg的剂量)之后,获得更高的肝水平。在实施例中,在给予多剂量的dsRNA(例如,1、2.5、3、5、或10mg/kg的每天或每周剂量,2-10次)之后,获得更高的肝水平。

[0056] 在一个实施例中,iRNA包含具有RNA链(反义链)的dsRNA,该RNA链具有一个区域,该区域基本上与ALAS1 mRNA的一部分互补,例如人ALAS1 mRNA(例如,如在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:382中提供的人ALAS1 mRNA)。

[0057] 在一个实施例中,用于抑制ALAS1基因表达的iRNA包含至少两个彼此互补的序列。iRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。反义链包含基本上与编码ALAS1转录本的mRNA的至少一部分互补的核苷酸序列,并且该互补区域是30个或更少个核苷酸和至少15个核苷酸长度。总体上,iRNA长度是19个至24个核苷酸。

[0058] 在一些实施例中,iRNA是19个至21个核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA是19-21个核苷酸长度并且使一种脂质配制品,例如,脂质纳米颗粒(LNP)配制品(例如,LNP11制剂)。

[0059] 在一些实施例中,iRNA是21个至23个核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA是21-23个核苷酸长度并且处于共轭物的形式,例如,共轭至如在此描述的一种或多种GalNAc衍生物。

[0060] 在一些实施例中,iRNA是从约15至约25个核苷酸长度,并且在其他实施例中,该iRNA是从约25至约30个核苷酸长度。一旦与表达ALAS1的细胞接触,靶向ALAS1的iRNA抑制ALAS1基因的表达至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多,如通过如本文所述的方法分析时。在一个实施例中,在稳定的核酸脂质颗粒(SNALP)中配制靶向ALAS1的iRNA。

[0061] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包括选自下组的dsRNA的第一序列,该组由表21至40的有义序列组成,和选自下组的第二序列,该组由表21至40的对应的反义序列组成。

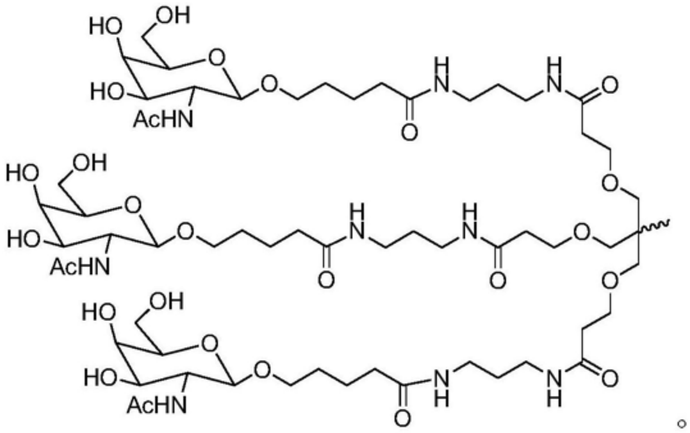
[0062] 在此表征的iRNA分子可以包括天然发生的核苷酸或可以包括至少一个经修饰的核苷酸。在实施例中,该至少一个经修饰的核苷酸包括在选自下组的核苷酸上的修饰中的一种或多种,该组由以下各项组成:锁核酸(LNA)、无环核苷酸、己糖醇或己糖核酸(HNA)、环己烯核酸(CeNA)、2′-甲氧基乙基、2′-O-烷基、2′-O-烯丙基、2′-C-烯丙基、2′-氟、2′-脱氧、2’-羟基、或其任何组合。在一个实施例中,该至少一个修饰的核苷酸包括但不限于2’-O-甲基修饰的核苷酸、2′-氟修饰核苷酸、具有5’-硫代磷酸酯基团的核苷酸、以及连接到配体上的末端核苷酸,例如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或胆甾醇基衍生物。可替代地,该经修饰的核苷酸可以选自下组:2’-脱氧-2’-氟修饰的核苷酸、2’-脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、无环核苷酸、脱碱基核苷酸、2’-氨基修饰的核苷酸、2’-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、以及包括非天然碱基的核苷酸。这种经修饰的序列可以基于,例如,所述iRNA的第一序列,所述第一序列选自由表21-40中所披露的有义序列组成的组,和第二序列,所述第二序列选自由表21-40中所披露的相应反义序列组成的组。

[0063] 在一个实施例中,在此描述的iRNA靶向野生型ALAS1 RNA转录本变体,并且在另一个实施例中,iRNA靶向突变转录本(例如,携带等位变体的ALAS1 RNA)。例如,本发明中表征的iRNA可以靶向ALAS1的多态性变体,如单核苷酸多态性(SNP)。在另一个实施例中,iRNA靶向野生型和突变ALAS1转录本两者。在又另一个实施例中,iRNA靶向ALAS1的特定转录本变体(例如,人ALAS1变体1)。在又另一个实施例中,iRNA剂靶向多种转录本变体(例如,人ALAS1的变体1和变体2两者)。

[0064] 在一个实施例中,本发明中表征的iRNA靶向ALAS1 RNA转录本的非编码区,如转录本的5'或3'非翻译区。

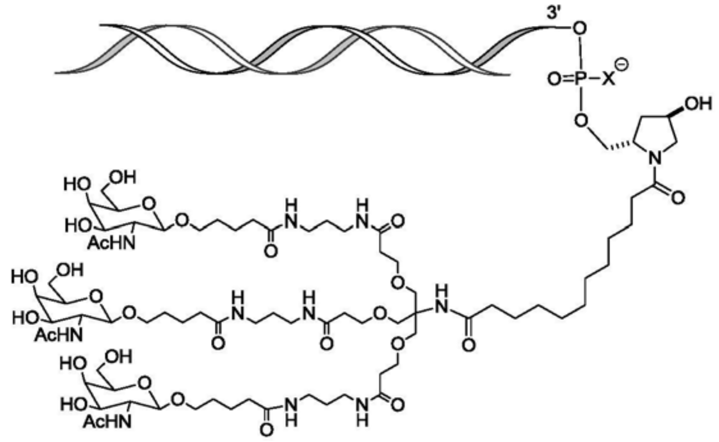
[0065] 在一些实施例中,在此描述的iRNA处于共轭物(例如,碳水化合物共轭物)形式,该共轭物可以用作靶向部分和/或配体,如在此描述的。在一个实施例中,共轭物附接至dsRNA的有义链的3'末端。在一些实施例中,共轭物经由接头附接,例如,经由二价或三价分支接头。

[0066] 在一些实施例中,共轭物包括一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。这样一种共轭物在此还称作GalNAc共轭物。在一些实施例中,共轭物将RNAi剂靶向特定细胞,例如,肝脏细胞(liver cell),像肝实质细胞(hepatocyte)。GalNAc衍生物可以经由接头附接,例如,二价或三价分支接头。在具体的实施例中,该共轭物是

[0067] 

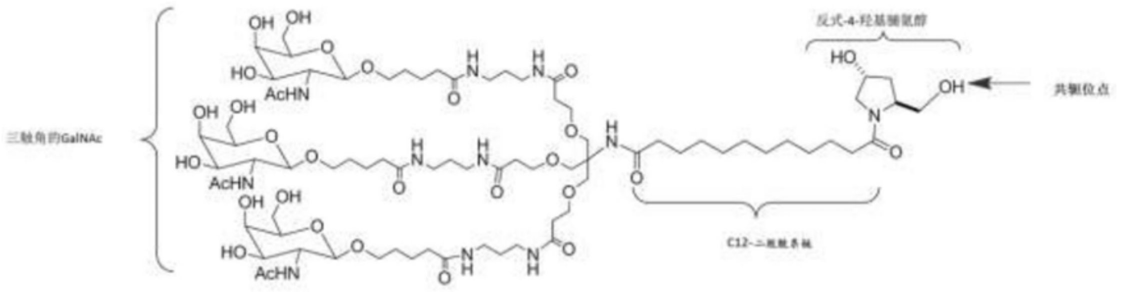
。

[0068] 在一些实施例中,RNAi剂经由接头附接至碳水化合物共轭物,例如,如以下方案中示出的接头,其中X是O或S

[0069] 

[0070] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,X是S。

[0071] 在一些实施例中,RNAi剂共轭至如表1中定义且如下示出的L96

[0072] 

[0073] 在一个实施例中，该dsRNA具有以下中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、十三种、十四种、十五种、十六种或所有：

[0074] (i)是化学合成的，例如，是通过固相寡核苷酸合成来合成的；

[0075] (ii)dsRNA中的所有核苷酸是经修饰的，例如，所有的核苷酸是2’-OMe或2’-F修饰的，或2’-OMe和2’-F修饰的组合；

[0076] (iii)所有的核苷酸通过3’-5’磷酸二酯键连接；

[0077] (iv)该有义链包括21个核苷酸，或由其组成；

[0078] (v)该反义链包括23个核苷酸，或由其组成；

[0079] (vi)在有义链的3’-端具有平端；

[0080] (vii)在反义链的3’-端具有3’-突出端，例如，二核苷酸突出端；

[0081] (viii)共价地附接到包含三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分的配体上；

[0082] (ix)将有义链的3’-端共轭至三触角的GalNAc部分(例如，在此称为如表1中所定义的L96)。在一个实施例中，通过磷酸二酯键，将3’-端连接至三触角的GalNAc部分；

[0083] (X)具有一种反义链，该反义链包括一个或多个(例如，四个)硫代磷酸酯键。在一个实施例中，这些硫代磷酸酯键位于反义链的3’端以及位于5’端。在一个实施例中，两个硫代磷酸酯键位于3’端并且两个硫代磷酸酯键位于反义链的5’端；

[0084] (xi)具有一种有义链，该有义链包括一个或多个(例如，两个)硫代磷酸酯键。在一个实施例中，该一个或多个(例如，两个)硫代磷酸酯键位于有义链的5’端；

[0085] (xii)有义链的21个核苷酸杂交至反义链的互补的21个核苷酸；

[0086] (xiii)在反义链的3’-端形成了21个核苷酸碱基对和二碱基突出端；

[0087] (xiv)包括具有AD-60519的序列的有义和反义链，或由其组成；

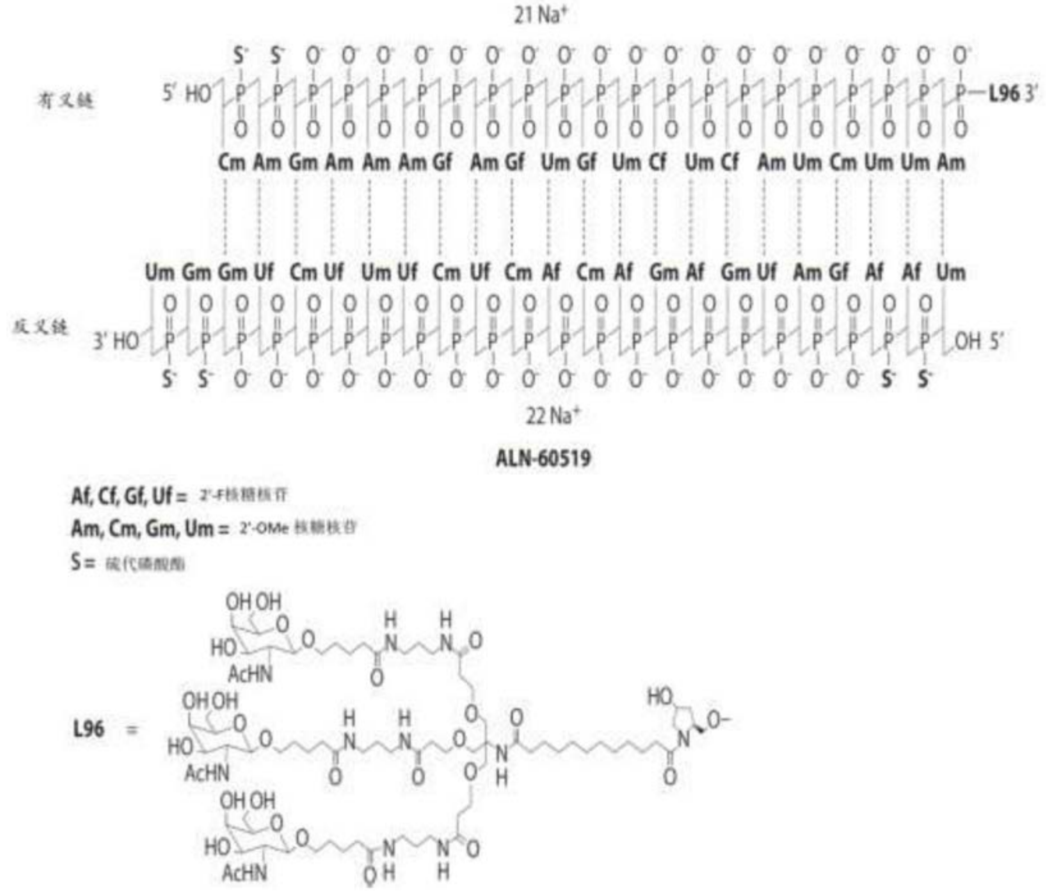
[0088] (xv)具有带有AD-60519的有义链的修饰中的10、12、14、16、18、19、20个或所有的有义链；

[0089] (xvi)具有带有AD-60519的反义链的修饰中的10、12、14、16、18、19、20个或所有的反义链;或

[0090] (xvii)具有双链体序列和AD-60519的所有的修饰。

[0091] 在实施例中，该dsRNA是处于具有以下结构的共轭物的形式(在此还称为AD-60519或ALN-60519)(按出现的顺序，分别是，SEQ ID NO 5238-5239)：

[0092]



[0093]　在一方面，在此提供的是一种组合物，例如，药物组合物，其包括在此描述的iRNA中的一种或多种和药学上可接受的载体或递送运载体。在一个实施例中，该组合物被用来抑制ALAS1在生物体(通常是人类受试者)中表达。在一个实施例中，该组合物用于治疗卟啉症，例如，AIP。

[0094]　在一个方面中，在此提供的iRNA是用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA)，其中所述dsRNA包括一个有义链和一个反义链(15-30个碱基对长度)，并且该反义链与SEQ ID NO:1或382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0095]　在另一个方面中，在此提供的iRNA是双链RNAi(dsRNA)，它包括与反义链互补的有义链，其中所述反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的一个区域，其中每条链具有约14至约30个核苷酸，其中所述双链RNAi剂由式(III)表示：

[0096]　有义：$5'n_p\text{-}N_a\text{-}(XXX)_i\text{-}N_b\text{-}YYY\text{-}N_b\text{-}(ZZZ)_j\text{-}N_a\text{-}n_q3'$

[0097]　反义：$3'n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'5'$

[0098]　(III)

[0099]　其中：

[0100]　i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

[0101]　p、p'、q、以及q'各自独立地是0-6；

[0102]　N_a和N_a'各自独立地表示包括0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸；

[0103]　N_b和N_b'各自独立地表示包括0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0104] n_p、n_p'、n_q、以及n_q'各自独立地表示突出核苷酸；

[0105] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序；

[0106] N_b上的修饰不同于Y上的修饰并且N_b'上的修饰不同于Y'上的修饰。

[0107] 在实施例中，有义链共轭至至少一个配体。

[0108] 在实施例中，i是1；j是1；或i和j两者均是1。

[0109] 在实施例中，k是1；l是1；或k和l两者均是1。

[0110] 在实施例中，XXX与X'X'X'互补，YYY与Y'Y'Y'互补，并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。

[0111] 在实施例中，Y'Y'Y'基序发生在该反义链从5'-端开始的位置11、12和13处。

[0112] 在实施例中，Y'是2'-O-甲基。

[0113] 在实施例中，双链体区域是15-30个核苷酸对的长度。

[0114] 在实施例中，双链体区域是17-23个核苷酸对的长度。

[0115] 在实施例中，双链体区域是19-21个核苷酸对的长度。

[0116] 在实施例中，双链体区域是21-23个核苷酸对的长度。

[0117] 在实施例中，核苷酸上的修饰选自下组，该组由以下各项组成：锁核酸(LNA)、无环核苷酸、己糖醇或己糖核酸(HNA)、环己烯核酸(CeNA)、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基、及其任何组合。

[0118] 在实施例中，核苷酸上的修饰选自下组，该组由以下各项组成：LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧基、2'-羟基、及其组合。

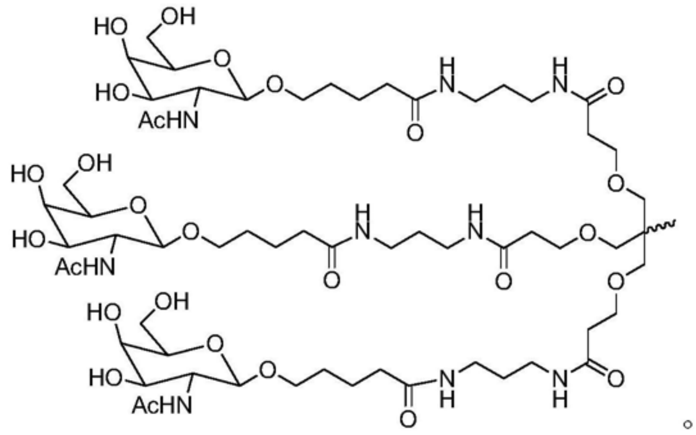
[0119] 在实施例中，核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、2'-氟或两者。

[0120] 在实施例中，配体包括碳水化合物。

[0121] 在实施例中，配体经由接头附接。

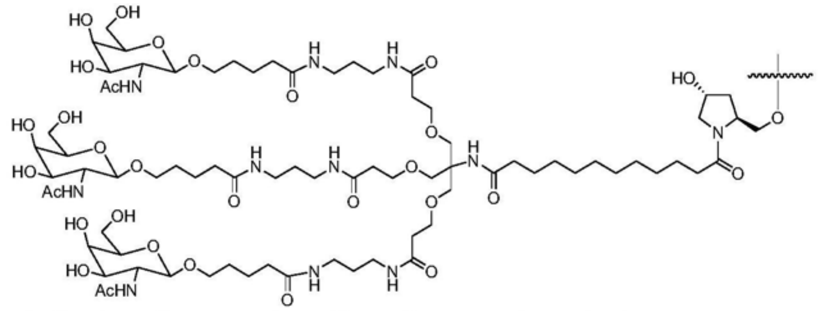
[0122] 在实施例中，接头是二价或三价分支接头。

[0123] 在实施例中，配体是

[0124] 

。

[0125] 在实施例中，配体和接头是如式XXIV所示的：

[0126] 

[0127] 在实施例中,配体附接至有义链的3’末端。

[0128] 在实施例中,该dsRNA由选自下组的核苷酸序列组成,或包括选自下组的核苷酸序列,该组是表21-40中提供的序列。

[0129] 在又一方面,在此提供的iRNA是用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括有义链和反义链,该反义链包括与ALAS1 RNA转录物互补的区域,该反义链包括与表21-40中任一个列出的反义序列之一相差不多于3个核苷酸的至少15连续核苷酸。在实施例中,与表21-40中任一个中列出的反义序列相比,该反义链的核苷酸具有更少的修饰,更多的修饰,或不同的修饰。

[0130] 在实施例中,有义和反义序列是在此披露的那些双链体,它们压制ALAS1 mRNA表达至少50%、60%、70%、80%、85%或90%,例如,如使用在此提供的实例中披露的测定进行评估。

[0131] 在实施例中,基于肝中的ALAS1 mRNA水平,评估ALAS1 mRNA表达,例如,如使用肝活检样品来评估的。在实施例中,基于生物学流体中的ALAS1 mRNA水平,评估ALAS1 mRNA表达,例如,血液、血清、血浆、脑脊髓液、或尿。在实施例中,使用循环性细胞外RNA检测(cERD)测定来评估ALAS1 mRNA表达,例如,如在此所描述的cERD测定或在塞加尔(Sehgal),A.等人,使用循环RNA定量组织特异性靶基因调控(Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA)(海报于2012年2月9日在基本原理基因沉默,由小型RNA讨论会出品)或塞加尔A.等人,在循环RNA中组织特异性基因沉默(Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA),RNA,20:1-7,与2013年12月19日在线发布。

[0132] 在一些实施例中,dsRNA包括至少一个修饰核苷酸。

[0133] 在一些实施例中,修饰的核苷酸的至少一个选自下组,该组由以下各项组成:2’-O-甲基修饰的核苷酸、包含5’-硫代磷酸酯基的核苷酸和与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷酸。

[0134] 在一些实施例中,修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2’-脱氧-2’-氟修饰的核苷酸、2’-脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、无环核苷酸、脱碱基核苷酸、2’-氨基修饰的核苷酸、2’-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、以及包括非天然碱基的核苷酸。

[0135] 在一些实施例中,互补区域长度是至少17个核苷酸。

[0136] 在一些实施例中,互补区域长度是在19个和21个核苷酸之间。

[0137] 在一些实施例中,互补区域长度是19个核苷酸。

[0138] 在一些实施例中,每一链的长度是不超过30个核苷酸。

[0139] 在一些实施例中，至少一条链包含具有至少1个核苷酸的3'突出端。在实施例中，该反义链包括具有至少1个核苷酸的3'突出端。

[0140] 在一些实施例中，至少一条链包含具有至少2个核苷酸的3'突出端。在实施例中，该反义链包括具有至少2个核苷酸的3'突出端。在实施例中，该反义链包括具有2个核苷酸的3'突出端。

[0141] 在一些实施例中，在此描述的dsRNA进一步包括配体。

[0142] 在一些实施例中，配体是GalNAc配体。

[0143] 在一些实施例中，配体将dsRNA靶向肝实质细胞。

[0144] 在一些实施例中，配体共轭至dsRNA的有义链的3'末端。

[0145] 在一些实施例中，该互补区域由选自表21-40中所列出的反义序列中的反义序列，或对应的反义序列(其中一些或所有的核苷酸是未修饰的)组成。在实施例中，该互补区域由序列UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU(SEQ ID NO:4153)或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU(SEQ ID NO:4154)组成。在一些实施例中，互补区域由双链体AD-60489的反义序列组成。在一些实施例中，互补区域由双链体AD-60519的反义序列组成。

[0146] 在实施例中，互补区域由选自在此披露的双链体的反义序列组成，它们压制ALAS1 mRNA表达至少50％、60％、70％、80％、85％或90％，例如，如使用在此提供的实例中披露的测定进行评估。

[0147] 在一些实施例中，dsRNA包括由选自表21-40的有义链序列组成的有义链和由选自表21-40的反义序列组成的反义链。在实施例中，dsRNA包括一对对应的有义和反义序列，其选自表21-40中披露的那些双链体。

[0148] 在一个方面中，本发明提供了包含在此表征的iRNA(例如，dsRNA)中至少一个的细胞。所述细胞通常是哺乳动物细胞，如人细胞。在一些实施例中，细胞是红细胞。在其他实施例中，细胞是肝脏细胞(例如，肝实质细胞)。

[0149] 在一个方面中，在此提供的是一种药物组合物，用于抑制ALAS1基因的表达，该组合物包括在此描述的iRNA(例如，dsRNA)。

[0150] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA(例如，dsRNA)在一种非缓冲溶液中进行给予。在实施例中，非缓冲溶液是盐水或水，例如，注射用水。

[0151] 在实施例中，该药物组合物包括AD-60519和注射用水。在实施例中，该组合物包括约100至300mg/mL，例如，200mg/mL的AD-60519。在实施例中，该组合物具有6.0-7.5的pH，例如，约7.0。在实施例中，该组合物用于皮下注射。在实施例中，以约0.3至1mL的体积，例如，0.55mL，将药物组合物封装在容器(例如，小玻璃瓶，例如2mL小玻璃瓶)中。在实施例中，该药物组合物是如在本文实例中所描述的ALN-AS1。

[0152] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA(例如，dsRNA)与缓冲溶液一起给予。在实施例中，缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐，或其任意组合。在实施例中，缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0153] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA(例如，dsRNA)靶向肝实质细胞。

[0154] 在本文描述的药物组合物的实施例中，静脉内给予组合物。

[0155] 在本文描述的药物组合物的实施例中，皮下给予组合物。

[0156] 在实施例中，药物组合物包括在此描述的iRNA(例如，dsRNA)，该iRNA包括配体(例

如,GalNAc配体),该配体将该iRNA(例如,dsRNA)靶向肝实质细胞。

[0157] 在实施例中,药物组合物包括在此描述的iRNA(例如,dsRNA),该iRNA包括配体(例如,GalNAc配体),并且皮下给予该药物组合物。在实施例中,该配体将该iRNA(例如,dsRNA)靶向肝实质细胞。

[0158] 在某些实施例中,药物组合物,例如,在此描述的组合物包括脂质配制品。在一些实施例中,RNAi剂是LNP配制品,例如,MC3配制品。在一些实施例中,LNP配制品将RNAi剂靶向特定细胞,例如,肝脏细胞,例如,肝实质细胞。在实施例中,脂质配制品是LNP11配制品。在实施例中,静脉内给予组合物。

[0159] 在另一个实施例中,配制这种药物组合物以便根据本文所述的剂量方案给药,例如,每4周不多于1次、每3周不多于1次、每2周不多于1次或每周不多于1次。在另一个实施例中,可以维持药物组合物的给药一个月或更长时间,例如,1个、2个、3个或6个月,或1年或更长时间。

[0160] 在另一个实施例中,将含有在本发明中表征的iRNA(例如,靶向ALAS1的dsRNA)的组合物随一种非iRNA治疗剂,如已知治疗卟啉症(例如,AIP)或卟啉症的症状(例如,疼痛)的药剂一起给予。在另一个实施例中,将含有在本发明中表征的iRNA(例如,靶向AIP的dsRNA)的组合物随一种非iRNA治疗方案,如氯化血红素或葡萄糖(例如,IV葡萄糖)输注一起给予。例如,在本发明中表征的iRNA可以在葡萄糖、右旋糖、或类似的用作恢复能量平衡(例如,全肠外营养)的治疗之前、之后或与其同时给予。在本发明中表征的iRNA还可以在血红素产品(例如,氯化血红素、精氨酸血红素、或白蛋白血红素)、以及任选地还与葡萄糖(例如,IV葡萄糖)或类似物组合给予之前、之后或与其同时给予。

[0161] 典型地,静脉内(IV)给予用于卟啉症治疗而给予的葡萄糖。静脉内给予葡萄糖在此称作"IV葡萄糖"。然而,还包括替代性实施例,其中通过其他手段给予葡萄糖。

[0162] 在一个实施例中,向患者给予ALAS1 iRNA,并且然后向该患者给予非iRNA剂或治疗方案(例如,葡萄糖和/或血红素产品)(反之亦然)。在另一个实施例中,同时给予ALAS1 iRNA和非iRNA治疗剂或治疗方案。

[0163] 在一个方面中,在此提供的是抑制细胞中ALAS1表达的方法,该方法包括:(a)向该细胞中引入在此描述的iRNA(例如dsRNA)并且(b)维持步骤(a)中产生的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解,由此抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0164] 在一个方面中,在此提供的是用于降低或抑制细胞(例如,红细胞或肝脏细胞,例如,像肝实质细胞)中ALAS1基因表达的方法。该方法包括:

[0165] (a)向该细胞引入双链核糖核酸(dsRNA),其中该dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。该dsRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链;该反义链具有基本上与编码ALAS1的mRNA的至少一部分互补的互补区域,并且其中该互补区域是30个或更少核苷酸长度,即15-30个核苷酸长度,并且总体上是19-24个核苷酸长度,并且其中一旦与表达ALAS1的细胞接触,则该dsRNA将ALAS1基因的表达抑制至少10%、例如至少20%、至少30%、至少40%或更多;并且

[0166] (b)维持步骤(a)中产生的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录物的降解,由此降低或抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0167] 在抑制细胞中ALAS1表达的前述方法的实施例中,将该细胞离体、体外、或体内地

进行处理。在实施例中，细胞是肝实质细胞。

[0168] 在实施例中，细胞存在于需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的受试者中。

[0169] 在实施例中，该失调是卟啉症。在实施例中，卟啉症是急性间歇性卟啉症或ALA-脱水酶缺乏性卟啉症。

[0170] 在实施例中，该卟啉症是肝性卟啉症，例如，是选自以下各项的卟啉症：急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如，纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是双卟啉症(dual porphyria)。

[0171] 在实施例中，ALAS1表达被抑制至少30％。

[0172] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)具有在0.01-1nM范围内的IC_{50}。

[0173] 在某些实施例中，细胞(例如，肝实质细胞)是哺乳动物细胞(例如，人类、非人类灵长动物、或啮齿动物细胞)。

[0174] 在一个实施例中，离体、体外、或体内地处理细胞(例如，存在于受试者(例如，需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的患者)中的细胞)。

[0175] 在一个实施例中，受试者是处于风险或被诊断为患有卟啉症的哺乳动物(例如，人类)，卟啉症是例如，X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP或Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症(CEP)、迟发性皮肤卟啉症(PCT)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症或HCP)、杂斑卟啉症(VP)、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在一些实施例中，该失调是急性肝性卟啉症，例如，ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、AIP、HCP、或VP。在具体实施例中，该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)或AIP。

[0176] 在实施例中，该卟啉症是肝性卟啉症，例如，是选自以下各项的卟啉症：急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如，纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是双卟啉症。

[0177] 在一个实施例中，引入的dsRNA降低或抑制细胞中ALAS1基因的表达。

[0178] 在一个实施例中，与参比细胞(例如，未治疗的细胞或用非靶向对照dsRNA治疗的细胞)相比较，引入的dsRNA降低或抑制ALAS1基因的表达、或一种或多种卟啉或卟啉前体(例如，δ-氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆色烷(HMB)、尿卟啉原(protoporphrinogen)I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、以及原卟啉IX)或卟啉产物或代谢物的水平至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％或更高。不受理论的限制，ALAS1是卟啉途径的第一酶。因此，降低ALAS1基因的表达很可能降低一种或多种卟啉前体、卟啉或卟啉产物或代谢物的水平。

[0179] 在其他方面，本发明提供了用于治疗、预防或管理与ALAS1表达相关的病理过程的方法，(例如，涉及卟啉、卟啉前体或卟啉途径缺陷的病理过程，例如，像卟啉症)。在一个实施例中，该方法包括向受试者，例如需要这种治疗、预防、或管理的患者施用有效(例如，治疗或预防有效)量的在此表征的一种或多种iRNA。

[0180] 在一个方面中，在此提供的是治疗和/或预防与ALAS1表达相关的失调的方法，该方法包括向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的在此描述的iRNA(例如，dsRNA)、或在此描述的包括iRNA(例如，dsRNA)的组合物。

[0181] 在一个方面中，在此提供的是治疗和/或预防卟啉症的方法，该方法包括向需要此类治疗的受试者给予双链核糖核酸(dsRNA)，其中所述dsRNA包括一个有义链和一个反义链(15-30个碱基对长度)，并且该反义链与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0182] 在一个实施例中，受试者(例如，患者)患有卟啉症。在另一个实施例中，受试者(例如，患者)处于发展卟啉症的风险中。在一些实施例中，靶向ALAS1的iRNA的给予减轻或缓解患者中与ALAS1相关的失调的至少一个症状的严重性。

[0183] 在一个实施例中，受试者是处于风险或已经被诊断为患有与ALAS1表达相关的失调的哺乳动物(例如，人类)，例如卟啉症，像X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症(CEP)、迟发性皮肤卟啉症(PCT)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症或HCP)、杂斑卟啉症(VP)、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在又一个实施例中，卟啉症是急性肝性卟啉症，例如，ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、AIP、HCP、或VP。在一些此类实施例中，该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)或AIP。

[0184] 在实施例中，受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中。在实施例中，该卟啉症是肝性卟啉症，例如，是选自以下各项的卟啉症：急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如，纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中，卟啉症是双卟啉症。

[0185] 在实施例中，卟啉症、卟啉症的症状、前驱症状、或卟啉症的发作通过暴露于如在此描述的诱发因素而诱导。在一些实施例中，诱发因素是化学暴露。在一些实施例中，诱发因素是药物，例如，处方药物或非处方药。在一些实施例中，诱发因素是月经周期，例如，月经周期的一个具体时期，例如，黄体期。

[0186] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是在卟啉症急性发作后给予。

[0187] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是在卟啉症急性发作过程中给予。

[0188] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是预防性给予的以防止卟啉症的急性发作。

[0189] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)被配制为LNP配制品。

[0190] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)处于GalNAc共轭物的形式。

[0191] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)以0.05-50mg/kg的剂量给予。

[0192] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)以0.01mg/kg-5mg/kg受试者体重的浓度给予。

[0193] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)被配制为LNP配制品并且是以0.05-5mg/kg的剂量给予。

[0194] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)是处于GalNAc共轭物的形式并且是以0.5-50mg/

kg的剂量给予。在某些实施例中，以少于10mg/kg(例如，5mg/kg或更少)的剂量给予以GalNAc共轭物形式的iRNA，例如，每周一次；例如，1mg/kg或更少、2.5mg/kg或更少、或5mg/kg或更少的剂量，例如，每周一次。在一个实施例中，以约2.5mg/kg或更少的剂量给予以GalNAc共轭物形式的iRNA，例如，每周一次。在一个实施例中，以GalNAc共轭物形式的iRNA的给予是皮下的。

[0195] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)是处于GalNAc共轭物的形式并且是，例如，皮下地，以0-5mg/kg(例如，0-2.5mg/kg或1-2.5mg/kg)的剂量给予。在实施例中，每周给予该iRNA。在实施例中，该iRNA作为包括iRNA和注射用水的组合物给予。在实施例中，该iRNA是AD-60519。在实施例中，该组合物包括约200mg/mL浓度的iRNA，例如，AD-60519。

[0196] 在实施例中，该方法降低受试者中卟啉或卟啉前体的水平。

[0197] 在实施例中，该水平被降低至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、或90％。在一个实施例中，该水平被降低至少30％。

[0198] 在实施例中，卟啉前体是δ-氨基乙酰丙酸(ALA)或胆色素原(PBG)。

[0199] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)具有在0.01-1nM范围内的IC_{50}。

[0200] 在实施例中，当将受试者暴露于诱发因素(例如，经前期或黄体期)时，在此描述的方法

[0201] (i)改善与ALAS1相关的失调(例如，卟啉症)相关联的症状

[0202] (ii)抑制ALAS1在受试者中表达(例如，如使用cERD测定来评估的)，

[0203] (iii)降低受试者中卟啉前体(例如，ALA或PBG)或卟啉的水平，

[0204] (iv)减少受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的频率，或

[0205] (v)减少受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的发病率。

[0206] 在实施例中，该方法改善疼痛和/或渐进性神经病变。

[0207] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是根据剂量方案给予的。

[0208] 在一些实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是在卟啉症的急性发作之前或过程中给予的。在一些实施例中，iRNA是在卟啉症的急性发作之前给予的。

[0209] 在一些实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是在前驱症状过程中给予的。在实施例中，前驱症状的特征在于腹痛、恶心、心理症状(例如，焦虑)、坐立不安和/或失眠。

[0210] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是在月经周期的一个具体时期过程中，例如，在黄体期过程中给予的。

[0211] 在实施例中，例如，通过降低严重性、持续时间、或发作频率，该方法改善或预防卟啉症的循环发作。在实施例中，循环发作与诱发因素相关联。在实施例中，诱发因素是月经周期，例如，月经周期的一个具体时期，例如，黄体期。

[0212] 在实施例中，受试者具有升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中，ALA和/或PBG的水平在来自该受试者的血浆或尿中是升高的。在实施例中，受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中，例如，肝性卟啉症。在实施例中，受试者是无症状的。在实施例中，如在此所述的，受试者携带有与卟啉症相关联的遗传变异(例如，基因突变)。在实施例中，受试者具有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中并且经受疼痛(例如，慢性疼痛，例如，慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如，渐进性神经病变)。在实施例中，受试者不经受急性发作但是经

受疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。

[0213] 在实施例中,受试者(a)具有升高的ALA和/或PBG的水平并且(b)经受疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。

[0214] 在实施例中,受试者具有ALA和/或PBG的升高的血浆水平和/或尿水平。在实施例中,升高的ALA和/或PBG的水平伴随有其他症状,例如,疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。在实施例中,受试者是无症状的。在实施例中,受试者具有与卟啉症相关联的基因突变,例如,如在此描述的突变。

[0215] 在实施例中,受试者具有升高的卟啉前体,例如,ALA和/或PBG水平(例如,血浆水平或尿水平),例如,该水平是大于、或大于或等于参比值。在实施例中,该水平是大于参比值。在实施例中,参比值是超过健康个体样本中平均水平两个标准差。在实施例中,参比值是参比上限。

[0216] 在实施例中,受试者具有ALA和/或PBG的大于、或大于或等于参比上限2倍、3倍、4倍、或5倍的血浆水平和/或尿水平。如在此使用的,"参比上限"是指参比样本的95%置信区间上限的一个水平,该样本是,例如,正常(例如,野生型)或健康个体,例如,不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体和/或不经受卟啉症的个体的样本。在实施例中,受试者具有大于参比上限2至4倍的ALA和/或PBG的尿水平。在实施例中,受试者具有大于参比上限4倍的ALA和/或PBG的尿水平。

[0217] 在实施例中,血浆PBG的参比值是0.12μmol/L。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或0.60μmol/L的血浆PBG水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的PBG的血浆水平。

[0218] 在实施例中,尿PBG的参比值是1.2mmol/mol肌酸酐。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于1.2mmol/mol肌酸酐、2.4mmol/mol肌酸酐、3.6mmol/mol肌酸酐、4.8mmol/mol肌酸酐、或6.0mmol/mol肌酸酐的尿PBG水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于4.8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。

[0219] 在实施例中,血浆ALA的参比值是0.12μmol/L。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或0.60μmol/L的血浆ALA水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的血浆ALA水平。

[0220] 在实施例中,尿ALA的参比值是3.1mmol/mol肌酸酐。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于3.1mmol/mol肌酸酐、6.2mmol/mol肌酸酐、9.3mmol/mol肌酸酐、12.4mmol/mol肌酸酐、或15.5mmol/mol肌酸酐的尿ALA水平。

[0221] 在实施例中,该方法减少了卟啉症的一种或多种体征或症状。在实施例中,该方法降低升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中,该方法减少疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。在实施例中,疼痛是神经性疼痛(例如,与急性卟啉症的渐进性神经病变相关联的疼痛)。减少疼痛可

以包括，例如，预防疼痛、疼痛发作延迟、疼痛频率下降、和/或疼痛严重性下降。在实施例中，基于患者使用的止痛药来评估疼痛的减少。

[0222] 在实施例中，例如，通过降低严重性、持续时间、或发作频率，该方法改善或预防卟啉症的急性发作。

[0223] 在实施例中，该方法减少或预防神经损伤。

[0224] 在实施例中，该方法预防恶化(例如，预防畸形发展)或导致临床测量值，例如，肌肉和/或神经功能临床测量值，例如，EMG和/或神经传导速度的改善。

[0225] 在实施例中，该方法减少了受试者的血红素使用。

[0226] 在实施例中，该方法减少了受试者的止痛药使用。

[0227] 在实施例中，该方法减少住院。

[0228] 在实施例中，该方法对于降低ALA和/或PBG的水平(例如，ALA和/或PBG的血浆或尿水平)是有效的。在实施例中，该方法对于产生升高的ALA和/或PBG水平的预定下降是有效的。

[0229] 在实施例中，该预定下降是降低至小于或等于参比值的一个值。在一些实施例中，参比值是参比上限。在一些实施例中，参比值是超过参比样本中平均水平两个标准差的一个值。

[0230] 在实施例中，该方法有效降低了受试者的ALA和/或PBG水平，至低于参考上限的二分之一的水平。在实施例中，该方法有效降低了ALA水平，至低于参考上限的二分之一的水平。在实施例中，该方法有效降低了PBG水平，至低于参考上限的二分之一的水平。

[0231] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是作为单剂量或以多剂量给予，例如，根据剂量方案。

[0232] 在实施例中，将iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物预防性给予受试者，该受试者处于发展卟啉症的风险中。在实施例中，从青春期开始预防性地给予iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物。在实施例中，受试者携带有与卟啉症相关联的基因突变和/或具有升高的ALA和/或PBG的水平(例如，ALA和/或PBG的升高的血浆或尿水平)。在实施例中，突变使得个体易于急性发作(例如，一旦暴露于诱发因素，例如，药物、饮食或其他诱发因素，例如，如在此披露的诱发因素)。在实施例中，突变是与卟啉或卟啉前体(例如，ALA和/或PBG)的升高的水平相关联的。在实施例中，突变是与慢性疼痛(例如，慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如，渐进性神经病变)相关联的。

[0233] 在实施例中，突变是ALAS1基因的突变。在实施例中，突变是ALAS1基因启动子的突变，或是ALAS1基因上游或下游区域中的突变。在实施例中，突变是转录因子或与ALAS1相互作用的其他基因的突变。在实施例中，突变是编码血红素生物合成途径中的酶的基因的突变。

[0234] 在实施例中，该iRNA(例如，dsRNA或其共轭物)或包括iRNA的组合物是皮下给予的。在实施例中，iRNA是处于GalNAc共轭物的形式。在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)以0.5-50mg/kg的剂量给予。在某些实施例中，每周一次以少于10mg/kg(例如，5mg/kg或更少)的剂量给予iRNA；例如，1mg/kg或更少、2.5mg/kg或更少、或5mg/kg或更少的剂量，例如，每周一次。在一个实施例中，以约2.5mg/kg或更少的剂量给予iRNA，例如，每周一次。

[0235] 在实施例中，待治疗的受试者是无症状的并且具有升高的ALA和/或PBG的水平。在

实施例中，该患者患有卟啉症，例如，AIP。在实施例中，该患者经历了反复卟啉症发作。

[0236] 在实施例中，以少于5mg/kg的剂量(例如，以0.1、0.35、1.0、或2.5mg/kg)给予该iRNA(例如，AD-60519)。在实施例中，以重复剂量给予该iRNA(例如，AD-60519)，例如，周剂量。

[0237] 在一个实施例中，该受试者是无症状的并且具有升高水平的ALA和/或PBG，并且以单剂量(例如，以0.1、0.35、1.0、或2.5mg/kg)；或以反复周剂量，例如，1和2.5mg/kg持续若干周(例如，持续4周)，给予该iRNA(例如，AD-60519)。

[0238] 在一个实施例中，该受试者患有AIP，例如，是一名AIP患者，以每周1-2.5mg/kg的剂量给予iRNA(例如，AD-60519)。

[0239] 在实施例中，使用治疗方案，其中该iRNA最初以较高频率给予，随后较低频率给予。在实施例中，该iRNA初始每天一次给予，持续数天(例如，持续2-14天，例如，持续2、3、4、5、6、或7天)。在实施例中，后续每周一次给予iRNA。在实施例中，后续每两周一次给予iRNA。在实施例中，随后以一定频率给予iRNA，该频率有效减少卟啉症的一种或多种体征或症状。

[0240] 在一个方面中，在此提供地是对具有升高的ALA和/或PBG水平的受试者进行治疗的方法，该方法包括向该受试者给予双链核糖核酸(dsRNA)，其中所述dsRNA包括一个有义链和一个长度是15-30个碱基对的反义链，并且该反义链与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0241] 在一个方面中，在此提供地是对具有升高的ALA和/或PBG水平的受试者进行治疗的方法，该方法包括向该受试者给予一个治疗有效量的、如在此所述的dsRNA或包含dsRNA的组合物。

[0242] 在一些实施例中，在此描述的方法对于降低ALA和/或PBG的水平是有效的。在一些实施例中，降低ALA和/或PBG的水平以使得它是小于、或小于或等于参比值，例如，参比上限。

[0243] 在实施例中，待治疗的受试者是无症状的并且具有升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中，该患者患有卟啉症，例如，AIP。

[0244] 在实施例中，以少于5mg/kg(例如，以0.1、0.35 1.0、或2.5mg/kg)的量给予iRNA。在实施例中，以重复剂量给予该iRNA，例如，周剂量。

[0245] 在另一个方面中，本发明提供了用于降低细胞(例如，红细胞或肝脏细胞，例如像肝实质细胞)中卟啉或卟啉前体水平的方法。在一个实施例中，离体、体外、或体内地治疗细胞(例如，存在于受试者(例如，需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的患者)中的细胞)。该方法包括使该细胞与有效量的一个或多个靶向ALAS1的iRNA相接触，例如，在此披露的一个或多个iRNA，由此相对于接触之前的水平，降低该细胞中卟啉或卟啉前体的水平；或降低该细胞位于其中的受试者体内的其他细胞、组织或流体中卟啉或卟啉前体的水平。可以使用此类方法来治疗与ALAS1表达相关的失调，例如卟啉症，例如，AIP或ALA脱水酶缺乏性卟啉症(例如，改善其严重性)。

[0246] 在一个实施例中，离体、体外、或体内地实现接触步骤。例如，该细胞可以存在于受试者中，例如，该受试者是哺乳动物(例如，人类)，处于患有卟啉症的风险中或已经被诊断为患有卟啉症。在一个实施例中，卟啉症是急性肝性卟啉症。在实施例中，该卟啉症是肝性卟啉症，例如，是选自以下各项的卟啉症：急性间歇性卟啉症(AIP)、遗传性粪卟啉症(HCP)、

杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症。

[0247] 在一个方面中,在此提供的是一种用于降低细胞中卟啉或卟啉前体(例如,ALA或PBG)的水平的方法,该方法包括以一个有效降低该细胞中卟啉或卟啉前体的水平的量将该细胞与iRNA(例如,dsRNA)相接触。

[0248] 在实施例中,细胞是肝实质细胞。在实施例中,卟啉或卟啉前体是δ-氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆色烷(HMB)、尿卟啉原I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、或原卟啉IX。在实施例中,卟啉前体是ALA或PBG。

[0249] 在一个实施例中,细胞是红细胞。在又一个实施例中,细胞是肝脏细胞(例如,肝实质细胞)。

[0250] 在一个方面中,在此提供的是一种载体,该载体编码如在此描述的iRNA(例如,dsRNA)的至少一条链。

[0251] 在一个方面中,在此提供的是一种编码dsRNA的至少一条链的载体,其中所述dsRNA包含与编码ALAS1的mRNA的至少一部分互补的一个区域,其中所述dsRNA长度是30个或更少碱基对,并且其中所述dsRNA靶向所述mRNA以便切割。

[0252] 在实施例中,该互补区域长度是至少15个核苷酸。

[0253] 在实施例中,该互补区域长度是19至21个核苷酸。在一个方面,本发明提供一种用于抑制细胞中ALAS1基因表达的载体。在一个实施例中,载体包括如在此所述的iRNA。在一个实施例中,该载体包含与核苷酸序列可操作连接的至少一种调节序列,其中所述核苷酸序列编码如本文所述的iRNA的至少一条链。在一个实施例中,载体包括ALAS1 iRNA的至少一条链。

[0254] 在一个方面中,在此提供的是一种细胞,该细胞包括如在此所述的载体。在一个方面中,在此提供的是一种细胞,该细胞包括用于抑制细胞中ALAS1基因表达的载体。该载体包括与核苷酸序列可操作连接的调节序列,其中所述核苷酸序列编码如本文所述的iRNA之一的至少一条链。在一个实施例中,细胞是肝脏细胞(例如,肝实质细胞)。在另一个实施例中,细胞是红细胞。

[0255] 在另一方面,提供一种方法,用于测定受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平,所述方法包括检测(例如,测量)生物流体样品(例如,来自患者的血液样品(例如,血清或血浆样品)、脑脊髓液样品、或尿)中ALAS1 mRNA的水平,所述生物流体样品包括ALAS1 mRNA,从而测定受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平。

[0256] 在另一方面,提供了一种方法用于测定受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平,所述方法包括(i)从来自受试者的生物流体样品提供RNA(例如,细胞外RNA),所述生物流体样品包括ALAS1 mRNA;(ii)从ALAS1 mRNA获得ALAS1 cDNA;(iii)将ALAS1 cDNA和与ALAS1 cDNA或其部分互补的核酸(例如,探针和/或引物)接触,从而产生反应混合物;并且(iv)检测(例如,测量)反应混合物中ALAS1 cDNA的水平,其中该ALAS1 cDNA水平指示ALAS1 mRNA水平,从而测定受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA水平。

[0257] 在实施例中,所述生物流体样品是血液样品。在实施例中,所述生物流体样品是血清样品。在实施例中,所述生物流体样品是尿液样品。

[0258] 在实施例中,该方法包括PCR、qPCR或5’-RACE。

[0259] 在实施例中,所述核酸是探针或引物。

[0260] 在实施例中,所述核酸包括可检测部分,并且通过检测可检测部分的量来确定ALAS1 mRNA的水平。

[0261] 在实施例中,所述方法进一步包括从受试者获得生物流体样品。在实施例中,该生物流体样品分离自组织并且包含外排体。在该方法的实施例中,基于相对于参考值的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平的比较,来评估卟啉症治疗的效力。

[0262] 在实施例中,相对于参考值,响应于卟啉症治疗的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平的降低,指示了卟啉症治疗是有效的。在实施例中,参考值是在卟啉症治疗之前的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平。

[0263] 在此提交的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文结合。

[0264] 在下文描述中叙述本发明的不同实施方案的详细内容。本发明的其他特征、目的以及优点将通过以下说明、附图以及权利要求书而清楚。

附图说明

[0265] 图1描绘了血红素生物合成途径。

[0266] 图2A和图2B示出一个表,该表总结了与血红素新陈代谢中遗传错误相关联的某些卟啉症。

[0267] 图3A和图3B描绘了人类ALAS1 mRNA序列转录物(参比序列NM_000688.4(GI:40316942,记录日期2011年11月19日),SEQ ID NO:1)。

[0268] 图4A和图4B描绘了人类ALAS1 mRNA序列转录物(参比序列NM_000688.5(GI:362999011,记录日期2012年4月1日),SEQ ID NO:382)。

[0269] 图5显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558在压制小鼠ALAS1(mALAS1)mRNA中的剂量响应。还显示了针对萤虫素酶(LUC)AD-1955对照的结果。

[0270] 图6显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558在压制大鼠ALAS1 mRNA中的剂量响应。还显示了针对萤虫素酶(LUC)AD-1955对照的结果。

[0271] 图7显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558对小鼠ALAS1(mALAS1)mRNA的压制的持久性。

[0272] 图8显示基线处的、以及苯巴比妥处理后实验组(ALAS1 siRNA)和对照组(LUC siRNA)中血浆ALA水平(以μM计)的平均值±标准差。

[0273] 图9示出接受ALAS1 siRNA和对照(LUC siRNA)治疗的动物中在基线处的以及苯巴比妥治疗后的个体动物的血浆ALA水平(以μM计)。

[0274] 图10显示在接受ALAS1 siRNA和对照(LUC siRNA)处理的动物中的在基线处的、以及苯巴比妥处理后的血浆PBG水平(以μM计)的平均值±标准差。

[0275] 图11示出接受ALAS1siRNA和对照(LUC siRNA)治疗的动物中的在基线处的以及苯巴比妥治疗后的个体动物的血浆PBG水平(以μM计)。

[0276] 图12显示在基线处,以及苯巴比妥处理后在挑选出的代表性实验(ALAS1 siRNA)和对照(PBS)动物中的肝脏中的相对mALAS1mRNA水平。

[0277] 图13显示在小鼠肝脏组织中,三种GalNAc共轭的mALAS1 siRNA对mALAS1表达(相

对于PBS对照)的影响。

[0278] 图14显示苯巴比妥给予以及用ALAS1 siRNA或对照LUC siRNA处理之后,随时间推移的血浆ALA和PBG水平。

[0279] 图15显示小鼠AIP苯巴比妥诱导模型中GalNAc共轭的ALAS1 siRNA对血浆ALA和血浆PBG水平的影响。

[0280] 图16显示小鼠AIP苯巴比妥诱导模型中ALAS1 siRNA对血浆ALA和PBG水平的剂量依赖性影响。针对接受ALAS1 siRNA的动物,将所给予的siRNA的剂量(0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、或1.0mg/kg)示于水平轴上。

[0281] 图17顶部图示出用来研究用ALAS1 siRNA抑制ALA和PBG的实验设计。底部图示出处于基线的、处于对照(Luc)条件的、以及在第0周、第2周、第4周用ALAS1 siRNA治疗后的血浆ALA和PBG水平。

[0282] 图18示出用来比较在AIP动物模型(顶部)中用ALAS1 siRNA或氯化血红素治疗的效果的实验设计,以及血浆ALA(μmol/L)水平(中部)和血浆PBG(μmol/L)水平(底部)的结果。

[0283] 图19示出,与用PBS对照治疗的动物相比,在用30mg/kg、10mg/kg、或3mg/kg的AD-58632治疗的动物中的相对mRNA水平(ALAS1/GAPDH)。

[0284] 图20示出,在大鼠AIP模型中用来研究AD-58632 ALAS1 GalNAc共轭物的剂量应答效果的实验设计。

[0285] 图21示出,在AIP大鼠模型中,肝PBGD mRNA的相对水平(顶部图)和肝ALAS1 mRNA的相对水平(底部图)。动物组将经受如下四种治疗之一:(1)仅有苯巴比妥(PB)治疗,(2)苯巴比妥和胆色素原脱氨酶(PBGD)siRNA治疗,(3)苯巴比妥、PBGD siRNA、以及30mg/kg的ALAS1 siRNA,(4)苯巴比妥、PBGD siRNA、以及10mg/kg的ALAS1 siRNA。

[0286] 图22示出在AIP大鼠模型中相对于肌酸酐水平的尿的PBG(顶部图)和ALA(底部图)水平。动物组将经受如下四种治疗之一:(1)仅有苯巴比妥(PB)治疗,(2)苯巴比妥和胆色素原脱氨酶(PBGD)siRNA治疗,(3)苯巴比妥、PBGD siRNA、以及30mg/kg的ALAS1 siRNA,(4)苯巴比妥、PBGD siRNA、以及10mg/kg的ALAS1 siRNA。

[0287] 图23示出,在数组大鼠(这些大鼠以6mg/kg、2mg/kg、或1mg/kg接受了五个日剂量的siRNA,与以30mg/kg、10mg/kg、或5mg/kg接受了单一推注剂量的siRNA)中,与PBS对照相比,由AD-58632造成的ALAS-1 mRNA的抑制。

[0288] 图24示出,在数组大鼠(这些大鼠以10mg/kg、5mg/kg、或2.5mg/kg接受了四次周剂量的siRNA)中,与PBS对照相比,由AD-58632造成的ALAS-1 mRNA的抑制。

[0289] 图25示出,由AD-58632造成的以及由五种19/19mer双链体造成的ALAS-1 mRNA的抑制。

[0290] 图26示出评估链长和突出端对最佳的两个19mer的作用的结果。

[0291] 图27是示出针对实例34中所描述的NHP研究中的各治疗组的肝(左条)中和血清(右条)中ALAS1 mRNA的水平的图。

[0292] 图28示出,在数组大鼠(这些大鼠接受了3mg/kg或10mg/kg的AD-58632或AD-60489)中,与PBS对照相比,ALAS-1 mRNA的抑制。

[0293] 图29示出,在非人类灵长动物中,用于研究ALAS1siRNA AD-58632和AD-60489在抑

制肝mRNA方面的效力的实验设计。

[0294] 图30示出，在用1.25mg/kg、2.5mg/kg、或5mg/kg的AD-58632或AD-60489的治疗后，在非人类灵长动物中肝mRNA的剂量依赖性抑制。

[0295] 图31示出，在非人类灵长动物研究中，从肝活检和从cERD测定获得的mRNA抑制结果的比较。

[0296] 图32示出，如在非人类灵长动物研究中使用cERD测定所评估的mRNA的抑制的时程。水平轴示出根据研究天数的时间。

[0297] 图33示出，在接受了PBS或单剂量的5mg/kg所指示的siRNA双链体之一的大鼠中，ALAS1mRNA的抑制。

[0298] 图34示出，在接受了单剂量的5mg/kg所指示的siRNA的大鼠中，siRNA的肝浓度。

[0299] 图35(顶部)示出，用于研究AD-60925和AD-60926的治疗效果的实验设计。图35(底部)示出，在用以下各项治疗的大鼠中，大鼠ALAS1/GAPDH mRNA的相对水平：(1)AF11-PBGD，(2)AF11-PBGD和PB，(3)AF-11PBGD、PB、和3mg/kg AD-60925，或(4)AF11-PBGD、PB、和AD-60926。

[0300] 图36示出，在用以下各项治疗的大鼠中，尿PBG(顶部)和尿ALA(底部)的相对水平：(1)AF11-PBGD，(2)AF11-PBGD和PB，(3)AF-11PBGD、PB、和3mg/kg AD-60925，或(4)AF11-PBGD、PB、和AD-60926。

[0301] 图37示出，在用以下各项治疗的大鼠中，随着时间尿PBG(顶部)和尿ALA(底部)的相对水平：(1)AF11-PBGD，(2)AF11-PBGD和PB，(3)AF-11PBGD、PB、和3mg/kg AD-60925，或(4)AF11-PBGD、PB、和AD-60926。箭头指示给予PB的时间点。

[0302] 图38示出，在接受4次剂量的PBS或2.5mg/kg的所指示的siRNA之一的大鼠中，大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的相对水平。

[0303] 图39示出，在接受单剂量的PBS或2.5mg/kg的所指示的siRNA之一的大鼠中，大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的相对水平。

[0304] 图40(顶部)示出，在接受单剂量的PBS或3mg/kg的所指示的siRNA之一的大鼠中，大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的相对水平。图40(底部)示出，肝中siRNA的浓度。

[0305] 图41(顶部)示出，由AD-60489、AD-60519、和AD-60901造成的大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的抑制。图41(底部)示出，肝中siRNA的浓度。

[0306] 图42示出，在用单剂量的PBS或2.5mg/kg的所指示的siRNA之一治疗的大鼠中，大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的相对水平。

[0307] 图43示出，在每周两次用2.5mg/kg剂量的PBS或所指示的siRNA之一治疗2周的大鼠中，大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA的相对水平。

[0308] 图44(顶部)示出，用于研究多次每两周剂量的AD-60519的治疗效果的实验设计的示意图。图44(底部)示出图，描绘了在用以下各项治疗的大鼠中尿PBG和尿ALA的抑制：(i)PBGD siRNA和六次剂量的PBS，(ii)PBGD siRNA、PB、和六次剂量的PBS，(iii)PBGD siRNA、PB、和六次剂量的2.5mg/kg AD-60519，或(iv)PBGD siRNA、PB、和六次剂量的5mg/kg AD-60519。

[0309] 图45示出图，描绘了在用以下各项治疗的小鼠AIP模型中血清PBG(上图)和血清ALA(下图)的抑制：(i)PBGD siRNA和六次剂量的PBS(基线)，(ii)PBGD siRNA、PB、和六次剂

量的PBS(盐水),(iii)PBGD siRNA、PB、和六次剂量的2.5mg/kg AD-60519,或(iv)PBGD siRNA、PB、和六次剂量的5mg/kg AD-60519。

[0310] 图46(顶部)示出,用于研究多次每周剂量的AD-60519的治疗效果的实验设计的示意图。图46(底部)示出图,描绘了在用以下各项治疗的大鼠中大鼠ALAS1 mRNA(rALAS1/GAPDH)的相对水平:(i)PBGD siRNA和四次剂量的PBS,(ii)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的PBS,(iii)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的3mg/kg AD-60519,(iv)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的1mg/kg AD-60519,或(v)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的0.3mg/kg AD-60519。

[0311] 图47示出图,描绘了在用以下各项治疗的大鼠中尿PBG(上图)和尿ALA(下图)的水平:(i)PBGD siRNA和四次剂量的PBS,(ii)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的PBS,(iii)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的3mg/kg AD-60519,(iv)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的1mg/kg AD-60519,或(v)PBGD siRNA、PB、和四次剂量的0.3mg/kg AD-60519。

[0312] 图48是示出非人类灵长动物研究的设计的示意图,其中研究ALAS1 siRNA GalNAc共轭物在抑制肝ALAS1 mRNA和循环性ALAS1 mRNA方面的效果。

[0313] 图49是图,示出在用ALAS1 siRNA GalNAc共轭物治疗后,在非人类灵长动物(NHP)中肝mRNA的抑制。

[0314] 图50是一张图,该图示出在研究(其中研究用ALAS1 siRNA GalNAc共轭物治疗的作用)的过程中,在不同的时间,在非人类灵长动物(NHP)中ALAS1 mRNA的归一化的血清水平。在水平轴上的天数对应于图48中示意图中的天数。

[0315] 图51示出归一化的ALAS1 mRNA水平(示为剂量给药前水平的分数),如在大鼠单剂量研究中所评估的,该研究使用尿cERD来监测ALAS1抑制。

[0316] 图52是示出非人类灵长动物研究的设计的示意图,其中研究AD-60519在抑制肝ALAS1 mRNA和循环性ALAS1 mRNA方面多剂量和单剂量的效果。

[0317] 图53是一个条形图,该条形图示出在研究的第24天(多剂量组)或在研究的第4天(单剂量组)的平均相对肝ALAS1 mRNA水平(PBS对照的%)。

[0318] 图54是一张图,该图示出归一化的血清ALAS1 mRNA水平(示为剂量给药前水平的分数),如使用cERD针对多剂量组(顶部图,示出直到第24天的结果)和单剂量组(底部图,示出直到第22天的结果)所评估的。

[0319] 图55是一张图,该图示出在研究的第4天(在单剂量组中)或在研究的第24天(在多剂量组中)的肝mRNA、血清mRNA、和尿mRNA水平。示出了单个动物的数据和各组的平均值。

[0320] 图56是一张图,该图示出8周后的归一化的血清ALAS1 mRNA水平(示为剂量给药前水平的分数),如使用cERD针对多剂量组所评估的。针对3只动物样品的组平均值±该组的标准偏差,各图形数据点代表了剩余的ALAS1 mRNA。

[0321] 图57是ALN-60519(在此又称为AD-60519)的结构的示意图。图57按照出现次序分别披露了SEQ ID NOS 5238-5239。

[0322] 图58示出ALAS1 mRNA水平,该水平使根据在匹配获得自AIP患者或正常健康志愿者(NHV)的血清或尿液样品中所评估的。使用cERD方法测量血清或尿中的ALAS1 mRNA水平。在AIP患者A和B中,收集血清和尿液样品的第二组,以评估随着时间ALAS1 mRNA的变化性。

[0323] 发明的详细说明

[0324] iRNA通过被称为RNA干扰(RNAi)的过程引导mRNA的序列特异性降解。本文中描述

了用于抑制细胞或哺乳动物中ALAS1基因表达的iRNA和使用它们的方法，在所述细胞或哺乳动物中iRNA靶向ALAS1基因。还提供了用于与ALAS1表达相关的失调的多种组合物和方法，像卟啉症(例如，ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP或Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、以及婴儿暂时性红细胞卟啉症)。

[0325] 卟啉症是遗传性或获得性失调，可能起因于血红素生物合成途径(在此还称作卟啉途径(参见图1))中特异性酶的降低的或增强的活性。卟啉是主要的血红素前体。卟啉和卟啉前体是δ-氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆色烷(HMB)、尿卟啉原I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、和原卟啉IX。血红素是血红蛋白、肌红蛋白、过氧化氢酶、过氧化物酶、以及细胞色素的基本部分，后者包括呼吸道和P450肝细胞色素。血红素是合成于大多数或全部人类细胞。大约85％的血红素在红细胞中制成，主要用于血红蛋白。剩余血红素中大部分在肝脏中制成，其中80％用于细胞色素合成。卟啉途径中特异性酶的缺乏导致血红素的不充分生产并且还导致卟啉前体和/或卟啉的累积，高浓度的卟啉前体和/或卟啉对细胞或器官是有毒的。

[0326] 卟啉症表现是神经系统并发症(“急性”)、皮肤问题(“皮肤性”)或两者。卟啉症可以依据卟啉或其前体超量产生和累积的主要部位进行分类。在肝性卟啉症中，卟啉和卟啉前体主要在肝脏中超量产生，而在红细胞生成性卟啉症中，卟啉在骨髓中的红细胞内超量产生。急性或肝性卟啉症导致神经系统和神经表现异常，可以影响中枢和周围神经系统两者，导致多种症状，例如，疼痛(例如，腹痛和/或慢性神经性疼痛)、呕吐、神经病变(例如，急性神经病变、渐进性神经病变)、肌无力、发作、精神紊乱(例如，幻觉、抑郁焦虑、妄想症)、心律失常、心动过速、便秘、以及腹泻。皮肤或红细胞生成性卟啉症主要影响皮肤，导致多种症状，例如光过敏，光过敏可以在多个区域，例如前额引起疼痛、疱瘿、坏死、瘙痒、肿胀、以及增加的毛发生长。皮肤损害的继发感染可能导致骨骼与组织损失，连同瘢痕、毁容、以及手指或足趾损失(例如，手指、足趾)。大多数卟啉症由编码血红素生物合成途径中的酶的突变导致。血红素新陈代谢中与遗传错误相关联的卟啉症概述于图2中。

[0327] 不是所有的卟啉症都是遗传性的。例如，患有肝脏疾病的患者可能发展卟啉症，这是由于肝脏异常的结果，并且暂时形式的红细胞卟啉症(婴儿暂时性红细胞卟啉症)已经被描述于婴儿中(参见克劳福德(Crawford,R.I.)等人，美国皮肤病学会杂志(J Am Acad Dermatol.)1995年8月;33(2Pt 2):333-6.)患有PCT的患者可能获得尿卟啉原脱羧酶的活性缺乏(URO-D)，这是由于具有低于正常酶活性的ORO-D酶的形成(参见菲利普斯(Phillips)等人，血液(Blood)，98:3179-3185,2001)。

[0328] 急性间歇性卟啉症(AIP)(还被称作胆色素原(PBG)脱氨酶缺乏，或羟甲基胆色烷合酶(HMBS)缺乏)，是急性肝性卟啉症的是最常见类型。急性肝性卟啉症的其他类型包括遗传性粪卟啉症(HCP)，杂斑卟啉症(VP)，以及ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)。急性肝性卟啉症描述于，例如，巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.)，血液(Blood)，120:4496-4504,2012中。

[0329] AIP典型地是一种常染色体显性疾病，特征在于酶:胆色素原脱氨酶(PBG脱氨酶)的缺乏;这种酶还称作羟甲基胆色烷合酶(HMB合酶或HMBS)。PBG脱氨酶是血红素生物合成

途径(参见图1)中的第三酶并且催化四个胆色素原分子头尾缩合成线性四吡咯,羟甲基胆色烷(HMB)。编码PBG脱氨酶不同同种型的可变剪接的转录本变体已经被描述。PBG脱氨酶基因的突变是与AIP相关联的。此类突变可能导致PBG脱氨酶的减少量和/或PBG脱氨酶的降低的活性(受累个体典型地具有约50%的PBG脱氨酶活性下降)。

[0330] 存在AIP以及其他急性肝性卟啉症病理生理学的至少两种不同模型(参见,例如,林(Lin CS-Y)等人,临床神经生理学(Clinical Neurophysiology),2011;122:2336-44)。根据一种模型,由PBG脱氨基酶缺陷引起的减少的血红素生产造成了能量衰竭和轴突变性。根据另一个当前更受欢迎的模型,卟啉前体(例如,ALA和PBG)的逐渐累积(buildup)导致神经毒性。

[0331] 已经发现AIP在某些群体中具有高达万分之一的患病率(例如,在瑞典北部;参见弗洛德拉斯(Floderus Y),等人临床遗传学(Clin Genet.)2002;62:288-97)。估计美国与欧洲(英国除外)总群体中的患病率是约万分之一至两万分之一。仅在大约10%-15%的携带有已知与AIP相关联的突变的个体中表现临床疾病本身。然而,在具有某些突变(例如,W198X突变)的个体中,外显率高达40%。在青春期之前,AIP典型地是潜伏的。症状在雌性中比在雄性中更加常见。由于其不完全外显以及长潜伏期,该疾病的患病率很可能被低估。在美国,估计有约2000个患者已经经受至少一次发作。在法国、瑞典和英国,估计有约150个活动性、复发性案例;这些患者主要是中位年龄30岁的年轻女性。参见,例如,埃尔德(Elder)等人,遗传代谢杂志(J Inherit Metab Dis.),在线发表,2012年11月1日。

[0332] AIP影响,例如,内脏神经系统、外周神经系统、自主神经系统、和中枢神经系统。AIP症状是可变的并且包括胃肠道症状(例如,严重和较轻的局部腹痛、恶心/呕吐、便秘、腹泻、肠梗阻),泌尿症状(排尿困难、尿潴留/失禁、或小便黄赤,例如,暗红色的尿液),神经性症状(例如,感觉神经病变、运动神经病变(例如,影响脑神经和/或导致上臂或下肢无力),发作,神经性疼痛(例如,与渐进性神经病变相关联的疼痛,例如,慢性神经性疼痛),神经精神症状(例如,精神错乱、焦虑、激动、幻觉、癔病、谵妄、冷漠、抑郁、恐怖症、精神病、失眠、嗜睡、昏迷),自主神经系统牵连(例如导致心血管症状,像心动过速、高血压、和/或心率失常,连同其他症状,例如,升高的循环的儿茶酚胺水平、显汗、坐立不安、和/或震颤),脱水,以及电解质异常。最常见的症状是腹痛和心动过速。神经表现包括运动神经和自主神经病变以及发作。患者更加频繁地具有慢性神经性疼痛并发展渐进性神经病变。具有复发性发作的患者通常具有前驱症状。发生严重发作之后可能导致永久性瘫痪。从未得到迅速治疗的严重发作的恢复可能花费数周或数月。急性发作可能是致命的,例如,归因于呼吸肌瘫痪或电解质失调导致的心血管衰竭。(参见,例如,桑奈尔(Thunell S.)羟甲基胆色烷合酶缺乏(Hydroxymethylbilane Synthase Deficiency),2005年9月27日[2011年9月1日更新].于:佩金(Pagon RA),波德(Bird TD),多兰(Dolan CR),等人,编著.GeneReviews™[网络版].西雅图(Seattle)(WA):华盛顿大学,西雅图(University of Washington,Seattle);1993-(在下文中,桑奈尔(1993)),通过引用以其整体结合在此)。在氯化血红素治疗可得之前,多达20%患有AIP的患者死于该疾病。

[0333] 在携带有AIP基因的个体中,肝细胞癌的风险增加。在具有复发性发作的那些人中,肝细胞癌的风险尤其重大:50岁之后,该风险大于总体群体接近100-倍。

[0334] 急性卟啉症的发作可由内源的或外源的因素促成。此类因素诱导发作的机制可能

包括，例如，对肝P450酶的增加的需求和/或肝脏中ALAS1活性的诱导。对肝P450酶的增加的需求导致下降的肝游离血红素，由此诱导肝ALAS1合成。

[0335] 诱发因素包括禁食(或其他形式的减少的或不充分的热量摄入，归因于速成节食、远距离运动等)、代谢应力(例如，感染、手术、国际航空旅行以及心理应激)、内源激素(例如，黄体酮)、吸烟、脂溶性异质化学品(包括，例如，存在于烟草烟雾中的化学品、某些处方药、有机溶剂、杀生物剂、酒精饮料中的组分)、内分泌物因素(例如，生殖激素(女性在经期前可能经历恶化)、合成雌激素类、黄体酮、促排卵药物、以及激素替代疗法)。参见，例如，桑奈尔(Thunell)(1993)。

[0336] 超过1000种药物是急性肝性卟啉症(例如，AIP、HCP、ADP、以及VP)中禁忌的，包括，例如，酒精、巴比妥类、卡马西平、卡立普多、氯硝西泮(高剂量)、达那唑、双氯芬酸和可能的其他NSAID、麦角(Ergot)、雌激素、乙氯戊烯炔醇、格鲁米特、灰黄霉素、美芬妥英、甲丙氨酯(也称作美布氨酯和tybutamate)、甲乙哌酮、甲氧氯普胺(Metodopramide)、苯妥英、扑米酮、黄体酮和合成黄体酮、吡嗪酰胺、吡唑啉酮(氨基比林和安替比林)、利福平、琥珀酰亚胺(乙琥胺和甲琥胺(methsuximide))、磺胺类抗生素、和丙戊酸。

[0337] AIP的体征包括急性发作期间的尿变色(尿可能显现为红色或棕红色)，以及急性发作期间尿中增加的PBG和ALA浓度。分子基因检测确认PBG脱氨酶(还称作HMBS)基因突变发生于超过98%的受累个体中。桑奈尔(Thunell)(1993)。

[0338] 卟啉症的诊断可以涉及家族史的评估，尿、血液、或排泄物中卟啉前体水平的评估，和/或酶活性和DNA突变分析的评估。卟啉症的鉴别诊断可能包括通过测量发作期间尿、粪便、和/或血浆中卟啉或卟啉前体(例如，ALA、PBG)的个体水平(例如，通过层析法以及荧光测定)来确定卟啉症的类型。通过确立红细胞PBG脱氨酶活性是正常水平的50%或更低，可以确认AIP的诊断。可以在患者中或在处于危险中的家族成员中进行突变的DNA检测。AIP的诊断典型地通过DNA检测鉴别特异性致病性基因突变(例如，HMBS突变)来确认。

[0339] AIP的急性发作的日常管理涉及住院治疗，监测症状，以及去除不安全药物。急性发作的治疗典型地需要住院治疗以控制并治疗急性症状，包括，例如，腹痛、发作、、脱水/低钠血症、恶心/呕吐、心动过速/高血压、尿潴留/梗阻。例如，像可以使用麻醉性镇痛药治疗腹痛，可以使用发作预防措施以及可能的药物(尽管许多抗-发作药物是禁忌的)治疗发作，例如可以使用酚噻嗪治疗恶心/呕吐，并且例如可以使用β-阻断剂治疗心动过速/高血压。治疗可以包括不安全药物的取消、呼吸功能连同肌肉强度和神经状态监控。轻度发作(例如，无轻瘫或低钠血症的那些)可以用每天至少300g静脉内10%葡萄糖进行治疗，尽管渐增地氯化血红素是立即提供的。重度发作典型地尽快使用静脉内氯化血红素(每天3-4mg/kg，持续4-14天)，并且在等待氯化血红素起效的同时使用IV葡萄糖进行治疗。典型地，使用IV氯化血红素持续4天并且在等待给予IV氯化血红素的同时使用IV葡萄糖来对发作进行治疗。在开始氯化血红素给予后的3-4天内，通常存在伴随着ALA和PBG水平降低的临床改进。

[0340] 氯化血红素(Panhematin®或注射用氯化血红素，先前称作羟高铁血红素)是美国批准使用的唯一的血红素产品并且是孤儿药法案(Orphan Drug Act)下第一个批准的药物。Panhematin®是衍生自经处理的红细胞(PRBC)的氯化血红素，并且是具有氯化物配体的、含三价铁离子(血红素B)的原卟啉IX。血红素发挥作用以限制卟啉的肝和/或骨髓合成。在患有肝性卟啉症急性发作的患者中，氯化血红素产品症状改善的确切的机制尚未被阐

明;然而,其作用可能归因于δ-氨基乙酰丙酸(ALA)合酶的(反馈)抑制,该酶限制卟啉/血红素生物合成途径的速率。参见Panhematin®产品标签,灵北公司(Lundbeck,Inc.),2010年10月。ALA合酶的抑制将导致降低的ALA和PBG,连同卟啉和卟啉中间体的产生。

[0341] 血红素产物(例如,氯化血红素)的缺点包括对临床症状的延迟的影响及不能预防发作复发。与血红素(例如,氯化血红素)给予相关联的不良反应可能包括静脉炎(例如,血栓性静脉炎)、静脉通路困难、抗凝(或凝血紊乱)、血小板减少、肾脏机能停止、或铁超负荷,这在需要多疗程氯化血红素治疗复发性发作的患者体内是尤其可能发生的。为了预防静脉炎,在患有复发性发作的患者体内需要留置静脉导管。用高剂量可能发生肾损伤。不常报道的副作用包括发热、疼痛、不适、溶血、全身型过敏性反应、以及循环衰竭。参见,安德森(Anderson,K.E),人类卟啉症治疗与预防法(Approaches to Treatment and Prevention of Human Porphyrias),于卟啉症手册:卟啉症的医学方面(The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyrins)中,卡尔M.凯蒂丝(Karl M.Kadish),凯文M.史密斯(Kevin M.Smith),罗杰古拉德(Roger Guilard)(2003)(在下文中,安德森(Anderson))。

[0342] 难以制备用于静脉给药的稳定态的血红素。它在中性pH下是不溶解的但是可将其在pH 8或更高下制备为血红素氢氧化物。安德森(Anderson)。Panhematin是一种冻干型氯化血红素制剂。当冻干型氯化血红素是针对静脉给药的增溶剂时,降解产物迅速形成;这些降解产物造成瞬时抗凝效应并且在输注部位造成静脉炎。安德森(Anderson)。血红素白蛋白和精氨酸血红素(Normosang,欧洲版氯化血红素)是更稳定的并且可潜在地引起较少的血栓性静脉炎。然而,精氨酸血红素在美国是不被批准使用的。通过将其溶解在30%人血白蛋白而不是在无菌水中用于输注,Panhemin可能是稳定的;然而,白蛋白增加血管内的容积膨胀效应并且增加治疗花费连同病原体风险,因为它分离自人类血液。参见,例如,安德森(Anderson),同上。

[0343] 急性发作的成功治疗未预防或延迟复发。由于血红素加氧酶的诱导,氯化血红素本身是否可以触发复发性发作是一个问题。尽管如此,在一些地区(尤其是法国),具有多次复发性发作的年轻女性正在每周使用氯化血红素的治疗,其目的是实现预防。使用肝移植进行的有限经验表明如果成功,它是针对AIP的一种有效治疗。在欧洲,在人类患者中已有将近12个移植病例是治愈的或具有不同效果。肝移植可恢复ALA和PBG的正常排泄并预防急性发作。参见,例如,达(Dar,F.S.)等人国际肝胆胰疾病杂志(Hepatobiliary Pancreat.Dis.Int.),9(1):93-96(2010)。此外,如果患有AIP患者的肝脏被移植到另一个患者中("多米诺移植(domino transplant)"),接受该移植的患者可能发展AIP。在急性卟啉症的长期临床效应中,神经性疼痛可能是由归因于神经毒性的渐进性神经病变导致的,例如,升高的卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)。该神经毒性效应可能与有毒的血红素中间体产生有关,例如,改变的GABA信号转导和/或铁介导的氧化和活性氧簇(ROS)的产生。在急性发作之前或过程中,患者可能经受神经性疼痛。年长的患者随年龄增长可能经历增加的神经性疼痛,对于他们而言,不同的麻醉性镇痛药典型地是失效的。已经在患有急性肝性卟啉症的患者中记录了肌电图异常以及降低的传导次数。值得注意地是,未经处理的、未诱导的AIP小鼠(PBG脱氨酶缺乏)发展了进行性运动神经病变,假定归因于组成性升高的卟啉前体(ALA&PBG)水平卟啉和/或血红素缺乏,该进行性运动神经病变已经显示引起进行性股四头肌神经轴突退化及丧失(林德贝格(Lindberg)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.),103

(8):1127-1134,1999)。在患有急性卟啉症(例如,ADP、AIP、HCP、或VP)的患者中,在两次发作之间,卟啉前体(ALA&PBG)水平在无症状患者以及在有症状患者中通常升高。因此,预期通过降低ALAS1表达水平和/或活性来减少卟啉前体以及恢复正常血红素生物合成,从而预防和/或最小化慢性和渐进性神经病变的发展。治疗,例如,慢性治疗(例如,使用如在此所述的iRNA的周期性治疗,例如,根据如在此所述的剂量方案的治疗,例如,每周或每两周一次的治疗)可持续降低急性卟啉症患者中的ALAS1表达,这些患者具有升高的卟啉前体、卟啉、卟啉产物或其代谢物水平。如果需要的话,可以提供此类治疗来预防或降低个体患者症状(例如,疼痛和/或神经病变)的频率或严重性和/或降低卟啉前体、卟啉、卟啉产物或代谢物水平。

[0344] 存在对鉴别可用于治疗卟啉症的新颖疗法的需求。如上所讨论的,现有治疗如血红素产品(例如,氯化血红素)具有大量缺点。例如,氯化血红素对临床症状的影响是延迟的,它是昂贵的,并且它可能具有副作用(例如,血栓性静脉炎、抗凝、血小板减少、铁超负荷、肾脏机能停止)。如在此所述的新颖的疗法可以解决这些缺点以及患者的未被满足的需求,作用更快,不诱导静脉炎,提供皮下施用的便利,成功预防复发性发作,预防或改善疼痛(例如,慢性神经性疼痛)和/或渐进性神经病变,和/或不产生与氯化血红素相关联的某些不良作用(例如,铁超负荷、增加的肝细胞癌的风险)。

[0345] 患有AIA的患者包括经历过反复发作的那些以及经历过急性、零星发作的那些。在遭受过反复发作的患者中,约5%-10%有间歇性反复发作(每年2-3次)或反复发作(每年>4次)。这些患者最可能考虑肝移植或接受预防性血红素(例如,氯化血红素)输注。由于长住院时间、阿片成瘾、和/或静脉网毒性,这些反复发作患者可能具有糟糕的生活质量。慢性血红素给予可以诱导血红素加氧酶(HO-1)。因此,它可能很难使患者脱离血红素,并且一些需要更频繁的治疗。因此,一些临床医生将血红素制约地用于最严重的发作。因此,针对具有更好耐受性的方便、有效预防和治疗存在未满足的需要。

[0346] 针对遭受急性发作的患者,临床指南建议尽早给予血红素。然而,在诊断挑战和缺乏立即药物可及性的情况下,可能延迟给予。血红素(例如,氯化血红素)的作用起效慢以及其耐受性差减缓了改进的时间。持续严重腹部疼痛,即使在给予血红素后,可能需要患者接受阿片持续多天。

[0347] 血红素的延迟给予或连续暴露于诱发因素可能导致更严重的并发症,这些并发症包括运动神经病变以及伴随的症状(例如,无力、轻瘫)。呼吸衰竭和瘫痪可能在重病患者中发生。从神经系统症状中恢复可能需要更长的时间来解决。因此,在急性发作的情况下,需要具有更快速作用起效以及良好耐受性的治疗。

[0348] 作为mRNA沉默的靶标的ALAS1的药理学验证至少被以下发现支持:在发作过程中,ALAS1 mRNA强烈上调;panhematin下调ALAS-1;并且向在培养物中的肝细胞添加血红素导致ALAS-1 mRNA的减少。若干发现还指示出抑制ALAS1 mRNA可以通过靶向肝来实现。例如,已经显示出肝移植是具有疗效的;并且肝衍生的代谢产物驱动了发作(参见,例如,达尔(Dar)等人,国际肝胆胰疾病杂志(Hepatobiliary Pancreat Dis Int.)9:93-6(2010);(Dowman)等人,内科医学年鉴(Ann Intern Med)154:571-2(2011);和吴(Wu)等人,基因与发育(Genes Dev)23:2201-2209(2009)。因此,使用iRNA组合物在例如肝中减少ALAS1的表达可以用来治疗卟啉症。在某些实施例中,iRNA组合物可以用于卟啉症的预防和急性治疗。

例如,在反复发作情况下,可以预防性使用iRNA组合物来诱导长期或慢性的ALAS1表达抑制(导致长期或慢性的ALA/PBG抑制),并且因此使驱使发作的反复ALAS1上调平化。此类预防性治疗可以减少发作的次数和严重性。在急性发作的过程中,给予iRNA组合物可以治疗急性发作,例如,通过减少ALA/PBG水平。

[0349]　本披露提供了用于调节ALAS1基因表达的方法和iRNA组合物。在某些实施例中,使用ALAS1-特异性iRNA减少或抑制ALAS1的表达,由此导致降低的ALAS1基因表达水平。降低的ALAS1基因的表达可以降低一种或多种卟啉前体、卟啉或卟啉产物或代谢物的水平。降低的ALAS1基因的表达,连同一种或多种卟啉前体、和/或卟啉水平的相关降低,可用于治疗与ALAS1表达相关的失调,例如,卟啉症。

[0350]　在此表征的组合物的iRNA包括RNA链(反义链),该RNA链具有一个区域,该区域是30个或更少个核苷酸长度,即,15-30个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的mRNA转录本(在此还称作"ALAS1-特异性iRNA")的至少一部分互补。这样一种iRNA的使用使得靶向降解基因的mRNA成为可能,这些基因参与哺乳动物中与ALAS1表达相关联的病理,例如,卟啉症像ALA脱水酶缺乏性卟啉症(又称Doss卟啉症或紫质症(plumboporphyria))或急性间歇性卟啉症。非常低剂量的ALAS1-特异性iRNA可以特异性且高效地介导RNAi,导致ALAS1基因表达的显著抑制。靶向ALAS1的iRNA可以特异性且高效地介导RNAi,导致ALAS1基因表达的显著抑制,例如,在基于细胞的测定中。因此,包含这些iRNA的方法和组合物用于治疗与ALAS1表达相关的病理过程,像卟啉症(例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、以及婴儿暂时性红细胞卟啉症)。

[0351]　以下描述披露了怎样制作和使用含有iRNA的组合物以抑制ALAS1基因表达,以及用于治疗由这种基因的表达引起或调制的疾病和失调的组合物和方法。在本发明中表征的药物组合物的实施例包括具有反义链的iRNA,连同一种药学上可接受的载体,该反义链包含一个区域,该区域是30个或更少个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。在本发明中表征的组合物的实施例还包括具有反义链的iRNA,该反义链具有一个互补区域,该互补区域是30个或更少个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。

[0352]　因此,在一些方面,本发明中表征了含有ALAS1 iRNA和一种药学上可接受的载体的药物组合物、使用这些组合物抑制ALAS1基因表达的方法、以及使用这些药物组合物来治疗与ALAS1表达相关的失调的方法。

[0353]　I.<u>定义</u>

[0354]　为方便起见,在本说明书、实例以及所附权利要求书中使用的某些术语与短语的意义提供于下。如果在本说明书中的其他部分中的术语使用与在本部分提供的该术语的定义有明显偏差,应该以在本部分中的定义为准。

[0355]　"G"、"C"、"A"、"T"以及"U"每一者通常分别代表包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶以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"还可以指一种经修饰的核苷酸(如以下进一步详述)或一种替代性的置换部分。技术人员应很好地意识到,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶可以被其他部分置换而基本上不改变一种寡核苷

酸(包括一种具有这种置换部分的核苷酸)的碱基配对特性。例如,而不限于,包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸发生碱基配对。因此,包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本发明表征的的dsRNA的核苷酸序列中被一种包含例如肌苷的核苷酸所置换。在另一个实例中,寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别地替换为鸟嘌呤和尿嘧啶,以形成与靶mRNA的G-U摇摆碱基配对。包含这类替换部分的序列适用于本发明表征的组合物和方法。

[0356] 如在此使用的,"ALAS1"(还称作ALAS-1;δ-氨基酮戊酸合酶1;δ-ALA合酶1;5'-氨基乙酰丙酸合酶1;ALAS-H;ALASH;ALAS-N;ALAS3;EC2.3.1.37;5-氨基酮戊酸合酶,非特异性的,线粒体的;ALAS;MIG4;OTTHUMP00000212619;OTTHUMP00000212620;OTTHUMP00000212621;OTTHUMP00000212622;迁移-诱导蛋白4;EC 2.3.1)是指一种核编码的线粒体酶,是哺乳动物血红素生物合成途径中的第一酶并且典型地是限速酶。ALAS1催化甘氨酸与琥珀酰-辅酶A缩合以形成δ-氨基乙酰丙酸(ALA)。人类ALAS1基因的表达无处不在,发现于染色体3p21.1,并且典型地编码640个氨基酸的一个序列。相比之下,编码一种同工酶的ALAS-2基因仅在红细胞中表达,发现于染色体Xp11.21,并且典型地编码550个氨基酸的一个序列。如在此使用的,"ALAS1蛋白"意指来自任何物种(例如,人类、小鼠、非人类灵长类动物)的ALAS1的任何蛋白变体,连同保留ALAS1活性的任何突变体及其片段。类似的,"ALAS1转录本"是指自任何物种(例如,人类、小鼠、非人灵长类动物)的ALAS1的任何转录本变体。人类ALAS1 mRNA转录物的序列可以在NM_000688.4处找到(图3A和图3B;SEQ ID NO:1)。另一个人类ALAS1 mRNA转录物可以在NM_000688.5处找到(图4A和图4B;SEQ ID NO:382)。成熟的、编码的ALAS1蛋白的水平是由血红素调节的:高水平血红素下调线粒体中成熟的酶而低血红素水平上调。迄今为止,已经鉴定了多个可变剪接的变体,这些变体编码相同蛋白。

[0357] 如在此使用的,术语"iRNA"、"RNAi"、"iRNA剂"、或"RNAi剂"是指包含如在此定义的术语RNA,并且例如,经由RNA诱导的沉默复合物(RISC)路径介导RNA转录本的靶向切割的一种试剂。在一个实施例中,如在此所述的iRNA实现ALAS1表达的抑制。ALAS1表达的抑制可以基于ALAS1 mRNA水平的下降或ALAS1蛋白水平的下降进行评估。如在此所使用的,"靶标序列"指的是在ALAS1基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。序列的靶部分将至少足够地长,以充当iRNA指导在这个部分或其附近切割的底物。例如,靶标序列总体上将是从9-36个核苷酸长度,例如,15-30个核苷酸长度,包括其之间的全部子范围。作为一个非限制性实例,该靶标序列可以是从15-30个核苷酸、15-26个核苷酸、15-23个核苷酸、15-22个核苷酸、15-21个核苷酸、15-20个核苷酸、15-19个核苷酸、15-18个核苷酸、15-17个核苷酸、18-30个核苷酸、18-26个核苷酸、18-23个核苷酸、18-22个核苷酸、18-21个核苷酸、18-20个核苷酸、19-30个核苷酸、19-26个核苷酸、19-23个核苷酸、19-22个核苷酸、19-21个核苷酸、19-20个核苷酸、20-30个核苷酸、20-26个核苷酸、20-25个核苷酸、20-24个核苷酸、20-23个核苷酸、20-22个核苷酸、20-21个核苷酸、21-30个核苷酸、21-26个核苷酸、21-25个核苷酸、21-24个核苷酸、21-23个核苷酸或21-22个核苷酸。

[0358] 如在此所使用,术语"包含序列的链"是指包含一个核苷酸链的寡核苷酸,该核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法提到的顺序来描述。

[0359] 如在此所使用,并且除非另外指明,当用来描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时,术语“互补”是指包含该第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含该第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员将理解。这样的条件可以例如是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl,40mM PIPES pH 6.4,1mM EDTA,50℃或70℃持续12-16小时,接着洗涤。可以应用其他条件,比如可以在有机体中遇到的生理学相关条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用,确定最适宜于测试两个序列的互补性的条件集合。

[0360] 在iRNA内部(例如,在如本文所述的dsRNA内部)的互补序列包括包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的整个长度范围内的碱基配对。此类序列在此可以称作相对于彼此“完全互补”。然而,在此在一个第一序列被称作相对于一个第二序列“基本上互补”的情况下,这两个序列可以是完全互补的,或者它们可以在针对高达30个碱基对的双链体杂交时形成一个或多个,但是总体上不多于5个、4个、3个或2个错配碱基配对,同时保留了在与它们的最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如,经由RISC路径的基因表达的抑制。然而,在两个寡核苷酸被设计为在杂交时形成一个或多个单链突出的情况下,此类突出不应该被认为是关于互补性确定的错配。例如,出于在此描述的目的,以下这样一种dsRNA也可以称作“完全互补”:该dsRNA包括一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸以及一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸,其中该更长的寡核苷酸包括一个与该更短的寡核苷酸完全互补的21核苷酸序列。

[0361] 如在此所使用,就满足以上相对于它们杂交的能力而言的要求来说,“互补”序列还可以包括或完全形成自非沃森-克里克碱基对和/或从非天然的以及经修饰的核苷酸形成的碱基对。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摇摆碱基配对或Hoogstein碱基配对。

[0362] 本文的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可相对于在dsRNA的有义链与反义链之间,或iRNA剂的反义链与靶标序列之间的碱基配对使用,如将从其使用的上下文理解。

[0363] 如在此使用的,与信使RNA(mRNA)的“基本上至少部分互补”的多核苷酸指与感兴趣的mRNA(例如,编码ALAS1蛋白的mRNA)的一个连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果一个多核苷酸与编码ALAS1的mRNA的一个非间断部分基本上互补,那么该序列则与ALAS1 mRNA的至少一部分互补。作为另一个实例,如果一个多核苷酸与编码ALAS1的mRNA的一个非间断部分基本上互补,那么该序列则与ALAS1 mRNA的至少一部分互补。。

[0364] 如在此所使用的,术语“双链RNA”或“dsRNA”指的是包括具有杂合的双链体区域的RNA分子或分子的复合体的iRNA,该区域包括两条反向平行的且基本上互补的核酸链,还可将其称之为相对于靶标RNA具有“有义”和“反义”取向。该双链体区可以是允许例如,经RISC路径特异性降解所需靶标的任何长度,但是一般范围是从9至36个碱基对长度,例如,15-30个碱基对长度。就9和36碱基对之间的双链体时,双链体可以具有在这个范围内的任意长度,例如,9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36和其间的任何子范围,包括但不限于15-30碱基对、15-26碱基对、15-23碱基对、15-22碱基对、15-21碱基对、15-20碱基对、15-19碱基对、15-18碱基对、15-17碱基对、18-30碱基对、18-26碱基对、18-23碱基对、18-22碱基对、18-21碱基对、18-20碱基对、19-30

碱基对、19-26碱基对、19-23碱基对、19-22碱基对、19-21碱基对、19-20碱基对、20-30碱基对、20-26碱基对、20-25碱基对、20-24碱基对、20-23碱基对、20-22碱基对、20-21碱基对、21-30碱基对、21-26碱基对、21-25碱基对、21-24碱基对、21-23碱基对或21-22碱基对。细胞中通过Dicer和相似酶加工产生的dsRNA通常具有范围19-22的碱基对长度。dsDNA的双链体区的一条链包含与靶RNA的区域基本上互补的序列。形成双链体结构的两个链可以来自具有至少一个自身互补区域的单一RNA分子,或可以由两个或更多个独立RNA分子组成。当该双链体区是形成自单个分子的两条链时,该分子可以在一条链的3'-端与形成该双链体结构的各自的另一条链的5'-端之间具有由核苷酸的一个单链的链分隔开的一个双链体区(在此称为"发夹环")。发夹环可以包括至少一个未成对的核苷酸;在一些实施例中,发夹环可以包括至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对的核苷酸。当dsRNA的两个基本上互补的链包含单独的RNA分子时,这些分子不是必须的,但是可以共价连接。当这两条链通过除发夹环之外的方式共价连接时,该连接结构被称为"接头"。术语"siRNA"还可以在此用作指代以上所述的dsRNA。

[0365] 在另一个实施例中,该iRNA剂可以是被引入到细胞或组织中以抑制靶标mRNA的一个"单链siRNA"。单链RNAi剂结合到RISC核酸内切酶Argonaute2上,该核酸内切酶然后切割该标靶mRNA。这些单链siRNA通常是15-30个核苷酸并且是化学修饰的。单链siRNA的设计和检测描述于美国专利号8,101,348中,以及利马(Lima)等人,(2012)《细胞》(Cell)150:883-894中,特此将它们各自的全部内容通过引用结合在此。在此描述的反义核苷酸序列中的任一个(例如,表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中或表21-40中提供的序列)可用作单链siRNA,如在此所述的或如通过利马等人,(2012)细胞150:883-894中描述的进行化学修饰的。

[0366] 在另一个方面中,RNA剂是一种"单链的反义RNA分子"。单链的反义RNA分子是与靶标mRNA之内的一个序列互补的。单链的反义RNA分子能以化学计量的方式通过与该mRNA碱基配对并且物理性地阻碍翻译装置来抑制翻译,参见蒂尔斯(Dias,N.)等人,(2002)分子癌症治疗学(Mol.Cancer Ther.)1:347-355。可替代地,该单链的反义分子通过杂交至靶标并通过RNaseH切割事件切割靶标来抑制靶标mRNA。该单链反义RNA分子的长度可以是约10至约30个核苷酸并且具有与靶序列互补的序列。例如,该单链的反义RNA分子可以包括以下这样一个序列:该序列是来自在此所述的反义核苷酸序列中任一个的至少大约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸,如表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中或表21-40中的任一个中提供的序列。

[0367] 熟练技术人员将意识到术语"RNA分子"或"核糖核酸分子"不仅包括自然中表达或发现的RNA分子,而且还包括包含一个或多个核糖核苷酸/核糖核苷类似物或衍生物的RNA的类似物或衍生物,如在此所述的或如本领域中已知的。严格来说,"核糖核苷"包括核苷碱基和核糖,并且"核糖核苷酸"是具有一个、两个或三个磷酸部分的一种核糖核苷。然而,如在此使用的,术语"核糖核苷"和"核糖核苷酸"可以被认为是相等的。例如,如下文所述,可以在核碱基结构、在核糖结构中或在核糖-磷酸酯主链结构中修饰RNA。然而,包含核糖核苷类似物或衍生物的分子必须保留形成双链体的能力。作为非限制性实例,RNA分子也可以包括至少一个修饰的核糖核苷,其包括但不限于2'-O-甲基修饰的核苷,包括5'硫代磷酸酯基的核苷、与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷、锁核苷、脱碱基核苷、无环核苷、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷、2'-氨基修饰的核苷,2'-烷基修饰的核苷,吗啉代核

苷、磷酰胺酯或包括非天然碱基的核苷，或其任意组合。可选地，RNA分子可以包含至少两个修饰的核糖核苷、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少31个或更多个修饰的核糖核苷，直到dsRNA分子的整个长度。对于RNA分子中这些多个修饰的核糖核苷中的每一个，修饰不需要是相同的。在一个实施例中，经构思用本文所述方法和组合物中的修饰RNA是具有形成所需双链体结构的能力并且经，例如RISC途径允许或介导靶RNA特异性降解的肽核酸(PNA)。

[0368] 在一个方面，修饰的核糖核苷包括脱氧核糖核苷。在这种情况下，iRNA剂可以包含一个或多个脱氧核苷，包括例如脱氧核苷突出端或在dsRNA的双链部分内部的一个或多个脱氧核苷。在某些实施例中，例如，在一个或两个链中，该RNA分子包括至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更高(但不是100％)脱氧核糖核苷的脱氧核糖核苷百分比。在其他实施例中，术语“iRNA”并不涵盖双链DNA分子(例如，天然发生的双链DNA分子或100％包含脱氧核苷的DNA分子)。在一个方面，RNA干扰剂包括与靶RNA序列相互作用以指导靶RNA切割的单链RNA。不希望受理论约束，引入细胞中的长的双链RNA由称作Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(夏普(Sharp)等人，基因和发育(Genes Dev.)2001,15:485)。Dicer(核糖核酸酶-III样酶)使dsRNA加工成具有特征性的两个碱基3’突出端的19-23个碱基对短干扰RNA(伯恩斯坦(Bernstein)等人，(2001)自然(Nature)409:363)。然后将siRNA结合到一种RNA诱导沉默复合体(RISC)中，其中一种或多种螺旋酶使siRNA双链体展开，从而能够实现互补反义链导引靶标识别(尼卡能(Nykanen)等人，(2001)细胞(Cell)107:309)。一旦与适宜的靶mRNA结合，RISC内部的一种或多种核酸内切酶切割靶以诱导沉默(巴希尔(Elbashir)等人，(2001)基因与发育(Genes Dev.)15:188)。因此，在一个方面，本发明涉及了促进实现靶基因沉默的RISC复合物形成的单链RNA。

[0369] 如在此所使用的，术语“核苷酸突出”是指至少一个非配对的核苷酸，其从iRNA的双链体结构(例如，dsRNA)突出。例如，当dsRNA的一条链的3’-端延伸超过另一条链的5’-端时或反之亦然，存在核苷酸突出端。dsRNA可以包括具有至少一个核苷酸的突出端；替代地该突出端可以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。核苷酸突出端可以包括核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任意组合上。另外，突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的反义或有义链的5’末端、3’末端或两个末端上。

[0370] 在一个实施例中，dsRNA的反义链在3’末端和/或5’末端具有一个1-10个核苷酸突出端。在一个实施例中，dsRNA的有义链在3’末端和/或5’末端具有一个1-10个核苷酸突出端。在另一个实施例中，突出中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替代。

[0371] 关于dsRNA，在此使用的“平端”或“平末端”是指在dsRNA的给定的末端没有非配对的核苷酸或核苷酸类似物，即，没有核苷酸突出。dsRNA的一个或两个末端可以是平端。当dsRNA的两个末端都是平末端，该dsRNA被称为平末端的。为了清楚起见，一个“平末端的”dsRNA是一个在其两端齐平的dsRNA，即，在该分子的任何一端都没有核苷酸突出。大多数情况下，这种分子将在其整个长度范围内是双链的。

[0372] 术语“反义链”或“引导链”是指iRNA链，例如，dsRNA，其包括一个区域，该区域基本上与靶标序列互补。如在此所使用的，术语“互补性区域”指的是该反义链上基本上与一个

序列互补的区域,例如如在此定义的一个靶标序列。其中互补区域不与靶序列完全互补的情况下,错配可以存在于分子的内部或末端区域内。通常,最耐受的错配存在于末端区域内,例如,在5'和/或3'末端的5、4、3或2个核苷酸内部。

[0373] 如在此所使用的,术语"有义链"或"过客链"指的是包括与在此定义的术语反义链的一个区域基本上互补的一个区域的iRNA链。

[0374] 如在此使用的,术语"SNALP"是指一种稳定的核酸-脂质颗粒。SNALP代表包覆缩减的含水内部的脂质囊泡,该含水内部包含核酸如iRNA或从中转录出iRNA的质粒。SNALP例如在美国专利申请公开号20060240093、20070135372中并且在国际申请号WO 2009082817中描述。这些申请以其全文通过引用结合在此。

[0375] 当提及iRNA时,"引入细胞内"意思是促进或影响摄取或吸收进入该细胞,如本领域内的普通技术人员所理解的。吸收或摄取iRNA可以通过无协助扩散过程或主动细胞过程或借助助剂或装置发生。该术语的含义并不限于体外的细胞;iRNA还可"被引入至细胞",其中所述细胞是活的生物的一部分。在这种情况下,引入细胞中将包括递送至生物。例如,对于体内递送,可以将iRNA注射至组织部位中或全身施用。体内递送还可以通过β-葡聚糖递送系统,如美国专利号5,032,401和5,607,677以及美国公开号2005/0281781中所描述的那些,将它们通过引用以其全文结合于此。体外引入细胞内包括本领域内已知的方法,例如电穿孔以及脂质转染法。另外的方法描述下文或在本领域内是已知的。

[0376] 如在此使用的,术语"调制...的表达"是指与ALAS1在对照细胞中的表达相比,至少部分"抑制"或部分"激活"ALAS1基因在用如在此所述的iRNA组合物处理过的细胞中的表达。对照细胞包括未处理的细胞或用非靶标对照iRNA处理的细胞。

[0377] 术语"激活"、"增强"、"上调...的表达"、"增加...的表达"等,只要它们是指ALAS1基因,在此是指至少部分激活ALAS1基因的表达,表示为:可从ALAS1基因在其中转录的一个第一细胞或一组第一细胞(已经经过处理由此ALAS1基因的表达被增加)中分离的ALAS1 mRNA的量增加,这是与一个第二细胞或一组第二细胞(对照细胞)相比,其与该一个第一细胞或一组第一细胞实质上相同,除了未经受如此的处理。

[0378] 在一个实施例中,通过施用如在此描述的iRNA激活ALAS1基因表达至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中,通过施用本发明中表征的iRNA激活ALAS1基因至少约60%、70%或80%。在一些实施例中,通过施用如本文所述的iRNA激活ALAS1基因表达至少约85%、90%或95%或更多。在一些实施例中,与未处理的细胞中的表达相比,ALAS1基因表达在用如本文所述的iRNA处理的细胞中增加至少1倍、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多倍。通过小dsRNA激活表达例如在李(Li)等人,2006美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)103:17337-42中并且在US 20070111963和US 2005226848中描述,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0379] 术语"沉默"、"抑制...的表达"、"下调...的表达"、"压制...的表达"等,只要它们是指ALAS1基因,在此是指至少部分地压制ALAS1基因的表达,这是基于例如,ALAS1 mRNA表达、ALAS1蛋白表达、或与ALAS1基因表达功能性相联系的另外的参数(例如,血浆或尿中的ALA或PBG浓度)进行评估的。例如,ALAS1表达的抑制可被表示为:与对照相比,可从ALAS1基因在其中转录的一个第一细胞或一组第一细胞(已经经过处理由此ALAS1基因的表达被抑

制)中分离的ALAS1 mRNA的量减少。对照可以是一个第二细胞或一组第二细胞,其与该一个第一细胞或一组第一细胞实质上相同,除了该第二细胞或该组第二细胞未经受如此的处理(对照细胞)。抑制程度通常表示为对照水平的百分比,例如,

[0380] $$\frac{(\text{对照细胞中的mRNA})-(\text{处理细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})}\bullet 100\%$$

[0381] 可替代地,抑制程度能以与ALAS1基因表达功能性相联系的一个参数的减少而给出,例如ALAS1基因编码的蛋白的量,或一种或多种卟啉的水平。与ALAS1基因表达功能性相联系的一个参数的减少可以类似地表示为对照水平的百分比。原则上,ALAS1基因沉默可以在(组成型地或通过基因组工程化)表达ALAS1的任何细胞中通过任何合适的测定来确定。然而,当需要一个参考来确定一个给定的iRNA是否在一定程度上抑制ALAS1基因的表达并且因此被本发明所囊括时,在以下实例中提供的这些测定应该作为此参考。

[0382] 例如,在某些情况下,通过施用本发明中表征的iRNA压制ALAS1基因表达至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中,通过施用本发明中表征的iRNA压制ALAS1基因至少约60%、65%、70%、75%、或80%。在一些实施例中,通过施用如本文所述的iRNA压制ALAS1基因至少约85%、90%、95%、98%、99%、或更多。

[0383] 如在此使用的,如在ALAS1表达的背景下,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”以及类似术语指缓解或减轻与ALAS1表达相关的病理过程(例如,涉及卟啉或卟啉途径缺陷的病理过程,例如,像卟啉症)。在本发明的上下文中,在涉及以下在此所引用的任何其他病状的范围内(除了与ALAS1表达相关的病理过程),术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”以及等等意思是预防、缓解或减轻至少一个与此病状相关联的症状,或意思是减缓或逆转这种病状的进程或预期进程。例如,在此表征的方法,当用于治疗卟啉症时,可以用于减少或预防与卟啉症相关联的一种或多种症状(例如,疼痛),降低与卟啉症相关联发作的严重性或频率,降低一旦暴露于诱发条件将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性,缩短与卟啉症相关联的发作,和/或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如,肝细胞癌或神经病变(例如,渐进性神经病变))的风险。因此,除非在上下文中另外明确的指出,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”以及等等意在包含预防,例如,预防与ALAS1表达相关的失调和/或失调的症状。

[0384] 在疾病标记或症状的背景下,“降低”意为此水平的统计学上或临床上的显著减少。下降可以是例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或更多,并且典型地降至作为不患这种病症的个体的正常范围内所接受的水平。

[0385] 如在此所使用的,短语“治疗有效量”以及“预防有效量”指这样一个量,该量在治疗、预防或管理与ALAS1表达相关的病理过程中提供一个治疗上的益处。治疗有效的具体量可以容易地由普通医疗从业者来确定,并且可以根据本领域内已知的因素而变化,比如,例如由病理学过程的类型、患者病史以及年龄、病理学过程的阶段、以及其他试剂的给予。

[0386] 如在此所使用的,“药物组合物”包括药理学有效量的iRNA以及药学上可接受的载体。如在此所使用的,“药理学有效量”、“治疗有效量”或简言之的“有效量”指有效产生预期的药理学、治疗或预防结果的iRNA的量。例如,在治疗与ALAS1表达相关的失调的方法中(例如,在治疗卟啉症的方法中),有效量包括有效地减少与卟啉症相关联的一种或多种症状的一个量,有效地降低发作频率的一个量,有效地降低一旦暴露于诱发因素将发生的、与卟啉

症相关联的一种或多种症状发作的可能性的一个量，或有效地降低发展与卟啉症相关联的病状(例如，神经病变(例如，渐进性神经病变)(例如，神经病变(例如，渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险的一个量。例如，如果当一个与一种疾病或病症相关联的可测量的参数减少至少10％时，一个给定的临床治疗才被认为是有效的，那么一种用于该疾病或病症的治疗的药物的治疗的有效量是实现该参数至少减少10％所需要的一个量。例如，治疗有效量的靶向ALAS1的iRNA可以减少ALAS1蛋白水平任何可测量的量，例如，至少10％、20％、30％、40％或50％。

[0387]　术语“药学上可接受的载体”指用于一种治疗剂的给予的载体。此类载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇、及其组合。该术语特别地排除细胞培养基。对于口服给予的药物，药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的赋形剂，比如惰性稀释剂、崩解剂、结合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠以及碳酸钙、磷酸钠以及磷酸钙，以及乳糖，而玉米淀粉以及褐藻酸是合适的崩解剂。结合剂可以包括淀粉以及明胶，而润滑剂(如果存在的话)将通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果希望的话，可以将片剂用一种材料进行包衣，比如单硬脂酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯，以延迟在胃肠道中的吸收。下文进一步描述药物制剂所包含的药剂。

[0388]　当提及数字或数值范围时，术语“约”是指所提及的数字或数值范围是在一个实验变异内(或在统计实验误差内)的近似值，并且由此该数字或数值范围可以从，例如，所陈述数字或数值范围的1％与15％之间变化。

[0389]　II.iRNA剂

[0390]　在此描述了抑制ALAS1基因表达的iRNA剂。在一个实施例中，该iRNA剂包括用于在细胞或受试者(例如，哺乳动物，像患有卟啉症的人类)中抑制ALAS1基因的表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子，其中该dsRNA包括一个具有互补性区域(该区域与在ALAS1基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补)的反义链，并且其中该互补性区域的长度小于或等于30个核苷酸，通常长度是19-24个核苷酸，并且其中该dsRNA在与表达该ALAS1基因的细胞相接触时抑制该ALAS1基因的表达至少10％，如通过例如PCR或基于分支DNA(bDNA)的方法、或通过基于蛋白的方法(例如通过蛋白质印迹(Western blot))所测定的。在一个实施例中，该iRNA剂激活ALAS1基因在细胞或哺乳动物中的表达。可以通过测量ALAS1 mRNA水平，如通过bDNA或TaqMan测定法，或使用例如蛋白质印迹法或流式细胞技术通过测量蛋白质水平，如通过免疫荧光分析，测定细胞培养物中如COS细胞、HeLa细胞、原代肝实质细胞、HepG2细胞、原代培养物细胞中或在来自受试者的生物样本中的ALAS1基因表达。

[0391]　dsRNA包括两个RNA链，它们足够地互补以在其中将使用dsRNA的条件下杂交形成一个双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括一个互补区域，该区域基本上是与衍生自ALAS1基因表达过程中形成的mRNA的序列的靶标序列互补的，通常是完全互补的。另一条链(有义链)包括与反义链互补的区域，从而在适合的条件下组合时，这两条链杂交并形成双链体结构。通常，该双链体结构具有15和30之间并包括15和30碱基对长度，更通常地具有18和25之间并包括18和25碱基对长度，然而更通常地具有19和24之间并包括19和24个碱基对长度，并且更通常地具有19和21个之间并包括19和21个碱基对长度。同样地，与靶标序列互补的区域具有15和30个之间并包括15和30个核苷酸长度，更通常地具有18和25个之间并包括18和25个核苷酸长度，然而更通常地具有19和24个之间并包括19和24个核苷酸长度，并

且最通常地具有19和21个之间并包括19和21个核苷酸长度。在一些实施例中，dsRNA具有15和20个之间并包括15和20个核苷酸长度，并且在其他实施例中，dsRNA具有25和30个之间并包括25和30个核苷酸长度。如普通技术人员将认识，被靶向以便切割的RNA的靶向区域将最经常是较大RNA分子(往往mRNA分子)的部分。在相关的情况下，mRNA靶标的“一部分”是mRNA靶标的连续序列，其长度足够作为RNAi指导的切割的底物(即，经RISC途径的切割)。在一些情况下，具有短至9个碱基对的双链体的dsRNA可以介导RNAi指导的RNA切割。最经常地，靶标将是至少15个核苷酸长度，例如，15-30个核苷酸长度。

[0392] 本领域技术人员将也认识到，双链体区是dsRNA的主要功能性部分，例如，9至36个碱基对(例如，15-30个碱基对)的双链体区。因此，在一个实施例中，为了达到被加工成导引所需RNA切割的(例如，15-30个碱基对)功能性双链体，具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此，随后，普通技术人员将认识到在一个实施例中miRNA是dsRNA。在另一个实施例中，dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施例中，用于靶向ALAS1表达的iRNA剂不是在靶标细胞中通过切割较大dsRNA产生的。

[0393] 如本文所述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出。该dsRNA可以通过如进一步在以下所讨论的、本领域内已知的标准方法来进行合成，例如，通过使用自动化的DNA合成仪，比如从例如生物研究公司(Biosearch)、应用生物系统公司(Applied Biosystem公司)可商购的合成仪。在一个实施例中，ALAS1基因是人类ALAS1基因。在另一个实施例中，ALAS1基因是小鼠或大鼠ALAS1基因。

[0394] 在特定的实施例中，第一序列是包括在此披露的有义序列的dsRNA的有义链，例如，在表21-40中，并且第二序列是包括在此披露的反义序列的dsRNA的反义链，例如，在表21-40中。

[0395] 在特定的实施例中，第一序列是包含表2或3中的有义序列的dsRNA的有义链，并且第二序列包含表2或3中的反义序列的dsRNA的反义链。在实施例中，第一序列是包含表2、3、6、7、8、9、14、或15中的有义序列的dsRNA有义链，并且第二序列包含表2、3、6、7、8、9、14、或15中的反义序列的dsRNA的反义链。在实施例中，第一序列是包含表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的有义序列的dsRNA的有义链，并且第二序列包含表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的反义序列的dsRNA的反义链。

[0396] 在一方面，dsRNA可以包括至少有义和反义核苷酸序列，由此有义链选自在此提供的有义序列，例如，在表21-40中，并且有义链的相应反义链选自在此提供的反义序列，例如，在表21-40中。

[0397] 在一方面，dsRNA可以至少包括有义和反义核苷酸序列，由此有义链选自表2和3中提供的序列的组，并且该有义链的相应反义链选自表2和3。在另外一方面，dsRNA可以至少包括有义和反义核苷酸序列，由此有义链选自表2、3、6、7、8、9、14、和15中提供的序列的组，并且该有义链的相应反义链选自表2、3、6、7、8、9、14、和15。在另外一方面，dsRNA可以至少包括有义和反义核苷酸序列，由此有义链选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的序列的组，并且该有义链的相应反义链选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20。

[0398] 在实施例中，该iRNA是AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-

60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419(例如,包括上述dsRNA的核苷酸序列和/或修饰中的一种或多种)。在实施例中,该iRNA包括反义链,该反义链包括选自以下各项的的反义序列的反义序列(包括一种或多种(例如,所有修饰)),或由其组成:AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。在实施例中,该iRNA包括有义链,该有义链包括选自以下各项的有义序列(和/或一种或多种(例如,所有)修饰),或由其组成:AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、AD-60935、AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、AD-60519、AD-60519、AD-60901、AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、AD-60926、AD-60820、AD-60843、AD-60819、AD-61140、AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、AD-61146、AD-60892、或AD-60419。

[0399] 在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链包括UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU或UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU的序列,或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA的序列,或由其组成。在实施例中,反义链和/或有义链中的一个或多个核苷酸如在此描述的进行修饰。

[0400] 在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-60489的反义序列,或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括AD-60489的有义序列,或由其组成(和/或AD-60489的有义链和/或反义链的一种或多种(例如,所有)修饰)。

[0401] 在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-60519的反义序列,或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括AD-60519的有义序列,或由其组成(和/或AD-60489的有义链和/或反义链的一种或多种(例如,所有)修饰)。

[0402] 在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-61193的反义序列,或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括AD-61193的有义序列,或由其组成(和/或AD-60489的有义链和/或反义链的一种或多种(例如,所有)修饰)。

[0403] 在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-60819的反义序列,或由其组成,和/或(ii)有义序列,该有义序列包括AD-60819的有义序列,或由其组成(和/或AD-60489的有义链和/或反义链的一种或多种(例如,所有)修饰)。

[0404] 在实施例中,提供了用于抑制ALAS1表达的iRNA,其中该dsRNA包括(i)反义链,该反义链包括AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的反义序列(或对应的未修饰的反义序列),或由其组成,和/或(ii)有义链,该有义链包括AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的有义序列,或由其组成(或对应的未修饰的反义序列)。在实施例中,该iRNA包括(i)反义链,该反义链由AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的反义序列组成,和/或(ii)有义链,该有义链由AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的有义序列组成,除了该dsRNA的反义链和/或有义链与AD-60489、AD-60519、AD-61193、或AD-60819的对应反义

和/或有义序列相差1、2、或3个核苷酸之外。

[0405] AD-60489、AD-60519、AD-61193、和AD-60819的序列和修饰示于在此披露的表44中。

[0406] 在一个实施例中，该iRNA是ALN-60519。ALN-60519是一种化学上合成的双链的寡核苷酸，该寡核苷酸共价连接至包含三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的配体(描绘于图57中)。在一个实施例中，ALN-60519的所有的核苷酸都是2'-OMe或2'-F修饰的并且都是通过3'-5'磷酸二酯键连接的，因此形成寡核苷酸的糖-磷酸骨架。ALN-60519的有义链和反义链分别包含21个和23个核苷酸。将ALN-60519的有义链的3'-端通过磷酸二酯键共轭至三触角的GalNAc部分(称为L96)。反义链包含四个硫代磷酸酯键-两个在3'端并且两个在5'端。ALN-60519的有义链在5'端包含两个硫代磷酸酯键。ALN-60519的有义链的21个核苷酸与反义链的互补的21个核苷酸杂交，因此在反义链的3'端形成21个核苷酸碱基对以及二碱基突出端。在5'-羟基被保护为二甲氧基三苯甲基(DMT)醚的情况下，可以使用标准亚磷酰胺化学，通过常规的固相寡核苷酸合成来合成ALN-60519的两个单链(有义链和反义链)。各链可以通过顺序添加所保护的核苷亚磷酰胺，从3'至5'末端进行组装。

[0407] 在这些方面中，两个序列的一者与两个序列的另一者互补，其中这些序列中的一者与ALAS1基因表达中产生的mRNA的序列基本上互补。如此，dsRNA将包括两个寡核苷酸，其中一个寡核苷酸在此描述为有义链，并且第二个寡核苷酸描述为相应的反义链。如在此的其他地方所描述并且如本领域中所知，与处于单独的寡核苷酸上相反，dsRNA的互补序列还可以被包含作为单一核酸分子的自我互补区。

[0408] 熟练的技术人员将很好的意识到，具有20与23之间个碱基对(但是特别是21个碱基对)的双链结构的dsRNA被奉为是尤其有效地诱导RNA干扰(厄尔巴瑟等人，EMBO 2001，20:6877-6888)。然而，其他人已经发现较短或较长的RNA双链体结构物也可以是有效的。在上文描述的实施例中，由于本文表中提供的寡核苷酸序列的性质，本文所述的dsRNA可以包括长度最小21个核苷酸的至少一条链。可以合理地预期，与上文描述的dsRNA相比，具有仅在一个端或两个端上减去少数个核苷酸的在此披露中的序列的较短双链体可以类似地有效。因此，根据本发明构思这样的dsRNA，它们具有来自在此披露中的序列的至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的部分序列并且在它们在抑制ALAS1基因表达的能力方面与包括全序列的dsRNA的差异不多于5％、10％、15％、20％、25％或30％。

[0409] 此外，本文表中提供的RNAs，鉴别易受RISC介导的切割影响的ALAS1转录物中的位点。就这一点而论，本发明进一步表征了靶向这类序列之一内部的iRNA。如在此所使用，如果iRNA在具体位点内的任何地方促进转录物的切割，则称该iRNA在RNA转录物的具体位点内靶向。这种iRNA通常将包括来自在此提供的序列之一的至少15个连续核苷酸，例如，表2、3、6、7、8、9、14、15、18、20中，和表21-40中，所述连续核苷酸偶联到从与ALAS1基因中的选择序列保持连续的区域所取得的另外核苷酸序列上。

[0410] 尽管靶序列总体上是15-30个核苷酸长度，但是在这个范围内的特定序列指导任何给定靶RNA切割的适用性方面存在广泛变异。在此陈述的不同软件包和指南提供了用于针对任意给定基因靶标识别最优靶标序列的指南，但是还可以采取一种经验主义的方法，其中给定大小的“窗口”或“掩码”(作为一个非限制性实例，21个核苷酸)被照字面的或象征性地(包括，例如，计算机模拟)放置在靶标RNA序列上以识别可用作靶标序列的大小范围内

的序列。通过移动该序列“窗口”渐进初始靶标序列位置的一个核苷酸上游或下游，可以鉴别下一个潜在的靶标序列，直到针对所选择的任何给定的靶标尺寸鉴别可能的序列的全套。这个过程(加上为了鉴定最佳执行的那些序列的所鉴定的序列的系统合成和测试(使用此处所述的或如本领域中已知的测定))可以鉴定当用一种iRNA剂靶向时介导靶基因表达的最好抑制的那些RNA序列。因此，当例如在本文表中鉴定的序列表示有效靶标序列时，在此考虑了可以通过以下方式实现抑制效力的进一步优化:沿着给定序列的上游或下游的一个核苷酸逐步地“窗口步移”来鉴别具有相同或更好抑制特性的序列。

[0411] 另外，考虑了对于例如在本文表中鉴定的任何序列，可以通过以下方式实现进一步优化:系统地添加或移走核苷酸以产生较长或较短的序列，并且测试通过从该点上游于或下游于靶标RNA步移具有更长或更短尺寸的窗口所产生的那些序列。再次地，使这种方案与产生新候选物靶联系，同时在如本领域已知或如本文所述的抑制测定法中基于这些靶序列测试iRNA的有效性，可以导致效率抑制的进一步改善。再者，可以例如通过引入如本文所述或如本领域已知的修饰核苷酸、添加或改变突出端或如本领域已知和/或本文中讨论的其他修饰，调节这类优化的序列以便进一步优化该分子(例如，增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加从内体放中等)作为表达抑制剂。

[0412] 如本文所述的iRNA可以含有一个或多个相对于靶标序列的错配。在一个实施例中，如本文所述的iRNA含有不多于3个错配。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配，则优选错配区域不应当位于互补区域的中心内。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配，则优选错配区域应当局限于距互补区域5’或3’末端的最末5个核苷酸内部。例如，对于与ALAS1基因的某区域互补的23个核苷酸iRNA剂的RNA链而言，RNA链通常在中央13个核苷酸内部不含任何错配。本文所述的方法或本领域已知的方法可以用来确定含有相对于靶序列的错配的iRNA是否有效抑制ALAS1基因表达。考虑具有错配的iRNA在抑制ALAS1基因表达方面的效率是重要的，尤其是如果ALAS1基因中的互补性具体区域已知在群体内具有多态性序列变异。

[0413] 在一个实施例中，dsRNA的至少一个端具有1至4个、总体上1或2个核苷酸的单链核苷酸突出端。具有至少一个核苷酸突出的dsRNA相对于它们的平末端的对应物，具备出乎意料优越的抑制性特性。在又一个实施例中，将iRNA(例如，dsRNA)的RNA化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。本发明中表征的核酸可以通过本领域充分建立的方法合成和/或修饰，如在“核酸化学实验室指南(Current protocols in nucleic acid chemistry)”，毕克奇(Beaucage,S.L.)等人(编著)，约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons,Inc.)，美国纽约(New York,NY,USA)中描述的那些方法，所述文献因此通过引用方式结合在此。修饰包括例如(a)末端修饰，例如，5’末端修饰(磷酸化、共轭、倒置键等)、3’末端修饰(共轭、DNA核苷酸、倒置键等)，(b)碱基修饰，例如，替换为稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩充的配偶物库发生碱基配对的碱基、移除碱基(脱碱基核苷酸)、或共轭的碱基，(c)糖修饰(例如，在2’位置或4’位置，或具有无环糖)或糖的替换，以及(d)主链修饰，包括修饰或替换磷酸二酯键。在本发明中的有用的RNA化合物的具体实例包括但不限于含有修饰主链或无天然核苷间键的RNA。具有修饰骨架的RNA除其他之外包括在骨架中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的和如有时本领域中谈及，也可以将在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰RNA视为

寡核苷。在具体的实施例中，修饰的RNA将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0414] 修饰的RNA骨架包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯，包括3’-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯、次膦酸酯、磷酰胺酯，包括3’-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯、硫代羰基磷酰胺酯、硫代羰基烷基膦酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯和具有正常3’-5’键的硼烷磷酸酯、这些酯的2’-5’连接的类似物，和具有反转极性的那些酯，其中相邻对的核苷单位为3’-5’至5’-3’或2’-5’至5’-2’连接。还包括不同盐、混合盐以及游离酸形式。

[0415] 教授制备以上含磷键的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;以及美国专利RE39464，所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0416] 其中不包含磷原子的修饰的RNA骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子核苷间键或杂环核苷间键形成的骨架。这些包括具有以下结构的那些：吗啉代键联(从核苷的糖部分中部分地形成)；硅氧烷骨架；硫化物、亚砜和砜骨架；甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；含烯的骨架；氨基磺酸盐骨架；亚甲亚氨基和亚甲肼基骨架；磺酸酯和磺酰胺骨架；酰胺骨架；以及具有混合N、O、S和CH_2组分部分的其他骨架。

[0417] 教授制备以上寡核苷的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;以及5,677,439，所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0418] 在适合用于或构思用于iRNA的其他RNA模拟物中，将核苷酸单位的糖和核苷间键即主链替换为新基团。保持碱基单元以与适当的核酸靶标化合物杂交。一种这样的低聚化合物(已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，RNA的糖骨架被含有酰胺的骨架置换，具体是氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。教授制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号5,539,082;5,714,331;以及5,719,262，所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。对PNA化合物的其他教授内容可以在例如尼尔森(Nielsen)等人，科学(Science)，1991,254,1497-1500中找到。

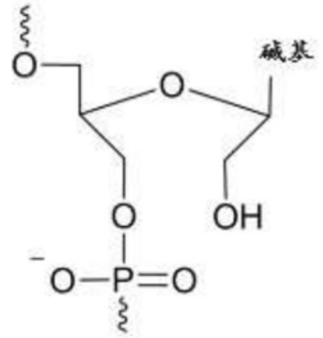
[0419] 本发明中表征的一些实施例包括具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷，并且尤其上文所参考美国专利号5,489,677的--CH_2--NH--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--[称作亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--、和--N(CH_3)--CH_2--CH_2--[其中天然磷酸二酯主链表述为--O--P--O--CH_2--]，和上文所参考美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施例中，在此表征的

RNA具有上文所参考美国专利号5,034,506的吗啉代主链结构。

[0420] 经修饰的RNA还可以含一个或多个经取代的糖部分。在此表征的iRNA(例如dsRNA)可以在2’位置包括以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中该烷基、烯基以及炔基可以是被取代的或未被取代的C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基。示例性适合的修饰包括$O[(CH_2)_nO]_mCH_3$、$O(CH_2).{}_nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$和$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$,其中n和m是从1至约10。在其他实施例中,dsRNA在2’位置处包括以下之一:C_1至C_{10}低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基因基团、嵌入剂、用于改进iRNA的药物代谢动力学特性的基团或用于改进iRNA的药效特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。在一些实施例中,该修饰包括2’-甲氧基乙氧基(2’-O--$CH_2CH_2OCH_3$,也称作2’-O-(2-甲氧基乙基)或2’-MOE)(马丁(Martin)等人,瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta),1995,78,486-504),即,烷氧基-烷氧基基团。另一个示例修饰是2’-二甲基氨基氧乙氧基,即$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基团,如在以下实例中所描述的也称作2’-DMAOE,以及2’-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称作2’-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2’-DMAEOE),即2’-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$,也如在以下实例中所描述的。

[0421] 在其他实施例中,iRNA剂包括一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,或更多个)无环核苷酸(或核苷)。在某些实施例中,该有义链或该反义链或有义链和反义链二者,包括少于五个无环核苷酸/链(例如,四个、三个、两个或一个无环核苷酸/链)。该一个或多个无环核苷酸可以发现于,例如,iRNA剂的有义或反义链的,或两个链的双链区域中;有义或反义链的,或两个链的5’-端、3’-端、5’和3’-端二者处。在一个实施例中,一个或多个无环核苷酸存在于有义或反义链,或二者的位置1至8处。在一个实施例中,一个或多个无环核苷酸发现于反义链中,从反义链的5’-端的位置4至10(例如,位置6-8)处。在另一个实施例中,该一个或多个无环核苷酸发现于iRNA剂的一个或两个3’-末端突出端处。

[0422] 如在此使用的术语“无环核苷酸”或“无环核苷”是指具有无环糖,例如,无环核糖的任何核苷酸或核苷。示例性无环核苷酸或核苷可以包括核碱基,例如,天然发生的或修饰的核碱基(例如,如在此描述的核碱基)。在某些实施例中,在任何核糖碳(C1、C2、C3、C4、或C5)之间的键从该核苷酸是独立地或结合地不存在的。在一个实施例中,在核糖环的C2-C3碳之间的键是不存在的,例如,无环2’-3’-开环核苷酸单体。在其他实施例中,在C1-C2、C3-C4、或C4-C5之间的键是不存在的(例如,1’-2’、3’-4’或4’-5’开环核苷酸单体)。实例性无环核苷酸披露于US 8,314,227,通过引用以其全文结合在此。例如,无环核苷酸可以包括US 8,314,227的图1-2中的任何单体D-J。在一个实施例中,该无环核苷酸包括以下单体:

[0423] 

[0424] 其中碱基是核碱基，例如，天然发生的或修饰的核碱基(例如，如在此描述的核碱基)。

[0425] 在某些实施例中，可以将该无环核苷酸修饰或衍生化，例如，通过将无环核苷酸偶联至另一部分，例如，配体(例如，GalNAc、胆固醇配体)、烷基、多胺、糖、多肽等。

[0426] 在其他实施例中，该iRNA剂包括一个或多个无环核苷酸以及一个或多个LNA(例如，如在此描述的LNA)。例如，一个或多个无环核苷酸和/或一个或多个LNA可以存在于有义链、反义链、或二者中。在一条链中的无环核苷酸的数量可以是与相对链中的LNA的数量相同的或不同的。在某些实施例中，该有义链和/或反义链包括位于双链区域或3'-突出端中的少于五个的LNA(例如，四个、三个、两个或一个LNA)。在其他实施例中，一个或多个LNA位于双链区域或有义链的3'-突出端中。可替代地，或结合地，该有义链和/或反义链包括双链区域或3'-突出端中的少于五个的无环核苷酸(例如，四个、三个、两个或一个无环核苷酸)。在一个实施例中，该iRNA剂的有义链包括在iRNA剂中的有义链的3'-突出端中的一个或两个LNA，并且包括在反义链的双链区域中的一个或两个无环核苷酸(例如，从反义链的5'-端的位置4至10(例如，位置6-8)处)。

[0427] 在其他实施例中，在iRNA剂中包括一个或多个无环核苷酸(单独的或还有一个或多个LNA)导致以下各项中的一种或多种(或所有)：(i)脱靶效应的减少；(ii)RNAi中过客链参与减少；(iii)引导链针对其靶标mRNA的特异性增加；(iv)微小RNA脱靶效应的减少；(v)稳定性的增加；或(vi)iRNA分子对降解的抗性增加。

[0428] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-氨基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)以及2'-氟代(2'-F)。也可以在iRNA的RNA上的其他位置处作出相似的修饰，尤其在3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有糖模拟物，如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教授制备这类修饰的糖结构的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633；以及5,700,920，这些专利中的某些与本申请属于同一申请人，并且所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0429] iRNA还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰物或取代物。如在此所使用的，“非修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰核碱基包括但不局限于其他合成以及天然核碱基例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)，5-羟甲基胞嘧啶，黄嘌呤，次黄嘌呤，2-氨基腺嘌呤，腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基以及其他烷基衍生物，腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其他烷基衍生

物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶以及2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶以及胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶以及胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶以及胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤基,8-氨基,8-氢硫基,8-硫烷基,8-羟基以及其他8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤基尤其是5-溴,5-三氟甲基以及其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤,以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包括披露于美国专利号3,687,808中的那些;披露于生物化学中的修饰核苷(Modified Nucleosides in Biochemistry),生物技术与医药(Biotechnology and Medicine),海瑞德威景(Herdewijn)P.编著威立-VCH,2008中的那些;披露于聚合物科学与工程的简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering),第858-859页,克奥赤威兹(Kroschwitz)J.L编著约翰威立国际出版公司,1990中的那些;由英格力士(Englisch)等人,应用化学(Angewandte Chemie),国际版,1991,30,613披露的那些;以及由桑格威(Sanghvi)Y S.,第15章,dsRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications),第289-302页,克鲁克(Crooke)S.T.和黎布鲁(Lebleu)B.编著,CRC出版社,1993披露的那些。这些核碱基中的某些特别有用于提高在本发明中体现的低聚化合物的结合亲和力。这些碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮嘧啶以及N-2、N-6以及O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶以及5-丙炔基胞嘧啶。已经显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性增加0.6℃-1.2℃(桑格威Y.S.、克鲁克S.T.和黎布鲁B.编著,dsRNA研究与应用,CRC出版社,波卡拉顿(Boca Raton),1993,第276-278页)并且是示例性碱基取代,甚至更具体地当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0430] 教授制备以上经修饰的核碱基以及其他经修饰的核碱基中的某些的代表性美国专利包括但不限于上述的美国专利号3,687,808,连同美国专利号4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;以及7,495,088,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此,以及美国专利号5,750,692,也通过引用结合在此。

[0431] iRNA的RNA还可以修饰为包括一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、或更多个)锁核酸(LNA)(在此又称为“锁核苷酸”)。在一个实施例中,锁核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸,其中该核糖部分包括连接,例如,2'碳和4'碳的额外的桥。这个结构有效地将该核糖“锁”在3'-内切结构构象中。向siRNA添加锁核酸已经显示增加血清中的siRNA稳定性,增加热稳定性并且减少脱靶效应(埃尔曼(Elmen,J.)等人,(2005)核酸研究(Nucleic Acids Research)33(1):439-447;莫克(Mook,OR.)等人,(2007)分子癌症治疗(Mol Canc Ther)6(3):833-843;谷万尔(Grunweller,A.)等人,(2003)核酸研究(Nucleic Acids Research)31(12):3185-3193)。

[0432] 教授制备锁核酸核苷酸的代表性美国专利包括但不限于以下:美国专利号6,268,490;6,670,461;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,084,125;7,399,845;以及8,314,227,所述文献的每一篇通过引用以其全文结合在此。示例性LNA包括但不限于2',4'-C亚甲基二环核苷酸(参见例如文格尔(Wengel)等人,国际PCT公开号WO 00/66604和WO 99/14226)。

[0433] 在其他实施例中，iRNA剂包括一个或多个(例如，约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10，或更多个)G-形钳核苷酸。G-形钳核苷酸是一种修饰的胞嘧啶类似物，其中该修饰赋予氢键在双链体内的互补鸟嘌呤的沃森-克里克和霍氏面的能力，参见，例如，林(Lin)和马泰乌奇(Matteucci)，1998，美国化学协会期刊(J.Am.Chem.Soc.)，120，8531-8532。在寡核苷酸中的单G-形钳类似物取代可以导致(当与互补的寡核苷酸杂交时)大幅提升的螺旋热稳定性和错配识别。iRNA分子中包括这种核苷酸可以导致提升的核酸靶标、互补序列、或模板链的亲和力和特异性。

[0434] 对RNA分子的末端的潜在的稳定化修饰可包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-NHAC)、N-(己酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-NHAC)、胸苷-2'-0-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-氨基)、2-二十二醇基(docosanoyl)-尿苷-3"-磷酸酯、反向dT(idT)及其他。这种修饰的披露可以在PCT公开号WO 2011/005861中找到。

[0435] <u>iRNA基序</u>

[0436] 在一个实施例中，有义链序列可以由式(I)表示：

[0437] 5' n_p-N_a-(XXX)$_i$-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)$_j$-N_a-n_q3' (I)

[0438] 其中：

[0439] i和j各自独立地是0或1；

[0440] p和q各自独立地是0-6；

[0441] 各N_a独立地表示包括0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸；

[0442] 各N_b独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0443] 各n_p和n_q独立地表示突出核苷酸；

[0444] 其中Nb和Y不具有相同修饰；并且

[0445] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。优选地YYY全是2'-F修饰的核苷酸。

[0446] 在一个实施例中，N_a和/或N_b包含具有交替模式的修饰。

[0447] 在一个实施例中，该YYY基序出现在该有义链的切割位点处或附近。例如，当该RNAi剂具有长度是17-23个核苷酸的一个双链体区时，该YYY基序可以出现在有义链的切割位点处或附近(例如：可以出现在位置6、7、8；7、8、9；8、9、10；9、10、11；10、11、12或11、12、13处)，计数从5'-端起从第一个核苷酸开始；或任选地，计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。

[0448] 在一个实施例中，i是1且j是0，或i是0且j是1，或i和j两者都是1。该有义链因此可以由以下式表示:

[0449] 5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3' (Ib)；

[0450] 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q3' (Ic)；或

[0451] 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3' (Id)。

[0452] 当该有义链由式(Ib)表示时，N_b表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各N_a可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0453] 当该有义链表示为式(Ic)时，N_b表示一个寡核苷酸序列，包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a可独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0454] 当该有义链表示为式(Id)时，每个N_b独立地表示一个寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。优选地，N_b是0、1、2、3、4、5或6。各N_a可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0455] X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。

[0456] 在其他实施例中，i是0并且j是0，并且该有义链可以由下式表示：

[0457] 5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q3' (Ia)。

[0458] 当该有义链由式(Ia)表示时，每个N_a独立地可以表示寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸。

[0459] 在一个实施例中，该RNAi的反义链序列可以由式(II)表示：

[0460] 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)

[0461] 其中：

[0462] k和l各自独立地是0或1；

[0463] p'和q'各自独立地是0-6；

[0464] 每个N_a'独立地表示包括0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

[0465] 每个N_b'独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0466] 每个n_p'和n_q'独立地表示突出核苷酸；

[0467] 其中N_b'和Y'不具有相同的修饰；

[0468] 并且

[0469] X'X'X'、Y'Y'Y'以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0470] 在一个实施例中，N_a'和/或N_b'包含具有交替模式的修饰。

[0471] Y'Y'Y'基序出现在该反义链的切割位点处或其附近。例如，当该RNAi剂具有长度是17-23个核苷酸的双链体区时，该Y'Y'Y'基序可以出现在有义链的位置9、位置10、位置11；位置10、位置11、位置12；位置11、位置12、位置13；位置12、位置13、位置14；或位置13、位置14、位置15处，计数从5'-端起从第一个核苷酸开始；或任选地，计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。优选地，该Y'Y'Y'基序出现在位置11、12、13处。

[0472] 在一个实施例中，Y'Y'Y'基序全是2'-OMe修饰的核苷酸。

[0473] 在一个实施例中，k是1且l是0，或k是0且l是1，或k和l两者都是1。

[0474] 该反义链因此可以由以下式表示：

[0475] 5'$n_{q'}$-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-$n_{p'}$3' (IIb)；

[0476] 5'$n_{q'}$-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-$n_{p'}$3' (IIc)；或

[0477] 5'$n_{q'}$-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-$n_{p'}$3' (IId)。

[0478] 当该反义链是由式(IIb)表示时，N_b'表示一个寡核苷酸序列，包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a'独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0479] 当该反义链表示为式(IIc)时，N_b'表示一个寡核苷酸序列，包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a'独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0480] 当该反义链表示为式(IId)时，每个N_b'独立地表示一个寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a'独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地，N_b是0、1、2、3、4、5或6。

[0481] 在其他实施例中，k是0且l是0，并且该反义链可以由下式表示：

[0482] 5'$n_{p'}$-$N_{a'}$-Y'Y'Y'-$N_{a'}$-$n_{q'}$3' (Ia)。

[0483] 当该反义链表示为式(IIa)时，各N_a'独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0484] X'、Y'和Z'各自可以是彼此相同的或不同的。

[0485] 该有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地由以下各项修饰：LNA、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'-氟代。例如，该有义链和反义链的每个核苷酸独立地由2'-O-甲基或2'-氟代修饰。具体地说，各X、Y、Z、X'、Y'以及Z'可以表示2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。

[0486] 在一个实施例中，该RNAi剂的有义链可以含有YYY基序，当双链体区是21个核苷酸时，该YYY基序出现在该链的9、10和11位置处，计数从5'-端起从第一个核苷酸开始，或任选地，计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始；并且Y表示2'-F修饰。该有义链可以另外包含在双链体区的相反端作为翼修饰的XXX基序或ZZZ基序；并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0487] 在一个实施例中，该反义链可以含有出现在该链的位置11、12和13处的Y′Y′Y′基序，计数从5'-端起从第一个核苷酸开始，或任选地，计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始；并且Y'表示2'-O-甲基修饰。该有义链可以另外含有在双链体区的相反端作为翼修饰的XXX基序或ZZZ基序；并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0488] 由上式(Ia)、(Ib)、(Ic)以及(Id)中任一项表示的有义链分别与由式(IIa)、(IIb)、(IIc)以及(IId)中任一项表示的反义链形成了一个双链体。

[0489] 因此，用于本发明的这些方法中的RNAi剂可以包含一条有义链和一条反义链，每条链具有14至30个核苷酸，该RNAi双链体由式(III)表示：

[0490] 有义：5'n_p-N_a-(XXX)$_i$-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)$_j$-N_a-n_q3'

[0491] 反义：3'n_p'-N_a'-(X'X′X′)$_k$-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'-(Z′Z′Z′)$_l$-N_a'-n_q'5'

[0492] (III)

[0493] 其中：

[0494] i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

[0495] p、p'、q以及q'各自独立地是0-6；

[0496] 各N_a和N_a'独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

[0497] 各N_b和N_b'独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0498] 其中

[0499] 各n_p、$n_{p'}$、nq以及n_q'，其中每个可以是存在的或可以是不存在的，独立地表示突出核苷酸；并且

[0500] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0501] 在一个实施例中，i是0并且j是0；或i是1并且j是0；或i是0并且j是1；或i和j两者均是0；或i和j两者均是1。在另一个实施例中，k是0并且l是0；或k是1并且l是0；k是0并且l是1；或k和l两者均是0；或k和l两者均是1。

[0502] 形成RNAi双链体的该有义链和反义链的示例性组合包括下式：

[0503] 5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q3'

[0504] 3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'n_q'5'

[0505] (IIIa)

[0506] 5'n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'

[0507] 3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'n_q'5'

[0508] (IIIb)

[0509] 5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q3'

[0510] 3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'

[0511] (IIIc)

[0512] 5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'

[0513] 3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a-n_q'5'

[0514] (IIId)

[0515] 当该RNAi剂由式(IIIa)表示时，各N_a独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0516] 当该RNAi剂由式(IIIb)表示时，各N_b独立地表示包含1-10个、1-7个、1-5个或1-4个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各N_a独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0517] 当该RNAi剂表示为式(IIIc)时，每个Nb、Nb'独立地表示寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0518] 当该RNAi剂表示为式(IIId)时，每个Nb、Nb'独立地表示寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个N_a、N_a'独立地表示包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。N_a、N_a'、N_b和N_b'各自独立地包括交替模式的修饰。

[0519] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中的X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。

[0520] 当该RNAi剂由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)以及(IIId)表示时，这些Y核苷酸中的至少一个可以与这些Y'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地，这些Y核苷酸中的至少两个与相应的Y'核苷酸形成碱基对；或这些Y核苷酸中的全部三个都与相应的Y'核苷酸形成碱基对。

[0521] 当该RNAi剂由式(IIIb)或(IIId)表示时，这些Z核苷酸中的至少一个可以与这些

Z’核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地，这些Z核苷酸中的至少两个与相应的Z’核苷酸形成碱基对；或这些Z核苷酸中的全部三个都与相应的Z’核苷酸形成碱基对。

[0522] 当该RNAi剂表示为式(IIIc)或(IIId)时，这些X核苷酸中的至少一个可以与这些X’核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地，这些X核苷酸中的至少两个与相应的X’核苷酸形成碱基对；或这些X核苷酸中的全部三个都与相应的X’核苷酸形成碱基对。

[0523] 在一个实施例中，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。

[0524] 在一个实施例中，当该RNAi剂由式(IIId)表示时，N_a修饰是2′-O-甲基或2′-氟代修饰。在另一个实施例中，当该RNAi剂由式(IIId)表示时，Na修饰是2′-O-甲基或2′-氟代修饰且n_p′>0并且至少一个n_p′经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上。在又另一个实施例中，当该RNAi剂由式(IIId)表示时，Na修饰是2′-O-甲基或2′-氟代修饰，n_p′>0并且至少一个n_p′经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上，并且有义链共轭到通过一个二价或三价分支接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。在另一个实施例中，当该RNAi剂由式(IIId)表示时，Na修饰是2′-O-甲基或2′-氟代修饰，n_p′>0并且至少一个n_p′经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0525] 在另一个实施例中，当该RNAi剂由式(IIIa)表示时，N_a修饰是2′-O-甲基或2′-氟代修饰，n_p′>0并且至少一个n_p′经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0526] 在一个实施例中，该RNAi剂是一种多聚体，该多聚体含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体，其中这些双链体通过一种接头来连接。该接头可以是可切割的或不可切割的。任选地，该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些双链体中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0527] 在一个实施例中，该RNAi剂是一种多聚体，该多聚体含有由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的三个、四个、五个、六个或更多个双链体。该接头可以是可切割的或不可切割的。任选地，该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些双链体中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0528] 在一个实施例中，由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的两种RNAi剂在5’端和这些3’端中的一个或两个处彼此连接，并且任选地共轭到一个配体上。这些试剂中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些试剂中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0529] <u>iRNA共轭物</u>

[0530] 在此披露的iRNA剂能处于共轭物的形式。该共轭物可以在iRNA分子的任何适合的位置处附接，例如，在该有义或反义链的3’末端或5’末端处。该共轭物可任选地经由接头附接。

[0531] 在一些实施例中，在此所述的iRNA剂化学地连接至一个或多个配体、部分或共轭

物,这可能赋予功能性,例如,通过影响(例如,增强)iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取。此类部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分(乐欣格(Letsinger)等人,美国科学院院刊(Proc.Natl.Acid.Sci.USA),1989,86:6553-6556),胆酸(马诺汗(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学快报(Biorg.Med.Chem.Let.),1994,4:1053-1060),硫醚如beryl-S-三苯甲基硫醇(马诺汗(Manoharan)等人,纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.),1992,660:306-309;马诺汗(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学快报(Biorg.Med.Chem.Let.),1993,3:2765-2770),硫代胆固醇(奥博汗瑟(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1992,20:533-538),脂肪链如十二烷基二醇或十一烷基残基(赛森-博和马拉(Saison-Behmoaras)等人,EMBO杂志,1991,10:1111-1118;卡波诺(Kabanov)等人,FEBS通讯,1990,259:327-330;斯伍那区克(Svinarchuk)等人,生物化学(Biochimie),1993,75:49-54),磷脂如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(马诺汗(Manoharan)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654;舍阿(Shea)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1990,18:3777-3783),聚胺或聚乙烯乙二醇链(马诺汗(Manoharan)等人,核苷&核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969-973)或金刚烷乙酸(马诺汗(Manoharan)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654),十六烷基部分(米莎(Mishra)等人,生物化学与生物物理学学报(Biochim.Biophys.Acta),1995,1264:229-237),或十八胺或己胺-羰基羟胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923-937)。

[0532] 在一个实施例中,配体改变向其中并入该配体的iRNA试剂的分布、靶向或寿命。在一些实施例中,与例如不存在这样一种配体的种类相比,该配体提供针对所选靶标(例如,分子、细胞或细胞类型、区室(例如,细胞或器官区室、身体组织、器官或区域)的增强的亲和力)。典型的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0533] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、茁霉多糖、壳多糖、壳聚糖、菊糖、环糊精或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组或合成分子,如合成聚合物,例如,合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括作为一种聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-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)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪的聚氨基酸。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、聚胺肽、树枝状聚合物的聚胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐、或α螺旋肽。

[0534] 配体也可以包括靶向基团,例如,与指定的细胞类型如肾细胞结合的细胞或组织靶向剂,例如,凝集素,糖蛋白,脂质或蛋白质,例如,抗体。靶向基团可以是促甲状腺激素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白质A、黏蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0535] 在一些实施例中,该配体是包括一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物的

GalNAc配体。GalNAc配体的另外的描述提供于标题为碳水化合物共轭物的节段。

[0536] 配体的其他例子包括染料、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多环芳烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子,例如,胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、鲸蜡基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰)石胆酸、O3-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁嗪肽共轭物(例如,触角足肽、Tat肽)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标记物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑聚类、吖啶-咪唑共轭物、四氮杂大环类的Eu3+络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0537] 配体可以是蛋白质,例如,糖蛋白,或肽,例如,对辅助配体具有特异亲和力的分子,或抗体,例如,与指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体也可以包括激素和激素受体。它们也可以包括非肽种类,如脂质、凝集素、糖类、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。该配体可以是例如脂多糖,p38MAP激酶的活化剂或NF-κB的活化剂。

[0538] 配体可以是可以例如通过破坏细胞骨架(例如,通过破坏细胞微管、微丝和/或中间丝)增加iRNA剂摄入细胞中的物质,例如,药物。药物可以例如是泰素(taxon)、长春新碱、长春碱、松胞菌素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵素A、鬼笔环肽、海洋苔藓素(swinholide)A、茚满诺星(indanocine)或myoservin。

[0539] 在一些实施例中,附接到如在此所描述的iRNA上的一个配体用作药物代谢动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括,但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等。包含许多硫代磷酸酯键联的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合,因此骨架中包含多个硫代磷酸酯键联的短寡核苷酸,例如具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,也服从于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。此外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适配体也适合用作在此所述的这些实施例中的PK调节配体。

[0540] 本发明的配体-共轭的寡核苷酸可以通过使用这样一种寡核苷酸来合成,该寡核苷酸具有下垂的反应功能性,例如来源于该寡核苷酸上的连接分子的附接(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体,合成的、具有多种保护基中的任一种的配体,或具有连接部分附接于其上的配体发生反应。

[0541] 在本发明的共轭物中使用的寡核苷酸可以方便且常规地通过固相合成的熟知技术来制备。用于这类合成的设备由多个供应商(包括例如应用生物系统公司(Applied Biosystems)(福斯特市,加利福尼亚州))销售。可另外地或替代地使用本领域中已知的用于这类合成的任何其他装置。使用相似的技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化衍生物)也是已知的。

[0542] 在本发明的配体-共轭的寡核苷酸以及具有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,该寡核苷酸以及寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体,或已经具有连接部分的核苷

酸或核苷共轭物前体,已经具有配体分子的配体-核苷酸或核苷共轭物前体,或带有结构基元的非核苷配体,在适合的DNA合成仪上进行组装。

[0543] 当使用已经具有连接部分的核苷酸-共轭物前体时,典型地完成该序列特异性连接的核苷的合成,并且然后该配体分子与该连接部分反应以形成配体共轭的寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过一种自动合成仪合成,除了可商购以及寡核苷酸合成中常规使用的标准亚磷酰胺以及非标准亚磷酰胺之外,该合成还使用衍生自配体-核苷共轭物的亚磷酰胺。

[0544] 脂质共轭物

[0545] 在一个实施例中,该配体是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子可以典型地结合血清蛋白,例如,人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许共轭物分布至靶组织,例如,身体的非肾靶组织。例如,该靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可以用作配体。例如,可以使用蘗警生(neproxin)或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加共轭物对降解的抵抗力,(b)增加靶向或转运至靶标细胞或细胞膜中,和/或(c)可以用来调节与血清蛋白(例如,HSA)的结合。

[0546] 基于脂质的配体可以用来调制,例如,控制(如,抑制)共轭物与靶组织的结合。例如,与HSA更强烈结合的脂质或基于脂质的配体将更不可能靶向肾并且因此较不可能从身体清除。与HSA较不强烈结合的脂质或基于脂质的配体可以用来使共轭物靶向肾。

[0547] 在一个实施例中,基于脂质的配体结合HSA。例如,该配体以足够的亲和力结合HSA,从而共轭物向分布至非肾组织的分布增强。然而,典型地是这种亲和力并不是这样强,从而HSA-配体结合不能逆转。

[0548] 在另一个实施例中,基于脂质的配体微弱或根本不结合HSA,从而共轭物向肾的分布增强。作为基于脂质的配体的替代或除它之外,也可以使用靶向肾细胞的其他部分。

[0549] 在另一个方面,配体是由靶标细胞(例如,正在增殖的细胞)摄取的部分,例如,维生素。这些特别可用于治疗以不希望的细胞(例如,恶性或非恶性型,例如,癌细胞)增殖为特征的病症。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括是B维生素,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或由癌细胞摄取的其他维生素或养分。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0550] 细胞渗透剂

[0551] 在另一个方面,配体是细胞渗透剂,如螺旋形细胞渗透剂。在一个实施例中,该药剂是两亲的。一种示例性剂渗透剂是肽如tat或触角足蛋白。如果该试剂是肽,则它可以被修饰,包括肽酰基模拟物、反转异构体、非肽键联或假肽键联和D-氨基酸的使用。该螺旋剂典型地是α-螺旋剂,并且可以具有亲脂性和疏脂性相。

[0552] 该配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称作寡肽模拟物)是能够折叠成与天然肽相似的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA剂的附接可以影响iRNA的药物代谢动力学分布,如通过增强细胞鉴别与吸收。肽或肽模拟物部分可以是约5-50氨基酸长的,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0553] 肽或肽模拟物可以例如是细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。在另一个替代中,该肽部分可以包含疏水性膜转位序列(MTS)。一种含有疏水性MTS的示例性肽是具有氨基酸序列

AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:3367)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:3368))也可以是靶向部分。该肽部分可以是一个"递送"肽,其可携带大的极性分子,包括肽、寡核苷酸、和跨细胞膜的蛋白。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:3369))和果蝇触角足蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:3370))的序列能够作为递送肽发挥作用。肽或肽模拟物可以通过DNA的随机序列来编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(拉姆(Lam)等人,自然,354:82-84,1991)。典型地,经由一个合并的单体单元留至dsRNA剂的肽或肽模拟物是细胞靶向肽,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽或RGD模拟物。肽部分可以在长度上范围从约5个氨基酸至约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰,如以便增加稳定性或指导构象特性。可以利用以下描述的结构修饰中的任一个。

[0554] 用于本发明的这些组合物和方法中的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化以促进靶向一个或多个特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD之外,可使用靶向整合素配体的其他部分。该配体的优选共轭物靶向PECAM-1或VEGF。

[0555] RGD肽部分可以用来靶向特定细胞类型,例如,肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳腺癌肿瘤细胞(扎特曼(Zitzmann)等人,癌症研究(Cancer Res.),62:5139-43,2002)。RGD肽可以促进dsRNA剂靶向多种其他组织(包括肺、脾或肝脏)的肿瘤(青木(Aoki)等人,癌症基因疗法(Cancer Gene Therapy)8:783-787,2001)。典型地,RGD肽将促进iRNA剂靶向肾。该RGD肽可以是线性的或环状的,并且可以被修饰(例如糖基化或甲基化)以促进靶向特定组织。例如,糖基化的RGD肽可以递送iRNA剂至表达$\alpha_V\beta_3$的肿瘤细胞(华博纳(Haubner)等人,核医学(Jour.Nucl.Med.),42:326-336,2001)。

[0556] "细胞渗透肽"能够渗透细胞例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以是,例如,α-螺旋形线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1),含有二硫键的肽(例如,α-防御素、β-防御素或牛抗菌肽),或仅含一个或两个支配性氨基酸的肽(例如,PR-39或indolicidin)。细胞渗透肽还可以包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二重的两亲性肽,如MPG,该肽来源于HIV-1gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(斯米尼(Simeoni)等人,核酸研究,31:2717-2724,2003)。

[0557] <u>碳水化合物共轭物</u>

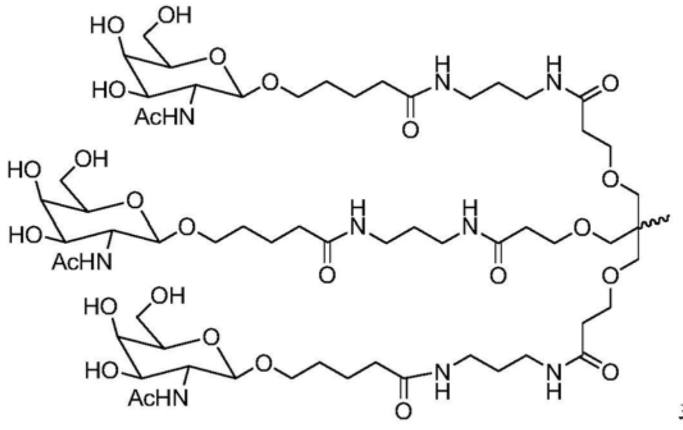
[0558] 在本发明的组合物与方法的一些实施例中,iRNA寡核苷酸进一步包括一种碳水化合物。碳水化合物共轭的iRNA对于核酸的体内递送以及适合于体内治疗用途的组合物而言是有利的,如在此所描述。如在此所使用,"碳水化合物"是指作为本身由具有至少6个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子的一个或多个单糖单元组成的碳水化合物的化合物;或具有由一个或多个单糖单元组成的碳水化合物部分的一部分的化合物,每个单糖具有至少六个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子。代表性的碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖以及含有从约4、5、6、7、8或9个单糖单元的寡糖),以及多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。具体的单糖包括C5以及以上的(例如C5、C6、C7或C8)糖;二糖以及三糖包括具有两个或三个单糖单位的糖(例如C5、C6、C7或C8)。

[0559] 在一个实施例中,碳水化合物共轭物包括单糖。在一个实施例中,该单糖是一种N-

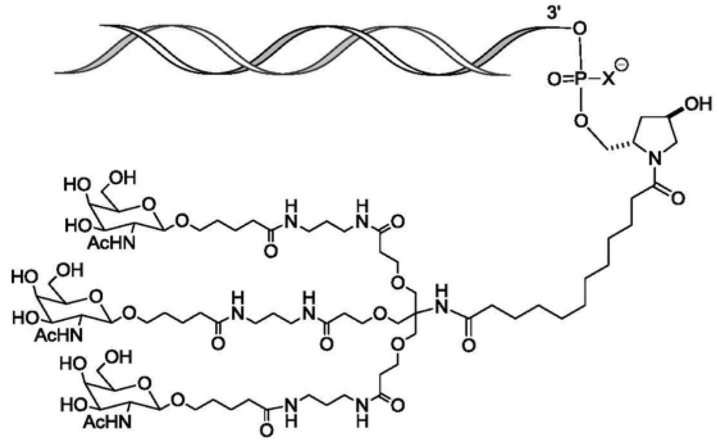
乙酰半乳糖胺(GalNAc)。GalNAc共轭物描述于,例如,美国专利号8,106,022,通过引用将其全部内容结合在此。在一些实施例中,GalNAc共轭物用作将iRNA靶向特定细胞的配体。在一些实施例中,GalNAc共轭物将iRNA靶向肝脏细胞,例如,通过用作针对肝脏细胞(例如,肝实质细胞)的脱唾液酸糖蛋白受体的一种配体。

[0560] 在一些实施例中,碳水化合物共轭物包括一个或多个GalNAc衍生物。GalNAc衍生物可以经由接头附接,例如,二价或三价分支接头。在一些实施例中,GalNAc共轭物共轭至有义链的3'末端。在一些实施例中,GalNAc共轭物经由接头(例如,在此所述的接头)共轭至iRNA剂(例如,有义链的3'末端)。

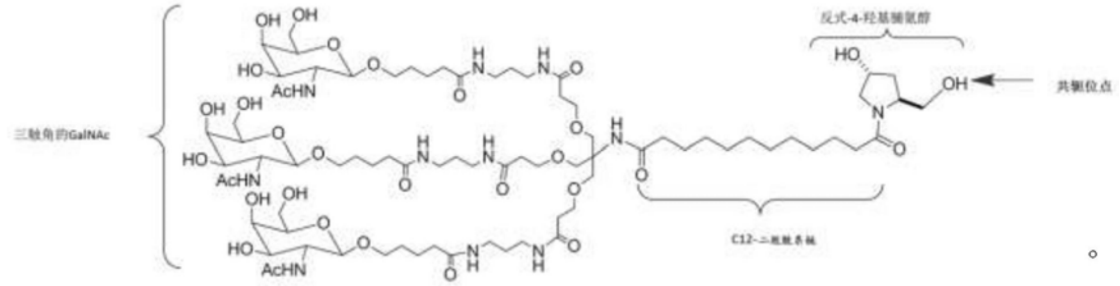
[0561] 在一些实施例中,该GalNAc共轭物是

[0562] 
式 II。

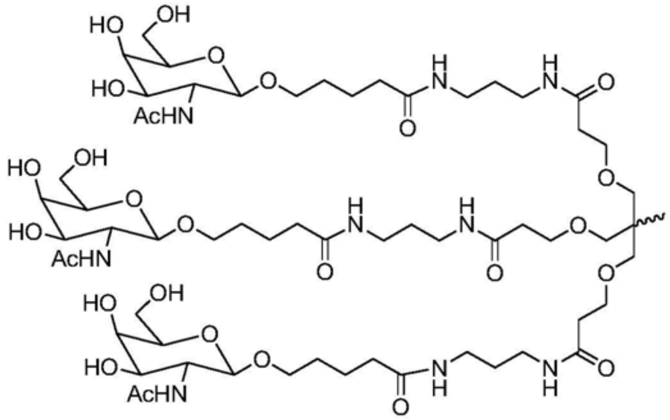
[0563] 在一些实施例中,RNAi剂经由接头附接至碳水化合物共轭物,例如,如以下方案中示出的接头,其中X是O或S

[0564] 

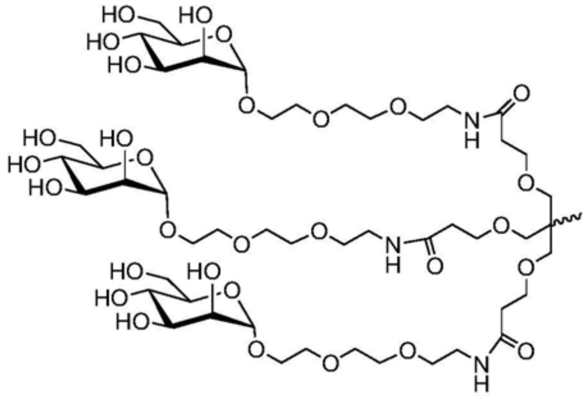
[0565] 在一些实施例中,RNAi剂共轭至如表1中定义且如下示出的L96

[0566] 
。

[0567] 在一些实施例中,用于在本发明的组合物以及方法中使用的碳水化合物共轭物是选自下组,该组由以下各项组成:

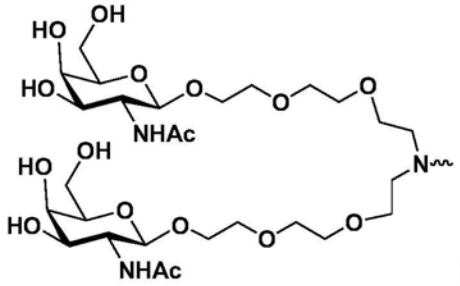


式II,

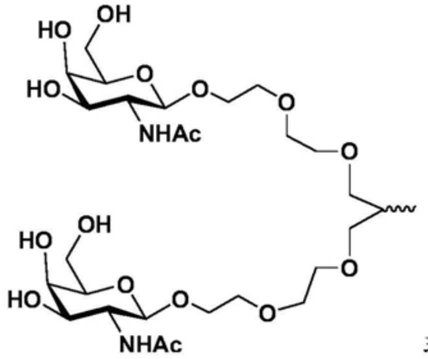


式III,

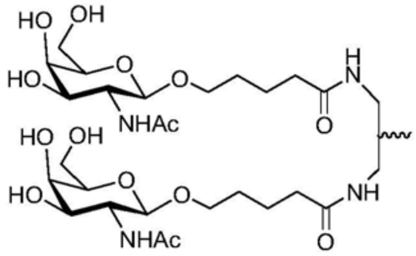
[0568]



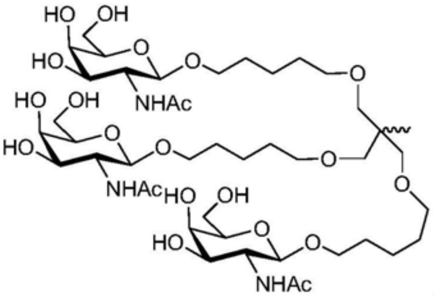
式IV,



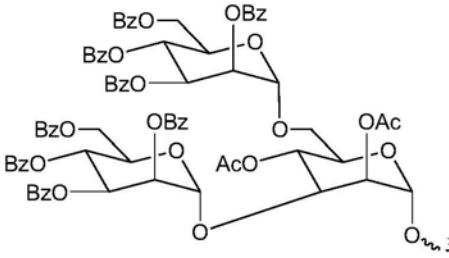
式V,



式VI,

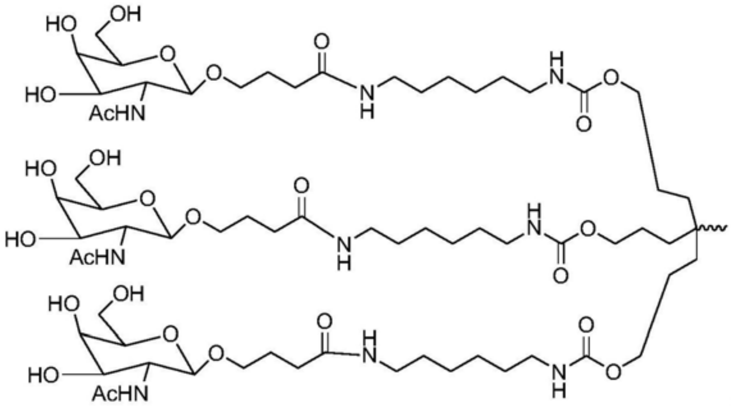


式 VII,

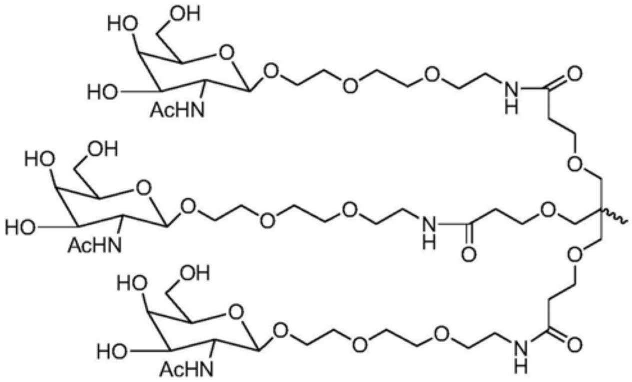


式 VIII,

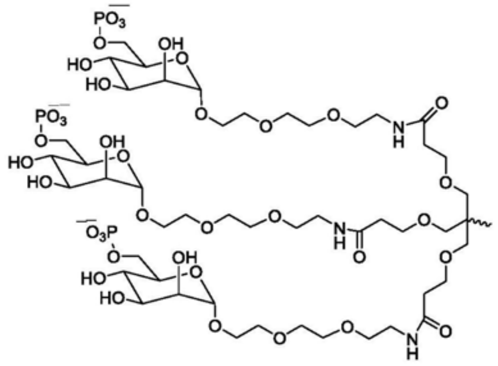
[0569]



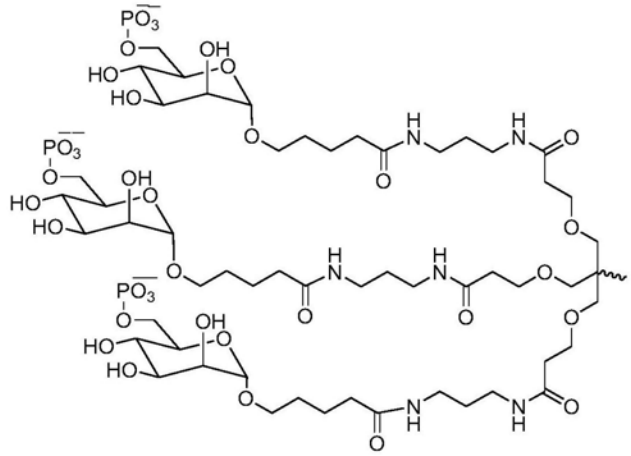
式 IX,

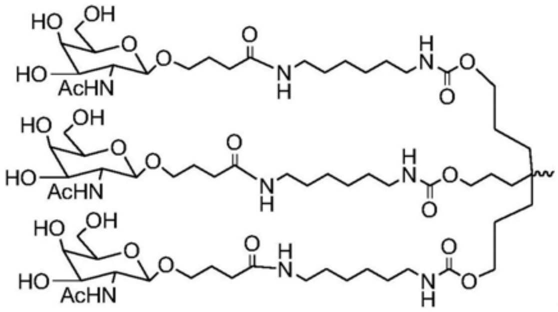


式 X,

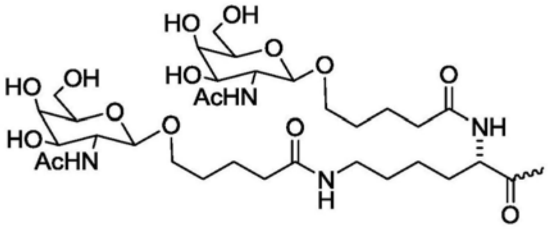


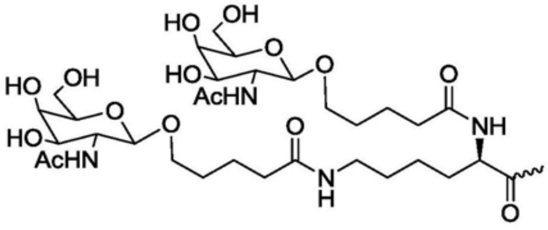
式 XI,

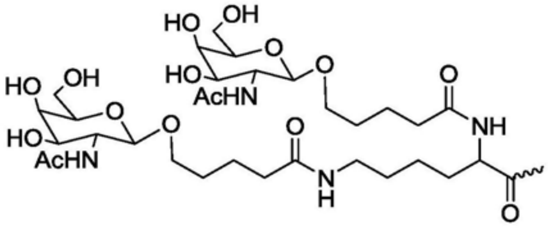

式XII，

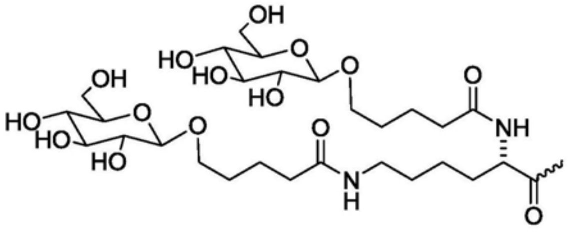

式XIII，

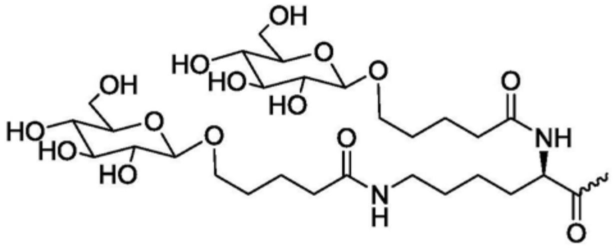
[0570]

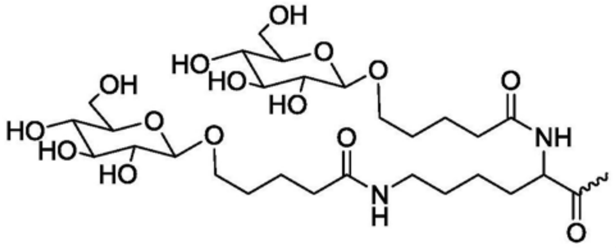

式XIV，

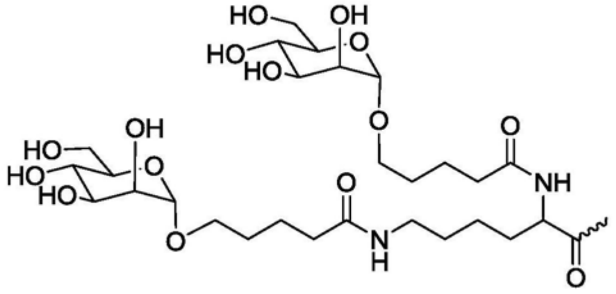

式XV，

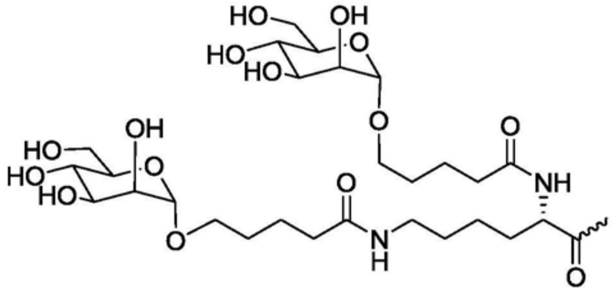

式XVI，

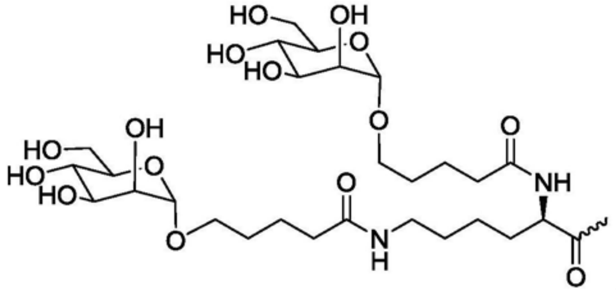

式XVII，


式 XVIII，

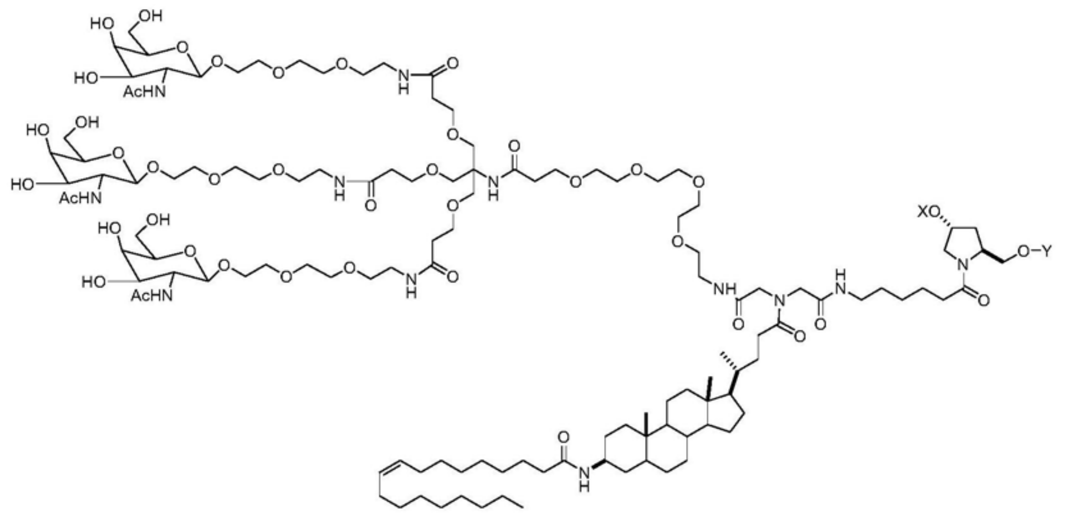

式 XIX，

[0571] 
式 XX，


式 XXI，


式 XXII。

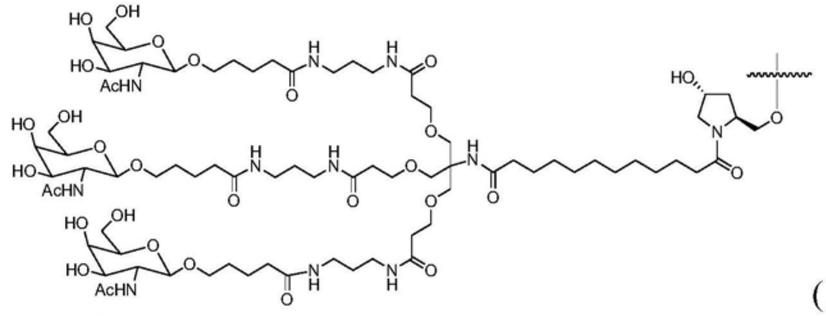
[0572] 用于在于此描述的实施例中使用的另一个代表性碳水化合物共轭物包括但不限于，

[0573] 

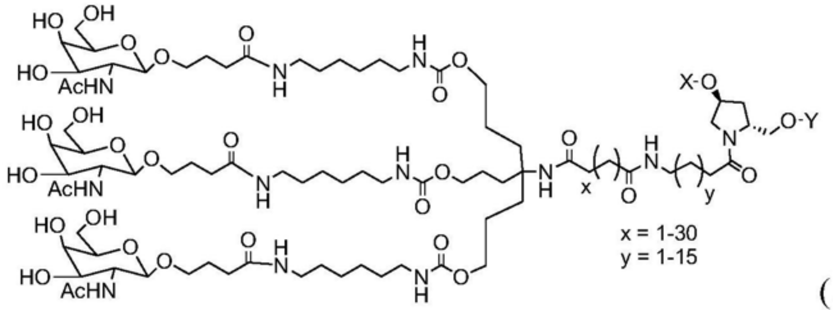
[0574] (式XXIII),当X或Y其中一者是寡核苷酸时,另一者是氢。

[0575] 在一些实施例中,该碳水化合物共轭物进一步包含如上所描述的一个或多个另外的配体,如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

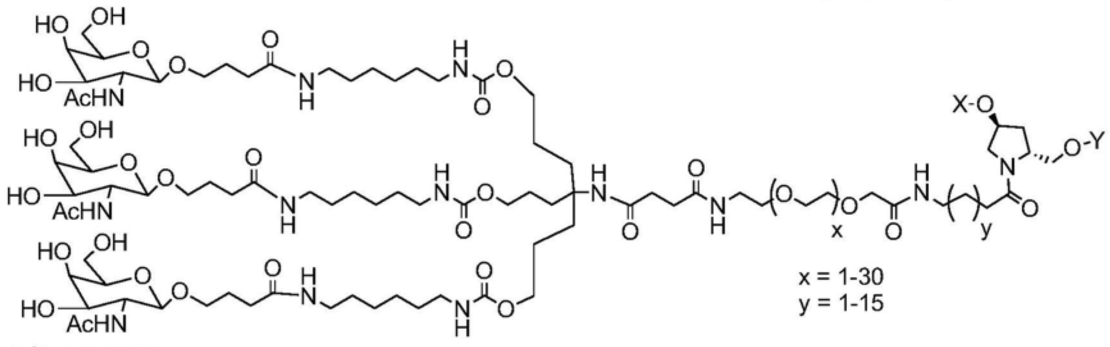
[0576] 在一个实施例中,本发明的iRNA通过接头被共轭至碳水化合物。本发明的这些组合物和方法的具有接头的iRNA碳水化合物共轭物的非限制性实例包括但不限于,



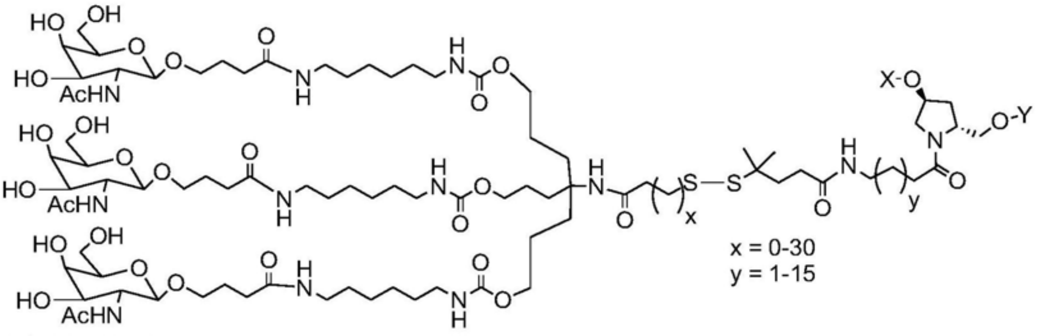
(式XXIV)、

[0577] 

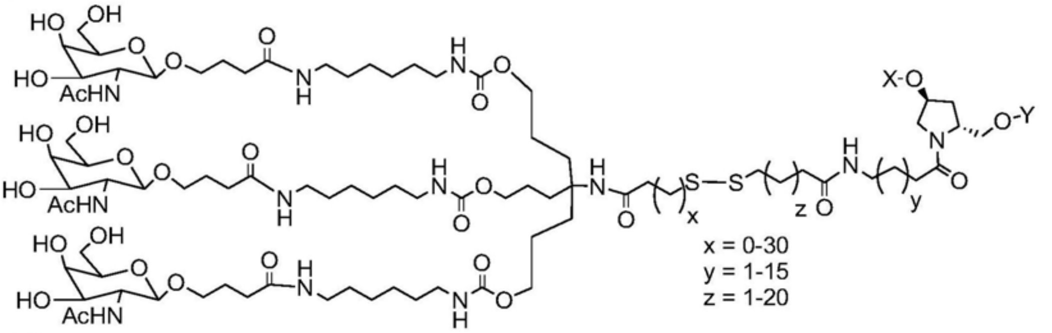
(式XXV)、



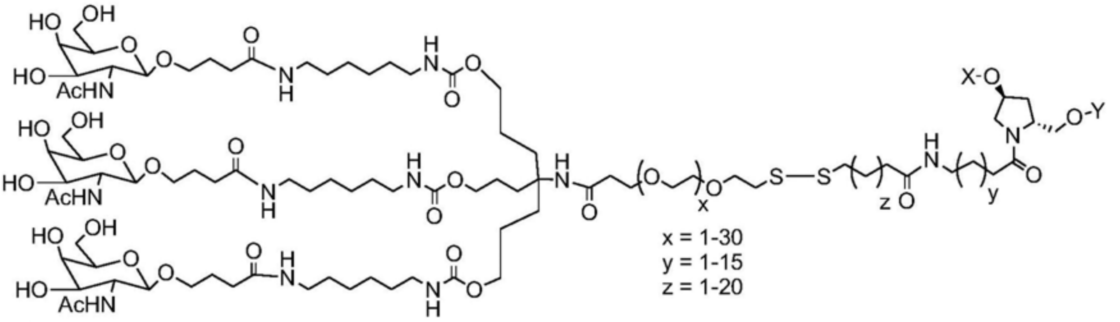
(式XXVI)、



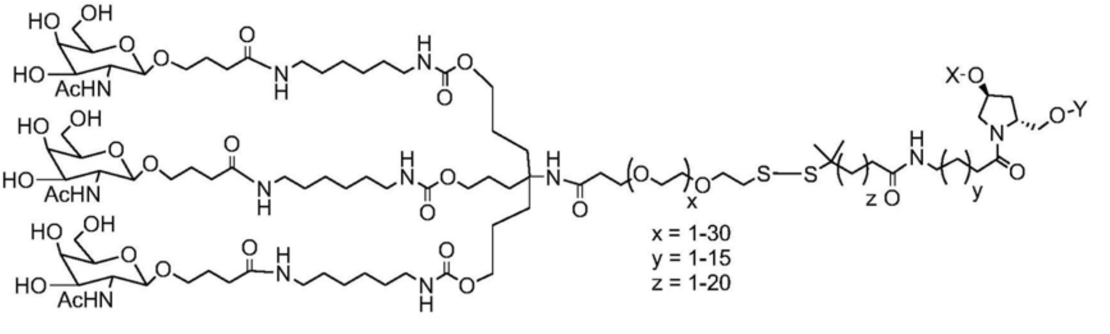
(式XXVII)、



[0578] (式XXVIII)、



(式XXIX)、和



[0579] (式XXX)，当X或Y其中一者是寡核苷酸时，另一者是氢。

[0580] 接头

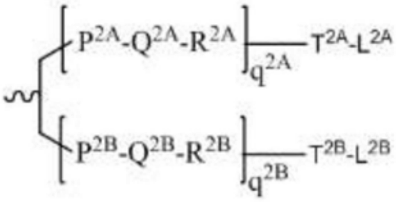
[0581] 在一些实施例中，在此描述的该共轭物或配体可以借助不同接头附接到iRNA寡核苷酸上，这些接头可以是可切割的或不可切割的。

[0582] 术语“接头”或“连接基团”意为一种有机部分，它连接一个化合物的两个部分，例如共价地附接一个化合物的两个部分。接头典型地包括一种直接的键或一种原子例如氧或硫，一种单位例如NR8、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH或者一种原子链，例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、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、

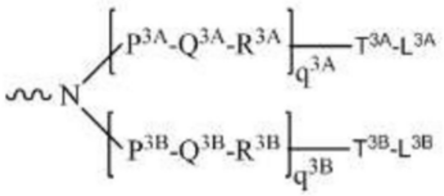
杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、烷基杂环烯基、烷基杂环炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烯基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基，其中一个或多个亚甲基可以被以下中断或封端：O、S、S(O)、SO_2、N(R8)、C(O)、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的杂环基；其中R8是氢、酰基、脂肪族的或经取代的脂肪族的。在一个实施例中，该接头是在约1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子、7-17、8-17、6-16、7-16或8-16个原子之间。

[0583] 在一个实施例中，本发明的dsRNA被共轭到选自下组的一种二价或三价分支接头上，该组具有以任何式(XXXI)-(XXXIV)示出的结构：

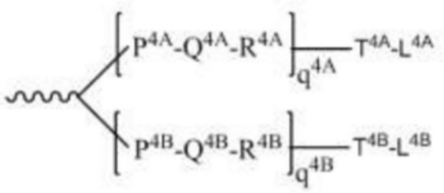
式 XXXI



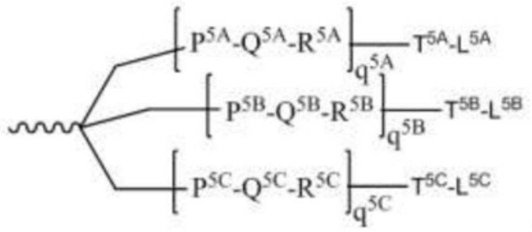
式 XXXII



[0584] ，，



，或



；

式 XXXIII 式 XXXIV

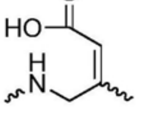
[0585] 其中：

[0586] q2A、q2B、q3A、q3B、q4A、q4B、q5A、q5B以及q5C对于每次出现独立地表示0-20并且其中该重复单元可以是相同或不同的；

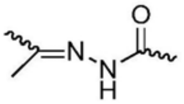
[0587] P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}对于每次出现各自独立地是：不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH_2、CH_2NH或CH_2O；

[0588] Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}对于每次出现独立地是：不存在、亚烷基、取代的亚烷基，其中一个或多个亚甲基可以被以下各项中的一个或多个中断或封端：O、S、S(O)、SO_2、N(R^N)、C(R')＝C(R")、C≡C或C(O)；

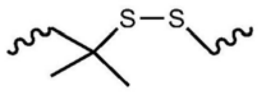
[0589] R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}对于每次出现各自独立地是：不存在、NH、O、S、CH_2、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH＝N-O、



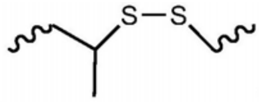
、



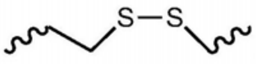
、



、



、

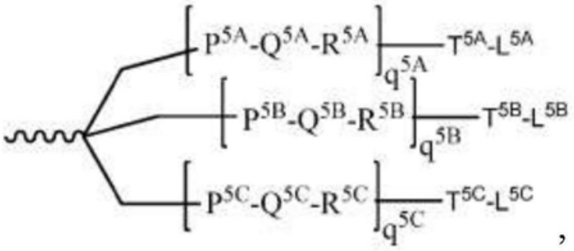


或杂环基；

[0590] L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}以及L^{5C}表示配体；即对于每次出现各自独立地表示单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖；并且R^a是H或氨基酸侧链。三价共轭的GalNAc衍生物特别有用于与RNAi剂一起使用以用于抑制靶基因的表达，如具有式(XXXV)的那些：

[0591] 式XXXV

[0592]



[0593] 其中L^{5A}、L^{5B}和L^{5C}表示单糖，如GalNAc衍生物。

[0594] 合适的二价与三价分支接头基团共轭GalNAc衍生物的实例包括但不限于在以上引用为式II、VII、XI、X以及XIII的结构。

[0595] 一种可切割的连接基团在细胞外是足够稳定的，但它在进入靶标细胞时被切割以释放该接头结合在一起的两个部分。在一个优选的实施例中，该可切割的连接基团在靶标细胞中或在一个第一参考条件(其可以例如被选择为模拟或代表细胞内条件)下的切割比在受试者的血液中或在一个第二参考条件下(其可以例如被选择为模拟或代表在该血液或血清中发现的条件)快至少大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多，或至少大约100倍。

[0596] 可切割的连接基团易于受到切割因子(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)的影响。一般地，切割因子在细胞内比在血清或血液中更普遍或具有更高水平或活性。此类降解因子的实例包括：氧化还原因子，它们被选择用于具体底物或者无底物特异性，包括例如氧化或还原酶或者在细胞中出现的还原因子例如硫醇(它可以通过还原作用降解一种可氧化还原切割的连接基团)；酯酶；核内体或可以创造酸性环境的因子，例如可以导致pH为5或更低的那些；可以通过作为一种广义酸起作用而水解或降解一种酸可切割的连接基团的酶，肽酶(它可以是底物特异性的)，以及磷酸酶。

[0597] 一种可切割的连锁群，例如二硫键可以对pH敏感。人血清的pH是7.4，而平均的细胞内pH稍低，范围为大约7.1-7.3。核内体具有在5.5-6.0范围内的更酸性的pH，并且溶酶体具有在5.0左右的甚至更酸性的pH。一些接头将具有在优选的pH下切割的可切割的连接基团，从而使阳离子脂质从细胞内的配体中释放，或进入希望的细胞区室中。

[0598] 接头可以包括可被一种具体的酶切割的可切割的连接基团。结合到接头中的可切割的连接基团的类型可以取决于有待靶向的细胞。例如靶向肝脏的配体可以通过包括酯基团的接头而被连接到阳离子脂质上。肝脏细胞富含酯酶，并且因此该接头将在肝脏细胞中比在不富含酯酶的细胞类型中更有效地切割。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质以及睾丸的细胞。

[0599] 当靶向富含肽酶的细胞类型(如肝细胞和滑膜细胞)时，可以使用含有肽键的接头。

[0600] 通常，一种候选的可切割的连接基团的适合性可以通过测试降解剂(或条件)切割

该候选的连接基团的能力来进行评估。还希望的是也测试该候选的可切割的连接基团在血液中或当与其他非靶组织接触时抵抗切割的能力。因此,可以确定在一种第一条件与一种第二条件之间进行切割的相对敏感性,其中该第一条件被选择成指示在靶细胞中的切割并且该第二条件被选择成指示在其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的切割。这些评估可以在无细胞系统中、在细胞中、在细胞培养物中、在器官或组织培养物中或在整个动物中进行。有用的是在无细胞或培养条件下进行初始评估并且通过在整个动物中的进一步评估来进行确证。在优选实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的切割比在血液或血清(或在被选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的切割快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。

[0601] 氧化还原可切割的连接基团

[0602] 在一个实施例中,可切割的连接基团是一种氧化还原可切割的连接基团,其在还原或氧化时被切割。可还原切割的连接基团的一个实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定一种候选的可切割连接基团是否是适合的"可还原切割的连接基团",或例如是否适合于与一种特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考在此描述的方法。例如可以通过用二硫苏糖醇(DTT)或本领域中已知的其他使用还原剂的试剂进行孵育来对一种候选物进行评估,这模拟了会在细胞(例如靶细胞)中观察到的切割速率。还可以在被选择成模拟血液或血清条件的条件下对这些候选物进行评估。在一个实施例中,候选化合物在血液中被切割至多约10%。在其他实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液(或在选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的降解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。可以在被选择成模拟细胞内介质的条件下,使用标准的酶动力学测定来确定候选化合物的切割速率,并且将其与被选择成模拟细胞外介质的条件下的速率相比较。

[0603] 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0604] 在另一个实施例中,可切割接头包括一种基于磷酸酯的可切割的连接基团。基于磷酸酯的可切割的连接基团通过降解或水解磷酸酯基团的试剂来切割。一种在细胞中切割磷酸酯基团的因子的实例是酶,例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例是-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。优选的实施例是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、-O-P(S)(H)-S-。一个优选实施例是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0605] 酸可切割的连接基团

[0606] 在另一个实施例中,可切割接头包括一种酸可切割的连接基团。酸可切割的连接基团是在酸性条件下被切割的一种连接基团。在优选的实施例中,酸可切割的连接基团在一个具有大约6.5或更低(例如大约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的pH的酸性环境中被切割,或者被多种因子(例如可以作为一种广义酸起作用的酶)切割。在细胞中,具体的低pH细胞器(例如核内体或溶酶体)可以提供一个针对酸可切割的连接基团的切割环境。酸可切

割的连接基团的实例包括但不限于腙、酯以及氨基酸的酯。酸可切割的基团可以具有通式-C＝NN-、C(O)O或-OC(O)。一个优选实施例是当附接到酯(烷氧基基团)的氧的碳是芳基基团、取代的烷基基团或叔烷基基团(如二甲基戊基或叔丁基)时。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0607] 基于酯的可切割的连接基团

[0608] 在另一个实施例中,可切割的接头包括一种基于酯的可切割的连接基团。基于酯的可切割的连接基团通过酶如细胞中的酯酶与酰胺酶来切割。基于酯的可切割的连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基以及亚炔基基团的酯。酯可切割的连接基团具有通式-C(O)O-、或-OC(O)-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0609] 基于肽的可切割的连接基团

[0610] 在又另一个实施例中,可切割的接头包括一种基于肽的可切割的连接基团。基于肽的可切割的连接基团通过酶(例如细胞中的肽酶与蛋白酶)而被切割。基于肽的可切割的连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如二肽、三肽,等等)以及多肽的肽键。基于肽的可切割的基团不包括酰胺基团(-C(O)NH-)。该酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的特定类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的肽键(即,酰胺键),并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割的连接基团具有通式-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-,其中RA与RB是这两个邻接氨基酸的R基团。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0611] 教授制备RNA共轭物的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;8,106,022,前述专利的每个的全部内容通过引用结合在此。

[0612] 给定化合物中的全部位置不必要一致地经修饰,并且实际上可以在单个化合物中或甚至在iRNA内部的单个核苷处掺入多于一个前述修饰。本发明也包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0613] 在本发明的上下文中,"嵌合的"iRNA化合物或"嵌合体"是以下这样的iRNA化合物,例如,dsRNA,它们包含两个或更多个化学上不同的区域,每者由至少一个单体单元构成,即,在dsRNA化合物的情况下的一种核苷酸。这些iRNA典型地含有至少一个区域,其中该RNA被修饰以便赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的靶核酸结合亲和力。iRNA的另外区域可以充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交分子的酶的底物。举例而言,RNase H是一种切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。因此,RNase H的激活

导致RNA靶标的切割，从而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此，与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比，可以在使用嵌合dsRNA时，经常用较短的iRNA获得可比较的结果。可以常规地通过凝胶电泳并且如果必要的话联合本领域中已知的核酸杂交技术来检测该RNA靶标的裂解。

[0614] 在某些实例中，iRNA的RNA可以通过非配体基团来进行修饰。许多非配体分子已经被共轭到iRNA上以增强该iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取，并且用于进行此类共轭的程序在科学文献中是可获得的。此类非配体部分已经包括脂质部分例如胆固醇(库博(Kubo,T.)等人，生物化学和生物物理研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)，2007,365(1):54-61;乐欣格(Letsinger)等人，美国科学院院刊，1989,86:6553)、胆酸(马诺汗(Manoharan)等人，生物有机化学与医药化学快报(Bioorg.Med.Chem.Lett.)，1994,4:1053)、硫醚，例如，己基-S-三苯甲基硫醇(马诺汗等人，纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.)，1992,660:306;马诺汗等人，生物有机化学与医药化学快报，1993,3:2765)、硫代胆固醇(奥博汗瑟(Oberhauser)等人，核酸研究(Nucl.Acids Res.)，1992,20:533)、脂肪链如十二烷基二醇或十一烷基残基(赛森-博和马拉(Saison-Behmoaras)等人，EMBO J.，1991,10:111;卡波诺(Kabanov)等人，FEBS Lett.，1990,259:327;斯伍那区克(Svinarchuk)等人，生物化学(Biochimie)，1993,75:49)、磷脂如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯(马诺汗等人，四面体通讯(Tetrahedron Lett.)，1995,36:3651;舍阿(Shea)等人，核酸研究，1990,18:3777)、聚胺或聚乙烯乙二醇链(马诺汗等人，核苷&核苷酸(Nucleosides&Nucleotides)，1995,14:969)，或金刚烷乙酸(马诺汗等人，四面体通讯，1995,36:3651)、棕榈基部分(米莎(Mishra)等人，生物化学与生物物理学学报(Biochim.Biophys.Acta)，1995,1264:229)，或十八胺或己胺-羰基-羟胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人，药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.)，1996,277:923)。教导此类RNA共轭物的制备的代表性美国专利已经在上文列出。典型的共轭方案涉及在序列的一个或多个位置处合成具有氨基接头的RNA。然后使用适当的偶联剂或活化剂使该氨基基团与被共轭的分子进行反应。共轭反应可以用仍与固相支持物结合或在切割RNA后处于溶液相的RNA进行。通过HPLC纯化RNA共轭物典型地提供纯的共轭物。

[0615] iRNA的递送

[0616] 可以按许多不同方式实现向有需求的受试者递送iRNA。可以通过向受试者施用包含iRNA(例如dsRNA)的组合物，直接进行体内递送。可选地，可以通过施用编码和指导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行递送。这些替代方案在后文进一步论述。

[0617] 直接递送

[0618] 通常，递送核酸分子的任何方法可以适应于随iRNA使用(参见例如，阿赫塔尔(Akhtar S.)和朱利安(Julian RL.)(1992)细胞生物学趋势(Trends Cell.Biol.)2(5):139-144和WO94/02595，所述文献通过引用的方式完整结合在此)。然而，存在认为对体内成功递送iRNA分子重要的三种因素：(a)所递送分子的生物学稳定性，(2)防止非特异性作用，和(3)所递送分子在靶组织中的积累。可以通过局部施用，例如通过直接注射或植入至组织中(作为非限制性例子，肿瘤)或局部施用该试剂，使siRNA的非特异性作用最小化。局部施用至治疗部位使试剂的局部浓度最大化，限制该试剂向全身组织的暴露，所述全身组织否则可能受试剂损害或可能降解该试剂，并且允许较低总剂量的iRNA分子施用。几项研究已

经显示在局部施用iRNA时成功敲减基因产物。例如，在猕猴中通过玻璃体内注射眼球内递送VEGF dsRNA(托伦蒂诺(Tolentino,MJ.)等人(2004)视网膜(Retina)24:132-138)和在小鼠中视网膜下注射(赖希(Reich,SJ.)等人(2003)分子视觉(Mol.Vis.)9:210-216)眼球内递送VEGF dsRNA均显示在年龄相关性黄斑变性的实验模型中防止血管新生。此外，在小鼠中直接肿瘤内注射dsRNA缩减肿瘤体积(派乐(Pille,J.)等人(2005)分子治疗(Mol.Ther.)11:267-274)并且可以延长带瘤小鼠的存活(金姆(Kim,WJ.)等人(2006)分子治疗14:343-350;李(Li,S.)等人(2007)分子治疗15:515-523)。也已经示出通过直接注射将RNA干扰成功局部递送递至CNS(多恩(Dorn),G.等人，(2004)核酸(Nucleic Acids)32:e49;谭(Tan)，PH.等人，(2005)基因治疗(Gene Ther.)12:59-66;牧村(Makimura)，H.等人，(2002)BMC神经科学(BMC Neurosci.)3:18;希什金娜(Shishkina)，GT.等人，(2004)神经科学(Neuroscience)129:521-528;塔克尔(Thakker)，ER.等人，(2004)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)101:17270-17275;阿卡尼亚(Akaneya)，Y.等人，(2005)神经生理学期刊(J.Neurophysiol.)93:594-602)并且通过鼻内给予成功递送至肺(霍华德(Howard)，KA.等人，(2006)分子治疗14:476-484;张(Zhang)，X.等人，(2004)生物化学杂志(JJ.Biol.Chem.)279:10677-10684;比特科(Bitko)，V.等人，(2005)自然医学(Nat.Med.)11:50-55)。对于全身性给予iRNA用于治疗疾病，可以将RNA修饰或可替代地使用药物递送系统进行递送;两种方法均起到防止dsRNA被体内核酸内切酶和核酸外切酶快速降解的作用。

[0619] RNA或药用载体的修饰也可以允许iRNA组合物靶向至靶标组织并避免不想要的脱靶效应。iRNA分子可以通过化学共轭至其他基团如在此所述的脂质或碳水化合物基团以进行修饰。此类共轭物可用于将iRNA靶向特定细胞，例如，肝脏细胞(liver cell)，像肝实质细胞(hepatocyte)。例如，GalNAc共轭物或脂质(例如，LNP)配制品可用于将iRNA靶向特定细胞，例如，肝脏细胞，像肝实质细胞。

[0620] 亲脂性基团如胆固醇以增强细胞摄取并预防降解。例如将与亲脂性胆固醇部分共轭的针对ApoB的iRNA全身注射到小鼠中并且导致肝脏和空肠两者中apoB mRNA的敲减(苏兹赫克(Soutschek)J.等人(2004)自然432:173-178)。已经显示iRNA与适配体的共轭在前列腺癌的小鼠模型中抑制肿瘤生长并且介导肿瘤消退(麦克纳马拉(McNamara)JO.等人(2006)自然生物技术(Nat.Biotechnol.)24:1005-1015)。在替代性实施例中，可以使用药物递送系统如纳米颗粒、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统递送iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)iRNA分子的结合并且也在带负电荷的细胞膜增强相互作用以允许iRNA由细胞高效摄取。阳离子脂质、树状物或聚合物可以与iRNA结合或被诱导以形成包装siRNA的囊泡或胶束(见例如，金姆(Kim SH.)等人(2008)缓释杂志(Journal of Controlled Release)129(2):107-116)。囊泡或胶束的形成进一步防止全身给予时iRNA的降解。用于制造和施用阳离子-iRNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(见例如，索伦森(Sorensen,DR.)等人(2003)分子化学杂志(J.Mol.Biol)327:761-766;维尔马(Verma,UN.)等人(2003)临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)9:1291-1300;阿诺德(Arnold,AS)等人(2007)高血压杂志(J.Hypertens.)25:197-205，所述文献通过引用方式完整结合在此)。可用于全身性递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(索伦森，DR.等人，(2003)，上文;维尔马，UN.等人，(2003)，上文)、Oligofectamine、“固体核酸脂质

粒子”(齐默尔曼(Zimmermann),TS.等人,(2006)自然441:111-114)、心磷脂(钱(Chien),PY.等人,(2005)癌症基因治疗12:321-328;帕尔(Pal),A.等人,(2005)国际肿瘤学杂志(Int J.Oncol.)26:1087-1091)、聚乙亚胺(博奈特(Bonnet)ME.等人(2008)药学研究(Pharm.Res.)8月16日电子出版先于印刷版;艾格纳(Aigner),A.(2006)生物医学与生物技术杂志(J.Biomed.Biotechnol.)71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽(刘(Liu),S.(2006)分子制药学(Mol.Pharm.)3:472-487)以及聚酰胺型胺类(托马里亚(Tomalia),DA.等人(2007)生物化学会汇刊(Biochem.Soc.Trans.)35:61-67;柳(Yoo),H.等人,(1999)药学研究(Pharm.Res.)16:1799-1804)。在一些实施例中,iRNA与环糊精形成用于全身给予的复合物。用于施用iRNA和环糊精的药物组合物的方法可以在美国专利号7,427,605中找到,所述专利通过引用方式完整地结合在此。

[0621] 载体编码的iRNA

[0622] 在另一个方面,靶向ALAS1基因的iRNA可以从插入DNA或RNA载体中的转录单位表达(见,例如,卡秋尔(Couture,A)等人,TIG.(1996),12:5-10;思科勒尔(Skillern,A.)等人,国际PCT公开号WO 00/22113,卡雷德(Conrad),国际PCT公开号WO 00/22114,和卡雷德(Conrad),美国专利号6,054,299)。取决于使用的具体构建体和靶组织或细胞类型,表达可以是瞬时的(在小时至周数量级上)或持久的(数周至数月或更长时间)。可以将这些转基因作为线性构建体、环状质粒或可以是整合或非整合载体的病毒载体引入。转基因也可以如此构建以允许它作为染色体外质粒遗传(加斯曼(Gassmann)等人,美国国家科学院院刊(1995)92:1292)。

[0623] iRNA的单条链或多条链可以从表达载体上的启动子转录。在两条单独的链待表达以产生例如dsRNA的情况下,可以将两个单独表达载体共引入(例如,通过转染或感染)靶标细胞中。可替代地,dsRNA的每个单独链可以通过均位于相同表达质粒上的启动子来转录。在一个实施例中,dsRNA表达为被一种接头多核苷酸序列连接的反向重复,由此该dsRNA具有茎环结构。

[0624] iRNA表达载体典型地是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞,例如,与脊椎动物细胞相容的表达载体,可以用来产生表达如本文所述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域熟知的并且从许多商业来源可获得。典型地,此类载体含有用于插入所需核酸区段的便利限制性位点。表达iRNA的载体的递送可以是全身性的,如通过静脉内或肌内施用,通过施用至从患者移植出来、随后重新引入患者的靶细胞或通过允许向所需靶细胞引入的任何其他手段。

[0625] 可以将iRNA表达质粒作为与阳离子脂质载体(例如,Oligofectamine)或基于非阳离子脂质的载体(例如,Transit-TKO™)的复合物转染至靶标细胞中。本发明还想到了在一周或更长时间范围内用于iRNA介导的靶向靶RNA的不同区的敲低的多次脂质转染。成功地将载体引入到宿主细胞中可以使用多种已知的方法来监测。例如瞬时转染可以使用一种报告基因来进行信号化,例如荧光标记,例如绿色荧光蛋白(GFP)。稳定的对离体细胞的转染可以使用以下这样的标记来进行确保:这些标记为被转染的细胞提供了对特定环境因子(例如抗生素或药物)的抗性,例如潮霉素B抗性。

[0626] 可以随在此所述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不局限于:(a)腺病毒载体;(b)逆转录病毒载体,包括但不局限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病病毒等;

(c)腺伴随病毒载体;(d)单纯疱疹病毒载体;(e)SV40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头瘤病毒载体;(h)微小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体,如正痘病毒,例如痘苗病毒载体,或禽痘病毒,例如金丝雀痘病毒或鸡痘病毒;以及(j)辅助病毒依赖性腺病毒或无肠腺病毒。复制缺陷型病毒也可以有利的。不同的载体将并入或将不并入细胞的基因组中。如果需要,构建体可以包含病毒序列以用于转染。可替代地,构建体可以并入能够发生附加型复制的载体(例如EPV和EBV载体)中。用于重组表达iRNA的构建体通常将需要调节元件,例如,启动子、增强子等,以确保RNA在靶标细胞中的表达。下文进一步描述针对载体和构建体考虑的其他方面。

[0627] 可用于递送iRNA的载体将包括足以在所需靶细胞或组织中表达iRNA的调节元件(启动子、增强子等)。可以选择调节元件以提供组成型或调节/诱导型表达。

[0628] 可以精确地调节iRNA的表达,例如,通过使用对某些生理调节剂(例如,循环型葡萄糖水平或激素)敏感的诱导型调节序列(多赫替(Docherty)等人,1994,FASEB J.8:20-24)。适合于在细胞中或哺乳动物中控制dsRNA表达的此类可诱导的表达系统包括,例如,由以下项进行的调节:蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚作用的化学诱导物、以及异丙基-β-D1-硫代半乳糖苷(IPTG)。本领域技术人员将能够基于iRNA转基因的预期用途选择适宜的调节/启动子序列。

[0629] 在一个具体实施例中,可以使用含有编码iRNA的核酸序列的病毒载体。例如,可以使用逆转录病毒载体(见米勒(Miller)等人,酶学方法(Meth.Enzymol.)217:581-599(1993))。这些逆转录病毒载体含有对于病毒基因组正确包装并整合入宿主细胞DNA必需的组分。将编码iRNA的核酸序列克隆至促进该核酸递送入患者的一种或多种载体中。关于逆转录病毒载体的更多细节可以在例如博恩(Boesen)等人,生物疗法(Biotherapy)6:291-302(1994)找到,所述文献描述使用逆转录病毒载体递送mdr1基因至造血干细胞,以便使得干细胞对化疗更耐受。说明基因治疗中逆转录病毒载体用途的其他参考文献是:克洛斯(Clowes)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.)93:644-651(1994);凯恩(Kiem)等人,血液(Blood)83:1467-1473(1994);萨尔蒙斯(Salmons)和古兹伯格(Gunzberg),人类基因疗法(Human Gene Therapy)4:129-141(1993);以及格罗斯曼(Grossman)和威尔逊(Wilson),遗传发育新见(Curr.Opin.in Genetics and Devel.)3:110-114(1993)。意欲使用的慢病毒载体包括例如描述于美国专利号6,143,520;5,665,557和5,981,276中的基于HIV的载体,这些美国专利通过引用结合在此。

[0630] 也构思腺病毒用于iRNA的递送。腺病毒是特别有吸引力的媒介物,例如,用于递送基因至呼吸道上皮。腺病毒天然地感染呼吸道上皮,在那里它们引起轻微疾病。基于腺病毒的递送系统的其他靶是肝脏、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感不分裂细胞的优点。科扎斯凯(Kozarsky)和威尔森,遗传学与发育学新观点3:499-503(1993)提出基于腺病毒的基因疗法的综述。布特(Bout)等人,人类基因疗法(Human Gene Therapy)5:3-10(1994)展示了腺病毒载体转移基因至恒河猴猴呼吸道上皮的用途。腺病毒在基因疗法中的用途的其他实例可以在罗森菲尔德(Rosenfeld)等人,科学(Science)252:431-434(1991);罗森菲尔德等人,细胞68:143-155(1992);马斯安格利(Mastrangeli)等人,临床研究杂志91:225-234(1993);PCT公开WO 94/12649以及王(Wang)等人,基因疗法2:775-783(1995)中找到。用于表达本发明中表征的iRNA的合适AV载体、用于构建重组AV载体的方法

和用于递送该载体至靶细胞中的方法在夏(Xia)H等人,(2002),自然生物技术(Nat.Biotech.)20:1006-1010中描述。

[0631] 也构思使用腺联病毒(AAV)载体(沃尔什(Walsh)等人,美国实验生物学和医学学会学报(Proc.Soc.Exp.Biol.Med.)204:289-300(1993);美国专利号5,436,146)。在一个实施例中,iRNA可以从具有例如U6或H1RNA启动子或细胞巨化病毒(CMV)启动子的重组AAV载体作为两个单独的互补性单链RNA分子表达。用于表达本发明中表征的dsRNA的合适AAV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于递送该载体至靶细胞中的方法在萨穆尔斯基(Samulski)R等人(1987),病毒学杂志(J.Virol.)61:3096-3101;费希尔(Fisher)K J等人(1996),病毒学杂志,70:520-532;萨穆尔斯基R等人(1989),病毒学杂志63:3822-3826;美国专利号5,252,479;美国专利号5,139,941;国际专利申请号WO 94/13788;以及国际专利申请号WO 93/24641中描述,这些文献的完整披露内容通过引用结合在此。

[0632] 另一种典型的病毒载体是痘病毒如痘苗病毒病毒,例如减毒痘苗病毒如修饰的安卡拉病毒(MVA)或NYVAC、禽痘病毒如鸡痘病毒或金丝雀痘病毒。

[0633] 病毒载体的向性可以通过用包膜蛋白或来自其他病毒的其他表面抗原来对这些载体假型化而进行修饰,或者适当时通过取代不同的病毒衣壳蛋白而进行修饰。例如慢病毒载体可以是用来自水泡性口炎病毒(VSV)、狂犬病病毒、埃博拉病毒、Mokola等的表面蛋白进行假病毒化。可以通过将载体工程化以表达不同衣壳蛋白血清型,使得AAV载体靶向不同的细胞;参见例如,拉宾诺维茨(Rabinowitz)J E等人,(2002),病毒学杂志76:791-801,这些文献的完整披露内容通过引用结合在此。

[0634] 载体的药物制剂可以包括在一种可接受的稀释剂中的该载体,或者可以包括一种缓释基质,该基因递送媒介物被嵌入其中。可替代地,当该完全的基因递送载体可以从重组细胞(例如逆转录病毒载体)完整地产出的情况下,该药物制剂可以包括产出该基因递送系统的一个或多个细胞。

[0635] III.含有iRNA的药物组合物

[0636] 在一个实施例中,本发明提供了包含如在此所描述的iRNA以及一种药学上可接受的载体的药物组合物。包含该iRNA的药物组合物对于治疗与ALAS1基因表达或活性相关的疾病或失调(例如,涉及卟啉途径的失调)而言是有用的。基于递送模型配制这类药物组合物。例如,可以经配制以便通过肠胃外递送,例如,通过静脉内(IV)递送来全身性施用的组合物。在一些实施例中,在此提供的组合物(例如,LNP配制品)被配制以用于静脉内递送。在一些实施例中,在此提供的组合物(例如,包含GalNAc共轭物的组合物)被配制以用于皮下递送。

[0637] 在此表征的药物组合物以足以抑制ALAS1基因表达的剂量给予。通常,iRNA的适合剂量处于每日受体每千克体重0.01毫至200.0毫克范围内,通常处于每日受体每千克体重1至50mg范围内。例如,dsRNA可以按每单剂量0.05mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg或50mg/kg施用。可以将该药物组合物一日给予一次,或者可以将该iRNA在一天内以适当的间隔给予两次、三次或更多次亚-剂量,或者甚至可以通过控释制剂使用连续输注或递送而给予。在这种情况下,每个亚-剂量中所含的iRNA必须相应地更少,以便实现每日总剂量。也可以将剂量单位复配用于在几天内递送,例如使用在几天时间范围内提供持久iRNA释放的常规持续释放配制品。持续释放配制品在

本领域内是熟知的并且对于在特定部位递送试剂是特别有用的，由此可以与本发明的试剂使用。在这一实施例中，该剂量单位包含相应的多个每日剂量。

[0638] 单一剂量对ALAS1水平的影响可以长久持续，从而后续剂量以不多于3、4或5天的间距或以不多于1、2、3，或4周的间距施用。

[0639] 本领域技术人员将理解，某些因素可以影响有效治疗一个受试者所需的剂量和时间安排，这些因素包括(但不局限于)疾病或病症的严重性、之前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄、以及其他存在的疾病。此外，用治疗有效剂量的组合物治疗一个受试者可以包括单一治疗或者一系列治疗。如在此的其他地方所描述，使用常规方法或基于使用适当动物模型的体内测试，可以评估本发明涵盖的各个iRNA的有效剂量和体内半衰期。

[0640] 小鼠遗传学的进展已经产生了用于不同人类疾病研究的大量小鼠模型，例如与ALAS1表达相关的病理过程(例如，涉及卟啉或卟啉途径缺陷的病理过程，例如，像卟啉症)。这类模型可以用于iRNA的体内测试，以及用于确定治疗有效剂量和/或有效剂量方案。

[0641] 适合的小鼠模型例如是含有表达人ALAS1的转基因的小鼠。具有敲入突变(例如，与人类中的急性肝性卟啉症相关联的突变)的小鼠可以用于确定治疗有效剂量和/或ALAS1 siRNA给予的持续时间。本发明还包括了包含在本发明中表征的iRNA化合物的药物组合物和配制品。取决于希望局部还是系统性治疗以及取决于有待治疗的区域，可以将本发明的药物组合物按许多方式给予。给予可以是局部的(例如，通过透皮贴剂)；肺的；例如通过粉末或气溶剂的吸入或吹入，包括通过喷雾器；气管内的；鼻内的；表皮的以及经皮的、经口的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内、动脉、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注；表皮下，例如通过一个植入性装置；或颅内，例如通过实质内、鞘内或脑室内的给予。

[0642] iRNA可以按这样的方式递送以靶向特定组织，如产生红细胞的组织。例如，iRNA可以被递送至骨髓、肝脏(例如，肝脏肝细胞)、淋巴结、脾、肺(例如，肺胸膜)或脊椎。在一个实施例中，iRNA被递送至骨髓。

[0643] 用于局部给予的药物组合物以及配制品可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉末。常规的药物载体、水、粉末或油基、增稠剂等等可以是必要的或希望的。包衣的避孕套、手套等等也可以是有用的。适合的局部配制品包括其中在本发明中体现的iRNA与局部用递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。适合的脂质和脂质体包括中性(例如，二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如，二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子脂质和脂质体(例如，二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明中表征的iRNA可以封装于脂质体内部或可以与其、尤其与阳离子脂质体形成复合物。可选地，iRNA可以与脂质、尤其与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸与酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、花生酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、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、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、或C_{1-20}烷基酯(例如异丙基肉豆蔻酸酯IPM)、甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部配制品被详细地描述于美国专利号6,747,014中，该美国专利通过引用方式结合在此。

[0644] 脂质体配制品

[0645] 除了已经被研究过并且用于药物的配制的微乳剂之外，还存在许多有组织的表面

活性剂结构。这些包括单分子层、微粒、双分子层以及囊泡。囊泡(比如脂质体)由于其特异性以及它们从药物递送方面所提供的作用持续时间而引起人们很大兴趣。如在本发明中所使用的,术语“脂质体”意为一种由以球形双分子层或双分子层排列的两亲性分子脂质构成的囊泡。

[0646] 脂质体是单层的或多层的囊泡,其具有一个形成自亲脂材料的膜以及一个水性内部。该水性部分包含有待递送的组合物。阳离子脂质体具有能够融合至细胞壁的优势。非阳离子脂质体尽管不能够一样有效地与细胞壁融合,但是可以被体内巨噬细胞摄取。

[0647] 为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适合透皮梯度的影响下通过一系列细孔,每个细孔具有小于50nm的直径。因此,希望的是使用高度可变形并且能够穿过这些细孔的脂质体。

[0648] 脂质体的其他优点包括;从天然磷脂获得的脂质体是生物相容和生物可降解的;脂质体可以并入广泛类型的水溶性和脂溶性药物;脂质体可以在其内部区室中保护封装的药物免受代谢和降解(罗索夫(Rosoff),药用剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)和班克(Banker)(编著)、1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,N.Y.,第1卷,第245页)。在制备脂质体配制品方面的重要的考虑是脂质表面电荷、囊泡尺寸以及这些脂质体的水性体积。

[0649] 脂质体对于将活性成分转移以及递送至作用位点是有用的。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜,所以当脂质体被应用至一个组织时,这些脂质体开始与这些细胞膜合并,并且随着脂质体的合并和细胞进程,这些脂质体的内容物被排空进入该细胞,在这里活性剂可以起作用。

[0650] 脂质体配制品已经作为许多药品的递送的模型成为广泛研究的焦点。越来越多的证据表明,对于局部给予而言,脂质体呈现超出其他制剂的一些优势。这些优势包括:减少的与所给予药物的高系统性吸收相关的副作用、在希望的靶标处所给予药物的增加的积累、以及将广泛种类的药物(亲水的与疏水的两者)给予进入皮肤的能力。

[0651] 一些报告已经详述了脂质体递送试剂(包括高分子量的DNA)进入皮肤的能力。已经将包括镇痛药、抗体、激素以及高分子量DNA的化合物给予至皮肤。大多数的应用导致靶向上表皮

[0652] 脂质体分成两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的DNA分子相互作用而形成一种稳定的复合体。该带正电荷的DNA/脂质体复合物结合至带负电荷的细胞表面并且内化在内涵体中。由于核内体内的酸性pH,脂质体破裂,从而将它们的内含物释放到细胞质中(王等人,生物化学与生物物理研究通讯,1987,147,980-985)。

[0653] pH敏感的或带负电荷的脂质体捕获DNA而不是与其形成复合体。由于该DNA与该脂质是带类似的电荷,所以形成排斥而不是复合。然而,一些DNA包埋于这些脂质体的含水内部。pH-敏感脂质体已经用来递送编码胸苷激酶基因的DNA至培养的细胞单层。在靶标细胞内检测到外源基因的表达(周(Zhou)等人,控释杂志(Journal of Controlled Release),1992,19,269-274)。

[0654] 脂质体组合物的一个主要类型包括除了天然来源的磷脂酰胆碱以外的磷脂。例如中性脂质体组合物可以从二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)中形成。阴离子脂质体组合物通常可以形成自二肉豆蔻酰磷脂酰甘油,而阴离子融

合脂质体主要形成自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。另一个类型的脂质体组合物从磷脂酰胆碱(PC),例如像大豆PC和蛋PC中形成。另一个类型从磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物中形成。

[0655] 一些研究已经评价了脂质体药物制剂至皮肤的局部递送。将包含干扰素的脂质体应用至天竺鼠皮肤导致皮肤疱疹溃疡的减少,而通过其他手段的干扰素递送(例如,作为溶液或作为乳剂)是无效的(维纳(Weiner)等人,药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting),1992,2,405-410)。此外,另外的研究测试了作为脂质体配制品的一部分而给予的干扰素与使用水性系统而给予的干扰素的疗效,并且总结出该脂质体制剂优于水性给予(杜普利斯(du Plessis)等人,抗病毒研究(Antiviral Research),1992,18,259-265)。

[0656] 还已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,具体地包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包括Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)以及Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)的非离子型脂质体配制品用于将环孢霉素A递送入小鼠皮肤的真皮。结果表明这类非离子型脂质体系统有效促进环孢菌素A沉积至皮肤的不同层中(胡(Hu)等人,S.T.P.制药科学(S.T.P.Pharma.Sci.),1994,4,6,466)。

[0657] 脂质体还包括“立体化学稳定的”脂质体,这个术语如在此所使用的指包括一种或多种专门化脂质的脂质体,当并入脂质体中时这些脂质导致相对于缺少此类专门化脂质的脂质体而言的增加的循环寿命。立体化学稳定的脂质体的实例是以下那些:在其中该脂质体的形成囊泡的脂质部分中的一部分(A)包括一种或多种糖脂,例如单唾液酸神经节苷酯G_{M1},或者(B)是用一种或多种亲水聚合物衍生,例如聚乙二醇(PEG)部分。虽然不希望受任何具体理论约束,但在本领域中认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG-衍生化的脂质的空间稳定的脂质体,这些空间稳定的脂质体的循环半衰期提高来源于进入网状内皮系统(RES)的细胞中的摄取减少(艾伦(Allen)等人,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Letters),1987,223,42;吴等人,癌症研究(Cancer Research),1993,53,3765)。

[0658] 包含一种或多种糖脂的不同脂质体是本领域中已知的。帕帕哈都久珀罗斯(Papahadjopoulos)等人(纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.),1987,507,64)报道了单唾液酸神经节苷酯G_{M1}、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半衰期的能力。这些研究结果由加比宗(Gabizon)等人(美国国家科学院院刊),1988,85,6949)阐释。均为艾伦等人的美国专利号4,837,028和WO 88/04924披露了包括(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂G_{M1}或硫酸半乳糖脑苷脂的脂质体。美国专利号5,543,152(韦伯(Webb)等人)披露了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻磷脂酰胆碱的脂质体在WO 97/13499(利姆(Lim)等人)中披露。

[0659] 含有由一种或多种亲水性聚合物衍生化的脂质的许多脂质体及其制备方法是本领域已知的。熊本(Sunamoto)等人(日本化学学会公报(Bull.Chem.Soc.Jpn.),1980,53,2778)描述包含非离子去垢剂$2C_{1215G}$的脂质体,所述脂质体含有PEG部分。伊录姆(Illum)等人(FEBS Lett.,1984,167,79)报道了用聚合物二醇对聚苯乙烯颗粒的亲水包覆导致显著增长的血液半衰期。通过附接聚二醇(例如,PEG)的羧基所修饰的合成磷脂由Sears描述(美国专利号4,426,330和4,534,899)。克利巴诺夫(Klibanov)等人(FEBS Lett.,1990,268,235)描述了展示以下的实验:包含用PEG或PEG硬脂酸酯衍生化的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质

体具有显著增加的血液循环半衰期。布鲁姆(Blume)等人(生物化学与生物物理学学报(Biochimica et Biophysica Acta),1990,1029,91)将这类观察结果扩展至其他PEG衍生化的磷脂,例如,由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)和PEG的组合形成的DSPE-PEG。授予Fisher的欧洲专利号EP 0445131B1和WO 90/04384中描述了在它们的外表面上具有共价结合的PEG部分的脂质体。含有1-20摩尔%用PEG衍生化的PE的脂质体组合物及其使用方法由Woodle等人(美国专利号5,013,556和5,356,633)和马丁(Martin)等人(美国专利号5,213,804和欧洲专利号EP 0496813B1)描述。包含许多其他脂质聚合共轭物的脂质体在WO 91/05545和美国专利号5,225,212(均授予马丁(Martin)等人)中和在WO 94/20073(Zalipsky等人)中公开包括PEG修饰的神经酰胺脂质的脂质体描述于WO 96/10391(佐伊(Choi)等人)中。美国专利号5,540,935(宫崎(Miyazaki)等人)以及美国专利号5,556,948(田川(Tagawa)等人)描述了包含PEG的脂质体,它们可以进一步被官能部分在其表面进行衍生化。

[0660]　一些包括核酸的脂质体在本领域内是已知的。授予蒂埃里(Thierry)等人的WO 96/40062公开了在脂质体中封装高分子量核酸的方法。授予田川(Tagawa)等人的美国专利号5,264,221公开了结合蛋白质的脂质体并且声称这类脂质体的内容物可以包含dsRNA。授予拉赫曼(Rahman)等人的美国专利号5,665,710描述在脂质体中封装寡脱氧核苷酸的某些方法。授予洛夫(Love)等人的WO 97/04787公开了包含靶向raf基因的dsRNA的脂质体。

[0661]　传递体是又另一种类型的脂质体,并且是高度可变形的脂质聚集物,它们是用于药物递送媒介物的引人注目的候选者。传递体可以描述为脂滴,其是高度可变形从而它们能够容易地穿过比该脂滴更小的孔。传递体能适应在其中使用它们的环境,例如它们是自优化性的(能适应皮肤中孔的形状)、自我修复性的、频繁地到达它们的靶标而不片段化,并且通常是自我负载性的。为了制备传递体,可能的是将表面边缘激活剂(通常是表面活性剂)添加至一种标准的脂质体组合物。传递体已经被用于将血清白蛋白递送至皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已经显示与包含血清白蛋白的溶液的皮下注射同样有效。

[0662]　表面活性剂在配制品如乳剂(包括微乳剂)和脂质体中有广泛应用。对许多不同类型的表面活性剂(天然的和合成的两者)的特性进行分类并评级的最普通的方法是通过使用亲水/亲油平衡值(HLB)。亲水基团(又称为“头部”)的性质为对用于配制品中的不同表面活性剂进行归类提供了最有用的手段(列赫尔,“药物剂型”,马塞尔德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约州纽约(New York,N.Y.),1988,第285页)。

[0663]　如果该表面活性剂分子没有离子化,它被分类为一种非离子型表面活性剂。发现非离子型表面活性剂在药物与化妆品产品方面有广泛应用并且能够在广泛的pH范围使用。总体上,取决于它们的结构,它们的HLB值范围为从2至大约18。非离子型表面活性剂包括非离子型酯,例如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯以及乙氧基化酯。非离子型烷醇酰胺以及醚(例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇、以及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物)也包括在这一类别中。聚氧乙烯表面活性剂是该非离子型表面活性剂类别中最常用的成员。

[0664]　如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带负电荷,则该表面活性剂被分类为阴离子型。阴离子型表面活性剂包括羧化物(例如皂)、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯(例如烷基硫酸酯以及乙氧基化的烷基硫酸酯)、磺酸酯(例如烷基苯磺酸酯、酰

基羟乙基磺酸酯、酰基牛磺酸酯以及磺基琥珀酸酯)、以及磷酸酯。该阴离子型表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸酯和皂类。

[0665] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带正电荷,则该表面活性剂被分类为阳离子型。阳离子型表面活性剂包括季铵盐以及乙氧基化胺。这些季铵盐是这一类别的最常用的成员。

[0666] 如果该表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,该表面活性剂被分类为两性型。两性型表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱以及磷脂。

[0667] 已经综述了表面活性剂在药品、配制品和在乳剂中的用途(列赫尔,“药物剂型”,马塞尔德克公司,纽约州纽约,1988,第285页)。

[0668] 核酸脂质颗粒

[0669] 在一个实施例中,本发明表征的ALAS1 dsRNA被完全包囊在脂质配制品中,从而例如形成一种SPLP、pSPLP、SNALP或其他核酸-脂质颗粒。如在此使用的,术语“SNALP”指一种稳定的核酸-脂质颗粒,包括SPLP。如在此使用的,术语“SPLP”指一种核酸-脂质颗粒,其包括包囊在脂质囊泡中的质粒DNA。SNALP与SPLP典型地包含一种阳离子脂质、一种非阳离子脂质以及一种阻止该颗粒聚集的脂质(例如一种PEG-脂质共轭物)。SNALP与SPLP对于合成应用是极其有用的,因为它们展示出在静脉内(i.v.)注射之后延长的循环寿命并且在远端位点积累(例如在与给予位点物理分开的位点)。SPLP包括“pSPLP”,pSPLP包括一种包囊化的缩合剂-核酸复合体,如在PCT公开号WO 00/03683中所提出的。本发明的颗粒典型地具有约50nm至约150nm,更典型地是约60nm至约130nm,更典型地是约70nm至约110nm,最典型地是约70nm至约90nm的平均直径,并且基本上是无毒的。另外,当出现在本发明的核酸-脂质颗粒中时,这些核酸在水溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒及其制备方法在例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;以及PCT公开号WO 96/40964。

[0670] 在一个实施例中,脂质与药物的比率(质量/质量比率)(例如脂质与dsRNA的比率)将处于从大约1:1至大约50:1,从大约1:1至大约25:1,从大约3:1至大约15:1,从大约4:1至大约10:1,从大约5:1至大约9:1,或大约6:1至大约9:1的范围内。

[0671] 阳离子脂质可以例如N,N-二油烯基-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-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油烯基氧基-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)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酸基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油烯基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-二亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1-二亚油烯基氧基-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)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪代)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷

(DLinDMA)、2,2-二油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺(ALN 100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(二(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇(Tech G1)或其混合物。该阳离子脂质可以占该颗粒中存在的总脂质的从大约20mol%至大约50mol%或大约40mol%。

[0672] 在另一个实施例中,化合物2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可以用来制备脂质-siRNA纳米颗粒。2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环的合成描述于2008年10月23日提交的美国临时专利申请号61/107,998中,将其通过引用结合于此。

[0673] 在一个实施例中,该脂质-siRNA颗粒包括40%2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环:10%DSPC:40%胆固醇:10%PEG-C-DOMG(摩尔百分数),颗粒尺寸在63.0±20nm,并且具有0.027siRNA/脂质比率。

[0674] 非阳离子脂质可以是一种阴离子脂质或一种中性脂质,包括但不限于:二硬脂酰磷酸卵磷酯(DSPC)、二油酰基磷酸卵磷酯(DOPC)、二棕榈酰磷酸卵磷酯(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷酸卵磷酯(POPC)、棕榈酰油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-一甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇,或其混合物。非阳离子脂质(如果包括胆固醇的话)可以占该颗粒中存在的总脂质的从大约5mol%至大约90mol%,大约10mol%,或大约58mol%。

[0675] 抑制颗粒聚集的共轭脂质可以是例如一种聚乙二醇(PEG)-脂质,其包括但不限于PEG-PEG-(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer),或其混合物。PEG-DAA共轭物可以例如是PEG-二月桂基氧丙基(Ci_2)、PEG-二肉豆蔻基氧丙基(Ci_4)、PEG-二棕榈基氧丙基(Ci_6)或PEG-二硬脂基氧丙基($C]_8$)。防止颗粒聚集的共轭脂质可以占从0mol%至约20mol%或约2mol%在颗粒中存在的总脂质。

[0676] 在一些实施例中,核酸-脂质颗粒进一步包括胆固醇,该胆固醇例如占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约60mol%或约48mol%。

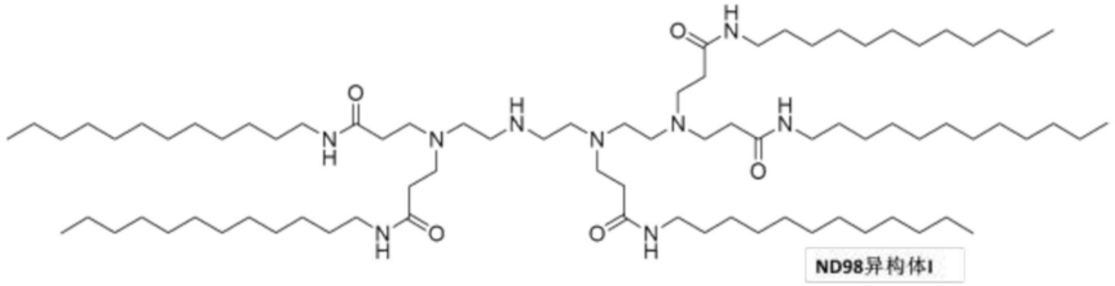
[0677] 在一些实施例中,该iRNA被配制成一种脂质纳米颗粒(LNP)。

[0678] LNP01

[0679] 在一个实施例中,脂质ND98.4HCl(MW 1487)(见2008年3月26日提交的美国专利申请号12/056,230,所述文献通过引用的方式结合在此)、胆固醇(Sigma-Aldrich)和PEG-脑苷脂C16(Avanti极性脂质)可以用来制备脂质-dsRNA纳米颗粒(例如,LNP01颗粒)。可以如下制备每种组分在乙醇中的母液:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml;PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。然后可以例如42:48:10摩尔比组合ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16储备溶液。合并的脂质溶液可以与(例如pH 5乙酸钠中的)水性dsRNA混合,这样使得最终乙醇浓度是约35%-45%并且最终乙酸钠浓度是约100-300mM。一旦混合,脂质-dsRNA纳米颗粒典型地

自发形成。取决于所需的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,如Lipex挤出机(北部脂质公司(Northern Lipids,Inc)),经聚碳酸酯膜(例如100nm截值)挤出所产生的纳米颗粒混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切线流过滤实现乙醇去除和同时交换缓冲液。缓冲液可以与例如在约pH 7,例如约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4下的磷酸盐缓冲的盐水(PBS)交换。

[0680]



式1

[0681] LNP01配制品例如在国际申请公开号WO 2008/042973中描述,将其通过引用结合在此。

[0682] 另外的示例性脂质-dsRNA制剂提供于下表中。

[0683] 表10:示例性脂质配制品

[0684]

	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 脂质:siRNA 比率
SNALP	1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA 大约 7:1
S-XTC	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA 大约 7:1
LNP05	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 大约 6:1
LNP06	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 大约 11:1
LNP07	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 大约 6:1
LNP08	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 大约 11:1
LNP09	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1

[0685]

LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3 aH-环戊[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺（ALN100）	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA 10：1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯（MC3）	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：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)双十二烷-2-醇(C12-200)	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA 10：1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：33：1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质：siRNA：11：1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质：siRNA：11：1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：7：1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：10：1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：12：1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质：siRNA：8：1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5

[0686]

		脂质:siRNA：10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质：siRNA：10:1

[0687] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0688] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱

[0689] PEG-DMG:PEG-双二肉豆蔻酰甘油(C14-PEG,或PEG-C14)(平均分子量为2000的PEG)

[0690] PEG-DSG:PEG-二苯乙烯基甘油(C18-PEG,或PEG-C18)(平均分子量为2000的PEG)

[0691] PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺(平均分子量为2000的PEG)

[0692] 包含SNALP(1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的制剂描述于2009年4与15日提交的国际公开号WO 2009/127060中,通过引用将其结合于此。

[0693] 包括XTC的配制品描述于,例如,以下各项中:2009年1月29日提交的美国临时序列号61/148,366;2009年3月2日提交的美国临时序列号61/156,851;2009年6月10日提交的美国临时序列号;2009年7月24日提交的美国临时序列号61/228,373;2009年9月3日提交的美国临时序列号61/239,686以及2010年1月29日提交的国际申请号PCT/US 2010/022614,将其通过引用特此结合。

[0694] 包括MC3的配制品描述于例如以下各项中:2009年9月22日提交的美国临时序列号61/244,834,2009年6月10日提交的美国临时序列号61/185,800,以及2010年6月10日提交的国际申请号PCT/US 10/28224,将其通过引用特此结合。

[0695] 包含ALNY-100的配制品描述于例如以下中:例如,2009年11月10日提交的国际专利申请号PCT/US 09/63933,将其通过引用特此结合。

[0696] 包含C12-200的配制品描述于例如以下各项中:2009年5月5日提交的美国临时序列号61/175,770以及2010年5月5日提交的国际申请号PCT/US 10/33777,将其通过引用特此结合。

[0697] 阳离子脂质的合成

[0698] 在本发明中表征的核酸颗粒中使用的任何化合物,例如,阳离子脂质等可以通过已知的有机合成技术(包括在实例中更详细描述的方法)制备。除非另外指明,否则全部取代基如下文定义。

[0699] “烷基”意指包含从1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状的饱和脂肪族烃。代表性饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等;而饱和支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和环状烷基包括环戊烯基和环己烯基等。

[0700] “烯基”意指在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如上所定义的烷基。烯基包括顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁

烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等。

[0701] "炔基"意指在相邻碳之间另外含有至少一个三键的如上所定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0702] "酰基"是指任何烷基,烯基或炔基,其中,在附接点的碳被氧代基团取代,如下所定义。例如,-C(=O)烷基、-C(=O)烯基和-C(=O)炔基是酰基。

[0703] "杂环"意味着一个5-至7-元单环、或7-至10-元二环的杂环,它是饱和的、不饱和的或芳香族的,并且它包含独立地选自氮、氧、和硫的从1或2个杂原子,并且其中该氮和硫杂原子可以是任选地氧化的,并且该氮杂原子可以任选地是季铵化的,包括双环,其中上述杂环的任一个被稠合至一个苯环。该杂环可通过任何杂原子或碳原子而附接。杂环包括如下文定义的杂芳基。杂环包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基(piperizynyl)、乙内酰脲基(hydantoinyl)、戊内酸胺基(valerolactamyl)、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

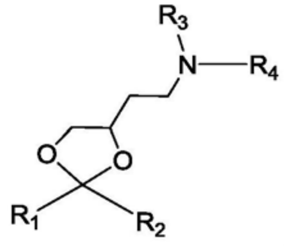
[0704] 术语"任选取代的烷基","任选取代的烯基","任选取代的炔基","任选取代的酰基"和"任选被取代的杂环"是指,当取代时,至少一个氢原子被一个取代基置换。在氧代取代基(=O)的情况下,两个氢原子被置换。就这一点而言,取代基包括氧代、卤素、杂环、-CN、$-OR^x$、$-NR^xR^y$、$-NR^xC(=O)R^y$、$-NR^xSO_2R^y$、$-C(=O)R^x$、$-C(=O)OR^x$、$-C(=O)NR^xR^y$、$-SO_nR^x$和$-SO_nNR^xR^y$,其中n是0、1或2,R^x和R^y是相同或不同的并且独立地是氢、烷基或杂环,并且所述烷基和杂环取代基中的每一个可以进一步地被一个或多个氧代、卤素、-OH、-CN、烷基、$-OR^x$、杂环、$-NR^xR^y$、$-NR^xC(=O)R^y$、$-NR^xSO_2R^y$、$-C(=O)R^x$、$-C(=O)OR^x$、$-C(=O)NR^xR^y$、$-SO_nR^x$和$-SO_nNR^xR^y$取代。

[0705] "卤素"是指氟、氯、溴、以及碘。

[0706] 在一些实施例中,本发明中表征的方法可以需要使用保护基。保护基方法是本领域技术人员熟知的(参见,例如有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis),格林(Green)T.W.等人,威利数字出版平台(Wiley-Interscience),纽约市,1999)。简言之,本发明上下文中的保护基是降低或消除不希望的官能团反应性的任何基团。可以将保护基添加到官能团以掩蔽其在某些反应过程中的反应性并且随后将其移除以暴露原始官能团。在一些实施例中,使用"醇保护基"。"醇保护基"是减少或消除不希望的醇官能团反应性的任何基团。保护基团可以使用本领域中公知的技术添加和去除。

[0707] 式A的合成

[0708] 在一个实施例中,使用式A的阳离子脂质配制本发明中表征的核酸-脂质颗粒:

[0709] 

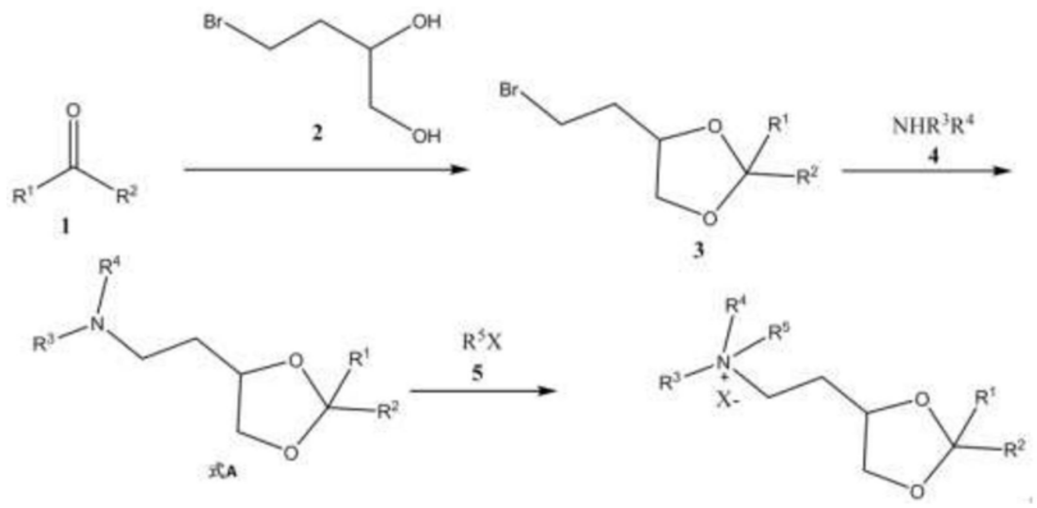
,

[0710] 其中R1和R2独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且R3和R4独立

地是低级烷基或R3和R4可以是一起形成任选取代的杂环。在一些实施例中，阳离子脂质是XTC(2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)。通常，可以通过以下反应方案1或2产生以上式A的脂质，其中除非另外指明，否则全部取代基如上文定义。

[0711] 方案1

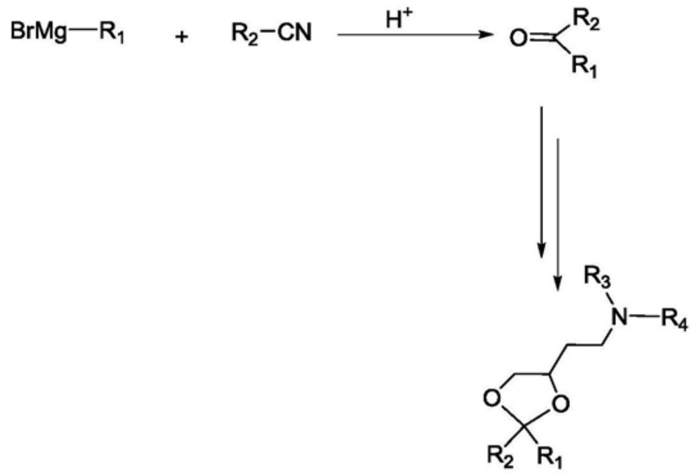
[0712]



[0713] 根据方案1制备脂质A，其中R_1和R_2独立地是烷基、烯基或炔基，每种可以是任选取代的，并且R_3和R_4独立地是低级烷基或R_3和R_4可以一起形成任选取代的杂环。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备酮1和溴化物2。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3产生式A的脂质。式A的脂质可以用式5的有机盐转化成相应的铵盐，其中X是选自卤素、氢氧化物、磷酸根、硫酸根等的阴离子反离子。

[0714] 方案2

[0715]



[0716] 可选地，可以根据方案2制备酮1原料。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备格氏(Grignard)试剂6和氰化物7。6和7的反应产生酮1。如方案1中所述，酮1转化成式A的相应脂质。

[0717] MC3的合成

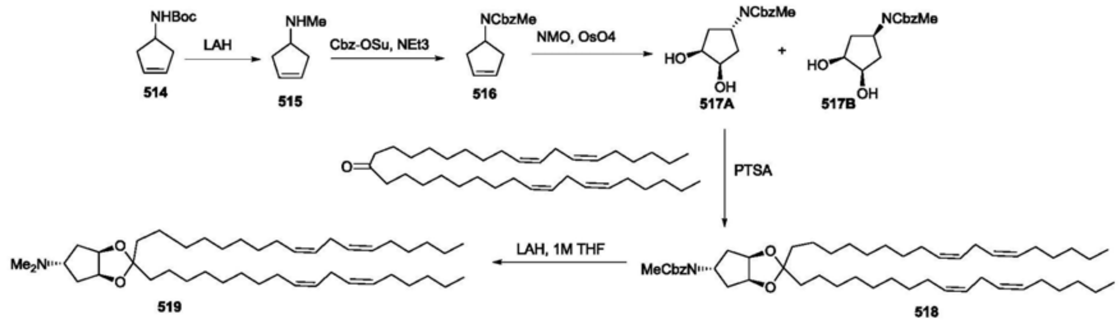
[0718] 如下制备DLin-M-C3-DMA(即，(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯)。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g)、4-N,N-二甲基氨基丁酸盐酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲氨基吡啶(0.61g)以及1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺)盐酸盐(0.53g)在二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温搅拌

过夜。将该溶液用稀盐酸洗涤,随后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机部分在无水硫酸镁上干燥,过滤并且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1%-5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度,使残余物穿过硅胶柱(20g)。合并包含纯化产物的级分并且移除溶剂,产生无色油(0.54g)。

[0719] ALNY-100的合成

[0720] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:

[0721]



[0722] 515的合成:

[0723] 在0℃在氮气氛下向双颈RBF(1L)中LiAlH4(3.74g,0.09852mol)在200ml无水THF中的搅拌悬浮液缓慢添加514(10g,0.04926mol)在70mLTHF中的溶液。在完全添加之后,将反应混合物加温至室温并且然后加热至回流,持续4h。通过TLC监测反应的进展。在完成反应(借助TLC监测)后,将混合物冷却至0℃并且通过小心添加饱和Na2SO4溶液淬灭。将反应混合物在室温搅拌4小时并滤出。将残余物用THF充分洗涤。将滤液和洗涤液混合并用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并且在室温搅拌20分钟。在真空下剥离挥发物以提供作为白色固体的515盐酸盐。产率:7.12g 1H-NMR(DMSO,400MHz):δ=9.34(宽,2H),5.68(s,2H),3.74(m,1H),2.66-2.60(m,2H),2.50-2.45(m,5H)。

[0724] 516的合成:

[0725] 向250mL双颈RBF中化合物515在100mL无水DCM中的搅拌溶液中添加NEt3(37.2mL,0.2669mol)并在氮气气氛下冷却至0℃。在缓慢添加50mL无水DCM中的N-(苄氧羰氧基)-琥珀酰亚胺(20g,0.08007mol)后,允许反应混合物加温到室温。在反应结束(通过TLC检测2-3小时)后,将混合物用1N HCl溶液(1x100mL)和饱和NaHCO3溶液(1x50mL)依次洗涤。随后在无水Na2SO4上干燥有机层并且蒸发溶剂以产生粗制材料,该粗制材料通过硅胶柱色谱法纯化以获得作为粘性物质的516。产率:11g(89%)。1H-NMR(CDCl3,400MHz):δ=7.36-7.27(m,5H),5.69(s,2H),5.12(s,2H),4.96(br.,1H)2.74(s,3H),2.60(m,2H),2.30-2.25(m,2H)。LC-MS[M+H]-232.3(96.94%)。

[0726] 517A和517B的合成:

[0727] 将环戊烯516(5g,0.02164mol)溶解于单颈500mL RBF中的220mL丙酮和水(10:1)的溶液内,并且在室温向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g,0.06492mol),随后添加叔-丁醇中的4.2mL 7.6%OsO4溶液(0.275g,0.00108mol)。在反应结束(约3小时)后,将混合物通过添加固体Na2SO3淬灭并且将所产生的混合物在室温搅拌1.5小时。将反应混合物用DCM(300mL)稀释并且用水(2x100mL)洗涤,随后用饱和NaHCO3(1x50mL)溶液、水(1x30mL)并最终用盐水(1x50mL)洗涤。在无水Na2SO4上干燥有机相并且在真空中移除溶剂。粗制材料的硅胶柱色谱法纯化提供了非对映异构体的混合物,这些非对映异构体由制备级HPLC分离。产率:约6g粗制物

[0728] 517A-峰-1(白色固体),5.13g(96%)。1H-NMR(DMSO,400MHz):δ=7.39-7.31(m,5H),5.04(s,2H),4.78-4.73(m,1H),4.48-4.47(d,2H),3.94-3.93(m,2H),2.71(s,3H),1.72-1.67(m,4H)。LC-MS-[M+H]-266.3,[M+NH4+]-283.5存在,HPLC-97.86%。通过X射线证实立体化学。

[0729] 518的合成:

[0730] 使用与被描述用于合成化合物505的方法类似的方法,获得呈无色油状物的化合物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%。

[0731] 用于合成化合物519的一般方法:

[0732] 将化合物518(1当量)在己烷(15mL)中的溶液以逐滴方式添加至LAH在THF(1M,2当量)中的冰冷溶液中。在完成添加后,将混合物在40℃加热0.5小时,随后在冰浴上再次冷却。将混合物用饱和Na2SO4水溶液小心地水解,随后经塞里滤料(celite)过滤并缩减成油。柱色谱法提供呈无色油状物获得的纯519(1.3g,68%)。13C NMR=130.2,130.1(x2),127.9(x3),112.3,79.3,64.4,44.7,38.3,35.4,31.5,29.9(x2),29.7,29.6(x2),29.5(x3),29.3(x2),27.2(x3),25.6,24.5,23.3,226,14.1;电喷雾MS(+ve):C44H80NO2(M+H)+的计算分子量为654.6,观察到分子量为654.6。

[0733] 通过标准或非挤出方法制备的配制品可以按类似的方式来表征。例如配制品典型地通过视觉检查来进行表征。它们应该是发白的半透明溶液,无聚集物或沉淀。脂质纳米颗粒的粒径和粒径分布可以使用例如马尔文(Malvern)Zetasizer Nano ZS(马尔文公司(Malvern),USA)通过光散射来进行测量。颗粒应该是约20-300nm,例如尺寸是40-100nm。该粒径分布应该是单峰的。配制品中的总dsRNA浓度以及捕获的片段是使用染料排除测定来评估。配制的dsRNA的样品可以与RNA结合染料如Ribogreen(分子探针公司(Molecular Probes))在配制品破坏性表面活性剂(例如0.5%Triton-X100)存在或不存在下孵育。配制品中的总dsRNA可以相对于标准曲线,通过来自含有表面活性剂的样品的信号来确定。该捕获的片段是通过将“游离”dsRNA内含物(如通过在表面活性剂不存在下的信号所测量的)从该总dsRNA内含物中减去来确定。包埋的dsRNA的百分比典型地>85%。对于SNALP配制品而言,颗粒尺寸是至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm、以及至少120nm。适合的范围典型地是约至少50nm至约至少110nm、约至少60nm至约至少100nm、或约至少80nm至约至少90nm。

[0734] 用于口服给予的组合物和配制品包括粉剂或颗粒剂、微粒剂、纳米颗粒剂、在水或非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或迷你片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可以是希望的。在一些实施例中,口服配制品是以下那些:在其中本发明所表征的dsRNA与一种或多种渗透增强剂表面活性剂以及螯合剂结合地给予。适合的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)以及乌索脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡糖胆酸、甘油胆酸、甘油脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-梭链孢酸钠以及甘油二氢梭链孢酸钠。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、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、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、一种酰基肉毒碱、一种酰基胆碱、或一种甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如钠盐)。在一些实施例中,渗透增强剂的组合(例如脂肪酸/盐)是与胆汁酸/盐组合使用。一个示例性的组合是月桂酸、羊蜡酸以及UDCA的钠盐。其他渗透促强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。本发明表征的dsRNA可以口服递送,以包括喷雾干燥颗粒的颗粒剂的形式递送,或者复合形成颗粒或纳米颗粒。DsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸烷基酯、聚氧乙烷(polyoxethane)、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生化聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。合适的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如p-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-异丁烯酸酯、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)、藻朊酸盐、以及聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服配制品及其制备在美国专利6,887,906、美国公开号20030027780以及美国专利号6,747,014中详述,这些文献的每一个通过引用结合在此。

[0735] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内给药的组合物和配制品可以包括无菌水溶液,其也可以包含缓冲液、稀释剂及其他适当的添加剂,例如但不限于:渗透增强剂、载体化合物及其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0736] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂以及含脂质体配制品。这些组合物可以产生自多种组分,这些组分包括但不限于预成形的液体、自乳化固体以及自乳化半固体。

[0737] 本发明中表征的药物配制品(可以方便地以单位剂型存在)可以根据医药工业内熟知的常规技术来制备。此类技术包括以下这样的步骤:将这些活性成分与该(这些)药物载体或赋形剂进行联合。总体而言,这些配制品是通过以下步骤来制备:使这些活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或它们两者均匀地且精细地联合,并且如果需要,进而将产品成形。

[0738] 本发明中表征的组合物可以被配制为许多可能的剂型中的任一者,这些剂型比如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软胶囊、栓剂以及灌肠剂。这些组合物还可以被配制为在水性或非水性介质或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

[0739] 另外的配制品

[0740] 乳剂

[0741] 本发明的组合物可以被制备或配制为乳剂。乳剂典型地是一种液体以直径通常超过0.1μm的液滴形式分散于另一种中的多相体系(参见,例如安赛尔(Ansel)的药物剂型与药物传递系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦LV.、波波维奇(Popovich)NG.以及安赛尔HC.,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(Lippincott

Williams&Wilkins)(第8版),纽约州纽约;爱德森,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页;罗索夫,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;布洛克,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第2卷,第335页;希古契(Higuchi),雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),麦克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿(Easton),Pa.,1985,第301页)。乳剂经常是包含密切混合且彼此分散的两个不混溶的液相的双相体系。通常,乳剂可以为油包水(w/o)或水包油(o/w)两种。当水相作为微小液滴细碎并分散到本体油相中时,所产生的组合物被称为油包水(w/o)乳剂。可替代地,当油相作为微小液滴细碎并分散到本体水相中时,所产生的组合物被称为水包油(o/w)乳剂。除了分散相和活性药物外,乳剂还可以含其他组分,并且活性药物可以作为在水相、油相中的溶液,或者其自身作为独立相。如果需要,也可以存在药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳剂还可以为包括多于两种相的多重乳剂,比如像油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳剂的情况。此类复合配制品通常提供某些简单的二元乳剂所不具有的优势。当多重乳剂中的o/w乳剂的各油滴还包有小水滴时,该多重乳剂形成w/o/w乳剂。同样地,在油连续相中稳定化的水滴中封装油滴的系统,构成o/w/o乳剂。

[0742] 乳剂具有较小或没有热力学稳定性的特征。通常,乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或配制品的粘性保持这种形式。在乳剂状软膏基料或膏剂的情况下,乳剂的每个相都可以为半固体或固体。其他稳定乳剂的方式需要使用乳化剂,这些乳化剂可以合并进入到乳剂的任意相中。乳化剂可以大致分成4类:合成性的表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和精细分散的固体(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen,LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。

[0743] 合成性的表面活性剂(又称为表面活性剂)在乳剂配制中有广泛应用并且已经在文献中进行了综述(参见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.(Allen,LV.)、波波维奇NG.(Popovich NG.)和安塞尔HC(Ansel HC.),2004,LWW数据库(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约州纽约(New York,NY);列赫尔(Rieger),于药物剂型,利伯曼(Lieberman)、列赫尔(Rieger)和班克(Banker)(编著),1988,马塞尔德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约州纽约,第1卷,第285页;爱德森(Idson),于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),马塞尔德克公司,纽约州纽约,1988,第1卷,第199页)。表面活性剂典型地是两亲的,并且包含亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比率被称为亲水/亲油平衡值(HLB),并且它是配制品制备中分类和选择表面活性剂的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质:非离子、阴离子、阳离子和两性分成不同类别(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen,LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利

平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;列赫尔(Rieger),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,285页)。

[0744] 乳剂配制品中使用的天然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水特性,所以它们能够吸收水以形成w/o乳剂并仍然保持它们的半固体稠度,如无水羊毛脂和亲水凡士林。精细分散的固体也已经被用做优良的乳化剂,尤其是与表面活性剂组合和在粘性制剂中使用。这些包括极性无机固体,如重金属氢氧化物、非溶胀粘土如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石,高岭土、蒙脱土、胶状硅酸铝和胶状镁硅酸铝、颜料和非极性固体如碳或甘油基三硬脂酸酯。

[0745] 在乳剂配制品中还包括多种非乳化材料,并且它们对乳剂的特性有帮助。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(布洛克,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第335页;爱德森,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。

[0746] 亲水胶体或水状胶体包括天然存在的树胶和合成的聚合物如多糖(如阿拉伯树胶、琼脂、藻酸、角叉菜聚糖、瓜耳胶、刺梧桐树胶和皇蓍胶),纤维素衍生物(如羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成的聚合物(如卡波姆胶、纤维素醚和羰基乙烯基聚合物)。这些物质在水中分散或溶胀形成胶状溶液,这些胶状溶液通过在分散相液滴的周围形成强的界面膜并通过增强外相的粘度来稳定乳剂。

[0747] 由于乳剂通常包含一些可以容易地支持微生物生长的成份如碳水化合物、蛋白、固醇和磷脂,所以这些制剂通常含有防腐剂。乳剂配制品中通常使用的防腐剂包括甲基对羟基苯甲酸酯、丙基对羟基苯甲酸酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。通常也将抗氧剂加入到乳剂配制品中,以预防配制品的变质。所用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,如生育酚,没食子酸烷基酯、丁化羟基茴香醚、丁化羟基甲苯,或还原剂如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,和抗氧化剂增效剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0748] 通过皮肤途径、口途径和肠胃外途径使用乳剂配制品和制造它们的方法已经在文献中综述(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen,LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。用于口服递送的乳剂配制品由于配制简单以及从吸收和生物可利用率方面上的功效已经被非常广泛地使用(参见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.和安塞尔HC,2004,LWW数据库(第8版),纽约州纽约;罗索夫,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;爱德森,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。基于矿物油的缓泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂属于经常作为o/w乳剂口服给予的物质。

[0749] 在本发明的一个实施例中，将iRNA和核酸的组合物配制为微乳剂。可以将微乳剂定义为水、油和两亲分子的体系，所述体系是光学各向同性和热动力学稳定的单一液态溶液(见例如，安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)，艾伦(Allen,LV.)，波波维奇(Popovich NG.)，以及安塞尔(Ansel HC.)，2004，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版)，纽约，纽约州；罗索夫(Rosoff)，于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中，利伯曼(Lieberman)，列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著)，1988，马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.)，纽约，纽约州，卷1，245页)。典型地，微乳剂是通过如下方法制备的系统：首先将油分散到表面活性剂水溶液中，然后加入足量的通常为中等链长度的醇的第四组分来形成透明系统。因此，微乳剂也被描述成由表面活性分子的界面膜稳定化的两种不能混合的液体的热力学稳定的各向同性的澄清分散系(朗(Leung)与纱(Shah)，在：药物的受控释放：聚合物和聚集体系统(Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate Systems)，罗索夫M.编著，1989，VCH出版公司，纽约，第185-215页)。通常微乳剂通过包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质的三至五种组分的组合来制备。微乳剂是为油包水(w/o)还是水包油(o/w)类型取决于所使用的油和表面活性剂的特性以及表面活性剂分子的极性头部和羟基尾的结构和几何包装(斯科特(Schott)，雷明顿氏药物科学，麦克出版公司，伊斯顿，Pa.，1985，第271页)。

[0750] 已经广泛研究了利用相图的现象学方法并且对本领域技术人员，该方法已经产生怎样配制微乳剂的广泛知识(见例如，安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)，艾伦(Allen,LV.)，波波维奇(Popovich NG.)，以及安塞尔(Ansel HC.)，2004，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版)，纽约，纽约州；罗索夫(Rosoff)，于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中，利伯曼(Lieberman)，列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著)，1988，马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.)，纽约，纽约州，卷1，245页；布洛克(Block)于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中，利伯曼(Lieberman)，列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著)，1988，马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.)，纽约，纽约州，卷2，335页)。与常规乳剂相比，微乳剂提供的优点是能将非水溶性药物溶解到自发形成的热力学稳定的液滴的配制品中。

[0751] 在微乳剂的制备中使用的表面活性剂包括但不限于单独的或与助表面活性剂组合使用的离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij96、聚氧乙烯油基醚、聚脂肪酸甘油酯、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)、一又二分之一油酸十甘油酯(SO750)(decaglycerol sequioleate)、十油酸十甘油酯(DAO750)。该辅助表面活性剂通常是短链醇如乙醇、1-丙醇和1-丁醇，作用是通过渗透到表面活性剂膜中并由此在表面活性剂分子间产生空余空间来产生无序膜从而提高界面流动性。然而，微乳剂可以不用助表面活性剂进行制备，并且无醇的自乳化微乳剂系统是本领域已知的。典型地，水相可以是(但不限于)水、药物的水溶液、甘油、PEG 300、PEG 400、聚甘油、丙二醇、和乙乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于如多种材料，比如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯，中等链(C8-C12)的单、二和三甘油三酯，聚氧乙基化的甘油脂肪酸酯、脂肪醇，聚乙二

醇化的甘油酯(polyglycolized glyceride),饱和的聚乙二醇化的C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0752] 从药物溶解和增强的药物吸收方面看,微乳剂是特别令人感兴趣的。已经提出基于脂质的微乳剂(o/w和w/o)以增强药物(包括肽)的口服生物利用率(见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;康斯坦丁尼德斯(Constantinides)等人,药物研究(Pharmaceutical Research),1994,11,1385-1390;里切尔(Ritschel),实验与临床药理学的方法与发现(Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.),1993,13,205)。微乳剂提供以下优点:改进药物溶解、保护药物免遭酶水解、可能因表面活性剂引起的膜流动性和通透性改变而增强药物吸收、易于制备、比固体剂型易于口服施用、临床效力改善和毒性降低(见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;康斯坦丁尼德斯(Constantinides)等人,药物研究(Pharmaceutical Research),1994,11,1385;胡(Ho)等人,药物科学杂志(J.Pharm.Sci.),1996,85,138-143)。通常,微乳剂的成份在环境温度下混合在一起时,它们可以自发形成微乳剂。在配制热不稳定药物、肽或iRNA时,这可以是特别有利的。在化妆品和药物应用领域,微乳剂在活性组分的透皮递送中也是有效的。预期本发明的微乳剂组合物和配制品将促进iRNA和核酸从胃肠道的全身性吸收增加以及改善iRNA和核酸的局部细胞摄取。

[0753] 本发明的微乳剂也可以含有另外的组分和添加剂,如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(Grill3)、Labrasol、和改善制剂特性并增强本发明iRNA和核酸吸收的渗透增强剂。可以将本发明的微乳剂中所用的渗透增强剂划分为属于5大类之一---表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(李(Lee)等人,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页)。每个类型都已经在以上进行了讨论。

[0754] <u>渗透增强剂</u>

[0755] 在一个实施例中,本发明采用了不同渗透增强剂来实现向动物皮肤高效递送核酸,具体地iRNA。大多数药物以离子化形式和非离子化形式两者存在于溶液中。然而,通常只有脂溶的或亲脂的药物易于穿过细胞膜。已经发现,如果用渗透增强剂处理要穿过的膜,甚至连非亲脂药物都可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂药物扩散穿过细胞膜以外,渗透增强剂还增强亲脂药物的渗透性。

[0756] 可以将渗透增强剂划分为属于5大类之一,即,表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(见例如,马姆斯顿(Malmsten,M.)药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92)。以下更详细地描述了以上提及的渗透增强剂的类别中的每一个。

[0757] 表面活性剂:在本发明的上下文中,表面活性剂(或“表面活性试剂”)为化学实体,当其溶解在水溶液中时,它能降低该溶液的表面张力或者水溶液和另一种液体之间的界面张力,结果是iRNA通过粘膜的吸收得到增强。除了胆汁盐和脂肪酸之外,这些渗透增强剂还包括例如月桂醇硫酸钠、聚氧乙烯基-9-月桂基醚和聚氧乙烯基-20-鲸蜡基醚(参见,例如,马姆斯顿(Malmsten,M.)药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers

in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92);以及全氟化学乳剂如FC-43(高松(Takahashi)等人,药物药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1988,40,252)。

[0758] 脂肪酸:充当渗透增强剂的各种脂肪酸及其衍生物例如包括油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯(1-单油酰-外消旋-甘油)、二月桂精、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C_{1-20}烷基酯(例如、甲基酯、异丙基酯和叔丁基酯)及其单和二甘油酯(即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(参见例如托乌托(Touitou),E.等人,药物递送的增强(Enhancement in Drug Delivery),CRC出版社,丹弗斯(Danvers),MA,2006;李(Lee)等人,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页;马尔姆斯滕(Malmsten),M.治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;El哈里里(Hariri)等人,药房和药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1992,44,651-654)。

[0759] 胆汁盐:胆汁的生理学作用包括促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如,马尔姆斯滕M.药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;布鲁顿(Brunton),第38章,引自:古德曼吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第9版,哈德曼(Hardman)等人编辑,McGraw-Hill公司,纽约,1996,第934-935页)。不同天然的胆汁盐和它们的合成衍生物用作渗透增强剂。因此术语“胆汁盐”包括胆汁的任何天然存在的组分以及任何它们的合成衍生物。适合的胆汁盐包括,例如,胆酸(或其药学上可接受的钠盐、胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡糖胆酸(葡糖胆酸钠)、甘氨胆酸(甘氨胆酸钠)、甘氨脱氧胆酸(甘氨脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢褐霉酸钠(STDHF)、糖二氢褐霉酸钠以及聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,马尔姆斯滕M.药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统锐评,1991,第92页;斯温雅德(Swinyard),第39章,雷明顿氏药物科学,第18版,真纳罗(Gennaro)编辑,麦克出版公司,伊斯顿,Pa.,1990,第782-783页;村西,治疗性药物载体系统锐评,1990,7,1-33;山本(Yamamoto)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharm.Exp.Ther.),1992,263,25;山下(Yamashita)等人,药物科学杂志,1990,79,579-583)。

[0760] 螯合剂:与本发明有关使用的螯合剂可以定义为通过金属离子与其形成复合物将金属离子从溶液中除去的化合物,结果是通过粘膜的iRNA的吸收得到加强。关于它们在本发明中作为渗透增强剂的应用,因为多数特征化的DNA核酸酶需要二价金属离子用于催化并且因此可以被螯合剂抑制,螯合剂还具有充当DNase抑制剂的附加优势(加热特(Jarrett),层析学杂志(J.Chromatogr.),1993,618,315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(如水杨酸钠、5-甲氧水杨酸酯和高香草酸酯(homovanilate))、胶原质的N-酰基衍生物、月桂醇聚醚-9和β-二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)(参见例如凯特戴尔(Katdare),A.等人,用于制药、生物技术和药物递送的赋形剂的

发展(Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery),CRC出版社,丹弗斯(Danvers),MA,2006;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页;村西(Muranishi),治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;李等人,治疗性药物载体系统锐评,1991,第92页;村西,治疗性药物载体系统锐评,1990,7,1-33;布尔(Buur)等人,控制释放杂志(J.Control Rel.),1990,14,43-51)。

[0761] 非螯合性非表面活性剂:如在此所使用,非螯合性非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或作为表面活性剂展示不明显活性但是反而增强iRNA经消化道粘膜吸收的化合物(见例如村西,治疗性药物载体系统锐评,1990,7,1-33)。这类别的渗透增强剂包括例如不饱和环状脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页);以非甾体抗炎剂如双氯芬酸钠、引哚美辛和苯丁唑啉(山下(Yamashit)等人药物药理学(,J.Pharm.Pharmacol.),1987,39,621-626)。

[0762] 也可以添加在细胞水平增强摄取iRNA的物质至本发明的药物组合物和其他组合物。例如阳离子脂质,如脂质体(淳一(Junichi)等人,美国专利号5,705,188)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸(洛洛(Lollo)等人,PCT申请WO 97/30731)也已知增强dsRNA的细胞摄取。市售转染试剂的例子包括例如Lipofectamine™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州(Invitrogen;Carlsbad,CA))、Lipofectamine 2000™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、293fectin™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Cellfectin™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、DMRIE-C™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、FreeStyle™MAX(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Lipofectamine™2000CD(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Lipofectamine™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、RNAiMAX(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Oligofectamine™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Optifect™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、X-tremeGENE Q2转染试剂(罗氏公司(Roche);格兰扎克尔街,瑞士(Grenzacherstrasse,Switzerland))、DOTAP脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)、DOSPER脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)或Fugene(格兰扎克尔街,瑞士)、Transfectam®试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州(Promega;Madison,WI))、TransFast™转染试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、Tfx™-20试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、Tfx™-50试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、DreamFect™(OZ生命科学公司;马赛市,法国(OZ Biosciences;Marseille,France))、EcoTransfect(OZ生命科学公司;马赛市,法国)、TransPass[a] D1转染试剂(新英格兰生物实验室;伊普斯威奇市,马萨诸塞州,美国(New England Biolabs;Ipswich,MA,USA))、LyoVec™/LipoGen™(英杰公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国(Invivogen;San Diego,CA,USA))、PerFectin转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国(Genlantis;San Diego,CA,USA))、NeuroPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER 2转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、Cytofectin转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、

BaculoPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、TroganPORTER™转染试剂(Genlantis公司;圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、RiboFect(星谱生计公司;陶顿市,马萨诸塞州,美国(Bioline;Taunton,MA,USA))、PlasFect(星谱生计公司;陶顿市,马萨诸塞州,美国)、UniFECTOR(晨桥国际公司;山景城,加利福尼亚州,美国(B-Bridge International,Mountain View,CA,USA))、SureFECTOR(晨桥国际公司;山景城,加利福尼亚州,美国)或HiFect™(晨桥国际公司;山景城,加利福尼亚州,美国),连同其他。

[0763] 其他物质可以用来增强所施用核酸渗透,包括二醇如乙二醇和丙二醇、吡咯如2-吡咯、氮酮和萜类如苧烯和薄荷酮。

[0764] 载体

[0765] 本发明的某些组合物还将载体化合物结合在配制品中。如在此所使用,“载体化合物”或“载体”可以指核酸或其类似物,它是惰性的(即本身不具有生物活性),但却在体内过程中被认为是核酸,例如通过降解生物活性的核酸或促进其从循环中的除去而减少具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载体化合物的共给予(典型地后一种物质过量)可以引起肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度减少,假定归因于该载体化合物与该核酸之间对共同受体的竞争。例如与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰胺基-4’异硫氰酸芪-2,2’-二磺酸共施用时,肝组织中部分硫代磷酸酯化的dsRNA的回收可以减少(宫尾(Miyao)等人,DsRNA研究与研发(DsRNA Res.Dev.),1995,5,115-121;高仓(Takakura)等人,DsRNA&核酸药物研发(DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.),1996,6,177-183)。

[0766] 赋形剂

[0767] 与载体化合物相反,“药物载体”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或用于将一种或多种核酸递送至动物的任何其他药理学上惰性的媒介物。该赋形剂可以是液体或固体,当与核酸和特定药物组合物的其他组分组合时,参考意欲的给予方式,对赋形剂进行选择以提供希望的容积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于结合剂(例如,糯性玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、淀粉乙醇酸钠等);以及润湿剂(例如,月桂基硫酸钠)。

[0768] 适合于非肠胃外给予的、不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。适当的药学上可接受载体包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0769] 用于局部给予核酸的配制品可以包括在普通溶剂如醇中的无菌或非无菌的水溶液、非水溶液,或在液体或固体油基质中的核酸溶液。这些溶液还可以包含缓冲液、稀释液和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外给予的、且不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0770] 适当的药学上可接受赋形剂包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0771] 其他组分

[0772] 本发明的组合物另外可以包含其他本领域熟知用量的在药物组合物中常用的辅助组分。因此，例如这些组合物可以包含另外的、可相容的药学上有活性的物质如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂，或者可以包含对本发明的组合物的各种剂型的物理配制有用的其他物质，如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而，当加入此类物质时，它们不应当过度干扰本发明的组合物的成份的生物活性。可以将这些配制品进行灭菌并且如果希望的话与助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、盐混合，用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质、芳香物质和/或芬芳物质等进行混合，这些助剂不与该配制品中的一种或多种核酸发生有害的相互作用。

[0773] 水性悬浮液可以包含增加该悬浮液的粘度的物质，这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

[0774] 在一些实施例中，本发明中表征的药物组合物包含(a)一种或多种iRNA化合物和(b)通过非RNAi机制发挥作用的一种或多种生物试剂。此类生物试剂的实例包括干扰ALAS1与至少一个ALAS1结合配偶体的相互作用的试剂。

[0775] 此类化合物的毒性与治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学程序来确定，例如以确定LD50(50％群体的致死剂量)以及ED50(在50％群体中治疗有效的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比为治疗指数，并且它可以被表示为比率LD50/ED50。典型地是那些表现出高的治疗指数的化合物。

[0776] 从细胞培养物测定法和动物研究中获得的数据可以在配制人类中使用的剂量范围时使用。在本发明中表征的组合物的剂量总体上处在一个循环浓度范围内，该范围包括具有很小或没有毒性的ED50。该剂量可以取决于所采用的剂型以及利用的给予途径而在该范围内变化。对于任何在本发明表征的方法中使用的化合物，该治疗上有效的剂量可以从细胞培养测定来进行初始估计。在动物模型中可以将一个剂量配制为达到该化合物的循环血浆浓度范围，或者当适当时，一个靶标序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如，达到该多肽的一个降低的浓度)，该范围包括如在细胞培养中确定的IC50(即，测试化合物实现症状的半最大抑制时的浓度)。这类信息可以用来更精确地确定用于人类中的剂量。可以测量血浆中的水平，例如，通过高效液相层析。

[0777] 除了给予它们之外，如在此所讨论的，还可以将在本发明中表征的iRNA与在治疗与ALAS1表达相关的疾病或失调中有效的其他已知试剂联合给予。在任何情况下，基于使用本领域已知或本文所述的标准功效量值所观察到的结果，施用医师可以调整施用iRNA的量和时间。

[0778] 用于治疗与ALAS1基因表达相关的疾病的方法

[0779] 本发明尤其涉及靶向ALAS1的iRNA的使用，用于抑制ALAS1表达和/或治疗与ALAS1表达相关的疾病、失调、或病理过程。

[0780] 如在此使用的，“与ALAS1表达相关的失调”、“与ALAS1表达相关的疾病”、“与ALAS1表达相关的病理过程”等等包括任何病况、失调、或疾病，其中ALAS1表达是被改变了的(例如，升高的)、一种或多种卟啉的水平是被改变了的(例如，升高的)、血红素生物合成途径(卟啉途径)中的一种或多种酶的水平或活性是被改变了的，或导致血红素生物合成途径病理变化的其他机制。例如，靶向ALAS1基因的iRNA、或其组合，可以用于治疗其中卟啉或卟啉前体(例如，ALA或PBG)水平升高了的病状，(例如，某些卟啉症)，或其中存在血红素生物合

成途径中的酶的缺乏的病状(例如,某些卟啉症)。与ALAS1表达相关的失调包括,例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、以及婴儿暂时性红细胞卟啉症。

[0781] 如在此使用的,有待于根据在此所述的方法进行治疗的"受试者"包括人类或非人动物,例如,哺乳动物。该哺乳动物可以是,例如,啮齿类动物(例如,大鼠或小鼠)或灵长类(例如,猴)。在一些实施例中,受试者是人。

[0782] 在一些实施例中,该受试者经受与ALAS1表达相关的失调(例如,已经被诊断为患有卟啉症或已经遭遇一种或多种卟啉症症状,以及是与卟啉症相关联的突变的携带者)或处于发展与ALAS1表达相关的失调(例如,具有卟啉症家族史的受试者,或是与卟啉症相关联的基因突变的携带者)的风险中。

[0783] 卟啉症(包括急性肝性卟啉症)的分类描述于,例如,巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.),血液(Blood),120(23),作为血液第一版论文在线发布,7月12日,102;DOI 10.1182/blood-2012-05-423186。如在巴望尼和戴斯尼克(Balwain&Desnick)中所述的,急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)是常染色体显性卟啉症并且ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)是常染色体隐性的。在罕见情况下,AIP、HCP、以及VP发生为纯合的显性形式。此外,存在迟发性皮肤卟啉症(PCT)的罕见的纯合隐性形式,这是单一的肝性皮肤性卟啉症,并且还称作肝性红细胞生成性卟啉症。这些卟啉症的临床和实验室特征描述于下表11中。

[0784] 表11:人类肝性卟啉症:临床和实验室特征

[0785]

卟啉症	缺乏酶	遗传	主要症状,NV或CP	酶活性,正常的%	增加的卟啉前体和/或卟啉* 红细胞	尿	粪便
急性肝性卟啉症							
ADP	ALA-脱水酶	AR	NV	约5	Zn-原卟啉	ALA,粪卟啉III	-
AIP	HMB-合酶	AD	NV	约50	-	ALA,PBG,尿卟啉	-
HCP	COPRO-氧化酶	AD	NV和CP	约50	-	ALA,PBG,粪卟啉III	粪卟啉III
VP	PROTO-氧化酶	AD	NV和CP	约50	-	ALA,PBG,粪卟啉III	粪卟啉III,原卟啉
肝性皮肤性卟啉症							
PCT	URO-脱羧酶	零星或AD	CP	<20	-	尿卟啉,7-羧酸卟啉	尿卟啉,7-羧酸卟啉

[0786] AR指示常染色体隐性;AD,常染色体显性;NV,脑脊髓交感神经系统的;CP,皮肤光过敏;并且-,不适用。

[0787] *增加对于诊断可以是非常重要的。

[0788] 在一些实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,肝性卟啉症,例如,AIP、HCP、VP、ADP、或肝性红细胞生成性卟啉症。

[0789] 在一些实施例中,该卟啉症是急性肝性卟啉症,例如,选自急性间歇性卟啉症(AIP)、遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、以及ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)的急性肝性卟啉症。

[0790] 在一些实施例中,该卟啉症是双卟啉症,例如,至少两种卟啉症。在一些实施例中,该双卟啉症包括选自急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、以及ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)的两种或更多种卟啉症。

[0791] 在一些实施例中,该卟啉症是纯合显性的肝性卟啉症(例如,纯合显性的AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在一些实施例中,该卟啉症是AIP、HCP、VP、或肝性红细胞生成性卟啉症、或其组合(例如,双卟啉症)。在实施例中,AIP、HCP、或VP是杂合显性的或是纯合显性的。

[0792] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,ADP,并且显示ALA和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,ADP,并且显示红细胞Zn-原卟啉的升高的水平。

[0793] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,AIP,并且显示ALA、PBG、和/或尿卟啉的升高的水平(例如,升高的尿水平)。

[0794] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示ALA、PBG、和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0795] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,VP,并且显示ALA、PBG、和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。

[0796] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示粪卟啉III和/或原卟啉的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0797] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,PCT,(例如,肝性红细胞生成性卟啉症),并且显示尿卟啉和/或7-羧酸卟啉的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,PCT,(例如,肝性红细胞生成性卟啉症),并且显示尿卟啉和/或7-羧酸卟啉的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0798] 与卟啉症相关联的突变包括编码血红素生物合成途径(卟啉途径)中的一种酶的基因的或改变血红素生物合成途径中基因的表达的基因的任何突变。在许多实施例中,受试者携带卟啉途径中酶的一个或多个突变(例如,ALA脱水酶或PBG脱氨酶)。在一些实施例中,受试者经受急性卟啉症(例如,AIP、ALA脱水酶缺乏卟啉症)。

[0799] 在一些情况中,与健康个体相比,患有急性肝性卟啉症(例如,AIP)的患者,或携带有与急性肝性卟啉症(例如,AIP)相关联的突变但无症状的患者具有升高的ALA和/或PBG水

平。参见,例如,弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006;沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007。在此类情况中,ALA和/或PBG的水平可以是升高的,甚至是在该患者不具有,或从未有过发作的情况下。在一些情况中,该患者否则是完全无症状的。在一些此类情况下,该患者经受疼痛,例如,神经性疼痛,这可以是慢性痛(例如,慢性神经性疼痛)。在一些情况中,该患者具有神经病变。在一些情况中,该患者具有渐进性神经病变。

[0800] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平。可以使用本领域中已知的方法或在此描述的方法对卟啉或卟啉前体的水平进行评估。例如,评估尿和血浆ALA和PBG水平,连同尿和血浆卟啉水平的方法披露于弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006;和沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007,将其全部内容以其整体通过引用结合在此。

[0801] 在一些实施例中,受试者是卟啉症的动物模型,例如,卟啉症的小鼠模型(例如,如在林德贝格等人自然遗传学(Nature Genetics),12:195-199,1996中描述的突变小鼠)。在一些实施例中,受试者是人类,例如,患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中的人类,如在此所述的。在一些实施例中,受试者是不具有卟啉症的急性发作。在一些实施例中,受试者从未有过发作。在一些实施例中,患者经受慢性痛。在一些实施例中,患者具有神经损伤。在实施例中,受试者具有EMG改变和/或神经传导速度改变。在一些实施例中,受试者是无症状的。在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中(例如,携带有与卟啉症相关联的基因突变)并且是无症状的。在一些实施例中,受试者先前有过急性发作但是在治疗时是无症状的。

[0802] 在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中并且接受预防性治疗以防止卟啉症的发展。。在一些实施例中,受试者具有升高的水平的卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG。在一些实施例中,预防治疗开始于青春期。在一些实施例中,治疗降低卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的水平(例如,血浆水平或尿水平)。在一些实施例中,治疗预防卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平。在一些实施例中,治疗预防与卟啉症相关联的症状,例如,疼痛或神经损伤的发展,或降低其频率或严重性。

[0803] 在一些实施例中,卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平是升高的,例如,在来自该受试者的血浆或尿的样本中。在一些实施例中,基于来自该受试者的样本中的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的绝对水平,评估受试者中卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平。在一些实施例中,基于来自该受试者的样本中的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的相对水平,评估受试者中卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平。在一些实施例中,相对水平是相对于来自该受试者的样本中的另一种蛋白或化合物的水平,例如,肌酸酐的水平。在一些实施例中,样本是尿样本。在一些实施例中,样本是血浆样本。在一些实施例中,样本是粪便样本。

[0804] 可以确定卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平,例如,通过显示受试者具有的卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG水平(例如,ALA和/或PBG的血浆或尿水平)是大于、或大于或等于参比值。具有治疗卟啉症经验的医师将能够确定卟啉或卟啉前体,(例如,ALA和/或PBG)的水平是否是升高的,例如,出于诊断卟啉症的目的或用于确定受试者是

否是处于发展卟啉症的风险中，例如，受试者可能预先倾向于急性发作或与卟啉症相关联的病变，例如像，慢性痛(例如，神经性疼痛)以及神经病变(例如，渐进性神经病变)。

[0805] 如在此使用的，“参比值”是指来当受试者不处于疾病状态时自该受试者的值，或是来自正常或健康受试者的值，或是来自参比样本或群体的值，例如，一组正常或健康的受试者(例如，不携带与卟啉症相关联的突变的一组受试者和/或不经受与卟啉症相关联的症状的一组受试者)。

[0806] 在一些实施例中，参比值是相同个体的疾病前水平。在一些实施例中，参比值是参比样本或群体的水平。在一些实施例中，参比值是参比样本或群体中的平均值或中位值。在一些实施例中，参比值是超过参比样本或群体中平均值的两个标准差的值。在一些实施例中，参比值是超过参比样本或群体中平均值2.5、3、3.5、4、4.5、或5个标准差的值。

[0807] 在一些实施例中，其中受试者具有卟啉或卟啉前体，例如，ALA和/或PBG的升高的水平，该受试者具有的ALA和/或PBG的水平高于参比值至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、或90％。在一些实施例中，受试者具有卟啉或卟啉前体，例如，ALA和/或PBG的升高的水平，该水平高于参比值至少2、3、4、5、6、7、8、9、或10倍。

[0808] 在一些实施例中，参比值是参比上限。如在此使用的，“参比上限”是指参比样本或群体的95％置信区间上限的一个水平，该样本或群体是，例如，一组正常(例如，野生型)或健康个体，例如，不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体和/或不经受卟啉症的个体。因此，参比下限是指相同95％置信区间下限的一个水平。

[0809] 在一些实施例中，其中受试者具有卟啉或卟啉前体，例如，ALA和/或PBG的升高的水平，例如，血浆水平或尿水平，该水平大于或等于参比值，例如参比上限2倍、3倍、4倍、或5倍。在一些实施例中，受试者具有大于参比上限4倍的卟啉或卟啉前体，例如，ALA或PBG的尿水平。

[0810] 在一些实施例中，参比值是提供于弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人，临床化学(Clinical Chemistry)，52(4):701-707,2006或沙赫(Sardh)等人，临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics)，46(4):335-349,2007中的值。在一些实施例中，参比值是提供于沙赫(Sardh)等人的表1中的值。

[0811] 在一些实施例中，受试者是人类并且具有大于或等于4.8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。在某些实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于约3、4、5、6、7、或8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。

[0812] 在实施例中，血浆PBG的参比值是0.12μmol/L。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.10μmol/L、0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或0.60μmol/L的血浆PBG水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的PBG的血浆水平。

[0813] 在实施例中，尿PBG的参比值是1.2mmol/mol肌酸酐。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于1.0mmol/mol肌酸酐、1.2mmol/mol肌酸酐、2.4mmol/mol肌酸酐、3.6mmol/mol肌酸酐、4.8mmol/mol肌酸酐、或6.0mmol/mol肌酸酐的尿PBG水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于4.8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。

[0814] 在实施例中，血浆ALA的参比值是0.12μmol/L。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.10μmol/L、0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或

0.60μmol/L的血浆ALA水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的血浆ALA水平。

[0815] 在实施例中，尿ALA的参比值是3.1mmol/mol肌酸酐。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于2.5mmol/mol肌酸酐、3.1mmol/mol肌酸酐、6.2mmol/mol肌酸酐、9.3mmol/mol肌酸酐、12.4mmol/mol肌酸酐、或15.5mmol/mol肌酸酐的尿ALA水平。

[0816] 在实施例中，血浆卟啉的参比值是10nmol/L。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于10nmol/L的血浆卟啉水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于8、10、15、20、25、30、35、40、45、或50nmol/L的血浆卟啉水平。受试者是人类并且具有大于、或大于或等于40nmol/L的血浆卟啉水平。在实施例中，尿卟啉的参比值是25μmol/mol肌酸酐。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于25μmol/mol肌酸酐的尿卟啉水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或等于20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、或80μmol/mol肌酸酐的尿卟啉水平。

[0817] 在一些实施例中，受试者具有卟啉或卟啉前体，例如，ALA或PBG的这样一个水平，例如，血浆水平或尿水平，该水平大于健康个体样本中99％的个体的水平。

[0818] 在一些实施例中，受试者具有ALA或PBG的这样一个水平，例如，血浆水平或尿水平，该水平大于超过健康个体样本中平均水平两个标准差的水平。

[0819] 在一些实施例中，受试者具有的ALA的尿水平是正常受试者(例如，不携带与卟啉症相关联的突变的受试者)平均水平的1.6或更多倍。在一些实施例中，受试者具有的ALA的血浆水平是正常受试者平均水平的2或3倍。在一些实施例中，受试者具有的PBG的尿水平是正常受试者平均水平的四倍或更多倍。在一些实施例中，受试者具有的PBG的血浆水平是正常受试者平均水平的四倍或更多倍。

[0820] 在一些实施例中，该方法有效降低卟啉或卟啉前体，例如，ALA和/或PBG的水平。在实施例中，该方法对于产生升高的卟啉或卟啉前体，例如，ALA或PBG水平的预定下降是有效的。在一些实施例中，预定下降是降低至少10％、20％、30％、40％、或50％。在一些实施例中，预定下降是有效预防或改善症状，例如，疼痛或复发性发作的一个下降。

[0821] 在一些实施例中，预定下降是至少1、2、3、或更多个标准差的一个下降，其中该标准差是基于来自参比样本，例如，如在此所述的参比样本的值确定的。

[0822] 在一些实施例中，预定下降是这样一个下降，该下降使卟啉或卟啉前体水平达到小于，或达到小于或等于参比值(例如，如在此所述的参比值)的一个水平。

[0823] 在一些实施例中，有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者经受疼痛，例如，慢性痛。在实施例中，受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中，例如，急性肝性卟啉症，例如，AIP。在实施例中，例如，通过降低疼痛的严重性或治愈疼痛，该方法有效治疗疼痛。在实施例中，该方法有效降低或预防神经损伤。

[0824] 在一些实施例中，有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(a)具有升高的ALA和/或PBG的水平并且(b)疼痛，例如，慢性痛。在实施例中，该方法有效降低升高的ALA和/或PBG的水平和/或治疗疼痛，例如，通过降低疼痛的严重性或治愈疼痛。

[0825] 在一些实施例中，受试者是一种动物，充当用于与ALAS1表达相关的失调的模型。

[0826] 在一些实施例中，受试者是一种动物，充当用于卟啉症的模型(例如，具有一个或多个突变的基因修饰动物。在一些实施例中，卟啉症是AIP并且受试者是AIP的动物模型。在

这样一种实施例中,受试者是胆色素原脱氨酶缺乏的遗传修饰的小鼠,例如像,描述于林德贝格等人,自然遗传学(Nature Genetics),12:195-199,1996中的小鼠,或描述于安田町(Yasuda,M.),于(Yu,C.)张(Zhang,J.),克拉维罗(Clavero,S.),德尔曼(Edelmann,W.),甘(Gan,L.),菲利普斯(Phillips,J.D.),&德斯耐克(Desnick,R.J.)中的纯合R167Q小鼠。急性间歇性卟啉症:严重地影响的敲入小鼠,模拟人类纯合显性表型。(摘要,2011年10月14日呈递于美国人类遗传学学会(American Society of Human Genetics);项目编号1308F;2012年4月4日开放在线访问,网址是ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167);将所有参考通过引用以其整体结合在此。针对在人类中引起纯合显性AIP的突变,已经生成了若干个敲入模型。所用的突变包括,例如,PBG脱氨酶中的R167Q、R173Q、以及R173W。能存活的纯合子包括R167Q/R176Q或R167Q/R173Q,这两者都展示组成型升高的ALA和PBG水平,该水平类似于人类纯合显性的AIP中的表型;在一些实施例中,这样一种能存活的纯合AIP小鼠模型是该受试者。

[0827] 在一个实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(例如,人类受试者或患者)处于发展卟啉症的风险中或已经被诊断为患有与ALAS1表达相关的失调,例如,卟啉症。在一些实施例中,受试者是经受一种或多种卟啉性症状的一次或多次急性发作的受试者。在其他实施例中,受试者是长期地经受卟啉症的一种或多种症状(例如,疼痛,例如,神经性疼痛和或神经病变,例如,渐进性神经病变)的受试者。在一些实施例中,受试者携带有在此描述的遗传变异(例如,突变)但是此外是无症状的。在一些实施例中,受试者之前接受过如在此描述的血红素产品(例如,氯化血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)的治疗。

[0828] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(例如患有卟啉症,例如像,AIP的受试者)近期经历过或正在经历一种前驱症状。在一些此类实施例中,对该受试者给予组合治疗,例如,如在此所述的iRNA,以及已知有效对抗卟啉症或其相关联的症状的一种或多种另外的治疗(例如,葡萄糖和/或血红素产品像氯化血红素,如在此所述的)。

[0829] 在一个实施例中,将如在此所述的iRNA与葡萄糖或右旋糖组合给予。例如,可以静脉内地提供10%-20%右旋糖生理盐水。典型地,当给予葡萄糖时,每天静脉内给予至少300g的10%葡萄糖。还可以静脉内给予iRNA(例如,LNP配制品中的iRNA),作为用于给予葡萄糖或右旋糖的相同输注的一部分,或作为葡萄糖或右旋糖给予之前、同时、或之后给予的一个单独的输注。在一些实施例中,iRNA是经由不同给予途径(例如,皮下地)给予的。在又另一个实施例中,iRNA是与全肠外营养组合给予。可以在全肠外营养给予之前、同时、或之后给予iRNA。

[0830] 在一个实施例中,iRNA是与血红素产品(例如,氯化血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)组合给予。在又一个实施例中,iRNA是与血红素产品和葡萄糖、血红素产品和右旋糖、或血红素产品和全肠外营养组合给予的。

[0831] 如在此使用的,“前驱症状”包括受试者先前发展急性发作之前刚刚经历的任何症状。前驱症状的典型症状包括,例如,腹痛、恶心、头痛、心理症状(例如,焦虑)、坐立不安和/或失眠。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中经历疼痛(例如,腹痛和/或头痛)。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中经历恶心。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程

中经历心理症状(例如,焦虑)。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中变得坐立不安和/或经受失眠。

[0832] 卟啉症的急性“发作”涉及一种或多种卟啉症症状的发病,典型地是在携带有与卟啉症相关联的突变(例如,编码卟啉途径中酶的基因的突变)的患者中。

[0833] 在某些实施例中,ALAS1 iRNA的给予致使如在此所述的一种或多种卟啉或卟啉前体,(例如,ALA和/或PBG)的水平下降。该下降相对于任何适当的对照或参比值是可以测得的。例如,与治疗前(例如,刚刚在治疗之前)的水平相比,在一个个体受试者中可以确定一种或多种卟啉或卟啉前体的水平的下降,例如,下降至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。卟啉前体、卟啉、或卟啉代谢物水平的降低可以使用本领域中已知的任何方法测得。例如,使用瓦-施二氏试验(Watson-Schwartz test)、离子交换层析法、或高效液相层析-质谱法,可以对尿或血浆中的PBG和/或ALA的水平进行评估。参见,例如,桑奈尔(Thunell)(1993)。

[0834] 在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效降低受试者中ALA和/或PBG的水平。可以在受试者中对来自该受试者的样本中的ALA或PBG的水平进行评估,例如,基于ALA或PBG的绝对水平,或基于ALA或PBG的相对水平(例如,相对于另一种蛋白或化合物的水平,例如,肌酸酐的水平)。在一些实施例中,样本是尿样本。在一些实施例中,样本是血浆样本。

[0835] 在某些实施例中,靶向ALAS1的iRNA是与一种或多种另外的治疗组合给予的,例如,已知在卟啉症或卟啉症症状的治疗中有效的另一种治疗。例如,其他治疗可以是葡萄糖(例如,IV葡萄糖)或血红素产品(例如,氯化血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)。这种或这些另外的治疗可以是iRNA给予之前、之后或与之一起给予的。

[0836] iRNA以及另外的治疗剂可以在相同的组合物中,例如,静脉内,组合地给予,或该另外的治疗剂可以作为一个单独的组合物的一部分或通过在此描述的另一种方法给予。

[0837] 在一些实施例中,iRNA的给予,或iRNA与一种或多种另外的治疗(例如,葡萄糖、右旋糖等)的组合的给予降低急性发作的频率(例如,通过预防急性发作以使得它们不再发生,或通过减少某一时间段内发生的发作的数目,例如,每一年发生较少的发作)。在一些此类实施例中,根据常规剂量方案给予iRNA,例如,每天、每周、每两周、或每月一次。

[0838] 在一些实施例中,iRNA是在卟啉症的急性发作之后给予的。在一些此类实施例中,iRNA处于一种组合物中,例如,包括一种脂质配制品,像LNP配制品的一种组合物。

[0839] 在一些实施例中,iRNA是在卟啉症的急性发作过程中给予的。在一些此类实施例中,iRNA处于一种组合物中,例如,包括一种脂质配制品,像LNP配制品的一种组合物或包括GalNAc共轭物的一种组合物。

[0840] 在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效减轻发作的严重性(例如,通过改善与该发作相关联的一种或多种体征或症状)。在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效缩短发作的持续时间。在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效终止发作。在一些实施例中,预防性地给予的iRNA以防止卟啉症的急性发作。在一些此类实施例中,iRNA是处于GalNAc共轭物的形式,例如,处于包括GalNAc共轭物的一种组合物。在一些实施例中,预防性给予是在暴露于或出现诱发因素之前、过程中、或之后给予的。在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中。

[0841] 在一些实施例中,siRNA是在前驱症状过程中给予的。在一些实施例中,前驱症状

特征在于疼痛(例如,头痛和/或腹痛)、恶心、心理症状(例如,焦虑)、坐立不安和/或失眠。

[0842] 在一些实施例中,siRNA是在月经周期的一个具体时期过程中,例如,在黄体期过程中给予的。

[0843] 在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效预防发作(例如,与前驱症状和/或诱发因素相关联的复发性发作,例如,与月经周期的一个具体时期,例如,黄体期相关联)。在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效降低发作的频率。在实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效减轻发作的严重性(例如,通过改善与该发作相关联的一种或多种体征或症状)。在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效缩短发作的持续时间。在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效终止发作。

[0844] 在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效预防或减少疼痛,例如,神经性疼痛的频率或严重性。

[0845] 在一些实施例中,ALAS1 siRNA的给予有效预防或减少神经病变的频率或严重性。

[0846] 例如,通过与适当的对照相比较,可以确定ALAS1 siRNA给予的效果。例如,可以确定急性发作频率的下降,连同一种或多种卟啉或卟啉前体水平的降低,例如,在患有AIP的一组患者中,如与适当的对照相比较的频率下降。对照组(例如,一组类似的个体或处于交叉设计的同一组个体)可以包括,例如,未处理的群体,已经接受针对卟啉症的传统治疗处理的群体(例如,针对AIP的传统治疗可以包括葡萄糖、氯化血红素、或两者);已经接受安慰剂、或非靶向性iRNA处理的群体,任选地与一种或多种针对卟啉症的传统治疗(例如,葡萄糖,例如,IV葡萄糖)组合,等。

[0847] 如在此使用的,处于发展卟啉症的“风险中”的受试者包括具有卟啉症家族史和/或一种或多种复发性或慢性卟啉性症状史的受试者,和/或携带有编码血红素生物合成途径中酶的基因的遗传变异(例如,基因突变)的受试者,以及携带有遗传变异(例如,已知与卟啉症相关联的突变)的受试者。

[0848] 在实施例中,变异,例如突变使得个体易于急性发作(例如,一旦暴露于诱发因素,例如,药物、饮食或其他诱发因素,例如,如在此披露的诱发因素)。在实施例中,变异,例如突变是与卟啉或卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)的升高的水平相关联的。在实施例中,变异,例如突变是与慢性疼痛(例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)相关联的。在实施例中,变异,例如突变是与EMG改变和/或神经传导速度改变相关联的。

[0849] 在实施例中,变异是ALAS1基因中的突变。在实施例中,变异是ALAS1基因启动子的突变,或是ALAS1基因上游或下游区域中的突变。在实施例中,变异是转录因子或与ALAS1相互作用的其他基因的突变。在实施例中,变异是一种变化,例如编码血红素生物合成途径中的酶的基因的突变。

[0850] 在一些实施例中,受试者具有如在此所述的遗传变异(例如,已知与卟啉症相关联的基因突变)。在一些此类实施例中,受试者具有升高的ALA和/或PBG水平(例如,尿或血浆水平)。在一些此类实施例中,受试者不具有升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中,受试者具有如在此所述的遗传变异并且具有其他症状,例如,慢性痛、EMG改变、神经传导速度改变、和/或与卟啉症相关联的其他症状。在实施例中,受试者具有遗传变异但不经受急性发作。

[0851] 在实施例中,受试者具有与AIP、HCP、VP、或ADP相关联的突变。

[0852] 在一些实施例中，卟啉症是AIP。在一些此类实施例中，在PBG脱氨酶基因中，受试者具有变异，例如，至少一个突变。许多PBG脱氨酶突变是本领域中已知的，例如，如报道于赫德卡(Hrdinka,M.)等人生理研究(Physiological Research),55(增刊2):S119-136(2006)中。在一些实施例中，受试者针对PBG脱氨酶突变是杂合的。在其他实施例中，受试者针对PBG脱氨酶突变是纯合的。纯合的受试者在PBG脱氨酶基因中可以携带两个相同突变或两个不同突变。

[0853] 在一些实施例中，卟啉症是HCP。在一些此类实施例中，受试者在编码粪卟啉原III氧化酶的基因中具有变异，例如，至少一个突变。

[0854] 在一些实施例中，卟啉症是VP。在一些此类实施例中，受试者在编码原卟啉原氧化酶的基因中具有变异，例如，至少一个突变。

[0855] 在实施例中，卟啉症是ADP，例如，常染色体隐性ADP。在一些此类实施例中，受试者在编码ALA脱水酶的基因中具有变异，例如，至少一个突变。

[0856] 在此提供的治疗方法可以用于改善与卟啉症相关联的一种或多种症状，降低与卟啉症相关联发作的频率，降低一旦暴露于诱发因子将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性，或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如，神经病变(例如，渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险。此外，在此提供的方法可以用于降低一种或多种卟啉前体、卟啉和/或相关卟啉产物或代谢物的水平。卟啉前体或卟啉的水平可以在任何生物样本中测得，例如像，尿、血液、粪便、脑脊髓液、或组织样品。该样本可以存在于受试者体内或可以从该受试者获得或提取。在一些实施例中，卟啉症是AIP，并且PBG和/或ALA的水平是下降了的。在一些实施例中，卟啉产物或代谢物是卟吩胆色素、胆色素原、或尿卟啉。卟啉产物或代谢物水平的降低可以使用本领域中已知的任何方法进行测量。例如，使用瓦-施二氏试验(Watson-Schwartz test)、离子交换层析法、或高效液相层析-质谱法，可以对尿或血浆中的PBG和/或ALA的水平进行评估。参见，例如，桑奈尔(Thunell)(1993)。

[0857] 在此描述的方法还可以用于降低经受卟啉症(例如，急性肝性卟啉症，例如，AIP)或处于发展卟啉症的风险中的受试者中的长期升高的卟啉前体(例如，ALA和/或PBG)水平。用于评估卟啉前体的血浆和尿水平(例如，长期升高的水平)的方法包括，例如，HPLC-质谱法以及离子交换层析术。卟啉前体的水平可以表示为相对于另一种蛋白或化合物(例如，肌酸酐)的水平。参见，例如，弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人，临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006；沙赫(Sardh)等人，临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007

[0858] 如在此使用的，“诱发因素”指的是可以诱导与卟啉症相关联的一种或多种症状的急性发作的一种内源或外源因素。诱发因素包括禁食(或其他形式的减少的或不充分的热量摄入，归因于速成节食、远距离运动等)、代谢应力(例如，感染、手术、国际航空旅行以及心理应激)、内源激素(例如，黄体酮)、吸烟、脂溶性异质化学品(包括，例如，存在于烟草烟雾中的化学品、某些处方药、有机溶剂、杀生物剂、酒精饮料中的组分)、内分泌物因素(例如，生殖激素(女性在经期前可能经历恶化)、合成雌激素类、黄体酮、促排卵药物、以及激素替代疗法)。参见，例如，桑奈尔(Thunell)(1993)。常见诱发因素包括细胞色素P450，包括药物和苯巴比妥。

[0859] 与卟啉症相关联的症状可以包括腹痛或冷烫、头痛、由神经系统异常引起的后果、

以及导致皮肤发疹、发疱和瘢痕(光照性皮炎)的光过敏。在某些实施例中,卟啉症是AIP。AIP症状包括胃肠道症状(例如,严重和较轻的局部腹痛、恶心/呕吐、便秘、腹泻、肠梗阻),泌尿症状(排尿困难、尿潴留/失禁、或小便黄赤),神经性症状(例如,感觉神经病变、运动神经病变(例如,影响脑神经和/或导致上臂或下肢无力),发作,神经性疼痛,渐进性神经病变,头痛,神经精神症状(例如,精神错乱、焦虑、激动、幻觉、癔病、谵妄、冷漠、抑郁、恐怖症、精神病、失眠、嗜睡、昏迷),自主神经系统牵连(例如导致心血管症状,像心动过速、高血压、和/或心率失常,连同其他症状,例如,升高的循环的儿茶酚胺水平、显汗、坐立不安、和/或震颤),脱水,以及电解质异常。

[0860] 在一些实施例中,靶向ALAS1的iRNA是与可以用于减轻上述症状中的一种或多种的另一种治疗一起给予的(例如,之前、之后、或同时)。例如,像可以使用麻醉性镇痛药治疗腹痛,像可以使用抗-发作药物治疗发作,像可以使用酚噻嗪治疗恶心/呕吐,并且像可以使用β-阻断剂治疗心动过速/高血压。

[0861] 术语“降低”(或“增加”)意思是指一个可测量的变化,例如,统计学显著的变化。该变化可以是,例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%或更高变化(例如,降低(或增加),这相对于参比值,例如,未提供iRNA情况下的参比)。

[0862] 本发明进一步涉及iRNA或其药物组合物的用途例如,用于与其他药物和/或其他治疗方法组合治疗与ALAS1表达相关的失调,例如,与已知的药物和/或已知的治疗方法组合,例如像当前使用以用于治疗失调的那些。在一个实施例中,iRNA或其药物组合物可以连同血红素产品(例如,如在此所述的氯化血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)和/或连同静脉内葡萄糖输注一起给予。在一些实施例中,预防性地使用iRNA或其药物组合物,例如,以预防或改善急性卟啉症的预期发作的症状。该预防性使用的时间可以根据受试者暴露或预期暴露于诱发因素的情况进行确定。如在此描述的,诱发因素可以是已知促成急性发作的任何内源或外源因素。例如,经前期是内源诱发因素,而细胞色素P450诱导药物是外源诱发因素。

[0863] 用于治疗与ALAS1表达相关的失调(例如,卟啉症像AIP)的有效量取决于待治疗的失调的类型、症状的严重性、接受治疗的受试者、该受试者的性别、年龄和总体健康状况、给予模式等。对于任意给定情况,使用常规实验,本领域的普通技术人员可以确定一个适当的“有效量”。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。结合靶向ALAS1的iRNA或其药物组合物的给予,“有效对抗”与ALAS1表达相关的失调是指以临床适当的方式给予以导致有益效果,例如,针对个体患者或针对至少一部分患者,例如,统计学上显著部分的患者。有益效果包括,例如,症状的预防或减少或其他效果。例如,有益效果包括,例如,改进症状(例如,降低严重性或频率),降低发作的严重性或频率,降低发展相关疾病的风险(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)、肝细胞癌),改进的诱发因素耐受能力,改进的生命质量,降低ALAS1表达,降低卟啉或卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)的水平(例如,血浆或尿水平)或其他通常被熟悉具体失调类型的治疗的医师认为是积极的效果。

[0864] 当存在改进时,例如,一种或多种疾病状态参数的统计学上显著的改进,或症状不能恶化或发展(否则这些症状将是所预期的),则治疗或预防效果是明显的。作为一个实例,疾病可测量参数中的至少10%的有利改变,例如,至少20%、30%、40%、50%或更多可以表

示有效的治疗。也可以使用如本领域已知的给定疾病的实验动物模型，判定给定diRNA剂或这种药物的制剂的功效。当使用实验动物模型时，当观察到标记(例如血浆或尿ALA或PBG)或症状的统计学上显著的降低时，证实了治疗效力。

[0865] 患者可以被给予治疗量的iRNA。该治疗量可以是，例如，0.05-50mg/kg。例如，该治疗量可以是0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、或2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50mg/kg dsRNA。

[0866] 在一些实施例中，iRNA被配制为一种脂质配制品，例如，如在此所述的LNP配制品。在一些此类实施例中，该治疗量是0.05-5mg/kg，例如，0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、或5.0mg/kg dsRNA。在一些实施例中，静脉内给予脂质配制品，例如，LNP配制品。

[0867] 在一些实施例中，通过经一段时间的静脉内输注来给予iRNA，例如，经5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、或25分钟的时间。

[0868] 在一些实施例中，iRNA处于如在此所述的GalNAc共轭物的形式。在一些此类实施例中，治疗量是0.5-50mg，例如，0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50mg/kg dsRNA。在一些实施例中，GalNAc共轭物是皮下给予的。

[0869] 在一些实施例中，重复进行该给予，例如，定期地，像每天、两周(即，每两周)一次持续一个月、两个月、三个月、四个月或更久。在初始治疗方案后，可以基于更低频率给予治疗。例如，在双周给予持续三个月后，给予可以按每个月重复一次，持续六个月或一年或更长。

[0870] 在一些实施例中，iRNA剂是以两个或更多个剂量给予的。在一些实施例中后续剂量的数或量取决于所希望的效果的实现，例如，ALAS基因的压制，卟啉或卟啉前体(例如，ALA和/或PBG)水平的降低，或治疗性或预防性效果的实现，例如，与卟啉症相关联的一种或多种症状(例如，疼痛，例如，神经性疼痛)的减少或预防，和/或预防发作或降低与卟啉症相关联的发作的频率和/或严重性。

[0871] 在一些实施例中，iRNA剂是根据一个时间表给予的。例如，可以每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、或每周五次给予该iRNA剂。在一些实施例中，该方案涉及定期间隔的给药，例如，每小时、每四小时、每六小时、每八小时、每十二小时、每天、每2天、每3天、每4天、每5天、每周、每两周、或每月一次。在实施例中，iRNA剂是每周或每两周一次给予的，以实现所希望的效果，例如，降低ALA和/或PBG的水平，减少疼痛、和/或预防急性发作。

[0872] 在实施例中，该时间表涉及密集的给予，随后是一个较长的时期，在该时期过程中，不给予该试剂。例如，该时间表可以涉及在相对短时期内给予的初始剂量设置(例如，约每6小时、约每12小时、约每24小时、约每48小时、或约每72小时)，随后是一个较长的时期，(例如，约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、或约8周)，在该时期过程中，不给予iRNA剂。在一个实施例中，iRNA剂初始地按小时给予，并且随后以一个较长的时间间隔给予(例如，每天、每周、每两周、或每月一次)。在另一个实施例中，iRNA剂初始地按天给予，并且随后以一个较长的时间间隔给予(例如，每周、每两周、或每月一次)。在某些实施例中，更长的时间间隔随时间增加或基于所希望的作用的实现来确定。在一个具体的实施例中，iRNA剂在急性发作期间每天一次地给予，随后是每周给予(从给予的第八天开始)。在另一

个具体的实施例中，iRNA剂在第一周期间每两天一次地给予，随后是每周给予(从给予的第八天开始)。

[0873] 在一个实施例中，给予iRNA剂以预防或降低复发性发作的严重性或频率，例如，与诱发因素相关联的循环发作。在一些实施例中，诱发因素是月经周期。在一些实施例中，重复给予iRNA，例如，每隔一定间隔地给予以预防或降低复发性发作的严重性或频率，例如，与诱发因素(例如，月经周期，例如，月经周期的一个具体时期，例如，黄体期)相关联的循环发作。在一些实施例中，在月经周期的一个具体时期过程中、或基于接受治疗的患者的激素水平(例如，基于与月经周期的一个具体时期相关联的激素水平)给予iRNA。在一些实施例中，在月经周期的一个或多个具体天内，例如，在第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天、第16天、第17天、第18天、第19天、第20天、第21天、第22天、第23天、第24天、第25天、第26天、第27天或第28天(或对于具有较长月经周期的受试者而言随后的天内)给予iRNA。在一些实施例中，在黄体期过程中，例如，在月经周期的第14-28天之间的一天或多天内(或在具有超过28天的月经周期的受试者中，随后的天内)给予iRNA。在一些实施例中，对受试者的排卵进行评估(例如，使用血液或尿检，检测与排卵相关联的激素，例如，LH)并且在排卵后以预定的时间间隔给予iRNA。在一些实施例中，在排卵之后立即给予iRNA。在一些实施例中，在排卵1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、或18天之后给予iRNA。这些方案中的任一者可以任选地被重复用于一个或多个迭代。迭代数目可以取决于所希望的效果的实现，例如，ALAS1基因的压制和/或治疗性或预防性效果的实现，例如，与卟啉症相关联的一种或多种症状的减少或预防、降低与卟啉症相关联的发作的频率。

[0874] 在一些实施例中，给予iRNA剂的初始剂量并对ALA或PBG水平进行检验，例如，给予初始剂量1-48小时，例如，2、4、8、12、或24小时后。在一些实施例中，如果ALA和/或PBG的水平得以降低(例如，至实现预定的降低，例如，正常)，和/或如果与卟啉症相关联的症状(例如，疼痛)得以改进(例如，以使得患者是无症状的)，不给予另外的剂量，而如果ALA和/或PBG的水平未降低(例如，未实现预定的降低，例如，未变为正常化)，给予ALA或PBG的另外的剂量。在一些实施例中，初始剂量12、24、36、48、60、或72小时后给予另外的剂量。在一些实施例中，如果初始剂量未有效降低ALA和/或PBG的水平，修改另外的剂量，例如，增加以实现ALA或PBG水平的所希望的降低(例如，预定的降低，例如，常态化)。

[0875] 在一些实施例中，预定下降是降低至少10％、20％、30％、40％、或50％。在一些实施例中，预定下降是有效预防或改善症状，例如，疼痛、前驱症状、或复发性发作的一个下降。

[0876] 在一些实施例中，预定下降是至少1、2、3、或更多个标准差的一个下降，其中该标准差是基于来自参比样本，例如，如在此所述的参比样本的值确定的。

[0877] 在一些实施例中，预定下降是这样一个下降，该下降使卟啉或卟啉前体水平达到小于，或达到小于或等于参比值(例如，如在此所述的参比值)的一个水平。

[0878] 如在此使用的，ALA或PBG水平的“正常”(或“正常的”或“正常化的”水平)是指ALA、或PBG、或两者的一个水平(例如，尿和/或血浆水平)，该水平在针对健康个体的预期范围之内，该个体是无症状的个体(例如，不经历疼痛和/或不经受神经病变的个体)，或不具有与卟啉症相关联的突变的个体。例如，在一些实施例中，正常化的水平是在正常平均值的两个

标准差内。在一些实施例中，正常化的水平是在正常参比限制内，例如，在针对适当对照样本的95％置信区间内，例如，健康个体或不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体的样本。在一些实施例中，每隔一段时间对受试者的ALA和/或PBG水平(例如，尿和/或血浆ALA和/或PBG水平)进行监控，当该水平增加超过参比值时，给予另外剂量的iRNA剂。

[0879] iRNA的施用可以降低例如患者的细胞、组织、血液、尿或其他区室中的ALAS1 mRNA或蛋白质水平至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％或至少90％或更多。iRNA的给予可以降低与ALAS1基因表达相关联的产物的水平，例如，一种或多种卟啉或卟啉前体的水平(例如，ALA和/或PBG的水平)。iRNA剂的给予还可以抑制或预防ALAS1 mRNA或蛋白水平在AIP急性发作期间的上调。

[0880] 在给予全剂量iRNA之前，可以对患者给予一个较小剂量，例如5％输注剂量，并监控不良作用，例如，过敏反应、或升高的脂质水平或血压。在另一个实例中，可以针对不希望的效果对患者进行监控。

[0881] 用于调制ALAS1基因表达的方法

[0882] 在又另一个方面，本发明提供了用于调制(例如，抑制或激活)ALAS1基因，例如，在细胞中或受试者中的表达的方法。在一些实施例中，细胞是离体、体外、或体内的。在一些实施例中，细胞是红细胞或肝实质细胞。在一些实施例中，细胞是在受试者(例如，哺乳动物，例如像人类)中的。在一些实施例中，受试者(例如，人类)处于与ALAS1表达相关的疾病的风险中，或被诊断为患有该疾病，如上所述。

[0883] 在一个实施例中，该方法包括以一个有效降低细胞中ALAS1基因的表达的量将该细胞与如在此所述的iRNA相接触。如在此使用的，“接触”包括直接接触一个细胞，连同间接接触一个细胞。例如，当向受试者给予(例如，静脉内或皮下地)包含iRNA的组合物时，该受试者体内的细胞(例如，红细胞或肝脏细胞像肝实质细胞)可以是被接触的。

[0884] 基于ALAS1 mRNA的表达水平、ALAS1蛋白、或与ALAS1基因表达水平功能性相联系的一个参数的水平(例如，卟啉的水平或与卟啉症相关的症状的发病率或严重性)，可以对ALAS1基因的表达进行评估。在一些实施例中，ALAS1的表达被抑制至少5％、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％、或至少95％。在一些实施例中，iRNA具有以下范围内的IC_{50}:0.001-0.01nM、0.001-0.10nM、0.001-1.0nM、0.001-10nM、0.01-0.05nM、0.01-0.50nM、0.02-0.60nM、0.01-1.0nM、0.01-1.5nM、0.01-10nM。IC_{50}值可以相对于适当的对照值被归一化，例如，非靶向性iRNA的IC_{50}。

[0885] 在一些实施例中，该方法包括向该细胞中引入在此描述的iRNA并且维持该细胞一段时间，该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解，由此抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0886] 在一个实施例中，该方法包括向哺乳动物给予在此描述的一种组合物，例如，包括靶向ALAS1的iRNA的组合物，以使得靶标ALAS1基因的表达被降低，如持续一个延长的时间，例如，至少两天、三天、四天或更多天，例如，一周、两周、三周、或四周或更久。在一些实施例中，在第一次给予1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、或24小时内，ALAS1表达下降是可检出的。

[0887] 在另一个实施例中，该方法包括向哺乳动物给予如在此所述的组合物以使得靶标

ALAS1基因的表达与未处理的动物相比，增加例如，至少10％。在一些实施例中，超过一个延长的持续时间发生ALAS1的激活，例如，至少两天、三天、四天或更多天，例如，一周、两周、三周、或四周或更久。不希望受理论约束，通过稳定ALAS1 mRNA转录本，与基因组中启动子相互作用和/或抑制ALAS1表达抑制剂，iRNA可以激活ALAS1表达。

[0888] 对本发明中表征的方法和组合物有用的iRNA特异性靶向ALAS1基因的RNA(初级或经加工的)。用于使用iRNA抑制ALAS1基因的表达的组合物和方法可以如在本文中其他地方描述的进行制备和执行。

[0889] 在一个实施例中，该方法包括给予包含iRNA的组合物，其中该iRNA包括一个核苷酸序列，该核苷酸序列与待治疗哺乳动物ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。当有待治疗的有机体是哺乳动物(比如人类)时，该组合物可以通过本领域内已知的任何手段进行给予，这些手段包括但不限于经口、腹膜内、或肠胃外途径(包括颅内(例如，心室内、实质内、鞘内)、静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气溶剂)、经鼻、直肠以及局部(包括口腔与舌下)给予)。

[0890] 在某些实施例中，通过静脉内输注或注射给予这些组合物。在一些此类实施例中，这些组合物包括一种脂质配制的siRNA(例如，LNP配制品，像LNP11制剂)，以用于静脉内输注。在具体实施例中，此类组合物可以用于治疗卟啉症的急性发作和/或用于预防(例如，降低发作的严重性或频率)。

[0891] 在其他实施例中，皮下给予这些组合物。在一些此类实施例中，这些组合物包括共轭至GalNAc配体的iRNA。在具体实施例中，此类组合物可以用于治疗卟啉症的急性发作或用于预防(例如，降低发作的严重性或频率)。

[0892] 用于降低卟啉或卟啉前体水平的方法

[0893] 在另一个方面中，本发明提供了一种用于降低卟啉或卟啉前体，例如，在细胞中或受试者中的水平的方法。

[0894] 在一些实施例中，细胞是离体、体外、或体内的。在一些实施例中，细胞是红细胞或肝实质细胞。在一些实施例中，细胞是肝实质细胞。在一些实施例中，细胞是在受试者(例如，哺乳动物，例如像人类)中的。

[0895] 在一些实施例中，受试者(例如，人类)处于卟啉症的风险中，或被诊断为患有卟啉症，如在此所述。在一些实施例中，该方法有效治疗如在此所述的卟啉症(例如，通过改善与卟啉症相关联的一种或多种症状，降低与卟啉症相关联发作的频率，降低一旦暴露于诱发因素将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性，或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如，神经病变(例如，渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险。在一个实施例中，该方法包括以一个足以降低该细胞或另一个相关细胞或细胞组或该受试者中卟啉或卟啉前体(例如，ALA或PBG)的量将该细胞与如在此所述的RNAi相接触。如在此使用的，“接触”包括直接接触一个细胞，连同间接接触一个细胞。例如，当向受试者给予(例如，静脉内或皮下地)包含RNAi的组合物时，该受试者体内的细胞(例如，红细胞或肝脏细胞像肝实质细胞)可以是被接触的。如在此使用的，“另一个相关细胞或细胞组”包括其中卟啉或卟啉前体的水平由于该接触而下降的任何细胞或细胞组。例如，该细胞可以是受试者体内存在的组织的一部分(例如，受试者体内存在的肝脏细胞)，并且将该受试者体内的细胞与RNAi相接触(例如，接触受试者体内存在的一个或多个肝脏细胞)可以导致另一个相关细胞或细胞组(例

如,受试者的神经细胞)或该受试者的组织或体液中(例如,该受试者的尿、血液、血浆、或脑脊髓液中)卟啉或卟啉前体水平的降低。

[0896] 在一些实施例中,卟啉或卟啉前体是选自下组,该组由以下各项组成:δ-氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆色烷(HMB)、尿卟啉原III、粪卟啉原III、原卟啉原IX、以及原卟啉IX。在一些实施例中,卟啉前体是ALA。在一些实施例中,卟啉前体是PBG。在一些实施例中,该方法降低ALA和PBG的水平。卟啉或卟啉前体的水平可以如在此所述的以及如本领域中已知的进行测量。

[0897] <u>用于监测RNAi活性的测定和方法</u>

[0898] 在另一方面,本发明提供了用于监测ALAS1 mRNA水平的测定和方法。肝中的RNAi活性可以通过检测组织中mRNA水平和5' RACE产物,或者通过检测循环分泌性蛋白的水平来进行监测。

[0899] 可替代地,或组合地,可以检测ALAS1 mRNA的循环性细胞外水平,例如,通过cERD测定(<u>循</u>环性<u>细</u>胞外<u>R</u>NA<u>检</u>测)。在一些实施例中,可以检测体液样品(例如,血清或尿液样品)中ALAS1 mRNA水平。在一些实施例中,外排体流出到来自不同细胞类型的体液,这些体液包含源自起源组织的mRNA和miRNA。这种外排体可以用来监测循环中的RNAi水平。在一个实施例中,可以用低速旋转纯化来自用在此所述的iRNA治疗的患者的样品(例如,血清或尿液样品),随后以约160,000g旋转约2小时以形成沉淀物。可以将RNA进行提取并且分析以测量ALAS1 mRNA的水平。示例性方法和测定披露于PCT/US 2012/043584,公布为WO 2012/177906,其内容通过引用进行结合。

[0900] 因此,提供用于检测受试者中循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平的测定、或方法。该测定、或方法包括提供来自受试者的生物流体样品(例如,尿、血液或血浆样品)的RNA(例如,细胞外RNA),所述生物流体样品包括ALAS1 mRNA;并且检测样品中循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平。

[0901] 在一个实施例中,该测定或方法包括从ALAS1 mRNA获得ALAS1 cDNA的步骤;并且将该ALAS1 cDNA和与该ALAS1 cDNA或其部分互补的核酸(例如,探针和/或引物)接触,从而产生反应混合物;并且检测(例如,测量)该反应混合物中ALAS1 cDNA的水平,其中该ALAS1 cDNA水平指示ALAS1 mRNA水平,从而测定受试者中循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平。

[0902] 在一个实施例中,该测定或方法包括从受试者中获得生物流体样品,其中将该生物流体样品从组织中分离,并且该生物流体样品包含外排体。该测定或方法可以进一步包括检测生物样品中的RNA的水平,其中该RNA是表达自受试者组织中的基因,其中在检测生物样品中RNA水平之前,并不将该外排体从生物样品中纯化。

[0903] 在实施例中,所述生物流体样品是血液样品。在实施例中,所述生物流体样品是血清样品。在另一个实施例中,该生物流体样品是尿液样品。

[0904] 在实施例中,该方法包括PCR、qPCR或5'-RACE。

[0905] 在实施例中,所述核酸是探针或引物。

[0906] 在实施例中,所述核酸包括可检测部分,并且通过检测可检测部分的量来确定ALAS1 mRNA的水平。

[0907] 在实施例中,所述方法进一步包括从受试者获得生物流体样品。

[0908] 在该方法的实施例中,基于相对于参考值的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA

的水平的比较，来评估卟啉症治疗的效力。

[0909] 在实施例中，相对于参考值，响应于卟啉症治疗的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平的降低，指示了卟啉症治疗是有效的。在实施例中，参考值是在卟啉症治疗之前的受试者中的循环性细胞外ALAS1 mRNA的水平。

[0910] 除非另外限定，否则在此使用的所有技术术语和科学术语具有如本发明所属领域的技术人员通常理解的相同含义。尽管与在此描述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或测试本发明中体现的iRNA和方法，但以下描述了适合的方法和材料。在此提交的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文结合。在矛盾的情况下，本发明说明书，包括定义，将占据主导。此外，所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0911] <u>实例</u>

[0912] <u>实例1.siRNA合成</u>

[0913] <u>试剂来源</u>

[0914] 当本文没有专门给出试剂来源时，这种试剂可以从分子生物学试剂的任何供应商获得，其质量/纯度标准符合分子生物学应用。

[0915] 寡核苷酸合成。

[0916] 全部寡核苷酸在AKTAoligopilot合成仪上合成。以下各项用于寡核苷酸合成：可商购的可控孔度玻璃固相支持体(dT-CPG，500Å，原初合成公司(Prime Synthesis))以及具有标准保护基的RNA亚磷酰胺，5’-O-二甲氧三苯甲基N6-苯甲酰基-2’-叔-丁基二甲基甲硅烷基二甲基甲硅烷基-腺苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、5’-O-二甲氧三苯甲基-N4-乙酰基-2’-叔-丁基二甲基甲硅烷基-胞苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、5’-O-二甲氧三苯甲基-N2--异丁基-2’-叔-丁基二甲基甲硅烷基-鸟苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、以及5’-O-二甲氧三苯甲基-2’-叔-丁基二甲基甲硅烷基-尿苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺(皮尔斯核酸技术公司(Pierce Nucleic Acids Technologies))。2’-F亚磷酰胺、5’-O-二甲氧三苯甲基-N4-乙酰基-2’-氟-胞苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰基乙基-亚磷酰胺以及5’-O-二甲氧三苯甲基-2’-氟-尿苷-3’-O-N,N’-二异丙基-2-氰基乙基-亚磷酰胺购自普洛麦格公司(Promega)。全部亚磷酰胺以乙腈(CH_3CN)中的0.2M浓度使用，除了以10％THF/ANC(v/v)中的0.2M浓度使用的鸟苷之外。使用16分钟偶联/再循环时间。活化剂是5-乙基硫代四唑(0.75M，美国国际化学品公司(American International Chemicals))；对于PO-氧化，使用碘/水/吡啶并且对于PS-氧化，使用2,6-卢剔啶/ACN(1:1v/v)中的PADS(2％)。

[0917] 3’-配体共轭的链使用含有相应配体的固相支持物合成。例如，从羟脯氨醇-胆固醇亚磷酰胺实施在序列中引入胆固醇单元。胆固醇经6-氨基己酸酯键系至反式-4-羟脯氨醇，以获得羟脯氨醇-胆固醇部分。5’-末端Cy-3和Cy-5.5(荧光团)标记的iRNA从购自生物研究技术公司(Biosearch Technologies)的相应Quasar-570(Cy-3)合成。通过使用适当保护的配体-亚磷酰胺结构单元实现配体与5’-末端和或内部位置的共轭。在活化剂5-(乙基硫代)-1H-四唑存在下，延长的15分钟使无水CH_3CN中的0.1M亚磷酰胺溶液偶联至固态支持物结合的寡核苷酸。使用标准碘-水如报道(1)那样，实施核苷酸间亚磷酸酯氧化成磷酸酯，或通过用叔-丁基过氧化氢/乙腈/水(10:87:3)以10分钟氧化等待时间共轭寡核苷酸。通过

使用硫转移试剂如DDTT(购自AM Chemicals)、PADS和或Beaucage试剂将亚磷酸酯氧化成硫代磷酸酯而引入硫代磷酸酯。自行合成胆固醇亚磷酰胺并且以二氯甲烷中的0.1M浓度使用。胆固醇亚磷酰胺的偶联时间是16分钟。

[0918] 脱保护I(核碱基脱保护)

[0919] 在完成合成后,将支持物转移至100mL玻璃瓶(VWR)。从支持物切下寡核苷酸,同时用80mL乙醇氨的混合物[氨:乙醇(3:1)]在55℃持续6.5小时使得碱基和磷酸酯基团脱保护。将瓶在冰上短暂冷却并且随后将乙醇-氨混合物过滤至一只新250-mL瓶。CPG用2x40mL份的乙醇/水(1:1v/v)洗涤。随后通过旋转蒸发器将混合物的体积缩减至约30mL。随后混合物在干冰上冷冻并在离心真空浓缩机上在真空下干燥。

[0920] 脱保护II(2'-TBDMS基团的移除)

[0921] 将干燥的残余物重悬于26mL的三乙胺、三乙胺三氟化氢(TEA·3HF)或吡啶-HF和DMSO(3:4:6)中并且在60℃加热90分钟以除去在2'位置的叔-丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)。反应随后用50mL的20mM乙酸钠淬灭并且调节pH至6.5。将寡核苷酸贮存在制冷器中直至纯化。

[0922] 分析

[0923] 在纯化之前通过高效液相层析(HPLC)分析寡核苷酸,并且缓冲溶液和柱的选择取决于序列和或共轭的配体的性质。

[0924] HPLC纯化

[0925] 通过反相制备型HPLC纯化配体共轭的寡核苷酸。通过阴离子-交换HPLC在自行装填的TSK凝胶柱上纯化未共轭的寡核苷酸。缓冲液是10%CH_3CN中的20mM磷酸钠(pH8.5)(缓冲液A)和10%CH_3CN,1M NaBr中的20mM磷酸钠(pH 8.5)(缓冲液B)。将含有全长寡核苷酸的级分池化、脱盐并冻干。将大约0.15OD的脱盐寡核苷酸稀释于水中至150μL,并随后吸取至CGE和LC/MS分析专用小瓶中。随后通过LC-ESMS和CGE分析化合物。

[0926] siRNA制备

[0927] 对于siRNA的一般制备,将等摩尔量的有义链和反义链在1xPBS中在95℃加热5分钟并且缓慢冷却至室温。通过HPLC分析证实双链体的完整性。

[0928] 下文使用标准命名并且具体是表1的缩写描述核酸序列。

[0929] 表1:核酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。应当理解在寡核苷酸中存在时这些单体是由5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

[0930]

缩写	一个或多个核苷酸/多个核苷酸
A	腺苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟尿苷-5’-磷酸酯或腺苷
Ab	β-L-腺苷-3`-磷酸酯、β-L-腺苷-5`-磷酸酯或β-L-腺苷
Abs	β-L-腺苷-3`-硫代磷酸酯
Af	2’-脱氧-2’-氟腺苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟腺苷-5’-磷酸酯或 2’-脱氧-2’-氟腺苷
Afs	2’-脱氧-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、胞苷-5’-磷酸酯或胞苷
Cb	β-L-胞苷-3'-磷酸酯或β-L-胞苷
Cbs	β-L-胞苷-3'-硫代磷酸
Cf	2’-脱氧-2’-氟胞苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟胞苷-5’-磷酸酯或 2’-脱氧-2’-氟胞苷
Cfs	2’-脱氧-2’-氟胞苷-3’-硫代磷酸酯
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯或2'-O-十六烷基-胞苷
(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3’-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3’-磷酸酯、鸟苷-5’-磷酸酯或鸟苷
Gb	β-L-鸟苷-3`-磷酸酯、β-L-鸟苷-5`-磷酸酯或β-L-鸟苷
Gbs	β-L-鸟苷-3’-硫代磷酸酯
Gf	2’-脱氧-2’-氟鸟苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟鸟苷-5’-磷酸酯或 2’-脱氧-2’-氟鸟苷
Gfs	2’-脱氧-2’-氟鸟苷-3’-硫代磷酸酯

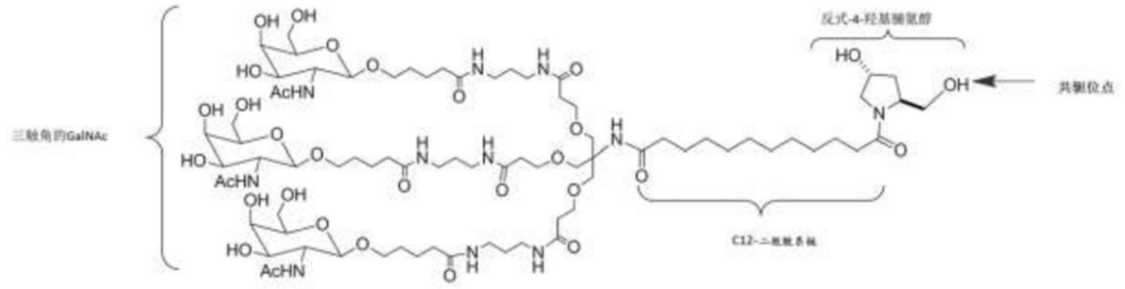
[0931]

Gs	鸟苷-3’-硫代磷酸酯
T	5’-甲基尿苷-3’-磷酸酯、5’-甲基尿苷-5’-磷酸酯或 5’-甲基尿苷
Tb	β-L-胸苷-3'-磷酸酯、β-L-胸苷-5'-磷酸酯或 β-L-胸苷
Tbs	β-L-胸苷-3'-硫代磷酸酯
Tf	2’-脱氧-2’-氟-5-甲基尿苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟-5-甲基尿苷-3’-磷酸酯或 2’-脱氧-2’-氟-5-甲基尿苷
Tfs	2’-脱氧-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	尿苷-3’-磷酸酯、尿苷-5’-磷酸酯或尿苷-
Ub	β-L-尿苷-3`-磷酸酯、β-L-尿苷-5`-磷酸酯或 β-L-尿苷
Ubs	β-L-尿苷-3`-硫代磷酸酯
Uf	2’-脱氧-2’-氟尿苷-3’-磷酸酯、2’-脱氧-2’-氟尿苷或 2’-脱氧-2’-氟尿苷-3’-磷酸酯
Ufs	2’-脱氧-2’-氟尿苷-3’-硫代磷酸酯
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六烷基-尿苷-6'-磷酸酯或 2'-O-十六烷基-尿苷
(Uhds)	2’-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3’-硫代磷酸酯
N	任何核苷酸（G、A、C、T 或 U）
a	2'-O-甲基腺苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基腺苷-5’-磷酸酯或 2'-O-甲基腺苷
as	2’-O-甲基腺苷-3’-硫代磷酸酯
c	2’-O-甲基胞苷-3’-磷酸酯、2'-O-甲基胞苷-5’-磷酸酯或 2'-O-甲基胞苷
cs	2’-O-甲基胞苷-3’-硫代磷酸酯
g	2’-O-甲基鸟苷-3’-磷酸酯、2’-O-甲基鸟苷-5’-磷酸酯或 2'-O-甲基鸟苷
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、2’-O-甲基-5-甲基尿苷-5’-磷酸酯或 2’-O-甲基-5-甲基尿苷
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、2'-O-甲基尿苷-5’-磷酸酯或 2'-O-甲基尿苷
us	2’-O-甲基尿苷-3’-硫代磷酸酯
dA	2`-脱氧腺苷-3`-磷酸酯、2`-脱氧腺苷-5`-磷酸酯或 2`-脱氧腺苷
dAs	2`-脱氧腺苷-3`-硫代磷酸
dC	2`-脱氧胞苷-3`-磷酸酯、2`-脱氧胞苷-5`-磷酸酯或 2`-脱氧胞苷
dCs	2`-脱氧胞苷-3`-硫代磷酸酯
dG	2`-脱氧鸟苷-3`-磷酸酯、2`-脱氧鸟苷-5`-磷酸酯或 2`-脱氧鸟苷
dGs	2`-脱氧鸟苷-3`-硫代磷酸酯或 2`-脱氧鸟苷

[0932]

dT	2'-脱氧胸苷-3'-磷酸酯、2'-脱氧胸苷-5'-磷酸酯或2'-脱氧胸苷
dTs	2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸酯
dU	2`-脱氧尿苷-3'-磷酸酯、2`-脱氧尿苷-5'-磷酸酯或2'-脱氧尿苷
s	硫代磷酸酯键
L96[1]	N-[三(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基)]-4-羟基脯氨醇 Hyp-(GalNAc-烷基)3
(Aeo)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基腺苷-5'-磷酸酯或2'-O-甲氧基乙基腺苷
(Aeos)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Ceo)	2'-O-甲氧基乙基胞苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基胞苷-5'-磷酸酯或2'-O-甲氧基乙基胞苷
(Ceos)	2'-O-甲氧基乙基胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Geo)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基鸟苷-5'-磷酸酯或2'-O-甲氧基乙基鸟苷
(Geos)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(Teo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-5'-磷酸酯或2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷
(Teos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(m5Ceo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-5'-磷酸酯或2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷
(m5Ceos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Agn)	1-(2,3-二羟基丙基)腺嘌呤-2-磷酸酯、1-(2,3-二羟基丙基)腺嘌呤-3-磷酸酯或1-(2,3-二羟基丙基)腺嘌呤
(Agns)	1-(2,3-二羟基丙基)腺嘌呤-2-硫代磷酸酯
(Cgn)	1-(2,3-二羟基丙基)胞嘧啶-2-磷酸酯、1-(2,3-二羟基丙基)胞嘧啶-3-磷酸酯或1-(2,3-二羟基丙基)胞嘧啶
(Cgns)	1-(2,3-二羟基丙基)胞嘧啶-2-硫代磷酸酯
(Ggn)	1-(2,3-二羟基丙基)鸟嘌呤-2-磷酸酯、1-(2,3-二羟基丙基)鸟嘌呤-3-磷酸酯或1-(2,3-二羟基丙基)鸟嘌呤
(Ggns)	1-(2,3-二羟基丙基)鸟嘌呤-2-硫代磷酸酯
(Tgn)	1-(2,3-二羟基丙基)胸腺嘧啶-2-磷酸酯、1-(2,3-二羟基丙基)胸腺嘧啶-3-磷酸酯或1-(2,3-二羟基丙基)胸腺嘧啶
(Tgns)	1-(2,3-二羟基丙基)胸腺嘧啶-2-硫代磷酸酯
(Ugn)	1-(2,3-二羟基丙基)尿嘧啶-2-磷酸酯、1-(2,3-二羟基丙基)尿嘧啶-3-磷酸酯或1-(2,3-二羟基丙基)胸腺嘧啶
(Ugns)	1-(2,3-二羟基丙基)尿嘧啶-2-硫代磷酸酯

[0933] [1]L96的化学结构如下：

[0934] 

[0935] 实例2.ALAS1 siRNA设计与合成

[0936] 实验方法

[0937] 生物信息学

[0938] 转录物

[0939] 进行siRNA设计以鉴别对NCBI基因库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/)中注释的人类、恒河猴(rhesus或Macaca mulatta)、小鼠、与大鼠ALAS1转录本进行靶向的siRNA。设计使用了以下来自NCBI RefSeq集的转录物:人类NM_000688.4(参见图3),NM_199166.1;恒河猴-XM_001090440.2,XM_001090675.2;小鼠-NM_020559.2;大鼠-NM_024484.2。由于高等灵长类动物/啮齿动物序列趋异,以若干个单独的批次设计siRNA双链体,包括但不限于包含匹配以下各项的双链体的批次:仅人类和啮齿动物转录本;仅人类、啮齿动物、小鼠和大鼠转录本;以及仅小鼠和大鼠转录本。设计的大多数siRNA双链体与每一设计批次(见上文)中所考虑的、列出的人类转录本以及其他物种的转录本具有100%一致性。在一些情况中,(参见表8)当反义链:靶标mRNA互补碱基对是GC或CG对时,允许在第一反义(最后有义)位置处的双链体与mRNA靶标之间的错配。在这些情况下,双链体被设计为在第一反义:最后有义对处具有UA或AU对。因此这些双链体维持互补性但是相对于靶标是错配的(U:C,U:G,A:C,或A:G)。这些“UA-交换”双链体中的十八个被设计为人类/恒河猴/小鼠/大鼠集合的一部分(参见表8中的双链体,其中“C19U”、“G19U”、“C19A”、或“G19A”在位置栏中标注)。

[0940] siRNA设计、特异性和功效预测

[0941] 从每一序列预测所有可能的19mer的预测特异性。然后选择缺乏长于7个核苷酸的重复的候选19mer。使用测试脚本‘BruteForce.py’中实施的详尽的穷尽蛮力(“brute-force”)算法,将该1510个候选人类/恒河猴,114个人类/恒河猴/小鼠/大鼠、以及717个小鼠/大鼠siRNA用于针对适当转录组(定义为人类、恒河猴、狗、小鼠、或大鼠NCBI Refseq组中NM_和XM_记录的组)的全面搜索中。该脚本接下来解析该转录物-寡核苷酸比对,以产生基于该siRNA和任何潜在的“脱靶”转录物之间的错配的位置和数目的分数。对该脱靶分数进行加权,以强调siRNA的“种子”区的差异,在从该分子的5'-端起的位置2-9处。通过对单独错配分数求和给予来自brute-force搜索的每个寡转录物对一个错配分数;位置2-9中的错配计数为2.8,切割位点位置10-11中的错配计数为1.2,并且区12-19中的错配计数为1.0。通过对衍生自每个寡聚物的3个相异种子衍生的六聚体的七聚体和八聚体的频率做比较来进行另外的脱靶预测。使用从相对于5'起点开始的位置2-7的六聚体来产生2个七聚体和1个八聚体。我们通过添加3'A到六聚体产生“七聚体1”;通过添加5'A到六聚体产生七聚体2;通过添加A到该六聚体的5'和3'末端产生八聚体。预先计算了人、恒河猴、小鼠或大鼠3'UTRome(定义为来自NCBI的Refseq数据库的转录组的子序列,其中编码区的末端‘CDS’被

清楚定义)中的八聚体和七聚体的频率。使用来自八聚体频率范围的中值,将八聚体的频率归一化为七聚体的频率。然后通过计算((3×归一化的八聚体计数)+(2×七聚体2计数)+(1×七聚体1计数))之和,计算“mirSeedScore”。

[0942] 两种siRNA链被指定为根据计算分数的特异性分类:得分高于3为高特异性的、等于3为特异性的,并且在2.2与2.8之间为中等特异性的。我们通过该反义链的特异性进行分类。然后我们选择双链体,其反义寡核苷酸在第一位置缺乏GC,在位置13和14两者缺乏G,并且在种子区域具有3个或更多个Us或As(具有高预测效力的双链体的特征)

[0943] 通过在3’方向上延伸反义19具体4个另外的核苷酸(保留与靶转录物的完美的互补性),设计在有义链和反义链上分别是21和23个核苷酸长的候选GalNac-共轭双链体。将该有义链指定为反义23聚体的第一个21核苷酸的反向互补体。选择全部23个核苷酸与所有所选物种的转录物维持完美匹配的双链体。

[0944] siRNA序列选择

[0945] 来自人类/恒河猴的90个有义和90个反义,来自人类/恒河猴/小鼠/小鼠/大鼠的40个有义和40个反义,以及来自小鼠/大鼠siRNA 19mer寡核苷酸的40个有义和40个反义全部合成并形成双链体。合成来自人类/恒河猴21/23mer寡核苷酸的总计45个有义和45个反义以获得45GalNac-共轭双链体。

[0946] 经修饰的双链体的有义链和反义链的序列示于表2中,并且未经修饰的双链体的有义链和反义链的序列示于表3中。

[0947] ALAS1序列的合成

[0948] 在MerMade 192合成仪上以1或0.2umol的规模合成ALAS1序列。单链用2’O-甲基修饰制造,用于使用转染试剂进行体外筛选。用采用21-23mer设计的、在有义链上包含2’F和2’-O-甲基修饰的序列制造3’GalNAc共轭物,以用于在细胞中自由摄取。对于所列出的全部21mer序列,使用如下详述的‘内发光(endolight)’化学。

[0949] •有义链中的全部嘧啶(胞嘧啶和尿苷)均含有2’-O-甲基碱基(2’O-甲基C和2’-O-甲基U)。

[0950] •在反义链中,与核糖A核苷毗邻(指向5’位置)的嘧啶被它们的相应2-O-甲基核苷替换。

[0951] •在有义序列和反义序列的3’末端均引入一个双碱基dTsdT延长物。

[0952] •序列文件被转换成文本文件,以便使其对在MerMade192合成软件中加载具有相容性。

[0953] 对于GalNAc共轭的有义链和互补反义序列,将2’F和其他修饰的核苷与具有2’O-甲基核苷的核糖组合引入。在GalNAc修饰的CPG支持物上进行有义链的合成,并且在通用支持物修饰的CPG上进行反义序列的合成。

[0954] 合成、切割与去保护:

[0955] 使用亚磷酰胺化学,使用固相支持的寡核苷酸合成法合成ALAS1序列。对于21mer内发光(endolight)序列,使用脱氧胸苷CPG作为固相支持物,而对于GalNAc共轭物,对于有义链使用GalNAc固相支持物并且对于反义链使用通用CPG。

[0956] 在96孔板中以1或2um的规模进行以上序列的合成。酰亚胺溶液按0.1M浓度制备并且可以乙基硫代四唑(乙腈中的0.6M)作为活化剂。

[0957] 在96孔板中进行合成序列的切割与去保护,在第一步骤中使用甲胺并且在第二步骤使用氟化物试剂。对于含GalNAc和2'F核苷序列,对去保护条件进行修改。使用丙酮:乙醇(80:20)混合物对切割与去保护后序列进行沉淀并且将沉淀物重悬浮在0.2M乙酸钠缓冲液中。将来自每一序列的样品通过LC-MS进行分析以确证一致性、UV用于定量并且通过IEX层析选定样品集以确定纯度。

[0958] 纯化与脱盐:

[0959] 沉淀ALAS1序列并使用葡聚糖凝胶柱在AKTA纯化系统上(AKTA Purifier system)进行纯化。ALAS1ess在环境温度下运行。样品注射与收集在96孔板(孔深1.8mL)中进行。在洗脱液中收集到对应于全长度序列的一个单一峰。将脱盐的ALAS1序列针对浓度(通过在A260处的UV测量)以及纯度(通过离子交换HPLC)进行分析。然后将这些互补单链以1:1化学计量比率进行组合以形成siRNA双链体。

[0960] 表2:人类ALAS1修饰的单链和双链体序列

[0961]

SEQ ID NO.:(有义)	SEQ ID NO.:(反义)	转录物上的位置 NM_000688.4	双链体名称	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
2	3	522-540	AD-55078.2	cuccGGccAGuGAGAAAGAdTsdT	UCUUUCUcACUGGCCGGAGdTsdT
4	5	669-687	AD-55084.2	uGGcAGcAcAGAuGAAucAdTsdT	UGAUUcAUCUGUGCUGCcAdTsdT
6	7	790-808	AD-55090.2	cAGuGuGGuuAGuGuGAAAdTsdT	UUUcAcACuAACcAcACUGdTsdT
8	9	853-871	AD-55096.2	cAucAuGcAAAAGcAAAGAdTsdT	UCUUUGCUUUUGcAUGAUGdTsdT
10	11	876-894	AD-55102.2	AAAGAGuGucucAucuucudTsdT	AGAAGAUGAGAcACUCUUUdTsdT
12	13	877-895	AD-55106.2	AAGAGuGucucAucuucuudTsdT	AAGAAGAUGAGAcACUCUUdTsdT
14	15	914-932	AD-55111.2	ucuGuuuccAcuuuucAGudTsdT	ACUGAAAAGUGGAAAcAGAdTsdT
16	17	923-941	AD-55073.2	AcuuuucAGuAuGAucGuudTsdT	AACGAUcAuACUGAAAAGUdTsdT
18	19	926-944	AD-55079.2	uuucAGuAuGAucGuuucudTsdT	AGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT

[0962]

20	21	927-945	AD-55085.2	uucAGuAuGAucGuuucuudTsdT	AAGAAACGAUcAuACUGAAdTsdT
22	23	928-946	AD-55091.2	ucAGuAuGAucGuuucuuudTsdT	AAAGAAACGAUcAuACUGAdTsdT
24	25	932-950	AD-55097.2	uAuGAucGuuucuuuGAGAdTsdT	UCUcAAAGAAACGAUcAuAdTsdT
26	27	973-991	AD-55103.2	uGAccAcAccuAucGAGuudTsdT	AACUCGAuAGGUGUGGUcAdTsdT
28	29	975-993	AD-55107.2	AccAcAccuAucGAGuuuudTsdT	AAAACUCGAuAGGUGUGGUdTsdT
30	31	1029-1047	AD-55112.2	uGGcAGAuGAcuAuucAGAdTsdT	UCUGAAuAGUcAUCUGCcAdTsdT
32	33	1077-1095	AD-55074.2	ucuGGuGcAGuAAuGAcuAdTsdT	uAGUcAUuACUGcACcAGAdTsdT
34	35	1124-1142	AD-55080.2	uGuGGGGcAGuuAuGGAcAdTsdT	UGUCcAuAACUGCCCcAcAdTsdT
36	37	1137-1155	AD-55086.2	uGGAcAcuuuGAAAcAAcAdTsdT	UGUUGUUUcAAAGUGUCcAdTsdT
38	39	1182-1200	AD-55098.2	AuAuuucuGGAAcuAGuAAdTsdT	UuACuAGUUCcAGAAAuAUdTsdT
40	41	1184-1202	AD-55104.2	AuuucuGGAAcuAGuAAAudTsdT	AUUuACuAGUUCcAGAAAUdTsdT
42	43	1185-1203	AD-55108.2	uuucuGGAAcuAGuAAAuudTsdT	AAUUuACuAGUUCcAGAAAdTsdT
44	45	1188-1206	AD-55113.2	cuGGAAcuAGuAAAuuccAdTsdT	UGGAAUUuACuAGUUCcAGdTsdT
46	47	1325-1343	AD-55075.2	uGuGAGAuuuAcucuGAuudTsdT	AAUcAGAGuAAAUCUcAcAdTsdT
48	49	1364-1382	AD-55081.2	AuccAAGGGAuucGAAAcAdTsdT	UGUUUCGAAUCCCUUGGAUdTsdT
50	51	1382-1400	AD-55087.2	AGccGAGuGccAAAGuAcAdTsdT	UGuACUUUGGcACUCGGCUdTsdT
52	53	1478-1496	AD-55093.2	uuuGAAAcuGuccAuucAAdTsdT	UUGAAUGGAcAGUUUcAAAdTsdT
54	55	1531-1549	AD-55099.2	uGAuGuGGcccAuGAGuuudTsdT	AAACUcAUGGGCcAcAUcAdTsdT
56	57	1631-1649	AD-53573.3	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTsdT
58	59	1637-1655	AD-55109.2	ccAAAAAuGGAcAucAuuudTsdT	AAAUGAUGUCcAUUUUUGGdTsdT
60	61	1706-1724	AD-55114.2	AcGAGuucucuGAuuGAcAdTsdT	UGUcAAUcAGAGAACUCGUdTsdT
62	63	1962-1980	AD-55076.2	AAGucuGuGAuGAAcuAAudTsdT	AUuAGUUcAUcAcAGACUUdTsdT
64	65	1967-1985	AD-55082.2	uGuGAuGAAcuAAuGAGcAdTsdT	UGCUcAUuAGUUcAUcAcAdTsdT
66	67	1977-1995	AD-55088.2	uAAuGAGcAGAcAuAAcAudTsdT	AUGUuAUGUCUGCUcAUuAdTsdT
68	69	2189-2207	AD-55094.2	uuuGAAGuGAuGAGuGAAAdTsdT	UUUcACUcAUcACUUcAAAdTsdT
70	71	2227-2245	AD-55100.2	AGGcuuGAGcAAGuuGGuAdTsdT	uACcAACUUGCUcAAGCCUdTsdT
72	73	2313-2331	AD-55105.2	ucuucAGAGuuGucuuuAudTsdT	AuAAAGAcAACUCUGAAGAdTsdT
74	75	2317-2335	AD-55110.2	cAGAGuuGucuuuAuAuGudTsdT	AcAuAuAAAGAcAACUCUGdTsdT
76	77	2319-2337	AD-55115.2	GAGuuGucuuuAuAuGuGAdTsdT	UcAcAuAuAAAGAcAACUCdTsdT
78	79	2320-2338	AD-55077.2	AGuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	UUcAcAuAuAAAGAcAACUdTsdT
80	81	2344-2362	AD-55083.2	uuAuAuuAAAuuuuAAucudTsdT	AGAUuAAAAUUuAAuAuAAdTsdT
82	83	2352-2370	AD-55089.2	AAuuuuAAucuAuAGuAAAdTsdT	UUuACuAuAGAUuAAAAUUdTsdT
84	85	2353-2371	AD-55095.2	AuuuuAAucuAuAGuAAAAdTsdT	UUUuACuAuAGAUuAAAAUdTsdT
86	87	2376-2394	AD-55101.2	AGuccuGGAAAuAAAuucudTsdT	AGAAUUuAUUUCcAGGACUdTsdT
88	89	358-376	AD-53511.1	cuGcccAuucuuAucccGAdTsdT	UCGGGAuAAGAAUGGGcAGdTsdT
90	91	789-807	AD-53512.1	ccAGuGuGGuuAGuGuGAAdTsdT	UUcAcACuAACcAcACUGGdTsdT
92	93	1076-1094	AD-53513.1	GucuGGuGcAGuAAuGAcudTsdT	AGUcAUuACUGcACcAGACdTsdT
94	95	1253-1271	AD-53514.1	GcAcucuuGuuuuccucGudTsdT	ACGAGGAAAAcAAGAGUGCdTsdT
96	97	1544-1562	AD-53515.1	GAGuuuGGAGcAAucAccudTsdT	AGGUGAUUGCUCcAAACUCdTsdT
98	99	2228-2246	AD-53516.1	GGcuuGAGcAAGuuGGuAudTsdT	AuACcAACUUGCUcAAGCCdTsdT
100	101	404-422	AD-53517.1	GGcAAAucucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
102	103	404-422	AD-53517.1	GGcAAAucucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
104	105	866-884	AD-53518.1	cAAAGAccAGAAAGAGuGudTsdT	AcACUCUUUCUGGUCUUUGdTsdT
106	107	1080-1098	AD-53519.1	GGuGcAGuAAuGAcuAccudTsdT	AGGuAGUcAUuACUGcACCdTsdT
108	109	1258-1276	AD-53520.1	cuuGuuuuccucGuGcuuudTsdT	AAAGcACGAGGAAAAcAAGdTsdT

[0963]

110	111	1616-1634	AD-53521.1	GGGGAucGGGAuGGAGucAdTsdT	UGACUCcAUCCCGAUCCCCdTsdT
112	113	2230-2248	AD-53522.1	cuuGAGcAAGuuGGuAucudTsdT	AGAuACcAACUUGCUcAAGdTsdT
114	115	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTsdT
116	117	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTsdT
118	119	885-903	AD-53524.1	cucAucuucuucAAGAuAAdTsdT	UuAUCUUGAAGAAGAUGAGdTsdT
120	121	1127-1145	AD-53525.1	GGGGcAGuuAuGGAcAcuudTsdT	AAGUGUCcAuAACUGCCCCdTsdT
122	123	1315-1333	AD-53526.1	GAuGccAGGcuGuGAGAuudTsdT	AAUCUcAcAGCCUGGcAUCdTsdT
124	125	1870-1888	AD-53527.1	GAGAcAGAuGcuAAuGGAudTsdT	AUCcAUuAGcAUCUGUCUCdTsdT
126	127	2286-2304	AD-53528.1	ccccAGGccAuuAucAuAudTsdT	AuAUGAuAAUGGCCUGGGGdTsdT
128	129	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
130	131	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
132	133	915-933	AD-53530.1	cuGuuuccAcuuuucAGuAdTsdT	uACUGAAAAGUGGAAAcAGdTsdT
134	135	1138-1156	AD-53531.1	GGAcAcuuuGAAAcAAcAudTsdT	AUGUUGUUUcAAAGUGUCCdTsdT
136	137	1324-1342	AD-53532.1	cuGuGAGAuuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUCUcAcAGdTsdT
138	139	1927-1945	AD-53533.1	cccuGuGcGGGuuGcAGAudTsdT	AUCUGcAACCCGcAcAGGGdTsdT
140	141	2312-2330	AD-53534.1	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdT
142	143	646-664	AD-53535.1	cAcuGcAAGcAAAuGcccudTsdT	AGGGcAUUUGCUUGcAGUGdTsdT
144	145	922-940	AD-53536.1	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTsdT
146	147	1163-1181	AD-53537.1	GGGGcAGGuGGuAcuAGAAdTsdT	UUCuAGuACcACCUGCCCCdTsdT
148	149	1347-1365	AD-53538.1	GGAAccAuGccuccAuGAudTsdT	AUcAUGGAGGcAUGGUUCCdTsdT
150	151	1964-1982	AD-53539.1	GucuGuGAuGAAcuAAuGAdTsdT	UcAUuAGUUcAUcAcAGACdTsdT
152	153	2321-2339	AD-53540.1	GuuGucuuuAuAuGuGAAudTsdT	AUUcAcAuAuAAAGAcAACdTsdT
154	155	671-689	AD-53541.1	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT
156	157	924-942	AD-53542.1	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsdT
158	159	1164-1182	AD-53543.1	GGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsdT	UUUCuAGuACcACCUGCCCdTsdT
160	161	1460-1478	AD-53544.1	GuccccAAGAuuGuGGcAudTsdT	AUGCcAcAAUCUUGGGGACdTsdT
162	163	1976-1994	AD-53545.1	cuAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsdT	UGUuAUGUCUGCUcAUuAGdTsdT
164	165	786-804	AD-53546.1	GccccAGuGuGGuuAGuGudTsdT	AcACuAACcAcACUGGGGCdTsdT
166	167	935-953	AD-53547.1	GAucGuuucuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTsdT
168	169	1165-1183	AD-53548.1	GGcAGGuGGuAcuAGAAAudTsdT	AUUUCuAGuACcACCUGCCdTsdT
170	171	1530-1548	AD-53549.1	GuGAuGuGGcccAuGAGuudTsdT	AACUcAUGGGCcAcAUcACdTsdT
172	173	2003-2021	AD-53550.1	cAAGcAAucAAuuAcccuAdTsdT	uAGGGuAAUUGAUUGCUUGdTsdT
174	175	788-806	AD-53551.1	cccAGuGuGGuuAGuGuGAdTsdT	UcAcACuAACcAcACUGGGdTsdT
176	177	974-992	AD-53552.1	GAccAcAccuAucGAGuuudTsdT	AAACUCGAuAGGUGUGGUCdTsdT
178	179	1191-1209	AD-53553.1	GAAcuAGuAAAuuccAuGudTsdT	AcAUGGAAUUuACuAGUUCdTsdT
180	181	1541-1559	AD-53554.1	cAuGAGuuuGGAGcAAucAdTsdT	UGAUUGCUCcAAACUcAUGdTsdT
182	183	2075-2093	AD-53555.1	ccccAGAuGAuGAAcuAcudTsdT	AGuAGUUcAUcAUCUGGGGdTsdT
184	185	360-378	AD-53561.1	GcccAuucuuAucccGAGudTsdT	ACUCGGGAuAAGAAUGGGCdTsdT
186	187	1356-1374	AD-53567.1	ccuccAuGAuccAAGGGAudTsdT	AUCCCUUGGAUcAUGGAGGdTsdT
188	189	1631-1649	AD-53573.1	GucAuGccAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTsdT
190	191	1634-1652	AD-53579.1	AuGccAAAAAuGGAcAucAdTsdT	UGAUGUCcAUUUUUGGcAUdTsdT

[0964] 表3:人ALAS1未修饰的单链和双链体序列

[0965]

SEQ ID NO.:	SEQ ID NO.:	转录物上的位置	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）

[0966]

（有义）	（反义）	NM_ 000688.4			
192	193	522-540	AD-55078.2	CUCCGGCCAGUGAGAAAGA	UCUUUCUCACUGGCCGGAG
194	195	669-687	AD-55084.2	UGGCAGCACAGAUGAAUCA	UGAUUCAUCUGUGCUGCCA
196	197	790-808	AD-55090.2	CAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUG
198	199	853-871	AD-55096.2	CAUCAUGCAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUG
200	201	876-894	AD-55102.2	AAAGAGUGUCUCAUCUUCU	AGAAGAUGAGACACUCUUU
202	203	877-895	AD-55106.2	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU
204	205	914-932	AD-55111.2	UCUGUUUCCACUUUUCAGU	ACUGAAAAGUGGAAACAGA
206	207	923-941	AD-55073.2	ACUUUUCAGUAUGAUCGUU	AACGAUCAUACUGAAAAGU
208	209	926-944	AD-55079.2	UUUCAGUAUGAUCGUUUCU	AGAAACGAUCAUACUGAAA
210	211	927-945	AD-55085.2	UUCAGUAUGAUCGUUUCUU	AAGAAACGAUCAUACUGAA
212	213	928-946	AD-55091.2	UCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGA
214	215	932-950	AD-55097.2	UAUGAUCGUUUCUUUGAGA	UCUCAAAGAAACGAUCAUA
216	217	973-991	AD-55103.2	UGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCA
218	219	975-993	AD-55107.2	ACCACACCUAUCGAGUUUU	AAAACUCGAUAGGUGUGGU
220	221	1029-1047	AD-55112.2	UGGCAGAUGACUAUUCAGA	UCUGAAUAGUCAUCUGCCA
222	223	1077-1095	AD-55074.2	UCUGGUGCAGUAAUGACUA	UAGUCAUUACUGCACCAGA
224	225	1124-1142	AD-55080.2	UGUGGGGCAGUUAUGGACA	UGUCCAUAACUGCCCCACA
226	227	1137-1155	AD-55086.2	UGGACACUUUGAAACAACA	UGUUGUUUCAAAGUGUCCA
228	229	1182-1200	AD-55098.2	AUAUUUCUGGAACUAGUAA	UUACUAGUUCCAGAAAUAU
230	231	1184-1202	AD-55104.2	AUUUCUGGAACUAGUAAAU	AUUUACUAGUUCCAGAAAU
232	233	1185-1203	AD-55108.2	UUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCCAGAAA
234	235	1188-1206	AD-55113.2	CUGGAACUAGUAAAUUCCA	UGGAAUUUACUAGUUCCAG
236	237	1325-1343	AD-55075.2	UGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACA
238	239	1364-1382	AD-55081.2	AUCCAAGGGAUUCGAAACA	UGUUUCGAAUCCCUUGGAU
240	241	1382-1400	AD-55087.2	AGCCGAGUGCCAAAGUACA	UGUACUUUGGCACUCGGCU
242	243	1478-1496	AD-55093.2	UUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAA
244	245	1531-1549	AD-55099.2	UGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCA
246	247	1631-1649	AD-53573.3	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
248	249	1637-1655	AD-55109.2	CCAAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUGAUGUCCAUUUUUGG
250	251	1706-1724	AD-55114.2	ACGAGUUCUCUGAUUGACA	UGUCAAUCAGAGAACUCGU
252	253	1962-1980	AD-55076.2	AAGUCUGUGAUGAACUAAU	AUUAGUUCAUCACAGACUU
254	255	1967-1985	AD-55082.2	UGUGAUGAACUAAUGAGCA	UGCUCAUUAGUUCAUCACA
256	257	1977-1995	AD-55088.2	UAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUUAUGUCUGCUCAUUA
258	259	2189-2207	AD-55094.2	UUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAA
260	261	2227-2245	AD-55100.2	AGGCUUGAGCAAGUUGGUA	UACCAACUUGCUCAAGCCU
262	263	2313-2331	AD-55105.2	UCUUCAGAGUUGUCUUUAU	AUAAAGACAACUCUGAAGA
264	265	2317-2335	AD-55110.2	CAGAGUUGUCUUUAUAUGU	ACAUAUAAAGACAACUCUG
266	267	2319-2337	AD-55115.2	GAGUUGUCUUUAUAUGUGA	UCACAUAUAAAGACAACUC
268	269	2320-2338	AD-55077.2	AGUUGUCUUUAUAUGUGAA	UUCACAUAUAAAGACAACU
270	271	2344-2362	AD-55083.2	UUAUAUUAAAUUUUAAUCU	AGAUUAAAAUUUAAUAUAA
272	273	2352-2370	AD-55089.2	AAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUU
274	275	2353-2371	AD-55095.2	AUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAAU
276	277	2376-2394	AD-55101.2	AGUCCUGGAAAUAAAUUCU	AGAAUUUAUUUCCAGGACU

[0967]

278	279	358-376	AD-53511.1	CUGCCCAUUCUUAUCCCGA	UCGGGAUAAGAAUGGGCAG
280	281	789-807	AD-53512.1	CCAGUGUGGUUAGUGUGAA	UUCACACUAACCACACUGG
282	283	1076-1094	AD-53513.1	GUCUGGUGCAGUAAUGACU	AGUCAUUACUGCACCAGAC
284	285	1253-1271	AD-53514.1	GCACUCUUGUUUUCCUCGU	ACGAGGAAAACAAGAGUGC
286	287	1544-1562	AD-53515.1	GAGUUUGGAGCAAUCACCU	AGGUGAUUGCUCCAAACUC
288	289	2228-2246	AD-53516.1	GGCUUGAGCAAGUUGGUAU	AUACCAACUUGCUCAAGCC
290	291	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAACAGAGAUUUGCC
292	293	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAACAGAGAUUUGCC
294	295	866-884	AD-53518.1	CAAAGACCAGAAAGAGUGU	ACACUCUUUCUGGUCUUUG
296	297	1080-1098	AD-53519.1	GGUGCAGUAAUGACUACCU	AGGUAGUCAUUACUGCACC
298	299	1258-1276	AD-53520.1	CUUGUUUUCCUCGUGCUUU	AAAGCACGAGGAAAACAAG
300	301	1616-1634	AD-53521.1	GGGGAUCGGGAUGGAGUCA	UGACUCCAUCCCGAUCCCC
302	303	2230-2248	AD-53522.1	CUUGAGCAAGUUGGUAUCU	AGAUACCAACUUGCUCAAG
304	305	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
306	307	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
308	309	885-903	AD-53524.1	CUCAUCUUCUUCAAGAUAA	UUAUCUUGAAGAAGAUGAG
310	311	1127-1145	AD-53525.1	GGGGCAGUUAUGGACACUU	AAGUGUCCAUAACUGCCCC
312	313	1315-1333	AD-53526.1	GAUGCCAGGCUGUGAGAUU	AAUCUCACAGCCUGGCAUC
314	315	1870-1888	AD-53527.1	GAGACAGAUGCUAAUGGAU	AUCCAUUAGCAUCUGUCUC
316	317	2286-2304	AD-53528.1	CCCCAGGCCAUUAUCAUAU	AUAUGAUAAUGGCCUGGGG
318	319	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
320	321	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
322	323	915-933	AD-53530.1	CUGUUUCCACUUUUCAGUA	UACUGAAAAGUGGAAACAG
324	325	1138-1156	AD-53531.1	GGACACUUUGAAACAACAU	AUGUUGUUUCAAAGUGUCC
326	327	1324-1342	AD-53532.1	CUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAG
328	329	1927-1945	AD-53533.1	CCCUGUGCGGGUUGCAGAU	AUCUGCAACCCGCACAGGG
330	331	2312-2330	AD-53534.1	GUCUUCAGAGUUGUCUUUA	UAAAGACAACUCUGAAGAC
332	333	646-664	AD-53535.1	CACUGCAAGCAAAUGCCCU	AGGGCAUUUGCUUGCAGUG
334	335	922-940	AD-53536.1	CACUUUUCAGUAUGAUCGU	ACGAUCAUACUGAAAAGUG
336	337	1163-1181	AD-53537.1	GGGGCAGGUGGUACUAGAA	UUCUAGUACCACCUGCCCC
338	339	1347-1365	AD-53538.1	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
340	341	1964-1982	AD-53539.1	GUCUGUGAUGAACUAAUGA	UCAUUAGUUCAUCACAGAC
342	343	2321-2339	AD-53540.1	GUUGUCUUUAUAUGUGAAU	AUUCACAUAUAAAGACAAC
344	345	671-689	AD-53541.1	GCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGC
346	347	924-942	AD-53542.1	CUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAG
348	349	1164-1182	AD-53543.1	GGGCAGGUGGUACUAGAAA	UUUCUAGUACCACCUGCCC
350	351	1460-1478	AD-53544.1	GUCCCCAAGAUUGUGGCAU	AUGCCACAAUCUUGGGGAC
352	353	1976-1994	AD-53545.1	CUAAUGAGCAGACAUAACA	UGUUAUGUCUGCUCAUUAG
354	355	786-804	AD-53546.1	GCCCCAGUGUGGUUAGUGU	ACACUAACCACACUGGGGC
356	357	935-953	AD-53547.1	GAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAGAAACGAUC
358	359	1165-1183	AD-53548.1	GGCAGGUGGUACUAGAAAU	AUUUCUAGUACCACCUGCC
360	361	1530-1548	AD-53549.1	GUGAUGUGGCCCAUGAGUU	AACUCAUGGGCCACAUCAC
362	363	2003-2021	AD-53550.1	CAAGCAAUCAAUUACCCUA	UAGGGUAAUUGAUUGCUUG
364	365	788-806	AD-53551.1	CCCAGUGUGGUUAGUGUGA	UCACACUAACCACACUGGG
366	367	974-992	AD-53552.1	GACCACACCUAUCGAGUUU	AAACUCGAUAGGUGUGGUC

[0968]

368	369	1191-1209	AD-53553.1	GAACUAGUAAAUUCCAUGU	ACAUGGAAUUUACUAGUUC
370	371	1541-1559	AD-53554.1	CAUGAGUUUGGAGCAAUCA	UGAUUGCUCCAAACUCAUG
372	373	2075-2093	AD-53555.1	CCCCAGAUGAUGAACUACU	AGUAGUUCAUCAUCUGGGG
374	375	360-378	AD-53561.1	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC
376	377	1356-1374	AD-53567.1	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
378	379	1631-1649	AD-53573.1	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
380	381	1634-1652	AD-53579.1	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU

[0969] 实例3.针对ALAS1敲低活性，对ALAS1 siRNA双链体进行体外筛选

[0970] 针对体外敲低ALAS1表达的能力对ALAS1 siRNA双链体进行筛选。

[0971] 体外筛选

[0972] 细胞培养和转染:

[0973] 将Hep3B细胞(ATCC公司，马纳萨斯，弗吉尼亚州(Manassas,VA))在37℃在5%CO_2的气氛中在MEM(ATCC公司)(补充有10%FBS)中生长至接近融合，然后通过胰酶消化从该板释放。转染通过以下进行:将14.8μl的Opti-MEM加每孔0.2μl的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司，卡尔斯巴德，加利福尼亚州，产品目录号13778-150)与每孔5μl的siRNA双链体添加至96孔板并且在室温孵育15分钟。然后将包含约2x10^4Hep3B细胞的80μl的完全生长培养基添加至该siRNA混合物。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时或120小时。单剂量实验以10nM和0.1nM双链体终浓度进行并且剂量应答实验以10、1.67、0.27、0.046、0.0077、0.0013、0.00021、0.00004nM双链体终浓度进行。

[0974] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司，部件号:610-12)的总RNA分离

[0975] 收获细胞并且在150μl裂解/结合缓冲液中进行裂解，然后使用Eppendorf Thermomixer在850rpm混合5分钟(混合速度在整个过程中相同)。将十微升磁珠与80μl裂解/结合缓冲液混合物添加至圆底板中并且混合1分钟。使用磁性表座捕获磁珠并且将该上清液移除而不扰动这些珠子。在移出上清液后，将裂解的细胞添加至剩余的磁珠并且混合5分钟。在除去上清液后，将磁珠用150μl洗涤缓冲液A(Wash Buffer A)洗涤2次并且混合1分钟。珠子再次被捕获并且去除上清液。然后将珠子用150μl洗涤缓冲液B(Wash Buffer B)进行洗涤，捕获，并且除上清液。然后将珠子用150μl洗脱缓冲液(Elution Buffer)进行洗涤、捕获并且除上清液。允许珠子干燥持续2分钟。在干燥之后，添加50μl的洗脱缓冲液(Elution Buffer)并且在70℃混合5分钟。用磁体捕获珠子持续5分钟。去除40μl的上清液并且添加至另一96孔板中。

[0976] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统，福斯特市，加利福尼亚州，目录号4368813)的cDNA合成

[0977] 将母混合物(每一反应:2μl 10×缓冲液、0.8μl 25 X dNTP、2μl随机引物、1μl逆转录酶、1μl R Nase抑制剂以及3.2μl H_2O)添加至10μl总RNA中。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(Hercules公司，加利福尼亚州)经以下步骤产生cDNA:25℃10min，37℃120min，85℃5s，4℃保持。

[0978] 实时PCR

[0979] 将2μl的cDNA添加至母混合物中，该母混合物在一个384孔板(罗氏公司(Roche)产品目录号04887301001)中每一孔包含0.5μl GAPDH TaqMan探针(应用生物系统公司(Applied Biosystems)产品目录号4326317E)、0.5μl ALAS1 TaqMan探针(应用生物系统公司，产品目录号Hs00167441_m1)以及5μl Lightcycler 480探针母混合物(罗氏公司，产品目录号04887301001)。实时PCR在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)上使用ΔΔCt(RQ)测定而完成。将每一双链体在两个独立的转染(各自具有两个生物学重复)中进行测试并且每一转染以一式两份进行测定，除非在总结表中另外指出。

[0980] 为了计算相对倍数变化，使用ΔΔCt方法分析实时数据，并且将这些数据归一化为利用以下这样的细胞而进行的测定:这些细胞是转染了10nM AD-1955的细胞，或是模拟

转染的细胞。使用4参数拟合模型使用XLFit计算IC50,并且将IC50归一化为在相同剂量范围内或至其自身最低剂量转染了AD-1955的细胞或原初细胞(naïve cell)。

[0981] 通过ALAS1 siRNA双链体体外敲低内源ALAS1表达

[0982] 表4示例了在Hep3B细胞中通过ALAS1修饰的siRNA双链体进行的ALAS1敲低(参见表2)。沉默表示为相对于阴性(萤虫素酶)对照siRNA AD-1955,剩余的RNA信使的分数。每个siRNA的10nM或0.1nM转染之后,如上所述生成数据。使用ALAS1 TaqMan探针Hs00167441_m1运行qPCR。

[0983] 表4:ALAS1 siRNA转染之后,Hep3B细胞中的ALAS1表达

[0984]

双链体 ID	10 nM 平均值	0.1 nM 平均值	10 nM STDEV	0.1 nM STDEV
AD-55078.2	0.7	0.87	0.001	0.089
AD-55084.2	0.08	0.3	0	0.04
AD-55090.2	0.06	0.08	0.002	0.003
AD-55096.2	0.61	0.92	0.171	0.34
AD-55102.2	0.63	0.62	0.005	0.069
AD-55106.2	0.07	0.08	0.004	0.027
AD-55111.2	0.06	0.23	0.013	0.062
AD-55073.2	0.21	0.4	0.018	0.061
AD-55079.2	0.17	0.43	0.033	0.089
AD-55085.2	0.13	0.21	0.011	0.019
AD-55091.2	0.27	0.55	0.033	0.009
AD-55097.2	0.31	0.38	0.051	0.059
AD-55103.2	0.05	0.11	0.017	0.006
AD-55107.2	0.12	0.24	0.007	0.008
AD-55112.2	0.15	0.2	0.036	0.025
AD-55074.2	0.16	0.45	0.008	0.002
AD-55080.2	0.79	0.99	0.095	0.304
AD-55086.2	0.09	0.22	0.005	0.035

	AD-55098.2	0.25	0.51	0.03	0.07
	AD-55104.2	0.06	0.1	0.017	0.001
	AD-55108.2	0.47	0.65	0.03	0.015
	AD-55113.2	0.38	0.62	0.068	0.039
	AD-55075.2	0.12	0.28	0.007	0.051
	AD-55081.2	0.21	0.51	0.036	0.066
	AD-55087.2	0.1	0.19	0.017	0.02
	AD-55093.2	0.24	0.56	0.029	0.053
	AD-55099.2	0.05	0.18	0.001	0.038
	AD-53573.3	0.67	1.07	0.16	0.153
	AD-55109.2	0.07	0.23	0.006	0.052
	AD-55114.2	0.08	0.16	0.004	0.017
	AD-55076.2	0.05	0.14	0.007	0.035
	AD-55082.2	0.08	0.3	0.019	0.016
	AD-55088.2	0.06	0.12	0.008	0.02
	AD-55094.2	0.06	0.18	0.005	0.023
	AD-55100.2	0.45	0.83	0.02	0.05
	AD-55105.2	0.02	0.05	0.005	0.004
	AD-55110.2	0.15	0.19	0.031	0.016
	AD-55115.2	0.35	0.58	0.045	0.052
	AD-55077.2	0.14	0.14	0.006	0.019
[0985]	AD-55083.2	0.56	0.98	0.24	0.188
	AD-55089.2	0.62	0.79	0.036	0.094
	AD-55095.2	0.59	0.92	0.12	0.079
	AD-55101.2	0.71	0.97	0.074	0.097
	AD-1955	1.00	1.01	0.03	0.04
	AD-53511.1	0.84	1.08	0.028	0.0515
	AD-53512.1	0.15	0.65	0.062	0.023
	AD-53513.1	0.34	0.86	0.055	0.011
	AD-53514.1	0.12	0.61	0.003	0.008
	AD-53515.1	0.25	0.66	0.005	0.004
	AD-53516.1	1.05	1.02	0.032	0.011
	AD-53517.1	0.145	0.725	0.025	0.0155
	AD-53518.1	0.72	0.85	0.045	0.028
	AD-53519.1	0.18	0.66	0.061	0.004
	AD-53520.1	0.18	0.9	0.041	0.001
	AD-53521.1	0.97	1.07	0.01	0.003
	AD-53522.1	0.87	1.1	0.065	0.112
	AD-53523.1	0.48	0.96	0.0305	0.0255
	AD-53524.1	0.11	0.66	0.02	0.006
	AD-53525.1	0.71	1.03	0.016	0.01
	AD-53526.1	0.23	0.85	0.075	0.01
	AD-53527.1	0.25	0.83	0.015	0.017

[0986]

AD-53528.1	0.44	0.93	0.037	0.006
AD-53529.1	0.185	0.73	0.015	0.014
AD-53530.1	0.1	0.62	0.02	0.003
AD-53531.1	0.48	0.93	0.019	0.045
AD-53532.1	0.06	0.17	0	0.003
AD-53533.1	0.36	0.93	0.025	0.034
AD-53534.1	0.1	0.36	0.014	0.012
AD-53535.1	0.58	1.05	0.036	0.071
AD-53536.1	0.12	0.45	0.009	0.026
AD-53537.1	0.73	0.96	0.101	0.015
AD-53538.1	0.74	1.07	0	0.046
AD-53539.1	0.52	0.97	0.057	0.032
AD-53540.1	0.1	0.47	0.017	0.012
AD-53541.1	0.11	0.29	0.026	0.015
AD-53542.1	0.08	0.23	0.008	0.006
AD-53543.1	0.62	1.01	0.027	0.014
AD-53544.1	0.8	1.04	0.002	0.001
AD-53545.1	0.17	0.73	0.007	0.007
AD-53546.1	0.27	0.93	0.058	0.019
AD-53547.1	0.12	0.28	0.008	0.01
AD-53548.1	0.1	0.34	0.022	0.002
AD-53549.1	0.8	1.04	0.011	0.026
AD-53550.1	0.05	0.54	0.02	0.003
AD-53551.1	0.96	1.16	0.029	0.044
AD-53552.1	0.13	0.5	0.002	0.009
AD-53553.1	0.92	1.1	0.027	0.02
AD-53554.1	0.76	0.67	0.005	0.004
AD-53555.1	0.11	0.53	0.009	0.007
AD-53561.1	0.72	0.94	0.014	0.001
AD-53567.1	0.16	0.66	0.019	0.003
AD-53573.1	1.06	1.10	0.019	0.037
AD-53579.1	0.19	0.76	0.036	0.019

[0987] 选择的ALAS1 siRNA双链体在体外筛选中的IC_{50}

[0988] 表5示例了选择的ALAS1 siRNA双链体的IC_{50},由内源性表达的ALAS1在Hep3B细胞系中通过ALAS1修饰的siRNA双链体进行的敲低确定(参见表2)。在每个siRNA双链体感染24或120小时后,如上所述生成数据。在该实例中,ALAS1的沉默表示为相对于siRNA AD-1955(用作阴性对照的非靶向性siRNA)的剩余的mRNA信使的分数。使用来自重复进行的转染实验的数据以拟合单线,从而确定IC_{50}。若干个双链体(例如,AD-53541.1、AD-53542.1、以及AD-53547.1)具有在24小时低至大约0.03nM的IC_{50}。大多数双链体具有在24小时低于0.1nM的IC_{50}(例如,AD-53534.1、AD-53536.1、AD-53540.1、AD-53541.1、AD-53542.1、AD-53547.1、AD-53548.1、AD-53550.1、AD-53552.1),并且这些中的一些还具有在120小时低于0.1nM的IC_{50}(例如,AD-53534.1、AD-53540.1、AD-53541.1、AD-53542.1、AD-53547.1、AD-53552.1)。

[0989] 表5:选择的ALAS1 siRNA双链体的、归一化为AD-1955的IC_{50}

[0990]

	IC50（nM）	
双链体 ID	24 hr	120 hr
AD-53534.1	0.045	0.076
AD-53536.1	0.049	0.105
AD-53540.1	0.054	0.077
AD-53541.1	0.032	0.062
AD-53542.1	0.028	0.093
AD-53547.1	0.03	0.062
AD-53548.1	0.044	0.101
AD-53550.1	0.085	0.152
AD-53552.1	0.077	0.063
AD-53567.1	0.219	0.357
AD-53579.1	0.217	0.566

[0991] 实例4.使用配制为LNP的小鼠/大鼠ALAS1 siRNA的体内沉默

[0992] 修饰的双链体AD-53558的序列示于下表6中。

[0993] 表6:ALAS1 siRNA双链体AD-53558.4的序列

[0994]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	NM_020559.2 的转录物上的起始位置	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
383	384	1184	AD-53558	cuGuGAAAuuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUUUcAcAGdTsdT

[0995] 这个双链体被配制为LNP11配制品(参见上表10)。该LNP-配制的AD-53558 siRNA在小鼠(N＝25只动物;每组5只动物)和大鼠(N＝20只动物;每组4只动物)中进行体内检验并进行确认以体内沉默ALAS1 mRNA。这些结果显示在图5和图6中。

[0996] 图5显示了siRNA证实了小鼠内的剂量响应效应。当siRNA以1mg/kg给予时，小鼠ALAS1(mALAS1)mRNA表达被减少约78％;当siRNA以0.3mg/kg给予时，小鼠ALAS1 mRNA表达被减少约60％;并且当siRNA以0.1mg/kg给予时，小鼠ALAS1 mRNA表达被减少约49％。这些减少是相对于PBS对照表述的。如图5中所示的，还利用了AD-1955LUC对照。

[0997] 同样地，图6显示了siRNA证实了大鼠内的剂量响应效应。当siRNA以1mg/kg给予时，ALAS1 RNA表达被减少约70％;当siRNA以0.3mg/kg给予时，ALAS1 mRNA表达被减少约62％;并且当siRNA以0.1mg/kg给予时，ALAS1 mRNA表达被减少约34％。

[0998] 还在小鼠中检验了沉默持久性(N＝15;每个时间点3只动物。结果示于图7中，该图显示AD-53558压制mALAS1 mRNA约80％，持续至少9天。至少约50％的压制持续至少14天。

[0999] 实例5.ALAS1 siRNA在AIP动物模型中的效力

[1000] AD-53558 LNP11配制品(描述于上文实例中的小鼠/大鼠ALAS1 siRNA)的效果在AIP小鼠模型中进行了研究。PBGD敲除是不可行的(-/-，0％活性)。杂合的PBGD敲除小鼠(+/-，约50％活性)是可得的但是不具有全生物化学表型并且因此不重现人类疾病表型。因此，所研发的AIP小鼠模型是具有T1/T2等位基因的复合杂合子，包括T1(+/-)启动子破坏和T2(-/-)剪接位点变更。这些小鼠已经显示具有肝残留的PBGD活性，该活性是约30％的野生型水平，并且具有正常或略微升高的基线血浆ALA和PBG水平。已经发现这些小鼠在生命早

期显现正常但是随着年龄增加变得略微变慢和共济失调。在六个月时，这些小鼠已经被记录为发展了病理检查方面的受损的运动协调和肌肉性能以及轴突变性。在年老的小鼠中，小鼠模型病理学研究显示轴突变性、受损的运动协调和肌肉性能。已经发现随着连续i.p.给予苯巴比妥，尿和血浆ALA以及PBG显著增加(参见林德贝格等人，(1996)、自然遗传学(Nature Genetics)，12:195-219以及林德贝格等人，(1999)临床研究杂志(Journal of Clinical Investigation)，103:1127-34)。通过肝脏中PBGD的AAV-介导的表达拯救小鼠(安田町(Yasuda)等人(2010)，分子医学(Molecular Medicine)，1:17-22以及尤组(Unzu)等人(2011)，分子医学，2:243-50)。

[1001] 在第1天，将小鼠通过i.v.注射给予1mg/kg ALAS1 siRNA(n＝5)或LUC AD-1955对照(n＝3)。给予三次苯巴比妥注射(在第2天、第3天和第4天每天1次注射)以诱导肝ALAS1以及卟啉前体、ALA和PBG。在第5天收集血浆和过夜尿样本并通过LC-MS测量代谢水平。在血浆中通过LC-MS测量代谢水平并且还在尿中对其进行了测量。在第1天，在第一次处理之前，测量代谢的基线水平。结果示于图8-12以及表12和13中。

[1002] 图8和图9显示了以μM计的血浆ALA水平。基线ALA水平低，(n＝4)，并且苯巴比妥处理在对照LUC siRNA处理的动物中诱导了显著增加的血浆ALA水平(n＝3)。使用ALAS1 siRNA进行的处理抑制血浆ALA的诱导(n＝5)，如在图8中所示的。在所研究的每个个体动物中，ALAS1 siRNA持续有效于阻断血浆ALA的诱导(参见图9)。这些研究表明在这一AIP动物模型中，ALAS1 siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的血浆ALA增加。

[1003] 图10和图11显示了以μM计的血浆PBG水平。基线PBG水平低(n＝4)，并且苯巴比妥处理在对照LUC siRNA处理的动物中诱导了显著增加的血浆PBG水平(n＝3)。使用ALAS1 siRNA进行的处理抑制血浆PBG的诱导(n＝5)，如在图10中所示的。在所研究的每个个体动物中，ALAS1 siRNA持续有效于阻断血浆PBG的诱导(参见图11)。这些研究表明在这一AIP动物模型中，ALAS1 siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的血浆PBG增加。

[1004] 表12和13示出了在LUC siRNA(n＝2)对照(CTR，是指PBS缓冲液处理的动物，n＝1)以及ALAS1 siRNA(n＝5)处理的动物中，基线处和苯巴比妥处理后尿ALA和PBG水平。

[1005] 表12：来自显示预防诱导的急性发作的个体小鼠的尿数据

[1006]

小鼠I	ALA（微M/l)	PBG（微M/L）	肌酸酐（mg/dl)	ALA（微 M/mg 肌酸酐）	PBG（微 M/mg 肌酸酐）	siRNA	PB
Ha-17-4-6				29.7	7.9	基线	-
Ha-19-5-4/2				15.7	5.1	基线	-
Ha-20-39-4/3				28.6	6.7	基线	-
Ha-20-38-4				21.4	4.7	基线	-
Ha-21-33-4	934.92	483.71	0.4205	222.33	115.03	Luc	+
Ha-21-36-9	944.08	563.53	0.5055	186.76	111.48	Luc	+
Ha-21-18-8	32.88	8.69	0.133	24.72	6.53	ALAS1；1 mg/kg	+
Ha-21-33-7	83.07	23.28	0.426	19.50	5.46	ALAS1；1 mg/kg	+
Ha-21-34-5	59.15	18.41	0.263	22.49	7.00	ALAS1；1 mg/kg	+

[1007]　PB代表苯巴比妥。A“+”表明给予苯巴比妥。

[1008]　表13:平均尿数据

[1009]

病症	平均 ALA（微 M/mg 肌酸酐）	平均 PBG（微 M/mg 肌酸酐）
AIP 基线	23.8	6.1
Luc-siRNA	204.55	113.26
ALAS1-siRNA	22.24	6.33

[1010]　在LUC siRNA处理的小鼠(对照)中,苯巴比妥处理诱导强增加(约25-30倍增加)尿中ALA(超过基线水平约9-倍)以及PBG(超过基线水平约19-倍),而这样的增加在ALAS1 siRNA处理的小鼠中未观察到。因此,ALAS1siRNA阻断苯巴比妥诱导的尿ALA和PBG的增加。这些结果与血浆测试值一致并且显示在这一AIP动物模型中,ALAS1 siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的尿代谢物(ALA和PBG)的增加。

[1011]　在另外的实验(图12)中,发现苯巴比妥处理诱导小鼠模型肝脏中ALAS1 mRNA表达的大的增加(约25倍)。ALAS1 siRNA给予完全阻断了ALAS1 mRNA诱导。这些结果提供了进一步的证据:ALAS1 siRNA在AIP动物模型中是有效的。

[1012]　总之,在该实例中提供的结果显示ALAS1 siRNA在急性肝性卟啉症AIP的动物模型中对治疗急性发作是有效的。多个结果测量支持这一结论,包括血浆ALA水平、血浆PBG水平、尿ALA水平、尿PBG水平、以及肝脏ALAS1 mRNA表达水平。

[1013]　实例6.使用GalNAc-共轭的小鼠ALAS1 siRNA的体内沉默

[1014]　在该实例中描述的实验研究了三种GalNAc-共轭的siRNA的体内效力(参见表7)。使用如在实例2中描述的那些方法设计并生产这些siRNA。

[1015]　表7:序列AD-57929

[1016]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	在转录物NM_020559.2上的正义序列的位置	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）	在转录物NM_020559.2上的反义序列的位置
385	386	775-795	AD-56211	AfaGfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaAfL96	uUfgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfusUfsg	773-795
387	388	2168-2188	AD-56173	AfcAfuAfgUfaGfCfCfaGfaAfuUfgUfcUfL96	aGfaCfaAfuUfcUfggcUfaCfuAfuGfusGfsg	2166-2188
389	390	775-795	AD-57929	AfsasGfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaAfL96	usUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfususg	773-795

[1017] 将这些小鼠(n＝40;对于每一实验条件,n＝4)分成多组:接受PBS或3mg/kg、10mg/kg、或30mg/kg剂量的siRNA的皮下给予。在给予72小时后,在肝脏细胞中确定相对于PBS对照的mALAS1/mGAPDH mRNA的水平。这些结果显示于图13中。对于siRNA AD-56211和siRNA AD-56173,不存在明显的剂量响应效应。相反地,ALAS1 siRNA AD-57929在抑制mALAS1表达中显示剂量响应效应。这些结果证明ALAS1 GalNAc共轭物有效抑制ALAS1 mRNA的体内表达,并且显示了一个剂量响应效应。

[1018] 实例7.人类siRNA

[1019] 如在实例2中描述的,设计并生产另外的人siRNA。基于它们的预测效力,选择最高的45个siRNA。这45个siRNA的序列提供于表8和其附接的序列表中(例如,分别是,与鉴定为SEQ ID NO:391至551的奇数序列之一相应的有义序列,与鉴定为SEQ ID NOs:392至552的偶数序列之一相应的反义序列)。表8披露于国际公开号WO 2013/155204A2中。包括表8的WO 2013/155204和序列表的内容通过引用清楚地进行结合。

[1020] 实例8.人类siRNA

[1021] 生成了另外的19mer人siRNA。这些siRNA的序列提供于表9和其附接的序列表中(例如,分别是,与鉴定为SEQ ID NO:553至3365的奇数序列之一相应的有义序列,与鉴定为SEQ ID NOs:554至3366的偶数序列之一相应的反义序列)。表9披露于国际公开号WO 2013/155204 A2中。包括表9的WO 2013/155204和序列表的内容通过引用清楚地进行结合。可以使用在此描述的方法和/或本领域中已知的方法对这些siRNA的效力进行检验。

[1022] 实例9.在急性治疗范例中使用ALAS1 siRNA进行卟啉前体的压制

[1023] 使用AIP小鼠模型(参见实例5)研究ALAS1 siRNA在急性治疗范例中是否起作用以降低已经升高了的ALA和PBG水平,该升高的水平可能是存在的,例如,当人类卟啉症患者经受急性发作时。距最后给予苯巴比妥12小时后以1mg/kg的剂量给予AD-53558 LNP11配制品siRNA迅速降低小鼠血浆中ALA和PBG两者的水平,而Luc对照处理的小鼠中,这些水平继续上升(图14)。这些结果表明ALAS siRNA对于治疗急性发作是有效的。ALAS1 siRNA有效降低并预防ALA和PBG水平的进一步增加。

[1024] 如可以在图14中所观察到的,ALAS siRNA在减少ALA和PBG水平方面具有快速起效作用。在给予siRNA后的数小时内发生作用起效。对血浆ALA的作用可以在给予siRNA的4小时内观察到,(参见图14;在最后给予苯巴比妥后的12小时给予该siRNA,并且在最后给予苯巴比妥后16小时处可以观察到相对于对照血浆ALA的减少)。对血浆PBG的作用可以在给予siRNA的8小时内观察到,(参见图14;在最后给予苯巴比妥后的12小时处给予该siRNA,并且在最后给予苯巴比妥后20小时处可以观察到相对于对照血浆ALA的减少)。

[1025]　实例10.靶向ALAS1的siRNA

[1026]　如在实例2中描述的，设计并生产靶向ALAS1 siRNA的、另外的未修饰的或修饰的siRNA序列。如下所述对这些修饰的双链体的体外活性进行检验。

[1027]　方法

[1028]　脂质介导的转染

[1029]　对于Hep3B、PMH、以及原代猕猴肝实质细胞，转染通过以下进行：将14.8μl的Opti-MEM加每孔0.2μl的Lipofectamine RNAiMax per well(英杰公司，卡尔斯巴德，加利福尼亚州，产品目录号13778-150)与每孔5μl的各自的siRNA双链体添加至96孔板中的每一个孔中。随后将该混合物在室温下孵育20分钟。然后将80μl不含抗生素的但包含适当细胞数目的完全培养基添加至该siRNA混合物。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。

[1030]　对于GalNAc修饰的，单剂量实验以1uM、500nM、20nM、10nM和0.2nM的双链体终浓度进行。

[1031]　自由摄取转染

[1032]　在使用之前立即在37℃水浴中对低温保存的原代猕猴肝细胞(Celsis体外技术公司，M003055-P)进行解冻，并且以0.26×10^6个细胞/毫升将这些细胞重新悬浮于体外GRO CP(平板接种)培养基(Celsis体外技术公司，目录号Z99029)中。在转染过程中，以每孔25,000个细胞将细胞涂布在BD BioCoat 96孔胶原板(BD,356407)上并且在37℃下在5％CO_2气氛中进行孵育。通过每孔添加PBS中的10μl的siRNA双链体到96孔(96w)板，进行游离摄取实验。然后将包含该细胞类型的适当细胞数目的90μl完全培养基添加至该siRNA。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。单剂量实验以1uM、500nM、20nM、和10nM的最终双链体进行。

[1033]　使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司，部件号:610-12)的总RNA分离

[1034]　收获细胞并且在150μl裂解/结合缓冲液中进行裂解，然后使用Eppendorf Thermomixer在850rpm混合5分钟，混合速度在整个过程中相同。将十微升磁珠与80μl裂解/结合缓冲液混合物添加至圆底板中并且混合1分钟。使用磁力支座捕获磁珠并且在不扰动磁珠的情况下移出上清液。在移除上清液后，将裂解的细胞添加至剩余的磁珠并且混合5分钟。在除去上清液后，将磁珠用150μl洗涤缓冲液A(Wash Buffer A)洗涤2次并且混合1分钟。珠子再一次被捕获，并且除去上清液。然后将珠子用150μl洗涤缓冲液B(Wash Buffer B)进行洗涤并且除去上清液。然后将珠子用150μl洗脱缓冲液(Elution Buffer)进行洗涤、捕获并且除上清液。最终，允许珠子干燥2分钟。在干燥之后，添加50μl的洗脱缓冲液(Elution Buffer)并且在70℃混合5分钟。用磁体捕获珠子持续5分钟。去除45μl的上清液并且添加至另一96孔板中。

[1035]　使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统，福斯特市，加利福尼亚州，目录号4368813)的cDNA合成

[1036]　母混合物如所制备的:每一反应:2μl 10X缓冲液、0.8μl 25X dNTP、2μl随机引物、1μl逆转录酶、1μl RNase抑制剂以及3.2μl的H2O。将相同体积的母混合物和RNA混合为用于体外筛选的样本的12μl终体积或用于体内筛选的样本的20μl终体积。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(大力神公司(Hercules)，CA)通过以下步骤产生cDNA:25℃10min、37℃120min、85℃5秒、4℃保持。

[1037]　实时PCR

[1038] 在384孔(384w)板(罗氏公司(Roche)产品目录号04887301001)的每个孔中，将2μl的cDNA添加到母混合物中，该母混合物包含：2μl的H_2O、0.5μl GAPDH TaqMan探针(生命技术公司(Life Technologies)产品目录号4326317E(对于Hep3B细胞)，产品目录号352339E(对于原初小鼠肝实质细胞)，或定制探针(对于猕猴原初肝实质细胞))、0.5μl C5 TaqMan探针(生命技术公司产品目录号Hs00167441_m1(对于Hep3B细胞)或Mm00457879_m1(对于原初小鼠肝实质细胞)或或定制探针(对于猕猴原初肝实质细胞))以及5μl Lightcycler 480探针母混合物(罗氏公司产品目录号04887301001)。实时PCR在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)上使用ΔΔCt(RQ)测定而进行。除非另外指出，对于体外筛选，使用两个生物重复对每个双链体进行检验并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。对于体内筛选，在一个或多个实验(每组3个小鼠)中对每个双链体进行测试，并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。

[1039] 为了计算ALAS1 mRNA水平变化的相对倍数，使用ΔΔCt方法分析实时数据，并且将这些数据归一化为利用以下这样的细胞而进行的测定：这些细胞是转染了10nM AD-1955的细胞，或是模拟转染的细胞。使用XLFit，使用4参数拟合模型计算IC_{50}，并且归一化成用AD-1955在相同剂量范围内转染的细胞或归一化成其自身的最低剂量。

[1040] AD-1955的有义链和反义链是：

[1041] 有义：cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT(SEQ ID NO:3682)

[1042] 反义：UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT(SEQ ID NO:3683)。

[1043] 修饰的和未修饰的siRNA的单链和双链体序列分别提供于下表14和表15中。

[1044] 表14：人类ALAS1修饰的单链和双链体序列

[1045]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）	在NM_000688.4上反义序列的靶标位点
3371	3372	AD-58848	CfsasUfgCfcAfaAfAfAfuGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgCfaUfgsAfsc	1635-1657
3373	3374	AD-58849	AfsusUfuUfgAfaGfUfGfaUfgAfgUfgAfaAfL96	usUfsuCfaCfuCfaUfcacUfuCfaAfaAfusGfsc	2189-2211
3375	3376	AD-58850	AfsgsUfuAfuAfuUfAfAfaUfuUfuAfaUfcUfL96	asGfsaUfuAfaAfaUfuuaAfuAfuAfaCfusUfsa	2344-2366
3377	3378	AD-58851	GfscsAfuUfuUfgAfAfGfuGfaUfgAfgUfgAfL96	usCfsaCfuCfaUfcAfcuuCfaAfaAfuGfcsAfsg	2187-2209
3379	3380	AD-58852	GfsasAfcUfaAfuGfAfGfcAfgAfcAfuAfaCfL96	gsUfsuAfuGfuCfuGfcucAfuUfaGfuUfcsAfsu	1975-1997
3381	3382	AD-58853	AfsasUfgAfcCfaCfAfCfcUfaUfcGfaGfuUfL96	asAfscUfcGfaUfaGfgugUfgGfuCfaUfusCfsu	973-995
3383	3384	AD-58854	UfsasAfaUfuUfuAfAfUfcUfaUfaGfuAfaAfL96	usUfsuAfcUfaUfaGfauuAfaAfaUfuUfasAfsu	2352-2374
3385	3386	AD-58855	UfsusCfaGfuAfuGfAfUfcGfuUfuCfuUfuGfL96	csAfsaAfgAfaAfcGfaucAfuAfcUfgAfasAfsa	929-951
3387	3388	AD-58856	CfsasCfuUfuUfcAfGfUfaUfgAfuCfgUfuUfL96	asAfsaCfgAfuCfaUfacuGfaAfaAfgUfgsGfsa	924-946
3389	3390	AD-58857	AfsasAfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaGfL96	csUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfuUfusUfsg	913-935
3391	3392	AD-58858	CfsasUfuUfgAfaAfCfUfgUfcCfaUfuCfaAfL96	usUfsgAfaUfgGfaCfaguUfuCfaAfaUfgsCfsc	1478-1500
3393	3394	AD-58859	CfscsUfaUfcGfaGfUfUfuUfuAfaAfaCfuGfL96	csAfsgUfuUfuAfaAfaacUfcGfaUfaGfgsUfsg	983-1005
3395	3396	AD-58861	GfsasCfcAfgAfaAfGfAfgUfgUfcUfcAfuCfL96	gsAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfuGfgUfcsUfsu	872-894
3397	3398	AD-58862	AfscsCfaGfaAfaGfAfGfuGfuCfuCfaUfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcUfgGfusCfsu	873-895
3399	3400	AD-58863	AfscsUfaAfuGfaGfCfAfgAfcAfuAfaCfaUfL96	asUfsgUfuAfuGfuCfugcUfcAfuUfaGfusUfsc	1977-1999

[1046]

3401	3402	AD-58864	UfsasGfuAfaAfaAfCfAfuAfgUfcCfuGfgAfL96	usCfscAfgGfaCfuAfuguUfuUfuAfcUfasUfsa	2366-2388
3403	3404	AD-58865	UfsasUfuUfcUfgGfAfAfcUfaGfuAfaAfuUfL96	asAfsuUfuAfcUfaGfuucCfaGfaAfaUfasUfsu	1185-1207
3405	3406	AD-58867	UfsusCfuGfcAfaAfGfCfcAfgUfcUfuGfaGfL96	csUfscAfaGfaCfuGfgcuUfuGfcAfgAfasGfsa	706-728
3407	3408	AD-58868	GfsasGfgAfaAfgAfGfGfuUfgCfuGfaAfaCfL96	gsUfsuUfcAfgCfaAfccuCfuUfuCfcUfcsAfsc	759-781
3409	3410	AD-58869	GfsgsUfaCfuAfgAfAfAfuAfuUfuCfuGfgAfL96	usCfscAfgAfaAfuAfuuuCfuAfgUfaCfcsAfsc	1174-1196
3411	3412	AD-58870	GfsasCfaUfcAfuGfCfAfaAfaGfcAfaAfgAfL96	usCfsuUfuGfcUfuUfugcAfuGfaUfgUfcsCfsu	853-875
3413	3414	AD-58871	AfsasAfuUfuUfaAfUfCfuAfuAfgUfaAfaAfL96	usUfsuUfaCfuAfuAfgauUfaAfaAfuUfusAfsa	2353-2375
3415	3416	AD-58873	CfsasUfgAfuCfcAfAfGfgGfaUfuCfgAfaAfL96	usUfsuCfgAfaUfcCfcuuGfgAfuCfaUfgsGfsa	1362-1384
3417	3418	AD-58874	AfsgsAfcCfaGfaAfAfGfaGfuGfuCfuCfaUfL96	asUfsgAfgAfcAfcUfcuuUfcUfgGfuCfusUfsu	871-893
3419	3420	AD-58875	AfsusCfcUfgAfaGfAfGfcGfcUfgAfgGfgAfL96	usCfscCfuCfaGfcGfcucUfuCfaGfgAfusCfsc	1810-1832
3421	3422	AD-58876	GfsusCfuGfuGfaUfGfAfaCfuAfaUfgAfgCfL96	gsCfsuCfaUfuAfgUfucaUfcAfcAfgAfcsUfsu	1966-1988
3423	3424	AD-58877	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuCfL96	gsAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsGfsu	875-897
3425	3426	AD-58878	AfscsUfuUfuCfaGfUfAfuGfaUfcGfuUfuCfL96	gsAfsaAfcGfaUfcAfuacUfgAfaAfaGfusGfsg	925-947
3427	3428	AD-58879	UfscsAfuGfcCfaAfAfAfaUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcAfuGfasCfsu	1634-1656
3429	3430	AD-58880	AfsasUfaUfuUfcUfGfGfaAfcUfaGfuAfaAfL96	usUfsuAfcUfaGfuUfccaGfaAfaUfaUfusUfsc	1183-1205
3431	3432	AD-58881	CfsusUfcUfuCfaAfGfAfuAfaCfuUfgCfcAfL96	usGfsgCfaAfgUfuAfucuUfgAfaGfaAfgsAfsu	892-914
3433	3434	AD-58882	UfsusUfcAfgUfaUfGfAfuCfgUfuUfcUfuUfL96	asAfsaGfaAfaCfgAfucaUfaCfuGfaAfasAfsg	928-950
3435	3436	AD-58883	CfscsCfaGfuGfuGfGfUfuAfgUfgUfgAfaAfL96	usUfsuCfaCfaCfuAfaccAfcAfcUfgGfgsGfsc	790-812
3437	3438	AD-58884	GfscsUfgUfgAfgAfUfUfuAfcUfcUfgAfuUfL96	asAfsuCfaGfaGfuAfaauCfuCfaCfaGfcsCfsu	1325-1347
3439	3440	AD-58885	AfsgsGfcUfuGfaGfCfAfaGfuUfgGfuAfuCfL96	gsAfsuAfcCfaAfcUfugcUfcAfaGfcCfusGfsa	2229-2251
3441	3442	AD-58886	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsUfsg	877-899
3443	3444	AD-58887	AfsusUfuCfuGfgAfAfCfuAfgUfaAfaUfuCfL96	gsAfsaUfuUfaCfuAfguuCfcAfgAfaAfusAfsu	1186-1208
3445	3446	AD-58888	UfsgsUfgAfuGfuGfGfCfcCfaUfgAfgUfuUfL96	asAfsaCfuCfaUfgGfgccAfcAfuCfaCfasCfsa	1531-1553
3447	3448	AD-58889	AfsasGfaGfaGfaAfGfUfcCfuAfuUfuCfuCfL96	gsAfsgAfaAfuAfgGfacuUfcUfcUfcUfusUfsc	2208-2230
3449	3450	AD-58890	UfsgsGfcAfgCfaCfAfGfaUfgAfaUfcAfgAfL96	usCfsuGfaUfuCfaUfcugUfgCfuGfcCfasGfsg	671-693
3451	3452	AD-58891	AfsusGfaUfcGfuUfUfCfuUfuGfaGfaAfaAfL96	usUfsuUfcUfcAfaAfgaaAfcGfaUfcAfusAfsc	935-957
3453	3454	AD-58892	UfscsUfgGfaAfcUfAfGfuAfaAfuUfcCfaUfL96	asUfsgGfaAfuUfuAfcuaGfuUfcCfaGfasAfsa	1189-1211
3455	3456	AD-59095	GfscsCfcAfuUfcUfUfAfuCfcCfgAfgUfL96	asCfsuCfgGfgAfuAfagaAfuGfgsgsc	360-382

[1047]

3457	3458	AD-59096	GfsgsAfaCfcAfuGfCfCfuCfcAfuGfaUfL96	asUfscAfuGfgAfgGfcauGfgUfuscsc	1347-1369
3459	3460	AD-59097	UfsgsGfaGfuCfuGfUfGfcGfgAfuCfcUfL96	asGfsgAfuCfcGfcAfcagAfcUfcscsa	1794-1816
3461	3462	AD-59098	CfsasCfcCfaCfgGfGfUfgUfgUfgGfgAfL96	usCfscCfaCfaCfaCfccgUfgGfgsusg	1112-1134
3463	3464	AD-59099	GfsgsAfgUfcUfgUfGfCfgGfaUfcCfuAfL96	usAfsgGfaUfcCfgCfacaGfaCfuscsc	1795-1817
3465	3466	AD-59100	CfsasAfaAfcUfgCfCfCfcAfaGfaUfgAfL96	usCfsaUfcUfuGfgGfgcaGfuUfususg	428-450
3467	3468	AD-59101	GfscsCfuCfcAfuGfAfUfcCfaAfgGfgAfL96	usCfscCfuUfgGfaUfcauGfgAfgsgsc	1355-1377
3469	3470	AD-59102	CfsasUfcAfuCfcCfUfGfuGfcGfgGfuUfL96	asAfscCfcGfcAfcAfgggAfuGfasusg	1921-1943
3471	3472	AD-59103	AfscsCfcAfcGfgGfUfGfuGfuGfgGfgAfL96	usCfscCfcAfcAfcAfcccGfuGfgsgsu	1113-1135
3473	3474	AD-59104	CfsasCfaUfcAfuCfCfCfuGfuGfcGfgAfL96	usCfscGfcAfcAfgGfgauGfaUfgsusg	1919-1941
3475	3476	AD-59105	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcsusg	873-895
3477	3478	AD-59106	CfscsUfcCfaUfgAfUfCfcAfaGfgGfaUfL96	asUfscCfcUfuGfgAfucaUfgGfasgsg	1356-1378
3479	3480	AD-59107	UfsgsCfcCfaUfuCfUfUfaUfcCfcGfaAfL96	usUfscGfgGfaUfaAfgaaUfgGfgscsa	359-381
3481	3482	AD-59108	CfsusUfcAfcCfcUfGfGfcUfaAfgAfuAfL96	usAfsuCfuUfaGfcCfaggGfuGfasasg	1297-1319
3483	3484	AD-59109	AfsusCfaUfcCfcUfGfUfgCfgGfgUfuAfL96	usAfsaCfcCfgCfaCfaggGfaUfgsasu	1922-1944
3485	3486	AD-59110	AfsgsAfaAfgAfgUfGfUfcUfcAfuCfuUfL96	asAfsgAfuGfaGfaCfacuCfuUfuscsu	874-896
3487	3488	AD-59111	CfsusCfcAfuGfaUfCfCfaAfgGfgAfuUfL96	asAfsuCfcCfuUfgGfaucAfuGfgsasg	1357-1379
3489	3490	AD-59112	CfscsAfuUfcUfuAfUfCfcCfgAfgUfcAfL96	usGfsaCfuCfgGfgAfuaaGfaAfusgsg	362-384
3491	3492	AD-59113	CfsasCfcCfuGfgCfUfAfaGfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfcUfuAfgccAfgGfgsusg	1300-1322
3493	3494	AD-59114	UfscsAfuCfcCfuGfUfGfcGfgGfuUfgAfL96	usCfsaAfcCfcGfcAfcagGfgAfusgsa	1923-1945
3495	3496	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu	877-899
3497	3498	AD-59116	GfsusCfaUfgCfcAfAfAfaAfuGfgAfcAfL96	usGfsuCfcAfuUfuUfuggCfaUfgsasc	1631-1653
3499	3500	AD-59117	CfsasUfuCfuUfaUfCfCfcGfaGfuCfcAfL96	usGfsgAfcUfcGfgGfauaAfgAfasusg	363-385
3501	3502	AD-59118	AfscsCfcUfgGfcUfAfAfgAfuGfaUfgAfL96	usCfsaUfcAfuCfuUfagcCfaGfgsgsu	1301-1323
3503	3504	AD-59119	CfsusCfuUfcAfcCfCfUfgGfcUfaAfgAfL96	usCfsuUfaGfcCfaGfgguGfaAfgsasg	1295-1317
3505	3506	AD-59120	AfsusGfcCfaAfaAfAfUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcsasu	1634-1656
3507	3508	AD-59121	UfsgsCfcCfcAfaGfAfUfgAfuGfgAfaUfL96	asUfsuCfcAfuCfaUfcuuGfgGfgscsa	434-456
3509	3510	AD-59122	GfsasAfcCfaUfgCfCfUfcCfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfgGfaGfgcaUfgGfususc	1348-1370
3511	3512	AD-59123	UfscsUfuCfaCfcCfUfGfgCfuAfaGfaUfL96	asUfscUfuAfgCfcAfgggUfgAfasgsa	1296-1318

[1048]

3513	3514	AD-59124	UfsgsCfcAfaAfaAfUfGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgscsa	1635-1657
3515	3516	AD-59125	CfscsAfgAfaAfgAfGfUfgUfcUfcAfuAfL96	usAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfusgsg	872-894
3517	3518	AD-59126	GfsasAfaCfuGfuCfCfAfuUfcAfaUfgAfL96	usCfsaUfuGfaAfuGfgacAfgUfususc	1481-1503
3519	3520	AD-59127	UfscsAfcCfcUfgGfCfUfaAfgAfuGfaUfL96	asUfscAfuCfuUfaGfccaGfgGfusgsa	1299-1321
3521	3522	AD-59128	CfscsCfuGfgAfgUfCfUfgUfgCfgGfaUfL96	asUfscCfgCfaCfaGfacuCfcAfgsgsg	1791-1813
3523	3524	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc	875-897
3525	3526	AD-59130	UfsgsGfaGfcCfcUfGfGfaGfuCfuGfuAfL96	usAfscAfgAfcUfcCfaggGfcUfcscsa	1786-1808

[1049] 表15:人类ALAS1未修饰的单链和双链体序列

[1050]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）	在NM_000688.4上反义序列的靶标位点
3684	3527	AD-58848	CAUGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCAUGAC	1635-1657
3528	3529	AD-58849	AUUUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAAUGC	2189-2211
3530	3531	AD-58850	AGUUAUAUUAAAUUUUAAUCU	AGAUUAAAAUUUAAUAUAACUUA	2344-2366
3532	3533	AD-58851	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUCAAAAUGCAG	2187-2209
3534	3535	AD-58852	GAACUAAUGAGCAGACAUAAC	GUUAUGUCUGCUCAUUAGUUCAU	1975-1997
3536	3537	AD-58853	AAUGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCAUUCU	973-995
3538	3539	AD-58854	UAAAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUUUAAU	2352-2374
3540	3541	AD-58855	UUCAGUAUGAUCGUUUCUUUG	CAAAGAAACGAUCAUACUGAAAA	929-951
3542	3543	AD-58856	CACUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAGUGGA	924-946
3544	3545	AD-58857	AAAUCUGUUUCCACUUUUCAG	CUGAAAAGUGGAAACAGAUUUUG	913-935
3546	3547	AD-58858	CAUUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAAUGCC	1478-1500
3548	3549	AD-58859	CCUAUCGAGUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAAACUCGAUAGGUG	983-1005
3550	3551	AD-58861	GACCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGGUCUU	872-894
3552	3553	AD-58862	ACCAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUGGUCU	873-895
3554	3555	AD-58863	ACUAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUUAUGUCUGCUCAUUAGUUC	1977-1999
3556	3557	AD-58864	UAGUAAAAACAUAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUACUAUA	2366-2388
3558	3559	AD-58865	UAUUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCCAGAAAUAUU	1185-1207
3560	3561	AD-58867	UUCUGCAAAGCCAGUC	CUCAAGACUGGCUUUGCA	706-728

[1051]

			UUGAG	GAAGA	
3562	3563	AD-58868	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCUCUUUCCUCAC	759-781
3564	3565	AD-58869	GGUACUAGAAAUAUUUCUGGA	UCCAGAAAUAUUUCUAGUACCAC	1174-1196
3566	3567	AD-58870	GACAUCAUGCAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCCU	853-875
3568	3569	AD-58871	AAAUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAAUUUAA	2353-2375
3570	3571	AD-58873	CAUGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGGA	1362-1384
3572	3573	AD-58874	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGUCUUU	871-893
3574	3575	AD-58875	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC	1810-1832
3576	3577	AD-58876	GUCUGUGAUGAACUAAUGAGC	GCUCAUUAGUUCAUCACAGACUU	1966-1988
3578	3579	AD-58877	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU	875-897
3580	3581	AD-58878	ACUUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGAAAAGUGG	925-947
3582	3583	AD-58879	UCAUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAUGACU	1634-1656
3584	3585	AD-58880	AAUAUUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUUCCAGAAAUAUUUC	1183-1205
3586	3587	AD-58881	CUUCUUCAAGAUAACUUGCCA	UGGCAAGUUAUCUUGAAGAAGAU	892-914
3588	3589	AD-58882	UUUCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGAAAAG	928-950
3590	3591	AD-58883	CCCAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUGGGGC	790-812
3592	3593	AD-58884	GCUGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACAGCCU	1325-1347
3594	3595	AD-58885	AGGCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCAAGCCUGA	2229-2251
3596	3597	AD-58886	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUUUCUG	877-899
3598	3599	AD-58887	AUUUCUGGAACUAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUUCCAGAAAUAU	1186-1208
3600	3601	AD-58888	UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCACACA	1531-1553
3602	3603	AD-58889	AAGAGAGAAGUCCUAUUUCUC	GAGAAAUAGGACUUCUCUCUUUC	2208-2230
3604	3605	AD-58890	UGGCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGCCAGG	671-693
3606	3607	AD-58891	AUGAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAGAAACGAUCAUAC	935-957
3608	3609	AD-58892	UCUGGAACUAGUAAAUUCCAU	AUGGAAUUUACUAGUUCCAGAAA	1189-1211
3610	3611	AD-59095	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC	360-382
3612	3613	AD-59096	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC	1347-1369
3614	3615	AD-59097	UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA	1794-1816
3616	3617	AD-59098	CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCCACACACCCGUGGGUG	1112-1134

[1052]

3618	3619	AD-59099	GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGACUCC	1795-1817
3620	3621	AD-59100	CAAAACUGCCCCAAGAUGA	UCAUCUUGGGGCAGUUUUG	428-450
3622	3623	AD-59101	GCCUCCAUGAUCCAAGGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC	1355-1377
3624	3625	AD-59102	CAUCAUCCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGGAUGAUG	1921-1943
3626	3627	AD-59103	ACCCACGGGUGUGUGGGGA	UCCCCACACACCCGUGGGU	1113-1135
3628	3629	AD-59104	CACAUCAUCCCUGUGCGGA	UCCGCACAGGGAUGAUGUG	1919-1941
3630	3631	AD-59105	CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUG	873-895
3632	3633	AD-59106	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG	1356-1378
3634	3635	AD-59107	UGCCCAUUCUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAGAAUGGGCA	359-381
3636	3637	AD-59108	CUUCACCCUGGCUAAGAUA	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG	1297-1319
3638	3639	AD-59109	AUCAUCCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU	1922-1944
3640	3641	AD-59110	AGAAAGAGUGUCUCAUCUU	AAGAUGAGACACUCUUUCU	874-896
3642	3643	AD-59111	CUCCAUGAUCCAAGGGAUU	AAUCCCUUGGAUCAUGGAG	1357-1379
3644	3645	AD-59112	CCAUUCUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAGAAUGG	362-384
3646	3647	AD-59113	CACCCUGGCUAAGAUGAUA	UAUCAUCUUAGCCAGGGUG	1300-1322
3648	3649	AD-59114	UCAUCCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA	1923-1945
3650	3651	AD-59115	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU	877-899
3652	3653	AD-59116	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC	1631-1653
3654	3655	AD-59117	CAUUCUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAGAAUG	363-385
3656	3657	AD-59118	ACCCUGGCUAAGAUGAUGA	UCAUCAUCUUAGCCAGGGU	1301-1323
3658	3659	AD-59119	CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG	1295-1317
3660	3661	AD-59120	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU	1634-1656
3662	3663	AD-59121	UGCCCCAAGAUGAUGGAAU	AUUCCAUCAUCUUGGGGCA	434-456
3664	3665	AD-59122	GAACCAUGCCUCCAUGAUA	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC	1348-1370
3666	3667	AD-59123	UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAGCCAGGGUGAAGA	1296-1318
3668	3669	AD-59124	UGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCA	1635-1657
3670	3671	AD-59125	CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUUCUGG	872-894
3672	3673	AD-59126	GAAACUGUCCAUUCAAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC	1481-1503
3674	3675	AD-59127	UCACCCUGGCUAAGAU	AUCAUCUUAGCCAGGGUG	1299-1321

[1053]

			GAU	A	
3676	3677	AD-59128	CCCUGGAGUCUGUGCG GAU	AUCCGCACAGACUCCAGG G	1791-1813
3678	3679	AD-59129	GAAAGAGUGUCUCAUC UUA	UAAGAUGAGACACUCUUU C	875-897
3680	3681	AD-59130	UGGAGCCCUGGAGUCU GUA	UACAGACUCCAGGGCUCC A	1786-1808

[1054] 体外测定的结果提供于表16中。表16还注释了每个siRNA的靶标物种。

[1055] 表16:功能测定的结果

[1056]

			猕猴游离摄取				猕猴转染		Hep3b 转染	
双链体 ID	靶标物种	类型	1 uM 平均值	500 nM	20 nM 平均值	10 nM	20 nM 平均值	0.2 nM 平均值	10 nM 平均值	0.1 nM 平均值
AD-58848	M/R/Rh/H	21/23	131.6	176.0	104.4	128.0	43.5	44.8	25.3	76.8
AD-58849	H/Rh	21/23	91.9	88.1	92.2	105.0	29.4	35.4	11.5	47.1
AD-58850	H/Rh	21/23	79.4	103.4	80.0	111.2	NA	62.2	31.3	72.0
AD-58851	H/Rh	21/23	99.7	74.7	94.8	104.7	NA	40.7	8.6	81.3
AD-58852	H/Rh	21/23	108.1	91.8	103.3	111.9	101.1	128.8	43.4	129.0
AD-58853	H/Rh	21/23	74.8	67.7	84.2	93.5	24.7	52.9	14.1	61.2
AD-58854	H/Rh	21/23	145.9	124.1	106.6	115.3	119.0	83.9	85.0	84.0
AD-58855	H/Rh	21/23	81.5	97.9	92.7	101.8	39.5	40.3	15.3	67.6
AD-58856	H/Rh	21/23	74.1	90.6	84.6	82.6	22.4	30.7	8.7	33.3
AD-58857	H/Rh	21/23	64.7	91.4	62.3	87.1	22.0	31.6	9.8	106.3
AD-58858	H/Rh	21/23	67.4	91.7	68.6	98.3	27.9	40.3	17.4	44.8
AD-58859	H/Rh	21/23	71.2	77.2	92.4	90.1	19.1	34.3	13.1	39.7
AD-58861	H/Rh	21/23	104.6	107.2	102.0	100.6	25.9	35.1	18.0	69.8
AD-58862	H/Rh	21/23	66.8	77.0	68.7	88.5	20.3	31.1	24.2	49.9
AD-58863	H/Rh	21/23	70.8	66.8	76.8	98.5	21.5	29.7	8.7	54.9
AD-58864	H/Rh	21/23	76.2	85.6	83.7	100.8	60.4	61.0	56.4	87.3
AD-58865	H/Rh	21/23	67.9	77.9	95.9	98.4	21.3	38.6	15.5	81.4
AD-58867	H/Rh	21/23	95.9	93.3	107.0	97.5	32.3	42.7	16.6	79.8
AD-58868	H/Rh	21/23	95.2	92.1	116.2	94.7	54.6	69.2	61.5	105.9
AD-58869	H/Rh	21/23	65.0	78.2	75.8	88.2	17.4	25.0	13.0	63.9
AD-58870	H/Rh	21/23	69.4	92.3	81.0	88.1	29.2	43.8	33.7	79.1
AD-58871	H/Rh	21/23	61.2	77.3	88.2	77.0	71.2	73.2	36.7	110.3
AD-58873	H/Rh	21/23	95.2	100.9	83.3	94.6	54.2	52.8	36.6	73.3
AD-58874	H/Rh	21/23	75.8	76.8	63.8	85.3	22.3	31.2	15.0	38.2
AD-58875	H/Rh	21/23	80.7	88.7	78.6	97.9	48.6	73.6	61.2	90.6
AD-58876	H/Rh	21/23	90.8	93.1	82.5	100.2	41.1	56.9	21.2	58.7
AD-58877	H/Rh	21/23	68.3	85.1	51.2	78.7	18.5	46.6	11.9	27.4
AD-58878	H/Rh	21/23	78.3	68.3	81.2	91.2	24.1	23.4	6.2	37.1
AD-58879	H/Rh	21/23	87.9	94.1	79.7	95.4	32.0	47.8	15.7	82.5
AD-58880	H/Rh	21/23	74.9	72.2	88.9	88.1	20.1	27.5	14.0	60.7
AD-58881	H/Rh	21/23	85.9	76.8	78.8	118.0	22.2	36.7	27.6	71.6
AD-58882	H/Rh	21/23	54.1	53.4	60.3	85.8	14.6	27.2	8.2	23.8
AD-58883	H/Rh	21/23	80.4	69.9	75.7	80.3	31.8	25.8	12.3	63.0
AD-58884	H/Rh	21/23	57.7	55.3	64.8	78.2	20.0	30.0	11.8	68.9
AD-58885	H/Rh	21/23	101.8	91.8	104.1	101.5	85.9	71.9	61.8	71.2
AD-58886	M/R/Rh/H	21/23	47.1	58.0	36.3	93.3	16.0	26.6	9.2	32.0
AD-58887	H/Rh	21/23	73.6	98.7	82.6	95.2	28.5	33.5	12.8	65.2
AD-58888	H/Rh	21/23	90.2	69.9	69.4	85.6	46.9	45.0	16.6	72.0
AD-58889	H/Rh	21/23	83.6	98.6	82.4	92.2	36.5	40.3	31.6	99.4
AD-58890	H/Rh	21/23	69.5	95.4	84.2	88.2	50.8	45.6	21.7	92.9
AD-58891	H/Rh	21/23	62.8	75.7	75.4	109.2	23.6	34.3	15.6	55.8

[1057]

AD-58892	H/Rh	21/23	60.2	92.9	89.8	92.9	22.8	43.3	20.2	75.6
AD-59095	M/R/Rh/H	19mer	88.9	NA	132.8	NA	48.3	97.4	54.3	99.0
AD-59096	M/R/Rh/H	19mer	95.5	NA	90.5	NA	105.7	138.6	131.4	120.7
AD-59097	M/R/Rh/H	19mer	92.5	NA	84.2	NA	75.0	NA	94.7	108.5
AD-59098	M/R/Rh/H	19mer	84.0	NA	87.7	NA	109.3	NA	130.0	87.3
AD-59099	M/R/Rh/H	19mer	89.7	NA	90.0	NA	77.8	85.4	46.8	74.9
AD-59100	M/R/Rh/H	19mer	84.8	NA	144.3	NA	70.6	108.1	91.5	117.6
AD-59101	M/R/Rh/H	19mer	79.0	NA	103.8	NA	89.8	102.9	124.2	107.0
AD-59102	M/R/Rh/H	19mer	85.9	NA	100.6	NA	72.2	68.5	87.9	95.1
AD-59103	M/R/Rh/H	19mer	86.0	NA	91.1	NA	93.0	81.3	130.0	96.0
AD-59104	M/R/Rh/H	19mer	92.6	NA	96.9	NA	94.9	91.4	124.4	83.1
AD-59105	M/R/Rh/H	19mer	48.9	NA	101.7	NA	18.4	48.9	17.0	34.7
AD-59106	M/R/Rh/H	19mer	63.2	NA	76.7	NA	28.5	40.7	28.6	46.4
AD-59107	M/R/Rh/H	19mer	71.4	NA	68.7	NA	37.1	45.3	26.8	63.6
AD-59108	M/R/Rh/H	19mer	70.7	NA	85.1	NA	89.9	84.8	139.2	101.7
AD-59109	M/R/Rh/H	19mer	86.1	NA	83.4	NA	84.9	96.2	131.7	86.7
AD-59110	M/R/Rh/H	19mer	70.8	NA	119.7	NA	38.5	60.4	67.4	80.3
AD-59111	M/R/Rh/H	19mer	66.1	NA	76.5	NA	52.2	61.0	69.7	87.6
AD-59112	M/R/Rh/H	19mer	71.2	NA	80.2	NA	91.2	83.4	127.4	89.0
AD-59113	M/R/Rh/H	19mer	67.0	NA	77.8	NA	49.1	59.0	66.8	91.4
AD-59114	M/R/Rh/H	19mer	81.7	NA	79.3	NA	96.3	88.0	129.6	72.4
AD-59115	M/R/Rh/H	19mer	40.4	NA	69.6	NA	19.6	35.7	9.3	16.9
AD-59116	M/R/Rh/H	19mer	72.2	NA	78.3	NA	53.5	77.8	70.1	107.8
AD-59117	M/R/Rh/H	19mer	70.7	NA	75.6	NA	75.8	74.9	129.0	103.5
AD-59118	M/R/Rh/H	19mer	68.8	NA	75.9	NA	81.4	82.1	114.1	89.7
AD-59119	M/R/Rh/H	19mer	64.9	NA	86.5	NA	85.1	125.1	122.8	124.8
AD-59120	M/R/Rh/H	19mer	63.5	NA	75.1	NA	29.9	52.0	16.1	54.1
AD-59121	M/R/Rh/H	19mer	67.6	NA	72.0	NA	88.8	77.4	108.0	103.1
AD-59122	M/R/Rh/H	19mer	60.2	NA	62.3	NA	25.1	45.3	16.2	54.8
AD-59123	M/R/Rh/H	19mer	68.6	NA	108.2	NA	59.2	84.6	80.0	97.7
AD-59124	M/R/Rh/H	19mer	47.5	NA	56.5	NA	23.9	40.0	9.8	18.9
AD-59125	M/R/Rh/H	19mer	45.4	NA	47.2	NA	15.2	40.7	14.7	15.1
AD-59126	M/R/Rh/H	19mer	64.3	NA	74.6	NA	51.6	57.1	35.5	54.4
AD-59127	M/R/Rh/H	19mer	103.4	NA	105.8	NA	94.0	156.4	135.9	113.7
AD-59128	M/R/Rh/H	19mer	102.4	NA	81.4	NA	66.3	89.3	60.2	74.9
AD-59129	M/R/Rh/H	19mer	41.3	NA	38.8	NA	17.9	41.4	8.6	12.6
AD-59130	M/R/Rh/H	19mer	58.3	NA	80.8	NA	94.9	78.3	106.7	88.0

[1058] 表17示例了所选择的ALAS1 siRNA双链体的IC_{50}。在每个ALAS1修饰的siRNA双链体的转染24小时后，从Hep3B细胞系中的内源性表达的ALAS1的敲低来确定IC_{50}(参见表14)。至少七个双链体(包括AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、和AD-59129)一致地证明IC_{50}低于0.1nm，表明这些双链体在抑制ALAS1表达中是特别有效的。

[1059] 表17:所选择的ALAS1 siRNA双链体的IC_{50}

[1060]

双链体 ID	384w IC50 (nM)	384w IC50 (nM)
AD-58882	0.008	0.014
AD-58878	0.040	0.031
AD-58886	0.037	0.033
AD-58877	0.031	0.034
AD-59115	0.093	0.052
AD-58856	0.061	0.066

[1061]

AD-59129	0.085	0.071
AD-59124	0.572	0.078
AD-58874	0.140	0.102
AD-59125	0.118	0.115
AD-59105	0.511	0.144
AD-59120	180.592	0.498
AD-59122	36.646	0.646
AD-59106	7.906	0.847
AD-59126	n/a	1.014
AD-59107	n/a	1.971

[1062] 实例11.AIP苯巴比妥诱导小鼠模型中的ALAS1-GalNAc活性

[1063] 使用AIP小鼠模型来研究为ALAS1-GalNAc共轭物的siRNA的效果。该siRNA具有双链体AD-58632的序列(参见表20)

[1064] 表20:ALAS1 siRNA双链体AD-58632的序列

[1065]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列的靶标部位	双链体名称	有义序列（5’-3’）	反义序列（5’-3’）
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg

[1066] AIP小鼠是未处理的(基线)、或在第1天皮下注射盐水或ALAS1-GalNAc共轭物(以20mg/kg的剂量)的。在第2天、第3天、和第4天,不对它们进行处理(基线)或用苯巴比妥的IP注射对其进行处理。在第5天,采集血浆并使用LC-MS测定法测量ALA和PBG水平。如在图15中所示的,ALAS1-GalNAc共轭物钝化血浆ALA和PBG生产分别约84%和80%。这些结果表明在这个AIP动物模型中,ALAS1-GalNAc共轭物处理有效预防与苯巴比妥诱导的急性发作相关联的血浆ALA和PBG两者的增加。

[1067] 实例12.靶向ALAS1并抑制ALAS1表达的另外的siRNA

[1068] 如在实例2中描述的,设计并生产靶向ALAS1 siRNA的、修饰的siRNA序列。这些序列提供于表18中。如下所述对这些修饰的双链体的体外活性进行检验。

[1069] 表18:人类ALAS1修饰的单链和双链体序列

[1070]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	双链体名称	有义序列（5’-3’）	反义序列（5’-3’）	在NM_000688.4上反义序列的靶标位点
3685	3686	AD-59453	CAGGCAAAUCUCUGUUGUUdTdT	AACAACAGAGAUUUGCCUGdTdT	402-420
3687	3688	AD-59395	GAAAAAAAUUGAUGAGAAAdTdT	UUUCUCAUCAAUUUUUUUCdTdT	949-967
3689	3690	AD-59477	GGAAAGAUGCCGCACUCU	AAGAGUGCGGCAUCUUU	1242-1260

[1071]

			UdTdT	CCdTdT	
3691	3692	AD-59492	UGUCUCAUCUUCUUCAAGAdTdT	UCUUGAAGAAGAUGAGACAdTdT	882-900
3693	3694	AD-59361	ACAUCUACGUGCAAGCAAUdTdT	AUUGCUUGCACGUAGAUGUdTdT	1992-2010
3695	3696	AD-59462	UUCUCUGAUUGACACCGUAdTdT	UACGGUGUCAAUCAGAGAAdTdT	1711-1729
3697	3698	AD-59433	GCUGCUGGCUUCAUCUUCAdTdT	UGAAGAUGAAGCCAGCAGCdTdT	1739-1757
3699	3700	AD-59424	AGCGCAACGUCAAACUCAUdTdT	AUGAGUUUGACGUUGCGCUdTdT	1851-1869
3701	3702	AD-59414	UAUUUCUGGAACUAGUAAAdTdT	UUUACUAGUUCCAGAAAUAdTdT	1183-1201
3703	3704	AD-59539	GGUUGUGUUGGAGGGUACAdTdT	UGUACCCUCCAACACAACCdTdT	1679-1697
3705	3706	AD-59400	GUGUCAGUCUGGUGCAGUAdTdT	UACUGCACCAGACUGACACdTdT	1070-1088
3707	3708	AD-59551	CUUUGUGGCCAAUGACUCAdTdT	UGAGUCAUUGGCCACAAAGdTdT	1273-1291
3709	3710	AD-59482	AGAUGCUGCUAAAAACACAdTdT	UGUGUUUUUAGCAGCAUCUdTdT	1942-1960
3711	3712	AD-59448	GAGUCAUGCCAAAAAUGGAdTdT	UCCAUUUUUGGCAUGACUCdTdT	1629-1647
3713	3714	AD-59392	CUGUGCGGAUCCUGAAGAGdTdT	CUCUUCAGGAUCCGCACAGdTdT	1800-1818
3715	3716	AD-59469	CACUUUGAAACAACAUGGUdTdT	ACCAUGUUGUUUCAAAGUGdTdT	1141-1159
3717	3718	AD-59431	AAGUGAUGAGUGAAAGAGAdTdT	UCUCUUUCACUCAUCACUUdTdT	2193-2211
3719	3720	AD-59423	AUCUGCUAGUCACAUGGAAdTdT	UUCCAUGUGACUAGCAGAUdTdT	2103-2121
3721	3722	AD-59517	UGGGGCAGGUGGUACUAGAdTdT	UCUAGUACCACCUGCCCCAdTdT	1162-1180
3723	3724	AD-59578	GCAGAUGACUAUUCAGACUdTdT	AGUCUGAAUAGUCAUCUGCdTdT	1031-1049
3725	3726	AD-59495	GCCUCAUUCCUCAGCUGAGdTdT	CUCAGCUGAGGAAUGAGGCdTdT	2143-2161
3727	3728	AD-59432	GUAUGAUCGUUUCUUUGAGdTdT	CUCAAAGAAACGAUCAUACdTdT	931-949
3729	3730	AD-59382	UAUCCAGAUGGUCUUCAGAdTdT	UCUGAAGACCAUCUGGAUAdTdT	2302-2320
3731	3732	AD-59472	UAGUGUGAAAACCGAUGGAdTdT	UCCAUCGGUUUUCACACUAdTdT	799-817
3733	3734	AD-59459	UCCCCAUGGCAGAUGACUAdTdT	UAGUCAUCUGCCAUGGGGAdTdT	1023-1041
3735	3736	AD-59413	CCACUGCAGCAGUACACUAdTdT	UAGUGUACUGCUGCAGUGGdTdT	483-501
3737	3738	AD-59478	CUGUGAACCGGCGAGCACAdTdT	UGUGCUCGCCGGUUCACAGdTdT	999-1017
3739	3740	AD-59376	GGUCCUAUGCUGCUGGCUUdTdT	AAGCCAGCAGCAUAGGACCdTdT	1731-1749
3741	3742	AD-59556	AGCCUUUGGUUGUGUUGGAdTdT	UCCAACACAACCAAAGGCUdTdT	1672-1690
3743	3744	AD-59399	AAUUCCAUGUGGACUUAGAdTdT	UCUAAGUCCACAUGGAAUUdTdT	1200-1218
3745	3746	AD-59474	CCAGGGCACUGCAAGCAAAdTdT	UUUGCUUGCAGUGCCCUGGdTdT	640-658

[1072]

3747	3748	AD-53542	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsdT	924-942
3749	3750	AD-59480	GAAUCAGAGAGGCAGCAGUdTdT	ACUGCUGCCUCUCUGAUUCdTdT	682-700
3751	3752	AD-59549	GCAAAGAUCUGACCCCUCAdTdT	UGAGGGGUCAGAUCUUUGCdTdT	1441-1459
3753	3754	AD-59515	GGAGAAGAGCUCCUACGGAdTdT	UCCGUAGGAGCUCUUCUCCdTdT	2033-2051
3755	3756	AD-59427	CCAUGAGUUUGGAGCAAUCdTdT	GAUUGCUCCAAACUCAUGGdTdT	1540-1558
3757	3758	AD-59390	CUUUGAGAAAAAAAUUGAUdTdT	AUCAAUUUUUUUCUCAAAGdTdT	943-961
3759	3760	AD-59511	UGAGCAGACAUAACAUCUAdTdT	UAGAUGUUAUGUCUGCUCAdTdT	1980-1998
3761	3762	AD-59532	CGUGCAAGCAAUCAAUUACdTdT	GUAAUUGAUUGCUUGCACGdTdT	1999-2017
3763	3764	AD-59562	AAAGCAAAGACCAGAAAGAdTdT	UCUUUCUGGUCUUUGCUUUdTdT	862-880
3765	3766	AD-59513	GGAUGUGCAGGAAAUGAAUdTdT	AUUCAUUUCCUGCACAUCCdTdT	733-751
3767	3768	AD-59362	CAGCAUACUUCCUGAACAUdTdT	AUGUUCAGGAAGUAUGCUGdTdT	321-339
3769	3770	AD-53541	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT	671-689
3771	3772	AD-59490	UCUGUUGUUCUAUGCCCAAdTdT	UUGGGCAUAGAACAACAGAdTdT	412-430
3773	3774	AD-59422	UGAGACAGAUGCUAAUGGAdTdT	UCCAUUAGCAUCUGUCUCAdTdT	1869-1887
3775	3776	AD-59467	GCCAAUGACUCAACCCUCUdTdT	AGAGGGUUGAGUCAUUGGCdTdT	1280-1298
3777	3778	AD-59579	GAGUGCAACUUCUGCAGGAdTdT	UCCUGCAGAAGUUGCACUCdTdT	2159-2177
3779	3780	AD-59426	GUGAAAGAGAGAAGUCCUAdTdT	UAGGACUUCUCUCUUUCACdTdT	2202-2220
3781	3782	AD-59363	UAACUUGCCAAAAUCUGUUdTdT	AACAGAUUUUGGCAAGUUAdTdT	901-919
3783	3784	AD-59436	AAGCCAGUCUUGAGCUUCAdTdT	UGAAGCUCAAGACUGGCUUdTdT	711-729
3785	3786	AD-53536	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTsdT	922-940
3787	3788	AD-59491	GCAGCAGUGUCUUCUGCAAdTdT	UUGCAGAAGACACUGCUGCdTdT	693-711
3789	3790	AD-59500	UCCUGAACAUGGAGAGUGUdTdT	ACACUCUCCAUGUUCAGGAdTdT	330-348
3791	3792	AD-59394	AUUUCUGGAACACUUGGCAdTdT	UGCCAAGUGUUCCAGAAAUdTdT	1652-1670
3793	3794	AD-59441	CAGUACACUACCAACAGAUdTdT	AUCUGUUGGUAGUGUACUGdTdT	492-510
3795	3796	AD-59365	GCAUGACCUCAAUUAUUUCdTdT	GAAAUAAUUGAGGUCAUGCdTdT	2261-2279
3797	3798	AD-59411	AGAACUGCUGCAAAGAUCUdTdT	AGAUCUUUGCAGCAGUUCUdTdT	1432-1450
3799	3800	AD-59544	CACCCCAGAUGAUGAACUAdTdT	UAGUUCAUCAUCUGGGGUGdTdT	2073-2091
3801	3802	AD-59428	GAUCCAAGGGAUUCGAAACdTdT	GUUUCGAAUCCCUUGGAUCdTdT	1363-1381
3803	3804	AD-59471	CUCAUCACCAAAAAGCAA	CUUGCUUUUUGGUGAUG	1052-1070

[1073]

			GdTdT	AGdTdT	
3805	3806	AD-59518	ACAACAUGGUGCUGGGGCAdTdT	UGCCCCAGCACCAUGUUGUdTdT	1150-1168
3807	3808	AD-53547	GAucGuuucuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTsdT	935-953
3809	3810	AD-59573	CAGCACGAGUUCUCUGAUUdTdT	AAUCAGAGAACUCGUGCUGdTdT	1702-1720
3811	3812	AD-59473	AAUGAUGUCAGCCACCUCAdTdT	UGAGGUGGCUGACAUCAUUdTdT	1412-1430
3813	3814	AD-59412	AGUUAUGGACACUUUGAAAdTdT	UUUCAAAGUGUCCAUAACUdTdT	1132-1150
3815	3816	AD-59522	GAUGAUGAACUACUUCCUUdTdT	AAGGAAGUAGUUCAUCAUCdTdT	2080-2098
3817	3818	AD-59502	GCAGGAAAUGAAUGCCGUGdTdT	CACGGCAUUCAUUUCCUGCdTdT	739-757
3819	3820	AD-59499	UCUUCAAGAUAACUUGCCAdTdT	UGGCAAGUUAUCUUGAAGAdTdT	892-910
3821	3822	AD-59520	CGAUGGAGGGGAUCCCAGUdTdT	ACUGGGAUCCCCUCCAUCGdTdT	811-829
3823	3824	AD-59581	CCAAAAAGCAAGUGUCAGUdTdT	ACUGACACUUGCUUUUUGGdTdT	1059-1077
3825	3826	AD-59461	GAUUGGGGAUCGGGAUGGAdTdT	UCCAUCCCGAUCCCCAAUCdTdT	1612-1630
3827	3828	AD-59370	CCCUGGAGUCUGUGCGGAUdTdT	AUCCGCACAGACUCCAGGGdTdT	1791-1809
3829	3830	AD-53540	GuuGucuuuAuAuGuGAAudTsdT	AUUcAcAuAuAAAGAcAACdTsdT	2321-2339
3831	3832	AD-59574	CGGGCAUUGUCCACUGCAGdTdT	CUGCAGUGGACAAUGCCCGdTdT	473-491
3833	3834	AD-59375	UAUUCAGACUCCCUCAUCAdTdT	UGAUGAGGGAGUCUGAAUAdTdT	1040-1058
3835	3836	AD-59387	CACUGCAUUUUGAAGUGAUdTdT	AUCACUUCAAAAUGCAGUGdTdT	2181-2199
3837	3838	AD-59397	CCAGAAAGAGUGUCUCAUCdTdT	GAUGAGACACUCUUUCUGGdTdT	872-890
3839	3840	AD-59396	AGGCGGAGGGAUUGGGGAUdTdT	AUCCCCAAUCCCUCCGCCUdTdT	1603-1621
3841	3842	AD-59393	AGACCUCCAUGGGAAAGAUdTdT	AUCUUUCCCAUGGAGGUCUdTdT	1231-1249
3843	3844	AD-59483	GCAGGAGGCCACUGCAUUUdTdT	AAAUGCAGUGGCCUCCUGCdTdT	2172-2190
3845	3846	AD-59430	AUCUGUUUCCACUUUUCAGdTdT	CUGAAAAGUGGAAACAGAUdTdT	913-931
3847	3848	AD-59463	AGAGAAGUCCUAUUUCUCAdTdT	UGAGAAAUAGGACUUCUCUdTdT	2209-2227
3849	3850	AD-53534	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdT	2312-2330
3851	3852	AD-59514	GGCUGGAACUGAAGCCUCAdTdT	UGAGGCUUCAGUUCCAGCCdTdT	2130-2148
3853	3854	AD-59575	GCCAUUAUCAUAUCCAGAUdTdT	AUCUGGAUAUGAUAAUGGCdTdT	2292-2310
3855	3856	AD-59364	AGCAGGCCCCAGUGUGGUUdTdT	AACCACACUGGGGCCUGCUdTdT	781-799
3857	3858	AD-59402	UCAGCUGAGUGCAACUUCUdTdT	AGAAGUUGCACUCAGCUGAdTdT	2153-2171
3859	3860	AD-59479	GAGCACACAUCUUCCCCAUdTdT	AUGGGGAAGAUGUGUGCUCdTdT	1011-1029

[1074]

3861	3862	AD-59481	ACUUCCAGGACAUCAUGCAdTdT	UGCAUGAUGUCCUGGAAGUdTdT	843-861
3863	3864	AD-59530	CCUAUCGAGUUUUUAAAACdTdT	GUUUUAAAAACUCGAUAGGdTdT	981-999
3865	3866	AD-59582	CUUCCUUGAGAAUCUGCUAdTdT	UAGCAGAUUCUCAAGGAAGdTdT	2092-2110
3867	3868	AD-59506	ACCAACAGAUCAAAGAAACdTdT	GUUUCUUUGAUCUGUUGGUdTdT	501-519
3869	3870	AD-59567	UAACCCCAGGCCAUUAUCAdTdT	UGAUAAUGGCCUGGGGUUAdTdT	2283-2301
3871	3872	AD-59485	CCAUGCCUCCAUGAUCCAAdTdT	UUGGAUCAUGGAGGCAUGGdTdT	1351-1369
3873	3874	AD-59525	UGAUGAACUAAUGAGCAGAdTdT	UCUGCUCAUUAGUUCAUCAdTdT	1969-1987
3875	3876	AD-59566	CCUGAAGAGCGCUGAGGGAdTdT	UCCCUCAGCGCUCUUCAGGdTdT	1810-1828
3877	3878	AD-59580	AACACUUGGCAAAGCCUUUdTdT	AAAGGCUUUGCCAAGUGUUdTdT	1660-1678
3879	3880	AD-59512	UCUGCAGAAAGCAGGCAAAdTdT	UUUGCCUGCUUUCUGCAGAdTdT	391-409
3881	3882	AD-59475	CCGGCCUCCCUGUUGUCCAdTdT	UGGACAACAGGGAGGCCGGdTdT	1890-1908
3883	3884	AD-59438	CAUCAUCCCUGUGCGGGUUdTdT	AACCCGCACAGGGAUGAUGdTdT	1921-1939
3885	3886	AD-59442	UGUGCGGGUUGCAGAUGCUdTdT	AGCAUCUGCAACCCGCACAdTdT	1930-1948
3887	3888	AD-59516	GGAAAGAGGUUGCUGAAACdTdT	GUUUCAGCAACCUCUUUCCdTdT	759-777
3889	3890	AD-59429	AGGUCCACGCAGUGGGGCUdTdT	AGCCCCACUGCGUGGACCUdTdT	1572-1590
3891	3892	AD-59510	UGCCGUGAGGAAAGAGGUUdTdT	AACCUCUUUCCUCACGGCAdTdT	751-769
3893	3894	AD-59457	GCUAAUGGAUGCCGGCCUCdTdT	GAGGCCGGCAUCCAUUAGCdTdT	1879-1897
3895	3896	AD-59434	GAAGCAAGUGGGGCUGGAAdTdT	UUCCAGCCCCACUUGCUUCdTdT	2119-2137
3897	3898	AD-59454	CAUCUUCCGCCACAAUGAUdTdT	AUCAUUGUGGCGGAAGAUGdTdT	1399-1417
3899	3900	AD-59468	AUUUCUCAGGCUUGAGCAAdTdT	UUGCUCAAGCCUGAGAAAUdTdT	2220-2238
3901	3902	AD-59565	CCCGAGUCCCCCAGGCCUUdTdT	AAGGCCUGGGGGACUCGGGdTdT	372-390
3903	3904	AD-59416	CAAGCAAAUGCCCUUUCCUdTdT	AGGAAAGGGCAUUUGCUUGdTdT	651-669
3905	3906	AD-59420	CCCCUCAGUCCCCAAGAUUdTdT	AAUCUUGGGGACUGAGGGGdTdT	1453-1471
3907	3908	AD-59552	CUACGGUGCCCCGGGGAGAdTdT	UCUCCCCGGGGCACCGUAGdTdT	2019-2037
3909	3910	AD-59558	AAAACUGCCCCAAGAUGAUdTdT	AUCAUCUUGGGGCAGUUUUdTdT	429-447
3911	3912	AD-59404	ACAAAACUGCUAAGGCCAAdTdT	UUGGCCUUAGCAGUUUUGUdTdT	540-558
3913	3914	AD-59455	GAUUCUGGGAACCAUGCCUdTdT	AGGCAUGGUUCCCAGAAUCdTdT	1340-1358
3915	3916	AD-59496	CCAGAUGGCACACAGCUUCdTdT	GAAGCUGUGUGCCAUCUGGdTdT	593-611
3917	3918	AD-59446	AGGGAUUCGAAACAGCCG	UCGGCUGUUUCGAAUCC	1369-1387

[1075]

			AdTdT	CUdTdT	
3919	3920	AD-59435	CUCUGCAGUCCUCAGCGC AdTdT	UGCGCUGAGGACUGCAG AGdTdT	109-127
3921	3922	AD-59419	CCGCCGCCUCUGCAGUCC UdTdT	AGGACUGCAGAGGCGGC GGdTdT	102-120
3923	3924	AD-59533	CUGGCUGGAGCCCUGGAG UdTdT	ACUCCAGGGCUCCAGCC AGdTdT	1781-1799
3925	3926	AD-59366	GACAUCAUGCAAAAGCAA AdTdT	UUUGCUUUUGCAUGAUG UCdTdT	851-869
3927	3928	AD-59521	GCUUGAGCAAGUUGGUA UCdTdT	GAUACCAACUUGCUCAA GCdTdT	2229-2247
3929	3930	AD-59563	CAGGCUGUGAGAUUUACU CdTdT	GAGUAAAUCUCACAGCC UGdTdT	1320-1338
3931	3932	AD-59534	AGAGCUGUGUGAUGUGG CCdTdT	GGCCACAUCACACAGCU CUdTdT	1522-1540
3933	3934	AD-59407	GGAGCUGGCAGACCUCCA UdTdT	AUGGAGGUCUGCCAGCU CCdTdT	1222-1240
3935	3936	AD-59445	AUCCCAGUGGACUGCUGA AdTdT	UUCAGCAGUCCACUGGG AUdTdT	822-840
3937	3938	AD-59546	GUCAAACUCAUGAGACAG AdTdT	UCUGUCUCAUGAGUUUG ACdTdT	1859-1877
3939	3940	AD-59456	CUUUCCUGGCAGCACAGA UdTdT	AUCUGUGCUGCCAGGAA AGdTdT	663-681
3941	3942	AD-59503	CCCUCCGGCCAGUGAGAA AdTdT	UUUCUCACUGGCCGGAG GGdTdT	520-538
3943	3944	AD-59536	CUACCUAGGAAUGAGUCG CdTdT	GCGACUCAUUCCUAGGU AGdTdT	1093-1111
3945	3946	AD-59385	CCCAAGAUUGUGGCAUUU GdTdT	CAAAUGCCACAAUCUUG GGdTdT	1463-1481
3947	3948	AD-59367	GAGCAAUCACCUUCGUGG AdTdT	UCCACGAAGGUGAUUGC UCdTdT	1551-1569
3949	3950	AD-59458	UGCCCAUUCUUAUCCCGA GdTdT	CUCGGGAUAAGAAUGGG CAdTdT	359-377
3951	3952	AD-59381	AAGGCCAAGGUCCAACAG AdTdT	UCUGUUGGACCUUGGCC UUdTdT	551-569
3953	3954	AD-59538	CACACAGCUUCCGUCUGG AdTdT	UCCAGACGGAAGCUGUG UGdTdT	601-619
3955	3956	AD-59421	UUAUGGGGCUCGAGGCGG AdTdT	UCCGCCUCGAGCCCCAU AAdTdT	1591-1609
3957	3958	AD-59388	UGUCUUCUGCAAAGCCAG UdTdT	ACUGGCUUUGCAGAAGA CAdTdT	700-718
3959	3960	AD-59444	AGGCCUGAGCAUGACCUC AdTdT	UGAGGUCAUGCUCAGGC CUdTdT	2253-2271
3961	3962	AD-59528	AUGUGAAUUAAGUUAUA UUdTdT	AAUAUAACUUAAUUCAC AUdTdT	2332-2350
3963	3964	AD-59498	ACUGCUGAAGAACUUCCA GdTdT	CUGGAAGUUCUUCAGCA GUdTdT	832-850
3965	3966	AD-59497	UGAGAAAGACAAAACUGC UdTdT	AGCAGUUUUGUCUUUCU CAdTdT	532-550
3967	3968	AD-59384	UCAGCCACCUCAGAGAAC UdTdT	AGUUCUCUGAGGUGGCU GAdTdT	1419-1437
3969	3970	AD-59452	GGCAACGAGCGUUUCGUU UdTdT	AAACGAAACGCUCGUUG CCdTdT	51-69
3971	3972	AD-59379	CCUGAUGGAUCCCAGCAG AdTdT	UCUGCUGGGAUCCAUCA GGdTdT	572-590
3973	3974	AD-59529	UGUGCCCACUGGAAGAGC UdTdT	AGCUCUUCCAGUGGGCA CAdTdT	1509-1527

[1076]

3975	3976	AD-59389	CCACAGGAGCCAGCAUAC UdTdT	AGUAUGCUGGCUCCUGU GGdTdT	311-329
3977	3978	AD-59585	GUGGUACUAGAAAUAUU UCdTdT	GAAAUAUUUCUAGUACC ACdTdT	1170-1188
3979	3980	AD-59570	UUCGCCGCUGCCCAUUCU UdTdT	AAGAAUGGGCAGCGGCG AAdTdT	351-369
3981	3982	AD-59415	CCGCCAGCACCAGCGCAA CdTdT	GUUGCGCUGGUGCUGGC GGdTdT	1840-1858
3983	3984	AD-59505	CGCUGAGGGACGGGUGCU UdTdT	AAGCACCCGUCCCUCAG CGdTdT	1819-1837
3985	3986	AD-59557	UGGACUUCUCGACUUGAG UdTdT	ACUCAAGUCGAGAAGUC CAdTdT	69-87
3987	3988	AD-59548	AAAGAAACCCCUCCGGCC AdTdT	UGGCCGGAGGGGUUUCU UUdTdT	512-530
3989	3990	AD-59487	UUGACACCGUACGGUCCU AdTdT	UAGGACCGUACGGUGUC AAdTdT	1719-1737
3991	3992	AD-59550	CCCUCUUCACCCUGGCUA AdTdT	UUAGCCAGGGUGAAGAG GGdTdT	1293-1311
3993	3994	AD-59572	CCCCCAGGCCUUUCUGCA GdTdT	CUGCAGAAAGGCCUGGG GGdTdT	379-397
3995	3996	AD-59554	AUGCCCAAAACUGCCCCA AdTdT	UUGGGGCAGUUUUGGGC AUdTdT	423-441
3997	3998	AD-59437	CUUGAGUGCCCGCCUCCU UdTdT	AAGGAGGCGGGCACUCA AGdTdT	81-99
3999	4000	AD-59584	GGGUACAUCGCCAGCACG AdTdT	UCGUGCUGGCGAUGUAC CCdTdT	1691-1709
4001	4002	AD-59373	GUGUGGGGCAGUUAUGG ACdTdT	GUCCAUAACUGCCCCAC ACdTdT	1123-1141
4003	4004	AD-59545	ACAUAGUCCUGGAAAUAA AdTdT	UUUAUUUCCAGGACUAU GUdTdT	2372-2390
4005	4006	AD-59547	AUCCCAGCAGAGUCCAGA UdTdT	AUCUGGACUCUGCUGGG AUdTdT	580-598
4007	4008	AD-59470	CUAGAUUCUUUCCACAGG AdTdT	UCCUGUGGAAAGAAUCU AGdTdT	300-318
4009	4010	AD-59417	UUGUUUUCCUCGUGCUUU GdTdT	CAAAGCACGAGGAAAAC AAdTdT	1259-1277
4011	4012	AD-59535	CCUCCUUCGCCGCCGCCU CdTdT	GAGGCGGCGGCGAAGGA GGdTdT	93-111
4013	4014	AD-59507	UGAGGCUGCUCCCGGACA AdTdT	UUGUCCGGGAGCAGCCU CAdTdT	31-49
4015	4016	AD-59519	CCAACAGACUCCUGAUGG AdTdT	UCCAUCAGGAGUCUGUU GGdTdT	562-580
4017	4018	AD-59391	UCACAUGGAAGCAAGUGG GdTdT	CCCACUUGCUUCCAUGU GAdTdT	2112-2130
4019	4020	AD-59537	CAUUCAAUGGAUGGGGCG GdTdT	CCGCCCCAUCCAUUGAA UGdTdT	1490-1508
4021	4022	AD-59450	AGGAAUGAGUCGCCACCC AdTdT	UGGGUGGCGACUCAUUC CUdTdT	1099-1117
4023	4024	AD-59449	UGGACUUAGAGCGGGAGC UdTdT	AGCUCCCGCUCUAAGUC CAdTdT	1209-1227
4025	4026	AD-59418	CUAAAAACACAGAAGUCU GdTdT	CAGACUUCUGUGUUUUU AGdTdT	1950-1968
4027	4028	AD-59561	CCCUCACCACACACCCCA GdTdT	CUGGGGUGUGUGGUGAG GGdTdT	2062-2080
4029	4030	AD-59460	AAUCCUUGCUUCAGGGAC UdTdT	AGUCCCUGAAGCAAGGA UUdTdT	171-189
4031	4032	AD-59409	UUGUGGCAUUUGAAACU	ACAGUUUCAAAUGCCAC	1470-1488

[1077]

			GUdTdT	AAdTdT	
4033	4034	AD-59476	UCAAUUACCCUACGGUGC CdTdT	GGCACCGUAGGGUAAUU GAdTdT	2010-2028
4035	4036	AD-59406	CAAGCCAGCCCCUCGGGC AdTdT	UGCCCGAGGGGCUGGCU UGdTdT	460-478
4037	4038	AD-59569	GAGUCUUCCCUGCCUGGA UdTdT	AUCCAGGCAGGGAAGAC UCdTdT	259-277
4039	4040	AD-59451	UGGAGAGUGUUGUUCGCC GdTdT	CGGCGAACAACACUCUC CAdTdT	339-357
4041	4042	AD-59553	ACCCCUUGCCUGCCACAA GdTdT	CUUGUGGCAGGCAAGGG GUdTdT	621-639
4043	4044	AD-59372	CUGGAUGGAUGAGUGGC UUdTdT	AAGCCACUCAUCCAUCC AGdTdT	272-290
4045	4046	AD-59377	CAAGAUGAUGGAAGUUG GGdTdT	CCCAACUUCCAUCAUCU UGdTdT	439-457
4047	4048	AD-59531	UUUCGUUUGGACUUCUCG AdTdT	UCGAGAAGUCCAAACGA AAdTdT	62-80
4049	4050	AD-59560	UCAUCUUCACCACCUCUC UdTdT	AGAGAGGUGGUGAAGAU GAdTdT	1749-1767
4051	4052	AD-59489	UGCCCAGUUCUUCCCGCU GdTdT	CAGCGGGAAGAACUGGG CAdTdT	132-150
4053	4054	AD-59540	AAAAAUGGACAUCAUUUC UdTdT	AGAAAUGAUGUCCAUUU UUdTdT	1639-1657
4055	4056	AD-59378	CUUGAGCUUCAGGAGGAU GdTdT	CAUCCUCCUGAAGCUCA AGdTdT	719-737
4057	4058	AD-59403	CCUCUCUGCCACCCAUGC UdTdT	AGCAUGGGUGGCAGAGA GGdTdT	1761-1779
4059	4060	AD-59493	AAAGUCAGGAUCCCUAAG AdTdT	UCUUAGGGAUCCUGACU UUdTdT	242-260
4061	4062	AD-59374	CGACCACGGAGGAAUCCU UdTdT	AAGGAUUCCUCCGUGGU CGdTdT	159-177
4063	4064	AD-59380	UUCCGUCUGGACACCCCU UdTdT	AAGGGGUGUCCAGACGG AAdTdT	609-627
4065	4066	AD-59576	CCACCCAUGCUGCUGGCU GdTdT	CAGCCAGCAGCAUGGGU GGdTdT	1769-1787
4067	4068	AD-59425	UGAGAAAAAGAAUGACC ACdTdT	GUGGUCAUUCUUUUUCU CAdTdT	961-979
4069	4070	AD-59509	UAAGAUGAUGCCAGGCUG UdTdT	ACAGCCUGGCAUCAUCU UAdTdT	1309-1327
4071	4072	AD-59488	AGUUAUAUUAAAUUUUA AUdTdT	AUUAAAAUUUAAUAUAA CUdTdT	2342-2360
4073	4074	AD-59486	UCUUCCCGCUGUGGGGAC AdTdT	UGUCCCCACAGCGGGAA GAdTdT	140-158
4075	4076	AD-59465	UGCCACAAGCCAGGGCAC UdTdT	AGUGCCCUGGCUUGUGG CAdTdT	631-649
4077	4078	AD-59484	AGCGCAGUUAUGCCCAGU UdTdT	AACUGGGCAUAACUGCG CUdTdT	122-140
4079	4080	AD-59368	GGACCAGGAGAAAGUCAG GdTdT	CCUGACUUUCUCCUGGU CCdTdT	232-250
4081	4082	AD-59464	UGUCCACUGCCCCAGCCA CdTdT	GUGGCUGGGGCAGUGGA CAdTdT	1903-1921
4083	4084	AD-59386	AUCGCGGCCUGAGGCUGC UdTdT	AGCAGCCUCAGGCCGCG AUdTdT	22-40
4085	4086	AD-59439	GGGGAUGUGGGGACCAG GAdTdT	UCCUGGUCCCCACAUCCC CdTdT	222-240
4087	4088	AD-59440	CUGGAAAUAAAUUCUUGC UdTdT	AGCAAGAAUUUAUUUCC AGdTdT	2380-2398

[1078]

4089	4090	AD-59542	UUGAAACUGUCCAUUCAAUdTdT	AUUGAAUGGACAGUUUCAAdTdT	1479-1497
4091	4092	AD-59559	GUGGGGACACGACCACGGAdTdT	UCCGUGGUCGUGUCCCCACdTdT	150-168
4093	4094	AD-59586	CGCAGUGGGGCUUUAUGGGdTdT	CCCAUAAAGCCCCACUGCGdTdT	1579-1597
4095	4096	AD-59408	UUGUCUUUAUAUGUGAAUUdTdT	AAUUCACAUAUAAAGACAAdTdT	2322-2340
4097	4098	AD-59568	UCACCCUGGCUAAGAUGAUdTdT	AUCAUCUUAGCCAGGGUGAdTdT	1299-1317
4099	4100	AD-59398	GUAUCUGCUCAGGCCUGAGdTdT	CUCAGGCCUGAGCAGAUACdTdT	2243-2261
4101	4102	AD-59508	AUGAGUGGCUUCUUCUCCAdTdT	UGGAGAAGAAGCCACUCAUdTdT	280-298
4103	4104	AD-59523	GAAGUUGGGGCCAAGCCAGdTdT	CUGGCUUGGCCCCAACUUCdTdT	449-467
4105	4106	AD-59410	UCAGGGACUCGGGACCCUGdTdT	CAGGGUCCCGAGUCCCUGAdTdT	181-199
4107	4108	AD-59541	UCCUACGGAUUGCCCCCACdTdT	GUGGGGGCAAUCCGUAGGAdTdT	2043-2061
4109	4110	AD-59524	UUACUCUGAUUCUGGGAACdTdT	GUUCCCAGAAUCAGAGUAAdTdT	1333-1351
4111	4112	AD-59501	AUCCCUAAGAGUCUUCCCUdTdT	AGGGAAGACUCUUAGGGAUdTdT	251-269
4113	4114	AD-59383	UGCCAAAGUACAUCUUCCGdTdT	CGGAAGAUGUACUUUGGCAdTdT	1389-1407
4115	4116	AD-59577	UCCUCGGGUUUAGGGGAUGdTdT	CAUCCCCUAAACCCGAGGAdTdT	210-228
4117	4118	AD-59447	UGCUGAAACCUCAGCAGGCdTdT	GCCUGCUGAGGUUUCAGCAdTdT	769-787
4119	4120	AD-59555	CCACCCACGGGUGUGUGGGdTdT	CCCACACACCCGUGGGUGGdTdT	1111-1129
4121	4122	AD-59405	UGGUGCAGUAAUGACUACCdTdT	GGUAGUCAUUACUGCACCAdTdT	1079-1097
4123	4124	AD-59371	UUCUCCACCUAGAUUCUUUdTdT	AAAGAAUCUAGGUGGAGAAdTdT	292-310
4125	4126	AD-59443	UAAGGCGCCGGCGAUCGCGdTdT	CGCGAUCGCCGGCGCCUUAdTdT	9-27
4127	4128	AD-59401	UGGAACUAGUAAAUUCCAUdTdT	AUGGAAUUUACUAGUUCCAdTdT	1189-1207
4129	4130	AD-59494	GGACCCUGCUGGACCCCUUdTdT	AAGGGGUCCAGCAGGGUCCdTdT	192-210
4131	4132	AD-59504	UCAAUUAUUUCACUUAACCdTdT	GGUUAAGUGAAAUAAUUGAdTdT	2269-2287
4133	4134	AD-59369	CCCGGACAAGGGCAACGAGdTdT	CUCGUUGCCCUUGUCCGGGdTdT	41-59
4135	4136	AD-59571	UUUUAAAACUGUGAACCGGdTdT	CCGGUUCACAGUUUUAAAAdTdT	991-1009
4137	4138	AD-59527	GUGCUUCGCCGCCAGCACCdTdT	GGUGCUGGCGGCGAAGCACdTdT	1832-1850
4139	4140	AD-59466	UGGACCCCUUCCUCGGGUUdTdT	AACCCGAGGAAGGGGUCCAdTdT	201-219
4141	4142	AD-59526	CUGUAUAUUAAGGCGCCGGdTdT	CCGGCGCCUUAAUAUACAGdTdT	1-19
4143	4144	AD-59543	UUGCCCCCACCCCUCACCAdTdT	UGGUGAGGGGUGGGGGCAAdTdT	2052-2070
4145	4146	AD-59564	AUGGGGCGGUGUGCCCACUdTdT	AGUGGGCACACCGCCCCAUdTdT	1500-1518

[1079]

4147	4148	AD-59583	CUAUAGUAAAAACAUAGUCdTdT	GACUAUGUUUUUACUAUAGdTdT	2361-2379

[1080] 在用Lipofectamine2000作为转染剂进行转染的Hep3B细胞中,以单剂量筛选,对siRNA在压制ALAS1 mRNA中的体外活性进行了检验。单剂量实验以10nM双链体浓度进行并

且通过分支DNA(bDNA)测定法进行分析。结果示于表19中并且表示为剩余mRNA百分数。

[1081] 表19:通过bDNA测定法评估的ALAS1mRNA的抑制

[1082]

双链体	% 剩余 mRNA	SD
AD-59453	11.2	1.5
AD-59395	12.7	1.1
AD-59477	14.5	2.0
AD-59492	14.8	2.1
AD-59361	15.1	4.9
AD-59462	15.4	2.6
AD-59433	15.8	2.7
AD-59424	16.0	1.7
AD-59414	16.1	1.3
AD-59539	16.2	2.6
AD-59400	16.2	1.8
AD-59551	16.3	2.3
AD-59482	16.6	2.1
AD-59448	16.6	3.7
AD-59392	16.9	3.5
AD-59469	16.9	2.2
AD-59431	17.0	2.0
AD-59423	17.1	3.8
AD-59517	17.2	1.5
AD-59578	17.3	3.1
AD-59495	17.7	3.7
AD-59432	17.7	2.8
AD-59382	17.9	3.2
AD-59472	18.6	3.5
AD-59459	18.7	3.8
AD-59413	18.8	2.4
AD-59478	18.9	3.0
AD-59376	18.9	3.2
AD-59556	18.9	2.4
AD-59399	19.0	4.1
AD-59474	19.4	1.6
AD-53542	19.4	1.7
AD-59480	19.6	1.6
AD-59549	19.7	2.1
AD-59515	19.8	4.4

[1083]

AD-59427	19.9	3.2
AD-59390	19.9	3.4
AD-59511	19.9	2.2
AD-59532	20.0	2.4
AD-59562	20.2	2.6
AD-59513	20.3	3.9
AD-59362	20.6	2.5
AD-53541	20.6	2.2
AD-59490	20.7	2.3
AD-59422	20.8	4.5
AD-59467	21.2	2.3
AD-59579	21.2	3.3
AD-59426	21.7	2.3
AD-59363	21.7	2.7
AD-59436	21.7	2.7
AD-53536	21.9	1.5
AD-59491	21.9	2.6
AD-59500	22.2	2.8
AD-59394	22.3	10.1
AD-59441	22.3	2.6
AD-59365	22.4	4.2
AD-59411	22.5	2.9
AD-59544	22.5	2.1
AD-59428	22.7	4.7
AD-59471	22.9	5.0
AD-59518	22.9	2.3
AD-53547	22.9	1.5
AD-59573	23.0	4.2
AD-59473	23.2	1.8
AD-59412	23.4	2.5
AD-59522	23.4	3.3
AD-59502	23.6	2.7
AD-59499	23.6	1.6
AD-59520	23.8	3.8
AD-59581	23.9	6.0
AD-59461	24.3	4.2
AD-59370	24.3	5.6
AD-53540	24.4	2.1
AD-59574	24.5	2.0
AD-59375	24.6	2.3
AD-59387	24.8	7.2
AD-59397	24.9	9.6
AD-59396	25.0	10.2
AD-59393	25.3	11.6
AD-59483	25.4	3.8
AD-59430	25.5	1.8

[1084]

AD-59463	25.6	4.8
AD-53534	25.9	3.1
AD-59514	26.2	5.7
AD-59575	26.2	3.2
AD-59364	26.2	4.5
AD-59402	26.3	3.1
AD-59479	26.3	2.5
AD-59481	26.4	2.2
AD-59530	26.4	4.4
AD-59582	26.6	3.9
AD-59506	27.0	4.1
AD-59567	27.3	1.1
AD-59485	27.7	4.7
AD-59525	28.3	3.1
AD-59566	28.5	0.6
AD-59580	28.7	7.1
AD-59512	29.5	2.5
AD-59475	29.6	4.2
AD-59438	29.6	3.3
AD-59442	29.9	2.8
AD-59516	30.4	3.8
AD-59429	30.8	4.3
AD-59510	31.3	1.9
AD-59457	31.4	1.2
AD-59434	31.6	3.5
AD-59454	32.0	1.9
AD-59468	32.2	3.2
AD-59565	32.4	1.5
AD-59416	32.7	1.7
AD-59420	33.2	3.1
AD-59552	33.2	2.2
AD-59558	33.8	3.8
AD-59404	34.0	5.4
AD-59455	34.8	1.3
AD-59496	34.9	5.2
AD-59446	35.5	1.7
AD-59435	35.9	1.2
AD-59419	36.0	1.4
AD-59533	36.7	3.7
AD-59366	36.7	6.0
AD-59521	36.9	4.3
AD-59563	36.9	4.1
AD-59534	36.9	3.3
AD-59407	37.1	4.7
AD-59445	37.2	3.2
AD-59546	37.9	4.9

[1085]

AD-59456	38.3	4.0
AD-59503	38.8	5.0
AD-59536	39.8	4.2
AD-59385	39.9	13.7
AD-59367	40.0	3.6
AD-59458	40.0	3.4
AD-59381	40.3	9.9
AD-59538	40.8	4.9
AD-59421	40.9	6.4
AD-59388	41.0	9.1
AD-59444	41.1	2.7
AD-59528	41.9	3.3
AD-59498	42.2	3.3
AD-59497	42.4	4.9
AD-59384	42.7	17.6
AD-59452	42.7	3.1
AD-59379	43.6	2.6
AD-59529	43.8	4.8
AD-59389	44.1	6.4
AD-59585	44.3	3.2
AD-59570	45.1	4.0
AD-59415	46.6	2.3
AD-59505	47.5	6.2
AD-59557	48.1	4.4
AD-59548	49.9	4.0
AD-59487	50.7	3.2
AD-59550	50.8	5.8
AD-59572	51.1	4.0
AD-59554	51.3	6.0
AD-59437	52.2	4.8
AD-59584	54.9	2.7
AD-59373	55.3	20.1
AD-59545	55.4	3.4
AD-59547	55.9	4.7
AD-59470	56.0	2.7
AD-59417	56.4	7.7
AD-59535	57.6	5.1
AD-59507	58.8	4.7
AD-59519	59.1	5.6
AD-59391	60.1	12.5
AD-59537	60.6	9.1
AD-59450	60.7	7.2
AD-59449	61.6	6.8
AD-59418	61.8	8.4
AD-59561	62.2	7.2
AD-59460	62.8	4.7

[1086]

AD-59409	64.4	9.0
AD-59476	65.2	5.6
AD-59406	65.6	3.5
AD-59569	66.7	7.6
AD-59451	66.9	2.9
AD-59553	67.2	8.8
AD-59372	67.3	25.6
AD-59377	68.7	5.1
AD-59531	68.7	9.0
AD-59560	68.7	12.7
AD-59489	69.6	8.9
AD-59540	70.1	10.1
AD-59378	70.6	14.1
AD-59403	71.4	3.3
AD-59493	72.3	3.5
AD-59374	75.9	5.1
AD-59380	76.4	11.1
AD-59576	77.5	16.2
AD-59425	77.9	10.6
AD-59509	78.0	3.2
AD-59488	78.6	7.1
AD-59486	79.4	5.0
AD-59465	79.5	5.1
AD-59484	79.8	3.2
AD-59368	80.0	11.9
AD-59464	80.2	9.3
AD-59386	80.6	33.2
AD-59439	80.9	4.0
AD-59440	82.2	1.9
AD-59542	83.3	10.6
AD-59559	83.7	9.1
AD-59586	83.8	11.5
AD-59408	86.3	2.8
AD-59568	86.8	4.2
AD-59398	87.4	24.9
AD-59508	87.5	2.5
AD-59523	87.6	11.8
AD-59410	88.8	8.3
AD-59541	88.9	10.8
AD-59524	89.5	12.1
AD-59501	89.9	5.1
AD-59383	90.8	27.4
AD-59577	91.1	2.3
AD-59447	91.3	12.9
AD-59555	91.7	3.4
AD-59405	92.5	5.7

[1087]

AD-59371	93.5	31.7
AD-59443	93.8	9.0
AD-59401	94.5	7.1
AD-59494	95.1	9.1
AD-59504	96.8	11.7
AD-59369	96.8	4.8
AD-59571	97.4	7.0
AD-59527	98.6	7.8
AD-59466	99.7	14.0
AD-59526	102.9	4.6
AD-59543	103.7	3.0
AD-59564	103.7	12.1
AD-59583	112.4	13.2

[1088] 在该单剂量测定中，所检验的232个双链体在不同程度上压制ALAS1 mRNA。根据这一测定，至少这些双链体中的四个(AD-59453、AD-59395、AD-59477、和AD-59492)压制ALAS1 mRNA 85％或更高，这些双链体中的39个压制ALAS1 mRNA 80％或更高，这些双链体中的101个压制ALAS1 mRNA 70％或更高，并且这些双链体中的152个压制ALAS1 mRNA 50％或更高。相反，在这个测定中，一些双链体不显示可感知的压制。

[1089] <u>实例13:使用ALAS1 siRNA对卟啉前体ALA和PBG的剂量应答性抑制</u>

[1090] 在AIP的小鼠模型中研究ALAS1 siRNA的剂量应答作用(参见实例5)。在通过每天一次持续3-4天的苯巴比妥的注射诱导后，该模型显示出，约30％剩余PBGD活性，基础的ALA和PBG水平的约2倍增加，ALA和PBG水平的约30-100倍增加。年长的动物具有轴突变性和受损的运动功能。

[1091] 在该实例中使用的ALAS1 siRNA是以AF11配制品的AD-53558双链体。在第1天，将小鼠通过i.v.注射给予1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、或0.05mg/kg的ALAS1 siRNA或LUC AD-1955对照。给予三次苯巴比妥注射(在第2天、第3天和第4天每天1次注射)以诱导肝ALAS1以及卟啉前体、ALA和PBG。在第5天收集血浆和过夜尿样本并通过LC-MS测量代谢水平。在第1天，在第一次治疗之前，测量ALA和PBG的基线水平。这些结果显示于图16中。该ALAS1 siRNA以剂量依赖性方式抑制ALA和PBG水平。在ALAS1 siRNA剂量低至0.05mg/kg的时候观察到对血浆ALA水平的抑制作用，并且在siRNA剂量低至0.1mg/kg的时候看到对血浆PBG水平的抑制作用。

[1092] <u>实例14:使用ALAS1 siRNA对卟啉前体ALA和PBG的持久抑制</u>

[1093] 在AIP的小鼠模型中研究ALAS1 siRNA的作用的持久性(参见实例5)。在该实例中使用的ALAS1 siRNA是以AF11配制品的AD-53558双链体。该试验设计和该实验的结果显示于图17中。在第1天，将小鼠通过i.v.注射给予1mg/kg ALAS1 siRNA或LUC AD-1955对照。在第0周(在第2、3、和4天每天1次注射)、第2周(在第15、16、和17天每天1次注射)、以及第4周(在第29、30、和31天每天1次注射)注射三次苯巴比妥来诱导肝ALAS1和卟啉前体ALA和PBG。在第5、18、和32天收集血浆和过夜尿样品并通过LC-MS测量代谢水平。在第1天，在第一次治疗之前，测量ALA和PBG的基线水平。

[1094] 如图17中所示，该ALAS1 siRNA在降低血浆ALA和PBG水平方面具有持久作用。给予该ALAS1 siRNA抑制血浆ALA和PBG水平持续至少2周。这些结果指示ALAS1 siRNA是用于降

低提高的ALA和PBG水平的有效的治疗，并且因此可以用于预防，例如，以降低长期提高的ALA和PBG水平并且以防止反复卟啉症发作。

[1095] 实例15：与氯化血红素治疗相比，ALAS1 siRNA提供更快的作用起效

[1096] 在AIP小鼠模型中，将用ALAS1 siRNA的治疗效果与氯化血红素治疗效果相比较(参见实例5)。在该实例中使用的ALAS1 siRNA是以AF11配制品的AD-53558双链体。该试验设计和该实验的结果显示于图18中。在第1、2、和3天给予苯巴比妥(PB)和二乙基二硫代氨基甲酸酯(DDC)。DDC是另一个p450诱导剂，像苯巴比妥一样，增加血红素的需求，并且帮助延长ALA/PBG代谢产物的诱导。

[1097] 在最后一次给予PB和DDC后的8小时处，经静脉内给予4mg/kg剂量的氯化血红素、2mg/kg剂量的ALAS1 siRNA、或对照治疗。

[1098] 如图18中所示，与氯化血红素治疗相比，用ALAS1 siRNA治疗的治疗作用的起效更快。用siRNA治疗ALA和PBG的快速减少指示，该siRNA针对急性发作是一种有效的治疗，因为预期临床症状的快速改进伴随ALA和PBG水平的减少。

[1099] 实例16：ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-58632的作用

[1100] AD-58632是披露于实例11中的21/23mer。AD-58632靶向人类转录物NM_000688.4并且还与小鼠、大鼠、和猕猴mRNA转录物交叉反应。AD-58632是从约45种化合物的筛选中鉴定的唯一交叉反应性21/23mer。用该双链体的另一个试验描述于该实例中。

[1101] AD-58632在抑制ALAS1 mRNA方面中的剂量依赖性的作用

[1102] 相对于GAPDH mRNA，在大鼠中研究AD-58632在抑制ALAS1 mRNA方面中的剂量应答作用。测试30mg/kg、10mg/kg、和3mg/kg的剂量。在最后一次给药后的72小时处，测量ALAS1 mRNA水平。与PBS对照相比，AD-58632以剂量依赖性方式抑制ALAS1 mRNA(参见图19)。AD-58632具有约10mg/kg的单剂量ED50。

[1103] AD-58632在大鼠AIP模型中的作用

[1104] 在大鼠AIP模型中，进一步研究AD-58632 ALAS1 GalNAc共轭物siRNA的剂量应答作用。在该模型中，在用苯巴比妥诱导血红素需要之前，将LNP中的siRNA用来敲低PBGD的水平，尤其在肝中。该大鼠AIP模型示出肝中短暂性PBGD siRNA敲低，具有约15％剩余的PBGD mRNA，并且当通过每天苯巴比妥注射持续三天来诱导后，示出ALAPBG的水平的约10-50倍增加。

[1105] 试验设计描绘于图20中。研究四组大鼠。将一组在所指示的时间点仅用苯巴比妥(PB)进行治疗。将第二组用苯巴比妥和胆色素原脱氨酶(PBGD)siRNA进行治疗。第三组接受苯巴比妥、PBGD siRNA、和30mg/kg剂量的ALAS1 siRNA。第四组接受苯巴比妥、PBGD siRNA、和10mg/kg剂量的ALAS1 siRNA。如图20中所示，在第1天经静脉内给予PBGD siRNA。在第4天给予ALAS1 GalNAc siRNA。在第4、5、6、以及7天给出苯巴比妥注射。在起始于第7天并结束于第8天的24小时期间收集尿。在第8天使用bDNA测定评估肝PBGD mRNA、GAPDH mRNA、和ALAS-1mRNA的水平。使用LC-MS确定尿中PBG和ALA水平。

[1106] mRNA结果示于图21中。PBGD siRNA降低了PBGD mRNA水平，但是并没有降低ALAS1 mRNA水平。该ALAS1 siRNA以剂量依赖性方式降低了ALAS1 mRNA水平(参见图21)。ALA和PBG结果示于图22中。该ALAS1 siRNA以剂量依赖性方式降低了ALA和PBG水平(参见图22)。

[1107] 实例17：用AD-58632分次给药

[1108]　在两个分开的分次给药范例中，研究ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-58632的效力。针对这些研究中的每个，使用雌性斯普拉-道来大鼠。将大鼠关在SCLR中(一种光循环房间，其中12小时开灯并且12小时关灯)，并且在最后一次注射后的72小时处处死。使用分支DNA(bDNA)测定来测量肝中的ALAS1和GAPDH mRNA水平。

[1109]　五次日剂量与一次推注剂量范例

[1110]　在第一范例中，给大鼠的组五次剂量的siRNA(每天一次)或单次推注剂量，该单次推注剂量具有与五次单独剂量的和相同的总浓度。确切地，将大鼠分配到以下治疗条件之一：(1)每天一次皮下注射6mg/kg siRNA，持续五天，(2)每天一次皮下注射2mg/kg siRNA，持续五天，(3)每天一次皮下注射1mg/kg siRNA，持续五天，(4)皮下注射单次推注剂量的30mg/kg siRNA，(5)皮下注射单次推注剂量的10mg/kg siRNA，(6)皮下注射单次推注剂量的5mg/kg siRNA，或(7)PBS对照治疗。

[1111]　这些结果显示于图23中。在本范例中，单次推注剂量的siRNA比经五天过程中反复给药相同浓度的siRNA提供了更大抑制ALAS1 mRNA。针对所有剂量研究这都是真的。

[1112]　每周一次给药，持续四周

[1113]　在第二范例中，每周一次以三种剂量(10mg/kg、5mg/kg、或2.5mg/kg)中的一种给大鼠皮下注射siRNA，持续四周。对照组接受PBS注射。

[1114]　这些结果显示于图24中。与单次给药相比，提供10mg/kg的四次每周剂量改进了所获得的最大的敲低(ED50是单次给药10mg/kg)。相比之下，每周5和2.5mg/kg的多次给药并没有改进该范例中的沉默。

[1115]　实例18：鉴定和测试具有较短有义和反义链的ALAS1 siRNA

[1116]　进行另外的试验以研究将该siRNA双连体缩短为19-19mer的作用。鉴别另外五个新的交叉反应性19-19mer双连体，这些双连体结合至人类(h)(NM_000688.4)、恒河猴(rh)(XM_001090440.2)、小鼠(m)(NM_020559.2)、和大鼠(r)(NM_024484.2)ALAS1 mRNA转录物。这些双链体没有显示出与21/23mer AD-58632一样好的结果(参见图25)。

[1117]　研究修饰长度和突出端对最佳的两个19-19mer(AD-59115和AD-59125)的作用(图26和27)。修饰序列的示于表21中。

[1118]　表21：用于最佳的两个19-19mer的长度/突出端评估的序列

[1119]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标部位	交叉反应性	突出端	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义（AS）序列（5'-3'）
4172	4173	877-895	h/rh/m/r	19/19	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu
4174	4175	875-895	h/rh/m/r	19/21	AD-60090	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfususc
4176	4177	877-895	NC OH*	19/21	AD-60091	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfusasa
4178	4179	873-895	h/rh/m/r	21/23	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4180	4181	875-895	NC OH*	21/23	AD-60092	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsasa
4182	4183	875-893	h/rh/m/r	19/19	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc
4184	4185	873-893	h/rh/m/r	19/21	AD-60093	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg
4186	4187	875-893	NC OH*	19/21	AD-60094	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsasa
4188	4189	871-893	h/rh	21/23	AD-60095	CfsasGfaAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
4190	4191	871-893	m/r	21/23	AD-60096	CfsasGfaAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsc

[1120] *非互补突出端

[1121] 突出端改进了效价。它们还提供了另外的衍生物序列(AD-60489,其基于AD-60095),用于进一步结构-活性关系(SAR)研究(相对于啮鼠动物,在位置23处有1个错配)。

[1122] <u>实例19:ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60489和AD-58632的作用</u>

[1123] 研究另外的GalNAc共轭物ALAS1 siRNA双链体AD-60489的作用,并且与AD-58632的作用进行比较。这些双链体的序列示于表22A中。AD-60489在反义序列的3'端具有相对于啮鼠动物ALAS1 mRNA的一个错配。因此,虽然AD-58632与人类、猕猴、小鼠、以及大鼠序列完全互补,但AD-60489是仅与人类和猕猴序列完全互补。

[1124] 表22A:ALAS1 siRNA双连体AD-58632和AD-60489的序列

[1125]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标部位	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4151	4152	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu

[1126] ALAS1 mRNA的抑制示于图28中。与AD-58632相比,3mg/kg和10mg/kg的AD-60489提供了更有效的抑制,并且展现ED50的约两倍的改进。AD-60489的单剂量ED50是约5mg/kg。

[1127] <u>实例20:在非人类灵长动物研究中ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60489和AD-58632的作用</u>

[1128] 在非人类灵长动物中,研究AD-58632和AD-60489在抑制肝mRNA方面的效力。实验设计示于图29中。每天以2mL/kg的体积给予siRNA(5mg/kg、2.5mg/kg、或1.25mg/kg)或PBS对照的剂量,持续5天,然后每2天,持续3周。从在第15天取的肝活检中获得的肝组织中,评

估ALAS1 mRNA沉默。该活检是在血清抽取后并且在给予剂量10之前进行(参见图29)。在第-10、-3、7、15、23、31、和43天收集血清样品用于循环性细胞外RNA检测(cERD)方法(参见实例21)。针对临床化学组,在第-3、6、30、和43天收集血清。临床化学组包括评估丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、和碱性磷酸酯酶(ALP)的水平。

[1129]　AD-58632和AD-60489以剂量依赖性方式降低了ALAS1 mRNA(参见图30)。AD-60489显示出比AD-58632更有效力。例如,以研究的最低剂量(1.25mg/kg),AD-60489将相关ALAS1信使抑制为对照水平的约42%,然而AD-58632在该剂量处显示出很少的抑制。以2.5mg/kg,AD-60489将相关ALAS1信使抑制为对照水平的约26%,然而AD-58632将相关ALAS1信使抑制为对照水平的约64%。以5mg/kg,AD-60489将相关ALAS1信使抑制为对照水平的约21%,并且AD-58632将相关ALAS1信使抑制为对照水平的约55%。

[1130]　临床化学结果指示出使用ALAS1 siRNA的持续敲低ALAS1是安全的并且耐受良好。观察到ALT、AST、或ALP没有提升。

[1131]　<u>实例21:如使用cERD测定所评估的,在非人类灵长动物研究中ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60489和AD-58632的作用</u>

[1132]　在非人类灵长类动物中,使用循环性细胞外RNA检测(cERD)方法,评估ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60489和AD-58632的作用。该方法描述于,例如,塞加尔(Sehgal),A.等人,使用循环RNA定量组织特异性靶基因调控(Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA)(海报于2012年2月9日在基本原理基因沉默,由小型RNA讨论会出品)和塞加尔A.等人,在循环RNA中组织特异性基因沉默(Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA),RNA,20:1-7,与2013年12月9日在线发布。如图29中所示,在第-10、-3、7、15、23、31、和43天收集血清样品用于循环性细胞外RNA检测(cERD)方法。

[1133]　针对cERD测定,在冰上解冻血清样品。将375-400μL的8M LiCl添加至在超离心机(UC)管中的3-3.5mL的血清中,并且在4℃下孵育至少1小时。将PBS添加至各UC管的顶部,在管的顶部留出约1cm的干空间,以防止管壁在旋转过程中坍缩。干燥这些管,以从在冰上孵育中去除任何凝聚。在护罩下,将样品装载到MC 55转子中,并且以150,000-200,000g旋转样品100-120分钟。将上清液从沉淀物去除。将1mL Trizol添加至UC管的沉淀中,将该管涡旋,并且将内容转移至1.5mL微量离心管。向各管,添加200μL的氯仿,并且将管倒置若干次以混合。一次制备一个样品。将这些样品在13,000RPM、4℃下旋转10-20分钟。将上层水相转移至新的1.5mL管中(约500μL体积)。向各样品中添加等体积的100%异丙醇、1μL的线性丙烯酰胺(4°)、和十分之一体积的3M NaoAc pH 5.5或更少(典型地,500μL的异丙醇和50μL NaoAc)。将样品在13,000RPM、4℃下旋转10min。保留上清液。将沉淀物用冰冷的70%EtOH(每次洗涤500μL)洗涤两次,并且在每次洗涤后在13,000RPM、4℃下旋转5min。允许沉淀物风干约5分钟并且然后重新悬浮于20μL NF H20中。在cDNA反应中使用10μL。将重新悬浮的RNA储存于-80℃下。

[1134]　<u>结果</u>

[1135]　如使用cERD测定所评估的血清mRNA敲低与从肝活检中获得的结果相关。参见图31。这是一个令人惊讶的结果,因为ALAS1不是血清蛋白。在此提供的cERD测定允许监测循环性ALAS1 mRNA。其具有以下优点,例如,ALAS1 mRNA的水平可以随着时间进行测量,无需

做连续的肝活检,这些肝活检在技术上是困难的并且是昂贵的。

[1136] 使用cERD测定结果确定mRNA敲低的动力学。参见图32。AD-60489,即使以仅有1.25mg/kg的剂量,也获得了超过50%的敲低。

[1137] 实例22:ALAS1 siRNA的安全研究

[1138] 以下安全性研究指示ALAS1的持续性敲低是安全的并且耐受良好。

[1139] 非-人类灵长类动物研究

[1140] 如以上所述(参见实例20),在非人类灵长动物研究中,在给予AD-60489和AD-58632之后没有观察到ALT、AST、或ALP提升。

[1141] 大鼠研究

[1142] 在大鼠中,用AD-58632进行四周研究。在第一周以10mg/kg每天给予siRNA持续5天,然后每隔一天以10mg/kg持续研究的第2-4周。总暴露量为140mg。没有观察到不利的临床体征或体重变化。没有观察到血液学和凝血参数的测试品相关的变化。此外,没有观察到不利的组织病理学。在脾中存在最小的空泡化并且在肾中存在最小的包膜下纤维化。

[1143] 小鼠研究

[1144] 在小鼠中,在ALAS1敲低后评估P450mRNA。在给予ALAS1 LNP配制品后48小时处观察Cyp2b10的小剂量依赖性增加。这种状况经过168小时消退。

[1145] 实例23:使用结构-活性关系研究鉴别另外有效的ALAS1 siRNA

[1146] 进行结构-活性关系(SAR)研究,包括在此的其他实例中所描述的研究,以鉴别源自已经鉴别的那些(例如,AD-58632和AD-60489)的另外有效的ALAS1 siRNA。研究化学修饰的作用。化学修饰的作用包括1)2'-O-甲基与2'-氟修饰、2)2'Uf的减少(2'氟修饰)、3)添加PS(硫代磷酸酯)、4)使用内部dTs、和/或5)乙二醇核酸(GNAs)。不希望受理论约束,修饰可以提升效价,例如,通过1)更好地解旋或提高的RISC装载,或2)更好的催化性靶标接合。修饰还可以提高稳定性,这样使得当给予多次剂量时,化合物可以积累并更好的进行。

[1147] 在一些例子中(参见表22B),观察到了相对于其他双链体(例如,AD-58632和/或AD-60489)的改进的活性,而在其他例子中观察到了类似的活性(参见表23)或减少的活性(表24)。这些例子仅呈现为基于超过150个siRNA的筛选的实例。在此提供了SAR研究的进一步例证。

[1148] 表22B:相对于亲本改进的活性

[1149]

双链体*	IC50	有义(5'至3')	反义(5'至3')
AD-58632.10(亲本)	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96(SEQ ID NO: 4192)	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg(SEQ ID NO: 4193)
AD-80643.1	0.004	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96(SEQ ID NO: 4194)	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg(SEQ ID NO: 4195)
AD-60489.3(亲本)	0.010	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96(SEQ ID NO: 4196)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO: 4197)
AD-60879.1	0.001	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96(SEQ ID NO: 4198)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu(SEQ ID NO: 4199)

[1150] 在该表和其他表中双链体名称中的小数点后的数字仅是指批生产号。

[1151] 表23:相对于亲本的相似的活性而稳定性增加

[1152]

双链体	IC50	有义（5'至3'）	反义（5'至3'）
AD-58632.10（亲本）	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96（SEQ ID NO: 4200）	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg（SEQ ID NO: 4201）
AD-60839.1	0.014	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96（SEQ ID NO: 4202）	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg（SEQ ID NO: 4203）

[1153] 表24:相对于亲本减少的活性

[1154]

双链体	IC50	有义（5'至3'）	反义（5'至3'）
AD-58632.10（亲本）	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96（SEQ ID NO: 4204）	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg（SEQ ID NO: 4205）

[1155]

AD-60886.1	0.801	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96（SEQ ID NO: 4206）	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg（SEQ ID NO: 4207）

[1156] 实例24:AD-58632的体外结构-活性关系研究

[1157] 产生AD-58632、和AD-58632的siRNA衍生物,并且针对活性体外筛选一些siRNA。化学修饰的缩写提供于表1中。

[1158] 10nM和0.1nM siRNA的体外活性

[1159] 在用Lipofectamine2000作为转染剂进行转染的Hep3B细胞中,对siRNA在抑制ALAS1mRNA方面的体外活性进行检测。以所指示的siRNA浓度(例如,0.1nM、10nM)进行实验,并且在转染后24小时处,通过分支DNA(bDNA)测定进行分析。将结果表达为相对于siRNA AD-1955(用作阴性对照的非靶向性siRNA)的剩余mRNA百分比。

[1160] siRNA的序列和体外测试结果提供于表25、表26、和表27。

[1161]

表 25：AD-58632 和 AD-58632 衍生物 siRNA 的序列和体外筛选结果

SEQ ID NO.: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称*	有义序列 (5'-3')	反义 (AS) 序列 (5'-3')	平均值 10 nM	SD 10 nM	平均值 0.1 nM	SD 0.1 nM
4208	4209	873-895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11.79	2.70	46.65	4.21
4210	4211	873-895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.61	4.49	63.49	10.51
4212	4213	873-895	AD-60411.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	15.04	6.13	62.59	10.05
4214	4215	873-895	AD-60417.1	GfsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	13.96	5.47	66.10	8.21
4216	4217	873-895	AD-60423.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	12.59	3.03	41.47	3.77
4218	4219	873-895	AD-60423.2	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	13.79	3.38	55.93	7.90
4220	4221	873-895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	14.74	2.76	48.68	6.64
4222	4223	873-895	AD-60440.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	28.31	8.68	77.01	3.99
4224	4225	873-895	AD-60400.1	gsasaagaguGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	39.90	5.67	99.64	8.58
4226	4227	873-895	AD-60406.1	gsasaagagugucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	56.06	2.08	95.83	17.01
4228	4229	873-895	AD-60412.1	GfsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	43.09	2.23	87.52	8.10
4230	4231	873-895	AD-60418.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcsusg	65.84	7.75	108.07	21.88
4232	4233	873-895	AD-60424.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcucuuUfcsusg	45.51	11.82	84.40	10.69
4234	4235	873-895	AD-60429.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcucuucsusg	63.96	13.25	81.21	1.96
4236	4237	873-895	AD-60435.1	gsasaagaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	80.12	10.02	95.33	23.09
4238	4239	873-895	AD-60441.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	63.29	17.48	97.07	8.04
4240	4241	873-895	AD-60401.1	gsasaaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	55.27	10.26	109.06	4.23
4242	4243	873-895	AD-60407.1	GfsasaaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	47.39	1.88	98.04	22.58
4244	4245	873-895	AD-60413.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	55.60	11.65	92.88	5.65
4246	4247	873-895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	20.82	15.07	57.82	8.31

[1162]

4248	4249	873-895	AD-60425.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	35.58	13.30	73.46	10.91
4250	4251	873-895	AD-60430.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucdTcaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40.54	1.41	81.87	11.23
4252	4253	873-895	AD-60436.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucudCaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	60.12	11.74	81.51	7.41
4254	4255	873-895	AD-60442.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucdAucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40.82	12.61	83.06	1.05
4256	4257	873-895	AD-60402.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucadTcuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	62.16	11.24	123.60	6.71
4258	4259	873-895	AD-60408.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaudCuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	45.39	15.50	86.69	6.12
4260	4261	873-895	AD-60414.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucudTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32.56	3.52	84.21	0.24
4262	4263	873-895	AD-60420.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuudCuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	52.57	10.77	94.45	3.43
4264	4265	873-895	AD-60426.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuucudTL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	52.49	1.91	91.15	14.49
4266	4267	873-895	AD-60431.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	26.66	1.16	73.09	6.83
4268	4269	873-895	AD-60437.1	gsasaaGfaGfuGfudCucadTcuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32.80	4.58	69.03	3.02
4270	4271	873-895	AD-60443.1	gsasaaGfaGfuGfudCucaucdTucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	35.10	7.10	69.92	17.93
4272	4273	873-895	AD-60403.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucdTucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	25.28	1.68	105.23	23.99
4274	4275	873-895	AD-60409.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCadTcdTucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	30.48	1.88	72.34	3.34
4276	4277	873-895	AD-60415.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCadTcdTudCuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	25.28	7.10	69.53	10.72
4278	4279	873-895	AD-60421.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucuuucsusg	59.28	5.83	66.88	0.63
4280	4281	873-895	AD-60427.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcdTcuuucsusg	34.80	8.13	79.65	11.25
4282	4283	873-895	AD-60432.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucdTuucsusg	46.78	6.42	79.19	16.72
4284	4285	873-895	AD-60438.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcdTcuuucsusg	32.07	9.46	57.87	10.18
4286	4287	873-895	AD-60444.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucdTuucsusg	55.55	10.17	89.52	3.91
4288	4289	873-895	AD-60404.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuuucsusg	50.06	9.17	93.46	2.56
4290	4291	873-895	AD-60410.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuuucsusg	44.40	13.93	88.96	6.06
4292	4293	873-895	AD-60416.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcuc(Tgn)uucsusg	28.56	7.82	76.36	19.47
4294	4295	873-895	AD-60422.1	GfsasAfaGfAfGfuGf(Tgn)cucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	40.37	10.86	84.06	12.08
4296	4297	873-895	AD-60428.1	GfsasAfaGfAfGfuGfuc(Tgn)caucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	56.81	22.64	92.15	0.26

[1163]

4298	4299	873-895	AD-60433.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc(Agn)ucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	36.78	5.31	67.92	12.55
4300	4301	873-895	AD-60439.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuca(Tgn)cuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	32.81	6.72	77.93	13.33
4302	4303	873-895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	13.25	3.28	78.08	4.05
4304	4305	873-895	AD-60451.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucu(Tgn)cuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	34.74	11.06	88.93	5.19
4306	4307	873-895	AD-60457.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuuc(Tgn)uL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	41.26	6.16	92.15	0.64
4308	4309	873-895	AD-60463.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuAfL96	usAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	19.58	7.98	69.67	4.64
4310	4311	873-895	AD-60469.1	CfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfgsasc	19.35	9.30	72.30	0.50
4312	4313	873-895	AD-60474.1	CfsusAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuAfgsasc	21.60	4.27	76.35	11.71
4314	4315	873-895	AD-60479.1	CfsusUfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfaAfgsasc	28.01	4.45	76.55	27.32
4316	4317	873-895	AD-60484.1	CfsusUfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfaAfgsusg	20.31	3.08	71.99	9.53
4318	4319	873-895	AD-60446.1	GfsusUfuGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcAfaAfcsusg	18.65	5.11	73.52	17.87
4320	4321	873-895	AD-60452.1	GfsasUfuCfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfgAfaUfcsusg	28.72	1.21	83.09	15.75
4322	4323	873-895	AD-60458.1	GfsasAfuCfuGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcAfgAfuUfcsusg	50.15	13.02	114.93	11.58
4324	4325	873-895	AD-60464.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	(Agn)AfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	35.71	5.07	103.88	3.01
4326	4327	873-895	AD-60470.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfs(Ggn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	17.59	0.78	73.15	11.75
4328	4329	873-895	AD-60475.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsg(Agn)aGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	22.07	4.57	68.64	25.12
4330	4331	873-895	AD-60480.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.54	1.22	66.39	14.34
4332	4333	873-895	n/a	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfa(Ggn)aUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4334	4335	873-895	AD-60447.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	31.33	4.75	104.36	7.71
4336	4337	873-895	AD-60453.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfa(Tgn)gAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.42	0.90	76.29	0.41
4338	4339	873-895	AD-60459.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUfcsusg	27.70	10.91	89.20	3.46
4340	4341	873-895	AD-60465.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfg(Agn)gacAfcUfcUfuUfcsusg	28.44	6.84	87.28	5.73
4342	4343	873-895	AD-60471.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAf(Ggn)acAfcUfcUfuUfcsusg	24.03	8.87	85.86	14.62
4344	4345	873-895	AD-60476.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUfcsusg	21.48	5.53	88.73	25.48
4346	4347	873-895	AD-60481.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu(Tgn)L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.18	4.19	68.10	6.86

[1164]

4348	4349	873-895	AD-60486.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCf(Tgn)UfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.31	0.31	74.06	8.48
4350	4351	873-895	AD-60448.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfu(Cgn)uUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.89	1.35	59.22	6.64
4352	4353	873-895	AD-60454.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf(Tgn)CfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	19.24	5.72	75.90	1.27
4354	4355	873-895	AD-60460.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.91	5.84	60.11	6.01
4356	4357	873-895	AD-60466.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.99	7.53	56.83	11.59
4358	4359	873-895	AD-60472.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfa(Tgn)cUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	12.35	0.60	64.36	11.74
4360	4361	873-895	AD-60477.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.62	1.76	65.96	7.77
4362	4363	873-895	AD-60482.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu(Cgn)aUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	18.58	6.43	66.67	2.31
4364	4365	873-895	AD-60487.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCf(Tgn)CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	34.89	15.62	86.39	6.10
4366	4367	873-895	AD-60449.1	GfsasAfaGfaGfuGfUf(Cgn)uCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	22.65		80.09	0.75
4368	4369	873-895	AD-60455.1	GfsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	31.05	2.82	104.24	23.01
4370	4371	873-895	AD-60461.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfu(Cgn)uUfL96	asAfs(Ggn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	16.30	2.08	85.78	22.00
4372	4373	873-895	AD-60467.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf(Tgn)CfuUfL96	asAfsg(Agn)aGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	17.77	8.38	82.16	18.92
4374	4375	873-895	AD-60473.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.64	4.25	61.05	7.88
4376	4377	873-895	n/a	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfa(Ggn)aUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4378	4379	873-895	AD-60483.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfa(Tgn)cUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	26.18	2.83	91.12	16.03
4380	4381	873-895	AD-60488.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfa(Tgn)gAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	24.74	0.56	87.66	7.90
4382	4383	873-895	AD-60450.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu(Cgn)aUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUfcsusg	37.09	2.89	111.90	1.97
4384	4385	873-895	AD-60456.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCf(Tgn)CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfg(Agn)gacAfcUfcUfuUfcsusg	41.82	0.60	102.56	11.25
4386	4387	873-895	AD-60462.1	GfsasAfaGfaGfuGfUf(Cgn)uCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAf(Ggn)acAfcUfcUfuUfcsusg	38.91	3.89	122.47	35.17
4388	4389	873-895	AD-60468.1	GfsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUfcsusg	28.44	3.05	97.09	2.66
4390	4391	873-895	AD-60550.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	20.35	0.63	69.13	22.65
4392	4393	873-895	AD-60555.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfscUfsuCfuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	19.17	8.76	68.86	17.72
4394	4395	873-895	AD-60560.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfscUfsuUfscsusg	25.71	5.66	67.63	27.72
4396	4397	873-895	AD-60565.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfscUfsuCfuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfscUfsuUfscsusg	22.78	7.32	74.11	1.85

[1165] 如上表中所示，在该体外筛选中，以10nM浓度提供了最大ALAS1 mRNA抑制(大于80％抑制，这样使得残留少于20％mRNA)的siRNA包括AD-58632、AD-60472、AD-60423、AD-60445、AD-60423、AD-60417、AD-60466、AD-60473、AD-60434、AD-60448、AD-60460、AD-

60411、AD-60481、AD-60486、和AD-60453、AD-60480、AD-60405、AD-60477、AD-60461、AD-60470、AD-60467、AD-60482、AD-60446、AD-60555、AD-60454、AD-60469和AD-60463。此外，在该体外筛选中，以0.1nM浓度提供了最大ALAS1 mRNA抑制(大于30％抑制，这样使得残留少于70％mRNA)的siRNA包括AD-60423、AD-58632、AD-60434、AD-60423、AD-60466、AD-60419、AD-60438、AD-60448、AD-60460、AD-60473、AD-60411、AD-60405、AD-60472、AD-60477、AD-60417、AD-60480、AD-60482、AD-60421、AD-60560、AD-60433、AD-60481、AD-60475、AD-60555、AD-60437、AD-60550、AD-60415、AD-60463、和AD-60443。

[1166] 如下表中所示，测试另外的siRNA披露了，以下双链体以10nM浓度提供了超过80％抑制:AD-58632、AD-60405、AD-60423、AD-60434、AD-60445、AD-60480、AD-60460、和AD-60466，并且以下双链体以0.1nM浓度提供了超过30％抑制:AD-58632、AD-60405、AD-60423、AD-60434、AD-60419、AD-60480、AD-60460、和AD-60466。

[1167]

表 26：AD-58632 和 AD-58632 衍生物 siRNA 的另外序列和体外筛选结果

SEQ ID NO.: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义 (AS) 序列 (5'-3')	平均值 10 nM	SD 10 nM	平均值 0.1 nM	SD 0.1 nM
4398	4399	873-895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11.8	2.7	46.7	4.2
4400	4401	873-895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.6	4.5	63.5	10.5
4402	4403	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4404	4405	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4406	4407	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4408	4409	873-895	AD-60423.2	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	13.8	3.4	55.9	7.9
4410	4411	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4412	4413	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4414	4415	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4416	4417	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4418	4419	873-895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	14.7	2.8	48.7	6.6
4420	4421	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4422	4423	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4424	4425	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4426	4427	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4428	4429	873-895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	20.8	15.1	57.8	8.3
4430	4431	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4432	4433	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4434	4435	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4436	4437	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				

[1168]

4438	4439	873-895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	13.3	3.3	78.1	4.0
4440	4441	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4442	4443	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4444	4445	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg				
4446	4447	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4448	4449	873-895	AD-60480.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.5	1.2	66.4	14.3
4450	4451	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4452	4453	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4454	4455	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4456	4457	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4458	4459	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4460	4461	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4462	4463	873-895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4464	4465	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4466	4467	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4468	4469	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4470	4471	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaugAfgacAfcucuuucsusg				
4472	4473	873-895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	11.8	2.7	46.7	4.2
4474	4475	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4476	4477	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4478	4479	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4480	4481	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsuCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4482	4483	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4484	4485	873-895	AD-60460.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.9	5.8	60.1	6.0
4486	4487	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				

[1169]

4488	4489	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4490	4491	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4492	4493	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)suCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4494	4495	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)sucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4496	4497	873-895	AD-60466.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.0	7.5	56.8	11.6
4498	4499	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4500	4501	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4502	4503	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4504	4505	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsuCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				
4506	4507	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg				

[1170] 表27:AD-58632衍生物siRNA的另外序列

[1171]

[1172]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_上的靶标部位	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4508	4509	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4510	4511	873-895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4512	4513	873-895	AD-60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4514	4515	873-895	AD-60923	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4516	4517	873-895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4518	4519	873-895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4520	4521	873-895	AD-60891	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4522	4523	873-895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4524	4525	873-895	AD-60924	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4526	4527	873-895	AD-60885	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4528	4529	873-895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4530	4531	873-895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4532	4533	873-895	AD-60890	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4534	4535	873-895	AD-60926	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

[1173] 基于体外活性的IC50

[1174] 与以上描述的实验相类似，以10nM、1.66667nM、0.277778nM、0.046296nM、0.007716nM、0.001286nM、0.000214nM、和3.57E-05nM最终双链体浓度进行另外的剂量应答实验，并且计算IC50值。

[1175] 表28:AD-58632和AD-58632衍生物siRNA的另外序列和IC50

[1176]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义（AS）序列（5'-3'）	IC50
4536	4537	873-895	AD-58632.10	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.017
4538	4539	873-895	AD-60405.2	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.070
4540	4541	873-895	AD-60887.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	0.120
4542	4543	873-895	AD-60819.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	0.009
4544	4545	873-895	AD-60823.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuucsusg	0.032
4546	4547	873-895	AD-60423.3	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	0.020
4548	4549	873-895	AD-60889.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	0.242
4550	4551	873-895	AD-60827.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg	0.044

[1177]

4552	4553	873-895	AD-60831.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.077
4554	4555	873-895	AD-60434.2	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	0.028
4556	4557	873-895	AD-60891.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.078
4558	4559	873-895	AD-60892.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.138
4560	4561	873-895	AD-60835.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.015
4562	4563	873-895	AD-60839.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.014
4564	4565	873-895	AD-60419.2	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.014
4566	4567	873-895	AD-60885.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.091
4568	4569	873-895	AD-60419.3	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.026
4570	4571	873-895	AD-60843.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.004
4572	4573	873-895	AD-60847.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.012
4574	4575	873-895	AD-60445.2	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.077
4576	4577	873-895	AD-60890.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	1.201
4578	4579	873-895	AD-60445.3	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.302
4580	4581	873-895	AD-60820.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.006
4582	4583	873-895	AD-60824.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.032
4584	4585	873-895	AD-60480.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.066
4586	4587	873-895	AD-60893.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.034
4588	4589	873-895	AD-60884.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.157
4590	4591	873-895	AD-60886.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.801
4592	4593	873-895	AD-60888.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.201
4594	4595	873-895	AD-60828.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.145
4596	4597	873-895	AD-60832.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.036
4598	4599	873-895	AD-60836.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.076
4600	4601	873-895	AD-60840.1	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.033
4602	4603	873-895	AD-60844.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.017
4604	4605	873-895	AD-60848.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.007
4606	4607	873-895	AD-60821.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucs(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.076

[1178]

4608	4609	873-895	AD-58632.11	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.063
4610	4611	873-895	AD-60825.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.031
4612	4613	873-895	AD-60829.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.033
4614	4615	873-895	AD-60833.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.100
4616	4617	873-895	AD-60837.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsuCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.031
4618	4619	873-895	AD-60841.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.010
4620	4621	873-895	AD-60460.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.009
4622	4623	873-895	AD-60845.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.002
4624	4625	873-895	AD-60849.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.005
4626	4627	873-895	AD-60822.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.007
4628	4629	873-895	AD-60826.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)suCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.009
4630	4631	873-895	AD-60830.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)sucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.019
4632	4633	873-895	AD-60466.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.066
4634	4635	873-895	AD-60834.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.024
4636	4637	873-895	AD-60838.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.013
4638	4639	873-895	AD-60842.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.010
4640	4641	873-895	AD-60846.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsuCfsuUfsL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.011
4642	4643	873-895	AD-60850.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsucsuUfsL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	0.018

[1179] 如表28中所示，以下双链体具有少于0.01nM的IC50:AD-60845、AD-60843、AD-60849、AD-60820、AD-60848、AD-60822、AD-60826、AD-60819、和AD-60460。

[1180] 以下双链体具有少于0.02nM的IC50:AD-60845、AD-60843、AD-60849、AD-60820、AD-60848、AD-60822、AD-60826、AD-60819、和AD-60460、AD-60841、AD-60842、AD-60846、AD-60847、AD-60838、AD-60419、AD-60839、AD-60835、AD-586320、AD-60844、AD-60850、和AD-60830。

[1181] 以下双链体具有少于0.05nM的IC50:AD-60845、AD-60843、AD-60849、AD-60820、AD-60848、AD-60822、AD-60826、AD-60819、和AD-60460、AD-60841、AD-60842、AD-60846、AD-60847、AD-60838、AD-60419、AD-60839、AD-60835、AD-586320、AD-60844、AD-60850、AD-60830、AD-60423、AD-60834、AD-60419、AD-60434、AD-60825、AD-60837、AD-60823、AD-60824、AD-60840、AD-60829、AD-60893、AD-60832、和AD-60827。

[1182] 实例25:AD-58632的体内结构-活性关系研究

[1183] 产生AD-58632亲本siRNA的衍生物，并且在大鼠中进行体内筛选。筛选的siRNA序列提供于下表中。

[1184] 表29:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1185]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4644	4645	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4646	4647	873-895	AD-60405	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4648	4649	873-895	AD-60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4650	4651	873-895	AD-60923	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4652	4653	873-895	AD-60434	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4654	4655	873-895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4656	4657	873-895	AD-60419	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4658	4659	873-895	AD-60924	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4660	4661	873-895	AD-60445	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4662	4663	873-895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4664	4665	873-895	AD-60926	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

[1186] 给予单剂量的5mg/kg的siRNA。在给予siRNA后5天，使用bDNA测定完成对大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA的mRNA测量，并且使用qPCR确定药物的组织水平。这些结果提供于图33和图34中。如图33中所示，与AD-58632相比，所筛选的至少十个双链体(AD-60405、AD-60887、AD-60923、AD-60434、AD-60892、AD-60419、AD-60924、AD-60445、AD-60925、和AD-60926)示出提高的ALAS1 mRNA抑制。此外，如图34中所示，这些双链体(除AD-60926之外)获得比AD-58632更高的肝浓度。

[1187] 实例26:在大鼠AIP模型中，AD-60925和AD-60926的效力

[1188] 在大鼠AIP模型中，研究AD-60925和AD-60926的治疗效力(在上述实例中所描述的)。实验设计示于图35顶部中。将大鼠用PBS或3mg/kg ALAS1-GalNAc siRNA每周三次，苯巴比妥和以AF11LNP配制品的PBGD siRNA(AF11-PBGD)以图35中所指示的次数进行治疗。对照大鼠接受了仅有PBGD siRNA，没有苯巴比妥诱导。

[1189] 这些结果显示于图35、图36和图37中。与对照相比，给予苯巴比妥诱导ALAS1 mRNA表达、和尿中PBG和ALA水平的增加。用每周三次总共八次剂量的3mg/kg的AD-60925或AD-60926的治疗抑制ALAS1 mRNA(图35)、尿PBG(图36和图37，顶部)，和尿ALA(图36和图37，底部)。苯巴比妥诱导ALAS1 mRNA、尿PBG、和ALA的增加。治疗效果的时程的示于图37中。箭头指示给予PB的时间点。siRNA治疗防止苯巴比妥诱导ALAS1 mRNA、尿PBG、和ALA的增加。

[1190] AD-60925和AD-60926都显示出AIP的治疗效力。AD-60925在抑制ALAS1 mRNA、尿ALA、和尿PBG方面比AD-60926甚至更有效。

[1191] 实例27:AD-58632的另外的体内结构-活性关系研究

[1192] 产生AD-58632亲本siRNA的衍生物，并且在大鼠中进行体内筛选。

[1193] 体内筛选，部分I

[1194] 筛选的siRNA序列提供于下表中。

[1195] 表30:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1196]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4666	4667	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4668	4669	873-895	AD-60820	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4670	4671	873-895	AD-60824	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4672	4673	873-895	AD-61137	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4674	4675	873-895	AD-60843	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4676	4677	873-895	AD-60847	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4678	4679	873-895	AD-61138	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4680	4681	873-895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4682	4683	873-895	AD-60823	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4684	4685	873-895	AD-61139	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4686	4687	873-895	AD-61140	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg

[1197] 将大鼠给予每两周四次剂量(每个周两次)的2.5mg/kg的siRNA,持续两周。在给予最后一次剂量的siRNA后72小时处,处死这些动物,使用bDNA测定完成大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA水平的测量。

[1198] 如图38中所示,与AD-58632相比,所测试的siRNA中的至少四种(AD-60820、AD-60843、AD-60819、和AD-61140)显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。

[1199] 体内筛选,部分II

[1200] 筛选的siRNA序列提供于下表中。

[1201] 表31:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1202]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4688	4689	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4690	4691	873-895	AD-61141.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4692	4693	873-895	AD-61142.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4694	4695	873-895	AD-60835	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4696	4697	873-895	AD-60839	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4698	4699	873-895	AD-61143.2	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4700	4701	873-895	AD-61144.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4702	4703	873-895	AD-61145.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4704	4705	873-895	AD-61146.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

[1203] 给予大鼠单剂量的2.5mg/kg的siRNA。在给予siRNA后72小时处，使用bDNA测定完成大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA的mRNA测量。

[1204] 如图39中所示，与AD-58632相比，这些siRNA AD-61141、AD-61142、AD-60835、AD-60839、AD-61143、AD-61144、AD-61145、和AD-61146显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。在该实验中提供最好的抑制的siRNA是AD-60835。

[1205] 实例28:AD-60489的体外结构-活性关系研究

[1206] 产生AD-60489、和AD-60489的siRNA衍生物，并且针对活性体外筛选一些siRNA。如实例24中描述的，测试siRNA在抑制ALAS1 mRNA方面的体外活性。siRNA的序列和体外测试结果提供于下表中。

[1207]

表 32：AD-60489 和 AD-60489 衍生物 siRNA 的序列和体外筛选结果

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO:（反义）	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称*	有义序列（5'-3'）	反义（AS）序列（5'-3'）	平均值 10 nM	SD 10 nM	平均值 0.1 nM	SD 0.1 nM
4706	4707	871-893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.02	0.18	50.65	5.11
4708	4709	871-893	AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.13	5.94	63.58	18.61
4710	4711	871-893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	11.90	0.66	45.19	8.93
4712	4713	871-893	AD-60507.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.63	7.85	48.50	19.55
4714	4715	871-893	AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.39	2.44	51.03	7.01
4716	4717	871-893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.67	4.88	51.70	7.72
4718	4719	871-893	AD-60525.1	csasgaaaGfaGfuguCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	45.24	18.16	105.09	14.17
4720	4721	871-893	AD-60531.1	csasgaaaGfaGfugucuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	62.19	12.47	107.18	1.37
4722	4723	871-893	AD-60490.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	39.06	10.92	82.70	10.67
4724	4725	871-893	AD-60496.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcugsgsu	48.90	1.85	71.55	5.47
4726	4727	871-893	AD-60502.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuucugsgsu	51.83	12.62	81.85	4.25
4728	4729	871-893	AD-60508.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcuuucugsgsu	65.34	21.75	89.23	11.08
4730	4731	871-893	AD-60514.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcucuuucugsgsu	97.13	3.47	102.94	7.36
4732	4733	871-893	AD-60520.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	104.97	0.93	126.75	20.47
4734	4735	871-893	AD-60526.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	61.48	15.44	81.28	7.99
4736	4737	871-893	AD-60532.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugsgsu	83.47	13.36	94.13	8.11
4738	4739	871-893	AD-60491.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugsgsu	109.05	0.43	97.85	9.77
4740	4741	871-893	AD-60497.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugsgsu	73.81	10.17	95.01	5.40
4742	4743	871-893	AD-60503.1	csasgaaaGfAfGfudGucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugsgsu	75.30	11.29	96.03	6.30
4744	4745	871-893	AD-60509.1	csasgaaaGfAfGfugudCucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuuucugsgsu	71.37	24.41	104.36	18.62

[1208]

4746	4747	871-893	AD-60515.1	csasgaaaGfAfGfugucudCaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	64.16	13.95	98.80	0.92
4748	4749	871-893	AD-60521.1	csasgaaaGfAfGfugucucadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	73.99	36.39	99.96	7.29
4750	4751	871-893	AD-60527.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucdTuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	82.69	26.56	114.13	4.81
4752	4753	871-893	AD-60533.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	89.41	4.69	107.40	9.67
4754	4755	871-893	AD-60492.1	csasgaaaGfAfGfudGucudCaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	83.52	1.56	100.70	0.79
4756	4757	871-893	AD-60498.1	csasgaaaGfAfGfudGucucadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	64.64	16.21	98.41	19.60
4758	4759	871-893	AD-60504.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	57.55	5.13	93.14	0.41
4760	4761	871-893	AD-60510.1	csasgaaaGfAfGfudGudCudCadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	58.88	25.48	91.39	2.06
4762	4763	871-893	AD-60516.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	53.24	6.56	84.40	2.73
4764	4765	871-893	AD-60522.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	67.17	6.48	91.62	5.43
4766	4767	871-893	AD-60528.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuucugsgsu	81.44	37.04	89.71	8.60
4768	4769	871-893	AD-60534.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcdTuucugsgsu	62.63	20.55	99.62	7.37
4770	4771	871-893	AD-60493.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	107.18	0.11	87.98	2.41
4772	4773	871-893	AD-60499.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	35.92	13.78	77.52	6.68
4774	4775	871-893	AD-60505.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucugsgsu	66.77	16.45	109.82	2.48
4776	4777	871-893	AD-60511.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucugsgsu	82.10	10.11	95.50	14.73
4778	4779	871-893	AD-60517.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfc(Tgn)cuucugsgsu	80.83	29.69	93.57	18.41
4780	4781	871-893	AD-60523.1	GfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfcscsa	29.60	1.64	67.16	8.40
4782	4783	871-893	AD-60529.1	GfsusGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcAfcscsa	21.15	1.21	79.02	28.99
4784	4785	871-893	AD-60535.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfgAfcscsa	31.78	13.54	79.36	26.56
4786	4787	871-893	AD-60494.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfgAfcsgsu	30.14	3.42	81.46	12.88
4788	4789	871-893	AD-60500.1	CfsusCfuAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuAfgAfgsgsu	29.85	11.78	72.14	4.56
4790	4791	871-893	AD-60506.1	CfsusCfuUfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfaAfgUfgsgsu	19.06	1.98	88.93	11.13
4792	4793	871-893	AD-60512.1	CfsusGfuUfuGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcAfaAfcUfgsgsu	29.71	1.79	86.32	17.69
4794	4795	871-893	AD-60518.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	(Tgns)AfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	27.47	2.59	81.03	10.93

[1209]

4796	4797	871-893	AD-60524.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfs(Agn)GfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.02	1.39	71.65	17.42
4798	4799	871-893	n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsa(Ggn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4800	4801	871-893	AD-60536.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGf(Agn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	61.77	10.19	91.55	2.20
4802	4803	871-893	AD-60541.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	25.47	2.83	54.36	15.02
4804	4805	871-893	AD-60546.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	49.32	1.50	90.79	11.36
4806	4807	871-893	AD-60551.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	24.37	1.11	76.80	24.99
4808	4809	871-893	AD-60556.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAf(Ggn)AfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	21.43	4.71	61.90	5.64
4810	4811	871-893	AD-60561.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfcUfgsgsu	28.25	6.41	71.84	27.01
4812	4813	871-893	AD-60566.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAf(Cgn)acUfcUfuUfcUfgsgsu	27.57	4.87	67.91	18.28
4814	4815	871-893	AD-60570.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)cUfcUfuUfcUfgsgsu	24.11	0.04	58.75	21.02
4816	4817	871-893	AD-60583.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.32	4.78	42.01	9.51
4818	4819	871-893	AD-60585.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUf(Tgn)AfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	21.15	4.14	49.54	13.34
4820	4821	871-893	AD-60587.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfc(Tgn)uAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	14.66	1.73	41.47	13.20
4822	4823	871-893	AD-60589.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf(Cgn)UfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	20.77	5.12	43.97	15.63
4824	4825	871-893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.66	0.05	36.42	16.94
4826	4827	871-893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.35	4.11	35.43	11.36
4828	4829	871-893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.13	0.28	39.99	19.39
4830	4831	871-893	AD-60582.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCf(Tgn)CfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	19.56	8.17	51.59	1.11
4832	4833	871-893	AD-60584.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu(Cgn)uCfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	23.36	6.63	58.79	10.35
4834	4835	871-893	AD-60586.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	27.78	2.20	76.86	6.81
4836	4837	871-893	AD-60588.1	CfsasGfaAfaGfaGfUf(Ggn)uCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	105.27	14.25	99.26	19.62
4838	4839	871-893	AD-60590.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	28.74	1.66	81.88	22.04
4840	4841	871-893	AD-60558.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfc(Tgn)uAfL96	usAfs(Agn)GfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	22.74	14.85	60.42	19.38
4842	4843	871-893	n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf(Cgn)UfuAfL96	usAfsa(Ggn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				

[1210]

4844	4845	871-893	AD-60568.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGf(Agn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	86.66	21.93	110.05	16.44
4846	4847	871-893	AD-60572.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	22.37	4.86	71.24	22.19
4848	4849	871-893	AD-60539.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	43.35	14.53	104.44	2.51
4850	4851	871-893	AD-60544.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCf(Tgn)CfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	25.85	1.18	69.98	5.86
4852	4853	871-893	AD-60549.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu(Cgn)uCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAf(Ggn)AfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	29.40	4.62	72.98	20.16
4854	4855	871-893	AD-60554.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfcUfgsgsu	33.74	0.45	75.36	19.39
4856	4857	871-893	n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUf(Ggn)uCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAf(Cgn)acUfcUfuUfcUfgsgsu				
4858	4859	871-893	AD-60564.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)cUfcUfuUfcUfgsgsu	27.77	10.34	77.01	11.51
4860	4861	871-893	AD-60569.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	20.34	5.29	59.40	19.74
4862	4863	871-893	AD-60573.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	20.07	3.83	60.80	14.93
4864	4865	871-893	AD-60540.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfsgAfgAfcacUfcUfsuUfscUfgsgsu	24.36	0.56	75.75	14.97
4866	4867	871-893	n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfsgAfgAfcacUfcUfsuUfscUfgsgsu				

[1211] 在结果示于上表中的体外筛选中，以10nM浓度提供最大ALAS1 mRNA抑制(大于80％抑制，这样使得残留少于20％的mRNA)的siRNA包括AD-60501、AD-60592、AD-60591、AD-60513、AD-60507、AD-60587、AD-60519、AD-60593、AD-60583、AD-60524、AD-60489、AD-

60495、AD-60506、和AD-60582。

[1212] 在结果示于上表中的体外筛选中，以0.1nM浓度提供最大ALAS1 mRNA抑制(大于30％抑制，这样使得残留少于70％的mRNA)的siRNA包括AD-60592、AD-60591、AD-60593、AD-60587、AD-60583、AD-60589、AD-60501、AD-60507、AD-60585、AD-60489、AD-60513、AD-60582、AD-60519、AD-60541、AD-60570、AD-60584、AD-60569、AD-60558、AD-60573、AD-60556、AD-60495、AD-60523、AD-60566、和AD-60544。

[1213] 如下表中所示，测试另外的siRNA披露了以下双链体以10nM浓度提供了超过80％抑制:AD-60489、AD-60495、AD-60501、AD-60507、AD-60513、AD-60519、AD-60583、AD-60591、AD-60592、and AD-60593，并且以下双链体以0.1nM浓度提供了超过30％抑制:AD-60489、AD-60495、AD-60501、AD-60507、AD-60513、AD-60519、AD-60583、AD-60591、AD-60592、和AD-60593。

[1214]

表 33：AD-60489 和 AD-60489 衍生物 siRNA 的序列和体外筛选结果

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO:（反义）	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义（AS）序列（5'-3'）	平均值 10 nM	SD 10 nM	平均值 0.1 nM	SD 0.1 nM
4868	4869	871-893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.0	0.2	50.7	5.1
4870	4871	871-893	AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.1	5.9	63.6	18.6
4872	4873	871-893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	11.9	0.7	45.2	8.9
4874	4875	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4876	4877	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4878	4879	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4880	4881	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4882	4883	871-893	AD-60507.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.6	7.8	48.5	19.6
4884	4885	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4886	4887	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4888	4889	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4890	4891	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4892	4893	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4894	4895	871-893	AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.4	2.4	51.0	7.0
4896	4897	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4898	4899	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4900	4901	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4902	4903	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4904	4905	871-893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4906	4907	871-893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.7	4.9	51.7	7.7

[1215]

4908	4909	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4910	4911	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4912	4913	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4914	4915	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4916	4917	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4918	4919	871-893	AD-60499.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	35.9	13.8	77.5	6.7
4920	4921	871-893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4922	4923	871-893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu				
4924	4925	871-893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4926	4927	871-893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4928	4929	871-893		csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4930	4931	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4932	4933	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu				
4934	4935	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4936	4937	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4938	4939	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu				
4940	4941	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu				
4942	4943	871-893	AD-60583.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.3	4.8	42.0	9.5
4944	4945	871-893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.7	0.0	36.4	16.9
4946	4947	871-893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.4	4.1	35.4	11.4
4948	4949	871-893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	15.1	0.3	40.0	19.4
4950	4951	871-893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.0	0.2	50.7	5.1
4952	4953	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu				
4954	4955	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4956	4957	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				

[1216]

4958	4959	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4960	4961	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4962	4963	871-893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.7	0.0	36.4	16.9
4964	4965	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4966	4967	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4968	4969	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4970	4971	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4972	4973	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4974	4975	871-893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	13.4	4.1	35.4	11.4
4976	4977	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg				
4978	4979	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4980	4981	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4982	4983	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4984	4985	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4986	4987	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				
4988	4989	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu				

[1217] 表34:AD-60489衍生物siRNA的另外序列

[1218]
[1219]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
4990	4991	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
4992	4993	871-893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
4994	4995	871-893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
4996	4997	871-893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
4998	4999	871-893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5000	5001	871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5002	5003	871-893	AD-60495.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5004	5005	871-893	AD-60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu

[1220]

表 35：AD-60489 和 AD-60489 衍生物 siRNA 的另外序列和 IC50

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO:（反义）	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标位点	双链体名称*	有义序列（5'-3'）	反义（AS）序列（5'-3'）	IC50
5006	5007	871-893	AD-60489.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.010
5008	5009	871-893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.254
5010	5011	871-893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.006
5012	5013	871-893	AD-60898.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5014	5015	871-893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.151
5016	5017	871-893	AD-60851.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.033
5018	5019	871-893	AD-60855.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0.065
5020	5021	871-893	AD-60507.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.029
5022	5023	871-893	AD-60902.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.024
5024	5025	871-893	AD-60904.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5026	5027	871-893	AD-60894.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.011
5028	5029	871-893	AD-60860.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.249
5030	5031	871-893	AD-60864.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	1.899
5032	5033	871-893	AD-60513.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5034	5035	871-893	AD-60896.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.034
5036	5037	871-893	AD-60899.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5038	5039	871-893	AD-60868.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.249

[1221]

5040	5041	871-893	AD-60872.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0.014
5042	5043	871-893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.026
5044	5045	871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.080
5046	5047	871-893	AD-60903.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5048	5049	871-893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.018
5050	5051	871-893	AD-60876.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.091
5052	5053	871-893	AD-60880.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0.131
5054	5055	871-893	AD-60499.2	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	na
5056	5057	871-893	AD-60895.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	na
5058	5059	871-893	AD-60897.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	na
5060	5061	871-893	AD-60526.2	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5062	5063	871-893	AD-60852.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	4.970
5064	5065	871-893	AD-60856.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	na
5066	5067	871-893	AD-60861.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5068	5069	871-893	AD-60865.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.061
5070	5071	871-893	AD-60869.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu	na
5072	5073	871-893	AD-60873.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.009
5074	5075	871-893	AD-60877.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu	0.008
5076	5077	871-893	AD-60881.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgsu	0.025
5078	5079	871-893	AD-60583.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)L96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.022
5080	5081	871-893	AD-60591.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.031
5082	5083	871-893	AD-60592.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.010

[1222]

5084	5085	871-893	AD-60593.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.006
5086	5087	871-893	AD-60489.4	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.011
5088	5089	871-893	AD-60857.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5090	5091	871-893	AD-60862.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.012
5092	5093	871-893	AD-60866.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.015
5094	5095	871-893	AD-60870.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.012
5096	5097	871-893	AD-60874.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.003
5098	5099	871-893	AD-60591.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.014
5100	5101	871-893	AD-60878.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.008
5102	5103	871-893	AD-60882.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.003
5104	5105	871-893	AD-60853.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.007
5106	5107	871-893	AD-60858.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.013
5108	5109	871-893	AD-60863.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.002
5110	5111	871-893	AD-60592.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.013
5112	5113	871-893	AD-60867.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.084
5114	5115	871-893	AD-60871.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.008
5116	5117	871-893	AD-60875.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.004
5118	5119	871-893	AD-60879.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.001
5120	5121	871-893	AD-60883.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.004
5122	5123	871-893	AD-60854.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.002
5124	5125	871-893	AD-60859.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscusuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.002

[1223] 如上表中所示，很多双链体示出在抑制ALAS1 mRNA方面的效力。以下双链体具有小于0.01nM的IC50:AD-60879、AD-60859、AD-60863、AD-60854、AD-60882、AD-60874、AD-60883、AD-60875、AD-60501、AD-60593、AD-60853、AD-60877、AD-60878、AD-60871、和AD-

60873。以下双链体具有小于0.02nM的IC50:AD-60879、AD-60859、AD-60863、AD-60854、AD-60882、AD-60874、AD-60883、AD-60875、AD-60501、AD-60593、AD-60853、AD-60877、AD-60878、AD-60871、AD-60873、AD-60489、AD-60592、AD-60894、AD-60489、AD-60870、AD-60862、AD-60858、AD-60592、AD-60591、AD-60872、AD-60866、AD-60905、AD-60857、AD-60513、和AD-60861。以下双链体具有小于0.05nM的IC50:AD-60879、AD-60859、AD-60863、AD-60854、AD-60882、AD-60874、AD-60883、AD-60875、AD-60501、AD-60593、AD-60853、AD-60877、AD-60878、AD-60871、AD-60873、AD-60489、AD-60592、AD-60894、AD-60489、AD-60870、AD-60862、AD-60858、AD-60592、AD-60591、AD-60872、AD-60866、AD-60905、AD-60857、AD-60513、AD-60861、AD-60583.2、AD-60902.1、AD-60881.1、AD-60519.2、AD-60507.2、AD-60591.3、AD-60851.1、AD-60896.1、和AD-60537.2。

[1224] 实例29:AD-60489的体内结构-活性关系研究

[1225] 产生AD-60489亲本siRNA的衍生物,并且在大鼠中进行体内筛选。

[1226] AD-60489衍生物的体内筛选1

[1227] 筛选的siRNA序列提供于下表中。

[1228] 表36:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1229]

SEQ ID NO.:(有义)	SEQ ID NO.:(反义)	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
5126	5127	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5128	5129	871-893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5130	5131	871-893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5132	5133	871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5134	5135	871-893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5136	5137	871-893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcudTcugsgsu
5138	5139	871-893	AD-60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5140	5141	871-893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfadTgAfgAfcAfcdTcudTcugsgsu

[1230] 给予大鼠单剂量的3mg/kg的siRNA。在给予siRNA后5天,使用bDNA测定完成对大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA的mRNA测量,并且使用qPCR确定药物(siRNA)的组织水平。

[1231] 如图40(顶部)中所示,与AD-60489相比,siRNA AD-60501、AD-60519、AD-60901、AD-60495、AD-60900、和AD-60935显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。siRNA AD-60519、AD-60901、AD-60495、和AD-60935比AD-60489获得更高的肝水平(参见图40,底部)。因此,提供提高的ALAS1 mRNA抑制的大部分的双链体还获得了更高的肝水平。

[1232] 至少针对双链体AD-60489、AD-60519、和AD-60901,效力与siRNA的肝水平相关(参见图41),这样使得肝中更高水平的siRNA与更大ALAS1 mRNA抑制相关。

[1233] AD-60489衍生物的体内筛选2

[1234] 筛选的siRNA序列提供于下表中。

[1235] 表37:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1236]

SEQ ID NO.:(有义)	SEQ ID NO.:(反义)	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
5142	5143	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5144	5145	871-893	AD-60879	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
5146	5147	871-893	AD-61190	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5148	5149	871-893	AD-61191	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5150	5151	871-893	AD-60877	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5152	5153	871-893	AD-61192	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5154	5155	871-893	AD-60865	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5156	5157	871-893	AD-60861	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5158	5159	871-893	AD-60876	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5160	5161	871-893	AD-61193	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
5162	5163	871-893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu

[1237] 给予大鼠单剂量的2.5mg/kg的siRNA。在给予siRNA后5天,使用bDNA测定完成大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA的mRNA测量。

[1238] 如图42中所示,与AD-60489相比,siRNA AD-60879、AD-61190、AD-61191、AD-60865、AD-60861、AD-60876、AD-61193、和AD-60519显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。

[1239] 实例30:多次给药提高了效价

[1240] 为了研究给予多次剂量的siRNA的作用,以每周两次2.5mg/kg的剂量给予大鼠(n=3/组)PBS或siRNA(AD-58632、AD-60925、AD-60419、AD-60445、AD-60892、AD-60489、AD-60519、或AD-60901),持续2周。使用bDNA测定来评估大鼠ALAS1(rALAS1)mRNA和大鼠GAPDH(rGAPDH)mRNA的水平。

[1241] 表38:ALAS1 siRNA双链体的序列

[1242]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
5164	5165	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
5166	5167	873-895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5168	5169	873-895	AD-60419	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5170	5171	873-895	AD-60445	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5172	5173	873-895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5174	5175	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5176	5177	871-893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5178	5179	871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu

[1243] 如图43中所示，与亲本AD-58632相比，AD-58632衍生物siRNA D-60892、AD-60419、AD-60445、和AD-60925显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。此外，与亲本AD-60489相比，AD-60489衍生物siRNA AD-60519和AD-60901显示出提高的ALAS1 mRNA抑制。

[1244] 实例31：使用AD-60519和AD-60489的多剂量给药的研究

[1245] 在大鼠AIP模型中，研究AD-60519的治疗效力。实验设计示于图44(顶部)中。每周两次用2.5mg/kg或5mg/kg的PBS或LAS1-GalNAc siRNA治疗大鼠，持续三周。以在图44中所指示的时间给予苯巴比妥(Phenobarb)和以AF11LNP配制品的PBGD siRNA。对照组接受了仅有PBS和PBGD siRNA，没有苯巴比妥诱导。在研究的第18-19天收集尿。

[1246] 结果显示于图44(底部)中。与仅有PBS相比，给予苯巴比妥和PBS诱导ALAS1 mRNA表达、和尿中PBG和ALA水平的增加(参见图44)。每周两次总计六次的2.5或5mg/kg的AD-60519的治疗抑制了苯巴比妥诱导尿PBG和尿ALA的增加(图44)。这些结果证实，当给予低至2.5mg/kg的重复剂量时，AD-60519在抑制ALA和PBG方面是有效的。具体地而言，在大鼠AIP模型中，AD-60519在减少与急性发作相关的PBG和ALA的尿水平的增加方面是有效的。

[1247] 在另外的研究中(使用相同的实验设计但是在小鼠模型中，参见图44顶部的原理图)，研究AD-60519和AD-60489在抑制苯巴比妥诱导血清PBG和ALA的增加方面的治疗效力。在PBS(“盐水”)对照组，与仅有PBS相比，给予苯巴比妥增加血清中PBG和ALA的水平(参见图45)。每周两次总计六次的2.5或5mg/kg的AD-60519或AD-60489的治疗抑制了苯巴比妥诱导血清PBG和血清ALA的增加(图44)。这些结果证实，当给予低至2.5mg/kg的重复剂量时，AD-60519和AD-60489在抑制ALA和PBG方面都是有效的。具体地而言，AD-60519和AD-60489在减少与急性发作相关的血清PBG和ALA的增加方面是有效的。

[1248] 因为该实例中的治疗是在苯巴比妥诱导前给予，这些结果指示出AD-60519和AD-60489具有预防的作用。

[1249] 实例32：另外的siRNA序列

[1250] 还已经产生了以下AD-58632衍生物(表39)和AD-60489衍生物(表40)siRNA序列。

[1251] 表39：AD-58632衍生物序列

[1252]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5’-3’）	反义序列（5’-3’）
5180	5181	873-895	AD-60802	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5182	5183	873-895	AD-60824	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5184	5185	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5186	5187	873-895	AD-60843	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5188	5189	873-895	AD-60847	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5190	5191	873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5192	5193	873-895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5194	5195	873-895	AD-60823	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5196	5197	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5198	5199	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5200	5201	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5202	5203	873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5204	5205	873-895	AD-60853	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
5206	5207	873-895	AD-60839	gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5208	5209	873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
5210	5211	873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg

[1253]

5212	5213	873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
5214	5215	873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuucuuL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

[1254] 表40:AD-60489衍生物序列

[1255]

SEQ ID NO.:（有义）	SEQ ID NO.:（反义）	反义序列在NM_000688.4上的靶标位点	双链体名称	有义序列（5'-3'）	反义序列（5'-3'）
5216	5217	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5218	5219	871-893	AD-60879	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
5220	5221	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5222	5223	871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5224	5225	871-893	AD-60877	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5226	5227	871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
5228	5229	871-893	AD-60865	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5230	5231	871-893	AD-60861	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5232	5233	871-893	AD-60876	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5234	5235	871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu
5236	5237	871-893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96	usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu

[1256] 实例33:AD-60519的另外的多剂量给药研究

[1257] 在像实例31中使用的AIP模型中,研究AD-60519的治疗效果。实验设计示于图46(顶部)中。将大鼠每周一次用PBS或ALAS1-GalNAc siRNA以3mg/kg、1mg/kg、或0.3mg/kg进行治疗,持续四周(在第0天、第7天、第14天、和第21天的治疗)。以在图46中所指示的时间给予苯巴比妥(Phenobarb)和以AF11LNP配制品的PBGD siRNA。对照组接受了仅PBS和PBGD siRNA,没有苯巴比妥诱导。在研究的第25天收集尿。

[1258] 这些结果显示于图46(底部)中和图47中。与仅有PBS相比,给予苯巴比妥和PBS诱导ALAS1 mRNA表达、和尿中PBG和ALA水平的增加。每周一次用总计四次剂量的3mg/kg、1mg/kg、或0.3mg/kg的AD-60519治疗以剂量依赖性方式抑制苯巴比妥诱导大鼠肝中ALAS1 mRNA水平的增加(参加图46)。(相对于大鼠GAPDH mRNA的水平,表达大鼠肝ALAS1(rALAS1)mRNA的水平。)尿PBG和尿ALA的水平还显示出了剂量依赖性治疗效果。

[1259] 在大鼠AIP模型中,AD-60519的重复周剂量在抑制ALAS1 mRNA表达和减少与诱导的急性发作相关的ALA和PBG的提升的水平方面是有效的。这些治疗效果是剂量依赖性的。这些结果说明了,当在发作前给药时,AD-60519可以起预防作用。

[1260] 实例34:在非人类灵长动物中ALAS1 siRNA GalNAc共轭物的多剂量作用

[1261] 在非人类灵长动物(NHP)研究中,研究ALAS1 siRNA GalNAc共轭物在抑制肝ALAS1 mRNA和循环性ALAS1 mRNA方面的作用。使用GalNAc共轭物AD-58632、AD-60519、AD-61193、和AD-60819。研究设计展示于表41中和图48中。

[1262] 表41:NHP研究设计

[1263]

<table>
<tr><th>测试品</th><th>组#</th><th>N</th><th>剂量水平（mg/kg）</th><th>剂量浓度（mg/mL）</th><th>剂量频率</th><th>剂量天数</th><th>剂量体积(mL/kg)</th><th>剂量途径</th></tr>
<tr><td>AD-58632</td><td>1</td><td>3</td><td>2.5</td><td>1.25</td><td>QDx5 WK1，BIW WK2-4</td><td rowspan="3">1，2，3，4，5，8，11，15，18，22，25</td><td rowspan="7">2</td><td rowspan="7">SC</td></tr>
<tr><td rowspan="4">AD-60519</td><td>2</td><td>3</td><td>1.25</td><td>0.625</td><td>QDx5 WK1，BIW WK2-4</td></tr>
<tr><td>3</td><td>3</td><td>2.5</td><td>1.25</td><td>QDx5 WK1，BIW WK2-4</td></tr>
<tr><td>4</td><td>3</td><td>2.5</td><td>1.25</td><td>QDx5 WK1，QW WK2-4</td><td rowspan="2">1，2，3，4，5，11，18，25</td></tr>
<tr><td>5</td><td>3</td><td>5</td><td>2.5</td><td>QDx5 WK1，QW WK2-4</td></tr>
<tr><td>AD-61193</td><td>6</td><td>3</td><td>2.5</td><td>1.25</td><td>QDx5 WK1，BIW WK2-4</td><td>1，2，3，4，5，8，11，15，18，22，25</td></tr>
<tr><td>AD-60819</td><td>7</td><td>3</td><td>2.5</td><td>1.25</td><td>QDx5 WK1，BIW WK2-4</td><td>1，2，3，4，5，8，11，15，18，22，25</td></tr>
</table>

[1264] 各组以2mg/ml的剂量体积接受ALAS1 siRNA GalNAc共轭物的多次皮下剂量。在第1、2、3、4、5、8、11、15、18、22、和25天，组1(n＝3)接受了2.5mg/kg的1.25mg/ml AD-58632。在第1、2、3、4、5、8、11、15、18、22、和25天，组2(n＝3)接受了1.25mg/kg的0.625mg/ml AD-60519。在第1、2、3、4、5、8、11、15、18、22、和25天，组3(n＝3)接受了2.5mg/kg的1.25mg/ml AD-60519。在第1、2、3、4、5、11、18、和25天，组4(n＝3)接受了2.5mg/kg的1.25mg/ml AD-60519。在第1、2、3、4、5、11、18、和25天，组5(n＝3)接受了5mg/kg的2.5mg/ml AD-60519。在第1、2、3、4、5、8、11、15、18、22、和25天，组6(n＝3)接受了2.5mg/kg的1.25mg/ml AD-61193。在第1、2、3、4、5、8、11、15、18、22、和25天，组7(n＝3)接受了2.5mg/kg的1.25mg/ml的AD-60819。

[1265] 在第-3、7、13、21、27、39、46、和60天(图48中，“PD抽取”指示收集血清的那些天)收集血清样品用于循环性细胞外RNA检测(cERD)测定(参见实例21)。针对临床化学组，在第-3、和6天收集血清。临床化学组包括评估丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、和碱性磷酸酯酶(ALP)的水平。从在第21天取的肝活检中获得的肝组织中，评估ALAS1 mRNA沉默(参见图48)。在血清抽取后进行活检。

[1266] 在肝中抑制ALAS1 mRNA水平

[1267] 在研究的第21天的肝ALAS 1 mRNA水平示于图49中。结果显示为在用PBS治疗的对照组中所观察到的平均水平百分比。结果显示为各治疗组的平均值。

[1268] 图49中呈现的这些结果证实，与接受PBS治疗的对照动物相比，所有治疗条件在抑制ALAS1 mRNA的肝水平方面是有效的。治疗实现了从约20％至80％范围的mRNA沉默(相应于对照水平的从约80％至20％范围的ALAS1 mRNA水平)。接受AD-58632的个体动物显示出约20％-50％的沉默，其中沉默的平均水平约40％(ALAS1 mRNA水平平均为对照水平的约

60%)。在所使用的所有这些给药方案的情况下,AD-60519在抑制ALAS1 mRNA水平方面是高度有效的。接受AD-60519的个体动物显示出在约60%和80%之间的沉默(ALAS1 mRNA水平是对照水平的约20%至40%)。通常,AD-60519治疗方案实现了在约65%和75%之间的沉默。如在此所披露的,AD-60519是AD-60489的衍生物。AD-60489的类似结果描述于实例20中,并且示于图30。此外,AD-61193(AD-60489的衍生物)和AD-60819(AD-58632的衍生物)也实现了超过50%的沉默。值得注意的是,实现了该实例和实例20中所报道的沉默的水平(例如,约20%至80%),即使在“非诱导”状态;所预料的是,在诱导状态中,例如,当ALAS1的水平是急性或长期升高的时(例如,在患有或处于卟啉症的风险的患者中,例如,急性肝性卟啉症,例如,AIP),较低的沉默水平,例如,ALAS1 mRNA水平减少至正常或发作前水平,可以足以实现治疗效果。

[1269] 抑制循环性细胞外ALAS1 mRNA水平

[1270] 图50显示出,当获得血清样品时,整个研究的各时间点的循环性细胞外ALAS 1 mRNA水平(平均值和标准偏差)。循环性细胞外ALAS 1 mRNA结果证实,在用所研究的各种siRNA(AD60519、AD-61193、AD-60819、和AD-58632)多剂量治疗后mRNA沉默的效力。在所有组中,在第25天的最后一次剂量的siRNA后,在第27天观察对循环性ALAS1 mRNA的最大抑制作用。在所有治疗组中,在停止治疗后的数周期间,ALAS1 mRNA水平逐渐增加并且在第60天通过最终测量恢复至基线。

[1271] 在组3(2.5mg/kg AD-60519QDx5,BIWx3)和组5(5mg/kg AD-60519,QDx5,QWx3)中,观察到循环性ALAS1 mRNA的最显著的抑制(近80%的最大沉默)。组2(1.25mg/kg AD-60519,QDx5,BIWx3)、组4(2.5mg/kg AD-60519,QDx5,QWx3)、组7(2.5mg/kg AD-60819,QDx5,BIWx3)、和组6(2.5mg/kg AD-61193,QDx5,BIWx3)也显示出良好的抑制,其中最大沉默(第27天)超过50%。在组1中,还实现了显著的沉默(在第27天超过30%)。

[1272] 这些结果与肝ALAS1 mRNA结果一致,并且证实AD-60519的有效活性。以低至1.25mg/kg的剂量水平,AD-60519提供了65%-75%沉默。

[1273] 在循环性和肝ALAS1 mRNA水平之间的关联

[1274] 图27示出肝中(左条)和血清中(右条)ALAS1 mRNA的水平。在肝中和在血清中测量的相对ALAS1 mRNA水平之间存在良好的相关性,指示出这些测量提供了一致的结果。

[1275] 实例35:使用尿cERD测定的AD-60519和AD-60589的大鼠单剂量研究,以监测ALAS1 mRNA抑制的持续时间

[1276] 在使用ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60489和AD-60519的大鼠中,进行单剂量研究。使用尿评估(用循环性细胞外RNA检测测定),监测这些GalNAc共轭物在抑制ALAS1 mRNA表达方面的效力。除了使用尿液样品之外,该测定与在实例21和34中使用的测定相似。将尿液样品冻干以将其浓缩。将冻干的尿重新悬浮于4ml dH2O中,并且涡旋混合。然后将该样品以4,000xg离心10-20分钟,以沉淀任何碎片。剩余步骤与实例21中描述的那些相似。

[1277] 给予大鼠组单剂量的10mg/kg的AD-60489或AD-60519。在整个研究中的各个时间点的ALAS1 mRNA的归一化的水平示于图51中。指示为“0小时”的时间点是仅在给予ALAS1 mRNA之前抽取的剂量给药前的基线尿液样品。后续时间点的结果表达为剂量给药前水平的分数。

[1278] 可以从图51中所示结果中看出,与AD-60489相比,所提供的AD-60519改进了效价。

以其最大程度，单剂量的AD-60519提供了高达约80％的抑制，然而由AD-60489所提供的抑制是约60％。这些ALAS1 siRNA的单次10mg/kg剂量在抑制ALAS1 mRNA的作用方面持续约21天。这些结果证实了，用于监测ALAS1 mRNA水平的尿cERD测定的有效性。

[1279] 实例36：在非人类灵长动物中AD-60519的药理学作用

[1280] 在非人类灵长动物中，进行了ALAS1 siRNA GalNAc共轭物AD-60519的作用的另外的研究。研究了每周与每两周给药的作用，负荷剂量与非负荷剂量的用途，以及在单剂量后ALAS1 mRNA沉默的动力学。研究设计示于表42中并且在图52中。

[1281] 表42：针对用AD-60519的研究的药理学研究设计

[1282]

<table>
<tr><th>组＃</th><th>N</th><th>剂量水平 (mg/kg)</th><th>剂量频率</th><th>材料需要 (mg) *</th><th>剂量体积 (mL/kg)</th><th>剂量天数</th><th>剂量浓度 (mg/mL)</th><th>剂量途径</th></tr>
<tr><td>1</td><td>3</td><td>2.5</td><td>QWx8Wks</td><td>210</td><td>0.125</td><td rowspan="2">1，8，15，22，29，36，43，50</td><td rowspan="7">20</td><td rowspan="7">SC</td></tr>
<tr><td>2</td><td>3</td><td>5</td><td>QWx8Wks</td><td>420</td><td>0.25</td></tr>
<tr><td>3</td><td>3</td><td>负荷-QDx3@ 5 mg/kg，维持-5 mg/kg</td><td>负荷 D1-D3，QWx7Wks</td><td>525</td><td>0.25/25</td><td rowspan="2">1，2，3，8，15，22，29，36，43，50</td></tr>
<tr><td>4</td><td>3</td><td>负荷-QDx3@5 mg/kg，维持-2.5 mg/kg</td><td>加载 D1-D3，QWx7Wks</td><td>270</td><td>0.25/0.125</td></tr>
<tr><td>5</td><td>3</td><td>5</td><td>BIWx8Wks</td><td>924</td><td>0.25</td><td>1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46、50、53</td></tr>
<tr><td>6</td><td>3</td><td>1</td><td>单剂量</td><td>12</td><td>0.05</td><td>1</td></tr>
<tr><td>7</td><td>3</td><td>10</td><td>单剂量</td><td>116</td><td>0.5</td><td>1</td></tr>
</table>

[1283] 各组接受如表42中所提供的AD-60519的一次或多次皮下剂量。组1(n＝3)每周一次以0.125ml/kg的剂量体积接受2.5mg/kg，持续8周(在第1、8、15、22、29、36、43、和50天给予剂量)。组2(n＝3)每周一次以0.25mg/ml的剂量体积接受5mg/kg，持续8周(在第1、8、15、22、29、36、43、和50天给予剂量)。组3(n＝3)每天一次接受以0.25ml/kg的剂量体积的5mg/kg，持续三天，随后以周一次以0.25ml/kg的剂量体积接受5mg/kg的维持剂量，持续7周(在第1、2、3、8、15、22、29、36、43、和50天给予剂量)。组4(n＝3)每天一次接受以0.25ml/kg的剂量体积的5mg/kg，持续三天，随后以周一次以0.125ml/kg的剂量体积接受2.5mg/kg的维持

剂量，持续7周(在第1、2、3、8、15、22、29、36、43、和50天给予剂量)。组5(n＝3)每周两次以0.25ml/kg的剂量体积接受5mg/kg，持续8周(在第1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46、50、和53天给予剂量)。组6(n＝3)在第1天以0.05ml/kg的剂量体积接受1mg/kg的单剂量。组7(n＝3)在第1天以0.5ml/kg的剂量体积接受10mg/kg的单剂量。

[1284] 如在图52中和在表43中所指示的，收集血清样品(在图52中列为“PD抽取”)、血浆样品(在图52中列为“PK抽取”)和尿液样品。将尿和血清样品经历cERD测定。在肝活检之前收集在肝活检的那天收集的所有的血液和尿液样品。

[1285] 表43:样品收集时间表

[1286]

<table>
<tr><th colspan="2">用于 mRNA 检测的血清</th><th colspan="2">肝活检</th><th colspan="2">用于示例性 mRNA 检测的尿**</th><th colspan="2">针对 PK 的血浆</th></tr>
<tr><td>组 1-4</td><td>第-3 天，和第 5、10、17、24、31、38、45、52、57、64、78、92 天</td><td>组 1-5</td><td>第 24 天*</td><td rowspan="2">组 1-5</td><td rowspan="2">第-3 天，和第 24*、52 天</td><td rowspan="3">组 7</td><td rowspan="3">第-3 天，和第 1 天的 0.25、0.5、1、2、4、8、12 小时和第 2，3，4，5，6，8，9，15，22，29，36 天</td></tr>
<tr><td>组 5</td><td>第-3 天，和第 3、10、17、24、31、38、45、52、60、67、81、95 天</td><td rowspan="2">组 6-7</td><td rowspan="2">第 4 天*</td></tr>
<tr><td>组 6-7</td><td>第-3 天，和第 2、4、6、9、15、22、29、36 天</td><td>组 6-7</td><td>第-3 天，和第 4*、36 天</td></tr>
<tr><td colspan="8">*在肝活检之前收集所有血液样品和尿
**晨尿收集</td></tr>
</table>

[1287] 肝ALAS1 mRNA结果示于图53中。在所有研究条件下，实现了显著的ALAS1 mRNA抑制。使用AD-60519，在整个多次剂量方案中，实现了高达75％-80％ALAS1沉默。在单剂量后三天，用1mg/kg的单剂量实现了约15％的沉默，并且用10mg/kg的单剂量实现了约70％的沉默(参见图53)。比较来自组1和7的数据披露了在相同累积量(给予了30mg)的单剂量(在组7中)与多剂量(组1)后动力学的轻微差异，如在组7中剂量后3天和在组1中第四次剂量后两天所评估的。具体地而言，在单剂量后观察到较大的沉默(在组7中平均约70％的沉默与在组1中平均约45％的沉默)。参见图54。在大鼠研究中也观察到这种类型的结果。

[1288] 直到第22天，血清ALAS1 mRNA结果示于图54(顶部)中。在肝ALAS1 mRNA、血清ALAS1 mRNA、和血浆ALAS1 mRNA之间的关联示于图55中。这些结果证实在肝、血清、和尿ALAS1 mRNA水平之间的良好的关联。这些结果还提供了证实AD-60519的有效活性的另外的证据。在整个所有多剂量的剂量方案中，在所有剂量水平都观察到了55％-75％的沉默。给予负荷剂量(每天一次，持续3天，如在组3和4中)导致ALAS1 mRNA的稍微更快速下调。每周接受(组1和2)或每两周接受(组5)剂量的组最终显示出ALAS1 mRNA抑制的可比较水平，这说明随着时间的积累提供了持续性敲低。

[1289] 在单剂量后显示出ALAS1 mRNA沉默的动力学的结果示于图54(底部)中。在1mg/kg组中,到第6天观察到约20%的ALAS1 mRNA抑制。在10mg/kg组中,到第4天存在快速、约70%ALAS1 mRNA减少,其中在第22天(剂量后第21天)恢复至基线的20%以内。在1mg/kg或10mg/kg单剂量后2周或4周后,血清ALAS1 mRNA水平分别恢复至基线。

[1290] 在给予AD-60519后长达8周,血清ALAS mRNA的全部时程示于图56中。ALN-AS1给药5至8周后,所有组到达最大80%ALAS1 mRNA抑制。在第1周内具有三次日剂量的组(QDx3),比在第一周中仅给药一次(QWx8)具有ALAS1 mRNA抑制的更快发生。在最后一次给药后约30-40天,所有动物恢复至基线ALAS1水平。

[1291] 实例37:siRNA药物产品的生产

[1292] ALN-60519(图57)是一种化学上合成的双链的寡核苷酸,该寡核苷酸共价连接至包含三种N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的配体。所有的核苷酸都是2'-OMe或2'-F修饰的并且都是通过3'-5'磷酸二酯键连接的,因此形成寡核苷酸的糖-磷酸骨架。有义链和反义链分别包含21个和23个核苷酸。将有义链的3'-端通过磷酸二酯键共轭至三触角的GalNAc部分(称为L96)。反义链包含四个硫代磷酸酯键-两个在3'端并且两个在5'端。有义链在5'端包含两个硫代磷酸酯键。有义链的21个核苷酸与反义链的互补的21个核苷酸杂交,因此在反义链的3'端形成21个核苷酸碱基对以及二碱基突出端。在5'-羟基作为二甲氧基三苯甲基(DMT)醚被保护的情况下,使用标准亚磷酰胺化学,通过常规的固相寡核苷酸合成来合成两个单链(有义链和反义链)。各链按顺序添加所保护的核苷亚磷酰胺,从3'至5'末端进行组装。

[1293] AD-60519,在此还称ALN-60519,配制为用于皮下使用的注射溶液,该溶液在此称为ALN-AS1。ALN-60519溶解于注射用水(WFI),并且调节pH(靶标7.0)。确定ALN-60519的浓度,并且通过添加WFI进行调节。然后将具有约200mg/mL的终浓度的溶液进行过滤消毒,并且填充到2mL类型I小玻璃瓶中。选择约0.55mL的填充体积,以允许0.5mL的药物产品的完全提取。

[1294] 实例38:使用cERD方法,在AIP患者或健康志愿者中,测量血清或尿ALAS1 mRNA水平

[1295] 使用ALN-AS1的非人类灵长动物药理学研究指示出,用于测量血清或尿中ALAS1 mRNA的循环性细胞外RNA检测(cERD)方法是稳健的并且是可再现的。还将该cERD测定用来测量来自AIP患者和健康志愿者的血清和尿中的ALAS1 mRNA水平。相对于健康志愿者,血清ALAS1 mRNA水平在AIP患者中普遍是增加的,与ALAS1诱导在疾病病理生理学中发挥的作用一致(图58)。重要的是,ALAS1在相同患者中的血清和尿中的水平彼此相关。在具有多次收集尿和血清的两个患者中,ALAS1 mRNA水平随着时间是一致的。共同地,这些数据指示出,可以在来自人类受试者(包括AIP患者)的血清和尿样品中测量ALAS1 mRNA,并且该cERD方法用于跟踪ALN-AS1的药效动力学活性。

[1296] 实例39:示例性临床研究

[1297] 可以进行人类研究,当作为单剂量和多剂量向无症状的高排菌者(ASHE)的AIP患者(具有ALA和/或PBG的提高的水平的患者,如在此描述的)或反复发作的AIP患者给予时,以确定ALN-AS1的安全性和耐受性。

[1298] 次要目的包括ALN-AS1的血浆和尿的表征,连同ALN-AS1对血浆和尿ALA和PBG水平

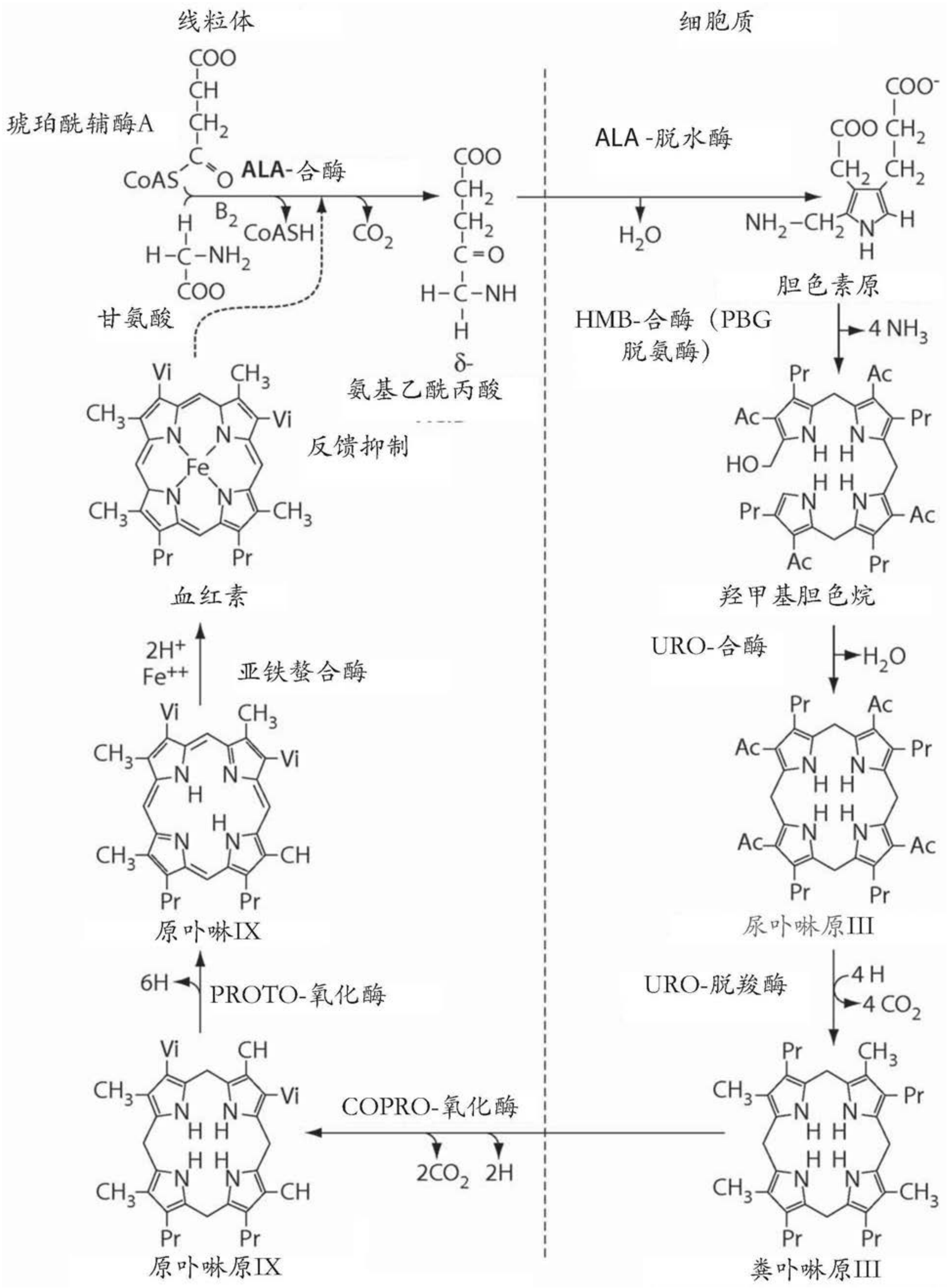
的影响的剂量后评估。使用测量外排体中的mRNA的cERD测定来测量血清(或血浆)和尿的5-氨基乙酰丙酸合酶(ALAS-1mRNA)。

[1299] 在无症状的高排菌者中,以单剂量(例如,以0.1、0.35、1.0、或2.5mg/kg)或以多次周剂量(例如,1和2.5mg/kg)给予ALN-AS1持续若干周(例如,持续4周)。作为比较,给予对照(例如,安慰剂)治疗。评估药物对ALA和PBG水平的安全性、药物代谢动力学和作用。可以选择将ALA和PBG降低至正常参考范围内的ALN-AS1的剂量(例如,将ALA和/或PBG归一化至2x上限参考值以下的水平的剂量)用于后续研究,例如,在AIP患者中。

[1300] 在AIP患者中,在给药前准备期过程中(例如,12周)评估发作率和基线症状。给予患者ALN-AS1,例如,每周以1-2.5mg/kg的剂量。评估药物对ALA和PBG水平的安全性、药物代谢动力学和作用。此外,监测发作次数、血红素使用、止痛药使用、和住院的变化。

[1301] 等效物

[1302] 利用不超出常规的实验,本领域技术人员将认识到,或将能够确定在此所描述的本发明具体实施例的许多等效物。此类等同物意在由以下权利要求书涵盖。



线粒体
细胞质
琥珀酰辅酶A
CoAS
ALA-合酶
B_2
CoASH
CO_2
甘氨酸
δ-
氨基乙酰丙酸
ALA -脱水酶
H_2O
胆色素原
HMB-合酶（PBG
脱氨酶）
$4\ NH_3$
反馈抑制
血红素
羟甲基胆色烷
URO-合酶
H_2O
$2H^+$
Fe^{++}
亚铁螯合酶
尿卟啉原III
原卟啉IX
6H
PROTO-氧化酶
URO-脱羧酶
4 H
$4\ CO_2$
COPRO-氧化酶
$2CO_2$
2H
原卟啉原IX
粪卟啉原III

图1

酶， 染色体定位	催化的反应	相关的卟啉症	卟啉症的类型	典型的遗传模式	典型的症状
δ-氨基乙酰丙酸（ALA）合酶1 3p21	甘油+琥珀酰辅酶A ↓ δ-氨基乙酰丙酸 (ALA)				
氨基乙酰丙酸（ALA）合酶2 (ALAS2) （红细胞特异性） Xp11.21	甘油+琥珀酰辅酶A ↓ δ-氨基乙酰丙酸 (ALA)	X-连锁的铁粒幼细胞贫血（XLSA）， X-连锁的原卟啉症 (XLP)	红细胞生成性的	X-连锁的	
δ-氨基乙酰丙酸脱水酶 (ALAD) 9q34	δ-氨基乙酰丙酸 (ALA) ↓ 胆色素原(PBG)	ALA脱水酶缺陷 卟啉症（ADP或Doss卟啉症）	肝的	常染色体隐性	腹痛、神经病变
PBG脱氨酶 (PBGD) 或 羟甲基胆色烷合酶 (HMBS) 11q23	胆色素原(PBG) ↓ 羟甲基胆色烷 (HMB)	急性间歇性卟啉症（AIP）	肝的	常染色体显性	定期腹痛、外周神经病变、精神障碍、心动过速

图2A

尿卟啉原III合酶 (UROS) 10q26	羟甲基胆色烷 ↓ 尿卟啉原III (URO)	先天性红细胞生成性卟啉症（CEP）	红细胞生成性的	常染色体隐性	具有红斑的严重光过敏，肿胀和发疱。溶血性贫血，脾肿大
尿卟啉原脱羧酶 (UROD) 1q34	尿卟啉原III (URO) ↓ 粪卟啉原III	迟发性皮肤卟啉症（PCT）	肝的	常染色体显性或零星性	具有的囊泡和大疱的光过敏
粪卟啉原III氧化酶 (CPOX)3q12	粪卟啉原III (COPRO) ↓ 原卟啉原IX	遗传性粪卟啉病 (HCP)	肝的	常染色体显性	光过敏，神经性症状，绞痛
原卟啉原氧化酶 (PPOX) 1q14	原卟啉原IX (PROTO) ↓ 原卟啉IX	杂斑卟啉症（VP）	混合的	常染色体显性	光过敏，神经性症状，发育迟滞
亚铁螯合酶 18q21.3	原卟啉IX ↓ 血红素	红细胞生成性原卟啉症 (EPP)	红细胞生成性的	常染色体隐性	具有皮肤损害的光过敏。胆石症，轻度肝脏异常

图2B

1 ctgtatatta aggcgccggc gatcgcggcc tgaggctgct cccggacaag ggcaacgagc
61 gtttcgtttg gacttctcga cttgagtgcc cgcctccttc gccgccgcct ctgcagtcct
121 cagcgcagtt atgcccagtt cttcccgctg tggggacacg accacggagg aatccttgct
181 tcagggactc gggaccctgc tggacccctt cctcgggttt aggggatgtg gggaccagga
241 gaaagtcagg atccctaaga gtcttccctg cctggatgga tgagtggctt cttctccacc
301 tagattcttt ccacaggagc cagcatactt cctgaacatg gagagtgttg ttcgccgctg
361 cccattctta tcccgagtcc cccaggcctt tctgcagaaa gcaggcaaat ctctgttgtt
421 ctatgcccaa aactgcccca agatgatgga agttggggcc aagccagccc ctcgggcatt
481 gtccactgca gcagtacact accaacagat caaagaaacc cctccggcca gtgagaaaga
541 caaaactgct aaggccaagg tccaacagac tcctgatgga tcccagcaga gtccagatgg
601 cacacagctt ccgtctggac accccttgcc tgccacaagc cagggcactg caagcaaatg
661 ccctttcctg gcagcacaga tgaatcagag aggcagcagt gtcttctgca aagccagtct
721 tgagcttcag gaggatgtgc aggaaatgaa tgccgtgagg aaagaggttg ctgaaacctc
781 agcaggcccc agtgtggtta gtgtgaaaac cgatggaggg gatcccagtg gactgctgaa
841 gaacttccag gacatcatgc aaaagcaaag accagaaaga gtgtctcatc ttcttcaaga
901 taacttgcca aaatctgttt ccacttttca gtatgatcgt ttctttgaga aaaaaattga
961 tgagaaaaag aatgaccaca cctatcgagt ttttaaaact gtgaaccggc gagcacacat
1021 cttccccatg gcagatgact attcagactc cctcatcacc aaaaagcaag tgtcagtctg
1081 gtgcagtaat gactacctag gaatgagtcg ccacccacgg gtgtgtgggg cagttatgga
1141 cactttgaaa caacatggtg ctggggcagg tggtactaga aatatttctg gaactagtaa
1201 attccatgtg gacttagagc gggagctggc agacctccat gggaaagatg ccgcactctt
1261 gttttcctcg tgctttgtgg ccaatgactc aaccctcttc accctggcta agatgatgcc
1321 aggctgtgag atttactctg attctgggaa ccatgcctcc atgatccaag ggattcgaaa
1381 cagccgagtg ccaaagtaca tcttccgcca caatgatgtc agccacctca gagaactgct
1441 gcaaagatct gacccctcag tccccaagat tgtggcattt gaaactgtcc attcaatgga
1501 tggggcggtg tgcccactgg aagagctgtg tgatgtggcc catgagtttg gagcaatcac
1561 cttcgtggat gaggtccacg cagtggggct ttatggggct cgaggcggag ggattgggga
1621 tcgggatgga gtcatgccaa aaatggacat catttctgga acacttggca aagcctttgg
1681 ttgtgttgga gggtacatcg ccagcacgag ttctctgatt gacaccgtac ggtcctatgc
1741 tgctggcttc atcttcacca cctctctgcc acccatgctg ctggctggag ccctggagtc
1801 tgtgcggatc ctgaagagcg ctgagggacg ggtgcttcgc cgccagcacc agcgcaacgt
1861 caaactcatg agacagatgc taatggatgc cggcctccct gttgtccact gccccagcca
1921 catcatccct gtgcgggttg cagatgctgc taaaaacaca gaagtctgtg atgaactaat
1981 gagcagacat aacatctacg tgcaagcaat caattaccct acggtgcccc ggggagaaga
2041 gctcctacgg attgccccca cccctcacca cacaccccag atgatgaact acttccttga
2101 gaatctgcta gtcacatgga agcaagtggg gctggaactg aagcctcatt cctcagctga
2161 gtgcaacttc tgcaggaggc cactgcattt tgaagtgatg agtgaaagag agaagtccta
2221 tttctcaggc ttgagcaagt tggtatctgc tcaggcctga gcatgacctc aattatttca

图3A

```
2281 cttaacccca ggccattatc atatccagat ggtcttcaga gttgtcttta tatgtgaatt
2341 aagttatatt aaattttaat ctatagtaaa aacatagtcc tggaaataaa ttcttgctta
2401 aatggtg
     (SEQ ID NO:1)
```

图3B

```
   1 cagaagaagg cagcgcccaa ggcgcatgcg cagcggtcac tcccgctgta tattaaggcg
  61 ccggcgatcg cggcctgagg ctgctcccgg acaagggcaa cgagcgtttc gtttggactt
 121 ctcgacttga gtgcccgcct ccttcgccgc cgcctctgca gtcctcagcg cagttatgcc
 181 cagttcttcc cgctgtgggg acacgaccac ggaggaatcc ttgcttcagg gactcgggac
 241 cctgctggac cccttcctcg ggtttagggg atgtggggac caggagaaag tcaggatccc
 301 taagagtctt ccctgcctgg atggatgagt ggcttcttct ccacctagat tctttccaca
 361 ggagccagca tacttcctga acatggagag tgttgttcgc cgctgcccat tcttatcccg
 421 agtcccccag gcctttctgc agaaagcagg caaatctctg ttgttctatg cccaaaactg
 481 ccccaagatg atggaagttg gggccaagcc agcccctcgg gcattgtcca ctgcagcagt
 541 acactaccaa cagatcaaag aaacccctcc ggccagtgag aaagacaaaa ctgctaaggc
 601 caaggtccaa cagactcctg atggatccca gcagagtcca gatggcacac agcttccgtc
 661 tggacacccc ttgcctgcca caagccaggg cactgcaagc aaatgccctt tcctggcagc
 721 acagatgaat cagagaggca gcagtgtctt ctgcaaagcc agtcttgagc ttcaggagga
 781 tgtgcaggaa atgaatgccg tgaggaaaga ggttgctgaa acctcagcag gccccagtgt
 841 ggttagtgtg aaaaccgatg gaggggatcc cagtggactg ctgaagaact tccaggacat
 901 catgcaaaag caaagaccag aaagagtgtc tcatcttctt caagataact tgccaaaatc
 961 tgtttccact tttcagtatg atcgtttctt tgagaaaaaa attgatgaga aaaagaatga
1021 ccacacctat cgagttttta aaactgtgaa ccggcgagca cacatcttcc ccatggcaga
1081 tgactattca gactccctca tcaccaaaaa gcaagtgtca gtctggtgca gtaatgacta
1141 cctaggaatg agtcgccacc cacgggtgtg tggggcagtt atggacactt tgaaacaaca
1201 tggtgctggg gcaggtggta ctagaaatat ttctggaact agtaaattcc atgtggactt
1261 agagcgggag ctggcagacc tccatgggaa agatgccgca ctcttgtttt cctcgtgctt
1321 tgtggccaat gactcaaccc tcttcaccct ggctaagatg atgccaggct gtgagattta
1381 ctctgattct gggaaccatg cctccatgat ccaagggatt cgaaacagcc gagtgccaaa
1441 gtacatcttc cgccacaatg atgtcagcca cctcagagaa ctgctgcaaa gatctgaccc
1501 ctcagtcccc aagattgtgg catttgaaac tgtccattca atggatgggg cggtgtgccc
1561 actggaagag ctgtgtgatg tggcccatga gtttggagca atcaccttcg tggatgaggt
1621 ccacgcagtg gggctttatg gggctcgagg cggagggatt ggggatcggg atggagtcat
1681 gccaaaaatg gacatcattt ctggaacact tggcaaagcc tttggttgtg ttggagggta
1741 catcgccagc acgagttctc tgattgacac cgtacggtcc tatgctgctg gcttcatctt
1801 caccacctct ctgccaccca tgctgctggc tggagccctg gagtctgtgc ggatcctgaa
1861 gagcgctgag ggacgggtgc ttcgccgcca gcaccagcgc aacgtcaaac tcatgagaca
1921 gatgctaatg gatgccggcc tccctgttgt ccactgcccc agccacatca tccctgtgcg
1981 ggttgcagat gctgctaaaa acacagaagt ctgtgatgaa ctaatgagca gacataacat
2041 ctacgtgcaa gcaatcaatt accctacggt gccccgggga gaagagctcc tacggattgc
2101 ccccaccccc caccacacac cccagatgat gaactacttc cttgagaatc tgctagtcac
2161 atggaagcaa gtggggctgg aactgaagcc tcattcctca gctgagtgca acttctgcag
2221 gaggccactg cattttgaag tgatgagtga aagagagaag tcctatttct caggcttgag
```

图4A

2281 caagttggta tctgctcagg cctgagcatg acctcaatta tttcacttaa ccccaggcca
2341 ttatcatatc cagatggtct tcagagttgt ctttatatgt gaattaagtt atattaaatt
2401 ttaatctata gtaaaaacat agtcctggaa ataaattctt gcttaaatgg tgaaaaaa
(SEQ ID NO:382)

图4B

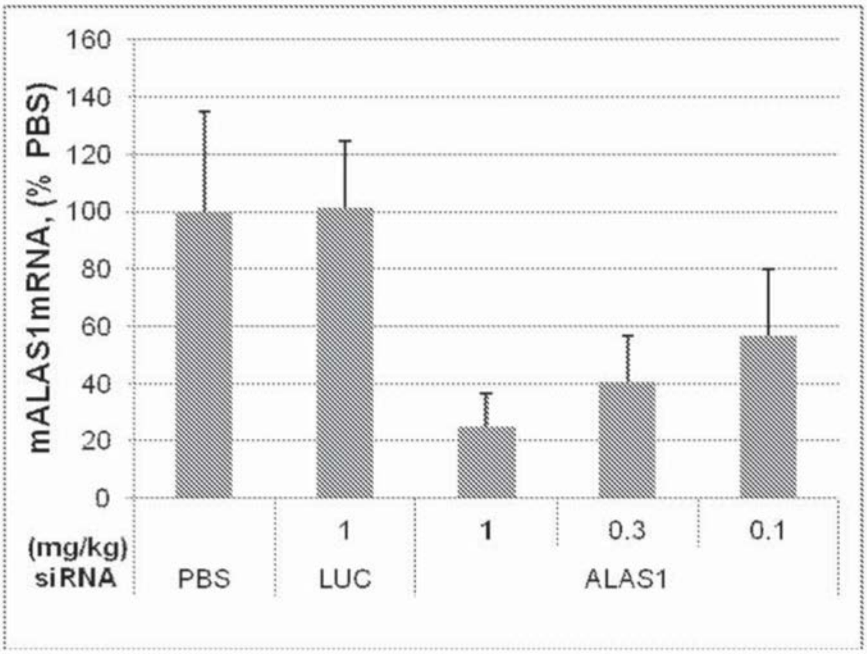


图5

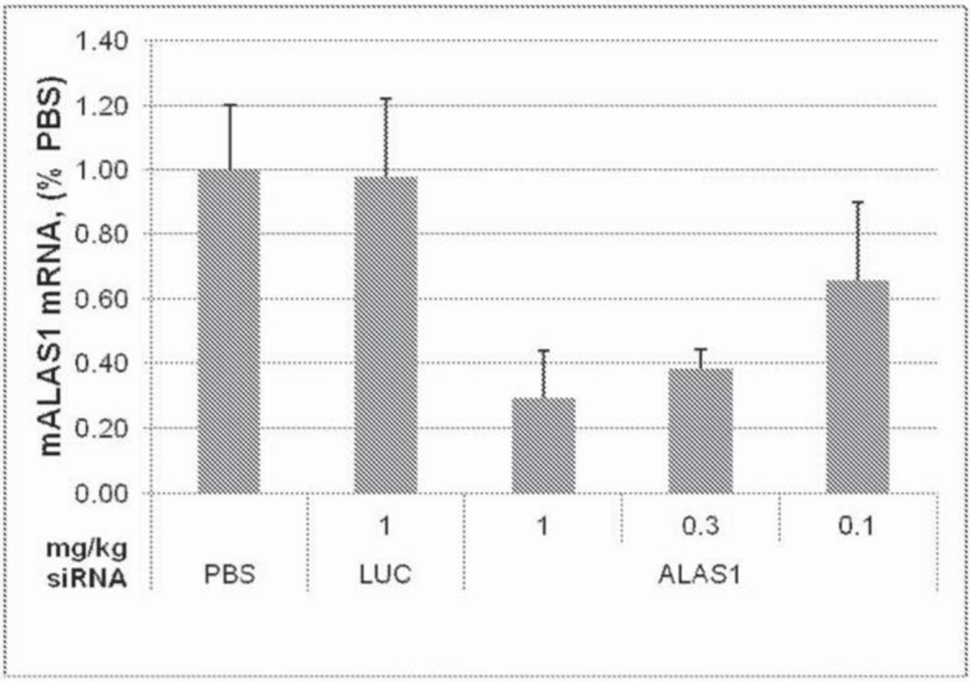

mALAS1 mRNA, (% PBS)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
mg/kg
siRNA
PBS
1
LUC
1
0.3
0.1
ALAS1

图6

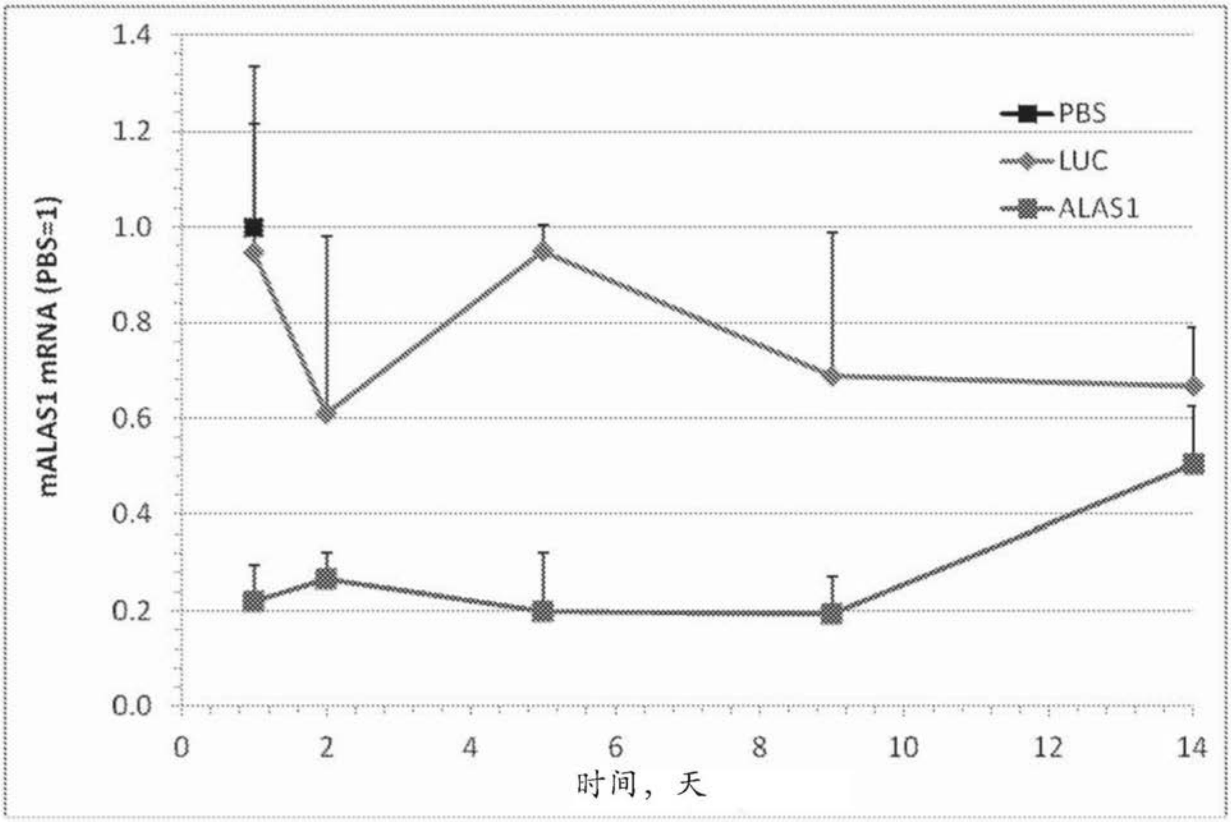

mALAS1 mRNA (PBS=1)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
时间，天
PBS
LUC
ALAS1

图7

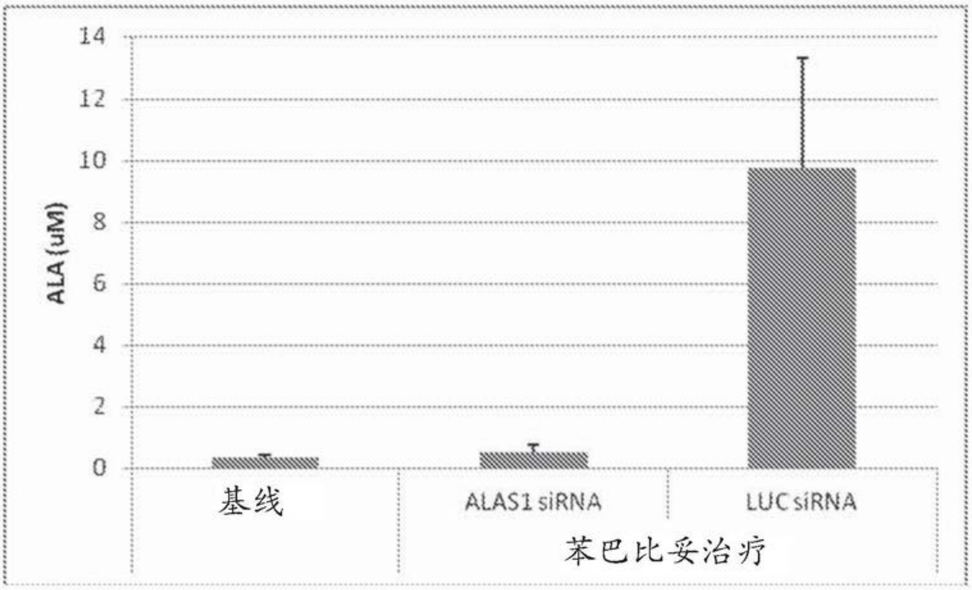

ALA (uM)
14
12
10
8
6
4
2
0
基线
ALAS1 siRNA
LUC siRNA
苯巴比妥治疗

图8

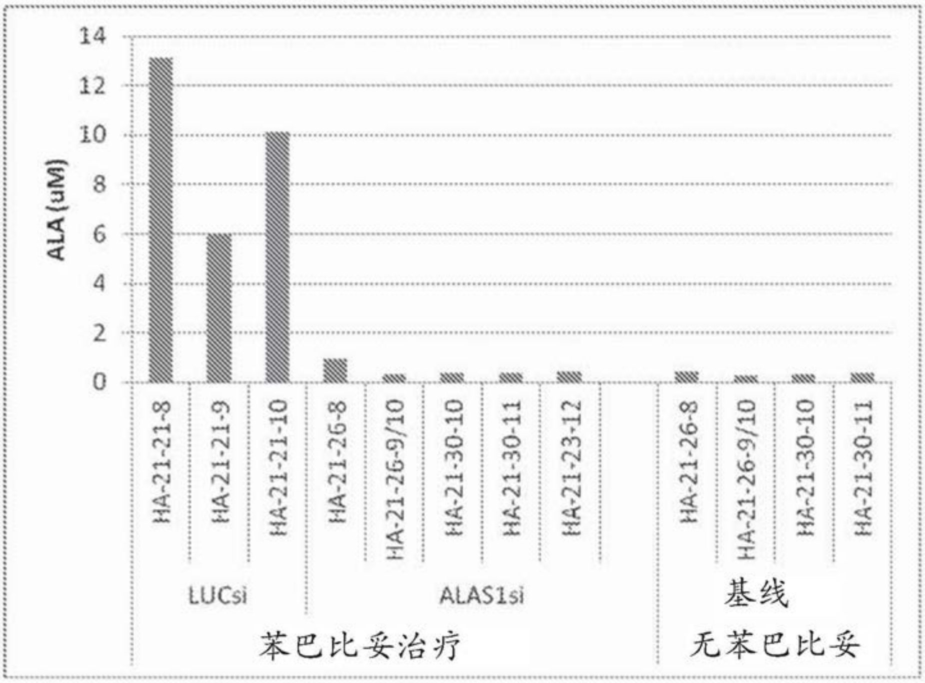

ALA (uM)
14
12
10
8
6
4
2
0
HA-21-21-8
HA-21-21-9
HA-21-21-10
HA-21-26-8
HA-21-26-9/10
HA-21-30-10
HA-21-30-11
HA-21-23-12
HA-21-26-8
HA-21-26-9/10
HA-21-30-10
HA-21-30-11
LUCsi
ALAS1si
基线
苯巴比妥治疗
无苯巴比妥

图9

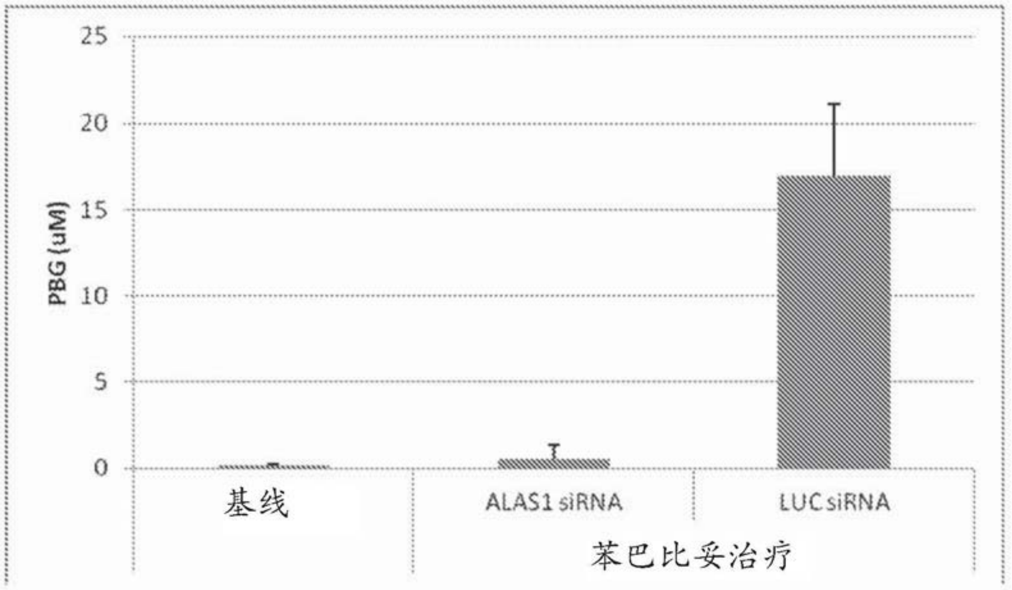

25
20
15
10
5
0
PBG (uM)
基线
ALAS1 siRNA
LUC siRNA
苯巴比妥治疗

图10

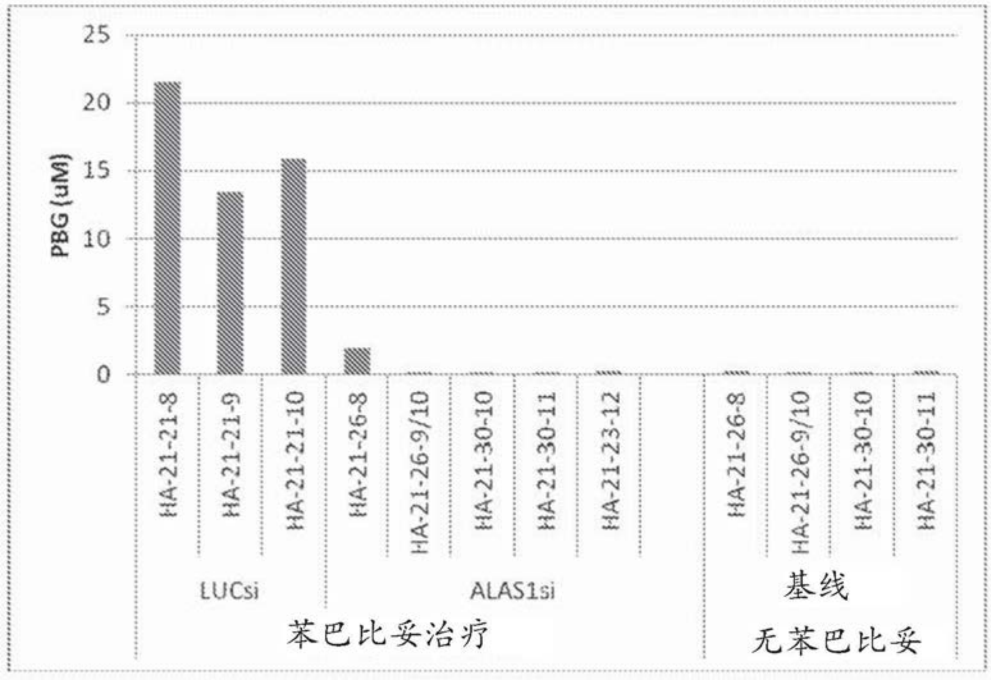

25
20
15
10
5
0
PBG (uM)
HA-21-21-8
HA-21-21-9
HA-21-21-10
HA-21-26-8
HA-21-26-9/10
HA-21-30-10
HA-21-30-11
HA-21-23-12
HA-21-26-8
HA-21-26-9/10
HA-21-30-10
HA-21-30-11
LUCsi
ALAS1si
基线
苯巴比妥治疗
无苯巴比妥

图11

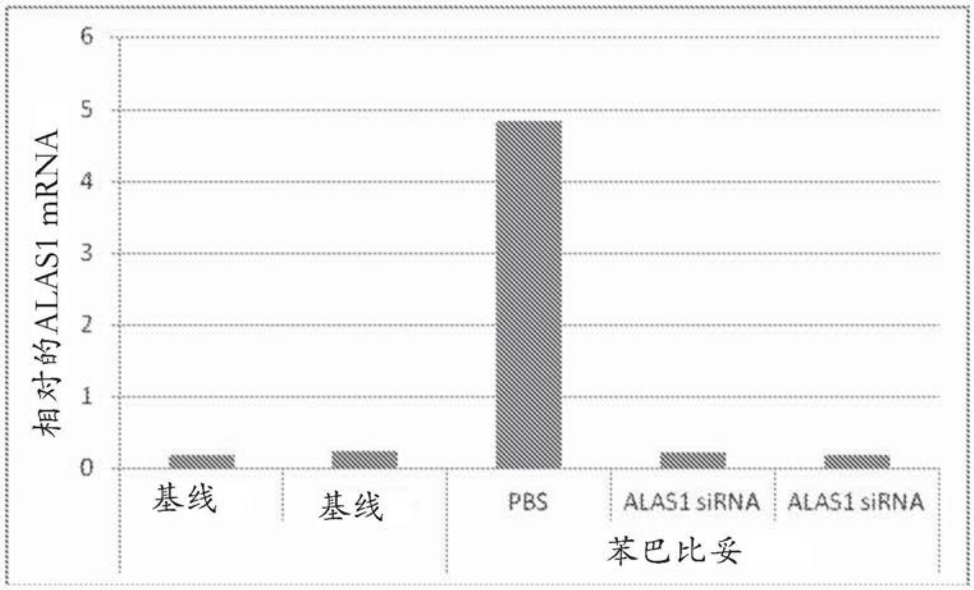

相对的ALAS1 mRNA
6
5
4
3
2
1
0
基线
基线
PBS
ALAS1 siRNA
ALAS1 siRNA
苯巴比妥

图12

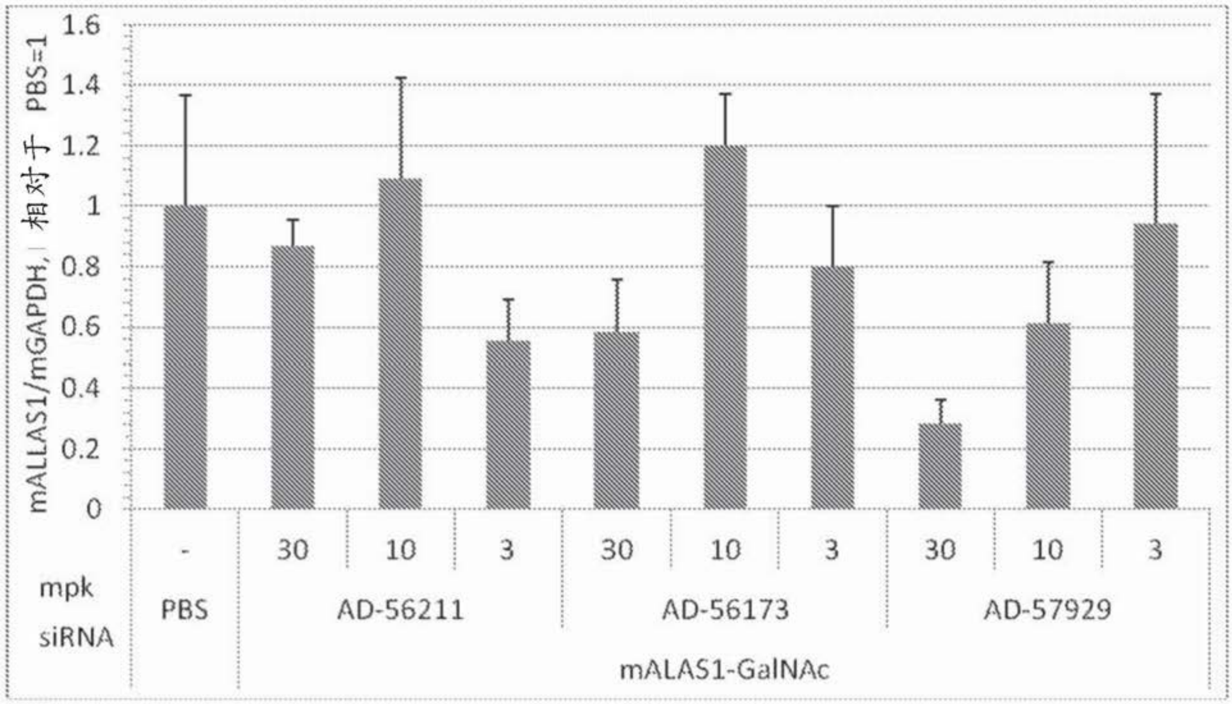

mALLAS1/mGAPDH, 相对于 PBS=1
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-
30
10
3
30
10
3
30
10
3
mpk
siRNA
PBS
AD-56211
AD-56173
AD-57929
mALAS1-GalNAc

图13

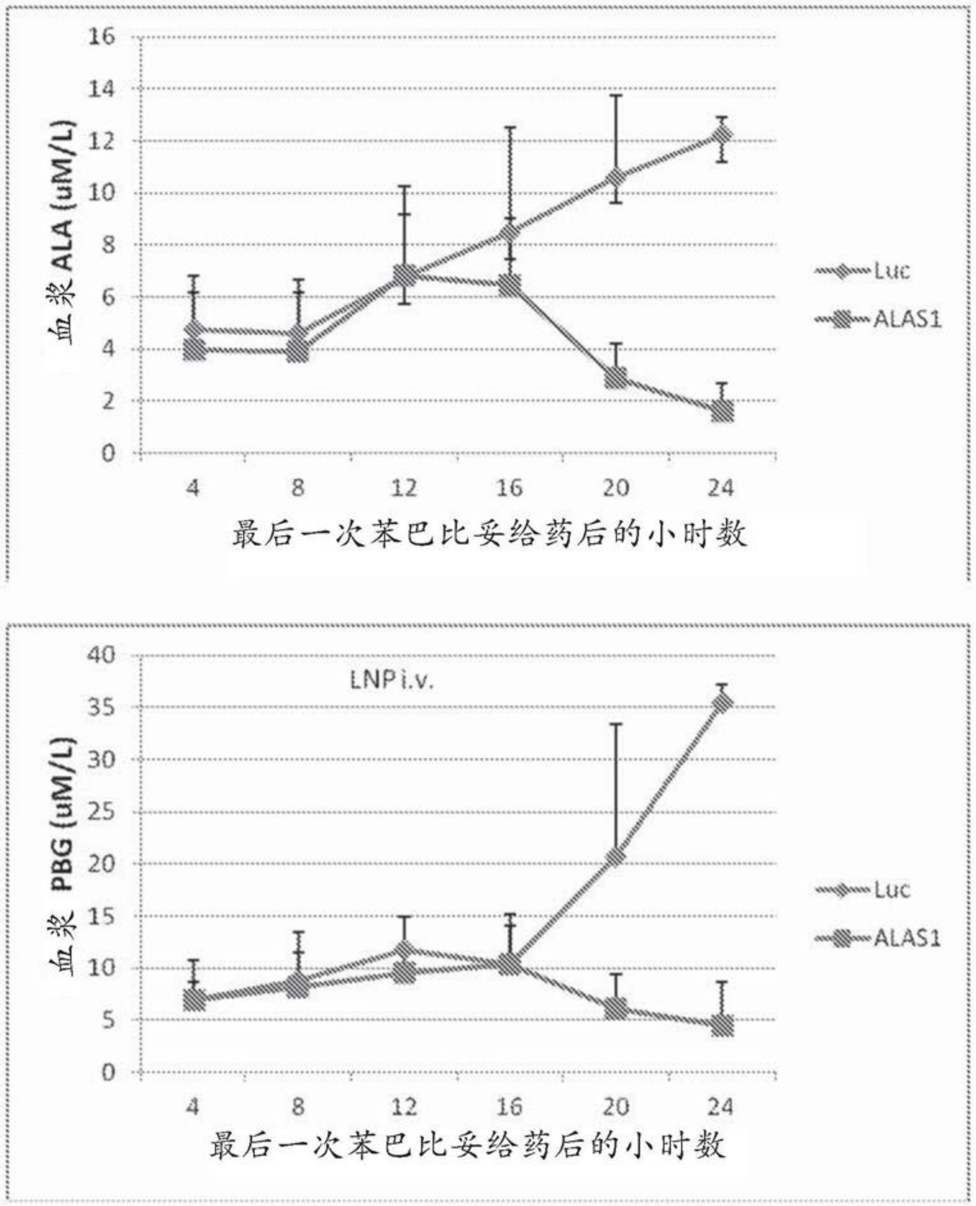

16
14
12
10
8
6
4
2
0
血浆 ALA (uM/L)
Luc
ALAS1
4
8
12
16
20
24
最后一次苯巴比妥给药后的小时数
40
35
30
25
20
15
10
5
0
LNP i.v.
血浆 PBG (uM/L)
Luc
ALAS1
4
8
12
16
20
24
最后一次苯巴比妥给药后的小时数

图14

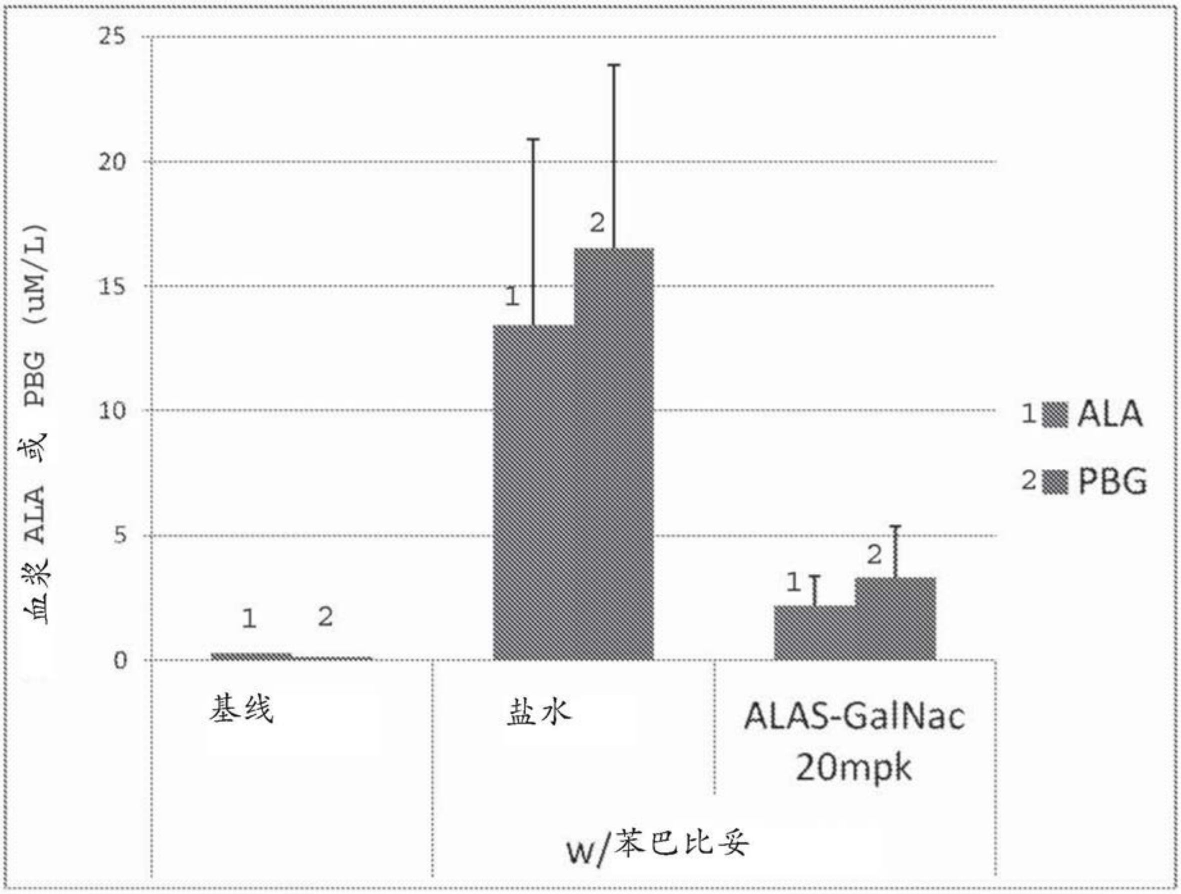

25
20
15
10
5
0
血浆 ALA 或 PBG (uM/L)
1 ALA
2 PBG
1
2
基线
盐水
ALAS-GalNac 20mpk
W/苯巴比妥

图15

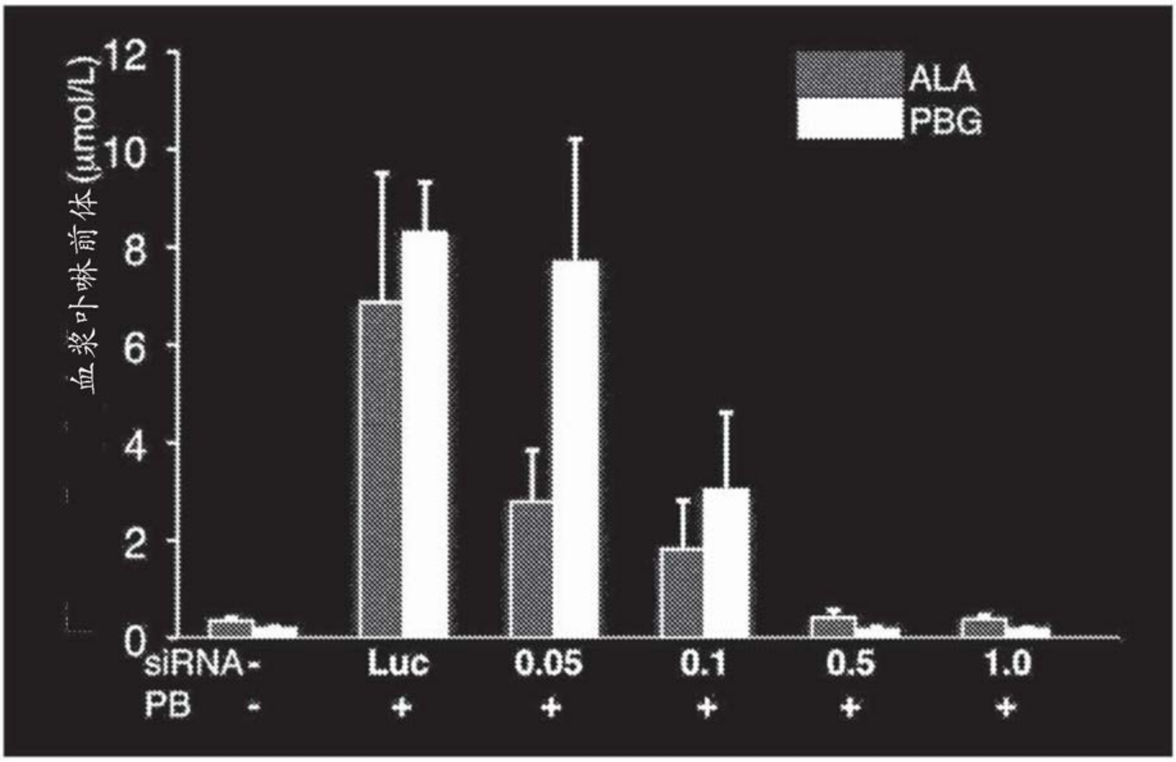


图16

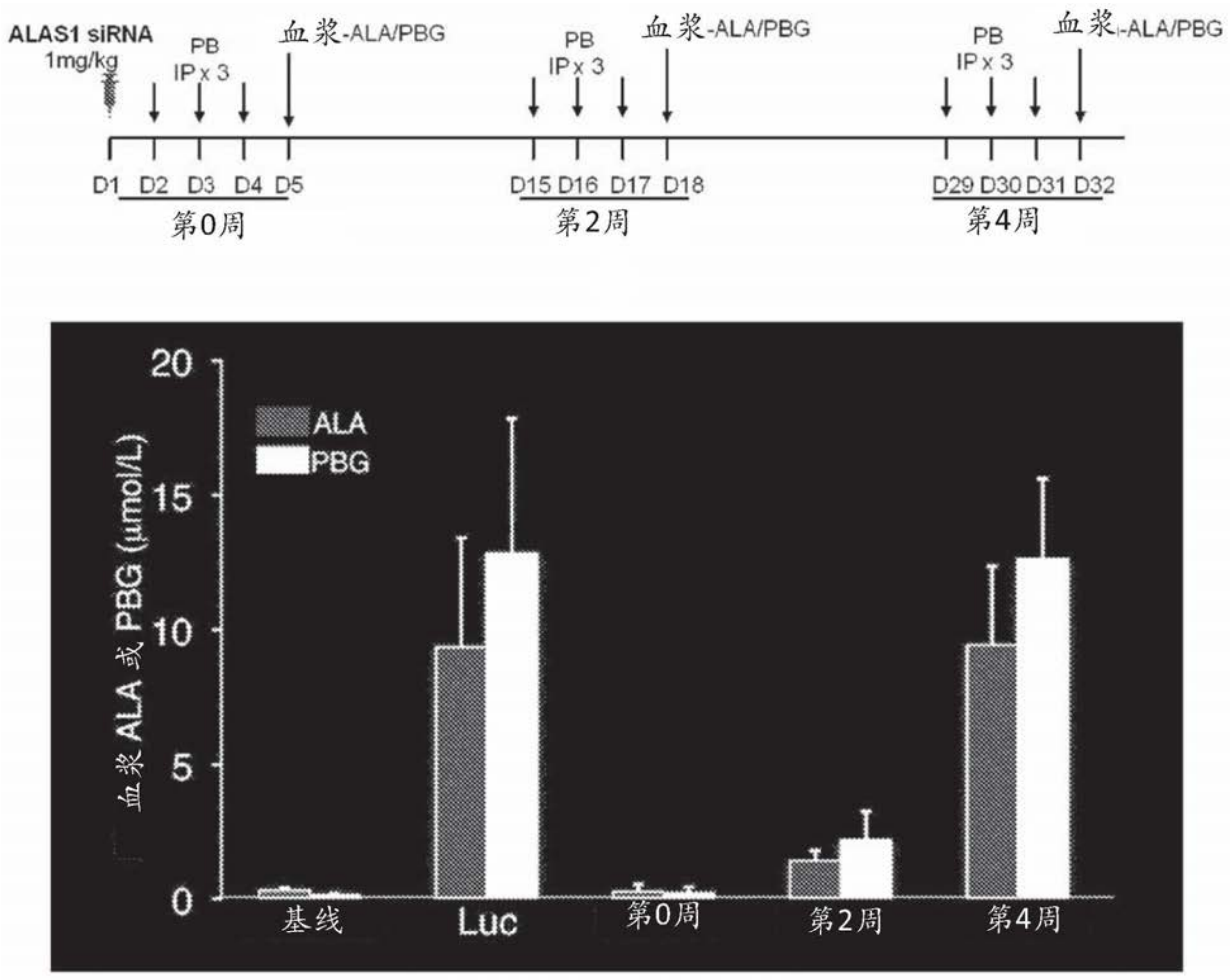

ALAS1 siRNA
1mg/kg
PB
IP x 3
血浆-ALA/PBG
D1 D2 D3 D4 D5
第0周
D15 D16 D17 D18
第2周
D29 D30 D31 D32
第4周
血浆 ALA 或 PBG (μmol/L)
20
15
10
5
0
ALA
PBG
基线
Luc
第0周
第2周
第4周

图17

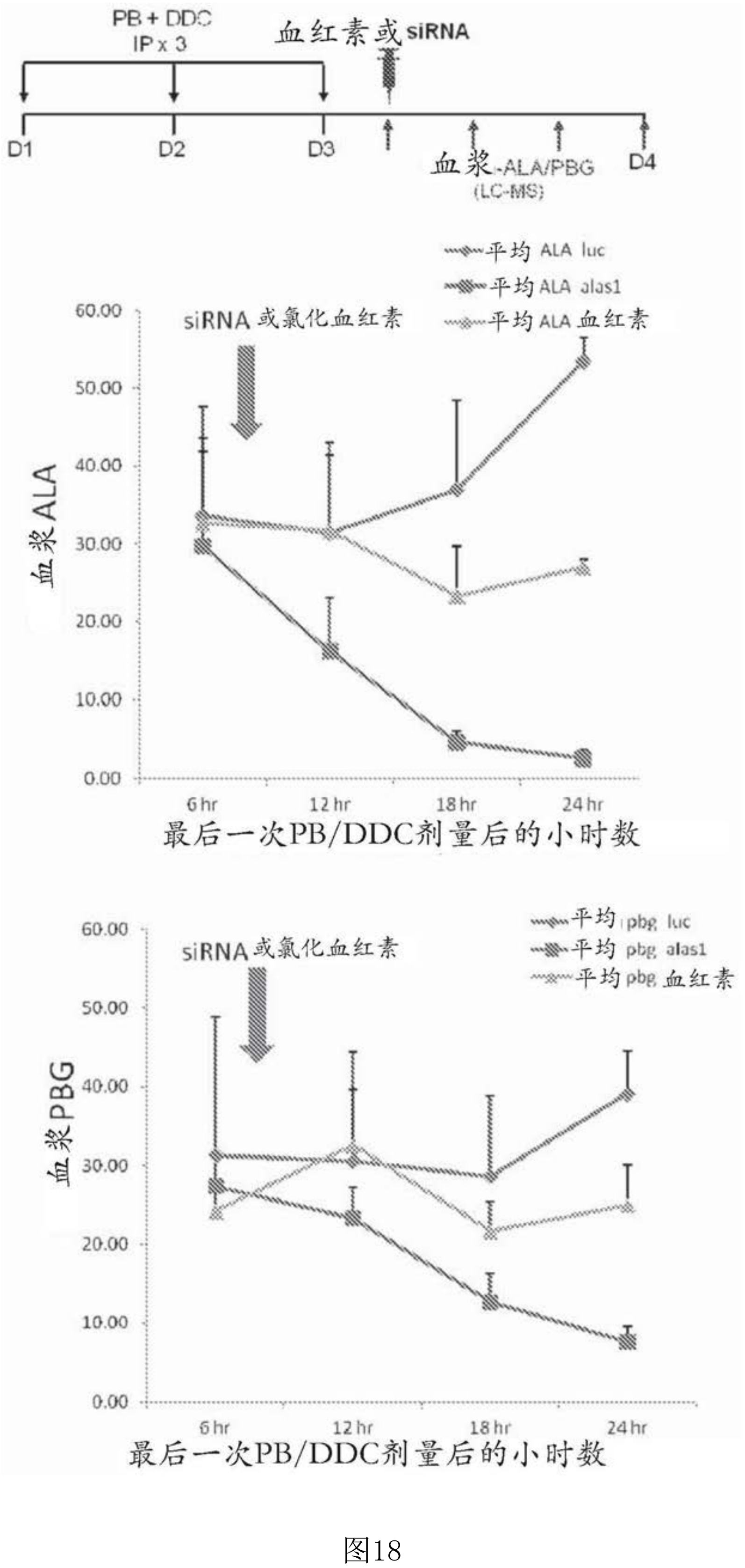

PB + DDC
IP x 3
血红素或siRNA
D1
D2
D3
D4
血浆-ALA/PBG
(LC-MS)
平均 ALA luc
平均 ALA alas1
平均 ALA 血红素
siRNA 或氯化血红素
血浆ALA
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
6 hr
12 hr
18 hr
24 hr
最后一次PB/DDC剂量后的小时数
平均 pbg luc
平均 pbg alas1
平均 pbg 血红素
siRNA 或氯化血红素
血浆PBG
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
6 hr
12 hr
18 hr
24 hr
最后一次PB/DDC剂量后的小时数

图18

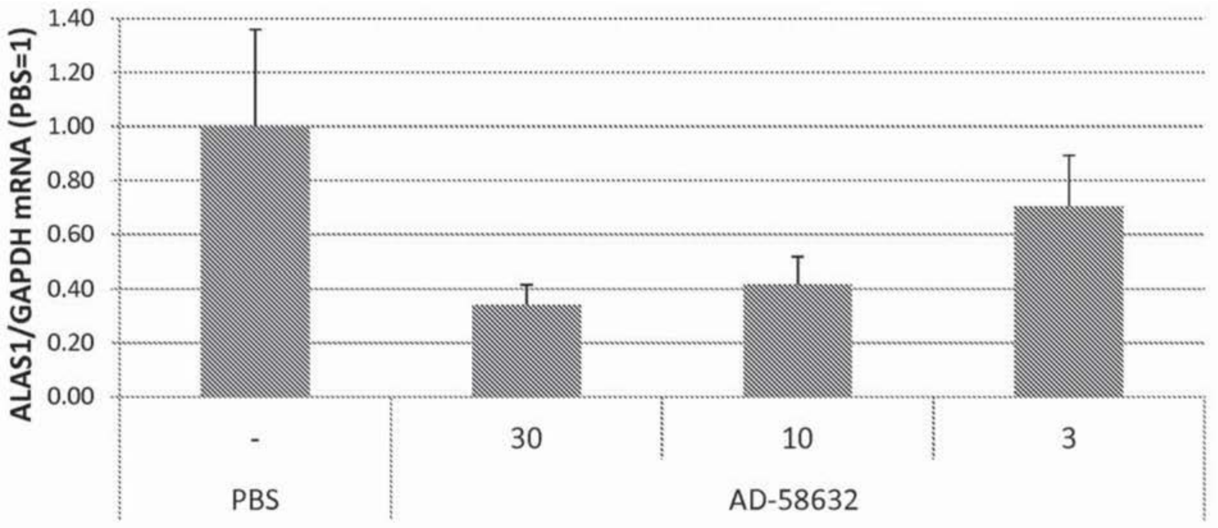

ALAS1/GAPDH mRNA (PBS=1)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
-
30
10
3
PBS
AD-58632

图19

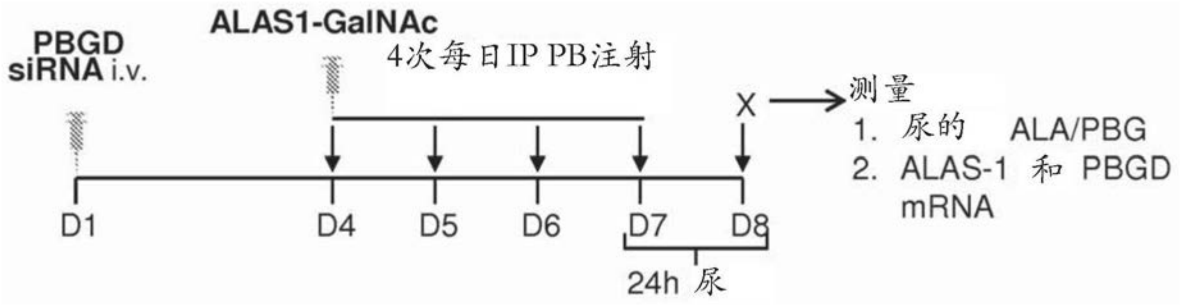

PBGD siRNA i.v.
ALAS1-GalNAc
4次每日IP PB注射
X
测量
1. 尿的 ALA/PBG
2. ALAS-1 和 PBGD mRNA
D1
D4
D5
D6
D7
D8
24h 尿

图20

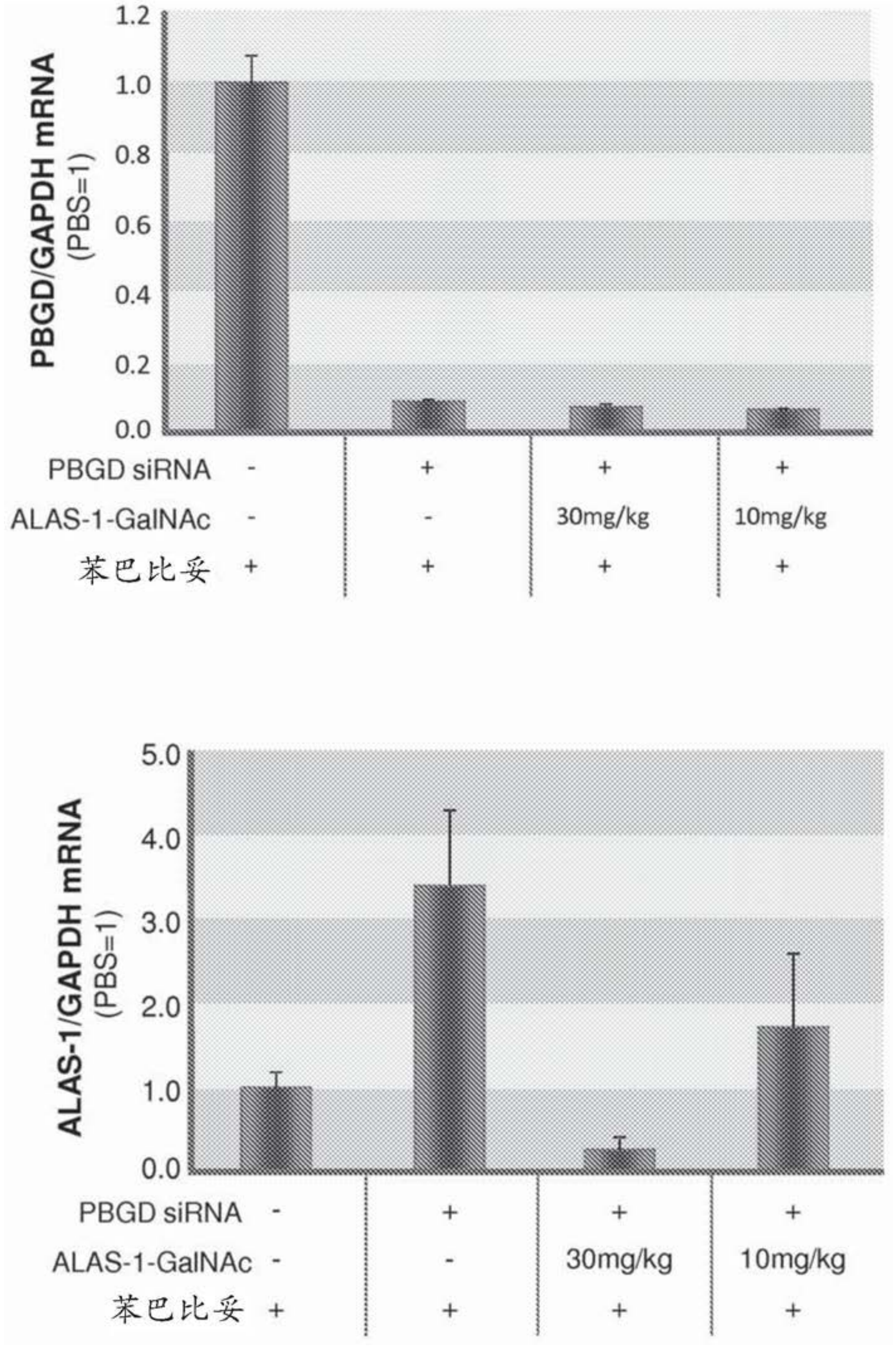

PBGD/GAPDH mRNA
(PBS=1)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBGD siRNA - + + +
ALAS-1-GalNAc - - 30mg/kg 10mg/kg
苯巴比妥 + + + +
ALAS-1/GAPDH mRNA
(PBS=1)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
PBGD siRNA - + + +
ALAS-1-GalNAc - - 30mg/kg 10mg/kg
苯巴比妥 + + + +

图21

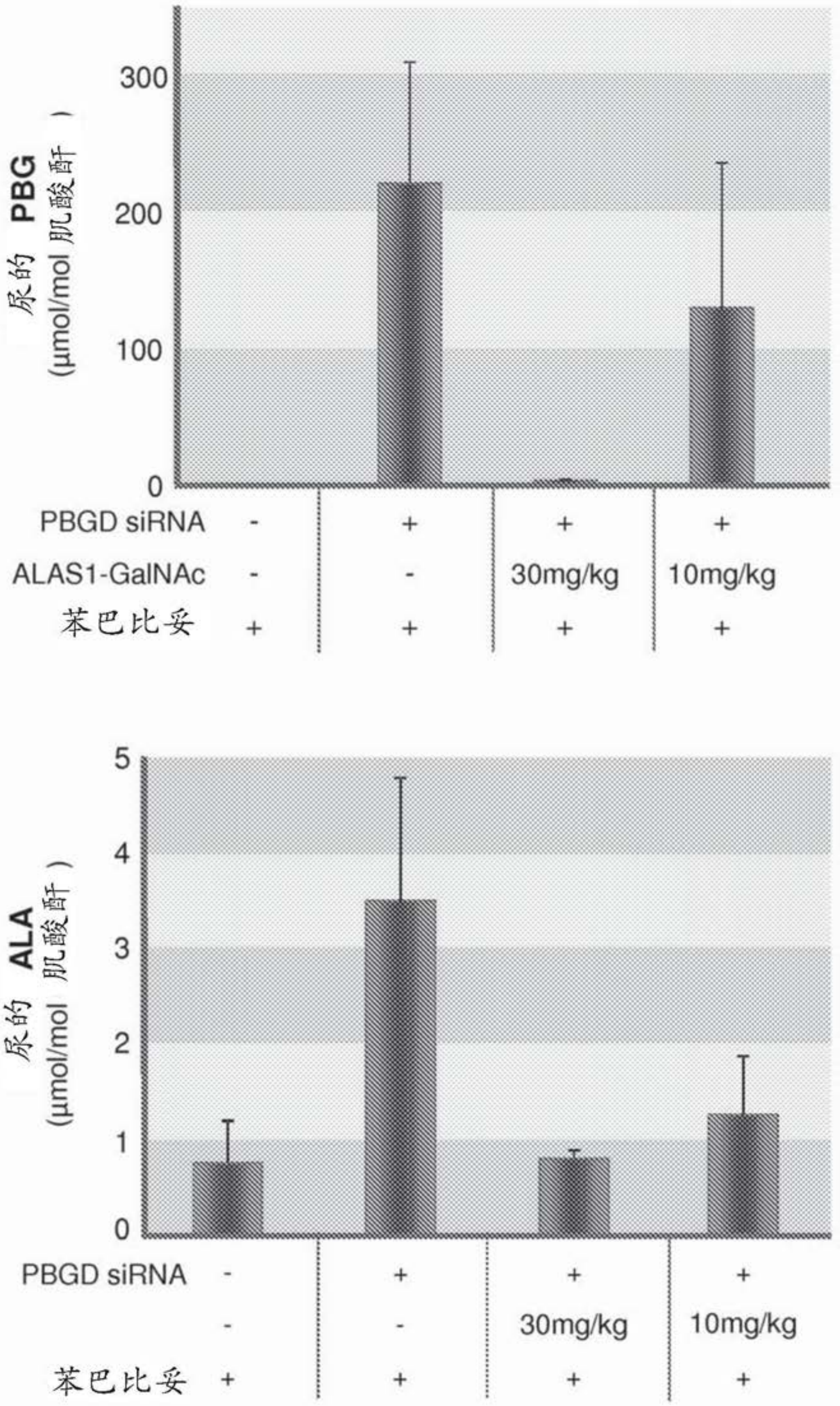

300
200
100
0
尿的 PBG (μmol/mol 肌酸酐)
PBGD siRNA - + + +
ALAS1-GalNAc - - 30mg/kg 10mg/kg
苯巴比妥 + + + +
5
4
3
2
1
0
尿的 ALA (μmol/mol 肌酸酐)
PBGD siRNA - + + +
- - 30mg/kg 10mg/kg
苯巴比妥 + + + +

图22

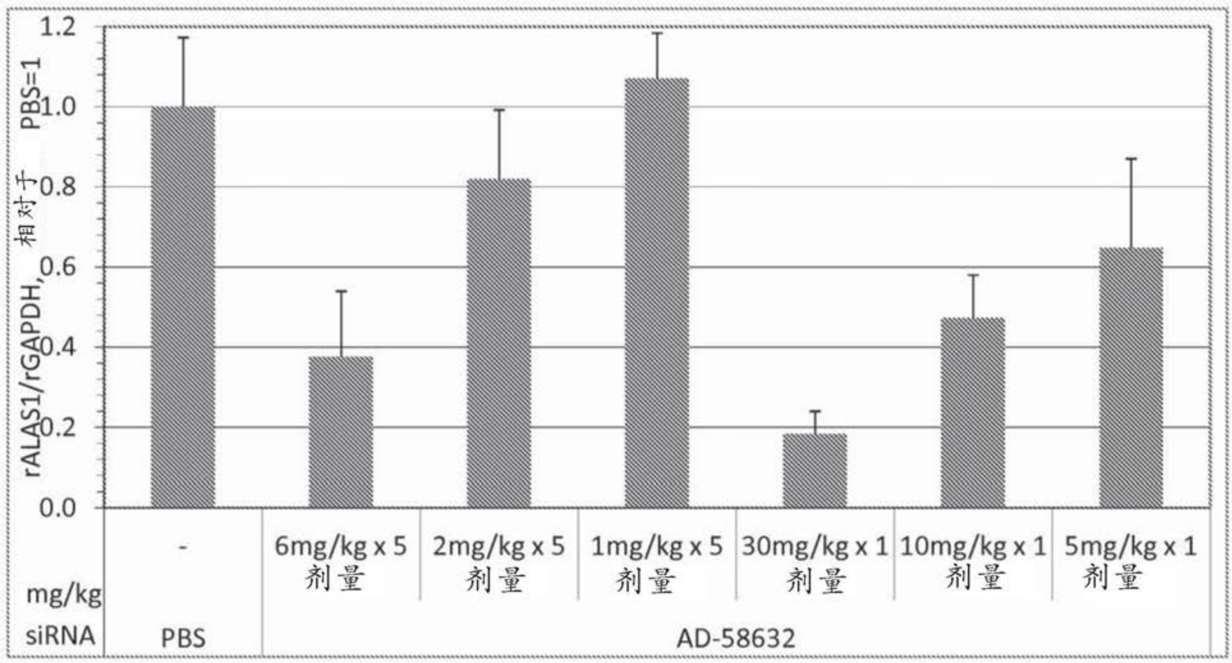

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
-
6mg/kg x 5 剂量
2mg/kg x 5 剂量
1mg/kg x 5 剂量
30mg/kg x 1 剂量
10mg/kg x 1 剂量
5mg/kg x 1 剂量
mg/kg
siRNA
PBS
AD-58632

图23

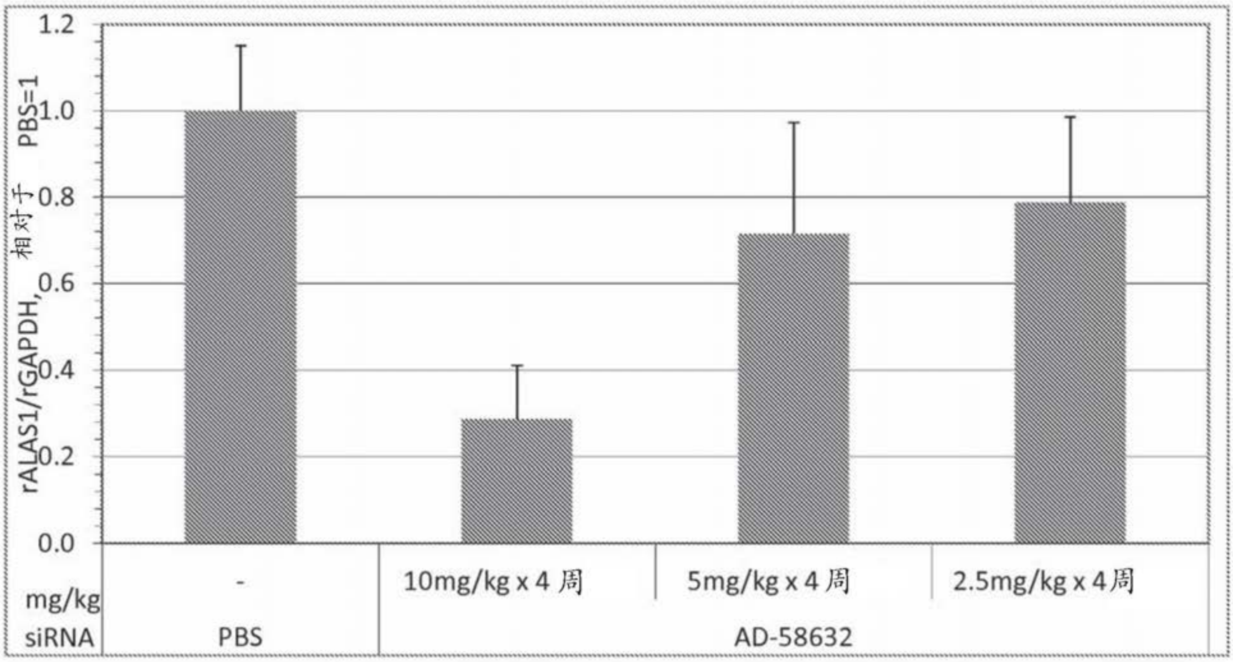

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
-
10mg/kg x 4 周
5mg/kg x 4 周
2.5mg/kg x 4 周
mg/kg
siRNA
PBS
AD-58632

图24

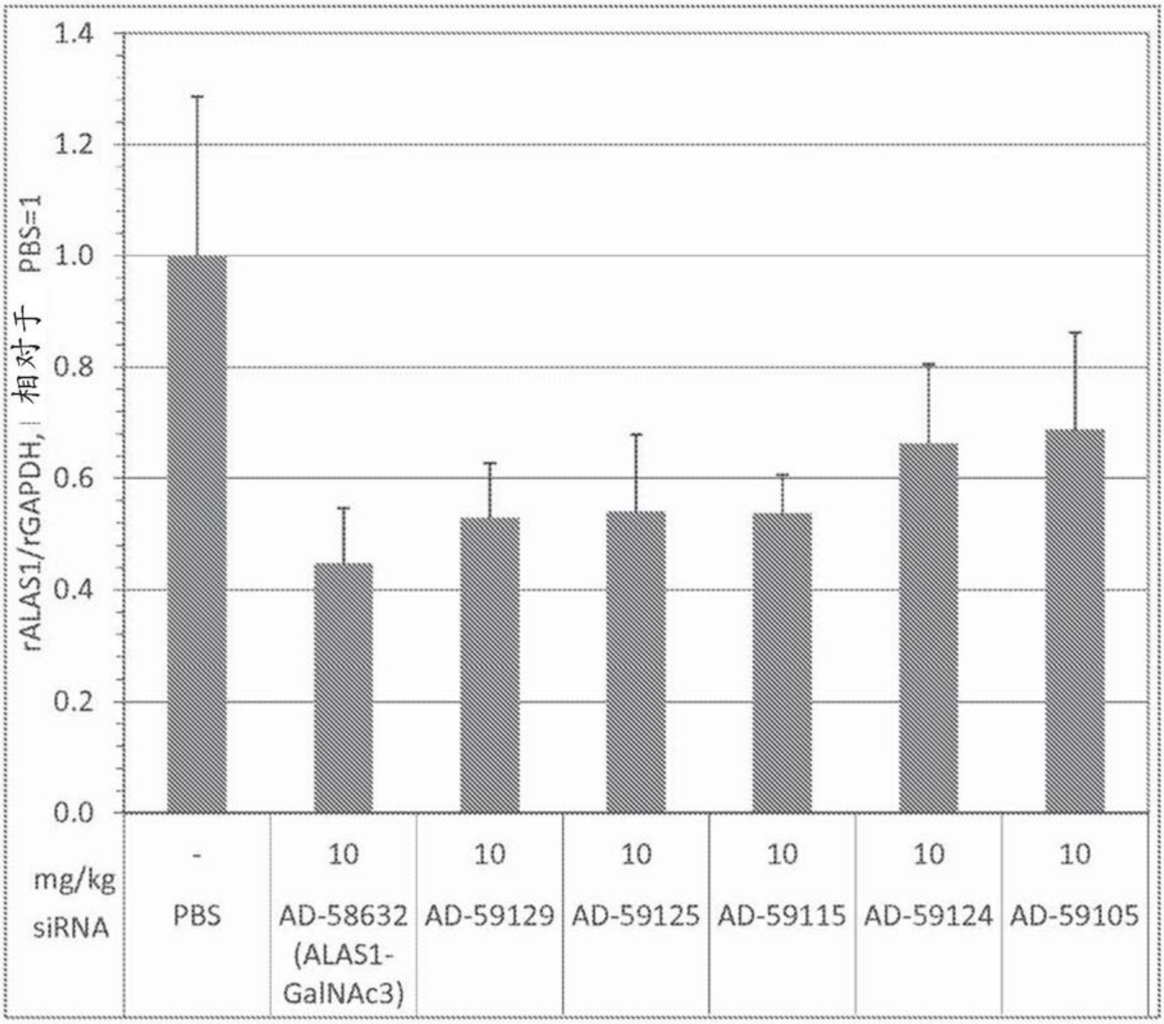

rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/kg
siRNA
-
PBS
10
AD-58632 (ALAS1-GalNAc3)
10
AD-59129
10
AD-59125
10
AD-59115
10
AD-59124
10
AD-59105

图25

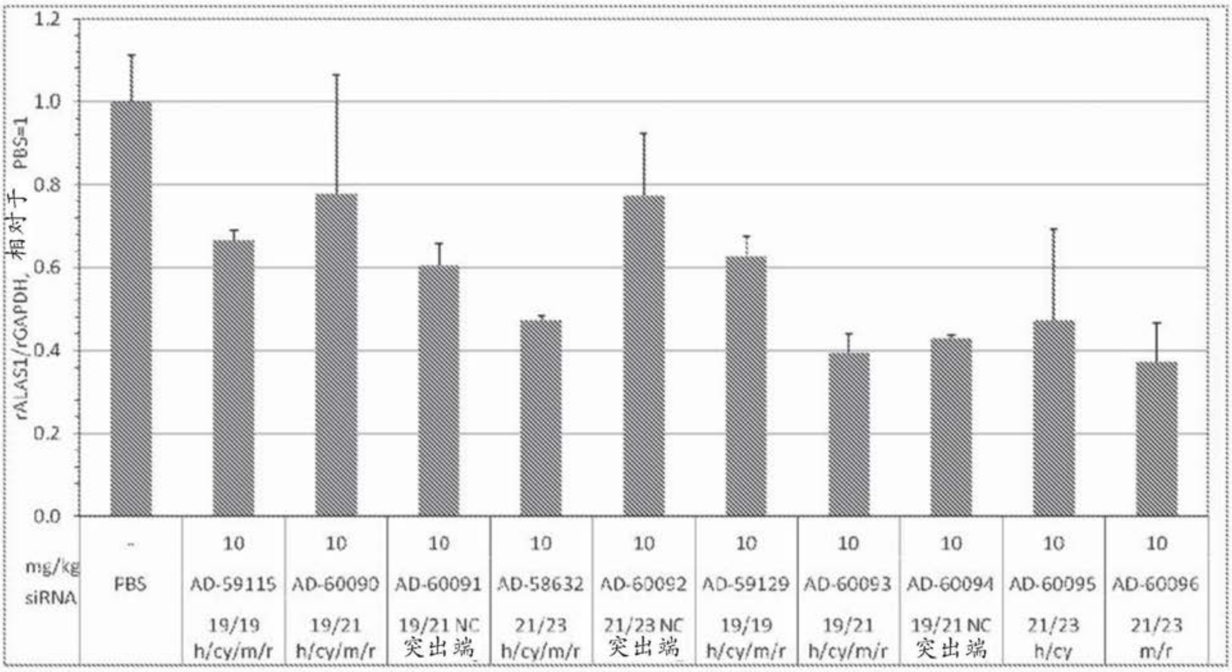

rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/kg
siRNA
-
PBS
10
AD-59115
19/19
h/cy/m/r
10
AD-60090
19/21
h/cy/m/r
10
AD-60091
19/21 NC
突出端
10
AD-58632
21/23
h/cy/m/r
10
AD-60092
21/23 NC
突出端
10
AD-59129
19/19
h/cy/m/r
10
AD-60093
19/21
h/cy/m/r
10
AD-60094
19/21 NC
突出端
10
AD-60095
21/23
h/cy
10
AD-60096
21/23
m/r

图26

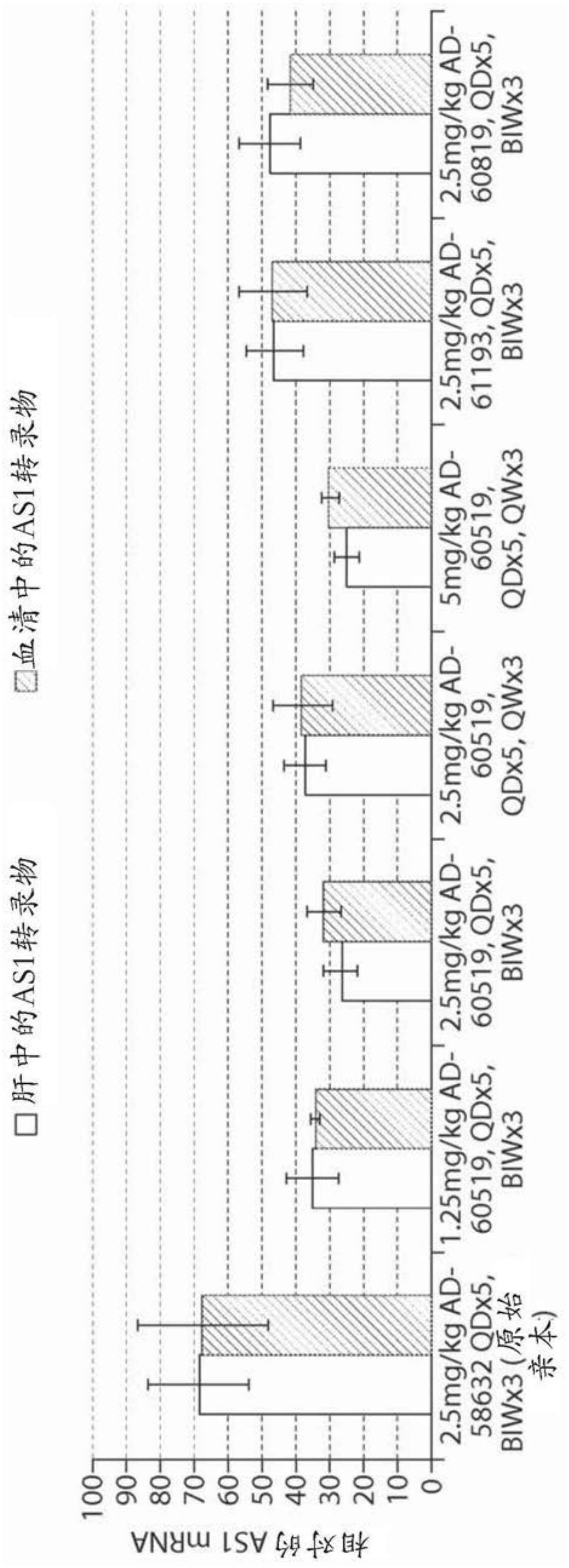

肝中的AS1转录物
血清中的AS1转录物
相对的AS1 mRNA
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2.5mg/kg AD-58632 QDx5, BIWx3 (原始亲本)
1.25mg/kg AD-60519, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60519, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60519, QDx5, QWx3
5mg/kg AD-60519, QDx5, QWx3
2.5mg/kg AD-61193, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60819, QDx5, BIWx3

图27

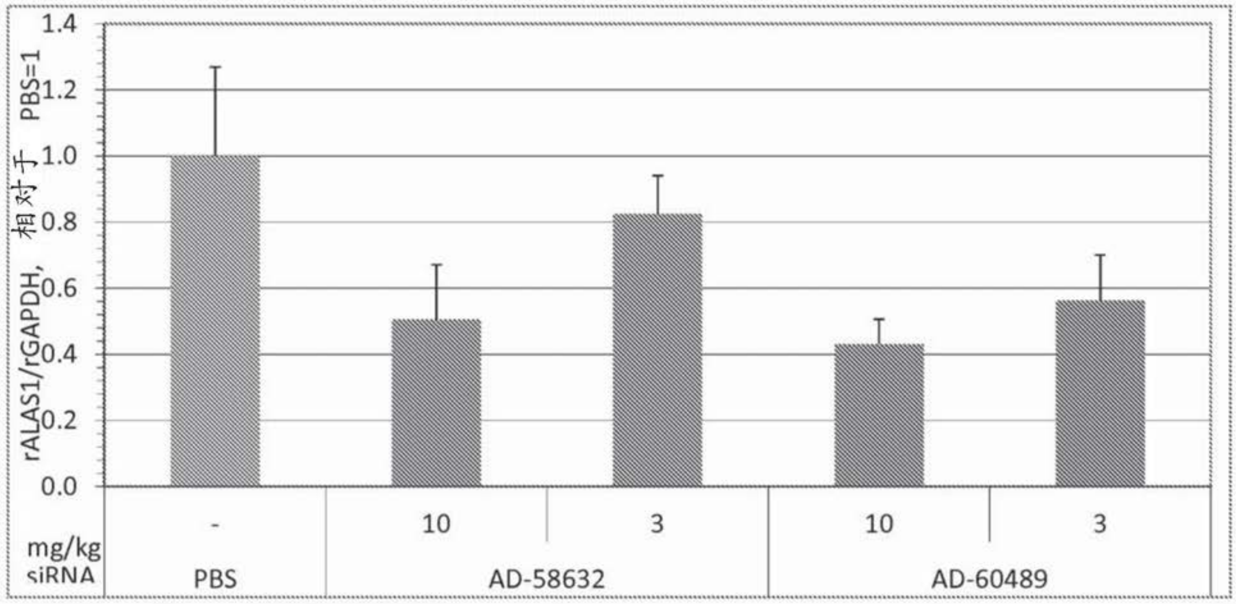
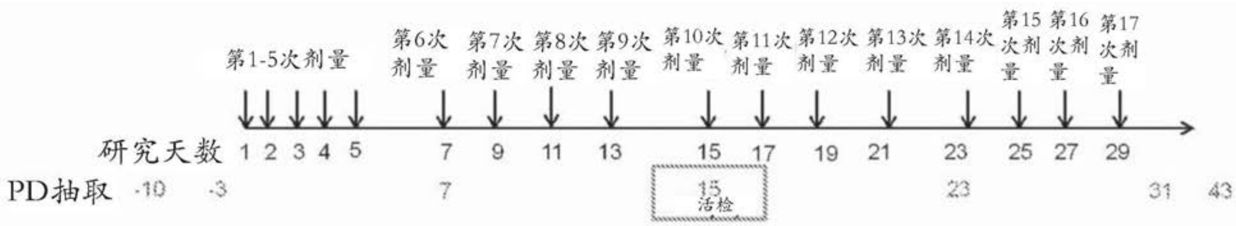


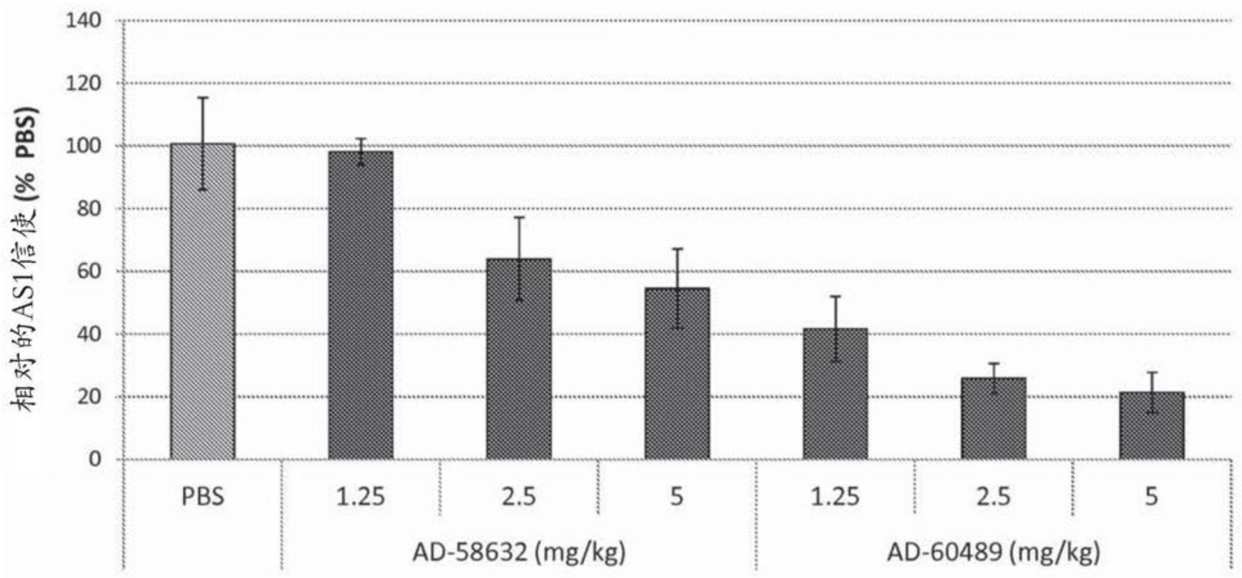
图28



组编号	配对物数量	测试品	剂量水平(mg/kg)	剂量浓度(mg/mL)	剂量方案	剂量体积(mL/kg)	剂量途径
1	3	PBS	0	0	QD×5随后q2d，持续3周	2	SC
2	3	AD-58632	5	2.5			
3	3	AD-58632	2.5	1.25			
4	3	AD-58632	1.25	0.625			
5	3	AD-60489	5	2.5			
6	3	AD-60489	2.5	1.25			
7	3	AD-60489	1.25	0.625			

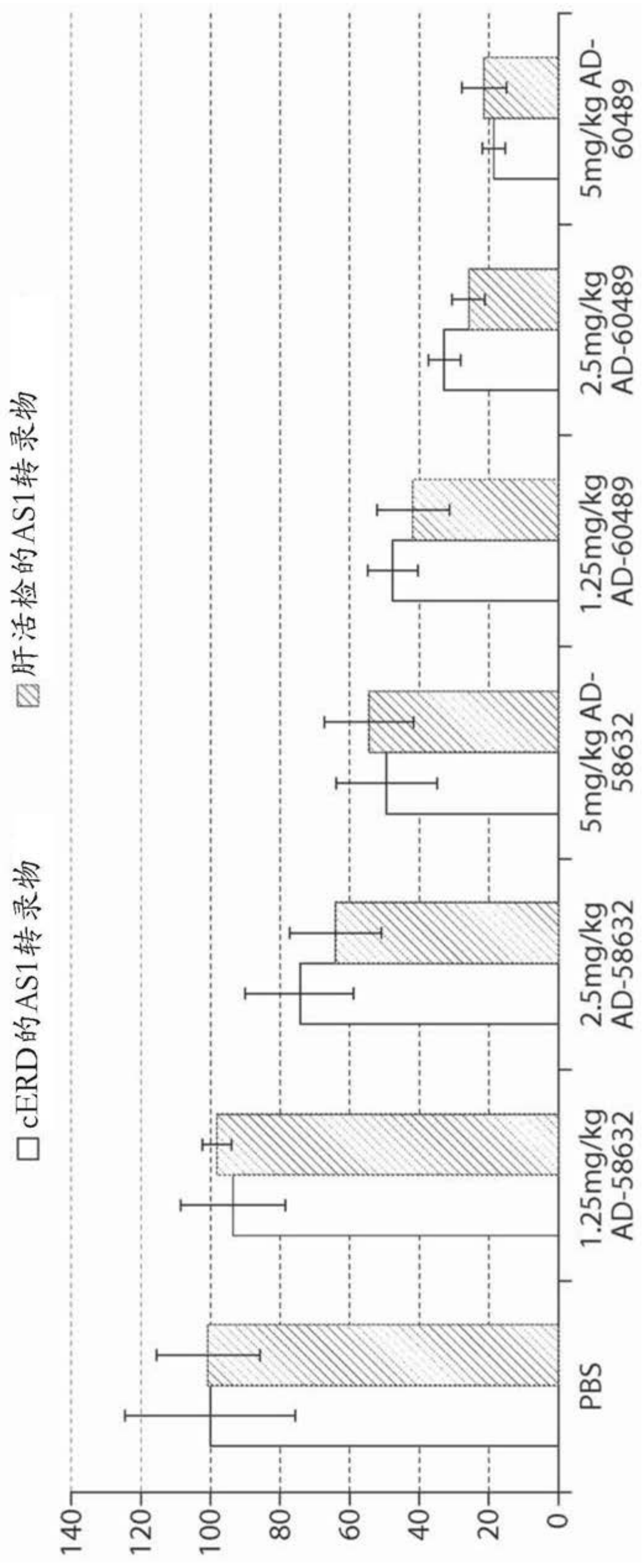
用于示例性mRNA检测的血清：第-10、-3、7*、15*、23*、31、和34天（*再次剂量给药前收集的所有血液样品）
针对mRNA的肝活检：第15**天（在活检前收集的血清）
针对临床化学组（ALT、AST、ALP）的血清：第-3、6、30、43天
尸体剖检：无
注射位点观察：有

图29



相对的AS1信使 (% PBS)
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS
1.25
2.5
5
1.25
2.5
5
AD-58632 (mg/kg)
AD-60489 (mg/kg)

图30



cERD的AS1转录物
肝活检的AS1转录物
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS
1.25mg/kg AD-58632
2.5mg/kg AD-58632
5mg/kg AD-58632
1.25mg/kg AD-60489
2.5mg/kg AD-60489
5mg/kg AD-60489

图31

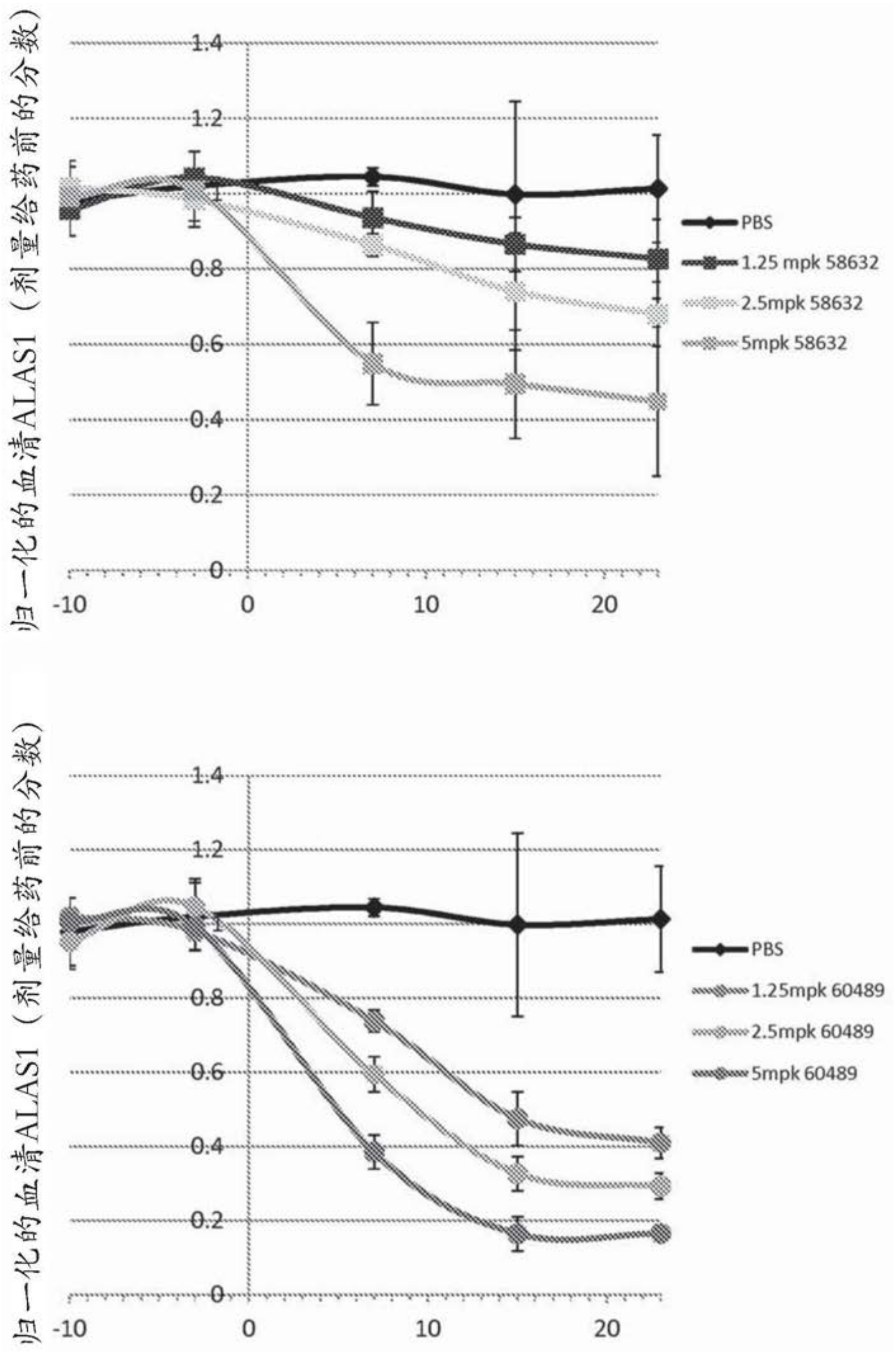

归一化的血清ALAS1（剂量给药前的分数）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-10
0
10
20
PBS
1.25 mpk 58632
2.5mpk 58632
5mpk 58632
归一化的血清ALAS1（剂量给药前的分数）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-10
0
10
20
PBS
1.25mpk 60489
2.5mpk 60489
5mpk 60489

图32

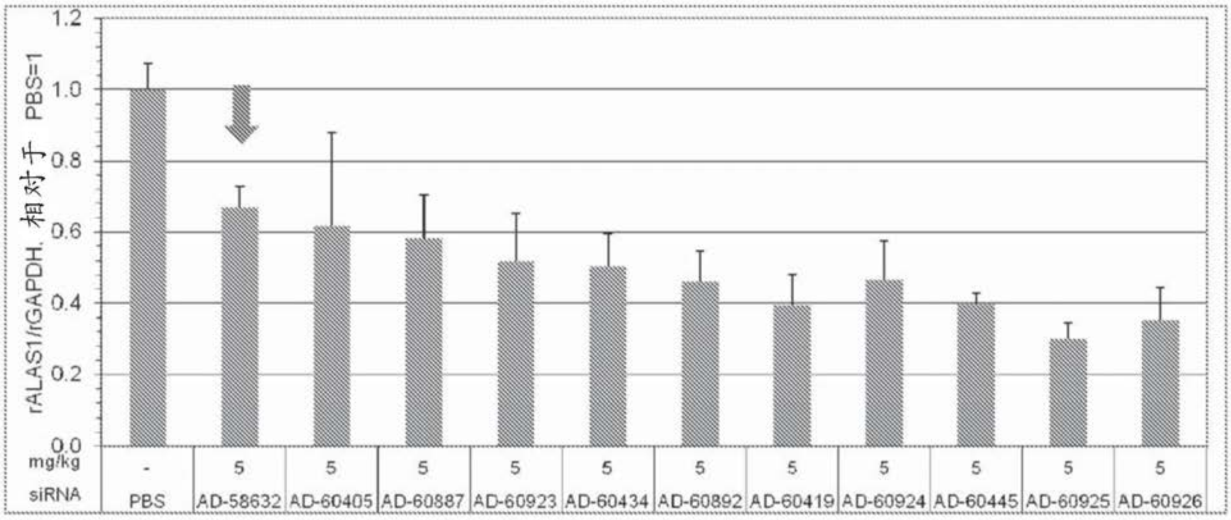

rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/kg
siRNA
-
PBS
5
AD-58632
AD-60405
AD-60887
AD-60923
AD-60434
AD-60892
AD-60419
AD-60924
AD-60445
AD-60925
AD-60926

图33

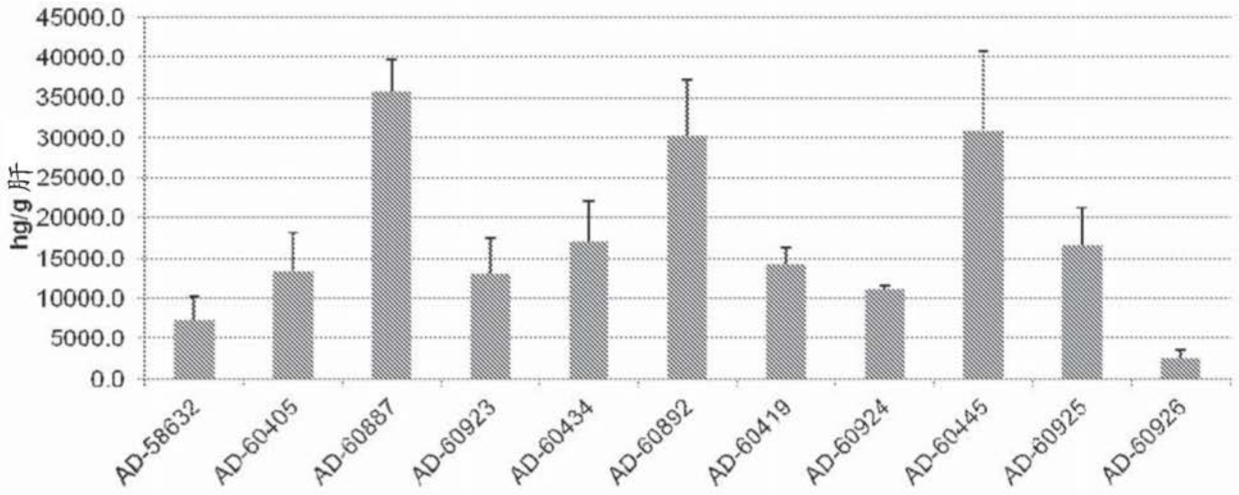

hg/g 肝
45000.0
40000.0
35000.0
30000.0
25000.0
20000.0
15000.0
10000.0
5000.0
0.0
AD-58632
AD-60405
AD-60887
AD-60923
AD-60434
AD-60892
AD-60419
AD-60924
AD-60445
AD-60925
AD-60926

图34

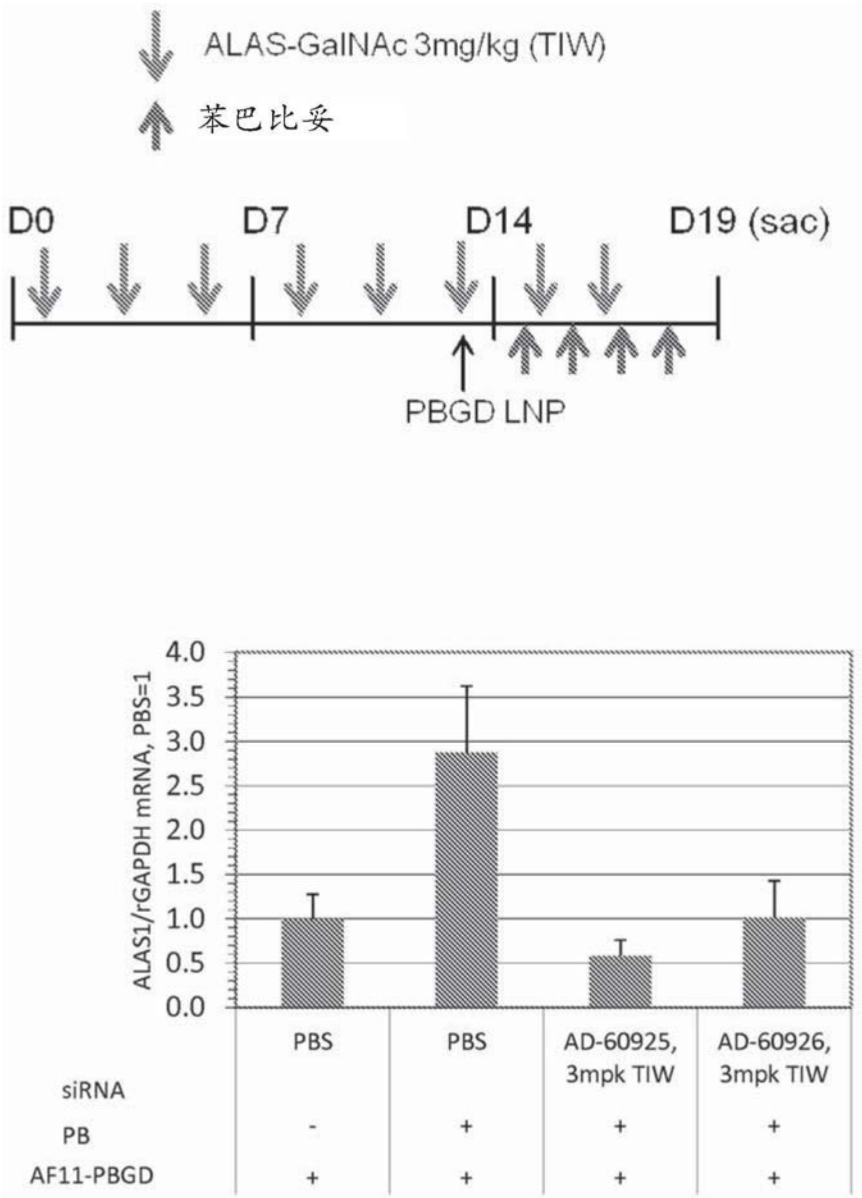

ALAS-GalNAc 3mg/kg (TIW)
苯巴比妥
D0
D7
D14
D19 (sac)
PBGD LNP
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ALAS1/rGAPDH mRNA, PBS=1
PBS
PBS
AD-60925, 3mpk TIW
AD-60926, 3mpk TIW
siRNA
PB
AF11-PBGD
-
+
+
+
+
+
+
+

图35

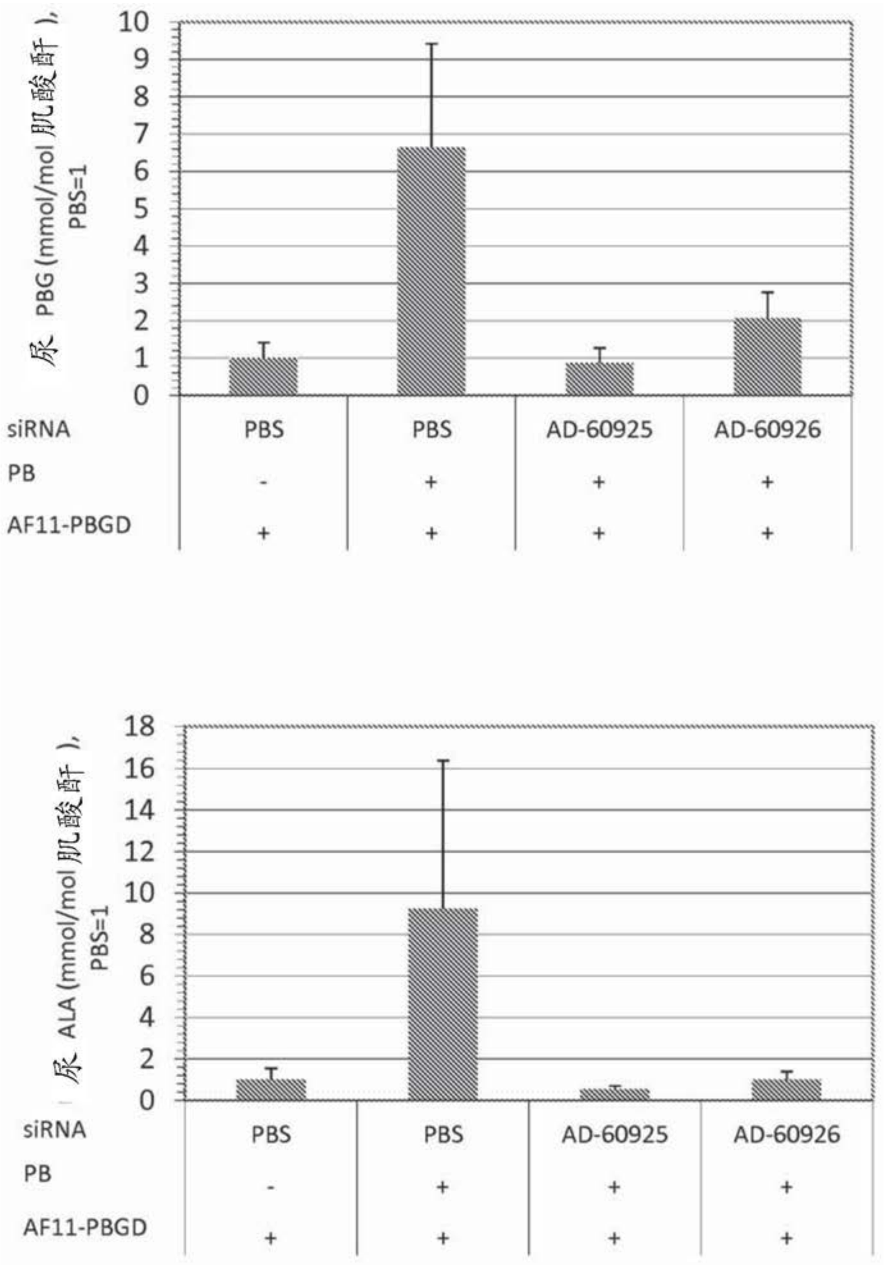

尿 PBG (mmol/mol 肌酸酐), PBS=1
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
siRNA
PBS
PBS
AD-60925
AD-60926
PB
-
+
+
+
AF11-PBGD
+
+
+
+
尿 ALA (mmol/mol 肌酸酐), PBS=1
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
siRNA
PBS
PBS
AD-60925
AD-60926
PB
-
+
+
+
AF11-PBGD
+
+
+
+

图36

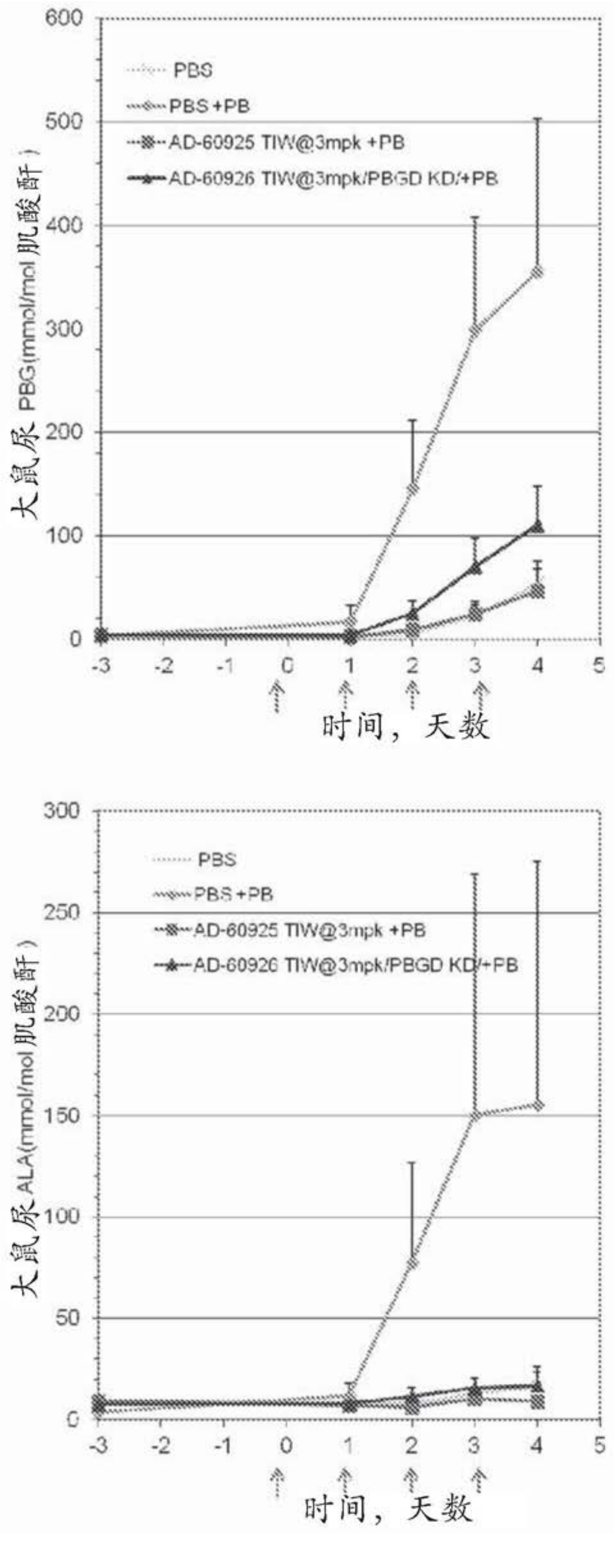
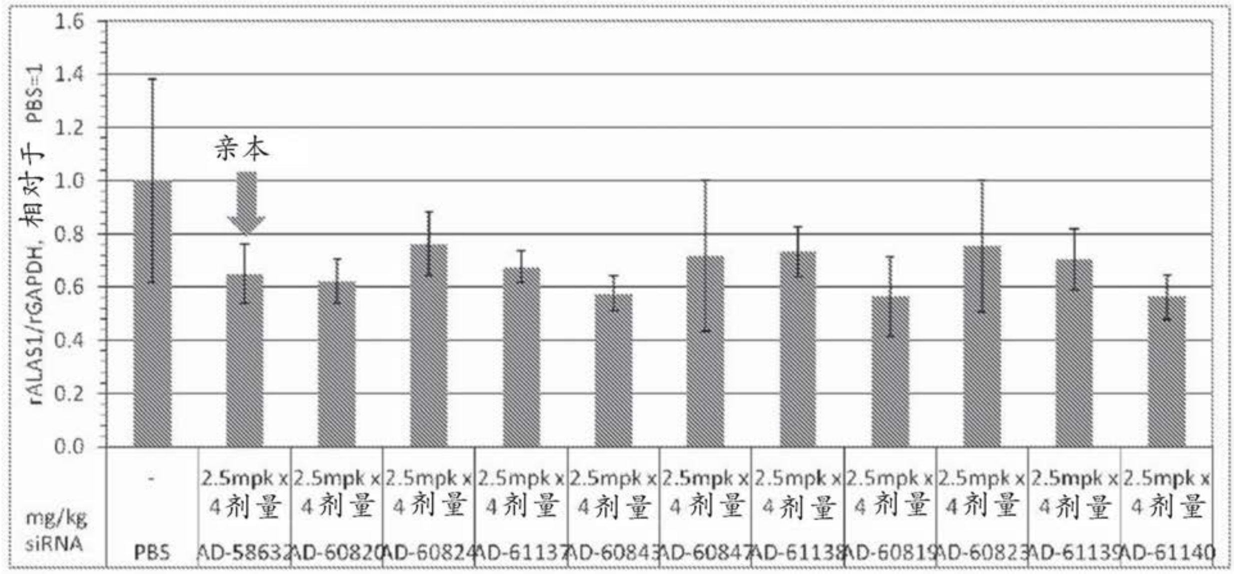
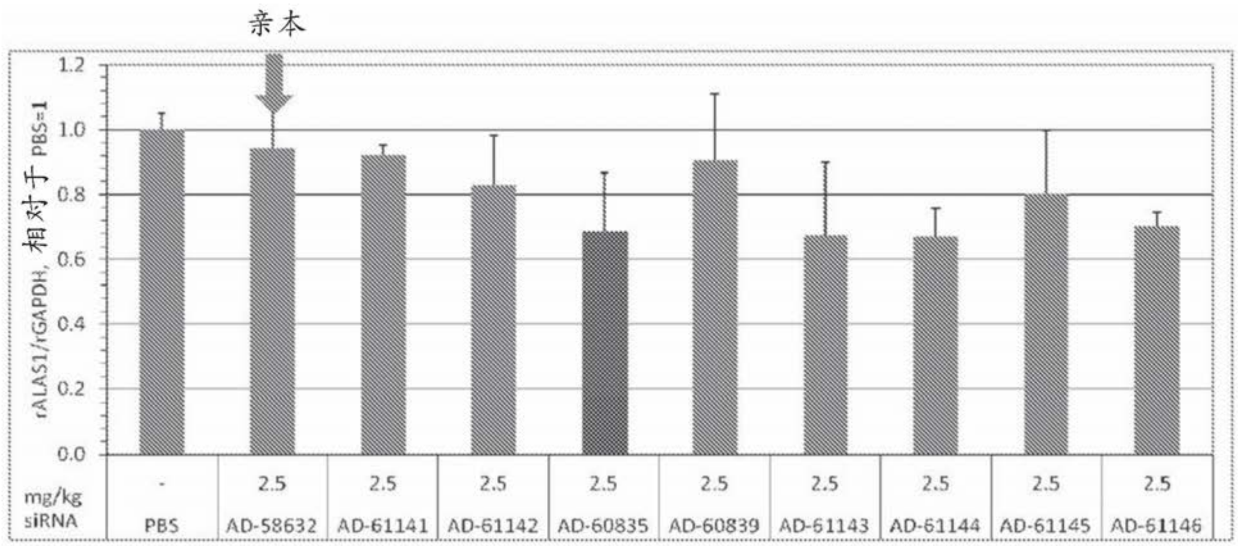

600
500
400
300
200
100
0
PBS
PBS+PB
AD-60925 TIW@3mpk+PB
AD-60926 TIW@3mpk/PBGD KD/+PB
大鼠尿 PBG(mmol/mol肌酸酐)
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
时间，天数
300
250
200
150
100
50
0
PBS
PBS+PB
AD-60925 TIW@3mpk+PB
AD-60926 TIW@3mpk/PBGD KD/+PB
大鼠尿 ALA(mmol/mol肌酸酐)
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
时间，天数

图37



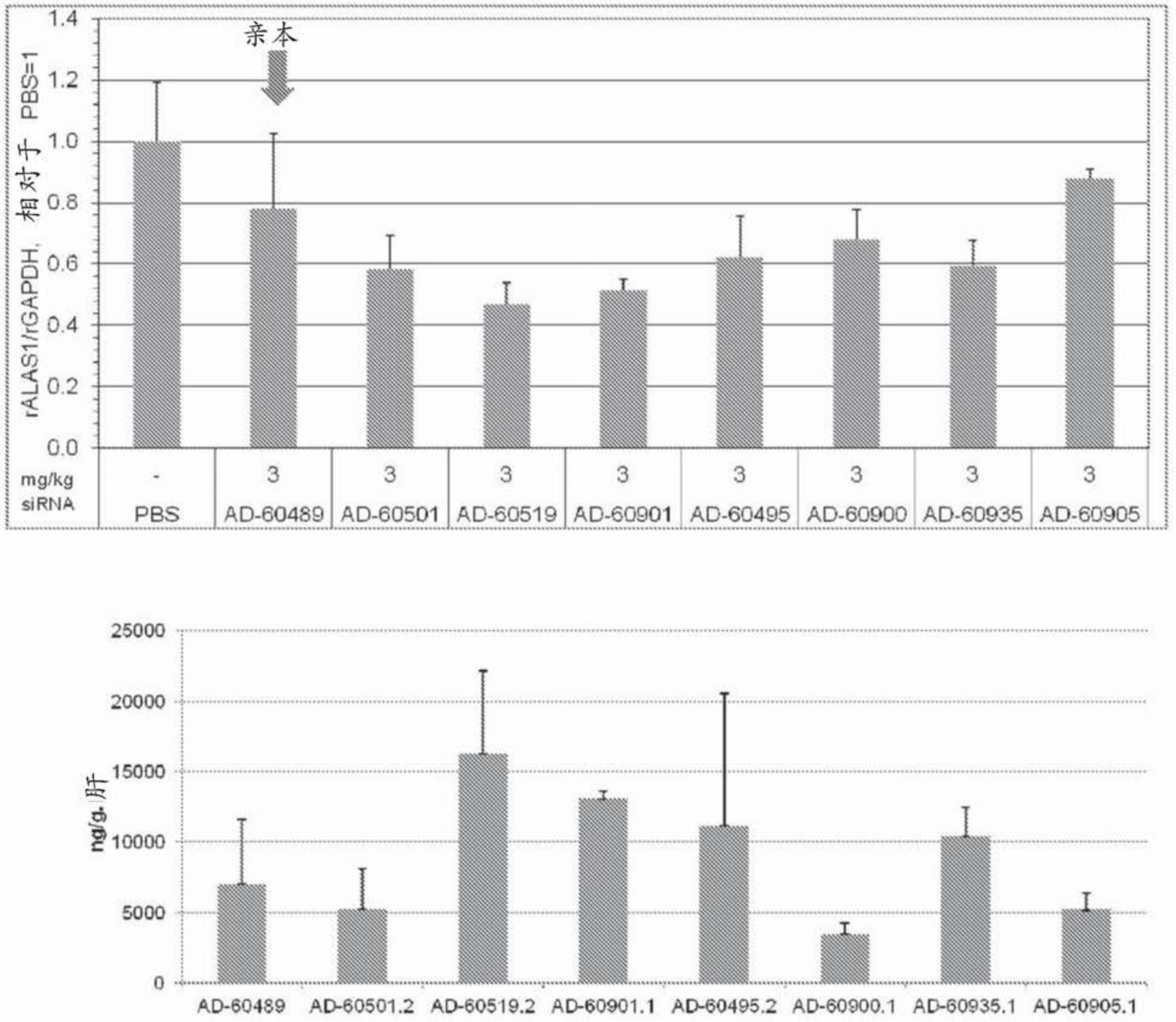
rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
亲本
mg/kg
siRNA
-
PBS
2.5mpk x 4剂量
AD-58632
AD-60820
AD-60824
AD-61137
AD-60843
AD-60847
AD-61138
AD-60819
AD-60823
AD-61139
AD-61140

图38



亲本
rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
mg/kg
siRNA
-
PBS
2.5
AD-58632
AD-61141
AD-61142
AD-60835
AD-60839
AD-61143
AD-61144
AD-61145
AD-61146

图39



1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
rALAS1/rGAPDH，相对于 PBS=1
亲本
mg/kg
siRNA
-
PBS
3
AD-60489
3
AD-60501
3
AD-60519
3
AD-60901
3
AD-60495
3
AD-60900
3
AD-60935
3
AD-60905
25000
20000
15000
10000
5000
0
ng/g.肝
AD-60489
AD-60501.2
AD-60519.2
AD-60901.1
AD-60495.2
AD-60900.1
AD-60935.1
AD-60905.1

图40

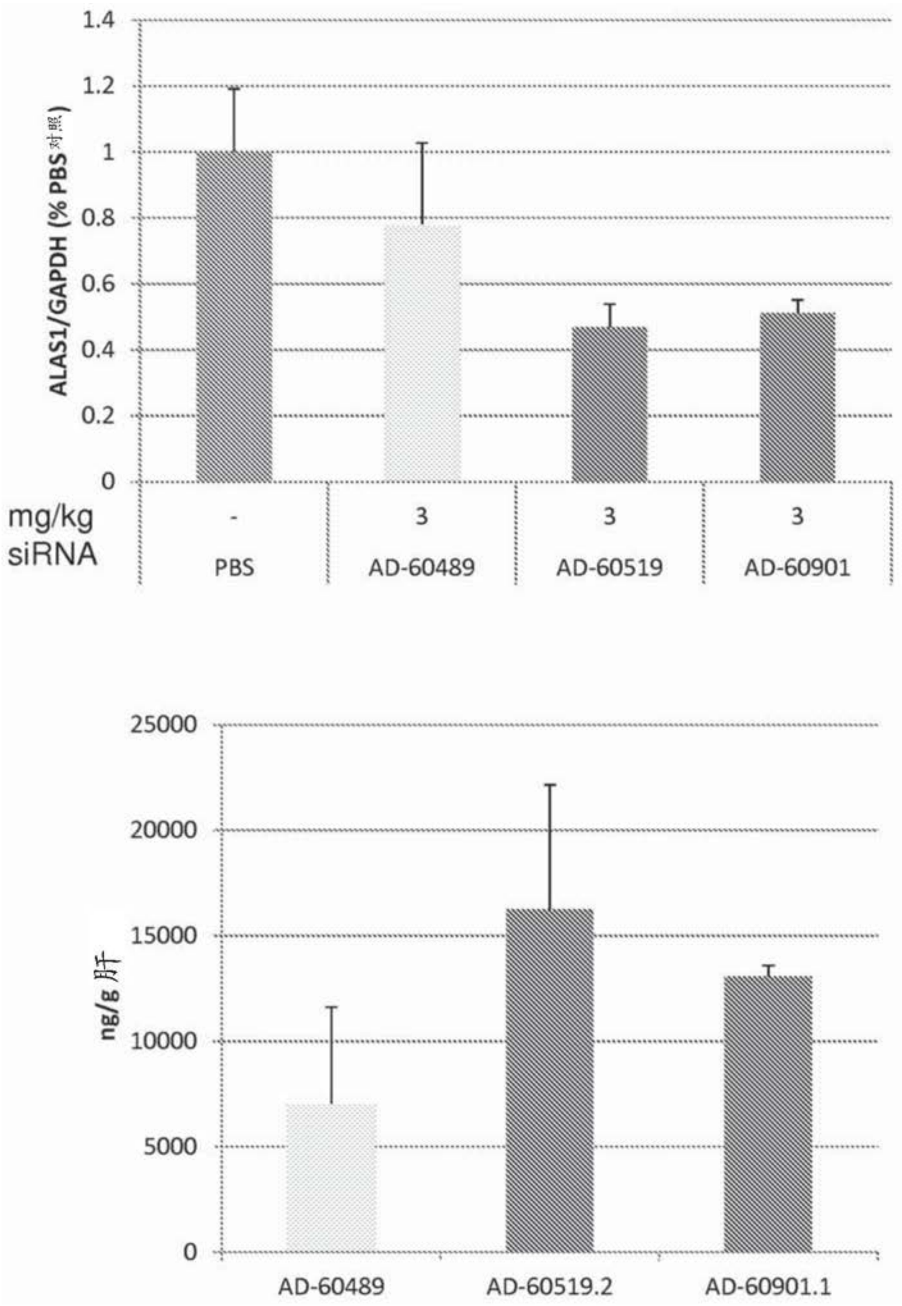

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ALAS1/GAPDH (% PBS对照)
mg/kg
siRNA
-
3
3
3
PBS
AD-60489
AD-60519
AD-60901
25000
20000
15000
10000
5000
0
ng/g 肝
AD-60489
AD-60519.2
AD-60901.1

图41

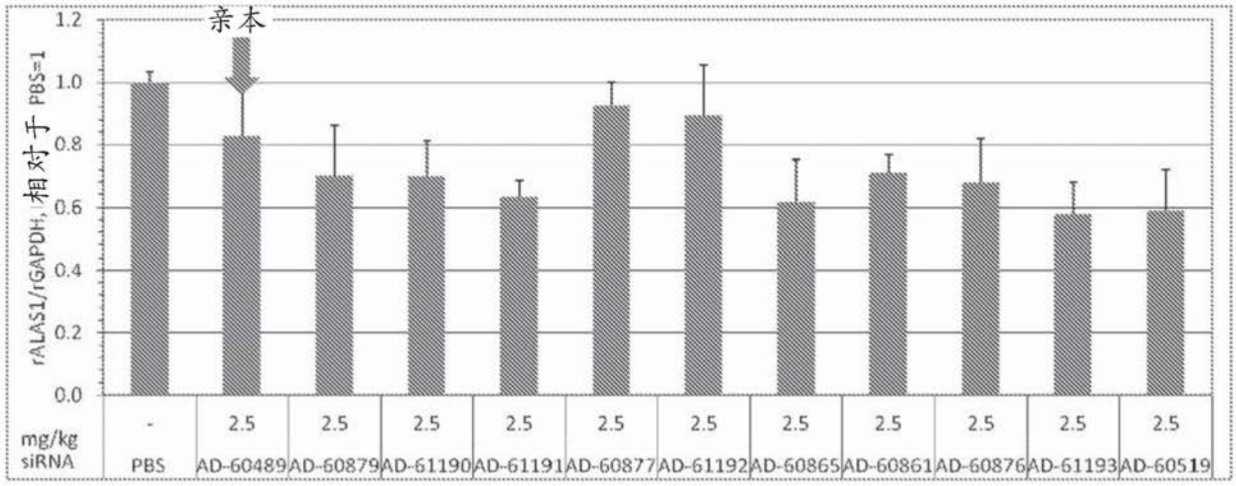

亲本
rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/kg
siRNA
-
PBS
2.5
AD-60489
AD-60879
AD-61190
AD-61191
AD-60877
AD-61192
AD-60865
AD-60861
AD-60876
AD-61193
AD-60519

图42

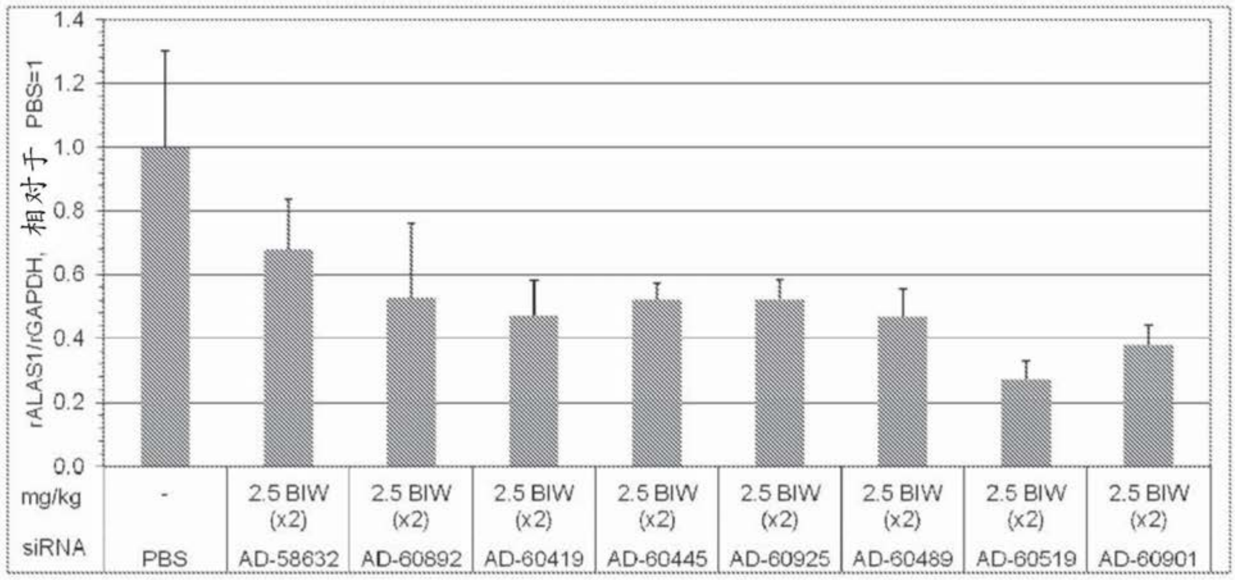

rALAS1/rGAPDH, 相对于 PBS=1
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/kg
siRNA
-
PBS
2.5 BIW
(x2)
AD-58632
AD-60892
AD-60419
AD-60445
AD-60925
AD-60489
AD-60519
AD-60901

图43

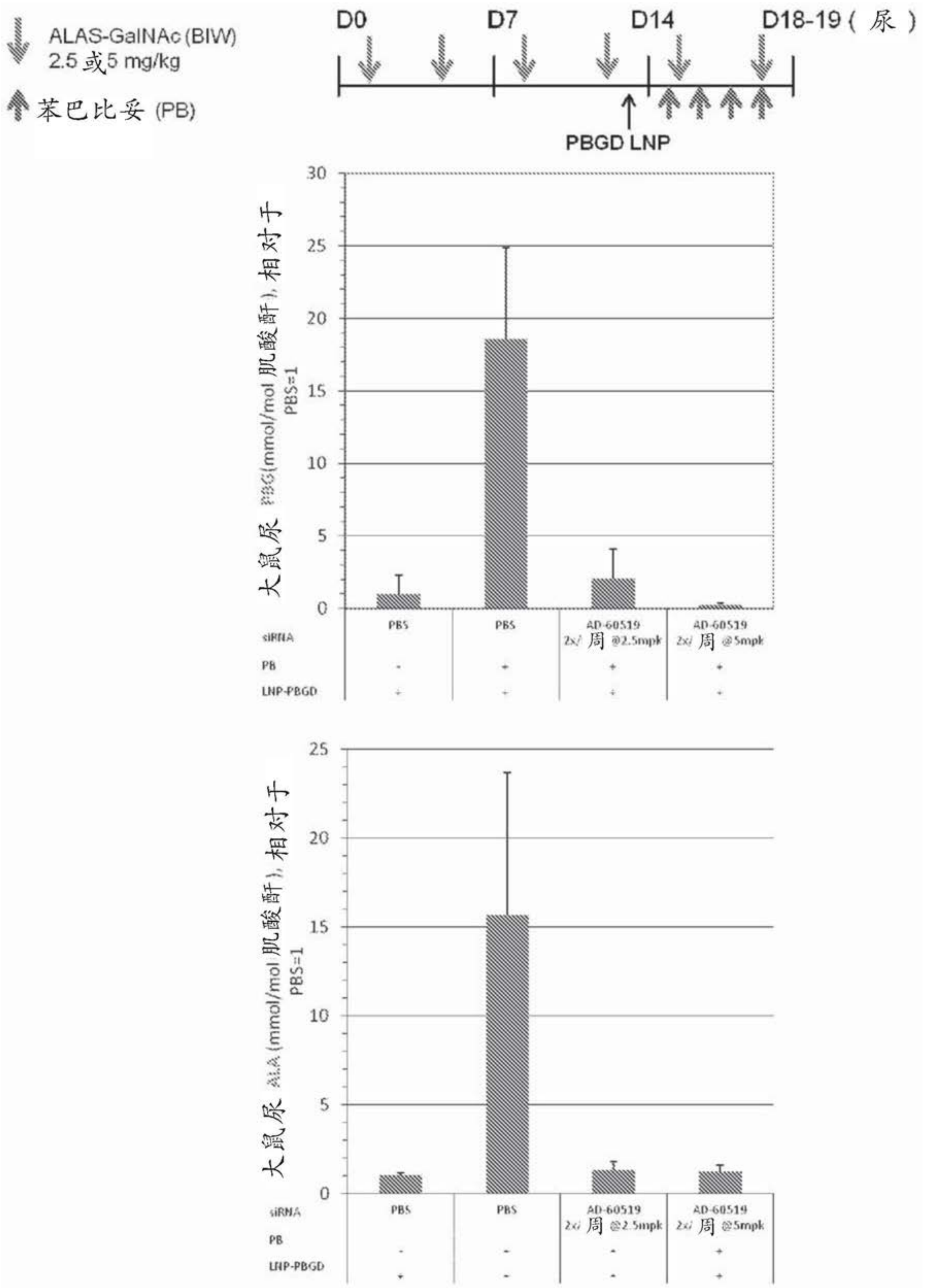

ALAS-GalNAc (BIW)
2.5或5 mg/kg
苯巴比妥 (PB)
D0
D7
D14
D18-19 (尿)
PBGD LNP
大鼠尿 PBG(mmol/mol肌酸酐)，相对于PBS=1
30
25
20
15
10
5
0
siRNA
PB
LNP-PBGD
PBS
PBS
AD-60519 2x/周 @2.5mpk
AD-60519 2x/周 @5mpk
大鼠尿 ALA (mmol/mol肌酸酐)，相对于PBS=1
25
20
15
10
5
0

图44

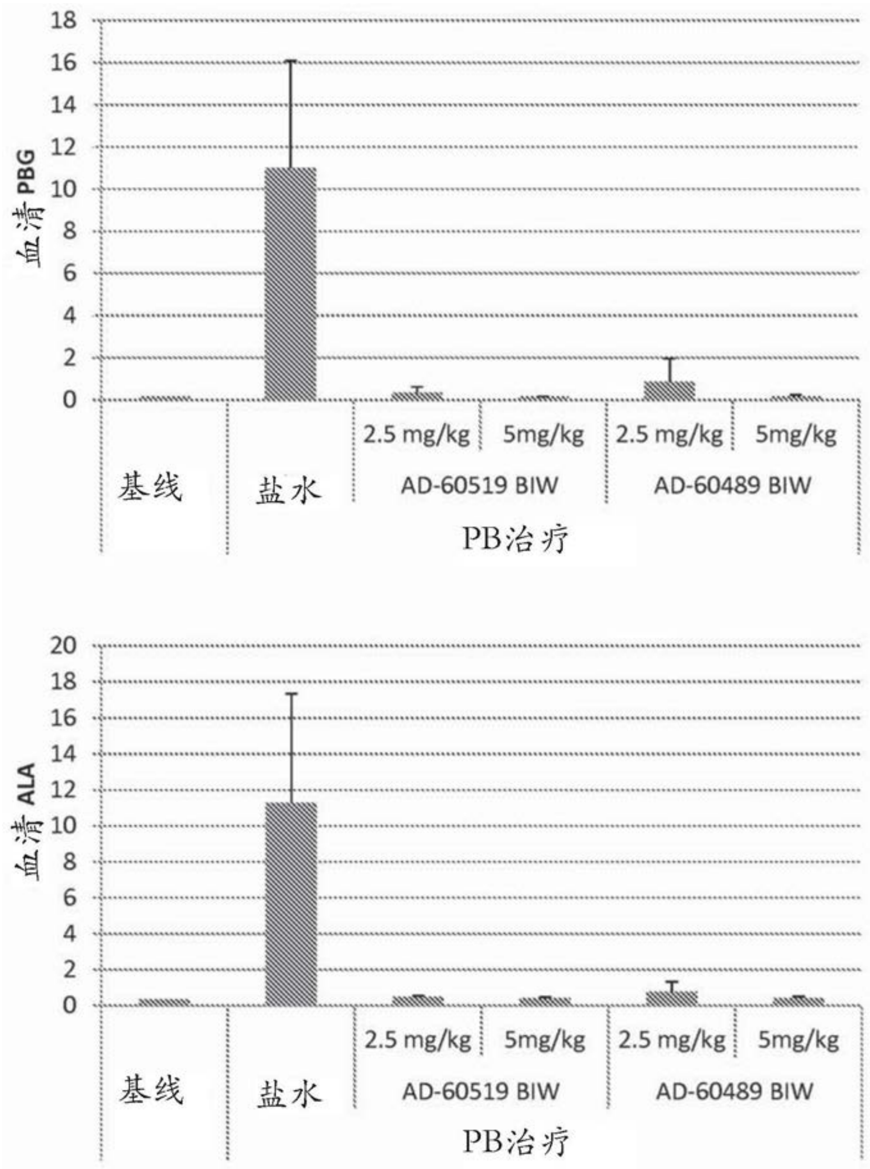

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
血清 PBG
2.5 mg/kg
5mg/kg
2.5 mg/kg
5mg/kg
基线
盐水
AD-60519 BIW
AD-60489 BIW
PB治疗
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
血清 ALA
2.5 mg/kg
5mg/kg
2.5 mg/kg
5mg/kg
基线
盐水
AD-60519 BIW
AD-60489 BIW
PB治疗

图45

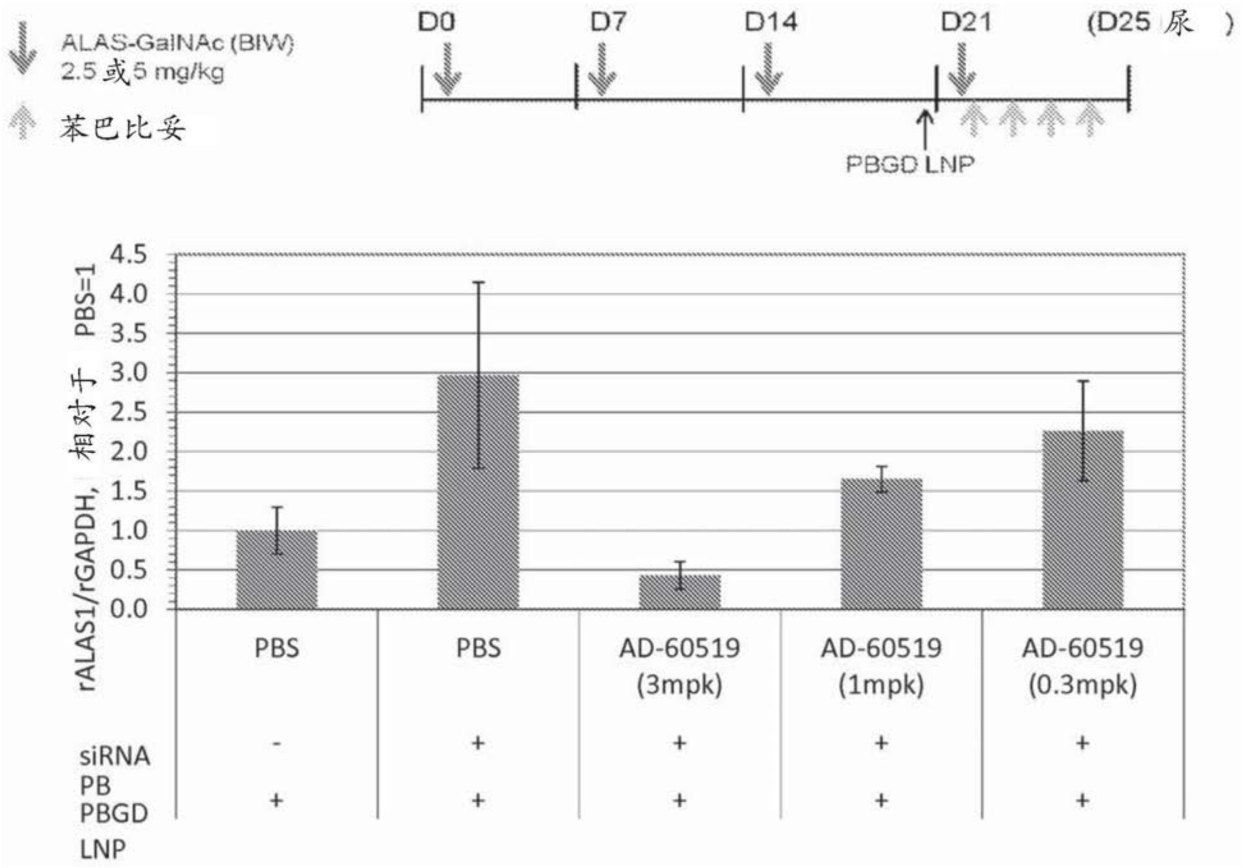

ALAS-GalNAc (BIW)
2.5 或 5 mg/kg
苯巴比妥
D0
D7
D14
D21
(D25 尿)
PBGD LNP
rALAS1/rGAPDH，相对于 PBS=1
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
PBS
AD-60519 (3mpk)
AD-60519 (1mpk)
AD-60519 (0.3mpk)
siRNA
PB
PBGD
LNP

图46

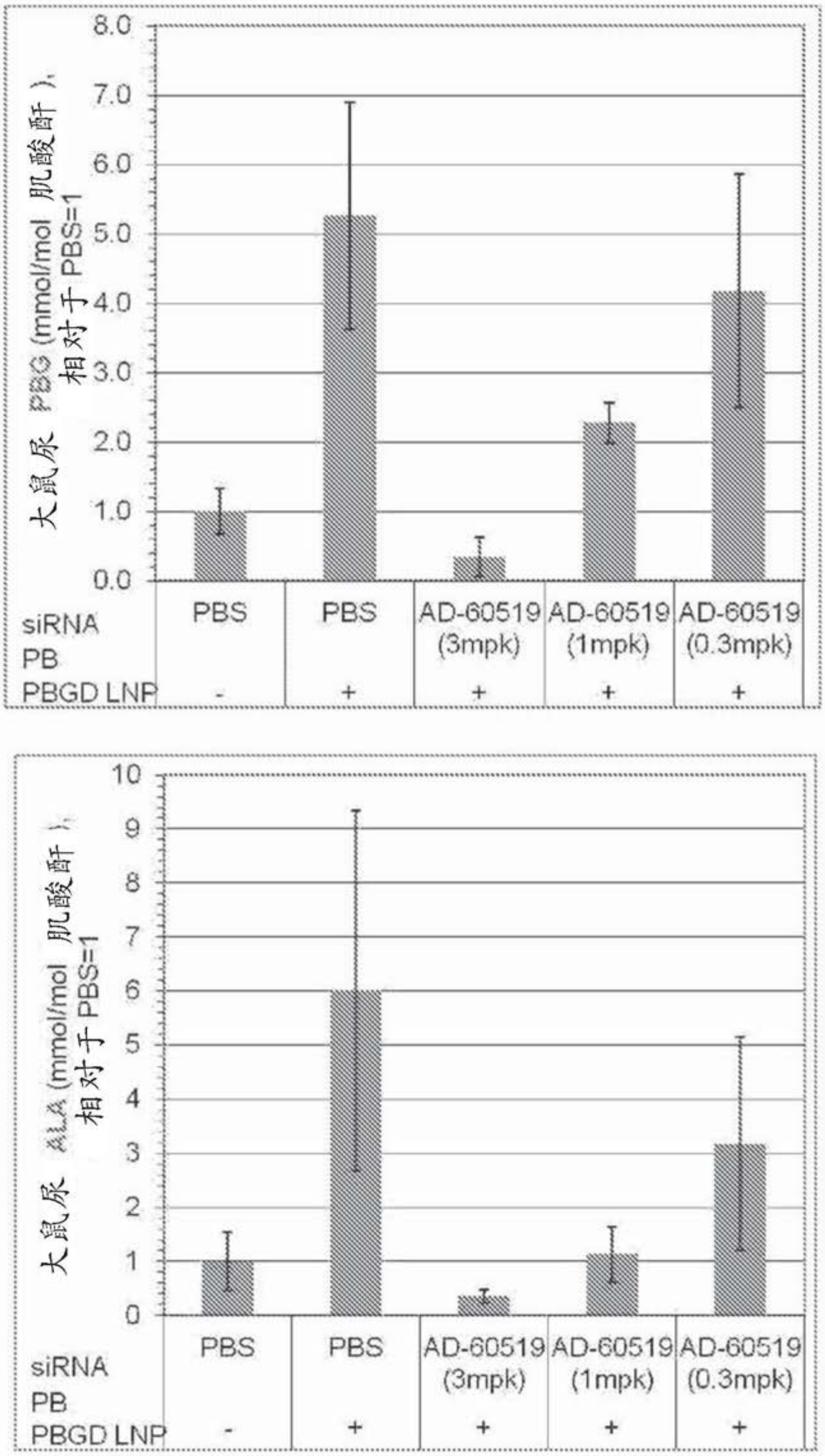

8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
大鼠尿 PBG (mmol/mol 肌酸酐)，相对于 PBS=1
siRNA
PB
PBGD LNP
PBS
PBS
AD-60519 (3mpk)
AD-60519 (1mpk)
AD-60519 (0.3mpk)
-
+
+
+
+
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
大鼠尿 ALA (mmol/mol 肌酸酐)，相对于 PBS=1
siRNA
PB
PBGD LNP
PBS
PBS
AD-60519 (3mpk)
AD-60519 (1mpk)
AD-60519 (0.3mpk)
-
+
+
+
+

图47

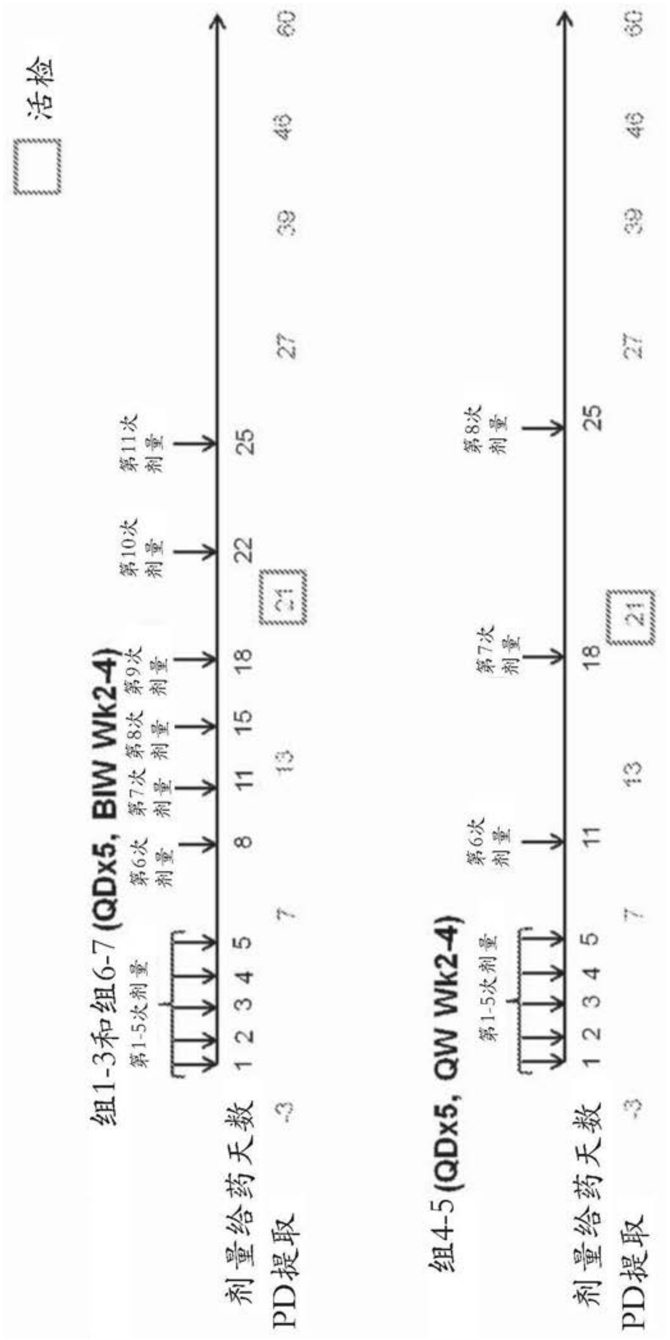

活检
组1-3和组6-7 (QDx5, BIW Wk2-4)
第1-5次剂量
第6次剂量
第7次剂量
第8次剂量
第9次剂量
第10次剂量
第11次剂量
剂量给药天数
1 2 3 4 5 8 11 15 18 22 25
PD提取
-3 7 13 21 27 39 46 60
组4-5 (QDx5, QW Wk2-4)
第1-5次剂量
第6次剂量
第7次剂量
第8次剂量
剂量给药天数
1 2 3 4 5 11 18 25
PD提取
-3 7 13 21 27 39 46 60

图48

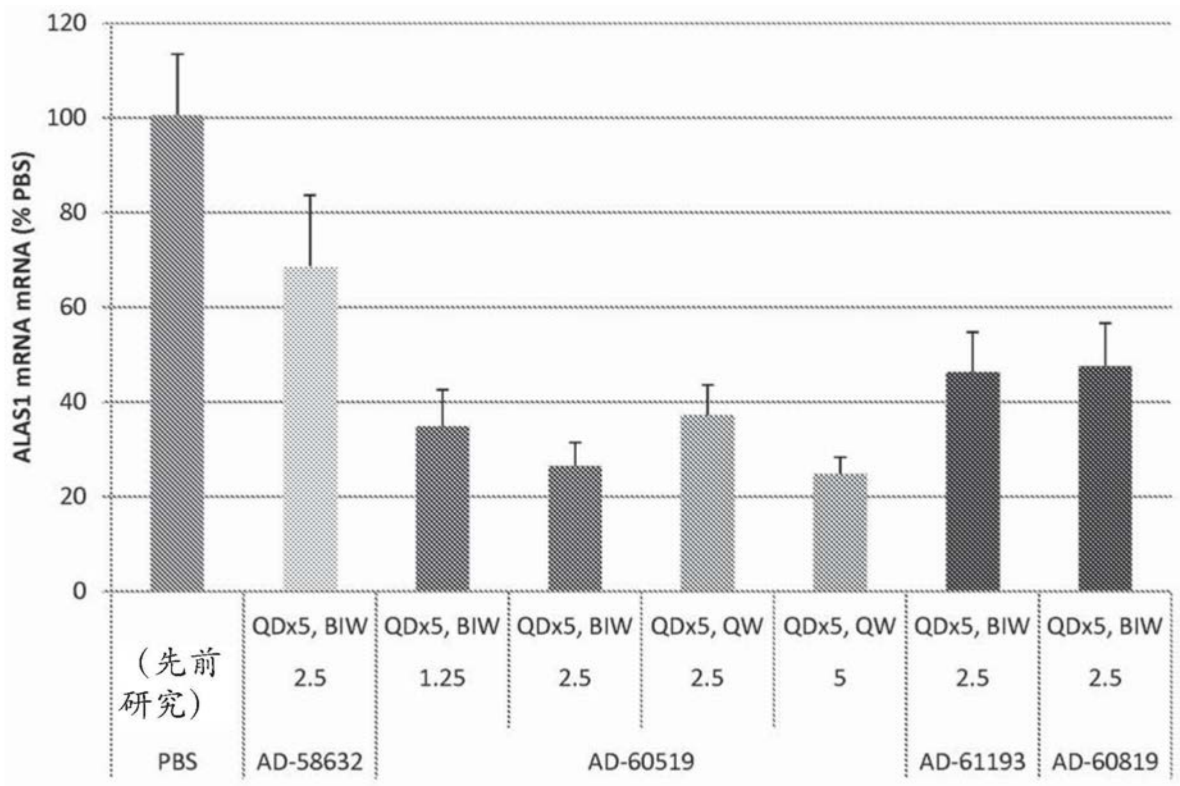
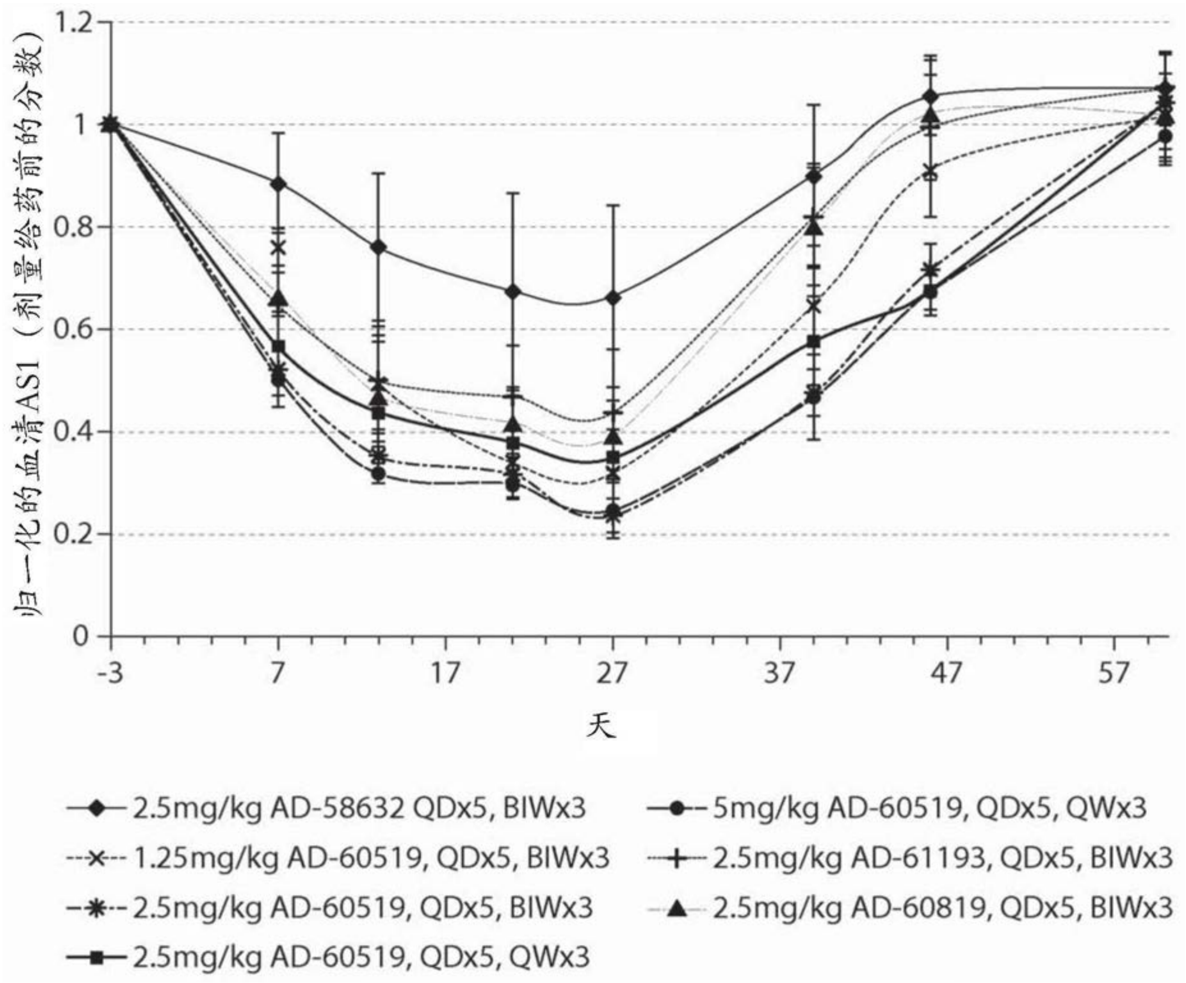

120
100
80
60
40
20
0
ALAS1 mRNA mRNA (% PBS)
（先前研究）
QDx5, BIW
2.5
QDx5, BIW
1.25
QDx5, BIW
2.5
QDx5, QW
2.5
QDx5, QW
5
QDx5, BIW
2.5
QDx5, BIW
2.5
PBS
AD-58632
AD-60519
AD-61193
AD-60819

图49



归一化的血清AS1（剂量给药前的分数）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-3
7
17
27
37
47
57
天
2.5mg/kg AD-58632 QDx5, BIWx3
5mg/kg AD-60519, QDx5, QWx3
1.25mg/kg AD-60519, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-61193, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60519, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60819, QDx5, BIWx3
2.5mg/kg AD-60519, QDx5, QWx3

图50

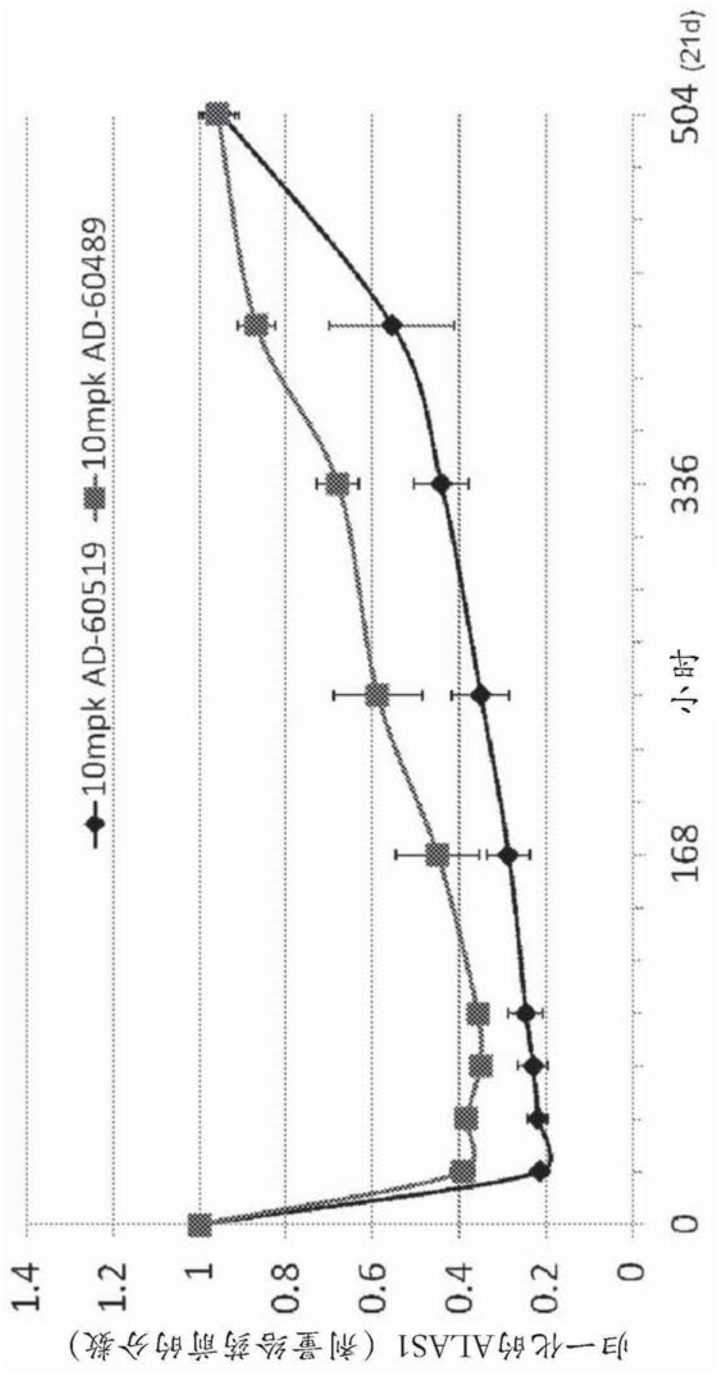

10mpk AD-60519
10mpk AD-60489
归一化的ALAS1（剂量给药前的分数）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
168
336
504 (21d)
小时

图51

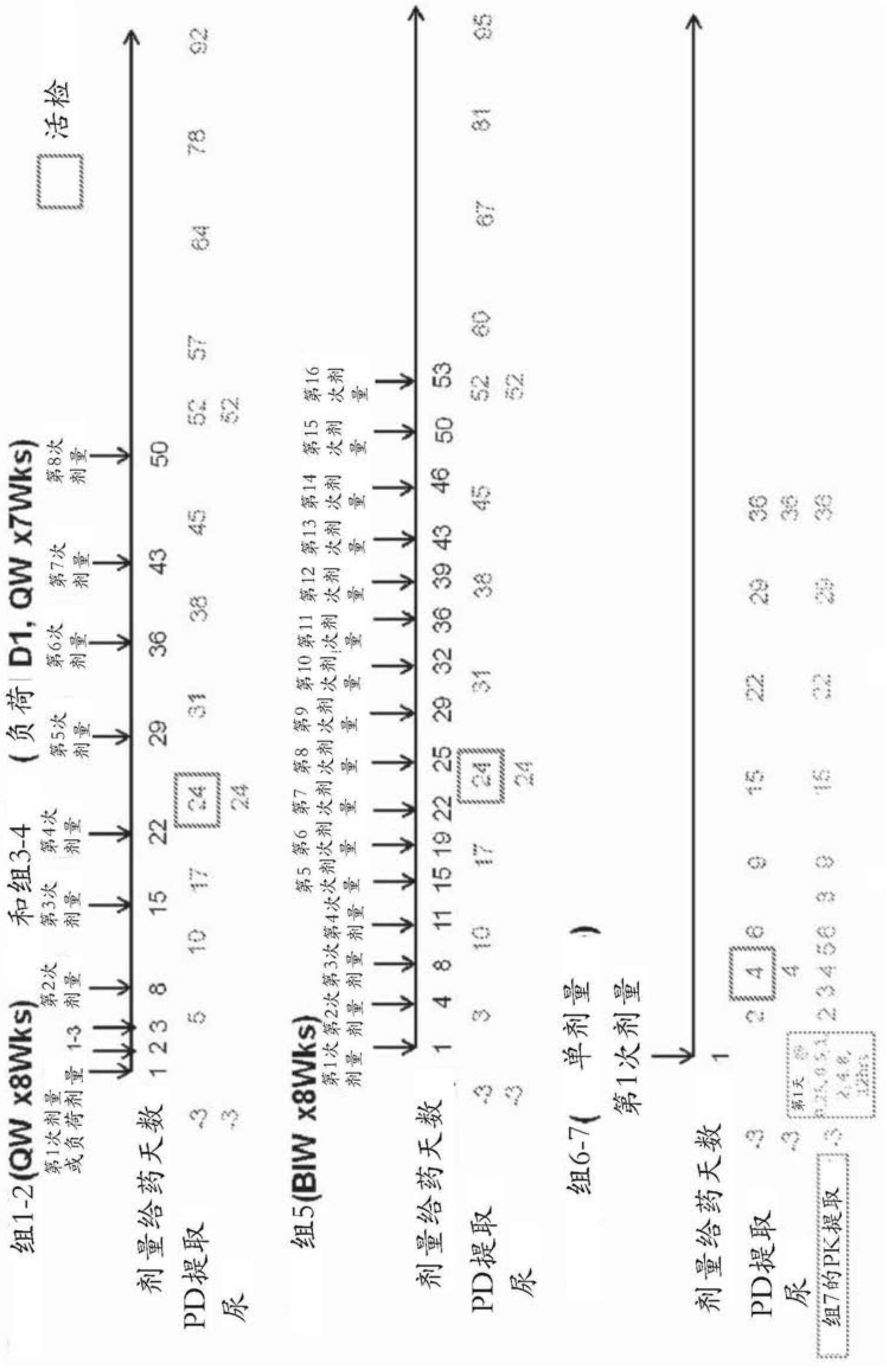

组1-2(QW x8Wks)
和组3-4
(负荷 D1, QW x7Wks)
活检
剂量给药天数
PD提取
尿
组5(BIW x8Wks)
组6-7(单剂量)
第1次剂量
组7的PK提取

图52

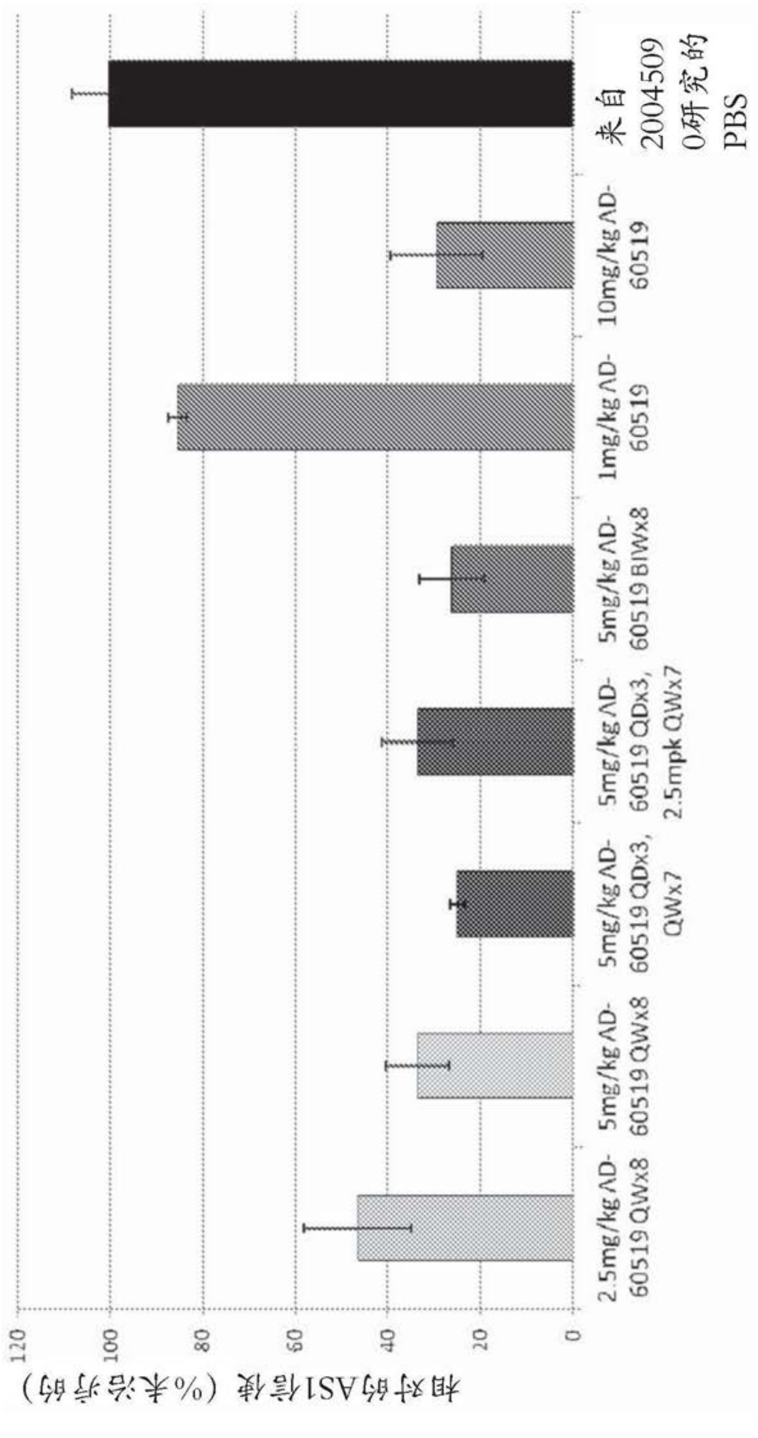

相对的AS1信使（%未治疗的）
120
100
80
60
40
20
0
2.5mg/kg AD-60519 QWx8
5mg/kg AD-60519 QWx8
5mg/kg AD-60519 QDx3, QWx7
5mg/kg AD-60519 QDx3, 2.5mpk QWx7
5mg/kg AD-60519 BIWx8
1mg/kg AD-60519
10mg/kg AD-60519
来自20045090研究的PBS

图53

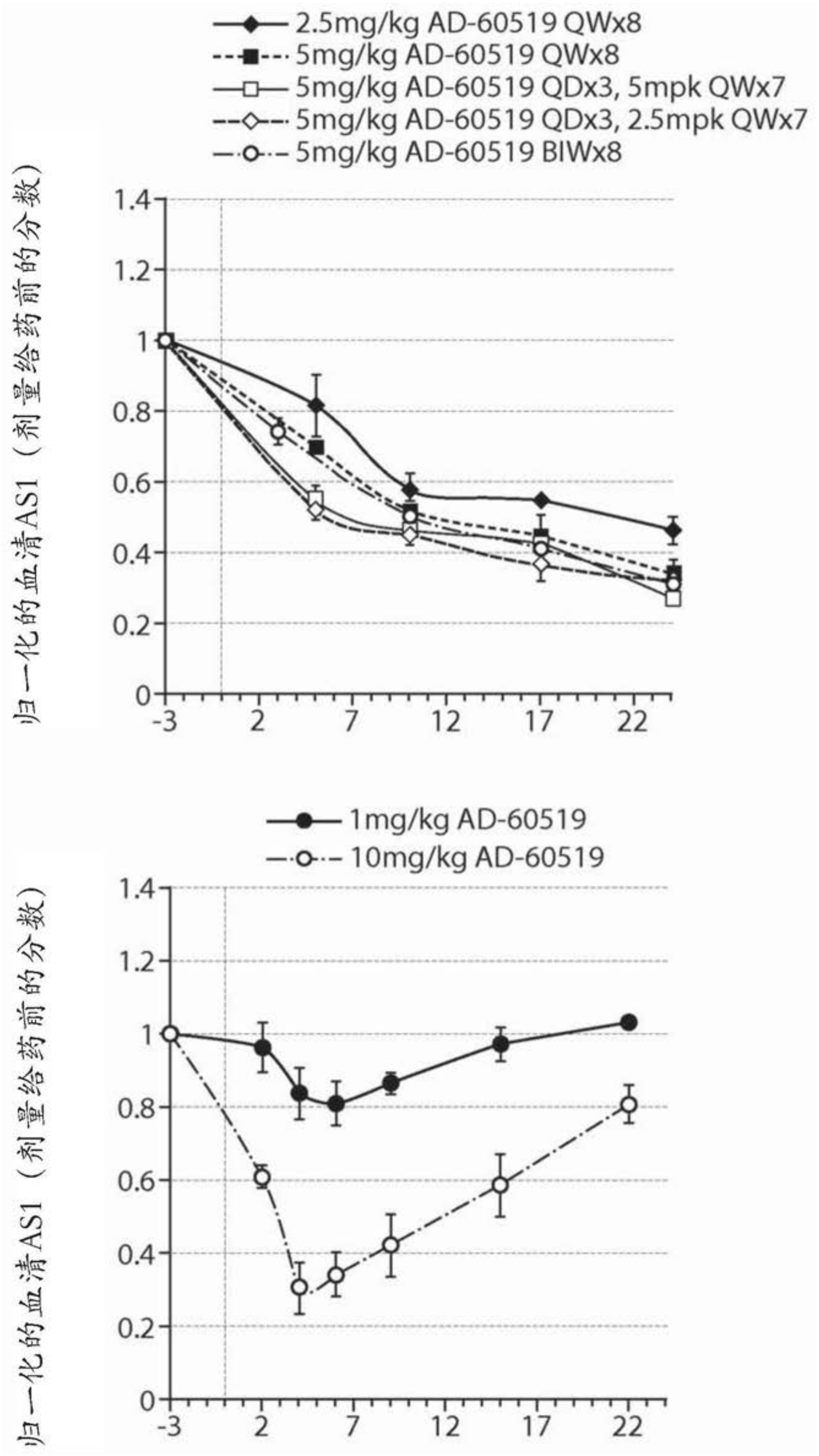

2.5mg/kg AD-60519 QWx8
5mg/kg AD-60519 QWx8
5mg/kg AD-60519 QDx3, 5mpk QWx7
5mg/kg AD-60519 QDx3, 2.5mpk QWx7
5mg/kg AD-60519 BIWx8
归一化的血清AS1（剂量给药前的分数）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-3
2
7
12
17
22
1mg/kg AD-60519
10mg/kg AD-60519
归一化的血清AS1（剂量给药前的分数）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-3
2
7
12
17
22

图54

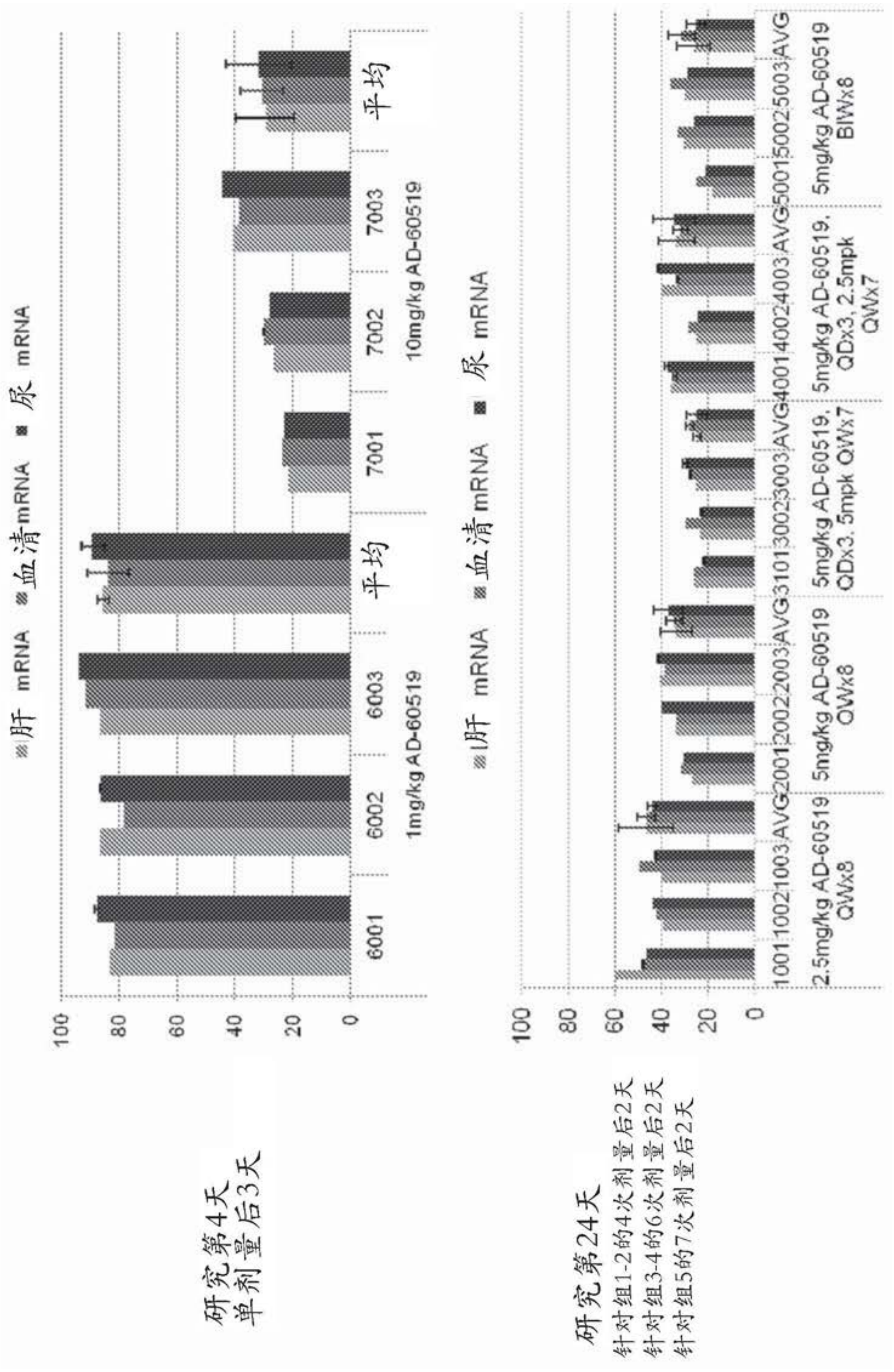

研究第4天
单剂量后3天
肝 mRNA
血清mRNA
尿 mRNA
100
80
60
40
20
0
6001
6002
6003
平均
1mg/kg AD-60519
7001
7002
7003
平均
10mg/kg AD-60519
研究第24天
针对组1-2的4次剂量后2天
针对组3-4的6次剂量后2天
针对组5的7次剂量后2天
1001
1002
1003
AVG
2.5mg/kg AD-60519 QWx8
2001
2002
2003
AVG
5mg/kg AD-60519 QWx8
3101
3002
3003
AVG
5mg/kg AD-60519, QDx3, 5mpk QWx7
4001
4002
4003
AVG
5mg/kg AD-60519, QDx3, 2.5mpk QWx7
5001
5002
5003
AVG
5mg/kg AD-60519 BIWx8

图55

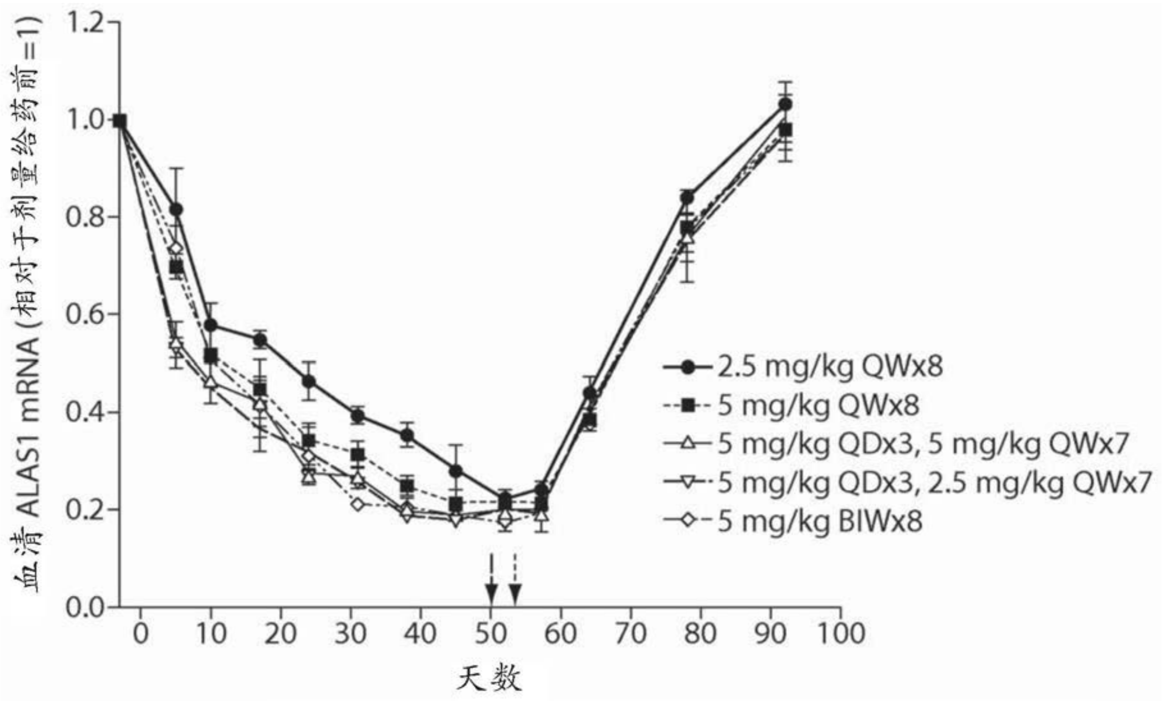

血清 ALAS1 mRNA (相对于剂量给药前=1)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
天数
2.5 mg/kg QWx8
5 mg/kg QWx8
5 mg/kg QDx3, 5 mg/kg QWx7
5 mg/kg QDx3, 2.5 mg/kg QWx7
5 mg/kg BIWx8

图56

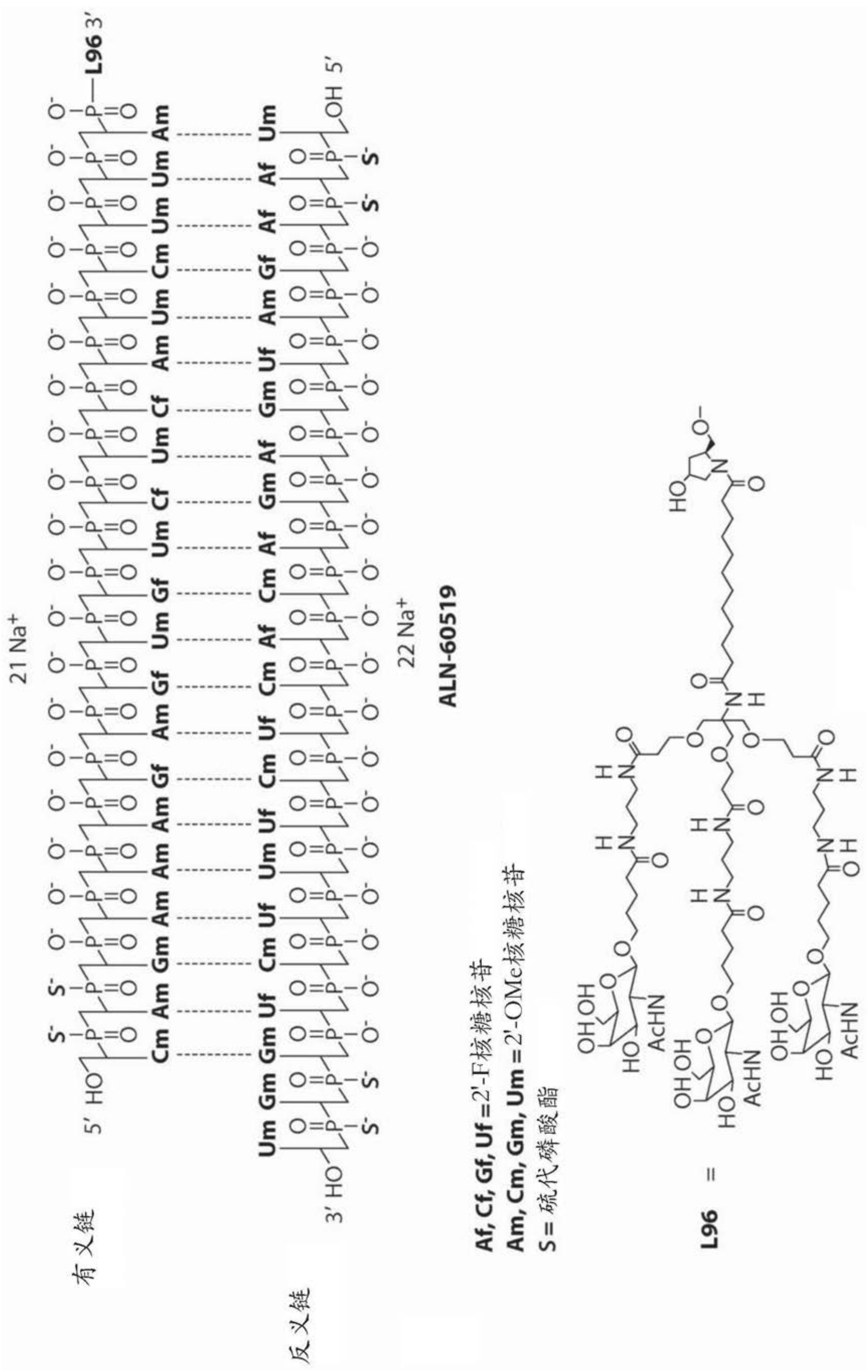

有义链
5' HO Cm Am Gm Am Am Am Gf Am Gf Um Gf Um Cf Um Cf Am Um Cm Um Um Am L96 3'
21 Na+
反义链
3' HO Um Gm Gm Uf Cm Uf Um Uf Cm Uf Cm Af Cm Af Gm Af Gm Uf Am Gf Af Af Um OH 5'
22 Na+
ALN-60519
Af, Cf, Gf, Uf = 2'-F核糖核苷
Am, Cm, Gm, Um = 2'-OMe核糖核苷
S = 硫代磷酸酯
L96 =

图57

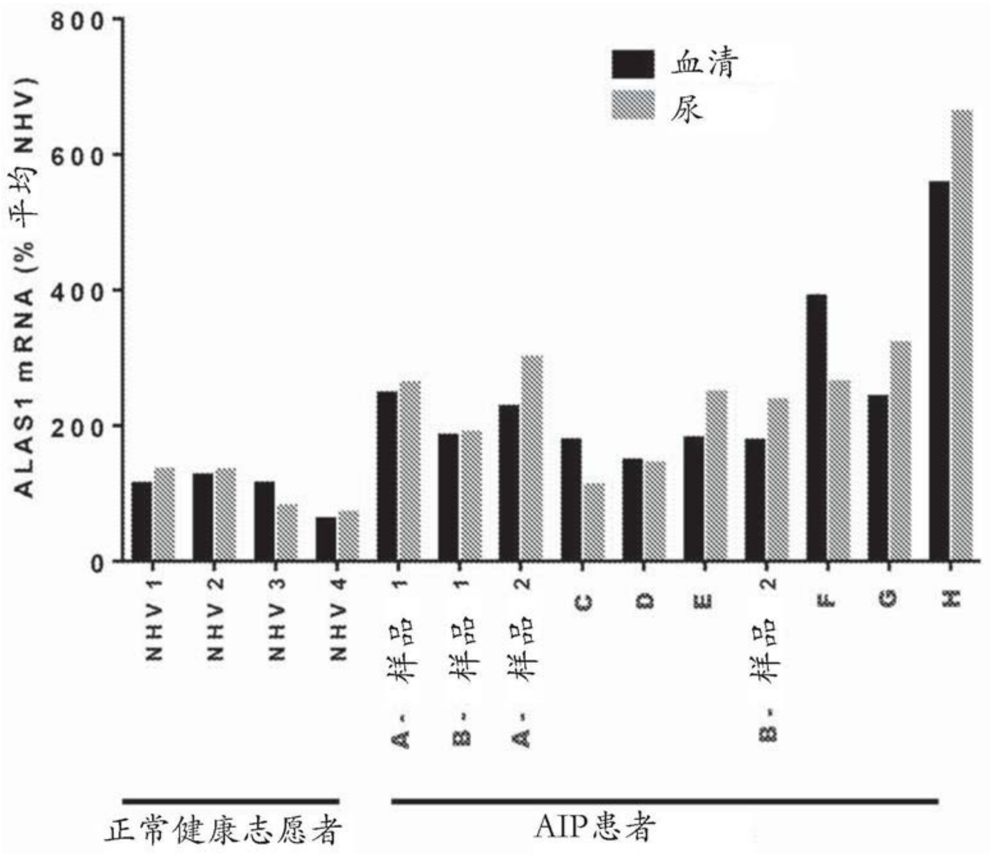

800
600
400
200
0
ALAS1 mRNA (% 平均 NHV)
血清
尿
NHV 1
NHV 2
NHV 3
NHV 4
A-样品 1
B-样品 1
A-样品 2
C
D
E
B-样品 2
F
G
H
正常健康志愿者
AIP患者

图58