



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114525280 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 24

(21) 申请号 202210187298.6

A61K 31/713 (2006.01)

(22) 申请日 2016.08.22

A61K 47/54 (2017.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/04 (2006.01)

62/213,224 2015.09.02 US

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

201680064059.4 2016.08.22

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·欣克尔

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 赵昊 汪烨君

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书7页 说明书113页

C12N 15/87 (2006.01)

序列表74页 附图1页

(54) 发明名称

程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)的iRNA组合
物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)基因的RNAi试剂,例如,双链RNAi试剂,以及使用此类RNAi试剂来抑制PD-L1基因表达的方法和治疗患有PD-L1相关疾病的受试者的方法。

1. 一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链核糖核酸 (RNAi) 试剂, 其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链, 其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸中任一项的差异不超过3个核苷酸, 并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸, 并且其中所述RNAi试剂包括至少一个经修饰的核苷酸。

2. 一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链核糖核酸 (RNAi) 试剂, 其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链, 所述反义链包括互补区, 所述互补区包含至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中任一个的任一反义序列的差异不超过3个核苷酸。

3. 根据权利要求1或2所述的dsRNA试剂, 其中所述有义链和反义链包括选自下组的核苷酸序列: AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中任一个的任一核苷酸序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的dsRNA试剂, 其中所述有义链的基本上所有核苷酸或者所述反义链的基本上所有核苷酸都包括核苷酸修饰。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的dsRNA试剂, 其中所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包括修饰。

6. 一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链核糖核酸 (RNAi) 试剂, 其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243位核苷酸中的任一项的差异不超过3个核苷酸, 并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸, 所述连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,

其中所述有义链的基本上所有核苷酸以及所述反义链的基本上所有核苷酸都包括核苷酸修饰, 并且

其中所述有义链与连接在3'-末端的配体缀合。

7. 根据权利要求6所述的双链RNAi试剂,其中所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包括修饰。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的RNAi试剂,其中至少一个所述核苷酸修饰选自下组:脱氧核苷酸、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸,构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸的核苷酸、以及包含5'-磷酸模拟物的核苷酸。

9. 根据权利要求8所述的RNAi试剂,其中所述核苷酸修饰包括3'-末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)短序列。

10. 根据权利要求2所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为至少17个核苷酸。

11. 根据权利要求2所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为19-21个核苷酸。

12. 根据权利要求11所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为19个核苷酸。

13. 根据权利要求1、2和6中任一项所述的RNAi试剂,其中每条链的长度都不超过30个核苷酸。

14. 根据权利要求1、2和6中任一项所述的RNAi试剂,其中至少有一条链包含具有至少1个核苷酸的3'悬端。

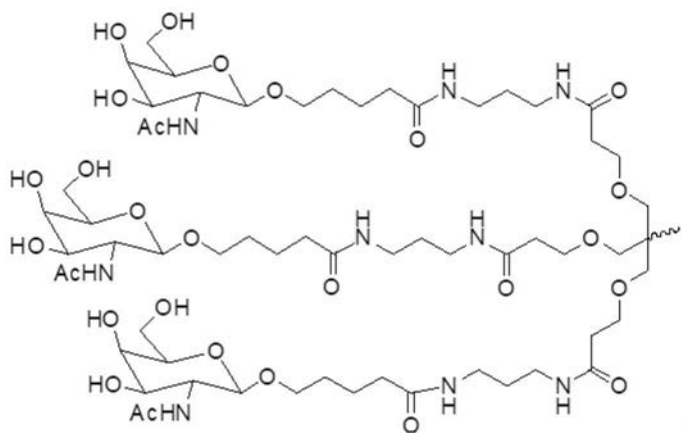
15. 根据权利要求1、2和6中任一项所述的RNAi试剂,其中至少有一条链包含具有至少2个核苷酸的3'悬端。

16. 根据权利要求1-5中任一项所述的RNAi试剂,其还包括配体。

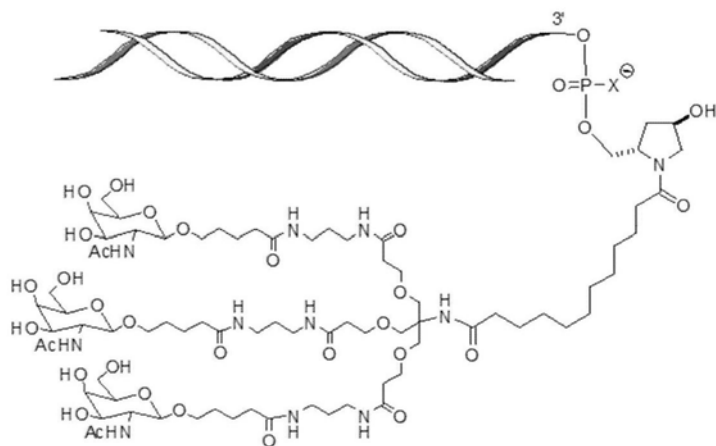
17. 根据权利要求16所述的RNAi试剂,其中所述配体与所述dsRNA试剂的所述有义链的3'端缀合。

18. 根据权利要求6或16所述的RNAi试剂,其中所述配体是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

19. 根据权利要求18所述的RNAi试剂,其中所述配体为



20. 根据权利要求18所述的RNAi试剂,其中所述dsRNA试剂如以下所示地与所述配体缀合:



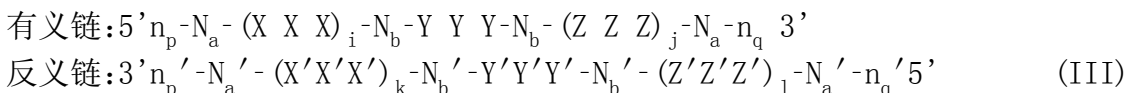
并且,其中X为O或S。

21. 根据权利要求20所述的RNAi试剂,其中所述X为O。

22. 根据权利要求2所述的RNAi试剂,其中所述互补区包括表3和表5中所示的任一个反义序列。

23. 根据权利要求2所述的RNAi试剂,其中所述互补区由表3或表5中所示的任一个反义序列组成。

24. 一种能够抑制PD-L1表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地为0或1;

p、p'、q和q'各自独立地为0-6;

每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

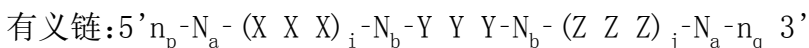
每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

每个 n_p 、 $n_{p'}$ 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 $n_{p'}$ 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序;

N_b 上的修饰与所述Y上的修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与所述Y'上的修饰不同;并且其中所述有义链与至少一个配体缀合。

25. 一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:



反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

其中:

i、j、k和l各自独立地为0或1;

p、p'、q和q'各自独立地为0-6;

每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个以不同方式修饰的核苷酸;

每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

每个 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

XXX、YYY、ZZZ、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

N_b 上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与Y'上的所述修饰不同;以及其中所述有义链与至少一个配体缀合。

26. 一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$
反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

其中:

i、j、k和l各自独立地为0或1;

每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

p、q和q'各自独立地为0-6;

$n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

XXX、YYY、ZZZ、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

N_b 上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与Y'上的所述修饰不同;以及其中所述有义链与至少一个配体缀合。

27. 一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$
反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

其中:

i 、 j 、 k 和 l 各自独立地为0或1;

每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

p 、 q 和 q' 各自独立地为0-6;

$n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

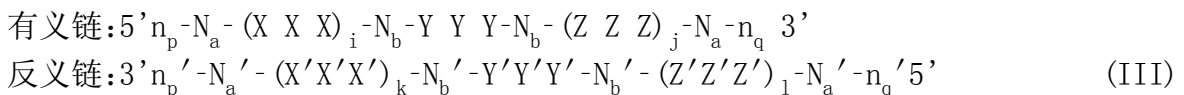
每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

N_b 上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与Y'上的所述修饰不同;以及

其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

28. 一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:



其中:

i 、 j 、 k 和 l 各自独立地为0或1;

每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

p 、 q 和 q' 各自独立地为0-6;

$n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

N_b 上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与Y'上的所述修饰不同;

其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及

其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

29. 一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

有义链:5'-N_p-Y Y Y-N_a-n_q 3'

反义链:3'-N_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5' (IIIa)

其中:

每个n_p、n_q和n_q'均独立地表示悬端核苷酸,每个n_p、n_q和n_q'均可能存在或可能不存在;
p、q和q'各自独立地为0-6;

n_p'>0并且至少有一个n_p'通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

每个N_a和N_a'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及

其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

30. 一种用于抑制PD-L1表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,

其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,

其中所述有义链的基本上全部核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,

其中所述有义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,

其中所述反义链的基本上所有核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,

其中所述反义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键并且在3'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,以及

其中所述有义链与在3'-末端通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

31. 一种细胞,所述细胞含有权利要求1、2、6和24-30中任一项所述的RNAi试剂。

32. 一种用于抑制PD-L1基因表达的药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-30中任一项所述的RNAi试剂。

33. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述RNAi试剂以非缓冲溶液形式施用。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物,其中所述非缓冲溶液是盐或水。

35. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中将所述RNAi试剂与缓冲溶液一起进行施用。

36. 根据权利要求35所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白盐、碳酸盐或磷酸盐或其任意组合。

37. 根据权利要求35所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸缓冲盐(PBS)。

38. 一种药物组合物,所述药物组合物包括权利要求1-5中任一项所述的双链RNAi试剂,以及脂质制剂。

39. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述脂质制剂包括LNP。

40. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述脂质制剂包括MC3。

41. 一种抑制细胞中PD-L1的表达的方法,所述方法包括:

使所述细胞与权利要求1-30中任一项所述的双链RNAi试剂或者权利要求32-40中任一项所述的药物组合物接触,从而抑制所述PD-L1基因在所述细胞中的表达。

42. 一种治疗患有能够因PD-L1表达的减少而受益的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-30中任一项所述的RNAi试剂或者权利要求32-40中任一项所述的药物组合物,从而治疗所述受试者。

程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 的iRNA组合物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是申请日为2016年8月22日、申请号为201680064059.4、发明名称为“程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 的iRNA组合物及其使用方法”的专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2016/047946的国家阶段申请,该国际申请要求要求于2015年9月2日提交的美国临时申请号62/213,224的优先权,其全部内容在此通过引用并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经通过电子方式提交的ASCII格式的序列表,并且其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII文件的拷贝创建于2016年7月29日,命名为 121301-04220_SL.txt并且大小为108,003个字节。

[0005] 发明背景

[0006] 程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 是由位于小鼠第19号染色体和人第9号染色体上的CD274基因编码的具有290个氨基酸的I型跨膜蛋白。PD-L1的表达涉及与慢性感染,例如,慢性病毒感染(包括,例如,HIV、HBV、HCV和HTLV等)、慢性细菌感染(包括,例如,幽门螺杆菌等)和慢性寄生虫感染(包括,例如,曼森氏裂体吸虫)相关的免疫应答逃逸。PD-L1在一些组织和细胞类型中都有表达,包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突细胞和非造血细胞(包括内皮细胞、肝细胞、肌细胞和胎盘)。

[0007] PD-L1的表达也参与抗肿瘤免疫活性的抑制。虽然肿瘤会表达能够被宿主T细胞识别的抗原,但是对肿瘤的免疫清除却很少见。这种失败一部分归因于肿瘤微环境导致的免疫抑制。PD-L1在许多肿瘤上的表达就是这种抑制性环境的组成部分,并且与其他免疫抑制信号一起发挥协同作用。已显示PD-L1在多种实体肿瘤(包括乳房、肺、结肠、卵巢、黑色素瘤、膀胱、肝脏、唾液、胃、神经胶质瘤、甲状腺、胸腺上皮、头和颈部)中原位表达(Brown JA等人,2003.J.Immunol.170:1257-66;Dong H等人2002. Nat.Med.8:793-800;Hamanishi J,等人2007.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:3360-65; Strome SE等人2003.Cancer Res.63:6501-5;Inman BA等人2007.Cancer 109:1499-505;Konishi J等人2004.Clin.Cancer Res.10:5094-100;Nakanishi J等人 2007.Cancer Immunol.Immunother.56:1173-82;Nomi T等人2007.Clin.Cancer Res. 13:2151-57;Thompson RH等人2004.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:17174-79;Wu C, Zhu Y,Jiang J, Zhao J,Zhang XG,Xu N.2006.Acta Histochem.108:19-24)。此外,在肿瘤浸润的淋巴细胞上PD-L1的受体-程序性细胞死亡蛋白1(也称为PD-1和CD279)的表达上调,而这也有助于肿瘤的免疫抑制(Blank C等人2003.J.Immunol. 171:4574-81)。最为重要的是,关于PD-L1在肿瘤上的表达与疾病后果相关性的研究表明,PD-L1的表达与肾癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌和胰腺癌的不良预后密切相关(Hamanishi J等人2007.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:3360-65;Inman BA等人2007.Cancer 109:1499-505;Konishi J等人2004.Clin.Cancer Res.10:5094-100; Nakanishi J等人2007.Cancer Immunol.Immunother.56:1173-82;Nomi T等人2007. Clin.Cancer Res.13:2151-57;Thompson RH等人2004.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:17174-79;Wu C,Zhu Y,Jiang J,

Zhao J, Zhang XG, Xu N. 2006. *Acta Histochem.* 108:19-24)。此外, 这些研究表明, 肿瘤上较高的PD-L1表达水平可能会促进肿瘤分期的恶化以及侵入更深的组织结构。

[0008] PD-1通路还能在血液恶性肿瘤中发挥作用。PD-L1在多发性骨髓瘤细胞上有表达, 但在正常的浆细胞上不表达(Liu J等人2007. *Blood* 110:296-304)。在一些原发性T细胞淋巴瘤上, 特别是间变性大细胞T淋巴瘤上, 表达有PD-L1(Brown JA等人, 2003. *J. Immunol.* 170:1257-66)。PD-1在血管免疫母细胞性淋巴瘤的T细胞上高度表达, 并且PD-L1在相关的滤泡树突细胞网络上也有表达(Dorfman DM等人2006. *Am. J. Surg. Pathol.* 30:802-10)。在以结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤中, 与淋巴细胞或组织细胞性(L&H)细胞相关的T细胞表达PD-1。基于PD-1的连接所诱导的基因读出的微阵列分析表明, 在霍奇金淋巴瘤中, 肿瘤相关的T细胞能对原位的PD-1信号产生应答(Chemnitz JM等人2007. *Blood* 110:3226-33)。HTLV-1介导的成年T细胞白血病和淋巴瘤中的CD4 T细胞表达PD-1和PD-L1(Shimauchi T等人2007. *Int. J. Cancer* 121:2585-90)。这些肿瘤细胞对TCR信号具有低应答性。

[0009] 在动物模型中的研究表明, 肿瘤上的PD-L1能抑制T细胞活化和肿瘤细胞的裂解, 并且在一些情况下会导致肿瘤特异性T细胞死亡增加(Dong H等人2002. *Nat. Med.* 8:793-800; Hirano F等人2005. *Cancer Res.* 65:1089-96)。肿瘤相关的APC也可以利用PD-1:PD-L通路来控制抗肿瘤的T细胞应答。肿瘤环境因子能上调PD-L1在肿瘤相关髓性DC群上的表达(Curiel TJ等人2003. *Nat. Med.* 9:562-67)。B16黑色素瘤的肿瘤引流淋巴结中的浆细胞样树突细胞(DC)表达IDO, 其能强烈激活调节性T细胞的抑制性活性。经IDO处理的调节性T细胞的抑制性活性需要与表达IDO的DC进行细胞接触才能产生(Sharma MD等人2007. *J. Clin. Invest.* 117:2570-82)。

[0010] 因此, 本领域需要针对PD-L1相关疾病, 例如感染性疾病(例如, 慢性细胞内感染性疾病, 如病毒性疾病, 如肝炎感染, 或细菌感染, 如结核感染)和癌症(例如, 肝癌, 例如肝细胞癌)的有效治疗。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了iRNA组合物, 所述iRNA组合物能影响由RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的对PD-L1基因的RNA转录物的切割。所述PD-L1基因可以在细胞内, 例如, 在受试者(例如, 人)体内的细胞内。

[0013] 因此, 一方面, 本发明提供了一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂, 其中所述RNAi包括有义链和反义链, 其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸, 并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸。

[0014] 在某些实施方案中, 所述有义链和反义链包括选自表3中的任意序列的序列。在其他实施方案中, 所述有义链和反义链包括选自表5中的任意序列的序列。

[0015] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂, 其中所述RNAi包括有义链和反义链, 所述反义链包括互补区, 所述互补区包含至少15个连续核苷酸, 所述至少15个连续核苷酸与表3中列出的任一反义序列的差异不超过3个核苷酸。在某些实施方案中, 所述有义链和反义链包括选自表5中的任意

序列的序列。

[0016] 在某些实施方案中,所述RNAi包含至少一个经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸以及所述反义链的基本上所有核苷酸都包括修饰。在一些实施方案中,所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包括修饰。

[0017] 一方面,本发明提供了用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链核糖核酸 (RNAi) 试剂,其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸中的任一项的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,并且其中所述RNAi试剂包含至少一个经修饰的核苷酸。

[0018] 另一方面,本发明提供了用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链核糖核酸 (RNAi) 试剂,其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链,所述反义链包括互补区,所述互补区包含至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中的任一项中的任一反义序列的差异不超过3个核苷酸。

[0019] 在一个实施方案中,所述正义链和反义链包括选自下组的核苷酸序列:AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中的任一项中的任一核苷酸序列。

[0020] 一方面,本发明提供了一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包括有义链和反义链,所述有义链和反义链形成双链区,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸以及所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且其中所述有义链与连接在3'-末端的配体缀合。

[0021] 一方面,本发明提供了用于抑制PD-L1表达的RNAi试剂,所述RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第

2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219 位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置的差异不超过3个核苷酸,使得所述反义链与所述有义链中的差异不超过3个核苷酸的所述至少15个连续核苷酸互补。

[0022] 在某些实施方案中,所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261 位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164 位、第3198-3219位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置的差异不超过3个核苷酸,使得所述反义链与所述有义链中的差异不超过3个核苷酸的所述至少15个连续核苷酸互补。

[0023] 在某些实施方案中,所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置的差异不超过3个核苷酸,使得所述反义链与所述有义链中的差异不超过3个核苷酸的所述至少15个连续核苷酸互补。

[0024] 另一方面,本发明提供了用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679 位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243 位核苷酸中的任一项的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸以及所述反义链的基本上所有核苷酸都包括核苷酸修饰,并且其中所述有义链与连接在3'-末端的配体缀合。

[0025] 在某些实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸或者所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,或者两条链的基本上所有核苷酸都是经修饰的;并且其中所述有义链与连接在3'-末端的配体缀合。

[0026] 一方面,本发明提供了用于抑制PD-L1表达的RNAi试剂,所述RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372 位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539 位、第2103-2124位、第2220-2261

位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680 位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219 位、第3221-3242位或第3222-3243位的核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续 核苷酸,所述至少15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置,使得所述反义链与所述有义链中的至少15个连续核苷酸互补。

[0027] 在某些实施方案中,所述试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第1093-1115位、第1093-1114位、第 1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669 位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242 位或第3222-3243位的核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少 15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置,使得所述反 义链与所述有义链中的至少15个连续核苷酸互补。

[0028] 在某些实施方案中,所述试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3222-3243位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第3221-3243位或第3221-3242位的核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸来自SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补性相应位置,使得所述反义链与所述有义链中的至少15个连续核苷酸互补。在某些实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,两条链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在优选的实施方案中,所述有义链与连接在3'-末端的 配体缀合。

[0029] 在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链包括互补区,所述互补区包含至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与表3和表5中任一个列出的任一反义 序列的差异不超过3个核苷酸。例如,在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链 包括包括互补区,所述互补区包含至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸 与AD-67635,AD-67637,AD-67658,AD-67632,AD-67629,AD-67631,AD-67633, AD-67643,AD-67653,AD-67640,AD-67650,AD-67676,AD-67661,AD-67667, AD-67655,AD-67672,AD-67659,AD-67673,AD-67664,AD-67662,AD-67660, AD-67656,AD-67628,AD-67647,AD-67626或AD-67645双链体的任一反义序列的差 异不超过3个核苷酸。在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链包括互补区,所 述互补区包含前述双链体的任一反义序列的至少15个连续核苷酸。

[0030] 在一些实施方案中,所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。在一个实施方案中,至少一个经修饰的核苷酸选自下组:脱氧核苷酸、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧 修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸,构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核 苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5- 失水己糖醇修饰的核苷

酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸的核苷酸、以及包含5'-磷酸模拟物的核苷酸。在另一实施方案中,所述经修饰的核苷酸包括3'-末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)短序列。

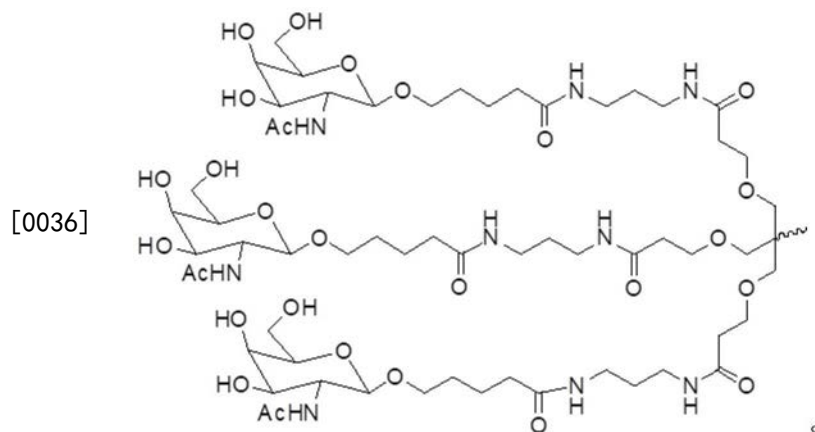
[0031] 在某些实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的。在某些实施方案中,所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的。在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链的基本上所有核苷酸都经过了修饰。

[0032] 在某些实施方案中,所述双链体包含表5中提供的经修饰的反义链。在某些实施方案中,所述双链体包含表5中提供的经修饰的有义链。在某些实施方案中,所述双链体包含表5中提供的经修饰的双链体。

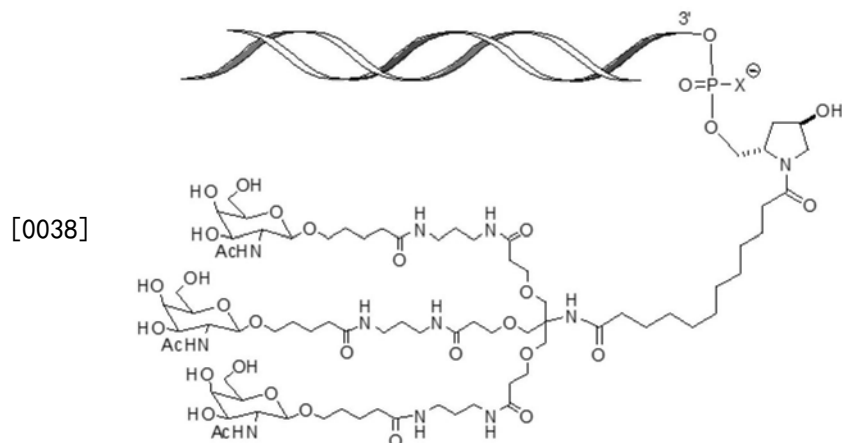
[0033] 在某些实施方案中,所述反义链和所述靶标之间的互补区域长度为至少17个核苷酸。例如,所述反义链和所述靶标之间的互补区域的长度为19到21个核苷酸,例如,所述互补区域的长度为21个核苷酸。在优选的实施方案中,每条链的长度不超过30个核苷酸。

[0034] 在一些实施方案中,至少有一条链包含具有至少1个核苷酸的3'悬端,例如,至少有一条链包含具有至少2个核苷酸的3'悬端。

[0035] 在许多实施方案中,所述RNAi试剂还包括配体。所述配体可以与所述RNAi试剂的所述有义链的3'端缀合。所述配体是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物,包括,但不限于,



[0037] 示例性的RNAi试剂如下所示地与配体缀合:



[0039] 并且,其中X为O或S。在一个实施方案中,所述X为O。

[0040] 在某些实施方案中,所述配体可以是胆固醇部分。

[0041] 在某些实施方案中,所述互补区包含表3和表5中任一所示的反义序列中的一个。

在另一实施方案中,所述互补区由表3和表5中任一所示的反义序列中的一个组成。

[0042] 另一方面,本发明提供了一种能够抑制PD-L1表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的 mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂优选由式(III)表示:

[0043] 有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0044] 反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0045] 其中: i、j、k和l各自独立地为0或1; p、p'、q和q'各自独立地为0-6; 每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同方式修饰的核苷酸; 每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列; 每个 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在; XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序; N_b 上的修饰与所述Y上的修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与所述Y'上的修饰不同; 并且其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0046] 在某些实施方案中, i为0; j为0; i为1; j为1; i和j都为0; 或者i和j都为1。在另一实施方案中, k为0; l为0; k为1; l为1; k和l都为0; 或者k和l都为1。在另一实施方案中, XXX与X'X'X'互补, YYY与Y'Y'Y'互补, 并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。在另一实施方案中, 所述YYY基序存在于所述有义链的切割位点处或附近。在另一实施方案中, 所述Y'Y'Y'基序存在于所述反义链上距5'-末端第11、12和13位处。在一个实施方案中, 所述Y'是2'-O-甲基。

[0047] 例如, 式(III)可以由式(IIIa)表示:

[0048] 有义链: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0049] 反义链: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

[0050] 在另一实施方案中, 式(III)由式(IIIb)表示:

[0051] 有义链: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0052] 反义链: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIb)

[0053] 其中每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0054] 或者, 式(III)可以由式(IIIc)表示:

[0055] 有义链: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0056] 反义链: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIc)

[0057] 其中每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0058] 另外, 式(III)可以由式(IIId)表示:

[0059] 有义链: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0060] 反义链: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIId)

[0061] 其中每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列, 并且每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

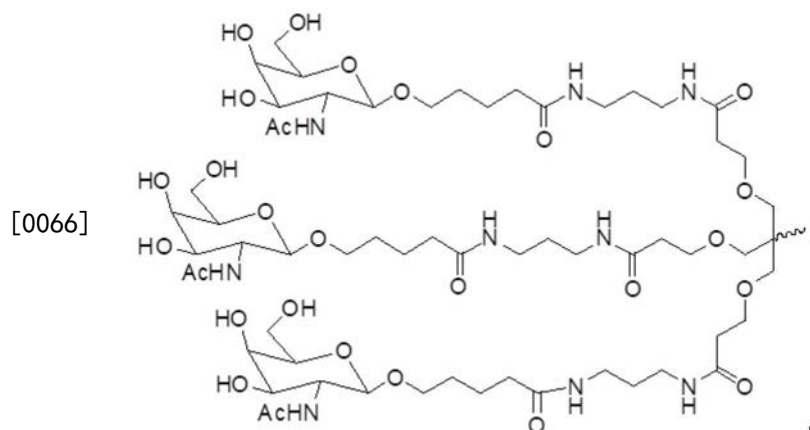
[0062] 在某些实施方案中, 所述双链区的长度为15-30个核苷酸对。例如, 所述双链区的长度可以是17-23个核苷酸对。所述双链区的长度可以是17-25个核苷酸对。所述双链区的长度可以是23-27个核苷酸对。所述双链区的长度可以是19-21个核苷酸对。所述双链区的

长度可以是21-23个核苷酸对。

[0063] 在某些实施方案中,每条链都具有15-30个核苷酸。在另一实施方案中,每条链都具有19-30个核苷酸。

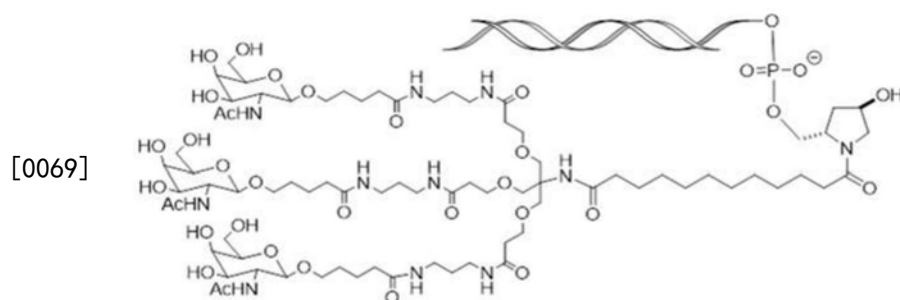
[0064] 所述核苷酸上的修饰可以选自下组:包括,但不限于,LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧基、2'-羟基及其组合。在另一实施方案中,所述核苷酸上的修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。

[0065] 在某些实施方案中,所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。在一个实施方案中,所述配体为



[0067] 所述配体可以与所述有义链的3'端连接。

[0068] 与配体缀合的RNAi试剂的示例性结构如下所示:



[0070] 在某些实施方案中,所述配体可以是胆固醇部分。

[0071] 在某些实施方案中,所述RNAi试剂进一步包括至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。例如,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键可以位于一条链(即,有义链或反义链)的3'-末端;或者位于两条链(有义链和反义链)的末端。

[0072] 在某些实施方案中,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键位于一条链(即,有义链或反义链)的5'-末端;或者位于两条链(有义链和反义链)的末端。

[0073] 在某些实施方案中,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键位于一条链(即,有义链或反义链)的5'-和3'-末端;或者位于两条链(有义链和反义链)的末端。

[0074] 在某些实施方案中,所述双链体的反义链5'-末端的第1位处的碱基对是AU碱基对。

[0075] 在某些实施方案中,所述Y核苷酸含有2'-氟代修饰。在另一实施方案中,所述Y'核苷酸含有2'-O-甲基修饰。在另一实施方案中, $p' > 0$ 。在一些实施方案中, $p' = 2$ 。在一些实施方案中, $q' = 0, p = 0, q = 0$,并且 p' 悬端核苷酸与所述靶mRNA互补。在一些实施方案

中, $q'=0, p=0, q=0$, 并且 p' 悬端核苷酸与所述靶 mRNA 不互补。

[0076] 在某些实施方案中, 所述有义链总共有 21 个核苷酸并且所述反义链总共有 23 个核苷酸。

[0077] 在某些实施方案中, 至少一个 n_p' 经由硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。在其他实施方案中, 所有的 n_p' 都经由硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。

[0078] 在某些实施方案中, 所述 RNAi 试剂选自表 3 和表 5 中任一所示的 RNAi 试剂组。在某些实施方案中, 所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸均包含修饰。

[0079] 一方面, 本发明提供了一种能够抑制细胞中 PD-L1 的表达的双链 RNAi 试剂, 其中所述双链 RNAi 试剂包括与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包括与编码 PD-L1 的 mRNA 的一部分互补的区域, 其中每条链的长度为约 14 个到约 30 个核苷酸, 其中所述双链 RNAi 试剂由式 (III) 表示:

[0080] 有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0081] 反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0082] 其中 i, j, k 和 l 各自独立地为 0 或 1; p, p', q 和 q' 各自独立地为 0-6; 每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含 0-25 个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个以不同方式修饰的核苷酸; 每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含 0-10 个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列, 每个 n_p, n_p', n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸, 每个 n_p, n_p', n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在; XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' 和 Z'Z'Z' 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序, 并且其中所述修饰是 2'-O-甲基或 2'-氟代修饰; N_b 上的修饰与 Y 上的修饰不同, 并且 N_b' 上的修饰与 Y' 上的修饰不同; 以及其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0083] 一方面, 本发明提供了一种能够抑制细胞中 PD-L1 的表达的双链 RNAi 试剂, 其中所述双链 RNAi 试剂包括与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包括与编码 PD-L1 的 mRNA 的一部分互补的区域, 其中每条链的长度为约 14 个到约 30 个核苷酸, 其中所述双链 RNAi 试剂由式 (III) 表示:

[0084] 有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0085] 反义链: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0086] 其中: i, j, k 和 l 各自独立地为 0 或 1; 每个 n_p, n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸, 每个 n_p, n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;

[0087] p, q 和 q' 各自独立地为 0-6; $n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接; 每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含 0-25 个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列, 每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸; 每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含 0-10 个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列; XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' 和 Z'Z'Z' 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序, 并且其中所述修饰是 2'-O-甲基或 2'-氟代修饰; N_b 上的修饰与 Y 上的修饰不同, 并且 N_b' 上的修饰与 Y' 上的修饰不同; 以及其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0088] 一方面, 本发明提供了一种能够抑制细胞中 PD-L1 的表达的双链 RNAi 试剂, 其中所述双链 RNAi 试剂包括与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包括与编码 PD-L1 的 mRNA

的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中 所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0089] 有义链: $5'n_p-N_a-(X\ X\ X)_i-N_b-Y\ Y\ Y-N_b-(Z\ Z\ Z)_j-N_a-n_q\ 3'$

[0090] 反义链: $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'\ 5'$ (III)

[0091] 其中i、j、k和l各自独立地为0或1;每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;p、q和q'各自独立地为0-6; $n_p'>0$ 并且 至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含 至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰 的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列;XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' 和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其 中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰; N_b 上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且 N_b' 上的修饰与Y'上的修饰不同;以及其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配 体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0092] 一方面,本发明提供了一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的RNAi试剂,其中所 述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的 mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所 述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0093] 有义链: $5'n_p-N_a-(X\ X\ X)_i-N_b-Y\ Y\ Y-N_b-(Z\ Z\ Z)_j-N_a-n_q\ 3'$

[0094] 反义链: $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'\ 5'$ (III)

[0095] 其中i、j、k和l各自独立地为0或1;每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或可能不存在;p、q和q'各自独立地为0-6; $n_p'>0$ 并且 至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含 至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰 的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列;XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' 和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其 中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰; N_b 上的修饰与Y上的修饰不同,并且 N_b' 上的 修饰与Y'上的修饰不同;其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及其中所述 有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或 多个GalNAc衍生物。

[0096] 一方面,本发明提供了一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的RNAi试剂,其中所 述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的 mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所 述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0097] 有义链: $5'n_p-N_a-Y\ Y\ Y-N_a-n_q\ 3'$

[0098] 反义链: $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'\ 5'$ (IIIa)

[0099] 其中每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 n_p 、 n_q 和 n_q' 均可能存在或 可能不存在;p、q和q'各自独立地为0-6; $n_p'>0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯 键与相邻的核苷酸连接;每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰 的或其混合的

核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;YYY和Y'Y'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0100] 一方面,本发明提供了一种用于抑制PD-L1表达的RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上全部核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中所述有义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的基本上所有核苷酸都包含选自下组的修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中所述反义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键并且在3'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,以及其中所述有义链与在3'-末端通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0101] 另一方面,本发明提供了用于抑制PD-L1表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上全部核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中所述有义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的基本上所有核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中所述反义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键并且在3'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,以及其中所述有义链与在3'-末端通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0102] 在某些实施方案中,所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,每条链都具有19-30个核苷酸。

[0103] 在某些实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的。在某些实施方案中,所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的。在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的。

[0104] 一方面,本发明提供了含有本文所述的RNAi试剂的细胞。

[0105] 一方面,本发明提供了编码RNAi试剂的至少一条链的载体,其中所述RNAi试剂包含与编码PD-L1的mRNA的至少一部分互补的区域,其中所述RNAi的长度为30个碱基对或更少,并且其中所述RNAi试剂靶向所述mRNA以进行切割。在某些实施方案中,所述互补区的

长度为至少15个核苷酸。在某些实施方案中,所述互补区的 长度为19到23个核苷酸。

[0106] 一方面,本发明提供了包括本文所述的载体的细胞。

[0107] 一方面,本发明提供了用于抑制PD-L1基因表达的药物组合物,所述药物组合物包含本发明所述RNAi试剂。在一个实施方案中,所述RNAi试剂以非缓冲溶液形式 施用。在某些实施方案中,非缓冲溶液是盐水或水。在其他实施方案中,所述RNAi 试剂以缓冲溶液形式施用。在此类实施方案中,所述缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬 酸盐、醇溶谷蛋白盐、碳酸盐或磷酸盐或其任意组合。例如,所述缓冲溶液是磷酸缓 冲盐(PBS)。

[0108] 一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括本发明所述的双链RNAi试剂,以及脂质制剂。在某些实施方案中,所述脂质制剂包括LNP。在某些实 施方案中,所述脂质制剂包括MC3。

[0109] 一方面,本发明提供了一种抑制细胞中PD-L1的表达的方法,所述方法包括(a) 使所述细胞与本发明所述的双链RNAi试剂或者本发明所述的药物组合物接触,以及 (b) 将步骤(a)中产生的细胞维持足够长的时间以实现PD-L1基因的mRNA转录本 的降解,从而抑制所述PD-L1基因在所述细胞中的表达。在某些实施方案中,所述细 胞在受试者(例如,人类受试者如女人或男人)体内。在优选的实施方案中,PD-L1 的表达被抑制了至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%;或者 被抑制到低于所使用的试验方法的检测阈值。

[0110] 一方面,本发明提供了一种治疗患有能够因PD-L1表达的减少而受益的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明所述RNAi 试剂或者本发明所述药物组合物,从而治疗所述受试者。

[0111] 一方面,本发明提供了在患有能够因PD-L1表达的减少而受益的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用预防有效量的本发 明所述RNAi试剂或本发明所述药物组合物,从而在患有能够因PD-L1表达的减少而 受益的疾病的受试者中预防至少一种症状。

[0112] 在某些实施方案中,向所述受试者施用所述RNAi引起PD-L1信号通路的降低。在某些实施方案中,施用所述RNAi引起所述受试者体内PD-L1水平的降低,例如, 所述受试者体内PD-L1血清水平的降低。

[0113] 在某些实施方案中,所述PD-L1相关疾病是感染性疾病,例如慢性的细胞内感染,例如,病毒性疾病(例如肝炎感染),或细菌感染(例如结核病感染)。

[0114] 在某些实施方案中,所述PD-L1相关疾病是癌症,例如肝癌(如肝细胞癌)。

[0115] 在某些实施方案中,本发明还包括向患有PD-L1相关疾病的受试者施用抗病毒试剂。在某些实施方案中,所述抗病毒试剂是核苷酸或核苷类似物。在某些实施方案中, 所述抗病毒试剂用于治疗肝炎病毒感染,例如HBV感染,HDV感染。在某些实 施方案中,所述抗病毒试剂不是免疫刺激剂。

[0116] 在某些实施方案中,本发明还包括向患有PD-L1相关疾病的受试者施用化学治疗 剂。

[0117] 在PD-L1相关疾病是癌症的某些实施方案中,还对受试者进行癌症治疗。在某些 实施方案中,所述癌症治疗包括手术。在某些实施方案中,所述癌症治疗包括放射治 疗。在某些实施方案中,所述癌症治疗包括施用化学治疗剂。

[0118] 在各种实施方案中,以约0.01mg/kg到约10mg/kg或者约0.5mg/kg到约50mg/kg 的剂量施用所述RNAi试剂。在一些实施方案中,以约10mg/kg到约30mg/kg的剂量 施用所述RNAi试剂。在一些实施方案中,以选自0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3 mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg的剂量施用所述RNAi试剂。在某些实施方案 中,约每周一次、每月一次、每两个月一次、或者每季度一次(即,每三个月一次) 施用约0.1mg/kg到约5.0mg/kg的剂量的所述RNAi试剂。

[0119] 在某些实施方案中,每周一次将所述RNAi试剂施用给受试者。在某些实施方案中,每月一次将所述RNAi试剂施用给所述受试者。在某些实施方案中,每季度一次 (即,每三个月一次)施用所述RNAi试剂。

[0120] 在一些实施方案中,以皮下方式向所述受试者施用所述RNAi试剂。

[0121] 在各种实施方案中,本发明所述方法还包括在所述受试者中测量PD-L1水平。在某些实施方案中,PD-L1信号传导途径的表达或活性水平的降低表明所述PD-L1相关 疾病正在被治疗。

[0122] 在各种实施方案中,测量PD-L1表达的替代标记物。例如,在治疗感染性疾病时,检测病原体的存在,例如来自所述病原体的蛋白质或核酸,例如HBsAg,HBcAg,HB cccDNA。在某些实施方案中,检测针对所述病原体的免疫应答指示物,例如抗-HB抗 体。在某些实施方案中,检测指示有效治疗感染的替代标记的改变,优选临床相关的 改变。在的癌症治疗过程中,使用RECIST标准证明肿瘤负荷的稳定或减少可以用作 PD-L1的表达或活性减少的替代标记物。

[0123] 附图简述

[0124] 图1显示了抗原呈递细胞和T细胞之间的PD-L1信号传导。

[0125] 发明详述

[0126] 本发明提供了iRNA组合物,所述iRNA组合物能影响由RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的对程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)基因的RNA转录物的切割。所 述基因可以存在于细胞内,例如,受试者(例如,人)体内的细胞内。使用这些iRNA 使得能够靶向性地降解哺乳动物中对应基因(PD-L1基因)的mRNA。

[0127] 本发明所述iRNA已被设计成靶向人PD-L1基因,包括在其他哺乳动物物种的 PD-L1同源物中保守的基因部分。在不受理论限制的前提下,据信前述特性的组合或 亚组合以及这些iRNA试剂中的特定靶位点或特定修饰使得本发明所述的iRNA具有 更好的功效、稳定性、效力、持久性和安全性。

[0128] 因此,本发明还提供了使用iRNA组合物治疗患有能因抑制或减少所述PD-L1基 因的表达而受益的疾病(例如,PD-L1相关疾病,例如感染如病毒感染(例如,肝炎 病毒感染),或者癌症,例如肝癌如肝细胞癌)的方法,所述iRNA组合物能影响由 RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的对PD-L1基因的RNA转录物的切割。

[0129] 特别地,极低剂量的本发明所述的iRNA能够特异且有效地介导RNA干扰 (RNAi),导致相应基因(PD-L1基因)表达的显著抑制。

[0130] 本发明所述iRNA包括具有长度为约30个核苷酸或以下(例如,长度为15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-

29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸) 的区域的RNA链,所述区域基本上与PD-L1基因的mRNA转录物的至少一部分互补。在某些实施方案中,本发明所述iRNA包括RNA链(所述反义链),所述RNA链可以包括更长的长度,例如高达66个核苷酸,例如,长度为36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸,并且具有由至少19个连续核苷酸组成的基本上与PD-L1基因的mRNA转录物的至少一部分互补的区域。具有较长长度反义链的这些iRNA优选包括长度为20-60个核苷酸的第二RNA链(所述有义链),其中所述有义链和反义链形成具有18-30个连续核苷酸的双链体。使用这些iRNA能够靶向性降解哺乳动物中相应基因(PD-L1基因)的mRNA。极低剂量的本发明所述iRNA尤其能够特异且有效地介导RNA干扰(RNAi),导致相应基因(PD-L1基因)表达的显著抑制。本发明人已经通过使用体外和体内测定法证明了靶向PD-L1基因的iRNA能够介导RNAi,导致显著抑制PD-L1的表达,以及减少通过所述PD-L1通路的信号传导,这将减少PD-L1相关疾病(例如,感染性疾病如病毒性疾病或慢性细胞内感染;或癌症)的一个或多个相关症状。因此,包括这些iRNA的方法和组合物可用于治疗患有PD-L1相关疾病(例如,感染性疾病如病毒性疾病或慢性细胞内感染;或癌症)的受试者。本文所述的方法和组合物可用于降低受试者中PD-L1的水平,例如,受试者(尤其是患有慢性细胞内感染,特别是慢性肝脏感染,或者肿瘤的受试者)肝脏中PD-L1的水平。

[0131] 以下详细描述公开了如何制备并使用含有iRNA的组合物来抑制PD-L1基因的表达,以及用于治疗患有能因所述PD-L1基因表达的减少而受益的疾病或病症的受试者的化合物、用途和方法。

[0132] I. 定义

[0133] 为了使本发明更易理解,首先定义了某些术语。此外,应该注意的是,当列举参数的值或范围时,所列举的值的中间值和中间范围也应为本发明的一部分。

[0134] 本文使用的冠词“一个”(“a”和“an”)是指一个或一个以上(即,指至少一个)该冠词所指代的语法对象。举个例子,“一个元素”是指一个元素或一个以上的元素,例如,多个元素。

[0135] 本文使用的术语“包括(including)”指“包括但不限于”,并且两者可以互换使用。

[0136] 除非上下文另有明确指示,否则本文使用的术语“或”表示术语“和/或”,并且可与其互换使用。例如,“有义链或反义链”应被理解为“有义链或反义链或者有义链和反义链”。

[0137] 本文使用的术语“约”意味着在本领域的公差范围内。例如,“约”可以理解为相对于平均值的约2个标准偏差。在某些实施方案中,约表示 $\pm 10\%$ 。在某些实施例中,约表示 $\pm 5\%$ 。当一系列数字或范围之前时出现约时,应该理解“约”能够修饰所述系列或范围中的每个数字。

[0138] 从上下文可以清楚地看到,存在于数字或一系列数字之前的术语“至少”应理解成包括与所述术语“至少”相邻的数字,以及从逻辑上可能包括的所有后续数字或整数。例如,核酸分子中的核苷酸数必须是整数。例如,“具有21个核苷酸的核酸分子的至少18个核苷酸”是指18个、19个、20个或21个核苷酸具有所述性质。当至少出现在一系列数字或范围

之前时,应该理解“至少”可以修饰所述系列或范围中的每个数字。

[0139] 本文使用的“不超过”或“小于”应被理解成与所述短语相邻的数值,以及符合上下文逻辑的逻辑较低值或整数,直到零为止。例如,具有“不超过2个核苷酸”的悬端的双链体具有2个、1个或0个核苷酸悬端。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,应该理解,“不超过”可以修饰所述系列或范围中的每个数字。

[0140] 如果序列与其所指示的转录物上的位点存在冲突,或者与其他序列存在冲突,则优先采用说明书中所列举的核苷酸序列。

[0141] 只要本领域技术人员认为合适,就可以组合本发明所述的各种实施方案。

[0142] 已经显示,在小鼠的T和B细胞、DC、巨噬细胞、间充质干细胞和骨髓衍生的肥大细胞上组成性地表达“程序性细胞死亡1配体1”、“PD-L1”或“CD274”(也称为B7-H;B7H1;PDL1;PD-L1;PDCD1L1;PDCD1LG1,B7同源物1,PDCD1配体1,以及程序性细胞死亡配体1)。在多种非造血细胞上也发现有PD-L1的表达,并且许多细胞类型在被激活后能上调PD-L1的表达。在经IFN- γ 刺激后,T细胞、NK细胞、巨噬细胞、骨髓DC、B细胞、上皮细胞和血管内皮细胞上都表达PD-L1(Flies DB和Chen L(2007) J Immunother.30(3):251-60)。PD-L1在巨噬细胞上显著表达。更多关于PD-L1的信息在例如NCBI的基因数据库中提供,其网址为www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29126(截至提交本申请之日,其通过引用并入本文)。

[0143] 本文使用的“程序性细胞死亡1配体1”可以与术语“PD-L1”(以及任选的上面列出的任何其他公认的名称)互换使用,是指天然存在的编码程序性细胞死亡1配体1蛋白的基因。所述人PDL-1基因参考序列的氨基酸序列和完整编码序列可以在,例如,GenBank登录号GI:390979638(RefSeq登录号NM_001267706.1;SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2)和GenBank登录号GI:292658763(RefSeq登录号NM_014143.3;SEQ ID NO:9和10)中找到。在,例如,Grzywnowicz等人,PLoS One.2012;7:e35178(其通过引用并入本文)中提供了另外的剪接变体。所述人PD-L1基因的哺乳动物直系同源物可在,例如,GI:755563510(RefSeq登录号XM_006527249.2,小鼠;SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4);GI:672040129(RefSeq登录号XM_006231248.2,大鼠;SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6);GenBank登录号GI:544494555(RefSeq登录号XM_005581779.1,食蟹猴;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8)中找到。

[0144] 许多天然存在的SNP是已知的,并且可以在,例如,NCBI的SNP数据库中找到,网址为www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=29126,所述SNP数据库列出了人PD-L1中的SNP(截至提交本申请提交之日,其通过引用并入本文)。在优选的实施方案中,此类天然存在的变体包括在所述PD-L1基因序列的范围内。

[0145] 通过使用例如GenBank、UniProt和OMIM等公开的数据库,可以方便地获取PD-L1 mRNA序列的其他实例。

[0146] 本文使用的“靶序列”是指在PD-L1基因转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括在初级转录产物的RNA加工过程中的产物mRNA。所述序列的靶部分至少要足够的长,才能充当siRNA-指导的切割的底物,所述siRNA-指导的切割位于在PD-L1基因转录期间形成的mRNA分子的那部分核苷酸序列处或附近。在一个实施方案中,所述靶序列位于PD-L1的蛋白编码区内。

[0147] 所述靶序列的长度可以是自约9-36个核苷酸,例如,长度为约15-30个核苷酸。例如,所述靶序列的长度可以是自约15-30个核苷酸,15-29个、15-28个、15-27个、15-26个、

15-25个、15-24个、15-23个、15-22个、15-21个、15-20个、15-19个、15-18个、15-17个、18-30个、18-29个、18-28个、18-27个、18-26个、18-25个、18-24个、18-23个、18-22个、18-21个、18-20个、19-30个、19-29个、19-28个、19-27个、19-26个、19-25个、19-24个、19-23个、19-22个、19-21个、19-20个、20-30个、20-29个、20-28个、20-27个、20-26个、20-25个、20-24个、20-23个、20-22个、20-21个、21-30个、21-29个、21-28个、21-27个、21-26个、21-25个、21-24个、21-23个或21-22个核苷酸。上述范围和长度的中间范围和长度也应是本发明的一部分。

[0148] 本文使用的术语“包括序列的链”是指包括核苷酸链的寡核苷酸，所述核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法提及的序列进行描述。

[0149] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常分别代表包含鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶等碱基的核苷酸。然而，应当理解，术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指经修饰的核苷酸(如下详述)，或者指替代物替换部分(参见，例如，表2)。本领域技术人员很清楚，鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶能被其他部分替换，但同时基本上不改变包含带有这种替换部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对性质。例如，但不限于，包含肌苷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碱基配对。因此，在本发明所述dsRNA的核苷酸序列中，含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以被含有，例如，肌苷的核苷酸替换。在另一实例中，所述寡核苷酸中任意地方的腺嘌呤和胞嘧啶都可以分别被鸟嘌呤和尿嘧啶替换，从而与所述靶mRNA形成G-U摆动(Wobble)碱基对。包含此类替代部分的序列适用于本发明所述的组合物和方法。

[0150] 本文中互换使用的术语“iRNA”、“RNAi试剂”以及“iRNA试剂”、“RNA干扰试剂”是指含有如本文所定义的RNA的试剂，并且其经由RNA诱导的沉默复合物(RISC)通路介导对RNA转录物的靶向性切割。iRNA通过一种被叫做RNA干扰(RNAi)的过程指导mRNA的序列特异性降解。所述iRNA调节(例如，抑制)细胞(例如，受试者如哺乳动物受试者体内的细胞)中PD-L1基因的表达。

[0151] 在一个实施方案中，本发明所述的RNAi试剂包括单链RNA，所述单链RNA与靶RNA序列(例如，PD-L1的靶mRNA序列)相互作用，以指导对所述靶RNA的切割。在不希望受理论束缚的前提下，据信被引入细胞的长双链RNA会被称为Dicer的III型内切核酸酶分解成siRNA(Sharp等人(2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer是一种核糖核酸酶III样酶，其能将所述dsRNA加工成具有19-23个碱基对和特征性的两个碱基的3'悬端的短干扰RNA(Bernstein等人，(2001) Nature 409:363)。然后将所述siRNA并入进RNA诱导的沉默复合物(RISC)中，其中一个或多个解旋酶能解开所述siRNA双链体，使得所述互补反义链能够引导靶标识别(Nykanen等人，(2001) Cell 107:309)。在与适当的靶mRNA结合后，所述RISC内的一个或多个内切核酸酶会切割所述靶标来诱导沉默(Elbashir等人，(2001) Genes Dev. 15:188)。因此，一方面，本发明涉及产生于细胞内的并且能促进RISC复合物的形成从而实现对所述靶基因(即，PD-L1基因)的沉默的单链RNA(siRNA)。因此，本文使用的术语“siRNA”还能指如上所述的iRNA。

[0152] 在某些实施方案中，所述RNAi试剂可以是被引入细胞或生物体内用以抑制靶mRNA的单链siRNA(ssRNAi)。单链RNAi试剂结合所述RISC核酸内切酶-Argonaute 2，随后Argonaute 2裂解所述靶mRNA。所述单链siRNA通常为15-30个核苷酸并且已经经过了化学

修饰。美国专利号8,101,348和Lima等人,(2012)Cell 150:883-894中 描述了关于单链 siRNA的设计和测试,其全部内容都通过引用并入本文。如本文所述,本文所述的任意反义核苷酸序列都可以以单链siRNA或以经如Lima等人,(2012)Cell 150:883-894中所描述的方法进行化学修饰后的形式使用。

[0153] 在某些实施方案中,用于本发明所述的组合物、用途和方法中的“iRNA”是双链RNA,并且在本文中称为“双链RNAi试剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA 试剂”或“dsRNA”。所述术语“dsRNA”是指核糖核酸分子复合物,其具有双链体 结构,所述双链体结构包含两条反向平行的并且基本上互补的核酸链,所述核酸链相 对于靶RNA(即,PD-L1基因)具有“有义的”和“反义的”取向。在本发明的一些 实施方案中,双链RNA(dsRNA)通过本文中称为RNA干扰或RNAi的转录后基因 沉默机制触发靶RNA(例如,mRNA)的降解。

[0154] 通常,dsRNA分子每条链的绝大部分核苷酸都是核糖核苷酸,但是如在本文中所详细描述的,每条链或两条链都还可以包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核 糖核苷酸或经修饰的核苷酸。另外,本说明书中使用的“iRNA”可以包括具有化学修 饰的核糖核苷酸;iRNA可以包括在多个核苷酸处的实质性修饰。本文使用的术语“经 修饰的核苷酸”是指独立地具有经修饰的糖部分、经修饰的核苷酸间键、或者经修饰 的核碱基、或其任意组合的核苷酸。因此,经修饰的核苷酸这个术语涵盖将例如官能 团或原子替换成、添加到或者移除出核苷间键、糖部分或核碱基。适用于本发明所述 试剂的修饰包括本文公开的或本领域已知的所有类型的修饰。就本说明书和权利要求 而言,“iRNA”或“RNAi试剂”涵盖 siRNA类分子中使用的任何此类修饰。

[0155] 双链体区可以具有允许通过RISC通路特异性地降解目标靶RNA的任何长度,并 且长度范围可以是约9个到36个碱基对,例如,长度为约15-30个碱基对,例如,长 度为约9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19 个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、 31个、32个、33个、34个、35个或36个碱基对,例如长度为约15-30个、15-29个、 15-28个、15-27个、15-26个、15-25个、15-24个、15-23个、15-22个、 15-21个、15-20个、15-19个、15-18个、15-17个、18-30个、18-29个、18-28个、18-27个、 18-26个、18-25个、18-24个、18-23个、18-22个、18-21个、18-20个、19-30个、 19-29个、19-28个、19-27个、19-26个、19-25个、19-24个、19-23个、19-22个、 19-21个、19-20个、20-30个、20-29个、20-28个、20-27个、20-26个、20-25个、 20-24个、20-23个、20-22个、20-21个、21-30个、21-29个、21-28个、21-27个、 21-26个、21-25个、21-24个、21-23个或21-22个碱基对。上述范围和长度的中间范 围和长度也应是本发明的一部分。

[0156] 形成双链体结构的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分,或者其可以是分 离的RNA分子。当所述两条链是一个较大分子的一部分,并且因此通过形成双链体结 构的一条链的3'-末端和相应另一条链的5'-末端之间的不间断核苷酸链连接时,便将 该连接性RNA链称为“发夹环”。发夹环可以包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实 施方案中,所述发夹环可以包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、 10个、20个、23个或更多个未配对的核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹环可以 是10个或更少的核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹环可以是8个或更少的未配对 的核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹环可以是4-10个未配对的核苷酸。在一些实 施方案中,所述发夹环可以是4-8个核苷酸。

[0157] 当dsRNA的两条基本互补的链被多个单独的RNA分子所包含时,虽然没有必要,但

是这些分子还是可以以共价方式连接。当所述两条链以不间断核苷酸链之外的方式 共价连接时(所述不间断核苷酸链存在于形成双链体结构的一条链的3'-末端和相应另一条链的5'-末端之间),则将所述连接结构称为“接头”。所述两条RNA链可以具有相同的或不同的核苷酸数量。将所述dsRNA的最短链中的核苷酸数量减去所述双链体中存在的任何悬端便得到了碱基对的最大数目。除了所述双链体结构之外, RNAi 还可以包含一个或多个核苷酸悬端。

[0158] 在某些实施方案中,本发明所述的iRNA试剂是与靶RNA序列(例如,PD-L1基因)相互作用的dsRNA,其每条链都包含19-23个核苷酸。在不希望受理论约束的前提下,被引入细胞的长双链RNA被一种称为Dicer的III型内切核酸酶分解形成siRNA (Sharp等人, (2001) *Genes Dev.* 15:485)。Dicer是一种核糖核酸酶III样酶,其能将所述dsRNA加工成具有19-23个碱基对的和具有特征性的两个碱基的3'悬端的短干扰RNA (Bernstein等人, (2001) *Nature* 409:363)。然后将所述siRNA并入进RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,其中一个或多个解旋酶能解开所述siRNA双链体,使得所述互补的反义链能够引导对靶标的识别(Nykanen等人, (2001) *Cell* 107:309)。在与适当的靶mRNA结合后,所述RISC内的一个或多个内切核酸酶会切割所述靶标来诱导沉默(Elbashir等人, (2001) *Genes Dev.* 15:188)。

[0159] 在一些实施方案中,本发明所述iRNA是具有24-30个核苷酸或者可能甚至更长(例如,25-35个、27-53个或27-49个核苷酸)的dsRNA,其与靶RNA序列(例如, PD-L1靶mRNA序列)相互作用,来指导切割所述靶RNA。在不希望受理论约束的前提下,被引入细胞的长双链RNA被一种称为Dicer的III型内切核酸酶分解形成 siRNA (Sharp等人, (2001) *Genes Dev.* 15:485)。Dicer是一种核糖核酸酶III样酶,其能将所述dsRNA加工成具有19-23个碱基对的和具有特征性的两个碱基的3'悬端的短干扰RNA (Bernstein等人, (2001) *Nature* 409:363)。然后将所述siRNA并入进RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,其中一个或多个解旋酶能解开所述siRNA双链体,使得所述互补的反义链能够引导对靶标的识别(Nykanen等人, (2001) *Cell* 107:309)。在与适当的靶mRNA结合后,所述RISC内的一个或多个内切核酸酶会切割所述靶标来诱导沉默(Elbashir等人, (2001) *Genes Dev.* 15:188)。

[0160] 本文使用的术语“核苷酸悬端”是指从双链iRNA的双链体结构往外伸出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA一条链的3'末端延伸超过另一条链的5'末端或者是相反的情况时,则存在核苷酸悬端。dsRNA可以包括具有至少一个核苷酸的悬端;或者,所述悬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个核苷酸。核苷酸悬端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或者由其组成。悬端可以存在于有义链上,存在于反义链上,或其任意组合。此外,悬端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'末端处、3'末端处或两端处。

[0161] 在某些实施方案中,dsRNA的反义链可以在3'末端或5'末端处拥有具有1-10个核苷酸(例如,0-3个、1-3个、2-4个、2-5个、4-10个、5-10个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸)的悬端。在某些实施方案中,在所述有义链或所述反义链上的或者在两者上都存在的所述悬端可以包括比10个核苷酸更长的延伸长度,例如,长度为1-30个核苷酸,2-30个核苷酸,10-30个核苷酸,或10-15核苷酸。在某些实施方案中,延伸的悬端位于所述双链体的所述有义链上。在某些实施方案中,延伸的悬端存在于所述双链体有义链的3'末端。在某些实施方案中,延伸的悬端存在于所述双链体有义链的5'末端。在某些

实施方案中,延伸的悬端位于 所述双链体的反义链上。在某些实施方案中,延伸的悬端存在于所述双链体反义链的 3'末端。在某些实施方案中,延伸的悬端存在于所述双链体反义链的5'末端。在某些 实施方案中,所述悬端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替换。

[0162] “钝的”或“钝端”是指在双链RNAi试剂的末端没有未配对的核苷酸,即没有 核苷酸悬端。“具有钝端的”双链RNAi试剂在其整个长度上都是双链的,即在该分 子的任一末端均没有核苷酸悬端。本发明所述RNAi试剂包括在一端没有核苷酸悬端 (即具有一个悬端和一个钝端的试剂) 或者在任一端都没有核苷酸悬端的RNAi试剂。

[0163] 术语“反义链”或“引导链”是指iRNA(例如,dsRNA)的一条链,其包括与靶 序列(例如,PD-L1 mRNA)基本互补的区域。本文使用的术语“互补区域”是指反 义链上与一个序列(例如,本文定义的靶序列如PD-L1核苷酸序列)基本互补的区域。在所述互补区域与所述靶序列不完全互补的情况下,错配可以位于分子的内部或末端 区域中。通常,最能接受的错配位于末端区域,例如,位于iRNA的5'-或3'-末端的5个、4个、3个、2个或1个核苷酸内。在一些实施方案中,本发明所述双链RNAi试 剂包括位于反义链中的核苷酸错配。在一些实施方案中,本发明所述双链RNAi试剂 包括位于有义链中的核苷酸错配。在一些实施方案中,所述核苷酸错配位于,例如, 从iRNA的3'-末端数起的5个、4个、3个、2个或1个核苷酸内。在另一实施方案中, 所述核苷酸错配位于,例如,iRNA的3'-末端核苷酸中。

[0164] 本文使用的术语“有义链”或“过客链”是指iRNA的一条链,其包括与本文所 述的反义链区域基本互补的区域。

[0165] 本文使用的术语“切割区”是指紧邻切割位点的区域。所述切割位点是在靶标上发生切割的位点。在一些实施方案中,所述切割区包括在所述切割位点的任一端上的 以及紧邻所述切割位点的三个碱基。在一些实施方案中,所述切割区包括在所述切割 位点的任一端上的以及紧邻所述切割位点的两个碱基。在一些实施方案中,所述切割 位点特异性地存在于与反义链的第10和11位核苷酸结合的位点处,并且所述切割区 包含第11、12和13位核苷酸。

[0166] 本领域技术人员应该理解,除非另有说明,否则本文使用的术语“互补的”在用于描述相关的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列时,是指包含所述第一核苷酸序列的 寡核苷酸或多核苷酸在一定条件下,与包含所述第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷 酸杂交并形成双链体结构的能力。这样的条件可以是,例如,较为严苛的条件,其中 所述严苛的条件可以包括:400mM NaCl,40mM pH 6.4的PIPES,1mM EDTA,50℃ 或70℃下进行12-16个小时,然后进行洗涤(参见,例如,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人,(1989)Cold Spring Harbor Laboratory出版社)。可以应用其他条件,例如生物体内可能发生的生理相关条件。根据所述杂交核苷酸的 最终应用,技术人员应该能够确定最适合于测试两个序列的互补性的一组条件。

[0167] 在iRNA内的互补序列,例如在本文所述dsRNA内的互补序列,包括在包含第一 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之间 的碱基配对,所述碱基配对贯穿于其中一个核苷酸序列的整个长度或者贯穿于这两个 核苷酸序列的整个长度。本文中此类序列可以彼此称为“完全互补”。然而,本文中 当第一序列相对于第二序列被称为“基本互补”的情况下,所述两个序列可以完全互 补,或者当其在杂交

形成多达30个碱基对的双链体时,可以形成一个或多个,但一般不超过5个、4个、3个或2个错配的碱基对,但同时保留了在与其最终应用(例如,通过RISC通路抑制基因表达)最为相关的条件下进行杂交的能力。然而,当两个寡核苷酸被设计成在杂交时形成一个或多个单链悬端的情况下,在确定互补性方面,此类悬端不应被认为是错配。例如,根据本文中的描述,当dsRNA包含一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸和另一长度为23个核苷酸的寡核苷酸,并且其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的具有21个核苷酸的序列时,在本文所述的目的下仍能称其为“完全互补”。

[0168] 本文使用的“互补性”序列还可以包括非沃森-克里克碱基对或者由非天然核苷酸和经修饰的核苷酸形成的碱基对,或者完全由非沃森-克里克碱基对或者由非天然核苷酸和经修饰的核苷酸形成的碱基对形成,只要能满足上述关于其杂交能力的条件即可。这种非沃森-克里克碱基对包括,但不限于,G:U Wobble或Hoogsteen碱基配对。

[0169] 从关于其使用的上下文中可以理解,本文中的术语“互补的”、“完全互补的”和“基本互补的”的使用可以涉及dsRNA的有义链和反义链之间的碱基匹配,或者双链RNAi试剂的反义链和靶序列之间的碱基匹配。

[0170] 本文使用的与信使RNA (mRNA) “的至少一部分基本互补的”多核苷酸是指与目标mRNA (例如,编码PD-L1基因的mRNA) 的连续部分基本互补的多核苷酸。例如,如果多核苷酸与编码PD-L1基因的mRNA的非中断部分基本互补,则所述序列与PD-L1 mRNA的至少一部分互补。

[0171] 因此,在一些实施方案中,本文公开的所述有义链多核苷酸和所述反义多核苷酸与所述靶PD-L1序列完全互补。

[0172] 在其他实施方案中,本文公开的所述反义多核苷酸与所述靶PD-L1序列基本互补,并且包含连续的核苷酸序列,所述连续的核苷酸序列的全长与SEQ ID NO:1中任一核苷酸序列的等长区域或者SEQ ID NO:1的任一片段至少约80%互补,例如至少约85%、86%、87%、88%、89%、约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补,或者100%互补。

[0173] 在一些实施方案中,本发明所述iRNA包括与反义多核苷酸基本互补的有义链,所述反义多核苷酸又与靶PD-L1序列互补并且包含连续的核苷酸序列,所述连续的核苷酸序列的全长与表3或表5所示反义链中的任一项的核苷酸序列的等长区域,或者表3和表5所示反义链中的任一个的片段至少约80%互补,例如约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补,或者100%互补。

[0174] 在一些实施方案中,本发明所述iRNA包括反义链,所述反义链与靶PD-L1序列互补并且包含连续的核苷酸序列,所述连续的核苷酸序列的全长与表3或表5所示有义链中的任一个的核苷酸序列的等长区域,或者表3和表5所示有义链中的任一个的片段至少80%互补,例如约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补,或者100%互补。

[0175] 在本发明的一方面,用于本发明所述方法和组合物的试剂是单链反义寡核苷酸分子,其通过反义抑制机制来抑制靶mRNA。所述单链反义寡核苷酸分子与所述靶mRNA内的序列互补。所述单链反义寡核苷酸可以通过与所述mRNA进行碱基配对并且以物理方式阻碍翻译机制,从而以化学计量的方式抑制翻译,参见Dias, N.等人, (2002) Mol Cancer Ther

1:347-355。所述单链反义寡核苷酸分子的长度可以是约14到约30个核苷酸并且具有与靶序列互补的序列。例如,所述单链反义寡核苷酸分子可以包含来自本文所述的任一反义序列的至少14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的序列。

[0176] 本文使用的短语“使细胞与iRNA接触”,例如与dsRNA接触,包括通过任何可能的手段使细胞发生接触。使细胞与iRNA接触包括使细胞在体外与所述iRNA接触或者使细胞在体内与所述iRNA接触。可以直接或间接地完成所述接触。因此,例如,可以由执行所述方法的个人将所述iRNA与所述细胞进行物理接触,或者可选地,可以将所述iRNA置于允许或者会导致其随后与所述细胞接触的条件下。

[0177] 可以,例如,通过将细胞与iRNA孵育来使所述细胞进行体外接触。可以,例如,通过将iRNA注射进细胞所在的组织中或组织附近,或者通过将iRNA注射进另一个区域(例如,血流或皮下空间中)来使该试剂随后到达要接触的细胞所在的组织,来使所述细胞进行体内接触。例如,iRNA可以含有能将所述iRNA引导到目的部位(例如,肝脏)的配体(例如,GalNAc,如GalNAc3)或者与其偶联。也可以组合使用体外和体内的接触方法。例如,也可以使细胞与iRNA体外接触并随后移植到受试者体内。

[0178] 在某些实施方案中,使细胞与iRNA接触包括通过促进或实现细胞的摄取或吸收而“引入”或“将所述iRNA输送到所述细胞中”。对iRNA的吸收或摄取可以通过独立扩散或主动的细胞过程来实现,或者通过辅助剂或辅助装置来实现。可以以体外或在体的方式将iRNA引入细胞中。例如,对于在体引入,可以将iRNA注射到组织部位或者进行全身施用。也可以通过 β -葡聚糖递送系统完成在体递送,例如美国专利号5,032,401和5,607,677以及美国公开号2005/0281781中所述的那些系统(其全部内容通过引用并入本文)。体外引入进细胞包括本领域已知的方法,例如电穿孔和脂质转染。其他方法见下文描述或者在本领域中是已知的。

[0179] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是一种囊泡,所述囊泡包括包封药物活性分子(例如,核酸分子,如iRNA或者转录出iRNA的质粒)的脂质层。LNP的描述见于,例如,美国专利号6,858,225、6,815,432、8,158,601和8,058,069中(其全部内容通过引用并入本文)。

[0180] 本文使用的“受试者”是动物,例如哺乳动物,包括灵长类动物(诸如人,非人灵长类动物,例如猴和黑猩猩),非灵长类动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马和鲸鱼),或者是内源性或异源性表达靶基因的鸟类动物(例如鸭或鹅),前提是所述靶基因序列与iRNA试剂具有足以促进降低靶标的互补性。如本文所述,在某些实施方案中,所述受试者是人,例如正在接受针对会因PD-L1基因的表达或复制的减少而受益的疾病、病症或障碍的治疗或评估的人;患有会因PD-L1基因表达的减少而受益的疾病、病症或障碍的人;正在接受针对会因PD-L1基因表达的减少而受益的疾病、病症或障碍的治疗的人。在一些实施方案中,所述受试者是女人。在其他实施方案中,所述受试者是男人。

[0181] 本文使用的术语“治”或“治疗”是指有益的或者所想要的结果,包括但不限于,减轻或改善与PD-L1基因表达或PD-L1蛋白产生相关的一种或多种症状,例如,感染,特别是慢性的细胞内感染如慢性病毒感染,或者癌症。“治疗”还表示与没有治疗时的预期存活相比能延长存活。治疗可以包括预防合并症的发生,例如,减少肝脏感染患者的肝损伤。

[0182] 在涉及受试者中PD-L1基因的表达水平或PD-L1蛋白的产生水平,或者疾病标志

物或症状时所使用的术语“较低的”是指这种水平具有统计学显著性的降低。该降低可以是，例如，相较于适当的对照组降低至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%，或者低于检测方法的检测水平。在某些实施方案中，将靶标的表达进行正常化，即，使其降低到没有该疾病的个体的正常范围内的可接受水平。在某些实施方案中，所述方法包括对PD-L1的表达进行临床相关的抑制，例如，如在用降低PD-L1表达的试剂治疗受试者后的临床相关结果所显示的。

[0183] 本文使用的术语“程序性细胞死亡1配体1相关疾病”或“PD-L1相关疾病”是指由PD-L1基因的表达或PD-L1蛋白的产生所引起的，或者与其相关的疾病或病症。术语“PD-L1相关疾病”包括会因PD-L1基因的表达、复制或蛋白活性的降低而受益的疾病、病症或障碍。PD-L1相关疾病的非限制性实例包括，例如，感染，特别是慢性细胞内感染，例如病毒感染，例如肝炎感染，或者癌症。

[0184] 在某些实施方案中，PD-L1相关疾病是感染，特别是慢性的细胞内感染，例如病毒感染，例如肝炎病毒感染（如乙型肝炎感染或丁型肝炎感染）。在某些实施方案中，所述感染是慢性细菌感染，例如结核病。在某些实施方案中，PD-L1相关疾病是癌症，特别是肝癌，例如肝细胞癌（HCC）。

[0185] 本文使用的“治疗有效量”旨在包括这样的iRNA量：当被施用给患者以治疗患有感染（特别是慢性细胞内感染）或癌症或者其他PD-L1相关疾病的受试者时，其足以（例如，通过减少、改善或维持现有疾病或者疾病或其相关合并症的一种或多种症状）有效地治疗所述疾病。所述“治疗有效量”可以因以下因素而异：iRNA、其如何进行施用、所述疾病及其严重程度以及疾病史、年龄、体重、家族史、基因构成、由PD-L1基因表达介导的病理过程的阶段、先前治疗或伴随治疗的类型（如果有的话）以及待治疗患者的其他个体特征。

[0186] “治疗有效量”还包括以适用于任何治疗的合理的效益/风险比产生一些所想要的局部或全身效应的iRNA量。在本发明的方法中使用的iRNA可以以足够的量进行施用，以产生适用于这种治疗的合理的效益/风险比。治疗有效量包括导致疾病或病症的指标发生适当的临床相关改变或者使其稳定下来的量。

[0187] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指与合理的利益/风险比相对应的，在合理的医学判断范围内适合用于接触人类受试者和动物受试者的组织而不会导致过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的化合物、材料或剂型。

[0188] 本文使用的短语“药学上可接受的运载体”是指涉及将目标化合物从一个器官（或身体的一部分）运载或输送到另一器官（或身体的一部分）的药学上可接受的材料、混合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂（例如，润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或锌或硬脂酸），或者包封溶剂的材料。每种运载体必须是“可接受的”，意思是其与制剂的其他成分相容并且不会对所治疗的受试者造成伤害。可以用作药学上可接受的运载体的材料的一些例子包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；(4) 粉状黄蓍胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 润滑剂，例如硬脂酸镁（magnesium stearate）、月桂基硫酸钠和滑石；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇类，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；

(14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 海藻酸;(16) 无热原水;(17) 等渗盐;(18) 林格氏液;(19) 乙醇;(20) pH缓冲溶液;(21) 聚酯、聚碳酸酯 和/或聚酐;(22) 膨松剂,例如多肽和氨基酸(23) 血清成分,例如血清白蛋白、HDL 和LDL;以及(22) 药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0189] 本文使用的术语“样品”包括从受试者中分离得到的一系列类似的流体、细胞或组织,以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。生物流体的实例包括血液、血清 和浆膜液、血浆、脑脊液、眼液、淋巴液、尿液、唾液等。组织样品可以包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如,样品可以来源于特定的器官、器官的一部分或者 这些器官内的流体或细胞。在某些实施方案中,样品可以来源于肝脏(例如,全肝或 者肝脏的某些部分或者肝脏中的某些类型的细胞,例如,如肝细胞)。“来源于受试 者的样品”可以是指从受试者中抽取的血液,或者来源于其的血浆。在某些实施方案 中,当检测PD-L1的水平时,优选地,“样品”是指来自受试者的组织或体液(例如, 来自患有肝脏感染的受试者的肝活组织检查,肿瘤活组织检查),其中在施用本发明 所述试剂之前就能检测到PD-L1的存在。在某些受试者中,例如,在健康的受试者中, 在许多体液、细胞类型和组织中可能不能够检测到PD-L1的水平。

[0190] I. 本发明所述iRNA

[0191] 本发明提供了抑制PD-L1基因表达的iRNA。在优选的实施方案中,所述iRNA 包括用于抑制细胞中,例如受试者(例如哺乳动物,如患有PD-L1相关疾病如慢性感 染的人)体内细胞中PD-L1基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子。所述dsRNAi 试剂包括具有互补区的反义链,所述互补区与在PD-L1基因的表达过程中形成的mRNA的至少一部分互补。所述互 补区域的长度为约30个核苷酸或更少(例如,长度 为约30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个或18个核苷酸或更少)。通过,例如,PCR法或基于枝化 DNA (bdNA) 的方 法,或者通过基于蛋白的方法(例如,通过免疫荧光分析法)使用例如蛋白 印迹分析 或者流式细胞技术测定发现,在与表达PD-L1基因的细胞接触时,iRNA会将PD-L1 基因(例如,人、灵长类动物、非灵长类动物或鸟类的PD-L1基因)的表达抑制至少 约20%, 优选至少30%。在优选的实施方案中,通过实施例中所提供的qPCR方法, 确定例如在双链 体浓度为10nM时对表达的抑制作用。可以将减少的水平与,例如, 适当的历史对照或者群 体样品对照池进行比较。

[0192] dsRNA包括两条RNA链,所述两条RNA链互补并且在将要使用所述dsRNA的 条件下杂交形成双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括互补区,其与靶序列基 本互补,并且通常完全互补。所述靶序列可以来源于在PD-L1基因的表达期间形成的 mRNA序列。另一条链(有义链)包括与所述反义链互补的区域,因此所述两条链在 适当条件下组合时会杂交并 形成双链体结构。本文中其他地方会述及并且本领域已知, 相对于存在于单独的多个寡核 苷酸上,dsRNA的互补序列也可以是在单个核酸分子上 包括的自身互补区。

[0193] 通常,所述双链体结构的长度为约15到30个碱基对,例如,长度为15-29个、15-28 个、15-27个、15-26个、15-25个、15-24个、15-23个、15-22个、15-21个、15-20个、15-19个、 15-18个、15-17个、18-30个、18-29个、18-28个、18-27个、18-26个、18-25个、18-24个、18- 23个、18-22个、18-21个、18-20个、19-30个、19-29个、19-28个、19-27个、19-26个、19-25 个、19-24个、19-23个、19-22个、19-21个、19-20个、20-30个、20-29个、20-28个、20-27个、

20-26个、20-25个、20-24、20-23个、20-22个、20-21个、21-30个、21-29个、21-28个、21-27个、21-26个、21-25个、21-24个、21-23个或21-22个碱基对。上述范围和长度的中间范围和长度也应是本发明的一部分。

[0194] 类似地,所述靶序列的互补区的长度为约15到30个核苷酸,例如,长度为15-29个、15-28个、15-27个、15-26个、15-25个、15-24个、15-23个、15-22个、15-21个、15-20个、15-19个、15-18个、15-17个、18-30个、18-29个、18-28个、18-27个、18-26个、18-25个、18-24个、18-23个、18-22个、18-21个、18-20个、19-30个、19-29个、19-28个、19-27个、19-26个、19-25个、19-24个、19-23个、19-22个、19-21个、19-20个、20-30个、20-29个、20-28个、20-27个、20-26个、20-25个、20-24个、20-23个、20-22个、20-21个、21-30个、21-29个、21-28个、21-27个、21-26个、21-25个、21-24个、21-23个或21-22个核苷酸。上述范围和长度的中间范围和长度也应是本发明的一部分。

[0195] 在一些实施方案中,所述dsRNA的长度为约15到23个核苷酸,或者长度为约25到30个核苷酸。通常来说,所述dsRNA长到能够充当Dicer酶的底物。例如,本领域众所周知,长度大于约21-23个核苷酸的dsRNA可以用作Dicer的底物。普通技术人员应认识到,被靶向性切割的RNA区域通常最有可能是较大RNA分子(通常为mRNA分子)的一部分。在相关情况下,mRNA靶标的“一部分”是mRNA靶标的一段连续序列,其长度足以使其成为RNAi指导的切割(即,通过RISC通路切割)的底物。

[0196] 本领域技术人员还将认识到,双链体区域,例如,具有约9个到约36个碱基对(例如,10-36个、11-36个、12-36个、13-36个、14-36个、15-36个、9-35个、10-35个、11-35个、12-35个、13-35个、14-35个、15-35个、9-34个、10-34个、11-34个、12-34个、13-34个、14-34个、15-34个、9-33个、10-33个、11-33个、12-33个、13-33个、14-33个、15-33个、9-32个、10-32个、11-32个、12-32个、13-32个、14-32个、15-32个、9-31个、10-31个、11-31个、12-31个、13-32个、14-31个、15-31个、15-30个、15-29个、15-28个、15-27个、15-26个、15-25个、15-24个、15-23个、15-22个、15-21个、15-20个、15-19个、15-18个、15-17个、18-30个、18-29个、18-28个、18-27个、18-26个、18-25个、18-24个、18-23个、18-22个、18-21个、18-20个、19-30个、19-29个、19-28个、19-27个、19-26个、19-25个、19-24个、19-23个、19-22个、19-21个、19-20个、20-30个、20-29个、20-28个、20-27个、20-26个、20-25个、20-24个、20-23个、20-22个、20-21个、21-30个、21-29个、21-28个、21-27个、21-26个、21-25个、21-24个、21-23个或21-22个碱基对)的双链体区域,是dsRNA的主要功能部分。因此,在一个实施方案中,要使其被加工成例如,具有15-30个碱基对的靶向所要切割的RNA的功能性双链体,具有大于30个碱基对的双链体区域的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此,普通技术人员将认识到,在一个实施方案中,miRNA是dsRNA。在另一实施方案中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一实施方案中,可用于靶向PD-L1基因表达的iRNA试剂并非是在靶细胞中通过切割更大的dsRNA而产生的。

[0197] 本文所述的dsRNA还可以包含一个或多个具有例如,1-4个、2-4个、1-3个、2-3个、1个、2个、3个或4个核苷酸的单链核苷酸悬端。具有至少一个核苷酸悬端的dsRNA相对于其钝端对应物可能具有优势性的抑制特性。核苷酸悬端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或者由核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)组成。所述悬端可以在有义链上、在反义链上或其任何组合。此外,悬端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链

或有义链的5'末端、3'末端或两端。

[0198] 可以通过如下文中进一步讨论的本领域已知的标准方法合成dsRNA,例如,通过使用,例如,从诸如Biosearch、Applied Biosystems, Inc公司购买得到的自动化的DNA合成仪合成。

[0199] 可以使用两步法制备出本发明所述双链RNAi化合物。首先,分别制备双链RNA分子的各条链。然后,将组分链进行退火。可以使用溶液相有机合成法或固相有机合成法或者使用两者来制备siRNA化合物的各条链。有机合成带来的优点在于能够容易地制备出包含非天然的或者经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。类似地,可以使用溶液相有机合成法或固相有机合成法或者使用两者来制备本发明所述的单链寡核苷酸。

[0200] 一方面,本发明所述dsRNA包含至少两个核苷酸序列:有义序列和反义序列。所述有义链选自表3和表5中提供的序列组,并且所述有义链的相应反义链选自表3和表5所示的序列组。在这方面,所述两个序列中的一个序列与该两个序列中的另一个互补,其中一个序列与在PD-L1基因表达期间所产生的mRNA的序列基本互补。因此,在这方面,dsRNA应包括两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸是表3或表5中所述的有义链,并且第二个寡核苷酸是与表3或表5中所述的有义链相对应的反义链。在某些实施方案中,dsRNA的基本互补的序列包含在单独的多个寡核苷酸上。在其他实施方案中,dsRNA的基本互补的序列包含在单个寡核苷酸上。

[0201] 应当理解,虽然没有将表3中的序列描述成经修饰的或者缀合的序列,但是本发明所述iRNA(例如,本发明所述的dsRNA)中的RNA可以包含经修饰的表3中所示的任何一种序列,或者表5所示的序列,或者缀合的表5所示的序列。换句话说,如本文所述,本发明包括表3和表5所示的未经修饰的、未缀合的、经修饰的或者缀合的dsRNA。

[0202] 本领域技术人员很清楚,一般认为具有由约20个和23个之间的碱基对(例如,21个碱基对)组成的双链体结构的dsRNA在诱导RNA干扰方面特别有效(Elbashir等人,EMBO 2001,20:6877-6888)。然而,其他人发现,更短的或更长的RNA双链体结构也很有效(Chu和Rana,(2007)RNA 14:1714-1719;Kim等人,(2005)Nat Biotech 23:222-226)。在上述实施方案中,根据表3和表5中任一个所提供的寡核苷酸序列的性质,本文所述dsRNA可以包括长度为至少21个核苷酸的至少一条链。一种合理的预期是,具有表3和表5所示的其中一条序列的一端或两端仅减去几个核苷酸的一条序列的较短双链体,可以具有与上述dsRNA相比类似的有效性。因此,以下dsRNA也应包括在本发明的范围内:所述dsRNA具有由至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个来源于表3和表5所示的任一序列的连续核苷酸组成的序列,并且其与包括完整序列的dsRNA在抑制PD-L1基因表达方面的差异不超过约5%、10%、15%、20%、25%或30%的抑制。

[0203] 另外,表3和表5中提供的RNA明确了PD-L1转录物中容易发生RISC介导的切割的位点。因此,本发明的特征还包括靶向这些位点其中之一范围内的iRNA。本文使用的iRNA如果能促进转录物在特定位点内任意地方的切割,则认为所述iRNA靶向所述RNA转录物的所述特定位点内。此类iRNA通常包括至少约15个连续核苷酸,所述至少约15个连续核苷酸来自表3和表5中提供的一个序列,所述序列与来自毗邻PD-L1基因选定序列的区域的其他核苷酸序列偶联。

[0204] 虽然靶序列的长度通常为约15-30个核苷酸,但是该范围内特定序列在指导任何

给定靶RNA切割上的适用性会有很大差异。虽然本文提供的各种软件包和指导方针能够指导确定任意给定基因靶标的最佳靶序列,但是也可以采用经验性方法,在该经验性方法中,将给定大小(一个非限制性的实例是21个核苷酸)的“窗口”或“掩膜”以文字或图形形式(包括,例如,在计算机上)放置在靶RNA序列上,以确定在所述大小范围内的能充当靶序列的序列。通过将所述序列“窗口”逐渐往初始靶序列位置的上游移动一个核苷酸或者往下游移动一个核苷酸,就可以识别出下一个潜在的靶序列,直到针对所选择的任意给定的目标大小识别出整套可能的序列为止。将该过程与系统性合成以及(使用本文所述的或本领域已知的或本文所提供的测定法)测试所确定的序列来确定出具有最佳表现的序列结合起来,能够确定出这样的RNA序列:当被iRNA试剂靶向时,其能够介导对靶基因表达的最佳抑制。因此,虽然例如在表3和表5中确定出的序列代表了有效的靶序列,但是可以预期,通过逐渐“使所述窗口”往给定序列的上游或下游“行进”一个核苷酸的方式来确定出具有相同的或更好的抑制特征的序列,可以实现对抑制效率的进一步优化。

[0205] 此外,可以预期,对于例如表3和表5中所示确定的任意序列,可以通过系统地添加或去除核苷酸以产生更长或更短的序列并通过使大小为更长或更短的窗口从该点开始沿该靶RNA进行上行或下行的方式,来实现进一步的优化。同样地,通过将这个产生新候选靶标的方法与通过本领域已知的或者本文所述的抑制测定法基于该靶序列测试iRNA的有效性的方法结合起来,可以进一步提高抑制效率。此外,可以通过,例如,引入如本文所述的或本领域已知的经修饰的核苷酸,在悬端进行添加或修改,或者本领域已知的或本文讨论的其他修饰手段来调整此类优化序列,以进一步优化用作表达抑制剂的分子(例如,提升血清稳定性或循环半衰期,提升热稳定性,增强跨膜递送,靶向特定的位置或细胞类型,提升与沉默通路酶的相互作用,提升内含体释放)。

[0206] 本文所述的iRNA可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个实施方案中,本文所述的iRNA含有不超过3个错配。如果所述iRNA的反义链含有与靶序列的错配,那么优选地,错配区不位于互补区域的中心。如果所述iRNA的反义链含有与所述靶序列的错配,那么优选地,错配应限制在从互补区的5'末端或3'末端算起最后的5个核苷酸内。例如,对于具有23个核苷酸的iRNA试剂,与PD-L1基因的区域互补的链通常在中心的13个核苷酸内不含有任何错配。本文所述的方法或本领域已知的方法可用于确定含有与靶序列的错配的iRNA是否能有效抑制PD-L1基因的表达。很重要的一点是要考量具有错配的iRNA在抑制PD-L1基因表达上的功效,在已知PD-L1基因中的特定互补区在群体内具有多态性序列变异的情况下,这点尤为重要。

[0207] II. 本发明所述经修饰的iRNA

[0208] 在某些实施方案中,本发明所述iRNA(例如,dsRNA)的RNA未经修饰,并且不包含例如,本领域已知的以及本文所描述的化学修饰或缀合。在其他实施方案中,本发明所述iRNA(例如,dsRNA)的RNA经过了化学修饰,以增强稳定性或其他有益的性状。在本发明的某些实施方案中,本发明所述iRNA的基本上所有核苷酸都经过了修饰。在本发明的其他实施方案中,iRNA的所有核苷酸或者iRNA的基本上所有核苷酸都经过了修饰,即所述iRNA的链中存在不超过5个、4个、3个、2个或1个未经修饰的核苷酸。

[0209] 本发明中所述的核酸可以通过本领域成熟的方法,例如“Current protocols in nucleic acid chemistry”Beaucage,S.L.等人,(Edrs.),John Wiley&Sons,Inc.,New

York, NY, USA中所描述的方法(其在此通过引用并入)合成或修饰。修饰包括,例如,末端修饰,如5'-末端修饰(磷酸化,缀合,反式键(inverted linkage))或3'-末端修饰(缀合, DNA核苷酸,反式键等);碱基修饰,如用稳定化的碱基、去稳定化的碱基 或者与扩展的配对组库碱基配对的碱基进行置换,除去碱基(无碱基核苷酸),或者 缀合的碱基;糖修饰(例如,在2'-位或4'-位进行糖修饰)或置换糖;或者骨架修饰,包括对磷酸二酯键进行修饰或置换。可用于本文所述实施方案的iRNA化合物的具体 实例包括,但不限于,含有经修饰的骨架或不含天然核苷间键的RNA。具有经修饰的 骨架的RNA尤其包括,骨架中不具有磷原子的RNA。在本说明书中,并且本领域中 也时有提及,在核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的RNA也可被认为是寡核苷酸。在一些实施方案中,修饰的iRNA应在其核苷间骨架中具有磷原子。

[0210] 经修饰的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、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性 磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯)、硫 代磷酰胺酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯,以及具有正常的3'-5'键的硼烷磷 酸酯、其以2'-5'方式连接的类似物,以及具有反向极性的RNA骨架,在所述具有反向 极性的RNA骨架中最接近的核苷单元对的连接从3'-5'到5'-3'或者从2'-5'到5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸的形式。

[0211] 教导了制备上述含磷键的代表性的美国专利包括,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;以及美国专利号 RE39464,其每个的全部内容通过引用并入本文。

[0212] 不包括有磷原子的经修饰的RNA骨架具有由以下形成的骨架:短链烷基或环烷基核苷间键,混杂的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或杂 环核苷间键。这些包括具有吗啉代键的骨架(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨 架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲酰基(formacetyl)骨架和硫代甲酰基(thioformacetyl) 骨架;亚甲基甲酰基和亚甲基硫代甲酰基骨架;含烯烃骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲 基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸盐和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及具有混合的N、O、S和CH₂组分部分的其他骨架。

[0213] 教导了制备上述寡核苷酸的代表性的美国专利包括,但不限于,美国专利号 5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564; 5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086; 5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437 和5,677,439,其每个的全部内容通过引用并入本文。

[0214] 考虑将合适的RNA模拟物用于本文提供的iRNA中,其中所述核苷酸单位的糖和 核苷间键(即,骨架)均被新基团置换。保留碱基单位用于与适当的核酸靶化合物杂 交。如果寡聚化合物中的RNA模拟物已经显示出具有优异的杂交性质,则将这种寡聚 化合物称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架被含酰胺的骨架(特 别是氨乙基甘氨酸骨架)置

换。所述核碱基被保留了下来并且直接或间接地与骨架酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导制备PNA化合物的代表性的美国专利包括,但不限于,美国专利5,539,082;5,714,331和5,719,262,其每个的全部内容都通过引用并入本文。适用于本发明所述iRNA中的另外的PNA化合物在,例如,Nielsen等人,Science,1991, 254,1497-1500中有描述。

[0215] 本发明所述的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯骨架的RNA和具有杂原子骨架的寡核苷酸,特别是上文所引用的美国专利号5,489,677中所示的 $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ 和 $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [其中的天然磷酸二酯骨架表示成 $--O--P--O--CH_2--$],以及上文所引用的美国专利号5,602,240所示的酰胺骨架。在一些实施方案中,本文所述RNA具有上文所引用的美国专利号5,034,506所示的吗啉代骨架结构。

[0216] 经修饰的RNA还可以含有一个或多个取代的糖部分。本文所述的iRNA(例如dsRNA)可以在2'-位上包括以下之一: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,其中所述烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的C₁到C₁₀烷基或C₂到C₁₀烯基和炔基。示例性的合适的修饰包括O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m为从1到约10。在其他实施方案中,dsRNA在2'位置包括以下之一:C₁到C₁₀低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA剪切基团、报告基团、嵌入剂、用于改善iRNA的药代动力学性质的基团或者用于改善iRNA的药效学性质的基团、以及具有类似性质的其他取代基。在一些实施方案中,所述修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即,烷氧基-烷氧基团。另一示例性修饰是下文实施例中所述的2'-二甲基氨基氧乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团(也称为2'-DMAOE),以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂。其他示例性修饰包括:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸,(这三个家族中的R和S异构体);2'-烷氧基烷基;以及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0217] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。也可以在iRNA的RNA的其他位置,特别是在3'末端核苷酸上糖的3'位上或者在以2'-5'方式连接的dsRNA以及5'末端核苷酸的5'位上,进行类似的修饰。iRNA也可以具有糖模拟物,例如用环丁基部分代替呋喃戊糖。教导制备此类经修饰的糖结构的代表性的美国专利包括,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,其中某些专利也为本申请的申请人所拥有。上述每一个的全部内容都通过引用并入本文。

[0218] iRNA还可以包括核碱基(本领域通常简称为“碱基”)的修饰或替代。本文使用的“未经修饰的”或“天然的”核碱基包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)等嘌呤碱基以及胸腺嘧啶

(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)等嘧啶碱基。经修饰的核碱基包括其他合成的和天然的核碱基,例如脱氧胸腺嘧啶(dT)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他在第8位处取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(特别是5-溴物)、5-三氟甲基物和其他在第5位处取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-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。其他核碱基包括在美国专利号3,687,808中公开的核碱基,在Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008中公开的核碱基;在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J.L 等人 John Wiley & Sons, 1990中公开的核碱基,在Englisch等人, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 中公开的核碱基,以及在Sanghvi, Y.S., 第15章, dsRNA Research and Applications, 第289-302页, Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 等人 CRC 出版社, 1993中公开的核碱基。这些核碱基中的某些对于提升本发明所述低聚化合物的结合亲和力特别有用。这些核碱基包括5-取代的嘧啶, 6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤, 5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经显示5-甲基胞嘧啶的取代能将核酸双链体的稳定性提升0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 等人, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第276-278页)并且也是示例性的碱基取代, 特别是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰结合时更明显。

[0219] 教导了制备上述某些经修饰的核碱基以及其他经修饰的核碱基的代表性的美国专利包括, 但不限于, 上述美国专利号3,687,808、4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672和7,495,088, 其每个的全部内容都通过引用并入本文。

[0220] iRNA的RNA也可以被修饰成包括一个或多个锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸, 其中所述核糖部分包含连接2'和4'碳的额外的桥。这种结构有效地将所述核糖“锁定”在了3'-内结构构象中。已经证明将锁定核酸添加到 siRNA 上能提升 siRNA 在血清中的稳定性并减少脱靶效应 (Elmen, J. 等人, (2005) Nucleic Acids Research 33 (1): 439-447; Mook, OR. 等人, (2007) Mol Canc Ther 6 (3): 833-843; Grunweller, A. 等人, (2003) Nucleic Acids Research 31 (12): 3185-3193)。

[0221] 在一些实施方案中, 本发明所述 iRNA 包含一个或多个为 UNA (解锁核酸) 核苷酸的单体。UNA 是解锁的无环核酸, 其中已经除去了糖的任何键, 从而形成了解锁的“糖”残基。在一个实例中, UNA 还涵盖已经除去了 C1'-C4' 之间的键 (即 C1' 和 C4' 碳之间共价的碳-氧-碳键) 的单体。在另一实例中, 糖的 C2'-C3' 键 (即 C2' 和 C3' 碳之间共价的碳-碳键) 已被除去 (参见 Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) 和 Fluiter 等人, Mol. Biosyst.,

2009,10,1039,其在此通过引用并入本文)。

[0222] iRNA的RNA也可以被修饰成包括一个或多个双环糖部分。“双环糖”是通过桥接两个原子而进行修饰的呋喃糖基环。“双环核苷”(“BNA”)是具有糖部分的核苷,所述糖部分包含连接所述糖环的两个碳原子的桥,从而形成双环的环体系。在某些实施方案中,所述桥连接所述糖环的4'-碳和2'-碳。因此,在一些实施方案中,本发明所述试剂可以包括一个或多个锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中所述核糖部分包含额外的连接2'和4'碳的桥。换句话说,LNA是包含双环糖部分的核苷酸,所述双环糖部分包含4'-CH₂-O-2'桥。这种结构有效地“锁定”了3'-内结构构象中的核糖。已经证明将锁定核酸添加到siRNA上可以提升增加siRNA在血清中的稳定性并减少脱靶效应(Elmen, J.等人,(2005)Nucleic Acids Research 33(1):439-447;Mook,OR.等人,(2007)Mol Canc Ther 6(3):833-843;Grunweller,A.等人,(2003)Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。用于本发明所述多核苷酸中的双环核苷的实例包括但不限于包含4'和2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施方案中,本发明所述反义多核苷酸试剂包括一种或多种包含4'至2'桥的双环核苷。这种4'至2'桥连的双环核苷的实例,包括但不限于4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'(也称为“限制性乙基”或“cEt”)和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利号7,399,845);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利号8,278,283);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利号8,278,425);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见,例如,美国专利公开号2004/0171570);4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R是H,C1-C12烷基,或保护基(参见,例如,美国专利号7,427,672);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见,例如,Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem., 2009,74,118-134);和4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利号8,278,426)。上述每一个的全部内容都通过引用并入此文。

[0223] 其他教导制备锁定核酸的核苷酸的代表性的美国专利和美国专利公开文本包括,但不限于以下:美国专利号6,268,490;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,034,133;7,084,125;7,399,845;7,427,672;7,569,686;7,741,457;8,022,193;8,030,467;8,278,425;8,278,426;8,278,283;US 2008/0039618和US 2009/0012281,其每个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0224] 任何前述双环核苷都可以被制备成具有一个或多个立体化学糖构型,包括例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0225] 也可以将iRNA的RNA修饰成包括一个或多个限制性乙基核苷酸。本文使用的“限制性乙基核苷酸”或“cEt”是包含双环糖部分的锁定核酸,所述双环糖部分包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥。在一个实施方案中,限制性乙基核苷酸处于S构象,在本文中称为“S-cEt”。

[0226] 本发明所述iRNA还可以包括一个或多个“构象限制的核苷酸”(“CRN”)。CRN是具有接头的核苷酸类似物,所述接头连接核糖的C2'和C4'碳或者核糖的C3和C5'碳。CRN将核糖环锁定在稳定的构象上并且提升对mRNA的杂交亲和力。所述接头具有足以将氧置于能达到稳定性和亲和性的最佳位置处的长度,导致有较少的核糖环发生折叠。

[0227] 教导制备某些上述CRN的代表性出版物包括,但不限于,美国专利公开号2013/0190383;以及PCT公开号WO 2013/036868,其每一个的全部内容都通过引用并入本文。

[0228] 在一些实施方案中,本发明所述iRNA包含一个或多个单体,所述单体是UNA(解锁

核酸)的核苷酸。UNA是解锁的无环核酸,在其中已经去除了糖的任何键,从而形成了解锁的“糖”残基。在一个实例中,UNA还涵盖已经去除了C1'-C4'之间的键(即,C1'和C4'碳之间共价的碳-氧-碳键)的单体。在另一实例中,已经去除了糖的C2'-C3'键(即,C2'和C3'碳之间共价的碳-碳键)(参见Nuc.Acids Symp.Series,52,133-134(2008)和Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,其在此通过引用并入本文)。

[0229] 教导制备UNA的代表性的美国专利公开文本包括,但不限于,美国专利号 8,314,227;和美国专利公开号2013/0096289;2013/0011922;以及2011/0313020,其 每一个的全部内容都通过引用并入本文。

[0230] 对RNA分子的末端进行的具有潜在稳定作用的修饰可以包括N-(乙酰氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷酰基-尿苷-3"-磷酸盐、反式碱基dT(idT)等。可以在PCT公开号W02011/005861中找到该修饰的公开信息。

[0231] 本发明所述iRNA的核苷酸的其它修饰包括5'磷酸或5'磷酸模拟物,例如,在iRNA反义链上的5'末端磷酸或磷酸模拟物。例如,在美国专利公开号2012/0157511(其全部内容通过引用并入本文)中公开了合适的磷酸模拟物。

[0232] A. 包含本发明所述基序的经修饰的iRNA

[0233] 在本发明的某些方面,本发明所述双链RNAi试剂包括具有,例如,02013/075035中所公开的化学修饰(其每个的全部内容都通过引用并入本文)的试剂。W02013/075035向dsRNAi试剂的有义链或反义链(是在切割位点处或附近)提供了 在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序。在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链和反义链可以被完全修饰。引入这些基序会干扰有义链或反义链的修饰模式(如果存在的话)。所述dsRNAi试剂可以任选地(例如在有义链上)与GalNAc 衍生物配体缀合。

[0234] 更具体地,当所述双链RNAi试剂的有义链和反义链被完全修饰成在dsRNAi试剂的至少一条链的切割位点处或附近的三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序时,观察到了所述dsRNAi试剂的基因沉默活性。

[0235] 因此,本发明提供了能够在体内抑制靶基因(即,PD-L1基因)表达的双链RNAi试剂。所述RNAi试剂包括有义链和反义链。所述RNAi试剂的每条链的长度可以独立地为12-30个核苷酸。例如,每条链可以独立地为14-30个核苷酸的长度、17-30个核苷酸的长度、25-30个核苷酸的长度、27-30个核苷酸的长度、17-23个核苷酸的长度、17-21个核苷酸的长度、17-19个核苷酸的长度、19-25个核苷酸的长度、19-23个核苷酸的长度、19-21个核苷酸的长度、21-25个核苷酸的长度或21-23个核苷酸的长度。

[0236] 所述有义链和反义链通常形成双链体的双链RNA(“dsRNA”),其在本文中也 被称为“dsRNAi试剂”。dsRNAi试剂的双链体区的长度可以是12-30个核苷酸对。例如,所述双链体区可以是14-30个核苷酸对的长度、17-30个核苷酸对的长度、27-30个核苷酸对的长度、17-23个核苷酸对的长度、17-21个核苷酸对的长度、17-19个核苷酸对的长度、19-25个核苷酸对的长度、19-23个核苷酸对的长度、19-21个核苷酸对的长度、21-25个核苷酸对的长度或者21-23个核苷酸对的长度。在另一实例中,所述双链体区具有选自15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸的长度。

[0237] 在某些实施方案中,所述有义链和反义链可能更长。例如,在某些实施方案中,所述有义链和所述反义链的长度独立地为25-35个核苷酸。在某些实施方案中,每条正义链和反义链的长度独立地为27-53个核苷酸,例如,长度为27-49、31-49、33-49、35-49、37-49和39-49个核苷酸。

[0238] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂可以在一条或两条链的3'末端,5'末端或两端都包含一个或多个悬端区或封端基团。所述悬端可以独立地具有1-6个核苷酸的长度,例如2-6个核苷酸的长度、1-5个核苷酸的长度、2-5个核苷酸的长度、1-4个核苷酸的长度、2-4个核苷酸的长度、1-3个核苷酸的长度、2-3个核苷酸的长度或者1-2个核苷酸的长度。在某些实施方案中,所述悬端区域可以包括上文所提供的延伸的悬端区域。所述悬端可以是一条链长于另一条链的结果,或者是具有相同长度的两条链交错的结果。所述悬端可以与靶mRNA形成错配,或者其可以与被靶向的基因序列互补,或者可以是其他序列。所述第一链和第二链也可以,例如,通过另外的碱基进行连接从而形成发夹,或者通过其他非碱基接头连接。

[0239] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂的悬端区域中的核苷酸可以各自独立地为经修饰的或未经修饰的核苷酸,包括,但不限于,2'-糖修饰的核苷酸,例如2'-F、2'-O-甲基、胸苷(T)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)及其任意组合。例如,TT可以是任一链上的任一末端的悬端序列。所述悬端可以与靶mRNA形成错配,或者其可以与被靶向的基因序列互补,或者可以是其他序列。

[0240] 所述dsRNAi试剂的有义链、反义链或两条链上的5'-或3'-悬端可以是磷酸化的。在一些实施方案中,所述悬端区含有两个核苷酸,在所述两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中所述两个核苷酸可以相同或不同。在一些实施方案中,所述悬端存在于所述有义链、反义链或两条链的3'末端。在一些实施方案中,该3'-悬端存在于所述反义链上。在一些实施方案中,该3'-悬端存在于所述有义链上。

[0241] 所述dsRNAi试剂可以只含有单个悬端,其能够增强所述RNAi的干扰活性但同时不影响其整体稳定性。例如,所述单链悬端可以位于所述有义链的3'末端,或者可选地,位于所述反义链的3'末端。所述RNAi还可以具有钝端,所述钝端位于反义链的5'末端(或者有义链的3'末端),或者反之亦然。通常,所述dsRNAi试剂的反义链在3'末端具有核苷酸悬端,并且5'末端是钝端。在不希望受理论束缚的前提下,不对称的反义链5'末端的钝端和反义链的3'末端悬端有利于将向导链加载到RISC的过程。

[0242] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂是长度为19个核苷酸的双头钝端物(double ended bluntmer),其中所述有义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第7、第8、第9位处的三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰。所述反义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第11、第12、第13位处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰。

[0243] 在其他实施方案中,所述dsRNAi试剂是长度为20个核苷酸的双头钝端物,其中所述有义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第8、第9、第10位处的三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰。所述反义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第11、第12、第13位处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰。

[0244] 在其他实施方案中,所述dsRNAi试剂是长度为21个核苷酸的双头钝端物,其中所述有义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第9、第10、第11位处处的三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰。所述反义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第11、第12、第13位处处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰。

[0245] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂包括具有21个核苷酸的有义链和具有23个核苷酸的反义链,其中所述有义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第9、第10、第11位处处的三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰;所述反义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在离5'末端的第11、第12、第13位处处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰,其中所述RNAi试剂的一端是钝的,而另一端包含具有2个核苷酸的悬端。优选地,所述具有2个核苷酸的悬端位于所述反义链的3'末端。

[0246] 当所述具有2个核苷酸的悬端位于反义链的3'末端时,在末端的三个核苷酸之间可能存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述三个核苷酸中的两个是悬端核苷酸,并且第三个核苷酸是与所述悬端核苷酸相邻的配对核苷酸。在一个实施方案中,此外,所述RNAi试剂在有义链的5'末端和反义链的5'末端处的末端三个核苷酸之间均具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸,包括作为基序的一部分的核苷酸,都是经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,在例如,交替基序中,每个残基均独立地经过了2'-O-甲基或3'-氟代的修饰。任选地,所述dsRNAi试剂还包括配体(优选GalNAc₃)。

[0247] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂包括有义链和反义链,其中所述有义链的长度为25-30个核苷酸残基,其中从第一链的5'末端核苷酸(第1位)开始的第1到第23位包括至少8个核糖核苷酸;所述反义链的长度为36-66个核苷酸残基,并且从3'末端核苷酸开始,在与有义链的第1-23位配对的位置处包括至少8个核糖核苷酸,从而形成双链体;其中至少反义链的3'末端核苷酸与有义链不配对,并且多达6个连续的3'末端核苷酸与有义链不配对,从而形成具有1-6个核苷酸的3'单链悬端;其中反义链的5'末端包括与有义链不配对的10-30个连续核苷酸,从而形成具有10-30个核苷酸的单链5'悬端;其中当将有义链和反义链进行比对以获得最大化的互补性时,如果至少所述有义链的5'末端和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸发生碱基配对,那么就会在有义链和反义链之间形成基本上为双链体的区域;并且在沿反义链长度的至少19个核糖核苷酸上反义链与靶RNA充分互补,从而在将双链核酸引入哺乳动物细胞中时减少靶基因的表达;并且其中所述有义链含有至少一个基序,所述基序在三个连续的核苷酸上含有三个2'-F修饰,其中至少一个所述基序出现在切割位点处或附近。所述反义链在所述切割位点处或附近具有至少一个三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0248] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂包括有义链和反义链,其中所述dsRNAi试剂包括第一链和第二链,所述第一链具有至少为25个并且最多为29个核苷酸的长度,并且所述第二链具有最多为30个核苷酸的长度,并且具有至少一个基序,所述基序在距离5'末端的第11、12、13位处处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰;其中所述第一链的3'末端和所述第二链的5'末端形成钝端并且所述第二链在其3'末端处比所述第一链长1-4个核苷酸,其中所述双链体区域的长度为至少25个核苷酸,并且在沿第二链长度的至少19个核糖核苷酸上第二链与靶mRNA充分互补,从而在将RNAi试剂引入哺乳动物细胞中时减少

靶基因的表达,并且其中Dicer对dsRNAi试剂的切割优先导致产生包含所述第二链的3'末端的siRNA,从而减少哺乳动物中靶基因的表达。任选地,所述dsRNAi试剂还包括配体。

[0249] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链含有至少一个基序,所述至少一个基序在三个连续的核苷酸上具有三个相同的修饰,其中一个所述基序出现在所述有义链的裂解位点处。

[0250] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂的反义链也可以含有至少一个基序,所述至少一个基序在三个连续的核苷酸上具有三个相同的修饰,其中一个所述基序出现在所述反义链的裂解位点处或附近。

[0251] 对于具有长度为17-23个核苷酸的双链体区域的dsRNAi试剂,所述反义链的切割位点通常在距5'末端的第10、11和12位附近。因此,在从反义链5'末端的第一个核苷酸开始计数,或者,从反义链5'末端的双链区域内的第一个配对核苷酸开始计数的情况下,具有三个相同修饰的基序可能在所述反义链的第9、10、11位处;第10、11、12位处;第11、12、13位处;第12、13、14位处;或者第13、14、15位处。所述反义链中的切割位点也可以根据dsRNAi试剂的双链体区域离5'末端的长度而变化。

[0252] 所述dsRNAi试剂的有义链可以含有至少一个基序,所述基序在所述链的切割位点处的三个连续核苷酸上具有三个相同的修饰;并且所述反义链可以含有至少一个基序,所述基序在所述链的切割位点处或附近的三个连续核苷酸上具有三个相同的修饰。当所述有义链和所述反义链形成dsRNA双链体时,可以将所述有义链和所述反义链排列成所述有义链上一个具有三个核苷酸的基序和所述反义链上一个具有三个核苷酸的基序具有至少一个核苷酸的重叠,即,所述有义链中的基序的三个核苷酸中的至少一个与所述反义链中的基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。或者,至少可以有二个核苷酸发生重叠,或者可以是所有三个核苷酸发生重叠。

[0253] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链可以含有一个以上的基序,所述基序在三个连续的核苷酸上具有三个相同的修饰。第一基序可以出现在所述链的切割位点处或附近,而其他基序可以是翼修饰(wing modification)。本文中的术语“翼修饰”是指出现在所述链的另一部分上的与同一链的所述切割位点处或附近的基序区分的基序。所述翼修饰或者与所述第一基序相邻,或者被至少一个或多个核苷酸分开。当所述基序彼此紧邻时,则所述基序的化学性质彼此不同,并且当所述基序被一个或多个核苷酸分开时,则化学性质可以相同或不同。可以存在两个或多个翼修饰。例如,当存在两个翼修饰时,每个翼修饰都可以出现在存在于切割位点处或附近的所述第一基序的一端,或者引导基序的两侧。

[0254] 与所述有义链一样,所述dsRNAi试剂的反义链可以含有一个以上的基序,所述基序在三个连续的核苷酸上具有三个相同的修饰,同时至少一个所述基序出现在所述链的切割位点处或附近。这种反义链也可以包含一个或多个翼修饰,其排列类似于所述有义链上的翼修饰。

[0255] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包括在所述链的3'末端,5'末端或两端上的最开始的一个或两个末端核苷酸。

[0256] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包括在所述链的3'末端,5'末端或两端上的双链体区域内最开始的一个或两个配对的核苷酸。

[0257] 当所述dsRNAi试剂的有义链和反义链各自包含至少一个翼修饰时,所述翼修饰可以落在双链体区的同一末端,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0258] 当所示dsRNAi试剂的有义链和反义链各自包含至少两个翼修饰时,可以将所述有义链和所述反义链排列成两个各自来自一条链的修饰落在双链体区的一端,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;两个各自来自一条链的修饰落在双链体区的另一端,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;两个来自一条链的修饰落在引导基序的两侧,并且在双链体区具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0259] 在一些实施方案中,可以修饰所述dsRNAi试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸,包括作为基序部分的核苷酸。每个核苷酸都可以用相同或不同的修饰进行修饰,所述修饰可以包括对一个或全部两个非连接磷酸氧或者一个或多个连接磷酸氧进行一个或多个改变;改变核糖的成分,例如,改变核糖上的2'-羟基;用“脱磷”接头批量置换磷酸盐部分;修饰或置换天然存在的碱基;以及置换或修饰核糖磷酸骨架。

[0260] 由于核酸是亚单元聚合物,因此许多修饰都出现在核酸内重复的位置上,例如,碱基修饰,或磷酸盐部分修饰,或者磷酸部分的非连接O的修饰。在一些情况下,修饰会出现在核酸中的所有目标位置(subject positions)上,但在许多情况来说,这是不会发生的。举例来说,修饰可能仅出现在3'-或5'-末端位置,可能仅出现在末端区域中,例如,在末端核苷酸处或者在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸上。修饰可以出现在双链区域、单链区域或者在两者中都发生。修饰可能仅出现在dsRNAi试剂的双链区域中,或者可能仅出现在dsRNAi试剂的单链区域中。例如,非连接O位置上的硫代磷酸酯修饰可能仅出现在一端或两端上,可能仅出现在末端区域中,例如,在末端核苷酸处,或者在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸上,或者可以出现在双链和单链区域中,尤其是在末端处。所述一个或两个5'端可以是磷酸化的。

[0261] 可以,例如,增强稳定性,将在悬端中包括特定的碱基,或者在单链悬端中包括经修饰的核苷酸或核苷酸替代物,例如,在5'或3'悬端中包括或者在两个悬端中都包括。例如,可能需要在悬端中包括嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,可以,例如,用本文所描述的修饰来修饰3'-或5'-悬端中的所有碱基或一些碱基。修饰可以包括,例如,使用本领域已知的修饰在核糖的2'位置使用修饰,例如,使用经2'-脱氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修饰的脱氧核糖核苷酸而非核碱基的核糖,以及磷酸基团中的修饰(例如,硫代磷酸酯修饰)。悬端不需要与靶序列同源。

[0262] 在一些实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地经LNA修饰、CRN修饰、cET修饰、UNA修饰、HNA修饰、CeNA修饰、2'-甲氧基乙基修饰、2'-O-甲基修饰、2'-O-烯丙基修饰、2'-C-烯丙基修饰、2'-脱氧修饰、2'-羟基修饰或2'-氟代修饰。链可以含有一个以上的修饰。在一个实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地经2'-O-甲基或2'-氟代修饰。

[0263] 通常,在有义链和反义链上至少有两个不同的修饰。这两个修饰可以是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰,或其他修饰。

[0264] 在某些实施方案中, N_a 或 N_b 包含交替形式的修饰。本文使用的术语“交替基序”是指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰出现在一条链的交替核苷酸上。所述交替的核苷酸可以是指间隔交替的核苷酸或每隔三个交替的核苷酸,或其他类似的模式。例如,如果A、B和C分别代表对核苷酸的一种修饰,那么交替基序可以是“ABABABABABAB...”、

“AABBAABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0265] 所述交替基序中所包含的修饰类型可以相同或不同。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸上的一种修饰类型,那么所述交替模式(即每隔一个核苷酸上的修饰)可以相同,但是每条有义链或反义链可以选自例如“ABABAB...”、“ACACAC...”“BDBDBD...”或“CDCDCD...”等交替基序中的一些可能的修饰。

[0266] 在一些实施方案中,本发明所述的dsRNAi试剂包括针对有义链上交替基序的修饰模式,其相对于反义链上交替基序的修饰模式发生了位移(shift)。所述位移可能使有义链的经修饰的核苷酸组与反义链的经不同方式修饰的核苷酸组对应,反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时,在所述双链体区域内,所述有义链中的交替基序可以从该链的5'至3'方向以“ABABAB”开始,并且所述反义链中的交替基序可以从该链的5'至3'方向以“BABABA”开始。另一个例子是,在所述双链体区域内,所述有义链中的交替基序可以从该链的5'至3'方向以“AABBAABB”开始,并且所述反义链中的交替基序可以从该链的5'至3'方向以“BBAABBAA”开始,这样就使得修饰模式在所述有义链和所述反义链之间发生完全的或部分的位移。

[0267] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂包括最初有义链上2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序模式,其相对于最初反义链上2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序模式发生了位移,即,有义链上经2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链上经2'-F修饰的核苷酸发生碱基配对,反之亦然。有义链的第1位置可以以2'-F修饰开始,并且反义链的第1位置可以以2'-O-甲基修饰开始。

[0268] 将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入有义链或反义链会中断(interrupt)在所述有义链或反义链中存在的初始修饰模式。这种通过将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入有义链或反义链的方式来中断所述有义链或反义链的修饰模式的做法,能够增强对靶基因的基因沉默活性。

[0269] 在一些实施方案中,当将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序引入到任何链中时,对紧挨基序的核苷酸的修饰是与所述基序的修饰不同的修饰。例如,含有所述基序的序列部分是“...N_aYYYN_b...”,其中“Y”代表在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序的修饰,并且“N_a”和“N_b”代表对紧挨所述“YYY”基序的核苷酸的修饰,所述修饰不同于Y的修饰,并且其中N_a和N_b可以是相同的或不同的修饰。或者,当存在翼修饰时,N_a或N_b可以存在或不存在。

[0270] 所述iRNA可以进一步包括至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的修饰可以出现在有义链、反义链或两条链的任意位置的任意核苷酸上。例如,所述核苷酸键修饰可以出现在有义链或反义链的每个核苷酸上;每个核苷酸间键修饰可以以交替模式出现在有义链或反义链上;或者有义链或反义链都可以以交替模式包含核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以相对于反义链上的核苷酸间键修饰的交替模式发生位移。在一个实施方案中,双链RNAi试剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,所述反义链在5'末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键并且在3'末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且所述有义链在5'末端或3'末端

包含至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0271] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂在悬端区中包含硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键修饰。例如,所述悬端区可以含有在两个核苷酸,在所述两个核苷酸之间 具有硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键。还可以通过进行核苷酸间键修饰来使悬端 核苷酸与双链体区域内的末端配对核苷酸连接。例如,至少可以有2个、3个、4个或 全部的悬端核苷酸可通过硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键连接,并且任选地,可 以存在额外的硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键,其能使悬端核苷酸与紧挨着所述 悬端核苷酸的配对核苷酸连接起来。例如,在末端三个核苷酸之间可能存在至少两个 硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述三个核苷酸中有两个是悬端核苷酸,并且第三个是 紧挨着所述悬端核苷酸的配对核苷酸。这些末端的三个核苷酸可能位于反义链的3'末 端,有义链的3'末端,反义链的5'末端或者有义链的5'末端。

[0272] 在一些实施方案中,所述具有2个核苷酸的悬端位于所述反义链的3'末端,并且 在所述末端三个核苷酸之间存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述三个核苷酸中 的两个是所述悬端核苷酸,并且所述第三个核苷酸是紧挨所述悬端核苷酸的配对核苷 酸。任选地,另外,所述dsRNAi试剂可以在所述有义链的5'末端和所述反义链的5' 末端处的所述末端三个核苷酸之间具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0273] 在一个实施方案中,所述dsRNAi试剂包含与靶标的错配,双链体内的错配,或 其组合。错配可以出现在悬端区域或双链体区域。可以根据碱基对促进解离或融解的 倾向性(例如,根据特定配对的结合或解离的自由能,最简单的方法是在单对检查的 基础上检查配对,但也可以使用邻近法分析或者类似的分析)来对其进行排序。就促 进解离而言:A:U优于G:C;G:U优于G:C;以及I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例 如,(如本文别处所述的)非标准配对或者除标准配对以外的其他配对,优于标准配 对(A:T、A:U、G:C);并且包括通用碱基的配对优于标准配对。

[0274] 在某些实施方案中,所述dsRNAi试剂包含从所述反义链的5'末端数起双链体区 域中最开始的1个、2个、3个、4个或5个碱基对中的至少一个独立地选自A:U、G:U、 I:C,以及错配对(例如,非标准配对或者除标准配对以外的其他配对或者包括通用碱 基的配对),从而促进在所述双链体5'末端处的反义链解离。

[0275] 在某些实施方案中,从所述反义链的5'末端数起双链体区域中的第1位处的核苷 酸选自A、dA、dU、U和dT。或者,从所述反义链的5'末端数起双链体区域中最开 始1个、2个或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从所述反义链的5'末端 数起双链体区域中的第一个碱基对是AU碱基对。

[0276] 在其他实施方案中,在所述有义链的3'末端处的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶(dT), 或者在所述反义链的3'末端处的核苷酸脱氧胸腺嘧啶(dT)。例如,在所述有义链、反义链或 者两条链上都存在脱氧胸腺嘧啶核苷酸短序列,例如,两个dT核苷酸。

[0277] 在某些实施方案中,所述有义链序列由式(I)表示:



[0279] 其中:

[0280] i和j各自独立地为0或1;

[0281] p和q各自独立地为0-6;

[0282] 每个 N_a 均独立地表示包含0-25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个以不同方式修饰的核苷酸;

[0283] 每个 N_b 均独立地表示包含0-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0284] 每个 n_p 和 n_q 均独立地表示悬端核苷酸;

[0285] 其中 N_b 和Y不具有相同的修饰;以及

[0286] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序。优选地,YYY表示全部为经2'-F修饰的核苷酸。

[0287] 在一些实施方案中,所述 N_a 或 N_b 包含交替模式的修饰。

[0288] 在一些实施方案中,所述YYY基序存在于所述有义链的切割位点处或附近。例如,当所述dsRNAi试剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区域时,所述YYY基序可以存在于所述有义链的切割位点处或附近(例如:可以存在于第6、7、8位;第7、8、9位;第8、9、10位;第9、10、11位;第10、11、12位;或者第11、12、13位)(从5'末端开始的第一个核苷酸开始计数;或者任选地,从5'端开始所述双链体区域内的第一个配对核苷酸开始计数)。

[0289] 在一个实施方案中,i是1并且j是0,或者i是0并且j是1,或者i和j都是1。因此所述有义链可以由下式表示:

[0290] 5'np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Ib);

[0291] 5'np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3' (Ic);或者

[0292] 5'np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Id)。

[0293] 当所述有义链由式(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个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 都可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0294] 当所述有义链由式(Ic)表示时, N_b 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 都可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0295] 当所述有义链由式(Id)表示时,每个 N_b 均独立地表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 为0、1、2、3、4、5或6。每个 N_a 都可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0296] X、Y和Z每个可以彼此相同或不同。

[0297] 在其他实施方案中,i是0并且j是0,并且所述有义链可以由下式表示:

[0298] 5'np-Na-YYY-Na-nq 3' (Ia)。

[0299] 当所述有义链由式(Ia)表示时,每个 N_a 都可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0300] 在一个实施方案中,所述RNAi的反义链序列可以由式(II)表示:

[0301] 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)

[0302] 其中:

[0303] k和l各自独立地为0或1;

[0304] p'和q'各自独立地为0-6;

[0305] 每个 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

- [0306] 每个 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,
- [0307] 每个 n_p' 和 n_q' 均独立地表示悬端核苷酸;
- [0308] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同的修饰;以及
- [0309] $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序。
- [0310] 在一些实施方案中,所述 N_a' 或 N_b' 包含交替模式的修饰。
- [0311] 所述 $Y'Y'Y'$ 基序存在于所述反义链的切割位点处或附近。例如,当所述dsRNAi试剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区域时,所述 $Y'Y'Y'$ 基序可以存在于所述反义链的第9、10、11位;第10、11、12位;第11、12、13位;第12、13、14位;或者第13、14、15位(从5'末端开始的第一个核苷酸开始计数;或者任选地,从5'末端开始所述双链体区域内的第一个配对核苷酸开始计数)。优选地,所述 $Y'Y'Y'$ 基序存在于第11、12、13位。
- [0312] 在某些实施方案中, $Y'Y'Y'$ 基序表示全部为经2'-OMe修饰的核苷酸。
- [0313] 在某些实施方案中,k是1并且l是0,或者k是0并且l是1,或者k和l都是1。
- [0314] 因此所述反义链可以由下式表示:
- [0315] $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p,3'$ (IIb);
- [0316] $5'n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p,3'$ (IIc);或者
- [0317] $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p,3'$ (IId)。
- [0318] 当所述反义链由式(IIb)表示时, N_b' 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0319] 当所述反义链由式(IIc)表示时, N_b' 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0320] 当所述反义链由式(IId)表示时,每个 N_b' 均独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 为0、1、2、3、4、5或6。
- [0321] 在其他实施方案中,k是0并且l是0,并且所述反义链可以由下式表示:
- [0322] $5'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q,3'$ (IIa)。
- [0323] 当所述反义链由式(IIa)表示时,每个 N_a' 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0324] X' 、 Y' 和 Z' 每个可以彼此相同或不同。
- [0325] 有义链和反义链的每个核苷酸都可以独立地被LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟代修饰。例如,有义链和反义链的每个核苷酸都独立地被2'-O-甲基或2'-氟代修饰。特别地,每个 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 和 Z' 都可以代表2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。
- [0326] 在一些实施方案中,当双链体区域是21nt时,所述dsRNAi试剂的有义链可以包含(从5'末端开始的第一个核苷酸开始计数;或者任选地,从5'末端开始所述双链体区域内的第一个配对核苷酸开始计数)存在于所述链的第9、10和11位的YYY基序;并且Y代表2'-F

修饰。此外,所述有义链可以在双链体区域的另一端含有作为翼修饰的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。

[0327] 在一些实施方案中,所述反义链可以含有(从5'末端开始的第一个核苷酸开始计数;或者任选地,从5'末端开始所述双链体区域内的第一个配对核苷酸开始计数)存在于所述链的第11、12和13位的Y'Y'Y'基序;并且Y'代表2'-O-甲基修饰。此外,所述反义链可以在所述双链体区域的另一端含有作为翼修饰的X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序;并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0328] 由上述式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中的任一个表示的有义链分别与由式(IIa)、(IIb)、(IIc)和(IId)中的任一个表示的反义链形成双链体。

[0329] 因此,用于本发明所述方法的dsRNAi试剂可以包括有义链和反义链,每条链具有14到30个核苷酸,所述iRNA双链体由式(III)表示:

[0330] 有义链: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0331] 反义链: $3' n_p' - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q' 5'$

[0332] (III)

[0333] 其中:

[0334] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0335] p、p'、q和q'各自独立地为0-6;

[0336] 每个 N_a 和 N_a' 均独立地表示包含0-25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0337] 每个 N_b 和 N_b' 均独立地表示包含0-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0338] 其中每个 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 均独立地表示悬端核苷酸,每 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 均可能存在或可能不存在;

[0339] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序。

[0340] 在一个实施方案中,i是0并且j是0;或者i是1并且j是1;或者i是0并且j是1;或者i和j都是0;或者i和j都是1。在另一实施方案中,k是0并且l是0;或者k是1并且l是0;k是0并且l是1;或者k和l都是0;或者k和l都是1。

[0341] 形成iRNA双链体的有义链和反义链的示例性组合包括下式:

[0342] $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0343] $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$

[0344] (IIIa)

[0345] $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0346] $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5'$

[0347] (IIIb)

[0348] $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0349] $3' n_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$

[0350] (IIIc)

[0351] $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0352] $3' n_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5'$

[0353] (IIId)

[0354] 当所述dsRNAi试剂由式(IIIa)表示时,每个 N_a 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0355] 当所述dsRNAi试剂由式(IIIb)表示时,每个 N_b 都独立地表示包含1-10个、1-7个、1-5个或1-4个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0356] 当所述dsRNAi试剂由式(IIIc)表示时,每个 N_b 、 N_b' 均独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0357] 当所述dsRNAi试剂由式(IIId)表示时,每个 N_b 、 N_b' 均独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 、 N_a' 都独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 、 N_a' 、 N_b 和 N_b' 都独立地包含具有交替模式的修饰。

[0358] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中的X、Y和Z的每个可以彼此相同或不同。

[0359] 当所述dsRNAi试剂由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示时,至少一个Y核苷酸可以与一个Y'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个Y核苷酸可以与相应的Y'核苷酸形成碱基对;或者所有三个Y核苷酸都与相应的Y'核苷酸形成碱基对。

[0360] 当所述dsRNAi试剂由式(IIIb)或(IIId)表示时,至少一个Z核苷酸可以与一个Z'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个Z核苷酸与相应的Z'核苷酸形成碱基对;或者所有三个Z核苷酸都与相应的Z'核苷酸形成碱基对。

[0361] 当所述dsRNAi试剂由式(IIIc)或(IIId)表示时,至少一个X核苷酸可以与一个X'核苷酸形成碱基对。或者,至少两个X核苷酸与相应的X'核苷酸形成碱基对;或者所有三个X核苷酸都与相应的X'核苷酸形成碱基对。

[0362] 在某些实施方案中,在Y核苷酸上的修饰与Y'核苷酸上的修饰不同,在Z核苷酸上的修饰与Z'核苷酸上的修饰不同,以及/或者在X核苷酸上的修饰与X'核苷酸上的修饰不同。

[0363] 在某些实施方案中,当所述dsRNAi试剂由式(IIId)表示时,所述 N_a 修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。在其他实施方案中,当所述RNAi试剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰,并且 $n_p' > 0$,并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。在其他实施方案中,当所述RNAi试剂由式(IIId)表示时,所述 N_a 修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接,并且所述有义链与通过二价或三价枝化接头(如下所述)连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。在其他实施方案中,当所述RNAi试剂由式(IIId)表示时,所述 N_a 修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接,所述有义链包含至少一个所述硫代磷酸酯键,并且所述有义链与通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0364] 在一些实施方案中,当所述RNAi试剂由式(IIIa)表示时,所述 N_a 修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少有一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接,

所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键,并且所述有义链与通过二价或三价枝 化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。

[0365] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂是多体,所述多体含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体,其中所述双链体通过接头连接。所述接头可以是可切割的或者不可切割的。任选地,所述多体还包括配体。每个所述 双链体都可以靶向同一基因或两个不同的基因;或者每个所述双链体都可以靶向同一 基因的两个不同的靶位点。

[0366] 在一些实施方案中,所述dsRNAi试剂是多体,所述多体含有三个、四个、五个、六个或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体,其 中所述双链体通过接头连接。所述接头可以是可切割的或者不可切割的。任选地,所 述多体还包括配体。每个所述双链体都可以靶向同一个基因或两个不同的基因;或者 每个所述双链体都可以靶向同一基因的两个不同的靶位点。

[0367] 在一个实施方案中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中的至 少一个表示的两种dsRNAi试剂在5'末端以及一个或两个3'末端,彼此连接,并且任 选地与配体缀合。每种所述试剂可以靶向所述同一基因或两个不同的基因;或者每种 所述试剂可以靶向同一基因的两个不同的靶位点。

[0368] 各种公开物都描述了可用于本发明所述方法中的多体iRNA。此类出版物包括美国专利号7,858,769、W02007/091269、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887 和 W02011/031520,其每个的全部内容都通过引用并入本文。

[0369] 如下文更详细的描述,含有一个或多个碳水化合物部分与iRNA之间的缀合的iRNA能够优化所述iRNA的一个或多个特性。在许多情况下,所述碳水化合物部分会 与所述iRNA的经修饰的亚单元连接。例如,iRNA的一个或多个核糖核苷酸亚单元的 核糖可以被另一部分(例如,与碳水化合物配体连接的非碳水化合物(优选环状的) 运载物)置换。如果核糖核苷酸亚单元中所述亚单元的核糖已经像这样进行了置换,那么所述核糖核苷酸亚单元在本文中被称作核糖置换修饰亚单元(RRMS)。环状运 载物可以是碳环系统(即,所有环原子都是碳原子)或者杂环系统(即一个或多个环 原子可以是杂原子,例如氮、氧、硫)。所述环状运载物可以是单环的环系统,或者 可以含有两个或更多个环,例如稠环。所述环状运载物可以是完全饱和的环系统,或 者其可以含有一个或多个双键。

[0370] 配体可以通过运载物与多核苷酸连接。所述运载物包括(i)至少一个“骨架连接点”,优选两个“骨架连接点”以及(ii)至少一个“拴附点(tethering attachment point)”。本文使用的“骨架连接点”是指官能团,例如羟基,或者一般来说可用于 以及适用于将所述运载物并入骨架中的键,例如,磷酸键或经修饰的磷酸键,例如核 糖核酸的含硫骨架。在一些实施方案中,“拴附点”(TAP)是指环状运载物的连接 选定部分的组成性环原子,例如,碳原子或杂原子(不同于提供骨架连接点的原子)。所述部分可以是,例如,碳水化合物,例如,单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖。任选地,所述选定部分通过一个干预栓连与所述环状运载物连接。因此,所述环状运 载物通常会包括官能团,例如氨基,或者通常提供适于将另一化学实体(例如,配体) 并入或拴到组成性环中的键。

[0371] iRNA可以通过运载物与配体缀合,其中所述运载物可以是环状基团或无环基团; 优选地,所述环状基团选自下组:吡咯烷基、吡咯啉基、吡咯烷基(pyrazolindinyl)、咪 唑

烷基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢化萘；优选地，所述无环基团是丝氨酸骨架或二乙醇胺骨架。

[0372] 在某些实施方案中，所述iRNA是选自表3和表5中所列的试剂的试剂。在一个实施方案中，所述iRNA试剂靶向SEQ ID NO:1所示的第3221-3243位核苷酸。在一个实施方案中，所述RNAi试剂是AD-67635 (其靶向SEQ ID NO:1所示的第3224-3243位核苷酸)。在另一实施方案中，所述RNAi试剂是AD-67637 (其靶向SEQ ID NO:1所示的第3223-3242位核苷酸)。这些试剂可以进一步包括配体。

[0373] III. 与配体缀合iRNA

[0374] 本发明所述iRNA的RNA的另一种修饰涉及使一种或多种能增强所述iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取 (例如，摄取进细胞) 的配体、部分 (moiety) 或缀合物与 所述iRNA化学连接。此类部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分 (Letsinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553-6556)、胆酸 (Manoharan等人, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060)。在某些实施方案中，所述修饰可以包括硫醚 (例如，芳基-S-三苯甲基硫醇) (Manoharan等人, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309, Manoharan等人, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770)、硫代胆固醇 (Oberhauser 等人, Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538)、脂族链 (例如，十二烷二醇或十一烷基残基) (Saison-Behmoaras等人, EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov等人, FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk等人, Biochimie, 1993, 75:49-54)、磷脂 (例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油基-3-磷酸酯) (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链 (Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) 或者金刚烷乙酸 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654)、棕榈酰基部分 (Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237) 或者十八烷基胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分 (Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937)。

[0375] 在某些实施方案中，配体能够改变其所引入的iRNA试剂的分布、靶向或寿命。在优选的实施方案中，配体，例如，与缺少此类配体的类别相比，能够增强对选定靶标 (例如，分子、细胞或细胞类型、隔室如细胞或器官隔室，组织、器官或身体区域) 的亲和力。优选的配体不参与双链体核酸中的双链配对。

[0376] 配体可以包括天然存在的物质，例如蛋白质 (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、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊糖、环糊精、N-乙酰半乳糖胺或透明质酸)；或脂质。所述配体也可以是 重组的或合成的分子，例如合成的聚合物如合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸为聚赖氨酸 (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)、聚氨酯、聚 (2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚膦嗪。多胺的实例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸 (PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、胍、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺季盐或 α -螺旋肽。

[0377] 配体还可以包括靶向基团，例如，结合特定细胞类型如肾细胞的细胞或组织的靶

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素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、单价或多价N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰-古洛糖胺多价甘露糖、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、胆汁酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素或者RGD肽或RGD肽模拟物。在某些实施方案中,所述配体是单价或多价的N-乙酰半乳糖胺。在某些实施方案中,所述配体是胆固醇。

[0378] 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、得克萨卟啉、Sapphyrin)、多环芳烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人造核酸内切酶(例如,EDTA)、亲脂性分子、例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、豆蔻酸、(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪)和肽缀合物(例如,黑腹果蝇触足肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标记物、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)、合成的核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu³⁺络合物)、二硝基苯、HRP或AP。

[0379] 配体可以是蛋白质(例如,糖蛋白)或者肽(例如,对共配体具有特异性亲和力的分子)或者抗体(例如,结合特定细胞类型如肝细胞的抗体)。配体还可以包括激素和激素受体。它们还可以包括非肽类物质,如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。所述配体可以是,例如,脂多糖、p38 MAP激酶的激活剂或NF- κ B激活剂。

[0380] 所述配体可以是能够,例如,通过破坏细胞的细胞骨架(例如,通过破坏细胞的微管、微丝或中间细丝)提升细胞对iRNA试剂的摄入的物质,例如药物。所述药物可以是,例如,紫杉醇、长春新碱、长春花碱、细胞松弛素、诺考达唑、japlakinolide、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽、swinholid A、indanocine或肌球蛋白(myoservin)。

[0381] 在一些实施方案中,如本文所述与iRNA连接的配体能作为药代动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲脂体、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括,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、维生素E、生物素等。包含多个硫代磷酸酯键的寡核苷酸也已知能结合血清蛋白,因此,在骨架中包含多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸(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)也可作为用于本发明的配体(例如,PK调节配体)。另外,结合血清组分(例如,血清蛋白)的适体也适合作为PK调节配体用于本文所述的实施方案中。

[0382] 本发明所述与配体缀合的iRNA可以通过使用带有侧挂的反应性官能团的寡核苷酸而合成得到,例如从连接分子连接到寡核苷酸上而衍生出的侧挂的反应性官能团(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与商购获得的配体、带有多种保护基团中的任一种的合成配体或者连接有连接部分的配体进行反应。

[0383] 可以通过熟知的固相合成技术方便且常规地制备出用于本发明所述缀合物中的寡核苷酸。用于这种合成的设备由几家供应商出售,包括,例如,Applied Biosystems(Foster City, CA)。可以附加地或可选地使用本领域已知的用于此类合成的任何其他手

段。也已知可以使用类似的技术来制备其他寡核苷酸,例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物。

[0384] 在与配体缀合的iRNA以及本发明所述配体分子(所述配体分子带有序列特异性的连接的核苷)中,可以利用标准核苷酸或核苷前体,或者已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合前体,或者已经带有所述配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合前体,或者带有非核苷配体的构件,在合适的DNA合成仪上合成寡核苷酸和寡核苷。

[0385] 当使用已经带有连接部分的核苷酸缀合前体时,通常在合成完以序列特异性的方式连接的核苷后,使配体分子与连接部分反应以形成与配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方案中,自动合成仪通过利用亚磷酸胺合成出本发明所述寡核苷酸或连接的核苷,其中所述亚磷酸胺除了可商购得到的并且常规用于寡核苷酸合成的标准亚磷酸胺和非标准亚磷酸胺以外还有衍生自配体-核苷缀合物的亚磷酸胺。

[0386] A. 脂质缀合物

[0387] 在某些实施方案中,所述配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。此类脂质或基于脂质的分子优选结合血清蛋白,例如,人血清白蛋白(HSA)。HSA的结合配体使得所述缀合物能分布到靶组织上,例如,身体内的非肾靶组织。例如,所述靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。其他能够结合HSA的分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)提升对缀合物降解的抗性,(b)促进向靶细胞或细胞膜的靶向或转运,或(c)可以用于调节与血清蛋白(例如,HSA)的结合。

[0388] 基于脂质的配体可用于抑制,例如,控制缀合物与靶组织的结合。例如,能更强烈地结合HSA的脂质或基于脂质的配体将不太可能被靶向到肾,因此不太可能从体内清除。与HSA结合较弱的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向到肾。

[0389] 在某些实施方案中,所述基于脂质的配体结合HSA。优选地,其结合HSA的亲合力足够使得所述缀合物优选分布到非肾脏组织。然而,优选地,亲和力不会太强以至于HSA-配体的结合不能逆转。

[0390] 在其他实施方案中,所述基于脂质的配体较弱地结合HSA或根本不结合HSA,使得所述缀合物优选分布于肾。靶向肾细胞的其他部分也可以代替所述基于脂质的配体进行使用,或者作为基于脂质的配体之外的另一种选择进行使用。

[0391] 另一方面,所述配体是被靶细胞例如增殖细胞吸收的部分(例如,维生素)。这些对于治疗以不想要的细胞(例如,恶性或非恶性类型的(例如,癌细胞))的增殖为特征的疾病特别有用。示例性的维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括B族维生素,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其他被靶细胞如肝细胞吸收的维生素或营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0392] B. 细胞渗透剂

[0393] 另一方面,所述配体是细胞渗透剂,优选螺旋细胞渗透剂。优选地,所述试剂是两亲性的。示例性试剂是肽,例如tat或果蝇触角蛋白(antennopedia)。如果所述试剂是肽,则其可以是经修饰的,包括肽模拟物,反转异构体(invertomer),非肽或假肽键,以及使用D-氨基酸。所述螺旋剂优选为 α -螺旋剂,其优选具有亲脂相和疏脂相。

[0394] 所述配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)是能够折叠成与天然肽类似的明确的三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA试剂的连接可以(例如,通过增强细胞识别和吸收)影响iRNA的药代动力学分布。所述肽或肽模拟物部分可以

长约为5-50个氨基酸,例如长约为5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸。

[0395] 肽或肽模拟物可以是,例如,细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成的疏水性肽)。所述肽部分可以是树状聚物肽、约束肽或交联肽。在另一替代方案中,所述肽部分可以包括疏水性膜易位序列(MTS)。示例性的含疏水性MTS的肽是具有AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:14)氨基酸序列的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:15)氨基酸序列)也可以是靶向部分。所述肽部分可以是“递送”肽,其可以运载大极性分子,包括肽、寡核苷酸和穿过细胞膜的蛋白质。例如,已经发现来自HIV Tat 蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:16)和果蝇触角蛋白(antennopedia)(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:17)的序列能够用作递送肽。肽或肽模拟物可以由DNA的随机序列编码,例如从噬菌体展示文库中鉴定出的肽,或者从一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定出的肽(Lam等人,Nature,354:82-84,1991)。以细胞靶向为目的从而通过引入单体单元拴到dsRNA试剂上的肽或肽模拟物的实例是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽,或者RGD模拟物。肽部分的长度范围可以从约5个氨基酸到约40个氨基酸。所述肽部分可以具有结构修饰,例如用于提升稳定性或指导构象性质的结构修饰。下面描述的任何结构修饰都可以被利用。

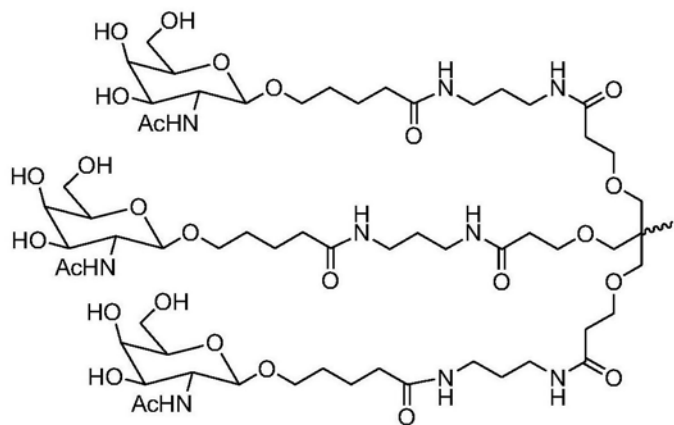
[0396] 用于本发明所述组合和方法的RGD肽可以是线性的或环状的,并且可以进行修饰,例如,糖基化或甲基化修饰,从而促进靶向特定的组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD,还可以使用靶向整合素配体的其他部分。该配体的优选缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0397] “细胞渗透肽”能够渗透细胞,例如,微生物细胞如细菌或真菌细胞,或哺乳动物细胞如人类细胞。微生物细胞渗透肽可以是,例如, α -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1),含二硫键的肽(例如, α -防卫素, β -防御素或牛抗菌肽),或仅含有一个或两个主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吡啶菌素(indolicidin))。细胞渗透肽还可以包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是衍生自HIV-1gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS的双分子两亲肽(bipartite amphipathic peptide)(例如,MPG)(Simeoni等人,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

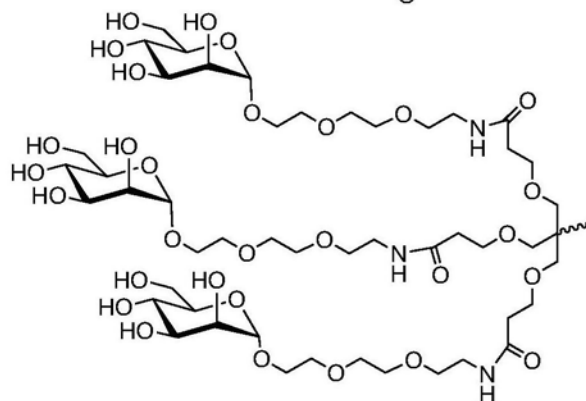
[0398] C.碳水化合物缀合物

[0399] 在本发明所述组合和方法的一些实施方案中,iRNA还包含碳水化合物。如本文所述,所述与碳水化合物缀合的iRNA有利于在体内递送核酸以及适用于体内治疗的组合。本文使用的“碳水化合物”是指本身为由一个或多个单糖单元组成的碳水化合物的化合物,所述一个或多个单糖单元具有至少6个碳原子(其可以是直链、支链或环状),同时每个碳原子与氧、氮或硫原子键合;或者是具有作为其一部分的碳水化合物部分的化合物,所述碳水化合物部分由一个或多个单糖单元组成,所述一个或多个单糖单元每个都具有至少6个碳原子(其可以是直链、支链或环状),同时每个碳原子与氧、氮或硫原子键合。代表性的碳水化合物包括糖(含有约4个、5个、6个、7个、8个或9个单糖单元的单糖、二糖、三糖和低聚糖)和多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。具体的单糖包括HBV和以上所述的(例如,C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单元的(例如,C5、C6、C7或C8)糖。

[0400] 在一个实施方案中,用于本发明所述组合物和方法的碳水化合物缀合物是单糖。在另一实施方案中,用于本发明所述组合物和方法的碳水化合物缀合物选自下组:

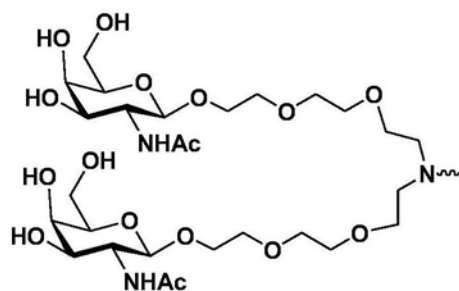


式 II,

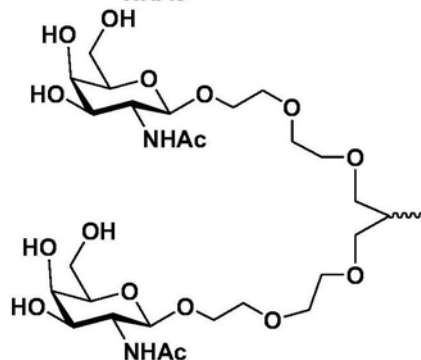


式 III,

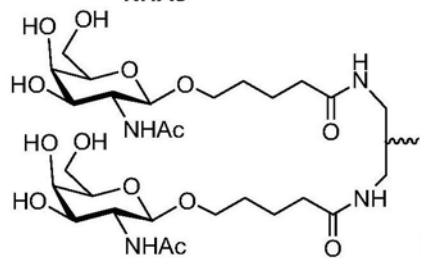
[0401]



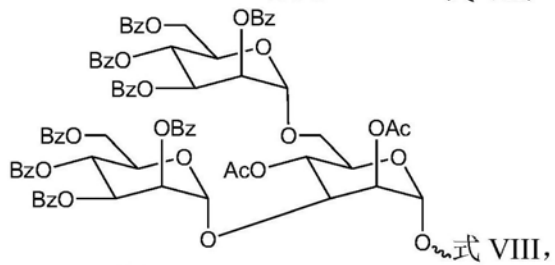
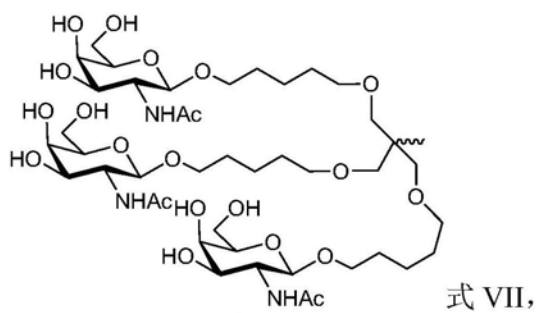
式 IV,



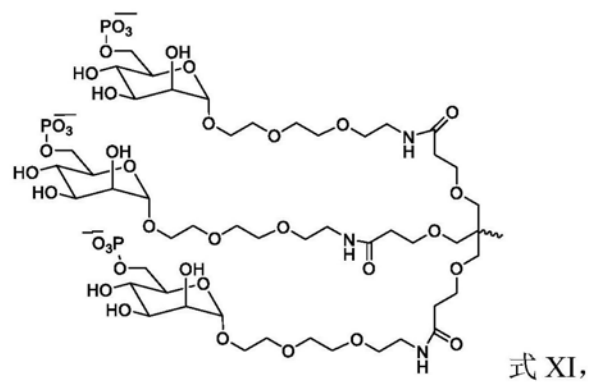
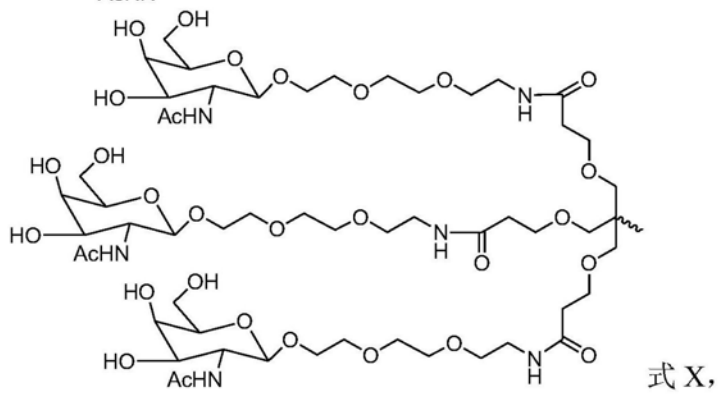
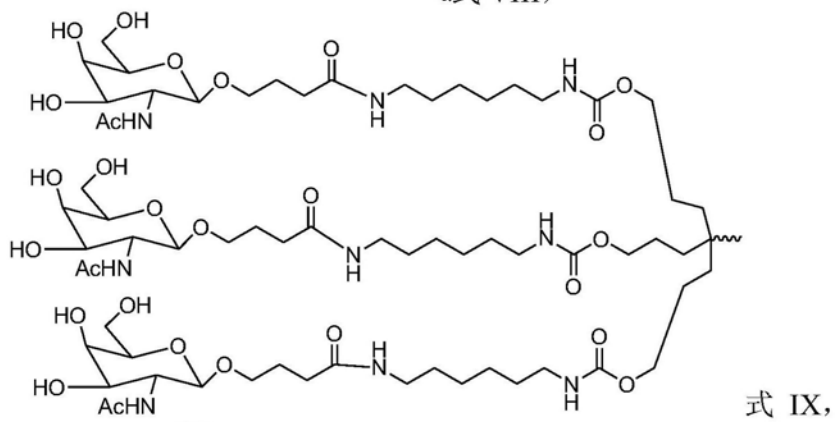
式 V,

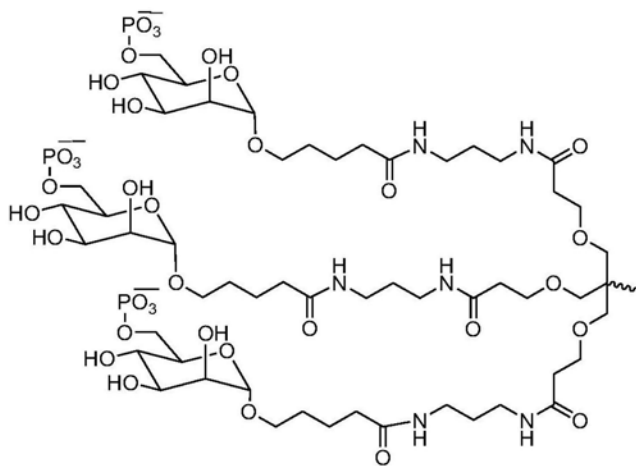


式 VI,

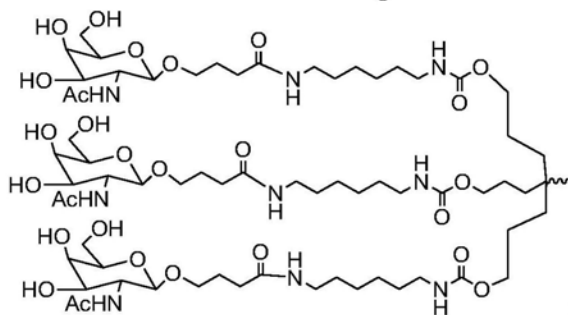


[0402]



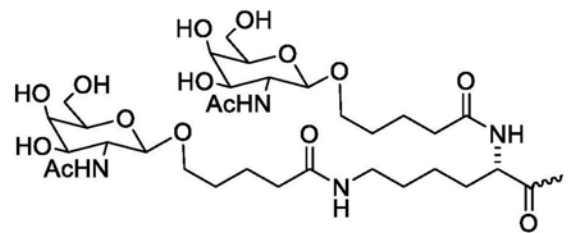


式 XII,

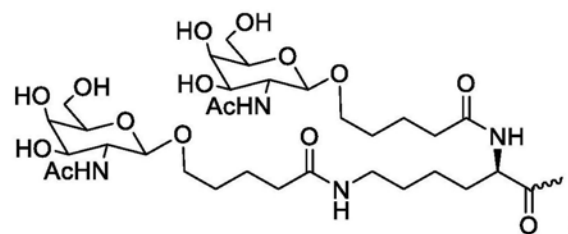


式 XIII,

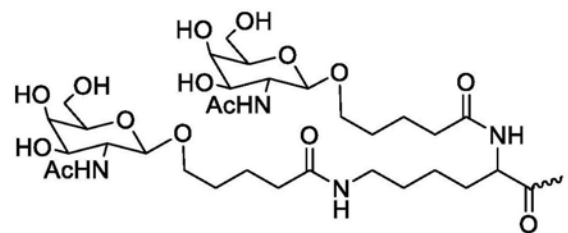
[0403]



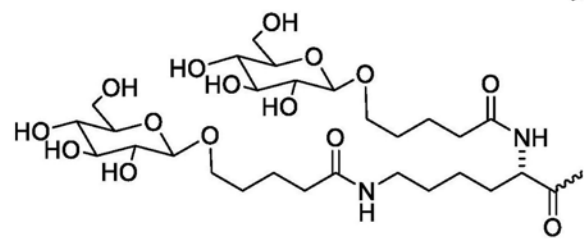
式 XIV,



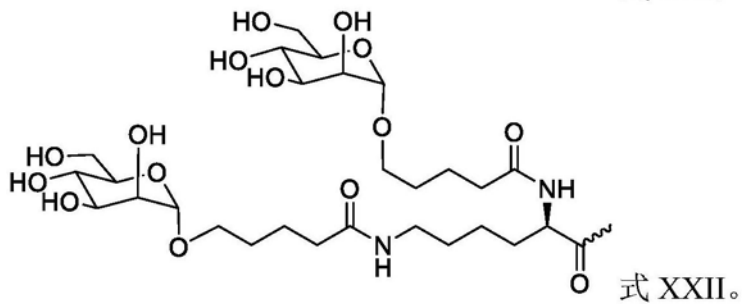
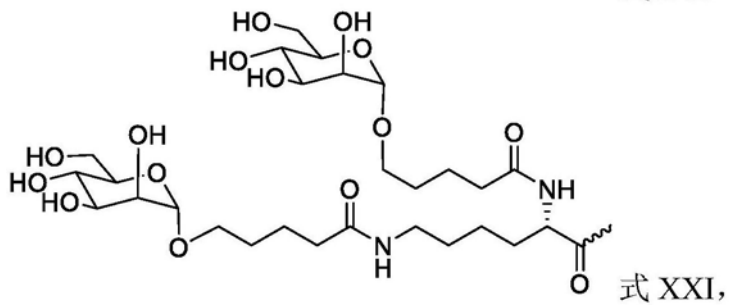
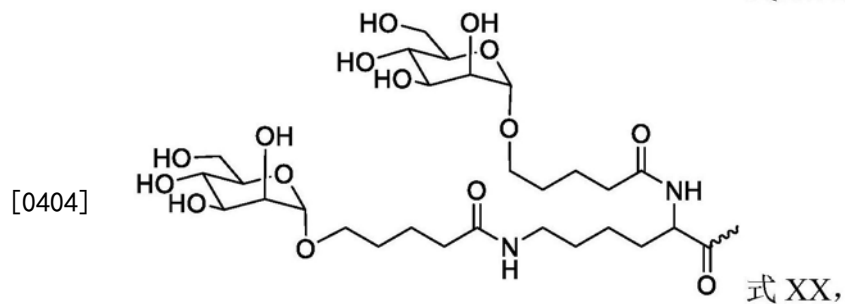
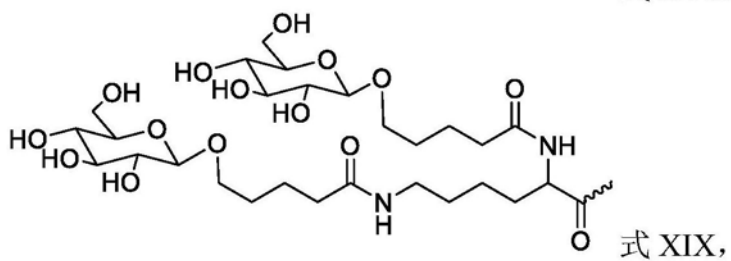
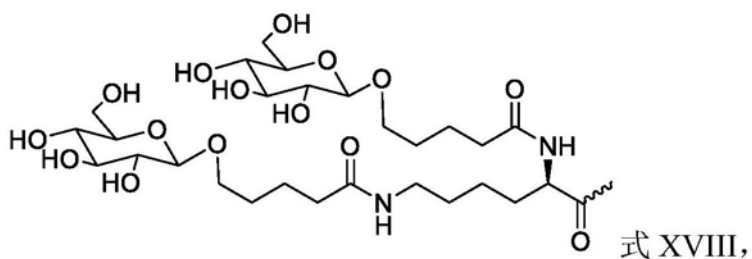
式 XV,



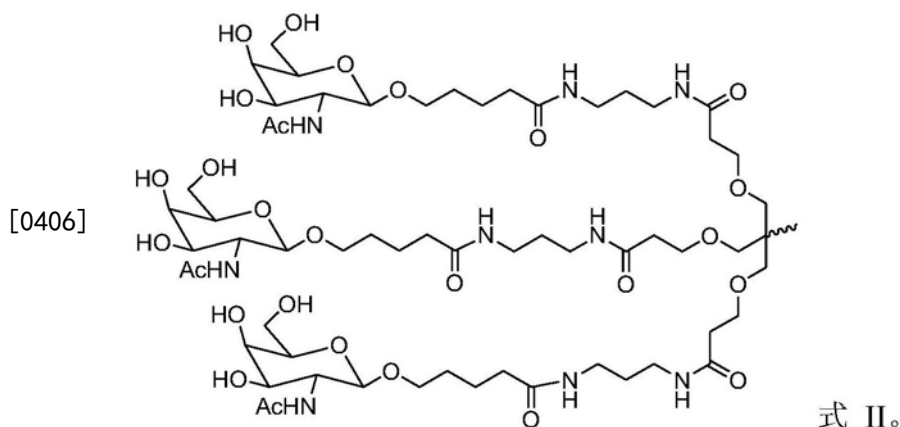
式 XVI,



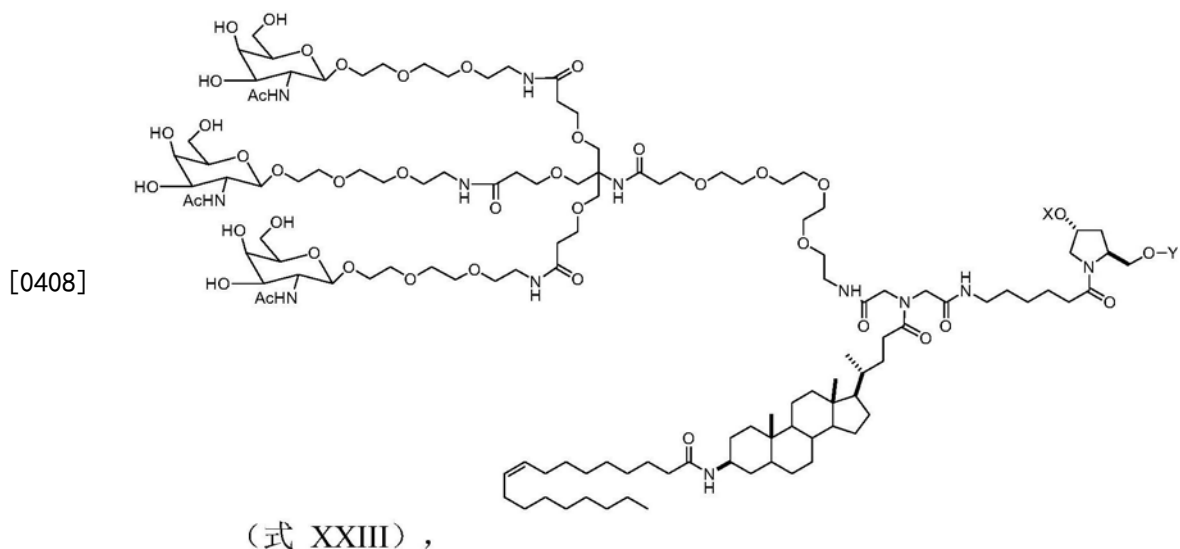
式 XVII,



[0405] 在一个实施方案中,所述单糖是N-乙酰半乳糖胺,例如



[0407] 用于本文所述实施方案的另一代表性碳水化合物缀合物包括,但不限于,



[0409] 当X或Y中有一个是寡核苷酸时,则另一个是氢。

[0410] 在本发明的某些实施方案中,所述GalNAc或GalNAc的衍生物通过单价接头与本发明所述iRNA试剂连接。在一些实施方案中,所述GalNAc或GalNAc的衍生物通过二价接头与本发明所述iRNA试剂连接。在本发明的其他实施方案中,所述GalNAc或GalNAc的衍生物通过三价接头与本发明所述iRNA试剂连接。

[0411] 在一个实施方案中,本发明所述双链RNAi试剂包括与所述iRNA试剂连接的一个GalNAc或GalNAc衍生物。在另一实施方案中,本发明所述双链RNAi试剂包括多个(例如,2个、3个、4个、5个或6个)GalNAc或GalNAc衍生物,其各自通过多个单价接头独立地与所述双链RNAi试剂的多个核苷酸连接。

[0412] 在一些实施方案中,例如,如果本发明所述iRNA试剂的两条链是一个较大分子的一部分,所述较大分子通过不间断链的核苷酸在一条链的3'-末端和相对的另一条链的5'-末端之间连接起来,形成包含多个未配对核苷酸的发夹环,那么所述发夹环内的每个未配对核苷酸都可独立地包含经由单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。所述发夹环也可以由所述双链体的一条链中的延伸悬端形成。

[0413] 在一些实施方案中,所述碳水化合物缀合物还包含一种或多种如上所述的其他配体,例如,但不限于,PK调节剂或细胞渗透肽。

[0414] 适用于本发明的其他碳水化合物缀合物包括PCT公开号WO 2014/179620和WO

2014/179627 (其每个的全部内容都通过引用并入本文) 中所描述的碳水化合物缀合物。

[0415] D. 接头

[0416] 在一些实施方案中, 本文所述的缀合物或配体可以经各种可切割的或不可切割的接头与iRNA寡核苷酸连接。

[0417] 术语“接头”或“连接基团”是指连接化合物的两部分的(例如, 共价连接化合物的两部分的) 有机部分。接头通常包括一个直接的键或原子(如氧或硫), 一个单元(例如NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH) 或原子链, 例如, 但不限于, 取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基、取代的或未取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环基烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基(其中一个或多个亚甲基可插入或者以O、S、S(O)、SO₂、N(R₈)、C(O) 终止), 取代的或未取代的芳基, 取代的或未取代的杂芳基, 或者取代的或未取代的杂环基; 其中R₈为氢、酰基、脂族或取代的脂族基团。在一个实施方案中, 接头在约1-24个原子之间、2-24个、3-24个、4-24个、5-24个、6-24个、6-18个、7-18个、8-18个、7-17个、8-17个、6-16个、7-16个或8-16个原子之间。

[0418] 可切割的连接基团是在细胞外足够稳定, 但是一旦进入靶细胞便会被切割成释放被所述接头保持在一起的两部分的连接基团。在优选的实施方案中, 所述可切割的连接基团在靶细胞中或者在第一参考条件(例如, 可被选作模拟或代表细胞内条件的第一参考条件) 下比在受试者的血液中或者比在第二参考条件(例如, 可被选作模拟或代表在血液或血清中的条件的第二参考条件) 下的切割快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍。

[0419] 可切割的连接基团对裂解剂敏感, 例如pH、氧化还原电位或者存在降解分子。通常, 裂解剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或者水平更高。此类降解剂的实例包括: 针对特定底物所选的氧化还原剂或者不具有底物特异性的氧化还原剂, 包括, 例如, 存在于细胞中的氧化还原酶或还原剂(例如硫醇), 其可通过还原的方式降解氧化还原可切割的连接基团; 酯酶; 内涵体或可产生酸性环境的试剂, 例如, 导致产生5或更低的pH值的试剂; 可以通过充当一般的酸、肽酶(其可以是底物特异性的) 和磷酸酶的作用来水解或降解酸可切割连接基团的酶。

[0420] 可切割的连接基团, 例如二硫键, 可能对pH敏感。人血清的pH为7.4, 而细胞内平均pH则稍低, 范围为约7.1-7.3。内涵体具有更酸性的pH, 范围为5.5-6.0, 并且溶酶体甚至具有在5.0左右的更酸性的pH。一些接头会具有可切割的连接基团, 其在优选的pH下被切割, 从而将阳离子脂质从配体上释放进细胞内, 或者释放到所想要的细胞区室中。

[0421] 接头可以包括被特定酶切割的可切割连接基团。并入接头的可切割连接基团的类型取决于待靶向的细胞。例如, 靶向肝的配体可以通过包含酯基的连接体与阳离子脂质连

接。肝细胞富含酯酶,因此接头在肝细胞中的切割会比在不富含酯酶的细胞类型中的切割更高效。其他富含酯酶的细胞类型包括肺细胞、肾皮质细胞和睾丸细胞。

[0422] 当要靶向富含肽酶的细胞类型(例如,肝细胞和滑膜细胞)时,可以使用含有肽键的接头。

[0423] 通常,可以通过测试降解剂(或降解条件)切割候选连接基团的能力来评估所述候选的可切割连接基团的适用性。还期望能测试所述候选的可切割连接基团在血液中或者在与其他非靶组织接触时,对切割作用的抵抗能力。由此可以确定第一和第二条件之间的切割相对敏感性,其中所述第一条件选择成指示靶细胞中的切割并且所述第二条件选择成指示其他组织或生物流体(例如,血液或血清)中的切割。可以在无细胞系统中、细胞中,细胞培养物中、器官或组织培养物中或者整个动物体中进行评价。不妨在无细胞中或在培养条件下进行初步评价并通过在整个动物体中的进一步评价来进行确认。在优选的实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或者在所选的模拟细胞内条件的体外条件下)的切割相比在血液或血清中(或者在所选的模拟细胞内条件的体外条件下)的切割快至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90或100倍。

[0424] i. 氧化还原可切割连接基团

[0425] 在某些实施方案中,可切割连接基团是在还原或氧化时被切割的氧化还原可切割连接基团。可还原切割的连接基团的实例是二硫键连接基团(-S-S-)。为了确定候选的可切割连接基团是否是合适的“可还原切割的连接基团”,或者例如是否适用于特定的iRNA部分和特定的靶向剂,可以参考本文所述的方法。例如,可以通过与二硫苏糖醇(DTT)孵育,或者通过使用本领域已知的试剂,用其他还原剂来评价候选物,所述试剂模拟在细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率。也可以在被选择用于模拟血液或血清条件的条件下评价候选物。在一个实施方案中,候选化合物在血液中最多被切割约10%。在其他实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或者在被选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的降解与血液中(或者在被选择成模拟细胞外条件的体外条件下)的降解快至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90或约100倍。使用标准的酶动力学测定法,在所选的模拟细胞内基质的条件下测定候选化合物的切割速率,并与所选的模拟细胞外基质的条件进行比较。

[0426] ii. 基于磷酸盐的可切割连接基团

[0427] 在其他实施方案中,可切割的接头包括基于磷酸盐的可切割连接基团。基于磷酸盐的可切割连接基团可被能够降解或水解所述磷酸基团的试剂切割。切割细胞中磷酸盐基团的试剂的例子是酶,例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸盐的连接基团的例子是 -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-。优选的实施方案是 -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-和-O-P(S)(H)-S-。优选的实施方案是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用与上述方法类似的方法评价这些候选物。

[0428] iii. 酸可切割连接基团

[0429] 在其他实施方案中,可切割接头包括酸可切割连接基团。酸可切割连接基团是在酸性条件下被切割的连接基团。在优选的实施方案中,酸可切割连接基团可在pH为 约6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境中被切割,或者被例如酶 等能充当普通酸的试剂切割。在细胞中,特定的具有低pH值的细胞器,例如内涵体 和溶酶体,可以为酸可切割连接基团提供裂解环境。酸可切割连接基团的实例包括但不限于 胺类、酯类、具有氨基酸的酯类。酸可裂解基团可以具有 $-C=NN-$ 、 $-C(O)O$ 或 $-OC(O)$ 等通式。在优选的实施方案中,与所述酯的氧(烷氧基)连接的碳芳基、替代的烷基 或叔烷基如二甲基戊基或叔丁基。可以使用与上述方法类似的方法评价这些候选物。

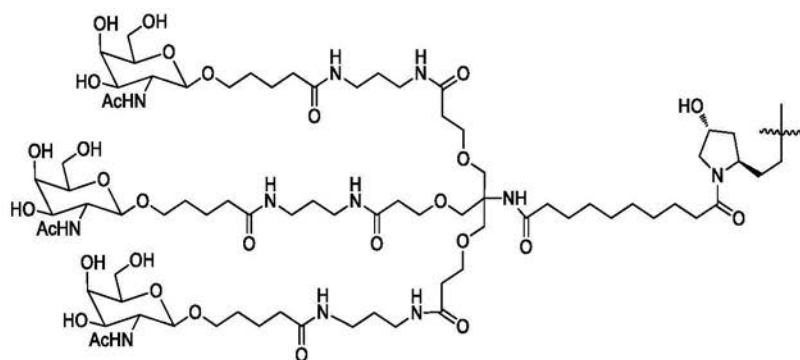
[0430] iv. 基于酯的连接基团

[0431] 在其他实施方案中,可切割接头包括基于酯的可切割连接基团。基于酯的可切割连接基团能被细胞中的酯酶和酰胺酶等酶切割。基于酯的可切割连接基团的实例包括, 但不限于,亚烷基酯,亚烯基酯和亚炔基酯。酯可裂解的连接基团具有 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$ 通式。可以使用与上述方法类似的方法评价这些候选物。

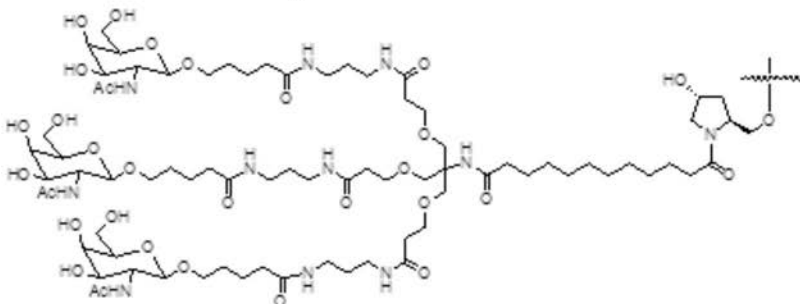
[0432] v. 基于肽的连接基团

[0433] 在其他实施方案中,可切割接头包括基于肽的可切割连接基团。基于肽的可切割连接基团能被细胞中的肽酶和蛋白酶等酶切割。基于肽的可切割连接基团是在氨基酸 之间形成的用以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基 团不包括酰胺基团($-C(O)NH-$)。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的用以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽 的切割基团通常局限于在氨基酸之间形成的用以产生肽和蛋白质的肽键(即,酰胺键), 并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有 $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ 通式(SEQ ID NO: __),其中RA和RB是该两个相邻氨 基酸的R基团。可以使用与上述方法类似的方法评价这些候选物。

[0434] 在一些实施方案中,本发明所述iRNA通过接头与碳水化合物缀合。具有本发明 所述组合物和方法的接头的iRNA碳水化合物缀合物的非限制性实例包括,但不限于,

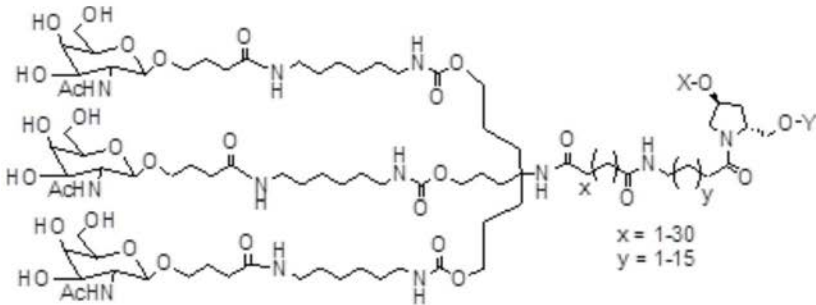


(式 XXIV),

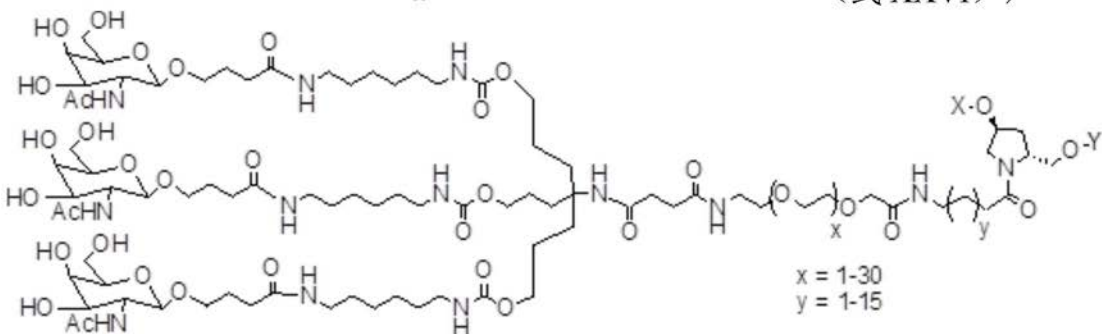


(式 XXV),

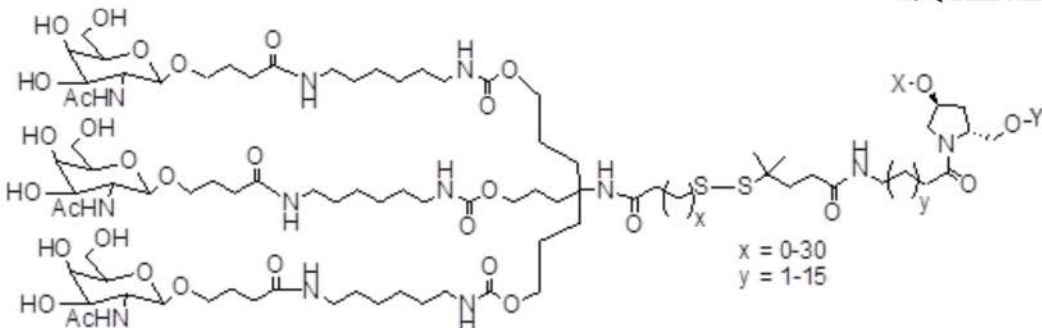
[0435]



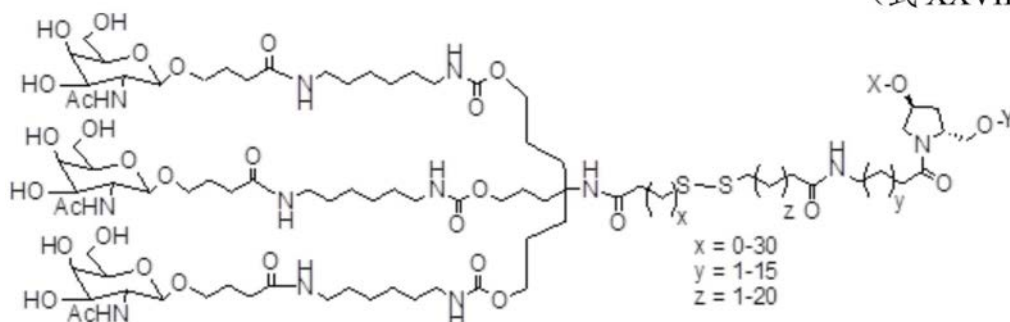
(式 XXVI),



(式 XXVII),

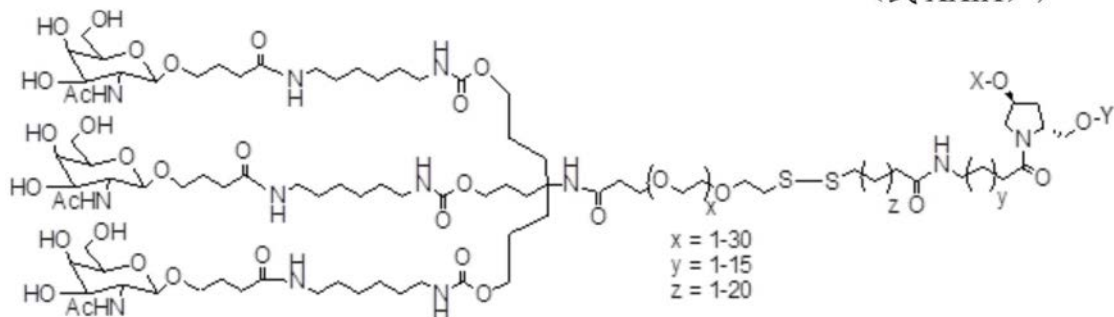


(式 XXVIII),

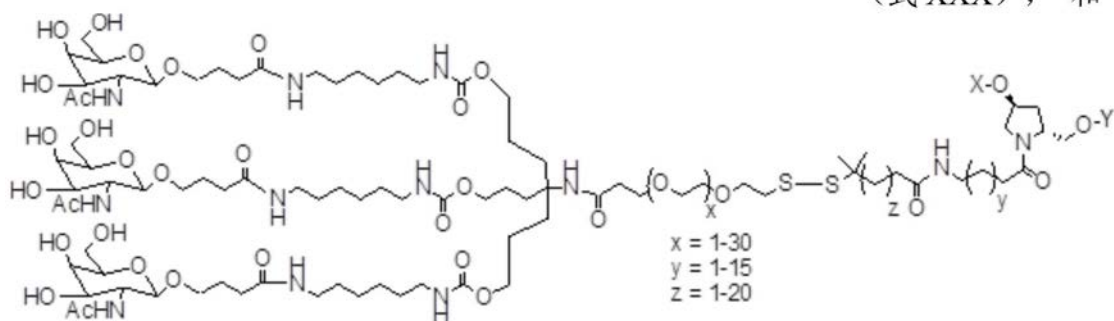


(式 XXIX),

[0436]



(式 XXX), 和



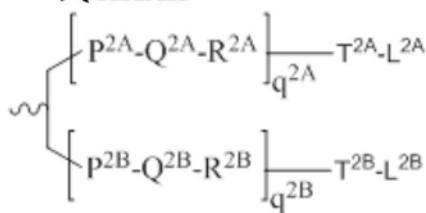
(式 XXXI),

[0437] 当X或Y中有一个是寡核苷酸时,则另一个是氢。

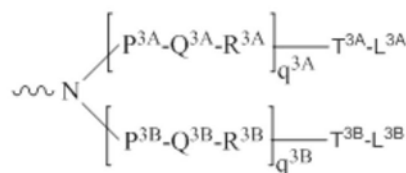
[0438] 在本发明所述组合物和方法的某些实施方案中,配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个“GalNAc”(N-乙酰半乳糖胺)衍生物。

[0439] 在某些实施方案中,本发明所述dsRNA与选自式(XXXII)-(XXXV)中的任一个所示结构组的二价或三价枝化接头缀合:

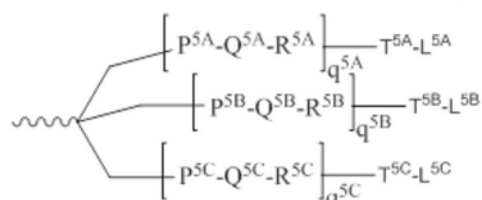
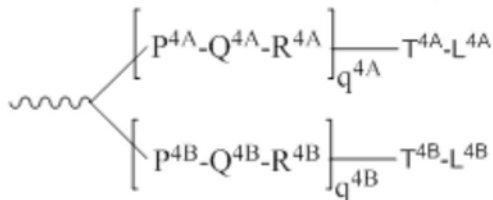
式 XXXII



式 XXXIII



[0440]



;

式 XXXIV

式 XXXV

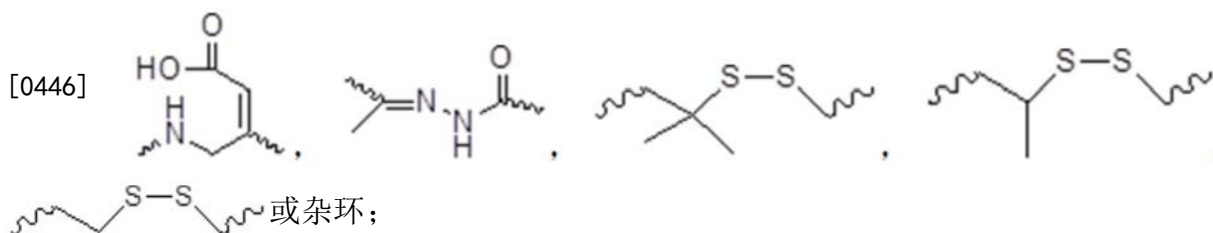
[0441] 其中:

[0442] 每次出现时, $q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ 和 $q^{5\text{C}}$ 各自独立地表示0-20,并且其中所述重复单元可以相同或不同;

[0443] 每次出现时, $\text{P}^{2\text{A}}$ 、 $\text{P}^{2\text{B}}$ 、 $\text{P}^{3\text{A}}$ 、 $\text{P}^{3\text{B}}$ 、 $\text{P}^{4\text{A}}$ 、 $\text{P}^{4\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{A}}$ 、 $\text{P}^{5\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{C}}$ 、 $\text{T}^{2\text{A}}$ 、 $\text{T}^{2\text{B}}$ 、 $\text{T}^{3\text{A}}$ 、 $\text{T}^{3\text{B}}$ 、 $\text{T}^{4\text{A}}$ 、 $\text{T}^{4\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{A}}$ 、 $\text{T}^{5\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{C}}$ 各自独立地表示空、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 CH_2 、 CH_2NH 或 CH_2O ;

[0444] 每次出现时, $Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ 各自独立地表示空、亚烷基、取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可插入或被O、S、S(O)、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}\equiv\text{C}$ 、或C(O)中的一个或多个终止;

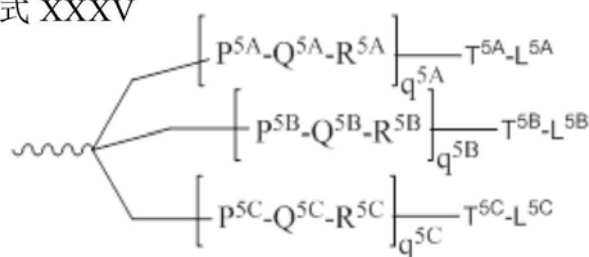
[0445] 每次出现时, $\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ 各自独立地表示空、NH、O、S、 CH_2 、C(O)O、C(O)NH、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、CO、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、



[0447] 每次出现时, $\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 和 $\text{L}^{5\text{C}}$ 代表配体;即独立地代表单糖(例如, GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;以及 R^{a} 为H或氨基酸侧链。三价缀合的GalNAc衍生物特别适用于与RNAi试剂一起抑制靶基因的表达,例如式(XXXV)所示的GalNAc衍生物:

式 XXXV

[0448]



[0449] 其中L^{5A}、L^{5B}和L^{5C}表示单糖,例如GalNAc衍生物。

[0450] 与GalNAc衍生物缀合的合适的二价和三价支化连接基团的实例包括,但不限于,上述式II、VII、XI、X和XIII所示的结构。

[0451] 教导制备RNA缀合物的代表性的美国专利包括,但不限于,美国专利号4,828,979; 4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731; 5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718; 5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263; 4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963; 5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098; 5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552; 5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923; 5,599,928;5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646; 和8,106,022,其每个的全部内容通过引用并入本文。

[0452] 没有必要对给定化合物中的所有位置进行均匀的修饰,事实上,可以将一个以上的上述修饰并入单个化合物中,或者甚至可以并入iRNA中的单个核苷中。本发明还包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0453] 在本发明的上下文中,“嵌合的”iRNA化合物或“嵌合体”是iRNA化合物,优选含有两个或多个化学上不同的区域的dsRNAi试剂,每个区域由至少一个单体单元组成,即dsRNA化合物情况下的核苷酸。这些iRNA通常含有至少一个区域,在所述区域中RNA经过了修饰从而提升iRNA针对核酸酶降解的抗性,提升细胞摄取,或者提升对靶核酸的结合亲和力。iRNA的另外的区域可以充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。举例来说,RNase H是切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。因此,RNase H的激活导致了RNA靶物的切割,从而大大提高了iRNA抑制基因表达的效率。因此,当使用嵌合dsRNA时,通常可以用较短的iRNA获得与同一靶区杂交的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相当的结果。可以通过凝胶电泳,并且如果必要的话,也可以通过本领域已知的相关核酸杂交技术,来常规地检测RNA靶物的切割情况。

[0454] 在某些情况下,iRNA的RNA可以被非配体基团修饰。为了增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,已经将许多非配体分子与iRNA缀合,并且在科学文献中可以找到用于执行这种缀合的步骤。这种非配体部分包括脂质部分,例如胆固醇(Kubo,T.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,365(1):54-61;Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553),可以用于本发明所述的试剂中。其他非配体部分包括脂质部分、胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053)、硫醚如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3:2765)、硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂族链如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J.,1991,10:111;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259:327;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75:49)、磷脂如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-H-磷酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&

Nucleotides, 1995, 14:969)、或者金刚烷乙酸(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、棕榈基部分(Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)或十八胺或己基氨基-羧基-羟胆固醇部分(Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)。教导制备此类RNA缀合物的代表性美国专利已在上文列出。常用的缀合步骤涉及合成RNA, 所述RNA在该序列的一个或多个位置上带有氨基接头。然后通过使用适当的偶联或活化试剂使氨基与缀合的分子反应。可以在溶液相中, 用仍然与固体支持物结合的RNA执行缀合反应, 或者在切割RNA后执行缀合反应。通过HPLC纯化RNA缀合物通常能提供纯的缀合物。

[0455] IV. 本发明所述iRNA的递送

[0456] 可以通过许多不同的方式来实现将本发明所述iRNA递送给细胞, 例如, 受试者如人受试者(例如, 需要其的受试者, 例如患有与PD-L1的基因表达相关的疾病、病症或病况的受试者)体内的细胞。例如, 可以通过使细胞在体外或在体内与本发明所述iRNA接触来执行递送。也可以通过将包含iRNA, 例如dsRNA的组合物施用给受试者来直接执行在体递送。或者, 可以通过施用编码和指导iRNA表达的一种或多种载体来间接地执行在体递送。下面进一步讨论这些替代方案。

[0457] 通常, 递送核酸分子(体外或在体的方式)的任何方法都可适用于本发明所述iRNA(参见例如, Akhtar S. 和 Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144以及 W094/02595, 其全部内容通过引用并入本文)。对于在体递送, 为了递送iRNA分子而考虑的因素包括, 例如, 所递送分子的生物学稳定性, 预防非特异性效应, 以及所递送分子在靶组织中的累积。可以通过局部施用, 例如通过直接注射或植入进组织或局部施用制剂, 来使iRNA的非特异性效应最小化。对治疗部位的局部施用能使试剂的局部浓度最大化, 限制试剂不使其暴露于全身性组织(否则该试剂可能会损害该组织或者该组织会降解该试剂), 并且允许施用较低总剂量的iRNA分子。几项研究已经显示了当局部施用dsRNAi试剂时能成功降低基因产物。例如, 以玻璃体内注射的方式将VEGF的dsRNA眼内递送到食蟹猴中(Tolentino, MJ等人, (2004) Retina 24:132-138)并且以视网膜下注射的方式将其递送到小鼠中(Reich, SJ. 等人, (2003) Mol. Vis. 9:210-216), 在年龄相关性黄斑变性的实验模型中都显示能预防新血管形成。此外, 将dsRNA直接瘤内注射进小鼠中能够减小肿瘤体积(Pille, J. 等人, (2005) Mol. Ther. 11:267-274)并延长荷瘤小鼠的存活时间(Kim, WJ. 等人, (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S. 等人, (2007) Mol. Ther. 15:515-523)。RNA干扰也显示通过直接注射能成功地局部递送到CNS(Dorn, G. 等人, (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH. 等人, (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H. 等人, (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT. 等人, (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER. 等人, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y. 等人, (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602)以及通过鼻内给药能成功地局部递送到肺(Howard, KA. 等人, (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X. 等人, (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V. 等人, (2005) Nat. Med. 11:50-55)。对于全身施用iRNA来治疗疾病, 可以使用药物递送系统来修饰或者递送RNA; 两种方法都起到防止内切核酸酶和外切核酸酶对dsRNA在体快速降解。对RNA或药物运载体的修饰还可以允许将iRNA靶向至靶组织并且避免不希望的脱靶效应。可以通过与亲脂基团(例如, 胆固醇)化学缀合的方式来对iRNA分子进行修

饰,从而增强细胞摄取并防止降解。例如,将与亲脂性胆固醇部分缀合的针对ApoB的iRNA全身性地注射到小鼠体内,导致了肝脏和空肠中apoB mRNA的降低(Soutschek,J.等人,(2004) *Nature* 432:173-178)。已经显示,iRNA与适体的缀合能抑制前列腺癌小鼠模型中的肿瘤生长并介导肿瘤消退(McNamara,J0等人,(2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015)。在替代的实施方案中,可以使用药物递送系统如纳米颗粒、树状聚物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统来递送所述iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进iRNA分子(带负电荷)的结合并且也增强在带负电荷的细胞膜上的相互作用以允许所述细胞有效地摄取iRNA。阳离子脂质,树状聚物或聚合物可以与iRNA结合,或者被诱导形成包裹iRNA的囊泡或胶束(参见,例如,Kim SH等人,(2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116)。囊泡或胶束的形成进一步阻止全身施用时的iRNA的降解。用于制备和施用阳离子-iRNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见例如,Sorensen,DR等人,(2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766;Verma,UN等人,(2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300;Arnold,AS等人,(2007) *J. Hypertens.* 25:197-205,其全部内容通过引用并入本文)。可用于系统递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(Sorensen,DR.等人,(2003),同上;Verma,UN等人,(2003),同上),Oligofectamine,“固体核酸脂质颗粒”(Zimmermann,TS等人,(2006) *Nature* 441:111-114),心磷脂(Chien,PY等人,(2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328;Pal,A等人,(2005) *Int. J. Oncol.* 26:1087-1091),聚乙烯亚胺(Bonnet ME等人,(2008) *Pharm. Res.* 8月16日提前在线发表;Aigner,A.(2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659),Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu,S.(2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487)和聚酰胺胺(polyamidoamines)(Tomalia,DA等人,(2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67;Yoo,H.等人,(1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804)。在一些实施方案中,iRNA与环糊精形成用于全身性施用的复合物。iRNA和环糊精的施用方法和药物组合物可以在美国专利号7,427,605(其全部内容通过引用并入本文)中找到。

[0458] A. 本发明所述由载体编码的iRNA

[0459] 靶向PD-L1基因的iRNA可以从插入到DNA或RNA载体中的转录单位中表达得到(参见,例如,Couture,A等人,TIG.(1996),12:5-10;Skillern,A等人,国际PCT公开号W0 00/22113,Conrad,国际PCT公开号W0 00/22114,以及Conrad,美国专利号6,054,299)。表达可以是短暂的(数小时至数周)或持续的(数周至数月或更长),取决于所使用的特定构建体和靶组织或靶细胞类型。这些转基因可以被引入成线性构建体、环状质粒或病毒载体,其可以是整合载体或非整合载体。也可以将转基因构建使其能够作为染色体外质粒进行遗传(Gassmann等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292)。

[0460] 可以从表达载体上的启动子转录出iRNA的单个链或多个链。当要表达两条独立的链以产生,例如,dsRNA时,可以将两个独立的表达载体共同引入(例如,通过转染或感染共同引入)到靶细胞中。或者,dsRNA的每条单链都可以通过启动子进行转录,所述两个启动子均位于同一表达质粒上。在一个实施方案中,dsRNA被表达成通过接头多核苷酸序列连接起来的反向重复多核苷酸,使得所述dsRNA具有茎结构和环结构。

[0461] iRNA表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体,优选与脊椎动物细胞相容的表达载体,可用于产生重组构建体,用于表达本文所述的iRNA。真核细胞表达载体在本领域中是公知的并且可以从许多商业来源获得。通常,提供的载体含有

方便插入所需核酸片段的限制性位点。iRNA表达载体的递送可以是全身性的，例如通过静脉内或肌内施用，通过向从患者中移植出来的靶细胞施用然后再将该靶细胞引入该患者体内，或者通过允许将其引入想要的靶细胞的任何其他手段。

[0462] 可以与本文所述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括，但不限于，(a) 腺病毒载体；(b) 逆转录病毒载体，包括但不限于慢病毒载体、莫罗尼鼠白血病毒等；(c) 腺伴随病毒载体；(d) 单纯疱疹病毒载体；(e) SV 40载体；(f) 多瘤病毒载体；(g) 乳头状瘤病毒载体；(h) 小核糖核酸病毒载体；(i) 痘病毒载体如牛痘病毒，例如，痘苗病毒载体或禽痘病毒载体，例如金丝雀痘或鸡痘病毒载体；和(j) 辅助依赖性或非肠腺病毒。复制缺陷型病毒也可能是有利的。不同的载体会或者不会并入细胞的基因组中。如果需要的话，构建体可以包括用于转染的病毒序列。或者，可以将构建体并入到能够进行附加体复制的载体中，例如，EPV和EBV载体。用于重组表达iRNA的构建体通常需要调控元件，例如，启动子、增强子等，以确保iRNA在靶细胞中的表达。有关载体和构建体的其他考虑方面在本领域中是已知的。

[0463] V. 本发明所述药物组合物

[0464] 本发明还包括包含本发明所述iRNA的药物组合物和制剂。在一个实施方案中，本文提供了药物组合物，所述药物组合物含有本文所述的iRNA和药学上可接受的运载体。含有所述iRNA的药物组合物可用于治疗与PD-L1基因的表达或活性相关的疾病或病症。此类药物组合物是基于递送模式配制的。一个实例是用于通过肠胃外递送（例如，通过皮下(SC)或静脉内(IV)递送)进行全身施用而配制的组合物。本发明所述药物组合物可以以足以抑制PD-L1基因表达的剂量进行施用。

[0465] 本发明所述药物组合物可以以足以抑制PD-L1基因表达的剂量进行施用。一般来说，本发明所述iRNA的合适剂量应该在每天约0.001到约200.0毫克每千克接受者体重的范围内，通常在约1到50毫克/千克接受者体重/天的范围内。通常，本发明所述iRNA的合适剂量会在约0.1mg/kg到约5.0mg/kg的范围内，例如约0.3mg/kg和约3.0 mg/kg。重复剂量方案可以包括定期施用治疗量的iRNA，例如每隔一天一次或每年一次。在某些实施方案中，约每月一次到约每季度一次(即约每三个月一次)施用所述iRNA。

[0466] 在最初的治疗方案之后，可以以较低的频率施用所述治疗。例如，在每周施用一次或每两周施用一次共施用了三个月后，可以每月重复施用一次，持续六个月或一年；或更长时间。

[0467] 可以每天施用一次所述药物组合物，或者可以在一天中以适当的间隔以两次、三次或更多次的亚剂量施用所述iRNA，或者甚至通过控释制剂使用连续输注或递送的方式施用所述iRNA。在这种情况下，为了达到每日总剂量，每个亚剂量中所含的iRNA必须相应地少一些。也可以，例如使用能够在几天时间内持续释放iRNA的常规的持续释放制剂，将剂量单位配制在几天内进行递送。持续释放制剂在本领域中是熟知的并且特别适用于在特定部位递送试剂，例如可以与本发明所述试剂一起使用。在该实施方案中，剂量单位含有日剂量的相应倍数。

[0468] 在其他实施方案中，单一剂量的药物组合物可以是持久的，从而以不超过3天、4天或5天的间隔或者以不超过1周、2周、3周或4周的间隔施用后续剂量。在本发明的一些实施方案中，本发明所述药物组合物的单剂量为每周施用一次。在本发明的其他实施方案

中,本发明所述药物组合物的单剂量每两个月施用一次。在某些实施方案中,约每月一次到约每季度一次(即约每三个月一次)施用所述iRNA。

[0469] 本领域技术人员将认识到,某些因素会影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康状况或年龄、以及存在的其他疾病。而且,用治疗有效量的组合物来治疗受试者可以包括单一治疗或一系列治疗。如本领域已知的,可以使用常规方法学或者在使用合适的动物模型进行在体测试的基础上,来估计本发明所囊括的个体iRNA的有效剂量和体内半衰期。

[0470] 例如,乙型肝炎病毒感染的动物模型是本领域已知的,包括黑猩猩、土拨鼠以及HBV的转基因小鼠模型(Wieland,2015.Cold Spring Harb.Perspect.Med.,5:a021469,2015;Tennant和Gerin,2001.ILAR Journal,42:89-102;以及Moriyama等人,1990.Science,248:361-364)。黑猩猩模型也可以用作丁型肝炎感染的模型。许多癌症模型是本领域已知的,包括化学诱导的肿瘤模型和异种移植肿瘤模型。

[0471] 根据是否需要局部或全身性的治疗以及待治疗的区域,可以以多种方式施用本发明所述药物组合物。施用可以是局部施用(例如,通过透皮贴剂进行施用)、肺部施用,例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器进行施用;气管内施用、鼻内施用、表皮施用和透皮施用、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;皮下施用,例如,通过植入的装置施用;或者颅内施用,例如通过脑实质内、鞘内或心室内施用。

[0472] 可以以靶向特定组织(例如,肝细胞)的方式递送所述iRNA。

[0473] 用于局部或透皮施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、霜剂、胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。常规的药物运载体、水性基质、粉末基质或油性基质、增稠剂等可能是必要的或需要的。带涂层的避孕套、手套等也可能有用。合适的局部剂型包括这样的局部剂型:其所含有的本发明所述iRNA与局部递送剂(例如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂)混合。合适的脂质和脂质体包括中性的脂质和脂质体(例如,二油酰磷脂酰乙醇胺DOPE、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性的脂质和脂质体(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)。本发明所述iRNA可以被包封在脂质体内或者可以与其形成复合物,特别是与阳离子脂质体形成复合物。或者,iRNA可以与脂质复合,特别是与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、二十酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油酸甘油酯、甘油桂酸酯、1-癸酸单甘油酯、1-十二烷基杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或C₁₋₂₀烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。美国专利号6,747,014(其通过引用并入本文)中详细描述了局部剂型。

[0474] A. 包含膜分子组装体的iRNA制剂

[0475] 可以将用于本发明所述组合物和方法的iRNA配制成在膜分子组装体(例如,脂质体或胶束)中进行递送。本文使用的术语“脂质体”是指由至少一个双层(例如,一个双层或多个双层)中排列的两亲脂质组成的囊泡。脂质体包括单层和多层囊泡,所述单层和多层囊泡具有由亲脂性物质和含水的内部形成的膜。所述含水部分含有iRNA。所述亲脂性材料

将水性内部与水性外部隔离开来,其中水性外部通常不包括 iRNA组合物,但是在一些实例中其可能包括iRNA组合物。脂质体可用于将活性成分 转移和递送至作用部位。由于脂质体膜在结构上与生物膜相似,所以当将脂质体应用 到组织上时,脂质体双层会与细胞膜双层融合。随着脂质体和细胞的不断合并,包括 所述iRNA的内部含水内容物被递送到细胞中,在所述细胞中所述iRNA可以特异性 结合靶RNA并且可以介导RNA干扰。在一些情况下,例如,为了将iRNA引导至特 定的细胞类型,脂质体也可以是特异性靶向的。

[0476] 可以通过多种方法制备含有iRNA试剂的脂质体。在一个实例中,将脂质体的脂 质组分溶于去污剂中,从而与脂质组分形成胶束。例如,所述脂质组分可以是两亲性 的阳离子脂质或脂质缀合物。所述去污剂可以具有较高的临界胶束浓度并且可以是非 离子型的。示例性的去污剂包括胆酸盐、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和月桂酰 肌氨酸。然后将所述iRNA试剂加入到包括有脂质组分的胶束中。脂质上的阳离 子基团与iRNA试剂相互作用并在iRNA试剂周围缩合以形成脂质体。在缩合之后, 例如,通过透析,去除去污剂,以产生iRNA试剂的脂质体制剂。

[0477] 如果需要的话,可以,例如,通过受控加入法,在缩合反应过程中加入有助于缩 合的运载体化合物。例如,所述载体化合物可以是除核酸以外的聚合物(例如,精胺 或亚精胺)。也可以调节pH以促进缩合。

[0478] 在例如,WO 96/37194(其全部内容通过引用并入本文)中进一步描述了用于产 生稳定的多核苷酸递送运载体的方法,所述运载体将多核苷酸/阳离子脂质复合物并入 成递送运载体的结构组分。脂质体的形成还可以包括以下所描述的示例性方法的一个 或多个方面:Felgner,P.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 8:7413-7417,1987;美国专 利号4,897,355;美国专利号5,171,678;Bangham等人,M.Mol.Biol.23:238,1965; Olson等人, Biochim.Biophys.Acta 557:9,1979;Szoka等人,Proc.Natl.Acad.Sci.75: 4194,1978; Mayhew等人,Biochim.Biophys.Acta 775:169,1984;Kim等人,Biochim. Biophys.Acta 728:339,1983;以及Fukunaga等人,Endocrinol.115:757,1984。用于制 备用作递送运载体的具有适当大小的脂质聚集体的常用技术包括超声处理和冻融加挤 压(参见,例如,Mayer 等人,Biochim.Biophys.Acta 858:161,1986)。当需要一致比 较小的(50到200nm)并且相对均匀的聚集体时,可以使用微流化处理(Mayhew等 人,Biochim.Biophys.Acta 775:169, 1984)。这些方法很适用于将iRNA试剂制剂包装 到脂质体中。

[0479] 脂质体分为两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的核酸分子相互作用形成稳定的复合物。带正电荷的核酸/脂质体复合物与带负电荷的细胞表面 结合并内化到内涵体中。由于内涵体内的酸性pH,脂质体会发生破裂,从而将其内容 物释放到细胞的胞质中(Wang等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.,1987,147, 980-985)。

[0480] 对pH敏感的或带负电的脂质体包裹核酸而不是与其复合。由于核酸和脂质都具有类似的带电情况,因此会发生排斥而不形成复合物。尽管如此,仍有一些核酸被截 留在这些脂质体的水性内部。对pH敏感的脂质体已被用于将编码胸苷激酶基因的核 酸递送到培养的细胞单层。在靶细胞中检测到了外源基因的表达(Zhou等人,Journal of Controlled Release,1992,19,269-274)。

[0481] 一种主要类型的脂质体组合物包括磷脂,但天然来源的磷脂酰胆碱除外。例如,可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成中性的 脂质体组

合物。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成,而阴离子促融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)(例如,大豆PC和蛋PC)形成。另一类型则由磷脂、磷脂酰胆碱和胆固醇中的两种或更多种的混合物形成。

[0482] 在体外和体内将脂质体引入细胞的其他方法的实例包括美国专利号5,283,185和5,171,678;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994;Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993;Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992;Gershon, Biochem. 32:7143, 1993;和Strauss, EMBO J. 11:417, 1992.

[0483] 还检验了非离子脂质体系统(特别是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统)以确定其在将药物递送到皮肤过程中的用处。使用了包括Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)和Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)的非离子脂质体制剂将环孢菌素A递送到小鼠皮肤的真皮。结果表明,这种非离子脂质体系统能有效促进环孢菌素A沉积在皮肤的不同层中(Hu等人, S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466)。

[0484] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,该术语在本文中是指包含一种或多种特化脂质的脂质体,当所述脂质被并入脂质体中时,相对于缺乏此类特化脂质的脂质体,会导致循环寿命的增长。空间稳定的脂质体的实例是这样的脂质体:其中脂质体(A)形成囊泡的脂质部分的一部分包含一种或多种糖脂,例如单唾液酸神经节苷脂 G_{M1} ,或者(B)通过使用一种或多种亲水性聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)部分)衍生而来。虽然不希望受任何特定理论的束缚,但本领域认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG衍生化脂质的空间稳定的脂质体来说,这些空间稳定的脂质体的增强的循环半衰期来源于网状内皮系统(RES)细胞摄取的减少(Allen等人, FEBS Letters, 1987, 223, 42;Wu等人, Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

[0485] 包含一种或多种糖脂的各种脂质体在本领域中是已知的。Papahadjopoulos等人(Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)报道了单唾液酸神经节苷脂 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。Gabizon等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)对这些发现进行了阐述。Allen等人的美国专利号4,837,028和WO 88/04924公开了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂 G_{M1} 或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利号5,543,152(Webb等人)公开了包含鞘磷脂的脂质体。WO 97/13499(Lim等人)中公开了包含1,2-sn-二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱的脂质体。

[0486] 在一些实施方案中,使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优点。非阳离子脂质体虽然不能与质膜高效融合,但能在体内被巨噬细胞摄取并且可用于将iRNA试剂递送给巨噬细胞。

[0487] 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的以及可生物降解的;脂质体可以并入多种水溶性和脂溶性药物;脂质体可保护其内部区室中包封的iRNA,使其不会代谢和降解(Rosoff, “Pharmaceutical Dosage Forms”, Lieberman, Rieger和Banker(编辑)中章节, 1988, 第1卷, 第245页)。在制备脂质体制剂过程中比较重要的考虑因素为脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的含水量。

[0488] 带正电荷的合成的阳离子脂质N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯

化铵 (DOTMA) 可用于形成小的脂质体,其自发地与核酸相互作用形成脂质-核酸 复合体,所述脂质-核酸复合体能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电荷脂质融合,从而递送iRNA试剂 (关于DOTMA及其与DNA一起的用途的描述,参见,例如,Felgner, P.L.等人, Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 8:7413-7417,1987和美国专利号4,897,355)。

[0489] DOTMA的类似物1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可以与磷脂组合使用以形成DNA复合囊泡。LipofectinTM(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg,Md.)是用于将较高阴离子的核酸递送到活组织培养细胞中的有效试剂, LipofectinTM包含带正电的DOTMA脂质体,其自发地与带负电荷的多核苷酸相互作用以形成复合物。当使用足够多的带正电的脂质体时,所得到的复合物的净电荷也是正的。以这种方式制备出来的带正电荷的复合物会自发地附着于带负电荷的细胞表面,与质膜融合,并将功能性核酸有效地递送到,例如,组织培养细胞中。另一种可商购得到的阳离子脂质 1,2-双(油酰氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷(“DOTAP”)(Boehringer Mannheim, Indianapolis,Indiana)与DOTMA的不同之处在于,油酰基部分通过酯键连接,而不通过醚键连接。

[0490] 其他已报道的阳离子脂质化合物包括已经与多种部分缀合的阳离子脂质化合物,包括,例如,与两类脂质之一缀合的并且包括诸如5-羧基精氨基甘氨酸二辛基油酰胺(“DOGS”)(TransfectamTM,Promega,Madison,Wisconsin)和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基精胺酰胺(“DPPE”)等化合物的羧基精胺(参见,例如,美国专利号 5,171,678)。

[0491] 另一种阳离子脂质缀合物包括胆固醇的脂质衍生物(“DC-Chol”),其已经与DOPE组合在一起配制成了脂质体(参见Gao,X.和Huang,L.,Biochim.Biophys.Res. Commun.179:280,1991)。据报道,通过将聚赖氨酸与DOPE缀合而制备出来的脂多聚赖氨酸在存在血清的条件下能有效地用于转染(Zhou,X.等人,Biochim.Biophys.Acta 1065:8, 1991)。对于某些细胞系,这些含有共轭阳离子脂质的脂质体能显示出比含有DOTMA的组合物更低的毒性并能提供更有效的转染。其他可商购的阳离子脂质产品包括DMRIE和DMRIE-HP(Vical,La Jolla,California)和Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology,Inc., Gaithersburg,Maryland)。适用于递送寡核苷酸的其它阳离子脂质在WO 98/39359和WO 96/37194中有所描述。

[0492] 脂质体制剂特别适合于局部施用,与其他制剂相比,脂质体具有几个优点。这些优点包括减少与所施用药物的较高的全身性吸收有关的副作用,提升所施用的药物在期望部位处的累积,以及具有将iRNA试剂施用到皮肤中的能力。在一些实施方式中,脂质体被用于将iRNA试剂递送到表皮细胞,并且还用于增强iRNA试剂向皮肤组织例如皮肤中的渗透。例如,可以局部应用所述脂质体。对于将被配制成脂质体的药物局部递送至皮肤,已有文献对此进行了记载(参见,例如,Weiner等人,Journal of Drug Targeting,1992, vol.2,405-410和du Plessis等人,Antiviral Research,18,1992, 259-265;;Mannino, R.J.和Fould-Fogerite,S.,Biotechniques 6:682-690,1988;Itani,T. 等人,Gene 56: 267-276.1987;Nicolau,C.等人,Meth.Enz.149:157-176,1987;Straubinger, R.M.and Papahadjopoulos,D.Meth.Enz.101:512-527,1983;Wang,C.Y.和Huang, L., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7851-7855,1987)。

[0493] 还检验了非离子型脂质体系统,特别是包含非离子型表面活性剂和胆固醇的系

统,以确定其在将药物递送至皮肤中的效用。使用包含Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和Novasome™ II(甘油二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子型脂质体制剂将药物递送至小鼠皮肤的真皮上。此类具有 iRNA试剂的制剂可用于治疗皮肤病。

[0494] 可以将包含iRNA的脂质体制成具有高度可变形性。这种可变形性能使得脂质体穿过比该脂质体的平均半径更小的孔。例如,转移体是一种可变形的脂质体。可以通过向标准的脂质体组合中加入表面边缘活化剂(通常为表面活性剂)来制备转移体。可以,例如,通过以皮下感染的方式递送包含iRNA的转移体,从而将iRNA递送至皮肤中的角质形成细胞。为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适当的经皮梯度的影响下,通过一系列精细的孔。每个的直径都小于50nm。此外,鉴于脂质的性质,这些转移体可以自我优化(适应孔的形状,例如皮肤毛孔的形状),自我修复,并且可以经常碰到其靶标但同时又不会碎裂,并且通常进行自装载。

[0495] 适用于本发明的其它制剂在W0/2008/042973中有描述。

[0496] 转移体还是另一种类型的脂质体,并且是高度可变形的脂质聚集体,其是药物递送赋形剂的有力候选者。转移体可以被描述成脂滴,其非常容易变形以至于其能够容易地穿过比所述脂滴更小的孔。转移体能适应其使用环境,例如,其能够自我优化(适应皮肤毛孔的形状),自我修复,可以经常碰到其靶标但同时又不会碎裂,并且通常进行自装载。在制造传递体的过程中,可以将表面边缘活化剂(通常为表面活性剂)添加到标准的脂质体组合中。转移体已被用于将血清白蛋白递送到皮肤。已经显示转移体介导的血清白蛋白的递送与皮下注射含有血清白蛋白的溶液一样有效。

[0497] 表面活性剂在制剂,例如乳剂(包括微乳剂)和脂质体中用途广泛。对天然的和合成性的许多不同类型的表面活性剂的性质进行分类和分级的最常见方式是通过使用亲水/亲脂平衡(HLB)来进行分类和分级。亲水基团(也称为“头部”)的性质是对制剂中使用的不同表面活性剂进行分类的最有用的手段(Rieger,in“Pharmaceutical Dosage Forms”,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第285页)。

[0498] 如果表面活性剂分子是非电离的,则其被分类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂能广泛用于制药产品和化妆品并且在各种pH值下都可用。一般来说,其HLB值的范围为约2到约18,具体取决于其结构。非离子表面活性剂包括非离子酯如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。这一类还包括非离子型链烷醇酰胺和醚例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类中最受欢迎的成员。

[0499] 如果表面活性剂分子在溶解或分散于水中时带有负电荷,则将该表面活性剂分为阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂包括羧酸盐例如肥皂、酰基乳酸盐、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯如烷基硫酸盐和乙氧基化烷基硫酸盐、磺酸盐如烷基苯磺酸盐、酰基羟乙基磺酸盐、酰基牛磺酸盐和磺基琥珀酸盐、以及磷酸盐。阴离子表面活性剂类最重要的成员是烷基硫酸盐和肥皂。

[0500] 如果表面活性剂分子在溶解或分散于水中时带正电荷,则将该表面活性剂分为阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是这类中最常用的成员。

[0501] 如果表面活性剂分子既具有携带正电荷又具有携带负电荷的能力,则将该表面活性剂分为两性表面活性剂。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N- 烷基甜菜碱和磷脂。

[0502] 已经综述了表面活性剂在药物产品、制剂和乳剂中的用途 (Rieger, in “Pharmaceutical Dosage Forms”, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p.285)。

[0503] 用于本发明所述方法中的iRNA也可以是胶束制剂。“胶束”在本文中表示特定类型的分子组装体,其中两亲分子排列成球形结构,使得分子的所有疏水部分都具有向内的取向,从而使亲水部分与周围的水相接触。如果环境是疏水性的,则存在相反的排布。

[0504] 可以通过将iRNA的水溶液、碱金属C₈-C₂₂烷基硫酸盐和形成胶束的化合物来制备适合通过透皮膜递送的混合的胶束制剂。示例性的形成胶束的化合物包括卵磷脂、透明质酸、药学上可接受的透明质酸盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、单油酸甘油酯、单油酸酯、单月桂酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧代胆烷甘氨酸及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚及其类似物、聚多卡醇烷基醚及其类似物、鹅脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐、及其混合物。可以在加入碱金属烷基硫酸盐的同时或在其之后加入形成胶束的化合物。基本上将所述成分进行各种混合都能形成混合胶束,但如果想要更小尺寸的胶束,就需要剧烈混合。

[0505] 在一种方法中,制备含有RNAi并且至少含有碱金属烷基硫酸盐的第一胶束组合物。然后将所述第一胶束组合物与至少三种形成胶束的化合物混合以形成混合的胶束组合物。在另一方法中,通过将RNAi、碱金属烷基硫酸盐和至少一种形成胶束的化合物混合,然后加入剩余的形成胶束的化合物并伴以剧烈混合的方式,来制备胶束组合物。

[0506] 可以往混合胶束组合物中加入苯酚或间甲酚来稳定制剂并防止细菌生长。或者,可以将苯酚或间甲酚与形成胶束的成分一起加入。在形成混合胶束组合物之后,还可以加入等渗剂例如甘油。

[0507] 为了以喷雾剂的形式递送胶束制剂,可将所述制剂放入气雾剂分配器中,并为该分配器装上推进剂。在所述分配器中,所述推进剂在压力下呈液态。调整成分的比例使得水相和推进剂相变成一个,即,有一相。如果存在两个相的话,则有必要在,例如,通过计量阀分配一部分内容物之前摇晃分配器。以精密喷雾的形式从计量阀推出分配剂量的药剂。

[0508] 推进剂可以包括含氢氯氟烃、含氢氟烃、二甲醚和二乙醚。在某些实施方案中,可以使用HFA 134a (1,1,1,2-四氟乙烷)。

[0509] 必需成分的具体浓度可以通过相对简单的实验来确定。对于通过口腔吸收,通常需要使用,例如,至少两倍或三倍的通过注射或通过胃肠道施用的剂量。

[0510] B. 脂质颗粒

[0511] iRNA,例如本发明所述dsRNAi试剂,可以完全包封在脂质制剂如LNP中,或其他核酸-脂质颗粒中。

[0512] 本文使用的术语“LNP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质和防止该颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP对于全身性应用非常有用,因为其在静脉内(i.v.)注射后表现出具有延长的循环寿命并且在远端部位(例如,与施用部位物理分离的部位)累积。LNP包括“pSPLP”,其包括PCT 公开号WO 00/03683中所示的封装的缩合剂-核酸复合物。本发明所述颗粒通常具有约50nm到约150nm的平均直径、

更典型的为约60nm到约130nm、更典型的为约70nm 到约110nm、最典型的为约70nm到约90nm,并基本无毒。另外,当核酸存在于本 发明所述核酸-脂质颗粒中时,其在水溶液中对核酸酶的降解作用具有抗性。在,例如, 美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;美国公布号 2010/0324120和PCT公开号W0 96/40964公开了核酸-脂质颗粒及其制备方法。

[0513] 在一个实施方案中,脂质与药物的比率(质量/质量比)(例如,脂质与dsRNA 的比率)会在从约1:1到约50:1、从约1:1到约25:1、从约3:1到约15:1、从约4:1到 约10:1、从约5:1到约9:1、或者约6:1到约9:1的范围内。在上述范围中间的范围也 应是本发明的一部分。

[0514] 阳离子脂质可以是,例如,N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(I-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油酰氧基)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)、1,2-二亚油基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚油-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油酰基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油酰基氨基甲酰氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油酰基氨基甲酰 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)、1,2-二亚油酰硫基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油氧基-3-二 甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化盐 (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)、1,2-二亚油氧基-3-(N-甲基哌嗪子基)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亚油酰氨基)-1,2- 丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油酰氧 基-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-Dilinolenyloxy-N,N- 二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊二烯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基偶氮苯基)双十二烷-2-醇(Tech G1)或其混合物。阳离子脂质可以包含颗粒中存在的总脂质的约20mol%到约50mol%或者约40mol%。

[0515] 在一些实施方案中,化合物2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可用于制备脂质-siRNA纳米颗粒。

[0516] 在一些实施方案中,所述脂质-siRNA颗粒包含40%2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环:10%DSPC:40%胆固醇:10%PEG-C-DMG(摩尔百分比)同时 具有 $63.0 \pm 20\text{nm}$ 的粒径和0.027的siRNA/脂质比率。

[0517] 所述可电离脂质/非阳离子脂质可以是阴离子脂质或中性脂质,包括,但不限于,二硬磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺-4-(N-马来酰亚胺基)-环己烷-1-羧酸(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(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-单甲基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。所述阳离子脂质可以占颗粒中存在的所有脂质的约5mol%到约90mol%、约10mol%、或者(在包括胆固醇的情况下)占到约58mol%。

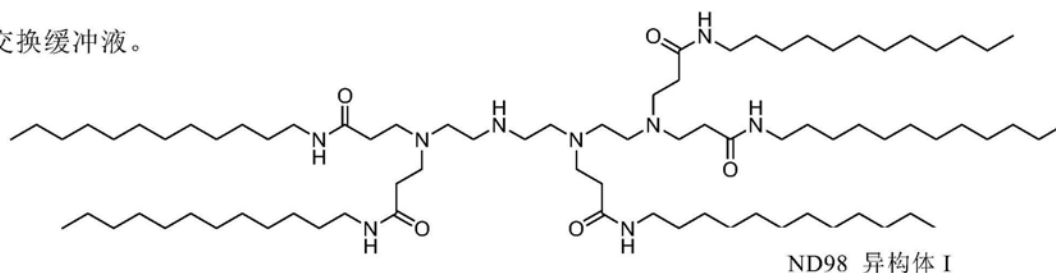
[0518] 抑制颗粒聚集的缀合脂质可以是,例如,聚乙二醇(PEG)-脂质,包括但不限于,PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)或其混合物。所述PEG-DAA缀合物可以是,例如,PEG-二月桂基氧基丙基(Ci₂)、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(Ci₄)、PEG-二棕榈基氧基丙基(Ci₆)或PEG-二硬脂基氧基丙基(Ci₈)。能够防止颗粒聚集的缀合脂质可以是颗粒中存在的总脂质的0mol%到约20mol%或约2mol%。

[0519] 在一些实施方案中,所述核酸-脂质颗粒还包括胆固醇,所述胆固醇为,例如,颗粒中存在的总脂质的约10mol%到约60mol%或约48mol%。

[0520] 在一个实施方案中,可以使用类脂质ND98·4HCl(MW1487)(参见US20090023673,其通过引用并入本文)、胆固醇(Sigma-Aldrich)和PEG-神经酰胺C16(Avanti极性脂质)来制备脂质-dsRNA纳米颗粒(即,LNP01颗粒)。每个的乙醇储备溶液可以按如下制备:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml,PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。然后可以以,例如,42:48:10的摩尔比将ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16的储备溶液进行组合。可以将组合的脂质溶液与含水dsRNA混合(例如,在pH 5的乙酸钠中混合),使得最终的乙醇浓度为约35-45%并且最终的乙酸钠浓度为约100-300mM。脂质-dsRNA纳米颗粒通常会在混合后自发形成。根据所要的粒度分布,可以使用,例如,热桶挤出机(thermobarrel extruder)如Lipex挤出机(Northern Lipids, Inc),将得到的纳米粒子混合物挤出通过聚碳酸酯膜(例如,100nm的界值)。在某些情况下,可以省略掉挤出这一步骤。可以通过,例如,透析或正切流动过滤来完成乙醇的去除并且同时进行缓冲液交换。可以用,例如,约pH 7(例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)

来交换缓冲液。

[0521]



式 1

[0522] LNP01制剂在,例如,国际申请公开号WO 2008/042973(其在此通过引用并入)中有描述。

[0523] 表1中描述了另外的示例性脂质-dsRNA制剂。

[0524] 表1. 示例性脂质制剂

[0525]

	可电离脂质/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质 缀合物 脂质:siRNA 比率
SNALP-1	1,2-二亚油基-N, N-二甲基 氨基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA ~ 6:1

[0526]

	可电离脂质/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质 缀合物 脂质:siRNA 比率
LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基 乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP10	(3aR, 5s, 6aS) -N, N- 二甲基-2,2-二((9Z, 12Z) -十八碳-9,12-二烯基)四氢 -3aH-环戊二烯并[d][1,3]二 氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质: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 基偶氮苯基)双十二烷-2- 醇(Tech G1)	Tech G1/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1

[0527]		可电离脂质/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质 缀合物 脂质:siRNA 比率
	LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
	LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12:1
	LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8:1
	LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
	LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
	LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1

[0528] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0529] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰甘油(C14-PEG或PEG-C14)
(PEG的平均分子量为2000)

[0530] PEG-DSG:PEG-二苯乙烯基甘油(C18-PEG或PEG-C18)(PEG的平均分子量为2000)

[0531] PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺(PEG的平均分子量为2000)

[0532] 包含SNALP(1,2-二亚氨基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的制剂在国际公开号W0 2009/127060中有描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0533] 包含XTC的制剂在PCT公开号W0 2010/088537中有描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0534] 包含MC3的制剂在,例如,2010年6月10日提交的美国专利公开号2010/0324120 中有描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0535] 包含ALNY-100的制剂在,例如,PCT公开号W0 2010/054406中有描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0536] 包含C12-200的制剂在,例如,PCT公开号W0 2010/129709中有描述,其全部内容在此通过引用并入本文。

[0537] i.可电离脂质/阳离子脂质的合成

[0538] 可以通过已知的有机合成技术来制备用于本发明所述核酸-脂质颗粒中的任何化合物,例如阳离子脂质等。

[0539] 可以用类似的方式来表征通过标准的或无挤压方法制备出来的制剂。例如,通常通过目视检查来表征制剂。其应该是不含聚集体或沉淀物的白色半透明溶液。可以通过光

散射,使用,例如,Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern,USA) 来测量脂质-纳米颗粒的粒度和粒度分布。颗粒的大小应该为约20-300nm,例如40-100nm。粒度分布应该是单峰的。使用染料排除测定法来估计制剂中的总dsRNA浓度以及截留率。可以在存在或不存在破坏制剂的表面活性剂(例如,0.5%的Triton®-X100)的情况下,将配制的dsRNA样品与RNA结合染料,例如Ribogreen (Molecular Probes)一起孵育。可以通过相对于标准曲线的来自含有表面活性剂的样品的信号来确定制剂中的总 dsRNA。通过从总dsRNA含量中减去“游离的”dsRNA含量(通过在不存在表面活性剂下的信号来测量)来确定截留率。截留的dsRNA的百分比通常为>85%。对于 SNALP制剂,粒度为至少30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100 nm、110nm或120nm。合适的范围通常为50nm到110nm,60nm到100nm,或者 80nm到90nm。

[0540] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、悬液或水介质或非水性介质、胶囊、凝胶胶囊、冲剂、片剂或迷你片剂。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。在一些实施方案中,口服制剂是这样的口服制剂:在其之中的本发明所述dsRNA与一种或多种渗透促进剂表面活性剂和螯合剂一起施用。合适的表面活性剂包括脂肪酸或其酯或盐、胆汁酸或其盐。合适的胆汁酸/盐包括鹅去氧胆酸(CDCA)和熊去氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡萄糖胆酸、甘胆酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢夫西地酸钠和甘氨二氢弗司他钠。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一酸、油酸、月桂酸、辛酸、癩酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸酯、三癩酸酯、单油酸甘油酯、二月桂精、1-癩酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如,钠)。在一些实施方案中,使用渗透促进剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。一个示例性的组合是月桂酸钠盐、癩酸和UDCA。其他渗透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚。本发明所述dsRNA可以以粒状形式(包括喷雾形式的干燥粒子)口服递送或者络合形成微粒或纳米粒子。DsRNA的络合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯;聚氧乙烯;聚烷基氰基丙烯酸酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚烷基氰基丙烯酸酯;DEAE衍生的聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。合适的络合剂包括壳聚糖、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、聚硫代二乙氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如、对氨基)、聚氰基丙烯酸乙酯、聚氰基丙烯酸乙酯、聚氰基丙烯酸丁酯、聚氰基丙烯酸异丁酯、聚异氰基丙烯酸异己酯、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻酸盐和聚乙二醇(PEG)。在美国专利6,887,906、美国公开号20030027780 和美国专利号6,747,014中详细描述了dsRNA的口服制剂及其制备方法,其每个都通过引用并入本文。

[0541] 用于肠胃外施用、脑实质内(脑内)施用、鞘内施用、心室内施用或肝内施用的组合物和制剂可以包括无菌水溶液,其也可以含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂,例如但不限于,渗透促进剂、载体化合物、以及其他药学上可接受的运载物或赋形剂。

[0542] 本发明所述药物组合物包括,但不限于,溶液、乳剂和含有脂质体的制剂。这些组合物可以由多种组分制备产生,包括,但不限于,预制液体、自乳化固体和自乳化半固体。制剂包括在治疗肝病如肝癌时靶向肝脏的制剂。

[0543] 可以根据制药行业中公知的常规技术来制备本发明所述药物制剂,所述药物制剂可以方便地以单位剂量的形式来表示。这些技术包括使活性成分与药物运载体或赋形剂联合起来的步骤。通常,通过将活性成分与液体运载体或细碎的固体载体或者与这两者都均匀且紧密地联合起来,然后如果需要的话,再使产品成型的方式来制备制剂。

[0544] 可以将本发明所述组合物配制成许多可能的剂型中的任何一种,例如,但不限于,片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。还可以将本发明所述组合物配制成含水介质、不含水介质或混合介质的悬液。含水悬液可以进一步含有能够提升该悬液的粘度的物质,包括,例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。所述悬液也可以含有稳定剂。

[0545] C.其他制剂

[0546] i.乳剂

[0547] 可以将本发明所述iRNA制备并配制成乳剂。乳剂通常是一种液体以液滴(通常直径超过 $0.1\mu\text{m}$)的形式分散在另一种液体中的非均相体系(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Idson,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker(Eds.),1988,Marcel Dekker, Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第199页;Rosoff,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第245页;Block in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第2卷,第335页;Higuchi等人,in Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,第301页)。乳剂通常是双相系统,包括两个彼此紧密混合而又分散的互不相容的液相。通常,乳剂可以是油包水(w/o)或水包油(o/w)类。当含水相细分成微小液滴并以微小液滴的形式分散到大体积油相中时,所得的组合物称为油包水(w/o)乳剂。或者,当油相细分成微小液滴并以微小液滴的形式分散到大体积水相中时,所得的组合物被称为水包油(o/w)乳剂。除分散相外,乳剂还可含有其它组分,以及活性药物,所述活性药物可以在水相、油相中以溶液的形式存在或者其自身以分离相的形式存在。根据需要,乳剂中还可存在药物赋形剂例如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳剂还可以是由两个以上的相组成的多重乳剂,例如,油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳剂这种情况。这种复杂的制剂通常具有简单的二元乳剂所无法拥有的某些优点。多重乳剂中o/w乳剂的单个油滴封闭小水滴构成了w/o/w乳剂。同样地,油滴封闭在经油性连续相稳定的水珠中形成了o/w/o乳剂体系。

[0548] 乳剂的特征在于具有很少的或者没有热力学稳定性。通常,乳剂的分散相或不连续相能很好地分散到外部相或连续相中,并且通过乳化剂或制剂粘度的方式保持这种形式。乳剂的任一相可以是半固体或固体,乳剂型软膏的基质和乳霜就是如此。其他用于稳定乳剂的方法需要使用乳化剂,所述乳化剂可以并入该乳剂的任一相中。乳化剂可大致分为四类:合成的表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和精细分散的固体(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;

Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。

[0549] 合成的表面活性剂也称为表面活性试剂, 已经被广泛用于乳剂配方中并且已经有文献对此进行了综述(参见, 例如, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第285页; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第1卷, 第199页)。表面活性剂通常为两亲性的表面活性剂并且包括亲水性和疏水性部分。表面活性剂的亲水性与疏水性之比称为亲水亲油平衡值(HLB), 并且是在制备制剂过程中对表面活性剂进行分类和选择的有力工具。表面活性剂可根据亲水基团的性质而分为不同的类别: 非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和两性表面活性剂(参见, 例如, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (第8版), New York, NY; Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第285页)。

[0550] 乳剂制剂中使用的天然存在的乳剂剂型包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水性, 这使得其可以吸收水形成w/o乳剂但同时仍保留其半固体性的稠度, 例如无水羊毛脂和亲水凡士林。细碎的固体也能用作良好的乳化剂, 特别是当与表面活性剂组合使用时以及在粘稠制剂中使用。这些包括极性无机固体, 例如重金属氢氧化物、非膨胀性粘土如膨润土、绿坡缕石、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸铝镁、色素和非极性固体如碳或甘油三硬脂酸酯。

[0551] 乳剂配方中还包括各种非乳化材料, 并且其有助于形成乳剂的性能。这些非乳化材料包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第335页; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 第1卷, 第199页)。

[0552] 亲水胶体或水胶体包括天然存在的胶质和合成的聚合物如多糖(例如, 阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、角叉菜胶、瓜尔豆胶、刺梧桐树胶和黄蓍胶), 纤维素衍生物(例如, 羧甲基纤维素和羧丙基纤维素), 以及合成的聚合物(例如, 卡波姆、纤维素醚和羧基乙烯基聚合物)。它们在水中分散或溶胀从而形成胶体溶液, 所述胶体溶液通过在分散相液滴周围形成强界面膜以及通过提升外相的粘度来稳定乳剂。

[0553] 由于乳剂通常含有许多能够很好地支持微生物生长的成分如碳水化合物、蛋白质、甾醇和磷脂, 因此这些配方往往含有防腐剂。乳剂配方中包含的常用防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸的酯和硼酸。通常还往乳剂配方中加入抗氧化剂以防止配方变质。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、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯, 或者是还原剂如抗坏血酸和

偏亚硫酸氢钠,以及抗氧化增效剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0554] 有文献已经对经由皮肤病学途径、口服途径和肠胃外途径应用乳剂配方及其制备方法进行了综述(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins (第8版),New York,NY;Idson,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第199页)。由于 配方简单以及具有吸收和生物利用度方面的功效,用于口服递送的乳剂配方使用广泛(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen, LV.,Popovich NG.,和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.), 1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第245页;Idson,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第199页)。通常以o/w乳剂的形式口服施用的材料包括矿物油 基础泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂。

[0555] ii.微乳剂

[0556] 在本发明的一个实施方案中,将所述iRNA配制成微乳剂。微乳剂可以定义为水,油和两亲物的体系,其是光学上各向同性的并且热力学稳定的单一液体溶液(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV. Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(8th ed.),New York,NY;Rosoff,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第245页)。通常,微乳剂是通过首先将油分散在含水表面活性剂溶液中然后加入足量的第四组分(通常为中等链长的醇用于形成透明的体系)所制备出来的体系。因此,微乳剂也被描述成由两种不能混合的 溶液体形成的热力学稳定的、具有各向同性的清澈的分散体,所述两种不能混合的溶 液体通过表面活性分子的界面膜得到稳定(Leung and Shah,in:Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems,Rosoff,M.,Ed.,1989,VCH Publishers,New York, pages 185-215)。通常通过组合三到五种组分来制备微乳剂,所述组分包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质。看微乳剂是油包水(w/o)型还是水包油(o/w)型,要取决于所使用的油和表面活性剂的性质以及所述表面活性剂的极性头和烃尾部的结构和几何包装(Schott,in Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co., Easton, Pa.,1985,第271页)。

[0557] 利用相图进行的现象学手段已经得到了广泛的研究,并且已经为本领域技术人员提供了关于如何配制微乳剂的比较全面的知识(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC., 2004, Lippincott Williams&Wilkins(8th ed.),New York,NY;Rosoff,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第245页;Block,in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第335页)。与 常规乳剂相比,微乳剂具有能使水不溶性药物溶于自发形成的热力学稳

定的液滴配方 中的优点。

[0558] 用于制备微乳剂的表面活性剂包括,但不限于,离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂、**Brij®96**、聚氧乙烯油基醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油单月桂酸酯(ML310)、四甘油单油酸酯(M0310)、六甘油单油酸酯(P0310)、六甘油五油酸酯(P0500)、十甘油单癸酸酯(MCA750)、十甘油单油酸酯(M0750)、十甘油倍半油酸酯(S0750)、十甘油十癸酸酯(DA0750),可以单独使用或者与助表面活性剂组合使用。所述助 表面活性剂通常是短链醇如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,其通过渗入表面活性剂的膜并且 随后产生无序膜的方式,并且由于表面活性剂分子间所产生的空隙,从而起到提升界 面流动性的作用。然而,本领域已知,可以在不使用助表面活性剂和无醇的自乳化微 乳剂体系的情况下,制备微乳剂。水相通常可以是,但不限于,水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇、以及乙二醇的衍生物。油相可以包括, 但不限于,诸如**Captex® 300**、**Captex® 355**、**Capmul® MCM**、脂肪酸酯、中链(C8-C12)的甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯、聚氧乙烯化甘油脂肪酸酯酯、脂肪醇、聚乙二 醇化的甘油酯、饱和的聚乙二醇化的C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0559] 从药物溶解和增强药物吸收的观点来看,微乳剂特别有意义。已经有人提出基于脂质的微乳剂(o/w和w/o)能够增强药物(包括肽)的口服生物利用度(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等人,Pharmaceutical Research,1994,11,1385-1390;Ritschel,Meth.Find.Exp.Clin. Pharmacol.,1993,13,205)。微乳剂具有以下优点:改善药物溶解性,保护药物免受酶 的水解作用,由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性改变从而可能增强药物的吸收 度,易于制备,与固体剂型相比能方便口服给药,改善临床效能以及降低的毒性(参 见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等人,Pharmaceutical Research,1994,11,1385;Ho等人,J.Pharm.Sci.,1996,85,138-143)。当在环境温度下将微乳剂的组分混合在一起时,常常可以自发形成该微乳剂。对于配 制热不稳定的药物、肽或iRNA时,这一点特别有利。在化妆品和药物应用中,微乳 剂也能够有效地用于透皮递送活性组分。预计本发明所述微乳剂组合物和配方会促进 提升对来自胃肠道的iRNA和核酸的全身性吸收,以及改善对iRNA和核酸的局部细 胞摄取。

[0560] 本发明所述微乳剂还可以含有附加组分和添加剂,例如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(**Grill®3**)、**Labrasol®**和渗透促进剂,从而改善制剂的性质并增强对本发明所述iRNA 和核酸的吸收。用于本发明所述微乳剂中的渗透促进剂可以分成五大类中的一种--表 面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页)。上面已经对这些类别中的每种 都进行了讨论。

[0561] iii.微粒

[0562] 本发明所述iRNA可以并入颗粒(例如,微粒)中。微粒可以通过喷雾干燥产生,但也可以通过其他方法产生,包括冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的 组合。

[0563] iv.渗透促进剂

[0564] 在一个实施方案中,本发明采用各种渗透促进剂来实现核酸(特别是iRNA)向动物皮肤的有效递送。大多数药物都以离子化和非离子化的形式存在于溶液中。但是,通常只有脂溶性或亲脂性药物才能容易地穿过细胞膜。已经发现,如果用渗透促进剂 处理待穿

过的膜,那么即使是非亲脂性药物也可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂性药物扩散穿过细胞膜,渗透促进剂还能增强亲脂性药物的渗透性。

[0565] 可以将渗透促进剂分成五大类中的一种,即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂(参见例如,Malmsten,M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee等人, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 第92页)。这样的化合物在本领域中是公知的。

[0566] v. 运载物

[0567] 本发明所述某些组合物也在制剂中并入了运载体化合物。本文使用的“运载体化合物”或“运载物”可以指核酸,或其类似物,所述类似物是惰性的(即不具有生物活性本身),但是可以通过在体过程被识别成核酸,所述在体过程通过,例如,降解生物活性核酸或促进从循环中去除所述生物活性核酸,来降低具有生物学活性的核酸的生物可利用度。共同施用核酸和运载体化合物(通常为后一种物质过量)可以导致显著减少在肝脏、肾脏或其他外循环储库中所回收的核酸量,这可能是由于运载体化合物和核酸之间竞争争取共同的受体而导致的。例如,当部分硫代磷酸酯的dsRNA与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰氨基-4'-异硫氰基-二苯乙烯-2,2'-二磺酸共同施用,可以减少其在肝组织中的回收量(Miyao等人, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura等人, DsRNA& Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183。

[0568] vi. 辅料

[0569] 与运载体化合物相比,“药物运载体”或“辅料”是用于将一种或多种核酸递送给动物的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其他在药理学上为惰性的赋形剂。所述辅料可以是液体或固体,并根据计划的给药方式进行选择,从而使其在与核酸以及给定的药物组合物的其他组分结合时能提供所想要的体积、稠度等。一般的药物运载体包括,但不限于,粘合剂(例如,预胶化的玉米淀粉、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、胶体二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟基乙酸淀粉钠等);以及润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0570] 也可以使用适合于非肠胃外施用的药学上可接受的有机辅料或无机辅料来配制本发明所述组合物,所述有机辅料或无机辅料不与核酸发生有害反应。合适的药学上可接受的运载体包括,但不限于,水、盐溶液、乙醇、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。

[0571] 用于局部施用核酸的剂型可以包括无菌和非无菌的水溶液,常用溶剂例如乙醇的非水溶液,或者液体油基或固体油基的核酸溶液。溶液也可以含有缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂。可以使用不与核酸发生有害反应的适合非肠胃外施用的药学上可接受的有机或无机辅料。

[0572] 合适的药学上可接受的辅料包括,但不限于,水、盐溶液、乙醇、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。

[0573] vii. 其他组分

[0574] 本发明所述组合物可以另外含有常规存在于药物组合物中的其他辅助组分,其水

平为在本领域确定的使用水平。因此,例如,所述组合物可以含有另外的相容的具有 药 学活性的材料如,例如,止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以含有用于物理配制所述组合物的各种剂型的其他材料,例如,染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,这些材料在添加时不应过度干扰本发明所述 组合物组分的生物学活性。可以将剂型进行灭菌,并且如果需要的话,将其与不和所述剂型的核酸发生不利的相互作用的辅助剂(例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等)混合。

[0575] 含水悬浮液可以含有能够提升悬浮液粘度的物质,包括,例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0576] 在一些实施方案中,本发明所述药物组合物包括(a)一种或多种iRNA和(b)一种或多种通过非iRNA机制发挥作用并且能用于治疗PD-L1相关疾病的试剂。

[0577] 可以通过在细胞培养物或实验动物中进行,例如,用于测定LD50(50%群体的致死剂量)和ED50(50%群体的治疗有效量)的标准药理学步骤来确定此类化合物的毒性和疗效。毒性效应和治疗效应之间的剂量比即为治疗指数,其可以表示为LD50/ED50 的比值。优选表现出较高的治疗指数的化合物。

[0578] 从细胞培养测试和动物研究中获得的数据可以用来配制用于人类的一系列剂量。本发明所述组合物的剂量通常在循环浓度范围(包括ED50)内,毒性很小或没有毒性。剂量可以在此范围内变化,具体取决于所使用的剂型和使用的施用途径。对于本发明 所述方法中使用的任何化合物,都可以最开始根据细胞培养测试来估计治疗有效剂量。可以在动物模型中规划剂量,使得具有在细胞培养测试中所测得的化合物的循环血浆 浓度范围,或者在适当的情况下,靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如,达到降低的多肽浓度),所述循环血浆浓度范围包括IC50(即,产生症状的半数最大抑制的测试化合物浓度)。这些信息可以用来更准确地确定人体中的有用剂量。可以,例如,通过高效液相色谱法来测量血浆水平。

[0579] 除了以上讨论的其施用方式之外,本发明所述iRNA还可以与其他已知的能有效治疗由PD-L1的表达所介导的病理过程的试剂组合施用。在任何情况下,主治医师都可以在使用本领域已知的或本文所述的标准效力测量法所观察到的结果的基础上调整iRNA施用的量和时间。

[0580] VI. 抑制PD-L1表达的方法

[0581] 本发明还提供了抑制细胞中PD-L1基因表达的方法。所述方法包括使细胞与RNAi试剂(例如,双链RNAi试剂)接触,所述RNAi试剂的量为能有效抑制所述细胞中 PD-L1表达的量,从而抑制所述细胞中PD-L1的表达。在本发明的某些实施方案中,优选抑制肝细胞中的PD-L1表达。

[0582] 可以在体外或在体内进行细胞与iRNA(例如,双链RNAi试剂)的接触。使细胞与所述iRNA在体内接触包括使受试者(例如,人受试者)体内的细胞或细胞群与所述iRNA接触。将在体外的和在体内的细胞接触方法进行组合也是可能的。如上所述,可以直接或间接地使细胞发生接触。此外,可以通过具有靶向性的配体(包括本文所述的或本领域已知的任何配体)来实现与细胞的接触。在优选的实施方案中,所述靶向性配体是碳水化合物部分,例如,GalNAc₃配体或者将RNAi试剂引导到目标部位的任何其他配体。

[0583] 本文使用的术语“抑制”可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑制”和其他类似的术语互换使用,并且包括任何水平的抑制。

[0584] 短语“抑制PD-L1的表达”旨在表示抑制任意PD-L1基因(如,例如,小鼠的PD-L1基因、大鼠的PD-L1基因、猴的PD-L1基因或人的PD-L1基因)以及PD-L1基因的变体或突变体的表达。因此,所述PD-L1基因可以是野生型PD-L1基因、突变的PD-L1基因、在以遗传手段操纵细胞、细胞群或生物体背景下的转基因的PD-L1基因。

[0585] “抑制PD-L1基因的表达”包括对PD-L1基因的任意水平的抑制,例如,至少部分抑制PD-L1基因的表达。可以基于与PD-L1基因的表达相关的任何变量(例如PD-L1的mRNA水平或PD-L1的蛋白质水平)的水平或水平的变化,来评估PD-L1基因的表达。可以在单个细胞或一组细胞(包括,例如,在来自受试者的样品)中评估所述水平。应该理解,在正常受试者中、在许多细胞类型和体液中,PD-L1的表达可能接近于或低于检测水平。因此,例如,关于PD-L1表达的抑制,可以比较感染肝炎病毒的受试者在用抑制PD-L1的试剂处理之前和之后的肝脏中PD-L1的水平,或者在用抑制PD-L1的试剂处理之前和之后肿瘤中PD-L1的水平。

[0586] 在某些实施方案中,替代标记可用于检测PD-L1的抑制。例如,可以理解,通过用可接受的诊断和监测标准证实降低PD-L1表达的试剂对感染(例如,肝炎病毒感染)的有效治疗,能够显示PD-L1临床相关性的下调。可以理解,通过RECIST标准确定的在用能够减少PD-L1的试剂治疗以后,患有癌症的受试者中肿瘤负荷的稳定或减少,也可以显示PD-L1临床相关性的下调。

[0587] 可以通过与对照水平进行比较,用与PD-L1表达相关的一个或多个变量的绝对或相对水平的降低来评估抑制作用。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如,剂量前基线水平,或者从未经处理的或经对照(如,例如,仅含有缓冲液的对照或者没有活性的试剂对照)处理的类似的受试者(例如历史对照)、细胞或样品中所确定的水平。

[0588] 在本发明所述方法的一些实施方案中,PD-L1基因的表达被抑制至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或抑制到低于测定法的检测水平。在某些实施方案中,所述方法包括PD-L1表达的临床相关的抑制,例如,在用降低PD-L1表达的试剂治疗受试者之后的临床相关结果所证实的抑制。

[0589] PD-L1基因表达的抑制可以通过第一细胞或第一细胞群(此类细胞可以存在于,例如,衍生自受试者的样品中)表达的mRNA量的减少来体现,在所述第一细胞或第一细胞群中PD-L1基因得到了转录并且其已经经过了处理(例如,通过使细胞与本发明所述iRNA接触,或者通过将本发明所述iRNA施用给存有或者过去存有所述细胞的受试者),从而使得PD-L1基因的表达相对于第二细胞或第二细胞群得到了抑制,所述第二细胞或第二细胞群与所述第一细胞或第一细胞群基本相同,但是其并没有经过这样的处理(没有经过iRNA处理的对照细胞或者没有经过靶向目的基因的iRNA处理的对照细胞)。在优选的实施方案中,通过实施例2中提供的方法,评估了经10 nM iRNA处理的RKO人结肠癌细胞中的抑制作用,并将经处理的细胞中的mRNA水平表示成对照细胞中mRNA水平的百分比,使用的公式如下:

(对照细胞中的mRNA) – (经处理的细胞中的mRNA)

[0590] _____ • 100%
(对照细胞中的mRNA)

[0591] 在其他实施方案中,可以根据与PD-L1基因表达具有功能性连接的参数(例如,PD-L1蛋白表达或PD-L1信号传导通路)的减少来评估PD-L1基因表达的抑制。可以在任何表达PD-L1(与表达构建体同源或异源的)的细胞中,并且通过本领域已知的任何测定法来测定PD-L1基因的沉默。

[0592] PD-L1蛋白表达的抑制可以通过细胞或细胞群所表达的PD-L1蛋白水平(例如,在来源于受试者的样品中表达的蛋白水平)的降低来体现。如上面所解释的,为了对 mRNA抑制进行评估,可以类似地将经处理的细胞或细胞群中蛋白表达水平的抑制表示成对照细胞或细胞群中蛋白质水平的百分比。

[0593] 可用于评估对PD-L1基因表达的抑制的对照细胞或细胞群包括尚未与本发明所述RNAi试剂接触的细胞或细胞群。例如,对照细胞或细胞群可以在用RNAi试剂治疗受试者之前从所述个体受试者(例如,人或动物受试者)处获得。

[0594] 可以使用本领域已知的用于评估mRNA表达的任何方法来测定由细胞或细胞群表达的PD-L1 mRNA水平。在一个实施方案中,通过检测转录的多核苷酸或其部分,例如,PD-L1基因的mRNA,来确定样品中PD-L1的表达水平。可以使用RNA提取技术从细胞中提取RNA,所述RNA提取技术包括,例如,使用酸性酚/异硫氰酸胍提取法(RNAzol B;Biogenesis)、RNeasyTM RNA制备试剂盒(Qiagen®)或PAXgene (PreAnalytix,Switzerland)。利用核糖核酸杂交的常用测定形式包括核运行测定法、RT-PCR、RNA酶保护测定法、northern印迹、原位杂交和微阵列分析。可以使用PCT 公开物W02012/177906(其全部内容在此通过引用并入本文)中描述的方法检测循环的PD-L1 mRNA。

[0595] 在一些实施方案中,使用核酸探针确定PD-L1的表达水平。本文使用的术语“探针”是指能够选择性结合特定PD-L1的任何分子。探针可由本领域技术人员合成,或者衍生自适当的生物制剂。可以将探针特别设计成被标记的形式。可用作探针的分子的实例包括,但不限于,RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0596] 分离的mRNA可用于杂交或扩增测定法,其包括,但不限于,Southern或Northern分析、聚合酶链式反应(PCR)分析和探针阵列。用于测定mRNA水平的一种方法包括使分离的mRNA与能够与PD-L1 mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。在一个实施方案中,将所述mRNA固定在固体表面上并且与探针接触,例如通过将所述分离的mRNA在琼脂糖凝胶上跑胶并将所述mRNA从所述凝胶转移到膜(例如,硝酸纤维素)上。在一个替代的实施方案中,在,例如,Affymetrix GeneChip®阵列中,将所述探针固定在固体表面上并且使所述mRNA与所述探针接触。技术人员可以容易地对已知的mRNA检测方法进行调整,以用于确定PD-L1 mRNA的水平。

[0597] 用于确定样品中PD-L1表达水平的另一种方法涉及,例如,通过RT-PCR(Mullis, 1987, 美国专利号4,683,202所示的实验实施方案)、连接酶链式反应(Barany (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自持续的序列复制(Guatelli等人, (1990) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人, (1989) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 86:1173-1177)、Q-β复制酶法(Lizardi等人, (1988) Bio/Technology 6:1197),

滚环复制 (Lizardi 等人, 美国专利号 5,854,033) 或任何其他核酸扩增方法对样品中的 mRNA 样品进行核酸扩增和/或逆转录酶 (用于制备 cDNA) 的过程, 接着使用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子存在的数量非常低, 那么这些检测方案对于检测此类分子会特别有用。在本发明的具体方面, 通过定量荧光 RT-PCR (即, TaqMan™ 系统) 或实施例 2 中的 Dual-Glo® 荧光素酶测定法来确定 PD-L1 的表达水平。

[0598] 可以使用膜印迹 (例如, 用于 northern、Southern、斑点印记等杂交分析的膜印迹), 或者微孔, 样品管, 凝胶, 珠或纤维 (或包括已结合核酸的任何固体支持物) 来监测 PD-L1 mRNA 的表达水平。参见美国专利号 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305、5,677,195 和 5,445,934, 其通过引用并入本文。对 PD-L1 表达水平的测定还可以包括使用溶液中的核酸探针。

[0599] 在优选的实施方案中, 使用枝化 DNA (bDNA) 测定法或实时 PCR (qPCR) 来评估 mRNA 表达水平。本文提供的实施例中描述并示例了该 PCR 方法的使用。此类方法也可以用于检测病原体核酸, 例如, 肝炎病毒核酸。

[0600] 可以使用本领域已知的用于测量蛋白质水平的任何方法来测定 PD-L1 蛋白质的表达水平。此类方法包括, 例如, 电泳法、毛细管电泳法、高效液相色谱法 (HPLC)、薄层色谱法 (TLC)、超扩散色谱法、流体或凝胶沉淀素反应、吸收光谱法、比色测定法、分光光度测定法、流式细胞术、免疫扩散 (单免疫扩散或双免疫扩散) 法、免疫电泳法、western 印迹、放射免疫测定 (RIA) 法、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法、免疫荧光测定法、电化学发光测定法等。此类测定法也可用于检测指示病原体存在或复制的蛋白质, 例如, 病毒蛋白。

[0601] 在一些实施方案中, 用 (通过肝活组织检查得到的) PD-L1 mRNA 水平的降低来评估本发明所述方法在治疗 PD-L1 相关疾病中的功效。

[0602] 在一些实施方案中, 通过评估如下所述的血清学标志物的组合来监测本发明所述方法在治疗 HBV 感染中的功效。可以通过检测受试者中乙肝抗体 HBsAg 或 HBeAg 的水平来监测治疗患有 HBV 的受试者的功效, 其中 (例如, 在血清中) HBsAg 或 HBeAg 的水平降低指示能够有效治疗这种病。在优选的实施方案中, HBsAg 或 HBeAg 水平的降低是临床相关的, 例如, 与用一般护理标准所观察到的降低水平相当。治疗功效还可以通过受试者中 HBV DNA 水平的临床相关降低来确定, 例如, 与用护理标准所观察到的降低水平相当, 例如, 抑制至少 $4\log_{10}$ IU/mL, 优选至少 $5\log_{10}$ IU/mL (Dienstag, Hepatology, 2009, 49: S112-S121)。也可以通过抗-HBsAg 抗体的存在来确定治疗功效。

[0603] 在一些实施方案中, 可以通过评估受试者维持或优选地降低原发性肿瘤或转移性肿瘤的肿瘤负荷或者预防转移来监测本发明所述方法在治疗癌症方面的功效。用于检测和监测肿瘤负荷的方法是本领域已知的, 例如在 Eisenhauer 等人, 2009, New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) .Eur. J. Cancer. 45:228-247 中提供的 RECIST 标准。

[0604] 在本发明所述方法的一些实施方案中, 将所述 iRNA 施用给受试者, 使得将所述 iRNA 递送到受试者体内的特定部位。PD-L1 表达的抑制可以通过测量来自受试者的特定位置 (例如, 肝脏) 的样品中 PD-L1 mRNA 或 PD-L1 蛋白的水平或水平的变化来评估。在某些实施方案中, 所述方法包括 PD-L1 表达的临床相关抑制, 例如, 在用降低 PD-L1 表达的试剂治疗受试者后的临床相关结果所证明的 PD-L1 表达抑制。

[0605] 应当理解,本文使用的术语检测或确定分析物水平是指执行步骤来确定是否存在(例如,蛋白质,RNA等)材料。本文使用的检测或确定的方法包括检测或确定低于所用方法的检测水平的分析物的水平。

[0606] PD-L1相关疾病的动物模型在本领域中是公知的。例如,本领域已知乙型肝炎病毒感染的动物模型,包括黑猩猩、土拨鼠和HBV转基因小鼠模型(Wieland,2015.Cold Spring Harb.Perspect.Med.,5:a021469,2015;Tennant和Gerin,2001.ILAR Journal,42:89-102;以及Moriyama等人,1990.Science,248:361-364)。黑猩猩模型也可以用作丁型肝炎感染的模型。慢性与急性的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)感染的比较性模型可用于研究免疫衰竭(Matloubian等人,1994,J.Virol.68:8056-8063)。包括表达PD-L1的肿瘤在内的大量癌症模型在本领域中是已知的(Iwai等人,2002,PNAS,99:12293-12297)。

[0607] VII. 治疗或预防PD-L1相关疾病的方法

[0608] 本发明还提供了使用本发明所述iRNA或含有本发明所述iRNA的组合物来减少或抑制细胞中PD-L1的表达的方法。所述方法包括使所述细胞与本发明所述dsRNA接触并且将所述细胞维持足够长的时间以获得PD-L1基因的mRNA转录物的降解,从而抑制所述细胞中PD-L1基因的表达。可以通过本领域已知的任何方法来评估基因表达的降低。例如,可以通过使用对本领域普通技术人员来说常规的方法(例如,Northern印迹法、如实施例2中所示的qRT-PCR法)测定PD-L1的mRNA表达水平;通过使用对本领域普通技术人员来说常规的方法(例如,Western印迹、免疫学技术)测定PD-L1的蛋白质水平,以此来确定PD-L1表达的降低。还可以通过测量PD-L1生物学活性的降低或测量受试者样品(例如,血清样品)中PD-L1的水平来间接评估PD-L1表达的降低。还可以通过测量或观察PD-L1相关疾病的至少一种体征或症状的变化(优选临床相关变化)来间接评估PD-L1表达的降低。

[0609] 在本发明所述方法中,可以使所述细胞在体外或体内接触,即所述细胞可以在受试者体内。

[0610] 适合使用本发明所述方法进行处理细胞可以是表达PD-L1基因的任何细胞,通常为肝细胞。适用于本发明所述方法的细胞可以是哺乳动物细胞,例如,灵长类动物细胞(例如人的细胞或非人灵长类动物的细胞,例如,猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类动物细胞(例如,牛细胞、猪细胞、骆驼细胞、美洲驼细胞、马细胞、山羊细胞、兔细胞、绵羊细胞、仓鼠细胞、豚鼠细胞、猫细胞、狗细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、狮子细胞、老虎细胞、熊细胞或水牛细胞)、鸟细胞(例如,鸭细胞或鹅细胞)、或鲸细胞,只要靶基因序列与iRNA试剂具有足够高的互补性来促进靶标的降低。在一个实施方案中,所述细胞是人细胞,例如人的肝细胞。

[0611] PD-L1的表达在细胞中被抑制了至少20%、25%、优选至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或者被抑制到低于测定法的检测水平的水平。在某些实施方案中,所述方法包括PD-L1表达的临床相关抑制,例如,在用降低PD-L1表达的试剂治疗受试者后的临床相关结果所证实的临床相关抑制。

[0612] 本发明所述在体方法可以包括向受试者施用含有iRNA的组合物,其中所述iRNA包括核苷酸序列,所述核苷酸序列与待治疗哺乳动物的PD-L1基因的RNA转录物的至少一部分互补。当待治疗的生物体是哺乳动物(例如人)时,可以通过本领域已知的任何方式施

用所述组合物,包括,但不限于,口服途径、腹膜内途径或肠胃外途径,包括颅内(例如心室内施用,脑实质内施用和鞘内施用)施用、静脉内施用、肌内施用、皮下施用、透皮施用、气道(气雾剂)施用、鼻腔施用、直肠施用和局部(包括口腔和舌下)施用。在某些实施方案中,通过静脉内输注或注射的方式施用所述组合物。在某些实施方案中,通过皮下注射的方式施用所述组合物。

[0613] 在一些实施方案中,所述施用是通过积存注射进行的施用。积存注射可以在很长的时间段内以一致的方式释放iRNA。因此,积存注射可以降低获得所要的效应(例如,所要的PD-L1抑制)或治疗效应而需要的剂量频率。积存注射也可以提供更为一致的 血清浓度。积存注射可以包括皮下注射或肌内注射。在优选的实施方案中,所述积存注射是皮下注射。

[0614] 在一些实施方案中,所述施用是通过泵进行的施用。所述泵可以是外部泵或经手术植入的泵。在某些实施方案中,所述泵是皮下植入的渗透泵。在其他实施方案中,所述泵是输液泵。输液泵可用于静脉输注、皮下输注、动脉输注或硬膜外输注。在优选的实施方案中,所述输液泵是皮下输液泵。在其他实施方案中,所述泵是将iRNA递送到肝脏的手术植入的泵。

[0615] 可根据是否需要局部或全身性的处理并基于待处理的区域来选择施用模式。可以对施用的途径和部位进行选择,以增强靶向性。

[0616] 一方面,本发明还提供了用于抑制哺乳动物中PD-L1基因表达的方法。所述方法包括向所述哺乳动物施用组合物,所述组合物包含靶向哺乳动物细胞中PD-L1基因的dsRNA,并且将所述哺乳动物维持足够长的时间以达到PD-L1基因的mRNA转录物的降解,从而抑制细胞中PD-L1基因的表达。基因表达的降低可以通过本领域已知的任何方法以及通过本文中所描述的例如qRT-PCR等方法来评估。蛋白产量的降低可以通过本领域已知的任何方法以及通过本文中所描述的例如ELISA方法来评估。在一个实施方案中,将穿刺肝活组织检查样品用作监测PD-L1基因或蛋白质表达降低的组织材料。在某些实施方案中,通过观察临床相关结果来证实对PD-L1表达的抑制。

[0617] 本发明进一步提供了治疗需要该治疗的受试者的方法。本发明所述治疗方法包括以治疗有效量的靶向PD-L1基因的iRNA或者包含靶向PD-L1基因的iRNA的药物组合物的形式,将本发明所述iRNA施用给受试者,例如,那些能够因PD-L1表达的减少或抑制而受益的受试者。

[0618] 本发明所述iRNA可以作为“游离的iRNA”进行施用。在不存在药物组合物的情况下施用游离的iRNA。裸露的iRNA可以处在合适的缓冲溶液中。所述缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、谷醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐、或其任何组合。在一个实施方案中,所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节含有iRNA的缓冲溶液的pH和同渗容摩,使其适合施用于受试者。

[0619] 或者,可以将本发明所述iRNA作为药物组合物(例如,dsRNA脂质体剂型)进行施用。

[0620] 能够因PD-L1基因表达的减少或抑制而受益的受试者是患有会因增加免疫应答而受益的病症(例如,感染性疾病如病毒性疾病,例如肝炎;或者癌症)的受试者。

[0621] 可以将iRNA和另外的治疗剂同时施用或者放在同一组合物中进行施用,例如肠

胃外施用,或者将所述另外的治疗剂作为单独组合物的一部分或在分开的时间进行施用,或通过本领域已知的或本文所述的另一种方法进行施用。

[0622] 在一个实施方案中,所述方法包括施用本文所述组合物,使得靶PD-L1基因的表达降低,例如降低约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、12小时、16小时、18小时、24小时、28小时、32小时或约36小时。在一个实施方案中,靶PD-L1基因表达的降低持续了很长时间,例如,至少约2天、3天、4天或更长,例如,约1周、2周、3周或4周或更长时间,例如,约1个月、2个月或3个月。

[0623] 优选地,用于本文所述方法和组合物的iRNA特异性地靶向PD-L1基因的靶RNA(初级的或加工的RNA)。用iRNA抑制这些基因表达的组合物和方法可以如本文所述进行制备和执行。

[0624] 根据本发明所述方法施用iRNA会导致在具有例如,升高的PD-L1或PD-L1应答性肿瘤的患者中,此类疾病或病症的严重性、体征、症状或标志物的减少。本文中的“减少”是指此类水平的统计学显著性降低,例如,受试者中存在病原体的指标的水平,例如,感染乙型肝炎的受试者血清中的HBsAg、HBeAg或HBcccDNA。减少可以是,例如,减少至少约20%、25%、优选至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%、或减少到低于所用测定法的检测水平。在某些实施方案中,标志物例如抗-HBs抗体的增加能指示疾病严重程度的降低。因此,增加可以是受试者中抗体水平统计学显著性地增加,例如,增加到可检测到的水平。

[0625] 可以通过,例如,检测疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减少、生活质量、维持治疗效应所需的药物剂量、疾病标志物水平、或任何其他适用于正在接受以预防为目的的治疗或靶向的特定疾病的可测量参数,来评估治疗或预防疾病的功效。通过测量这些参数中的任何一个参数或参数的任何组合,本领域技术人员完全有能力来监测治疗或预防的功效。例如,能够因增加的免疫应答而受益的病症(例如,感染性疾病如病毒性疾病,例如肝炎;或者癌症)的治疗功效。

[0626] 可以例如通过感染物存在量的减少来证明对感染性疾病的治疗功效,所述感染物存在量的减少可以通过不能从受试者样品中培养出感染物剂来证明。可以例如通过感染物存在量的减少来证明对感染性疾病的治疗功效,所述感染物存在量的减少可以通过感染物中存在的蛋白质、核酸或碳水化合物的减少来证明。可以例如通过免疫应答的存在来证明治疗功效,所述免疫应答的存在通过靶向感染物的抗体或免疫细胞的存在来证明。可以通过感染物存在量的减少来证明对感染性疾病的治疗功效,所述感染物存在量的减少可以通过,例如,所述感染的一种或多种体征或症状(例如,发烧、疼痛、恶心、呕吐、血液化学异常、体重减轻)的减少来证明。具体的体征或症状将取决于具体的病原体。感染性疾病的治疗功效可以通过靶向病原体的抗体或免疫细胞的生成来证明。

[0627] 可以通过肿瘤负荷的稳定或减少来证明癌症的治疗功效,所述肿瘤负荷的稳定或减少通过原发性肿瘤、转移性肿瘤的肿瘤负荷的稳定或减少,或肿瘤转移的延迟或预防来证明。本文提供了诊断和监测方法,例如,RECIST标准。

[0628] 将后来的读数与初始读数进行比较能为医生提供关于治疗是否有效的指示。通过测量这些参数中的任何一个参数或参数的任意组合,本领域技术人员完全有能力监测治疗或预防的功效。关于施用靶向PD-L1的iRNA或其药物组合物,“有效地抵抗”PD-L1相关疾

病表明以临床上适当的方式进行施用,能对于至少统计上显著的部分患者产生有益效应,例如改善症状、治愈或减少疾病、延长生命、改善生活质量、或其他通常被医师认为是正面的效应,所述医师熟悉对PD-L1相关疾病(例如,本文提供的HBV诊断标准中的PD-L1相关疾病)的治疗。

[0629] 如果疾病状态的一个或多个参数有统计学显著的改善、或者没有恶化或没有发展出预期的症状,则治疗或预防效应是明显。举个例子,疾病可测量的参数中至少有10% (优选至少20%、30%、40%、50%或更多)的有利变化可以指示有效的治疗。也可以通过使用本领域已知的给定疾病的实验动物模型来判断给定的iRNA药物或该药物的剂型的功效。当使用实验动物模型时,当观察到标志物或症状具有统计学显著性的减少时,则证明治疗具有功效。

[0630] 或者,可以由诊断领域技术人员基于临床上接受的疾病严重程度分级标准所确定的疾病严重程度的降低来测量功效。任何导致,例如,使用适当量表所测得的疾病严重程度的减轻的积极变化,都代表使用本文所述的iRNA或iRNA剂型能够进行充分的治疗。

[0631] 可以向受试者施用治疗量(例如约0.01mg/kg到约200mg/kg)的iRNA。

[0632] 可以在一段时间内以定期的方式静脉内输注iRNA。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以以较低的频率施用所述治疗。施用所述iRNA可以将例如患者的细胞或组织中的PD-L1水平减少至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或者减少至低于所用测定方法的检测水平。在某些实施方案中,施用会导致PD-L1相关疾病的至少一种体征或症状的临床性稳定(或优选临床相关的减少)。

[0633] 在某些实施方案中,相对于全剂量的iRNA,可以给患者施用更小的剂量,例如5%的输注反应,并监测不良反应例如过敏反应。在另一实例中,可以监测所述患者不需要的(unwanted)免疫刺激效应,例如上升的细胞因子(例如,TNF- α 或INF- α)水平。

[0634] 或者,可以皮下施用,即通过皮下注射的方式施用所述iRNA。可以使用一次或多次注射将所要的每日剂量的iRNA递送给受试者。可以在一段时间内重复注射。可以定期重复施用。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以以较低的频率施用所述治疗。重复给药方案可以包括定期施用治疗量的iRNA,例如每隔一天或每年一次。在某些实施方案中,约每月一次到约每季度一次(即,约每三个月一次)施用所述iRNA。

[0635] IX. PD-L1相关疾病的诊断标准和治疗

[0636] 以下提供了各种PD-L1相关疾病的示例性诊断和监测标准。

[0637] A. 乙型肝炎

[0638] 肝炎是通用术语,表示肝脏的炎症,并且可由多种不同的病毒引起,例如甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎。由于发展出黄疸是肝病的典型特征,因此只能通过检测患者血清中是否存在特异性的抗病毒抗原或抗体来进行正确的诊断。持续性HBV感染的严重病理学后果包括发展成慢性肝功能不全、肝硬化和肝细胞癌(HCC)。此外,HBV携带者可以在很多年内传播疾病。

[0639] HBV是一种大型病毒并且不会穿过胎盘,然而,感染HBV的孕妇会在婴儿出生时将该疾病传播给婴儿。如果没有在出生时接种疫苗,许多这些婴儿会发展成终身的HBV感染,并且许多人在以后会发展成肝功能衰竭或肝癌。在急性HBV感染后,发生慢性感染的风险

与年龄成反比。慢性HBV感染的发生率在出生时感染的婴儿中是约 90%，在1-5岁年龄时感染的儿童中是25-50%，而在更大龄的儿童和成人时感染的人 中是约1-5%。慢性HBV感染在免疫缺陷者中也很常见(乙型肝炎:世界卫生组织。传染病监测与应急部门,获取地址 www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf?ua=1,其通过引用 并入本文)。

[0640] 在疾病的孵化阶段(6至24周),患者可能感到不适,可能出现恶心、呕吐、腹 泻、厌食和头痛。虽然低烧和食欲不振可能会有所改善,但是患者随后会出现黄疸。有时HBV感染既不会产生黄疸,也不会产生明显的症状。无症状的病例可以通过检测 其血液中生化性的或病毒特异性的血清学改变来鉴定。此类无症状的个体可能会成为 病毒的沉默携带者,并构成面向其他人的进一步的传播库。

[0641] 大多数成人患者会完全从HBV感染中恢复,但其他约5%到10%的患者不能清除病毒,并且将发展成无症状携带者或发展成可能导致肝硬化或肝癌的慢性肝炎。罕见 的是,一些患者可能会发生暴发性肝炎并死亡。持续的或慢性的HBV感染是人类最常 见的持续性病毒感染。据估计,目前全球有超过3.5亿人持续感染HBV。其中很大一 部分位于东亚和撒哈拉以南的非洲地区,在这些地区慢性肝病的相关并发症和肝癌是 最重要的健康问题。

[0642] 乙肝三项标准血液检测(HB抗原、抗HB抗体和HBc抗原)能够确定一个人目 前是否感染了HBV、是否已经康复、是否是慢性携带者、或者是否容易感染HBV。

测定法结果			解释
HBsAg	抗-HBs	抗-HBc	
[0643]	+	-	早期急性 HBV 感染。
	+	+/-	急性或慢性 HBV 感染。用 IgM-anti-HBc 进行区分。用 HBcAg 或 HBV DNA 确定感染水平。
	-	+	表明以前的 HBV 感染以及对乙型肝炎的免疫力。
	-	+	可能性包括:过去的 HBV 感染;低水平 HBV 的携带者; HBsAg 消失和出现抗-HBs 之间的时间跨度;或
[0644]			者假阳性或非特异性反应。用 IgM 抗-HBc 进行研究,以及/或者用 HBsAg 疫苗进行免疫增强。当抗 HBc 存在时,其有助于验证抗-HBc 的反应性。
	-	-	另一种传染源,对肝脏有毒性损伤,免疫紊乱,肝脏遗传性疾病,或者胆道疾病。
	-	+	疫苗型应答

[0645] 来源:Hollinger FB,Liang TJ.Hepatitis B Virus.In:Knipe DM等人,eds.Fields Virology,第4版,Philadelphia,Lippincott Williams&Wilkins,2001:2971-3036.

[0646] 可以进行进一步执行血清学检测以区分慢性或急性乙肝患者,或者可能的携带者。许多针对HBV的疫苗是现成的,并且目前比治疗更有效,更具成本效益。

[0647] 目前,还没有针对急性乙型肝炎的治疗方法。可以对恶心、厌食、呕吐和其他症状进行对症治疗。

[0648] 治疗慢性乙型肝炎的目的是通过消灭血清和肝脏中HBV复制的标记物(像HBV DNA、HBeAg和HBcAg)来消除传染性以防止HBV的传播和扩散,中止肝病的进展并改善临床和组织学图像,以及防止HCC继续发展。这些病毒学变化通常伴随有ALT活性的正常化、肝脏炎症的消退以及患者症状的改善。然而,目前可用的针对HBV的治疗很少能治愈该疾病。患者必须无限期地接受治疗以抑制疾病并预防传播。

[0649] 有两种主要的治疗方法:旨在通过干扰病毒的复制来抑制或破坏HBV的抗病毒药物方法和旨在帮助人体免疫系统针对病毒进行防御的免疫调节剂方法。不管是诱导增强表达病毒和病毒抗原的以及诱导抑制T淋巴细胞功能的皮质类固醇,还是阿拉伯糖苷、阿昔洛韦或双脱氧肌苷,都显示对于治疗慢性乙型肝炎没有益处。

[0650] 目前用干扰素治疗慢性乙型肝炎,以调节免疫应答。唯一批准的干扰素是干扰素- α -2a和干扰素- α -2b。干扰素具有多种特性,包括抗病毒效应、免疫调节效应和抗增殖效应。这些效应增强辅助T细胞的活性、引起B淋巴细胞成熟、抑制T细胞抑制因子、并增强HLA I型的表达。符合干扰素治疗条件的患者应该至少有6个月的感染记录、肝酶(AST和ALT)升高、以及其血液中存在活跃分裂的病毒(HBeAg和/或HBV DNA阳性检测)。急性感染的、末期肝硬化的或具有其他重大疾病的患者不应接受治疗。干扰素- α 能在35%的慢性乙型肝炎患者中使疾病得到长期持续的缓解,同时使肝酶正常化并且使活动性感染的三种标记物(HBeAg、HBV DNA和HBsAg)都消失。在一些经过仔细选择的患者中,可以完全消除病毒。

[0651] 针对患有HBV相关肝硬化患者的干扰素疗法能显著降低HCC的发生率,特别是在具有大量的血清HBV DNA的患者中特别明显。在患有HBeAg阳性代偿性肝硬化患者中,在进行了干扰素治疗后,在病毒学和生物化学方面的缓解与改善的生存率相关。在慢性HBV感染的患者中,用干扰素- α 治疗后HBeAg的清除与改善的临床结果相关。

[0652] 干扰素- α (内含子A(干扰素- α -2b),Schering Plough和Roferon,(干扰素- α -2a)Roche Labs)是针对慢性乙型肝炎的主要治疗方法。通常认为治疗的标准持续时间是16周。在标准方案结束时表现出低水平的病毒复制的患者最受益于长期治疗。

[0653] 核苷酸和核苷类似物长期以来一直用于治疗HBV。目前已有的和正在开发的化合物包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、恩曲他滨、克拉夫定、利托那韦、双泊酯、洛布卡韦、famvir、FTC、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、PC1323、theradigm-HBV、胸腺素- α 和更昔洛韦。其中一些化合物能用于抵抗其它病毒(例如,HCV,HIV)的感染,而其他化合物则主要用于治疗HBV。

[0654] HBV DNA和HBeAg的永久性消除被认为是抗病毒治疗的最终目标,因为此结果与坏死性炎症损伤的改善和降低的感染性相关。

[0655] B. 丁型肝炎

[0656] 丁型肝炎病毒(HDV)是一种有缺陷的病毒,其仅在存在活动性HBV感染的情况下才具有传染性。HDV感染既可以与HBV一起共感染,也可以与HBV运载体一起发生双重感染。共感染通常可以解决。然而,双重感染常常引起慢性HDV感染和慢性活动性肝炎。这两种感染都可能导致暴发性肝炎。

[0657] 传播途径与HBV的相似。通过接种疫苗预防易感人群的急性和慢性HBV感染也会

预防HDV感染。某些HBV治疗在治疗HDV方面也是有效的,例如,与阿德福韦 一起作用或不与其一起作用的干扰素- α 。但其他药物,例如HBV-DNA复制的抑制剂 拉米夫定,则对治疗慢性丁型肝炎无效。

[0658] C. 结核病 (TB)

[0659] 结核病是由结核分枝杆菌引起的疾病。结核病与以下症状有关:包括不明原因的体重减轻、食欲不振、夜间盗汗、发烧、疲劳、咳嗽超过三周、咯血(咳血)和胸痛。有两种测试能用于确定一个人是否感染了TB细菌:结核菌素皮肤测试和TB血液测试,包括 **QuantiFERON®-TB Gold In-Tube**测试(QFT-GIT)和**T-SPOT®.TB**测试(T-Spot)。但是,这些测试并不能指示活动性TB感染。TB感染的诊断包括评估病史、身体检查、胸部X射线摄影、以及诊断性微生物学培养测定法,包括对耐药性进行分析。本领域 技术人员有能力评估TB的体征或症状的临床相关变化。

[0660] D. 癌症

[0661] 癌症是指以间变细胞增殖为特征的各种恶性肿瘤中的任一种(所述间变细胞趋于侵入周围组织并转移到新的身体部位),并且也指以此类恶性肿瘤生长为特征的病理 状况。癌症可以是肿瘤或恶性血液瘤,并且包括但不限于,所有类型的淋巴瘤/白血病、癌和肉瘤。在某些实施方案中,癌症包括肝癌。在某些实施方案中,癌症包括肝细胞 癌(HCC)。

[0662] RECIST标准是临床上接受的评估标准,用于提供实体肿瘤测量的标准方法,并 为客观评估用于临床试验的肿瘤大小的变化提供定义。此类标准也可用于监测正在接 受针对实体瘤的治疗的个体的应答。RECIST 1.1标准在Eisenhauer等人,New response evaluation criteria in solid tumors:Revised RECIST guideline(version 1.1).Eur.J.Cancer. 45:228-247,2009(其在此通过引入并入)中有详细的讨论。靶病灶的应答标准包括:

[0663] 完全应答(CR):所有靶病灶都已消失。任何病理性淋巴结(无论是靶病灶还是 非靶病灶)都必须在短轴上缩短至 $<10\text{mm}$ 。

[0664] 部分应答(PR):以基线直径总和作为参照,靶病灶的直径总和至少减少30%。

[0665] 进行性疾病(PD):以研究中的最小总和作为参照(如果基线总和是研究中的最 小总和的话,也包括基线总和),靶病灶的直径总和上升至少20%。除了相对上升20% 之外,总和还必须显示具有至少5mm的绝对增量。(注意:出现一个或多个新的病 灶也应该是进展。)

[0666] 稳定性疾病(SD):以研究中的最小总和直径作为参照,即没有发生足够达到PR 的收缩,也没有发生足够达到PD的增量。

[0667] RECIST 1.1标准也考虑非靶病灶,其被定义成可测量的但无需测量的、并且只应在所需时间点进行定性评估的病灶。非靶病灶的应答标准包括:

[0668] 完全应答(CR):所有非靶病灶都已消失并且肿瘤标记物水平正常化。所有淋巴 结必须是非病理性的(短轴上 $<10\text{mm}$)。

[0669] 非CR/非PD:持续存在一个或多个非靶病灶和/或肿瘤标志物水平维持在正常限值之上。

[0670] 进行性疾病(PD):现有非靶病灶具有明确的进展。进展还可以是出现一个或多个新病灶。非靶疾病基础上的“明确进展”意味着非靶疾病的总体水平必然会显著恶 化,即使

靶疾病中存在SD或PR,但总体肿瘤负荷已增加到足以需要中止治疗才更有 益处。一个或多个非靶病灶适度的进展“增加”通常不足以具备明确的进展状态。因此,在靶疾病中存在SD或PR的情况下,仅仅根据非靶疾病的变化来指定总体进展非 常罕见。

[0671] 临床上可接受的急性白血病治疗应答的标准如下:

[0672] 完全缓解(CR):患者必须没有白血病相关症状,并且绝对中性粒细胞计数 $\geq 1.0 \times 10^9/L$,血小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$,正常骨髓中具有 $<5\%$ 的原始细胞并且没有Auer小 体。

[0673] 伴有血细胞计数不完全恢复的完全缓解(Cri):同CE,但残留有血小板减少症(血小板计数 $<100 \times 10^9/L$)或残留有嗜中性粒细胞减少症(嗜中性粒细胞绝对计数 $<1.0 \times 10^9/L$)。

[0674] 部分缓解(PR):骨髓原始细胞减少 $\geq 50\%$,骨髓中异常细胞减少 5% 到 25% ;或者如果Auer小体存在的话,CR具有 $\leq 5\%$ 的原始细胞。

[0675] 治疗失败:治疗未能达到CR,Cri或PR。复发。

[0676] 证实CR后复发:外周血中再次出现白血病原始细胞或者骨髓中有 $\geq 5\%$ 的原始细胞不能归因于任何其他原因(例如,巩固治疗后的骨髓再生)或出现新的异常变化。

[0677] 本发明所述组合物和方法的用途包括在具有实体瘤的受试者中实现至少足够长时间的稳定性疾病,以达到RECIST标准对稳定性疾病的定义要求。在某些实施方案中,本发明所述组合物和方法的用途包括在患有实体瘤的受试者中实现足够长时间的部分 应答,以达到RECIST标准对稳定性疾病的定义要求。

[0678] 本发明所述组合物和方法的用途包括在患有急性白血病的受试者中实现至少足够 长时间的部分缓解,以达到RECIST标准对稳定性疾病的定义要求。在某些实施方案 中,本发明所述组合物和方法的用途包括在患有急性白血病的受试者中实现至少足够 长时间的完全缓解并且伴有血细胞计数的不完全恢复,以达到RECIST标准对稳定性 疾病的定义要求。

[0679] 本申请还包括以下实施方式:

[0680] 实施方式1:一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核 酸(RNAi)试剂,其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链,其中所述有义链包括至 少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第 620-641位、第1093-1115位、第 1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241 位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680 位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242位或第3222-3243位核苷酸中任 一项的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少 15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异 不超过3个核 苷酸,并且其中所述RNAi试剂包括至少一个经修饰的核苷酸。

[0681] 实施方式2:一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核 酸(RNAi)试剂,其中所述RNAi试剂包括有义链和反义链,所述反义链包括互补区,所述互补区包含至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-

67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中任一个的任一反义序列的差异不超过3个核苷酸。

[0682] 实施方式3:根据实施方式1或实施方式2所述的dsRNA试剂,其中所述有义链和反义链包括选自下组的核苷酸序列:AD-67635、AD-67637、AD-67658、AD-67632、AD-67629、AD-67631、AD-67633、AD-67643、AD-67653、AD-67640、AD-67650、AD-67676、AD-67661、AD-67667、AD-67655、AD-67672、AD-67659、AD-67673、AD-67664、AD-67662、AD-67660、AD-67656、AD-67628、AD-67647、AD-67626或AD-67645双链体中任一个的任一核苷酸序列。

[0683] 实施方式4:根据实施方式1至实施方式3中任一项所述的dsRNA试剂,其中所述有义链的基本上所有核苷酸或者所述反义链的基本上所有核苷酸都包括核苷酸修饰。

[0684] 实施方式5:根据实施方式1至实施方式3中任一项所述的dsRNA试剂,其中所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包括修饰。

[0685] 实施方式6:一种用于抑制程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243位核苷酸中的任一项的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3个核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸以及所述反义链的基本上所有核苷酸都包括核苷酸修饰,并且其中所述有义链与连接在3'-末端的配体缀合。

[0686] 实施方式7:根据实施方式6所述的双链RNAi试剂,其中所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包括修饰。

[0687] 实施方式8:根据实施方式1至实施方式6中任一项所述的RNAi试剂,其中至少一个所述核苷酸修饰选自下组:脱氧核苷酸、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸的核苷酸、以及包含5'-磷酸模拟物的核苷酸。

[0688] 实施方式9:根据实施方式8所述的RNAi试剂,其中所述核苷酸修饰包括3'-末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)短序列。

[0689] 实施方式10:根据实施方式2所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为至少17个核苷酸。

[0690] 实施方式11:根据实施方式2所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为19-21个核苷酸。

[0691] 实施方式12:根据实施方式11所述的RNAi试剂,其中所述互补区的长度为19 个核苷酸。

[0692] 实施方式13:根据实施方式1、实施方式2和实施方式6中任一项所述的RNAi 试剂,其中每条链的长度都不超过30个核苷酸。

[0693] 实施方式14:根据实施方式1、实施方式2和实施方式6中任一项所述的RNAi 试剂,其中至少有一条链包含具有至少1个核苷酸的3'悬端。

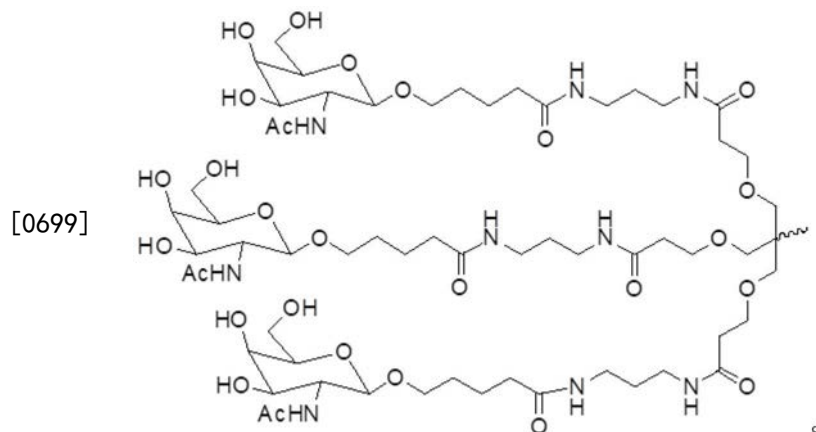
[0694] 实施方式15:根据实施方式1、实施方式2和实施方式6中任一项所述的RNAi 试剂,其中至少有一条链包含具有至少2个核苷酸的3'悬端。

[0695] 实施方式16:根据实施方式1至实施方式5中任一项所述的RNAi试剂,其还包括配体。

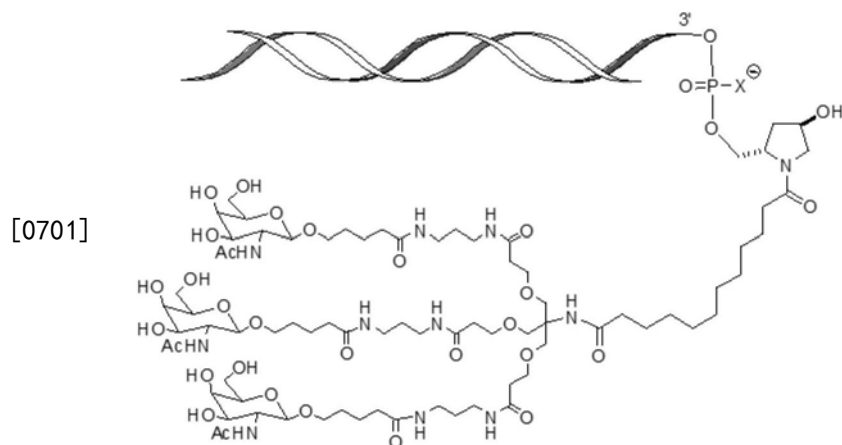
[0696] 实施方式17:根据实施方式16所述的RNAi试剂,其中所述配体与所述dsRNA 试剂的所述有义链的3'端缀合。

[0697] 实施方式18:根据实施方式6或实施方式16所述的RNAi试剂,其中所述配体是 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 衍生物。

[0698] 实施方式19:根据实施方式18所述的RNAi试剂,其中所述配体为



[0700] 实施方式20:根据实施方式18所述的RNAi试剂,其中所述dsRNA试剂如以下 所示地与配体缀合:



[0702] 并且,其中X为O或S。

[0703] 实施方式21:根据实施方式20所述的RNAi试剂,其中所述X为O。

[0704] 实施方式22:根据实施方式2所述的RNAi试剂,其中所述互补区包括表3和表5中所

示的任一个反义序列。

[0705] 实施方式23:根据实施方式2所述的RNAi试剂,其中所述互补区由表3或表5 中所示的任一个反义序列组成。

[0706] 实施方式24:一种能够抑制PD-L1表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码PD-L1的 mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0707] 有义链:5'np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'

[0708] 反义链:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq'5' (III)

[0709] 其中:

[0710] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0711] p、p'、q和q'各自独立地为0-6;

[0712] 每个Na和Na'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0713] 每个Nb和Nb'均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0714] 每个np、np'、nq和nq'均独立地表示悬端核苷酸,每个np、np'、nq和nq'均可能存在或可能不存在;

[0715] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序;

[0716] Nb上的修饰与所述Y上的修饰不同,并且Nb'上的修饰与所述Y'上的修饰不同;并且

[0717] 其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0718] 实施方式25:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中i为0;j为0;i为1;j为1;i和j都为0;或者i和j都为1。

[0719] 实施方式26:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中k为0;l为0;k为1;l为1;k和l都为0;或者k和l都为1。

[0720] 实施方式27:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中XXX与X'X'X'互补,YYY与Y'Y'Y'互补,并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。

[0721] 实施方式28:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述YYY基序存在于所述有义链的切割位点处或附近。

[0722] 实施方式29:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述Y'Y'Y'基序存在于所述反义链上距5'-末端第11、12和13位处。

[0723] 实施方式30:根据实施方式29所述的双链RNAi试剂,其中所述Y'是2'-O-甲基。

[0724] 实施方式31:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中式(III)由式(IIIa)表示:

[0725] 有义链:5'np-Na-Y Y Y-Na-nq 3'

[0726] 反义链:3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Na'-nq'5' (IIIa)

[0727] 实施方式32:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中式(III)由式(IIIb)表

示:

[0728] 有义链:5'np-Na-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

[0729] 反义链:3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'-nq'5' (IIIb)

[0730] 其中每个Nb和Nb'均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0731] 实施方式33:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中式(III)由式(IIIc)表示:

[0732] 有义链:5'np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Na-nq 3'

[0733] 反义链:3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq'5' (IIIc)

[0734] 其中每个Nb和Nb'均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0735] 实施方式34:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中式(III)由式(IIId)表示:

[0736] 有义链:5'np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

[0737] 反义链:3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'-nq'5' (IIId)

[0738] 其中每个Nb和Nb'均独立地表示包含1-5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,并且每个Na和Na'均独立地表示包含2-10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0739] 实施方式35:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区的长度为15-30个核苷酸对。

[0740] 实施方式36:根据实施方式35所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区的长度为17-23个核苷酸对。

[0741] 实施方式37:根据实施方式35所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区的长度为17-25个核苷酸对。

[0742] 实施方式38:根据实施方式35所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区的长度为23-27个核苷酸对。

[0743] 实施方式39:根据实施方式35所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区长度为19-21个核苷酸对。

[0744] 实施方式40:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述双链区长度为21-23个核苷酸对。

[0745] 实施方式41:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中每条链都具有15-30个核苷酸。

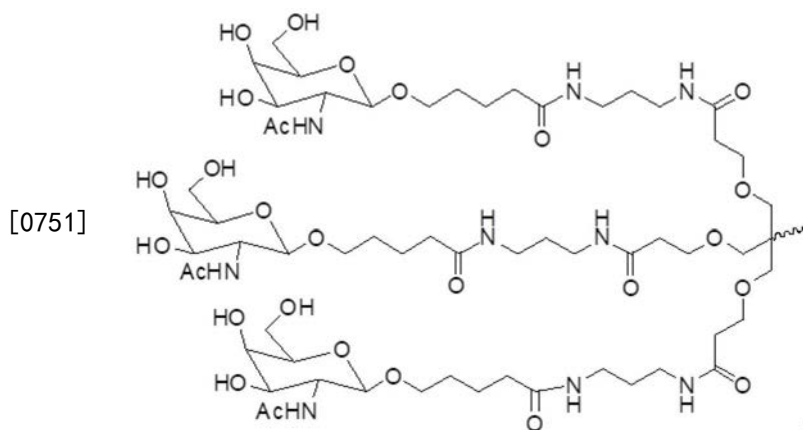
[0746] 实施方式42:根据实施方式6、实施方式24和实施方式34中任一项所述的双链RNAi试剂,其中每条链都具有19-30个核苷酸。

[0747] 实施方式43:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述核苷酸修饰选自下组:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧基、2'-羟基及其组合。

[0748] 实施方式44:根据实施方式43所述的双链RNAi试剂,其中所述核苷酸修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。

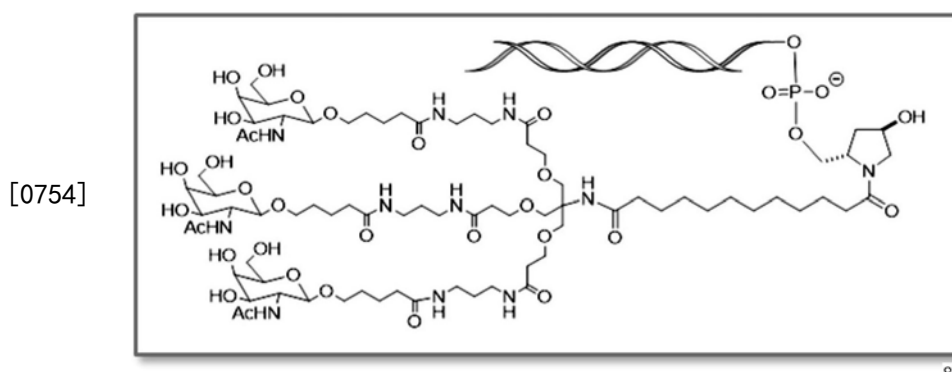
[0749] 实施方式45:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物或者胆固醇。

[0750] 实施方式46:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,所述配体为



[0752] 实施方式47:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述配体与所述有义链的3'端连接。

[0753] 实施方式48:根据实施方式47所述的双链RNAi试剂,其中所述RNAi试剂如下所示地与配体缀合



[0755] 实施方式49:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述试剂进一步包括至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键。

[0756] 实施方式50:根据实施方式49所述的双链RNAi试剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的3'-末端。

[0757] 实施方式51:根据实施方式50所述的双链RNAi试剂,其中所述链是所述反义链。

[0758] 实施方式52:根据实施方式50所述的双链RNAi试剂,其中所述链是所述有义链。

[0759] 实施方式53:根据实施方式49所述的双链RNAi试剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'-末端。

[0760] 实施方式54:根据实施方式53所述的双链RNAi试剂,其中所述链是所述反义链。

[0761] 实施方式55:根据实施方式53所述的双链RNAi试剂,其中所述链是所述有义链。

[0762] 实施方式56:根据实施方式49所述的双链RNAi试剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'-和3'-末端。

[0763] 实施方式57:根据实施方式56所述的双链RNAi试剂,其中所述链是所述反义链。

[0764] 实施方式58:根据实施方式6或实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述双链体的反义链的5'-末端的第1位处的碱基对是AU碱基对。

[0765] 实施方式59:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述Y核苷酸含有2'-氟代修饰。

[0766] 实施方式60:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述Y核苷酸含有2'-O-

甲基修饰。

[0767] 实施方式61:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中 $p' > 0$ 。

[0768] 实施方式62:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中 $p' = 2$ 。

[0769] 实施方式63:根据实施方式62所述的双链RNAi试剂,其中 $q' = 0, p = 0, q = 0$, 并且 p' 悬端核苷酸与所述靶mRNA互补。

[0770] 实施方式64:根据实施方式62所述的双链RNAi试剂,其中 $q' = 0, p = 0, q = 0$, 并且 p' 悬端的核苷酸与所述靶mRNA不互补。

[0771] 实施方式65:根据实施方式56所述的双链RNAi试剂,其中所述有义链总共有 21个核苷酸并且所述反义链总共有23个核苷酸。

[0772] 实施方式66:根据实施方式61至实施方式65中任一项所述的双链RNAi试剂, 其中至少一个 np' 经由硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。

[0773] 实施方式67:根据实施方式66所述的双链RNAi试剂,其中所有的 np' 都经由 硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。

[0774] 实施方式68:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述RNAi试剂选自 表3和表5所示的RNAi试剂组。

[0775] 实施方式69:根据实施方式24所述的双链RNAi试剂,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸均包含修饰。

[0776] 实施方式70:一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂, 其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码 PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸, 其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0777] 有义链: $5'np\text{-}Na\text{-(X X X)}i\text{-}Nb\text{-}Y Y Y\text{-}Nb\text{-(Z Z Z)}j\text{-}Na\text{-}nq\text{' }3'$

[0778] 反义链: $3'np'\text{-}Na'\text{-(X'X'X')}k\text{-}Nb'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}Nb'\text{-(Z'Z'Z')}l\text{-}Na'\text{-}nq'\text{' }5'$ (III)

[0779] 其中:

[0780] i, j, k 和 l 各自独立地为0或1;

[0781] p, p', q 和 q' 各自独立地为0-6;

[0782] 每个 Na 和 Na' 均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个以不同方式修饰的核苷酸;

[0783] 每个 Nb 和 Nb' 均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0784] 每个 np, np', nq 和 nq' 均独立地表示悬端核苷酸,每个 np, np', nq 和 nq' 均可能存在或可能不存在;

[0785] $XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0786] Nb 上的修饰与 Y 上的所述修饰不同,并且 Nb' 上的修饰与 Y' 上的所述修饰不同; 以及

[0787] 其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0788] 实施方式71:一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂, 其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码 PD-L1的

mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0789] 有义链:5'np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'

[0790] 反义链:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq'5' (III)

[0791] 其中:

[0792] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0793] 每个np、nq和nq'均独立地表示悬端核苷酸,每个np、nq和nq'均可能存在 或可能不存在;

[0794] p、q和q'各自独立地为0-6;

[0795] np'>0并且至少有一个np'通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

[0796] 每个Na和Na'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0797] 每个Nb和Nb'均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0798] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0799] Nb上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且Nb'上的修饰与Y'上的所述修饰不同;以及

[0800] 其中所述有义链与至少一个配体缀合。

[0801] 实施方式72:一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码 PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0802] 有义链:5'np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'

[0803] 反义链:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq'5' (III)

[0804] 其中:

[0805] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0806] 每个np、nq和nq'均独立地表示悬端核苷酸,每个np、nq和nq'均可能存在 或可能不存在;

[0807] p、q和q'各自独立地为0-6;

[0808] np'>0并且至少有一个np'通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

[0809] 每个Na和Na'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0810] 每个Nb和Nb'均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0811] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0812] Nb上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且Nb'上的修饰与Y'上的所述修饰不同;以及

[0813] 其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0814] 实施方式73:一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码 PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0815] 有义链:5'np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'

[0816] 反义链:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq'5' (III)

[0817] 其中:

[0818] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0819] 每个np、nq和nq'均独立地表示悬端核苷酸,每个np、nq和nq'均可能存在或可能不存在;

[0820] p、q和q'各自独立地为0-6;

[0821] np'>0并且至少有一个np'通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

[0822] 每个Na和Na'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0823] 每个Nb和Nb'均独立地表示包含0-10个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,

[0824] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0825] Nb上的修饰与Y上的所述修饰不同,并且Nb'上的修饰与Y'上的所述修饰不同;

[0826] 其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及

[0827] 其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0828] 实施方式74:一种能够抑制细胞中PD-L1的表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,其中所述双链RNAi试剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与编码 PD-L1的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14个到约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0829] 有义链:5'np-Na-Y Y Y-Na-nq 3'

[0830] 反义链:3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Na'-nq'5' (IIIa)

[0831] 其中:

[0832] 每个np、nq和nq'均独立地表示悬端核苷酸,每个np、nq和nq'均可能存在或可能不存在;

[0833] p、q和q'各自独立地为0-6;

[0834] np'>0并且至少有一个np'通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接;

[0835] 每个Na和Na'均独立地表示包含0-25个经修饰的或未经修饰的或其混合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列都包含至少两个以不同的方式修饰的核苷酸;

[0836] YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

- [0837] 其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;以及
- [0838] 其中所述有义链与至少一个配体缀合,其中所述配体是通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物。
- [0839] 实施方式75:一种用于抑制PD-L1表达的双链核糖核酸(RNAi)试剂,
- [0840] 其中所述双链RNAi试剂包括形成双链区的有义链和反义链,
- [0841] 其中所述有义链包括至少15个连续核苷酸,所述至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第3221-3243位、第351-372位、第618-641位、第618-639 位、第619-640位、第620-641位、第1093-1115位、第1093-1114位、第1094-1115 位、第1167-1188位、第1293-1314位、第1518-1539位、第2103-2124位、第2220-2261 位、第2220-2241位、第2240-2261位、第2648-2680位、第2648-2669位、第2658-2679 位、第2659-2680位、第3143-3164位、第3198-3219位、第3221-3242或第3222-3243 位核苷酸的差异不超过3个核苷酸,并且所述反义链包括至少15个连续核苷酸,所述 至少15个连续核苷酸与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的互补部分的差异不超过3 个核苷酸,
- [0842] 其中所述有义链的基本上全部核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,
- [0843] 其中所述有义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,
- [0844] 其中所述反义链的基本上所有核苷酸都包含选自下组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,
- [0845] 其中所述反义链在5'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键并且在3'-末端包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,以及
- [0846] 其中所述有义链与在3'-末端通过二价或三价枝化接头连接的一个或多个GalNAc衍生物缀合。
- [0847] 实施方式76:根据实施方式75所述的双链RNAi试剂,其中所述有义链的所有核苷酸以及所述反义链的所有核苷酸都包含核苷酸修饰。
- [0848] 实施方式77:根据实施方式75所述的双链RNAi试剂,其中每条链都具有19-30 个核苷酸。
- [0849] 实施方式78:一种细胞,所述细胞含有实施方式1、实施方式2、实施方式6、实施方式24和实施方式70至实施方式75中任一项所述的RNAi试剂。
- [0850] 实施方式79:一种用于抑制PD-L1基因表达的药物组合物,所述药物组合物包含实施方式1至实施方式77中任一项所述的RNAi试剂。
- [0851] 实施方式80:根据实施方式79所述的药物组合物,其中所述RNAi试剂以非缓冲 溶液形式施用。
- [0852] 实施方式81:根据实施方式80所述的药物组合物,其中所述非缓冲溶液是盐或水。
- [0853] 实施方式82:根据实施方式79所述的药物组合物,其中将所述RNAi试剂与缓冲 溶液一起进行施用。
- [0854] 实施方式83:根据实施方式82所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白盐、碳酸盐或磷酸盐或其任意组合。
- [0855] 实施方式84:根据实施方式82所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸缓 冲

盐(PBS)。

[0856] 实施方式85:一种药物组合物,所述药物组合物包括实施方式1至实施方式5中 任一项所述的双链RNAi试剂,以及脂质制剂。

[0857] 实施方式86:根据实施方式85所述的药物组合物,其中所述脂质制剂包括LNP。

[0858] 实施方式87:根据实施方式85所述的药物组合物,其中所述脂质制剂包括MC3。

[0859] 实施方式88:一种抑制细胞中PD-L1的表达的方法,所述方法包括:

[0860] 使所述细胞与实施方式1至实施方式77中任一项所述的双链RNAi试剂或者实施方式79-87中任一项所述的药物组合物接触,从而抑制所述PD-L1基因在所述细胞中 的表达。

[0861] 实施方式89:根据实施方式88所述的方法,其中所述细胞在受试者体内。

[0862] 实施方式90:根据实施方式89所述的方法,其中所述受试者是人。

[0863] 实施方式91:根据实施方式88至实施方式90中任一项所述的方法,其中所述 PD-L1的表达被抑制了至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%; 或者被抑制到低于试验的检测水平。

[0864] 实施方式92:一种治疗患有能够因PD-L1表达的减少而受益的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的实施方式1至I-77中任一项 所述的RNAi试剂或者实施方式79至实施方式87中任一项所述的药物组合物,从而 治疗所述受试者。

[0865] 实施方式93:根据实施方式92所述的方法,其中向所述受试者施用所述RNAi 引起PD-L1信号通路的降低。

[0866] 实施方式94:根据实施方式92所述的方法,其中所述疾病是PD-L1相关疾病。

[0867] 实施方式95:根据实施方式94所述的方法,其中所述PD-L1相关疾病是感染。

[0868] 实施方式96:根据实施方式95所述的方法,其中所述感染是慢性的细胞内感染。

[0869] 实施方式97:根据实施方式94至实施方式96中任一项所述的方法,其中所述 PD-L1相关疾病是病毒感染。

[0870] 实施方式98:根据实施方式94至实施方式97中任一项所述的方法,其中所述 PD-L1相关疾病是肝炎病毒感染。

[0871] 实施方式99:根据实施方式95至实施方式98中任一项所述的方法,其还包括在 所述受试者中检测感染的至少一种体征或症状。

[0872] 实施方式100:根据实施方式92所述的方法,其中所述癌症是PD-L1相关疾病的 癌症。

[0873] 实施方式101:根据实施方式92至实施方式100中任一项所述的方法,其中所述 受试者是人。

[0874] 实施方式102:根据实施方式92至实施方式101中任一项所述的方法,其还包括 施用试剂用于治疗感染或癌症。

[0875] 实施方式103:根据实施方式92至实施方式102中任一项所述的方法,其中以约0.01mg/kg到约50mg/kg的剂量施用所述dsRNA试剂。

[0876] 实施方式104:根据实施方式92至实施方式103中任一项所述的方法,其中以皮 下的方式向所述受试者施用所述dsRNA试剂。

[0877] 实施方式105:根据实施方式92至实施方式104中任一项所述的方法,其还包括 在所述受试者中测量PD-L1信号通路水平。

[0878] 实施方式106:根据实施方式92至实施方式104中任一项所述的方法,其还包括 在所述受试者中测量PD-L1的水平。

[0879] 下面的实施例进一步说明了本发明,这些实施例不应是限制性的。本申请通篇引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的全部内容,以及序列表,都通过引用并入本文。

实施例

[0880] 实施例1. siRNA的合成

[0881] 试剂来源

[0882] 如果本文中沒有具体给出试剂来源,那么此类试剂可以从任何分子生物学试剂的供应商处获得,且具有满足分子生物学应用的质量/纯度标准。

[0883] 转录体

[0884] siRNA的设计

[0885] 使用定制的R和Python脚本设计出靶向人PD-L1/CD274(人:NCBI refseqID NM_001267706;NCBI GeneID:29126;SEQ ID NO:1)、以及毒理学物种PD-L1的直系同源物(小鼠:XM_006527249(SEQ ID NO:3);大鼠, XM_006231248(SEQ ID NO:5);和食蟹猴:XM_005581779(SEQ ID NO:7))的一组siRNA。人PD-L1的REFSEQ mRNA 具有3349个碱基的长度。这组siRNA设计的基本原理和方法如下:用线性模型确定 从第109个位点一直到第3349个位点(编码区和3'UTR)中每个潜在的19mer siRNA 的预测效力,所述线性模型通过直接测量超过20,000种不同的靶向许多脊椎动物基因 的siRNA设计对mRNA的敲低作用衍生而来。设计出的PD-L1 siRNA亚组在人和食蟹猴之间具有完美的或近乎完美的匹配。另外设计出一组则与小鼠和大鼠的PD-L1 直系同源物具有完美的或近乎完美的匹配。还有另外设计出一组则与人、食蟹猴、小鼠和大鼠的PD-L1直系同源物具有完美的或近乎完美的匹配。

[0886] 对于siRNA的每条链,使用定制的Python脚本进行蛮力搜索以测量siRNA与目标物种转录组中所有可能比对之间的错配数目和位置。对种子区域中的错配以及 siRNA的切割位点给予额外的权重,所述种子区域中的错配在此定义为反义寡核苷酸的 第2-9个位置,所述siRNA的切割位点在此定义为反义寡核苷酸的 第10-11位。对于种子错配、切割位点和上至反义链的第19个位置的其他位置,错配的相对权重是 2.8:1.2:1。忽略第一位置上的错配。通过累加每个加权错配的值来计算每条链的特异性分数。优先考虑这样的siRNA:其在人和食蟹猴中的反义评分为 ≥ 3.0 并且预测 功效为PD-L1转录物降低 $\geq 70\%$ 。

[0887] 未经修饰的PD-L1正义链和反义链序列的详细列表示于表3中。经修饰的PD-L1 正义链和反义链序列的详细列表示于表5中。

[0888] siRNA的合成

[0889] 使用固体载体介导的亚磷酰胺化学方法,在Mermade 192合成仪(BioAutomation)上以 $1\mu\text{mol}$ 的规模合成PD-L1 siRNA序列。固体支持物是装载有定制的GalNAc配体 的可控多孔玻璃(500A)或通用的固体支持物(AM biochemical)。辅助合成试剂2'-F 和2'-O-甲基

RNA以及脱氧亚磷酰胺获自Thermo-Fisher® (Milwaukee, WI) 和Hongene (中国)。使用相应的亚磷酰胺引入2'F 2'-O-甲基、GNA(乙二醇核酸)、5'-磷酸和其他修饰。在经GalNAc修饰的CPG载体上完成合成3'GalNAc缀合单链。定制的CPG 通用固体支持物用于合成反义单链。在使用5-乙硫基-1H-四唑(ETT)作为活化剂(以0.6M存在于乙腈中)的条件下,所有亚磷酰胺(以100mM存在于乙腈中)的偶联时间均为5分钟。使用50mM的3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT, 获自Chemgenes® (Wilmington, MA, USA)) 无水乙腈/吡啶(v/v为1:1)溶液生成了硫代磷酸酯键。氧化时间为3分钟。所有序列合成后都会最后除去DMT基团(“无DMT”)。

[0890] 完成固相合成后,将寡核糖核苷酸从固体支持物上切下,并使用200μL甲基胺水溶液试剂在密封的96孔深孔板中60℃下脱保护20分钟。对于含有经叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)基团保护的2'核糖残基(2'-OH)的序列,使用TEA·3HF(三乙胺三氢氟酸盐)试剂执行了第二步去保护。向甲胺脱保护溶液中加入200μL二甲基亚砷(DMSO)和300μL TEA·3HF试剂,并将该溶液在60℃再温育20min。在裂解和脱保护步骤结束时,使合成板达到室温并通过加入1mL乙腈:乙醇混合物(9:1)进行沉淀。将平板在-80℃下冷却2小时,借助多通道移液管小心地去除上清液。将寡核苷酸沉淀重新悬浮在20mM的NaOAc缓冲液中,并在AKTA®纯化系统上使用5mL的HiTrap®体积排阻柱(GE Healthcare)进行脱盐,所述AKTA®纯化系统配备有A905自动取样器和Frac 950级分收集器。将脱盐的样品收集在96孔板中。对于来自每个序列的样品,通过LC-MS分析确认其身份,通过UV(260nm)进行定量,并通过IEX色谱法分析选定的一组样品以确定纯度。

[0891] 在Tecan®液体处理机器人上执行了PD-L1单链退火。将正义单链和反义单链的等摩尔混合物进行组合并在96孔板中退火。将互补的单链进行组合后,将96孔板密封并在100℃的烘箱中加热10分钟,并在2-3小时内缓慢回到室温。将每个双链体的浓度在1X PBS中基线化至10μM。

[0892] 实施例2-体外筛选:

[0893] 用于Dual-Glo®测定法的细胞培养和质粒/转染:

[0894] 使Cos7细胞(ATCC®, Manassas, VA)在补充有10%FBS的DMEM(ATCC®)培养基中,在37℃和5%CO₂气氛下,生长至接近饱和,然后通过胰蛋白酶消化将其从板上释放出来。使用具有约750bp,1.4kb和1.4kb长度的插入片段的三种构建体(SEQ ID NOs:11-13)将完整的人CD274参考序列(NM_001267706.1)克隆到双荧光素酶 psiCHECK2™载体中。使用Lipofectamine™ 2000(Invitrogen™, Carlsbad CA, cat#11668-019)将双荧光素酶质粒与siRNA共转染进15x10³个细胞中。对于96孔板的每个孔,将0.2μl的Lipofectamine™加入到含有10ng质粒载体和siRNA的14.8 μl Opti-MEM®中,并使其在室温下复合15分钟。然后将混合物加入到重悬于80μl新鲜完全培养基的细胞中。将细胞孵育48小时,然后测量荧光素酶。在最终双链体浓度为10nM和0.1nM的条件下执行单剂量实验。

[0895] Dual-Glo®荧光素酶测定法

[0896] 在siRNA转染48小时后,测量了萤火虫(转染对照)荧光素酶和海肾(与3'UTR中的PD-L1靶序列融合)荧光素酶。首先,从细胞中去除培养液。然后通过向各孔中加入75μl等

同于培养液体积的Dual-Glo®荧光素酶试剂并混合来测量萤火虫荧光素酶活性。将混合物在室温下温育30分钟,然后在Spectramax® (Molecular Devices®)上测量发光度(500nm),以检测萤火虫荧光素酶信号。通过向各孔中加入75μl室温的Dual-Glo®Stop&Glo®试剂测量了海肾荧光素酶活性,并将板孵育10-15分钟,然后再次测量发光度以确定海肾荧光素酶的信号。Dual-Glo®Stop&Glo®试剂淬灭萤火虫荧光素酶信号并使得海肾荧光素酶反应持续发光。通过将各孔内的海肾(PD-L1)信号对萤火虫(对照)信号进行基准化来确定siRNA活性。然后与转染有相同载体但未经siRNA处理的或经非靶向性siRNA处理的细胞比较,评估siRNA活性的量级。所有转染一式三份进行。

[0897] 细胞培养和用于qPCR的转染:

[0898] 使RK0人结肠癌细胞(ATCC®, Manassas, VA)在补充有10%FBS的DMEM(ATCC®)培养基中,在37℃和5%CO₂气氛下,生长至接近饱和,然后通过胰蛋白酶消化将其从板上释放出来。

[0899] 将4.9μl Opti-MEM/孔以及0.1μl Lipofectamine™ RNAiMax (Invitrogen™, Carlsbad CA, cat#13778-150)/孔和5μl siRNA双链体/孔加入到384孔板中,并在室温下孵育15分钟以转染细胞。然后将40μl含有~5x10³个细胞的DMEM加入到siRNA混合物中。将细胞孵育24小时,随后进行RNA纯化。在10nM和0.1nM的双链体终浓度下进行单剂量实验。

[0900] 使用DYNABEADS® mRNA分离试剂盒分离总RNA:

[0901] 在BioTek-EL406平台上使用DYNABEADS® (Invitrogen™, cat#61012)利用自动化方案分离RNA。简单地说,将50μl裂解/结合缓冲液和2.5μl含有3μl磁珠的裂解缓冲液加入到含有细胞的平板中。将平板在电磁振荡器上室温孵育10分钟,然后捕获磁珠并除去上清液。将与珠结合的RNA用150μl洗涤缓冲液A洗涤2次并用洗涤缓冲液B洗涤一次。然后用150μl洗脱缓冲液对珠进行洗涤,重新捕获该珠,并去除上清液。

[0902] 使用ABI™高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems®, Foster City, CA, Cat #4368813)合成cDNA:

[0903] 将在每个反应中含有1μl 10X缓冲液,0.4μl 25X dNTP,1μl 10x随机引物,0.5μl 逆转录酶,0.5μl RNase抑制剂和6.6μl H₂O的10μl母混合物加入到上述分离的RNA中。将平板密封,混合,并在电磁振荡器上室温孵育10分钟,然后在37℃孵育2小时。然后将平板在81℃孵育5min。

[0904] 实时PCR:

[0905] 在384孔板的每孔内,将2μl cDNA加入到含有0.5μl GAPDH TaqMan® 探针(Hs99999905),0.5μl CD274探针(Hs01125301_m1, CD274)和5μl Lightcycler® 480 探针母液(Roche Cat#04887301001)的母混合物中。使用ΔΔCt(RQ)测定法在LightCycler®48实时PCR系统(Roche)中进行实时PCR。在四个独立的转染中测试了每个双链体。

[0906] 为了计算相对倍数变化,使用ΔΔCt方法分析了实时数据,并根据使用10nM AD-1955转染的细胞或者模拟转染的细胞进行的检测来进行基准化。

[0907] 表2.用于表示核酸序列的核苷酸单体的缩写。应当理解,这些单体当存在于寡核苷酸中时通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

[0908]

缩写	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸
Af	2'-氟代腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟代腺苷-3'硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸
Cf	2'-氟代胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟代胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸
Gf	2'-氟代鸟苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟代鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tf	2'-氟代-5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tfs	2'-氟代-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
Uf	2'-氟代尿苷-3'-磷酸
Ufs	2'-氟代尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任意核苷酸 (G, A, C, T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸

[0909]

缩写	核苷酸
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
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
us	2'-O-甲基-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键
L96	N- [三 (GalNAc-烷基) -酰胺癸酰基]]-4-羟基脯氨酸 Hyp- (GalNAc-烷基) 3
dT	2'脱氧胸苷-3'-磷酸
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸
Y44	倒转脱碱基 DNA (2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸)
(Tgn)	胸苷二醇核酸 (GNA) S-异构体
P	磷酸
VP	乙烯基磷酸酯
(Aam)	2'-O- (N-甲基乙酰胺) 腺苷-3'-磷酸

[0910]

表 3. PD-L1 dsRNA 的经修饰的正义链和反义链序列

双链体名称	正义寡核苷酸名称	正义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	反义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID
AD-67630	A-135540	GAAACUUUUCAAUGUGACCAA	332-351	18	A-135541	UUUGUACAUUGAAAAAGCUUCUC	330-351	19
AD-67639	A-135560	GAAACUUUUCAAUGUGACCAA	332-351	20	A-135561	UUUGUACAUUGAAAAAGCUUCUC	330-351	21
AD-67649	A-135560	GAAACUUUUCAAUGUGACCAA	332-351	22	A-135576	UUUGUACAUUGAAAAAGCUUCUC	330-351	23
AD-67634	A-135550	AGCUUUUUCAAUGUGACCAAGCA	334-353	24	A-135551	UGCUGGUCACAUUGAAAAAGCUUC	332-353	25
AD-67644	A-135570	AGCUUUUUCAAUGUGACCAAGCA	334-353	26	A-135571	UGCUGGUCACAUUGAAAAAGCUUC	332-353	27
AD-67654	A-135570	AGCUUUUUCAAUGUGACCAAGCA	334-353	28	A-135581	UGCUGGUCACAUUGAAAAAGCUUC	332-353	29
AD-67627	A-135534	GCUUUUCAAUGUGACCAAGCAA	335-354	30	A-135535	UUUGUGGUCACAUUGAAAAAGCUU	333-354	31
AD-67636	A-135554	GCUUUUCAAUGUGACCAAGCAA	335-354	32	A-135555	UUUGUGGUCACAUUGAAAAAGCUU	333-354	33
AD-67646	A-135554	GCUUUUCAAUGUGACCAAGCAA	335-354	34	A-135573	UUUGUGGUCACAUUGAAAAAGCUU	333-354	35
AD-67658	A-135590	CACACUGAGAAUCAAACACAAA	353-372	36	A-135591	UUUGUGUUGAUUUCUCAGUGGCU	351-372	37
AD-67657	A-135586	CCAAAUGAAAGGACUCACUUA	471-490	38	A-135587	UAAGUGAGUCCUUUUAUUUGGAG	469-490	39
AD-67632	A-135546	UACACAUUUUGGAGGAGACGUA	620-639	40	A-135547	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	41
AD-67642	A-135566	UACACAUUUUGGAGGAGACGUA	620-639	42	A-135567	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	43
AD-67652	A-135566	UACACAUUUUGGAGGAGACGUA	620-639	44	A-135579	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	45
AD-67629	A-135538	ACACAUUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	46	A-135539	UUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAU	619-640	47
AD-67638	A-135558	ACACAUUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	48	A-135559	UUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAU	619-640	49
AD-67648	A-135558	ACACAUUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	50	A-135575	UUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAU	619-640	51
AD-67631	A-135544	CACAUUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	52	A-135545	AUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUA	620-641	53
AD-67641	A-135564	CACAUUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	54	A-135565	AUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUA	620-641	55
AD-67651	A-135564	CACAUUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	56	A-135578	AUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUA	620-641	57
AD-67675	A-135630	GAGACCUUGAUACUUUCAAAU	848-867	58	A-135631	AUUUGAAAAGUAUCAAAGGUCUCCC	846-867	59
AD-67665	A-135608	UAAUUUGAGGGGUCAGUUCUUA	978-997	60	A-135609	UAGGAACUGAGCCUCAAUUUAGG	976-997	61

[0911]

双链体名称	正义寡核苷酸名称	正义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	反义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID
AD-67633	A-135548	UUCCU AUUU AUUUU GAGUCUA	1095-1114	62	A-135549	UAGACU CAAAA UAAU AGGAAAA	1093-1114	63
AD-67643	A-135568	UUCCU AUUU AUUUU GAGUCUA	1095-1114	64	A-135569	UAGACU CAAAA UAAU AGGAAAA	1093-1114	65
AD-67653	A-135568	UUCCU AUUU AUUUU GAGUCUA	1095-1114	66	A-135580	UAGACU CAAAA UAAU AGGAAAA	1093-1114	67
AD-67640	A-135562	UCCU AUUU AUUUU GAGUCUGU	1096-1115	68	A-135563	ACAGACU CAAAA UAAU AGGAAAA	1094-1115	69
AD-67650	A-135562	UCCU AUUU AUUUU GAGUCUGU	1096-1115	70	A-135577	ACAGACU CAAAA UAAU AGGAAAA	1094-1115	71
AD-67663	A-135604	UUGAAGAU AUUUU GAGUAGA	1159-1178	72	A-135605	UCUACU CAAU AUUCU CAAAA	1157-1178	73
AD-67676	A-135632	AUUGU AGU AGAUU ACAAUU	1169-1188	74	A-135633	AAUGU AACU CUACU ACAAUU	1167-1188	75
AD-67666	A-135610	GUUUU GUU AAGGU GCUUGGUA	1247-1266	76	A-135611	UACCAAG CACCU UACAAU ACUC	1245-1266	77
AD-67661	A-135596	AAGCAU AAAAG AUCAA ACCGUU	1295-1314	78	A-135597	AACGGU UUGAU CUUUU AUGCUU CC	1293-1314	79
AD-67669	A-135618	CCUUU AUUU AACCC AUUAAUA	1333-1352	80	A-135619	UAUUU AUGGG UUUAAA UAAAGGUG	1331-1352	81
AD-67667	A-135612	AGGAAGCA AACAG AUUAAAGUA	1520-1539	82	A-135613	UACUU AAUCUG UUUUGCUU CCUA	1518-1539	83
AD-67674	A-135628	CAGGCAUUGAAUCUACAGAU	1684-1703	84	A-135629	UAUCUGU AGAUU CAUUGCCU GGC	1682-1703	85
AD-67655	A-135582	UGAUUC AAAAUU CAAAAGAU	2105-2124	86	A-135583	UAUCUUU UGAAU UUUGAAU CAUG	2103-2124	87
AD-67672	A-135624	UCUAA AGAU AGUCU ACAUUU	2222-2241	88	A-135625	UAAUGU AGACU AUCUUU AGAAG	2220-2241	89
AD-67659	A-135592	GGAAU GUU AUGUU AAAAGCAA	2242-2261	90	A-135593	UUUCUUU UAACAU ACAUUU CCAA	2240-2261	91
AD-67673	A-135626	UGUUU UCUGCUU UCUGU CAAA	2650-2669	92	A-135627	UUUGA CAGAAA GCGAGAAA CAAA	2648-2669	93
AD-67664	A-135606	UUUCUGU CAAAGU AUAACUUA	2660-2679	94	A-135607	UAAGUUU AUACU UGACAGAAA GCG	2658-2679	95
AD-67662	A-135598	UUCUGU CAAAGU AUAACUUA	2661-2680	96	A-135599	UGAAGUU AUACU UGACAGAAA G	2659-2680	97
AD-67671	A-135622	GUACUUG CAAA AUCAU UUUU	2692-2711	98	A-135623	AAAUGU GAUUU UGCAAGU ACAG	2690-2711	99
AD-67670	A-135620	UUUUU UGUGU GAAUU ACAGGA	3033-3052	100	A-135621	UCCUGU AAUU CACACAAA GAACA	3031-3052	101
AD-67668	A-135616	UGUGGU GUUGG AUUUUGU AAGA	3117-3136	102	A-135617	UCUUU ACAAU CCAAC ACCACA AG	3115-3136	103
AD-67660	A-135594	UCCUUU UUGUCU CAU GUUUCA	3145-3164	104	A-135595	UGAAACAUG AGACAAA AGGGAUA	3143-3164	105
AD-67656	A-135584	CUGCAU UUGAU UGUCU UUUU	3200-3219	106	A-135585	AAAAGU GACAAU CAAU GCGAGAA	3198-3219	107

[0912]

双链体名称	正义寡核苷酸名称	正义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	反义序列	在 SEQ ID: 1 中的位置	SEQ ID
AD-67628	A-135536	UACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3223-3242	108	A-135537	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUACA	3221-3242	109
AD-67637	A-135556	UACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3223-3242	110	A-135557	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUACA	3221-3242	111
AD-67647	A-135556	UACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3223-3242	112	A-135574	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUACA	3221-3242	113
AD-67626	A-135532	ACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3224-3243	114	A-135533	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUAC	3222-3243	115
AD-67635	A-135552	ACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3224-3243	116	A-135553	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUAC	3222-3243	117
AD-67645	A-135552	ACCUGCAUUAAUUUAAUAAA	3224-3243	118	A-135572	UUUAUUAAAUUAAUUGCAGGUAC	3222-3243	119

[0913] 4. CD274 Dual-Glo® 荧光素酶和 qPCR 数据

[0914] 数据表示成相对于非靶向性对照的剩余信息百分比。

[0915]

双链体 ID	Cos7 细胞中的荧光素酶测定法数据				RKO 细胞中的 qPCR 数据				转录起始
	10nM AVG	10nM STDEV	0.1nM AVG	0.1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0.1nM AVG	0.1nM STDEV	
AD-67630	7.6	0.4	17.8	1.2	53.4	3.5	63.0	15.2	330
AD-67639	16.0	2.5	62.6	2.8	44.4	2.8	71.7	5.5	330
AD-67649	12.5	1.2	32.0	10.0	70.7	6.9	65.4	11.6	330
AD-67634	19.7	1.6	25.1	1.0	73.7	13.6	78.8	5.8	332
AD-67644	67.7	5.5	107.1	3.9	79.4	5.1	85.0	4.2	332
AD-67654	28.1	1.8	65.9	5.2	79.7	4.0	77.6	9.8	332
AD-67627	12.7	2.3	27.1	0.9	52.3	3.4	67.5	1.9	333
AD-67636	33.1	6.0	82.6	5.0	56.0	3.9	67.2	23.7	333
AD-67646	21.4	1.0	70.3	8.4	62.1	5.7	85.7	4.9	333
AD-67658	11.7	0.1	16.6	0.8	35.3	5.4	58.4	3.2	351
AD-67657	18.7	3.2	55.0	3.0	53.7	8.4	61.7	15.7	469
AD-67632	6.0	0.3	10.1	0.8	25.9	4.9	29.1	15.5	618
AD-67642	33.7	3.6	79.1	0.7	52.4	4.9	85.3	0.6	618
AD-67652	25.9	5.9	49.3	0.9	30.6	1.7	75.3	4.0	618
AD-67629	10.4	0.6	24.9	1.9	23.1	1.9	47.6	4.8	619
AD-67638	15.9	1.2	79.5	5.1	28.6	2.9	68.3	6.7	619
AD-67648	13.6	1.2	35.4	5.3	18.9	4.3	62.6	7.0	619
AD-67631	6.8	1.0	11.4	0.8	18.5	2.8	42.9	1.2	620
AD-67641	19.2	3.2	61.2	9.4	67.3	8.7	62.3	11.4	620
AD-67651	15.2	0.9	48.5	1.1	45.3	5.9	81.8	7.6	620
AD-67675	18.5	1.1	30.7	4.2	44.4	4.8	58.6	8.6	846
AD-67665	29.9	1.1	34.3	2.8	36.4	2.0	54.0	4.4	976
AD-67633	7.4	0.8	23.2	1.0	42.5	4.9	55.3	26.1	1093
AD-67643	9.2	0.5	57.4	4.1	32.7	1.9	71.5	5.5	1093
AD-67653	7.7	0.1	16.2	1.2	22.0	1.8	59.5	4.8	1093
AD-67640	6.7	0.5	31.8	2.2	18.4	4.4	45.1	14.4	1094
AD-67650	7.3	0.7	17.3	2.3	22.0	1.7	45.6	3.2	1094
AD-67663	13.2	2.2	33.8	3.3	35.7	2.6	46.5	2.7	1157
AD-67676	10.4	1.2	27.7	3.1	34.7	4.3	51.8	4.4	1167
AD-67666	9.3	0.6	14.7	1.8	47.5	4.7	63.4	6.5	1245
AD-67661	9.9	0.6	21.1	1.1	37.1	2.0	48.9	3.1	1293
AD-67669	25.4	4.2	51.9	5.8	52.0	3.3	73.3	12.0	1331

[0916]

双链体 ID	Cos7 细胞中的荧光素酶测定法数据				RKO 细胞中的 qPCR 数据				转录 起始
	10nM AVG	10nM STDEV	0.1nM AVG	0.1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0.1nM AVG	0.1nM STDEV	
AD-67667	15.8	4.0	31.4	1.0	35.8	0.3	51.0	3.7	1518
AD-67674	13.8	2.7	21.3	3.9	43.1	10.8	61.2	15.1	1682
AD-67655	5.8	1.5	20.5	3.2	23.2	3.4	40.2	3.7	2103
AD-67672	5.7	0.3	13.5	0.5	36.1	9.0	52.5	2.6	2220
AD-67659	12.0	1.8	24.3	4.3	32.8	2.4	54.0	5.5	2240
AD-67673	8.1	0.5	44.0	5.0	33.2	1.4	58.8	8.6	2648
AD-67664	10.1	0.4	20.1	4.9	37.3	2.9	48.2	3.1	2658
AD-67662	14.6	0.9	25.9	0.6	28.6	1.8	40.3	3.0	2659
AD-67671	5.8	1.0	32.2	7.4	49.1	2.0	65.0	3.5	2690
AD-67670	9.6	0.6	28.7	3.5	41.0	2.0	63.6	3.5	3031
AD-67668	15.7	3.2	30.7	6.3	42.4	7.2	62.8	2.2	3115
AD-67660	4.9	0.6	17.1	2.7	29.2	2.0	53.5	1.7	3143
AD-67656	6.1	1.0	6.6	0.7	27.9	6.6	36.0	7.0	3198
AD-67628	11.6	0.3	26.8	3.7	38.8	4.7	53.1	8.4	3221
AD-67637	8.8	0.6	24.6	4.2	26.9	0.7	45.5	7.8	3221
AD-67647	9.1	0.6	23.7	4.1	25.2	1.3	47.3	2.2	3221
AD-67626	7.3	0.6	7.7	0.4	29.1	8.9	26.5	9.4	3222
AD-67635	9.3	1.0	28.2	4.4	26.3	3.0	49.7	4.8	3222
AD-67645	9.2	1.0	44.7	7.2	29.0	1.5	57.8	5.0	3222

[0917]

表 5. PD-L1 的经修饰的序列

双链体名称	正义寡核苷酸名称	寡核苷酸序列	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	正义寡核苷酸序列	SEQ ID	SEQ ID: 1 中转录起始位置
AD-67630	A-135540	Y44GAAAGCUUUUCAUUGUGACCAa	120	A-135541	UUGGUCACAUUUGAAAAGCUUCUc	121	330
AD-67639	A-135560	gsasagcuUfuUfCfAfaugugaccaal.96	122	A-135561	usUfsgguCfaCfAfaungaAfaAfgcuucsuc	123	330
AD-67649	A-135560	gsasagcuUfuUfCfAfaugugaccaal.96	124	A-135576	UfsUfsgguCfaCfAfaungaAfaAfgcuucsuc	125	330
AD-67634	A-135550	Y44AGCUUUUCAUUGUGACCAAGCa	126	A-135551	UGCUGGUCACAUUUGAAAAGCUUc	127	332
AD-67644	A-135570	asgscuuuUfcAfAfUfGfugaccagcaL.96	128	A-135571	usGfscugGfuCfAfcauuGfaAfaageusuc	129	332
AD-67654	A-135570	asgscuuuUfcAfAfUfGfugaccagcaL.96	130	A-135581	UfsGfscugGfuCfAfcauuGfaAfaageusuc	131	332
AD-67627	A-135534	Y44GCUUUUCAUUGUGACCAAGCAa	132	A-135535	UUGCUGGUCACAUUUGAAAAGCUu	133	333
AD-67636	A-135554	gsesuuuuCfaAfUfGfugaccagcaL.96	134	A-135555	usUfsgguGfgUfCfacaUfGfAfaaagesusu	135	333
AD-67646	A-135554	gsesuuuuCfaAfUfGfugaccagcaL.96	136	A-135573	UfsUfsgguGfgUfCfacaUfGfAfaaagesusu	137	333
AD-67658	A-135590	CACACUGAGAAUCAACACAa	138	A-135591	UUUGUGUUGAUUCUCAGUGUGCa	139	351
AD-67657	A-135586	CCAAAUAGAAAGGACUCACUa	140	A-135587	UAAAGUGAGUCCUUUCAUUUGGAg	141	469
AD-67632	A-135546	Y44UACACAUUUGGAGGAGACGUa	142	A-135547	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUc	143	618
AD-67642	A-135566	usascacaUfuUfGfGfaggagagcuaL.96	144	A-135567	usAfscguCfuCfCfuccaAfaUfGfuguasuc	145	618
AD-67652	A-135566	usascacaUfuUfGfGfaggagagcuaL.96	146	A-135579	UfsAfscguCfuCfCfuccaAfaUfGfuguasuc	147	618
AD-67629	A-135538	Y44ACACAUUUGGAGGAGACGUa	148	A-135539	UUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAu	149	619
AD-67638	A-135558	ascsacauUfuGfGfAfaggagagcuaL.96	150	A-135559	usUfsaegUfUfCfuccaAfaAfuugusasu	151	619
AD-67648	A-135558	ascsacauUfuGfGfAfaggagagcuaL.96	152	A-135575	UfsUfsaegUfUfCfuccaAfaAfuugusasu	153	619
AD-67631	A-135544	Y44CACAUUUGGAGGAGACGUAAu	154	A-135545	AUUACGUCUCCUCCAAAUGUGUA	155	620
AD-67641	A-135564	csaseauuUfgGfAfGfaggagagcuaL.96	156	A-135565	asUfsuacGfuCfuUfCfuccaCfaAfaugugsusa	157	620
AD-67651	A-135564	csaseauuUfgGfAfGfaggagagcuaL.96	158	A-135578	AfsUfsuacGfuCfuUfCfuccaCfaAfaugugsusa	159	620
AD-67675	A-135630	GAGACCUUGAUACUUUCAAAu	160	A-135631	AUUUGAAAAGUAUCAAGGUCUCc	161	846

[0918]

双链体名称	正义寡核苷酸名称	寡核苷酸序列	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	正义寡核苷酸序列	SEQ ID	SEQ ID: 1 中转录起始位置
AD-67665	A-135608	UAAUUUGAGGGUCAGUUCUa	162	A-135609	UAGGAACUGAGCCCUCAAAUUAAGg	163	976
AD-67633	A-135548	Y44UUCCUAAUUUAUUUGAGUCUa	164	A-135549	UAGACUCUAAAUAUAAUAGGAAa	165	1093
AD-67643	A-135568	ususcuaUfuUfaUfuuuugagucuaL96	166	A-135569	usAfsagcUfcAfafaauaAfaUfaggaaasa	167	1093
AD-67653	A-135568	ususcuaUfuUfaUfuuuugagucuaL96	168	A-135580	UfsAfsagcUfcAfafaauaAfaUfaggaaasa	169	1093
AD-67640	A-135562	usescuaUfuAfUfuuuugagucugL96	170	A-135563	asCfsagaCfuCfafaauaAfaUfaggaaasa	171	1094
AD-67650	A-135562	usescuaUfuAfUfuuuugagucugL96	172	A-135577	AfsCfsagaCfuCfafaauaAfaUfaggaaasa	173	1094
AD-67663	A-135604	UUGAAGAUAAUUAUUGUAGUAga	174	A-135605	UCUACUACAAUAUAUCUUCAAAa	175	1157
AD-67676	A-135632	AUUGUAGUAGAUGUUACAAUu	176	A-135633	AAUUGUAACAUCUACUACAAUAu	177	1167
AD-67666	A-135610	GUUUUUGUAAGGUGCUUGGUa	178	A-135611	UACCAAGCACCUUACAAUAUCUe	179	1245
AD-67661	A-135596	AAGCAUAAAAGAUCAAAACCGUa	180	A-135597	AACGGUUUGAUUCUUUAUGCUUCa	181	1293
AD-67669	A-135618	CCUUUAUUUAACCCAUUAUAUa	182	A-135619	UAUUAAUGGGUUAAUAAAGGUGg	183	1331
AD-67667	A-135612	AGGAAGCAAACAGAUUAAGUa	184	A-135613	UACUUAUCUGUUUGCUUCCUCa	185	1518
AD-67674	A-135628	CAGGCAUUGAAUUCUACAGAUa	186	A-135629	UAUCUGUAGAUUCAAUGCCUGGe	187	1682
AD-67655	A-135582	UGAUUCAAAAUAUCAAAGAUa	188	A-135583	UAUCUUUUGAAUUUUGAAUUAUg	189	2103
AD-67672	A-135624	UCUAAAGAUAGUCUACAUUUa	190	A-135625	UAAAUGUAGACUACUUUAAGAAg	191	2220
AD-67659	A-135592	GGAAAUGUAUGUUAAAAGCAa	192	A-135593	UUGCUUUUAACAUAUAUUUCCa	193	2240
AD-67673	A-135626	UGUUUUCUGCUUUCUGUCAa	194	A-135627	UUUGACAGAAAGCAGAAAACAa	195	2648
AD-67664	A-135606	UUUCUGUCAAGUAUAAACUUa	196	A-135607	UAAGUUUUAUACUUGACAGAAAAGe	197	2658
AD-67662	A-135598	UUCUGCAAGUAUAAACUUCa	198	A-135599	UGAAGUUUUAUACUUGACAGAAAG	199	2659
AD-67671	A-135622	GUACUUGCAAAAUCAUAUUUu	200	A-135623	AAAAGUGAUUUUGCAAGUACAg	201	2690
AD-67670	A-135620	UUCUUUGUGAAUUACAGGa	202	A-135621	UCCUGUAUUUCACACAAAAGAAc	203	3031
AD-67668	A-135616	UGUGGUGUUGGAUUUGUAAGa	204	A-135617	UCUUAACAUAUCCAAACACCACAAG	205	3115

[0919]

双链体名称	正义寡核苷酸名称	寡核苷酸序列	SEQ ID	反义寡核苷酸名称	正义寡核苷酸序列	SEQ ID	SEQ ID: 1 中转录起始位置
AD-67660	A-135594	UCCCUUUUGUCUCAUGUUUCa	206	A-135595	UGAAACAUGAGACAAAAGGGAUa	207	3143
AD-67656	A-135584	CUGCAUUUGAUUGUCACUUUu	208	A-135585	AAAAGUGACAAUCAAUUGCAGAA	209	3198
AD-67628	A-135536	Y44UACCUGCAUUAAUUUAAUAa	210	A-135537	UUUAUUAAAUUAAUAGCAGGUACa	211	3221
AD-67637	A-135556	usascgCfaUfUfAfauuuaaL96	212	A-135557	usUfsuauUfaAfafuuaaUfgCfagguascsa	213	3221
AD-67647	A-135556	usascgCfaUfUfAfauuuaaL96	214	A-135574	UfsUfsuauUfaAfafuuaaUfgCfagguascsa	215	3221
AD-67626	A-135532	Y44ACCUGCAUUAAUUUAAUAa	216	A-135533	UUUUAAUUAAAUUAAUAGCAGGUAc	217	3222
AD-67635	A-135552	ascscgcAfuUfaAfafuuaaL96	218	A-135553	usUfsuuaUfuAfafauuaAfuGfcaggusasc	219	3222
AD-67645	A-135552	ascscgcAfuUfaAfafuuaaL96	220	A-135572	UfsUfsuuaUfuAfafauuaAfuGfcaggusasc	221	3222

[0920] 等同物

[0921] 本领域技术人员将认识到,或者仅仅使用常规实验就能够确定本文所述的具体实施方案和方法的许多等同物。此类等同物应包括在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 阿尔尼拉姆医药品有限公司

<120> 程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 的iRNA组合物及其使用方法

<130> 121301-04220

<140>

<141>

<150> 62/213,224

<151> 2015-09-02

<160> 221

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1

<211> 3349

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

ggcgcaacgc tgagcagctg gcgcgtcccg cgcgggcccca gttctgcgca gcttcccagag 60
gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatatttt 120
gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg ccccatacaa caaatcaac 180
caaagaatttt tggttgtgga tccagtcacc tctgaacatg aactgacatg tcaggctgag 240
ggctacccca aggccgaagt catctggaca agcagtgacc atcaagtcct gagtggtaag 300
accaccacca ccaattccaa gagagaggag aagcttttca atgtgaccag cacactgaga 360
atcaacacaa caactaatga gattttctac tgcactttta ggagattaga tcctgaggaa 420
aaccatacag ctgaattggg catcccagaa ctacctctgg cacatcctcc aaatgaaagg 480
actcacttgg taattctggg agccatctta ttatgccttg gtgtagcact gacattcatc 540
ttccgtttta gaaaaggag aatgatggat gtgaaaaaat gtggcatcca agatacaaac 600
tcaaagaagc aaagtgatac acatttggag gagacgtaat ccagcattgg aacttctgat 660
cttcaagcag ggatttctaa cctgtggttt aggggttcat cggggctgag cgtgacaaga 720
ggaaggaatg ggcccgtggg atgcaggcaa tgtgggactt aaaaggccca agcactgaaa 780
atggaacctg gcgaaagcag aggaggagaa tgaagaaaga tggagtcaaa cagggagcct 840
ggagggagac cttgatactt tcaaatgcct gaggggctca tcgacgcctg tgacagggag 900
aaaggatact tctgaacaag gagcctccaa gcaaatcatc cattgctcat cctaggaaga 960
cgggttgaga atccctaatt tgagggtcag ttcttcgaga agtgcccttt gcctccactc 1020
aatgcctcaa tttgttttct gcatgactga gagtctcagt gttggaacgg gacagtatttt 1080
atgtatgagt ttttcctatt tattttgagt ctgtgaggtc ttcttgtcat gtgagtgtgg 1140
ttgtgaatga tttcttttga agatatattg tagtagatgt tacaattttg tcgccaaact 1200
aaacttgctg cttaatgatt tgctcacatc tagtaaaaca tggagtattt gtaaggtgct 1260
tggtctcctc tataactaca agtatacatt ggaagcataa agatcaaacc gttggttgca 1320
taggatgtca cctttattta acccattaat actctggttg acctaattctt attctcagac 1380

```

ctcaagtgtc tgtgcagtat ctgttcatt taaatatcag ctttacaatt atgtggtagc 1440
 ctacacacat aatctcatth catcgctgta accaccctgt tgtgataacc actattatth 1500
 taccatcgt acagctgagg aagcaaacag attaatgaac ttgcccacac cagtaaatag 1560
 cagacctcag actgccaccc actgtcctth tataatacaa ttacagcta taththactth 1620
 taagcaattc ththattcaa aaaccattth ttaagtgcc ttgcaatata aatcgctgtg 1680
 ccaggcattg aatctacaga tgtgagcaag acaaagtacc tgtcctcaag gagctcatag 1740
 tataatgagg agattaacaa gaaaatgtat tattacaatt tagtccagtg tcatagcata 1800
 aggatgatgc gaggggaaaa cccgagcagt gttgccaaga ggaggaaata ggccaatgtg 1860
 gtctgggacg gttggatata cttaaacatc ttaataatca gagtaathth catttacaah 1920
 gagaggctcg tacttaaaat aacctgaaa aataacactg gaathcctth tctagcatta 1980
 taththattc tgathtgctt ttgcatata atctaattgt tgtthataata gtgtctggta 2040
 ttgtthtaaca gttctgtctt thctaththaa atgccactaa aththaaatt catactthc 2100
 catgattcaa aatcaaaaag atcccatggg agatggttg aaaatctcca ctctactctc 2160
 caagccattc aagthtcctt tccagaagca actgctactg cctthcattc atatgttctt 2220
 ctaagatag tctacattg gaaatgtatg ttaaaagcac gtathththaa aththththc 2280
 ctaaatagta acacattgta tgtctgtgt gtactthgt aththththth aththtagtgt 2340
 thctthataata gcagatggaa tgaathtgaa gttcccagg ctgaggatcc atgcctthctt 2400
 tgtthctaa ttatctthc catagctthh cattatctth catatgatcc agtatatgtt 2460
 aaatatgtcc tacatataca thtagacaac caccatttgt taagtathtg ctctaggaca 2520
 gagthtgat thgtthtatgt ttgtcaaaa ggagaccat gggctctcca ggtgactg 2580
 agtcaatcta gtctaaaaa gcaatcttat tathaactct gtatgacaga atcatgtctg 2640
 gaactthtg thctgtctth ctgtcaagta taaactcac thtgatgtg tacttgcaah 2700
 atcacathth ctthctggaa attccggcag tgtacttgta ctgctagcta ccctgtgcca 2760
 gaaaagcctc attcgttgt ctggaacct tgaatgccac cagctgtcat cactacacag 2820
 cctcctaag aggtthctg gaggtthcga gattcagat ccctgggaga tccagagth 2880
 thctthccct ctggccata thctggtgtc aatgacaagg agtacttg ctthgcca 2940
 tgtcaaggct gaagaaacag tgtctccaac agagctcct gtgttatctg thgtacatg 3000
 tgcatthgta cagtaattgg tgtgacagt thctthgtg gaattacagg caagaattgt 3060
 ggctgagcaa ggcacatagt ctactcagtc thctctaag tctaactcc thctgttgt 3120
 gttgatttg taaggcactt tathctthh gtctcatgt tcatcgtaah tggcataggc 3180
 agagatgata cctaattctg catttgattg tcaaththg tactgcatt aaththataa 3240
 aatathctta ththththgt tacttggtac accagcatgt caththctt gththththg 3300
 tgtthataa aatgttcagt ttaacatccc agtggagaa gthththth 3349

<210> 2

<211> 3349

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

ththththth thctccactg ggatgtthaa ctgaacathh tathaacac aaataaaca 60

```

agaaaatgga catgctgggtg taccaagtaa caaaataaat aagaatattt tattaaatta 120
atgcaggtac aaaaagtac aatcaaatgc agaattaggt atcatctctg cctatgccat 180
ttacgatgaa acatgagaca aaagggataa agtgccttac aaatccaaca ccacaaggag 240
gagttaggac ttaggaatag actgagtaga ctatgtgcct tgctcagcca caattcttgc 300
ctgtaattca cacaaagaac actgtcacac caattactgt acaaatgcac atgtacaaac 360
agataacaca aggagctctg ttggagacac tgtttcttca gccttgacat gtggcaaagc 420
caaggtactc cttgtcattg acaccagaat atggccaaga gggaaaggaa actctgggat 480
ctcccagggc atctgaatct cgaaacctcc aggaagcctc ttaggagggc tgtgtagtga 540
tgacagctgg tggcattcaa gggttcaagc acaacgaatg aggcttttct ggcacagggt 600
agctagcagt caaggtacac tgccggaatt tccagaaaga aaatgtgatt ttgcaagtac 660
agcatcaaag tgaagtttat acttgacaga aagcagaaaa caaaagttcc agacatgatt 720
ctgtcataca gagttaataa taagattgct ttttaggact agattgactc agtgcacctt 780
ggagagccca tgggtctcct tttgagcaaa cataaacaaa tccaaactct gtcttagagc 840
aaataactta caaatgggtg ttgtctaaat gtatatgtag gacatattta acatatactg 900
gatcatatga aagataatga aaagctatgg gaaagataac ttagaaacaa agaaggcatg 960
gatcctcagc cctgggaact tcaaattcat tccatctgct atataagaaa cactaaaata 1020
aataaaaaata gcaaagtaca cagcagacat acaatgtgtt actatttagg aaaaaattt 1080
taaaaatacg tgcttttaac atacatttcc aaatgtagac tatctttaga agaacatatg 1140
aatgaaaggc agtagcagtt gcttctggaa aggaaacttg aatggcttgg aggatgaagt 1200
ggagattttc caaccatctc ccatgggatc ttttgaattt tgaatcatgg aaaggtatga 1260
atttaaaatt tagtggcatt taaatagaaa agacagaact gttaaacaat accagacact 1320
atataaacia gcattagatt atatggcaaa ggcaaatcag gaataaatat aatgctagaa 1380
aaggaattcc agtgttattt ttcagggtta ttttaagtac cgacctctct ttgtaaata 1440
aaattactct gattattaag atgtttaagt atatccaacc gtcccagacc acattggcct 1500
atttcctcct cttggcaaca ctgctcgggt tttccctcgc catcatcctt atgctatgac 1560
actggactaa attgtaataa tacattttct tgtaaatctc ctcatatac tatgagctcc 1620
ttgaggacag gtactttgtc ttgctcacat ctgtagattc aatgcctggc acagcgattg 1680
atattgcaag ggcacttaat aaatggtttt tgaataaaag aattgcttaa agtaaaatat 1740
agctgtaaat tgtattataa aaggacagtg ggtggcagtc tgaggtctgc tatttactgg 1800
tttgggcaag ttacttaate tgtttgctc ctcagctgta cgatgggtaa aataatagtg 1860
gttatcacia cagggtgggt acagcgatga aatgagatta tgtgtgtagg ctaccacata 1920
attgtaaagc tgatatttaa atggaacaga tactgcacag acacttgagg tctgagaata 1980
agattaggtc aaccagagta ttaatgggtt aaataaagggt gacatcctat gcaaccaacg 2040
gtttgatctt tatgttcca atgtatactt gtagttatag aggagaccaa gcaccttaca 2100
aatactccat gttttactag atgtgagcaa atcattaagc agcaagttta gtttggcgac 2160
aaaattgtaa catctactac aatatactct caaaagaaat cattcacaac cacttcaca 2220
tgacaagaag acctcacaga ctcaaaataa ataggaaaaa ctcatacata aatactgtcc 2280
cgttccaaca ctgagactct cagtcatgca gaaaacaaat tgaggcattg agtggaggca 2340
aagggcactt ctgcaggaac tgaccctcaa attagggtt ctcaaccctg cttcctagga 2400

```

tgagcaatgg atgatttgct tggaggctcc ttgttcagaa gtatcctttc tccctgtcac 2460
 aggcgtcgat gagccccca ggcatttgaa agtatcaagg tctccctcca ggctccctgt 2520
 ttgactccat ctttcttcat tctcctcctc tgctttcgcc aggttccatt ttcagtgttt 2580
 gggcctttta agtcccacat tgcctgcac ccacggggcc attccttcct cttgtcacgc 2640
 tcagccccga tgaacccta aaccacaggt tgagaatccc tgcttgaaga tcagaagttc 2700
 caatgtctga ttacgtctcc tccaaatgtg tatcactttg cttctttgag tttgtatctt 2760
 ggatgccaca ttttttcaca tccatcattc tcccttttct taaacggaag atgaatgtca 2820
 gtgctacacc aaggcataat aagatggctc ccagaattac caagtgagtc ctttcatttg 2880
 gaggatgtgc cagaggtagt tctgggatga ccaattcagc tgtatggttt tcctcaggat 2940
 ctaatctcct aaaagtgcag tagaaaatct cattagtgtt tgtgttgatt ctcagtgtgc 3000
 tggtcacatt gaaaagcttc tcctctctct tggaattggt ggtggtggtc ttaccactca 3060
 ggacttgatg gtcaactgct gtccagatga cttcggcctt ggggtagccc tcagcctgac 3120
 atgtcagttc atgttcagag gtgactggat ccacaacca aattcttttg ttgattttgt 3180
 tgtatggggc gttcagcaaa tgccagtagg tcatgaatat aaagacagca aatatcctca 3240
 tctttctgga atgccctgca ggcggacaga agcgcggctg gtgcggagcc tcgggaagct 3300
 gcgcagaact ggggccgcgc gggacgcgcc agctgctcag cgttgccgc 3349

<210> 3

<211> 3566

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 3

tggccccaa gcctcatgcc aggctgcact tgcacgtcgc gggccagtct cctcgcctgc 60
 agcgtttact atcacggctc caaaggactt gtacgtgggt gagtatggca gcaacgtcac 120
 gatggagtg agattccctg tagaacggga gctggacctg cttgcgttag tgggtgactg 180
 ggaaaaggaa gatgagcaag tgattcagtt tgtggcagga gaggaggacc ttaagcctca 240
 gcacagcaac ttcaggggga gagcctcgct gccaaaggac cagcttttga agggaaatgc 300
 tgcccttcag atcacagacg tcaagctgca ggacgcaggc gtttactgct gcataatcag 360
 ctacgggtgg gcgactaca agcgaatcac gctgaaagtc aatgccccat accgcaaaat 420
 caaccagaga atttccgtgg atccagccac ttctgagcat gaactaatat gtcaggccga 480
 gggttatcca gaagctgagg taatctggac aaacagtgac caccaaccgc tgagtgggaa 540
 gagaagtgtc accacttccc ggacagaggg gatgcttctc aatgtgacca gcagtctgag 600
 ggtcaacgcc acagcgaatg atgttttcta ctgtacgttt tggagatcac agccagggca 660
 aaaccacaca gcggagctga tcatcccaga actgcctgca acacatctc cacagaacag 720
 gactcactgg gtgcttctgg gatccatcct gttgttctc attgtagtgt ccacggctct 780
 cctcttcttg agaaaacaag tgagaatgct agatgtggag aatgtggcg ttgaagatac 840
 aagctcaaaa aaccgaaatg atacacaatt cgaggagacg taagcagtgt tgaacctct 900
 gatcgtcgat tggcagcttg tggctgtga aagaaaggc ccatgggaca tgagtccaaa 960
 gactcaagat ggaacctgag ggagagaacc aagaaagtgt tgggagagga gcctggaaca 1020
 acggacattt tttccaggga gacactgcta agcaagttgc ccatcagtcg tcttgggaaa 1080

```

tggattgagg gttcctggct tagcagctgg tccttgcaca gtgacctttt cctctgtctca 1140
gtgccgggat gagagatgga gtcattgagtg ttgaagaata agtgccttct atttattttg 1200
agtctgtgtg ttctcacttt gggcatgtaa ttatgactgg tgaattctga cgacatgata 1260
gatcttaaga thtagtcacc aaactcaact gctgcttagc atcctccgta actactgata 1320
caagcaggga acacagaggt cacctgcttg gtttgacagg ctcttgctgt ctgactcaaa 1380
taatctttat ttttcagtcc tcaaggtctt tcgatagcag ttgttctgta tcagccttat 1440
aggtgtcagg tatagcactc aacatctcat ctattacaa tagcaaccct catcaccata 1500
gcaacagcta acctctgtta tcctcacttc atagccagga agctgagcga ctaagtcact 1560
tgcccacaga gtatcagctc tcagatttct gttcttcagc cactgtcctt tcaggataga 1620
atttgtcggt aagaaattaa tttaaaaact gattattgag tagcattgta tatcaatcac 1680
aacatgcctt gtgcaactgt ctggcctctg agcataaaga tgtacgccgg agtaccggtc 1740
ggacatgttt atgtgtgtta aatactcaga gaaatgttca ttaacaagga gcttgcattt 1800
tagagacact ggaaagtaac tccagttcat tgtctagcat tacatttacc tcatttgcta 1860
tccttgccat acagtctctt gttctccatg aagtgtcatg aatcttgttg aatagttctt 1920
ttatttttta aatgtttcta tttaaatgat attgacatct gaggcgatag ctgatttgg 1980
aaaacccttt cctcacaagt gtgaaaccct gagtcttctc cctagaacct acataaaaaa 2040
cagttgcgta tgtttgtgca tgcttttgat ccagcacta gggaggcaga ggcaggcaga 2100
tcctgagctc tcattgacca ccagcctag cctacatggt tagctccagg cctacaggag 2160
ctggcagagc ctgaaaaacg atgcctagac acacacacac acacacacac acacacacac 2220
acacacacac accatgtact catagacct agtgcacct cctacacatg cacacacata 2280
caattcaaac acaaatcaac aggaattgt ctgagaatgg tcccaagac aaagaagaag 2340
aaaaacacca aaccagctct attccctcag cctatctct ctactccttc ctagaagcaa 2400
ctactattgt ttttgtatat aaatttacc aacgacagtt aatatgtaga atatatatta 2460
aagtgtctgt caatatatat tatctcttc tttcttctt ctttcttct tttcttctt 2520
tcttcttct tttcttctt tcttcttct tcttcttct ctttcttct tcttcttct 2580
ccttcttct tttcttctt tcttcttct tcttcttct tcttcttct tcttcttct 2640
atgcattttc tgtgctcttc gcccttttta ttaattgtat ggatatttat gctgcttcca 2700
gaatggatct aaagctcttt gtttctaggt tttctcccc atccttctag gcatctctca 2760
cactgtctag gccagacacc atgtctgctg cctgaatctg tagacacat ttataaagca 2820
cgtactcacc gagtttgtat ttggcttgt ctgtgtctga ttaaaggag accatgagtc 2880
cccagggtac actgagttac ccagtagca agggggagcc ttgtttgtgt ctccatggca 2940
gaagcaggcc tggagccatt ttggtttct cttgacttc tctcaaacac agacgcctca 3000
cttgcctatt acaggttctc ctttgggaat gtcagcattg ctcttgact gctggctgcc 3060
ctggaaggag ccatttagct ctgtgtgagc cttgacagc tactgcctct cttaccaca 3120
ggggcctcta agatactgtt acctagaggt cttgaggatc tgtgttctct ggggggagga 3180
aaggaggagg aaccagaac tttcttacag ttttcttct tctgtcacat gtcaagactg 3240
aaggaacagg ctgggctacg tagtgagatc ctgtctcaa ggaaagacga gcatagccga 3300
acccccggtg gaacccccct tgttacctgt tcacacaagc ttattgatga gtctcatgtt 3360
aatgtcttgt ttgtatgaag ttttaaaaa tatcgggttg ggcaacacat tctatttatt 3420

```

cattttatatt gaaatcttaa tgccatctca tgggtgttga ttggtgtggc actttattct 3480
 tttgtgttgt gtataacat aaattttatt ttgcatcaga ttgtcaatgt attgcattaa 3540
 ttttaataaat atttttattt attaaa 3566

<210> 4

<211> 3566

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 4

tttaataaat aaaaaatattt attaaattaa tgcaatacat tgacaatctg atgcaaaata 60
 aaattttatgg ttatacacia cacaaaagaa taaagtgcc caaccaatcca acaccatgag 120
 atggcattaa gatttcaaat aaaatgaata aatagaatgt gttgccaac ccgatatttt 180
 cttaaacttc atacaaacia gacattaaca tgagactcat caataagctt gtgtgaacag 240
 gtaacagagg ggggtccacc ggggggttcg ctatgctcgt ctttcctttg agacaggatc 300
 tcactacgta gcccagcctg ttccttcagt cttgacatgt gacagaacia ggaaaactgt 360
 aagaaagttc tgggttcctc ctcttttcct ccccccagag aacacagatc ctcaagacct 420
 ctaggtaaca gtatcttaga ggcccctgtg gtaaggagag gcagtagctg tcaagggtc 480
 acacagagct aatgggctcc ttccaggga gccagcagtc aaggagcaat gctgacattc 540
 ccaaaggaga acctgtaatg agcaagttag gcgtctgtgt ttgagagaag tcaaggaaga 600
 aacaaaaatg gctccaggcc tgcttctgcc atggagacac aaacaaggct ccccttgggt 660
 actggggtaa ctcatgttac cctggggact catggtctcc ctttaatcag acacagaaca 720
 agccaaatac aaactcgggt agtacgtgct ttataaatgg tgtctacaga ttcaggcagc 780
 agacatgggt tctggcctag acagtgtgag agatgcctag aaggatgggg gagaaaacct 840
 agaaacaaaag agcttttagat ccattctgga agcagcataa atatccatac attaaataaa 900
 aagggcgaag agcacagaaa atgcatagt agcaaccatt taggtacaga tagacagaaa 960
 aaaagaaaga aagaaagaaa ggaaggaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aaggaagaaa 1020
 gaaagaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa gaaaggaaga aagaaagaaa 1080
 gagataatat atattgacag acactttaat atatattcta catattaact gtcgttgggt 1140
 aaattttatat acaaaaaacia tagtagttgc ttctaggaag gagtagagag gataggctga 1200
 gggaatagag ctggttttgt gtttttcttc ttctttgtct tggggacat tctgagacia 1260
 ttccctgttg atttgtgtt gaattgtatg tgtgtgcatg tgtaggaggg tgcacttagg 1320
 tctatgagta catggtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtct 1380
 aggcatcgtt tttcaggctc tgccagctcc tgtaggcctg gagctaacca tgtaggctag 1440
 gctgggttgt caatgagagc tcaggatctg cctgcctctg cctccctagt gctgggatca 1500
 aaagcatgca caaacatacg caactgtttt ttatgtgggt tctaggata agactcaggg 1560
 tttcacactt gtgaggaaa gggtttacca actgagctat cgcctcagat gtcaatatca 1620
 tttaaataga aacatttaaa aaataaaaga actattcaac aagattcatg acatttcag 1680
 gagaacaaga gactgtatgg caaggatagc aatgaggt aatgtaatgc tagacaatga 1740
 actggagtta ctttccagt tctctaaaat gcaagctcct tgtaaatgaa catttctctg 1800
 agtatattaac acacataaac atgtccgacc ggtactccgg cgtacatctt tatgctcaga 1860

ggccagcaca gtgcacaagg catgtttgtga ttgatataca atgctactca ataatacagtt 1920
 ttttaaattaa tttcttaacg acaaattcta tcctgaaagg acagtggctg aagaacagaa 1980
 atctgagagc tgatactctg tgggcaagtg acttagtcgc tcagcttcct ggctatgaag 2040
 tgaggataac agagggttagc tgttgctatg gtgatgaggg ttgctattgt aatgagatga 2100
 gatgttgagt gctataacctg acacctataa ggctgataca gaacaactgc tatcgaagag 2160
 ccttgaggac tgaaaaataa agattatttg agtcagacag caagagcctg tcaaaccaag 2220
 cagggtgacct ctgtgttccc tgcttgatc agtagttacg gaggatgcta agcagcagtt 2280
 gagtttggtg actacatctt aagatctatc atgtcgtcag aattcaccag tcataattac 2340
 atgccccaaag tgagaacaca cagactcaaa ataaatagaa ggcacttatt cttcaacact 2400
 catgactcca tctctcatcc cggcactgag cagaggaaaa ggtcactgtg caaggaccag 2460
 ctgctaagcc aggaaccctc aatccatttc ccaagacgac tgatgggcaa cttgcttagc 2520
 agtgtctccc tggaaaaaat gtccgttggt ccaggtcct ctcccaacac tttcttggtt 2580
 ctctccctca ggttccatct tgagtctttg gactcatgtc ccatgggccc tttctttcac 2640
 agaccacaag ctgccaatcg acgatcagag ggttcaacac tgcttacgtc tctcgaatt 2700
 gtgtatcatt tcggtttttt gagcttgat cttcaacgcc acatttctcc acatctagca 2760
 ttctcacttg ttttctcaag aagaggagga ccgtggacac tacaatgagg aacaacagga 2820
 tggatcccag aagcaccag tgagtccgtg tctgtggagg atgtgttgca ggcagttctg 2880
 ggatgatcag ctccgctgtg tggttttgcc ctggctgtga tctccaaaac gtacagtaga 2940
 aaacatcatt cgctgtggcg ttgaccctca gactgctggt cacattgaga agcatccct 3000
 ctgtccggga agtggtgaca cttctcttcc cactcacggg ttggtggtca ctgtttgtcc 3060
 agattacctc agcttctgga taaccctcgg cctgacatat tagttcatgc tcagaagtgg 3120
 ctggatccac ggaaattctc tggttgattt tgcggtatgg ggcattgact ttcagcgtga 3180
 ttcgcttgta gtccgcacca ccgtagctga ttatgcagca gtaaagcct gcgtcctgca 3240
 gcttgacgtc tgtgatctga agggcagcat ttcccttcaa aagctggtcc tttggcagcg 3300
 aggctctccc cctgaagttg ctgtgctgag gcttaaggtc ctctctcct gccacaaact 3360
 gaatcacttg ctcatcttcc ttttcccagt acaccactaa cgcaagcagg tccagctccc 3420
 gttctacagg gaatctgcac tccatcgtga cgttgctgcc atactccacc acgtacaagt 3480
 cctttggagc cgtgatagta aacgctgcag gcgaggagac tggcccgca cgtgcaagt 3540
 cagcctggca tgaggcttg ggacca 3566

<210> 5

<211> 3706

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 5

tctttgctac ggataagacc aggaaatcgc cctccccagc ctccagccag gctgcagcta 60
 cgcgacttgc cagtctcctc gcctacaggt aagtctcaaa ccatgaggat atttgctgtc 120
 cttatagtca cagcctgcag tcacgtgcta gcggcattta ccatcacagc tccaaaggac 180
 ctgtacgtgg tggagtatgg cagcaatgtc acgatggaat gcagattccc agtagaacag 240
 aaattggacc tgcttgctt agtggtgtac tgggaaaagg aagacaagga agttattcag 300

```

tttgtggagg gagaggagga cctgaagcct caacacagca gcttcagggg gagagccttc 360
ttgccaaagg accagctttt gaaggggaac gcggtgcttc agatcacaga tgtcaagctg 420
caggacgcag gtgtctactg ctgcatgata agctatgggt gagcggacta caagcgaatc 480
acattgaaag tcaacgctcc ataccgcaa atcaaccaa gaatttccat ggatccagcc 540
acttctgagc atgaactaat gtgccaggct gagggttacc cagaagccga agtgatctgg 600
acaaacagtg accaccagtc cctgagtggg gaaacaactg tcaccacttc ccagactgag 660
gagaagcttc tcaacgtgac cagcgttctg aggggtcaacg caacagctaa tgatgttttc 720
cactgtacgt tctggagagt acactcaggg gagaaccaca cggctgaact gatcatccca 780
gaactgcctg taccacgtct cccacataac aggacacact ggggtactcct gggatccgtc 840
cttttgttcc tcatcgtggg gttcacctgc ttcttctgct tgagaaaaca agtgagaatg 900
ctagatgtgg aaaaatgcgg cttcgaagat agaaattcaa agaaccgaaa tgatacacag 960
ttcgaggaga cgtaagcagt gttgaaccct ctgagcctcg aggcgggatt ggcagcttgt 1020
ggctctgtgaa agaaagggcc cgtgggacat ggggtccaggg actcaaaaat ggaaccggag 1080
aggagaagag aacaaagaaa gtgttggaag aggagcctgg gacgaaagac atttctacag 1140
gagacactgc taagcaagtt acccatcagt catctcgggc aataagttga gggttcctca 1200
ttttaacagc tggtcctcgc acaagtacc tttctctcta cccagtgcct ggatgagagg 1260
cagagtcaca agtggtgaag tgtgagtgcc ttctatttac ttccagtccg tgtgttcttg 1320
ctgtgggcat gtggttatga ctagtgacat aataggcgtt aaaatgcagt caccaaactc 1380
aactgctgct tagcatcctc tgtaactact ggcacaagca ggaaacgtgg aggtcacatg 1440
gttcgtttga cgggctcttg ctgtccgact tgagtaatct tcattctcag gcctcaaggt 1500
tctgcagtag tagttgttct ctttaaatat ctgctttaca agtggtgggt actatactca 1560
aacatcttat tcatcacca tggcaaccct catactaacc tctgtcatac tcccttcata 1620
gccaaagcgc tgagtgtctg agtaacttga ccacaaaatg acagctatca gatttctatt 1680
tttcagacac tgtcctttca ggatagaatt tgtagctaag aatttaataa taacaaaaaa 1740
accccgttta ttaggcactt ccacaccaca ccatgccttg tgcactgctc tggcctctga 1800
cagagaagga agccagagtg ccggtcggat ttgcttatgt gtgttcaata ctcaaatcaa 1860
tgctcattaa catggagtct gcattttaaa gacactctcc agttctttgt ctagcattat 1920
atttacctct aatctgttat ccctgccaaa caatctcatg ttctccatga agtgtctagt 1980
cttgttgagt agttcttttt ttttttttc tatttaaatg atattgacat ctgaggagac 2040
agctcagttg gtagaattct ttccttaca gtgggaaacc ctgttttatc ccagaaccc 2100
acataaaaaa cagttgcgta tatctgtgca tgcttaatcc aagcactagg gaggcagaga 2160
caggcagatc tctagctctc accgatcagc cagctccagg tctacaagag ctgacagtgc 2220
ctgagaaaca tgtctacaca cacacacata cacactctca catacatgga ccatgtactc 2280
atacacctaa gtggactctc ttagtgaaca cacatacaat ggtccccaag acaaaacaaa 2340
acaaaaaaa aataaaccaa actagctcta ttccatcagc ctagccatgc tactcccttc 2400
ccagaagcaa ctgctattgt ttttgacat atattttctt aaagacagtt aatatgtata 2460
aatctttgtt aaagtatgtc tgtctgtctg cctgcctgcc tacctatcta cctatctatc 2520
tatccatcca tccatccatc catccacca tctgtccatc cgtctgtctg tccatctgtc 2580
tgtctatcta cctatctacc tactacata cctatcatct gtctgtctgt ctttcctaaa 2640

```

```

tggtatagga aaactgtacg ttttctatgc actttgcctt tttcatttag tgtattgata 2700
cttatgctgc ttccagactg atctaaagat ccataaagag aactgcctca tttctagggt 2760
ttctttccca tccctctagg cacctctcac actgtctagg ccagacactt gctgcctgta 2820
tctgtagaca tcatttataa agtgtgtact caccgagttt gtgtctactc aaaggagggc 2880
catgggtccc cagggtcact gagtcaaccc agtaccaagg tggagccttg tatctccatg 2940
gcagaagcaa atctggggcc atttctgttt cttccttgac ttcttttcta aaacacagat 3000
gctctaatta cttattacag gttgtccctg gtaatgtcag cattgctcct agacttctgg 3060
gtgccctgga aaagcccgtt agctctgtgt gaacccttaa ggcagctgtc tctccttacc 3120
tcatagacac tgtttcctgg agggtttgag atactgtttc caaaagggtg tcacttgggc 3180
gaggagggga gggggagccc agaactttgt tactattttc tttgttttgt cacatgtcaa 3240
ggctgaagaa agagcctggg tatgttggcg catgtctcca gttgcaggca gaggcagggtg 3300
gatctctgtg agtttgtggc cagcctggtc tccatagtga attctaagcc agccagggtc 3360
cggttacata gtgagatccc gtctcaaagg aaagactggc ctatcagaac cccagtgaa 3420
acccttctg ttacttgttc acacatgttt gttgatgatt ctcgtgttaa tgtcttgttt 3480
gtatgacgtt caagaaaaga tctggttggg caacacattg tatttattca tcttattcaa 3540
aatcttaatg ccatctcatg gcattggatt ggtatggcac tttattcttt tgtgttctgt 3600
ataaccacaa atggaaatth tttttgtgt ctgattgtca ttgtattgca ttaatttaat 3660
aagatattat ttattaaaaa catttgattt ttttcttttt taaaaa 3706

```

<210> 6

<211> 3706

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 6

```

tttttaaaaa agaaaaaat caaatgtttt taataaataa tatcttatta aattaatgca 60
atacaatgac aatcagacac aaaataaaat ttccatttgt ggttatacag aacacaaaag 120
aataaagtgc cataccaatc caatgccatg agatggcatt aagattttga ataagatgaa 180
taaatacaat gtgttgccca accagatctt ttcttgaacg tcatacaaac aagacattaa 240
cacgagaatc atcaacaaac atgtgtgaac aagtaacaga aggggtttca ctgggggttc 300
tgataggcca gtctttcctt tgagacggga tctcactatg taaccgagcc ctggctggct 360
tagaattcac tatggagacc aggctggcca caaactcaca gagatccacc tgcctctgcc 420
tgcaactgga gacatgcgcc aacataacca ggctctttct tcagccttga catgtgacaa 480
aacaaagaaa atagtaacaa agttctgggc tccccctccc ctctcgcgcc aagtgaacac 540
cttttggaag cagtatctca aacctccag gaaacagtgt ctatgaggta aggagagaca 600
gctgccttaa gggttcacac agagctaacg ggcttttcca gggcaccagc aagtctagga 660
gcaatgctga cattaccagg gacaacctgt aataagtaat tagagcatct gtgtttttaga 720
aaagaagtca aggaagaaac agaaatggcc ccagatttgc ttctgcatg gagatacaag 780
gctccacctt ggtactgggt tgactcagt accctgggga cccatggcct ccttttgagt 840
agacacaaac tcggtgagta cacactttat aaatgatgtc tacagataca ggcagcaagt 900
gtctggccta gacagtgtga gaggtgccta gagggatggg aaagaaaacc tagaaatgag 960

```

gcagttctct ttatggatct ttagatcagt ctggaagcag cataagtatc aatacactaa 1020
 atgaaaaggg caaagtgc atgaaaacgta cagttttcct ataccattta ggaaagacag 1080
 acagacagat gataggatg taggtaggta gataggtaga tagacagaca gatggacaga 1140
 cagacggatg gacagatggg tggatggatg gatggatgga tggatagata gataggtaga 1200
 taggtaggca ggcaggcaga cagacagaca tactttaaca aagatttata catattaact 1260
 gtctttaaga aaatatatgt gcaaaaacaa tagcagttgc ttctgggaag ggagtagcat 1320
 ggctaggctg atggaataga gctagtttgg tttatttttt ttttgttttg ttttgtcttg 1380
 gggaccattg tatgtgtgtt cactaagaga gtccacttag gtgtatgagt acatgggtcca 1440
 tgtatgtgag agtgtgtatg tgtgtgtgtg tagacatgtt tctcaggcac tgtcagctct 1500
 tgtagacctg gagctggctg atcgggtgaga gctagagatc tgcctgtctc tgcctcccta 1560
 gtgcttggat taagcatgca cagatatagc caactgtttt ttatgtgggt tctggggata 1620
 aaacagggtt tcccacttgt aaggaaagaa ttctaccaac tgagctgtct cctcagatgt 1680
 caatatcatt taaatagaaa aaaaaaaaaa agaactactc aacaagacta gacacttcat 1740
 ggagaacatg agattgtttg gcagggataa cagattagag gtaaataata tgctagacaa 1800
 agaactggag agtgtcttta aaatgcagac tccatgttaa tgagcattga tttgagtatt 1860
 gaacacacat aagcaaatcc gaccggcact ctggcttctt tctctgtcag aggccagagc 1920
 agtgacaaag gcatggtgtg gtgtggaagt gcctaataag cgggggtttt tttttattat 1980
 taaattctta gctacaaatt ctatcctgaa aggacagtgt ctgaaaaata gaaatctgat 2040
 agctgtcatt ttgtggtcaa gttactcaga cactcagcgt cttggctatg aaggagatg 2100
 gacagagggt agtatgaggg ttgcatggt gatgaaataa gatgtttgag tatagtacc 2160
 aacacttgta aagcagatat ttaaagagaa caactactac tgcagaacct tgaggcctga 2220
 gaatgaagat tactcaagtc ggacagcaag agcccgtaa acgaacctg tgacctccac 2280
 gtttcctgct tgtgccagta gttacagagg atgctaagca gcagttgagt ttggtgactg 2340
 cattttaacg cctattatgt cactagtc ataccatgc ccacagcaag aacacacgga 2400
 ctggaagtaa atagaaggca ctcacacttc aacacttgtg actctgcctc tcatccaggc 2460
 actgggtaga gagaaaggtc acttgtgcga ggaccagctg ttaaaatgag gaaccctcaa 2520
 cttattgccc gagatgactg atgggtaact tgcttagcag tgtctcctgt agaaatgtct 2580
 ttctgcccag gctcctcttc caacacttct tttgttctct tctcctctcc ggttccattt 2640
 ttgagtcctt ggacctatgt cccacgggcc cttcttttca cagaccacaa gctgccaatc 2700
 ccgctcagag gctcagaggg ttcaaacactg cttacgtctc ctgaactgt gtatcatttc 2760
 ggttctttga atttctatct tcgaagccgc atttttccac atctagcatt ctcacttgtt 2820
 ttctcaagca gaagaagacg gtgaaccca cgatgaggaa caaaaggacg gatcccagga 2880
 gtaccagatg tgcctgtta tgtgggagac gtggtacagg cagttctggg atgatcagtt 2940
 cagccgtgtg gttctccctt gactgtactc tccagaacgt acagtggaaa acatcattag 3000
 ctgttgctgt gacctcaga acgtgtgtca cgttgagaag cttctctcga gtctgggaag 3060
 tggtgacagt tgtttcccca ctcagggact ggtggtcact gtttgtccag atcacttcgg 3120
 cttctgggta accctcagcc tggcacatta gttcatgctc agaagtggct ggatccatgg 3180
 aaattctttg gttgattttg cggtatggag cgttgacttt caatgtgatt cgctttagt 3240
 ccgtccacc atagctgatc atgcagcagt agacacctgc gtcctgcagc ttgacatctg 3300

tgatctgaag caccgcgttc cccttcaaaa gctggtcctt tggcaagaag gctctccccc 3360
 tgaagctgct gtgttgaggc ttcaggctcct cctctccctc caciaactga ataacttcct 3420
 tgtcttcctt ttcccagtag accactaagg caagcaggtc caatttctgt tctactggga 3480
 atctgcattc catcgtgaca ttgctgccat actccaccac gtacaggtcc tttggagctg 3540
 tgatggtaaa tgccgctagc acgtgactgc aggctgtgac tataaggaca gcaaatatcc 3600
 tcatggtttg agacttacct gtaggcgagg agactggcaa gtcgcgtagc tgcagcctgg 3660
 ctggaggctg gggagggcga tttcctggtc ttatccgtag caaaga 3706

<210> 7

<211> 3909

<212> DNA

<213> 食蟹猕猴

<400> 7

aaatcaaggt gcgttcagat gttggttgt tgtaaatttc tgtttatatt aataacatac 60
 caaatgtgga tttgttttaa tcttcggaac tctttccggt gaaaacctca ttacaagaa 120
 aactggactg acaggtttca ctttctgttt catttctata catagcttta ttcttaggac 180
 accaacacca ctcgctaccc aaactgaaag cttccccgat tccgccgaag gtcaggaaag 240
 tccaatgccg ggcaaaactgg atttgctgcc ttgcgcagag gtgggcggga cccgcctcc 300
 gggccgggcg ccaagttgag cagctggcac gcctcgcgaa gccccagtcc tgaagcccca 360
 gtctcgcgct gcttcccag gctccgcacc agccgcgctt ctctctgcct gcagcacatt 420
 ccagaaagat gaggatattt gctgtcttta tattcacgat ctactggcat ttgctgaatg 480
 catttactgt cacggttccc aaggacctat atgtggtaga gtatggcagc aatatgacaa 540
 ttgaatgcaa attcccagta gaaaaacaat tagacctgac ttcactaatt gtctattggg 600
 aaatggagga taagaacatt attcaatttg tgcatggaga ggaagacctg aaggttcagc 660
 atagtaacta cagacagagg gccagctgt tgaaggacca gctctccctg ggaaatgctg 720
 cacttcggat cacagatgtg aaattgcagg atgcaggggt ttaccgctgc atgatcagct 780
 atggtgggtg cgactacaag cggattaccg tgaaagtcaa tgctccatac aacaaaatca 840
 accaaagaat tttggttgc gatccagtca cctctgaaca tgaactaaca tgtcaggctg 900
 agggtaccc caaggccgaa gtcatttga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggta 960
 agaccaccac caccaattcc aagagagagg agaagctttt aaatgtgacc agcactga 1020
 gaatcaacac aacagctaag gagattttct actgcatttt taggagatta gatcctgagg 1080
 aaaaccatac agctgaattg gtcacccag aactacctct ggcgcttcct ccaaataaaa 1140
 ggactcactt ggtaattctg ggagccatct ttttactcct tgggtgtagca ctgacattca 1200
 tcttctattt aagaaaaggg agaattgatg atatgaaaa atgtggcatt cgagttacaa 1260
 actcaaagaa gcaacgtgat acacaattgg aggagacgta atccagcatt ggaacttctg 1320
 atcttcaagc agggattctc agcctgtggt ttgggggttc gtcagggtg agcatgacca 1380
 gaggaatgaa tgggcccgtg ggatgcatgc agtatgggac ttaaaaggcc caagcactga 1440
 aaatggaacc tggcgaaagc agaggaggag aatgaagaaa aatggagttg aacagggagc 1500
 gtggagggag accttgatac tttcaaatgc ctgaggggtc catcggtgca tgtgacaggg 1560
 agaaaggata cttctgaaca aggagcctcc aagcaaatca tccactgctc atcttaggaa 1620

```

aacgggttga gaatccctaa tttgagggtc agttcctgca gaagtgcctt ttgcctccac 1680
tcaatgcctc aatttgtttt ctgcgtgact gaggtgccca gtgttggaac agtatttatg 1740
tatgagattt tcctatttat tttgagtctg tgaggcttct ttgtcatggg agtgtggttg 1800
tgaatgattt cttttgaaga tatattgtag tagatgttac aattttgtcg ccaaactaaa 1860
cttgatgctt aatgacttgc tcacatctag taaaacatgg agtatttgta aggtgcttgg 1920
tctcctctat aactacaagt acacattgga agcataaaga tcaaaccgtt gatttgtata 1980
ggatgtcacc tttatttaac ccattaatac tctgattgac ttaatcttat tctcagacct 2040
caagtgtctg tgcagtatct gttccattta aatatcagct ttataattat gtggtacat 2100
acacacataa tctcctttca tcgctgtaac caccctgttg tgatgaccac tattatttta 2160
cccattgtac agctgaggaa gcaaacagat taagtaactt gccaaaacca gtaaatagca 2220
gagctcagac tgccaccac tgtcctttta taatacaatt tacagctata ttttacttta 2280
agcaattcat ttattcaaaa cccatttatt aagtgcctt gcaatatcaa tcaactgtacc 2340
aggcattgaa tctacagatg tgagcaagag aaagtacctg tcctcaagga gcttgagta 2400
taataaggag attaataaga aaatatatta ttacaatcta gtccagtgtc atagcataag 2460
gatgatgtga ggagaaaagc tgagcagtgt tgccaagagg aggaaatagg ccaatgtggt 2520
ctgggacagt tgaatgtatt taaacatctt aataatcaa gtaattttca tttacaaaga 2580
gaagtcagta cttaaaataa cctgaaaaa taacactgga attccttttc tagcattata 2640
tttatccctg atttgccttt gccatacaat ctaatgcttg tttatatagt gtctgatatt 2700
gtttaacagt tctgtctttt ctattcaaat gctattaaat tttaaattca tacctttcca 2760
tgattcaaaa ttcaaaagat cccatgggag atggtttgaa aatctccact tcatectcca 2820
agccattcaa gtttcctttc cagaagcaac tgctactgcc ttttattcat atgttcttct 2880
aaagatagtc tacatttggg aatgtatgtt aaaagcatat atttttaaat tttttccct 2940
aaatagtaac acattatatg tctgctgtgc actttgctat tttatttat tgtagtgtt 3000
cttatgtagc agatggaatg aatttgaagc tccaagggt caggacacat gccttctttg 3060
tttctaagtt atctttccca tagcttttca taatctttca tatgatttag tacatgttaa 3120
atatgtgcta catatacatt tagacaacca gcatttgta agtatttgct ctaggactga 3180
gtttggattt atgtttgctc aaaaggagac ccatgggctc tccagggtgc actgagtcaa 3240
tctagtccta aaaagcaatc ttattattaa ctctgtatga cagaatcata tctggaactt 3300
ttgttttctg ctttctgtca agtataaact tcactttgat gctgtacttg caaaatcaca 3360
ttttctttct ggaaattcca gtagtgtagc ttgactgcta gttaccctgt gccagaaaag 3420
cctcattcgt tgtgcttgaa ccttttaatg ccaccagctg tcactactac acaggcctcc 3480
taaggagctt cctggaggtt ttgagattca gatgcctga gagatcccag agtttctttt 3540
ccctcttggc cacattctgg tgtcagtgc aaggaatacc ttcgctttgc caccgtcaa 3600
ggttgaagaa acagcgtctc caacagagct cttgtgtta tctgtttgta catgtgcatt 3660
tgtacagtaa tttgtgtgac agtgttcttt gtgtgaatta caggcaagaa ctgtggctga 3720
gcaaggcaca tagtctactc agtctattcc taactctcc ttttggtgtt ggatttgtaa 3780
ggcactttat cccttttgc tcatgtttca tcgtaaatgg cataggcaga gatgatatt 3840
aattctgcat ttgattgtca cttttgtac ctgcattaat ttaataaaat atccttattt 3900
attttgtta 3909

```

<210> 8

<211> 3909

<212> DNA

<213> 食蟹猕猴

<400> 8

```

taacaaaata aataaggata ttttattaaa ttaatgcagg tacaaaaagt gacaatcaaa 60
tgcagaatta gatatcatct ctgcctatgc catttacgat gaaacatgag acaaaaggga 120
taaagtgcct tacaaatcca acaccaaaaag gaggagttag gaatagactg agtagactat 180
gtgccttgct cagccacagt tcttgctgt aattcacaca aagaacactg tcacacaaat 240
tactgtacaa atgcacatgt acaaacagat aacacaagga gctctgttgg agacgctgtt 300
tcttcaacct tgacgggtgg caaagcgaag gtattccttg tcaactgacac cagaatgtgg 360
ccaagaggga aaggaaactc tgggatctct cagggcactc gaatctcaaa acctccagga 420
agcctcttag gaggcctgtg tagtgatgac agctggtggc attaaagggt tcaagcaca 480
cgaatgaggc ttttctggca cagggttaact agcagtcaag gtacactact ggaatttcca 540
gaaagaaaat gtgattttgc aagtacagca tcaaagtga gtttatactt gacagaaagc 600
agaaaacaaa agttccagat atgattctgt catacagagt taataataag attgcttttt 660
aggactagat tgactcagtg caccctggag agcccatggg tctccttttg agcaaacata 720
aatccaaact cagtcctaga gcaaatactt aacaaatgct ggttgtctaa atgtatatgt 780
agcacatatt taacatgtac taaatcatat gaaagattat gaaaagctat gggaaagata 840
acttagaaac aaagaaggca tgtgtcctga cccttgggag cttcaaattc attccatctg 900
ctacataaga aacactacaa taaataaaaa tagcaaagtg cacagcagac atataatgtg 960
ttactattta gggaaaaaaa tttaaaaata tatgctttta acatacattt ccaaattgtag 1020
actatcttta gaagaacata tgaataaaag gcagtagcag ttgcttctgg aaaggaaact 1080
tgaatggcct ggaggatgaa gtggagattt tcaaaccatc tcccatggga tcttttgaat 1140
tttgaatcat ggaaaggat gaatttaaaa tttaatagca tttgaataga aaagacagaa 1200
ctgttaaaca atatcagaca ctatataaac aagcattaga ttgtatggca aaggcaaact 1260
agggataaat ataatgctag aaaaggaatt ccagtgttat ttttcagggt tattttaagt 1320
actgacttct ctttgtaaact gaaaattact ttgattatta agatgtttta atacattcaa 1380
ctgtcccaga ccacattggc ctatttctc ctcttggcaa cactgctcag cttttctcct 1440
cacatcatcc ttatgctatg acaactggact agattgtaat aatatatttt cttattaatc 1500
tccttattat actccaagct ccttgaggac aggtactttc tcttgctcac atctgtagat 1560
tcaatgcctg gtacagtgat tgatattgca agggcactta ataaatgggt tttgaataaa 1620
tgaattgctt aaagtaaaat atagctgtaa attgtattat aaaaggacag tgggtggcag 1680
tctgagctct gctatttact ggttttggca agttacttaa tctgtttgct tcctcagctg 1740
tacaatgggt aaaataatag tggtcacac aacagggtgg ttacagcgat gaaaggagat 1800
tatgtgtgta tggtaggaca taattataaa gctgatattt aatggaaca gatactgcac 1860
agacacttga ggtctgagaa taagattaag tcaatcagag tattaatggg ttaaataaag 1920
gtgacatcct atacaaatca acggtttgat ctttatgctt ccaatgtgta cttgtagtta 1980
tagaggagac caagcacctt acaaatactc catgttttac tagatgtgag caagtcatta 2040

```

agcatcaagt ttagtttggc gacaaaattg taacatctac tacaatatat cttcaaaaga 2100
 aatcattcac aaccacactc ccatgacaag aagacctcac agactcaaaa taaataggaa 2160
 aatctcatac ataaatactg ttccaacact gggaccctca gtcacgcaga aaacaaattg 2220
 aggcatlgag tggaggcaaa gggcacttct gcaggaactg accctcaaat tagggattct 2280
 caacccgttt tcctaagatg agcagtggat gatttgcttg gaggtcctt gttcagaagt 2340
 atcctttctc cctgtcacat gcaccgatga gccctcagg catttgaaag tatcaaggctc 2400
 tccctccacg ctccctgttc aactccattt ttcttcattc tcctcctctg ctttcgccag 2460
 gttccatttt cagtgttgg gccttttaag tcccatactg catgcatccc acgggcccac 2520
 tcattcctct ggcatgctc agccctgacg aacccccaaa ccacaggctg agaatccctg 2580
 cttgaagatc agaagttcca atgctggatt acgtctctc caattgtgta tcacgttgct 2640
 tctttgagtt tgtaactcga atgccacatt ttttcatac catcattctc ctttttctta 2700
 aatagaagat gaatgtcagt gctacaccaa ggagtaaaaa gatggctccc agaattacca 2760
 agtgagtcct ttcatltgga ggaagcgcca gaggtagttc tgggatgacc aattcagctg 2820
 tatggttttc ctcaggatct aatctcctaa aaatgcagta gaaaatctca ttagctgttg 2880
 tgttgattct cagtgtgctg gtcacattta aaagcttctc ctctctcttg gaattggtgg 2940
 tgggtggtctt accactcagg acttgatggg cactgcttgt ccaaagact tcggccttgg 3000
 ggtagccctc agcctgacat gttagttcat gttcagaggt gactggatcg acaacccaaa 3060
 ttctttgggt gattttgttg tatggagcat tgactttcac ggtaatccgc ttgtagtcgg 3120
 caccaccata gctgatcatg cagcggtaaa cccctgcac ctgcaatttc acatctgtga 3180
 tccgaagtgc agcatttccc agggagagct ggtccttcaa cagctgggcc ctctgtctgt 3240
 agttactatg ctgaacctc aggtcttcct ctccatgcac aaattgaata atgttcttat 3300
 cctccatttc ccaatagaca attagtgaag tcaggctctaa ttgtttttct actgggaatt 3360
 tgcatccaat tgtcatattg ctgccatact ctaccacata taggtccttg ggaaccgtga 3420
 cagtaaatgc attcagcaaa tgccagtaga tcgtgaatat aaagacagca aatctctca 3480
 tctttctgga atgtgctgca ggcagagaga agcgcggctg gtgcggagcc tcgggaagca 3540
 gcgcaggact ggggcttcag gactggggct tcgcgaggcg tgccagctgc tcaacttggc 3600
 gcccgccccg gaggcggggt cccgcccacc tctgcgcaag gcagcaaatac cagtttgccc 3660
 ggcatltgac tttcctgacc ttcggcgga tccgggaagc tttcagtttg gtagcagat 3720
 ggtgttggtg tcctaggaat aaagctatgt atagaaatga aacagaaagt gaaacctgtc 3780
 agtccagttt tcttgtaaat gaggttttca ccggaagag ttccgaagat taaaacaaat 3840
 ccacatttgg tatgttatta atataaacag aaatttaca caagccaaca tctgaacgca 3900
 ccttgattt 3909

<210> 9

<211> 3691

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

ggcgaacgc tgagcagctg gcgcgtcccg cgcggcccca gttctgcgca gcttcccag 60
 gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt 120

```

gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg catttactgt cacggttccc 180
aaggacctat atgtggtaga gtatggtagc aatatgacaa ttgaatgcaa attcccagta 240
gaaaaacaat tagacctggc tgcactaatt gtctattggg aaatggagga taagaacatt 300
attcaatttg tgcattggaga ggaagacctg aaggttcagc atagtagcta cagacagagg 360
gcccggctgt tgaaggacca gctctccctg ggaaatgctg cacttcagat cacagatgtg 420
aaattgcagg atgcaggggt gtaccgctgc atgatcagct atggtggtgc cgactacaag 480
cgaattactg tgaaagtcaa tgccccatac aacaaaatca accaaagaat tttggttgtg 540
gatccagtca cctctgaaca tgaactgaca tgtcaggctg agggctaccc caaggccgaa 600
gtcatctgga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggta agaccaccac caccaattcc 660
aagagagagg agaagctttt caatgtgacc agcacactga gaatcaacac aacaactaat 720
gagattttct actgcacttt taggagatta gatcctgagg aaaaccatac agctgaattg 780
gtcatcccag aactacctct ggacatcct ccaaatgaaa ggactcactt ggtaattctg 840
ggagccatct tattatgcct tgggtgtagc ctgacattca tcttccgttt aagaaaaggg 900
agaatgatgg atgtgaaaaa atgtggcatc caagatacaa actcaaagaa gcaaagtgat 960
acacatttgg aggagacgta atccagcatt ggaacttctg atcttcaagc agggattctc 1020
aacctgtggt ttaggggttc atcggggctg agcgtgacaa gaggaaggaa tgggcccgtg 1080
ggatgcaggc aatgtgggac ttaaaaggcc caagcactga aaatggaacc tggcgaaagc 1140
agaggaggag aatgaagaaa gatggagtca aacagggagc ctggagggag accttgatac 1200
tttcaaatgc ctgaggggct catcgacgcc tgtgacaggg agaaaggata cttctgaaca 1260
aggagcctcc aagcaaatca tccattgctc atcctaggaa gacgggttga gaatccctaa 1320
tttgagggtc agttcctgca gaagtgcctt ttgcctccac tcaatgcctc aatttgtttt 1380
ctgcatgact gagagtctca gtgttggaac gggacagtat ttatgtatga gtttttcccta 1440
tttattttga gtctgtgagg tcttctgtc atgtgagtgt ggttgtgaat gatttctttt 1500
gaagatatat tgtagtagat gttacaattt tgtcgccaaa ctaaacttgc tgcttaatga 1560
tttgctcaca tctagtaaaa catggagtat ttgtaagggtg cttggtctcc tctataacta 1620
caagtataca ttggaagcat aaagatcaaa ccgttggttg cataggatgt cacctttatt 1680
taaccattta atactctggt tgacctaatc ttattctcag acctcaagtg tctgtgcagt 1740
atctgttcca tttaaatata agctttacaa ttatgtggta gcctacacac ataattctcat 1800
ttcatcgctg taaccaccct gttgtgataa ccactattat tttaccatc gtacagctga 1860
ggaagcaaac agattaagta acttgcccaa accagtaaat agcagacctc agactgccac 1920
ccactgtcct tttataatac aatttacagc tatattttac ttttaagcaat tctttttattc 1980
aaaaaccatt tattaagtgc ccttgcaata tcaatcgctg tgccaggcat tgaatctaca 2040
gatgtgagca agacaaaagta cctgtcctca aggagctcat agtataatga ggagattaac 2100
aagaaaatgt attattacaa tttagtccag tgtcatagca taaggatgat gcgaggggaa 2160
aaccggagca gtgttgccaa gaggaggaaa taggccaatg tggctctggga cggttgata 2220
tacttaaaaca tcttaataat cagagtaatt ttcatttaca aagagaggtc ggtacttaaa 2280
ataaccctga aaaataacac tggaattcct tttctagcat tatattttatt cctgatttgc 2340
ctttgccata taatctaagt cttgtttata tagtgtctgg tattgtttaa cagttctgtc 2400
ttttctattt aaatgccact aaattttaaa ttcatacctt tccatgattc aaaattcaaa 2460

```

agatcccatg ggagatgggt ggaaaatctc cacttcatcc tccaagccat tcaagtttcc 2520
 tttccagaag caactgctac tgcctttcat tcatatgttc ttctaaagat agtctacatt 2580
 tggaaatgta tggtaaaagc acgtatTTTT aaaatTTTT tcctaaatag taacacattg 2640
 tatgtctgct gtgtactttg ctatTTTTat ttatTTtagt gtttcttata tagcagatgg 2700
 aatgaatttg aagttcccag ggctgaggat ccatgccttc tttgtttcta agttatcttt 2760
 cccatagctt ttcattatct ttcatatgat ccagtatatg ttaaataatgt cctacatata 2820
 catttagaca accaccattt gttaagtatt tgctctagga cagagtttgg atttgtttat 2880
 gtttgctcaa aaggagaccc atgggctctc cagggtgcac tgagtcaatc tagtcctaaa 2940
 aagcaatctt attattaact ctgtatgaca gaatcatgtc tggaactttt gttttctgct 3000
 ttctgtcaag tataaaactc actttgatgc tgtacttgca aaatcacatt ttctttctgg 3060
 aaattccggc agtgtacctt gactgctagc taccctgtgc cagaaaagcc tcattcgttg 3120
 tgcttgaacc cttgaatgcc accagctgtc atcactacac agccctccta agaggcttcc 3180
 tggaggtttc gagattcaga tgccctggga gatcccagag ttctctttcc ctcttgGCCA 3240
 tattctgggtg tcaatgacaa ggagtacctt ggctttGCCA catgtcaagg ctgaagaaac 3300
 agtgtctcca acagagctcc ttgtgttata tgtttgtaca tgtgcatttg tacagtaatt 3360
 ggtgtgacag tgttctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata 3420
 gtctactcag tctattccta agtcctaact cctccttggt gtgttgatt tgtaaggcac 3480
 tttatccctt ttgtctcatg tttcatcgta aatggcatag gcagagatga tacctaattc 3540
 tgcatttgat tgtcactttt tgtacctgca ttaatttaaat aaaatattct tatttatttt 3600
 gttacttggg acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tgtgtttaat aaaatgttca 3660
 gtttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa a 3691

<210> 10

<211> 3691

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10

ttttttaact ttctccactg ggatgttaaa ctgaacattt tattaacac aaaataaaca 60
 agaaaatgga catgctgggt taccaagtaa caaaataaat aagaatattt tattaatta 120
 atgcaggtag aaaaagtac aatcaaatgc agaattaggt atcatctctg cctatgccat 180
 ttacgatgaa acatgagaca aaagggataa agtgccttac aaatccaaca ccacaaggag 240
 gagttaggac ttaggaatag actgagtaga ctatgtgcct tgctcagcca caattcttgc 300
 ctgtaattca cacaaagaac actgtcacac caattactgt acaaatgcac atgtacaaac 360
 agataacaca aggagctctg ttggagacac tgtttcttca gccttgacat gtggcaaagc 420
 caaggtactc cttgtcattg acaccagaat atggccaaga gggaaaggaa actctgggat 480
 ctcccagggc atctgaatct cgaaacctcc aggaagcctc ttaggagggc tgtgtagtga 540
 tgacagctgg tggcattcaa gggttcaagc acaacgaatg aggcTTTTct ggcacagggt 600
 agctagcagt caaggtacac tgccggaatt tccagaaaga aaatgtgatt ttgcaagtac 660
 agcatcaaag tgaagtttat acttgacaga aagcagaaaa caaaagttcc agacatgatt 720
 ctgtcataca gagttaataa taagattgct ttttaggact agattgactc agtgcacct 780

```

ggagagccca tgggtctcct tttgagcaaa cataaacaac tccaaactct gtcctagagc 840
aaatacttaa caaatggtgg ttgtctaaat gtatatgtag gacatattta acatatactg 900
gatcatatga aagataatga aaagctatgg gaaagataac ttagaaacaa agaaggcatg 960
gatcctcagc cctgggaact tcaaattcat tccatctgct atataagaaa cactaaaata 1020
aataaaaaata gcaaagtaca cagcagacat acaatgtgtt actattttagg aaaaaaattt 1080
taaaaaatacg tgcttttaac atacatttcc aaatgtagac tatctttaga agaacatatg 1140
aatgaaaaggc agtagcagtt gcttctggaa aggaaacttg aatggcttgg aggatgaagt 1200
ggagattttc caaccatctc ccatgggatc ttttgaattt tgaatcatgg aaaggtatga 1260
atttaaaatt tagtggcatt taaatagaaa agacagaact gttaaacaat accagacact 1320
atataaacaac gcattagatt atatggcaaa ggcaaatcag gaataaatat aatgctagaa 1380
aaggaattcc agtgttattt ttcagggtta ttttaagtac cgacctctct ttgtaaatga 1440
aaattactct gattattaag atgtttaagt atatccaacc gtcccagacc acattggcct 1500
atttcctcct ctggaaca ctgctcgggt tttccctcg catcctctt atgctatgac 1560
actggactaa attgtaataa tacattttct tgtaatctc ctctattac tatgagctcc 1620
ttgaggacag gtactttgtc ttgtcacat ctgtagattc aatgcctggc acagcgattg 1680
atattgcaag ggcacttaac aaatggtttt tgaataaaag aattgcttaa agtaaaatat 1740
agctgtaaat tgtattataa aaggacagtg ggtggcagtc tgaggtctgc tattttactg 1800
tttgggcaag ttacttaatc tgtttgctc ctgagctgta cgatgggtaa aataatagtg 1860
gttatcaca cagggtggtt acagcgatga aatgagatta tgtgtgtagg ctaccacata 1920
attgtaaagc tgatatttaa atggaacaga tactgcacag acacttgagg tctgagaata 1980
agattaggtc aaccagagta ttaatgggtt aaataaaggt gacatcctat gcaaccaacg 2040
gtttgatctt tatgcttcca atgtatactt gtagttatag aggagaccaa gcaccttaca 2100
aatactccat gttttactag atgtgagcaa atcattaagc agcaagttaa gtttgcgac 2160
aaaattgtaa catctactac aatatactt caaaagaaat cattcacaac cacactcaca 2220
tgacaagaag acctcacaga ctcaaaataa ataggaaaaa ctcatataa aatactgtcc 2280
cgttccaaca ctgagactct cagtcagca gaaaacaaat tgaggcattg agtggaggca 2340
aagggcactt ctgcaggaaac tgaccctcaa attagggatt ctcaaccgt cttcctagga 2400
tgagcaatgg atgatttgct tggaggtcc ttgttcagaa gtatcctttc tccctgtcac 2460
aggcgctgat gagccccca ggcatttgaa agtatcaagg tctccctcca ggctccctgt 2520
ttgactccat ctttcttcat tctctctc tgctttcgcc aggttccatt ttcagtgtt 2580
gggcctttta agtcccacat tgcttgcac ccacgggccc attccttctt cttgtcacgc 2640
tcagccccga tgaacccta aaccacaggt tgagaatccc tgcttgaaga tcagaagttc 2700
caatgctgga ttacgtctcc tccaaatgtg tatcactttg cttctttgag tttgtatctt 2760
ggatgccaca ttttttcaca tccatcattc tccctttct taaacggaag atgaatgtca 2820
gtgctacacc aaggcataat aagatggctc ccagaattac caagtgagtc ctttcatttg 2880
gaggatgtgc cagaggtagt tctgggatga ccaattcagc tgtatggttt tctcaggat 2940
ctaactctct aaaagtgcag tagaaaatct cattagttgt tgtgttgatt ctgagtgtgc 3000
tggtcacatt gaaaagcttc tctctctct tggaattggt ggtggtggtc ttaccactca 3060
ggacttgatg gtcactgctt gtccagatga cttcggcctt ggggtagccc tcagcctgac 3120

```

atgtcagttc atgttcagag gtgactggat ccacaaccaa aattcttttg ttgattttgt 3180
 tgtatggggc attgactttc acagtaattc gctttagtc ggcaccacca tagctgatca 3240
 tgcagcggta caccctgca tcctgcaatt tcacatctgt gatctgaagt gcagcatttc 3300
 ccagggagag ctggtccttc aacagccggg ccctctgtct gtagctacta tgctgaacct 3360
 tcaggctcttc ctctccatgc acaaattgaa taatgttctt atcctccatt tcccaataga 3420
 caattagtgat agccagggtct aattgttttt ctactgggaa tttgcattca attgtcatat 3480
 tgctaccata ctctaccaca tataagtcct tgggaaccgt gacagtaa at gcgttcagca 3540
 aatgccagta ggtcatgaat ataaagacag caaatatcct catctttctg gaatgccctg 3600
 caggcggaca gaagcgcggc tgggtcggag cctcgggaag ctgcgagaa ctggggccgc 3660
 gcgggacgcg ccagctgctc agcgttgccg c 3691

<210> 11

<211> 753

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

ctcgagggcg caacgctgag cagctggcg gtcccgcgcg gccccagttc tgcgcagctt 60
 cccgaggctc cgcaccagcc gcgcttctgt ccgcctgcag ggcattccag aaagatgagg 120
 atatttgctg tctttatatt catgacctac tggcatttgc tgaacgcccc atacaacaaa 180
 atcaacacaaa gaatttttgt tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact gacatgtcag 240
 gctgagggct accccaaggc cgaagtcac tggacaagca gtgaccatca agtcctgagt 300
 ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca 360
 ctgagaatca acacaacaac taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct 420
 gaggaaaacc atacagctga attggtcac ccagaactac ctctggcaca tcctccaaat 480
 gaaaggactc acttggtaat tctgggagcc atcttattat gccttggtgt agcactgaca 540
 ttcatcttcc gtttaagaaa agggagaatg atggatgtga aaaaatgtgg catccaagat 600
 acaaactcaa agaagcaaag tgataacat ttggaggaga cgtaatccag catttggaact 660
 tctgatcttc aagcagggat tctcaacctg tggtttaggg gttcatcggg gctgagcgtg 720
 acaagaggaa ggaatgggcc cgtgggcggc cgc 753

<210> 12

<211> 1418

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12

ctcagtgcca gcattggaac ttctgatctt caagcaggga ttctcaacct gtggtttagg 60
 gggtcatcgg ggctgagcgt gacaagagga aggaatgggc ccgtgggatg caggcaatgt 120
 gggacttaaa aggcccaagc actgaaaatg gaacctggcg aaagcagagg aggagaatga 180
 agaaagatgg agtcaaacag ggagcctgga gggagacctt gatactttca aatgcctgag 240
 gggctcatcg acgcctgtga caggagaaaa ggatacttct gaacaaggag cctccaagca 300
 aatcatccat tgctcatcct aggaagacgg gttgagaatc cctaatttga gggtcagttc 360

ctgcagaagt gccctttgcc tccactcaat gcctcaattt gttttctgca tgactgagag 420
 tctcagtggt ggaacgggac agtatattat tatgagtttt tcctatttat tttgagtcctg 480
 tgaggctctt ttgtcatgtg agtgtggtt tgaatgattt cttttgaaga tatattgtag 540
 tagatgttac aattttgtcg ccaaactaaa cttgctgctt aatgatttgc tcacatctag 600
 taaaacatgg agtatttcta aggtgcttgg tctcctctat aactacaagt atacattgga 660
 agcataaaga tcaaaccgtt ggttgcatag gatgtcacct ttatttaacc cattaatact 720
 ctggttgacc taatcttatt ctcagacctc aagtgtctgt gcagtatctg ttccatttaa 780
 atatcagctt tacaattatg tggtagccta cacacataat ctcatttcat cgctgtaacc 840
 accctgttgt gataaccact attattttac ccatcgtaca gctgaggaag caaacagatt 900
 aagtaacttg cccaaaccag taaatagcag acctcagact gccaccact gtccttttat 960
 aatacaattt acagctatat tttactttaa gcaattcttt tattcaaaaa ccatttatta 1020
 agtgccttg caatatcaat cgtgtgcca ggcattgaat ctacagatgt ggcaagacaa 1080
 agtacctgtc ctcaaggagc tcatagtata atgaggagat taacaagaaa atgtattatt 1140
 acaatttagt ccagtgtcat agcataagga tgatgcgagg ggaaaacccg agcagtgttg 1200
 ccaagaggag gaaataggcc aatgtggtct gggacggtt gatatactta aacatcttaa 1260
 taatcagagt aattttcatt taaaaagaga ggtcgggtact taaaataacc ctgaaaaata 1320
 acactggaat tccttttcta gcattatatt tattcctgat ttgcctttgc catataatct 1380
 aatgcttgtt tatatagtgt ctggtattgt gcggccgc 1418

<210> 13

<211> 1419

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

ctcgagctga aaaataacac tggaattcct tttctagcat tatatttatt cctgatttgc 60
 ctttgccata taatctaata ctgttttata tagtgtctgg tattgtttta cagttctgtc 120
 ttttctatctt aaatgccact aaatttttaa ttcatacctt tccatgattc aaaattcaaa 180
 agatcccatg ggagatggtt ggaaaatctc cacttcatcc tccaagccat tcaagtttcc 240
 tttccagaag caactgctac tgcctttcat tcatatgttc ttctaaagat agtctacatt 300
 tggaaatgta tgtaaaaagc acgtattttt aaaatttttt tcctaaatag taacacattg 360
 tatgtctgct gtgtactttg ctatttttat ttatttttagt gtttcttata tagcagatgg 420
 aatgaatttg aagttcccag ggctgaggat ccatgccttc tttgtttcta agttatcttt 480
 cccatagctt ttcatatctt ttcatatgat ccagtatatg ttaaatatgt cctacatata 540
 cathtagaca accaccattt gttaagtatt tgctctagga cagagtttgg atttgtttat 600
 gtttgctcaa aaggagaccc atgggctctc cagggtgcac tgagtcaatc tagtcctaaa 660
 aagcaatctt attattaact ctgtatgaca gaatcatgtc tggaactttt gttttctgct 720
 ttctgtcaag tataaacttc actttgatgc tgtacttgca aaatcacatt ttctttctgg 780
 aaattccggc agtgtacctt gactgctagc taccctgtgc cagaaaagcc tcattcgttg 840
 tgcttgaacc cttgaatgcc accagctgtc atcactacac agccctccta agaggcttcc 900
 tggaggtttc gagattcaga tgccctggga gatcccagag tttcctttcc ctcttgccca 960

tattctggtg tcaatgacaa ggagtacctt ggctttgcc aatgtcaagg ctgaagaaac 1020
agtgtctcca acagagctcc ttgtgttatc tgtttgtaca tgtgcatttg tacagtaatt 1080
ggtgtgacag tgttctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata 1140
gtctactcag tctattccta agtcctaact cctccttggt gtgttggtatt tgtaaggcac 1200
tttatccctt ttgtctcatg tttcatcgta aatggcatag gcagagatga tacctaattc 1260
tgcatattgat tgtcactttt tgtacctgca ttaatttaaat aaaatattct tattttatttt 1320
gttacttggt acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tgtgtttaat aaaatgttca 1380
gtttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa agcggccgc 1419

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注="对未知的描述:

RFGF肽"

<400> 14

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注="对未知的描述:

RFGF类似物肽"

<400> 15

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 人类免疫缺陷病毒

<400> 16

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 果蝇属

<400> 17

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1

5

10

15

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 18

gaagcuuuuc aaugugacca a 21

<210> 19

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 19

uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 20

gaagcuuuuc aaugugacca a 21

<210> 21

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 21
uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23
<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 22
gaagcuuuuc aaugugacca a 21
<210> 23
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 23
uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23
<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 24
agcuuuucaa ugugaccagc a 21
<210> 25
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 25
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 26
agcuuuucaa ugugaccagc a 21
<210> 27
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 27
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 28
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 28
agcuuuucaa ugugaccagc a 21
<210> 29
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 29
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 30
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 30
gcuuuucaau gugaccagca a 21
<210> 31
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 31
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 32
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 32
gcuuuucaau gugaccagca a 21
<210> 33

<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 33
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 34
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 34
gcuuuucaau gugaccagca a 21
<210> 35
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 35
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 36
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 36
cacacugaga aucaacacaa a 21

<210> 37
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 37
uuuguguuga uucucagugu gcu 23
<210> 38
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 38
ccaaaugaaa ggacucacuu a 21
<210> 39
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 39
uaagugaguc cuuucuuug gag 23
<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 40

uacacauuug gaggagacgu a 21

<210> 41

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 41

uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

<210> 42

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 42

uacacauuug gaggagacgu a 21

<210> 43

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 43

uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 44
uacacauuug gaggagacgu a 21
<210> 45
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 45
uacgucuccu ccaaaugugu auc 23
<210> 46
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 46
acacauuugg aggagacgua a 21
<210> 47
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 47
uuacgucucc uccaaaugug uau 23
<210> 48
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的

寡核苷酸”

<400> 48

acacauuugg aggagacgua a 21

<210> 49

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 49

uuacgucucc uccaaaugug uau 23

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 50

acacauuugg aggagacgua a 21

<210> 51

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 51

uuacgucucc uccaaaugug uau 23

<210> 52

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 52

cacauuugga ggagacguaa u 21

<210> 53

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 53

auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

<210> 54

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 54

cacauuugga ggagacguaa u 21

<210> 55

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 55

auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

<210> 56

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 56
cacauuugga ggagacguaa u 21
<210> 57
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 57
auuacgucuc cuccaaugu gua 23
<210> 58
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 58
gagaccuuga uacuuucaaa u 21
<210> 59
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 59
auuugaaagu aucaaggucu ccc 23
<210> 60
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 60
uaauuugagg gucaguuccu a 21
<210> 61
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 61
uaggaacuga cccucaaauu agg 23
<210> 62
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 62
uuccuauuuu uuuugagucu a 21
<210> 63
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 63
uagacucaaa auaaaauagga aaa 23
<210> 64
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 64
uuccuauuuu uuuugagucu a 21
<210> 65
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 65
uagacucaaa auaaauagga aaa 23
<210> 66
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 66
uuccuauuuu uuuugagucu a 21
<210> 67
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 67
uagacucaaa auaaauagga aaa 23
<210> 68
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 68
uccuauuuuau uuugagucug u 21
<210> 69
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 69
acagacucuaa aauaaaauagg aaa 23
<210> 70
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 70
uccuauuuuau uuugagucug u 21
<210> 71
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 71
acagacucuaa aauaaaauagg aaa 23
<210> 72

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 72
uugaagauau auuguaguag a 21
<210> 73
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 73
ucuacuacaa uauaucuuca aaa 23
<210> 74
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 74
auuguaguag auguuacaau u 21
<210> 75
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 75
aauguuacaa ucuacuacaa uau 23

<210> 76
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 76
guauuuuguaa ggugcuuggu a 21
<210> 77
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 77
uaccaagcac cuuacaaaua cuc 23
<210> 78
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 78
aagcauaaaag aucaaaccgu u 21
<210> 79
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 79

aacgguuuga uuuuuauugcu ucc 23

<210> 80

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 80

ccuuuuuuua acccauuuau a 21

<210> 81

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 81

uauuaauggg uuaauuaag gug 23

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 82

aggaagcaaa cagauuaagu a 21

<210> 83

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 83
uacuuauaucu guuugcuucc uca 23
<210> 84
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 84
caggcauuga aucuacagau a 21
<210> 85
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 85
uaucuguaga uucaaugccu ggc 23
<210> 86
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 86
ugauucaaaa uucaaaagau a 21
<210> 87
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的

寡核苷酸”

<400> 87

uauuuuuuga auuuugaauuc aug 23

<210> 88

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 88

ucuaaagaua gucuacauuu a 21

<210> 89

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 89

uaaauguaga cuauuuuag aag 23

<210> 90

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 90

ggaaauguau guuaaaagca a 21

<210> 91

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 91

uugcuuuuaa cauacauuuc caa 23

<210> 92

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 92

uguuuucugc uuucuguc aa 21

<210> 93

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 93

uuugacagaa agcagaaaac aaa 23

<210> 94

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 94

uuucuguc aa guauaaacuu a 21

<210> 95

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 95
uaaguuuaua cuugacagaa agc 23
<210> 96
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 96
uucugucaag uauaaacuuc a 21
<210> 97
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 97
ugaaguuuau acuugacaga aag 23
<210> 98
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 98
guacuugcaa aaucacauuu u 21
<210> 99
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 99
aaaaugugau uuugcaagua cag 23
<210> 100
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 100
uucuuugugu gaauuacagg a 21
<210> 101
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 101
uccuguaauu cacacaaaga aca 23
<210> 102
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 102
ugugguguug gauuuguaag a 21
<210> 103
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 103
ucuuacaaau ccaacaccac aag 23
<210> 104
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 104
ucccuuuugu cucauguuuc a 21
<210> 105
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 105
ugaaacauga gacaaaaggg aua 23
<210> 106
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 106
cugcauuuga uugucacuuu u 21
<210> 107
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 107
aaaagugaca aucaaaugca gaa 23
<210> 108
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 108
uaccugcauu aaauuaauaa a 21
<210> 109
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 109
uuuauuaaa uaaugcaggu aca 23
<210> 110
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 110
uaccugcauu aaauuaauaa a 21
<210> 111

<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 111
uuuauuuuuu uaaugcaggu aca 23
<210> 112
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 112
uaccugcauu aaauuaauaa a 21
<210> 113
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 113
uuuauuuuuu uaaugcaggu aca 23
<210> 114
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 114
accugcauuu auuuuauaaa a 21

<210> 115
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 115
uuuuauuaaa uuaaugcagg uac 23
<210> 116
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 116
accugcauuu auuuauuaaa a 21
<210> 117
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 117
uuuuauuaaa uuaaugcagg uac 23
<210> 118
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 118

accugcauuu auuuauuaaa a 21

<210> 119

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 119

uuuuauuaaa uuaaugcagg uac 23

<210> 120

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<220>

<221> 经修饰的碱基

<222> (1) .. (1)

<223> 倒转脱碱基核苷酸

<400> 120

ngaagcuuuu caaugugacc aa 22

<210> 121

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 121

uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23

<210> 122

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 122
gaagcuuuuc aaugugacca a 21
<210> 123
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 123
uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23
<210> 124
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 124
gaagcuuuuc aaugugacca a 21
<210> 125
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 125
uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23
<210> 126
<211> 22
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 126
nagcuuuuca augugaccag ca 22
<210> 127
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 127
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 128
agcuuuucaa ugugaccagc a 21
<210> 129
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 129
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 130
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 130
agcuuuucaa ugugaccagc a 21
<210> 131
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 131
ugcuggucac auugaaaagc uuc 23
<210> 132
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 132
ngcuuuucaa ugugaccagc aa 22
<210> 133
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 133
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 134
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 134
gcuuuucaau gugaccagca a 21
<210> 135
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 135
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 136
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 136
gcuuuucaau gugaccagca a 21
<210> 137
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 137
uugcugguca cauugaaaag cuu 23
<210> 138
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 138
cacacugaga aucaacacaa a 21
<210> 139
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 139
uuuguguuga uucucagugu gca 23
<210> 140
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 140
ccaaaugaaa ggacucacuu a 21
<210> 141

<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 141
uaagugaguc cuuucuuug gag 23
<210> 142
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 142
nuacacauuu ggaggagacg ua 22
<210> 143
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 143
uacgucuccu ccaaauugu auc 23
<210> 144
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 144

uacacauuug gaggagacgu a 21

<210> 145

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 145

uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

<210> 146

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 146

uacacauuug gaggagacgu a 21

<210> 147

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 147

uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

<210> 148

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 148
nacacauuug gaggagacgu aa 22
<210> 149
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 149
uuacgucucc uccaaaugug uau 23
<210> 150
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 150
acacauuugg aggagacgua a 21
<210> 151
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 151
uuacgucucc uccaaaugug uau 23

<210> 152
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 152
acacauuugg aggagacgua a 21
<210> 153
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 153
uuacgucucc uccaaaugug uau 23
<210> 154
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 154
ncacauuugg aggagacgua au 22
<210> 155
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 155
auuacgucuc cuccaaaugu gua 23
<210> 156
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 156
cacauuugga ggagacguaa u 21
<210> 157
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 157
auuacgucuc cuccaaaugu gua 23
<210> 158
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 158
cacauuugga ggagacguaa u 21
<210> 159
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 159
auuacgucuc cuccaaaugu gua 23
<210> 160
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 160
gagaccuuga uacuuucaaa u 21
<210> 161
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 161
auuugaaagu aucaaggucu ccc 23
<210> 162
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 162
uaauuugagg gucaguuccu a 21
<210> 163
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 163
uaggaacuga cccucaaauu agg 23
<210> 164
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 164
nuuccuauuu auuuugaguc ua 22
<210> 165
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 165
uagacucaaa auaaaauagga aaa 23
<210> 166
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 166
uuccuauuuu uuuugagucu a 21
<210> 167
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 167
uagacucaaa auaaaauagga aaa 23
<210> 168
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 168
uuccuauuuu uuuugagucu a 21
<210> 169
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 169
uagacucaaa auaaaauagga aaa 23
<210> 170
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的

寡核苷酸”

<400> 170

uccuauuuau uuugagucug u 21

<210> 171

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 171

acagacucuaa aauaaaauagg aaa 23

<210> 172

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 172

uccuauuuau uuugagucug u 21

<210> 173

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 173

acagacucuaa aauaaaauagg aaa 23

<210> 174

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 174

uugaagauau auuguaguag a 21

<210> 175

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 175

ucuacuacaa uauaucuua aaa 23

<210> 176

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 176

auuguaguag auguuacaau u 21

<210> 177

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 177

aauguuaaca ucuacuacaa uau 23

<210> 178

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 178
guauuuuguaa ggugcuuggu a 21
<210> 179
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 179
uaccaagcac cuuacaaaua cuc 23
<210> 180
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 180
aagcauaaag aucaaaccgu a 21
<210> 181
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 181
aacgguuuga ucuuuauugcu uca 23
<210> 182
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 182
ccuuuauuuu acccauuau a 21
<210> 183
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 183
uauuaauggg uuaauuaag gug 23
<210> 184
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 184
aggaagcaaa cagauuaagu a 21
<210> 185
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 185
uacuuauucu guuugcuucc uca 23
<210> 186
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 186
caggcauuga aucuacagau a 21
<210> 187
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 187
uaucuguaga uucaaugccu ggc 23
<210> 188
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 188
ugauucaaaa uucaaaagau a 21
<210> 189
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 189
uauuuuuga auuuugaau aug 23
<210> 190
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 190
ucuaaagaua gucuacauuu a 21
<210> 191
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 191
uaaauguaga cuaucuuuag aag 23
<210> 192
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 192
ggaaauguau guuaaaagca a 21
<210> 193
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 193
uugcuuuuaa cauacauuuc caa 23
<210> 194

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 194
uguuuucugc uuucugucaa a 21
<210> 195
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 195
uuugacagaa agcagaaaac aaa 23
<210> 196
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 196
uuucugucaa guauaaacuu a 21
<210> 197
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 197
uaaguuuaua cuugacagaa agc 23

<210> 198
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 198
uucugucaag uauaaacuuc a 21
<210> 199
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 199
ugaaguuuau acuugacaga aag 23
<210> 200
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 200
guacuugcaa aaucacauuu u 21
<210> 201
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 201

aaaaugugau uuugcaagua cag 23

<210> 202

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 202

uucuuugugu gaauuacagg a 21

<210> 203

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 203

uccuguaauu cacacaaaga aca 23

<210> 204

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 204

ugugguguug gauuuguaag a 21

<210> 205

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 205
ucuuacaaau ccaacaccac aag 23
<210> 206
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 206
ucccuuuugu cucauguuuc a 21
<210> 207
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 207
ugaaacauga gacaaaaggg aua 23
<210> 208
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 208
cugcauuuga uugucacuuu u 21
<210> 209
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的

寡核苷酸”

<400> 209

aaaagugaca aucaaaugca gaa 23

<210> 210

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<220>

<221> 经修饰的碱基

<222> (1) .. (1)

<223> 倒转脱碱基核苷酸

<400> 210

nuaccugcau uaauuuuaaua aa 22

<210> 211

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 211

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca 23

<210> 212

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“对人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 212

uaccugcauu aaauuaauaa a 21

<210> 213

<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 213
uuuauuuuuu uaaugcaggu aca 23
<210> 214
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 214
uaccugcauu aauiuuuuuu a 21
<210> 215
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 215
uuuauuuuuu uaaugcaggu aca 23
<210> 216
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (1) .. (1)

<223> 倒转脱碱基核苷酸
<400> 216
naccugcauu aaauuaauaa aa 22
<210> 217
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 217
uuuuuuuuuu uuaaugcagg uac 23
<210> 218
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 218
accugcauuu auuuuuuuuu a 21
<210> 219
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"
<400> 219
uuuuuuuuuu uuaaugcagg uac 23
<210> 220
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 220

accugcauua auuuauuaa a 21

<210> 221

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="对人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 221

uuuuuuuuuu uuaaugcagg uac 23

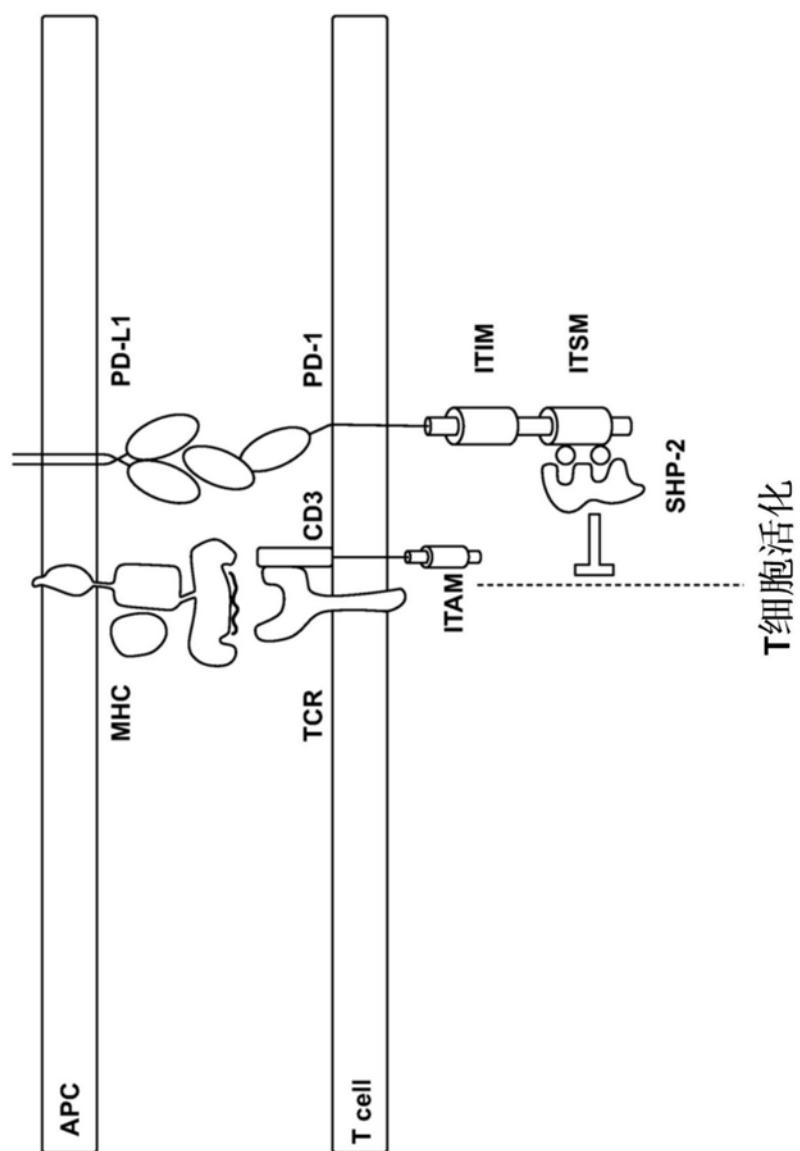


图1