



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104994884 B

(45)授权公告日 2018.07.17

(21)申请号 201480007862.5

(22)申请日 2014.02.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104994884 A

(43)申请公布日 2015.10.21

(30)优先权数据
61/764,969 2013.02.14 US
61/880,779 2013.09.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/016546 2014.02.14

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/127268 EN 2014.08.21

(73)专利权人 IONIS制药公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 V·J·亚历山大 N·J·瓦伊尼
J·L·魏茨滕

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所
11111
代理人 戈晓美 白华胜

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件
US 2012270929 A1,2012.10.25,
WO 2011123401 A1,2011.10.06,
WO 2012149495 A1,2012.11.01,
US 2011060030 A1,2011.03.10,
审查员 李谦

权利要求书2页 说明书62页
序列表7页

(54)发明名称

对脂蛋白脂肪酶缺乏(LPLD)群体中的载脂蛋白C-III(APOCIII)表达的调节

(57)摘要

本发明提供用于在患者中减少ApoCIII mRNA和蛋白质的表达以治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常/FCS/LPLD的方法、化合物和组合物。所述方法、化合物和组合物在所述患者中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比和减少血浆脂质和血浆葡萄糖,并且可用于治疗、预防、延迟或改善胰腺炎、心血管疾病或代谢病症或其相关症状中的任何一种或多种。

1. ApoCIII特异性抑制剂在制备用于i) 在动物中治疗、预防、延迟或改善FCS;或ii) 在患有FCS的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的药物中的用途,其中所述ApoCIII特异性抑制剂包含靶向ApoCIII的反义化合物,且其中所述反义化合物抑制ApoCIII的表达。

2. 如权利要求1所述的用途,其中降低了所述动物的甘油三酯水平。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述反义化合物包含经修饰的寡核苷酸。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸具有包含SEQ ID NO:3的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸包含核碱基序列SEQ ID NO:3。

6. 如权利要求4所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由核碱基序列SEQ ID NO:3组成。

7. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的核碱基序列至少80%互补。

8. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的核碱基序列至少90%互补。

9. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的核碱基序列100%互补。

10. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由经修饰的单链或双链寡核苷酸组成。

11. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷组成。

13. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸具有至少一个经修饰的核苷间键联、糖部分或核碱基。

14. 如权利要求13所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的所述经修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,所述经修饰的糖是双环糖或2'-O-甲氧基乙基,且所述经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

15. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

(a) 由连接的脱氧核苷组成的间隙区段;

(b) 由连接的核苷组成的5'翼状区段;

(c) 由连接的核苷组成的3'翼状区段;

其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,且其中各翼状区段的各核苷包含经修饰的糖。

16. 如权利要求3所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

(a) 由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;

(b) 由5个连接的核苷组成的5'翼状区段;

(c) 由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;

其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,且其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞

嘧啶是5-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

17. 包含具有序列SEQ ID NO:3的经修饰的寡核苷酸的化合物在制备用于在动物中治疗、预防、延迟或改善FCS的药物中的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- (a) 由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;
- (b) 由5个连接的核苷组成的5'翼状区段;
- (c) 由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;

其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联,其中所述化合物是靶向ApoCIII的反义化合物,且其中所述反义化合物抑制ApoCIII的表达。

18. 包含具有序列SEQ ID NO:3的经修饰的寡核苷酸的化合物在制备用于在患有FCS的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的药物中的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- (a) 由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;
- (b) 由5个连接的核苷组成的5'翼状区段;
- (c) 由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;

其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联,其中所述化合物是靶向ApoCIII的反义化合物,且其中所述反义化合物抑制ApoCIII的表达。

19. 如权利要求1、17或18所述的用途,其中所述药物是经肠胃外施用。

20. 如权利要求19所述的用途,其中所述肠胃外施用是皮下施用。

21. 如权利要求1、17或18所述的用途,其中所述药物与第二药剂组合施用。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述第二药剂是选自ApoCIII降低剂、胆固醇降低剂、非HDL脂质降低剂、LDL降低剂、TG降低剂、HDL升高剂、鱼油、烟酸、贝特类、他汀类、DCCR(二氮嗪胆碱控释片)、葡萄糖降低剂或抗糖尿病剂。

23. 如权利要求21所述的用途,其中所述第二药剂与所述药物同时或依序施用。

24. 如权利要求1、17或18所述的用途,其中所述ApoCIII特异性抑制剂或化合物是呈盐形式。

25. 如权利要求1、17或18所述的用途,其中所述药物还包括药学上可接受的载剂或稀释剂。

26. 如权利要求1、17或18所述的用途,其中所述FCS是通过遗传筛查来鉴定。

对脂蛋白脂肪酶缺乏 (LPLD) 群体中的载脂蛋白C-III (APOCIII) 表达的调节

[0001] 序列表

[0002] 本申请正随电子格式的序列表一起提交。所述序列表是以2014年1月28日创建的名称为BIOL0218W0SEQ_ST25.txt的文件的形式提供,其大小为16Kb。所述序列表的电子格式中的信息是以全文引用的方式并入本文中。

发明领域

[0003] 本文中提供了用于在弗雷德里克森I型血脂异常患者中减少载脂蛋白C-III (ApoCIII) mRNA和蛋白质的表达、降低甘油三酯水平和增高高密度脂蛋白 (HDL) 水平或HDL活性的方法、化合物和组合物。本文中还提供了用于治疗弗雷德里克森I型血脂异常或其相关病症的化合物和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 脂蛋白是由被两亲性蛋白质、磷脂和胆固醇包覆层围绕的酰基甘油和胆固醇酯的非极性核心组成的球形胶束状颗粒。已基于脂蛋白的功能和物理性质将其分为五大类:乳糜微粒、极低密度脂蛋白 (VLDL)、中密度脂蛋白 (IDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL)。乳糜微粒将饮食脂质从肠转运到组织。VLDL、IDL和LDL都能将三酰基甘油和胆固醇从肝脏转运到组织。HDL将内源性胆固醇从组织转运到肝脏。

[0006] 载脂蛋白C-III (也称为APOC3、APOC-III、ApoCIII和APO C-III) 是HDL和富甘油三酯 (TG) 脂蛋白的成分。ApoCIII升高与TG水平升高和诸如心血管疾病、代谢综合征、肥胖和糖尿病等疾病相关 (Chan等, Int J Clin Pract, 2008, 62:799-809; Onat等, Atherosclerosis, 2003, 168:81-89; Mendivil等, Circulation, 2011, 124:2065-2072; Mauger等, J. Lipid Res, 2006, 47:1212-1218; Chan等, Clin. Chem, 2002, 278-283; Ooi等, Clin. Sci, 2008, 114:611-624; Davidsson等, J. Lipid Res, 2005, 46:1999-2006; Sacks等, Circulation, 2000, 102:1886-1892; Lee等, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23:853-858)。ApoCIII通过抑制脂蛋白脂肪酶 (LPL) 和干扰脂蛋白与细胞表面葡萄糖胺聚糖基质结合来抑制脂解作用而减缓对富TG脂蛋白的廓清 (Shachter, Curr. Opin. Lipidol, 2001, 12, 297-304)。由于ApoCIII抑制LPL从而导致TG的脂解作用下降,所以抑制ApoCIII在LPL缺乏 (LPLD) 受试者中具有有益的效应是出乎意料的。

[0007] LPLD的特征在于使受影响的个体不能够产生功能活性LPL。LPL主要在骨骼肌、脂肪组织和心肌中产生,且具有多种关键功能,尤其是富TG脂蛋白 (例如VLDL) 和乳糜微粒 (CM) 的分解代谢。TG从CM (和VLDL) 中卸载在正常情况下能防止CM质量和TG在饭后过度上升。在LPLD中, LPL存在功能障碍,且在饭后超过12小时,仍存在高TG和乳糜微粒血症且直观表现为脂血症。

[0008] 使用弗雷德里克森系统对患者的诸如高甘油三酯血症等血脂异常的原发性 (遗传) 原因进行分类。弗雷德里克森I型 (也称为LPLD或家族性乳糜微粒血症综合征 (FCS)) 通常由LPL基因或所述基因的辅因子ApoC-II突变,导致受影响的个体不能够产生功能活性

LPL (即LPLD) 而引起。患者具有纯合性突变(各等位基因上具有相同的突变)或复合杂合性突变(各等位基因上具有不同的突变)。流行率在一般群体中为大约1/1,000,000,且在南非和东魁北克,由于始祖效应而高得多。

[0009] 目前,弗雷德里克森I型、FCS、LPLD患者极少或根本不回应诸如他汀类、贝特类和烟酸等降TG药物(Tremblay等,J Clin Lipidol,2011,5:37-44;Brisson等,Pharmacogenet Genom,2010,20:742-747)。弗雷德里克森I型、FCS、LPLD患者的临床处置一般由将总饮食脂肪严重减至远少于热量摄入的20%和使用经由门静脉系统吸收且因此不直接进入血浆的中链TG组成。所述终生饮食方案给患者带来了重大顺应性问题。即使当患者顺应所述饮食且在脂质门诊被饮食学家和医疗团队密切跟进时,TG往往并未降至胰腺炎风险增高的临界值以下。最近,欧洲已批准基因疗法产物(Glybera^R)用于治疗尽管进行了饮食脂肪限制但仍遭受严重或多次胰腺炎发作的成年LPLD患者。经Glybera^R治疗的患者需要在Glybera^R治疗之前和之后施用免疫抑制药物。Glybera^R将仅由具有治疗LPLD专长的专门中心和由受过特殊训练的医生提供,以确保治疗的进行安全性(<http://www.uniquere.com/products/glybera/>)。

[0010] 因此,仍需要为患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者提供新颖的治疗选择。反义技术正作为一种减少某些基因产物的表达的有效手段而兴起,并且会被证明在用于调节ApoCIII的许多治疗、诊断和研究应用中特别有用。我们先前在US 20040208856(美国专利7,598,227)、US 20060264395(美国专利7,750,141)、WO 2004/093783和WO 2012/149495中已经公开了通过反义化合物抑制ApoCIII的组合物和方法,所有文献都以引用的方式并入本文中。已经在I期临床试验中测试了靶向ApoCIII的反义寡核苷酸且被证明是安全的。目前,靶向ApoCIII的反义寡核苷酸正进行II期临床试验以评定其在治疗糖尿病或高甘油三酯血症方面的有效性。

[0011] 发明概述

[0012] 某些实施方案提供了一种治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的方法,其包括向动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。某些实施方案提供了一种ApoCIII特异性抑制剂用于治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD。

[0013] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低甘油三酯水平的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。

[0014] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。

[0015] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。

[0016] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的方法,其包括向动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。

[0017] 在某些实施方案中,所述ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是靶向ApoCIII的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述寡核苷酸是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含SEQ ID NO:3的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:3的核碱基序列组成。

[0018] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低甘油三酯水平的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含具有SEQ ID NO:3的序列的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段、由5个连接的核苷组成的5'翼状区段和由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0019] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的包含具有SEQ ID NO:3的序列的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段、由5个连接的核苷组成的5'翼状区段和由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0020] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的包含具有SEQ ID NO:3的序列的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段、由5个连接的核苷组成的5'翼状区段和由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0021] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的包含具有SEQ ID NO:3的序列的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段、由5个连接的核苷组成的5'翼状区段和由5个连接的核苷组成的3'翼状区段;其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0022] 在某些实施方案中,所述ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是靶向ApoCIII的反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是反义寡核苷酸。在某些实施方案中,所述反义寡核苷酸是经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS

304801,即AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT (SEQ ID NO:3)的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0023] 发明详述

[0024] 应理解,如权利要求所称,上述一般说明和以下详细描述仅是示例性的和阐释性的,而不限本发明。在本文中,除非另外明确阐述,否则单数的使用包括复数。如本文中所使用,除非另外阐述,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其它形式,诸如“包括(includes)”和“包括(included)”,不具限制性。同样,除非另外明确阐述,否则诸如“元素”或“组分”等术语涵盖包含一个单位的元素和组分,和包含多于一个亚单位的元素和组分。

[0025] 本文中所使用的章节标题仅用于组织的目的,且不应被视为限制所描述的主题。在本申请中所引用的所有文献或文献部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文中,本文中所讨论的文献部分及其全文明确地以引用的方式并入本文中。

[0026] 定义

[0027] 除非提供特定的定义,否则结合本文中所描述的分析化学、合成有机化学和医药化学所用的名称及其程序和技术是本领域中熟知和常用的那些。标准技术可用于化学合成和化学分析。如果允许,在所有专利、申请、已公开的申请或其它出版物、GENBANK登录号和可通过诸如美国国立生物技术信息中心(NCBI)等数据库获得的相关的序列信息和贯穿本文公开内容所提及的其它数据中,本文中所讨论的文献部分以及其全文是以引用的方式并入。

[0028] 除非另外指明,否则以下术语具有以下含义:

[0029] “2'-O-甲氧乙基”(也为2'-MOE、2'-O(CH₂)₂-OCH₃和2'-O-(2-甲氧基乙基)))是指岩藻糖基环的2'位置的O-甲氧基-乙基修饰。经2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是经修饰的糖。

[0030] “2'-O-甲氧基乙基核苷酸”意指包含经2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分的核苷酸。

[0031] “3'靶位点”是指与特定反义化合物的3'最末端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0032] “5'靶位点”是指与特定反义化合物的5'最末端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0033] “5-甲基胞嘧啶”意指经连接于5'位置的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是经修饰的核碱基。

[0034] “约”意指在值的±10%以内。例如,若陈述“可使标记物增加约50%”,则其意味着可使标记物增加45%至55%之间。

[0035] “活性药剂”意指药物组合中当被施用于个体时提供治疗益处的物质。例如,在某些实施方案中,靶向ApoCIII的反义寡核苷酸是活性药剂。

[0036] “活性靶区”或“靶区”意指一种或多种活性反义化合物所靶向的区域。“活性反义化合物”意指降低靶核酸水平或蛋白水平的反义化合物。

[0037] “同时施用”是指两种药剂以能使二者的药理作用在患者中同时显现的任何方式共同施用。同时施用不需要两种药剂在单一药物组合中、在同一剂型中或通过同一施用路径来施用。两种药剂的作用不必同时显现。作用仅需重叠一段时间且不必在时间上共同延长。

[0038] “施用”意指向个体提供药剂,且包括但不限于由医学专业人士施用和自行施用。

[0039] “药剂”意指当被施用于动物时可提供治疗益处的活性物质。“第一药剂”意指本发明的治疗化合物。例如，第一药剂可以是靶向ApoCIII的反义寡核苷酸。“第二药剂”意指本发明的第二治疗化合物（例如，靶向ApoCIII的第二反义寡核苷酸）和/或非ApoCIII治疗化合物。

[0040] “改善”是指相关疾病、病症或病状的至少一种适应症、病征或症状的减轻。适应症的严重程度可以通过本领域技术人员已知的主观或客观量度来确定。

[0041] “动物”是指人类或非人动物，包括但不限于小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪和非人灵长类，包括但不限于猴子和黑猩猩。

[0042] “反义活性”意指可归因于反义化合物与其靶核酸杂交的任何可检测或可测量的活性。在某些实施方案中，反义活性是靶核酸或由所述靶核酸编码的蛋白质的量或表达的降低。

[0043] “反义化合物”意指能够通过氢键合与靶核酸杂交的寡聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物，诸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、ssRNAi和基于占位的化合物。

[0044] “反义抑制”意指与在不存在反义化合物的情况下的靶核酸水平或靶蛋白水平相比，在存在与靶核酸互补的反义化合物的情况下靶核酸水平或靶蛋白水平的降低。

[0045] “反义寡核苷酸”意指具有允许与靶核酸的相应区域或区段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。如本文中所使用，术语“反义寡核苷酸”涵盖本文中所描述的化合物的药学上可接受的衍生物。

[0046] “ApoA5”、“载脂蛋白A-V”或“ApoA-V”意指编码ApoA5的任何核酸或蛋白质序列。

[0047] “ApoCII”、“载脂蛋白C-II”或“ApoC2”意指编码ApoCII的任何核酸或蛋白质序列。ApoCII蛋白是乳糜微粒和VLDL颗粒的组分，并且活化LPL以使TG水解。

[0048] “ApoCIII”、“载脂蛋白C-III”或“ApoC3”意指编码ApoCIII的任何核酸或蛋白质序列。例如，在某些实施方案中，ApoCIII包括编码ApoCIII的DNA序列、从编码ApoCIII的DNA（包括包含内含子和外显子的基因组DNA）转录的RNA序列、编码ApoCIII的mRNA序列或编码ApoCIII的肽序列。

[0049] “ApoCIII特异性抑制剂”是指能够在分子层级上特异性地抑制ApoCIII mRNA的表达和/或ApoCIII蛋白的表达或活性的任何药剂。例如，ApoCIII特异性抑制剂包括能够抑制ApoCIII mRNA和/或ApoCIII蛋白的表达的核酸（包括反义化合物）、肽、抗体、小分子和其它药剂。在某些实施方案中，所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中，所述反义化合物是靶向ApoCIII的寡核苷酸。在某些实施方案中，所述靶向ApoCIII的寡核苷酸是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中，所述靶向ApoCIII的寡核苷酸具有如SEQ ID NO: 3中所示的序列或另一个序列，例如，诸如美国专利7,598,227、美国专利7,750,141、PCT公布WO 2004/093783或WO 2012/149495中所公开的那些，所述文献都以引用的方式并入本文中。在某些实施方案中，通过特异性地调节ApoCIII mRNA水平和/或ApoCIII蛋白表达，ApoCIII特异性抑制剂可以影响脂质生成途径的组件。类似地，在某些实施方案中，ApoCIII特异性抑制剂可能在动物中影响其它分子过程。

[0050] “ApoCIII mRNA”意指编码ApoCIII蛋白的mRNA。

[0051] “ApoCIII蛋白”意指编码ApoCIII的任何蛋白质序列。

[0052] “动脉粥样硬化”意指影响大型和中型动脉且以存在脂肪沉积物为特征的动脉硬

化。所述脂肪沉积物称为“粥样”或“斑块”，其主要由胆固醇和其它脂肪、钙和瘢痕组织组成且损害动脉内膜。

[0053] “双环糖”意指通过两个非偕位环原子桥连而经修饰的岩藻糖基环。双环糖是经修饰的糖。

[0054] “双环核酸”或“BNA”是指核苷或核苷酸，其中核苷或核苷酸的呋喃糖部分包括连接呋喃糖环上的两个碳原子的桥连基，从而形成双环糖系统。

[0055] “帽结构”或“末端帽部分”意指并在反义化合物的任一末端的化学修饰。

[0056] “心血管疾病”或“心血管病症”是指与心脏、血管或循环有关的病状群组。心血管疾病的实例包括但不限于动脉瘤、绞痛、心律不齐、动脉粥样硬化、脑血管疾病(中风)、冠心病、高血压、血脂异常、高脂血症、高甘油三酯血症和高胆固醇血症。

[0057] “化学上不同的区域”是指反义化合物中在某些方面化学上不同于同一反义化合物的另一个区域的区域。例如，具有2'-O-甲氧基乙基核苷酸的区域在化学上不同于具有无2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸的区域。

[0058] “嵌合反义化合物”意指具有至少两个化学上不同的区域的反义化合物。

[0059] “胆固醇”是在所有动物组织的细胞膜中发现的固醇分子。胆固醇必须通过脂蛋白在动物的血浆中输送，所述脂蛋白包括极低密度脂蛋白(VLDL)、中密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。“血浆胆固醇”是指血浆或血清中存在的所有脂蛋白(VLDL、IDL、LDL、HDL)酯化和/或非酯化胆固醇的总和。

[0060] “胆固醇吸收抑制”意指抑制从饮食中获得的外源性胆固醇的吸收的药剂。

[0061] “共同施用”意指两种或更多种药剂对个体的施用。两种或更多种药剂可以在单一药物组合物中，或可以在单独的药物组合物中。两种或更多种药剂中的每一种可以通过相同或不同的施用路径来施用。共同施用涵盖平行或相继施用。

[0062] “互补性”意指第一核酸与第二核酸的核碱基之间配对的能力。在某些实施方案中，第一核酸与第二核酸之间的互补性可以在两个DNA链之间、在两个RNA链之间或在DNA链与RNA链之间。在某些实施方案中，一个链上的一些核碱基与另一个链上的互补氢键合碱基相匹配。在某些实施方案中，一个链上的所有核碱基与另一个链上的互补氢键合碱基相匹配。在某些实施方案中，第一核酸是反义化合物，且第二核酸是靶核酸。在某些所述实施方案中，反义寡核苷酸是第一核酸，且靶核酸是第二核酸。

[0063] “连续核碱基”意指彼此紧密相邻的核碱基。

[0064] “受限的乙基”或“cEt”是指具有呋喃糖基糖的双环核苷，其包含介于4'与2'碳原子之间的甲基(亚甲氧基)(4'-CH(CH₃)-O-2')桥连基。

[0065] “交叉反应性”意指靶向一个核酸序列的寡聚化合物可以与不同的核酸序列杂交。例如，在一些情况下，靶向人类ApoCIII的反义寡核苷酸可以与鼠类ApoCIII交叉反应。寡聚化合物是否与除其指定靶标以外的核酸序列交叉反应取决于该化合物与非靶标核酸序列具有的互补性程度。寡聚化合物与非靶标核酸之间的互补性越高，寡聚化合物将越可能会与所述核酸交叉反应。

[0066] “治愈”意指恢复健康的方法或针对疾病的处方治疗。

[0067] “冠心病(CHD)”意指向心脏供应血液和氧的小血管变狭窄，这往往是动脉粥样硬化的结果。

[0068] “脱氧核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2'位置具有氢的核苷酸。脱氧核糖核苷酸可被多种取代基中的任一种修饰。

[0069] “糖尿病”是以由于胰岛素水平不足或胰岛素敏感性降低导致的无序代谢和异常高的血糖(高血糖)为特征的综合征。特征性症状为由于高血糖水平所致的过量尿产生(多尿症)、试图补偿增加的排尿的过度口渴和增加的流体摄取(烦渴)、由于高血糖对眼睛光学的影响所致的视力模糊、原因不明的体重减轻和嗜睡症。

[0070] “糖尿病性血脂异常”或“伴随血脂异常的2型糖尿病”意指以2型糖尿病、降低的HDL-C、升高的甘油三酯和升高的小型致密LDL颗粒为特征的病状。

[0071] “稀释剂”意指组合物中缺乏药理学活性,但是在药学上必需或理想的成分。例如,注射组合物中的稀释剂可以是液体,例如,生理盐水溶液。

[0072] “血脂异常”是指脂质和/或脂蛋白代谢病症,包括脂质和/或脂蛋白生产过剩或缺乏。血脂异常可表现为诸如乳糜微粒、胆固醇和甘油三酯等脂质以及诸如低密度脂蛋白(LDL)胆固醇等脂蛋白的升高。血脂异常的一个实例是乳糜微粒血症或高甘油三酯血症。

[0073] “剂量单位”意指提供药剂的形式,例如,丸剂、片剂或本领域中已知的其它剂量单位。在某些实施方案中,剂量单位是含有冻干的反义寡核苷酸的小瓶。在某些实施方案中,剂量单位是含有复原的反义寡核苷酸的小瓶。

[0074] “剂量”意指在单次施用中或在规定时间段中提供的药剂的规定量。在某些实施方案中,剂量可在一个、两个或更多个大丸剂、片剂或注射剂中施用。例如,在需要经皮下施用的某些实施方案中,所需剂量需要单次注射不容易容纳的体积,因此,可以使用两次或更多次注射来实现所需剂量。在某些实施方案中,药剂是通过在较长时间段内或连续输注来施用。剂量可以阐述为每小时、每天、每周或每月的药剂量。剂量还可以阐述为mg/kg或g/kg。

[0075] “有效量”或“治疗有效量”意指足以在需要药剂的个体中实现所需的生理结果的活性药剂的量。视欲治疗个体的健康和身体状况、欲治疗个体的分类群、组合物的配方、对个体医学病状的评估和其它相关因素而定,有效量在个体之间可以有所不同。

[0076] “贝特类(fibrates)”是经由调节脂质和脂蛋白代谢中的不同步骤的转录因子起作用的过氧化物酶体增植物活化受体 α (PPAR- α) 促效剂。通过与PPAR- α 相互作用,贝特类募集不同的辅因子且调节基因表达。因此,贝特类在降低空腹TG水平以及餐后TG和TRL残留颗粒方面是有效的。贝特类还具有适度LDL-C降低和HDL-C升高作用。ApoC-III的表达和水平降低是PPAR- α 促效剂的一致效应(Hertz等,J Biol Chem,1995,270(22):13470-13475)。在代谢综合征中,在非诺贝特治疗的情况下报告了血浆ApoC-III水平降低36%(Watts等,Diabetes,2003,52:803-811)。然而,贝特类在治疗患有高甘油三酯血症的LPLD受试者时已经无效。

[0077] “弗雷德里克森”系统用于将血脂异常的原发性(遗传)原因分类为数个亚组或类型。可能顺应于利用本文中所公开的化合物的疗法的血脂异常类型包括但不限于弗雷德里克森I型、FCS、LPLD。

[0078] “弗雷德里克森I型”也称为“脂蛋白脂肪酶缺乏”、“LPLD”、“家族性乳糜微粒血症综合征”或“FCS”且以数种形式存在:1a型(也称为Buerger-Gruestz综合征)是通常由于LPL缺乏或ApoC-II改变所致的脂蛋白脂肪酶缺陷;1b型(也称为家族性载脂蛋白CII缺陷)是一种由缺乏脂蛋白脂肪酶活化子载脂蛋白C-II导致的病状;和1c型是由于脂蛋白脂肪酶的循

环抑制剂所致的乳糜微粒血症。I型是常现于儿童期的罕见病症。其特征在于乳糜微粒严重升高和TG水平极度升高(一直达到远高于1000mg/dL而不是偶尔上升高达10,000mg/dL或更高),伴随腹痛、复发性急性胰腺炎、暴发性皮肤黄瘤和肝脾肿大的发作。患者罕见地显现动脉粥样硬化,可能是因为其血浆脂蛋白颗粒太大而不能进入动脉内膜(Nordestgaard等,J Lipid Res,1988,29:1491-1500;Nordestgaard等,Arteriosclerosis,1988,8:421-428)。I型通常由LPL基因或所述基因的辅因子ApoC-II的突变,导致了受影响的个体不能产生充分的功能活性LPL而引起。患者对所述突变来说是纯合的,或是复合杂合的。弗雷德里克森I型还可能是由于GPIHBP1、APOA5、LMF1或导致功能障碍LPL的其它基因的突变所致。Brunzell, Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K编, GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. 1999年10月12日 [2011年12月15日更新]。此外,在一些情况下,弗雷德里克森I型可能是由于个体中存在LPL抑制剂(例如抗LPL抗体),从而导致功能障碍LPL所致。在一般群体中,弗雷德里克森I型的流行率大约为百万分之一,且在南非和东魁北克由于始祖效应而高得多。患者对降TG药物反应极小或根本没反应(Tremblay等,J Clin Lipidol, 2011, 5:37-44; Brisson等, Pharmacogenet Genom, 2010, 20:742-747)且因此使用20克/天或更低的饮食脂肪限制来控制这种罕见病症的症状。

[0079] “弗雷德里克森II型”是原发性高脂血症的最常见形式。其进一步分类为IIa型和IIb型,主要取决于除LDL胆固醇(LDL-C)以外是否存在VLDL升高。IIa型(家族性高胆固醇血症)可以是散发性的(由于饮食因素)、多基因性的,或由于19号染色体上的LDL受体基因的突变(占群体的0.2%)或载脂蛋白B(apoB)基因的突变(0.2%)所致的真正家族性的。家族性形式以腱黄瘤、黄斑瘤和早熟性心血管疾病为特征。该病的发生率对于杂合子为约五百分之一,且对于纯合子为约百万分之一。IIb型(也称为家族性组合型高脂蛋白血症)是由于LDL-C和VLDL升高而导致的混合性高脂血症(高胆固醇和TG水平)。高VLDL水平是由于底物(包括TG、乙酰CoA)的过量产生和B-100合成的增加而导致。其也可能是由于LDL清除率的降低而导致。群体中的流行率为约10%。

[0080] “弗雷德里克森III型”(也称为异常β脂蛋白血症)是残留物廓清病或广义β病(Fern等,J Clin Pathol, 2008, 61:1174-118)。其是由于富胆固醇的VLDL(β-VLDL)所致。通常,患有该病状的患者由于乳糜微粒和VLDL残留物(例如,IDL)的廓清受损而具有升高的血浆胆固醇和TG水平。该廓清受损是由于载脂蛋白E(apoE)的缺陷而导致。残留物上所含的正常起作用的apoE使得能够与LDL受体结合并从循环中去除。受影响的个体体内的残留物累积会导致黄瘤症和早熟性冠状血管病和/或外周血管病。III型的最常见原因是存在apoE E2/E2基因型。据评估其流行率为大约1/10,000。

[0081] “弗雷德里克森IV型”(也称为家族性高甘油三酯血症)是大约1%人口中发生的常染色体显性病状。TG水平由于肝脏产生过量VLDL或杂合LPL缺陷而升高,但几乎总是小于1000mg/dL。血清胆固醇水平通常在正常限度内。所述病症是异源性的且表型受环境因素的强烈影响,尤其是碳水化合物和乙醇消耗。

[0082] “弗雷德里克森V型”具有高VLDL和乳糜微粒。其特征为功能损失型LPL基因变体的携带者,伴随LPL活性为至少20%(即,部分LPL缺陷,与弗雷德里克森I型相比较)。由于乳糜微粒和VLDL,这些患者呈现乳状血浆和严重的高甘油三酯血症。TG水平常大于1000mg/dL且

总胆固醇水平总是升高。LDL-C水平通常较低。其还与急性胰腺炎、葡萄糖耐受不良和高尿酸血症的风险升高相关联。症状一般存在于成人(>35岁)且虽然流行率相对罕见,但其比纯合的或复合杂合的LPL缺陷患者常见得多。

[0083] “完全互补”或“100%互补”意指第一核酸的核碱基序列的各核碱基在第二核酸的第二核碱基序列中具有互补的核碱基。在某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且第二核酸是靶核酸。

[0084] “间隙聚体(gapmer)”意指嵌合的反义化合物,其中具有支持RNase H裂解的多个核苷的内部区域位于具有一个或多个核苷的外部区域之间,其中构成内部区域的核苷在化学上不同于构成外部区域的核苷。内部区域可被称为“间隙”或“间隙区段”且外部区域可被称为“翼部”或“翼状区段”。

[0085] “间隙变宽”意指嵌合的反义化合物,其具有位于具有1至6个核苷的5'和3'翼状区段之间且紧邻所述翼状区段的12个或更多个连续2'-脱氧核糖核苷的间隙区段。

[0086] “基因筛选”意指在动物中筛选基因型变异或突变。在一些情况下,突变可以导致动物的表型变化。在某些情况下,表型变化是或导致动物的疾病、病症或病状。例如,LPL或ApoC-II基因中的突变可以导致弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD。基因筛选可以通过任何本领域已知的技术来进行,例如对LPL或ApoC-II基因或mRNA进行定序以检测突变。将所筛选的动物的序列与正常动物的序列相比较以确定序列中是否存在任何突变。或者,例如,LPL或ApoC-II基因或mRNA中的突变的鉴定可以使用PCR扩增和凝胶或晶片分析来进行。

[0087] “葡萄糖”是被细胞用作能量来源和炎性中间物的单糖。“血浆葡萄糖”是指血浆中存在的葡萄糖。

[0088] “高密度脂蛋白”或“HDL”是指脂质(胆固醇、甘油三酯和磷脂)与蛋白质(载脂蛋白(apo)和酶)的大分子复合物。HDL的表面主要含有载脂蛋白A、载脂蛋白C和载脂蛋白E。这些载脂蛋白中的一些的功能在于指引HDL从外周组织到肝脏。血清HDL水平可以受潜在的基因原因影响(Weissglas-Volkov和Pajukanta,J Lipid Res,2010,51:2032-2057)。流行病学研究已经指出,HDL水平增加能防止心血管疾病或冠心病(Gordon等,Am.J.Med.1977.62:707-714)。HDL的这些作用与甘油三酯和LDL浓度无关。在临床实践中,低血浆HDL更常与增加血浆甘油三酯的其它病症,例如中心性肥胖、胰岛素抗性、2型糖尿病和肾病(慢性肾衰竭或肾病变性蛋白尿)相关(Kashyap.Am.J.Cardiol.1998.82:42U-48U)。

[0089] “高密度脂蛋白-胆固醇”或“HDL-C”意指与高密度脂蛋白颗粒缔合的胆固醇。血清(或血浆)中的HDL-C的浓度典型地以mg/dL或nmol/L定量。“HDL-C”和“血浆HDL-C”分别意指血清和血浆中的HDL-C。

[0090] “HMG-CoA还原酶抑制剂”意指通过抑制酶HMG-CoA还原酶而起作用的药剂,诸如阿伐他汀、罗苏伐他汀、氟伐地汀、洛伐他汀、帕伐他汀和辛伐他汀。

[0091] “杂交”意指使互补的核酸分子退火。在某些实施方案中,互补的核酸分子包括反义化合物和靶核酸。

[0092] “高胆固醇血症”意指按照有关成人高胆固醇的治疗的检测、评估的国家胆固醇教育计划(NCEP)的专门组报告的指南(参见Arch.Int.Med.(1988)148,36-39),以升高的胆固醇或循环(血浆)胆固醇、LDL-胆固醇和VLDL-胆固醇为特征的病症。

[0093] “高脂血症”或“高脂血”是以升高的血清脂质或循环(血浆)脂质为特征的病状。这

种病状表现为异常高的脂肪浓度。循环血液中的脂质级分是胆固醇、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白、乳糜微粒和甘油三酯。高脂血症的弗雷德里克森分类是基于如通过电泳或超速离心所测量的TG和富胆固醇脂蛋白颗粒的型式,且通常用于表征诸如高甘油三酯血症等高脂血症的原发性原因(Fredrickson和Lee, *Circulation*, 1965, 31:321-327; Fredrickson等, *New Eng J Med*, 1967, 276(1):34-42)。

[0094] “高甘油三酯血症”意指以升高的甘油三酯水平为特征的病状。高甘油三酯血症是富甘油三酯(TG)脂蛋白:VLDL和在较低程度上乳糜微粒(CM)的产生增加和/或其分解代谢减少或延迟的结果。其病因包括原发性(即,遗传原因)和继发性(其它潜在的原因诸如糖尿病、代谢综合征/胰岛素抗性、肥胖、机体不活动、吸烟、过量饮酒和极高碳水化合物的饮食)因素或,最常见的是二者的组合(Yuan等, *CMAJ*, 2007, 176:1113-1120)。高甘油三酯血症是与心血管代谢疾病(Hegele等, 2009, *Hum Mol Genet*, 18:4189-4194; Hegele和Pollex 2009, *Mol Cell Biochem*, 326:35-43)以及发生最严重形式的急性胰腺炎(Toskes 1990, *Gastroenterol Clin North Am*, 19:783-791; Gaudet等, 2010, *Atherosclerosis Supplements*, 11:55-60; Catapano等, 2011, *Atherosclerosis*, 217S:S1-S44; Tremblay等, 2011, *J Clin Lipidol*, 5:37-44)的风险增加相关的常见临床特质。心血管代谢疾病的实例包括但不限于糖尿病、代谢综合征/胰岛素抗性和遗传病症,诸如家族性乳糜微粒血症综合征(FCS)、家族性组合型高脂血症和家族性高甘油三酯血症。边界高TG水平(150-199mg/dL)通常见于一般群体中并且是代谢综合征/胰岛素抗性状态的常见组分。高TG水平(200-499mg/dL)同样如此,但随着血浆TG水平增高,潜在基因因素起着越来越重要的发病作用。极高TG水平($\geq 500\text{mg/dL}$)也最常与升高的CM水平相关,且伴随有急性胰腺炎风险增高。如果TG水平超过 880mg/dL ($>10\text{mmol}$),则临床上认为胰腺炎风险显著,且欧洲动脉粥样硬化学会/欧洲心脏病学会(EAS/ESC) 2011版指南阐述预防急性胰腺炎的行动是强制性的(Catapano等, 2011, *Atherosclerosis*, 217S:S1-S44)。根据EAS/ESC 2011版指南,高甘油三酯血症是所有胰腺炎案例中的大约10%的原因,且在介于440至 880mg/dL 之间的TG水平下可能发展胰腺炎。基于来自显示升高的TG水平对于动脉粥样硬化CVD是无关的风险因素的临床研究的证据,国家胆固醇教育计划成人治疗小组III(NCEP 2002, *Circulation*, 106:3143-421)和美国糖尿病学会(ADA 2008, *Diabetes Care*, 31:S12-S54)推荐低于 150mg/dL 的靶TG水平以降低心血管风险。

[0095] “鉴定”或“诊断”患有所述疾病、病症或病状的动物意指通过本领域已知的方法鉴定倾向于或患有所述疾病、病症或病状的受试者。

[0096] “鉴定”或“诊断”患有弗雷德里克森I型血脂异常的动物意指鉴定倾向于或患有弗雷德里克森I(a、b或c)型血脂异常、FCS、LPLD的受试者。鉴定患有弗雷德里克森I型、FCS、LPLD的受试者可以通过来检查受试者的病历连同任何本领域已知的筛选技术,例如基因筛选或LPL抑制剂筛选来进行。例如,具有空腹TG在 750mg/dL 以上的记录病历的患者则筛选诸如ApoC2、ApoA5、GPIHBP1或LMF1等影响LPL的LPL基因的突变。

[0097] “鉴定”或“诊断”患有代谢疾病或心血管疾病的动物意指鉴定倾向于或患有代谢疾病、心血管疾病或代谢综合征的受试者;或鉴定具有代谢疾病、心血管疾病或代谢综合征的任何症状,包括但不限于高胆固醇血症、高血糖、高脂血症、高甘油三酯血症、高血压致胰岛素抗性增高、胰岛素敏感性降低、超正常的体重和/或超正常的体脂含量或其任何组合的

受试者。所述鉴定可以通过任何方法来实现,包括但不限于标准临床测试或评估,诸如测量血清或循环(血浆)胆固醇、测量血清或循环(血浆)血糖、测量血清或循环(血浆)甘油三酯、测量血压、测量体脂含量、测量体重等等。

[0098] “改善心血管结果”意指减少不利心血管事件的发生或降低其风险。不利心血管事件的实例包括而限于死亡、再梗死、中风、心源性休克、肺水肿、心脏停搏和心房节律障碍。

[0099] “紧邻”意指在紧邻的要素之间,例如在区域、区段、核苷酸和/或核苷之间不存在介入的要素。

[0100] “增高HDL”或“升高HDL”意指在施用至少一种本发明化合物之后使动物中的HDL水平与未施用任何化合物的动物中的HDL水平相比增高。

[0101] “个体”或“受试者”或“动物”意指选择用于治疗或疗法的人类或非人类动物。

[0102] “诱导”、“抑制”、“增强”、“升高”、“增高”、“降低”、“减少”等等表示两种状态之间的定量差异。例如,“有效抑制ApoCIII的活性或表达的量”意指经处理的样品中的ApoCIII活性或表达的水平将不同于未处理样品中的ApoCIII活性或表达的水平。所述术语适用于例如表达水平和活性水平。

[0103] “抑制表达或活性”是指降低或阻遏RNA或蛋白的表达或活性,且未必指示完全消除表达或活性。

[0104] “胰岛素抗性”被定义为正常量的胰岛素不足以由脂肪细胞、肌肉细胞和肝细胞产生正常胰岛素应答的状况。脂肪细胞中的胰岛素抗性导致存储的甘油三酯水解,由此使血浆中的游离脂肪酸升高。肌肉中的胰岛素抗性降低了葡萄糖摄取,而肝脏中的胰岛素抗性减少了葡萄糖存储,两种作用都用于使血糖升高。由于胰岛素抗性所致的胰岛素和葡萄糖的高血浆水平往往导致代谢综合征和2型糖尿病。

[0105] “胰岛素敏感性”是个体有效地处理葡萄糖的程度的量度。具有高胰岛素敏感性的个体有效地处理葡萄糖,而具有低胰岛素敏感性的个体不会有效地处理葡萄糖。

[0106] “核苷间键联”是指核苷之间的化学键。

[0107] “静脉内施用”意指施用到静脉内。

[0108] “连接的核苷”意指键合在一起的相邻核苷。

[0109] “脂质降低”意指受试者中的一种或多种脂质的降低。“脂质升高”意指受试者中的脂质(例如HDL)的增高。脂质降低或脂质增高可以在一个或多个剂量下在一定时间内发生。

[0110] “脂质降低疗法”或“脂质降低剂”意指提供给受试者以在受试者中降低一种或多种脂质的治疗方案。在某些实施方案中,提供脂质降低疗法以在受试者中降低CETP、ApoB、总胆固醇、LDL-C、VLDL-C、IDL-C、非HDL-C、甘油三酯、小致密LDL颗粒和Lp(a)中的一种或多种。脂质降低疗法的实例包括他汀类、贝特类、MTP抑制剂。

[0111] “脂蛋白”,诸如VLDL、LDL和HDL,是指在血清、血浆和淋巴中发现的且对脂质转运非常重要的蛋白质群组。每种脂蛋白的化学组成的不同之处在于HDL具有较高的蛋白质对脂质比例,而VLDL具有较低的蛋白质对脂质比例。

[0112] “脂蛋白脂肪酶”或“LPL”是指使诸如CM或VLDL等脂蛋白中发现的TG水解成游离脂肪酸和单酰基甘油的酶。LPL需要apo C-II作为辅因子以在使TG水解方面起作用。LPL主要在骨骼肌、脂肪组织和心肌中产生。TG从CM和VLDL中水解和去除在正常情况下能防止CM质

量和TG饭后过度上升。

[0113] “脂蛋白脂肪酶缺乏性”、“脂蛋白脂肪酶缺乏”、“LPL缺乏”或“LPLD”也称为“弗雷德里克森I型血脂异常”、“乳糜微粒血症”、“家族性乳糜微粒血症综合征”或“FCS”。虽然患有LPLD的受试者一般缺乏有效分解诸如TG等脂肪酸所必需的LPL或LPL活性,但这些受试者可能仍具有极小LPL活性或表达极小水平的LPL。在一些情况下,LPLD受试者可以表达LPL或具有LPL活性直至约或不超过20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%活性。在其它情况下,LPLD受试者不具有可测量的LPL或LPL活性。LPLD的一个实施方案涵盖患有“高脂蛋白血症Ia型”(也称为“弗雷德里克森Ia型”)的受试者,且是指受试者不能够产生充足的有效分解诸如TG等脂肪酸所必需的功能脂蛋白脂肪酶。不能够分解TG导致受试者的高甘油三酯血症,且往往在饭后超过12个小时,仍存在高TG和乳糜微粒血症且直观表现为脂血症。Ia型通常是由LPL基因中的一个或多个突变造成。如本文中所公开,LPLD还涵盖具有功能障碍脂蛋白脂肪酶的受试者,诸如患有“高脂蛋白血症Ib型”(也称为“弗雷德里克森Ib型”)和“高脂蛋白血症Ic型”(也称为“弗雷德里克森Ic型”)的那些受试者。Ib型是由缺乏脂蛋白脂肪酶活化载脂蛋白C-II造成。Ic型是由于脂蛋白脂肪酶的循环抑制剂。如同Ia型,Ib/Ic型受试者受不能够分解TG,从而导致高甘油三酯血症和高TG困扰,且往往在饭后超过12小时仍存在乳糜微粒血症且直观表现为脂血症。在某些实施方案中,LPLD与LPL基因中的至少一个突变相关,诸如P207L、G188L或D9N或影响LPL的其它突变(Brunzell, Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K编, GeneReviews™[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. 1999年10月12日[2011年12月15日更新])。

[0114] “低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)”意指低密度脂蛋白颗粒中所输送的胆固醇。血清(或血浆)中的LDL-C的浓度典型地以mg/dL或nmol/L定量。“血清LDL-C”和“血浆LDL-C”分别意指血清和血浆中的LDL-C。

[0115] “主要风险因子”是指导致特定疾病或病状的高风险因子。在某些实施方案中,冠心病的主要风险因子包括而限于吸烟、高血压、低HDL-C、冠心病家族史、年龄和本文中所公开的其它因子。

[0116] “代谢病症”或“代谢疾病”是指以代谢功能的改变或失调为特征的病状。“代谢性”和“代谢”是本领域中熟知的术语且一般包括活有机体内发生的生物过程的全部范围。代谢性病症包括但不限于高血糖、前驱糖尿病、糖尿病(1型和2型)、胰岛素抗性、代谢综合征和由于2型糖尿病所致的血脂异常。

[0117] “代谢综合征”意指以起源于代谢的脂质和非脂质心血管风险因子的簇集为特征的病状。在某些实施方案中,通过以下因子中的任何3个的存在来鉴定代谢综合征:男性中腰围大于102cm或女性中腰围大于88cm;至少150mg/dL的血清甘油三酯;男性中HDL-C小于40mg/dL或女性中小于50mg/dL;至少130/85mmHg的血压;和至少110mg/dL的空腹葡萄糖。这些决定因素可以在临床实践中容易地测量(JAMA, 2001, 285:2486-2497)。

[0118] “错配”或“非互补性核碱基”是指当第一核酸的核碱基不能够与第二核酸或靶核酸的对应核碱基配对时的情况。

[0119] “混合型血脂异常”意指以升高的胆固醇和升高的甘油三酯为特征的病状。

[0120] “经修饰的核苷间键联”是指来自天然存在的核苷间键的取代或任何变化。例如,

硫代磷酸酯键联是经修饰的核苷间键联。

[0121] “经修饰的核碱基”是指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶以外的任何核碱基。例如,5-甲基胞嘧啶是经修饰的核碱基。“未经修饰的核碱基”意指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0122] “经修饰的核苷”意指具有至少一个经修饰的糖部分和/或经修饰的核碱基的核苷。

[0123] “经修饰的核苷酸”意指具有至少一个经修饰的糖部分、经修饰的核苷间键联和/或经修饰的核碱基的核苷酸。

[0124] “经修饰的寡核苷酸”意指包含至少一个经修饰的核苷酸的寡核苷酸。

[0125] “经修饰的糖”是指对天然的糖的取代或改变。例如,经2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是经修饰的糖。

[0126] “基序”意指反义化合物中的化学上不同的区域的类型。

[0127] “天然存在的核苷间键联”意指3'与5'磷酸二酯键联。

[0128] “天然的糖部分”意指DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中发现的糖。

[0129] 已经报告“烟酸”或“烟碱酸”能减少对肝脏的脂肪酸流入量和肝脏的VLDL分泌。这种作用似乎部分由对脂肪组织中的激素敏感性脂肪酶的作用来介导。烟酸在肝脏和脂肪组织中都有关键作用位点。在肝脏中,据报告烟酸能抑制甘油二酯酰基转移酶-2(DGAT-2),所述酶导致VLDL颗粒从肝脏分泌减少,这还体现在IDL和LDL颗粒二者减少,另外,烟酸主要通过刺激肝脏中的apo A1产生使HDL-C和apo A1升高,并且还被证明能降低患有高脂血症的患者中的VLDL-ApoCIII浓度(Wahlberg等人,Acta Med Scand 1988;224:319-327)。烟酸对脂肪细胞中的脂解作用和脂肪酸动员的作用非常明确。然而,烟酸在治疗患有高甘油三酯血症的LPLD受试者方面无效。

[0130] “核酸”是指构成单体核苷酸的分子。核酸包括核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸(ssDNA)、双链核酸(dsDNA)、小干扰核糖核酸(siRNA)和微小RNA(miRNA)。核酸还可以包含单一分子中的这些要素的组合。

[0131] “核碱基”意指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0132] “核碱基互补性”是指能够与另一核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)互补。例如,在RNA中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)互补。在某些实施方案中,互补核碱基是指反义化合物中能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,如果反义化合物的某一位置上的核碱基能够与靶核酸的某一位置上的核碱基进行氢键合,则所述寡核苷酸与所述靶核酸被视为在该核碱基对处互补。

[0133] “核碱基序列”意指与任何糖、键联或核碱基修饰无关的连续核碱基顺序。

[0134] “核苷”意指与糖连接的核碱基。

[0135] “核苷模拟物”包括用于在寡聚化合物一个或多个位置上置换糖或糖和碱基且未必置换键联的那些结构;例如具有吗啉基、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、诸如非呋喃糖单元等双环或三环糖模拟物的核苷模拟物。

[0136] “核苷酸”意指具有与核苷的糖部分共价连接的磷酸酯基的核苷。

[0137] “核苷酸模拟物”包括用于在寡聚化合物诸如例如肽核酸或吗啉基(由-N(H)-C(=O)-O-或其它非磷酸二酯键联连接的吗啉基)的一个或多个位置上置换核苷和键联的那些

结构。

[0138] “寡聚化合物”或“寡聚体”意指连接的单体亚单元的聚合物,其能够与核酸分子的区域杂交。在某些实施方案中,寡聚化合物是寡核苷。在某些实施方案中,寡聚化合物是寡核苷酸。在某些实施方案中,寡聚化合物是反义化合物。在某些实施方案中,寡聚化合物是反义寡核苷酸。在某些实施方案中,寡聚化合物是嵌合寡核苷酸。

[0139] “寡核苷酸”意指连接的核苷的聚合物,各核苷可以彼此独立地经修饰或未经修饰。

[0140] “胃肠外施用”意指通过注射或输注进行的施用。胃肠外施用包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、腹膜内施用或颅内施用,例如,鞘内或脑室内施用。施用可以是连续的、长期的、或短期的或间歇的。

[0141] “肽”意指通过由酰胺键连接至少两个氨基酸而形成的分子。肽是指多肽和蛋白质。

[0142] “药剂”意指当被施用于个体时提供治疗益处的物质。例如,在某些实施方案中,靶向ApoCIII的反义寡核苷酸是药剂。

[0143] “药物组合物”或“组合物”意指适合施用于个体的物质的混合物。例如,药物组合物可以包含一种或多种活性剂和药物载剂,诸如无菌水溶液。

[0144] “药学上可接受的载体”意指不干扰化合物的结构的介质或稀释剂。所述载剂中的某些使得药物组合物能够被配制为例如片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、糊剂、膏剂、悬浮液和口含锭以便由受试者口服摄入。所述载剂中的某些使得药物组合物能够经配制以用于注射、输注或局部施用。例如,药学上可接受的载剂可以是无菌水溶液。

[0145] “药学上可接受的衍生物”或“盐”涵盖本文中所描述的化合物的衍生物,诸如溶剂合物、水合物、酯、前药、多晶型物、异构体、经同位素标记的变异体、药学上可接受的盐和本领域中已知的其它衍生物。

[0146] “药学上可接受的盐”意指反义化合物的生理学上和药学上可接受的盐,即,保留亲本化合物的所需生物活性且不会赋予其不需要的毒理学作用的盐。术语“药学上可接受的盐”或“盐”包括由药学上可接受的无毒酸或碱,包括无机的或有机的酸和碱制备的盐。本文中所描述的化合物的药学上可接受的盐可以通过本领域中所熟知的方法来制备。关于药学上可接受的盐的综述,参见Stahl和Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)。反义寡核苷酸的钠盐是可用的且被普遍接受治疗性施用于人类。因此,在一个实施方案中,本文中所描述的化合物呈钠盐形式。

[0147] “硫代磷酸酯键联”意指核苷之间的键联,其中磷酸二酯键通过用硫原子置换非桥连氧原子之一而被修饰。硫代磷酸酯键联是经修饰的核苷间键联。

[0148] “部分”意指核酸的限定数目的连续(即,连接的)核碱基。在某些实施方案中,部分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,部分是反义化合物的限定数目的连续核碱基。

[0149] “预防”是指延迟或阻碍疾病、病症或病状的发作或发展,持续几分钟到无限期的时间段。预防还意指降低发展疾病、病症或病状的风险。

[0150] “前药”意指以无活性形式制备的治疗剂,其在体内或其细胞内通过内源性酶或其

它化学物质或条件的作用转化为活性形式(即,药物)。

[0151] “上升”意指量的增加。例如,使血浆HDL水平上升意指使血浆中的HDL的量增加。

[0152] “TG与HDL之比”意指TG水平相对于HDL水平。已经将高TG和/或低HDL的出现与心血管疾病发病率、结果和死亡率相关联。“改良TG与HDL之比”意指降低TG水平和/或升高HDL水平。

[0153] “降低”意指使得下降至较小程度、大小、量或数目。例如,降低血浆甘油三酯水平意指使血浆中的甘油三酯的量下降。

[0154] “区域”或“靶区域”被定义为靶核酸中具有至少一种可鉴定结构、功能或特征的部分。例如,靶区域可以涵盖3'UTR、5'UTR、外显子、内含子、外显子/内含子接合点、编码区、翻译起始区、翻译终止区或其它确定的核酸区。ApoCIII的结构确定的区域可以通过登录号从诸如NCBI等序列数据库获得,且所述信息是以引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,靶区域可以涵盖从靶区域内的一个靶区段的5'靶位点到靶区域内的另一靶区段的3'靶位点的序列。

[0155] “核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2'位置具有羟基的核苷酸。核糖核苷酸可以被多种取代基中的任一种修饰。

[0156] “第二药剂”或“第二治疗剂”意指可以与“第一药剂”组合使用的药剂。第二治疗剂可以包括但不限于siRNA或反义寡核苷酸,包括靶向ApoCIII的反义寡核苷酸。第二药剂还可以包括抗ApoCIII抗体、ApoCIII肽抑制剂、DGAT1抑制剂、胆固醇降低剂、脂质降低剂、葡萄糖降低剂和消炎剂。

[0157] “区段”被定义为核酸内的区域的较小子部分。例如,“靶区段”意指靶核酸中被一种或多种反义化合物靶向的核苷酸序列。“5'靶位点”是指靶区段的5'最末端核苷酸。“3'靶位点”是指靶区段的3'最末端核苷酸。

[0158] 本文中所教授的反义寡核苷酸或靶核酸的“缩短”或“截短”型式缺失一个、两个或更多个核苷。

[0159] “副作用”意指可归因于治疗的除所需作用以外的生理性应答。在某些实施方案中,副作用包括注射位点反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝毒性、肾毒性、中枢神经系统异常、肌病和不适。例如,血清中的转氨酶水平增高可以指示肝毒性或肝功能异常。例如,胆红素增高可以指示肝毒性或肝功能异常。

[0160] “单链寡核苷酸”意指未与互补链杂交的寡核苷酸。

[0161] “可特异性杂交的”是指在活体内测定和治疗性治疗的情况下,反义化合物与靶核酸具有足以诱导所需效应的互补性程度,而在需要特异性结合的条件下(即,在生理条件下)对非靶核酸表现出极少作用或无作用。

[0162] “他汀类”意指抑制HMG-CoA还原酶的活性的药剂。他汀类通过竞争性抑制HMG-CoA还原酶活性来减少肝脏中的胆固醇合成。细胞内胆固醇浓度降低诱导肝细胞细胞表面上的LDL受体表达,这导致LDL-C从血液中浸出增加和循环LDL-C和其它含apo-B脂蛋白(包括富TG颗粒)的浓度降低。与其对LDL-C和LDL受体的作用无关,他汀类降低ApoC-III的血浆浓度和细胞mRNA水平(Ooi等,Clinical Sci,2008,114:611-624)。由于他汀类对死亡率以及大部分心血管疾病结果参数具有显著影响,所以这些药物是降低总心血管疾病风险和适度升高的TG水平的第一选择。更有效的他汀类(阿托伐他汀、瑞舒伐他汀和匹伐他汀)显示TG水

平稳定下降,尤其在剂量下和具有升高的TG的患者中。然而,他汀类在治疗患有高甘油三酯血症的LPLD受试者时已经无效。

[0163] “皮下施用”意指仅在皮肤下面的施用。

[0164] “受试者”意指选择用于治疗或疗法的人类或非人类动物。

[0165] “心血管疾病或病症的症状”意指由心血管疾病或病症产生的和伴随心血管疾病或病症且充当其指示的现象。例如,绞痛;胸痛;气短;心悸;虚弱;眩晕;恶心;盗汗;心动过速;心搏徐缓;心律不齐;心房颤动;下肢肿胀;发绀;疲劳;晕厥;面部麻木;肢端麻木;跛行或肌肉抽筋;腹部肿胀;或发烧是心血管疾病或病症的症状。

[0166] “靶向”或“靶向的”意指将与靶核酸特异性杂交并诱导所需效应的反义化合物的设计和选择的过程。

[0167] “靶核酸”、“靶RNA”和“靶RNA转录物”均指能够由反义化合物来靶向的核酸。

[0168] “治疗性生活方式改变”意指旨在降低脂肪/脂肪组织质量和/或胆固醇的饮食和生活方式改变。所述改变可以降低发展心脏疾病的风险,并且可以包括关于日总卡路里、总脂肪、饱和脂肪、多不饱和脂肪、单不饱和脂肪、糖类、蛋白质、胆固醇、不溶性纤维的饮食摄入的建议,以及关于身体活动的建议。

[0169] “治疗”是指施用本发明的化合物以实现对疾病、病症或病状的改变或改善。

[0170] “甘油三酯”或“TG”意指由甘油与三个脂肪酸分子的组合组成的脂质或中性脂肪。

[0171] “2型糖尿病”(也称为“2型糖尿病”、“糖尿病2型”、“非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)”、“肥胖相关糖尿病”或“成人发作糖尿病”)是代谢性病症,主要以胰岛素抗性、相关胰岛素缺陷和高血糖为特征。

[0172] “未经修饰的核苷酸”意指由天然存在的核碱基、糖部分和核苷间键联组成的核苷酸。在某些实施方案中,未经修饰的核苷酸是RNA核苷酸(即, β -D-核糖核苷)或DNA核苷酸(即, β -D-脱氧核糖核苷)。

[0173] “翼状区段”意指经修饰以赋予诸如提高的抑制活性、增加的靶核酸结合亲和力或对被活体内核酸酶降解的抗性寡核苷酸性质的一个或多个核苷。

[0174] 某些实施方案

[0175] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低ApoCIII水平的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,肝脏、脂肪组织、心脏、骨骼肌或小肠中的ApoCIII水平被降低。

[0176] 某些实施方案提供了一种在动物中治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的心血管和/或代谢疾病或病症或其症状或风险得到改良。

[0177] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中治疗、预防、延迟或改善胰腺炎的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,胰腺炎或其症状或风险得到改良。

[0178] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化

合物。

[0179] 在某些实施方案中,所述动物具有至少 $\geq 1200\text{mg/dL}$ 、 $\geq 1100\text{mg/dL}$ 、 $\geq 1000\text{mg/dL}$ 、 $\geq 900\text{mg/dL}$ 、 $\geq 880\text{mg/dL}$ 、 $\geq 850\text{mg/dL}$ 、 $\geq 800\text{mg/dL}$ 、 $\geq 750\text{mg/dL}$ 、 $\geq 700\text{mg/dL}$ 、 $\geq 650\text{mg/dL}$ 、 $\geq 600\text{mg/dL}$ 、 $\geq 550\text{mg/dL}$ 、 $\geq 500\text{mg/dL}$ 、 $\geq 450\text{mg/dL}$ 、 $\geq 440\text{mg/dL}$ 、 $\geq 400\text{mg/dL}$ 、 $\geq 350\text{mg/dL}$ 、 $\geq 300\text{mg/dL}$ 、 $\geq 250\text{mg/dL}$ 、 $\geq 200\text{mg/dL}$ 、 $\geq 150\text{mg/dL}$ 的TG水平。在某些实施方案中,所述动物具有 $\geq 880\text{mg/dL}$ 的历史TG水平、 $\geq 750\text{mg/dL}$ 的空腹TG水平和/或 $\geq 440\text{mg/dL}$ 的饮食后TG水平。

[0180] 在某些实施方案中,所述化合物使TG(饭后或空腹)从基线TG水平降低至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、至少15%、至少10%、至少5%或至少1%。在某些实施方案中,TG(饭后或空腹)水平是 $\leq 1900\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1800\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1700\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1600\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1500\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1400\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1300\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1200\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1100\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1000\text{mg/dL}$ 、 $\leq 900\text{mg/dL}$ 、 $\leq 800\text{mg/dL}$ 、 $\leq 750\text{mg/dL}$ 、 $\leq 700\text{mg/dL}$ 、 $\leq 650\text{mg/dL}$ 、 $\leq 600\text{mg/dL}$ 、 $\leq 550\text{mg/dL}$ 、 $\leq 500\text{mg/dL}$ 、 $\leq 450\text{mg/dL}$ 、 $\leq 400\text{mg/dL}$ 、 $\leq 350\text{mg/dL}$ 、 $\leq 300\text{mg/dL}$ 、 $\leq 250\text{mg/dL}$ 、 $\leq 200\text{mg/dL}$ 、 $\leq 150\text{mg/dL}$ 或 $\leq 100\text{mg/dL}$ 。

[0181] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,所述化合物使HDL(饭后或空腹)从基线HDL水平增高至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、至少15%、至少10%、至少5%或至少1%。

[0182] 在某些实施方案中,所述化合物使ApoCIII降低约81%、使TG降低约69%、使VLDL ApoCIII降低约80%、使HDL增高约78%、使非HDL-C降低约58%和/或使ApoB降低约13%。

[0183] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,所述化合物在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状,方式是通过在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0184] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的方法,其包括向动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,所述化合物在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状,方式是通过在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0185] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状的方法,其包括向动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,所述化合物在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状,方式是通过在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0186] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中

预防、治疗、改善心血管疾病、病症或病状、延迟其发作或降低其风险的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、治疗、改善心血管疾病、病症或病状、延迟其发作或降低其风险,方式是通过在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0187] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低CETP、VLDL、VLDL ApoCIII、胆固醇、乳糜微粒和/或ApoB水平的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,ApoB是ApoB-48或ApoB-100。在某些实施方案中,ApoB-48的量体现动物中的乳糜微粒的量。在某些实施方案中,胆固醇是总胆固醇或非HDL胆固醇。

[0188] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增加ApoA1、PON1、脂肪清除率、乳糜微粒-甘油三酯(CM-TG)清除率和/或HDL的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。某些实施方案提供了一种用于在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中改良TG与HDL之比的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。

[0189] 某些实施方案提供了一种用于治疗受严重或多发性胰腺炎发作困扰的患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的成年患者的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物。在某些实施方案中,所述患者尽管进行了饮食脂肪限制但仍受胰腺炎困扰。

[0190] 某些实施方案提供了一种用于鉴定受弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD困扰的受试者的方法,其包括对所述受试者进行基因筛选。某些实施方案提供了一种用于鉴定处于弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD风险下的受试者的方法,其包括对所述受试者进行基因筛选。在某些实施方案中,所述基因筛选是通过编码LPL或ApoC-II的基因或RNA转录物的序列分析来进行。在某些实施方案中,针对LPL基因中的至少一个突变,诸如P207L、G188L、D9N或影响LPL的其它突变对所述受试者进行基因筛选(Brunzell, Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K编, GeneReviews™[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. 1999年10月12日[2011年12月15日更新])。

[0191] 某些实施方案提供了一种用于鉴定受弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD困扰的受试者的方法,其包括针对LPL抑制抗体的存在对所述受试者进行筛选。某些实施方案提供了一种用于鉴定处在弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的风险下的受试者的方法,其包括针对LPL抑制抗体的存在对所述受试者进行筛选。

[0192] 在某些实施方案中,LPLD受试者中的LPL表达水平是不可检测的。在某些实施方案中,LPLD受试者中的LPL水平是可检测的。在某些实施方案中,所述LPLD受试者中的LPL水平是非LPLD受试者的LPL水平的至多25%、至多24%、至多23%、至多22%、至多21%、至多20%、至多19%、至多18%、至多17%、至多16%、至多15%、至多14%、至多13%、至多12%、至多11%、至多10%、至多9%、至多8%、至多7%、至多6%、至多5%、至多4%、至多3%、至多2%或至多1%。

[0193] 在某些实施方案中,LPLD受试者中的LPL活性水平是不可检测的。在某些实施方案中,LPLD受试者中的LPL活性水平是可检测的。在某些实施方案中,所述LPLD受试者中的LPL

活性水平是非LPLD受试者的LPL活性水平的至多25%、至多24%、至多23%、至多22%、至多21%、至多20%、至多19%、至多18%、至多17%、至多16%、至多15%、至多14%、至多13%、至多12%、至多11%、至多10%、至多9%、至多8%、至多7%、至多6%、至多5%、至多4%、至多3%、至多2%或至多1%。在某些实施方案中,ApoCIII核酸是GENBANK登录号NM_000040.1中所阐述的序列(作为SEQ ID NO:1并入本文中)、从核苷酸20262640至20266603的截短的GENBANK登录号NT_033899.8中所阐述的序列(作为SEQ ID NO:2并入本文中)和从核苷酸6238608至6242565的截短的GenBank登录号NT_035088.1中所阐述的序列(作为SEQ ID NO:4并入本文中)中的任一个。

[0194] 在某些实施方案中,所述ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是靶向ApoCIII的反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是反义寡核苷酸。在某些实施方案中,所述反义寡核苷酸是经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4互补的序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0195] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含与ApoCIII互补的反义寡核苷酸的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的核碱基序列。在某些实施方案中,所述靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸具有除SEQ ID NO:3的序列以外的序列。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含从美国专利7,598,227、美国专利7,750,141、PCT公布WO 2004/093783或PCT公布WO 2012/149495中所公开的任何序列中选出的序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列,所述文献都以引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有从美国专利7,598,227、美国专利7,750,141、PCT公布WO 2004/093783或PCT公布WO 2012/149495中所公开的任何序列中选出的序列,所述文献都以引用的方式并入本文中。

[0196] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸由经修饰的单链寡核苷酸组成。

[0197] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成。

[0198] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷组成。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷和ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的核碱基序列组成。

[0199] 在某些实施方案中,所述化合物包含至少一个经修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,所述核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,各核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0200] 在某些实施方案中,所述化合物包含至少一个包含经修饰的糖的核苷。在某些实施方案中,所述至少一个经修饰的糖是双环糖。在某些实施方案中,所述至少一个经修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基。

[0201] 在某些实施方案中,所述化合物包含至少一个包含经修饰的核碱基的核苷。在某些实施方案中,所述经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0202] 在某些实施方案中,所述化合物包含有包含以下各项的经修饰的寡核苷酸:(i)由连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,且其中各翼状区段的各核苷包含经修饰的糖。

[0203] 在某些实施方案中,所述化合物包含有包含以下各项的经修饰的寡核苷酸:(i)由8至12个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由1至5个连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由1至5个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0204] 在某些实施方案中,所述化合物包含有包含以下各项的经修饰的寡核苷酸:(i)由十个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由五个连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由五个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0205] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低心血管疾病的风险的方法,所述方法是通过向所述动物施用治疗有效量的包含由12至30个连接的核苷组成的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸与ApoCIII核酸互补,且其中所述经修饰的寡核苷酸降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。在某些实施方案中,所述ApoCIII核酸是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%互补。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸包含靶向ApoCIII的反义寡核苷酸的至少8个连续核碱基。在其它实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的核碱基序列的至少8个连续核碱基。

[0206] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、治疗、改善或减轻心血管疾病的至少一种症状的方法,其包括向所述动物施用治疗有效量的包含由12至30个连接的核苷组成且与ApoCIII核酸互补的经修饰的寡核苷酸的化合物。在某些实施方案中,所述ApoCIII核酸是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%互补。在其它实施方案中,施用于所述动物的所述经修饰的寡核苷酸通过降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比来预防、治疗、改善或减轻心血管疾病的至少一种症状。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸包含靶向ApoCIII的反义寡核苷酸的至少8个连续核碱基。在其它实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的至少8个连续核碱基。

[0207] 在其它实施方案中,心血管疾病的症状包括但不限于绞痛;胸痛;气短;心悸;虚弱;眩晕;恶心;盗汗;心动过速;心搏徐缓;心律不齐;心房颤动;下肢肿胀;发绀;疲劳;晕

厥;面部麻木;肢端麻木;跛行或肌肉抽筋;腹部肿胀;或发烧。

[0208] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,所述方法是通过向所述动物施用治疗有效量的由靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸组成的化合物。其它实施方案提供了一种在动物中预防、治疗、改善或减轻心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的至少一种症状的方法,所述方法是通过向所述动物施用由靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸组成的化合物,从而在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0209] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,所述方法是通过向所述动物施用治疗有效量的由ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的核碱基序列组成的化合物。其它实施方案提供了一种在动物中预防、治疗、改善或减轻心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的至少一种症状的方法,所述方法是通过向所述动物施用由ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的核碱基序列组成的化合物,从而在所述动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比。

[0210] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,所述方法是通过向所述动物施用治疗有效量的具有ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的序列的经修饰的寡核苷酸,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:(i)由十个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由五个连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由五个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0211] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟、治疗、改善或减轻心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的至少一种症状的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸,其中所述化合物的所述经修饰的寡核苷酸包含:(i)由十个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由五个连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由五个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0212] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟、治疗、改善或减轻心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的至少一种症状的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的具有ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的序列的经修饰的寡核苷酸,其中所述化合物的所述经修饰的寡核苷酸包含:(i)由十个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;(ii)由五个连接的核苷组成的5'翼状区段;(iii)由五个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0213] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中

降低TG水平、升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的方法,所述方法是通过向所述动物施用治疗有效量的包含由12至30个连接的核苷组成的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸与ApoCIII核酸互补。在某些实施方案中,所述ApoCIII核酸是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0214] 某些实施方案提供了一种在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟、治疗、改善或减轻心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状的至少一种症状的方法,其是通过向所述动物施用治疗有效量的由12至30个连接的核苷组成的经修饰的寡核苷酸,其中所述经修饰的寡核苷酸与ApoCIII核酸互补,且在所述动物中降低TG水平和/或升高HDL水平。在某些实施方案中,所述ApoCIII核酸是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0215] 在某些实施方案中,所述动物是人类。

[0216] 在某些实施方案中,所述心血管疾病是动脉瘤、绞痛、心律不齐、动脉粥样硬化、脑血管疾病、冠心病、高血压、血脂异常、高脂血症、高甘油三酯血症或高胆固醇血症。在某些实施方案中,所述血脂异常是高甘油三酯血症或乳糜微粒血症(例如FCS)。在某些实施方案中,所述代谢疾病是糖尿病、肥胖或代谢综合征。

[0217] 在某些实施方案中,所述患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物处在胰腺炎风险下。在某些实施方案中,降低肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平能预防胰腺炎。在某些实施方案中,降低TG水平、升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比能预防胰腺炎。

[0218] 在某些实施方案中,降低患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物的肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平能提高饭后TG的清除率。在某些实施方案中,在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比能提高饭后TG的清除率。在某些实施方案中,降低肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平能降低患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中的饭后甘油三酯。在某些实施方案中,升高HDL水平和/或改良TG与HDL之比能降低饭后TG。

[0219] 在某些实施方案中,降低患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物的肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平能改良HDL与TG之比。

[0220] 在某些实施方案中,所述化合物是经肠胃外施用。在其它实施方案中,所述肠胃外施用是经皮下。

[0221] 在某些实施方案中,所述化合物是与第二药剂或疗法共同施用。在某些实施方案中,所述第二药剂是ApoCIII降低剂、Apo C-II降低剂、DGAT1降低剂、LPL升高剂、胆固醇降低剂、非HDL脂质降低剂、LDL降低剂、TG降低剂、胆固醇降低剂、HDL升高剂、鱼油、烟碱酸(烟酸)、贝特类、他汀类、DCCR(二氮嗪的盐)、葡萄糖降低剂或抗糖尿病剂。在某些实施方案中,所述第二疗法是饮食脂肪限制。

[0222] 在某些实施方案中,所述ApoCIII降低剂包括与所述第一药剂不同的ApoCIII反义寡核苷酸、贝特类或Apo B反义寡核苷酸。

[0223] 在某些实施方案中,所述DGAT1降低剂是LCQ908。

[0224] 在某些实施方案中,所述LPL升高剂包括能使LPL水平升高的基因疗法剂(例如Glybera^R、ApoC-II、GPIHBP1、APOA5、LMF1或当突变时可导致功能障碍LPL的其它基因的正常拷贝)。

[0225] 在某些实施方案中,所述葡萄糖降低剂和/或抗糖尿病剂包括但不限于PPAR促效剂、二肽基肽酶(IV)抑制剂、GLP-1类似物、胰岛素或胰岛素类似物、胰岛素促分泌剂、SGLT2抑制剂、人类支链淀粉类似物、双胍、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、二甲双胍、磺酰脲、罗格列酮、美格替奈、噻唑烷二酮、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等等。磺酰脲可以是醋磺环己脲、氯磺丙脲、甲磺丁脲、甲磺氮卓脲、格列美脲、格列甲脲、格列本脲或格列齐特。美格替奈可以是那格列奈或瑞格列奈。噻唑烷二酮可以是吡格列酮或罗格列酮。 α -葡萄糖苷酶可以是阿卡波糖或米格列醇。

[0226] 在某些实施方案中,所述胆固醇或脂质降低剂包括但不限于他汀类、胆汁酸螯合剂、烟酸和贝特类。他汀类可以是阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、帕伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀等等。胆汁酸螯合剂可以是考来维仑、消胆胺、考来替泊等等。贝特类可以是吉非罗齐、非诺贝特、安妥明等等。治疗性生活方式变化可以是饮食脂肪限制。

[0227] 在某些实施方案中,HDL增高剂包括胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制药(诸如Torcetrapib)、过氧化物酶体增殖活化受体促效剂、Apo-A1、吡格列酮等等。

[0228] 在某些实施方案中,所述化合物和所述第二药剂是同时或相继施用。

[0229] 在某些实施方案中,所述化合物是盐形式。在其它实施方案中,所述化合物还包含药学上可接受的载剂或稀释剂。

[0230] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物,其用于制备用以治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的药物。

[0231] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物在制备用以在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低ApoCIII水平的药物中的用途。在某些实施方案中,肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平被降低。

[0232] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物在制备用以在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的药物中的用途。

[0233] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物在制备用以通过在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比来预防、治疗、改善或减轻心血管或代谢疾病的至少一种症状的药物中的用途。

[0234] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物在制备用以治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD、处在胰腺炎风险下或患有胰腺炎的动物的药物中的用途。

[0235] 在某些实施方案中,所述用于制备药物的ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3)的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0236] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物,其用于治疗、预防、延迟或改善弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD。

[0237] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物用于在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低ApoCIII水平的用途。在某些实施方案中,肝脏和/或小肠中的ApoCIII水平被降低。

[0238] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物用于在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比的用途。

[0239] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物用于通过在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平、增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比来预防、治疗、改善或减轻心血管疾病的至少一种症状的用途。

[0240] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的化合物用于治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD、处在胰腺炎风险下或患有胰腺炎的动物的用途。

[0241] 在某些实施方案中,所使用的ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3) 的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0242] 某些实施方案提供了一种包含ApoCIII特异性抑制剂的组合物以用于:在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平;在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比;在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状;和/或在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状。在某些实施方案中,所述ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3) 的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0243] 某些实施方案提供了一种组合物用于在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中降低TG水平;在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中增高HDL水平和/或改良TG与HDL之比;在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善心血管和/或代谢疾病、病症、病状或其症状;和/或在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的动物中预防、延迟或改善胰腺炎或其症状,其包含ApoCIII特异性抑制剂。在某些实施方案中,所述ApoCIII特异性抑制剂是能够抑制ApoCIII表达的核酸、肽、抗体、小分子或其它药剂。在某些实施方案中,所述核酸是反义化合物。在某些实施方案中,所述反义化合物是靶向ApoCIII的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述经修饰的寡核

苷酸具有包含ISIS 304801 (SEQ ID NO:3) 的至少8个连续核碱基的核碱基序列。在某些实施方案中,所述经修饰寡核苷酸与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%互补。

[0244] 反义化合物

[0245] 寡聚化合物包括但不限于寡核苷酸、寡核酸、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物、反义化合物、反义寡核苷酸和siRNA。寡聚化合物对靶核酸可以是“反义的”,意指它能够通过氢键合与靶核酸进行杂交。

[0246] 本文中提供的反义化合物是指能够通过氢键合与靶核酸进行杂交的寡聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物,诸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA和miRNA。

[0247] 在某些实施方案中,反义化合物具有当被以5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。在某些所述实施方案中,反义寡核苷酸具有当被以5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。

[0248] 在某些实施方案中,被ApoCIII核酸靶向的反义化合物是12至30个核苷酸长。换句话说,反义化合物是12至30个连接的核碱基。在其它实施方案中,所述反义化合物包含由8至80个、10至80个、12至50个、15至30个、18至24个、19至22个或20个连接的核碱基组成的经修饰的寡核苷酸。在某些所述实施方案中,所述反义化合物包含长度上由8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80个或由以上值中任何两个所限定的范围内的连接的核碱基组成的经修饰的寡核苷酸。在一些实施方案中,所述反义化合物是反义寡核苷酸。

[0249] 在某些实施方案中,所述反义化合物包含缩短或截短的经修饰的寡核苷酸。缩短或截短的经修饰的寡核苷酸可以从5'端缺失一个或多个核苷(5'截短)、从3'端缺失一个或多个核苷(3'截短)或从中心部分缺失一个或多个核苷。或者,缺失的核苷可以分散在整个经修饰的寡核苷酸中,例如,在从5'端缺失一个核苷且从3'端缺失一个核苷的反义化合物中。

[0250] 当延长的寡核苷酸中存在单一附加核苷时,所述附加核苷可以位于寡核苷酸的中间部分、5'或3'端。当存在两个或更多个附加核苷时,所添加的核苷可以彼此相邻,例如,在两个核苷添加至寡核苷酸的中间部分、5'端(5'添加)或者3'端(3'添加)的寡核苷酸中。或者,添加的核苷可以分散在整个经修饰的寡核苷酸中,例如,在对5'端添加一个核苷且对3'端添加一个亚单位的寡核苷酸中。

[0251] 有可能在不消除活性的情况下增加或减小诸如反义寡核苷酸等反义化合物的长度和/或引入错配碱基。例如,在Woolf等(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7305-7309,1992)中,在卵母细胞注入模型中测试了一系列13至25个核碱基长的反义寡核苷酸诱导靶RNA裂解的能力。在反义寡核苷酸的末端附近具有8或11个错配碱基的25个核碱基长的反义寡核苷酸能够指导靶mRNA的特异性裂解,但所达程度低于不含错配的反义寡核苷酸。类似地,使用13个核碱基的反义寡核苷酸(包括具有1或3个错配的反义寡核苷酸)来实现靶特异性裂解。

[0252] Gautschi等(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471,2001年3月)证明了与bcl-2mRNA

具有100%互补性且与bcl-xL mRNA具有3个错配的寡核苷酸在活体外和活体内减少bcl-2和bcl-xL的表达的能力。此外,这种寡核苷酸在活体内显示了强效抗肿瘤活性。

[0253] Maher和Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) 测试了一系列串联14个核碱基反义寡核苷酸和分别由两个或三个串联反义寡核苷酸构成的28和42个核碱基反义寡核苷酸在兔网状红细胞测定中阻遏人类DHFR的翻译的能力。三种14个核碱基反义寡核苷酸中的每一个单独能够抑制翻译,但与28或42个核碱基反义寡核苷酸相比处于更适度的水平。

[0254] 反义化合物基序

[0255] 在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的反义化合物具有排列在图案中的经化学修饰的亚单位或基序,从而赋予所述反义化合物以诸如提高的抑制活性、增高的对靶核酸的结合亲和力或对被活体内核酸酶降解的抗性 etc 等性质。

[0256] 嵌合反义化合物典型地含有至少一个经修饰的区域,以便赋予增高的对核酸酶降解的抗性、增加的细胞摄入、增高的对靶核酸的结合亲和力和/或增高的抑制活性。嵌合反义化合物的第二区域可以任选地充当细胞核酸内切酶核糖核酸酶H的底物,所述酶能裂解RNA:DNA双链体的RNA链。

[0257] 具有间隙聚体基序的反义化合物被视为嵌合反义化合物。在间隙聚体中,具有多个核苷酸且支持核糖核酸酶H裂解的内部区域位于具有多个在化学上与内部区域的核苷不同的核苷酸的外部区域之间。在具有间隙聚体基序的反义寡核苷酸的情况下,间隙区段一般充当核酸内切酶裂解的底物,而翼状区段包含经修饰的核苷。在某些实施方案中,间隙聚体的区域按包含各不同区域的糖部分的类型来区分。在一些实施方案中,用于区分间隙聚体的区域的糖部分的类型可以包括 β -D-核糖核苷、 β -D-脱氧核糖核苷、2'-经修饰的核苷(所述2'-经修饰的核苷尤其可以包括2'-MOE和2'-O-CH₃)和双环糖经修饰的核苷(所述双环糖经修饰的核苷可以包括具有4'-(CH₂)_n-O-2'桥连基的那些,其中n=1或n=2)。优选地,各不同的区域包含均一的糖部分。翼部-间隙-翼部基序常被描述为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼状区域的长度,“Y”表示间隙区域的长度,且“Z”表示3'翼状区域的长度。如本文中所使用,描述为“X-Y-Z”的间隙聚体所具有的构型使得间隙区段位于紧邻5'翼状区段和3'翼状区段中的每一者。因此,5'翼状区段与间隙区段之间或间隙区段与3'翼状区段之间不存在插入核苷酸。本文中所描述的反义化合物中的任一种都可以具有间隙聚体基序。在一些实施方案中,X与Z相同;在其它实施方案中,它们不同。在一个优选实施方案中,Y在8与15个核苷酸之间。X、Y或Z可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个核苷酸中的任一种。因此,间隙聚体包括但不限于例如5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、6-8-6、5-8-5、1-8-1、2-6-2、2-13-2、1-8-2、2-8-3、3-10-2、1-18-2或2-18-2。

[0258] 在某些实施方案中,所述反义化合物作为“翼部聚体”基序具有翼部-间隙或间隙-翼部构型,即,如上文针对间隙聚体构型所述的X-Y或Y-Z构型。因此,翼部聚体构型包括但不限于例如5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13或5-13。

[0259] 在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的反义化合物具有5-10-5间隙聚体基序。

[0260] 在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的反义化合物具有间隙变宽基序。

[0261] 靶核酸、靶区域和核苷酸序列

[0262] 编码ApoCIII的核苷酸序列包括而限于以下:GENBANK登录号NM_000040.1(作为SEQ ID NO:1并入本文中)、从核苷酸20262640至20266603的截短的GENBANK登录号NT_033899.8(作为SEQ ID NO:2并入本文中)和从核苷酸6238608至6242565的截短的GenBank登录号NT_035088.1(作为SEQ ID NO:4并入本文中)。

[0263] 应理解,本文中所含的实施中的各SEQ ID NO中所阐述的序列与对糖部分、核苷间键联或核碱基的任何修饰无关。因而,由SEQ ID NO限定的反义化合物可以独立地包含一个或多个对糖部分、核苷间键联或核碱基的修饰。由Isis编号(Isis No)描述的反义化合物指示核碱基序列与基序的组合。

[0264] 在某些实施方案中,靶区域是靶核酸的结构上限定的区域。例如,靶区域可以涵盖3'UTR、5'UTR、外显子、内含子、外显子/内含子接合点、编码区、翻译起始区、翻译终止区或其它确定的核酸区。ApoCIII的结构确定的区域可以通过登录号从诸如NCBI等序列数据库获得,且所述信息是以引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,靶区域可以涵盖从靶区域内的一个靶区段的5'靶位点到靶区域内的另一靶区段的3'靶位点的序列。

[0265] 在某些实施方案中,“靶区段”是核酸内的靶区域的较小子部分。例如,“靶区段”可以是靶核酸中被一种或多种反义化合物靶向的核苷酸序列。“5'靶位点”是指靶区段的5'最末端核苷酸。“3'靶位点”是指靶区段的3'最末端核苷酸。

[0266] 靶区段可以含有一个或多个靶区段。靶区域内的多个靶区段可以重叠。或者,它们可以不重叠。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段由不超过约300个核苷酸隔开。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段被许多核苷酸隔开,所述核苷酸是靶核酸上的约、不超过、不超过约250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20或10个核苷酸,或是由先前值中任何两个所限定的范围。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段被靶核酸上的不超过或不超过约5个核苷酸隔开。在某些实施方案中,靶区段是连续的。涵盖由具有作为本文中所列出的5'靶位点或3'靶位点中的任一个的起始核酸的范围限定的靶区域。

[0267] 靶向包括确定与反义化合物杂交从而发生所需效应的至少一个靶区段。在某些实施方案中,所需效应是降低mRNA靶核酸水平。在某些实施方案中,所需效应是降低由靶核酸编码的蛋白质的水平或与靶核酸相关的表型变化。

[0268] 可以在5'UTR、编码区、3'UTR、内含子、外显子或外显子/内含子接合点内发现合适的靶区段。含有起始密码子或终止密码子的靶区段也是合适的靶区段。合适的靶区段可以特异性地排除某一结构确定的区域,诸如起始密码子或终止密码子。

[0269] 合适的靶区段的确定可以包括比较靶核酸的序列与基因组中的其它序列。例如,可以使用BLAST算法在不同的核酸中鉴定具有相似性的区域。这种比较可以防止选择可能以非特异性方式与除选定靶核酸以外的序列(即,非靶或脱靶序列)杂交的反义化合物序列。

[0270] 在活性靶区域内的反义化合物的活性方面可能存在变化(例如,如靶核酸水平的降低百分比所限定)。在某些实施方案中,ApoCIII mRNA水平降低指示对ApoCIII表达的抑制。ApoCIII蛋白水平降低可以指示对靶mRNA表达的抑制。此外,表型变化可以指示对ApoCIII表达的抑制。例如,HDL水平增高、LDL水平下降或TG水平下降在可以测定对ApoCIII表达的抑制的表型变化中。也可以评估其它表型适应症,例如,与心血管或代谢疾病相关的症状;例如,绞痛;胸痛;气短;心悸;虚弱;眩晕;恶心;盗汗;心动过速;心搏徐缓;心律不齐;

心房颤动;下肢肿胀;发绀;疲劳;晕厥;面部麻木;肢端麻木;跛行或肌肉抽筋;腹部肿胀;或发烧。

[0271] 杂交

[0272] 在一些实施方案中,杂交发生在本文中所公开的反义化合物与ApoCIII核酸之间。大部分常见杂交机制涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键合(例如Watson-Crick、Hoogsteen或反向Hoogsteen氢键合)。

[0273] 杂交可以在不同的条件下发生。严格条件是序列依赖性的且由待杂交的核酸分子的性质和组成决定。

[0274] 确定序列是否可与靶核酸特异性杂交的方法在本领域中是熟知的(Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,2001,CSHL Press)。在某些实施方案中,本文中所提供的反义化合物可与ApoCIII核酸特异性杂交。

[0275] 互补性

[0276] 当反义化合物的足够数目的核碱基可与靶核酸的相应核碱基氢键合时,反义化合物和靶核酸是彼此互补的,从而将发生所需作用(例如,对诸如ApoCIII核酸等靶核酸的反义抑制)。

[0277] 反义化合物可在ApoCIII核酸的一个或多个区段上杂交,从而间杂的或相邻的区段不参与杂交事件(例如,环结构、错配或发夹结构)。

[0278] 在某些实施方案中,本文中所提供的反义化合物,或其规定部分与ApoCIII核酸、靶区域、靶区段或其规定部分具有或至少具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补性。反义化合物与靶核酸的互补性百分比可以使用常规方法确定。

[0279] 例如,反义化合物,其中所述反义化合物的20个核碱基中的18个与靶区域互补,且因此将特异性杂交,则代表90%互补性。在该实例中,其余的非互补核碱基可以聚集或散布于互补的核碱基,且不必相互连续或与互补核碱基连续。因而,长度为18个核碱基且具有4(四)个非互补核碱基且侧接与靶核酸完全互补的两个区域的反义化合物将与靶核酸具有77.8%总体互补性且因此将属于本发明的范围内。反义化合物与靶核酸的区域的互补性百分比可以使用本领域中已知的BLAST(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序以常规方式确定(Altschul等,J.Mol.Biol.,1990,215,403410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649656)。同源性、序列同一性或互补性百分比可以通过使用例如Smith和Waterman的算法(Adv.Appl.Math.,1981,2,482-489)的Gap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,针对Unix的版本8,Genetics Computer Group,University Research Park, Madison Wis.)利用默认设置来确定。

[0280] 在某些实施方案中,本文中所提供的反义化合物或其规定部分与靶核酸或其规定部分完全互补(即,100%互补)。例如,反义化合物可与ApoCIII核酸或其靶区域或靶区段或靶序列完全互补。如本文中所使用,“完全互补”意指反义化合物的各核碱基能够与靶核酸的相应核碱基进行精确的碱基配对。例如,20个核碱基的反义化合物与400个核碱基长的靶序列完全互补,只要靶核酸中相应的20个核碱基部分与反义化合物完全互补即可。完全互补还可用于指第一和/或第二核酸的规定部分。例如,30个核碱基反义化合物的20个核碱基部分可以与400个核碱基长的靶序列“完全互补”。若靶序列具有相应的20个核碱基部分,其

中各核碱基与反义化合物的20个核碱基部分互补,则30个核碱基寡核苷酸的20个核碱基部分与靶序列完全互补。同时,取决于反义化合物的其余10个核碱基是否也与靶序列互补,整个30个核碱基反义化合物可能或可能不与靶序列完全互补。

[0281] 非互补性核碱基的位置可在反义化合物的5'端或3'端。或者,非互补性核碱基可在反义化合物的内部位置。当存在两个或更多个非互补核碱基时,它们可以是连续的(即,连接的)或非连续的。在一个实施方案中,非互补核碱基位于间隙聚体反义寡核苷酸的翼状区段中。

[0282] 在某些实施方案中,相对于诸如ApoCIII核酸等靶核酸或其规定部分,长度是或长度多达12、13、14、15、16、17、18、19或20个核碱基的反义化合物包含不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个非互补核碱基。

[0283] 在某些实施方案中,相对于诸如ApoCIII核酸等靶核酸或其规定部分,长度是或长度多达12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基的反义化合物包括不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个非互补核碱基。

[0284] 本文中所提供的反义化合物还包括与靶核酸的部分互补的那些。如本文中所使用,“部分”是指靶核酸的区域或区段内限定数目的连续的(即,连接的)核碱基。“部分”还可以指反义化合物的限定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少8个核碱基部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少10个核碱基部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少12个核碱基部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少15个核碱基部分互补。还涵盖与靶区段的至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个,或由这些值中的任何两个限定的范围的核碱基部分互补的反义化合物。

[0285] 同一性

[0286] 本文中所提供的反义化合物还可以与特定的核苷酸序列、SEQ ID NO或特定的Isis编号表示的化合物或其部分具有限定的同一性百分比。如本文中所使用,若其具有相同的核碱基配对能力,则反义化合物与本文中所公开的序列同一。例如,在公开的DNA序列中胸腺嘧啶的位置含有尿嘧啶的RNA将被视为与该DNA序列是同一的,因为尿嘧啶和胸腺嘧啶均可与腺嘌呤配对。还预期本文中所描述的反义化合物的缩短或延长形式以及相对于本文中所提供的反义化合物具有非同一的碱基的化合物。非同一的碱基可以彼此相邻或分散在反义化合物中。根据相对于与其相比较的序列具有同一的碱基配对的碱基的数目计算反义化合物的同一性百分比。

[0287] 在某些实施方案中,反义化合物或其部分与本文中公开的反义化合物、SEQ ID NO或其部分中的一个或多个具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0288] 修饰

[0289] 核苷是碱基-糖组合。核苷的核碱基(也称作碱基)部分通常是杂环碱基部分。核苷酸是还包括与核苷的糖部分共价连接的磷酸酯基团的核苷。对于包括戊呋喃糖基糖的那些核苷,可将磷酸酯基团与糖的2'、3'或5'羟基部分连接。通过相邻核苷与彼此的共价键联形成线性聚合寡核苷酸而形成寡核苷酸。在寡核苷酸结构内,磷酸酯基团通常称为形成寡核

苷酸的核苷间键联。

[0290] 对反义化合物的修饰涵盖对核苷间键联、糖部分或核碱基的取代或改变。由于所需性质,例如,诸如增强的细胞摄入、增强的对核酸靶标的亲和力、增强的在核酸酶存在下的稳定性或升高的抑制活性,所以经修饰的反义化合物常优于天然形式。

[0291] 还可以采用经化学修饰的核苷来增高缩短的或截短的反义寡核苷酸对于其靶核酸的结合亲和力。因此,利用具有所述经化学修饰的核苷的较短反义化合物通常可以获得相当的结果。

[0292] 经修饰的核苷间键联

[0293] RNA和DNA的天然存在的核苷间键联是3'-5'磷酸二酯键联。由于所需性质诸如,例如,增强的细胞摄入、增强的对靶核酸的亲和力和增强的在核酸酶存在下的稳定性,故与具有天然存在的核苷间键联的反义化合物相比,常选择具有一个或多个经修饰的,即,非天然存在的核苷间键联的反义化合物。

[0294] 具有经修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联以及不具有磷原子的核苷间键联。代表性含磷核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯。制备含磷键联和非含磷键联的方法是熟知的。

[0295] 在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的反义化合物包含一种或多种经修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,经修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯键联。在某些实施方案中,反义化合物的各核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0296] 经修饰的糖部分

[0297] 本发明的反义化合物可任选地含有其中糖基团已被修饰的一个或多个核苷。所述糖经修饰的核苷可赋予反义化合物增强的核酸酶稳定性、增高的结合亲和力或一些其它有利的生物性质。在某些实施方案中,核苷包含经化学修饰的呋喃核糖环部分。经化学修饰的呋喃核糖环的实例包括而不限于取代基(包括5'和2'取代基)的添加;非偕位环原子桥连以形成双环核酸(BNA);用S、N(R)或C(R₁)(R₂)(R、R₁和R₂各自独立地是H,C₁-C₁₂烷基或保护基)置换核糖基环氧原子;和其组合。经化学修饰的糖的实例包括经2'-F-5'-甲基取代的核苷(关于其它公开的经5',2'-双取代的核苷,参见08年8月21日公开的PCT国际申请W0 2008/101157)、在2'-位置上具有另外取代的情况下用S置换核糖基环氧原子(参见,于2005年6月16日公开的美国专利申请US2005-0130923)或者对BNA的5'-取代(参见,于07年11月22日公开的PCT国际申请W0 2007/134181,其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代)。

[0298] 具有经修饰的糖部分的核苷的实例包括而不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F和2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核苷。2'位置上的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-C₁-C₁₀烷基、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n),其中各R₁、R_m和R_n独立地为H或经取代的或未经取代的C₁-C₁₀烷基。

[0299] 如本文中所使用,“双环核苷”是指包含双环糖部分的经修饰的核苷。双环核酸(BNA)的实例包括而不限于在4'和2'核糖基环原子之间包含桥连基的核苷。在某些实施方案中,本文中所提供的反义化合物包括一个或多个BNA核苷,其中桥连基包含以下各式之一:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2';和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(和其类似物,参见于2008年7月15日授权的美国专利7,399,845);4'-C

(CH₃) (CH₃) -O-2' (和其类似物, 参见于2009年1月8日公开为W0/2009/006478的PCT/US2008/068922); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (和其类似物, 参见2008年12月11日公开为W0/2008/150729的PCT/US2008/064591); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (参见于2004年9月2日公开的美国专利申请US2004-0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 其中R是H、C₁-C₁₂烷基或保护基(参见于2008年9月23日授权的美国专利7,427,672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (参见, Chattopadhyaya等, J.Org.Chem., 2009, 74, 118-134); 和4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (和其类似物, 参见于2008年12月8日公开的公开为W0 2008/154401的PCT/US2008/066154)。

[0300] 已公开的文献中已经报告了其它双环核苷(参见例如: Srivastava等, J.Am.Chem.Soc., 2007, 129 (26) 8362-8379; Frieden等, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372; Elayadi等, Curr.Opinion Invens.Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch等, Chem.Biol., 2001, 8, 1-7; Orum等, Curr.Opinion Mol.Ther., 2001, 3, 239-243; Wahlestedt等, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Singh等, Chem.Comm., 1998, 4, 455-456; Koshkin等, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Kumar等, Bioorg.Med.Chem.Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh等, J.Org.Chem., 1998, 63, 10035-10039; 美国专利号: 7,399,845; 7,053,207; 7,034,133; 6,794,499; 6,770,748; 6,670,461; 6,525,191; 6,268,490; 美国专利公开号: US2008-0039618; US2007-0287831; US2004-0171570; 美国专利申请序列号: 12/129,154; 61/099,844; 61/097,787; 61/086,231; 61/056,564; 61/026,998; 61/026,995; 60/989,574; 国际申请W0 2007/134181; W0 2005/021570; W0 2004/106356; W0 94/14226; 和PCT国际申请号: PCT/US2008/068922; PCT/US2008/066154; 和PCT/US2008/064591)。前述双环核苷各自可以被制备为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(参见于1999年3月25日作为W0 99/14226公开的PCT国际申请PCT/DK98/00393)。

[0301] 如本文中所使用, “单环核苷”是指包含不是双环糖部分的经修饰的糖部分的核苷。在某些实施方案中, 核苷的糖部分或糖部分类似物可以在任何位置经修饰或经取代。

[0302] 如本文中所使用, “4'-2'双环核苷”或“4'-2'双环核苷”是指包含有包含连接呋喃核糖环的两个碳原子的桥连基的呋喃核糖环的双环核苷连接糖环的2'碳原子和4'碳原子。

[0303] 在某些实施方案中, BNA核苷的双环糖部分包括但不限于在戊呋喃糖基糖部分的4'和2'碳原子之间具有至少一个桥连基的化合物, 包括但不限于包含1个或1至4个连接的基团的桥连基, 所述连接的基团独立地选自-[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-和-N(R_a)-; 其中: x为0、1或2; n为1、2、3或4; 各R_a和R_b独立地为H、保护基、羟基、C₁-C₁₂烷基、经取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、经取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、经取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、经取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、C₅-C₇脂族基、经取代的C₅-C₇脂族基、卤素、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、酰基(C(=O)-H)、经取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)₂-J₁)或硫氧基(S(=O)-J₁); 且

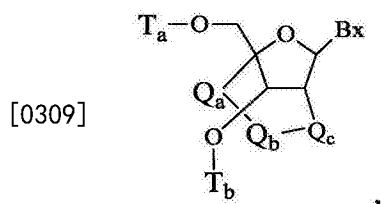
[0304] 各J₁和J₂独立地为H、C₁-C₁₂烷基、经取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、经取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、经取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、经取代的C₅-C₂₀芳基、酰基(C(=O)-H)、经取代的酰基、杂环基、经取代的杂环基、C₁-C₁₂氨基烷基、经取代的C₁-C₁₂氨基烷基或保护基。

[0305] 在某些实施方案中,双环糖部分的桥连基是 $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)-$ 、 $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{N}(\text{R})-\text{O}-$ 或 $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{O}-\text{N}(\text{R})-$ 。在某些实施方案中,桥连基是 $4'-\text{CH}_2-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_2-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_3-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R})-2'$ 和 $4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{O}-2'$,其中各R独立地为H、保护基或 C_1-C_{12} 烷基。

[0306] 在某些实施方案中,双环核苷由同分异构构型进一步限定。例如,包含 $4'-(\text{CH}_2)-\text{O}-2'$ 桥连基的核苷可以呈 α -L构型或呈 β -D构型。先前,已将 α -L-亚甲基氧($4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$)BNA并入到显示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0307] 在某些实施方案中,双环核苷包括具有 $4'-2'$ 桥连基的那些,其中所述桥连基包括但不限于 α -L- $4'-(\text{CH}_2)-\text{O}-2'$ 、 β -D- $4'-\text{CH}_2-\text{O}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R})-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{O}-2'$ 、 $4'-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{S}-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-2'$ 、 $4'-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-2'$ 和 $4'-(\text{CH}_2)_3-2'$,其中R是H、保护基或 C_1-C_{12} 烷基。

[0308] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



[0310] 其中:

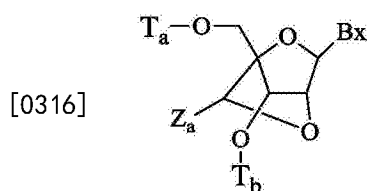
[0311] Bx是杂环碱基部分;

[0312] $-\text{Q}_a-\text{Q}_b-\text{Q}_c-$ 是 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R}_c)-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-\text{CH}_2-$;

[0313] R_c 是 C_1-C_{12} 烷基或氨基保护基;且

[0314] T_a 和 T_b 各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介质的共价连接。

[0315] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



[0317] 其中:

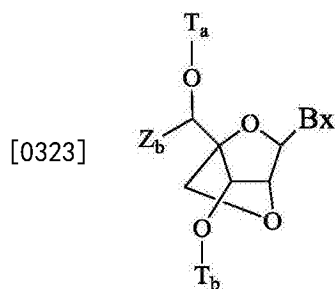
[0318] Bx是杂环碱基部分;

[0319] T_a 和 T_b 各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介质的共价连接;

[0320] Z_a 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、经取代的 C_1-C_6 烷基、经取代的 C_2-C_6 烯基、经取代的 C_2-C_6 炔基、酰基、经取代的酰基、经取代的酰胺、硫醇或经取代的硫醇。

[0321] 在一个实施方案中,经取代的基团各自独立地经独立地选自以下各项的取代基单或多取代:卤素、氧代、羟基、 OJ_c 、 NJ_cJ_d 、 SJ_c 、 N_3 、 $\text{OC}(=\text{X})\text{J}_c$ 和 $\text{NJ}_c\text{C}(=\text{X})\text{NJ}_c\text{J}_d$,其中各 J_c 、 J_d 和 J_e 独立地为H、 C_1-C_6 烷基或经取代的 C_1-C_6 烷基且X为O或 NJ_c 。

[0322] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



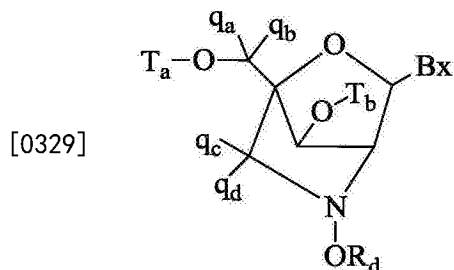
[0324] 其中:

[0325] Bx是杂环碱基部分;

[0326] Ta和Tb各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介质的共价连接;

[0327] Zb是C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、经取代的C₁-C₆烷基、经取代的C₂-C₆烯基、经取代的C₂-C₆炔基或经取代的酰基(C(=O)-)。

[0328] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



[0330] 其中:

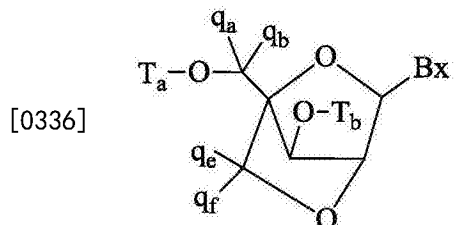
[0331] Bx是杂环碱基部分;

[0332] Ta和Tb各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介质的共价连接;

[0333] Rd是C₁-C₆烷基、经取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、经取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或经取代的C₂-C₆炔基;

[0334] 各qa、qb、qc和qd独立地为H、卤素、C₁-C₆烷基、经取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、经取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或经取代的C₂-C₆炔基、C₁-C₆烷氧基、经取代的C₁-C₆烷氧基、酰基、经取代的酰基、C₁-C₆氨基烷基或经取代的C₁-C₆氨基烷基;

[0335] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



[0337] 其中:

[0338] Bx是杂环碱基部分;

[0339] Ta和Tb各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介

质的共价连接；

[0340] q_a 、 q_b 、 q_e 和 q_f 各自独立地为氢、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ ；

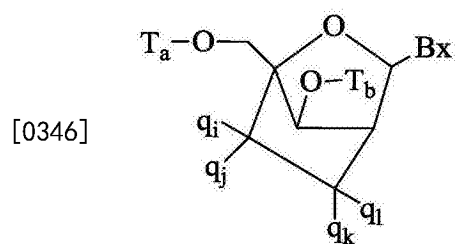
[0341] 或 q_e 和 q_f 一起= $C(q_g)(q_h)$ ；

[0342] q_g 和 q_h 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或经取代的 C_1 - C_{12} 烷基。

[0343] 已描述了具有4'- CH_2 -O-2'桥连基的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶双环核苷的合成和制备以及其寡聚化和核酸识别性质(Koshkin等, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。WO 98/39352和WO 99/14226中也描述了双环核苷的合成。

[0344] 已经制备了具有诸如4'- CH_2 -O-2'和4'- CH_2 -S-2'等4'-2'桥连基的各种双环核苷的类似物(Kumar等, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。已经描述了制备包含双环核苷的寡脱氧核糖核苷酸双链体以用作核酸聚合酶底物(Wengel等, WO 99/14226)。此外,本领域中已经描述了新颖的构型受限的高亲和力和寡核苷酸类似物2'-氨基-BNA的合成(Singh等, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。另外,已经制备了2'-氨基-和2'-甲基氨基-BNA,且先前已经报告了其具有互补的RNA链和DNA链的双链体的热稳定性。

[0345] 在某些实施方案中,双环核苷具有下式:



[0347] 其中:

[0348] Bx是杂环碱基部分;

[0349] T_a 和 T_b 各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基团、磷部分或与载体介质的共价连接;

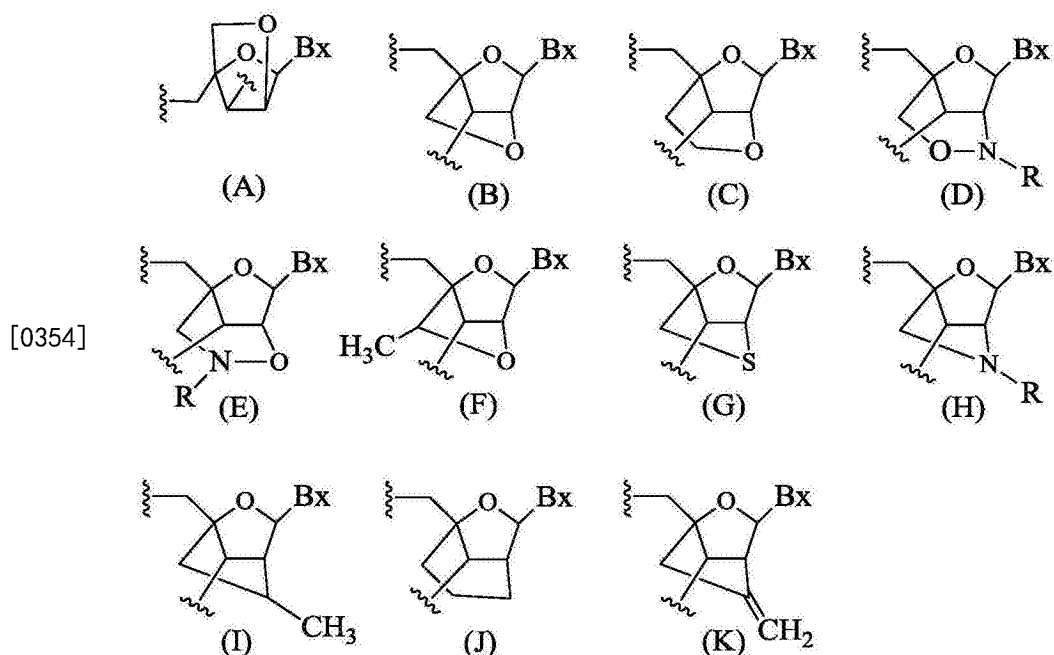
[0350] 各 q_i 、 q_j 、 q_k 和 q_1 独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;且

[0351] q_i 和 q_j 或 q_1 和 q_k 一起= $C(q_g)(q_h)$,其中 q_g 和 q_h 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或经取代的 C_1 - C_{12} 烷基。

[0352] 已经公开了一种具有4'-(CH_2)₃-2'桥连基和烯基类似物桥连基4'- $CH=CH$ - CH_2 -2'的碳环双环核苷(Frier等, Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443;和Albaek等, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。还已经描述了碳环双环核苷的合成和制备以及其寡聚化和生物化学研究(Srivastava等, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379)。

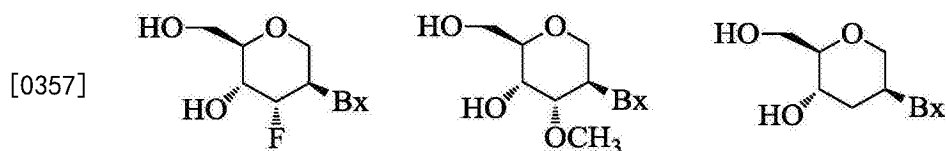
[0353] 在某些实施方案中,双环核苷包括但不限于如下文所描绘的(A) α -L-亚甲基氧(4'- CH_2 -O-2')BNA、(B) β -D-亚甲基氧(4'- CH_2 -O-2')BNA、(C) 亚乙基氧(4'-(CH_2)₂-O-2')

BNA、(D) 氨基氧 (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA、(E) 氧氨基 (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA、(F) 甲基 (亚甲基氧) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (也称为受限的乙基或cEt)、(G) 亚甲基-硫 (4'-CH₂-S-2') BNA、(H) 亚甲基-氨基 (4'-CH₂-N(R)-2') BNA、(I) 甲基碳环 (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA、(J) 亚丙基碳环 (4'-(CH₂)₃-2') BNA和 (K) 乙烯基BNA。

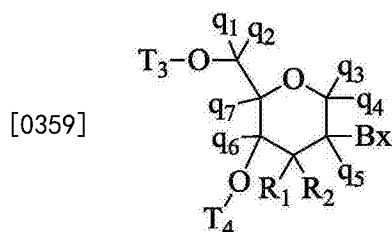


[0355] 其中Bx是碱基部分,且R独立地为H、保护基、C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基。

[0356] 如本文中所使用,“经修饰的四氢吡喃核苷”或“经修饰的THP核苷”意指六元四氢吡喃“糖”取代正常核苷中的戊呋喃糖基残基的核苷,并且也可以称为糖替代物。经修饰的THP核苷包括但不限于在本领域中被称作己糖醇核酸(HNA)、木密醇核酸(ANA)、甘露醇核酸(MNA)的(参见Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854)或具有如下式所说明的四氢吡喃环系统的氟HNA(F-HNA)。



[0358] 在某些实施方案中,选择具有下式的糖替代物:



[0360] 其中:

[0361] Bx是杂环碱基部分;

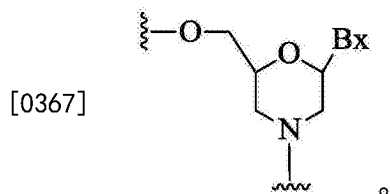
[0362] T₃和T₄各自独立地为连接四氢吡喃核苷类似物与寡聚化合物的核苷间连接基团,或T₃和T₄中的一个为连接四氢吡喃核苷类似物与寡聚化合物或寡核苷酸的核苷间连接基团,且T₃和T₄中的另一个是H、羟基保护基、连接的缀合基团、或5'或3'-末端基;

[0363] q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 各自独立地为H、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基；且

[0364] R_1 和 R_2 中的一个为氢，且另一个选自卤素、经取代或未经取代的烷氧基、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $OC(=X)J_1$ 、 $OC(=X)NJ_1J_2$ 、 $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ 和CN，其中X是O、S或N，且各 J_1 、 J_2 和 J_3 独立地为H或 C_1 - C_6 烷基。

[0365] 在某些实施方案中， q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 各自为H。在某些实施方案中， q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 中至少一个不是H。在某些实施方案中， q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 中至少一个是甲基。在某些实施方案中，提供了THP核苷，其中 R_1 和 R_2 中的一个为F。在某些实施方案中， R_1 是氟且 R_2 是H； R_1 是甲氧基且 R_2 是H，且 R_1 是甲氧基乙氧基且 R_2 是H。

[0366] 在某些实施方案中，糖替代物包含具有多于5个原子和多于一个杂原子的环。例如，已经报告了包含吗啉基糖部分的核苷及其在寡聚化合物中的用途（参见例如：Braasch等，*Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510；和美国专利5,698,685；5,166,315；5,185,444；和5,034,506）。如此处所使用，术语“吗啉基”意指具有下式的糖替代物：

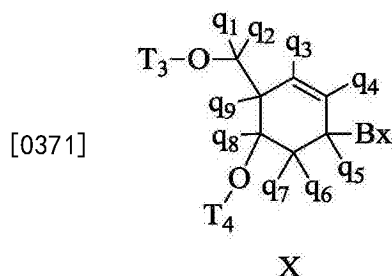


[0368] 在某些实施方案中，吗啉基可以例如通过添加或改变以上吗啉基结构的各种取代基而被修饰。所述糖替代物在本文中被称作“经修饰的吗啉基”。

[0369] 还提供了修饰的组合，不限于诸如经2'-F-5'-甲基取代的核苷（关于其它公开的5', 2'-双取代核苷，参见08年8月21日公开的PCT国际申请W0 2008/101157）和用S置换核糖基环氧原子且在2'位置上进一步取代（参见2005年6月16日公开的公开美国专利申请US2005-0130923）或者对双环核酸的5'-取代（参见07年11月22日公开的PCT国际申请W0 2007/134181，其中4'-CH₂-O-2'双环核苷在5'位置上经5'-甲基或5'-乙烯基进一步取代）。还已经描述了碳环双环核苷的合成和制备以及其寡聚化和生物化学研究（参见例如Srivastava等，*J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (26), 8362-8379）。

[0370] 在某些实施方案中，反义化合物包含一个或多个经修饰的环己烯基核苷，这是六元环己烯基替代天然存在的核苷中的戊呋喃糖基残基的核苷。经修饰的环己烯基核苷包括但不限于本领域中所描述的那些（参见例如2010年4月10日公开的共同拥有的已公开的PCT申请W0 2010/036696；Robeyns等，*J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (6), 1979-1984；Horváth等，*Tetrahedron Letters*, 2007, 48, 3621-3623；Nauwelaerts等，*J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129 (30), 9340-9348；Gu等，*Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2005, 24 (5-7), 993-998；Nauwelaerts等，*Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (8), 2452-2463；Robeyns等，*Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2005, F61 (6), 585-586；Gu等，*Tetrahedron*, 2004, 60 (9), 2111-2123；Gu等，*Oligonucleotides*, 2003, 13 (6), 479-489；Wang等，*J. Org. Chem.*, 2003, 68, 4499-4505；Verbeure等，*Nucleic Acids Research*, 2001, 29 (24), 4941-4947；Wang等，*J. Org. Chem.*, 2001, 66, 8478-82；Wang等，*Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2001, 20 (4-7), 785-

788;Wang等., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602; 已公开的PCT申请W0 06/047842; 和已公开的PCT申请W0 01/049687; 各文献的正文是以全文引用的方式并入本文中)。某些经修饰的环己烯基核苷具有式X。



[0372] 其中对于所述具有式X的至少一种环己烯基核苷类似物中的每一种, 独立地:

[0373] Bx是杂环碱基部分;

[0374] T3和T4各自独立地为连接环己烯基核苷类似物与反义化合物的核苷间连接基团, 或T3和T4中的一个连接四氢吡喃核苷类似物与反义化合物或寡核苷酸的核苷间连接基团, 且T3和T4中的另一个是H、羟基保护基、连接的缀合基团、或5'或3'-末端基; 且

[0375] q1、q2、q3、q4、q5、q6、q7、q8和q9各自独立地为H、C1-C6烷基、经取代的C1-C6烷基、C2-C6烯基、经取代的C2-C6烯基、C2-C6炔基、经取代的C2-C6炔基或其它糖取代基。

[0376] 许多其它单环、双环和三环环系统在本领域中是已知的, 且适合作为可用于修饰核苷的糖替代物以便并入如本文中所提供的寡聚化合物中(参见例如综述: Leumann, Christian J. Bioorg. & Med. Chem., 2002, 10, 841-854)。所述环系统可以经历各种附加取代以进一步提高其活性。

[0377] 如本文中所使用, “经2'-修饰的糖”意指在2'位置上经修饰的呋喃糖基糖。在某些实施方案中, 所述修饰包括选自以下的取代基: 卤化物, 包括但不限于经取代的和未经取代的烷氧基、经取代的和未经取代的硫代烷基、经取代的和未经取代的氨基烷基、经取代的和未经取代的烷基、经取代的和未经取代的烯丙基和经取代的和未经取代的炔基。在某些实施方案中, 2'修饰选自取代基, 包括但不限于: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nF$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、 $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ 和 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, 其中n和m为从1到约10。其它的2'-取代基还可选自: C1-C12烷基、经取代的烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH3、OCN、Cl、Br、CN、F、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、经取代的硅烷基、RNA裂解基、报告基、插入子、用于提高药物动力学性质的基团或用于提高反义化合物的药效学性质的基团, 和具有类似性质的其它取代基。在某些实施方案中, 经修饰的核苷包含2'-MOE侧链(Baker等, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000)。已经描述所述2'-MOE取代在与未经修饰的核苷和诸如2'-O-甲基、O-丙基和O-氨基丙基等其它经修饰的核苷相比时具有提高的结合亲和力。还已经显示了具有2'-MOE取代基的寡核苷酸是基因表达的反义抑制剂, 具有活体内使用的期望特征(Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann等, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann等, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; 和Altmann等, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

[0378] 如本文中所使用, “经2'-修饰”或“经2'-取代”是指包含有在2'位置上包含除H或OH以外的取代基的糖的核苷。经2'-修饰的核苷包括但不限于其中连接糖环的两个碳原子

的桥连基连接所述2'碳和所述糖环的另一个碳的双环核苷;和具有诸如烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、0-烯丙基、0-C₁-C₁₀烷基、-OCF₃、0-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、0-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)或O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)等非桥连2'取代基的核苷,其中各R_m和R_n独立地为H或经取代的或未经取代的C₁-C₁₀烷基。经2'-修饰的核苷还可以包含其它修饰,例如在糖的其它位置上和/或在核碱基上。

[0379] 如本文中所使用,“2'-F”是指包含有在糖环的2'位置上包含氟代基团的糖的核苷。

[0380] 如本文中所使用,“2'-OMe”或“2'-OCH₃”、“2'-O-甲基”或“2'-甲氧基”各自是指包含有在糖环的2'位置上包含-OCH₃基团的糖的核苷。

[0381] 如本文中所使用,“MOE”或“2'-MOE”或“2'-OCH₂CH₂OCH₃”或“2'-O-甲氧基乙基”各自是指包含有在糖环的2'位置上包含-OCH₂CH₂OCH₃基团的糖的核苷。

[0382] 用于制备经修饰的糖的方法对本领域技术人员是熟知的。教授所述经修饰的糖的制备的一些代表性美国专利包括而限于U.S.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、5,670,633、5,700,920、5,792,847和6,600,032;和于2005年6月2日提交且于2005年12月22日作为W0 2005/121371公开的国际申请PCT/US2005/019219,且各文献是以全文引用的方式并入本文中。

[0383] 如本文中所使用,“寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷的化合物。在某些实施方案中,所述多个核苷中的一个或多个经修饰。在某些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷(RNA)和/或脱氧核糖核苷(DNA)。

[0384] 在具有经修饰的糖部分的核苷酸中,维持核碱基部分(天然的、经修饰的或其组合)与适当的核酸靶标杂交。

[0385] 在某些实施方案中,反义化合物包含一个或多个具有经修饰的糖部分的核苷。在某些实施方案中,所述经修饰的糖部分是2'-MOE。在某些实施方案中,所述经2'-MOE修饰的核苷排列在间隙聚体基序中。在某些实施方案中,经修饰的糖部分是具有(4'-CH(CH₃)-O-2')桥连基的双环核苷。在某些实施方案中,经(4'-CH(CH₃)-O-2')修饰的核苷贯穿间隙聚体基序的翼部排列。

[0386] 经修饰的核碱基

[0387] 核碱基(或碱基)修饰或取代虽然在结构上与天然存在的或合成的未经修饰的核碱基不同,但在功能上可与之互换。天然的和经修饰的核碱基能够参与氢键合。所述核碱基修饰可赋予反义化合物核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其它有利的生物性质。经修饰的核碱基包括合成的和天然的核碱基,诸如,例如,5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代,包括5-甲基胞嘧啶取代,对于提高反义化合物对靶核酸的结合亲和力特别有用。例如,已显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C(Sanghvi,Y.S.,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编,Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,1993,pp.276-278)。

[0388] 其它经修饰的核碱基包括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-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)

尿嘧啶和胞嘧啶和嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其它经8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(特别是5-溴代、5-三氟甲基和其它5-取代)尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0389] 杂环碱基部分可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环置换的那些,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基嘧啶和2-吡啶酮。对于增加反义化合物的结合亲和力特别有用的核碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0390] 在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的反义化合物包含一个或多个经修饰的核碱基。在某些实施方案中,靶向ApoCIII核酸的间隙变宽的反义寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核碱基。在某些实施方案中,经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,各胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

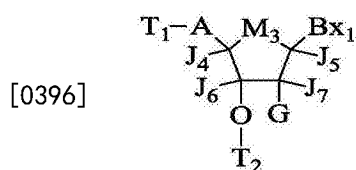
[0391] RNAi化合物

[0392] 在某些实施方案中,反义化合物是干扰RNA化合物(RNAi),其包括双链RNA化合物(也被称为短干扰RNA或siRNA)和单链RNAi化合物(或ssRNA)。所述化合物至少部分通过RISC途径起作用以降解和/或螯合靶核酸(因此,包括微小RNA/微小RNA模拟化合物)。在某些实施方案中,反义化合物包含使其特别适合于所述机制的修饰。

[0393] i.ssRNA化合物

[0394] 在某些实施方案中,包括特别适合作单链RNAi化合物(ssRNA)的反义化合物包含经修饰的5'-末端。在某些所述实施方案中,所述5'-末端包含经修饰的磷酸酯部分。在某些实施方案中,所述经修饰的磷酸酯经过稳定(例如与未经修饰的5'-磷酸酯相比抗降解/裂解)。在某些实施方案中,所述5'-末端核苷使5'-磷部分稳定。某些经修饰的5'-末端核苷可见于本领域中,例如WO/2011/139702中。

[0395] 在某些实施方案中,ssRNA化合物的5'-核苷具有式IIc:



[0397] IIc

[0398] 其中:

[0399] T₁是任选地经保护的磷部分;

[0400] T₂是连接式IIc化合物与寡聚化合物是核苷间连接基团;

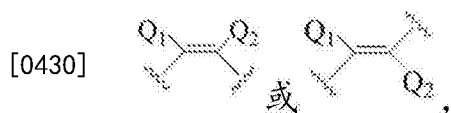
[0401] A具有下式之一:



[0403] Q₁和Q₂各自独立地为H、卤素、C₁-C₆烷基、经取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、经取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、经取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、经取代的C₂-C₆炔基或N(R₃)(R₄);

- [0404] Q_3 是O、S、N (R_5) 或C (R_6) (R_7) ;
- [0405] 各 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 独立地为H、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基;
- [0406] M_3 是O、S、 NR_{14} 、C (R_{15}) (R_{16})、C (R_{15}) (R_{16}) C (R_{17}) (R_{18})、C (R_{15}) = C (R_{17})、OC (R_{15}) (R_{16}) 或OC (R_{15}) (Bx_2) ;
- [0407] R_{14} 是H、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0408] R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0409] Bx_1 是杂环碱基部分;
- [0410] 或如果 Bx_2 存在,则 Bx_2 是杂环碱基部分且 Bx_1 是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0411] J_4 、 J_5 、 J_6 和 J_7 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0412] 或 J_4 与 J_5 或 J_7 之一形成桥连基,其中所述桥连基包含1至3个选自O、S、 NR_{19} 、C (R_{20}) (R_{21})、C (R_{20}) = C (R_{21})、C [=C (R_{20}) (R_{21})]和C (=O) 的连接的双基,且 J_5 、 J_6 和 J_7 中的其它两个各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0413] 各 R_{19} 、 R_{20} 和 R_{21} 独立地为H、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;
- [0414] G是H、OH、卤素或O-[C (R_8) (R_9)]_n-[(C=O)_m-X₁]_j-Z;
- [0415] 各 R_8 和 R_9 独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基或经取代的 C_1 - C_6 烷基;
- [0416] X_1 是O、S或N (E_1) ;
- [0417] Z是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、经取代的 C_2 - C_6 炔基或N (E_2) (E_3) ;
- [0418] E_1 、 E_2 和 E_3 各自独立地为H、 C_1 - C_6 烷基或经取代的 C_1 - C_6 烷基;
- [0419] n是1至约6;
- [0420] m是0或1;
- [0421] j是0或1;
- [0422] 各经取代的基团包含一个或多个任选地经保护的取代基,所述取代基是独立地选自卤素、OJ₁、N (J₁) (J₂)、=NJ₁、SJ₁、N₃、CN、OC (=X₂) J₁、OC (=X₂) N (J₁) (J₂) 和C (=X₂) N (J₁) (J₂) ;
- [0423] X_2 是O、S或NJ₃;
- [0424] 各J₁、J₂和J₃独立地为H或 C_1 - C_6 烷基;
- [0425] 当j是1时,则Z不是或N (E_2) (E_3) ;且
- [0426] 其中所述寡聚化合物包含8至40个单体亚单位且可与靶核酸的至少一部分杂交。
- [0427] 在某些实施方案中, M_3 是O、CH=CH、OCH₂或OC (H) (Bx_2)。在某些实施方案中, M_3 是O。
- [0428] 在某些实施方案中, J_4 、 J_5 、 J_6 和 J_7 各自为H。在某些实施方案中, J_4 与 J_5 或 J_7 之一形成桥连基。

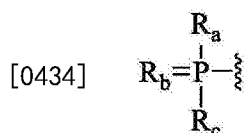
[0429] 在某些实施方案中,A具有下式之一:



[0431] 其中:

[0432] Q_1 和 Q_2 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基或经取代的 C_1 - C_6 烷氧基。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 各自为H。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 各自独立地为H或卤素。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 是H且 Q_1 和 Q_2 中另一者是F、 CH_3 或 OCH_3 。

[0433] 在某些实施方案中, T_1 具有下式:



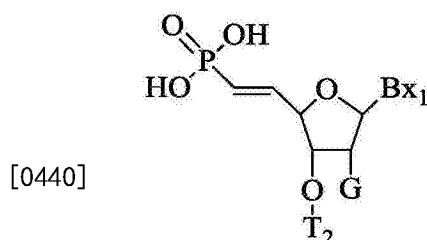
[0435] 其中:

[0436] R_a 和 R_c 各自独立地为经保护的羟基、经保护的硫醇、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、经保护的氨基或经取代的氨基;且

[0437] R_b 是O或S。在某些实施方案中, R_b 是O且 R_a 和 R_c 各自独立地为 OCH_3 、 OCH_2CH_3 或 $CH(CH_3)_2$ 。

[0438] 在某些实施方案中,G是卤素、 OCH_3 、 OCH_2F 、 $OCHF_2$ 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 $O(CH_2)_2F$ 、 OCH_2CHF_2 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2-CH=CH_2$ 、 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-SCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-OCF_3$ 、 $O(CH_2)_3-N(R_{10})$ 、 $O(CH_2)_2-ON(R_{10})(R_{11})$ 、 $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O)-N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O)-N(R_{12})-(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ 或 $O(CH_2)_2-N(R_{12})-C(=N R_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$,其中 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地为H或 C_1 - C_6 烷基。在某些实施方案中,G是卤素、 OCH_3 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2-CH=CH_2$ 、 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ 、 $OCH_2C(=O)-N(H)CH_3$ 、 $OCH_2C(=O)-N(H)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ 或 $OCH_2-N(H)-C(=NH)NH_2$ 。在某些实施方案中,G是F、 OCH_3 或 $(CH_2)_2-OCH_3$ 。在某些实施方案中,G是 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 。

[0439] 在某些实施方案中,5'-末端核苷具有式IIe:



IIe。

[0441] 在某些实施方案中,反义化合物,包括特别适合于ssRNA的那些,包含一种或多种类型的经修饰的糖部分和/或天然存在的糖部分,所述糖部分沿寡核苷酸或其区域排列在限定的图案或糖修饰基序中。所述基序可以包括本文中所论述的糖修饰和/或其它已知的糖修饰中的任一种。

[0442] 在某些实施方案中,所述寡核苷酸包含具有均一糖修饰的区域或由其组成。在某

些所述实施方案中,所述区域的各核苷包含相同的RNA样糖修饰。在某些实施方案中,所述区域的各核苷是2'-F核苷。在某些实施方案中,所述区域的各核苷是2'-OMe核苷。在某些实施方案中,所述区域的各核苷是2'-MOE核苷。在某些实施方案中,所述区域的各核苷是cEt核苷。在某些实施方案中,所述区域的各核苷是LNA核苷。在某些实施方案中,所述均一的区域组成整个或基本上整个寡核苷酸。在某些实施方案中,所述区域组成除1至4个末端核苷以外的整个寡核苷酸。

[0443] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个交替糖修饰的区域,其中所述核苷交替介于具有第一种类型糖修饰的核苷酸与具有第二种类型糖修饰的核苷酸之间。在某些实施方案中,两种类型核苷都是RNA样核苷。在某些实施方案中,交替的核苷是选自:2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA和cEt。在某些实施方案中,交替的修饰是2'-F和2'-OMe核苷。所述区域可以是连续的,或可以被经不同修饰的核苷或缀合的核苷中断。

[0444] 在某些实施方案中,交替修饰的交替区域各自由单一核苷组成(即,图案是 $(AB)_x A_y$,其中A是具有第一种类型糖修饰的核苷,且B是具有第二种类型糖修饰的核苷;x是1至20且y是0或1)。在某些实施方案中,交替基序中的一个或多个交替区域包括多于一种类型的单一核苷。例如,寡核苷酸可以包括一个或多个具有任何以下核苷基序的区域:

[0445] AABBA;

[0446] ABBABB;

[0447] AABAAB;

[0448] ABBABAABB;

[0449] ABABAA;

[0450] AABABAB;

[0451] ABABAA;

[0452] ABBAABBABABAA;

[0453] BABBAABBABABAA;或

[0454] ABABBAABBABABAA;

[0455] 其中A是第一种类型核苷且B是第二种类型核苷。在某些实施方案中,A和B各自是选自2'-F、2'-OMe、BNA和MOE。

[0456] 在某些实施方案中,具有所述交替基序的寡核苷酸还包含经修饰的5'末端核苷,诸如具有式IIc或式IIe的那些。

[0457] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含具有2-2-3基序的区域。所述区域包含以下基序:

[0458] $-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$,

[0459] 其中:A是第一种类型的经修饰的核苷;

[0460] B和C是与A相比经不同修饰的核苷,然而,B和C可以具有彼此相同或不同的修饰;

[0461] x和y是1至15。

[0462] 在某些实施方案中,A是经2'-OMe修饰的核苷。在某些实施方案中,B和C都是经2'-F修饰的核苷。在某些实施方案中,A是经2'-OMe修饰的核苷且B和C都是经2'-F修饰的核苷。

[0463] 在某些实施方案中,寡核苷酸具有以下糖基序:

[0464] $5'-(Q)-(AB)_x A_y-(D)_z$

[0465] 其中：

[0466] Q是包含经稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施方案中，Q是具有式IIc或式IIe的核苷；

[0467] A是第一种类型的经修饰的核苷；

[0468] B是第二种类型的经修饰的核苷；

[0469] D是包含与其相邻核苷不同的修饰的经修饰的核苷。因此，如果y是0，则D必须与B不同地经修饰，且如果y是1，则D必须与A不同地经修饰。在某些实施方案中，D不同于A和B。

[0470] X是5至15；

[0471] Y是0或1；

[0472] Z是0至4。

[0473] 在某些实施方案中，寡核苷酸具有以下糖基序：

[0474] $5'-(Q)-(A)_x-(D)_z$

[0475] 其中：

[0476] Q是包含经稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施方案中，Q是具有式IIc或式IIe的核苷；

[0477] A是第一种类型的经修饰的核苷；

[0478] D是包含与A不同的修饰的经修饰的核苷。

[0479] X是11至30；

[0480] Z是0至4。

[0481] 在某些实施方案中，以上基序中的A、B、C和D是选自：2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA和cEt。在某些实施方案中，D表示末端核苷。在某些实施方案中，所述末端核苷并不旨在与靶核酸杂交（但一种或多种可能偶然杂交）。在某些实施方案中，各D核苷的核碱基是腺嘌呤，不考虑靶核酸的相应位置上的核碱基的同一性。在某些实施方案中，各D核苷的核碱基是胸腺嘧啶。

[0482] 在某些实施方案中，反义化合物，包括特别适合于用作ssRNA的那些，包含沿寡核苷酸或其区域排列在限定的图案或经修饰的核苷间键联基序中的经修饰的核苷间键联。在某些实施方案中，寡核苷酸包含具有交替核苷间键联基序的区域。在某些实施方案中，寡核苷酸包含具有一律经修饰的核苷间键联的区域。在某些所述实施方案中，寡核苷酸包含一律由硫代磷酸酯核苷间键联连接的区域。在某些实施方案中，寡核苷酸一律由硫代磷酸酯核苷间键联连接。在某些实施方案中，寡核苷酸的各核苷间键联是选自磷酸二酯和硫代磷酸酯。在某些实施方案中，寡核苷酸的各核苷间键联是选自磷酸二酯和硫代磷酸酯，且至少一个核苷间键联是硫代磷酸酯。

[0483] 在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含至少6个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含至少8个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含至少10个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含具有至少6个连续硫代磷酸酯核苷间键联的至少一个嵌段。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含具有至少8个连续硫代磷酸酯核苷间键联的至少一个嵌段。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含具有至少10个连续硫代磷酸酯核苷间键联的至少一个嵌段。在某些实施方案中，所述寡核苷酸包含具有至少12个连续硫代磷酸酯核苷间键联的至少一个嵌段。在某些所述

实施方案中,至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'端。在某些所述实施方案中,至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'端的3个核苷内。

[0484] 具有本文中所描述的各种糖基序中的任一种的寡核苷酸可以具有任何键联基序。例如,寡核苷酸,包括但不限于以上描述的那些,可以具有选自而限于下表的键联基序:

[0485]

5'最末端键联	中心区域	3'-区域
PS	交替的P0/PS	6PS
PS	交替的P0/PS	7PS
PS	交替的P0/PS	8PS

[0486] ii.siRNA化合物

[0487] 在某些实施方案中,反义化合物是双链RNAi化合物(siRNA)。在所述实施方案中,一个或两个链可以包含如以上关于ssRNA所描述的任何修饰基序。在某些实施方案中,ssRNA化合物可以是未经修饰的RNA。在某些实施方案中,siRNA化合物可以包含未经修饰的RNA核苷,但经修饰的核苷间键联。

[0488] 若干实施方案涉及双链组合物,其中各链包含由一个或多个经修饰或未经修饰的核苷的位置限定的基序。在某些实施方案中,提供了包含第一和第二寡聚化物的组合物,所述化合物完全或至少部分杂交以形成双链体区域且进一步包含与核酸靶标互补且杂交的区域。合适的是所述组合物包含作为与核酸靶标具有完全或部分互补性的反义链的第一寡聚化合物和作为具有一个或多个互补性区域且与所述第一寡聚化合物形成至少一个双链体区域的有义链的第二寡聚化合物。

[0489] 若干实施方案的组合物通过与核酸靶标杂交,从而丧失其正常功能来调节基因表达。在一些实施方案中,靶核酸是ApoCIII。在某些实施方案中,通过本发明组合物形成的活化的RISC复合物来促进所靶向的ApoCIII的降解。

[0490] 若干实施方案涉及双链组合物,其中所述链中的一个可用于例如影响相对链优先载入RISC(或裂解)复合物中。所述组合物可用于靶向选定的核酸分子和调节一个或多个基因的表达。在一些实施方案中,本发明的组合物与靶RNA的一部分杂交,导致靶RNA丧失正常功能。

[0491] 某些实施方案涉及双链组合物,其中两个链都包含半聚体基序、经完全修饰的基序、经位置修饰的基序或交替基序。本发明组合物的各链可以经修饰以在例如siRNA途径中履行特定作用。在各链中使用不同的基序或在各链中使用具有不同化学修饰的相同基序允许靶向RISC复合物的反义链,同时抑制有义链的并入。在这个模型内,各链可以独立地经修饰,从而增强它的特定作用。反义链可以在5'端经修饰以增强它在RISC的一个区域中的作用,而3'端可以经差异性修饰以增强它在RISC的不同区域中的作用。

[0492] 双链寡核苷酸分子可以是包含自补有义和反义区域的双链多核苷酸分子,其中所述反义区域包含与靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列且有义区域具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。双链寡核苷酸分子可以由两个单独的寡核苷酸组装,其中的一个链是有义链且另一个是反义链,其中所述反义和有义链是自补的(即,各链包含与另一个链中的核苷酸序列互补的核苷酸序列;诸如其中所述反义链和有义链形成双链体或双链结构,例如其中双链区域是约15至约30约,例如约15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29或30个碱基对；反义链包含与靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列，且有义链包含对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列（例如双链寡核苷酸分子的约15至约25个或更多个核苷酸与靶核酸或其部分互补）。或者，双链寡核苷酸由单一寡核苷酸组装，其中siRNA的自补有义和反义区域是借助于基于核酸或非基于核酸的连接子连接。

[0493] 双链寡核苷酸可以是含具有自补有义和反义区域的双链体、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构的多核苷酸，其中所述反义区域包含与单独靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列且有义区域具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。双链寡核苷酸可以是具有两个或更多个环结构和包含自补有义和反义区域的茎区的环形单链多核苷酸，其中所述反义区域包含与靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列且所述有义区域具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列，且其中所述环形多核苷酸可以在活体内或活体外经处理以产生能够调节RNAi的活性siRNA分子。

[0494] 在某些实施方案中，双链寡核苷酸包含单独的有义和反义序列或区域，其中所述有义和反义区域通过本领域中已知的核苷酸或非核苷酸连接分子共价连接，或者通过离子相互作用、氢键合、范德华相互作用、疏水性相互作用和/或堆叠相互作用而非共价连接。在某些实施方案中，双链寡核苷酸包含与靶基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在另一个实施方案中，双链寡核苷酸以抑制靶基因表达的方式与靶基因的核苷酸序列相互作用。

[0495] 如本文中所使用，双链寡核苷酸无需受限于仅含有RNA的那些分子，而是还涵盖经化学修饰的核苷酸和非核苷酸。在某些实施方案中，短干扰核酸分子缺乏含2'-羟基(2'-OH)的核苷酸。在某些实施方案中，短干扰核酸任选地不包括任何核糖核苷酸（例如具有2'-OH基团的核苷酸）。然而，不要求分子内存在核糖核苷酸以支撑RNAi的所述双链寡核苷酸可以具有含一个或多个具有2'-OH基团的核苷酸的连接子或其它连接的或缔合的基团、部分或链。任选地，双链寡核苷酸可以在约5%、10%、20%、30%、40%或50%的核苷酸位置包含核糖核苷酸。如本文中所使用，术语siRNA意在等效于用于描述例如短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰经修饰的寡核苷酸、经化学修饰的siRNA、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)、ssRNAi等能够调节序列特异性RNAi的核酸分子的其它术语。另外，如本文中所使用，术语RNAi意在等效于用于描述诸如转录后基因沉默、翻译抑制或表观遗传等序列特异性RNA干扰的其它术语。例如，双链寡核苷酸可用于在转录后水平和转录前水平下使基因表观遗传沉默。在非限制性实例中，本发明的siRNA分子对基因表达的表观遗传调节可以由siRNA介导对染色质结构或甲基化模式的修饰以改变基因表达来实现（参见例如Verdel等，2004，Science, 303, 672-676；Pal-Bhadra等，2004，Science, 303, 669-672；Allshire, 2002，Science, 297, 1818-1819；Volpe等，2002，Science, 297, 1833-1837；Jenuwein, 2002，Science, 297, 2215-2218；和Hall等，2002，Science, 297, 2232-2237）。

[0496] 预期本文中所提供的若干实施方案的化合物和组合物可以通过dsRNA介导的基因沉默或RNAi机制靶向ApoCIII，包括例如“发夹”或茎-环双链RNA效应分子，其中具有自补序列的单一RNA链能够呈双链构型，或包含两个单独RNA链的双链体dsRNA效应分子。在各种实施方案中，dsRNA完全由核糖核苷酸组成或由核糖核苷酸与脱氧核苷酸的混合物组成，诸如例如2000年4月19日提交的WO 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377所

公开的RNA/DNA混合物。dsRNA或dsRNA效应分子可以是具有自补性区域的单一分子,使得所述分子的一个区段中的核苷酸与所述分子的另一个区段中的核苷酸碱基配对。在各种实施方案中,由单一分子组成的dsRNA完全由核糖核苷酸组成或包括与脱氧核糖核苷酸区域互补的核糖核苷酸区域。或者,dsRNA可以包括具有彼此互补的区域的两个不同的链。

[0497] 在各种实施方案中,两个链都完全由核糖核苷酸组成,一个链完全由核糖核苷酸组成且一个链完全由脱氧核糖核苷酸组成,或者一个或两个链含有核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的混合物。在某些实施方案中,互补区域与彼此和靶核酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、98%或100%互补性。在某些实施方案中,双链构型中所存在的dsRNA区域包括至少19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、50、75、100、200、500、1000、2000或5000个核苷酸或包括dsRNA中所呈现的cDNA或其它靶核酸序列中的所有核苷酸。在一些实施方案中,dsRNA不含任何单链区域,诸如单链端,或dsRNA是发夹。在其它实施方案中,dsRNA具有一个或多个单链区域或悬垂物。在某些实施方案中,RNA/DNA混合物包括作为反义链或区域(例如,与靶核酸具有至少70%、80%、90%、95%、98%或100%互补性)的DNA链或区域和作为有义链或区域(例如,与靶核酸具有至少70%、80%、90%、95%、98%或100%互补性)的RNA链或区域,反之亦然。

[0498] 在各种实施方案中,使用酶或化学合成法,诸如本文中所描述的那些或2000年4月19日提交的W0 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377中所描述的那些,在活体外产生RNA/DNA混合物。。在其它实施方案中,在DNA链转型至细胞中之前、之后或同时使活体外合成的DNA链与活体内或活体外产生的RNA链形成复合物。在其它实施方案中,dsRNA是含有有义和反义区域的单一环形核酸,或dsRNA包括环形核酸和第二环形核酸或线性核酸中的任一者(参见例如2000年4月19日提交的W0 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377)。示例性环形核酸包括套索结构,其中核苷酸的游离5'磷酰基以环回方式连接于另一个核苷酸的2'羟基。

[0499] 在其它实施方案中,dsRNA包括一个或多个经修饰的核苷酸,其中糖中的2'位置含有卤素(诸如氟基)或含有烷氧基(诸如甲氧基),与相应的2'位置含有氢或羟基的相应dsRNA相比,这增加了dsRNA的活体外或活体内半衰期。在其它实施方案中,dsRNA在相邻核苷酸之间包括一个或多个除天然存在的磷酸二酯键联以外的键联。所述键联的实例包括磷酸酰胺、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯键联。dsRNA还可以是如美国专利号6,673,661中所教授的经化学修饰的核酸分子。在其它实施方案中,dsRNA含有一个或两个封帽链,如例如2000年4月19日提交的W0 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377所公开。

[0500] 在其它实施方案中,dsRNA可以是W0 00/63364中所公开的至少部分dsRNA分子中的任一种以及美国临时申请60/399,998和美国临时申请60/419,532和PCT/US2003/033466中所描述的dsRNA分子任一种,其教授内容是以引用的方式并入在此。可以使用本文中所描述的方法或标准方法,诸如W0 00/63364中所描述的那些,在活体外或活体内表达所述dsRNA中的任一种。

[0501] 用于配制药物组合物的组合物和方法

[0502] 可将反义化合物与药学上可接受的活性或惰性物质相混合以制备药物组合物或制剂。用于配制药物组合物的组合物和方法取决于许多标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或欲施用的剂量。

[0503] 通过将反义化合物与合适的药学上可接受的稀释剂或载剂组合而将靶向ApoCIII核酸的反义化合物用于药物组合物。

[0504] 在某些实施方案中，“药物载剂”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或用于向动物递送一种或多种核酸的任何其它药理学惰性媒剂。赋形剂可以是液体或固体，且可以在考虑计划施用模式的情况下加以选择，以便在与核酸和给定药物组合物的其它组分组合时提供所需容积、一致性等等。典型医药载剂包括但不限于粘合剂（例如预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等等）；填充剂（例如乳糖和其它糖、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等）；润滑剂（例如硬脂酸镁、滑石、硅土、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、乙酸钠等等）；崩解剂（例如淀粉、羧基乙酸淀粉钠等等）；和润湿剂（例如月桂基硫酸钠等等）。

[0505] 不会与核酸发生不利反应、适合肠胃外或非肠胃外施用的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用于配制本发明的组合物。合适的药学上可接受的载剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。

[0506] 药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水（PBS）。PBS是适用于欲经胃肠外递送的组合物的稀释剂。因此，在一个实施方案中，本文中所描述的方法中采用包含靶向ApoCIII核酸的反义化合物和药学上可接受的稀释剂的医药组合物。在某些实施方案中，药学上可接受的稀释剂是PBS。在某些实施方案中，所述反义化合物是反义寡核苷酸。

[0507] 包含反义化合物的药物组合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或所述酯的盐或在施用于包括人的动物后能够提供（直接地或间接地）生物活性代谢物或其残余物的寡核苷酸。因此，例如，本公开还涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前药、所述前药的药学上可接受的盐和其它生物等效物。合适的药学上可接受的盐包括但不限于钠盐和钾盐。

[0508] 前药可以包括在反义化合物的一端或两端并入另外的核苷，通过体内的内源性核酸酶将其裂解，以形成活性反义化合物。

[0509] 缀合的反义化合物

[0510] 可将反义化合物共价连接于能增强所得反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄入的一个或多个部分或缀合物。典型的缀合物基团包括胆固醇部分和脂质部分。其它缀合物基团包括糖类、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啉、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。

[0511] 反义化合物还可以经修饰以具有一个或多个稳定基团，所述稳定基团一般连接于反义化合物的一个或两个末端以增强诸如例如核酸酶稳定性等性质。稳定基团中包括帽子结构。这些末端修饰保护反义化合物避免核酸外切酶降解，并且可以协助细胞内的递送和/或定位。帽子可以存在于5'-末端（5'-帽子）或3'-末端（3'-帽子）或可以存在于两个末端。帽子结构是本领域中熟知的且包括，例如，反向脱氧无碱基帽子。可用于封盖反义化合物的一端或两端以赋予核酸酶稳定性的其它3'和5'稳定基团包括于2003年1月16日公开的W003/004602中公开的那些。

[0512] 细胞培养物和反义化合物处理

[0513] 可以在多种细胞类型中对反义化合物对ApoCIII核酸的水平、活性或表达的作用

进行活体外测试。可从商业供应商(例如,美国典型培养物保藏中心Manassus,VA;Zen-Bio, Inc.,Research Triangle Park,NC;Clonetics Corporation,Walkersville,MD)获得用于所述分析的细胞类型且使用市售试剂(例如,Invitrogen Life Technologies,Carlsbad,CA)根据供应商的说明来收集细胞。示例性的细胞类型包括但不限于HepG2细胞、Hep3B细胞、Huh7(肝细胞癌)细胞、原代肝细胞、A549细胞、GM04281成纤维细胞和LLC-MK2细胞。

[0514] 反义寡核苷酸的活体外测试

[0515] 本文中描述了用反义寡核苷酸处理细胞的方法,所述反义寡核苷酸可以适当地经修饰以使用其它反义化合物进行处理。

[0516] 一般来说,当培养物中细胞达到约60-80%汇合时用反义寡核苷酸处理细胞。

[0517] 常用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的一种试剂包括阳离子脂质转染试剂 **LIPOFECTIN®** (Invitrogen,Carlsbad,CA)。将反义寡核苷酸与**LIPOFECTIN®**在 **OPTI-MEM® 1** (Invitrogen,Carlsbad,CA) 中混合以达到反义寡核苷酸的所需最终浓度和通常在2至12µg/mL/100nM反义寡核苷酸范围内的**LIPOFECTIN®**浓度。

[0518] 用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的另一试剂包括**LIPOFECTAMINE 2000®** (Invitrogen,Carlsbad,CA)。反义寡核苷酸与**LIPOFECTAMINE 2000®**在 **OPTI-MEM® 1** 低血清培养基 (Invitrogen,Carlsbad,CA) 中混合以达到反义寡核苷酸的所需终浓度,和通常在2至12µg/mL/100nM反义寡核苷酸范围内的 **LIPOFECTAMINE®**浓度。

[0519] 用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的另一试剂包括 **Cytofectin®** (Invitrogen,Carlsbad,CA)。将反义寡核苷酸与**Cytofectin®** 在 **OPTI-MEM® 1**低血清培养基 (Invitrogen,Carlsbad,CA) 中混合以达到反义寡核苷酸的所需浓度,和通常在2至12µg/mL/100nM反义寡核苷酸范围内的 **Cytofectin®**浓度。

[0520] 用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的另一试剂包括**Oligofectamine™** (Invitrogen Life Technologies,Carlsbad,CA)。将反义寡核苷酸与**Oligofectamine™**在 **Opti-MEM™-1**低血清培养基 (Invitrogen Life Technologies,Carlsbad,CA) 中混合以达到反义寡核苷酸的所需浓度,其中每100nM的**Oligofectamine™**与寡核苷酸比是约0.2比0.8µL。

[0521] 用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的另一试剂包括**FuGENE 6** (Roche Diagnostics Corp.,Indianapolis,IN)。将反义寡核苷酸与**FuGENE 6**在1mL无血清RPMI中混合以达到寡核苷酸的所需浓度,其中**FuGENE 6**与寡聚化合物比是1:4µL **FuGENE 6**/100nM。

[0522] 用于将反义寡核苷酸引入培养的细胞中的另一种技术包括电穿孔 (Sambrook和Russell,Molecular Cloning.A Laboratory Manual.第3版.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York.2001)。

[0523] 通过常规方法利用反义寡核苷酸处理细胞。通常在反义寡核苷酸处理后16-24小时收获细胞,此时通过本领域中已知的和本文中所描述的方法测量靶核酸的RNA或蛋白水平 (Sambrook和Russell,Molecular Cloning.A Laboratory Manual.第3版.Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。一般来说,当以多次重复进行处理时,数据呈现为重复处理的平均值。

[0524] 所使用的反义寡核苷酸的浓度在细胞系与细胞系间是不同的。用于确定对特定细胞系的最佳反义寡核苷酸浓度的方法是本领域中熟知的(Sambrook和Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。当利用**LIPOFECTAMINE2000®** (Invitrogen, Carlsbad, CA)、**Lipofectin®** (Invitrogen, Carlsbad, CA) 或**Cytofectin™** (Genlantis, San Diego, CA) 转染时通常使用在1nM至300nM范围内的反义寡核苷酸浓度。当使用电穿孔转染时使用在625至20,000nM范围内的较高浓度的反义寡核苷酸。

[0525] RNA分离

[0526] 可以对于总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法是本领域中熟知的(Sambrook和Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。RNA是使用本领域中熟知的方法来制备,例如,利用**TRIZOL®**试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA),根据制造商推荐的方案。

[0527] 对靶标水平或表达的抑制的分析

[0528] 可以用本领域中已知的多种方式来测定ApoCIII核酸水平或表达的抑制(Sambrook和Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。例如,靶核酸水平可以通过例如Northern印迹分析、竞争性聚合酶链式反应(PCR)或定量实时PCR来定量。可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法是本领域中熟知的。Northern印迹分析也是本领域中常用的。定量实时PCR可以利用从PE-Applied Biosystems (Foster City, CA)获得的市售ABI **PRISM®** 7600、7700或7900 Sequence Detection System方便地实现且根据制造商的说明加以使用。

[0529] 对靶RNA水平的定量实时PCR分析

[0530] 对靶RNA水平的定量可以使用ABI **PRISM®** 7600、7700或7900 Sequence Detection System(PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)根据制造商的说明通过定量实时PCR来实现。定量实时PCR方法是本领域中熟知的。

[0531] 在实时PCR之前,对分离的RNA进行逆转录酶(RT)反应,由此产生随后用作实时PCR扩增的底物的互补DNA(cDNA)。在同一样品孔中相继进行RT和实时PCR反应。RT和实时PCR试剂是获自Invitrogen (Carlsbad, CA)。RT和实时PCR反应是通过本领域技术人员熟知的方法来进行。

[0532] 使用诸如亲环蛋白A等表达恒定的基因的表达水平或使用**RIBOGREEN®** (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)通过定量总RNA对通过实时PCR获得的基因(或RNA)靶标量进行归一化。亲环蛋白A表达是通过与靶标同时、多路或分别运行的实时PCR来定量。总RNA是使用**RIBOGREEN®** RNA定量试剂(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)来定量。Jones, L.J.等(Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)中教授了通过**RIBOGREEN®**进行RNA定量的方法。**CYTOFLUOR®** 4000仪器(PE Applied

Biosystems, Foster City, CA) 被用于测量 RIBOGREEN® 荧光。

[0533] 设计探针和引物以便与ApoCIII核酸杂交。用于设计实时PCR探针和引物的方法是本领域中熟知的,并且可以包括使用诸如PRIMER EXPRESS® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) 等软件。

[0534] 通过RT、实时PCR获得的基因靶标量可以使用表达恒定的基因GAPDH或亲环蛋白A的表达水平或通过使用RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 来定量总RNA。GAPDH或亲环蛋白A表达可以通过与靶标同时、多路或分别运行的RT实时PCR来定量。使用RiboGreen™ RNA定量试剂 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) 来定量总RNA。

[0535] 对蛋白水平的分析

[0536] 通过测量ApoCIII蛋白水平来评价对ApoCIII核酸的反义抑制。ApoCIII的蛋白水平可以用本领域中熟知的多种方法来评估或定量,诸如免疫沉淀、蛋白质印迹分析(免疫印迹)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、定量蛋白测定、蛋白活性测定(例如,半胱天冬酶活性测定)、免疫组织化学、免疫细胞化学或荧光活化细胞分选(FACS) (Sambrook和Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。针对靶标的抗体可以鉴定并从多种来源获得,诸如MSRS抗体目录(Aerie Corporation, Birmingham, MI), 或可以经由本领域中熟知的常规单克隆或多克隆抗体产生方法来制备。可用于检测人类和小鼠ApoCIII的抗体可购自市面。

[0537] 对反义化合物的活体内测试

[0538] 在动物中测试反义化合物,例如,反义寡核苷酸,以评价其抑制ApoCIII表达和产生表型变化的能力。测试可以在正常动物中或在实验疾病模型中进行。对于对动物施用,在药理学上可接受的稀释剂,诸如磷酸缓冲盐水中配制反义寡核苷酸。施用包括胃肠外施用途径。反义寡核苷酸剂量和给药频率的计算取决于诸如施用途径和动物体重等因素。用反义寡核苷酸处理一段时间之后,从组织分离RNA且测量ApoCIII核酸表达的变化。还测量ApoCIII蛋白水平的变化。

[0539] 某些适应症

[0540] 本文中已经鉴定并公开了ApoCIII抑制在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者中的新颖效应。下文所公开的实例公开了具有极低或不可检测的LPL活性的弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD患者中TG的令人惊讶的降低和HDL的增加以及其它指标。

[0541] 不受任何特定理论束缚,论述了对所述令人惊讶的结果的两种潜在解释。首先,抑制ApoCIII可以活化弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD患者中的残余LPL活性。这不是可能性很大的解释,因为这些患者具有极低至不可检测的LPL活性,而ApoCIII抑制显著影响TG和HDL水平。第二,且更可能的是,ApoCIII抑制由apoE介导的受体(诸如低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (LRP1) 或多配体蛋白聚糖1) 介导的TG颗粒廓清。在从VLDL和乳糜微粒颗粒中去除ApoCIII后,它们更容易被肝脏摄入。实际上,这些受体介导的廓清机制可以显著促进用ApoCIII抑制剂治疗的弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD患者中所观测到的临床观测表型(例如实质性TG下降)。

[0542] 在某些实施方案中,本文中提供了治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD

的受试者的方法,包括施用一种或多种如本文中所描述的药物组合物。在某些实施方案中,所述医药组合物包含靶向ApoCIII的反义化合物。

[0543] 在某些实施方案中,向患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者施用靶向ApoCIII核酸的反义化合物引起ApoCIII表达降低至少约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个限定的范围。在某些实施方案中,ApoCIII表达降至 $\leq 50\text{mg/L}$ 、 $\leq 60\text{mg/L}$ 、 $\leq 70\text{mg/L}$ 、 $\leq 80\text{mg/L}$ 、 $\leq 90\text{mg/L}$ 、 $\leq 100\text{mg/L}$ 、 $\leq 110\text{mg/L}$ 、 $\leq 120\text{mg/L}$ 、 $\leq 130\text{mg/L}$ 、 $\leq 140\text{mg/L}$ 、 $\leq 150\text{mg/L}$ 、 $\leq 160\text{mg/L}$ 、 $\leq 170\text{mg/L}$ 、 $\leq 180\text{mg/L}$ 、 $\leq 190\text{mg/L}$ 或 $\leq 200\text{mg/L}$ 。

[0544] 在某些实施方案中,受试者患有与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的疾病或病症。在某些实施方案中,所述疾病或病症是心血管或代谢疾病或病症。在某些实施方案中,所述疾病是胰腺炎。

[0545] 在某些实施方案中,所述心血管疾病包括但不限于动脉瘤、绞痛、心律不齐、动脉粥样硬化、脑血管疾病、冠心病、高血压、血脂异常、高脂血症、高甘油三酯血症、高胆固醇血症、中风等等。在某些实施方案中,所述血脂异常是乳糜微粒血症(例如FCS)或高甘油三酯血症。在某些实施方案中,所述疾病是由血脂异常引起的胰腺炎。

[0546] 在某些实施方案中,所述代谢疾病或病症包括但不限于高血糖、前驱糖尿病、糖尿病(I型和II型)、肥胖、胰岛素抗性、代谢综合征和糖尿病性血脂异常。

[0547] 在某些实施方案中,如本文中所描述的靶向ApoCIII的化合物在患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者中调节胰腺炎、心血管或代谢疾病或病症的生理学标记物或表型。在某些实验中,与未经治疗的动物相比,所述化合物可以增加或减少生理学标记物或表型。在某些实施方案中,生理学标记物或表型的增加或减少与本文中所描述的化合物对ApoCIII的抑制相关。

[0548] 在某些实施方案中,心血管疾病或病症的生理学标记物或表型可以是定量的。例如,TG或HDL水平可以通过例如标准脂质测试进行测量和定量。在某些实施方案中,诸如HDL等生理学标记物或表型可以增加约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个限定的范围。在某些实施方案中,诸如TG(饭后或空腹)等生理学标记物或表型可以降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个限定的范围。在某些实施方案中,TG(饭后或空腹)被降至 $\leq 100\text{mg/dL}$ 、 $\leq 110\text{mg/dL}$ 、 $\leq 120\text{mg/dL}$ 、 $\leq 130\text{mg/dL}$ 、 $\leq 140\text{mg/dL}$ 、 $\leq 150\text{mg/dL}$ 、 $\leq 160\text{mg/dL}$ 、 $\leq 170\text{mg/dL}$ 、 $\leq 180\text{mg/dL}$ 、 $\leq 190\text{mg/dL}$ 、 $\leq 200\text{mg/dL}$ 、 $\leq 210\text{mg/dL}$ 、 $\leq 220\text{mg/dL}$ 、 $\leq 230\text{mg/dL}$ 、 $\leq 240\text{mg/dL}$ 、 $\leq 250\text{mg/dL}$ 、 $\leq 260\text{mg/dL}$ 、 $\leq 270\text{mg/dL}$ 、 $\leq 280\text{mg/dL}$ 、 $\leq 290\text{mg/dL}$ 、 $\leq 300\text{mg/dL}$ 、 $\leq 350\text{mg/dL}$ 、 $\leq 400\text{mg/dL}$ 、 $\leq 450\text{mg/dL}$ 、 $\leq 500\text{mg/dL}$ 、 $\leq 550\text{mg/dL}$ 、 $\leq 600\text{mg/dL}$ 、 $\leq 650\text{mg/dL}$ 、 $\leq 700\text{mg/dL}$ 、 $\leq 750\text{mg/dL}$ 、 $\leq 800\text{mg/dL}$ 、 $\leq 850\text{mg/dL}$ 、 $\leq 900\text{mg/dL}$ 、 $\leq 950\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1000\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1100\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1200\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1300\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1400\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1500\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1600\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1700\text{mg/dL}$ 、 $\leq 1800\text{mg/dL}$ 或 $\leq 1900\text{mg/dL}$ 。

[0549] 在某些实施方案中,代谢疾病或病症的生理学标记物或表型可以是定量的。例如,可以通过本领域中已知的标准测试来测量和定量葡萄糖水平或胰岛素抗性。在某些实施方案中,诸如葡萄糖水平或胰岛素抗性等生理学标记物或表型可以降低约5%、10%、15%、

20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个限定的范围。在某些实施方案中,诸如胰岛素敏感性等生理学标记表型可以增加约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个限定的范围。

[0550] 本文中还提供了用本文中所描述的化合物预防、治疗或改善与患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者中的疾病或病症相关的症状的方法。在某些实施方案中,提供了一种降低跟与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的疾病相关的症状的发作率的方法。在某些实施方案中,提供了一种降低与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的症状的严重程度的方法。在所述实施方案中,所述方法包括向患有弗雷德里克森I型血脂异常的个体施用治疗有效量的靶向ApoCIII核酸的化合物。在某些实施方案中,所述疾病或病症是胰腺炎或心血管或代谢疾病或病症。

[0551] 心血管疾病或病症以许多身体症状为特征。可以如本文中所描述的方法中所阐述来预防、治疗、改善或者调节本领域技术人员已知的与心血管疾病相关的任何症状。在某些实施方案中,所述症状可以是以下各项中的任一项但不限于绞痛、胸痛、气短、心悸、虚弱、眩晕、恶心、盗汗、心动过速、心搏徐缓、心律不齐、心房颤动、下肢肿胀、发绀、疲劳、晕厥、面部麻木、肢端麻木、跛行或肌肉抽筋、腹部肿胀或发烧。

[0552] 代谢疾病或病症以许多身体症状为特征。可以如本文中所描述的方法中所阐述来预防、治疗、改善或者调节本领域技术人员已知的与代谢病症相关的任何症状。在某些实施方案中,所述症状可以是以下各项中的任一项但不限于过量尿产生(多尿症)、过度口渴和流体摄取增加(烦渴)、视力模糊、原因不明的体重减轻和嗜睡症。

[0553] 胰腺炎以许多身体症状为特征。可以如本文中所描述的方法中所阐述来预防、治疗、改善或者调节本领域技术人员已知的与胰腺炎相关的任何症状。在某些实施方案中,所述症状可以是以下各项中的任一项但不限于腹痛、呕吐、恶心和腹部压力敏感性。

[0554] 在某些实施方案中,提供了治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者的方法,包括施用治疗有效量的一种或多种如本文中所描述的药物组合物。在某些实施方案中,施用治疗有效量的靶向ApoCIII核酸的反义化合物伴随监测ApoCIII水平或与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的疾病标记物,以确定受试者对反义化合物的反应。医师使用受试者对施用反义化合物的反应来决定治疗干预的量和持续时间。

[0555] 在某些实施方案中,包含靶向ApoCIII的反义化合物的药物组合物是用于制备用以治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者的药物。

[0556] 施用

[0557] 本发明的化合物或药物组合物可以用许多方式施用,取决于需要局部还是全身治疗和欲治疗的区域。施用可以经口或经肠胃外。

[0558] 在某些实施方案中,如本文中所描述的化合物和组合物是经肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注。

[0559] 在某些实施方案中,肠胃外施用是通过输注。输注可以是长期的或连续的或短期的或间歇的。在某些实施方案中,用泵递送输注的药剂。在某些实施方案中,输注是经静脉内。

[0560] 在某些实施方案中,肠胃外施用是通过注射。注射可以用注射器或泵递送。在某些实施方案中,注射是弹丸注射。在某些实施方案中,注射是直接施用于组织或器官。在某些实施方案中,肠胃外施用是经皮下。

[0561] 在某些实施方案中,用于肠胃外施用的制剂可以包括无菌水溶液,所述无菌水溶液还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂,诸如但不限于渗透促进剂、载剂化合物和其它药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0562] 在某些实施方案中,用于经口施用本发明的化合物或组合物的制剂可以包括但不限于药物载剂、赋形剂、粉剂或颗粒、微粒、纳米颗粒、悬浮液或处于水或非水介质中的溶液、胶囊、凝胶胶囊、香囊、片剂或小片。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。在某些实施方案中,经口制剂是本发明化合物连同一种或多种渗透促进剂、表面活性剂和螯合剂一起施用的那些。

[0563] 给药

[0564] 在某些实施方案中,根据给药方案(例如剂量、剂量频率和持续时间)施用医药组合物,其中可以对所述给药方案进行选择以实现所需效应。所需效应可以是例如降低ApoCIII或预防、减轻、改善与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的疾病或病状或减缓其进展。

[0565] 在某些实施方案中,调节给药方案的变量以在受试者中产生药物组合物的所需浓度。如与给药方案一起使用的“药物组合物的浓度”可以指化合物、寡核苷酸或药物组合物的活性成分。例如,在某些实施方案中,调节剂量和剂量频率以提供处于足以实现所需效应的量下的药物组合物的组织浓度或血浆浓度。

[0566] 给药取决于欲治疗的疾病状态的严重程度和反应,其中治疗过程从若干天持续到若干个月,或直到实现治愈或实现疾病状态的减轻。给药还取决于药物效力和代谢。在某些实施方案中,剂量是每千克体重0.01 μ g至100mg或在0.001mg至1000mg给药范围内,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次,或甚至每2至20年一次。在成功治疗之后,可能需要对患者进行维持疗法以预防所述疾病状态再发生,其中所述寡核苷酸是以在每千克体重0.01 μ g至100mg、每日一次或多次至每20年一次范围内或在0.001mg至1000mg范围内的维持剂量施用。

[0567] 某些组合疗法

[0568] 在某些实施方案中,包含本文中所描述的化合物的第一药剂是与一种或多种第二药剂共施用。在某些实施方案中,第二药剂被设计用于治疗与本文中所描述的第一药剂相同的疾病、病症或病状。在某些实施方案中,第二药剂被设计用于治疗与本文中所描述的第一药剂不同的疾病、病症或病状。在某些实施方案中,第一药剂被设计用于治疗第二药剂的不合需要的副作用。在某些实施方案中,第二药剂被设计用于与第一药剂共施用以治疗第一药剂的不合需要的作用。在某些实施方案中,所述第二药剂被设计用于治疗一种或多种如本文中所描述的药物组合物的不合需要的副作用。在某些实施方案中,第二药剂与第一药剂共施用以产生组合效应。在某些实施方案中,第二药剂与第一药剂共施用以产生协同作用。在某些实施方案中,第一药剂和第二药剂共施用允许使用比在所述药剂作为独立疗法施用时为实现治疗或预防效应所需的剂量低的剂量。在某些实施方案中,第一药剂被施用于已经对第二药剂无效或无反应的受试者。在某些实施方案中,第一药剂替代第二药剂

施用于受试者。

[0569] 在某些实施方案中,将一种或多种本文中所描述的组合物和一种或多种其它药剂同时施用。在某些实施方案中,在不同的时间施用一种或多种本发明组合物和一种或多种其它药剂。在某些实施方案中,将一种或多种本文中所描述的组合物和一种或多种其它药剂一起制备在单一制剂中。在某些实施方案中,单独制备一种或多种本文中所描述的组合物和一种或多种其它药剂。

[0570] 在某些实施方案中,第二药剂包括但不限于ApoCIII降低剂、DGAT1抑制剂、LPL升高剂、胆固醇降低剂、非HDL脂质降低(例如LDL)剂、HDL升高剂、鱼油、烟碱酸(烟酸)、贝特类、他汀类、DCCR(二氮嗪的盐)、葡萄糖降低剂和/或抗糖尿病剂。在某些实施方案中,第一药剂是与最大耐受剂量的第二药剂组合施用。在某些实施方案中,第一药剂是施用于不能对第二药剂的最大耐受剂量作出反应的受试者。

[0571] ApoCIII降低剂的实例包括与第一药剂不同的ApoCIII反义寡核苷酸、贝特类或Apo B反义寡核苷酸。

[0572] DGAT1抑制剂的实例是目前正在治疗家族性乳糜微粒血症综合征(FCS)的3期临床试验中加以测试的LCQ908(Novartis Pharmaceuticals)。

[0573] LPL升高剂包括使LPL水平升高的基因疗法剂。所述药剂的实例包括正常基因的拷贝,其可补充正常基因的缺乏。例如,Glybera^R通过提供LPL基因的正常拷贝以补充正常LPL基因的缺乏而使LPL水平升高。在其它实例中,LPL升高剂包括ApoC-II、GPIIIBP1、APOA5、LMF1或其它当突变时可能导致功能障碍LPL的基因的正常拷贝。在某些实施方案中,第一药剂(例如ApoCIII ASO)与第二药剂(例如Glybera)的组合提供了加成或协同作用。在某些实施方案中,第一药剂(例如ApoCIII ASO)被施用于对第二药剂(例如Glybera^R)失败或无反应的受试者。

[0574] 葡萄糖降低剂和/或抗糖尿病剂的实例包括但不限于治疗性生活方式变化、PPAR促效剂、二肽基肽酶(IV)抑制剂、GLP-1类似物、胰岛素或胰岛素类似物、胰岛素促分泌剂、SGLT2抑制剂、人类支链淀粉类似物、双胍、 α -葡糖苷酶抑制剂、二甲双胍、磺酰脲、罗格列酮、美格替奈、噻唑烷二酮、 α -葡糖苷酶抑制剂等等。磺酰脲可以是醋磺环己脲、氯磺丙脲、甲磺丁脲、甲磺氮卓脲、格列美脲、格列甲脲、格列本脲或格列齐特。美格替奈可以是那格列奈或瑞格列奈。噻唑烷二酮可以是吡格列酮或罗格列酮。 α -葡糖苷酶可以是阿卡波糖或米格列醇。

[0575] 胆固醇或脂质降低疗法可以包括但不限于治疗性生活方式变化、他汀类、胆汁酸螯合剂、烟酸和贝特类。他汀类可以是阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、帕伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀等等。胆汁酸螯合剂可以是考来维仑、消胆胺、考来替泊等等。贝特类可以是吉非罗齐、非诺贝特、安妥明等等。治疗性生活方式变化可以是饮食脂肪限制。

[0576] HDL增高剂包括胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制药(诸如Torcetrapib)、过氧化物酶体增殖活化受体促效剂、Apo-A1、吡格列酮等等。

[0577] 某些治疗群体

[0578] 一些类型的高甘油三酯血症可以通过弗雷德里克森分类系统或通过Tremblay所描述的分类系统(Tremblay等,J Clin Lipidol,2011,5:37-44)加以表征。在某些实施方案中,本文中所描述的化合物、组合物和方法可用于治疗患有弗雷德里克森I型血脂异常、

FCS、LPLD的受试者。

[0579] 患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的受试者处在严重胰腺炎、心血管和代谢疾病风险下。对于这些受试者,复发性胰腺炎是最使人衰弱且可能致命的并发症;其它后遗症包括动脉粥样硬化和糖尿病趋向增加。

[0580] 弗雷德里克森I型、FCS、LPLD受试者缺乏大量的功能活性LPL。ApoCIII在TG代谢中起重要作用,并且在具有功能或部分功能LPL的受试者中是心血管疾病的独立风险因子。ApoCIII目前在临床试验中用于治疗非弗雷德里克森I型高甘油三酯血症受试者。然而,由于认为ApoCIII途径通过LPL途径起作用,所以尚未考虑抑制ApoCIII作为用于弗雷德里克森I型、FCS、LPLD受试者的治疗选择。

[0581] 如本文中所示,在弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD受试者中,ApoCIII抑制出乎意料地降低TG水平和/或升高HDL水平。TG降低和/或HDL增高又可以预防、治疗、延迟或改善与弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD相关的疾病、病症或其症状。

[0582] 某些化合物

[0583] 我们先前已经在US 20040208856 (美国专利7,598,227)、US 20060264395 (美国专利7,750,141)、WO 2004/093783和WO 2012/149495中公开了包含靶向ApoCIII的反义化合物的组合物和通过所述反义化合物抑制ApoCIII方法,所有文献都以引用的方式并入本文中。在这些申请中,一系列反义化合物被设计用于使用公开的序列(GenBank登录号NT_035088.1的核苷酸6238608至6242565,表示基因组序列,作为SEQ ID NO:4并入本文中;和GenBank登录号NM_000040.1,作为SEQ ID NO:1并入本文中)靶向人类ApoCIII RNA的不同区域。所述化合物是嵌合寡核苷酸(“间隙聚体”),长度是20个核苷酸,由十个2'-脱氧核苷酸组成且在两侧(5'和3'方向)上侧接五个核苷酸的“翼部”的中心“间隙”区域组成。翼部由2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷酸,也称为(2'-MOE)核苷酸组成。核苷间(骨架)键联是所述遍布寡核苷酸的硫代磷酸酯(P=S)。所有胞嘧啶残基都是5-甲基胞嘧啶。

[0584] 在HepG2细胞中通过定量实时PCR分析反义化合物对人类ApoCIII mRNA水平的效应。若干种化合物显示对ApoCIII mRNA的至少45%抑制且因此是优选的。若干种化合物显示对人类ApoCIII mRNA的至少50%抑制且因此是优选的。若干种化合物显示对人类ApoCIII mRNA的至少60%抑制且因此是优选的。若干种化合物显示对人类ApoCIII mRNA的至少70%抑制且因此是优选的。若干种化合物显示对人类ApoCIII mRNA的至少80%抑制且因此是优选的。若干种化合物显示对人类ApoCIII mRNA的至少90%抑制且因此是优选的。

[0585] 与这些优选反义化合物互补的靶区域被称为“优选的靶区段”,且因此被反义化合物优先靶向。

实施例

[0586] 非限制性公开内容和以引用的方式并入

[0587] 尽管已经根据某些实施方案具体描述了本文中所描述的某些化合物、组合物和方法,但以下实施例仅用于说明本文中所描述的化合物而并不意在限制本发明。本申请中所述的各参考文献是以全文引用的方式并入本文中。

[0588] 实施例1:ISIS 304801临床试验

[0589] 如本文中所描述,对患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者进行开放标

记研究,以评估对研究药物ISIS 304801的反应和药效学效应。ISIS 304801先前被公开于美国专利7,598,227中且具有序列5'-AGCTTCTTGTCAGCTTTAT-3' (SEQ ID NO:3),起始于SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NM_000040.1) 上的位置508或起始于SEQ ID NO:2 (从核苷酸20262640至20266603的经截短的GENBANK登录NT_033899.8) 上的位置3139。ISIS 304801具有5-10-5MOE间隙聚体基序,其包含由10个连接的脱氧核苷组成的间隙区段、由5个连接的核苷组成的5'翼状区段、由5个连接的核苷组成的3'翼状区段,其中所述间隙区段位于紧邻所述5'翼状区段和所述3'翼状区段处且在所述5'翼状区段与所述3'翼状区段之间,其中各翼状区段的各核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中各胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶,且其中各核苷间键联是硫代磷酸酯键合。ISIS 304801已经被证明在抑制ApoC-III方面有效且当被施用于受试者时是可耐受的。

[0590] 征募许多已经被诊断患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者以进行这项研究。历史TG水平 $\geq 880\text{mg/dL}$ 、针对所述研究进行筛选期间的空腹TG水平 $\geq 750\text{mg/dL}$ 和/或在饮食之后但在开始治疗之前的TG水平 $\geq 440\text{mg/dL}$ 的弗雷德里克森I型、FCS、LPLD患者被包括在所述研究中。

[0591] 为了扩大研究群体,可以针对弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD对一些受高TG困扰但未被诊断有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者进行筛选。在一个实施例中,具有高TG的患者将通过其TG水平 $\geq 880\text{mg/dL}$ 的病历和/或通过空腹TG水平 $\geq 750\text{mg/dL}$ 时对其血液中的脂质进行离心来鉴定。将针对以下参数中的至少一个对空腹TG水平 $\geq 750\text{mg/dL}$ 的患者进行进一步筛选,以证实弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的诊断:

[0592] (1) 已知会引起弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的纯合或复合杂合功能损失型基因突变,诸如LPL (例如P207L、G188L、D9N)、ApoC2、GPIHBP1、ApoC5或LMF1;

[0593] (2) LPL活性 $\leq$ 正常的20%;和

[0594] (3) 抗LPL抗体。

[0595] 对于被诊断有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的各患者,参与周期由 ≤ 8 周筛选周期(其包括4周严格饮食控制磨合(run-in)资格周期)、1周研究资格/基线评价周期、13周治疗周期和13周治疗后评估周期组成,总计35周研究参与。经过饮食控制的TG水平 $\geq 440\text{mg/dL}$ 的患者被包括在所述研究中。在整个研究周期中记录伴随药物治疗和不利事件(AE)。

[0596] 在研究参与持续期间给予患者经过严格控制的饮食(在进行筛选程序之后)。在执行受控制的饮食28天之后,对患者进行基线测量且评价录入所述研究的治疗阶段中的资格。

[0597] 评估终点包括:ISIS 304801的药效学(PD)效应,如通过以下各项来量度:空腹脂蛋白、总ApoC-III、TG、ApoC-II (总的和与VLDL相关的)、载脂蛋白B-100 (apoB-100和/或apoB-48)、载脂蛋白A-1 (apoA-1)、载脂蛋白A-2 (apoA-2)、载脂蛋白E (apoE)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、LDL-TG、VLDL-C、VLDL-TG、非高密度脂蛋白-胆固醇(非HDL-C)、非HDL-TG、HDL-C、HDL-TG、乳糜微粒-胆固醇(CM-C)、乳糜微粒-甘油三酯(CM-TG)、游离脂肪酸(FFA)和甘油水平;饭后脂质、载脂蛋白和脂蛋白特征和动力学性质和葡萄糖水平;和ISIS 304801的安全性、耐受性和药物动力学(PK)。其它评估终点可以包括CETP降低或ApoA1、PON1、脂肪清除率和甘油三酯清除率增加和HDL与TG之比的改良。

[0598] 研究药物和治疗

[0599] 提供了容纳在2mL加塞玻璃小瓶中的研究药物ISIS 304801的溶液(200mg/mL, 1.0mL)。小瓶仅用于单次使用。由药剂师(或有资格的委托人)制备ISIS 304801溶液和安慰剂。受过训练的专业人士在各给药日以单次SC注射形式在腹部、大腿或上臂外侧区域施用300mg研究药物。

[0600] 患者接受通过SC注射施用的13个剂量的研究药物,每周一次,持续13周(第1天、第8天、第15天、第22天、第29天、第36天、第43天、第50天、第57天、第64天、第71天、第78天和第85天)。患者在第1±0天和第8天、第15天、第22天、第29天、第36天、第43天、第50天、第57天、第64天、第71天、第78天和第85天(±1天)完成治疗访问。相对于第1天和第85天,大范围PK组中的患者还分别在第2和86±0天访问诊所,以便进行24小时血液抽取。患者在预定访问日期的第92天和第99天(±1天)、第127天(±3天)和第176天(±5)天完成随访。饭后评估群组中的患者还在第103天(±2天)和第103天访问的第二天访问诊所,以便进行24小时血液抽取。

[0601] 在各访问(包括血液抽取以进行PD测量(第8天、第15天、第29天、第43天、第57天、第71天和第85天))之前,在其访问前一晚给患者提供标准化预烹调膳食作为晚餐(以确保每位患者和每个时间点同样适度的脂肪摄入),此后他们保持禁食。这些诊所访问前48小时不允许饮酒。

[0602] 在第8天、第15天、第29天、第43天、第57天、第71天和第85天(在研究药物施用之前),在空腹之后和/或在膳食之后收集血液以便测量VLDL、ApoC-III和其它PD标记物。

[0603] 饭后评价群组中的患者在饭后评估之前消费标准化预烹调膳食(午餐和晚餐(提供)和关于早餐和零食的说明),持续2天。在各饭后评估日,在血液抽取之后,患者消费具有稳定放射性同位素示踪剂的标准化液体膳食,这相当于每日卡路里需求的约三分之一,随后连续血液取样。患者在消费液体膳食之后9小时接受标准化预烹调膳食,之后他们禁食,直至第二天的24小时血液抽取。

[0604] 除了谷浓度样品收集以外,广泛PK评价群组中的患者在其第一次(第1-2天)和最后一次(第85-86天)研究药物剂量之后经历连续血液采样24小时。将评价诸如曲线下面积(AUC)、谷浓度(Cmin)等PK参数。

[0605] 治疗后评估周期

[0606] 追踪患者直到研究第176天。在这段时间期间,患者在第92天、第99天、第127天和第176天(和第103天,对于饭后评价群组中的患者)返回研究中心进行门诊患者诊所访问,以进行安全性和临床实验室评估(血液抽取)、饮食咨询和监测、伴随药物处理使用记录和AE事件收集。

[0607] 在整个治疗后评估周期中周期性地收集用于PK和PD分析的血液样品。整个研究中在不同的时间进行血清化学性质、尿分析、凝聚、补充、血液学、免疫功能、甲状腺功能和全部脂质组的实验室测量。

[0608] 如以下所描述在患者子集中进行饭后评价。

[0609] 饭后餐、取样流程和评价

[0610] 使用补充有标记示踪剂³H-棕榈酸(300μCi, Perkin Elmer Inc., Woodbridge, ON, Canada)且被超声处理成液体膳食的经放射性同位素标记的膳食进行脂蛋白代谢的餐后评

价。棕榈酸是作为任何饮食的共同成分的脂肪酸。3H-棕榈酸示踪剂发射弱放射性,相当于X射线。因为饮食棕榈酸在肠管的肠上皮细胞中形成乳糜微粒时被并入其中,所以这使得能够监测新形成的乳糜微粒的出现和从循环中廓清。应用于研究乳糜微粒出现和廓清的饭后动力学的方法是确立的(Mittendorfer等,2003,Diabetes,52:1641-1648;Bickerton等,2007;Normand-Lauziere等,2010,PLoS.One,5:e10956)。

[0611] 将提供含有少量(300 μ Ci)经放射性同位素标记的脂肪酸(3H-棕榈酸)的液体膳食(类似于奶昔)。所述液体膳食将提供每日卡路里需求的约三分之一。从摄取所述膳食之前1小时至之后9小时,如先前所描述施用[U-13C]-K棕榈酸(0.01 μ mol/kg/min,于100ml 25%人血清白蛋白中;Cambridge Isotopes Laboratories Inc.,Andover,MA)的恒定输注和[1,1,2,3,3-2H]-甘油(Cambridge Isotopes Laboratories Inc.)的预致敏(1.6 μ mol/kg)连续(0.05 μ mol/kg/min)输注(Normand-Lauziere等,2010,PLoS.One,5:e10956)。使用斯蒂尔非稳定态等式,分别假定分布体积是90ml/kg和230ml/kg来计算血浆棕榈酸和甘油出现率(Gastaldelli等,1999,J Appl.Physiol,87:1813-1822)。

[0612] 在治疗阶段前后几天,如下表中所指示在摄取经放射性同位素标记的膳食前后以一定间隔抽取血液样品。在9小时血液抽取之后给予参与者标准化膳食。将血液收集在含有Na2EDTA和奥利司他(30 μ g/ml,Roche,Mississauga,Canada)的管子中,以防止活体外甘油三酯脂解,且个别样品将被收集在NaF管中以便进行血浆葡萄糖测定。

[0613] 在各时间点测量测量于以下各项:

- [0614] • 3H-示踪剂的血浆和CM级分水平
- [0615] • 血浆[U-13C]-K棕榈酸和[1,1,2,3,3-2H]-甘油出现率
- [0616] • TG、TC和apoB的血浆和CM级分水平
- [0617] • apo CIII、apo CII和apo E的血浆和VLDL级分水平
- [0618] • 葡萄糖的血浆水平

[0619] 血浆样品还可以用于药物结合蛋白质的分型、生物分析方法验证目的、稳定性和代谢物评价,或用于评价ISIS 304801与血浆成分的其它作用。

[0620] 结果

[0621] 以下提供为本研究征募的三名患有弗雷德里克森I型血脂异常、FCS、LPLD的患者的结果。两名患者对于P207L无效LPL基因突变是纯合的,且一名患者对于P207L和G188E无效LPL基因突变是复合杂合的。所有患者都具有LPL质量,但不具有或具有极低水平(<5%)的LPL活性。所述患者在饮食之后但在开始治疗之前具有 ≥ 440 mg/dL的TG水平。患者中有两名具有经证实的急性胰腺炎过往史,且一名已经在2007年12月用Glybera^R进行基因疗法。

[0622] 空腹ApoCIII水平的变化百分比数据提供于下表中。结果表明,用ISIS 304801治疗降低了ApoC-III的空腹水平。‘n.d.’表明尚未针对该特定时间点收集数据。

[0623] 表1

[0624] 空腹ApoCIII水平的变化百分比

[0625]

	患者1	患者2	患者3
第1天	0	0	0
第8天	n.d.	-23	-18

第15天	n.d.	-63	-44
第29天	-47	-69	-61
第43天	-58	-80	-77

[0626]

第57天	-60	-85	-85
第71天	-66	-90	-84
第85天	-71	-91	-84
第92天	-71	-90	-81
第99天	-62	-87	-78
第127天	-61	-68	-75
第176天	-14	-67	-39

[0627] 还测量了空腹甘油三酯水平的水平。空腹甘油三酯水平的变化百分比以及绝对水平的数据提供于下表中。结果表明,用ISIS 304801治疗降低了甘油三酯的空腹水平。

[0628] 表2

[0629] 空腹甘油三酯的变化百分比

[0630]

	患者1	患者2	患者3
第1天	0	0	0
第8天	-39	-8	-6
第15天	-35	-57	-63
第29天	-54	-40	-61
第43天	-49	-63	-81
第57天	-55	-68	-82
第71天	-53	-76	-89
第85天	-49	-88	-71
第92天	-64	-84	-57
第99天	-17	-62	-69
第127天	-66	-43	-79
第176天	-6	-58	-16

[0631] 表3

[0632] 空腹甘油三酯水平 (mg/dL)

[0633]

	患者1	患者2	患者3
第1天	1406	2083	2043
第8天	851	1918	1922
第15天	911	892	751
第29天	651	1260	804
第43天	719	775	389
第57天	633	667	368

第71天	658	505	234
第85天	723	251	595
第92天	510	324	874

[0634]

第99天	1167	793	626
第127天	485	1197	429
第176天	1317	867	1706

[0635] 还测量了空腹非HDL胆固醇水平的水平。空腹非HDL胆固醇水平的变化百分比以及绝对水平的数据提供于下表中。结果表明,用ISIS 304801治疗降低了非HDL胆固醇的空腹水平。

[0636] 表4

[0637] 空腹非HDL胆固醇水平的变化百分比

[0638]

	患者1	患者2	患者3
第1天	0	0	0
第8天	-23	-24	-15
第15天	-19	-60	-51
第29天	-38	-49	-50
第43天	-43	-64	-64
第57天	-43	-65	-59
第71天	-44	-71	-55
第85天	-42	-74	-56
第92天	-51	-75	-53
第99天	-21	-60	-55
第127天	-42	-47	-56
第176天	-2	-57	-16

[0639] 表5

[0640] 空腹非HDL胆固醇水平 (mg/dL)

[0641]

	患者1	患者2	患者3
第1天	214	327	244
第8天	165	250	207
第15天	173	131	119
第29天	133	167	123
第43天	123	118	88
第57天	122	116	99
第71天	119	96	109
第85天	125	85	107
第92天	104	83	115

第99天	169	131	110
第127天	125	173	108
第176天	210	139	206

[0642] 还测量了ApoB-48的水平(乳糜微粒的量度)。ApoB-48水平的变化百分比以及绝对水平的数据提供于下表中。结果表明,用ISIS 304801治疗降低了ApoB-48的空腹水平。

[0643] 表6

[0644] ApoB-48水平的变化百分比

[0645]

	患者1	患者2	患者3
第1天	0	0	0
第8天	30	21	31
第15天	13	-71	-64
第29天	-48	-10	-35
第43天	-21	-71	-76
第57天	-36	-69	-75
第71天	-21	-84	-80
第85天	21	-89	-50
第92天	-36	-92	-29
第99天	190	-13	-55
第127天	-39	86	-42
第176天	366	-28	28

[0646] 表7

[0647] ApoB-48水平(mg/dL)

[0648]

	患者1	患者2	患者3
第1天	1.68	3.40	2.16
第8天	2.19	4.13	2.82
第15天	1.89	1.00	0.78
第29天	0.87	3.07	1.40
第43天	1.32	0.99	0.51
第57天	1.07	1.04	0.55
第71天	1.32	0.53	0.43
第85天	2.03	0.36	1.07
第92天	1.07	0.28	1.53
第99天	4.87	2.97	0.98
第127天	1.03	6.34	1.26
第176天	7.83	2.45	2.77

[0649] 在治疗结束时测量空腹FCS患者的总体脂质概况且与基线相比较。数据提供于下表中并且表明,用ISIS 304801治疗改良了患者中的总体脂质概况。

[0650] 表8

[0651] 脂质概况的变化百分比 (平均值)

[0652]

	%
ApoC-III	-81
甘油三酯	-69
HDL-C	+78
VLDL ApoC-III	-80
ApoB	-13
非HDL-C	-58
VLDL	-65
总胆固醇	-53

[0653] 表9

[0654] 个别患者概况

脂质参数	患者编号	基线 (mg/dL)	治疗结束 (mg/dL)	绝对变化 (mg/dL)	变化 %	平均 变化%
ApoC-III	1	19	6	-13	-71	-81
	2	35	3	-32	-90	
	3	20	4	-16	-83	
甘油三酯	1	1406	617	-790	-56	-69
	2	2083	288	-1796	-86	
	3	2043	735	-1309	-64	
VLDL ApoC-III	1	12	5	-8	-64	-80
	2	33	3	-30	-92	
	3	17	2	15	86	
HDL-C	1	16	24	8	50	+78
	2	8	21	13	163	
	3	14	17	3	21	
非 HDL-C	1	214	115	-100	-47	-58
	2	327	84	-243	-74	
	3	244	111	-133	-55	
ApoB	1	109	57	-53	-48	-13
	2	65	68	3	5	
	3	114	120	6	5	

[0656] 安全性评价

[0657] 用ISIS 304801治疗不具有任何肝脏酶升高超过三倍ULN、肾功能异常、其它实验室值中的有意义的临床变化或相关SAE或显著AE问题。

[0658] 所有患者都能耐受治疗而无流感样症状和罕见的轻微部位反应,这不经治疗即可自行缓解。不存在由于注射部位反应所致的中断。

[0001]

序列表

<110> ISIS 制药公司

<120> 对脂蛋白脂肪酶缺乏 (LPLD) 群体中的载脂蛋白CIII (APOCIII) 表达的调节

<130> BIOL0218W0

<150> 61/880, 779

<151> 2013-09-20

<150> 61/764, 969

<151> 2013-02-14

<160> 4

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 533

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (47).. (346)

<400> 1

tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgcc atg cag ccc	55
Met Gln Pro	
1	
egg gta ctc ctt gtt gtt gcc ctc ctg geg ctc ctg gcc tct gcc cga	103
Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg	
5 10 15	
gct tca gag gcc gag gat gcc tcc ctt ctc agc ttc atg cag ggt tac	151
Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr	
20 25 30 35	
atg aag cac gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg agc agc gtg cag	199
Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln	
40 45 50	
gag tcc cag gtg gcc cag cag gcc agg ggc tgg gtg acc gat ggc ttc	247
Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe	
55 60 65	
agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag gac aag ttc tct gag	295
Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu	
70 75 80	
ttc tgg gat ttg gac cct gag gtc aga cca act tca gcc gtg gct gcc	343
Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala	
85 90 95	
tga gacctcaata ccccaagtc acctgccat ccctctgcg agctccttgg	396

[0002]

gtectgcaat ctccagggct gccctgtag gtigetttaaa agggacagta ttctcagtgc 456
 tctectaccc cacctcatgc ctggccccc tccaggeatg ctggcctccc aataaagctg 516
 gacaagaage tgctatg 533

<210> 2
 <211> 3964
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 2
 ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tggtagggg aggggcctga aattccagtg 60
 tgaaaggctg agatgggccc gaggccctg gcctatgtcc aagccatttc cctctcacc 120
 agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggtcccccag gccaccccc 180
 agttcctgag ctcatctggg ctgcagggtt ggcgggacag cagcgtggac tcagtctct 240
 agggatttcc caactctccc gcccgcttgc tgcctctgga caccctgctt caggccctca 300
 tctccactgg tcagcaggtg accttggccc agcgccttgg gtctcagtg cctgtgccc 360
 tggagatgat ataaaacagg tcagaacctt cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag 420
 gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag 480
 gggeaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc 540
 taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc cccacccctc atcataacct gaagaacatg 600
 gaggcccggg aggggtgtca cttgccc aaa gctacacagg gggtagggct ggaagtggct 660
 ccaagtgcag gtccccctt cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720
 cagtcctacc ccagacagg aaactgagc ctggagaggg ccagaaatca cccaaagaca 780
 cacagcatgt tggttgact ggacggagat cagtcagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840
 gtctggtggg tttctgtct catccaccc acctcccttt gggcctcgat cctctgcccc 900
 tcaccagtc ccttctgag agccgtatt agcaggagc cggccctac tcttctggtc 960
 agaccagct aaggttctac cttaggggccc acgccacctc ccaggagg ggtccagagg 1020
 catggggacc tgggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtgccatgca 1080
 gcccgggtta ctcttgtt ttgcccctt ggcctcttgc gctctgccc glaagcatt 1140
 ggtgggactg ggttggggc aggttggagg caacttgggg atccagtc caatgggtg 1200
 tcaagcagga gccagggt ctccagagg ccgacccacc cactcagcc ctgctctttc 1260
 ctcaggagct tcagagccg aggatgcctc ccttctcagc ttcctgcagg gttacatgaa 1320

[0003]

gcacgccacc aagaccgcca aggatgcact gagcagcgtg caggagtecc aggtggceca	1380
gcaggccagg tacacceget ggecieccie cccatcccc ctgccagctg cctccattcc	1440
cacecgcccc tgccctgggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgcteca gcctccccgt	1500
ggcctgtgcc tetteagcct cctctttcct cacagggcct ttgtcaggct gctgcgggag	1560
agatgacaga gttgagactg cattcctccc aggtccctcc ttctctcccg gagcagtcct	1620
aggcgctgcc gtttagccc tcatttccat ttctcttccc ttctctcttc ttctctcttc	1680
tatttctcttc ttctctctct ttctctcttc ttctctctct ttctctcttc ttctctctct	1740
ttctctcttc ctctctctct tctctctctt ttctctctct ctctctctct tctctctctt	1800
ttctctctct ttctctcttc cttctctctt ctctctctct ctctctctct ctctctctct	1860
ctctctctct ttttttaaat ggagtctccc tctgtcacct aggcctggagt gcagtgggtc	1920
catctcggtc cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctcctg cctcagcctc	1980
ccaagtagct gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaatttttg tatttttagc	2040
agagatgggg ttccaccatg ttggccaggt tggctctgaa ttctgacct caggggatcc	2100
tcctgcctcg gccctccaaa gtgctgggat tacaggcaig agccactcg cctggcccca	2160
tttctctctt ctgaaggctc ggetagagca gtggtcctca gccttttttg caccagggac	2220
cagttttgtg gtggacaatt ttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt	2280
tccacctcag atcctcaggc attagattct cataaggagc cctccacctc gctccctggt	2340
atgtgcagtt cacaataggg ttcacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca	2400
ggaggcggag ctcaggcggt attgctcact caccaccac tcacttcgtg ctgtgcagcc	2460
eggctctaa cagtccatgg accagtacct atctatgact tgggggttg ggaccttg	2520
getaggggtt tgcttggga ggeccacct gaccacatc aagccctga gtgctctgc	2580
ttgttctaa gacctggggc cagtgtgagc agaagtgtgt ccttctctc ccatctgcc	2640
cctgcccate agtactctcc tctccctac tccctctcc acctacacct gactggcatt	2700
agctggcata gcagaggtgt tcataaacat tcttagtccc cagaaccggc tttgggtag	2760
gtgttatctt ctcactttgc agatgagaaa attgaggctc agagcgatta ggtgacctgc	2820
cccagatcac acaactaatc aatctctcaa tgactttcca aatgagaggc tgcctcctc	2880
tgctctacce tgctcagagc caccaggttg tgcactcca ggagggtgtg ttgcacaga	2940
aaacaatgac agcctlgacc ttacacatc cccacccig tcaatttgg cctcaggecc	3000
aggggcataa acatctgagg tgacctggag atggcagggt ttgacttgtg ctggggttcc	3060

[0004]

tgcaaggata tctcttctcc cagggtggca gctgtggggg attcctgcct gaggtctcag	3120
ggetgtcgtc cagtgaagtt gagagggtgg tgtggctctg actggtgtcg tccagtgggg	3180
acatgggtgt gggccccatg gttgcctaca gaggagtctt caigccctgc tctgttgett	3240
cccctgactg atttaggggc tgggtgaccg atggcttcag ttccctgaaa gactactgga	3300
gcaccgttaa ggacaagttc tctgagttct gggatttggg cctgaggtc agaccaactt	3360
cagecgtggc tgcctgagac ctcaataccc caagtcacc tgcctatcca tctgcgagc	3420
tccttgggtc ctgcaatctc cagggtgccc cctgtaggtt gcttaaaagg gacagtatc	3480
tcagtgtctt cctacccccc ctcatgcctg gccccctcc aggcattgtg gcctcccaat	3540
aaagctggac aagaagctgc tatgagtggg cegtcgcaag tgtgccatct gtgtctgggc	3600
atgggaaagg gccgaggtg ttctgtgggt gggcactgga cagactccag gtcaggcagg	3660
catggaggcc agcgtctat ccaccttcg gtagctgggc agtcctggg cctcagttc	3720
ttcatctcta aggtaggaat caccctccgt accctgcctt ccttgacagc tttgtgcgga	3780
aggtcaaaca ggacaataag tttgtgata ctttgataaa ctgttaggtg ctgcacaaca	3840
tgacttgagt ggtgccccca tgcagccac tatgcctggc acttaagttg tcatcagagt	3900
tgagactgtg igtgtttact caaaactgtg gagctgacct cccctatcca ggccccctag	3960
ccct	3964

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 3	
agcttcttgt ccagctttat	20

<210> 4
 <211> 3958
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 4	
ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tgggtggagg aggggcctga aattccagt	60
tgaaaggctg agatgggccc gagggccctg gcctatgtcc aagccatttc cctctcacc	120
agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggtcccccag gccacccccc	180
agttcctgag ctcactctggg ctgcagggtt ggccgggacag cagcgtggac tcagtctct	240

[0005]

agggatttcc caactctccc gcccgttgc tgcattctga caccctgcct caggceetca	300
tctccactgg tccagcagtg accttgcgc agcgccttgg gtccctcagt cctgctgcgc	360
tggagatgat ataaaacagg tcagaacct cctgcctgtc tgcctcagtc atccctagag	420
gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag	480
gggcaagagg agctccctgc ccagcccgag cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc	540
taaggaagcc tcggagctgg acgggtgcgc cccacccctc atcataacct gaagaacatg	600
gaggcccggg aggggtgtca cttgcccaca gctacatagg ggggtgggct ggaagtggct	660
ccaagtgcag gtccccccct cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc	720
cagtcclacc ccagacagg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca cccaaagaca	780
cacagcatgt tggtctggact ggacggagat cagtcagac cgcagggtgc ttgatgttca	840
gtctggtggg tttctgctc cctccaccc acctccctt gggcctcgat cctcgcgcgc	900
tcaccagtc ccctctgag agcccgatt agcagggagc cggccctac tcttctggc	960
agaccagct aaggttctac cttaggggac accccacct cccagggagg ggtccagagg	1020
catggggacc tgggtgcgc ctcacaggac atttcttgc aggaacagag gtgccatgca	1080
gccccgggta ctcttgttg ttgcctctt ggcgtcttg gcctctgcgc gtaagcactt	1140
ggtgggactg ggtgggggc aggggtgagg caacttgggg atcccagtc caatgggtgg	1200
tcaagcagga gccagggct cgtccatagg ccgaccacc ccaactagcc ctgctcttcc	1260
ctcaggagct tcagaggccg aggatgcctc ccttctcag ttcctgcagg gctacatgaa	1320
gcacgccacc aagaccgcca aggatgcact gagcagcgtg caggagtcgc aggtggccca	1380
gcaggccagg tacaccgct ggcctccctc cccatccccc ctgccagctg cctccattcc	1440
caccacccc tgcctgggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgctcca gctcccttg	1500
ggcctgtgac tcttcagct cctcttctc cacagggtct ttgtcaggt gctggggag	1560
agatgacaga gttgagact cattctccc aggtccctc tttctccca gacagtcct	1620
agggcgcgc gttttagccc tcatttccat tttcttctc tttcccttc tttcccttc	1680
tatttcttcc ttttttctt tttttcttc ttttttctt tttttcttc ttttttctt	1740
tttttcttc ctttttctt ttttttctt ctttttctt ttttttctt ttttttctt	1800
tttttcttc tttctttt ctttttctt ctctctctt tttctcttt ctttttctt	1860
ctttttttt taatggagtc tccctctgt acccaggtg gactgcagt gtgccatctc	1920
ggctcactgc aacctccgc tccgggttc aaccttctt cctgcctcag cctcccaagt	1980

[0006]

agctgggatt acaggcacgc gccaccacac ccagetaatt tttgtatitt tagcagagat	2040
ggggtttcac catgttggcc aggttggctc tgaattccct acccagggg atccctctgc	2100
ctcgccctcc caaagecctg ggattacagg catgagccac tgcgcctggc cccattttcc	2160
ttttctgaag gtctggctag agcagtggtc ctcagccttt ttggcaccag ggaccagttt	2220
tgtggtggac aatttttcca tgggccagcg gggatggttt tgggatgaag ctgttccacc	2280
tcagatcctc aggcattaga ttctcataag gagecctcca cctagatccc tggcatgtgc	2340
agttcacaac agggttcaca ctccatgag aatgtaagge cacttgatct gacaggaggc	2400
ggagctcagg cggatttget cactcaceca ccactcaett cgtgctgtgc agcccgctc	2460
ctaacagtc cttgaccagt acctatctat gaattggggg ttggggaccc ctgggctagg	2520
ggtttgcctt gggaggcccc acctgacctt attcaagccc gtgagtgett ctgctttgtt	2580
ctaagacctg gggccagtgt gagecagaag gtgtccctcc tctcccatcc tgcacctgce	2640
catcagtaet ctctctccc ctactccctt ctccacctca cctgactgg cattagctgg	2700
catagcagag gtgttcataa acattcttag tcccagaaac cgctttggg gtaggtgta	2760
ttttctcact ttgcagatga gaaaattgag gctcagagcg attaggtgac ctgccccaga	2820
tcacacaact aatcaatcct ccaatgaett tccaaatgag aggcctgecte cctctgtcct	2880
acctgtctca gagecaccag gttgtgcaac tccaggcggt gctgtttgca cagaaaacaa	2940
tgacagcctt gacctttcac atctccccc cctgtcaett tgtgcctcag gccaggggc	3000
ataaacatct gaggtgacct ggagatggca gggtttgact tgtgctgggg ttcttgcaag	3060
gatactcttt ctcccagggt ggcagctgtg ggggattcct gctgaggte tcagggtgt	3120
cgctcagtga agttgagagg gtggtgtggt cctgactggt gtcgtccagt ggggacatgg	3180
gtgtgggtcc catggttgc tacagaggag ttctcatgce ctgctctgtt gcttccctg	3240
actgatttag gggttgggtg accgatggtc tcagttccct gaaagactac tggagcaccg	3300
ttaaggacaa gttctctgag ttctgggatt tggacctga ggtcagacca acttcagccg	3360
tggtgcctg agacctcaat accccaagtc cactgccta tccatctgc cagctcctg	3420
ggctctgcaa tctccagggc tgccctgtg ggttgcttaa aaggacagt attctcagt	3480
ctctctacc ccacctcatg cctgcccccc ctccaggeat gctggcctcc caataaagct	3540
ggacaagaag ctgctatgag tgggcctgct caagtgtgce atctgtgtct gggcatggga	3600
aagggcagag gctgttctgt ggggtggcac tggacagact ccaggtcagg caggcatgga	3660
ggccagcgt ctatccacct tctggtagct gggcagctct tgggcctcag ttcttctc	3720

[0007]

tetaaggtag gaatcacect ccgtaccetg ccttcecttga cagctttgtg cggaaggtea	3780
aacaggacaa taagtttget gatactttga taaactgtta ggtgctgcae aacatgactt	3840
gagtgtgtgc cccatgceag ccactatgcc tggcacttaa gttgtcatca gagttgagac	3900
tgtgtgtgtt tactcaaaac tgtggagetg acctccccta tccaggccac ctagecct	3958