



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118845818 A

(43) 申请公布日 2024.10.29

(21) 申请号 202410901373.X

A61K 48/00 (2006.01)

(22) 申请日 2015.02.11

A61K 9/51 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/938,567 2014.02.11 US

A61K 45/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201580012399.8 2015.02.11

C12N 15/113 (2010.01)

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

A61P 1/16 (2006.01)

地址 美国马萨诸塞州

A61P 3/06 (2006.01)

(72) 发明人 K·菲茨杰拉德 B·贝腾考特

A61P 3/10 (2006.01)

G·辛克尔 J·威洛比

A61P 9/00 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

A61P 13/12 (2006.01)

11256

A61P 3/00 (2006.01)

专利代理人 陈文平

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

(51) Int.Cl.

权利要求书10页 说明书110页

A61K 31/713 (2006.01)

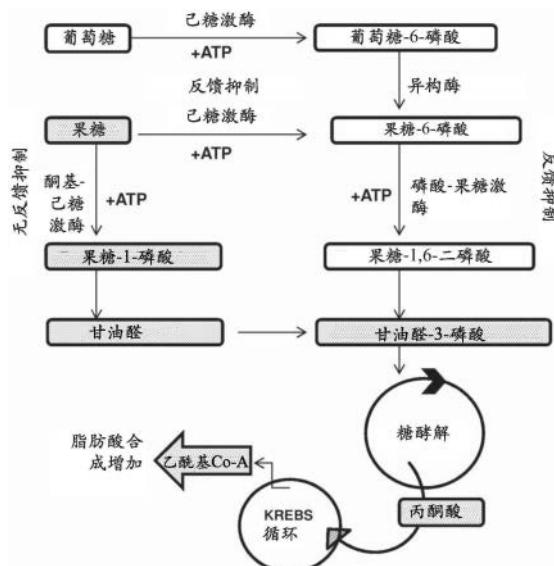
序列表（电子公布） 附图2页

(54) 发明名称

己酮糖激酶(KHK) iRNA组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向己酮糖激酶(KHK)基因的RNAi试剂(例如,双链RNAi试剂)和使用这类RNAi试剂来抑制KHK表达的方法、以及治疗患有一种KHK相关病症的受试者的方法,该病症是例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。



1. 一种用于抑制己酮糖激酶 (KHK) 的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链，其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

2. 一种用于抑制己酮糖激酶 (KHK) 的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链，该反义链包含一个互补区，该互补区包含与表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

3. 如权利要求2所述的dsRNA，其中该有义链和该反义链包含选自下组的序列，该组由以下各项组成：AD-63851、AD-63820、AD-63853、AD-63839、AD-63854、AD-63855和AD-63886、以及表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中披露的任一个序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含至少一个修饰的核苷酸。

5. 如权利要求4所述的dsRNA，其中所述修饰的核苷酸选自下组，该组由以下各项组成：2'-0-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶 (dT) 核苷酸、2'-0-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、锁核苷酸、解锁核苷酸、构象限制的核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-0-烯丙基-修饰的核苷酸、2'-C-烷基-修饰的核苷酸、2'-羟基-修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-0-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、以及包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸。

6. 如权利要求5所述的dsRNA，其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自下组，该组由以下各项组成：2'-0-甲基修饰的核苷酸、包括5'-硫代磷酸基团的核苷酸、和与胆甾烯基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸。

7. 一种用于抑制己酮糖激酶 (KHK) 的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链，其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，

其中所述有义链基本上所有的这些核苷酸和所述反义链基本上所有的这些核苷酸是修饰的核苷酸，并且

其中所述有义链被共轭到在3'-末端处附接的一个配体上。

8. 如权利要求7所述的双链RNAi试剂，其中所述有义链的所有这些核苷酸和所述反义链的所有这些核苷酸均是修饰的核苷酸。

9. 如权利要求7所述的双链RNAi试剂，其中所述有义链和所述反义链包含一个互补区，该互补区包含与表3、表4、以及表5中的任一个中列出的反义序列中的任一个相差不多于3

个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

10. 如权利要求7-9中任一项所述的双链RNAi试剂,其中所述修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-0-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、锁核苷酸、解锁核苷酸、构象限制的核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-0-烯丙基-修饰的核苷酸、2'-C-烷基-修饰的核苷酸、2'-羟基-修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-0-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、以及包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸。

11. 如权利要求1、2和7中任一项所述的双链RNAi试剂,其中至少一个链包含具有至少1个核苷酸的一个3'突出端。

12. 如权利要求1、2和7中任一项所述的双链RNAi试剂,其中至少一个链包含具有至少2个核苷酸的一个3'突出端。

13. 如权利要求1或2所述的双链RNAi试剂,进一步包含一个配体。

14. 一种药用组合物,包含如权利要求1或2所述的双链RNAi试剂和一种脂质配制品。

15. 如权利要求14所述的药用组合物,其中该脂质配制品包含一种脂质纳米颗粒(LNP)。

16. 如权利要求15所述的药用组合物,其中该脂质纳米颗粒(LNP)包含一种MC3脂质。

17. 一种包含修饰的反义多核苷酸试剂的组合物,其中所述试剂能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达,并且包含与选自下组的一个有义序列互补的一个序列,该组具有在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的序列,其中该多核苷酸的长度是约14个至约30个核苷酸。

18. 一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

有义:5' $n_p$ -N<sub>a</sub>-(X X X)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-(Z Z Z)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义:3' $n_p'$ -N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (III)

其中:

i、j、k,以及l各自独立地是0或1;

p、p'、q,以及q'各自独立地是0-6;

N<sub>a</sub>和N<sub>a</sub>'各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;

各n<sub>p</sub>、n<sub>p</sub>'、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'独立地表示一个突出端核苷酸,该n<sub>p</sub>、n<sub>p</sub>'、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'中的每一个

可以或可以不存在；

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

N<sub>b</sub>上的修饰不同于Y上的修饰，并且N<sub>b</sub>'上的修饰不同于Y'上的修饰；并且其中该有义链被共轭到至少一个配体上。

19. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中i是0；j是0；i是1；j是1；i和j两者均是0；或i和j两者均是1。

20. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中k是0；l是0；k是1；l是1；k和l两者均是0；或k和l两者均是1。

21. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中XXX与X'X'X'互补，YYY与Y'Y'Y'互补，并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。

22. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中该YYY基序出现在该有义链的裂解位点处或附近。

23. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中该Y'Y'Y'基序出现在该反义链的从5'-端起的11、12以及13位置处。

24. 如权利要求23所述的双链RNAi试剂，其中该Y'是2'-0-甲基。

25. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中化学式(III)由化学式(IIIa)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-Y Y Y-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义链：3'n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (IIIa)。

26. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中化学式(III)由化学式(IIIb)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-Z Z Z-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义：3'n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-Z'Z'Z'-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (IIIb)

其中各N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。

27. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中化学式(III)由化学式(IIIc)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-X X X-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义：3'n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-X'X'X'-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (IIIc)

其中各N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。

28. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中化学式(III)由化学式(IIId)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-X X X-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-Z Z Z-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义：3'n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-X'X'X'-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-Z'Z'Z'-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (IIId)

其中各N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列，并且各N<sub>a</sub>和N<sub>a</sub>'独立地表示包含2-10个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。

29. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是15-30个核苷酸对。

30. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是17-23个核苷酸对。

31. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是17-25个核苷酸对。

32. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是23-27个核苷酸对。

33. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是19-21个核苷酸对。

34. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是19-23个核苷酸对。

35. 如权利要求29所述的双链RNAi试剂，其中该双链区的长度是21-23个核苷酸对。

36. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中每个链具有15-30个核苷酸。

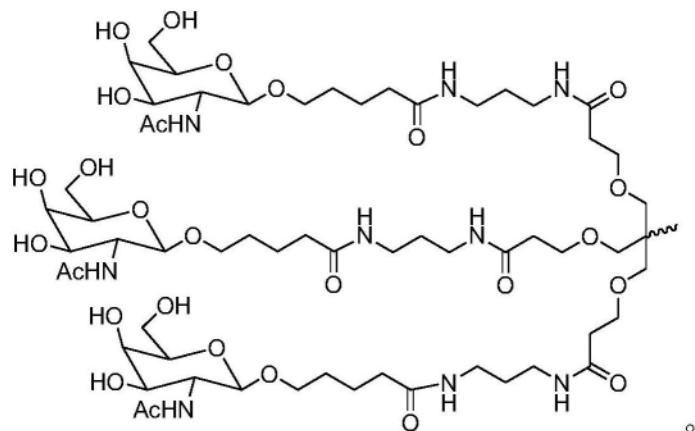
37. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中每个链具有19-30个核苷酸。

38. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂，其中在这些核苷酸上的这些修饰选自下组，该组由以下各项组成：LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-烷基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧、2'-羟基、以及其组合。

39. 如权利要求38所述的双链RNAi试剂，其中在这些核苷酸上的这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰。

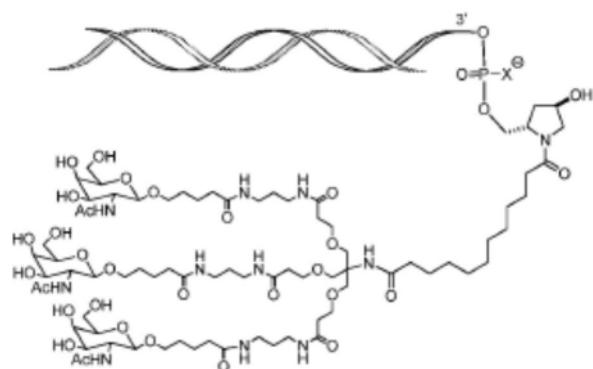
40. 如权利要求7、13和18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

41. 如权利要求7、13和18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中该配体是



42. 如权利要求7、13和18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中该配体被附接到该有义链的该3'端上。

43. 如权利要求42所述的双链RNAi试剂，其中该RNAi试剂被共轭到如在以下示意图中所示的该配体上



其中X是O或S。

44. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂，其中所述RNAi试剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。

45. 如权利要求44所述的双链RNAi试剂，其中该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键

联是在一条链的3'-末端处。

46. 如权利要求45所述的双链RNAi试剂,其中所述链是该反义链。
47. 如权利要求45所述的双链RNAi试剂,其中所述链是该有义链。
48. 如权利要求44所述的双链RNAi试剂,其中该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联是在一条链的5'-末端处。
  49. 如权利要求48所述的双链RNAi试剂,其中所述链是该反义链。
  50. 如权利要求48所述的双链RNAi试剂,其中所述链是该有义链。
  51. 如权利要求44所述的双链RNAi试剂,其中该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联是在一条链的5'-末端和3'-末端这两者处。
  52. 如权利要求51所述的双链RNAi试剂,其中所述链是该反义链。
  53. 如权利要求44所述的双链RNAi试剂,其中所述RNAi试剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键联。
  54. 如权利要求53所述的双链RNAi试剂,其中该反义链包含在该5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在该3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且该有义链包含在该5'-末端抑或该3'-末端处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。
  55. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂,其中在该双链体的该反义链的该5'-端的1位置处的碱基对是一个AU碱基对。
  56. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂,其中这些Y核苷酸含有一个2'-氟代修饰。
  57. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂,其中这些Y'核苷酸含有一个2'-0-甲基修饰。
  58. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂,其中 $p' > 0$ 。
  59. 如权利要求18所述的双链RNAi试剂,其中 $p' = 2$ 。
  60. 如权利要求59所述的双链RNAi试剂,其中 $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与该靶mRNA互补。
  61. 如权利要求59所述的双链RNAi试剂,其中 $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与该靶mRNA不互补。
  62. 如权利要求59所述的双链RNAi试剂,其中该有义链具有总计21个核苷酸,并且该反义链具有总计23个核苷酸。
  63. 如权利要求58-62中任一项所述的双链RNAi试剂,其中至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上。
  64. 如权利要求63所述的双链RNAi试剂,其中所有 $n_p'$ 均经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上。
  65. 如权利要求1、2、7、以及18中任一项所述的双链RNAi试剂,其中所述RNAi试剂选自下组,该组具有在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的RNAi试剂。
  66. 如权利要求7或18所述的双链RNAi试剂,其中所述RNAi试剂选自下组,该组由以下各项组成:AD-63851、AD-63820、AD-63853、AD-63839、AD-63854、AD-63855、以及AD-63886。
  67. 一种用于抑制己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,  
其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,  
其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:

2、SEQ ID NO:4、或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，

其中所述有义链的基本上所有的这些核苷酸包含选自下组的一种修饰，该组由以下各组成：2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰，

其中所述有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联，

其中所述反义链的基本上所有的这些核苷酸包含选自下组的一种修饰，该组由以下各组成：2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰，

其中所述反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联，并且

其中所述有义链被共轭到一种或多种GalNAc衍生物上，这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价连接子附接在该3'-末端处。

68. 如权利要求67所述的双链RNAi试剂，其中所述有义链的所有这些核苷酸和所述反义链的所有这些核苷酸均包含一种修饰。

69. 一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链，其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区，其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸，其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示：

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

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

其中：

i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

p、p'、q以及q'各自独立地是0-6；

$N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

$N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列；

各 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸，该 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序，并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰；

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰，并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰；并且

其中该有义链被共轭到至少一个配体上。

70. 一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链，其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区，其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸，其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示：

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

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

其中：

i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

各n<sub>p</sub>、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'独立地表示一个突出端核苷酸，该n<sub>p</sub>、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'中的每一个可以或不可以不存在；

p、q、以及q'各自独立地是0-6；

n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上；

N<sub>a</sub>和N<sub>a</sub>'各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序，并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰；

N<sub>b</sub>上的修饰不同于Y上的修饰，并且N<sub>b</sub>'上的修饰不同于Y'上的修饰；并且

其中该有义链被共轭到至少一个配体上。

71.一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链，其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区，其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸，其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-(X X X)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-(Z Z Z)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

反义：3'n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (III)

其中：

i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

各n<sub>p</sub>、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'独立地表示一个突出端核苷酸，该n<sub>p</sub>、n<sub>q</sub>、以及n<sub>q</sub>'中的每一个可以或不可以不存在；

p、q、以及q'各自独立地是0-6；

n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上；

N<sub>a</sub>和N<sub>a</sub>'各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

N<sub>b</sub>和N<sub>b</sub>'各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序，并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰；

N<sub>b</sub>上的修饰不同于Y上的修饰，并且N<sub>b</sub>'上的修饰不同于Y'上的修饰；并且

其中该有义链被共轭到至少一个配体上，其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

72.一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂，其中所述双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链，其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区，其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸，其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示：

有义：5'n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-(X X X)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-(Z Z Z)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

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

其中:

i、j、k、以及l各自独立地是0或1;

各 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或不可以不存在;

$p$ 、 $q$ 、以及 $q'$ 各自独立地是0-6;

$n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上;

$N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

$N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;

其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联;并且

其中该有义链被共轭到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

73.一种能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中所述反义链包含与编码KHK的一种mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

有义:  $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

反义:  $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIa)

其中:

各 $n_p$ 、 $n_q$ 以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 以及 $n_q'$ 中的每一个可以或不可以不存在;

$p$ 、 $q$ 、以及 $q'$ 各自独立地是0-6;

$n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上;

$N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联;并且

其中该有义链被共轭到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

74.一种双链RNAi试剂,包含在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的这些RNAi试剂。

75.一种细胞,含有如权利要求1、2、7、18、67、以及69-74中任一项所述的双链RNAi试剂。

76. 一种编码双链RNAi试剂的至少一个链的载体,其中所述双链RNAi试剂包含与编码己酮糖激酶的一种mRNA的至少一部分互补的一个区,其中所述双链RNAi试剂的长度是30个碱基对或更少,并且其中所述双链RNAi试剂靶向所述mRNA用于裂解。

77. 如权利要求76所述的载体,其中该互补区的长度是至少15个核苷酸。

78. 如权利要求76所述的载体,其中该互补区的长度是19个至21个核苷酸。

79. 一种细胞,包含如权利要求76所述的载体。

80. 一种药用组合物,包含如权利要求1、2、7、18、67、以及69-74中任一项所述的双链RNAi试剂,该组合物包含如权利要求14所述的修饰的反义多核苷酸试剂或如权利要求76所述的载体。

81. 如权利要求80所述的药用组合物,其中在一种无缓冲的溶液中给予双链RNAi试剂。

82. 如权利要求81所述的药用组合物,其中所述无缓冲的溶液是盐水或水。

83. 如权利要求80所述的药用组合物,其中与一种缓冲溶液一起给予所述双链RNAi试剂。

84. 如权利要求83所述的药用组合物,其中所述缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐、或磷酸盐,或其任何组合。

85. 如权利要求84所述的药用组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

86. 一种抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)表达的方法,该方法包括:

(a) 使该细胞与如权利要求1、2、7、18、67、以及69-74中任一项所述的双链RNAi试剂、如权利要求14-16和80-85中任一项所述的药用组合物、包含如权利要求17所述的修饰的反义多核苷酸试剂或如权利要求76所述的载体的组合物相接触;并且

(b) 使在步骤(a)中产生的该细胞维持足以获得KHK基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制该细胞中该KHK基因的表达。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述细胞是在受试者体内。

88. 如权利要求87所述的方法,其中该受试者是人。

89. 如权利要求88所述的方法,其中该受试者患有一种己酮糖激酶相关疾病。

90. 如权利要求86-89中任一项所述的方法,其中该KHK表达被抑制至少约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%或约100%。

91. 一种治疗患有己酮糖激酶(KHK)相关病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者给予治疗有效量的如权利要求1、2、7、18、67、69-74中任一项所述的双链RNAi试剂、如权利要求14-16和80-85中任一项所述的药用组合物、包含如权利要求17所述的修饰的反义多核苷酸试剂或如权利要求76所述的载体的组合物,从而治疗所述受试者。

92. 一种治疗患有己酮糖激酶(KHK)相关病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者皮下给予治疗有效量的一种双链RNAi试剂,从而治疗该受试者,

其中所述双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,

其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中所述反义链的基本上所有的这些核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各

项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,

其中所述反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,

其中所述有义链基本上所有的这些核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,

其中所述有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且

其中所述有义链被共轭到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价连接子附接在该3'-末端处。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述有义链的所有这些核苷酸和所述反义链的所有这些核苷酸均包含一种修饰。

94. 如权利要求91或92所述的方法,其中该受试者是人。

95. 如权利要求94所述的方法,其中该己酮糖激酶相关疾病选自下组,该组由以下各项组成:肝病、血脂异常、血糖控制病症、心血管疾病、肾病、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

96. 如权利要求95所述的方法,其中该肝病是脂肪肝和/或脂肪性肝炎。

97. 如权利要求95所述的方法,其中该血脂异常选自下组,该组由以下各项组成:高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、以及餐后高甘油三酯血症。

98. 如权利要求95所述的方法,其中该血糖控制病症是胰岛素抵抗和/或糖尿病。

99. 如权利要求95所述的方法,其中该心血管疾病是高血压和/或内皮细胞功能障碍。

100. 如权利要求95所述的方法,其中该肾病选自下组,该组由以下各项组成:急性肾病症、肾小管功能障碍、以及近端小管的促炎性变化。

101. 如权利要求91或92所述的方法,其中以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约1mg/kg至约10mg/kg的剂量给予该双链RNAi试剂。

102. 如权利要求101所述的方法,其中以约0.1mg/kg、约1.0mg/kg或约3.0mg/kg的剂量给予该双链RNAi试剂。

103. 如权利要求101所述的方法,其中以约1mg/kg至约10mg/kg的剂量给予该双链RNAi试剂。

104. 如权利要求101所述的方法,其中皮下给予该双链RNAi试剂。

105. 如权利要求101所述的方法,其中静脉内给予该双链RNAi试剂。

106. 如权利要求101所述的方法,其中以两个或更多个剂量给予所述双链RNAi试剂。

107. 如权利要求91或92所述的方法,进一步包括向该受试者给予一种另外的治疗剂。

108. 如权利要求107所述的方法,其中该另外的治疗剂选自下组,该组由以下各项组成:一种HMG-CoA还原酶抑制剂、一种糖尿病疗法、一种抗高血压药物、以及白藜芦醇。

## 己酮糖激酶(KHK) iRNA组合物及其使用方法

[0001] 本申请是申请号为202110287683.3、申请日为2015年2月11日、名称为“己酮糖激酶(KHK) iRNA组合物及其使用方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此通过引用以其全文结合的序列表。创建于2015年2月11日的所述ASCII副本被命名为121301-01220\_SL.txt并且大小为116,205个字节。

[0004] 相关申请

[0005] 本申请要求2014年2月11日提交的美国临时专利申请号:61/938,567的优先权权益,该申请的全部内容通过引用结合在此。

### 发明背景

[0007] 流行病学研究已表明,西方饮食是现代肥胖症流行病的主要原因之一。与丰富的软饮料和加工食品的使用相关的果糖吸收的增加被提出为该流行病的一个主要促成因素。到1967年高果糖玉米甜味剂开始在食品工业中获得广泛使用。虽然葡萄糖和果糖每个分子具有相同的热值,但这两种糖不同地代谢并且利用不同的GLUT转运蛋白。果糖几乎完全在肝中代谢,并且与葡萄糖代谢途径不同,果糖代谢途径不受产物的反馈抑制调控(科海坦Z (Khaitan Z) 等人, (2013) 营养和代谢杂志 (J.Nutr.Metab.) , 文章ID 682673,1-12)。虽然己糖激酶和磷酸果糖激酶(PFK) 调控从葡萄糖、果糖激酶或己酮糖激酶(KHK) 产生甘油醛-3-P(其负责肝中果糖磷酸化为果糖-1-磷酸),但不通过增加果糖-1-磷酸的浓度下调。因此,进入细胞的所有果糖被快速磷酸化(西里洛P. (Cirillo P.) 等人, (2009) 美国肾脏病学会杂志 (J.Am.Soc.Nephrol.) 20:545-553)。持续利用ATP来将果糖磷酸化为果糖-1-磷酸导致细胞内磷酸耗竭、ATP耗竭、AMP脱氨酶的活化、以及尿酸的形成(科海坦Z. 等人, (2013) 营养和代谢杂志2013, 文章ID 682673,1-12)。尿酸增加进一步刺激KHK的上调(拉纳斯帕M.A. (Lanaspa M.A.) 等人, (2012) 公共科学图书馆 • 综合 (PLOS ONE) 7 (10) :1-11), 并且导致内皮细胞和脂肪细胞功能障碍。果糖-1-磷酸通过醛缩酶B的作用随后转化为甘油醛并且磷酸化为甘油醛-3-磷酸。后者下游进行至糖酵解途径以便形成丙酮酸盐,丙酮酸进入柠檬酸循环,由此在良好进食条件下,柠檬酸盐从线粒体输出至细胞溶质,从而提供乙酰辅酶A以用于脂肪生成(图1)。

[0008] 通过KHK磷酸化果糖以及脂肪生成的随后活化导致(例如)脂肪肝、高甘油三酯血症、血脂异常、以及胰岛素抵抗。肾近端小管上皮细胞的促炎性变化也已显示是由KHK活性诱导的(西里洛P. 等人, (2009) 美国肾脏病学会杂志20:545-553)。通过KHK磷酸化果糖与以下疾病、病症和/或病状相关,诸如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。因此,本领域中需要

用于治疗与KHK活性相关的疾病、病症和/或病状的组合物和方法。

## 发明概述

[0010] 本发明提供包含靶向己酮糖激酶(KHK)的RNAi试剂(例如双链RNAi试剂)的组合物。本发明还提供使用本发明的组合物用于抑制KHK表达和/或用于治疗患有将受益于抑制或降低KHK基因的表达的病症的受试者的方法,该病症例如是KHK相关疾病,诸如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0011] 因此,在一方面,本发明提供一种用于抑制己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0012] 另一方面,本发明提供一种用于抑制己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、以及表5中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0013] 在一个实施例中,这些有义链和反义链包含选自下组的序列,该组由以下各项组成:AD-63851、AD-63820、AD-63853、AD-63839、AD-63854、AD-63855和AD-63886、以及表3、表4、表8、表11、表12、表14和表15中的任一个中披露的任一个序列。

[0014] 在一个实施例中,该双链RNAi试剂包含至少一个修饰的核苷酸。

[0015] 在一个实施例中,该至少一个修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、脱氧-核苷酸、3' -末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-0-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、锁核苷酸、解锁核苷酸(unlocked nucleotide)、构象限制的核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2' -氨基-修饰的核苷酸、2' -0-烯丙基-修饰的核苷酸、2' -C-烷基-修饰的核苷酸、2' -羟基-修饰的核苷酸、2' -甲氧基乙基修饰的核苷酸、2' -0-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5' -磷酸酯的核苷酸、以及包含5' -磷酸酯模拟物的核苷酸。

[0016] 在另一个实施例中,该至少一个修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、以及与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸。

[0017] 在另一方面,本发明提供用于抑制己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂,该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,其中该有义链包含与SEQ ID

NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，并且该反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸，其中该有义链的基本上所有的核苷酸和该反义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸，并且其中该有义链被共轭到附接在3'-末端处的一个配体上。

[0018] 在一个实施例中，该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。

[0019] 在另一个实施例中，该有义链和该反义链包含一个互补区，该互补区包含与表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的反义序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0020] 在一些实施例中，这些修饰的核苷酸选自下组，该组由以下各项组成：2'-0-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-0-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、与胆固醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、锁核苷酸、解锁核苷酸、构象限制的核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-0-烯丙基-修饰的核苷酸、2'-C-烷基-修饰的核苷酸、2'-羟基-修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-0-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-失水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、以及包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸。

[0021] 在双链RNAi试剂的另一个实施例中，至少一条链包含具有至少1个核苷酸的3'突出端。在另一个实施例中，至少一条链包含具有至少2个核苷酸的3'突出端。

[0022] 在又另一个实施例中，该双链RNAi试剂包含一个配体。在另一个实施例中，该双链RNAi试剂是使用一种药用组合物和一种脂质配制品给予的。在另一个实施例中，该脂质配制品包含一种脂质纳米颗粒(LNP)。在又另一个实施例中，该脂质纳米颗粒(LNP)包含一种MC3脂质。

[0023] 在另一方面，本发明提供一种包含修饰的反义多核苷酸试剂的组合物，其中该试剂能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达，并且包含与选自下组的一个有义序列互补的一个序列，该组具有在表3、表4和表5中的任一个中列出的序列，其中该多核苷酸的长度是约14个至约30个核苷酸。

[0024] 在另一方面，本发明提供能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的RNAi试剂，例如双链RNAi试剂，其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链，其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区，其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸，其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示：

[0025] 有义：5' $n_p$ -N<sub>a</sub>-(X X X)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-Y Y Y-N<sub>b</sub>-(Z Z Z)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3'

[0026] 反义：3' $n_p$ '-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>' 5' (III)

[0027] 其中：

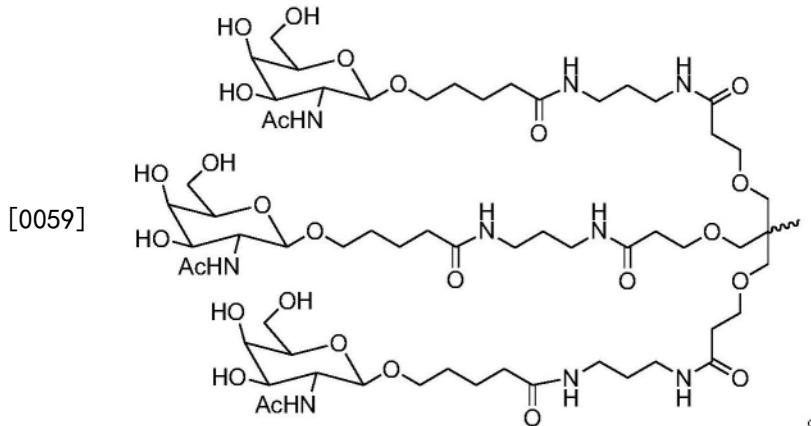
[0028] i、j、k、以及l各自独立地是0或1；

[0029] p、p'、q、以及q'各自独立地是0-6；

- [0030]  $N_a$  和  $N_a'$  各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0031]  $N_b$  和  $N_b'$  各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;
- [0032] 各  $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及  $n_q'$  独立地表示一个突出端核苷酸, 该  $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及  $n_q'$  中的每一个可以或可以不存在;
- [0033] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及 Z'Z'Z' 各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序;
- [0034]  $N_b$  上的修饰不同于 Y 上的修饰, 并且  $N_b'$  上的修饰不同于 Y' 上的修饰; 并且
- [0035] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上。
- [0036] 在一个实施例中, i 是 0; j 是 0; i 是 1; j 是 1; i 和 j 两者均是 0; 或 i 和 j 两者均是 1。在另一个实施例中, k 是 0; l 是 0; k 是 1; l 是 1; k 和 l 两者均是 0; 或 k 和 l 两者均是 1。
- [0037] 在一个实施例中, XXX 与 X'X'X' 互补, YYY 与 Y'Y'Y' 互补, 并且 ZZZ 与 Z'Z'Z' 互补。
- [0038] 在一个实施例中, 该 YYY 基序出现在该有义链的裂解位点处或附近。
- [0039] 在另一个实施例中, 该 Y'Y'Y' 基序出现在该反义链的从 5'-端起的 11、12 和 13 位置处。
- [0040] 在一个实施例中, Y' 是 2'-0-甲基。
- [0041] 在一个实施例中, 化学式(III)由化学式(IIIa)表示:
- [0042] 有义:  $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$
- [0043] 反义:  $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIa)
- [0044] 在另一个实施例中, 化学式(III)由化学式(IIIb)表示:
- [0045] 有义:  $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$
- [0046] 反义:  $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIb)
- [0047] 其中各  $N_b$  和  $N_b'$  独立地表示包含 1-5 个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。
- [0048] 在又另一个实施例中, 化学式(III)由化学式(IIIc)表示:
- [0049] 有义:  $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$
- [0050] 反义:  $3' n_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIc)
- [0051] 其中各  $N_b$  和  $N_b'$  独立地表示包含 1-5 个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。
- [0052] 在另一个实施例中, 化学式(III)由化学式(IIId)表示:
- [0053] 有义:  $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$
- [0054] 反义:  $3' n_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5'$  (IIId)
- [0055] 其中各  $N_b$  和  $N_b'$  独立地表示包含 1-5 个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列, 并且各  $N_a$  和  $N_a'$  独立地表示包含 2-10 个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。
- [0056] 在一个实施例中, 该双链区的长度是 15-30 个核苷酸对。在另一个实施例中, 该双链区的长度是 17-23 个核苷酸对。在又另一个实施例中, 该双链区的长度是 17-25 个核苷酸对。在另一个实施例中, 该双链区的长度是 23-27 个核苷酸对。在另一个实施例中, 该双链区的长度是 19-21 个核苷酸对。在另一个实施例中, 该双链区的长度是 19-23 个核苷酸对。在另一个实施例中, 该双链区的长度是 21-23 个核苷酸对。在又另一个实施例中, 每条链具有 15-30 个核苷酸。

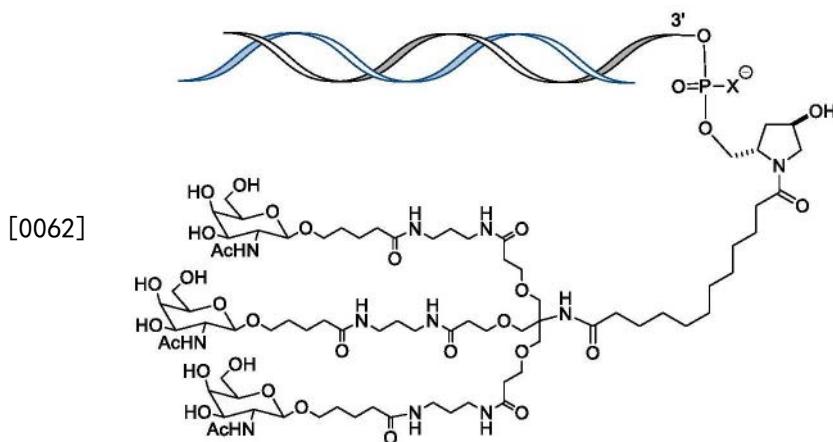
[0057] 在一个实施例中,这些核苷酸上的修饰选自下组,该组由以下各项组成:LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-烷基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧、2'-羟基、以及其组合。在另一个实施例中,这些核苷酸上的修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰。

[0058] 在一个实施例中,该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。在另一个实施例中,该配体是



[0060] 在一个实施例中,该配体附接到该有义链的3'端上。

[0061] 在另一个实施例中,该RNAi试剂共轭到如以下示意图中所示的配体:



[0063] 其中X是O或S。在一个特定的实施例中,X是O。

[0064] 在一个实施例中,该试剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。

[0065] 在另一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联是在一条链的3'-末端处。在另一个实施例中,该链是该反义链。在另一个实施例中,该链是该有义链。

[0066] 在一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联是在一条链的5'-末端处。在另一个实施例中,该链是该反义链。在另一个实施例中,该链是该有义链。

[0067] 在一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联是在一条链的5'-末端和3'-末端两者处。在另一个实施例中,该链是该反义链。

[0068] 在另一个实施例中,该双链RNAi试剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在另一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且该有义链包含在该有义链的5'-末端抑或3'-末端处的

至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0069] 在一个实施例中,该双链体的反义链的5'端的1位置处的碱基对是一个AU碱基对。在另一个实施例中,这些Y核苷酸含有一种2'-氟代修饰。在另一个实施例中,这些Y'核苷酸含有一种2'-0-甲基修饰。

[0070] 在一个实施例中, $p' > 0$ 。在另一个实施例中, $p' = 2$ 。在另一个实施例中, $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与该靶mRNA互补。在又另一个实施例中, $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出核苷酸与该靶mRNA不互补。

[0071] 在一个实施例中,该有义链具有总计21个核苷酸,并且该反义链具有总计23个核苷酸。

[0072] 在另一个实施例中,至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上。在另一个实施例中,所有 $n_p'$ 均经由硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上。

[0073] 在另一个实施例中,该RNAi试剂选自下组,该组具有在表3、表4和表5中的任一个中列出的RNAi试剂。

[0074] 在一方面,本发明提供用于抑制己酮糖激酶(KHK)的表达的双链RNAi试剂。该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该有义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该有义链包含在5' -末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中该反义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该反义链包含在5' -末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3' -末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且其中该有义链被共轭到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价连接子附接在3' -末端处。

[0075] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均包含一种修饰。

[0076] 在另一方面,本发明提供能够抑制细胞中KHK(己酮糖激酶)的表达的RNAi试剂,例如双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

[0077] 有义: $5'n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3'$

[0078] 反义: $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-(Y'Y'Y')_l-N_b'-(Z'Z'Z')_m-N_a'-n_q' 5'$  (III)

[0079] 其中:

[0080] i、j、k、以及l各自独立地是0或1;

[0081] p、p'、q以及q'各自独立地是0-6;

[0082]  $N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0083]  $N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;

[0084] 各 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在;

[0085] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

[0086]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0087] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上。

[0088] 在又另一方面,本发明提供能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的RNAi试剂,例如双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

[0089] 有义:5' $n_p$ - $N_a$ -(X X X)<sub>i</sub>- $N_b$ -Y Y Y- $N_b$ -(Z Z Z)<sub>j</sub>- $N_a$ - $n_q$  3'

[0090] 反义:3' $n_p'$ - $N_a'$ -(X'X'X')<sub>k</sub>- $N_b'$ -Y'Y'Y'- $N_b'$ -(Z'Z'Z')<sub>l</sub>- $N_a'$ - $n_q'$  5' (III)

[0091] 其中:

[0092] i、j、k,以及l各自独立地是0或1;

[0093] 各 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在;

[0094] p、q,以及q'各自独立地是0-6;

[0095]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上;

[0096]  $N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0097]  $N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;

[0098] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

[0099]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0100] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上。

[0101] 在另一方面,本发明提供能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的RNAi试剂,例如双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

[0102] 有义:5' $n_p$ - $N_a$ -(X X X)<sub>i</sub>- $N_b$ -Y Y Y- $N_b$ -(Z Z Z)<sub>j</sub>- $N_a$ - $n_q$  3'

[0103] 反义:3' $n_p'$ - $N_a'$ -(X'X'X')<sub>k</sub>- $N_b'$ -Y'Y'Y'- $N_b'$ -(Z'Z'Z')<sub>l</sub>- $N_a'$ - $n_q'$  5' (III)

[0104] 其中:

[0105] i、j、k,以及l各自独立地是0或1;

[0106] 各 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在;

[0107] p、q,以及q'各自独立地是0-6;

[0108]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上;

[0109]  $N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包括0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核

苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0110]  $N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包括0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0111] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

[0112]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0113] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0114] 在另一方面,本发明提供能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的RNAi试剂,例如双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

[0115] 有义:5' $n_p$ - $N_a$ -(X X X)<sub>i</sub>- $N_b$ -Y Y Y- $N_b$ -(Z Z Z)<sub>j</sub>- $N_a$ - $n_q$  3'

[0116] 反义:3' $n_p'$ - $N_a'$ -(X'X'X')<sub>k</sub>- $N_b'$ -Y'Y'Y'- $N_b'$ -(Z'Z'Z')<sub>l</sub>- $N_a'$ - $n_q'$  5' (III)

[0117] 其中:

[0118] i、j、k,以及l各自独立地是0或1;

[0119] 各 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在;

[0120] p、q,以及q'各自独立地是0-6;

[0121]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上;

[0122]  $N_a$ 和 $N_a'$ 各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0123]  $N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地表示包含0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列;

[0124] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰;

[0125]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;

[0126] 其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联;并且

[0127] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0128] 在又另一方面,本发明提供能够抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)的表达的RNAi试剂,例如双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一条反义链互补的一条有义链,其中该反义链包含与编码KHK的mRNA的一部分互补的一个区,其中每条链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由化学式(III)表示:

[0129] 有义:5' $n_p$ - $N_a$ -Y Y Y- $N_a$ - $n_q$  3'

[0130] 反义:3' $n_p'$ - $N_a'$ -Y'Y'Y'- $N_a'$ - $n_q'$  5' (IIIa)

[0131] 其中:

[0132] 各 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q'$ 中的每一个可以或可以不存在;

- [0133] p、q、以及q'各自独立地是0-6；
- [0134]  $n_p' > 0$  并且至少一个  $n_p'$  经由一个硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上；
- [0135]  $N_a$  和  $N_a'$  各自独立地表示包含0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的一个寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；
- [0136] YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序，并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰；
- [0137] 其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联；并且
- [0138] 其中该有义链被共轭到至少一个配体上，其中该配体是通过一个二价或三价支链连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物。
- [0139] 本发明还提供包含本发明的双链RNAi试剂的细胞、载体、宿主细胞、以及药用组合物。
- [0140] 在一个实施例中，本发明提供双链RNAi试剂，这些双链RNAi试剂包含在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的RNAi试剂。
- [0141] 在一个实施例中，一种细胞包含该双链RNAi试剂。
- [0142] 在另一个实施例中，一种载体编码一种双链RNAi试剂的至少一个链，其中该双链RNAi试剂包含与编码己酮糖激酶的mRNA的至少一部分互补的一个区，其中该双链RNAi试剂的长度是30个碱基对或更少，并且其中该双链RNAi试剂靶向该mRNA用于裂解。在另一个实施例中，该互补区的长度是至少15个核苷酸。在另一个实施例中，该互补区的长度是19至21个核苷酸。在另一个实施例中，一种细胞包含该载体。
- [0143] 在一些实施例中，该双链RNAi试剂或包含一种修饰的反义多核苷酸试剂的组合物是使用一种药用组合物给予的。
- [0144] 在优选的实施例中，该双链RNAi试剂在一种溶液中给予。在一些实施例中，该双链RNAi试剂在一种无缓冲的溶液中给予。在另一个实施例中，该无缓冲的溶液是盐水或水。在另一个实施例中，与一种缓冲溶液一起给予该双链RNAi试剂。在又一个实施例中，该缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在一些实施例中，该缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。
- [0145] 在另一个方面，本发明提供抑制细胞中己酮糖激酶(KHK)表达的方法。这些方法包括：使该细胞与该双链RNAi试剂、一种药用组合物、一种包含修饰的反义多核苷酸试剂的组合物或一种包含该RNAi试剂的载体接触；并且将产生的细胞维持足以获得KHK基因的mRNA转录物降解的一段时间，由此抑制该细胞中KHK基因的表达。
- [0146] 在一个实施例中，该细胞是在一个受试者内。在另一个实施例中，该受试者是人。在另一个实施例中，该受试者患有一种己酮糖激酶相关疾病。
- [0147] 在一个实施例中，该KHK表达被抑制至少约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%或约100%。
- [0148] 在另一个方面，本发明提供治疗患有一种己酮糖激酶(KHK)相关病症的受试者的方法，这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的该双链RNAi试剂、一种包含修饰的反义多核苷酸试剂的组合物或一种包含该双链RNAi试剂的药用组合物，由此治疗该受试者。
- [0149] 在另一个方面，本发明提供治疗患有一种己酮糖激酶(KHK)相关病症的受试者的方法，这些方法包括向该受试者皮下给予治疗有效量的一种双链RNAi试剂，其中该双链

RNAi试剂包含形成一个双链区的一条有义链和一条反义链,其中该有义链包含与SEQ ID N0:1、SEQ ID N0:3或SEQ ID N0:5的核苷酸序列中的任一个相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:6的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该反义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中该有义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-0-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且其中该有义链被共轭到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价连接子附接在3'-末端处。

[0150] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均包含一种修饰。

[0151] 在一个实施例中,该受试者是人。

[0152] 在一个实施例中,该己酮糖激酶相关疾病选自下组,该组由以下各项组成:肝病、血脂异常、血糖控制病症、心血管疾病、肾病、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。在一个特定的实施例中,该肝病是脂肪肝和/或脂肪性肝炎。在另一个实施例中,该血脂异常选自下组,该组由以下各项组成:高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、以及餐后高甘油三酯血症。在又另一个实施例中,该血糖控制病症是胰岛素抵抗和/或糖尿病。在另一个实施例中,该心血管疾病是高血压和/或内皮细胞功能障碍。在又另一个实施例中,该肾病选自下组,该组由以下各项组成:急性肾病症、肾小管功能障碍、以及近端小管的促炎性变化。

[0153] 在一个实施例中,该双链RNAi试剂是以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约1mg/kg至约10mg/kg的剂量给予的。在一个优选的实施例中,该双链RNAi试剂是以约0.1mg/kg、约1.0mg/kg或约3.0mg/kg的剂量给予的。在一个特定的实施例中,该双链RNAi试剂是以约1mg/kg至约10mg/kg的剂量给予的。

[0154] 在一个实施例中,该双链RNAi试剂是皮下或静脉内给予的。

[0155] 在一个实施例中,该RNAi试剂是以两个或更多个剂量给予的。

[0156] 在又另一个实施例中,这些方法进一步包括向该受试者给予一种另外的治疗剂。在一些实施例中,该另外的治疗剂选自下组,该组由以下各项组成:一种HMG-CoA还原酶抑制剂、一种糖尿病疗法、一种抗高血压药物、以及白藜芦醇。

## 附图简要说明

[0158] 图1描绘通过己酮糖激酶进行的果糖的代谢以及通过己糖激酶进行的葡萄糖和果糖的代谢。

[0159] 图2描绘己酮糖激酶A (NM\_000221.2)、己酮糖激酶C (NM\_006488.2)、以及转录变体X5 (XM\_005264298.1)的转录产物的人KHK基因上的外显子排列。

[0160] 发明的详细说明

[0161] 本发明提供包含靶向KHK的RNAi试剂(例如双链iRNA试剂)的组合物。本发明还提供使用本发明的组合物用于抑制KHK表达且用于治疗KHK相关疾病、病症和/或病状的方法,

该疾病、病症和/或病状例如是肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求(科海坦Z.等人,(2013)营养和代谢杂志,文章ID 682673,1-12;迪格尔C.P. (Diggle C.P.) 等人,(2009)组织化学与细胞化学杂志(J.Hisotchem.Cytochem.),57(8):763-774;西里洛P.等人,(2009)美国肾脏病学会杂志20:545-553;拉纳斯帕M.A.等人,(2012)公共科学图书馆·综合7(10):1-11)。

[0162] KHK(己酮糖激酶)基因位于染色体2p23上且编码己酮糖激酶,还称为果糖激酶。KHK是以一种醇作为磷酸酯受体的一种磷酸转移酶。KHK属于糖激酶的核糖激酶家族(郑(Trinh)等人,晶体学报(ACTA Cryst.),D65:201-211)。已经鉴别了因全长mRNA的选择性剪接产生的己酮糖激酶的两种同种型,KHK-A和KHK-C。这些同种型不同之处在于包含外显子3a或3c,且不同之处在于位置72与位置115之间的32个氨基酸(参见例如图2)。KHK-C mRNA主要在肝、肾、以及小肠中以高水平表达。与KHK-A相比,KHK-C对果糖结合具有更低K<sub>m</sub>,且因此在磷酸化膳食果糖方面是高度有效的。人KHK-C mRNA转录物的序列可以例如在基因库登录号GI:153218447 (NM\_006488.2; SEQ ID NO:1) 中找到。人KHK-A mRNA转录物的序列可以例如在基因库登录号GI:153218446 (NM\_000221.2; SEQ ID NO:3) 中找到。全长人KHK mRNA的序列提供于基因库登录号GI:530367552 (XM\_005264298.1; SEQ ID NO:5) 中(图2)。

[0163] 本发明提供用于调节KHK基因的表达的iRNA试剂、组合物、以及方法。在某些实施例中,使用一种KHK特异性iRNA试剂降低或抑制KHK的表达,由此导致果糖磷酸化为果糖-1-磷酸的减少且由此防止尿酸水平增加和脂肪生成增加。因此,使用本发明的iRNA组合物抑制KHK基因表达或活性适用作用于降低膳食果糖的脂肪生成作用且防止受试者中尿酸的伴随积聚的一种治疗。这种抑制适用于治疗以下疾病、病症和/或病状,诸如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

#### [0164] I. 定义

[0165] 为了使本发明可更容易理解,首先定义某些术语。此外,应该注意的是,每当列举一个参数的一个值或取值范围时,目的是表明这些列举的值的中间值和范围也意在成为本发明的部分。

[0166] 在此使用的冠词“一个”和“一种(“a”和“an”)是指一个或超过一个(即,至少一个)该冠词的语法宾语。通过举例,“一个元素”是指一个元素或超过一个元素,例如多个元素。

[0167] 在此使用术语“包括(including)”意指短语“包括但不限于”,并且与该短语可互换使用。

[0168] 在此使用术语“或(or)”意指术语“和/或”,并且与该术语可互换使用,除非上下文清楚地另外指明。

[0169] 如在此使用,“KHK”是指己酮糖激酶基因或蛋白质。KHK还被称为果糖激酶。术语

“KHK”包括人KHK，其氨基酸和完整编码序列可以在例如基因库登录号BC006233中找到。人KHK-C mRNA转录物的序列可以例如在基因库登录号GI:153218447 (NM\_006488.2; SEQ ID NO:1) 中找到。SEQ ID NO:1的反向互补序列被提供为SEQ ID NO:2。人KHK-A mRNA转录物的序列可以例如在基因库登录号GI:153218446 (NM\_000221.2; SEQ ID NO:3) 中找到。SEQ ID NO:3的反向互补序列被提供为SEQ ID NO:4。人全长KHK mRNA转录物的序列提供于基因库登录号GI:530367552 (XM\_005264298.1; SEQ ID NO:5) 中。SEQ ID NO:5的反向互补序列被提供为SEQ ID NO:6。小鼠(小家鼠)KHK mRNA的序列可以在例如基因库登录号GI:118130797 (NM\_008439.3; SEQ ID NO:7) 中找到，并且反向互补序列被提供为SEQ ID NO:8。大鼠(*Rattus rattovorus*)KHK mRNA的序列可以在例如基因库登录号GI:126432547 (NM\_031855.3; SEQ ID NO:9) 中找到，并且反向互补序列被提供为SEQ ID NO:10。食蟹猴(*cynomolgus monkey/Macaca fasciculari*)KHK mRNA, 变体X1的序列可以在例如基因库登录号GI:544482340 (XM\_005576321.1; SEQ ID NO:11) 或GI:中找到，并且反向互补序列被提供在SEQ ID NO:12。食蟹猴(*cynomolgus monkey/Macaca fasciculari*)KHK mRNA, 变体X3的序列可以在例如基因库登录号GI:544482340 (XM\_005576321.1; SEQ ID NO:325) 或GI:中找到，并且反向互补序列被提供在SEQ ID NO:326。KHK mRNA序列的另外实例使用公开可获得的数据库，例如GenBank、UniProt、OMIM、以及猕猴属基因组测序计划网站很容易获得。

[0170] 如在此所使用，“靶序列”是指在一种KHK基因转录过程中形成的一种mRNA分子的核苷酸序列的一个连续部分，包括作为一种原代转录产物的RNA加工的一种产物的mRNA。

[0171] 如在此所使用，“靶序列”是指在一种KHK基因转录过程中形成的一种mRNA分子的核苷酸序列的一个连续部分，包括作为一种原代转录产物的RNA加工的一种产物的mRNA。在一个实施例中，序列的靶部分将是至少足够长的，以用作在一种KHK基因转录过程中形成的一种mRNA分子的核苷酸序列的该部分处或附近用于iRNA引导的裂解的底物。

[0172] 靶序列的长度可以是从约9-36个核苷酸，例如约15-30个核苷酸长度。例如靶序列的长度可以是从约15-30个核苷酸，15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、或21-22个核苷酸。以上引用的范围和长度的范围与长度中间值也意在成为本发明的部分。

[0173] 如在此所使用，术语“包含序列的链”是指包含一个核苷酸链的寡核苷酸，该核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法提到的顺序来描述。

[0174] “G”、“C”、“A”、“T”以及“U”每一者通常分别代表包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶以及尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而，应理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指一种经修饰的核苷酸(如以下进一步详述)或一种替代性的置换部分(参见，如表2)。技术人员应很好地意识到，鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶可以被其他部分置换而基本上不改变一种寡核苷酸(包括一种具有这种置换部分的核苷酸)的碱基配对特性。例如非限制性地，包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸进行碱基配对。因此，含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本发明中体现的dsRNA的核苷酸序列中由含有例如肌苷的核苷酸置换。在另一个实例中，寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和

胞嘧啶可以对应地置换为鸟嘌呤和尿嘧啶,以便形成与靶mRNA碱基配对的G-U摇摆。含有这类置换部分的序列适用于在本发明中体现的组合物和方法。

[0175] 如在此可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi试剂”、“iRNA试剂”、“RNA干扰试剂”或“小抑制性RNA”或“siRNA”是指含有作为在此定义的该术语的RNA的一种试剂,并且该试剂经由一种RNA诱导的沉默复合体(RISC)途径介导一种RNA转录物的靶向裂解。iRNA通过被称为RNA干扰(iRNA)的一个过程引导mRNA的序列特异性降解。iRNA调节(例如,抑制)细胞(例如,受试者如哺乳动物受试者内的细胞)中KHK的表达。

[0176] 在一个实施例中,本发明的iRNA试剂包括与一个靶RNA序列(例如一个KHK靶mRNA序列)相互作用的一种单链RNA,以便引导该靶RNA的裂解。不希望受理论约束,认为引入细胞中长的双链RNA由称作Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(夏普(Sharp)等人,基因与发育(Genes Dev.)2001,15:485)。Dicer(核糖核酸酶-III样酶)使dsRNA加工成具有特征性的两个碱基3'突出端的19-23个碱基对短干扰RNA(伯恩斯坦(Bernstein)等人,(2001)自然(Nature)409:363)。然后将siRNA结合到一种RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种螺旋酶使siRNA双链体展开,从而能够实现互补反义链导引靶标识别(尼卡能(Nykanen)等人,(2001)细胞(Cell)107:309)。当结合至适当的靶mRNA时,RISC内的一种或多种核酸内切酶裂解该靶标以便诱导沉默(巴希尔等人,(2001)基因与发育15:188)。因此,在一个方面,本发明涉及促进实现靶基因(即一种KHK基因)的沉默的一种RISC复合体形成的、产生于细胞内的一种单链RNA(siRNA)。因此,术语“siRNA”还在此用于指代以上所述的一种iRNA。

[0177] 在另一个实施例中,该iRNA试剂可以是引入到细胞或生物体中以便抑制一种靶mRNA的一种单链siRNA。单链iRNA试剂结合到RISC核酸内切酶Argonaute 2上,该核酸内切酶然后裂解该靶mRNA。这些单链siRNA通常是15-30个核苷酸并且是化学修饰的。单链siRNA的设计和检测描述于美国专利号8,101,348中,以及利马(Lima)等人,(2012)《细胞》(Cell)150:883-894中,特此将它们各自的全部内容通过引用结合在此。在此描述的任何反义核苷酸序列可以被用作如在此所描述或如通过描述于利马(Lima)等人,(2012)细胞150;:883-894中的方法化学修饰的一种单链siRNA。

[0178] 在另一个实施例中,用于本发明的组合物、用途以及方法中的“iRNA”是双链RNA,并且在此称为“双链RNAi试剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA试剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指核糖核酸分子的一种复合体,该复合体具有包含两条反平行和基本上互补的核酸链的双链体结构,称为相对于一种靶RNA(即一种KHK基因)具有“有义”和“反义”取向。在本发明的一些实施例中,一种双链RNA(dsRNA)通过在此称为RNA干扰或RNAi或iRNA的一种转录后基因沉默机理来引发一种靶RNA(例如一种mRNA)的降解。

[0179] 通常,dsRNA分子的每条链的大部分的核苷酸是核糖核苷酸,但是如在此详述的,两条链的每一者或两者还可以包括一个或多个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。另外,如在此说明中所使用,一种“iRNA试剂”可以包括具有化学修饰的核糖核苷酸;一种iRNA试剂可以包括在多个核苷酸处的实质性修饰。

[0180] 如在此使用,术语“修饰的核苷酸”是指独立地具有一个修饰的糖部分、一个修饰的核苷酸间键联和/或一个修饰的核碱基的一个核苷酸。因此,该术语修饰的核苷酸涵盖核苷酸间键联、糖部分或核碱基的例如一个官能团或原子的取代、添加或去除。适用于本发明的试剂中的修饰包括在此披露的或本领域中已知的所有类型的修饰。如在siRNA型分子中

使用的,任何这样的修饰出于本说明书和权利要求书的目的都由“RNAi试剂”涵盖。

[0181] 双链体区可以具有容许通过一种RISC途径特异性降解一种所希望的靶RNA的任何长度,并且长度可以在从约9个至36个碱基对的范围内,例如长度是约15-30个碱基对,例如长度是约9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个碱基对,如长度是约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0182] 形成双链体结构的两个链可以是一个更大的RNA分子的不同部分,或它们可以是单独的RNA分子。当这两条链是一个更大的分子的部分时,并且因此通过一条链的3' -端与形成双链体结构的对应的另一条链的5' -端之间的不间断核苷酸链来连接,连接的RNA链称为“发夹环”。发夹环可以包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施例中,该发夹环可以包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对的核苷酸。

[0183] 当dsRNA的两个基本上互补的链包含单独的RNA分子时,这些分子不是必须的,但是可以共价连接。

[0184] 在这两条链是通过除了一条链的3' -末端与形成该双链结构的对应另一条链的5' -末端之间的非间断核苷酸链以外的方式而共价连接的情况下,该连接结构称作“连接子(linker)”。这些RNA链可以具有相同或不同数目的核苷酸。碱基对的最大数目是该dsRNA的最短链中的核苷酸数目减去存在于该双链体中的任何突出端。除了双链体结构以外,iRNA可以包含一个或多个核苷酸突出端。

[0185] 如在此所使用的,术语“核苷酸突出”是指至少一个非配对的核苷酸,其从iRNA的双链体结构(例如,dsRNA)突出。例如,当dsRNA的一条链的3' -端延伸超过另一条链的5' -端时或反之亦然,存在核苷酸突出端。dsRNA可以包括具有至少一个核苷酸的突出端;替代地该突出端可以包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包括核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任意组合上。另外,突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的反义或有义链的5'末端、3'末端或两个末端上。

[0186] 在一个实施例中,dsRNA的反义链在3' -末端和/或5' -末端具有一个1-10核苷酸,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个核苷酸的突出端。在一个实施例中,dsRNA的有义链在3' -末端和/或5' -末端具有一个1-10核苷酸,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个核苷酸的突出端。在另一个实施例中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替代。

[0187] “平端”或“平末端”意指在该双链iRNA试剂的该端处不存在不成对的核苷酸,即无核苷酸突出端。“平端”iRNA试剂是在其整个长度上为双链的dsRNA,即,在分子的任一端处没有核苷酸突出端。本发明的iRNA试剂包括在一端处具有核苷酸突出端(即,具有一个突出端和一个平端的试剂)或在两端处均具有核苷酸突出端的iRNA试剂。

[0188] 术语“反义链”或“引导链”是指一种iRNA(如一种dsRNA)的包括与一个靶序列(例

如一种KHK mRNA)基本上互补的一个区的链。如在此所使用,术语“互补性区域”是指反义链上与一个序列(例如,如在此定义的一个靶序列,例如如一个KHK核苷酸序列)基本上互补的区。当该互补区不完全与该靶序列互补时,错配可以处于分子的内部区域或末端区域中。通常,最耐受的错配存在于末端区域内,例如在iRNA的5'-和/或3'-末端的5、4、3或2个核苷酸内部。

[0189] 如在此使用的术语“有义链”或“过客链”是指包括与如在此定义的该术语的反义链的一个区基本上互补的一个区的一种iRNA的链。

[0190] 如在此所使用,术语“裂解区”是指位于紧邻裂解位点处的一个区。裂解位点是在其上发生裂解的靶标上的位点。在一些实施例中,该裂解区包含三个在该裂解位点的任一端上并且与其紧紧相邻的碱基。在一些实施例中,该裂解区包含两个在该裂解位点的任一端上并且与其紧紧相邻的碱基。在一些实施例中,该裂解位点具体来说存在于由该反义链的核苷酸10和11结合的位点处,并且该裂解区包含核苷酸11、12以及13。

[0191] 如在此所使用,并且除非另外指明,当用来描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时,术语“互补”是指包含该第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含该第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员将理解。这类条件可以例如是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl, 40mM PIPES, pH 6.4, 1mM EDTA, 50°C或70°C持续12-16小时,随后洗涤(参见例如“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),萨拉布鲁克(Sambrook)等人(1989)冷泉港实验室出版社)。其他条件如生物体内部可以遇到的生理相关的条件可以应用。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用,确定最适宜于测试两个序列的互补性的条件集合。

[0192] 一种iRNA内(例如,如在此描述的一种dsRNA内)的互补序列包括包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的整个长度上的碱基配对。此类序列在此可以称作相对于彼此“完全互补”。然而,当一个第一序列在此称为相对于一个第二序列“基本上互补”时,这两个序列可以是完全互补的,或在对于高达30个碱基对的一种双链体杂交时,它们可以形成一个或多个但通常不多于5、4、3或2个错配的碱基对,同时保持在与其最终应用(例如经由一种RISC途径抑制基因表达)最相关的条件下杂交的能力。然而,当两个寡核苷酸被设计成在杂交时形成一个或多个单链突出端时,此类突出端不应该被认为是关于互补性确定的错配。例如,出于在此描述的目的,包含长度为21个核苷酸的一个寡核苷酸和长度为23个核苷酸的另一个寡核苷酸的一种dsRNA也可以称为“完全互补”,其中更长的寡核苷酸包含与更短的寡核苷酸完全互补的具有21个核苷酸的一个序列。

[0193] 如在此使用,“互补”序列还可以包括非沃森-克里克碱基配对和/或从非天然核苷酸和修饰的核苷酸中形成的碱基对,或完全从其中形成,以至于实现以上关于其杂交能力的要求。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摇摆碱基配对或Hoogstein碱基配对。

[0194] 在此的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可以相对于一种dsRNA的有义链与反义链之间,或一种iRNA试剂的反义链与一个靶序列之间的碱基配对使用,如将从其使用的上下文理解。

[0195] 如在此使用,与一种信使RNA(mRNA)的“至少部分基本上互补”的多核苷酸是指与

感兴趣的mRNA(例如,编码KHK的一种mRNA)的一个连续部分基本互补的多核苷酸。例如,如果序列与编码KHK的一种mRNA的一个非中断部分基本上互补,则多核苷酸与一种KHK mRNA的至少一个部分互补。

[0196] 总体上,每一链的大部分的核苷酸是核糖核苷酸,但是如在此详述的,两条链的每一者或两者还可以包括一个或多个非核糖核苷酸,例如一种脱氧核糖核苷酸和/或一种经修饰的核苷酸。此外,“iRNA”可以包括化学修饰的核糖核苷酸。这些修饰可以包括在此披露的或在本领域中已知的所有类型的修饰。如在iRNA分子中所使用的任何此类修饰被“iRNA”所囊括用于本说明书以及权利要求书的目的。

[0197] 在本发明的一个方面中,用于本发明的这些方法和组合物中的一种试剂是经由一种反义抑制机理抑制一种靶mRNA的一种单链反义寡核苷酸分子。该单链反义寡核苷酸分子与该靶mRNA内的一个序列互补。单链反义寡核苷酸可以通过与mRNA碱基配对并且物理性地阻碍翻译机器以化学计量的方式抑制翻译,参见,迪亚斯N. (Dias N.) N. 等人, (2002) 分子癌症治疗 (Mol Cancer Ther) 1:347-355。该单链反义寡核苷酸分子的长度可以是约15至约30个核苷酸并且具有与靶序列互补的序列。例如,该单链反义寡核苷酸分子可以包含来自在此描述的任一个反义序列的至少约15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的一个序列。

[0198] 在此使用的术语“抑制”,可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“压制”和其他类似术语交替使用,并且包括任何水平的抑制。

[0199] 如在此使用的短语“抑制一种KHK的表达”包括抑制任何KHK基因(例如像一种小鼠KHK基因、一种大鼠KHK基因、一种猴KHK基因、或一种人KHK基因)以及编码一种KHK蛋白的一种KHK基因的变体或突变体的表达。

[0200] “抑制一种KHK基因的表达”包括一种KHK基因的任何水平的抑制,例如至少部分抑制一种KHK基因的表达,如抑制至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%。

[0201] 可以基于与KHK基因表达相关的任何变量水平,例如KHK mRNA水平或KHK蛋白水平来评定一种KHK基因的表达。抑制可通过这些变量中的一个或多个与对照水平相比的绝对或相对水平的减少来评估。该对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(例如仅缓冲液对照或惰性剂对照)处理的受试者、细胞、或样品确定的水平。

[0202] 在一个实施例中,对一种KHK基因的表达的至少部分抑制是通过以下评定的:可从一种KHK基因在其中转录的一种第一细胞或一组第一细胞(已经过处理以使得一种KHK基因的表达被抑制)中分离的或检测到的KHK mRNA的量如与一种第二细胞或一组第二细胞相比减少,该一种第二细胞或一组第二细胞与该第一细胞或一组第一细胞基本上相同、但未经受如此的处理(对照细胞)。抑制程度可如下表示

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

$$\quad \quad \quad / (\text{对照细胞中的mRNA})$$

[0204] 如在此使用的短语“使一种细胞与一种iRNA试剂”(如一种dsRNA)相接触包括通过任何可能的手段接触一种细胞。使一种细胞与一种iRNA试剂相接触包括使一种细胞在体外与该iRNA相接触或使一种细胞在体内与该iRNA相接触。该接触可以直接或间接地完成。因此,例如,该RNAi试剂可以通过执行该方法的个体与细胞物理接触,或者可替代地,该iRNA试剂可以进入容许或引起它随后接触该细胞的一种情况。

[0205] 在体外接触一种细胞可以通过例如用该iRNA试剂孵育该细胞来进行。在体内接触细胞可以例如通过将该iRNA试剂注入该细胞所位于的组织中或其附近,或通过将该iRNA试剂注入另一个区域(例如血流或皮下空间)中,这样使得该试剂将随后到达有待接触的细胞所位于的组织来完成。例如,该iRNA试剂可以包含和/或被偶联到一个配体(例如GalNAc3)上,该配体将该iRNA试剂引导至感兴趣的位点(例如肝脏)。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如,也可以使一种细胞在体外与一种iRNA试剂相接触,且随后移植到受试者中。

[0206] 在一个实施例中,使细胞与一种iRNA接触包括通过促进或实现摄取或吸收入细胞来将该iRNA“引入”或“递送到该细胞”。吸收或摄取iRNA可以通过无协助扩散过程或主动细胞过程或借助助剂或装置发生。向细胞中引入iRNA可以在体外和/或体内进行。例如对于体内引入,可以将iRNA注入组织位点中或全身给予。体内递送也可以通过一种 $\beta$ -葡聚糖递送系统来进行,如在美国专利号5,032,401和5,607,677以及美国公开号2005/0281781(其全部内容特此通过引用结合在此)中所描述的那些。体外引入到细胞中包括本领域中已知的方法,如电穿孔和脂质转染。其他方案在下文描述和/或是本领域已知的。

[0207] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是包含一个脂质层的一种囊泡,该脂质层包裹一种药物活性分子,如一种核酸分子,例如一种iRNA或从其中转录一种iRNA的一种质粒。LNP描述在例如美国专利号6,858,225、6,815,432、8,158,601和8,058,069中,特此将其全部内容通过引用结合在此。

[0208] 如在此使用的,“受试者”是动物,例如哺乳动物,包括灵长类动物(如人、非人灵长类动物(例如猴子和黑猩猩)、非灵长类(如牛、猪、骆驼、美洲鸵、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马、以及鲸)、或鸟(如鸭或鹅)。在一在一个实施例中,该受试者是人,如正针对将受益于KHK表达的降低的一种疾病、病症和/或病状进行治疗或评定的人类;处于将受益于己酮糖激酶表达降低的一种疾病、病症或病状的风险的人;患有将受益于己酮糖激酶表达降低的一种疾病、病症或病状的人。

[0209] 如在此使用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指一种有益的或所希望的结果,包括但不限于改善或减轻与不想要的己酮糖激酶活化(例如,肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求)相关的一种或多种症状;与己酮糖激酶活性相关的一种或多种疾病、病症和/或病状的稳定化(即,不恶化);改善或缓和不想要的己酮糖激酶活性(例如,导致脂肪生成的活化以及尿酸产生增加的果糖磷酸化)(无论是可检测的还是不可检测的)。“治疗”还可以意指与不存在治疗情况下的预期存活相比,延长存活。

[0210] 因此,减轻或改善由经由KHK途径进行的果糖代谢引起的任何症状包括减轻或改善包括但不限于下组的任何一种或多种症状,该组包括脂肪肝、脂肪性肝炎、高血压 (high blood pressure)、高血压 (hypertension)、高胆固醇、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高血脂症、高甘油三酯血症、肾病、代谢综合征、过度糖渴求、进食障碍、餐后高甘油三酯血症、肝脂肪变性 (hepatosteatosis)、痛风、糖尿病、急性肾病症、肾小管功能障碍、胰岛素抵抗、以及肥胖症。在一些实施例中,减轻或改善一种KHK相关疾病、病症或病状意指减轻肝脂肪变性、过量体脂肪、肥胖症、高胆固醇、高血压 (hypertension)、高血压 (high blood pressure)。

[0211] 在受试者中的己酮糖激酶活性或疾病标志物或症状的水平背景下的术语“降低”是指此种水平的统计学上显著的降低。该降低可以例如是至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多,并且优选地低至对于不具有此种病症的个体而言正常的范围内所接受的水平。

[0212] 如在此使用,当关于将受益于一种KHK基因的表达降低的一种疾病、病症或病状使用时,“预防 (prevention)”或“预防 (preventing)”是指受试者将发展与这种疾病、病症或病状相关的一种症状的可能性降低,该症状例如是果糖磷酸化为果糖-1-磷酸的一种症状,如导致例如以下各项的脂肪生成的活化和尿酸的产生增加:肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。例如,当具有针对任何或所有这些疾病、病症和/或病状的一种或多种风险因素的个体未能发展该疾病、病症和/或病状抑或相对于具有相同风险因素且未接受如在此描述的治疗的群体发展具有较低严重程度的一种疾病、病症和/或病状时,发展任何或所有这些疾病、病症和/或病状的可能性被降低。没有发展一种疾病、病症和/或病状,或者减少发展与这种疾病、病症和/或病状相关的一种症状(例如在临幊上接受的比例上,针对该疾病或病症减少至少约10%),或表现出症状延迟(如延迟数天、数周、数月或数年)被认为是有效的预防。

[0213] 如在此使用,术语“己酮糖激酶相关疾病”是由己酮糖激酶基因或蛋白质引起或与其相关的一种疾病、病症或病状,例如由果糖磷酸化为果糖-1-磷酸引起或与其相关的一种疾病、病症或病状。这类疾病典型地与脂肪生成的活化和尿酸产生增加相关。己酮糖激酶相关疾病的非限制性实例包括肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0214] 如在此使用,“治疗有效量”旨在包括当给予患有一种KHK相关疾病或病症的受试者时足以实现该疾病或病症的治疗(例如,通过减轻或改善该疾病或该疾病的一种或多种症状)的一种iRNA试剂的量。该“治疗有效量”可以取决于RNAi试剂、如何给予该试剂、该疾病及其严重程度、以及待治疗的受试者的病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随

治疗(如果有)的类型和其他个体特征而变化。

[0215] 如在此使用的“预防有效量”旨在包括当向患有一种KHK相关疾病但尚未(或当前)经历或表现出该疾病的症状的受试者和/或处于发展一种KHK相关疾病(例如,肝病、血脂异常、血糖控制病症、心血管疾病、肾病、代谢综合症、和/或肥胖症)的风险的受试者给予时,足以预防或改善该疾病或该疾病的一种或多种症状的一种iRNA试剂的量。改善疾病包括减缓疾病的进程或降低后发疾病的严重程度。该“预防有效量”可以取决于该iRNA试剂、如何给予该试剂、该疾病的风险程度、以及待治疗的患者的病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗(如果有)的类型和其他个体特征而变化。

[0216] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括在合理的适用于任何治疗的效益/风险比下产生一些希望的局部或全身效果的RNAi试剂的量。本发明的方法中所用的iRNA试剂可以按足以产生一个适用于这种治疗的合理效益/风险比的一个量给予。在此采用的短语“药学上可接受的”是指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在正确医学判断范围内,适合于接触人受试者和动物受试者的组织而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。

[0217] 如在此所使用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、或溶剂封装材料(涉及将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运输到身体的另一个器官或部分)。在与该配制品的其他成分相容并且对所治疗的受试者无害的意义上来讲,每种载体必须是“可接受的”。可以充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素和它的衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)粉状黄蓍;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油、以及大豆油;(10)二醇,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇、以及聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)褐藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯类、聚碳酸酯类和/或聚酐类;(22)增量剂,如多肽和氨基酸;(23)血清组分,如血清白蛋白、HDL和LDL;以及(22)在药物配制品中采用的其他无毒相容的物质。

[0218] 如在此使用,术语“样品”包括从受试者体内分离的类似的流体、细胞、或组织,以及受试者体内存在的流体、细胞、或组织的一个集合。生物流体的实例包括血液、血清以及浆膜液、血浆、尿液、淋巴液、脑脊液、眼内液、唾液等。组织样品可包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如样品可以源自特定器官、器官部分、或这些器官内的流体或细胞。在某些实施例中,样品可源自肝脏(例如,整个肝脏或肝脏的某些段,或肝脏中的某些类型的细胞,例如,肝细胞)。在优选实施例中,“源自受试者的样品”是指从该受试者中取出的血液或血浆。在其他实施例中,“源自受试者的样品”是指源自该受试者的肝脏组织(或其亚成分)。

[0219] II. 本发明的iRNA

[0220] 本发明还提供抑制一种KHK基因的表达的iRNA。在一个实施例中,该iRNA试剂包括用于抑制细胞中的一种KHK基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子,该细胞是如受试者、例如哺乳动物,如患有一种KHK相关疾病或病症的人内的细胞,该疾病或病症包括但不限于肝

病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。该dsRNA包含一个反义链,该反义链具有与在一种KHK基因的表达中形成的一种mRNA的至少一部分互补的一个互补区。互补性区域是约30个核苷酸或更小的长度(例如约30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个或18个核苷酸或更小的长度)。当与表达KHK基因的细胞接触时,该iRNA将该KHK基因(例如人、灵长类、非灵长类、或鸟KHK基因)的表达抑制至少约10%,如通过例如一种基于PCR或支链DNA(bDNA)的方法或通过一种基于蛋白质的方法,如通过免疫荧光分析,使用例如蛋白质印迹法或流式细胞技术所评定的。

[0221] dsRNA包含互补且在将使用dsRNA的条件下杂交以形成一种双链体结构的两条RNA链。dsRNA的一条链(反义链)包含一个互补区,该互补区与一个靶序列基本上互补并且通常完全互补。该靶序列可以来源于在一种KHK基因的表达过程中形成的一种mRNA的序列。另一条链(有义链)包含与反义链互补的一个区,这样使得在适合的条件下组合时,这两条链杂交并形成双链体结构。如在此的其他地方所描述并且如本领域中所知,与处于单独的寡核苷酸上相反,dsRNA的互补序列还可以被包含作为单一核酸分子的自我互补区。

[0222] 通常,双链结构是15到30个碱基对之间的长度,例如在15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、或21-22个碱基对之间的长度。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0223] 类似地,靶序列的互补区的长度是在15与30个核苷酸之间,例如在15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、或21-22个核苷酸之间的长度。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0224] 在一些实施例中,dsRNA是在约15至约20个核苷酸之间的长度,或者在约25至约30个核苷酸之间长度。总之,dsRNA作为Dicer酶的底物是足够长的。例如本领域中所熟知的,长度长于约21-23个核苷酸的dsRNA可以用作Dicer的底物。如技术人员也将认识,被靶向用于裂解的RNA的区将最经常是较大RNA分子(经常是mRNA分子)的部分。在相关的情况下,一种mRNA靶标的“一部分”是一种mRNA靶标的一个连续序列,该连续序列的长度足以允许它作为iRNA引导的裂解的底物(即,通过一种RISC途径的裂解)。

[0225] 本领域技术人员还将认识到,双链体区是dsRNA的一个主要功能部分,例如具有约9至36个碱基对,例如约10-36、11-36、12-36、13-36、14-36、15-36、9-35、10-35、11-35、12-

35、13-35、14-35、15-35、9-34、10-34、11-34、12-34、13-34、14-34、15-34、9-33、10-33、11-33、12-33、13-33、14-33、15-33、9-32、10-32、11-32、12-32、13-32、14-32、15-32、9-31、10-31、11-31、12-31、13-32、14-31、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对的双链体区。因此，在一个实施例中，达到加工成靶向所希望的RNA以用于裂解的具有例如15-30个碱基对的一种功能双链体的程度，具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子的复合体是dsRNA。因此，技术人员将认识到在一个实施例中miRNA是dsRNA。在另一个实施例中，dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施例中，用于靶向KHK表达的iRNA试剂不是在靶细胞中通过裂解较大dsRNA产生的。

[0226] 如在此所描述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端，例如1、2、3或4个核苷酸。具有至少一个核苷酸突出端的dsRNA相对于其平端的对应物可以具有出乎意料地优越的抑制特性。核苷酸突出端可以包括核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任意组合上。另外，突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的反义或有义链的5'末端、3'末端或两个末端上。

[0227] dsRNA可以通过如进一步在以下所讨论的、本领域内已知的标准方法来进行合成，例如通过使用自动化的DNA合成仪，例如从例如生物研究(Bioscience)、应用生物系统公司(Applied Biosystems, Inc)可商购的合成仪。

[0228] 本发明的iRNA化合物可以使用二步程序来制备。首先，分别制备该双链RNA分子的各链。然后，将这些组分链退火。siRNA iRNA化合物的单独链可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供了以下优点，可以容易地制备包含非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。本发明的单链寡核苷酸可以通过使用溶液相或固相有机合成或二者来制备。

[0229] 一个方面，本发明的dsRNA包括至少两个核苷酸序列，一个有义序列和一个反义序列。该有义链选自在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的序列的组，并且该有义链的相应反义链选自在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的序列的组。在这方面，这两个序列中的一个与这两个序列中的另一个互补，其中这些序列中的一个与在一种KHK基因的表达中产生的一种mRNA的一个序列基本上互补。照此，在这方面，dsRNA将包含两个寡核苷酸，其中一个寡核苷酸被描述为表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中的有义链，并且第二个寡核苷酸被描述为表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中的有义链的相应反义链。在一个实施例中，该dsRNA的基本上互补的序列被包含在单独的寡核苷酸上。在另一个实施例中，该dsRNA的基本上互补的序列被包含在单一寡核苷酸上。

[0230] 技术人员将很好地意识到，具有在约20与23个碱基对之间(例如，21个碱基对)的双链体结构的dsRNA作为特别有效于诱导RNA干扰而受到欢迎(巴希尔(Elbashir)等人，欧洲分子生物学学会(EMBO)2001,20:6877-6888)。然而，其他人已经发现较短或较长的RNA双链体结构物也可以是有效的(朱(Chu)和拉纳(Rana)(2007)RNA 14:1714-1719；金姆(Kim)等人(2005)自然生物技术(Nat Biotech)23:222-226)。在以上描述的实施例中，由于在表

3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的寡核苷酸序列的性质。在此描述的dsRNA可以包含最少21个核苷酸长度的至少一个链。可以合理地预期，与以上描述的dsRNA相比，具有表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的序列中的一个减去一端或两端上的仅有几个核苷酸的较短双链体可以是类似有效的。因此，具有来源于表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的序列中的一个的至少15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的序列，并且与包含全部序列的dsRNA在其抑制KHK基因的表达能力上相差不多于约5%、10%、15%、20%、25%或30%抑制的dsRNA被考虑在本发明的范围内。

[0231] 另外，在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的RNA在KHK转录物中鉴别出易受RISC介导的裂解的一个或多个位点。因此，本发明进一步体现了在这些位点中的一个内靶向的iRNA。如在此所使用，如果iRNA在具体位点内的任何地方促进转录物的裂解，则称该iRNA在RNA转录物的具体位点内靶向。这样一种iRNA将通常包含来自在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中提供的序列中的一个的至少约15个连续核苷酸，这些核苷酸联接到取自与KHK基因中的选定序列相邻的区的另外核苷酸序列上。

[0232] 虽然靶序列的长度通常是约15-30个核苷酸，但在用于引导任何给定靶RNA的裂解的这个范围内的具体序列适用性上存在广泛的变化。在此所列出的各种软件包和准则提供了用于鉴别对于任何给定的基因靶标的最佳靶序列的准则，但还可以采取经验方法，其中一个给定尺寸（如一个非限制性实例，21个核苷酸）的“窗口”或“掩模”被照字面地或象征性（包括，例如计算机模拟）地放置在靶RNA序列上，以鉴别可以充当靶序列的在该尺寸范围内的序列。通过将该序列“窗口”向初始靶序列位置的上游或下游渐进地移动一个核苷酸，可以鉴别出下一个潜在的靶序列，直到针对所选择的任何给定靶尺寸鉴别出全套可能的序列。这个过程（加上为了鉴定最佳执行的那些序列的所鉴定的序列的系统合成和测试（使用在此所述的或如本领域中已知的测定））可以鉴定当用一种iRNA试剂靶向时介导靶基因表达的最好抑制的那些RNA序列。因此，虽然例如在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中鉴别的序列表示有效的靶序列，但应想到的是可以通过向给定序列的上游或下游渐进地“使窗口行走”一个核苷酸以鉴别具有同等或更好抑制特征的序列来实现抑制效率的进一步优化。

[0233] 此外，对于例如在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中鉴别的任何序列应想到的是，可以通过系统添加或去除核苷酸以产生更长或更短的序列并且测试通过使具有更长或更短尺寸的窗口从该点向靶RNA上方或下方行走所产生的那些序列来实现进一步优化。再次地，使这种方法与产生新候选物靶标结合，同时基于如本领域中所知和/或如在此所描述的抑制测定中的那些靶序列测试iRNA的有效性，可以引起抑制效率的进一步改善。再者，可以例如通过引入如在此所描述或如本领域中所知的修饰核苷酸、添加或改变突出端或如本领域中所知和/或在此讨论的其他修饰，调节此类优化的序列以便进一步优化分子（例如，增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加核内体释放）作为表达抑制剂。

[0234] 如在此所描述的iRNA可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个实施例中，如在此所描述的iRNA含有不多于3个错配。如果iRNA的反义链含有与靶序列的错配，则优选错配区域不应当位于互补区的中心内。如果iRNA的反义链含有与靶序列的错配，则优选错配被局限在离互补区的5' -端或3' -端的最后5个核苷酸内。例如，对于23个核苷酸的iRNA试

剂,与一种KHK基因的一个区互补的链通常在中心13个核苷酸内不含任何错配。在此所述的方法或本领域已知的方法可以用来确定含有相对于靶序列的错配的iRNA是否有效抑制KHK基因表达。考虑具有错配的iRNA在抑制KHK基因表达方面的功效是重要的,尤其是如果KHK基因中的具体互补性区域已知在群体内具有多态性序列变异。

[0235] III. 本发明的修饰的iRNA

[0236] 在一个实施例中,本发明的iRNA的RNA(例如dsRNA)是未经修饰的,并且不包含例如本领域中已知的和在此所述的化学修饰和/或共轭。在另一个实施例中,本发明的iRNA例如dsRNA的RNA被化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。在本发明的某些实施例中,本发明的iRNA基本上所有的核苷酸是修饰的。在本发明的其他实施例中,本发明的iRNA的所有核苷酸都是修饰的。其中“基本上所有的核苷酸是修饰的”本发明的iRNA是大部分但不是全部修饰的,并且可以包含不多于5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0237] 本发明所表征的核酸可以通过本领域内良好建立的方法来进行合成和/或修饰,例如描述于“当前核酸化学方案(Current protocols in nucleic acid chemistry)”,比尤克居(Beaucage),S.L.(编),约翰威利父子公司(John Wiley&Sons, Inc.),纽约,纽约州,美国中的那些,特此通过引用将其结合于此。修饰包括,例如,末端修饰,例如,5' -端修饰(磷酸化、共轭、倒置键联)或3' -端修饰(共轭、DNA核苷酸、倒置键联等);碱基修饰,例如,置换为稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩充的配伍物库发生碱基配对的碱基、移除碱基(非碱基核苷酸)、或共轭的碱基;糖修饰(例如,在2' 位置或4' 位置)或糖的置换;和/或骨架修饰,包括磷酸二酯键联的修饰或置换。有用于在此所描述的这些实施例的iRNA化合物的具体实例包括,但不限于含有修饰的骨架或无天然核苷间键联的RNA。具有修饰的骨架的RNA包括在骨架中不具有磷原子的那些,连同其他。出于本说明书的目的和如有时本领域中谈及,也可以将在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰RNA视为寡核苷。在一些实施例中,修饰的iRNA将在其核苷间骨架中具有磷原子。

[0238] 修饰的RNA骨架包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯,包括3' -亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯、次膦酸酯、磷酰胺酯,包括3' -氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯、硫代羰基磷酰胺酯、硫代羰基烷基膦酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯和具有正常3' -5' 键的硼烷磷酸酯,这些酯的2' -5' 连接的类似物,和具有反转极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位为3' -5' 至5' -3' 或2' -5' 至5' -2' 连接。还包括不同盐、混合盐以及游离酸形式。

[0239] 传授制备以上含磷键联的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;以及美国专利RE39464,前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0240] 其中不包含磷原子的修饰的RNA骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子核苷间键或杂环核苷间键形成

的骨架。这些包括具有以下结构的那些：吗啉代键联(从核昔的糖部分中部分地形成)；硅氧烷骨架；硫化物、亚砜和砜骨架；甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；含烯的骨架；氨基磺酸盐骨架；亚甲亚氨基和亚甲肼基骨架；磺酸酯和磺酰胺骨架；酰胺骨架；以及具有混合N、O、S和CH<sub>2</sub>组分部分的其他骨架。

[0241] 传授制备以上寡核昔的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437；以及5,677,439，前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0242] 在其他实施例中，构思了用于iRNA的适合的RNA模拟物，其中核昔酸单位的糖和核昔间键即骨架被置换为新基团。维持碱基单元用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的低聚化合物(已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，RNA的糖骨架被含有酰胺的骨架置换，具体是氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。传授制备以上PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于：美国专利号5,539,082;5,714,331；以及5,719,262，前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。适合用于本发明的iRNA中的另外PNA化合物被描述于例如尼尔森(Nielsen)等人，科学(Science)，1991,254,1497-1500中。

[0243] 本发明中表征的一些实施例包括具有硫代磷酸酯骨架的RNA和具有杂原子骨架的寡核昔，并且尤其上文所参考的美国专利号5,489,677的--CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[称作亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架]、--CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--和--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--[其中天然磷酸二酯骨架表述为--O--P--O--CH<sub>2</sub>--]，和上文所参考美国专利号5,602,240的酰胺骨架。在一些实施例中，在此表征的RNA具有以上提及的美国专利号5,034,506的吗啉代骨架结构。

[0244] 修饰的RNA还可以含有一个或多个取代的糖部分。在此表征的iRNA(例如dsRNA)可以在2'位置包括以下之一：OH；F；O-、S-或N-烷基；O-、S-或N-烯基；O-、S-或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中该烷基、烯基以及炔基可以是被取代的或未被取代的C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>烷基或C<sub>2</sub>至C<sub>10</sub>烯基和炔基。示例性适合的修饰包括O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>和O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>，其中n和m是从1至约10。在其他实施例中，dsRNA在2'位置处包括以下之一：C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、杂环烷基、杂环芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基因基团、嵌入剂、用于改进iRNA的药物代谢动力学特性的基团或用于改进iRNA的药效特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。在一些实施例中，该修饰包括2'甲氧基乙氧基(2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>，也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(马丁(Martin)等人，瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta)，1995,78,486-504)，即，一烷氧基-烷氧基基团。另一个示例性修饰是2'-二甲基氨基氧基乙氧基，即O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基团，也称为2'-DMAOE，如下在此实例中所描述；和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中又称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE)，即2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0245] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH<sub>3</sub>)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)以及2'-氟

代(2'-F)。也可以在iRNA的RNA上的其他位置处作出相似的修饰,尤其在3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有糖模拟物,如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。传授制备这类修饰的糖结构的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;以及5,700,920,这些专利中的某些与本申请属于同一申请人。前述的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0246] iRNA还可以包括核碱基(在本领域中经常简称为“碱基”)修饰或取代。如在此所使用,“非修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成核碱基和天然核碱基,如脱氧-胸腺嘧啶(dT);5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶;2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮基尿嘧啶、6-偶氮基胞嘧啶和6-偶氮基胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代(具体地5-溴代)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包括披露于美国专利号3,687,808中的那些;披露于生物化学中的修饰核苷(Modified Nucleosides in Biochemistry),生物技术与医药(Biotechnology and Medicine),海瑞德威景(Herdewijn)P.编著威立-VCH,2008中的那些;披露于聚合物科学与工程的简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering),第858-859页,克奥赤威兹(Kroschwitz)J.L编著约翰威立国际出版公司,1990中的那些;由英格力士(Englisch)等人,应用化学(Angewandte Chemie),国际版,1991,30,613披露的那些;以及由桑格威(Sanghvi)Y.S.,第15章,dsRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications),第289-302页,克鲁克(Crooke)S.T.和黎布鲁(Lebleu)B.编著,CRC出版社,1993披露的那些。这些核碱基中的某些特别有用于提高在本发明中体现的低聚化合物的结合亲和力。这些碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮嘧啶以及N-2、N-6以及O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶以及5-丙炔基胞嘧啶。已经显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性增加0.6°C-1.2°C(桑格威Y.S.、克鲁克S.T.和黎布鲁B.编著,dsRNA研究与应用,CRC出版社,波卡拉顿(Boca Raton),1993,第276-278页)并且是示例性碱基取代,甚至更具体地当与2'-O-甲氨基乙基糖修饰组合时。

[0247] 传授制备以上修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基中的某些的代表性美国专利包括但不限于上述的美国专利号3,687,808;4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;以及7,495,088,前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0248] 一种iRNA的RNA还可以被修饰成包含一个或多个双环糖部分。“双环糖”是通过两个原子桥联而修饰的呋喃糖基环。“双环核苷”（“BNA”）是具有糖部分的核苷，该糖部分包含连接糖环的两个碳原子的桥，从而形成一种双环环系统。在某些实施例中，该桥连接糖环的4'-碳与2'-碳。因此，在一些实施例中，本发明的一种试剂可以包含一种或多种锁核酸（LNA）。锁核酸是具有一个修饰的核糖部分的核苷酸，其中该核糖部分包含连接2'碳和4'碳的额外桥。换言之，LNA是包含含有4'-CH<sub>2</sub>-O-2'桥的双环糖部分的核苷酸。这个结构有效地将该核糖“锁”在3'-内切结构构象中。向siRNA添加锁核酸已经显示增加血清中的siRNA稳定性并且减少脱靶效应（埃尔曼（Elmen），J.等人，（2005）核酸研究（Nucleic Acids Research）33(1) :439-447；穆克（Mook），OR.等人，（2007）分子癌症疗法（Mol Canc Ther）6(3) :833 - 843；格伦韦勒（Grunweller），A.等人，（2003）核酸研究（Nucleic Acids Research）31(12) :3185-3193）。用于在本发明的多核苷酸中使用的双环核苷的实例包括但不限于在4'与2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施例中，本发明的反义多核苷酸试剂包含一个或多个双环核苷，该一个或多个双环核苷包含一个4'至2'桥。这种4'至2'桥联双环核苷的实例包括但不限于4'- (CH<sub>2</sub>) —O-2' (LNA) ; 4'- (CH<sub>2</sub>) —S-2' ; 4'- (CH<sub>2</sub>) 2—O-2' (ENA) ; 4'-CH(CH<sub>3</sub>) —O-2' (还称为“限制性以及”或“cEt”)、以及4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) —O-2' (以及其类似物；参见例如美国专利号7,399,845) ; 4'-C(CH<sub>3</sub>) (CH<sub>3</sub>) —O-2' (以及其类似物；参见例如美国专利号8,278,283) ; 4'-CH<sub>2</sub>—N(OCH<sub>3</sub>) -2' (以及其类似物；参见例如美国专利号8,278,425) ; 4'-CH<sub>2</sub>—O—N(CH<sub>3</sub>) -2' (参见例如，美国专利公开号2004/0171570) ; 4'-CH<sub>2</sub>—N(R) —O-2'，其中R是H、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基或一个保护基团（参见例如美国专利号7,427,672）；4'-CH<sub>2</sub>—C(H) (CH<sub>3</sub>) -2' (参见例如，恰托帕底耶耶（Chattopadhyaya）等人，有机化学杂志（J.Org.Chem.），2009, 74, 118-134) ; 以及4'-CH<sub>2</sub>—C(-CH<sub>2</sub>) -2' (以及其类似物；参见例如美国专利号8,278,426)。前述的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0249] 传授制备锁核酸核苷酸的另外代表性美国专利和美国专利公开包括但不限于以下：美国专利号6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US2008/0039618; 以及US2009/0012281，前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0250] 任何上述双环核苷可以被制备为具有一种或多种立体化学糖构型，包括例如 $\alpha$ -L-呋喃核糖及 $\beta$ -D-呋喃核糖（参见WO 99/14226）。

[0251] 一种iRNA的RNA还可以被修饰成包含一个或多个限制性乙基核苷酸。如在此所使用，“限制性乙基核苷酸”或“cEt”是包含一个双环糖部分的锁核酸，该双环糖部分包含一个4' -CH (CH<sub>3</sub>) -O-2' 桥。在一个实施例中，一个限制性乙基核苷酸是呈S构象，在此称为“S-cEt”。

[0252] 本发明的一种iRNA还可以包含一个或多个“构象限制的核苷酸”（“CRN”）。CRN是具有连接核糖的C2' 和C4' 碳或核糖的C3和-C5' 碳的一个连接子的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定成一种稳定构象且增加对mRNA的杂交亲和力。该连接子具有足够长度以将氧置于一个最佳位置中以获得稳定性和亲和力，从而产生更少核糖环缩拢。

[0253] 传授制备某些以上提到的CRN的的代表性公开包括但不限于，美国专利公开号2013/0190383；和PCT公开WO 2013/036868，前述公开的每个的全部内容特此通过引用结合

在此。

[0254] 本发明的一种iRNA的一个或多个核苷酸还可以包含一个羟基甲基取代的核苷酸。一个“羟基甲基取代的核苷酸”是一个无环2' - 3' - 开环-核苷酸,还称为一种“解锁核酸”(“UNA”)修饰。

[0255] 传授制备UNA的代表性美国公开包括但不限于,美国专利号8,314,227;以及美国专利公开号2013/0096289;2013/0011922;和2011/0313020,前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0256] 对RNA分子的末端的潜在稳定化修饰可以包括N- (乙酰氨基己酰基) -4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-NHAC)、N- (己酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6)、N- (乙酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-NHAC)、胸昔-2'-0-脱氧胸苷(醚)、N- (氨基己酰基) -4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-氨基)、2-二十二醇基(docosanoyl)-尿昔-3"-磷酸酯、反向dT(idT)及其他。这种修饰的披露可以在PCT公开号WO 2011/005861中找到。A. 包含本发明的基序的修饰的iRNA

[0257] 在本发明的某些方面中,本发明的双链iRNA试剂包括具有化学修饰的试剂,如在例如2011年11月18日提交的美国临时申请号61/561,710中或在2012年11月16日提交的PCT/US2012/065691中所披露,其各自的全部内容通过引用结合在此。

[0258] 如在此和在临时申请号61/561,710或PCT申请号PCT/US2012/065691中所示,可以通过将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入一种iRNA试剂的有义链和/或反义链中(具体地在裂解位点处或附近)来获得优越的结果。在一些实施例中,该iRNA试剂的有义链和反义链可以另外的方式完全修饰。这些基序的引入中断了该有义链和/或反义链的修饰模式(如果存在的话)。该iRNA试剂可以任选地与例如该有义链上的一种GalNAc衍生物配体共轭。所得到的iRNA试剂呈现优越的基因沉默活性。

[0259] 更确切地说,出人意料地发现,当该双链iRNA试剂的有义链和反义链被完全修饰成在iRNA试剂的至少一个链的裂解位点处或附近具有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序时,该iRNA试剂的基因沉默活性被卓越地增强。

[0260] 因此,本发明提供能够在体内抑制一种靶基因(即,KHK基因)的表达的双链iRNA试剂。该iRNA试剂包含一条有义链和一条反义链。该iRNA试剂的每条链的长度可以在12-30个核苷酸范围内。例如,每条链的长度可以在14-30个核苷酸之间、17-30个核苷酸之间、25-30个核苷酸之间、27-30个核苷酸之间、17-23个核苷酸之间、17-21个核苷酸之间、17-19个核苷酸之间、19-25个核苷酸之间、19-23个核苷酸之间、19-21个核苷酸之间、21-25个核苷酸之间或21-23个核苷酸之间。

[0261] 该有义链和反义链典型地形成一种双链体双链RNA(“dsRNA”),在此还称为“iRNA试剂”。一种iRNA试剂的双链体区的长度可以是12-30个核苷酸对。例如,该双链体区的长度可以在14-30个核苷酸对之间、17-30个核苷酸对之间、27-30个核苷酸对之间、17-23个核苷酸对之间、17-21个核苷酸对之间、17-19个核苷酸对之间、19-25个核苷酸对之间、19-23个核苷酸对之间、19-21个核苷酸对之间、21-25个核苷酸对之间或21-23个核苷酸对之间。在另一个实例中,该双链体区的长度是选自15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26以及27个核苷酸。

[0262] 在一个实施例中,该iRNA试剂可以在一条或两条链的3' - 端、5' - 端或两端处含有一个或多个突出端区和/或封端基团。突出端可以具有1-6个核苷酸长度,例如2-6个核苷酸

长度、1-5个核苷酸长度、2-5个核苷酸长度、1-4个核苷酸长度、2-4个核苷酸长度、1-3个核苷酸长度、2-3个核苷酸长度或1-2个核苷酸长度。这些突出端可以是一个链比另一个链更长的结果,或具有相同长度的两个链交错的结果。该突出端可以与靶mRNA形成错配,或它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一个序列。第一链和第二链还可以例如通过另外的碱基连接以形成一个发夹或通过其他非碱基连接子连接。

[0263] 在一个实施例中,该iRNA试剂的突出端区中的核苷酸可以各自独立地是修饰的或未修饰的核苷酸,包括但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-0-甲基、胸昔(T)、2'-0-甲氧基乙基-5-甲基尿昔(Tho)、2'-0-甲氧基乙基腺昔(Aeo)、2'-0-甲氧基乙基-5-甲基胞昔(m5Ceo)、以及其任何组合。例如,TT可以是任一链上的任一端的一个突出端序列。该突出端可以与靶mRNA形成错配,或它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一个序列。

[0264] 在该iRNA试剂的有义链、反义链或这两条链处的5' -突出端或3' -突出端可以被磷酸化。在一些实施例中,一个或多个突出端区含有两个在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯的核苷酸,其中这两个核苷酸可以是相同或不同的。在一个实施例中,该突出端存在于有义链、反义链或这两个链的3' 端处。在一个实施例中,这个3' -突出端存在于反义链中。在一个实施例中,这个3' -突出端存在于有义链中。

[0265] 该iRNA试剂可以仅含有一个单个突出端,该突出端可以加强该iRNA的干扰活性而不影响其总体稳定性。例如,单链突出端可以位于有义链的3' -末端处,或替代地位于反义链的3' -末端处。该iRNA还可以具有位于该反义链的5' -端(或该有义链的3' -端)处的平端,或反之亦然。一般来说,该iRNA的反义链在3' -端处具有核苷酸突出端,并且5' -端是平的。虽然不希望受理论约束,但该反义链的5' -端处的不对称平端和该反义链的3' -端突出端有利于引导链加载到RISC过程中。

[0266] 在一个实施例中,该iRNA试剂是具有19个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5' 端起的位置7、位置8、位置9处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -F修饰的至少一个基序。该反义链在从5' 端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -0-甲基修饰的至少一个基序。

[0267] 在另一个实施例中,该iRNA试剂是具有20个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5' 端起的位置8、位置9、位置10处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -F修饰的至少一个基序。该反义链在从5' 端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -0-甲基修饰的至少一个基序。

[0268] 在又另一个实施例中,该iRNA试剂是具有21个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5' 端起的位置9、位置10、位置11处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -F修饰的至少一个基序。该反义链在从5' 端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -0-甲基修饰的至少一个基序。

[0269] 在一个实施例中,该iRNA试剂包含一个21个核苷酸的有义链和一个23个核苷酸的反义链,其中该有义链在从5' 端起的位置9、位置10、位置11处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -F修饰的至少一个基序;该反义链在从5' 端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -0-甲基修饰的至少一个基序;其中该iRNA试剂的一端是平的,而另一端包含一个2个核苷酸的突出端。优选地,该2个核苷酸的突出端在该反义链的3' -端处。当该2个核苷酸的突出端在该反义链的3' -端处时,在末端的三个核苷酸之间可以

存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键联，其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸，并且第三个核苷酸是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。在一个实施例中，该iRNA试剂在该有义链的5' -端和在该反义链的5' -端处均另外地具有在末端三个核苷酸之间的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中，该iRNA试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸(包括作为基序的一部分的核苷酸)是修饰的核苷酸。在一个实施例中，每个残基独立地被例如交替基序中的2' -O-甲基或3' -氟代修饰。任选地，该iRNA试剂进一步包含一个配体(优选地GalNAc<sub>3</sub>)。

[0270] 在一个实施例中，该iRNA试剂包含一个有义链和一个反义链，其中该有义链的长度是25-30个核苷酸残基，其中从5' 末端核苷酸(位置1)开始，第一链的位置1至23包含至少8个核糖核苷酸；该反义链的长度是36-66个核苷酸残基，并且从3' 末端核苷酸开始，在与有义链的位置1-23配对的位置中包含至少8个核糖核苷酸以形成一种双链体；其中反义链的至少3' 末端核苷酸与有义链未配对，并且达6个连续的3' 末端核苷酸与有义链未配对，从而形成具有1-6个核苷酸的3' 单链突出端；其中反义链的5' 末端包含从10-30个连续的与有义链未配对的核苷酸，从而形成10-30个核苷酸的单链5' 突出端；其中当针对最大互补性比对有义链和反义链时，至少该有义链5' 末端核苷酸和3' 末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对，从而在有义链与反义链之间形成基本上双链体的区；并且沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸，反义链与靶RNA充分互补，以便当双链核酸被引入到哺乳动物细胞中时减少靶基因表达；并且其中该有义链含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -F修饰的至少一个基序，其中这些基序中的至少一个出现在裂解位点处或附近。该反义链在裂解位点处或附近含有在三个连续核苷酸上具有三个2' -O-甲基修饰的至少一个基序。

[0271] 在一个实施例中，该iRNA试剂包含有义链和反义链，其中该iRNA试剂包含一条第一链和一条第二链，该第一链具有至少25个且至多29个核苷酸的长度，该第二链具有至多30个核苷酸的长度，其中在从5' 端起的位置11、位置12、位置13处在三个连续核苷酸上具有三个2' -O-甲基修饰的至少一个基序；其中该第一链的3' 端和该第二链的5' 端形成一个平端并且该第二链在其3' 端处比该第一链长1-4个核苷酸，其中双链体区的长度是至少25个核苷酸，并且沿着该第二链长度的至少19个核苷酸，该第二链与靶mRNA充分互补，以便当该iRNA试剂被引入哺乳动物细胞中时减少靶基因表达，并且其中iRNA试剂的dicer裂解优选产生包含该第二链的3' 端的siRNA，从而在该哺乳动物中减少靶基因的表达。任选地，该iRNA试剂进一步包含一个配体。

[0272] 在一个实施例中，该iRNA试剂的有义链含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序，其中这些基序中的一个出现在该有义链中的裂解位点处。

[0273] 在一个实施例中，该iRNA试剂的反义链也可以含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序，其中这些基序中的一个出现在该反义链中的裂解位点处或附近。

[0274] 对于具有长度为17-23个核苷酸的一个双链体区的一种iRNA试剂，反义链的裂解位点典型地在从5' -端起的10、11和12位置周围。因此，具有三个相同修饰的这些基序可以出现在反义链的9、10、11位置；10、11、12位置；11、12、13位置；12、13、14位置；或13、14、15位置，计数从反义链的5' -端起从第一个核苷酸开始，或计数从反义链的5' -端起从双链体区内的第一个配对的核苷酸开始。该反义链中的裂解位点还可以根据该iRNA的从5' 端起的双

链体区的长度而变化。

[0275] 该iRNA试剂的有义链可以含有在该链的裂解位点处的在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序；并且该反义链可以具有在该链的裂解位点处或附近的在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当该有义链和该反义链形成一种dsRNA双链体时，该有义链和该反义链可以被如此对准，以使得在该有义链上具有三个核苷酸的一个基序和在该反义链上具有三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠，即该有义链中的该基序的三个核苷酸中的至少一者与该反义链中的该基序的三个核苷酸中的至少一者形成碱基对。可替代地，至少两个核苷酸可以重叠，或所有三个核苷酸均可以重叠。

[0276] 在一个实施例中，该iRNA试剂的有义链可以含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的多于一个基序。第一基序可以出现在该链的裂解位点处或附近并且其他基序可以是翼修饰。术语“翼修饰”在此是指出现在链的与同一链裂解位点处或附近的基序分开的另一个部分处的一个基序。该翼修饰与该第一基序相邻，抑或被至少一个或多个核苷酸分隔。当这些基序与彼此紧紧相邻时，则这些基序的化学性质不同于彼此，并且当这些基序被一个或多个核苷酸分隔时，则化学性质可以是相同或不同的。可以存在两个或更多个翼修饰。例如，当存在两个翼修饰时，每个翼修饰可以存在于相对于在裂解位点处或附近的该第一基序的一端处或该前导基序的任一侧上。

[0277] 如同有义链，该iRNA试剂的反义链可以含有多于一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序，这些基序中的至少一者出现在该链的裂解位点处或附近。这个反义链也可以在一个比对中含有一个或多个与可以在有义链上存在的翼修饰类似的翼修饰。

[0278] 在一个实施例中，该iRNA试剂的有义链或反义链上的翼修饰典型地在该链的3'端、5'端或两端处不包括前一个或两个末端核苷酸。

[0279] 在另一个实施例中，该iRNA试剂的有义链或反义链上的翼修饰典型地在该链的3'端、5'端或两端处的双链体区内不包括前一个或两个配对的核苷酸。

[0280] 当该iRNA试剂的有义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时，这些翼修饰可以落在双链体区的同一端上，并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0281] 当该iRNA试剂的有义链和反义链各自包含至少两个翼修饰时，该有义链和该反义链可以如此比对以使得各自来自一条链的两个翼修饰落在该双链体区的一端上，具有一个、两个或三个核苷酸的一个重叠；各自来自一条链的两个修饰落在该双链体区的另一端上，具有一个、两个或三个核苷酸的重叠；各自来自一条链的两个修饰落在该前导基序的任一侧上，在该双链体区具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0282] 在一个实施例中，该iRNA试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸（包括作为基序的一部分的核苷酸）可以是修饰的。每个核苷酸可以被相同或不同的修饰来修饰，该修饰可以包括非连接的磷酸酯氧中的一个或两个和/或连接的磷酸酯氧中的一个或多个的一种或多种改变；核糖的组分（例如核糖上的2'羟基）的改变；用“脱磷”连接子全部置换磷酸酯部分；修饰或置换天然存在的碱基；以及置换或修饰核糖-磷酸酯骨架。

[0283] 由于核酸是亚单位的聚合物，因此许多修饰出现在核酸内重复的一个位置处，例如一种碱基或一种磷酸酯部分或一种磷酸酯部分的一个非连接O的修饰。在一些情况下，该修饰将出现在该核酸中的所有标的位置处，但在许多情形下它不会这样。例如，一个修饰可

以仅出现在3'或5'末端位置处,可以仅出现在一个末端区中,例如在一条链的一个末端核苷酸上或在最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中的一个位置处。修饰可以出现在双链区、单链区或两者中。修饰可以仅出现在RNA的双链区中或可以仅出现在RNA的单链区中。例如,一个非连接0位置处的一个硫代磷酸酯修饰可以仅存在于一个或两个末端处,可以仅存在于一个末端区中,例如在一条链的一个末端核苷酸上或最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中的一个位置处,或可以存在于双链和单链区中,特别是在末端处。一个或多个5'端可以被磷酸化。

[0284] 为了增强稳定性,可能的是例如在突出端中包括特定碱基或在单链突出端中(例如,在一个5'或3'突出端或两者中)包括被修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,可以希望在突出端中包括嘌呤核苷酸。在一些实施例中,一个3'或5'突出端中的全部或一些碱基可以用例如在此描述的修饰进行修饰。修饰可以包括例如使用核糖的2'位置处的修饰与本领域中已知的修饰,例如使用2'-脱氧-2'-氟代(2'-F)或2'-O-甲基修饰的脱氧核糖核苷酸代替核碱基的核糖,以及磷酸酯基中的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出端不必与靶序列同源。

[0285] 在一个实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地用LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧、2'-羟基或2'-氟代修饰。这些链可以含有多于一个修饰。在一个实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地被2'-O-甲基或2'-氟代修饰。

[0286] 至少两个不同修饰典型地存在于有义链和反义链上。那两个修饰可以是2'-O-甲基或2'-氟代修饰或其他修饰。

[0287] 在一个实施例中,N<sub>a</sub>和/或N<sub>b</sub>包含交替模式的修饰。如在此所使用,术语“交替基序”是指具有一个或多个修饰,每个修饰出现在一条链的交替核苷酸上的基序。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每隔两个核苷酸一个、或一种类似模式。例如,如果A、B以及C各自表示针对核苷酸的一种修饰类型,那么交替基序可以是“ABABABABABAB……”、“AABBAABBAABB……”、“AABAABAABAAB……”、“AAABAAABAAAB……”、“AAABBAAABBB……”或“ABCABCABCABC……”等。

[0288] 交替基序中所包含的修饰的类型可以是相同或不同的。例如,如果A、B、C、D各自表示针对核苷酸的一种修饰类型,那么交替模式(即每隔一个核苷酸上的修饰)可以是相同的,但有义链或反义链中的每一者可以选自交替基序内的修饰的若干种可能,例如“ABABAB……”、“ACACAC……”、“BDBDBD……”或“CDCDCD……”等。

[0289] 在一个实施例中,本发明的iRNA试剂包含:用于有义链上的交替基序的修饰模式相对于用于反义链上的交替基序的修饰模式移位。该移位可以是如此以使得有义链的核苷酸的修饰基团相对于反义链的核苷酸的不同修饰基团,并且反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时,有义链中的交替基序可以从该链的5'-3'起由“ABABAB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从该链的5'-3'起由“BABABA”开始。作为另一个实例,有义链中的交替基序可以从该链的5'-3'起由“AABBAABB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从该链的5'-3'起由“BBAABBAA”开始,以使得在该有义链与该反义链之间存在修饰模式的完全或部分移位。

[0290] 在一个实施例中,该iRNA试剂包含起初在有义链上具有2'-O-甲基修饰和2'-F修

饰的交替基序模式,该模式相对于起初在反义链上具有2' -O-甲基修饰和2' -F修饰的交替基序模式具有移位,即有义链上的2' -O-甲基修饰的核苷酸与反义链上的2' -F修饰的核苷酸碱基配对,并且反之亦然。该有义链的1位置可以由2' -F修饰开始,并且该反义链的1位置可以由2' -O-甲基修饰开始。

[0291] 将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链中断了存在于该有义链和/或反义链中的初始修饰模式。通过将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链而使该有义链和/或反义链的修饰模式的这一中断出人意料地增强了对靶基因的基因沉默活性。

[0292] 在一个实施例中,当将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序引入到这些链中的任一个时,紧挨着该基序的核苷酸的修饰是与该基序的修饰不同的修饰。例如,包含该基序的序列的一部分是“……N<sub>a</sub>YYN<sub>b</sub>……”,其中“Y”表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的该基序的修饰,并且“N<sub>a</sub>”和“N<sub>b</sub>”表示对紧挨着该基序“YYY”的该核苷酸的不同于Y的修饰,并且其中N<sub>a</sub>和N<sub>b</sub>可以是相同或不同修饰。可替代地,当存在一个翼侧修饰时,N<sub>a</sub>和/或N<sub>b</sub>可以存在或不存在。

[0293] 该iRNA试剂可以进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键合修饰可以存在于有义链或反义链或这两条链的该链的任何位置中的任何核苷酸上。例如,该核苷酸间键联修饰可以存在于该有义链和/或该反义链上的每个核苷酸上;每个核苷酸间键联修饰可以以交替模式存在于该有义链和/或该反义链上;或者该有义链或反义链可以含有交替模式的两个核苷酸间键联修饰。该有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以与该反义链相同或不同,并且该有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以相对于该反义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式具有移位。

[0294] 在一个实施例中,该iRNA在突出端区中包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联修饰。例如,该突出端区可以含有两个在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联的核苷酸。还可以进行核苷酸间键联修饰以使突出端核苷酸与双链体区内的末端配对的核苷酸连接。例如,至少2个、3个、4个或所有的突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联来连接,并且任选地,可以存在将突出端核苷酸与紧挨着该突出端核苷酸的一个配对的核苷酸连接的另外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。例如,在末端三个核苷酸之间可以存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。这些末端三个核苷酸可以在该反义链的3' -端处、该有义链的3' -端处、该反义链的5' -端处和/或该反义链的5' 端处。

[0295] 在一个实施例中,该2个核苷酸的突出端是在该反义链的3' -端处,并且在末端的三个核苷酸之间存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。任选地,该iRNA试剂在该有义链的5' 端和在该反义链的5' 端处都可以另外具有在末端三个核苷酸之间的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0296] 在一个实施例中,双链RNAi试剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含5' -末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和3' -末端处的两个硫代磷

酸酯核苷酸间键联，并且该有义链在或者5' -末端或者3' -末端处包含至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0297] 在一个实施例中，该iRNA试剂在双链体内包含与靶标的一个或多个错配、或其组合。该错配可以出现在突出端区或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或熔融的倾向来分等级(例如对于一个具体配对的缔合或解离自由能，最简单的方法是基于个别对检查这些对，但也可以使用紧接着的相邻物或类似分析)。就促进解离而言：A:U优先于G:C；G:U优先于G:C；并且I:C优先于G:C(I=肌苷)。错配例如非规范的配对或除了规范以外的配对(如在此其他地方所描述)优先于规范的(A:T、A:U、G:C)配对；并且包括通用碱基的配对优先于规范的配对。

[0298] 在一个实施例中，该iRNA试剂包含从反义链的5' -端起在双链体区内的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个，这些碱基对独立地选自下组，该组具有A:U、G:U、I:C和错配的对，例如非规范的配对或除了规范以外的配对，或包括通用碱基的配对，以便促进在双链体的5' -端处解离反义链。

[0299] 在一个实施例中，该双链体区内从该反义链中的5' 端起的1位处的核苷酸选自下组，该组由以下各项组成：A、dA、dU、U以及dT。可替代地，从该反义链的5' 端起在该双链体区内的前1、2或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如，从该反义链的5' -端起在该双链体区内的第一个碱基对是AU碱基对。

[0300] 在一个实施例中，有义链序列可以由化学式(I)表示：

[0301]  $5' n_p - N_a - (X \ X \ X)_i - N_b - Y \ Y - N_b - (Z \ Z \ Z)_j - N_a - n_q \ 3' \ (I)$

[0302] 其中：

[0303] i和j各自独立地是0或1；

[0304] p和q各自独立地是0-6；

[0305] 各 $N_a$ 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

[0306] 各 $N_b$ 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0307] 各 $n_p$ 和 $n_q$ 独立地表示突出端核苷酸；

[0308] 其中Nb和Y不具有相同修饰；并且

[0309] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。优选地YYY全是2' -F修饰的核苷酸。

[0310] 在一个实施例中， $N_a$ 和/或 $N_b$ 包含具有交替模式的修饰。

[0311] 在一个实施例中，该YYY基序出现在该有义链的裂解位点处或附近。例如，当该iRNA试剂具有长度为17-23个核苷酸的一个双链体区时，该YYY基序可以出现在有义链的裂解位点处或附近(例如：可以出现在位置6、位置7、位置8、位置7、位置8、位置9、位置8、位置9、位置10、位置9、位置10、位置11、位置10、位置11、位置12或位置11、位置12、位置13处)，计数从5' 端起从第一个核苷酸开始；或任选地，计数从5' -端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。

[0312] 在一个实施例中，i是1且j是0，或i是0且j是1，或i和j两者都是1。该有义链因此可以由以下化学式表示：

[0313]  $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \ 3' \ (Ib) ;$

[0314]  $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$  (Ic); 或

[0315]  $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$  (Id)。

[0316] 当该有义链由化学式(Ib)表示时,  $N_b$  表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各  $N_a$  可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0317] 当该有义链表示为化学式(Ic)时,  $N_b$  表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各  $N_a$  可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0318] 当该有义链表示为化学式(Id)时, 各  $N_b$  独立地表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地,  $N_b$  是0、1、2、3、4、5或6, 各  $N_a$  可独立地表示包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0319] X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。

[0320] 在其他实施例中, i是0并且j是0, 并且该有义链可以由以下化学式表示:

[0321]  $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$  (Ia)。

[0322] 当该有义链由化学式(Ia)表示时, 每个  $N_a$  独立地可以表示寡核苷酸序列, 该寡核苷酸序列包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸。

[0323] 在一个实施例中, 该iRNA的反义链序列可以由化学式(II)表示:

[0324]  $5' n_{q'} - N_a' - (Z' Z' Z')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (X' X' X')_l - N_a' - n_p' 3'$  (II)

[0325] 其中:

[0326] k和l各自独立地是0或1;

[0327] p' 和q' 各自独立地是0-6;

[0328] 各  $N_a'$  独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0329] 各  $N_b'$  独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0330] 各  $n_p'$  和  $n_q'$  独立地表示突出端核苷酸;

[0331] 其中  $N_b'$  和  $Y'$  不具有相同的修饰; 并且

[0332]  $X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$  以及  $Z' Z' Z'$  各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0333] 在一个实施例中,  $N_a'$  和/或  $N_b'$  包含具有交替模式的修饰。

[0334]  $Y' Y' Y'$  基序出现在该反义链的裂解位点处或其附近。例如, 当该iRNA试剂具有长度为17-23个核苷酸的一个双链体区时, 该  $Y' Y' Y'$  基序可以出现在反义链的位置9、位置10、位置11; 位置10、位置11、位置12; 位置11、位置12、位置13; 位置12、位置13、位置14; 或位置13、位置14、位置15处, 计数从5' - 端起从第一个核苷酸开始; 或任选地, 计数从5' - 端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。优选地, 该  $Y' Y' Y'$  基序出现在位置11、12、13处。

[0335] 在一个实施例中,  $Y' Y' Y'$  基序全是2' -OMe修饰的核苷酸。

[0336] 在一个实施例中, k是1且l是0, 或k是0且l是1, 或k和l两者都是1。

[0337] 该反义链因此可以由以下化学式表示:

[0338]  $5' n_{q'} - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_p' 3'$  (IIb);

[0339]  $5' n_{q'} - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - n_p' 3'$  (IIc); 或

[0340]  $5' n_q - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - N_a' - n_p, 3'$  (IIId)。

[0341] 当该反义链由化学式 (IIb) 表示时,  $N_b'$  表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各  $N_a'$  独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0342] 当该反义链表示为化学式 (IIc) 时,  $N_b'$  表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各  $N_a'$  独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0343] 当该反义链表示为化学式 (IIId) 时, 各  $N_b'$  独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各  $N_a'$  独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地,  $N_b$  是0、1、2、3、4、5或6。在其他实施例中, k是0且l是0, 并且该反义链可以由以下化学式表示:

[0344]  $5' n_p - N_a - Y' Y' Y' - N_a - n_q, 3'$  (Ia)。

[0345] 当该反义链表示为化学式 (IIa) 时, 各  $N_a'$  独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0346] X'、Y' 和Z' 各自可以是彼此相同的或不同的。

[0347] 该有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地由以下各项修饰:LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2' -甲氧基乙基、2' -0-甲基、2' -0-烯丙基、2' -C-烯丙基、2' -羟基、或2' -氟代。例如, 该有义链和反义链的每个核苷酸独立地由2' -0-甲基或2' -氟代修饰。具体地说, 各X、Y、Z、X'、Y' 以及Z' 可以表示2' -0-甲基修饰或2' -氟代修饰。

[0348] 在一个实施例中, 该iRNA试剂的有义链可以含有YYY基序, 当双链体区为21个核苷酸时, 该YYY基序出现在该链的9、10和11位置处, 计数从5' -端起从第一个核苷酸开始, 或任选地, 计数从5' -端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始; 并且Y表示2' -F修饰。该有义链可以另外含有在双链体区的相反端作为翼修饰的X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序; 并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示2' -OMe修饰或2' -F修饰。

[0349] 在一个实施例中, 该反义链可以含有出现在该链的位置11、12和13处的Y'Y'Y'基序, 计数从5' -端起从第一个核苷酸开始, 或任选地, 计数从5' -端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始; 并且Y' 表示2' -0-甲基修饰。该有义链可以另外含有在双链体区的相反端作为翼修饰的XXX基序或ZZZ基序; 并且XXX和ZZZ各自独立地表示2' -OMe修饰或2' -F修饰。

[0350] 由以上化学式 (Ia)、(Ib)、(IC)、和(Id) 中任一项表示的有义链分别与由化学式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、和(IIId) 中任一项表示的反义链形成了一个双链体。

[0351] 因此, 用于在本发明的这些方法中使用的iRNA试剂可以包含一条有义链和一条反义链, 每条链具有14至30个核苷酸, 该iRNA双链体由化学式 (III) 表示:

[0352] 有义:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q, 3'$

[0353] 反义:  $3' n_p' - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q', 5'$

[0354] (III)

[0355] 其中:

[0356] i、j、k、以及l各自独立地是0或1;

[0357] p、p'、q以及q'各自独立地是0-6;

[0358] 各 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0359] 各 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0360] 其中

[0361] 各 $n_p$ 、 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q$ 独立地表示一个突出端核苷酸,该 $n_p$ 、 $n_p$ 、 $n_q$ 、以及 $n_q$ 中的每个可以或可以不存在;并且

[0362] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0363] 在一个实施例中,i是0并且j是0;或i是1并且j是0;或i是0并且j是1;或i和j两者均是0;或i和j两者均是1。在另一个实施例中,k是0并且l是0;或k是1并且l是0;k是0并且l是1;或k和l两者均是0;或k和l两者均是1。

[0364] 形成iRNA双链体的有义链和反义链的示例性组合包括以下化学式:

[0365] 5' $n_p$ - $N_a$ -Y Y Y- $N_a$ - $n_q$  3'

[0366] 3' $n_p$ '- $N_a$ '-Y'Y'Y'- $N_a$ ' $n_q$ ' 5'

[0367] (IIIa)

[0368] 5' $n_p$ - $N_a$ -Y Y Y- $N_b$ -Z Z Z- $N_a$ - $n_q$  3'

[0369] 3' $n_p$ '- $N_a$ '-Y'Y'Y'- $N_b$ '-Z'Z'Z'- $N_a$ ' $n_q$ ' 5'

[0370] (IIIb)

[0371] 5' $n_p$ - $N_a$ -X X X- $N_b$ -Y Y Y- $N_a$ - $n_q$  3'

[0372] 3' $n_p$ '- $N_a$ '-X'X'X'- $N_b$ '-Y'Y'Y'- $N_a$ ' $n_q$ ' 5'

[0373] (IIIc)

[0374] 5' $n_p$ - $N_a$ -X X X- $N_b$ -Y Y Y- $N_b$ -Z Z Z- $N_a$ - $n_q$  3'

[0375] 3' $n_p$ '- $N_a$ '-X'X'X'- $N_b$ '-Y'Y'Y'- $N_b$ '-Z'Z'Z'- $N_a$ ' $n_q$ ' 5'

[0376] (IIId)

[0377] 当i该RNA剂由化学式(IIIa)表示时,各 $N_a$ 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。

[0378] 当该iRNA试剂由化学式(IIIb)表示时,各 $N_b$ 独立地表示包含1-10个、1-7个、1-5个或1-4个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。各 $N_a$ 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0379] 当该iRNA试剂表示为化学式(IIIc)时,各 $N_b$ 、 $N_b'$ 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 $N_a$ 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0380] 当该iRNA试剂表示为化学式(IIId)时,各 $N_b$ 、 $N_b'$ 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的一个寡核苷酸序列。每个 $N_a$ 、 $N_a'$ 独立地表示包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。 $N_a$ 、 $N_a'$ 、 $N_b$ 和 $N_b'$ 各自独立地包括交替模式的修饰。化学式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)中的X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。

[0381] 当该iRNA试剂由化学式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)以及(IIId)表示时,这些Y核苷酸中的至少一个可以与这些Y'核苷酸中的一个形成一个碱基对。可替代地,这些Y核苷

酸中的至少两个与相应的Y'核苷酸形成碱基对；或这些Y核苷酸中的全部三个都与相应的Y'核苷酸形成碱基对。

[0382] 当该iRNA试剂由化学式(IIIb)或(IIId)表示时，这些Z核苷酸中的至少一个可以与这些Z'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地，这些Z核苷酸中的至少两个与相应的Z'核苷酸形成碱基对；或这些Z核苷酸中的全部三个都与相应的Z'核苷酸形成碱基对。

[0383] 当该iRNA试剂表示为化学式(IIIC)或(IIId)时，这些X核苷酸中的至少一个可以与这些X'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地，这些X核苷酸中的至少两个与相应的X'核苷酸形成碱基对；或这些X核苷酸中的全部三个都与相应的X'核苷酸形成碱基对。

[0384] 在一个实施例中，Y核苷酸上的修饰不同于Y'核苷酸上的修饰，Z核苷酸上的修饰不同于Z'核苷酸上的修饰，和/或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0385] 在一个实施例中，当该iRNA试剂由化学式(IIId)表示时，N<sub>a</sub>修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰。在另一个实施例中，当该iRNA试剂由化学式(IIId)表示时，N<sub>a</sub>修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰且n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上。在又另一个实施例中，当该iRNA试剂由化学式(IIId)表示时，N<sub>a</sub>修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰，n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上，并且有义链共轭到通过一个二价或三价支链连接子(如下描述)附接的一种或多种GalNAc衍生物上。在另一个实施例中，当该iRNA试剂由化学式(IIId)表示时，N<sub>a</sub>修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰，n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物上。

[0386] 在一个实施例中，当该iRNA试剂由化学式(IIIA)表示时，N<sub>a</sub>修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰，n<sub>p</sub>'>0并且至少一个n<sub>p</sub>'经由硫代磷酸酯键联连接到一个相邻核苷酸上，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支连接子附接的一种或多种GalNAc衍生物上。

[0387] 在一个实施例中，该iRNA试剂是一种多聚体，该多聚体含有至少两个由化学式(III)、(IIIA)、(IIIB)、(IIIC)和(IIId)表示的双链体，其中这些双链体通过一个连接子连接。该连接子可以是可裂解的或不可裂解的。任选地，该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些双链体中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0388] 在一个实施例中，该iRNA试剂是一种多聚体，该多聚体含有由化学式(III)、(IIIA)、(IIIB)、(IIIC)和(IIId)表示的三个、四个、五个、六个或更多个双链体，其中这些双链体通过一个连接子连接。该连接子可以是可裂解的或不可裂解的。任选地，该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些双链体中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0389] 在一个实施例中，由化学式(III)、(IIIA)、(IIIB)、(IIIC)和(IIId)表示的两种iRNA试剂在5'端和这些3'端中的一个或两个处彼此连接，并且任选地共轭到一个配体上。这些试剂中的每个可以靶向相同基因或两个不同基因；或这些试剂中的每个可以靶向两个不同靶位点处的相同基因。

[0390] 不同公开描述了可以在本发明的这些方法中使用的多聚体iRNA试剂。此类公开包

括W02007/091269、美国专利号7858769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887以及W02011/031520,这些公开的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0391] 如下更详细地描述,含有一个或多个碳水化合物部分与一种iRNA试剂的共轭的iRNA试剂可以优化该iRNA试剂的一种或多种特性。在许多情况下,该碳水化合物部分将附接到该iRNA试剂的一个修饰的亚单位。例如,一种dsRNA试剂的一个或多个核糖核苷酸亚单位的核糖可以被另一个部分(例如,一个碳水化合物配体所附接的一个非碳水化合物(优选环状)载体)置换。其中亚单位的核糖已经如此被置换的核糖核苷酸亚单位在此被称为核糖置换修饰亚单位(RRMS)。一种环状载体可以是一个碳环系统,即所有环原子均是碳原子,或一个杂环系统,即一个或多个环原子可以是一个杂原子,例如氮、氧、硫。该环状载体可以是一个单环系统,或可以含有两个或更多个环,例如稠合环。该环状载体可以是一个完全饱和的环系统,或它可以含有一个或多个双键。

[0392] 该配体可以通过一个载体附接到多核苷酸上。这些载体包括(i)至少一个“骨架附接点”、优选两个“骨架附接点”,和(ii)至少一个“系拴附接点”。如在此使用的“骨架附接点”是指一个官能团(例如一个羟基基团),或通常,可供用于并且适用于将该载体结合到一种核糖核酸的骨架(例如含硫骨架)中的一个键(例如磷酸酯或修饰的磷酸酯)。在一些实施例中,“系拴附接点”(TAP)是指该环状载体的、连接一个选择的部分的一个组成环原子,例如一个碳原子或一个杂原子(相异于提供骨架附接点的原子)。该部分可以是例如一种碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖以及多糖。任选地,该选择的部分通过一个介入系拴物连接到该环状载体上。因此,该环状载体将经常包括一个官能团(例如氨基基团),或通常提供适用于将另一个化学实体(例如一个配体)结合或系拴到组成型环上的一个键。

[0393] 这些iRNA试剂可以经由一个载体共轭到一个配体上,其中该载体可以是环状基团或非环状基团;优选地,该环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基以及十氢萘;优选地,该非环状基团选自丝氨酸骨架或二乙醇胺骨架。

[0394] 在某些具体的实施例中,用于在本发明的这些方法中使用的iRNA试剂是选自下组的一种试剂,该组具有在表3、表4、表5、表6、以及表7中的任一个中列出的试剂。这些试剂可以进一步包含一个配体。

#### [0395] IV. 共轭至配体的iRNA

[0396] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及使RNA化学连接到一种或多种增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取的配体、部分或共轭物上。这类部分包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(莱兹斯英格(Letsinger)等人,美国科学院院报(Proc.Natl Acid.Sci.USA),1989,86:6553-6556)、胆酸(曼汉兰(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Let.),1994,4:1053-1060)、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(曼汉兰等人,纽约科学院年报(Ann.N Y.Acad.Sci.),1992,660:306-309;曼汉兰等人,生物有机化学与医药化学通讯,1993,3:2765-2770)、硫代胆固醇(奥伯豪泽尔(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl Acids Res.),1992,20:533-538)、脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(赛松-贝莫若斯(Saison-Behmoaras)等人,欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J),1991,10:1111-1118;卡巴诺夫(Kabanov)等人,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.),1990,259:

327-330;斯威那查克(Svinarchuk)等人,生化与分子生物学(Biochimie),1993,75:49-54)、磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(曼汉兰等人,四面体快报(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654;谢伊(Shea)等人,核酸研究,1990,18:3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链(曼汉兰等人,核苷与核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969-973)、或金刚烷乙酸(曼汉兰等人,四面体快报,1995,36:3651-3654)、棕榈基部分(米什拉(Mishra)等人,生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta),1995,1264:229-237)、或十八胺或己基氨基-羧基氧基胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,美国药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923-937)。

[0397] 在一个实施例中,配体改变向其中并入该配体的iRNA试剂的分布、靶向或寿命。在优选实施例中,与例如不存在这样一个配体的物种相比,这种配体为选择的靶标(例如分子、细胞或细胞类型、区室(例如细胞或器官区室、组织、器官或身体的区域))提供增强的亲和力。优选的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0398] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉、甲壳质、壳聚糖、菊糖、环糊精、N-乙酰半乳糖胺或透明质酸);或脂质。配体还可以是重组或合成的分子,如合成聚合物,例如合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括作为一种聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷噪的聚氨基酸。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟聚胺、树枝状聚合物聚胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐、或 $\alpha$ 螺旋肽。

[0399] 配体还可以包括靶向基团,例如与指定的细胞类型如肾细胞结合的细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如抗体。靶向基团可以是促甲状腺激素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0400] 配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、噻吩(Sapphyrin))、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子,例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-花生酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、鲸蜡基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰)石胆酸、03-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噁嗪肽共轭物(例如触角足肽、Tat肽)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标记物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶(例如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑聚类、吖啶-咪唑共轭物、四氮杂大环类的Eu<sup>3+</sup>络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0401] 配体可以是蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如对辅助配体具有特异亲和力的分子,

或抗体,例如与指定细胞类型如肝细胞结合的抗体。配体还可以包括激素和激素受体。它们也可以包括非肽种类,如脂质、凝集素、糖类、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。该配体可以是例如脂多糖,p38 MAP激酶的活化剂或NF- $\kappa$ B的活化剂。

[0402] 该配体可以是可以例如通过破坏细胞的细胞骨架(例如通过破坏细胞微管、微丝和/或中间丝)增加iRNA试剂摄入到细胞中的物质,例如药物。药物可以例如是泰素(taxon)、长春新碱、长春碱、松胞菌素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵素A、鬼笔环肽、海洋苔藓素(swinholide)A、茚满诺星(indanocine)或myoservin。

[0403] 在一些实施例中,附接到如在此所描述的iRNA上的一个配体用作药物代谢动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括,但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等。包含许多硫代磷酸酯键联的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合,因此骨架中包含多个硫代磷酸酯键联的短寡核苷酸,例如具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,也服从于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。此外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适配体也适合用作在此所述的这些实施例中的PK调节配体。

[0404] 本发明的配体-共轭的寡核苷酸可以通过使用这样一种寡核苷酸来合成,该寡核苷酸具有下垂的反应功能性,例如来源于该寡核苷酸上的连接分子的附接(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体,合成的、具有多种保护基中的任一种的配体,或具有连接部分附接于其上的配体发生反应。

[0405] 在本发明的共轭物中使用的寡核苷酸可以方便且常规地通过固相合成的熟知技术来制备。用于这类合成的设备由多个供应商(包括例如应用生物系统公司(Applied Biosystems)(福斯特市,加利福尼亚州))销售。可另外地或替代地使用本领域中已知的用于这类合成的任何其他装置。使用相似的技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化衍生物)也是已知的。

[0406] 在本发明的配体-共轭的寡核苷酸以及具有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,该寡核苷酸以及寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体,或已经具有连接部分的核苷酸或核苷共轭物前体,已经具有配体分子的配体-核苷酸或核苷共轭物前体,或带有结构基元的非核苷配体,在适合的DNA合成仪上进行组装。

[0407] 当使用已经具有连接部分的核苷酸-共轭物前体时,典型地完成该序列特异性连接的核苷的合成,并且然后该配体分子与该连接部分反应以形成配体共轭的寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过一种自动合成仪合成,除了可商购以及寡核苷酸合成中常规使用的标准亚磷酸酰胺以及非标准亚磷酸酰胺之外,该合成还使用衍生自配体-核苷共轭物的亚磷酸酰胺。

[0408] A. 脂质共轭物

[0409] 在一个实施例中,该配体或共轭物是一种脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子优选地结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许共轭物分布至一个靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,该靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可以用作配体。例如可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或

基于脂质的配体可以 (a) 增加共轭物对降解的抗性, (b) 增加靶向或运输到靶细胞或细胞膜中, 和/或 (c) 可以用来调节与血清蛋白(例如HSA)的结合。

[0410] 基于脂质的配体可以用来抑制(例如控制)共轭物与靶组织的结合。例如,与HSA更强烈结合的脂质或基于脂质的配体将更不可能靶向肾并且因此较不可能从身体清除。与HSA较不强烈结合的脂质或基于脂质的配体可以用来使共轭物靶向肾。

[0411] 在一个优选实施例中,基于脂质的配体结合HSA。优选地,它以足够的亲和力结合HSA,以使得该共轭物将优选地分布至非肾组织。然而,优选的是这种亲和力并不是这样强,以使得HSA-配体结合不能逆转。

[0412] 在另一个优选的实施例中,基于脂质的配体微弱或根本不结合HSA,这样使得共轭物将优选地分布至肾。作为基于脂质的配体的替代或除它之外,还可以使用靶向肾细胞的其他部分。

[0413] 另一方面,该配体是由靶细胞(例如正在增殖的细胞)摄取的部分,例如维生素。这些特别有用于治疗特征在于不想要的细胞增殖(例如具有恶性或非恶性类型,例如癌细胞)的病症。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括是B维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其他维生素或由靶细胞如肝细胞摄取的养分。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

#### [0414] B. 细胞渗透剂

[0415] 另一方面,该配体是细胞渗透剂,优选地是螺旋细胞渗透剂。优选地,该试剂是两亲的。一种示例性试剂是肽如tat或触角足蛋白。如果该试剂是肽,则它可以被修饰,包括肽酰基模拟物、反转异构体、非肽键联或假肽键联和D-氨基酸的使用。该螺旋剂优选地是一种 $\alpha$ -螺旋剂,该 $\alpha$ -螺旋剂优选具有一个亲脂性相和一个疏脂性相。

[0416] 该配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在此也称作寡肽模拟物)是能够折叠成与天然肽相似的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA试剂的附接可以影响iRNA的药物代谢动力学分布,如通过增强细胞鉴别与吸收。肽或肽模拟物部分可以是约5-50氨基酸长的,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0417] 肽或肽模拟物可以例如是细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。在另一个替代中,该肽部分可以包含疏水性膜转位序列(MTS)。一种包含疏水性MTS的示例性肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:13)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:14))也可以是靶向部分。该肽部分可以是一个“递送”肽,该递送肽可以携带大的极性分子,包括肽、寡核苷酸和跨细胞膜的蛋白。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白的序列(GRKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:15))和果蝇触角足蛋白的序列(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:16))能够作为递送肽发挥作用。肽或肽模拟物可以通过DNA的随机序列来编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(拉姆(Lam)等人,自然,354:82-84,1991)。通过为了细胞靶向的目的结合的单体单元栓系至dsRNA试剂的肽或肽模拟物的实例是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可以在从约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。这些肽部分可以具有结构修饰,如以便增加稳定性或引导构象特性。可以利用以下描述的任何结构修饰。

[0418] 用于本发明的这些组合物和方法中的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修

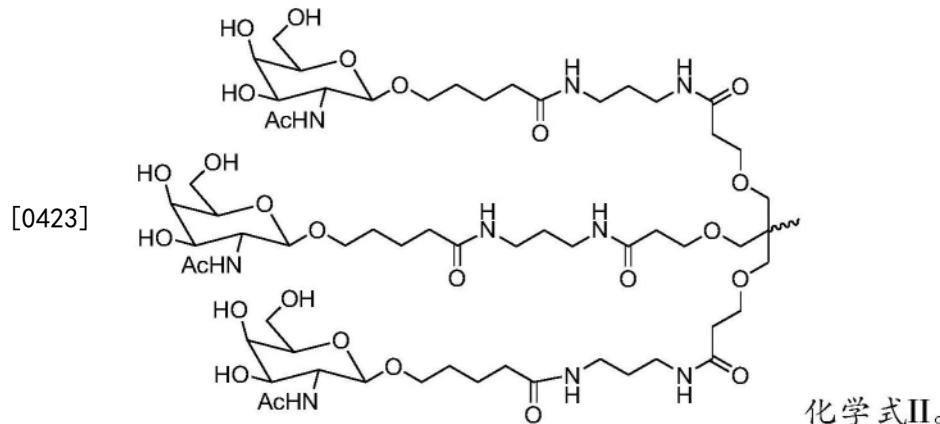
饰,例如糖基化或甲基化以促进靶向一个或多个特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD以外,可以使用靶向整合素配体的其他部分。该配体的优选共轭物靶向PECAM-1或VEGF。

[0419] “细胞渗透肽”能够渗透细胞例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以是例如 $\alpha$ -螺旋线性肽(例如LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如 $\alpha$ -防卫素、 $\beta$ -防卫素或牛抗菌肽)、或只包含一个或两个主导性氨基酸(例如PR-39或咧哚力西丁)的肽。细胞渗透肽还可以包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二重的两亲性肽,如MPG,该肽来源于HIV-1 gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(斯米尼(Simeoni)等人,核酸研究,31:2717-2724,2003)。

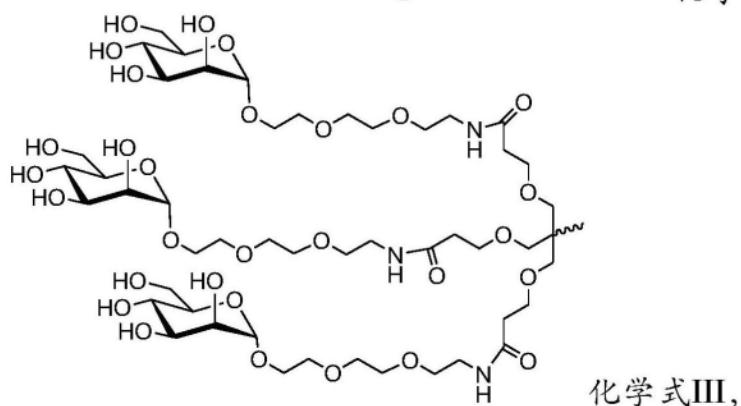
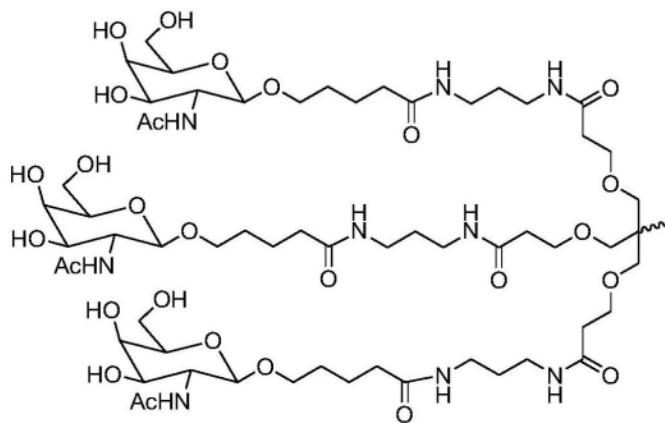
[0420] C. 碳水化合物共轭物

[0421] 在本发明的组合物与方法的一些实施例中,iRNA寡核苷酸进一步包括一种碳水化合物。碳水化合物共轭的iRNA对于核酸的体内递送以及适合于体内治疗用途的组合物而言是有利的,如在此所描述。如在此所使用,“碳水化合物”是指作为本身由具有至少6个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子的一个或多个单糖单元组成的碳水化合物的化合物;或具有由一个或多个单糖单元组成的碳水化合物部分的一部分的化合物,每个单糖具有至少六个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子。代表性的碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖以及含有从约4、5、6、7、8或9个单糖单元的寡糖),以及多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。具体的单糖包括C5和以上(例如,C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单元的糖(例如,C5、C6、C7或C8)。

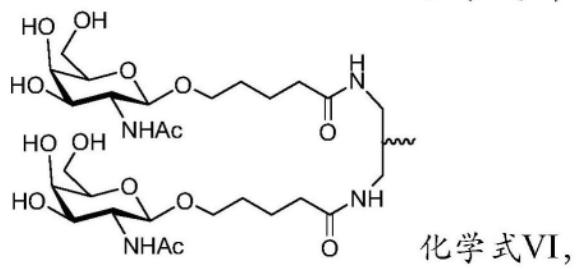
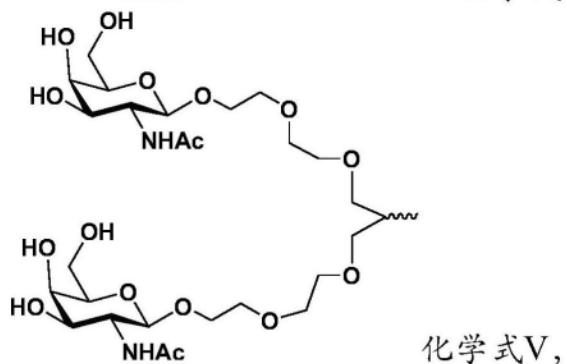
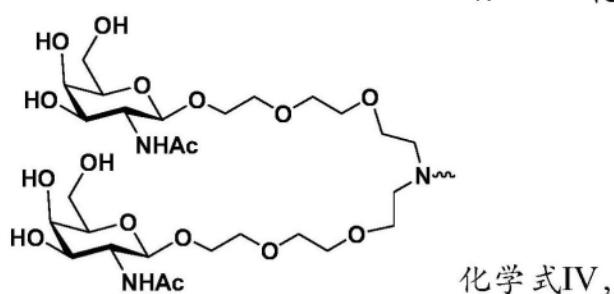
[0422] 在一个实施例中,用于在本发明的这些组合物和方法中使用的碳水化合物共轭物是一种单糖。在一个实施例中,该单糖是一种N-乙酰半乳糖胺,如

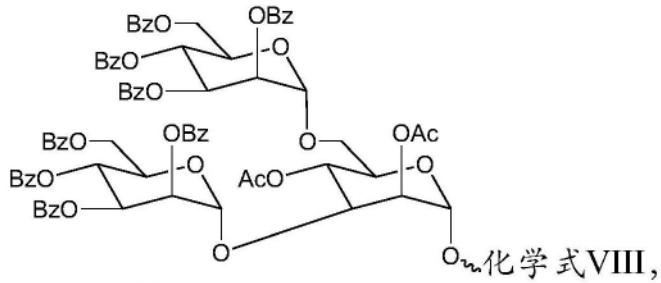
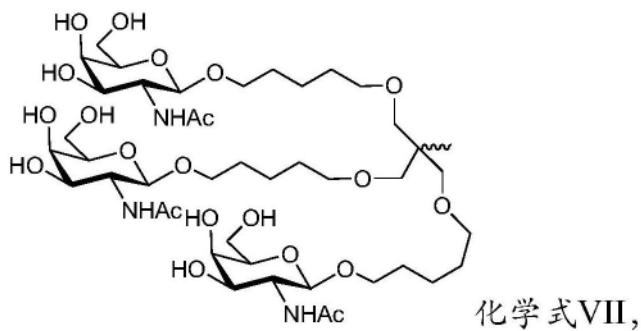


[0424] 在另一个实施例中,用于在本发明的组合物以及方法中使用的碳水化合物共轭物是选自下组,该组由以下各项组成:

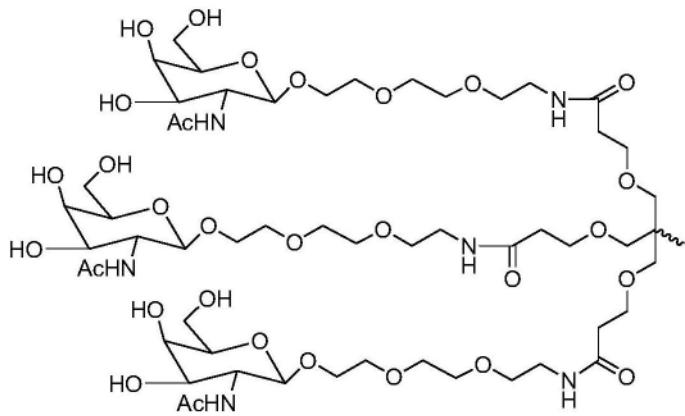
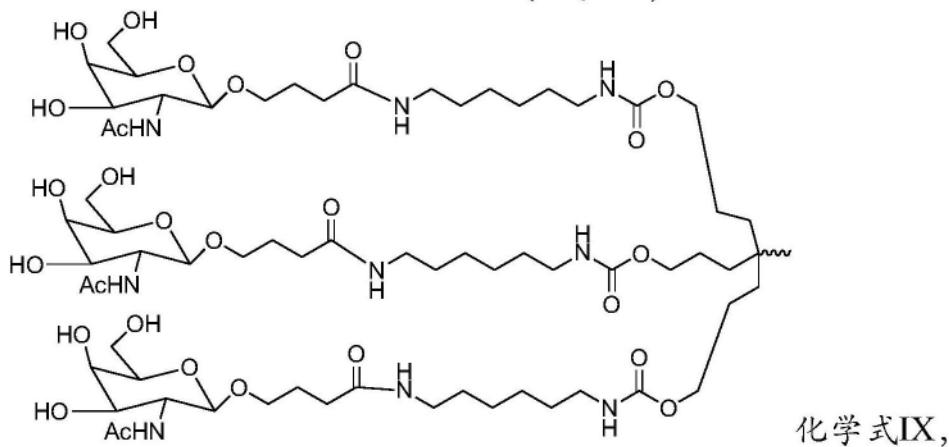


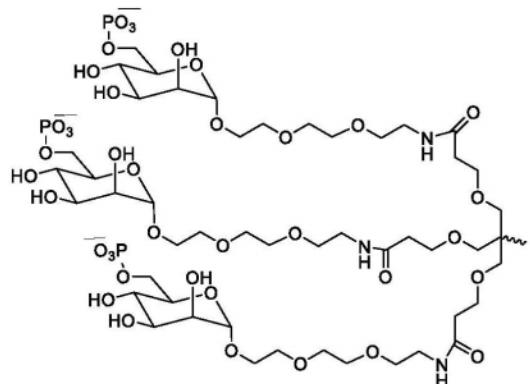
[0425]



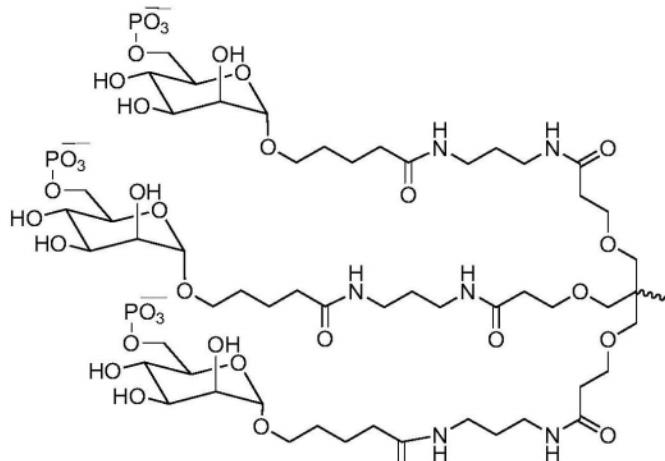


[0426]



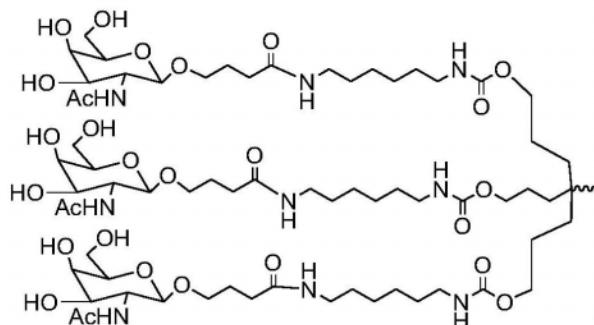


化学式XI,

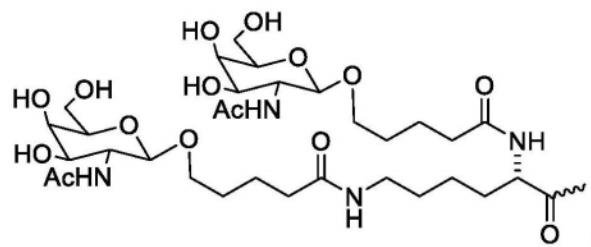


[0427]

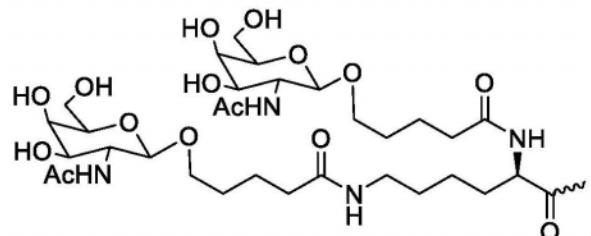
化学式XII,



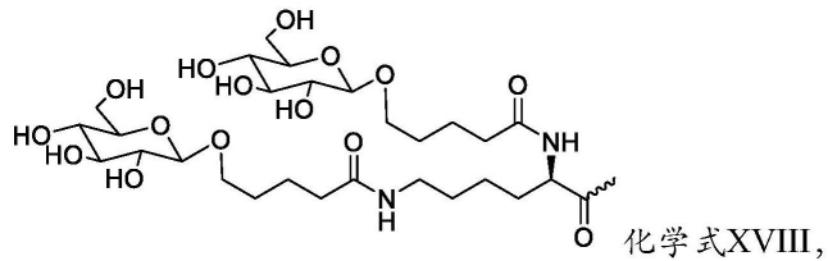
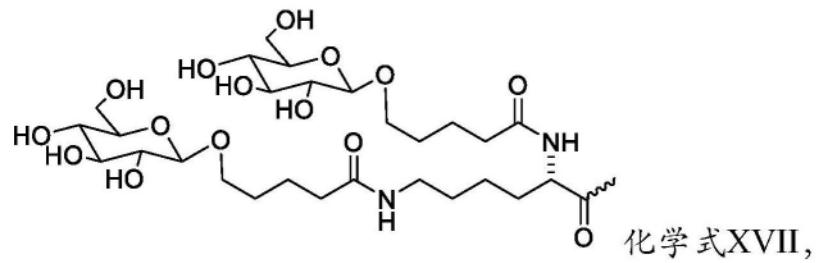
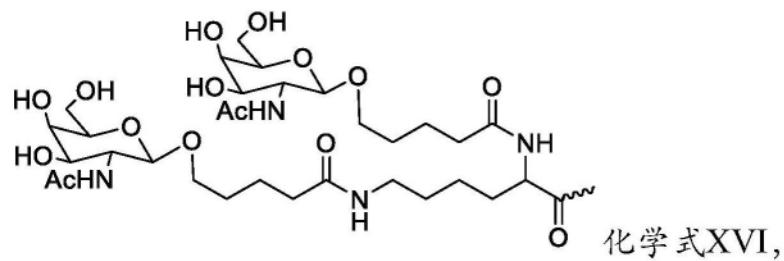
化学式XIII,



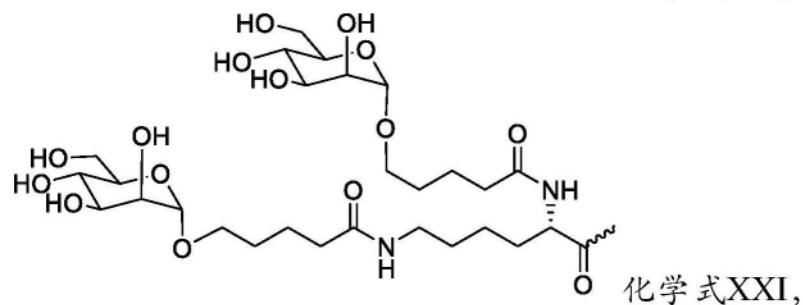
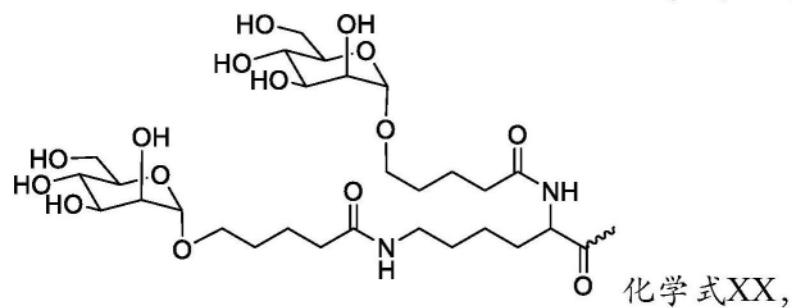
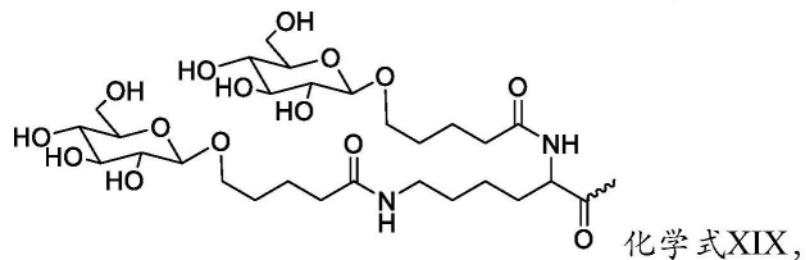
化学式XIV,

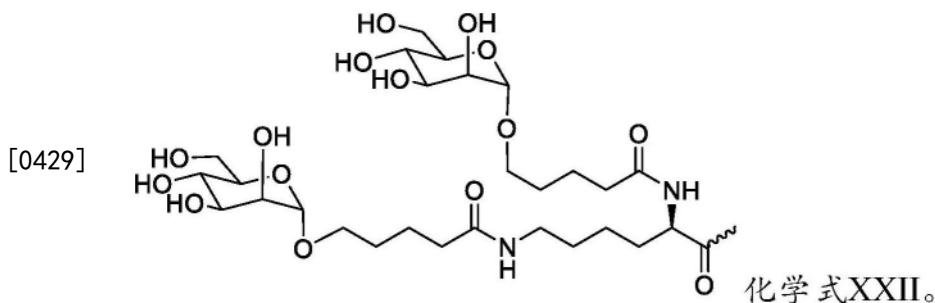


化学式XV,

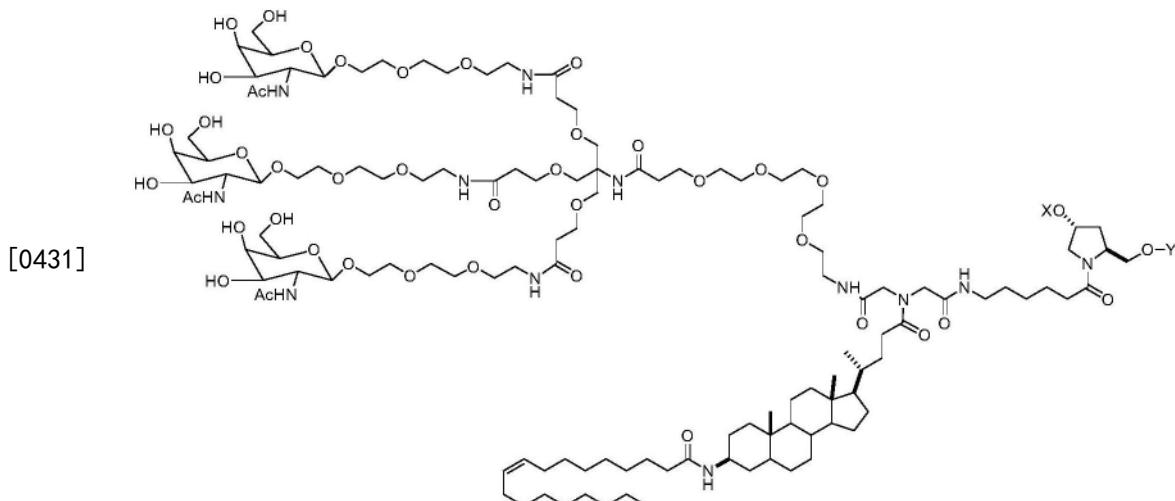


[0428]





[0430] 用于在此描述的实施例中使用的另一个代表性碳水化合物共轭物包括但不限于，



[0432] (化学式XXIII)，当X或Y其中一者是寡核苷酸时，另一者是氢。

[0433] 在一些实施例中，该碳水化合物共轭物进一步包含如上所描述的一个或多个另外的配体，如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

[0434] 适合用于在本发明中使用的另外的碳水化合物共轭物包括在PCT公开号W0 2014/179620和W0 2014/179627中描述的那些，这些公开各自的全部内容通过引用结合在此。

#### [0435] D.连接子

[0436] 在一些实施例中，在此描述的共轭物或配体可以借助不同连接子附接到iRNA寡核苷酸上，这些连接子可以是可裂解的或不可裂解的。

[0437] 术语“连接子”或“连接基团”意指一种有机部分，该有机部分连接一种化合物的两个部分，例如共价地附接一个种化合物的两个部分。连接子典型地包括一种直接的键或一种原子例如氧或硫，一种单位例如NR<sub>2</sub>、C(=O)NH、SO、SO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NH或者一种原子链，例如但不限于经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、烷基杂环烯基、烷基杂环炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烯基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基。

基、炔基杂芳基,其中一个或多个亚甲基可以被以下中断或封端:O、S、S(0)、SO<sub>2</sub>、N(R8)、C(0)、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的杂环基;其中R8是氢、酰基、脂肪族的或经取代的脂肪族的。在一个实施例中,该连接子是在约1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子、7-17、8-17、6-16、7-16或8-16个原子之间。

[0438] 可裂解的连接基团在细胞外是足够稳定的一种基团,但该基团在进入靶细胞时被裂解以释放该连接子结合在一起的两个部分。在一个优选实施例中,该可裂解的连接基团在靶细胞中或在一种第一参考条件(该第一参考条件可以例如被选择成模拟或代表细胞内条件)下的裂解比在受试者的血液中或在一种第二参考条件下(该第二参考条件可以例如被选择成模拟或代表在该血液或血清中发现的条件)快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少约100倍。

[0439] 可裂解的连接基团易于受到裂解因子(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)的影响。一般地,裂解因子在细胞内比在血清或血液中更普遍或具有更高水平或活性。此类降解剂的实例包括:被选择用于具体底物或不具有底物特异性的氧化还原剂,包括例如存在于细胞中,可以通过还原降解氧化还原可裂解的连接基团的氧化性或还原性酶或还原剂如硫醇;酯酶;可以产生酸性环境的核内体或试剂,例如产生5或更低的pH的那些;可以通过用作广义酸、肽酶(该肽酶可以是底物特异性的)和磷酸酶来水解或降解酸可裂解的连接基团的酶。

[0440] 一种可裂解的键基团,如二硫键可以对pH敏感。人血清的pH是7.4,而平均的细胞内pH稍低,在约7.1-7.3范围内。核内体具有在5.5-6.0范围内的更酸性的pH,并且溶酶体具有在5.0左右的甚至更酸性的pH。一些连接子将具有在优选的pH下裂解的可裂解的连接基团,从而使阳离子脂质从细胞内的配体中释放,或进入希望的细胞区室中。

[0441] 连接子可以包括可被一种具体的酶裂解的可裂解的连接基团。结合到连接子中的可裂解的连接基团的类型可以取决于有待靶向的细胞。例如,靶向肝脏的配体可以通过包括酯基团的连接子而被连接到阳离子脂质上。肝脏细胞富含酯酶,并且因此该连接子将在肝脏细胞中比在不富含酯酶的细胞类型中更有效地裂解。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质以及睾丸的细胞。

[0442] 当靶向富含肽酶的细胞类型(如肝细胞和滑膜细胞)时,可以使用含有肽键的连接子。

[0443] 通常,一种候选的可裂解的连接基团的适合性可以通过测试降解剂(或条件)裂解该候选的连接基团的能力来进行评估。还希望的是也测试该候选的可裂解的连接基团在血液中或当与其他非靶组织接触时抵抗裂解的能力。因此,可以确定在一种第一条件与一种第二条件之间进行裂解的相对敏感性,其中该第一条件被选择成指示在靶细胞中的裂解并且该第二条件被选择成指示在其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的裂解。这些评估可以在无细胞系统中、在细胞中、在细胞培养物中、在器官或组织培养物中或在整个动物中进行。有用的是在无细胞或培养条件下进行初始评估并且通过在整个动物中的进一步评估来进行确证。在优选实施例中,有用候选化合物在细胞中(或在选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解比在血液或血清(或在被选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的裂解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。

[0444] i. 氧化还原可裂解连接基团

[0445] 在一个实施例中, 可裂解的连接基团是一种氧化还原可裂解的连接基团, 其在还原或氧化时被裂解。可还原裂解的连接基团的一个实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定一种候选的可裂解连接基团是否是适合的“可还原裂解的连接基团”, 或例如是否适合于与一种特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用, 可以参考在此描述的方法。例如可以通过用二硫苏糖醇(DTT)或本领域中已知的其他使用还原剂的试剂进行孵育来对一种候选物进行评估, 这模拟了会在细胞(例如靶细胞)中观察到的裂解速率。还可以在被选择成模拟血液或血清条件的条件下对这些候选物进行评估。在一个实施例中, 候选化合物在血液中被裂解至多约10%。在其他实施例中, 有用候选化合物在细胞中(或在被选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液(或在选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的降解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。可以在被选择成模拟细胞内介质的条件下, 使用标准的酶动力学测定来确定候选化合物的裂解速率, 并且将其与被选择成模拟细胞外介质的条件下的速率相比较。

[0446] ii. 基于磷酸酯的可裂解连接基团

[0447] 在另一个实施例中, 可裂解连接子包括一种基于磷酸酯的可裂解的连接基团。基于磷酸酯的可裂解的连接基团通过降解或水解磷酸酯基团的试剂来裂解。一种在细胞中裂解磷酸酯基团的因子的实例是酶, 例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例是-0-P(0)(ORk)-0-、-0-P(S)(ORk)-0-、-0-P(S)(SRk)-0-、-S-P(0)(ORk)-0-、-0-P(0)(ORk)-S-、-S-P(0)(ORk)-S-、-0-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-0-、-0-P(0)(Rk)-0-、-0-P(S)(Rk)-0-、-S-P(0)(Rk)-0-、-S-P(S)(Rk)-0-、-S-P(0)(Rk)-S-、-0-P(S)(Rk)-S-。优选的实施例是-0-P(0)(OH)-0-、-0-P(S)(OH)-0-、-0-P(S)(SH)-0-、-S-P(0)(OH)-0-、-0-P(0)(OH)-S-、-S-P(0)(OH)-S-、-0-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-0-、-0-P(0)(H)-0-、-0-P(S)(H)-0-、-S-P(0)(H)-0-、-S-P(S)(H)-0-、-S-P(0)(H)-S-、-0-P(S)(H)-S-。一个优选实施例是-0-P(0)(OH)-0-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0448] iii. 酸可裂解连接基团

[0449] 在另一个实施例中, 可裂解连接子包括一种酸可裂解的连接基团。酸可裂解的连接基团是在酸性条件下被裂解的一种连接基团。在优选的实施例中, 酸可裂解的连接基团在一个具有大约6.5或更低(例如大约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的pH的酸性环境中被裂解, 或者被多种因子(例如可以作为一种广义酸起作用的酶)被裂解。在细胞中, 具体的低pH细胞器(例如核内体或溶酶体)可以提供一个针对酸可裂解的连接基团的裂解环境。酸可裂解的连接基团的实例包括但不限于腙、酯以及氨基酸的酯。酸可裂解的基团可以具有通式-C=NN-、C(0)O或-OC(0)。一个优选实施例是当附接到酯(烷氧基基团)的氧的碳是芳基基团、取代的烷基基团或叔烷基基团(如二甲基戊基或叔丁基)时。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

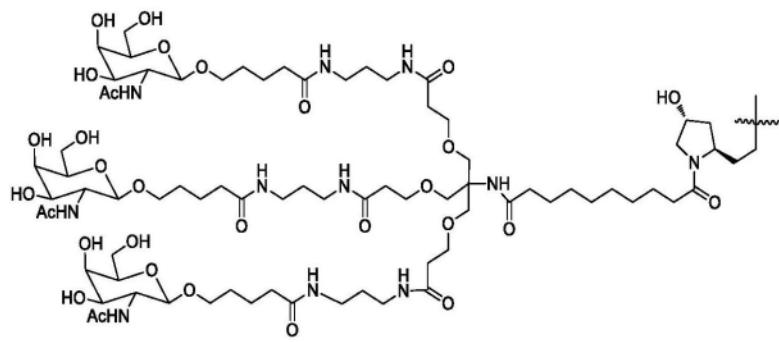
[0450] iv. 基于酯的连接基团

[0451] 在另一个实施例中, 可裂解的连接子包括一种基于酯的可裂解的连接基团。基于酯的可裂解的连接基团通过酶如细胞中的酯酶与酰胺酶来裂解。基于酯的可裂解的连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基以及亚炔基基团的酯。酯可裂解的连接基团具有通式-C(0)O-、或-OC(0)-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

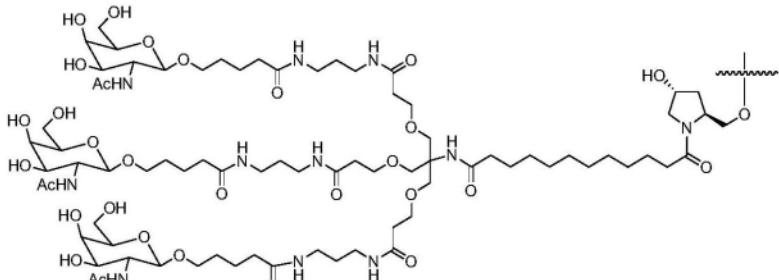
[0452] v. 基于肽的裂解基团

[0453] 在又另一个实施例中,可裂解的连接子包括一种基于肽的可裂解的连接基团。基于肽的可裂解的连接基团通过酶(例如细胞中的肽酶与蛋白酶)而被裂解。基于肽的可裂解的连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如二肽、三肽,等等)以及多肽的肽键。基于肽的可裂解的基团不包括酰胺基团(-C(0)NH-)。该酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的特定类型的酰胺键。基于肽的裂解基团通常限于在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的肽键(即,酰胺键),并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可裂解的连接基团具有通式-NHCHRAC(0)NHCHRBC(0)-,其中RA与RB是这两个邻接氨基酸的R基团。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0454] 在一个实施例中,本发明的iRNA通过一种连接子被共轭到碳水化合物上。本发明的这些组合物和方法的具有连接子的iRNA碳水化合物共轭物的非限制性实例包括但不限于,

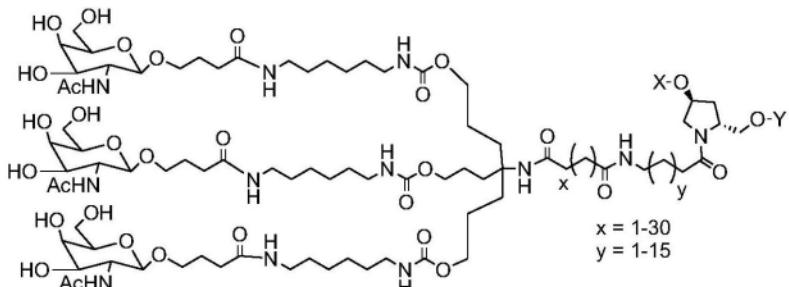


(化学式XXIV)、

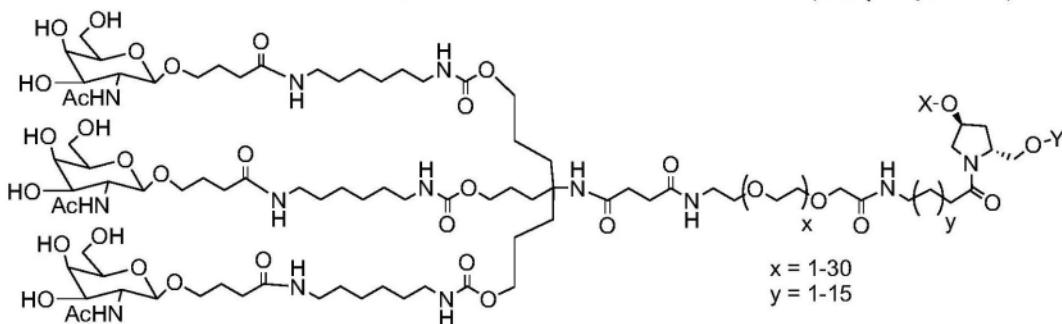


(化学式XXV)、

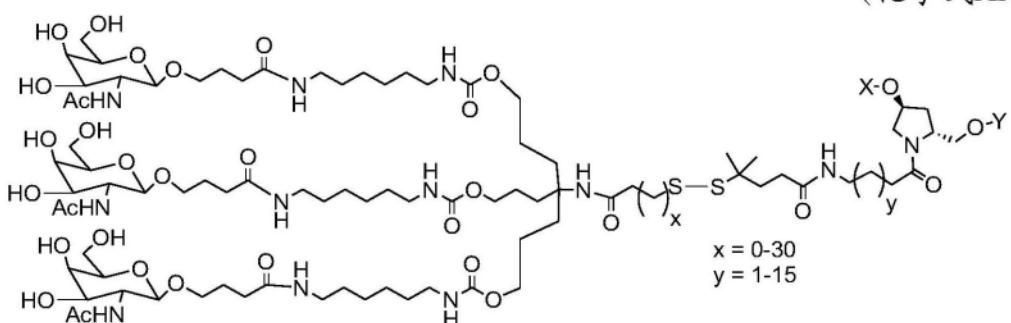
[0455]



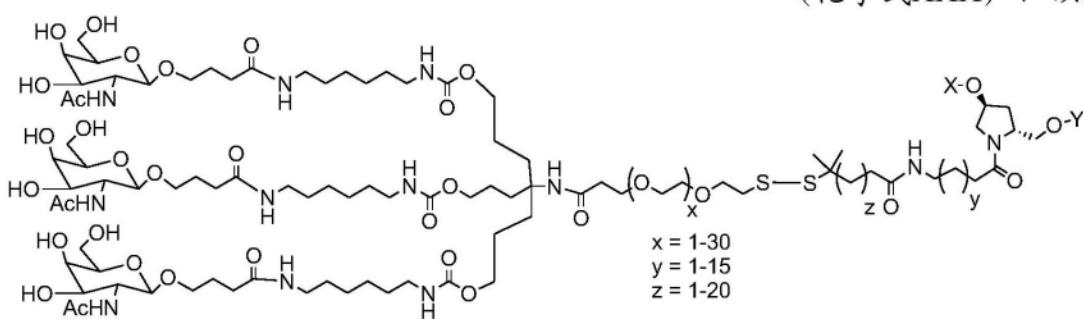
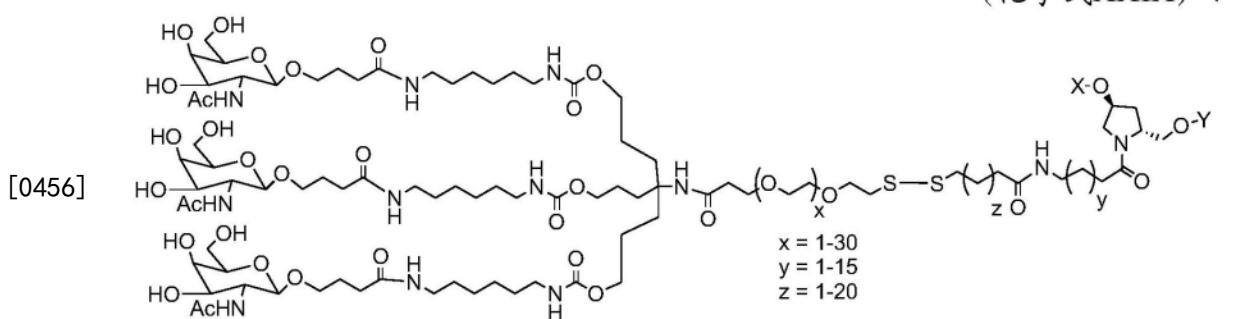
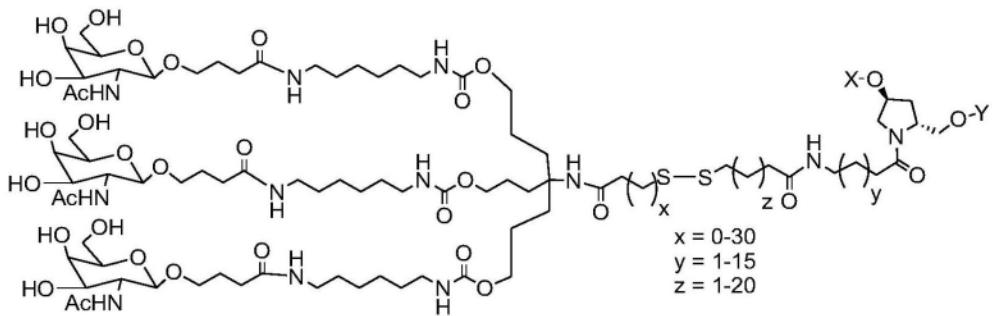
(化学式XXVI)、



(化学式XXVII)、



(化学式XXVIII)、

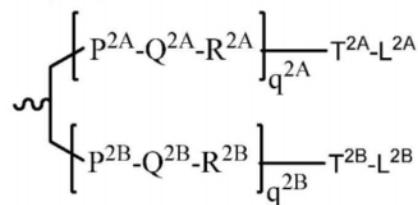


[0457] 当X或Y中的一个是一个寡核苷酸时,另一个是氢。

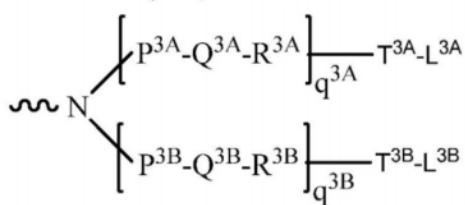
[0458] 在本发明的组合物与方法的某些实施例中,配体是通过二价或三价分支连接子而附接的一个或多个GalNAc (N-乙酰半乳糖胺) 衍生物。

[0459] 在一个实施例中,本发明的dsRNA被共轭到选自下组的一种二价或三价分支连接子上,该组具有以任何化学式(XXXII) - (XXXV)示出的结构:

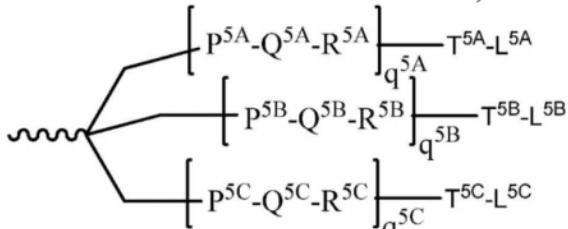
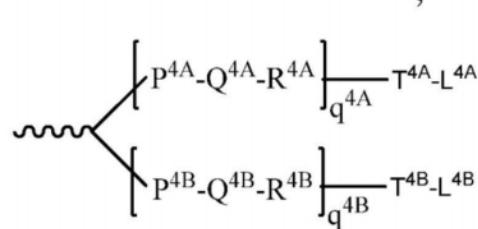
化学式XXXII



化学式XXXIII



[0460]



;

化学式XXXIV

化学式XXXV

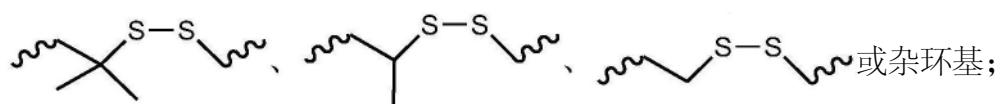
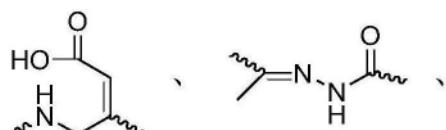
[0461] 其中：

[0462]  $q_{2A}$ 、 $q_{2B}$ 、 $q_{3A}$ 、 $q_{3B}$ 、 $q_{4A}$ 、 $q_{4B}$ 、 $q_{5A}$ 、 $q_{5B}$ 以及 $q_{5C}$ 对于每次出现独立地表示0-20并且其中该重复单元可以是相同或不同的；

[0463]  $P^{2A}$ 、 $P^{2B}$ 、 $P^{3A}$ 、 $P^{3B}$ 、 $P^{4A}$ 、 $P^{4B}$ 、 $P^{5A}$ 、 $P^{5B}$ 、 $P^{5C}$ 、 $T^{2A}$ 、 $T^{2B}$ 、 $T^{3A}$ 、 $T^{3B}$ 、 $T^{4A}$ 、 $T^{4B}$ 、 $T^{5B}$ 、 $T^{5C}$ 对于每次出现各自独立地是：不存在、CO、NH、O、S、OC(0)、NHC(0)、CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NH或CH<sub>2</sub>O；

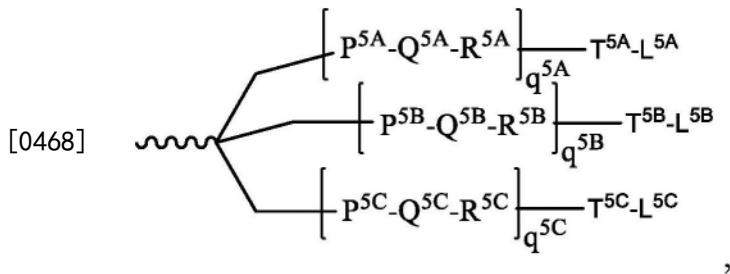
[0464]  $Q^{2A}$ 、 $Q^{2B}$ 、 $Q^{3A}$ 、 $Q^{3B}$ 、 $Q^{4A}$ 、 $Q^{4B}$ 、 $Q^{5A}$ 、 $Q^{5B}$ 、 $Q^{5C}$ 对于每次出现独立地是：不存在、亚烷基、取代的亚烷基，其中一个或多个亚甲基可以被以下各项中的一个或多个中断或封端：O、S、S(0)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>N</sup>)、C(R')=C(R'')、C≡C或C(0)；

[0465]  $R^{2A}$ 、 $R^{2B}$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{3B}$ 、 $R^{4A}$ 、 $R^{4B}$ 、 $R^{5A}$ 、 $R^{5B}$ 、 $R^{5C}$ 对于每次出现各自独立地是：不存在、NH、O、S、CH<sub>2</sub>、C(0)O、C(0)NH、NHCH(R<sup>a</sup>)C(0)、-C(0)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-、CO、CH=N-O、



[0466]  $L^{2A}$ 、 $L^{2B}$ 、 $L^{3A}$ 、 $L^{3B}$ 、 $L^{4A}$ 、 $L^{4B}$ 、 $L^{5A}$ 、 $L^{5B}$ 以及 $L^{5C}$ 表示配体；即对于每次出现各自独立地表示单糖（如GalNAc）、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖；并且R<sup>a</sup>是H或氨基酸侧链。三价共轭的GalNAc衍生物特别适用于与RNAi试剂一起使用以用于抑制靶基因的表达，如具有化学式(XXXV)的那些：

[0467] 化学式XXXV



[0469] 其中L<sup>5A</sup>、L<sup>5B</sup>和L<sup>5C</sup>表示单糖,如GalNAc衍生物。

[0470] 合适的二价与三价分支连接子基团共轭GalNAc衍生物的实例包括但不限于在以上引用为化学式II、VII、XI、X以及XIII的结构。

[0471] 传授制备RNA共轭物的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;8,106,022,前述专利的每个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0472] 给定化合物中的全部位置不必要经统一修饰,并且实际上可以在单个化合物中或甚至在iRNA内部的单个核苷处掺入多于一个前述修饰。本发明也包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0473] 在本发明的上下文中,“嵌合体的”iRNA化合物或“嵌合体”是以下这样的iRNA化合物,优选是dsRNA,它们包含两个或更多个化学上不同的区域,每者由至少一个单体单元构成,即,在dsRNA化合物的情况下的一种核苷酸。这些iRNA典型地含有至少一个区域,其中该RNA被修饰以便赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的靶核酸结合亲和力。iRNA的额外区域可以充当能够裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂交分子的酶的底物。举例而言,RNase H是一种裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。因此,RNase H的激活导致RNA靶标的裂解,从而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,可以在使用嵌合dsRNA时,经常用较短的iRNA获得可比较的结果。可以常规地通过凝胶电泳并且如果必要的话联合本领域中已知的核酸杂交技术来检测该RNA靶标的裂解。

[0474] 在某些实例中,iRNA的RNA可以通过非配体基团来进行修饰。许多非配体分子已经被共轭到iRNA上以增强该iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且用于进行此类共轭的程序在科学文献中是可获得的。这类非配体部分包括脂质部分,诸如胆固醇(久保(Kubo),T.等人,生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)2007,365(1):54-61;莱特辛格(Letsinger)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),1989,86:6553)、胆酸(马诺哈兰(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学通讯

(Bioorg.Med.Chem.Lett.),1994,4:1053)、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇(马诺哈兰等人,纽约科学院纪事(Ann.N.Y.Acad.Sci),1992,660:306;马诺哈兰等人,生物有机化学与医药化学通讯,1993,3:2765)、巯基胆固醇(奥本豪森(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1992,20:533)、脂肪链例如十二烷二醇或十一烷基残余物(塞森-贝毛拉斯(Saison-Behmoaras)等人,EMBO杂志,1991,10:111;卡巴诺夫(Kabanov)等人,欧洲生物化学学会联盟通讯(FEBS Lett.),1990,259:327;斯维纳楚克(Svinarchuk)等人,生物化学(Biochimie),1993,75:49)、磷脂例如二十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯(马诺哈兰等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651;谢(Shea)等人,核酸研究,1990,18:3777)、多胺或聚乙二醇链(马诺哈兰等人,核苷&核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969)、或金刚烷乙酸(马诺哈兰等人,四面体通讯,1995,36:3651)、棕榈基部分(米什拉(Mishra)等人,生物化学与生物物理学学报,1995,1264:229)、或十八胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923)。教导此类RNA共轭物的制备的代表性美国专利已经在上文列出。典型的共轭方案涉及在序列的一个或多个位置处合成具有氨基连接子的RNA。然后使用适当的偶联剂或活化剂使该氨基基团与被共轭的分子进行反应。可以用仍与固相载体结合或在裂解RNA之后处于溶液相中的RNA来进行共轭反应。通过HPLC纯化RNA共轭物典型地提供纯的共轭物。

[0475] V. 本发明的iRNA的递送

[0476] 可以按许多不同方式实现向细胞、例如受试者像人受试者(例如有需要的受试者,例如患有与通过KHK磷酸化果糖相关的一种疾病、病症或病状的受试者)体内的细胞递送本发明的iRNA。例如,可以通过在体外或体内使细胞与本发明的iRNA接触来进行递送。还可以通过向受试者给予包含iRNA(例如dsRNA)的组合物来直接进行体内递送。可替代地,可以通过给予编码和引导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行体内递送。这些替代方案在后文进一步论述。

[0477] 通常,递送(体外或体内)核酸分子的任何方法可以适应于随本发明的iRNA使用(参见例如阿赫塔尔(Akhtar) S. 和朱利安(Julian) RL. (1992) 细胞生物学趋势(Trends Cell.Biol.) 2(5):139-144和W094/02595,通过引用以其全文结合在此)。对于体内递送,为了递送iRNA分子所考虑的因素包括例如,所递送的分子的生物稳定性、非特异性效应的预防以及所递送的分子在靶组织中的累积。可以通过局部给予,例如通过直接注射或植入到组织中或局部给予制剂来使iRNA的非特异性效应最小化。向治疗部位局部给予使试剂的局部浓度最大化,限制该试剂向全身组织的暴露,该全身组织否则可以受该试剂损害或可以降解该试剂,并且容许给予较低总剂量的iRNA分子。若干研究已经显示在局部给予iRNA时成功敲低基因产物。例如,通过在食蟹猴中玻璃体内注射(托伦蒂诺(Tolentino) MJ. 等人(2004) 视网膜(Retina) 24:132-138) 和在小鼠中视网膜下注射(赖希(Reich) SJ. 等人(2003) 分子视觉(Mol.Vis.) 9:210-216) 进行的VEGF dsRNA眼内递送均显示出在年龄相关的黄斑变性的实验模型中预防新血管形成。此外,在小鼠中直接肿瘤内注射dsRNA缩减肿瘤体积(皮尔(Pille),J. 等人,(2005) 分子治疗(Mol.Ther.) 11:267-274) 并且可以延长荷瘤小鼠的存活期(金姆(Kim),WJ. 等人,(2006) 分子治疗14:343-350;李(Li),S. 等人,(2007) 分子治疗15:515-523)。也已经示出通过直接注射将RNA干扰成功局部递送递至CNS(多恩

(Dorn), G. 等人, (2004) 核酸 (Nucleic Acids) 32:e49; 谭 (Tan), PH. 等人, (2005) 基因治疗 (Gene Ther.) 12:59-66; 牧村 (Makimura), H. 等人, (2002) BMC 神经科学 (BMC Neurosci.) 3: 18; 希什金娜 (Shishkina), GT. 等人, (2004) 神经科学 (Neuroscience) 129:521-528; 塔克尔 (Thakker), ER. 等人, (2004) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 101: 17270-17275; 阿卡尼娅 (Akaneya), Y. 等人, (2005) 神经生理学期刊 (J. Neurophysiol.) 93: 594-602 并且通过鼻内给予成功递送至肺 (霍华德 (Howard), KA. 等人, (2006) 分子治疗 14: 476-484; 张 (Zhang), X. 等人, (2004) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 279:10677-10684; 比特科 (Bitko), V. 等人, (2005) 自然医学 (Nat. Med.) 11:50-55)。对于全身性给予iRNA用于治疗疾病,可以将RNA修饰或可替代地使用药物递送系统进行递送;两种方法均起到防止dsRNA被体内核酸内切酶和核酸外切酶快速降解的作用。RNA或药用载体的修饰也可以允许iRNA组合物靶向至靶组织并避免不想要的脱靶效应。iRNA分子可以通过化学共轭至亲脂性基团如胆固醇以增强细胞摄取和防止降解进行修饰。例如,将与亲脂性胆固醇部分共轭的针对ApoB的iRNA全身注射到小鼠中并且导致肝脏和空肠两者中apoB mRNA的敲低(苏兹赫克 (Soutschek) J. 等人 (2004) 自然 432:173-178)。已经显示iRNA与适体的共轭在前列腺癌小鼠模型中抑制肿瘤生长并且介导肿瘤消退 (麦克纳马拉 (McNamara) J. O. 等人 (2006) 自然生物技术 (Nat. Biotechnol.) 24:1005-1015)。在替代实施例中,可以使用药物递送系统如纳米颗粒、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统递送iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的) iRNA分子的结合并且也在带负电荷的细胞膜增强相互作用以容许iRNA由细胞高效摄取。阳离子脂质、树状物或聚合物可以与iRNA结合或被诱导以形成包装 siRNA的囊泡或胶束 (参见例如金姆 (Kim) SH. 等人 (2008) 控制释放期刊 (Journal of Controlled Release) 129 (2): 107-116)。囊泡或胶束的形成进一步防止全身给予时iRNA的降解。用于制备和给予阳离子-iRNA复合物的方法很好地在本领域普通技术人员的能力范围内 (参见例如,索伦森 (Sorensen), DR. 等人, (2003) 分子生物学杂志 327:761-766; 维尔马 (Verma), UN. 等人, (2003) 临床癌症研究 (Clin. Cancer Res.) 9:1291-1300; 阿诺德 (ArnoId), AS 等人, (2007) 高血压杂志 (J. Hypertens.) 25:197-205, 这些文献的全部内容通过引用结合在此)。可用于全身性递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP (索伦森, DR. 等人, (2003), 上文; 维尔马, UN. 等人, (2003), 上文)、Oligofectamine、“固体核酸脂质粒子” (齐默尔曼 (Zimmermann), TS. 等人, (2006) 自然 441:111-114)、心磷脂 (钱 (Chien), PY. 等人, (2005) 癌症基因治疗 12:321-328; 帕尔 (Pal), A. 等人, (2005) 国际肿瘤学杂志 (Int. J. Oncol.) 26:1087-1091)、聚乙亚胺 (博奈特 (Bonnet) ME. 等人 (2008) 药学研究 (Pharm. Res.) 8月16日电子出版先于印刷版; 艾格纳 (Aigner), A. (2006) 生物医学与生物技术杂志 (J. Biomed. Biotechnol.) 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) 肽 (刘 (Liu), S. (2006) 分子制药学 (Mol. Pharm.) 3:472-487) 以及聚酰胺型胺类 (托马里亚 (Tomalia), DA. 等人 (2007) 生物化学会汇刊 (Biochem. Soc. Trans.) 35:61-67; 柳 (Yoo), H. 等人, (1999) 药学研究 (Pharm. Res.) 16:1799-1804)。在一些实施例中, iRNA与环糊精形成用于全身给予的复合物。用于给予iRNA和环糊精的药用组合物的方法可以在美国专利号7,427,605中找到, 该专利通过引用以其全文结合在此。

[0478] A. 本发明的载体编码的iRNA

[0479] 靶向C5基因的iRNA可以从插入DNA或RNA载体中的转录单位表达 (参见, 例如, 蒂尔

(Couture), A等人, TIG. (1996), 12:5-10; 斯基尔伦 (Skillern), A. 等人, 国际PCT公开号W0 00/22113; 康拉德 (Conrad), 国际PCT公开号W0 00/22114; 以及康拉德, 美国专利号6,054,299。取决于使用的具体构建体和靶组织或细胞类型, 表达可以是瞬时的(在小时至周数量级上)或持久的(数周至数月或更长时间)。可以将这些转基因作为线性构建体、环状质粒或可以是整合或非整合载体的病毒载体引入。转基因也可以如此构建以允许它作为染色体外质粒遗传(加斯曼 (Gassmann) 等人, 美国国家科学院院刊 (1995) 92:1292)。

[0480] iRNA的单个链或多个链可以从表达载体上的启动子转录。当两个单独的链有待被表达以产生例如dsRNA时, 可以将两个单独的表达载体共引入(例如通过转染或感染)到靶细胞中。可替代地, dsRNA的每个单独链可以通过均位于相同表达质粒上的启动子来转录。在一个实施例中, dsRNA被表达为通过一种连接子多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸, 这样使得该dsRNA具有茎环结构。

[0481] iRNA表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体、优选地与脊椎动物细胞相容的那些, 可以用来产生用于表达如在此所描述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域中熟知的并且从许多商业来源可获得。典型地, 提供含有用于插入希望的核酸区段的合宜限制性位点的这类载体。表达iRNA的载体的递送可以是全身性的, 如通过静脉内或肌内给予, 通过给予至从患者移植出来、随后重新引入患者的靶细胞或通过允许向所需靶细胞引入的任何其他手段。

[0482] iRNA表达质粒可以被转染到靶细胞中作为具有阳离子脂质载体(例如, Oligofectamine)或基于非阳离子脂质的载体(例如, Transit-TKO<sup>TM</sup>)的复合物。本发明还想到了在一周或更长时间范围内用于iRNA介导的靶向靶RNA的不同区的敲低的多次脂质转染。成功地将载体引入到宿主细胞中可以使用多种已知的方法来监测。例如瞬时转染可以使用一种报告基因来进行信号化, 例如荧光标记, 例如绿色荧光蛋白(GFP)。稳定的对离体细胞的转染可以使用以下这样的标记来进行确保:这些标记为被转染的细胞提供了对特定环境因子(例如抗生素或药物)的抗性, 例如潮霉素B抗性。

[0483] 可以随在此所述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不限于:(a)腺病毒载体; (b)逆转录病毒载体, 包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病病毒等; (c)腺伴随病毒载体; (d)单纯疱疹病毒载体; (e) SV 40载体; (f)多瘤病毒载体; (g)乳头瘤病毒载体; (h)微小核糖核酸病毒载体; (i)痘病毒载体, 如正痘病毒, 例如痘苗病毒载体, 或禽痘病毒, 例如金丝雀痘病毒或鸡痘病毒; 以及(j)辅助病毒依赖性腺病毒或无肠腺病毒。复制缺陷型病毒也可以有利的。不同的载体将并入或将不并入细胞的基因组中。如果需要, 构建体可以包含病毒序列以用于转染。可替代地, 构建体可以并入能够发生附加体型复制的载体(例如EPV和EBV载体)中。用于重组表达iRNA的构建体通常将需要调节元件, 例如启动子、增强子等, 以确保iRNA在靶细胞中的表达。以下进一步描述针对载体和构建体考虑的其他方面。

[0484] 有用于递送iRNA的载体将包括足以在希望的靶细胞或组织中表达iRNA的调节元件(启动子、增强子等)。可以选择调节元件以提供组成型或调节/诱导型表达。

[0485] 可以精确地调节iRNA的表达, 例如通过使用对某些生理调节物(例如循环型葡萄糖水平或激素)敏感的诱导型调节序列(多赫替 (Docherty) 等人, 1994, FASEB杂志8:20-24)。适合于在细胞中或哺乳动物中控制dsRNA表达的此类诱导型表达系统包括例如由以下

各项进行的调节:蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚作用的化学诱导物以及异丙基- $\beta$ -D1-硫代毗喃半乳糖昔(IPTG)。本领域技术人员将能够基于iRNA转基因的预期用途选择适宜的调节/启动子序列。

[0486] 可以使用含有编码iRNA的核酸序列的病毒载体。例如,可以使用逆转录病毒载体(参见米列尔(Miller)等人,酶学方法(Meth. Enzymol.) 217:581-599(1993))。这些逆转录病毒载体含有对于病毒基因组正确包装并整合入宿主细胞DNA必需的组分。将编码iRNA的核酸序列克隆至促进该核酸递送入患者的一种或多种载体中。关于逆转录病毒载体的更多细节可以在例如博森(Boesen)等人,生物疗法(Biotherapy)6:291-302(1994)找到,所述文献描述使用逆转录病毒载体递送mdr1基因至造血干细胞,以便使得干细胞对化疗更耐受。说明基因治疗中逆转录病毒载体用途的其他参考文献是:克劳斯(Clownes)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.)93:644-651(1994);金(Kiem)等人,血液83:1467-1473(1994);萨尔蒙斯(Salmons)和贡兹堡(Gunzberg),人类基因治疗(Human Gene Therapy)4:129-141(1993);以及格罗斯曼(Grossman)和威尔逊(Wilson),遗传学与发育学新观点(Curr.Opin.in Genetics and Devel.)3:110-114(1993)。意欲使用的慢病毒载体包括例如描述于美国专利号6,143,520;5,665,557和5,981,276中的基于HIV的载体,这些美国专利通过引用结合在此。

[0487] 还想到腺病毒用于本发明的iRNA的递送中。腺病毒是特别有吸引力的媒介物,例如用于递送基因至呼吸道上皮。腺病毒天然地感染呼吸道上皮,在那里它们引起轻微疾病。基于腺病毒的递送系统的其他靶是肝脏、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感染不分裂细胞的优点。科扎斯凯(Kozarsky)和威尔森,遗传学与发育学新观点3:499-503(1993)提出基于腺病毒的基因疗法的综述。布特(Bout)等人,人类基因疗法5:3-10(1994)展示了腺病毒载体将基因转移至恒河猴呼吸道上皮的用途。基因治疗中使用腺病毒的其他实例可以在罗森菲尔德(Rosenfeld)等人,科学252:431-434(1991);罗森菲尔德等人,细胞68:143-155(1992);马斯特兰杰利(Mastrangeli)等人,临床研究杂志91:225-234(1993);PCT公开W094/12649;以及王(Wang)等人,基因治疗2:775-783(1995)中找到。用于表达本发明中表征的iRNA的合适AV载体、用于构建重组AV载体的方法和用于递送该载体至靶细胞中的方法在夏(Xia)H等人,(2002),自然生物技术(Nat.Biotech.)20:1006-1010中描述。

[0488] 也可以使用腺伴随病毒(AAV)载体来递送本发明的iRNA(沃尔什(Walsh)等人,实验生物学与实验医学会报(Proc.Soc.Exp.Biol.Med.) 204:289-300(1993);美国专利号5,436,146)。在一个实施例中,iRNA可以从具有例如U6或H1 RNA启动子或细胞巨化病毒(CMV)启动子的重组AAV载体作为两个单独的互补性单链RNA分子表达。用于表达本发明中表征的dsRNA的合适AAV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于递送该载体至靶细胞中的方法在萨穆尔斯基(Samulski)R等人(1987),病毒学杂志(J.Virol.)61:3096-3101;费希尔(Fisher)K J等人(1996),病毒学杂志,70:520-532;萨穆尔斯基R等人(1989),病毒学杂志63:3822-3826;美国专利号5,252,479;美国专利号5,139,941;国际专利申请号W0 94/13788;以及国际专利申请号W0 93/24641中描述,这些文献的完整披露内容通过引用结合在此。

[0489] 另一种适合于递送本发明的iRNA的病毒载体是痘病毒如痘苗病毒,例如减毒痘苗病毒如修饰的安卡拉病毒(MVA)或NYVAC、禽痘病毒如鸡痘病毒或金丝雀痘病毒。

[0490] 病毒载体的向性可以通过用包膜蛋白或来自其他病毒的其他表面抗原来对这些载体假型化而进行修饰,或者适当时通过取代不同的病毒衣壳蛋白而进行修饰。例如慢病毒载体可以是用来自水泡性口炎病毒(VSV)、狂犬病病毒、埃博拉病毒、Mokola等的表面蛋白进行假病毒化。可以通过将载体工程化以表达不同衣壳蛋白血清型,使得AAV载体靶向不同的细胞;参见例如,拉宾诺维茨(Rabinowitz)J E等人,(2002),病毒学杂志76:791-801,这些文献的完整披露内容通过引用结合在此。

[0491] 载体的药物制剂可以包括在一种可接受的稀释剂中的该载体,或可以包括一种缓释基质,在该缓释基质中该基因递送媒介物被嵌入。可替代地,当该完全的基因递送载体可以从重组细胞(例如逆转录病毒载体)完整地产出的情况下,该药物制剂可以包括产出该基因递送系统的一个或多个细胞。

[0492] VI.本发明的药用组合物

[0493] 本发明还包括包含本发明的iRNA的药用组合物和配制品。在一个实施例中,在此提供了含有如在此所描述的iRNA和药学上可接受的载体的药用组合物。含有iRNA的药用组合物适用于治疗与KHK基因的表达或活性相关的疾病或病症。基于递送模式配制这类药用组合物。一个实例是被配制用于经由胃肠外递送,例如皮下(SC)或静脉内(IV)递送来全身给予的组合物。另一个实例是被配制用于例如通过输注到脑,如通过连续泵输注来直接递送到脑实质中的组合物。本发明的这些药用组合物可以足以抑制KHK基因的表达的剂量给予。

[0494] 药用组合物可以通过静脉内输注经过一段时间来给予,如经过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20和21、22、23、24或约25分钟的周期。该给予可以例如在一个常规基础上(例如每周地、双周地(即,每两周))重复持续一个月、两个月、三个月、四个月或更久。在初始治疗方案后,可以基于更低频率给予治疗。例如在每周或双周给予持续三个月后,给予可以按每个月重复一次,持续六个月或一年或更长。

[0495] 可以将该药用组合物一日给予一次,或者可以将该iRNA在一天内以适当的间隔给予两次、三次或更多次亚剂量,或者甚至可以通过控释配制品使用连续输注或递送而给予。在所述情况下,包含在每次亚剂量中的iRNA必须是相对应更小的,以便实现总每日剂量。也可以将剂量单位复配用于在几天内递送,例如使用在几天时间范围内提供持续的iRNA释放的常规持续释放配制品。持续释放配制品是本领域中熟知的并且对于在特定位点递送试剂是特别有用的,由此可以与本发明的试剂使用。在这一实施例中,该剂量单位包含相对应的多个每日剂量。

[0496] 在其他实施例中,单剂量的该药用组合物可以长久持续,从而后续剂量以不多于3、4或5天的间距或以不多于1、2、3、或4周的间距给予。在本发明的一些实施例中,每周给予一次单剂量的本发明的药用组合物。在本发明的其他实施例中,每两月给予单剂量的本发明的这些药用组合物。

[0497] 本领域技术人员将理解,某些因素可以影响有效治疗受试者所要求的剂量和时间安排,这些因素包括但不限于疾病的严重性、先前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效剂量的组合物治疗受试者可以包括单次治疗或一系列治疗。如在此的其他地方所描述,使用常规方法或基于使用适当动物模型的体内测试,可以评估本发明涵盖的各个iRNA的有效剂量和体内半衰期。

[0498] 取决于希望局部或全身性治疗并且取决于有待治疗的区域,可以将本发明的药用组合物按许多方式给予。给予可以是局部的(例如,通过透皮贴剂);肺的,例如通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内的;鼻内的;表皮的和透皮的;口服的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内、动脉、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;表皮下,例如通过一个植入性装置;或颅内,例如通过实质内、鞘内或脑室内的给予。

[0499] iRNA可以按这样的方式递送以靶向特定组织,如肝脏(例如肝脏的肝细胞)。

[0500] 用于局部给予的药用组合物和配制品可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉剂。常规的药物载体、水、粉末或油基、增稠剂等可以是必要的或希望的。包衣的安全套、手套等也可以是有用的。适合的局部配制品包括其中在本发明中体现的iRNA与局部用递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。适合的脂质和脂质体包括中性(例如二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子脂质和脂质体(例如二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明中表征的iRNA可以封装于脂质体内部或可以与其、尤其是与阳离子脂质体形成复合物。可替代地,iRNA可以与脂质、具体地与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸与酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、花生酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、或C<sub>1-20</sub>烷基酯(例如异丙基肉豆蔻酸酯IPM)、甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部配制品被详细地描述于美国专利号6,747,014中,该美国专利通过引用方式结合在此。

[0501] A. 包括膜性分子集合体的iRNA配制品

[0502] 用于在本发明的组合物和方法中使用的iRNA可以被配制成用于在膜性分子集合体中递送例如脂质体或胶束。如在此所使用,术语“脂质体”是指由设置在至少一个双层(例如一个双层或多个双层)中的两亲性脂质构成的囊泡。脂质体包括单层的或多层的囊泡,其具有一个形成自亲脂材料的膜以及一个水性内部。水性部分包含该iRNA组合物。该亲脂性材料从典型地不包括iRNA组合物的水性外部(尽管在一些实例中,它可能包括)分离该水性内部。脂质体对于将活性成分转移以及递送至作用位点是有用的。因为脂质体膜与生物膜结构上类似,当脂质体被施加到一种组织时,该脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体与细胞的融合进行,包含iRNA的内部水性内容物被递送到细胞中,其中该iRNA可以特异性结合到一种靶RNA并且可以介导iRNA。在一些情况下,这些脂质体还被特异地靶向成例如将该iRNA引导到特定细胞类型上。

[0503] 包含iRNA试剂的脂质体可以通过多种方法来制备。在一个实例中,脂质体的脂质组分被溶解在洗涤剂中以使得用脂质组分形成胶束。例如,该脂质组分可以是一种两亲性阳离子脂质或脂质共轭物。该洗涤剂可以具有高的临界胶束浓度并且可以是非离子的。示例性的洗涤剂包括胆酸盐、CHAPS、辛基葡萄糖苷、脱氧胆酸盐和月桂酰肌氨酸。然后将iRNA试剂制剂添加到包括该脂质组分的胶束中。该脂质上的阳离子基团与iRNA试剂相互作用并在iRNA试剂周围缩合以形成脂质体。缩合后,例如通过透析将该洗涤剂除去以得到iRNA试剂的脂质体制剂。

[0504] 如果必要,可以在缩合反应过程中添加协助缩合的载体化合物,例如通过控制添

加。例如,该载体化合物可以是除了核酸以外的一种聚合物(例如,精胺或亚精胺)。还可以调整pH以有利于缩合。

[0505] 用于产生稳定的多核苷酸递送媒介物的方法(其结合了多核苷酸/阳离子脂质复合物作为该递送媒介物的结构组分)进一步描述在例如WO 96/37194中,其全部内容通过引用结合在此。脂质体形成还可以包括描述于以下文献中的示例性方法的一个或多个方面:费尔格纳(Felgner),P.L等人,美国国家科学院院刊8:7413-7417,1987;美国专利号4,897,355;美国专利号5,171,678;班厄姆(Bangham)等人,膜分子生物学(M.Mol.Biol.)23:238,1965;奥尔森(Olson)等人,生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta)557:9,1979;苏卡(Szoka)等人,美国国家科学院院刊75:4194,1978;梅休(Mayhew)等人生物化学与生物物理学报775:169,1984;金等人生物化学与生物物理学报728:339,1983;以及福永(Fukunaga)等人,内分泌学(Endocrinol.)115:757,1984。常用的用于制备用作递送媒介物的具有适当尺寸的脂质聚集体的技术包括超声处理和冻融加挤出(参见例如梅耶(Mayer)等人生物化学与生物物理学报858:161,1986)。当希望一致小(50nm至200nm)和相对均匀的聚集体时,可以使用微流化法(梅休等人,生物化学与生物物理学报775:169,1984)。这些方法容易地适用于将iRNA试剂制剂封装到脂质体中。

[0506] 脂质体分成两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,这些脂质体与带负电荷的核酸分子相互作用以形成一种稳定的复合物。该带正电荷的核酸/脂质体复合物结合至带负电荷的细胞表面并且内化在核内体中。由于核内体内的酸性pH,脂质体破裂,从而将它们的内含物释放到细胞质中(王等人,生物化学与生物物理研究通讯,1987,147,980-985)。

[0507] pH-敏感或带负电荷的脂质体包埋核酸而不与它复合。由于该核酸与该脂质是带类似的电荷,所以形成排斥而不是复合。然而,某种核酸包埋于这些脂质体的含水内部。pH-敏感脂质体已经用来递送编码胸苷激酶基因的核酸至培养的细胞单层。在靶细胞内检测到外源基因的表达(周(Zhou)等人,控制释放期刊,1992,19,269-274)。

[0508] 脂质体组合物的一个主要类型包括除了天然来源的磷脂酰胆碱以外的磷脂。例如中性脂质体组合物可以从二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)中形成。阴离子脂质体组合物通常可以形成自二肉豆蔻酰磷脂酰甘油,而阴离子融合脂质体主要形成自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。另一个类型的脂质体组合物从磷脂酰胆碱(PC),例如像大豆PC和蛋PC中形成。另一个类型从磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物中形成。

[0509] 用于将脂质体体内和体外引入细胞中的其他方法的实例包括美国专利号5,283,185;美国专利号5,171,678;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;费尔格纳,生物化学杂志269:2550,1994;纳贝尔(Nabel),美国国家科学院院刊90:11307,1993;纳贝尔,人类基因治疗3:649,1992;格申(Gershon),生物化学32:7143,1993;以及施特劳斯(Strauss)EMBO杂志11:417,1992。

[0510] 还已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,具体地包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包括Novasome<sup>TM</sup> I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)以及Novasome<sup>TM</sup> II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)的非离子型脂质体配制品用于将环孢霉素A递送入小鼠皮肤的真皮。结果表明这类非离子型脂质体系统有效促进环孢菌素A沉积至皮肤的不同层中(胡(Hu)等人,S.T.P.制药科学

(S.T.P.Pharm.A Sci.) ,1994,4,6,466)。

[0511] 脂质体还包括“立体化学稳定的”脂质体,这个术语如在此所使用的指包括一种或多种专门化脂质的脂质体,当并入脂质体中时这些脂质导致相对于缺少此类专门化脂质的脂质体而言的增加的循环寿命。立体化学稳定的脂质体的实例是以下那些:在其中该脂质体的形成囊泡的脂质部分中的一部分(A)包括一种或多种糖脂,例如单唾液酸神经节苷酯G<sub>M1</sub>,或者(B)是用一种或多种亲水聚合物衍生,例如聚乙二醇(PEG)部分。虽然不希望受任何具体理论约束,但在本领域中认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG-衍生化的脂质的空间稳定的脂质体,这些空间稳定的脂质体的循环半衰期提高来源于进入网状内皮系统(RES)的细胞中的摄取减少(艾伦(Allen)等人,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Letters),1987,223,42;吴等人,癌症研究(Cancer Research),1993,53,3765)。

[0512] 包含一种或多种糖脂的不同脂质体是本领域中已知的。帕帕哈都久珀罗斯(Papahadjopoulos)等人(纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.),1987,507,64)报道了单唾液酸神经节苷酯G<sub>M1</sub>、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半衰期的能力。这些研究结果由加比宗(Gabizon)等人(美国国家科学院院刊),1988,85,6949)阐释。均为艾伦等人的美国专利号4,837,028和W0 88/04924披露了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂G<sub>M1</sub>或硫酸半乳糖脑苷脂的脂质体。美国专利号5,543,152(韦伯(Webb)等人)披露了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻磷脂酰胆碱的脂质体在W0 97/13499(利姆(Lim)等人)中披露。

[0513] 在一个实施例中,使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够融合至细胞膜的优势。非阳离子脂质体尽管不能够一样有效地与质膜融合,但是可以被体内巨噬细胞摄取,并且可以用来将iRNA试剂递送到巨噬细胞中。

[0514] 脂质体的其他优点包括;从天然磷脂获得的脂质体是生物相容的且生物可降解的;脂质体可以并入广泛类型的水溶性和脂溶性药物;脂质体可以在其内部区室中保护封装的iRNA试剂免受代谢和降解(洛索夫(Rosoff),“药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)”,利伯曼(Lieberman)、列赫尔(Rieger)与班克(Banker)(编著),1988,卷1,第245页)。在制备脂质体配制品方面的重要的考虑是脂质表面电荷、囊泡尺寸以及这些脂质体的水性体积。

[0515] 可以使用一种带正电荷的合成阳离子脂质,N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)以形成小的脂质体,其自发地与核酸相互作用形成脂质-核酸复合物,这些复合物能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电荷的脂质融合,导致递送iRNA试剂(参见,例如费尔格纳P.L.等人,美国国家科学院院刊8:7413-7417,1987和美国专利号4,897,355,关于DOTMA以及其与DNA一起使用的说明)。

[0516] 可以将一种DOTMA类似物、1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨基)丙烷(DOTAP)与磷脂组合使用形成DNA络合囊泡。Lipofectin™(毕士大研究实验室,盖瑟斯堡,马里兰州),是一种有效试剂,用于递送高度阴离子性核酸到活组织培养细胞中,这些细胞包括带正电荷的DOTMA脂质体,其自发地与带负电荷的多核苷酸相互作用以形成复合物。当使用足够的带正电荷的脂质体时,所得复合物的净电荷也为正。以这种方式制备的带正电荷的复合物自发地附接到带负电荷的细胞表面上,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送到例如组织培养物细胞中。另一种可商购的阳离子脂质体1,2-双(油酰氧基)-3,3-(三甲基氨基)丙烷

(“DOTAP”)(宝灵曼公司(Boehringer Mannheim),印第安纳波利斯,印第安纳州)不同于DOTMA在于该油酰基部分被酯连接而不是醚连接。

[0517] 其他报道的阳离子脂质化合物包括已共轭至多个部分的那些,包括例如已共轭至两种类型的脂质中的一种的羧基精胺,并且包括化合物如5-羧基精胺基甘氨酸二辛油酰基酰胺(“DOGS”)(Transfectam<sup>TM</sup>,普洛麦格公司(Promega),麦迪逊,威斯康星州)以及二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基精胺基-酰胺(“DPPES”)(参见例如美国专利号5,171,678)。

[0518] 另一种阳离子脂质共轭物包括用胆固醇(“DC-Chol”)对该脂质进行的衍生,其已被配制成脂质体与DOPE的组合(参见高(Gao),X和黄(Huang),L.,生物化学与生物物理学研究通讯179:280,1991)。通过将聚赖氨酸共轭至DOPE制成的脂质聚赖氨酸已被报道在血清存在下是有效于转染的(周(Zhou),X等人,生物化学和生物物理学报1065:8,1991)。对于某些细胞系,这些含有共轭阳离子脂质的脂质体据说显示出较低的毒性,并且比含DOTMA组合物提供更有效的转染。其他可商购的阳离子脂质产品包括DMRIE和DMRIE-HP(维考(Vical),拉霍亚(La Jolla),加利福尼亚州)和Lipofectamine(DOSPA)(生命科技公司(Life Technology, Inc.),盖瑟斯堡,马里兰州)。适合用于寡核苷酸的递送的其他阳离子脂质被描述于WO 98/39359和WO 96/37194中。

[0519] 脂质体配制品特别适用于局部给予,脂质体比其他配制品呈现若干优势。这些优势包括:减少的与所给予药物的高全身性吸收相关的副作用、在希望的靶标处所给予药物的增加的积累、以及将iRNA试剂给予进入皮肤的能力。在一些实施例中,脂质体用于将iRNA试剂递送到表皮细胞,并且也用以增强iRNA试剂向真皮组织(例如皮肤)的渗入。例如,可以局部应用这些脂质体。已经记录了配制为脂质体的药物至皮肤的局部递送(参见,例如温纳(Weiner)等人,药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting),1992,卷2,405-410和杜普莱西斯(Plessis)等人,抗病毒研究(Antiviral Research),18,1992,259-265;曼尼诺(Mannino),R.J.和福尔德-福格利特(Fould-Fogerite),S.,生物技术(Biotechniques)6:682-690,1988;伊塔尼(Itani),T.等人,基因56:267-276,1987;尼古劳(Nicolau),C.等人,酶学方法(Meth. Enz.)149:157-176,1987;施特劳宾格(Straubinger),R.M.和帕帕哈都久珀罗斯D.,酶学方法101:512-527,1983;王C.Y.和黄L.,美国国家科学院院刊84:7851-7855,1987)。

[0520] 还已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,具体地包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包括Novasome I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)以及Novasome II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)的非离子型脂质体配制品用于将一种药物递送入小鼠皮肤的真皮。具有iRNA试剂的这类配制品适用于治疗皮肤病学失调。

[0521] 包括iRNA的脂质体可以被制成高度可变形的。这样的变形可以使脂质体能够通过比该脂质体的平均半径小的孔渗透。例如传递体是一种可变形的脂质体的类型。传递体可以通过将表面边缘活化剂(通常为表面活性剂)添加到一种标准的脂质体组合物中制成。包含iRNA试剂的传递体可以例如通过皮下地感染被递送以将iRNA试剂递送到皮肤中的角质形成细胞中。为了跨过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适合的透皮梯度的影响下穿过一系列的细孔,每一孔具有小于50nm的直径。此外,由于这些脂质特性,这些传递体可以是自优化的(适应例如皮肤中的孔的形状)、自我修复性的,并且可频繁地到达它们的靶标。

而不片段化，并且通常是自我负载性的。

[0522] 属于本发明的其他配制品描述在2008年1月2日提交的美国临时申请序列号61/018,616;2008年1月2日提交的美国临时申请序列号61/018,611;2008年3月26日提交的美国临时申请序列号61/039,748;2008年4月22日提交的美国临时申请序列号61/047,087以及2008年5月8日提交的美国临时申请序列号61/051,528。2007年10月3日提交的PCT申请号PCT/US2007/080331还描述了属于本发明的配制品。

[0523] 传递体是又另一种类型的脂质体，并且是高度可变形的脂质聚集体，它们是用于药物递送媒介物的引人注目的候选物。传递体可以被描述为脂滴，其是高度可变形从而它们能够容易地穿过比该脂滴更小的孔。传递体能适应在其中使用它们的环境，例如它们是自优化性的(能适应皮肤中孔的形状)、自我修复性的、频繁地到达它们的靶标而不片段化，并且通常是自我负载性的。为了制备传递体，可能的是将表面边缘激活剂(通常是表面活性剂)添加至一种标准的脂质体组合物。传递体已经被用于将血清白蛋白递送至皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已经显示与包含血清白蛋白的溶液的皮下注射同样有效。

[0524] 表面活性剂在配制品如乳剂(包括微乳剂)和脂质体中有广泛应用。对许多不同类型的表面活性剂(天然的和合成的两者)的特性进行分类并评级的最普通的方法是通过使用亲水/亲油平衡值(HLB)。亲水基团(又称为“头部”)的性质为对用于配制品中的不同表面活性剂进行归类提供了最有用的手段(列赫尔，“药物剂型”，马塞尔德克公司(Marcel Dekker, Inc.)，纽约州纽约(New York, N.Y.)，1988,第285页)。

[0525] 如果该表面活性剂分子没有离子化，它被分类为一种非离子型表面活性剂。发现非离子型表面活性剂在药物与化妆品产品方面有广泛应用并且能够在广泛的pH范围使用。总体上，取决于它们的结构，它们的HLB值范围为从2至大约18。非离子型表面活性剂包括非离子型酯，例如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯以及乙氧基化酯。非离子型烷醇酰胺以及醚(例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇、以及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物)也包括在这一类别中。聚氧乙烯表面活性剂是该非离子型表面活性剂类别中最常用的成员。

[0526] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带负电荷，则该表面活性剂被分类为阴离子型。阴离子型表面活性剂包括羧化物(例如皂)、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯(例如烷基硫酸酯以及乙氧基化的烷基硫酸酯)、磺酸酯(例如烷基苯磺酸酯、酰基羟乙基磺酸酯、酰基牛磺酸酯以及磺基琥珀酸酯)、以及磷酸酯。该阴离子型表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸酯和皂类。

[0527] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带正电荷，则该表面活性剂被分类为阳离子型。阳离子型表面活性剂包括季铵盐以及乙氧基化胺。这些季铵盐是这一类别的最常用的成员。

[0528] 如果该表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力，该表面活性剂被分类为两性型。两性型表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱以及磷脂。

[0529] 已经综述了表面活性剂在药品、配制品和在乳剂中的用途(列赫尔，“药物剂型”，马塞尔德克公司，纽约州纽约，1988,第285页)。

[0530] 用于在本发明的方法中使用的iRNA也可提供为胶束配制品。“胶束”在此定义为一种特定类型的分子集合体，其中两亲性分子排列在一个球形结构中，使得这些分子的所有

疏水部分向内定向,而使亲水部分与周围的水相接触。如果环境是疏水性的,则存在相反的排列。

[0531] 适合用于通过透皮的膜递送的混合胶束配制品可以通过混合该siRNA组合物的水溶液、碱金属C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>烷基硫酸盐以及胶束形成化合物来制备。示例性的胶束形成化合物包括卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、油酸单甘油酯、单油酸酯、单月桂酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧胆烷基甘氨酸和其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚及其类似物、聚多卡醇烷基醚及其类似物、鹅脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐、及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸盐的同时或之后添加。混合胶束会随着基本上任何种类的这些成分的混合(但剧烈的混合)形成,以提供更小尺寸的胶束。

[0532] 在一个方法中,制备一种第一胶束组合物,其包含该siRNA组合物以及至少该碱金属烷基硫酸盐。然后将该第一胶束组合物与至少三种胶束形成化合物混合,以形成混合胶束组合物。在另一种方法中,该胶束组合物是通过将该siRNA组合物、碱金属烷基硫酸盐和至少一种胶束形成的化合物混合,然后添加剩余的胶束形成化合物(剧烈混合下)来制备。

[0533] 可将苯酚和/或间甲酚添加到该混合胶束组合物中以稳定该配制品并防止细菌生长。可替代地,可随着胶束形成成分一起添加苯酚和/或间甲酚。也可以在该混合胶束组合物形成之后加入等渗剂,如甘油。

[0534] 对于作为喷雾的胶束配制品的递送,该配制品可被装入气溶剂分配器中并将该分配器用推进剂填充。在该分配器中推进剂(其在压力下)处于液体形式。对各成分的比例进行调整,以便使该水相和推进剂相成为一体,即存在一个相。如果有两个相,有必要在分配这些内容物的部分(例如通过计量阀)之前摇动该分配器。药物试剂的分配量是从计量阀中以细雾推进。

[0535] 推进剂可以包括含氢氯氟烃、含氢氟烃、二甲醚和二乙醚。在某些实施例中,也可以使用HFA 134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0536] 这些必需成分的特定浓度可以通过相对简单的实验来确定。对于经口腔的吸收,通常希望的是增加例如至少两倍或三倍的对于通过经胃肠道注射或给予的剂量。

[0537] B. 脂质颗粒

[0538] RNA,例如本发明的dsRNA可以被完全封装在脂质配制品(例如LNP或其他核酸-脂质颗粒)中。

[0539] 如在此所使用,术语“LNP”是指一种稳定的核酸-脂质颗粒。LNP典型地含有阳离子脂质、非阳离子脂质以及防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质共轭物)。LNP对于合成应用是极其有用的,因为它们展示出在静脉内(i.v.)注射之后延长的循环寿命并且在远端位点积累(例如在与给予位点物理分开的位点)。LNP包括“pSPLP”,该pSPLP包括如在PCT公开号W0 00/03683中列举的一种包囊的缩合剂-核酸复合物。本发明的颗粒典型地具有约50nm至约150nm,更典型地是约60nm至约130nm,更典型地是约70nm至约110nm,最典型地是约70nm至约90nm的平均直径,并且基本上是无毒的。另外,当出现在本发明的核酸-脂质颗粒中时,这些核酸在水溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒及其制备方法在例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;美国公开号2010/0324120以及PCT公开号W0 96/40964中披露。

[0540] 在一个实施例中,脂质与药物的比率(质量/质量比率)(例如脂质与dsRNA的比率)将处于从约1:1至约50:1,从约1:1至约25:1,从约3:1至约15:1,从约4:1至约10:1,从约5:1至约9:1,或约6:1至约9:1的范围内。以上引用的范围的范围中间值也意在成为本发明的部分。

[0541] 阳离子脂质可以例如N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(I-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酸基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油烯基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-二亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1-二亚油烯基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.C1)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.C1)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪代)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺(ALN 100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-(2-(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇(Tech G1)或其混合物。该阳离子脂质可以占该颗粒中存在的总脂质的从约20mol%至约50mol%或约40mol%。

[0542] 在另一个实施例中,化合物2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可以用来制备脂质-siRNA纳米颗粒。2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环的合成描述于2008年10月23日提交的美国临时专利申请号61/107,998中,将其通过引用结合于此。

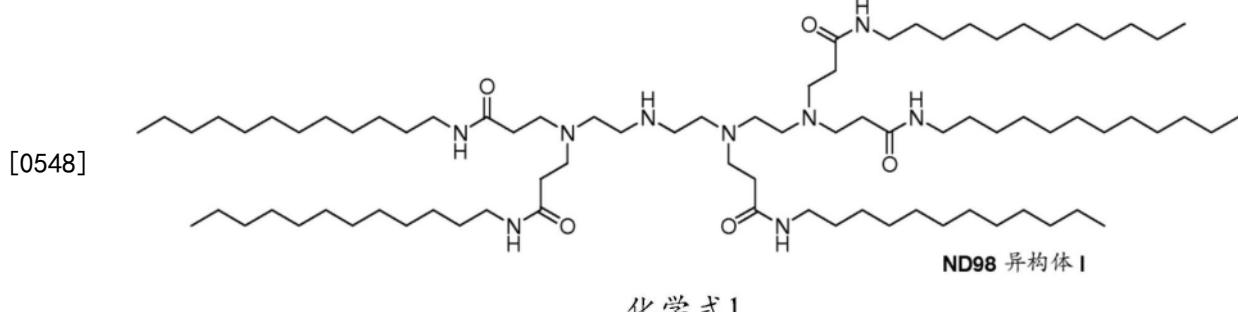
[0543] 在一个实施例中,该脂质-siRNA颗粒包括40%2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环:10%DSPC:40%胆固醇:10%PEG-C-DOMG(摩尔百分数),颗粒尺寸在63.0±20nm,并且具有0.027siRNA/脂质比率。

[0544] 该可电离的/非阳离子脂质可以是一种阴离子脂质或一种中性脂质,包括但不限于:二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-ma1)、二棕榈酰磷脂酰基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-一甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇,或其混合物。非阳离子脂质(如果包括胆固醇的话)可以占该颗粒中存在的总脂质的从约5mol%至约90mol%,约10mol%,或约58mol%。

[0545] 抑制颗粒聚集的共轭脂质可以是例如一种聚乙二醇(PEG)-脂质,其包括但不限于PEG-二酰甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer),或其混合物。PEG-DAA共轭物可以是,例如PEG-二月桂基氧丙基( $C_{12}$ )、PEG-二肉豆蔻基氧丙基( $C_{14}$ )、PEG-二棕榈基氧丙基( $C_{16}$ )或PEG-二硬脂基氧丙基( $C_{18}$ )。防止颗粒聚集的共轭脂质可以占颗粒中存在的总脂质的从0mol%至约20mol%或约2mol%。

[0546] 在一些实施例中,核酸-脂质颗粒进一步包括胆固醇,该胆固醇例如占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约60mol%或约48mol%。

[0547] 在一个实施例中,利匹哆异德(lipidoid)ND98.4HCl(MW 1487)(参见2008年3月26日提交的美国专利申请号12/056,230,通过引用结合在此)、胆固醇(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))以及PEG-神经酰胺C16(阿文蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids))可以用来制备脂质-dsRNA纳米颗粒(即,LNP01颗粒)。可以如下制备每种组分在乙醇中的母液:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml;PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。然后可以例如42:48:10摩尔比组合ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16储备溶液。合并的脂质溶液可以与(例如pH5乙酸钠中的)水性dsRNA混合,这样使得最终乙醇浓度是约35%-45%并且最终乙酸钠浓度是约100-300mM。一旦混合,脂质-dsRNA纳米颗粒典型地自发形成。取决于所需的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,如Lipex挤出机(北部脂质公司(Northern Lipids, Inc)),经聚碳酸酯膜(例如100nm截值)挤出所产生的纳米颗粒混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切线流过滤实现乙醇去除和同时交换缓冲液。缓冲液可以与例如在约pH 7,例如约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4下的磷酸盐缓冲的盐水(PBS)交换。



化学式I

[0549] LNP01配制品例如在国际申请公开号WO 2008/042973中描述,将其通过引用结合在此。

[0550] 另外的示例性脂质-dsRNA配制品被描述于表1中。

[0551] 表1

		可电离的/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质共轭物 脂质 : siRNA比率
[0552]	SNALP-1	1,2-二亚油烯基氨基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质 : siRNA 大约 7:1
	2-XTC	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质 : siRNA 大约 7:1
	LNP05	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质 : siRNA 大约 6:1
	LNP06	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质 : siRNA 大约 11:1
	LNP07	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG

	[1,3]-二氧戊环 (XTC)	60/7.5/31/1.5, 脂质 : siRNA 大约 6:1	
LNP08	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质 : siRNA 大约 11:1	
LNP09	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA 10:1	
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N- 二 甲 基 -2,2- 二 ((9Z,12Z)- 十 八 -9,12- 二 烯 基 ) 四 氢 -3 aH- 环 戊 [d][1,3] 间 二 氧 杂 环 戊 烯 -5- 胍 (ALN100)	ALN100/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA 10:1	
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)- 三 十 七 碳 -6,9,28,31-四 烯 -19- 基 4-(二 甲 基 氨 基) 丁 酸 酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA 10:1	
[0553]	LNP12	1,1'-2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氯烷二基)双十二烷-2-醇 (Tech G1)	Tech G1/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA 10:1
	LNP13	XTC	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 33:1
	LNP14	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质 : siRNA: 11:1
	LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质 : siRNA: 11:1
	LNP16	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 7:1
	LNP17	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 10:1
	LNP18	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 12:1
	LNP19	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质 : siRNA: 8:1

	LNP20	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 10 : 1
[0554]	LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 7 : 1
	LNP22	XTC	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 10 : 1

[0555] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0556] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱

[0557] PEG-DMG:PEG-双二肉豆蔻酰甘油(C14-PEG,或PEG-C14)(平均分子量为2000的PEG)

[0558] PEG-DSG:PEG-二苯乙烯基甘油(C18-PEG,或PEG-C18)(平均分子量为2000的PEG)

[0559] PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氨基丙胺(平均分子量为2000的PEG)

[0560] 包含SNALP(1,2-二亚麻基氨基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的制剂描述于2009年4月15日提交的国际公开号WO 2009/127060中,通过引用将其结合于此。

[0561] 包括XTC的配制品描述于,例如,以下各项中:2009年1月29日提交的美国临时序列号61/148,366;2009年3月2日提交的美国临时序列号61/156,851;2009年6月10日提交的美国临时序列号;2009年7月24日提交的美国临时序列号61/228,373;2009年9月3日提交的美国临时序列号61/239,686以及2010年1月29日提交的国际申请号PCT/US2010/022614,将其通过引用特此结合。

[0562] 包含MC3的配制品描述于,例如2010年6月10日提交的美国公开号2010/0324120,其全部内容通过引用特此结合。

[0563] 包含ALNY-100的配制品描述于例如以下中:例如,2009年11月10日提交的国际专利申请号PCT/US 09/63933,将其通过引用特此结合。

[0564] 包含C12-200的配制品描述于例如以下各项中:2009年5月5日提交的美国临时序列号61/175,770以及2010年5月5日提交的国际申请号PCT/US 10/33777,将其通过引用特此结合。

[0565] 可电离的/阳离子脂质的合成

[0566] 在本发明的核酸-脂质颗粒中使用的任何化合物,例如阳离子脂质等可以通过已知的有机合成技术(包括在实例中更详细描述的方法)制备。除非另外指明,否则全部取代基如下文定义。

[0567] “烷基”意指包含从1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状的饱和脂肪族烃。代表性饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等;而饱和支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和环状烷基包括环戊烯基和环己烯基等。

[0568] “烯基”意指在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如上所定义的烷基。烯基包括顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁

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

[0569] “炔基”意指在相邻碳之间另外含有至少一个三键的如上所定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0570] “酰基”是指任何烷基，烯基或炔基，其中，在附接点的碳被氧化基团取代，如下所定义。例如，-C(=O)烷基、-C(=O)烯基和-C(=O)炔基是酰基。

[0571] “杂环”意味着一个5-至7-元单环、或7-至10-元二环的杂环，它是饱和的、不饱和的或芳香族的，并且它包含独立地选自氮、氧、和硫的从1或2个杂原子，并且其中该氮和硫杂原子可以是任选地氧化的，并且该氮杂原子可以任选地是季铵化的，包括双环，其中上述杂环的任一个被稠合至一个苯环。杂环可以经由任何杂原子或碳原子附接。杂环包括如下文定义的杂芳基。杂环包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基(piperizynyl)、乙内酰脲基(hydantoinyl)、戊内酸胺基(valerolactamyl)、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

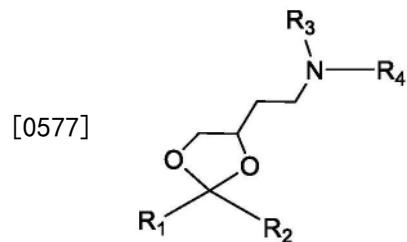
[0572] 术语“任选取代的烷基”，“任选取代的烯基”，“任选取代的炔基”，“任选取代的酰基”和“任选被取代的杂环”是指，当取代时，至少一个氢原子被一个取代基置换。在氧化取代基(=O)的情况下，两个氢原子被置换。在这方面，取代基包括氧化、卤素、杂环、-CN、-ORx、-NRxRy、-NRxC(=O)Ry、-NRxS02Ry、-C(=O)Rx、-C(=O)ORx、-C(=O)NRxRy、-S0nRx以及-S0nNRxRy，其中n是0、1或2，Rx和Ry是相同或不同的并且独立地是氢、烷基或杂环，并且所述烷基和杂环取代基的每一个可以进一步由以下取代基的一种或多种取代：氧化、卤素、-OH、-CN、烷基、-ORx、杂环、-NRxRy、-NRxC(=O)Ry、-NRxS02Ry、-C(=O)Rx、-C(=O)ORx、-C(=O)NRxRy、-S0nRx以及-S0nNRxRy。

[0573] “卤素”是指氟、氯、溴、以及碘。

[0574] 在一些实施例中，本发明的方法可能需要使用保护基。保护基方法是本领域技术人员熟知的(参见，例如有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)，格林(Green)T.W.等人，威利数字出版平台(Wiley-Interscience)，纽约市，1999)。简言之，本发明上下文中的保护基是降低或消除不希望的官能团反应性的任何基团。可以将保护基添加到官能团以掩蔽其在某些反应过程中的反应性并且随后将其移除以暴露原始官能团。在一些实施例中，使用“醇保护基”。“醇保护基”是减少或消除不希望的醇官能团反应性的任何基团。保护基团可以使用本领域中公知的技术添加和去除。

[0575] 化学式A的合成

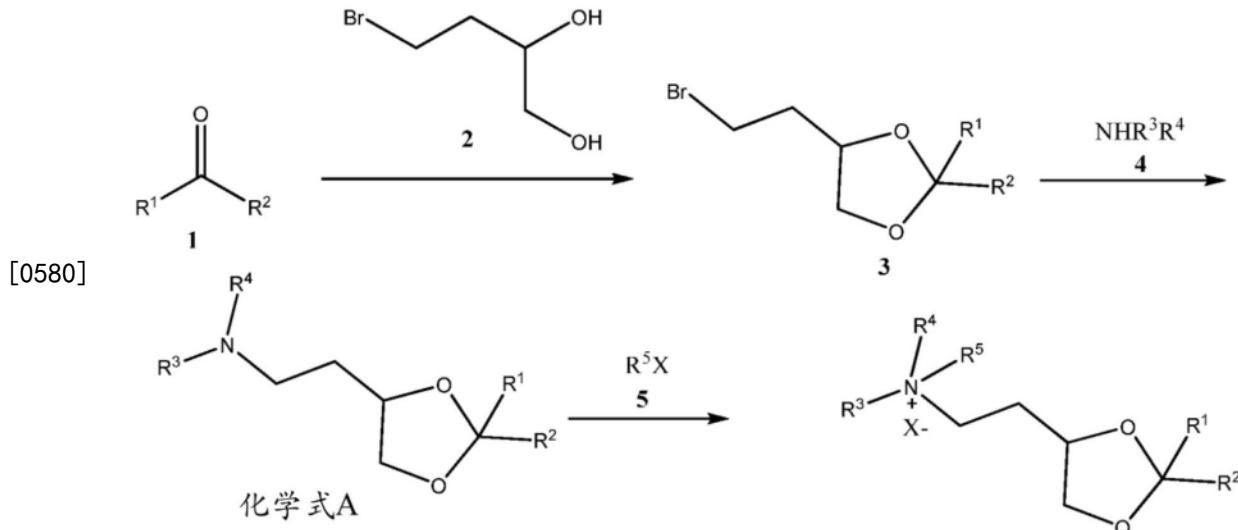
[0576] 在一些实施例中，使用化学式A的阳离子脂质配制本发明的核酸-脂质颗粒：



[0578] 其中R1和R2独立地是烷基、烯基或炔基，每种可以是任选取代的，并且R3和R4独立地是低级烷基或R3和R4可以是一起形成任选取代的杂环。在一些实施例中，阳离子脂质是

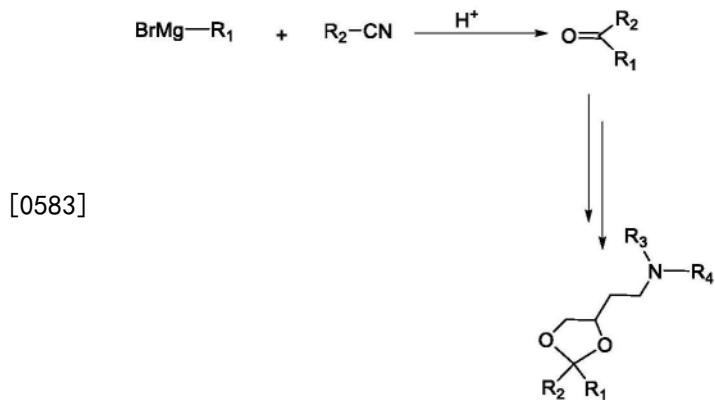
XTC (2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)。通常,可以通过以下反应方案1或2产生以上化学式A的脂质,其中除非另外指明,否则全部取代基如上文定义。

[0579] 方案1



[0581] 根据方案1制备脂质A,其中R1和R2独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且R3和R4独立地是低级烷基或R3和R4可以一起形成任选取代的杂环。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备酮1和溴化物2。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3产生化学式A的脂质。化学式A的脂质可以用化学式5的有机盐转化成相应的铵盐,其中X是选自卤素、氢氧化物、磷酸根、硫酸根等的阴离子反离子。

[0582] 方案2



[0584] 可选地,可以根据方案2制备酮1原料。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备格氏(Grignard)试剂6和氰化物7。6和7的反应产生酮1。如方案1中所述,酮1转化成化学式A的相应脂质。

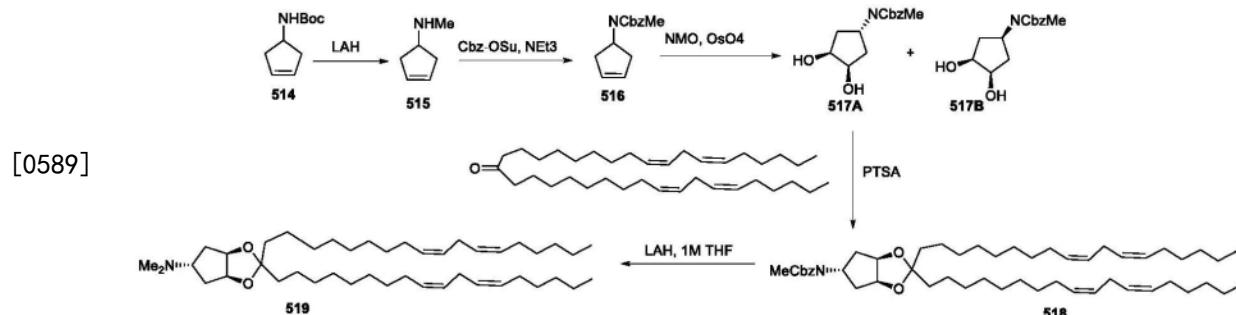
[0585] MC3的合成

[0586] 如下制备DLin-M-C3-DMA(即,(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲氨基)丁酸酯)。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g)、4-N,N-二甲氨基丁酸盐酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲氨基吡啶(0.61g)以及1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.53g)在二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温搅拌过夜。将该溶液用稀盐酸洗涤,随后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机部分在无水硫酸镁上干燥,过滤并且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1%-5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度,使残余物

穿过硅胶柱(20g)。合并包含纯化产物的级分并且移除溶剂,产生无色油(0.54g)。

[0587] ALNY-100的合成

[0588] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:



[0590] 515的合成

[0591] 在0℃在氮气气氛下向双颈RBF(1L)中LiAlH4(3.74g, 0.09852mol)在200mL无水THF中的搅拌悬浮液缓慢添加514(10g, 0.04926mol)在70mLTHF中的溶液。在完全添加之后,将反应混合物加温至室温并且然后加热至回流,持续4h。通过TLC监测反应的进展。在完成反应(借助TLC监测)后,将混合物冷却至0℃并且通过小心添加饱和Na2S04溶液淬灭。将反应混合物在室温搅拌4小时并滤出。将残余物用THF充分洗涤。将滤液和洗涤液混合并用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并且在室温搅拌20分钟。在真空下剥离挥发物以提供作为白色固体的盐酸盐515。产率:7.12g 1H-NMR(DMSO, 400MHz): $\delta$ =9.34(宽, 2H), 5.68(s, 2H), 3.74(m, 1H), 2.66-2.60(m, 2H), 2.50-2.45(m, 5H)。

[0592] 516的合成

[0593] 向250mL双颈RBF中化合物515在100mL无水DCM中的搅拌溶液中添加NEt3(37.2mL, 0.2669mol)并在氮气气氛下冷却至0℃。在缓慢添加50mL无水DCM中的N-(苯氧羰基)-琥珀酰亚胺(20g, 0.08007mol)后,允许反应混合物加温到室温。在反应完成(通过TLC监测2-3小时)之后,用1N HCl溶液(1×100mL)和饱和NaHC03溶液(1×50mL)连续洗涤混合物。随后在无水Na2S04上干燥有机层并且蒸发溶剂以产生粗制材料,该粗制材料通过硅胶柱色谱法纯化以获得作为粘性物质的516。产率:11g (89%)。1H-NMR(CDC13, 400MHz): $\delta$ =7.36-7.27(m, 5H), 5.69(s, 2H), 5.12(s, 2H), 4.96(br., 1H) 2.74(s, 3H), 2.60(m, 2H), 2.30-2.25(m, 2H)。LC-MS [M+H]<sup>+</sup>-232.3 (96.94%)。

[0594] 517A和517B的合成

[0595] 将环戊烯516(5g, 0.02164mol)溶解于单颈500mL RBF中的220mL丙酮和水(10:1)的溶液内,并且在室温向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g, 0.06492mol),随后添加叔-丁醇中的4.2mL 7.6% Os04溶液(0.275g, 0.00108mol)。在反应结束(约3小时)后,将混合物通过添加固体Na2S03淬灭并且将所产生的混合物在室温搅拌1.5小时。将反应混合物用DCM(300mL)稀释并且用水(2×100mL)洗涤,随后用饱和NaHC03(1×50mL)溶液、水(1×30mL)并最终用盐水(1×50mL)洗涤。在无水Na2S04上干燥有机相并且在真空中移除溶剂。粗制材料的硅胶柱色谱法纯化提供了非对映异构体的混合物,这些非对映异构体由制备级HPLC分离。产率:约6g粗制物

[0596] 517A-峰-1(白色固体), 5.13g (96%)。1H-NMR(DMSO, 400MHz): $\delta$ =7.39-7.31(m, 5H), 5.04(s, 2H), 4.78-4.73(m, 1H), 4.48-4.47(d, 2H), 3.94-3.93(m, 2H), 2.71(s, 3H),

1.72-1.67 (m, 4H)。LC-MS- [M+H] - 266.3, [M+NH4+] - 283.5存在, HPLC- 97.86%。通过X射线证实立体化学。

[0597] 518的合成

[0598] 使用与被描述用于合成化合物505的方法类似的方法,获得呈无色油状物的化合物518 (1.2g, 41%)。1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : δ = 7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (br m, 36H), 0.87 (m, 6H) HPLC-98.65%。

[0599] 用于合成化合物519的一般方法

[0600] 将化合物518(1当量)在己烷 (15mL) 中的溶液以逐滴方式添加至LAH在THF (1M, 2当量) 中的冰冷溶液中。在完成添加之后,将混合物在40°C下加热0.5h,然后在冰浴上再次冷却。将混合物用饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液小心地水解,然后经硅藻土 (celite) 过滤并且缩减成油状物。柱色谱法提供呈无色油状物获得的纯519 (1.3g, 68%)。<sup>13</sup>C NMR δ = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 226, 14.1; 电喷雾MS (+ve) : C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>0</sub>2 (M+H)<sup>+</sup>的计算分子量为654.6, 观察到分子量为654.6。

[0601] 通过标准或非挤出方法制备的配制品可以按类似的方式来表征。例如配制品典型地通过视觉检查来进行表征。它们应该是发白的半透明溶液,无聚集物或沉淀。脂质纳米颗粒的粒径和粒径分布可以使用例如马尔文 (Malvern) Zetasizer Nano ZS (马尔文公司 (Malvern), USA) 通过光散射来进行测量。颗粒应该是约20-300nm, 例如尺寸是40-100nm。该粒径分布应该是单峰的。配制品中的总dsRNA浓度以及捕获的片段是使用染料排除测定来评估。配制的dsRNA的样品可以与RNA结合染料如Ribogreen (分子探针公司 (Molecular Probes)) 在配制品破坏性表面活性剂 (例如0.5% Triton-X100) 存在或不存在下孵育。配制品中的总dsRNA可以相对于标准曲线,通过来自含有表面活性剂的样品的信号来确定。该捕获的片段是通过将“游离”dsRNA内含物 (如通过在表面活性剂不存在下的信号所测量的) 从该总dsRNA内含物中减去来确定。包埋的dsRNA的百分比典型地>85%。对于SNALP配制品而言,颗粒尺寸是至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm、以及至少120nm。适合的范围典型地是约至少50nm至约至少110nm、约至少60nm至约至少100nm、或约至少80nm至约至少90nm。

[0602] 用于口服给予的组合物和配制品包括粉剂或颗粒剂、微粒剂、纳米颗粒剂、在水或非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或迷你片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可以是希望的。在一些实施例中,口服配制品是以下那些:其中在本发明中体现的dsRNA与一种或多种渗透增强剂表面活性剂以及螯合剂结合地给予。适合的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆酸/盐包括鹅脱氧胆酸 (CDCA) 以及乌索脱氧胆酸 (UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡糖胆酸、甘油胆酸、甘油脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-梭链孢酸钠以及甘油二氢梭链孢酸钠。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、一种酰基肉毒碱、一种酰基胆碱、或一种

甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如钠盐)。在一些实施例中,渗透增强剂的组合(例如脂肪酸/盐)是与胆汁酸/盐组合使用。一个示例性的组合是月桂酸、羊蜡酸以及UDCA的钠盐。其他渗透促强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。本发明表征的dsRNA可以口服递送,以包括喷雾干燥颗粒的颗粒剂的形式递送,或者复合成微颗粒或纳米颗粒。DsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸烷基酯、聚氧乙烷(polyoxethane)、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生化聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。合适的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如p-氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-异丁烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白与DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻朊酸盐、以及聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服配制品及其制备在美国专利6,887,906、美国公开号20030027780以及美国专利号6,747,014中详述,这些文献的每一个通过引用结合在此。

[0603] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内给药的组合物和配制品可以包括无菌水溶液,其也可以包含缓冲液、稀释剂及其他适当的添加剂,例如但不限于:渗透增强剂、载体化合物及其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0604] 本发明的药用组合物包括但不限于溶液、乳剂、以及含脂质体配制品。这些组合物可以产生自多种组分,这些组分包括但不限于预成形的液体、自乳化固体以及自乳化半固体。特别优选的是当治疗肝脏病症(例如肝癌)时靶向肝脏的配制品。

[0605] 本发明的药物配制品(可以方便地以单位剂量型存在)可以根据医药工业内熟知的常规技术来制备。此类技术包括以下这样的步骤:将这些活性成分与该(这些)药物载体或赋形剂进行联合。总体而言,这些配制品是通过以下步骤来制备:使这些活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或它们两者均匀地且精细地联合,并且如果需要,进而将产品成形。

[0606] 本发明的这些组合物可以被配制成任何许多可能的剂型,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂以及灌肠剂。本发明的这些组合物还可以被配制为在水性、非水性或混合性介质中的混悬液。水性悬浮液可以进一步包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该混悬液还可以含有稳定剂。

[0607] C. 另外的配制品

[0608] i. 乳剂

[0609] 可以将本发明的组合物制备和配制为乳剂。乳剂典型地是一种液体以直径通常超过 $0.1\mu\text{m}$ 的液滴形式分散于另一种中的多相体系(参见,例如安赛尔(Ansel)的药物剂型与药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦LV.、波波维奇(Popovich)NG.以及安赛尔HC., 2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约州纽约;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页;洛索夫,药物剂型,利伯曼、列赫

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

[0610] 乳剂具有较小或没有热力学稳定性的特征。通常,乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或配制品的粘性保持这种形式。在乳液状软膏基质或膏剂的情况下,乳液的任一相可以为半固体或固体。其他稳定乳液的方式需要使用乳化剂,这些乳化剂可以合并到乳液的任一相中。乳化剂可以被广泛地分成四类:合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质以及精细分散的固体(参见例如,安塞尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安塞尔HC,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。

[0611] 合成表面活性剂,也称作表面活性试剂,已经发现在乳剂的配制中广泛应用并且已经在文献中综述(参见,例如安赛尔的药物剂型与药物传递系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安赛尔HC.,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;列赫尔,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第285页;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),马塞尔德克公司,纽约州纽约,1988,第1卷,第199页;表面活性剂典型地是两亲的,并且包含亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比率被称为亲水/亲油平衡值(HLB),并且它是配制品制备中分类和选择表面活性剂的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质:非离子、阴离子、阳离子和两亲分成不同类别(参见例如,安塞尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安赛尔HC,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;列赫尔,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第285页)。

[0612] 乳剂配制品中使用的天然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水特性,所以它们能够吸收水以形成w/o乳剂并仍然保持它们的半固体稠度,如无水羊毛脂和亲水凡士林。精细分散的固体也已经被用做优良的乳化剂,尤其是与表面活性剂组合和在粘性制剂中使用。这些包括极性无机固体,如重金属氢氧化物、非溶胀粘土如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石,高岭土、蒙脱土、胶状硅酸铝和胶状镁硅酸铝、颜料和非极性固体如碳或甘油基三硬脂酸酯。

[0613] 在乳液配制品中还包括多种非乳化材料，并且它们对乳液的特性有帮助。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(布洛克,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第335页;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。

[0614] 亲水胶体或水状胶体包括天然存在的树胶和合成的聚合物如多糖(如阿拉伯树胶、琼脂、藻酸、角叉菜聚糖、瓜耳胶、刺梧桐树胶和皇蓍胶),纤维素衍生物(如羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成的聚合物(如卡波姆胶、纤维素醚和羧基乙烯基聚合物)。这些物质在水中分散或溶胀形成胶状溶液,这些胶状溶液通过在分散相液滴的周围形成强的界面膜并通过增强外相的粘度来稳定乳剂。

[0615] 由于乳剂通常包含一些可以容易地支持微生物生长的成份如碳水化合物、蛋白、固醇和磷脂,所以这些配制品通常含有防腐剂。乳剂配制品中通常使用的防腐剂包括甲基对羟基苯甲酸酯、丙基对羟基苯甲酸酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。通常也将抗氧剂加入到乳剂配制品中,以预防配制品的变质。所用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,如生育酚,没食子酸烷基酯、丁化羟基茴香醚、丁化羟基甲苯,或还原剂如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,和抗氧化剂增效剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0616] 经由皮肤途径、口途径和肠胃外途径使用乳剂配制品和制造它们的方法已经在文献中综述(参见,例如安赛尔的药物剂型与药物传递系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安赛尔HC.,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。由于易于配制以及从吸收和生物利用度观点来看的有效性,用于口服递送的乳剂配制品已得到非常广泛地使用(参见,例如安赛尔的药物剂型与药物传递系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安赛尔HC.,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;洛索夫,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;艾迪升,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。基于矿物油的缓泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂属于经常作为o/w乳剂口服给予的物质。

[0617] ii. 微乳剂

[0618] 在本发明的一个实施例中,将iRNA和核酸的组合物配制为微乳剂。可以将微乳剂定义为水、油和两亲分子的体系,所述体系是光学各向同性和热力学稳定的单一液态溶液(参见例如,安赛尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安赛尔HC,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;洛索夫,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。典型地,微乳液是通过如下方法制备的系统:首先将油分散到表面活性剂水溶液中,然后加入足量的通常为中等链长度的醇的第四组分来形成透明系统。因此,微乳剂也被描述成由表面活性分子的界面膜稳定化的两种不能混合的液体的热力学稳定的各向同性的澄清分散系(朗(Leung)与纱(Shah),在:药物的受控释放:聚合物和聚集体系统(Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems),洛索夫M.编著,1989,VCH出版公司,纽约,第185-215页)。通常微乳剂通过包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质的三至五种组分的组

合来制备。微乳剂是为油包水(w/o)还是水包油(o/w)类型取决于所使用的油和表面活性剂的特性以及表面活性剂分子的极性头部和羟基尾的结构和几何包装(斯科特(Schott),雷明顿氏药物科学,麦克出版公司,伊斯顿,Pa.,1985,第271页)。

[0619] 已经广泛研究了利用相图的现象学方法并且该方法已经产生了为本领域普通技术人员所知的如何配制微乳剂的广泛知识(参见例如,安塞尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.以及安塞尔HC,2004,利平科特威廉姆斯&威尔金斯(第8版),纽约州纽约;洛索夫,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;布洛克,药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第335页)。与常规乳剂相比,微乳剂提供的优点是能将非水溶性药物溶解到自发形成的热力学稳定的液滴的配制品中。

[0620] 在微乳剂的制备中使用的表面活性剂包括但不限于单独的或与助表面活性剂组合使用的离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij96、聚氧乙烯油基醚、聚脂肪酸甘油酯、单月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(M0310)、单油酸六甘油酯(P0310)、五油酸六甘油酯(P0500)、单癸酸十甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(M0750)、一又二分之一油酸十甘油酯(S0750)(decaglycerol sequioleate)、十油酸十甘油酯(DA0750)。该辅助表面活性剂通常是短链醇如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,作用是通过渗透到表面活性剂膜中并由此在表面活性剂分子间产生空余空间来产生无序膜从而提高界面流动性。然而,微乳液可以不使用辅助表面活性剂来制备,并且无醇的自乳化微乳液系统是本领域中已知的。水相可以典型地是,但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于如多种材料,例如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯,中等链(C8-C12)的单、二和三甘油三酯,聚氧乙基化的甘油脂肪酸酯、脂肪醇,聚乙二醇化的甘油酯(polyglycolized glyceride),饱和的聚乙二醇化的C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0621] 从药物溶解和增强的药物吸收方面看,微乳剂是特别令人感兴趣的。已提议基于脂质的微乳剂(o/w和w/o二者)增强药物(包括肽)的口服生物利用度(参见例如美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;康斯坦丁尼德斯(Constantinides)等人,药学研究(Pharmaceutical Research),1994,11,1385-1390;瑞茨尔(Ritschel),实验与临床药理学方法与成果(Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.)1993,13,205)。微乳剂提供以下优点:改善药物溶解、保护药物免遭酶水解、可能因表面活性剂引起的膜流动性和通透性改变而增强药物吸收、易于制备、比固体剂型易于口服给予、临床效力改善和毒性减少(见例如美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;康斯坦丁尼德斯等人,药学研究,1994,11,1385;霍(Ho)等人,药学科学杂志(J.Pharm.Sci.),1996,85,138-143)。通常,当微乳液的组分在环境温度下混合在一起时,它们可以自发形成微乳液。当配制热不稳定的药物、肽或iRNA时,这可以是特别有利的。在化妆品和药物应用领域,微乳剂在活性组分的经皮递送中也是有效的。预期本发明的微乳剂组合物和配制品将促进iRNA和核酸从胃肠道的全身性吸收增加以及改善iRNA和核酸的局部细胞摄取。

[0622] 本发明的微乳剂还可以含有另外的组分和添加剂,如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(Gri113)、Labrasol、以及改善配制品特性并增强本发明的iRNA和核酸吸收的渗透增强剂。本发明的微乳剂中使用的渗透增强剂可以分成归于五大类中的一种:表面活性剂、脂肪酸、

胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂(李(Lee)等人,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页)。这些类别中的每一个已经在以上进行了讨论。

[0623] iii. 微颗粒

[0624] 本发明的iRNA试剂可以并入颗粒,例如微颗粒。微颗粒可以通过喷雾干燥来产生,但也可以通过其他方法包括冷冻干燥、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合来产生。

[0625] iv. 渗透增强剂

[0626] 在一个实施例中,本发明采用了不同渗透增强剂来实现向动物皮肤高效递送核酸,具体地iRNA。大多数药物以离子化形式和非离子化形式两者存在于溶液中。然而,通常只有脂溶的或亲脂的药物易于穿过细胞膜。已经发现,如果用渗透增强剂处理有待穿过的膜,甚至连非亲脂药物也可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂药物扩散穿过细胞膜以外,渗透增强剂还增强亲脂药物的渗透性。

[0627] 渗透增强剂可以被分成属于五个广泛分类中的一个,即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂(参见例如,马尔姆斯滕(Malmsten)M.药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),健康传播杂志(Informa Health Care),纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统锐评,1991,第92页)。以下更详细地描述了以上提及的渗透增强剂的类别中的每一个。

[0628] 表面活性剂(或“表面活性试剂”)为化学实体,当其溶解在水溶液中时,它能减少该溶液的表面张力或者水溶液和另一种液体之间的界面张力,结果是iRNA通过粘膜的吸收得到增强。除了胆汁盐和脂肪酸之外,这些渗透增强剂还包括例如月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚(参见例如马尔姆斯滕M.药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统锐评,1991,第92页;以及全氟化学乳剂如FC-43(高桥(Takahashi)等人,药物药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1988,40,252))。

[0629] 充当渗透增强剂的各种脂肪酸及其衍生物例如包括油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯(1-单油酰-外消旋-甘油)、二月桂精、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C1-20烷基酯(例如、甲基酯、异丙基酯和叔丁基酯)及其单和二甘油酯(即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(参见例如托乌托(Touitou),E.等人,药物递送的增强(Enhancement in Drug Delivery),CRC出版社,丹弗斯(Danvers),MA,2006;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页;马尔姆斯滕(Malmsten),M.治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;El哈里里(Hariri)等人,药房和药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1992,44,651-654)。

[0630] 胆汁的生理学作用包括促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如,马尔姆斯滕M.药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;布鲁顿(Brunton),第38章,引自:古德曼吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman&Gilman's The

Pharmacological Basis of Therapeutics), 第9版, 哈德曼(Hardman)等人编辑, McGraw-Hill公司, 纽约, 1996, 第934-935页)。不同天然的胆汁盐和它们的合成衍生物用作渗透增强剂。因此术语“胆汁盐”包括胆汁的任何天然存在的组分以及任何它们的合成衍生物。适合的胆盐包括, 例如, 胆酸(或其药学上可接受的钠盐、胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡糖胆酸(葡糖胆酸钠)、甘氨胆酸(甘氨胆酸钠)、甘氨脱氧胆酸(甘氨脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢褐霉酸钠(STDHF)、糖二氢褐霉酸钠以及聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE) (参见例如, 马尔姆斯滕M. 药物递送中的表面活性剂和聚合物, 健康传播杂志, 纽约州纽约, 2002; 李等人, 治疗性药物载体系统锐评, 1991, 第92页; 斯温雅德(Swinyard), 第39章, 雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第18版, 真纳罗(Gennaro)编辑, 麦克出版公司, 伊斯顿(Easton), 宾夕法尼亚州(Pa), 1990, 第782-783页; 村西(Muranishi), 治疗性药物载体系统锐评, 1990, 7, 1-33; 山本(Yamamoto)等人, 药理学与实验治疗学杂志(J. Pharm. Exp. Ther.), 1992, 263, 25; 山下(Yamashita)等人, 药物科学杂志, 1990, 79, 579-583)。

[0631] 与本发明有关使用的螯合剂可以定义为通过金属离子与其形成复合物将金属离子从溶液中除去的化合物, 结果是通过粘膜的iRNA的吸收得到加强。关于它们在本发明中作为增渗剂的应用, 因为多数特征化的DNA核酸酶需要二价金属离子用于催化并且因此可以被螯合剂抑制, 融合剂还具有充当DNase抑制剂的附加优势(加热特(Jarrett), 层析学杂志(J. Chromatogr.), 1993, 618, 315-339)。适合的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(例如, 水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸酯和高香草酸酯(homovanilate))、胶原的N-酰基衍生物、月桂醇聚醚-9和 $\beta$ -二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺) (参见例如凯特戴尔(Katdare), A. 等人, 用于制药、生物技术和药物递送的赋形剂的发展(Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery), CRC出版社, 丹弗斯(Danvers), MA, 2006; 李等人, 治疗性药物载体系统锐评, 1991, 第92页; 村西, 治疗性药物载体系统锐评, 1990, 7, 1-33; 布尔(Buur)等人, 控制释放杂志(J. Control Rel.), 1990, 14, 43-51)。

[0632] 如在此所使用, 非螯合性非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或作为表面活性剂展示不明显活性但是反而增强iRNA经消化道粘膜吸收的化合物(见例如村西, 治疗性药物载体系统锐评, 1990, 7, 1-33)。这类别的渗透增强剂包括例如不饱和环状脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(李等人, 治疗性药物载体系统锐评, 1991, 第92页); 以及非类固醇类的抗炎剂, 如双氯芬酸钠、吲哚美辛和保泰松(山下等人, 药物科学杂志, 1987, 39, 621-626)。

[0633] 还可以添加在细胞水平增强摄取iRNA的试剂至本发明的药用组合物和其他组合物。例如阳离子脂质, 如脂质体(淳一(Junichi)等人, 美国专利号5,705,188)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸(洛洛(Lollo)等人, PCT申请WO 97/16529)也已知增强dsRNA的细胞摄取。可商购获得的转染试剂的实例包括例如Lipofectamine<sup>TM</sup>(英杰公司(Invitrogen); 卡尔斯巴德(Carlsbad), 加利福尼亚州)、Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>(英杰公司; 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)、293fectin<sup>TM</sup>(英杰公司; 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)、Cellfectin<sup>TM</sup>(英杰公司; 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)、DMRIE-C<sup>TM</sup>(英杰公司; 卡尔斯巴德,

加利福尼亚州)、FreeStyle<sup>TM</sup> MAX(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 CD(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Lipofectamine<sup>TM</sup>(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、iRNAMAX(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Oligofectamine<sup>TM</sup>(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Optifect<sup>TM</sup>(英杰公司;卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、X-tremeGENE Q2转染试剂(罗氏公司(Roche);格兰扎克尔街(Grenzacherstrasse),瑞士)、DOTAP脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)、DOSPER脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)或Fugene(格兰扎克尔街,瑞士)、Transfectam®试剂(普洛麦格公司(Promega);麦迪逊,威斯康辛州)、TransFast<sup>TM</sup>转染试剂(普洛麦格公司;麦迪逊,威斯康辛州)、Tfx<sup>TM</sup>-20试剂(普洛麦格公司;麦迪逊,威斯康辛州)、Tfx<sup>TM</sup>-50试剂(普洛麦格公司;麦迪逊,威斯康辛州)、DreamFect<sup>TM</sup>(OZ生物科学公司;马赛,法国)、EcoTransfect(OZ生物科学公司;马赛,法国)、TransPass<sup>a</sup> D1转染试剂(新英格兰生物试验室(New England Biolabs); Ipswich(伊普斯威奇),马萨诸塞州,美国)、LyoVec<sup>TM</sup>/LipoGen<sup>TM</sup>(英杰公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、PerFectin转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、NeuroPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER2转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、Cytofectin转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、BaculoPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、TroganPORTER<sup>TM</sup>转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、RiboFect(Bioline公司;Taunton(陶顿),马萨诸塞州,美国)、PlasFect(Bioline公司;陶顿,马萨诸塞州,美国)、UniFECTOR(B-Bridge International公司;山景城,加利福尼亚州,美国)、SureFECTOR(B\_Bridge International公司;山景城,加利福尼亚州,美国)或HiFect<sup>TM</sup>(B-Bridge International公司,山景城,加利福尼亚州,美国),连同其他。

[0634] 可以用其他试剂来增强所给予核酸的渗透,包括二醇如乙二醇和丙二醇、吡咯如2-吡咯、氮酮和萜类如苧烯和薄荷酮。

[0635] v.载体

[0636] 本发明的某些组合物还将载体化合物结合在配制品中。如在此使用,“载体化合物”或“载体”可以指惰性的(即,本身不具有生物活性)但通过体内过程被识别为核酸的一种核酸或其类似物,这些体内过程例如通过降解生物活性的核酸或促进它从循环中去除来降低具有生物活性的核酸的生物可利用率。核酸和载体化合物的共给予(典型地后一种物质过量)可以引起肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度减少,假定归因于该载体化合物与该核酸之间对共同受体的竞争。例如与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰胺基-4'异硫氰酸芪-2,2'-二磺酸共给予时,肝组织中部分硫代磷酸酯化的dsRNA的回收可以减少(宫尾(Miyao)等人,DsRNA研究与研发(DsRNA Res.Dev.),1995,5,115-121;高仓(Takakura)等人,DsRNA&核酸药物研发(DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.),1996,6,77-183)。

[0637] vi.赋形剂

[0638] 与载体化合物相反,“药物载体”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或用于将一种或多种核酸递送至动物的任何其他药理学上惰性的媒介物。该赋形剂可以是液体或固体,并且当与核酸和给定药用组合物的其他组分组合时,参考意欲的给予方式,对赋形

剂进行选择以提供希望的容积、稠度等。典型的药用载体包括但不限于结合剂(例如,糯性玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、淀粉乙醇酸钠等);以及润湿剂(例如,月桂基硫酸钠)。

[0639] 适合于非肠胃外给予的、不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。适当的药学上可接受载体包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0640] 用于局部给予核酸的配制品可以包括在普通溶剂如醇中的无菌或非无菌的水溶液、非水溶液,或在液体或固体油基质中的核酸溶液。这些溶液还可以包括缓冲液、稀释液和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外给予的、且不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0641] 适当的药学上可接受赋形剂包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0642] vii. 其他组分

[0643] 本发明的这些组合物可以另外地含有其他本领域熟知用量水平的在药用组合物中常用的辅助组分。因此,例如这些组合物可以包括另外的、可相容的药学上有活性的物质如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以包括对本发明的组合物的各种剂型的物理配制有用的其他物质,如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当加入此类物质时,它们不应当过度干扰本发明的组合物的成份的生物活性。可以将这些配制品进行灭菌并且如果希望的话与助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、盐混合,用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质、芳香物质和/或芬芳物质等进行混合,这些助剂不与该配制品中的一种或多种核酸发生有害的相互作用。

[0644] 水性悬浮液可以包括增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该混悬液还可以含有稳定剂。

[0645] 在一些实施例中,在本发明中体现的药用组合物包含(a)一种或多种iRNA化合物和(b)一种或多种通过非iRNA机制起作用并且有用于治疗溶血病症的试剂。这些试剂的实例包括但不限于抗炎剂、抗脂肪变性剂、抗病毒和/或抗纤维化剂。另外,其他常用于保护肝脏的物质,如水飞蓟素,也可以与在此描述的iRNA结合使用。其他适用于治疗肝脏疾病的试剂包括替比夫定,恩替卡韦和蛋白酶抑制剂,如特拉匹韦和例如在董(Tung)等人,美国专利申请公开号2005/0148548、2004/0167116、和2003/0144217;以及在黑尔(Hale)等人,美国专利申请公开号2004/0127488中披露的其他试剂。

[0646] 此类化合物的毒性与治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学程序来确定,例如以确定LD<sub>50</sub>(50%群体的致死剂量)以及ED<sub>50</sub>(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比为治疗指数,并且它可以被表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>。优选那些表现出高的治疗指数的化合物。

[0647] 从细胞培养物测定法和动物研究中获得的数据可以在配制人类中使用的剂量范

围时使用。在此在本发明中体现的组合物的剂量总体上处在一个循环浓度范围内,该范围包括具有很小或没有毒性的ED50。该剂量可以取决于所采用的剂型以及使用的给予途径而在该范围内变化。对于任何在本发明表征的方法中使用的化合物,该治疗上有效的剂量可以从细胞培养测定来进行初始估计。在动物模型中剂量可以被配制成为达到化合物(或当适当时,靶序列的多肽产物)的循环血浆浓度范围(例如,达到多肽的减小的浓度),该浓度范围包括如在细胞培养物中所确定的IC50(即,达到症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)。这类信息可以用来更精确地确定用于人类中的剂量。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相色谱法。

[0648] 除了给予它们之外,如在此所讨论的,还可以将在本发明中表征的iRNA与在治疗由KHK表达介导的病理学过程方面有效的其他已知试剂联合给予。在任何情况下,基于使用本领域已知或在此描述的标准功效量值所观察到的结果,给予医师可以调整给予iRNA的量和时间。

[0649] VII. 本发明的方法

[0650] 本发明提供治疗性和预防性方法,这些方法包括向患有或易于发展KHK相关疾病、病症和/或病状的受试者给予一种iRNA试剂、包含一种iRNA试剂的药用组合物、或包含本发明的一种iRNA的载体,该疾病、病症和/或病状例如是肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0651] 在一个方面中,本发明提供治疗患有将受益于KHK表达降低的病症的受试者的方法,该病症是例如KHK相关疾病,例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。本发明的这些治疗方法(和用途)包括向该受试者(例如人)给予治疗有效量的靶向KHK基因的一种iRNA试剂或包含靶向KHK基因的iRNA试剂的一种药用组合物,从而治疗患有将受益于KHK表达降低的病症的该受试者。

[0652] 在一个方面中,本发明提供预防患有将受益于KHK表达降低的病症的受试者中的至少一种症状的方法,该病症是例如一种KHK相关疾病,例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。该方法包括向该受试者给予治疗有效量的本发明的iRNA试剂(例如dsRNA)或载体,由此预防患有将受益于KHK表达降低的病症的受试者中的至少一种症状。例如,本发明提供用于预防患有将受益于KHK表达降低的病症的受试者中的脂肪生成和/或高尿酸血症的方法。

[0653] 在另一个方面,本发明提供治疗有效量的本发明的iRNA试剂用于治疗受试者,例

如将受益于KHK表达减少和/或抑制的受试者的用途。

[0654] 在一个另外方面中,本发明提供本发明的靶向KHK基因的一种iRNA试剂(例如dsRNA)或包含一种靶向KHK基因的iRNA试剂的药用组合物在制造一种用于治疗受试者,例如将受益于KHK表达的降低和/或抑制的受试者,如患有将受益于KHK表达降低的病症的受试者的药剂中的用途,该病症是例如一种KHK相关疾病,例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0655] 在另一个方面中,本发明提供本发明的一种iRNA(例如,一种dsRNA)用于预防患有将受益于KHK表达的降低和/或抑制的一种病症的受试者中的至少一种症状的用途,该病症是诸如一种KHK相关疾病,例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0656] 在一个另外的方面中,本发明提供本发明的一种iRNA试剂在制造一种用于预防患有将受益于KHK表达的降低和/或抑制的一种病症的受试者中的至少一种症状的药剂中的用途,该病症是诸如一种KHK相关疾病,例如肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)、血脂异常(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)、血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)、心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)、肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)、代谢综合征、脂肪细胞功能障碍、内脏脂肪沉积、肥胖症、高尿酸血症、痛风、进食障碍、以及过度糖渴求。

[0657] 在一个实施例中,向患有KHK相关疾病的受试者给予一种靶向KHK的iRNA试剂,这样使得当向该受试者给予该dsRNA试剂时,例如该受试者的细胞、组织、血液、或其他组织或流体中的KHK水平降低至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、12%、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%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多。

[0658] 本发明的这些方法和用途包括给予在此描述的一种组合物,这样使得靶KHK基因的表达减少如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76或约80小时。在一个实施例中,使靶KHK基因的表达减少延长的持续时间,例如至少约2、3、4、5、6、7天或更多,例如约1周、2周、3周或约4周或更长。

[0659] 根据本发明的方法和用途给予dsRNA可以导致患有KHK相关疾病的患者的此类疾病或病症的严重程度、体征、症状、和/或标志物减少。在上下文中“减少”意为此水平的统计

学上的显著减少。该减少可以是例如至少大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0660] 可以例如通过测量疾病进展、疾病缓和、症状严重性、疼痛减少、生活品质、维持治疗作用所要求的药剂的剂量、疾病标志物或适用于被治疗或目标用于预防的给定疾病的任何其他可测量参数的水平来评价疾病治疗或预防的功效。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。例如,血脂异常的治疗功效可以例如通过定期监测LDL胆固醇、HDL胆固醇以及甘油三酯水平来进行评定。在一个另外的实例中,葡萄糖控制病症的治疗功效可以例如通过定期监测胰岛素和葡萄糖水平来进行评定。在另一个实施例中,肥胖症的治疗功效可以例如通过定期监测身体质量指数来进行评定。在又另一个实施例中,高血压的治疗功效可以例如通过定期监测血压来进行评定。稍后数据与初始数据的比较为医师提供该治疗是否有效的指示。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。关于给予靶向KHK的iRNA或其药用组合物,针对KHK相关疾病“有效”指示以临幊上适当的方式给予会对至少统计学上显著分数的患者产生有益作用,如改善症状、治愈、减少疾病、延长生命、提高生活品质或由熟悉治疗KHK相关疾病和相关病因的医师公认为积极的其他作用。

[0661] 当在疾病状态的一个或多个参数方面存在统计学上显著的改善的时候,或者通过使得以另外方式可以被预期的症状不再恶化或发展,治疗或预防效果是明显的。作为一个实例,在疾病的可测量参数方面的至少10%,并且优选是至少20%、30%、40%、50%或更多的有利改变,可以指示有效治疗。也可以使用如本领域已知的给定疾病的实验动物模型,判定给定iRNA药物或这种药物的配制品的功效。当使用实验动物模型时,当观察到标志物或症状的统计学上显著的减少时,治疗的功效是明显的。

[0662] 可以向受试者给予治疗量的iRNA,如约0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.65mg/kg、0.7mg/kg、0.75mg/kg、0.8mg/kg、0.85mg/kg、0.9mg/kg、0.95mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg dsRNA、2.6mg/kg dsRNA、2.7mg/kg dsRNA、2.8mg/kg dsRNA、2.9mg/kg dsRNA、3.0mg/kg dsRNA、3.1mg/kg dsRNA、3.2mg/kg dsRNA、3.3mg/kg dsRNA、3.4mg/kg dsRNA、3.5mg/kg dsRNA、3.6mg/kg dsRNA、3.7mg/kg dsRNA、3.8mg/kg dsRNA、3.9mg/kg dsRNA、4.0mg/kg dsRNA、4.1mg/kg dsRNA、4.2mg/kg dsRNA、4.3mg/kg dsRNA、4.4mg/kg dsRNA、4.5mg/kg dsRNA、4.6mg/kg dsRNA、4.7mg/kg dsRNA、4.8mg/kg dsRNA、4.9mg/kg dsRNA、5.0mg/kg dsRNA、5.1mg/kg dsRNA、5.2mg/kg dsRNA、5.3mg/kg dsRNA、5.4mg/kg dsRNA、5.5mg/kg dsRNA、5.6mg/kg dsRNA、5.7mg/kg dsRNA、5.8mg/kg dsRNA、5.9mg/kg dsRNA、6.0mg/kg dsRNA、6.1mg/kg dsRNA、6.2mg/kg dsRNA、6.3mg/kg dsRNA、6.4mg/kg dsRNA、6.5mg/kg dsRNA、6.6mg/kg dsRNA、6.7mg/kg dsRNA、6.8mg/kg dsRNA、6.9mg/kg dsRNA、7.0mg/kg dsRNA、7.1mg/kg dsRNA、7.2mg/kg dsRNA、7.3mg/kg dsRNA、7.4mg/kg dsRNA、7.5mg/kg dsRNA、7.6mg/kg dsRNA、7.7mg/kg dsRNA、7.8mg/kg dsRNA、7.9mg/kg dsRNA、8.0mg/kg dsRNA、8.1mg/kg dsRNA、8.2mg/kg dsRNA、

8.3mg/kg dsRNA、8.4mg/kg dsRNA、8.5mg/kg dsRNA、8.6mg/kg dsRNA、8.7mg/kg dsRNA、8.8mg/kg dsRNA、8.9mg/kg dsRNA、9.0mg/kg dsRNA、9.1mg/kg dsRNA、9.2mg/kg dsRNA、9.3mg/kg dsRNA、9.4mg/kg dsRNA、9.5mg/kg dsRNA、9.6mg/kg dsRNA、9.7mg/kg dsRNA、9.8mg/kg dsRNA、9.9mg/kg dsRNA、9.0mg/kg dsRNA、10mg/kg dsRNA、15mg/kg dsRNA、20mg/kg dsRNA、25mg/kg dsRNA、30mg/kg dsRNA、35mg/kg dsRNA、40mg/kg dsRNA、45mg/kg dsRNA或约50mg/kg dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0663] 在某些实施例中,例如,当本发明的组合物包含如在此所描述的dsRNA和脂质时,可以向受试者给予治疗量的iRNA,如约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.05mg/kg至约5mg/kg、约0.05mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.2mg/kg至约5mg/kg、约0.2mg/kg至约10mg/kg、约0.3mg/kg至约5mg/kg、约0.3mg/kg至约10mg/kg、约0.4mg/kg至约5mg/kg、约0.4mg/kg至约10mg/kg、约0.5mg/kg至约5mg/kg、约0.5mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1.5mg/kg至约5mg/kg、约1.5mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约2.5mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约3mg/kg至约5mg/kg、约3mg/kg至约10mg/kg、约3.5mg/kg至约5mg/kg、约4mg/kg至约5mg/kg、约4.5mg/kg至约5mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约5.5mg/kg至约10mg/kg、约6mg/kg至约10mg/kg、约6.5mg/kg至约10mg/kg、约7mg/kg至约10mg/kg、约7.5mg/kg至约10mg/kg、约8mg/kg至约10mg/kg、约8.5mg/kg至约10mg/kg、约9mg/kg至约10mg/kg或约9.5mg/kg至约10mg/kg。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0664] 例如,可以按以下剂量给予dsRNA:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9或约10mg/kg。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0665] 在其他实施例中,例如,当本发明的组合物包含如在此所描述的dsRNA和N-乙酰半乳糖胺时,可以向受试者给予治疗量的iRNA,如约0.1mg/kg至约50mg/kg、约0.25mg/kg至约50mg/kg、约0.5mg/kg至约50mg/kg、约0.75mg/kg至约50mg/kg、约1mg/kg至约50mg/kg、约1.5mg/kg至约50mg/kg、约2mg/kg至约50mg/kg、约2.5mg/kg至约50mg/kg、约3mg/kg至约50mg/kg、约3.5mg/kg至约50mg/kg、约4mg/kg至约50mg/kg、约4.5mg/kg至约50mg/kg、约5mg/kg至约50mg/kg、约7.5mg/kg至约50mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、约15mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约30mg/kg至约50mg/kg、约35mg/kg至约50mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约45mg/kg、约0.25mg/kg至约45mg/kg、约0.5mg/kg至约45mg/kg、约0.75mg/kg至约45mg/kg、约1mg/kg至约45mg/kg、约1.5mg/kg至约45mg/kg、约2mg/kg至约45mg/kg、约2.5mg/kg至约45mg/kg、约3mg/kg至约45mg/kg、约3.5mg/kg至约45mg/kg、约4mg/kg至约45mg/kg、约4.5mg/kg至约45mg/kg、约5mg/kg至约45mg/kg、约7.5mg/kg至约45mg/kg、约10mg/kg至约45mg/kg、约15mg/kg至约45mg/kg、约

20mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约30mg/kg至约45mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约45mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.25mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约40mg/kg、约0.75mg/kg至约40mg/kg、约1mg/kg至约40mg/kg、约1.5mg/kg至约40mg/kg、约2mg/kg至约40mg/kg、约2.5mg/kg至约40mg/kg、约3mg/kg至约40mg/kg、约3.5mg/kg至约40mg/kg、约4mg/kg至约40mg/kg、约4.5mg/kg至约40mg/kg、约5mg/kg至约40mg/kg、约7.5mg/kg至约40mg/kg、约10mg/kg至约40mg/kg、约15mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约40mg/kg、约0.1mg/kg至约30mg/kg、约0.25mg/kg至约30mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.75mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1.5mg/kg至约30mg/kg、约2mg/kg至约30mg/kg、约2.5mg/kg至约30mg/kg、约3mg/kg至约30mg/kg、约3.5mg/kg至约30mg/kg、约4mg/kg至约30mg/kg、约4.5mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约7.5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg、约15mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约25mg/kg至约30mg/kg、约0.1mg/kg至约20mg/kg、约0.25mg/kg至约20mg/kg、约0.5mg/kg至约20mg/kg、约0.75mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1.5mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约20mg/kg、约2.5mg/kg至约20mg/kg、约3mg/kg至约20mg/kg、约3.5mg/kg至约20mg/kg、约4mg/kg至约20mg/kg、约4.5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约7.5mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg或约15mg/kg至约20mg/kg的剂量。在一个实施例中,当本发明的组合物包含如在此所描述的一种dsRNA和N-乙酰半乳糖胺时,可以向受试者给予治疗量的约10mg/kg至约30mg/kg的dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0666] 例如可以给予受试者治疗量的iRNA:例如大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或大约50mg/kg。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0667] 可以通过静脉输注经一个时期来给予该iRNA,例如经5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或大约25分钟的时期。该给予可以例如在一个常规基础上(例如每周地、双周地(即,每两周))重复持续一个月、两个月、三个月、四个月或更久。在初始治疗方案后,可以基于更低频率给予治疗。例如在每周或双周给予持续三个月后,给予可以按每个月重复一次,持续六个月或一年或更长。

[0668] 给予该iRNA可以使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的KHK水平降低至少约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、

34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多。

[0669] 在给予全部剂量的iRNA之前,可以给予患者更少的剂量,如5%输注,并且监测不良作用,如过敏反应。在另一个实例中,针对不想要的免疫刺激作用(比如增加的细胞因子(例如,TNF- $\alpha$ 或INF- $\alpha$ )水平)对该患者进行监测。

[0670] 归因于对KHK表达的抑制作用,根据本发明的组合物或从其中制备的药用组合物可以提高生活品质。

[0671] 本发明的一种iRNA可以“裸”形式给予,其中该修饰的或未修饰的iRNA试剂直接悬浮于水性或适合的缓冲溶剂中,作为一种“游离iRNA”。游离iRNA是在药用组合物不存在下进行给予。该游离iRNA可以处在一种适合的缓冲溶液中。该缓冲溶液可以包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在一个实施例中,该缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以将含有该iRNA的缓冲溶液的pH和摩尔渗透压浓度进行调节,这样使得它适合用于向受试者给予。

[0672] 可替代地,可以将本发明的iRNA作为药用组合物进行给予,如一种dsRNA脂质体配制品。

[0673] 将受益于KHK基因表达的减少和/或抑制的受试者是患有如在此所描述的KHK相关疾病或病症的那些受试者。在一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有肝病(例如,脂肪肝、脂肪性肝炎)。在另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有(例如,高血脂症、高LDL胆固醇、低HDL胆固醇、高甘油三酯血症、餐后高甘油三酯血症)。在另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有一种血糖控制病症(例如,胰岛素抵抗、糖尿病)。在又另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有心血管疾病(例如,高血压、内皮细胞功能障碍)。在一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有肾病(例如,急性肾病症、肾小管功能障碍、近端小管的促炎性变化)。在另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有代谢综合征。在一个特定实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有脂肪细胞功能障碍。在又另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有内脏脂肪沉积。在又另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有肥胖症。在一个特定实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有高尿酸血症。在又另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有痛风。在另一个实施例中,患有KHK相关疾病的受试者患有进食障碍和/或过度糖渴求。

[0674] 治疗将受益于KHK基因表达的降低和/或抑制的受试者包括治疗性和预防性治疗。

[0675] 本发明进一步提供一种iRNA试剂或其一种药用组合物与其他药物剂和/或其他治疗方法(例如,与已知的药物剂和/或已知的治疗方法,例如像当前用于治疗这些病症所采用的那些)组合用于治疗将受益于KHK表达的降低和/或抑制的受试者(例如,患有KHK相关疾病的受试者)的方法和用途。例如,在某些实施例中,将一种靶向KHK的iRNA与例如适用于治疗如在此其他地方所述的KHK相关疾病的一种试剂组合地给予。例如,适合用于治疗将受益于KHK表达的降低的受试者,例如具有KHK相关疾病的受试者的另外的治疗剂和治疗方法包括一种HMG-CoA还原酶抑制剂、一种糖尿病疗法、一种抗高血压药物、白藜芦醇、或其他用

于治疗KHK相关疾病的治疗剂。示例性HMG-CoA还原酶抑制剂包括阿托伐他汀(辉瑞(Pfizer)的Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl)、普伐斯汀(百时美施贵宝(Bristol-Myers Squibb)的Pravachol、三共(Sankyo)的Mevalotin/Sanaprav)、辛伐他汀(默克(Merck)的Zocor®/Sinvacor、勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim)的Denan、邦榆(Banyu)的Lipovas)、洛伐他汀(默克的Mevacor/Mevinacor、Bexal的Lovastatina、Cepa;许瓦兹制药(Schwarz Pharma)的Liposcler)、氟伐他汀(诺华公司(Novartis)的Lescol®/Locol/Lochol、藤泽公司(Fujisawa)的Cranoc、索尔维公司(Solvay)的Digaril)、西立伐他汀(拜耳(Bayer)的Lipobay/葛兰素史克(GlaxoSmithKline)的Baycol)、瑞舒伐他汀(阿斯利康(AstraZeneca)的Crestor®)、以及匹伐他汀(伊伐他汀/瑞西伐他汀(risivastatin)(日产化学(Nissan Chemical)、兴和工业株式会社(Kowa Kogyo)、三共、以及诺华公司)。示例性糖尿病疗法是本领域中已知的并且包括例如胰岛素增敏剂,如双胍类(例如二甲双胍)和噻唑烷二酮类(例如,罗格列酮、吡格列酮、曲格列酮);促分泌素类,如磺酰脲类(例如,格列本脲、格列吡嗪、格列美脲、甲苯磺丁脲、醋磺环己脲、甲磺氮脲、氯磺丙脲、格列齐特、格列吡脲(glycopyamide)、格列喹酮),非磺酰脲类促分泌素,例如美格替奈衍生物(例如,瑞格列奈、那格列奈等);二肽基肽酶IV抑制剂(例如,西他列汀、沙格列汀、利格列汀、维格列汀、阿格列汀、西格列汀(septagliptin); $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂(例如,阿卡波糖、米格列醇、伏格列波糖);拟胰淀素(amylinomimetics)(例如,醋酸普兰林肽);肠促胰岛素模拟物(例如,艾塞那肽、利拉鲁肽、他司鲁泰);胰岛素及其类似物(例如,速效、缓效、以及中效);胆酸螯合剂(例如,考来维仑);以及多巴胺激动剂(例如,溴麦角环肽),单独地或组合地。示例性抗高血压药是本领域中已知的并且包括利尿剂(例如,噻嗪类利尿剂(例如,氯噻嗪、氯噻酮、氢氯噻嗪、吲达帕胺、美托拉宗)、袢利尿剂(例如,布美他尼、依他尼酸、呋塞米、托塞米)、以及保钾利尿剂/醛固酮受体阻断剂(例如,阿米洛利、螺内酯、氨苯蝶啶、依普利酮))、抗肾上腺素能药物(例如, $\beta$ -阻断剂(例如,阿替洛尔、美托洛尔、美托洛尔缓释、奈必洛尔、纳多洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、噻吗洛尔)、 $\alpha$ -1阻断剂(例如,多沙唑嗪、哌唑嗪、特拉唑嗪)、 $\alpha$ 和 $\beta$ 阻断剂(例如,卡维地洛、拉贝洛尔)、中枢作用剂(例如,可乐定、甲基多巴)、外周神经作用剂(例如,胍乙啶、利血平)、以及直接作用的血管扩张剂(例如,肼屈嗪、米诺地尔))、钙通道阻断剂(例如,氨氯地平、地尔硫卓、非洛地平、伊拉地平、尼卡地平、硝苯地平、维拉帕米)、ace抑制剂(例如,贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、喹那普利、雷米普利)、血管紧张素受体阻断剂(例如,坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、奥美沙坦、替米沙坦、缬沙坦)或其任何组合。

[0676] 可以将该iRNA试剂以及另外的治疗试剂和/或治疗在相同时间和/或在相同组合中进行给予,例如非胃肠地,或者可以将该另外的治疗试剂作为一种单独组合物的部分或在单独的时间和/或通过本领域内已知的或在此描述的另一种方法进行给予。

[0677] 本发明还提供使用本发明的一种iRNA试剂和/或一种含有本发明的iRNA试剂的组合物来降低和/或抑制细胞中的KHK表达的方法。在其他方面中,本发明提供用于在降低和/或抑制细胞中的KHK表达的本发明的一种iRNA和/或一种包含本发明的iRNA的组合物。在又其他方面,提供本发明的一种iRNA和/或一种包含本发明的iRNA的组合物用于制造一种用以降低和/或抑制细胞中的KHK表达的药剂中的用途。

[0678] 这些方法和用途包括使该细胞与本发明的一种iRNA(例如,dsRNA)相接触并且使

该细胞维持足以获得KHK基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制该细胞中的KHK基因的表达。

[0679] 基因表达的减少可以通过本领域中已知的任何方法来评价。例如,KHK表达的降低可以通过如下进行确定:使用对本领域内的普通技术人员而言常规的方法(例如, RNA印迹法、qRT-PCR)来确定KHK的mRNA表达水平, 使用对本领域内的普通技术人员而言常规的方法(如蛋白质印迹法、免疫技术、流式细胞术方法、ELISA)来确定KHK的蛋白质水平, 和/或确定KHK的生物活性(例如, 果糖磷酸化为果糖-1-磷酸)。在一个实施例中, KHK基因表达的降低可通过测量尿中果糖的水平来确定。

[0680] 在本发明的这些方法和用途中, 该细胞可以在体外或体内被接触, 即, 该细胞可以在一个受试者内。

[0681] 使用本发明的这些方法适合用于治疗的细胞可以是表达KHK基因的任何细胞。适合于在本发明的方法和用途中使用的细胞可以是哺乳动物细胞, 例如灵长类细胞(例如人类细胞或非人类灵长类细胞, 例如猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类细胞(例如母牛细胞、猪细胞、骆驼细胞、美洲鸵细胞、马细胞、山羊细胞、兔细胞、绵羊细胞、仓鼠、豚鼠细胞、猫细胞、狗细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、狮子细胞、老虎细胞、熊细胞、或水牛细胞)、鸟细胞(例如鸭细胞或鹅细胞)、或鲸细胞。在一个实施例中, 该细胞是人类细胞, 例如人类肝细胞。

[0682] 在该细胞中可以使KHK表达抑制至少约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、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%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或约100%。

[0683] 本发明的体内方法和用途可以包括向受试者给予一种含有iRNA的组合物, 其中该iRNA包括与有待治疗的哺乳动物的KHK基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。当有待治疗的生物体是人时, 该组合物可以通过本领域中已知的任何手段来给予, 包括但不限于皮下、静脉内、口服、腹膜内或胃肠外途径, 包括颅内(例如, 脑室内、实质内和鞘内)、肌肉内、透皮、气道(气雾剂)、鼻、直肠和局部(包括颊和舌下)给予。在某些实施例中, 这些组合物通过皮下或静脉内输注或注射来给予。

[0684] 在一些实施例中, 该给予是通过积存注射。积存注射可以在一个延长的时期以连贯的方式释放该iRNA。因此, 积存注射可以减少获得希望的作用所需要的给药频率, 该希望的作用例如对KHK的希望的抑制或治疗性或预防性作用。积存注射还可以提供更连贯的血清浓度。积存注射包括皮下注射或肌内注射。在优选的实施例中, 该积存注射是皮下注射。

[0685] 在一些实施例中, 该给予是经由一个泵。该泵可以是外部泵或手术植入的泵。在某些实施例中, 该泵是一个皮下植入的渗透泵。在其他实施例中, 该泵是一个输注泵。输注泵可以用于静脉内、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施例中, 该输注泵是一个皮下输注泵。在其他实施例中, 该泵是将该iRNA递送至肝脏的一个手术植入的泵。

[0686] 给予模式可以基于是否希望局部治疗或全身性治疗并且基于有待治疗的区域来进行选择。给予的途径和部位可以被选择成增强靶向。

[0687] 在一个面中,本发明还提供用于抑制哺乳动物(例如人)中的KHK基因表达的方法。本发明还提供一种包含靶向哺乳动物细胞中的KHK基因的iRNA(例如,dsRNA)的组合物,以用于抑制该哺乳动物中的KHK基因的表达。在另一个方面中,本发明提供靶向哺乳动物细胞中的KHK基因的一种iRNA(例如dsRNA)在制造一种用于抑制该哺乳动物中的KHK基因表达的药剂中的用途。

[0688] 这些方法和用途包括向该哺乳动物(例如人)给予一种包含靶向该哺乳动物细胞中的KHK基因的iRNA(例如dsRNA)的组合物并且维持该哺乳动物一段时间,该时间足以获得该KHK基因的mRNA转录物的降解,由此抑制该哺乳动物中的该KHK基因的表达。

[0689] 基因表达的降低可以在给予iRNA的受试者的外周血液样品中通过在此描述的本领域中已知的任何方法(例如qRT-PCR)进行评定。蛋白质产生的减少可以通过本领域中任何已知的方法并且通过在此描述的方法(例如ELISA或蛋白质印迹法)来评价。在一个实施例中,穿刺肝脏活检样品用作用于监测KHK基因和/或蛋白质表达降低的组织材料。在另一个实施例中,血液样品用作用于监测KHK基因和/或蛋白质表达降低的组织材料。

[0690] 在一个实施例中,在给予iRNA试剂之后验证体内RISC介导的靶标裂解是通过执行如本领域中已知的5'-RACE或该方案的修改来进行的(莱瑟姆(Lasham)A等人,(2010)核酸研究(Nucleic Acid Res.),38 (3) p-e19)(齐默尔曼(Zimmermann)等人(2006)自然(Nature)441:111-4)。

[0691] 除非另外限定,否则在此使用的所有技术术语和科学术语具有如本发明所属领域的技术人员通常理解的相同含义。尽管与在此描述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或测试本发明中体现的iRNA和方法,但以下描述了适合的方法和材料。在此提交的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文结合。在矛盾的情况下,本发明说明书,包括定义,将占据主导。此外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0692] 实例实例1.iRNA合成

[0693] 试剂来源

[0694] 当在此没有专门给出试剂来源时,此种试剂可以从分子生物学试剂的任何供应商获得,其品质/纯度标准符合分子生物学应用。

[0695] KHK有义链序列和反义链序列的详细列表示于表3、表4和表5中。

[0696] 转录物

[0697] 进行siRNA设计以便鉴别在NCBI基因数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)中被注释的靶向人、食蟹猴(猕猴;此后称为“食蟹猴(cyno)”)、小鼠和大鼠KHK转录物的siRNA。设计使用以下来自NCBI RefSeq集合的转录物:人-XM\_005264298.1;食蟹猴-XM\_005576324.1;小鼠-NM\_008439.3;大鼠-NM\_031855.3。由于高等灵长类动物/啮齿动物序列趋异,以若干个单独的批次设计siRNA双链体,包括但不限于包含匹配以下各项的双链体的批次:仅人和猕猴转录物;仅人、猕猴和小鼠转录物;以及仅人、猕猴、小鼠和大鼠转录物。设计与列出的人转录物和在每次设计批次(以上)中考虑的其他物种转录物在指定区共有100%一致性的所有siRNA双链体。在一些情况下,当反义链:靶mRNA互补碱基对是GC或CG对时,允许在第一反义(最后有义)位置处的双链体与mRNA靶标之间的错配。在这些情况下,双链体被设计为在第一反义:最后有义对处具有UA或AU对。因此这些双链体维持互补性但

是相对于靶标是错配的(U:C,U:G,A:C,或A:G)。

[0698] siRNA设计、特异性和功效预测

[0699] 从每个序列中预测所有可能的19聚体的特异性。然后选择出缺乏长于7个核苷酸的重复的候选19聚体。这些476种候选人类/猕猴、71种人类/猕猴/小鼠、以及58种人类/猕猴/小鼠/大鼠siRNA用于使用在python脚本‘BruteForce.py’中实现的穷尽性“brute-force”算法,针对适当转录组(定义为在人类、猕猴、小鼠或大鼠NCBI Refseq组内的NM\_和XM\_记录的组)的综合搜索中。该脚本接下来解析该转录物-寡核苷酸比对,以产生基于该siRNA和任何潜在的“脱靶”转录物之间的错配的位置和数目的分数。对该脱靶分数进行加权,以强调siRNA的“种子”区的差异,在从该分子的5’-端起的位置2-9处。通过对单独错配分数求和给予来自brute-force搜索的每个寡转录物对一个错配分数;位置2-9中的错配计数为2.8,裂解位点位置10-11中的错配计数为1.2,并且区12-19中的错配计数为1.0。通过对衍生自每个寡聚物的3个相异种子衍生的六聚体的七聚体和八聚体的频率做比较来进行另外的脱靶预测。来自相对于5’起始的位置2-7的六聚体被用来创建2个七聚体和1个八聚体。通过将3’A添加至六聚体来创建七聚体1;通过将5’A添加至六聚体来创建七聚体2;通过将A添加至六聚体的5’和3’端来创建八聚体。预先计算了人、食蟹猴、小鼠或大鼠3’UTRome(定义为来自NCBI的Refseq数据库的转录组的子序列,其中编码区的末端‘CDS’被清楚定义)中的八聚体和七聚体的频率。使用来自八聚体频率范围的中值,将八聚体的频率归一化为七聚体的频率。然后通过计算((3×标准化的八聚体计数)+(2×七聚体2计数)+(1×七聚体1计数))之和来计算“mirSeedScore”。

[0700] 两种siRNA链被指定为根据计算分数的特异性分类:得分高于3为高特异性的、等于3为特异性的,并且在2与2.8之间为中等特异性的。siRNA链通过该反义链的特异性进行分类。选择中等(或更高)特异性的双链体,其反义寡核苷酸拥有具有高预测功效的双链体的特征,包括在种子区的最大UA含量以及低的整体GC含量。还包括在大鼠中具有1.2(但在其他物种中>=2)的反义分数的一种另外双链体。

[0701] 通过将反义19聚体(以上描述)延长至靶互补序列的23个核苷酸来设计候选GalNAc-共轭的双链体,有义链和反义链上分别21和23个核苷酸长。对包括在设计批次中的所有物种转录物的互补性进行检查。对于每个双链体,该有义21聚体被指定为反义链的前21个核苷酸的反向补体。

[0702] siRNA序列选择

[0703] 合成总计21个有义和21个反义衍生的人/食蟹猴/小鼠/大鼠siRNA 21/23聚体寡核苷酸(表3),29个有义和29个反义衍生的人/食蟹猴siRNA 21/23聚体寡核苷酸(表4),以及3个有义和3个反义衍生的人/食蟹猴/小鼠(表5)siRNA 21/23聚体寡核苷酸。

[0704] siRNA合成

[0705] 通用中小规模的RNA合成程序

[0706] 根据标准的固相寡核苷酸合成方案,使用可商购的5’-O-(4,4’-二甲氧基三苯甲基)-2’-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-3’-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)尿苷亚磷酰胺单体、4-N-乙酰胞苷、6-N-苯甲酰基腺苷和2-N-异丁酰基鸟苷以及相应的2’-O-甲基和2’-氟代亚磷酰胺,以0.2-500μmol之间的规模合成RNA寡核苷酸。以0.1-0.15M浓度制备该亚酰胺(amidite)溶液并将5-乙硫基-1H-四唑(乙腈中0.25-0.6M)用作活化剂。在合成过程中用在

二甲基吡啶:乙腈(1:1) (v:v) 中的0.2M苯乙酰二硫化物(PADS)或在吡啶中的0.1M 3-(二甲氨基亚甲基)氨基-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)引入硫代磷酸酯骨架修饰以用于氧化步骤。在合成完成后,从固体支持物裂解下这些序列,并用甲胺接着用三乙胺.3HF去保护以除去存在的任何2'-0-叔丁基二甲基甲硅烷基保护基。

[0707] 对于5-500 $\mu\text{mol}$ 之间合成规模和完全2'修饰的序列(2'-氟和/或2'-0-甲基或其组合),使用3:1(v/v)乙醇和浓(28%-32%)氨水在35°C持续16h或在55°C持续5.5h对这些寡核苷酸进行去保护。在氨水去保护之前,将寡核苷酸在固体载体上用在乙腈中的0.5M哌啶处理20分钟。通过LC-MS和阴离子交换HPLC(IEX-HPLC)来分析粗制寡核苷酸。使用:20mM磷酸盐,10%-15% ACN,pH=8.5(缓冲液A)以及20mM磷酸盐,10%-15% ACN,1M NaBr,pH=8.5(缓冲液B)通过IEX HPLC,对这些寡核苷酸进行纯化。通过分析型HPLC分析级分纯度。将具有适合纯度的含产物的级分汇集,并且在脱盐之前在旋转蒸发仪上浓缩。将样品通过尺寸排阻色谱法脱盐并且冻干至干燥。将等摩尔量的有义链和反义链在1×PBS缓冲液中退火,以制备相应的siRNA双链体。

[0708] 对于小规模(0.2-1 $\mu\text{mol}$ ),在96孔形式下在MerMade 192合成仪上进行合成。在充分地2'-修饰的序列(2'-氟和/或2'-0-甲基或其组合)的情况下,将这些寡核苷酸使用甲胺在室温下30-60分钟,然后在60°C孵化30分钟,或用3:1(v/v)乙醇和浓(28%-32%)氨水在室温下30-60分钟,然后在40°C下孵化1.5小时进行去保护。然后在乙腈:丙酮(9:1)的溶液中沉淀粗制的寡核苷酸,并通过离心分离并且倾析上清液。将粗制的寡核苷酸沉淀物重新悬浮于20mM NaOAc缓冲液中,并且通过LC-MS和阴离子交换HPLC来分析。在5mL HiTrap Sephadex G25柱(GE卫生保健公司(GE Healthcare))上在96深孔板中将粗制的寡核苷酸序列进行脱盐。在每个孔中收集对应于一个单独的序列的约1.5mL的样品。通过LC-MS和阴离子交换色谱法分析这些纯化脱盐的寡核苷酸。通过在Tecan机器人上退火等摩尔量的有义序列和反义序列来制备双链体。将双链体的浓度调节至于1×PBS缓冲液中10 $\mu\text{M}$ 。

#### [0709] 合成GalNAc共轭的寡核苷酸用于体内分析

[0710] 使用一种固体载体在0.2-500 $\mu\text{mol}$ 之间的规模下合成在其3'-末端处与GalNAc配体共轭的寡核苷酸,该固体载体用具有用于寡核苷酸合成的4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)保护的伯羟基基团的Y形连接子和通过系链附接的GalNAc配体预先负载。

[0711] 对于5-500 $\mu\text{mol}$ 之间规模下的GalNAc共轭物的合成,遵循以上用于RNA的合成方案并且具有以下改编:对于基于聚苯乙烯的合成,在合成过程中使用载体5%二氯乙酸的甲苯溶液来进行DMT裂解。如上所述进行从该支持体的裂解和去保护。不去除最后的5'-DMT基团(“带有DMT”)合成富含硫代磷酸酯的序列(通常>5硫代磷酸酯),并且在如上所述的裂解和去保护之后,使用于水中的50mM乙酸铵(缓冲液A)和于80%乙腈中的50mM乙酸铵(缓冲液B)通过反相HPLC进行纯化。通过分析型HPLC和/或LC-MS分析级分纯度。将具有适合纯度的含产物的级分汇集,并且在旋转蒸发仪上浓缩。使用在水中的20%-25%乙酸去除DMT基团直到完成。将样品通过尺寸排阻色谱法脱盐并且冻干至干燥。将等摩尔量的有义链和反义链在1×PBS缓冲液中退火,以制备相应的siRNA双链体。

[0712] 对于GalNAc共轭物的小规模合成(0.2-1 $\mu\text{mol}$ ),包括具有多个硫代磷酸酯键联的序列,适用以上描述的用于在MerMade平台上合成RNA或含完全2'-F/2'-OMe的序列的方案。在含GalNAc功能化的可控孔度玻璃载体的预填充柱上进行合成。

[0713] 实例2.siRNA双链体的通用体外筛选

[0714] 可以使用以下方法针对任何RNAi靶向基因表达在单剂量筛选中测定双链体的体外功效。类似的方法可以用于多剂量筛选以便测定这些双链体的剂量反应并且计算这些双链体的IC<sub>50</sub>。

[0715] 细胞培养和转染

[0716] 将Hep3B细胞(ATCC公司,弗吉尼亚州马纳萨斯)在37°C在5% CO<sub>2</sub>的气氛中在伊格尔氏最低基础培养基(ATCC公司)(补充有10% FBS、链霉素以及谷氨酰胺(ATCC公司))中生长接近融合,然后通过胰酶消化从该板释放。洗涤细胞并且以 $0.25 \times 10^6$ 个细胞/ml重新悬浮。在转染过程中,以每个孔约20,000个细胞将细胞接种到96孔板上。

[0717] 在转染之前小于1小时,从C57BL/6雌性小鼠(查尔斯河试验室国际公司(Charles River Laboratories International, Inc.)威明顿(Willmington), MA)中新鲜分离原代小鼠肝细胞(PMH),并且将这些细胞生长在原代肝细胞培养基中。以 $0.11 \times 10^6$ 个细胞/ml将细胞重新悬浮在体外GRO CP大鼠(接种)培养基(Celsis体外技术公司(Celsis In Vitro Technologies),目录号S01494)中。在转染过程中,以每孔10,000个细胞将细胞接种到BD BioCoat 96孔胶原板(BD,356407)上并且在37°C下在5% CO<sub>2</sub>气氛中进行孵育。

[0718] 在使用之前立即在37°C水浴中对低温保存的原代猕猴肝细胞(Celsis体外技术公司,M003055-P)进行解冻,并且以 $0.26 \times 10^6$ 个细胞/毫升将这些细胞重新悬浮于体外GRO CP(平板接种)培养基(Celsis体外技术公司,目录号Z99029)中。在转染过程中,以每孔25,000个细胞将细胞接种到BD BioCoat96孔胶原板(BD,356407)上并且在37°C下在5% CO<sub>2</sub>气氛中进行孵育。

[0719] 对于Hep3B、PMH和原代食蟹猴肝细胞,通过向96孔板中的各个孔中将每孔 $14\mu l$ 的Opti-MEM加上 $0.2\mu l$ 的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德加利福尼亚州目录号13778-150)添加至 $5\mu l$ 的每个siRNA双链体中来进行转染。然后在室温下将混合物孵育20分钟。然后将含有适当细胞数目的不具有抗生素的 $80\mu l$ 完全生长培养基添加至siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。

[0720] 对于GalNAc修饰的序列,在10nM和0.1nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验,对于所有其他序列在1nM和0.01nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验。对于原代小鼠肝细胞,在3nM、1nM、0.3nM、0.1nM、0.037nM、0.0123nM、0.00412nM和0.00137nM最终双链体浓度下完成剂量响应实验,并且对于Hep3B细胞,在3nM、1nM、0.3nM、0.1nM、0.037nM、0.0123nM、0.00412nM、0.00137nM、0.00046nM、0.00015nM、0.00005nM和0.000017nM下完成剂量响应实验。

[0721] 自由摄取转染

[0722] 通过将每孔 $10\mu l$  siRNA双链体的PBS溶液添加到96孔板中来进行自由摄取实验。然后将对于细胞类型含有适当细胞数目的 $90\mu l$ 完全生长培养基添加至siRNA。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。在500nM和5nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验,并且在1000nM、333nM、111nM、37nM、12.3nM、4.12nM、1.37nM、0.46nM最终双链体浓度下完成剂量响应实验。

[0723] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件号:610-12)的总RNA分离

[0724] 收获细胞并且溶解于 $150\mu l$ 的溶解/结合缓冲液中,然后使用埃彭道夫(Eppendorf)热混合器(在整个过程中混合速度相同)在850rpm下混合5分钟。将十微升磁珠

与80 $\mu$ l裂解/结合缓冲液混合物添加至圆底板中并且混合1分钟。使用磁台(magnetic stand)捕获磁珠，并且在不扰动这些珠粒的情况下去除上清液。在移除上清液后，将裂解的细胞添加至剩余的磁珠并且混合5分钟。在去除上清液之后，用150 $\mu$ l洗涤缓冲液A洗涤磁珠2次，并且混合1分钟。再次捕获珠粒，并且移除上清液。然后用150 $\mu$ l洗涤缓冲液B洗涤这些珠粒，捕获并且去除上清液。接下来用150 $\mu$ l洗脱缓冲液洗涤这些珠粒，捕获并且去除上清液。最终，允许珠粒干燥2分钟。在干燥之后，添加50 $\mu$ l的洗脱缓冲液(Elution Buffer)并且在70℃混合5分钟。用磁体捕获珠粒持续5分钟。去除55 $\mu$ l的上清液，并且添加至另一个96孔板。

[0725] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统,福斯特市,加利福尼亚州,目录号4368813)的通用cDNA合成

[0726] 制备母混合物：每一反应2 $\mu$ l 10X缓冲液、0.8 $\mu$ l 25X dNTP、2 $\mu$ l随机引物、1 $\mu$ l逆转录酶、1 $\mu$ l RNA酶抑制剂、以及3.2 $\mu$ l的H<sub>2</sub>O。将相同体积的母混合物和RNA混合为用于体外筛选的样品的12 $\mu$ l最终体积或用于体内筛选的样品的20 $\mu$ l最终体积。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(大力神公司(Hercules),加利福利亚州)通过以下步骤产生cDNA：25℃持续1分钟、37℃持续120分钟、85℃持续5秒、以及4℃保持。

[0727] 实时PCR

[0728] 在384孔(384w)板(罗氏公司(Roche)产品目录号04887301001)的每个孔中，将2 $\mu$ l的cDNA添加到母混合物中，该母混合物包含：2 $\mu$ l的H<sub>2</sub>O、0.5 $\mu$ l GAPDH TaqMan探针(生命技术公司(Life Technologies)产品目录号4326317E(对于Hep3B细胞)，产品目录号352339E(对于原代小鼠肝上皮实质细胞)，或定制探针(对于猕猴原代肝上皮实质细胞))、0.5 $\mu$ l C5TaqMan探针(生命技术公司产品目录号Hs00156197\_m1(对于Hep3B细胞)或mm00439275\_m1(对于原代小鼠肝上皮实质细胞)或定制探针(对于猕猴原代肝上皮实质细胞))、以及5 $\mu$ l Lightcycler 480探针母混合物(罗氏公司产品目录号04887301001)。实时PCR在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)上使用 $\Delta\Delta Ct$ (RQ)测定而进行。除非另外指出，对于体外筛选，使用两个生物重复对每个双链体进行检验并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。对于体内筛选，在一个或多个实验(每组3个小鼠)中对每个双链体进行测试，并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。

[0729] 为了计算KHK mRNA水平的相对倍数变化，使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法分析实时数据，并且将这些数据标准化为利用以下这样的细胞而进行的测定：这些细胞是转染了10nM AD-1955的细胞，或是模拟转染的细胞。使用XLFit，使用4参数拟合模型计算IC<sub>50</sub>，并且归一化成用AD-1955在相同剂量范围内转染的细胞或归一化成其自身的最低剂量。

[0730] AD-1955的有义链和反义链是：

[0731] 有义：cuuAcGcuGAGuAcyucGAdTsdT (SEQ ID NO:17)

[0732] 反义：UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdt (SEQ ID NO:18).

[0733] 表2.核酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。应当理解在寡核苷酸中存在时这些单体是由5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

缩写	一个或多个核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸酯
Af	2'-氟代腺苷-3'-磷酸酯
Afs	2'-氟代腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸酯
Cf	2'-氟代胞苷-3'-磷酸酯
Cfs	2'-氟代胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸酯
Gf	2'-氟代鸟苷-3'-磷酸酯
Gfs	2'-氟代鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tf	2'-氟代-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tfs	2'-氟代-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸酯
Uf	2'-氟代尿苷-3'-磷酸酯
Ufs	2'-氟代尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任何核苷酸 (G、A、C、T或U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯

[0734]

t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键联
L96	N-[三(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基]-4-羟基脯氨酸Hyp-(GalNAc-烷基)3

[0735]

表3.KHK dsRNA的未修饰的有义链序列和反义链序列

[0736]

Ref Seq; 有义链的相应mRNA位 置	靶位点	有义 (5'-3')	SEQ ID	反义 (5'-3')	SEQ ID	
		NO:	NO:		NO:	
XM_005264298	816-838 S	816	UGUCAGCAAAGAUGUGGCCAA	19	UUGGCCACAUUUUGCUGACAAA	40
XM_005264298	504-526 S	504	AGAGAACGCAUCCUGUGCGU	20	ACGCACAGGAUCUGCUUCUCUUC	41
XM_005264298	810-832 S	810	GGUGUUUUGUCAGCAAAGAUGU	21	ACAUUCUUUGCUGACAAACACCAC	42
XM_005264298	651-673 S	651	GAUCCACAUUUGAGGGCCGGAA	22	UUCCGGGCCUCAAUGUGGAUCCA	43
XM_005264298	815-837 S	815	UUGUCAGCAAAGAUGUGGCCA	23	UGGCCACAUUCUJUGCUGACAAAC	44
XM_005264298	650-672 S	650	GGAUCCCCACAUUUGAGGGCCGGAA	24	UCCGGGCCUCAAUGUGGAUCUCCAC	45
XM_005264298	510-532 S	510	GCAGAUCCUGUGCGUGGGCU	25	AGCCCCCACGCACAGGAUCUGCUU	46
XM_005264298	813-835 C21A s	813	GUUUUGUCAGCAAAGAUGUGGA	26	UCCACAUUCUJUGCUGACAAACAC	47
XM_005264298	505-527 G21A s	505	GAGAACGGAGCAUCCUGUGCGUA	27	UACGCACAGGAUCUGCUUCUCUU	48
XM_005264298	644-666 G21A s	644	UCAAGUGGAUCCCACAUUUGAGA	28	UCUCAAUGUGGAUCUCCACUUGAAC	49
XM_005264298	648-670 G21A s	648	GUGGAUCCCACAUUUGAGGGCCA	29	UGGCCCUCAAUGUGGAUCCACUU	50
XM_005264298	646-668 C21A s	646	AAGUGGAUCCACAUUUGAGGGA	30	UCCCCUCAAUGUGGAUCCACUUGA	51
XM_005264298	811-833 G21A s	811	GUGUUUUGUCAGCAAAGAUGUA	31	UACAUUCUUUGCUGACAAACACCA	52
XM_005264298	812-834 G21A s	812	UGUUUUGUCAGCAAAGAUGUGA	32	UCACAUCUUUGCUGACAAACACC	53
XM_005264298	649-671 G21A s	649	UGGAUCCCACAUUUGAGGGCCGA	33	UCGGGCCUCAAUGUGGAUCCACU	54
XM_005264298	507-529 G21A s	507	GAAGGCAGAACUCCUGGGUGGA	34	UCCACGGCACAGGAUCUGCUUCUC	55
XM_005264298	502-524 C21A s	502	GAAGAGAACAGAACUCCUGUGA	35	UCACAGGAUCUGCUUCUCUUCUA	56
XM_005264298	645-667 G21A s	645	CAAGUGGAUCCACAUUUGAGGA	36	UCCUCAAUGUGGAUCCACUUGAA	57
XM_005264298	647-669 C21A s	647	AGUGGAUCCACAUUUGAGGGCA	37	UGCCCUCAAUGUGGAUCCACUUG	58
XM_005264298	503-525 G21A s	503	AAGAGAACAGAACUCCUGUGCA	38	UGCACAGGAUCUGCUUCUUCUCC	59
XM_005264298	506-528 G21A s	506	AGAACGAGAACUCCUGUGCGUGA	39	UCACGGCACAGGAUCUGCUUCUCU	60

表4.KHK dsRNA的未修饰的有义链序列和反义链序列

[0737]

Ref Seq; 有义链的相应mRNA位置	靶位点	有义 (5'-3')	SEQ ID NO: 反义 (5'-3')	SEQ ID NO:
XM_005264298.1 593-615 s	593	GCCUGCCAGAUGUGUCUGCUA	61	UAGCAGACACACAUCUGGCAAGGCUC
XM_005264298.1 642-664 s	642	GUUCAAGUGGAUCCACAUUGA	62	UCAAAUGUGGAUCCACUUUGAACUG
XM_005264298.1 640-662 s	640	CAGUUCAAGUGGAUCCACAUU	63	AAUGUGGAUCCACUUUGAACUGGG
XM_005264298.1 808-830 s	808	GUGGGUUUUGUACGCCAAAGAU	64	AUCUUUUGCUGACAAACACCACGU
XM_005264298.1 643-665 G21A s	643	UUCAAGUGGAUCCACAUUGAA	65	UUCAAUGUGGAUCCACUUUGAACU
XM_005264298.1 806-828 G21U s	806	ACGUGGGUUUUGUACGCCAAU	66	AUUUGUGACAAACACCACGUCU
XM_005264298.1 641-663 G21A s	641	AGUUCAAGUGGAUCCACAUUA	67	UAAUUGUGGAUCCACUUUGAACUGG
XM_005264298.1 877-899 s	877	UUGUAUGGUUCGUGUGAGGAAA	68	UUUCCUCACACGACCAUACAAGC
XM_005264298.1 795-817 s	795	UGGCUACGGAGACGUGGUGUU	69	AACACCCACGUUCUCCGUAGCCAAA
XM_005264298.1 828-850 s	828	UGUGGCCAAGGCACUUGGGGUU	70	AACCCCAAGUGGUUGGCCACAUUC
XM_005264298.1 639-661 s	639	CCAGUUCAAGUGGAUCCACAU	71	AUGUGGAUCCACUUUGAACUGGGU
XM_005264298.1 804-826 s	804	AGACGUGGUUUUGUCAGCAA	72	UUGCUGACAAACACCACGUCUCC
XM_005264298.1 555-577 s	555	GGUGGACAAGUACCUAAGGA	73	UCCUUAGGGUACUUUGGUCCAC
XM_005264298.1 632-654 s	632	AUCUGACCCAGUUCAAGUGGA	74	UCCACUUUGAACUGGGUCAGAUCA
XM_005264298.1 883-905 s	883	GGUCGGUGUGAGGAAAGGGCU	75	AGCCCCUUUCCUCACACGACCAU
XM_005264298.1 675-697 s	675	AUCCGGAGCAGGUGAAGAUGC	76	AGCAUUUACCCUGCUCCGAUGC
XM_005264298.1 800-822 s	800	ACGGAGACGUGGUUUUGUCA	77	UGACAAACACCACGUCUCCGUAG

XM_005264298.1_513-535_s	513	GAUCCUGUGGGGUAGU	78	ACUAGCCCCACGCCACAGGAUCUG	107
XM_005264298.1_875-897_s	875	GCUUGUAUGGUUCGGAGGA	79	UCCUCACACGCCAUACAAGCCC	108
XM_005264298.1_796-818_s	796	GGCUACGGAGACGGUGGUUU	80	AAACACCACGGUCUCCGUAGCCA	109
XM_005264298.1_891-913_s	891	GAGGAAAGGGCUGUGCUUGU	81	ACAAGGCACAGCCCCUUCCUCAC	110
XM_005264298.1_624-646_s	624	GAAGGUUUGAUCUGACCCAGUU	82	AACUGGGUCAGAUCUACCUUCUC	111
XM_005264298.1_552-574_s	552	CCUUGGGACAAGUACCCUA	83	UUAGGGGUACUUGGUCCACCAGGU	112
XM_005264298.1_619-641_C21A_s	619	UUUGAGAAGGUUGAUCUGACA	84	UGUCAGAUCAACCUUCUCAAAGU	113
XM_005264298.1_628-650_G21A_s	628	GUUGGAUCUGACCCAGUUCAA	85	UUUGAACUGGGUCAGAUCAACCU	114
XM_005264298.1_873-895_G21A_s	873	GGGCUUGUAUGGUUGUGUAA	86	UUCACACGACCAUACAAAGCCCCU	115
XM_005264298.1_836-858_G21A_s	836	AGCACUUGGGGUUCAGUCAA	87	UUGACUGGAAACCCCAAGUGGUUG	116
XM_005264298.1_797-819_G21A_s	797	GCUACGGAGACGGUGGUUUUA	88	UAAACACCACGUCUCCGUAGCCA	117
XM_005264298.1_802-824_C21A_s	802	GGAGACGUGGUUGUCAGA	89	UCUGACAAACACCACGUCUCCGU	118

[0738]

表5.KHK dsRNA的未修饰的有义链序列和反义链序列

Ref Seq: 有义链的相应mRNA位置	靶位点	有义 (5'-3')	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 反义 (5'-3')
XM_005264298.1_685-707_s	685	GUGAAGAUGCUGCAGCGGAUA	119	UAUCCGCUGCAGCAUCUUACCU
XM_005264298.1_687-709_s	687	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	120	UCUAUCCGCUUGCAGCAUCUUACAC
XM_005264298.1_686-708_G21A_s	686	UGAAAGAUGCUGCAGCGGAUA	121	UUUAUCCGCUUGCAGCAUCUUACCC

[0739]

- [0740] 实例3. 另外的siRNA的设计、合成、以及体外筛选  
 [0741] siRNA设计

[0742] 使用定制R和Python脚本设计了一组另外的靶向人KHK“己酮糖激酶(果糖激酶)”(人:NCBI refseqID XM\_005264298;NCBI GeneID:3795)以及毒物学物种KHK直向同源物(食蟹猴XM\_005545463;小鼠NM\_008439;大鼠:NM\_031855)的siRNA。人XM\_005264298REFSEQ mRNA具有2146个碱基的长度。用源自来自靶向大量脊椎动物基因的多于20,000种不同的siRNA设计的mRNA敲低的直接测量的一种线性模型来测定用于该组siRNA设计的基本原理和方法是如下:从位置501至位置2146(编码区和3' UTR)的每种潜在19聚体siRNA的预测功效。设计了在人、食蟹猴以及啮齿动物物种之间具有完美或接近完美匹配的KHK siRNA的子组,以及单独靶向人和食蟹猴的子组。设计了与小鼠和大鼠KHK直向同源物具有完美或接近完美匹配的另一个子组。对于siRNA的每条链,定制Python脚本用于一种蛮力搜索中来测量该siRNA与靶物种转录组中的所有潜在比对之间的错配的数目和位置。对种子区(在此定义为反义寡核苷酸中的位置2-9)中的错配以及siRNA的裂解位点(在此定义为反义寡核苷酸的位置10-11)给出额外权重。这些错配的相对权重是2.8;对于种子错配、裂解位点以及直到反义位置19的其他位置是1.2:1。第一位置中的错配被忽略。通过求和每个加权的错配的值来计算每条链的特异性分数。对于在人和食蟹猴中的反义分数 $\geq 3.0$ 并且预测功效是XM\_005264298转录物的 $\geq 70\%$ 敲低的siRNA给予优先。

[0743] 合成

[0744] 使用固体载体介导的亚磷酰胺化学以 $1\mu\text{mol}$ 规模在Mermade 192合成仪(BioAutomation)上合成KHK siRNA序列。固体载体是负载有定制GalNAc配体的可控孔度玻璃( $500^\circ\text{A}$ )或通用固体载体(AM生物化学公司(AM biochemical))。辅助合成试剂2'-F和2'-O-甲基RNA以及脱氧亚磷酰胺获自赛默飞世尔(Thermo-Fisher)公司(威斯康星州密尔沃基市)和Hongene(中国)。使用相应的亚磷酰胺将2' F、2' -O-甲基、RNA、DNA、以及其他修饰的核苷引入这些序列中。在一种GalNAc修饰的CPG载体上进行的3' GalNAc共轭的单链合成。定制CPG通用固体载体用于合成反义单链。用于所有亚磷酰胺的偶联时间(于乙腈中 $100\text{mM}$ )是5分钟,采用5-乙硫基-1H-四唑(ETT)作为活化剂(于乙腈中 $0.6\text{M}$ )。使用3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT,获自Chemgenes(美国马萨诸塞州威尔明顿)于无水乙腈/吡啶(1:1v/v)中的 $50\text{mM}$ 溶液来产生硫代磷酸酯键联。氧化时间是3分钟。在最终去除DMT基团(“DMT去除”的情况下合成所有序列。

[0745] 在完成固相合成之后,将寡核糖核苷酸从固体载体裂解且在密封的96孔深孔板中使用 $200\mu\text{L}$ 水性甲胺试剂在 $60^\circ\text{C}$ 下脱保护20分钟。对于用叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)基团保护的含有2' 核糖残基(2' -OH)的序列,使用TEA.3HF(三乙胺三氢氟化物)试剂进行第二步脱保护。向甲胺脱保护溶液中添加 $200\mu\text{L}$ 的二甲亚砜(DMSO)和 $300\mu\text{l}$  TEA.3HF试剂,并且将溶液在 $60^\circ\text{C}$ 下孵育另外20分钟。在裂解和脱保护步骤结束时,使合成板到达室温且通过添加 $1\text{mL}$ 的乙腈:乙醇混合物(9:1)来沉淀。将这些板在 $-80^\circ\text{C}$ 下冷却2小时,并且在一种多通道移液管帮助下小心地倾析上清液。将寡核苷酸沉淀再悬浮于 $20\text{mM}$  NaOAc缓冲液中,并且在配备有一个A905自动进样器和一个Frac 950积分收集器的一种AKTA普利菲尔(Purifier)系统上使用一个 $5\text{mL}$  HiTrap尺寸排阻柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare))脱盐。将脱盐的样品收集在96孔板中。将来自每一序列的样品通过LC-MS进行分析以确证一致性、UV(260nm)用于定量并且通过IEX色谱法选定样品集以确定纯度。

[0746] 在一个帝肯(Tecan)液体处理机器人上进行KHK单链的退火。将有义链和反义链的

等摩尔混合物组合且在96孔板中退火。在组合互补单链之后,将96孔板紧密密封且在炉中在100°C下加热10分钟,且使其历经2-3小时的时间段缓慢到达室温。将每种多链体的浓度标准化至于1X PBS中10uM且随后提交用于体外筛选测定。

[0747] 细胞培养和转染

[0748] 通过将4.9μl的Opti-MEM加每孔0.1μl的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州,产品目录号13778-150)与每孔5μl的siRNA双链体添加至384孔板中并且在室温孵育15分钟来转染Hep3b细胞。然后将含有约 $5 \times 10^3$ 个细胞的40μl的DMEM添加至该siRNA混合物。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。以10nM和0.1nM最终双链体浓度进行单剂量实验并且以经8、6倍稀释的从10nM至36fM最终双链体浓度进行剂量反应实验。

[0749] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒的总RNA分离

[0750] 在一个BioTek-EL406平台上使用DYNABEAD(英杰公司,目录号61012)使用自动方案分离RNA。简言之,将50μl的溶解/结合缓冲液以及含有3μl的磁珠的25μl溶解缓冲液添加至具有细胞的板。将板在一个电磁振荡器上在室温下孵育10分钟且随后捕获磁珠且移除上清液。随后将珠粒结合的RNA用150μl洗涤缓冲液A洗涤2次且用洗涤缓冲液B洗涤一次。随后将珠粒用150μl洗脱缓冲液洗涤、重新捕获并且移除上清液。

[0751] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统(Applied Biosystems),福斯特市(Foster City),加利福尼亚州,目录号4368813)的cDNA合成

[0752] 将每反应10μl的含有1μl 10X缓冲液、0.4μl 25X dNTP、1μl 10x随机引物、0.5μl逆转录酶、0.5μl RNA酶抑制剂、以及6.6μl的H2O的主混合物添加至以上分离的RNA。将板密封,混合且在一个电磁振荡器上在室温下孵育10分钟,接着在37°C下孵育2小时。随后将板在81°C下孵育8分钟。

[0753] 实时PCR

[0754] 将2μl的cDNA添加至主混合物中,该主混合物在一个384孔板(罗氏公司目录号04887301001)中每孔含有0.5μl的GAPDH TaqMan探针(Hs99999905)、0.5μl KHK探针(Hs00240827\_m1)、以及5μl Lightcycler480探针主混合物(罗氏公司目录号04887301001)。实时PCR在LightCycler480实时PCR系统(罗氏公司)上使用Δ Δ Ct(RQ)测定进行。在四次独立的转染中测试每种双链体。

[0755] 为了计算相对倍数变化,将实时数据使用Δ Δ Ct方法进行分析,并且标准化至以用10nM AD-1955转染的细胞或模拟转染的细胞执行的测定。使用4参数拟合模型使用XLFit计算IC<sub>50</sub>,并且将IC<sub>50</sub>归一化为转染了AD-1955的细胞或原初细胞。

[0756] KHK有义链序列和反义链序列的详细列表示于表6和表7中。

[0757] 单次剂量筛选的结果提供于表8中。数据表达为相对于AD-1955剩余的信息的百分比。

[0758] 表9示出用指定iRNA转染的Hep3B细胞中一子组试剂的剂量反应。指定的IC<sub>50</sub>值表示相对于未处理的细胞的IC<sub>50</sub>值。

表6.KHK未修饰的序列

[0759]

双链 体 名称	有义链	SEQ ID Ref Seq ; 相应的靶 mRNA位置	反义链	SEQ ID Corresponding mRNA position	target
AD-63824	AUCAAUGUGGGACAAUAAA	NM_008439.3_70-90 C21A_s	UUAUUGUCCACCACAUUGAUGA	NM_008439.3_68-90 C21A as	
AD-63829	GGUGGACAAAUACCCAGAGGA	NM_008439.3_78-9880218 s	UCCUCUGGGUAUUUGUCCACAC	NM_008439.3_76-9880218 as	
AD-63855	CUUUGAGAAGGUCAUCUGAA	NM_008439.3_393-413_C21A_s	UUCAGAUCGACCUUCUCAAAGUC	NM_008439.3_391-413_C21A as	
AD-63835	CCCGGUUCAAGUGGAUCCACA	NM_008439.3_413-4335-213 s	UGUGGAUCCACUUGAACCGGGUC	NM_008439.3_411-4335-213 as	
AD-63845	UGUGGCCAAGCACCUGGGUU	NM_008439.3_603-6235-213 s	AACCCCAGGUGCUUGGCCACAUUC	NM_008439.3_601-6235-213 as	
AD-63823	UUGCAGGGUUUGGAUGGCAUU	NM_008439.3_892-9124-212 s	AAUGCCAUCAAACCCUGCAAGC	NM_008439.3_890-9124-212 as	
AD-63863	GAAAGAGAAGCAGAUCCUGUGA	NM_005264298.1_504-524_C21A_s	UCACAGGAUCUGCUUCUCCCC	NM_005264298.1_502-524_C21A as	
AD-63881	AAAGAGAAGCAGAUCCUGUGCA	NM_005264298.1_505-525_G21A_s	UGCACAGGAUCUGCUUCUCCCC	NM_005264298.1_503-525_G21A as	
AD-63862	GAGAAGCAGAUCCUGUGCGUA	NM_005264298.1_507-527_G21A_s	UACGCACAGGAUCUGCUUCUCCU	NM_005264298.1_505-527_G21A as	
AD-63887	AGAAGCAGAUCCUGUGCGUGA	NM_005264298.1_508-528_G21A_s	UCACGGCACAGGAUCUGCUUCUCCU	NM_005264298.1_506-528_G21A as	
AD-63902	GAAGCAGAUCCUGUGCGUGGA	NM_005264298.1_509-529_G21A_s	UCCACGGCACAGGAUCUGCUUCUCCU	NM_005264298.1_507-529_G21A as	
AD-	GCAGAUCUGUGCGUGGGCU	NM_005264298.1_512-AGCCCCACGCAACAGGAUCUGCUU		NM_005264298.1_510-	

[0760]

63896		532 s		532 as
AD-	XM_005264298.1_515-			XM_005264298.1_513-
63843	GAUCCUGUGGGCUAGU	137 535 s	ACUAGCCCCACGGCACAGGAUCUG	187 535 as
AD-	XM_005264298.1_557-			XM_005264298.1_555-
63857	GGUGGACAAGUACCCUAAGGA	138 577 s	UCCUUAGGGUACUUGUCCACCAG	188 577 as
AD-	XM_005264298.1_595-			XM_005264298.1_593-
63836	GCCUGCCAGAUGUGUCUGCUA	139 615 s	UAGCAGACACAUUCUGGCAGGCUC	189 615 as
AD-	XM_005264298.1_621-			XM_005264298.1_619-
63834	UUUGAGAAGGUUGAUCUGACA	140 641 C21A s	UGUCAGAUCAACCUUCUCAAAGU	190 641 C21A as
AD-	XM_005264298.1_630-			XM_005264298.1_628-
63839	GUUGAUCUGACCCAGUUCAAA	141 650 G21A s	UUUGAACUGGGUCAGAUCAACCU	191 650 G21A as
AD-	XM_005264298.1_634-			XM_005264298.1_632-
63821	AUCUGACCCAGUCAAGUGGA	142 654 s	UCCACUUGAACUGGGUCAGAUCA	192 654 as
AD-	XM_005264298.1_641-			XM_005264298.1_639-
63847	CCAGUUCAAGUGGAUCCACAU	143 661 s	AUGUGGAUCCACUUGAACUGGGU	193 661 as
AD-	XM_005264298.1_642-			XM_005264298.1_640-
63846	CAGUUCAAGUGGAUCCACAUU	144 662 s	AAUGUGGAUCCACUUGAACUGGG	194 662 as
AD-	XM_005264298.1_643-			XM_005264298.1_641-
63826	AGUUCAAGUGGAUCCACAUUA	145 663 G21A s	UAAUUGGGGAUCCACUUGAACUGG	195 663 G21A as
AD-	XM_005264298.1_644-			XM_005264298.1_642-
63841	GUUCAAGUGGAUCCACAUUGA	146 664 s	UCAA AUGUGGAUCCACUUGAACU	196 664 as
AD-	XM_005264298.1_645-			XM_005264298.1_643-
63856	UUCAAGUGGAUCCACAUUGAA	147 665 G21A s	UUCAA AUGUGGAUCCACUUGAAC	197 665 G21A as
AD-	XM_005264298.1_647-			XM_005264298.1_645-
63868	UCAGUGGAUCCACAUUGAGA	148 666 G21A s	UCUCAA AUGUGGAUCCACUUGAAC	198 666 G21A as
AD-	XM_005264298.1_648-			XM_005264298.1_644-
63869	CAAGUGGAUCCACAUUGAGGA	149 667 G21A s	UCCUCAA AUGUGGAUCCACUUGAA	199 667 G21A as
AD-	XM_005264298.1_649-			XM_005264298.1_646-
63880	AAUGUGGAUCCACAUUGAGGA	150. 668 C21A s	UCCCUCAA AUGUGGAUCCACUUGA	200 668 C21A as
AD-	XM_005264298.1_649-			XM_005264298.1_647-
63875	AGUGGAUCCACAUUGAGGGCA	151 669 C21A s	UGCCCUCAA AUGUGGAUCCACUUG	201 669 C21A as

## 说 明 书

[0761]

AD-	63874GUGGAUCCACAUUGAGGCCA	152	XM_005264298.1_650- 670 G21A s	UGGCCCUAAUGUGGAUCCACUU	202	XM_005264298.1_648- 670 G21A as
AD-	63897UGGAUCCACAUUGAGGCCGA	153	XM_005264298.1_651- 671 G21A s	UCGGCCCUAAUGUGGAUCCACU	203	XM_005264298.1_649- 671 G21A as
AD-	63879GAUCCACAUUGGGGGAA	154	XM_005264298.1_653- 673 s	UUCGGCCCUAAUGUGGAUCCA	204	XM_005264298.1_651- 673 as
AD-	63819GUGAAGAUGCUGCAGCGAUA	155	XM_005264298.1_687- 707 s	UAUCCCGUGCGAGCAUCUUCACCU	205	XM_005264298.1_685- 707 as
AD-	63825GAAAGAUGCUGCAGCGGAAUAGA	156	XM_005264298.1_689- 709 s	UCUAUCCCGUGCAGCAUCUUCAC	206	XM_005264298.1_687- 709 as
AD-	63837GGCUACGGAGACGUGGUUU	157	XM_005264298.1_797- 817 s	AACACCACGUCUCCGUAGCCAA	207	XM_005264298.1_795- 817 as
AD-	63853GGCUACGGAGACGUGGUUU	158	XM_005264298.1_798- 818 s	AAACACCCACGGUCUCCGUAGCCAA	208	XM_005264298.1_796- 818 as
AD-	63854GCUACGGAGACGUGGUUU	159	XM_005264298.1_799- 819 G21A s	UAAAACACCACGUCUCCGUAGCCAA	209	XM_005264298.1_797- 819 G21A as
AD-	63859GGAGACGGGGGUUGUCAGA	160	XM_005264298.1_804- 824 C21A s	UCUGACAAACACCCACGUCUCCGU	210	XM_005264298.1_802- 824 C21A as
AD-	63820ACGUGGUUUUGUCAGCAAU	161	XM_005264298.1_808- 828 G21U s	AUUUGCUGACAAACACCCACGUCU	211	XM_005264298.1_806- 828 G21U as
AD-	63851GUGGUGUUUGUCAGCAAAGAU	162	XM_005264298.1_810- 830 s	AUCUUUGCUGACAAACACCCACG	212	XM_005264298.1_808- 830 as
AD-	63873GGGUUUUGUCAGCAAAGAUGU	163	XM_005264298.1_812- 832 s	ACAUCUUUGCUGACAAACACCCAC	213	XM_005264298.1_810- 832 as
AD-	63886GUGGUUUUGUCAGCAAAGAUGUA	164	XM_005264298.1_813- 833 G21A s	UACAUUUUGUGACAAACACCCA	214	XM_005264298.1_811- 833 G21A as
AD-	63892UGUUUGUCAGCAAAGAUGUGA	165	XM_005264298.1_814- 834 G21A s	UCACAUUUUGUGACAAACACCC	215	XM_005264298.1_812- 834 G21A as
AD-	63901GUUUGUCAGCAAAGAUGUGGA	166	XM_005264298.1_815- 835 C21A s	UCCACAUUUUGUGACAAACAC	216	XM_005264298.1_813- 835 C21A as
AD-	UGUCAGCAAAGAUGUGGCCA	167	XM_005264298.1_817-	UGGCCACACAUUUUGCUGACAAAC	217	XM_005264298.1_815-

63885		837 s		837 as
AD-	ADUCAGCAAAGAUGUGGCCAA	XM_005264298.1_818-s	UUGGCCACAUUUUGCUGACAAA	XM_005264298.1_816-838 as
AD-	63861UGUCAGCAAAGAUGUGGCCAA	168 838 s	218	838 as
AD-	63842UGUGGCCAAGCACUUGGGUU	169 850 s	AACCCCAAGUGCUUGGCCACAUC	XM_005264298.1_828-219
AD-	63849AGCACAUUGGGGUUCCAGUCAA	170 858 G21A s	220	850 as
AD-	63844GGCUUGUAUGGUCGUGUGAA	171 895 G21A s	UUGACUUGGAACCCCAGUGCUUG	XM_005264298.1_836-858 G21A as
AD-	63832UUGUAUGGUCGUGAGGAAA	172 899 s	221	G21A as
AD-	63827GGUCGUGUGAGGAAAGGGCU	173 905 s	UUCACACGACCAUACAAAGCCCCU	XM_005264298.1_873-895 G21A as
AD-	63858GAGGAAAAGGGCUGUGCUUGU	174 913 s	222	899 as
			UUUCCUCACACGACCAUACAAGC	XM_005264298.1_877-905 as
			223	905 as
			ACAAGCACAGCCCCUUUCCUCAC	XM_005264298.1_891-913 as

[0762]

表7.KHK修饰的序列

双链体名称	有义寡核苷酸名称	有义链	SEQ ID NO.	反义寡核苷酸名称	反义链	SEQ ID NO.	物种
AD-63824	A-127677	AfsusCfaAfufuGfuGffGfuUfgGfaCfaAfaUfaAfl96	225	A-127678	usUfsuUfuUfgUfcCfaccAfcaFuUfgAfusgsa	275	Mm
AD-63829	A-127663	GfsgsUfgGfaCfaAfAfUfaCfcCfcCfaGfaGfgAfl96	226	A-127664	uCfscUfcUfgGfgUfauuUfgUfcCfaCfcasac	276	Mm
AD-63855	A-127673	CfsusUfuGfaGfaAfGffGfuCfcAfuCfuGfaAfl96	227	A-127674	usUfsuAfufuGfcAfccuUfcUfcAfaAfgusuc	277	Mm
AD-63835	A-127665	CfsesCfgGfuUfcAfaGfuGfgAfuCfuGfaAfcAfl96	228	A-127666	usGfsuGfgAfucfcAfciuGfaAfcCfgGfgusuc	278	Mm
AD-63845	A-127669	UfsgsUfgGfcCfaAfGfcCfcUfgGfgGfuUfl96	229	A-127670	asAfsccfcCfaGfgUfgcuUfgGfcCfaCfasusc	279	Mm
AD-63823	A-127661	UfsusGfcAfgGfgGfuUfuGfaUfgGfcAfuUfl96	230	A-127662	asAfsuGfcCfaUfcAfaacCfcCfuGfcAfagasc	280	Mm
AD-63863	A-127587	GfsasAfgAfgAfaGfgAfgAfuCfcUfgUfgAfl96	231	A-127588	usCfsaCfaCfaGfgAfuCfugCfuCfuUfcscsa	281	Hs
AD-63881	A-127593	AfsasGfaGfaAfgCfaAfGfaUfcCfuGfuGfcAfl96	232	A-127594	usGfscaAfcaAfgeGfaUfcugCfuUfcUfcUfuscs	282	Hs
AD-63862	A-127571	GfsasGfaAfgCfaGfaAfUfcCfuGfuGfcGfuAfl96	233	A-127572	usAfsicGfcAfcAfgGfaucUfgCfuUfcUfcusu	283	Hs
AD-63887	A-127595	AfsgsAfaGfcAfgAfgAfuCfcUfgUfgUfgUfgAfl96	234	A-127596	usCfsaCfgCfaCfaGfgauCfuGfcfuCfuscsu	284	Hs
AD-63902	A-127585	GfsasAfgCfaGfaUfcCfcUfcGfuGfcGfuGfcAfl96	235	A-127586	usCfcscAfcGfcAfcAfggalUfcUfgCfuUfcsc	285	Hs
AD-63896	A-127567	GfsesAfgAfuCfcUfgGfuUfgCfgUfgGfcUfl96	236	A-127568	asGfscCfcCfaCfcGfcfaCfaGfgAfuCfuGfesusu	286	Hs
AD-63843	A-127637	GfsasUfcCfuGfuGfcUfgGfuGfgGfgCfuAfgUfl96	237	A-127638	asCfsuAfgCfcCfcAfcgcaAfgeGfaUfcusug	287	Hs
AD-63857	A-127627	GfsgsUfgGfaCfaAfGfuUfaCfcCfcCfaGfgAfl96	238	A-127628	usCfcscUfuAfgGfgUfacuUfgUfcCfaCfcasag	288	Hs
AD-63836	A-127603	GfsesCfuGfcCfaGfaGfuUfgUfgCfuAfgUfl96	239	A-127604	usAfsqCfaGfaCfcAfcgcaAfgeGfaUfcsc	289	Hs
AD-63834	A-127649	UfsusUfgAfgAfaGfgGfuUfgAfcAfl96	240	A-127650	usGfsuCfaGfaUfcAfacclUfuCfuCfaAfagsu	290	Hs
AD-63839	A-127651	GfsusUfgAfuCfuGfuGfcAfcCfaGfuUfcAfaAfl96	241	A-127652	usUfsuGfaAfcUfgGfguAfgAfuCfaAfcsusu	291	Hs
AD-63821	A-127629	AfsusCfuGfaCfcCfaGffGfuUfcAfaGfuGfgAfl96	242	A-127630	usCfcscAfcUfuGfaAfsguGfgUfcAfgAfuscsa	292	Hs
AD-63847	A-127623	CfsesAfgUfuCfaAfGfuUfgGfaUfcCfaCfaUfl96	243	A-127624	asUfsqUfgGfaUfcCfacuUfgAfaCfuGfgsgsu	293	Hs
AD-63846	A-127607	CfsasGfuUfcAfaGfuGffGfaUfcCfcAfcAfuUfl96	244	A-127608	asAfsuGfuGfgAfuCfcacUfuGfaAfcUfgsgsg	294	Hs
AD-63826	A-127615	AfsgsUfuCfaAfgUffGffGfaUfcCfaUfuAfl96	245	A-127616	usAfsuUfgUfgGfaUfcuaCfuUfgAfaCfusgs	295	Hs
AD-63841	A-127605	GfsusUfcAfaGfuGffGfaUfcAfcAfuUfgAfl96	246	A-127606	usCfsaAfuGfuGfgAfuCCafUfuGfaAfcusug	296	Hs

[0763]

[0764]

AD-63856	A-127611	UfsusCfaAfgUfgGfAAUfcCfaCfaCfaAfl96	247	A-127612	usUfscAfaUfgUfgGfaucCfuCfaCfuUfgAfascu	297	Hs
AD-63868	A-127573	UfsesAfaGfuGfgAfuFcAfcaFcAfcaFcAfcaFl96	248	A-127574	usCfsuCfaAfaGfuGfgAfcAfcaFcAfcaFcAfcaFl96	298	Hs
AD-63869	A-127589	CfsasAfgUfgGfAAUfcCfcFaCfaUfuGfaGfgAfafl96	249	A-127590	usCfscUfcAfaUfgUfggAfcCfaCfaUfgsasa	299	Hs
AD-63880	A-127577	AfsasGfuGfgAfuCfcAfcaFuUfgAfggGfgAfl96	250	A-127578	usCfscCfuCfaAfuGfuggAfuCfcAfcaUfusgsa	300	Hs
AD-63875	A-127591	AfsgsUfgGfaUfcCfaFcAfcfaUfuGfaGfgGfcAfl96	251	A-127592	usGfscCfcUfcAfaUfgugGfaUfcCfaCfususg	301	Hs
AD-63874	A-127575	GfsusGfgAfuCfcAfcaFuUfgAfggGfgCfcAfl96	252	A-127576	usGfsgCfcCfuCfaAfuGfgGfgAfuCfcAfcsusu	302	Hs
AD-63897	A-127583	UfsgsGfaUfcCfaCfaAfuUfuGfaGfgGfcCfgAfl96	253	A-127584	usCfsgGfcCfcUfcAfaangUfgGfaUfcCfascsu	303	Hs
AD-63879	A-127561	GfsasUfcCfaCfaUfuUfgfaGfgGfcCfgCfaAfl96	254	A-127562	usUfscCfcGfcCfcUfcfaaUfgUfgGfaUfcscsa	304	Hs
AD-63819	A-127597	GfsusGfaAfgAfuGfcUfgCfcGfgAfaUfafl96	255	A-127598	usAfsuCfcGfcUfgCfagcAfuCfuUfcAfcsusu	305	Hs
AD-63825	A-127599	GfsasAfgAfuGfcUfgCfcGfgAfuaAfgafl96	256	A-127600	usCfsuAfuCfcGfcUfgcaGfcAfuCfuUfcscasc	306	Hs
AD-63837	A-127619	UfsgsGfcUfaCfcGfcAfgGfaCfcGfcUfgUfl96	257	A-127620	asAfsAcfcCfcCfcUfcuccCfcUfaGfcCfasasa	307	Hs
AD-63853	A-127641	GfsgsCfuAfcGfgAfgAfcaFcGfcGfuGfgUfgUfufl96	258	A-127642	asAfsaCfaCfcAfcGficiuCfcGfuAfigCfcscasa	308	Hs
AD-63854	A-127657	GfsccsUfaCfcGfcGfaGfaGfcAfcfcUfgGfuUfuAfl96	259	A-127658	usAfsaaCfcAfcCfcfaCfcgcuUfcCfcUfaGfcscsa	309	Hs
AD-63859	A-127659	GfsgsAfgAfcGfuGfgUfgUfgUfcAfgAfafl96	260	A-127660	usCfsuGfaCfaAfaCfacCfcGfuCfuCfcgsu	310	Hs
AD-63820	A-127613	AfsesGfuGfgUfgUfuUfgUfgUfcAfgCfaAfaUfl96	261	A-127614	asUfsuUfgCfuGfaCfcGfiusesu	311	Hs
AD-63851	A-127609	GfsusGfgUfgUfuUfgUfuGfuGfaAfaGfaUfl96	262	A-127610	asUfscUfuUfgUfgCfuGfaCfaAfaCfcgsu	312	Hs
AD-63873	A-127559	GfsgsUfgUfuUfgUfcAfgCfaAfaGfaUfgUfl96	263	A-127560	asCfsaUfcUfuUfgCfugacfaAfaCfcscasc	313	Hs
AD-63886	A-127579	GfsusGfuCfaGfcAfcaGfcAfcaAfgaAfuaGfufl96	264	A-127580	usAfsaCfuCfuUfuGfcugAfcAfaAfcaCfcscsa	314	Hs
AD-63892	A-127581	UfsgsUfuUfgUfcAfGfcCfaAfaGfaUfgUfgAfl96	265	A-127582	usCfsaaCfaUfcUfuUfgCfcuGfaCfaAfcCfcsc	315	Hs
AD-63901	A-127569	GfsusUfuGfuCfaAfGfcfaAfaGfuGfgAfaUfl96	266	A-127570	usCfcscAfcAfcAfcUfgcUfgAfcAfaAfcsasc	316	Hs
AD-63885	A-127563	UfsusGfuCfaGfcAfcaGfcAfcaAfgaAfuaGfufl96	267	A-127564	usGfsgCfcAfcAfuCfuuuGfcUfgAfcAfafasasc	317	Hs
AD-63861	A-127555	UfsgsUfcAfgCfaAfAfGfcfaUfgUfgUfgAfl96	268	A-127556	usUfsgGfcCfcfaCfcfaUfcuuUfgCfuGfaCfasasa	318	Hs
AD-63842	A-127621	UfsgsUfgGfcCfaAfGfcfaAfaGfuGfgGfuUfl96	269	A-127622	asAfsccCfcCfaAfgUfgcUfgAfcAfaAfcsasc	319	Hs
AD-63849	A-127655	AfsgsCfaCfuUfgGfGfuUfcGfuCfaAfaUfl96	270	A-127656	usUfsgAfcUfgGfaAfccccCfaAfgUfgCfususg	320	Hs
AD-63844	A-127653	GfsigsGfcUfuGfuGfuAfUfgGfgUfcGfuGfuGfaAfl96	271	A-127654	usUfscAfcAfcGfcfaCfcfaUfcAfaGfcCfcscu	321	Hs
AD-63832	A-127617	UfsusGfuAfuGfgUfcGfuGfuGfaGfaAfaAfl96	272	A-127618	usUfsuCfcUfcAfcAfcgacCfcAfuAfcAfafasgsc	322	Hs
AD-63827	A-127631	GfsgsUfcGfuGfuGfaAfGfgGfgAfaAfGfgGfuUfl96	273	A-127632	asGfscCfcCfuUfuCfcuAfcGfaCfcasuu	323	Hs
AD-63858	A-127643	GfsasGfgAfaAfGfgGfgCfcUfgUfgCfuUfgUfl96	274	A-127644	asCfsaaCfcAfcGfcfaGfccccCfuUfuCfcUfcscasc	324	Hs

[0765] 表8.Hep3b中的KHK单次剂量筛选

[0766]

双链体ID	10 nM_AVG	0.1 nM_AVG	10 nM_STDEV	0.1 nM_STDEV
AD-63819	82.0	82.1	24.1	10.0
AD-63820	11.2	45.6	N/A	3.6
AD-63821	68.2	102.4	19.8	10.5
AD-63823	134.3	84.4	22.3	14.0
AD-63824	94.1	98.0	4.1	4.3
AD-63825	70.4	77.7	6.5	5.3
AD-63826	45.3	89.7	5.5	7.5
AD-63827	51.7	130.0	21.2	82.8
AD-63829	89.6	78.2	1.3	1.5
AD-63832	17.4	80.5	1.4	19.5
AD-63834	11.0	72.7	0.8	20.7
AD-63835	17.2	103.5	8.1	76.4
AD-63836	37.7	63.8	2.8	23.5
AD-63837	87.3	66.8	33.0	5.2
AD-63839	N/A	34.0	N/A	2.8
AD-63841	46.4	64.4	0.7	7.9
AD-63842	72.6	76.9	22.7	13.9
AD-63843	48.6	108.0	9.0	35.8
AD-63844	68.2	80.1	16.5	12.9
AD-63845	54.4	68.1	43.3	4.0
AD-63846	66.0	88.9	18.8	2.2
AD-63847	43.7	58.1	17.5	12.7
AD-63849	31.0	85.4	4.4	30.3
AD-63851	28.9	29.5	4.1	21.4
AD-63853	39.9	49.3	0.0	11.7
AD-63854	7.1	53.3	2.6	10.1
AD-63855	15.0	32.6	14.5	7.3
AD-63856	66.8	96.9	3.3	15.1
AD-63857	64.9	101.4	7.3	3.5
AD-63858	67.5	89.9	5.6	18.8
AD-63859	44.8	91.0	1.1	10.2
AD-63861	78.2	89.1	0.0	8.3
AD-63862	48.0	92.9	14.8	14.5
AD-63863	39.3	65.7	17.9	13.1
AD-63868	47.4	106.8	4.4	13.1
AD-63869	20.7	68.0	3.8	28.2
AD-63873	22.6	102.8	8.0	31.7
AD-63874	64.7	107.6	2.9	6.3
AD-63875	85.2	108.4	30.6	60.3
AD-63879	66.1	81.1	3.6	7.9
AD-63880	86.7	85.9	19.4	3.8
AD-63881	60.8	63.1	4.5	3.1
AD-63885	75.1	66.3	12.4	11.6
AD-63886	27.5	53.3	5.1	7.8
AD-63887	40.0	70.5	8.4	0.7

[0767]	AD-63892	19.9	82.7	1.5	5.7
	AD-63896	88.6	86.6	1.7	15.6
	AD-63897	96.7	91.4	4.3	4.9
	AD-63901	48.1	97.6	4.5	2.9
	AD-63902	43.1	99.2	8.6	9.7

[0768] 表9.Hep3b中的KHK剂量反应筛选

[0769]	双链体ID	IC50 (nM)
	AD-63851	0.027
	AD-63820	0.010
	AD-63853	0.067
	AD-63839	0.015
	AD-63854	0.075
	AD-63855	0.017853
	AD-63886	0.082879

[0770] 等效物

[0771] 本领域的普通技术人员仅仅使用常规实验将识别或能够确定在此描述的具体实施例和方法的多种等效物。这样的等效物旨在由以上权利要求书的范围所涵盖。

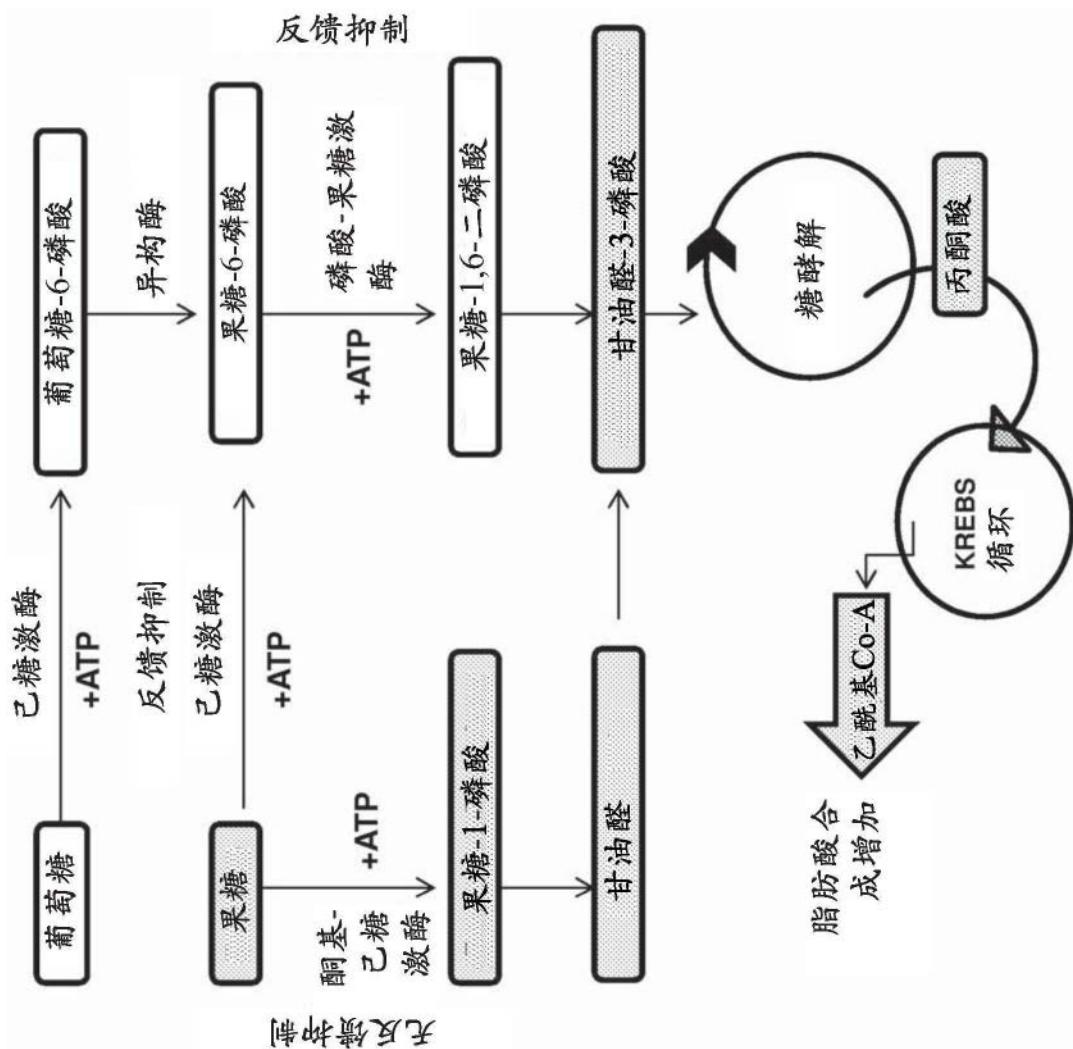


图1

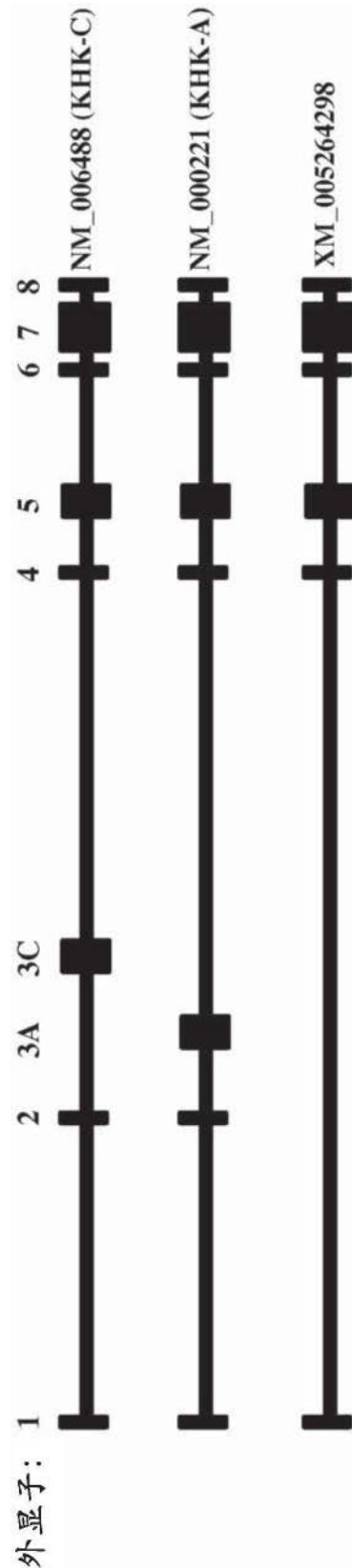


图2