



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117441017 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 23

(21) 申请号 202280040593.7

(22) 申请日 2022.06.07

(30) 优先权数据

63/208299 2021.06.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2022/055292 2022.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/259145 EN 2022.12.15

(71) 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

(72) 发明人 D·林登

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 李波 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

权利要求书10页 说明书28页
序列表30页 附图5页

(54) 发明名称

用于治疗肝病的组合疗法

(57) 摘要

提供了治疗受试者的肝病的方法,该方法包括向该受试者施用:i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。还提供了药物和试剂盒,其包含i) PNPLA3表达抑制剂;和ii) 胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂。

1. 一种治疗受试者的肝病的方法,该方法包括向该受试者施用:
 - i) 含patatin样磷脂酶域3(PNPLA3)表达抑制剂;以及
 - ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中该反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5731内的位点互补。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中该反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5644-5731内的位点互补。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中该反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5642内的位点互补。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中该反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5620内的位点互补。
7. 根据权利要求2至6中任一项所述的方法,其中该编码PNPLA3的核酸是mRNA。
8. 根据权利要求2至7中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸的长度为12至30个核苷。
9. 根据权利要求2至7中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸的长度为16至30个核苷。
10. 根据权利要求2至9中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中该一个或多个修饰的糖部分是2'-脱氧基、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'或其组合。
12. 根据权利要求2至11中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含一个或多个修饰碱基。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中该一个或多个修饰碱基是5-甲基胞嘧啶。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中该反义寡核苷酸中的每个胞嘧啶是5'甲基胞嘧啶。
15. 根据权利要求2至14中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含一个或多个非天然核苷间键联。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中该一个或多个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。
18. 根据权利要求2至17中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。
19. 根据权利要求2至17中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。
20. 根据权利要求2至19中任一项所述的方法,其中该反义寡核苷酸包含:
 - a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;
 - b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

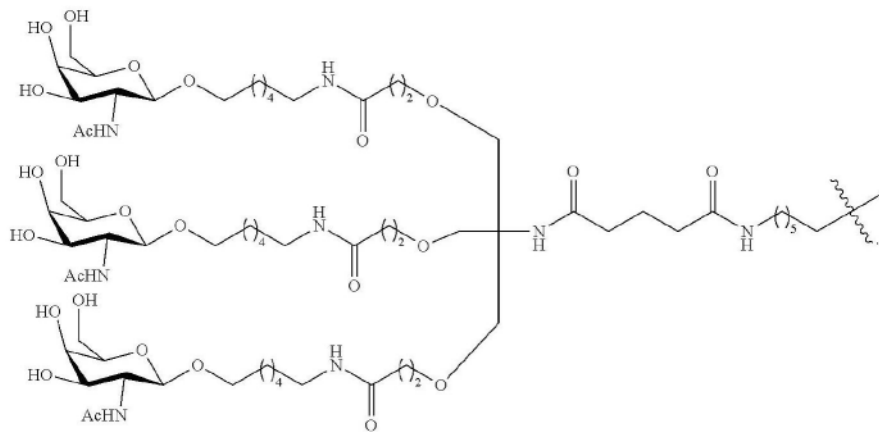
其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖,

其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

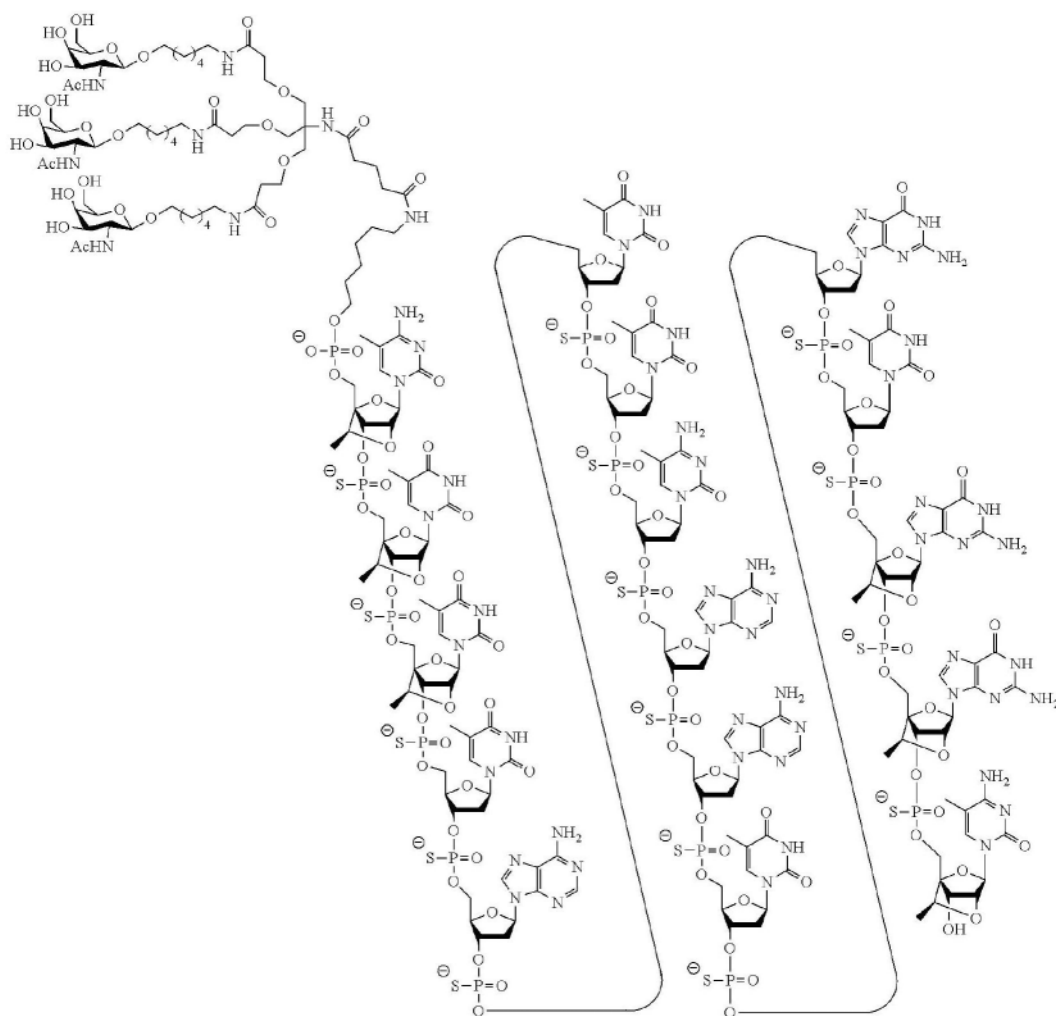
21. 根据权利要求2至20中任一项所述的方法,其中该PNPLA3表达抑制剂还包含缀合物基团。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中该缀合物基团位于该反义寡核苷酸的5'末端。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中该缀合物基团是:



24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中该PNPLA3表达抑制剂是下式 (SEQ ID NO:2) 的化合物:



或其药学上可接受的盐。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO: 25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 33); 或者

(6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D,

X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

27. 根据权利要求25所述的方法, 其中该肽包含氨基酸序列
HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO:33)。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的方法, 其中该肽还包含对该氨基酸序列中的氨基酸的修饰。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中该修饰是添加酰基部分。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中该修饰是赖氨酸残基的N(ϵ)基团上的棕榈酰基部分。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中该棕榈酰基经由接头与赖氨酸连接。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中该接头是 γ 谷氨酸。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂与该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂同时施用。

34. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂和该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到1小时施用。

35. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂和该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到24小时施用。

36. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂和该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到72小时施用。

37. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂和该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到一周施用。

38. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂和该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到两周施用。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂肠胃外施用。

40. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。

41. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。

42. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法, 其中将该PNPLA3表达抑制剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法, 其中将该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂肠胃外施用。

44. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法, 其中将该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。

45. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法, 其中将该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。

46. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法, 其中将该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。

47. 根据权利要求1至46中任一项所述的方法, 其中该受试者是肥胖的和/或患有2型糖

尿病。

48. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法, 其中该肝病是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

49. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法, 其中该肝病是非酒精性脂肪性肝炎。

50. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法, 其中该肝病是肝纤维化。

51. 一种减少患有肝病的受试者的肝脏中脂肪变性的方法, 该方法包括向该受试者施用:

i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 以及

ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为12至30个核苷。

54. 根据权利要求52所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为16至30个核苷。

55. 根据权利要求52至54中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

56. 根据权利要求52至54中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。

57. 根据权利要求52至56中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含:

a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段; 以及

c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间, 其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖; 其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

58. 根据权利要求51至57中任一项所述的方法, 其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFSTDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO: 25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO: 33); 或者

(6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

60. 根据权利要求51至59中任一项所述的方法, 其中与单独施用该PNPLA3表达抑制剂或该胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 该受试者的总肝脂肪变性降低。

61. 根据权利要求51至59中任一项所述的方法, 其中与单独施用该PNPLA3表达抑制剂或该胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 该受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。

62. 根据权利要求51至59中任一项所述的方法, 其中与单独施用该PNPLA3表达抑制剂或该胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 该受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。

63. 根据权利要求51至62中任一项所述的方法, 其中该肝病是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

64. 根据权利要求51至62中任一项所述的方法, 其中该肝病是非酒精性脂肪性肝炎。

65. 根据权利要求51至62中任一项所述的方法, 其中该肝病是肝纤维化。

66. 一种减少患有非酒精性脂肪肝病的受试者的肝脏中炎症的方法, 该方法包括向该受试者施用:

- i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 以及
- ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为12至30个核苷。

69. 根据权利要求67所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为16至30个核苷。

70. 根据权利要求67至69中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

71. 根据权利要求67至69中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。

72. 根据权利要求67至71中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含:

- a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;
- b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段; 以及
- c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间, 其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖; 其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

73. 根据权利要求66至72中任一项所述的方法, 其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

74. 根据权利要求73所述的方法, 其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO: 25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:14);

(2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:15);

(3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO:20);

(4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:18);

(5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:33); 或者

(6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

75. 根据权利要求50至58中任一项所述的方法, 其中与单独施用该PNPLA3表达抑制剂或该胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝脏炎症相比, 该受试者的肝脏炎症减少至少50%。

76. 一种减少患有肝病的受试者的肝胶原的方法, 该方法包括向该受试者施用:

- i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 以及
- ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

77. 根据权利要求76所述的方法, 其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为12至30个核苷。

79. 根据权利要求77所述的方法, 其中该反义寡核苷酸的长度为16至30个核苷。

80. 根据权利要求77至79中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

81. 根据权利要求77至79中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。

82. 根据权利要求77至81中任一项所述的方法, 其中该反义寡核苷酸包含:

- a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;
- b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段; 以及
- c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间, 其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖; 其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

83. 根据权利要求76至82中任一项所述的方法, 其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

84. 根据权利要求83所述的方法, 其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO:25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D,

X23是V,X24是A,X27是V,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:14);

(2) X2是S,X10是K,X12是E,X13是Y,X15是D,X16是S,X17是E,X18是R,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:15);

(3) X2是S,X10是K,X12是K,X13是Y,X15是E,X16是G,X17是Q,X18是A,X20是K,X21是E,X23是I,X24是A,X27是E,X28是K,并且X30是R(SEQ ID NO:20);

(4) X2是S,X10是K,X12是S,X13是Y,X15是D,X16是S,X17是R,X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:18);

(5) X2是S,X10是K,X12是E,X13是Y,X15是D,X16是S,X17是E,X18是R,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:33);或者

(6) X2是S,X10是K,X12是S,X13是Y,X15是D,X16是S,X17是R,X18是R,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:19)。

85. 根据权利要求50至84中任一项所述的方法,其中与单独施用该PNPLA3表达抑制剂或该胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝胶原相比,该受试者的肝胶原减少至少25%。

86. 根据权利要求50至85中任一项所述的方法,其中该受试者是肥胖的和/或患有2型糖尿病。

87. 根据权利要求50至85中任一项所述的方法,其中该肝病是非酒精性脂肪性肝炎。

88. 根据权利要求50至85中任一项所述的方法,其中该肝病是肝纤维化。

89. 一种药学上可接受的组合物,该药学上可接受的组合物包含:

- i) 含patatin样磷脂酶域3(PNPLA3)表达抑制剂;
- ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂;
- iii) 至少一种药学上可接受的赋形剂。

90. 根据权利要求89所述的组合物,其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。

91. 根据权利要求90所述的组合物,其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

92. 根据权利要求90所述的组合物,其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。

93. 根据权利要求90至92中任一项所述的组合物,其中该反义寡核苷酸包含:

- a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;
- b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及
- c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖;其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

94. 根据权利要求89至93中任一项所述的组合物,其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

95. 根据权利要求94所述的组合物,其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30(SEQ ID NO:25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:14);

(2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:15);

(3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO:20);

(4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:18);

(5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:33); 或者

(6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

96. 根据权利要求89至95中任一项所述的组合物, 其中该组合物被配制用于肠胃外施用。

97. 一种试剂盒, 该试剂盒包含:

- i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 以及
- ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

98. 根据权利要求97所述的试剂盒, 其中该PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。

99. 根据权利要求98所述的试剂盒, 其中该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

100. 根据权利要求98所述的试剂盒, 其中该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。

101. 根据权利要求98至100中任一项所述的试剂盒, 其中该反义寡核苷酸包含:

- a) 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;
- b) 由三个连接的核苷组成的5'翼区段; 以及
- c) 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间, 其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖; 其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

102. 根据权利要求97至101中任一项所述的试剂盒, 其中该胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。

103. 根据权利要求102所述的试剂盒, 其中该肽包含氨基酸序列:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO:25)

其中,

(1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:14);

(2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:15);

(3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO:20);

(4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:18);

(5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:33); 或者

(6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

用于治疗肝病的组合疗法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交且通过引用以其全文特此并入的序列表。所述ASCII副本创建于2021年6月4日,名称为0098-0076PR1_SL.txt并且大小为60,642字节。

技术领域

[0003] 本披露提供了一种治疗受试者的肝病的方法,该方法包括向该受试者施用:i)含patatin样磷脂酶域3(PNPLA3)表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂。还提供了药物和试剂盒,其包含:i)PNPLA3表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂。

背景技术

[0004] 肝病的发病率在世界范围内正在增加,特别是在西方国家。特别常见的是非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。NAFLD涵盖从脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝硬化的一系列肝病。NAFLD被定义为在肝脏中脂肪积聚超过按重量计5%、缺乏显著的酒精消耗、脂肪生成药物治疗或遗传性障碍(Kotronen等人,Arterioscler Thromb.Vasc.Biol.[动脉粥样硬化、血栓形成和血管生物学]2008,28:27-38)。

[0005] 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是具有炎症和肝损伤迹象的NAFLD。NASH在组织学上通过大泡性脂肪变性、肝细胞气球样变性和小叶炎性浸润来定义(Sanyal,Hepatol.Res.[肝脏病学研究]2011.41:670-4)。据估计,NASH影响普通人群的2%-3%。在存在其他病变的情况下,如肥胖或糖尿病,估计的患病率分别增加至7%和62%(Hashimoto等人,J.Gastroenterol.[胃肠病学杂志]2011.46(1):63-69)。

[0006] PNPLA3(481个氨基酸)是含patatin样磷脂酶域家族的成员,其在ER中和在脂滴上表达。在人中,PNPLA3在肝脏中高度表达,而在脂肪组织表达低五倍(Huang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]2010.107:7892-7)。

[0007] 胰高血糖素和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)衍生自前胰高血糖素原,该前胰高血糖素原为具有158个氨基酸的前体多肽,其在组织中经过差异蛋白水解加工以形成多种不同的胰高血糖素原衍生肽,包括胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)和胃酸调节素(OXM),它们涉及许多种生理功能,包括葡萄糖稳态、胰岛素分泌、胃排空、和肠道生长,以及调节进食。胰高血糖素是具有相应于胰高血糖素原的氨基酸33到61(前胰高血糖素原的53到81)的29个氨基酸的肽,而GLP-1产生为具有相应于胰高血糖素原的氨基酸72到108(前胰高血糖素原的92到128)的37个氨基酸的肽。GLP-1(7-36)酰胺或GLP-1(7-37)酸是GLP-1的生物活性形式,其在GLP-1受体处显示出基本上等同的活性。

[0008] 胰高血糖素由内分泌胰腺产生并激活胰高血糖素受体("GCGR")。胰高血糖素在肝脏中起作用经由糖异生和糖原分解而升高血糖。当血糖开始下降时,胰高血糖素向肝脏发出信号以分解糖原和释放葡萄糖并刺激葡萄糖的产生,导致血糖水平向正常水平升高。还

显示胰高血糖素增加能量消耗、增加酮体产生、抑制脂肪生成并促进脂肪酸氧化、延迟胃排空并抑制食欲(Müller等人,Proc.Intl.Journal of Molecular Sciences[国际分子科学杂志]2020.21(2):383)(Boland等人,Nat Metab.[自然代谢],2020.2(5):413-431)。

[0009] GLP-1相比于胰高血糖素具有不同的生物活性。它从肠L细胞分泌并且结合到GLP-1受体上。其活性包括经由肠促胰岛素作用增强胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌和抑制食物摄取。胰高血糖素和GLP-1两者,充当它们各自的受体处的激动剂,已经显示出对减轻体重有效。在销售或开发中的用于治疗肥胖症的某些GLP-1类似物包括,例如,利拉鲁肽(来自诺和诺德公司的VICTOZA®)和艾塞那肽(来自AstraZeneca AB的Byetta®)。

发明内容

[0010] 本披露涉及一种治疗受试者的肝病的方法,该方法包括向该受试者施用:i)含patatin样磷脂酶域3(PNPLA3)表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂。

[0011] 在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。在一些实施例中,反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5731内的位点互补。在一些实施例中,反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5644-5731内的位点互补。在一些实施例中,反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5642内的位点互补。在一些实施例中,反义寡核苷酸与编码PNPLA3的核酸的核苷酸5567-5620内的位点互补。在一些实施例中,编码PNPLA3的核酸是mRNA。在一些实施例中,反义寡核苷酸的长度为12至30个核苷。在一些实施例中,反义寡核苷酸的长度为16至30个核苷。

[0012] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。在一些实施例中,一个或多个修饰的糖部分是2'-脱氧基、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'或其组合。在一些实施例中,反义寡核苷酸包含一个或多个修饰碱基。在一些实施例中,一个或多个修饰碱基是5-甲基胞嘧啶。在一些实施例中,反义寡核苷酸中的每个胞嘧啶是5'甲基胞嘧啶。在一些实施例中,反义寡核苷酸包含一个或多个非天然核苷间键联。在一些实施例中,一个或多个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施例中,每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0013] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中任一个的至少8个连续碱基的序列。在一些实施例中,反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9和10中的一个。在一些实施例中,反义寡核苷酸包含:a)由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;b)由三个连接的核苷组成的5'翼区段;和c)由三个连接的核苷组成的3'翼区段;其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含受约束的乙基糖,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0014] 在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂还包含缀合物基团。

[0015] 在一些实施例中,胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂是肽。在一些实施例中,肽包含以下氨基酸序列:

[0016] HX2QGTFSTDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO:25)

[0017] 其中,

[0018] (1) X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:14);

[0019] (2) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:15);

[0020] (3) X2是S, X10是K, X12是K, X13是Y, X15是E, X16是G, X17是Q, X18是A, X20是K, X21是E, X23是I, X24是A, X27是E, X28是K, 并且X30是R (SEQ ID NO:20);

[0021] (4) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是S, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:18);

[0022] (5) X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是E, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:33); 或者

[0023] (6) X2是S, X10是K, X12是S, X13是Y, X15是D, X16是S, X17是R, X18是R, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:19)。

[0024] 在一些实施例中, 肽包含氨基酸序列HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO:33)。

[0025] 在一些实施例中, 肽还包含对氨基酸序列中的氨基酸的修饰。在一些实施例中, 修饰是添加酰基部分。在一些实施例中, 修饰是赖氨酸残基的N(ϵ)基团上的棕榈酰基部分。在一些实施例中, 棕榈酰基经由接头与赖氨酸连接。在一些实施例中, 接头是 γ 谷氨酸。在至少一个实施例中, 肽是HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO:33), 其中赖氨酸经谷氨酸接头用棕榈酰基部分修饰。

[0026] 在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂与胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂同时施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到1小时施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到24小时施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到72小时施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到一周施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到两周施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂肠胃外施用。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。在一些实施例中, 将PNPLA3表达抑制剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。

[0027] 在一些实施例中, 将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂肠胃外施用。在一些实施例中, 将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。在一些实施例中, 将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。在一些实施例中, 将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。

[0028] 在一些实施例中, 受试者是肥胖的和/或患有2型糖尿病。在一些实施例中, 肝病是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。在一些实施例中, 肝病是非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。在一些实施例中, 肝病是肝纤维化和/或肝硬化。

[0029] 在一些实施例中,本披露涉及一种减少患有肝病的受试者的肝脏中脂肪变性的方法,该方法包括向该受试者施用:i)含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

[0030] 在一些实施例中,与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比,受试者的总肝脂肪变性降低。在一些实施例中,与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比,受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。在一些实施例中,与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比,受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。在一些实施例中,肝病是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。在一些实施例中,肝病是非酒精性脂肪性肝炎。在一些实施例中,肝病是肝纤维化。

[0031] 在一些实施例中,本披露提供了一种减少患有非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的受试者的肝脏中炎症的方法,该方法包括向该受试者施用:i)含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。在一些实施例中,与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝脏炎症相比,受试者的肝脏炎症减少至少50%。

[0032] 在一些实施例中,本披露提供了一种减少患有肝病的受试者的肝胶原的方法,该方法包括向该受试者施用:i)含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。在一些实施例中,与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝胶原相比,受试者的肝胶原减少至少25%。

[0033] 在一些实施例中,本披露提供一种药学上可接受的组合物,该药学上可接受的组合物包含:i)含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂;和iii)至少一种药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,组合物被配制用于肠胃外施用。

[0034] 在一些实施例中,本披露提供了一种试剂盒,该试剂盒包含:i)含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii)胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

附图说明

[0035] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步展示本披露的某些方面的示例性实施例。

[0036] 图1A显示了纯合Pnpla3^{148M/M}敲入小鼠的体重变化百分比图,该小鼠喂食诱导NASH的饮食36周,并给药1) 对照ASO+盐水,2) Pnpla3 ASO+盐水,3) 对照ASO+可妥度肽 (Cotadutide),或4) Pnpla3ASO+可妥度肽治疗14周,如实例1中所述。图1B显示同一小鼠的肝脏mPnpla3 mRNA浓度图,如实例1所述测量的。

[0037] 图2显示了从取自上述图1A和实例1的小鼠的染色肝脏切片测量的总肝脂肪变性 (2A)、大泡性脂肪变性 (2B) 和微泡性脂肪变性 (2C) 的图。图2D显示了染色切片的图像,每个切片提供了单位面积的总脂滴百分比。

[0038] 图3A显示了从取自上述图1A和实例1的小鼠的肝脏切片测量的肝脏巨噬细胞百分

比的图。图3B显示了从上述图1A和实例1的小鼠获得的肝脏的炎症得分图。

[0039] 图4显示了对上述图1A和实例1的小鼠如实例1所述计算的NAFLD活性得分 (NAS) 图。

[0040] 图5显示了取自上述图1A和实例1的小鼠的肝脏切片中肝胶原A1A的百分比图。如实例1所述测量肝胶原。

具体实施方式

[0041] 本披露提供了一种治疗肝病如NASH和/或NAFLD的方法。在一些实施例中,本披露提供一种治疗受试者的肝病的方法,该方法包含向该受试者施用:i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂;和ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。

[0042] 定义

[0043] 除非另外指明,以下术语具有以下含义:

[0044] 在整个本申请中,术语“约”用于指示值包括被采用以确定值的方法/装置的误差的固有变化,或者研究受试者之间存在的变化。典型地,术语“约”意指涵盖近似于或小于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%或更高变化,这取决于具体情况。在实施例中,本领域技术人员将理解由术语“约”指示的可变性水平,这是由于其在本文中使用的上下文。还应理解,术语“约”的使用也包括具体列举的值。

[0045] 权利要求中使用术语“或”用于意指“和/或”,除非明确指示仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,尽管本披露支持仅是指替代方案以及“和/或”的定义。

[0046] 如本文所用,“之间”是包括范围末端的范围。例如,x和y之间的数值明确地包括数值x和y,以及落在x和y内的任何数值。

[0047] “2'-脱氧核苷”意指包含2'-H(H) 呋喃糖基糖部分的核苷,如在天然存在的脱氧核糖核酸(DNA)中发现的。在某些实施例中,2'-脱氧核苷可包含经修饰的核碱基或者可包含RNA核碱基(尿嘧啶)。

[0048] “2'-O-甲氧基乙基”(亦称2'-MOE)是指2'-O(CH₂)₂-OCH₃) 代替核糖基环的2'-OH基团。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是经修饰的糖。

[0049] “2'-MOE核苷”(亦称2'-O-甲氧基乙基核苷)意指包含2'-MOE修饰的糖部分的核苷。

[0050] “2'-取代的核苷”或“2-修饰的核苷”意指包含2'-取代的或2'-修饰的糖部分的核苷。如本文所用,关于糖部分的“2'-取代的”或“2-修饰的”意指包含除H或OH之外的至少一种2'-取代基基团的糖部分。

[0051] “3'靶位点”是指与特定化合物的最3'核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0052] “5'靶位点”是指与特定化合物的最5'核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0053] “5-甲基胞嘧啶”意指具有附接至5位的甲基基团的胞嘧啶。

[0054] “施用(administration或administering)”是指将本文提供的化合物或组合物引入个体体内以执行其预定功能的途径。可以使用的施用途径的实例包括但不限于肠胃外施用,如皮下、静脉内、或肌内注射或输注。

[0055] “同时施用”或“共施用”意指以任何方式施用两种或更多种化合物,以此方式,两种药物的药理作用在患者体内显现。同时施用不要求以单个药物组合物、以相同剂型、通过相同施用途径、或同时施用两种化合物。两种化合物的作用本身不需要同时显现出来。这些作用仅需重叠一段时间并且不需同延。同时施用或共施用涵盖并行地或顺序地施用。

[0056] “缓解”是指相关疾病、障碍、或病症的至少一种指标、体征、或症状的改善或减轻。在某些实施例中,缓解包括病症或疾病的一种或多种指标的进展或严重性的延迟或减缓。指标的进展或严重性可以通过本领域技术人员已知的主观或客观量度来确定。

[0057] “动物”是指人或非人动物,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪、以及非人灵长类动物(包括但不限于猴和黑猩猩)。

[0058] “反义化合物”意指包含寡核苷酸和任选地一种或多种另外的特征(如缀合物基团或端基)的化合物。反义化合物的实例包括单链的和双链的化合物,如寡核苷酸、核糖酶、siRNA、shRNA、ssRNA、以及基于占用的化合物。

[0059] “反义寡核苷酸”意指具有与靶核酸或其区域或区段互补的核碱基序列的寡核苷酸。在某些实施例中,反义寡核苷酸可特异性地与靶核酸或其区域或区段杂交。

[0060] “cEt”或“受约束的乙基”意指核糖基二环糖部分,其中该二环糖的第二环经由连接4'-碳和2'-碳的桥形成,其中该桥具有式:4'-CH(CH₃)-O-2',并且其中该桥的甲基基团是S构型。

[0061] “cEt核苷”意指包含cEt经修饰的糖部分的核苷。

[0062] 化合物中的“化学修饰”描述了相对于这样的单位的初始状态,通过该化合物中任何单位的化学反应的取代或改变。“经修饰的核苷”意指独立地具有经修饰的糖部分和/或修饰的核碱基的核苷。“经修饰的寡核苷酸”意指包含至少一种经修饰的核苷间键联、经修饰的糖、和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。

[0063] “化学上不同的区域”是指化合物的在某种程度上来说与同一化合物的另一个区域在化学上不同的区域。例如,具有2'-O-甲氧基乙基核苷酸的区域在化学上不同于具有没有2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸的区域。

[0064] “嵌合反义化合物”意指具有至少2个化学上不同的区域的反义化合物,每个位置具有多个亚单位。

[0065] “缀合物基团”意指附接至寡核苷酸的一组原子。缀合物基团包括缀合物部分和将缀合物部分附接至寡核苷酸的缀合物接头。

[0066] “缀合物接头”意指包含将缀合物部分连接至寡核苷酸的至少一个键的一组原子。

[0067] “缀合物部分”意指经由缀合物接头附接至寡核苷酸的一组原子。

[0068] 在寡核苷酸的背景下,“连续”是指彼此紧邻的核苷、核碱基、糖部分、或核苷间键联。例如,“连续核碱基”意指在序列中彼此紧邻的核碱基。

[0069] “剂量”意指在单次施用中、或在指定的时间段内提供的化合物或药剂的指定量。在某些实施例中,剂量可以按两个或更多个大丸剂、片剂或注射剂形式施用。例如,在某些实施例中,在希望皮下施用的情况下,所希望的剂量可以要求不是通过单次注射容易地提供的体积。在此类实施例中,可以使用两次或更多次注射达到所希望的剂量。在某些实施例中,剂量可以按两次或更多次注射施用,以使个体体内的注射部位反应最小化。在其他实施例中,经延长的时间段或连续地通过输注施用化合物或药剂。可以将剂量指明为每小时、每

天、每周或每月的药剂的量。

[0070] “给药方案”是被设计为实现一种或多种所希望的效果的剂量的组合。

[0071] “有效量”意指足以在对化合物有需要的个体体内实现所希望的生理学结果的化合物的量。有效量在个体之间可以根据有待治疗的个体的健康和身体状况、有待治疗的个体的分类群、组合物的配方、个体的医学症状的评估、以及其他相关因素而变化。

[0072] “缺口体 (Gapmer)”意指寡核苷酸,该寡核苷酸包含多个核苷的内部区域,这些核苷支持被定位在具有一个或多个核苷的外部区域之间的RNA酶H切割,其中这些包含内部区域的核苷在化学上不同于包含外部区域的该一个核苷或多个核苷。内部区域可以被称作“缺口”并且外部区域可以被称作“翼”。

[0073] “紧邻”意指在相同种类的紧邻元件之间不存在间插元件(例如在紧邻核碱基之间没有间插核碱基)。

[0074] “核苷间键联”意指在寡核苷酸中的相邻核苷之间形成共价键联的基团或键。“经修饰的核苷间键联”意指除天然存在的、磷酸酯核苷间键联之外的任何核苷间键联。非磷酸酯键联在本文意指经修饰的核苷间键联。

[0075] “接头-核苷”意指将寡核苷酸连接至缀合物部分的核苷。接头-核苷位于化合物的缀合物接头内。不认为接头-核苷是化合物的寡核苷酸部分的一部分(即使它们与寡核苷酸邻接)。

[0076] “错配”或“非互补”意指当将第一和第二寡核苷酸进行比对时,该第一寡核苷酸的核碱基不与该第二寡核苷酸或靶核酸的相应核碱基互补。例如,核碱基(包括但不限于通用核碱基、肌苷、和次黄嘌呤)能够与至少一个核碱基杂交,但是相对于它所杂交的核碱基仍是错配的或非互补的。作为另一个实例,当将第一和第二寡核苷酸进行比对时,不能够杂交到该第二寡核苷酸或靶核酸的相应核碱基上的该第一寡核苷酸的核碱基是错配或非互补核碱基。

[0077] “调节”是指改变或调整细胞、组织、器官或生物体中的特征。例如,调节PNPLA3 RNA可以意指升高或降低PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白在细胞、组织、器官或生物体中的水平。“调节剂”在该细胞、组织、器官或生物体中实现该改变。例如,PNPLA3化合物可以是降低细胞、组织、器官或生物体中的PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白的量的调节剂。

[0078] “MOE”意指甲氧基乙基。

[0079] “非-二环经修饰的糖”或“非二环经修饰的糖部分”意指经修饰的糖部分,该糖部分包含不形成该糖的两个原子之间的桥从而形成第二环的修饰(如取代)。

[0080] “寡聚化合物”意指包含单个寡核苷酸和任选地一种或多种另外的特征(例如缀合物基团或端基)的化合物。

[0081] “寡核苷酸”意指连接的核苷的聚合物,这些核苷中的每个核苷都可以彼此独立地被修饰或不被修饰。除非另有说明,寡核苷酸由8-80个连接的核苷组成。“经修饰的寡核苷酸”意指寡核苷酸,其中至少一个糖、核碱基、或核苷间键联是被修饰的。“未经修饰的寡核苷酸”意指不包含任何糖、核碱基、或核苷间经修饰的寡核苷酸。

[0082] “硫代磷酸酯键联”意指经修饰的磷酸酯键联,其中非桥接氧原子之一被硫原子置换。硫代磷酸酯核苷间键联是经修饰的核苷间键联。

[0083] “部分”意指核酸的限定数目的连续(即,连接的)核碱基。在某些实施例中,一个部

分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施例中,一个部分是寡聚化合物的限定数目的连续核碱基。

[0084] “RefSeq No.”是分配给序列的字母和数字的唯一组合,从而表示该序列是针对特定靶转录物(例如,靶基因)。关于靶基因的这种序列和信息(统称为基因记录)可以在遗传序列数据库中找到。遗传序列数据库包括NCBI参考序列数据库、GenBank、欧洲核苷酸存档、和日本DNA数据库(后三者形成国际核苷酸序列数据库合作或INSDC)。

[0085] “RNAi化合物”意指至少部分地通过RISC或Ago2而非通过RNA酶H起作用以调节靶核酸和/或由靶核酸编码的蛋白的反义化合物。RNAi化合物包括但不限于双链siRNA、单链RNA(ssRNA)、和微小RNA(包括微小RNA模拟物)。

[0086] “糖部分”意指未经修饰的糖部分或经修饰的糖部分。“未经修饰的糖部分”或“未经修饰的糖”意指如在RNA中发现的2'-OH(H)核糖基部分(“未经修饰的RNA糖部分”)或如在DNA中发现的2'-H(H)部分(“未经修饰的DNA糖部分”)。“经修饰的糖部分”或“经修饰的糖”意指修饰的呋喃糖基糖部分或糖代用品。“修饰的呋喃糖基糖部分”意指呋喃糖基糖,其包含代替未经修饰的糖部分的至少一个氢或羟基的非氢取代基。在某些实施例中,修饰的呋喃糖基糖部分是2'-取代的糖部分。此类修饰的呋喃糖基糖部分包括二环糖和非二环糖。

[0087] “糖代用品”意指具有不同于呋喃糖基部分的修饰的糖部分,该修饰的糖部分可以将核碱基键联至另一个基团(例如在寡核苷酸中的核苷间键联、缀合物基团、或端基)。包含糖代用品的经修饰的核苷可以掺入到寡核苷酸内的一个或多个位置,并且此类寡核苷酸能够与互补化合物或核酸杂交。

[0088] “治疗有效量”意指为个体提供治疗益处的化合物、药剂、或组合物的量。

[0089] 如本文所用,术语“多肽”旨在涵盖单数“多肽”以及复数“多肽”,并且包含两个或更多个氨基酸的任何链或多个链。因此,如本文所用,“肽”、“肽亚单位”、“蛋白质”、“氨基酸链”、“氨基酸序列”、或用来指代两个或更多个氨基酸的链或多个链的任何其他术语,都被包括定义“多肽”中,尽管这些术语的每一者都可具有更具体的含义。术语“多肽”可以用来替代任何这些术语或者与其可互换地使用。该术语进一步包括已经历翻译后或合成后修饰的多肽,这些修饰例如,糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团进行的衍生、蛋白水解裂解或通过非天然存在的氨基酸进行的修饰。

[0090] 如本文所用,术语“序列一致性”指的是在两个或更多个多核苷酸序列之间或在两个或更多个多肽序列之间的关系。当一个序列中的位置被与比较序列的相应位置中的相同核酸碱基或氨基酸占据时,该序列被说成是与那个位置“一致”。“序列一致性”的百分比是通过确定在这两个序列中存在的一致核酸碱基或氨基酸的位置的数目进行计算的,从而产生“一致”位置的数目。然后将“一致”位置的数目除以在比较窗口中的位置的总数并且乘以100而产生“序列一致性”的百分比。通过将两个最佳比对序列在比较窗口上进行比较来确定“序列一致性”的百分比。为了对用于比较的序列进行最优化的比对,多核苷酸或多肽序列的在比较窗口中的部分可包含被称为空位的添加或缺失,而参照序列保持不变。最佳比对是,即使存在空位,也可在参照序列与比较序列之间生成最大可能数量的“一致的”位置的比对。可以使用国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)截止到2004年9月1日提供的程序“BLAST 2序列”的版本来确定在两个序列之间的“序列一致性”百分比,该程序可与程序BLASTN(用于核苷酸序列比较)以及BLASTP(用

于多肽序列比较) 结合使用, 这些程序基于Karlin和Altschul的算法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90(12):5873-5877,1993)。当利用“BLAST 2序列”时,对于下述参数使用截止到2004年9月1日的默认参数:字长(3)、开放空位罚分(11)、扩展空位罚分(1)、空位急速下降(50)、期望值(10)以及任何其他需要的包括但不限于基质选项的参数。

[0091] PNPLA3

[0092] 在一些实施例中,本披露提供了一种通过施用PNPLA3抑制剂来治疗肝病的方法。PNPLA3(481个氨基酸)是含patatin样磷脂酶域家族的成员,其在ER中和在脂滴上表达。在人中,PNPLA3在肝脏中高度表达,而在脂肪组织表达低五倍(Huang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]2010.107:7892-7)。在一些实施例中,PNPLA3是指SEQ ID NO:1。“PNPLA3”意指PNPLA3的任何核酸或蛋白质。“PNPLA3核酸”意指编码PNPLA3的任何核酸。例如,在某些实施例中,PNPLA3核酸包括编码PNPLA3的DNA序列、从编码PNPLA3的DNA(包括含有内含子和外显子的基因组DNA)转录的RNA序列、以及编码PNPLA3的mRNA序列。“PNPLA3 mRNA”意指编码PNPLA3蛋白的mRNA。靶标可以用大写字母或小写字母来表示。

[0093] 在一些实施例中,本披露提供与胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂组合用于抑制PNPLA3(PNPLA3)表达以治疗肝病的方法、化合物和组合物。本文提供的某些实施例涉及通过施用PNPLA3抑制剂治疗肝病的方法。“PNPLA3特异性抑制剂”可指能够在分子水平上特异性地抑制PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白的表达或活性的任何试剂。例如,PNPLA3特异性抑制剂包括能够抑制PNPLA3 RNA和/或PNPLA3蛋白表达的核酸(包括反义化合物)、肽、抗体、小分子、以及其他试剂。

[0094] 术语“PNPLA3的抑制剂”、“PNPLA3抑制剂”和“PNPLA3表达抑制剂”在本文中可互换使用。抑制PNPLA3表达可用于通过施用靶向PNPLA3的化合物,治疗、预防、或缓解个体中与PNPLA3相关联的疾病。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂可以是PNPLA3特异性抑制剂。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂可以是靶向PNPLA3的反义化合物、寡聚化合物、或寡核苷酸。在一些实施例中,PNPLA3是反义寡核苷酸。在一些实施例中,寡核苷酸是siRNA、靶向寡核苷酸的微小RNA或单链RNAi化合物,例如小发夹RNA(shRNA)、单链siRNA(ssRNA)和微小RNA模拟物。

[0095] 在一些实施例中,PNPLA3抑制剂是靶向PNPLA3核酸的反义寡核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3核酸具有通过引用并入的美国专利号10,774,333中列出的序列,例如RefSeq或GENBANK登录号NM_025225.2;从核苷酸43921001至43,954,500截短的NC_000022.11(SEQ ID NO:2);AK123806.1;BQ686328.1;BF762711.1;DA290491.1;和美国专利号10,774,333中作为“SEQ ID No 7、8、9、和10”列出的序列。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸或寡聚化合物。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是单链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的。

[0096] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含长16个连接的核苷的修饰的寡核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义化合物或寡聚化合物。

[0097] 在一些实施例中,PNPLA3抑制剂是长12至30个连接的核苷的修饰的寡核苷酸,并且具有包含如通过引用并入本文的美国专利号10,774,333中所述的任何核碱基序列的核碱基序列,例如美国专利号10,774,333的“SEQ ID NO:17-2169”中的任一个。在某些实施例

中,PNPLA3抑制剂是反义化合物或寡聚化合物。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是单链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是长16至30个连接的核苷的修饰的寡核苷酸。

[0098] 在一些实施例中,PNPLA3抑制剂包含修饰的寡核苷酸,其由如通过引用并入本文的美国专利号10,774,333中所发现的任何核碱基序列组成,例如美国专利号10,774,333的“SEQ ID NO:17-2169”中的任一个。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义化合物或寡聚化合物。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是单链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的。

[0099] 在一些实施例中,PNPLA3抑制剂包含修饰的寡核苷酸,其长12至30个连接的核苷,并且在如通过引用并入本文的美国专利号10,774,333中发现的核碱基内互补,例如SEQ ID NO:1的核碱基5567-5642、5644-5731、5567-5731、5567-5620、13697-13733、20553-20676、20664-20824、20553-20824、和25844-25912,其中所述修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1至少85%、至少90%、至少95%或100%互补。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义化合物或寡聚化合物。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是单链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸是长16至30个连接的核苷。

[0100] 在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂是与编码PNPLA3的核酸的区域互补的反义寡核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂靶向PNPLA3核酸的核苷酸5567-5620。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂靶向具有SEQ ID NO:1的核碱基序列的PNPLA3核酸的核苷酸5567-5642、5644-5731、5567-5731、5567-5620中发现的核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂与编码PNPLA3的核酸序列(例如SEQ ID NO:1)的5567-5731内的位点互补。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂与编码PNPLA3的核酸序列(例如SEQ ID NO:1)的5644-5731内的位点互补。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂与编码PNPLA3的核酸序列(例如SEQ ID NO:1)的5567-5642内的位点互补。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂与编码PNPLA3的核酸序列(例如SEQ ID NO:1)的5567-5620内的位点互补。在某些实施例中,这些化合物是反义化合物、寡聚化合物、或寡核苷酸。在一些实施例中,编码PNPLA3的核酸是mRNA。

[0101] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含长12至30个连接的核苷的修饰的寡核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含长16至30个连接的核苷的修饰的寡核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含修饰的寡核苷酸,该修饰的寡核苷酸长12至30个连接的核苷并且具有包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、或16个连续核碱基部分的核碱基序列。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一个的至少8个连续核碱基。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸是长16至30个连接的核苷。

[0102] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含修饰的寡核苷酸,该修饰的寡核苷酸长12至30个连接的核苷并且具有包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一个的核碱基序列。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸是长16至30个连接的核苷。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一个的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个连续碱基的序列。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一个的至少8个连续碱基的序列。

[0103] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸包含SEQ ID

N0:2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一个。

[0104] 在某些实施例中,靶向PNPLA3的PNPLA3抑制剂是通过引用并入本文的美国专利号10,774,333所述的ION 916333、975616、994284、975605、994282、975613、975617、975735、975736、或975612。

[0105] 在某些实施例中,上述经修饰的寡核苷酸中任一种包含至少一种经修饰的核苷间键联、至少一种经修饰的糖、和/或至少一种修饰的核碱基。在某些实施例中,上述修饰的寡核苷酸中任一种包含至少一种修饰的糖部分。在一些实施例中,至少一种修饰的糖部分是2'-脱氧基、2'-0-甲基、2'-0-甲氧基甲基、2'-0-甲氧基乙基、2'-氟、4'-CH(CH₃)-0-2'、4'-CH₂-0-2'、4'-(CH₂)₂-0-2'或其组合。在某些实施例中,至少一种修饰的糖包括2'-脱氧基、2'-0-甲氧基乙基。在某些实施例中,至少一种修饰的糖是二环糖,如4'-CH(CH₃)-0-2'基团、4'-CH₂-0-2'基团、或4'-(CH₂)₂-0-2'基团。

[0106] 在某些实施例中,任何前述修饰的寡核苷酸包含一个或多个修饰的碱基。在一些实施例中,修饰的碱基是5-甲基胞嘧啶。在一些实施例中,1、2、3、4、5、6个或更多个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。在一些实施例中,反义寡核苷酸中的每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0107] 在某些实施例中,经修饰的寡核苷酸包括至少一种经修饰的核苷间键联,如硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施例中,每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0108] 在某些实施例中,上述经修饰的寡核苷酸中的任一种包含:由连接的脱氧核苷组成的缺口区段;由连接的核苷组成的5'翼(wing)区段;以及由连接的核苷组成的3'翼区段;其中该缺口区段位于该5'翼区段与该3'翼区段之间并且其中每个翼区段的每个核苷都包含经修饰的糖。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸长12至30个连接的核苷,并且具有包含SEQ ID N0:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一项列举的序列的核碱基序列。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸长16至30个连接的核苷,并且具有包含SEQ ID N0:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一项列举的序列的核碱基序列。在某些实施例中,修饰的寡核苷酸长16个连接的核苷,并且具有由SEQ ID N0:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一项列举的序列组成的核碱基序列。

[0109] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其包含:

[0110] 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0111] 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

[0112] 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0113] 其中该缺口区段位于该5'翼区段与该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含cEt糖;其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0114] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其由长12-30个连接的核碱基的修饰的寡核苷酸组成并且具有包含SEQ ID N0:2、3、4、5、6、7、8、9、或10中任一项列举的序列的核碱基序列,其中该修饰的寡核苷酸包含

[0115] 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0116] 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

[0117] 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0118] 其中该缺口区段位于该5'翼区段与该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含cEt糖;其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

嘧啶。在某些实施例中,经修饰的寡核苷酸由16-30个连接的核苷组成。在某些实施例中,经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成。

[0119] 在某些实施例中,化合物包含修饰的寡核苷酸或由其组成,其中该修饰的寡核苷酸长16个连接的核苷并且由SEQ ID NO:2的序列组成,其中该修饰的寡核苷酸包含:

[0120] 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0121] 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

[0122] 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0123] 其中该缺口区段位于该5'翼区段与该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含cEt糖;其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联;并且其中每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

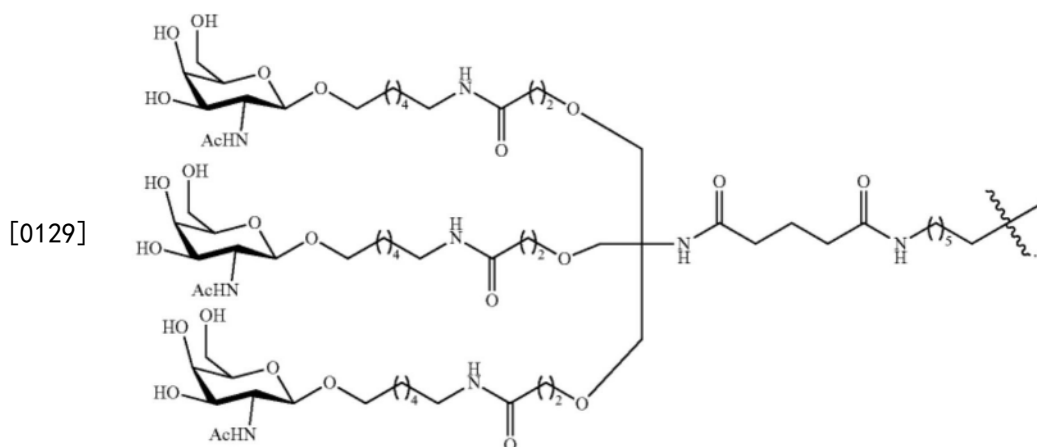
[0124] 在一些实施例中,PNPLA3抑制剂是还包含缀合物基团的反义寡核苷酸。在一些实施例中,缀合物基团在反义寡核苷酸的5'末端。因此,在某些实施例中,化合物由修饰的寡核苷酸和缀合物基团组成,其中该修饰的寡核苷酸长16个连接的核苷并且由SEQ ID NO:2的序列组成,其中该修饰的寡核苷酸包含:

[0125] 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0126] 由三个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

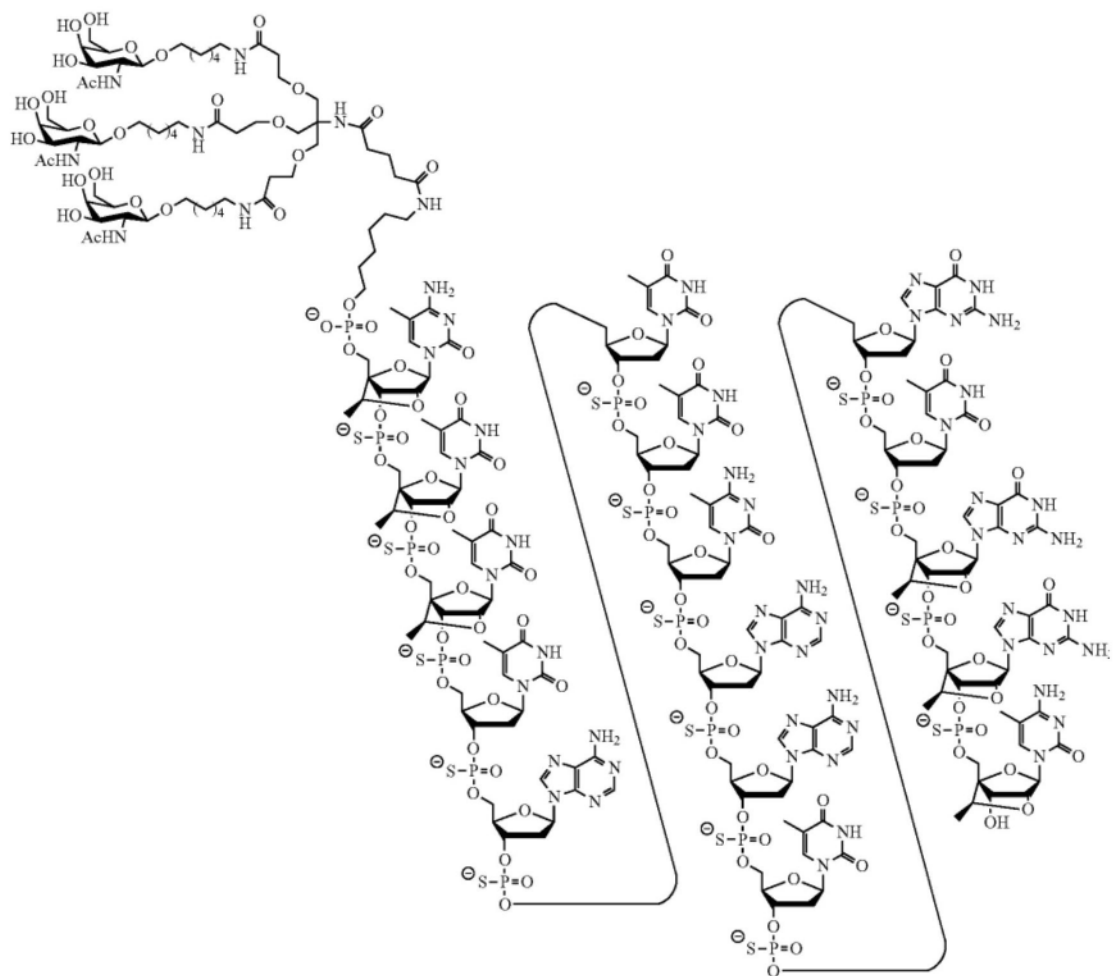
[0127] 由三个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0128] 其中该缺口区段位于该5'翼区段与该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含cEt糖;其中每个核苷间键联都是硫代磷酸酯键联;其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶;并且其中该缀合物基团位于该修饰的寡核苷酸的5'末端,并且是



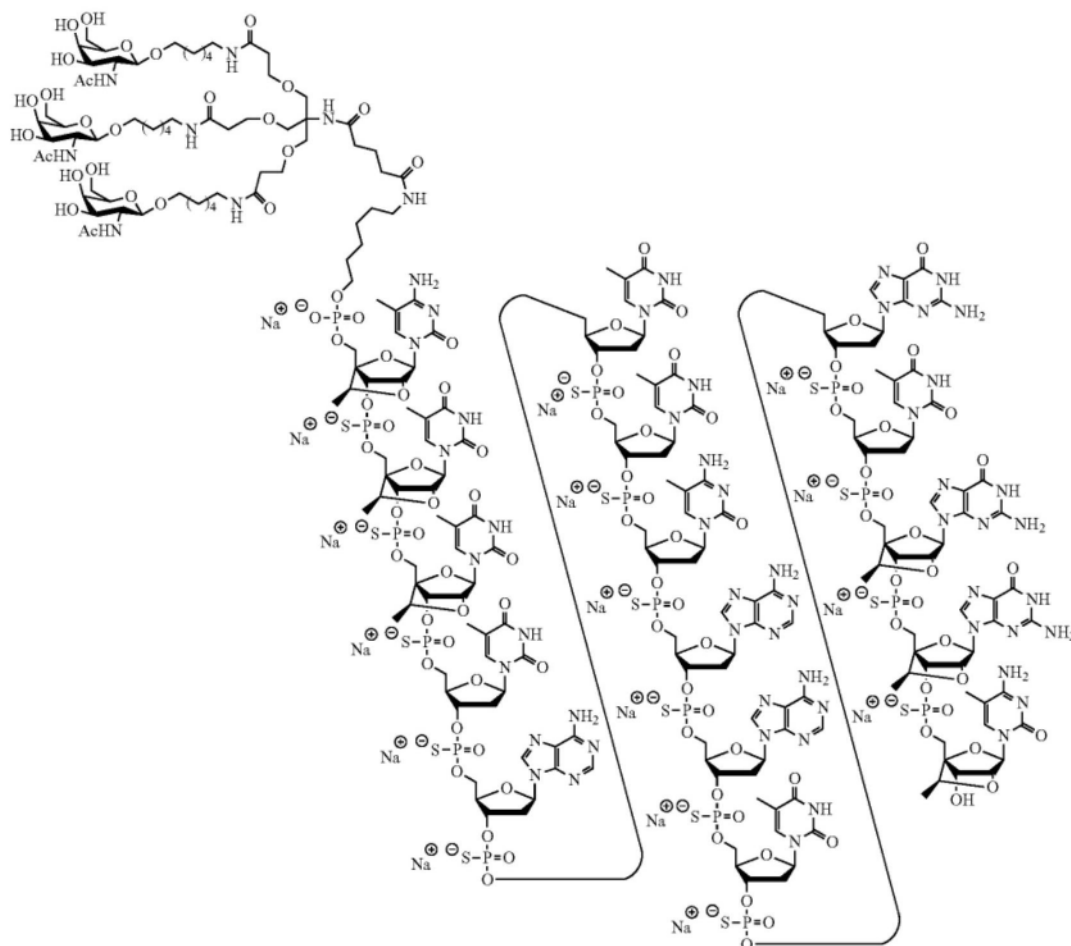
[0130] 在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂是下式化合物 (SEQ ID NO:2):

[0131]



[0132] 在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂是下式化合物 (SEQ ID NO:2):

[0133]



[0134] 在上述实施例的任一项中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸可以与编码PNPLA3的核酸至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0135] 在上述实施例的任一项中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸可以是单链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂包含脱氧核糖核苷酸。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是双链的并且包含核糖核苷酸。

[0136] 在上述实施例的任一项中,PNPLA3抑制剂可以是反义化合物或寡聚化合物。

[0137] 在上述实施例的任一项中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的长度可以是8至80、10至30、12至50、13至30、13至50、14至30、14至50、15至30、15至50、16至30、16至50、17至30、17至50、18至22、18至24、18至30、18至50、19至22、19至30、19至50、或20至30个连接的核苷。在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是寡核苷酸。

[0138] 在某些实施例中,PNPLA3抑制剂是反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含本文所述的修饰的寡核苷酸和缀合物基团。在某些实施例中,缀合物基团在该经修饰的寡核苷酸的5'末端连接至该经修饰的寡核苷酸。在某些实施例中,缀合物基团在该经修饰的寡核苷酸的3'末端连接至该经修饰的寡核苷酸。在某些实施例中,缀合物基团包括至少一个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、至少两个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、或至少三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0139] 在某些实施例中,本文提供的PNPLA3抑制剂包含该经修饰的寡核苷酸的药学上可接受的盐。在某些实施例中,盐是钠盐。在某些实施例中,盐是钾盐。

[0140] 在某些实施例中,如本文描述的PNPLA3抑制剂由于具有小于2 μ M、小于1.5 μ M、小于

1 μ M、小于0.9 μ M、小于0.8 μ M、小于0.7 μ M、小于0.6 μ M、小于0.5 μ M、小于0.4 μ M、小于0.3 μ M、小于0.2 μ M、小于0.1 μ M、小于0.05 μ M、小于0.04 μ M、小于0.03 μ M、小于0.02 μ M、或小于0.01 μ M的体外IC₅₀中的至少之一而是有活性的。

[0141] 在某些实施例中,如本文描述的PNPLA3抑制剂是可高度耐受的,如通过具有相对于对照动物丙氨酸转氨酶(ALT)或天冬氨酸转氨酶(AST)值不超过4倍、3倍、或2倍的增加,或与对照动物相比肝、脾、或肾重量不超过30%、20%、15%、12%、10%、5%、或2%的增加中至少一者所证明的。在某些实施例中,如本文描述的PNPLA3抑制剂是可高度耐受的,如通过相对于对照动物ALT或AST没有增加所证明的。在某些实施例中,如本文描述的PNPLA3抑制剂是可高度耐受的,如通过相对于对照动物肝、脾、或肾重量没有增加所证明的。

[0142] 某些实施例提供了组合物,该组合物包含前述提及的实施例中任一项所述的PNPLA3抑制剂或其任一种药学上可接受的盐以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。在某些实施例中,组合物具有小于约40厘泊(cP)、小于约30厘泊(cP)、小于约20厘泊(cP)、小于约15厘泊(cP)、或小于约10厘泊(cP)的粘度。在某些实施例中,具有前述提及的粘度中任一种的组合物包含约100mg/mL、约125mg/mL、约150mg/mL、约175mg/mL、约200mg/mL、约225mg/mL、约250mg/mL、约275mg/mL、或约300mg/mL浓度的本文提供的PNPLA3抑制剂。在某些实施例中,具有任何前述粘度和/或PNPLA3抑制剂浓度的组合物具有室温或约20°C、约21°C、约22°C、约23°C、约24°C、约25°C、约26°C、约27°C、约28°C、约29°C或约30°C的温度。

[0143] GLP-1肽

[0144] 胰高血糖素和胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 衍生自前胰高血糖素原,该前胰高血糖素原为具有158个氨基酸的前体多肽,其在不同的组织中被加工形成多种不同的胰高血糖素原衍生肽,包括胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 和胃泌酸调节素 (OXM),它们涉及许多种生理功能,包括葡萄糖稳态、胰岛素分泌、胃排空、和肠道生长,以及调节进食。胰高血糖素是具有相应于胰高血糖素原的氨基酸33到61(前胰高血糖素原的53到81)的29个氨基酸的肽,而GLP-1产生为具有相应于胰高血糖素原的氨基酸72到108(前胰高血糖素原的92到128)的37个氨基酸的肽。GLP-1 (7-36) 酰胺或GLP-1 (7-37) 酸是GLP-1的生物活性形式,其在GLP-1受体处显示出基本上等同的活性。参见例如,通过引用并入本文的US 9,765,130。

[0145] 如本文所用“GLP-1/胰高血糖素激动肽”是嵌合肽,在测定1的条件下,其展现出相对于天然胰高血糖素的至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在胰高血糖素受体上的活性,并且还展现出相对于天然GLP-1的至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在GLP-1受体上的活性。

[0146] 如本文所用,术语“天然胰高血糖素”指的是天然存在的胰高血糖素,例如,人胰高血糖素,其包含SEQ ID NO:11的序列。术语“天然GLP-1”是指天然存在的GLP-1,例如人GLP-1,并且是涵盖例如GLP-1 (7-36) 酰胺 (SEQ ID NO:12)、GLP-1 (7-37) 酸 (SEQ ID NO:13) 或者这两种化合物的混合物的通用术语。如本文所用,在没有任何进一步指定的情况下,对“胰高血糖素”或“GLP-1”的一般参考旨在分别表示天然的人胰高血糖素或天然的人GLP-1。除非另外指出,“胰高血糖素”是指人胰高血糖素,并且“GLP-1”是指人GLP-1。

[0147] 胰高血糖素可通过胰脏产生的并且可与胰高血糖素受体 (“GCGR”) 相互作用。胰高

血糖素可在肝脏中起作用经由糖异生和糖原分解而升高血糖。当血糖开始下降时,胰高血糖素可发信号给肝脏以便分解糖原和释放葡萄糖,从而引起血糖水平朝向正常水平上升。GLP-1相比于胰高血糖素可具有不同的生物活性。它可从肠L细胞分泌并且可结合到GLP-1受体上。GLP-1活性可包括刺激胰岛素合成和分泌、抑制胰高血糖素分泌、和抑制进食。

[0148] 本文提供了胰高血糖素受体或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的激动剂。在一些实施例中,胰高血糖素受体或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的激动剂包含多肽。结合到胰高血糖素受体上且结合到GLP-1受体上的肽。在某些实施例中,本文提供的肽是胰高血糖素和GLP-1活性的共激动剂。此类肽在本文中称为GLP-1/胰高血糖素激动肽。如本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽具有有利比率的GLP-1和胰高血糖素活性,以便促进体重减轻、预防体重增加、或者维持所希望的体重,并且具有优化的溶解度、可配制性、和稳定性。在某些实施例中,如本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽对人GLP1和人胰高血糖素受体具有活性,在某些实施例中相比于天然配体,对GLP-1受体的相对活性比对胰高血糖素受体高至少约1倍、2倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍或25倍。

[0149] 如本文所用,术语“肽”涵盖全长肽以及其片段、变体或衍生物,例如,GLP-1/胰高血糖素激动肽(例如,在长度上为29、30或31个氨基酸)。如本文披露的“肽”,例如GLP-1/胰高血糖素激动肽,可以是包含用来增加半衰期的另外的成分(例如像Fc结构域或白蛋白结构域)的融合多肽的一部分。如本文描述的肽还可以许多不同的途径衍生。

[0150] 当提及GLP-1/胰高血糖素激动肽时,术语“片段”、“类似物”、“衍生物”或“变体”包括保留至少某种期望的活性(例如,结合到胰高血糖素和/或GLP-1受体上)的任何肽。本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽的片段包括在表达、纯化、和/或施用至受试者期间展现出所希望的特性的蛋白水解片段、缺失片段。

[0151] 在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽对胰高血糖素和GLP-1受体具有所希望的效价,并且具有所希望的促进体重减轻的相对效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在cAMP测定1(参见实例2)中展现出对GLP-1受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在4.4%人血清白蛋白中的cAMP测定(测定2,参见实例2)中展现出对GLP-1受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在cAMP测定1(参见通过引用并入本文的美国专利号9,765,130中的实例2)中展现出对胰高血糖素受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在4.4%人血清白蛋白中的cAMP测定(测定2,参见通过引用并入本文的美国专利号9,765,130中的实例2)中展现出对胰高血糖素受体小于10,000pM、小于5000pM、小于

2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽当使用测定2时,当与天然配体比较时具有在约0.01到0.50范围,例如,从约0.02到0.30,例如,约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、或0.30的相对GLP1-R/GCGR效价比。

[0152] 在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在cAMP测定1(参见通过引用并入本文的美国专利号9,765,130中的实例2)中展现出对葡萄糖依赖性促胰岛素肽(抑胃肽)(GIPR)小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在4.4%人血清白蛋白中的cAMP测定(测定2,参见通过引用并入本文的美国专利号9,765,130中的实例2)中展现出对GIPR小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的以EC50表示的体外效价。

[0153] 在某些实施例中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽具有可接受的溶解度、可易于配制、血浆稳定性、和改善的药代动力学特性中的一个或多个标准。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽可溶于在宽pH范围的标准缓冲液中。

[0154] 在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动肽可以高达0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml或更高的浓度溶于通用缓冲溶液中,溶于缓冲系和例如从0.25到150mM的一系列离子强度中,包括但不限于,磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、谷氨酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、或组氨酸缓冲液。示例性的缓冲液包括100mM谷氨酸盐pH 4.5缓冲液、100mM乙酸盐pH 5缓冲液、100mM琥珀酸盐pH 5缓冲液、100mM磷酸盐pH 6缓冲液、100mM组氨酸pH 6缓冲液、100mM磷酸盐pH 6.5缓冲液、100mM磷酸盐pH 7.0缓冲液、100mM组氨酸pH 7.0缓冲液、100mM磷酸盐pH 7.5缓冲液、100mM Tris pH 7.5缓冲液和100mM Tris pH 8.0缓冲液。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽能以0.8mg/ml溶于跨一系列pH范围,例如,从pH 4.0到pH 8.0,例如,在pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、或8.5的标准缓冲液中。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽可溶于标准缓冲液中,该缓冲液的pH为从4.5至8.0、5.0至8.0、5.5至8.0、6.0至8.0、6.5至8.0、7.0至8.0、4.5至8.5、5.5至8.5、5.5至8.5、6.0至8.5、6.5至8.5或7.0至8.5。

[0155] 在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽可在标准药物配制品中配制。示例性配制品包括但不限于:0.1M Tris pH 7.5,150mM甘露醇,最终配制品pH=7.2;0.05M Tris,50mM精氨酸/脯氨酸,最终配制品pH=8.0;或磷酸钠缓冲液(pH 8)/1.85%W/V丙二醇,最终配制品pH=7.0。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽以高达0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/

ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml或更高的浓度可溶于这些或其他配制品中。

[0156] 在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽针对在血清或血浆中的蛋白酶是可接受地稳定的。胰高血糖素或GLP-1的常见降解产物包括+1产物(酸)和DPP IV-裂解产物。具有+1质量的产物可能由谷氨酰胺的酰胺基团或C末端的脱酰胺作用产生,裂解产物由血浆中蛋白酶DPP IV的作用产生。在某些实施例中,所披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽在37°C下在血浆中24小时之后以高达30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%的水平在血浆中保持稳定。

[0157] 本文披露了包含以下氨基酸序列的GLP-1/胰高血糖素激动肽:

[0158] HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30

[0159] 其中X2是G或S,X10是Y或K,X12是K、E、R或S,X13是K或Y,X15是D或E,X16是S或G,X17是E、R、Q或K,X18是R、S或A,X20是R、K或Q,X21是D或E,X23是V或I,X24是A或Q,X27是E或V,X28是A或K,并且X30是G或R(SEQ ID NO:25)。在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是Y或K,X12是K、E、R或S,X13是K或Y,X15是D,X16是S,X17是E、R、Q或K,X18是R、S或A,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E或V,X28是A,并且X30是G(SEQ ID NO:26)。在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是Y or K,X12是K、E、R或S,X13是K或Y,X15是D,X16是S,如果X17是E则X18是R,或如果X17是R则X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E或V,X28是A,并且X30是G(分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28)。

[0160] 在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是Y,X12是K,X13是K,X15是D,X16是S,如果X17是E则X18是R,或如果X17是R则X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是V,X28是A,并且X30是G(分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30)。在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是K,如果X12是K、E或R且如果X12是K、E、R或S,X13是Y,X15是D,X16是S,如果X17是E则X18是R,以及如果X17是R则X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(分别为SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)。在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是K,X12是E,X13是Y,X15是D,X16是S,如果X17是E则X18是R,或如果X17是R则X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(分别为SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34)。在某些实施例中,提供了以上所示的分离肽,其中X2是S,X10是K,X12是R,X13是Y,X15是D,X16是S,如果X17是E则X18是R,或如果X17是R则X18是S,X20是R,X21是D,X23是V,X24是A,X27是E,X28是A,并且X30是G(分别为SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36)。

[0161] 本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽可以包括但不限于G730(SEQ ID NO:14)、G797(SEQ ID NO:15)、G849(SEQ ID NO:16)、G933(SEQ ID NO:17)、G865(SEQ ID NO:18)、G796(SEQ ID NO:19)、G812(SEQ ID NO:20)和G380(SEQ ID NO:21)。这些GLP-1/胰高血糖素激动肽列在表1中:

[0162] 表1

[0163]

GLP-1/胰高血糖素肽序列		
肽	序列	SEQ ID NO
G730	HSQGT FTSDY SKXD SERAR DFVAW LVAGG-酰胺 X13 = K(gE-palm)	14
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-酰胺 X10 = K(gE-palm)	15
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG-酰胺 X10 = K(gE-palm)	16
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-酸 X10 = K(gE-palm)	17
G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-酰胺 X10 = K(gE-palm)	18
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG-酰胺 X10 = K(gE-palm)	19
G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFAW LEKGR-酰胺 X10 = K(gE-palm)	20
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG-酰胺 X17 =K(gE-palm)	21
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-酸 X13 - K (gE-palm)	22
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFAW LEKGR-酸 X10 - K (gE-palm)	23
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-酸 X10 - K (gE-palm)	24
GLP-1 (7-36酰胺)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFAW LVKGR	12
GLP-1 (7-37酸)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFAW LVKGRG	13
胰高血糖素	HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LMNT	11

[0164] i. 制备针对胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂的方法

[0165] GLP-1/胰高血糖素激动肽。本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽可通过任何合适的方法制备,例如US 9,765,130中所述的方法,其通过引用并入本文。例如,在某些实施例中,通过本领域普通技术人员熟知的方法,例如通过如Merrifield描述的固相合成(1963, J. Am. Chem. Soc. [美国化学学会杂志]85:2149-2154),化学合成本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽。可以例如,通过使用自动合成仪,使用标准试剂完成固相肽合成。

[0166] 可替代地,可以使用如本领域普通技术人员熟知的合宜的载体/宿主细胞组合以重组方式产生本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽。用于以重组方式产生GLP-1/胰高血糖素激动肽的多种方法是可得。通常,将编码GLP-1/胰高血糖素激动肽的多核苷酸序列插入适当的表达媒介物,例如,含有用于该插入的编码序列的转录和翻译的必需元件的载体。

将编码GLP-1/胰高血糖素激动肽的核酸插入载体的正确阅读框中。然后将该表达载体转染到适合的表达该GLP-1/胰高血糖素激动肽的宿主细胞中。适合的宿主细胞包括但不限于细菌、酵母、或哺乳动物细胞。多种可商购的宿主-表达载体系统可以用来表达本文描述的GLP-1/胰高血糖素激动肽。

[0167] ii. 修饰、缀合、融合和衍生。

[0168] 在一些实施例中,本文所述的肽包含对氨基酸序列中氨基酸的修饰。在某些实施例中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽经由氨基酸修饰而被稳定化。在某些实施例中,C末端氨基酸的羧基被酰胺化。在某些实施例中,C末端氨基酸是酰胺化甘氨酸,例如G730、G797、G849、G865、G796、G812和G380。在某些实施例中,例如G933,C末端甘氨酸是未经修饰的酸。在某些实施例中,提供了GLP-1/胰高血糖素激动肽,其中一个或多个氨基酸残基被酰化,即添加酰基部分。例如,在某些实施例中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽含有一个或多个赖氨酸残基,其中棕榈酰基部分被附接到N(ε)基团上。在某些实施例中,接头结合在赖氨酸与该棕榈酰基团之间。这个接头可以是γ谷氨酸基团,或为替代接头,例如但不限于,β丙氨酸和氨基己酸。可以使用不同的酰化方法,如添加胆固醇基或肉豆蔻酰基。在某些实施例中,棕榈酰基部分被添加在位置13(例如,G730)。在某些实施例中,棕榈酰基部分被添加在位置10(例如,G797、G849、G933、G865、G796、和G812)。在某些实施例中,棕榈酰基部分被添加在位置17(例如,G380)。

[0169] 本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动肽,例如,G730、G797、G849和G933可以被棕榈酰化,以便借助于与血清白蛋白结合而延长它们的半衰期,由此降低它们的肾脏清除倾向,如通过引用并入本文的US 9,765,130的实例1中所述。

[0170] 可替代地或另外,如本文披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽可与异源部分结合,例如以延长半衰期。该异源部分是蛋白质、肽、蛋白质结构域、接头、有机聚合物、无机聚合物、聚乙二醇(PEG)、生物素、白蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA FcRn结合部分、抗体、抗体的结构域、抗体片段、单链抗体、结构域抗体、白蛋白结合结构域、酶、配体、受体、结合肽、非FnIII支架、表位标签(epitope tag)、重组多肽聚合物、细胞因子、或此类部分的两种或更多种的组合。

[0171] 例如,GLP-1/胰高血糖素激动肽可与异源多肽融合。通过重组基因融合和表达或通过化学缀合,这些肽可融合到蛋白质上。适合于作为用于融合的伴侣的蛋白质包括但不限于,人血清白蛋白、抗体和包含到抗体的Fc部分上的融合的抗体片段。GLP-1已经与这些蛋白质融合,并保留了效力(L. Baggio等人,Diabetes[糖尿病]532492-2500(2004); P. Barrington等人Diabetes, Obesity and Metabolism[糖尿病,肥胖和代谢]13426-433(2011); P. Paulik等人American Diabetes Association[美国糖尿病学会]2012,海报1946)。还已描述了延伸的重组肽序列以给出高分子量肽(V. Schellenberger等人,Nature Biotechnol[自然生物技术]271186-1190(2009); PASylation(EP 2173890))。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动肽与C末端的融合伴侣(例如白蛋白或Fc部分)结合为融合蛋白的N末端部分。如本文描述的GLP-1/胰高血糖素激动肽还可被融合到肽或蛋白质结构域上,例如对于人血清白蛋白具有亲和力的“Albudabs”(M.S. Dennis等人,JBiol Chem[生物化学杂志]27735035-35043(2002); A. Walker等人,Protein Eng Design Selection[蛋白质工程、设计与选择]23271-278(2010))。用于将如本文披露的GLP-1/胰高血糖素激动肽与

异源多肽例如白蛋白或Fc部分融合的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0172] 其他异源部分可以缀合到GLP-1/胰高血糖素激动肽上以进一步稳定或增加半衰期。为了化学融合,某些实施例的特征为维持自由N末端,但是可以产生用于衍生的可替代点。另一种替代方法是用大的化学部分,例如高分子量聚乙二醇(PEG),来衍生这种肽。“聚乙二醇化GLP-1/胰高血糖素激动肽”具有共价结合到其上的PEG链。GLP-1/胰高血糖素激动肽的衍生,例如,聚乙二醇化,可以在经棕榈酰化的赖氨酸上进行,或者替代地在被取代或通过延伸而被结合的残基(如半胱氨酸)上进行,以允许衍生。可以针对相对效价和在GLP-1受体与胰高血糖素受体活化之间的平衡将以上GLP-1/胰高血糖素激动肽形式进行体外和/或体内表征。

[0173] 通用术语“聚乙二醇链”或“PEG链”指的是以通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 表示的处于支链或直链形式的氧化乙烯和水的缩合聚合物的混合物,其中n是3、4、5、6、7、8、9或更大的整数。PEG链包括乙二醇的聚合物,具有选自大约500到大约40,000道尔顿范围的平均总分子量。PEG链的平均分子量以数字指示,例如,PEG-5,000指的是具有平均大约5,000的总分子量的聚乙二醇链。

[0174] 可以通过本领域已知的任何聚乙二醇化反应来进行聚乙二醇化。参见,例如,Focus on Growth Factors[聚焦生长因子],3:4-10,1992和欧洲专利申请EP 0154316和EP 0401384。可以通过使用反应性聚乙二醇分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。

[0175] 用于制备聚乙二醇化的GLP-1/胰高血糖素激动肽的方法通常包括以下步骤:(a)在分子藉此附接到一个或多个PEG基团的条件下,使GLP-1/胰高血糖素激动肽与聚乙二醇(如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应,和(b)获得一种或多种反应产物。

[0176] 施用

[0177] 本披露提供了通过向受试者施用PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂来治疗受试者的肝病的方法。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂与胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂同时施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到1小时施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到24小时施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到72小时施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到一周施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到两周施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂彼此间隔不到一个月、彼此间隔不到2个月、或彼此间隔不到3个月或更长时间施用。

[0178] 各种施用模式是本领域技术人员已知的,并且可用于施用PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂。例如,施用方式可包括口服、肠胃外、吸入或局部施用。“肠胃外施用”可意指通过注射或输注施用。肠胃外施用可包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、或颅内施用(例如鞘内或脑室内、阴道或直肠施用)。用于施用的形式的另一个实例是注射用溶液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。本文提供的PNPLA3表达抑制剂和/或GLP-1/胰高血糖素激动肽可以作为单剂量或作为

多剂量施用。在某些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和/或GLP-1/胰高血糖素激动肽通过皮下注射施用。

[0179] 在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂通过相同的施用方式施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂通过不同的施用方式施用。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂肠胃外施用。在一些实施例中,将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂肠胃外施用。

[0180] 肠胃外配制品可以是单次推注剂量,输注或加载推注剂量,随后是维持剂量。可以具体固定的或可变的间隔给予这些组合物,例如,每日一次,或以“在需要时”为基础。也可以调整剂量方案以便提供最佳期望反应(例如治疗性或预防性反应)。

[0181] PNPLA3表达抑制剂和/或胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂的给药频率可由本领域普通技术人员确定而无需过度实验。在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂的给药频率与胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂的给药频率相同。在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂的给药频率不同于胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂的给药频率,例如更频繁或更不频繁。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。在一些实施例中,将PNPLA3表达抑制剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。在一些实施例中,施用PNPLA3表达抑制剂不超过每周一次、每两周一次、每三周一次、每4周一次、每五周一次、每六周一次或每7周一次。在一些实施例中,将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。在一些实施例中,将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每周施用一次、每周施用两次或每周施用三次。在一些实施例中,将胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂每月施用一次、每月施用两次或每月施用三次。在一些实施例中,施用胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂不超过每周一次、每两周一次、每三周一次、每4周一次、每五周一次、每六周一次或每7周一次。

[0182] 适应症

[0183] 本文所述的方法、化合物、肽和组合物可用于治疗受试者的肝病。术语“受试者”是指需要用本文提供的PNPLA3表达抑制剂和GLP-1/胰高血糖素激动肽的组合治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括,但不限于,人、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、熊、母牛、猿类、猴子、猩猩和黑猩猩等。在一个实施例中,受试者是人类受试者。在一些实施例中,受试者是女性受试者。在一个实施例中,受试者是男性受试者。

[0184] 如本文所用,“有需要的受试者”是指需要治疗的个体,例如患有肝病的受试者。在一些实施例中,本披露提供治疗肝病例如NASH和/或NAFLD的方法。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)可包括从脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝硬化的一系列肝病。NAFLD可被定义为在肝脏中脂肪积聚超过按重量计5%、缺乏显著的酒精消耗、脂肪生成药物治疗或遗传性障碍(参见例如,Kotronen等人,Arterioscler Thromb.Vasc.Biol.[动脉粥样硬化、血栓形成和血管生物学]2008,28:27-38)。

[0185] 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)可以是具有炎症和肝损伤迹象的NAFLD。在一些实施例中,NASH可在组织学上通过大泡性脂肪变性、肝细胞气球样变性和小叶炎性浸润来定义(Sanyal,Hepatol.Res.[肝脏病学研究]2011.41:670-4)。一些研究估计NASH影响2%-3%的普通人群。在存在其他病变的情况下,如肥胖或糖尿病,一些研究已报道估计的患病率分

别增加至7%和62% (参见例如, Hashimoto等人, J.Gastroenterol. [胃肠病学杂志] 2011.46(1):63-69)。

[0186] 在一些实施例中, 本文提供的方法适用于治疗肝病、NAFLD、肝性脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬化、肝细胞癌、酒精性肝病、酒精性脂肪性肝炎 (ASH)、HCV肝炎、慢性肝炎、遗传性血色素沉着症、或原发性硬化性胆管炎。本文提供的某些实施例涉及降低动物中肝损伤、脂肪变性、肝纤维化、肝脏炎症、肝瘢痕化或硬化、肝功能衰竭、肝肿大、转氨酶升高、或肝脏脂肪堆积的化合物和组合物。

[0187] 在一些实施例中, 受试者可具有次要适应症, 例如, 肥胖受试者或希望促进体重或体脂肪减少、体重或体脂肪维持、或在规定时间段预防体重增加或将其降低到最低限度的有肥胖症倾向的受试者。在一些实施例中, 肝病是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。在一些实施例中, 肝病是非酒精性脂肪性肝炎。在一些实施例中, 肝病是肝纤维化。

[0188] 在一些实施例中, 本披露提供了一种减少患有肝病的受试者的肝脏中脂肪变性的方法, 该方法包括向该受试者施用: i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 和ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 受试者的总肝脂肪变性降低。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 受试者的总肝脂肪变性降低至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。

[0189] 在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 受试者的总肝脂肪变性降低至少30%。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的总肝脂肪变性相比, 受试者的总肝脂肪变性降低至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。

[0190] 在一些实施例中, 本披露提供了一种减少患有非酒精性脂肪肝病的受试者的肝脏中炎症的方法, 该方法包括向该受试者施用: i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 和ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝脏炎症相比, 受试者的肝脏炎症减少至少50%。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝脏炎症相比, 受试者的肝脏炎症减少至少55%、至少60%、至少65%、至少70%或至少75%。

[0191] 在一些实施例中, 减少患有肝病的受试者的肝胶原的方法包括向该受试者施用: i) 含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂; 和ii) 胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝胶原相比, 受试者的肝胶原减少至少25%。在一些实施例中, 与单独施用PNPLA3表达抑制剂或胰高血糖素受体GLP-1受体激动剂时的肝胶原相比, 受试者的肝胶原减少至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、或至少50%。

[0192] 药物配制品

[0193] 在一些实施例中, 本披露提供了药学上可接受的组合物, 该药学上可接受的组合

物包含含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0194] 术语“组合物”或“药物组合物”是指包含本文提供的PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂以及例如药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的组合物,其用于施用给需要治疗的受试者,例如患有肝病的人类受试者。

[0195] 术语“药学上可接受的”是指如下组合物,这些组合物在合理的医学判断范围内适合于与人以及动物的组织接触而没有过度的毒性或与合理的利益/风险比相当的其他并发症。“药物组合物”或“药物配制品”可包括适于向个体施用的物质的混合物。例如,药物组合物可以包括一种或多种化合物或其盐和无菌水溶液。在一些实施例中,药物配制品包含药学上可接受的载体或稀释剂。“药学上可接受的载体或稀释剂”意指适合于在施用个体中使用的任何物质。例如,药学上可接受的载体可以是无菌水溶液,如PBS或注射用水。

[0196] 在一些实施例中,药物配制品包含药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”意指化合物(如寡聚化合物或寡核苷酸)的生理学和药学上可接受的盐,即保留母体化合物的所希望的生物学活性并且不对其赋予不希望的毒理学效应的盐。

[0197] 还提供了组合物,例如药物组合物,其含有有效量的如本文提供的PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂,被配制用于治疗代谢疾病,例如肝病。“有效量”是如本文提供的PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂的量,其以单剂量或作为一系列剂量的一部分向受试者施用,对于治疗(例如治疗肝病)是有效的。这个量可以是对于所有被治疗的受试者而言的固定剂量,或者可以取决于被治疗的受试者的重量、健康、和身体状况、所希望的体重减轻或体重维持的程度、肽的配制、医疗状况的专业评估、以及其他相关因素而改变。

[0198] 可以根据已知的方法配制本披露的组合物。适合的制备方法描述于,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第19版,A.R.Gennaro编著,马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿市(Easton,PA) (1995),将其通过引用以其全文并入本文。组合物可以处于多种形式,包括但不限于,水溶液、乳剂、凝胶剂、混悬剂、冻干形式或本领域已知的任何其他形式。另外,该组合物可含有药学上可接受的添加剂,包括例如,稀释剂、粘合剂、稳定剂和防腐剂。一旦配制,本披露的组合物即可以直接施用给受试者。

[0199] 可以与本披露的组合物一起使用的载体是本领域熟知的,并且包括但不限于,例如甲状腺球蛋白、白蛋白(如人血清白蛋白)、破伤风类毒素、和聚氨基酸(如聚L-赖氨酸、聚L-谷氨酸)、流感病毒和乙肝病毒核心蛋白等。可以使用多种水性载体,例如,水、缓冲水、0.8%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。可以通过常规的、熟知的灭菌技术将组合物灭菌,或者可以将其过滤灭菌。可将得到的组合物包装为原样使用、或冻干,该冻干制剂在给药之前与无菌溶液组合。根据需要,组合物可以含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。在一些实施例中,组合物被配制用于肠胃外施用。

[0200] 在一些实施例中,本披露提供了试剂盒,该试剂盒包含:i) PNPLA3表达抑制剂;和ii) 胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂。在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂和胰高血

糖素受体和/或GLP受体激动剂在试剂盒中处于同一剂型中。在一些实施例中,PNPLA3表达抑制剂和胰高血糖素受体和/或GLP-1受体激动剂在试剂盒中处于不同剂型中。

[0201] 本文引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、论文、教科书等以及其中引用的参考文献(如同它们还未曾引用过的程度)通过引用以其全文并入本文。

[0202] 实例

[0203] 实例1-组合的PNPLA3沉默抑制和基于肠促胰岛素的疗法GLP-1和胰高血糖素受体双重激动剂对改善非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和肝纤维化具有优异的功效

[0204] 介绍

[0205] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 及其更晚期的致病形式非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 是影响庞大且日益增长的人群的未满足的医学需求 (Younossi 等人 *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [自然评论:胃肠病学与肝脏病学], 2018, DOI:10.1038/nrgastro.2017.109)。NAFLD被定义为由酒精摄入以外的原因诱导的过量肝脏脂肪堆积(脂肪肝),并且包括NAFL和NASH、纤维化和肝硬化。脂肪肝在不同比例的个体中进展为脂肪性肝炎、NASH,伴有或不伴有纤维化,最终导致易感个体中的肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌 (Friedman 等人 *Nat Med* [自然医学], 2018, DOI:10.1038/s41591-018-0104-9)。

[0206] NAFLD和NASH具有强遗传成分。与这些病症相关的最常见突变是含patatin样磷脂酶域3 (PNPLA3) 基因的rs738409变体 (148M) (Carlsson 等人 *Aliment Pharmacol Ther* [消化药理学和治疗学], 2020, DOI:10.1111/apt.15738)。肝脏中的Pnpla3沉默改善了小鼠模型中的NAFLD、NASH和相关的肝纤维化,该小鼠模型经基因工程化以在小鼠Pnpla3基因中携带人风险等位基因变体 (148M) (Lindén 等人 *Mol Metab* [分子代谢], 2019, DOI:10.1016/j.molmet.2019.01.013)。

[0207] 肥胖和2型糖尿病 (T2DM) 是发生NAFLD和NASH的主要风险因素,并且已经显示用减轻体重和改善葡萄糖稳态的肠促胰岛素激素治疗改善NAFLD和NASH。此类肠促胰岛素激素包括接合胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体、GLP-1和胰高血糖素受体、或GLP-1和胃抑制多肽 (GIP) 受体的肽类似物 (Newsome 等人 *NEJM* [新英格兰医学杂志], 2020, DOI:10.1056/NEJMoa2028395; Ambry 等人 *Lancet* [柳叶刀], 2018, DOI:10.1016/S0140-6736(18)30726-8; Boland 等人 *Nat Metab* [自然代谢], 2020, DOI:10.1038/s42255-020-0209-6+Hartman 等人 *Diabetes Care* [糖尿病护理], 2020, DOI:10.2337/dc19-1892; Kannt 等人 *Diabetes Obes Metab* [糖尿病肥胖与代谢], 2020, DOI:10.1111/dom.14035)。

[0208] 假设用PNPLA3沉默抑制和肠促胰岛素激素受体激活的组合治疗对NAFLD、NASH和肝纤维化的治疗具有累加的有益效果。为了探索这一点,使用人PNPLA3 I148M NASH风险等位基因的基因工程小鼠模型,同时喂食诱导NASH的饮食。然后用以下治疗这些小鼠;1) 对照反义寡核苷酸 (ASO); 2) Pnpla3 ASO; 3) 可妥度肽,平衡的GLP-1受体和胰高血糖素受体双重激动肽;或4) Pnpla3 ASO和可妥度肽的组合。

[0209] 该研究首次证明,通过将PNPLA3 ASO沉默抑制治疗与肠促胰岛素模拟物治疗(以可妥度肽为例)组合,对NAFLD、NASH和肝纤维化实现了令人惊讶的优异有益治疗效果。与各自单独的治疗相比,通过组合治疗获得的结果显示出协同效应。

[0210] 材料和方法

[0211] 鼠Pnpla3 cEt 5'-GalNAc₃-缀合的cEtASO和可妥度肽

[0212] 使用靶向小鼠Pnpla3基因(5'-TATTTTGGTGTATCC-3') (SEQ ID NO:37)的最佳有效小鼠S-受约束的乙基(cEt)-修饰的16聚体ASO(Lindén等人Mol Metab[分子代谢],2019,DOI:10.1016/j.molmet.2019.01.013)。该小鼠Pnpla3 ASO通过与三触角型N-乙酰半乳糖胺(GalNAc₃)的5'-缀合修饰,以进一步增强皮下施用后体内肝细胞靶向。使用化学匹配的混杂对照GalNAc₃缀合的ASO(5'-GGCCAATACGCCGTCA-3') (SEQ ID NO:38)证明了靶标敲低的特异性。可妥度肽(MEDI0382)被工程化以平衡GLP-1受体和胰高血糖素受体激动作用(对GLP-1受体亲和力具有约5:1偏差)(Henderson等人Diabetes Obes Metab[糖尿病肥胖与代谢],2016,DOI:10.1111/dom.12735)。

[0213] 动物

[0214] 所有动物实验都是在人道关怀下进行的,并得到瑞典哥德堡实验动物伦理委员会的批准。饲养机构已获得实验动物护理评估和认证协会(AAALAC)的全面认可。通过使用如前所述的同源重组,将小鼠Pnpla3基因第148位氨基酸中的异亮氨酸密码子替换为甲硫氨酸密码子,将人PNPLA3 I148M突变引入小鼠Pnpla3基因中(Lindén等人Mol Metab[分子代谢],2019,DOI:10.1016/j.molmet.2019.01.013)。将杂合Pnpla3^{148I/M}小鼠杂交以产生实验纯合Pnpla3^{148M/M}敲入小鼠用于药理学研究。在研究开始前使用PCR验证所有实验动物具有正确的基因型,并在终止后使用PCR再次验证,如前所述(Lindén等人Mol Metab[分子代谢],2019,DOI:10.1016/j.molmet.2019.01.013)。将所有动物安置在具有白杨木片垫料和筑巢材料的透明模克隆笼中,并控制饲养设施的温度(21℃±1℃)和湿度(50%±10%)。小鼠自由获取自来水和食物,并且处于12小时昼/夜周期。

[0215] 给雄性Pnpla3^{148M/M}小鼠(6-8周龄)喂食高脂肪(40kcal%脂肪(非反式脂肪Primex Shortening)、果糖(20kcal%)和胆固醇(2%))饮食(NASH饮食;D16022301,研究饮食公司(Research Diets),新布朗斯维克市,新泽西州),持续22周。然后基于体重将小鼠分配到研究组,喂食相同的NASH饮食,并给予1)对照ASO+盐水,2)Pnpla3 ASO+盐水,3)对照ASO+可妥度肽,或4)Pnpla3 ASO+可妥度肽,持续14周。ASO以5mg/kg/周给药,每周两次皮下注射施用,盐水作为媒介物。可妥度肽以1nmol/kg给药,每天皮下注射施用,盐水作为媒介物。未接受可妥度肽治疗的小鼠每天注射媒介物(盐水),使得所有动物接受相同数量的皮下注射。在研究期间记录体重。处死时,将未禁食的小鼠用异氟烷(Forene,Abbot Scandinavia AB,瑞典)实施安乐死,收集血液并分离血浆,收集肝脏,并且将碎片(所有小鼠的左侧叶的相同位置)用在PBS中的4%甲醛固定用于组织学或在液氮(N₂)中快速冷冻并且储存在-80℃下。

[0216] 肝组织学

[0217] 用苏木精-伊红(HE)常规染色4μm厚的甲醛固定的石蜡包埋的小鼠肝脏切片(每只小鼠一个肝脏切片)。相邻切片对胶原1A1(Col1A1,LS-C343921,美国博适公司(BioSite, USA))进行免疫组织化学染色。将载玻片在全景扫描II(3Dhistech,匈牙利)中扫描,并使用图像分析程序Visiopharm(版本2020.03.0.7300,丹麦赫斯霍尔姆Visiopharm公司(Visiopharm, Hørsholm, Denmark))通过检测半乳糖凝集素-3或胶原1A1的染色面积/总切片面积来分析数字图像。

[0218] 通过评价HE染色的肝切片确定肝脂肪变性。通过测量脂滴的总量作为切片面积的百分比来确定总肝脂肪变性。通过测量大脂滴的量作为切片面积的百分比来确定大泡性脂

肪变性。通过测量小脂滴的量作为切片面积的百分比来确定微泡性脂肪变性。

[0219] 通过用半乳糖凝集素-3 (Mac2) 染色不同的肝切片并确定染色切片的百分比来测定肝巨噬细胞。

[0220] 根据Kleiner等人报道的方法 (Kleiner等人Hepatology[肝脏病学], 2005, DOI: 10.1002/hep.20701) 确定NAFLD活性得分 (NAS)。NAS基于肝脂肪变性得分 (脂肪变性<5% = 得分0, 5%-33% = 得分1, >33%-66% = 得分2, >66% = 得分3) 和炎症得分 (无病灶 = 得分0, <2个病灶/200x视野 = 得分1, 2-4个病灶/200x视野 = 得分2, >4个病灶/200x视野 = 得分3) 的组合。在任何小鼠肝脏中都没有发现肝细胞气球样变性, 并且没有预料不到, 因为与人NASH病理学相比, 这种情况在临床前啮齿动物NASH模型中很少观察到。所有组织学评估均由对治疗不知情的委员会认证的兽医病理学家进行。

[0221] RNA制备和qPCR

[0222] 使用RNeasy Mini试剂盒 (德国凯杰公司 (Qiagen)) 从速冻肝组织中分离RNA。用cDNA试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 斯德哥尔摩, 瑞典) 通过逆转录产生cDNA模板, 并用QuantStudio 7Flex仪器 (瑞典斯德哥尔摩应用生物系统公司 (Applied Biosystems)) 进行实时定量PCR。使用商业性完整测定来分析小鼠Pnpla3 mRNA的表达 (Mm00504420_m1, TaqMan, 瑞典斯德哥尔摩欧洲生命技术公司 (Life Technologies Europe))。使用正向引物5'-GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA-3' (SEQ ID NO:39), 反向引物5'-AAGCAGGCTGACTTGTTGC-3' (SEQ ID NO:40) 和FAM-TAM标记的探针5'-TCGGTCTCTTCGACTAATCCCGCCAA-3' (SEQ ID NO:41) (Sigma-Aldrich) 作为参照基因, 将结果归一化为小鼠核糖体蛋白大P0 (Rplp0, 36B4)。

[0223] 统计学分析

[0224] 使用单因素ANOVA和图基 (Tukey) 事后检验 (GraphPadPrism v.8.0.1., GraphPad Software, CA) 检查治疗组之间的差异。通过有序回归分析来分析治疗组之间源自肝组织学的NAFLD活性得分 (NAS) 的差异, 随后使用Šidák方法校正族错误率。小于0.05的p值被认为是显著的。数据表示为单个值和平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

[0225] 结果和结论

[0226] Pnpla3 AS0和可妥度肽组合治疗对喂食诱导NASH的喂食的Pnpla3^{148M/M}小鼠的NAFLD、NASH和肝纤维化的改善具有累加效应。

[0227] 为了研究用Pnpla3 AS0和可妥度肽的组合治疗, 将纯合Pnpla3^{148M/M}敲入小鼠喂食诱导NASH的饮食36周。在最后14周, 它们也用Pnpla3 AS0或可妥度肽单独或组合治疗, 并与对照AS0治疗的动物 (所有小鼠接受相同数量的皮下注射) 比较。与对照AS0治疗的动物相比, 在治疗期间, 可妥度肽治疗而非Pnpla3 AS0治疗降低了体重增加 (图1A)。Pnpla3 AS0治疗而非可妥度肽治疗显著降低肝脏Pnpla3 mRNA水平≥97% (图1B)。

[0228] 如所述的确定总肝脂肪变性 (图2A)、大泡性脂肪变性 (图2B) 和微泡性脂肪变性 (图2C)。染色的切片示于图2D中, 每个切片提供单位面积的总脂滴百分比。如图2A-C所示, 与任一单独治疗相比, 用Pnpla3 AS0和可妥度肽组合治疗显著减少了所有类型的脂肪变性。如所述的确定每种治疗的肝巨噬细胞百分比 (图3A) 和炎症得分 (图3B)。如图3A和3B所示, 与对照相比, 所有治疗组中的肝巨噬细胞和炎症得分均降低。

[0229] 如上所述计算NAFLD活性得分 (NAS)。与对照AS0治疗的动物相比, Pnpla3 AS0治疗

降低了NAS ($p < 0.005$) (图4)。与对照ASO治疗的动物相比,可妥度肽治疗降低了NAS ($p < 0.001$) (图4)。重要的是,与对照ASO治疗的动物相比 ($p < 0.001$),与Pnp1a3ASO治疗的动物相比 ($p < 0.001$),以及与可妥度肽治疗的动物相比 ($p < 0.001$),组合的Pnp1a3 ASO和可妥度肽治疗降低了NAS (图4)。这些结果表明,用Pnp1a3敲低抑制和双重GLP-1和胰高血糖素受体激动剂的组合治疗对改善NAFLD和NASH具有改善的有益治疗效果。

[0230] Pnp1a3 ASO治疗倾向于减少肝纤维化,测量为肝胶原1A1含量,并且可妥度肽治疗也倾向于减少肝胶原1A1含量 (图5)。重要的是,与对照ASO治疗的动物相比,Pnp1a3 ASO和可妥度肽组合治疗显著降低了肝胶原1A1含量 ($p < 0.005$) (图5)。因此,这些结果表明,用Pnp1a3敲低抑制和双重GLP-1和胰高血糖素受体激动剂的组合治疗对改善肝纤维化具有优异的有益治疗效果。

序列表

<110> 阿斯利康(瑞典)有限公司(ASTRAZENECA AB)

<120> 用于治疗肝病的组合疗法

<130> 201129-US-PSP

<140>

<141>

<160> 41

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 33500

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

gaacactgag	ttcaagataa	gaaatgttta	taactctgtg	ctggcagcca	agagctggat	60
cccagttgca	gatgggggcta	tgcgtagcag	tgagagtggg	agacacagag	acagggactg	120
agagagagag	agagagagat	gggatcaggg	ataagggcag	tactgccagg	cactgggctg	180
ggtgctttct	gttcatacaca	tttaacttca	caatgccctt	cacacaactg	ttttctcccc	240
catggtacag	atataaaaag	tgaagctctg	agagatgaaa	tgatgcttgc	gagtcttgtg	300
cactggctgt	ctgatgccaa	agcttgacgt	ctcaacctat	atatcatgtg	cctgtcccac	360
tggaggctgg	atgggggggct	gagagagctg	gacatgaaa	cccttgccca	gctgggtcct	420
ctctttgtct	ctggaaagtg	gggagggccc	ccagctgctg	tctacatgca	gtgacgaaga	480
gggggtgagt	cctcagccct	gctcctgtcc	tgcccacatc	tgggtcacac	tggggatgac	540
agatgtccag	tgtggctggc	caagaatgaa	tgccggtgga	caggaagaga	atatgaatgc	600
ctgtggctgg	tggcagggtg	actcatctcg	ggccttcggt	cacagcctca	aattcctgtg	660
ccagagcctg	gccctcctgt	cattagtcct	aagactggtc	atgcaatgca	ggagggatgg	720
atgggtacag	gaggctagag	gttctgacct	cagctgtccc	ctccagaagc	ctcagttccg	780
ccgcagccct	gagcgtgagg	tgggggtgga	gggcagttag	ggcaggactg	taggtaatgc	840
ccctctccag	caaagccaac	acgtcaggaa	tagatgggac	cccctgtctg	cttctcagct	900
ctcctgacct	tccccgggac	ttaggacctg	accctgcctt	gctctgggcc	tccatctaca	960
aagtgtctat	gtgatgaggc	agtcagccca	ggtattcact	aaggcctgaa	gctcccatgc	1020
cctgggattc	ctgcccagag	aaaggaggca	gcctgtctcc	cagctcccct	accctccag	1080
gcaaggcaaa	agcaaggact	gcagcagaat	ggggaagctc	agttgaacat	gaaccaccca	1140
accaatccag	gtgcttctca	ggtgacattt	ggaatcctga	cagcaatgtc	acctgtttta	1200
caacaccacc	agtcattctg	cagttgagga	cactgagcca	caaagagggc	agaggcctga	1260
cccaaagct	cacatactct	gcattcctcc	aggtctcacg	gagaaggggg	agggttctct	1320
ggtccactcc	agctgggggc	gctatggccc	ggcagaccag	ggtcctccag	tgaggagctc	1380
tggaccaagg	tctaacttgg	ctccatgtac	tgctgtgggc	ttgctccacc	cagtgccagg	1440
ggtaggtcaa	ggtcaagggg	cctcttaggc	atctcctaag	ggcatgctac	tatccaaatg	1500

tttgtgtccc	cactaaaggt	catctgttga	aatcctacac	cttaaggtga	tgatcttttg	1560
aggcgggggc	ctttggaagg	tgatttgatg	agagggtggc	acccttatga	atgggattgg	1620
tgcccttatc	aaagaggccc	agaggtgagg	atgtggcaag	atggcacctt	ctacgagcca	1680
tacctctcac	cagggaccaa	atctgctggg	atcttgaact	tgggctttcc	agcctccaga	1740
actgtgagac	agagaaataa	gccaggcgaa	gtggctcacc	cctgtaatcc	cagcattttg	1800
ggaggctgag	gtgggtgatg	acttgaggtc	aggagttcta	gactagcctg	gccaacatgg	1860
tgaaacccca	tctctactaa	aaatacaaaa	aattagtcag	gcatggtggc	gcatgcttgt	1920
aatcccagct	actcgtgagg	ctgaggcagg	agaatccctt	gaacccggga	ggaagaggct	1980
gcagtggggc	aagatcgtgc	cattgcactc	cagcctgggg	ggaaaaagat	agaaataaat	2040
ctcttgtttg	taagcccctc	cgctttaagg	tgttttgttt	tcgcacctga	acggactaag	2100
ggactaaggg	accaggaatc	atccaggcct	cagcttccca	aagcactccc	cactccccag	2160
ttcctacagg	gccccgaccc	cagccccagc	accgctcatt	cacatttttt	acttacaag	2220
gaaactttga	aatggacact	tcctgttact	ttcattcaat	gaaaaaate	cccagcactt	2280
gaaggcaatc	atacagaaa	cctgcaacaa	cgcagagagt	agactcttca	ggtggtggtg	2340
cctgctttag	gctggctctc	cccgggtcaa	aaggacgtg	ataaagtgtt	aaagtgatgt	2400
taaggatcaa	gtgggcacca	actgcgactc	ccctcccacc	ccccgactta	acagatgtca	2460
aggaaaacag	aaggaagccg	tttctctcca	ggacatgcag	tgtctgctgg	agttttggaa	2520
aaatgctttc	tctcgagtcg	ctgcggggag	ctcccaggct	ggaccccccc	gcacaggtcc	2580
tccgccatcg	ccctcccagc	ccccgcccc	aatccccctc	ccagaccg	tccccgcccc	2640
catccccgc	cagacgtcgt	ccccaccccc	atccccctcc	aagccccgcc	cgggaggggc	2700
tcctgcccc	tcattggggc	tcccgccggc	tcatttgcat	ggtccgagg	ggcggggct	2760
gacgtcgcgc	tgggaatgcc	ctggccgaga	cactgaggca	gggtagagag	cgcttgccgg	2820
cgccggggcg	agctgctgcg	gatcaggacc	cgagccgatt	cccgatcccg	accagatcc	2880
taaccgcgc	ccccgcccc	ccgccgccgc	catgtacgac	gcagagcgcg	gctggagctt	2940
gtccttcgcg	ggctgcggct	tcctgggctt	ctaccacgtc	ggggcgaccc	gctgcctgag	3000
cgagcacgcc	ccgcacctcc	tccgcgacgc	gcgcatgttg	ttcggcgctt	cggccggggc	3060
gttgcaactgc	gtcggcgtcc	tctccggtat	cccgtgggt	gcgtctgggg	acgctgcccc	3120
ggctccacgt	gcggagtggg	tgccccctag	gccggggagc	gggggatccc	caggggtcgc	3180
ggggcccttg	aggagcgggc	atcggacgcg	gacacggcgg	ggtgcatccc	gagggcccc	3240
tccgaggcag	atgcttcctg	cgggggcgct	gttcttgggc	ccgggaaggg	ggcgttggaa	3300
ccccgagcgg	tccgggccga	agcctgggac	tctcgtgcgt	ccccaccct	acccccatca	3360
ggcgcccgtg	catgaaggga	gacctcacc	tccggactga	gagtcggagc	gtctcggagc	3420
gacggggagt	aggagcggg	acccggggcg	gagggtagt	ctggccccctg	cggactccgg	3480
gtcccctgtg	tcctctcggg	aggggtgga	cgggctgagc	tgccgagggg	ccgatttgcc	3540
ctgggccgga	caaagagtgg	ggctttggcc	ggtccccac	ggtgggctcc	ttccctctgg	3600
ggattgagg	actcaagaca	ccccgcgcct	gcgtttttct	tttctttttt	tctttttttt	3660
tttttgagac	ggagtttcgc	tcagtgcgcc	aggctggagt	gcagtggcgt	gatctcaact	3720
cactgcaagc	tccacctccc	aggttcacgc	cattctcctg	cctcagcctc	ccgagtagct	3780
gggactacag	gcgccagcca	ccaagcccgg	ctaatttttt	gtatttttta	gtagagacgg	3840

ggtttcaccg	tgtagccag	gatggtctcg	atctcctgac	ctcgtgatct	gccacctcg	3900
gcctcccaga	atgctgggt	tacaggcgtg	agccactgct	ccctgctgcc	tacgtctct	3960
gggtcgcagc	ccagccttct	gggggctggg	tagcctccca	gaagggaac	cctgggcatc	4020
ctccagggca	ggctaactgg	agtctagtgg	ggaggggtac	cttgaaagag	gaaagtgtt	4080
tcctcctcct	cctcctcctc	cagtgtttgg	gacccttctt	gggggctgga	gtgcatccct	4140
ggacaccccc	caatcccatc	ctcttctcta	gtttccactg	acctaggccc	accctcccct	4200
ctccggctca	gtactcctgg	aaatgagatt	ccgtacattt	gaatcttgct	ctaataaat	4260
atttgtccat	gtgggtacct	gtgtgtgtgt	ggtgggggtg	cagacggagg	gtttgtttct	4320
cactagctgg	aactactggg	gtgtggtatg	cttcttgga	atttgtgtgc	cacagtccctg	4380
gaggcgagga	gggggttggt	agccagtagg	caggggctgg	ggcaagtagc	attgtgaagc	4440
tattgacacc	cagacgtccc	caggcaggag	attatgcccc	cattagcccc	cttttatctg	4500
ggcttcctta	acaatggact	ctttgccttg	cctgccagag	ccagcaggga	gtgactgttc	4560
agtggtgagg	aagcgggcag	aggaagccct	gccattgggt	aggagcagtg	ggcagccctt	4620
gggctgactg	ggaggtgggg	attagggatt	agacagtcct	ggctgtctgc	cttcccctaa	4680
gccaggggga	gaggagcaaa	gggcacgaaa	tgtggcctcc	aggaggatta	gaccgccaca	4740
tgatcatttg	cacaccctgg	ggtttagcaa	caataaaagt	cagctttttt	gtatcccaag	4800
gtggcctgtg	gacaccaca	tggacaaatg	tttactactg	gacagaattc	aaatgcagag	4860
gtcccaggag	cctaaagtac	actcactctg	gtatagaaag	gattccttac	tgggcagagg	4920
acaggtgcag	cctggggcct	tcccaggcag	gacacaggga	ggctcaggaa	ccaccaagtc	4980
cctggaaggt	ggatctggag	gcgttggcag	gagccactcc	ctgggttcca	gggctccagg	5040
ttcctgcttt	aacccctgt	ctcacagagg	gctgtgcact	tgggggctgc	tgagcatgtc	5100
ccagaggctg	catcctggac	acagcacctc	agtgcactctg	agctgaggct	aacttggcag	5160
gagggacagg	cagaacctgc	cagccacgtg	caattccacc	cctctggcca	ctcagggaag	5220
gagagctgtg	agtcaagatc	agatttgggt	caggacaggc	tggggcctgc	ctgtccctgt	5280
gcatcccaag	atttatggct	ggccaggggt	tgggctggga	ggggtggtct	tgcatgccag	5340
gagagtgcag	atcagcctga	gaggccaggc	cagtaagtga	ggtcagatct	cctgcacctg	5400
atagcattaa	ggccatctac	accaaagctc	taatgctgat	atgttcctgg	cctctatgtg	5460
gggcatggag	gtggggcatg	gaggtgaggc	ctgctcgcct	gggcttctgg	aagtgggaga	5520
ctcattcctg	tggctgaggc	ctacagcagt	gctgtgtggt	aggaatacac	tggaagccat	5580
gatgtcattg	tgcattttct	agaagccaca	ttgaataaag	taaaagacac	aggtagaatt	5640
aatttcattg	agcccaatat	atccaaaata	atatcatttt	cacatctatt	caatataaaa	5700
atttactaat	gagatatttc	atactaagcc	actgaaatcc	agtttgtatc	ttacacatct	5760
cagttttgac	gagccacatt	tcaagggcgt	gatagccaca	tgtggctccc	atagtagaca	5820
gtactggtct	agagaaatgt	tgggtggcatc	cttgcgtctt	ggtttctggc	cttgccaaaa	5880
gtattaccat	cccagtgtgg	tacattcttt	catgtatttg	tctcctgtcc	ccagagcaga	5940
ctctgcaggt	cctctcagat	cttgtgcgga	aggccaggag	tcggaacatt	ggcatcttcc	6000
atccatcctt	caacttaagc	aagttcctcc	gacagggtct	ctgcaaatgc	ctcccggcca	6060
atgtccacca	gctcatctcc	ggcaaaaatag	gcatctctct	taccagagtg	tctgatgggg	6120
aaaacgttct	ggtgtctgac	tttcggtcca	aagacgaagt	cgtggatgta	agcagtttgc	6180

ttatctggac	gttgtcaagt	tagaaaagct	gttttgggat	gggtgtggtg	gctcatgcct	6240
gtcatcccg	cactttggga	ggccgaagcg	ggtgggttgc	ttgagcccag	gagctcgaga	6300
ccaacatgat	gaaacccagt	ctctacaaaa	attacagaaa	aattagctag	gcatggtgtt	6360
gtgggcccac	agtcccagct	actagggagg	ctgaggcagg	agaattgctt	gagcctggga	6420
ggtggagggt	gcagtaagtc	atgatcatgc	cactgtactc	cagcccgggt	gacagtgaga	6480
tgtgtgtctg	aaaaaaaaaa	aaaagaaaga	ctgttttgtt	ttggaagcaa	cacaggcagt	6540
tgtaggcccc	ctgtgccaga	gtgacataaa	ctctgtacac	ctccagtgat	ttggtccatg	6600
tttgtaaacc	ctgaatgttc	cagggcagtt	tcttttcttc	actttttatc	tctttttttt	6660
gggtgggggg	gcgggggtaca	gagtcttgct	ctgtctccca	ggctggagtg	cagtggcgca	6720
atctcaacct	cccaggagc	tgggactaca	ggcacaggcc	atcacacctt	gctaattgtt	6780
gtactttttg	tagagacggg	gttttgcctt	gttcccagg	ctggtcccaa	actcctgcac	6840
ccaagtaatc	tgccacctc	tgcttggcag	ttacaatttc	aaataattcc	tccctttcct	6900
tcaacacttg	gctcatgacc	gtccagtcca	aggaaactgt	cctgcagggtg	tgctctctcc	6960
gagcttcctc	tatgcatctt	ccataatgaa	gatgccttct	cactggaaac	cctacaaggg	7020
tgggaacgtg	ccttatattg	ctgtatcttc	agggtctagc	agagagaaga	taattttgtaa	7080
tacaaaaaca	ccattaaatt	cagctgatgc	ttcataagc	gctccttgga	ggaaggactc	7140
catttacttg	acagatctgt	gcaagacagc	agcctggcgc	gtctaacctg	cagccagttg	7200
catcctctgt	ttaaccttgt	ttgcggaagc	tttctctaaa	cagccagcac	ttgtctgttc	7260
ccacatgggt	ccgttctccc	agtgaatcac	cgtggtgcct	gctgactgct	ctgtagcaca	7320
gtgcttcgca	aagtgtgatc	ctgggaccag	cagagcagca	gctcctttga	gcttattgga	7380
atggcagacc	ctcaggctcc	acctctgacc	tgctgcatgg	gaattctggg	gagggacgca	7440
gaatctcttg	ttccacaggc	tctccggtga	tgctaatgaa	taccggcatt	tgaacagcac	7500
cgatctagcc	cctttcagtc	catgagccaa	caacccttgg	tcctgtctgt	ggtgaccagg	7560
tgtgactctc	atggggagca	aggagaggaa	gttgaagttc	actgacaggg	ttgttaaggg	7620
gattatgcaa	tagatgagac	ccatgggcct	gaagtccgag	ggtgtatgtt	agttccccgt	7680
tcttttgacc	catggattaa	cctactctgt	gcaaagggca	ttttcaagtt	tgttgccctg	7740
ctcacttgga	gaaagcttat	gaaggatcag	gaaaattaaa	agggtgctct	cgcctataac	7800
ttctctctcc	tttgctttca	caggccttgg	tatgttctct	cttcatcccc	ttctacagtg	7860
gccttatccc	tccttccttc	agaggcgtgg	taagtcgget	ttctctgcta	gcgctgagtc	7920
ctgggggcct	ctgaagtgtg	ctcacacatc	tcctgcctgc	agggcactgg	tgctgggcac	7980
ctcagggtct	gtcccatggt	ggagcccat	gcctcactgc	ctttcagaca	gagtagccac	8040
agctggccct	atttccaggc	taccggggca	gcaaaactta	ctgcatgtgt	aattaattat	8100
ttggctatct	gtaaggtaaa	ctggctggtt	cacttaatct	gcaccttaag	catcagatag	8160
cttctcagtg	atctagttaa	actatatgat	gttggccagg	cgcggtggct	catgtctgta	8220
atcccagcac	tttgggagcc	tgaagcaggc	agatcacttg	aggtcaggag	ttcgagacca	8280
gcctggccaa	cagtgtgaaa	ctctgtctct	cctaaaaata	caaaaattag	ctgggcatgg	8340
tggtgtgcac	ctgtaatccc	agctgctcgg	gaggctgagg	caggagaatt	gcttgaactt	8400
gggaggcgga	agttgcagtg	agccaagatc	gcaccactgc	actccatcct	gggtgacaga	8460
gcgagactct	atctcaaaaa	gaaaaaaaaa	aaaaaggtaa	ataaagtata	tgacactgaa	8520

gaatctgtta	ccccctggaag	gtggagcttt	actcttaggg	ggaactataa	cagtcataa	8580
tatatatttt	tttcttttct	tttttttttt	ttttgagatg	gagtctggct	ctgtcgccca	8640
ggctggagtg	cagtgggtgca	atctcggctc	actgcaacct	ccacctcaca	ggttcaggca	8700
attctcctgc	ctcaacctcc	cgagtagctg	ggattacagg	tgcctgccgt	cacgccaagc	8760
taatttttgt	atttttagta	gagacagggt	ttcatcatat	tggccaggct	ggtctccaac	8820
tcctgacctc	aggtgatccg	cccgcttgg	cctcccaaag	tgctgagatt	acaggcgtga	8880
gccatgggtc	ccggccaaca	atcacatgtg	ttgtaaaca	caacaaaaat	ctgtcagcct	8940
ggtctaacct	agatttgtgc	tttgttttgt	tttgccactt	tgtgatgcac	aggaggaagt	9000
ttaggctgta	aaatactagc	cttttaggggt	aatttttgaa	ctcacaagag	cagcagcgga	9060
acctttgatg	caatcctgta	tgtagcacca	gcagagccac	gtggcagagg	gactcgcatt	9120
aggagcctcc	cattacagac	tacgtgtctc	tgtgcgttat	cttatagggt	ccccacaacc	9180
aaggggagat	gtgattattc	atcctgtgtg	gctgtgggga	acttgagagt	catacttgcc	9240
caaagagcac	ggccagcgag	cttgcaccca	ggtcactctc	tgctcctctg	tcagaacagg	9300
gcatgtcttg	gttcaactgca	gggcggctct	tctcattctc	tgtagtttgg	ggtccaggat	9360
agtggccac	ggagccactg	gagtgccccag	ctactgagtg	accaaagcat	attttggtatt	9420
tccgacattg	ccacagcatg	gttgggcatc	agcaggaccc	caacccttg	ttatgctggt	9480
ggctttatgt	ggttatttga	tcttccccag	aactcagcag	gagtgcaccc	agcagcacccg	9540
tagtgatgct	ctctggctcc	ccagtgcacg	gttctggctt	tccttcctgg	tcgagagttt	9600
caagccctct	gggtcctact	ctgtcctttt	cagcccatag	ctttgttcaa	aagctgctgg	9660
cagtgttcag	atttggctga	gttcagtga	tatgtgcatt	ggctgatttc	tgagccatgc	9720
cagggggatg	gagaagccga	agcaggagtg	ttgtttctgc	aggctctgga	gtaggcattg	9780
ggtctgtgcc	ggctcacttg	ctagtcttgc	atccttcccc	aaccctctct	ggggatgtct	9840
ggccacatca	gaagacagtt	tgggttgtca	gaactggggg	agtaccaggc	cgaggtgggt	9900
ggatcatgag	gtcaggagat	cgagaccatc	ctggctaaca	cagtgaacc	tcattctctac	9960
taaacatacg	aaaaaaatta	gctgggcgtg	gtggcgggcg	cctgtagtcc	cagctactcg	10020
ggaggctgag	gcaggagaat	ggtgtgaacc	cggggggcg	agcttgagct	gagctgagat	10080
cctgccactg	cactccagcc	tgggcaaca	agcgagactc	cgtctcaca	acaaaacaaa	10140
acaaaacaaa	acaaaatctg	ggggagtgcc	actggcatct	gatgtataga	ggcccagat	10200
gctgtgtcat	cacccgttga	gtgcgtcat	aggcatcttc	ctgacaatta	gaaccatta	10260
ttcttcaaat	tcaatgcaag	caaattcaaa	gcattactgt	gtacataccg	catgctaata	10320
aattgcacca	ctggagctcc	taaattcaaa	acattactat	aaaaaagttc	aaaatgcatg	10380
gaaaagttgt	acatggcagg	agaatatttg	ggcttctgac	tacccttgga	atgaagatga	10440
tccaccagcc	gccttcctcc	ttggtcttca	ctccagattc	ctagcatttc	attctgtgtc	10500
tctttatgca	gtgaggtttt	tgtttgtttt	ttgagacaga	gtctcactgt	atcacctagg	10560
cctggagtgc	agtggcgca	tctcagctca	ctgcaacctt	cggctcctgg	gtttaagcga	10620
ttctcctgcc	tcagcctccc	gagcagctga	gattacaagc	acacatcccc	atgcccagct	10680
aatttttgta	tttttagcag	agacagggtt	tcacatggtt	gcccaggctg	gtctcgaact	10740
cctggcctca	agtgatccat	gtgcctcagc	cttccaaagt	gctgggatta	caggcgtgag	10800
ccaccatgcc	cagctcctag	tgaggttttt	gatgccttgc	tacatctgcc	ctagaaattg	10860

tgtgactacg	attttggaaa	tgttgctgtg	taaacttgtg	atcatttctg	gactccaggc	10920
aagaatcttg	atggctaagg	tgtggctgaa	catgtctgat	tctctcctgg	acctgtttta	10980
ggccaaactc	tgctctgaaa	ttcctccgtg	tggaagggcg	ggctggggag	agcctcccag	11040
ctggaatctt	ttggatgcct	ttctctgtgg	gtatctgatg	gctggctctg	atggctggct	11100
gtgatggctg	tggctggaaa	tcattgttga	catgagtttc	acagatgcag	gctctgtcca	11160
aattgtagca	aaagctgcct	gccccagccg	agctatgggc	aataaggtgg	tttaaggata	11220
tagatgaagg	aaaactcacc	cttagaataa	tttatccaaa	atgctgctgt	gttgtgggtt	11280
agaggacatt	ttctgaggtc	ccaggttcat	tgtttcattt	aagtctcaaa	agtcctccca	11340
ggtgttgggt	ctaattgtca	aagcatgggg	ggagatgggc	tcattgggtta	aaggtcttat	11400
cccagatttc	tgtatcctcc	ttgcaagcag	caaaggggtc	tggatttgaa	tccatgacca	11460
tgttttctct	ttgggtttcc	atcacactct	gtccccgtgc	actgagcacc	ctttagtcca	11520
tatgaccccc	ttaggcatgt	tacatgggca	ctctataggt	tgcccatctg	gccctaggac	11580
ttggccaaca	caacatggac	tccagtttcc	atctgcctct	ttgccaggca	cttttgtgca	11640
gtgcacacac	tgtacaacag	tagacggcaa	ccctgagagc	cagagtagag	cctgtcctag	11700
caccggaatg	ctcggttaagg	atttgtcgca	ggagtgatcc	caaagccaat	gtcctccctc	11760
catatcagcc	tgtttgtggc	tctgagaagc	tctgcccaca	tgtgaaagct	tgtaagcac	11820
ttaagcacta	accagagct	tcagacagt	ccagtccttt	ttcccccttct	ttaaaagcga	11880
tatgtggatg	gaggagttag	tgacaacgta	cccttcattg	atgccaaaac	aaccatcacc	11940
gtgtccccct	tctatgggga	gtacgacatc	tgccctaaag	tcaagtccac	gaactttctt	12000
catgtggaca	tcaccaagct	cagtctacgc	ctctgcacag	ggaacctcta	ccttctctcg	12060
agagcttttg	tcccccgga	tctcaaggtg	agttgggtgt	gagggggcag	gtgttctggg	12120
gtgcagctct	tctttgcctc	cctgattgcc	aggagctacc	agttactgtc	tgcacaatca	12180
aacagaaata	gacctgtcct	tgatgggtta	cggaaataaa	aggcgcttgt	cccagaagct	12240
caggtgaggc	accaccctga	ttatgggaat	cacctgggaa	catataccca	gacctaaaac	12300
tcagatccac	ttcccaggct	gtgggtatat	agtcaggggg	gtgcagtatg	ggtattagga	12360
ttttttattt	tttagttata	aagatttttt	tttggtttgt	ttttgagaca	gggtcttgct	12420
ctgccgctta	ggctggagt	cagtggtgca	atcatagctc	actgaagcct	cagactcctg	12480
ggttcaagca	gtcctccccc	ctcagcctcc	taaggagctg	ggaccacacag	gcatgcagca	12540
ccacacctgg	ctaattttta	aaaattttgt	ggagtgttgc	ccaggctgggt	ctcacactcc	12600
tggcctcaag	cgatcctccc	accccagcct	cccaatgtgt	tgggattaca	ggcatgagcc	12660
attgtaccca	gccactaaga	tgattcttat	ttggaaacac	ggtcaagaac	aactgcgttc	12720
ggtagtttaa	ccttttttga	ttgtggtgggt	tttagtatgc	cttaccactc	taccatagta	12780
agaaaatttg	agaccatgta	caccaacctt	tggtgctcct	ggggagaaaag	aaagaaggct	12840
atgcaatgca	atgcatgctc	acagtccaag	ggagagggaa	agctgtctaa	caggattgggt	12900
tttcccgtgt	gctttataag	cagatgagta	gaggagacag	ctcttattgt	cctagtggca	12960
attgggatag	gctgcaaagt	ttgttaggggt	ggaggcttat	tccgggacca	aggagaccca	13020
aagaaacaag	ctcctgccag	gcgcggtggc	tcacgcctgt	aatcccagca	ctttgggagg	13080
ctgaggcagg	tggatcacct	gaggtcagga	gtttgagacc	agcctggcca	acatggtgaa	13140
accccgtctc	catgaaaaat	acaaaaatta	cccgggcatg	gtggcgggca	cctgtaatcc	13200

cagctactag	ggaggctgag	gcaggaaaat	ggcttgaacc	tcggaagtgg	aggtggccgt	13260
tagccgagat	cacgccactg	cactccagcc	tgggcaacag	agcaagactc	tgcttataaa	13320
aaaaaaaaaa	aaaaaagaaa	agtaaaagga	aaaaaaagag	gctctggcct	gctgggggtgc	13380
ctgcaaagtc	tccgtggaag	ggtgacattc	aagccgagac	ctccagggaa	ctgtctcctg	13440
ggagcacaga	gcccctttgct	cagccccccag	gtggctcagt	gccccagcc	agcagactca	13500
gagcttgcat	gattcttttg	tgctctctgc	ggtcttccaa	tgatgctgaa	ataaatgggtg	13560
cttggtgtct	ccctgctgta	gtccccttgc	ttgctttgct	cacaggtgct	gggagagata	13620
tgcttctgag	gatatattgga	tgcattcagg	ttcttggaag	agaagggtat	gtatgggctg	13680
ggaggatcag	ccatgccctt	ttgacaagca	tttactagcg	gtcttggtaa	agacttgaga	13740
tttgcccttag	ttctaacact	tagtgcccaa	cgccttcctt	gtgttgctca	acctactcat	13800
gagcccagga	gataggaaat	ctccgtccca	ttgtacagat	ggggaaacag	aatttttgaa	13860
aggagagcca	agcagcacac	acccctccct	gaggggcaga	gccgagattt	gaactgggat	13920
gtcatgactc	cagggccctc	tcctcccca	gggtccctt	atctgaaggc	ggtttttctt	13980
tccagctcga	cctcttgtga	cccttagttt	aacaagggcc	gaagttaaag	agtttctgcg	14040
cctggacccc	aaatgaagca	atcagatttc	tcctctccag	tcaggtgtgg	gtccaagccc	14100
actagacaag	tttgctcttc	ccagagcaca	tttctgcctt	caagtcatcc	tggttgttca	14160
gggctggggg	agttctgctg	tagaaatatt	agagtggaag	gaaaaagatg	tggtgggagc	14220
tatttttctt	taatactaaa	agttggttga	tgaatttgct	gttgccaag	accaaggaga	14280
ctgcattttt	aaggacatat	gtgtatttat	ctgctcagaa	aatgttcatt	gctgtgtgct	14340
agggatactg	cagtgaacac	agaggtgtga	cccttgccag	ccttgtgaga	gaagttagca	14400
gataagtaag	cagaagggtg	atgctgtgtc	gatgggaaag	tacaggtgcc	aatgagaagg	14460
cacaggtgtc	aaggagaaga	cacaggatgc	tggaggctca	tgcaggatgg	atctccaagg	14520
cccaggggaa	gaagggcctc	tcggaggacg	tgaatccaca	ttaagacttt	ggggataagt	14580
aggagcgcct	taggcatggg	gacccatgga	tgcgaggcct	gtaggacaca	gacaggatgg	14640
catgaaggcc	tgtgcaactg	gaggggtggg	gatggggaca	ctaagagatg	gctggaagtg	14700
tgggggtggg	gacactaaga	gatgactgga	gaagaggggg	tcaggagtgg	tgaaaaatgg	14760
gagaggaggg	caggctgggc	cttttgata	cagggggatt	gcctcctgca	gtggttagga	14820
gccactgagg	gctgctgcag	taggagttag	gggatcagag	gagagctttg	gaagccccct	14880
ggatgcggga	caggaagcga	gataaccagt	tctaggaggc	cagtgaggca	gccacaggct	14940
ccaccaggat	cagggtgcg	agggtcatga	ggaggaaacc	aatttgaagg	agtccagggg	15000
aataggactt	ggaaatgacc	gatgggacat	ttgggaagag	gaagacagaa	gagcgcagtc	15060
ccggcttctg	gcttttagcag	ttgggcaagg	ggagatgggg	agatgtgccc	atgggttgag	15120
ggttgaggac	attaggaggg	agccggtatg	gcaggaagag	ctggtgtgcc	agagatgctg	15180
gaagcagcat	ctgcctgaga	acagatacct	ggcaatatte	ctaagggaaa	gtgacatctc	15240
ggagggtgag	gagggcattc	gatagggcct	ggaaagagcc	ggggcaagca	tgaatgtgag	15300
gttatcttgg	ggggcaaggc	tcaggcgttg	aggagcagcc	cctggtctct	tcagcctgaa	15360
gttggaagcc	agagtgggc	caggtgcagc	tgtggttgct	tgaagtcccc	ctccccagc	15420
ccagtgtgcc	aatgctgtaa	gagcaagggc	cgctcactgg	tgctggtggc	tgagtccag	15480
caccaggac	agggcctggc	acatactggt	gcccatacct	cccttctggg	tgcttcttcc	15540

aaggccttgt	gatggaagtg	agtaccctct	tcgacatcag	accagcttc	aaatcctggc	15600
tctgctatgt	attggctgcg	tggctttaga	caagtctttt	aaccttgctg	tgcttctgat	15660
ttctcagctg	aaaaatggag	atgatgatag	tggtttctgt	aaggccttat	ggtgaagcac	15720
ctagctcagg	gcctggaagg	caggtgtaac	cagtggttca	gttgttataa	accaacacta	15780
accctcgcct	ttgcacctca	tgaaccaga	tatgtagatg	gagcccacaa	agctagcagg	15840
agccaagctc	acgtgtgtcc	tgctttaaag	ccccataccc	ctttctccgg	gtgacaaaca	15900
cctgtgctcg	ttctcttccc	ttcccccttt	ccccttgcat	ttggctaata	acaggccagc	15960
tgctgcctc	cctgcagttt	ggtagatggg	tgggtaacga	ccaccactcc	cacgttcgcc	16020
tgatgggctt	gttttccgtg	cccttcacag	gcattctgca	caggccccag	ccaggcctga	16080
agtcattcctc	agaagggatg	gacctgagg	tcgcatgcc	cagctgggca	aacatgagtc	16140
tggattcttc	cccggagtcg	gctgccttgg	ctgtgaggct	ggaggagat	gagctgctag	16200
accacctgcg	tctcagcatc	ctgccttggg	atgagagcat	cctggacacc	ctctcgccca	16260
ggctcgctac	aggtaccac	tcctcggggg	gagcacgggc	agcaccttgt	tttctttctt	16320
gtgcattatg	gaggaagatg	gtactgccac	atgggagcga	tagggtgagg	caacctgac	16380
aggtggttgg	gaacatctcc	ttccatgtgt	acagcctggg	ctgctgccat	cactcccagc	16440
acagcccca	accccccaa	tcctggaacc	ttgccaagtc	tcccttccca	tggggtcatg	16500
accaggagga	aaacaaactc	cagctgagcc	ccttgggggt	ccccatatag	gctcctgcct	16560
gtggcagctg	ggccctctgt	acccctttcc	aactctgtct	ccctaactg	gcacctgagc	16620
tcctgccatc	ctggatttca	tggaccccaa	ggatgggggt	cctgcatctg	ggacttggcc	16680
tattactcgg	agctcctttt	cagccgcctc	cctccacctg	tccaccacc	tcaaggctcc	16740
tttcttgaga	cctctcctaa	tttctccctt	cccctaaacc	cacaattttg	aacctccatc	16800
gaatggtgct	gtattttata	atgtcatcaa	atatcaaagt	gagacagtgc	tatggtccaa	16860
atgatttgtgt	acccccaga	atttgtcttt	tgaatccta	acccccaca	tgatggtctt	16920
aggaggtggg	gcctttggga	ggagattagg	tcattgaggaa	agggtgtca	tgaatgggat	16980
tggtgccctt	attaaacaga	cccaagagag	gtcccttgtc	ccttctactg	tgtgaggact	17040
cagaaggtgg	tgtctatgaa	gaagcaggcc	ctcaccagac	accaacatgt	ctgctgcccc	17100
ttgatctggg	accttgacgc	ctctagaact	ctgaaaaatc	gatgtttgtt	gttttataag	17160
ccactcagtt	ggtggcattt	tgtagagta	gcctgaacac	ggactaagtc	aaacagaaga	17220
accacaaac	cagctacaga	gttgggcatt	tggagaaatt	caaaaatgag	tcagacataa	17280
ctccttattc	ttgaggtgcc	ctaagagatg	ggacacagca	gctgccagg	tgcattagtt	17340
tgttctcaca	ttgctataaa	gaaataacct	agactgggta	actcataaag	aaagaggttg	17400
aattggctca	cagttgcaca	ggctggacag	gaagcatggt	gctggcatct	gctcagcttc	17460
tggggaggcc	tcaggaaaact	tacaatcatg	gcagaaggtg	aacgggaagc	atgcacatcc	17520
catgactgga	gcaggagtga	gagagagagg	gaaatagagg	gaaggtgcca	tacactttta	17580
aacaaccaga	tctcatgaga	acacattcac	tatcaagaga	acagcaccag	tggggaaatc	17640
cgcctccatg	atccaatcac	ctcccatcag	gtccgcctc	caacactggg	aattacaatt	17700
tgacatgaga	tgtgggcagg	gacacagatc	caaaccatat	gaccagatta	atacgatttg	17760
aggcatcacg	aggtcattaa	agagaggga	taaaagactg	gggctccagg	aagaaggctc	17820
tggaatccag	cagagggtca	aggaccagct	tgtaaagctg	gtggtgcctg	agaagtacct	17880

aggagaacat	agatgctgtg	acgtttgatg	tagctgtttt	ttgttttgtg	ttttggtttt	17940
ttagacagag	tctcactctg	ttgccaggc	tggagtgtgc	agtggcgtga	tcttggctca	18000
ctggagcctc	catctcccag	gttcaaatga	tcctcatgcc	tcagcctcct	gagttgctgg	18060
gattacaggt	gcacaccacc	acgcctggct	aatttttgtg	ttttcagtag	agacagggtt	18120
tcaccatggt	ggccaggctg	gtcttgaact	cctgacctca	agtgatccaa	caacttcagc	18180
ctcccaaagt	gctgggatga	caggcatgag	ccaccatgcc	cagcctgatg	tagctgtttc	18240
tgtgcacatt	atttgctgtg	gggtatatc	agattttcta	atacaagatg	attctttgcc	18300
tcatgactta	cacaccattt	tctatttaat	ttcagctatg	atattggaaa	tggacatgtc	18360
ttttcaagga	aaataaaaagc	aggctttctg	gaatggcgac	ttccaaacat	atttgtcaat	18420
ttaaaggagc	tgggagtggg	gaccctatgc	tccgtaagca	ctctcttagc	tgttcttggc	18480
tgtgctcccc	gcttcagctt	cacaactgcc	ttgctgtgaa	gggagcagcc	tgggccgggc	18540
gcggtggctt	acacctgtaa	tcctagcact	ttgggaggcc	gaggtgggtg	gatcacctga	18600
ggtcaggagt	tcaagaccag	cctggccaac	atggtgaaac	tccatctcta	ctaaaaatac	18660
aaaaaattag	ctgggcatgg	tggcagggtc	ctgtaatccc	agctacttgg	gaggctgagg	18720
cagaagaatc	gcttgaaccc	aggaggcgga	ggttgcatg	agccgagatt	gcgccattgc	18780
actccagcct	gggggcaaca	agagcaaaac	tctgtctgga	aaaaaaagaa	aggagcagct	18840
tggcaaacc	cacctgtcgc	cttttgtgag	tgcctctgac	cctttggctg	ccaggacggg	18900
cgtattttat	ggaaatgcta	agcaccaaca	gagtaaagt	gtttggtttt	tcacagtgg	18960
gggagataat	agctccaaat	tgtctttttc	agcactgagt	gaagaaatga	aagacaaagg	19020
tggatacatg	agcaagattt	gcaacttgct	accattagg	ataatgtctt	atgtaatgct	19080
gccctgtacc	ctgcctgtgg	aatctgccat	tgcgattgtc	cagaggtgag	catttttaggt	19140
ggctccgtgt	cttcctcaca	gggttgatat	gaggatgaaa	caagatgata	gatcatgggt	19200
gcatgtagtc	tgggacctgg	attgtcgtgc	cacagatcac	agctcacagt	ctatgtgcaa	19260
tgccccctgaa	tgttgcccac	ctgtcctcaa	gccacacatg	cacctgtaac	tcagtgaag	19320
cccagaaact	ccccgtgggg	actcctagag	ctgtcagtgg	cctcacatag	cagctggtcc	19380
agtctcttgt	gattgccccaa	ggaaactgag	gcctggagag	cttgggggtca	ctgctctgag	19440
gccatagaga	tgcctagtag	aagggccagg	cctagaagca	ggatccttgc	tgccccctctg	19500
agctgtttcc	atttaaaaatc	acatgaaggc	cggcgccgtg	gctcacggct	gtaatccag	19560
cattttggga	ggccaagggtg	ggtggatcat	gtgaggctcag	gagtttgaga	ccagcttggc	19620
caacatggtg	aaatgccatc	tgtactaaaa	atacaaaaat	tagtgagca	tgggtggcacg	19680
tgcctgtact	cccagctact	tgggaaggctg	gggcagaaga	atcgcttgag	cctgggaggc	19740
agaggttgta	gtgagccaag	attgtaccac	tgcactccag	cctgggtgac	aggagagaaa	19800
ccctatctca	aaataaaaatg	aaaggtaatg	aatgaataa	aataataaat	caagtcacgg	19860
ccgggcacgg	tggctcacac	ctgtaatccc	agcgctttgg	gaggccgagg	tgggtggata	19920
atgaggtcag	gagttcaaga	ccagcctggc	caacatggtg	aaacatgtc	tctactaaaa	19980
atacaaaaat	tagctgggca	tgggtgtgca	tgcctgtaat	cccagctact	ccggaggcta	20040
aggcaggaga	attgcttgaa	gcaggacctc	ggaggcggag	gttggttgca	gtgagccgag	20100
atcatgccac	tgcactctag	cctgggctac	agagcgaaac	tccgactcaa	aaaaaaaaaa	20160
aaaaaaaaaat	caaatcacat	gaaagtagaa	catagggaat	tccatctttc	gttctaggca	20220

tagtttgta	atatgattca	gagccagcag	ttaggagaac	acagtgtgac	tctcctagaa	20280
cttcttgatt	gggcttcctc	tgattgggtt	tcctctgatt	gggcttcctc	tgaaagtggg	20340
ggggatgggg	ggtggggagc	agaatggtca	gagcttggct	cagcagtcag	actgctcttc	20400
ttcaaactct	ggctgcattg	cttactacag	ctgtgtgact	ccagatgact	gaatccacct	20460
ctctgtgctg	cagcttcccc	tctagagaga	tcacctggag	cagagggtgg	tcaggagact	20520
caatctgggt	actgactcac	agtgcaggag	tactcatccc	atagtaagca	tccagctaga	20580
gatgttgatt	tctattttca	ggtaataatg	atgacgtaa	aattagagac	agataaaaagg	20640
tatgggcatt	aggccagggc	actgcaattt	ctaagctgtg	tgacctcagg	caagttactc	20700
gacttctctg	agcctcagcg	gtttcatccg	caatatatgg	ataggaaaac	cgacctcagt	20760
gggttgctg	acagtggagg	gcacttgatt	aaaaaaaaa	aaattaccct	ggtctgaata	20820
ttaccctgga	ctgaaagaaa	aatattgagc	taatacaggc	atcaggaatg	gggctgcagg	20880
gagtccaggg	aaggggagaac	gaagagcctg	aaggtgtgag	gaggtgcgag	tgctgatctg	20940
tctgctacaa	agaggctgct	gagcctcctg	tggatgtggc	cctggacttg	gcagtttaat	21000
acctgagctg	ttaaaataac	ctcagatgct	gtgttcttta	aggggtagga	ttcagattcc	21060
tgctgaaatg	cttctgaaag	ggagggaatg	agccagccca	tccccagttg	ctttttaaga	21120
tcattgggaa	gttctggtct	tgccatttgt	ccctggacca	ctcttaggtc	ctcctgcccc	21180
acttccatct	gggtgtgtgc	cctgggctgt	ccaccacaca	gctacatcct	gccatcttcc	21240
ctcctggagc	cactgtgcca	tgcatggatc	tgtagcttca	tttttcttgg	cttttccctg	21300
gtttttctgg	agcagagtct	ctagtaaaact	cccaaggaag	aaaacgtttg	actttatgtg	21360
tgttgggaaa	cgtgcttttt	ttctattaca	tctcagtgat	aggttggcca	tgtctagaat	21420
tgcaggttga	aaatcatttc	ctctcagtat	attggttagt	gagaagcctg	ggactgagac	21480
agtcacattc	tcacttcttt	gcaggtgagt	gctcttagga	ctgtcttttt	atcccttata	21540
ctctgaaatg	tcatatgtct	tggtgtaagt	ccttatttca	gttattgagc	tggacaagta	21600
ctggagaccc	cttcagtcaa	agccttctgt	cattctccag	ctctaggaaa	ttatcttcta	21660
ttgttatttc	tgttatccct	tcccttccat	tttctttttt	cttttttttt	tttttttttt	21720
gagacagggt	cttactctgg	tgcccaggct	ggaatgcagt	gacctgatca	tggtacactg	21780
cagcctgaac	ctcccagact	caagtgatcc	tcccacctca	acctcctaag	tagctgggac	21840
tgaagcaca	catcaccaca	cccaacaaat	attttttaaa	aattttgtaa	gatgggatct	21900
tactatgttg	cccagacttt	ttcttccctc	tcctggggct	cttattagga	agatgtttga	21960
cttccctgggt	tggattccctg	tctccgtgtc	tgactttctc	tctttgtcat	atttttcatc	22020
actcgttgtc	tttttgctgc	tgctctgaca	gatttccctc	aattttgtct	tctagtccta	22080
tcctacagtt	tttactttca	gcaaataata	tttaatctcc	aagagtactc	tcttgttctt	22140
ttttcttagc	attctgttct	tgttttatgg	atgtaacatt	ctcttggaat	atttgctgtc	22200
ctctagatca	tcccttctcc	atttcttctt	gggctagttt	ttctgtttct	tcattcttct	22260
cttttatgct	acttattctg	ggcgtgttct	tggtgggttt	tttcccatat	agcaacagag	22320
gacttggagc	tcagggagaa	aagggtaggt	gcacacctg	gcagagctcc	cagacagtga	22380
caggcaggct	gcgggaagga	tgtctacttg	gcggtgtac	cgctttccta	gaaacccttt	22440
ccctggagct	ggttgaaactg	ttgggttttg	ccctgggtgt	gaacgtggc	tccccgtgct	22500
ctgcctgttt	catcaccagc	cccctcccct	tctgcctggg	gtccagtaat	ctgttgaaat	22560

atatactcttg	ctcattgggtg	agctcctgct	ccttcctcgt	tgctcttgca	gatttatcac	22620
ttctcgtaaag	gctgcgcttg	tacttcggga	ttttctctgt	gccacactgg	gaaacatagg	22680
gtgggtgcat	gctgcagtcc	tgagcactta	tttcactcac	atctttacac	gaagatttgg	22740
tgggtgttta	ctttgttttt	agtaagttag	tctgtcatgt	cctttgatcc	tttttttttg	22800
ttttttgaga	tggagtctct	ctgtgtcctc	caggctggag	tgcaatgtcg	cgatctcagc	22860
tcactgcaac	ctccacctcc	tgggtcaag	agattctcct	gcttcagtct	cctgagtagc	22920
tgggattaca	ggcatgtgcc	accacacctg	gctaattttt	gtatttttag	tagaggtggg	22980
gtttggcatg	ttggccagcc	tgggtctcaa	ctcctgacct	cctgacctgc	ctgccttggc	23040
ctcccaaagt	gctgggatta	caggtgtgag	ccaccacacc	tggccctgat	taatctttta	23100
atgcccagtc	tctccttcaa	aagccggctc	ctttctctcc	ctcgccttcc	tagattcctt	23160
ctccactccc	caggatcagc	ctcctctctc	ccaccccacc	actgccgggg	ggatgtctgt	23220
ggtcaggcat	ttatcagaga	ccctgaggtg	ggggtccttt	atgtgtctgg	gggatggaga	23280
gtctagagga	ggtagcgttc	agacctctcc	atggtgcctc	tgctgggctc	acatgtgacc	23340
aagcacagca	aaccatgagg	caggggatgg	tcttgacct	gagagccctt	gcagcagctg	23400
ccatgggcct	cagctcctct	ccaagctggg	aagagccctg	aaaagccaag	gtgttttttt	23460
ttccctcttt	atttcagtgt	aagtcccttg	agctttcttg	aaccagaagt	gggctcattt	23520
tgtcttagag	atttcagggtg	ggcttgtcct	tgctctagca	tcccagatcc	accttctggg	23580
aagtcacag	attggaggtg	atgttggcag	cttttgtaaa	caaagggtag	tgttgtaagc	23640
tgttgtgtct	gcctatgtgt	gtgtttgtgt	acttggctct	atctctgcag	actggtgaca	23700
tggcttccag	atatgcccga	cgatgtcctg	tggttgcagt	gggtgacctc	acaggtgttc	23760
actcgagtgc	tgatgtgtct	gctccccgcc	tccaggtaaa	tactttggct	gtgggtgtgt	23820
gggccggacg	ggcacctctc	tcatctgatg	aggcctcaca	cgacattcta	gaaacagctg	23880
gctgaacacc	aagcaaggag	cttgccttgg	ggtgtgggga	ccctgtctca	tgggaggcag	23940
ctgagtcagt	cagaggtcct	ggcacacctg	ctgagagctg	ccaccaggc	caacctgaac	24000
cggagccttg	gaagacttcc	cgtcggatga	gtctctttga	gtgcagcatt	gatggtggaa	24060
gagcagagag	gccccagata	agcagggaaa	ggtgcttcag	acagagtggc	tgggatgagg	24120
actggggagt	gtcagatagc	gctggcgtgt	ctgagcgaag	gagctctggc	acctatggca	24180
caggaaggag	gtgggacctt	ggaggggcag	ggctagcaga	gctcctcgga	gcgtgtggct	24240
aggtgccttg	taatgcaagc	ccccgtcct	ccacctctg	ttgtactgag	tcacagtctc	24300
cggggtgaag	cctagcagtc	tgcgttgaca	ggccccaggg	gatgccgcta	cttctgaat	24360
tctgaattct	ggaaaactgag	ccggagtcca	gggcctggct	cccattacca	gggttgggcg	24420
ttatcctgaa	aatcataggc	cttggtttcc	tcacttggct	aacaggggtg	atccccatcc	24480
cctcaatggg	tttccgtgag	ctcctgagag	cccgtagcat	ggtacttggc	acatgctggg	24540
catcaggagg	tatggcctct	cttgcctattg	ttgttatttg	tagacacaga	aggatttaaa	24600
agtaggggaa	tgcaaagatc	cgatttgcta	gggaagaggg	cagtagtggc	caagtagagg	24660
gtggatcctg	ggccctggct	ggcagcaggc	agcaaggggg	gctgccaggg	cccaggcagg	24720
gacgatctgt	agaccgagag	gcttcctaag	gctcttggac	aggaggaggt	gtcggttcca	24780
agcctaagga	gtggggcagc	cctggtgact	ggtggtcagt	ggtgccaggc	ggtgggtggt	24840
aggacaccct	ggcaggcaag	taggtttgtg	tgggggaaac	tgataggccc	ctccagggat	24900

tcgttgggtg	acaacacctg	tgatgtccag	tgggaggtgt	ccaggtagct	gggagggcca	24960
caggcttgga	agacctaggt	ggtgacatca	gcccagcact	gagggctaga	agaagctgtg	25020
tctctggctg	tgacggcacc	ctagagtgtg	tgtggtgccc	tctactggcc	ggcaatgtgg	25080
gtccaccgta	gctcagactg	cacactgcag	cagcgggaac	ggcctctaag	ccaacttcct	25140
ccatgtgttt	caggtcccaa	atgccagtga	gcagccaaca	ggcctcccca	tgcacacctg	25200
agcaggactg	gccctgctgg	actccctgct	cccccaaggg	ctgtccagca	gagaccaaag	25260
cagaggccac	cccgcggtcc	atcctcaggt	ccagcctgaa	cttcttcttg	ggcaataaag	25320
tacctgctgg	tgctgagggg	ctctccacct	ttcccagttt	ttcactagag	aagagtctgt	25380
gagtcacttg	aggaggcgag	tctagcagat	tctttcagag	gtgctaaagt	ttcccatctt	25440
tgtgcagcta	cctccgcatt	gctgtgtagt	gacccctgcc	tgtgacgtgg	aggatcccag	25500
cctctgagct	gagttggttt	tatgaaaagc	taggaagcaa	cctttcgcct	gtgcagcggt	25560
ccagcactta	actctaatac	atcagcatgc	gttaattcag	ctggttggga	aatgacacca	25620
ggaagcccag	tgacagagggt	cccttactga	ctgtttcgtg	gccctattaa	tggtcagact	25680
gttccagcat	gaggttctta	gaatgacagg	tgtttggatg	ggtggggggc	ttgtgatggg	25740
gggtaggctg	gcccattgtg	gatcttgtgg	ggtggaggga	agagaatagc	atgatccac	25800
ttcccatg	tgtgggaagg	ggtgcagttc	gtccccaaga	acgacactgc	ctgtcaggtg	25860
gtctgcaaag	atgataacct	tgactactaa	aaacgtctcc	atggcggggg	taacaagatg	25920
ataatctact	taattttaga	acaccttttt	cacctaacta	aaataatgtt	taaagagttt	25980
tgtataaaaa	tgtaagggaag	cgttgttacc	tgttgaattt	tgtattatgt	gaatcagtga	26040
gatgttagta	gaataagcct	taaaaaaaaa	aaaatcgggt	gggtgcagtg	gcacacggct	26100
gtaatcccag	cactttggga	ggccaagggt	ggcagatcac	ctgaggtcag	gagttcaaga	26160
ccagtctggc	caacatagca	aaaccctgtc	tctactaaaa	atacaaaaat	tatctgggca	26220
tggtgggtgca	tgctgtaat	cccagctatt	cggaaggctg	aggcaggaga	atcacttgaa	26280
cccaggaggc	ggaggttgcg	gtgagctgag	attgcaccat	ttcattccag	cctgggcaac	26340
atgagtgaaa	gtctgactca	aaaaaaaaaa	atttaaaaaa	caaaataatc	tagtgtgcag	26400
ggcattcacc	tcagcccccc	aggcaggagc	caagcacagc	aggagcttcc	gcctcctctc	26460
cactggagca	cacaacttga	acctggctta	ttttctgcag	ggaccagccc	cacatgggtca	26520
gtgagtttct	ccccatgtgt	ggcgatgaga	gagtgtagaa	ataaagacac	aagacaaaga	26580
gataaaaaga	aagacagctg	ggcccggggg	accactacca	ccaatgcgcg	gagaccggta	26640
gtggccctga	atgtctggct	gcgctgttat	ttattggata	caaagcaaaa	ggggcagggt	26700
aaagagtgtg	actcatctcc	aatgataggt	aaggtcacgt	gggtcacgtg	tccactggac	26760
agggtccct	tccctgcctg	gcagctgagg	cagagagaga	gaggagacaa	agagaaagac	26820
agcttacgcc	attatttctg	catatcagag	acttttagta	ctttcaataa	tttactactg	26880
ctatctagaa	ggcagagcca	ggtgtacagg	atggaacatg	aaggtggact	aggagcgtga	26940
ccactgaagc	acagcatcac	aggagacag	ttaggcctcc	agataactgt	gggcgagcct	27000
gactgatgcc	aggccctcca	caagaggtgg	aagagcagag	tcttctctaa	actccccag	27060
ggaaaggag	actctcttct	ctcgtctgct	aagtagcggg	tgttgttcct	tgacactttt	27120
tgtaccgct	agaccaggt	ccgcctggca	atgggcgtct	tcccagatgt	tggtgtcacc	27180
gctagaccaa	ggagccctct	gatggccctg	tccaggcata	acagaaggct	cgcactcctg	27240

tcttctgggc	acttctcgct	acgtcccctc	agctcctatc	tctgtatggc	ctggtttttc	27300
ctaggttatg	attgtagagt	gaggattatt	ataatattgg	aataaagagt	aattgctaca	27360
aataatgatt	aatgatattc	atatataatc	atatctaaga	tctatatctg	gtataactat	27420
tcttgtttta	tattttatta	tactggaaca	gctcgtgtcc	tcagtctctt	gcctcagcac	27480
ctgggtgggt	tgccacccac	aattttccac	atgcttctgg	tctgcgttct	ttttttctcc	27540
ttgcatcttc	tcattctctg	atcaccccaa	cctctctctg	tcttccctac	tctgccagcc	27600
ttgatggaga	caagcccttg	agaccagaac	tcaccttttc	cccaggtgtg	ataatctatt	27660
agcaaggtca	gtgtaatatg	actgacgggtg	aaacgtgtat	ttttttctat	ttatgcattt	27720
gagtacagta	cgtacaagaa	aaataatggg	gtgctcaaac	tgttaaagt	tggaaaagaa	27780
agatacaacc	cttacccata	ttgtgtaagt	gccctggagt	agaagaacca	gcaagctcag	27840
acaaagcact	tgactgagaa	gacagaccct	ttaaaggaaa	cgggttctag	ggacaaactc	27900
tacgtgggcc	tgttctcttg	ataagaccgt	gaactctttg	agaaaagagg	ctacttgtga	27960
aaataatgag	cccccttcgg	ggcaggagtt	ccggggtttg	aacctgcctt	cttacatctt	28020
gagggctaag	tgagttccca	aggcctctgt	tcagtggttg	ctccgtcagt	gagctcaggt	28080
ctggtgagtg	gcagggtcct	ccaccccaaa	ccccaccggg	tgtcagagca	agacactgtc	28140
ccccatggag	ctggaatggg	gtggaggagc	ccacatctgg	caccacgtg	gcctccttgt	28200
gacggacca	cccttgcaat	gttggaagg	aaagttacaa	gtttcttttc	ccaagtttcc	28260
cagtaggctt	tgttctgtta	gcttcacgcc	ttcggtcatt	agcagacata	aataaacttt	28320
aaccattggt	ttttatcttt	tttttttttt	tttgagatgg	agtttctactc	ttgttgccca	28380
ggctggagta	caatggcaca	atctcggctc	accacaacct	ccgcctcccg	ggttcaaacg	28440
tttctcctgc	ctcagcctcc	caagtagatg	ccaagcctcc	caagtagata	caggcatgtg	28500
ccaccacgcc	cagctaattt	tttgtatttt	tagtagagat	ggggtttctc	caggttggtc	28560
aggctgatct	cgaattcccg	acctcagatg	atccaccgcg	ctcgggtctcc	caaagtgttg	28620
ggattccagg	tgtgagccac	cacgcccggc	caacagtatt	ttctaataac	cagtatatatt	28680
ccatatacat	gtgtacatgg	gtattgtgat	tgttatcagg	aaaaaatata	ttaaattggct	28740
gataggagac	catgggacgt	attttctttc	tgcttttaaa	aattattcag	gccgggtgcg	28800
gtggctcatg	cctgtaatcc	cagccctttg	ggaggccaac	gtggacagat	cacctgaggt	28860
caggagtctg	ggacaagcct	ggccaacatg	gtgaaaccct	gtctctacta	aaaacacaaa	28920
aattagccag	gtgtgggtgc	aggcgctgt	aatcccaatt	agtgggttg	ctgaggcagg	28980
agaatcactt	gaaccacagga	ggtgggtggt	gcagtgagct	gagatcgtgc	cactgcaccc	29040
cagccccggg	gacagagtga	gactccatct	caaaaaata	aaaaataaaa	aataaaaaat	29100
aaattattca	atcttcttta	tttttattgt	tttaatgact	aaagttattt	ttagtagaaa	29160
cagggtcttg	ctatgttacc	cacgctagtc	ttgaactcat	tggtttaagc	agtcttctctg	29220
ccttagcctc	ccaaagtgt	gggattacag	gcatgcctgg	ctcctccacc	ttcttaaaat	29280
aagcatttgt	tttataattt	tttccaagt	tgtatcaaga	taaggaaatc	aggaagtgt	29340
atattcttat	agaaatggcc	aaggcctccc	ccttcacctg	tgcctcagat	gctacceaat	29400
ccgccttct	ctgtccctcc	agaaggcacc	ctttgcttag	gcctccctct	cttctgaac	29460
cacctctgga	agtttcttat	tggcctatga	atgcattctt	atttcttctt	atcaaataaa	29520
gccttccctt	taatttatgg	cacatttatg	ctttggaatc	cactctcagg	aataatcagt	29580

atgtagcata	ttacacgtca	ggcggcaaca	ttcttttttt	tttttttttt	ttttgaggca	29640
gggtccccgt	ctgtcatcca	ggctagagta	cgggtggtga	atcatagttc	actgcagcct	29700
caacttcctg	gggtcaagcc	atcttcccac	ctcagtctcc	caagtagctg	gaaccacatg	29760
tgtgcactac	cacacccagc	tagttttttt	ttgtagagac	agggccttgc	cttggtgccc	29820
aggctgggtc	ccaagtccct	ggctcaagtg	atgctcctgc	cttggccttc	caaagtgcta	29880
ggattacagg	tgtgagctac	catgcctggg	ccaacattct	tcatttggtg	aatggctaaa	29940
cttagtgacg	agtatgagcc	tgattttgtt	taaaaaaaaa	atgtgtgtgg	gtgtgtatat	30000
gtatctttga	gtgtatataa	aaagactgaa	agagggtggg	gcacggtggc	tcatgcctgt	30060
aatcccagca	ctttgggagg	ctgagggagg	cggatcactt	aagtcaggag	tttgagacca	30120
gactgggtga	aacccccatc	ctactaaaaa	atgcaaaaat	tagctgggca	tggtggcggg	30180
cacctgtaat	cccagcaacc	agggaggtg	aggcaggaga	atcacttgaa	cccaggaggt	30240
ggaggttgca	gtgacccgag	atgcagttag	actccacctc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	30300
aaaaaaaaag	taaggatata	tatcaaaacc	cttatggcag	actgttatatt	gtaattgtat	30360
tttatattgt	gtgcttatat	gtgttgccca	agtttctatg	gtgaacggta	tgcatacatt	30420
tcagcatgag	aaaataactc	ctaataaacg	tgattcttaa	aggactctcc	ctgtgtacat	30480
cctttccaag	gagccccgat	gtaccctgct	tccctcacag	ccaagctcct	ctaggacagt	30540
cctccctagg	gggttacggc	cttgctcctt	tgatggccct	gccacagccc	aggggctctt	30600
tcttgggcac	tgtggaccag	accctcctag	aatccctctc	cttctcaac	cccagactct	30660
caggcacccc	atctctatcc	tggacaccga	gcttgtcacc	aaggcccagc	tgcagctgct	30720
gtgctgagtg	tgcacagcca	cctctgggaa	ggctgtgctc	cccctgagga	cctgggtcct	30780
cagtctctga	ctctgggggg	attcggggcc	acctaccac	cttctggctc	tactcaacac	30840
cagcagcccc	tcaacatcaa	gccctccagc	tcacagcacc	tcagctctgc	agctccaaag	30900
ccaccccagc	ctggaactgg	ggactcaggg	agactccctc	gctccaactc	cagctggtcc	30960
cagcactgcc	tctgctgtca	tctctggaat	ctggctctct	gtccccagcc	cactgctgcc	31020
agggtcagcc	ctggfacttt	ctacctgggt	tgctgcaaca	gcttccctct	gggggccgcc	31080
tgttttcagc	cttgggcccc	tctgccctcc	acgttgctgc	tgggcaagct	gaggccccac	31140
cacaccccc	gcaccttcct	gtgcctccag	gccttccctg	ccagtaacac	ccctccagcc	31200
cctgaagccc	tgtcagcagc	tcagagcctt	tccccggagt	caccctgctt	cccaggggga	31260
cccacgttgc	tgtctggcaa	gctgaggccc	cgccacaacc	ccagcgcctt	cctctgcctc	31320
cagactccct	cctagcacac	cctctccagc	tcttgcagtc	ccaccagcag	ctcagagcct	31380
cttccctgag	tcacctgct	tcccaggggg	acctccaccc	agggaatgcc	cttccaggct	31440
cctctcactg	attcaccttc	actcctcaga	ggtcagggtg	tggctgatag	aggcaatgag	31500
gtgagcccc	cacctcaggg	cgtcagccc	ctgggaaggt	gatgaaaaag	ggcaccccaa	31560
ggggtgtccc	aaactaatag	gtggatgact	cccgtgggaa	gatccagtct	ccccccccca	31620
tggccaatta	aatttggggg	gtttttcttt	acttttttga	ggcaaggtct	tgttttgttg	31680
ctcaggctgg	agtgacgtgg	cacaatcaca	gtcactgca	gccttgacct	cctgggctca	31740
agcaatcctc	ctccttcagc	ttcctgagga	ggttttaatt	aaataaatta	aaagctaatt	31800
aaaaacattt	tttttttttt	ttggtagaga	tggggtctca	ctgttttcca	ggctgatctt	31860
gaactcctgg	actcaagcaa	tcctcttgct	tcagcctctg	gagtagctgg	gactacaggt	31920

```

gcttgctact atgcccagct atttttttta ttttttattt ttattttgta gtgatggggt 31980
gtgtttccta ggctgatcct gaactcctgg gctcaagcaa tcctcctgcc tcggcctccc 32040
aaagtgctga gattataggt atgagccatt gcactcagcc tggattgtat taaggaaact 32100
agcttagtca ctaaactgca cttctacttc tgattggaca agattggcac tttgtaaacc 32160
aggttttctg ggatgctggt ttccttgaag atgtttctag ctggtattat catataggat 32220
aggctgagtt atgctgcatt aacaagcaaa acccaaaagg tttatttctc attcgtgctg 32280
tatgtccagc aaatgtggct gggcttcatt ttaagtcgtc ctactccca gacctagcct 32340
gtaggtgccc caccattggg ggatcgctga ttgccatggc atggttagag aaatatggtt 32400
cttaaagggt ctcacccaga gtggcacatc tctcttctgc tcacaatgtg ttgaccaaag 32460
caagtcacat ggatgggagc agggagatgc aatcctctct tgtgccc aaa agaggagcac 32520
aagaaatact gttgaatagc attgccagag gccacagaaa aatctccaaa accaaaaatc 32580
tctatgaccc aataaattca agaaatactg ggttaaagag aaggaaacca gtatatgcac 32640
tgtgagactt ctcagctctt attatataca ttgtaacat cacagacagc ctttaatata 32700
tacatcttaa ctatcacaga cagccttcag tatattatat acattataac catcacagac 32760
agccttcaat atattatata cattataacc atcacagaca gcctttaata tatacattat 32820
aactatcaca gcctttaata tattatgtac attgtaacta tcacagcctt taatatatta 32880
tatacattgt aactaccacc gcctttaata tagtataccc attgtaacta tcacagcctt 32940
taatatacac attgttaact accacagaca gcctttaata tattatatac attgtaacta 33000
tcacagatag cctttaatat atacattgta actatcgag acagcccttt gtttgagggt 33060
aaagcatgtg actttgtttt cctcctgttc cctctgcat cctccagggc ctcacacaca 33120
ataggctctc aaatatgtga accatcttgc actctgcagg gcaacctcat ggcttatcct 33180
ttacaagtgg catactcaga agaataacga ggaagaaagt gtaagaaaag agggctgttt 33240
gggcaaagaa aatctggttg attcgatgtt tacagagtgc caggcccat gcttgatctc 33300
atgaggctcct cagaccttat gccttaggct atcatttcca ttttacagat aaggaattga 33360
ggctcaggga actgagagtg aggggaagggc aggggcctgg ctggtgctgg gttctgtctc 33420
tttccaggca agaagggaca tgtggacttg aatatttagc tcagggatgt tggaggccta 33480
gggtgctgct atttaaatgg 33500

```

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸

<400> 2

ctttattcaa tgtggc

16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 3	
tttttagtag tcaagg	16
<210> 4	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 4	
cgttttagt agtcaa	16
<210> 5	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 5	
ttggatatat tgggct	16
<210> 6	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 6	
ctagtaaag cttgtc	16
<210> 7	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 7	
agaaattgca gtgccc	16
<210> 8	
<211> 16	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 8	
cttagaaatt gcagtg	16
<210> 9	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 9	
taatattcag accagg	16
<210> 10	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸	
<400> 10	
gtaatattca gaccag	16
<210> 11	
<211> 29	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 11	
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser	
1 5 10 15	
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr	
20 25	
<210> 12	
<211> 30	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 12	
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly	
1 5 10 15	
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg	
20 25 30	

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10				15		
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 14

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5					10				15		
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 15

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10				15		
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 16

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 17

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 18

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 19

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 20

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Glu	Lys	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 21

His	Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Lys	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> G931

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13) .. (13)

<223> Lys(gE-palm)

<400> 22

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> G934

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10) .. (10)

<223> Lys(gE-palm)

<400> 23

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Glu	Lys	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> G973

<220>

<221> MOD_RES
<222> (10) .. (10)
<223> Lys(gE-palm)
<400> 24
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30
<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<220>
<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Gly或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10) .. (10)
<223> Tyr或Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12) .. (12)
<223> Lys,Glu,Arg或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13) .. (13)
<223> Lys或Tyr
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15) .. (15)
<223> Asp或Glu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16) .. (16)

<223> Ser或Gly
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17) .. (17)
<223> Glu,Arg,Gln或Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18) .. (18)
<223> Arg,Ser或Ala
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20) .. (20)
<223> Arg,Lys或Gln
<220>
<221> MOD_RES
<222> (21) .. (21)
<223> Asp或Glu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (23) .. (23)
<223> Val或Ile
<220>
<221> MOD_RES
<222> (24) .. (24)
<223> Ala or Gln
<220>
<221> MOD_RES
<222> (27) .. (27)
<223> Glu或Val
<220>
<221> MOD_RES
<222> (28) .. (28)
<223> Ala或Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) .. (30)
<223> Gly或Arg
<400> 25

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Xaa

1	5	10	15
Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Gly Xaa			
	20	25	30
<210> 26			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:合成多肽			
<220>			
<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (10) .. (10)			
<223> Tyr或Lys			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (12) .. (12)			
<223> Lys、Glu、Arg或Ser			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (13) .. (13)			
<223> Lys或Tyr			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (17) .. (17)			
<223> Glu、Arg、Gln或Lys			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (18) .. (18)			
<223> Arg、Ser或Ala			
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (27) .. (27)			
<223> Glu或Val			
<400> 26			
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser			
1	5	10	15
Xaa Xaa Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly			

<221> MOD_RES
<222> (10) .. (10)
<223> Tyr或Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12) .. (12)
<223> Lys,Glu,Arg或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13) .. (13)
<223> Lys或Tyr
<220>
<221> MOD_RES
<222> (27) .. (27)
<223> Glu或Val
<400> 28

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<220>
<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽
<400> 29

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 30

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> Lys、Glu或Arg

<400> 31

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Xaa	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> Lys、Glu、Arg或Ser

<400> 32

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Xaa	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 33

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 35

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<223> 嵌合 GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 36

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸

<400> 37

tatattttggt gatatcc

16

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸

<400> 38

ggccaatacgc cgtca

16

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成引物

<400> 39

gaggaatcag atgaggatat ggga

24

<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成引物	
<400> 40	
aagcaggctg acttggttgc	20
<210> 41	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成探针	
<400> 41	
tcggtctctt cgactaatcc cgccaa	26

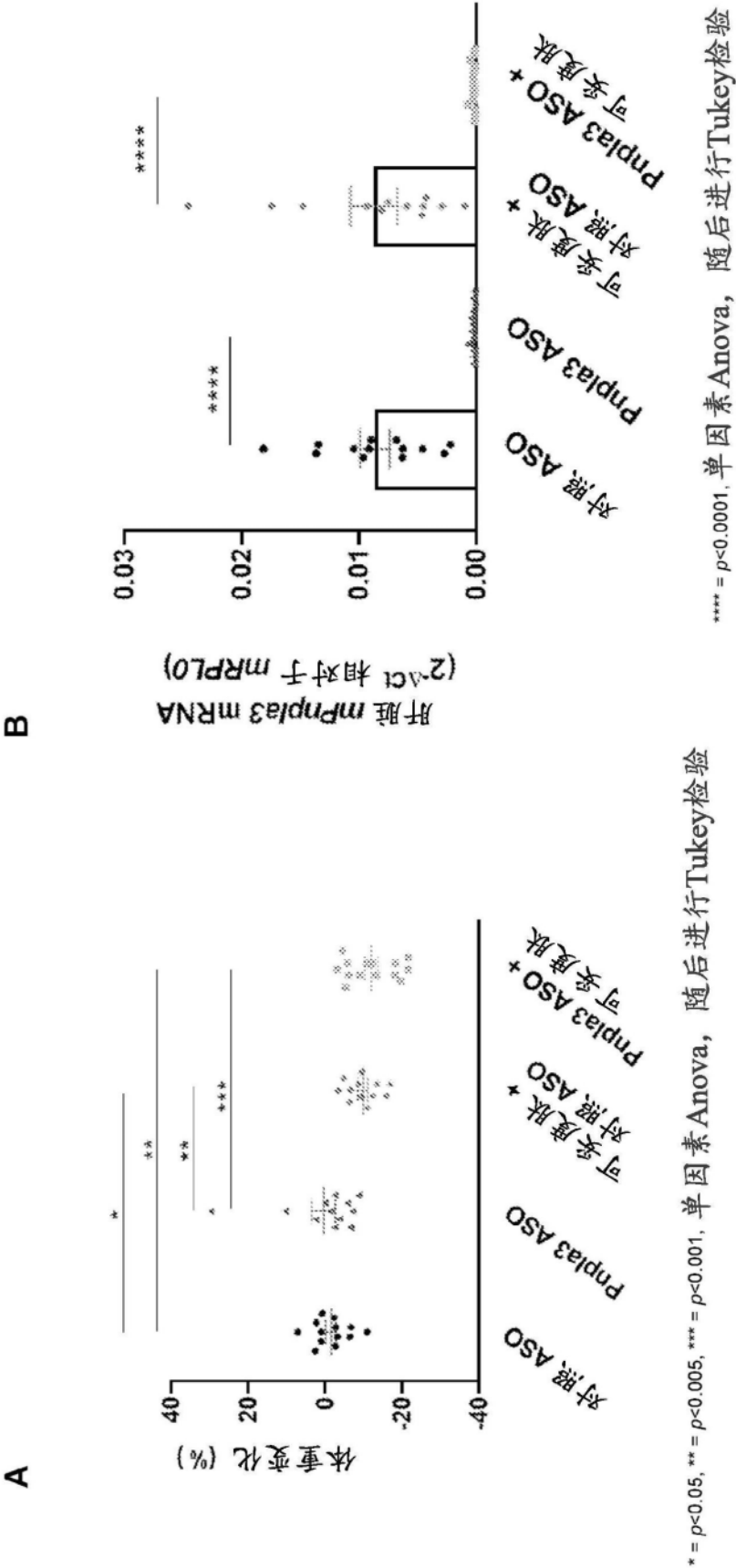


图1

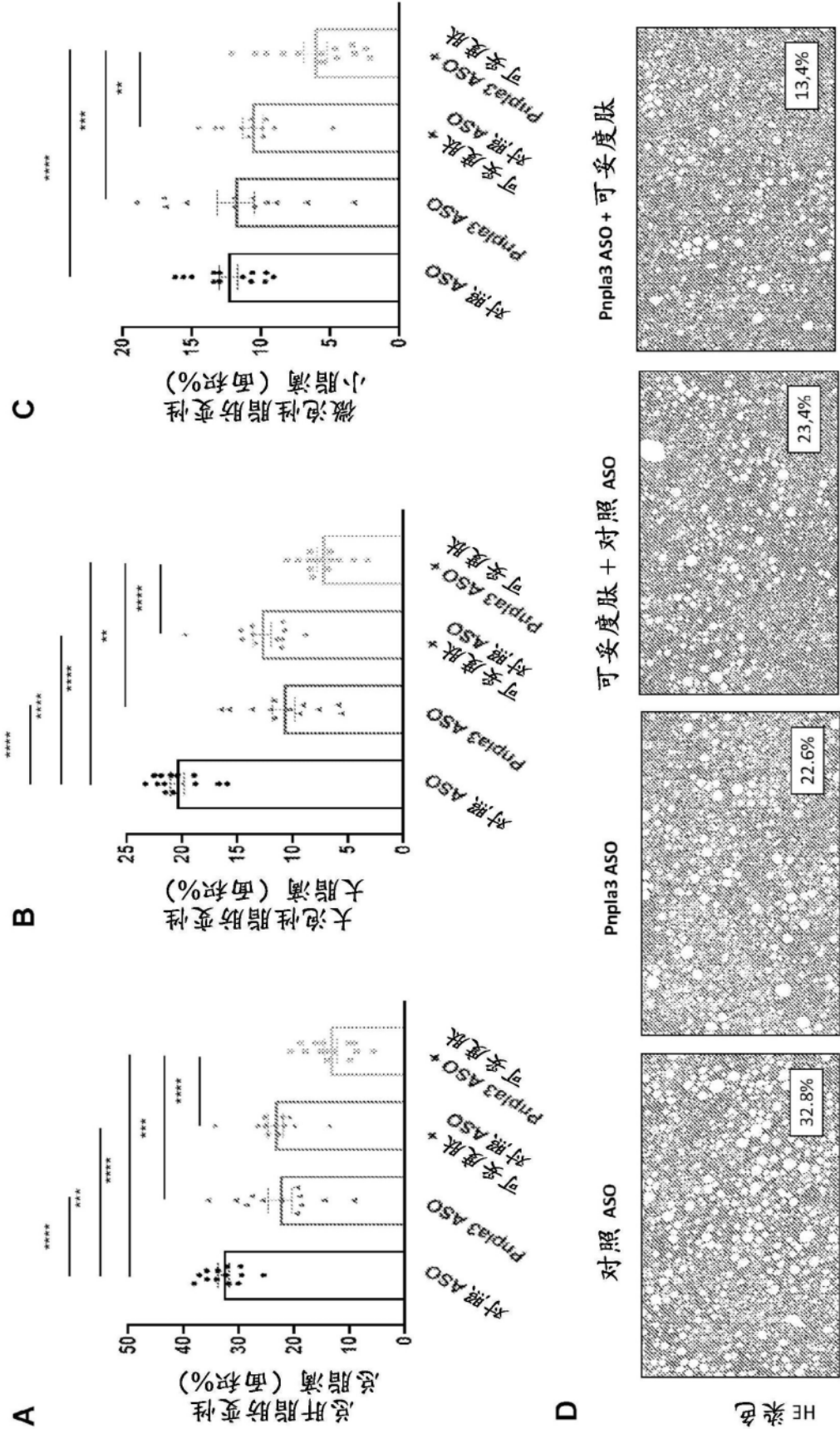


图2

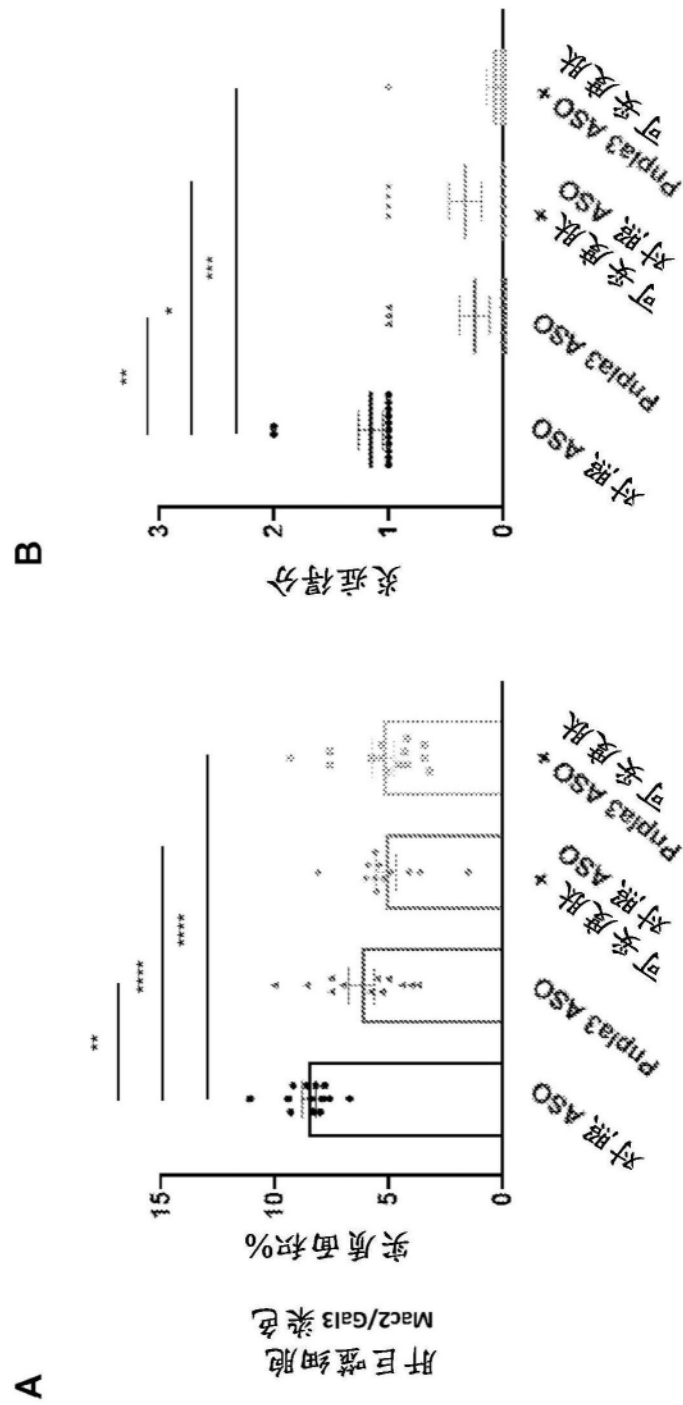


图3

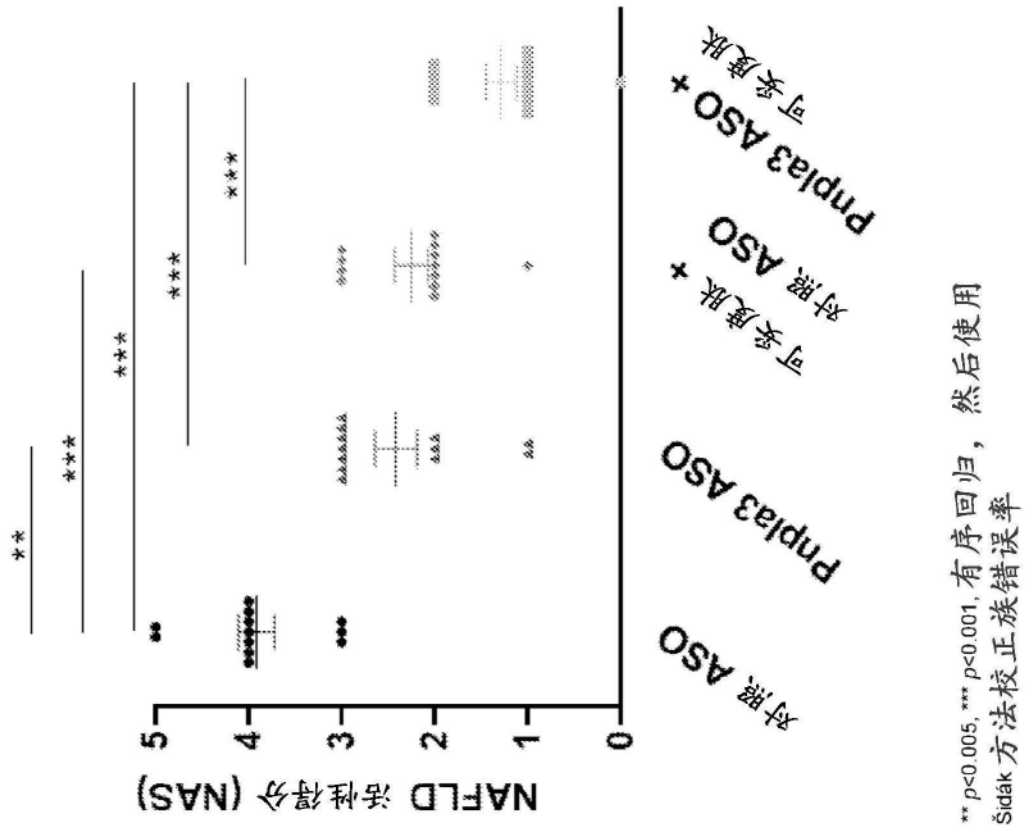
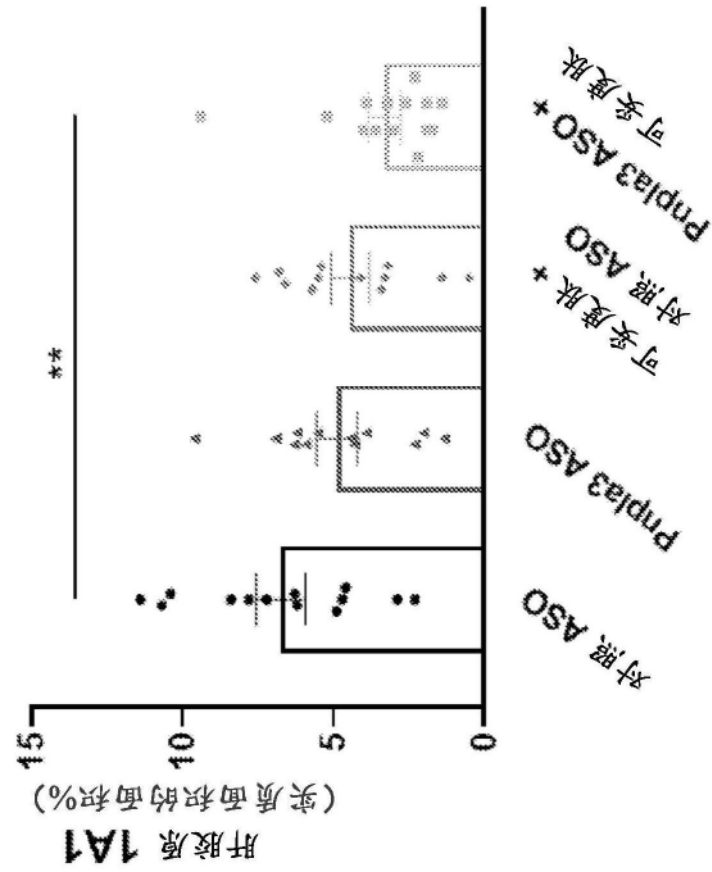


图4



** = <0.005, 单因素Anova, 随后进行图基检验

图5