



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115461460 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 09

(21) 申请号 202180030650.9

(22) 申请日 2021.03.05

(30) 优先权数据

62/985,950 2020.03.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/021049 2021.03.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/178778 EN 2021.09.10

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·陈 M·贾纳斯

R·D·麦克杜格尔 D·拉姆斯登

M·K·施莱格尔 J·E·萨瑟兰

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

权利要求书5页 说明书49页

序列表22页 附图2页

(54) 发明名称

用于抑制转甲状腺素蛋白 (TTR) 的表达的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了使用靶向转甲状腺素蛋白 (TTR) 基因的RNAi剂 (例如双链RNAi剂) 治疗TTR相关疾病的组合物和方法。

1. 一种包含有义链和反义链的RNAi剂,其中:

每条所述有义链和所述反义链的长度独立地为最长达30个核苷酸;

所述有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);以及

所述反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

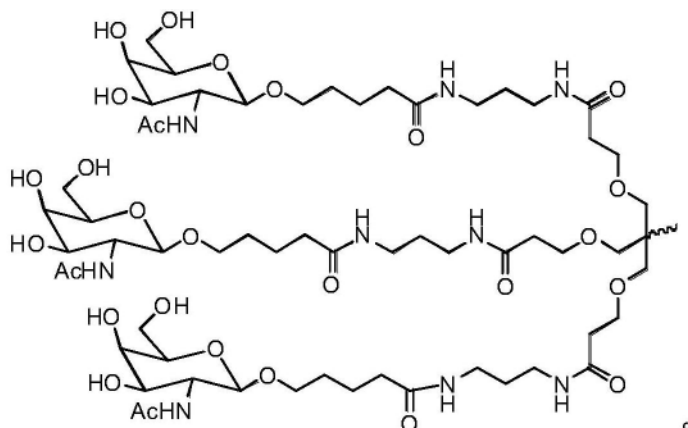
(Tgn)是胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体;以及

s是硫代磷酸酯接头。

2. 根据权利要求1所述的RNAi剂,其中该双链RNAi剂的所述有义链与至少一种配体缀合。

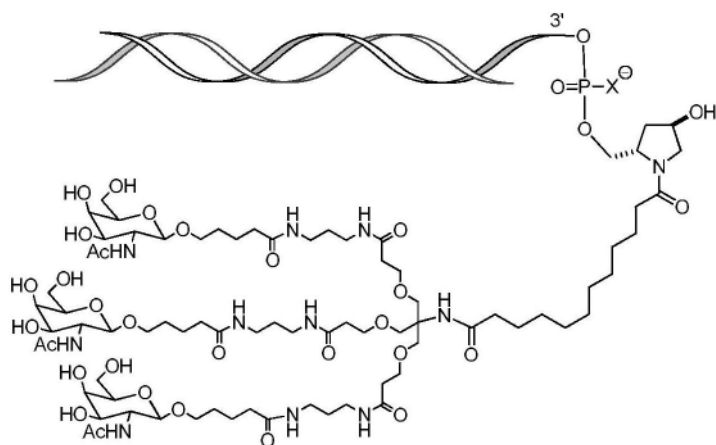
3. 根据权利要求2所述的RNAi剂,其中所述配体是通过二价或三价支链接头所附接的一个或多个GalNAc衍生物。

4. 根据权利要求3所述的RNAi剂,其中所述配体是



5. 根据权利要求2-4中任一项所述的RNAi配体,其中所述配体附接到所述有义链的3'端。

6. 根据权利要求5所述的RNAi剂,其中所述双链RNAi剂如以下示意图所示与所述配体缀合



其中X是O或S。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的RNAi剂,其中所述有义链的长度为21个核苷酸,并且所述反义链的长度为23个核苷酸。

8. RNAi剂在治疗患有TTR相关疾病的人类受试者的方法中的用途,所述方法包括向所述受试者施用25mg至1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,所述双链RNAi剂包含有义链和反义链,其中:

每条所述有义链和所述反义链的长度独立地为最多达30个核苷酸;

所述有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6); 以及

所述反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

(Tgn)是胸苷-二核苷酸(GNA)S-异构体; 以及

s是硫代磷酸酯接头。

9. RNAi剂在抑制不符合TTR相关疾病诊断标准的人类受试者中TTR的表达的方法中的用途,所述方法包括向受试者施用25mg至1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,所述双链RNAi剂包含有义链和反义链,其中:

每条所述有义链和所述反义链的长度独立地为最多达30个核苷酸;

所述有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6); 以及

所述反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

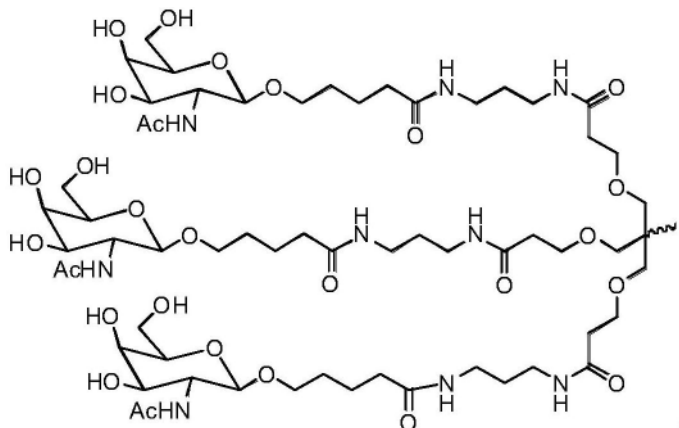
Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

(Tgn) 是胸苷-二醇核酸 (GNA) S-异构体; 以及
s 是硫代磷酸酯接头。

10. 根据权利要求8或9所述的用途, 其中所述双链RNAi剂的所述有义链与至少一种配体缀合。

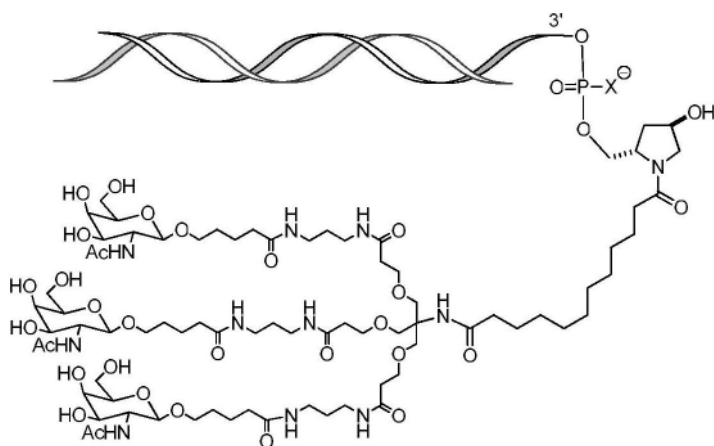
11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述配体是通过二价或三价支链接头所附接的一个或多个GalNAc衍生物。

12. 根据权利要求11所述的用途, 其中所述配体是



13. 根据权利要求9-12中任一项所述的用途, 其中所述配体附接到所述有义链的3'端。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述双链RNAi剂如以下示意图所示与所述配体缀合



其中X是O或S。

15. 根据权利要求8-14中任一项所述的用途, 其中所述有义链的长度为21个核苷酸并且所述反义链的长度为23个核苷酸。

16. 根据权利要求8-15中任一项所述的用途, 其中所述方法包括改善神经功能损伤、生活质量、持续的神经损伤或心血管损伤的至少一种指标。

17. 根据权利要求16所述的用途, 其中所述指标是神经功能损伤指标。

18. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述神经功能损伤指标是选自以下的组的指标相对于基线的变化: 神经病变损伤 (NIS) 评分、改良的NIS (mNIS+7) 评分、NIS-W评分、复合自主症状评分 (COMPASS-31)、中位体重指数 (mBMI) 评分、6分钟步行测试 (6MWT) 评分和10米步行测试评分。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述指标是生活质量指标。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述生活质量指标是选自以下的组的指标相对于基线的变化:**SF-36®**健康调查评分、Norfolk生活质量-糖尿病神经病变(Norfolk QOL-DN)评分和Rasch建立的总体残疾量表(R-ODS)评分。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中所述指标是持续的神经损伤。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述持续的神经损伤的指标是选自以下的组的一种或多种蛋白的血浆蛋白水平相对于基线的变化:神经丝轻链(NfL)、RSP03、CCDC80、EDA2R、NT-proBNP和N-CDase。

23. 根据权利要求21所述的用途,其中所述持续的神经损伤的指标是神经丝轻链(NfL)蛋白水平的血浆水平变化。

24. 根据权利要求16所述的用途,其中所述指标是心血管损伤指标。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述心血管损伤指标为心血管住院治疗、使用堪萨斯城心肌病问卷总体总结(KCCQ-OS)得出的其中评分增加表示更好的健康状况的相对于基线的变化、通过超声心动图评估平均左心室(LV)壁厚度相对于基线的变化、通过超声心动图评估整体纵向应变相对于基线的变化、以及N末端B型利钠肽原(NTproBNP)相对于基线的变化。

26. 根据权利要求8-25中任一项所述的用途,其中所述人类受试者携带与TTR相关疾病的发展有关的TTR基因突变。

27. 根据权利要求8-26中任一项所述的用途,其中所述TTR相关疾病选自由以下组成的组:老年性系统性淀粉样变性(SSA)、系统性家族性淀粉样变性、家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP)、家族性淀粉样变性心肌病(FAC)、软脑膜淀粉样变性/中枢神经系统(CNS)淀粉样变性、高甲状腺素血症和心脏淀粉样变性。

28. 根据权利要求8-25中任一项所述的用途,其中所述人类受试者患有转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性(ATTR淀粉样变性)并且所述RNAi剂方法的使用减少了所述人类受试者中的淀粉样蛋白TTR的沉积。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中ATTR是遗传性ATTR(h-ATTR)。

30. 根据权利要求28所述的用途,其中所述ATTR是非遗传性ATTR(wt ATTR)。

31. 根据权利要求8-30中任一项所述的用途,其中通过皮下施用或静脉内施用将所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者。

32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述皮下施用是自我施用。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述自我施用是通过预填充注射器或自动注射的注射器进行的。

34. 根据权利要求8-33中任一项所述的用途,所述方法还包括评估来源于所述人类受试者的样本中的TTR mRNA表达的水平或TTR蛋白表达的水平。

35. 根据权利要求8-34中任一项所述的用途,其中将所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,每三个月一次至每年一次。

36. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,约每三个月一次,每六个月一次或一年一次。

37. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂

施用于所述人类受试者,以25mg至300mg的固定剂量,每三个月一次。

38. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以25mg至200mg的固定剂量,每三个月一次。

39. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以75mg至200mg的固定剂量,每三个月一次。

40. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以25mg的固定剂量,每三个月一次。

41. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以75mg的固定剂量,每三个月一次。

42. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以100mg的固定剂量,每三个月一次。

43. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以200mg的固定剂量,每三个月一次。

44. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以300mg的固定剂量,每三个月一次。

45. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以400mg至600mg的固定剂量,每六个月一次至每12个月一次。

46. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以400mg至600mg的固定剂量,每六个月一次或每12个月一次。

47. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以400mg或600mg的固定剂量,每六个月一次或每12个月一次。

48. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以700mg至1000mg的固定剂量,每12个月一次。

49. 根据权利要求8-35中任一项所述的用途,其中将所述固定剂量的所述双链RNAi剂施用于所述人类受试者,以700mg、800mg、900mg或1000mg的固定剂量,每12个月一次。

50. 根据权利要求8-49中任一项所述的用途,所述方法还包括向所述人类受试者施用另外的治疗剂。

51. 根据权利要求50所述的用途,其中所述另外的治疗剂是TTR四聚体稳定剂或非甾体抗炎剂。

用于抑制转甲状腺素蛋白 (TTR) 的表达的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求享有于2020年3月6日提交的美国临时申请第62/985,950号的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已以ASCII格式提交了电子版的序列表,并且其全部内容通过引用并入本文。该ASCII副本创建于2021年2月26日,命名为121301_12320_SL.txt,大小为44,455字节。

背景技术

[0005] 转甲状腺素蛋白 (TTR) (也称为前白蛋白) 存在于血清和脑脊液 (CSF) 中。TTR转运视黄醇结合蛋白 (RBP) 和甲状腺素 (T4), 并通过与血液和CSF中的RBP结合而充当视黄醇 (维生素A) 的载体。转甲状腺素蛋白因其转运甲状腺素和视黄醇而得名。TTR还具有蛋白酶的作用,可以裂解包括apoA-I (主要的HDL载脂蛋白)、淀粉样蛋白 β -肽和神经肽Y的蛋白质。参见Liz,M.A.et al. (2010) IUBMB Life,62 (6):429-435。

[0006] TTR是富含 β 折叠结构的四个相同的127-氨基酸亚基 (单体) 的四聚体。每个单体都具有两个4链 β 折叠和长椭圆体的形状。反平行的 β 折叠相互作用将单体连接成二聚体。每个单体的短环形成主要的二聚体-二聚体相互作用。这两对环将二聚体相对的、凸出的 β 折叠分开以形成内部通道。

[0007] 肝脏是TTR表达的主要部位。其他重要的表达部位包括脉络丛、视网膜 (特别是视网膜色素上皮) 和胰腺。

[0008] 转甲状腺素蛋白是淀粉样蛋白原纤维 (amyloid fibril) 形成的前体蛋白的至少27种不同类型的蛋白质之一。参见Guan,J.et al. (Nov.4,2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis,Am J Physiol Heart Circ Physiol,doi:10.1152/ajpheart.00815.2011。淀粉样蛋白原纤维在器官和组织中的细胞外沉积是淀粉样变性的标志。淀粉样蛋白原纤维由错误折叠的蛋白质聚集体构成,这可能是由于前体蛋白的过量产生或特定突变造成的。TTR的淀粉样原性 (amyloidogenic) 潜力可能与其大量的 β 折叠结构有关。X射线晶体研究表明,某些淀粉样原性突变使蛋白质的四聚体结构不稳定。参见,例如Saraiva M.J.M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine,4 (12):1-11。

[0009] 淀粉样变性是一组以淀粉样蛋白沉积为特征的淀粉样蛋白疾病 (amyloid disease) 的总称。淀粉样蛋白疾病根据其前体蛋白进行分类;例如,名称以“A”开头表示淀粉样蛋白,后面是前体蛋白的缩写,例如ATTR表示淀粉原性转甲状腺素蛋白。同上。

[0010] 存在许多与TTR相关的疾病,其中大多数是淀粉样蛋白疾病。正常序列的TTR与老年人的心脏淀粉样变性有关,并被称为老年性系统性淀粉样变性 (SSA) (也被称为老年性心脏淀粉样变性 (SCA) 或心脏淀粉样变性)。

[0011] SSA通常伴有在许多其他器官中的微小沉积。TTR淀粉样变性有多种表现形式。当周围神经系统受到更显著影响时,该疾病被称为家族性淀粉样变性多发性神经病变 (FAP)。

当主要累及心脏而未累及神经系统时,这种疾病被称为家族性淀粉样变性心肌病(FAC)。TTR淀粉样变性的第三种主要类型是软脑膜淀粉样变性,也被称为软脑膜或脑膜脑血管淀粉样变性、中枢神经系统(CNS)淀粉样变性或VII型淀粉样变性。TTR突变还可能导致淀粉样变性玻璃体混浊、腕管综合征和甲状腺功能正常的高甲状腺素血症,这是一种非淀粉样变性疾病,被认为是继发于由于突变的TTR分子对甲状腺素的亲和力增加而导致的甲状腺素与TTR的结合增加。参见,例如Moses et al. (1982) J.Clin.Invest., 86, 2025-2033。

[0012] 异常的TTR等位基因可以是遗传的或通过体细胞突变获得的。Guan, J. et al. (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, Am J Physiol Heart Circ Physiol, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011。转甲状腺素蛋白相关的ATTR是遗传性系统性淀粉样变性最常见的形式。Lobato, L. (2003) J. Nephrol., 16: 438-442。TTR突变加速了TTR淀粉样蛋白的形成过程,是发生ATTR的最重要的危险因素。已知有超过85种淀粉样原性TTR变体会导致系统性家族性淀粉样变性。TTR突变通常会导致系统性淀粉样蛋白沉积,特别是累及周围神经系统,尽管一些突变与心肌病或玻璃体浑浊有关。同上。

[0013] V30M突变是最普遍的TTR突变。参见例如Lobato, L. (2003) J. Nephrol, 16: 438-442。V122I突变由3.9%的非裔美国人携带,是FAC最常见的原因。Jacobson, D. R. et al. (1997) N. Engl. J. Med. 336 (7): 466-73。据估计,超过25%的80岁以上人群患有SSA。Westermarck, P. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (7): 2843-5。

[0014] 因此,本领域需要对TTR相关疾病的有效治疗。

发明内容

[0015] 本发明提供了用于抑制TTR的表达的组合物和方法,以及使用靶向TTR基因的双链RNAi剂治疗或预防人类受试者中转甲状腺素蛋白(TTR)相关疾病的方法。

[0016] 本发明提供了包含有义链和反义链的双链RNAi剂,其中:

[0017] 每条所述有义链和所述反义链的长度独立地为最长达30个核苷酸;

[0018] 所述有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO:6);以及

[0019] 所述反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-u s C f s u u g G f (T g n) u A f c a u g A f a A f u c c c a s u s c - 3' (SEQ ID NO:7),

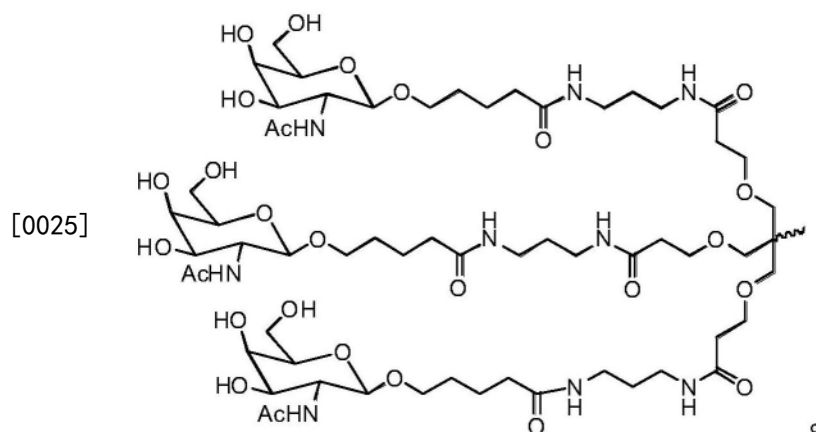
[0020] 其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

[0021] Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

[0022] (Tgn)是胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体;以及

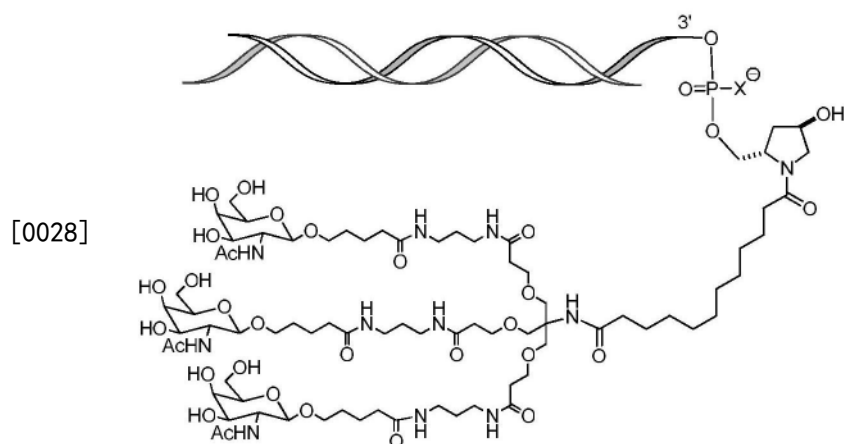
[0023] s是硫代磷酸酯接头。

[0024] 在某些实施方案中,双链RNAi剂的有义链与至少一种配体缀合。在某些实施方案中,配体是通过二价或三价支链接头所附接的一个或多个GalNAc衍生物。在某些实施方案中,配体是



[0026] 在某些实施方案中,配体附接到所述有义链的3'端。

[0027] 在某些实施方案中,双链RNAi剂如以下示意图所示与配体缀合



[0029] 其中X是O或S。

[0030] 在某些实施方案中,有义链的长度为21个核苷酸,且反义链的长度为23个核苷酸。

[0031] 本发明提供了双链RNAi剂在治疗患有TTR相关疾病的人类受试者的方法中的用途,包括施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,其中:

[0032] 每条有义链和反义链的长度独立地为最多达30个核苷酸;

[0033] 有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);以及

[0034] 反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

[0035] 其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

[0036] Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

[0037] (Tgn)是胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体;以及

[0038] s是硫代磷酸酯接头。

[0039] 本发明还提供了双链RNAi剂在抑制不符合TTR相关疾病诊断标准的人类受试者中TTR的表达的方法中的用途,包括施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,其中:

[0040] 每条所述有义链和所述反义链的长度独立地为最多达30个核苷酸;

[0041] 有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6); 以及

[0042] 反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

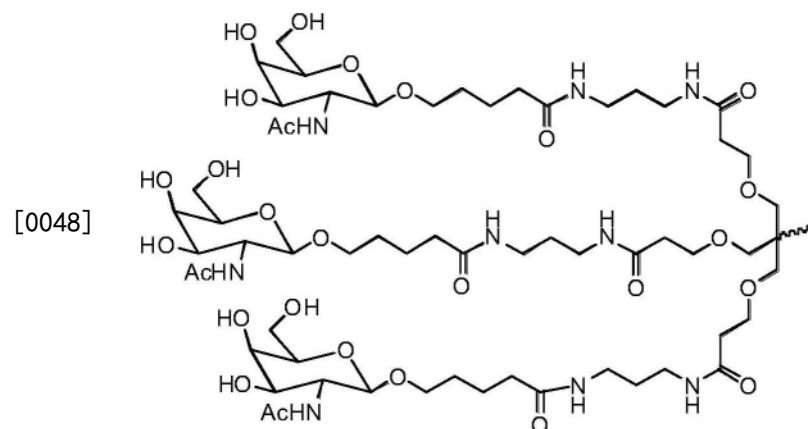
[0043] 其中a、c、g和u分别是2'-0-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-0-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-0-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-0-甲基尿苷-3'-磷酸;

[0044] Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

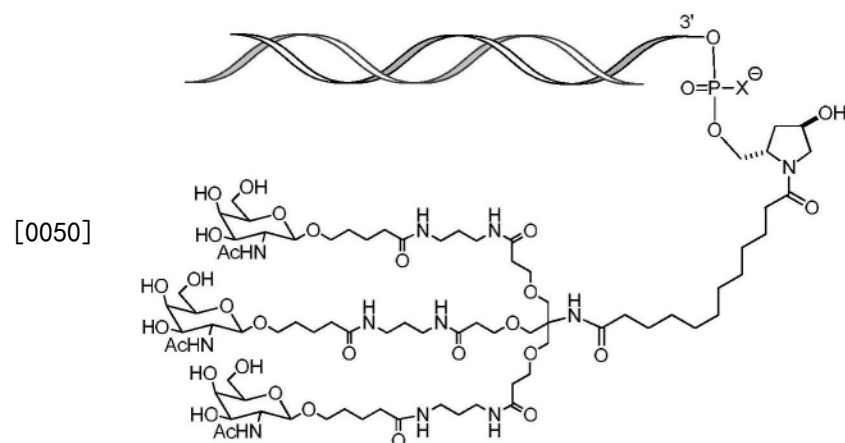
[0045] (Tgn) 是胸苷-二醇核酸 (GNA) S-异构体; 以及

[0046] s是硫代磷酸酯接头。

[0047] 在某些实施方案中, 双链RNAi剂的有义链与至少一种配体缀合。在某些实施方案中, 配体是通过二价或三价支链接头所附接的一个或多个GalNAc衍生物。在某些实施方案中, 配体是



[0049] 在某些实施方案中, 配体附接到有义链的3'端。在某些实施方案中, 双链RNAi剂如下示意图所示与配体缀合:



[0051] 其中X是O或S。

[0052] 在某些实施方案中, 有义链的长度为21个核苷酸, 且反义链的长度为23个核苷酸。

[0053] 在某些实施方案中, 本发明的用途包括改善神经功能损伤 (neurological impairment)、生活质量、神经损伤 (nerve damage)、心血管健康的至少一种指标。在某些实施方案中, 评估的指标是神经功能损伤, 例如, 使用神经病变损伤 (Neuropathy

Impairment, NIS) 评分或改良的NIS (mNIS+7) 评分。在某些实施方案中,所述指标是对生活质量指标的评估,例如使用**SF-36®**健康调查评分、Norfolk生活质量-糖尿病神经病变(Norfolk QOL-DN) 评分、NIS-W评分、Rasch建立的总体残疾量表(R-ODS) 评分、复合自主症状评分(COMPASS-31)、中位体重指数(mBMI) 评分、6分钟步行测试(6MWT) 评分和10米步行测试评分。在某些实施方案中,所述指标是对神经损伤的评估,例如,例如人类血液样本,或由其衍生的血清或血浆中的选自神经丝轻链(NfL)、RSP03、CCDC80、EDA2R、NT-proBNP和N-CDase的组中的一种或多种蛋白质水平的变化。在某些实施方案中,神经损伤的指标是神经丝轻链(NfL) 蛋白水平相对于基线水平的变化。在某些实施方案中,心血管损伤的指标是心血管相关的住院治疗、使用堪萨斯城心肌病问卷总体总结(KCCQ-OS,其中评分增加表示更好的健康状况)、通过超声心动图评估平均左心室(LV) 壁厚度相对于基线的变化、通过超声心动图评估整体纵向应变相对于基线的变化、以及N末端B型利钠肽原(NTproBNP) 相对于基线的变化。

[0054] 在某些实施方案中,所述人类受试者携带与TTR相关疾病的发展有关的TTR基因突变,例如老年性系统性淀粉样变性(SSA)、系统性家族性淀粉样变性、家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP)、家族性淀粉样变性心肌病(FAC)、软脑膜淀粉样变性/中枢神经系统(CNS) 淀粉样变性和高甲状腺素血症。

[0055] 在某些实施方案中,所述人类受试者患有转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性(ATTR淀粉样变性) 并且双链RNAi剂的使用减少了人类受试者中的淀粉样蛋白TTR的沉积。在某些实施方案中,ATTR淀粉样变性是遗传性ATTR(h-ATTR) 淀粉样变性。在某些实施方案中,ATTR淀粉样变性是非遗传性ATTR(wt ATTR) 淀粉样变性。

[0056] 在某些实施方案中,通过皮下或静脉内施用将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,皮下施用是自我施用。在某些实施方案中,自我施用是通过预填充注射器或自动注射器装置进行的。

[0057] 在某些实施方案中,所述用途还包括评估样本中的TTR mRNA表达的水平或TTR蛋白表达的水平,所述样本来源于人类受试者,例如人类血液样本,或由其衍生的血清或血浆。

[0058] 在某些实施方案中,每月一次、隔月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次或每六个月一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每三个月一次将固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每六个月一次将固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0059] 在某些实施方案中,将双链RNAi剂长期施用于人类受试者。

[0060] 在某些实施方案中,约每季度一次至约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每季度一次、约每六个月一次或约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0061] 在某些实施方案中,以约25mg至约300mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约50mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg

的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约100mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,每季度一次(即约每三个月一次)将约25mg至约300mg;约25mg至约200mg;约75mg至约200mg;约25mg;约50mg;约75mg;约100mg;约200mg;或约300mg的固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0062] 在某些实施方案中,以约400mg至约600mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每六个月一次至约每年一次将约400mg或约600mg的固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每六个月一次或约每年一次将约400mg或约600mg的固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0063] 在某些实施方案中,以约700mg至约1000mg或约700mg至约900mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每年一次将约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0064] 在某些实施方案中,所述用途还包括向人类受试者施用另外的治疗剂,例如TTR四聚体稳定剂或非甾体抗炎剂。

[0065] 本发明还提供了用于执行本发明的任何方法的试剂盒。所述试剂盒可包含双链RNAi剂;以及包含使用说明的标签。

[0066] 通过以下详细描述和附图来进一步说明本发明。

附图说明

[0067] 图1是描绘了在单次施用1mg/kg剂量的指定双链RNAi剂后的第0天的V30M转基因小鼠(每组n=3)中相对血清TTR蛋白水平的图。

[0068] 图2是描述了在单次施用1mg/kg剂量或3mg/kg剂量的指定双链RNAi剂后的第0天的食蟹猴(每组n=3)中相对血清TTR蛋白水平的图。所示的结果来自三项独立研究。

具体实施方式

[0069] 本发明提供了抑制TTR的表达的方法,包括在不符TTR相关疾病诊断标准的人类受试者中抑制TTR的表达,以及使用靶向TTR基因的双链RNAi剂治疗患有转甲状腺素蛋白(TTR)相关疾病的人类受试者的方法,其中双链RNAi剂中的有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO:6);并且反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO:7)。

[0070] 以下的详细描述公开了如何制备和使用含有iRNA剂的组合物以选择性地抑制TTR基因的表达,以及用于治疗患有将受益于TTR基因表达的抑制或降低的疾病和病症的受试者的组合物、用途和方法。

[0071] I. 定义

[0072] 为了更容易地理解本发明,首先定义某些术语。此外,应当注意,每当列举参数的值或值的范围时,其意图是介于所列举值的中间的值和范围也旨在成为本发明的一部分。

[0073] 冠词“a”和“an”在本文中用于指代冠词的语法对象中的一个或多于一个(即,至少一个)。举例来说,“一个要素”是指一个要素或多于一个要素,例如,多个要素。

[0074] 术语“包括”在本文中用于表示短语“包括但不限于”,并且可与短语“包括但不限

于”互换使用。

[0075] 除非上下文另有明确说明,术语“或”在本文中用于表示术语“和/或”并且可与术语“和/或”互换使用。

[0076] 术语“约”在本文中用于表示在本领域的典型公差范围内的,例如剂量之间可接受的的倍数变化、剂量单位量的可接受的变化。例如,“约”可以理解为与平均值的相差是在约2个标准差内。在某些实施方案中,约是指+10%。在某些实施方案中,约是指+5%。当约出现在一系列数字或范围之前时,应当理解,“约”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0077] 在数字或一系列数字之前的术语“至少”、“不少于”或“或多于”应理解为包括与术语“至少”相邻的数字,以及在逻辑上可包括在内的所有后续的数字或整数,如从上下文中可以清楚看出的。例如,核酸分子中的核苷酸的数目必须是整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子中的至少18个核苷酸”是指18、19、20或21个核苷酸具有指定的性质。当至少出现在一系列数字或范围之前时,应当理解,“至少”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0078] 如本文所用,“不超过”或“小于”应理解为从上下文看符合逻辑的与短语相邻的值和逻辑上更小的值或整数至零。例如,具有“不超过2个核苷酸”的突出的双链体具有2、1或0个核苷酸突出。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,应当理解,“不超过”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0079] 如本文所用,检测方法可以包括确定存在的分析物的量低于该方法的检测水平。

[0080] 如本文所用,“转甲状腺素蛋白”(“TTR”)是指众所周知的基因和蛋白质。TTR也被称为前白蛋白、HsT2651、PALB和TBPA。TTR通过作为视黄醇结合蛋白(RBP)、甲状腺素(T4)和视黄醇的转运蛋白发挥作用,它也充当一种蛋白酶。肝脏将TTR分泌到血液中,脉络丛将TTR分泌到脑脊液中。TTR也在胰腺和视网膜色素上皮中表达。TTR最大的临床相关性是正常(野生型)和突变型TTR蛋白均可形成淀粉样蛋白原纤维,聚集成细胞外沉积,导致淀粉样变性。参见,例如Saraiva M.J.M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4(12):1-11进行的综述。Dickson, P.W. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(13) 8214-8219描述了大鼠转甲状腺素蛋白的分子克隆和核苷酸序列,以及mRNA表达的分布。Blake, C.C. et al. (1974) J Mol Biol 88, 1-12描述了人TTR的X射线晶体结构。人TTR mRNA转录本的序列可以在国家生物技术信息中心(NCBI) RefSeq登录号NM_000371(例如,SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5)中找到。小鼠TTR mRNA的序列可以在RefSeq登录号NM_013697.2中找到,大鼠TTR mRNA的序列可以在RefSeq登录号NM_012681.1中找到。可以使用公开可用的数据库例如GenBank、UniProt和OMIM轻松获得TTR mRNA序列的其他实例。

[0081] 如本文所用,“TTR相关疾病”旨在包括与TTR基因或蛋白质相关的任何疾病。此类疾病可以由例如TTR蛋白的过量产生、TTR基因突变、TTR蛋白的异常裂解、TTR四聚体的不稳定、TTR与其他蛋白或其他内源性或外源性物质之间的异常相互作用引起的。“TTR相关疾病”包括任何类型的转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性(ATTR淀粉样变性),其中TTR在异常细胞外聚集物或淀粉样沉积的形成中起作用,例如遗传性ATTR(h-ATTR)淀粉样变性或非遗传性淀粉样变性ATTR(ATTR)淀粉样变性。TTR相关疾病包括老年性系统性淀粉样变性(SSA)、系统性家族性淀粉样变性、家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP)、家族性淀粉样变性心肌病(FAC)、软脑膜/中枢神经系统(CNS)淀粉样变性、淀粉样变性玻璃体混浊、腕管综合征和高甲状腺素血症。TTR淀粉样变性的症状包括感觉神经病变(例如,感觉异常、远端

肢体感觉迟钝)、自主神经病变(例如,胃肠功能障碍,例如胃溃疡或直立性低血压)、运动神经病变、癫痫、痴呆、脊髓病、多发性神经病变、腕管综合征、自主神经功能不全(autonomic insufficiency)、心肌病、玻璃体混浊、肾功能不全、肾病、mBMI(改进的体重指数)大幅降低、颅神经功能障碍和角膜格状营养不良。

[0082] 如本文所用,术语“包含序列的链”是指包含核苷酸链的寡核苷酸,所述核苷酸通过参照使用标准核苷酸命名法的序列进行描述。

[0083] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”、“RNA干扰剂”是指包含如本文所定义的术语的RNA的剂,并且其通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)途径介导了RNA转录本的靶向裂解。iRNA通过被称为RNA干扰(RNAi)的过程引导mRNA的序列特异性降解。iRNA调节,例如,抑制细胞中TTR基因的表达,所述细胞是例如受试者例如哺乳动物受试者中的细胞。

[0084] 如本文所用,用于本发明的组合物、用途和方法中的“iRNA”是双链RNA并且在本文中是指“双链RNAi剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指具有双链体结构的核糖核酸分子的复合体,该双链体结构包含两条反向平行且基本上互补的核酸链,被称为具有相对于靶RNA(即TTR基因)具有“有义”和“反义”方向。双链RNAi剂通过在本文中被称作RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制而触发靶RNA例如mRNA的降解。

[0085] 如本文所用,术语“经修饰的核苷酸”是指独立地具有经修饰的糖部分、经修饰的核苷酸间键合或经修饰的核碱基的核苷酸。因此,术语经修饰的核苷酸包括了对核苷间键合、糖部分或核碱基的例如官能基或原子的取代、添加或删除。适用于本发明的剂的修饰包括本文公开的或本领域已知的所有类型的修饰。就本说明书和权利要求而言,用于siRNA类型分子中的任何此类修饰都包括在“RNAi剂”中。

[0086] 双链体区域可以是允许所期望的靶RNA通过RISC途径特异性降解的任何长度,并且可以为约21至36个碱基对的长度范围,例如约21至30个碱基对的长度,例如约21至30、21至29、21至28、21至27、21至26、21至25、21至24、21至23或21至22个碱基对的长度。在一个实施方案中,本发明的RNAi剂是dsRNA试剂,其中的每条链包含21至23个核苷酸,其与TTR mRNA序列相互作用以指导靶mRNA的裂解。不希望受理论所束缚,引入细胞中的长双链RNA通过被称为Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15: 485)。Dicer是一种核糖核酸酶III样酶,其将dsRNA加工成19至23个碱基对的短干扰RNA,该短干扰RNA具有特征性的二碱基3'突出(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。随后,将siRNA插入RNA诱导沉默复合物(RISC)中,在其中一种或多种解旋酶解开siRNA双链体,使得互补的反义链能够引导靶向识别(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。在与适当的靶标mRNA结合后,RISC内的一种或多种核酸内切酶裂解靶标以诱导沉默(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。在一个实施方案中,本发明的RNAi剂是24至30个核苷酸的dsRNA,其与TTR mRNA序列相互作用以指导靶RNA的裂解。

[0087] 如本文所用,术语“核苷酸突出”是指从iRNA例如dsRNA的双链体结构中突出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA的一条链的3'端延伸超出另一条链的5'端时,或反之亦然,则存在核苷酸突出。dsRNA可包含至少一个核苷酸的突出;或者该突出可包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多个核苷酸。核苷酸突出可包含核苷酸/核苷类似物或由核苷酸/核苷类似物组成,其中该核苷酸/核苷类似物

包括脱氧核苷酸/核苷。突出可位于有义链、反义链或其任意组合上。此外,突出的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'端、3'端或两端。在dsRNA的一个实施方案中,至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出。在另一实施方案中,至少一条链包含至少2个核苷酸的3'突出,例如2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸的3'突出。在其他实施方案中,RNAi剂的至少一条链包含至少1个核苷酸的5'突出。在某些实施方案中,至少一条链包含至少2个核苷酸的5'突出,例如2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸的5'突出。在其他实施方案中,RNAi剂的一条链的3'端和5'端都包含至少1个核苷酸的突出。

[0088] 在一个实施方案中,dsRNA的反义链具有在3'端或5'端的1至9个核苷酸的突出,例如0至3、1至3、2至4、2至5、4至9、5至9个核苷酸的突出,例如1、2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸的突出。在一个实施方案中,dsRNA的有义链具有在3'端或5'端的1至9个核苷酸的突出,例如1、2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸的突出。在另一个实施方案中,突出中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸替代。

[0089] “钝”或“钝端”是指在双链RNAi剂的末端没有未配对的核苷酸,即,没有核苷酸突出。“钝端”RNAi剂是在其整个长度上为双链的dsRNA,即,在该分子的任一端都没有核苷酸突出。本发明的RNAi剂包括在一端具有核苷酸突出(即,具有一个突出和一个钝端的剂)或在两端都具有核苷酸突出的RNAi剂。

[0090] 术语“反义链”或“引导链”是指iRNA(例如dsRNA)的链,其包括与靶序列例如TTR mRNA基本上互补的区域。如本文所用,术语“互补性区域”是指反义链上与本文定义的序列例如靶序列(例如TTR核苷酸序列)基本上互补的区域。在互补性区域与靶序列不完全互补的情况下,错配可以存在于分子的内部区域或末端区域。通常,最耐受的错配存在于末端区域中,例如在iRNA的5'末端或3'末端的5、4、3、2或1个核苷酸内。在一个实施方案中,本发明的双链RNAi剂包括在反义链中的核苷酸错配。在另一实施方案中,本发明的双链RNAi剂包括在有义链中的核苷酸错配。在一个实施方案中,核苷酸错配位于例如自iRNA的3'末端起的5、4、3、2或1个核苷酸内。在另一实施方案中,核苷酸错配位于例如iRNA的3'末端核苷酸中。

[0091] 如本文所用,术语“有义链”或“随从链”是指包含与本文所定义的反义链区域基本上互补的区域的iRNA的链。

[0092] 如本文所用,术语“裂解区域”是指紧邻裂解位点的区域。裂解位点是靶标裂解发生处的位点。在一些实施方案中,裂解区域包含在裂解位点的任一端且紧邻该裂解位点的三个碱基。在一些实施方案中,裂解区域包含在裂解位点的任一端且紧邻该裂解位点的两个碱基。在一些实施方案中,裂解位点特异性地出现在反义链的核苷酸10和11所结合的位点处,并且该裂解区域包含核苷酸11、12和13。

[0093] 如本文所用,除非另有说明,当术语“互补”被用来描述第一核苷酸序列和第二核苷酸序列的关系时,是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在特定条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构的能力,正如本领域技术人员所理解的那样。此类条件可以是例如“严格条件”,其中严格条件可以包括:400mM NaCl, 40mM PIPES pH 6.4, 1mM EDTA, 50°C或70°C,持续12至16小时,然后进行洗涤(参见,例如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。也可以施加其他条件,例如可以在生物体内遇到的生理相关

条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用来确定最适用于两个序列的互补性测试的条件设置。

[0094] iRNA内的互补序列,例如如本文所述的dsRNA内的互补序列,其包括包括第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长碱基配对。在本文中,此类序列可被称为彼此是“完全互补的”。然而,在本文中,如果第一序列相对于第二序列被称为是“基本互补的”,则这两个序列可以是完全互补的,或在杂交形成多达30个碱基对的双链体时,它们可形成一个或多个但通常不超过5、4、3或2个错配的碱基对,同时保留在最适于其最终应用的条件下(例如通过RISC途径的基因表达的抑制)杂交的能力。然而,如果两个寡核苷酸被设计为在杂交时形成一个或多个单链突出,则就确定互补性而言,此类突出不应被视为错配。例如,包含一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA,其中较长的寡核苷酸包含一个与较短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列,出于本文所述目的,其仍可被称为是“完全互补的”。

[0095] 如本文所用,“互补”序列还可以包括非Watson-Crick碱基对或由非天然核苷酸及经修饰的核苷酸形成的碱基对,或完全由非Watson-Crick碱基对或由非天然核苷酸及经修饰的核苷酸形成的碱基对形成,只要满足上述关于它们的杂交能力的要求。此类非Watson-Crick碱基对包括但不限于G:U摇摆(Wobble)碱基配对或Hoogsteen碱基配对。

[0096] 本文中的术语“互补的”、“完全互补的”和“基本上互补的”可用于描述dsRNA的有义链和反义链之间或两个寡核苷酸或多核苷酸之间的碱基匹配,例如iRNA剂的反义链和靶序列之间的碱基匹配,如可从其使用的上下文中将理解的。

[0097] 如本文所用,与信使RNA(mRNA)“的至少一部分是基本上互补”的多核苷酸是指与感兴趣的mRNA(例如,编码TTR基因的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果该序列与编码TTR基因的mRNA的非间断部分是基本上互补的,则该多核苷酸与TTR mRNA的至少一部分是互补的。

[0098] 因此,在一些实施方案中,本文所公开的反义多核苷酸与靶TTR序列是完全互补的。在其他实施方案中,本文所公开的反义多核苷酸与SEQ ID NO:8(5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3')是完全互补的。在一个实施方案中,反义多核苷酸序列是5'-UCUUGGUUACAUGAAUCCCAUC-3'(SEQ ID NO:9),其中反义链位置7的U可以是T。

[0099] 如本文所用,“参考水平”被理解为与从分析中获得的水平(例如,生物标志物水平,例如,蛋白质生物标志物水平)进行比较的预定水平。在某些实施方案中,参考水平可以是针对健康群体确定的对照水平,所述健康群体为例如未患有与生物标志物水平改变相关的疾病或病症并且不具有与生物标志物水平变化相关的疾病或病症的易感性(例如遗传易感性)的群体。在某些实施方案中,该群体应符合某些标准,例如年龄、性别。在某些实施方案中,生物标志物的参考水平是来自同一受试者在早前时间(例如,在出现症状性疾病之前或治疗开始之前)的水平。通常,按临床相关的间隔从受试者中获得样本,例如,在时间上充分分开的间隔,以便可以观察到生物标志物的变化,例如,至少三个月的间隔、至少六个月的间隔,或至少九个月的间隔。当随时间推移从受试者中获得两个以上的样本时,应当理解,任何先前的样本都可以作为参考水平。

[0100] 如本文所用,“与参考水平相比的变化”等被理解为生物标志物水平的在统计学或

临床上的显著变化,例如,与参考水平相比,蛋白质生物标志物水平的变化大于分析方法的典型标准偏差。此外,该变化应具有临床相关性。可以将与参考水平相比的变化确定为百分比变化。例如,如果生物标志物X的参考水平为100pg/ml,而受试者体内的生物标志物X水平为150pg/ml,则该水平增加了50%,计算公式为 $((150\text{pg/ml}-100\text{pg/ml})/100\text{pg/ml}) \times 100\% = 50\%$ 。如果受试者体内的生物标志物X水平为300pg/ml,则该水平增加了300%。如果受试者体内的生物标志物X水平为50pg/ml,则该水平降低了50%。在某些实施方案中,与参考水平相比,变化为增加了至少50%。在某些实施方案中,与参考水平相比,变化为增加了至少100%、至少200%或至少300%。在某些实施方案中,与参考样本相比,变化为减少了至少25%。在某些实施方案中,与参考样本相比,变化为减少了至少50%。

[0101] 如本文所用,“来自受试者的生物样本”或“来自受试者的样本”包括从受试者分离的一种或多种液体、细胞或组织。生物液体的实例包括血液、血清、浆膜液、血浆、脑脊液、眼液、淋巴液、尿液、唾液等。组织样本可以包括来自组织、器官或局部区域的样本。例如,样本可以来自具体器官、器官的部分或这些器官内的液体或细胞。在某些实施方案中,样本可以是肝脏组织或来源于肝脏。在一些实施方案中,“来自受试者的生物样本”可以指来自受试者的血液或衍生自血液的血清或血浆。在一些实施方案中,液体基本上不含细胞,例如不含细胞。

[0102] 如本文所用,“临床相关差异”被理解为至少比评估的典型观察者间差异更大的差异,其中所述观察者可以是经过培训的医疗保健专业人员、护理人员或患者,在大约相同的时间(例如一周内,如连续几天内)对同一个体进行相同的评估。可以理解,当由不同的观察者在短时间内进行观察时,某些患者观察结果是主观的,并且应该几乎相同,例如体重、心率。其他定性测量,例如mNIS+7的某些方面(例如,对触摸-压力的反应、振动、关节位置和运动)和Norfolk生活质量(例如,疼痛水平、手足发热或发冷、站立时的稳定性)可能每天都发生较大的变化,并且并且观察者之间可能变化更大。因此,使用综合评分汇总观察结果,在没有临床相关变化迹象的情况下,预期观察者之间可能存在较大的差异。生物标志物水平的分析具有已知的样本内和样本间的变化水平。确定临床相关差异是在本领域技术人员的能力范围内的,例如,在治疗患有TTR相关疾病的患者方面经验丰富的医疗保健专业人员、临床实验室专业人员。

[0103] 如本文所用,“长期施用”被理解为期限不定的施用,例如,在受试者的余生中,直到进行肝移植。

[0104] 如本文所用,“稳定TTR的治疗剂”或“稳定TTR四聚体的治疗剂”是减少或防止TTR四聚体的亚基解离成例如单体的剂。在一些实施方案中,所述剂减少TTR淀粉样蛋白斑的形成,例如,通过降低形成TTR淀粉样蛋白斑的TTR单体或TTR单体的蛋白水解片段的水平。此类剂包括但不限于tafamidis、diflunisal和AG10。

[0105] 如本文所用,术语“施用治疗剂”被理解为向受试者提供治疗剂。在实施方案中,以适当的剂量并通过例如治疗剂的标签所规定的施用途提供治疗剂。

[0106] II. 治疗TTR相关疾病的方法

[0107] 本发明提供了双链RNAi剂及其在人类受试者中治疗TTR相关疾病的方法中的用途,所述TTR相关疾病是例如转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性(ATTR淀粉样变性),例如遗传性ATTR(h-ATTR)淀粉样变性或非遗传性ATTR(wt ATTR)淀粉样变性;或所述双链RNAi剂

在抑制还不符合TTR相关疾病诊断标准但有发展为TTR相关疾病风险的受试者中TTR表达的方法中的用途,所述受试者为例如具有与TTR淀粉样变性相关的TTR突变的受试者、具有一些TTR淀粉样变性指标但还不符合TTR淀粉样变性诊断标准的受试者、具有与TTR淀粉样变性相关的生物标志物水平改变的受试者。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的RNAi剂。

[0108] 在一方面,本发明提供了治疗患有TTR相关疾病或有发展为TTR相关疾病风险的人类受试者的方法。所述方法包括向人类受试者施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂

[0109] 其中有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);并且反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7),

[0110] 其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸、2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸、2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸和2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸;

[0111] Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟腺苷-3'-磷酸、2'-氟胞苷-3'-磷酸、2'-氟鸟苷-3'-磷酸和2'-氟尿苷-3'-磷酸;

[0112] (Tgn)是胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体;以及

[0113] s是硫代磷酸酯接头。

[0114] 在另一方面,本发明提供了改善患有TTR相关疾病或有发展为TTR相关疾病风险的人类受试者的神经功能损伤或生活质量的至少一个指标的方法。所述方法包括向人类受试者施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,其中有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);并且反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7)。

[0115] 在另一方面,本发明提供了在患有TTR相关疾病或有发展为TTR相关疾病风险的人类受试者中降低、减缓或阻止神经病变损伤评分(NIS)或改良的NIS(mNIS+7)的方法。所述方法包括向人类受试者施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,其中有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);并且反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7)。

[0116] 在另一方面,本发明提供了在患有TTR相关疾病或有发展为TTR相关疾病风险的人类受试者中增加6分钟步行测试(6MWT)的方法。所述方法包括向人类受试者施用约25mg至约1000mg的固定剂量的双链RNAi剂,其中有义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:6);并且反义链包含经修饰的核苷酸序列5'-usCfsuugGf (Tgn) uAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7)。

[0117] 在某些实施方案中,约每季度一次至约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每季度一次、约每六个月一次或约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0118] 在某些实施方案中,以约25mg至约300mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方

案中,以约50mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约100mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,每季度一次,即,约每三个月一次,将双链RNAi剂以约25mg至约300mg;约25mg至约200mg;约50mg至约300mg;约25mg;约50mg;约100mg;约200mg;或约300mg的固定剂量施用于人类受试者。

[0119] 在某些实施方案中,以约400mg至约600mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约400mg或约600mg的固定剂量,以约每六个月一次至约每年一次的频率,将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约400mg或约600mg的固定剂量,以约每六个月一次或约每年一次的频率,将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0120] 在某些实施方案中,以约700mg至约1000mg或约700mg至约900mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每年一次将双链RNAi剂以约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的固定剂量施用于人类受试者。

[0121] 在一个实施方案中,所述受试者是因将受益于TTR基因表达降低的疾病、障碍或病症而进行治疗或评估的人类;处于将受益于TTR基因表达降低的疾病、障碍或病症的风险中的人类,例如,不符合TTR相关疾病的诊断标准但表现出TTR相关疾病的至少一种体征或症状的人类或具有至少一个发展为TTR相关疾病的风险因素的人类;患有将受益于TTR基因表达减少的疾病、障碍或病症的人类;因将受益于TTR基因表达降低的疾病、障碍或病症而进行治疗的人类,如本文所述。

[0122] 在一些实施方案中,所述人类受试者患有TTR相关疾病。在其他实施方案中,所述受试者是处于发展为TTR相关疾病风险中的受试者,例如,具有与TTR相关疾病发生相关的TTR基因突变的受试者、具有TTR相关疾病家族史的受试者、或具有提示会发展为TTR相关疾病的体征或症状但不符合TTR相关疾病诊断标准的受试者。

[0123] 如本文所用,“TTR相关疾病”包括由淀粉样蛋白沉积的形成所引起的或与之相关的任何疾病,其中淀粉样蛋白的纤维前体由变体或野生型TTR蛋白组成。突变型TTR和野生型TTR会导致各种形式的淀粉样蛋白沉积(淀粉样变性)。淀粉样变性涉及错误折叠蛋白质的形成和聚集,导致损害器官功能的细胞外沉积。与TTR聚集相关的临床综合征包括,例如老年性系统性淀粉样变性(SSA);系统性家族性淀粉样变性;家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP);家族性淀粉样变性心肌病(FAC);以及软脑膜淀粉样变性,也被称为软脑膜或脑膜脑血管淀粉样变性、中枢神经系统(CNS)淀粉样变性或VII型淀粉样变性。

[0124] 在一个实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有家族性淀粉样变性心肌病(FAC)的受试者。在另一实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有混合表型的FAC的受试者,即具有心脏损伤和神经损伤的受试者。在又一个实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有混合表型的FAP的受试者,即具有神经和心脏损伤的受试者。在一个实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有FAP的受试者,所述受试者已接受原位肝移植(OLT)治疗。

[0125] 在另一实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有老年性系统性淀粉样变性(SSA)的受试者。在本发明的方法的其他实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有家族性淀粉样变性心肌病(FAC)和老年性系统性淀粉样变性(SSA)的受试者。正常序列的TTR会在老年人中引起心脏淀粉样变性,被称为老年性系统性淀粉样变性(SSA)(也被称为老年性心

脏淀粉样变性 (SCA) 或心脏淀粉样变性)。SSA通常伴有许多其他器官中的微小沉积。TTR突变加速了TTR淀粉样蛋白的形成过程,是临床上显著的TTR淀粉样变性(也被称为ATTR(淀粉样变性-转甲状腺素蛋白型))发展的最重要的危险因素。已知有超过85种淀粉样原性TTR变体会导致系统性家族性淀粉样变性。

[0126] 在本发明的方法的一些实施方案中,将本发明的RNAi剂施用于患有转甲状腺素蛋白(TTR)相关的家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP)的受试者。此类受试者可能出现眼部临床表现,例如玻璃体混浊和青光眼。本领域技术人员已知由视网膜色素上皮(RPE)合成的淀粉样原性转甲状腺素蛋白(ATTR)在眼部淀粉样变性的进展中起重要作用。先前的研究表明,减少RPE细胞的全视网膜激光光凝可阻止玻璃体中淀粉样蛋白沉积的进展,这表明有效抑制RPE中ATTR表达可以成为治疗眼部淀粉样变性的新疗法(参见,例如Kawaji, T., et al., *Ophthalmology*. (2010) 117:552-555)。另一种与TTR相关的疾病是高甲状腺素血症,也被称为“转甲状腺素蛋白异常高甲状腺素血症”或“前白蛋白异常高甲状腺素血症”。这种类型的高甲状腺素血症可能继发于由于突变的TTR分子对甲状腺素的亲和力增加而导致的甲状腺素与TTR的结合增加。参见,例如Moses et al. (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033。

[0127] 可以使用本领域已知的任何施用方式,将本发明的RNAi剂施用于受试者,包括但不限于皮下、静脉内和肌内注射,以及它们的任何组合。

[0128] 在一些实施方案中,将所述剂皮下施用于受试者。

[0129] 在一些实施方案中,通过皮下注射例如腹部、大腿或上臂注射向受试者施用单剂量的RNAi剂。在其他实施方案中,通过皮下注射向受试者施用分剂量的RNAi剂。在一个实施方案中,在受试者的两个不同的解剖学位置,通过皮下注射向受试者施用分剂量的RNAi剂。例如,受试者可以以25mg至1000mg的剂量进行皮下注射。在本发明的一些实施方案中,皮下施用是通过例如预填充注射器或自动注射器的自我施用。在一些实施方案中,用于皮下施用的RNAi剂的剂量包含在体积小于或等于1ml的例如药学上可接受的载体中。在一些实施方案中,RNAi剂是在无热原制剂中。

[0130] 在一些实施方案中,以有效抑制受试者体内细胞中的TTR表达的量向受试者施用RNAi剂。抑制受试者细胞中TTR表达的有效量可使用下文讨论的方法来评估,包括涉及评估对TTR mRNA、TTR蛋白或相关变量(例如淀粉样蛋白沉积物)的抑制的方法。

[0131] 在一些实施方案中,将RNAi剂以治疗有效量施用于受试者。

[0132] 如本文所用,“治疗有效量”旨在包括当施用于患者以治疗TTR相关疾病时足以影响疾病治疗(例如通过,与合适的对照相比,减少、维持、或减缓了现有疾病的进展;或与合适的对照相比,减少、维持或减缓了疾病的一种或多种症状)的RNAi剂的量。“治疗有效量”可以根据以下各项进行变化:RNAi剂、剂的施用方式、疾病及其严重程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、由TTR表达介导的病理过程的阶段、在先治疗或伴随治疗的类型(如果有的话)、以及待治疗患者的其他个体特征。TTR淀粉样变性、多发性神经病变和心肌病的诊断标准将在下文中进一步讨论。

[0133] 如本文所用,“治疗有效量”旨在包括当施用于受试者时,足以预防或改善疾病或疾病的一种或多种症状的RNAi剂的量,所述受试者是还不符合TTR相关疾病诊断标准的受试者,例如尚未被诊断为患有hTTR淀粉样变性多发性神经病变的受试者;不符合1期FAP诊断标准但可能易患上该疾病的受试者,例如具有与TTR淀粉样变性相关的TTR突变的受试

者、患有以下一种或多种病症的受试者：直立性低血压、心力衰竭、心律失常、左心室壁厚、室间隔壁厚、心脏后壁厚、腹泻、便秘、勃起功能障碍、青光眼、玻璃体内沉积、扇形瞳孔；腕管综合征、腰椎管狭窄症和二头肌腱断裂；与参考样本相比，神经丝轻链 (NfL) 水平升高的受试者，例如至少37pg/ml的血清NfL水平。可以改善的症状包括感觉神经病变（例如，感觉异常、远端肢体感觉迟钝）、自主神经病变（例如，胃肠功能障碍，例如胃溃疡或直立性低血压）、运动神经病变、癫痫、痴呆、脊髓病、多发性神经病、腕管综合征、自主神经功能不全、心肌病、玻璃体混浊、肾功能不全、肾病、mBMI (改进的体重指数) 大幅降低、颅神经功能障碍、角膜格状营养不良、超声心动图评估的左心室 (LV) 壁增厚、超声心动图评估的整体纵向应变增加、N末端B型利钠肽原 (NTproBNP) 增加和由心脏事件导致的住院治疗。疾病的减轻包括减缓疾病的进程或降低后期发展的疾病的严重程度。剂量可以根据RNAi剂、剂的施用方式、疾病风险程度、病史、年龄、体重、家族史、基因组成、在先治疗或伴随治疗的类型（如果有的话）和待治疗患者的其他个体特征而变化。

[0134] “治疗有效量”还包括以适用于任何治疗的合理的收益/风险比产生一些期望的局部或全身效应的RNAi剂的量。本发明的方法中使用的RNAi剂可以以足够的量施用以产生适用于这种治疗的合理的收益/风险比。

[0135] 如本文所用，短语“治疗有效量”还包括在由TTR表达介导的病理过程或病理过程的症状的治疗、预防或管理中提供益处的量。TTR淀粉样变性的症状包括感觉神经病变（例如感觉异常、远端肢体感觉迟钝）、自主神经病变（例如胃肠功能障碍，例如胃溃疡或直立性低血压）、运动神经病变、癫痫、痴呆、脊髓病、多发性神经病、腕管综合征、自主神经功能不全、心肌病、玻璃体混浊、肾功能不全、肾病，mBMI (改进的体重指数) 大幅降低、颅神经功能障碍、角膜格状营养不良、超声心动图评估的左心室 (LV) 壁增厚、超声心动图评估的整体纵向应变增加、N末端B型利钠肽原 (NTproBNP) 增加，以及由心脏事件导致的住院治疗。

[0136] 在一个实施方案中，例如，当受试者患有FAP、混合表型的FAP、混合表型的FAC、或FAP并且已经经历了OLT时，使用本发明的dsRNA剂治疗受试者能减缓神经病变的进展。在另一实施方案中，例如，当受试者患有FAP、混合表型的FAP、混合表型的FAC、SSA、或FAP并且已经经历了OLT时，使用本发明的dsRNA剂治疗受试者能减缓神经病变和心肌病的进展。在另一实施方案中，例如，当受试者的心脏受累时，本发明的方法能改善心脏结构和心脏功能，包括，例如所述方法能降低左心室壁的平均厚度和纵向应变，并降低心脏应激生物标志物 (N末端B型利钠肽原 (NT-proBNP)) 的表达水平。

[0137] 施用治疗有效量或预防有效量的本发明的RNAi剂也可用于改善患有TTR相关疾病或有发展为TTR相关疾病风险的受试者的神经功能损伤或生活质量的至少一个指标的方法中。

[0138] 例如，在一个实施方案中，本发明的方法至少改善了受试者的神经功能损伤的指标。在受试者中的“改善神经功能损伤的至少一个指标”是指本发明的方法减缓、减轻或阻止神经功能损伤的能力，或改善与神经功能损伤相关的任何症状的能力。任何合适的神经功能损伤的测量均可用于确定受试者中的神经功能损伤是否已经被减轻、减缓或阻止，或与神经功能损伤相关的症状是否已经得到改善。

[0139] 一种合适的测量是神经病变损伤评分 (NIS)。NIS是指一种评分系统，其能测量无力、感觉和反射，尤其是在周围神经病变方面。NIS评分评估了肌肉无力的标准组 (1是25%

无力,2是50%无力,3是75%无力,3.25是抵抗重力的运动,3.5是消除重力的运动,3.75是无运动的肌肉颤动,4是瘫痪),肌牵张反射的标准组(0是正常,1是减少,2是不存在),以及触摸压力、振动、关节位置和运动以及针刺的标准组(均在食指和大脚趾上进行分级:0是正常,1是减少,2是不存在)。根据年龄、性别和身体健康对评估进行校正。

[0140] 在一个实施方案中,在自给药开始18个月后,本发明的方法将NIS降低了至少5分。在其他实施方案中,自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,本发明的方法导致了NIS的稳定。在其他实施方案中,与显示了疾病自然史的适当对照组(例如,如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)相比,所述方法减缓了NIS评分的增加。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于受试者在治疗开始时的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0141] 用于确定人类受试者的NIS的方法是本领域技术人员周知的并且可以在例如 Dyck, PJ et al., (1997) Neurology 1997.49 (1) :pgs.229-239 ;Dyck PJ. (1988) Muscle Nerve. Jan;1 1 (1) :21-32中找到。

[0142] 其他合适的神经性损伤的测量是改良的神经病变损伤评分(mNIS+7)。如本领域普通技术人员已知的,mNIS+7是指基于临床检查的神经病变损伤(NIS)评估与大小神经纤维功能(NCS和QST)的电生理测量以及自主神经功能测量(体位血压)的结合。mNIS+7评分是对NIS+7评分(代表NIS+7测试)的改良。NIS+7分析了无力和肌牵张反射。七项测试中有五项包括神经传导的属性。这些属性是腓神经复合肌肉动作电位振幅、运动神经传导速度和运动神经远端潜伏期(MNDL)、胫骨MNDL和腓肠感觉神经动作电位振幅。这些值已根据年龄、性别、身高和体重等变量进行了校正。七项测试中的其余两项包括振动检测阈值和深呼吸时心率降低。

[0143] mNIS+7评分对NIS+7进行了改良,以考虑使用智能躯体特定区定量感觉测试(Smart Somatotopic Quantitative Sensation Testing)、新的自主神经评估,以及使用尺神经、腓神经和胫神经振幅的复合肌肉动作电位,以及尺神经和腓肠神经的感觉神经动作电位(Suanprasert, N. et al., (2014) J. Neurol. Sci., 344 (1-2) :pgs.121-128)。

[0144] 在一个实施方案中,本发明的方法在给药开始后18个月时将mNIS+7降低了至少5分。在其他实施方案中,本发明的方法从开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后导致了mNIS+7的稳定。在其他实施方案中,与显示了疾病自然史的适当对照组(例如,如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)相比,所述方法减缓了mNIS+7评分的增加。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0145] 在另一实施方案中,本发明的方法改善了受试者的生活质量的至少一个指标。在受试者中的“改善生活质量的至少一个指标”是指本发明的方法减缓或阻止生活质量的恶化的能力,或改善生活质量的能力。可以使用任何合适的生活质量的测量方法来确定是否减缓或阻止了受试者的生活质量的恶化,或改善了受试者的生活质量。

[0146] 例如, **SF-36®**健康调查提供了自我报告的多项目量表,测量了八个健康参数:身体机能、由于身体健康问题导致的角色限制、身体疼痛、总体健康、活力(精力和疲劳)、社会功能、情绪问题导致的角色限制和心理健康(心理困扰和心理幸福感)。假设每个问题具有

相同的权重,将每个量表都直接转换为0-100量表。评分越低,障碍(disability)越多。分数越高,障碍越少,即,0分相当于最大障碍,100分相当于没有障碍。该调查还提供了身体部分的总结和和心理部分的总结。

[0147] 在一个实施方案中,本发明的方法向受试者提供了至少一个SF-36身体健康相关参数(身体健康、角色-身体、身体疼痛或总体健康)或至少一个SF-36心理健康相关参数(活力、社会功能、角色情绪或心理健康)相对于基线的改善。这种改善可以是自给药开始9个月后,任何一个或多个参数在量表上例如至少2分或至少3分的增加的形式。

[0148] 在其他实施方案中,本发明的方法自给药开始9个月后阻止了任何一个或多个参数的SF-36参数评分的下降,例如,所述方法导致了SF-36没有临床显著变化(例如,在进行SF-36评估的个体中观察到的变化内)。在其他实施方案中,本发明的方法自给药开始9个月后减缓了SF-36评分下降的速度,例如,与显示了疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)的SF-36评分下降的速度相比用RNAi剂治疗的受试者中的SF-36评分下降的速度减缓了。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0149] 另一合适的生活质量的测量是Norfolk生活质量-糖尿病神经病变(Norfolk QOL-DN)问卷。Norfolk QOL-DN是经过验证的综合问卷,旨在获取现有仪器未获取的与大纤维、小纤维和自主神经病变相关的DN的全部信息。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的方法改善了受试者的相对于基线的Norfolk QOL-DN评分,例如自开始用本文提供的RNAi剂进行治疗9个月后变化了约-2.5、-3.0、-3.5、-4.0、-4.5或-5.0。在其他实施方案中,所述方法阻止了Norfolk QOL-DN评分的增加,例如,所述方法导致Norfolk QOL-DN评分没有临床上显著的变化(例如,在进行QOL-DN评估的个体之间观察到的变化内)。在其他实施方案中,本发明的方法减缓了QOL-DN评分增加的速度,例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)QOL-DN评分增加的速度相比,用本发明的RNAi剂治疗的受试者的QOL-DN评分增加的速度减缓了。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0151] 生活质量的另一合适的测量方法是通过例如NIS-W评分来评估运动强度。NIS-W评分是综合了头部、躯干和四肢肌肉的无力的综合评分。使用NIS(W)(指量表测量无力的部分),将肌肉力量评估为正常(0)或完全瘫痪(4),和中间级别;1代表通过临床力量测试被认为是25%无力的肌肉,2代表50%无力,3代表75%无力,3.25代表抵抗重力的运动,3.50代表消除重力的运动,以及3.75代表肌肉颤动。

[0152] 在一个实施方案中,本发明的方法向受试者提供了NIS-W评分相对于基线的改善。这种改善可以表现为在开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,受试者的NIS-W评分降低至少5、6、7、8、9或10分的形式。在其他实施方案中,所述方法阻止了NIS-W评分的降低,例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)相比,所述方法导致NIS-W评分没有临床上的显著增加,或减缓了NIS-W评分增加的速度。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但

不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0153] 另一合适的生活质量的指标是Rasch建立的整体残疾量表(R-ODS),它是一种患者问卷,旨在获取患者的活动限制和社会参与限制。在一个实施方案中,本发明的方法为受试者提供了R-ODS评分相对于基线的改善。这种改善可以是自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后的受试者的R-ODS评分增加至少2分、例如至少2、3、4或5分的形式。在其他实施方案中,所述方法阻止了R-ODS评分的降低,例如,自开始使用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,所述方法导致R-ODS评分没有在临床上的显著降低。在其他实施方案中,在自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,本发明的方法减缓了R-ODS评分下降的速度,例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)R-ODS评分的降低速度相比,用本发明的RNAi剂治疗的受试者的R-ODS评分的下降速度减缓了。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0154] 复合自主症状评分(COMPASS-31)是一种评估自主神经功能障碍症状的患者问卷,其提供了0至100的症状评分,是生活质量的另一种合适指标。在一个实施方案中,本发明的方法为受试者提供了COMPASS-31评分相对于基线的改善。这种改善可以是自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后的受试者的COMPASS-31评分增加至少5分、例如至少5、6、7、8、9或10分的形式。在其他实施方案中,所述方法阻止了COMPASS-31评分的降低,例如,自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,所述方法导致COMPASS-31评分没有临床上的相关变化。在其他实施方案中,本发明的方法减缓了COMPASS-31评分降低的速度,例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)COMPASS-31评分降低的速度相比,自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后的受试者的COMPASS-31评分降低的速度减缓了。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0155] 其他生活质量的指标可以包括营养状况(例如,通过中位体重指数(mBMI)的变化来评估。在一个实施方案中,本发明的方法为受试者提供了mBMI相对于基线的改善。这种改善可以是自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后的mBMI评分增加至少2、3、4、5或更多的形式。在其他实施方案中,所述方法阻止了mBMI指数评分的降低,例如,自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后,所述方法导致mBMI评分没有临床上的显著变化。在其他实施方案中,本发明的方法减缓了mBMI评分降低的速度,例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)mBMI评分降低的速度相比,自开始用本文提供的RNAi剂治疗18个月后的受试者的mBMI评分降低的速度减缓了。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0156] 另一生活质量的指标包括对运动能力的评估。一种合适的运动能力测量方法是6分钟步行测试(6MWT),它测量受试者在6分钟内可以步行多远,即6分钟步行距离(6MWD)。在一个实施方案中,本发明的方法自开始用本文提供的RNAi剂进行治疗18个月后为受试者提

供了在6MWD中的从基线增加至少10米,例如,增加至少10米、15米、20米、或约30米。

[0157] 另一合适的测量方法是测量步态速度的10米步行测试。在一个实施方案中,本发明的方法自开始用本文提供的RNAi剂进行治疗18个月后为受试者提供了在10米步行测试中的从基线增加至少0.025米/秒,例如,增加0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或约5.0米/秒。

[0158] 在一些实施方案中,血浆生物标志物水平的变化是ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展减少的标志。例如,与治疗开始时的NfL水平相比,9个月后的神经丝轻链(NfL)水平的降低可以是ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展减少的标志。在某些实施方案中,与在治疗开始时的相应水平相比,自治疗开始9个月后的其他蛋白质(尤其是RSP03、CCDC80、EDA2R和NT-proBNP)的水平单独降低或其与NfL水平降低的结合可以是ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展减少的标志。在某些实施方案中,与治疗开始时的相应水平相比,在治疗开始后9个月,N-CDase水平的增加(单独的或与上面列出的其他标志物的组合)可以是ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展减少的标志。表1提供了可作为ATTR淀粉样变性中神经损伤或多发性神经病变减少的指标的其他生物标志物,例如在自开始用本文提供的RNAi剂治疗9个月后。ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展的减少与具有正 β 系数的蛋白质的减少相关。ATTR淀粉样变性中的持续的神经损伤或多发性神经病变进展的减少与具有负 β 系数的蛋白质的增加相关。可以理解的是,生物标志物水平的变化是统计学上显著的变化,即,大于试验的固有可变性的变化。

[0159] 在某些实施方案中,本发明的方法提供了对心血管指标的改善,例如堪萨斯城心脏病问卷总体总结(KCCQ-OS)的增加、与基线相比通过超声心动图评估的左心室(LV)壁增厚的减少、与基线相比通过超声心动图评估的整体纵向应变的减少、与基线相比的N末端B型利钠肽原(NTproBNP)减少,以及由心脏事件导致的住院治疗的减少。

[0160] 本发明的方法还可以改善被治疗受试者的预后。例如,与显示疾病自然史的适当对照组(例如,例如在Adams et al., N Engl J Med 2018;379:11-21中提供的安慰剂对照组)相比,本发明的方法可以为受试者提供在治疗期间临床恶化事件的概率的降低、或寿命延长、或住院治疗减少。在某些实施方案中,治疗期间临床恶化事件的概率的降低可以包括与适当的对照组(例如在Maurer et al., N Engl J Med 2018:379:11-21中提供的)相比的全因死亡率或心血管相关住院率的降低,如根据Finkelstein-Schoenfeld方法所评估的。可以理解的是,疾病进展的速度取决于许多因素,包括但不限于治疗开始时受试者的疾病严重程度、治疗持续时间、在先治疗和存在的特定TTR突变(如果有的话)。

[0161] 可以调整施用于受试者的RNAi剂的剂量以平衡具体剂量的风险和益处,例如,以实现所需的TTR基因表达抑制水平(如例如基于TTRmRNA表达、TTR蛋白表达或淀粉样蛋白沉积的减少所评估的,如上文所定义的)或所需的治疗效果,同时避免不希望的副作用。

[0162] 在一个实施方案中,本发明的iRNA剂以“固定剂量”(例如,以mg为单位的剂量)施用于受试者,这意味着将单剂量iRNA剂用于所有受试者,而不管任何具体的受试者相关因素,比如体重。

[0163] 在一些实施方案中,将RNAi剂以约25mg至约1000mg的固定剂量施用,例如约25mg、约50mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约

900mg或约1000mg。

[0164] 在某些实施方案中,约每季度一次至约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,约每季度一次、约每六个月一次或约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0165] 在某些实施方案中,以约25mg至约300mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg至约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约50mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约75mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约100mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约200mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约25mg至约300mg;约25mg至约200mg;约75mg至约200mg;约25mg;约50mg;约100mg;约200mg;或约300mg的固定剂量,每季度一次(即约每三个月一次)将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0166] 在某些实施方案中,以约400mg至约600mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约400mg或约600mg的固定剂量,约每六个月一次至约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约400mg或约600mg的固定剂量,约每六个月一次或约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0167] 在某些实施方案中,以约700mg至约1000mg或约700mg至约900mg的固定剂量将双链RNAi剂施用于人类受试者。在某些实施方案中,以约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的固定剂量,约每年一次将双链RNAi剂施用于人类受试者。

[0168] 在某些实施方案中,施用是皮下施用,例如,通过例如预填充注射器或自动注射的注射器的自我施用。在一些实施方案中,用于皮下施用的RNAi剂的剂量包含在体积小于或等于1ml的例如药学上可接受的载体中的。

[0169] 这些计划中的任何一个都可以任选地进行一个或多个迭代的重复。迭代次数可以取决于所需效果的实现,例如TTR基因的抑制、视黄醇结合蛋白水平、维生素A水平,或治疗效果的实现,例如减少淀粉样蛋白沉积或减轻与TTR相关的疾病的症状。在某些实施方案中,长期施用iRNA剂,持续一段期限不定的时间,例如,在患者的整个生命中。

[0170] 在一些实施方案中,RNAi剂是与其他治疗剂或其他治疗方案一起施用的。例如,适用于治疗TTR相关疾病的其他剂或其他治疗方案可包括肝移植、心脏移植、起搏器植入、可降低体内单体TTR水平的剂;Tafamidis (Vyndaqel®或Vyndamax®) 或AG10,其可在动力学上稳定TTR四聚体,防止TTR淀粉样变生成所需的四聚体解离;非甾体类抗炎药(NSAIDs),例如二氟尼柳和利尿剂,可用于减轻在心脏受累的TTR淀粉样变性中的水肿。

[0171] 在一个实施方案中,向受试者施用初始剂量和一个或多个维持剂量的RNAi剂。一个或多个维持剂量可以与初始剂量相同或比初始剂量更低,例如初始剂量的二分之一。治疗后,可以监测患者的病情变化。

[0172] 在本发明方法的一些实施方案中,通过血清或血浆TTR水平评估的TTR基因的表达被抑制了至少85%,在一些实施方案中TTR基因的表达被抑制了至少90%。可以理解的是,使用本文提供的iRNA剂抑制TTR表达将抑制TTR在肝脏中的表达,而基本上不抑制TTR在其

他组织中的表达,例如眼部的TTR表达。

[0173] 如本文所用,术语“抑制”可与“减少”、“沉默”、“下调”、“遏止”和其他类似术语互换使用,并且包括任何水平的抑制。在一些实施方案中,抑制包括统计学上显著的抑制或临床上显著的抑制。

[0174] 短语“抑制TTR的表达”是指抑制任何TTR基因的表达,包括TTR基因的变体或突变体。因此,TTR基因可以是野生型TTR基因、突变型TTR基因(例如引起淀粉样蛋白沉积的突变型TTR基因)。

[0175] 抑制可以通过与对照水平相比的与TTR表达相关的一种或多种变量的绝对水平或相对水平的降低来评估。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如给药前基线水平,或从未经处理或用对照(例如,例如仅对照缓冲液或无活性剂对照缓冲液)处理的类似受试者、细胞或样本确定的水平。如本文所用,TTR表达的抑制的评估通常是通过确定适当样本中的TTR水平(例如,历史对照样本、在正常样本或临床试验中确定的水平)或在用iRNA剂治疗受试者之前的TTR水平,所述iRNA剂是例如在本文或PCT公布W02010048228、W02013075035和W02017023660中提供的那些,或抑制TTR表达的其他剂,例如反义寡核苷酸试剂、dicer底物剂,参见例如W02011139917和W02015085158;以及在使用本文提供的iRNA剂处理后的TTR水平。可以理解的是,本文提供的iRNA剂是持久但作用缓慢的。因此,在足够长的时间达到最低点后确定敲低水平,例如,在人类受试者中首次iRNA剂给药至少3周后,或当已经达到TTR敲低的稳定状态时,例如在本文提供的iRNA剂的多次给药后。

[0176] TTR基因表达的抑制可以通过第一细胞或第一组细胞(例如,如存在于来自受试者的样本中的细胞)表达的mRNA的量的减少来证明,其中TTR基因被转录并且其已经被处理(例如,通过使细胞与本发明的RNAi剂接触,或通过本发明的RNAi剂施用于细胞所在的受试者或细胞曾存在的受试者),使得与第二细胞或第二组细胞相比,所述第一细胞或第一组细胞的TTR基因的表达受到抑制,所述第二细胞或第二组细胞基本上与所述第一细胞或第一组细胞相同但没有经过如此处理(对照细胞)。在一些实施方案中,通过使用以下公式将处理细胞中的mRNA水平表示为对照细胞中mRNA水平的百分比来评估抑制百分比:

$$[0177] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \bullet 100\%$$

[0178] 可以对例如从受试者获得的血液样本中的血清TTR蛋白浓度进行类似的计算,以确定表达抑制百分比。如果在处理后的血清或血浆样本中未检出TTR,则认为存在的TTR量处于所用分析的检测下限。

[0179] 在一些实施方案中,抑制百分比是使用经过验证的和临床上可接受的方法来确定的。

[0180] 或者,可以根据与TTR基因表达功能相关的参数的减少来评估TTR基因表达的抑制,例如TTR蛋白表达、视黄醇结合蛋白水平、维生素A水平或包含TTR的淀粉样蛋白沉积的存在。TTR基因沉默可以在任何表达TTR(无论是组成型还是通过基因组工程化)的细胞中通过本领域已知的任何分析来确定。肝脏是TTR基因表达的主要部位。其他重要的表达部位包括视网膜和脉络丛。

[0181] III. 本发明的iRNA

[0182] 用于本发明的方法中的合适iRNA包括双链核糖核酸(dsRNA)分子,其用于抑制细胞中TTR基因的表达,所述细胞是例如受试者的细胞,例如哺乳动物例如具有与TTR相关的疾病的人体内的细胞。dsRNA包括具有互补性区域的反义链,所述互补性区域与在TTR基因表达中形成的mRNA的至少一部分是互补的。互补性区域的长度约为21至30个核苷酸或更短(例如,长度约为30、29、28、27、26、25、24、23、22或21个核苷酸)。在与表达TTR基因的细胞接触后,iRNA选择性将TTR基因(例如,人类、非人灵长类动物或非灵长类哺乳动物的TTR基因)的表达抑制至少约70%,如通过例如实时PCR使用W02013075035的实施例4中提供的方法所评估的(当使用其中提供的方法用10nM的iRNA剂转染Hep3B细胞时)。

[0183] dsRNA包括两条互补的RNA链,它们在dsRNA的使用条件下杂交形成双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括与靶序列基本上互补并且通常完全互补的互补性区域。靶序列可以来源于在TTR基因表达过程中形成的mRNA序列。另一条链(有义链)包括与反义链互补的区域,使得两条链在合适条件下结合时杂交并形成双链体结构。如在本文其他部分所述和本领域已知的,dsRNA的互补序列也可以包含在单个核酸分子的自身互补区域,而非位于分开的寡核苷酸上。

[0184] 通常,双链体结构的长度为21至30个碱基对。类似地,与靶序列互补的区域长度为22和30个核苷酸。

[0185] 可以通过本领域已知的标准方法来合成dsRNA,如下文所进一步讨论的。

[0186] 本发明的iRNA化合物可以使用两步法来制备。首先,分别制备双链RNA分子的单链。然后,将组成链退火。可以使用溶液相有机合成、固相有机合成或两者来制备siRNA化合物的单链。有机合成的优点是可以容易地制备包含非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。本发明的单链寡核苷酸可以使用溶液相有机合成、固相有机合成或两者来制备。

[0187] IV. 本发明的经修饰的iRNA

[0188] 用于本发明的方法中的iRNA剂包括有义链和反义链中确定的化学修饰。当将任一链的长度延长以提供长于23个核苷酸的反义链和长于21个核苷酸的有义链时,核苷酸可包括修饰,包括但不限于糖修饰、主链修饰和碱基修饰。修饰包括例如,末端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、缀合、反向连接)或3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);碱基修饰,例如,用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伴侣库碱基配对的碱基进行替换、移除碱基(无碱基核苷酸)或缀合碱基;糖修饰(例如,在2'-位置或4'-位置)或糖替代;或主链修饰,包括磷酸二酯键的修饰或替换。可用于本文所述实施方案的iRNA化合物的具体实例包括但不限于含有经修饰的主链或不合天然核苷间键合的RNA。除此之外,具有经修饰的主链的RNA还包括那些在主链中没有磷原子的RNA。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提到的,在其核苷间主链中不具有磷原子的经修饰的RNA也可以被认为是寡核苷酸。在一些实施方案中,经修饰的iRNA在其核苷间主链中具有磷原子。

[0189] 经修饰的RNA主链包括例如具有正常3'-5'键的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯的甲基磷酸酯和其他烷基磷酸酯、亚膦酸酯、包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯的氨基磷酸酯、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、以及硼磷酸酯,它们的2'-5'键类似物,以及其中相邻的核苷单元对是以3'-5'至5'-3'或以2'-5'至5'-2'连接

的具有相反极性的那些。也可包括各种盐、混合盐及游离酸形式。

[0190] 其中不包括磷原子的经修饰的RNA主链具有通过短链烷基或环烷基的核苷间键合、混合杂原子和烷基或环烷基的核苷间键合、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键合形成的主链。这些包括具有吗啉键(部分地由核苷的糖部分形成)的那些主链;硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰乙酰基(formacetyl)和硫代甲酰乙酰基主链;亚甲基甲乙酰基及硫代甲酰乙酰基主链;含有烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯及磺酰胺主链;酰胺主链;以及具有混合了N、O、S及CH₂组成成分的其他主链。

[0191] 在其他实施方案中,预期将合适的RNA模拟物用于iRNA中,其中核苷酸单元的糖和核苷间键合即主链,均被新基团所替换。碱基单元维持不变以便与适当的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物被称为肽核酸(PNA),其中的RNA模拟物已经显示出具有优异杂交特性。在PNA化合物中,RNA的糖主链被替换为含有酰胺的主链,尤其是氨基乙基甘氨酸主链。核碱基得以保留,且直接或间接地结合至主链的酰胺部分的氮杂氮原子上。

[0192] 本公开中的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷,特别是上文引用的美国专利第5,489,677号的--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[被称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--和--N(CH₃)--CH₂--CH₂--和上文提及的美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施方案中,本文提出的RNA具有上文提及的美国专利号5,034,506的吗啉基主链结构。天然磷酸二酯主链可以表示为O-P(O)(OH)-OCH₂-。

[0193] 经修饰的RNA也可以包含一个或多个取代的糖部分。本文提出的iRNA,例如dsRNA,可以在2'-位置包括以下之一:OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代的或未经取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。合适的示例性修饰包括O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m为1至约10。在其他实施方案中,dsRNA在2'位置包括以下之一:C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷基芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、用于改善iRNA药代动力学特性的基团、或用于改善iRNA药效动力学特性的基团,以及其他具有类似特性的取代基团。在一些实施方案中,修饰包括2'甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin et al., Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基基团。另一示例性修饰是2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,也被称为2'-DMAOE,如下文实施例所述,和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也被称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂。更多的示例性修饰包括:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(在这三个家族中的R异构体和S异构体);2'-烷氧基烷基;和2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

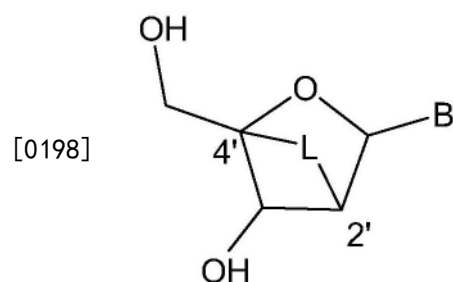
[0194] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟基(2'-F)。也可以在iRNA的RNA上的其他位置进行类似的修饰,特别是3'末端核苷酸或2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有替代呋喃戊糖基糖

的糖模拟物如环丁基部分。

[0195] 本发明的iRNA的RNA还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)的修饰或取代。如本文所用,“未经修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包括其他合成的和天然的核碱基,例如脱氧胸苷(dT),5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和,5-卤代胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,6-偶氮胞嘧啶和6-偶氮胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫脲嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基及其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代特别是5-溴代、5-三氟甲基及其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。这些核碱基中的某些对于增加本发明提出的寡聚化合物的结合亲和力尤其有用。这些包括5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6及O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙基尿嘧啶以及5-丙基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已经显示出将核酸双链体稳定性增加0.6°C至1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) 并且是示例性的碱基取代,尤其是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰结合时尤甚。

[0196] 本公开的RNAi剂也可以被修饰以包括一个或多个双环糖部分。“双环糖”是通过两个碳(无论是相邻的还是不相邻的原子)桥接形成的环修饰的呋喃糖基环。“双环核苷”(“BNA”)是具有包含由桥接形成的环的糖部分的核苷,所述桥接包含连接两个碳原子(无论是相邻的还是不相邻的)的桥,糖环的两个碳原子从而形成双环的环系统。在某些实施方案中,桥连接糖环的4'-碳和2'-碳,任选地通过2'-无环氧原子。因此,在一些实施方案中,本公开的剂可以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包含连接2'碳和4'碳的额外的桥。换言之,LNA是包含双环糖部分的核苷酸,所述双环糖部分包含4'-CH₂-O-2'桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-环内结构构象中。已经显示向siRNA添加锁定核酸可增加血清中siRNA的稳定性,并减少脱靶效应(Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, O. R. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。用于本公开的多核苷酸的双环核苷的实例包括但不限于在4'核糖基环原子和2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施方案中,本公开的反义多核苷酸剂包括一个或多个包含4'至2'桥的双环核苷。

[0197] 锁核苷可以由以下结构表示(省略立体化学),



[0199] 其中B是核碱基或经修饰的核碱基,L是将核糖环的2'-碳连接到4'-碳上的连接基团。

[0200] 此类4'至2'桥接双环核苷的实例包括但不限于4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'(也被称为“限制性乙基”或“cEt”)和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利号7,399,845);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及其类似物;参见例如美国专利号8,278,283);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及其类似物;参见例如美国专利号8,278,425);4'-CH₂-ON(CH₃)-2'(参见,例如,美国专利公开号2004/0171570);4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R是H、C1-C12烷基或氮保护基团(参见例如美国专利号7,427,672);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见,例如Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134);和4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及其类似物;参见例如美国专利号8,278,426)。前述各项的全部内容在此通过引用并入本文。

[0201] 教导制备锁核酸核苷酸的其他代表性美国专利和美国专利公开包括但不限于以下:美国专利第6,268,490号、第6,525,191号、第6,670,461号、第6,770,748号、第6,794,499号、第6,998,484号、第7,053,207号、第7,034,133号、第7,084,125号、第7,399,845号、第7,427,672号、第7,569,686号、第7,741,457号、第8,022,193号、第8,030,467号、第8,278,425号、第8,278,426号、第8,278,283号、US 2008/0039618、及US 2009/0012281,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0202] 可将前述任意双环核苷制备为具有一种或多种立体化学糖构型,包括,例如 α -L-呋喃核糖及 β -D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0203] 本公开的RNAi剂也可以被修饰以包括一个或多个限制性乙基核苷酸。如本文所用,“限制性乙基核苷酸”或“cEt”是包含双环糖部分的锁核酸,所述双环糖部分包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥(即,前述结构中的L)。在一个实施方案中,限制性乙基核苷酸为S构象,在本文中被称为“S-cEt”。

[0204] 本发明的iRNA还可以包括一种或多种“构象限制性核苷酸”(“CRN”)。CRN是具有连接核糖的C2'碳和C4'碳或核糖的C3碳和C5'碳的接头的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定为稳定的构象并增加了其与mRNA的杂交亲和力。接头的长度足以将氧置于最佳位置以获得稳定性和亲和力,从而减少核糖环的起皱(puckering)。

[0205] 本发明的iRNA的一种或多种核苷酸还可以包括羟甲基取代的核苷酸。“羟甲基取代的核苷酸”是无环的2'-3'-开环核苷酸,也被称为“未锁核酸”(“UNA”)修饰。

[0206] 对RNA分子末端的潜在的稳定化修饰可包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-NHAc)、胸腺嘧啶-2'-O-脱氧胸腺嘧啶(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二酰基-尿苷-3-磷酸、倒置碱基dT(idT)等。这种修饰的公开可见于WO 2011/005861。

[0207] 本发明的iRNA的核苷酸的其他修饰包括5'磷酸或5'磷酸模拟物,例如RNAi剂反义链上的5'-末端磷酸或5'-末端磷酸模拟物。合适的磷酸模拟物公开于例如美国专利公开第2012/0157511号中,其全部内容通过引用并入本文。

[0208] V. 与配体缀合的iRNA

[0209] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及将增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取

的一个或多个配体、部分 (moiety) 或缀合物化学连接到RNA上。此类部分包括但不限于脂质部分,例如胆固醇部分 (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553-6556)、胆酸 (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060)、硫醚例如 beryl-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770)、硫代胆固醇 (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538)、脂肪链例如十二烷二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54)、磷脂例如双-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸三乙铵 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973)、或金刚烷乙酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654)、棕榈基部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237)、或十八烷基胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937)。

[0210] 在一个实施方案中,配体会改变其所并入的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在一些实施方案中,配体提供了对于所选靶标如分子,细胞或细胞类型,区室如细胞区室或器官区室,身体的组织、器官或区域的更高的亲和性,例如与没有此类配体者相比。示例性配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0211] 配体还可包括与具体细胞类型 (例如肾脏细胞) 结合的靶向基团,如细胞靶向剂或组织靶向剂,如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,如抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白糖类、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、多价甘露糖、多价海藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、运铁蛋白、双磷酸盐、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸盐、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。在某些实施方案中,配体包括单价或多价半乳糖。在某些实施方案中,配体包括胆固醇。

[0212] 本发明的配体缀合的寡核苷酸可以通过使用具有侧链反应性官能团的寡核苷酸来合成,如衍生自连接分子与寡核苷酸的附接 (如下所述)。这种反应性寡核苷酸可以直接与以下配体反应:可商购的配体、合成的具有多种保护基团中的任一种的配体、或具有附接于其上的连接部分的配体。

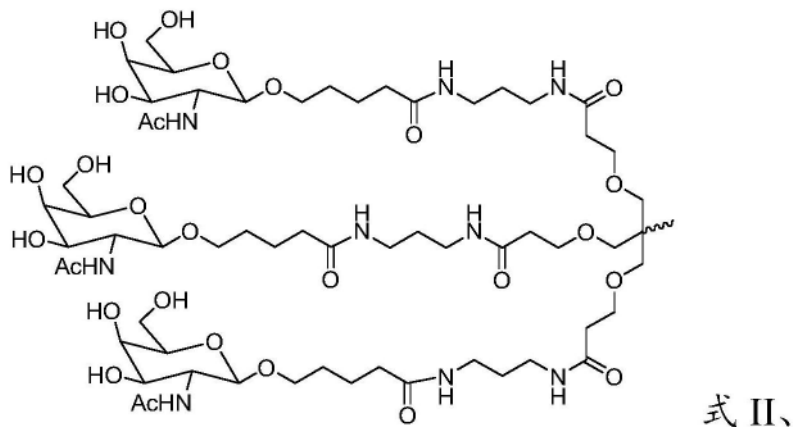
[0213] 用于本发明的缀合物的寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术方便且常规地制备。可以额外地或替代地采用本领域中已知的用于这种合成的任何其他方法。使用类似技术来进行其他寡核苷酸如硫代磷酸酯及烷基化衍生物的制备也是已知的。

[0214] A. 糖类缀合物

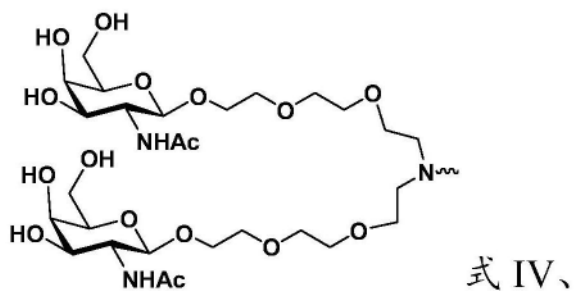
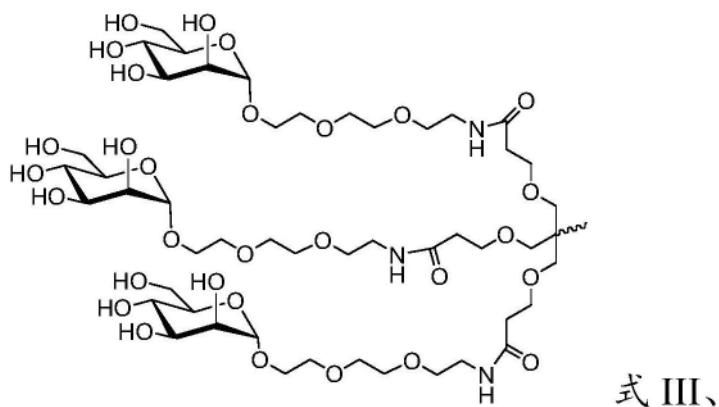
[0215] 在本发明的组合物和方法的一些实施方案中,iRNA寡核苷酸还包含糖类。缀合有糖类的iRNA有利于核酸的体内递送,且组合物适用于体内治疗性用途,如本文所述。如本文所用,“糖类”是指本身由一个或多个具有至少6个碳原子的单糖单元 (其可以是线性的、分支的或环状的),与键结至每个碳原子的氧、氮或硫原子所构成的化合物;或是具有糖类部分作为其一部分的化合物,该糖类部分由一个或多个具有至少六个碳原子的单糖单元 (其

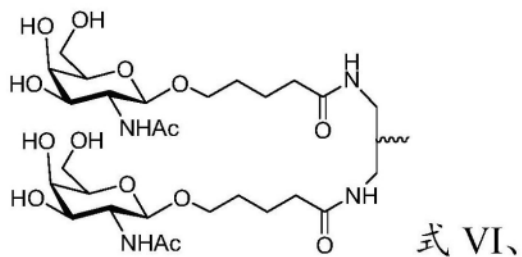
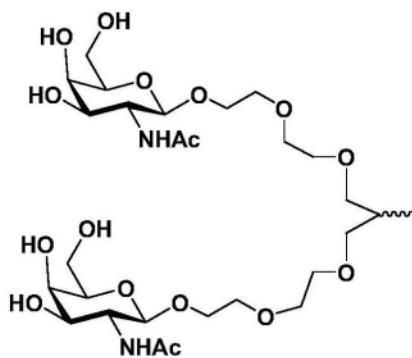
可以是线性的、分支的或环状的) 与键结至每个碳原子的氧、氮或硫原子所构成。代表性糖类包括糖(单糖、二糖、三糖及含有约4、5、6、7、8、或9个单糖单元的寡糖), 以及多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。具体的单糖包括C5和以上(如, C5、C6、C7或C8) 糖; 二糖和三糖, 其包括具有两个或三个单糖单元(如, C5、C6、C7或C8) 的糖。

[0216] 在一个实施方案中, 用于本发明的组合物和方法的糖类缀合物是单糖。在另一实施方案中, 用于本发明的组合物和方法的糖类缀合物选自由以下组成的组:

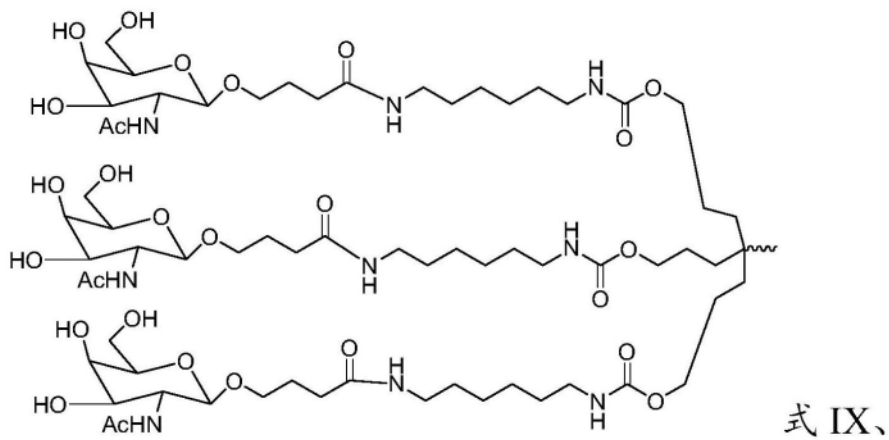
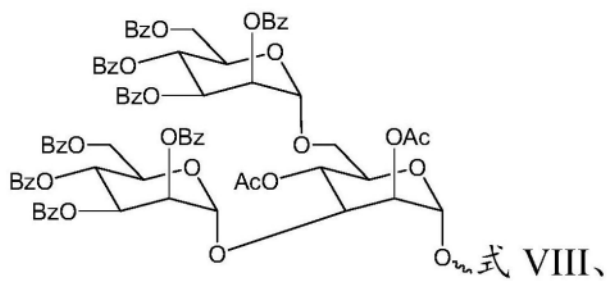
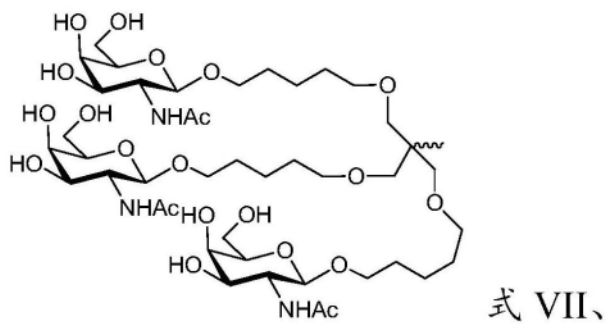


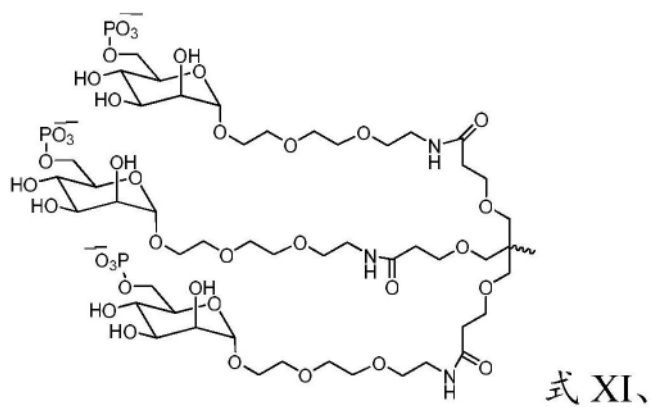
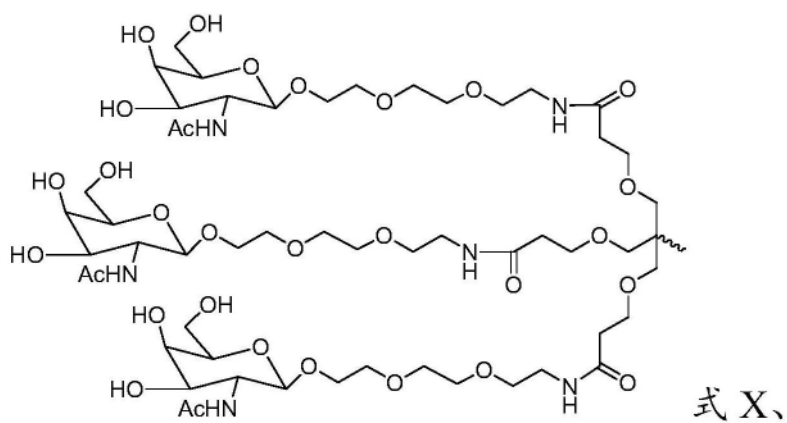
[0217]



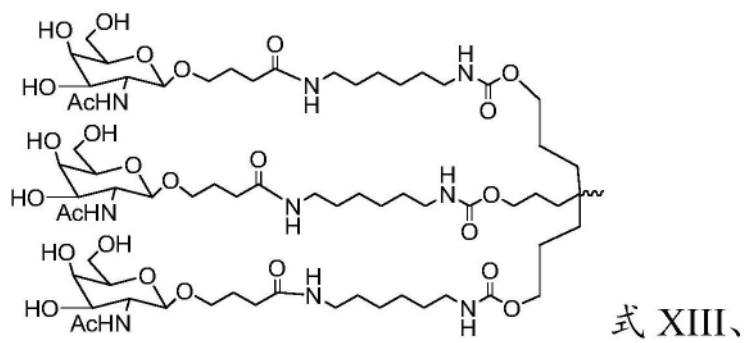
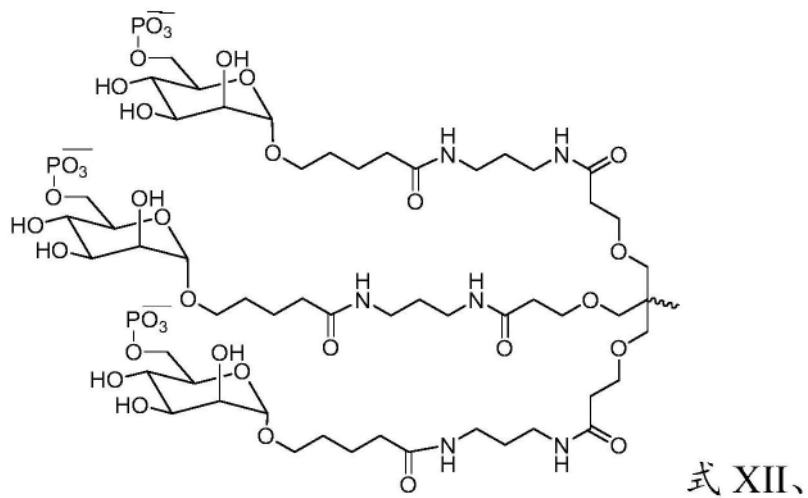


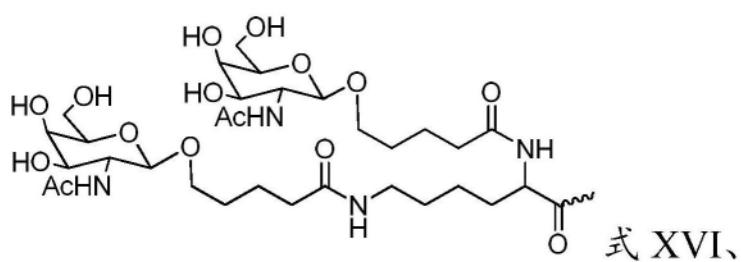
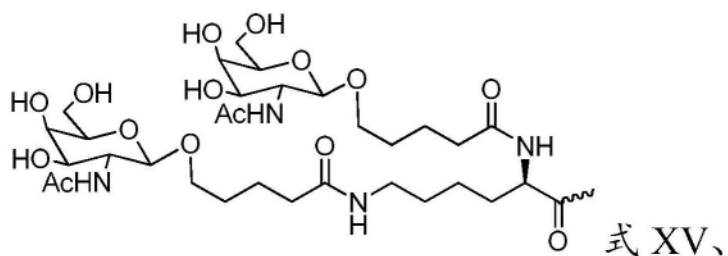
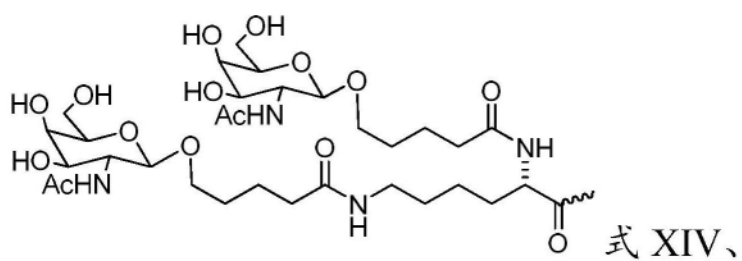
[0218]



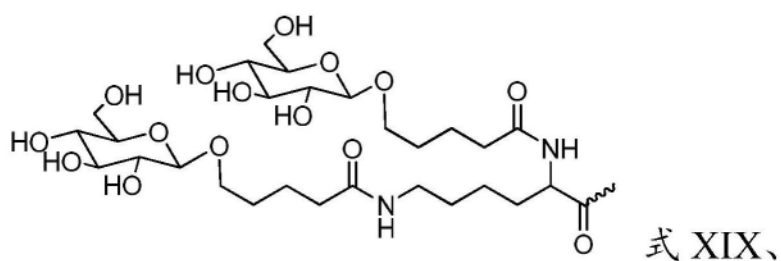
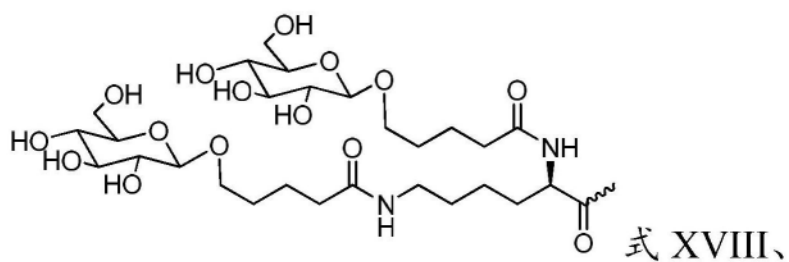
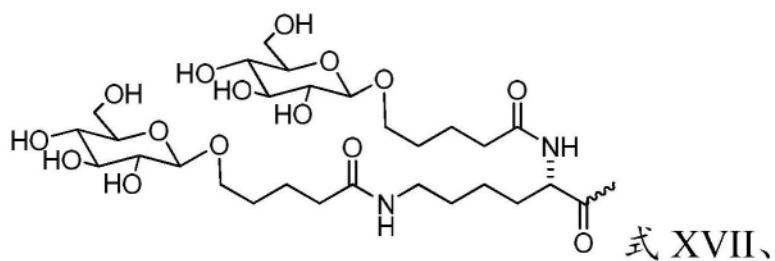


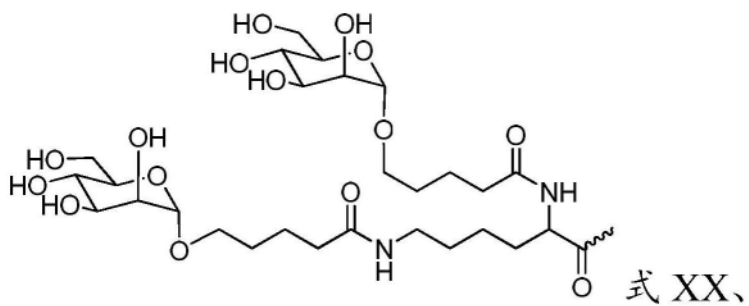
[0219]



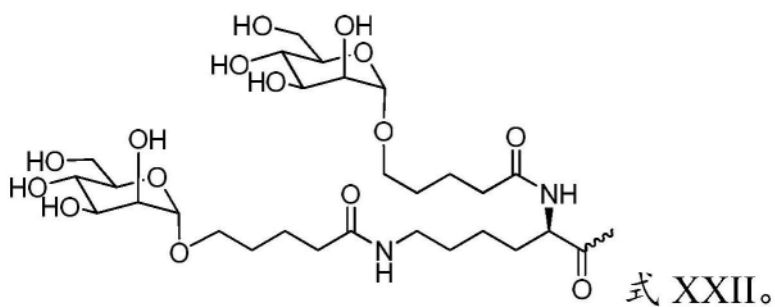
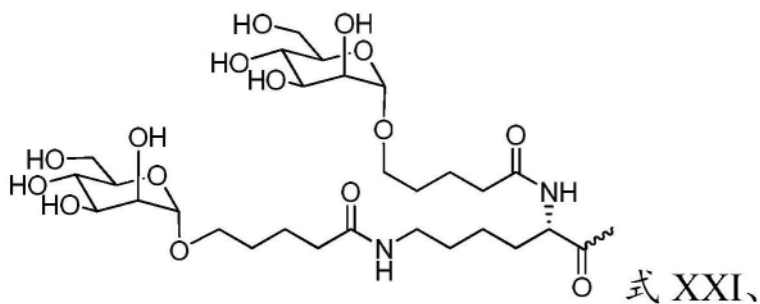


[0220]



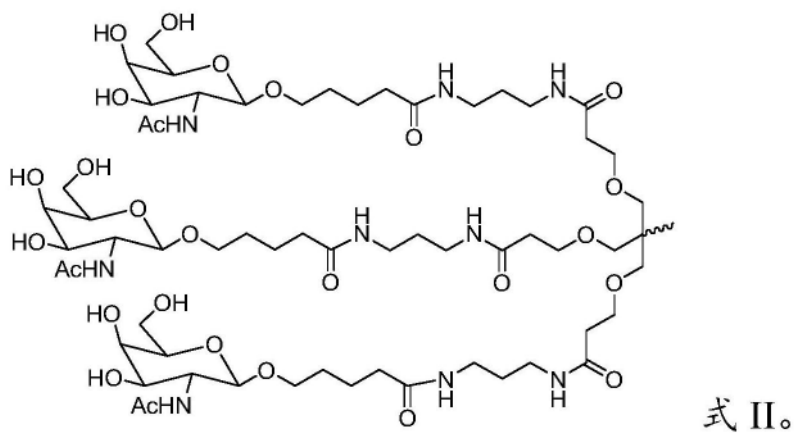


[0221]

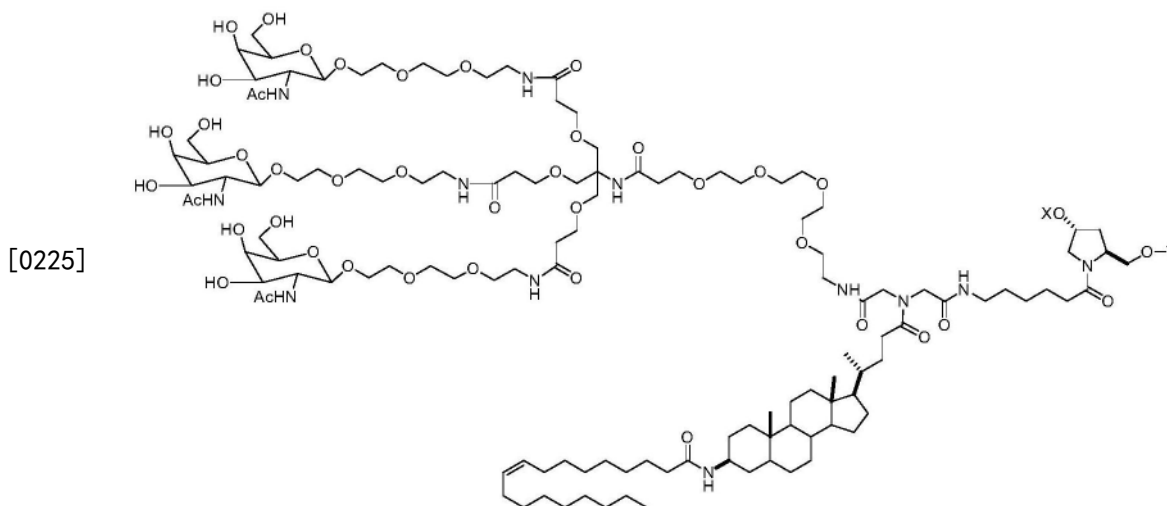


[0222] 在一个实施方案中,单糖是N-乙酰半乳糖胺,例如

[0223]



[0224] 用于本文所述实施方案中的另一种代表性糖类缀合物包括但不限于,



[0226] (式XXIII), 当X或Y中的一个为寡核苷酸时, 另一个为氢。

[0227] 在本发明的某些实施方案中, GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA剂连接。在一些实施方案中, GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA剂连接。在本发明的其它实施方案中, GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA剂连接。

[0228] 在一个实施方案中, 本发明的双链RNAi剂包含一个与iRNA剂连接的GalNAc或GalNAc衍生物。在另一个实施方案中, 本发明的双链RNAi剂包含多个(例如, 2、3、4、5或6)个GalNAc或GalNAc衍生物, 其通过多个单价接头各自独立地连接至双链RNAi剂的多个核苷酸上。

[0229] 在一些实施方案中, 例如, 当本发明的iRNA剂的两条链是一个较大分子的一部分且通过一条链的3'端与另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链连接而形成包含多个未配对核苷酸的发夹环圈时, 该发夹环圈内的每个未配对核苷酸可独立包含通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。发夹环圈也可由双链体的一条链的延伸突出形成。

[0230] 在一些实施方案中, 糖类缀合物还包含如上所述的一个或多个其他配体, 例如但不限于PK调节剂或细胞渗透肽。

[0231] 适用于本发明的其他糖类缀合物包括在PCT公布WO 2014/179620和WO 2014/179627中所描述的那些, 其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0232] B. 接头

[0233] 在一些实施方案中, 本文所述的缀合物或配体可以使用多种接头与iRNA寡核苷酸连接, 所述接头可以是可裂解的或不可裂解的。

[0234] 术语“接头”或“连接基团”是指将化合物的两个部分连结在一起(例如, 将化合物的两个部分共价连接)的有机部分。接头通常包含直接键或原子如氧或硫, 单元如NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH或原子链, 例如但不限于, 取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基、取代的或未取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基

杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环基烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基, 其中一个或多个亚甲基可被如下基团所中断或终止: O、S、S(O)、SO₂、N(R8)、C(O)、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、或取代的或未取代的杂环基; 其中R8是氢、酰基、脂肪族或取代的脂肪族。在一个实施方案中, 接头是约1至24个原子、2至24个原子、3至24个原子、4至24个原子、5至24个原子、6至24个原子、6至18个原子、7至18个原子、8至18个原子、7至17个原子、8至17个原子、6至16个原子、7至17个原子、或8至16个原子。

[0235] 可裂解的连接基团是在细胞外足够稳定的连接基团, 但其在进入靶细胞时被裂解以释放被接头保持在一起的两个部分。在一个实施方案中, 可裂解的连接基团在靶细胞中或在第一参考条件(其可以是例如经选择以模拟或呈现细胞内的条件)下的裂解速度比在受试者血液中或在第二参考条件(其可以是例如经选择以模拟或呈现见于血液或血清中的条件)下的裂解速度快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更高、或至少100倍。

[0236] 可裂解的连接基团易受裂解剂的影响, 例如pH、氧化还原电位或可降解分子的存在。通常, 与在血清或血液中相比, 裂解剂在细胞内更为普遍或以更高水平或活性存在。此类降解剂的实例包括: 氧化还原剂, 其被选择用于特定底物或其不具有底物特异性, 包括例如细胞中存在的氧化酶、还原酶或还原剂如硫醇, 其可通过氧化还原降解可通过氧化还原裂解的连接基团; 酯酶; 可创建酸性环境的核内体或剂, 例如导致pH为5或更低的那些; 可通过作为广义酸、肽酶(可以是底物特异性的)和磷酸酶来水解或降解酸可裂解的连接基团的酶。

[0237] 可裂解的连接基团例如二硫键可能对pH敏感。人血清的pH值为7.4, 而细胞内的平均pH值略低, 范围约为7.1至7.3。核内体具有酸性更强的pH, 其范围约为5.5至6.0; 而溶酶体甚至具有酸性更强的pH, 约为5.0。一些接头将具有可裂解的连接基团, 该连接基团在选定的pH发生裂解, 从而将阳离子脂质从细胞内的配体释放出来或将该阳离子脂质释放进所期望的细胞区室内。

[0238] 接头可以包括可通过特定酶裂解的可裂解的连接基团。并入接头中的可裂解连接基团的类型可取决于要靶向的细胞。例如, 肝脏靶向配体可以通过包括酯基的接头而连接至阳离子脂质。肝脏细胞富含酯酶, 因此与不富含酯酶的细胞类型相比, 肝脏细胞中的接头将更有效地被裂解。其他富含酯酶的细胞类型包括肺细胞、肾皮质细胞和睾丸细胞。

[0239] 当靶向富含肽酶的细胞类型(例如肝脏细胞和滑膜细胞)时, 可以使用包含肽键的接头。

[0240] 通常, 可通过测试降解剂(或条件)裂解候选连接基团的能力来评估候选的可裂解连接基团的适用性。还需要测试候选的可裂解连接基团在血液中或与其他非靶组织接触时抵抗裂解的能力。因此, 可以确定第一条件与第二条件之间的裂解相对敏感性, 其中, 选择第一条件以指示靶细胞中的裂解, 且选择第二条件以指示其它组织或生物液体如血液或血清中的裂解。评估可在无细胞系统中、细胞中、细胞培养物中、器官或组织培养物中、或在完整动物体内进行。可能有用的是, 在无细胞或培养条件进行初始评估, 并通过在完整动物体内的进一步评估进行证实。在一些实施方案中, 有用的候选化合物在细胞内(或在被选择以

模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解速度比在血液或血清中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)快至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍。

i. 氧化还原可裂解的连接基团

[0241] 在一个实施方案中,可裂解的连接基团是在还原或氧化时被裂解的氧化还原可裂解的连接基团。可经还原裂解的连接基团的实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。可参考本文所述的方法来确定候选可裂解连接基团是否是合适的“可还原裂解的连接基团”,或者例如是否适合与特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用。例如,可以通过使用本领域中的已知试剂将二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂与候选物一起孵育来评估候选物,以模拟在细胞如靶细胞中将会观察到的裂解速率。候选物也可在被选用以模拟血液或血清条件的条件下进行评估。在一种情况下,候选化合物在血液中被裂解至多约10%。在其他实施方案中,有用的候选化合物在细胞内(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的降解速度比在血液或血清中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)快至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。可使用标准酶动力学分析在被选择以模拟细胞内介质的条件下测定候选化合物的裂解速率,并将其与在被选择以模拟细胞外介质的条件下所测定的候选化合物的裂解速率进行比较。

ii. 基于磷酸的可裂解连接基团

[0242] 在某些实施方案中,可裂解接头包含基于磷酸的可裂解连接基团。基于磷酸的可裂解连接基团被降解或水解磷酸基团的剂所裂解。在细胞内裂解磷酸基团的剂的实例是酶如细胞内的磷酸酶。基于磷酸的链接基团的实例是-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-,其中Rk在每次出现时可以独立地为C1-C20烷基、C1-C20卤代烷基、C6-C10芳基,或C7-C12芳烷基。示例性实施方案包括-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-和-O-P(S)(H)-S-。在一个实施方案中,基于磷酸的连接基团是-O-P(O)(OH)-O-。这些候选物可以使用与上述方法类似的方法进行评估。

iii. 酸可裂解的连接基团

[0244] 在某些实施方案中,可裂解接头包含酸可裂解的连接基团。酸可裂解的连接基团是在酸性条件下被裂解的连接基团。在一些实施方案中,酸可裂解的连接基团在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境中被裂解,或被剂例如可用作广义酸的酶所裂解。在细胞中,具体的低pH细胞器如核内体和溶酶体,可提供用于酸可裂解的连接基团的裂解环境。酸可裂解的连接基团的实例包括但不限于脞类、酯类和氨基酸的酯类。酸可裂解基团可具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。示例性的实施方案是与酯的氧(烷氧基)连接的碳是芳基基团、取代的烷基基团或叔烷基基团例如二甲基戊基或叔丁基。这些候选物可以使用与上述方法类似的方法进行评估。

iv. 基于酯的连接基团

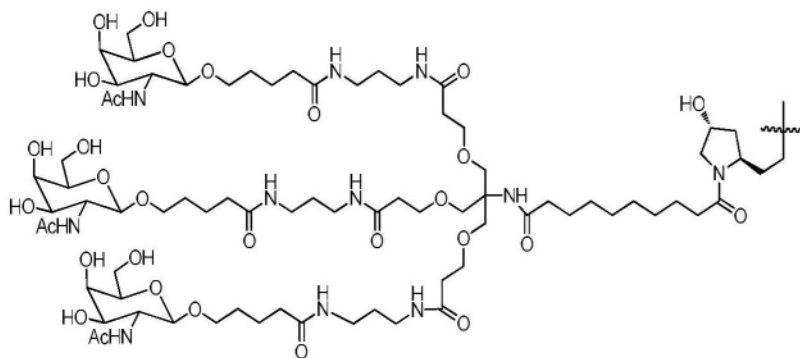
[0246] 在另一实施方案中,可裂解接头包含基于酯的可裂解连接基团。基于酯的可裂解连接基团通过细胞中的酶例如酯酶或酰胺酶而被裂解。基于酯的可裂解连接基团的实例包括但不限于亚烷基基团、亚烯基基团和亚炔基基团的酯类。酯可裂解的连接基团具有通式-

C(O)O-或-OC(O)-。这些候选物可以使用与上述方法类似的方法进行评估。

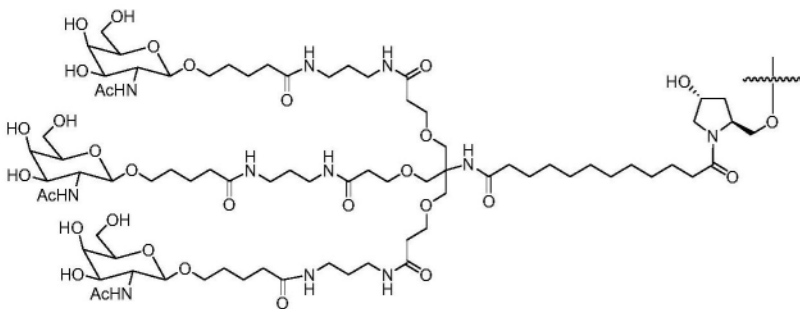
[0247] v. 基于肽的裂解基团

[0248] 在又一实施方案中,可裂解接头包含基于肽的可裂解连接基团。基于肽的可裂解连接基团通过细胞中的酶例如肽酶和蛋白酶而被裂解。基于肽的可裂解连接基团是在氨基酸之间形成的肽键以产生寡肽(例如二肽、三肽等)和多肽。基于肽的可裂解基团不包括酰胺基团(-C(O)NH-)。酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是氨基酸之间形成以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的裂解基团通常被限定为为产生肽及蛋白质而在氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键),而不包括完整酰胺官能团。基于肽的可裂解连接基团具有通式-NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-,其中R^A和R^B是两个相邻氨基酸的R基团。这些候选物可以使用与上述方法类似的方法进行评估。

[0249] 在一个实施方案中,本发明的iRNA通过接头与糖类缀合。本发明的组合物和方法的具有接头的iRNA糖类缀合物的非限制性实例包括但不限于,

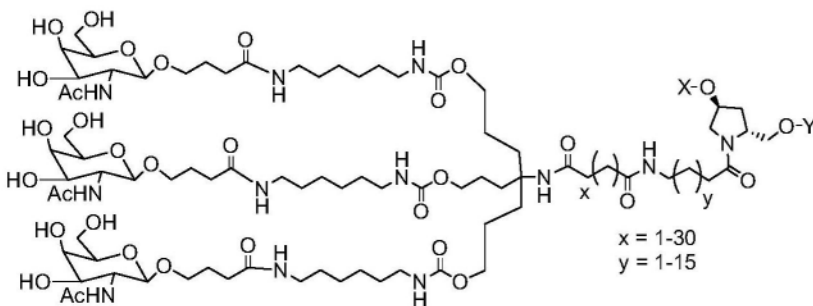


(式 XXIV)、

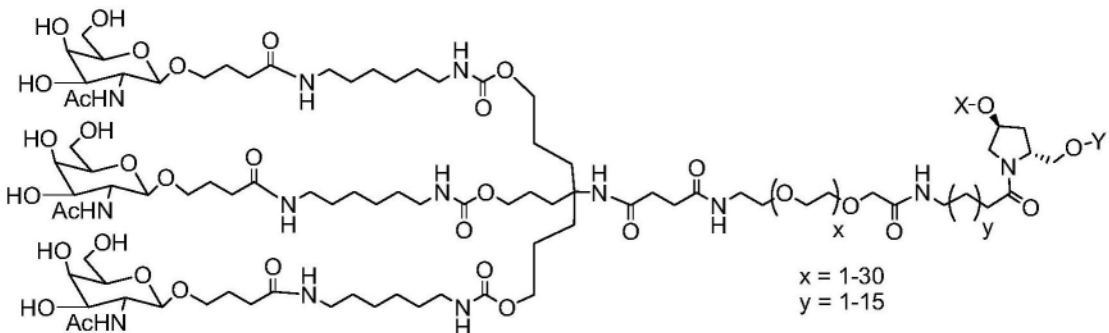


(式 XXV)、

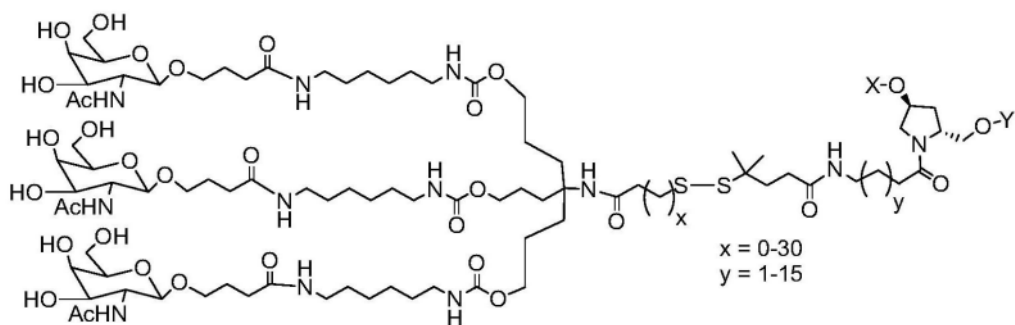
[0250]



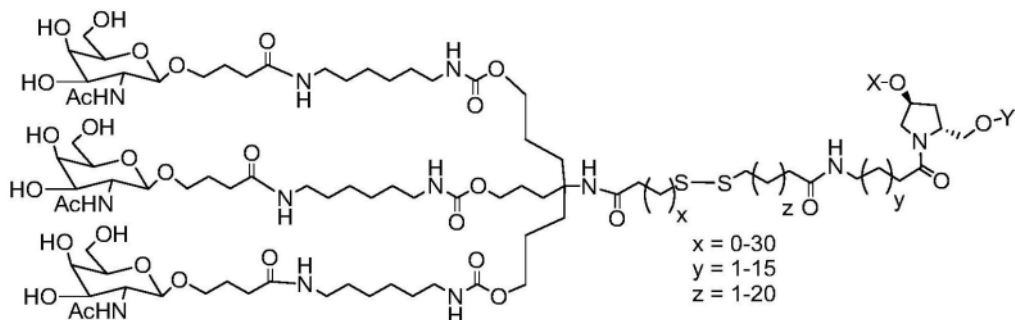
(式 XXVI)、



(式 XXVII)、

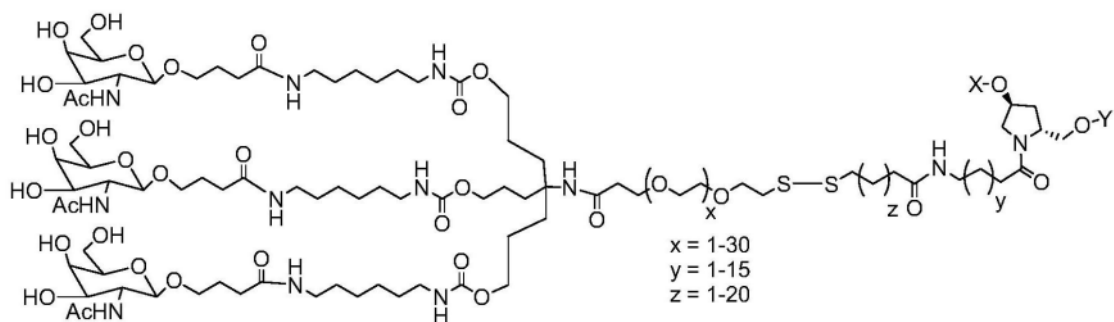


(式 XXVIII)、

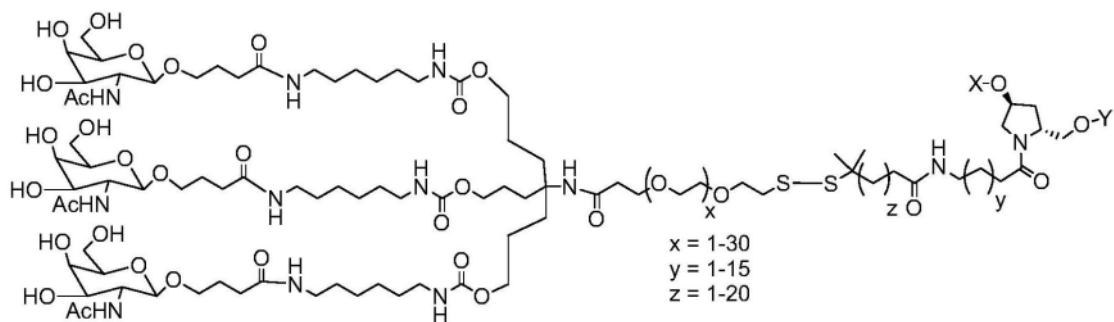


(式 XXIX)、

[0251]



(式 XXX)、和



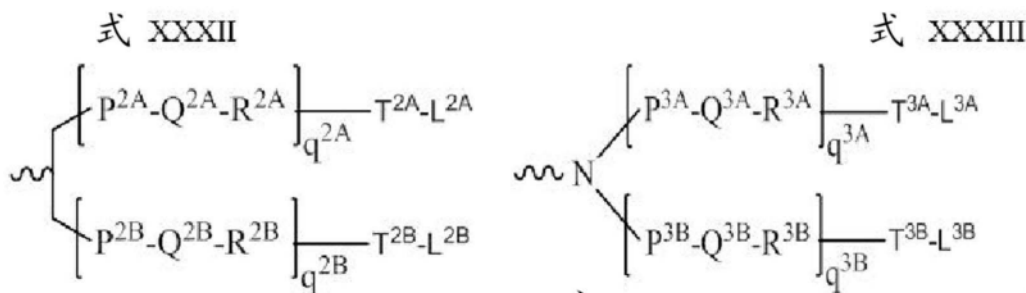
(式 XXXI)、

[0252] 当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

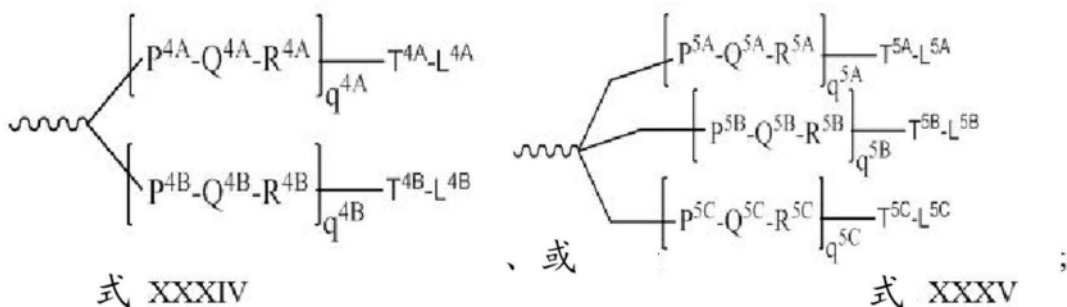
[0253] 在本发明的组合物和方法的某些实施方案中,配体是通过二价或三价支链接头所连接的一个或多个“GalNAc”(N-乙酰半乳糖胺)衍生物。

[0254] 在一个实施方案中,本发明的dsRNA缀合至选自式 (XXXII) - 式 (XXXV) 中任一个所

示结构的组的二价或三价分支接头：



[0255]



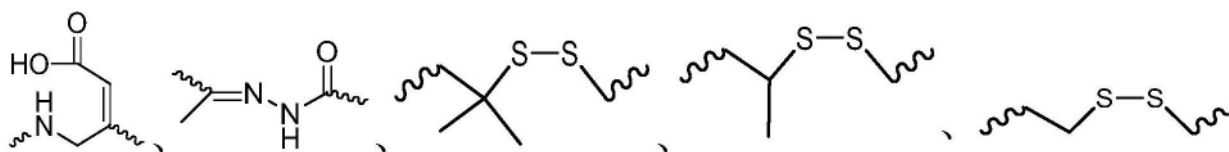
[0256] 其中：

[0257] $q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ 和 $q^{5\text{C}}$ 每次出现时， $q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ 和 $q^{5\text{C}}$ 独立地表示0至20，并且其中的重复单元可以是相同的或不同的；

[0258] $P^{2\text{A}}$ 、 $P^{2\text{B}}$ 、 $P^{3\text{A}}$ 、 $P^{3\text{B}}$ 、 $P^{4\text{A}}$ 、 $P^{4\text{B}}$ 、 $P^{5\text{A}}$ 、 $P^{5\text{B}}$ 、 $P^{5\text{C}}$ 、 $T^{2\text{A}}$ 、 $T^{2\text{B}}$ 、 $T^{3\text{A}}$ 、 $T^{3\text{B}}$ 、 $T^{4\text{A}}$ 、 $T^{4\text{B}}$ 、 $T^{5\text{A}}$ 、 $T^{5\text{B}}$ 、 $T^{5\text{C}}$ 每次出现时各自独立地表示：不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH或CH₂O；

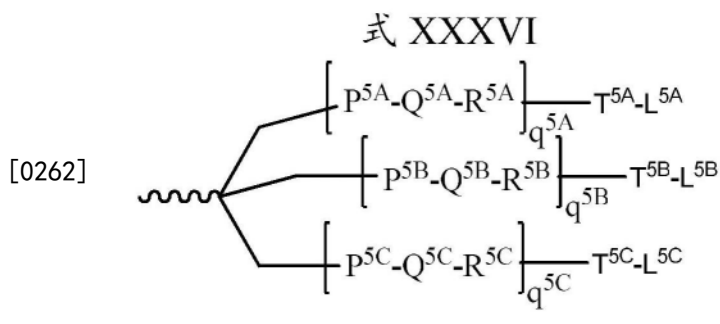
[0259] $Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ 每次出现时独立地表示：不存在、亚烷基、取代的亚烷基，其中一个或多个亚甲基可被如下一个或多个基团所中断或终止：O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C或C(O)；

[0260] $R^{2\text{A}}$ 、 $R^{2\text{B}}$ 、 $R^{3\text{A}}$ 、 $R^{3\text{B}}$ 、 $R^{4\text{A}}$ 、 $R^{4\text{B}}$ 、 $R^{5\text{A}}$ 、 $R^{5\text{B}}$ 、 $R^{5\text{C}}$ 每次出现时独立地表示：不存在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、



或杂环基；

[0261] $L^{2\text{A}}$ 、 $L^{2\text{B}}$ 、 $L^{3\text{A}}$ 、 $L^{3\text{B}}$ 、 $L^{4\text{A}}$ 、 $L^{4\text{B}}$ 、 $L^{5\text{A}}$ 、 $L^{5\text{B}}$ 和 $L^{5\text{C}}$ 表示配体，即，每次出现时各自独立地为单糖（例如GalNAc）、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖；并且R^a是H或氨基酸侧链。三价缀合的GalNAc衍生物与RNAi剂合用对于抑制靶基因的表达是特别有用的，例如式(XXXVI)的那些：



[0263] 其中 L^{5A} 、 L^{5B} 和 L^{5C} 表示单糖,例如GalNAc衍生物。

[0264] 合适的缀合GalNAc衍生物的二价和三价分支接头的实例包括但不限于,上文列举的如式II、式VII、式XI、式X、和式XIII所示的结构。

[0265] 教导了RNA缀合物制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第4,828,979号、第4,948,882号、第5,218,105号、第5,525,465号、第5,541,313号、第5,545,730号、第5,552,538号、第5,578,717号、第5,580,731号、第5,591,584号、第5,109,124号、第5,118,802号、第5,138,045号、第5,414,077号、第5,486,603号、第5,512,439号、第5,578,718号、第5,608,046号、第4,587,044号、第4,605,735号、第4,667,025号、第4,762,779号、第4,789,737号、第4,824,941号、第4,835,263号、第4,876,335号、第4,904,582号、第4,958,013号、第5,082,830号、第5,112,963号、第5,214,136号、第5,082,830号、第5,112,963号、第5,214,136号、第5,245,022号、第5,254,469号、第5,258,506号、第5,262,536号、第5,272,250号、第5,292,873号、第5,317,098号、第5,371,241号、第5,391,723号、第5,416,203号、第5,451,463号、第5,510,475号、第5,512,667号、第5,514,785号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,595,726号、第5,597,696号、第5,599,923号、第5,599,928号、第5,688,941号、第6,294,664号、第6,320,017号、第6,576,752号、第6,783,931号、第6,900,297号、第7,037,646号、第8,106,022,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0266] 没有必要对给定化合物中的所有位置进行统一修饰,实际上可将超过一种的前述修饰并入单个化合物中或甚至并入iRNA的单个核苷处。本发明还包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0267] VI. 本发明的iRNA的递送

[0268] 将本发明的iRNA递送至细胞,例如人类受试者(例如,有需要的受试者,例如患有与接触激活途径基因表达相关的疾病、障碍或病症的受试者)内的细胞,可以以多种不同的方式来实现。例如,可以通过使细胞与本发明的iRNA在体外或体内接触来进行递送。还可以通过将包含iRNA(例如,dsRNA)的组合物施用于受试者来直接进行体内递送。例如,可以通过静脉内施用或皮下施用来进行递送。在某些实施方案中,iRNA剂通过皮下施用来递送。在某些实施方案中,iRNA剂通过使用预填充注射器或自动注射器装置的自我施用来施用。

[0269] 通常,任何递送核酸分子的方法(体外或体内)都可适用于与本发明的iRNA一起使用(参见例如Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell Biol. 2 (5):139-144和W09402595,其全部内容通过引用整体并入本文)。对于体内递送,递送iRNA分子要考虑的因素包括,例如,所递送分子的生物稳定性、非特异性效应的预防、以及所递送的分子在靶组织中的积累。

[0270] VII. 本发明的药物组合物

[0271] 本发明还包括药物组合物和制剂,其包含本文所述的用于本发明方法的iRNA。在一个实施方案中,本文提供了包含如本文所述的iRNA和药学上可接受的载体的药物组合物。含有iRNA的药物组合物可用于治疗与TTR基因的表达或活性相关的疾病或病症。此类药物组合物是根据递送方式来配制的。一个实例是将组合物配制为用于系统性施用,所述施用通过肠胃外递送,例如,通过皮下(SC)递送或静脉内(IV)递送。本发明的药物组合物可以足以抑制TTR基因表达的剂量施用。在一个实施方案中,将本发明的iRNA剂例如dsRNA剂配制在药学上可接受的载体中以用于皮下施用。

[0272] 在其他实施方案中,单剂量的药物组合物可以是长效的,使得后续剂量以1个月的间隔、不超过1、2、3或4个月的间隔,或以季度(约每三个月)的间隔施用。在本发明的一些实施方案中,每个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。在本发明的其他实施方案中,每隔一个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。在其他实施方案中,每季度施用一次,即约每三个月一次单剂量的本发明的药物组合物。在其他实施方案中,每四个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。在另一实施方案中,每五个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。在其他实施方案中,每六个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。在其他实施方案中,每十二个月施用一次单剂量的本发明的药物组合物。

[0273] VIII. 试剂盒

[0274] 本发明还提供了用于执行任何本发明的方法的试剂盒。此类试剂盒包括一种或多种双链RNAi剂和提供了双链试剂的使用说明以用于任何本发明的方法中的标签。试剂盒还可以任选地包括用于使细胞与RNAi剂接触的构件(例如,注射装置或输液泵),或用于测量对TTR的抑制的构件(例如,用于测量对TTR mRNA或TTR蛋白的抑制的构件)。此类用于测量对TTR的抑制的构件可以包括用于从受试者获得样本例如血浆样本的构件。本发明的试剂盒还可以任选地包括用于将RNAi剂施用于受试者的构件或用于确定治疗有效量或预防有效量的构件。

[0275] RNAi剂可以以任何方便的形式提供,例如在无菌水中的溶液或其他合适的溶液,例如PBS、生理盐水、5mM磷酸盐缓冲液,用于重悬和注射。例如,RNAi剂可以以300mg、200mg、100mg或50mg的小瓶形式提供,其中装有水或其他合适的无菌注射用水溶液。在某些实施方案中,RNAi剂以用于自我施用的试剂盒提供,所述试剂盒包括预填充注射器或自动注射器,所述注射器含有用于施用的在适当体积的赋形剂中的300mg、200mg、100mg或50mg的RNAi剂,任选地还包括使用说明。在某些实施方案中,可以在多个小瓶或装置中提供RNAi剂,以用于通过在约同一时间(例如在一周内、一天内、一小时内)给予的多次注射来施用剂量。

[0276] IX. TTR淀粉样变性多发性神经病变的诊断和疾病负担评估

[0277] TTR淀粉样变性是一种复杂的多因素疾病。已使用扩展的标准列表来监测TTR-FAP的进展:神经病变损伤评分(NIS)、NIS+7和改良的NIS(mNIS)+7和mNIS+7_{Ionis}。这些诊断标准在本领域中是众所周知的并且下文提供了这些标准的重点。如本文所用,满足TTR-FAP的诊断标准被理解为满足FAP 1期标准,无论是否存在与遗传性TTR-FAP相关的突变。神经病变指标的进展被认为是在改良的神经病变损伤评分(mNIS)+7中至少两分的增加。

[0278] 家族性淀粉样变性多发性神经病变(FAP)阶段

[0279] Coutinho等人为hATTR(以前被称为家族性淀粉样蛋白神经病变)的神经病变症状

开发了一种临床分期系统。分级范围为1至3,如下所示(Ando et al.Orphanet J Rare Dis.2013;8:31):

[0280] FAP阶段1:在没有辅助的情况下行走,下肢轻度神经病变(感觉、自主神经和运动)。

[0281] FAP阶段2:在辅助下行走,下肢、躯干和上肢中度损伤。

[0282] FAP阶段3:轮椅或卧床,严重的神经病变。

[0283] 没有神经病变的受试者被认为是FAP 0期。

[0284] 神经病变损伤评分方法

[0285] 评估神经病变的方法是本领域已知的。例如,在Mayo门诊神经病学检查表以及神经病变损伤评分(NIS)的无力子评分中,无力(NIS-W)分别针对身体每侧的主要肌肉群,以25%的递减方式从1到4分进行评分(Dyck et al.,Quantitating overall neuropathic symptoms,impairments,and outcomes.In:Dyck PJ,Thomas PK,editors.Peripheral neuropathy.4th ed.Philadelphia:Elsevier;2005.p.1031-52)。在NIS-W中评估了一个广泛的组,特别是头部、近端和远端肢体肌肉,最高分数为192分。主要5种肌牵张反射的减少通常由神经科医生来评估,并且在Mayo门诊神经病学检查表中针对脚和手的触觉压力、振动、关节运动和针刺感,以25%的递减方式从1到4分进行评分。为了完成反射的NIS(NIS-R)和感觉的NIS(NIS-S),将Mayo门诊记录分数转换为NIS分数(即,Mayo门诊评分为1或2的NIS评分为1,Mayo门诊评分为3或4的NIS评分为2)。因此,由神经科医生评估的通常反射的最大NIS分评分(NIS-R)为 $5 \times 2 \times 2 = 20$ 分,而经常由神经科医生评估的4种感觉模式(NIS-S)的最高NIS分数为 $8 \times 2 \times 2 = 32$ 分。因此,最高的NIS分数为: $192 + 20 + 32 = 244$ 分。已在之前的出版物中对NIS进行了描述(Dyck et al.2005and Dyck et al.,Neurol.1997;49:229-39)。

[0286] NIS+7已被用作糖尿病感觉运动性多发性神经病变、TTR FAP和其他全身性感觉运动性多发性神经病变的试验的主要或共同主要的结果测量指标(N.Suanprasert et al.J Neurol Sci 344 (2014) 121-128)。NIS+7充分评估了肌肉无力和肌肉牵张反射异常的分级的严重程度,其中反射的天花板效应很小。在NIS+7中,7项测试中有5项是神经传导的属性——表示为正常偏差(Z分数)或分数。选择NIS+7中包含的属性是因为它们能异常敏感地检测出糖尿病感觉运动性多发性神经病变((Dyck et al.Muscle Nerve 2003;27 (2):202-10)。包括的属性是腓神经复合肌肉动作电位(CMAP)振幅、运动神经传导速度(MNCV)和运动神经远端潜伏期(MNDL)、胫骨MNDL和腓肠感觉神经动作电位(SNAP)振幅。根据早期对大型健康受试者参考队列的研究,他们的测量值可以转换为对年龄、性别、身高或体重等适用变量进行校正的百分位值的正常偏差。此外,这些百分位值可以根据获得的百分位值表示为NIS分数(即, $N5th = 0$ 分; $\leq 5th - N1st = 1$ 分和 $\leq 1st = 2$ 分(当异常出现在正态分布的上尾时也是如此)。

[0287] 在TTR FAP的试验中,使用NIS+7不能充分评估无力和反射异常、感觉丧失、自主神经功能障碍和神经生理学测试异常。在NIS+7中,感觉丧失没有得到最佳评估:1)没有充分考虑感觉丧失的身体分布,2)与小的纤维感觉丧失相比,过分强调了大的感觉丧失,以及3)改良的测试方法和与参考值的比较优于临床评估。此外,仅使用深呼吸心率(HRdb)无法充分评估自主神经功能障碍。用于评估NIS+7的神经传导属性对于TTR FAP的研究并不理想。

[0288] 改良的神经病变损伤评分+7(mNIS+7)和NIS+7的更新版,是衡量运动强度、反射、

感觉、神经传导和自主神经功能的综合评分。这种复合测量的两个版本改编自NIS+7,以更好地反映伴有多发性神经病变的hATTR淀粉样变性,并已被用作inotersen和patisiran临床试验的主要结果。下表总结了这两个版本和其他神经病变评分系统之间的主要区别(来自Adams et al.,BMC Neurology,volume 17,Article number:181(2017))。在这两个量表中,较低的分数代表更好的神经功能(例如,分数的增加反映了神经功能障碍的恶化)。

[0289] 神经病变损伤评分标准

	NIS-LL	NIS	NIS+7	mNIS+7	mNIS+7 _{Ionis}
总评分	88	244	270	304	346.3
评估 (评分)					
运动强度/ 无力	神经系统检查[仅下肢] (64)	神经系统检查 (192)	神经系统检查 (192)	神经系统检查 (192)	神经系统检查 (192)
反射	神经系统检查[仅下肢] (8)	神经系统检查 (20)	神经系统检查 (20)	神经系统检查 (20)	神经系统检查 (20)
[0290]	-	-	-	QST-多处的热痛和触压 (80)	QST-多处的热痛和触压 (80)
感觉	神经系统检查[仅下肢] (16)	神经系统检查 (32)	神经系统检查 (32)	-	神经系统检查 (32)
	-	-	颤动检测阈值 (3.7)	-	-
复合神经	-	-	Σ 5- 腓 肠	Σ 5- 尺 骨	Σ 5- 尺 骨

传导评分	SNAP/腓骨神 CMAP 和 CMAP 和 经 CMAP、胫 SNAP、腓骨 SNAP、腓骨 骨运动神经远 (peroneal) °CMAP、胫 端潜伏期、运 °CMAP、胫骨 骨 CMAP、腓 动神经传导速 CMAP、腓肠 肠 SNAP 度、运动神经 SNAP (10) ^b (18.6) ^a 远端潜伏期 (18.6) ^a
[0291]	
自主功能	响应于深呼吸 体位性血压 响应于深呼 的心脏速率 (2) ^b 吸的心脏速 (3.7) ^a 率 (3.7) ^a

[0292] 1. CMAP复合肌肉动作电位;检查(exam)检查(examination);mNIS+7改良的NIS+7;NIS神经病变损伤评分;NIS-LL仅基于下肢检查的NIS;QST定量感觉测试;SNAP感觉神经动作电位

[0293] 2. ^a表示为基于健康受试者的参数的正常偏离(0-3.72)的评分

[0294] 3. ^b根据定义的类别分级的评分:正常(第95百分点)=0分;轻度减少(≥第95百分点至<第99百分点)=1分;剧烈减少(≥第99百分点)=2分

[0295] 4. ^c也可被称为腓骨(fibular)

[0296] TTR淀粉样变性心肌病(ATTR-CM)的诊断和疾病负担评估

[0297] 患有hATTR淀粉样变性和心肌病的患者通常会出现心力衰竭(HF)和心律失常的进展性症状,通常在诊断后2.5至5年死亡。TTR淀粉样蛋白原纤维对胞外基质的心脏浸润导致心室壁厚度的逐渐增加和心室僵硬度的显著增加,从而导致舒张功能受损。收缩功能也受损,通常表现为纵向应变异常,尽管射血分数正常,这种情况一直持续到疾病的晚期。在ATTR淀粉样变性和轻链(AL)心脏淀粉样变性患者中,纵向应变和N末端B型利钠肽原(NT-proBNP)已被证明是存活的独立预测因子。

[0298] 超声心动图通常用于评估心脏结构和功能;统计分析计划中预先指定的参数包括平均左心室(LV)壁厚、LV质量、纵向应变和射血分数。心输出量、左心房大小、LV舒张末期容积(LVEDV)和LV收缩末期容积(LVESV)。超声心动图通常用于心脏成像。可以使用独立于供应商的软件(TOMTEC, Munich, Germany)通过散斑跟踪评估心肌应变。对NT-proBNP和肌钙蛋白I水平的分析通常在临床实验室中使用市售的诊断性测试进行,例如,使用化学发光测定法(用于NT-proBNP的Roche Diagnostic Cobas, Indianapolis, IN, USA;用于肌钙蛋白I的Siemens Centaur XP, Camberley, Surrey, UK)。类似地,临床实践通常包括测量肌酐水平和基于肌酐水平估算的肾小球滤过率(eGFR),例如,使用肾脏疾病饮食改良研究公式(Modification of Diet in Renal Disease study formula)。

[0299] Witteles et al., 2019(JACC:Heart Failure, 2019.7:709-716)最近发表了一篇提供ATTR-CM筛查和诊断方法的综述,其中提供了有关诊断方法的信息,包括提示ATTR-CM存在的“危险信号”列表和筛查方法,包括超声心动图、心电图、心脏磁共振,以下症状的存

在：伴随心脏功能障碍的涉及外周或自主神经系统的全身症状，包括从下肢开始并随后遵循上升模式的双侧感觉运动性多发性神经病变，直立性低血压、腹泻/便秘和勃起功能障碍形式的自主神经功能障碍，以及青光眼、玻璃体内沉积和扇形瞳孔等眼部受累；腕管综合征，尤其是双侧腕管综合征，腰椎管狭窄症，二头肌腱断裂。其他诊断方法包括使用锝 (Tc) 标记的双膦酸盐进行骨闪烁显像定位TTR心脏淀粉样蛋白沉积，原因尚不清楚。活组织检验也用于确认心脏中是否存在TTR淀粉样变性。

[0300] 对于上述提供的参数的心脏功能进行评估和分类的方法是本领域已知的。如本文所用，对心脏功能进行评估或分类的具体方法可以是任何临床上可接受的标准，以证明心脏功能充分降低，以致护理标准包括医学干预，例如，施用药剂、进行手术。

[0301] 血清生物标志物作为神经损伤和TTR淀粉样变性进展的指标

[0302] 上面提出的诊断和监测方法很复杂并且通常是主观的。此外，由于TTR淀粉样变性很罕见，并且上述体征和症状可能存在于许多其他疾病中，因此经临床验证的非侵入性血浆生物标志物可促进早期诊断并有助于监测疾病进展。在Ticau et al., 2019的一项研究中 (参见www.medrxiv.org/content/10.1101/19011155v2.full.pdf)，在3期APOLLO研究 (NCT01960348) 的接受安慰剂或patisiran治疗的伴有多发性神经病变的hATTR淀粉样变性患者和一组健康个体中测量了>1000种蛋白质的血浆水平。在第0、9和18个月时，通过线性混合模型确定使用patisiran (一种抑制TTR肝脏表达的脂质配制的RNAi剂) 治疗对每种蛋白质的时间分布的影响。使用正交定量方法进一步评估神经丝轻链 (NfL) 蛋白。与安慰剂组相比，从patisiran组观察到66种蛋白质水平的显著变化，其中NfL (神经元损伤的标志物) 的变化最为显著。对蛋白质水平变化的分析表明，接受patisiran治疗的患者的蛋白质组在18个月时趋向于健康个体。健康对照组的血浆NfL水平比患有伴多发性神经病变的TTR淀粉样变性患者低四倍 (16.3 [SD 12.0] pg/mL vs 69.4 [SD 42.1] pg/mL, $p < 10^{-16}$)。在18个月时，安慰剂组的NfL水平升高 (99.5 [SD 60.1] pg/mL)，patisiran治疗组的NfL水平降低 (48.8 [SD 29.9] pg/mL)。在18个月时，patisiran治疗的患者的改良神经病变损伤评分+7 (mNIS+7) 的改善与NfL水平的降低是显著相关的 ($R = 0.43$, $p < 10^{-7}$)。patisiran治疗导致的NfL的降低与mNIS+7改善相关，这表明NfL可以作为TTR淀粉样变性中神经损伤和多发性神经病变的生物标志物。这种生物标志物可使hATTR淀粉样变患者的多神经病变的早期诊断成为可能，并有助于监测疾病进展。

[0303] 已发现其他蛋白质 (尤其是RSP03、CCDC80、EDA2R和NT-proBNP) 水平的降低与mNIS+7的改善相关，这表明，无论是单独还是与其他蛋白质或NfL组合，这些蛋白质都可以用作ATTR淀粉样变性中神经损伤和多发性神经病变的生物标志物。已发现N-CDase水平的升高与mNIS+7的改善相关，这表明无论是单独或与上面列出的其他标志物组合，N-CDase都可以用作ATTR淀粉样变性中神经损伤和多发性神经病变的生物标志物。

[0304] 下表列出了被观察到响应于patisiran治疗而发生变化的其他潜在生物标志物。当受试者具有与指示ATTR淀粉样变性进展的参考水平相比正 β 系数的蛋白质水平增加时，以及当受试者具有与指示ATTR淀粉样变性进展的参考水平相比负 β 系数的蛋白质水平降低时。一种或多种这些标志物水平的变化可以是ATTR淀粉样变性中持续的神经损伤和多发性神经病变进展的改善、稳定或减少的标志。

[0305] 表1. 响应于patisiran治疗而发生水平变化的生物标志物

[0306]

蛋白质	β 系数	$-\log_{10}(\text{p-值})$	蛋白质	β 系数	$-\log_{10}(\text{p-值})$
NfL	0.55	20.40	LDLR	-0.20	5.85
RSPO3	0.53	18.43	NOV	0.19	5.83
CCDC80	0.40	17.28	CD160	0.16	5.69
EDA2R	0.25	17.10	PI3	0.19	5.61
N-CDase	-0.25	15.17	SMOC1	0.12	5.61
NT-proBNP	0.62	13.15	TFPI-2	0.22	5.54
	0.46	11.43	LEP	-0.38	5.49
WNT9A	0.20	10.78	TNFRSF19	0.16	5.47
SMOC2	0.14	10.33	ERBB3	-0.07	5.44
PTN	0.39	9.20	DUA	-0.14	5.43
HGF	0.17	9.02	IL-4RA	0.13	5.33
	0.14	6.13	REN	-0.24	5.31
NELL1	-0.16	8.98	CES2	-0.15	5.23
DCN	0.10	8.90	CR2	0.15	5.23
ARSA	-0.23	8.86	PSG1	0.21	5.20
KLK4	0.27	8.66	FGF-BP1	0.11	5.19
GPC1	0.18	8.57	OPN	0.18	5.18
SFRP	0.21	8.41	TFF3	0.17	5.08
DRAXIN	0.20	8.11	ANGPT2	0.15	5.05
IL-18R1	-0.15	7.82	CCL24	-0.17	5.05
BNP	0.48	7.81	LAYN	0.13	5.02
GFR-alpha1	0.17	7.69	FUCA1	-0.11	4.97
CXCL9	0.31	7.42	AXL	0.11	4.95
TIMD4	-0.21	7.02	TLR3	-0.10	4.94
RSPO1	0.16	6.94	SCARB2	0.12	4.90
MYOC	0.21	6.94	B4GAT1	-0.09	4.83
WFDC2	0.11	6.76	SORCS2	0.15	4.65
GUSB	-0.27	6.71	CD300E	0.18	4.63
HSPB6	0.19	6.70	CD27	0.10	4.62
MFGE8	-0.21	6.68	SPON1	0.10	4.58
SMPD1	-0.15	6.59	IGFBP-2	0.15	4.58
FLT1	0.09	6.29	DNER	-0.07	4.57
CTSD	-0.13	6.06	RARRES1	0.09	4.57
CD209	-0.11	5.85	Dkk-4	0.15	4.49

[0307] 这些生物标志物的序列在本文中作为SEQ ID NO:17-34提供。

[0308] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例不应被解释为限制性的。在整个申请中引用的所有参考文献和公开的专利和专利申请以及序列表的内容都通过引用并入本文。

[0309] 实施例

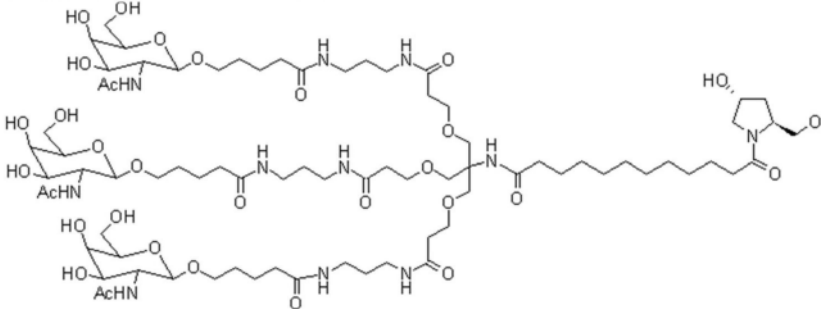
[0310] 在下表3中提供了用于本发明的方法的示例性双链RNAi剂。下表2提供了用于核酸序列表示的核苷酸单体和配体的缩写。应当理解,除非另有说明,当这些单体存在于寡核苷酸中时,其是通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接的。

[0311] 表2. 核苷酸单体和配体的缩写

[0312]

缩写	核苷酸(s)和配体
A	腺苷-3'-磷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸
As	腺苷-3'-硫代磷酸
C	胞苷-3'-磷酸
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸
G	鸟苷-3'-磷酸
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
U	尿苷-3'-磷酸
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸
Us	尿苷-3'-硫代磷酸
N	任何核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸

[0313]

缩写	核苷酸(s)和配体
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
s	硫代磷酸酯键
L96	N-[三(GalNAc-烷基)-氨基癸酰基]-4-羟脯氨酸 (Hyp-(GalNAc-烷基)3) 
(Agn)	腺苷-二醇核酸 (GNA)
(Cgn)	胞苷-二醇核酸 (GNA)
(Ggn)	鸟苷-二醇核酸 (GNA)
(Tgn)	胸苷-二醇核酸 (GNA) S-异构体

[0314] 表3. 靶向TTR的RNAi剂的有义链和反义链的经修饰的核苷酸序列

[0315]

双链体 ID	链	经修饰的寡核苷酸序列(5'-3')	SEQ ID NO:
AD-65492	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	反义	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	11
AD-87400	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	反义	usCfs(Tgn)ugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	12
AD-87401	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
	反义	usCfsu(Tgn)gGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	13

[0316]	双链体 ID	链	经修饰的寡核苷酸序列(5'-3')	SEQ ID NO:
	AD-87402	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
		反义	usCfsuu(Ggn)GfuuAfcaugAfaAfucccasusc	14
	AD-87403	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
		反义	usCfsuug(Ggn)uuAfcaugAfaAfucccasusc	15
	AD-87404	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
		反义	usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc	7
	AD-87405	有义	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96	10
		反义	usCfsuugGfu(Tgn)AfcaugAfaAfucccasusc	16

[0317] 实施例1:在V30M转基因小鼠中通过RNAi剂敲低TTR蛋白

[0318] V30M突变是人类TTR中常见的淀粉样原性突变。研究中使用了缺乏小鼠TTR并表达具有V30M突变的人TTR的转基因小鼠。对小鼠(每组n=3)皮下施用单次1mg/kg剂量的RNAi剂AD-65492(先前公开于W02018112320中),或基于AD-65492的序列和化学性质的其他RNAi剂,其中反义链单个位置的化学修饰被改变为GNA修饰,如上表2所示。在第0天(给药前)、第3、7、10、14、21、35和49天采集血样。制备血清并使用ELISA分析法测定人TTR水平(参见例如Coelho,et al.(2013)N Engl J Med 369:819)。图1显示了与第0天相比的相对TTR水平。

[0319] GNA在反义链的位置7或位置8的并入具有良好的耐受性(AD-87404和AD-87405)。相似的动力学并且最大蛋白质敲低与亲本RNAi剂AD-65492相似。通过AD-87404敲低的持久性与AD-65492相似。GNA在反义链的位置3-6的并入具有较差的耐受性。

[0320] 实施例2:在非人类灵长类动物中通过RNAi剂敲低TTR蛋白

[0321] 表2中iRNA剂的序列与食蟹猴TTR发生完全交叉反应。在三项独立研究中,在第0天对食蟹猴(每组n=3)皮下施用单次剂量的AD-65492(1mg/kg)或AD-87404(1mg/kg或3mg/kg)。如图2所示,在第-7天(给药前7天)至第119天收集不同时间的血样。制备血清并使用ELISA分析法测定食蟹猴TTR水平(参见例如Coelho,et al.(2013)N Engl J Med 369:819)。图2显示了与第0天相比的相对TTR水平。在施用1mg/kg AD-65492和3mg/kg AD-87404的猴子中,TTR的敲低是相似的。

[0322] 实施例3:向健康人类受试者施用单剂量AD-87404

[0323] 在一项I期、随机、单盲、安慰剂对照研究中,将AD-87404(有义:5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3'(SEQ ID NO:6),其中L96配体缀合至有义链的3'末端);反义:5'-usCfsuugGf(Tgn)uAfcaugAfaAfucccasusc-3'(SEQ ID NO:7))以25mg、75mg、100mg、200mg或400mg的单次剂量,以及可能的600mg、700mg、900mg和1000mg的剂量组,施用于健康人类志愿者。根据相关人口统计特征(例如年龄、性别、体重)对各组进行平衡。

[0324] 也给人口统计学匹配的对照受试者施用了单次剂量的安慰剂。

[0325] 以预定的时间间隔,例如第1、2、3、8、15、22、29、43、57、90天收集血浆样本并使用ELISA分析法测定来自安慰剂组的受试者和所有治疗组的受试者的样本中的TTR蛋白水平(参见例如Coelho,et al.(2013)N Engl J Med 369:819),然后,对于积极治疗组的受试

者,每28天收集并测定一次,直到TTR水平恢复到治疗前水平的80%(直至给药后约一年)。确定敲低的水平和持续时间。

[0326] 还监测了AD-87404组和对照组中的受试者的不良事件。研究中监测到的示例性不良事件包括但不限于注射部位红斑、注射部位疼痛、瘙痒、咳嗽、恶心、疲劳和腹痛,以及体检、心电图、生命体征或临床实验室参数的临床显著变化,例如,肾功能、血液学参数和肝功能(例如,丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST))。

[0327] 这项研究的结果表明,皮下单次剂量的AD-87404以剂量依赖性方式有效且持久地降低了TTR蛋白水平。

[0328] 还考虑进行多剂量研究和多次递增剂量的研究,同时监测血清中的TTR蛋白敲低和不良事件。

[0329] 等同物

[0330] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定与本文所述具体实施方案和方法等同的多种实施方案和方法。此类等同的实施方案和方法旨在包含在下述权利要求的范围内。

序列表

<110> 阿尔尼拉姆医药品有限公司

<120> 用于抑制转甲状腺素蛋白 (TTR) 的表达的组合物和方法

<130> 121301-12320

<140>

<141>

<150> 62/985,950

<151> 2020-03-06

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<400> 1

000

<210> 2

<400> 2

000

<210> 3

<400> 3

000

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<400> 5

000

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源(source)

<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")

<400> 6

ugggauuuca uguaaccaag a 21

<210> 7

<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="组合的DNA/RNA分子描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide")
<400> 7
ucuuggtuac augaaaucac auc 23
<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 8
ugggauuua uuaaaccaag a 21
<210> 9
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 9
ucuugguuac augaaaucac auc 23
<210> 10
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 10
ugggauuuuca uguaaccaag a 21
<210> 11
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 11
ucuuggguuac augaaaucac auc 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="组合的DNA/RNA分子描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide")
<400> 12
uctuggguuac augaaaucac auc 23
<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="组合的DNA/RNA分子描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide")
<400> 13
ucutgguuac augaaaucce auc 23
<210> 14
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 14
ucuugguuac augaaaucce auc 23
<210> 15
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源(source)
<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")
<400> 15
ucuugguuac augaaaucce auc 23
<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> 来源(source)

<223> /注释="人工序列描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide")

<220>

<221> 来源(source)

<223> /注释="组合的DNA/RNA分子描述:合成寡核苷酸"(/note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide")

<400> 16

uccuuggutac augaaaucac auc 23

<210> 17

<211> 543

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 17

Met	Ser	Ser	Phe	Ser	Tyr	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Lys	Arg
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Val	Glu	Thr	Pro	Arg	Val	His	Ile	Ser	Ser	Val	Arg	Ser	Gly
			20					25					30		
Tyr	Ser	Thr	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ala	Pro	Val	Ser
			35				40					45			
Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Arg	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu
		50				55					60				
Met	Pro	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Ala	Ile	Ser
65				70					75					80	
Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	Ile	Arg	Thr	Gln	Glu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gln	Asp
				85				90					95		
Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Val	His	Glu	Leu	Glu
			100					105					110		
Gln	Gln	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Arg	Gln	Lys
			115					120					125		
His	Ser	Glu	Pro	Ser	Arg	Phe	Arg	Ala	Leu	Tyr	Glu	Gln	Glu	Ile	Arg
			130				135				140				
Asp	Leu	Arg	Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Thr	Asn	Glu	Lys	Gln	Ala	Leu
145				150					155					160	
Gln	Gly	Glu	Arg	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Asn	Leu	Gln	Ala
				165				170					175		
Arg	Tyr	Glu	Glu	Glu	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	Asp	Ala	Glu	Gly	Arg	Leu

180	185	190
Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Asp	Glu Ala Ala Leu Ala Arg Ala Glu	
195	200	205
Leu Glu Lys Arg Ile Asp Ser Leu Met Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys		
210	215	220
Lys Val His Glu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Tyr		
225	230	235
Ala Gln Ile Ser Val Glu Met Asp Val Thr Lys Pro Asp Leu Ser Ala		
245	250	255
Ala Leu Lys Asp Ile Arg Ala Gln Tyr Glu Lys Leu Ala Ala Lys Asn		
260	265	270
Met Gln Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr		
275	280	285
Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu		
290	295	300
Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ile Glu		
305	310	315
Ala Cys Arg Gly Met Asn Glu Ala Leu Glu Lys Gln Leu Gln Glu Leu		
325	330	335
Glu Asp Lys Gln Asn Ala Asp Ile Ser Ala Met Gln Asp Thr Ile Asn		
340	345	350
Lys Leu Glu Asn Glu Leu Arg Thr Thr Lys Ser Glu Met Ala Arg Tyr		
355	360	365
Leu Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile		
370	375	380
Glu Ile Ala Ala Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Thr Arg Leu		
385	390	395
Ser Phe Thr Ser Val Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Gln Ser Ser		
405	410	415
Gln Val Phe Gly Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Thr Ser Ser Tyr		
420	425	430
Leu Met Ser Thr Arg Ser Phe Pro Ser Tyr Tyr Thr Ser His Val Gln		
435	440	445
Glu Glu Gln Ile Glu Val Glu Glu Thr Ile Glu Ala Ala Lys Ala Glu		
450	455	460
Glu Ala Lys Asp Glu Pro Pro Ser Glu Gly Glu Ala Glu Glu Glu Glu		
465	470	475
Lys Asp Lys Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu Glu Glu Glu		
485	490	495

Ala Ala Lys Glu Glu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
500	505	510
Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Thr Lys Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys		
515	520	525
Lys Val Glu Gly Ala Gly Glu Glu Gln Ala Ala Lys Lys Lys Asp		
530	535	540
<210> 18		
<211> 284		
<212> PRT		
<213> 人类(Homo sapiens)		
<400> 18		
Met Ser Ser Phe Ser Tyr Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ser Tyr Lys Arg		
1	5	10
Arg Tyr Val Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser Ser Val Arg Ser Gly		
20	25	30
Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser		
35	40	45
Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu		
50	55	60
Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser		
65	70	75
Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp		
85	90	95
Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu		
100	105	110
Gln Gln Asn Lys Val Leu Glu Ala Glu Leu Leu Val Leu Arg Gln Lys		
115	120	125
His Ser Glu Pro Ser Arg Phe Arg Ala Leu Tyr Glu Gln Glu Ile Arg		
130	135	140
Asp Leu Arg Leu Ala Ala Glu Asp Ala Thr Asn Glu Lys Gln Ala Leu		
145	150	155
Gln Gly Glu Arg Glu Gly Leu Glu Glu Thr Leu Arg Asn Leu Gln Ala		
165	170	175
Arg Tyr Glu Glu Glu Val Leu Ser Arg Glu Asp Ala Glu Gly Arg Leu		
180	185	190
Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala		
195	200	205
Lys Asp Glu Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu		
210	215	220

Glu	Ile	Glu	Ala	Cys	Arg	Gly	Met	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu
225						230				235					240
Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Lys	Gln	Asn	Ala	Asp	Ile	Ser	Val	Met	Gln	Asp
				245					250					255	
Thr	Ile	Asn	Lys	Leu	Glu	Asn	Glu	Leu	Arg	Thr	Thr	Lys	Ser	Glu	Met
			260					265					270		
Ala	Arg	Tyr	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gln	Asp	Leu	Leu	Thr				
		275					280								
<210> 19															
<211> 272															
<212> PRT															
<213> 人类(Homo sapiens)															
<400> 19															
Met	His	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Trp	Leu	Phe	Ile	Ile	Leu	Asn	Phe	Met
1				5					10					15	
Glu	Tyr	Ile	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg
			20					25					30		
Met	His	Pro	Asn	Val	Ser	Gln	Gly	Cys	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys
			35				40					45			
Ser	Asp	Tyr	Asn	Gly	Cys	Leu	Ser	Cys	Lys	Pro	Arg	Leu	Phe	Phe	Ala
	50					55				60					
Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Met	Lys	Gln	Ile	Gly	Val	Cys	Leu	Ser	Ser	Cys
65				70					75						80
Pro	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Arg	Tyr	Pro	Asp	Ile	Asn	Lys	Cys	Thr
				85					90					95	
Lys	Cys	Lys	Ala	Asp	Cys	Asp	Thr	Cys	Phe	Asn	Lys	Asn	Phe	Cys	Thr
			100					105					110		
Lys	Cys	Lys	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	His	Leu	Gly	Lys	Cys	Leu	Asp	Asn
			115				120					125			
Cys	Pro	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Asn	Asn	His	Thr	Met	Glu	Cys	Val	Ser
			130			135					140				
Ile	Val	His	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Trp	Asn	Pro	Trp	Ser	Pro	Cys	Thr
145				150					155						160
Lys	Lys	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Phe	Lys	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Arg	Val
			165						170					175	
Arg	Glu	Ile	Ile	Gln	His	Pro	Ser	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Cys	Pro	Pro
			180					185					190		
Thr	Asn	Glu	Thr	Arg	Lys	Cys	Thr	Val	Gln	Arg	Lys	Lys	Cys	Gln	Lys
			195				200						205		

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220
 Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255
 Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270
 <210> 20
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 人类(Homo sapiens)
 <400> 20
 Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr Lys Cys Lys Ala Asp
 20 25 30
 Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Ser Gly
 35 40 45
 Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn Cys Pro Glu Gly Leu
 50 55 60
 Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser Ile Val His Cys Glu
 65 70 75 80
 Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr Lys Lys Gly Lys Thr
 85 90 95
 Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val Arg Glu Ile Ile Gln
 100 105 110
 His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro Thr Asn Glu Thr Arg
 115 120 125
 Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys Gly Glu Arg Gly Lys
 130 135 140
 Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn Lys Gly Glu Ser Lys
 145 150 155 160
 Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser Ser Lys Glu Ile Pro
 165 170 175
 Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys Arg Lys Val Gln Asp
 180 185 190
 Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 195 200

<210> 21

<211> 224

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 21

```

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
1           5           10           15
Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
           20           25           30
Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
           35           40           45
Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
           50           55           60
Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
65           70           75           80
Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
           85           90           95
Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
           100          105          110
Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
           115          120          125
Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
           130          135          140
Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
145          150          155          160
Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
           165          170          175
Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
           180          185          190
Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
           195          200          205
Gly Glu Arg Gly Arg Thr Ser Arg Gly Asp Glu Arg Cys Phe Asn His
210          215          220

```

<210> 22

<211> 553

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 22

```

Met Thr Trp Arg Met Gly Pro Arg Phe Thr Met Leu Leu Ala Met Trp

```

1	5	10	15
Leu Val Cys Gly Ser Glu Pro His Pro His Ala Thr Ile Arg Gly Ser			
20	25	30	
His Gly Gly Arg Lys Val Pro Leu Val Ser Pro Asp Ser Ser Arg Pro			
35	40	45	
Ala Arg Phe Leu Arg His Thr Gly Arg Ser Arg Gly Ile Glu Arg Ser			
50	55	60	
Thr Leu Glu Glu Pro Asn Leu Gln Pro Leu Gln Arg Arg Arg Ser Val			
65	70	75	80
Pro Val Leu Arg Leu Ala Arg Pro Thr Glu Pro Pro Ala Arg Ser Asp			
85	90	95	
Ile Asn Gly Ala Ala Val Arg Pro Glu Gln Arg Pro Ala Ala Arg Gly			
100	105	110	
Ser Pro Arg Glu Met Ile Arg Asp Glu Gly Ser Ser Ala Arg Ser Arg			
115	120	125	
Met Leu Arg Phe Pro Ser Gly Ser Ser Ser Pro Asn Ile Leu Ala Ser			
130	135	140	
Phe Ala Gly Lys Asn Arg Val Trp Val Ile Ser Ala Pro His Ala Ser			
145	150	155	160
Glu Gly Tyr Tyr Arg Leu Met Met Ser Leu Leu Lys Asp Asp Val Tyr			
165	170	175	
Cys Glu Leu Ala Glu Arg His Ile Gln Gln Ile Val Leu Phe His Gln			
180	185	190	
Ala Gly Glu Glu Gly Gly Lys Val Arg Arg Ile Thr Ser Glu Gly Gln			
195	200	205	
Ile Leu Glu Gln Pro Leu Asp Pro Ser Leu Ile Pro Lys Leu Met Ser			
210	215	220	
Phe Leu Lys Leu Glu Lys Gly Lys Phe Gly Met Val Leu Leu Lys Lys			
225	230	235	240
Thr Leu Gln Val Glu Glu Arg Tyr Pro Tyr Pro Val Arg Leu Glu Ala			
245	250	255	
Met Tyr Glu Val Ile Asp Gln Gly Pro Ile Arg Arg Ile Glu Lys Ile			
260	265	270	
Arg Gln Lys Gly Phe Val Gln Lys Cys Lys Ala Ser Gly Val Glu Gly			
275	280	285	
Gln Val Val Ala Glu Gly Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Pro			
290	295	300	
Ser Leu Gly Ser Glu Lys Lys Lys Glu Asp Pro Arg Arg Ala Gln Val			
305	310	315	320

Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Ser	Arg	Val	Lys	Val	Leu	Arg	Lys	Leu	Ala	Ala			
				325					330					335				
Thr	Ala	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Arg	Ala	Thr	Thr			
			340					345					350					
Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Arg	Ser	Thr	Ser	Arg	Ala			
			355				360					365						
Val	Thr	Val	Ala	Ala	Arg	Pro	Met	Thr	Thr	Thr	Ala	Phe	Pro	Thr	Thr			
			370			375					380							
Gln	Arg	Pro	Trp	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	His	Arg	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr			
385					390					395					400			
Glu	Val	Ile	Thr	Ala	Arg	Arg	Pro	Ser	Val	Ser	Glu	Asn	Leu	Tyr	Pro			
				405					410					415				
Pro	Ser	Arg	Lys	Asp	Gln	His	Arg	Glu	Arg	Pro	Gln	Thr	Thr	Arg	Arg			
			420					425						430				
Pro	Ser	Lys	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Ser	Phe	Thr	Asn	Ala	Pro	Pro	Thr			
			435				440						445					
Thr	Ile	Ser	Glu	Pro	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Phe	Arg			
			450				455						460					
Asp	Asn	Arg	Met	Asp	Arg	Arg	Glu	His	Gly	His	Arg	Asp	Pro	Asn	Val			
465					470					475					480			
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Lys	Pro	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys			
					485				490					495				
Ala	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Asn	Glu	Tyr	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu			
			500					505						510				
Ser	Arg	Pro	Thr	Ala	Ser	Gln	Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Gln	Val	Gly	Asn			
			515				520						525					
Val	Pro	Leu	Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	His	Glu	Lys	Leu	Glu			
			530				535					540						
Lys	Pro	Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys										
545						550												
<210>	23																	
<211>	331																	
<212>	PRT																	
<213>	人类(Homo sapiens)																	
<400>	23																	
Glu	Gly	Lys	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ile	Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Glu	Asn			
1				5					10					15				
Asn	Met	Tyr	Val	Gln	Gln	Arg	Asp	Glu	Tyr	Leu	Glu	Ser	Phe	Cys	Lys			
			20					25					30					

Met	Ala	Thr	Arg	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Asn
	35						40					45			
Asn	Ser	Thr	Met	Lys	Ile	Asp	His	Phe	Gln	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Pro
	50					55					60				
Met	Arg	Val	Val	Asp	Asp	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Gln	Arg	Leu	Ile	Ser
65					70				75					80	
Glu	Leu	Arg	Lys	Glu	Tyr	Gly	Met	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe	Phe	Met	Val
			85						90					95	
Leu	Thr	Asp	Val	Asp	Leu	Arg	Val	Lys	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Val	Pro	Ile
			100					105					110		
Thr	Met	Lys	Ser	Val	Phe	Asp	Leu	Ile	Asp	Thr	Phe	Gln	Ser	Arg	Ile
		115					120					125			
Lys	Asp	Met	Glu	Lys	Gln	Lys	Lys	Glu	Gly	Ile	Val	Cys	Lys	Glu	Asp
	130					135					140				
Lys	Lys	Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Phe	Leu	Ser	Arg	Phe	Arg	Trp	Arg	Arg
145				150					155					160	
Arg	Leu	Leu	Val	Ile	Ser	Ala	Pro	Asn	Asp	Glu	Asp	Trp	Ala	Tyr	Ser
			165						170					175	
Gln	Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Ala	Cys	Asn	Phe	Gly	Leu	Arg
		180						185					190		
His	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Glu	Glu	Val	Gly	Gly
	195						200					205			
Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Pro	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Val	Glu	Arg	Glu
	210					215					220				
Asp	Val	Pro	Ala	His	Leu	Val	Lys	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Phe	Gln	Val
225				230					235					240	
Ser	Pro	Glu	Tyr	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Val	Gly	Lys	Asp	Gly	Asn	Val
			245						250				255		
Lys	Ser	Trp	Tyr	Pro	Ser	Pro	Met	Trp	Ser	Met	Val	Ile	Val	Tyr	Asp
		260					265					270			
Leu	Ile	Asp	Ser	Met	Gln	Leu	Arg	Arg	Gln	Glu	Met	Ala	Ile	Gln	Gln
	275						280					285			
Ser	Leu	Gly	Met	Arg	Cys	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Gly	Tyr
	290					295					300				
His	Ser	Tyr	His	Gln	Gly	Tyr	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gln	Asp	Asp	Tyr	Arg
305				310					315					320	
His	His	Glu	Ser	Tyr	His	His	Gly	Tyr	Pro	Tyr					
			325						330						

<210> 24

<211> 85

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 24

```

Met Leu Leu Val Gly Lys Asp Gly Asn Val Lys Ser Trp Tyr Pro Ser
1           5           10           15
Pro Met Trp Ser Met Val Ile Val Tyr Asp Leu Ile Asp Ser Met Gln
          20           25           30
Leu Arg Arg Gln Glu Met Ala Ile Gln Gln Ser Leu Gly Met Arg Cys
          35           40           45
Pro Glu Asp Glu Tyr Ala Gly Tyr Gly Tyr His Ser Tyr His Gln Gly
          50           55           60
Tyr Gln Asp Gly Tyr Gln Asp Asp Tyr Arg His His Glu Ser Tyr His
65           70           75           80
His Gly Tyr Pro Tyr
          85

```

<210> 25

<211> 297

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 25

```

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val
1           5           10           15
Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly
          20           25           30
Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg
          35           40           45
Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys
          50           55           60
Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn
65           70           75           80
Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile
          85           90           95
Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro
          100          105          110
Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp
          115          120          125
Ala Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser
          130          135          140

```

Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu
 145 150 155 160
 Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu
 165 170 175
 Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val
 180 185 190
 Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile
 195 200 205
 Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser
 210 215 220
 Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr
 225 230 235 240
 Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu
 245 250 255
 Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu
 260 265 270
 Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu
 275 280 285
 Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro
 290 295
 <210> 26
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 人类(Homo sapiens)
 <400> 26
 Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val
 1 5 10 15
 Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly
 20 25 30
 Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg
 35 40 45
 Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys
 50 55 60
 Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn
 65 70 75 80
 Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile
 85 90 95
 Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro
 100 105 110

Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp		
115	120	125
Ala Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser		
130	135	140
Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu		
145	150	155
Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Glu Lys Leu Ile		
	165	170
Ile Phe Ser Asp Pro Val Pro Ala Ser Leu Asn Leu Ile Pro Glu Phe		
	180	185
Ala Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu		
	195	200
Ser Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln		
	210	215
Val Ser Glu Asn Ile Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu		
225	230	235
Asp Asp Cys Ser Ser Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr		
	245	250
Met Ala Ser Cys Thr Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro		
	260	265
Ile Glu Cys Thr Glu Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser		
	275	280
Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly		
	290	295
Asp Arg Leu Glu Leu Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro		
305	310	315
<210> 27		
<211> 173		
<212> PRT		
<213> 人类(Homo sapiens)		
<400> 27		
Met Ser Thr Gly Thr Asn Gly Asp Gly Val Ser Pro Ala Asn Gly Val		
1	5	10
Val Leu Asp Arg Ser Tyr Pro Arg Cys Leu Pro Val Glu Leu Ser Gly		
	20	25
Gly Arg Tyr Thr His Ser Ala Pro Ser Gly Gly His Thr Cys Cys Thr		
	35	40
Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser		
	50	55
		60

Leu	Phe	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	Val
65					70					75					80
Ser	Glu	Asn	Ile	Phe	Gln	Thr	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Asp
			85						90					95	
Asp	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Gly	Phe	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Met
			100					105					110		
Ala	Ser	Cys	Thr	Ser	Glu	Ser	His	Ser	His	Trp	Val	His	Ser	Pro	Ile
			115					120					125		
Glu	Cys	Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr
			130				135					140			
Thr	Gly	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Asp
145					150					155					160
Arg	Leu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Phe	Glu	Val	Pro	Ser	Pro			
				165					170						

<210> 28

<211> 265

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 28

Met	Ser	Thr	Gly	Thr	Asn	Gly	Asp	Gly	Val	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Val
1				5					10					15	
Val	Leu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Pro	Arg	Ile	Val	Val	Met	Glu	Arg	Val	Glu
			20					25					30		
Met	Pro	Thr	Ala	Gln	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Thr	Lys	Ala	Ala	Gly
			35				40					45			
Ala	Thr	Thr	Asp	Val	Arg	Val	Ala	Ser	Pro	Val	Leu	Ser	Ser	Ile	Val
			50				55				60				
Phe	Arg	Arg	Ser	Thr	Ala	Gln	Leu	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Val	Gly	Thr
65					70					75					80
Val	Cys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gln	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Thr	Pro
				85					90					95	
Thr	Val	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Leu
			100					105					110		
Leu	Val	Val	Phe	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Leu	Phe	Phe	Leu	Tyr	Cys
			115					120					125		
Lys	Gln	Phe	Phe	Asn	Arg	His	Cys	Gln	Arg	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu
						130		135				140			
Gln	Phe	Glu	Ala	Asp	Lys	Thr	Ala	Lys	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Pro	Val
145					150					155					160

Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile
 165 170 175
 Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser
 180 185 190
 Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr
 195 200 205
 Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu
 210 215 220
 Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu
 225 230 235 240
 Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu
 245 250 255
 Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro
 260 265

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 29

Met Ser Thr Gly Thr Asn Gly Asp Gly Val Ser Pro Ala Asn Gly Val
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Arg Ser Tyr Pro Arg Cys Leu Pro Val Glu Leu Ser Gly
 20 25 30
 Gly Arg Tyr Thr His Ser Ala Pro Ser Gly Gly His Thr Cys Cys Thr
 35 40 45
 Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser
 50 55 60
 Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Ser Trp Ala Pro Gly Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val
 85 90 95
 Pro Ile Pro Gln Gln Gln Gln Gly Pro Glu Met
 100 105

<210> 30

<211> 134

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 30

Met Gly Thr Val Cys His Leu Pro Thr Val Trp Ser Trp Thr Gly Ala

1	5	10	15
Ile Gln Gly Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp Thr Pro Thr			
20	25	30	
Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Leu			
35	40	45	
Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu Tyr Cys Lys			
50	55	60	
Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Val Ala Gly Gly Leu Leu Gln			
65	70	75	80
Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val Pro			
85	90	95	
Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Trp Ala Pro Gly			
100	105	110	
Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val Pro Ile Pro Gln Gln			
115	120	125	
Gln Gln Gly Pro Glu Met			
130			
<210> 31			
<211> 132			
<212> PRT			
<213> 人类(Homo sapiens)			
<400> 31			
Met Gly Thr Val Cys His Leu Pro Thr Val Trp Ser Trp Thr Gly Ala			
1	5	10	15
Ile Gln Gly Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp Thr Pro Thr			
20	25	30	
Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Leu			
35	40	45	
Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu Tyr Cys Lys			
50	55	60	
Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu Gln Phe Glu			
65	70	75	80
Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val Pro Pro Ser			
85	90	95	
Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Trp Ala Pro Gly Ser Leu			
100	105	110	
Ala Gln Leu Phe Ser Leu Asp Ser Val Pro Ile Pro Gln Gln Gln Gln			
115	120	125	
Gly Pro Glu Met			

130
<210> 32
<211> 299
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)
<400> 32
Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val
1 5 10 15
Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly
20 25 30
Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg
35 40 45
Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys
50 55 60
Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn
65 70 75 80
Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile
85 90 95
Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro
100 105 110
Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp
115 120 125
Thr Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser
130 135 140
Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu
145 150 155 160
Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Val Ala Gly Gly
165 170 175
Leu Leu Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe
180 185 190
Pro Val Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu
195 200 205
Asn Ile Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys
210 215 220
Ser Ser Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser
225 230 235 240
Cys Thr Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys
245 250 255
Thr Glu Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly

260	265	270
Ala Glu Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu		
275	280	285
Glu Leu Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro		
290	295	
<210> 33		
<211> 297		
<212> PRT		
<213> 人类(Homo sapiens)		
<400> 33		
Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys Val		
1 5 10 15		
Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp Cys Gly		
20 25 30		
Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Ala Tyr Cys Thr Ala Cys Pro Pro Arg Arg		
35 40 45		
Tyr Lys Ser Ser Trp Gly His His Arg Cys Gln Ser Cys Ile Thr Cys		
50 55 60		
Ala Val Ile Asn Arg Val Gln Lys Val Asn Cys Thr Ala Thr Ser Asn		
65 70 75 80		
Ala Val Cys Gly Asp Cys Leu Pro Arg Phe Tyr Arg Lys Thr Arg Ile		
85 90 95		
Gly Gly Leu Gln Asp Gln Glu Cys Ile Pro Cys Thr Lys Gln Thr Pro		
100 105 110		
Thr Ser Glu Val Gln Cys Ala Phe Gln Leu Ser Leu Val Glu Ala Asp		
115 120 125		
Thr Pro Thr Val Pro Pro Gln Glu Ala Thr Leu Val Ala Leu Val Ser		
130 135 140		
Ser Leu Leu Val Val Phe Thr Leu Ala Phe Leu Gly Leu Phe Phe Leu		
145 150 155 160		
Tyr Cys Lys Gln Phe Phe Asn Arg His Cys Gln Arg Gly Gly Leu Leu		
165 170 175		
Gln Phe Glu Ala Asp Lys Thr Ala Lys Glu Glu Ser Leu Phe Pro Val		
180 185 190		
Pro Pro Ser Lys Glu Thr Ser Ala Glu Ser Gln Val Ser Glu Asn Ile		
195 200 205		
Phe Gln Thr Gln Pro Leu Asn Pro Ile Leu Glu Asp Asp Cys Ser Ser		
210 215 220		
Thr Ser Gly Phe Pro Thr Gln Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Cys Thr		

225	230	235	240
Ser Glu Ser His Ser His Trp Val His Ser Pro Ile Glu Cys Thr Glu			
	245	250	255
Leu Asp Leu Gln Lys Phe Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Thr Gly Ala Glu			
	260	265	270
Thr Leu Gly Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Gly Asp Arg Leu Glu Leu			
	275	280	285
Asn Val Pro Phe Glu Val Pro Ser Pro			
290	295		
<210> 34			
<211> 134			
<212> PRT			
<213> 人类(Homo sapiens)			
<400> 34			
Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe			
1	5	10	15
Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro			
	20	25	30
Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn			
	35	40	45
His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu			
	50	55	60
Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg			
65	70	75	80
Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr			
	85	90	95
Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys			
	100	105	110
Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys			
	115	120	125
Lys Val Leu Arg Arg His			
130			

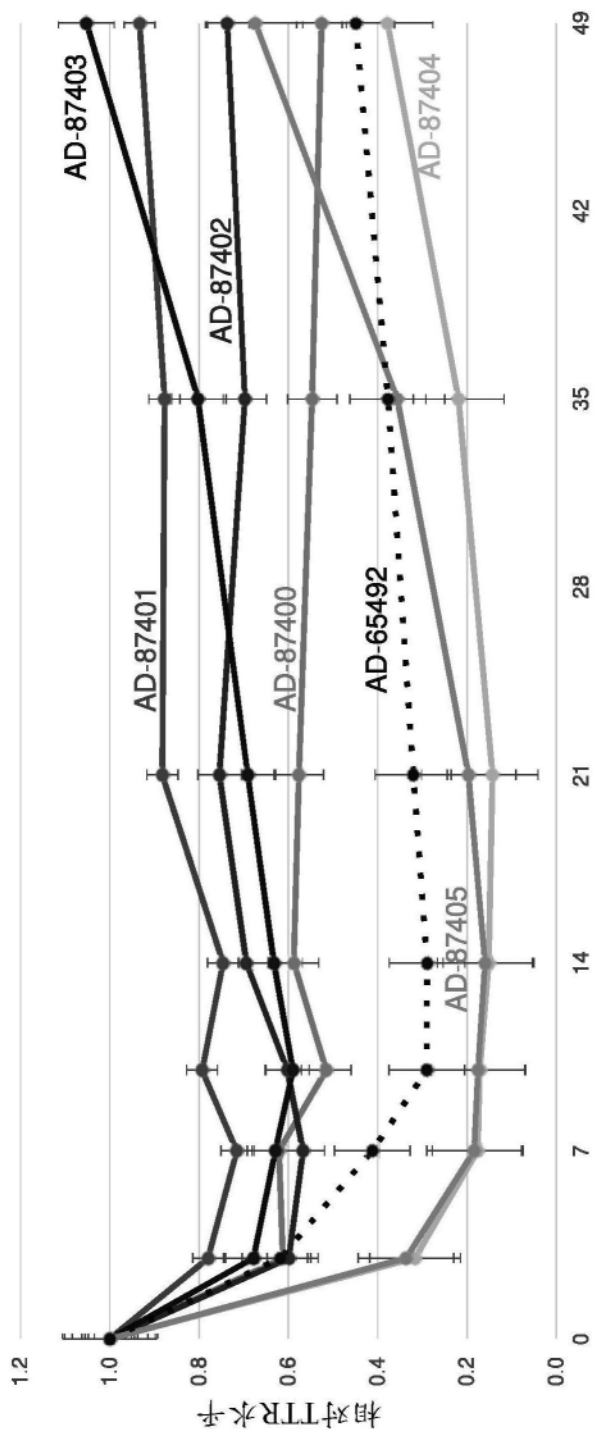


图1

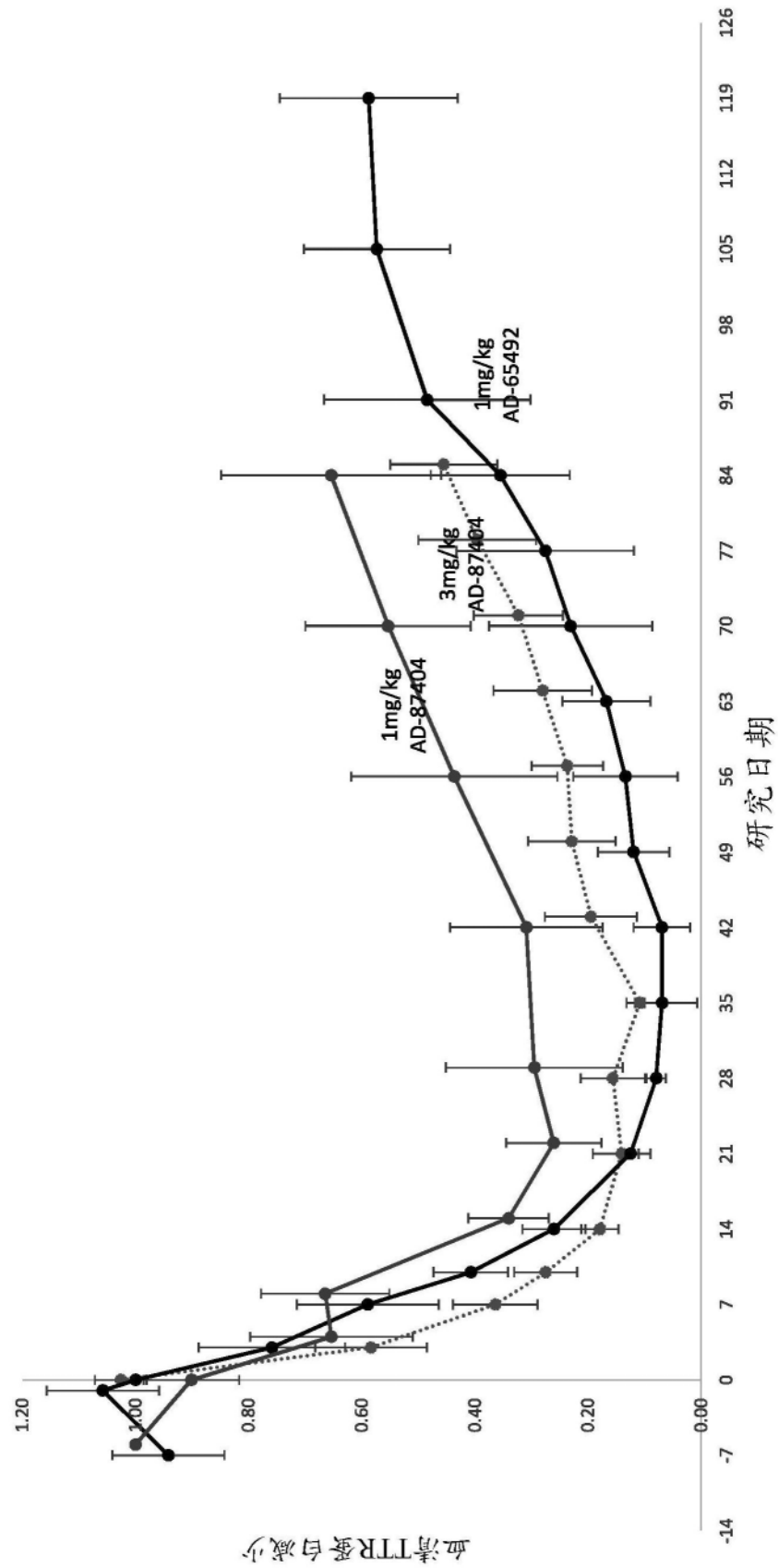


图2