



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107106874 B

(45) 授权公告日 2021.08.31

(21) 申请号 201580059089.1

A61P 25/28 (2006.01)

(22) 申请日 2015.08.27

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2011/056883 A1, 2011.05.12

申请公布号 CN 107106874 A

T. Coelho等.Phase 2 open-label

(43) 申请公布日 2017.08.29

extension study of patisiran, an  
investigational RNAi therapeutic for the  
treatment of familial amyloid  
polyneuropathy (S9.003).《Neurology》.2015,  
第84卷(第14期),

(30) 优先权数据

62/044,100 2014.08.29 US

62/150,596 2015.04.21 US

T. Coelho等.Phase 2 open-label

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.28

extension study of patisiran, an  
investigational RNAi therapeutic for the  
treatment of familial amyloid  
polyneuropathy (S9.003).《Neurology》.2015,  
第84卷(第14期),

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/047185 2015.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2016/033326 EN 2016.03.03

Muthusamy Jayaraman等.Maximizing the  
Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for  
Hepatic Gene Silencing In Vivo.《Angew.  
Chem. Int. Ed.》.2012,第51卷第 8529 -8533  
页.

(73) 专利权人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

Teresa Coelho, M.D.等.Safety and  
Efficacy of RNAi Therapy for

(72) 发明人 B·贝腾考特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 马慧

Transthyretin Amyloidosis.《NEW ENGLAND  
JOURNAL OF MEDICINE》.2013,第369卷(第9期),  
第819-829页.

(51) Int.Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/603 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

审查员 武波

权利要求书4页 说明书21页 附图1页

(54) 发明名称

治疗甲状腺素运载蛋白(TTR)介导的淀粉样  
变性的方法

(57) 摘要

本文披露的是通过给予有效量的甲状腺素  
运载蛋白(TTR)抑制组合物来减少或阻止人类受  
试者中的神经病变损伤评分(NIS)或改良的NIS  
(mNIS+7)增加的方法。

1. 甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合物在制备用于患有TTR淀粉样变性的人类受试者中减少神经病变损伤评分 (NIS) 或改良的NIS (mNIS+7) 或阻止NIS或mNIS+7增加的用途,其中所述甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合物以95%可能性将血清TTR蛋白的浓度降低83.8%至89.3%,

其中所述TTR抑制组合物是帕提斯然,所述帕提斯然具有如下组成:

活性成分:	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质:	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布:	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG ( (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	胆固醇,合成的,cGMP; 5.9 mg/mL
缓冲液:	磷酸盐缓冲盐水、cGMP; 足量。

2. 如权利要求1所述的用途,其中该TTR淀粉样变性是家族性淀粉样多发性神经病变 (FAP)、家族性淀粉样心肌病 (FAC)、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性 (ATTR) 或症状性多发性神经病变。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是有效量为0.01至0.5mg/kg的帕提斯然。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是有效量为0.15至0.3mg/kg的帕提斯然。

5. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是有效量为0.3mg/kg的帕提斯然。

6. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是有效量为0.3mg/kg的帕提斯然,其每21天给予一次。

7. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是有效量为0.3mg/kg的帕提斯然,其经由以1mL/min持续15分钟、接着以3mL/min持续55分钟的70分钟输注每21天给予一次。

8. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是帕提斯然,其有效量为0.3mg/kg并且经由以3.3mL/min的60分钟输注、或经由以1.1mL/min持续15分钟接着以3.3mL/min持续55分钟的70分钟输注每21-28天以两个剂量给予。

9. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物是经静脉内给予的。

10. 如权利要求1或2所述的用途,其中该TTR抑制组合物与四聚体稳定剂共同给予,其中所述四聚体稳定剂选自氯苯唑酸和二氟尼柳。

11. 如权利要求1或2所述的用途,其中该血清TTR蛋白的浓度通过基于免疫化学的测

定、确定维生素A浓度的测定、确定RBP浓度的测定或确定TTR mRNA浓度的测定来确定。

12. 如权利要求1或2所述的用途,其中该血清TTR蛋白的浓度通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定。

13. 帕提斯然在制备用于减少患有TTR淀粉样变性的人类受试者中的神经病变损伤评分(NIS)或改良的NIS(mNIS+7)的药物中的用途,其中该帕提斯然是经静脉内以0.3mg/kg的有效量给予人类受试者,并且其中该有效量以95%可能性将人类受试者的血清中的TTR蛋白的浓度降低83.8%至89.3%,该TTR浓度通过酶联免疫吸附测定(ELISA)确定,其中所述帕提斯然具有如下组成:

活性成分:	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质:	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布:	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	胆固醇,合成的,cGMP; 5.9 mg/mL
缓冲液:	磷酸盐缓冲盐水、cGMP; 足量。

14. 帕提斯然在制备一种用于减少或阻止患有TTR淀粉样变性的人类受试者中的神经病变损伤评分(NIS)或改良的NIS(mNIS+7)增加的药物中的用途,其中所述帕提斯然以0.3mg/kg给予人类受试者,每21天给予一次,并且通过ELISA确定,以95%可能性将血清TTR蛋白的浓度降低83.8%至89.3%,其中所述帕提斯然具有如下组成:

活性成分:	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质:	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布:	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	胆固醇,合成的,cGMP; 5.9 mg/mL
缓冲液:	磷酸盐缓冲盐水、cGMP; 足量。

15. 一种包含帕提斯然的组合物, 其中所述帕提斯然具有如下组成:

活性成分:	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质:	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布:	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	胆固醇, 合成的, cGMP; 5.9 mg/mL
缓冲液:	磷酸盐缓冲盐水、 cGMP; 足量。

16. 一种由帕提斯然组成的组合物, 其中所述帕提斯然具有如下组成:

活性成分:	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质:	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布:	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	DSPC (1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
LNP颗粒的结构完整性:	胆固醇, 合成的, cGMP; 5.9 mg/mL
缓冲液:	磷酸盐缓冲盐水、 cGMP; 足量。

17. 权利要求15或16所述的组合物在制备用于治疗人类受试者的TTR淀粉样变性的药物中的用途。

18. 如权利要求17所述的用途, 其中该组合物以0.01至0.5mg/kg的剂量给予。

19. 如权利要求17所述的用途, 其中该组合物以0.15至0.3mg/kg的剂量给予。

20. 如权利要求17所述的用途, 其中该组合物以0.3mg/kg的剂量给予。

21. 如权利要求17所述的用途, 其中该组合物以0.3mg/kg的剂量每21天给予一次。

22. 如权利要求17所述的用途, 其中该组合物经由以1mL/min持续15分钟、接着以3mL/min持续55分钟的70分钟输注以0.3mg/kg的剂量每21天给予一次。

23. 如权利要求17所述的用途, 其中通过血液血清甲状腺素运载蛋白的ELISA确定, 治疗导致甲状腺素运载蛋白水平平均降低的范围为从82.3%至86.8%。

24. 如权利要求17所述的用途,其中该人类受试者具有轻度至中度神经病变的甲状腺素运载蛋白淀粉样变性的活组织检查证实的诊断。

25. 权利要求15或16所述的组合物在制备用于治疗人类受试者中甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性 (ATTR) 的药物中的用途。

26. 如权利要求25所述的用途,其中该组合物以0.01至0.5mg/kg的剂量给予。

27. 如权利要求25所述的用途,其中该组合物以0.15至0.3mg/kg的剂量给予。

28. 如权利要求25所述的用途,其中该组合物以0.3mg/kg的剂量给予。

29. 如权利要求25所述的用途,其中该组合物以0.3mg/kg的剂量每21天给予一次。

30. 如权利要求25所述的用途,其中该组合物经由以1mL/min持续15分钟、接着以3mL/min持续55分钟的70分钟输注以0.3mg/kg的剂量每21天给予一次。

31. 如权利要求25所述的用途,其中治疗导致该受试者的神经病变损伤评分 (NIS) 降低。

32. 如权利要求25所述的用途,其中该人类受试者具有症状性多发性神经病。

33. 一种试剂盒,其包含如权利要求15或16所述的组合物和使用说明书。

## 治疗甲状腺素运载蛋白 (TTR) 介导的淀粉样变性的方法

[0001] 相关申请交叉参考

[0002] 本申请要求于2014年8月29日提交的美国临时专利申请号62/044,100和于2015年4月24日提交的美国临时专利申请号62/150,596的权益和优先权,其两者出于所有目的,通过引用以其整体结合。

[0003] 发明背景

[0004] 甲状腺素运载蛋白 (TTR) 是主要在肝脏中产生的四聚体蛋白质。TTR基因中的突变使蛋白质四聚体不稳定,导致单体的错误折叠和聚集成TTR淀粉样蛋白原纤维 (ATTR)。组织沉积导致全身性ATTR淀粉样变性 (科蒂纽 (Coutinho) 等人,对I型淀粉样蛋白神经病变的40年经验,复查483例 (Forty years of experience with type I amyloid neuropathy. Review of 483 cases)。在如下中:格列纳 (Glenner) 等人,淀粉样蛋白和淀粉样变性 (Amyloid and Amyloidosis),阿姆斯特丹 (Amsterdam):摘要媒体 (Excerpta Media),1980,第88-93页;霍 (Hou) 等人,甲状腺素运载蛋白和家族性淀粉样多发性神经病,最近在理解神经变性的分子机制方面的最新进展 (Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration),欧洲联合生化学会杂志 (FEBS J) 2007,274:1637-1650;韦斯特马克 (Westermarck) 等人,老年性全身性淀粉样变性中的原纤维来源于正常的甲状腺素运载蛋白 (Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin),美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA),1990,87:2843-2845)。超过100例报告的TTR突变表现出一系列疾病症状。

[0005] TTR淀粉样变性以多种形式表现。当周围神经系统更显著地受影响时,该疾病被称为家族性淀粉样多发性神经病变 (FAP)。当心脏主要受累但神经系统则不受累时,该疾病被称为家族性淀粉样心肌病 (FAC)。第三种主要类型的TTR淀粉样变性被称为柔脑膜/CNS (中枢神经系统) 淀粉样变性。

[0006] 与家族性淀粉样蛋白多发性神经病变 (familial amyloid polyneuropathy, FAP) 和ATTR相关性心肌病相关的最常见的突变分别是Val30Met (科埃略 (Coelho) 等人,用于甲状腺素运载蛋白家族性淀粉样蛋白多发性神经病变的氯苯唑酸:一项随机对照试验 (Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial),神经学 (Neurology),2012,79:785-792) 以及Val122Ile (康纳斯 (Connors) 等人,非洲裔美国人的心脏淀粉样变性:甲状腺素运载蛋白V122I淀粉样变性和免疫球蛋白轻链淀粉样变性的临床和实验室特征的比较 (Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis),美国心脏杂志 (Am Heart J),2009,158:607-614)。

[0007] FAP的当前治疗选项关注于稳定或降低循环成淀粉样蛋白的量。原位肝移植降低突变TTR水平 (霍姆格伦 (Holmgren) 等人,在两个瑞典的家族性淀粉样多发性神经病变 (FAP-met30) 患者中肝移植的生化效应 (Biochemical effect of liver transplantation

in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30))。临床遗传学(Clin Genet)1991,40:242-246),其中在具有早期FAP的患者中报道了存活改善,尽管野生型TTR的沉积可能持续(矢崎(Yazaki)等人,肝移植后进展的野生型甲状腺素运载蛋白沉积优先发生在FAP患者的心肌中(Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs into myocardium in FAP patients),美国移植杂志(Am J Transplant),2007,7:235-242;亚当斯(Adams)等人,家族性淀粉状蛋白多发性神经病的快速进展:多国自然史研究(Rapid progression of familial amyloid polyneuropathy:a multinational natural history study),神经学(Neurology),2015年8月25日;85(8)675-82;山下(Yamashita)等人,肝移植后患有家族性淀粉状蛋白多发性神经病的患者的长期存活(Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy),神经学(Neurology),2012,78:637-643;冈本(Okamoto)等人,家族性淀粉样多发性神经病的肝移植:对瑞典患者存活的影响(Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy:impact on Swedish patients' survival),肝移植(Liver Transpl),2009,15:1229-1235;斯坦欧(Stangou)等人,继发于家族性淀粉状蛋白多发性神经病肝移植后的进行性心脏淀粉样变性:对淀粉样蛋白原纤维形成的影响(Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy:implications for amyloid fibrillogenesis),移植(Transplantation),1998,66:229-233;福斯(Fosby)等人,在北欧国家的肝移植—从北欧肝移植登记处治疗和移植后分析的意图(Liver transplantation in the Nordic countries-An intention to treat and post-transplant analysis from The Nordic Liver Transplant Registry),1982-2013,斯堪的纳维亚胃肠病学杂志(Scand J Gastroenterol),2015年6月;50(6):797-808,移植(Transplantation),正在出版)。

[0008] 氯苯唑酸和二氟尼柳稳定循环TTR四聚体,其可以减缓疾病进展的速率(伯克(Berk)等人,重复利用二氟尼柳用于家族性淀粉状蛋白多发性神经病:一项随机临床试验(Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy:a randomized clinical trial),美国医学协会杂志(JAMA),2013,310:2658-2667;科赫尔(Coelho)等人,2012;科赫尔(Coelho)等人,用于治疗甲状腺素运载蛋白家族性淀粉状蛋白多发性神经病的氯苯唑酸的长期效应(Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy),神经病学杂志(J Neurol),2013,260:2802-2814;洛泽龙(Lozeron)等人,对Met30甲状腺素运载蛋白家族性淀粉状蛋白多发性神经病晚期发病中氯苯唑酸的失能和安全性的影响(Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy),欧洲神经病学杂志(Eur J Neurol),2013,20:1539-1545)。然而,在大部分患者中,治疗中症状继续恶化,突出了对FAP的新的、改善疾病的治疗选项的需要。

[0009] 关于dsRNA靶向TTR的描述可以在例如国际专利申请号PCT/US2009/061381(WO 2010/048228)和国际专利申请号PCT/US 2010/055311(WO2011/056883)中找到。

[0010] 概述

[0011] 本文描述了通过给予有效量的甲状腺素运载蛋白(TTR)抑制组合物来减少或阻止

人类受试者的神经病变损伤评分 (NIS) 或改良的NIS (mNIS+7) 增加的方法, 其中该有效量将人类受试者的血清中TTR蛋白的浓度降低至低于50 $\mu$ g/ml或降低至少80%。本文还描述了通过向具有增加的NIS或家族性淀粉样多发性神经病变 (Familial Amyloidotic Polyneuropathy, FAP) 的受试者给予TTR抑制组合物并确定具有增加的NIS或FAP的受试者中TTR蛋白水平来调节用于治疗增加的NIS或FAP的TTR抑制组合物的剂量的方法。在一些实施例中, 如果TTR蛋白水平大于50 $\mu$ g/ml, 则随后向受试者给予的TTR抑制组合物的量增加, 并且如果TTR蛋白水平小于50 $\mu$ g/ml, 则随后向受试者给予的TTR抑制组合物的量减少。本文还描述了TTR抑制siRNA的配制形式。

[0012] 附图简要说明

[0013] 图1是表示  $\Delta$  NIS或  $\Delta$  mNIS+7的进展与TTR浓度之间的关系的图。

[0014] 图2是表示  $\Delta$  NIS或  $\Delta$  mNIS+7的进展与TTR浓度之间的关系的图。

[0015] 详细说明

[0016] 如下文更加详细地描述, 本文披露了通过给予有效量的甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合物来减少或阻止人类受试者的神经病变损伤评分 (NIS) 或改良的NIS (mNIS+7) 增加的方法, 这样使得该有效量将血清中TTR蛋白的浓度降低至低于50 $\mu$ g/ml或降低至少80%。在一个实施例中, TTR抑制组合物是帕提斯然 (patisiran)。帕提斯然是对TTR特异的小干扰核糖核酸 (siRNA), 并且配制在用于静脉内 (IV) 给药的嗜肝脂质纳米粒 (LNP) 中。

[0017] TTR抑制组合物

[0018] 本文所述的方法包括给予TTR抑制组合物。TTR抑制组合物可以是降低人类受试者血清中TTR蛋白浓度的任何化合物。实例包括但不限于RNAi, 例如siRNA。siRNA的实例包括靶向TTR基因的siRNA, 例如帕提斯然 (在下文更加详细地描述) 和瑞维斯然 (revusiran)。实例还包括反义RNA。靶向TTR基因的反义RNA的实例可以在美国专利号8,697,860中找到。

[0019] TTR抑制组合物抑制TTR基因的表达。如本文中所使用, “甲状腺素运载蛋白” (“TTR”) 是指细胞中的基因。TTR也称为ATTR、HsT2651、PALB、前白蛋白、TBPA和甲状腺素运载蛋白 (前白蛋白、淀粉样变性I型)。人类TTR mRNA转录物的序列可以在NM\_000371中找到。小鼠TTR mRNA的序列可以在NM\_013697.2中找到, 并且大鼠TTR mRNA的序列可以在NM\_012681.1中找到。

[0020] 术语“沉默”、“抑制其表达”、“下调……的表达”、“抑制……的表达”等, 只要它们涉及TTR基因, 本文是指至少部分抑制TTR基因的表达, 表现为与一个第二细胞或一组第二细胞 (对照细胞) 相比, 可以从TTR基因转录的一个第一细胞或一组第一细胞中分离的mRNA的量降低, 该第一细胞或一组第一细胞已经经过处理使得TTR基因的表达被抑制, 该第二细胞或一组第二细胞与该第一细胞或一组第一细胞基本上相同, 但是未经过如此的处理。抑制程度通常按照以下来表示

$$[0021] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{经处理细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \bullet 100\%$$

[0022] 可替代地, 抑制程度能按照与TTR基因表达功能性相联系的一个参数的减少而给出, 例如由细胞分泌的TTR基因编码的蛋白的量, 或展现某种表型 (例如细胞凋亡) 的细胞数量。原则上, TTR基因沉默可以在 (组成型地或通过基因组工程) 表达该靶标的任何细胞中并且通过任何合适的测定来确定。然而, 当需要参考来确定给定的dsRNA是否在一定程度上抑



制TTR基因的表达并且因此被本发明所涵盖时,在以下实例中提供的这些测定将作为此类参考。

[0023] RNAi

[0024] 在一些实施例中,本文所述的方法使用TTR抑制组合物用于抑制TTR基因的表达,该TTR抑制组合物是RNAi,例如siRNA,例如dsRNA。在一个实施例中,siRNA是靶向TTR基因的dsRNA。dsRNA包括具有互补区域的反义链,该互补区域与在TTR基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补,并且该互补区域的长度小于30个核苷酸,通常为19-24个核苷酸长度。本发明的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸悬突。TTR抑制siRNA描述于国际专利申请号PCT/US 2009/061381 (WO 2010/048228) 和国际专利申请号PCT/US 2010/055311 (WO 2011/056883) 中,两者通过引用以其整体结合在此。

[0025] 在一个实施例中,TTR抑制组合物是帕提斯然,在下文进行了更加详细地描述。在另一个实施例中,TTR抑制组合物是瑞维斯然,一种对与三价GalNAc碳水化合物簇结合的TTR特异的siRNA。瑞维斯然的完整描述可以在国际申请号PCT/US 2012/065691和美国专利公开号US 20140315835中找到,其内容通过引用以其整体结合在此。

[0026] dsRNA包括充分杂交互补以形成双链体结构的两条RNA链。dsRNA (反义链) 的一条链包括:与靶序列基本上互补并且通常完全互补的互补区,该靶序列源自TTR基因表达期间形成的mRNA的序列,另一条链 (有义链) 包括与反义链互补的区域,使得当在合适的条件下组合时,两条链杂交并形成双链体结构。术语“反义链”是指dsRNA链,其包括一个区域,该区域基本上与靶序列互补。如本文所使用,术语“互补区域”是指该反义链上基本上与一个序列 (例如如本文所定义的靶序列) 互补的区域。在互补区域不与靶序列完全互补的情况下,错配在末端区域是最可容忍的,并且如果出现错配,它们通常在一个或多个末端区域中,例如5' 和/或3' 末端的6个、5个、4个、3个、或2个核苷酸之内。如本文所使用,术语“有义链”是指含有与反义链区域基本上互补的区域的dsRNA链。通常,双链体结构的长度在15和80之间、或15和60之间或15和30之间、或在25和30之间、或在18和25之间、或在19和24之间、或在19和21之间、或为19、20或21个碱基对。在一个实施例中,双链体的长度为19个碱基对。在另一个实施例中,双链体的长度为21个碱基对。

[0027] dsRNA的每条链的长度通常在15和80、或15和60、或15和30之间、或在18和25之间、或为18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在其他实施例中,每条链的长度为25-30个核苷酸。双链体的每条链可以是相同的长度或不同的长度。当组合使用两种不同的siRNA时,每种siRNA的每条链的长度可以相同或可以不同。

[0028] dsRNA可以包括一个或多个核苷酸的一个或多个单链悬突。在一个实施例中,dsRNA的至少一个末端具有1至4个、通常1或2个核苷酸的单链核苷酸悬突。在另一个实施例中,dsRNA的反义链在3' 末端和5' 末端各自具有超出有义链的1-10个核苷酸悬突。在进一步的实施例中,dsRNA的有义链在3' 末端和5' 末端各自具有超出反义链的1-10个核苷酸悬突。

[0029] 如本文所使用,并且除非另外指明,当用来描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时,术语“互补”是指包含该第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含该第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员将理解的。此类条件可以例如是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA,50℃或70℃持续12-16小时,随后洗涤。可以应用其他条件,例如

可以在有机体中遇到的生理学相关条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用,确定最适宜于测试两个序列的互补性的条件集合。

[0030] 这包括:包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在第一和第二核苷酸序列的整个长度上碱基配对。此类序列本文可以称作相对于彼此“完全互补”。然而,本文中,在第一序列被称作相对于第二序列“基本上互补”的情况下,这两个序列可以是完全互补的,或者它们可以在杂交时形成一个或多个,但是通常不多于4个、3个或2个错配碱基配对,同时保留了在与它们的最终应用最相关的条件下杂交的能力。然而,当两个寡核苷酸被设计成在杂交时形成一个或多个单链悬突时,此类悬突不应该被认为是关于互补性确定的错配。例如,出于本文描述的目的,以下这样一种dsRNA也可以称作“完全互补”:该dsRNA包括一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸以及另一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸,其中该更长的寡核苷酸包括一个与该更短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸序列。

[0031] 如本文所使用,就满足以上相对于它们杂交的能力而言的要求来说,“互补”序列还可以包括或完全形成自非沃森-克里克碱基对和/或从非天然的以及经修饰的核苷酸形成的碱基对。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摇摆碱基配对或Hoogsteen碱基配对。

[0032] 本文的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可以相对于在dsRNA的有义链与反义链之间、或dsRNA的反义链与靶标序列之间的碱基配对使用,如将从其使用的上下文中理解的。

[0033] 如本文所使用,与信使RNA(mRNA)的“至少部分基本上互补”的多核苷酸是指与感兴趣的mRNA(例如,编码TTR的mRNA)的一个连续部分(包括5'UTR、开放阅读框(ORF)或3'UTR)基本互补的多核苷酸。举例来说,如果多核苷酸与编码TTR的mRNA的非中断部分基本上互补,那么该序列与TTR mRNA的至少一部分互补。

[0034] dsRNA可以通过如在下文进一步讨论的、本领域内已知的标准方法来进行合成,例如通过使用自动化的DNA合成仪,例如从例如生物研究公司(Biosearch)、应用生物系统公司(Applied Biosystems, Inc)可商购的合成仪。

[0035] 修饰的dsRNA

[0036] 在一些实施例中,在本文所述的方法中使用的dsRNA被化学修饰以增强其稳定性。本发明中表征的核酸可以通过本领域已建立好的方法合成和/或修饰,如在“核酸化学实验室指南(Current protocols in nucleic acid chemistry)”,毕克奇(Beaucage, S.L.)等人(编辑),约翰威利父子出版公司(John Wiley & Sons, Inc.),美国纽约州纽约市(New York, NY, USA)中描述的那些方法,该文献因此通过引用结合在此。在本发明中有用的dsRNA化合物的具体实例包括含有修饰骨架或无天然核苷间键合的dsRNA。如本说明书中所定义的,具有修饰骨架的dsRNA包括:在骨架中保留磷原子的那些和在骨架中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的并且如有时本领域中所提及的,在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰dsRNA也可以被认为是寡核苷酸。

[0037] 修饰的dsRNA骨架包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯、亚磷酸酯、磷酸胺酯,包括3'-氨基磷酸胺酯和氨基烷基磷酸胺酯、硫代羰基磷酸胺酯、硫代羰基

烷基磷酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、这些酯的2'-5'连接的类似物、和具有反转极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位为3'-5'至5'-3'连接或2'-5'至5'-2'连接。还包括不同盐、混合盐以及游离酸形式。

[0038] 教授制备以上含磷键的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050,其每一个通过引用在此结合。

[0039] 其中不包含磷原子的修饰的dsRNA骨架具有由短链烷基或环烷基核苷酸间键合、混合杂原子和烷基或环烷基核苷酸间键合或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷酸间键合形成的骨架。这些包括具有以下结构的那些:吗啉代键合(从核苷的糖部分中部分地形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;含烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲亚氨基和亚甲胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及具有混合N、O、S和CH<sub>2</sub>组分部分的其他骨架。

[0040] 教授制备以上寡核苷的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,其每一个通过引用在此结合。

[0041] 在其他合适的dsRNA模拟物中,将核苷酸单位的糖和核苷间键合即骨架替换为新颖的基团。保持碱基单元以与适当的核酸靶标化合物杂交。一种这样的低聚化合物,已经显示具有优异杂交特性的dsRNA模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,dsRNA的糖骨架被含有酰胺的骨架替换,具体是氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。教授制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262,其每一个通过引用在此结合。对PNA化合物的进一步教授内容可以在尼尔森(Nielsen)等人,科学(Science),1991,254,1497-1500中找到。

[0042] 本发明的其他实施例是:具有硫代磷酸酯骨架的dsRNA和具有杂原子骨架的寡核苷,并且尤其是上文所引用的美国专利号5,489,677的--CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[称作亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架]、--CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--、和--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--[其中天然磷酸二酯骨架表示为--O--P--O--CH<sub>2</sub>--],以及上文所引用的美国专利号5,602,240的酰胺骨架。还优选的是具有上文所引用的美国专利号5,034,506的吗啉代骨架结构的dsRNA。

[0043] 修饰的dsRNA还可以含有一个或多个经取代的糖部分。优选的dsRNA在2'位置处包含以下各项之一:OH;F;O-、S-、或N-烷基;O-、S-、或N-烯基;O-、S-、或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中该烷基、烯基以及炔基可以是经取代的或未经取代的C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>烷基或C<sub>2</sub>至C<sub>10</sub>烯基和炔基。特别优选的是:O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、和O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>,其中n和m是从1至约10。其他优选的dsRNA在2'位置处包含以下各项之一:C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、

SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、杂环烷基、杂环烷基芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善dsRNA的药物代谢动力学特性的基团或用于改善dsRNA的药效特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(马丁(Martin)等人,瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta),1995,78,486-504),即,烷氧基-烷氧基基团。进一步优选的修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基团,如在本文以下实例中所描述的也称作2'-DMAOE,以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称作2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,也如在本文以下实例中所描述的。

[0044] 其他优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH<sub>3</sub>)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)以及2'-氟代(2'-F)。也可以在dsRNA上的其他位置处作出相似的修饰,尤其在3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。DsRNAs还可以具有糖模拟物,例如代替戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教授制备此类修饰的糖结构的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;和5,700,920,这些专利中的某些与本申请被共同拥有人,并且其每一个通过引用以其整体在此结合。

[0045] DsRNA还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰物或取代物。如本文所使用,“非修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包括其他合成和天然的核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟基甲基胞嘧啶;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-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫尿嘧啶;8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代、尤其5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤;以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包括披露于美国专利号3,687,808中的那些;披露于聚合物科学与工程简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering),第858-859页,克罗斯威兹(Kroschwitz,J.L.)编辑,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),1990中的那些;由英格力士(Englich)等人,应用化学(Angewandte Chemie),国际版,1991,30,613披露的那些;以及由桑格威(Sanghvi,Y.S.)第15章,d sRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications),第289-302页,克鲁克(Crooke,S.T.)和黎布鲁(Lebleu,B.),编辑,CRC出版社,1993披露的那些。这些核碱基中的某些对于提高在本发明中出现的低聚化合物的结合亲和力特别有用。这些碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性增加0.6°C-1.2°C(桑格威(Sanghvi,Y.S.)、克鲁克(Crooke,S.T.)和黎布鲁(Lebleu,B.),编辑,DsRNA研究与应用(DsRNA Research and Applications),CRC出版社,波卡拉顿(Boca Raton),1993,第276-278页)并且是示例性碱基取代,甚至更具体地

当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0046] 教授制备上述经修饰的核碱基以及其他经修饰的核碱基中的某些的代表性美国专利包括但不限于上述的美国专利号3,687,808,连同美国专利号4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;和5,681,941,其每一个通过引用结合在此,以及美国专利号5,750,692,也通过引用结合在此。

[0047] 帕提斯然

[0048] 在一个实施例中,TTR抑制组合物是帕提斯然。帕提斯然是对TTR特异的小干扰核糖核酸(siRNA),并且是配制在用于静脉内(IV)给药的嗜肝脂质纳米粒(LNP)中(阿基尼克(Akinc A),松巴赫(Zumbuehl A)等人,用于递送RNAi治疗剂的脂质样材料的组合文库(A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics),自然生物技术(Nat Biotechnol),2008;26(5):561-569)。该TTR siRNA具有在TTR基因的3'UTR区域内的靶区域,以确保和证实与WT TTR以及所有报道的TTR突变的同源性。在LNP介导的向肝脏的递送后,帕提斯然靶向用于降解的TTR mRNA,导致经由RNAi机制来有效并且持续的减少突变体和WT TTR蛋白。

[0049] TTR siRNA(也称为ALN-18328)由具有以下序列的有义链和反义链组成;小写字母表示核苷酸的2'-O-甲基形式:

	链	寡核苷酸 名称	序列 5'到 3'	SEQ ID NO:
[0050]	有义	A-32345	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1
		8		
	反义	A-32346	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTd	2
		8	T	

[0051] 制造方法由通过常规的固相寡核苷酸合成来合成双链体的两个单链寡核苷酸组成。纯化后,将两个寡核苷酸退火成双链体。

[0052] 帕提斯然药物产品是TTR siRNA ALN-18328与等渗磷酸盐缓冲盐水中的脂质赋形剂(DLin-MC3-DMA、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2000</sub>-C-DMG)的无菌配制品。

[0053] 帕提斯然配制品示于下表1中:

[0054] 表1:帕提斯然药物产品的组成

[0055]	功能	帕提斯然组分、等级 浓度 (mg/mL)
	活性成分	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL
	赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP; 12.7 mg/mL
	赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP; 1.5 mg/mL
	LNP颗粒的结构完整性	DSPC(1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP; 3.1 mg/mL
	LNP颗粒的结构完整性	胆固醇, 合成的, cGMP; 5.9 mg/mL
	缓冲液	磷酸盐缓冲盐水、 cGMP; 足量

[0056] 在一些实施例中, 帕提斯然药物产品提供在容器 (例如玻璃小瓶) 中, 其中每个小瓶具有以下量:

[0057] 表2: 每个小瓶包括的帕提斯然药物产品的组成

[0058]	功能	帕提斯然组分、等级 浓度 (mg/mL) / 小瓶 (mg)
	活性成分	ALN-18328、cGMP 2.0 mg/mL/11.0 mg
	赋形剂; 与活性成分相互作用的可滴定的氨脂质	DLin-MC3-DMA (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸甲酯、cGMP 分子量: 642; 12.7 mg/mL/69.6 mg
	赋形剂; 药物产品的稳定性和希望的生物分布	PEG <sub>2000</sub> -C-DMG (R)-甲氧基-PEG <sub>2000</sub> -氨基甲酰基-二-O-肉豆蔻基-sn-甘油酯)、cGMP 分子量: 2510; 1.5 mg/mL/8.2 mg
	LNP颗粒的结构完整性	DSPC(1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)、cGMP 分子量: 790; 3.1 mg/mL/17.3 mg
	LNP颗粒的结构完整性	胆固醇, 合成的, cGMP 分子量: 387; 5.9 mg/mL/32.2 mg
	缓冲液	磷酸盐缓冲盐水、 cGMP; 足量

[0059] 用于注射的帕提斯然溶液含有2mg/mL的TTR siRNA药品。将帕提斯然药物产品包装在充填容积为5.5mL的10mL玻璃小瓶中。容器封闭系统由美国药典/欧洲药典 (United States Pharmacopeia/European Pharmacopoeia, USP/EP) I型硼硅酸盐玻璃小瓶、特氟隆 (Teflon) 为面的丁基橡胶塞和铝封盖组成。

[0060] 四聚体稳定剂

[0061] 在一些实施例中,本文所述的方法包括四聚体稳定剂与另一种TTR抑制组合物的共同给予。

[0062] 四聚体稳定剂是结合TTR蛋白并且用于稳定TTR四聚体的化合物。使TTR四聚体不稳定的突变导致错配和聚集的TTR。

[0063] 四聚体稳定剂的实例包括:氯苯唑酸和二氟尼柳。氯苯唑酸和二氟尼柳两者都可以减缓疾病进展的速率(伯克(Berk)等人,重复利用二氟尼柳用于家族性淀粉状蛋白多发性神经病:一项随机临床试验(Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy:a randomized clinical trial),美国医学协会杂志(JAMA),2013,310:2658-2667;科赫尔(Coelho)等人,2012;科赫尔(Coelho)等人,用于治疗甲状腺素运载蛋白家族性淀粉状蛋白多发性神经病的氯苯唑酸的长期效应(Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy),神经病学杂志(JNeurol),2013,260:2802-2814;洛泽龙(Lozeron)等人,对Met30甲状腺素运载蛋白家族性淀粉状蛋白多发性神经病晚期发病中氯苯唑酸的失能和安全性的影响(Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy),欧洲神经病学杂志(Eur JNeurol),2013,20:1539-1545)。

[0064] 受试者和诊断

[0065] 本文披露了用于减少或阻止人类受试者的神经病变损伤评分(NIS)或改良的NIS(mNIS+7)增加的方法,其中该人类受试者具有TTR相关失调。在一些实施例中,TTR相关失调是由甲状腺素运载蛋白(TTR)基因中的突变引起的疾病之一。在一个实施例中,该疾病是TTR淀粉样变性,其以多种形式表现,例如家族性淀粉状蛋白多发性神经病变(FAP)、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性(ATTR)和症状性多发性神经病变。当周围神经系统更显著地受影响时,该疾病被称为FAP。当心脏主要受累但神经系统则不受累时,该疾病被称为家族性淀粉样心肌病(FAC)。第三种主要类型的TTR淀粉样变性被称为柔脑膜/CNS(中枢神经系统)淀粉样变性。ATTR影响自主神经系统。

[0066] 在一些实施例中,具有TTR相关失调的人类受试者具有突变的TTR基因。超过100例报告的TTR突变表现出一系列疾病症状。与FAP和ATTR相关的心肌病相关联的最常见的突变分别是Val30Met和Val122Ile。TTR突变引起蛋白质的错误折叠,并加速TTR淀粉样形成的过程,并且TTR突变是临床上显著TTR淀粉样变性(也称为ATTR(淀粉样变性-甲状腺素运载蛋白型))发展的最重要的风险因素。已知超过85种成淀粉样TTR变体会引起全身性家族性淀粉样变性。

[0067] 在一些实施例中,如果人类受试者是具有活组织检查证实的ATTR淀粉样变性和轻度至中度神经病变的成年人( $\geq 18$ 岁),则选择该人类受试者接受任何形式的TTR淀粉样变性的治疗。在进一步的实施例中,人类受试者还具有以下各项中的一种或多种:卡诺夫斯库机能状态量表评分(Karnofsky performance status,KPS) $\geq 60\%$ ;体重指数(BMI)为 $17-33\text{kg/m}^2$ ;适当的肝肾功能(天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT) $\leq 2.5 \times$ 正常上限(ULN)、总胆红素在正常限度内、白蛋白 $>3\text{g/dL}$ 、和国际标准化比率(INR) $\leq 1.2$ ;血清肌酐酞 $\leq 1.5\text{ULN}$ ;以及乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒为血清阴性。

[0068] 在另一个实施例中,如果人类受试者有下列情况,则将该人类受试者排除在治疗

之外:接受过肝移植;在治疗期间计划进行手术;HIV阳性;在30天内已经接受了除氯苯唑酸或二氟尼柳以外的研究药物;纽约心脏协会心力衰竭分类>2;怀孕或哺乳;已知或怀疑有全身性细菌、病毒、寄生虫或真菌感染;具有不稳定的心绞痛、不受控制的临床显著心律失常;或先前对脂质体产物具有严重反应或已知对寡核苷酸过敏。

[0069] 神经病变损伤评分 (NIS)

[0070] 本文披露的方法通过给予甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合物来减少或阻止人类受试者中神经病变损伤评分 (NIS) 的增加。NIS是指测量虚弱、感觉和反射,尤其是关于周围神经病变的评分系统。NIS分数评价标准组的肌肉虚弱 (1是25%虚弱、2是50%虚弱、3是75%虚弱、3.25是克服重力的运动、3.5是重力消除的运动、3.75是没有运动下肌肉颤动、并且4是瘫痪),标准组的肌肉拉伸反射 (0是正常、1是减少、2是不存在),以及触摸压力、振动、关节位置和运动和针刺 (全部在食指和拇趾上进行分级:0是正常,1是减少,2是不存在)。针对年龄、性别和身体健康校正评价。

[0071] 在一个实施例中,用于降低NIS分数的方法导致NIS降低至少10%。在其他实施例中,该方法分数导致NIS降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或至少50%。在其他实施例中,该方法阻止NIS分数增加,例如,该方法导致NIS分数增加0%。

[0072] 用于确定人类受试者的NIS的方法是本领域技术人员公知的,并且可以从以下参考文献中找到:

[0073] 戴克 (Dyck,PJ) 等人,使用罗切斯特糖尿病神经病研究组群中的综合分数来纵向评估糖尿病多发性神经病变 (Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort),神经学 (Neurology),1997.49 (1):pg.229-239)。

[0074] 戴克 (Dyck,PJ),多发性神经病的检测、表征和分期:在糖尿病患者中评估 (Detection,characterization,and staging of polyneuropathy:assessed in diabetics),肌肉神经 (Muscle Nerve),1988年1月,11 (1):21-32。

[0075] 改良的神经病变损伤评分 (mNIS+7)

[0076] 在一些实施例中,本文披露的方法通过给予甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合物来减少或阻止人类受试者中改良的神经病变损伤评分 (mNIS+7) 的增加。如普通技术人员所熟知的,mNIS+7是指与小和大神经纤维功能的电生理测量 (NCS和QST) 以及自主功能测量 (体位性血压) 结合的基于临床检查的神经损伤评估 (NIS)。

[0077] 该mNIS+7分数是NIS+7分数的改良 (其代表NIS加7个测试)。NIS+7分析虚弱和肌肉拉伸反射。七个测试中的五个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。这些值针对年龄、性别、身高和体重的变量进行校正。七个测试中的剩余两个包括振动检测阈值和伴随深呼吸的心率下降。

[0078] 该mNIS+7分数改良了NIS+7,以考虑使用智能躯体特定区定量感觉测试 (Smart Somatotopic Quantitative Sensation Testing),新自主神经评估和使用尺骨、腓骨和胫神经振幅的复合肌肉动作电位,以及尺骨和腓肠神经的感觉神经动作电位 (苏安巴硕 (Suanprasert,N) 等人,TTR FAP组群的回顾性研究以改良NIS+7用于治疗试验 (Retrospective study of a TTR FAP cohort to modify NIS+7for therapeutic



trials), 神经科学杂志 (J.Neurol), 2014, 344 (1-2): pg.121-128)。

[0079] 在一个实施例中,用于降低mNIS+7分数的方法导致mNIS+7降低至少10%。在其他实施例中,该方法分数导致mNIS+7分数降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或至少50%。在其他实施例中,该方法阻止mNIS+7分数增加,例如,该方法导致mNIS+7分数增加0%。

[0080] 血清TTR蛋白浓度

[0081] 本文所述的方法包括向人类受试者给予有效量的甲状腺素运载蛋白 (TTR) 抑制组合,其中该有效量将人类受试者血清中的TTR蛋白的浓度降低至低于50 $\mu$ g/ml或降低至少80%。血清TTR蛋白浓度可以使用本领域技术人员已知的任何方法直接确定,例如基于抗体的测定,例如ELISA。可替代地,可以通过测量TTR mRNA的量来确定血清TTR蛋白浓度。在进一步的实施例中,通过测量替代物(例如维生素A或视黄醇结合蛋白(RBP))的浓度来确定血清TTR蛋白浓度。在一个实施例中,使用如在下面实例中所述的ELISA测定来确定血清TTR蛋白浓度。

[0082] 在一些实施例中,血清TTR蛋白的浓度降低至低于50 $\mu$ g/ml、或低于40 $\mu$ g/ml、25 $\mu$ g/ml或10 $\mu$ g/ml。在一些实施例中,血清TTR蛋白的浓度降低了80%、或降低了81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%或95%。

[0083] AUC

[0084] AUC是指向患者给予一个剂量的药物(如TTR抑制组合)后,血流的血浆中组合(如TTR)浓度随时间的曲线下面积。其受组合从患者血浆中的吸收速率和去除速率的影响。如本领域技术人员所知,可以通过计算给予药物后血浆组合浓度的积分来确定AUC。在另一个方面,可以使用以下化学式预测AUC:

[0085] 预测的AUC = (D x F) / CL

[0086] 其中D是剂量浓度,F是生物利用度的量度,并且CL是预测的清除率。本领域技术人员理解的是预测的AUC的值具有 $\pm 3$ 至4倍范围内的误差。

[0087] 在一些实施例中,用于确定AUC的数据通过在给予药物之后在不同时间间隔从患者采集血液样品而获得。在一个方面,在给予TTR抑制组合之后,患者血浆中的平均AUC在约9000至约18000的范围内。

[0088] 应当理解的是,由于代谢和/或可能与其他治疗剂的相互作用的可变性,TTR的血浆浓度可能在受试者之间有显著变化。根据本发明的一个方面,TTR的血浆浓度可以随受试者而变化。同样地,诸如最大血浆浓度( $C_{max}$ )或达到最大血浆浓度的时间( $T_{max}$ )或从时间零到最后可测量浓度( $AUC_{last}$ )时间的曲线下面积或血浆浓度时间曲线下总面积(AUC)的值都可以随受试者而变化。由于这种可变性,构成化合物(例如TTR抑制组合)的“治疗有效量”所需的量可以随受试者而变化。

[0089] 药物组合

[0090] 本文所述的方法包括给予TTR抑制组合,例如靶向TTR基因的siRNA,例如帕提斯然。在一些实施例中,TTR抑制组合是药物组合。

[0091] 如本文所使用,“药物组合”包含TTR抑制组合和药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”是指用于给予治疗剂的载体。此类载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇、及其组合。该术语特别地排除细胞培养基。对于口服给予的药

物,药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的赋形剂,例如惰性稀释剂、崩解剂、结合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙、以及乳糖,而玉米淀粉和海藻酸是合适的崩解剂。结合剂可以包括淀粉和明胶,而润滑剂(如果存在的话)将通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果希望的话,可以将片剂用一种材料(例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯)进行包衣,以延迟在胃肠道中的吸收。

[0092] 取决于希望局部还是系统性治疗以及取决于有待治疗的区域,可以将本发明的药物组合物按许多方式给予。给予可以是局部的;肺的,例如通过吸入或吹入粉剂或气溶胶,包括通过喷雾器;气管内的;鼻内的;表皮的和经皮的;口服的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内(例如,脑实质内、鞘内或脑室内)给予。

[0093] 组合物可以按这样的方式递送以靶向特定组织,例如肝脏(如肝脏的肝细胞)。药物组合物可以通过直接注射到脑中来递送。注射可以通过立体定位注射到脑的特定区域(例如黑质、皮质、海马体、纹状体或苍白球),或dsRNA可以递送到中枢神经系统的多个区域(例如进入多个脑区域、和/或进入脊髓)。dsRNA还可以递送到脑的弥漫区(例如,弥漫递送到脑的皮层)。

[0094] 在一个实施例中,靶向TTR的dsRNA可以经由插管或其他递送装置递送,该递送装置有一端被植入组织,例如脑(例如大脑的黑质、皮质、海马体、纹状体、胼胝体或苍白球)。可以将插管连接到dsRNA组合物的贮液器。流动或递送可以通过泵介导,例如渗透泵或微型泵(例如阿尔泽特(Alzet)泵)(杜瑞科公司(Durect),丘珀蒂诺市(Cupertino),加利福尼亚州(CA))。在一个实施例中,将泵和贮液器植入远离组织的区域(例如腹部),并且通过从泵或贮液器通向释放部位的导管来实现递送。将dsRNA组合物输注到脑中可以在几小时内或持续几天,例如,持续1天、2天、3天、5天或7天或更长时间。用于递送至脑的装置描述于例如美国专利号6,093,180和5,814,014中。

[0095] 剂量和时间

[0096] 本领域技术人员将理解的是,某些因素可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,这些因素包括(但不限于)疾病或失调的严重性、先前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄、以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效量的组合物治疗受试者可以包括单一治疗或者一系列治疗。如本文的其他地方所描述,使用常规方法或基于使用适当动物模型的体内测试,可以评估由本发明涵盖的TTR抑制组合物的有效剂量和体内半衰期。

[0097] 通常,TTR抑制组合物的药物组合物的合适剂量将处于0.01毫克至200.0毫克/受试者体重/日的范围内,通常处于1mg至50mg/千克体重/日的范围内。

[0098] 例如,TTR抑制组合物可以是siRNA,并且能以0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.628mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5.0mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg或50mg/kg每个剂量进行给予。在另一个实施例中,该剂量在0.15mg/kg和0.3mg/kg之间。例如,TTR抑制组合物能以0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg或0.3mg/kg的剂量给予。在一个实施例中,TTR抑制组合物以0.3mg/kg的剂量给予。

[0099] 药物组合物(例如帕提斯然)可以每天给予一次,或每5天、10天、15天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天给予一次或两次。例如使用经几天的时间提供持续的TTR抑制组合物释放的常规持续释放配制品,可以将剂量单位复配用于在几天内递送。持续释放配制品是本领域中熟知的并且对于在特定位点递送药剂是特别有用的,由此可以与本发明的药剂一起使用。

[0100] 在一个实施例中,该TTR抑制组合物是帕提斯然,且剂量为0.3mg/kg,并且其中该剂量每21天给予一次。在另一个实施例中,有效量为0.3mg/kg,并且有效量经由70分钟输注(以1mL/min持续15分钟,接着以3mL/min持续55分钟),每21天给予一次。在另一个实施例中,有效量为0.3mg/kg,并且有效量经由60分钟输注(3.3mL/min)或经由70分钟输注(以1.1mL/min持续15分钟,接着以3.3mL/min持续55分钟),每21-28天给予两个剂量。

[0101] 可以通过以下方式调节TTR抑制组合物的剂量用于治疗增加的NIS或FAP:给予TTR抑制组合物并确定受试者的TTR蛋白水平。如果TTR蛋白水平大于50 $\mu$ g/ml,则随后向受试者给予的TTR抑制组合物的量增加,并且如果TTR蛋白水平低于50 $\mu$ g/ml,则随后向受试者给予的TTR抑制组合物的量减少。

[0102] TTR抑制组合物可以与其他已知的、有效治疗由靶基因表达介导的病理过程的药剂组合来进行给予。在一个实施例中,帕提斯然与四聚体稳定剂(例如如氯苯唑酸或二氟尼柳)一起给予。在任何情况下,基于使用本领域已知或本文描述的标准功效测量所观察到的结果,给药医师可以调整帕提斯然和/或四聚体稳定剂给予的量和时间。

#### [0103] 实例

[0104] 下面是用于实施本发明的具体实施例的实例。所提供的实例仅用于说明性目的,并非旨在以任何方式限制本发明的范围。就使用的数字(例如量、温度等)而言,已努力确保其精确度,但仍应一定允许有一些实验误差和偏差。

[0105] 除非另外指明,本发明的实践将使用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。这些技术在文献中已充分解释。参见例如:克赖顿(T.E.Creighton),蛋白质:结构和分子特性(Proteins:Structures and Molecular Properties)(弗里曼与康帕尼公司(W.H.Freeman and Company),1993);莱宁(A.L.Lehninger),生物化学(Biochemistry)(价值出版商公司(Worth Publishers,Inc.)最新版);桑布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(1989年第2版);酶学方法(Methods In Enzymology)(科威克(S.Colowick)和卡普兰(N.Kaplan)编辑,学术出版公司(Academic Press,Inc.));雷明顿的制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,(宾夕法尼亚州伊斯顿市麦克出版公司(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company),1990);卡蕾(Carey)和松德贝里(Sundberg),高等有机化学(Advanced Organic Chemistry)第3版(普莱纳姆出版社(Plenum Press)),卷A和卷B(1992)。

#### [0106] 实例1:帕提斯然治疗TTR淀粉样变性的安全性和功效

[0107] 在临床I期试验中,发现帕提斯然在28天的时间内降低了患者的TTR水平。该研究的结果发表在新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)(科埃略(Coelho)等人,新英格兰医学杂志(N Engl J Med),2013;369:819-29)中。该出版物出于所有目的通过引用结合。研究设计和结果的总结提供如下。

[0108] 该试验是多中心的、随机的、单盲的、安慰剂对照的和有剂量范围的试验,用来评价单个剂量的帕提斯然在TTR淀粉样变性患者或健康成人中的安全性和功效。对于年龄在18-45岁之间的男性和女性,如果他们是健康的(根据病史、体格检查和12导联心电图确定),BMI为18.0-31.5,具有适当的肝功能和血细胞计数,并且没有分娩可能性,则有资格参加该试验。

[0109] 参与者系列(每个系列四个参与者)被随机分配为以3:1的比例接受0.01-0.5mg/kg剂量的帕提斯然或安慰剂(生理盐水)。分别在15分钟和60分钟的时间内静脉内给予帕提斯然。在试验中,患者在输注前一天晚上和当天接受类似的前药以降低输注相关反应的风险。这些药物包括:地塞米松、醋氨酚、苯海拉明或西替利嗪和雷尼替丁。

[0110] 使用验证的酶联免疫吸附测定(ELISA)对总TTR(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories),马萨诸塞州威尔明顿(Wilmington MA)),通过血清TTR水平反映测定帕提斯然药效学活性。将每个患者的TTR、视黄醇结合蛋白和维生素A的基线水平定义为在给予帕提斯然之前的四次测量的平均值。从药物给予开始到第28天监测不良事件。安全监测还包括血液学评价、血液化学分析和甲状腺功能测试。

[0111] 凭借经验证的基于ELISA的杂交测定来评估帕提斯然中包含的TTR siRNA的血浆药物代谢动力学。对于siRNA的检测和定量,使用ATTO-探针-HPLC测定(定量下限,每毫升1.0ng)(坦德姆实验室(Tandem Laboratories),犹他州盐湖城(Salt Lake City UT))。使用温诺林(WinNonlin)(法赛特公司(Pharsight),新泽西州普林斯顿(Princeton NJ))来确定药物代谢动力学估算值。

[0112] 与基线水平相比,测量到TTR、维生素A和视黄醇结合蛋白的敲低。(数据未显示)。

[0113] 结果

[0114] 在两个最低剂量的帕提斯然中没有观察到TTR水平(与安慰剂相比)的显著变化。然而,在接受0.15-0.5mg/kg剂量的所有参与者中观察到实质的TTR敲低(数据未显示)。与直到第28天使用安慰剂( $P<0.001$ )相比,TTR敲低在所有三个剂量水平上都是快速、有效和持久的,并且具有高度显著的变化。鉴于在0.15和0.3mg/kg下观察到的强烈响应和在0.5mg/kg下响应的适度增加性改善,仅一个参与者接受了0.5mg/kg的剂量。

[0115] 特别是在至少0.3mg/kg的剂量下,在响应的动力学中参与者之间几乎没有变异性(数据未显示),其中在第3天超过50%降低,在大约第10天达到最低值水平,并且在第28天持续抑制超过50%,以及在第70天发生完全恢复。接受0.15mg/kg、0.3mg/kg和0.5mg/kg的参与者的TTR敲低的最大值分别为85.7%、87.6%和93.8%。在0.15mg/kg和0.3mg/kg剂量的平均最低值分别为82.3%(95%置信区间(CI),67.7-90.3)和86.8%(95%CI,83.8-89.3);当作为绝对TTR水平或TTR敲低百分比分析时,这些最低值在参与者之间显示出很小的变异性,并且与安慰剂相比高度显著( $P<0.001$ )(数据未显示)。

[0116] 敲低程度似乎确定抑制的持续时间,对于接受0.15mg/kg和0.3mg/kg的参与者在第28天分别平均减少56.6%(95%CI,11.6-78.7)和67.1%(95%CI,45.5-80.1),并且对于接受0.5mg/kg的单个患者在第28天减少76.8%。在0.3mg/kg的剂量下,在人类中观察到的TTR敲低与在相同剂量水平下在非人类灵长类动物中观察到的TTR敲低实际上相同(数据未显示)。通过帕提斯然的这些TTR减少与视黄醇结合蛋白和维生素A水平的变化相关(数据未显示)。

[0117] 使用帕提斯然没有导致血液学、肝脏或肾脏测量或甲状腺功能的任何显著变化,并且由于不良事件,没有药物相关的严重不良事件或任何研究药物中止(数据未显示)。

[0118] 帕提斯然的血浆药物代谢动力学曲线显示:在测试的剂量范围内,TTR siRNA直到最后一天的血浆峰浓度和曲线下面积的值以与剂量近似成比例的方式增加(数据未显示)。

[0119] 帕提斯然的特异性

[0120] 为了进一步证明帕提斯然作用的特异性,还在ALN-PCS的1期试验中在一组健康志愿者中测量TTR,该ALN-PCS含有靶向PCSK9(胆固醇降低的靶标)的siRNA,该siRNA配制于用于帕提斯然的相同类型的脂质纳米颗粒中。单剂量的0.4mg/kg ALN-PCS(所谓的对照siRNA)对TTR没有作用(数据未显示),这表明帕提斯然对TTR的作用是由于siRNA的特异性靶向而不是脂质纳米颗粒配制品的非特异性作用。

[0121] 使用从接受0.3mg/kg剂量的参与者获得的血液样品上的5'RACE(互补DNA末端的快速扩增)试验获得支持帕提斯然的药效学作用的特异性和作用机制的另外的证据,以便检测在循环细胞外RNA中的预测的TTR mRNA切割产物。为了收集血液样品,在以1200x g离心凝固的血液样品(取自给药前和给药后24小时的受试者)20分钟之后收集血清。将血清在1200x g下第二次离心10分钟以除去漂浮的细胞材料,然后冷冻。将解冻的血清与氯化锂(最终浓度1M)混合,并且在4℃下孵育1小时。将样品以120,000x g在4℃下旋转2小时以沉淀RNA,并且通过试剂盒(Trizol)提取(生命技术公司(Life Technologies),美国纽约州格兰德艾兰市(Grand Island, New York, USA))和异丙醇沉降来从沉淀中分离总RNA。

[0122] 为了检测TTR siRNA介导的切割产物,使用基因瑞思(GeneRacer)试剂盒(生命技术公司(Life Technologies))将分离的RNA用于连接介导的RACE PCR。将RNA连接到基因瑞思衔接子上,并且使用TTR特异性反向引物(5'-aatcaagttaaagtggaaatgaaaagtgccctttcacag-3')(SEQ ID NO:3)进行逆转录,随后使用与衔接子互补的基因瑞思GR5'正向引物和TTR特异性反向引物(5'-gcctttcacaggaatgttttattgtctctg-3')(SEQ ID NO:4)进行2轮PCR。使用GR5'巢式引物和TTR特异性反向巢式引物(5'-ctctgcctggacttctaacaatagcatatgagggtg-3')(SEQ ID NO:5)进行巢式PCR。使用TOPO-平端(Blunt)载体(生命技术公司(Life Technologies))克隆PCR产物。使用M13正向和反向引物通过菌落PCR扩增克隆的插入片段。在马克罗根(MacroGen)测序设备中用T7启动子引物对扩增子进行测序。使用软件(CLC工作台(WorkBench))将来自96个克隆的序列与人TTR进行比对。

[0123] 在给药前的样品和药物给予后24小时获得的样品中都检测到TTR mRNA。与RNAi机制一致,在所有三个参与者中,预测的mRNA切割产物在给药前的样品中不存在,并且在给药后样品中存在(数据未显示)。

[0124] 用于定量人血清中野生型和突变型TTR的LC/MS/MS测定是合格的,并且由坦德姆实验室(Tandem Labs)进行。在通过LC/MS/MS分析之前,使用胰凝乳蛋白酶消化血清样品,然后通过蛋白质沉淀提取进行处理。根据它们独特的具体质/荷比转换,监测代表野生型TTR的胰凝乳蛋白酶肽TTRW-1和代表突变体V30M的V30M-1。使用采用稳定的同位素标记的肽(TTRW-1-D8和V30M-1-D8)获得的标准校准曲线数据,来用于计算人血清样品中的内源肽片段(TTRW-1和V30M-1)。使用1/x<sup>2</sup>加权最小二乘回归分析,标准物的峰面积比(即TTRW-1-D8比内标TTRW-L1-D16以及V30M-1-D8比V30M-L1-D16)被用来产生线性校准曲线。合格的LC/MS/MS方法实现了5ng/ml的下限量(LLOQ),其中标准曲线范围为从5至2500ng/ml。

[0125] 实例2:多剂量研究帕提斯然 (patisiran) 治疗对家族性淀粉状蛋白多发性神经病的安全性和功效

[0126] 在该临床II期试验中,向患有TTR介导的FAP的患者给予多剂量的帕提斯然,以便评价在这些患者中帕提斯然的多次递增静脉内剂量的安全性、耐受性、药物代谢动力学和药效学。这些数据在2013年11月举行的家族性淀粉样多发性神经病变国际研讨会 (ISFAP) 上提出。

[0127] 合格的患者是成人( $\geq 18$ 岁),具有活组织检查证实的ATTR淀粉样变性和轻度至中度神经病变;卡诺夫斯库机能状态量表评分 (Karnofsky performance status, KPS)  $\geq 60\%$ ;体重指数 (BMI) 为 $17-33\text{kg}/\text{m}^2$ ;适当的肝肾功能(天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT)  $\leq 2.5 \times$  正常上限 (ULN)、总胆红素在正常限度内、白蛋白 $>3\text{g}/\text{dL}$ 、且国际标准化比率 (INR)  $\leq 1.2$ ;血清肌酸酐 $\leq 1.5\text{ULN}$ );以及乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒为血清阴性。如果患者有下列情况,则将该患者排除:接受过肝移植;在研究期间计划进行手术;HIV阳性;在30天内已经接受了除氯苯唑酸或二氟尼柳以外的研究药物;纽约心脏协会心力衰竭分类 $>2$ ;怀孕或哺乳;已知或怀疑有全身性细菌、病毒、寄生虫或真菌感染;具有不稳定的心绞痛、不受控制的临床显著心律失常;或先前对脂质体产物具有严重反应或已知对寡核苷酸过敏。

[0128] 这是一项在患有FAP患者中的帕提斯然的多中心、国际化、开放标签、多剂量递增II期研究。3名患者的组群接受了两个剂量的帕提斯然,其中每一个剂量都是静脉内 (IV) 输注给予。组群1-3每四周 (Q4W) 分别接受两个剂量的帕提斯然 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 和 $0.15\text{mg}/\text{kg}$ ;组群4和5都接受两个剂量的帕提斯然 $0.3\text{mg}/\text{kg}$  Q4W。组群6-9中的所有患者每三周 (Q3W) 接受 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 的两个剂量的帕提斯然给予。所有患者在每次帕提斯然输注之前接受前药以降低输注相关反应的风险,该前药由地塞米松、对扑热息痛(醋氨酚)、H2阻滞剂(例如雷尼替丁或法莫替丁)和H1阻滞剂(例如西替利嗪、羟嗪或非索非那定)组成。使用微剂量方案( $1.1\text{mL}/\text{min}$ 持续15分钟,接着剩余剂量为 $3.3\text{mL}/\text{min}$ ),以 $3.3\text{mL}/\text{min}$ 经60分钟或经70分钟IV给予帕提斯然。

[0129] 使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 评估所有患者的总TTR蛋白的血清水平。另外,使用专有质谱方法(查尔斯河实验室 (Charles River Laboratories), 加拿大魁北克省 (Quebec, Canada)), 在患有Val30Met突变的患者的血清中单独并且明确地测量野生型和突变型TTR蛋白。在筛选时和在随访的第0天、第1天、第2天、第7天、第10天、第14天、第21天、第22天、第23天(仅Q3W);第28天、第29天(仅Q4W);第30天(仅Q4W);第31天(仅Q3W);第35天、第38天(仅Q4W)及第42天、第49天、第56天、第112天及第208天收集血清样品。

[0130] 基于在第0天和在以下时间点收集的血液样品,为TTR siRNA创建血浆浓度-时间曲线:给药前(在计划给药开始的1小时内),在输注结束时 (EOI), 在输注后5、10和30分钟以及在1、2、4、6、24、48、168、336、504(第21天,仅Q3W方案)和672(第28天,仅Q4W方案)小时。在Q4W方案的第84天和第180天以及在Q3W方案的第35天、第91天和第187天收集另外的样品。对于组群3-9,也分析了在EOI的第0天和输注后2小时的血液样品中游离和封装的TTR siRNA。使用验证的ATTO-探针高效液相色谱 (HPLC) 测定(美国犹他州盐湖城坦德姆实验室 (Tandem Laboratories, Salt Lake City, Utah, USA))分析血清TTR siRNA。使用验证的软件程序温诺林 (WinNonlin)®,使用非区划和/或区划评价TTR siRNA血浆浓度-时间数据来

进行PK分析以便确定PK参数估计。分析尿样品中排泄的TTR siRNA的水平,并且在给药后测量肾清除率( $CL_R$ )。

[0131] 在对总TTR特异的相同时间点,通过HPLC和浊度测定法分别测量维生素A和视黄醇结合蛋白(RBP)的血清水平(百奥明专业医学病理学(Biomins Specialized Medical Pathology),法国里昂市(Lyon,France))。

[0132] 对于PP群体计算从基线的TTR敲低的平均值和方差,其中基线定义为所有给药前值的平均值。将方差分析(ANOVA)和协方差分析(ANCOVA)用于分析PD数据(相对于基线的自然对数转换的TTR),其中(剂量水平之间的)单独成对比较使用图基(tukey)事后检验法。最低TTR水平定义为在每个剂量给予(第一剂量、第二剂量时期:Q4W组和Q3W组分别为第1-28、29-56天和第1-21、22-42天)后在28天的时期期间(Q3W组的21天期间)每个患者的最低水平。经由线性回归探索TTR和RBP或维生素A之间相对于基线的关系以及野生型和V30M TTR水平之间的关系。使用能力模型分析评估了帕提斯然组分在PK参数中的剂量比例性。使用监管活动医学词典(MedDRA)编码系统(版本15.0)对AE进行编码,并且为AE、实验室数据、生命体征数据和ECG区间数据提供描述性统计。使用版本9.3或更高版本的SAS软件进行所有统计分析。功效和药效学:平均(SD)基线血清TTR蛋白水平在以下剂量组群中相似:对于0.01、0.05、0.15、0.3mg/kg Q4W剂量组和0.3mg/kg Q3W剂量组分别为272.9(98.86)、226.5(12.67)、276.1(7.65)、242.6(38.30)和235.5(44.45)  $\mu\text{g/mL}$ 。

[0133] 与0.01mg/kg剂量组群相比,在0.3mg/kg的Q4W和Q3W组群中在帕提斯然的第一和第二剂量后观察到TTR显著降低(在ANCOVA后的事后检验, $p<0.001$ ) (数据未显示)。在具有Val30Met突变的患者中,观察到野生型和突变型TTR具有非常相似的敲低程度(数据未显示)。血清TTR敲低的水平与RBP( $r^2=0.89$ , $p<10^{-15}$ )和维生素A( $r^2=0.90$ , $p<10^{-15}$ )的循环水平的降低高度相关(数据未显示)。

[0134] 尽管与未采取稳定剂治疗的患者相比,服用氯苯唑酸和二氟尼柳的患者具有显著增加的血清TTR基线水平(通过ANOVA, $p<0.001$ ) (数据未显示),帕提斯然给予导致这两个患者组中类似程度的TTR敲低(数据未显示)。

[0135] 药物代谢动力学:在EOI后,帕提斯然TTR siRNA组分的平均浓度降低(数据未显示),并且在第21/28天第二次给药后没有siRNA积累。每个剂量后TTR siRNA的包封与未包封浓度的测量表明循环LNP配制品的稳定性。对于第一和第二剂量两者,从零到最后可测量时间点(AUC0-last)的最大血浆浓度( $C_{\text{max}}$ )和血浆浓度-时间曲线下面积的平均值,在测试的剂量范围内以与剂量成比例的方式增加。剂量1和剂量2之后的 $C_{\text{max}}$ 和AUC0-last具有可比性而没有积累。在第0天和第21/28天,帕提斯然的中值终末半衰期为39-59小时(在剂量 $>0.01\text{mg/kg}$ 时),并且当比较每个剂量组群的剂量1和剂量2时其相对不变。

[0136] 这些II期数据表明:用帕提斯然治疗患有FAP的患者导致强健的、剂量依赖性的和统计学显著的血清TTR蛋白水平的敲低。使用两个连续剂量的帕提斯然(每3-4周给药0.3mg/kg)达到了TTR平均持续降低 $>80\%$ ,并且在Q3W组中达到96%的最大敲低。这些敲低率与在单次递增剂量、安慰剂对照的1期帕提斯然研究中观察到的速率一致(科尔贺(Coelho)等人,2013a)。来自其他系统性淀粉样变性疾病的证据表明,致病蛋白质减少至仅仅50%可以导致临床疾病改善或稳定(拉赫曼(Lachmann)等人,2003;拉赫曼(Lachmann)等人,2007)。使用帕提斯然的TTR敲低的程度不受服用氯苯唑酸和二氟尼柳的患者的影响,表

明这些TTR稳定剂药物不干扰帕提斯然的药理学活性。在具有Val30Met突变的患者中,帕提斯然抑制了突变型和野生型TTR两者的产生;后者在患有晚发性FAP患者肝移植后保持成淀粉样蛋白(矢崎(Yazaki)等人,2003;列尼克(Liepnieks)等人,2010)。

[0137] 实例3:通过给予帕提斯然减少如通过NIS和mNIS+7测量的神经损伤

[0138] 使用实例2中所述的方案,对FAP患者已经并且正在进行开放标记延伸研究。给予帕提斯然导致NIS和mNIS+7两者的降低。

[0139] 先前在2期试验中给药的FAP患者有资格进行2期OLE研究。已经并且正在进行长达2年的给药,每3周给予0.30mg/kg,其中每6个月评估临床终点。研究目标包括:对神经损伤(mNIS+7和NIS)、生活质量、mBMI、失能、运动、握力、自主症状、皮肤活组织检查的神经纤维密度、心脏受累(心脏亚组)和血清TTR水平的影响。

[0140] 患者人口统计学如下所示。

特征	结果	
患者数量	N = 27 (包括在心脏亚组的 11 名患者)	
年龄中值	64.0 岁 (范围 29-77)	
性别	18 名男性, 9 名女性	
TTR 基因型	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Val30Met (V30M) = 20</li> <li>• Ser77Tyr (S77Y) = 2</li> <li>• Ser77Phe (S77F) = 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tyr116Ser (Y116S) = 1</li> <li>• Phe64Leu (F64L) = 1</li> <li>• Arg54Thr (R54T) = 1</li> </ul>
FAP 阶段/PND 分数	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 阶段 1: 24</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• I: 14</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 阶段 2: 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• II: 10</li> <li>• IIIa: 2</li> <li>• IIIb: 1</li> </ul>
在基线处同时使用四聚体稳定剂	13 名给予氯苯唑酸, 7 名给予二氟尼柳, 7 名不给予任何药物	
当前的四聚体稳定剂使用 <sup>1</sup>	12 名给予氯苯唑酸, 6 名给予二氟尼柳, 9 名不给予任何药物	
给予的总剂量	511	
到目前为止的中位剂量/患者	19 (范围 13-24)	
平均治疗持续时间	12.9 个月 (范围 8.4-16.7)	

[0143] 基线特征包括以下:

特征	N	平均值 (范围)
mNIS+7a (最大损伤: 304)	27	52.9 (2.0-122.5)
NIS (最大损伤: 244)	27	34.8 (4.0-93.4)

[0145] 如下表所示,给予帕提斯然导致血清TTR水平降低。帕提斯然达到大约80%的持续



血清TTR降低,在剂量之间进一步达到88%的最低值。

[0146]

天数	N	平均%敲低
1	25	21.4
3	25	46.8
7	25	71.1
17	24	77.8
84	26	78.1
168	27	80.5
182	27	87.7
231	25	82.4
234	24	87.0

[0147]

238	24	88.1
248	25	86.0
273	22+	80.7
357	22	81.3
371	18	87.1
462	3	79.2

[0148] 如下表所示,给予帕提斯然导致如在6个月和12个月测量的mNIS+7的变化。

[0149]

mNIS+7 组分	从基线到第6个月的变化 (n=27)		从基线到第12个月的变化 (n=20)	
	平均值(SEM)	中值(最小值, 最大值)	平均值(SEM)	中值(最小值, 最大值)
总计	-1.4 (2.06)	-2 (-25.38, 22)	-2.5 (2.85)	-1.5 (-29.75, 24)
NIS-虚弱	0.2 (1.17)	0 (-9.88, 16)	-0.5 (0.86)	0 (-10.38, 6)
NIS-反射	-0.7 (0.49)	0 (-8, 3)	0.6 (0.43)	0 (-5.5, 4)
QST <sup>a</sup>	-1.1 (1.49)	-1.5 (-15, 16)	-2.6 (2.35)	-2 (-23, 19)
NCS E5	0.2 (0.13)	0 (-1.5, 1.5)	-0.1 (0.25)	0 (-2, 3.5)
体位性 BP <sup>a</sup>	0 (0.08)	0 (-1, 1)	-0.1 (0.11)	0 (-1.5, 0.5)

[0150] 如下表所示,给予帕提斯然导致在6个月和12个月的NIS的变化。

[0151]

NIS 组分	从基线到第6个月的变化 (n=27)		从基线到第12个月的变化 (n=20)	
	平均值 (SEM)	中值 (范围)	平均值 (SEM)	中值 (范围)
总计	-0.7 (1.3)	-1.0 (-12.9, 12)	0.4 (1.2)	-0.8 (-8.4, 11)
NIS-虚弱	0.2 (1.2)	0 (-9.9, 16)	-0.5 (0.9)	0 (-10.4, 6)
NIS-反射	-0.7 (0.5)	0 (-8, 3)	0.6 (0.44)	0 (-5.5, 4)
NIS-感觉	-0.3 (0.7)	0 (-9.5, 5)	0.4 (0.8)	0.5 (-5, 8)

[0152] 如图1和图2所示,经由线性回归来探索  $\Delta$  NIS或  $\Delta$  mNIS+7的进展与TTR浓度之间的关系。TTR和平均给药前低谷期[TTR]与在6个月的mNIS+7的变化相关。

[0153] 在0、6和12个月测量NIS和mNIS+7。 $\Delta$  NIS或  $\Delta$  mNIS+7从0至6个月和从0至12个月被用作响应变量。预测变量包括TTR浓度的两种不同测量:TTR蛋白质浓度曲线下面积(“AUC”),以及在第84和168天(用于0-6个月的比较)和第84、168、273和357天(用于0-12个月的比较)相对于基线的平均敲低百分比。

[0154] 对于两种TTR测量,“基线”定义为所有给药前值的平均值。使用原始TTR浓度( $\mu\text{g/mL}$ )和梯形法,从基线值(在第0天插入)开始并且延伸至第182天(用于0-6个月的比较)或第357天(用于0-12个月的比较)来计算TTR AUC。在每个安排的时间点计算相对于基线的敲低百分比。进行了线性回归分析,并且报告了与零假设(在预测变量和响应变量之间不存在关联)相关联的P值。

[0155] 在具有相似基线NIS的患者群体中,在12个月时mNIS+7和NIS的平均变化分别为-2.5和0.4分,与来自先前FAP研究的在12个月估计的mNIS+7和NIS的快速增加(例如,10-18分的增加)相比是有利的。帕提斯然对神经病变损伤评分进展的有利影响与TTR降低的程度相关。这表明,通过帕提斯然对血清TTR负荷的降低给FAP患者带来临床益处。

[0156] 尽管已经参考优选实施例和各种替代实施例具体示出和描述了本发明,但是相关领域的技术人员将理解,可以在形式和细节上进行各种改变而不脱离本发明的精神和范围。

[0157] 出于所有目的,在本说明书的正文中引用的所有参考文献、发布的专利和专利申请通过引用以其整体特此结合。

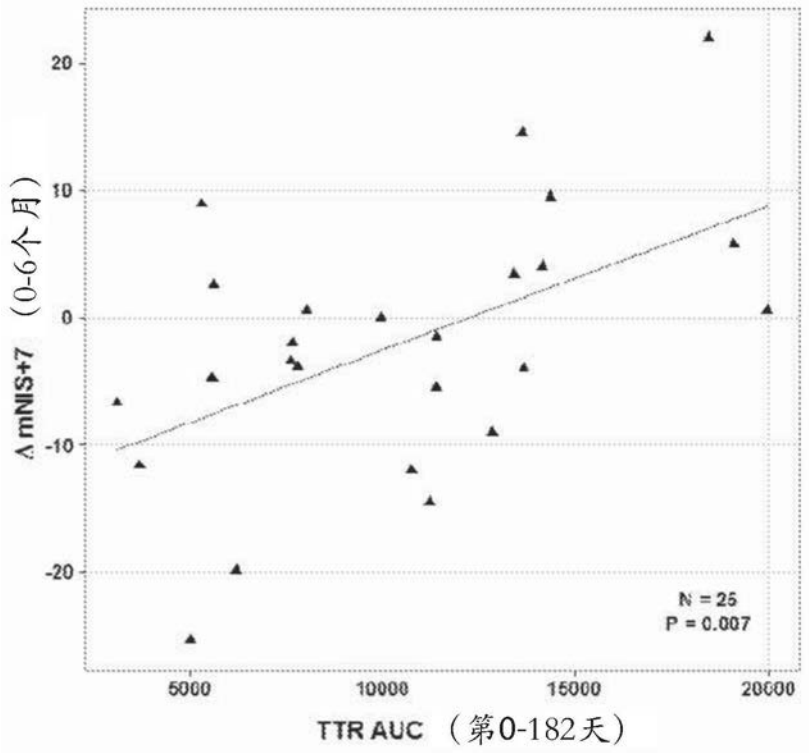


图1

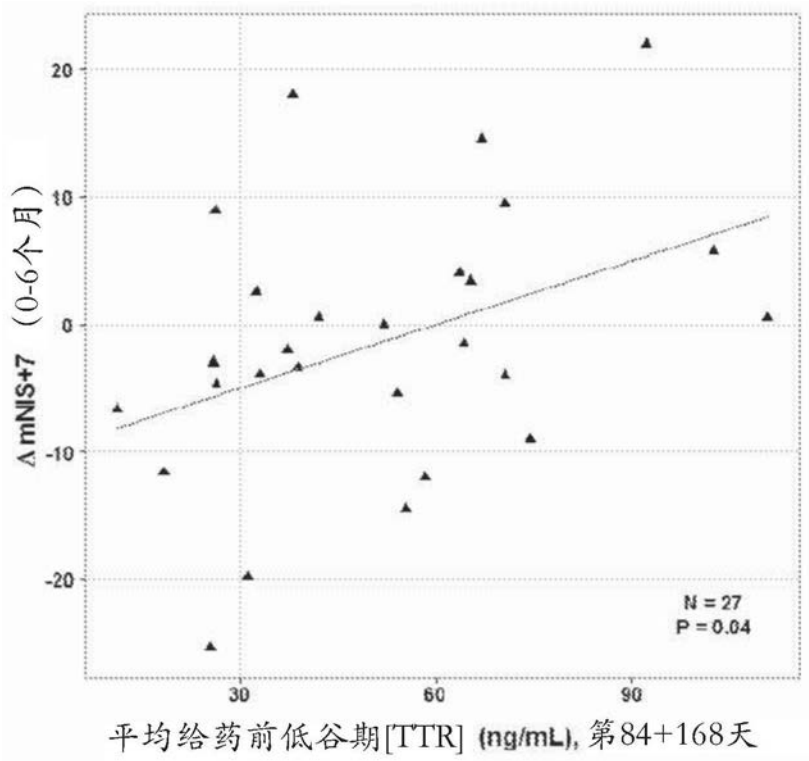


图2