



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114015692 B

(45) 授权公告日 2024.12.31

(21) 申请号 202111348463.3

(22) 申请日 2014.03.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114015692 A

(43) 申请公布日 2022.02.08

(30) 优先权数据
61/782,531 2013.03.14 US
61/837,399 2013.06.20 US
61/904,579 2013.11.15 US
61/912,777 2013.12.06 US
61/942,367 2014.02.20 US

(62) 分案原申请数据
201480027279.0 2014.03.13

(73) 专利权人 阿尔尼拉姆医药有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 K·菲茨杰拉德 J·巴特勒
B·贝腾考特 A·博罗多夫斯基
S·库奇曼奇 K·查里斯
M·玛诺哈兰 M·迈尔
K·G·雷杰夫 D·福斯特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

- G12N 15/113 (2010.01)
- A61K 31/713 (2006.01)
- A61K 47/54 (2017.01)
- A61P 3/10 (2006.01)
- A61P 7/04 (2006.01)
- A61P 9/02 (2006.01)
- A61P 9/10 (2006.01)
- A61P 9/14 (2006.01)
- A61P 11/06 (2006.01)
- A61P 13/12 (2006.01)
- A61P 15/06 (2006.01)
- A61P 17/06 (2006.01)
- A61P 19/02 (2006.01)
- A61P 25/00 (2006.01)
- A61P 25/28 (2006.01)
- A61P 27/02 (2006.01)
- A61P 29/00 (2006.01)
- A61P 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件

- EP 1752536 A1, 2007.02.14
- US 2011015252 A1, 2011.01.20

审查员 万青

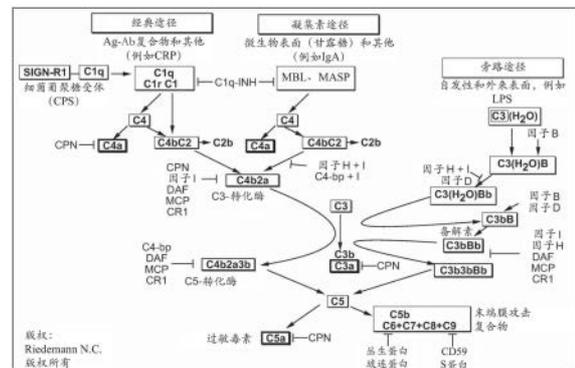
权利要求书7页 说明书218页
序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

补体组分C5 iRNA组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及iRNA例如双链核糖核酸(dsRNA)、靶向补体组分C5基因的组合物以及使用此种iRNA(例如dsRNA)、组合物来抑制C5的表达并且治疗患有补体组分C5相关联的疾病(例如,阵发性睡眠性血红蛋白尿症)的受试者的方法。



CN 114015692 B

1. 一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂或其药学上可接受的盐,

其中所述dsRNA试剂包含形成双链区的一个有义链和一个反义链,其中所述反义链包含SEQ ID NO:113的核苷酸序列5'-UAUUUAAAAUAUCUUGCUUUU-3'的至少20个连续核苷酸,其中所述dsRNA试剂包含至少一个修饰的核苷酸,且其中每个链的长度是不多于25个核苷酸。

2. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述反义链包含SEQ ID NO:113的核苷酸序列5'-UAUUUAAAAUAUCUUGCUUUU-3'。

3. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述有义链包含SEQ ID NO:62的核苷酸序列5'-AAGCAAGAUUUUUUAAUA-3'。

4. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述有义链包含SEQ ID NO:62的核苷酸序列5'-AAGCAAGAUUUUUUAAUA-3',且所述反义链包含SEQ ID NO:113的核苷酸序列5'-UAUUUAAAAUAUCUUGCUUUU-3'。

5. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸均包含修饰。

6. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述修饰的核苷酸中的至少一个是选自下组,该组由以下各项组成:3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁定核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸以及连接到胆固醇基衍生物或十二烷酸二癸酰胺基团上的末端核苷酸。

7. 如权利要求6所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述修饰的核苷酸包含3'-末端脱氧-胸腺嘧啶核苷酸(dT)的一个短序列。

8. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述双链区的长度是20-21个核苷酸对。

9. 如权利要求8所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述双链区的长度是20个核苷酸对。

10. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中至少一个链包含具有至少1个核苷酸的一个3'突出端。

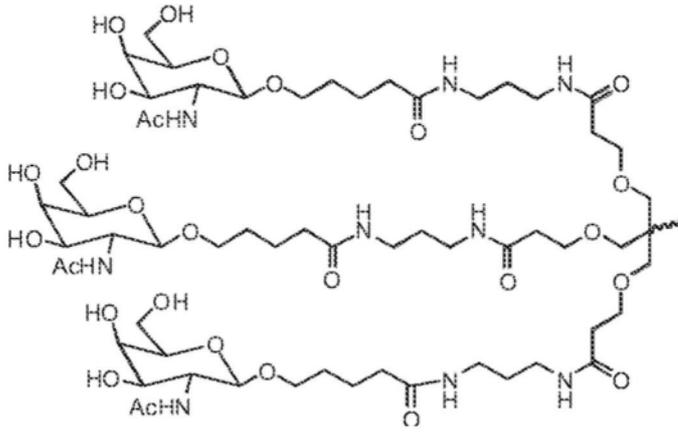
11. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中至少一个链包含具有至少2个核苷酸的一个3'突出端。

12. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,进一步包含一个配体。

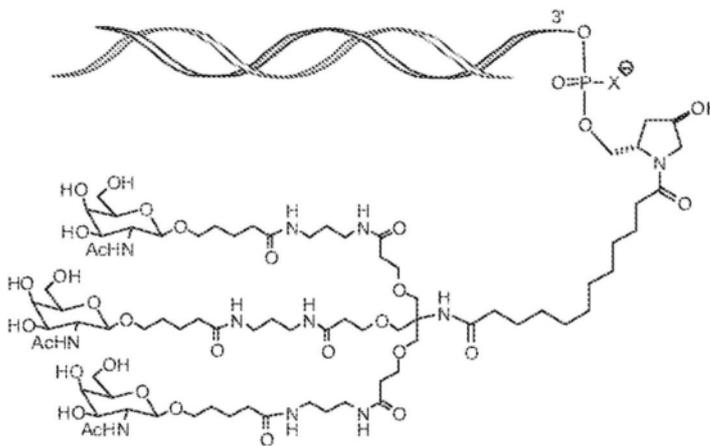
13. 如权利要求12所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该配体被缀合到该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐的该有义链的3'端上。

14. 如权利要求12所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该配体是一种N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

15. 如权利要求14所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该配体是



16. 如权利要求14所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该dsRNA试剂如以下示意所示的被缀合到该配体上,



并且,其中X是O或S。

17. 如权利要求16所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中X是O。

18. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述有义链包含核苷酸序列5' -asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua-3',且所述反义链包含核苷酸序列5' -usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT-3',

其中a、g、c和u分别为2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U;Af、Gf、Cf和Uf分别为2'-氟代A、G、C和U;dT为脱氧-胸腺嘧啶核苷酸;且s为硫代磷酸酯键联。

19. 如权利要求18所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,进一步包含一个配体。

20. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该双链区的长度是20-25个核苷酸对。

21. 如权利要求20所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该双链区的长度是20-23个核苷酸对。

22. 如权利要求20所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该双链区的长度是23-25个核苷酸对。

23. 如权利要求20所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该双链区的长度是21-23个核苷酸对。

24. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述有义链长度为21-23个核苷酸,和所述反义链长度为21-25个核苷酸。

25. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述至少一个修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-烷基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧、2'-羟基以及其组合。

26. 如权利要求25所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述至少一个修饰的核苷酸是2'-0-甲基或2'-氟代修饰。

27. 如权利要求12所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该配体是通过一个二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

28. 如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述dsRNA试剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联。

29. 如权利要求28所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的3'-末端处。

30. 如权利要求29所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述链是该反义链。

31. 如权利要求29所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述链是该有义链。

32. 如权利要求28所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的5'-末端处。

33. 如权利要求32所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述链是该反义链。

34. 如权利要求32所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述链是该有义链。

35. 如权利要求28所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的5'-末端和3'-末端两者处。

36. 如权利要求35所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述链是该反义链。

37. 一种分离的细胞,含有如权利要求1-36中任一项所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐,其中所述细胞不是胚胎干细胞或生殖细胞。

38. 一种用于抑制补体组分C5基因的表达的药物组合物,该组合物包含如权利要求1-36中任一项所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐。

39. 如权利要求38所述的药物组合物,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐存在于无缓冲的溶液中。

40. 如权利要求39所述的药物组合物,其中所述无缓冲的溶液是盐水或水。

41. 如权利要求38所述的药物组合物,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐存在于缓冲溶液中。

42. 如权利要求41所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。

43. 如权利要求41所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

44. 一种药物组合物,包含如权利要求1所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐和一种脂质配制品。

45. 如权利要求44所述的药物组合物,其中该脂质配制品包含一种LNP。

46. 如权利要求44所述的药物组合物,其中该脂质配制品包含一种MC3。

47. 如权利要求1-36中任一项所述的dsRNA试剂或其药学上可接受的盐或如权利要求38-46中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗患有溶血病症的受试者的药物中的用途。

48. 如权利要求47所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐或药物组合物在该受试者中引起血管内溶血减少、血红蛋白水平稳定和/或C5蛋白减少。

49. 如权利要求47所述的用途,其中该溶血病症是阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。

50. 如权利要求47所述的用途,其中该溶血病症是非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。

51. 如权利要求47所述的用途,其中该受试者是人。

52. 如权利要求47-51中任一项所述的用途,进一步包括一种抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段。

53. 如权利要求47-52中任一项所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于以0.01mg/kg至10mg/kg或0.5mg/kg至50mg/kg的剂量给予。

54. 如权利要求53所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于以10mg/kg至30mg/kg的剂量给予。

55. 如权利要求53所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于以选自下组的剂量给予,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg。

56. 如权利要求53所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于每周一次给予。

57. 如权利要求53所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于每周两次给予。

58. 如权利要求53所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于每月两次给予。

59. 如权利要求47-58中任一项所述的用途,其中该dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于皮下给予。

60. 如权利要求47所述的用途,进一步包括测量所述受试者中的血红蛋白和/或LDH水平。

61. 如权利要求52所述的用途,其中所述抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段是依库珠单抗。

62. 治疗有效量的双链核糖核酸(dsRNA)试剂或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患有溶血病症的受试者的药物的用途,其中所述dsRNA试剂包含形成双链区的一个有义链和一个反义链,

其中所述反义链包含SEQ ID NO:113的核苷酸序列5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3'的至少20个连续核苷酸,其中所述dsRNA试剂包含至少一个修饰的核苷酸,且其中每个链的长度是不多于25个核苷酸,

其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐与抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段一起施用。

63. 如权利要求62所述的用途,其中所述有义链包含SEQ ID NO:62的核苷酸序列5'-AAGCAAGAUUUUUUAUAUA-3',且所述反义链包含SEQ ID NO:113的核苷酸序列5'-UAUUAUAAAAUAUCUUGCUUUU-3'。

64. 如权利要求62所述的用途,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸均包含修饰。

65. 如权利要求64所述的用途,其中所述至少一个修饰的核苷酸和/或所述修饰选自: 3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁定核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸以及连接到胆固醇基衍生物或十二烷酸二癸酰胺基团上的末端核苷酸。

66. 如权利要求65所述的用途,其中所述修饰的核苷酸包含3'-末端脱氧-胸腺嘧啶核苷酸(dT)的短序列。

67. 如权利要求62所述的用途,其中所述双链区的长度是17个核苷酸对。

68. 如权利要求62所述的用途,其中所述双链区的长度是17-23个核苷酸对、长度17-25个核苷酸对、长度19-21个核苷酸对、长度21-23个核苷酸对或长度23-25个核苷酸对。

69. 如权利要求68所述的用途,其中所述双链区的长度是21个核苷酸对。

70. 如权利要求62所述的用途,其中所述有义链的长度是21-23个核苷酸,和所述反义链的长度是21-25个核苷酸。

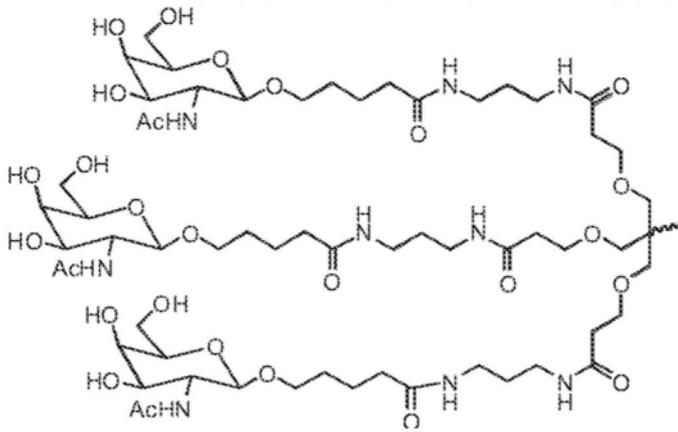
71. 如权利要求62所述的用途,其中至少一个链包含具有至少1个核苷酸或至少2个核苷酸的3'突出端。

72. 如权利要求62所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐进一步包含配体。

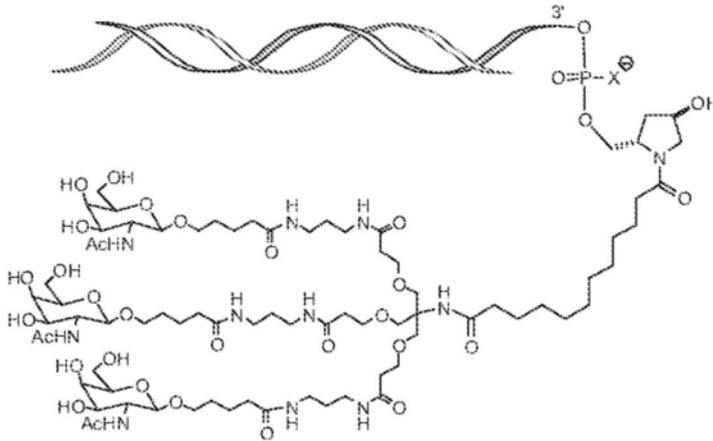
73. 如权利要求72所述的用途,其中所述配体或其药学上可接受的盐被缀合到该dsRNA试剂的该有义链的3'端上。

74. 如权利要求72所述的用途,其中所述配体是通过二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

75. 如权利要求74所述的用途,其中所述配体是



76. 如权利要求74所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐如下示意图所示的被缀合到该配体上:



并且其中X是O或S。

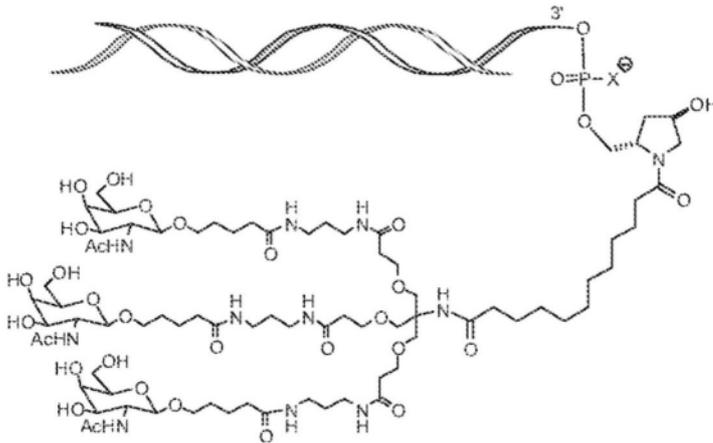
77. 如权利要求76所述的用途,其中X是O。

78. 治疗有效量的双链核糖核酸 (dsRNA) 试剂或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患有溶血病症的受试者的药物的用途,其中所述dsRNA试剂包含形成双链区的一个有义链和一个反义链,

其中所述有义链包含SEQ ID NO:2876的核苷酸序列5'-asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua-3',并且其中所述反义链包含SEQ ID NO:2889的核苷酸序列5'-usAfsUfuAfuaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT-3',

其中a、g、c和u分别为2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U;Af、Gf、Cf和Uf分别为2'-氟代A、G、C和U;dT为脱氧-胸腺嘧啶核苷酸;且s为硫代磷酸酯键联,且

其中所述有义链的3'端如以下示意所示的被缀合到配体上:



其中X是O;

其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐与抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段一起施用。

79. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐存在于无缓冲的溶液中。

80. 如权利要求79所述的用途,其中所述无缓冲的溶液是盐水或水。

81. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐存在于缓冲溶液中。

82. 如权利要求81所述的用途,其中所述缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。

83. 如权利要求81所述的用途,其中所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

84. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述抗补体组分C5抗体是依库珠单抗。

85. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐在所述受试者中减少血管内溶血、稳定血红蛋白水平和/或降低C5蛋白水平。

86. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述溶血病症是阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。

87. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述补体组分C5相关联的疾病是非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。

88. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述受试者是人。

89. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐包含0.01mg/kg至10mg/kg或0.5mg/kg至50mg/kg的剂量。

90. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于每周一次、每周两次或每月两次施用于所述受试者。

91. 如权利要求62或78所述的用途,其中所述dsRNA试剂或其药学上可接受的盐用于皮下施用。

补体组分C5 iRNA组合物及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2014年3月13日和发明名称为“补体组分C5 iRNA组合物及其使用方法”的201480027279.0号发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2013年3月14日提交的美国临时专利申请号:61/782,531、于2013年6月20日提交的美国临时专利申请号:61/837,399和于2013年11月15日提交的美国临时专利申请号:61/904,579、于2013年12月6日提交的美国临时专利申请号:61/912,777以及2014年2月20日提交的美国临时专利申请号:61/942367的权益。将前述临时专利申请每一者的全部内容特此通过引用结合在此。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此通过引用以其全文结合的序列表。创建于2014年3月10日的所述ASCII副本被命名为121301-00520_SL.txt并且大小为734,486个字节。

发明背景

[0006] 在19世纪90年代,当发现补体通过存在于正常血清中的热稳定性抗体帮助或“补充”杀死细菌时,首次发现了补体(沃尔波特(Walport),M.J.(2001)新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)344:1058)。补体系统由多于30种蛋白质组成,这些蛋白质或者作为可溶性蛋白存在于血液中或者作为膜相关蛋白存在。补体的激活引起依序的酶促反应级联(称为补体激活途径),从而导致有效的过敏毒素C3a和C5a的形成,这些过敏毒素诱发从化学吸引到细胞凋亡范围内的多种生理学反应。最初,补体被认为在先天免疫方面起主要作用,其中对抗入侵病原体发动有力和快速的反应。然而,最近越发明显的是,补体还在适应性免疫方面起重要作用,该适应性免疫涉及帮助消除病原体(邓克尔伯格(Dunkelberger)JR和宋(Song)WC.(2010)细胞研究(Cell Res.)20:34;莫利纳(Molina)H等人(1996)美国国家科学院院报(Proc Natl Acad Sci U S A.)93:3357)、帮助维持防止病原性再入侵的免疫记忆T细胞和B细胞,并且补体涉及许多人体病理学病况(曲(Qu)H等人(2009)分子免疫学(Mol Immunol.)47:185;瓦格纳(Wagner)E.和法兰克(Frank)MM.(2010)自然评论:药物发现(Nat Rev Drug Discov.)9:43)。

[0007] 已知补体激活通过三种不同途径发生:旁路途径、经典途径和凝集素途径(图1),涉及主要作为非活性酶原存在的蛋白质,然后这些非活性酶原依序地裂解并且激活。补体激活的所有途径均引起C5分子的裂解,从而产生过敏毒素C5a和随后形成末端补体复合体(C5b-9)的C5b。C5a通过与经典G蛋白偶联受体C5aR(CD88)以及与表达在不同免疫细胞和非免疫细胞上的非G蛋白偶联受体C5L2(GPR77)相互作用来发挥主要的促炎性活性。C5b-9通过形成膜攻击复合体(MAC)来引起细胞溶解,并且亚溶解型MAC和可溶性C5b-9还具有众多的非细胞溶解免疫功能。从C5裂解产生的这两种补体效应子C5a和C5b-9是在不同疾病中负责传播和/或启动病理学的补体系统的关键组分,这些疾病包括阵发性睡眠性血红蛋白尿症、类风湿性关节炎、缺血-再灌注损伤以及神经变性疾病。

[0008] 迄今为止,仅有一种靶向C5-C5a轴线的治疗剂可供用于治疗补体组分C5相关联的疾病,抗C5抗体依库珠单抗(eculizumab) (**Soliris® (索利瑞斯®)**)。虽然已经显示依库珠单抗有效用于治疗阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)和非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS),并且针对另外的补体组分C5相关联的疾病当前正进行临床试验评估,但是依库珠单抗疗法要求年花费约\$400,000的每周高剂量的输注,接着是每两周的维持输注。因此,在本领域中存在对患有补体组分C5相关联的疾病的受试者进行替代疗法和联合疗法的需要。

发明概述

[0009] 本发明提供了iRNA组合物,这些iRNA组合物影响C5基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体(RISC)介导的裂解。该C5基因可以是在一种细胞内,例如在一个受试者如人内的一种细胞。本发明还提供了用于治疗患有将受益于抑制或减少C5基因的表达的病证的受试者的方法和联合疗法,该病症例如补体组分C5相关联的疾病,如阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)和非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS),这些方法和联合疗法使用影响C5基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体(RISC)介导的裂解的iRNA组合物来抑制C5基因的表达。

[0010] 因此,一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,其中该dsRNA包含一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0011] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,其中该dsRNA包含一个有义链和一个反义链,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0012] 在一个实施例中,这些有义链和反义链包含选自下组的序列,该组由以下各项组成:A-118320、A-118321、A-118316、A-118317、A-118332、A-118333、A-118396、A-118397、A-118386、A-118387、A-118312、A-118313、A-118324、A-118325、A-119324、A-119325、A-119332、A-119333、A-119328、A-119329、A-119322、A-119323、A-119324、A-119325、A-119334、A-119335、A-119330、A-119331、A-119326、A-119327、A-125167、A-125173、A-125647、A-125157、A-125173和A-125127。在另一个实施例中,这些有义链和反义链包含选自下组的序列,该组由表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中的任何序列组成。在一个实施例中,该dsRNA试剂包含至少一个修饰的核苷酸。

[0013] 一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,其中该dsRNA试剂包含一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含核苷酸序列AAGCAAGAUUUUUUAUAAUA (SEQ ID NO:62),并且其中该反义链包含核苷酸序列UAUUUAUUUUUAUCUUGCUUUU (SEQ ID NO:113)。在一个实施例中,该dsRNA试剂包含至少一个修饰的核苷酸,如下所述。

[0014] 一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与

SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该有义链的基本上所有的核苷酸和该反义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸,并且其中该有义链被缀合到附接在3'-末端处的一个配体上。

[0015] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均包含一种修饰。

[0016] 在一个实施例中,该有义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸。在另一个实施例中,该反义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸。在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。在另一个实施例中,该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在又一个实施例中,该有义链被缀合到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处。

[0017] 在一个实施例中,这些修饰的核苷酸中的至少一个是选自下组,该组由以下各项组成:3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁定核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸以及连接到胆固醇基衍生物或十二烷酸二癸酰胺基团上的末端核苷酸。

[0018] 在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸包含3'-末端脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。

[0019] 在一个实施例中,该互补区的长度是至少17个核苷酸。在另一个实施例中,该互补区的长度是在19个与21个核苷酸之间。

[0020] 在一个实施例中,该互补区的长度是19个核苷酸。

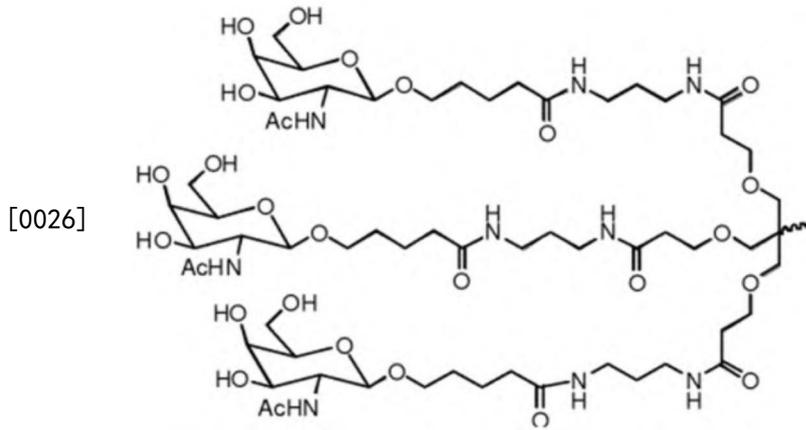
[0021] 在一个实施例中,每个链的长度是不多于30个核苷酸。

[0022] 在一个实施例中,至少一个链包含具有至少1个核苷酸的3'突出端。在另一个实施例中,至少一个链包含具有至少2个核苷酸的3'突出端。

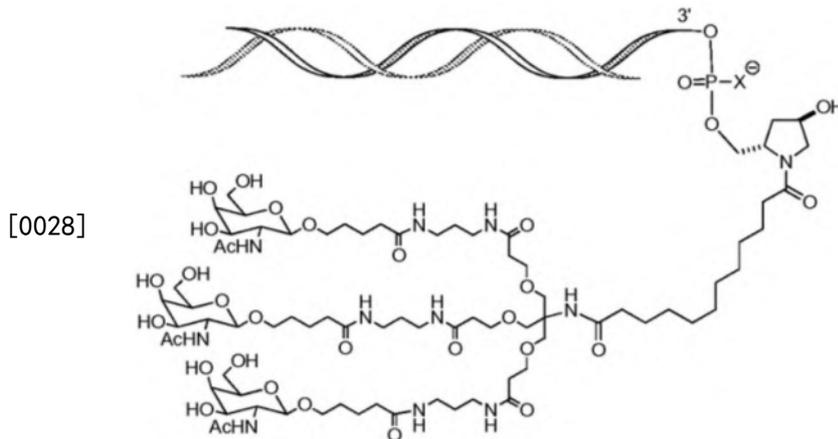
[0023] 在一个实施例中,该dsRNA试剂进一步包含一个配体。

[0024] 在一个实施例中,该配体被缀合到该dsRNA试剂的该有义链的3'端上。

[0025] 在一个实施例中,该配体是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。在一个实施例中,该配体是



[0027] 在一个实施例中,该dsRNA试剂被缀合到以下示意图中所示的配体上,



[0029] 并且其中X是O或S。

[0030] 在一个实施例中,该X是O。

[0031] 在一个实施例中,该互补区由表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个的反义序列中的一个组成。

[0032] 在一个实施例中,该dsRNA试剂是选自下组,该组由以下各项组成:AD-58123、AD-58111、AD-58121、AD-58116、AD-58133、AD-58099、AD-58088、AD-58642、AD-58644、AD-58641、AD-58647、AD-58645、AD-58643、AD-58646、AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651。

[0033] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,其中该dsRNA试剂包含一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含核苷酸序列AAGCAAGAUUUUUUAUAUA (SEQ ID NO:62),并且其中该反义链包含核苷酸序列UAUUUAUUUUUAUCUUGCUUUUdTdT (SEQ ID NO:2899)。

[0034] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,其中该dsRNA试剂包含一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含核苷酸序列asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfauaL96 (SEQ ID NO:2876),并且其中该反义链包含核苷酸序列usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT (SEQ ID NO:2889)。

[0035] 一方面,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中该反义链包含与编码C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双

链RNA_i试剂由式(III)表示:

[0036] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0037] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0038] 其中:

[0039] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0040] p、p'、q和q'各自独立地是0-6;

[0041] 各N_a和N_a'独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0042] 各N_b和N_b'独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0043] 各n_p、n_p'、n_q和n_q'独立地表示突出端核苷酸,该n_p、n_p'、n_q和n_q'中的每一个可以或可以不存在;

[0044] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序;

[0045] N_b上的修饰不同于Y上的修饰,并且N_b'上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0046] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0047] 在一个实施例中,i是0;j是0;i是1;j是1;i和j这两者均是0;或i和j这两者均是1。

[0048] 在一个实施例中,k是0;l是0;k是1;l是1;k和l这两者均是0;或k和l这两者均是1。

[0049] 在一个实施例中,XXX与X'X'X'互补,YYY与Y'Y'Y'互补,并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。

[0050] 在一个实施例中,该YYY基序出现在该有义链的裂解位点处或附近。

[0051] 在一个实施例中,该Y'Y'Y'基序出现在从5'-端起该反义链的11、12和13位置处。

[0052] 在一个实施例中,该Y'是2'-O-甲基。

[0053] 在一个实施例中,式(III)由式(IIIa)表示:

[0054] 有义: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0055] 反义: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)。

[0056] 在另一个实施例中,式(III)由式(IIIb)表示:

[0057] 有义: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0058] 反义: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIb)

[0059] 其中各N_b和N_b'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0060] 在又一个实施例中,式(III)由式(IIIc)表示:

[0061] 有义: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0062] 反义: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIc)

[0063] 其中各N_b和N_b'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0064] 在另一个实施例中,式(III)由式(IIIId)表示:

[0065] 有义: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0066] 反义: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIId)

[0067] 其中各N_b和N_b'独立地表示包含1-5个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,并且各N_a和N_a'独立地表示包含2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0068] 在一个实施例中,该双链区的长度是15-30个核苷酸对。

[0069] 在一个实施例中,该双链区的长度是17-23个核苷酸对。在另一个实施例中,该双链区的长度是17-25个核苷酸对。在另一个实施例中,该双链区的长度是23-27个核苷酸对。在又一个实施例中,该双链区的长度是19-21个核苷酸对。在另一个实施例中,该双链区的长度是21-23个核苷酸对。

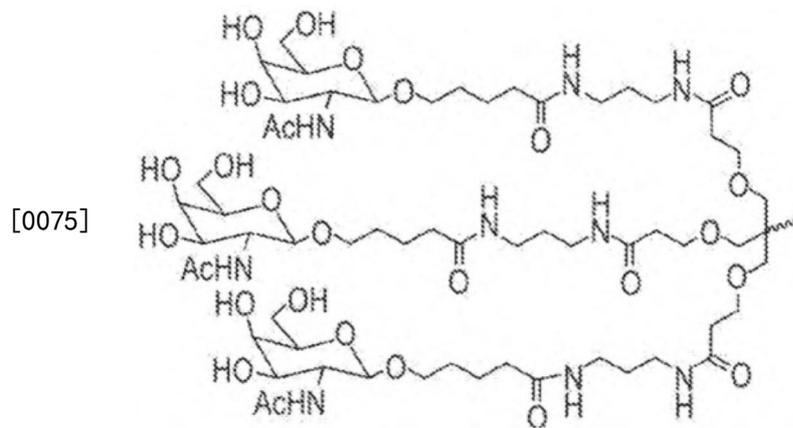
[0070] 在一个实施例中,每个链具有15-30个核苷酸。

[0071] 在一个实施例中,在这些核苷酸上的这些修饰是选自下组,该组由以下各项组成: LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-烷基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-脱氧、2'-羟基及其组合。

[0072] 在一个实施例中,在这些核苷酸上的这些修饰是2'-0-甲基或2'-氟代修饰。

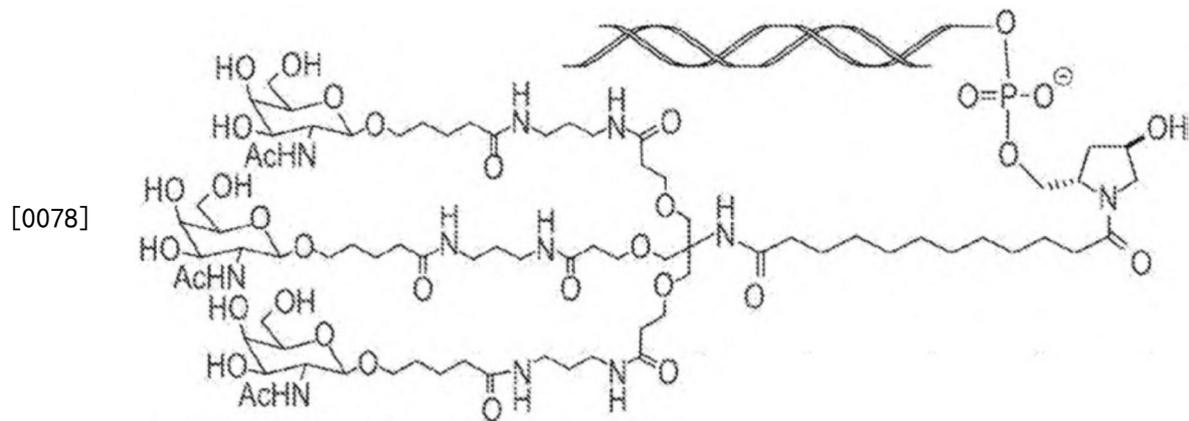
[0073] 在一个实施例中,该配体是通过一个二价或三价支链接头附接的一种或多种 GalNAc 衍生物。

[0074] 在一个实施例中,该配体是



[0076] 在一个实施例中,该配体被附接到该有义链的3'端上。

[0077] 在一个实施例中,该RNAi剂被缀合到以下示意图中所示的配体上



[0079] 在一个实施例中,该试剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联。

[0080] 在一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的3'-末端处。

[0081] 在一个实施例中,该链是该反义链。在另一个实施例中,该链是该有义链。

[0082] 在一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的5'-末

端处。

[0083] 在一个实施例中,该链是该反义链。在另一个实施例中,该链是该有义链。

[0084] 在一个实施例中,该硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联是在一个链的5'-末端和3'-末端这两者处。

[0085] 在一个实施例中,该链是该反义链。

[0086] 在一个实施例中,在该双链体的该反义链的5'-端的1位置处的碱基对是AU碱基对。

[0087] 在一个实施例中,这些Y核苷酸包含一种2'-氟代修饰。

[0088] 在一个实施例中,这些Y'核苷酸包含一种2'-O-甲基修饰。

[0089] 在一个实施例中, $p' > 0$ 。

[0090] 在一个实施例中, $p' = 2$ 。

[0091] 在一个实施例中, $q' = 0, p = 0, q = 0$,并且 p' 突出端核苷酸与靶mRNA互补。

[0092] 在一个实施例中, $q' = 0, p = 0, q = 0$,并且 p' 突出端核苷酸与靶mRNA不互补。

[0093] 在一个实施例中,该有义链具有总共21个核苷酸,并且该反义链具有总共23个核苷酸。

[0094] 在一个实施例中,至少一个 n_p' 通过一个硫代磷酸酯键联被连接到一个相邻核苷酸上。

[0095] 在一个实施例中,所有 n_p' 均通过硫代磷酸酯键联被连接到相邻核苷酸上。

[0096] 在一个实施例中,该RNAi试剂是选自在表4、表18、表19或表23中列出的RNAi试剂的组。在另一个实施例中,该RNAi试剂是选自下组,该组由以下各项组成:AD-58123、AD-58111、AD-58121、AD-58116、AD-58133、AD-58099、AD-58088、AD-58642、AD-58644、AD-58641、AD-58647、AD-58645、AD-58643、AD-58646、AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651。

[0097] 一方面,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达式的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中所述反义链包含与编码补体组分C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0098] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0099] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0100] 其中:

[0101] i, j, k 和 l 各自独立地是0或1;

[0102] p, p', q 和 q' 各自独立地是0-6;

[0103] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0104] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0105] 各 n_p, n_p', n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p, n_p', n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0106] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有

三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0107] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0108] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0109] 另一方面,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中所述反义链包含与编码补体组分C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0110] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0111] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0112] 其中:

[0113] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0114] 各 n_p 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0115] p、q和q'各自独立地是0-6;

[0116] $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过一个硫代磷酸酯键联被连接到一个相邻核苷酸上;

[0117] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0118] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0119] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0120] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0121] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0122] 另一方面,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中所述反义链包含与编码补体组分C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0123] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0124] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0125] 其中:

[0126] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0127] 各 n_p 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0128] p、q和q'各自独立地是0-6;

[0129] $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过一个硫代磷酸酯键联被连接到一个相邻核苷酸上;

[0130] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0131] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0132] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0133] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0134] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0135] 在又一个方面中,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中所述反义链包含与编码补体组分C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0136] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0137] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

[0138] 其中:

[0139] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0140] 各 n_p 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0141] p、q和q'各自独立地是0-6;

[0142] $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过一个硫代磷酸酯键联被连接到一个相邻核苷酸上;

[0143] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0144] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0145] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0146] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;

[0147] 其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联;并且

[0148] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0149] 另一方面,本发明提供了一种能够在细胞中抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中所述双链RNAi试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中所述反义链包含与编码补体组分C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0150] 有义: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0151] 反义: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

[0152] 其中:

[0153] 各 n_p 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0154] p、q和q'各自独立地是0-6;

[0155] $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过一个硫代磷酸酯键联被连接到一个相邻核苷酸上;

[0156] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰

的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0157] YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序,并且其中这些修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰;

[0158] 其中该有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联;并且

[0159] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上,其中该配体是通过一个二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物。

[0160] 一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5的表达的双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该有义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中该反义链的基本上所有的核苷酸包含选自下组的一种修饰,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰和2'-氟代修饰,其中该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,并且其中该有义链被缀合到通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处的一种或多种GalNAc衍生物上。

[0161] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。在另一个实施例中,每个链具有19-30个核苷酸。

[0162] 一方面,本发明提供了一种含有本发明的dsRNA试剂的细胞。

[0163] 一方面,本发明提供了一种编码dsRNA试剂的至少一个链的载体,其中该dsRNA试剂包含与编码补体组分C5的mRNA的至少一部分互补的一个区,其中该dsRNA的长度是30个碱基对或更少,并且其中该dsRNA试剂靶向该mRNA用于裂解。

[0164] 在一个实施例中,该互补区的长度是至少15个核苷酸。在另一个实施例中,该互补区的长度是19至21个核苷酸。在另一个实施例中,每个链具有19-30个核苷酸。

[0165] 一方面,本发明提供了一种包含本发明的载体的细胞。

[0166] 一方面,本发明提供了一种用于抑制补体组分C5基因的表达的药物组合物,该药物组合物包含本发明的dsRNA试剂。

[0167] 在一个实施例中,以一种无缓冲的溶液给予该RNAi试剂。

[0168] 在一个实施例中,该无缓冲的溶液是盐水或水。

[0169] 在一个实施例中,与一种缓冲溶液一起给予该RNAi试剂。

[0170] 在一个实施例中,该缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。

[0171] 在另一个实施例中,该缓冲溶液是磷酸盐缓冲的盐水(PBS)。

[0172] 另一方面,本发明提供了一种包含本发明的双链RNAi试剂和脂质配制品的药物组合物。

[0173] 在一个实施例中,该脂质配制品包含LNP。在另一个实施例中,该脂质配制品包含MC3。

[0174] 一方面,本发明提供了一种包含选自下组的反义多核苷酸试剂的组合物,该组由表3、表4、表5、表6、表19、表18、表20、表21和表23中的任一个中列出的序列组成。

[0175] 另一方面,本发明提供了一种包含选自下组的有义多核苷酸试剂的组合物,该组由表3、表4、表5、表6、表19、表18、表20、表21和表23中的任一个中列出的序列组成。

[0176] 在又一个方面中,本发明提供了一种选自下组的修饰的反义多核苷酸试剂,该组由表4、表6、表18、表19、表21和表23中的任一个中列出的反义序列组成。

[0177] 在一个另外的方面中,本发明提供了一种选自下组的修饰的有义多核苷酸试剂,该组由表4、表6、表18、表19、表21和表23中的任一个中列出的有义序列组成。

[0178] 一方面,本发明提供了治疗患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而治疗该患者,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0179] 另一方面,本发明提供了在患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而在患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者中预防至少一种症状,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0180] 另一方面,本发明提供了治疗患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而治疗该受试者,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21、表23中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0181] 在又一个方面中,本发明提供了在患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状的方法。这些方法包括向该受试者给予预防有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而在患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者中预防至少一种症状,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0182] 一方面,本发明提供了治疗患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者的方法,这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该反义链的基本上所有的核苷酸和该有义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸,并且其中该有义链被缀合到3'-末端处的一个或多个配体上。

[0183] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。

[0184] 在一个实施例中,该给予是皮下给予。

[0185] 在一个实施例中,该有义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,

该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,该反义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。在另一个实施例中,该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在又一个实施例中,该有义链被缀合到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处。

[0186] 另一方面,本发明提供了在患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状的方法,这些方法包括向该受试者给予预防有效量的双链RNAi试剂,其中该双链RNAi试剂包含形成一个双链区的一个有义链和一个反义链,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该反义链的基本上所有的核苷酸和该有义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸,并且其中该有义链被缀合到3'-末端处的一个配体上。

[0187] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。

[0188] 在一个实施例中,该给予是皮下给予。

[0189] 在一个实施例中,该有义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,该反义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。在另一个实施例中,该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在又一个实施例中,该有义链被缀合到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处。

[0190] 一方面,本发明提供了治疗患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含与一个反义链互补的一个有义链的dsRNA试剂,从而治疗该受试者,从而治疗患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者,其中该反义链包含与编码C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0191] 有义:5'-N_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3'

[0192] 反义:3'-n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'5' (III)

[0193] 其中:

[0194] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0195] p、p'、q和q'各自独立地是0-6;

[0196] 各N_a和N_a'独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0197] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0198] 各 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0199] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序;

[0200] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0201] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0202] 另一方面,本发明提供了在患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状的方法。这些方法包括向该受试者给予预防有效量的包含与一个反义链互补的一个有义链的dsRNA试剂,从而在患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者中预防至少一种症状,从而在患有将受益于补体组分C5表达减少的疾病或病症的受试者中预防至少一种症状,其中该反义链包含与编码C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0203] 有义:5' n_p - N_a -(X X X)_i- N_b -Y Y Y- N_b -(Z Z Z)_j- N_a - n_q 3'

[0204] 反义:3' n_p' - N_a' -(X'X'X')_k- N_b' -Y'Y'Y'- N_b' -(Z'Z'Z')_l- N_a' - n_q' 5' (III)

[0205] 其中:

[0206] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0207] p、p'、q和q'各自独立地是0-6;

[0208] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0209] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0210] 各 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0211] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序;

[0212] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0213] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0214] 在一个实施例中,向该受试者给予该dsRNA引起血管内溶血减少、血红蛋白水平稳定和/或C5蛋白累积减少。

[0215] 在一个实施例中,该病症是一种补体组分C5相关联的疾病。在一个实施例中,该补体组分C5相关联的疾病是选自下组,该组由以下各项组成:阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、哮喘、类风湿性关节炎(RA);抗磷脂抗体综合征;狼疮肾炎;缺血-再灌注损伤;典型的或感染性溶血性尿毒症综合征(tHUS);致密沉积物病(DDD);视神经脊髓炎(NMO);多灶性运动神经病(MMN);多发性硬化(MS);黄斑变性(例如,年龄相关的黄斑变性(AMD));溶血、肝脏酶升高以及血小板低(HELLP)综合征;血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自发性流产;寡免疫血管炎;大疱性表皮松解症;习惯性流产;先兆子痫、创伤性脑损伤、重症肌无力、冷凝集素病、皮炎大疱性类天疱疮、志贺毒素(Shiga

toxin) 大肠杆菌 (E. coli) 相关的溶血性尿毒症综合征、C3肾病、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关联的血管炎、体液和血管移植排斥、移植物功能异常、心肌梗塞、异源移植、脓毒症、冠状动脉病、皮炎、格雷夫斯病、动脉粥样硬化、阿耳茨海默氏病、全身性炎症反应脓毒症、脓毒性休克、脊髓损伤、肾小球性肾炎、桥本氏甲状腺炎、I型糖尿病、牛皮癣、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血 (AIHA)、ITP、肺出血肾炎综合征、德戈斯病、抗磷脂综合征 (APS)、灾难性APS (CAPS)、心血管病症、心肌炎、脑血管疾病、外周血管疾病、肾血管疾病、肠系膜/肠血管疾病、血管炎、亨诺赫-舍恩莱因紫癜肾炎、全身性红斑狼疮相关联的血管炎、与类风湿性关节炎相关联的血管炎、免疫复合物血管炎、高安氏病、扩张性心肌病、糖尿病性血管病、川崎氏病 (动脉炎)、静脉气体栓子 (VGE) 以及支架放置、旋转式动脉粥样斑块去除术、膜性肾病、格-巴二氏综合征和经皮穿刺冠状动脉成形术 (PTCA) 后的再狭窄。在另一个实施例中, 该补体组分C5相关联的疾病是阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)。在又一个实施例中, 该补体组分C5相关联的疾病是非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS)。

[0216] 在一个实施例中, 该受试者是人。

[0217] 在另一个实施例中, 本发明的这些方法进一步包括向该受试者给予一种抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段。

[0218] 在一个实施例中, 该抗体或其抗原结合片段抑制补体组分C5裂解成片段C5a和C5b。在另一个实施例中, 该抗补体组分C5抗体是依库珠单抗。

[0219] 在另一个实施例中, 本发明的这些方法进一步包括向该受试者给予一种脑膜炎球菌疫苗。

[0220] 在一个实施例中, 以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续4周, 接着在约一周以后以小于约900mg的第五剂量给予, 接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予。

[0221] 在另一个实施例中, 以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续4周, 接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予, 接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予。

[0222] 在一个实施例中, 该受试者的年龄是小于18岁, 并且

[0223] 以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续4周, 接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予, 接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予。

[0224] 在另一个实施例中, 该受试者的年龄是小于18岁, 并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续2周, 接着在约一周以后以小于约900mg的第三剂量给予, 接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予。

[0225] 在另一个实施例中, 该受试者的年龄是小于18岁, 并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续2周, 接着在约一周以后以小于约600mg的第三剂量给予, 接着此后约每两周以小于约600mg的剂量给予。

[0226] 在又一个实施例中, 该受试者的年龄是小于18岁, 并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续1周, 接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予, 接着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予。

[0227] 在一个实施例中, 该受试者的年龄是小于18岁, 并且以小于约300mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗, 持续1周, 接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予, 接

着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予。

[0228] 在另一个实施例中,本发明的这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆去除术或血浆交换。在一个这样的实施例中,以小于约600mg的剂量或以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0229] 在一个另外的实施例中,本发明的这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆输注。在一个这样的实施例中,以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0230] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约15mg/kg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,以约5mg/kg至约15mg/kg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0231] 在一个实施例中,以选自下组的剂量向该受试者给予依库珠单抗,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg和15mg/kg。

[0232] 在一个实施例中,通过一种静脉内输注向该受试者给予依库珠单抗。

[0233] 在另一个实施例中,向该受试者皮下给予依库珠单抗。

[0234] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约50mg/kg的剂量给予该dsRNA试剂。

[0235] 在另一个实施例中,以约10mg/kg至约30mg/kg的剂量给予dsRNA试剂。

[0236] 在一个实施例中,以选自下组的剂量给予该dsRNA试剂,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg。

[0237] 在一个实施例中,每周一次向该受试者给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,每周两次向该受试者给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,每个月两次向该受试者给予该dsRNA试剂。

[0238] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂。

[0239] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。在另一个实施例中,向该受试者同时给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。

[0240] 在一个实施例中,首先向该受试者给予该dsRNA试剂持续足以降低该受试者中的补体组分C5水平的一段时间,并且随后以小于约600mg的剂量给予依库珠单抗。

[0241] 在一个实施例中,该受试者中的补体组分C5水平降低至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。

[0242] 在一个实施例中,以约100-500mg的剂量给予依库珠单抗。

[0243] 在一个实施例中,本发明的这些方法进一步包括测量该受试者中的血红蛋白和/或LDH水平。

[0244] 在一个实施例中,该dsRNA被缀合到一个配体上。

[0245] 在一个实施例中,该配体被缀合到该dsRNA的该有义链的3'-端上。

[0246] 在一个实施例中,该配体是N-乙酰半乳糖胺(Ga1NAc)衍生物。

[0247] 一方面,本发明提供了在细胞中抑制补体组分C5表达的方法。这些方法包括使该细胞与包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂接触,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;并且使在步骤(a)中产生的该细胞维持足以获得C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该细胞中抑制该C5基因的

表达。

[0248] 另一方面,本发明提供了在细胞中抑制补体组分C5表达的方法。这些方法包括使该细胞与包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂接触,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;并且使在步骤(a)中产生的该细胞维持足以获得C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该细胞中抑制该C5基因的表达。

[0249] 另一方面,本发明提供了在细胞中抑制补体组分C5表达的方法,该方法包括使该细胞与包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂接触,该反义链包含一个互补区,该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该反义链的基本上所有的核苷酸和该有义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸,并且其中该有义链被缀合到3'-末端处的一个或多个配体上;并且使在第一步中产生的该细胞维持足以获得C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该细胞中抑制该C5基因的表达。

[0250] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。

[0251] 在一个实施例中,该有义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,该反义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。在另一个实施例中,该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在又一个实施例中,该有义链被缀合到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处。

[0252] 在又一个方面中,本发明提供了在细胞中抑制补体组分C5表达的方法。这些方法包括使该细胞与dsRNA试剂接触,该dsRNA试剂包含与一个反义链互补的一个有义链,其中该反义链包含与编码C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0253] 有义:5'-N_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3'

[0254] 反义:3'-n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'5' (III)

[0255] 其中:

[0256] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0257] p、p'、q和q'各自独立地是0-6;

[0258] 各N_a和N_a'独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0259] 各N_b和N_b'独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;各n_p、n_p'、n_q和n_q'独立地表示突出端核苷酸,该n_p、n_p'、n_q和n_q'中的每一个可以或可以不存在;

[0260] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有

三个相同修饰的一个基序；

[0261] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0262] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上;并且使在步骤(a)中产生的该细胞维持足以获得C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该细胞中抑制该C5基因的表达。

[0263] 在一个实施例中,该细胞是在一个受试者内。

[0264] 在一个实施例中,该受试者是人。

[0265] 在一个实施例中,该人受试者遭受一种补体组分C5相关联的疾病。

[0266] 在一个实施例中,该补体组分C5相关联的疾病是选自下组,该组由以下各项组成:阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、哮喘、类风湿性关节炎(RA);抗磷脂抗体综合征;狼疮肾炎;缺血-再灌注损伤;典型的或感染性溶血性尿毒症综合征(tHUS);致密沉积物病(DDD);视神经脊髓炎(NMO);多灶性运动神经病(MMN);多发性硬化(MS);黄斑变性(例如,年龄相关的黄斑变性(AMD));溶血、肝脏酶升高以及血小板低(HELLP)综合征;血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自发性流产;寡免疫血管炎;大疱性表皮松解症;习惯性流产;先兆子痫、创伤性脑损伤、重症肌无力、冷凝集素病、皮肌炎大疱性类天疱疮、志贺毒素(Shiga toxin)大肠杆菌(E.coli)相关的溶血性尿毒症综合征、C3肾病、抗嗜中性粒细胞细胞质抗体相关联的血管炎、体液和血管移植排斥、移植物功能异常、心肌梗塞、异源移植、脓毒症、冠状动脉病、皮肌炎、格雷夫斯病、动脉粥样硬化、阿耳茨海默氏病、全身性炎症反应脓毒症、脓毒性休克、脊髓损伤、肾小球性肾炎、桥本氏甲状腺炎、I型糖尿病、牛皮癣、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、ITP、肺出血肾炎综合征、德戈斯病、抗磷脂综合征(APS)、灾难性APS(CAPS)、心血管病症、心肌炎、脑血管疾病、外周血管疾病、肾血管疾病、肠系膜/肠血管疾病、血管炎、亨诺赫-舍恩莱因紫癜肾炎、全身性红斑狼疮相关联的血管炎、与类风湿性关节炎相关联的血管炎、免疫复合物血管炎、高安氏病、扩张性心肌病、糖尿病性血管病、川崎氏病(动脉炎)、静脉气体栓子(VGE)以及支架放置、旋转式动脉粥样斑块去除术、膜性肾病、格-巴二氏综合征和经皮穿刺冠状动脉成形术(PTCA)后的再狭窄。在另一个实施例中,该补体组分C5相关联的疾病是阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。在另一个实施例中,该补体组分C5相关联的疾病是非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。

[0267] 在一个实施例中,这些方法进一步包括使该细胞与一种抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段接触。

[0268] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段抑制补体组分C5裂解成片段C5a和C5b。

[0269] 在一个实施例中,该抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段是依库珠单抗。

[0270] 在一个实施例中,这些方法进一步包括使该细胞与一种脑膜炎球菌疫苗接触。

[0271] 在一个实施例中,以小于约600mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续4周,接着在约一周以后以小于约900mg的第五剂量接触,接着此后约每两周以小于约900mg的剂量接触。

[0272] 在另一个实施例中,以小于约900mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量接触,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量接触。

[0273] 在另一个实施例中,以小于约900mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量接触,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量接触。

[0274] 在又一个实施例中,以小于约600mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续2周,接着在约一周以后以小于约900mg的第三剂量接触,接着此后约每两周以小于约900mg的剂量接触。

[0275] 在一个实施例中,以小于约600mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续2周,接着在约一周以后以小于约600mg的第三剂量接触,接着此后约每两周以小于约600mg的剂量接触。

[0276] 在另一个实施例中,以小于约600mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量接触,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量接触。

[0277] 在一个实施例中,以小于约300mg的剂量每周使该细胞与依库珠单抗接触,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量接触,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量接触。

[0278] 在一个实施例中,该细胞在受试者体内。

[0279] 在一个实施例中,本发明的这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆去除术或血浆交换。在一个实施例中,以小于约600mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0280] 在一个实施例中,本发明的这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆输注。在一个实施例中,以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0281] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约15mg/kg的剂量使该细胞与依库珠单抗接触。

[0282] 在另一个实施例中,以约5mg/kg至约15mg/kg的剂量使该细胞与依库珠单抗接触。

[0283] 在一个实施例中,以选自下组的剂量使该细胞与依库珠单抗接触,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg和15mg/kg。

[0284] 在一个实施例中,通过一种静脉内输注向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,向该受试者皮下给予依库珠单抗。

[0285] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约50mg/kg的剂量使该细胞与该dsRNA试剂接触。

[0286] 在另一个实施例中,以约10mg/kg至约30mg/kg的剂量使该细胞与该dsRNA试剂接触。

[0287] 在一个实施例中,以选自下组的剂量使该细胞与该dsRNA试剂接触,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg。

[0288] 在一个实施例中,每周一次使该细胞与该dsRNA试剂接触。在另一个实施例中,每周两次向该受试者给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,每个月两次使该细胞与该dsRNA试剂接触。

[0289] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂。

[0290] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。在另一个实

施例中,向该受试者同时给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。

[0291] 在一个实施例中,使该细胞同时与该dsRNA试剂和该依库珠单抗接触。

[0292] 在一个实施例中,首先向该受试者给予该dsRNA试剂持续足以降低该受试者中的补体组分C5水平的一段时间,并且随后以小于约600mg的剂量给予依库珠单抗。

[0293] 在一个实施例中,该受试者中的补体组分C5水平降低至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。

[0294] 在一个实施例中,以约100-500mg的剂量给予依库珠单抗。

[0295] 在一个实施例中,首先使该细胞与该dsRNA试剂接触持续足以降低该细胞中的补体组分C5水平的一段时间,并且随后以小于约600mg的剂量使该细胞与依库珠单抗接触。

[0296] 在一个实施例中,该细胞中的补体组分C5水平降低至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。

[0297] 在一个实施例中,以约100-500mg的剂量使该细胞与依库珠单抗接触。

[0298] 一方面,本发明提供了在受试者中抑制C5表达的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而在该受试者中抑制C5的表达,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0299] 另一方面,本发明提供了在受试者中抑制C5表达的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而在该受试者中抑制C5的表达,该反义链包含一个互补区,该互补区包含与表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中列出的任一个反义序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0300] 另一方面,本发明提供了在受试者中抑制补体组分C5表达的方法,这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含形成一个双链区的一个有义链和一个反义链的dsRNA试剂,从而在该受试者中抑制C5基因的表达,其中该有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且该反义链包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中该反义链的基本上所有的核苷酸和该有义链的基本上所有的核苷酸是修饰的核苷酸,并且其中该有义链被缀合到3'-末端处的一个或多个配体上。

[0301] 在一个实施例中,该有义链的所有核苷酸和该反义链的所有核苷酸均是修饰的核苷酸。

[0302] 在一个实施例中,该给予是皮下给予。

[0303] 在一个实施例中,该有义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,该反义链的基本上所有的核苷酸是选自下组的修饰的核苷酸,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰、2'-氟代修饰和3'-末端dT核苷酸。在另一个实施例中,这些修饰的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)核苷酸的短序列。在另一个实施例中,该有义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含在5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和在3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在又一个实施例中,

该有义链被缀合到一种或多种GalNAc衍生物上,这些GalNAc衍生物通过一个支链二价或三价接头附接在3'-末端处。

[0304] 另一方面,本发明提供了在受试者中抑制C5表达的方法。这些方法包括向该受试者给予治疗有效量的包含与一个反义链互补的一个有义链的dsRNA试剂,从而在该受试者中抑制C5的表达,其中该反义链包含与编码C5的mRNA的一部分互补的一个区,其中每个链的长度是约14个至约30个核苷酸,其中该双链RNAi试剂由式(III)表示:

[0305] 有义:5' n_p - N_a -(X X X)_i- N_b -Y Y Y- N_b -(Z Z Z)_j- N_a - n_q 3'

[0306] 反义:3' n_p '- N_a '-(X'X'X')_k- N_b '-Y'Y'Y'- N_b '-(Z'Z'Z')_l- N_a '- n_q '5' (III)

[0307] 其中:

[0308] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0309] p 、 p' 、 q 和 q' 各自独立地是0-6;

[0310] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0311] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个核苷酸的寡核苷酸序列,这些核苷酸或者是修饰的或者是未修饰的或者是其组合;

[0312] 各 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p 、 n_p' 、 n_q 和 n_q' 中的每一个可以或可以不存在;

[0313] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序;

[0314] N_b 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 N_b' 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0315] 其中该有义链被缀合到至少一个配体上。

[0316] 在一个实施例中,这些方法进一步包括向该受试者给予一种抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段。

[0317] 在一个实施例中,该抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段是依库珠单抗。

[0318] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段抑制补体组分C5裂解成片段C5a和C5b。

[0319] 在一个实施例中,本发明的这些方法进一步包括向该受试者给予一种脑膜炎球菌疫苗。

[0320] 在一个实施例中,以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约900mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予。

[0321] 在另一个实施例中,以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予。

[0322] 在一个实施例中,该受试者的年龄是小于18岁,并且以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予。

[0323] 在另一个实施例中,该受试者的年龄是小于18岁,并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续2周,接着在约一周以后以小于约900mg的第三剂量给予,

接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予。

[0324] 在一个实施例中,该受试者的年龄是小于18岁,并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续2周,接着在约一周以后以小于约600mg的第三剂量给予,接着此后约每两周以小于约600mg的剂量给予。

[0325] 在另一个实施例中,该受试者的年龄是小于18岁,并且以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予。

[0326] 在又一个实施例中,该受试者的年龄是小于18岁,并且以小于约300mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予。

[0327] 在一个实施例中,这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆去除术或血浆交换。在一个实施例中,以小于约600mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0328] 在一个实施例中,这些方法进一步包括在该受试者中进行血浆输注。在一个实施例中,以小于约300mg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0329] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约15mg/kg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,以约5mg/kg至约15mg/kg的剂量向该受试者给予依库珠单抗。

[0330] 在另一个实施例中,以选自下组的剂量向该受试者给予依库珠单抗,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg和30mg/kg。

[0331] 在一个实施例中,通过一种静脉内输注向该受试者给予依库珠单抗。在另一个实施例中,向该受试者皮下给予依库珠单抗。

[0332] 在一个实施例中,以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约15mg/kg的剂量给予该dsRNA试剂。

[0333] 在一个实施例中,以约10mg/kg至约30mg/kg的剂量给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,以选自下组的剂量给予该dsRNA试剂,该组由以下各项组成:0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg。

[0334] 在一个实施例中,每周一次向该受试者给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,每周两次向该受试者给予该dsRNA试剂。在另一个实施例中,每个月两次向该受试者给予该dsRNA试剂。

[0335] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂。

[0336] 在一个实施例中,向该受试者皮下给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。在另一个实施例中,向该受试者同时给予该dsRNA试剂和该依库珠单抗。

[0337] 在一个实施例中,首先向该受试者给予该dsRNA试剂持续足以降低该受试者中的补体组分C5水平的一段时间,并且随后以小于约600mg的剂量给予依库珠单抗。

[0338] 在一个实施例中,该受试者中的补体组分C5水平降低至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。

[0339] 在一个实施例中,以约100-500mg的剂量给予依库珠单抗。

[0340] 在一个实施例中,该dsRNA试剂被缀合到一个配体上。

[0341] 在一个实施例中,该配体被缀合到该dsRNA试剂的该有义链的3'-端上。

[0342] 在一个实施例中,该配体是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

附图简要说明

[0343] 图1是三种补体途径:旁路途径、经典途径和凝集素途径的示意图。

[0344] 图2是示出在单次10mg/kg剂量的指定iRNA之后余留在C57BL/6小鼠中的补体组分C5的百分比的图。

[0345] 图3是示出在单次10mg/kg剂量的指定iRNA之后余留在C57BL/6小鼠中的补体组分C5的百分比的图。

[0346] 图4是示出在单次10mg/kg剂量的指定iRNA之后48小时余留在C57BL/6小鼠中的补体组分C5的百分比的图。

[0347] 图5A是示出在单次2.5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg皮下剂量的AD-58642之后在第4天和第7天余留在大鼠中的溶血百分比的图。

[0348] 图5B是示出在单次2.5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg皮下剂量的AD-58642之后在第7天余留在大鼠中的补体组分C5的量的蛋白质印迹。

[0349] 图6A和图6B是示出在单次1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg剂量的AD-58642之后5天余留在C57BL/6小鼠中的补体组分C5的百分比的图。

[0350] 图7A和图7B是示出在单次1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg剂量的AD-58642之后在第5天余留在C57BL/6小鼠中的溶血百分比的图。

[0351] 图8是示出在单次1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg剂量的AD-58642之后在第5天余留在C57BL/6小鼠中的补体组分C5的量的蛋白质印迹。

[0352] 图9是示出在单次0.625mg/kg、1.25mg/kg、2.5mg/kg、5.0mg/kg或10mg/kg剂量的AD-58641之后在第5天和第9天余留在小鼠血清中的补体组分C5蛋白的量的图。测定的定量下限(LLoQ)以虚线示出。

[0353] 图10是示出在第0天、第1天、第2天和第3天在0.625mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg剂量的AD-58641之后,在第8天余留在小鼠血清中的补体组分C5蛋白的量的图。测定的定量下限(LLoQ)以虚线示出。

[0354] 图11A和图11B描绘了在大鼠中重复给予化合物AD-58641的功效和累积效应。图11A是描绘了在以2.5mg/kg/剂量或5.0mg/kg/剂量,q2w x3(每周两次持续3周)重复给予之后,在第0天、第4天、第7天、第11天、第14天、第18天、第25天和第32天余留在大鼠血清中的溶血活性的图。图11B是示出余留在动物血清中的补体组分C5蛋白的量的蛋白质印迹。

[0355] 图12是示出在两轮每三天以2.5mg/kg或5mg/kg的AD-58641皮下给药持续8次剂量之前、之中和之后,在不同时间点下食蟹猴血清中的补体组分C5蛋白的量的图。C5蛋白水平被归一化成三个剂量前的样品的平均值。

[0356] 图13是示出在两轮每三天以2.5mg/kg或5mg/kg的AD-58641皮下给药持续8次剂量之前、之中和之后,在不同时间点下余留在食蟹猴血清中的溶血百分比的图。相对于最大溶血和对照样品中的背景溶血计算溶血百分比。

[0357] 图14是示出在单次1mg/kg剂量的指定iRNA之后在第5天余留在C57BL/6小鼠血清中的补体组分C5蛋白的百分比的图。

[0358] 图15是示出在单次0.25mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg或2.0mg/kg剂量的指定iRNA之后在第5天余留在C57BL/6小鼠血清中的补体组分C5蛋白的百分比的图。

[0359] 图16是示出在单次1mg/kg剂量的指定iRNA之后,在第6天、第13天、第20天、第27天和第34天余留在C57BL/6小鼠血清中的补体组分C5蛋白的百分比的图。

[0360] 图17是示出在第0天、第4天和第7天给予5mg/kg剂量的指定化合物之后,在不同时间点下余留在大鼠血清中的溶血百分比的图。

[0361] 图18A示出智人补体组分5 (C5) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1);图18B示出猕猴补体组分5 (C5) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:2);图18C示出小家鼠补体组分5 (C5) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3);图18D示出褐鼠补体组分5 (C5) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:4);图18E示出SEQ ID NO:1的反向补体 (SEQ ID NO:5);图18F示出SEQ ID NO:2的反向补体 (SEQ ID NO:6);图18G示出SEQ ID NO:3的反向补体 (SEQ ID NO:7);并且图18H示出SEQ ID NO:4的反向补体 (SEQ ID NO:8)。

[0362] 本发明的详细说明

[0363] 本发明提供了iRNA试剂,这些iRNA试剂影响补体组分C5基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体 (RISC) 介导的裂解。

[0364] 本发明的这些iRNA包括一个RNA链 (反义链),该RNA链具有长度是约30个核苷酸或更少的一个区,例如长度是15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸,该区基本上与C5基因的mRNA转录物的至少部分互补。使用这些iRNA能实现在哺乳动物中靶向降解C5基因的mRNA。具体地说,非常低剂量的C5 iRNA可以特异性地和有效地介导RNA干扰 (RNAi),从而引起对C5基因的表达的显著抑制。本发明已经证实了靶向C5的iRNA可以在体外和在体内介导RNAi,从而引起对C5基因的表达的显著抑制。因此,包括这些iRNA的方法和组合物有用于治疗将通过C5蛋白的水平 and/或活性降低而受益的受试者,如患有补体组分C5相关联的疾病如阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 的受试者。

[0365] 本发明还提供了用于治疗患有将受益于抑制或减少C5基因的表达的病证的受试者的方法和联合疗法,该病症例如补体组分C5相关联的疾病,如阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 和非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS),这些方法和联合疗法使用了影响补体组分C5基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体 (RISC) 介导的裂解的iRNA组合物。

[0366] 本发明还提供了用于在患有将受益于抑制或减少C5基因的表达的病证的受试者中预防至少一种症状例如溶血的方法,该病症例如补体组分C5相关联的疾病如阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 和非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS)。本发明进一步提供了iRNA组合物,这些iRNA组合物影响补体组分C5基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体 (RISC) 介导的裂解。该C5基因可以是在一种细胞内,例如在一个受试者如人内的一种细胞。

[0367] 本发明的这些联合疗法包括向患有有一种补体组分C5相关联的疾病的患者给予本发明的一种RNAi试剂和一种另外的治疗剂,如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段,例如依库珠单抗。本发明的这些联合疗法通过使C5 mRNA与本发明的一种iRNA试剂靶向来使该

受试者中的C5水平降低(例如,约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约99%),并且因此,允许治疗该受试者所要求的治疗(或预防)有效量的依库珠单抗减少,从而降低治疗成本并且容许更简单和更方便的给予依库珠单抗的方法,如皮下给予。

[0368] 以下详细说明披露了如何制备和使用抑制C5基因表达的含有iRNA的组合物,以及用于治疗患有将受益于抑制和/或减少这个基因的表达的疾病和病症的受试者的组合物、用途和方法。

[0369] I. 定义

[0370] 为了使本发明可更容易理解,首先定义某些术语。此外,应该注意的是,每当列举一个参数的一个值或取值范围时,目的是表明这些列举的值的中间值和范围也意在成为本发明的部分。

[0371] 在此使用冠词“一个(a)”和“一种(an)”是指一个或多于一个(即,至少一个)该冠词的语法对象。通过举例,“一个元件”意指一个元件或多于一个元件,例如多个元件。

[0372] 在此使用术语“包括(including)”意指短语“包括但不限于”,并且与该短语可互换使用。

[0373] 在此使用术语“或(or)”意指术语“和/或”,并且与该术语可互换使用,除非上下文清楚地另外指明。

[0374] 如在此所使用,与术语“C5”可互换使用的“补体组分C5”是指熟知的基因和多肽,该基因和多肽在本领域中又称为CPAMD4、C3和PZP样含 α -2-巨球蛋白结构域的蛋白质、过敏毒素C5a类似物、溶血补体(Hc)以及补体C5。人C5 mRNA转录物的序列可以例如在基因库登录号GI:38016946(NM_001735.2;SEQ ID NO:1)中找到。恒河猴C5 mRNA的序列可以例如在基因库登录号GI:297270262(XM_001095750.2;SEQ ID NO:2)中找到。小鼠C5 mRNA的序列可以例如在基因库登录号GI:291575171(NM_010406.2;SEQ ID NO:3)中找到。大鼠C5 mRNA的序列可以例如在基因库登录号GI:392346248(XM_345342.4;SEQ ID NO:4)中找到。使用公共可获得的数据库例如基因库容易地获得C5 mRNA序列的另外实例。

[0375] 如在此所使用的术语“C5”还指C5基因的天然存在的DNA序列变异,如C5基因中的单核苷酸多态性。已经鉴定了C5基因内的众多SNP,并且可以例如在NCBI dbSNP中找到(参见,例如ncbi.nlm.nih.gov/snp)。C5基因内的SNP的非限制性实例可以在NCBI dbSNP登录号rs121909588和rs121909587中找到。

[0376] 如在此所使用,“靶序列”是指在C5基因转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的一个连续部分,包括作为原代转录产物的RNA加工的产物的mRNA。在一个实施例中,序列的靶部分将是至少足够长的,以用作在C5基因转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的所述部分处或附近用于iRNA引导的裂解的底物。

[0377] 该靶序列的长度可以是约9-36个核苷酸,例如长度是约15-30个核苷酸。例如,该靶序列的长度可以是约15-30个核苷酸,15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸。以上列举

的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0378] 如在此所使用,术语“包含序列的链”是指包含一个核苷酸链的寡核苷酸,该核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法提到的顺序来描述。

[0379] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常代表对应地含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,将理解的是,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指如下进一步详细描述的修饰的核苷酸、或替代物置换部分(参见,例如表2)。技术人员应很好地意识到,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶可以被其他部分置换而基本上不改变一种寡核苷酸(包含一种具有这种置换部分的核苷酸)的碱基配对特性。例如非限制性地,包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸进行碱基配对。因此,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本发明中体现的dsRNA的核苷酸序列中由含有例如肌苷的核苷酸置换。在另一个实例中,寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以对应地置换为鸟嘌呤和尿嘧啶,以便形成与靶mRNA碱基配对的G-U摇摆。含有这类置换部分的序列适用于在本发明中体现的组合物和方法。

[0380] 如在此可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi试剂”、“iRNA试剂”、“RNA干扰试剂”是指含有作为在此定义的所述术语的RNA的试剂,并且该试剂通过一种RNA诱导沉默复合体(RISC)途径介导RNA转录物的靶向裂解。iRNA通过称为RNA干扰(RNAi)的方法引导mRNA的序列特异性降解。该iRNA在细胞(例如,受试者如哺乳动物受试者内的细胞)中调节(例如,抑制)C5的表达。

[0381] 在一个实施例中,本发明的RNAi试剂包括与靶RNA序列例如C5靶mRNA序列相互作用的一个单链RNA,以便引导靶RNA的裂解。不希望受理论约束,认为通过称为Dicer的III型核酸内切酶来将引入到细胞中的长双链RNA分解成siRNA(夏普(Sharp)等人(2001)基因与发育(Genes Dev.)15:485)。Dicer(核糖核酸酶-III样酶)使dsRNA加工成具有特征性的两个碱基3'突出端的19-23个碱基对短干扰RNA(伯恩斯坦(Bernstein)等人(2001)自然(Nature)409:363)。然后将siRNA结合到一种RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种螺旋酶使siRNA双链体展开,从而能够实现互补反义链导引靶标识别(尼卡能(Nykanen)等人(2001)细胞(Cell)107:309)。当结合至适当的靶mRNA时,RISC内的一种或多种核酸内切酶裂解该靶标以便诱导沉默(巴希尔(Elbashir)等人(2001)基因与发育15:188)。因此,一方面,本发明涉及一种在细胞内产生的单链RNA(siRNA)并且该单链RNA促进RISC复合体形成以实现靶基因即C5基因的沉默。因此,在此使用术语“siRNA”还指如上所述的RNAi。

[0382] 在另一个实施例中,该RNAi试剂可以是引入到细胞或生物体中以便抑制靶mRNA的单链siRNA。单链RNAi试剂结合至RISC核酸内切酶(Argonaute 2),然后该RISC核酸内切酶裂解靶mRNA。这些单链siRNA通常是15-30个核苷酸并且是化学修饰的。单链siRNA的设计和测试被描述于美国专利号8,101,348和利马(Lima)等人(2012)细胞150:883-894中,这些参考文献中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。在此描述的任何反义核苷酸序列可以被用作如在此所描述或如通过描述于利马等人(2012)细胞150:883-894中的方法化学修饰的单链siRNA。

[0383] 在另一个实施例中,用于本发明的这些组合物、用途和方法中的“iRNA”是双链RNA,并且在此称为“双链RNAi试剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA试剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指核糖核酸分子的复合体,该复合体具有包含两个反平行和基本上互补的核酸

链的双链体结构,称为相对于靶RNA即C5基因具有“有义”和“反义”取向。在本发明的一些实施例中,双链RNA(dsRNA)通过在此称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机理来引发靶RNA例如mRNA的降解。

[0384] 通常,dsRNA分子的每个链的大多数核苷酸是核糖核苷酸,但如在此所详细描述,每个链或这两个链还可以包括一个或多个非核糖核苷酸,例如脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。另外,如在本说明书中所使用,“RNAi试剂”可以包括具有化学修饰的核糖核苷酸;RNAi试剂可以在多个核苷酸上包括许多修饰。此类修饰可以包括在此披露的或在本领域中已知的所有类型的修饰。如在siRNA类型分子中所使用的任何此类修饰出于本说明书和权利要求的目的,涵盖在“RNAi试剂”中。

[0385] 双链体区可以具有容许通过RISC途径特异性降解希望的靶RNA的任何长度,并且长度可以在从约9个至36个碱基对的范围内,例如长度是约15-30个碱基对,例如长度是约9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个碱基对,如长度是约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0386] 形成双链体结构的两个链可以是一个更大的RNA分子的不同部分,或它们可以是单独的RNA分子。当这两个链是一个更大的分子的部分时,并且因此通过一个链的3'-端与形成双链体结构的对应的另一个链的5'-端之间的不间断核苷酸链来连接,连接的RNA链称为“发夹环”。发夹环可以包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施例中,该发夹环可以包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对的核苷酸。

[0387] 当dsRNA的两个基本上互补的链包含单独的RNA分子时,这些分子不是必须的,但是可以共价连接。当这两个链通过除了一个链的3'-端与形成双链体结构的对应的另一个链的5'-端之间的不间断核苷酸链以外的方式共价连接时,连接的结构称为“接头”。这些RNA链可以具有相同或不同数目的核苷酸。碱基对的最大数目是该dsRNA的最短链中的核苷酸数目减去存在于该双链体中的任何突出端。除了双链体结构以外,RNAi可以包含一个或多个核苷酸突出端。

[0388] 在一个实施例中,本发明的RNAi试剂是与靶RNA序列例如C5靶mRNA序列相互作用的具有24-30个核苷酸的dsRNA,以便引导靶RNA的裂解。不希望受理论约束,通过称为Dicer的III型核酸内切酶来将引入到细胞中的长双链RNA分解成siRNA(夏普等人(2001)基因与发育15:485)。Dicer(核糖核酸酶-III样酶)使dsRNA加工成具有特征性的两个碱基3'突出端的19-23个碱基对短干扰RNA(伯恩斯坦等人(2001)自然409:363)。然后将siRNA结合到一种RNA诱导沉默复合体(RISC)中,其中一种或多种螺旋酶使siRNA双链体展开,从而能够实现互补反义链导引靶标识别(尼卡能等人(2001)细胞107:309)。当结合至适当的靶mRNA时,RISC内的一种或多种核酸内切酶裂解该靶标以便诱导沉默(巴希尔等人(2001)基因与发育15:188)。

[0389] 如在此所使用,术语“核苷酸突出端”是指从iRNA例如dsRNA的双链体结构伸出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA的一个链的3'-端延伸超过另一个链的5'-端时,或反之亦然,存在核苷酸突出端。dsRNA可以包含具有至少一个核苷酸的突出端;替代地该突出端可以包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的或者反义链或者有义链的5'-端、3'-端或这两端上。

[0390] 在一个实施例中,dsRNA的反义链在3'-端和/或5'-端处具有1-10个核苷酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的突出端。在一个实施例中,dsRNA的有义链在3'-端和/或5'-端处具有1-10个核苷酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的突出端。在另一个实施例中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯置换。

[0391] “钝头”或“平端”意指在双链RNAi试剂的所述端处不存在未配对的核苷酸,即没有核苷酸突出端。“平端”RNAi试剂是在其整个长度上是双链的dsRNA,即,在分子的任一端处没有核苷酸突出端。本发明的RNAi试剂包括在一端处具有核苷酸突出端(即具有一个突出端和一个平端的试剂)或在两端处均具有核苷酸突出端的RNAi试剂。

[0392] 术语“反义链”或“引导链”是指包括与靶序列例如C5 mRNA基本上互补的一个区的iRNA例如dsRNA的链。如在此所使用,术语“互补区”是指在反义链上的基本上与例如靶序列的序列(例如,如在此所定义的C5核苷酸序列)基本上互补的区。当该互补区不完全与该靶序列互补时,错配可以处于分子的内部区域或末端区域中。通常,最耐受的错配是在末端区域中,例如在iRNA的5'-末端和/或3'-末端的5、4、3或2个核苷酸内。

[0393] 如在此所使用的术语“有义链”或“过客链”是指包括与如在此定义的所述术语的反义链的一个区基本上互补的一个区的iRNA的链。

[0394] 如在此所使用,术语“裂解区”是指位于紧邻裂解位点处的一个区。裂解位点是在其上发生裂解的靶标上的位点。在一些实施例中,该裂解区在裂解位点的任一端处并且紧邻裂解位点包含三个碱基。在一些实施例中,该裂解区在裂解位点的任一端处并且紧邻裂解位点包含两个碱基。在一些实施例中,裂解位点特异性地出现在反义链的核苷酸10和核苷酸11结合的位点处,并且该裂解区包含核苷酸11、核苷酸12和核苷酸13。

[0395] 如在此所使用,并且除非另外指明,当用来描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时,术语“互补”是指包含该第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含该第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员将理解。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°C或70°C持续12-16个小时,接着洗涤(参见,例如“分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),萨姆布鲁克(Sambrook)等人(1989)冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press))。其他条件如生物体内部可以遇到的生理相关的条件可以应用。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用,确定最适宜于测试两个序列的互补性的条件集合。

[0396] iRNA内例如在此所描述的dsRNA内的互补序列包括包含第一核苷酸序列的该寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的整个长度上的碱基配对。此类序列在此可以称为相对于彼此而“完全互补”。然而,当第一

序列在此称为相对于第二序列“基本上互补”时,这两个序列可以是完全互补的,或在对于高达30个碱基对的双链体杂交时,它们可以形成一个或多个但通常不多于5、4、3或2个错配的碱基对,同时保持在与其最终应用(例如通过RISC途径抑制基因表达)最相关的条件下杂交的能力。然而,当两个寡核苷酸被设计成在杂交时形成一个或多个单链突出端时,此类突出端不应该被认为是关于互补性确定的错配。例如,包含长度是21个核苷酸的一个寡核苷酸和长度是23个核苷酸的另一个寡核苷酸的dsRNA出于在此描述的目的又可以称为“完全互补”,其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的具有21个核苷酸的序列。

[0397] 如在此所使用“互补”序列还可以包括非沃森-克里克碱基配对和/或从非天然核苷酸和修饰的核苷酸中形成的碱基对,或完全从其中形成,以至于实现以上针对其杂交能力的要求。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摇摆碱基配对或Hoogsteen碱基配对。

[0398] 在此可以相对于dsRNA的有义链与反义链之间或iRNA试剂的反义链与靶序列之间的碱基配对使用术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”,如从其使用的上下文中将理解。

[0399] 如在此所使用,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C5的mRNA)的一个连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果序列与编码C5的mRNA的一个非中断部分基本上互补,多核苷酸与C5 mRNA的至少一个部分互补。

[0400] 通常,每个链的大多数核苷酸是核糖核苷酸,但如在此详细描述,每个链或这两个链还可以包括一个或多个非核糖核苷酸,例如脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。另外,“iRNA”可以包括具有化学修饰的核糖核苷酸。此类修饰可以包括在此披露的或在本领域中已知的所有类型的修饰。如在iRNA分子中所使用的任何此类修饰出于本说明书和权利要求的目的,涵盖在“iRNA”中。

[0401] 在本发明的一个方面中,用于本发明的这些方法和组合物中的试剂是通过反义抑制机理抑制靶mRNA的单链反义RNA分子。该单链反义RNA分子与靶mRNA内的一个序列互补。单链反义寡核苷酸可以通过与mRNA碱基配对并且物理阻塞翻译机以化学计量的方式抑制翻译,参见,迪亚斯(Dias)N.等人,(2002)分子癌症治疗(Mol Cancer Ther)1:347-355。该单链反义RNA分子的长度可以是约15至约30个核苷酸并且具有与靶序列互补的序列。例如,该单链反义RNA分子可以包含来自在此描述的任一个反义序列的至少约15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的序列。

[0402] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是包含一个脂质层的囊泡,该脂质层包囊一种药物活性分子,如核酸分子,例如iRNA或从其中转录iRNA的质粒。LNP被描述于例如美国专利号6,858,225、6,815,432、8,158,601和8,058,069中,这些美国专利的全部内容特此通过引用结合在此。

[0403] 如在此所使用,“受试者”是一种动物,如一种哺乳动物,包括灵长类动物(如人、非人灵长类动物,例如猴和黑猩猩)、非灵长类动物(如奶牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马以及鲸)或禽类(例如,鸭或鹅)。在一个实施例中,该受试者是人,如治疗或评价将受益于C5表达减少的疾病、病症或病状的人类;处于将受益于C5表达减少的疾病、病症或病状风险的人;患有将受益于C5表达减少的疾病、病症或病状的人;和/或治疗如在此所描述的将受益于C5表达减少的疾病、病症或病状的人类。

[0404] 如在此所使用,属于“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指一种有益的或

希望的结果,包括但不限于缓解或改善与不想要的补体途径激活相关联的一种或多种症状(例如,溶血和/或慢性炎症);降低不想要的补体途径激活的程度;稳定(即,不恶化)慢性炎症和/或溶血的状况;改善或减轻不想要的补体途径激活(例如,慢性炎症和/或溶血),无论可检测到或不可检测到。“治疗”还可以意指与不存在治疗情况下的预期存活相比,延长存活。

[0405] 在受试者中的补体组分C5或疾病标志物或症状的水平的背景下的术语“降低”是指此种水平的统计学上显著的降低。该降低可以例如是至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多,并且优选地低至对于不具有此种病症的个体而言正常的范围内所接受的水平。

[0406] 如在此所使用,当关于将受益于C5基因表达减少的疾病、病症或其病状使用时,“预防(prevention)”或“预防(preventing)”是指降低受试者将发展与这样一种疾病、病症或病状相关联的症状的可能性,例如,不想要的补体激活的症状,如慢性炎症、溶血和/或血栓形成。例如,当具有血栓形成的一种或多种风险因素的个体相对于具有相同风险因素并且没有接受如在此所描述的治疗的群体,没有发展血栓形成或发展具有较小严重性的血栓形成时,发展血栓形成的可能性降低。没有发展疾病、病症或病状;或减少发展与这样一种疾病、病症或病状相关联的症状(例如,减少对于所述疾病或病症临床上接受的标度的至少约10%);或表现出延迟的症状(例如,延迟数天、数周、数月或数年)被认为是有效的预防。

[0407] 如在此所使用,术语“补体组分C5相关联的疾病”是由补体激活引起或与补体激活相关联的疾病或病症。此类疾病典型地与炎症和/或免疫系统激活,例如膜攻击复合体介导的溶解、过敏反应和/或溶血相关联。补体组分C5相关联的疾病的非限制性实例包括阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、哮喘、类风湿性关节炎(RA);抗磷脂抗体综合征;狼疮肾炎;缺血-再灌注损伤;典型的或感染性溶血性尿毒症综合征(tHUS);致密沉积物病(DDD);视神经脊髓炎(NMO);多灶性运动神经病(MMN);多发性硬化(MS);黄斑变性(例如,年龄相关的黄斑变性(AMD));溶血、肝脏酶升高以及血小板低(HELLP)综合征;血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自发性流产;寡免疫血管炎;大疱性表皮松解症;习惯性流产;先兆子痫、创伤性脑损伤、重症肌无力、冷凝集素病、皮炎大疱性类天疱疮、志贺毒素(Shiga toxin)大肠杆菌相关的溶血性尿毒症综合征、C3肾病、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关联的血管炎(例如,肉芽肿性血管炎(先前称为韦格纳肉芽肿病)、丘-施综合征以及显微镜下多血管炎)、体液和血管移植排斥、移植物功能异常、心肌梗塞(例如,心肌梗塞中的组织损伤和局部缺血)、异源移植、脓毒症(例如,脓毒症中的不良结果)、冠状动脉病、皮炎、格雷夫斯病、动脉粥样硬化、阿耳茨海默氏病、全身性炎症反应脓毒症、脓毒性休克、脊髓损伤、肾小球性肾炎、桥本氏甲状腺炎、I型糖尿病、牛皮癣、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、ITP、肺出血肾炎综合征、德戈斯病、抗磷脂综合征(APS)、灾难性APS(CAPS)、心血管病症、心肌炎、脑血管疾病、外周(例如,肌骨骼)血管疾病、肾血管疾病、肠系膜/肠血管疾病、血管炎、亨诺赫-舍恩莱因紫癜肾炎、全身性红斑狼疮相关联的血管炎、与类风湿性关节炎相关联的血管炎、免疫复合物血管炎、高安氏病、扩张性心肌病、糖尿病性血管病、川崎氏病(动脉炎)、静脉气体栓子(VGE)以及支架放置、旋转式动脉粥样斑块去除术、膜性肾病、格-巴二氏综合征和经皮穿刺冠状动脉成形术(PTCA)后的再狭窄(参

见,例如霍尔(Holers) (2008)免疫学评论(immunological Reviews) 223:300-316;霍尔和瑟曼(Thurman) (2004)分子免疫学(Molecular Immunology) 41:147-152;美国专利公开号20070172483)。

[0408] 在一个实施例中,补体组分C5相关联的疾病是阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。该PNH可以是经典的PNH或在另一种骨髓衰竭综合征和/或骨髓增生异常综合征(MDS)例如细胞减少环境中的PNH。在另一个实施例中,补体组分C5相关联的疾病是非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。

[0409] II. 本发明的iRNA

[0410] 本发明提供了抑制补体组分C5基因表达的iRNA。在一个实施例中,iRNA试剂包括用于在一种细胞中抑制C5基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子,该细胞如一个受试者例如哺乳动物(如患有补体组分C5相关联的疾病如PNH的人)内的细胞。该dsRNA包括一个反义链,该反义链具有与在C5基因的表达中形成的mRNA的至少一个部分互补的一个互补区。该互补区的长度是约30个核苷酸或更少(例如,长度是约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18个核苷酸或更少)。当与表达C5基因的细胞接触时,iRNA使C5基因(例如,人、灵长类动物、非灵长类动物或禽类C5基因)的表达抑制至少约10%,如通过例如PCR或基于支链DNA(bDNA)的方法,或通过基于蛋白质的方法,如通过免疫荧光分析,使用例如蛋白质印迹法或流式细胞术技术所测定。

[0411] dsRNA包括互补并在其中将使用dsRNA的条件下杂交以形成双链体结构的两个RNA链。dsRNA的一个链(反义链)包括一个互补区,该互补区与一个靶序列基本上互补并且通常完全互补。该靶序列可以来源于在C5基因的表达过程中形成的mRNA的序列。另一个链(有义链)包括与反义链互补的一个区,这样使得在适合的条件组合时,这两个链杂交并形成双链体结构。如在此的其他地方所描述并且如本领域中所知,与处于单独的寡核苷酸上相反,dsRNA的互补序列还可以被包含作为单一核酸分子的自我互补区。

[0412] 通常,该双链体结构的长度是在15个与30个碱基对之间,例如长度是在15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对之间。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0413] 类似地,与该靶序列互补的该区的长度是在15个与30个核苷酸之间,例如长度是在15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸之间。以上列举的范围和长度的范围与长度中间值也被想到成为本发明的部分。

[0414] 在一些实施例中,该dsRNA的长度是在约15与约20个核苷酸之间,或长度是在约25与约30个核苷酸之间。通常,该dsRNA是足够长以用作Dicer酶的底物。例如本领域中所熟知

的,长度长于约21-23个核苷酸的dsRNA可以用作Dicer的底物。如技术人员也将认识,被靶向用于裂解的RNA的区将最经常是较大RNA分子(经常是mRNA分子)的部分。在必要时,mRNA靶标的一“部分”是足够长以允许其作为RNAi引导的裂解(即,通过RISC途径裂解)的底物的mRNA靶标的连续序列。

[0415] 本领域技术人员还将认识到的是,双链体区是dsRNA的一个主要功能部分,例如具有约9至36个碱基对,例如约10-36、11-36、12-36、13-36、14-36、15-36、9-35、10-35、11-35、12-35、13-35、14-35、15-35、9-34、10-34、11-34、12-34、13-34、14-34、15-34、9-33、10-33、11-33、12-33、13-33、14-33、15-33、9-32、10-32、11-32、12-32、13-32、14-32、15-32、9-31、10-31、11-31、12-31、13-32、14-31、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对的双链体区。因此,在一个实施例中,达到加工成靶向希望的RNA用于裂解的具有例如15-30个碱基对的功能双链体的程度,具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子的复合体是dsRNA。因此,技术人员将认识到在一个实施例中miRNA是dsRNA。在另一个实施例中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施例中,有用于靶向C5表达的iRNA试剂不是通过裂解更大的dsRNA而在靶细胞中产生的。

[0416] 如在此所描述的dsRNA可以进一步包括一个或多个单链核苷酸突出端,例如1、2、3或4个核苷酸。具有至少一个核苷酸突出端的dsRNA相对于其平端的对应物可以具有出乎意料地优越的抑制特性。核苷酸突出端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的或者反义链或者有义链的5'-端、3'-端或这两端上。

[0417] 可以通过如下所进一步讨论的本领域中已知的标准方法,例如通过使用DNA自动合成仪(如从例如生物研究美国应用生物系统公司(Biosearch, Applied Biosystems, Inc.)商业上可获得的)来合成dsRNA。

[0418] 本发明的iRNA化合物可以使用二步程序来制备。首先,分别制备该双链RNA分子的各链。然后,将这些组分链退火。siRNA化合物的各链可以使用溶液相或固相有机合成或这两者来制备。有机合成提供了以下优点,可以容易地制备包含非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。本发明的单链寡核苷酸可以通过使用溶液相或固相有机合成或二者来制备。

[0419] 一个方面,本发明的dsRNA包括至少两个核苷酸序列,一个有义序列和一个反义序列。该有义链是选自在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中提供的序列的组,并且该有义链的相对应的反义链是选自表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个的序列的组。在这方面,这两个序列中的一个与这两个序列中的另一个互补,其中这些序列中的一个与在C5基因的表达中产生的mRNA的一个序列基本上互补。因此,在这方面,dsRNA将包括两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸被描述为表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中的有义链,并且第二寡核苷酸被描述为表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中的有义链的相对应的反义链。在一个实施例中,该dsRNA的基本上互补的序列被包含在单独的寡核苷酸上。在另一个实施

例中,该dsRNA的基本上互补的序列被包含在单一寡核苷酸上。

[0420] 将理解的是,虽然表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的一些序列被描述为修饰的和/或缀合的序列,但本发明的iRNA例如本发明的dsRNA的RNA可以包含未修饰的、未缀合的和/或与其中所描述不同修饰和/或缀合的在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中列举的任一个序列。

[0421] 技术人员将很好地意识到,具有在约20与23个碱基对之间(例如,21个碱基对)的双链体结构的dsRNA作为特别有效于诱导RNA干扰而受到欢迎(巴希尔等人,欧洲分子生物学学会(EMBO)2001,20:6877-6888)。然而,其他人发现更短或更长的RNA双链体结构也可以是有有效的(朱棣文(Chu)和拉纳(Rana)(2007)RNA 14:1714-1719;金姆(Kim)等人(2005)自然生物技术(Nat Biotech)23:222-226)。在以上描述的这些实施例,凭借在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中提供的寡核苷酸序列的性质,在此描述的dsRNA可以包括具有长度是最小21个核苷酸的至少一个链。可以合理预期到的是,与以上描述的dsRNA相比,具有表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个的序列中的一个减去一端或两端上的仅有几个核苷酸的较短双链体可以是类似有效的。因此,具有来源于表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个的序列中的一个的至少15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸的序列,并且与包含全部序列的dsRNA在其抑制C5基因的表达能力上相差不多于约5%、10%、15%、20%、25%或30%抑制的dsRNA被想到在本发明的范围内。

[0422] 另外,在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中提供的RNA在C5转录物中鉴定出易受RISC介导的裂解的一个或多个位点。因此,本发明进一步体现了在这些位点中的一个内靶向的iRNA。如在此所使用,如果iRNA在具体位点内的任何地方促进转录物的裂解,则称该iRNA在RNA转录物的具体位点内靶向。这样一种iRNA将通常包括来自在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中提供的序列中的一个的至少约15个连续核苷酸,这些核苷酸联接到取自与C5基因中的选择的序列相邻的区的另外核苷酸序列上。

[0423] 虽然靶序列的长度通常是约15-30个核苷酸,但在用于引导任何给定靶RNA的裂解的这个范围内的具体序列适用性上存在广泛的变化。在此列出的不同软件包和准则为鉴定任何给定基因靶标的最佳靶序列提供了指导,但还可以采取经验方法,其中具有给定尺寸(作为一个非限制性实例,21个核苷酸)的“窗口”或“掩膜”被真实或象征性地(包括,例如计算机模拟)放置于靶RNA序列上,以便鉴定在尺寸范围内的可以用作靶序列的序列。通过渐进地将该序列“窗口”向初始靶标序列位置的上游或下游移动一个核苷酸,可以鉴别出下一个潜在的靶标序列,直到针对所选择的任何给定靶标尺寸鉴别出全套可能的序列。这个方法结合系统合成和测试鉴定的序列(使用如在此所描述或如本领域中所知的测定)以鉴定表现最佳的那些序列一起,可以鉴定出当与iRNA试剂靶向时介导靶基因表达的最佳抑制的那些RNA序列。因此,虽然例如在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中鉴定出的序列表示有效的靶序列,但应想到的是可以通过向给定序列的上游或下游渐进地“使窗口行走”一个核苷酸以鉴定具有同等或更好抑制特征的序列来实现抑制效率的进一步优化。

[0424] 此外,对于例如在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中

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

[0425] 如在此所描述的iRNA可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个实施例中,如在此所描述的iRNA含有不多于3个错配。如果iRNA的反义链含有与靶序列的错配,则优选错配区域不应当位于互补区的中心内。如果iRNA的反义链含有与靶序列的错配,则优选错配被局限在离互补区的5'-端或3'-端的最后5个核苷酸内。例如,对于23个核苷酸的iRNA试剂,与C5基因的一个区互补的链通常在中心13个核苷酸内不含有任何错配。在此描述的这些方法或本领域中已知的方法可以用来确定含有与靶序列的错配的iRNA是否有效于抑制C5基因的表达。考虑具有错配的iRNA在抑制C5基因的表达上的功效是重要的,尤其如果已知C5基因中的具体互补区在群体内具有多态序列变化。

[0426] III. 本发明的修饰的iRNA

[0427] 在一个实施例中,本发明的iRNA例如dsRNA的RNA是未修饰的,并且不包含例如本领域中已知和在此描述的化学修饰和/或缀合。在另一个实施例中,本发明的iRNA例如dsRNA的RNA被化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。在本发明的某些实施例中,本发明的iRNA基本上所有的核苷酸是修饰的。在本发明的其他实施例中,本发明的iRNA的所有核苷酸均是修饰的。其中“基本上所有的核苷酸是修饰的”本发明的iRNA是大部分但不是全部修饰的,并且可以包括不多于5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0428] 在本发明中体现的核酸可以通过本领域中公知的方法来合成和/或修饰,这些方法如描述于“核酸化学实验室指南(Current protocols in nucleic acid chemistry)”比优凯奇(Beaucage) S.L. 等人(编著),约翰威立国际出版公司(John Wiley&Sons, Inc.),美国纽约州纽约(New York, NY, USA)中的那些,所述参考文献特此通过引用结合在此。修饰包括,例如端修饰,例如5'-端修饰(磷酸化、缀合、反向键联)或3'-端修饰(缀合物、DNA核苷酸、反向键合等);碱基修饰,例如被稳定的碱基或与配伍物的扩展抗体库碱基配对的碱基置换、碱基去除(脱碱基核苷酸)或缀合的碱基;糖修饰(例如,在2'-位置或4'-位置处)或糖置换;和/或骨架修饰,包括磷酸二酯键联的修饰和置换。有用于在此所描述的这些实施例的iRNA化合物的具体实例包括,但不限于含有修饰的骨架或无天然核苷间键联的RNA。具有修饰的骨架的RNA包括在骨架中不具有磷原子的那些,连同其他。出于说明书的目的并且如有时本领域中提及,在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰RNA也可以被认为是寡核苷。在一些实施例中,修饰的iRNA将在其核苷间骨架中具有磷原子。

[0429] 修饰的RNA骨架包括,例如硫代磷酸酯;手性硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯;磷酸三酯;氨基烷基磷酸三酯;甲基磷酸酯和其他烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯;亚磷酸酯;氨基磷酸酯,包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸

酯;硫代烷基磷酸酯;硫代烷基磷酸三酯;以及具有通常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些物质的2'-5'连接的类似物以及具有反相极性的那些,其中相邻的核苷单元对被3'-5'连接至5'-3'上或2'-5'连接至5'-2'上。还包括不同盐、混合盐以及游离酸形式。

[0430] 教导以上含磷键联的制备的代表性美国专利包括,但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;以及美国专利RE39464,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0431] 在其中不包括磷原子的修饰RNA骨架具有通过短链烷基或环烷基核苷间键联、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键联、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键联形成的骨架。这些骨架包括具有以下各项的那些:吗啉代键联(部分地从核苷的糖部分中形成);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;含烯烃的骨架;磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的其他骨架。

[0432] 教导以上寡核苷的制备的代表性美国专利包括,但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;以及5,677,439,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0433] 在其他实施例中,适合的RNA模拟物被想到用于iRNA中,其中核苷单元的糖和核苷间键联(即骨架)均被新颖基团置换。维持碱基单元用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的低聚化合物(已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架被含有酰胺的骨架置换,具体是氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。教导PNA化合物的制备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,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。适合用于本发明的iRNA中的另外PNA化合物被描述于例如尼尔森(Nielsen)等人,科学(Science),1991,254,1497-1500中。

[0434] 在本发明中体现的一些实施例包括具有硫代磷酸酯骨架的RNA和具有杂原子骨架的寡核苷,并且具体地以上提及的美国专利号5,489,677的--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、CH₂-N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--和--N(CH₃)-CH₂--CH₂--[其中天然磷酸二酯骨架被表示为--O--P--O--CH₂--]以及以上提及的美国专利号5,602,240的酰胺骨架。在一些实施例中,在此体现的RNA具有以上提及的美国专利号5,034,506的吗啉代骨架结构。

[0435] 修饰的RNA还可以含有一个或多个取代的糖部分。在此体现的iRNA例如dsRNA可以在2'-位置处包括下列基团中的一个:OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-

烯基;0-炔基、S-炔基或N-炔基;或0-烷基-0-烷基,其中该烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。示例性适合的修饰包括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是从1至约10。在其他实施例中,dsRNA在2'位置处包括下列基团中的一个:C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、0-烷芳基或0-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基因基团、嵌入剂、用于改进iRNA的药物代谢动力学特性的基团或用于改进iRNA的药效特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。在一些实施例中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃,又称为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。另一个示例性修饰是2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,又称为2'-DMAOE,如下在此实例中所描述;和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中又称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂。

[0436] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟代(2'-F)。还可以在iRNA的RNA上的其他位置处做出类似的修饰,具体地在3'末端核苷酸上的糖的3'位置或在2'-5'连接的dsRNA中以及5'末端核苷酸的5'位置。iRNA还可以具有糖模拟物,如代替戊呋喃糖的环丁基部分。

[0437] 教导此类修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括,但不限于美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;以及5,700,920,所述美国专利中的某些与本申请共同拥有。特此通过引用将前述的每个的全部内容结合在此。

[0438] iRNA还可以包括核碱基(在本领域中经常简称为“碱基”)修饰或取代。如在此所使用,“非修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成核碱基和天然核碱基,如脱氧-胸腺嘧啶(dT);5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶;2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮基尿嘧啶、6-偶氮基胞嘧啶和6-偶氮基胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代(具体地5-溴代)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包括披露于美国专利号3,687,808中的那些;披露于生物化学中的修饰核苷(Modified Nucleosides in Biochemistry),生物技术与医药(Biotechnology and Medicine),海瑞德威景(Herdewijn)P.编著威立-VCH,2008中的那些;披露于聚合物科学与工程简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering),第858-859页,克奥赤威兹(Kroschwitz)J.L编著约翰威立国际出版公司(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, dsRNA研究与应用 (dsRNA Research and Applications), 第289-302页, 克鲁克 (Crooke) S. T. 和黎布鲁 (Lebleu) B. 编著, CRC出版社, 1993披露的那些。这些核碱基中的某些特别有用于提高在本发明中体现的低聚化合物的结合亲和力。这些核碱基包括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Y.S.、克鲁克S.T.和黎布鲁B. 编著, dsRNA研究与应用, CRC出版社, 波卡拉顿 (Boca Raton), 1993, 第276-278页) 并且是示例性碱基取代, 甚至更具体地当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0439] 教导以上所述的修饰核碱基中的某些以及其他修饰核碱基的制备的代表性美国专利包括, 但不限于以上所述的美国专利号3,687,808;4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;以及7,495,088, 所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0440] iRNA的RNA还可以被修饰成包括一个或多个锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸, 其中该核糖部分包含连接2' 碳和4' 碳的额外的桥。这个结构有效地以3'-内切结构构型“锁定”该核糖。已经显示将锁定核酸添加到siRNA上可增加siRNA在血清中的稳定性, 并且减少脱靶效应 (埃尔门 (Elrnen) J. 等人, (2005) 核酸研究 (Nucleic Acids Research) 33(1):439-447;穆克 (Mook) O.R. 等人, (2007) 分子癌症治疗 6(3):833-843;格如威勒 (Grunweller) A. 等人, (2003) 核酸研究 31(12):3185-3193)。

[0441] 教导锁定核酸核苷酸的制备的代表性美国专利包括, 但不限于下列美国专利: 美国专利号6,268,490;6,670,461;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,084,125;以及7,399,845, 所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0442] 对于RNA分子的末端潜在稳定的修饰可以包括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)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸 (Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷酰基-尿苷-3'-磷酸酯、反相碱基 (idT) 以及其他修饰。这种修饰的披露可以在PCT公开号WO 2011/005861中找到。

[0443] A. 包含本发明的基序的修饰iRNA

[0444] 在本发明的某些方面中, 本发明的双链RNAi试剂包括具有化学修饰的试剂, 如在例如2011年11月18日提交的美国临时申请号61/561,710中或在2012年11月16日提交的PCT/US2012/065691中所披露, 所述参考文献中的每一个的全部内容通过引用结合在此。

[0445] 如在此和在临时申请号61/561,710或PCT申请号PCT/US2012/065691中所示, 可以通过将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入到RNAi试剂的有义链和/或反义链中 (具体地在裂解位点处或附近) 来获得优越的结果。在一些实施例中, 该RNAi剂的该有义链和反义链可以另外的方式被完全修饰。这些基序的引入中断了该有义链和/或反义链的修饰模式 (如果存在的话)。该RNAi剂可以任选地与例如在该有义链上的GalNAc衍生物配体缀合。所得到的RNAi剂呈现优越的基因沉默活性。

[0446] 更确切地说,出人意料地发现,当该双链RNAi试剂的该有义链和反义链被完全修饰成在RNAi试剂的至少一个链的裂解位点处或附近具有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序时,该RNAi试剂的基因沉默活性被卓越地增强。

[0447] 因此,本发明提供了能够在体内抑制靶基因(即,补体组分C5(C5)基因)的表达式的双链RNAi试剂。该RNAi试剂包含一个有义链和一个反义链。该RNAi试剂的每个链的长度可以在12-30个核苷酸范围内。例如,每个链的长度可以在14-30个核苷酸之间、17-30个核苷酸之间、25-30个核苷酸之间、27-30个核苷酸之间、17-23个核苷酸之间、17-21个核苷酸之间、17-19个核苷酸之间、19-25个核苷酸之间、19-23个核苷酸之间、19-21个核苷酸之间、21-25个核苷酸之间或21-23个核苷酸之间。

[0448] 该有义链和该反义链典型地形成一种双链体双链RNA(“dsRNA”),在此又称为“RNAi试剂”。RNAi试剂的双链体区的长度可以是12-30个核苷酸对。例如,该双链体区的长度可以在14-30个核苷酸对之间、17-30个核苷酸对之间、27-30个核苷酸对之间、17-23个核苷酸对之间、17-21个核苷酸对之间、17-19个核苷酸对之间、19-25个核苷酸对之间、19-23个核苷酸对之间、19-21个核苷酸对之间、21-25个核苷酸对之间或21-23个核苷酸对之间。在另一个实例中,该双链体区的长度是选自15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26以及27个核苷酸。

[0449] 在一个实施例中,该RNAi试剂可以在一个或两个链的3'-端、5'-端或两端处含有一个或多个突出端区和/或封端基团。该突出端的长度可以是1-6个核苷酸,例如2-6个核苷酸、1-5个核苷酸、2-5个核苷酸、1-4个核苷酸、2-4个核苷酸、1-3个核苷酸、2-3个核苷酸或1-2个核苷酸。这些突出端可以是一个链比另一个链更长的结果,或具有相同长度的两个链交错的结果。该突出端可以与靶mRNA形成错配,或它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一个序列。第一链和第二链还可以例如通过另外的碱基连接以形成一个发夹或通过其他非碱基接头连接。

[0450] 在一个实施例中,该RNAi试剂的突出端区中的核苷酸可以各自独立地是一种修饰的或未修饰的核苷酸,包括但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-O甲基、胸苷(T)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'-O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)以及其任何组合。例如,TT可以是任一链上的任一端的一个突出端序列。该突出端可以与靶mRNA形成错配,或它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一个序列。

[0451] 在该RNAi试剂的有义链、反义链或这两个链处的5'-突出端或3'-突出端可以被磷酸化。在一些实施例中,一个或多个突出端区含有两个在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯的核苷酸,其中这两个核苷酸可以是相同或不同的。在一个实施例中,该突出端存在于有义链、反义链或这两个链的3'端处。在一个实施例中,这个3'-突出端存在于反义链中。在一个实施例中,这个3'-突出端存在于有义链中。

[0452] 该RNAi试剂可以仅含有单个突出端,该突出端可以加强该RNAi的干扰活性而不影响其总稳定性。例如,单链突出端可以位于有义链的3'-末端处,或替代地位于反义链的3'-末端处。该RNAi还可以具有位于该反义链的5'-端(或该有义链的3'-端)处的平端,或反之亦然。一般来说,该RNAi的反义链在3'-端处具有核苷酸突出端,并且5'-端是平的。虽然不希望受理论约束,但该反义链的5'-端处的不对称平端和该反义链的3'-端突出端有利于引导链加载到RISC过程中。

[0453] 在一个实施例中,该RNAi试剂是具有19个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5'端起的位置7、位置8、位置9处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰的至少一个基序。该反义链在从5'端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0454] 在另一个实施例中,该RNAi试剂是具有20个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5'端起的位置8、位置9、位置10处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰的至少一个基序。该反义链在从5'端起的位置13、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0455] 在又一个实施例中,该RNAi试剂是具有21个核苷酸长度的双端平物,其中该有义链在从5'端起的位置9、位置10、位置11处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰的至少一个基序。该反义链在从5'端起的位置11、位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0456] 在一个实施例中,该RNAi试剂包含一种21个核苷酸的有义链和一种23个核苷酸的反义链,其中该有义链在从5'端起的位置9、位置10、位置11处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰的至少一个基序;该反义链在从5'端起的位置11位置12、位置13处含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序,其中该RNAi试剂的一端是平的,而另一端包含一种2个核苷酸的突出端。优选地,该2个核苷酸的突出端在该反义链的3'-端处。当该2个核苷酸的突出端在该反义链的3'-端处时,在末端的三个核苷酸之间可以存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。在一个实施例中,该RNAi试剂在该有义链的5'-端和在该反义链的5'-端处均另外地具有在末端三个核苷酸之间的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该RNAi试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸(包括作为基序的一部分的核苷酸)是修饰的核苷酸。在一个实施例中,每个残基独立地被例如交替基序中的2'-O-甲基或3'-氟代修饰。任选地,该RNAi试剂进一步包含一个配体(优选地GalNAc₃)。

[0457] 在一个实施例中,该RNAi试剂包含一个有义链和一个反义链,其中该有义链的长度是25-30个核苷酸残基,其中从5'末端核苷酸(位置1)开始,第一链的位置1至23包含至少8个核糖核苷酸;该反义链的长度是36-66个核苷酸残基,并且从3'末端核苷酸开始,在与有义链的位置1-23配对的位置上包含至少8个核糖核苷酸以形成一种双链体;其中反义链的至少3'末端核苷酸与有义链未配对,并且高达6个连续的3'末端核苷酸与有义链未配对,从而形成具有1-6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包含从10-30个连续的与有义链未配对的核苷酸,从而形成10-30个核苷酸的单链5'突出端;其中当出于最大互补性对准有义链和反义链时,至少该有义链5'末端核苷酸和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,从而在有义链与反义链之间形成基本上双链体的区;并且沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸,反义链与靶RNA充分互补,以便当双链核酸被引入到哺乳动物细胞中时减少靶基因表达;并且其中该有义链含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-F修饰的至少一个基序,其中这些基序中的至少一个出现在裂解位点处或附近。该反义链在裂解位点处或附近含有在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0458] 在一个实施例中,该RNAi试剂包含有义链和反义链,其中该RNAi试剂包含一个第

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

[0459] 在一个实施例中,该RNAi试剂的有义链含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序,其中这些基序中的一个出现在该有义链中的裂解位点处。

[0460] 在一个实施例中,该RNAi试剂的反义链也可以含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序,其中这些基序中的一个出现在该反义链中的裂解位点处或附近。

[0461] 对于具有长度是17-23个核苷酸的双链体区的RNAi试剂,反义链的裂解位点典型地在从5'-端起的10、11和12位置周围。因此,具有三个相同修饰的这些基序可以出现在反义链的9、10、11位置;10、11、12位置;11、12、13位置;12、13、14位置;或13、14、15位置,计数从反义链的5'-端起从第一个核苷酸开始,或计数从反义链的5'-端起从双链体区内的第一个配对的核苷酸开始。该反义链中的裂解位点还可以根据该RNAi的从5'端起的双链体区的长度而变化。

[0462] 该RNAi试剂的有义链可以在该链的裂解位点处含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序;并且反义链可以在该链的裂解位点处或附近具有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当该有义链和该反义链形成一种dsRNA双链体时,该有义链和该反义链可以被如此对准,以使得在该有义链上具有三个核苷酸的一个基序和在该反义链上具有三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠,即该有义链中的该基序的三个核苷酸中的至少一者与该反义链中的该基序的三个核苷酸中的至少一者形成碱基对。可替代地,至少两个核苷酸可以重叠,或所有三个核苷酸均可以重叠。

[0463] 在一个实施例中,该RNAi试剂的有义链可以含有在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的多于一个基序。第一基序可以出现在该链的裂解位点处或附近并且其他基序可以是翼修饰。术语“翼修饰”在此是指出现在链的与同一链裂解位点处或附近的基序分开的另一个部分处的一个基序。该翼修饰或者与该第一基序相邻,或者被至少一个或多个核苷酸分隔。当这些基序彼此紧邻着时,则这些基序的化学性质彼此相异,并且当这些基序被一个或多个核苷酸分隔时,则化学性质可以是相同或不同的。可以存在两个或更多个翼修饰。例如,当存在两个翼修饰时,每个翼修饰可以存在于相对于在裂解位点处或附近的该第一基序的一端处或该前导基序的任一侧上。

[0464] 如同有义链,该RNAi剂的反义链可以含有多于一个在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序,这些基序中的至少一者出现在该链的裂解位点处或附近。这个反义链也可以在一个比对中含有一个或多个与可以在有义链上存在的翼修饰类似的翼修饰。

[0465] 在一个实施例中,该RNAi剂的有义链或反义链上的翼修饰典型地在该链的3'端、5'端或两端处不包括前一个或两个末端核苷酸。

[0466] 在另一个实施例中,该RNAi试剂的有义链或反义链上的该翼修饰典型地不包括该链的3'-端、5'-端或这两端处的双链体区内的前一个或两个配对核苷酸。

[0467] 当该RNAi剂的有义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时,这些翼修饰可以落在双链体区的同一端上,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0468] 当该RNAi剂的有义链和反义链各自含有至少两个翼修饰时,该有义链和该反义链可以被如此对准,以使得各来自一个链的两个修饰落在双链体区的一端上,从而具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;各来自一个链的两个修饰落在双链体区的另一端上,从而具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;一个链的两个修饰落在前导基序的每一侧上,从而在双链体区中具有一个、两个、三个核苷酸的重叠。

[0469] 在一个实施例中,该RNAi试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸(包括作为基序的一部分的核苷酸)可以被修饰。每个核苷酸可以被相同或不同的修饰来修饰,该修饰可以包括对非键联的磷酸酯氧中的一个或两个和/或键联的磷酸酯氧中的一个或多个进行一种或多种改变;对核糖的成分例如核糖上的2' 羟基进行改变;用“脱磷”接头全部置换磷酸酯部分;修饰或置换天然存在的碱基;以及置换或修饰核糖-磷酸酯骨架。

[0470] 由于核酸是亚单位的聚合物,所以许多修饰出现在核酸内重复的一个位置处,例如一个碱基或一个磷酸酯部分或一个磷酸酯部分的一个非键联O的一种修饰。在一些情况下,该修饰将出现在该核酸中的所有标的位置处,但在许多情形下它不会这样。通过举例,修饰可以仅出现在3' 或5' 末端位置处,可以仅出现在末端区中,例如在末端核苷酸上的一个位置处或在一个链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中。修饰可以出现在双链区、单链区或两者中。修饰可以仅出现在RNA的双链区中或可以仅出现在RNA的单链区中。例如,一个非键联O位置处的一个硫代磷酸酯修饰可以仅出现在一个或两个末端处,可以仅出现在末端区中,例如在末端核苷酸上的一个位置处或在一个链的最后2、3、4、5或10个核苷酸中,或可以出现在特别是末端处的双链区和单链区中。一个或多个5' 端可以被磷酸化。

[0471] 为了增强稳定性,可能的是例如在突出端中包括具体碱基或在单链突出端中(例如在一个5' 或3' 突出端或两者中)包括修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,可以在突出端中包括嘌呤核苷酸。在一些实施例中,一个3' 或5' 突出端中的全部或一些碱基可以被例如在此描述的修饰而修饰。修饰可以包括,例如使用本领域中已知的修饰在核糖的2' 位置处使用修饰,例如使用脱氧核糖核苷酸、代替核碱基的核糖修饰的2' -脱氧-2' -氟代(2' -F)或2' -O-甲基以及硫酸酯基团中的修饰,例如硫代硫酸酯修饰。突出端不必与靶序列同源。

[0472] 在一个实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地被LNA、HNA、CeNA、2' -甲氧基乙基、2' -O-甲基、2' -O-烯丙基、2' -C-烯丙基、2' -脱氧、2' -羟基或2' -氟代修饰。这些链可以含有多于一个修饰。在一个实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地被2' -O-甲基或2' -氟代修饰。

[0473] 至少两个不同修饰典型地存在于有义链和反义链上。那两个修饰可以是2' -O-甲基或2' -氟代修饰或其他修饰。

[0474] 在一个实施例中, N_a 和/或 N_b 包含交替模式的修饰。如在此所使用的术语“交替基序”是指具有一个或多个修饰,每个修饰出现在一个链的交替核苷酸上的基序。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每隔两个核苷酸一个、或一种类似模式。例如,如果A、B和C各

自表示对核苷酸的一种修饰类型,则交替基序可以是“ABABABABABAB...”、“AABB AABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0475] 包含在交替基序中的修饰类型可以是相同或不同的。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸上的一种修饰类型,则交替模式(即每隔一个核苷酸上的修饰)可以是相同的,但有义链或反义链中的每一个可以是选自交替基序如“ABABAB...”、“ACACAC...”、“BDBDBD...”或“CDCDCD...”等内的若干修饰可能。

[0476] 在一个实施例中,本发明的RNAi试剂包含的有义链上的交替基序的修饰模式是相对于反义链上的交替基序的修饰模式移位的。该移位可以是如此以使得有义链的核苷酸的修饰基团相应于反义链的核苷酸的不同修饰基团,并且反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时,有义链中的交替基序可以从该链的5'-3'起由“ABABAB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从该链的5'-3'起由“BABABA”开始。作为另一个实例,有义链中的交替基序可以从该链的5'-3'起由“AABBAABB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从该链的5'-3'起由“BBAABBAA”开始,以使得在该有义链与该反义链之间存在修饰模式的完全或部分移位。

[0477] 在一个实施例中,该RNAi试剂包含起初在有义链上具有2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序模式,该模式相对于起初在反义链上具有2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序模式具有移位,即有义链上的2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链上的2'-F修饰的核苷酸碱基配对,并且反之亦然。该有义链的1位置可以由2'-F修饰开始,并且该反义链的1位置可以由2'-O-甲基修饰开始。

[0478] 将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链中断了存在于该有义链和/或反义链中的初始修饰模式。通过将三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链而使该有义链和/或反义链的修饰模式的这一中断出人意料地增强了对靶基因的基因沉默活性。

[0479] 在一个实施例中,当将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序引入到这些链中的任一个时,紧挨着该基序的核苷酸的修饰是与该基序的修饰不同的修饰。例如,含有基序的序列的部分是“...N_aYYYN_b...”,其中“Y”表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的基序的修饰,并且“N_a”和“N_b”表示不同于Y的修饰的对紧挨着基序“YYY”的核苷酸的修饰,并且其中N_a和N_b可以是相同或不同的修饰。可替代地,当存在翼修饰时,N_a和/或N_b可以存在或不存在。

[0480] 该RNAi剂可以进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联。该硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键联修饰可以出现在有义链或反义链或这两个链的任何核苷酸上,在该链的任何位置中。例如,核苷酸间键联修饰可以出现在有义链和/或反义链上的每一个核苷酸上;每个核苷酸间键联修饰可以一种交替模式出现在有义链和/或反义链上;或有义链或反义链可以一种交替模式含有这两种核苷酸间键联修饰。该有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以与该反义链相同或不同,并且该有义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式可以相对于该反义链上的核苷酸间键联修饰的交替模式具有移位。在一个实施例中,双链RNAi试剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一个实施例中,该反义链包含5'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联和3'-末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸

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

[0481] 在一个实施例中,该RNAi在突出端区中包含硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联修饰。例如,该突出端区可以含有两个在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联的核苷酸。还可以进行核苷酸间键联修饰以使突出端核苷酸与双链体区内的末端配对的核苷酸连接。例如,至少2个、3个、4个或所有的突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联来连接,并且任选地,可以存在将突出端核苷酸与紧挨着该突出端核苷酸的一个配对的核苷酸连接的另外的硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键联。例如,在末端三个核苷酸之间可以存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。这些末端三个核苷酸可以在该反义链的3' -端处、该有义链的3' -端处、该反义链的5' -端处和/或该反义链的5' 端处。

[0482] 在一个实施例中,该2个核苷酸的突出端是在该反义链的3' -端处,并且在末端的三个核苷酸之间存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键联,其中这三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是紧挨着该突出端核苷酸的配对的核苷酸。任选地,该RNAi试剂可以在该有义链的5' -端和在该反义链的5' -端处均另外地具有在末端三个核苷酸之间的两个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

[0483] 在一个实施例中,该RNAi试剂在双链体内包含与靶标的一个或多个错配、或其组合。该错配可以出现在突出端区或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或熔融的倾向来分等级(例如对于一个具体配对的缔合或解离自由能,最简单的方法是基于个别对检查这些对,但也可以使用紧接着的相邻物或类似分析)。就促进解离而言,A:U优选于G:C;G:U优选于G:C;并且I:C优选于G:C(I=肌苷)。错配例如非规范的配对或除了规范以外的配对(如在此其他地方所描述)优选于规范的(A:T、A:U、G:C)配对;并且包括通用碱基的配对优选于规范的配对。

[0484] 在一个实施例中,该RNAi试剂包含从反义链的5' -端起在双链体区内的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个,这些碱基对独立地选自下组,该组具有以下各项:A:U、G:U、I:C和错配的对,例如非规范的配对或除了规范以外的配对,或包括通用碱基的配对,以便促进在双链体的5' -端处解离反义链。

[0485] 在一个实施例中,从反义链中的5' -端起在双链体区内的1位置处的核苷酸是选自下组,该组由以下各项组成:A、dA、dU、U和dT。可替代地,从该反义链的5' 端起在该双链体区内的前1、2或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从该反义链的5' -端起在该双链体区内的第一个碱基对是AU碱基对。

[0486] 在另一个实施例中,在该有义链的3' -端处的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)。在另一个实施例中,在该反义链的3' -端处的核苷酸是脱氧-胸腺嘧啶(dT)。在一个实施例中,在有义链和/或反义链的3' -端上存在脱氧-胸腺嘧啶核苷酸的短序列,例如两个dT核苷酸。

[0487] 在一个实施例中,有义链序列可以由式(I)表示:

[0488] $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3' \text{ (I)}$

[0489] 其中:

[0490] i和j各自独立地是0或1;

- [0491] p和q各自独立地是0-6;
- [0492] 各 N_a 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0493] 各 N_b 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;
- [0494] 各 n_p 和 n_q 独立地表示突出核苷酸;
- [0495] 其中 N_b 和 Y 不具有相同修饰;并且
- [0496] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。优选地YYY全是2'-F修饰的核苷酸。
- [0497] 在一个实施例中, N_a 和/或 N_b 包含具有交替模式的修饰。
- [0498] 在一个实施例中,该YYY基序出现在该有义链的裂解位点处或附近。例如,当该RNAi试剂具有长度是17-23个核苷酸的一个双链体区时,该YYY基序可以出现在有义链的裂解位点处或附近(例如:可以出现在位置6、位置7、位置8、位置7、位置8、位置9、位置8、位置9、位置10、位置9、位置10、位置11、位置10、位置11、位置12或位置11、位置12、位置13处),计数从5'-端起从第一个核苷酸开始;或任选地,计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。
- [0499] 在一个实施例中,i是1并且j是0,或i是0并且j是1,或i和j这两者均是1。该有义链因此可以由以下式表示:
- [0500] $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Ib);
- [0501] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ic);或
- [0502] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - N_a - n_q 3'$ (Id)。
- [0503] 当该有义链由式(Ib)表示时, N_b 表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0504] 当该有义链表示为式(Ic)时, N_b 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0505] 当该有义链表示为式(Id)时,各 N_b 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 是0、1、2、3、4、5或6。各 N_a 可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0506] X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。
- [0507] 在其他实施例中,i是0并且j是0,并且该有义链可以由下式表示:
- [0508] $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ia)。
- [0509] 当该有义链由式(Ia)表示时,各 N_a 可以独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0510] 在一个实施例中,该RNAi的反义链序列可以由式(II)表示:
- [0511] $5' n_q - N_a' - (Z' Z' Z')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (X' X' X')_l - N_a' - n_p' 3'$ (II)
- [0512] 其中:
- [0513] k和l各自独立地是0或1;
- [0514] p'和q'各自独立地是0-6;

[0515] 各 N_a' 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0516] 各 N_b' 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0517] 各 n_p' 和 n_q' 独立地表示突出核苷酸;

[0518] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同的修饰;

[0519] 并且

[0520] $X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ 和 $Z' Z' Z'$ 各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0521] 在一个实施例中, N_a' 和/或 N_b' 包含具有交替模式的修饰。

[0522] 该 $Y' Y' Y'$ 基序出现在该反义链的裂解位点处或附近。例如,当该RNAi试剂具有长度是17-23个核苷酸的一个双链体区时,该 $Y' Y' Y'$ 基序可以出现在反义链的位置9、位置10、位置11;位置10、位置11、位置12;位置11、位置12、位置13;位置12、位置13、位置14;或位置13、位置14、位置15处,其中计数从5'-端起从第一个核苷酸开始;或任选地,计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始。优选地,该 $Y' Y' Y'$ 基序出现在位置11、位置12、位置13处。

[0523] 在一个实施例中, $Y' Y' Y'$ 基序全是2'-OMe修饰的核苷酸。

[0524] 在一个实施例中,k是1且l是0,或k是0且l是1,或k和l这两者均是1。

[0525] 该反义链因此可以由以下式表示:

[0526] $5' n_q' - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_p', 3'$ (IIb);

[0527] $5' n_q' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - n_p', 3'$ (IIc);或

[0528] $5' n_q' - N_a' - Z' Z' Z' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - X' X' X' - N_a' - n_p', 3'$ (IId)。

[0529] 当该反义链由式(IIb)表示时, N_b' 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a' 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0530] 当该反义链表示为式(IIc)时, N_b' 表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a' 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0531] 当该反义链表示为式(IId)时,各 N_b' 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a' 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b' 是0、1、2、3、4、5或6。

[0532] 在其他实施例中,k是0并且l是0,并且该反义链可以由下式表示:

[0533] $5' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q', 3'$ (Ia)。

[0534] 当该反义链表示为式(IIa)时,各 N_a' 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0535] X' 、 Y' 和 Z' 各自可以是彼此相同或不同的。

[0536] 该有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地被LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟代修饰。例如,该有义链和反义链的每个核苷酸独立地由2'-O-甲基或2'-氟代修饰。具体地说,各 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 和 Z' 可以表示2'-O-甲基修饰或2'-氟代修饰。

[0537] 在一个实施例中,该RNAi试剂的有义链可以含有YYY基序,当双链体区是21个核苷酸时,该YYY基序出现在该链的9、10和11位置处,计数从5'-端起从第一个核苷酸开始,或任选地,计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始;并且Y表示2'-F修饰。该有义链可以另外地含有XXX基序或ZZZ基序作为该双链体区的相反端处的翼修饰;并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0538] 在一个实施例中,该反义链可以含有出现在该链的位置11、12和13处的Y' Y' Y' 基序,计数从5'-端起从第一个核苷酸开始,或任选地,计数从5'-端起在该双链体区内的第一个配对的核苷酸处开始;并且Y' 表示2'-O-甲基修饰。该反义链可以另外地含有X' X' X' 基序或Z' Z' Z' 基序作为该双链体区的相反端处的翼修饰;并且X' X' X' 和Z' Z' Z' 各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0539] 由以上式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中的任一个表示的有义链与对应地由式(IIa)、(IIb)、(IIe)和(IIId)中的任一个表示的反义链形成一种双链体。

[0540] 因此,用于本发明的这些方法中的RNAi试剂可以包含一个有义链和一个反义链,每个链具有14至30个核苷酸,该RNAi双链体由式(III)表示:

[0541] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0542] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q' 5'$

[0543] (III)

[0544] 其中:

[0545] i、j、k和l各自独立地是0或1;

[0546] p、p'、q和q'各自独立地是0-6;

[0547] 各 N_a 和 N_a' 独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0548] 各 N_b 和 N_b' 独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0549] 其中

[0550] 各 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 独立地表示突出端核苷酸,该 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 中的每一个可以或可以不存在;并且

[0551] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个基序。

[0552] 在一个实施例中,i是0并且j是0;或i是1并且j是0;或i是0并且j是1;或i和j这两者均是0;或i和j这两者均是1。在另一个实施例中,k是0并且l是0;或k是1并且l是0;k是0并且l是1;或k和l这两者均是0;或k和l这两者均是1。

[0553] 形成RNAi双链体的该有义链和反义链的示例性组合包括下式:

[0554] $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$

[0555] $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5'$

[0556] (IIIa)

[0557] $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0558] $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5'$

[0559] (IIIb)

[0560] $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0561] $3' n_p' -N_a' -X' X' X' -N_b' -Y' Y' Y' -N_a' -n_q' 5'$

[0562] (IIIc)

[0563] $5' n_p -N_a -X X X -N_b -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a -n_q 3'$

[0564] $3' n_p' -N_a' -X' X' X' -N_b' -Y' Y' Y' -N_b' -Z' Z' Z' -N_a' -n_q' 5'$

[0565] (IIIId)

[0566] 当该RNAi试剂由式(IIIa)表示时,各 N_a 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0567] 当该RNAi试剂由式(IIIb)表示时,各 N_b 独立地表示包含1-10个、1-7个、1-5个或1-4个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0568] 当该RNAi试剂表示为式(IIIc)时,各 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0569] 当该RNAi试剂表示为式(IIIId)时,各 N_b 、 N_b' 独立地表示包含0-10个、0-7个、0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。各 N_a 、 N_a' 独立地表示包含2-20个、2-15个或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。 N_a 、 N_a' 、 N_b 和 N_b' 中的每一个独立地包含具有交替模式的修饰。

[0570] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIIId)中的X、Y和Z各自可以是彼此相同或不同的。

[0571] 当该RNAi试剂由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIIId)表示时,这些Y核苷酸中的至少一个可以与这些Y'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地,这些Y核苷酸中的至少两个与相对应的Y'核苷酸形成碱基对;或所有三个Y核苷酸与相对应的Y'核苷酸都形成碱基对。

[0572] 当该RNAi试剂由式(IIIb)或(IIIId)表示时,这些Z核苷酸中的至少一个可以与这些Z'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地,这些Z核苷酸中的至少两个与相对应的Z'核苷酸形成碱基对;或所有三个Z核苷酸与相对应的Z'核苷酸都形成碱基对。

[0573] 当该RNAi试剂表示为式(IIIc)或(IIIId)时,这些X核苷酸中的至少一个可以与这些X'核苷酸中的一个形成碱基对。可替代地,这些X核苷酸中的至少两个与相对应的X'核苷酸形成碱基对;或所有三个X核苷酸与相对应的X'核苷酸都形成碱基对。

[0574] 在一个实施例中,Y核苷酸上的修饰不同于Y'核苷酸上的修饰,Z核苷酸上的修饰不同于Z'核苷酸上的修饰,和/或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0575] 在一个实施例中,当该RNAi试剂由式(IIIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰。在另一个实施例中,当该RNAi试剂由式(IIIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰,并且 $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上。在又一个实施例中,当该RNAi试剂由式(IIIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上,并且有义链被缀合到通过二价或三价支链接头(如下描述)附接的一种或多种GalNAc衍生物上。在另一个实施例中,当该RNAi试剂由式(IIIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联,并且有义

链被缀合到通过二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物上。

[0576] 在一个实施例中,当该RNAi试剂由式(IIIa)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟代修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键联连接到相邻核苷酸上,有义链包含至少一个硫代磷酸酯键联,并且有义链被缀合到通过二价或三价支链接头附接的一种或多种GalNAc衍生物上。

[0577] 在一个实施例中,该RNAi试剂是一种多聚体,该多聚体含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体,其中这些双链体通过一种接头来连接。该接头可以是可裂解的或不可裂解的。任选地,该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体各自可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些双链体各自可以在两个不同靶位点处靶向相同基因。

[0578] 在一个实施例中,该RNAi试剂是一种多聚体,该多聚体含有由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的三个、四个、五个、六个或更多个双链体。该接头可以是可裂解的或不可裂解的。任选地,该多聚体进一步包含一个配体。这些双链体各自可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些双链体各自可以在两个不同靶位点处靶向相同基因。

[0579] 在一个实施例中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的两种RNAi试剂在5'端和这些3'端中的一个或两个处彼此连接,并且任选地缀合到一个配体上。这些试剂各自可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些试剂各自可以在两个不同靶位点处靶向相同基因。

[0580] 不同公开物描述了可以在本发明的这些方法中使用的多聚体RNAi试剂。此类公开物包括W02007/091269、美国专利号7858769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887以及W02011/031520,所述公开物的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0581] 如下更详细地描述,含有一个或多个碳水化合物部分与RNAi试剂的缀合的RNAi试剂可以优化该RNAi试剂的一种或多种特性。在许多情况下,该碳水化合物部分将被附接到该RNAi试剂的一个修饰的亚单元上。例如,一种dsRNA试剂的一个或多个核糖核苷酸亚单元的核糖可以被另一个部分(例如,一个碳水化合物配体所附接的一个非碳水化合物(优选环状)载体)置换。其中亚单元的核糖被如此置换的核糖核苷酸亚单元在此被称为核糖置换修饰亚单元(RRMS)。一种环状载体可以是一个碳环系统,即所有环原子均是碳原子,或一个杂环系统,即一个或多个环原子可以是一个杂原子,例如氮、氧、硫。该环状载体可以是一个单环系统,或可以含有两个或更多个环,例如稠合环。该环状载体可以是一个完全饱和的环系统,或它可以含有一个或多个双键。

[0582] 该配体可以通过一个载体附接到多核苷酸上。这些载体包括(i)至少一个“骨架附接点”、优选两个“骨架附接点”,和(ii)至少一个“系拴附接点”。如在此使用的“骨架附接点”是指一个官能团(例如一个羟基基团),或通常,可供用于并且适用于将该载体结合到一种核糖核酸的骨架(例如含硫骨架)中的一个键(例如磷酸酯或修饰的磷酸酯)。在一些实施例中,“系拴附接点”(TAP)是指该环状载体的、连接一个选择的部分的一个组成环原子,例如一个碳原子或一个杂原子(相异于提供骨架附接点的原子)。该部分可以是例如一种碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖以及多糖。任选地,该选择的部分通过一个介入系拴物连接到该环状载体上。因此,该环状载体将经常包括一个官能团(例如氨基基团),或通常提供适用于将另一个化学实体(例如一个配体)结合或系拴到组成型环上的一个键。

[0583] 这些RNAi试剂可以通过一种载体缀合到一个配体上,其中该载体可以是环状基团或非环状基团;优选地,该环状基团是选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基以及十氢化萘;优选地,该非环状基团是选自丝氨酸骨架或二乙醇胺骨架。

[0584] 在某些具体的实施例中,用于本发明的这些方法中的RNAi试剂是选自下组的一种试剂,该组具有在表3、表4、表5、表6、表18、表19、表20、表21和表23中的任一个中列出的试剂。这些试剂可以进一步包含一个配体。

[0585] IV. 缀合到配体上的iRNA

[0586] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及使RNA化学连接到一种或多种增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取的配体、部分或共轭物上。此类部分包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(莱兹斯英格(Letsinger)等人,美国科学院院报(Proc.Natl Acad.Sci.USA),1989,86:6553-6556)、胆酸(曼汉兰(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学通讯(Biorg.Med.Chem.Lett.),1994,4:1053-1060)、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(曼汉兰等人,纽约科学院年报(Ann.N Y.Acad.Sci.),1992,660:306-309;曼汉兰等人,生物有机化学与医药化学通讯,1993,3:2765-2770)、硫代胆固醇(奥伯豪泽尔(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl Acids Res.),1992,20:533-538)、脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(赛松-贝莫若斯(Saison-Behmoaras)等人,欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J),1991,10:1111-1118;卡巴诺夫(Kabanov)等人,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.),1990,259:327-330;斯威那查克(Svinarchuk)等人,生化与分子生物学(Biochimie),1993,75:49-54)、磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(曼汉兰等人,四面体快报(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654;谢伊(Shea)等人,核酸研究,1990,18:3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链(曼汉兰等人,核苷与核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969-973)、或金刚烷乙酸(曼汉兰等人,四面体快报,1995,36:3651-3654)、棕榈基部分(米什拉(Mishra)等人,生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta),1995,1264:229-237)、或十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,美国药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923-937)。

[0587] 在一个实施例中,配体改变向其中并入该配体的iRNA试剂的分布、靶向或寿命。在优选实施例中,与例如不存在这样一个配体的物种相比,这种配体为选择的靶标(例如分子、细胞或细胞类型、区室(例如细胞或器官区室、组织、器官或身体的区域))提供增强的亲和力。优选的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0588] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉、甲壳质、壳聚糖、菊糖、环糊精、N-乙酰半乳糖胺或透明质酸);或脂质。配体还可以是重组或合成的分子,如合成聚合物,例如合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括作为一种聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪的聚氨基酸。聚胺的实例包

括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟物聚胺、树枝状聚胺、精氨酸、胍、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0589] 配体还可以包括靶向基团,例如与指定的细胞类型如肾细胞结合的细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如抗体。靶向基团可以是促甲状腺激素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0590] 配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吡啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉类化合物(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、大环扩展卟啉(Sapphyrin))、多环芳香族烃类(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子,例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-二-(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基基团、十六烷基甘油、冰片、甲醇、1,3-丙二醇、十七烷基基团、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪)以及肽缀合物(例如,触角基因肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如生物素)、运输/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑团簇、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu³⁺复合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0591] 配体可以是蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如对辅助配体具有特异性亲和力的分子,或抗体,例如结合到指定细胞类型如肝细胞上的抗体。配体还可以包括激素和激素受体。配体还可以包括非肽物种,如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、多价甘露糖或多价岩藻糖。该配体可以例如是脂多糖、p38 MAP激酶的激活物或NF- κ B的激活物。

[0592] 该配体可以是例如通过破坏细胞的细胞骨架(例如通过破坏细胞微管、微丝和/或中间丝)增加iRNA试剂摄入到细胞中的物质,例如药物。该药物可以例如是泰素(taxon)、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑(nocodazole)、促微丝聚合剂(japlakinolide)、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽、海洋苔藓素A(swinholide A)、茚满诺星(indanocine)或myoservin。

[0593] 在一些实施例中,附接到如在此所描述的iRNA上的一个配体用作药物代谢动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括,但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等。包含许多硫代磷酸酯键联的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合,因此骨架中包含多个硫代磷酸酯键联的短寡核苷酸,例如具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,也服从于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。此外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适配体也适合用作在此所述的这些实施例中的PK调节配体。

[0594] 本发明的配体-缀合的寡核苷酸可以通过使用这样一种寡核苷酸来合成,该寡核苷酸具有下垂的反应功能性,例如来源于该寡核苷酸上的连接分子的附接(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体,合成的、具有多种保护基中的任一种的配体,或

具有连接部分附接于其上的配体发生反应。

[0595] 在本发明的缀合物中使用的寡核苷酸可以方便且常规地通过固相合成的熟知技术来制备。用于这种合成的仪器由若干个供应商销售,包括例如美国应用生物系统公司(加利福尼亚州,福斯特市(Foster City, Calif))。可另外地或替代地使用本领域中已知的用于这种合成的任何其他装置。使用类似的技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化的衍生物)也是已知的。

[0596] 在本发明的配体-缀合的寡核苷酸以及具有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,该寡核苷酸以及寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体,或已经具有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体,已经具有配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合物前体,或带有结构基元的非核苷配体,在适合的DNA合成仪上进行组装。

[0597] 当使用已经具有连接部分的核苷酸-共轭物前体时,典型地完成该序列特异性连接的核苷的合成,并且然后该配体分子与该连接部分反应以形成配体共轭的寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的这些寡核苷酸或连接的核苷通过自动化的合成仪,使用除了可商购的并且常规用于寡核苷酸合成中的标准亚磷酰胺和非标准亚磷酰胺以外的来源于配体-核苷缀合物的亚磷酰胺来合成。

[0598] A. 脂质缀合物

[0599] 在一个实施例中,该配体或缀合物是一种脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子优选地结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许缀合物分布至一个靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,该靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可以用作配体。例如可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加缀合物对降解的抗性,(b)增加靶向或运输到靶细胞或细胞膜中,和/或(c)可以用来调节与血清蛋白(例如HSA)的结合。

[0600] 基于脂质的配体可以用来抑制(例如控制)缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA更强烈结合的脂质或基于脂质的配体将更不可能靶向肾并且因此较不可能从身体清除。与HSA较不强烈结合的脂质或基于脂质的配体可以用来使缀合物靶向肾。

[0601] 在一个优选实施例中,基于脂质的配体结合HSA。优选地,它以足够的亲和力结合HSA,以使得该缀合物将优选地分布至非肾组织。然而,优选的是这种亲和力并不是这样强,以使得HSA-配体结合不能逆转。

[0602] 在另一个优选实施例中,基于脂质的配体微弱或根本不结合HSA,这样使得缀合物将优选地分布至肾。作为基于脂质的配体的替代或除它之外,还可以使用靶向肾细胞的其他部分。

[0603] 另一方面,该配体是由靶细胞(例如正在增殖的细胞)摄取的部分,例如维生素。这些特别有用于治疗特征在于不想要的细胞增殖(例如具有恶性或非恶性类型,例如癌细胞)的病症。示例性维生素包括维生素A、维生素E和维生素K。其他示例性维生素包括维生素B,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或由靶细胞如肝脏细胞摄取的其他维生素或营养物质。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0604] B. 细胞渗透剂

[0605] 另一方面,该配体是细胞渗透剂,优选地是螺旋细胞渗透剂。优选地,该试剂是两亲的。一种示例性试剂是肽如tat或触角足蛋白。如果该试剂是肽,则它可以被修饰,包括肽

酰基模拟物、反转异构体、非肽键联或假肽键联和D-氨基酸的使用。该螺旋剂优选地是一种 α -螺旋剂,该 α -螺旋剂优选具有一个亲脂性相和一个疏脂性相。

[0606] 该配体可以是一种肽或肽模拟物。肽模拟物(在此又称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA剂的接合可以影响iRNA的药物代谢动力学分布,如通过增强细胞鉴别与吸收。该肽或肽模拟物部分可以是约5-50个氨基酸长,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0607] 肽或肽模拟物可以例如是细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。在另一个替代中,该肽部分可以包含疏水性膜转位序列(MTS)。一个示例性的含疏水性MTS的肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:9)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:10))也可以是靶向部分。该肽部分可以是一个“递送”肽,该递送肽可以携带大的极性分子,包括肽、寡核苷酸和跨细胞膜的蛋白。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白的序列(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:11))和果蝇触角足蛋白的序列(RQIKIWFQNRMMKWKK(SEQ ID NO:12))能够作为递送肽发挥作用。肽或肽模拟物可以通过DNA的随机序列来编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(拉姆(Lam)等人,自然,354:82-84,1991)。通过为了细胞靶向的目的结合的单体单元栓系至dsRNA试剂的肽或肽模拟物的实例是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可以在从约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。这些肽部分可以具有结构修饰,如以便增加稳定性或引导构象特性。可以利用以下描述的任何结构修饰。

[0608] 用于本发明的这些组合物和方法中的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化以促进靶向一个或多个特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD以外,可以使用靶向整合素配体的其他部分。这个配体的优选缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

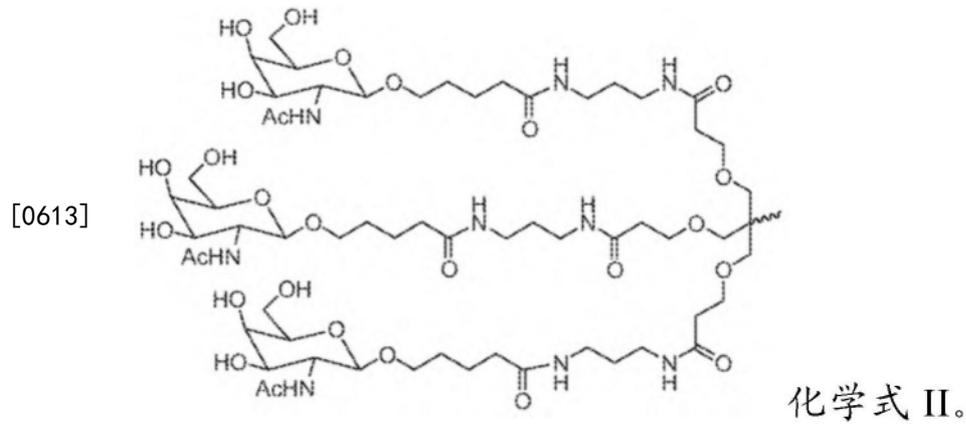
[0609] “细胞渗透肽”能够渗透细胞例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以例如是 α -螺旋线性肽(例如,LL-37或天蚕素(Ceropin)P1)、含二硫键的肽(例如, α -防御素、 β -防御素或牛抗菌肽)、或仅含有一种或两种主要的氨基酸的肽(例如,PR-39或吡啶力西丁(indolicidin))。细胞渗透肽还可以包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二重的两亲性肽,如MPG,该肽来源于HIV-1gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(斯米尼(Simeoni)等人,核酸研究,31:2717-2724,2003)。

[0610] C. 碳水化合物缀合物

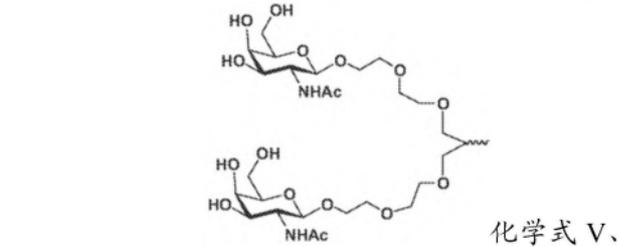
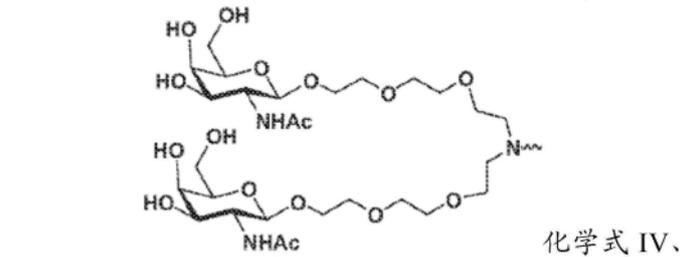
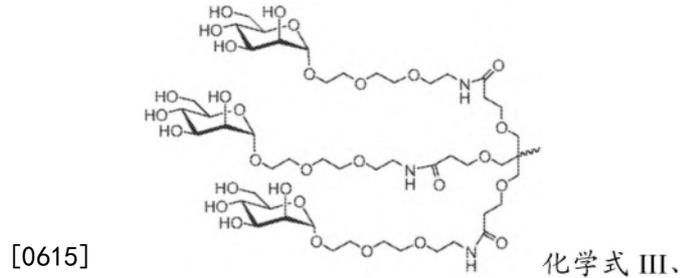
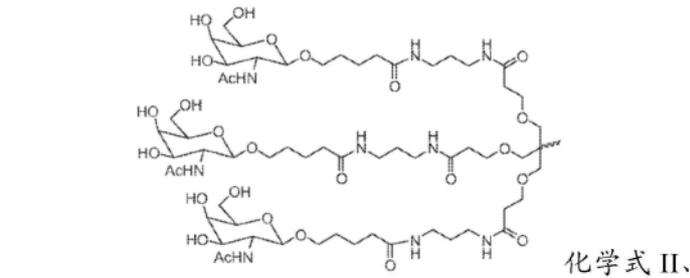
[0611] 在本发明的这些组合物和方法的一些实施例中,iRNA寡核苷酸进一步包含一种碳水化合物。该碳水化合物缀合的iRNA有利于体内递送如在此所描述的核酸以及适用于体内治疗使用的组合物。如在此所使用,“碳水化合物”是指作为本身由具有至少6个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子的一个或多个单糖单元组成的碳水化合物的化合物;或具有由一个或多个单糖单元组成的碳水化合物部分的一部分的化合物,每个单糖具有至少六个碳原子(这些碳原子可以是线性、支链或环状的)与键合到每个碳原子上的氧、氮或硫原子。代表性的碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖以及含有从约4、5、6、7、8或9个单糖单元的寡糖),以及多糖如淀粉、糖原、纤维素和多

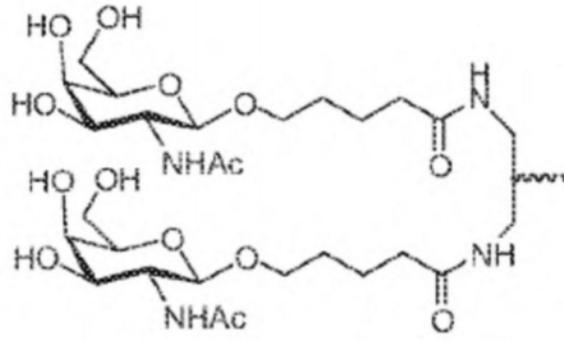
糖胶。具体的单糖包括C5和以上(例如,C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单元的糖(例如,C5、C6、C7或C8)。

[0612] 在一个实施例中,用于在本发明的这些组合物和方法中的碳水化合物缀合物是一种单糖。在一个实施例中,该单糖是一种N-乙酰半乳糖胺,如

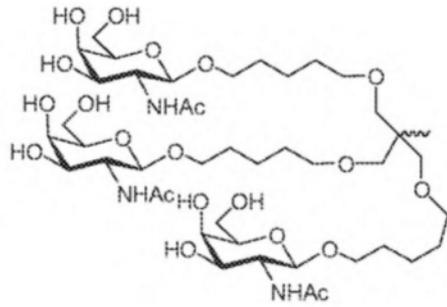


[0614] 在另一个实施例中,用于在本发明的这些组合物和方法中的碳水化合物缀合物是选自下组,该组由以下各项组成:

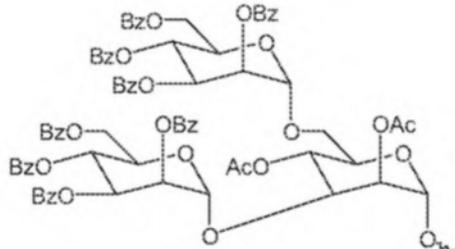




化学式 VI、

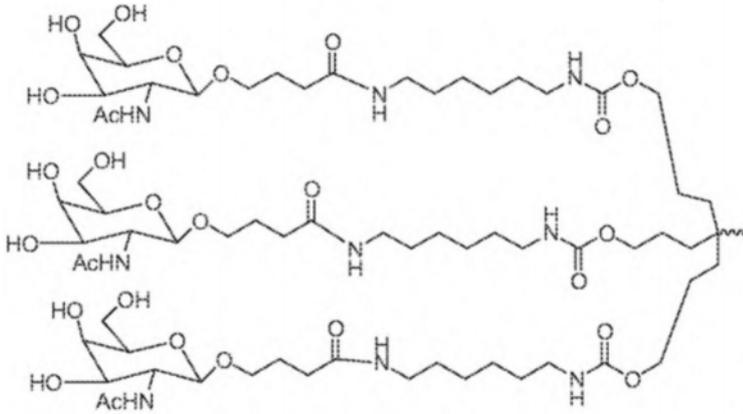


化学式 VII、

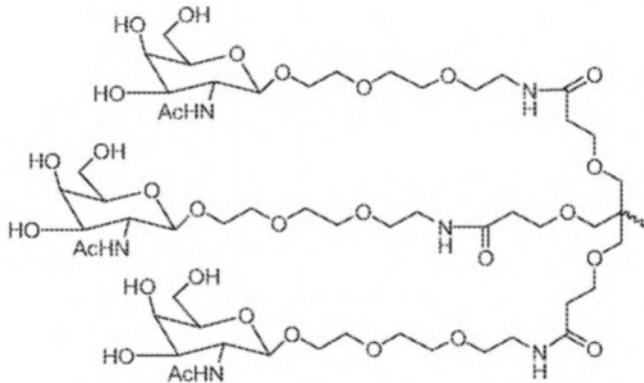


化学式 VIII、

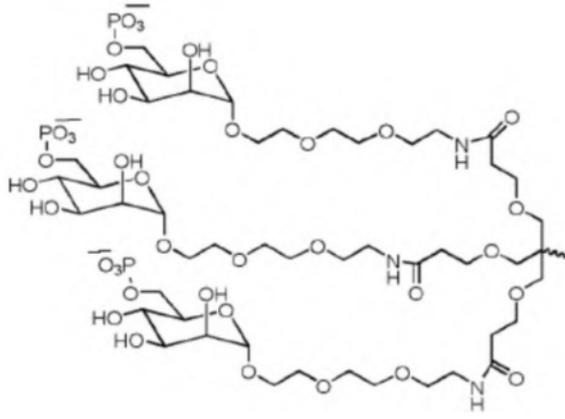
[0616]



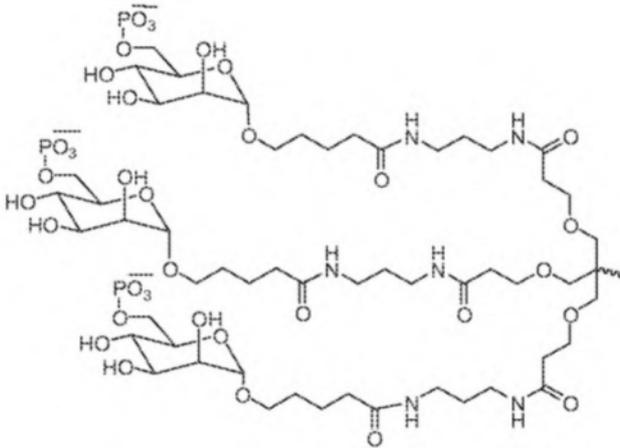
化学式 IX、



化学式 X、

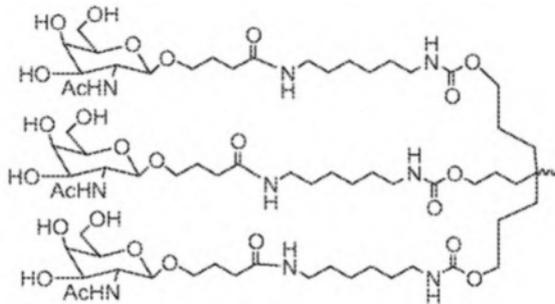


化学式 XI、

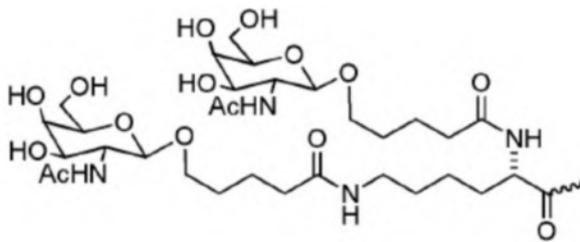


化学式 XII、

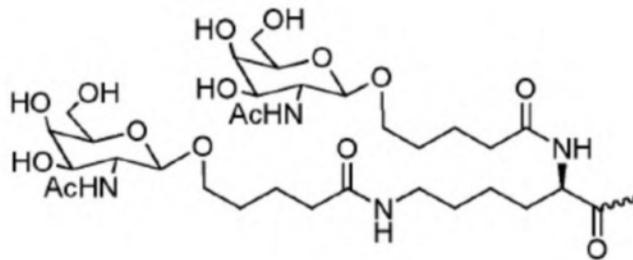
[0617]



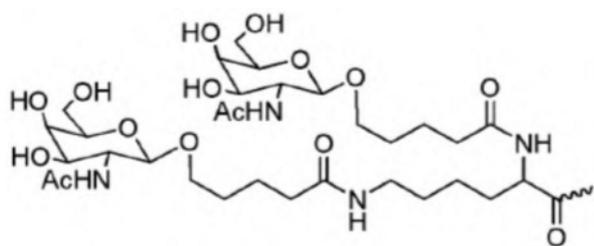
化学式 XIII、



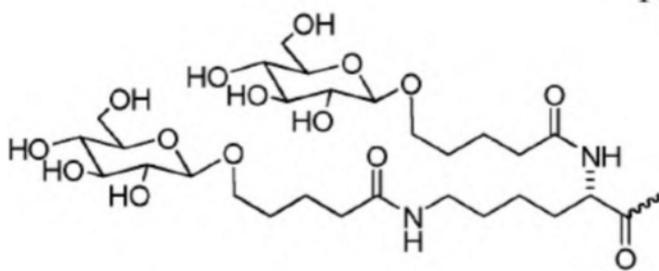
化学式 XIV、



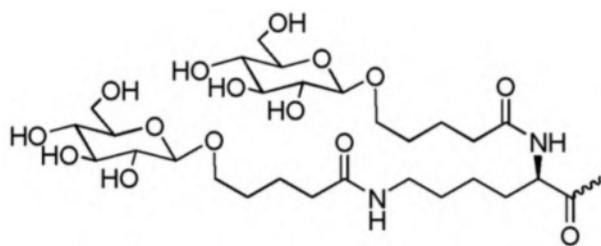
化学式 XV、



化学式 XVI、

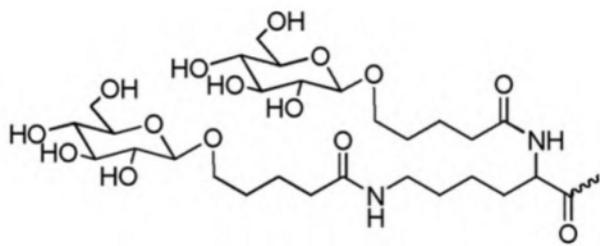


化学式 XVII、

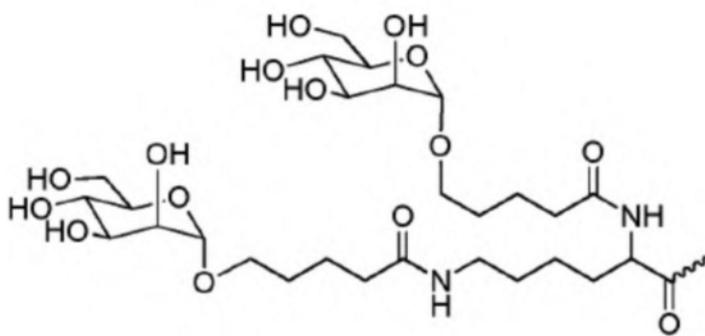


化学式 XVIII、

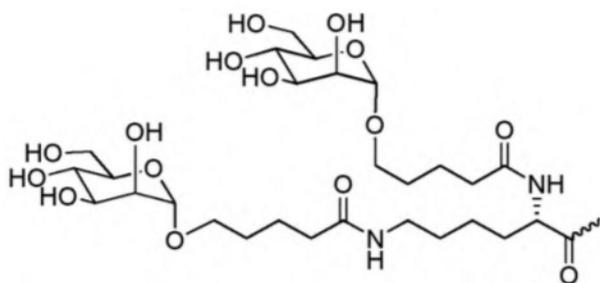
[0618]



化学式 XIX、

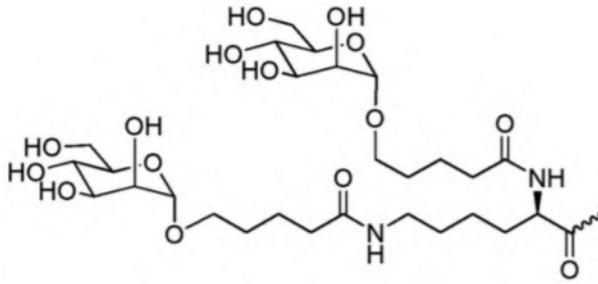


化学式 XX、



化学式 XXI、

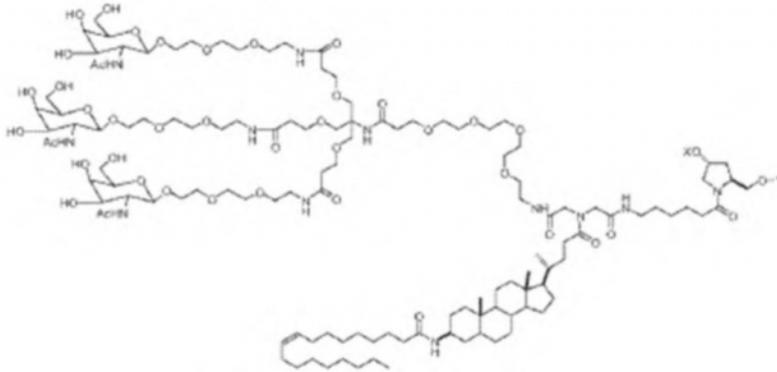
[0619]



化学式 XXII。

[0620] 用于所描述的这些实施例中的另一个代表性的碳水化合物缀合物包括,但不限于

[0621]



(化学式 XXIII) ,

[0622] 当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

[0623] 在一些实施例中,该碳水化合物缀合物进一步包含如上所描述的一个或多个另外的配体,如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

[0624] D. 接头

[0625] 在一些实施例中,在此描述的该缀合物或配体可以借助不同接头附接到iRNA寡核苷酸上,这些接头可以是可裂解的或不可裂解的。

[0626] 术语“接头”或“连接基团”意指连接化合物的两个部分,例如共价附接化合物的两个部分的有机部分。接头典型地包括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,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,该一个或多个亚甲基可以被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、取代的或未取代的杂环中断或封端;其中R₈是氢、酰基、脂肪族或取代的脂肪族。在一个实施例中,该接头是在约1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子、7-17、8-17、6-16、7-16或8-16个原子之间。

[0627] 可裂解的连接基团在细胞外是足够稳定的一种基团,但该基团在进入靶细胞时被裂解以释放该接头结合在一起的两个部分。在一个优选实施例中,该可裂解的连接基团在

靶细胞中或在一种第一参考条件(该第一参考条件可以例如被选择成模拟或代表细胞内条件)下的裂解比在受试者的血液中或在一种第二参考条件下(该第二参考条件可以例如被选择成模拟或代表在该血液或血清中发现的条件)快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少约100倍。

[0628] 可裂解的连接基团对裂解剂敏感,例如pH、氧化还原电势或存在降解性分子。通常,裂解剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或以更高水平或活性被发现。此类降解剂的实例包括:被选择用于具体底物或不具有底物特异性的氧化还原剂,包括例如存在于细胞中,可以通过还原降解氧化还原可裂解的连接基团的氧化性或还原性酶或还原剂如硫醇;酯酶;可以产生酸性环境的核内体或试剂,例如产生5或更低的pH的那些;可以通过用作广义酸、肽酶(该肽酶可以是底物特异性的)和磷酸酶来水解或降解酸可裂解的连接基团的酶。

[0629] 一种可裂解的键基团,如二硫键可以对pH敏感。人血清的pH是7.4,而平均的细胞内pH稍低,在约7.1-7.3范围内。核内体具有在5.5-6.0范围内的更酸性的pH,并且溶酶体具有在5.0左右的甚至更酸性的pH。一些接头将具有在优选的pH下裂解的可裂解的连接基团,从而使阳离子脂质从细胞内的配体中释放,或进入希望的细胞区室中。

[0630] 接头可以包括可被一种具体的酶裂解的可裂解的连接基团。结合到接头中的可裂解的连接基团的类型可以取决于有待靶向的细胞。例如靶向肝脏的配体可以通过包括酯基团的接头而被连接到阳离子脂质上。肝脏细胞富含酯酶,并且因此该接头将在肝脏细胞中比在不富含酯酶的细胞类型中更有效地裂解。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质以及睾丸的细胞。

[0631] 当靶向富含肽酶的细胞类型(如肝细胞和滑膜细胞)时,可以使用含有肽键的接头。

[0632] 通常,一种候选的可裂解的连接基团的适合性可以通过测试降解剂(或条件)裂解该候选的连接基团的能力来进行评估。还希望的是也测试该候选的可裂解的连接基团在血液或当与其他非靶组织接触时抵抗裂解的能力。因此,可以确定在一种第一条件与一种第二条件之间进行裂解的相对敏感性,其中该第一条件被选择成指示在靶细胞中的裂解并且该第二条件被选择成指示在其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的裂解。这些评估可以在无细胞系统中、在细胞中、在细胞培养物中、在器官或组织培养物中或在整个动物中进行。有用的是在无细胞或培养条件下进行初始评估并且通过在整个动物中的进一步评估来进行确证。在优选实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解比在血液或血清(或在被选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的裂解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。

[0633] i. 氧化还原可裂解的连接基团

[0634] 在一个实施例中,可裂解的连接基团是在还原或氧化时被裂解的一种氧化还原可裂解的连接基团。可还原裂解的连接基团的一个实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定一种候选的可裂解连接基团是否是适合的“可还原裂解的连接基团”,或例如是否适合于与一种特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考在此描述的方法。例如可以通过用二硫苏糖醇(DTT)或本领域中已知的其他使用还原剂的试剂进行孵育来对一种候选物进行评估,这模拟了会在细胞(例如靶细胞)中观察到的裂解速率。还可以在被选择成模拟血液

或血清条件的条件下对这些候选物进行评估。在一个实施例中,候选化合物在血液中被裂解至多约10%。在其他实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择成模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液(或在被选择成模拟细胞外条件的体外条件下)中的降解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。可以在被选择成模拟细胞内介质的条件下,使用标准的酶动力学测定来确定候选化合物的裂解速率,并且将其与被选择成模拟细胞外介质的条件下的速率相比较。

[0635] ii. 基于磷酸酯的可裂解的连接基团

[0636] 在另一个实施例中,可裂解接头包括一种基于磷酸酯的可裂解的连接基团。基于磷酸酯的可裂解的连接基团通过降解或水解磷酸酯基团的试剂来裂解。在细胞中裂解磷酸酯基团的试剂的一个实例是酶,例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例是-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-。优选实施例是-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-、-O-P(S)(H)-S-。一个优选实施例是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0637] iii. 酸可裂解的连接基团

[0638] 在另一个实施例中,可裂解的接头包括一种酸可裂解的连接基团。酸可裂解的连接基团是在酸性条件下裂解的连接基团。在优选实施例中,酸可裂解的连接基团在具有约6.5或更低(例如约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的pH的酸性环境中裂解,或被多种试剂(如可以用作广义酸的酶)裂解。在细胞中,具体的低pH细胞器(如核内体或溶酶体)可以为酸可裂解的连接基团提供一种裂解环境。酸可裂解的连接基团的实例包括但不限于脞、酯以及氨基酸的酯。酸可裂解的基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。一个优选实施例是当附接到酯(烷氧基基团)的氧的碳是芳基基团、取代的烷基基团或叔烷基基团(如二甲基戊基或叔丁基)时。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0639] iv. 基于酯的连接基团

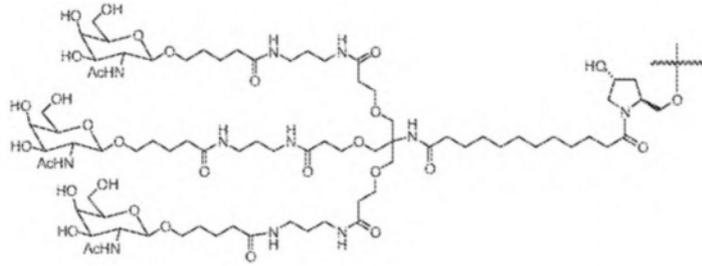
[0640] 在另一个实施例中,可裂解的接头包括一种基于酯的可裂解的连接基团。基于酯的可裂解的连接基团通过酶如细胞中的酯酶与酰胺酶来裂解。基于酯的可裂解的连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基以及亚炔基基团的酯。酯可裂解的连接基团具有通式-C(O)O或-OC(O)-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

[0641] v. 基于肽的裂解基团

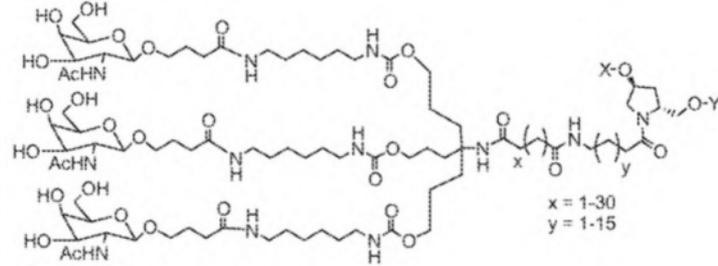
[0642] 在又一个实施例中,可裂解的接头包括一种基于肽的可裂解的连接基团。基于肽的可裂解的连接基团通过酶如细胞中的肽酶和蛋白酶来裂解。基于肽的可裂解的连接基团是在氨基酸之间形成以得到寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可裂解的基团不包括酰胺基团(-C(O)NH-)。酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以得到肽和蛋白质的特定类型的酰胺键。基于肽的裂解基团通常限于在氨基酸之间形成从而得到肽和蛋白质的肽键(即,酰胺键),并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可裂解的连接基团具有通式-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-,其中RA和RB是两个

相邻氨基酸的R基团。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选物。

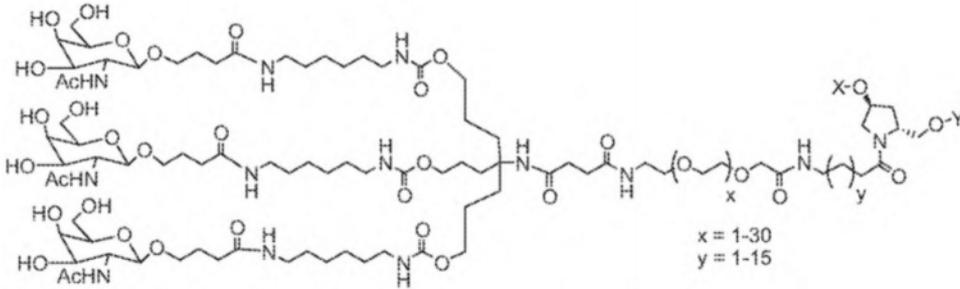
[0643] 在一个实施例中,本发明的iRNA通过一种接头被缀合到碳水化合物上。本发明的这些组合物和方法的具有接头的iRNA碳水化合物缀合物的非限制性实例包括但不限于,



(化学式 XXIV)、



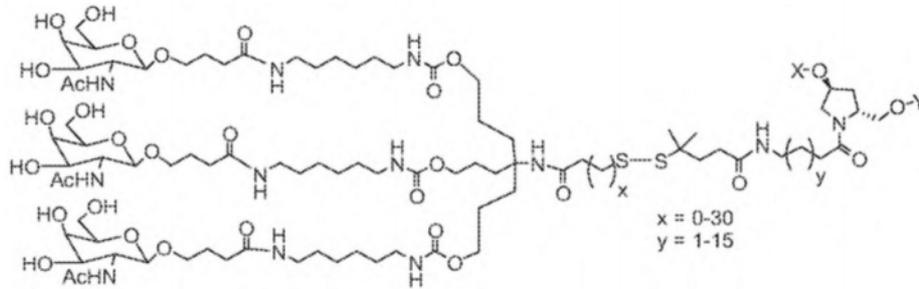
(化学式 XXV)、



[0644]

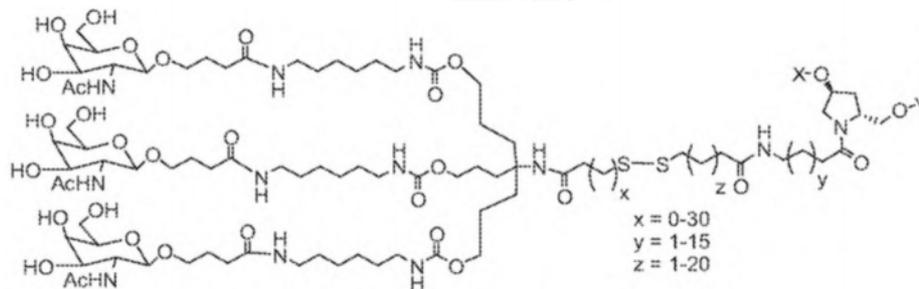
(化学式

XXVI)、



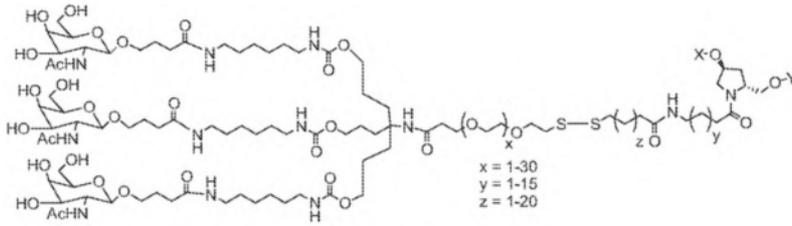
(化学式

XXVII)、



(化学式

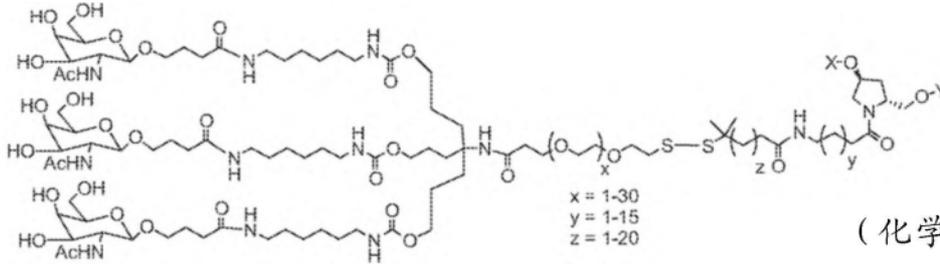
XXVIII)、



以及

(化学式 XXIX)

[0645]



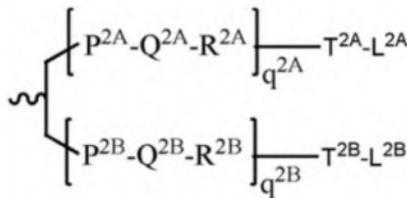
(化学式 XXX),

当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

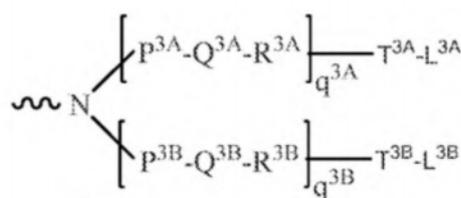
[0646] 在本发明的这些组合物和方法的某些实施例中,配体是通过二价或三价支链接头附接的一种或多种“GalNAc”(N-乙酰半乳糖胺)衍生物。

[0647] 在一个实施例中,本发明的dsRNA被缀合到选自下组的一种二价或三价支链接头上,该组具有以任何式(XXXI)-(XXXIV)示出的结构:

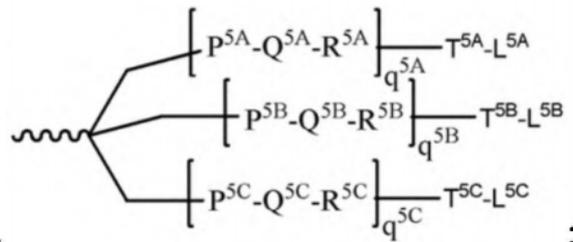
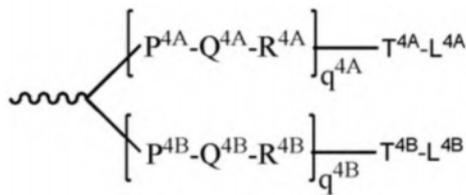
式 XXXI



式 XXXII



[0648]



式 XXXIII

式 XXXIV

[0649] 其中:

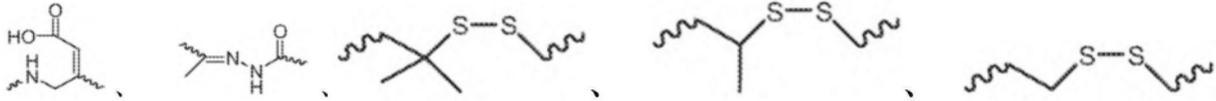
[0650] $q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, q^{4A}, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B}$ 以及 q^{5C} 对于每次出现独立地表示0-20并且其中该重复单元可以是相同或不同的;

[0651] $P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C}$ 对于每次出现各自独立地是:不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH或CH₂O;

[0652] $Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}$ 对于每次出现独立地是:不存在、亚烷基、取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可以被以下各项中的一个或多个中断或封端:O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R^{R'})=C(R^{R''})、C≡C或C(O);

[0653] $R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}$ 对于每次出现各自独立地是:不存在、

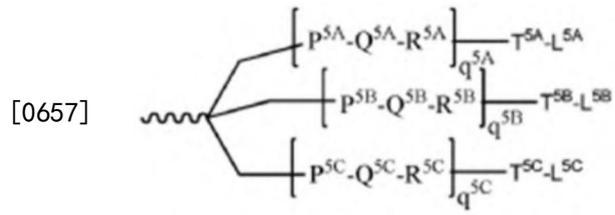
[0654] NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、



或杂环基；

[0655] L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 和 L^{5C} 表示配体；即对于每次出现各自独立地表示单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖；并且 R^a 是H或氨基酸侧链。三价缀合的GalNAc衍生物特别有用于与RNAi试剂一起使用以用于抑制靶基因的表达，如具有式(XXXV)的那些：

[0656] 式XXXV



[0658] 其中 L^{5A} 、 L^{5B} 和 L^{5C} 表示单糖，如GalNAc衍生物。

[0659] 适合的缀合GalNAc衍生物的二价和三价支链接头基团的实例包括，但不限于以上如式II、式VII、式XI、式X和式XIII所列举的结构。

[0660] 教导RNA缀合物的制备的代表性美国专利包括，但不限于美国专利号4,828,979；4,948,882；5,218,105；5,525,465；5,541,313；5,545,730；5,552,538；5,578,717；5,580,731；5,591,584；5,109,124；5,118,802；5,138,045；5,414,077；5,486,603；5,512,439；5,578,718；5,608,046；4,587,044；4,605,735；4,667,025；4,762,779；4,789,737；4,824,941；4,835,263；4,876,335；4,904,582；4,958,013；5,082,830；5,112,963；5,214,136；5,082,830；5,112,963；5,214,136；5,245,022；5,254,469；5,258,506；5,262,536；5,272,250；5,292,873；5,317,098；5,371,241；5,391,723；5,416,203；5,451,463；5,510,475；5,512,667；5,514,785；5,565,552；5,567,810；5,574,142；5,585,481；5,587,371；5,595,726；5,597,696；5,599,923；5,599,928和5,688,941；6,294,664；6,320,017；6,576,752；6,783,931；6,900,297；7,037,646；8,106,022，所述美国专利的每一个的全部内容特此通过引用结合在此。

[0661] 对于给定化合物中的所有位置不必一致地被修饰，并且事实上，前面提到的修饰中的多于一种可以结合在单个化合物中或甚至iRNA内的单个核苷处。本发明还包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0662] 在本发明的上下文中的“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”是iRNA化合物，优选地dsRNA，这些iRNA化合物含有两个或更多个化学相异的区，每个区由至少一个单体单元组成，即，在dsRNA化合物的情况下是核苷酸。

[0663] 这些iRNA典型地含有至少一个区域，其中该RNA被修饰以便赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的靶核酸结合亲和力。iRNA的一个另外的区可以用作能够裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。通过举例，RNA酶H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶。因此，RNA酶H的激活导致RNA靶标的裂解，从而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此，与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比，可以在使用

嵌合dsRNA时,经常用较短的iRNA获得可比较的结果。可以常规地通过凝胶电泳并且如果必要的话联合本领域中已知的核酸杂交技术来检测该RNA靶标的裂解。

[0664] 在某些实例中,iRNA的RNA可以通过非配体基团来进行修饰。许多非配体分子已经被缀合到iRNA上以增强该iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且用于进行此类缀合的程序在科学文献中是可获得的。此类非配体部分包括脂质部分,如胆固醇(库伯(Kubo) T.等人,生物化学与生物物理研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Comm.), 2007, 365(1): 54-61;莱兹斯英格等人,美国科学院院报,1989, 86: 6553)、胆酸(曼汉兰等人,生物有机化学与医药化学通讯,1994, 4: 1053)、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(曼汉兰等人,纽约科学院年报,1992, 660: 306;曼汉兰等人,生物有机化学与医药化学通讯,1993, 3: 2765)、硫代胆固醇(奥伯豪泽尔等人,核酸研究,1992, 20: 533)、脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(赛松-贝莫若斯等人,欧洲分子生物学学会杂志,1991, 10: 111;卡巴诺夫等人,欧洲生化学会联合会快报,1990, 259: 327;斯威那查克等人,生化与分子生物学,1993, 75: 49)、磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯(曼汉兰等人,四面体快报,1995, 36: 3651;谢伊等人,核酸研究,1990, 18: 3777)、聚胺或聚乙二醇链(曼汉兰等人,核苷与核苷酸,1995, 14: 969)、或金刚烷乙酸(曼汉兰等人,四面体快报,1995, 36: 3651)、棕榈基部分(米什拉等人,生物化学与生物物理学报,1995, 1264: 229)、或十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分(克鲁克等人,美国药理学与实验治疗学杂志,1996, 277: 923)。教导此类RNA缀合物的制备的代表性美国专利已经在上文列出。典型的缀合方案涉及在序列的一个或多个位置处合成具有氨基接头的RNA。然后使用适当的偶联剂或活化剂使该氨基基团与被缀合的分子进行反应。可以用仍与固相载体结合或在裂解RNA之后处于溶液相中的RNA来进行缀合反应。通过HPLC纯化RNA缀合物典型地提供纯的缀合物。

[0665] IV. 本发明的iRNA的递送

[0666] 可以通过许多不同方式实现本发明的iRNA向一种细胞的递送,该细胞例如受试者内的细胞,如人受试者(例如,有需要的受试者,如患有补体组分C5相关联的疾病的受试者)。例如,可以通过在体外或体内使细胞与本发明的iRNA接触来进行递送。还可以通过向受试者给予包含iRNA(例如dsRNA)的组合物来直接进行体内递送。可替代地,可以通过给予编码并且引导iRNA表达的一种或多种载体来间接进行体内递送。这些替代方案在以下进一步论述。

[0667] 通常,递送核酸分子(体外或体内)的任何方法均可以被适配用于与本发明的iRNA一起使用(参见,例如阿赫塔尔(Akhtar) S.和朱利安(Julian) RL. (1992) 细胞生物学趋势(Trends Cell. Biol.) 2(5): 139-144和W094/02595,所述参考文献通过引用以其全文结合在此)。对于体内递送,为了递送iRNA分子所考虑的因素包括例如,所递送的分子的生物稳定性、非特异性效应的预防以及所递送的分子在靶组织中的累积。可以通过局部给予,例如通过直接注射或植入到组织中或局部给予制剂来使iRNA的非特异性效应最小化。向治疗部位局部给予使试剂的局部浓度最大化,限制该试剂向全身组织的暴露,该全身组织否则可以受该试剂损害或可以降解该试剂,并且容许给予较低总剂量的iRNA分子。若干研究已经显示在局部给予iRNA时成功敲低基因产物。例如,通过在食蟹猴中玻璃体内注射(托伦蒂诺(Tolentino) ML等人(2004) 视网膜(Retina) 24: 132-138) 和在小鼠中视网膜下注射(赖希

(Reich) S.J. 等人 (2003) 分子视觉 (Mol. Vis.) 9:210-216) 进行的 VEGF dsRNA 眼内递送均显示出在年龄相关的黄斑变性的实验模型中预防新血管形成。另外, 在小鼠中直接瘤内注射 dsRNA 使肿瘤体积减小 (佩雷 (Pille) J. 等人 (2005) 分子疗法 (Mol. Ther.) 11:267-274), 并且可以延长荷瘤小鼠的存活期 (金姆 W.J. 等人 (2006) 分子疗法 14:343-350; 李 (Li) S. 等人 (2007) 分子疗法 15:515-523)。RNA 干扰也已经显示通过直接注射来向 CNS 局部递送 (多恩 (Dorn) G. 等人 (2004) 核酸 (Nucleic Acids) 32:e49; 谈 (Tan) P.H. 等人 (2005) 基因疗法 (Gene Ther.) 12:59-66; 马卡马如 (Makimura) H. 等人 (2002) BMC 神经科学 (BMC Neurosci.) 3:18; 希什金娜 (Shishkina) G. 等人 (2004) 神经科学 (Neuroscience) 129:521-528; 塔克尔 (Thakker) E.R. 等人 (2004) 美国科学院院报 101:17270-17275; 阿卡尼亚 (Akaneya) Y. 等人 (2005) 神经生理学杂志 (J. Neurophysiol) 93:594-602), 并且通过鼻内给予向肺局部递送 (霍华德 (Howard) K.A. 等人 (2006) 分子疗法 14:476-484; 张 (Zhang) X. 等人 (2004) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 279:10677-10684; 比特克 (Bitko) V. 等人 (2005) 自然医学 (Nat. Med.) 11:50-55)。对于全身给予 iRNA 以用于治疗疾病, 该 RNA 可以被修饰或替代地使用一个药物递送系统来递送; 这两种方法用来防止在体内由核酸内切酶和核酸外切酶引起的 dsRNA 的快速降解。对 RNA 或药物载体的修饰还可以容许 iRNA 组合物靶向靶组织, 并且避免不希望的脱靶效应。iRNA 分子可以通过化学缀合到亲脂基团如胆固醇上而被修饰, 以便增强细胞摄取并且防止降解。例如将与亲脂性胆固醇部分缀合的针对 ApoB 的 iRNA 全身注射到小鼠中并且导致肝脏和空肠两者中 apoB mRNA 的敲减 (苏兹赫克 (Soutschek) J. 等人 (2004) 自然 432:173-178)。已经显示 iRNA 与适配体的缀合在前列腺癌的小鼠模型中抑制肿瘤生长并且介导肿瘤消退 (麦克纳马拉 (McNamara) J.O. 等人 (2006) 自然生物技术 (Nat. Biotechnol.) 24:1005-1015)。在替代实施例中, 可以使用药物递送系统如纳米颗粒、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统递送 iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进 (带负电荷的) iRNA 分子的结合并且也在带负电荷的细胞膜增强相互作用以容许 iRNA 由细胞高效摄取。阳离子脂质、树状物或聚合物可以或者结合到 iRNA 上, 或者诱导形成包住 iRNA 的囊泡或胶束 (参见例如, 金姆 S.H. 等人 (2008) 控释杂志 (Journal of Controlled Release) 129(2):107-116)。囊泡或胶束的形成进一步防止全身给予时 iRNA 的降解。用于制备并且给予阳离子-iRNA 复合物的方法是处于本领域技术人员能力范围内的 (参见例如, 索伦森 (Sorensen) D.R. 等人 (2003) 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol) 327:761-766; 维尔马 (Verma) U.N. 等人 (2003) 临床癌症研究 (Clin. Cancer Res.) 9:1291-1300; 阿诺德 (Arnold) A.S. 等人 (2007) 高血压杂志 (J. Hypertens.) 25:197-205, 所述参考文献通过引用以其全文结合在此)。有用于全身递送 iRNA 的药物递送系统的一些非限制性实例包括 DOTAP (索伦森 D.R. 等人 (2003), 同上; 维尔马 U.N. 等人 (2003), 同上)、Oligofectamine “固体核酸脂质颗粒” (齐默曼 (Zimmermann) T.S. 等人 (2006) 自然 441:111-114)、心磷脂 (钱 (Chien) P.Y. 等人 (2005) 癌症基因疗法 (Cancer Gene Ther.) 12:321-328; 帕尔 (Pal) A. 等人 (2005) 国际肿瘤学杂志 (Int. J. Oncol.) 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺 (邦尼特 (Bonnet) M.E. 等人 (2008) 药学研究 (Pharm. Res.) 8月16日的印刷前电子版本; 艾格纳 (Aigner) A. (2006) 生物医学与生物技术杂志 (J. Biomed. Biotechnol.) 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) 肽 (刘 (Liu) S. (2006) 分子制药 (Mol. Pharm.) 3:472-487) 以及聚酰胺型胺类 (托马利亚 (Tomalia) D.A. 等人 (2007) 生物化学会汇刊 (Biochem. Soc. Trans.) 35:61-67; 奥沙瓦 (Yoo) H. 等人 (1999) 药学研究 16:1799-

1804)。在一些实施例中，iRNA与环糊精形成用于全身给予的复合物。用于给予iRNA和环糊精的药物组合物的方法可以在美国专利号7,427,605中找到，所述专利通过引用以其全文结合在此。

[0668] A. 载体编码的本发明的iRNA

[0669] 靶向C5基因的iRNA可以由插入到DNA或RNA载体中的转录单元表达(参见，例如库蒂尔(Couture)A.等人TIG.(1996),12:5-10;斯基伦(Skillern)A.等人,国际PCT公开号W0 00/22113;康拉德(Conrad),国际PCT公开号W0 00/22114以及康拉德,美国专利号6,054,299)。取决于使用的具体构建体和靶组织或细胞类型,表达可以是瞬时的(在小时至周数量级上)或持久的(数周至数月或更长时间)。可以将这些转基因作为线性构建体、环状质粒或可以是整合或非整合载体的病毒载体引入。该转基因还可以被构建成容许其被遗传作为一种染色体外的质粒(加斯曼(Gassmann)等人美国科学院院报(1995)92:1292)。

[0670] iRNA的单个链或多个链可以从表达载体上的启动子转录。当两个单独的链有待被表达以产生例如dsRNA时,可以将两个单独的表达载体共引入(例如通过转染或感染)到靶细胞中。可替代地,dsRNA的每个单独链可以通过均位于相同表达质粒上的启动子来转录。在一个实施例中,dsRNA被表达为通过一种接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸,这样使得该dsRNA具有茎环结构。

[0671] iRNA表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体、优选地与脊椎动物细胞相容的那些,可以用来产生用于表达如在此所描述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域中熟知的并且从许多商业来源可获得。典型地,提供含有用于插入希望的核酸区段的合宜限制性位点的这类载体。iRNA表达载体的递送可以是全身性的,如通过静脉内或肌肉内给予,通过向从患者外植接着重新引入到患者中的靶细胞给予,或通过允许引入到希望的靶细胞中的任何其他手段。

[0672] iRNA表达质粒可以被转染到靶细胞中作为具有阳离子脂质载体(例如,Oligofectamine)或基于非阳离子脂质的载体(例如,Transit-TKO™)的复合物。本发明还想到了在一周或更长时间范围内用于iRNA介导的靶向靶RNA的不同区的敲低的多次脂质转染。成功地将载体引入到宿主细胞中可以使用多种已知的方法来监测。例如瞬时转染可以使用一种报告基因来进行信号化,例如荧光标记,例如绿色荧光蛋白(GFP)。可以使用标志物来确保细胞离体的稳定转染,这些标志物提供对特定环境因素(例如,抗生素和药物)具有抗性如潮霉素B抗性的转染的细胞。

[0673] 可以与在此描述的这些方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括,但不限于(a)腺病毒载体;(b)逆转录病毒载体,包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼氏鼠白血病病毒等;(c)腺伴随病毒载体;(d)单纯疱疹病毒载体;(e)SV 40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头状瘤病毒载体;(h)小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体如正痘病毒,例如牛痘病毒载体或禽痘病毒,例如金丝雀痘或鸡痘;以及(j)辅助依赖性空壳的腺病毒。复制缺陷型病毒也可以有利的。不同的载体将并入或将不并入细胞的基因组中。如果需要,构建体可以包含病毒序列以用于转染。可替代地,构建体可以并入能够发生附加体型复制的载体(例如EPV和EBV载体)中。用于重组表达iRNA的构建体通常将需要调节元件,例如启动子、增强子等,以确保iRNA在靶细胞中的表达。以下进一步描述针对载体和构建体考虑的其他方面。

[0674] 有用于递送iRNA的载体将包括足以在希望的靶细胞或组织中表达iRNA的调节元

件(启动子、增强子等)。可以选择调节元件以提供组成型或调节/诱导型表达。

[0675] iRNA的表达可以例如通过使用对某些生理学调节剂例如循环的葡萄糖水平或激素敏感的一种诱导型调节序列来精确调节(多彻蒂(Docherty)等人,1994,FASEB杂志(FASEB J.)8:20-24)。适合于在细胞中或哺乳动物中控制dsRNA表达的此类诱导型表达系统包括例如由以下各项进行的调节:蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚作用的化学诱导物以及异丙基- β -D1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)。本领域技术人员将能够基于iRNA转基因的预期用途选择适当的调节/启动子序列。

[0676] 可以使用含有编码iRNA的核酸序列的病毒载体。例如,可以使用逆转录病毒载体(参见米列尔(Miller)等人,酶学方法(Meth.Enzymol.)217:581-599(1993))。这些逆转录病毒载体含有对于病毒基因组正确包装并整合入宿主细胞DNA必需的组分。将编码iRNA的核酸序列克隆到促进该核酸递送入患者的一种或多种载体中。关于逆转录病毒载体的更多细节可以例如在博森(Boesen)等人,生物疗法(Biotherapy)6:291-302(1994)中找到,该参考文献描述了一种逆转录病毒载体将mdr1基因递送至造血干细胞以便制备对化学疗法更有抗性的干细胞的用途。说明逆转录病毒载体在基因疗法中的用途的其他参考文献是:克洛斯(Clows)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.)93:644-651(1994);凯尔门(Kiem)等人,血液(Blood)83:1467-1473(1994);萨蒙斯(Salmons)和根兹伯格(Gunzberg),人类基因疗法(Human Gene Therapy)4:129-141(1993);以及格罗斯曼(Grossman)和威尔森(Wilson),遗传学与发育新观点(Curr.Opin.in Genetics and Devel)3:110-114(1993)。想到使用的慢病毒载体包括例如描述于美国专利号6,143,520;5,665,557和5,981,276中的基于HIV的载体,所述美国专利通过引用结合在此。

[0677] 还想到腺病毒用于本发明的iRNA的递送中。腺病毒是特别有吸引力的媒介物,例如用于递送基因至呼吸道上皮。腺病毒天然地感染呼吸道上皮,在那里它们引起轻微疾病。基于腺病毒的递送系统的其他靶是肝脏、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感不分裂细胞的优点。科扎斯基(Kozarsky)和威尔森,遗传学与发育学新观点3:499-503(1993)提出基于腺病毒的基因疗法的综述。布特(Bout)等人,人类基因疗法5:3-10(1994)展示了腺病毒载体将基因转移至恒河猴呼吸道上皮的用途。腺病毒在基因疗法中的用途的其他实例可以在罗森菲尔德(Rosenfeld)等人,科学(Science)252:431-434(1991);罗森菲尔德等人,细胞68:143-155(1992);马斯安格利(Mastrangeli)等人,临床研究杂志91:225-234(1993);PCT公开W094/12649以及王(Wang)等人,基因疗法2:775-783(1995)中找到。用于表达在本发明中体现的iRNA的适合的AV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于将载体递送到靶细胞中的方法被描述于夏(Xia)H等人(2002),自然生物技术20:1006-1010中。

[0678] 腺伴随病毒(AAV)载体还可以用来递送本发明的iRNA(瓦尔希(Walsh)等人,实验生物学与实验医学会会报(Proc.Soc,Exp.Biol.Med.)204:289-300(1993);美国专利号5,436,146)。在一个实施例中,iRNA可以从具有例如U6或H1 RNA启动子或细胞巨化病毒(CMV)启动子的重组AAV载体作为两个单独的互补性单链RNA分子表达。用于表达在本发明中体现的dsRNA的适合的AAV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于将载体递送到靶细胞中的方法被描述于萨穆尔斯基(Samulski)R等人(1987),病毒学杂志(J.Virol.)61:3096-3101;费希尔(Fisher)K J等人(1996),病毒学杂志,70:520-532;萨穆尔斯基R等人(1989),病毒学杂志63:3822-3826;美国专利号5,252,479;美国专利号5,139,941;国际专利申请号W0

94/13788以及国际专利申请号WO 93/24641中,这些参考文献的全部披露内容通过引用结合在此。

[0679] 适合用于递送本发明的iRNA的另一种病毒载体是痘病毒如牛痘病毒,例如减毒牛痘,像改良的安卡拉病毒(MVA)或NYVAC;禽痘病毒,如鸡痘或金丝雀痘。

[0680] 病毒载体的向性可以通过用包膜蛋白或来自其他病毒的其他表面抗原来对这些载体假型化而进行修饰,或者适当时通过取代不同的病毒衣壳蛋白而进行修饰。例如,慢病毒载体可以是具有来自疱疹性口腔炎病毒(VSV)、狂犬病、埃博拉病毒(Ebola)、莫克拉(Mokola)病毒等的表面蛋白的假型。AAV载体可以被制成通过工程化载体以表达不同衣壳蛋白血清型来靶向不同细胞;参见,例如拉比诺维茨(Rabinowitz)J E等人(2002),病毒学杂志76:791-801,该参考文献的全部披露内容通过引用结合在此。

[0681] 载体的药物制剂可以包括在一种可接受的稀释剂中的该载体,或可以包括一种缓释基质,在该缓释基质中该基因递送媒介物被嵌入。可替代地,当完整的基因递送载体可以从重组细胞中完整产生时,例如逆转录病毒载体,药物制剂可以包括产生基因递送系统的一种或多种细胞。

[0682] V. 本发明的药物组合物

[0683] 本发明还包括药物组合物和配制品,它们包括本发明的iRNA。在一个实施例中,在此提供了含有如在此所描述的iRNA和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0684] 在此采用的短语“药学上可接受的”是指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在正确医学判断范围内,适合于接触人受试者和动物受试者的组织而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。

[0685] 如在此所使用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、或溶剂封装材料(涉及将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运输到身体的另一个器官或部分)。在与该配制品的其他成分相容并且对所治疗的受试者无害的意义上讲,每种载体必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉类,如玉米淀粉和土豆淀粉;(3)纤维素和它的衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,如丙二醇;(11)多元醇类,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯类、聚碳酸酯类和/或聚酞类;(22)增量剂,如多肽和氨基酸;(23)血清组分,如血清白蛋白、HDL和LDL;以及(24)在药物配制品中采用的其他无毒性相容的物质。

[0686] 含有iRNA的药物组合物有用于治疗与C5基因的表达或活性相关联的疾病或病症,例如补体组分C5相关联的疾病。此类药物组合物基于递送方式来配制。一个实例是被配制用于通过肠胃外递送,例如皮下(SC)或静脉内(IV)递送来全身给予的组合物。另一个实例是被配制用于例如通过输注到脑,如通过连续泵输注来直接递送到脑实质中的组合物。本发明的这些药物组合物可以足以抑制C5基因的表达的剂量给予。通常,本发明的iRNA的适

合剂量将处于每天约0.001至约200.0毫克/受体的千克体重范围内,通常处于每天约1mg至50mg/千克体重范围内。例如,可以在每单次剂量约0.01mg/kg、约0.05mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约1.5mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg或约50mg/kg下给予该dsRNA。

[0687] 例如,可以约0.1mg/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、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg或约10mg/kg的剂量给予该dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0688] 在另一个实施例中,以约0.1mg/kg至约50mg/kg、约0.25mg/kg至约50mg/kg、约0.5mg/kg至约50mg/kg、约0.75mg/kg至约50mg/kg、约1mg/kg至约50mg/kg、约1.5mg/kg至约50mg/kg、约2mg/kg至约50mg/kg、约2.5mg/kg至约50mg/kg、约3mg/kg至约50mg/kg、约3.5mg/kg至约50mg/kg、约4mg/kg至约50mg/kg、约4.5mg/kg至约50mg/kg、约5mg/kg至约50mg/kg、约7.5mg/kg至约50mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、约15mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约30mg/kg至约50mg/kg、约35mg/kg至约50mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约45mg/kg、约0.25mg/kg至约45mg/kg、约0.5mg/kg至约45mg/kg、约0.75mg/kg至约45mg/kg、约1mg/kg至约45mg/kg、约1.5mg/kg至约45mg/kg、约2mg/kg至约45mg/kg、约2.5mg/kg至约45mg/kg、约3mg/kg至约45mg/kg、约3.5mg/kg至约45mg/kg、约4mg/kg至约45mg/kg、约4.5mg/kg至约45mg/kg、约5mg/kg至约45mg/kg、约7.5mg/kg至约45mg/kg、约10mg/kg至约45mg/kg、约15mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约30mg/kg至约45mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约45mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.25mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约40mg/kg、约0.75mg/kg至约40mg/kg、约1mg/kg至约40mg/kg、约1.5mg/kg至约40mg/kg、约2mg/kg至约40mg/kg、约2.5mg/kg至约40mg/kg、约3mg/kg至约40mg/kg、约3.5mg/kg至约40mg/kg、约4mg/kg至约40mg/kg、约4.5mg/kg至约40mg/kg、约5mg/kg至约40mg/kg、约7.5mg/kg至约40mg/kg、约10mg/kg至约40mg/kg、约15mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约40mg/kg、约0.1mg/kg至约30mg/kg、约0.25mg/kg至约30mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.75mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1.5mg/kg至约30mg/kg、约2mg/kg至约

30mg/kg、约2.5mg/kg至约30mg/kg、约3mg/kg至约30mg/kg、约3.5mg/kg至约30mg/kg、约4mg/kg至约30mg/kg、约4.5mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约7.5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg、约15mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约25mg/kg至约30mg/kg、约0.1mg/kg至约20mg/kg、约0.25mg/kg至约20mg/kg、约0.5mg/kg至约20mg/kg、约0.75mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1.5mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约20mg/kg、约2.5mg/kg至约20mg/kg、约3mg/kg至约20mg/kg、约3.5mg/kg至约20mg/kg、约4mg/kg至约20mg/kg、约4.5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约7.5mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg或约15mg/kg至约20mg/kg的剂量给予该dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0689] 例如,可以约0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.1mg/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、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg或约10mg/kg的剂量给予该dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0690] 在另一个实施例中,以约0.5mg/kg至约50mg/kg、约0.75mg/kg至约50mg/kg、约1mg/kg至约50mg/kg、约1.5mg/kg至约50mg/kg、约2mg/kg至约50mg/kg、约2.5mg/kg至约50mg/kg、约3mg/kg至约50mg/kg、约3.5mg/kg至约50mg/kg、约4mg/kg至约50mg/kg、约4.5mg/kg至约50mg/kg、约5mg/kg至约50mg/kg、约7.5mg/kg至约50mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、约15mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约30mg/kg至约50mg/kg、约35mg/kg至约50mg/kg、约40mg/kg至约50mg/kg、约45mg/kg至约50mg/kg、约0.5mg/kg至约45mg/kg、约0.75mg/kg至约45mg/kg、约1mg/kg至约45mg/kg、约1.5mg/kg至约45mg/kg、约2mg/kg至约45mg/kg、约2.5mg/kg至约45mg/kg、约3mg/kg至约45mg/kg、约3.5mg/kg至约45mg/kg、约4mg/kg至约45mg/kg、约4.5mg/kg至约45mg/kg、约5mg/kg至约45mg/kg、约7.5mg/kg至约45mg/kg、约10mg/kg至约45mg/kg、约15mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约30mg/kg至约45mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约45mg/kg、约0.5mg/kg至约40mg/kg、约0.75mg/kg至约40mg/kg、约1mg/kg至约40mg/kg、约1.5mg/kg至约40mg/kg、约2mg/kg至约40mg/kg、约2.5mg/kg至约40mg/kg、约3mg/kg至约40mg/kg、约3.5mg/kg至约40mg/kg、约

4mg/kg至约40mg/kg、约4.5mg/kg至约40mg/kg、约5mg/kg至约40mg/kg、约7.5mg/kg至约40mg/kg、约10mg/kg至约40mg/kg、约15mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.75mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1.5mg/kg至约30mg/kg、约2mg/kg至约30mg/kg、约2.5mg/kg至约30mg/kg、约3mg/kg至约30mg/kg、约3.5mg/kg至约30mg/kg、约4mg/kg至约30mg/kg、约4.5mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约7.5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg、约15mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约25mg/kg至约30mg/kg、约0.5mg/kg至约20mg/kg、约0.75mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1.5mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约20mg/kg、约2.5mg/kg至约20mg/kg、约3mg/kg至约20mg/kg、约3.5mg/kg至约20mg/kg、约4mg/kg至约20mg/kg、约4.5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约7.5mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg或约15mg/kg至约20mg/kg的剂量给予该dsRNA。在一个实施例中,以约10mg/kg至约30mg/kg的剂量给予该dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0691] 例如,可以例如皮下或静脉内给予受试者单次治疗量的iRNA,如约0.1mg/kg、0.125mg/kg、0.15mg/kg、0.175mg/kg、0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、0.5mg/kg、0.525mg/kg、0.55mg/kg、0.575mg/kg、0.6mg/kg、0.625mg/kg、0.65mg/kg、0.675mg/kg、0.7mg/kg、0.725mg/kg、0.75mg/kg、0.775mg/kg、0.8mg/kg、0.825mg/kg、0.85mg/kg、0.875mg/kg、0.9mg/kg、0.925mg/kg、0.95mg/kg、0.975mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、20mg/kg、20.5mg/kg、21mg/kg、21.5mg/kg、22mg/kg、22.5mg/kg、23mg/kg、23.5mg/kg、24mg/kg、24.5mg/kg、25mg/kg、25.5mg/kg、26mg/kg、26.5mg/kg、27mg/kg、27.5mg/kg、28mg/kg、28.5mg/kg、29mg/kg、29.5mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg或约50mg/kg。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0692] 在一些实施例中,例如皮下或静脉内给予受试者多次剂量的治疗量的iRNA,如约0.1mg/kg、0.125mg/kg、0.15mg/kg、0.175mg/kg、0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、0.5mg/kg、0.525mg/kg、0.55mg/kg、0.575mg/kg、0.6mg/kg、0.625mg/kg、0.65mg/kg、0.675mg/kg、0.7mg/kg、0.725mg/kg、0.75mg/kg、0.775mg/kg、0.8mg/kg、0.825mg/kg、0.85mg/kg、0.875mg/kg、0.9mg/kg、0.925mg/kg、0.95mg/kg、0.975mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、20mg/kg、20.5mg/kg、21mg/kg、21.5mg/kg、22mg/kg、22.5mg/kg、23mg/kg、23.5mg/kg、24mg/kg、24.5mg/kg、25mg/kg、25.5mg/kg、26mg/kg、26.5mg/kg、27mg/kg、27.5mg/kg、28mg/kg、28.5mg/kg、29mg/kg、29.5mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg或约50mg/kg。多次剂量方案可以包括每日给予治疗量的iRNA,如持续两天、三天、四天、五天、六天、七天或更长。

[0693] 在其他实施例中,例如皮下或静脉内给予受试者重复剂量的治疗量的iRNA,如约0.1mg/kg、0.125mg/kg、0.15mg/kg、0.175mg/kg、0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、0.5mg/kg、0.525mg/kg、0.55mg/kg、0.575mg/kg、0.6mg/kg、0.625mg/kg、0.65mg/kg、0.675mg/kg、0.7mg/kg、0.725mg/kg、0.75mg/kg、0.775mg/kg、0.8mg/kg、0.825mg/kg、0.85mg/kg、0.875mg/kg、0.9mg/kg、0.925mg/kg、0.95mg/kg、0.975mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg

kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、20mg/kg、20.5mg/kg、21mg/kg、21.5mg/kg、22mg/kg、22.5mg/kg、23mg/kg、23.5mg/kg、24mg/kg、24.5mg/kg、25mg/kg、25.5mg/kg、26mg/kg、26.5mg/kg、27mg/kg、27.5mg/kg、28mg/kg、28.5mg/kg、29mg/kg、29.5mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg或约50mg/kg。重复剂量方法可以包括在规则的基础上给予治疗量的iRNA,如每隔一天、每隔两天、每隔三天、每周两次、每周一次、每隔一周或每月一次。

[0694] 药物组合物可以通过静脉内输注经过一段时间来给予,如经过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20和21、22、23、24或约25分钟的周期。可以例如在规则的基础上重复该给予,如每周、每两周(即每两周)持续一个月、两个月、三个月、四个月或更长。在初始治疗方案后,可以基于更低频率给予治疗。例如在每周或双周给予持续三个月后,给予可以按每个月重复一次,持续六个月或一年或更长。

[0695] 可以将该药物组合物一日给予一次,或者可以将该iRNA在一天内以适当的间隔给予两次、三次或更多次亚剂量,或者甚至可以通过控释配制品使用连续输注或递送而给予。在所述情况下,包含在每次亚剂量中的iRNA必须是相对应更小的,以便实现总每日剂量。也可以将剂量单位复配用于在几天内递送,例如使用在几天时间范围内提供持续的iRNA释放的常规持续释放配制品。持续释放配制品是本领域中熟知的并且对于在特定位点递送试剂是特别有用的,由此可以与本发明的试剂使用。在这一实施例中,该剂量单位包含相对应的多个每日剂量。

[0696] 在其他实施例中,单次剂量的药物组合物可以是持续长久的,这样使得在不多于3、4或5天间隔下或在不多于1、2、3或4周间隔下给予随后的剂量。在本发明的一些实施例中,每周给予一次单次剂量的本发明的这些药物组合物。在本发明的其他实施例中,每两月给予单次剂量的本发明的这些药物组合物。

[0697] 本领域技术人员将理解,某些因素可以影响有效治疗受试者所要求的剂量和时间安排,这些因素包括但不限于疾病或病症的严重性、先前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效剂量的组合物治疗受试者可以包括单次治疗或一系列治疗。如在此的其他地方所描述,使用常规方法或基于使用适当动物模型的体内测试,可以评估本发明涵盖的各个iRNA的有效剂量和体内半衰期。

[0698] 小鼠遗传学进展产生了用于研究不同人类疾病的许多小鼠模型,这些人类疾病如将受益于C5表达减少的病症。此类模型可以用于iRNA的体内测试,以及用于确定治疗有效的剂量。适合的小鼠模型是本领域中已知的,并且包括例如胶原诱导性关节炎小鼠模型(库特尼(Courtenay)J.S.等人(1980)自然283,666-668)、心肌缺血(霍米斯特(Homeister)JW和卢凯西(Lucchesi)BR(1994)药理学与毒理学年评(Annu Rev Pharmacol Toxicol)34:

17-40)、卵白蛋白诱导性哮喘小鼠模型(例如,汤姆金森(Tomkinson)A.等人(2001).免疫学杂志(J.Immunol.)166,5792-5800)、(NZB×NZW)F1、MRL/Fas^{1pr}(MRL/lpr)和BXSB小鼠模型(赛奥菲诺斯(Theofilopoulos)A.N.和科诺(Kono)D.H.1999.鼠狼疮模型;基因特异性研究和基因组范围研究(Murine lupus models;gene-specific and genome-wide studies).于拉黑塔(Lahita)R.G.编著,全身性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus),第3版,第145页.学术出版社(Academic Press),加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA))、小鼠aHUS模型(乔治高赛彻(Goicoechea de Jorge)等人,(2011)非典型性溶血性尿毒症综合征的发展取决于补体C5(The development of atypical hemolytic uremic syndrome depends on complement C5),美国肾脏病学杂志(JAm Soc Nephrol)22:137-145)。

[0699] 取决于希望局部或全身性治疗并且取决于有待治疗的区域,可以将本发明的药物组合物按许多方式给予。给予可以是局部的(例如,通过透皮贴剂);肺的,例如通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内的;鼻内的;表皮的和透皮的;口服的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内、动脉、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;表皮下,例如通过一个植入性装置;或颅内,例如通过实质内、鞘内或脑室内的给予。

[0700] iRNA可以按这样的方式递送以靶向特定组织,如肝脏(例如肝脏的肝细胞)。

[0701] 用于局部给予的药物组合物和配制品可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉剂。常规的药物载体、水、粉末或油基、增稠剂等可以是必要的或希望的。包衣的安全套、手套等也可以是有用的。适合的局部配制品包括其中在本发明中体现的iRNA与局部用递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。适合的脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰基磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰基磷脂酰胆碱)、阴性(例如,二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油DMPG)和阳离子性(例如,二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰基磷脂酰乙醇胺DOTMA)。在本发明中体现的iRNA可以被包裹在脂质体内或可以与其形成复合物,具体地与阳离子脂质体形成复合物。可替代地,iRNA可以与脂质、具体地与阳离子脂质复合。适合的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、棕榈酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油酸甘油酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱或C₁₋₂₀烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐)。局部配制品被详细地描述于美国专利号6,747,014中,所述美国专利通过引用方式结合在此。

[0702] A. 包含膜性分子组件的iRNA配制品

[0703] 用于本发明的这些组合物和方法中的iRNA可以被配制用于在膜性分子组件例如脂质体或胶束中递送。如在此所使用,术语“脂质体”是指主要由安排在至少一个双层(例如,一个双层或多个双层)中的双嗜性脂质组成的囊泡。脂质体包括单层囊泡和多层囊泡,这些囊泡具有从亲脂性材料和水性内部形成的膜。水性部分含有该iRNA组合物。该亲脂性材料使该水性内部与典型地不包括该iRNA组合物的水性外部(尽管在一些实例中,它可能包括)分离。脂质体有用于将活性成分转移并且递送至作用位点上。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜,所以当脂质体被应用至组织上时,脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体和细胞的合并进行,包括iRNA的内部水性内含物被递送到细胞中,其中该iRNA可以特异性结合到靶RNA上并且可以介导RNAi。在一些情况下,这些脂质体还被特异地靶向成例如

将该iRNA引导到特定细胞类型上。

[0704] 含有RNAi试剂的脂质体可以通过各种方法来制备。在一个实例中,脂质体的脂质组分被溶解在洗涤剂中以使得用脂质组分形成胶束。例如该脂质组分可以是一种两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。该洗涤剂可以具有高的临界胶束浓度并且可以是非离子的。示例性洗涤剂包括螯合物、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐以及月桂酰基肌氨酸。然后将RNAi试剂制剂添加到包括该脂质组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与RNAi试剂相互作用并且缩合在RNAi试剂周围以形成脂质体。缩合之后,例如通过渗析去除该洗涤剂以得到RNAi试剂的脂质体制剂。

[0705] 如果必要,可以在缩合反应过程中添加协助缩合的载体化合物,例如通过控制添加。例如,该载体化合物可以是除了核酸以外的一种聚合物(例如,精胺或亚精胺)。pH还可以调节成有利于缩合。

[0706] 用于产生稳定的多核苷酸递送囊泡的方法被进一步描述于例如WO 96/37194中,这些方法结合了多核苷酸/阳离子脂质复合物作为该递送囊泡的结构组分,所述专利的全部内容通过引用结合在此。脂质体形成还可以包括描述于以下参考文献中的示例性方法的一个或多个方面:菲格那(Feigner) P.L.等人,美国科学院院报8:7413-7417,1987;美国专利号4,897,355;美国专利号5,171,678;班厄姆(Bangham)等人,分子生物学(M.Mot Biol.) 23:238,1965;奥尔逊(Olson)等人,生物化学与生物物理学报557:9,1979;思卓卡(Szoka)等人,美国科学院院报75:4194,1978;梅休(Mayhew)等人生物化学与生物物理学报775:169,1984;金姆等人,生物化学与生物物理学报728:339,1983;以及福永佳娜(Fukunaga)等人,内分泌(Endocrinol.) 115:757,1984。用于制备用作递送囊泡的具有适当尺寸的脂质聚集体的常用技术包括超声和冻融加挤出(参见,例如迈耶(Mayer)等人,生物化学与生物物理学报58:161,1986)。当希望一致小(50nm至200nm)和相对均匀的聚集体时,可以使用微流化法(梅休等人,生物化学与生物物理学报775:169,1984)。这些方法容易地适用于将RNAi试剂制剂封装到脂质体中。

[0707] 脂质体分成两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,这些脂质体与带负电荷的核酸分子相互作用以形成一种稳定的复合物。带正电荷的核酸/脂质体复合物结合到带负电荷的核酸/脂质体复合物上,并且在核内体中内化。由于核内体内的酸性pH,脂质体破裂,从而将它们的内含物释放到细胞质中(王等人,生物化学与生物物理研究通讯,1987,147,980-985)。

[0708] pH-敏感或带负电荷的脂质体包埋核酸而不与它复合。由于该核酸与该脂质是带类似的电荷,所以形成排斥而不是复合。然而,某种核酸包埋于这些脂质体的水性内部之内。pH-敏感脂质体已经用来将编码胸苷激酶基因的核酸递送至培养的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(周(Zhou)等人,控释杂志,1992,19,269-274)。

[0709] 脂质体组合物的一个主要类型包括除了天然来源的磷脂酰胆碱以外的磷脂。例如中性脂质体组合物可以从二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)中形成。阴离子脂质体组合物通常从二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油中形成,而阴离子促融脂质体主要从二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)中形成。另一个类型的脂质体组合物从磷脂酰胆碱(PC),例如像大豆PC和蛋PC中形成。另一个类型从磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物中形成。

[0710] 在体外和在体内将脂质体引入到细胞中的其他方法的实例包括美国专利号5,283,185;美国专利号5,171,678;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;菲格那,生物化学杂志269:2550,1994;诺贝尔(Nobel),美国科学院院报90:1 1307,1993;诺贝尔,人类基因疗法3:649,1992;格申(Gershon),生物化学32:7143,1993;以及施特劳斯(Strauss)欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)11:417,1992。

[0711] 还已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,具体地包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包含Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子型脂质体配制品被用来将环孢菌素-A递送到小鼠皮肤的真皮中。结果表明此类非离子型脂质体系统有效于促进环孢菌素A沉积进入皮肤的不同层中(胡(Hu)等人,标准药物科学(S.T.P.Pharma.Sci.),1994,4(6)466)。

[0712] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,如在此所使用的指包含一种或多种专门化的脂质的脂质体的术语,相对于缺乏此类专门化的脂质的脂质体,这些脂质当结合到脂质体中时引起循环寿命提高。空间稳定的脂质体的实例是其中该脂质体的形成囊泡的脂质部分中的一部分(A)包含一种或多种糖脂,如单唾液酰神经节苷脂 G_{M1} 或(B)被衍生具有一种或多种亲水聚合物,如聚乙二醇(PEG)部分的那些脂质体。虽然不希望受任何具体理论约束,但在本领域中认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG-衍生化的脂质的空间稳定的脂质体,这些空间稳定的脂质体的循环半衰期提高来源于进入网状内皮系统(RES)的细胞中的摄取减少(艾伦(Allen)等人,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Letters),1987,223,42;吴等人,癌症研究(Cancer Research),1993,53,3765)。

[0713] 包含一种或多种糖脂的不同脂质体是本领域中已知的。帕帕哈德乔布力洛斯(Papahadjopoiilos)等人美国纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.,1987,507,64)报道了单唾液酰神经节苷脂 G_{M1} 、半乳糖脑苷脂硫酸酯和磷脂酰肌醇提高脂质体的血液半衰期的能力。这些发现由格比松(Gabizon)等人(美国科学院院报,1988,85,6949)进行详细阐述。艾伦等人的美国专利号4,837,028和WO 88/04924披露了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂 G_{M1} 或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利号5,543,152(韦伯(Webb)等人)披露了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱的脂质体被披露于WO 97/13499(利姆(Lim)等人)中。

[0714] 在一个实施例中,使用了阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够融合到细胞膜上的优点。非阳离子脂质体尽管不能够一样有效地与质膜融合,但是可以被体内巨噬细胞摄取,并且可以用来将RNAi试剂递送到巨噬细胞中。

[0715] 脂质体的另外的优点包括:从天然磷脂中获得的脂质体是生物相容的和可生物降解的;脂质体可以结合广范围的水和脂质可溶性药物;脂质体可以保护在它们的区室中包裹的RNAi试剂不受代谢和降解(罗索夫(Rosoff),于“药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)”,利伯曼(Lieberman)、列赫尔(Rieger)和班克(Banker)(编著),1988,第1卷,第245页)。在制备脂质体配制品方面的重要的考虑是脂质表面电荷、囊泡尺寸以及这些脂质体的水性体积。

[0716] 带正电荷的合成阳离子脂质N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可以用来形成自发地与核酸相互作用以形成脂质-核酸复合物的小脂质体,这些

复合物能够与组织培养物细胞的细胞膜的带负电荷的脂质融合,从而递送RNAi试剂(参见,例如菲格那P.L.等人,美国科学院院报8:7413-7417,1987和美国专利号4,897,355对于DOTMA及其与DNA一起使用的描述)。

[0717] DOTMA类似物1,2-二(油酰基氧基)-3-(三甲基铵)丙烷(DOTAP)可以与磷脂组合使用以形成复合DNA的囊泡。Lipofectin™(贝特斯达研究实验室(Bethesda Research Laboratories),马里兰州盖瑟斯堡(Gaithersburg, Md.))是用于将高度阴离子核酸递送到活的组织培养物细胞中的有效试剂,这些活的组织培养物细胞包含自发地与带负电荷的多核苷酸相互作用以形成复合物的带正电荷的DOTMA脂质体。当使用足够的带正电荷的脂质体时,所得复合物的净电荷也为正。以这种方式制备的带正电荷的复合物自发地附接到带负电荷的细胞表面上,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送到例如组织培养物细胞中。另一种可商购的阳离子脂质1,2-二(油酰基氧基)-3,3-(三甲基铵)丙烷(“DOTAP”) (德国宝灵曼公司(Boehringer Mannheim),印第安纳州印第安纳波利斯(Indianapolis, Indiana))与DOTMA的不同之处在于油酰基部分通过酯而不是醚键来连接。

[0718] 其他报道的阳离子脂质化合物包括已经被缀合到各种部分上的那些,包括例如已经被缀合到两种类型脂质中的一种上的羧基精胺,并且包括化合物如5-羧基精胺甘氨酸二辛油酰基酰胺(spermylglycine dioctaoyleamide) (“DOGS”) (Transfectam™, 普洛麦格公司(Promega)威斯康辛州,麦迪逊(Madison, Wisconsin))和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺5-羧基精胺酰胺(“DPPE”) (参见,例如美国专利号5,171,678)。

[0719] 另一种阳离子脂质缀合物包括脂质与胆固醇的衍生(“DC-Chol”),该衍生被配制到与DOPE组合的脂质体中(参见,高X.和黄(Huang)L.,生物化学与生物物理研究通讯179:280,1991)。已经报道了通过将聚赖氨酸缀合到DOPE上而制备的脂质聚赖氨酸有效于在血清存在下转染(周X.等人,生物化学与生物物理学报1065:8,1991)。对于某些细胞系,这些含有缀合阳离子脂质的脂质体据说显示出较低的毒性,并且比含DOTMA组合物提供更有效的转染。其他可商购的阳离子脂质产品包括DMRIE和DMRIE-HP(威卡尔(Vical)、加州拉霍亚(La Jolla, California))和脂质体(Lipofectamine) (DOSPA) (美国生命技术公司,马里兰州盖瑟斯堡)。适合用于寡核苷酸的递送的其他阳离子脂质被描述于WO 98/39359和WO 96/37194中。

[0720] 脂质体制制品特别适用于局部给予,脂质体比其他制品呈现若干优势。这些优势包括:减少的与所给予药物的高全身性吸收相关的副作用、在希望的靶标处所给予药物的增加的积累、以及将RNAi剂给予进入皮肤的能力。在一些实施中,脂质体用于将RNAi试剂递送至表皮细胞并且还用来增强RNAi试剂渗透进入真皮组织例如进入皮肤中。例如,可以局部应用这些脂质体。已经记载了将配制呈脂质体的药物局部递送至皮肤(参见,例如魏纳(Weiner)等人,药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting),1992,第2卷,405-410和迪普莱西(du Plessis)等人,抗病毒研究(Antiviral Research),18,1992,259-265;曼尼诺(Mannino)R.J.和付吾尔德-付格瑞特(Fould-Fogerite)S.,生物技术(Biotecimiques)6:682-690,1988;伊塔尼(Itani)T.等人,基因(Gene)56:267-276,1987;尼古劳(Nicolau)C.等人,酶学方法(Meth.Enz.)149:157-176,1987;施特劳宾格(Straubinger).M.和帕帕哈德乔布力洛斯D.酶学方法101:512-527,1983;王C.Y.和黄L.,美国科学院院报84:7851-7855,1987)。

[0721] 还已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,具体地包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包含Novasome I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和Novasome II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子型脂质体制成品被用来将药物递送到小鼠皮肤的真皮中。具有RNAi试剂的此类配制品有用于治疗皮肤病学失调。

[0722] 包括iRNA的脂质体可以被制成高度可变形的。此种变形能力可以使得脂质体通过小于脂质体平均半径的孔渗透。例如传递体是一种可变形的脂质体的类型。传递体可以通过将表面边缘活化剂(通常为表面活性剂)添加到一种标准的脂质体组合物中制成。包括RNAi剂的传递体可以例如通过皮下地感染被递送以将RNAi剂递送到皮肤中的角质形成细胞中。为了跨过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适合的透皮梯度的影响下穿过一系列的细孔,每一孔具有小于50nm的直径。另外,由于脂质特性,这些传递体可以自动优化(适于例如皮肤中的孔隙的形状)、自动修复,并且可以经常到达其靶标而不破碎,并且通常自动负载。

[0723] 适于本发明的其他配制品被描述于2008年1月2日提交的美国临时申请序号61/018,616;2008年1月2日提交的美国临时申请序号61/018,611;2008年3月26日提交的美国临时申请序号61/039,748;2008年4月22日提交的美国临时申请序号61/047,087以及2008年5月8日提交的美国临时申请序号61/051,528中。2007年10月3日提交的PCT申请号PCT/US2007/080331还描述了适于本发明的配制品。

[0724] 传递体是又另一种类型的脂质体,并且是高度可变形的脂质聚集体,它们是用于药物递送媒介物的引人注目的候选物。传递体可以被描述为脂滴,其是高度可变形从而它们能够容易地穿过比该脂滴更小的孔。传递体可适于其中使用它们的环境,例如它们是自动优化(适于皮肤中的孔隙的形状)、自动修复,经常到达其靶标而不破碎,并且通常自动负载。为了制备传递体,可能的是将表面边缘活化剂(通常是表面活性剂)添加至一种标准的脂质体组合物。传递体已经被用于将血清白蛋白递送至皮肤。已经显示血清白蛋白的传递体介导的递送与皮下注射含有血清白蛋白的溶液一样有效。

[0725] 表面活性剂在配制品如乳剂(包括微乳剂)和脂质体中有广泛应用。对许多不同类型的表面活性剂(天然的和合成的两者)的特性进行分类并评级的最普通的方法是通过使用亲水/亲油平衡值(HLB)。亲水基团(又称为“头部”)的性质为对用于配制品中的不同表面活性剂进行归类提供了最有力的手段(列赫尔,于“药物剂型”,马塞尔德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约州纽约(New York, N.Y.),1988,第285页)。

[0726] 如果该表面活性剂分子没有离子化,它被分类为一种非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂在药物产品和化妆品产品中有广泛应用,并且可在广范围的pH值上使用,通常取决于它们的结构,它们的HLB值在从2至约18的范围内。非离子型表面活性剂包括非离子型酯,如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯以及乙氧基化的酯。非离子型烷醇酰胺和醚如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化的醇以及乙氧基化的/丙氧基化的嵌段聚合物也被包括在这个类别中。聚氧乙烯表面活性剂是该非离子型表面活性剂类别中最常用的成员。

[0727] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带负电荷,则该表面活性剂被分类为阴离子型。阴离子型表面活性剂包括羧酸盐如皂类、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰

胺、硫酸酯如烷基硫酸酯和乙氧基化的烷基硫酸酯、磺酸酯如烷基苯磺酸酯、酰基谷胱甘肽、酰基牛磺酸酯以及磺基琥珀酸酯以及磷酸酯。该阴离子型表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸酯和皂类。

[0728] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带正电荷,则该表面活性剂被分类为阳离子型。阳离子型表面活性剂包括季铵盐和乙氧基化的胺。这些季铵盐是这一类别的最常用的成员。

[0729] 如果该表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,该表面活性剂被分类为两性型。两性型表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱以及磷脂。

[0730] 已经综述了表面活性剂在药物产品、配制品和在乳剂中的用途(列赫尔,于“药物剂型”,马塞尔德克公司,纽约州纽约,1988,第285页)。

[0731] 用于在本发明的方法中使用的iRNA也可提供为胶束配制品。“胶束”在此定义为一种特定类型的分子组件,其中两亲性分子以球形结构排列这样使得这些分子的所有疏水性部分均向内定向,从而使亲水性部分与周围水相接触。如果环境是疏水性的,则存在相反的排列。

[0732] 适合用于通过透皮的膜递送的混合胶束配制品可以通过混合该siRNA组合物的水溶液、碱金属C₈-C₂₂烷基硫酸盐以及胶束形成化合物来制备。示例性胶束形成化合物包括卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、油酸单甘油酯、单油酸酯、单月桂酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧代胆甾烷基甘氨酸及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚及其类似物、聚醚醇烷基醚及其类似物、鹅脱氧胆酸酯、脱氧胆酸酯以及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸盐的同时或之后添加。混合胶束会随着基本上任何种类的这些成分的混合(但剧烈的混合)形成,以提供更小尺寸的胶束。

[0733] 在一个方法中,制备一种第一胶束组合物,其包含该siRNA组合物以及至少该碱金属烷基硫酸盐。然后将该第一胶束组合物与至少三种胶束形成化合物混合,以形成混合胶束组合物。在另一种方法中,该胶束组合物是通过将该siRNA组合物、碱金属烷基硫酸盐和至少一种胶束形成的化合物混合,然后添加剩余的胶束形成化合物(剧烈混合下)来制备。

[0734] 可将苯酚和/或间甲酚添加到该混合胶束组合物中以稳定该配制品并防止细菌生长。可替代地,可随着胶束形成成分一起添加苯酚和/或间甲酚。也可以在该混合胶束组合物形成之后加入等渗剂,如甘油。

[0735] 对于作为喷雾的胶束配制品的递送,该配制品可被装入气溶剂分配器中并将该分配器用推进剂填充。在该分配器中推进剂(其在压力下)处于液体形式。对各成分的比例进行调整,以便使该水相和推进剂相成为一体,即存在一个相。如果存在两个相,必需在例如通过计量阀分配内含物的一部分之前振荡该分配器。药物试剂的分配量是从计量阀中以细雾推进。

[0736] 推进剂可以包括含氢的氯氟烃、含氢的碳氟化合物、二甲基醚和二乙基醚。在某些实施例中,可以使用HFA 134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0737] 这些必需成分的特定浓度可以通过相对简单的实验来确定。对于通过口腔吸收,经常希望的是使用于通过注射或通过胃肠道给予的剂量增加例如至少两倍或三倍。

[0738] B. 脂质颗粒

[0739] 本发明的iRNA(例如dsRNA)可以被完全包裹在一种脂质配制品中,例如一种LNP或其他核酸-脂质颗粒。

[0740] 如在此所使用,术语“LNP”是指一种稳定的核酸-脂质颗粒。LNP典型地含有阳离子脂质、非阳离子脂质以及防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP尤其有用于全身性应用,因为它们能在静脉内(静脉内(i.v.))注射之后表现出延长的循环寿命,并且在远端部位(例如,物理上与给予部分分开的部位)累积。LNP包括“pSPLP”,该pSPLP包括如在PCT公开号W0 00/03683中列举的一种包裹的缩合剂-核酸复合物。本发明的这些颗粒典型地具有约50nm至约150nm,更典型地约60nm至约130nm,更典型地约70nm至约110nm、最典型地约70nm至约90nm的平均直径,并且基本上是无毒性的。另外,当存在于本发明的核酸-脂质颗粒中时,这些核酸在水溶液中对核酸酶的降解是有抗性的。核酸-脂质颗粒及其制备方法披露于例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;美国公开号2010/0324120和PCT公开号W0 96/40964中。

[0741] 在一个实施例中,脂质与药物的比率(质量/质量比率)(例如,脂质与dsRNA比率)将在从约1:1至约50:1、从约1:1至约25:1、从约3:1至约15:1、从约4:1至约10:1、从约5:1至约9:1、或约6:1至约9:1的范围内。以上列举的范围的范围中间值也被想到成为本发明的部分。

[0742] 该阳离子脂质可以是例如N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(I-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酸基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油烯基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-二亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1-二亚油烯基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪代)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺(ALN 100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-四十七-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂环丁基)二十二烷-2-醇(Tech G1)或其混合物。该阳离子脂质可以构成存在于颗粒中的总脂质的从约20mol%至约50mol%或约40mol%。

[0743] 在另一个实施例中,化合物2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可以用来制备脂质-siRNA纳米颗粒。2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环

的合成描述于2008年10月23日提交的美国临时专利申请号61/107,998中,该专利通过引用结合在此。

[0744] 在一个实施例中,该脂质-siRNA颗粒包括40%2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环;10%DSPC;40%胆固醇;10%PEG-C-DOMG(摩尔百分比),其中粒径是 $63.0 \pm 20\text{nm}$ 并且siRNA/脂质比率是0.027。

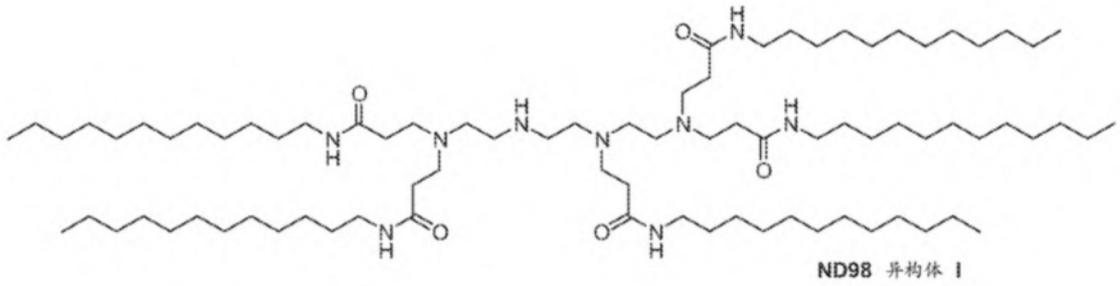
[0745] 可电离的/非阳离子脂质可以是一种阴离子脂质或一种中性脂质,包括但不限于二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-一甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇或其混合物。如果包括胆固醇,该非离子脂质可以是存在于颗粒中的总脂质的从约5mol%至约90mol%、约10mol%或约58mol%。

[0746] 抑制颗粒聚集的缀合脂质可以是例如一种聚乙二醇(PEG)-脂质,其包括但不限于PEG-二酰甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer),或其混合物。PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂基氧基丙基(Ci_2)、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(Ci_4)、PEG-二棕榈基氧基丙基(Ci_6)或PEG-二硬脂基氧基丙基(C_8)。防止颗粒聚集的缀合脂质可以是存在于颗粒中的总脂质的从0mol%至约20mol%或约2mol%。

[0747] 在一些实施例中,核酸-脂质颗粒进一步包括胆固醇,该胆固醇例如占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约60mol%或约48mol%。

[0748] 在一个实施例中,利匹哆异德(lipidoid)ND98-4HC1(MW 1487)(参见2008年3月26日提交的美国专利申请号12/056,230,该专利通过引用结合在此)、胆固醇(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))以及PEG-神经酰胺C16(Avanti Polar Lipids公司)可以用来制备脂质-dsRNA纳米颗粒(即LNP01颗粒)。可以如下制备各物质在乙醇中的储备溶液:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml;PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。然后可以例如42:48:10摩尔比组合ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16储备溶液。合并的脂质溶液可以与(例如pH5乙酸钠中的)水性dsRNA混合,这样使得最终乙醇浓度是约35%-45%并且最终乙酸钠浓度是约100-300mM。一旦混合,脂质-dsRNA纳米颗粒典型地自发形成。取决于希望的粒径分布,可以使用例如一种热屏障挤出器,像Lipex挤出器(加拿大Northern Lipids公司),通过聚碳酸酯膜(例如,100nm截留量)挤出所得到的纳米颗粒混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切线流过滤实现乙醇去除和同时交换缓冲液。缓冲液可以与例如在约pH 7,例如约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4下的磷酸盐缓冲的盐水(PBS)交换。

[0749]



化学式 1

[0750] LNP01配制品被例如描述于国际申请公开W0 2008/042973中,该专利特此通过引用结合。

[0751] 另外的示例性脂质-dsRNA配制品被描述于表1中。

[0752] 表1

[0753]

可电离/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质缀合物脂质:siRNA 比率
SNALP-1	DLinDMA/DPPC/ 胆固醇

[0754]

	氨基丙烷 (DLinDMA)	/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA 大约 7 : 1
2-XTC	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/ 胆 固 醇 /PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA 大约 7 : 1
LNP05	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 大约 6 : 1
LNP06	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 大约 11 : 1
LNP07	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 大约 6 : 1
LNP08	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 大约 11 : 1
LNP09	2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10 : 1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四	ALN100/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG

[0755]

	氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)	50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10 : 1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-四十七-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯 (MC3)	MC-3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10 : 1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(二(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂环丁基)二十二烷-2-醇 (Tech G1)	Tech G1/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10 : 1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33 : 1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11 : 1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11 : 1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/3.5 脂质:siRNA: 7 : 1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/3.5

		脂质:siRNA: 10 : 1
	LNP18 MC3	MC3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12 : 1
	LNP19 MC3	MC3/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8 : 1
[0756]	LNP20 MC3	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DPG 50/10/38.5/3.5 脂质:siRNA: 10 : 1
	LNP21 C12-200	C12-200/DSPC/ 胆 固 醇 /PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7 : 1
	TNP22 XTC	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10 : 1

[0757] DSPC:二硬脂酰基磷脂酰胆碱

[0758] DPPC:二棕榈酰基磷脂酰胆碱

[0759] PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰基甘油(C14-PEG或PEG-C14)(PEG具有2000的平均摩尔质量)

[0760] PEG-DSG:PEG-二苯乙基甘油(C 18-PEG或PEG-C18)(PEG具有2000的平均摩尔质量) PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺(PEG具有2000的平均摩尔质量) 包含SNALP(1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的配制品被描述于2009年4月15日提交的国际公开号W02009/127060中,该专利特此通过引用结合。

[0761] 包含XTC的配制品被例如描述于2009年1月29日提交的美国临时序号61/148,366; 2009年3月2日提交的美国临时序号61/156,851; 2009年6月10日提交的美国临时序号; 2009年7月24日提交的美国临时序号61/228,373; 2009年9月3日提交的美国临时序号61/239,686 以及2010年1月29日提交的国际申请号PCT/US2010/022614中,所述专利特此通过引用结合。

[0762] 包含MC3的配制品被例如描述于2010年6月10日提交的美国公开号2010/0324120 中,该专利的全部内容特此通过引用结合。

[0763] 包含ALNY-100的配制品被例如描述于2009年11月10日提交的国际专利申请号PCT/

US09/63933中,该专利特此通过引用结合。

[0764] 包含C12-200的配制品被描述于2009年5月5日提交的美国临时序列号61/175,770和2010年5月5日提交的国际申请号PCT/US 10/33777中,所述专利特此通过引用结合。

[0765] 可电离/阳离子脂质的合成

[0766] 可以通过已知的有机合成技术(包括在实例中更详细描述的方法)来制备在本发明的核酸-脂质颗粒中使用的任何化合物,例如阳离子脂质等。除非另外指明,否则全部取代基如下文定义。

[0767] “烷基”意指含有从1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状的饱和脂肪族烃。代表性饱和的直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等;而饱和的支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和的环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和的环状烷基包括环戊烯基和环己烯基等。

[0768] “烯基”意指在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如上所定义的烷基。烯基包括顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等。

[0769] “炔基”意指在相邻碳之间另外含有至少一个三键的如上所定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0770] “酰基”意指其中在附接点处的碳被一个氧代基团取代的任何烷基、烯基或炔基,如下所定义。例如, $-C(=O)$ 烷基、 $-C(O)$ 烯基和 $-C(O)$ 炔基是酰基基团。

[0771] “杂环”意指饱和的、不饱和的或芳香族的并且含有从1或2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5元至7元单环或7元至10元双环、杂环,并且其中该氮和硫杂原子可以任选地被氧化,并且该氮杂原子可以被任选地季铵化,包括其中任何以上杂环被稠合到一个苯环上的双环。杂环可以经任何杂原子或碳原子附接。杂环包括如下文定义的杂芳基。杂环包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基(hydantoinyl)、戊内酰胺基、环氧乙烷基、氧杂环丁基(oxetanyl)、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

[0772] 术语“任选取代的烷基”、“任选取代的烯基”、“任选取代的炔基”、“任选取代的酰基”和“任选取代的杂环”意指当取代时,至少一个氢原子被取代基替代。在氧代取代基($=O$)的情况下,两个氢原子被替代。在这点上,取代基包括氧代、卤素、杂环、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 $-NR_xR_y$ 、 $-NR_xC(=O)R_y$ 、 $-NR_xSO_2R_y$ 、 $-C(=O)R_x$ 、 $-C(=O)OR_x$ 、 $-C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SO_nR_x$ 和 $-SO_nNR_xR_y$,其中n是0、1或2, R_x 和 R_y 是相同或不同的并且独立地氢、烷基或杂环,并且所述烷基和杂环取代基中的每一个可以被以下取代基中的一个或多个进一步取代:氧代、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR_x$ 、杂环、 $-NR_xR_y$ 、 $-NR_xC(=O)R_y$ 、 $-NR_xSO_2R_y$ 、 $-C(=O)R_x$ 、 $-C(=O)OR_x$ 、 $-C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SO_nR_x$ 和 $-SO_nNR_xR_y$ 。

[0773] “卤素”意指氟、氯、溴和碘。

[0774] 在一些实施例中,本发明的方法可能需要使用保护基。保护基方法是本领域技术人员熟知的(参见,例如有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis),格林(Green)T.W.等人,威利数字出版平台(Wiley-Interscience),纽约市,1999)。简言之,本发明上下文中的保护基是降低或消除不希望的官能团反应性的任何基

团。可以将保护基添加到官能团以掩蔽其在某些反应过程中的反应性并且随后将其移除以暴露原始官能团。在一些实施例中,使用了“醇保护基”。“醇保护基”是降低或消除不希望的官能团反应性的任何基团。保护基团可以使用本领域中公知的技术添加和去除。

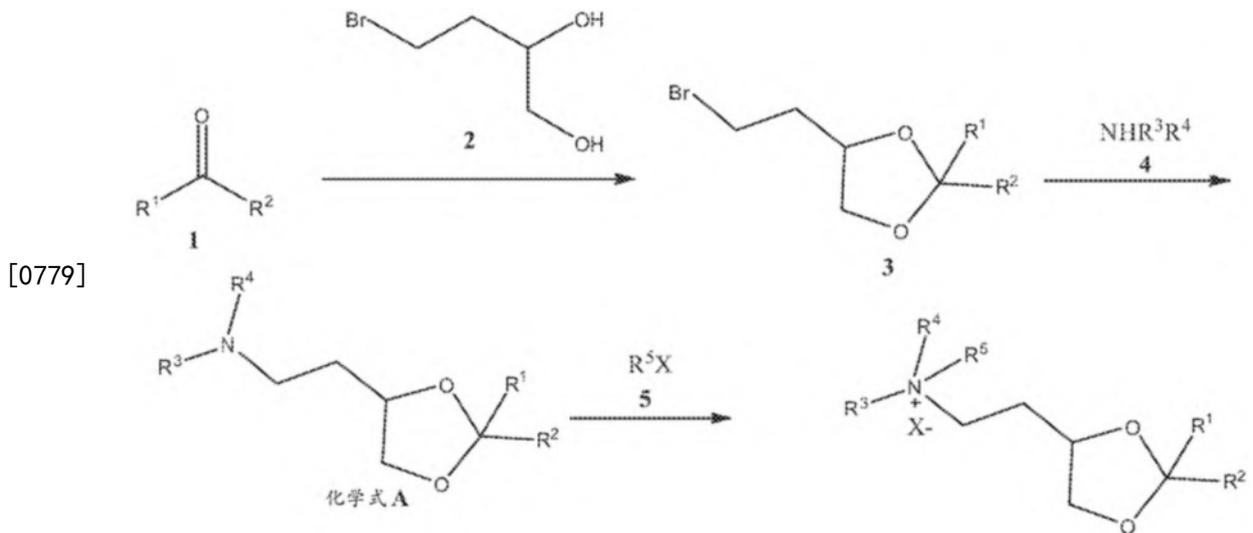
[0775] 式A的合成

[0776] 在一些实施例中,使用式A的阳离子脂质配制本发明的核酸-脂质颗粒:



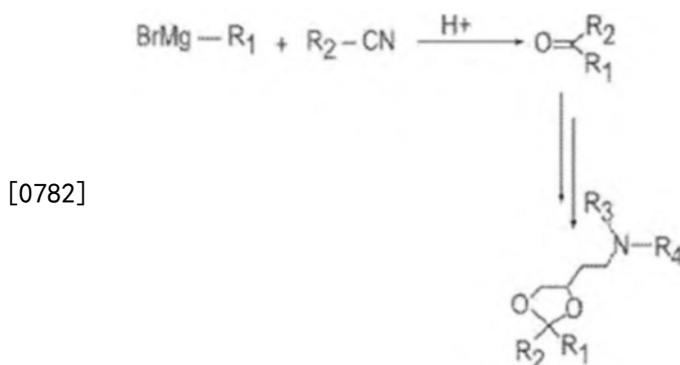
R3和R4独立地是低级烷基或R3和R4可以一起形成任选取代的杂环。在一些实施例中,该阳离子脂质是XTC(2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)。通常,可以通过以下反应方案1或2产生以上式A的脂质,其中除非另外指明,否则全部取代基如上文定义。

[0778] 方案1



[0780] 根据方案1制备脂质A,其中R1和R2独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且R3和R4独立地是低级烷基或R3和R4可以一起形成任选取代的杂环。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备酮1和溴化物2。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3产生具有化学式A的脂质。具有化学式A的脂质可以使用具有化学式5的有机盐转化成相对应的铵盐,其中X是选自卤素、羟基、磷酸酯、硫酸酯等的阴离子反离子。

[0781] 方案2

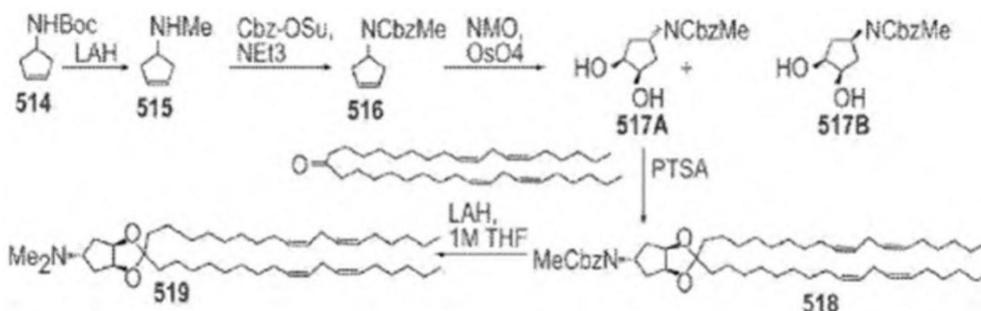


[0783] 可替代地,可以根据方案2制备该酮1起始材料。可以根据本领域技术人员已知的方法购买或制备格氏试剂6和氰化物7。6和7的反应产生酮1。酮1向相对应的具有化学式A的脂质的转化如方案1中所描述。

[0784] MC3的合成

[0785] 如下制备DLin-M-C3-DMA(即,(6Z,9Z,28Z,31Z)-四十七-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯)。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-四十七-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g)、4-N,N-二甲基氨基丁酸盐酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲基氨基吡啶(0.61g)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.53g)在二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。将该溶液用稀盐酸洗涤,随后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机部分在无水硫酸镁上干燥,过滤并且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1%-5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度,使残余物穿过硅胶柱(20g)。合并含有纯化产物的级分并且移除溶剂,产生无色油(0.54g)。ALNY-100的合成

[0786] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:



[0788] 515的合成

[0789] 在0℃下,在氮气气氛下,向双颈RBF(1L)中LiAlH₄(3.74g,0.09852mol)在200ml无水THF中的搅拌悬浮液中缓慢添加514(10g,0.04926mol)在70mL的THF中的溶液。在完全添加之后,将反应混合物加温至室温并且然后加热至回流,持续4h。通过TLC监测反应的进展。在反应完成(通过TLC)之后,将混合物冷却至0℃,并且使用小心添加饱和的Na₂SO₄溶液来猝灭。将反应混合物在室温搅拌4小时并滤出。将残余物用THF充分洗涤。混合滤液和洗涤物,并且用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并在室温下搅拌20分钟。在真空下剥离挥发物以提供呈白色固体的515的盐酸盐。产率:7.12g 1H-NMR(DMSO,400MHz): δ =9.34(宽峰,2H),5.68(s,2H),3.74(m,1H),2.66-2.60(m,2H),2.50-2.45(m,5H)。

[0790] 516的合成

[0791] 向250mL双颈RBF中化合物515在100mL无水DCM中的搅拌溶液中添加NEt₃(37.2mL,0.2669mol)并在氮气气氛下冷却至0℃。在缓慢添加50mL干燥DCM中的N-(苄氧基-羰基氧基)-琥珀酰亚胺(20g,0.08007mol)之后,允许反应混合物加温至室温。在反应完成(通过TLC监测的2-3h)之后,用1N HCl溶液(1×100mL)和饱和NaHCO₃溶液(1×50mL)连续洗涤混合物。然后在无水Na₂SO₄上干燥有机层并且蒸发溶剂以得到粗制材料,该粗制材料通过硅胶柱色谱法纯化得到呈粘性块状的516。产率:11g(89%)。1H-NMR(CDC13,400MHz): δ =7.36-7.27(m,5H),5.69(s,2H),5.12(s,2H),4.96(宽峰,1H)2.74(s,3H),2.60(m,21H),2.30-2.25(m,2H)。LC-MS[M+H]⁻-232.3(96.94%)。

[0792] 517A和517B的合成

[0793] 将环戊烯516(5g,0.02164mol)溶解于220mL丙酮和水(10:1)在单颈500mL RBF中

的溶液中,并且在室温下向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g,0.06492mol),接着是4.2mL的OsO₄(0.275g,0.00108mol)在叔丁醇中的7.6%溶液。在反应完成(大约3h)之后,使用添加固体Na₂SO₃猝灭混合物,并且在室温下将所得到的混合物搅拌1.5h。用DCM(300mL)稀释反应混合物并且用水(2×100mL)洗涤,接着是饱和NaHCO₃(1×50mL)溶液、水(1×30mL)并且最后用盐水(1×50mL)洗涤。在无水Na₂SO₄上干燥有机相,并且在真空中去除溶剂。粗制材料的硅胶柱色谱法纯化提供了非对映异构体的混合物,这些非对映异构体由制备级HPLC分离。产率:约6g粗制物

[0794] 517A-峰-1(白色固体),5.13g(96%)。¹H-NMR(DMSO,400MHz): δ =7.39-7.31(m,5H),5.04(s,2H),4.78-4.73(m,1H),4.48-4.47(d,2H),3.94-3.93(m,2H),2.71(s,3H),1.72-1.67(m,4H)。LC-MS-[M+H]⁻-266.3,[M+NH₄]⁺-283.5存在,HPLC-97.86%。通过X射线证实立体化学。

[0795] 518的合成

[0796] 使用与被描述用于合成化合物505的方法类似的方法,获得呈无色油状物的化合物518(1.2g,41%)。¹H-NMR(CDC13,400MHz): δ =7.35-7.33(m,4H),7.30-7.27(m,1H),5.37-5.27(m,8H),5.12(s,2H),4.75(m,1H),4.58-4.57(m,2H),2.78-2.74(m,7H),2.06-2.00(m,8H),1.96-1.91(m,2H),1.62(m,4H),1.48(m,2H),1.37-1.25(宽m,36H),0.87(m,6H)。HPLC-98.65%。

[0797] 用于合成化合物519的一般程序

[0798] 将化合物518(1当量)在己烷(15mL)中的溶液以逐滴方式添加至LAH在THF(1M,2当量)中的冰冷溶液中。在完成添加之后,将混合物在40℃下加热0.5h,然后在冰浴上再次冷却。将混合物用饱和Na₂SO₄水溶液小心地水解,然后经硅藻土(celite)过滤并且缩减成油状物。柱色谱法提供呈无色油状物获得的纯519(1.3g,68%)。¹³C NMR δ =130.2,130.1(x2),127.9(x3),112.3,79.3,64.4,44.7,38.3,35.4,31.5,29.9(x2),29.7,29.6(x2),29.5(x3),29.3(x2),27.2(x3),25.6,24.5,23.3,226,14.1;电喷射MS(+ve):C₄₄H₈₀N₂(M+H)⁺的分子量计算值654.6,实测值654.6。

[0799] 通过标准或非挤出方法制备的配制品可以按类似的方式来表征。例如配制品典型地通过视觉检查来进行表征。它们应该是发白的半透明溶液,无聚集物或沉淀。脂质纳米颗粒的粒径和粒径分布可以使用例如马尔文(Malvern) Zetasizer Nano ZS(马尔文公司(Malvern),USA)通过光散射来进行测量。颗粒应该是约20-300nm,例如尺寸是40-100nm。该粒径分布应该是单峰的。使用染料排除测定来评估配制品中的总dsRNA浓度以及包埋的级分。可以在存在或不存在破坏配制品的表面活性剂(例如,0.5%曲通(Triton)-X100)的情况下,用RNA结合染料孵育配制的dsRNA的样品,该RNA结合染料如Ribogreen(分子探针公司(Molecular Probes))。配制品中的总dsRNA可以相对于标准曲线,通过来自含有表面活性剂的样品的信号来确定。包埋的级分通过从总dsRNA含量中扣除“游离”dsRNA含量(如通过不存在表面活性剂的情况下的信号所测量)来确定。包埋的dsRNA的百分比典型地>85%。对于SNALP配制品,该粒径是至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm并且至少120nm。适合的范围典型地是约至少50nm至约至少110nm、约至少60nm至约至少100nm、或约至少80nm至约至少90nm。

[0800] 用于口服给予的组合物和配制品包括粉剂或颗粒剂、微粒剂、纳米颗粒剂、在水或

非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或迷你片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可以是希望的。在一些实施例中,口服配制品是以下那些:其中在本发明中体现的dsRNA与一种或多种渗透增强剂表面活性剂以及螯合剂结合地给予。适合的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。适合的胆汁酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、谷氨胆酸(glucolic acid)、甘氨酸(glycolic acid)、甘氨酸鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-褐霉酸钠以及甘氨酸二氢褐霉酸钠。适合的脂肪酸类包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸盐、三癸酸盐、油酸单甘油酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱或甘油单酯、二甘油酯或其药学上可接受的盐(例如,钠盐)。在一些实施例中,渗透增强剂的组合(例如脂肪酸/盐)是与胆汁酸/盐组合使用。一个示例性的组合是月桂酸、羊蜡酸以及UDCA的钠盐。另外的渗透增强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。在本发明中体现的dsRNA可以口服递送,以包括喷雾干燥颗粒的颗粒剂的形式递送,或复合成微颗粒或纳米颗粒。DsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯、聚氧杂环丁烷、聚烷基氰基丙烯酸酯;阳离子化的明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚烷基氰基丙烯酸酯;DEAE-衍生的聚亚胺、菊糖、纤维素和淀粉。适合的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如,对氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、海藻酸酯以及聚乙二醇(PEG)。用于dsRNA的口服配制品及其制备被详细描述于美国专利6,887,906、美国公开号20030027780和美国专利号6,747,014中,所述专利中的每一个通过引用结合在此。

[0801] 用于肠胃外、实质内(进入脑中)、鞘内、心室内或肝内给予的组合物和配制品可以包括无菌水溶液,这些无菌水溶液还可以含有缓冲剂、稀释剂和其他适合的添加剂,如但不限于渗透增强剂、载体化合物和其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0802] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂以及含脂质体配制品。这些组合物可以产生自多种组分,这些组分包括但不限于预成形的液体、自乳化固体以及自乳化半固体。特别优选的是当治疗肝脏病症(例如肝癌)时靶向肝脏的配制品。

[0803] 本发明的药物配制品(可以方便地以单位剂型存在)可以根据医药工业内熟知的常规技术来制备。此类技术包括使活性成分与一种或多种药物载体或一种或多种赋形剂结合的步骤。通常,通过使活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或这两者均匀地和密切地结合来制备这些配制品,并且然后如果必要,使产品成形。本发明的这些组合物可以被配置成任何许多可能的剂型,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂以及灌肠剂。本发明的这些组合物还可以被配制为在水性、非水性或混合性介质中的混悬液。水性混悬液可以进一步含有增加混悬液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该混悬液还可以含有稳定剂。

[0804] C. 另外的配制品

[0805] i. 乳液

[0806] 可以将本发明的这些组合物制备和配制为乳液。乳液典型地是一种液体分散在另一种中的以直径通常超过 $0.1\mu\text{m}$ 的液滴形式的多相系统(参见例如,安西尔(Ansel)的药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦LV.、波波维奇(Popovich)NG.和安西尔HC,2004,LWW数据库(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约州纽约(New York,NY);艾迪升(Idson),于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页;罗索夫,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;布洛克(Block)于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第2卷,第335页;樋口(Higuchi)等人于雷明顿的医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,Pa.),1985,第301页)。乳液经常是包含彼此密切混合且分散的两个不混溶的液相的双相体系。通常,乳液可以为油包水(w/o)或水包油(o/w)两种。当水相精细分散并且呈微小的液滴分散到大量油相中时,所得到的组合物被称为油包水(w/o)乳液。可替代地,当油相精细分散并且呈微小的液滴分散到大量水相中时,所得到的组合物被称为水包油(o/w)乳液。乳液可以含有除了分散相和活性药物以外的其他组分,该活性药物可以作为在水相、油相中的溶液或其自身作为独立相而存在。如果需要,也可以存在药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳液还可以是包含多于两个相的多重乳液,例如像在油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳液的情况下。此类复合配制品通常提供某些简单的二元乳液所不具有的优势。其中o/w乳液的单独油滴封装小水滴的多重乳液构成w/o/w乳液。同样地,在油连续相中稳定化的水滴中封装油滴的系统提供o/w/o乳液。

[0807] 乳剂具有较小或没有热力学稳定性的特征。通常,乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或配制品的粘性保持这种形式。在乳液状软膏基质或膏剂的情况下,乳液的任一相可以为半固体或固体。其他稳定乳液的方式需要使用乳化剂,这些乳化剂可以合并到乳液的任一相中。乳化剂可以被广泛地分成四类:合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质以及精细分散的固体(参见例如,安西尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.和安西尔HC,2004,LWW数据库(第8版),纽约州纽约;艾迪升,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第199页)。

[0808] 合成表面活性剂(又称为表面活性剂)在乳液配制中有广泛应用并且已经在文献中进行了综述(参见例如,安西尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.和安西尔HC,2004,LWW数据库(第8版),纽约州纽约;列赫尔,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第285页;艾迪升,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),马塞尔德克公司,纽约州纽约,1988,第1卷,第199页)。表面活性剂典型地是两亲的,并且包含亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比率被称为亲水/亲油平衡值(HLB),并且它是配制品制备中分类和选择表面活性剂的有价值的工具。可以基于亲水基团的性质将乳化剂广泛地分成不同类别:非离子型、阴离子型、阳离子型和两性的(参见例如,安西尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.和安西尔HC,2004,LWW数据库(第8版),纽约州纽约;列赫尔,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),

1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第285页)。

[0809] 乳液配制品中使用的天然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水特性, 以使得它们可以吸收水以形成乳液但还保留其半固体一致性, 如无水羊毛脂和亲水石油蜡。精细分散的固体也已经被用做优良的乳化剂, 尤其是与表面活性剂组合和在粘性制剂中使用。这些包括极性无机固体, 如重金属氢氧化物、非溶胀粘土如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石, 高岭土、蒙脱土、胶状硅酸铝和胶状镁硅酸铝、颜料和非极性固体如碳或甘油基三硬脂酸酯。

[0810] 在乳液配制品中还包括多种非乳化材料, 并且它们对乳液的特性有帮助。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(布洛克, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第335页; 艾迪升, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第199页)。

[0811] 亲水胶体或水胶体包括天然存在的胶和合成聚合物, 如多糖(例如, 阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、角叉菜胶、瓜尔胶、梧桐胶和黄蓍胶)、纤维素衍生物(例如, 羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)以及合成聚合物(例如, 卡波姆(carbomer)、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。这些物质在水中分散或溶胀形成胶状溶液, 这些胶状溶液通过在分散相液滴的周围形成强的界面膜并通过增强外相的粘度来稳定乳液。

[0812] 由于乳液通常含有许多可以容易地支持微生物生长的成分如碳水化合物、蛋白、固醇和磷脂, 所以这些配制品通常掺入防腐剂。在乳液配制品中包括的通常使用的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸的酯类和硼酸。通常也将抗氧化剂加入到乳液配制品中, 以防止配制品变质。所使用的抗氧化剂可以是自由基清除剂如生育酚、五倍子酸烷基酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯; 或还原剂如抗坏血酸和焦亚硫酸钠; 以及抗氧化剂协同剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0813] 通过皮肤学、口服和肠胃外途径应用乳液配制品及其制造方法已经在文献中进行了综述(参见例如, 安西尔的药物剂型和药物递送系统, 艾伦LV.、波波维奇NG. 和安西尔HC, 2004, LWW数据库(第8版), 纽约州纽约; 艾迪升, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第199页)。用于口服递送的乳液配制品由于配制简单以及从吸收和生物可利用率方面上的功效已经被非常广泛地使用(参见例如, 安西尔的药物剂型和药物递送系统, 艾伦LV.、波波维奇NG. 和安西尔HC, 2004, LWW数据库(第8版), 纽约州纽约; 罗素夫, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第245页; 艾迪升, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第199页)。基于矿物油的缓泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂属于经常作为o/w乳液口服给予的物质。

[0814] ii. 微乳液

[0815] 在本发明的一个实施例中, 将iRNA和核酸的组合物配制为微乳液。微乳液可以被定义为水、油和两亲物的系统, 该系统是单一的光学各向同性和热力学稳定的液体溶液(参见例如, 安西尔的药物剂型和药物递送系统, 艾伦LV.、波波维奇NG. 和安西尔HC, 2004, LWW数据库(第8版), 纽约州纽约; 罗素夫, 于药物剂型, 利伯曼、列赫尔和班克(编著), 1988, 马塞尔德克公司, 纽约州纽约, 第1卷, 第245页)。典型地, 微乳液是通过如下方法制备的系统:

首先将油分散到表面活性剂水溶液中,然后加入足量的通常为中等链长度的醇的第四组分来形成透明系统。因此,微乳液还被描述为具有两种不可混溶的液体的热力学稳定的、各向同性的澄清分散体,这两种不可混溶的液体通过表面活性剂分子的界面膜来稳定(莱昂(Leung)和沙哈(Shah),于:药物的控释:聚合物和聚集体系统(Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate Systems),罗索夫M.编著,1989,VCH出版社,纽约,第185-215页)。微乳液通常通过将三至五种组分组合来制备,这些组分包括油、水、表面活性剂、辅助表面活性剂和电解质。该微乳液是否具有油包水(w/o)或水包油(o/w)类型取决于所使用的油和表面活性剂的特性,并且取决于表面活性剂分子的极性头部和烃尾部的结构和几何堆积(肖特(Schott),于雷明顿的医药科学,马克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1985,第271页)。

[0816] 使用相图的现象学方法已经被广泛研究,并且已经对本领域技术人员而言得到如何配制微乳液的广泛认识(参见例如,安西尔的药物剂型和药物递送系统,艾伦LV.、波波维奇NG.和安西尔HC,2004,LWW数据库(第8版),纽约州纽约;罗索夫,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第245页;布洛克,于药物剂型,利伯曼、列赫尔和班克(编著),1988,马塞尔德克公司,纽约州纽约,第1卷,第335页)。与常规乳液相比,微乳液提供以下优点:使水不可溶的药物溶于具有自发形成的热力学稳定的液滴的配制品中。

[0817] 用于微乳液制备中的表面活性剂包括,但不限于单独地或与辅助表面活性剂组合的离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油烯醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油单月桂酸酯(ML310)、四甘油单油酸酯(MO310)、六甘油单油酸酯(PO310)、六甘油五油酸酯(PO500)、十甘油单癸酸酯(MCA750)、十甘油单油酸酯(MO750)、十甘油脱水山梨糖醇二油酸酯(sequioleate)(SO750)、十甘油十油酸酯(DA0750)。该辅助表面活性剂通常是短链醇如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,作用是通过渗透到表面活性剂膜中并由此在表面活性剂分子间产生空余空间来产生无序膜从而提高界面流动性。然而,微乳液可以不使用辅助表面活性剂来制备,并且无醇的自乳化微乳液系统是本领域中已知的。水相可以典型地是,但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括,但不限于材料如Captex 300;Captex 355;Capmul MCM;脂肪酸酯;中链(C8-C12)单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯;聚氧乙基化的甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇化的甘油酯、饱和和聚乙二醇化的C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0818] 从药物溶解和增强的药物吸收方面看,微乳液是特别令人感兴趣的。已经提出基于脂质的微乳液(o/w和w/o两者)提高药物包括肽的口服生物可利用率(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;肯斯坦替奈德斯(Constantinides)等人,医药研究(Pharmaceutical Research),1994,11,1385-1390;里切尔(Ritschel),实验与临床药理学方法与成果(Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.),1993,13,205)。微乳液提供以下优点:改进的药物溶解、防止药物酶促水解、由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性的改变而带来的可能的药物吸收增强、制备简单、通过固体剂型口服给予简单、改进的临床有效性以及降低的毒性(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;肯斯坦替奈德斯等人,医药研究,1994,11,1385;霍(Ho)等人,药物科学杂志(J.Pharm.Sci.),1996,85,138-143)。通常,当微乳液的组分在环境温度下混合在一起时,它们可以自

发形成微乳液。当配制热不稳定的药物、肽或iRNA时,这可以是特别有利的。在化妆品和药物应用领域,微乳剂在活性组分的透皮递送中也是有效的。期望的是,本发明的微乳液组合物和配制品将有利于增加从胃肠道中全身性吸收iRNA和核酸,以及改进iRNA和核酸的局部细胞摄取。

[0819] 本发明的微乳液还可以含有另外的组分和添加剂,如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(Grill3)、Labrasol、以及改善配制品特性并增强本发明的iRNA和核酸吸收的渗透增强剂。用于本发明的微乳液中的渗透增强剂可以被分为属于五个广泛分类中的一个—表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂以及非螯合的非表面活性剂(李(Lee)等人,治疗性药物载体系统的关键评论(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页)。这些类别中的每一个已经在以上进行了讨论。

[0820] iii. 微颗粒

[0821] 本发明的RNAi试剂可以被结合到颗粒中,例如微颗粒。微颗粒可以通过喷雾干燥来产生,但也可以通过其他方法包括冷冻干燥、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合来产生。

[0822] iv. 渗透增强剂

[0823] 在一个实施例中,本发明采用了不同渗透增强剂来实现向动物皮肤高效递送核酸,具体地iRNA。大多数药物以离子化形式和非离子化形式两者存在于溶液中。然而,通常仅有脂质可溶的或亲脂的药物易于穿过细胞膜。已经发现,如果用渗透增强剂处理有待穿过的膜,甚至连非亲脂药物也可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂药物扩散穿过细胞膜以外,渗透增强剂还增强亲脂药物的渗透性。

[0824] 渗透增强剂可以被分成属于五个广泛分类中的一个,即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂(参见例如,马尔姆斯滕(Malmsten)M. 药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),健康传播杂志(Informa Health Care),纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统的关键评论,1991,第92页)。以下更详细地描述了以上提及的渗透增强剂的类别中的每一个。

[0825] 表面活性剂(或“表面活性剂”)是当溶解于水溶液中时,减小该溶液的表面张力或该水溶液与另一种液体之间的界面张力的化学实体,结果就是通过粘膜对iRNA的吸收增强。除了胆汁盐和脂肪酸以外,这些渗透增强剂包括,例如月桂基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚(参见例如,马尔姆斯滕M., 药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统的关键评论,1991,第92页);以及全氟化合物乳液,如FC-43(塔卡哈施(Takahashi)等人,药学与药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol),1988,40,252)。

[0826] 用作渗透增强剂的不同脂肪酸和它们的衍生物包括,例如油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯(1-单油酰基-外消旋-甘油)、甘油二月桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯(例如,甲基、异丙基和叔丁基)以及其单甘油酯和二甘油酯(即,油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(参见例如,特优易特优(Touitou)E.等人,药物递送增强(Enhancement in Drug Delivery),CRC出版社,丹佛市(Danvers)MA,2006;李等人,治疗性药物载体系统的关

键评论,1991,第92页;村西(Muranishi),治疗性药物载体系统的关键评论,1990,7,1-33;艾尔哈里里(El Hariri)等人,药学与药理学杂志,1992,44,651-654)。

[0827] 胆汁的生理学作用包括促进脂质和脂溶性维生素分散并且吸收(参见例如,马尔姆斯滕M.,药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;布鲁顿(Brunton)等人,于:古德曼(Goodman)和奥利曼(Oilman)的治疗剂的药理学基础中的第38章,第9版,哈德曼(Hardman)等人编著,麦格劳希尔集团(McGraw-Hill),纽约,1996,第934-935页)。不同天然的胆汁盐和它们的合成衍生物用作渗透增强剂。因此术语“胆汁盐”包括胆汁的任何天然存在的组分以及任何它们的合成衍生物。适合的胆汁盐包括,例如胆酸(或它的药学上可接受的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、谷氨胆酸(谷氨胆酸钠)、甘氨酸胆酸(甘氨酸胆酸钠)、甘氨酸脱氧胆酸(甘氨酸脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢-褐霉酸盐(STDHF)、甘氨酸二氢褐霉酸钠和聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,马尔姆斯滕M.,药物递送中的表面活性剂和聚合物,健康传播杂志,纽约州纽约,2002;李等人,治疗性药物载体系统的关键评论,1991,第92页;斯温亚德(Swinyard),于:雷明顿的医药科学中的第39章,第18版,詹纳罗(Gennaro)编著,马克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1990,第782-783页;村西,治疗性药物载体系统的关键评论,1990,7,1-33;山本(Yamamoto)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharm.Exp.Ther.),1992,263,25;山下(Yamashita)等人,药物科学杂志(J.Pharm.Sci),1990,79,579-583)。

[0828] 与本发明有关使用的螯合剂可以定义为通过金属离子与其形成复合物将金属离子从溶液中除去的化合物,结果是通过粘膜的iRNA的吸收得到加强。关于它们在本发明中作为增渗剂的应用,因为多数特征化的DNA核酸酶需要二价金属离子用于催化并且因此可以被螯合剂抑制,螯合剂还具有充当DNase抑制剂的附加优势(加热特(Jarrett),层析学杂志(J.Chromatogr.),1993,618,315-339)。适合的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐和同香兰酸盐)、胶原的N-酰基衍生物、聚乙二醇单十二醚(laureth)-9和 β -二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)(参见例如,卡特德若(Katdare)A.等人,用于医药、生物技术和药物递送的赋形剂发展(Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery),CRC出版社,丹佛市MA,2006;李等人,治疗性药物载体系统的关键评论,1991,第92页;村西,治疗性药物载体系统的关键评论,1990,7,1-33;布尔(Buur)等人,控释杂志(J.Control Rel.),1990,14,43-51)。

[0829] 如在此所使用,非螯合的非表面活性剂渗透增强化合物可以被定义为作为螯合剂或作为表面活性剂展示不明显活性但是反而增强iRNA经消化道粘膜吸收的化合物(参见例如,村西,治疗性药物载体系统的关键评论,1990,7,1-33)。这种类别的渗透增强剂包括,例如不饱和的环脲、1-烷基氮杂环-烷酮衍生物和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(李等人,治疗性药物载体系统的关键评论,1991,第92页);以及非类固醇抗炎剂如双氯芬酸钠、吲哚美辛(indomethacin)和苯基丁氮酮(山下等人,药学与药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1987,39,621-626)。

[0830] 还可以添加在细胞水平增强摄取iRNA的试剂至本发明的药物组合物和其他组合物。例如,还已知阳离子脂质如lipofectin(醇一(Junichi)等人,美国专利号5,705,188)、

阳离子甘油衍生物以及聚阳离子分子,如聚赖氨酸(洛洛(Lollo)等人,PCT申请WO 97/30731)增强dsRNA的细胞摄取。可商购的转染试剂的实例包括,例如Lipofectamine™(英杰公司(Invitrogen);卡尔斯巴德(Carlsbad),CA)、Lipofectamine 2000™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、293fectin™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、Ceilfectm™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、DMRIE-C™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、FreeStyle™MAX(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、Lipofectamine™2000CD(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、Lipofectamine™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、RNAiMAX(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、Oligofectamine™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、Optifect™(英杰公司;卡尔斯巴德,CA)、X-tremeGENE Q2转染试剂(罗氏公司(Roche);瑞士格兰扎克街(Grenzacherstrasse,Switzerland))、DOTAP脂质体转染试剂(瑞士格兰扎克街)、DOSPER脂质体转染试剂(瑞士格兰扎克街)、或Fugene(瑞士格兰扎克街)、Transfectam®试剂(普洛麦格公司;威斯康辛州,麦迪逊(Madison,WI))、TransFast™转染试剂(普洛麦格公司;威斯康辛州,麦迪逊)、Tfx™-20试剂(普洛麦格公司;威斯康辛州,麦迪逊)、Tfx™-50试剂(普洛麦格公司;威斯康辛州,麦迪逊)、DreamFect™(OZ生物科技公司(OZ Biosciences);法国马赛(Marseille,France))、EcoTransfect(OZ生物科技公司;法国马赛)、TransPass^a D1转染试剂(NEB公司(New England Biolabs);伊普斯威奇(Ipswich),MA,USA)、LyoVec™/LipoGen™(英杰公司;圣地亚哥(San Diego),CA,USA)、PerFectin转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、NeuroPORTER转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、GenePORTER转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、GenePORTER 2转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、Cytofectin转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、BaculoPORTER转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、TrojanPORTER™转染试剂(美国Genlantis公司;圣地亚哥,CA,USA)、RiboFect(Bioline公司;陶顿(Taunton),MA,USA)、PlasFect(Bioline公司;陶顿,MA,USA)、UniFECTOR(B-Bridge国际公司;美国加利福尼亚州山景城(Mountain View,CA,USA))、SureFECTOR(B-Bridge国际公司;美国加利福尼亚州山景城)或HiFect™(B-Bridge国际公司;美国加利福尼亚州山景城)以及其他转染试剂。

[0831] 可以使用其他试剂来增强所给予的核酸的渗透,这些其他试剂包括二醇类如乙二醇和丙二醇、吡咯类如2-吡咯、氮酮类以及萜类如柠檬烯和薄荷酮。

[0832] v. 载体

[0833] 本发明的某些组合物还将载体化合物结合在配制品中。如在此所使用,“载体化合物”或“载体”可以指惰性的(即,本身不具有生物活性)但通过体内过程被识别为核酸的一种核酸或其类似物,这些体内过程例如通过降解生物活性的核酸或促进它从循环中去除来降低具有生物活性的核酸的生物可利用率。核酸和载体化合物的共给予(典型地后一种物质过量)可以引起肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度减少,假定归因于该载体化合物与该核酸之间对共同受体的竞争。例如,当部分地硫代磷酸酯dsRNA与聚肌氨酸、葡聚糖硫酸盐、聚丙烯酸(polycytidic acid)或4-乙酰氨基-4'异硫氰基-芪-2,2'-二磺酸共给予时,可以减少肝组织中的部分硫代磷酸酯dsRNA的回收(米瑶(Miyao)等人,DsRNA研究发展(DsRNA Res.Dev.),1995,5,115-121;高仓(Takakura)等人,DsRNA与核酸药物开发(DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.),1996,6,177-183)。

[0834] vi. 赋形剂

[0835] 与载体化合物相反,“药物载体”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或用于将一种或多种核酸递送至动物的任何其他药理学上惰性的媒介物。该赋形剂可以是液体或固体并且在考虑计划的给予方式的情况下来选择,以便当与核酸和给定药物组合物的其他组分组合时提供希望的整体、一致性等。典型的药物载体包括,但不限于粘合剂(例如,预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶状二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、淀粉羟乙酸钠等);润湿剂(例如,月桂基硫酸钠等)。

[0836] 适合于非肠胃外给予的、不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。适合的药学上可接受的载体包括,但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0837] 用于局部给予核酸的配制品可以包括在普通溶剂如醇中的无菌或非无菌的水溶液、非水溶液,或在液体或固体油基质中的核酸溶液。这些溶液还可以包括缓冲液、稀释液和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外给予的、且不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0838] 适当的药学上可接受赋形剂包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0839] vii. 其他组分

[0840] 本发明的这些组合物可以另外地含有其他本领域熟知用量的在药物组合物中常用的辅助组分。因此,例如这些组合物可以包括另外的、可相容的药学上有活性的物质如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以包括对本发明的组合物的各种剂型的物理配制有用的其他物质,如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。

[0841] 然而,当加入此类物质时,它们不应当过度干扰本发明的组合物的成份的生物活性。可以将这些配制品进行灭菌并且如果希望的话与助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、盐混合,用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质、芳香物质和/或芬芳物质等进行混合,这些助剂不与该配制品中的一种或多种核酸发生有害的相互作用。

[0842] 水性混悬液可以含有增加混悬液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该混悬液还可以含有稳定剂。

[0843] 在一些实施例中,在本发明中体现的药物组合物包括(a)一种或多种iRNA化合物和(b)一种或多种通过非RNAi机制起作用并且有用于治疗溶血病症的试剂。此类试剂的实例包括,但不限于抗炎剂、抗脂肪变性剂、抗病毒剂和/或抗纤维变性剂。另外,其他常用于保护肝脏的物质,如水飞蓟素,也可以与在此描述的iRNA结合使用。有用于治疗肝脏疾病的其他试剂包括替比夫定(telbivudine)、恩替卡韦(entecavir)和蛋白酶抑制剂如特拉匹韦(telaprevir)以及被例如披露于董(Tung)等人,美国申请公开号2005/0148548、2004/0167116和2003/0144217和哈勒(Hale)等人,美国申请公开号2004/0127488中的其他物质。

[0844] 此类化合物的毒性与治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如以确定LD50(50%群体的致死剂量)以及ED50(在50%群体中治疗有效的

剂量)。毒性与疗效之间的剂量比为治疗指数,并且它可以被表示为比率LD50/ED50。优选那些表现出高的治疗指数的化合物。

[0845] 从细胞培养物测定法和动物研究中获得的数据可以在配制人类中使用的剂量范围时使用。在此在本发明中体现的组合物的剂量总体上处在一个循环浓度范围内,该范围包括具有很小或没有毒性的ED50。该剂量可以取决于所采用的剂型以及使用的给予途径而在该范围内变化。对于用于在本发明中体现的这些方法中的任何化合物,该治疗有效剂量起初可以从细胞培养物测定来评估。在动物模型中剂量可以被配制成达到化合物(或当适当时,靶序列的多肽产物)的循环血浆浓度范围(例如,达到多肽的减小的浓度),该浓度范围包括如在细胞培养物中所确定的IC50(即,达到症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)。这类信息可以用来更精确地确定用于人类中的剂量。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相色谱法。

[0846] 除了以上所讨论的它们的给予之外,在本发明中体现的iRNA可以与有效于治疗由C5表达介导的病理过程的其他已知试剂组合来给予。在任何情况下,基于使用本领域已知或在此描述的标准功效量值所观察到的结果,给予医师可以调整给予iRNA的量和时间。

[0847] VI. 用于抑制C5表达的方法

[0848] 本发明提供了在细胞中抑制C5表达的方法。这些方法包括使细胞与有效于在该细胞中抑制该C5表达的量的RNAi试剂(例如,双链RNAi试剂)接触,从而在该细胞中抑制该C5的表达。

[0849] 使细胞与双链RNAi试剂的接触可以在体外或在体内完成。在体内使细胞与该RNAi试剂接触包括在一个受试者(例如,人受试者)内使细胞或细胞的组与该RNAi试剂接触。体外和体内接触方法的组合也是可能的。如上所论述,接触可以是直接或间接的。此外,使细胞接触可以通过靶向配体(包括在此描述或本领域中已知的任何配体)来实现。在优选实施例中,该靶向配体是一个碳水化合物部分,例如GalNAc₃配体,或将RNAi引导至感兴趣的部位例如受试者的肝脏的任何其他配体。

[0850] 如在此所使用的术语“抑制”与“降低”、“沉默”、“下调”和其他类似的术语可互换地使用,并且包括任何水平的抑制。

[0851] 短语“抑制C5的表达”意图是指抑制任何C5基因(例如像小鼠C5基因、大鼠C5基因、猴C5基因或人C5基因)以及C5基因的变异体或突变体的表达。因此,该C5基因可以是遗传操纵的细胞、细胞的组或生物体上下文中的野生型C5基因、突变型C5基因或转基因C5基因。

[0852] “抑制C5基因的表达”包括任何水平的抑制C5基因,例如至少部分压制C5基因的表达。可以基于与C5基因表达相关联的任何变量的水平或水平变化来评价C5基因的表达,例如C5 mRNA水平、C5蛋白水平或例如作为总溶血补体的量度的CH₅₀活性、测量补体旁路途径的溶血活性的AH₅₀、和/或作为血管内溶血的量度的乳酸脱氢酶(LDH)水平、和/或血红蛋白水平。还可以测量C5a、C5b和可溶性C5b-9复合物的水平来评价C5表达。这个水平可以在单独细胞中或在一组细胞中(包括例如来源于一个受试者的一种样品)进行评价。

[0853] 可以通过与对照水平比较,与C5表达相关联的一种或多种变量的绝对或相对水平降低来评价抑制。该对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(例如仅缓冲液对照或惰性剂对照)处理的受试者、细胞、或样品确定的水平。

[0854] 在本发明的这些方法的一些实施例中,C5基因的表达被抑制至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%。

[0855] C5基因的表达抑制可以通过由第一细胞或细胞的组(此类细胞可以例如存在于来自一个受试者的一种样品中)表达的mRNA的量减少来表现,在该第一细胞或细胞的组中C5基因被转录并且该第一细胞或细胞的组已经被处理(例如,通过使该细胞或多个细胞与本发明的RNAi试剂接触,或通过向其中存在这些细胞的受试者给予本发明的RNAi试剂),这样使得与基本上与该第一细胞或细胞的组相同但没有如此被处理的第二细胞或细胞的组(一个或多个对照细胞)相比,C5基因的表达被抑制。在优选实施例中,通过使用下式将被处理的细胞中的mRNA的水平表示为对照细胞中的mRNA的水平的百分比来评估该抑制:

$$[0856] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \bullet 100\%$$

[0857] 可替代地,可以通过功能上与C5基因表达相关的参数的减小来评估C5基因的表达抑制,例如C5蛋白表达、铁调素基因或蛋白质表达、或组织或血清中的铁水平。或者在组成上或者通过基因组工程化,并且通过本领域中已知的任何测定,可以在表达C5的任何细胞中确定C5基因沉默。肝脏是C5表达的主要部位。其他重要的表达部位包括肾脏和子宫。

[0858] C5蛋白的表达抑制可以通过由一种细胞或细胞的组表达的C5蛋白的水平(例如,在来源于一个受试者的一种样品中表达的蛋白质水平)降低来表现。如上对于mRNA压制的评价所解释,在经处理的细胞或细胞的组中抑制蛋白质表达水平可以类似地表达为对照细胞或细胞的组中的蛋白质水平的百分比。

[0859] 可以用来评价C5基因的表达抑制的对照细胞或细胞的组包括尚未与本发明的RNAi试剂接触的细胞或细胞的组。例如,在用RNAi试剂处理受试者之前,该对照细胞或细胞的组可以来源于单独受试者(例如,人或动物受试者)。

[0860] 可以使用本领域中已知的用于评价mRNA表达的任何方法来确定由细胞或细胞的组表达的C5 mRNA的水平。在一个实施例中,通过检测C5基因的转录的多核苷酸或其部分(例如,mRNA)来确定C5在样品中的表达水平。可以使用RNA提取技术,包括例如使用酸性苯酚/胍异硫氰酸酯提取(RNAzol B;Biogenesis公司)、RNeasy RNA制备试剂盒(凯杰公司(Qiagen))或PAXgene(PreAnalytix公司,瑞士),从细胞中提取RNA。使用核糖核酸杂交的典型测定形式包括核连缀测定、RT-PCR、RNA酶保护测定(梅尔顿(Melton)等人,核酸研究12:7035)、RNA印迹法、原位杂交以及微阵列分析。

[0861] 在一个实施例中,使用核酸探针确定C5表达的水平。如在此所使用的术语“探针”是指能够选择性地结合特异性C5的任何分子。探针可以由本领域的技术人员合成或来源于适当生物制剂。探针可以具体地经设计成被标记的。可以用作探针的分子的实例包括,但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0862] 分离的mRNA可以用于杂交或扩增测定中,这些杂交或扩增测定包括,但不限于DNA印迹或RNA印迹分析、聚合酶链反应(PCR)分析和探针阵列。用于确定mRNA水平的一种方法涉及使分离的mRNA与可以杂交C5 mRNA的核酸分子(探针)接触。在一个实施例中,将该mRNA

固定在一个固体表面上,并且例如通过使该分离的mRNA在一个琼脂糖凝胶上跑胶并且将该mRNA从该凝胶转移到一个膜(如硝化纤维素)而与一种探针接触。在一个替代性实施例中,将该探针或这些探针固定在一个固体表面上,并且使该mRNA例如在一个Affymetrix基因芯片阵列中与该探针或这些探针接触。熟练的技术人员可以容易地采取已知的用于确定C5 mRNA水平的mRNA检测方法。

[0863] 用于确定样品中的C5表达的水平的一种替代方法涉及在该样品中的例如mRNA的核酸扩增过程和/或逆转录酶(制备cDNA),例如通过RT-PCR(在穆利斯(Mullis),1987,美国专利号4,683,202中列出的实验性实施例)、连接酶链反应(巴拉尼(Barany)(1991)美国科学院院报88:189-193)、自主序列复制(顾埃替勒(Guatelli)等人(1990)美国科学院院报87:1 874-1878)、转录扩增系统(科国(Kwoh)等人(1989)美国科学院院报86:1173-1177)、Q- β 复制酶(里扎迪(Lizardi)等人(1988)生物/技术(Bio/Technology)6:1197)、滚环复制(里扎迪等人,美国专利号5,854,033)或任何其他核酸扩增方法,接着是使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。这些检测方案尤其有用于检测核酸分子,如果此类分子以非常少的数量存在。在本发明的具体方面中,通过定量荧光团RT-PCR(即,TaqMan™系统)来确定C5表达的水平。

[0864] 可以使用膜印迹(如用于杂交分析如RNA印迹、DNA印迹、斑点印迹等)或微孔、取样管、凝胶、珠粒或纤维(或包含结合核酸的任何固体载体)来监测C5 mRNA的表达水平。参见美国专利号5,770,722、5,874,219、5,744,305、5,677,195和5,445,934,所述美国专利通过引用结合在此。C5表达水平的确定还可以包括使用溶液中的核酸探针。

[0865] 在优选实施例中,使用支链DNA(bDNA)测定或实时PCR(qPCR)评估mRNA表达水平。这些方法的使用描述并且例证于在此呈现的实例中。

[0866] 可以使用本领域中已知的用于测量蛋白质水平的任何方法来确定C5蛋白质表达的水平。此类方法包括,例如电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法、流体或凝胶沉淀素反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度法测定、流式细胞术、免疫扩散(单向或双向)、免疫电泳法、蛋白质印迹法、放射性免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、电化学发光测定等。

[0867] 如在此所使用的术语“样品”是指从受试者中分离的一批类似的流体、细胞或组织以及存在于受试者内的流体、细胞或组织。生物流体的实例包括血液、血清以及浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、脑脊液、唾液、眼内液等。组织样品可包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如样品可以源自特定器官、器官部分、或这些器官内的流体或细胞。在某些实施例中,样品可以来源于肝脏(例如,全部的肝脏或肝脏的某些区段或肝脏中的某些类型的细胞,例如像肝细胞)。在优选实施例中,“来源于受试者的样品”是指从该受试者中取出的血液或血浆。在另外的实施例中,“来源于受试者的样品”是指来源于该受试者的肝脏组织。

[0868] 在本发明的方法的一些实施例中,向一个受试者给予该RNAi试剂,这样使得该RNAi剂被递送到该受试者内的一个具体部位上。可以使用来源于来自该受试者内的特定部位的流体或组织的样品中的C5 mRNA或C5蛋白质水平的测量值或变化来评价C5的表达抑制。在优选实施例中,该部位是肝脏。该部位还可以是来自前述部位的任一个的细胞的亚组或亚群。该部位还可以包括表达特定类型的受体的细胞。

[0869] 如在此所使用的短语“使细胞与RNAi试剂(如dsRNA)接触”包括通过任何可能的方

式使细胞接触。使细胞与RNAi试剂接触包括在体外使细胞与iRNA接触或在体内使细胞与iRNA接触。该接触可以直接或间接地完成。因此,例如该RNAi试剂可以通过执行该方法的个体与细胞物理接触,或可替代地,该RNAi试剂可以进入容许或引起它随后接触到该细胞的一种情况。

[0870] 在体外使细胞接触可以例如通过用该RNAi试剂孵育该细胞来完成。在体内使细胞接触可以例如通过将该RNAi试剂注射到细胞位于其中的组织中或附近,或通过将该RNAi试剂注射到另一个区域(例如血流或皮下空间)中,这样使得该试剂将随后到达有待接触的细胞位于其中的组织来完成。例如,该RNAi试剂可以含有和/或被偶联到将该RNAi试剂引导至感兴趣的部位(例如,肝脏)的一个配体上,例如GalNAc3。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如也可以在体外用RNAi剂接触细胞,并随后移植入受试者。

[0871] 在一个实施例中,使细胞与iRNA接触包括通过促进或实现摄取或吸收到该细胞中的“引入”或“递送”该iRNA到该细胞中。吸收或摄取iRNA可以通过无协助扩散过程或主动细胞过程或借助助剂或装置发生。将iRNA引入到细胞中可以是在体外和/或在体内。例如对于体内引入,可以将iRNA注射到组织位点中或全身给予。体内递送还可以通过 β -葡聚糖递送系统来完成,如被描述于美国专利号5,032,401和5,607,677以及美国公开号2005/0281781中的那些,所述专利的全部内容特此通过引用结合在此。体外引入到细胞中包括本领域中已知的方法,如电穿孔和脂质转染。其他方法在下文描述和/或是本领域中已知的。

[0872] VII. 用于治疗或预防补体组分C5相关联的病症的方法

[0873] 本发明还提供了治疗性和预防性的方法,这些方法包括向患有补体组分C5相关联的疾病(例如,PNH或aHUS)的受试者给予iRNA试剂、包含iRNA试剂的药物组合物或包含本发明的iRNA的载体。在本发明的一些方面中,这些方法进一步包括向该受试者给予另外的治疗剂,如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)。

[0874] 一方面,本发明提供了治疗患有将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者的方法。本发明的这些治疗方法(和用途)包括向该受试者例如人给予治疗有效量的靶向C5基因的iRNA试剂或包含靶向C5基因的iRNA试剂的药物组合物,从而治疗患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者。

[0875] 另一方面,本发明提供治疗患有将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者的方法,这些方法包括向该受试者例如人给予治疗有效量的靶向C5基因的iRNA试剂或包含靶向C5基因的iRNA试剂的药物组合物以及另外的治疗剂,如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗),从而治疗患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者。

[0876] 一方面,本发明提供了在患有将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的方法。这些方法包括向该受试者给予预防有效量的本发明的该iRNA试剂(例如dsRNA)或载体,从而在患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者中预防至少一种症状。例如,本发明提供了在遭受将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防溶血的方法。

[0877] 另一方面,本发明提供了在患有将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的方法。这些方法包括向该受

试者给予预防有效量的本发明的该iRNA试剂(例如dsRNA)或载体以及另外的治疗剂,如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗),从而在患有将受益于C5表达减少的病症的该受试者中预防至少一种症状。

[0878] 如在此所使用的“治疗有效量”意图包括当向患有补体组分C5相关联的疾病的受试者给予时,足以实现对该疾病的治疗(例如,通过减弱、改善或维持现有的疾病或疾病的一种或多种症状)的RNAi试剂或抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)的量。该“治疗有效量”可以取决于该RNAi试剂或抗体或其抗原结合片段、如何给予该试剂、该疾病和它的严重性和病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前的或伴随的治疗(如果有的话)以及有待治疗的该受试者的其他个体特征而变化。

[0879] 如在此所使用的“预防有效量”意图包括当向患有补体组分C5相关联的疾病但尚未(或当前)经历或表现出该疾病的症状的受试者和/或处于发展补体组分C5相关联的疾病风险的受试者,例如具有移植物和/或移植体的受试者,例如敏化的或同种异体的受者,患有脓毒症的受试者和/或患有心肌梗死的受试者给予时,足以预防或改善该疾病或该疾病的一种或多种症状的iRNA试剂或抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)的量。改善疾病包括减缓疾病的进程或减少后发疾病的严重度。该“预防有效量”可以取决于该iRNA试剂或抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段、如何给予该试剂或抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段、疾病的危险程度和病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前的或伴随的治疗的类型(如果有的话)以及有待治疗的患者的其他个体特征而变化。

[0880] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括在可适用于任何治疗的合理效益/风险比下产生一些希望的局部或全身作用的RNAi试剂或抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)的量,在本发明的这些方法中采用的iRNA试剂可以足够的产生可适用于此种治疗的合理效益/风险比的量给予。

[0881] 另一方面,本发明提供了治疗有效量的本发明的iRNA试剂用于治疗受试者,例如将受益于C5表达的减少和/或抑制的受试者的用途。

[0882] 另一方面,本发明提供了治疗有效量的本发明的iRNA试剂和另外的治疗剂如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)用于治疗受试者,例如将受益于C5表达的减少和/或抑制的受试者的用途。

[0883] 在又一个方面中,本发明提供了靶向C5基因的本发明的iRNA试剂(例如,dsRNA)或包含靶向C5基因的iRNA试剂的药物组合物在制造用于治疗受试者(例如,将受益于C5表达的减少和/或抑制的受试者,如患有将受益于C5表达减少的病症(例如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者)的药剂的用途。

[0884] 另一方面,本发明提供了靶向C5基因的本发明的iRNA试剂(例如,dsRNA)或包含靶向C5基因的iRNA试剂的药物组合物在制造与另外的治疗剂如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)组合使用用于治疗受试者(例如,将受益于C5表达的减少和/或抑制的受试者,例如患有补体组分C5相关联的疾病(例如PNH或aHUS)的受试者)的药剂的用途。

[0885] 另一方面,本发明提供了本发明的iRNA(例如,dsRNA)用于在遭受将受益于C5表达减少和/或抑制的病症(如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的用途。

[0886] 在又一个方面中,本发明提供了本发明的iRNA(例如,dsRNA)和另外的治疗剂如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)用于在遭受将受益于C5表达减少和/或抑制的病症(如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的用途。

[0887] 在另外的方面中,本发明提供了本发明的iRNA试剂在制造用于在遭受将受益于C5表达减少和/或抑制的病症(如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的药剂的用途。

[0888] 在另外的方面中,本发明提供了本发明的iRNA试剂在制造与另外的治疗剂如抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段(例如,依库珠单抗)组合使用,用于在遭受将受益于C5表达减少和/或抑制的病症(如,补体组分C5相关联的疾病,例如PNH或aHUS)的受试者中预防至少一种症状的药剂的用途。

[0889] 在一个实施例中,向患有补体组分C5相关联的疾病的受试者给予靶向C5的iRNA试剂,这样使得例如该受试者的细胞、组织、血液、尿液或其他组织或流体中的C5水平降低至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多,并且随后,向该受试者给予另外的治疗剂(如下描述)。

[0890] 该另外的治疗剂可以是一种抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段或衍生物。在一个实施例中,该抗补体组分C5抗体是依库珠单抗(**SOLIRIS[®]**)或其抗原结合片段或衍生物。依库珠单抗是一种人源化的单克隆IgG2/4、 κ 轻链抗体,该抗体具有高亲和力和特异性结合补体组分C5并且抑制C5裂解成C5a和C5b,从而抑制产生末端补体复合物C5b-9。依库珠单抗被描述于美国专利号6,355,245中,该美国专利的全部内容通过引用结合在此。

[0891] 包括向受试者给予本发明的iRNA试剂和依库珠单抗的本发明的这些方法可以进一步包括向该受试者给予脑膜炎球菌疫苗。

[0892] 可以在与靶向C5的该iRNA试剂相同的时间下或在不同的时间下,向该受试者给予该另外的治疗剂,例如依库珠单抗和/或脑膜炎球菌疫苗。

[0893] 此外,可以在与靶向C5的该iRNA试剂相同的配制品中或与靶向C5的该iRNA试剂不同的配制品中,向该受试者给予该另外的治疗剂,例如依库珠单抗。

[0894] 依库珠单抗剂量方案被描述于例如依库珠单抗(**SOLIRIS[®]**)的产品插页中和美国专利申请号2012/0225056中,所述参考文件中的每一个的全部内容通过引用结合在此。在用于治疗补体组分C5相关联的疾病(例如PNH或aHUS)的本发明的示例性方法中,向该受试者首先(例如,皮下)给予靶向C5的iRNA试剂,这样使得该受试者中的C5水平降低(例如,至少约20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、

78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多),并且随后,在比SOLIRIS®的产品插页中描述的剂量更低的剂量下给予依库珠单抗。例如,可以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约900mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予。

[0895] 还可以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予。如果该受试者的年龄是小于18岁,可以小于约900mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续4周,接着在约一周以后以小于约1200mg的第五剂量给予,接着此后约每两周以小于约1200mg的剂量给予;或如果该受试者的年龄是小于18岁,可以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续2周,接着在约一周以后以小于约900mg的第三剂量给予,接着此后约每两周以小于约900mg的剂量给予;或如果该受试者的年龄是小于18岁,可以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续2周,接着在约一周以后以小于约600mg的第三剂量给予,接着此后约每两周以小于约600mg的剂量给予;或如果该受试者的年龄是小于18岁,可以小于约600mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予;或如果该受试者的年龄是小于18岁,可以小于约300mg的剂量每周向该受试者给予依库珠单抗,持续1周,接着在约一周以后以小于约300mg的第二剂量给予,接着此后约每两周以小于约300mg的剂量给予。如果该受试者正接受血浆去除术或血浆交换,可以小于约300mg(例如,如果依库珠单抗的最近剂量是约300mg)或小于约600mg(例如,如果依库珠单抗的最近剂量是约600mg或更多)的剂量向该受试者给予依库珠单抗。如果该受试者正接受血浆输注,可以小于约300mg(例如,如果依库珠单抗的最近剂量是约300mg或更多)的剂量向该受试者给予依库珠单抗。较低剂量的依库珠单抗允许或者皮下或者静脉内给予依库珠单抗。

[0896] 在包含依库珠单抗的本发明的联合疗法中,可以约0.01mg/kg至约10mg/kg、或约5mg/kg至约10mg/kg、或约0.5mg/kg至约15mg/kg的剂量,向该受试者例如皮下给予依库珠单抗。例如,可以0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、4.5mg/kg、5mg/kg、5.5mg/kg、6mg/kg、6.5mg/kg、7mg/kg、7.5mg/kg、8mg/kg、8.5mg/kg、9mg/kg、9.5mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg或15mg/kg的剂量,向该受试者例如皮下给予依库珠单抗。

[0897] 本发明的这些方法和用途包括给予在此描述的一种组合物,这样使得靶C5基因的表达减小如约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76或约80小时。在一个实施例中,使靶C5基因的表达减少延长的持续时间,例如至少约2、3、4、5、6、7天或更多,例如约1周、2周、3周或约4周或更长。

[0898] 给予根据本发明的这些方法和用途的该dsRNA可以在患有补体组分C5相关联的疾病的患者中,引起此类疾病或病症的严重性、体征、症状和/或标志物减少。在此背景下的“减少”意指此种水平统计学上显著的降低。该减少可以是例如至少大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

95%或约100%。

[0899] 可以例如通过测量疾病进展、疾病缓和、症状严重性、疼痛减少、生活品质、维持治疗作用所要求的药剂的剂量、疾病标志物或适用于被治疗或目标用于预防的给定疾病的任何其他可测量参数的水平来评价疾病治疗或预防的功效。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。例如,可以例如通过周期性监测LDH和CH₅₀水平来评价溶血病症的治疗功效。稍后数据与初始数据的比较为医师提供了该治疗是否有效的指示。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。与给予靶向C5的iRNA或其药物组合物相关,对补体组分C5相关联的疾病“有效”指示以临床上适当的方式给予会对患者产生至少统计学上显著的部分的有益作用,如改善症状、治愈、减少疾病、延长生命、提高生活品质或由熟悉治疗补体组分C5相关联的疾病和相关病因的医师公认为阳性的其他作用。

[0900] 当疾病状态的一个或多个参数存在统计学上显著的改进时,或通过没有恶化或发展其中它们以另外的方式提前发生的症状,治疗或预防作用是明显的。作为一个实例,在疾病的可测量参数方面的至少10%,并且优选是至少20%、30%、40%、50%或更多的有利改变,可以指示有效治疗。还可以使用如本领域中所知的给定疾病的实验动物模型,判定给定iRNA药物或所述药物的配制品的功效。当使用实验动物模型时,当观察到标志物或症状的统计学上显著的减少时,治疗的功效是明显的。

[0901] 可替代地,可以基于临床上接受的疾病严重性分级量表(仅举一例,类风湿性关节炎严重性量表(RASS)),通过诊断领域技术人员所确定的疾病严重性减小来测量该功效。产生例如使用合适的量表而测量的疾病严重性的减轻的任何积极的改变代表使用如在此描述的iRNA或iRNA配制品的足够的治疗。

[0902] 可以给予受试者治疗量的iRNA,如约0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.65mg/kg、0.7mg/kg、0.75mg/kg、0.8mg/kg、0.85mg/kg、0.9mg/kg、0.95mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg dsRNA、2.6mg/kg dsRNA、2.7mg/kg dsRNA、2.8mg/kg dsRNA、2.9mg/kg dsRNA、3.0mg/kg dsRNA、3.1mg/kg dsRNA、3.2mg/kg dsRNA、3.3mg/kg dsRNA、3.4mg/kg dsRNA、3.5mg/kg dsRNA、3.6mg/kg dsRNA、3.7mg/kg dsRNA、3.8mg/kg dsRNA、3.9mg/kg dsRNA、4.0mg/kg dsRNA、4.1mg/kg dsRNA、4.2mg/kg dsRNA、4.3mg/kg dsRNA、4.4mg/kg dsRNA、4.5mg/kg dsRNA、4.6mg/kg dsRNA、4.7mg/kg dsRNA、4.8mg/kg dsRNA、4.9mg/kg dsRNA、5.0mg/kg dsRNA、5.1mg/kg dsRNA、5.2mg/kg dsRNA、5.3mg/kg dsRNA、5.4mg/kg dsRNA、5.5mg/kg dsRNA、5.6mg/kg dsRNA、5.7mg/kg dsRNA、5.8mg/kg dsRNA、5.9mg/kg dsRNA、6.0mg/kg dsRNA、6.1mg/kg dsRNA、6.2mg/kg dsRNA、6.3mg/kg dsRNA、6.4mg/kg dsRNA、6.5mg/kg dsRNA、6.6mg/kg dsRNA、6.7mg/kg dsRNA、6.8mg/kg dsRNA、6.9mg/kg dsRNA、7.0mg/kg dsRNA、7.1mg/kg dsRNA、7.2mg/kg dsRNA、7.3mg/kg dsRNA、7.4mg/kg dsRNA、7.5mg/kg dsRNA、7.6mg/kg dsRNA、7.7mg/kg dsRNA、7.8mg/kg dsRNA、7.9mg/kg dsRNA、8.0mg/kg dsRNA、8.1mg/kg dsRNA、8.2mg/kg dsRNA、8.3mg/kg dsRNA、8.4mg/kg dsRNA、8.5mg/kg dsRNA、8.6mg/kg dsRNA、8.7mg/kg dsRNA、8.8mg/kg

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

[0903] 在某些实施例中,例如,当本发明的组合物包含如在此所描述的dsRNA和脂质时,可以给予受试者治疗量的iRNA,如约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.05mg/kg至约5mg/kg、约0.05mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.2mg/kg至约5mg/kg、约0.2mg/kg至约10mg/kg、约0.3mg/kg至约5mg/kg、约0.3mg/kg至约10mg/kg、约0.4mg/kg至约5mg/kg、约0.4mg/kg至约10mg/kg、约0.5mg/kg至约5mg/kg、约0.5mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1.5mg/kg至约5mg/kg、约1.5mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约2.5mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约3mg/kg至约5mg/kg、约3mg/kg至约10mg/kg、约3.5mg/kg至约5mg/kg、约4mg/kg至约5mg/kg、约4.5mg/kg至约5mg/kg、约4mg/kg至约10mg/kg、约4.5mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约5.5mg/kg至约10mg/kg、约6mg/kg至约10mg/kg、约6.5mg/kg至约10mg/kg、约7mg/kg至约10mg/kg、约7.5mg/kg至约10mg/kg、约8mg/kg至约10mg/kg、约8.5mg/kg至约10mg/kg、约9mg/kg至约10mg/kg或约9.5mg/kg至约10mg/kg。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0904] 例如,可以约0.1mg/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、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg或约10mg/kg的剂量给予该dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0905] 在其他实施例中,例如,当本发明的组合物包含如在此所描述的dsRNA和N-乙酰半乳糖胺时,可以给予受试者治疗量的iRNA,如约0.1mg/kg至约50mg/kg、约0.25mg/kg至约50mg/kg、约0.5mg/kg至约50mg/kg、约0.75mg/kg至约50mg/kg、约1mg/kg至约50mg/kg、约1.5mg/kg至约50mg/kg、约2mg/kg至约50mg/kg、约2.5mg/kg至约50mg/kg、约3mg/kg至约50mg/kg、约3.5mg/kg至约50mg/kg、约4mg/kg至约50mg/kg、约4.5mg/kg至约50mg/kg、约5mg/kg至约50mg/kg、约7.5mg/kg至约50mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、约15mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约30mg/kg至约50mg/kg、约35mg/kg至约50mg/kg、约40mg/kg至约

50mg/kg、约45mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约45mg/kg、约0.25mg/kg至约45mg/kg、约0.5mg/kg至约45mg/kg、约0.75mg/kg至约45mg/kg、约1mg/kg至约45mg/kg、约1.5mg/kg至约45mg/kg、约2mg/kg至约45mg/kg、约2.5mg/kg至约45mg/kg、约3mg/kg至约45mg/kg、约3.5mg/kg至约45mg/kg、约4mg/kg至约45mg/kg、约4.5mg/kg至约45mg/kg、约5mg/kg至约45mg/kg、约7.5mg/kg至约45mg/kg、约10mg/kg至约45mg/kg、约15mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约20mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约25mg/kg至约45mg/kg、约30mg/kg至约45mg/kg、约35mg/kg至约45mg/kg、约40mg/kg至约45mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.25mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约40mg/kg、约0.75mg/kg至约40mg/kg、约1mg/kg至约40mg/kg、约1.5mg/kg至约40mg/kg、约2mg/kg至约40mg/kg、约2.5mg/kg至约40mg/kg、约3mg/kg至约40mg/kg、约3.5mg/kg至约40mg/kg、约4mg/kg至约40mg/kg、约4.5mg/kg至约40mg/kg、约5mg/kg至约40mg/kg、约7.5mg/kg至约40mg/kg、约10mg/kg至约40mg/kg、约15mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约20mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约25mg/kg至约40mg/kg、约30mg/kg至约40mg/kg、约35mg/kg至约40mg/kg、约0.1mg/kg至约30mg/kg、约0.25mg/kg至约30mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.75mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1.5mg/kg至约30mg/kg、约2mg/kg至约30mg/kg、约2.5mg/kg至约30mg/kg、约3mg/kg至约30mg/kg、约3.5mg/kg至约30mg/kg、约4mg/kg至约30mg/kg、约4.5mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约7.5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg、约15mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约20mg/kg至约30mg/kg、约25mg/kg至约30mg/kg、约0.1mg/kg至约20mg/kg、约0.25mg/kg至约20mg/kg、约0.5mg/kg至约20mg/kg、约0.75mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1.5mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约20mg/kg、约2.5mg/kg至约20mg/kg、约3mg/kg至约20mg/kg、约3.5mg/kg至约20mg/kg、约4mg/kg至约20mg/kg、约4.5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约7.5mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg或约15mg/kg至约20mg/kg的剂量。在一个实施例中,当本发明的组合物包含如在此所描述的dsRNA和N-乙酰半乳糖胺时,可以给予受试者治疗量的约10mg/kg至约30mg/kg的dsRNA。这些列举值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0906] 例如,可以给予受试者治疗量的iRNA,如约0.1mg/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、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、

13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、20mg/kg、20.5mg/kg、21mg/kg、21.5mg/kg、22mg/kg、22.5mg/kg、23mg/kg、23.5mg/kg、24mg/kg、24.5mg/kg、25mg/kg、25.5mg/kg、26mg/kg、26.5mg/kg、27mg/kg、27.5mg/kg、28mg/kg、28.5mg/kg、29mg/kg、29.5mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg或约50mg/kg。这些引用值的中间值与范围也意在成为本发明的部分。

[0907] 可以通过经过一段时间静脉内输注来给予该iRNA,如经过5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或约25分钟的周期。可以例如在规则的基础上重复该给予,如每周、每两周(即每两周)持续一个月、两个月、三个月、四个月或更长。在初始治疗方案后,可以基于更低频率给予治疗。例如在每周或双周给予持续三个月后,给予可以按每个月重复一次,持续六个月或一年或更长。

[0908] 给予该iRNA可以使例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的C5水平降低至少约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多。

[0909] 在给予全部剂量的iRNA之前,可以给予患者更少的剂量,如5%输注,并且监测不良作用,如过敏反应。在另一个实例中,可以针对不想要的免疫刺激作用对该患者进行监测,如细胞因子(例如,TNF- α 或INF- α)水平增加。

[0910] 归因于对C5表达的抑制作用,根据本发明的组合物或从其中制备的药物组合物可以提高生活品质。

[0911] 本发明的iRNA可以“裸”形式或作为“游离iRNA”给予。在不存在药物组合物的情况下给予裸iRNA。该裸iRNA可以处在适合的缓冲溶液中。该缓冲溶液可以包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在一个实施例中,该缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以将含有该iRNA的缓冲溶液的pH和摩尔渗透压浓度进行调节,这样使得它适合用于向受试者给予。

[0912] 可替代地,可以将本发明的iRNA作为药物组合物进行给予,如dsRNA脂质体制成品。

[0913] 将受益于C5基因表达减少和/或抑制的受试者是患有如在此所描述的补体组分C5相关联的疾病或病症的那些受试者。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有哮喘。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有类风湿性关节炎。在又一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有全身性红斑狼疮。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有肾小球肾炎。在

另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有牛皮癣。在又一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有皮炎大疱性类天疱疮。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有非典型溶血性尿毒症综合征。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有志贺氏毒素大肠杆菌相关的溶血性尿毒症综合征。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有重症肌无力。在又一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有视神经脊髓炎。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有致密沉积物病。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有C3神经病。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有年龄相关的黄斑变性。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有冷凝集素病。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有抗嗜中性粒细胞细胞质抗体相关联的血管炎。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有体液和血管移植排斥。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有移植物功能异常。在一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有心肌梗塞。在另一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者是移植物的敏化受体。在又一个实施例中,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者患有脓毒症。

[0914] 对将受益于C5基因表达减少和/或抑制的受试者进行的治疗包括治疗性和预防性(例如,该受试者有待经历敏化的(或同种异体的)移植手术)治疗。

[0915] 本发明进一步提供了iRNA试剂或其药物组合物与其他药物剂和/或其他治疗方法(例如,与已知的药物剂和/或已知的治疗方法,例如像当前用于治疗这些病症所采用的那些)组合用于治疗将受益于C5表达减少和/或抑制的受试者(例如,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者)的用途(包括iRNA试剂或包含iRNA试剂的药物组合物和抗补体组分C5抗体或其抗原结合片段的方法和用途)。例如,在某些实施例中,与例如有用于治疗如在此其他地方所描述的补体组分C5相关联的疾病的一种试剂组合来给予靶向C5的iRNA。

[0916] 例如,适合用于治疗将受益于C5表达减少的受试者(例如,患有补体组分C5相关联的疾病的受试者)的另外治疗剂和治疗方法包括血浆去除术、溶血栓疗法(例如,链激酶)、抗血小板剂、叶酸、皮质类固醇;免疫抑制剂;雌激素、甲氨蝶呤、6-MP、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、美沙拉秦(mesalazine)、奥沙拉秦(olsalazine)、氯喹啉/羟基氯喹、青霉胺、金硫苹果酸盐(肌肉内和口服)、硫唑嘌呤、秋水仙碱、皮质类固醇(口服、吸入和局部注射)、 β -2肾上腺素受体激动剂(沙丁胺醇、特布他林(terbutaline)、沙美特罗(salmeteral))、黄嘌呤类(茶碱、氨茶碱)、色甘酸酯、奈多罗米(nedocromil)、酮替芬(ketotifen)、异丙托品(ipratropium)和氧托品(oxitropium)、环孢菌素(cyclosporin)、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、麦考酚酸莫酯(mycophenolate mofetil)、来氟米特(leflunomide)、NSAID、例如布洛芬(ibuprofen)、皮质类固醇如泼尼松龙(prednisolone)、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓形成剂、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰通过促炎性细胞因子如TNF- α 或IL-1信号传导的试剂(例如,IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制剂)、IL-1 β 转化酶抑制剂、TNF α 转化酶(TACE)抑制剂、T-细胞信号传导抑制剂,如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、可溶性细胞因子受体及其衍生物(例如,可溶性p55或p75 TNF受体和衍生物p75TNFRIgG(EnbrelTM)和p55TNFRIgG(来那西

普(Lenercept)))、sIL-1RI、sIL-1RII和sIL-6R)、抗炎性细胞因子(例如,IL-4、IL-10、IL-11、IL-13和TGF β)、塞来考昔(celecoxib)、叶酸、羟基氯喹硫酸盐、罗非考昔(rofecoxib)、依那西普(etanercept)、英夫利昔单克隆单体(infliximono-clonal antibody)、萘普生(naproxen)、伐地考昔(valdecoxib)、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙(methylprednisolone)、美洛昔康(meloxicam)、乙酸甲泼尼龙、硫代苹果酸金钠、阿司匹林、曲安奈德(triamcinolone acetone)、萘磺酸丙氧芬/apap、叶酸盐、萘丁美酮(nabumetone)、双氯芬酸(diclofenac)、吡罗昔康(piroxicam)、依托度酸(etodolac)、双氯芬酸钠、奥沙普秦(oxaprozin)、盐酸羟考酮(oxycodone hcl)、重酒石酸二氢可待因酮/apap、双氯芬酸钠/米索前列醇(misoprostol)、芬太尼(fentanyl)、阿那白滞素(anakinra)、人重组盐酸曲马多(tramadol hcl)、双水杨酯(salsalate)、舒林酸(sulindac)、氰钴胺素(cyanocobalamin)/fa/吡哆醇(pyridoxine)、对乙酰氨基酚(acetaminophen)、阿仑膦酸钠(alendronate sodium)、泼尼松龙(prednisolone)、硫酸吗啡、盐酸利多卡因(lidocaine hydrochloride)、吲哚美辛(indomethacin)、葡糖胺硫酸盐/软骨素(chondroitin)、盐酸阿米替林(amitriptyline hcl)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、盐酸羟考酮/对乙酰氨基酚、盐酸奥洛他定(olopatadine hcl)、米索前列醇(misoprostol)、甲氧萘丙酸钠(naproxen sodium)、奥美拉唑(omeprazole)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、利妥昔单克隆抗体(rituximono-clonal antibody)、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗IL-18、抗IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特(Roflumilast)、IC-485、CDC-801、美索普兰(Mesopram)、环孢霉素、一种或多种细胞因子抑制性抗炎性药物(CSAID);CDP-571/BAY-10-3356(人源化抗TNF α 抗体;美国Celltech公司/拜耳公司(Bayer));cA2/英夫利昔单克隆单体(嵌合抗TNF α 抗体;Centocor公司);75kdTNFR-IgG/依那西普(75kd TNF受体-IgG融合蛋白;免疫公司(Inimunex);参见例如(1994)关节炎和风湿病(Arthr.Rheum.)37:S295;(1996)研究医学杂志(J.Invest.Med.)44:235A);55kdTNF-IgG(55kd TNF受体-IgG融合蛋白;豪夫迈-罗氏有限公司(Hoffmann-LaRoche));IDEC-CE9.1/SB 210396(非缺失的灵长类动物源化的抗CD4抗体;IDEC/史密斯克莱恩公司(SmithKline);参见例如(1995)关节炎和风湿病38:S185);DAB 486-IL-2和/或DAB 389-IL-2(IL-2融合蛋白;Seragen公司;参见例如(1993)关节炎和风湿病36:1223);抗Tac(人源化的抗IL-2R α ;蛋白质设计实验室/罗氏公司);IL-4(抗炎性细胞因子;DNAX/先灵公司(Schering));IL-10(SCH 52000;重组IL-10,抗炎性细胞因子;DNAX/先灵公司);IL-4;IL-10和/或IL-4激动剂(例如,激动剂抗体);IL-1RA(IL-1受体拮抗剂;非牛脂胺/安进公司(Amgen));阿那白滞素(Kineret[®]/安进公司);TNF-bp/s-TNF(可溶性TNF结合蛋白;参见例如(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S284;(1995)美国生理学杂志-心脏与循环生理学(Amer.J.Physiol.-Heart and Circ.Physiol.)268:37-42);R973401(磷酸二酯酶IV型抑制剂;参见例如(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S282);MK-966(COX-2抑制剂;参见例如(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S81);伊洛前列素(Iloprost)(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S82);甲氨蝶呤;萨立多胺(thalidomide)(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S282)和萨立多胺相关的药物(例如,Celgen);来氟米特(抗炎性和细胞因子抑制剂;参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊)):S131;(1996)炎症研究(Inflamm.Res.)45:103-107);凝血酸(tranexamic acid)(血浆酶原激活的抑制剂;参见例如(1996)关节炎和风湿病39(9

(增刊):S284);T-614(细胞因子抑制剂;参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S282);前列腺素E1(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S282);替尼达普(Tenidap)(非类固醇抗炎性药物;参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S280);萘普生(非类固醇抗炎性药物;参见例如,(1996)神经学报道(Neuro.Report)7:1209-1213);美洛昔康(非类固醇抗炎性药物);布洛芬(非类固醇抗炎性药物);吡罗昔康(非类固醇抗炎性药物);双氯芬酸(非类固醇抗炎性药物);吲哚美辛(非类固醇抗炎性药物);柳氮磺吡啶(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S281);硫唑嘌呤(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S281);ICE抑制剂(酶白细胞介素-1 β 转化酶的抑制剂);zap-70和/或1ck抑制剂(酪氨酸激酶zap-70或1ck的抑制剂);VEGF抑制剂和/或VEGF-R抑制剂(血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体的抑制剂;血管生成的抑制剂);皮质类固醇抗炎性药物(例如,SB203580);TNF-转化酶抑制剂;抗IL-12抗体;抗IL-18抗体;白细胞介素-11(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S296);白细胞介素-13(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S308);白细胞介素-17抑制剂(参见例如,(1996)关节炎和风湿病39(9(增刊):S120);金;青霉胺;氯喹;苯丁酸氮芥;羟基氯喹;环孢霉素;环磷酰胺;全淋巴照射;抗胸腺细胞球蛋白;抗CD4抗体;CD5-毒素;口服给予的肽和胶原;氯苯扎利二钠(lobenzarit disodium);细胞因子调节剂(CRA)HP228和HP466(Houghten医药公司);ICAM-1反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ISIS 2302;伊希斯医药公司(isis Pharmaceuticals,Inc.));可溶性补体受体1(TP10;T细胞科技公司(T Cell Sciences, Inc.));泼尼松;奥古蛋白(orgotein);粘多糖聚硫酸酯;米诺环素(minocycline);抗IL2R抗体;海洋和植物脂质(鱼和植物种子脂肪酸;参见例如,德卢卡(DeLuca)等人(1995)北美风湿病临床(Rheum.Dis.Clin.North Am),21:759-777);金诺芬(auranofin);苯基丁氮酮(phenylbutazone);甲氯芬那酸(meclofenamic acid);氟芬那酸(flufenamic acid);静脉内免疫球蛋白;齐留通(zileuton);阿扎立平(azaribine);霉酚酸(mycophenolic acid)(RS-61443);他克莫司(tacrolimus)(FK-506);西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素);氨普立糖(amiprilose)(盐酸氨普立糖(therafectin));克拉屈滨(cladribine)(2-氯脱氧腺苷酸);甲氨蝶呤;bcl-2抑制剂(参见布朗克口(Bruncko)M.等人(2007)医药化学杂志(J.Med, Chem.)50(4):641-662);抗病毒剂和免疫调节剂、KDR的小分子抑制剂、Tie-2的小分子抑制剂;甲氨蝶呤;泼尼松;塞来考昔;叶酸;羟基氯喹硫酸盐;罗非考昔;依那西普;英夫利昔单抗克隆单体;来氟米特;萘普生;伐地考昔;柳氮磺吡啶;甲泼尼龙;布洛芬;美洛昔康;乙酸甲泼尼龙;硫代苹果酸金钠;阿司匹林;硫唑嘌呤;曲安奈德;萘磺酸丙氧芬/apap;叶酸盐;萘丁美酮;双氯芬酸;吡罗昔康;依托度酸;双氯芬酸钠;奥沙普秦;盐酸羟考酮;重酒石酸二氢可待因酮/apap;双氯芬酸钠/米索前列醇;芬太尼;阿那白滞素、人重组盐酸曲马多;双水杨酯;舒林酸;氰钴胺素/fa/吡哆醇;对乙酰氨基酚;阿仑膦酸钠;泼尼松龙;硫酸吗啡;盐酸利多卡因;吲哚美辛;葡糖胺硫酸盐/软骨素;环孢霉素;盐酸阿米替林;磺胺嘧啶;盐酸羟考酮/对乙酰氨基酚;盐酸奥洛他定;米索前列醇;甲氧萘丙酸钠;奥美拉唑;麦考酚酸莫酯;环磷酰胺;利妥昔单抗克隆抗体;IL-1TRAP;MRA;CTLA4-IG;IL-18BP;IL-12/23;抗IL-18;抗IL-15;BIRB-796;SC10-469;VX-702;AMG-548;VX-740;罗氟司特;IC-485;CDC-801;美索普兰、沙丁胺醇、沙美特罗/氟替卡松(fluticasone)、孟鲁司特钠(montelukast sodium)、丙酸氟替卡松、布地奈德(budesonide)、泼尼松、沙美特罗昔萘酸酯、盐酸左沙丁胺醇、硫酸舒喘

灵/异丙托品、泼尼松龙磷酸钠、曲安奈德、二丙酸氯地米松、异丙托溴铵、阿奇霉素 (azithromycin)、乙酸吡布特罗 (pirbuterol acetate)、泼尼松龙、无水茶碱、甲基泼尼松龙琥珀酸酯钠、克拉霉素 (clarithromycin)、扎鲁司特 (zafirlukast)、富马酸福莫特罗 (formoterol fumarate)、流感病毒疫苗、甲泼尼龙、三水阿莫西林、氟尼缩松 (flunisolide)、过敏注射剂、色甘酸钠 (cromolyn sodium)、盐酸非索那定 (fexofenadine hydrochloride)、氟尼缩松/薄荷醇、阿莫西林/克拉维酸钾、左氧氟沙星 (levofloxacin)、吸入器辅助装置、愈创甘油醚、塞米松磷酸钠、盐酸莫西沙星 (moxitloxacin hcl)、盐酸多西环素 (doxycycline hyclate)、愈创甘油醚/d-吗喃甲醚、p-麻黄碱/cod/氯苯那敏 (chlorphenir)、加替沙 (gatifloxacin)、盐酸西替立嗪 (cetirizine hydrochloride)、莫米松糠酸酯 (mometasone furoate)、沙美特罗昔萘酸酯、苯佐那酯 (benzonatate)、先锋霉素IV (cephalexin)、pe/氢可酮/氯苯那敏、盐酸西替立嗪/伪麻黄碱 (pseudoephed)、苯肾上腺素/cod/异丙嗪 (promethazine)、甲基吗啡 (codeine)/异丙嗪、头孢罗齐 (cefprozil)、地塞米松 (dexamethasone)、愈创甘油醚/伪麻黄碱、氯苯那敏/氢可酮、奈多罗米钠 (nedocromil sodium)、硫酸特普他林 (terbutaline sulfate)、肾上腺素、甲泼尼龙、硫酸间羟异丙肾上腺素、阿司匹林、硝化甘油、酒石酸美多洛尔 (metoprolol tartrate)、依诺肝素钠 (enoxaparin sodium)、肝素钠、氯吡格雷硫酸氢盐 (clopidogrel bisulfate)、卡维地洛 (carvedilol)、阿替洛尔 (atenolol)、硫酸吗啡、琥珀酸美多洛尔、华法令钠 (warfarin sodium)、赖诺普利 (lisinopril)、单硝酸异山梨酯、地高辛 (digoxin)、利尿磺胺 (furosemide)、辛伐他汀 (simvastatin)、雷米普利 (ramipril)、替奈普酶 (tenecteplase)、马来酸依那普利、托塞米 (torsemide)、瑞替普酶 (retavase)、氯沙坦钾 (losartan potassium)、盐酸喹那普利 (quinapril hcl)/碳酸镁 (mag carb)、布美他尼 (bumetanide)、阿替普酶、依那普利拉 (enalaprilat)、盐酸胺碘酮 (amiodarone hydrochloride)、盐酸替罗非班 (tirofiban hcl)m-水合物、盐酸地尔硫卓 (diltiazem hydrochloride)、卡托普利 (captopril)、依贝沙坦 (irbesartan)、缬沙坦 (valsartan)、盐酸普萘洛尔 (propranolol hydrochloride)、福辛普利钠 (fosinopril sodium)、盐酸利多卡因、依替巴肽 (eptifibatide)、头孢钠素 (cefazolin sodium)、硫酸阿托品 (atropine sulfate)、氨基己酸、安体舒通 (spironolactone)、干扰素、盐酸索他洛尔、氯化钾、多库酯钠 (docusate sodium)、盐酸多巴酚丁胺 (dobutamine hcl)、阿普唑仑 (alprazolam)、普伐他汀钠 (pravastatin sodium)、阿托伐他汀钙 (atorvastatin calcium)、盐酸咪达唑 (midazolam hydrochloride)、盐酸麦佩里定 (meperidine hydrochloride)、硝酸异山梨酯、肾上腺素、盐酸多巴胺 (dopamine hydrochloride)、比伐卢定 (bivalirudin)、罗苏伐他汀 (rosuvastatin)、依泽替米贝 (ezetimibe)/辛伐他汀、阿伐麦布 (avasimibe) 和卡立泊来德 (cariporide)。

[0917] 该iRNA试剂(和/或抗补体组分C5抗体)和另外的治疗剂和/或治疗可以同时和/或在相同的组合中给予,例如肠胃外给予,或该另外的治疗剂可以作为分开的组合物的一部分或在分开的时间下和/或通过本领域中已知或在此描述的另一方法来给予。

[0918] 本发明还提供了使用本发明的iRNA试剂和/或含有本发明的iRNA试剂的组合物来在细胞中减少和/或抑制补体组分C5表达的方法。在其他方面中,本发明提供了用于在细胞中减少和/或抑制C5表达的本发明的iRNA和/或包含本发明的iRNA的组合物。在又其他方面

中,提供了本发明的iRNA和/或包含本发明的iRNA的组合物用于制造用于在细胞中减少和/或抑制C5表达的药剂的用途。

[0919] 这些方法和用途包括使该细胞与本发明的iRNA(例如,dsRNA)接触并且使该细胞维持足以获得C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该细胞中抑制该C5基因的表达。

[0920] 基因表达的减少可以通过本领域中已知的任何方法来评价。例如,可以通过使用本领域技术人员常用的方法,例如RNA印迹法、qRT-PCR确定C5的mRNA表达水平,通过使用本领域技术人员常用的方法,如蛋白质印迹法、免疫技术、流式细胞术方法、ELISA确定C5的蛋白质水平,和/或通过如CH₅₀或AH₅₀溶血测定确定C5的生物活性,和/或通过确定与补体系统相关联的一种或多种分子,例如C5产物,像C5a和C5b的生物活性(或在体内背景下,例如溶血)来确定C5表达的减少。

[0921] 在本发明的这些方法和用途中,该细胞可以在体外或体内被接触,即,该细胞可以在一个受试者内。在其中该细胞是在一个受试者内的本发明的实施例中,这些方法可以包括进一步使该细胞与一种抗补体组分C5抗体(例如依库珠单抗)接触。

[0922] 使用本发明的这些方法适合用于治疗细胞可以是表达C5基因的任何细胞。适合用于本发明的这些方法和用途中的细胞可以是哺乳动物细胞,例如灵长类动物细胞(如人细胞或非人灵长类动物细胞,例如猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类动物细胞(如奶牛细胞、猪细胞、骆驼细胞、美洲驼细胞、马细胞、山羊细胞、兔细胞、绵羊细胞、仓鼠、豚鼠细胞、猫细胞、狗细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、狮子细胞、老虎细胞、熊细胞或水牛细胞)、禽类细胞(例如,鸭细胞或鹅细胞)、或鲸细胞。在一个实施例中,该细胞是人细胞,例如人肝脏细胞。

[0923] 在该细胞中可以使C5表达抑制至少约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或约100%。

[0924] 本发明的体内方法和用途可以包括向受试者给予含有iRNA的组合物,其中该iRNA包括与有待治疗的哺乳动物的C5基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。当有待治疗的生物体是哺乳动物如人时,该组合物可以通过本领域中已知的任何手段来给予,包括但不限于皮下、静脉内、口服、腹膜内或肠胃外途径,包括颅内(例如,脑室内、实质内和鞘内)、肌肉内、透皮、气道(气雾剂)、鼻、直肠和局部(包括颊和舌下)给予。在某些实施例中,这些组合物通过皮下或静脉内输注或注射来给予。

[0925] 在一些实施例中,该给予是通过积存注射。积存注射可以在一个延长的时期以连贯的方式释放该iRNA。因此,积存注射可以减少获得希望的作用所需要的给药频率,该希望的作用例如对C5的希望的抑制或治疗性或预防性作用。积存注射还可以提供更连贯的血清浓度。积存注射可以包括皮下注射或肌肉内注射。在优选实施例中,该积存注射是一种皮下注射。

[0926] 在一些实施例中,该给予是通过一个泵。该泵可以是一个外部泵或手术植入的泵。在某些实施例中,该泵是一种皮下植入的渗透泵。在其他实施例中,该泵是一种输注泵。输

注泵可以用于静脉内、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施例中,该输注泵是一个皮下输注泵。在其他实施例中,该泵是将该iRNA递送至肝脏的一个手术植入的泵。

[0927] 给予模式可以基于是否希望局部治疗或全身性治疗并且基于有待治疗的区域来进行选择。给予的途径和部位可以被选择成增强靶向。

[0928] 一方面,本发明还提供了用于在哺乳动物例如人中抑制C5基因表达的方法。本发明还提供了包含靶向哺乳动物细胞中的C5基因的iRNA(例如,dsRNA)的组合物,以用于在该哺乳动物中抑制该C5基因的表达。另一方面,本发明还提供了靶向哺乳动物细胞中的C5基因的iRNA(例如,dsRNA)在制造用于在该哺乳动物中抑制该C5基因的表达的药剂中的用途。

[0929] 这些方法和用途包括向该哺乳动物(例如人)给予包含靶向该哺乳动物细胞中的C5基因的iRNA(例如,dsRNA)的组合物,并且使该哺乳动物维持足以获得该C5基因的mRNA转录物降解的时间,从而在该哺乳动物中抑制该C5基因的表达。在一些实施例中,这些方法进一步包括向该受试者给予一种抗补体组分C5抗体,例如依库珠单抗。

[0930] 基因表达的减少可以通过本领域中任何已知的方法或通过在此描述的方法(例如qRT-PCR)来评价。蛋白质产生的减少可以通过本领域中任何已知的方法并且通过在此描述的方法(例如ELISA或蛋白质印迹法)来评价。在一个实施例中,穿刺肝脏活检样品用作用于监测C5基因和/或蛋白质表达减少的组织材料。在另一个实施例中,血液样品用作用于监测C5基因和/或蛋白质表达减少的组织材料。在其他实施例中,C5基因的表达抑制间接地通过例如确定C5途径中的基因的表达和/或活性来监测,该C5途径包括例如C5a、C5b和可溶性C5b-9(参见例如,图1)。例如,可以监测CD59的活性来确定C5基因的表达抑制。还可以测量一种样品例如血液或肝脏样品中的 CH_{50} 、 AH_{50} 、血块形成和/或血清乳酸脱氢酶(LDH)。适合的测定在以下实例部分中进一步描述。

[0931] 除非另外限定,否则在此使用的所有技术术语和科学术语具有如本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。尽管与在此描述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或测试本发明中体现的iRNA和方法,但以下描述了适合的方法和材料。在此提交的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文结合。在冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。另外,这些材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0932] 实例

[0933] 实例1.iRNA合成

[0934] 试剂来源

[0935] 当在此没有专门给出试剂来源时,此种试剂可以从分子生物学试剂的任何供应商获得,其品质/纯度标准符合分子生物学应用。

[0936] 转录物

[0937] 进行siRNA设计以鉴定在NCBI基因数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)中被注释的靶向人、恒河猴(猕猴)、小鼠和大鼠C5转录物的siRNA。设计使用以下来自NCBI RefSeq集合的转录物:人-NM_001735.2;恒河猴-XM_001095750.2;小鼠-NM_010406.2;大鼠-XM_345342.4。在数个分开的批次中设计siRNA双链体,包括但不限于含有匹配仅人和恒河猴转录物;仅人、恒河猴和小鼠转录物;仅人、恒河猴、小鼠和大鼠转录物;并且仅小鼠和大鼠转录物的双链体的批次。设计与列出的人转录物和每次设计批次(以

上)中考虑的其他物种转录物共有100%一致性的所有siRNA双链体。

[0938] siRNA设计、特异性和功效预测

[0939] 从每个序列中预测所有可能的19聚体的预测特异性。然后选择缺乏长于7个核苷酸的重复的候选19聚体。这些2971候选人/恒河猴、142人/恒河猴/小鼠、54人/恒河猴/小鼠/大鼠和807小鼠/大鼠siRNA用于使用在python脚本‘BruteForce.py’中实现的穷尽性“brute-force”算法,针对适当转录组的综合搜索(定义为在人、恒河猴、狗、小鼠或大鼠NCBI Refseq组内的NM_和XM_记录的组)中。该脚本接下来语法分析转录物-寡聚物比对,以便基于siRNA与任何潜在的‘脱靶’转录物之间的错配位置和数目产生分数。对该脱靶分数进行加权,以强调siRNA的“种子”区的差异,在从该分子的5'-端起的位置2-9处。

[0940] 来自brute-force搜索的每个寡聚物-转录物对通过加和各个错配分数给出错配分数;在位置2-9上的错配被计数为2.8,在裂解位点位置10-11上的错配被计数为1.2,并且在区12-19上的错配被计数为1.0。通过对衍生自每个寡聚物的3个相异种子衍生的六聚体的七聚体和八聚体的频率做比较来进行另外的脱靶预测。来自相对于5'起始的位置2-7的六聚体被用来创建2个七聚体和1个八聚体。通过将3'-A添加至该六聚体来创建‘七聚体1’;通过将5'-A添加至该六聚体来创建七聚体2;通过将A添加至该六聚体的5'-端和3'-端这两者上来创建该八聚体。预先计算了人、恒河猴、小鼠或大鼠3'-UTR组(定义为来自NCBI的Refseq数据库的转录组的子序列,其中编码区的末端‘CDS’被清楚定义)中的八聚体和七聚体的频率。使用来自八聚体频率的范围的中间值将八聚体频率归一化成七聚体频率。然后通过计算 $((3 \times \text{归一化的八聚体计数}) + (2 \times \text{七聚体2计数}) + (1 \times \text{七聚体1计数}))$ 的总和来计算‘mirSeedScore’。

[0941] 两种siRNA链被指定为根据计算分数的特异性分类:得分高于3为高特异性的、等于3为特异性的,并且在2.2与2.8之间为中等特异性的。通过反义链的特异性对这些双链体进行分类,并且选择其反义寡聚物在第一位置缺乏GC、在位置13和14两处缺乏G、并且在种子区具有3个或更多个U或A的那些双链体。

[0942] 对于GalNaC-缀合的双链体,通过将反义19聚体(以上描述)延长至靶互补序列的23个核苷酸来设计有义21聚体和反义23聚体寡聚物。对包括在设计批次中的所有物种转录物的互补性进行检查。使用了在至少2个物种中保存100%序列互补性的仅有的23聚体。对于每个双链体,该有义21聚体被指定为反义链的前21个核苷酸的反向补体。

[0943] siRNA序列选择

[0944] 合成总共23个有义和23个反义衍生的人/恒河猴、6个有义和6个反义人/恒河猴/小鼠、6个有义和6个反义衍生的人/恒河猴/小鼠/小鼠/大鼠以及13个有义和13个反义衍生的小鼠/大鼠siRNA 19聚体寡聚物,并且形成为双链体。

[0945] 对于GalNac缀合物设计,将以上19聚体组延长至21个23聚体双链体,并且根据其新物种匹配重新分类。合成27个有义和27个反义衍生的人/恒河猴、1个有义和1个反义人/恒河猴/小鼠、3个有义和3个反义衍生的人/恒河猴/大鼠、4个有义和4个反义衍生的人/恒河猴/小鼠/大鼠以及13个有义和13个反义衍生的小鼠/大鼠21聚体(有义)和23聚体(反义)寡聚物,并且形成为双链体。

[0946] C5有义链序列和反义链序列的详细列表表示于表3-6中。

[0947] siRNA合成

[0948] 通用中小规模的RNA合成程序

[0949] 根据标准固相寡核苷酸合成方案,使用可商购的尿苷的5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺单体、4-N-乙酰基胞苷、6-N-苯甲酰基腺苷和2-N-异丁酰基鸟苷和相对应的2'-O-甲基亚磷酰胺和2'-氟代亚磷酰胺,在0.2-500 μ mol之间的规模下合成RNA寡核苷酸。在0.1-0.15M浓度下制备亚酰胺溶液,并且5-乙硫基-1H-四唑(0.25-0.6M的乙腈溶液)被用作活化剂。在合成过程中,使用0.2M苯基乙酰基二硫化物(PADS)的二甲基吡啶:乙腈(1:1)(v:v)溶液或0.1M 3-(二甲基氨基亚甲基)氨基-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)的吡啶溶液用于氧化步骤来引入硫代磷酸酯骨架修饰。在合成完成之后,序列从固体载体上裂解,并且使用甲胺接着三乙胺去保护。存在去除任何2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基保护基的3HF。

[0950] 对于5-500 μ mol之间的合成规模和完全2'修饰的序列(2'-氟代和/或2'-O-甲基或其组合),或者在35 $^{\circ}$ C下持续16h或者在55 $^{\circ}$ C下持续5.5h使用3:1(v/v)乙醇和浓(28%-32%)氨水去保护寡核苷酸。在氨水去保护之前,在固体载体上用0.5M哌啶的乙腈溶液处理寡核苷酸持续20min。通过LC-MS和阴离子交换HPLC(IEX-HPLC)来分析粗制寡核苷酸。使用以下物质,通过IEX HPLC进行寡核苷酸的纯化:20mM磷酸盐、10%-15%ACN,pH=8.5(缓冲液A)和20mM磷酸盐、10%-15%ACN、1M NaBr,pH=8.5(缓冲液B)。通过分析型HPLC分析级分纯度。将具有适合纯度的含产物的级分汇集,并且在脱盐之前在旋转蒸发仪上浓缩。将样品通过尺寸排阻色谱法脱盐并且冻干至干燥。在1 \times PBS缓冲液中退火等摩尔量的有义链和反义链,以便制备相对应的siRNA双链体。

[0951] 对于小规模(0.2-1 μ mol),在96孔形式下在MerMade 192合成仪上进行合成。在完全2'-修饰的序列(2'-氟代和/或2'-O-甲基或其组合)的情况下,在室温下使用甲胺持续30-60min接着在60 $^{\circ}$ C下孵育30min,或在室温下使用3:1(v/v)乙醇和浓(28%-32%)氨水持续30-60min接着在40 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时来去保护寡核苷酸。然后在乙腈:丙酮(9:1)的溶液中沉淀粗制寡核苷酸,并且通过离心分离并且倾析上清液。将粗制的寡核苷酸沉淀物重新悬浮于20mM NaOAc缓冲液中,并且通过LC-MS和阴离子交换HPLC来分析。在5mL HiTrap Sephadex G25柱(GE卫生保健公司(GE Healthcare))上在96深孔板中将粗制的寡核苷酸序列进行脱盐。在每个孔中,收集相应于各个序列的约1.5mL样品。通过LC-MS和阴离子交换色谱法分析这些纯化脱盐的寡核苷酸。通过在帝肯(Tecan)机械手上退火等摩尔量的有义序列和反义序列来制备双链体。将双链体的浓度调节至10 μ M的1 \times PBS缓冲液的溶液。

[0952] 用于体内分析的GalNAc-缀合的寡核苷酸的合成

[0953] 使用一种固体载体在0.2-500 μ mol之间的规模下合成在其3'-末端处与GalNAc配体缀合的寡核苷酸,该固体载体用具有用于寡核苷酸合成的4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)保护的伯羟基基团的Y形接头和通过系链附接的GalNAc配体预先负载。

[0954] 对于5-500 μ mol之间规模下的GalNAc缀合物的合成,遵循以上用于RNA的合成方案并且具有以下改编:对于基于聚苯乙烯的合成,在合成过程中使用载体5%二氯乙酸的甲苯溶液来进行DMT裂解。如上所述进行从该载体的裂解和去保护。在不去除最后5'-DMT基团("存在DMT")的情况下合成富含硫代磷酸酯序列(通常>5个硫代磷酸酯),并且在如上所述裂解和去保护之后,通过反向HPLC,使用50mM乙酸铵的水溶液(缓冲液A)和50mM乙酸铵的80%乙腈溶液(缓冲液B)来纯化。通过分析型HPLC和/或LC-MS分析级分纯度。将具有适合纯

度的含产物的级分汇集,并且在旋转蒸发仪上浓缩。使用在水中的20%-25%乙酸去除DMT基团直到完成。将样品通过尺寸排阻色谱法脱盐并且冻干至干燥。在1×PBS缓冲液中退火等摩尔量的有义链和反义链,以便制备相对应的siRNA双链体。

[0955] 对于GalNAc缀合物的小规模合成(0.2-1 μ mol),包括具有多个硫代磷酸酯键联的序列,适用以上描述的用于在MerMade平台上合成RNA或含完全2'-F/2'-OMe的序列的方案。在含GalNAc功能化的可控孔度玻璃载体的预填充柱上进行合成。

[0956] 实例2. 体外筛选

[0957] 细胞培养和转染

[0958] 将Hep3B细胞(ATCC公司,弗吉尼亚州马纳萨斯(Manassas,VA))在37°C在5%CO₂的气氛中在伊格尔氏最低基础培养基(ATCC公司)(补充有10%FBS、链霉素以及谷氨酰胺(ATCC公司))中生长接近融合,然后通过胰酶消化从该板释放。洗涤细胞并且以0.25×10⁶个细胞/毫升重新悬浮。在转染过程中,以每个孔约20,000个细胞将细胞放置在96孔板上。

[0959] 在转染之前小于1小时,从C57BL/6雌性小鼠(查尔斯河实验室国际公司(Charles River Laboratories International, Inc.)威明顿(Willmington),MA)中新鲜分离原代小鼠肝细胞(PMH),并且将这些细胞生长在原代肝细胞培养基中。以0.11×10⁶个细胞/毫升将细胞重新悬浮在体外GRO CP大鼠(平板接种)培养基(Celsis体外技术公司(Celsis In Vitro Technologies),目录号S01494)中。在转染过程中,以每孔10,000个细胞将细胞放置在BD BioCoat 96孔胶原板(BD,356407)上并且在37°C下在5%CO₂气氛中进行孵育。

[0960] 在使用之前立即在37°C水浴中对低温保存的原代食蟹猴肝细胞(Celsis体外技术公司,M003055-P)进行解冻,并且以0.26×10⁶个细胞/毫升将这些细胞重新悬浮于体外GRO CP(平板接种)培养基(Celsis体外技术公司,目录号Z99029)中。在转染过程中,以每孔25,000个细胞将细胞涂布在BD BioCoat 96孔胶原板(BD,356407)上并且在37°C下在5%CO₂气氛中进行孵育。

[0961] 对于Hep3B、PMH和原代食蟹猴肝细胞,通过向96孔板中的各个孔中将每孔14.8 μ l的Opti-MEM加上0.2 μ l的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德CA目录号13778-150)添加至5 μ l的每个siRNA双链体中来进行转染。然后在室温下将混合物孵育20分钟。然后将含有适当细胞数目的不具有抗生素的80 μ l完全生长培养基添加至siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。

[0962] 对于GalNAc修饰的序列,在10nM和0.1nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验,对于所有其他序列在1nM和0.01nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验。对于原代小鼠肝细胞,在3nM、1nM、0.3nM、0.1nM、0.037nM、0.0123nM、0.00412nM和0.00137nM最终双链体浓度下完成剂量响应实验,并且对于Hep3B细胞,在3nM、1nM、0.3nM、0.1nM、0.037nM、0.0123nM、0.00412nM、0.00137nM、0.00046nM、0.00015nM、0.00005nM和0.000017nM下完成剂量响应实验。

[0963] 自由摄取转染

[0964] 通过将每孔10 μ l siRNA双链体的PBS溶液添加到96孔板中来进行自由摄取实验。然后将对于细胞类型含有适当细胞数目的90 μ l完全生长培养基添加至siRNA。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。在500nM和5nM最终双链体浓度下进行单次剂量实验,并且在1000nM、333nM、111nM、37nM、12.3nM、4.12nM、1.37nM、0.46nM最终双链体浓度下完成剂量响应实验。

[0965] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件号:610-12)的总RNA分离

[0966] 收获细胞并且溶解于150 μ l的溶解/结合缓冲液中,然后使用埃彭道夫(Eppendorf)热混合器(在整个过程中混合速度相同)在850rpm下混合5分钟。将10微升磁珠和80 μ l溶解/结合缓冲液混合物添加至圆底板,并且混合1分钟。使用磁力支座捕获磁珠并且在不扰动磁珠的情况下移出上清液。在移除上清液后,将裂解的细胞添加至剩余的磁珠并且混合5分钟。在去除上清液之后,用150 μ l洗涤缓冲液A洗涤磁珠2次,并且混合1分钟。这些珠粒再次被捕获,并且去除上清液。然后用150 μ l洗涤缓冲液B洗涤这些珠粒,捕获并且去除上清液。接下来用150 μ l洗脱缓冲液洗涤这些珠粒,捕获并且去除上清液。最后,允许这些珠粒干燥2分钟。在干燥之后,添加50 μ l的洗脱缓冲液,并且在70 $^{\circ}$ C下混合5分钟。用磁体捕获这些珠粒持续5分钟。去除55 μ l的上清液,并且添加至另一个96孔板。

[0967] 使用ABI大容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统,福斯特市(Foster City),加利福尼亚州,目录号4368813)的cDNA合成

[0968] 每个反应制备2 μ l 10 \times 缓冲液、0.8 μ l 25 \times dNTP、2 μ l随机引物、1 μ l逆转录酶、1 μ l RNA酶抑制剂和3.2 μ l H₂O的主混合物。对于体外筛选的样品,将等体积主混合物和RNA混合至12 μ l的最终体积,或对于体内筛选的样品,将等体积主混合物和RNA混合至20 μ l的最终体积。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(赫力仕公司(Hercules),CA),通过以下步骤产生cDNA:25 $^{\circ}$ C持续10分钟,37 $^{\circ}$ C持续120分钟,85 $^{\circ}$ C持续5秒,并且在4 $^{\circ}$ C保持。

[0969] 实时PCR

[0970] 在384孔板(罗氏公司目录号04887301001)中,将2 μ l的cDNA添加至每孔含有2 μ l的H₂O、0.5 μ l GAPDH TaqMan探针(美国生命技术公司对于Hep3B细胞目录号4326317E,对于原代小鼠肝细胞目录号352339E或对于食蟹猴原代肝细胞为定制的探针)、0.5 μ l C5TaqMan探针(美国生命技术公司对于Hep3B细胞目录号Hs00156197_m1或对于原代小鼠肝细胞为mm00439275_m1或对于食蟹猴原代肝细胞为定制的探针)和5 μ l Lightcycler 480探针主混合物的主混合物中。使用 $\Delta\Delta$ Ct(RQ)测定,在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)中进行实时PCR。除非另外指出,对于体外筛选,使用两个生物重复对每个双链体进行检验并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。对于体内筛选,在一个或多个实验(每组3个小鼠)中对每个双链体进行测试,并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。

[0971] 为了计算C5 mRNA水平变化的相对倍数,使用 $\Delta\Delta$ Ct方法分析实时数据并且归一化成用10nM AD-1955转染的细胞或模拟物转染的细胞进行的测定。使用XLfit,使用4参数拟合模型计算IC₅₀,并且归一化成用AD-1955在相同剂量范围内转染的细胞或归一化成其自身的最低剂量。

[0972] AD-1955的有义序列和反义序列是:

[0973] 有义:cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT(SEQ ID NO:13);

[0974] 反义:UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdt(SEQ ID NO:14)。

[0975] 表7示出用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA转染的Hep3B细胞中的单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[0976] 表8示出用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA转染的原代小鼠肝细胞中的单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[0977] 表9示出使用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA,在原代食蟹猴肝细胞中的单次剂

量自由摄取筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[0978] 表10示出使用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA,在原代小鼠肝细胞中的单次剂量自由摄取筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[0979] 表11示出使用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA,在原代食蟹猴肝细胞中的自由摄取筛选的剂量响应。指定的 IC_{50} 值表示相对于未处理的细胞的 IC_{50} 值。

[0980] 表12示出使用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA,在原代小鼠肝细胞中的自由摄取筛选的剂量响应。指定的 IC_{50} 值表示相对于未处理的细胞的 IC_{50} 值。

[0981] 表13示出用指定的修饰的和未修饰的iRNA转染的Hep3B细胞中的单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。该0.01nM剂量是单次生物转染,并且该1nM剂量是两次生物转染。

[0982] 表14示出用指定的修饰的和未修饰的iRNA转染的原代小鼠肝细胞中的单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[0983] 表15示出用指定的修饰的和未修饰的iRNA转染的Hep3B细胞中的剂量响应。指定的 IC_{50} 值表示相对于未处理的细胞的 IC_{50} 值。

[0984] 表16示出用指定的修饰的和未修饰的iRNA转染的原代小鼠肝细胞中的剂量响应。指定的 IC_{50} 值表示相对于未处理的细胞的 IC_{50} 值。

[0985] 表2:用于核酸序列表示中的核苷酸单体的缩写。应当理解在寡核苷酸中存在时这些单体是由5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

	缩写	一种或多种核苷酸
	A	腺苷-3'-磷酸酯
	Af	2'-氟代腺苷-3'-磷酸酯
	Afs	2'-氟代腺苷-3'-硫代磷酸酯
	As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
	C	胞苷-3'-磷酸酯
	Cf	2'-氟代胞苷-3'-磷酸酯
	Cfs	2'-氟代胞苷-3'-硫代磷酸酯
	Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
	G	鸟苷-3'-磷酸酯
	Gf	2'-氟代鸟苷-3'-磷酸酯
[0986]	Gfs	2'-氟代鸟苷-3'-硫代磷酸酯
	Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
	T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
	Tf	2'-氟代-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
	Tfs	2'-氟代-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
	Ts	5'-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
	U	尿苷-3'-磷酸酯
	Uf	2'-氟代尿苷-3'-磷酸酯
	Ufs	2'-氟代尿苷-3'-硫代磷酸酯
	Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
	N	任何核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
	a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
	as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
	c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
	cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
	g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
	gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
	t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
[0987]	ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
	u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
	us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
	s	硫代磷酸酯键联
	L96	N-[三(GalNAc-烷基)-酰氨基癸酰基]-4-羟脯氨酸 Hyp-(GalNAc-烷基) ₃
	(dt)	脱氧-胸腺嘧啶

[0988] 表3.C5 dsRNA的未修饰的有义链序列和反义链序列

[0989]

双链身份	有义链	未修饰的有义序列	SEQ ID NO:	反义	未修饰的反义序列	SEQ ID NO:	物种_寡聚物名称 ¹	开始	结束
AD-58093.1UM ²	A-118310.1	AAUAAUCACUAAAUAUUU	15	A-118311.1	AAGUAAUUUAGUGAGUUUUUU	66	NM_001735.2_as	1513	1535
AD-58099.1UM	A-118312.1	UGACAAAUAUCACUAAUA	16	A-118313.1	UUUAGUGAGUUUUUUGUCAU	67	NM_001735.2_as	1507	1529
AD-58105.1UM	A-118314.1	CUUCCUCUGAAAUUGGCCUU	17	A-118315.1	AAGGCCAAUUCCAGAGGAAGCA	68	NM_001735.2_as	2729	2751
AD-58111.1UM	A-118316.1	GACAAAUAACUCACUAUAU	18	A-118317.1	AUUUAGUGAGUUUUUUGUCA	69	NM_001735.2_as	1508	1530
AD-58117.1UM	A-118318.1	UCCUCUGGAAAUUGGCCUUA	19	A-118319.1	UGAAGGCCAAUUCCAGAGGAAG	70	NM_001735.2_as	2731	2753
AD-58123.1UM	A-118320.1	AAGCAAGAUUUUUUAUAUA	20	A-118321.1	UAUUUAAAAAUUUCUUGCUUUU	71	NM_001735.2_as	780	802
AD-58129.1UM	A-118322.1	AAAAGUUUUUUGUCAAGUACA	21	A-118323.1	UGUACUUGACAAAAACAUUUCU	72	NM_001735.2_as	4740	4762
AD-58088.1UM	A-118324.1	AUUUAAACAACAAGUACUUU	22	A-118325.1	AAAGGUACUUGUGUUUAAAUCU	73	NM_001735.2_as	978	1000
AD-58094.1UM	A-118326.1	AUUCAGAAAGUCUGUGAAGGA	23	A-118327.1	UCCUUACACAGACUUUCUGAAUUU	74	NM_001735.2_as	4574	4596
AD-58100.1UM	A-118328.1	ACACUGAAGCAUUUGAUGCAA	24	A-118329.1	UUUGCAUCAAAUUGCUACAGUUAU	75	NM_001735.2_1_as	165	187
AD-58106.1UM	A-118330.1	GCAGUUCUGUGUUAAAUGUC	25	A-118331.1	GACAUUUUAAACACAGAAACUGCAU	76	NM_001735.2_as	2587	2609
AD-58112.1UM	A-118332.1	AGGAUUUUGAGUGUAAAAGGA	26	A-118333.1	UCCUUUUACACUCAAAAUCUUU	77	NM_001735.2_as	2951	2973
AD-58118.1UM	A-118334.1	AAUGAUGAACCUUGUAAAAGAA	27	A-118335.1	UUUUUUUACAGGUUCAUUUUU	78	NM_001735.2_as	2021	2043
AD-58124.1UM	A-118336.1	AUCAUUGGAACAUUUUUCAUU	28	A-118337.1	AAUGAAAAAUUCCAAUGAUUUU	79	NM_001735.2_as	3114	3136
AD-58130.1UM	A-118338.1	AGCCAGAAAUUCGGAGUUUAU	29	A-118339.1	AAUAAACUCCGAAUUUCUGGCUUG	80	NM_001735.2_as	2313	2335
AD-58089.1UM	A-118340.1	UCCUUGGAGUAAAACUAC	30	A-118341.1	GUGAGUUUUUUAUCCUCCAGGAAA	81	NM_001735.2_as	3614	3636
AD-58095.1UM	A-118342.1	GAAAAUGAUAACCUUGUAAA	31	A-118343.1	UUUACAAGGUUCAUUUUUUUU	82	NM_001735.2_as	2018	2040

[0990] ¹物种寡聚物名称反映了基因库记录(例如,NM_001735.2)和反义链靶向的基因库记录的核苷酸序列中的位置(例如,1513-1535)。

[0991] ²小数点后面的数字是指批号。

[0992] ³UM=未修饰

[0993]

AD-58101.1 UM	A-118344.1	AUUGCUCAAGUCACAUUUGAU	32	A-118345.1	AUCAAUUGUCACUUGCAGAAUUC	83	NM_001735.2_as	914	936
AD-58107.1 UM	A-118346.1	GAGAUUGCAUUGCUUUAUAAA	33	A-118347.1	UUUAUAAGCAUUAAGCAUUCUCUG	84	NM_001735.2_as	4694	4716
AD-58113.1 UM	A-118348.1	GUUAUCCUGAUAAAAAUUUA	34	A-118349.1	UAAUUUUUUUAUCAGGAUAAUUU	85	NM_001735.2_as	201	223
AD-58119.1 UM	A-118350.1	AGGAAGUUUGCAGCUUUUAUU	35	A-118351.1	AUUAAMAGCUGCAAAUUCUCCA	86	NM_001735.2_as	4143	4165
AD-58125.1 UM	A-118352.1	GAAGAAAUUGAUCAUUUGGA	36	A-118353.1	UCCAAUUGAUCAAUUCUUCUA	87	NM_001735.2_as	551	573
AD-58131.1 UM	A-118354.1	AUCCUGAUAAAAAUUUUGUU	37	A-118355.1	AAUAAAUUUUUAUCAGGAUAAA	88	NM_001735.2_as	204	226
AD-58090.1 UM	A-118356.1	UGGAAAGAAAUUCUUGUAAA	38	A-118357.1	UUUACUAAAGAUUUUUUCCAAA	89	NM_001735.2_as	2782	2804
AD-58096.1 UM	A-118358.1	UCUUUAUCAAAGUUAACAUU	39	A-118359.1	AAUGUUUAACUUGAUAGAUG	90	NM_001735.2_as	1592	1614
AD-58102.1 UM	A-118360.1	UCCUACAACUGAAUUUGGU	40	A-118361.1	ACCAAUUCAGUUUGUAGGGAGA	91	NM_001735.2_as	1078	1100
AD-58108.1 UM	A-118362.1	CAGGAGCAACAUUUGUCAUU	41	A-118363.1	AAUGACAUUUGUUCUUCUGUC	92	NM_001735.2_as	83	105
AD-58114.1 UM	A-118364.1	ACAUGUAACAACUGUAGUUA	42	A-118365.1	UGAACUACAGUUGUACAUGUAC	93	NM_001735.2_as	4105	4127
AD-58120.1 UM	A-118366.1	CAGGAAUUCAUUGGAACAUUU	43	A-118367.1	AAUGUCCAAGAUUUCUUGUU	94	NM_001735.2_as	3108	3130
AD-58126.1 UM	A-118368.1	UUUAAGAAUUUUGAAAUUACU	44	A-118369.1	AGUAAUUUCAAAAUUUUAAAGU	95	NM_001735.2_as	755	777
AD-58132.1 UM	A-118370.1	UAUUUCGCAACUGAAUUCGAU	45	A-118371.1	AUCGAAUUCAGUUGCAGAAUJAC	96	NM_001735.2_as	4408	4430
AD-58091.1 UM	A-118372.1	GCCUUUGGAAAGAGUUAUUA	46	A-118373.1	UGAAAUAUCUUUCCAAAGGCUU	97	NM_001735.2_as	1882	1904
AD-58097.1 UM	A-118374.1	CCUGAUAAAAAUUUGUUAAC	47	A-118375.1	GUAAUAAAUUUUUUUAUCAGAU	98	NM_001735.2_as	206	228
AD-58103.1 UM	A-118376.1	CCCUUGGAAAGAGUUAUUA	48	A-118377.1	UUUAAAUCUUCUUUCCAAAGGCU	99	NM_001735.2_as	1883	1905
AD-58121.1 UM	A-118382.1	UGCAGAUCAAACACAAUUUA	49	A-118383.1	UGAAAUUGUUUUGAUUCGAGA	100	NM_010406.2_as	4939	4961
AD-58133.1 UM	A-118386.1	CAGAUCAAACACAAUUCAGU	50	A-118387.1	ACUGAAAUUGUUUUGAUUCGCA	101	NM_010406.2_as	4941	4963
AD-58116.1 UM	A-118396.1	GUUCCGGAUUUUUGAACUUUU	51	A-118397.1	AAAAGUCAAUUAUCCGGAACCG	102	NM_010406.2_as	4496	4518
AD-58644.1 UM	A-119328.1	AUUUAAACAAAGUACCUUU	52	A-119329.1	AAAGUACUUGUUUUUAUUAUUCU	103	NM_001735.2_as	978	1000
AD-58651.1 UM	A-119328.2	AUUUAAACAAAGUACCUUU	53	A-119339.1	AAAGUACUUGUUUUUAUUAUUCU	104	NM_001735.2_as	978	1000
AD-58641.1 UM	A-119322.1	UGCAAAAUAACUCACUAUAA	54	A-119323.1	UUUAUGAGUUUUUUUGUCAAU	105	NM_001735.2_as	1507	1529
AD-58648.1 UM	A-119322.2	UGCAAAAUAACUCACUAUAA	55	A-119336.1	UUUAUGAGUUUUUUUGUCAAU	106	NM_001735.2_as	1507	1529

[0994]

AD-58642.1 UM	A-119324.1	GACAAAUAACUCACUAUAU	A-119325.1	AUUUAGUGAGUUUUUUGUCA	107	NM_001735.2_as	1508	1530
AD-58649.1 UM	A-119324.2	GACAAAUAACUCACUAUAU	A-119337.1	AUUUAGUGAGUUUUUUGUCA	108	NM_001735.2_as	1508	1530
AD-58647.1 UM	A-119334.1	GUUCCGGAUUUUGAACUUUU	A-119335.1	AAAAGUUCAAAUAUCCGGAACCG	109	NM_010406.2_as	4496	4518
AD-58654.1 UM	A-119334.2	GUUCCGGAUUUUGAACUUUU	A-119342.1	AAAAGUUCAAAUAUCCGGAACCG	110	NM_010406.2_as	4496	4518
AD-58645.1 UM	A-119330.1	UGCAGAUCAACACACAUUCA	A-119331.1	UGAAAUIUGUGUUUGAUCUGCAGA	111	NM_010406.2_as	4939	4961
AD-58652.1 UM	A-119330.2	UGCAGAUCAACACACAUUCA	A-119340.1	UGAAAUIUGUGUUUGAUCUGCAGA	112	NM_010406.2_as	4939	4961
AD-58643.1 UM	A-119326.1	AAGCAAGAUUUUUUAUAUA	A-119327.1	UAUUUAAAAAAUAUCUUGCUUUU	113	NM_001735.2_as	780	802
AD-58650.1 UM	A-119326.2	AAGCAAGAUUUUUUAUAUA	A-119338.1	UAUUUAAAAAAUAUCUUGCUUUU	114	NM_001735.2_as	780	802
AD-58646.1 UM	A-119332.1	CAGAUCAACACACAAUUCAGU	A-119333.1	ACUGAAAUIUGUGUUUGAUCUGCA	115	NM_010406.2_as	4941	4963
AD-58653.1 UM	A-119332.2	CAGAUCAACACACAAUUCAGU	A-119341.1	ACUGAAAUIUGUGUUUGAUCUGCA	116	NM_010406.2_as	4941	4963

[0995] 表4.C5 dsRNA的Ga1NAC缀合的修饰的有义链序列和反义链序列

[0997]

AD-58101.1	A-118344.1	AkUJgChUChAaFGRUfCkAkaFuUfGfUfU.96	134	A-118345.1	aUJfAaFuGfUgfaUuUfGfGfCfaFuUfJsc	185
AD-58107.1	A-118346.1	GfAaFuUfGfAaUfAfaUfGfUfAfaUfAfaUf.96	135	A-118347.1	uUfUfaUfGfAfaUfaUfaUfGfAfaUfUfUfGf	186
AD-58113.1	A-118348.1	GfUfUfUfGfUfAfaUfaUfaUfaUfAfaUf.96	136	A-118349.1	uAfaAfuUfUfUfaUfaUfGfAfaUfaUfaUfUfU	187
AD-58119.1	A-118350.1	AfgGaaGfUfUfGfGfAaGfUfUfUfaUfUf.96	137	A-118351.1	aaFuAfaUfaUfGfUfaUfaUfUfUfUfUfUfUfU	188
AD-58125.1	A-118352.1	GfAfaAfaUfUfGfAfaUfUfUfUfUfUfUf.96	138	A-118353.1	uUfAfaUfUfUfUfaUfaUfUfUfUfUfUfUfUfU	189
AD-58131.1	A-118354.1	AfuUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	139	A-118355.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	190
AD-58090.1	A-118356.1	UfGfAfaUfaUfAfaUfAfaUfUfUfUfUfUf.96	140	A-118357.1	uUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	191
AD-58096.1	A-118358.1	UfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	141	A-118359.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	192
AD-58102.1	A-118360.1	UfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	142	A-118361.1	aUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	193
AD-58106.1	A-118362.1	CfaGfGfGfCfaAfaUfUfUfUfUfUfUfUf.96	143	A-118363.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	194
AD-58114.1	A-118364.1	AfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	144	A-118365.1	uGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	195
AD-58120.1	A-118366.1	CfaGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	145	A-118367.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	196
AD-58126.1	A-118368.1	UfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	146	A-118369.1	aGfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	197
AD-58132.1	A-118370.1	UfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	147	A-118371.1	aUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	198
AD-58091.1	A-118372.1	GfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	148	A-118373.1	uGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	199
AD-58097.1	A-118374.1	CfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	149	A-118375.1	gUfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	200
AD-58103.1	A-118376.1	CfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	150	A-118377.1	uUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	201
AD-58121.1	A-118382.1	UfGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	151	A-118383.1	uGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	202
AD-58133.1	A-118386.1	CfaGfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	152	A-118387.1	aUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	203
AD-58116.1	A-118396.1	GfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	153	A-118397.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	204
AD-58544.1	A-119328.1	AfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	154	A-119329.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	205
AD-58651.1	A-119328.2	AfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	155	A-119329.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	206
AD-58641.1	A-119322.1	UfGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	156	A-119323.1	uUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	207
AD-58648.1	A-119322.2	UfGfAfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	157	A-119326.1	uUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	208
AD-58642.1	A-119324.1	GfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	158	A-119325.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	209
AD-58649.1	A-119324.2	GfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	159	A-119327.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	210
AD-58647.1	A-119341.1	GfaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUf.96	160	A-119335.1	aaUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfU	211

[0998]

AD-58654.1	A-119334.2	GfauUhcCfGgaUfAfuUfUgAfaCuUfuUfU.96	161	A-119342.1	aaAfaAfIgUfhuCfAaAfaauAfcrCfGgGfaaAfcscg	212
AD-58645.1	A-119330.1	UfgrCfaufcaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfa.96	162	A-119331.1	usGfaAfaUfGfuUgFuuuGfaufcUfgCfaaga	213
AD-58652.1	A-119330.2	UfgrCfaufcaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfa.96	163	A-119340.1	usGfaAfaUfGfuUgFuuuGfaufcUfgCfaaga	214
AD-58643.1	A-119326.1	AfaaGfaGfaUfaUfuUfuUfaAfaAfa.96	164	A-119327.1	usAfuUfaUfaAfaAfaaUfUfUfGfUfUfuU	215
AD-58650.1	A-119326.2	AfaaGfaGfaUfaUfuUfuUfaAfaAfa.96	165	A-119338.1	usAfuUfaUfaAfaAfaaUfUfUfGfUfUfuU	216
AD-58646.1	A-119332.1	CfaaGfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfa.96	166	A-119333.1	atCfuGfaAfaUfGfuUgFuuuGfaufcUfgCfaaga	217
AD-58653.1	A-119332.2	CfaaGfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfa.96	167	A-119341.1	atCfuGfaAfaUfGfuUgFuuuGfaufcUfgCfaaga	218

[0999] ⁴物种寡聚物名称和反义链靶向的基因库记录的核苷酸序列中的位置相应于表3中示出的那些。

[1000] 表5.C5 dsRNA的未修饰的有义链序列和反义链序列

[1001]

双链体身份	有义链	未修饰的有义序列	反义	未修饰的反义序列	SEQ ID NO.	物种_寡聚物名称
AD-58143.1 UM	A-118423.1	CACUAAAUUACUUGAUUU	A-118424.1	AAAUCAAUAUUUAUGUG	302	NM_001735.2_1522-1540_as
AD-58149.1 UM	A-118425.1	UAACUCACUAUAUUACUU	A-118426.1	AAGUAUUUAUGAGAGUUA	303	NM_001735.2_1517-1535_as
AD-58155.1 UM	A-118427.1	ACAAAUAACUCACUAUA	A-118428.1	UUUAUGAGAGUUAUUUGU	304	NM_001735.2_1511-1529_as
AD-58161.1 UM	A-118429.1	UCCUCUGAAAUUGCCUU	A-118430.1	AAGGCAAUUCCAGAGGA	305	NM_001735.2_2733-2751_as
AD-58167.1 UM	A-118431.1	CAAAAUAACUCACUAUAU	A-118432.1	AUUUAUGAGAGUUAUUUG	306	NM_001735.2_1512-1530_as
AD-58173.1 UM	A-118433.1	CUCUGAAAUUGCCUJCA	A-118434.1	UGAAGGCCAAUJCCAGAG	307	NM_001735.2_2735-2753_as
AD-58179.1 UM	A-118435.1	GCAAGAUUUUUUAUAUA	A-118436.1	UAUUUAUUAAAAUJCUUGC	308	NM_001735.2_784-802_as
AD-58185.1 UM	A-118437.1	AAUGUUUUUGUCAAGUACA	A-118438.1	UGUACUUGACAAAAACAUU	309	NM_001735.2_4744-4762_as
AD-58144.1 UM	A-118439.1	UUAAACAACAAGUACCUUU	A-118440.1	AAAGGUACUUGUUGUUUA	310	NM_001735.2_982-1000_as
AD-58150.1 UM	A-118441.1	UCAGAAAGUCUGGAGGA	A-118442.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	311	NM_001735.2_4578-4596_as
AD-58156.1 UM	A-118443.1	ACUGAAGCAUUUGAUGCAA	A-118444.1	UUGCAUCAAUUGCUUCAGU	312	NM_001735.2_169-187_as
AD-58162.1 UM	A-118445.1	AGUUCUGUGUAAAAUGUC	A-118446.1	GACAUUUUAACACAGAACU	313	NM_001735.2_2591-2609_as
AD-58168.1 UM	A-118447.1	GAUUUUGAGUGUAAAAGGA	A-118448.1	UCCUUUUACACUCAAUAUC	314	NM_001735.2_2955-2973_as
AD-58174.1 UM	A-118449.1	UGAUGAACCUUGUAAAGAA	A-118450.1	UUUUUUAACAAGGUUCAUCA	315	NM_001735.2_2025-2043_as
AD-58180.1 UM	A-118451.1	CAUUGGAACAUUUUUCAUU	A-118452.1	AAUGAAAAAUUGUCCAAUG	316	NM_001735.2_3118-3136_as

[1002]

AD-58186.1 UM	A-118453.1	CCAGAAUUCGAGUUAUU	234	A-118454.1	AAUAACUCCGAUJUUCGG	317	NM_001735.2_2317-2335_25
AD-58145.1 UM	A-118455.1	CCUGGAGALMAACUCAC	235	A-118456.1	GUGAGUUUUUUCUCCAGG	318	NM_001735.2_3618-3636_25
AD-58151.1 UM	A-118457.1	AAAUAGUAACCUUGJMAA	236	A-118458.1	UUUAACAAGGUUUAUUAU	319	NM_001735.2_2022-2040_26
AD-58157.1 UM	A-118459.1	UGUCUAAAGUJCAUUAUGAU	237	A-118460.1	AUCAAUUGUGAUUUGCA	320	NM_001735.2_918-936_26
AD-58163.1 UM	A-118461.1	GAUUGCAUUGUCUUAJAAA	238	A-118462.1	UUUAUAAGCAUUAUGCAUUC	321	NM_001735.2_4696-4716_26
AD-58169.1 UM	A-118463.1	UAUCCUGAUAAAAUUUA	239	A-118464.1	UAAAUUUUUUUAUUGGAAU	322	NM_001735.2_205-223_26
AD-58175.1 UM	A-118465.1	GAAGUUUGCAGCUUUUUU	240	A-118466.1	AAUAAAAGCUGCAACUUC	323	NM_001735.2_4147-4165_26
AD-58181.1 UM	A-118467.1	AGAAAUUUGAUCAUUGGA	241	A-118468.1	UCCAUAUUGAUCAUUAUCU	324	NM_001735.2_555-573_26
AD-58187.1 UM	A-118469.1	CCUGAUAAAAUUUAUGUJ	242	A-118470.1	AAUAUAUUUUUUUAUCAGG	325	NM_001735.2_208-226_26
AD-58146.1 UM	A-118471.1	GAAGAAGAAUCUUAAGJAAA	243	A-118472.1	UUUAUAUUAUUUUUUUUC	326	NM_001735.2_2786-2804_26
AD-58152.1 UM	A-118473.1	UUUAUCAAAGUUAJAAACAUJ	244	A-118474.1	AAUUGUUUAUUAUUGAUAA	327	NM_001735.2_1596-1614_26
AD-58158.1 UM	A-118475.1	CCUJACAACUGAAUUUGGU	245	A-118476.1	ACCAAUUCAGUUUUGUAGG	328	NM_001735.2_1082-1100_26
AD-58164.1 UM	A-118477.1	GGAGCAACAUUUGJCAUU	246	A-118478.1	AAUUGCAUUAUUGUUCUCC	329	NM_001735.2_87-105_26
AD-58170.1 UM	A-118479.1	AUGUAACAACUUGUAGUJCA	247	A-118480.1	UGAAUUAUUAUUGUUAUUAU	330	NM_001735.2_4109-4127_26
AD-58176.1 UM	A-118481.1	GGAAAUUAUUGGAAUUAUU	248	A-118482.1	AAAUUGUCCCAUUAUUAUUC	331	NM_001735.2_3112-3130_26
AD-58182.1 UM	A-118483.1	UAAAGAUUUUGAAUUUAUCU	249	A-118484.1	AGUAAUUUCAAUUUAUUAU	332	NM_001735.2_759-777_26
AD-58188.1 UM	A-118485.1	UUUCUGCAACUGAAUUUGAU	250	A-118486.1	AUCGAAUUCAGUUUGCAGAA	333	NM_001735.2_4612-4630_26
AD-58147.1 UM	A-118487.1	CCUUGGAAAAGAUUAUJCA	251	A-118488.1	UGAAAUAUCUUUCCAGG	334	NM_001735.2_1886-1904_26
AD-58153.1 UM	A-118489.1	UGAUAAAAUUUUAUGUUAAC	252	A-118490.1	GUUAUAUUUUUUUAUUAUCA	335	NM_001735.2_210-228_26
AD-58159.1 UM	A-118491.1	CUUGGAAAGAUUUUJCAA	253	A-118492.1	UUGAAUAUCUUUUCCAAG	336	NM_001735.2_1887-1905_26
AD-58190.1 UM	A-118519.1	CACUAUAUAUUAUUGAUUU	254	A-118520.1	AAAUCAAAGUUAUUUAUUGU	337	NM_001735.2_1522-1540_26
AD-58196.1 UM	A-118521.1	UUAACUCCAUUAUAUUAUUCU	255	A-118522.1	AAGUUAUUUAUUGUAGAUUA	338	NM_001735.2_1517-1535_26
AD-58202.1 UM	A-118523.1	ACAAAUAACUUAUUAUUA	256	A-118524.1	UUUAUUGUAGUUUAUUUUGU	339	NM_001735.2_1511-1529_26
AD-58208.1 UM	A-118525.1	UCCUUGGAAUUGGCCUU	257	A-118526.1	AAGCCAAUUAUCCAGAGA	340	NM_001735.2_2733-2751_26
AD-58214.1 UM	A-118527.1	CAAAAUAACUUAUUAUUA	258	A-118528.1	AUUUAUUGAGUUUAUUUUG	341	NM_001735.2_1512-1530_26
AD-58220.1 UM	A-118529.1	CUUCUGAAAUUGGCCUUA	259	A-118530.1	UGAAGCCAAUUAUCCAGG	342	NM_001735.2_2735-2753_26
AD-58226.1 UM	A-118531.1	GCAGAUUAUUUUUAUUAUA	260	A-118532.1	UUUAUUUAUUAUUUUAUUC	343	NM_001735.2_784-802_26

[1003]

AD-58231.1 UM	A-118533.1	AAUUGUUUUGUCAAGUJACA	261	A-118534.1	UGUACUUGACAAAACAAU	344	NM_001735_2_4744-4762_35
AD-58191.1 UM	A-118535.1	UUAACAACAAAGUACCUUU	262	A-118536.1	AAAGGUACUUGUUGUUUA	345	NM_001735_2_982-1000_35
AD-58197.1 UM	A-118537.1	UCAGAAGUCUUGAAGGA	263	A-118538.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	346	NM_001735_2_4578-4596_36
AD-58203.1 UM	A-118539.1	ACUGAAGCAUUUGAUGCAA	264	A-118540.1	UUGCAUCMAUUCUUCAGU	347	NM_001735_2_169-187_36
AD-58209.1 UM	A-118541.1	AGUUCUGUGUUAUAUGUC	265	A-118542.1	GACAUUUACACACAGACU	348	NM_001735_2_2591-2609_35
AD-58233.1 UM	A-118565.1	CACUAUAUUACUUGAUUU	266	A-118566.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	349	NM_001735_2_1522-1540_36
AD-58193.1 UM	A-118567.1	UAACUCACUAUAUUACUU	267	A-118568.1	AAGUAUUUAGUGAGUUA	350	NM_001735_2_1517-1535_35
AD-58199.1 UM	A-118569.1	ACAAAUAACUCACUAJAA	268	A-118570.1	UUUAGUGAGUUUUUUGU	351	NM_001735_2_1511-1529_35
AD-58205.1 UM	A-118571.1	UCCUCUGGAAUUUGCCUU	269	A-118572.1	AAGCCAAUUUCCAGAGGA	352	NM_001735_2_2733-2751_36
AD-58211.1 UM	A-118573.1	CAAAUAACUCUCUAJAAU	270	A-118574.1	AUUUAGUGAGUUUUUUG	353	NM_001735_2_1512-1530_36
AD-58217.1 UM	A-118575.1	CUCUGGAAUUGCCUJCA	271	A-118576.1	UGAAGGCCAAUUCACAGAG	354	NM_001735_2_2735-2753_36
AD-58223.1 UM	A-118577.1	GCAAGAUUUUUUAUUAU	272	A-118578.1	UAUUUAUAAAUAUUUCUGC	355	NM_001735_2_784-802_36
AD-58229.1 UM	A-118579.1	AAUUGUUUUGUCAAGUJACA	273	A-118580.1	UGUACUUGACAAAACAAU	356	NM_001735_2_4744-4762_36
AD-58234.1 UM	A-118581.1	UUAACAACAAAGUACCUUU	274	A-118582.1	AAAGGUACUUGUUGUUUA	357	NM_001735_2_982-1000_35
AD-58194.1 UM	A-118583.1	UCAGAAGUCUUGAAGGA	275	A-118584.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	358	NM_001735_2_4578-4596_35
AD-58200.1 UM	A-118585.1	ACUGAAGCAUUUGAUGCAA	276	A-118586.1	UUGCAUCMAUUCUUCAGU	359	NM_001735_2_169-187_36
AD-58206.1 UM	A-118587.1	AGUUCUGUGUUAUAUGUC	277	A-118588.1	GACAUUUACACACAGACU	360	NM_001735_2_2591-2609_36
AD-58236.1 UM	A-118423.2	CACUAUAUUACUUGAUUU	278	A-118644.1	AAAUCAAGUAAUUUAGUG	361	NM_001735_2_1522-1540_35
AD-58242.1 UM	A-118425.2	UAACUCACUAUAUUACUU	279	A-118645.1	AAGUAUUUAGUGAGUUA	362	NM_001735_2_1517-1535_36
AD-58248.1 UM	A-118427.2	ACAAAUAACUCACUAJAA	280	A-118646.1	UUUAGUGAGUUUUUUGU	363	NM_001735_2_1511-1529_36
AD-58254.1 UM	A-118429.2	UCCUCUGGAAUUUGCCUU	281	A-118647.1	AAGCCAAUUCACAGAGGA	364	NM_001735_2_2733-2751_36
AD-58260.1 UM	A-118431.2	CAAAUAACUCACUAJAAU	282	A-118648.1	AUUUAGUGAGUUUUUUG	365	NM_001735_2_1512-1530_35
AD-58266.1 UM	A-118433.2	CUCUGGAAUUGCCUJCA	283	A-118649.1	UGAAGGCCAAUUCACAGAG	366	NM_001735_2_2735-2753_36
AD-58272.1 UM	A-118435.2	GCAAGAUUUUUUAUUAU	284	A-118650.1	UAUUUAUAAAUAUUUCUGC	367	NM_001735_2_784-802_36
AD-58277.1 UM	A-118437.2	AAUUGUUUUGUCAAGUJACA	285	A-118651.1	UGUACUUGACAAAACAAU	368	NM_001735_2_4744-4762_35
AD-58237.1 UM	A-118439.2	UUAACAACAAAGUACCUUU	286	A-118652.1	AAAGGUACUUGUUGUUUA	369	NM_001735_2_982-1000_35
AD-58243.1 UM	A-118441.2	UCAGAAGUCUUGAAGGA	287	A-118653.1	UCCUUCACAGACUUCUGA	370	NM_001735_2_4578-4596_36

[1004]

AD-58249.1 UM	A-118443.2	ACUGAAGCAUUUUGAUGCAA	288	A-118654.1	UUGCAUCAAAUUCUUCAGU	371	NM_001735.2_169-187_as
AD-58255.1 UM	A-118445.2	AGUUCUGUGUUAUAUUGJC	289	A-118655.1	GACAUUUUAACACAGAACU	372	NM_001735.2_2591-2609_as
AD-58279.1 UM	A-118423.3	CACUAUUAUUACUUGAUUU	290	A-118667.1	AAAUCAAGUAAUUUAUGUG	373	NM_001735.2_1522-1540_as
AD-58239.1 UM	A-118475.3	UAAUCUACAUAAUUUACUU	291	A-118668.1	AAGUAAUUUAUGUGAGUUA	374	NM_001735.2_1517-1535_as
AD-58245.1 UM	A-118427.3	ACAUAUAUACUCACUUAUA	292	A-118669.1	UUUAUGUGAGUUUUUUUGU	375	NM_001735.2_1511-1529_as
AD-58251.1 UM	A-118429.3	UCCUCUGGAAAUUGGCCUU	293	A-118670.1	AAGGCCAAUUUCCAGAGGA	376	NM_001735.2_2733-2751_as
AD-58257.1 UM	A-118431.3	CAAAUAUACUCACUUAUAU	294	A-118671.1	AUUUAUGUGAGUUUUUUUG	377	NM_001735.2_1512-1530_as
AD-58263.1 UM	A-118433.3	CUCUGGAAAUUGGCCUUA	295	A-118672.1	UGAAGGCCAAUUUCCAGAG	378	NM_001735.2_2735-2753_as
AD-58269.1 UM	A-118435.3	GCAAGAUUUUUUAUAUA	296	A-118673.1	UAUUUAUAAAUUUUUCUUGC	379	NM_001735.2_784-802_as
AD-58275.1 UM	A-118437.3	AAUGUUUUUGUCAAGUACA	297	A-118674.1	UGUACUUGCAAAAACAUU	380	NM_001735.2_4741-4762_as
AD-58280.1 UM	A-118439.3	UUAAAACACAGUACCUUU	298	A-118675.1	AAAGGUACUUUUUUUUUA	381	NM_001735.2_982-1009_as
AD-58240.1 UM	A-118441.3	UCAGAAGUCUGUGAAGGA	299	A-118676.1	UCCUUCACAGACUUUCUGA	382	NM_001735.2_4578-4596_as
AD-58246.1 UM	A-118443.3	ACUGAAGCAUUUUGAUGCAA	300	A-118677.1	UUGCAUCAAAUUCUUCAGU	383	NM_001735.2_169-187_as
AD-58252.1 UM	A-118445.3	AGUUCUGUGUUAUAUUGJC	301	A-118678.1	GACAUUUUAACACAGAACU	384	NM_001735.2_2591-2609_as

[1005] 表6.C5 dsRNA的修饰的有义链序列和反义链序列

[1006]

双链体身份	有义链	有义序列	SEQ ID NO:	反义	反义序列	SEQ ID NO:	物种名称 ⁵
AD-58143.1	A-118423.1	cAciUAAuuAcuuGauuuUdTsdT	385	A-118424.1	AAAUcAAgUAAUuAUuAGUGdTsdT	468	
AD-58149.1	A-118425.1	UAAcucAcUuAUuAUuAcUuUdTsdT	386	A-118426.1	AAGUuAUuAUuAGUGAGUuAdTsdT	469	
AD-58155.1	A-118427.1	AcAAAuAAcucAcuAAAdTsdT	387	A-118428.1	UuAUuAGUGAGUuAUUUUGUdTsdT	470	
AD-58161.1	A-118429.1	uccuUcUGAAAUuUGGccuUdTsdT	388	A-118430.1	AAGGcAAUuUcCAGAGGAdTsdT	471	
AD-58167.1	A-118431.1	cAAAuAAcUcAcUuAAAdTsdT	389	A-118432.1	AUuAUuAGUGAGUuAUUUUGdTsdT	472	
AD-58173.1	A-118433.1	cUcUGGAAAUuUGGccUcAdTsdT	390	A-118434.1	UGAAGGcAAUuUcCAGAGdTsdT	473	
AD-58179.1	A-118435.1	GcAAGAUuuuuuuAUuAAAdTsdT	391	A-118436.1	uAUuAUuAAAAAUuAUUUGCAdTsdT	474	
AD-58185.1	A-118437.1	AAGuuuuuuGucAAGuAcAdTsdT	392	A-118438.1	UGuACUUGAcAAAAAUuUdTsdT	475	

[1007]

AD-58144.1	A-118439.1	uuAAAcAAcAAGuAcuuuuTsdT	393	A-118440.1	AAAAGuAcUUGUUGUUAUAJTsdT	476
AD-58150.1	A-118441.1	ueAGAAAuGucGUGAAGGAdTsdT	394	A-118442.1	UCCUUcAcAGAcUUCUGAdTsdT	477
AD-58156.1	A-118443.1	AcuGAAcGhuuGucGAAAdTsdT	395	A-118444.1	UUUGAUcAAAUUGCUUAGUdTsdT	478
AD-58162.1	A-118445.1	AGucucGuGUuAAAUGuAdTsdT	396	A-118446.1	GAUJUUAACAcAGAAAUcUdTsdT	479
AD-58168.1	A-118447.1	GAUuuGAGUuAAAGGAdTsdT	397	A-118448.1	UCCUUUAcACUcAAAUcUdTsdT	480
AD-58174.1	A-118449.1	uGAUGAAccuuGUAAGAAAdTsdT	398	A-118450.1	UUUUuUAAGGUUGUUAUAdTsdT	481
AD-58180.1	A-118451.1	cAucGGAcAuuuuuuuuuuTsdT	399	A-118452.1	AAUGUAAAuUGUUCcAAUuGdTsdT	482
AD-58186.1	A-118453.1	ccAGAAUucGGAGuuuuuuTsdT	400	A-118454.1	AUAuACUCCGAUUUCUGGdTsdT	483
AD-58192.1	A-118455.1	ccuGGGAGuuAAAcuAcAdTsdT	401	A-118456.1	GUGAGUUUAUcUCCcAGGdTsdT	484
AD-58198.1	A-118457.1	AAUcGUcAAcCuGUAAdTsdT	402	A-118458.1	UUUAcMGGUUGUAUUUdTsdT	485
AD-58204.1	A-118459.1	uGucAAcucAcAuuuGAdTsdT	403	A-118460.1	AUGAAAUUGUGAcUUGAGAdTsdT	486
AD-58210.1	A-118461.1	GuuGcAuuGcuuAAAdTsdT	404	A-118462.1	UUuuAAcAcAuuGcAAUcUdTsdT	487
AD-58216.1	A-118463.1	uAuccuGUAuuAAAUuuAdTsdT	405	A-118464.1	uuAAUUUUUUuuUAUGGUAuAdTsdT	488
AD-58222.1	A-118465.1	GAAGuuGcAGcuuuuuuuuTsdT	406	A-118466.1	AUAuAAuCGUcAAuCUcUdTsdT	489
AD-58228.1	A-118467.1	AGAAuuGAcuuuuuuuuuuTsdT	407	A-118468.1	UCcAAuAUGAUcAAUUUCUdTsdT	490
AD-58234.1	A-118469.1	ccuGAAuAAAUuuuuuuuuTsdT	408	A-118470.1	AACuAAAUUUUUuuUAUGGdTsdT	491
AD-58240.1	A-118471.1	GAUuAGuAuuuuuuuuuuuuTsdT	409	A-118472.1	UUUAcUAAGAUUUUUUUcUdTsdT	492
AD-58246.1	A-118473.1	uuAucAAAGuuAAAcAuuuTsdT	410	A-118474.1	AAUGUUuAAuACUUUGUAuAdTsdT	493
AD-58252.1	A-118475.1	ccuAcAAcCuGAAuucGGAdTsdT	411	A-118476.1	AcAAAUUcAGUUUGuAGGdTsdT	494
AD-58258.1	A-118477.1	GGAGcAAcAuuuuuuuuuuTsdT	412	A-118478.1	AAUGAcAAUUGUUUuUcUCCdTsdT	495
AD-58264.1	A-118479.1	AuGUAcAAcUGuAGuuAdTsdT	413	A-118480.1	UGAAcUAUGUUGUUuAGAUdTsdT	496
AD-58270.1	A-118481.1	GGAuuuAuuGGAAcAuuuTsdT	414	A-118482.1	AAAUUGUCCAAUUAUUUCcUdTsdT	497
AD-58276.1	A-118483.1	uAAGAAuuuuGAAuuuuuuTsdT	415	A-118484.1	AGUAUUUUcAAAUUUUUuAdTsdT	498
AD-58282.1	A-118485.1	uuucGcAAcGAAuuuGAdTsdT	416	A-118486.1	AUCGAUUUGAUUGUUGGAAAdTsdT	499
AD-58288.1	A-118487.1	ccuucGAAAGGGuuuuuuuuuTsdT	417	A-118488.1	UGAAAUcCUUUUCcAAAGGdTsdT	500
AD-58294.1	A-118489.1	uGAUAAuAAuuuuuuuuuuTsdT	418	A-118490.1	GUAAcUAAUUUUUUuUAUAdTsdT	501
AD-58300.1	A-118491.1	cuuGGAAAGGGuuuuuuuuuTsdT	419	A-118492.1	UUcAAuAcCUUUUCcAGGdTsdT	502

[1008]

AD-58190.1	A-118519.1	CACUAUAUAUCUUSAUUUdTGT	420	A-118520.1	AAUCAAUAUAUAUGUGtGT	503
AD-58196.1	A-118521.1	UAAUCACUAUAUAUAUCUdTGT	421	A-118522.1	AAGUAUAUAUGUGAGUAdTGT	504
AD-58202.1	A-118523.1	ACAANAUAUCACUAUAAdtGT	422	A-118524.1	UUUAUGUGAGUAUUUUUGdtGT	505
AD-58208.1	A-118525.1	UCCUCUGGAUUUGCCUAdtGT	423	A-118526.1	AAGGCCAAUUCACAGAGGdtGT	506
AD-58214.1	A-118527.1	CAAAUAACUCACUAUAAdtGT	424	A-118528.1	AUUUAUGUGAGUAUUUUUGdtGT	507
AD-58220.1	A-118529.1	UUCUGGAUUUGCCUUCAdtGT	425	A-118530.1	UGAAGCCAAUUCACAGAdtGT	508
AD-58226.1	A-118531.1	GCAAGUAUUUUUAUAAdtGT	426	A-118532.1	UAUUUAATAAUUCUUGCdtGT	509
AD-58231.1	A-118533.1	AUUGUUUUGUCAAGUAdtGT	427	A-118534.1	UGUACUUGACAAAACAUAUdTGT	510
AD-58191.1	A-118535.1	UUAACAACAAGUACCUUdTGT	428	A-118536.1	AAAGGUACUUGUGUUAUAAdtGT	511
AD-58197.1	A-118537.1	UCAGAAAGUCUGUAGAGAdtGT	429	A-118538.1	UCCUUCACAGACUUUUGAGdtGT	512
AD-58203.1	A-118539.1	ACUGAAGCAUUUGAGCAAdtGT	430	A-118540.1	UUSCAUCAAUGCUUCAGUdtGT	513
AD-58209.1	A-118541.1	AGUUCUGUUAATAUUGCdtGT	431	A-118542.1	GACAUUUAACAACAAGCAUdtGT	514
AD-58233.1	A-118565.1	CACTUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	432	A-118566.1	AAAUCAAGUUAUAUAUAUAUAAdtGT	515
AD-58193.1	A-118567.1	UFAAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	433	A-118568.1	AAGUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	516
AD-58199.1	A-118569.1	ACAATAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	434	A-118570.1	UUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	517
AD-58205.1	A-118571.1	UFCUUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	435	A-118572.1	AAGGCCAAUUCACAGAGGdtGT	518
AD-58211.1	A-118573.1	CAAAAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	436	A-118574.1	AUUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	519
AD-58217.1	A-118575.1	CUUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	437	A-118576.1	UGAAGGCCAAUUCACAGAGdtGT	520
AD-58223.1	A-118577.1	GCAAGUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	438	A-118578.1	UUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	521
AD-58229.1	A-118579.1	AUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	439	A-118580.1	UUGUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	522
AD-58234.1	A-118581.1	UUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	440	A-118582.1	AAAGGUACUUGUGUUAUAUAUAAdtGT	523
AD-58194.1	A-118583.1	UFCAGAAAGUUAUAUAUAUAUAAdtGT	441	A-118584.1	UCCUUCACAGACUUAUAUAUAAdtGT	524
AD-58200.1	A-118585.1	ACUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	442	A-118586.1	UUUGUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	525
AD-58206.1	A-118587.1	AGUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	443	A-118588.1	GACUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	526
AD-58236.1	A-118642.2	CAUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	444	A-118644.1	AAAUCAAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	527
AD-58242.1	A-118625.2	UAUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	445	A-118645.1	AAGUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	528
AD-58248.1	A-118627.2	ACAUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	446	A-118646.1	UUUAUAUAUAUAUAUAUAUAAdtGT	529

[1009]

AD-58254.1	A-118429.2	ucccuGGAAAuuuGGccuudTsdT	447	A-118647.1	AAGGcAAUuUcCAGAGGAdTsdT	530
AD-58260.1	A-118431.2	CAAAuAAcucAcuAAuAdTsdT	448	A-118648.1	AUuAuAGuGAGUuAuUuuGgTsdT	531
AD-58266.1	A-118433.2	cucuGGAAAuGGccuucAdTsdT	449	A-118649.1	UGAAGGcCAuUcCAGAGGtTsdT	532
AD-58272.1	A-118435.2	GcAAGuAuuuuuAuAAuAdTsdT	450	A-118650.1	uAUuAAAAAuAUcuUGcCdTsdT	533
AD-58277.1	A-118437.2	AuGuuuuuGucAAGuAcAdTsdT	451	A-118651.1	uGuACuuGACAAAAAcAuUdTsdT	534
AD-58237.1	A-118439.2	uuAAA-cAACAAGuAuccuudTsdT	452	A-118652.1	AAAGGuACuuGuuGuUuAAAdTsdT	535
AD-58243.1	A-118441.2	ucAGAAAuGucuGuGAAGAdTsdT	453	A-118653.1	UCCuUcAcAGACuUcCuGAdTsdT	536
AD-58249.1	A-118443.2	AcuGAAGcAuuuGAuGcAdTsdT	454	A-118654.1	uuGcAUcAAuUGCuUcAGUdTsdT	537
AD-58255.1	A-118445.2	AGhuucuGuuuAAAuGuccTsdT	455	A-118655.1	GAcAuUuUAcAcAGAACuJdTsdT	538
AD-58279.1	A-118423.3	cAcuAuAAuAcuuGAuuudTsdT	456	A-118667.1	AAAUcAAAGuuAuuuAuAgudTsdT	539
AD-58239.1	A-118425.3	uAAcucAcuAAuAAuAcuudTsdT	457	A-118668.1	AAGuAuUuAuGUGuGAGuuadTsdT	540
AD-58245.1	A-118427.3	AcAAAuAAcucAcuAAuAdTsdT	458	A-118669.1	UuAuAGuGAGuuAuuuugudTsdT	541
AD-58251.1	A-118429.3	ucccuGAAAuGGccuudTsdT	459	A-118670.1	AAGGcCAuUcCAGAGgAdTsdT	542
AD-58257.1	A-118431.3	CAAAuAAcucAcuAAuAdTsdT	460	A-118671.1	AuUuAGuGAGuuAuuuugdTsdT	543
AD-58263.1	A-118433.3	cucuGGAAAuGGccuucAdTsdT	461	A-118672.1	UGAAGcCAuUcCAGAGd TsdT	544
AD-58269.1	A-118435.3	GcAAGuAuuuuuAuAAuAdTsdT	462	A-118673.1	UAuUuAAAAAuAuCuugcdTsdT	545
AD-58275.1	A-118437.3	AuGuuuuuGucAAGuAcAdTsdT	463	A-118674.1	UGuACuUgACAAAAcAuudTsdT	546
AD-58280.1	A-118439.3	uuAAA-cAACAAGuAuccuudTsdT	464	A-118675.1	AAAGGuACuUGuuGuuuuadTsdT	547
AD-58240.1	A-118441.3	ucAGAAAuGucuGuGAAGAdTsdT	465	A-118676.1	UCCuUcAcAGACuUcCuGAdTsdT	548
AD-58246.1	A-118443.3	AcuGAAGcAuuuGAuGcAdTsdT	466	A-118677.1	UuGcUCAAAuUGCuUcAgudTsdT	549
AD-58252.1	A-118445.3	AGhuucuGuuuAAAuGuccTsdT	467	A-118678.1	GACAuUuUAcAcAGACuGdTsdT	550

[1010] ⁵物种寡聚物名称和反义链靶向的基因库记录的核苷酸序列中的位置相应于表5中示出的那些。

[1011] 表7-使用Ga1NAC缀合的iRNA的Hep3B细胞中的C5单次剂量筛选

[1012]

双链体身 份	10nM	0.1nM	10nM	0.1nM
	AVG	AVG	STDEV	STDEV
AD-58093.1	15.62	21.60	7.48	6.52
AD-58099.1	9.07	14.70	1.18	4.65
AD-58105.1	36.71	60.23	5.07	19.83
AD-58111.1	11.83	22.78	3.51	12.75
AD-58117.1	12.43	33.46	2.00	23.56
AD-58123.1	8.05	15.18	2.89	7.94
AD-58129.1	10.77	40.06	1.30	19.66
AD-58088.1	6.55	16.40	1.24	4.58
AD-58094.1	19.59	40.68	7.64	12.30
AD-58100.1	10.92	20.12	0.74	8.38
AD-58106.1	10.97	37.23	2.49	19.95
AD-58112.1	13.24	29.32	2.90	14.08
AD-58118.1	6.63	15.23	0.54	5.72
AD-58124.1	7.17	13.00	1.44	6.48
AD-58130.1	10.38	17.92	2.36	6.92
AD-58089.1	8.81	30.67	2.91	10.53
AD-58095.1	8.72	14.66	1.04	3.37
AD-58101.1	8.17	19.36	1.30	5.69
AD-58107.1	4.84	18.10	1.66	7.21
AD-58113.1	8.78	14.62	1.77	7.89
AD-58119.1	8.90	15.01	0.91	7.35
AD-58125.1	11.13	17.04	2.61	9.03
AD-58131.1	13.50	40.14	1.08	12.07
AD-58090.1	7.90	21.57	2.95	6.61
AD-58096.1	8.02	16.56	1.54	6.68
AD-58102.1	12.40	27.93	1.83	11.78
AD-58108.1	12.02	15.07	2.88	5.74
AD-58114.1	11.86	25.05	1.48	9.46
AD-58120.1	7.65	10.57	0.58	3.56
AD-58126.1	8.45	15.39	2.08	7.42

[1013]

AD-58132.1	8.50	19.26	2.52	9.38
AD-58091.1	8.68	18.05	2.95	6.62
AD-58097.1	9.31	23.02	0.67	10.10
AD-58103.1	8.53	17.23	2.90	7.27
AD-1955	57.41	81.16	10.76	5.29
模拟物	78.61	75.97	5.70	2.76
未处理	100	100	6.13	5.98

[1014] 表8-使用GalNAC缀合的iRNA的原代小鼠肝细胞中的单次剂量转染筛选

[1015]

双链体身份	10nM	0.1nM	10nM	0.1nM
	AVG	AVG	STDEV	STDEV
AD-58093.1	1.53	1.65	0.17	0.25
AD-58099.1	1.65	1.50	0.61	0.22
AD-58105.1	11.20	46.95	0.08	3.89
AD-58111.1	2.49	2.13	0.26	0.20
AD-58117.1	3.57	31.91	0.93	0.62
AD-58123.1	4.29	2.97	0.11	2.22
AD-58129.1	1.19	8.53	0.23	0.72
AD-58088.1	0.84	1.34	0.68	0.07
AD-58094.1	11.34	66.82	0.17	3.01
AD-58100.1	2.78	1.51	0.43	0.33
AD-58106.1	6.79	52.91	4.42	6.78
AD-58121.1	1.94	2.15	0.04	0.91
AD-58133.1	1.74	3.25	0.19	1.64
AD-58116.1	1.76	2.21	1.27	0.78
AD-1955	87.39	91.71	5.77	4.68
模拟物	79.67	89.02	1.51	3.91
未处理	100	100	6.39	13.11

[1016] 表9-使用GalNAC缀合的iRNA的原代食蟹猴肝细胞中的C5单次剂量筛选

双链体身 份	500nM AVG	5nM AVG	500nM STDEV	5nM STDEV
AD-58093.1	63.94	83.09	2.14	12.65
AD-58099.1	61.34	85.85	12.32	21.95
AD-58105.1	91.98	97.57	6.09	11.48
AD-58111.1	71.27	92.28	1.93	12.72
AD-58117.1	73.42	88.82	3.24	11.08
AD-58123.1	75.14	73.06	7.72	9.71
AD-58129.1	81.66	90.62	2.13	4.77
AD-58088.1	53.63	87.03	5.93	19.86
AD-58094.1	89.62	93.65	0.87	14.76
AD-58100.1	79.56	96.70	4.31	1.10
AD-58106.1	116.24	125.99	14.28	40.65
AD-58112.1	97.19	107.81	N/A	3.13
AD-58118.1	67.40	97.38	5.28	22.64
AD-58124.1	58.04	96.14	8.72	10.64
AD-58130.1	84.19	88.65	10.50	4.34
AD-58089.1	83.83	83.44	1.91	12.26
AD-58095.1	58.53	78.02	15.07	12.45
AD-58101.1	76.68	76.73	3.95	6.35
AD-58107.1	57.37	86.78	14.71	2.99
AD-58113.1	37.79	71.10	8.27	7.76
AD-58119.1	36.77	83.16	3.42	9.66
AD-58125.1	72.40	96.53	4.46	4.96
AD-58131.1	95.58	101.69	10.17	2.21
AD-58090.1	56.37	75.00	3.21	4.97
AD-58096.1	44.33	57.99	11.46	25.17
AD-58102.1	95.46	89.35	0.83	1.76
AD-58108.1	41.54	56.41	8.41	0.14
AD-58114.1	88.32	101.88	20.02	30.29
AD-58120.1	37.34	56.41	0.73	2.14
AD-58126.1	84.97	105.90	2.39	7.96
AD-58132.1	81.55	85.12	12.93	8.94
AD-58091.1	78.88	84.60	44.66	17.40
AD-58097.1	106.06	98.16	13.74	3.14
AD-58103.1	57.21	89.46	6.40	5.93
未处理	100	100	8.77	10.33

[1017]

[1018] 表10-使用GalNAC缀合的iRNA的原代小鼠肝细胞中的C5单次剂量自由摄取筛选

[1019]

双链体身份	500nM AVG	5nM AVG	500nM STDEV	5nM STDEV
AD-58093.1	31.62	64.91	7.13	8.39
AD-58099.1	9.46	29.63	1.29	5.66
AD-58105.1	84.77	96.41	5.22	1.89
AD-58111.1	17.35	50.95	1.21	3.16
AD-58117.1	94.95	139.52	15.43	43.39
AD-58123.1	13.07	44.58	2.11	3.49
AD-58129.1	68.87	85.04	2.62	4.42
AD-58088.1	17.61	48.22	2.22	3.40
AD-58094.1	95.92	104.23	4.16	6.53
AD-58100.1	34.92	61.71	1.30	2.15
AD-58106.1	85.26	107.53	2.30	3.38
AD-58121.1	12.88	43.76	1.41	1.28
AD-58133.1	20.97	42.76	0.24	0.11
AD-58116.1	8.35	38.04	1.35	1.40
未处理	100.00	100.00	3.85	4.38

[1020]

表11-使用Ga1NAC缀合的iRNA的原代食蟹猴肝细胞中的IC₅₀数据

双链体身份	IC ₅₀ (nM)	STDEV
AD-58099.1	3.131	1.141
AD-58111.1	12.750	5.280
AD-58123.1	0.679	7.587

[1021]

AD-58088.1	0.218	3.487
AD-58113.1	7.296	3.540
AD-58119.1	33.240	14.740
AD-58096.1	10.380	4.199
AD-58108.1	0.953	10.080
AD-58120.1	36.170	88.070

[1022]

表12-使用Ga1NAC缀合的iRNA的原代小鼠肝细胞中的IC₅₀数据

[1023]

双链体身份	IC ₅₀ (nM)	STDEV
AD-58099	3.777	0.122
AD-58111	0.622	2.421
AD-58123	0.549	1.626
AD-58088	9.513	2.588
AD-58121	2.169	1.176
AD-58133	3.802	1.006
AD-58116	2.227	0.604

AD-58644.1	4.596	0.3506
AD-58651.1	59.76	51.99
AD-58641.1	0.82	0.2618
AD-58648.1	7.031	1.256
AD-58642.1	0.5414	0.7334
AD-58649.1	3.32	4.922
AD-58647.1	1.356	0.5215
AD-586541	2.09	0.8338
AD-58645.1	2.944	0.3315
AD-58652.1	5.316	2.477
AD-58643.1	2.179	1.112
AD-58650.1	8.223	3.76
AD-58646.1	2.581	0.8186
AD-58653.1	2.451	1.249

[1024] 表13-使用修饰的和未修饰的iRNA的Hep3B细胞中的C5单次剂量筛选

[1025]

双链体身份	1nM AVG	0.01nM AVG	1nM STDEV	0.01nM STDEV
AD-58143.1	12.13	100.58	3.47	3.94
AD-58149.1	10.46	64.97	0.98	0.00
AD-58155.1	44.88	76.24	1.56	3.74
AD-58161.1	8.51	102.30	1.06	0.50
AD-58167.1	6.54	76.24	1.15	3.74
AD-58173.1	6.85	107.44	0.85	4.74
AD-58179.1	10.19	78.07	0.59	1.15
AD-58185.1	29.46	79.99	3.64	0.78
AD-58144.1	16.82	81.95	1.09	0.40
AD-58150.1	11.05	76.20	2.55	0.00
AD-58156.1	25.92	76.73	2.72	1.50
AD-58162.1	13.25	71.89	0.43	3.87
AD-58168.1	9.74	45.16	0.52	1.11
AD-58174.1	4.84	70.14	0.25	2.75
AD-58180.1	9.41	56.77	1.91	1.95
AD-58186.1	9.97	68.91	1.03	0.34
AD-58145.1	14.29	103.38	1.94	2.03
AD-58151.1	10.16	81.17	1.71	4.77
AD-58157.1	4.72	63.19	1.05	0.00
AD-58163.1	4.95	40.13	1.65	0.59
AD-58169.1	17.02	83.10	1.88	2.04
AD-58175.1	8.30	62.54	0.28	0.31
AD-58181.1	21.89	55.26	4.22	3.52
AD-58187.1	61.96	71.12	2.61	2.79
AD-58146.1	14.25	95.23	2.64	6.53
AD-58152.1	11.22	70.09	0.80	7.88
AD-58158.1	7.96	98.86	0.76	4.36
AD-58164.1	11.60	43.83	2.06	3.43
AD-58170.1	12.28	39.59	0.96	1.36
AD-58176.1	6.89	38.77	1.04	1.33
AD-58182.1	18.65	55.78	0.96	0.55

[1026]

AD-58188.1	5.40	69.39	1.07	0.34
AD-58147.1	8.22	106.66	0.77	2.61
AD-58153.1	68.10	104.17	4.44	18.29
AD-58159.1	8.76	81.41	1.54	2.79
AD-58190.1	21.94	77.26	2.23	0.76
AD-58196.1	15.97	72.43	1.07	5.32
AD-58202.1	11.99	93.83	5.34	2.76
AD-58208.1	18.63	52.07	12.88	2.55
AD-58214.1	6.85	94.15	0.51	2.31
AD-58220.1	11.50	78.34	3.85	0.77
AD-58226.1	5.77	57.75	1.71	1.13
AD-58231.1	7.23	75.67	1.07	0.74
AD-58191.1	35.40	66.17	5.50	4.21
AD-58197.1	12.05	67.49	1.70	0.33
AD-58203.1	15.16	66.80	1.46	1.31
AD-58209.1	7.58	71.23	3.58	6.28
AD-58233.1	27.01	86.02	0.86	0.42
AD-58193.1	15.37	99.85	1.44	0.00
AD-58199.1	21.52	78.39	6.02	16.40
AD-58205.1	24.13	78.88	5.46	0.77
AD-58211.1	16.38	32.37	2.61	0.48
AD-58217.1	12.23	70.16	0.29	3.44
AD-58223.1	8.51	72.85	3.01	1.79
AD-58229.1	5.50	75.93	1.96	0.37
AD-58234.1	46.86	101.94	15.59	0.00
AD-58194.1	14.49	107.05	2.47	4.20
AD-58200.1	16.21	61.04	0.96	1.20
AD-58206.1	13.25	37.73	2.82	2.03
AD-58236.1	8.29	119.17	1.16	2.92
AD-58242.1	12.05	102.69	0.44	4.03
AD-58248.1	62.78	83.41	15.22	3.27
AD-58254.1	11.18	100.54	1.59	0.00
AD-58260.1	8.42	71.84	1.10	0.35
AD-58266.1	14.05	92.21	1.91	2.26
AD-58272.1	22.63	81.11	1.62	1.59

[1027]

AD-58277.1	70.51	75.67	4.80	0.74
AD-58237.1	28.10	98.56	1.96	5.79
AD-58243.1	14.16	86.05	1.11	2.95
AD-58249.1	77.08	96.45	15.14	0.95
AD-58255.1	12.27	47.89	2.58	0.00
AD-58279.1	25.78	94.13	5.52	0.46
AD-58239.1	22.98	83.45	0.28	4.91
AD-58245.1	89.60	90.93	15.24	0.45
AD-58251.1	28.39	86.32	7.29	0.00
AD-58257.1	48.97	64.53	9.10	1.90
AD-58263.1	9.14	83.39	1.27	1.63
AD-58269.1	83.84	75.94	15.90	1.12
AD-58275.1	10.29	86.32	0.73	0.85
AD-58280.1	72.77	110.04	7.44	3.24
AD-58240.1	65.42	75.69	3.82	2.23
AD-58246.1	59.19	65.88	28.95	0.65
AD-58252.1	15.35	97.26	1.14	7.62
模拟物	76.53	66.57	14.26	4.72
AD-1955	72.30	82.72	19.54	49.99
未处理	100.00	100.00	21.68	26.78

[1028] 表14-使用修饰的和未修饰的iRNA的原代小鼠肝细胞中的C5单次剂量筛选

[1029]

双链体身份	1nM AVG	0.1nM AVG	1nM STDEV	0.1nM STDEV
AD-58143.1	4.51	81.77	3.13	8.75
AD-58149.1	4.65	73.16	3.14	20.17
AD-58155.1	65.56	79.74	4.66	9.36
AD-58161.1	16.82	81.11	6.22	7.43
AD-58167.1	4.72	77.12	1.17	14.25
AD-58173.1	5.57	76.00	3.14	13.52
AD-58179.1	14.55	77.88	1.44	18.40
AD-58185.1	15.69	72.59	8.67	7.81
AD-58144.1	8.70	91.49	0.90	7.08

[1030]

AD-58150.1	12.51	84.01	1.64	8.20
AD-58156.1	18.23	97.32	1.47	19.50
AD-58162.1	7.72	78.89	5.19	13.80
AD-58190.1	11.86	92.80	2.82	4.41
AD-58196.1	7.27	82.71	1.39	31.81
AD-58202.1	10.67	87.11	1.04	35.79
AD-58208.1	32.21	74.39	8.60	27.45
AD-58214.1	4.24	67.63	0.45	17.85
AD-58220.1	13.64	96.14	4.56	14.36
AD-58226.1	3.83	63.44	1.30	11.94
AD-58231.1	5.95	82.24	2.80	17.36
AD-58191.1	14.50	99.50	5.48	5.53
AD-58197.1	16.12	93.09	0.81	3.21
AD-58203.1	12.52	104.63	5.98	6.02
AD-58209.1	8.79	59.35	3.05	13.07
AD-58233.1	9.50	64.26	5.69	8.70
AD-58193.1	8.88	89.60	3.36	3.08
AD-58199.1	13.56	87.14	2.18	6.44
AD-58205.1	46.84	89.13	4.48	17.16
AD-58211.1	13.10	111.62	1.10	21.54
AD-58217.1	29.79	117.49	11.85	20.41
AD-58223.1	20.53	105.44	1.94	2.98
AD-58229.1	13.76	98.15	1.05	9.03
AD-58234.1	12.33	71.34	0.72	4.17
AD-58194.1	14.02	90.60	1.39	15.64
AD-58200.1	5.25	90.95	1.37	31.70
AD-58206.1	8.19	109.47	3.99	21.75
AD-58236.1	2.07	70.19	0.80	20.59
AD-58242.1	4.76	53.26	1.59	11.56
AD-58248.1	62.42	78.23	5.47	25.85
AD-58254.1	16.47	70.22	2.92	21.74
AD-58260.1	2.84	75.65	0.38	11.59
AD-58266.1	40.70	89.88	16.05	11.57
AD-58272.1	21.42	59.44	13.29	10.98
AD-58277.1	71.72	121.44	16.35	21.16

[1031]

AD-58237.1	11.85	112.68	9.22	12.88
AD-58243.1	10.46	90.64	3.42	4.33
AD-58249.1	71.47	113.30	4.30	3.84
AD-58255.1	6.86	78.55	2.22	28.37
AD-58279.1	7.15	74.96	2.84	4.72
AD-58239.1	13.64	106.45	1.87	8.25
AD-58245.1	68.67	112.08	21.89	7.73
AD-58251.1	47.01	133.20	4.69	7.14
AD-58257.1	30.68	87.51	2.87	32.84
AD-58263.1	7.22	83.23	2.55	37.50
AD-58269.1	78.90	106.06	5.07	3.04
AD-58275.1	8.92	95.77	1.91	7.14
AD-58280.1	16.67	78.47	4.15	6.06
AD-58240.1	71.03	138.54	5.32	10.87
AD-58246.1	71.87	89.02	4.95	8.63
AD-58252.1	4.04	56.10	1.23	12.02
模拟物	66.84	82.81	2.75	17.19
AD-1955	87.44	102.07	3.64	4.08
未处理	100.00	100.00	15.25	18.37

[1032]

表15-使用修饰的和未修饰的iRNA的Hep3B细胞中的IC₅₀数据

[1033]

双链体身份	IC ₅₀ (pM)	STDEV
AD-58143.1	36.35	12.26
AD-58149.1	5.735	6.196
AD-58161.1	78.12	26.64
AD-58167.1	31.03	18.14
AD-58173.1	29.12	16.53
AD-58236.1	52.73	32.02
AD-58242.1	8.859	4.321
AD-58260.1	7.706	5.094
AD-58263.1	96.64	47.61

[1034]

表16-使用修饰的和未修饰的iRNA的原代小鼠肝细胞中的IC₅₀数据

[1035]

双链体身份	IC ₅₀ (pM)	STDEV
AD-58260.1	1.015	0.9676
AD-58149.1	1.309	1.749
AD-58167.1	1.991	2.477
AD-58242.1	0.5866	1.8
AD-5S236.1	0.4517	0.06392
AD-58143.1	0.8876	0.1613

AD-58279.1	3.116	0.7368
AD-58252.1	7.153	1.021
AD-58173.1	7.144	19.88
AD-58263.1	3.224	5.478

[1036] 实例3. 体内筛选

[1037] 选择七个GalNAC缀合的iRNA的亚组用于进一步体内评估。

[1038] 用10mg/kg的GalNAc缀合的双链体或等体积的1×杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)(美国生命技术公司,目录号14040133)对C57BL/6小鼠(每组N=3)进行皮下注射。48小时后,使小鼠安乐死并且解剖肝脏,并在液氮中迅速冷冻。在2000Geno/研磨机(SPEX样品制备公司(SPEX SamplePrep),新泽西州麦塔成(Metuchen,NJ))中研磨肝脏。使用每个样品近似10mg的肝脏粉末用于RNA分离。首先在组织溶解器II(凯杰公司,加利福利亚州瓦伦西亚(Valencia,CA))中对样品进行均质化,并且然后使用真空/自旋技术,使用RNeasy 96通用组织试剂盒(凯杰公司,目录号74881),根据制造商的方案提取RNA。通过NanoDrop 8000(赛默飞科技公司(Thermo Scientific),威明顿,DE)来测量RNA浓度并且调节至100ng/μl。如上所述进行cDNA和RT-PCR。

[1039] 单次剂量筛选的结果描绘于图2中。表17示出使用指定的GalNAC缀合的修饰的iRNA的体内单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于DPBS处理的小鼠的余留mRNA的百分比。“实验”列列出了从其中计算平均值的实验数目。在所分析的所有实验中,从一个组中的所有小鼠计算标准偏差。

[1040] 表17-体内C5单次剂量筛选

[1041]

双链体身份	实验	AVG	STDEV
AD-58088.2	2	82.66	13.54
AD-58644.1	1	37.79	9.63
AD-58651.1	1	75.33	5.21
AD-58099.2	2	71.94	15.45
AD-58641.1	1	20.09	4.09
AD-58648.1	1	48.43	9.07
AD-58111.2	3	67.17	13.60
AD-58642.1	2	21.78	5.32
AD-58649.1	1	45.30	14.02
AD-58116.2	2	70.16	10.32
AD-58647.1	1	26.77	4.14
AD-58654.1	1	50.06	27.85
AD-58121.2	2	52.56	13.00
AD-58645.1	1	24.60	1.29
AD-58652.1	1	52.67	3.87
AD-58123.2	2	65.70	9.60
AD-58643.1	1	23.21	2.41
AD-58650.1	1	46.75	14.10

AD-58133.2	3	51.98	13.45
AD-58646.1	2	28.67	5.34
AD-58653.1	1	43.02	10.61
PBS	3	100.00	9.03

[1042] 进一步修饰两种最有效的GalNAc缀合的iRNA以包括另外的硫代磷酸酯键联(表18),并且如上所述在体内确定这些双链体的功效。单次剂量筛选的结果描绘于图3中,并且证实了具有另外的硫代磷酸酯键联的iRNA试剂比不具有或具有较少硫代磷酸酯键联的那些iRNA试剂更有效。

[1043] 表18-硫代磷酸酯修饰的GalNAc缀合的C5 iRNA

双链体身份	有义链	有义序列	反义	反义序列	SEQ ID NO:	交叉反应性
AD-58642.1	A-119324.1	GfcaacCfaAfaAfaATAfCfcaCfaAfaAfaUfl.96	A-119325.1	asUfsuAfaAfgUfgAfgmuAfaUfuUfgUfcsasa	555	人恒河猴小鼠 大鼠
AD-58111.2	A-118316.1	GfaCfaAfaAfaATAfCfcaCfaAfaAfaUfl.96	A-118317.1	gUfuAfaAfgUfgAfgmuAfaUfuUfgUfcsAfsa	556	人恒河猴小鼠 大鼠
AD-58646.1	A-119332.1	ChaacGfaUfcAfaARfAfcAfaUfuUfcaAfgUfl.96	A-119333.1	asCfsuGfcaAfaUfuGfuquUfuGfuUfclUfgscsa	557	小鼠大鼠
AD-58133.2	A-118386.1	CfcaGfaUfcAfaARfAfcAfaUfuUfcaAfgUfl.96	A-118387.1	gaCfcaGfaAfaUfuGfuquUfuGfuUfclUfgscfca	558	小鼠大鼠

[1045] 考虑到另外的硫代磷酸酯键联对以上描述的iRNA试剂的沉默能力的影响,如上所

述在体内确定包括硫代磷酸酯键联的另外GalNAC缀合的iRNA双链体(表19)的功效。这个单次剂量筛选的结果描绘于图4中。

[1046] 通过向大鼠给予单次2.5mg/kg、10mg/kg或25mg/kg的剂量来确定体内AD-58642的沉默持续时间,并且确定在第7天存在的C5蛋白的量(图5B)和在第4天和第7天存在的C5蛋白的活性(图5A)。如在图5中所证实,在25mg/kg剂量下,到第4天C5蛋白的活性降低50%,并且在第7天,C5蛋白的活性降低大于70%。

[1047] 通过全血清的蛋白质印迹分析来确定C5蛋白的量。通过溶血测试来确定C5蛋白的活性。简言之,将人C5缺失的人血清的固定稀释物与小鼠血清混合,并且用抗体涂覆的绵羊红血细胞孵育1小时。测量血红蛋白吸光度,并且计算与参比曲线(使用小鼠血清的一系列稀释物制备)相比的%溶血。

[1048] 还在单次皮下注射1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg的AD-58642之后,在小鼠中测定体内AD-58642的功效。在第5天,使用qPCR在肝脏样品中测定C5 mRNA,对于溶血测定C5活性,并且通过全血清的蛋白质印迹分析来确定C5蛋白的量。

[1049] 如在图6A和图6B中所描绘,虽然与10mg/kg剂量相比,在25mg/kg的剂量下AD-58642抑制C5 mRNA的功效仅存在微小改进(即,约5%),但使用25mg/kg剂量的沉默的平均值是85%,另外,存在IC₅₀是约2.5mg/kg的剂量响应作用。

[1050] 图7A和图7B和图8证实了AD-58642有效用于降低C5蛋白的量(图8)和C5蛋白活性(图7A和图7B)。

[1051] 还通过向C57B1/6(n=3)小鼠皮下给予单次0.625mg/kg、1.25mg/kg、2.5mg/kg、5.0mg/kg或10mg/kg剂量的AD-58641来确定体内AD-58641沉默的持续时间,并且通过ELISA确定在第5天和第9天存在于这些动物中的C5蛋白的量。简言之,在第0天(放血前)、第5天和第9天收集血清,并且通过ELISA定量C5蛋白的水平。将C5蛋白水平归一化成第0天放血前的水平。如在图9中所描绘,结果证实了存在剂量依赖型有效的和持久的C5血清蛋白敲低。(单次剂量ED₅₀是0.6mg/kg)。

[1052] 还使用多次给药的给予方案测试化合物AD-58641在C57B1/6小鼠中的功效。在第0天、第1天、第2天和第3天,以0.625mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg剂量皮下给予小鼠化合物AD-58641。如在图10中所示,在第0天和第8天收集血清,并且通过ELISA分析C5蛋白水平。将C5水平归一化成第0天放血前的水平。图10示出在所测试的所有剂量下,多次给药AD-58641实现了C5蛋白的沉默,其中在2.5mg/kg的剂量下C5蛋白的沉默大于90%。

[1053] 进一步测试化合物AD-58641的功效,并且使用重复给予方案评估该化合物在大鼠中的累积作用。每周两次以2.5mg/kg/剂量或5.0mg/kg/剂量,用化合物AD-58641皮下注射野生型斯普拉道来(Sprague Dawley)大鼠,持续3周(q2w×3)。在第0天、第4天、第7天、第11天、第14天、第18天、第25天和第32天收集血清。使用溶血测定来定量血清溶血活性,其中在GVB++缓冲液中用敏化的绵羊大鼠血细胞孵育大鼠血清的1:150稀释物持续3小时,并且通过测量415nm处的吸光度来定量血红蛋白释放(参见图11A)。还通过ELISA确定样品中存在的C5蛋白的量(图11B)。结果证实了在溶血活性方面存在剂量依赖型有效的和持久的降低,从而实现约90%溶血活性抑制。

[1054] 表19-另外的硫代磷酸酯修饰的GalNAC缀合的C5 iRNA

[1055]

双链体身 份	有义链	有义序列	SEQ ID NO:	反义	反义序列	SEQ ID NO:	起始 位置	交叉反应性	PS#
AD-58088.2	A-118324.1	AfaUfaAfaAfcAFAFCfaAfgUfaCfcUfaUfL.96	559	A-118325.1	aaAfaGfgUfaCfutUfguuGfuUfaAfaAfusCfsu	580	984	人恒河猴小鼠	2
AD-58644.1	A-119328.1	AfsusUfuAfaAfcAFAFCfaAfgUfaCfcUfaUfL.96	560	A-119329.1	asAfsaGfgUfaCfutUfguuGfuUfaAfaAfuscu	581	984	人恒河猴小鼠	6
AD-58651.1	A-119328.2	AfsusUfuAfaAfcAFAFCfaAfgUfaCfcUfaUfL.96	561	A-119339.1	asAfsaGfsgUfsaCfsaUfsguuGfsaUfsaAfsaAfsuscfsu	582	984	人恒河猴小鼠	14
AD-58099.2	A-118312.1	UfgAfcAfaAfaUFAFAfcUfcAfcUfaUfaAfl.96	562	A-118313.1	uuUfaUfaGfaGfaGfuaaUfuUfuGfuCfasAfsu	583	1513	人恒河猴小鼠 大鼠	2
AD-58641.1	A-119322.1	UfsgAfcAfaAfaUFAFAfcUfcAfcUfaUfaAfl.96	563	A-119323.1	uusUfsaUfaGfuGfaGfuaaUfuUfuGfuCfasasu	584	1513	人恒河猴小鼠 大鼠	6
AD-58648.1	A-119322.2	UfsgAfcAfaAfaUFAFAfcUfcAfcUfaUfaAfl.96	564	A-119336.1	uusUfsaUfsaGfsaGfsaGfsuaaUfsaUfsaGfsaCfsaasasu	585	1513	人恒河猴小鼠 大鼠	14
AD-58111.2	A-118316.1	GfaCfaAfaAfaAfaAfcfcCfaCfaAfaAfaUfL.96	565	A-118317.1	aaUfaAfaAfgUfgAfguaAfaUfuUfuUfgUfcsAfsa	586	1514	人恒河猴小鼠 大鼠	2
AD-58642.1	A-119324.1	GfisaCfaAfaAfaAfcfcCfaCfaAfaAfaUfL.96	566	A-119325.1	asUfsaAfaAfgUfgAfguaAfaUfuUfuUfgUfcsasa	587	1514	人恒河猴小鼠 大鼠	6
AD-58649.1	A-119324.2	GfisaCfaAfaAfaAfcfcCfaCfaAfaAfaUfL.96	567	A-119337.1	asUfsaAfsaAfsaGfsgUfsgAfsaUfsaUfsgUfscasasa	588	1514	人恒河猴小鼠 大鼠	14
AD-58116.2	A-118396.1	GfuUfcCfsgGfaUfaUfuUfgAfcUfaUfL.96	568	A-118397.1	aaAfaAfgUfuCfaAfaaUfcCfsgGfaAfcscfsg	589	4502	小鼠大鼠	2
AD-58647.1	A-119334.1	GfisuUfcCfsgGfaUfaUfuUfgAfcUfaUfL.96	569	A-119335.1	asAfsaAfgUfuCfaAfaaUfcCfsgGfaAfcscsg	590	4502	小鼠大鼠	6
AD-58654.1	A-119334.2	GfisuUfcCfsgGfaUfaUfuUfgAfcUfaUfL.96	570	A-119342.1	asAfsaAfsaUfsaCfsaAfsaUfscCfsgGfaAfcscsg	591	4502	小鼠大鼠	14
AD-58121.2	A-118382.1	UfgCfagGfaUfcAFAFAfcAfcAfaUfuUfcAfl.96	571	A-118383.1	aaGfaAfaUfRfGfRfGfuaaGfaUfUfgCfscGfisa	592	4945	小鼠大鼠	2
AD-58645.1	A-119330.1	UfsgCfagGfaUfcAFAFAfcAfcAfaUfuUfcAfl.96	572	A-119331.1	uusGfsaAfaUfuGfuGfuaaGfaUfUfgCfscGfisa	593	4945	小鼠大鼠	6
AD-58652.1	A-119330.2	UfsgCfagGfaUfcAFAFAfcAfcAfaUfuUfcAfl.96	573	A-119340.1	uusGfsaAfsaUfsaGfsaGfsaUfscUfscGfsaGfsa	594	4945	小鼠大鼠	14

[1059] 使用在基因库登记号NM_001735.2中列举的人C5 mRNA序列来设计有义链和反义链的长度均是19个核苷酸的C5双链体。最初鉴定出不含有长于7个核苷酸的重复、基本上跨越整个5480核苷酸转录物的569个双链体。然后根据在每个双链体位置处评估核苷酸对的线性模型和有待用于筛选的剂量和细胞系,针对预测的功效对所有569个双链体进行分类。还使用定制的brute分数算法将这些双链体与人RefSeq集中的所有转录物进行匹配,并且对于与除了C5以外的转录物的最少数目的错配(每个链)进行分类。然后根据以下方法,从569个双链体中选择有待合成和筛选的双链体:在转录物的5'端处开始,在每 10 ± 2 个核苷酸的“窗口”内选择双链体,该窗口

[1060] 1) 具有最高预测的功效,

[1061] 2) 在两个链中与除了SERPINC1以外的所有转录物具有至少一个错配,

[1062] 3) 还没有被合成并且筛选未其他双链体组的一部分。

[1063] 如果在满足所有标准的给定窗口内没有鉴定出双链体,跳过所述窗口。

[1064] 这569个C5有义链序列和反义链序列的详细列表表示于表20中。

[1065] 使用以下方法来确定包含被列于表20中的有义序列和反义序列的双链体的体外功效。

[1066] 细胞培养和转染

[1067] 将HepG2细胞(ATCC公司,弗吉尼亚州马纳萨斯)在 37°C 在5%CO₂的气氛中在伊格尔氏最低基础培养基(ATCC公司)(补充有10%FBS、链霉素以及谷氨酰胺(ATCC公司))中生长接近融合,然后通过胰酶消化从该板释放。通过向96孔板中的各个孔中,将每孔14.8 μl 的Opti-MEM加上0.2 μl 的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德CA目录号13778-150)添加至5 μl 的164个siRNA双链体中的每一个中来进行转染。然后在室温下将混合物孵育15分钟。然后将含有大约 2.5×10^4 个HepG2细胞的不具有抗生素的80 μl 完全生长培养基添加至siRNA混合物中。在RNA纯化之前,将细胞孵育24小时。在20nM下进行实验,并且包括首次用于实验的细胞和用AD-1955转染的细胞,荧光素酶靶向的siRNA作为阴性对照。

[1068] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件号:610-12)的总RNA分离

[1069] 收获细胞并且溶解于150 μl 的溶解/结合缓冲液中,然后在平台振荡器上(在整个过程中混合速度相同)在700rpm下混合5分钟。将10微升磁珠和80 μl 溶解/结合缓冲液混合物添加至圆底板,并且混合1分钟。使用磁台(magnetic stand)捕获磁珠,并且在不扰动这些珠粒的情况下去除上清液。在去除上清液之后,将溶解的细胞添加至余留的珠粒并且混合5分钟。在去除上清液之后,用150 μl 洗涤缓冲液A洗涤磁珠2次,并且混合1分钟。再次捕获珠粒并且去除上清液。然后用150 μl 洗涤缓冲液B洗涤珠粒,捕获并且去除上清液。接下来用150 μl 洗脱缓冲液洗涤珠粒,捕获并且去除上清液。允许珠粒干燥2分钟。在干燥之后,添加50 μl 的洗脱缓冲液,并且在 70°C 下混合5分钟。用磁体捕获珠粒持续5分钟。去除含有分离的RNA的40 μl 的上清液,并且添加至另一个96孔板中。

[1070] 使用ABI大容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统,福斯特市,加利福尼亚州,目录号4368813)的cDNA合成

[1071] 将每个反应2 μl 10 \times 缓冲液、0.8 μl 25 \times dNTP、2 μl 随机引物、1 μl 逆转录酶、1 μl 1RNA酶抑制剂和3.2 μl H₂O的主混合物添加到10 μl 总RNA中。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(赫力仕公司,CA),通过以下步骤产生cDNA: 25°C 10分钟, 37°C 120分钟, 85°C 5秒,

在4℃保持。

[1072] 实时PCR

[1073] 在384孔板(罗氏公司目录号04887301001)中,将2μl的cDNA添加至每孔含有0.5μl的人GAPDH TaqMan探针(应用生物系统目录号4326317E)、0.5μl人SERPINC1 TaqMan探针(应用生物系统目录号Hs00892758_m1)和5μl Lightcycler 480探针主混合物(罗氏公司目录号04887301001)的主混合物中。在LC480实时PCR机器(罗氏公司)中进行实时PCR。

[1074] 为了计算变化的相对倍数,使用ΔΔCt方法分析实时数据并且归一化成用20nM AD-1955转染的细胞进行的测定。

[1075] 表20:另外的C5未修饰的有义链序列和反义链序列

[1076]

寡聚物名称	NM 001735.2 中的位置	有义序列	SEQ ID NO:	反义序列	SEQ ID NO:
NM_001735.2_3-21_s	3-21	UAUCCGUGGUUUCUGCUA	601	UAGCAGGAAACCACGGAUUA	1170
NM_001735.2_10-28_s	10-28	GGUUUCCUGCUACCUCAA	602	UUGGAGGUAGCAGGAAACC	1171
NM_001735.2_22-40_s	22-40	CCUCCAACCAUUGGGCCUUU	603	AAAGGCCCAUGGUUGGAGG	1172
NM_001735.2_33-51_s	33-51	GGGCCUUUUGGGAUACUU	604	AAGUAUUCCCAAAAGGCC	1173
NM_001735.2_43-61_s	43-61	GGAAUACUUUGUUUUUAA	605	UUAAAAACAAGUAUUCC	1174
NM_001735.2_49-67_s	49-67	CUUUGUUUUUAAUCUUCC	606	GGAAGAUUAAAAACAAG	1175
NM_001735.2_63-81_s	63-81	CUUCCUGGGAAAACCUGG	607	CCAGGUUUUCCCGAGGAG	1176
NM_001735.2_71-89_s	71-89	GGAAAACCUUGGGACAGGA	608	UCCUGUCCCGAGGUUUCC	1177
NM_001735.2_81-99_s	81-99	GGGACAGGAGCAACAUAU	609	AUAUGUUUGCUCCUGUCC	1178
NM_001735.2_91-109_s	91-109	CAAAACAUUGUCAUUUCAG	610	CUGAAAUAGACAUUUGUUUG	1179
NM_001735.2_102-120_s	102-120	CAUUUCAGCACCAAAAUA	611	UAUUUUUGGUGCUGAAAUG	1180
NM_001735.2_109-127_s	109-127	GCACCAAAAUAUUCGUG	612	CACGGAAUAUUUUUGGUGC	1181
NM_001735.2_123-141_s	123-141	CCGUGUUGGAGCAUCUGAA	613	UUCAGAUUCUCCAACACGG	1182
NM_001735.2_130-148_s	130-148	GGAGCAUCUGAAAUAUUG	614	CAAUAUUUCAGAUUCUCC	1183
NM_001735.2_139-157_s	139-157	GAAAAUUUGUAUUC AAG	615	CUUGAAUCACAAUAUUUUC	1184
NM_001735.2_150-168_s	150-168	GAUUAAGUUUAUGGAUAC	616	GUAUCCAUAACUUGAAUC	1185
NM_001735.2_163-181_s	163-181	GGAUACACUGAAGCAUUUG	617	CAAAUGCUUCAGUGUAUCC	1186

[1077]

NM 001735.2 172-190 s	172-190	GAAGCAUUUGAUGCAACA	618	UUUGUCAUCAAUUGCUUC	1187
NM 001735.2 183-201 s	183-201	UGCAACAUCUCUAUAAA	619	UUUAAUAGAGAUUGUGCA	1188
NM 001735.2 189-207 s	189-207	AAUCUCUAUUAAAAGUUAU	620	AUAACUUUAUAUAGAGAUU	1189
NM 001735.2 201-219 s	201-219	AAGUUAUCUGAUAUAAAA	621	UUUUUAUCAGGAUAACUU	1190
NM 001735.2 209-227 s	209-227	CUGAUAAAAUUUUAUUA	622	UAACUAAAAUUUUUAUCAG	1191
NM 001735.2 221-239 s	221-239	UUAGUUACUCCUCAGGCCA	623	UGGCCUGAGGAGUAACUAA	1192
NM 001735.2 230-248 s	230-248	CCUCAGGCCAUGUUCAUUU	624	AAAUGAACAUUGCCUGAGG	1193
NM 001735.2 242-260 s	242-260	UUCAUUUAUCCUCAGAGAA	625	UUUCUCGAGGAUAAUUGAA	1194
NM 001735.2 252-270 s	252-270	CUCAGAGAAUAAAUUCCAA	626	UUGGAAUUUAUUCUCUGAG	1195
NM 001735.2 259-277 s	259-277	AAUAAAAUCCAAAAUCUG	627	CAGAGUUUUGGAUUUAUU	1196
NM 001735.2 273-291 s	273-291	CUCUGCAAUUUAACAUA	628	UAUUUUUAAGAUUGCAGAG	1197
NM 001735.2 282-300 s	282-300	CUUAAACAUAACAACAAA	629	UUUUUGUUUAUUGUUAAG	1198
NM 001735.2 292-310 s	292-310	CAACCAAAACAUAUUGCCUG	630	CAGGCAAUUGUUUUGGUUG	1199
NM 001735.2 301-319 s	301-319	CAAUUGCCUGGAGGACAAA	631	UUUGUCCUCCAGGCAAUUG	1200
NM 001735.2 313-331 s	313-331	GGACAAAACCCAGUUUCUU	632	AAGAAAACUGGGUUUUGUCC	1201
NM 001735.2 322-340 s	322-340	CCAGUUUCUUAUGUGUAUU	633	AAUACACAUAAAGAAACUGG	1202
NM 001735.2 332-350 s	332-350	AUGUGUAUUUGGAAGUUUGU	634	ACAACUUCCAAAUAACACAU	1203
NM 001735.2 342-360 s	342-360	GGAGUUGUAUCAAAGCAU	635	AUGCUUUGUAUCAAACUCC	1204
NM 001735.2 349-367 s	349-367	GUUAUCAAAGCAUUUUUCAA	636	UUGAAAAAUUCUUUGAUAC	1205
NM 001735.2 361-379 s	361-379	UUUUCAAAAUCAA AAAAGAA	637	UUCUUUUUGAUUUUUGAAAA	1206
NM 001735.2 371-389 s	371-389	CAAAAAGAAUUGCCAAUAAAC	638	GUUAUUGGCAUUCUUUUUG	1207

[1078]

NM 001735.2_381-399 s	381-399	GCCAAUAACCUAUGACA AU	639	AUUGUCAUAGGUUAUUGGC	1208
NM 001735.2_389-407 s	389-407	CCUAUGACA AUGGAUUUCU	640	AGAAAUCCA UUGUCAUAGG	1209
NM 001735.2_399-417 s	399-417	UGGAUUUCUUCU CAUUCAU	641	AUGAAUGAAGAGAAA UCCA	1210
NM 001735.2_411-429 s	411-429	CAUUCAUACAGACA AACCUCU	642	AGGUUUUGUCUGUAUGAAUG	1211
NM 001735.2_419-437 s	419-437	CAGACA AACCUGUUUAUAC	643	GUAAUAAACAGGUUUUGUCUG	1212
NM 001735.2_430-448 s	430-448	GUUUUAUACUCCAGACCAGU	644	ACUGGUCUGGAGUAUAAAC	1213
NM 001735.2_441-459 s	441-459	AGACCAGUCAGUAAAAGUU	645	AACUUUUACUGACTUGGUCU	1214
NM 001735.2_450-468 s	450-468	AGUAAAAGUUAGAGUUUAU	646	AUAAAACUUAACUUUUJACU	1215
NM 001735.2_460-478 s	460-478	AGAGUUUAUUCGUUGAAUG	647	CAUUCAACGAALUAAAACUCU	1216
NM 001735.2_470-488 s	470-488	CGUUUGAAUUGACGACUUGAA	648	UUCAAGUCGUCAUUUCACAGC	1217
NM 001735.2_483-501 s	483-501	CUUGAAGCCAGCCAAAAGA	649	UCUUUUUGGCGGCUUCUCAAAG	1218
NM 001735.2_490-508 s	490-508	CCAGCCAAAAGAGAAAACUG	650	CAGUUUCUCUUUUUGGCGUGG	1219
NM 001735.2_503-521 s	503-521	AAACUGUCUUAACUUUCAU	651	AUGAAAAGUUAAGACAGUUUU	1220
NM 001735.2_513-531 s	513-531	AACUUUCAUAGAUCCUGAA	652	UUCAGGAUCUAUGAAAAGUUU	1221
NM 001735.2_519-537 s	519-537	CAUJAGAUCUGAAGGAUCA	653	UGAUCCUUCAGGAUCUAUG	1222
NM 001735.2_529-547 s	529-547	GAAGGAUCAGAAGUUGACA	654	UGUCAACUUCUGAUCCUUC	1223
NM 001735.2_543-561 s	543-561	UGACAUUGGUAGAAGAAA AUU	655	AAUUUCUUUCUACCAUGUCA	1224
NM 001735.2_553-571 s	553-571	GAAGAAAUIUGAUCAUUAUG	656	CAAUJAGUAUCAUUIUCUUC	1225
NM 001735.2_562-580 s	562-580	GAUCAUUAUUGGAAUUUAUCU	657	AGAUAAUUCCAAUAUUAUC	1226
NM 001735.2_571-589 s	571-589	GGAAUUUAUCUUUUUCCUG	658	CAGGAAAAGAGAUAAUUC	1227
NM 001735.2_579-597 s	579-597	CUCUUUUCUCCAGUUCUCAAAG	659	CUUGAAGUCAGGAAAAGAG	1228

[1079]

NM 001735.2. 590-608 s	590-608	ACUUC AAGAUUCCGUCUAA	660	UUAGACGGAAUCUUGAAGU	1229
NM 001735.2. 601-619 s	601-619	CCGUCUAUCCUAGAUUG	661	CAUAUCUAGGAUUGAGCGG	1230
NM 001735.2. 610-628 s	610-628	CCUAGAUUGGUAUGUGGA	662	UCCACAUACCAUAUCUAGG	1231
NM 001735.2. 623-641 s	623-641	UGUGGACGAUC AAGGCUAA	663	UUAGCCUUGAUCGUCUACA	1232
NM 001735.2. 629-647 s	629-647	CGAUC AAGGCUAAAUAUA	664	UUUAUUUAGCCUUGAUCG	1233
NM 001735.2. 642-660 s	642-660	AUAUAAAAGAGACUUUCA	665	UGAAAAGUCCUCUUUAUAU	1234
NM 001735.2. 649-667 s	649-667	GAGGACUUUUC AACAACUG	666	CAGUUGUUGAAAAGUCCUC	1235
NM 001735.2. 662-680 s	662-680	CAACUGGAACCGCAUUAUU	667	AAAUUGCGGUUCCAGUUG	1236
NM 001735.2. 672-690 s	672-690	CGCAUAUUUUGAAGUAAA	668	UUUAACUUCAAAUAUUGCG	1237
NM 001735.2. 683-701 s	683-701	AAGUAAAAGAAUAUGUCUU	669	AAGACAUUUUCUUUAACUU	1238
NM 001735.2. 691-709 s	691-709	GAAUAUGUCUUGCCACAUU	670	AAUGUGGCAAGACAUAUUC	1239
NM 001735.2. 703-721 s	703-721	CCACAUUUUUCUGUCUCA	671	UUAGAGACAGAAAUAUGUGG	1240
NM 001735.2. 713-731 s	713-731	CUGUCUCAUUCGAGCCAGA	672	UCUGGCUCGAUUGAGACAG	1241
NM 001735.2. 719-737 s	719-737	CAAUCGAGCCAGAAUAUA	673	UUUAUUUCUGGCUCGAIUG	1242
NM 001735.2. 730-748 s	730-748	GAAUAUAAAUAUUCAUUGGUU	674	AACCAUUGAAAUAUAUUC	1243
NM 001735.2. 742-760 s	742-760	AUUGGUUACAAGAACUUUA	675	UAAAAGUUCUUGUAACCAAU	1244
NM 001735.2. 752-770 s	752-770	AGAAUUUAAGAAUUUUUGA	676	UCAAAAUUCUUAAGUUCU	1245
NM 001735.2. 762-780 s	762-780	GAAUUUUGAAAUAUUAUA	677	UAUAUAUUUCAAAUAUUC	1246
NM 001735.2. 769-787 s	769-787	GAAUUUACUAUAAAAGCAA	678	UUGCUUUUAUAGUAUUUC	1247
NM 001735.2. 781-799 s	781-799	AAAGCAAGAUUUUUUAUA	679	UAUAAAAUAUUCUUGCUUU	1248
NM 001735.2. 789-807 s	789-807	AUAUUUUUAUAAAAGUA	680	UACUUUAUUAUAAAAUAU	1249

[1080]

NM 001735.2.803-821 s	803-821	AAGUAGUCACUGAGGCUGA	681	UCAGCCUCAGUGACUACUU	1250
NM 001735.2.810-828 s	810-828	CACUGAGGCUGACGUUUU	682	AUAACGUCAGCCUCAGUG	1251
NM 001735.2.822-840 s	822-840	CGUUUAUACACAUUUGGA	683	UCCAAUUGUAUUAACG	1252
NM 001735.2.831-849 s	831-849	CACAUUUGGAUUAAGAGAA	684	UUCUCUUAUCCAAUUGUG	1253
NM 001735.2.840-858 s	840-858	AUAAGAGAAGACUUAAAA	685	UUUUAAGUCUUCUCUUAUU	1254
NM 001735.2.852-870 s	852-870	CUUAAAAAGAUCAAAAA	686	UUUUUGAUCUUCUUUAAG	1255
NM 001735.2.859-877 s	859-877	GAUGAUCAAAAAGAAUGA	687	UCAUUUCUUUUUGAUC	1256
NM 001735.2.872-890 s	872-890	AAUUGAUGCAACACGCAU	688	AUUGCUGUUUGCAUCAUUU	1257
NM 001735.2.883-901 s	883-901	ACAGCAUUGCAAAACACAA	689	UUGUGUUUGCAUUGCUGU	1258
NM 001735.2.893-911 s	893-911	AAAACACAUGUUGAUAAA	690	UUUAUCAACAUUGUGUUAUU	1259
NM 001735.2.899-917 s	899-917	CAAUGUUGAUAAAUGGAAU	691	AUUCCAUUUAUCAACAUUG	1260
NM 001735.2.913-931 s	913-931	GGAAUUGCUAAGUCACAU	692	AUGUGACUUGAGCAAUUCC	1261
NM 001735.2.919-937 s	919-937	GCUC AAGUCACAUUUGAUU	693	AAUCAAAUGUGACUUGAGC	1262
NM 001735.2.930-948 s	930-948	AUUUGAUUCUGAAACAGCA	694	UGCUGUUUCAGAAUCAAAU	1263
NM 001735.2.939-957 s	939-957	UGAAACAGCAGUCAAAAGAA	695	UUUUUGACUGCUGUUAUCA	1264
NM 001735.2.951-969 s	951-969	CAAAGAACUGUCAUACUAC	696	GUAGUAUGACAGUUCUUUG	1265
NM 001735.2.962-980 s	962-980	CAUACUACAGUUUAGAAGA	697	UCUUUAAAACUGUAGUAGUG	1266
NM 001735.2.969-987 s	969-987	CAGUUUAGAAGAUUUAAAC	698	GUUUAAAUCUUCUAAAACUG	1267
NM 001735.2.983-1001 s	983-1001	UAAACAACAAGUACCUUUA	699	UAAAGGUACUUGUUGUUA	1268
NM 001735.2.990-1008 s	990-1008	CAAGUACCUUUUAUUAUUGCU	700	AGCAAUAUAAAAGGUACUUG	1269
NM 001735.2.1002-1020 s	1002-1020	UAUUGCUGUAACAGUCAUA	701	UAUGACUGUUAACAGCAUA	1270

[1081]

NM 001735.2.1011-1029 s	1011-1029	AACAGUCAUAGAGUCUACA	702	UGUAGACTUCUAGACUGUU	1271
NM 001735.2.1020-1038 s	1020-1038	AGAGUCUACAGGUGGAUUU	703	AAAUCCACCUGUAGACUCU	1272
NM 001735.2.1033-1051 s	1033-1051	GGAUUUUCUGAAGAGGCAG	704	CUGCCUUCUCAGAAAAUCC	1273
NM 001735.2.1042-1060 s	1042-1060	GAAGAGGCAGAAAAUACCUG	705	CAGUAUUUCUGCCUCUUC	1274
NM 001735.2.1050-1068 s	1050-1068	AGAAAUAJACCUGGCAUCAA	706	UUUGAUGCCAGGUUUUCU	1275
NM 001735.2.1061-1079 s	1061-1079	GCACAUAUAUGUCCUCUC	707	GAGAGACAUAUUUGAUGC	1276
NM 001735.2.1071-1089 s	1071-1089	UGUCUCUCUCCCUACAAA	708	UUUGUAGGGAGAGAGGACA	1277
NM 001735.2.1092-1110 s	1092-1110	GAAUUUGGUUGCUACUCCU	709	AGGAGUAGCAACCAAAUUC	1278
NM 001735.2.1102-1120 s	1102-1120	GCUACUCCUCUUUUCUGA	710	UCAGGAAAAGAGGAGUAGC	1279
NM 001735.2.1109-1127 s	1109-1127	CUCUUUCCUGAAGCCUUGG	711	CCAGGCUUCAGGAAAAAGAG	1280
NM 001735.2.1123-1141 s	1123-1141	CCUGGGAUUCCAUUCCCA	712	UGGGAUUUGGAAUCCAGG	1281
NM 001735.2.1133-1151 s	1133-1151	CAUAUCCCAUCAAGGUGCA	713	UGCACCUUGAUGGGUAUUG	1282
NM 001735.2.1139-1157 s	1139-1157	CCAUCAAGGUGCAGGUUAA	714	UUAAACCUGCACCUIUGAUGG	1283
NM 001735.2.1150-1168 s	1150-1168	CAGGUUAAAAGAUUCGUUG	715	CAAGCGAAUCUUAJACCUG	1284
NM 001735.2.1161-1179 s	1161-1179	UUCGCUUGACCAGUUGGUA	716	UACCAACUGGUCAAGCGAA	1285
NM 001735.2.1170-1188 s	1170-1188	CCAGUUGGUAGGAGGAGUC	717	GACUCCUCCUACCAACUGG	1286
NM 001735.2.1180-1198 s	1180-1198	GGAGGAGUCCAGUAACAC	718	GUGUACUGGGACUCCUCC	1287
NM 001735.2.1190-1208 s	1190-1208	CAGUAACACUGAAUUGCACA	719	UGUGCAUUCAGUUGUACUG	1288
NM 001735.2.1200-1218 s	1200-1218	GAAUGCACAACAUAUGAU	720	AUCAAUUGUUUGUGCAUUC	1289
NM 001735.2.1209-1227 s	1209-1227	AACAUAUGAUGUAAAACCAA	721	UUGGUUUAUCAUAUUUGUU	1290
NM 001735.2.1220-1238 s	1220-1238	UAAAACCAAGAGACAUCUGA	722	UCAGAUGUCUCUUGGUUUA	1291

[1082]

NM 001735.2 1232-1250 s	1232-1250	CAUCUGACUUGGAUCCAAG	723	CUUGGAUCCAAGUCAGAUG	1292
NM 001735.2 1243-1261 s	1243-1261	GAUCCAAGCAAAAGUGUAA	724	UUACACUUUUGCUUGGAUC	1293
NM 001735.2 1251-1269 s	1251-1269	CAAAAGUGUAACACGUGUU	725	AACACGUGUUAACACUUUUG	1294
NM 001735.2 1260-1278 s	1260-1278	AACACGUGUUGGAUGAUGGA	726	UCCAUCAUCAACACAGUUGU	1295
NM 001735.2 1272-1290 s	1272-1290	UGAUGGAGUAGCUUCCUUU	727	AAAGGAAGCUACUCCAUCA	1296
NM 001735.2 1279-1297 s	1279-1297	GUAGCUUCCUUUGUGCUUA	728	UAAGCACAAAAGGAAGCUAC	1297
NM 001735.2 1293-1311 s	1293-1311	GCUUAAUUCUCCAUCUGGA	729	UCCAGAUUGGAGAUUAAGC	1298
NM 001735.2 1303-1321 s	1303-1321	CCAUCUGGAGUGACGGUGC	730	GCAACGUCACUCCAGAUGG	1299
NM 001735.2 1313-1331 s	1313-1331	UGACGGUUCUGGAGUUUAA	731	UUAAACUCCAGCACCGUCA	1300
NM 001735.2 1320-1338 s	1320-1338	GCUGGAGUUUAAUUGUCAA	732	UUUGACAUUAAACUCCAGC	1301
NM 001735.2 1332-1350 s	1332-1350	UGUCAAACUGAUGCUCCA	733	UGGAGCAUCAGUUUUGACA	1302
NM 001735.2 1342-1360 s	1342-1360	GAUGUCCAGAUUUUCCAG	734	CUGGAAGAUUCUGGAGCAUC	1303
NM 001735.2 1349-1367 s	1349-1367	CAGAUUUCCAGAAGAAAA	735	UUUUUCUCUGGAAGAUCUG	1304
NM 001735.2 1362-1380 s	1362-1380	AGAAAAUCAGGCCAGGGAA	736	UUCCUUGGCCUGAUUUUCU	1305
NM 001735.2 1371-1389 s	1371-1389	GGCCAGGAAGGUUACCGA	737	UCGGUAACCUUCCUUGGCC	1306
NM 001735.2 1382-1400 s	1382-1400	GUUACCGAGCAAUAGCAUA	738	UAUGCUAUUGCUCCGGUAAC	1307
NM 001735.2 1393-1411 s	1393-1411	AUAGCAUACUACUUCUCA	739	UGAGAGAUAGAUUGCUAU	1308
NM 001735.2 1399-1417 s	1399-1417	UACUCAUCUCUACGCCAAA	740	UUUUGGCUAGAGAGAGAGUA	1309
NM 001735.2 1412-1430 s	1412-1430	GCCAAAGUUAACUUUAUUI	741	AUAUAAAGGUUAACUUUGGC	1310
NM 001735.2 1422-1440 s	1422-1440	CCUUUAUUAUUGAUUGGACU	742	AGUCCAUAUUAUUAUAAAGG	1311
NM 001735.2 1432-1450 s	1432-1450	GAUUGGACUGAUAAACCAUA	743	UAUUGGUUAUCAGUCCAUC	1312

[1083]

NM 001735.2 1439-1457 s	1439-1457	CUGAUACCAUAAGGCUUU	744	AAAGCCUUUAGGUUAUCAG	1313
NM 001735.2 1451-1469 s	1451-1469	AGGCUUUGCUAGUGGGAGA	745	UCUCCACUAGCAAAGCCU	1314
NM 001735.2 1462-1480 s	1462-1480	GUGGGAGAACAUUGAAUA	746	UAUCAGAUUUCUCCAC	1315
NM 001735.2 1471-1489 s	1471-1489	CAUCUGAAUUAUUAUGUA	747	UAACAUAUAUUCAGAUG	1316
NM 001735.2 1479-1497 s	1479-1497	UAUUAUUGUUAACCCCAAA	748	UUUUGGGGUACAUAUAUA	1317
NM 001735.2 1492-1510 s	1492-1510	CCCAAAAGCCCAUAUAUUG	749	CAUAUAUGGGCUUUUGGG	1318
NM 001735.2 1493-1511 s	1493-1511	CCAAAAGCCCAUAUAUUGA	750	UCAUAUAUGGGCUUUUGG	1319
NM 001735.2 1494-1512 s	1494-1512	CAAAAGCCCAUAUAUUGAC	751	GUCAUAUAUGGGCUUUUG	1320
NM 001735.2 1495-1513 s	1495-1513	AAAAGCCCAUAUAUUGACA	752	UGUCAUAUAUGGGCUUUU	1321
NM 001735.2 1496-1514 s	1496-1514	AAAGCCCAUAUAUUGACAA	753	UUGUCAUAUAUGGGCUUU	1322
NM 001735.2 1497-1515 s	1497-1515	AAGCCCAUAUAUUGACAAA	754	UUUGUCAUAUAUGGGCUU	1323
NM 001735.2 1498-1516 s	1498-1516	AGCCCAUAUAUUGACAAA	755	UUUUGUCAUAUAUGGGCU	1324
NM 001735.2 1499-1517 s	1499-1517	GCCCAUAUAUUGACAAAAU	756	AUUUUGUCAUAUAUGGGC	1325
NM 001735.2 1500-1518 s	1500-1518	CCCAUAUAUUGACAAAAUA	757	UAUUUUGUCAUAUAUGGG	1326
NM 001735.2 1501-1519 s	1501-1519	CCAUAUAUUGACAAAAUA	758	UUUUUUGUCAUAUAUGGG	1327
NM 001735.2 1502-1520 s	1502-1520	CAUAUAUUGACAAAAUAAC	759	GUUAUUUUGUCAUAUAUG	1328
NM 001735.2 1503-1521 s	1503-1521	AUAUAUUGACAAAAUAACU	760	AGUAUUUUGUCAUAUAU	1329
NM 001735.2 1504-1522 s	1504-1522	UAUAUUGACAAAAUAACUC	761	GAGUAUUUUGUCAUAUA	1330
NM 001735.2 1505-1523 s	1505-1523	AUAUUGACAAAAUAACUCA	762	UGAGUAUUUUGUCAUAU	1331
NM 001735.2 1506-1524 s	1506-1524	UAUUGACAAAAUAACUCAC	763	GUGAGUAUUUUGUCAUA	1332
NM 001735.2 1507-1525 s	1507-1525	AUUGACAAAAUAACUCACU	764	AGUGAGUAUUUUGUCAU	1333

[1084]

NM 001735.2.1508-1526 s	1508-1526	UUACAAAAUAACUCACUA	765	UAGUGAGUUUUUUUGUCA	1334
NM 001735.2.1509-1527 s	1509-1527	UGACAAAAUAACUCACUAU	766	AUAGUGAGUUUUUUUGUCA	1335
NM 001735.2.1510-1528 s	1510-1528	GACAAAAUAACUCACUAUA	767	UAUAGUGAGUUUUUUUGUC	1336
NM 001735.2.1513-1531 s	1513-1531	AAAAUAACUCACUAUAUUU	768	AAUUUAAGUGAGUUUUUUU	1337
NM 001735.2.1514-1532 s	1514-1532	AAUAACUCACUAUAUUUA	769	UAAUUUAAGUGAGUUUUUU	1338
NM 001735.2.1515-1533 s	1515-1533	AAUAACUCACUAUAUUUAC	770	GUAUUUAAGUGAGUUUUUU	1339
NM 001735.2.1516-1534 s	1516-1534	AUAACUCACUAUAUUUAU	771	AGUAAUUUAAGUGAGUUUU	1340
NM 001735.2.1518-1536 s	1518-1536	AACUCACUAUAUUUAUUG	772	CAAGUAAUUUAAGUGAGUU	1341
NM 001735.2.1519-1537 s	1519-1537	ACUCACUAUAUUUAUUGA	773	UCAAGUAAUUUAAGUGAGU	1342
NM 001735.2.1520-1538 s	1520-1538	CUCACUAUAUUUAUUGAU	774	AUCAAGUAAUUUAAGUGAG	1343
NM 001735.2.1521-1539 s	1521-1539	UCACUAUAUUUAUUGAUU	775	AAUCAAGUAAUUUAAGUGA	1344
NM 001735.2.1523-1541 s	1523-1541	ACUAUAUUUAUUGAUUUU	776	AAAUCAAGUAAUUUAAGU	1345
NM 001735.2.1524-1542 s	1524-1542	CUAUAUUUAUUGAUUUUA	777	UAAAUCAAGUAAUUUAUAG	1346
NM 001735.2.1525-1543 s	1525-1543	UAUAUUUAUUGAUUUUUUAU	778	AUAAAAUCAAGUAAUUUA	1347
NM 001735.2.1526-1544 s	1526-1544	AUAUUUAUUGAUUUUUUAUC	779	GAUAAAAUCAAGUAAUUUAU	1348
NM 001735.2.1527-1545 s	1527-1545	UAUUUAUUGAUUUUUUAUCC	780	GGUAAAAUCAAGUAAUUUA	1349
NM 001735.2.1528-1546 s	1528-1546	AAUUUAUUGAUUUUUUAUCCA	781	UGGAUAAAAUCAAGUAAUUU	1350
NM 001735.2.1529-1547 s	1529-1547	AUUUAUUGAUUUUUUAUCCAA	782	UUUGAUAAAAUCAAGUAAU	1351
NM 001735.2.1540-1558 s	1540-1558	UUUAUCCAAAGGGCAAAAUUA	783	UAAUUUUGCCCUUGGAUUA	1352
NM 001735.2.1550-1568 s	1550-1568	GC AAAUUUAUCCACUUUGG	784	CCAAAGUUGGAUAAUUUUUGC	1353
NM 001735.2.1561-1579 s	1561-1579	CACUUUGGCACGAGGGAGA	785	UCUCCUCUGGCCAAAGUG	1354

[1085]

NM 001735.2 1571-1589 s	1571-1589	CGAGGGAGAAUUUUCAGA	786	UCUGAAAUUUUCUCCUCG	1355
NM 001735.2 1581-1599 s	1581-1599	AUUUCAGAUCAUCUUU	787	AUAAGAUGCAUCUGAAAAU	1356
NM 001735.2 1591-1609 s	1591-1609	GCAUCUUUCAAAAGUAUA	788	UUUAUCUUUGAUAAGAUGC	1357
NM 001735.2 1600-1618 s	1600-1618	CAAAAGUAUAAACAUIUCCAG	789	CUGGAAUGUUUAUACUUIUG	1358
NM 001735.2 1612-1630 s	1612-1630	AUJCCAGUAACACAGAACA	790	UGUUUCUGUGUACUGGAU	1359
NM 001735.2 1622-1640 s	1622-1640	CACAGAACAUGGUUCCUUC	791	GAAGGAACCAUGUUCUGUG	1360
NM 001735.2 1632-1650 s	1632-1650	GGUUCUUCAUCCCGACUUC	792	AAGUCGGGAUGAAGGAACC	1361
NM 001735.2 1643-1661 s	1643-1661	CCCGACUUCUGGUUAUUA	793	UAAUAGACCAGAAGUCGGG	1362
NM 001735.2 1653-1671 s	1653-1671	GGUCUAUUACAUCGUCACA	794	UGUGACGAUGUAUUAAGACC	1363
NM 001735.2 1663-1681 s	1663-1681	AUJGUACACAGGAGAACAAGA	795	UCUGUUCUCCUGUGACGUAU	1364
NM 001735.2 1670-1688 s	1670-1688	CAGGAGAACAGACAGCAGA	796	UCUGCUGUCUGUUCUCCUG	1365
NM 001735.2 1682-1700 s	1682-1700	CAGCAGAAUUAGUUCUGA	797	UCAGACACUAUUUCUGCUG	1366
NM 001735.2 1693-1711 s	1693-1711	GUGUCUGAUUCAGUCUGGU	798	ACCAGACUGAAUCAGACAC	1367
NM 001735.2 1703-1721 s	1703-1721	CAGUCUGGUUAAAUAUUGA	799	UCAAUUUUAACCAGACUG	1368
NM 001735.2 1710-1728 s	1710-1728	GUUAAAUAUUGAAGAAAAA	800	UUUUUUCUCAAUUUUUAAAC	1369
NM 001735.2 1722-1740 s	1722-1740	AGAAAAUUGUGGCAACCAG	801	CUGGUUGCCACAUUUUUUCU	1370
NM 001735.2 1733-1751 s	1733-1751	GCAACCAGUCCAGGUUCA	802	UGAACCUUGGAGCUGGUUGC	1371
NM 001735.2 1740-1758 s	1740-1758	GCUCAGGUUCUUCUGUUCU	803	AGACAGAUAGAACCUGGAGC	1372
NM 001735.2 1751-1769 s	1751-1769	AUCUGUCUCCUGAUGCAGA	804	UCUGCAUCAGGAGACAGAU	1373
NM 001735.2 1762-1780 s	1762-1780	GAUGCAGAUCAUAUUCUC	805	GAGAAUAUGCAUCUUGCAUC	1374
NM 001735.2 1771-1789 s	1771-1789	GCAUAUUCUCCAGGCCAAA	806	UUUUGCCUUGGAGAAUAGC	1375

[1086]

NM 001735.2.1782-1800 s	1782-1800	AGCCAAACUGUGUCUCU	807	AAGAGACACAGUUGGCCU	1376
NM 001735.2.1792-1810 s	1792-1810	GUGUCUCUUAUAUGGCAA	808	UUGCCAUUAUAGAGACAC	1377
NM 001735.2.1799-1817 s	1799-1817	UUAAUAUGGCAACUGGAU	809	AUCCAGUUGCCAUUAUAA	1378
NM 001735.2.1809-1827 s	1809-1827	AACUGGAAUGGAUUCUGG	810	CCAGGAUCCAUUCCAGUU	1379
NM 001735.2.1821-1839 s	1821-1839	UUCCUGGGUUGCAUUAACA	811	UGCUAUGCCACCCAGGAA	1380
NM 001735.2.1830-1848 s	1830-1848	GGCAUUAAGCAGCAGUGGAC	812	GUCCACUGCUGCUAAUGGC	1381
NM 001735.2.1842-1860 s	1842-1860	AGUGGACAGUCUGUGUAU	813	AUACACAGCACUGUCCACU	1382
NM 001735.2.1852-1870 s	1852-1870	GCUGUGUAUGGAGUCCAAA	814	UUUGGACUCCAUACACAGC	1383
NM 001735.2.1863-1881 s	1863-1881	AGUCCAAAGAGGAGCCAAA	815	UUUGGCUCUUCUUGGACU	1384
NM 001735.2.1870-1888 s	1870-1888	AGAGGACCAAAAAGCCCU	816	AGGGCUUUUUGGCUCCUCU	1385
NM 001735.2.1883-1901 s	1883-1901	AGCCUUGGAAAGAGUAUU	817	AAUACUCUUUCCAAGGGCU	1386
NM 001735.2.1893-1911 s	1893-1911	AAGAGUAUUCAAUUCUUA	818	UAAGAAUUGAAAUAUCUCU	1387
NM 001735.2.1900-1918 s	1900-1918	UUUCAUUUCUUAAGAGAAGA	819	UCUUCUUAAGAAUUGAAA	1388
NM 001735.2.1912-1930 s	1912-1930	GAGAAAGUGAUUCUGGGCU	820	AGCCAGAUACUCUCUCUC	1389
NM 001735.2.1920-1938 s	1920-1938	UGAUCUGGGCUGUGGGGCA	821	UGCCCCACAGCCAGAUCA	1390
NM 001735.2.1933-1951 s	1933-1951	GGGGCAGGUGGUGGCCUCA	822	UGAGGCCACCACCCUGGCC	1391
NM 001735.2.1943-1961 s	1943-1961	GUGGCCUCAACAAUUGCCAA	823	UUUGCAUUGUUGAGGGCCAC	1392
NM 001735.2.1950-1968 s	1950-1968	CAACAUUGCCAUGUUGUUC	824	GAACACAUUGGCAUUGUUG	1393
NM 001735.2.1959-1977 s	1959-1977	CAAUUGUUCCACCUAGCU	825	AGCUAGGUGGAACACAUUG	1394
NM 001735.2.1969-1987 s	1969-1987	CACCUAGCUGGACUUAACCU	826	AGGUAAGUCCAGCUAGGUG	1395
NM 001735.2.1979-1997 s	1979-1997	GACUUAACCUUCCUCACUAA	827	UUAGUGAGGAAGGUAAGUC	1396

[1087]

NM 001735.2 1991-2009 s	1991-2009	UCACUAAUUGCAAUUGCAGA	828	UCUGCAUUUGCAUUGAGUGA	1397
NM 001735.2 2001-2019 s	2001-2019	AAAUUGCAGAUAGACUCCAA	829	UUUGGGAGUCAUCUGCAUUU	1398
NM 001735.2 2013-2031 s	2013-2031	CUCCCAAGAAAUAUGAUGAA	830	UUCAUCAUUUCUUGGGAG	1399
NM 001735.2 2032-2050 s	2032-2050	CCUUGUAAAAGAAAUUCUCA	831	UGAGAAUUUCUUUACAAGG	1400
NM 001735.2 2043-2061 s	2043-2061	AAUUCUCAGGCCAAGAAGA	832	UCUUUCUUGGCCUGAGAAUU	1401
NM 001735.2 2053-2071 s	2053-2071	CCAAGAAGAACGUCGCAA	833	UUUGCAGGUUCUUCUUGG	1402
NM 001735.2 2063-2081 s	2063-2081	CGCUGCAAAAAGAAAGAUAGA	834	UCUAUCUUUCUUUJGCGCG	1403
NM 001735.2 2070-2088 s	2070-2088	AAAGAAGAUAGAAGAAAUA	835	UAUUUCUUCUUCUUCUUU	1404
NM 001735.2 2082-2100 s	2082-2100	AGAAUAGCUGCUAAAUAU	836	AUAUUUAGCAGCUAUUUUCU	1405
NM 001735.2 2089-2107 s	2089-2107	GCUGCUAAAUAUAAAACAUU	837	AAUGUUUAUUAUUAGCAGC	1406
NM 001735.2 2103-2121 s	2103-2121	ACAUUCAGUAGUGAAGAAA	838	UUUCUUCACUACUGAAUUGU	1407
NM 001735.2 2110-2128 s	2110-2128	GUAGUGAAGAAAUGUUGUU	839	AACAACAUUUUCUUCACUAC	1408
NM 001735.2 2119-2137 s	2119-2137	AAUUGUUUJGACGAUJGGAG	840	CUCCAUCGUAAACAACAUUU	1409
NM 001735.2 2130-2148 s	2130-2148	CGAUGGAGCCUGCGUUAU	841	AUUAAACGCAGGCCUCCAUCC	1410
NM 001735.2 2142-2160 s	2142-2160	CGUUAAUAUAUGAUGAAACC	842	GGUUUCAUCAUUUAUUAACG	1411
NM 001735.2 2150-2168 s	2150-2168	AUGAUGAAAACCUGUGAGCA	843	UGCUCACAGGUUUCAUCAU	1412
NM 001735.2 2160-2178 s	2160-2178	CUGUGAGCAGCGAGCUGCA	844	UGCAGCUCGUGCUCACACAG	1413
NM 001735.2 2170-2188 s	2170-2188	CGAGCUGCACGGAUUJGUU	845	AACUAAUCCGUGCAGCUGC	1414
NM 001735.2 2180-2198 s	2180-2198	GGAUUAGUUUJAGGGCCAAG	846	CUUGGCCCUAAAACUUAUCC	1415
NM 001735.2 2191-2209 s	2191-2209	GGGCCAAGGAUGCAUCAAAAG	847	CUUUGAUGCAUCUUGGCCCC	1416
NM 001735.2 2202-2220 s	2202-2220	CAUCAAAAGCUUUCACUGAA	848	UUCAGUGAAAGCUUJUGAUG	1417

[1088]

NM 001735.2 2209-2227 s	2209-2227	GCUUUCACUGAAUGUUGUG	849	CACAACAUUCAGUGAAAGC	1418
NM 001735.2 2219-2237 s	2219-2237	AAUGUUGUUCGUCGCAAG	850	CUUUGCAGCACACAACAUU	1419
NM 001735.2 2229-2247 s	2229-2247	CGUCGCAAGCCAGCUCCGU	851	ACGGAGCUGGCUUGCGACG	1420
NM 001735.2 2241-2259 s	2241-2259	GCUCCGUGCUAAUAUCUCU	852	AGAGAUUUAGCACGGGAGC	1421
NM 001735.2 2249-2267 s	2249-2267	CUAAUAUCUCUAUAAAGA	853	UCUUUAUGAGAGAUUUAG	1422
NM 001735.2 2263-2281 s	2263-2281	AAAGACAUCCAUAUUGGAA	854	UUCCCAAUUGCAUGUCUUU	1423
NM 001735.2 2272-2290 s	2272-2290	CAAUUGGGAAGGCUACACA	855	UGUGUAGCCUUCCCAAUUG	1424
NM 001735.2 2283-2301 s	2283-2301	GCUACACAUAGAAGCCUUG	856	CAGGGUUCUUAUGUUGAGC	1425
NM 001735.2 2289-2307 s	2289-2307	CAUGAAGACCCUGUUACCA	857	UGGUAAACAGGGUCUUCUUG	1426
NM 001735.2 2303-2321 s	2303-2321	UACCAGUAAGCAAGCCAGA	858	UCUGGCUUGCUUACUGGUA	1427
NM 001735.2 2311-2329 s	2311-2329	AGCAAGCCAGAAAUUGGA	859	UCCGAAUUUCUGGCUUGCU	1428
NM 001735.2 2319-2337 s	2319-2337	AGAAAUUCGGAGUUUUUU	860	AAAUAACUCCGAAUUUCU	1429
NM 001735.2 2329-2347 s	2329-2347	AGUUUUUUUCCAGAAAGCU	861	AGCUUUCUGGAAAAUAACU	1430
NM 001735.2 2339-2357 s	2339-2357	CAGAAAGCUGGUUGUGGGA	862	UCCCACACCAGCUUUCUG	1431
NM 001735.2 2352-2370 s	2352-2370	GUGGGAAGUUCAUUCUUGUU	863	AAACAAGUAACUUCUCCAC	1432
NM 001735.2 2361-2379 s	2361-2379	UCAUCUUGUUUCCAGAAAGA	864	UCUUCUGGGAACAAGAUGA	1433
NM 001735.2 2372-2390 s	2372-2390	CCAGAAGAAAACAGUUGCA	865	UGCAACUGUUUUUUCUUCUGG	1434
NM 001735.2 2383-2401 s	2383-2401	CAGUUCAGUUUUGCCUAC	866	GUAGGGCAACUUGCAACUG	1435
NM 001735.2 2389-2407 s	2389-2407	CAGUUUGCCCUUACCUUGAUU	867	AAUCAGGUAGGGCAACUUG	1436
NM 001735.2 2401-2419 s	2401-2419	CCUGAUUCUCUAACCACCU	868	AGGUGGUUAGAGAAUUCAGG	1437
NM 001735.2 2413-2431 s	2413-2431	ACCACCUUGGGAUUUUAAG	869	CUUGAAUUUCCAGGUGGU	1438

[1089]

NM 001735.2_2422-2440 s	2422-2440	GAAAUUCAAAGCGUUGGCA	870	UGCCAACGCCUUGAAUJUC	1439
NM 001735.2_2433-2451 s	2433-2451	CGUUGCCAUUUCAAACACU	871	AGUGUUUGAAAUUGCCAACG	1440
NM 001735.2_2439-2457 s	2439-2457	CAUUUCAAAACACUGGUAUA	872	UAUACCAGUGUUUGAAUUG	1441
NM 001735.2_2453-2471 s	2453-2471	GUUAUUGUGUUGCUGAUAC	873	GUUUCAGCAACACAUUAUC	1442
NM 001735.2_2463-2481 s	2463-2481	UGCUGAUACUGUCAAGGCA	874	UGCCUUGACAGUAUCAGCA	1443
NM 001735.2_2471-2489 s	2471-2489	CUGUCAAGGCAAAGGUGUU	875	AACACCUUUGCCUUGACAG	1444
NM 001735.2_2483-2501 s	2483-2501	AGGUGUUCAAAAGAUGUCUU	876	AAGACAUCUUUGAACACCU	1445
NM 001735.2_2490-2508 s	2490-2508	CAAGAUGUCUUCUGGAA	877	UUCAGGAAGACAUCUJUG	1446
NM 001735.2_2499-2517 s	2499-2517	CUUCCUGGAAUUGAAUAUA	878	UAUAUUCAUUUCAGGAAG	1447
NM 001735.2_2511-2529 s	2511-2529	GAAUAUACCAUUAUUCUGUU	879	AACAGAUAUUGGUUAUJUC	1448
NM 001735.2_2520-2538 s	2520-2538	AUAUUCUGUUGUACGAGGA	880	UCCUCGUACACAGAAUAU	1449
NM 001735.2_2533-2551 s	2533-2551	CGAGGAGAACAGAUCCAUA	881	AUUGGAUCUGUUCUCCUCG	1450
NM 001735.2_2539-2557 s	2539-2557	GAACAGAUCCAUAUUGAAAG	882	CUUUCAUUGGUAUCUGUUC	1451
NM 001735.2_2553-2571 s	2553-2571	GAAAGGAACUGUUUACAAC	883	GUUGUAACAGUUCUUCUUC	1452
NM 001735.2_2560-2578 s	2560-2578	ACUGUUUACAACUAUAGGA	884	UCCUAUAGUUGUAAAACAGU	1453
NM 001735.2_2569-2587 s	2569-2587	AACUAUAGGACUUCUGGGA	885	UCCCAGAAGUCCUAUJGUU	1454
NM 001735.2_2583-2601 s	2583-2601	UGGGAUUGCAGUUCUGUGUU	886	AACACAGAACUUGCAUCCCA	1455
NM 001735.2_2592-2610 s	2592-2610	GUUCUGUGUUAAAAGUUCU	887	AGACAUUUUAACACAGAAC	1456
NM 001735.2_2600-2618 s	2600-2618	UUAAAAGUUCUGCUGUGGA	888	UCCACAGCAGACAUUUUAA	1457
NM 001735.2_2612-2630 s	2612-2630	CUGUGGAGGGAUUCUGCAC	889	GUGCAGAUUCCUCCACAG	1458
NM 001735.2_2620-2638 s	2620-2638	GGAAUUCGACUUCUGGAA	890	UUUCCGGAAGUCCAGAUUCC	1459

[1090]

NM 001735.2_2633-2651 s	2633-2651	CGGAAAGCCAGUCAUUGA	891	UCAUAGACUGGGCUUUCG	1460
NM 001735.2_2641-2659 s	2641-2659	CCAGUCAUUGAUCACAGG	892	CCUGAUGAUCAUAGACUGG	1461
NM 001735.2_2653-2671 s	2653-2671	CAUCAGGCACAAAGUCCU	893	AGGACUUUGGCCUGAUG	1462
NM 001735.2_2659-2677 s	2659-2677	GGCACAAAGUCCUCAAUU	894	AUUUGGAGGACUUUGGCC	1463
NM 001735.2_2673-2691 s	2673-2691	CAAUUGUGGCCAGAAA	895	UUUCUGGGCCACACAUUUG	1464
NM 001735.2_2682-2700 s	2682-2700	GCCCCAGAAAGUAGAGGGC	896	GCCUCUACUUUCUGGGCC	1465
NM 001735.2_2691-2709 s	2691-2709	AGUAGAGGCUCUCCAGU	897	ACUGGAGGAGCCUCUACU	1466
NM 001735.2_2702-2720 s	2702-2720	CCUCCAGUACUUGGUGAC	898	GUCACCAAGUGACUGGAGG	1467
NM 001735.2_2709-2727 s	2709-2727	UCACUUGGUGACAUUCACU	899	AGUGAAUGUACCAAGUGA	1468
NM 001735.2_2720-2738 s	2720-2738	CAUUCACUGUGCUUCCUCU	900	AGAGGAAGCACAGUUGAAUG	1469
NM 001735.2_2739-2757 s	2739-2757	GGAAAUUGCCUUCACAAC	901	GUUGUGAAGGCCAAUUC	1470
NM 001735.2_2749-2767 s	2749-2767	CUUCACAACAUAUUUUU	902	AAAAUUUGAUUGUGAAG	1471
NM 001735.2_2761-2779 s	2761-2779	AAUUUUACUGGAGACUU	903	AAGUCUCCAGUGAAAAAUU	1472
NM 001735.2_2770-2788 s	2770-2788	CUGGAGACUUGGUUUGGAA	904	UUCCAAACCAAGUCUCCAG	1473
NM 001735.2_2780-2798 s	2780-2798	GGUUUGGAAAAGAAAUUU	905	AAGAUUUUUUUUCCAAACC	1474
NM 001735.2_2793-2811 s	2793-2811	AAUCUUAGUAAAAACAUA	906	UAAUGUUUUUACUAAGAUU	1475
NM 001735.2_2802-2820 s	2802-2820	AAAAACUUACGAGUGGUG	907	CACCACUCGUAAUGUUUUU	1476
NM 001735.2_2813-2831 s	2813-2831	GAGUGUGCCAGAAGGUGU	908	ACACCUUCUGGCACCACUC	1477
NM 001735.2_2823-2841 s	2823-2841	AGAAGGUGUCAAAGGGAA	909	UUCCUUUUGACACCUUUCU	1478
NM 001735.2_2829-2847 s	2829-2847	UGUCAAAGGGAAAAGCUAU	910	AUAGCUUUUCCUUUUGACA	1479
NM 001735.2_2843-2861 s	2843-2861	GCUAUUUCUGGUGUUACUUU	911	AAAGUAACACCAGAAUAGC	1480

[1091]

NM 001735.2 2852-2870 s	2852-2870	GUGUJACUUUGGAUCCUAG	912	CUAGGAUCCAAGUAACAC	1481
NM 001735.2 2862-2880 s	2862-2880	GGAUCCUAGGGGUUUUUU	913	AUAAAUACCCUAGGAUCC	1482
NM 001735.2 2872-2890 s	2872-2890	GGUUAUUUUGGUACCAUUA	914	UAAUGGUACCAUAAAUACC	1483
NM 001735.2 2882-2900 s	2882-2900	GUACCAUUAGCAGACGAAA	915	UUUCGUCUGCUAAUUGGUAC	1484
NM 001735.2 2892-2910 s	2892-2910	CAGACGAAAGGAGUCCCA	916	UGGGAACUCCUUUCGUCUG	1485
NM 001735.2 2900-2918 s	2900-2918	AGGAGUCCCAUACAGGAU	917	AUCCUGUAUGGGAACUCCU	1486
NM 001735.2 2909-2927 s	2909-2927	CAUACAGGAUACCCUUAGA	918	UCUAAGGGUAUCCUGUAUG	1487
NM 001735.2 2922-2940 s	2922-2940	CUJAGAUUUGGUCCCAAA	919	UUUUGGGACCAAAUUCUAAAG	1488
NM 001735.2 2933-2951 s	2933-2951	UCCCCAAAACAGAAAUCAA	920	UUUGAUUCUGUUUUUGGGGA	1489
NM 001735.2 2941-2959 s	2941-2959	ACAGAAAUCAAAAGGAUUU	921	AAAUCUUUUUGAUUUUCUGU	1490
NM 001735.2 2951-2969 s	2951-2969	AAAGGAUUUUGAGUGUAAA	922	UUUACACUCUAAAUCUUUU	1491
NM 001735.2 2962-2980 s	2962-2980	AGUGUAAAAGGACUUCUUG	923	CAAGCAGUCCUUUUUACACU	1492
NM 001735.2 2969-2987 s	2969-2987	AAGGACUGCUUUGUAGGUGA	924	UCACCUACAAGCAGUCCUU	1493
NM 001735.2 2980-2998 s	2980-2998	GUAGGUGAGAUUCUUGUCUG	925	CAGACAAGAUUCACCCUAC	1494
NM 001735.2 2989-3007 s	2989-3007	AUCUUUUCUCCAGUUCUAA	926	UUAGAAACUCCAGACAAGAU	1495
NM 001735.2 3001-3019 s	3001-3019	GUUCUAAAGUCAGGAAGGCA	927	UGCCUUCUGACUUUJAGAAC	1496
NM 001735.2 3013-3031 s	3013-3031	GAAGGCAUCAAAUUCUAA	928	UUAGGAUUDUGAUGCCUUC	1497
NM 001735.2 3020-3038 s	3020-3038	UCAAUUCCUUAACCCACCU	929	AGGUUGGUUJAGGAUJUGA	1498
NM 001735.2 3033-3051 s	3033-3051	CCACCUCCCCAAAGGGAGU	930	ACUCCUUUUGGGGAGGUGG	1499
NM 001735.2 3039-3057 s	3039-3057	CCCCAAAGGGAGUGCAGAG	931	CUCUGCACUCCUUUUGGGG	1500
NM 001735.2 3050-3068 s	3050-3068	GUGCAGAGCGGAGCUGAU	932	AUCAGUCCGCCUUCUGCAC	1501

[1092]

NM 001735.2.3060-3078_s	3060-3078	GGAGCUGAUGAGCGUUGUC	933	GACAACGTCUaucAGCUCC	1502
NM 001735.2.3072-3090_s	3072-3090	CGUUGUCCcAGUAUUCUAU	934	AUAGAAUAcUGGGACAACG	1503
NM 001735.2.3079-3097_s	3079-3097	CCAGUAUUCUAUGUUUUUC	935	GAAAAcAUAGAAUAcUGG	1504
NM 001735.2.3091-3109_s	3091-3109	GUUUUUCACUAcCCUGGAAA	936	UUUCAGGUAGUGAAAAAc	1505
NM 001735.2.3102-3120_s	3102-3120	CCUGGAAAcAGGAAAUCAU	937	AUGAUUCCUGUUUCCAGG	1506
NM 001735.2.3122-3140_s	3122-3140	GGAAcAUUUUCAUUCUGA	938	UCAGAAUGAAAAAUUGUCC	1507
NM 001735.2.3133-3151_s	3133-3151	CAUUcUGAcCCAUUAAUUG	939	CAAUAAUGGGUCAGAAUG	1508
NM 001735.2.3142-3160_s	3142-3160	CCAUUAAUUGAAAcAGcAGA	940	UCUGUUUUcAAUUAAUGG	1509
NM 001735.2.3153-3171_s	3153-3171	AAAGcAGAAcCUGAAAGAAA	941	UUUCUUCAGUUUCUGCUUU	1510
NM 001735.2.3161-3179_s	3161-3179	AAcUGAAAGAAAAAUUAAA	942	UUUAAUUUUUUcUUCAGUU	1511
NM 001735.2.3169-3187_s	3169-3187	AAAAAUUAAAAAGAAcGGGA	943	UCCUUUcUUUUAAUUUUUU	1512
NM 001735.2.3183-3201_s	3183-3201	AcGGGAUUUGAcCAUUUAUG	944	CAUAAUGCUcAAcAUCCCU	1513
NM 001735.2.3192-3210_s	3192-3210	GAGcAUUAcUGUCCUAcAGAc	945	UCUGAcGGAcAUAAUAcGUC	1514
NM 001735.2.3200-3218_s	3200-3218	UGUCCUAcAGAAAUcGUGAc	946	UCAGcAUUUcUGUAcGGAc	1515
NM 001735.2.3211-3229_s	3211-3229	AAUGCUcAGAcUAcUUAcAc	947	UGUAAGAcGUAcGUAcGAcAUU	1516
NM 001735.2.3220-3238_s	3220-3238	UAcCUUUAcAGUGUGUGGAc	948	UCCAcAcAcCUUGAAAGAcGUAc	1517
NM 001735.2.3229-3247_s	3229-3247	AcGUUGUGGAAcGGUGGAA	949	UUCCAcCUUcUCCAcAcAcAcU	1518
NM 001735.2.3240-3258_s	3240-3258	GGUGGAAcUGUcUAcGAcAcU	950	AcGUcUAcGAcUcUCCAcCC	1519
NM 001735.2.3250-3268_s	3250-3268	GcUAcAcCUUGGUUUAcAcAG	951	CUGUUAcCCAAcGUGCUAcG	1520
NM 001735.2.3260-3278_s	3260-3278	GGUUAAcAcAGCUUUUGCUUU	952	AAAGcAAAAcAGCUUGUUAcAc	1521
NM 001735.2.3273-3291_s	3273-3291	UGCUUUAAcAGAcUAcUUGGAc	953	UCCAAcGUAcCUUUAAAcGAc	1522

[1093]

NM 001735.2.3283-3301 s	3283-3301	GUACUUGGACAAGUAAAUA	954	UAUUACUUUCCAAGUAC	1523
NM 001735.2.3292-3310 s	3292-3317	CAAGUAAAUAUUACGUAG	955	CUACGUUUUUUUUACUUG	1524
NM 001735.2.3299-3317 s	3299-3317	AUAAAACGUAGAGCAGAA	956	UUCUGCUCUACGUUUUUU	1525
NM 001735.2.3310-3328 s	3310-3328	GAGCAGAACCAAAAUAUCA	957	UUGAAUUUUUGGUUCUCUC	1526
NM 001735.2.3322-3340 s	3322-3340	AAUUCAAUUUGUAAUUCUU	958	AAGAAUUACAAAUUUGAAUU	1527
NM 001735.2.3332-3350 s	3332-3350	GUAAUUCUUUAUUUGGGCU	959	AGCCACAUAAGAUAUAC	1528
NM 001735.2.3342-3360 s	3342-3360	AUUGUGGCUAGUUGAGAAU	960	AUUCUACAACUAGCCACA AU	1529
NM 001735.2.3349-3367 s	3349-3367	CUAGUUGAGAAUUUAUCAU	961	AUUGAAUUUUCUACAUCUAG	1530
NM 001735.2.3360-3378 s	3360-3378	UUUUCAAUUAGAUAAUGGA	962	UCCAUUAUCUAAUUUGAUAA	1531
NM 001735.2.3373-3391 s	3373-3391	AAUGGAUCUUUCAAGGAAA	963	UUUCCUUGAAAGAUCUCAAUU	1532
NM 001735.2.3380-3398 s	3380-3398	CUUUCAAAGGAAAUAUUCACA	964	UGUGAAUUUUUCUUUGAAAG	1533
NM 001735.2.3391-3409 s	3391-3409	AAUUCACAGUAUCAACCAA	965	UUUGGUUGAUACUGUGAAUU	1534
NM 001735.2.3399-3417 s	3399-3417	GUUUCACACCAUAAAUAUA	966	UAAUUUUUAUUGGUUGAUAC	1535
NM 001735.2.3411-3429 s	3411-3429	AAAUUACAGGUACCUUG	967	CAAGGUACCCUUGUAUUUUU	1536
NM 001735.2.3419-3437 s	3419-3437	AGGGUACCUUGCCUUGUGA	968	UCAACAGGCAAGGUACCCU	1537
NM 001735.2.3433-3451 s	3433-3451	GUUGAAGCCCGAGAGAACA	969	UGUUUCUCUGGGCUUCAAC	1538
NM 001735.2.3441-3459 s	3441-3459	CCGAGAGAACAGCUUAUAU	970	AUAUAAGCUGUUUCUCUCGG	1539
NM 001735.2.3452-3470 s	3452-3470	GCUUUAUUCUUACAGCCUU	971	AAGGCUGUAAGAUUAAGC	1540
NM 001735.2.3460-3478 s	3460-3478	CUUACAGCCUUUACUGUGA	972	UCACAGUAAAGGCUGUAAG	1541
NM 001735.2.3482-3500 s	3482-3500	GAAUUAGAAAAGGCUUUCGA	973	UCGAAAAGCCUULKUAUUUC	1542
NM 001735.2.3492-3510 s	3492-3510	GGCUUUCGUAUAUUGCCCC	974	GGGGCAUAUAUCGAAAGCC	1543

[1094]

NM 001735.2 3499-3517 s	3499-3517	GAAUAUAGCCCCUGGUGA	975	UCACAGGGGGCAUAUAUC	1544
NM 001735.2 3513-3531 s	3513-3531	GGUGAAAAUCCACACAGCU	976	AGCUGUGUGAUUUUCACC	1545
NM 001735.2 3522-3540 s	3522-3540	CGACACAGCUCUAUUAAA	977	UUUAAUUAGAGCUGUGUCG	1546
NM 001735.2 3529-3547 s	3529-3547	GCUCUAAUUAAAAGCUGACA	978	UGUCAGCUUUAAUUAGAGC	1547
NM 001735.2 3542-3560 s	3542-3560	CUGACAACUUUCUGCUUGA	979	UCAAGCAGAAAGUUGUCAG	1548
NM 001735.2 3549-3567 s	3549-3567	CUUUCUGCUUGAAAAUACA	980	UGUAUUUUAAGCAGAAAAG	1549
NM 001735.2 3560-3578 s	3560-3578	AAAAUACACUGCCAGCCCA	981	UGGGCUGGCAGUGUAUUUU	1550
NM 001735.2 3573-3591 s	3573-3591	AGCCAGAGCACCUUUACA	982	UGUAAAAGGUUGCUUGGGCU	1551
NM 001735.2 3581-3599 s	3581-3599	GCACCUUUACAUIUGGCCAU	983	AUGGCCAAUUGUAAAAGGUGC	1552
NM 001735.2 3589-3607 s	3589-3607	ACAUUGGCCAUUUUCUGCGU	984	ACGCAGAAAUGGCCCAAUGU	1553
NM 001735.2 3602-3620 s	3602-3620	CUGCGUAUGCUCUUUCCCU	985	AGGGAAAGAGCAUACGCAG	1554
NM 001735.2 3613-3631 s	3613-3631	CUUUCCUUGGGAGAUAAAA	986	UUUUUAUCUCCCGGGAAG	1555
NM 001735.2 3623-3641 s	3623-3641	GAGUAAAACUCACCCACA	987	UGUGGGUGAGUUUUUAUCUC	1556
NM 001735.2 3631-3649 s	3631-3649	ACUCACCCACAGUUUCGUU	988	AACGAAACUGUGGGUGAGU	1557
NM 001735.2 3640-3658 s	3640-3658	CAGUUUCGUUCAAUUGUUU	989	AAACA AUUGAACGAAAACUG	1558
NM 001735.2 3650-3668 s	3650-3668	CAAUUGUUUCAGCUUUGAA	990	UUCAAAAGCUGAAAACAAUUG	1559
NM 001735.2 3662-3680 s	3662-3680	CUUUGAAGAGAGAAGCUUU	991	AAAGCUUCUCUCUUCAAAAG	1560
NM 001735.2 3669-3687 s	3669-3687	GAGAGAAGCUUUGGUUAAA	992	UUUUAACCAAGGCUUCUCUC	1561
NM 001735.2 3682-3700 s	3682-3700	GUUAAAAGGUAAUCCACCCA	993	UGGGUGGAUUACCUUUUAAC	1562
NM 001735.2 3691-3709 s	3691-3709	AAUCCACCCAUUUUAUCGUU	994	AACGAUAAAUGGGUGGAUU	1563
NM 001735.2 3699-3717 s	3699-3717	CAUUUAUCGUUUUUUGGAAA	995	UUUCCAAAACGAAUAAAUG	1564

[1095]

NM 001735.2.3710-3728 s	3710-3728	UUUGGAAAGACAAUCUUA	996	UGAAGAUUGUUCUCCAAA	1565
NM 001735.2.3721-3739 s	3721-3739	AAUCUUCAGCAUAAAGACA	997	UGUCUUUAUGCUGAAGAUU	1566
NM 001735.2.3730-3748 s	3730-3748	CAUAAAGACAGCUCUGUAC	998	GUACAGAGCUGUCUUUAUG	1567
NM 001735.2.3741-3759 s	3741-3759	CUCUGUACCUAACACUGGU	999	ACCAGUJUAGGUACAGAG	1568
NM 001735.2.3752-3770 s	3752-3770	ACACUGGUACGGCACGUAU	1000	AUACGUGCCGUACCAGUGU	1569
NM 001735.2.3762-3780 s	3762-3780	GGCACGUAUGGUAGAAACA	1001	UGUUUCUACCAUACCGUGCC	1570
NM 001735.2.3771-3789 s	3771-3789	GGUAGAAACAACUGCCUUAU	1002	AUAGGCAGUUUUUUCUACC	1571
NM 001735.2.3779-3797 s	3779-3797	CAACUGCCUUAUGCUUUAU	1003	AGUAAAGCAUAGGCAGUUG	1572
NM 001735.2.3791-3809 s	3791-3809	CUUUAUCACACCAGUCUGAA	1004	UUCAGACUGGUGAGUAAAG	1573
NM 001735.2.3803-3821 s	3803-3821	GUUGAACUUGGAAAGAUU	1005	AUAUCUUUCAAGUUCAGAC	1574
NM 001735.2.3809-3827 s	3809-3827	ACUUGAAAGAUUAAAUUA	1006	UAAUUUAUCUUUCAAGU	1575
NM 001735.2.3819-3837 s	3819-3837	UAUAAAUUAUGUUAACCCA	1007	UGGGUUAACAUAUUUAUA	1576
NM 001735.2.3829-3847 s	3829-3847	GUUAAACCCAGUCAUCAAU	1008	AUUUGAUGACUGGGUUAAC	1577
NM 001735.2.3839-3857 s	3839-3857	UCAUCAAAUIGGCUAUCAGA	1009	UCUGAUAGCCAUJUUGAUGA	1578
NM 001735.2.3851-3869 s	3851-3869	UAUCAGAAGAGCAGAGGUA	1010	UACCUCUGCUCUUCUGAUA	1579
NM 001735.2.3863-3881 s	3863-3881	AGAGGUUAGGAGGUGGCUU	1011	AAGCCACCUCCAUAACCUCU	1580
NM 001735.2.3872-3890 s	3872-3890	GAGGUGGCUUUUAUUAUCAA	1012	GUUGAAUAAAAGCCACCUC	1581
NM 001735.2.3883-3901 s	3883-3901	UAUJCAACCAGGACACAA	1013	UUUGUUCUUGGUUGAUAUA	1582
NM 001735.2.3893-3911 s	3893-3911	AGGACACAAUCAUUGCCAU	1014	AUGGCAUUGAUUGUGUCCU	1583
NM 001735.2.3899-3917 s	3899-3917	CAAUCAAUIGCCAUUGAGGG	1015	CCCUCAAUGGCAUUGAUUG	1584
NM 001735.2.3909-3927 s	3909-3927	CAUUGAGGGCCUGACGGAA	1016	UUCCGUCAGGCCUCCAUG	1585

[1096]

NM 001735.2	3922-3940	ACGGAAUUAUCACUCCUGG	1017	CCAGGAGUGAAUAUJCCGU	1586
NM 001735.2	3930-3948	UUCACUCCUGGUAAACAA	1018	UUUUUUAACCAGGAGUGAA	1587
NM 001735.2	3939-3957	GGUUAACAACUCCGUUG	1019	CAAGCGGAGUUGUUUAACC	1588
NM 001735.2	3951-3969	CCGCUUGAGUAUJGACAU	1020	GAUGUCCAUACUCAAGCGG	1589
NM 001735.2	3963-3981	GGACAUCCGAUGUUUCUAC	1021	GUAAGAAACAUCGAUGUCC	1590
NM 001735.2	3969-3987	CGAUGUUUCUUAACAAGCAU	1022	AUGCUUGUAAGAAACAUCG	1591
NM 001735.2	3981-3999	C AAGCAUAAAGGUGCCUUA	1023	UAAGGCACCUUUUAUGCUUG	1592
NM 001735.2	3992-4010	GUGCCUUAUAUAUUUAUA	1024	UUUAUAUUUAUGUAAGGCAC	1593
NM 001735.2	3999-4017	ACAUAAUUAUAAAAUGACA	1025	UGUCAUUUUUAUAUAUUGU	1594
NM 001735.2	4009-4027	AAAAUGACAGACAAGAAUU	1026	AAUUCUUGUCUGUCAUUUU	1595
NM 001735.2	4020-4038	CAAGAAUUUCUUJGGGAGG	1027	CCUCCAAAGGAAAUUCUUG	1596
NM 001735.2	4029-4047	CCUUJGGAGGCCAGUAGAG	1028	CUCUACUGGCCUCCCAAGG	1597
NM 001735.2	4041-4059	AGUAGAGGUGCUUCUCAAU	1029	AUUGAGAAGCACCUUCUACU	1598
NM 001735.2	4051-4069	CUUCUCAAUUGAUGACCUCA	1030	UGAGGUCAUCAUJUGAGAAG	1599
NM 001735.2	4062-4080	UGACCUCAUUJUCAGUACA	1031	UGUACUGACAUAUGAGGUCA	1600
NM 001735.2	4072-4090	GUACAGUACAGGAUUJGGCA	1032	UGCCAAAUCCUGUACUGAC	1601
NM 001735.2	4080-4098	AGGAUUJGGCAGUJGGCUUG	1033	CAAGCCACUGCCAAAUCU	1602
NM 001735.2	4092-4110	UJGGCUJGGCUACAGUACAU	1034	AUGUACUGUJAGCCAAGCCA	1603
NM 001735.2	4099-4117	GUACAGUACAUJGUAACAA	1035	UUGUUACAUGUACUGUAGC	1604
NM 001735.2	4113-4131	AACAACUGUAGUJUCACAAA	1036	UUUGUGAACUACAGUJUGU	1605
NM 001735.2	4120-4138	GUAGUJUCAAAAACCAGUA	1037	UACUJGUUUUJUGAUCUAC	1606

[1097]

NM 001735.2 4130-4148 s	4130-4148	AAACCAGUACCUUGAGGA	1038	UCCUCAGAGGUACUGGUUU	1607
NM 001735.2 4143-4161 s	4143-4161	UGAGGAAGUUUUGCAGCUUU	1039	AAAGCUGCAAACUUCUCA	1608
NM 001735.2 4153-4171 s	4153-4171	UGCAGCUUUUAUUUGAAAA	1040	UUUCAAUA AAAAGCUGCA	1609
NM 001735.2 4163-4181 s	4163-4181	AUUUGAAAAUJCGAUACUCA	1041	UGAGUAUCGALUUUUAUU	1610
NM 001735.2 4173-4191 s	4173-4191	CGAUACUCAGGAUAUUGAA	1042	UUCAAUAUCCUGAGUAUCG	1611
NM 001735.2 4182-4200 s	4182-4200	GGAUUUUGAAGCAUCCAC	1043	GUGGGAUGCUUCAUAUCC	1612
NM 001735.2 4189-4207 s	4189-4207	GAAGCAUCCACUACAGAG	1044	CUCUGAUGGGGAGUUCUUC	1613
NM 001735.2 4199-4217 s	4199-4217	ACUACAGAGGCUACGGAAA	1045	UUUCCGUAGCCUCUCUGAGU	1614
NM 001735.2 4212-4230 s	4212-4230	CGGAAACUCUGAUUACAAA	1046	UUUGUAUUCAGAGUUUCCG	1615
NM 001735.2 4221-4239 s	4221-4239	UGAUUACAACGCAUAGUA	1047	UACUAUGCGUUUUGUAUUA	1616
NM 001735.2 4232-4250 s	4232-4250	GC AUAGUAGCAUUGCCAG	1048	CUGGCACAUGCUACUAUCC	1617
NM 001735.2 4240-4258 s	4240-4258	GCAUGUCCAGCUACAAGC	1049	GC UUGUAGCUGGCACAUGC	1618
NM 001735.2 4251-4269 s	4251-4269	CUAC AAGCCACGACGGGAA	1050	UUCCUCUGGGGUUGUAG	1619
NM 001735.2 4260-4278 s	4260-4278	CAGCAGGAAGAAUUAUCA	1051	UGAUGAUUUCUUCUCCUGCUG	1620
NM 001735.2 4270-4288 s	4270-4288	GAAUCAUC AUCUGGAUCCU	1052	AGGAUCCAGAUGAUGAUUC	1621
NM 001735.2 4283-4301 s	4283-4301	GAUCCUCUCAUGCGGUGAU	1053	AUCACCCGAUGAGAGGAUC	1622
NM 001735.2 4289-4307 s	4289-4307	CUCAUCCGGUGAUGGACAU	1054	AUGUCCAUCACCCGCAUGAG	1623
NM 001735.2 4299-4317 s	4299-4317	GAUUGACAUCUCCUUGCCU	1055	AGGCAAGGAGAUUGUCCAUC	1624
NM 001735.2 4311-4329 s	4311-4329	CUUUGCCUACUGGAAUACAGU	1056	ACUGAUUCCAGUAGGCCAAG	1625
NM 001735.2 4322-4340 s	4322-4340	GAAUCAGUGCAAAUUGAAGA	1057	UCUUCAUUUGCACUGAUUC	1626
NM 001735.2 4332-4350 s	4332-4350	AAAUAGAAGACUAUAAAA	1058	UUUUAAGUCUUCUUCAUUU	1627

[1098]

NM 001735.2.4339-4357 s	4339-4357	GAAGACUUAAAAGCCUUG	1059	CAAGGGCUUUUAAGUCUUC	1628
NM 001735.2.4353-4371 s	4353-4371	CCUUUGGAAGGGUGGGAU	1060	AUCCACCCUUCACAAAGG	1629
NM 001735.2.4360-4378 s	4360-4378	GAAGGGUGGAUCAACUUAU	1061	AUAGUUGAUCCACCCUUC	1630
NM 001735.2.4370-4388 s	4370-4388	AUCAACUUAUCACUGAUUA	1062	UAAUCAGUGAAUAGUUGAU	1631
NM 001735.2.4380-4398 s	4380-4398	CACUGAUUACCAAAUCAAA	1063	UUUGAUUUUGGUAUCAGUG	1632
NM 001735.2.4393-4411 s	4393-4411	AUCAAGAUGGACAUGUUA	1064	UAAUCAUGUCCAUUUUGAU	1633
NM 001735.2.4402-4420 s	4402-4420	GGACAUUUUAUUCUGCAAC	1065	GUUGCAGAAUAACAUGUUC	1634
NM 001735.2.4413-4431 s	4413-4431	UCUGCAACUGAAUUCGAUU	1066	AAUCGAAUUCAGUUGCAGA	1635
NM 001735.2.4422-4440 s	4422-4440	GAAUUCGAUUCUCCUCCAGU	1067	ACUGGAGGGAUUCGAAUUC	1636
NM 001735.2.4432-4450 s	4432-4450	CCUCCAGUGAUUUCCUUU	1068	AAAGGAAUUCACUUGGAGGG	1637
NM 001735.2.4441-4459 s	4441-4459	GAUUUCUUUGUGUACGAU	1069	AUCGUACACAAGGAAUUC	1638
NM 001735.2.4453-4471 s	4453-4471	GUACGAUUCGGAAUUUUG	1070	CAAAUAUCCGGAAUCGUAC	1639
NM 001735.2.4462-4480 s	4462-4480	CGGAUAUUUGAACUCUUG	1071	CAAAGAGUUCAAUAUCCG	1640
NM 001735.2.4473-4491 s	4473-4491	ACUCUUUGAAGUUGGGUUU	1072	AAACCAACUUCAAAGAGU	1641
NM 001735.2.4482-4500 s	4482-4500	AGUUUGGUUUCUCAGUCCU	1073	AGGACUGAGAAACCCAUCU	1642
NM 001735.2.4490-4508 s	4490-4508	UUUCAGUCCUGCCACUUU	1074	AAAGUGGCAGGACUGAGAA	1643
NM 001735.2.4503-4521 s	4503-4521	CACUUUCACAGUGUACGAA	1075	UUCGUACACUUGUGAAAAGU	1644
NM 001735.2.4509-4527 s	4509-4527	CACAGUUCACGAUUACCAC	1076	GUGGUUUUGUACUACUUG	1645
NM 001735.2.4523-4541 s	4523-4541	ACCACAGACCAGAUAAACA	1077	UGUUUAUCUGGUCUCUGGU	1646
NM 001735.2.4531-4549 s	4531-4549	CCAGAUAAACAGUGUACCA	1078	UGGUACACUGUUUAUCUGG	1647
NM 001735.2.4540-4558 s	4540-4558	CACUGUACCAUGUUUUAUA	1079	UAUAAAACAUGGUACACUG	1648

[1099]

NM 001735.2 4551-4569 s	4551-4569	GUUUUAUAGCACUCCAUAU	1080	AUUUGGAAGUCUAUAAAAC	1649
NM 001735.2 4562-4580 s	4562-4580	CUUCCAUAUCAAUUUCA	1081	UGAAUUUUUGAUUUGGAAG	1650
NM 001735.2 4570-4588 s	4570-4588	AUCAAUUUCAGAAAAGUCU	1082	AGACUUUCUGAAUUUUUGAU	1651
NM 001735.2 4581-4599 s	4581-4599	GAAAGUCUGUGAAGGAGCC	1083	GGCUCCUUUCACAGACUUUC	1652
NM 001735.2 4591-4609 s	4591-4609	GAAGGAGCCCGUGCAAGU	1084	ACUUUGCACGGGCUCCUUC	1653
NM 001735.2 4601-4619 s	4601-4619	CGUGCAAGUGUGUAGAAGC	1085	GCUUCUACACACUUUGCAGG	1654
NM 001735.2 4612-4630 s	4612-4630	GUAGAAAGCUGAUUGUGGGC	1086	GCCACAUAUCAGCUUCUAC	1655
NM 001735.2 4619-4637 s	4619-4637	CUGAUUGUGGGCAAAUGCA	1087	UGCAUUUGCCCACAUAUCAG	1656
NM 001735.2 4629-4647 s	4629-4647	GCAAAUGCAGGAAGAUAUG	1088	CAAUUCUUCUGCAUUUUGC	1657
NM 001735.2 4639-4657 s	4639-4657	GAAAGAUUGGAUCUGACAAA	1089	UUUCACAGAUCCAUAUUCUUC	1658
NM 001735.2 4651-4669 s	4651-4669	CUGACAAUCUCUGCAGAGA	1090	UCUCUGCAGAGAUUGUCAG	1659
NM 001735.2 4663-4681 s	4663-4681	GCAGAGACAAGAAAACAAA	1091	UUUGUUUUUCUUGUCUCUGC	1660
NM 001735.2 4670-4688 s	4670-4688	CAAGAAAACAACACAGCAUG	1092	CAUGCUGUUUUGUUUUCUUG	1661
NM 001735.2 4681-4699 s	4681-4699	ACAGCAUGUAAACCAGAGA	1093	UCUCUGGUUUACAUGCUGU	1662
NM 001735.2 4693-4711 s	4693-4711	CCAGAGAUUUGCAUAUGCUU	1094	AAGCAUAUGCAAUCUCUGG	1663
NM 001735.2 4702-4720 s	4702-4720	GCAUAUCCUUUAUAAAAGUUA	1095	UAAUUUAUAAGCAUAUUGC	1664
NM 001735.2 4710-4728 s	4710-4728	UUUAAAAGUUUAGCAUCACA	1096	UGUGAUGCUAACUUUAUAA	1665
NM 001735.2 4722-4740 s	4722-4740	CAUCACAUCUACUCUGUA	1097	UACAGUGAUGGAUGUGAUG	1666
NM 001735.2 4733-4751 s	4733-4751	UCACUGUAGAAAAGUUUUU	1098	AAAAUAUUUCUACAGUGA	1667
NM 001735.2 4740-4758 s	4740-4758	AGAAAAGUUUUUUGUCAAG	1099	CUUGACAAAACAUAUUUCU	1668
NM 001735.2 4750-4768 s	4750-4768	UUUGUCAAGUACAAGGCAA	1100	UUUGCUUGUACUUGACAAA	1669

[1100]

NM 001735.2.4763-4781 s	4763-4781	AGCAACCCUUCUGGAUUAU	1101	AUAUCCAGAAGGUGUGCCU	1670
NM 001735.2.4770-4788 s	4770-4788	CCUUCUGGAUAUUCUACAAA	1102	UUUGUAGAUUCCAGAAGG	1671
NM 001735.2.4779-4797 s	4779-4797	UAUCUACAAAAACUGGGAA	1103	UCCCCAGUUUUUGUAGAU	1672
NM 001735.2.4790-4808 s	4790-4808	CUGGGAAAGCUUGUUGCUGA	1104	UCAGCAACAGCUUCCCCAG	1673
NM 001735.2.4799-4817 s	4799-4817	CUGUUCUUGAGAAAGACUC	1105	GAGUCUUUCUCAGCAACAG	1674
NM 001735.2.4813-4831 s	4813-4831	GACUCUGAGAUUACCUUCA	1106	UGAAGGUAUUCUCAGAGUC	1675
NM 001735.2.4819-4837 s	4819-4837	GAGAUUACCUUCAUUA AAA	1107	UUUAAUGAAGGUAAUUCU	1676
NM 001735.2.4831-4849 s	4831-4849	AUUAAAAAGGUAAACCUUA	1108	UACAGGUUACCUUUUUAAU	1677
NM 001735.2.4841-4859 s	4841-4859	UAACCUUUAUAACGCUGA	1109	UCAGGUAUAGUACAGGUUA	1678
NM 001735.2.4850-4868 s	4850-4868	CUAACGUCGAGCUGGUAAA	1110	UUUACCAGCUCAGCGUUAG	1679
NM 001735.2.4863-4881 s	4863-4881	GGUAAAAGGAAGACAGUAC	1111	GUACUGUCUUCUUUUACC	1680
NM 001735.2.4871-4889 s	4871-4889	GAAGACAGUACUUAAUUUAU	1112	AUAUUUAAGUACUGUCUUC	1681
NM 001735.2.4881-4899 s	4881-4899	CUUAAUUUAGGGUAAAAGAA	1113	UUCUUACCCAUAAUUUAAAG	1682
NM 001735.2.4893-4911 s	4893-4911	UAAAAGAACCCUCCAGAU	1114	UAUCUGGAGGGCUUCUUUA	1683
NM 001735.2.4902-4920 s	4902-4920	CCUCCAGAUAAAUAUACAAU	1115	AUUUGUUUUUAUCUGGAGG	1684
NM 001735.2.4912-4930 s	4912-4930	AAAUACAUUUCAGUUUCA	1116	UGAAACUGAAAUUUGAUUUU	1685
NM 001735.2.4923-4941 s	4923-4941	CAGUUUCAGGUACAUUCUAC	1117	GUAGAUUACCUUGAAAACUG	1686
NM 001735.2.4931-4949 s	4931-4949	GGUACAUCUACCUUUUAGA	1118	UCUAAAAGGGUAGAUUACC	1687
NM 001735.2.4942-4960 s	4942-4960	CCUUUAGAUUCCUUGACCU	1119	AGGUCAAGGAUUCUAAAAGG	1688
NM 001735.2.4952-4970 s	4952-4970	CCUUGACCUUGGAUUGAAUA	1120	UAUUCAAUCCAGGUCAAGG	1689
NM 001735.2.4961-4979 s	4961-4979	GGAUUGAAUACUGGCCUAG	1121	CUAGGCCAGUAUUCAAUCC	1690

[1101]

NM 001735.2.4971-4989 s	4971-4989	CUGGCCUAGAGACACAACA	1122	UGUUGUGUCUAGGCCAG	1691
NM 001735.2.4979-4997 s	4979-4997	GAGACACAACAUGUUAUC	1123	GAUGAACAUUGUGUCUC	1692
NM 001735.2.4991-5009 s	4991-5009	GUUCAUCGUGUCAAGCAUU	1124	AAUGCUUGACACGAUGAAC	1693
NM 001735.2.5000-5018 s	5000-5018	GUC AAGCAUUUUUAGCUAA	1125	UUAGCUAAAAAUUCUUGAC	1694
NM 001735.2.5013-5031 s	5013-5031	AGCUAAUUUAGAUAAUUU	1126	AAAUUCAUCUAAAAUUAGCU	1695
NM 001735.2.5022-5040 s	5022-5040	AGAUGAAUUUGCCGAAGAU	1127	AUCUUCGGCAAUUUCAUCU	1696
NM 001735.2.5033-5051 s	5033-5051	CCGAAGAUUUCUUUUUAAA	1128	UUUAAAAAGAUUUCUUCGG	1697
NM 001735.2.5043-5061 s	5043-5061	CUUUUUAAUUGGAUGCUAA	1129	UUAGCAUCCAUUUAAAAAG	1698
NM 001735.2.5053-5071 s	5053-5071	GGAUUCUAAAAUUCUGAA	1130	UUCAGGAUUUUUAGCAUCC	1699
NM 001735.2.5059-5077 s	5059-5077	UAAAAUUCUGAAGUUCAG	1131	CUGAACUUCAGGAAUUUUA	1700
NM 001735.2.5071-5089 s	5071-5089	AGUUCAGCUGCACUACAGUU	1132	AACUGUAUGCAGCUGAACU	1701
NM 001735.2.5080-5098 s	5080-5098	GCACACAGUUUGCACUUUU	1133	AUAAGUGCAAACUGUAUGC	1702
NM 001735.2.5093-5111 s	5093-5111	ACUUUAGGACUCCUGUUGU	1134	ACAACAGGAGUCCAUAAAGU	1703
NM 001735.2.5099-5117 s	5099-5117	GGACUCCUGUUGUUGAAGU	1135	ACUUCAACAACAGGAGUCC	1704
NM 001735.2.5109-5127 s	5109-5127	UGUUUAAGUUCGUUUUUUU	1136	AAAAAACGAACUUAACA	1705
NM 001735.2.5122-5140 s	5122-5140	UUUUUUGUUUUUCUUUUUU	1137	AAAAGAAGAAAAACAAAAA	1706
NM 001735.2.5132-5150 s	5132-5150	UCUUUUUUUUUUAAAAAUU	1138	AAUGUUUAAAAAAAAGAAGA	1707
NM 001735.2.5139-5157 s	5139-5157	UUUUUUAACAUUCAUAGCU	1139	AGCUAUGAAUGUUUAAAAA	1708
NM 001735.2.5152-5170 s	5152-5170	AUAGCUGGUCUUUUUUGUA	1140	UACAAAUAAGACCAGCUAU	1709
NM 001735.2.5159-5177 s	5159-5177	GUCUUUUUUUUUAAAGCUCA	1141	UGAGCUUUACAAAUAAGAC	1710
NM 001735.2.5170-5188 s	5170-5188	AAAGCUCACUUUACUUAGA	1142	UCUAAGUAAAGUGAGCUUU	1711

[1102]

NM 001735.2 5182-5200 s	5182-5200	ACUAGAAUUAGUGGCACU	1143	AGUGCCACUAAUUCUAAGU	1712
NM 001735.2 5192-5210 s	5192-5210	AGUGGCACUUGCUUUUAUU	1144	AAUAAAAGCAAGUGCCACU	1713
NM 001735.2 5202-5220 s	5202-5220	GCUUUUAUUAGAGAAUGAU	1145	AUCAUUCUCUAAUAAAAGC	1714
NM 001735.2 5212-5230 s	5212-5230	GAGAAUGAUUUCAAAUGCU	1146	AGCAUUUGAAAUCAUUCUC	1715
NM 001735.2 5220-5238 s	5220-5238	UUUCAAUUGCUUUAACUUU	1147	AAAGUUACAGCAUUUGAAA	1716
NM 001735.2 5231-5249 s	5231-5249	GUAACUUUUCUGAAAUAACA	1148	UGUUUUUCAGAAAAGUUAC	1717
NM 001735.2 5241-5259 s	5241-5259	GAAAUAAAC AUGGCCUUGGA	1149	UCCAAGGCCAUGUUAUUUC	1718
NM 001735.2 5253-5271 s	5253-5271	CCUUGGAGGCCAUGAAGAC	1150	GUUUCAUGCCUCCAAGG	1719
NM 001735.2 5259-5277 s	5259-5277	AGGGCAUGAAGACAGAUAC	1151	GUUUCUGUCUUC AUGCCCU	1720
NM 001735.2 5273-5291 s	5273-5291	GAUACUCCUCCAAGGUUAU	1152	AUAACCUUGGAGGAGUAUC	1721
NM 001735.2 5279-5297 s	5279-5297	CCUCCAAGGUUAUUGGACA	1153	UGUCCAUAUACCUUGGAGG	1722
NM 001735.2 5293-5311 s	5293-5311	GGACACCGGAAACAUAUA	1154	UUUAUUUUUCCGGUUCU	1723
NM 001735.2 5301-5319 s	5301-5319	GAAACAUAUUAUUGGAACA	1155	UGUCCAUAUUAUUGUUCU	1724
NM 001735.2 5311-5329 s	5311-5329	AUUGGAACACCUCCUCAAA	1156	UUUGAGGAGGUGUUCCAAU	1725
NM 001735.2 5322-5340 s	5322-5340	UCCUCAAACCUACCACUCA	1157	UGAGUGGUAGGUUUGAGGA	1726
NM 001735.2 5331-5349 s	5331-5349	CUACCACUCAGGAAUUGUUU	1158	AAACAUCUUGAGUGGUAG	1727
NM 001735.2 5343-5361 s	5343-5361	AAUGUUUGCUUGGCCGAA	1159	UUCGGCCCCAGCAAACAUU	1728
NM 001735.2 5349-5367 s	5349-5367	UGCUUGGCCCGAAAGAACA	1160	UGUUUUUUUGGCCCCAGCA	1729
NM 001735.2 5360-5378 s	5360-5378	AAAGAACAGUCCAUUGAAA	1161	UUUCAUUGGACUGUUCUUU	1730
NM 001735.2 5371-5389 s	5371-5389	CAUUGAAAAGGAGUAUUAC	1162	GUAAUACUCCUUUCAAUUG	1731
NM 001735.2 5380-5398 s	5380-5398	GGAGUAUUUACAAAACAUG	1163	CAUGUUUUUUAUAUACUCC	1732

[1103]

NM_001735.2_5391-5409_s	5391-5409	AAACAUGGCCUUUGCUUG	1164	CAAGCAAAGGCCAUGUUUU	1733
NM_001735.2_5399-5417_s	5399-5417	GCCUUUGCUUGAAAAGAAAA	1165	UUUUUCUUUCAAGCAAAGGC	1734
NM_001735.2_5409-5427_s	5409-5427	GAAAGAAAAUACCAAGGAA	1166	UUCCUUUGGUUUUUUCUUC	1735
NM_001735.2_5420-5438_s	5420-5438	CCAAGGAACAGGAAACUGA	1167	UCAGUUUCCUGUUCUUGG	1736
NM_001735.2_5433-5451_s	5433-5451	AACUGAUCAUUAAAGCCUG	1168	CAGGCUUUAUUGAUCAGUU	1737
NM_001735.2_5441-5459_s	5441-5459	AUUAAGCCUGAGUUUGCU	1169	AGCAAACUCAGGCCUUUAAU	1738

[1104] 实例5:体内C5沉默

[1105] 以2.5mg/kg或5mg/kg剂量或媒介物对照,在背部的肩胛骨区域和中背侧区域中用C5-siRNA AD-58641皮下处理三个雌性食蟹猴的组。在每隔两天给定的每轮中,用八次剂量给予两轮给药。收集血清C5,并且在指定时间点上使用专门用于C5检测的ELISA测定(艾博抗公司(Abcam))来评估(图13)。C5水平被归一化成三个剂量前的样品的平均值。通过全血清化学性质、血液学和凝结小组来分析在给药之前和在第23天(在第一轮处理给予的最后

剂量后的24小时)收集的样品。

[1106] 相对于处理前血清C5蛋白水平的血清C5蛋白水平的分析证实了,5mg/kg AD-58641给药方案使血清C5蛋白水平降低高达98% (图12)。在最低点平均血清C5水平降低97%,从而表明大多数的循环的C5是肝来源的。使用皮下给予AD-58641存在有效的、剂量依赖型和持久的血清C5蛋白水平敲低。在第一轮给药之后24小时鉴定出血液学、血清化学性质或凝结参数没有变化。

[1107] 还使用敏化的绵羊红细胞测定来分析血清溶血活性,以便测量经典途径活性。相对于最大溶血和对照样品中的背景溶血计算溶血百分比。计算并且分析三个动物的平均溶血值+/-SEM (图13)。在5mg/kg给药方案中溶血减少高达94%,其中在最低点平均抑制是92%。在最后剂量之后大于两周维持了溶血减少。

[1108] 实例6:另外的siRNA的体外筛选

[1109] 在3'-末端处用脱氧-胸腺嘧啶核苷酸(dT)的短序列对示于表20中的C5有义链序列和反义链序列进行修饰(表21)。使用以下方法来确定包含被列于表21中的有义序列和反义序列的双链体的体外功效。

[1110] 细胞培养和转染

[1111] 将Hep3B细胞(ATCC公司,弗吉尼亚州马纳萨斯)在37°C在5%CO₂的气氛中在EMEM(ATCC公司)(补充有10%FBS)中生长接近融合,然后通过胰酶消化从该板释放。通过将每孔5μl的Opti-MEM加上0.1μl的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德CA目录号13778-150)添加至5μl的siRNA双链体中进入384孔板来进行转染,并且在室温下孵育15分钟。然后将含有大约5×10³个Hep3B细胞的40μl完全生长培养基添加至siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。在10nM最终双链体浓度下进行实验。

[1112] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件号:610-12)的总RNA分离

[1113] 使用Biotek EL 405洗涤器的半自动化方法进行RNA分离。简言之,将细胞溶解于含有2ul Dynabeads的75μl溶解/结合缓冲液中,然后在电磁振荡器(联合科技公司(Union Scientific))的设定7上混合10分钟。使用磁台捕获磁珠并且去除上清液。在去除上清液之后,用90μl洗涤缓冲液A接着是90μl洗涤缓冲液B来洗涤磁珠。然后用100ul的洗脱缓冲液洗涤珠粒两次,随后抽出该洗脱缓冲液并且在384孔板中在珠粒结合RNA上直接产生cDNA。

[1114] 使用ABI大容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统,福斯特市,加利福尼亚州,目录号4368813)的cDNA合成

[1115] 将每个反应2μl 10×缓冲液、0.8μl 25×dNTP、2μl随机引物、1μl逆转录酶、1μl RNA酶抑制剂和3.2μl H₂O的主混合物直接添加到用于RNA分离的384孔板中的珠粒结合RNA中。然后在电磁振荡器上使板振荡10分钟,并且然后放置于37°C孵育器中持续2小时。在此孵育之后,将板放置于80°C孵育器中振荡7分钟以使酶失活并且从这些珠粒上洗脱RNA/cDNA。

[1116] 实时PCR

[1117] 将2μl的cDNA添加至384孔板(罗氏公司目录号04887301001)中的每孔含有0.5μl GAPDH TaqMan探针(应用生物系统目录号4326317E)、0.5μl C5 TaqMan探针(应用生物系统目录号Hs00156197_M1)和5μl Lightcycler 480探针主混合物(罗氏公司目录号04887301001)的主混合物中。在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)中完成实时PCR。在至少

两次独立的转染中测试每个双链体并且一式两份测定每次转染。

[1118] 为了计算变化的相对倍数,使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法分析实时数据并且归一化成用10nM AD-1955转染的细胞或模拟物转染的细胞进行的测定。

[1119] 表22示出用指定的dT修饰的iRNA转染的Hep3B细胞中的单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于未处理的细胞余留的信息的百分比。

[1120] 表21.dT修饰的C5 iRNA

[1121]

双链体 份	有义序列	SEQ ID NO:	NM_001735.2 中的位置	反义序列	SEQ ID NO:
AD-61779.2	UAUCCGUGGUUUUCCUGCUAdTdT	1739	3-21	UAGCAGGAAACCACGGAUAdTdT	2306
AD-61785.2	GGUUUCCUGCUACCUCCAAdTdT	1740	10-28	UUGGAGGUAGCAGGAAACCdTdT	2307
AD-61791.2	CCUCCAACCAUGGGCCUUUdTdT	1741	22-40	AAAGGCCCAUGGUUGGAGGdTdT	2308
AD-61797.2	GGGCUUUUUGGGAUACUUdTdT	1742	33-51	AAGUAUUCCCAAAAAGGCCdTdT	2309
AD-61803.2	GGAAUACUUUGUUUUUUAAdTdT	1743	43-61	UUAAAAACAAGUAUUCCTdTdT	2310
AD-61809.2	CUUUGUUUUUAAUCUUCCTdTdT	1744	49-67	GGAAGAUUAAAAACAAGdTdT	2311
AD-61815.2	CUUCCUGGGAAAAACCUGGdTdT	1745	63-81	CCAGGUUUUCCCCAGGAAGdTdT	2312
AD-61821.2	GGAAAACCUGGGACAGGAdTdT	1746	71-89	UCCUGUCCCCAGGUUUUCCdTdT	2313
AD-61780.2	GGGACAGGAGCAACAUAdTdT	1747	81-99	AUAUGUUUCUCCUGUCCCTdTdT	2314
AD-61786.2	CAACAUAUGUCAUUUCAGdTdT	1748	91-109	CUGAAUAGACAUUUGUdTdT	2315
AD-61792.2	CAUUCAGCACCAAAAAUAdTdT	1749	102-120	UAUUUUGGUGCUGAAAUUGdTdT	2316
AD-61798.2	GCACCAAAAAUUAUCCGUGdTdT	1750	109-127	CACGGAAUUAUUUUGGUGCdTdT	2317
AD-61804.2	CCGUGUUGGAGCAUCUGAAdTdT	1751	123-141	UUCAGAUGCUCCAACACGGdTdT	2318
AD-61810.2	GGAGCAUCUGAAAAUUAUGdTdT	1752	130-148	CAAUUUUUCAGAUUCUCCdTdT	2319
AD-61816.2	GAAAAUUAUUGAUUCAAGdTdT	1753	139-157	CUUGAAUCACAAAUUUUCdTdT	2320
AD-61822.2	GAUUCAAGUUUAUUGGAUACdTdT	1754	150-168	GUAUCCAUAACUUUGAAUUCdTdT	2321
AD-61781.2	GGAUACACUGAAGCAUUUGdTdT	1755	163-181	CAAUUGCUUCAGUGUAUCCdTdT	2322
AD-61787.2	GAAACUUUGAUUGCAACAAdTdT	1756	172-190	UUGUUGCAUCAAAUUGCUUCdTdT	2323
AD-61793.2	UGCAACAUAUCUCAUUUAAAAdTdT	1757	183-201	UUUAAUAGAGAUUUGUCAdTdT	2324
AD-61799.2	AAUCUCUAUUAAAAAGUUUAAdTdT	1758	189-207	AUAAUUUUUAUAGAGAUUdTdT	2325
AD-61805.2	AAGUUUCCUGAUAAAAAAdTdT	1759	201-219	UUUUUUUUCAGGAAUACUUdTdT	2326
AD-61811.2	CUGAUAAAAAAUUUAGUUAdTdT	1760	209-227	UAACUAAAAUUUUUAUCAGdTdT	2327
AD-61817.2	UUAGUUUACUCCUACAGGCCAdTdT	1761	221-239	UGGCCUUGAGGAGUAACUAdTdT	2328
AD-61823.2	CCUCAGGCCAUGUUUCAUUUdTdT	1762	230-248	AAAUGAACAUUGGCCUGAGGdTdT	2329

[1122]

AD-61782.2	UUCAUUUUAUCCUCAGAGAAdTdT	1763	242-260	UUUCUGAGGAUAAAUGAAAdTdT	2330
AD-61788.2	CUCAGAGAAUAAAUUCAAAdTdT	1764	252-270	UUUGAAUUUAUUCUCUGAGAdTdT	2331
AD-61794.2	AUUAAUUCCAAAACUCUGAdTdT	1765	259-277	CAGAGUUUUGGAAUUUAUUAdTdT	2332
AD-61800.2	CUCUGCAAUCUUAAACAUAAdTdT	1766	273-291	UAUUUUUAAGAUUCAGAGAdTdT	2333
AD-61806.2	CUUAAACAUAACAACCAAAAdTdT	1767	282-300	UUUUUGUUUAUUUGUUAAGAdTdT	2334
AD-61812.2	CAACCAAAACAUAUCCUGAdTdT	1768	292-310	CAGGCAAUUUUUUUUGGUUAdTdT	2335
AD-61818.2	CAAUUGCCUGGAGGACAAAdTdT	1769	301-319	UUUGUCCUCCAGGCAAUUGAdTdT	2336
AD-61824.2	GGACAAAACCCAGUUUCUUAdTdT	1770	313-331	AAGAAACUUGGUUUUUGUCCAdTdT	2337
AD-61783.2	CCAGUUUCUUUAUGUGUAUUAdTdT	1771	322-340	AAUACACAUAAGAAACUGGAdTdT	2338
AD-61789.2	AUGUGUAUUUGGAAAGUUUGAdTdT	1772	332-350	ACAACUUCCAAAUAACAUAAdTdT	2339
AD-61795.2	GGAAUUUGUAUCAAAAGCAUAdTdT	1773	342-360	AUGCUUUUGUAUACAACUUCAdTdT	2340
AD-61801.2	GUAUCAAAGCAUUUUUAAdTdT	1774	349-367	UUGAAAUAUGCUUUUGAUACAdTdT	2341
AD-61807.2	UUUUCAAAAUAUAAAAGAAdTdT	1775	361-379	UUUUUUUUUGAUUUUGAAAAdTdT	2342
AD-61813.2	CAAAAAGAAUUGCCAAUAACAdTdT	1776	371-389	GUUAUUUGCAUUCUUUUUGAdTdT	2343
AD-61819.2	GCCAAUAACCUAUGACAUAAdTdT	1777	381-399	AUUUGUCAUAGGUUAUUUGGCAdTdT	2344
AD-61825.2	CCUAUGACAUAUGGAUUUCUAdTdT	1778	389-407	AGAAAUCCAUUUGUCAUAGGAdTdT	2345
AD-61784.2	UGGAUUUCUCUUCAUUCAUAdTdT	1779	399-417	AUGAAUUGAAGAGAAAUCCAdTdT	2346
AD-61790.2	CAUUCAUACAGACAACCUAdTdT	1780	411-429	AGGUUUUGUCUGUAUGAAUUGAdTdT	2347
AD-61796.2	CAGACAACCCUGUUUAUACAdTdT	1781	419-437	GUUAUAAACAGGUUUUGUCUGAdTdT	2348
AD-61802.2	GUUUUAUACUCCAGACCAGUAdTdT	1782	430-448	ACUGGUUCUGGAGUAUAAACAdTdT	2349
AD-61808.2	AGACCAGUCAGUAAAAGUUAdTdT	1783	441-459	AACUUUUACUGACUGGUUCUAdTdT	2350
AD-61814.2	AGUAAAAGUUAGAGUUUAUAdTdT	1784	450-468	AUAAAUCUUAACUUUUUACUAdTdT	2351
AD-61820.2	AGAGUUUAUUUGUUGAAUUGAdTdT	1785	460-478	CAUUAACGAAUAAAACUCUAdTdT	2352
AD-61826.2	CGUUGAAUUGACGACUUUGAAAdTdT	1786	470-488	UUCAAAGUCUGCAUUAACGAdTdT	2353
AD-61832.2	CUUGAAGCCAGCCAAAAGAdTdT	1787	483-501	UCUUUUUGGUCUGCUCAAGAdTdT	2354
AD-61838.2	CCAGCCAAAAGAGAAAACUAdTdT	1788	490-508	CAGUUUCUCUUUUUGGUCUGAdTdT	2355
AD-61844.2	AAACUUGUCUUAACUUUCAUAdTdT	1789	503-521	AUGAAAAGUUUAAGACAGUUUUAdTdT	2356

[1123]

AD-61850.2	AUUUUCAUAGAUCCUGAAdTdT	1790	513-531	UUAGGAUCUAUGAAAGUUdTdT	2357
AD-61856.2	CAUAGAUCUUGAAGGAUCAdTdT	1791	519-537	UGAUCCUUCAGGAUCUAUGdTdT	2358
AD-61862.2	GAAGGAUCAGAAAGUUGACAdTdT	1792	529-547	UGUCAACUUCUGAUCCUUCdTdT	2359
AD-61868.2	UGACAUUGGUAGAAAGAAUUdTdT	1793	543-561	AAUUUCUUCUACCAUUGUCAdTdT	2360
AD-61827.2	GAAGAAUUGAUCAUAUUGdTdT	1794	553-571	CAAUUGAUCAAAUUCUUCdTdT	2361
AD-61833.2	GAUCAUUAUGGAAUUAUCUdTdT	1795	562-580	AGAUAAUUCCAAUAUGAUCdTdT	2362
AD-61839.2	GGAAUUUAUCUUCUUUCCUGdTdT	1796	571-589	CAGGAAAAGAGAAUAUUCdTdT	2363
AD-61845.2	CUCUUUCCUGACUUC AAGdTdT	1797	579-597	CUUGAAGUCAGGAAAAGAGdTdT	2364
AD-61851.2	ACUUC AAGAUUCGUUAAdTdT	1798	590-608	UUAGACGGAAUCUUGAAGUdTdT	2365
AD-61857.2	CCGUCUAAUCUAGAUUGdTdT	1799	601-619	CAUAUCUAGGAUUGAGACGGdTdT	2366
AD-61863.2	CCUAGAUUGGUUUGUGGAdTdT	1800	610-628	UCCACAUACCAUAUCUAGGdTdT	2367
AD-61869.2	UGUGGACGAUCAAGGCUAAdTdT	1801	623-641	UUAGCCUUGAUCGUCCACAdTdT	2368
AD-61828.2	CGAUCAAGGCUAUAUAAdTdT	1802	629-647	UUUAUUUAGCCUUGAUCGdTdT	2369
AD-61834.2	AUAUAAAAGAGGACUUUUCAdTdT	1803	642-660	UGAAAAGUCCUUAUAUAdTdT	2370
AD-61840.2	GAGGACUUUUC AACACUUGdTdT	1804	649-667	CAGUUUGUUGAAAAGUCCUCdTdT	2371
AD-61846.2	CAACUGGAACCGCAUAUUUdTdT	1805	662-680	AAAUUGCGGUUCCAGUUUGdTdT	2372
AD-61852.2	CGCAUUAUUUGAAGUUAAdTdT	1806	672-690	UUUAACUUC AAAUAUGCGdTdT	2373
AD-61858.2	AAGUUAAGAAUAUGUCUdTdT	1807	683-701	AAGACAUAUUCUUUAACUUCdTdT	2374
AD-61864.2	GAAUAUGUCUUGCCACAUUdTdT	1808	691-709	AAUGGGCAAGACAUAUUCdTdT	2375
AD-61870.2	CCACAUUUUCUGUCUCAdTdT	1809	703-721	UUUGAGACAGAAAUAUGUGdTdT	2376
AD-61829.2	CUGUCUCAUUCGAGCCAGAdTdT	1810	713-731	UCUGGCUUGAUUGAGACAGdTdT	2377
AD-61835.2	CAUUCGAGCCAGAAUAUAAdTdT	1811	719-737	UUUAUUUCUGGCUCG AUUGdTdT	2378
AD-61841.2	GAAUAUAUUUCAUUGGUUdTdT	1812	730-748	AACCAUUGAAAUAUAUUCdTdT	2379
AD-61847.2	AUUGGUUAC AAGAACUUUAdTdT	1813	742-760	UAAAAGUUUCUUGUAACCAAUdTdT	2380
AD-61853.2	AGAACUUUAAGAAUUUUGAdTdT	1814	752-770	UCAAAUAUUCUAAAAGUUCUdTdT	2381
AD-61859.2	GAAUUUUGAAAUUAUAUAAdTdT	1815	762-780	UAUAGUAUAUUUCAAUAUUCdTdT	2382
AD-61865.2	GAAAUUACUUAUAAAAGCAAdTdT	1816	769-787	UUUGCUUUAUAUAUAUUCdTdT	2383

[1124]

AD-61871.2	AAAGCAAGAUUUUUUAUAAdTdT	1817	781-799	UAUAAAAUAUCUUGCUUUAdTdT	2384
AD-61830.2	AUAUUUUUAUAAUAAAGUAdTdT	1818	789-807	UACUUUAUUAUAAAAAUAdTdT	2385
AD-61836.2	AAGUAGUCACUGAGGCUGAdTdT	1819	803-821	UCAGCCUCAGUGACUACUAdTdT	2386
AD-61842.2	CACUGAGGCUGACGUUUUAAdTdT	1820	810-828	AUAAACGUCAGCCUCAGUGAdTdT	2387
AD-61848.2	CGUUUAUAUCACAUUUGGAdTdT	1821	822-840	UCCAAUUGUGAUUAAAAAGAdTdT	2388
AD-61854.2	CACAUUUGGAAUAAGAGAAAdTdT	1822	831-849	UUUCUUUAUUCAAAAUGUGAdTdT	2389
AD-61860.2	AUAAGAGAGACUUAAAAAdTdT	1823	840-858	UUUUAAAGUUCUUCUUAUAdTdT	2390
AD-61866.2	CUUAAAAGAU/GAU/CAAAAAAdTdT	1824	852-870	UUUUUGAUCAUCUUUUUAAGAdTdT	2391
AD-61872.2	GAUGAUCAAAAAGAAAU/GAdTdT	1825	859-877	UCAUUUCUUUUUGAUC/AUCAdTdT	2392
AD-61831.2	AAUUGAUGCAACAGCAAUAdTdT	1826	872-890	AUUGCUUUUGCAUC/AUUAdTdT	2393
AD-61837.2	ACAGCAUUGCAAAACACAAdTdT	1827	883-901	UUUGUUUUUGCAUUGCUUGAdTdT	2394
AD-61843.2	AAACACAUAUUGUUAUAAAdTdT	1828	893-911	UUUAUCAACAUAUUGUUAUUAdTdT	2395
AD-61849.2	CAUUGUUAUAAUUGGAAUAdTdT	1829	899-917	AUUCCAUUUUAUCAAUUUGAdTdT	2396
AD-61855.2	GGAAUUGCUCAAAGUCACAUAdTdT	1830	913-931	AUGUGACUUUGAGCAAUUCAdTdT	2397
AD-61861.2	GCUCAAGUCACAUUUGAUUAdTdT	1831	919-937	AAUCAAAUUGUACUUGAGCAdTdT	2398
AD-61867.2	AUUUGAUUCUGAAACAGCAAdTdT	1832	930-948	UGCUUUUUCAGAAUCAAUAdTdT	2399
AD-62062.1	UGAAACAGCAGUCAAAAGAAAdTdT	1833	939-957	UUUUUUGACUGCUUUUUCAdTdT	2400
AD-62068.1	CAAAGAACUUGUCAUACUAdTdT	1834	951-969	GUAGUAUGACAGUUCUUUUGAdTdT	2401
AD-62074.1	CAUACUACAGUUUAGAAGAdTdT	1835	962-980	UCUUUCAAACUGUAGUAUUGAdTdT	2402
AD-62080.1	CAGUUUAGAAGAUUUAAACAdTdT	1836	969-987	GUUUAAAUCUUUAACUUGAdTdT	2403
AD-62086.1	UAAACAACAAGUACUUUAAdTdT	1837	983-1001	UAAAGGUACUUUUUUUUAAdTdT	2404
AD-62092.1	CAAGUACCUUUUAUUGCUAdTdT	1838	990-1008	AGCAAUAUAAAGGUACUUGAdTdT	2405
AD-62098.1	UAUUGCUUGAAACAGUCAUAdTdT	1839	1002-1020	UAUGACUUGUACAGCAAAUAdTdT	2406
AD-62104.1	AACAGUCAUAGAGUCUACAdTdT	1840	1011-1029	UGUAGACUCUUAUGACUUGUAdTdT	2407
AD-62063.1	AGAGUUCACAGGUGGAUUUAdTdT	1841	1020-1038	AAAUCCACUUGUAGACUCUAdTdT	2408
AD-62069.1	GGAUUUUCUGAAGAGGCAGAdTdT	1842	1033-1051	CUGCCUUCUAGAAAAUCCAdTdT	2409
AD-62075.1	GAAGAGGCAGAAAUACCUCAdTdT	1843	1042-1060	CAGGUUUUUCUGCCUUCUAdTdT	2410

[1125]

AD-62081.1	AGAAAUACCUUGGCAUCAAAAdTdT	1844	1050-1068	UUUGAUGCCAGGUAUUUCUdTdT	2411
AD-62087.1	GCACAAAUUUGUCCUCUCdTdT	1845	1061-1079	GAGAGGACAUUUUGAUGCdTdT	2412
AD-62093.1	UGUCCUCUCUCCUACAAAdTdT	1846	1071-1089	UUUUGAGGGAGAGAGCAdTdT	2413
AD-62099.1	GAAUUUGGUUGCUACUCCUdTdT	1847	1092-1110	AGGAGUAGCAACCAAUUCdTdT	2414
AD-62105.1	GCUACUCCUCUUUUCUGAdTdT	1848	1102-1120	UCAGGAAAAGAGGAGUAGCdTdT	2415
AD-62064.1	CUCUUUCCUGAAGCCUGGdTdT	1849	1109-1127	CCAGGCUUCAGGAAAAGAdTdT	2416
AD-62070.1	CCUGGGAUUCCAUAUCCAdTdT	1850	1123-1141	UGGGAUUGGAAUCCAGGdTdT	2417
AD-62076.1	CAUAUCCAUCAAGGUGCAdTdT	1851	1133-1151	UGCACCUUGAUGGGAUUUGdTdT	2418
AD-62082.1	CCAUCAGGUGCAGGUUAAdTdT	1852	1139-1157	UUAAACCUUGCACCUGAUGGdTdT	2419
AD-62088.1	CAGGUAAAAGAUUCGUUGdTdT	1853	1150-1168	CAAGGAAUCUUUAAACCUUGdTdT	2420
AD-62094.1	UUJCGUUGACCAGUUGGUAdTdT	1854	1161-1179	UACCACUGGUCAAAGCGAdTdT	2421
AD-62100.1	CCAGUUGGUAGGAGGAGUCdTdT	1855	1170-1188	GACUCCUCCUACCAACUUGGdTdT	2422
AD-62106.1	GGAGGAGUCCAGUAACACdTdT	1856	1180-1198	GUUUAUUGGGACUCCUCCdTdT	2423
AD-62065.1	CAGUAAACACUGAAUUGCACAdTdT	1857	1190-1208	UGUGCAUUCAGUGUUAUCUGdTdT	2424
AD-62071.1	GAAUGCACAAACAUAUUGAUdTdT	1858	1200-1218	AUCAAUUGUUUGUGCAUUCdTdT	2425
AD-62077.1	AACAUAUGAUGUAAAACAAdTdT	1859	1209-1227	UUUGUUUACAUCAAUUUGUUdTdT	2426
AD-62083.1	UAAACC AAGAGACAUUGAdTdT	1860	1220-1238	UCAGAUUGUCUUGGUUUAdTdT	2427
AD-62089.1	CAUCUGACUUGGAUCCAAGdTdT	1861	1232-1250	CUJGGAUCCAAGUCAGAUUGdTdT	2428
AD-62095.1	GAUCCAAGCAAAAAGUGUAAdTdT	1862	1243-1261	UUACACUUUUGCUUGGAUCdTdT	2429
AD-62101.1	CAAAAGUUAACACGUGUAdTdT	1863	1251-1269	AACACUUGUUAACUUUUUGdTdT	2430
AD-62107.1	AACACGUGUUGAUUGGAdTdT	1864	1260-1278	UCCAUCAUCAACACGUGUAdTdT	2431
AD-62066.1	UGAUGGAGUAGCUUCCUUUdTdT	1865	1272-1290	AAAGGAAGUACUCCAUCAAdTdT	2432
AD-62072.1	GUAGCUUCCUUUGUGCUUAdTdT	1866	1279-1297	UAAAGCAAAAAGGAAGCUACdTdT	2433
AD-62078.1	GCUUAAUUCUCCAUUCUGGAdTdT	1867	1293-1311	UCCAGAUUGGAGAUUAAGCdTdT	2434
AD-62084.1	CCAUCUGGAGUGACGGUGCdTdT	1868	1303-1321	GCACCGUACUCCAGAUUGGdTdT	2435
AD-62090.1	UGACGGUGCUGGAGUUUAAdTdT	1869	1313-1331	UUAAACUCCAGCACCGUCAdTdT	2436
AD-62096.1	GCUGGAGUUUAUUGUCAAAAdTdT	1870	1320-1338	UUUGACAUAUAAACUCCAGCdTdT	2437

[1126]

AD-62102.1	UGUCAAAACUGAUGCUCAdTdT	1871	1332-1350	UGGAGCAUCAGUUUUGACAdTdT	2438
AD-62108.1	GAUGCUCAGAUUUCAGdTdT	1872	1342-1360	CUGGAAGAUUCUGGAGCAUCdTdT	2439
AD-62067.1	CAGAUUUCAGAGAAGAAAAdTdT	1873	1349-1367	UUUUCUUCUGGAAGAUUCUGdTdT	2440
AD-62073.1	AGAAAUCAGGCCAGGGAAdTdT	1874	1362-1380	UUCCUUGCCUGAUUUUCUdTdT	2441
AD-62079.1	GGCCAGGGAAGGUUACCGAdTdT	1875	1371-1389	UCGGUAAACCUUCCUGGCCdTdT	2442
AD-62085.1	GUUACCGAGCAUJAGCAUAdTdT	1876	1382-1400	UAUGCUAUUGCUCGGUAACdTdT	2443
AD-62091.1	AUAGCAUACUCUUCUCAdTdT	1877	1393-1411	UGAGAGAUAGAUUGCUAUdTdT	2444
AD-62097.1	UACUCAUCUCAGCCAAAAdTdT	1878	1399-1417	UUUGGCUAGAGAGAUAGAUAdTdT	2445
AD-62103.1	GCCAAAGUUACCUUAUAUAdTdT	1879	1412-1430	AUUAAGGUAACUUUGGCdTdT	2446
AD-62109.1	CCUUUAUUAUUGAUUGGACUdTdT	1880	1422-1440	AGUCCAAUCAAUAAAAGGdTdT	2447
AD-62115.1	GAUUGGACUGAUAAACCAUAdTdT	1881	1432-1450	UAUGGUUAUCAGUCCAAUCdTdT	2448
AD-62121.1	CUGAUACC AUAAAGCCUUUdTdT	1882	1439-1457	AAAGCCUUUAGGUUAUCAGdTdT	2449
AD-62127.1	AGGCUUUGUAGUGGAGAdTdT	1883	1451-1469	UCUCCACUAGCAAAAGCCUdTdT	2450
AD-62133.1	GUGGGAGAACAUUCUGAAUAdTdT	1884	1462-1480	UAUUCAGAUUGUUCUCCACdTdT	2451
AD-62139.1	CAUCUGAAUUAUUAUUGUUAAdTdT	1885	1471-1489	UAACAUAUAUUCAGAUAdTdT	2452
AD-62145.1	UAUUAUUGUUACCCCAAAAdTdT	1886	1479-1497	UUUGGGGUAACAUAUAAdTdT	2453
AD-62151.1	CCCAAAAGCCAUUAUUGdTdT	1887	1492-1510	CAUAUAUUGGCUUUUGGdTdT	2454
AD-62110.1	CCAAAGCCAUUAUUGAdTdT	1888	1493-1511	UCAUAUAUUGGCUUUUGGdTdT	2455
AD-62116.1	CAAAAGCCAUUAUUGACdTdT	1889	1494-1512	GUCAUAUAUUGGCUUUUGdTdT	2456
AD-62122.1	AAAAGCCAUUAUUGACAdTdT	1890	1495-1513	UGUCAUAUAUUGGCUUUUdTdT	2457
AD-62128.1	AAAGCCAUUAUUGACAAAdTdT	1891	1496-1514	UUGUCAUAUAUUGGCUUUdTdT	2458
AD-62134.1	AAGCCAUUAUUGACAAAdTdT	1892	1497-1515	UUUGUCAUAUAUUGGCUUdTdT	2459
AD-62140.1	AGCCAUUAUUGACAAAAdTdT	1893	1498-1516	UUUUGUCAUAUAUUGGCUdTdT	2460
AD-62146.1	GCCCAUAUAUUGACAAAAdTdT	1894	1499-1517	AUUUUGUCAUAUAUUGGCUdTdT	2461
AD-62152.1	CCCAUAUAUUGACAAAAdTdT	1895	1500-1518	UAUUUUGUCAUAUAUUGGdTdT	2462
AD-62111.1	CCAUUAUUGACAAAAdTdT	1896	1501-1519	UUUAUUUGUCAUAUAUUGGdTdT	2463
AD-62117.1	CAUAUAUUGACAAAAdTdT	1897	1502-1520	GUUAUUUGUCAUAUAUUGdTdT	2464

[1127]

AD-62123.1	AUAUUUGACAAAUAACUAdTdT	1898	1503-1521	AGUUUUUUUGUCAAAUAUAUdTT	2465
AD-62129.1	UAUUUUGACAAAUAACUCdTTdT	1899	1504-1522	GAGUUUUUUUGUCAAAUAUAAdTT	2466
AD-62135.1	AUAUUGACAAAUAACUCAdTTdT	1900	1505-1523	UGAGUUUUUUUGUCAAAUAUdTTdT	2467
AD-62141.1	UAUUUGACAAAUAACUCAdTTdT	1901	1506-1524	GUGAGUUUUUUUGUCAAAUAAdTT	2468
AD-62147.1	AUUGACAAAUAACUCAdTTdT	1902	1507-1525	AGUGAGUUUUUUUGUCAAAUdTTdT	2469
AD-62153.1	UUGACAAAUAACUCAdTTdT	1903	1508-1526	UAGUGAGUUUUUUUGUCAAdTTdT	2470
AD-62112.1	UGACAAAUAACUCAdTTdT	1904	1509-1527	AUAGUGAGUUUUUUUGUCAAdTTdT	2471
AD-62118.1	GACAAAUAACUCAdTTdT	1905	1510-1528	UAUAGUGAGUUUUUUUGUCdTTdT	2472
AD-62124.1	AAAUUACUCACUAUAUAUdTTdT	1906	1513-1531	AAUUUUAGUGAGUUUUUUdTTdT	2473
AD-62130.1	AAUAACUCACUAUAUAUdTTdT	1907	1514-1532	UAAUUUUAGUGAGUUUAUUdTTdT	2474
AD-62136.1	AAUAACUCACUAUAUAUdTTdT	1908	1515-1533	GUAAUUUUAGUGAGUUUAUUdTTdT	2475
AD-62142.1	AUAACUCACUAUAUAUdTTdT	1909	1516-1534	AGUAAUUUUAGUGAGUUUAUdTTdT	2476
AD-62148.1	AACUCACUAUAUAUdTTdT	1910	1518-1536	CAAGUAAUUUUAGUGAGUUUdTTdT	2477
AD-62154.1	ACUCACUAUAUAUdTTdT	1911	1519-1537	UCAAGUAAUUUUAGUGAGUUdTTdT	2478
AD-62113.1	CUCACUAUAUAUdTTdT	1912	1520-1538	AUCAAGUAAUUUUAGUGAGdTTdT	2479
AD-62119.1	UCACUAUAUAUdTTdT	1913	1521-1539	AAUCAAAGUAAUUUUAGUGAdTTdT	2480
AD-62125.1	ACUAUAUAUdTTdT	1914	1523-1541	AAAUAUCAGUAAUUUAUAGUdTTdT	2481
AD-62131.1	CUAUAUAUdTTdT	1915	1524-1542	UAAAUAUCAGUAAUUUAUAGdTTdT	2482
AD-62137.1	UAUAUAUdTTdT	1916	1525-1543	AUAAAUAUCAGUAAUUUAUdTTdT	2483
AD-62143.1	AUAUAUdTTdT	1917	1526-1544	GAUAAAUAUCAGUAAUUUAUdTTdT	2484
AD-62149.1	UAUAUdTTdT	1918	1527-1545	GGAUAAAUAUCAGUAAUUUAdTTdT	2485
AD-62155.1	AUAUAUdTTdT	1919	1528-1546	UGGAUAAAUAUCAGUAAUUUdTTdT	2486
AD-62114.1	AUUUAUdTTdT	1920	1529-1547	UUUGAUAAAUAUCAGUAAUUdTTdT	2487
AD-62120.1	UUUAUdTTdT	1921	1540-1558	UAAUUUUGCCUUUGGAUAAAdTTdT	2488
AD-62126.1	GCAAAUAUdTTdT	1922	1550-1568	CCAAAGUGGAUAAUUUUGCAdTTdT	2489
AD-62132.1	CACUUUGGCACGAGGAGAdTTdT	1923	1561-1579	UCUCCUUGGCACAAAGUGAdTTdT	2490
AD-62138.1	CGAGGGAGAAUUUUCAGAdTTdT	1924	1571-1589	UCUGAAAUAUUUUCUCCUCCGAdTTdT	2491

[1128]

AD-62144.1	AUUUUCAGAUUGCAUCUUAUAdTdT	1925	1581-1599	AUAGAUGCAUCUGAAAAAUdTT	2492
AD-62150.1	GCAUCUUUAUCAAAGUAUAAdTdT	1926	1591-1609	UUUAUCUUUGAAAGAUdGdTT	2493
AD-62156.1	CAAAGUAUAAACAUIUCCAGdTdT	1927	1600-1618	CUGGAAUUIUUUAUACUUUGdTdT	2494
AD-62162.1	AUUCAGUAACACAGAAdTdT	1928	1612-1630	UGUUCUGUJUACUGGAAUdTT	2495
AD-62168.1	CACAGAACAUGGUUCUUCdTdT	1929	1622-1640	GAAGGAACCAUGUUCUGUGdTdT	2496
AD-62174.1	GGUCCUUAUCCCGACUUdTdT	1930	1632-1650	AAGUCGGGAUGAAGGAACCCdTdT	2497
AD-62180.1	CCCGACUUCUGGUUAUAdTdT	1931	1643-1661	UAAUAGACCAGAAGUCGGdTT	2498
AD-62186.1	GGUCUAUUACAUCUACAdTdT	1932	1653-1671	UGUGACGAUGUAUJAGACCdTdT	2499
AD-62192.1	AUCGUCACAGGAGAACAGAdTdT	1933	1663-1681	UCUGUUCUCUGUGACGAUdTdT	2500
AD-62198.1	CAGGAGAACAGACAGCAGAdTdT	1934	1670-1688	UCUGUCUGUUCUCCUGdTdT	2501
AD-62157.1	CAGCAGAAUJAGUUCUGAdTdT	1935	1682-1700	UCAGACACUAAUUCUGUdTdT	2502
AD-62163.1	GUUCUGAUUCAGUCUGGUdTdT	1936	1693-1711	ACCAGACUGAAUCAGACACdTdT	2503
AD-62169.1	CAGUCUGGUUAAAUAUUGAdTdT	1937	1703-1721	UCAAUUUAUAAACAGACUdTdT	2504
AD-62175.1	GUUAAAUAUUGAAAGAAAAAdTdT	1938	1710-1728	UUUUUCUCAAUUAUUAACdTdT	2505
AD-62181.1	AGAAAAUUGUUGCAACCAGdTdT	1939	1722-1740	CUGGUUGCCACAUIUUUCUdTdT	2506
AD-62187.1	GCAACCAGCUCAGGUUCAdTdT	1940	1733-1751	UGAACCUUGGAGCUGGUUGdTdT	2507
AD-62193.1	GCUCCAGGUUCAUUCUGUCdTdT	1941	1740-1758	AGACAGAUGAACUUGGAGCdTdT	2508
AD-62199.1	AUCUGUCUCCUGAUGCAGAdTdT	1942	1751-1769	UCUGCAUCAGGAGACAGAAdTdT	2509
AD-62158.1	GAUGCAGAUUGCAUAUUCUCdTdT	1943	1762-1780	GAGAAUAUGCAUUCUGCAUCdTdT	2510
AD-62164.1	GCAUAUUCUCCAGGCCAAAdTdT	1944	1771-1789	UUUUGCCUGGAGAAUAUUGdTdT	2511
AD-62170.1	AGGCCAAACUGUGUCUUAdTdT	1945	1782-1800	AAGAGACACAGUUUGCCUdTdT	2512
AD-62176.1	GUUCUCUUAUAUUGGCAAdTdT	1946	1792-1810	UUUGCCAUUAUAGAGACACdTdT	2513
AD-62182.1	UUAAUAUUGGCAACUGGAAUdTdT	1947	1799-1817	AUUCAGUUUGCCAUUAUUAAdTdT	2514
AD-62188.1	AACUGGAAUUGGAUUCUUGGdTdT	1948	1809-1827	CCAGGAAUCCAUUCCAGUUdTdT	2515
AD-62194.1	UUCCUUGGUUGCAUUAAGCAdTdT	1949	1821-1839	UGCUAAUUGCCACCAGGAAdTdT	2516
AD-62200.1	GGCAUUAAGCAGCAGUUGACdTdT	1950	1830-1848	GUCCACUGUCUUAUUGCCdTdT	2517
AD-62159.1	AGUGGACAGUUGCUUUAUdTdT	1951	1842-1860	AUACACAGCACUGUCCACUdTdT	2518

[1129]

AD-62165.1	GCUGUGUAUGGAGUCCAAAdTdT	1952	1852-1870	UUUGGACUCCAUACACAGCtTdT	2519
AD-62171.1	AGUCCAAAGAGGAGCCAAAdTdT	1953	1863-1881	UUUGGCUCCUCUUUGGACUdTdT	2520
AD-62177.1	AGAGGAGCCAAAAGCCCUdTdT	1954	1870-1888	AGGGUUUUUGGCUCUCUdTdT	2521
AD-62183.1	AGCCUUGGAAAGAGUAUdTdT	1955	1883-1901	AUACUCUUUJCAAGGGCUdTdT	2522
AD-62189.1	AAGAGUAUUCAAUUCUAdTdT	1956	1893-1911	UAAGAAUUGAAAUACUCUUdTdT	2523
AD-62195.1	UUUCAAUUCUJAGAGAAAdTdT	1957	1900-1918	UCUUCUUAAGAAAUUGAAAdTdT	2524
AD-62201.1	GAGAAGAGUGAUCUGGGCUdTdT	1958	1912-1930	AGCCCAGAUACUCUCUCdTdT	2525
AD-62160.1	UGAUUCUGGGCUGUGGGCAdTdT	1959	1920-1938	UGCCCCACAGCCCAGAUCAAdTdT	2526
AD-62166.1	GGGGCAGGUGGUGGGCCUCAdTdT	1960	1933-1951	UGAGGCCACCACUUGCCCCdTdT	2527
AD-62172.1	GUGGCCUCAACA AUGCCAAAdTdT	1961	1943-1961	UUGGCAUUGUUGAGGGCCACdTdT	2528
AD-62178.1	CAACA AUGCCAAUUGUUCdTdT	1962	1950-1968	GAACACAUUGGCAUUGUUGdTdT	2529
AD-62184.1	CAUUGUUCUCCACCUAGCUdTdT	1963	1959-1977	AGCUAGGUGGAACACAUUGdTdT	2530
AD-62190.1	CACCUAGCUGGACUJACCUCdTdT	1964	1969-1987	AGGUAAUUCACCUAGGUUGdTdT	2531
AD-62196.1	GACUUACCUUCCUCACUAAAdTdT	1965	1979-1997	UUAGUGAGGAAGUAAGUCdTdT	2532
AD-62202.1	UCACUAAUJGAAAUGCAGAdTdT	1966	1991-2009	UCUUGCAUJUGCAUJAGUGAdTdT	2533
AD-62161.1	AAUUGCAGAUACUCCAAAdTdT	1967	2001-2019	UUGGGAGUCAUCUGCAUUUdTdT	2534
AD-62167.1	CUCCC AAGAAAUGAUGAAdTdT	1968	2013-2031	UUCAUCAUJUUUCUUGGGAGdTdT	2535
AD-62173.1	CCUUGUAAAAGAAAUCUCAdTdT	1969	2032-2050	UGAGAAUJUCUUUJACAAAGGdTdT	2536
AD-62179.1	AAUUCUCAGGCCAAGAAGAdTdT	1970	2043-2061	UCUUCUUGGCCUGAGAAUdTdT	2537
AD-62185.1	CCAAGAAGAACCGUCCAAAdTdT	1971	2053-2071	UUUGCAGCGUUCUUCUUGGdTdT	2538
AD-62191.1	CGUCGAAAAGAAAGAUAGAdTdT	1972	2063-2081	UCUAUCUUCUUUUGCAGCGdTdT	2539
AD-62197.1	AAAGAAGAUJAGAAAGAAUAdTdT	1973	2070-2088	UAUUUCUUCUJAGUUCUUCUdTdT	2540
AD-62203.1	AGAAAUAGCUGCUAAAUAUdTdT	1974	2082-2100	AUAUUUAGCAGCUAUUUUCUdTdT	2541
AD-62209.1	GCUGUAAAUAUAAACAUUdTdT	1975	2089-2107	AAUGUUUAUJUUJAGCAGCAdTdT	2542
AD-62215.1	ACAUUCAGUJAGUJAGAAAGAdTdT	1976	2103-2121	UUUCUUCACUACUGAAUUGUdTdT	2543
AD-62221.1	GUAGUGAAGAAAUJGUJGUdTdT	1977	2110-2128	AACAACAUUUCUUCACUACAdTdT	2544
AD-62227.1	AAAUUGUJUJACCGAUJGGAGdTdT	1978	2119-2137	CUCCAUJGUJAAACAUAUUUdTdT	2545

[1130]

AD-62233.1	CGAUGGAGCCUGCGUUAUUAUdTdT	1979	2130-2148	AUUAACGCAGGCUCCAUUGdTdT	2546
AD-62239.1	CGUUAUUAUGAUGAAACCdTdT	1980	2142-2160	GGUUCUAUCAUUAUUAACGdTdT	2547
AD-62245.1	AUGAUGAAACUGUGAGCAdTdT	1981	2150-2168	UGCUCACAGGUUUCAUCAUdTdT	2548
AD-62204.1	CUGUGAGCAGGAGCUCAdTdT	1982	2160-2178	UGCAGCUCGUCUCACAGdTdT	2549
AD-62210.1	CGAGCUGCACGGAUUAGUUAdTdT	1983	2170-2188	AACUAAUCCGUGCAGCUCGdTdT	2550
AD-62216.1	GGAUUAGUUUAGGGCCAAAGdTdT	1984	2180-2198	CUUGGCCUAAACUAAUCCdTdT	2551
AD-62222.1	GGGCCAAGAUUGCAUCAAAGdTdT	1985	2191-2209	CUUUGAUGCAUUGUGGCCdTdT	2552
AD-62228.1	CAUCAAGCUUUCACUGAAAdTdT	1986	2202-2220	UUCAGUGAAAGCUUUGAUUGdTdT	2553
AD-62234.1	GCUUUCACUGAAUUGUUGAdTdT	1987	2209-2227	CACAAACAUUCAGUGAAAGCdTdT	2554
AD-62240.1	AUGUUGUGUCGUGCGAAGdTdT	1988	2219-2237	CUUGCGACGACACAACAUUdTdT	2555
AD-62246.1	CGUCCGAAGCCAGCUCGAdTdT	1989	2229-2247	ACGGAGCUGGCUUGCGACGdTdT	2556
AD-62205.1	GCUCCGUGCUAAUUAUCUAdTdT	1990	2241-2259	AGAGAUUUAGCACGGAGCdTdT	2557
AD-62211.1	CUAAUUCUCUCAUAAAGAdTdT	1991	2249-2267	UCUUUAUGAGAGAUUAUAGdTdT	2558
AD-62217.1	AAAGACAUGCAAUUGGGAAdTdT	1992	2263-2281	UUCCAAUUGCAUGUCUUUdTdT	2559
AD-62223.1	CAAUUGGGAAGGCUACACAdTdT	1993	2272-2290	UGUGAGCCUUCCAAUUGdTdT	2560
AD-62229.1	GCUACACAUGAAGACCCUGdTdT	1994	2283-2301	CAGGGUUCUUAUGUGUAGCdTdT	2561
AD-62235.1	CAUGAAGACCUUGUJACCAdTdT	1995	2289-2307	UGGUAAACAGGGUUCUUAUGdTdT	2562
AD-62241.1	UACCAGUAAGCAAGCCAGAdTdT	1996	2303-2321	UCUGGCUUGCUUACUGGUAdTdT	2563
AD-62247.1	AGCAAGCCAGAAAUJCGGAdTdT	1997	2311-2329	UCCGAAUUUCUGGCUUGCUdTdT	2564
AD-62206.1	AGAAAUUCGGAGUUAUUUdTdT	1998	2319-2337	AAAUAACUCCGAAUUAUUUdTdT	2565
AD-62212.1	AGUUUUUUUCCAGAAAGCUdTdT	1999	2329-2347	AGUUUUCUGGAAAUAACUdTdT	2566
AD-62218.1	CAGAAAGCUGGUUGGGAdTdT	2000	2339-2357	UCCCAACACAGCUUUUCUGdTdT	2567
AD-62224.1	GUGGGAAGUUCAUUUGUAdTdT	2001	2352-2370	AACAAGAUGAAACUUCACdTdT	2568
AD-62230.1	UCAUCUUGUUCUCCAGAAGAdTdT	2002	2361-2379	UCUUUCUGGGAACAAGAUGdTdT	2569
AD-62236.1	CCAGAAGAAAACAGUUGCAdTdT	2003	2372-2390	UGCAACUUGUUUCUUCUGGdTdT	2570
AD-62242.1	CAGUUGCAGUUUGCCUACAdTdT	2004	2383-2401	GUAGGGCAACAGUCCAACUGdTdT	2571
AD-62248.1	CAGUUUGCCUJACCUGAUUdTdT	2005	2389-2407	AAUCAGUJAGGCAAAACUUGdTdT	2572

[1131]

AD-62207.1	CCUGAUUCUCUAACCACCUbTbT	2006	2401-2419	AGGUGUUAGAGAAUACAGGbTbT	2573
AD-62213.1	ACCACUUGGGAUUUAAGbTbT	2007	2413-2431	CUUGAAUUUCCAGGUGGUbTbT	2574
AD-62219.1	GAAAUUCAAGGCGUUGGCAdTbT	2008	2422-2440	UGCCAACGCCUUGAAUUUCbTbT	2575
AD-62225.1	CGUUGGCAUUCAAACACUAdTbT	2009	2433-2451	AGUJUUGAAAUJGCAACGgTbT	2576
AD-62231.1	CAUUUCAAAACACUGGUUAAdTbT	2010	2439-2457	UAUACCAGUJUUGAAAUUGbTbT	2577
AD-62237.1	GUUAUUGUUGUGUGAUACbTbT	2011	2453-2471	GUUAUCAGCAACACAUUAUCbTbT	2578
AD-62243.1	UGCUGAUACUGUCAAGGCAdTbT	2012	2463-2481	UGCCUUGACAGUAUCAGCAdTbT	2579
AD-62249.1	CUJUCAAGGCAAGGUGUUbTbT	2013	2471-2489	AACACCUJUUGCCUUGACAGbTbT	2580
AD-62208.1	AGGUGUUCAAAGAUGUCUUbTbT	2014	2483-2501	AAGACAUUCUJUUGAACACCUbTbT	2581
AD-62214.1	CAAAGAUJUCUUCUGGAAdTbT	2015	2490-2508	UUCAGGAAGACAUUUUGbTbT	2582
AD-62220.1	CUJCCUGGAAUUGAAUAUAdTbT	2016	2499-2517	UAUAUJCAUJUJCCAGGAAGbTbT	2583
AD-62226.1	GAAUAUACCAUAUUCUGUUbTbT	2017	2511-2529	AACAGAAUJGGUAUAUUCbTbT	2584
AD-62232.1	AUAUUCUGUUGUACGAGGAdTbT	2018	2520-2538	UCCUCGUACACAGAAUAUAdTbT	2585
AD-62238.1	CGAGGAGAACAGAUCAAUAdTbT	2019	2533-2551	AUUGGAUCUJUGUJCCUCGgTbT	2586
AD-62244.1	GAACAGAUCCAUAUGAAAGbTbT	2020	2539-2557	CUUJCAAUJGGAUUCUGUUCbTbT	2587
AD-61874.1	GAAAGGAACUGUUUACAAACbTbT	2021	2553-2571	GUUGUAAACAGUJUCUUUCbTbT	2588
AD-61880.1	ACUGUUUACAAUAUAGGAdTbT	2022	2560-2578	UCCUAUAGUJUGUAAACAGUAdTbT	2589
AD-61886.1	AACUAUAGGACUUCUGGAdTbT	2023	2569-2587	UCCAGAAAUUCUAUJAGUJbTbT	2590
AD-61892.1	UGGGAUGCAGUUCUGUUGUUbTbT	2024	2583-2601	AACACAGAAACUGCAUCCAdTbT	2591
AD-61898.1	GUUCUGUJUAAAUAUGUCUAdTbT	2025	2592-2610	AGACAUJUUAACACAGAACbTbT	2592
AD-61904.1	UUAAAUGUCUGCUGUGGAdTbT	2026	2600-2618	UCCACAGCAGACAUUUUAAdTbT	2593
AD-61910.1	CUJUGGAGGAAUUCUGCACbTbT	2027	2612-2630	GUGCAGAUUCCUCCACAGbTbT	2594
AD-61916.1	GGAAUUCUGCACUUCGGAAdTbT	2028	2620-2638	UUUCCGAAUGCAGAUUCCbTbT	2595
AD-61875.1	CGGAAAGCCAGUCAUUGAdTbT	2029	2633-2651	UCAAUAGACUGGCUUUCCGgTbT	2596
AD-61881.1	CCAGUCAUUGAUCAUACAGGAdTbT	2030	2641-2659	CCUGAUJCAUUAUAGACUGGAdTbT	2597
AD-61887.1	CAUCAGGCAAAAAGUCCUAdTbT	2031	2653-2671	AGGACUUJUGGCCUCUGAUUGbTbT	2598
AD-61893.1	GGCACAAAUCCUCCAAAUAAdTbT	2032	2659-2677	AUUJGGAGGACUUUJUGUCCbTbT	2599

[1132]

AD-61899.1	CAAUUGUGGCCCCAGAAAATdT	2033	2673-2691	UUUUGGGGCACAAUUUGdTdT	2600
AD-61905.1	GCGCCAGAAAAGUAGAGGGCtTdT	2034	2682-2700	GCCCUUACUUUCU'GGCGCtTdT	2601
AD-61911.1	AGUAGAGGGCUCCUCCAGUdTdT	2035	2691-2709	ACUGGAGGAGCCUUCUACUdTdT	2602
AD-61917.1	CCUCCAGUCCAUUUGGUGACdTdT	2036	2702-2720	GUCACCAAGUACUGGAGGdTdT	2603
AD-61876.1	UCACUUGGUGACAUUCACUdTdT	2037	2709-2727	AGUGAAUUGUCACCAAGUGAdTdT	2604
AD-61882.1	CAUUCACUGUGCUUCCUCUdTdT	2038	2720-2738	AGAGGAAACACAGUGAAUUGdTdT	2605
AD-61888.1	GGAAUUUGGCCUUCACAAACdTdT	2039	2739-2757	GUUGUGAAGGCCAAUUUCCcTdT	2606
AD-61894.1	CUUCACAAACAUCAAUUUUUdTdT	2040	2749-2767	AAAAUUUGAUUGUUUGUAAAGdTdT	2607
AD-61900.1	AUUUUUUCACUGGAGACUUdTdT	2041	2761-2779	AAGUUCUCCAGUGAAAAAUUdTdT	2608
AD-61906.1	CUGGAGACUUGGUUUUGGAAdTdT	2042	2770-2788	UUCCAAACCAAGUUCUCCAGdTdT	2609
AD-61912.1	GGUUUGGAAAAGAAAUCUUdTdT	2043	2780-2798	AAGAUUUUCUUUCCAAAACCdTdT	2610
AD-61918.1	AUUCUUAGUAAAAACAUAAdTdT	2044	2793-2811	UAAUGUUUUUACUAAAGAUUdTdT	2611
AD-61877.1	AAAAACAUAUACGAGUGGUdTdT	2045	2802-2820	CACCACUCGUAAUGUUUUUdTdT	2612
AD-61883.1	GAGUGGUGCCAGAAAGGUGUdTdT	2046	2813-2831	ACACCUUCUGGGCACACUCdTdT	2613
AD-61889.1	AGAAAGGUGUCAAAAGGGAAdTdT	2047	2823-2841	UUCCUUUUUGACACCUUCUdTdT	2614
AD-61895.1	UGUCAAAAGGGAAGCUAUdTdT	2048	2829-2847	AUAGCUUUUCCUUUUGACAdTdT	2615
AD-61901.1	GCUAUUCUGGUGUJUAUUUdTdT	2049	2843-2861	AAAGUAAACACACAGAAUAGCtTdT	2616
AD-61907.1	GUGUUACUUUGGAUCCUAGdTdT	2050	2852-2870	CUAGGAUCCAAAAGUAAACACtTdT	2617
AD-61913.1	GGAUCCUAGGGGUUUUUAUdTdT	2051	2862-2880	AUAAAUAACCCUAGGAUCCcTdT	2618
AD-61919.1	GGUAAUUUAGGUJACC AUUAdTdT	2052	2872-2890	UAAUGGUACCAUAAAUAACcTdT	2619
AD-61878.1	GUACCAUUAGCAGACGAAAAdTdT	2053	2882-2900	UUUCGUUCGUAAAUGGUUACcTdT	2620
AD-61884.1	CAGACGAAAGGAGUJCCCAAdTdT	2054	2892-2910	UGGGAACUCCUUUCGUUCUGdTdT	2621
AD-61890.1	AGGAGUUUCCAUACAGGAUJdTdT	2055	2900-2918	AUCCUUGUAUGGGAAACUCCUdTdT	2622
AD-61896.1	CAUACAGGAUJACCCUUJAGAdTdT	2056	2909-2927	UCUAAAGGUUAUCCUGUAUGdTdT	2623
AD-61902.1	CUUAGAUUUUGGUJCCCAAdTdT	2057	2922-2940	UUUUGGGACCAAAAUCUAAAGdTdT	2624
AD-61908.1	UCCCCAAAACAGAAAUC'AAAdTdT	2058	2933-2951	UUUGAUUUUGUUUUGGGGAdTdT	2625
AD-61914.1	ACAGAAAUCAAAAGGAUUUdTdT	2059	2941-2959	AAAUCUUUUUGAUUUUCUGUdTdT	2626

[1133]

AD-61920.1	AAAGGAAUUUUGAGUGUAAAAdTdT	2060	2951-2969	UUUACACUCAAAAUCCUUUdTdT	2627
AD-61879.1	AGUGUAAAAGGACUGCUUGdTdT	2061	2962-2980	CAAGCAGUCCUUUUAACACUdTdT	2628
AD-61885.1	AAGGACUGGUUUGAGGUGAdTdT	2062	2969-2987	UCACCUACAAGCAGUCCUUdTdT	2629
AD-61891.1	GUAGGUGAGAUUCUUGUCUGdTdT	2063	2980-2998	CAGACAAGAUUCACCUACdTdT	2630
AD-61897.1	AUCUUGUCUGCAGUUCUAAAdTdT	2064	2989-3007	UUAGAACUGCAGACAAGAAdTdT	2631
AD-61903.1	GUUCUAAAGUCAGGAAGCAdTdT	2065	3001-3019	UGCCUUCUGACUUAGAACdTdT	2632
AD-61909.1	GAAGGC AUCAAUAUCCUAAAdTdT	2066	3013-3031	UUAGGAU AUUGAUUGCCUUCdTdT	2633
AD-61915.1	UCAAUUCCUAAACCCACCUdTdT	2067	3020-3038	AGGUGGGUUAAGGAU AUUGAdTdT	2634
AD-61921.1	CCACCUCCCAAGGGAGUdTdT	2068	3033-3051	ACUCCUUUUGGGAGGUGGdTdT	2635
AD-61927.1	CCCCAAAGGAGUGCAGAGdTdT	2069	3039-3057	CUUGCACUCCUUUUGGGdTdT	2636
AD-61933.1	GUGCAGAGGCGGAGCUGAUdTdT	2070	3050-3068	AUCAGCUCGCCUUCGCACdTdT	2637
AD-61939.1	GGAGCUGALIGAGCGUUGUCdTdT	2071	3060-3078	GACAAGCUC AUAGCUCdTdT	2638
AD-61945.1	CGUUGUCCAGUAUUCUAUdTdT	2072	3072-3090	AUAGAAU ACUUGGAC AACGdTdT	2639
AD-61951.1	CCAGUAUUC AUUGUUUUCdTdT	2073	3079-3097	GAAAAAC AUAGAAU ACUGGdTdT	2640
AD-61957.1	GUUUUCACUACCUUGGAAAdTdT	2074	3091-3109	UUUCC AGGUAGUGAAAAACdTdT	2641
AD-61963.1	CCUGGAAAC AGGAAAUCAUdTdT	2075	3102-3120	AUGAUUCCUGUUUCCAGGdTdT	2642
AD-61922.1	GGAACAUUUUGAUUCUGAdTdT	2076	3122-3140	UCAGAAUGAAAAAUUGUCCdTdT	2643
AD-61928.1	CAUUCUGACCAUUAUUUGdTdT	2077	3133-3151	CAAUUAUUGGUUCAGAAUUGdTdT	2644
AD-61934.1	CCAUUAAUUGAAAAAGCAGAdTdT	2078	3142-3160	UCUGCUUUC AAUUAUUGGdTdT	2645
AD-61940.1	AAAGCAGAAACUGAAGAAAdTdT	2079	3153-3171	UUUCUUCAGUUCUUGCUUUdTdT	2646
AD-61946.1	AACUGAAGAAAAAUUAAAAdTdT	2080	3161-3179	UUUAAAUUUUUCUUCAGUUdTdT	2647
AD-61952.1	AAAAAUUAAAAGAGGGAdTdT	2081	3169-3187	UCCUUCUUUUUAUUUUUUdTdT	2648
AD-61958.1	AGGGAUUUUGAGCAUUAUGdTdT	2082	3183-3201	CAUAAUGCUCAACAUCUCCUdTdT	2649
AD-61964.1	GAGCAUUAUUGUCCUACAGAdTdT	2083	3192-3210	UCUGUAGGAC AUAAUUGUUCdTdT	2650
AD-61923.1	UGUCCUACAGAAAUUGCUGAdTdT	2084	3200-3218	UCAGCAUUUCUUGUAGGACAdTdT	2651
AD-61929.1	AAUGCUGACUACUUCUACAdTdT	2085	3211-3229	UGUAAAGAUAGUACAGCAUUdTdT	2652
AD-61935.1	UACUCUUCACAGUUGUGGAdTdT	2086	3220-3238	UCCACACACUUAAGAGUAdTdT	2653

[1134]

AD-61941.1	AGUGUGGGAAGGGUGGAAAdTdT	2087	3229-3247	UUCCACCUUCCACACACUdTdT	2654
AD-61947.1	GGGUGGAAGUGCUAGCACUdTdT	2088	3240-3258	AGUGCUAGCACUJCCACCCdTdT	2655
AD-61953.1	GCUAGCACUUGGUUACAGdTdT	2089	3250-3268	CUGUUAAACCAGUGCUAGCdTdT	2656
AD-61959.1	GGUUAACAGCUUUGCUUdTdT	2090	3260-3278	AAAGCAAAGCUGUUAACCdTdT	2657
AD-61965.1	UGUUUAAGAGUACUUGGAdTdT	2091	3273-3291	UCCAAAGUACUCUAAAAGCdTdT	2658
AD-61924.1	GUACUUGGACAAAGUAAAAdTdT	2092	3283-3301	UAUUUACUUGUCCAAAGUACdTdT	2659
AD-61930.1	CAAGUAAAUAUUACGUAGdTdT	2093	3292-3310	CUACGUUUUUUUUACUUGdTdT	2660
AD-61936.1	AUAAUACGUAGAGCAGAAAdTdT	2094	3299-3317	UUUCUGUCUACGUUUUUUUdTdT	2661
AD-61942.1	GAGCAGAACCAAAAUUCAdTdT	2095	3310-3328	UUUGAAUUUUGGUUCUGCUCdTdT	2662
AD-61948.1	AUUCAAUUUGUAAUUCUdTdT	2096	3322-3340	AAGAAUUACAAAUUUGAAUUdTdT	2663
AD-61954.1	GUAAUUCUUUAUUUGUGCUdTdT	2097	3332-3350	AGCCACAAUAAAGAAUUACdTdT	2664
AD-61960.1	AUUUGGCUAGUUUGAGAAUdTdT	2098	3342-3360	AUUCUCAAGUAGCCACAAUdTdT	2665
AD-61966.1	CUAGUUGGAAUUAUCAAUdTdT	2099	3349-3367	AUUGAAUUAUUCUAAUCUAGdTdT	2666
AD-61925.1	UUAUCAAUAGAUAAUUGGAdTdT	2100	3360-3378	UCCAUUUAUUAUUUGAAUAdTdT	2667
AD-61931.1	AUUGGALUUUCAAGGAAAdTdT	2101	3373-3391	UUUCUUGAAAGAUCCAUUdTdT	2668
AD-61937.1	CUUUCAGGGAUUUACAdTdT	2102	3380-3398	UGUGAAUUUUCUUUGAAAGdTdT	2669
AD-61943.1	AUUUCACAGUUC AACCAAdTdT	2103	3391-3409	UUUGUUGAUACUGUGAAUUdTdT	2670
AD-61949.1	GUAUCAACCAUAAAUAUAdTdT	2104	3399-3417	UAAUUUUUUGGUUGAUACdTdT	2671
AD-61955.1	AAAUUACAGGGUACCUUGdTdT	2105	3411-3429	CAAGGUACCCUGUAAAUUUdTdT	2672
AD-61961.1	AGGUACCUUGCCUGUUGAdTdT	2106	3419-3437	UCAACAGCAAGGUUACCCUdTdT	2673
AD-61967.1	GUUGAAGCCCGAGAGAACAdTdT	2107	3433-3451	UGUUCUCUCGGGUUCAACdTdT	2674
AD-61926.1	CCGAGAGAACAGCUUAUAdTdT	2108	3441-3459	AUUAAGCUGUUCUCUCGGdTdT	2675
AD-61932.1	GCUUUAUCUUUACAGCCUdTdT	2109	3452-3470	AAGGCUUGAAAGAUAAAGCdTdT	2676
AD-61938.1	CUUACAGCCUUUACUGUGAdTdT	2110	3460-3478	UCACAGUAAAAGCCUGUAAAGdTdT	2677
AD-61944.1	GAAUUAGAAAGGCUUUCGAdTdT	2111	3482-3500	UCGAAAGCCUUUCUAAUUCdTdT	2678
AD-61950.1	GGUUUCGAUUAUUGCCCCdTdT	2112	3492-3510	GGGGCAUUAUUGGAAAGCCdTdT	2679
AD-61956.1	GAUAUAGCCCCUUGUGAdTdT	2113	3499-3517	UCACCAGGGGCAUAUUCdTdT	2680

[1135]

AD-61962.1	GGUGAAAUCGACACAGCUdTdT	2114	3513-3531	AGCUGUGCGAUUUUCACCCdTdT	2681
AD-61968.1	CGACACAGUCUAUUAAAAdTdT	2115	3522-3540	UUUAAUUAGAGCUGUGUCGdTdT	2682
AD-61974.1	GCUCUAAUUAAAGCUGACAdTdT	2116	3529-3547	UGUCAGCUUUAAUUAGAGCdTdT	2683
AD-61980.1	CUGACAACUUUCUGCUUGAdTdT	2117	3542-3560	UCAAGCAGAAAAGUUUCAGdTdT	2684
AD-61986.1	CUUUCUGCUUGAAAUAACAdTdT	2118	3549-3567	UGUAUUUUAAGCAGAAAAGdTdT	2685
AD-61992.1	AAAAUACACUGCCAGCCAdTdT	2119	3560-3578	UGGGCUGGCAGUUAUUUUdTdT	2686
AD-61998.1	AGCCCAGAGCACCUUUAACAdTdT	2120	3573-3591	UGUAAAAGGUGCUCUGGGCUCdTdT	2687
AD-62004.1	GCACCUUUACAUUGGCCAUdTdT	2121	3581-3599	AUGGCCAAUUGUAAAAGGUGCdTdT	2688
AD-62010.1	ACAUUGGCCAUUUUCUGCUdTdT	2122	3589-3607	ACGCAGAAAUGGCCAAUUGdTdT	2689
AD-61969.1	CUGCGUAUGCUUUUCUdTdT	2123	3602-3620	AGGGAAAAGAGCAUAGCAGdTdT	2690
AD-61975.1	CUUUCUUGGGAGAUAAAAdTdT	2124	3613-3631	UUUUAUUCUCCAGGGAAAAGdTdT	2691
AD-61981.1	GAGAUAAAACUCACCCACAdTdT	2125	3623-3641	UGUUGGGUGAGUUUAUCUCdTdT	2692
AD-61987.1	ACUCACCCACAGUUUCUUdTdT	2126	3631-3649	AACGAAAACUUGGGUGAGUdTdT	2693
AD-61993.1	CAGUUUCGUUCAAUUGUUdTdT	2127	3640-3658	AAACAAUUGAACGAAAACUGdTdT	2694
AD-61999.1	CAUUUGUUUCAGCUUUGAAAdTdT	2128	3650-3668	UUCAAAGCUGAACAAUUGdTdT	2695
AD-62005.1	CUUUGAAGAGAGAAAGCUUdTdT	2129	3662-3680	AAAGCUUCUCUUCUUCAAAAGdTdT	2696
AD-62011.1	GAGAGAAGCUUUGGUUAAAAdTdT	2130	3669-3687	UUUAACCAAAGCUUCUCUCdTdT	2697
AD-61970.1	GUUAAAGGUAAUCCACCCAdTdT	2131	3682-3700	UGGGUGGAUUACCUUUAACdTdT	2698
AD-61976.1	AAUCCACCCAUUUUAUCGUdTdT	2132	3691-3709	AACGAUAAAUGGGUGGAUUdTdT	2699
AD-61982.1	CAUUUAUCGUUUUUGGAAAAdTdT	2133	3699-3717	UUUCCAAAACGAUAAAUGdTdT	2700
AD-61988.1	UUUGGAAAGACAALUCUUCAdTdT	2134	3710-3728	UGAAGAUUUGUUCUUUCCAAAAdTdT	2701
AD-61994.1	AAUCUUCAGCAUAAAGACAdTdT	2135	3721-3739	UGUCUUUAUUGCUGAAGAUUdTdT	2702
AD-62006.1	CUCUGUACCUAACACUGGUdTdT	2136	3741-3759	ACCAGUUGUAGGUACAGAGdTdT	2703
AD-62012.1	ACACUGGUACGGCACGUAdTdT	2137	3752-3770	AUACGUGCCGUACCAGUGUdTdT	2704
AD-61971.1	GGCACGUUUGGUAGAAAACAdTdT	2138	3762-3780	UGUUUCUACCAUACGUGCCdTdT	2705
AD-61977.1	GGUAGAAAACAACUGCCUAdTdT	2139	3771-3789	AUAGGCAGUUUGUUUCUACCCdTdT	2706
AD-61983.1	CAACUGCCUAUGCUUUACUdTdT	2140	3779-3797	AGUAAAAGCAUAGCCAGUUUGdTdT	2707

[1136]

AD-61989.1	CUUUACUCACACCAGUCUCUGAAdTdT	2141	3791-3809	UUCAGACUGGUGAGUAAAAGdTdT	2708
AD-61995.1	GUUCGAAACUUGAAAAGAUAdTdT	2142	3803-3821	AUAUCUUUC AAGUUCAGACdTdT	2709
AD-62001.1	ACUUUGAAAGAUUAAAUAAdTdT	2143	3809-3827	UAAUUUAUAUCUUUCAAGUdTdT	2710
AD-62007.1	UAUAAAUAUUGUUAACCCAdTdT	2144	3819-3837	UGGGUUAAACAUAAAUAUAAdTdT	2711
AD-62013.1	GUUAAACCAGUCAUCAAAUdTdT	2145	3829-3847	AUUUGAUGACUGGGUUAAACdTdT	2712
AD-61972.1	UCAUCAAAUGGCUAUCAGAdTdT	2146	3839-3857	UCUGAUAGCCAUUUGAUGAdTdT	2713
AD-61978.1	UAUCAGAAAGACAGAGGUAdTdT	2147	3851-3869	UACCUUCUGUCUUCUGAUAdTdT	2714
AD-61984.1	AGAGGUUUGGAGGUGGCUUdTdT	2148	3863-3881	AAGCCACCUCCAUACCUCUdTdT	2715
AD-61990.1	GAGGUGGCUUUUAUUAACdTdT	2149	3872-3890	GUUGAAUAAAAGCCACCUCdTdT	2716
AD-61996.1	UAUUCAAACCAGGACACAAdTdT	2150	3883-3901	UUUGUUCUGGGUUUGAAUAdTdT	2717
AD-62002.1	AGGACACAUAUCAUUGCCAAdTdT	2151	3893-3911	AUGGC AUUGAUUGUGUCCUdTdT	2718
AD-62008.1	CAAUCAUUGCCAUUGAGGGdTdT	2152	3899-3917	CCUCUAAUGGC AUUGAUUGdTdT	2719
AD-62014.1	CAUUGAGGGCCUGACGGAdTdT	2153	3909-3927	UUCCGUACAGCCCUCAUUGdTdT	2720
AD-61973.1	ACGGAAUAUUCACUCCUGGdTdT	2154	3922-3940	CCAGGAGUGAAUAUUCUGUdTdT	2721
AD-61979.1	UUACACUCCUGGUAAAACAAdTdT	2155	3930-3948	UUUJUUAAC CAGGAGUGAAdTdT	2722
AD-61985.1	GGUUAACAACUCCGUUGdTdT	2156	3939-3957	CAAGCGGAGUUUGUUAAACCdTdT	2723
AD-61991.1	CCGUUGAGUUGGACAUAdTdT	2157	3951-3969	GAUGUCCAUACUCAAGCGGdTdT	2724
AD-61997.1	GGACAUCCGUAUUCUUAAdTdT	2158	3963-3981	GUAAAGAAACAUCCGUAUCCdTdT	2725
AD-62003.1	CGAUGUUUCUUAACAAGCAUdTdT	2159	3969-3987	AUGCUUUGUAAGAAAACAUCCdTdT	2726
AD-62009.1	CAAGCAUAAAAGGUCCUUAAdTdT	2160	3981-3999	UAAGGCACCUUUAUUGCUUGdTdT	2727
AD-62056.1	GUGCCUUACAUAAAUAUAAdTdT	2161	3992-4010	UUUAUUAUUGUAAGGCACdTdT	2728
AD-62015.1	ACAUAUAUUAUAAAUGACAdTdT	2162	3999-4017	UGUCAAUUUAUAUUAUUGUdTdT	2729
AD-62021.1	AAAAUGACAGACAAGAAUUAdTdT	2163	4009-4027	AAUUCUUGUCUGUCAUUUUdTdT	2730
AD-62027.1	CAAGAAUUUCUUGGAGGGdTdT	2164	4020-4038	CCUCCCAAGGAAAUAUUCUUGdTdT	2731
AD-62033.1	CCUUGGGAGGCCAGUAAGAdTdT	2165	4029-4047	CUCUACUUGGCCUCCCAAGGdTdT	2732
AD-62039.1	AGUAGAGGUGCUUCUCAAUdTdT	2166	4041-4059	AUUGAGAAGCCCUUCUACUdTdT	2733
AD-62045.1	CUUCUCAUUGAUGACCUCAdTdT	2167	4051-4069	UGAGGUCAUCAUUGAGAAGdTdT	2734

[1137]

AD-62051.1	UGACCUCAUUUGUCAGUACAdTdT	2168	4062-4080	UGUACUGACAAGGAGUCAdTdT	2735
AD-62057.1	GUCAGUACAGGAUUUGGCAdTdT	2169	4072-4090	UGCCAAAUCCUUGUACUGACAdTdT	2736
AD-62016.1	AGGAUUUGGCAGUGGCUUGdTdT	2170	4080-4098	CAAGCCACUGCCAAAUCUAdTdT	2737
AD-62022.1	UGGCUUGGCUACAGUACAUdTdT	2171	4092-4110	AUGUACUUGUAGCCAAAGCCAdTdT	2738
AD-62028.1	GCUACAGUACAUUGAAACAAdTdT	2172	4099-4117	UUGUUACAUUGUACUGUAGCAdTdT	2739
AD-62034.1	AACAACUGUAGUUCACAAAAdTdT	2173	4113-4131	UUUGUGAACUACAGUUGUUGAdTdT	2740
AD-62040.1	GUAGUUCACAAAACAGUAdTdT	2174	4120-4138	UACUGGUUUUGUGAACUACAdTdT	2741
AD-62046.1	AAACCAGUACCUUGAGGAdTdT	2175	4130-4148	UCCUCAGAGGUACUGGUUUAdTdT	2742
AD-62052.1	UGAGGAAGUUUGCAGCUUUdTdT	2176	4143-4161	AAAGCUGCAACUUCUCUAdTdT	2743
AD-62058.1	UGCAGCUUUUAUUUGAAAAdTdT	2177	4153-4171	UUUUCAAUAAAAGCUGCAdTdT	2744
AD-62017.1	AUUUGAAAUCGAUACUCAdTdT	2178	4163-4181	UGAGUUAUCGAUUUUCAAAAdTdT	2745
AD-62023.1	CGAUACUCAGGAUUAUUGAAAdTdT	2179	4173-4191	UUCAAUUAUCCUGAGUAUCGAdTdT	2746
AD-62029.1	GGAUUUUGAAGCAUCCACAdTdT	2180	4182-4200	GUGGGUUGUUCUAAUUAUCCAdTdT	2747
AD-62035.1	GAAGCAUCCACUACAGAGAdTdT	2181	4189-4207	CUCUUAUUGGGUAGUUCUAdTdT	2748
AD-62041.1	ACUACAGAGGCUACGGAAAAdTdT	2182	4199-4217	UUUCCGUAGCCUCUGUAGUAdTdT	2749
AD-62047.1	CGGAAACUCUGAUUACAAAAdTdT	2183	4212-4230	UUUUGAAUUCAGAGUUUCCGAdTdT	2750
AD-62053.1	UGAUUACAACCGCAUAGUAdTdT	2184	4221-4239	UACUUAUGCGUUUGUAAUUCAdTdT	2751
AD-62059.1	GCAUAGUAGCAUGUGCCAGAdTdT	2185	4232-4250	CUGGCACUUGCUACUUAUUCAdTdT	2752
AD-62018.1	GCAUGUGCCAGCUACAAGCAdTdT	2186	4240-4258	GCUUGUAGCUGGACAUUGCAdTdT	2753
AD-62024.1	CUACAAGCCAGCAGGGAAdTdT	2187	4251-4269	UUCCUUGUUGGCUUGUAGAdTdT	2754
AD-62030.1	CAGCAGGGAAGAAUUAUAdTdT	2188	4260-4278	UGAUGAUUUCUUCUUGCUGAdTdT	2755
AD-62036.1	GAAUCAUUCUGGAUCCUAdTdT	2189	4270-4288	AGGAUCCAGAUAGUAGUUCAdTdT	2756
AD-62042.1	GAUCCUCUUAUGCGUUAUAdTdT	2190	4283-4301	AUACCCGCAUGAGAGGAUUCAdTdT	2757
AD-62048.1	CUCAUGCGGUUGAUUGGACAUAdTdT	2191	4289-4307	AUGUCCAUACCGCAUGAGAdTdT	2758
AD-62054.1	GAUGGACAUUCUUCUUGCAdTdT	2192	4299-4317	AGGCAGGAGAUUGUCCAUUCAdTdT	2759
AD-62060.1	CUUGCCUACUGGAAUUCAGUAdTdT	2193	4311-4329	ACUGAUUCCAGUAGGCAAGAdTdT	2760
AD-62019.1	GAAUCAGUUGCAAAUUGAAGAdTdT	2194	4322-4340	UCUUAUUAUUGCAUUGAUUCAdTdT	2761

[1138]

AD-62025.1	AAUGAAGAAGACUUAAAAdTdT	2195	4332-4350	UUUUAAGUCUUUCUUAUUdTT	2762
AD-62031.1	GAAGACUUAAAAGCCUUUGdTdT	2196	4339-4357	CAAGGGCUUUUAAGUCUUCdTdT	2763
AD-62037.1	CCUUGUGGAAGGGUGGAUdTdT	2197	4353-4371	AUCCACCCUUCCACAAGGdTdT	2764
AD-62043.1	GAAGGGUGGAUCAACUAUdTdT	2198	4360-4378	AUAGUUGAUCCACCCUUCdTdT	2765
AD-62049.1	AUCAACUAUCACUGAUUAdTdT	2199	4370-4388	UAAUCAGUGAAUAGUUGAUdTdT	2766
AD-62055.1	CACUGAUUACAAAUAAdTdT	2200	4380-4398	UUUGAUUUGGUAAUCAGUGdTdT	2767
AD-62061.1	AUCAAAAGAUAGGACAUUUAdTdT	2201	4393-4411	UAACAUUGUCCAUUUUGAUdTdT	2768
AD-62020.1	GGACAUUUUAUUCUGCAACdTdT	2202	4402-4420	GUUGCAGAAUAACAUUUCdTdT	2769
AD-62026.1	UCUGCAACUGAAUUCGAUUdTdT	2203	4413-4431	AAUCGAAUUCAGUUGCAGAdTdT	2770
AD-62032.1	GAAUUCGAUUCUCCAGUdTdT	2204	4422-4440	ACUGGAGGGAUUCGAAUUCdTdT	2771
AD-62038.1	CCUCCAGUUGAUUCCUUUdTdT	2205	4432-4450	AAAGGAAUUCACUUGGAGGdTdT	2772
AD-62044.1	GAUUUCCUUUGUGUACGAUdTdT	2206	4441-4459	AUCGUACACAAGGAAAUCdTdT	2773
AD-62050.1	GUACGAUUCGGAUUUUUGdTdT	2207	4453-4471	CAAAUUCUCCGAAUUCGUACdTdT	2774
AD-62320.1	CGGAUUAUUUGAACUCUUUGdTdT	2208	4462-4480	CAAAGAGUUCAAAUAUCCGdTdT	2775
AD-62326.1	ACUCUUUGAAGUUGGGUUUdTdT	2209	4473-4491	AAACCCAUCUCAAAGAGUdTdT	2776
AD-62332.1	AGUUGGGUUUCUCAGUCCUdTdT	2210	4482-4500	AGGACUAGAGAAACCAACUdTdT	2777
AD-62338.1	UUCUCAGUCCUGCCACUUUdTdT	2211	4490-4508	AAAGUGGCAGGACUGAGAAdTdT	2778
AD-62344.1	CACUUUCACAGUUGUACGAAdTdT	2212	4503-4521	UUUCGUACACUGUGAAAAGUGdTdT	2779
AD-62350.1	CACAGUGUACGAAUACCACdTdT	2213	4509-4527	GUUGUUAUUCGUACACUGUGdTdT	2780
AD-62356.1	ACCACAGACCAGAUAAACAdTdT	2214	4523-4541	UGUUUAUUCUGGUUCUGUGUdTdT	2781
AD-62362.1	CCAGAUAAACAGUGUACCAdTdT	2215	4531-4549	UGGUACACUGUUUAUUCUGGdTdT	2782
AD-62321.1	CAGUGUACCAUGUUUUUAUAdTdT	2216	4540-4558	UAUAAAACAUGGUACACUUGdTdT	2783
AD-62327.1	GUUUUAUAGCACUUCUCCAAUdTdT	2217	4551-4569	AUUGGAAAGUUGUAUAAAACdTdT	2784
AD-62333.1	CUUCCAAUAUCAAUAUUCAdTdT	2218	4562-4580	UGAAUUUUGUAUUGGAAAGdTdT	2785
AD-62339.1	AUCAAAUAUUCAGAAAGUCUdTdT	2219	4570-4588	AGACUUUCUGAAUUUUGAUdTdT	2786
AD-62345.1	GAAAGUCUGUAGAGGAGCCdTdT	2220	4581-4599	GGUCCUUCACAGACUUUCdTdT	2787
AD-62351.1	GAAGGAGCCGCGUACAAGUdTdT	2221	4591-4609	ACUUGCACGGGCUCCUUCdTdT	2788

[1139]

AD-62357.1	CGUGCAAGUGUGUAGAAGCPTdT	2222	4601-4619	GCUUCUACACACUUGCACGgTdT	2789
AD-62363.1	GUAGAAGCUGAUUUGGGCPTdT	2223	4612-4630	GCCCACAAUCAGCUUCUACPTdT	2790
AD-62322.1	CUGAUUGUGGGCAAAUUCAdTdT	2224	4619-4637	UGCAUUUGCCACAAUCAGgTdT	2791
AD-62328.1	GCAAUJGCAGGAAGAUAUUGdTdT	2225	4629-4647	CAAUUCUUCUUGCAUUUGCPTdT	2792
AD-62334.1	GAAGAAUUGGAUCUGACAAAdTdT	2226	4639-4657	UUGUCAGAUCCAAUUCUUCPTdT	2793
AD-62340.1	CUGACAAUCUCUGCAGAGAdTdT	2227	4651-4669	UCUCUGCAGAGAUUGUCAGdTdT	2794
AD-62346.1	GCAGAGACAAGAAAACAAdTdT	2228	4663-4681	UUUGUUUUCUUGUCUCUGCPTdT	2795
AD-62352.1	CAAGAAAACAACAGCAUUGdTdT	2229	4670-4688	CAUGCUGUUUGUUUUUCUUGdTdT	2796
AD-62358.1	ACAGCAUGUAACACAGAGAdTdT	2230	4681-4699	UCUCUGGUUUACAUUCUGUdTdT	2797
AD-62364.1	CCAGAGAUUGCAUUGCUUdTdT	2231	4693-4711	AAGCAUUGCAAUUCUGGgTdT	2798
AD-62323.1	GCAUUGCUUAUAAAAGUUAdTdT	2232	4702-4720	UAACUUUAUAAGCAUAUUGCPTdT	2799
AD-62329.1	UUUAAAAGUUAGCAUCACAdTdT	2233	4710-4728	UGUGAUGCUAACUUUAUAAdTdT	2800
AD-62335.1	CAUCACAUCACUCUGAdTdT	2234	4722-4740	UACAGUGAUGGAUGUGAUGdTdT	2801
AD-62341.1	UCACUGUAGAAAAGUUUUdTdT	2235	4733-4751	AAAACUUUUUCUACAGUGAdTdT	2802
AD-62347.1	AGAAAUGUUUUUGUCAAGdTdT	2236	4740-4758	CUUGACAAAACAUUUUCUdTdT	2803
AD-62353.1	UUUGUCAAGUACAAGGCAdTdT	2237	4750-4768	UUUGCUUGUACUUGACAAAdTdT	2804
AD-62359.1	AGGCAACCCUUCUGGAUAUdTdT	2238	4763-4781	AUAUCCAGAAAGGUUGCCUdTdT	2805
AD-62365.1	CCUUCUGGAUAUCUACAAdTdT	2239	4770-4788	UUUUGAUAUUCAGAGAGGdTdT	2806
AD-62324.1	UAUCUACAAAACUGGGGAAdTdT	2240	4779-4797	UUCCCCAGUUUUGUAGAUAdTdT	2807
AD-62330.1	CUGGGAAGCUGUUGCUGAdTdT	2241	4790-4808	UCAGCAACAGCUUCCCCAGdTdT	2808
AD-62336.1	CUGUUGCUGAGAAAGACUCdTdT	2242	4799-4817	GAGUUCUUCUCAGCAACAGdTdT	2809
AD-62342.1	GACUCUGAGAUUACCUUCAdTdT	2243	4813-4831	UGAAGGUAAUUCUCAGAGUCdTdT	2810
AD-62348.1	GAGAUUACCUUCAUUAAAAdTdT	2244	4819-4837	UUUUAAAUGAAGGUAAAUCUdTdT	2811
AD-62354.1	AUUAAAAGGUAAACCUGUAdTdT	2245	4831-4849	UACAGGUUACCUUUUUAAUdTdT	2812
AD-62360.1	UAACCUGUACUAAACGUGAdTdT	2246	4841-4859	UCAGCGUUAGUACAGGUUAdTdT	2813
AD-62366.1	CUAACGUGAGCUGGUAAAAdTdT	2247	4850-4868	UUUACCAGCUCAGCGUUAGdTdT	2814
AD-62325.1	GGUAAAAGGAAGACAGUACPTdT	2248	4863-4881	GUACUGUUCUUUUUACCPTdT	2815

[1140]

AD-62331.1	GAAGACAGUACUUAAUUUAUdTdT	2249	4871-4889	AUAAUUAAAGUACUGUCUUCdTdT	2816
AD-62337.1	CUUAAUUUUGGUAAAAGAAAdTdT	2250	4881-4899	UUUUUUACCCAUAAUUAAAGdTdT	2817
AD-62343.1	UAAAGAAGCCUCCAGAUAdTdT	2251	4893-4911	UAUCUGGAGGCUCUUUAdTdT	2818
AD-62349.1	CCUCCAGAUAAAUAACAAdTdT	2252	4902-4920	AUUUUAUUUAUCUGGAGGdTdT	2819
AD-62355.1	AAAUACAUUUCAGUUUCAdTdT	2253	4912-4930	UGAAACUGAAAUUUAUUAdTdT	2820
AD-62361.1	CAGUUUCAGGUACAUUCAdTdT	2254	4923-4941	GUAGAUGUACCUGAAAACUGdTdT	2821
AD-62367.1	GGUACAUCUACCCUUUAGAdTdT	2255	4931-4949	UCUAAAAGGUAGUAGUACCCdTdT	2822
AD-62373.1	CCUUUJAGAUUCUUGACCUdTdT	2256	4942-4960	AGGUCAAAGGAAUUCUAAAAGGdTdT	2823
AD-62379.1	CCUUGACCUUGAUUGAAUAdTdT	2257	4952-4970	UAUUCAAUCCAGGUCAAAGGdTdT	2824
AD-62385.1	GGAUUGAAUACUUGGCCUJAGdTdT	2258	4961-4979	CUAGGCCAGUUAUUCAAUCCdTdT	2825
AD-62391.1	CUGGCCUJAGAGACACAAAdTdT	2259	4971-4989	UGUUUGUUCUJAGGCCAGdTdT	2826
AD-62397.1	GAGACACAAACAUUUUCUUCdTdT	2260	4979-4997	GAUGAACAUUUUGUUCUCdTdT	2827
AD-62403.1	GUUCAUCGUUCAAGCAUUdTdT	2261	4991-5009	AAUGCUUGACACGAUGAACdTdT	2828
AD-62409.1	GUCAAGCAUUUUUJAGCUAAAdTdT	2262	5000-5018	UUAGCUAAAAUUGCUUGACdTdT	2829
AD-62368.1	AGCUAAUUUJAGAUAAAUUdTdT	2263	5013-5031	AAAUUCAUCUAAAUUAGCUdTdT	2830
AD-62374.1	AGAUGAAUUUGCCGAAGAUdTdT	2264	5022-5040	AUCUUCGGCAAUUUCUUCdTdT	2831
AD-62380.1	CCGAAAGAUUCUUUUUAAAAdTdT	2265	5033-5051	UUUAAAAGAUUUCUUCGGdTdT	2832
AD-62386.1	CUUUUUAAAUGGAUUCUAAAdTdT	2266	5043-5061	UUAGCAUCCAUUUAAAAGdTdT	2833
AD-62392.1	GGAUUCUAAAUAUUCUGAAAdTdT	2267	5053-5071	UUCAGGAUUUUUJAGCAUCCdTdT	2834
AD-62398.1	UAAAUAUCCUGAAGUUCAGdTdT	2268	5059-5077	CUGAACUUCAGGAAUUUUAdTdT	2835
AD-62404.1	AGUUCAGCUGCAUACAGUUAdTdT	2269	5071-5089	AACUGUAUGCAGCUGAACUdTdT	2836
AD-62410.1	GCAUACAGUUUGCACUUAdTdT	2270	5080-5098	AUAAUGUCAAACUUAUUGCdTdT	2837
AD-62369.1	ACUUUUGGACUCCUGUUUUAdTdT	2271	5093-5111	ACAACAGGAGUCCAUAAAGUdTdT	2838
AD-62375.1	GGACUCUGUUUGUUUGAAGUdTdT	2272	5099-5117	ACUUCAAACACAGGAGUCCdTdT	2839
AD-62381.1	UGUUUGAAGUUCUUUUUUAdTdT	2273	5109-5127	AAAAAAACGAAACUUCAAACdTdT	2840
AD-62387.1	UUUUUUGUUUUCUUCUUUUAdTdT	2274	5122-5140	AAAAAGAAAGAAAACAAAAAdTdT	2841
AD-62393.1	UCUUUUUUUUUAAAACAUUUdTdT	2275	5132-5150	AAUGUUUAAAAAAGAAAGdTdT	2842

[1141]

AD-62399.1	UUUUUAAACAUCAUAGCUbTbT	2276	5139-5157	AGCUAUGAAUGUUUAAAAAdTbT	2843
AD-62405.1	AUAGCUGGUCUUAUUUGAdTbT	2277	5152-5170	UACAAAUAAAGACCAGCUAUbTbT	2844
AD-62411.1	GUCUUUUUUUAAAGCUCAdTbT	2278	5159-5177	UGAGCUUUAACAAAUAAGACbTbT	2845
AD-62370.1	AAAGCUCACUUUACUUAGAdTbT	2279	5170-5188	UCUAAAGUAAAGUAGACUUUAdTbT	2846
AD-62376.1	ACUUAGAAUAGUGGCACUAdTbT	2280	5182-5200	AGUGCCACUAAUUUCUAAAGUAdTbT	2847
AD-62382.1	AGUGGCACUUGCUUUUAUUAdTbT	2281	5192-5210	AAUAAAAGCAAGUGCCACUAdTbT	2848
AD-62388.1	GCUUUUAUUAGAGAAUGAUAdTbT	2282	5202-5220	AUCAUUCUCUAAAUAAAAAGCAdTbT	2849
AD-62394.1	GAGAAUGAUUUCAAAUGCUAdTbT	2283	5212-5230	AGCAUUUGAAAUCAUUCUCbTbT	2850
AD-62400.1	UUUCAAUUGCUUUAACUUUAdTbT	2284	5220-5238	AAAGUUUACAGCAUUUUGAAAdTbT	2851
AD-62406.1	GUAAUUUUGUGAAAUAACAdTbT	2285	5231-5249	UGUUUUUUUCAGAAAAGUUACbTbT	2852
AD-62412.1	GAAAUAAACAUUGCCUUUGGAdTbT	2286	5241-5259	UCCAAGGCCAUUUUAUUUCbTbT	2853
AD-62371.1	CCUUGGAGGCAUGAAGACbTbT	2287	5253-5271	GUCUUCAUUGCCUCCAAAGGAdTbT	2854
AD-62377.1	AGGGCAUGAAGACAGAUACbTbT	2288	5259-5277	GUUUCUGUCUUCUAGGCCUAdTbT	2855
AD-62383.1	GAUACUCCUCCAAGGUUAUAdTbT	2289	5273-5291	AUAAACUUUGGAGGAGUAUCbTbT	2856
AD-62389.1	CCUCCAAGGUUAUUGGACAdTbT	2290	5279-5297	UGUCCAAUAACCUUGGAGGAdTbT	2857
AD-62395.1	GGACACCGGAAACAAUAAAdTbT	2291	5293-5311	UUUAUUUUUUUCGGUGUCCbTbT	2858
AD-62401.1	GAAACAUAUUUGGAACAdTbT	2292	5301-5319	UGUUCCAAUUUAUUUUUUUCbTbT	2859
AD-62407.1	AUUGGAACACUCCUCAAAdTbT	2293	5311-5329	UUUGAGGAGGUUUUCCAAUAdTbT	2860
AD-62413.1	UCCUCAACCCUACCACUAdTbT	2294	5322-5340	UGAGUGGUAGGUUUUGAGGAdTbT	2861
AD-62372.1	CUACCACUCAGGAUUUUUUAdTbT	2295	5331-5349	AAACAUUCCUGAGUGGUAGAdTbT	2862
AD-62378.1	AAUGUUUUGCUGGGCCGAAdTbT	2296	5343-5361	UUUCGGCCCAAGCAAAACAUUAdTbT	2863
AD-62384.1	UGCUGGGCCGAAAAGAACAdTbT	2297	5349-5367	UGUUUUUUUUGGGCCCAAGCAdTbT	2864
AD-62390.1	AAAGAACAAGUCCAUUUGAAAdTbT	2298	5360-5378	UUUCAAUGGACUGUUUUUUAdTbT	2865
AD-62396.1	CAUUGAAAAGGGAGUAUUACbTbT	2299	5371-5389	GUAAUACUCCUUUUAUUGAdTbT	2866
AD-62402.1	GGAGUAUUUACAAAAACAUGAdTbT	2300	5380-5398	CAUGUUUUUUUUAUUAUCCbTbT	2867
AD-62408.1	AAAACAUGGCCUUUUGCUUGbTbT	2301	5391-5409	CAAGCAAAGGCCAUGUUUUUAdTbT	2868
AD-62414.1	GCCUUUGCUUUGAAAAGAAAdTbT	2302	5399-5417	UUUUUUUUUUAACAAGGCAAdTbT	2869

[1142]

AD-62415.1	GAAAGAAAUAACCAAGGAAdTdT	2303	5409-5427	UUCCUUGGUAAUUUUCUUUCdTdT	2870
AD-62416.1	CCAAAGGAACAGGAAACUGAdTdT	2304	5420-5438	UCAGUUUCCUGUUCCUUGGdTdT	2871
AD-62417.1	AACUGAUCAUUAAAGCCUGdTdT	2305	5433-5451	CAGGCUUUAUGAUCAGUUdTdT	2872

[1143] 表22. 使用dT修饰的iRNA的Hep3B细胞中的C5单次剂量筛选 (10nM)

[1144]

双链体身份	余留信息的平均%
AD-61779.2	43.2
AD-61785.2	22.5
AD-61791.2	27.3
AD-61797.2	30.5
AD-61803.2	30.9
AD-61809.2	75.1
AD-61815.2	90.7
AD-61821.2	33.7
AD-61780.2	53.5
AD-61786.2	34.4
AD-61792.2	27.5
AD-61798.2	23.3
AD-61804.2	23.6
AD-61810.2	33.4
AD-61816.2	39.7
AD-61822.2	24.9
AD-61781.2	31.2
AD-61787.2	22.8
AD-61793.2	28.4
AD-61799.2	91
AD-61805.2	22.1
AD-61811.2	90.9
AD-61817.2	26.1
AD-61823.2	41.3
AD-61782.2	42.5
AD-61788.2	28.9
AD-61794.2	133.5
AD-61800.2	27.9
AD-61806.2	42.8
AD-61812.2	26.9
AD-61818.2	30.6

[1145]

AD-61824.2	29.3
AD-61783.2	61.3
AD-61789.2	25.5
AD-61795.2	34.2
AD-61801.2	24.2
AD-61807.2	42.8
AD-61813.2	31
AD-61819.2	42.2
AD-61825.2	31
AD-61784.2	34.1
AD-61790.2	26.8
AD-61796.2	34.6
AD-61802.2	30
AD-61808.2	23.5
AD-61814.2	45.3
AD-61820.2	56
AD-61826.2	31.6
AD-61832.2	36.2
AD-61838.2	39.7
AD-61844.2	37
AD-61850.2	66.3
AD-61856.2	172.6
AD-61862.2	41.3
AD-61868.2	32.2
AD-61827.2	52.7
AD-61833.2	29.6
AD-61839.2	41.5
AD-61845.2	29.7
AD-61851.2	37
AD-61857.2	34.9
AD-61863.2	33.3
AD-61869.2	38.2
AD-61828.2	30.3
AD-61834.2	27.1

[1146]

AD-61840.2	64.3
AD-61846.2	42
AD-61852.2	25.2
AD-61858.2	96.7
AD-61864.2	29.6
AD-61870.2	30.5
AD-61829.2	92.7
AD-61835.2	24.8
AD-61841.2	59.2
AD-61847.2	30.9
AD-61853.2	35.2
AD-61859.2	40.1
AD-61865.2	42.3
AD-61871.2	55.8
AD-61830.2	162.9
AD-61836.2	28.8
AD-61842.2	18.2
AD-61848.2	25
AD-61854.2	42.3
AD-61860.2	41.7
AD-61866.2	28.9
AD-61872.2	64.7
AD-61831.2	16.9
AD-61837.2	24.9
AD-61843.2	27.5
AD-61849.2	25.8
AD-61855.2	20
AD-61861.2	28.6
AD-61867.2	18
AD-62062.1	22
AD-62068.1	29.9
AD-62074.1	40.2
AD-62080.1	30.4
AD-62086.1	21

[1147]

AD-62092.1	20
AD-62098.1	38.4
AD-62104.1	42.7
AD-62063.1	26.6
AD-62069.1	55.6
AD-62075.1	114.4
AD-62081.1	21.2
AD-62087.1	33.8
AD-62093.1	26.3
AD-62099.1	23.9
AD-62105.1	30.1
AD-62064.1	32
AD-62070.1	135.7
AD-62076.1	84.3
AD-62082.1	42.3
AD-62088.1	36.5
AD-62094.1	66
AD-62100.1	66.4
AD-62106.1	33.9
AD-62065.1	33
AD-62071.1	38.4
AD-62077.1	27.8
AD-62083.1	44.7
AD-62089.1	42.7
AD-62095.1	46.6
AD-62101.1	35.3
AD-62107.1	29.9
AD-62066.1	33.5
AD-62072.1	27.5
AD-62078.1	49.9
AD-62084.1	117.6
AD-62090.1	44
AD-62096.1	33.5
AD-62102.1	39.2

[1148]

AD-62108.1	69.5
AD-62067.1	32.3
AD-62073.1	81.1
AD-62079.1	46.8
AD-62085.1	31.6
AD-62091.1	32
AD-62097.1	35.3
AD-62103.1	35.6
AD-62109.1	24.7
AD-62115.1	25.7
AD-62121.1	23.1
AD-62127.1	36.3
AD-62133.1	50.9
AD-62139.1	84.1
AD-62145.1	90.8
AD-62151.1	56.9
AD-62110.1	26
AD-62116.1	145.5
AD-62122.1	198.7
AD-62128.1	178.4
AD-62134.1	52.4
AD-62140.1	55.6
AD-62146.1	47.2
AD-62152.1	16.4
AD-62111.1	49.3
AD-62117.1	46.2
AD-62123.1	95.1
AD-62129.1	156.2
AD-62135.1	62
AD-62141.1	128.1
AD-62147.1	146.2
AD-62153.1	35.5
AD-62112.1	43
AD-62118.1	32

[1149]

AD-62124.1	48.4
AD-62130.1	49.4
AD-62136.1	141.9
AD-62142.1	38.7
AD-62148.1	165.2
AD-62154.1	94.7
AD-62113.1	52.5
AD-62119.1	44
AD-62125.1	129.9
AD-62131.1	68.9
AD-62137.1	106
AD-62143.1	176.1
AD-62149.1	201.3
AD-62155.1	143.3
AD-62114.1	22.8
AD-62120.1	34.6
AD-62126.1	44.6
AD-62132.1	39.5
AD-62138.1	34.5
AD-62144.1	28
AD-62150.1	22.1
AD-62156.1	44.1
AD-62162.1	19.8
AD-62168.1	17.3
AD-62174.1	27
AD-62180.1	15.8
AD-62186.1	20.5
AD-62192.1	33.9
AD-62198.1	14
AD-62157.1	19.3
AD-62163.1	15.4
AD-62169.1	23.6
AD-62175.1	29.6
AD-62181.1	26.4

[1150]

AD-62187.1	28.8
AD-62193.1	22.9
AD-62199.1	16.4
AD-62158.1	18.5
AD-62164.1	19.1
AD-62170.1	15
AD-62176.1	62.7
AD-62182.1	70.8
AD-62188.1	81.1
AD-62194.1	63.6
AD-62200.1	21.6
AD-62159.1	42.8
AD-62165.1	27.7
AD-62171.1	31.9
AD-62177.1	29.6
AD-62183.1	25.2
AD-62189.1	32.7
AD-62195.1	73.1
AD-62201.1	35.6
AD-62160.1	56.5
AD-62166.1	115.1
AD-62172.1	107.4
AD-62178.1	71.3
AD-62184.1	27.2
AD-62190.1	37.2
AD-62196.1	19.5
AD-62202.1	19.4
AD-62161.1	23.7
AD-62167.1	24.4
AD-62173.1	36
AD-62179.1	50.5
AD-62185.1	40.5
AD-62191.1	39.3
AD-62197.1	39.4

[1151]

AD-62203.1	34.1
AD-62209.1	34.6
AD-62215.1	31
AD-62221.1	16.3
AD-62227.1	68.5
AD-62233.1	34.3
AD-62239.1	37.2
AD-62245.1	31.2
AD-62204.1	33
AD-62210.1	29
AD-62216.1	38.7
AD-62222.1	34.5
AD-62228.1	30.3
AD-62234.1	15.2
AD-62240.1	26.2
AD-62246.1	40.4
AD-62205.1	17.1
AD-62211.1	20.9
AD-62217.1	49.8
AD-62223.1	40
AD-62229.1	26.7
AD-62235.1	21.5
AD-62241.1	46.2
AD-62247.1	40.4
AD-62206.1	42.2
AD-62212.1	51.7
AD-62218.1	26
AD-62224.1	40.3
AD-62230.1	32.8
AD-62236.1	52.4
AD-62242.1	33.1
AD-62248.1	18
AD-62207.1	19.7
AD-62213.1	43.4

[1152]

AD-62219.1	39.8
AD-62225.1	34.3
AD-62231.1	37.2
AD-62237.1	25.9
AD-62243.1	19.8
AD-62249.1	13.8
AD-62208.1	13.7
AD-62214.1	16.6
AD-62220.1	25.2
AD-62226.1	27
AD-62232.1	36.5
AD-62238.1	51.5
AD-62244.1	31.5
AD-61874.1	27.1
AD-61880.1	30.8
AD-61886.1	30.4
AD-61892.1	48.9
AD-61898.1	24.7
AD-61904.1	125.9
AD-61910.1	45.7
AD-61916.1	25.7
AD-61875.1	33.4
AD-61881.1	64
AD-61887.1	36.7
AD-61893.1	22.9
AD-61899.1	84.5
AD-61905.1	32.1
AD-61911.1	23.7
AD-61917.1	22.1
AD-61876.1	47.3
AD-61882.1	26.5
AD-61888.1	27.7
AD-61894.1	64.8
AD-61900.1	89.8

[1153]

AD-61906.1	22.4
AD-61912.1	19.8
AD-61918.1	37.1
AD-61877.1	145
AD-61883.1	31.5
AD-61889.1	33.9
AD-61895.1	37.5
AD-61901.1	26.1
AD-61907.1	33
AD-61913.1	33.1
AD-61919.1	36.6
AD-61878.1	26.9
AD-61884.1	33.9
AD-61890.1	37.2
AD-61896.1	41.7
AD-61902.1	58.6
AD-61908.1	28
AD-61914.1	31.4
AD-61920.1	27.1
AD-61879.1	33.1
AD-61885.1	33.7
AD-61891.1	41.3
AD-61897.1	39.4
AD-61903.1	51.5
AD-61909.1	48.6
AD-61915.1	122.4
AD-61921.1	66.4
AD-61927.1	40.5
AD-61933.1	27.7
AD-61939.1	28.1
AD-61945.1	30
AD-61951.1	33.7
AD-61957.1	32.6
AD-61963.1	17

[1154]

AD-61922.1	32.9
AD-61928.1	28.3
AD-61934.1	24
AD-61940.1	28.2
AD-61946.1	33.2
AD-61952.1	167.9
AD-61958.1	37
AD-61964.1	30.6
AD-61923.1	51.2
AD-61929.1	29.4
AD-61935.1	61
AD-61941.1	29.5
AD-61947.1	28.9
AD-61953.1	23.7
AD-61959.1	18.9
AD-61965.1	17
AD-61924.1	24.1
AD-61930.1	31.9
AD-61936.1	36.9
AD-61942.1	13.8
AD-61948.1	40.2
AD-61954.1	41.8
AD-61960.1	24.1
AD-61966.1	18.9
AD-61925.1	52.4
AD-61931.1	25.8
AD-61937.1	19.1
AD-61943.1	27.8
AD-61949.1	26.5
AD-61955.1	83.8
AD-61961.1	26
AD-61967.1	16.3
AD-61926.1	17.8
AD-61932.1	18.6

[1155]

AD-61938.1	31.9
AD-61944.1	29.5
AD-61950.1	57.8
AD-61956.1	42.1
AD-61962.1	30
AD-61968.1	29.1
AD-61974.1	50.8
AD-61980.1	19.7
AD-61986.1	36.4
AD-61992.1	36.3
AD-61998.1	18.3
AD-62004.1	14
AD-62010.1	56.8
AD-61969.1	30
AD-61975.1	51.1
AD-61981.1	37.6
AD-61987.1	32.5
AD-61993.1	23.4
AD-61999.1	43.8
AD-62005.1	23.8
AD-62011.1	32.7
AD-61970.1	39.6
AD-61976.1	27.5
AD-61982.1	64.9
AD-61988.1	29.5
AD-61994.1	40.5
AD-62006.1	42.1
AD-62012.1	21
AD-61971.1	27.1
AD-61977.1	23.4
AD-61983.1	57.5
AD-61989.1	25.8
AD-61995.1	18.2
AD-62001.1	29.7

[1156]

AD-62007.1	106.4
AD-62013.1	36.1
AD-61972.1	40.5
AD-61978.1	49.1
AD-61984.1	24.3
AD-61990.1	38.8
AD-61996.1	40.5
AD-62002.1	32.5
AD-62008.1	35.3
AD-62014.1	23.6
AD-61973.1	39.3
AD-61979.1	27.4
AD-61985.1	31.3
AD-61991.1	34.9
AD-61997.1	29.2
AD-62003.1	25.9
AD-62009.1	21.1
AD-62056.1	16.3
AD-62015.1	139.3
AD-62021.1	36.4
AD-62027.1	42.4
AD-62033.1	62
AD-62039.1	35.2
AD-62045.1	30.8
AD-62051.1	22.9
AD-62057.1	31.8
AD-62016.1	29.2
AD-62022.1	36.9
AD-62028.1	52.6
AD-62034.1	31
AD-62040.1	30.7
AD-62046.1	28.2
AD-62052.1	23.7
AD-62058.1	77.9

[1157]

AD-62017.1	41
AD-62023.1	27
AD-62029.1	31.8
AD-62035.1	46.4
AD-62041.1	25.3
AD-62047.1	20
AD-62053.1	37.1
AD-62059.1	31
AD-62018.1	37.8
AD-62024.1	34.7
AD-62030.1	50.4
AD-62036.1	25.5
AD-62042.1	32.5
AD-62048.1	28.3
AD-62054.1	55.6
AD-62060.1	26.9
AD-62019.1	29
AD-62025.1	78.5
AD-62031.1	152.8
AD-62037.1	27.3
AD-62043.1	33.8
AD-62049.1	46
AD-62055.1	24.5
AD-62061.1	30.5
AD-62020.1	25.1
AD-62026.1	24.9
AD-62032.1	23
AD-62038.1	21.2
AD-62044.1	34.1
AD-62050.1	22.4
AD-62320.1	16.6
AD-62326.1	16.6
AD-62332.1	15.4
AD-62338.1	41.9

[1158]

AD-62344.1	19.6
AD-62350.1	32.3
AD-62356.1	20.4
AD-62362.1	27.8
AD-62321.1	18.7
AD-62327.1	14.8
AD-62333.1	22.2
AD-62339.1	134.5
AD-62345.1	32.1
AD-62351.1	35.6
AD-62357.1	31
AD-62363.1	28.2
AD-62322.1	45.1
AD-62328.1	30.1
AD-62334.1	39.1
AD-62340.1	24.3
AD-62346.1	35.4
AD-62352.1	33.8
AD-62358.1	45.7
AD-62364.1	19.7
AD-62323.1	40.5
AD-62329.1	57.5
AD-62335.1	27.6
AD-62341.1	69.2
AD-62347.1	125.9
AD-62353.1	53.1
AD-62359.1	38.1
AD-62365.1	23.6
AD-62324.1	27.1
AD-62330.1	25.1
AD-62336.1	25.3
AD-62342.1	45.4
AD-62348.1	91.6
AD-62354.1	132.1

[1159]

AD-62360.1	31.6
AD-62366.1	14.2
AD-62325.1	27.9
AD-62331.1	31.5
AD-62337.1	33.9
AD-62343.1	36.1
AD-62349.1	37.6
AD-62355.1	38.8
AD-62361.1	46.1
AD-62367.1	23.6
AD-62373.1	32.1
AD-62379.1	29.6
AD-62385.1	35.7
AD-62391.1	33.7
AD-62397.1	54.1
AD-62403.1	34.8
AD-62409.1	28.2
AD-62368.1	29.7
AD-62374.1	29.6
AD-62380.1	30.6
AD-62386.1	23.4
AD-62392.1	30.5
AD-62398.1	48.7
AD-62404.1	24.8
AD-62410.1	21.9
AD-62369.1	27.4
AD-62375.1	31.9
AD-62381.1	27.3
AD-62387.1	77
AD-62393.1	93.3
AD-62399.1	150.2
AD-62405.1	28.5
AD-62411.1	19.4
AD-62370.1	16.3

[1160]

AD-62376.1	48.2
AD-62382.1	28.5
AD-62388.1	49.9
AD-62394.1	29.9
AD-62400.1	45.2
AD-62406.1	23
AD-62412.1	45.5
AD-62371.1	66.5
AD-62377.1	49.5
AD-62383.1	73.8
AD-62389.1	82.4
AD-62395.1	31.8
AD-62401.1	31.2
AD-62407.1	30.2
AD-62413.1	28.1
AD-62372.1	43
AD-62378.1	17.9
AD-62384.1	29.6
AD-62390.1	37.7
AD-62396.1	26
AD-62402.1	31.6
AD-62408.1	46.6
AD-62414.1	27.2
AD-62415.1	17.6
AD-62416.1	25.3
AD-62417.1	36.3
AD-61779.2	43.2
AD-61785.2	22.5
AD-61791.2	27.3
AD-61797.2	30.5
AD-61803.2	30.9
AD-61809.2	75.1
AD-61815.2	90.7
AD-61821.2	33.7

[1161]	AD-61780.2	53.5
	AD-61786.2	34.4
	AD-61792.2	27.5
	AD-61798.2	23.3
	AD-61804.2	23.6

[1162] 实例7:另外的siRNA的体内筛选

[1163] 基于AD-58643的序列,合成另外的四个有义序列和三个反义序列,并且用来制备12种21聚体/25聚体化合物(表23)。通常,用dTdT延长这些化合物的反义链并且双链体具有较少的氟代修饰的核苷酸。

[1164] 用1mg/kg的这些GalNAc缀合的双链体皮下注射C57BL/6小鼠(每组N=3),在第0天放血前和第5天收集血清,并且通过ELISA定量C5蛋白的水平。将C5蛋白水平归一化成第0天放血前的水平。

[1165] 图14示出使用指定的iRNA的体内单次剂量筛选的结果。数据表达为相对于放血前水平余留的C5蛋白质的百分比。与母体化合物相比具有改进的功效的那些iRNA包括AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651。这些iRNA还证实了类似的潜力(IC₅₀是约23-59pM)。

[1166] 还使用单次给药给予方案,在C57B1/6小鼠中测试了这些iRNA的功效。以0.25mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg或2.5mg/kg剂量皮下给予小鼠AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651。在第0天和第5天收集血清,并且通过ELISA分析C5蛋白水平。将C5水平归一化成第0天放血前的水平。

[1167] 图15示出针对所有所测试的iRNA存在剂量响应,并且单次给药所有这些iRNA实现了类似于或优于AD-58641的C5蛋白沉默。

[1168] 通过向C57B1/6小鼠给予单次1.0mg/kg剂量并且通过ELISA确定在第6天、第13天、第20天、第27天和第34天存在的C5蛋白的量来确定体内AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651的沉默持续时间。将C5水平归一化成第0天放血前的水平。

[1169] 如在图16中所证实,所测试的每个iRNA具有与AD-62643相同的倾向于朝着最佳沉默但在测定误差内的回收率动力学。

[1170] 进一步测试了AD-62510、AD-62643、AD-62645、AD-62646、AD-62650和AD-62651的功效,并且使用重复给予方案评估这些iRNA在大鼠中的累积作用。在第0天、第4天和第7天,以5.0mg/kg/剂量用这些iRNA中的每一个皮下注射野生型斯普拉道来大鼠。在第0天、第4天、第7天、第11天、第14天、第18天、第25天、第28天和第32天收集血液。如上所述定量血清溶血活性。

[1171] 图17中描绘的结果证实了所有所测试的iRNA具有有效的和持久的溶血活性降低和与用AD-58641处理所观察到的类似的溶血回收率。

[1172] 表23:GalNAc缀合的C5 dsRNA的修饰的有义链序列和反义链序列

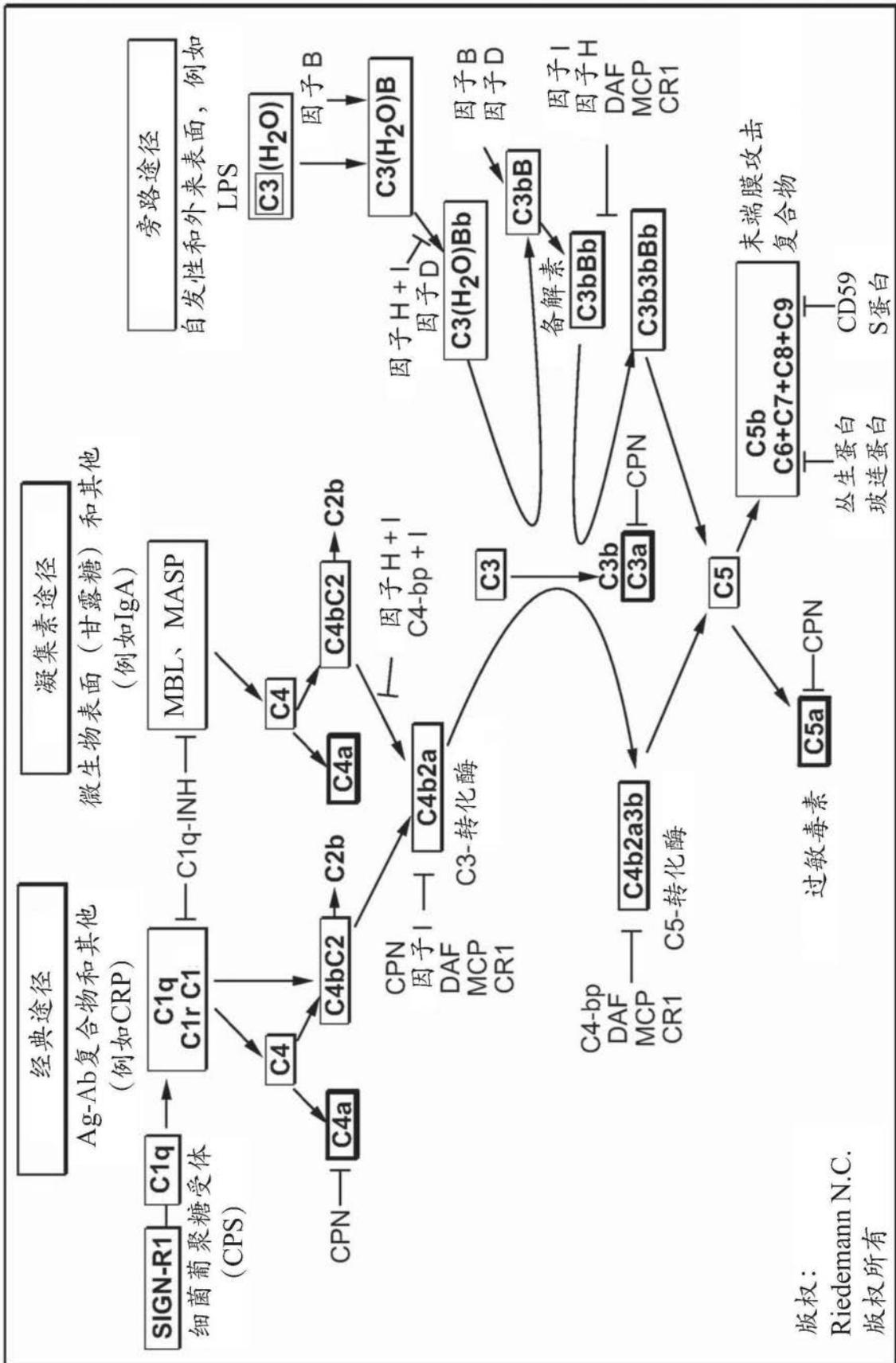


图1

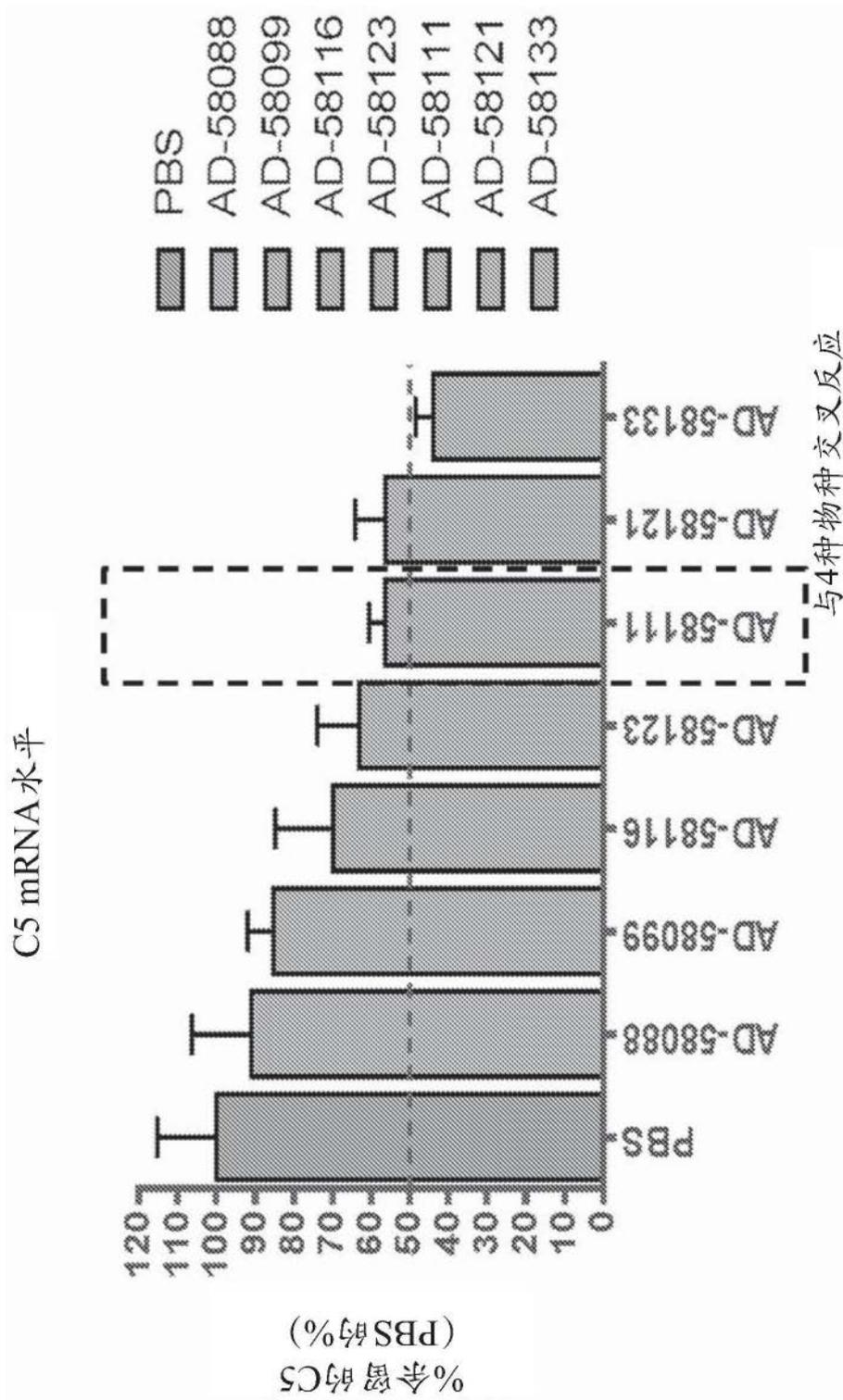


图2

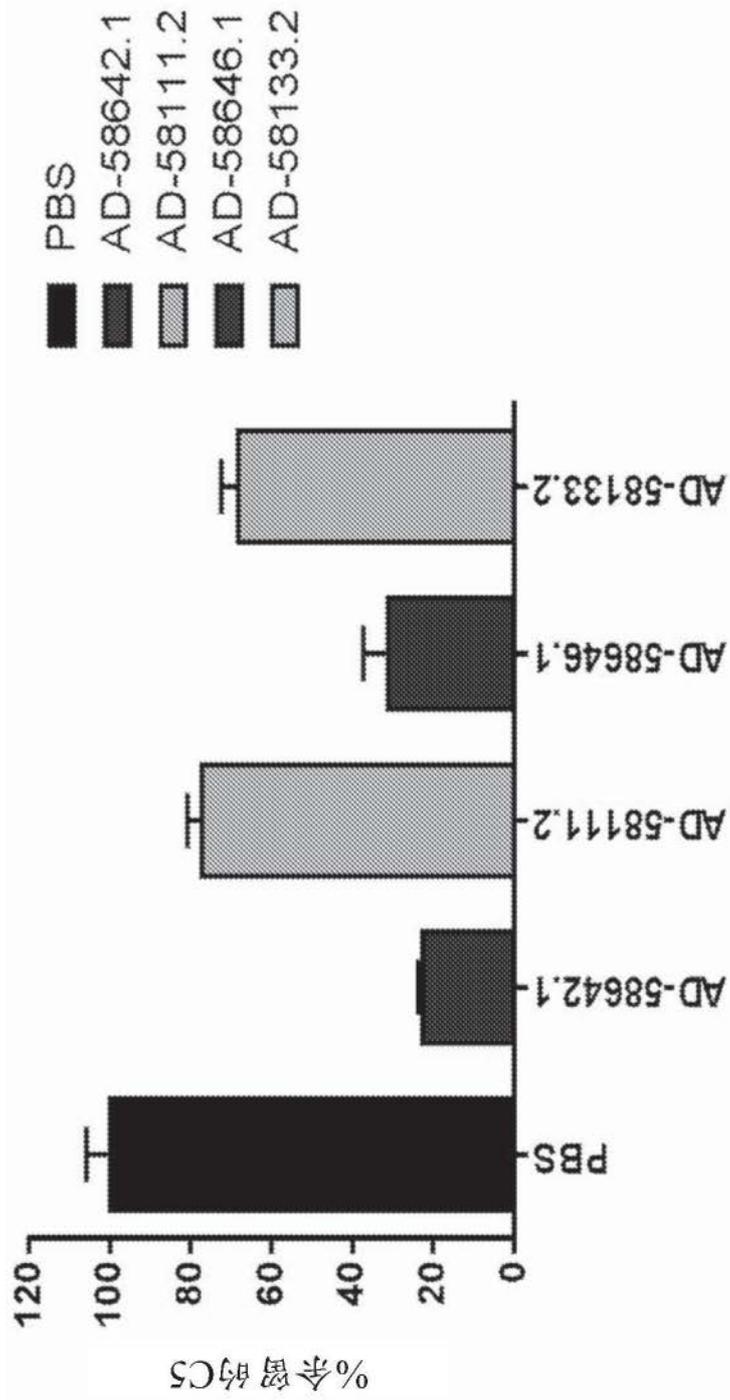


图3

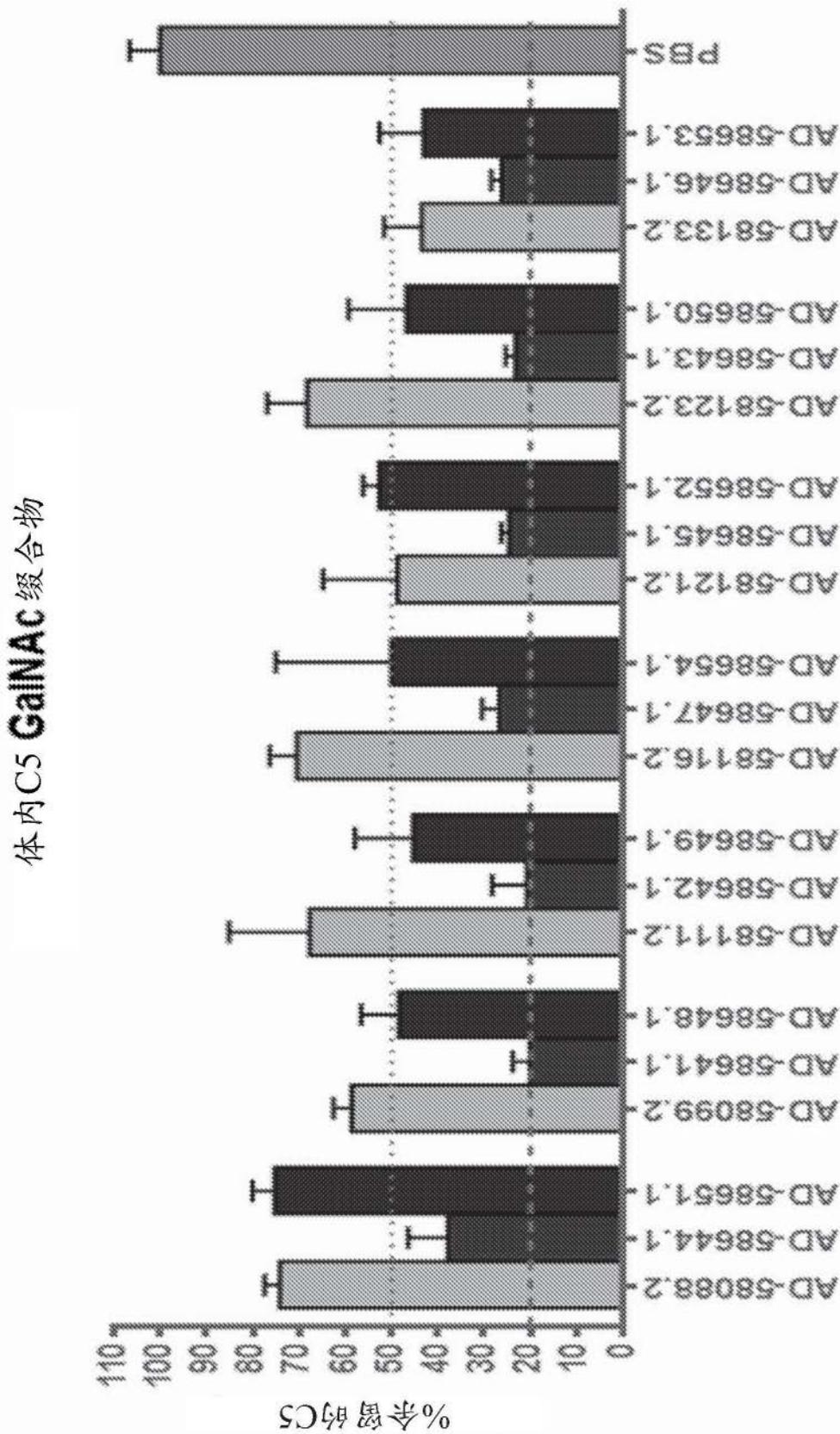


图4

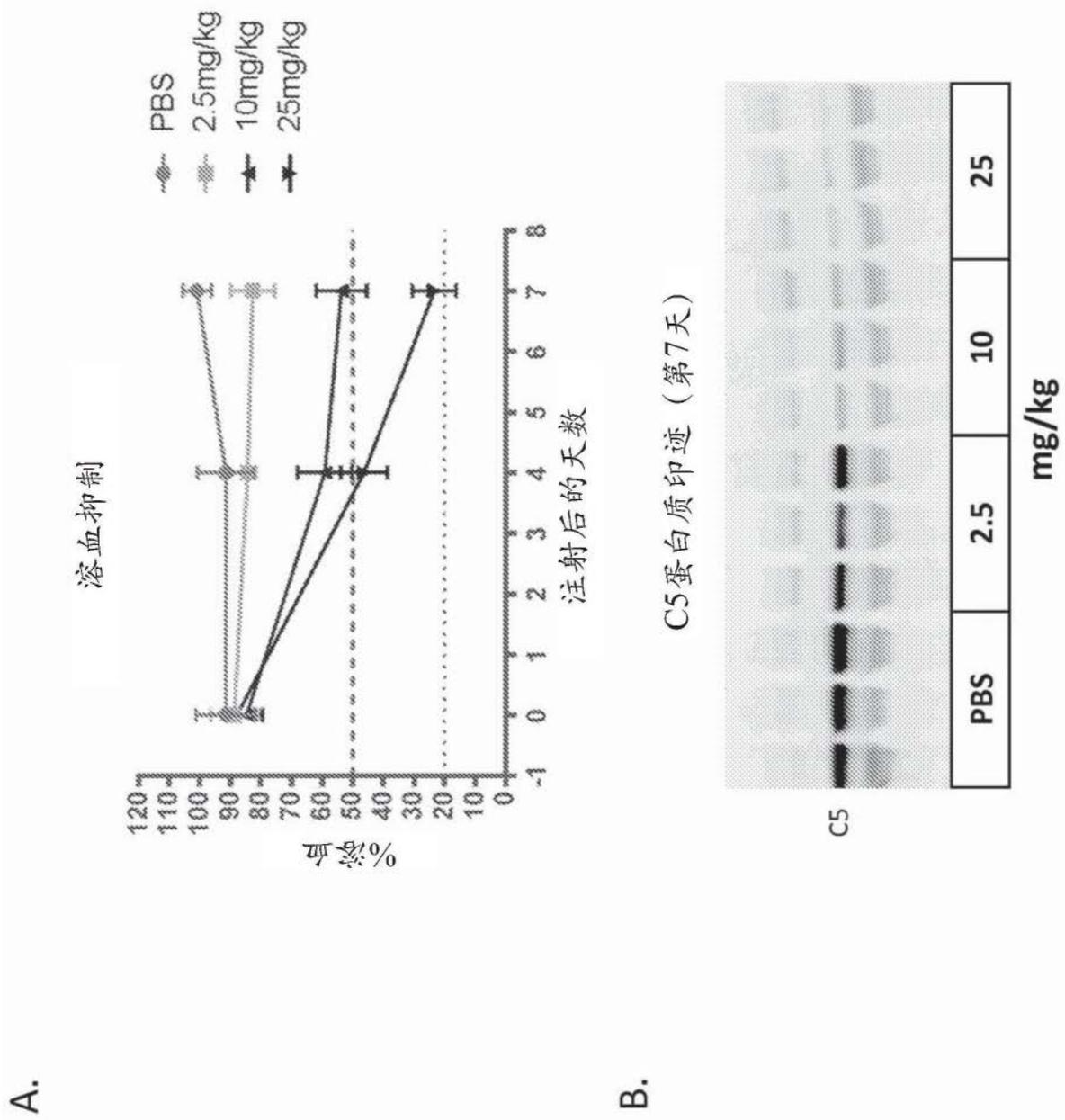


图5

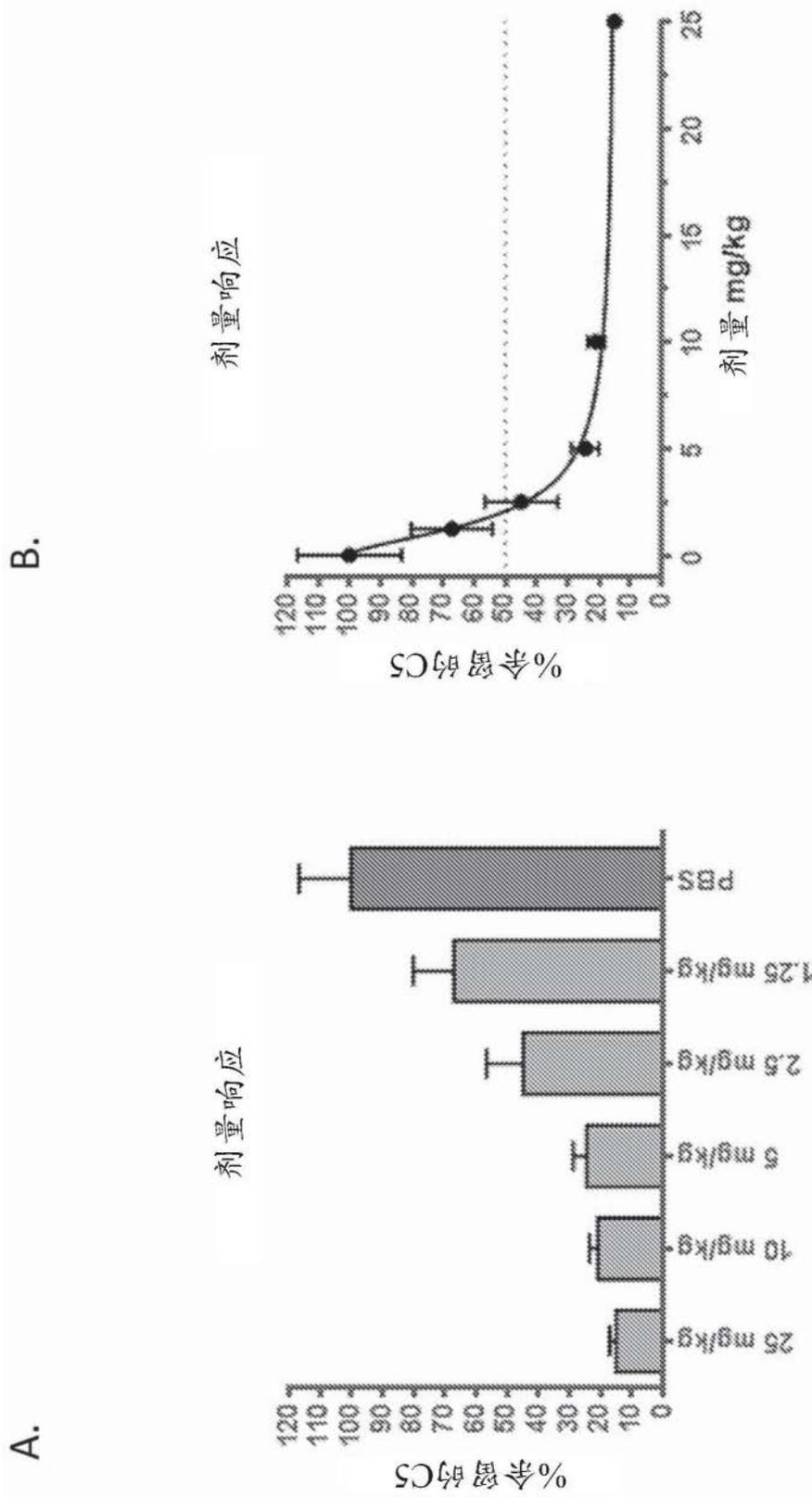


图6

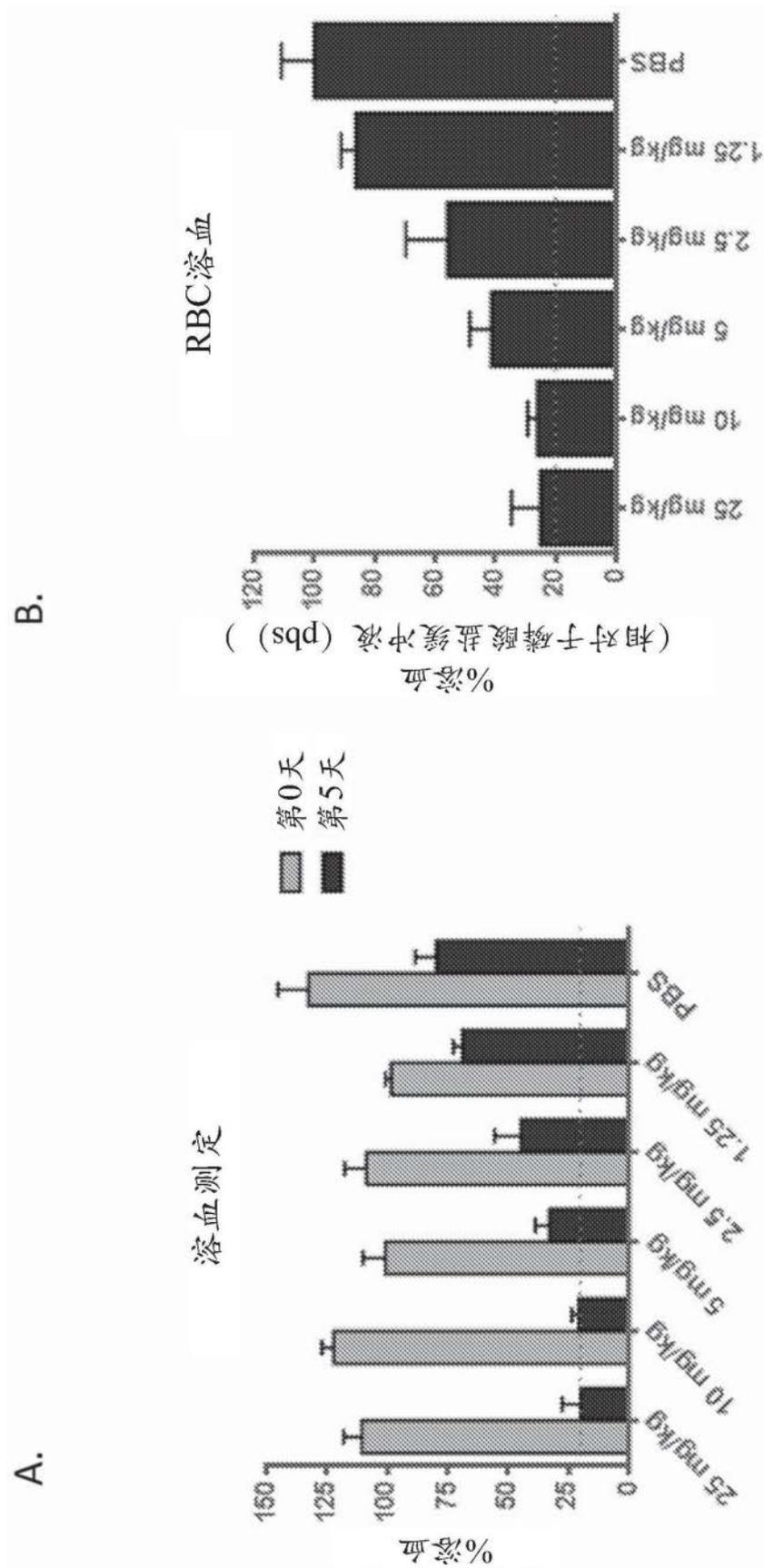


图7

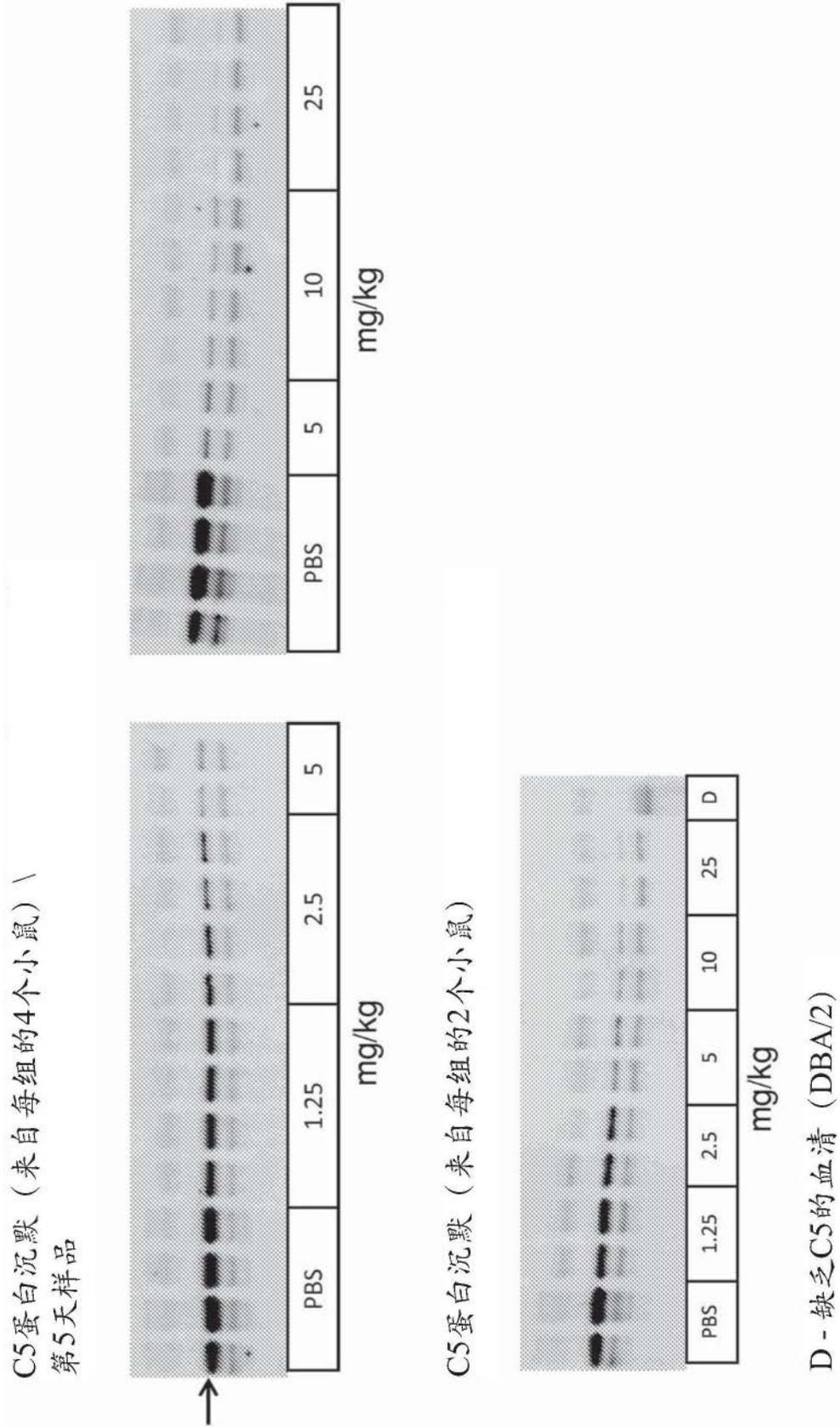


图8

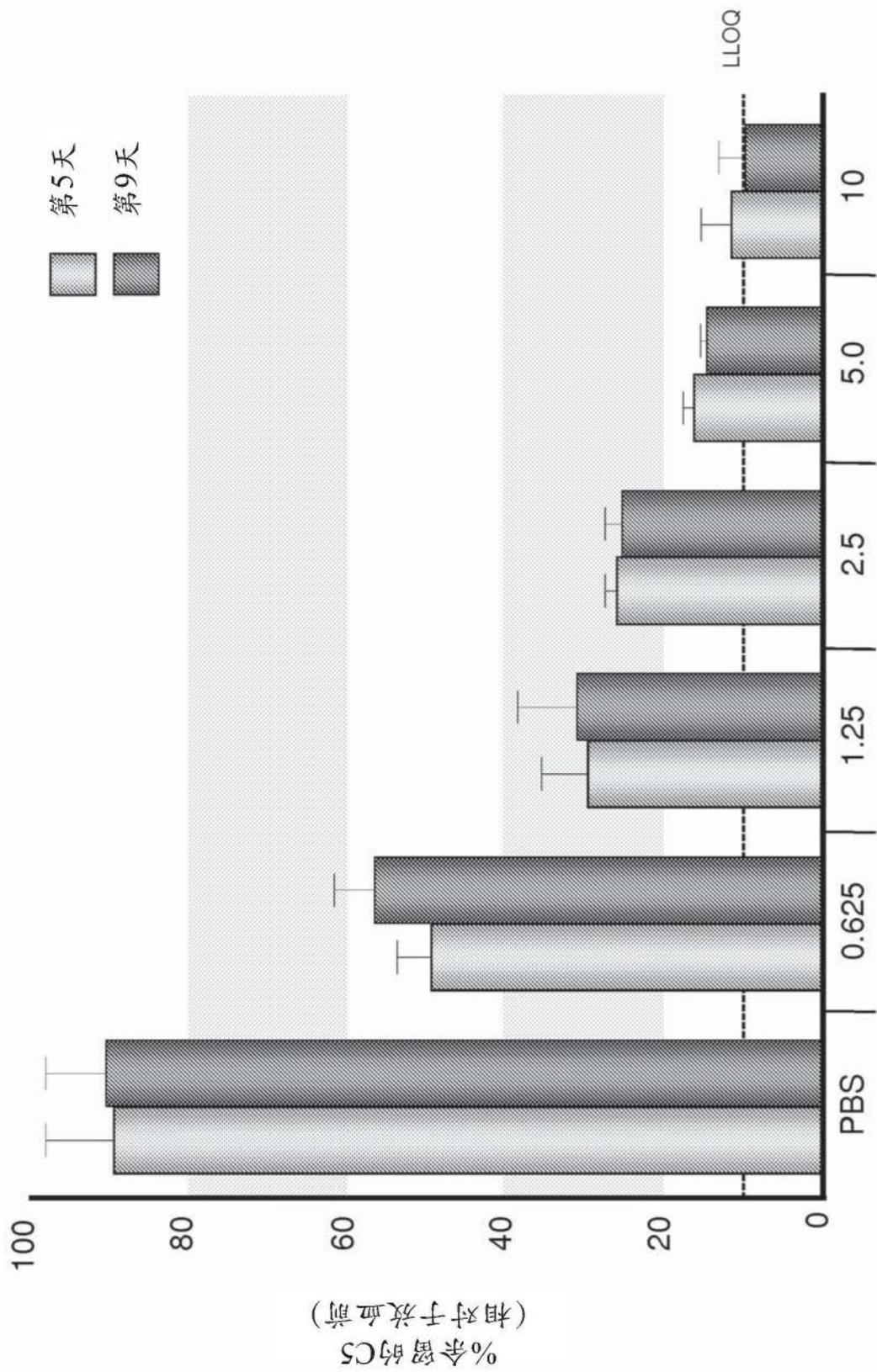


图9

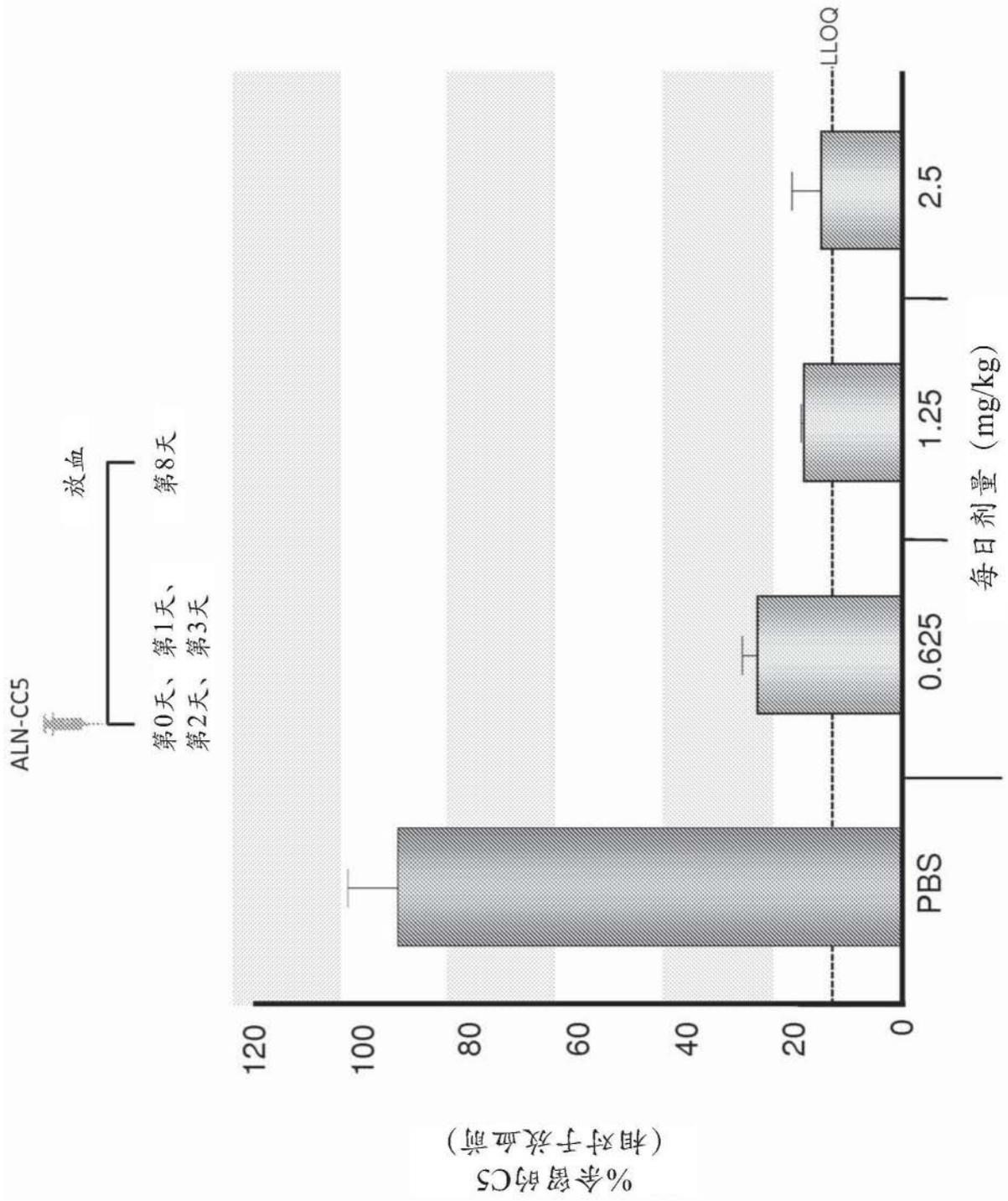


图10

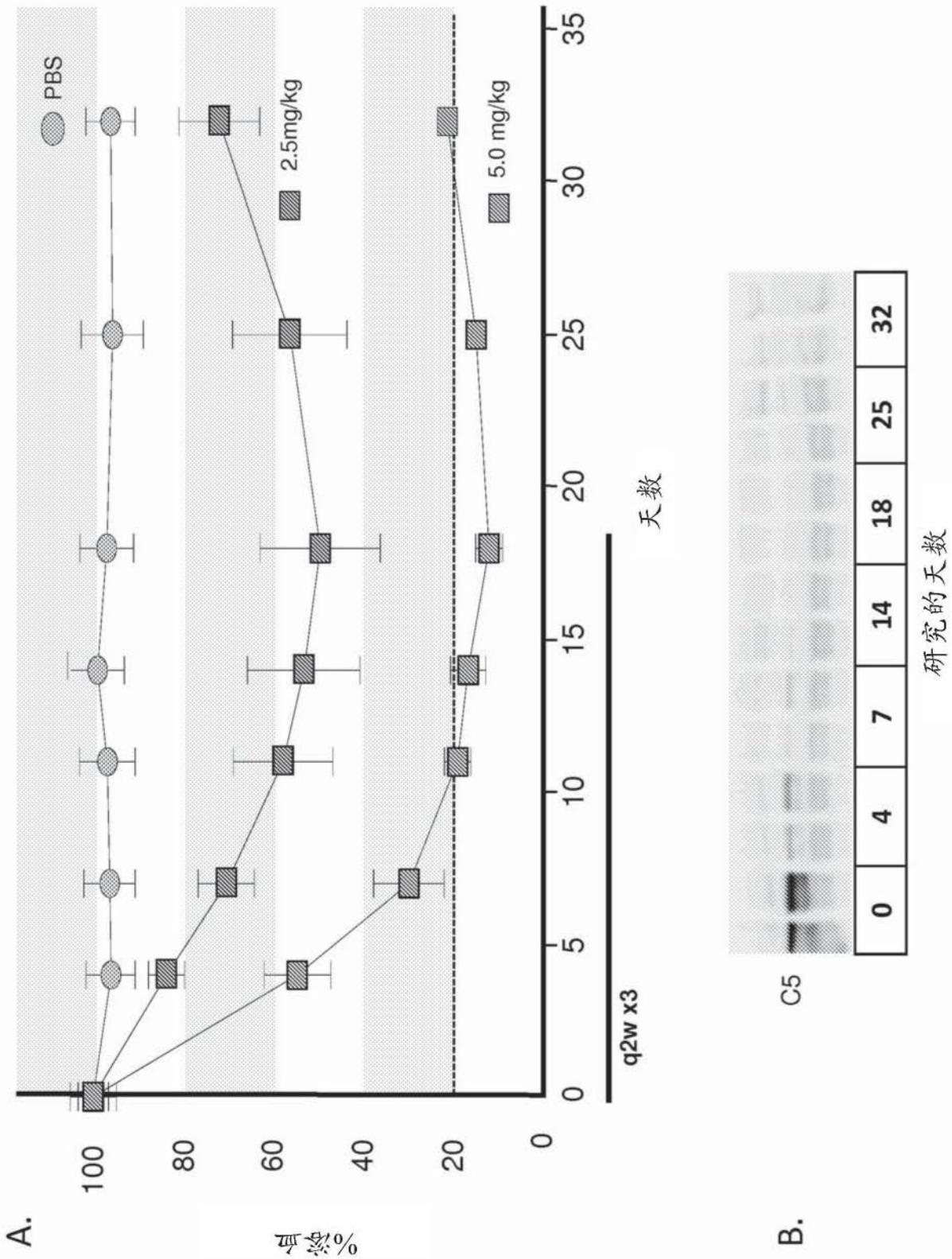


图11

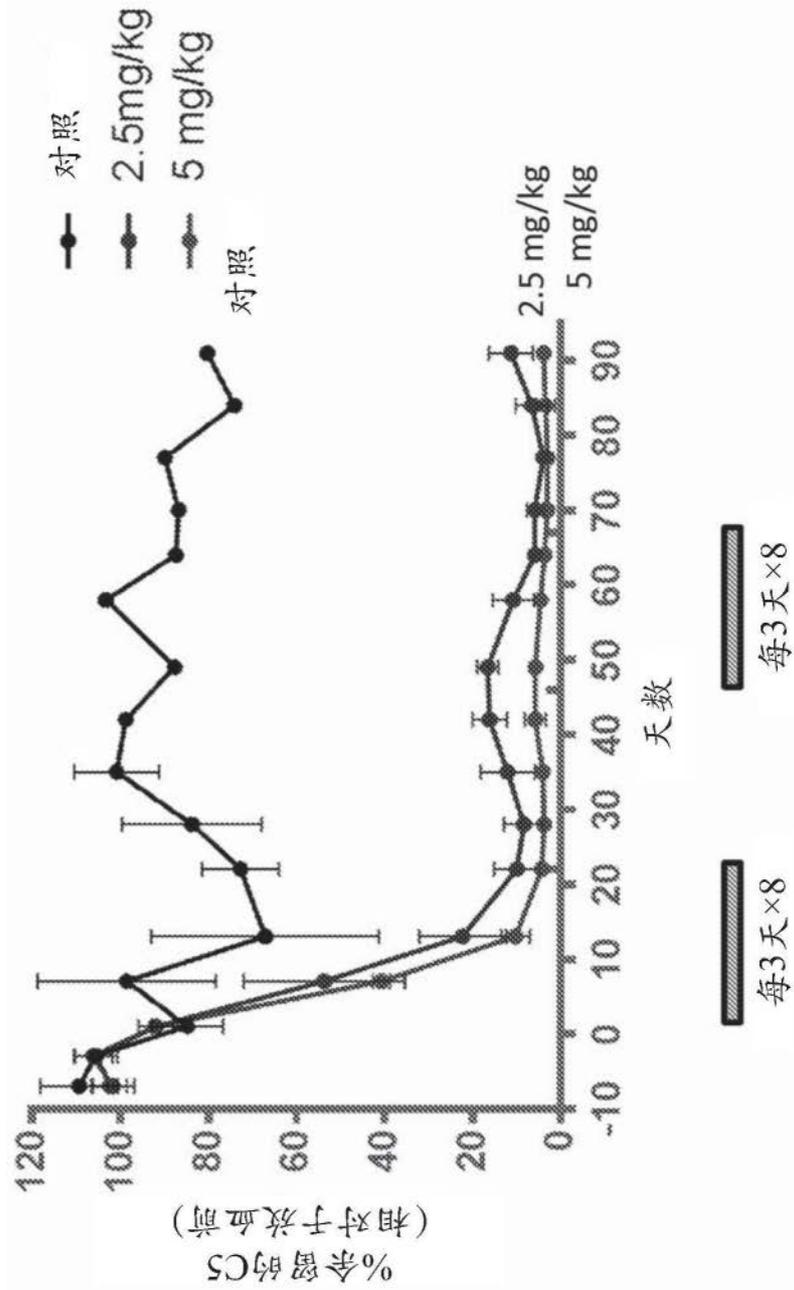


图12

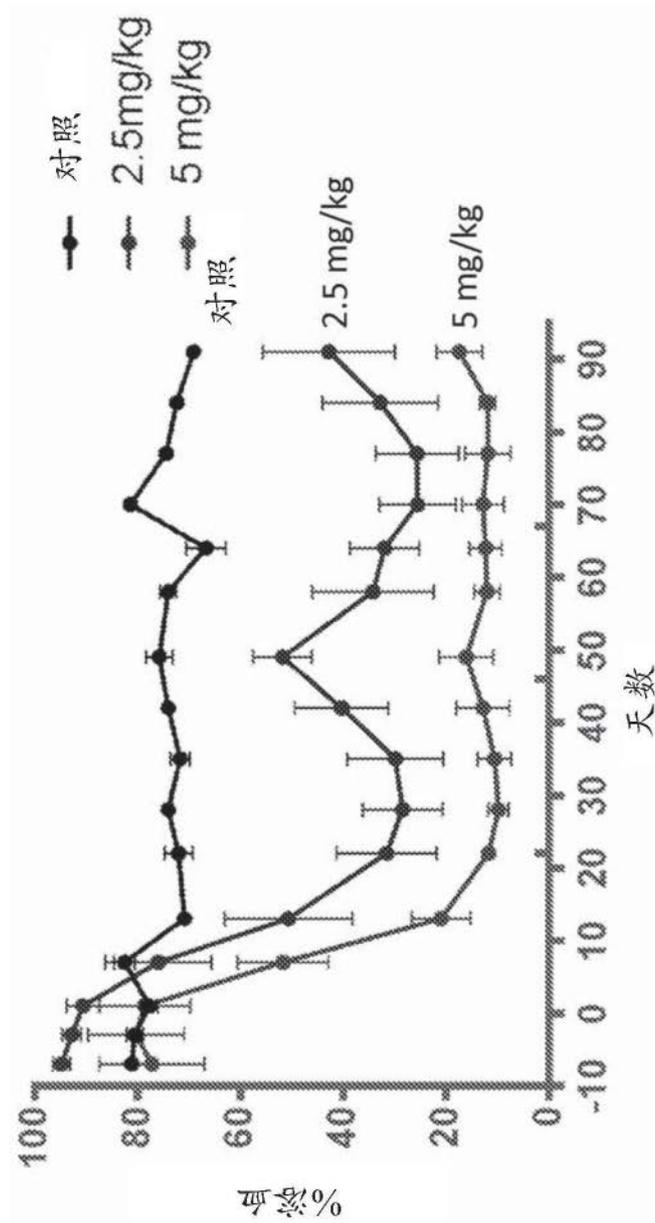


图13

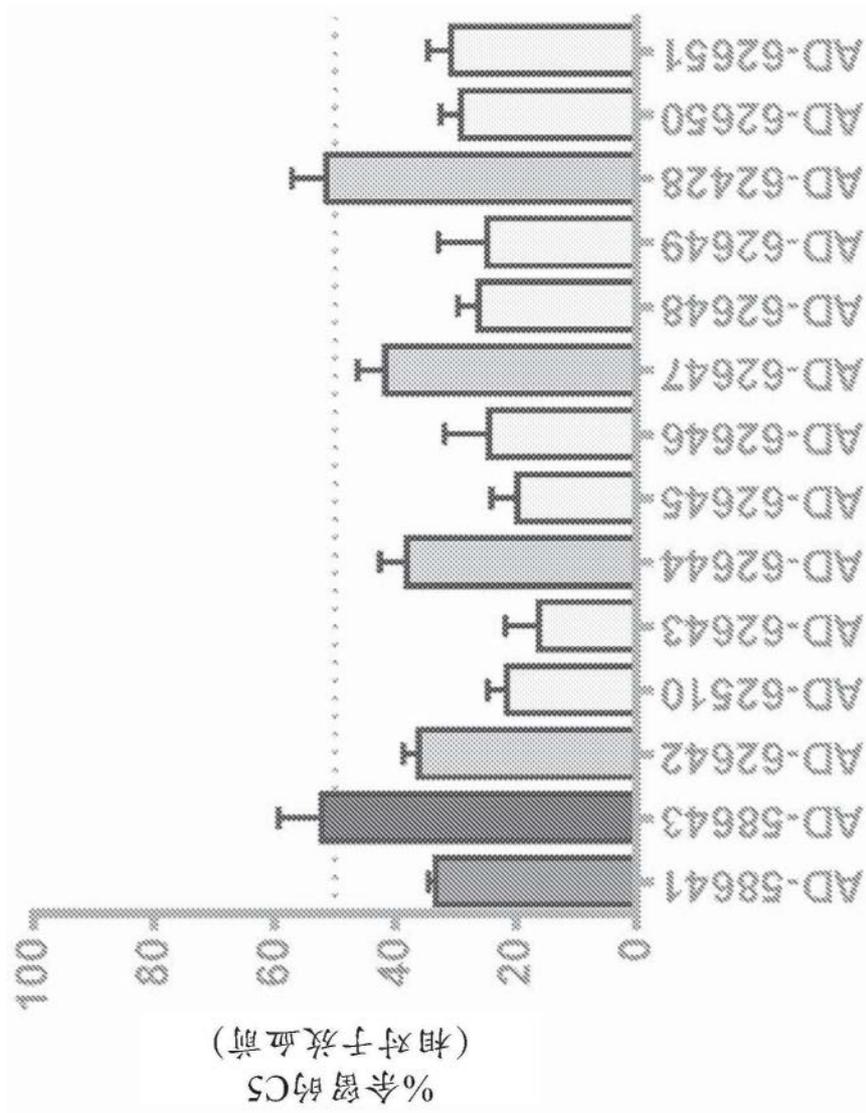


图14

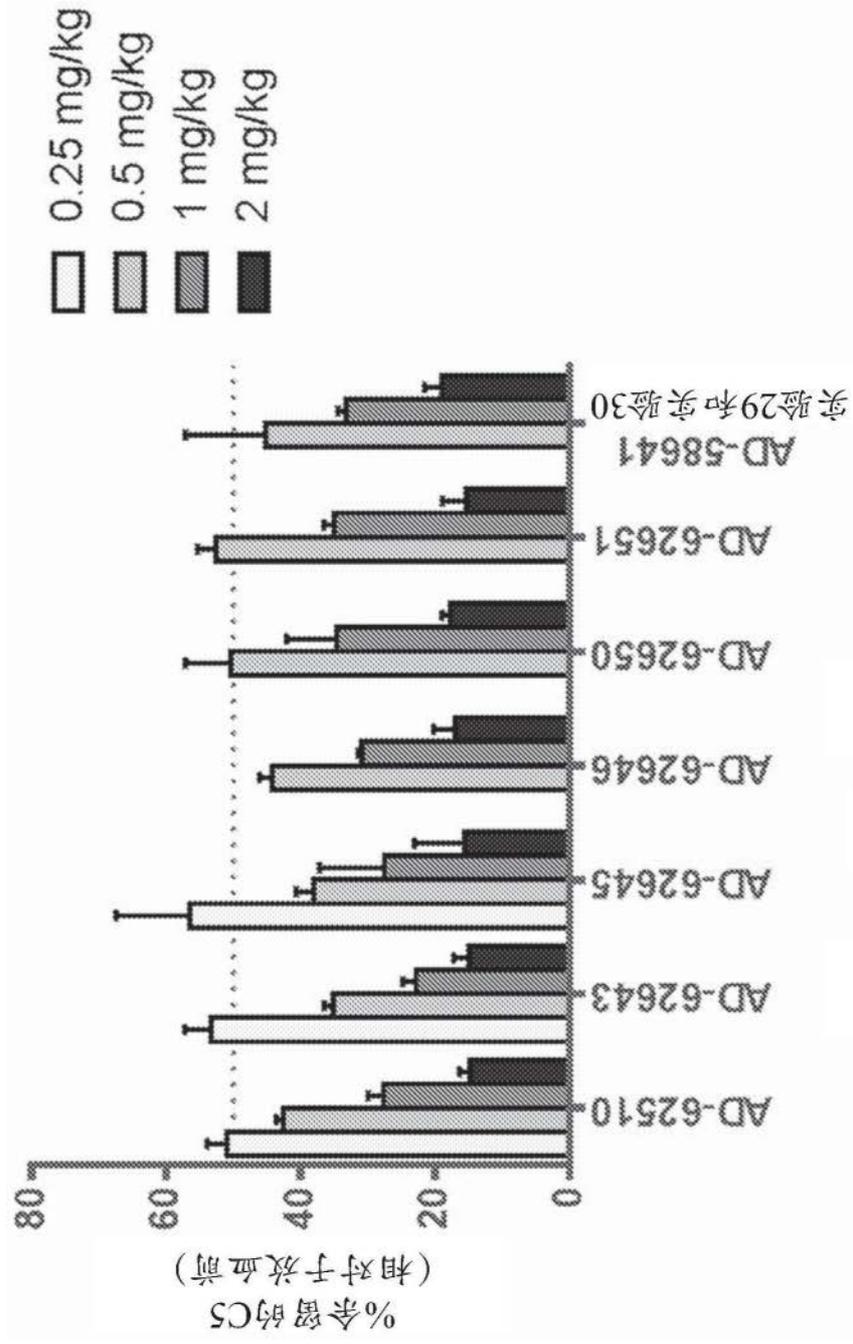


图15

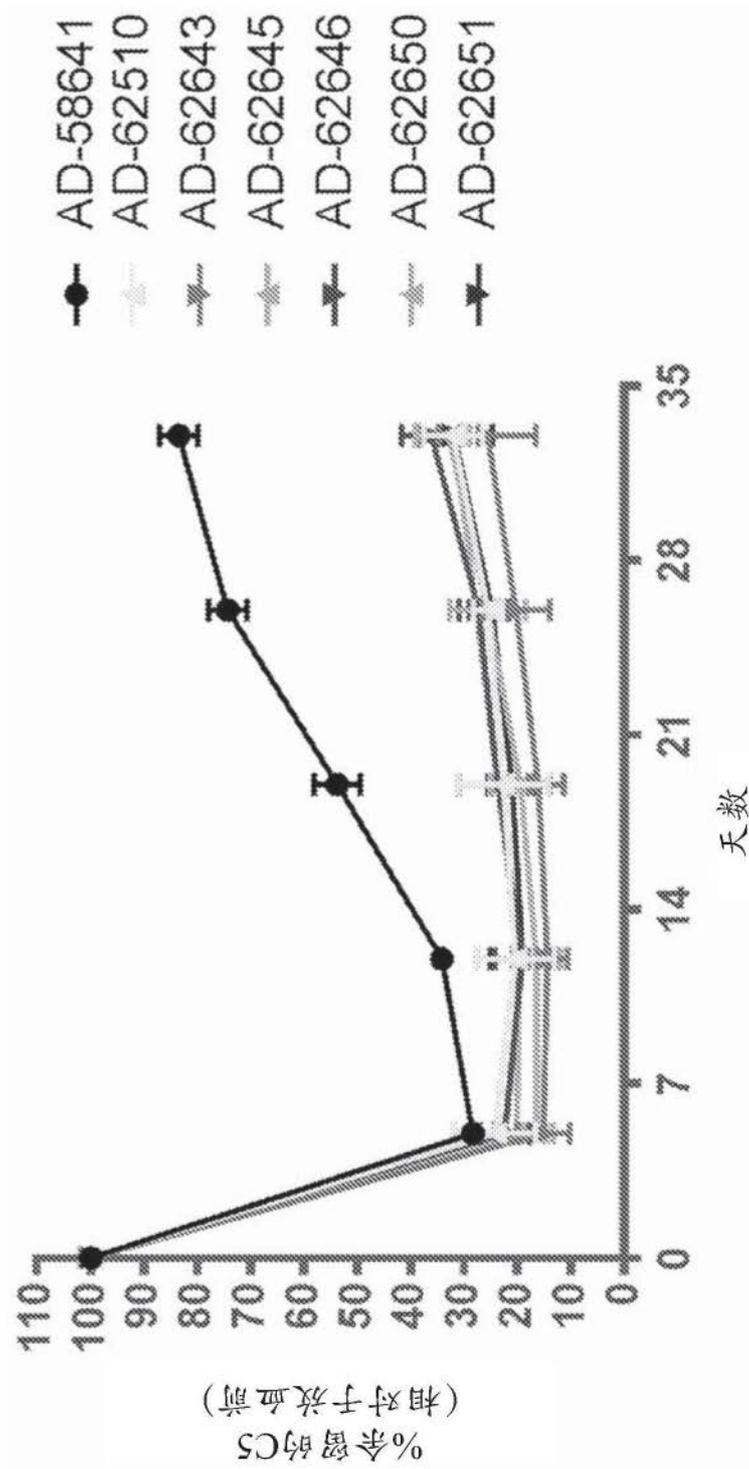


图16

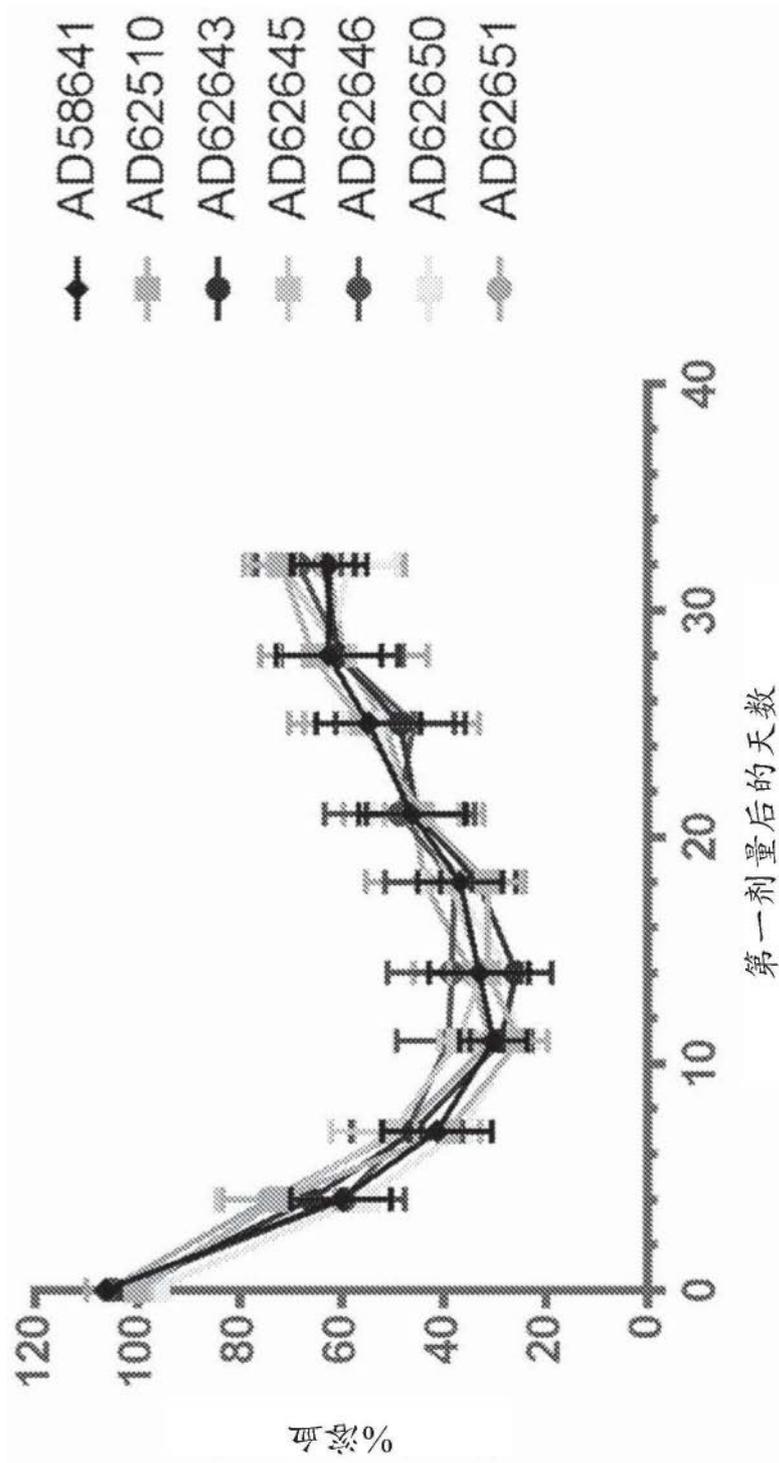


图17

```

SEQ ID NO:1
>gi|38016946|参考|NM_001735.2| 智人补体组分5 (C5) ,
mRNATATATCCGTGGTTTCCTGCTACCTCCAACCATGGGCCTTTTGGGAATACTTTGTTTTTAACTTCCTGGGGAAAACCTGGGGACAGGAGC
AAACATATGTCATTTCCAGCACAAAAATATCCCGTGTGGAGCATCTGAAAAATTTGTGATTCAAGTTTTATGGATACACTGAAGCATTTTGATGCA
ACAATCTCTATTAAGTTATCTGTATAAAAAATTTAGTTACTCTCCAGGCCATGTTTCATTTATCCCTCAGAGAATAAATCCAAAACCTGCAAT
CTTAACAATCAACAAAAACAATTTGCTGGAGGACAAAACCCAGTTTCTTATGTGATTTTGGAAAGTTGTATCAAAAGCATTTTCAAATTCAAAA
GAATGCCAATAACCTATGACAATGGATTTCTCTTCAATTCATACAGACAAAACCTGTTTATACTCCAGACCAGTCAGTAAAAAGTTAGAGTTTATTCG
TTGAATGACGACTTGAAGCCAGCCAAAAGAGAAAACCTGCTTAACTTTTCATAGATCCTGAAGGATCAGAAGTTGACATGGTAGAAGAAAATGATCA
TATTGGAATTTACTCTTTTCTGACTTCAAGATTCCTGCTAATCCATAGATATGGTATGTTGGACGATCAAGGCTAAATATAAAGAGGACTTTTCAA
CAACTGGAACCGCATATTTGAAAGTTAAAGAAATATGCTGTGGCCACATTTTCTGTCTCAATCGAGCCAGAATAAATTTCAATTTGGTTACAAGAAC
TTTAAAGAAATTTGAAATTAATAAAAAGCAAGATATTTTATAATAAAGTAGTCACTGAGGCTGACGTTTATATCACATTTGGAATAAGAGAAGA
CTTAAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAAAACAGCAATGCAAAAACAATGTTGATAAATGGAATTTGCTCAAGTCACATTTGATTCTGAAACAG
CAGTCAAAGAACTGTCATACACTACAGTTTAGAAGATTTAAACAACAAGTACCTTTATATGCTGTAACAGTCATAGAGTCTACAGGTGGATTTTCT
GAAGAGGCAGAAAATACCTGGCATCAAAATATGCTCTCTCCCTACAAAACCTGAAATTTGGTTGCTACTCCTCTTTTCTGAAAGCCCTGGGATTCATA
TCCCATCAAGGTGCAGTTAAAGATTCGCTTGACCAGTTGGTAGGAGGATCCAGTAACACTGAATGCACAACAATGATGTAAACCAAGAGA
CATCTGACTTTGGATCCAAGCAAAAAGTGAACACGTTGATGATGGAGTAGCTTCCCTTTGTGCTTAATCTCCCATCTGGAGTGACGGTCTGGAG
TTTAAATGTCAAAACCTGATGCTCCAGATCTTCCAGAAGAAAATCAGGCCAGGGAAGGTTACCGAGCAATAGCATACTCATCTCTCAGCCAAAAGTTA
CCTTTATATTGATTTGACTGATAACCATAAGGCTTTGCTAGTGGGAGAACATCTGAATATATTGTTACCCCAAAAAGCCCATATATTGACAAAA
TAACCTACTATAAATTAATTTGATTTTATCCAAGGGCAAAAATTAACCTTTGGCAGCAGGGGAGAAAATTTTCCAGATGCATCTTATCAAAGTATAAC
ATCCAGTAACACAGAAACATGGTTCCCTTCATCCCGACTTCTGGTCTATTACATCGTCCAGGAGAACAGACAGCAGAAATTAGTGTCTGATTCAGT
CTGGTTAAATATTGAAGAAAATGTGGCAACCAGCTCCAGGTTTCATCTGTCTCCTGATGCAGATGCATATTCTCCAGGCCAAAACCTGTGCTCTTTA
ATATGGCAACTGGAATGGATTCTGGGTGGCATTAGCAGCAGTGGACAGTGTGTGTATGGAGTCCAAAAGAGGAGCCAAAAGCCCTTGGAAAGA
GTATTTCAATTTCTTAGAGAAGAGTGTCTGGGCTGTGGGCGAGGTGGTGGCCCAACAATGCCAATGTGTCCACCTAGCTGGACTTACCTTCCT
CACTAATGCAAAATGCAGATGACTCCCAAGAAAATGATGAACCTGTAAAGAAAATCTCAGGCCAAGAAGAAGCTGCAAAAAGAAGATAGAAGAAA
TAGCTGCTAAAATAAAAACATTCAGTAGTGAAGAAAATGTTGTACGATGGAGCCCTGCCTTAATAATGATGAAAACCTGTGAGCAGGAGCTGCACGG
ATTAGTTTAGGGCCAAGATGCATCAAAGCTTTCAGTGAATGTTGTGTGCTGCGCAAGCCAGCTCCGTGCTAATAATCTCTCATAAAGACATGCAAT
GGGAAGGCTACACATGAAGACCCCTGTTACCAGTAAGCAAGCCAGAAAATTCGGAGTTATTTCCAGAAAGCTGGTTGTGGGAAGTTCATCTTGTT
CCAGAAGAAAACAGTTGCAGTTTGCCTACCTGATTCTTAACCACCTGGGAAATTCAGGCGCTTGGCATTTCAAACACTGGTATATGTTGTGCT
GATCTGTCAAAGGCTGTTCAAAGATGCTTCCCTGAAAATGAATATACCATATTCTGTTGTACGAGGAGAACAGATCCAATGAAAAGGAAC
TGTTTACAACATAGAGACTTCTGGGATGCAGTTCTGTGTAAAATGCTGCTGTGGAGGAACTCTGCACTTCGAAAAGCCAGTCAATGATCATC
AGGGCACAAGTCTCCAAATGTGTGCGCCAGAAAAGTAGAGGGCTCCTCCAGTCACTTGGTGACATTCAGTGTGCTTCCCTGAAAATTTGGCCTT
CACACATCAATTTTTCAGTGGAGACTTGGTTTGGAAAAGAAAATCTTAGTAAAACATTTACGAGTGGTGCCAGAGGTGTCAAAGGGGAAAGCTA
TTCTGGTGTACTTTGGATCCTAGGGGTATTTATGGTACCATTAGCAGACGAAAGGAGTTCCCATACAGGATACCCCTTAGATTTGGTCCCAAAA
CAGAAATCAAAGGATTTTGGAGTGAAGGACTGCTTGTAGGTGAGATCTTGTCTGCAGTTCTAAGTCAGGAAGGCATCAATATCCTAACCCAC
CTCCCAAAAAGGGAGTGCAGAGCCGAGCTGATGAGCGTTGTCCAGTATTCTATGTTTTTCACTACCTGGAAAACAGGAAATCATTTGGAACATTTT
TCATCTGACCCATTAATTTGAAAAGCAGAACTGAAGAAAATTAAGAAGGGATGTTGAGCATTATGCTTACAGAAAATGCTGACTACTCTT
ACAGTGTGTGGAAAGGTGGAAGTGTAGCAGCTTGGTTAACAGCTTTTGTCTTAAAGAGTACTTGGACAAGTAAATAAATACGTAGAGCAGAACCAA
AATTCAAATTTGTAATCTTTATTTGTGGCTAGTTGAGAAATATCAATTAGATAATGGATCTTTCAAGGAAAATTCACAGTATCAACCAATAAAAAT
ACAGGGTACCTTGCCTGTTGAAGCCGAGAGAACAGCTTATATCTTACAGCCTTTACTGTGATTGGAATTAGAAAAGGCTTTCCGATATATGCCCC
TGGTAAAATCGACAGCTCTAATTTAAAGCTGACAACCTTCTGCTTGAAGAAATACACTGCCAGCCAGAGCACCTTTACATGTGCCATTTCTGCG
TATGCTCTTCCCTGGGAGATAAAAACCTCACCCAGTTCGTTCAATTTGTTTCAGCTTTGAAGAGAGAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCAT
TTATCGTTTTTGGAAAAGACAACTTCAGCATAAAGACAGCTCTGTACTAACACTGGTACGGCACGTATGGTAGAAAACAACAGCTATGCTTTTAC
TCACCAGTCTGAACCTGAAAGATATAAATATGTTAACCCAGTCTCAATGGCTATCAGAAGAGCAGAGGTATGGAGGTGGCTTTTATTCAACC
CAGGACACAAATCAATGCCATGAGGGCTGACGGAAATTTCACTCCCTGGTTAAACAACCTCCGCTTGGATGAGATGATGTTTCTACAAGCA
TAAAGGTGCCTTACATAAATTAATAAATGACAGACAAGAAATTTCTTGGGAGGCCAGTAGAGGTGCTTCTCAATGATGACCTCATTGTCAAGTACAG
GATTTGGCAGTGGCTTGGCTACAGTACATGTAACAACCTGTAGTTTCAAAAACCCAGTACCTCTGAGGAAGTTTGCAGCTTTTATTTGAAAATCGAT
ACTCAGGATATTTGAAGCATCCCACTACAGAGGCTACGGAACCTCTGATTTACAACCGCATAGTAGCATGTGCCAGCTACAAGCCAGCAGGGAAGA
ATCATCATCTGGATCTCTCATGCGGTGATGGACATCTCCTTGCCTACTGGAATCAGTGCAAAATGAAGAAGACTTAAAAGCCCTTGTGGAAGGGG
TGGATCAACTATTCACTGATTACCAAATCAAAGATGGACATGTTATTTCTGCACTGAAATTCGATTTCCCTCCAGTGAATTTCTTTGTGTACGATTC
CGGATATTTGAATCTTTGAAAGTTGGGTTTTCTCAGTCTGCACCTTTCACAGTGTACGAAATACCACAGACCAGATAAACAGAGTGTACATGTTTTA
TAGCCTTCCAATATCAAAATTCAGAAAAGTCTGTGAAGGAGCCGCTGCAAGTGTGTAGAAGCTGATTGTGGGCAAAATGCAGGAAGAAATGGATC
TGACAACTCTGACAGAGACAAGAAAACAACAGCATGTAACCAGAGATGTCATATGCTTATAAAGTTAGCATCACATCCATCACTGTAGAAAAT
GTTTTGTCAAGTACAAGGCAACCCCTTCTGGATATCTACAAAACCTGGGGAAGCTGTTGCTGAGAAAAGACTCTGAGATTACCTTCATTAAAAAGGT
AACCTGTACTAACGCTGAGCTGGTAAAAGGAAGACAGTACTTAATTAATGGGTAAGAAGCCCTCCAGATAAAAATCAAAATTCAGTTTCAGGTACA
TCTACCCCTTAGATTCTTGCCTGGATTGAATACTGGCCTAGAGACACAACATGTTTCATCGTGTCAAGCATTTTTAGCTAATTTAGATGAATTT
GCCGAAGATACTTTTTAAATGGATGCTAAAATTCCTGAAGTTCAGCTGCATACAGTTTGCATTTATGGACTCCTGTTGTTGAAGTTCGTTTTTT
TGTTTTCTCTTTTTTAAACATTCATAGCTGGTCTTATTTGTAAGGCTCACTTACTTAGAATTAGTGGCACTTGTCTTTATAGAGAAATGATT
TCAAATGCTGTAACCTTCTGAAATAACATGGCCTTGGAGGGCATGAAGACAGATACTCCTCCAAGGTTATGGACACCCGAAACAATAAATTTGGA
ACACCTCTCAACCTACCCTCAGGAATGTTTCTGGGGCCGAAAGAACAGTCCACTTGAAGGGAGTATTACAAAACATGGCCTTTGCTTTGAA
AGAAAATACCAAGGAACAGGAAACTGATCATTAAAGCCTGAGTTGCTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图18A

SEQ ID NO:2
>gi|297270262|参考序列XM_001095750.2|预测: 猕猴补体组分5 (C5), mRNA
CATGATTTCTGCTACCTCCAACCATGGGCTTTTGGGAATACTTTGTTTTTAATCTTCTGGGAAAACTTGGGGACAGGAGCAACATATGTCATT
TCAGCACCAAAAATATTCCTGTTGGAGCATCTGAAAACATTGTGATTCAAGTTTATGGATACACTGAAGCATTGATGCAACAATCTCTATTAAGG
TTATCTGTAAAAAATTTAGTTACTCTCAGGCCATGTTCAATTTATCTCAGAGAATAAATCCAAAACCTCGGCAGTCTTAACAATACAACCAAAAACA
ATTACCTGGAGGACAAAACCAAGTTTCTATGTGATTTGGAAAGTTGATCAAAGCATTTTCAAATCAAAAAAATCCAAATACCTATGACAATG
GATTTCTCTTATTATACAGACAAAACCTGTTTATACTCCAGACCAATCAAGTAAAGGTTAGAGTTTATTCTGTTGAATGATGACTTGAAGCCAGCCAAAA
GAGAACTGTCTTAACCTTTCATAGATCCTGAAGGATCAGAAATTGACATGGTAGAAGAAATGATCATATTGGAATTATCTTTTCTGACTTCAAG
ATTCCTGTAATCTAGATATGGTATGTGGATGATCCAGGCTAAATAAAGAGGACTTTTCAACAACCTGGAAGTGCATTTTTGAGTTAAAGAATA
TGTCTTGCCACATTTTTCTGTCTCAGTAGAACAGAAAGTAAATTCATTGGTTATAAAGAACTTAAAGAAATTTGAAATTAATAAAAGCAAGATATTT
TTATAATAAAGTAGTCACTGAGGCTGATGTTTATATCACATTTGGAAAGAGAAGACTTAAAGATGATCAAAAAGAAATGATGCAAAACAGCAATG
CAAAACACAATGTTGATAAATGGAATGCTCAAGTACATTTGATTTCTGAAACAGCAGTCAAGAAGTGCATACTACAGTTTGAAGATTTAAACAA
CAAGTACCTTTTATATTGCTGTAAACAGTACATAGAGTCTCAGAGTGGATTTCTGAAAGAGGCAGAAATACCTGGCATCAAATATGCTCTCTCCCTACA
AACTGAATTTGGTTGCTACTCTCTTTTCTGAAGCCTGGGATCCATATCCATCAAGGTGCAGGTTAAAGATGCGCTTGACCAGTTGGTAGGAGGG
GTCCAGTAACACTGAATGCACAAAATGATGTCAACCAAGAGACATCTGACTTGGAGCCAGGAAAAGTGAACACGTGTTGATGATGGAGTA
GCTTCGTTTGTGGTTAATCTCCCATCTGGAGTGACGGTGCTGGAGTTAATGTCAAAAACCTGATGCTCCAGATCTCCAGACGAAAATCAGGCCAGGG
AAGGTTACCGAGCAATAGCATACTCATCTCAGCCAAAGTTACCTTTATATCGATTGGACTGATAACCACAAGGCTTTGCTAGTGGGAGAATATTTG
AATATTATTGTTACCCCAAAAGCCATATATTGACAAAATAACTCACTATAATTACTTGTATTTTCAAGGGCAAAATATCCACTTTGGCACAAGG
GAGAAACTTTCAAGTGCATCTTCAAAGTATAAACATTCAGTAACGACAGAAACATGGTTCTTCATCCCGACTCTGGTCTATTACATGCTCACAGG
AGAGCAGACAGCAGAATTAGTGTCTGATTAGTCTGTTAAATATTGAAGAAAATGTGGCAACCAGCTCCAGGTTCACTGTCTCTGATGCAGAT
ACATATTCTCCAGGCCAACTGTGTCTCTTAATATGGTAAGTGGGATGGATTCTGGGTGGCATTAAACAGCAGTGGACAGCGCTGTGATGGAGTCC
AAAGAAGAGCCAAAAGCCCTTGGAAAGAGTATTTCAATCTTAGAGAAGAGTATCTGGGCTGTGGGGCAGGTGGTGGCCTCAACATGCCAATG
TGTTCCACCTAGCTGGACTTACCTTCTCACTAATGCAAAATGCAGATGACTCCCAAGAAAATGATGAACCTTGTAAAGAAATATCAGGCCAAGAAGA
ATGCTACAAGAGAAGATAGAAGAAATAGCTGCTAAATATAAACATTTAGTAGTGAAGAAATGTTGTTACGATGGAGTCCGTTAATCATGATGAA
ACCTGTGAGCAGCGAGCTGCACGGATTAGTGTAGGGCCGAGATGCGTCAAAGCTTTCACTGAATGTTGTGCTGCAAGCCAGCTCCGTGCTCAATA
ACTCTCATAAAGACTTGAATTTGGAAAGGCTACACATGAAGACCCTGTTACCAGTAAGCAAGCCAGAAATTCGGAGTTATTTCCAGAAAAGCTGGTT
ATGGGAAGTTCATCTTGTCCAGAAAGAAAACAGTTGCAGTTTGCCTACCTGATTCTGTAACCTACCTGGGAAATCAAGGTGTTGGCATTCAAACA
GTGGTATATGTGTTGCTGATACTATAAGGCCAAAGGTGTTCAAAGATGTCTTCTGGAAATGAATATACCATATTTCTGTTGACGAGGAGAACAGGT
CCAGTTGAAAGGAACTGTTTCAACTATAGGACTTCTGGGATGCAGTTCTGTGTTAAATGTCTGCTGTGGAGGGAATCTGCACTTCAGAAAAGCCCA
GTCATTGATCATCAGGGCACAAGTCTCCAAATGTGTGCGACAGAAAGTAGAGGGCTCCTCAATCACTTGGTACCTTTACTGTGCTTCTCTGGA
AATTGGCCTTCAGAACATCAATTTCTCACTGGAGACTTCTGTTGGAAAAGAAATCTAGTAAATCGTTACGAGTGGTCCAGAAAGGTGCAAAAGG
GAAAGCTATTCTGGTATTACTTTGGATCTAGGGGATTTATGNN
TTTGGTCCCAAAAACAGAAATCAAAGGATTTTGAAGTAAAAGGACTGCTTGTAGGTGAGATCTTGTCTGCAGTTCTAAGTCGGGAAGGCATCAAT
ATCCTAACCCACCTCCCAAGGGAGTGACAGAGGGGAGCTGATGAGCGTTGTCCAGTATTCTATGTTTTCTACTACCTGGAACAGGAAATCATT
GGAACATTTTTTCTCCGACCCATTAATGAAAAGCGGAACCTGGAGAAAAAATTAAGAAAGGGATGGTGAAGCATTATGCTCTACAGAAATGCTG
ACTATTCTACAGCGTGTGGAAGGGTGGCAGTGTAGCAGTTGTTAACAGCTTTTGTCTTAAAGAGTACTGGACAAGTACATAAATATGTAGAGCA
GAACCAAAATTAATATGTAATTTCTTATTGGTGGTGGAGAATTATCAGTTAGATAATGGATCCTTCAAGGAAAATTCACAGTATCAACCAATAA
AATTACAGAAAATCAACACAGCTCTAATTAAGCTGACACCTTTCTGCTGAAAATCACTGCCAGCCAGAGCACCTTTACATTGGCCATTTCTGCT
ATGCTCTTCCCTGGGAGATAAACTCACCCACAGTTTTTGTCAATTTTTCAGCTTTGAAGAGAGAAGCTTTGGTTAAAGGTAATCCACCCATTTATC
GTTTTTGGAAAGACAGTCTTCAACATAAAGACAGCTCTGTACCTAACACTGGTACAGCAGTATGGTAGAAAACACTGCCTATGCTTTACTACCAGT
CTGAACCTGAAAGACATAAATATGTTAACCCATCATCAATGGCTATCAGAAGAGCAGAGGTATGGAGGTGGCTTTTATTCAACCCAGGACACAA
TCAATGCCATCGAGGGCCTGACAGAATATCACTCCTGGTAAACAGCTCCGCTTGAATATGGACATCGATGTTGCTTACAAGCATAAAGGTCCTTA
CATAATTATAAAATGACAGACAAGAATTTCTTGGGAGGCCAGTAGAGGTTCTCTCAATGATGACCTGTTGTCAGTACAGGATTTGGAGTGGCT
TGGCTACGGTACATGTAACAACCTGTAGTTCAAAAACAGTACCTCTGAGGAAGTTTGCAGCTTTTATTGAAAATGATACTCAGGATATTGAAGCA
TCCCACTACAGAGGCTACGGAACTCTGATTACAAAACGCATAGTAGCATGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAAGAATCATCTTCTGGATCCTCTC
ATGCAGTATGGACATCTCCTGCTACTGGAATCAATGCAATGAAGAAGACTTAAAGCTCTGTGGAAGGGGTGGATCAGCTATTCACTGATTA
CCAAATAAAGATGGACATGTTATTCTGCAACTGAATTCGATCCCTCCAGTGATTTCTTTGTGTACGATTCCGGATTTTGAACCTTTGAAAGTTGG
GTTTCTTAGTCTGCCACTTTCACAGTGTATGAATACCACAGACCAGATAAACAGTGTACCATGTTTTATAGCACTTCCAATATCAAAATTCAGAAAGT
CTGTGAAGGAGCCAGTGAAGTGTATAGAAGCTGATTGTGGCAAAATGAGAAAGAAATGGATCTGCAACTCTGACAGACTGAAAAACAAC
AGCATGTAACCCAGAGATTGCATATGCTTATAAAGTTATCATCATCCATCACTACAGAAAATGTTTTTGTCAAGTACAAGGCAACCCCTTCTGGATAT
CTACAAAACCTGGGGAAGCTGTTGCTGAAAAAGACTCTGAAATCACCTTCATTAAAAAGGTAACCTGCACTAACGCTGAGCTGGTGAAGGAAGACA
GTACTTAATATGGGGAAGAGCTCCAGATAAAATACAATTTCACTTTCAAGTACATCTACCCTTAGATTCTTACCTGGATTGAATCTGACC
TAGAGACACAACATGTTATCGTGTCAAGCATTGTTAGCTAATTTAGATGAATTTGCTGAAGACATCTTTTAAATGGATGCTAAAATCCTGAAGTTC
AGCTGCATACAGTTTGCATTTATGGACTCCTGTTGTTGAAGTTTGTGTTTTTTCTGTTTTTTGCTTTAAACATTCACAGCTGGTCTTATTTGTAAG
CTCACTTTACTAGAATTAGTGCACCTGCTTTTATTAGAGAAATGATTTAAACCTGTAACCTTTCTGAAATAACATGGCCCTTGGAGGGCATGAAGAC
AGATACTCTCAAGGTTATTGGACACCGGAAAACAATAAATAGAACACCTCTCAAACCTACCCTTAGGAATGTTTGTGGAGCCGAAAGAACAG
TCCATTGAAATGGAGTATTACAAAACATGGCCTTTGCTTGAAGAAAATACCAGGGGACAGGAAACTGATCATTAAAGCCTGAGTTTCTTTCAA
CTGTGCTAAAA

图18B

SEQ ID NO:3>gi|291575171|参考NM_010406.2|小鼠鼠溶血补体 (Hc) ,
mRNATTTAAAGGAAAGTGGTTACAGGGAGGCCATGCCATGGGTTTATGCCCTACCAGCCATGGGCTTTGGGGAATCTTTGTCTTTAATTTT
CCTGGACAAAACCTGGGGACAGGAACAAACCTACGTCAATTCAGCACCCAAAATCCTCCGGGTCGGCTCGTCTGAAAATGTGGTAATCAAGTCCAT
GGCTACACTGAAGCATTGATGCAACTCTTTCTAAAAAGCTATCCTGACAAAAAGTCACTTCTCTCAGGCTATGTTAATTTGCCCCGGAAAAC
AAATCCAAAACCGCGGCACTGTTGACACTACAGCCCAATCAAGTTCTAGAGAAGAAAAGCCAGTCTCTCACGTGTATCTGGAAGTTGTGTCAAAC
ACTTTTCAAATCAAAGAAAATACCAATTACCTATAACAATGGAATTCCTTCATCCATACAGACAAAACCTGTTTACACGCCGGACCAAGTCAAGTAAAG
ATCAGAGTCTATCTCTGGGTGACGACTTGAAGCCAGCCAAACGGGAGACTGTCTAACTTTTATAGACCCCAAGGATCAGAAGTTGACATTGTAG
AAGAAAATGATTACACCGGAATTATCTCTTTTCTGACTTCAAGATTCCTAATCCCAAGTATGGTGTTGGACAATTAAGCTAACTATAAGAAG
GATTTTACAACAACCTGGAAGTGCATCTTTGAAATTAAGAATATGTCTTGCACGATTTCTGTTTCAATAGAAGTAAAGAACCTTATTGGCTAT
AAAACTTTAAGAATTTGAAATCACTGTGAAAGCAAGATATTTTATAATAAAGTGGTACCTGATGCTGAAAGTGTATGCCTTTTGGATTGAGAGA
GGACATAAAGATGAGGAGAAGCAGATGATGCACAAAGCCACACAAGCCGCAAAGTTGGTTGACGGAGTTGCTCAGATCTTTTTGATTCTGAAAC
AGCAGTTAAAGAGCTGCTCAACAACAGTCTAGAAGACTTAAACAACAAGTACCTTTATATTGCGATTAACAGTCAAGATCTTCAGGTGGATTTTCAG
AAGAGGCAGAAATCCCTGGAGTCAAATATGCTCTCTCCCTACACTGAATTTGGTCGCTACTCTCTTTTCTGTAAGCCCGGATTCCATTTTCCA
TCAAGGCACAGGTTAAAGATTCACTCGACAGGGCGGTAGGAGGGTCCAGTAACTCTGATGGCACAACAGTCCGATGTGAATCAAGAGACATCTG
ACTTGGAAACAAAGAGGAGCATCACTCATGACACTGATGGAGTAGCTGTGTTTGTGCTGAACCTCCCATCAAATGTGACGGTGTAAAGTTTGGAT
CAGAAGTATGACCCAGAATCTCCGAAGAAAATCAAGCCAGAAAAGAGTACGAAGCAGTTGCGTACTCGTCTCTCAGCAAAGTTACATTTACATC
GCTTGGACTGAAAACCTACAAGCCATGCTTGTGGGAGAATACCTGAATATTATGGTTACCCCAAGAGCCATATATCGACAAAATAACTCACTATAA
TTACTTGATTTTATCAAAGGCAAATTTGTACAGTACGGCACAAGAGAGAAAACCTTTTCTCTCAACTATCAAATATAAATTTCCAGTGACACAGA
ACATGGTTCCTTCAGCAGACTCCTGGTCTATTACATAGTACAGGGGAGCAAACAGCAGAATTAGTGGCTGACGCGTCTGGATAAATATTGAGGA
GAAGTGTGGCAACCAGCTCCAGTCCATCTGTCTCCAGATGAATATGTGATTCTCCAGGCCAAACTGTGCTCCCTGACATGGTGAAGCAGACT
CATGGGTAGCACTATCAGCAGTGGACAGAGCTGTGTATAAAGTCCAGGAAACGCCAAAAGGGCCATGCAAAGAGTCTTTCAAGCTTTGGATGAAA
AGAGTGACCTGGGCTGTGGGCGAGGTGGTGGCCATGACAATGCAGATGATTCCATCTAGCTGGGCTCACCTTCTCACCACGCAAACGCAGATG
ACTCCATTATCGTGACTCTGTAAAGAAAATCTCAGGTCAAAGAGAAAACCTGCATCTCCTAAGGCAGAAAATAGAAGAACAAGCTGCTAAGTA
CAAACATAGTGTGCCAAAGAAAATGCTGCTATGACGGAGCCGAGTGAACCTTCTACGAAACCTGTGAGGAGCGAGTGGCCCGGGTTACCATAGGCC
TCTCTGCATCAGGCGCTTCAACGAGTGTGTACTATTGCGAACAAGTCCGAAAAGAAAGCCCAATAAAGTGTCAACTGGGAAGGATCCACATT
AAGACCTGTTACCAAGTATGAAGGCAGATATCCGAAGCTACTTTCCAGAGAGCTGGCTATGGGAAATTCATCGCTTCCAAAAGAAAACAGCTGC
AGGTACGCTGCTGACTCACTAACGACTTGGGAAAATCAAGGCATTGGCATTTCAGACAATGGTATATGTTGCTGATACACTCAAGGCAAAGGT
GTTCAAAGAAGTCTTCTGGAGATGAACATACCATATTCTGTTGTGCGAGGAGAACAGATCCAATTGAAAGGAAGTGTTTACAACATATGACCTCA
GGGACAAAAGTCTGTGTTAAAATGTCTGTGTGGAGGGATCTGCATTCAGGAAGCTCAGCTGCTAGCCTTACACCTCCAGGCCCTCAGATGTG
TGTTCCAGAGGATAGAGGGCTCGTCCAGTCACTTGGTGACCTTACCCTGCTTCTCTGGAAATTTGGCCTTCACTCCATAAAGTCTTCACTAGAGACCT
CATTGGGAAAGACATCTAGTAAAGACATTACGGGTAGTGCCAGAAGGATCAAGAGGGAAAGCTATGCCGGCGTATTCTGGACCTAAGGGA
ATTGCTGGTATTGTTAAACAGACGAAAGGAATCCCATACAGGATCCCATTAGATTGTTGGTCCCAAGACCAAAGTTGAAAGGATTTGAGTGTCAAAG
GACTGCTTGTAGGGGAGTTCTTGTCCACGGTCTGAGTAAGGAAGGATCAACATCCCTAAGCCACCTCCCAAGGGCAGTGCAGAGGCAAGACTCAT
GAGCATAGCTCCGGTGTCTATGTTTTCACTACCTGGAAGCAGGAAACCTTGGAAATTTTTCTATCTGATACACTGAGTAAAAGACAGAGCCTGG
AGAAAAAATAAAACAAGGGGTGGTGTGAGCGTATGCTCTACAGAAACGCTGACTATTCTCAGCATGTGGAAGGGGGCGAGCGCTAGTACCTGG
CTGACAGCTTTTCTGCTGAGAGTGTGGACAGGTGGCCAAAGTATGAAAACAGGATGAAAACCTCAATTTGAACTTTTGTATGGCTGGTGGAGA
AGTGTGAGTGGAAAACGGCTCTTTCAAGGAAAATCCCAATATCTACCAATAAAATACAGGGTACTTTGCCTGCTGAAGCCCAAGAGAAAACCTTT
GTATCTTACAGCTTTTCTGTGATTGGAATAGAAAAGCAGTGTGACATGCCCCACCTGAAAATCCACACAGCGCTAGATAAAGCCGACTCTCTCC
GTCTCTGAGGAATTTTGCAGCTTTTACTTGAAAATTTGATACCCAAAGATATTGAAGCATCCAGCCACTCAGGCTCAGTACTGATGATCAAGCGCAT
AATAGCATGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAGGAGTCAACATCCGGTCTCCATGCAGTAAATGGATATATCACTGCCACTGGAATCGGAGC
AAACGAGGAAGATTTACGGGCTCTTGTGGAAGGAGTGGATCAACTACTAAGTATTACCAGATCAAAGATGGCCATGTCATTCTGCAACTGAATTCG
ATCCCTCCAGAGATTTCTCTGTGCTCCGGTCCGGATATTGAACTTTTCAAGTTGGGTTTCTGAATCCTGCTACCTTACGGTGTACGAGTATCACA
GACCAGATAAGCAGTGCACCATGATTTATAGCATTCTGACACCAGGCTTCAAGAAAGTCTGTGAAGGAGCAGCTTGCACATGTGTGGAAGCTGACTG
TGCGCAACTGCAGGCAGAAGTAGACCTAGCCATCTCTGCAGACTCCAGAAAAGAGAAAGCTGTAACCAGAGACTGCATATGCTTATAAAGTCAAG
GATCACATAGCCACTGAAGAAAATGTTTTTGTCAAGTACACTGCGACTCTTCTGGTCACTTACAAAACAGGGGAAGCTGCTGATGAGAATTCGGAG
GTCACCTTCATTAAGAAAGTGTGCTGTACCAATGCCAACCTGGTGAAGGGAAGCAGTATTTAATCATGGGCAAAGAGTTTCTGCAGATCAAACAC
AATTTAGTTTCAAGTATATATACCCTCTAGATTCCTCCACTGGATTGAATATTGGCCACAGACACAACGTGTCATCTGTCAAGCATTGTAGAG
AATTTGAATAACTTTGCTGAAGACCTTTTTTAAACAGCTGTGAATGAAAAGTCTGCTGCACGAAGATTCTCTGCGGGCGGGGGATTGCTCTCC
TCTGGCTTGGAAAACCTAGCTAGAAATCAGATACACTTTCTTAGAGTAAAGCACAAGCTGATGAGTTACGACTTTGTGAAATGGATAGCCTTGAAGG
GAGGCGAAAACAGGTCCTCCAAAGGCTATCAGATGTGAGTCCAATAGACTGAAACAAGTCTGTAAGTTAGCAGTCAAGGGTGTGGTGGGGCCG
GAAGAAGAGACCCACTGAAACTGTAGCCCTTATCAAAACATATCTTGTCTTGAAGAAAAATACCAAGGACAGAAAATGCCATAAATCTTGACTT
TGCACT

图18C

SEQ ID NO:4>gi|392346248|参考|XM_345342.4|预测: 褐鼠补体组分5 (C5),
 mRNAATGGATAGCACAGAGACCCGACAGATGTCCTACAGCCCGCCATCATCTTTCCGGAAACATTAACCTCAGTGCTTGTGCCCTGTAGGTGGGTTT
 TCGGAAGAGGCGAGAAATCCTGGCATCAAATACGTCCTCTCCCTATACACTGAATTTGGTCGCTACCCCTCTTTTCTGAAGCCTGGGATTCCATTT
 TCCATCAAGGTACAGGTTAAGGATCACTCGAGCAGTTGGTAGGAGGGTCCAGTAACTCTGATGGCACAACAGTCAATGTGAATCAAGAGACA
 TCTGACTTGGAAACCAAGAGGAGCATCACACTCTGCTGATGGAGTGGCTTCAATTTGGTGAACCTCCCATCAGAAGTACATCACTGAAGTTTG
 AGGTCAAACTGATGCCCCGAACTTCCCGAAGAAAATCAAGCCAGCAAAGAAATGAAGCAGTTACATACTCACTCCCTCAGCCAGAGTTACATTTA
 CATTGGCTGGACTGAAAACACAAGCCCATGCTTGTGGGAGAATATCTGAATATTATCTGTCACCCCAAGAGTCCATATATTGACAAAATAACTCACT
 ATAATTACTTGTATTTATCCAAAGGCAAAATTTGTACAGTATGGCACAAGAGAAACTTCTCTATTCACTTATCAAAATATAAACATCCCAAGTGACAC
 AGGACATGGTTCCTCAGCGCGGCTCCTGGTCTATTACATAGTCACGGGGAGCAGACAGCAGAATTGGTGGCTGACGCAGTCTGGATAAACATTG
 AGGAGAAGTGTGGCAACCAGCTCCAGGTCCATCTGTCTCCAGATAAAGACGTGTATTCTCCAGGCCAACTGTGTCCCTTGACATGGTACTGAAGC
 AGACTCATGGGTGGCACTATCTCGGTGGACAGCGTGTGTATGGAGTCCGGGGAAAAGCCAAAAGGGCCATGCAAAGAGTGTCCAAAGCTTTTGA
 TGACAAGAGTGACCTGGGCTGTGGGGCAGGTGGTGGCCGTGACAATGTAGATGTATTCATCTAGCTGGGCTCACCTTCTCACAATGCAAACGCA
 GATGACTCCCAATACCAGATGACTCTTGAAGGAAATTCAGGCCAAAGAGACACTGCAGCTCCTGCATCAGAAAGTGGGAAGCAAGCTGCT
 AAATCAAAACACCGTGTGCCAAGAAATGCTGTTATGATGGAGCCCGAGAAAACAAATACGAAACCTGTGAGCAGCGAGTTGCCGGGTGACCATA
 GGCCACACTGCATCAGGGCCTTCAACGAGTGTGTACTATTGCGGATAAAGTCCGAAAAGAAAGCCACCACAAGGCATGCTGTTGGGAAGGATC
 CAAATAAAGGCCCTGTACCAGTGTGAAGCAGAAATCCGAAGCTACTTCCAGAGAGCTGGCTATGGGAAGTTCATCGTGTCCAAAAGAAACC
 AGCTGCAGGTTGCACTGCCTGACTCACTGACGACTGGGAAATCAAGGCATCGGCATCTCAGACAATGGTATATGTGTTGCTGACACACTCAAGGC
 AAAGGTGTTCAAAGATGTCTTCTGGAGATGAACATACCATATTCTGTTGTACGAGGGGAGCAGATCCAATTGAAGGGAACCGTTTACAATTATAGG
 ACCTCTGGGACAATGTTCTGTGTTAAAATGTCTGCCGTGGAGGGAATCTGCACTCCAGGAAGCTCGGCTGTAGCCCTCAGACCTTAGTCTCCAG
 ATGTGTGCGCCAGAGAATAGAGGGCTCCTCCAGTCACTTGGTGACCTTCAGCCTGCTTCCCTCTGGAAATTGGCCTTCACTCCATAAACTTCACTAGA
 GACTTCATTTGGGAAAGAAATCTTAGTGAAGACATTACGGGTAGTGCCAGAAGGGATCAAAGGGAAAGCTATGCTGGTGTGACTCTGGACCCAG
 GGGAGTTTATGGTATTGTTAACAGACGAAAGGAATCCCATACAGGATACCATTAGATTTGGTCCCAAAACCAACGTCAAAGGATTTTGAAGTGA
 AAAGGACTGCTTATAGGGGAATTTCTGTCCACGGTCTGAGTAAAGAAGGCATCGACATCCTAACCCACCTCCCAAGGGCAGCGCCGAGGCAGAA
 CTCATGAGCATAGTCCCGTGTCTACGTTTTCACTACCTGGAAGCAGGAAACCATTGGAATATTTCCACCCTGATACGTTAGCTAGAAAACAGAG
 CCTGCAGAAAAAATAAAGAAGGGCTGGTGAAGCTCATGTCTACAGAAACGCTGACTATTCTACAGCATGTGGAAGGGAGCAAGCTTAGTGTG
 CTGGCTGACAGCTTTTGTCTGAGAGTCTTGGACAGGTGAACAAGTATGTGAAACAAGACCAATACTCGATCTGTAACCTCTGTTATGGCTGATTG
 AGAAGTGTGAGCTGGAACCGGATCTTTCAAGGAAATCCCAATATCTACCAATAAAATTACAGGGTACTTTGCTGCTGAAGCCCAAGAGAACAC
 TTTATATCTACAGCCTTTTCTGTGATTGGAATTAGAAGGCTATTGGCATATGCCCCACGGAGAAAATCTACACAGCGCTGGCTAAAGCTGACTCCT
 TCCTACTTGAAAGGACCTTGCCTTCCAAGAGCACCTTCAACCTGGCCATTGTGGCTATGCTCTCTCCCTGGGAGACAGAACCACCCGAAGTTTCGTT
 CTATTGTGTGAGCCTGAAGAGGGGAAGCTTTGGTTAAAGGAGACCCGCCATTTACCCTTCTGGAGAGACTCTCAACGTCCAGACAGCTCAGC
 ACCCAACAGCGGCACAGCAGGTATGGTAGAAACCACGGCCTATGCTTGTCTCACCAGCCTGAACCTGAAGGAGACGAGTTATGTCAACCCGATCATC
 AAGTGGCTATCTGAGGAGCAGAGGTATGGAGGCGGCTTTTATCCACCCAGGATACCCATTAACGCCATCGAGGGCTGACAGAGTATTCACTCTCG
 TTAACAACACTTCAATTTGGATATGGATATCAATGTCTCCTACAACACAAGGGGATTTTACCAGTATAAAGTGACAGAGAAGAATTCTCGGGAG
 GCCAGTGGAGGTACCCCTCAATGATGACCTCATCGTACCACAGGCTATAGCAGTGGCTTGGCTACAGTATATGTA AAAACTGTGGTTCACAAAAC
 AGTGTGCTGAGGAATTTGAGCTTTTACTTGAAAATTGATACCAAGAAGTTGAAGCCTCCAGCTACCTCAGCTACAGTACTCGGGACACAAGC
 GCATAATAGCCTGTGCCAGCTACAAGCCAGCAAGGAGGAGTCAAGCATCTGGGCTCCCATGCAGTAATGGATATACTGCTGCCGACCCGGAATCG
 GAGCAAACCAAGAAGATTTACGAGCTCTTGTGGAAGGAGTAGATCAACTCTAACTGATTACCAGATCAAAGACAGTCAATGTTTCTGCAATTGAA
 TTCGATTCCCTCAGAGATTTCTTTGTGTTCCGGTCCGGATATTTGAACTTTTCCAAGTTGGGTTTCTGAATCCTGCTACGTTACAGGTGTACGAGTAT
 CACAGACCAGATAAGCAGTGTACCATGATTTACAGCACTTCTGACACCAACCTTCAAGAGTCTGTGAAGGAGCGGCATGCAAATGCGTTGAAGCTG
 ATTGTGGGCAACTGCAGGCAGAACTGGACCTGGCCATCTCTGCAGACACCAGGAAAGAAACAGCATGTAACCAGAGATTGCATATGCTTATAAAGG
 TCAGGATCACGTCCGGCCACGGAAGAAAACATTTTGTCAAGTACTGCGACGCTTCTGGATATTTACAAAACAGGGGAAGCCGCTGCTGAGAAGG
 ACTCTGAGATCACCTTATTAAAAAGATAAGCTGTACCAACGCCAACCTGGTGAAGGAAAGCAATATTTAATCATGGGCAAGAGGGCTCTGCAGAT
 CAAACACAATTTGAGTTTCAAGTATATACCCTTAGATTCTCCACCTGGATTGAATTTGGCCACAGACACAACGTGTCCATCCTGCCAAGCGTT
 TGTAGCTAATTTGGACGAGTTTCGCTGAAGACATCTTTCTAAATGGCTGTGAAAATGCCTGAGGAAGTTCTGCTGCGTGGCCTCCCGGGTACTCTGT
 TGGTGGCTCCTAGGAGCCAGGATCGCTTGGAAACTTAGCCTAGAATCGGATACATTTTCTTTATAGTAAAGCGTAAGTTGAAGAGTTACTTTGTGAA
 ACAAATAGCCTTGTGGAGAGCCGAAGGCAGGTCCCCCAAGGCTATTGGACATCAGCACCAATAAGCTGGAACAAGTCTGTAACGTTAGCAGCCAG
 GGGTGTGTTGTTGGGGCCGAAGAAGAGACTCACTGAAATTGTAGCCCTTAGGAAAACATGGTCTTGTGTA AAAAAAATAACCAAGGACAGAAA
 ATGCCATAAAGCTTGACTTTGCACTCAACTGTA

图18D

SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:1的反向补体

```

TTTTTTTTTTTTTTTTGAAAGCAAACCTCAGGCTTTAATGATCAGTTTCCTGTTCTTGGTATTTTCTTTCAAGCAAAGGCCATGTTTTGTAATACTCCC
TTTCAATGGACTGTTCTTTCCGCCCCAGCAAACATTCTGAGTGGTAGGTTTGAGGAGGTGTTCCAATTTATTGTTCCGGTGTTCCAATAACCTTGGAG
GAGTATCTGTCTTCATGCCCTCCAAGGCCATGTTATTTTCAGAAAGTTACAGCATTGAAATCATTCTCTAATAAAAAGCAAGTGCCACTAATTCTAAGTA
AAGTGAGCTTTACAATAAGACCAGCTATGAATGTTTAAAAAAGAAGAAAAACAAAAACGAACCTCAACAACAGGAGTCCATAAGTGCAAACTG
TATGCAGCTGAACTTCAGGAATTTAGCATCCATTTAAAAAGATATCTTCGGCAAATTCATCTAAATTAGCTAAAAATGCTTGACACGATGAACATGT
TGTGTCTCTAGGCCAGTATTCAATCCAGGTCAGGAATCTAAAGGGTAGATGTACCTGAAACTGAAATTTGATTTTATCTGGAGGGCTCTTTACCCA
TAATTAAGTACTGTCTTCTTTTACCAGCTCAGCGTTAGTACAGGTTACTTTTTAATGAAGTAATCTCAGAGTCTTTCTCAGCAACAGCTTCCCCAGT
TTTGTAGATATCCAGAAGGGTTCCTTGTACTTGACAAAAACATTTCTACAGTGATGGATGTGATGCTAACTTTATAAGCATATGCAATCTCTGGTT
ACATGCTGTTTGTCTTCTGCTCAGAGATTGTCAGATCCAATCTTCTGCTGATTTGCCACAATCAGCTTCTACACTTGCACGCGGCTCCTTCA
CAGACTTCTGAATTTTGTATTTGGAAGTGCTATAAAACATGGTACACTGTTTATCTGGTCTGTGGTATTCTGACTGTGAAAGTGGCAGGACTGAG
AAACCAACTTCAAAGAGTTCAAATATCCGGAATCGTACACAAGGAATCACTGGAGGGAAATCGAATTCAGTTGCAGAATAACATGTCCATCTTTG
ATTTGGTAAATCAGTGAATAGTTGATCCACCCCTTCCACAAGGGCTTTTAAAGTCTTCTCATTGCACTGATTCCAGTAGGCAAGGAGATGTCCATCACC
GCATGAGAGGATCCAGATGATGATTTCCCTGCTGGGCTTGTAGCTGGCACATGCTACTATGCGTTTGAATCAGAGTTTCCGTAGCCTCTGTAGTG
GGATGCTTCAATATCCTGAGTATCGATTTTCAAATAAAGCTGCAAACTTCTCAGAGGTAAGTGGTTTGTGAACTACAGTTGTTACATGTACTGTAGC
CAAGCCACTGCCAAATCCTGTACTGACAAATGAGGTATCATTGAGAAGCACCTTACTGGCCTCCCAAGGAAATCTGTCTGTCTTTATAATTATG
TAAGGCACCTTTATGCTTGAAGAAACATCGATGTCCATACTCAAGCGGAGTGTGTTAACCAGGAGTGAATATCCGTAGCAGCCCTCAATGGCATTGA
TTGTGCTCTGGGTTGAATAAAGCCACCTCCATACCTCTGCTCTTCTGATAGCCATTTGATGACTGGGTTAACATAATTTATATCTTTCAAGTTCAGACT
GGTGAGTAAAGCATAGGCAGTTGTTCTACCATACGTGCCGTACCAGTGTAGGTACAGAGCTGTCTTTATGCTGAAGATTGTCTTTCAAAAAACGAT
AAATGGGTGGATTACCTTTAACCAGGCTTCTCTTTCAAAGTGAACAATGAACGAAACTGGGGTAGTTTTATCTCCAGGGAAAGAGCATA
CGCAGAAATGGCCAATGTAAGGTGCTCTGGGCTGGCAGTGTATTTTCAAGCAGAAAGTTGTCAGCTTAAATTAGAGCTGTGTGATTTTACCAGG
GGGCATATATCGAAAGCCTTTCTAATCCAATCACAGTAAAGGCTGAAGATATAAGCTGTTCTCTCGGGCTTCAACAGGCAAGGTACCTGTAAATTT
TATGGTTGATACTGTGAATTTTCTTGAAGATCCATTATCTAATTGATAATTCTCACTAGCCACAATAAAGAAATCAAAATTTGAAATTTGGTTCTGC
TCTACGTATTTTACTTGTCCAAGTACTCTTAAAGCAAAGCTGTTAACCAGTGTAGCACTTCCACCTTCCACACTGTAAAGTAGTTCAGCA
TTTCTGTAGGACATAATGCTCAACATCCCTTCTTTAATTTTTCTCAGTTTCTGCTTTCAATTAATGGGTGAGAATGAAAAATGTTCCAATGATTTCC
TGTTCCAGGTAGTGAATAAAGTACTGGGACACGCTCATCAGCTCCGCTCTGCCTTCCACTCCCTTTGGGGAGGTGGGTTAGGATATTGATGCTT
TCCTGACTTAGAACTGCAGACAAGATCTCACCTACAAGCAGTCTTTTCACTCAAATCCTTTTGATTTCTGTTTTGGGGACCAAACTAAGGGTATC
CTGTATGGGAACTCCTTCTGCTGCTAATGGTACCATAAATACCCTAGGATCCAAGTAACACCAGAATAGCTTTCCCTTTTGACACCTTCTGGCACC
ACTGTAATGTTTTACTAAGATTTCTTTCCAAACCAAGTCTCCAGTGAATAAATGATGTTGTGAAGGCCAATTTCCAGAGGAAGCACAGTGAATGT
CACCAGTACTGGAGGAGCCTCTACTTTCTGGCGCACACATTTGGAGGACTTTGTGCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTCCGAAGTGCAGATTC
CTCCACAGCAGACATTTAACACAGAAGTGCATCCAGAAGTCTATAGTTGTAACAGTTCCTTTCAATTTGGATCTGTTCTCCTCGTACAACAGAAT
ATGGTATATTCATTTCCAGGAAGACATCTTTGAACCTTTGCTTTGACAGTATCAGCAACACATATACCAGTGTGAAATGCCAACGCCTTGAATTT
CCCAGGTGGTTAGAGAAATCAGGTAGGCAAACTGCAACTGTTTTCTCTGGGAACAAGATGAACCTCCACAAACCAGCTTTCTGGAAAATAACTCCG
AATTTCTGGCTTCTACTGGTAAACAGGGTCTTATGTTAGCCTTCCCAATTCATGTCTTTATGAGAGATATTAGCACGGAGCTGGCTTGGCAGCA
CACAACTTCAGTGAAGCTTTGATGATCTTTGGCCCTAACTAATCCGTGCAGCTCGTCTCACAGTTTTCATATTAAACGAGGCTCCATCGT
AACAACTTTCTCACTACTGAATGTTTATATTAGCAGCTATTTCTTCTATCTTTTGCAGCGTTCTTCTGGCTGAGAATTTCTTTACAAGGTTCA
TCATTTTCTGGGAGTCACTGCAATTTGCATTAGTGAGGAAGGTAAGTCCAGCTAGGTGGAACACATTGGCATTGTTGAGGCCACCACCTGCCCCACA
GCCAGACTCTTCTCTAAGAATTGAAATACTTTTCCAAGGGCTTTTGGCTCTCTTTGGACTCCATACACAGCACTGTCCACTGCTGCTAATGCC
ACCCAGGAATCCATTTCCAGTTCCATATTAAGAGACACAGTTTGGCCTGGAGAAATGCACTCTGCATCAGGAGACAGATGAACCTGGAGCTGGTTGC
CACATTTTCTCAATATTAACCAGACTGAATCAGACACTAATCTGCTGTCTTCTCCTGTGACGATGTAATAGACCAGAAGTCCGGATGAAGGA
ACCATGTTCTGTACTGGAATGTTTATACTTTGATAAGATGCATCTGAAAATTTCTCCCTCGTGCCAAAGTGGATAATTTGCCCCTGGATAAAATC
AAGTAATTATAGTGAGTATTTTGTCAATATATGGGCTTTTGGGGTAAACAATAATATTAGATGTTCTCCACTAGCAAAGCCTTATGGTTATCAGTC
CAATCAATATAAGGTAACCTTTGGCTGAGAGATGAGTATGCTATTGCTCGGTAACCTTCCCTGGCCTGATTTTCTCTGGAAGATCTGGAGCATCAGT
TTTGACATTAACCTCCAGCACCGTCACTCCAGATGGGAGATTAAGCACAAGGAAGTCACTCCATCATCAACAGTGTACACTTTTGTCTGGATCCA
AGTCAGATGCTCTTGGTTTACATCAATTTTGTGCTTCACTGTTAGTGGGACTTCCCTACCAATGGTCAAGCGAATCTTTAACTGCACCTTGT
GGGATATGGAATCCAGGCTTCCAGGAAAAGAGGAGTAGCAACCAAATTCAGTTTGTAGGGAGAGAGGACATATTTGATGCCAGGATTTTCTGCCTC
TTCAGAAAATCCACCTGTAGACTCTATGACTGTTACAGCAATATAAAGGTAAGTGTGTTAAATCTTCAAAGTGTAGTATGACAGTCTTTGACTGC
TGTTTCCAGAAATCAAATGTGACTTGGCAATTTCAATTTATCAACATTTGTTTTGCATTGCTGTTTGCATCAATTTCTTTTGTATCATCTTTAAGTCTTCT
TTATTTCAAATGTGATATAACGCTCAGCCTCAGTACTTTTATTATAAAAAATCTTGTCTTTATAGTAATTTCAAATTTCTAAAGTCTTTGTAACC
AATGAAATATATTTCTGGCTCGATTGAGACAGAAAAATGTGGCAAGACATATTTTAACTTCAAATATGCGGTTCCAGTTGTTGAAAAGTCCCTCTT
TATATTTAGCCTTGTGCTCCACATACCATATCTAGGATTAGACGGAATCTTGAAGTCAAGGAAAAGAGATAATTTCAAATATGATCAATTTCTTACCA
TGTCAACTTCTGATCCTTCCAGGATCTATGAAAGTTAAGACAGTTTCTCTTTGGCTGGCTTCAAGTCTGATCAACGAATAAACTCTAACTTTTACTGA
CTGGTCTGGAGTATAAACAGGTTTGTCTGTATGAATGAAGAGAAATCCATTGTCATAGGTTATTGGCATTCTTTTGTATTTGAAAATGCTTTGATAC
AACTTCAAATACACATAAGAACTGGGTTTTGCTCCAGGCAATTTGTTTGGTTGATTGTTAAGATTGCAGAGTTTTGGAATTTATTTCTGAGGA
TAAATGAACATGGCCTGAGGAGTAACTAAATTTTTATCAGGATAACTTTAATAGAGATTGTTGCATCAAATGCTTCAAGTGTATCCATAAACTTGA
TCACAATTTTTAGATGCTCCAACACGGAATTTTTTGGTGCTGAAATGACATATGTTTGTCTCTGCTCCAGGTTTTCCAGGAAAGATTAATAAAC
AAAGTATTTCCAAAAGGCCATGGTTGGAGGTAGCAGGAAACCACGGATATA

```

图18E

SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:2的反向补体

TTTTAGCACAGTTTGAAGCAAACCTCAGGCTTAAATGATCAGTTTCCTGTCGCCCTGGTATTTTCTTCAAGCAAAGGCCATGTTTTGTAATACTCCAT
TTCAATGGACTGTTCTTTCCGGCTCCAGCAAACATTCCTAAGTGGTAGGTTTGGAGAGGTGTTCTAATTTATTGTTCCGGTGTCCAATAACCTTGGAGG
AGTATCTGTCTTCATGCCCTCCAAGGCCATGTTATTTAGAAAAGTTACAGCGTTAAAATCATTCTCTAATAAAAAGCAAGTGCCACTAATTCTAAGTAA
AGTGAGCTTTACAATAAGACCAGCTGTGAATGTTAAAGACAAAAAACGAGAAAAAAAACAACTTCAACAACAGGAGTCCATAAGTGCAAAC
TGATGACAGCTGAACCTCAGGAATTTAGCATCCATTTAAAAAGATGTCTTCAGCAAATTCATCTAAATTAGCTAAAAATGCTTGACACGATGAACAT
GTTGTGTCTAGGCCAGTATCAATCCAGGTCAAGGAATCTAAAGGGTAGATGTAACCTGAAAGTGAATTTGATTTTATCTGGAGAGCTTCTTTCCC
CATAAATAAGTACTGTCTTCTTCCAGCTCAGCGTTAGTGCAGGTTACCTTTTAAATGAAGGTGATTTAGAGTCTTTTTCAGCAACAGCTTCCCCA
GTTTTGTAGATATCCAGAAGGGTGCCTTGTACTTGACAAAAACATTTTCTGTAGTGTGGATGTGATGATACTTTATAAGCATATGCAATCTCTGG
GTTACATGCTGTTTCTAGTCTCTGCAGAGATTGTGAGTCCAATCTTCTGCAATTTGCCACAATCAGCTTCTATACACTTGCAGTGGCTCCTT
CACAGACTTTCTGAATTTTGATATTGGAAGTGCTATAAAACATGGTACACTGTTTATCTGGTCTGTGGTATTCATACACTGTGAAAGTGGCAGGACTA
AGAAACCAACTTCAAAGAGTTCAAAAATCCGGAATCGTACACAAAGGAAATCACTGGAGGGGATCGAATTGATGTCAGAATAACATGTCCATCTT
TTATTTGGTAATCAGTGAATAGCTGATCCACCCCTCCACAAGAGCTTTAAGTCTTCTCATTTGCATTGATTCCAGTAGGCAAGGAGATGTCATCA
CTGCATGAGAGGATCCAGAAGATGATTTCTTCTTCTGGGCTTGTAGCTGGCACATGCTACTATGCGTTTGAATCAGAGTTTCCGTAGCCTCTGTAG
TGGGATGCTCAATATCCTGAGTATCAATTTCAAATAAAAGCTGCAAACCTCCTCAGAGGACTGGTTTTGTGAACACAGTTGTTACATGTACCGTA
GCCAAGCCACTGCCAATCTGTACTGACAACGAGGTGATCATTGAGAAGCACCTTACTGGCCTCCCAAGGAAATCTGTCTGTCAATTTATAATTA
TGTAAGGGACCTTATGCTTGAAGCAACATCGATGTCATATCAAGCGGAGCTGTTAACCAGGAGTGAATTTCTGTGAGGCCCTCGATGGCATT
GATTGTGCTGGGTTGAATAAAAGCCACCTCCATACCTCTGCTCTTCTGATAGCCATTTGATGATTGGGTTAACATAATTTATGTCTTTCAAGTTCAG
ACTGGTGTAGTAAAGCATAGGCCAGTTGTTCTACCACAGTGTGACAGTGTAGGTACAGAGCTGCTTTATGTTGAAGACTGTCTTTCCAAAAA
GATAAATGGGTGGATTACCTTTAACCAAGCTTCTCTTCAAAGCTGAAACAATTGAACAAAACTGTGGGTGAGTTTATCTCCAGGGAAAGAGC
ATAGGCAGAAATGGCAATGTAAGGTGCTCTGGGCTGGCAGTGTATTTCAAGCAGAAAGGTGTCAGCTTAAATTAGAGCTGTGTTGATTTTCTGT
AATTTTATTGGTTGACTGTGAATTTTCTTGAAGGATCCATTATCTAAGTATAATCTCAACCAGCCACAATAAAGAAATACATATTGAATTTTGGT
TCTGCTACATATTTATGACTTGTCCAAGTACTCTTAAAGCAAAAGCTGTTAACCAGTGTAGCACTGCCACCTTCCACACGCTGTAAGAATAGT
CAGCATTTCTGTAGGACATAATGCTCACCATCCCTCTTTTAAATTTTTCTCCAGGTTCCGCTTTCAATTAATGGGTGCGAATGAAAAATGTTCCAATG
ATTTCTGTTTCCAGGTAGTGA AAAACATAGAATACTGGGACAACGCTCATCAGCTCCGCTCTGCACCTTTGGGGAGGTGGGTTAGGATATTGA
TGCCTCCCGACTAGAACTGCAGACAAGATCTCACCTACAAGCAGTCTTTTACACTCAAATCCTTTTGATTCTGTTTTGGGGACCAATCTAATG
GTATCTGTATGGGAACTCCTTTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCATAAATACCCTAGGATCCAAAGTAAATACCAGAATAGCTTTCCCTTTTGA
CACCTTCTGGCACCCTCGTAACGATTTTACTAAGATTTCTTTCCAAACGAAAGTCTCCAGTGAGAAATGATGTTCTGAAGGCCAATTTCCAGAGGA
AGCACAGTAAAGGTACCAAGTGATTAGAGGAGCCCTCTACTTCTGTGCGACACATTTGGAGGACTTTGTGCCCTGATGATCAATGACTGGGCTTTC
TGAAGTGCAGATTCCTCCACAGCAGACATTTAACAACAGAACTGCATCCAGAAGTCTATAGTTGTAACAGTTCCTTTCAACTGGACCTGTTCTCC
TCGTACAACAGAATATGGTATATTCATTTCCAGGAAGACATCTTTGAACACCTTTGCCTAATAGTATCAGCAACACATATACCCTGTTTGAATGCC
AACACCTTGAATTTCCAGGTAGTTACAGAATCAGGTAGGGCAAACGCAACTGTTTTCTTCTGGGAACAAGATGAATCCCAATACCAGCTTTCTG
GAAAATAACTCCGAATTTCTGGCTGCTTACTGGTAACAGGGTCTTCACTGTGTAGCCTTCCCAATTGCAAGTCTTATGAGAGTTATTAGCACGGAGC
TGGCTTGCAGCAGACAACATTCAGTGAAGCTTTGACGCATCTCGGCCCTACACTAATCCGTGCAGCTCGCTGCTCACAGGTTTTCATCATGATTAAT
ACGGACTCCATCGTAACAACATTTCTCACTACTAAATGTTTATATTTAGCAGCTATTTCTTCTATCTTCTTGTAGCATTCTTCTGGCCTGATAATTT
CTTTACAAGGTTTCATCATTTTCTGGGAGTCACTGCAATTTGCATTAGTGAGGAAGGTAAAGTCCAGTAGGTGGAAACACATTTGGCATTGTTGAGGCCA
CCACCTGCCCCACAGCCAGATCACTCTTCTAAGAATTGAAATACTTTTCAAAGGGCTTTTGGCTCTTCTTGGACTCCATACACAGCGCTGTCCA
CTGCTGTTAATGCCACCAGGAATCCATCCAGTTACCATATTAAGAGACACAGTTTGGCCTGGAGAATATGATCTGCATCAGGAGACAGATGAAC
CTGGAGCTGGTGGCAATTTTCTCAATATTTAACCAGACTGAATCAGACACTAATCTGCTGTCTGCTCCTGTGACGATGTAATAGACCAGGAG
TCGGGATGAAGGAACCATGTTCTGCGTTACTGGAATGTTTATACTTTGATAAGATGCATCTGAAAGTTTCTCCCTGTGCCAAAGTGGATAATTTTGC
CCTTGGATAAAAATCAAGTAATTATAGTGAATTTTGTCAATATATGGGCTTTTGGGGTAACAATAATATTCAAATATTCTCCCACTAGCAAAGCCT
TGTGGTTATCAGTCCAATCGATATAAAGGTAACCTTGGCTGAGAGATGAGTATGCTATTGCTCGGTAACCTTCCCTGGCCTGATTTCTGCTGGAAGA
TCTGGAGCATCAGTTTTGACATTAACCTCCAGCACCCTCACTCCAGATGGGAGATTAACCACAAACGAAGCTACTCCATCATCAACACGTGTTACT
TTTCTTGGCTCCAAGTCAGATGTCTTGGTTGACATCAATGTTTGTGCACTCAGTGTACTGGGACCCCTCCTACCACTGGTCAAGCGCATCTTTA
ACCTGCACCTTGATGGAATATGGAATCCAGGCTTCAAGAAAAGAGGAGTAGCAACCAAAATCAGTTTGTAGGAGAGAGGACATATTTGATGCCA
GGTATTTCTGCCTTTCAGAAAATCCACCTGTAGACTCTATGACTGTTACAGCAATATAAAGGTACTTGTGTTAAATCTTAAACTGTAGTATGAC
AGTTCTTGTACTGCTGTTTCAAGTCAAAATGTGACTTGTGCAATTTCCATTTATCAACATTTGTTTTGCATTGCTGTTTGCATCATTTCTTTTGTATC
TTTTAAGTCTTCTTATTTCAAATGTGATATAAACATCAGCTCAGTACTTATTATAAAAAATCTTGTCTTTATAGTAATTTCAAATTTCTTAA
AGTTCTTATAACCAATGAAATTAATTTCTGTTTCTACTGAGACAGAAAAATGTGGCAAGACATATCTTTAACTTCAAAAAATGCAAGTTCCAGTTGTTG
AAAAGTCTCTTATATTTAGCCTGGATCATCCACATACCATATCTAGGATTAGACGGAACTTGAAGTCAAGAAAAGAGATAATTTCAAATATGATCA
ATTTCTTACCATGCAATTTCTGATCCTTCAAGATCTATGAAAAGTAAAGACAGTTTCTTTTTGGCTGGCTTCAAGTCACTTCAACGAATAAACTC
TAACCTTACTGATTGGTCTGGAGTATAAACAGGTTTGTCTGTATGAATGAAGAGAAATCCATTGTCATAGGTTATTGGAATTTTTTTGATTTGAAA
AATGCTTTGATACAACCTTCAAATACACATAAGAACTTGGTTTTGCTCCAGGTAATGTTTTGGTTGATTGTTAAGACTGCCAGTTTTGAAT
TATTCTGAGGATAAATGAACATGGCCTGAGGAGTAACTAAATTTTTATCAGGATAACTTTAATAGAGATTGTTGCATCAAATGCTTCAAGTGTAT
CCATAAACTGAAATCACAATGTTTTAGATGCTCCAACACGGAATATTTTTGGTGTGAAATGACATATGTTTGTCTGTCCCAAGTTTTTCCAGG
AAGATTA AAAAACAAAGTATTTCCAAAAGGCCATGTTTGGAGGTAGCAGGAAATCATG

图18F

SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:3的反向补体

GAGTGC AAAAGTCAAGATTTTTATGGCATTTCCTGTCTTGGTATTTTTCTTTCAAGCAAGGATATGTTTTGATAAGGGGCTACAGTTTCAGTGGGTCTCT
TCTTCCGGCCCCAACCAACACCCCTGACTGCTAACTTTACAGACTTGTTCAGTCTATTGGCACTGACATCTGATAGCCTTGGGGGACCTGTTTTCGCC
TCCCTCAAGGCTATCCATTTACAAAAGTCTAACTCATCAGCTTGTGCTTTACTCTAAAGAAAGTGTATCTGATTCTAGGCTAGGTTTCCAAGCCAGA
GGAGGAGCAATCCCCCGCCGAGGAGGAATCTTCGTGCAGCAGAACTTTTCATTCACAGCTGTTTAAAAAGAGGTCTTCAGCAAAGTTATTCAAAT
TCTCTACAAATGCTTGACAGGATGGACACGTTGTGTCTGTGGGCAATATTCATCCAGGTGGAGGAATCTAGAGGGTATATATACTTGAAGTAAAGTAA
ATTGTTGTTGATCTGCAGAACCTCTTTGCCATGATTAATACTGCTCCCTTACCAGGTTGGCATTGGTACAGCTCATTTTTAATGAAGGTGACC
TCCGAATTCATCAGCAGCTTCCCTGTTTTGTAAGTGACCAGAAGAGTCGCAAGTGTACTTGACAAAAACATTTTTCTCAGTGGCTGATGTGATCCTG
ACTTTATAAGCATATGCAGTCTCTGGTTACAGGCTTTCTTTTTCTGGAGTCTGCAGAGATGGCTAGGTCTACTTCTGCCTGCAGTTGCGCACAGTCA
GCTTCCACACATGTGCAAGCTGCTCCTCACAGACTTTCTGAAGCCTGGTGTGAGAAATGCTATAAATCATGGTGCAGTCTTATCTGGTCTGTGATAC
TCGTACACCGTGAAGGTAGCAGGATTAGAAACCAACTTGGAAAAGTTCAAATATCCGGAACCCGGACACAGAGGAAATCTCTGGAGGGGATCGA
ATTCAGTTGCAGAATGACATGGCCATCTTTGATCTGGTAATCAGTTAGTAGTTGATCCACTCTTCCACAAGAGCCCGTAAATCTTCTCGTTTGCTCC
GATTCAGCTCGGCAGTGATATACCACTACTGCATGGGAGGACCCGGATGTTGACTCCTCCTTGGGCTGTAGCTGGCACATGCTATTATGCGCT
TGAATCCAGAGTCACTGAGCCTGAAGTGGCTGGATGCTCAATATCTTGGGTATCAATTTTCAAGTAAAAGCTGCAAAAATCTCAGAGACACTAATT
TTGTGAACACAGTTTTACATATACTGTGGCCAAGCCACTGCTGTAGCCTGTGTGACAAACAAGGTATCATTGAGAGATACCTCCACTGGCCTCCC
CAGGAAATGCTTCTGTACCTTATACTTGTGGAAGTCACTTCGTGTTGTAGGCGACATTGATGCCATCCAAATGAATTTGTTTTAACAGGAG
TGAATATTCTGTACAGCCCTCGATGGCATTAACTGATCTCTGGTGGAAATAAAGCCGCTCCATACCTCTGCTTTCAGATAGCCACTTGATGATGG
GGTTGGCGTAATTCATATCCTCAGTTTCAGGCTGGCGAGCAAAGCATAGGCTGTGGTTCAACCATACTGTGTGCCGCTGTGGGCACAGAGCT
GTCTGGACGTTTGAGGATCTCTCCAGTAAACGGTAAATGGGCGGATCACCTTAAACAAAAGCTTCTTCTCAGGGCCGACACAATTAGACGAAAC
CTCGGTGGGTTCTGTCTAGGAAAGAGCATAGGCTACAATGGCCAGTGTGAAGGTGCTTTGGATGGCAGGGTGTTCAGCAGGAAAGGAG
TCGGCTTATCTAGCGCTGTGGATTTTCATGGTGGGCGATATGTCAACTGCCTTTCTAATTTCAAATCACAGAAAAGGCTGTAAGATACAAAATTTT
CTCTGGGCTTCCAGGCAAGTACCCTGTAATTTTATTGGTAGATATTGGGAATTTCTTGAAGAGCCGTTTTCCAGCTGACACTTCTCAACCAG
CCATAGCAAAGAGTTACAAATGAGTTTTCATCTGTTTTACATACTTGGCCACTGTCCAAGCACTCTCAGAGCAAAAAGCTGTACGCCAGGTACTAG
CGCTCGCCCCCTCCACATGCTGTAGGAATAGTCAGCGTTTCTGTAGGACATGACGCTCACCCCTTGTTTTTTTTTTCTCCAGGCTGTCTTTTT
ACTCAGTGTATCAGGATAGAAAATTTCCAATGGTTTCTGCTTCCAGGTAGTGGAAAACATAGAACACCCGAGCTATGCTCATGAGCTGTGCCTCTG
CACTGCCCTTGGGAGGTTAGGATGTTGATGCCTTCTTACTCAGAACCCTGGACAAGAAGTCCCTACAAGCAGTCTTTGACACTCAAATC
TTTTCAACTTTGGTCTTGGGACCAAATCTAATGGGATCCTGTATGGGAATCTTTCGTCTGTTAACAATACCACGAATTCCTTAGGGTCCAGAATC
ACGCCGCATAGCTTTCCCTTGTACTCCTTCTGGCACTACCCGTAATGTCTTTACTAAGATGTCTTTCCAAATGAGGTCTCTAGTGAGAAGTTTATG
GAGTGAAGGCCAATTTCCAGAGGAAGCAGGGTGAAGGTACCAAGTACTGGACGAGCCCTATCTCTGGAACACACATCTGGAGGGCCTGGA
GGTGTGAAGGCTAGCAGCTGAGCTTCTGAAGTGCAGATCCCTCCACAGCAGACATTTAACACAGAACTTTGTCCCTGAGGTCATATAGTTGTAA
ACAGTTCTTTCAATGGATCTGTTCTCCTCGCACAACAGAATATGGTATGTTTCTCCAGGAAGACTTCTTGAACACCTTTGCCTTGTAGTGTATCA
GCAACACATATACCATTGTCTGAAATGCCAATGCCTTGAATTTCCCAAGTCTTGTAGTGAAGTGCAGCAGCGTGACCTGCAGCTGTTTTCTTTGGGAAC
GCGATGAATTTCCATAGCCAGCTCTCTGAAAGTAGCTTGGATATCTGCCTTCTACTGTTAACAGGGTCTTAATGTGGATCCTTCCAGTTGGA
CAGGTTTATGGGGCTTTCTTTCCGATCTTGTTCGCAATAGTACAGCACTGTTGAAGGCCCTGATGCAGAGAGGGCCTATGGTAAACCCGGGCCAC
TCGCTCCTCACAGTTCGTAGAAAGTCACTCGGGCTCCGTCATAGCAGCAATTTCTTGGCACACTATGTTTGTACTTAGCAGCTGTTCTTCTATTTTT
TGCCTTAGGAGATGCAGGTTTCTTTGACCTGAGAATTTCTTACAAGAGTCACTACGATAATGGGAGTCACTGCGTTTGCCTTGGTGGAGGAGGT
GAGCCCAGTATAGGAATACATCTGCATTGTGATGGCCACCACCTGCCACAGCCAGGTCACTTTTTATCCAAAGCTTGAAGACTCTTTGCAT
GGCCTTTTGGCGTTTTCCCTGGACTTTATACACAGCTCTGTCCACTGCTGATAGTGTACTCCACTAGTCTGCTTCACTCAGTACCATGTCAAGGGACAGT
TTGGCCTGGAGAATACACATATTCTGAGACAGATGGACCTGGAGCTGGTGGCACACTTCTCCTCAATATTTATCCAGACTGCGTCAGCCACTA
ATTCTGCTGTTTCTCCCTGTGACTATGTAATAGACCAGGAGTCTGCTGAAGGAACCATGTTCTGTGCTACTGGAATATTTATATTTTGATAAGTTG
AGGAGAAAAGTTTCTCTTGTGCCGACTGTACAATTTTGCCTTTGGATAAAATCAAGTAAATATAGTGAGTTATTTTGTGATATATGGGCTTGG
GGTAACCATAATATTCAGGTATTCTCCACAAGCATGGGCTTGTAGTTTTCAAGTCCAAGCGATGTAATGTAATTTGGCTGAGAGACGAGTACGC
AACTGCTTCTGACTCTTTGCTGGCTGATTTTTCTCGGAAAGTCTGGGTATCAGTTCTGATCTCAAATTTAGCACCGTCAATTTGATGGGAGGTT
CAGCACAAAACACAGTACTCCATCAGTGTGATGAGTGTGCTCCTCTTGTGTTTCCAAGTCAAGTCAAGTGTCTTGTATTACATCGACTGTTTGTGCCATCAG
AGTTACTGGGACCCCTCCTACCGCTGCTCGAGTGAATCTTAACTGTCCCTGATGAAAATGGAATCCCGGGCTTACGAAAAGAGGAGTAGCG
ACCAAATTCAGTGTGATGGGAGAGAGGACATTTGACTCCAGGGATTTCTGCCTTCTGAAAATCCACCTGAAGATTCTGTACTGTTACTGCAAT
ATAAAGTACTTGTGTTAAGTCTTCTAGACTGTTGTAGGACAGCTTTAACTGCTGTTTCCAGAAATCAAAGAGATCTGAGCAACTCCGTCAACCA
ACTTTGCGGCTTGTGTGGCTTTGTGCATCATCTGCTTCTCCTCATTTTTATGTCTCTCAATCCAAAAAGGCATACACTTCAGCATCAGGTACCAC
TTTATTAAAAATATCTTCTTTCACAGTGATTTCAAAGTCTTAAAGTTTTATAGCCAATGAAGGTTCTTTCTAGTTCTATTGAAACAGAGAATCGT
GGCAAGACATATCTTAAATTTCAAAGTATGCAAGTCCAGTTGTTGTAATACTCTTATAGTTAGCTTAAATTTGCAAAACACCACTACTGGGATTA
GATGGAATCTTGAAGTCAAGAAAAGAGATAATCCGGTGAATCATTTTTCTTCTACAATGTCAACTTCTGATCCTTGGGGTCTATGAAAAGTTAAGAC
AGTCTCCGTTTGGCTGGCTTCAAGTGTGACCCAGAGAATAGACTCTGATCTTACTGACTGGTCCGGCGTGAACAGGTTTGTCTGTATGGATGA
AGAGAATCCATTGTTATAGGTAATGGTATTTCTTGTATTTGAAAAGTGTGTTGACACAACCTCCAGATACAGGTGAGAGACTGGGCTTCTTCTC
TAGGAATGATTGGGCTGTAGTGTCAACAGTCCCGCTTTTGGAAATTTGTTTTCCGGGGACAAATTAACATAGCCTGAAGAGAAGGTGACTTTTTT
GTCAGGATAGCTTTTATAGAAAAGAGTGCATCAAATGCTTCAAGTGTAGCCATGGACTTGAATTAACACATTTTCCAGACGAGCCGACCCGGAGGATT
TTGGGTGCTGAAATGACGTAGGTTTGTCTGCTCCCAAGTTTTGTCAGGAAAAATAAAAGACAAGTATCCCAAAGACCCATGGCTGGTAGCG
GCATAAACCCATGGGCGATGGCCTCCTGTAACCACTTTCTTTTTAA

图18G

SEQ ID NO:8 SEQ ID NO:4的反向补体

TACAGTTGAGTGCAAAGTCAAGCTTTTATGGCATTCTGTCTGCTGGTATTTTTTTTTCAAGCAAGACCATGTTTTCTAAGGGGCTACAATTCAGTG
AGTCTCTTCTCCGGCCCAACAAACACCCCTGGCTGCTAACGTTACAGACTGTTCCAGCTTATTGGTGTGATGTCCAATAGCCTGGGGGACCTGC
CTTCGGCTCTCCACAAGGCTATTTTGTTCACAAAGTAACTCTCAACTTACGCTTACTATAAAGAAAATGTATCCGATTCTAGGCTAAGTTCCAAGC
GATCCTGGCTCCTAGGAGCCACCAACAGGAGTACCCGGGAAGGCCACGCAGCAGAACTTCTCAGGCATTTTCACAGCCATTAGAAAAGATGTCTTC
AGCGAACTCGTCCAAATTAGTACAAACGCTTGGCAGGATGGACACGTTGTGTCTGTGGGCCAATATTCAATCCAGGTGGAGGAATCTAGAGGGTA
TATACTTGAAGTAAATTTGTTGATCTGCAGAGCCTTTGGCCATGATTAATATTGCTTCTTTCCAGGTTGGCCTTGGTACAGCTTATC
TTTTAATGAAGTGATCTCAGAGTCTTCTCAGCAGCGGCTCCCTGTTTTGTAATATCCAGAAGCGTCGAGTGTACTTGACAAAAATGTTTTCT
TCCGTGGCCGACGTGATCTGACCTTATAAGCATATGCAATCTCTGGTTACATGCTGTTCTTCTGGTGTCTGCAGAGATGGCCAGGTCCAGTTCT
GCCTGCAGTTGCCACAATCAGCTTCAACGCATTTGCATGCCGCTCTCACAGACTCTCTGAAGGTTGGTGTGAGAAGTGTGATAATCATGGTACA
CTGCTTATCTGGTCTGTGATACTCTGACACCGTGAACGTAGCAGGATTCAGAAAACCAACTGGAAAAGTTCAAATATCCGGAACCGAACACAAAGG
AAATCTCTGGAGGGAATCGAATCAATTGCGAATAACATGACTGTCTTGTGATCTGGTAATCAGTTAGGAGTTGATCTACTCCTTCCACAAGAGCTCG
TAAATCTTCTGGTTTGTCCGATTCCGGTCCGGCAGCAGTATATCCATTACTGCATGGGAGGACCCAGATGCTGACTCCTCTTGTGGCCTGTAGCT
GGCACAGGCTATTATGCGCTTGTGCCGAGTCACTGTAGCTGAGGTAGCTGGAGGCTTCAACTTCTGGGTATCAATTTCAAGTAAAAGCTGCAA
AATCTCTCAGCGACACTAGTTTTGTAACACAGTTTTACATATACTGTAGCCAAGCCACTGCTATAGCCTGTGGTACGATGAGGTCATCATTGAG
GGGTACCTCACTGGCCTCCCGAGGAAGTCTCTGTCACTTTATACTGGTAGAAAACCCCTTGTGTTGTAGGAGACATTGATATCCATATCCAA
ATGAAGTTGTTAACCAGGAGTGAATACTCTGTACAGCCCTCGATGGCGTTAATGGTATCCTGGGTGGAATAAAAGCCGCTCCATACCTCTGCTCCT
CAGATAGCCACTTGATGATCGGGTTGACATAACTCGTCTCCTCAGGTTCAGGCTGGTGAGCAAAGCATAGGCCGTGGTTTCTACCATACCTGCTGTG
CCGCTGTTGGGTGTGAGCTGTCTGGACGTTGGAGAGTGTCTCCAGAAACGGTAAATGGGCGGGTCTCCTTAACCAAAGCTTCCCTCTCAGGG
CTGACACAATAGAACGAAACTCCGGTGGGTTCTGTCTCCAGGGAGAGACATAGGCCACAATGGCCAGGGTGAAGGTGCTCTTGGAAAGGCAGG
GTCCTTTCAAGTAGGAAGGAGTCACTTTAGCCAGCGCTGTGTAGATTTTCTCCGTGGGGCATATGCCAATAGCCTTTCTAATTCCAATCACAGAAAA
GGCTGAAGATATAAAGTGTCTCTGGGCTTCAGCAGGCAAAGTACCTGTAAATTTATTGGTAGATATTGGGAATTTCTTGAAGATCCGTTTTCT
CAGCTGACACTTCTCAATCAGCCATAACAAGGAGTACAGATCGAGTATTGGTCTTGTTCACATACTGTTCACTGTCCAAGCACTCTCAGAGCAAA
AGCTGTACAGCCAGGCACTAGAGCTTGTCCCTCCACATGCTGTAGGAATAGTACAGGTTTCTGTAGGACATGACGCTCACAGCCCTCTTTTATTTT
TTTCTGCAGGCTGTGTTTTAGTCAACGTATCAGGGTGGAAAATTTCCAATGGTTTCTGCTCCAGGTAGTGGAAAACGTAGAACCACCCGGGACTA
TGCTCATGAGTTCTGCCTCGGCCTGCCCTTGGGAGGTGGGTTAGGATGTCGATGCCCTTTTACTCAGAACCCTGGACAAGAATCCCTATAAGC
AGTCTTTTACTCATAAATCCTTTGACGTTGGTTTTGGGACCAAATCTAATGGTATCCTGTATGGGAATCCTTCTGCTGTTAACAATACCATAA
ACTCCCTGGGGTCCAGAGTACACCAGCATAGCTTTCCCTTTGATCCCTCTGGCACTACCCGTAATGTCTTCACTAAGATTTCTTCCAAATGAAG
TCTTAGTGAGAAGTTATGGAGTGAAGGCAATTTCCAGAGGAAGCAGGCTGAAGGTCAACAAGTACTGGAGGAGCCCTTATTCTCTGGCGCA
CACATCTGGAGGACCTAGAGGCTGAGGGTACGAGCCGAGCTTCTGGAGTGCAGATTCCCTCCACGGCAGACATTTAACACAGAACATTTGCC
AGAGGTCTATAATTGTAACGGTTCCCTTCAATGGATCTGCTCCCTCGTACAACAGAATATGGTATGTTCACTCCAGGAAGACATCTTGAACAC
CTTTGCCTTGTGTGTGAGCAACACATATACCATTGTCTGAGATGCCGATGCCTTGAATTTCCAGGTGTCAGTGTGAGTCAAGGAGTCAACCTGCA
GCTGGTTTTCTTTGGGAACACGATGAACCTCCATAGCCAGCTCTCTGGAAAGTGCCTCGGATTTCTGCCTTCACTGGTAACAGGGCTTTATTT
GGATCTTCCCAACAGCATGCCTTTGTGGTGGCTTTCTTTCCGATCTTATCCGCAATAGTACAACACTCGTTGAAGGCCCTGATGAGTGTGGGCCTA
TGGTACCCGGGCAACTCGCTGCTCACAGGTTTCTGATTTGTTTTCTGGGCTCCATATAACAGCATTCTTGGGCACACGGTGTGTTGATTTAGCAG
CTTGTCTTCACTTTCTGATGCAGGAGTGCAGGCTCTCTTTGGCTGAGAATTTCTTACAAGAGTCACTGGTATTGGGAGTCACTGCGTTTTG
CATTGGTGAGGAAGGTGAGCCAGCTAGATGGAATACATCTACATTGTCACGGCCACCCTGCCCCACAGCCAGGTCACCTTGTATCAAAAAGC
TTGGAACACTCTTGTATGGCCCTTTGGCTTTCCCGGACTCCATACACAGCGCTGTCCACCCAGATAGTCCACCCATGAGTCTGCTTCAAGTCA
CATGTCAAGGGACACAGTTTTGGCCTGGAGAATACACGCTTTTATCTGGAGACAGATGGACCTGGAGCTGGTTGCCACACTTCTCCTCAATGTTTATCC
AGACTGCGTCAGCCACCAATTCTGCTGTCTGCTCCCCGCTGACTATGTAATAGACCAGGAGCCGCTGAAGGAACCATGTCCTGTGCTACTGGGAT
GTTTATATTTGATAAGATGAATAGAGAAGTTTCTCTTTGTGCCATACTGTACAATTTGCTTTGGATAAAAATCAAGTAATTATAGTGAGTTATTTT
GTCAATATATGGACTCTTGGGGGTGACGATAATATTAGATATTCTCCACAAGCATGGGCTTGTAGTTTTCACTCCAGCCAATGTAATGTAACCT
GGCTGAGGGATGAGTATGTAACCTGCTTCAATTTCTTGTGGCTTATTTCTTCCGGGAAGTCCGGGGCATAGTTTTGACCTCAAACCTCAGTGAT
GTCATCTGATGGGAGGTTACCACAATGAAGCCACTCCATCAGCAGAGTGTGTGATGCTCCTTTGGTTCCAAGTCAAGTGTCTCTTGTATTAC
ATTGACTGTTTGTCCATCAGAGTACTGGGACCCCTCTACCAACTGCTCAGTGAATCCTTAACCTGTACCTTGTAGGAAAATGGAATCCAGGCT
TCAGGAAAAGAGGGGTAGCGACCAAATTCAGTGTATAGGGAGAGAGGACGTAATTTGATGCCAGGAATTTCTGCCTTCTCCGAAAACCCACCTACAA
GGGCAGCAAGCACTGAGTTAATGTTCCGGAAAGATGATGGCGGGCTGTAGGACATCTGTCGGTCTCTGTGCTATCCAT

图18H