(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110997692 B
(45)授权公告日 2025.01.07

(21)申请号 201880049516.1
(22)申请日 2018.06.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110997692 A
(43)申请公布日 2020.04.10
(30)优先权数据
62/514,769 2017.06.02 US
62/670,698 2018.05.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/035721 2018.06.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/223081 EN 2018.12.06
(73)专利权人 波涛生命科学有限公司
地址 新加坡新加坡
(72)发明人 C·瓦格斯 N·岩本
D·C·D·巴特勒 S·马拉帕
陆根良 张敬新
V·瓦蒂帕迪卡尔 L·H·阿波尼
H·M·维斯涅夫斯卡 成夏耘
曹永镇
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 刘文娜 郗名悦
(51)Int.Cl.
C07H 21/02(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017/048620 A1,2017.03.23
CN 106068325 A,2016.11.02
WO 2017/062862 A2,2017.04.13
WO 2017/015555 A1,2017.01.26
审查员 李青翠

权利要求书4页 说明书516页
序列表322页 附图15页

(54)发明名称

寡核苷酸组合物及其使用方法

(57)摘要

本公开尤其提供了设计的PNPLA3寡核苷酸、组合物及其方法。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物提供了改善的单链RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低。本公开尤其涵盖以下认识:寡核苷酸的结构元件,诸如碱基序列、化学修饰(例如,糖、碱基和/或核苷酸间键联的修饰)或其样式、与附加的化学部分的缀合和/或立体化学[例如,主链手性中心的立体化学(手性核苷酸间键联)]和/或其样式,可对寡核苷酸的性质和活性例如RNA干扰(RNAi)活性、稳定性、递送等具有显著影响。在一些实施方案中,本公开提供了使用所提供的寡核苷酸组合物(例如在RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低中)治疗疾病的方法。

CN 110997692 B

1.一种包含特定寡核苷酸类型的寡核苷酸的组合物,其特征在于:

a)共同的碱基序列;

b)共同的主链键联样式;

c)共同的主链手性中心样式;

其中所述寡核苷酸包含至少一个包含呈Sp构型的键联磷的核苷酸间键联;

其中所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同的共同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;

其中所述寡核苷酸靶向PNPLA3;

其中共同的碱基序列包含TACUGUAGAAAGGCAUGAATU(SEQ ID NO:153)的15或更多的连续碱基,其中一个或多个U可任选且独立地被T取代;并且

其中共同的碱基序列的长度为总计15至49个核苷酸。

2.权利要求1所述的组合物,其中多个寡核苷酸:

在五个或多个手性控制的核苷酸间键联处独立地共享相同的键联磷立体化学;和

其中在所述组合物中共享所述共同的碱基序列的全部寡核苷酸的至少10%是所述多个寡核苷酸。

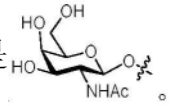
3.权利要求2所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸在五个或更多个手性核苷酸间键联处独立地共享相同的键联磷立体化学,和在所述组合物中共享所述共同的碱基序列的全部寡核苷酸的50%-100%是所述多个寡核苷酸。

4.权利要求2所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸在每个硫代磷酸酯核苷酸间键联处独立地共享相同的键联磷立体化学。

5.权利要求2所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸具有相同的构造。

6.权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是液体组合物。

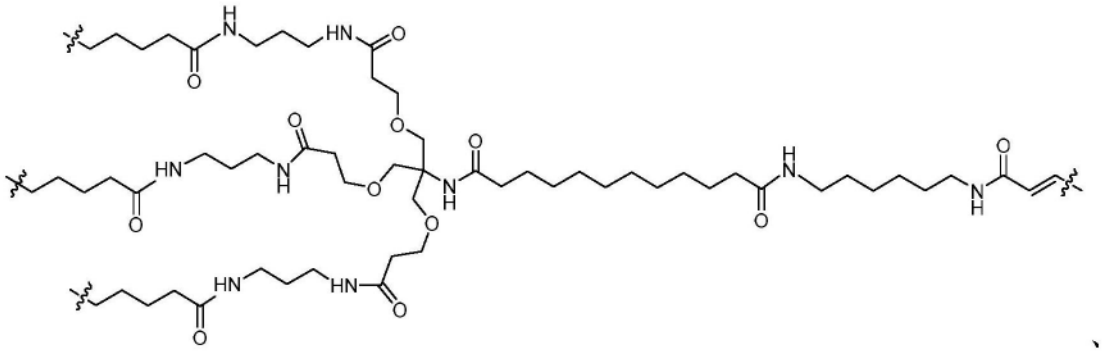
7.权利要求2所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸各自独立地包含靶向部分。

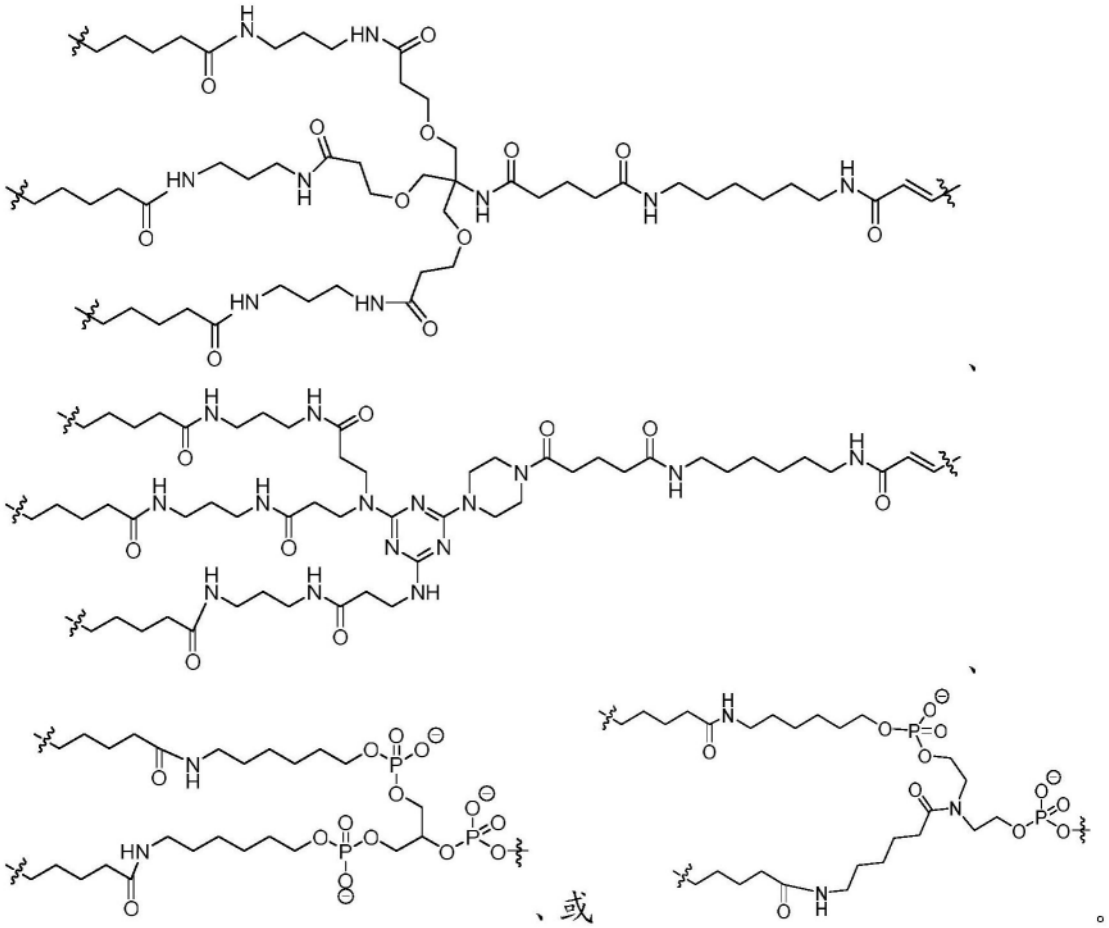
8.权利要求7所述的组合物,其中靶向部分是  。

9.权利要求7或8所述的组合物,其中靶向部分通过接头与一个或多个寡核苷酸连接。

10.权利要求9所述的组合物,其中所述接头具有以下结构:

、

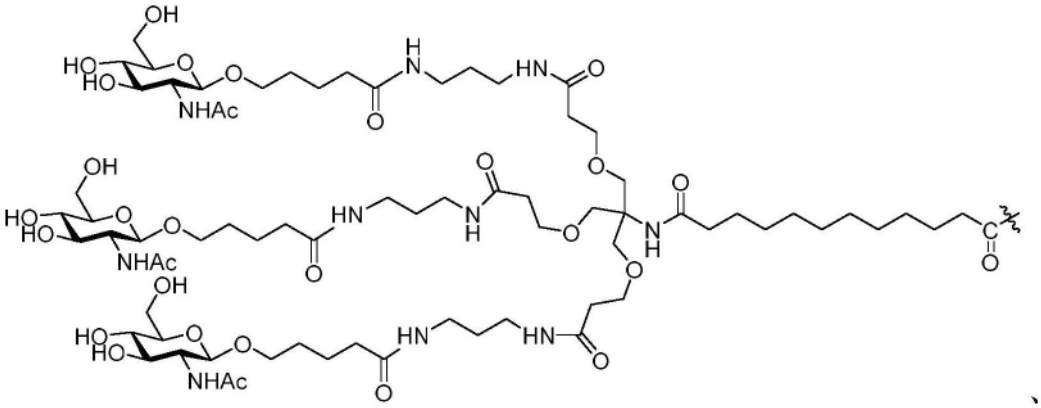
 、



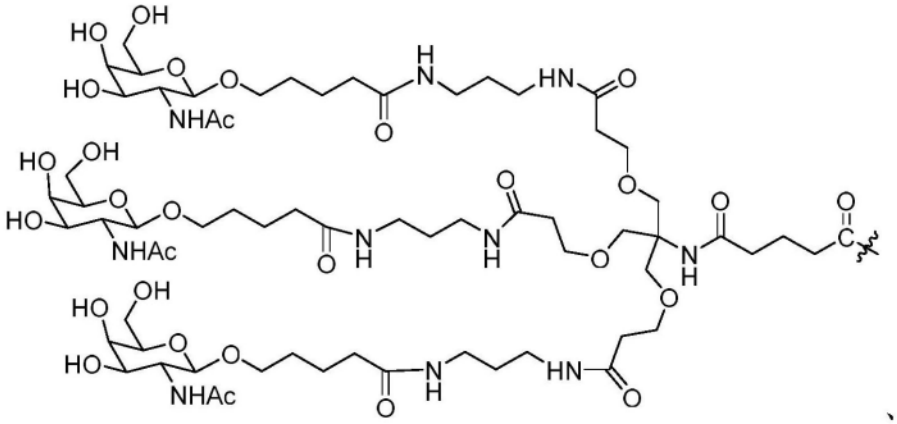
、或

。

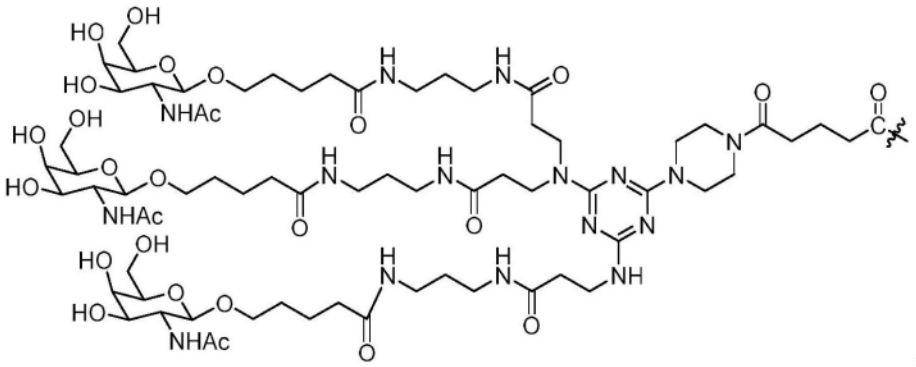
11.权利要求7所述的组合物,其中靶向部分选自:



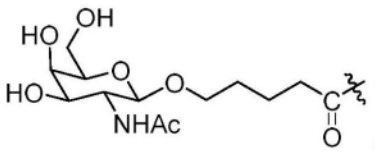
、



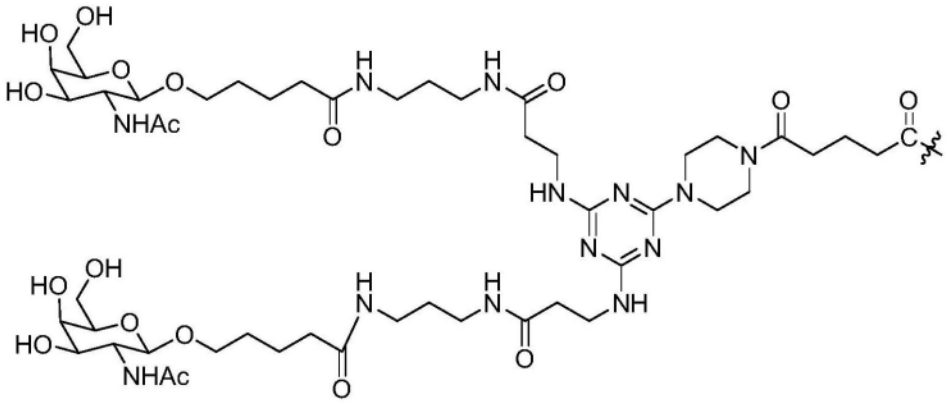
、



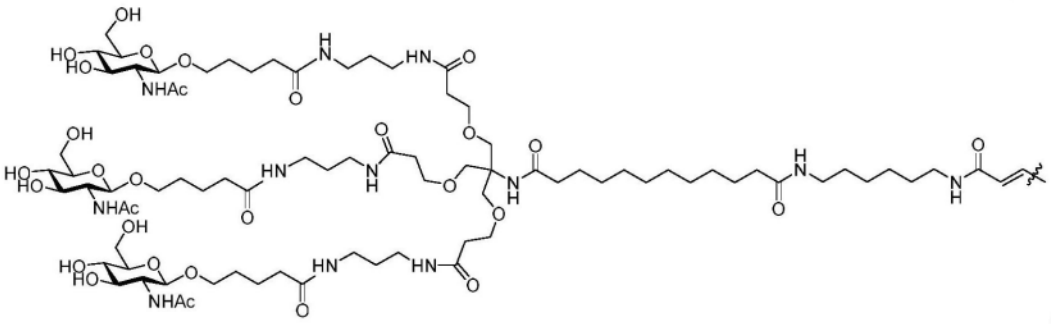
、



、



、或



。

12.治疗有效量的权利要求1-11中任一项所述的组合物在制备用于治疗人类中的脂肪肝的药物中的用途,其中向需要此类治疗的人施用治疗有效量的组合物。

13.权利要求12所述的用途,其中脂肪肝为非酒精性脂肪肝病。

14.权利要求12所述的用途,其中脂肪肝为非酒精性脂肪性肝炎。

15.治疗有效量的权利要求1-11中任一项所述的组合物在制备用于治疗人类中的非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化的药物中的用途,其中向需要此类治疗的人施用治疗有效量的组合物。

16.治疗有效量的权利要求1-11中任一项所述的组合物在制备用于治疗人类中的非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌的药物中的用途,其中向需要此类治疗的人施用治疗有效量的组合物。

寡核苷酸组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年6月2日提交的美国临时申请号62/514,769以及2018年5月11日提交的美国临时申请号62/670,698的优先权,所述临时申请中的每个以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 靶向PNPLA3的寡核苷酸(PNPLA3寡核苷酸)可用于各种应用,例如治疗应用。天然存在的核酸(例如未修饰的DNA或RNA)的使用可以例如因它们易受核酸内切酶和核酸外切酶影响而受到限制。

发明内容

[0004] 本公开尤其涵盖了以下认识:控制PNPLA3寡核苷酸的结构元件,诸如化学修饰(例如,糖、碱基和/或核苷酸间键联的修饰)或其样式、立体化学(例如,主链手性核苷酸间键联的立体化学)或其样式的改变和/或与附加的化学部分(例如脂质部分、靶向部分、碳水化合物部分、与脱唾液酸糖蛋白受体或ASGPR结合的部分,例如GalNAc部分)等的缀合,可对PNPLA3寡核苷酸的性质和/或活性产生重大影响。在一些实施方案中,所述性质和/或活性包括但不限于参与指导例如由RNA干扰(RNAi干扰)、单链RNA干扰(ssRNAi)、RNA酶H介导的敲低、翻译的空间位阻等介导的PNPLA3基因或其基因产物的表达、活性或水平的降低。

[0005] 应理解,前述的一般描述和以下详细描述都仅仅是示例性和解释性的,并且不限制要求保护的本发明。

[0006] 发明详述

[0007] 通过参考以下本发明的示例性实施方案的详述和其中包括的实施例可以更容易理解本发明。

[0008] 应理解,本发明不限于所描述的指定制备合成方法,其当然可以发生变化。还应理解,本文使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的并且不意图具有限制性。

[0009] 在一些实施方案中,本公开涵盖了以下认识:立体化学,特别是主链手性中心的立体化学,可以出乎意料地改善PNPLA3寡核苷酸的性质。许多先前的观察结果是一些增加稳定性的结构元件也可以降低活性,例如RNA干扰,与之相反,本公开证明立体化学的控制可以令人惊讶地增加稳定性而不会显著降低活性。

[0010] 在一些实施方案中,本公开提供了具有某些5'-末端结构的寡核苷酸。

[0011] 在一些实施方案中,本公开提供了在根据本公开使用时可以提供具有高生物学活性(例如RNAi活性)的寡核苷酸的5'-末端结构。

[0012] 在一些实施方案中,本公开涵盖了以下认识:各种附加的化学部分,诸如脂质部分和/或碳水化合物部分,在掺入寡核苷酸中时,可以改善一种或多种PNPLA3寡核苷酸性质,诸如PNPLA3靶基因或其基因产物的敲低。在一些实施方案中,附加的化学部分是任选的。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可包含多于一个附加的化学部分。在一些实施方案中,

PNPLA3寡核苷酸可包含两个或更多个附加的化学部分,其中所述附加的化学部分是相同或不同的,或属于相同的类别(例如,靶向部分、碳水化合物部分、与ASPGR结合的部分、脂质部分等)或不属于相同的类别。在一些实施方案中,某些附加的化学部分促进寡核苷酸向所需细胞、组织和/或器官的递送。在一些实施方案中,某些附加的化学部分促进寡核苷酸的内化和/或增加寡核苷酸的稳定性。

[0013] 在一些实施方案中,本公开提供了实现等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中相对于同一基因的至少一个其他等位基因,选择性地敲低来自特定靶基因的一个等位基因的转录物。

[0014] 在一些实施方案中,本公开证明某些所提供的结构元件、技术和/或特征对于参与和/或指导RNAi机制的PNPLA3寡核苷酸(例如RNAi剂)特别有用。然而,无论如何,本公开的教义不限于通过任何特定机制参与或起作用的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及任何寡核苷酸,所述寡核苷酸可通过任何机制起作用并且包含本文所述的任何序列、结构或格式(或其部分)。在一些实施方案中,本公开提供了PNPLA3寡核苷酸,所述寡核苷酸可通过任何机制起作用并且包含本文所述的任何序列、结构或格式(或其部分),其包括但不限于任何5-'末端结构;5'-末端区域;第一区域(包括但不限于种子区域);第二区域(包括但不限于种子后区域);和3'-末端区域(其可以是3'-末端二核苷酸和/或3'-末端帽);任选的附加的化学部分(包括但不限于靶向部分、碳水化合物部分、结合APGR的部分和脂质部分);立体化学或立体化学样式;修饰或修饰样式;核苷酸间键联或核苷酸间键联样式;糖的修饰或糖的修饰样式;碱基的修饰或碱基的修饰样式。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以参与(例如,指导)RNAi机制。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以参与RNA酶H(核糖核酸酶H)机制。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以充当翻译抑制剂(例如,可以提供翻译的空间位阻)。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以是治疗性的。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可用于治疗性应用、诊断性应用、研究应用和/或纳米材料应用。在一些实施方案中,靶标是相对于所述靶标旨在改变一种或多种产物(例如,RNA和/或蛋白质产物)的表达和/或活性的特定等位基因。在许多实施方案中,靶等位基因是其存在和/或表达与一种或多种疾病和/或病状的存在、发生率和/或严重性相关联(例如,相关)的一种等位基因。另选地或除此之外,在一些实施方案中,靶等位基因是其一种或多种基因产物的水平和/或活性的改变与疾病和/或病状的一个或多个方面的改善(例如,发作延迟、严重性降低、对其他疗法的反应性等)相关的一种等位基因。

[0015] 在一些实施方案中,在特定等位基因(疾病相关等位基因)的存在和/或活性与一种或多种病症、疾病和/或病状的存在、发生率和/或严重性相关联(例如,相关)的情况下,同一基因的不同等位基因存在但并不如此相关联或者相关联程度较小(例如,表现出较小的显著性或统计学上不显著的相关性)。在一些此类实施方案中,如本文所述的寡核苷酸及其方法可以相对于一个或多个较少相关联/不相关联的等位基因优先或特异性地靶向相关联的等位基因,从而介导等位基因特异性抑制。

[0016] 在一些实施方案中,PNPLA3靶序列是与如本文所述的PNPLA3寡核苷酸结合的序列。在许多实施方案中,靶序列与所提供的寡核苷酸或其中的连续残基的序列相同或精确互补(例如,所提供的寡核苷酸包括与靶序列相同或精确互补的靶向结合序列)。在一些实施方案中,靶向结合序列与转录物的靶序列(例如,前mRNA、mRNA等)精确互补。靶向结合序

列/靶序列可以具有各种长度,以提供具有所需活性和/或性质的寡核苷酸。在一些实施方案中,靶向结合序列/靶序列包含5-50个碱基。在一些实施方案中,容许在PNPLA3寡核苷酸(的相关部分)与其靶序列(包括但不限于靶标和/或寡核苷酸序列的5'-和/或3'-末端区域)之间的少量差异/错配。在许多实施方案中,靶序列存在于由靶基因产生的转录物(例如,mRNA和/或前mRNA)中。

[0017] 在一些实施方案中,靶序列包括一个或多个等位基因位点(即,靶基因内发生等位基因变异的位置)。在一些实施方案中,等位基因位点是突变。在一些实施方案中,等位基因位点是SNP。在一些此类实施方案中,所提供的寡核苷酸相对于一个或多个其他等位基因优先或特异性地与一个等位基因结合。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸优先与疾病相关等位基因结合。例如,在一些实施方案中,本文提供的PNPLA3寡核苷酸(或其靶向结合序列部分)具有与靶序列的特定等位基因形式至少部分相同或精确互补的序列。

[0018] 除非另外指出,否则所有序列(包括但不限于碱基序列以及化学、修饰和/或立体化学的样式)均以5'至3'的顺序呈现。

[0019] 在一些实施方案中,本公开提供了与PNPLA3寡核苷酸有关的组合物和方法,所述寡核苷酸对靶标具有特异性并且具有或包含本文公开的任何寡核苷酸的碱基序列或本文公开的任何寡核苷酸的碱基序列的至少15个连续核苷酸的区域,其中所述碱基序列的第一核苷酸或至少15个连续核苷酸的第一核苷酸可以任选地被T或DNA T替代。在一些实施方案中,所述寡核苷酸能够指导ssRNAi。

[0020] 在一些实施方案中,本公开提供了一种PNPLA3寡核苷酸组合物,其包含第一多个寡核苷酸,所述第一多个寡核苷酸具有共同的碱基序列并包含一个或多个核苷酸间键联、糖和/或碱基修饰。

[0021] 在一些实施方案中,核苷酸是天然核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸是修饰的核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸是核苷酸类似物。在一些实施方案中,碱基是修饰的碱基。在一些实施方案中,碱基是受保护的核碱基,诸如在寡核苷酸合成中使用的受保护的核碱基。在一些实施方案中,碱基是碱基类似物。在一些实施方案中,糖是修饰的糖。在一些实施方案中,糖是糖类似物。在一些实施方案中,核苷酸间键联是修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,核苷酸包含碱基、糖和核苷酸间键联,其中所述碱基、糖和核苷酸间键联中的每个独立且任选地是天然存在的或非天然存在的。在一些实施方案中,核苷包含碱基和糖,其中所述碱基和糖中的每个独立且任选地是天然存在的或非天然存在的。核苷酸的非限制性实例包括DNA(2'-脱氧)和RNA(2'-OH)核苷酸;以及在碱基、糖和/或核苷酸间键联处包含一个或多个修饰的那些核苷酸。糖的非限制性实例包括核糖和脱氧核糖;以及具有2'-修饰的核糖和脱氧核糖,所述2'-修饰包括但不限于2'-F、LNA、2'-OMe和2'-MOE修饰。在一些实施方案中,核苷酸间键联可以具有如本公开所述的式I的结构。在一些实施方案中,核苷酸间键联是不包含磷但用于连接两个天然或非天然糖的部分。

[0022] 在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的PNPLA3寡核苷酸组合物,其在与参考条件(例如,不存在组合物或不存在参考组合物(例如,具有相同碱基序列和化学修饰的寡核苷酸的立体无规组合物))相比时指导PNPLA3基因或其基因产物的表达、活性和/或水平的更大降低,单链RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低。

[0023] 在一些实施方案中,包含多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物是立体无规的,

因为多个寡核苷酸在任何手性核苷酸间键联处都不共享共同的立体化学。在一些实施方案中,包含多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物是手性控制的,因为多个寡核苷酸在一个或多个手性核苷酸间键联处共享共同的立体化学。在一些实施方案中,相对于立体无规的包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,手性控制的包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物对核酸内切酶和核酸外切酶的敏感性降低。

[0024] 在一些实施方案中,组合物包含以下中的两个或更多个的多聚体:第一多个PNPLA3寡核苷酸和/或第二多个寡核苷酸,其中所述第一和第二多个寡核苷酸可以独立地通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导相同或不同靶标的敲低。

[0025] 在一些实施方案中,包含多个寡核苷酸(例如,第一多个寡核苷酸)的PNPLA3寡核苷酸组合物是手性控制的,因为多个寡核苷酸在一个或多个手性核苷酸间键联处独立地共享共同的立体化学。在一些实施方案中,多个寡核苷酸在1、2、3、4、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、35、40、45、50个或更多个手性核苷酸间键联处共享共同的立体化学构型,其中的每个独立地是Rp或Sp。在一些实施方案中,多个寡核苷酸在每个手性核苷酸间键联处共享共同的立体化学构型。在一些实施方案中,在组合物的预定水平的寡核苷酸共享共同的立体化学构型(独立地是Rp或Sp)时,将手性核苷酸间键联称为手性控制的核苷酸间键联。

[0026] 在一些实施方案中,至少5个核苷酸间键联是手性控制的;在一些实施方案中,至少10个核苷酸间键联是手性控制的;在一些实施方案中,至少15个核苷酸间键联是手性控制的;在一些实施方案中,每个手性核苷酸间键联都是手性控制的。

[0027] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个PNPLA3寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个PNPLA3寡核苷酸共享:

[0028] 1)共同的碱基序列;

[0029] 2)共同的主链键联样式;和

[0030] 3)共同的主链手性中心样式,所述组合物是单个寡核苷酸的基本上纯的制品,因为所述组合物中预定水平的寡核苷酸具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式。

[0031] 在一些实施方案中,共同的主链手性中心样式包括至少一个包含手性控制的手性中心的核苷酸间键联。

[0032] 在一些实施方案中,寡核苷酸和/或非对映体纯度的水平可以通过分析方法(例如色谱法、分光光度法、光谱法或其任何组合)来确定。

[0033] 本公开尤其涵盖了以下认识:立体无规的PNPLA3寡核苷酸制品含有多个例如在寡核苷酸链内的各个主链手性中心的立体化学结构(或立体化学)方面彼此不同的不同化学实体。在不控制主链手性中心的立体化学的情况下,立体无规的寡核苷酸制品提供了不受控制的组合物,其包含未定水平的寡核苷酸立体异构体。即使这些立体异构体可能具有相同的碱基序列和/或化学修饰,但至少由于它们的主链立体化学不同,它们是不同的化学实体,并且如本文所证明的它们可以具有不同的性质,例如对核酸酶的敏感性、活性、分布等。在一些实施方案中,特定的立体异构体可以例如通过其碱基序列、其长度、其主链键联样式和其主链手性中心样式来定义。在一些实施方案中,本公开证明了通过控制PNPLA3寡核苷酸内的立体化学实现的性质和活性的改善可以与通过使用化学修饰实现的那些改善可比

或者甚至更好。

[0034] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸以5'至3'的顺序包含5'-末端区域、种子区域、种子后区域和3'-末端区域,任选地还包含附加的化学部分。

[0035] 在一些实施方案中,5'-末端区域是PNPLA3寡核苷酸的整个部分,其在种子区域的5'端。在一些实施方案中,3'-末端区域是PNPLA3寡核苷酸的整个部分,其在种子区域的3'端。

[0036] 在一些实施方案中,5'-末端结构是5'-末端基团。

[0037] 在一些实施方案中,5'-末端结构包含5'-末端基团。

[0038] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的5'-末端区域、5'-末端结构、5'-末端基团、5'-末端核苷或5'-末端核苷酸。

[0039] 在一些实施方案中,5'-末端结构、5'-末端区域、5'-核苷酸部分、种子区域、种子后区域、3'-末端二核苷酸和/或3'-末端帽独立地具有本文所述的或本领域已知的任何结构。在一些实施方案中,可以合并本文所述的或本领域已知的5'-末端的任何结构、和/或本文所述的或本领域已知的5'核苷酸部分的任何结构、和/或本文所述的或本领域已知的种子区域的任何结构、和/或本文所述的或本领域已知的种子后区域的任何结构、和/或本文所述的或本领域已知的3'-末端二核苷酸的任何结构、和/或本文所述的或本领域已知的3'末端帽的任何结构。

[0040] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段,其中嵌段包含一个或多个连续的核苷、和/或核苷酸、和/或糖或碱基、和/或核苷酸间键联。在一些实施方案中,嵌段涵盖整个种子区域或其一部分。在一些实施方案中,嵌段涵盖整个种子后区域或其一部分。

[0041] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是嵌段聚体。

[0042] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是包含交替嵌段的交替聚体。在一些实施方案中,可以通过化学修饰(包括存在或不存在)(例如碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰、立体化学等)或其样式来定义嵌段聚体或交替聚体。

[0043] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个糖修饰。在一些实施方案中,糖修饰在2'-位置。在一些实施方案中,糖修饰选自:2'-F、2'-OMe和2'-MOE。2'-F也称为2'氟代。2'-OMe也称为2'-O-甲基。2'-MOE也称为2'-甲氧基乙基或MOE。

[0044] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F,其中两个核苷酸在第2和第14位。

[0045] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F,其中两个核苷酸在第2和第14位,并且其中第一核苷酸是2'-脱氧。

[0046] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F,其中两个核苷酸在第2和第14位,并且其中第一核苷酸是2'-脱氧T。

[0047] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F,其中两个核苷酸在第2和第14位,并且其中第一核苷酸是2'-脱氧,并且5'-末端结构是-OH。

[0048] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸仅包含两个2'-F,其中两个核苷酸在第2和第14位,并且其中第一核苷酸是2'-脱氧T,并且5'-末端结构是-OH。

[0049] 在本文的一些实施方案中,关于PNPLA3寡核苷酸,"第一"(例如,第一核苷酸)是指

寡核苷酸的5'末端,并且"最后"或"末端"(例如,最后核苷酸或末端核苷酸)是指3'末端。

[0050] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含具有特定修饰的糖,其与没有修饰或具有不同修饰的糖交替。在一些实施方案中,具有特定修饰的糖在一个或多个嵌段中出现。

[0051] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段,所述一个或多个嵌段包含具有特定的2'修饰的糖,其与独立地没有修饰或具有不同修饰的糖交替。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段,所述一个或多个嵌段包含具有2'-F修饰的糖,其与独立地没有修饰或具有不同修饰的糖交替。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段,所述一个或多个嵌段包含具有2'-OMe修饰的糖,其与独立地没有修饰或具有不同修饰的糖交替。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个嵌段,所述一个或多个嵌段包含具有2'-OMe修饰的糖,其与具有2'-F修饰的糖交替。

[0052] 在一些实施方案中,糖的嵌段具有或包含以下任一种的2'-修饰的样式:ff、fffm、fffmm、fffmmm、fffmmmm、fffmmmmm、fffmmmmmm、fffmmmmmmf、fffmmmmmmff、fffmmmmmmffm、fffmmmmmmffmm、fffmmmmmmffmmf、fffmmmmmmffmmfm、fffmmmmmmffmmfmf、fffmmmmmmffmmfmfm、fffmmmmmmffmmfmfmf、fffmmmmmmffmmfmfmfm、fffmmmmmmffmmfmfmfmm、fffmmmmmmffmmfmfmfmmm、ffmmffmm、ffmmmmmmffmmfmfmfmmm、fmfmfmfmfmfmfm、fmfmfmfmfmfmfmf、fmfmfmfmfmfmfmfm、fmfmfmfmfmfmfmfmf、fmfmfmfmfmfmfmfmfm、fmfmfmfmfmfmfmfmfmf、fmfmfmfmfmfmfmfmfmfm、fmfmfmfmfmfmfmfmfmfmm、fmfmfmfmfmfmfmfmfmm、fmfmfmfmfmfmfmfmfmm、fmfmfmfmfmfmfmfmfmm、fmfmfmfmfmfmmm、fmmffmm、fmmmmmmffmmfmfmfmmm、mff、mffm、mffmf、mffmff、mffmffm、mffmmffmm、mfmfm、mfmfmfmfmffffmfmfmfmmm、mfmfmfmfmfmfmfm、mfmfmfmfmfmfmfmfmfmm、mfmfmfmfmfmfmfmfmfmmm、mfmfmfmfmfmfmfmfmm、mfmfmfmfmfmfmfmm、mfmfmfmfmfmfmm、mfmfmfmfmfmmm、mfmfmfmfmfmmmfm、mfmfmfmfmfmmmmm、mfmfmfmfmmm、mfmfmfmfmmmfmfm、mfmfmfmfmmmfmmm、mfmfmfmfmmmmmfm、mfmfmfmmm、mfmfmfmmmfmfmfm、mfmfmfmmmfmfmmm、mfmfmfmmmfmmmfm、mfmfmfmmmmmfmfm、mfmfmmm、mfmfmmmfmfmfmfm、mfmfmmmfmfmfmmm、mfmfmmmfmfmmmfm、mfmfmmmfmmmfmfm、mfmfmmmmmfmfmfm、mfmmm、mfmmmfmfmfmfmfm、mfmmmfmfmfmfmmm、mfmmmfmfmfmmmfm、mfmmmfmfmmmfmfm、mfmmmfmmmfmfmfm、mfmmmfmmmfmfmfmfm、mmffm、mmffmm、mmffmm、mmffmmf、mmffmmff、mmffmmffm、mmffmmffmm、mmffmmfmfmfmmm、mmm、mmmffmmfmfmfmmm、mmmfmfmfmfmfmfm、mmmfmfmfmfmfmmm、mmmfmfmfmfmmmfm、mmmfmfmfmmmfmfm、mmmfmfmmmfmfmfm、mmmfmmmfmfmfmfm、mmmmffmmfmfmfmmm、mmm、mmmm、mmmmm、mmmmmffmmfmfmfmmm、mmmmmfmfmfmfmfm、mmmmmm、mmmmmmffmmfmfmfmmm、mfmf、mfmf、mfmfmf、fmfm、fmfmfm、fmfmfmf、dfdf、dfdfdf、dfdfdfd f、fdfd、fdfdfd、fdfdfdfd、dfdfmfmf、dfmfmf、mfdfmf或dfmfdf,其中m表示2'-OMe,f表示2'-F,并且d表示在2'-位置无取代。在一些实施方案中,种子区域和/或种子后区域可以包含糖修饰的嵌段。

[0053] 在一些实施方案中,嵌段是立体化学嵌段。在一些实施方案中,嵌段是Rp嵌段,因为所述嵌段的每个核苷酸间键联是Rp。在一些实施方案中,种子区域-嵌段是Rp嵌段。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段是Rp嵌段。在一些实施方案中,嵌段是Sp嵌段,因为所述嵌段的每个核苷酸间键联是Sp。在一些实施方案中,种子区域-嵌段是Sp嵌段。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段是Sp嵌段。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含Rp嵌段和Sp

嵌段两者。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个Rp嵌段,但不包含Sp嵌段。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个Sp嵌段,但不包含Rp嵌段。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个PO嵌段,其中所述嵌段的每个核苷酸间键联是天然磷酸酯键联。

[0054] 在一些实施方案中,种子区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键联是修饰的核苷酸间键联,并且每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联,并且每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子区域-嵌段包含4个或多个核苷单元。在一些实施方案中,核苷单元是核苷。在一些实施方案中,种子区域-嵌段包含5个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子区域-嵌段包含6个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子区域-嵌段包含7个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键联是修饰的核苷酸间键联,并且每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联,并且每个糖部分包含2'-F修饰。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段包含4个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段包含5个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段包含6个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子后区域-嵌段包含7个或多个核苷单元。在一些实施方案中,种子区域和/或种子后区域可以包含嵌段。在一些实施方案中,种子区域和/或种子后区域包含立体化学嵌段。

[0055] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[0056] 1)具有共同的碱基序列;并且

[0057] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联。

[0058] 在一些实施方案中,本公开提供了包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[0059] 1)具有与转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

[0060] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联。

[0061] 在一些实施方案中,参考条件是不存在组合物。在一些实施方案中,参考条件是存在参考组合物。在本公开中充分描述了包含参考多个寡核苷酸的示例性参考组合物。在一些实施方案中,与所提供的组合物中的第一多个寡核苷酸相比,参考多个寡核苷酸具有不同的结构元件(化学修饰、立体化学等)。在一些实施方案中,所提供的包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物是手性控制的,因为所述第一多个寡核苷酸包含一个或多个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物是手性控制的,因为所述第一多个寡核苷酸包含1-20个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述第一多个寡核苷酸包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同化学修饰的寡核苷酸的立体无规制品。在一些实施方案中,参考组合物是立体异构体的混合物,而所提供的组合物是一种立体异构体的单链RNAi剂。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的碱基序列。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参

考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的化学修饰。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的糖修饰。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的碱基修饰。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的核苷酸间键联修饰。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的碱基序列和相同的化学修饰。在一些实施方案中,在所提供的组合物中,参考多个寡核苷酸具有与第一多个寡核苷酸相同的立体化学,但是具有不同的化学修饰,例如碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰等。

[0062] 在一些实施方案中,本公开提供了包含PNPLA3寡核苷酸的组合物,其中所述寡核苷酸与靶RNA序列互补或基本上互补,具有总计约15至约49个核苷酸的长度,其中所述寡核苷酸包含至少一个非天然碱基、糖和/或核苷酸间键联。

[0063] 在一些实施方案中,本公开提供了包含单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中所述单链RNAi剂与靶RNA序列互补或基本上互补,具有总计约15至约49个核苷酸的长度,并能够指导靶标特异性RNA干扰,其中所述单链RNAi剂包含至少一个非天然碱基、糖和/或核苷酸间键联。

[0064] 在一些实施例中,长度为总计15至49、约17至约49、17至49、约19至约29、19至29、约19至约25、19至25、约19至约23或19至23个核苷酸。

[0065] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[0066] 1)具有与转录物中的靶序列互补或基本上互补的共同的碱基序列;并且

[0067] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联,

[0068] 所述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与转录物接触时,转录物的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0069] 在一些实施方案中,本公开提供了包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[0070] 1)具有与转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

[0071] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联,

[0072] 所述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0073] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中所述第一多个寡核苷酸属于通过以下来定义的特定寡核苷酸类型:

[0074] 1)碱基序列;

[0075] 2)主链键联样式;

[0076] 3)主链手性中心样式;以及

[0077] 4)主链磷修饰样式。

[0078] 在一些实施方案中,本公开提供了包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中所述第一多个寡核苷酸属于通过以下来定义的特定寡核

苷酸类型：

[0079] 1)碱基序列；

[0080] 2)主链键联样式；

[0081] 3)主链手性中心样式；以及

[0082] 4)主链磷修饰样式。

[0083] 在一些实施方案中，本公开提供了包含PNPLA3寡核苷酸类型的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物，其中所述寡核苷酸类型通过以下来定义：

[0084] 1)碱基序列；

[0085] 2)主链键联样式；

[0086] 3)主链手性中心样式；以及

[0087] 4)主链磷修饰样式，

[0088] 所述组合物是手性控制的，因为相对于具有相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，

[0089] 所述寡核苷酸组合物的特征在于，当其与转录物接触时，转录物的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善，所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0090] 在一些实施方案中，本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物，所述第一多个寡核苷酸能够指导单链RNA干扰并且属于通过以下来定义的PNPLA3寡核苷酸类型：

[0091] 1)碱基序列；

[0092] 2)主链键联样式；

[0093] 3)主链手性中心样式；以及

[0094] 4)主链磷修饰样式，

[0095] 所述组合物是手性控制的，因为相对于具有相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言，所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸，

[0096] 所述寡核苷酸组合物的特征在于，当其与RNA干扰体系中的转录物接触时，转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善，所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0097] 在一些实施方案中，所提供的寡核苷酸具有图1所示的任何格式，或图1所示的任何格式的任何结构元件。

[0098] 在一些实施方案中，所提供的单链RNAi剂具有图1所示的任何格式，或图1所示的任何格式的任何结构元件。

[0099] 本公开提供的数据尤其表明，所公开格式的各种寡核苷酸能够指导若干个不同基因中的任一个中的靶基因或其基因产物(当其靶向针对若干个不同序列中的任一个时)的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中，本公开提供的数据表明，所公开格式的各种RNAi剂能够指导许多不同基因中的任一个中针对许多不同序列中的任一个的RNA干扰。

[0100] 在一些实施方案中，具有本文所述和/或所示的结构中的任一种的PNPLA3寡核苷酸能够指导RNA干扰。在一些实施方案中，具有本文所述和/或所示的结构中的任一种的PNPLA3寡核苷酸能够指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中，具有本文所述和/或所示

的结构中的任一种的PNPLA3寡核苷酸能够指导RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含本文所述的任何寡核苷酸或者本文所述的或图1所示的任何格式的任何结构元件。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含本文所述的任何寡核苷酸或者本文所述的或图1所示的任何格式的任何结构元件,并且能够指导RNA干扰。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含本文所述的任何寡核苷酸或者本文所述的或图1所示的任何格式的任何结构元件,并且能够指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含本文所述的任何寡核苷酸或者本文所述的或图1所示的任何格式的任何结构元件,并且能够指导RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低。

[0101] 在一些实施方案中,RNAi剂包含以下中的一个或多个:5'-末端结构、5'-末端区域、种子区域、种子后区域和3'-末端区域以及任选的附加的化学部分。在一些实施方案中,种子区域是本文所述或本领域已知的任何种子区域。在一些实施方案中,种子后区域可以是本文所述或本领域已知的种子区域与3'-末端区域之间的任何区域。在一些实施方案中,3'-末端区域可以是本文所述或本领域已知的任何3'-末端区域。在一些实施方案中,任何任选的附加的化学部分可以是本文所述或本领域已知的任何任选的附加的化学部分。本文所述或本领域已知的任何单独的5'-末端结构、5'-末端区域、种子区域、种子后区域、3'-末端区域和任选的附加的化学部分可以独立地与本文所述或本领域已知的任何其他5'-末端结构、5'-末端区域、种子区域、种子后区域、3'-末端区域和任选的附加的化学部分组合。在一些实施方案中,作为非限制性实例,单链RNAi剂的区域是5'-末端结构、5'-末端区域、种子区域、种子后区域、种子区域的一部分、种子后区域的一部分或3'-末端二核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列由本文所公开的任何寡核苷酸的碱基序列组成。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含本文所公开的任何寡核苷酸的碱基序列。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含以下序列,其包含本文所公开的任何寡核苷酸的碱基序列的15个连续碱基的序列。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含以下序列,其包含本文所公开的任何寡核苷酸的碱基序列的20个连续碱基(具有至多5个错配)的序列。

[0103] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导单链RNAi干扰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导单链RNA干扰和RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,寡核苷酸包含靶向本文所公开的寡核苷酸靶向的任何转录物或基因的序列。

[0104] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸靶向PNPLA3。

[0105] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可用于降低或抑制PNPLA3基因或其基因产物的活性、水平和/或表达。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可用于降低或抑制基因或其基因产物的活性、水平和/或表达,其中基因或其基因产物的异常或过度的活性、水平或/或表达,基因或其基因产物中的有害突变,或者基因或其基因产物的组织或细胞间或细胞内分布与病症有关,引起病症,并且/或者与病症相关联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可用于治疗病症和/或制备用于治疗病症的药物,所述病症与基因或其基因产物的异常或过度活性、水平和/或表达或者异常分布有关,由其引起并且/或者与其相关联。

[0106] 在一些实施方案中,本公开涉及使用本文公开的寡核苷酸的方法,所述寡核苷酸

能够靶向PNPLA3并且可用于治疗PNPLA3相关病症和/或制备PNPLA3相关病症的治疗。

[0107] 在一些实施方案中,能够靶向基因的PNPLA3寡核苷酸包含碱基序列,所述碱基序列是靶基因的碱基序列的一部分或者与靶基因的碱基序列的一部分互补或基本上互补。在一些实施方案中,一部分的长度为至少15个碱基。在一些实施方案中,单链RNAi剂的碱基序列可以包含碱基序列或由碱基序列组成,所述碱基序列具有与指定碱基序列的指定最大错配数。

[0108] 在一些实施方案中,错配是当两个序列被最大限度地比对和比较时碱基序列或长度之间的差异。作为非限制性实例,如果一个序列中特定位置的碱基与另一个序列中对应位置的碱基之间存在差异,则算作错配。因此,例如,如果一个序列中的位置具有特定碱基(例如,A),而另一序列中的对应位置具有不同的碱基(例如,G、C或U),则算作错配。例如,如果一个序列中的位置具有碱基(例如,A),而另一序列中的对应位置没有碱基(例如,所述位置是包含磷酸糖主链但没有碱基的无碱基核苷酸)或跳过所述位置,也算作错配。任一序列(或者有义链或反义链)中的单链切口可以不算作错配,例如,如果一个序列包含序列5'-AG-3',而另一序列包含序列5'-AG-3'且在A与G之间具有单链缺口,将不算作错配。碱基修饰一般不被认为是错配,例如,如果一个序列包含C,而另一序列在同一位置包含修饰的C(例如,5mC),则可以不算作错配。在一些实施方案中,出于计数错配的目的,用T取代U或反之亦然不认为是错配。

[0109] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸与靶序列(例如,RNA,诸如mRNA)互补或完全或100%互补,这意味着所述寡核苷酸的碱基序列与和靶基因完全互补(例如,通过Watson-Crick碱基配对的碱基对)的序列没有错配。不希望受到任何特定理论的束缚,本公开指出,对于单链RNAi剂,5'-末端核苷酸部分或3'-末端二核苷酸不必与靶标碱基配对。这些可以是错配。此外,反义寡核苷酸或单链RNAi剂可能具有少量内部错配,并且仍指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低,并且/或者指导由RNA酶H介导的敲低和/或RNA干扰。如果PNPLA3寡核苷酸的第一碱基序列(例如,反义寡核苷酸或单链RNAi剂)与和靶序列100%互补的参考碱基序列具有少量错配,则所述第一碱基序列与靶序列基本上互补。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸或单链RNAi剂)可以具有与靶序列互补或基本上互补的碱基序列。在一些实施方案中,互补是基于Watson-Crick碱基配对(鸟嘌呤-胞嘧啶和腺嘌呤-胸腺嘧啶/尿嘧啶)确定的,其中鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶可以被任选且独立地修饰,但保持其未修饰时的配对氢键结样式。在一些实施方案中,与另一个序列互补的序列包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个碱基。

[0110] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、寡核苷酸组合物或寡核苷酸类型具有共同的主链键联样式。在一些实施方案中,共同的主链键联样式包含至少10个修饰的核苷酸间键联。

[0111] 在一些实施方案中,共同的主链键联样式包含至少10个硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、寡核苷酸组合物或寡核苷酸类型具有共同的主链手性中心样式。在一些实施方案中,共同的主链手性中心样式包含至少1个Sp构型的核苷酸间键联。在一些实施方案中,共同的主链手性中心样式包含至少1个核苷酸间键联,其是Sp构型的硫代磷酸酯。在一些实施方案中,所提供的组合物中的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式。在一些实施方案中,所提供的组合物是手性控制的PNPLA3寡核苷酸组合物,因为所述组合

物含有预定水平的单个寡核苷酸类型的寡核苷酸,其中PNPLA3寡核苷酸类型通过以下来定义:

[0112] 1)碱基序列;

[0113] 2)主链键联样式;

[0114] 3)主链手性中心样式;以及

[0115] 4)主链磷修饰样式。

[0116] 如上文所指出并且如本领域所理解的,在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的碱基序列可以指寡核苷酸中核苷残基的同一性和/或修饰状态(例如,糖和/或碱基组分,相对于标准天然存在的核苷酸诸如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶和尿嘧啶而言)和/或此类残基的杂交特征(即,与特定互补残基杂交的能力)。

[0117] 在一些实施方案中,特定寡核苷酸类型可以通过以下来定义:

[0118] 1A)碱基同一性;

[0119] 1B)碱基修饰样式;

[0120] 1C)糖修饰样式;

[0121] 2)主链键联样式;

[0122] 3)主链手性中心样式;以及

[0123] 4)主链磷修饰样式。

[0124] 因此,在一些实施方案中,特定类型的寡核苷酸可以共享相同的碱基,但是其碱基修饰和/或糖修饰的样式不同。在一些实施方案中,特定类型的寡核苷酸可以共享相同的碱基和碱基修饰样式式(包括例如不存在碱基修饰),但是糖修饰的样式不同。

[0125] 在一些实施方案中,特定类型的寡核苷酸在化学上是相同的,因为它们具有相同的碱基序列(包括长度)、相同的糖和碱基部分的化学修饰样式、相同的主链键联样式(例如,天然磷酸酯键联、硫代磷酸酯键联、硫代磷酸三酯键联及其组合的样式)、相同的主链手性中心样式(例如,手性核苷酸间键联的立体化学样式(Rp/Sp))以及相同的主链磷修饰样式(例如,核苷酸间磷原子的修饰样式,诸如-S^-和式I的-L-R^1)。

[0126] 本公开尤其提供了用于优化性质(例如,改善的单链RNA干扰、RNA酶H介导的敲低等)的寡核苷酸组合物和技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于降低与寡核苷酸及其组合物的施用相关联的免疫反应的方法(即,施用寡核苷酸组合物使得对组合物中寡核苷酸的不良免疫反应例如相对于用具有可比的或相同核苷酸序列的核苷酸的参考组合物观察到的不良免疫反应而言减少的方法)。在一些实施方案中,本公开提供了通过寡核苷酸及其组合物增加与某些蛋白质的结合的方法。在一些实施方案中,本公开提供了通过寡核苷酸及其组合物增加与某些蛋白质的结合的方法。在一些实施方案中,本公开提供了用于增强寡核苷酸及其组合物的递送的方法。本公开尤其涵盖以下认识:在一些实施方案中,寡核苷酸向其靶标的最佳递送涉及寡核苷酸与某些蛋白质结合的平衡,使得可以将寡核苷酸转运至所需位置,并且涉及寡核苷酸的释放,使得寡核苷酸可以从某些蛋白质中适当释放出来以执行其所需功能,例如,与其靶标杂交、切割其靶标、抑制翻译、调节转录物加工等。如本公开所示例的,本公开尤其认识到,可以通过化学修饰和/或立体化学来实现寡核苷酸性质的改善。

[0127] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗或预防疾病的方法,其包括向受

试者施用本文所述的PNPLA3寡核苷酸组合物。

[0128] 在一些实施方案中,疾病是其中在施用所提供的组合物之后,通过单链RNA干扰敲低靶核酸可以修复、恢复或引入新的有益功能的疾病。

[0129] 在一些实施方案中,共同序列包含选自表1A的序列。在一些实施方案中,共同序列是选自表1A的序列。在一些实施方案中,主链手性中心样式选自表1A中所述的那些样式。

[0130] 在一些实施方案中,本公开提供了一种方法,所述方法包括施用包含第一多个寡核苷酸的组合物,所述组合物与包含多个寡核苷酸的参考组合物相比表现出改善的递送,所述多个核苷酸中的每个也具有共同的碱基序列,但是在结构上与所述第一多个寡核苷酸不同,因为:

[0131] 参考多个寡核苷酸中的各个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同;并且/或者

[0132] 参考多个寡核苷酸中的至少一些寡核苷酸具有与由所述组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。

[0133] 在一些实施方案中,本公开提供了施用PNPLA3寡核苷酸组合物的方法,所述寡核苷酸组合物包含能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低并具有共同核苷酸序列的第一多个寡核苷酸,所述改善包括:

[0134] 施用包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸,其特征在于相对于具有相同的共同核苷酸序列的参考寡核苷酸组合物而言改善的递送。

[0135] 在一些实施方案中,本公开提供了施用PNPLA3寡核苷酸组合物的方法,所述寡核苷酸组合物包含能够指导单链RNA干扰并具有共同核苷酸序列的第一多个寡核苷酸,所述改善包括:

[0136] 施用包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸,其特征在于相对于具有相同的共同核苷酸序列的参考寡核苷酸组合物而言改善的递送。

[0137] 在一些实施方案中,本公开提供了选自本文所公开的任何表(包括但不限于表1A)或其他地方的PNPLA3寡核苷酸的单链RNAi剂。在一些实施方案中,本公开提供了选自本文所公开的任何表(包括但不限于表1A)或其他地方的PNPLA3寡核苷酸的单链RNAi剂,其中所述寡核苷酸与脂质部分缀合。

[0138] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含脂质部分。在一些实施方案中,脂质部分通过与脂质的缀合掺入。在一些实施方案中,脂质部分是脂肪酸。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸与脂肪酸缀合。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂还包含脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在第9或第11个核苷酸处缀合的脂质部分(从5'-末端开始计数)。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸在碱基处与脂肪酸缀合。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质部分。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在第9或第11个核苷酸处的碱基处缀合的脂质部分(从5'-末端开始计数)。

[0139] 在一些实施方案中,单链RNAi剂是前述组合物中的任一种,其还包含一种或多种附加的组分。

[0140] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA酶H机制和RNAi机制降解靶转录物,例如RNA。

[0141] 在一些实施方案中,脂质部分与PNPLA3寡核苷酸的缀合改善了寡核苷酸的至少一种性质。在一些实施方案中,改善的性质包括增加的活性(例如,增加的指导靶基因或其基

因产物的表达和/或水平的降低、和/或指导单链RNA干扰、和/或指导RNA酶H介导的敲低的能力)和/或改善的组织分布。在一些实施方案中,组织是肌肉组织。在一些实施方案中,组织是骨骼肌、腓肠肌、三头肌、心脏或隔膜。在一些实施方案中,改善的性质包括降低的hTLR9激动剂活性。在一些实施方案中,改善的性质包括hTLR9拮抗剂活性。在一些实施方案中,改善的性质包括增加的hTLR9拮抗剂活性。

[0142] 一般来讲,如本文所述的寡核苷酸组合物的性质可以使用任何适当的测定进行评估。

[0143] 本领域技术人员将意识到并且/或者将能够容易地开发用于特定寡核苷酸组合物的适当测定。

[0144] 定义

[0145] 如本文所用,除非另外指明,否则应用以下定义。出于本公开的目的,化学元素根据元素周期表(Periodic Table of the Elements,CAS版本)和Handbook of Chemistry and Physics,第75版来鉴定。此外,有机化学的一般原理描述于"Organic Chemistry",Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999,和"March's Advanced Organic Chemistry",第5版,Smith,M.B.和March,J.编,John Wiley&Sons,New York:2001。

[0146] 如本文在说明书中所用,"一个(a)"或"一种(an)"可意指一个(种)或多个(种)。如本文在权利要求中所用,当与词语"包括/包含(comprising)"结合使用时,词语"一个"或"一种"可意指一个(种)或多于一个(种)。如本文所用,"另一个(种)"可以指至少第二个(种)或更多个(种)。

[0147] 术语"约"是指表示其所指的标称值的正负10%的近似值,或者在一个实施方案中,正负5%的近似值,或者在另一实施方案中,正负2%的近似值。对于本公开的领域,此近似值的水平是合适的,除非特别说明所述值要求更严格的范围。

[0148] 脂族:如本文所用,"脂族"意指完全饱和或含有一个或多个不饱和单元的直链(即,无支链)或支链的取代或未取代的烃链,或者完全饱和或含有一个或多个不饱和单元(但不包括芳族单元)的取代或未取代的单环、双环或多环烃环,或者其组合。在一些实施方案中,脂族基团含有1-50个脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基团含有1-20个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-10个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-9个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-8个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-7个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-6个脂族碳原子。在其他实施方案中,脂族基团含有1-5个脂族碳原子,并且在又其他实施方案中,脂族基团含有1、2、3或4个脂族碳原子。合适的脂族基团包括但不限于直链或支链的取代或未取代的烷基、烯基、炔基以及其杂合物,诸如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0149] 烯基:如本文所用,术语"烯基"是指具有一个或多个双键的如本文所定义的烷基。

[0150] 烷基:如本文所用,术语"烷基"具有其在本领域中通常的含义,并且可以包括饱和的脂族基团,包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在一些实施方案中,烷基具有1-100个碳原子。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有约1-20个碳原子(例如,对于直链是C_1-C_{20},对于支链是C_2-C_{20}),并且另选地具有约1-10个碳原子。在一些实施方案中,环烷基环在其环结构中具有约3-10个碳原

子,其中此类环是单环、双环或多环,并且另选地在所述环结构中具有约5、6或7个碳。在一些实施方案中,烷基可以是低级烷基,其中低级烷基包含1-4个碳原子(例如,对于直链低级烷基是C_1-C_4)。

[0151] 炔基:如本文所用,术语"炔基"是指具有一个或多个三键的如本文所定义的烷基。

[0152] 反义:如本文所用,术语"反义"是指具有与能够和其杂交的靶核酸互补或基本上互补的碱基序列的寡核苷酸或其他核酸的特征。在一些实施方案中,靶核酸是靶基因mRNA。在一些实施方案中,杂交对于一种活性是必需的或导致一种活性,例如,靶核酸或其基因产物的水平、表达或活性的降低。如本文所用,术语"翻译寡核苷酸"是指与靶核酸互补的寡核苷酸。在一些实施方案中,反义寡核苷酸能够指导靶核酸或其基因产物的水平、表达或活性的降低。在一些实施方案中,反义寡核苷酸能够通过涉及RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰的机制来指导靶核酸或其基因产物的水平、表达或活性的降低。

[0153] 大约:如本文所用,除非另外陈述或另外根据上下文显而易见,否则关于某一数值的术语"大约"或"约"通常视为包括在任一方向(大于或小于)上落在所述数值的5%、10%、15%或20%的范围内的数值(不同的是此类数值将小于可能值的0%或超过可能值的100%的情况)。在一些实施方案中,关于剂量的术语"约"的使用意指±5mg/kg/天。

[0154] 芳基:如本文所用,单独或作为较大部分如"芳烷基"、"芳烷氧基"或"芳氧基烷基"的一部分使用的术语"芳基"是指具有总计五个至三十个环成员的单环、双环或多环环系统,其中所述系统中的至少一个环是芳族。在一些实施方案中,芳基是具有总计五至十四个环成员的单环、双环或多环环系统,其中所述系统中的至少一个环是芳族并且其中所述系统中的每个环含有3至7个环成员。在一些实施方案中,芳基是联芳基。术语"芳基"与术语"芳基环"可互换使用。在本公开的某些实施方案中,"芳基"是指可携带一个或多个取代基的芳族环系统,其包括但不限于苯基、联苯、萘基、联萘、蒽基等。在如本文所用的术语"芳基"的范围内也包括其中芳族环稠合于一个或多个非芳族环的基团,诸如茚满基、邻苯二甲酰亚胺基、萘酰亚胺基、菲啶基或四氢萘基等。

[0155] 特征部分:如本文所用,短语蛋白质或多肽的"特征部分"是含有一段连续氨基酸或共同作为蛋白质或多肽的特征的多段连续氨基酸的集合的部分。每个此类连续段一般将含有至少两个氨基酸。一般来说,特征部分是除上文指定的序列同一性之外,也与相关完整蛋白质共享至少一种功能特征的部分。

[0156] 特征结构元件:术语"特征结构元件"或"结构元件"是指存在于多肽、小分子或核酸家族的所有成员中并因此可被本领域普通技术人员用于定义所述家族的成员的独特结构元件。在一些实施方案中,单链RNAi剂的结构元件包括但不限于:5'-末端结构、5'-末端区域、5'核苷酸部分、种子区域、种子后区域、3'-末端区域、3'-末端二核苷酸、3'帽、修饰样式、主链中的立体化学样式、附加的化学部分等。

[0157] 可比的:术语"可比的"在本文中用于描述彼此足够类似以允许比较获得的结果或观察到的现象的两组(或更多组)条件或情况。在一些实施方案中,多组可比条件或情况的特征在于多种基本上相同的特征和一种或少数不同特征。本领域普通技术人员将了解,当多组条件的特征在于足够数目和类型的基本上相同的特征时,所述多组条件是彼此可比的以保证得出以下合理结论:在不同组条件或情况下获得的结果或观察到的现象的差异是由那些不同特征的变化引起或指示那些不同特征的变化。

[0158] 脂环族:术语“脂环族(cycloaliphatic)”、“碳环(carbocycle)”、“碳环基(carbocyclyl)”、“碳环基(carbocyclic radical)”和“碳环(carbocyclic ring)”可互换使用,并且如本文所用,是指本文所述的除非另外指明否则具有3至30个环成员的饱和的或部分不饱和的但非芳族的环状脂族单环、双环或多环环系统。脂环族基团包括不限于环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基、环庚烯基、环辛基、环辛烯基、降冰片基、金刚烷基和环辛二烯基。在一些实施方案中,脂环族基团具有3-6个碳。在一些实施方案中,脂环族基团是饱和的并且是环烷基。术语“脂环族”也可以包括稠合至一个或多个芳族或非芳族环(诸如十氢萘基或四氢萘基)的脂族环。在一些实施方案中,脂环族基团是双环。在一些实施方案中,脂环族基团是三环。在一些实施方案中,脂环族基团是多环。在一些实施方案中,“脂环族”是指C_3-C_6单环烃,或者C_8-C_{10}双环或多环烃,其完全饱和或含有一个或多个不饱和但不是芳族的单元,其具有与分子其余部分的单个连接点,或者C_9-C_{16}多环烃,其完全饱和或含有一个或多个不饱和但不是芳族的单元,其具有与分子其余部分的单个连接点。

[0159] 杂脂族:如本文所用,术语“杂脂族”具有其在本领域中通常的含义,并且是指本文所述的其中一个或多个碳原子独立地被一个或多个杂原子(例如,氧、氮、硫、硅、磷等)替代的脂族基团。在一些实施方案中,选自C、CH、CH_2和CH_3的一个或多个单元独立地被一个或多个杂原子(包括其氧化和/或取代形式)替代。在一些实施方案中,杂脂族基团是杂烷基。在一些实施方案中,杂脂族基团是杂烯基。

[0160] 杂烷基:如本文所用,术语“杂烷基”具有其在本领域中通常的含义,并且是指本文所述的其中一个或多个碳原子独立地被一个或多个杂原子(例如,氧、氮、硫、硅、磷等)替代的烷基。杂烷基的实例包括但不限于烷氧基、聚(乙二醇)-、烷基取代的氨基、四氢呋喃基、哌啶基、吗啉基等。

[0161] 杂芳基:如本文所用,单独或作为较大部分(例如“杂芳烷基”或“杂芳烷氧基”)的一部分使用的术语“杂芳基”和“杂芳-”是指具有总计五个至三十个环成员的单环、双环或多环环系统,其中所述系统中的至少一个环是芳族并且至少一个芳族环原子是杂原子。在一些实施方案中,杂芳基是具有5至10个环原子的基团(即,单环、双环或多环),在一些实施方案中,是具有5、6、9或10个环原子的基团。在一些实施方案中,杂芳基具有在环状阵列中共享的6、10或14个π电子;并且除碳原子之外,还具有一至五个杂原子。杂芳基包括但不限于,噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吲嗪基、嘌呤基、萘啶基以及喋啶基。在一些实施方案中,杂芳基是杂联芳基,诸如联吡啶基等。如本文所用,术语“杂芳基”和“杂芳-”还包括其中杂芳族环稠合至一个或多个芳基、脂环族或杂环基环的基团,其中连接基团或连接点在杂芳族环上。非限制性实例包括吲哚基、异吲哚基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、吲唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、酞嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、4H-喹嗪基、咔唑基、吖啶基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基以及吡啶并[2,3-b]-1,4-噁嗪-3(4H)-酮。杂芳基可以是单环、双环或多环的。术语“杂芳基”可与术语“杂芳基环”、“杂芳基基团”或“杂芳族”互换使用,这些术语中的任一个都包括任选取代的环。术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基,其中所述烷基和杂芳基部分独立地是任选取代的。

[0162] 杂原子:如本文所用,术语“杂原子”意指不是碳或氢的原子。在一些实施方案中,杂原子是氧、硫、氮、磷或硅(包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式;或杂环的可取代氮(例如3,4-二氢-2H-吡咯基中的N)、NH(如在吡咯烷基中)或NR^+(如在N-取代的吡咯烷基中)等)。

[0163] 杂环:如本文所用,术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基(heterocyclyl)”、“杂环基(heterocyclic radical)”和“杂环(heterocyclic ring)”可互换使用,并且是指饱和的或部分不饱和的并且具有一个或多个杂原子环原子的单环、双环或多环部分(例如3-30元)。在一些实施方案中,杂环基是稳定的5至7元单环或7至10元双环杂环部分,其是饱和或部分不饱和的,并且除了碳原子之外,具有一个或多个、优选一至四个如上所定义的杂原子。当涉及杂环的环原子使用时,术语“氮”包括取代的氮。举例来说,在具有0-3个选自氧、硫和氮的杂原子的饱和或部分不饱和的环中,氮可以是N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或$^+$NR(如在N-取代的吡咯烷基中)。杂环可以在产生稳定结构的任何杂原子或碳原子处连接至其侧基,并且任何环原子都可以是任选取代的。此类饱和或部分不饱和的杂环基的实例包括但不限于四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、哌啶基、吡咯啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、噁唑烷基、哌嗪基、二噁烷基、二氧杂戊环烷基、二氮呼基、氧氮呼基、硫氮呼基、吗啉基和奎宁环基。术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基(heterocyclyl)”、“杂环基环(heterocyclyl ring)”、“杂环基团(heterocyclic group)”、“杂环部分(heterocyclic moiety)”和“杂环基(heterocyclic radical)”在本文中可互换使用,并且也包括其中杂环基环稠合至一个或多个芳基、杂芳基或脂环族环的基团,诸如吲哚啉基、3H-吲哚基、苯并二氢吡喃基、菲啶基或四氢喹啉基。杂环基可以是单环、双环或多环的。术语“杂环基烷基”是指被杂环基取代的烷基,其中所述烷基和杂环基部分独立地是任选取代的。

[0164] 低级烷基:术语“低级烷基”是指C_{1-4}直链或支链烷基。示例性低级烷基是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。

[0165] 低级卤代烷基:术语“低级卤代烷基”是指被一个或多个卤基原子取代的C_{1-4}直链或支链烷基。

[0166] 任选取代的:如本文所述,本公开的化合物(例如寡核苷酸)可以含有任选取代的和/或取代的部分。一般来说,术语“取代的”,无论之前是否有术语“任选”,都是指指定部分的一个或多个氢被合适的取代基替代。除非另外指明,否则“任选取代的”基团可在基团的每个可取代位置处具有合适的取代基,并且当任何给定结构中的多于一个位置可用选自指定基团的多于一个取代基取代时,所述取代基在每个位置处可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,任选取代的基团是未取代的。由本公开所设想的取代基的组合优选地是导致形成稳定的或化学上可行的化合物的那些。如本文所用,术语“稳定的”是指在经受允许它们生产、检测以及在某些实施方案中允许它们回收、纯化并用于本文公开的一种或多种目的的条件时基本上不会改变的化合物。

[0167] 在可取代原子(例如合适的碳原子)上的合适的单价取代基独立地是卤素;$-(CH_2)_{0-4}R^o$;$-(CH_2)_{0-4}OR^o$;$-O(CH_2)_{0-4}R^o$;$-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$;$-(CH_2)_{0-4}CH(OR^o)_2$;被R^o取代的$-(CH_2)_{0-4}Ph$;被R^o取代的$-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$;被$R^o$取代的-CH=CHPh;可以被$R^o$取代的$-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$-吡啶基;$-NO_2$-CN;$-N_3$;$-(CH_2)_{0-4}N(R^o)_2$;$-(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)R^o$;$-N(R^o)C(S)$

R^o;-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)NR^o_2$;-$N(R^o)C(S)NR^o_2$;-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)OR^o$;-$N(R^o)N(R^o)C(O)R^o$;-$N(R^o)N(R^o)C(O)NR^o_2$;-$N(R^o)N(R^o)C(O)OR^o$;-$(CH_2)_{0-4}C(O)R^o$;-$C(S)R^o$;-$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$;-$(CH_2)_{0-4}C(O)SR^o$;-$(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^o_3$;-$(CH_2)_{0-4}OC(O)R^o$;-$OC(O)(CH_2)_{0-4}SR$;-$SC(S)SR^o$;-$(CH_2)_{0-4}SC(O)R^o$;-$(CH_2)_{0-4}C(O)NR^o_2$;-$C(S)NR^o_2$;-$C(S)SR^o$;-$SC(S)SR^o$;-$(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^o_2$;-$C(O)N(OR^o)R^o$;-$C(O)C(O)R^o$;-$C(O)CH_2C(O)R^o$;-$C(NOR^o)R^o$;-$(CH_2)_{0-4}SSR^o$;-$(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^o$;-$(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^o$;-$(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^o$;-$S(O)_2NR^o_2$;-$(CH_2)_{0-4}S(O)R^o$;-$N(R^o)S(O)_2NR^o_2$;-$N(R^o)S(O)_2R^o$;-$N(OR^o)R^o$;-$C(NH)NR^o_2$;-$Si(R^o)_3$;-$OSi(R^o)_3$;-$B(R^o)_2$;-$OB(R^o)_2$;-$OB(OR^o)_2$;-$P(R^o)_2$;-$P(OR^o)_2$;-$OP(R^o)_2$;-$OP(OR^o)_2$;-$P(O)(R^o)_2$;-$P(O)(OR^o)_2$;-$OP(O)(R^o)_2$;-$OP(O)(OR^o)_2$;-$OP(O)(OR^o)(SR^o)$;-$SP(O)(R^o)_2$;-$SP(O)(OR^o)_2$;-$N(R^o)P(O)(R^o)_2$;-$N(R^o)P(O)(OR^o)_2$;-$P(R^o)_2[B(R^o)_3]$;-$P(OR^o)_2[B(R^o)_3]$;-$OP(R^o)_2[B(R^o)_3]$;-$OP(OR^o)_2[B(R^o)_3]$;-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$O-N(R^o)_2$;或-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$C(O)O-N(R^o)_2$,其中每个$R^o$可以如以下所定义地被取代并且独立地是氢,$C_{1-20}$脂族,具有1-5个独立地选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的C_{1-20}杂脂族,-CH_2-(C_{6-14}芳基),-$O(CH_2)_{0-1}$(C_{6-14}芳基),-CH_2-(5-14元杂芳基环),5-20元单环、双环或多环,具有0-5个独立地选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的饱和的、部分不饱和的或芳基环,或者尽管有上述定义,但两个独立出现的R^o及其居间原子一起形成具有0-5个独立地选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的5-20元单环、双环或多环的、饱和的、部分不饱和的或芳基环,其可以如以下所定义地被取代。

[0168] R^o(或两个独立出现的R^o及其中间原子一起形成的环)上的合适的单价取代基独立地为卤素、-$(CH_2)_{0-2}R^\bullet$、-(卤代$R^\bullet$)、-$(CH_2)_{0-2}OH$、-$(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$、-O(卤代$R^\bullet$)、-CN、-$N_3$、-$(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}C(O)OH$、-$(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}SH$、-$(CH_2)_{0-2}NH_2$、-$(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$、-$(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$、-$NO_2$、-$SiR^\bullet_3$、-$OSiR^\bullet_3$、-$C(O)SR^\bullet$、-($C_{1-4}$直链或支链亚烷基)$C(O)OR^\bullet$或-$SSR^\bullet$,其中每个$R^\bullet$是未取代的或当之前有"卤代"时仅被一个或多个卤素取代,并且独立地选自C_{1-4}脂族,-CH_2Ph,-$O(CH_2)_{0-1}Ph$,以及具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元饱和的、部分不饱和的或芳基环。R^o的饱和碳原子上的合适的二价取代基包括=O和=S。

[0169] 例如在合适的碳原子上的合适的二价取代基独立地是以下:=O、=S、=NNR^*_2、=$NNHC(O)R^*$、=$NNHC(O)OR^*$、=$NNHS(O)_2R^*$、=NR^*、=NOR^*、-$O(C(R^*_2))_{2-3}O$-或-$S(C(R^*_2))_{2-3}S$-,其中每个独立出现的R^*选自氢,可如以下所定义地被取代的C_{1-6}脂族,以及具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的未取代的5-6元饱和的、部分不饱和的或芳基环。与"任选取代的"基团的邻位可取代碳结合的合适的二价取代基包括:-$O(CR^*_2)_{2-3}O$-,其中每个独立出现的R^*选自氢,可如以下所定义地被取代的C1-6脂族,以及具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的未取代的5-6元饱和的、部分不饱和的或芳基环。

[0170] R^*的脂族基团上的合适的取代基独立地是卤素、-$R^\bullet$、-(卤代$R^\bullet$)、-OH、-$OR^\bullet$、-O(卤代$R^\bullet$)、-CN、-C(O)OH、-$C(O)OR^\bullet$、-NH_2、-$NHR^\bullet$、-$NR^\bullet_2$或-NO_2,其中每个$R^\bullet$是未取代的或在之前有"卤代"时仅被一个或多个卤素取代,并且独立地是C_{1-4}脂族,-CH_2Ph,-$O(CH_2)_{0-1}Ph$,或者具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元饱和的、部分不饱的和或芳基环。

[0171] 部分不饱和:如本文所用,术语"部分不饱和"是指包括至少一个双键或三键的环部分。术语"部分不饱和"意图涵盖具有多个不饱和位点的环,而不意图包括如本文所定义的芳基或杂芳基部分。

[0172] RNA干扰:如本文所用,术语“RNA干扰”或“RNAi”是指涉及RISC(RNA诱导的沉默复合物)的转录后靶向基因沉默过程。据报道,当核糖核酸酶III(Dicer)将较长的dsRNA切割成较短的片段(称为siRNA)时,自然发生RNAi的过程。天然产生的siRNA(小干扰RNA)长度通常为约21至23个核苷酸,具有约19个碱基对双链体和两个单链突出端,并且通常是RNA。然后据报道,这些RNA片段指导靶核酸(诸如mRNA或前mRNA)的降解。据报道,Dicer还牵涉从具有保守结构的前体RNA中切除牵涉翻译控制的21和22个核苷酸的小时序RNA(stRNA)。Hutvagner等2001,Science,293,834。本领域技术人员意识到,RNAi可以由单链或双链寡核苷酸介导,所述单链或双链寡核苷酸包括与靶序列(例如,在靶mRNA中)互补或基本上互补的序列。因此,在本公开的一些实施方案中,如本文所述的单链寡核苷酸可以充当RNAi剂;在一些实施方案中,如本文所述的双链寡核苷酸可以充当RNAi剂。在一些实施方案中,RNAi反应涉及核酸内切酶复合物,通常称为RNA诱导的沉默复合物(RISC),其指导与siRNA的反义链互补的单链mRNA的切割。在一些实施方案中,RISC指导与所提供的寡核苷酸互补的靶RNA的切割,所述寡核苷酸可以用作单链RNAi剂。在一些实施方案中,靶RNA的切割发生在与siRNA双链体或单链RNAi剂的反义链互补的区域的中间。在一些实施方案中,RNA干扰由单链寡核苷酸指导,所述单链寡核苷酸充当单链RNAi剂,其可以在涉及RISC途径的机制中指导RNA干扰。

[0173] RNAi剂:如本文所用,术语“RNAi剂”、“iRNA剂”等是指当向其中正在表达或已经表达靶基因产物(例如,靶基因的转录物,诸如前mRNA或mRNA)的系统施用时,降低所述靶基因产物的水平和/或活性(例如,翻译)的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,RNAi剂可以是或包含单链寡核苷酸或双链寡核苷酸。在一些实施方案中,RNAi剂可具有本领域公认的结构,如siRNA(短抑制RNA)、shRNA(短或小发夹RNA)、dsRNA(双链RNA)、微小RNA等。在一些实施方案中,RNAi剂可以特异性地与RNA靶标(例如,靶标基因的转录物)结合。在一些实施方案中,在与其靶标结合后,则RNAi剂被加载至RISC(RNA诱导的沉默复合物)。在一些实施方案中,RNAi剂在一些实施方案中通过涉及RISC(RNA诱导的沉默复合物)途径的机制指导其靶标的降解和/或抑制其靶标的翻译。在一些实施方案中,RNAi剂是激活RISC复合物/途径的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,RNAi剂包含反义链序列。在一些实施方案中,RNAi剂仅包含一条寡核苷酸链(例如,是单链寡核苷酸)。在一些实施方案中,单链RNAi剂寡核苷酸可以是或包含有义或反义链序列,如Sioud 2005J.Mol.Biol.348:1079-1090。在一些实施方案中,RNAi剂是能够指导RNA干扰的化合物。在一些实施方案中,RNAi剂可具有如存在于“规范的”siRNA结构中的结构或格式)。在一些实施方案中,RNAi剂可具有与“规范的”siRNA结构不同的结构。仅举几个例子,在一些实施方案中,RNAi剂可以比规范更长或更短,可以是平末端的,并且/或者可以包含一个或多个修饰、错配、空位和/或核苷酸替代。在一些实施方案中,RNAi剂含有如本公开中所述的3'-末端帽。不希望受任何特定理论的束缚,申请人提出,在某些实施例中,3'-末端帽可以允许两个功能:(1)允许RNA干扰;和(2)增加RNAi剂的活性持续时间和/或生物学半衰期(这可以例如通过增加与Dicer和/或一种或多种Ago蛋白的PAZ结构域的结合来实现)和/或减少或防止RNAi剂的降解(例如,通过核酸酶,诸如血清或肠液中的那些核酸酶)。在一些实施方案中,本公开的RNAi剂靶向(例如,结合、退火等)靶mRNA。在一些实施方案中,将RNAi剂暴露于其靶标导致活性、水平和/或表达的降低,例如靶标的“敲低”或“敲除”。特别地,在一些实施方案中,在以靶基因的过表达和/或过

度活跃为特征的疾病、病症和/或病状的情况下,向细胞、组织或受试者施用RNAi剂充分敲低靶基因以恢复正常活性水平或将活性降低至可以减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、病症和/或病状、延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或多种症状或特征的发生的水平。在一些实施方案中,RNAi剂是双链的,其包含反义链,所述反义链是如本文所述的单链RNAi剂,其与有义链组合可以指导RNA干扰。

[0174] 单链RNA干扰:如本文所用,短语“单链RNAi”或“单链RNA干扰”等是指至少部分地通过向系统(例如,细胞、组织、器官、受试者等)施用单链RNAi剂指导的基因沉默的过程或方法,其中RNAi将由RNAi剂指导,并且需要RISC途径。所述术语在本文中在某些情况下可用于与“双链RNAi”或“双链RNA干扰”区分,其中双链RNAi剂施用于系统并且可以进一步处理,例如使得将其两条链中的一条加载到RISC来例如抑制翻译、切割靶RNA等。

[0175] 单链RNAi剂:如本文所用,短语“单链RNAi剂”是指可以通过RISC途径指导单链RNA干扰(RNAi或iRNA)基因沉默的单链寡核苷酸。单链RNAi剂可包括一种或多种单链核苷酸的聚合物。

[0176] 受试者:如本文所用,术语“受试者”或“测试受试者”是指根据本发明,例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的向其施用所提供的化合物或组合物的任何生物体。典型受试者包括动物(例如哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人;昆虫;蠕虫;等)和植物。在一些实施方案中,受试者可罹患和/或易感疾病、病症和/或病状。

[0177] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指表现总体或接近总体范围或程度的目标特征或性质的定性情况。与第二序列基本上互补的碱基序列与第二序列不相同,但是与第二序列大部分或几乎相同。此外,生物学领域的普通技术人员将理解生物学和化学现象很少(如果曾发生)达到完全和/或进行至完全或者达成或避免绝对结果。因此,术语“基本上”在本文中用于获取许多生物学和/或化学现象中固有的潜在完全性的缺乏。

[0178] 罹患:“罹患”疾病、病症和/或病状的个体已被诊断有和/或表现出疾病、病症和/或病状的一种或多种症状。

[0179] 易感:“易感”疾病、病症和/或病状的个体是发展所述疾病、病症和/或病状的风险高于公众成员的个体。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体可尚未被诊断有所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体可表现所述疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体可不表现所述疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体将发展所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病状的个体将不发展所述疾病、病症和/或病状。

[0180] 全身性:如本文所用,短语“全身性施用(systemic administration)”、“全身性施用(administered systemically)”、“外周施用(peripheral administration)”和“外周施用(administered peripherally)”具有其在本领域中理解的含义,是指施用化合物或组合物以使其进入接受者的系统。

[0181] 治疗剂:如本文所用,短语“治疗剂”是指当向受试者施用时具有治疗作用和/或引发所需生物学和/或药理学作用的任何药剂。在一些实施方案中,治疗剂是可用于减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、病症和/或病状、延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或多种症状或特征的发生的任何物质。

[0182] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”是指物质(例如,治疗剂、组合物和/或制剂)在作为治疗方案的一部分施用时引发所需生物学反应的量。在一些实施方案中,物质的治疗有效量是当向罹患或易感疾病、病症和/或病状的受试者施用时足以治疗、诊断、预防所述疾病、病症和/或病状和/或延迟其发作的量。如本领域普通技术人员将了解的,物质的有效量可以根据诸如所需的生物学终点、待递送的物质、靶细胞或组织等因素而变化。例如,制剂中治疗疾病、病症和/或病状的化合物的有效量是减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、病症和/或病状、延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或多种症状或特征的发生的量。在一些实施方案中,治疗有效量以单剂量施用;在一些实施方案中,需要多个单位剂量来递送治疗有效量。

[0183] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treat、treatment或treating)”是指用于部分或完全减轻、改善、缓和、抑制、预防疾病、病症和/或病状、延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其一种或多种症状或特征的发生的任何方法。治疗可向未表现疾病、病症和/或病状的病征的受试者施用。在一些实施方案中,治疗可向仅表现疾病、病症和/或病状的早期病征的受试者施用,例如以达成降低发展与所述疾病、病症和/或病状相关的病变的风险的目的。

[0184] 不饱和:如本文所用,术语“不饱和”意指一个部分具有一个或多个不饱和单元。

[0185] 野生型:如本文所用,术语“野生型”具有其在本领域中理解的含义,是指具有如在“正常”(与突变、患病、改变等相对)状态或背景下存在于自然界中的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将了解野生型基因和多肽常以多种不同形式(例如,等位基因)存在。

[0186] 核酸:如本文所用,术语“核酸”包括任何核苷酸及其聚合物。如本文所用,术语“多核苷酸”是指任何长度的聚合形式的核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA))。这些术语是指分子的一级结构,并且因此包括双链和单链DNA以及双链和单链RNA。这些术语包括由修饰的核苷酸和/或修饰的多核苷酸(诸如但不限于甲基化、受保护的和/或加帽的核苷酸或多核苷酸)制得的RNA或DNA的类似物作为等效物。所述术语涵盖多核糖核苷酸或寡核糖核苷酸(RNA)和多脱氧核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸(DNA);衍生自核碱基和/或修饰的核碱基的N-糖苷或C-糖苷的RNA或DNA;衍生自糖和/或修饰的糖的核酸;以及衍生自磷酸酯桥和/或修饰的核苷酸间键联的核酸。所述术语涵盖含有核碱基、修饰的核碱基、糖、修饰的糖、磷酸酯桥或修饰的核苷酸间键联的任何组合的核酸。实例包括并且不限于含有核糖部分的核酸、含有脱氧核糖部分的核酸、含有核糖与脱氧核糖部分两者的核酸、含有核糖和修饰的核糖部分的核酸。除非另外指明,否则前缀多是指核酸含有2至约10,000个核苷酸单体单元,并且其中前缀寡是指核酸含有2至约200个核苷酸单体单元。

[0187] 核苷酸:如本文所用,术语“核苷酸”是指由杂环碱基、糖和一个或多个核苷酸间键联组成的多核苷酸的单体单元。天然存在的碱基(鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U))是嘌呤或嘧啶的衍生物,但应理解也包括天然和非天然存在的碱基类似物。天然存在的糖是戊糖(五碳糖)脱氧核糖(其形成DNA)或核糖(其形成RNA),但应理解也包括天然和非天然存在的糖类似物。核苷酸通过核苷酸间键联连接以形成核酸或多核苷酸。许多核苷酸间键联在本领域中是已知的(诸如但不限于磷酸酯、硫代磷酸酯、硼代磷酸酯等)。人工核酸包括PNA(肽核酸)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、H-膦酸酯、氨基磷酸酯、硼代磷酸酯、甲基膦酸酯、膦酰基乙酸酯、硫代膦酰基乙酸酯和天然核酸的磷酸酯主链的其他变

体,如本文所述的那些。在一些实施方案中,天然核苷酸包含天然存在的碱基、糖和核苷酸间键联。如本文所用,术语“核苷酸”还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,诸如修饰的核苷酸和核苷酸类似物。

[0188] 修饰的核苷酸:术语“修饰的核苷酸”包括在结构上与天然核苷酸不同但能够执行天然核苷酸的至少一种功能的任何化学部分。在一些实施方案中,修饰的核苷酸在糖、碱基和/或核苷酸间键联处包含修饰。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含修饰的糖、修饰的核碱基和/或修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,修饰的核苷酸能够具有核苷酸的至少一种功能,例如在聚合物中形成能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的亚基。

[0189] 类似物:术语“类似物”意指任何功能性类似物,其中的化学部分在结构上与参考化学部分或部分类别不同但能够执行这种参考化学部分或部分类别的至少一种功能。作为非限制性实例,核苷酸类似物在结构上与核苷酸不同,但执行核苷酸的至少一种功能;核碱基类似物在结构上与核碱基不同,但执行核碱基的至少一种功能;等。

[0190] 核苷:术语“核苷”是指其中核碱基或修饰的核碱基与糖或修饰的糖共价结合的部分。

[0191] 修饰的核苷:术语“修饰的核苷”是指衍生自或化学上类似于天然核苷的部分,但是其包含将其与天然核苷区分开的化学修饰。修饰的核苷的非限制性实例包括在碱基和/或糖处包含修饰的那些核苷。修饰的核苷的非限制性实例包括在糖处具有2’修饰的那些核苷。修饰的核苷的非限制性实例还包括无碱基核苷(其缺乏核碱基)。在一些实施方案中,修饰的核苷能够具有核苷的至少一种功能,例如在聚合物中形成能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的部分。

[0192] 核苷类似物:术语“核苷类似物”是指在化学上与天然核苷不同但能够执行核苷的至少一种功能的化学部分。在一些实施方案中,核苷类似物包含糖的类似物和/或核碱基的类似物。在一些实施方案中,修饰的核苷能够具有核苷的至少一种功能,例如在聚合物中形成能够与包含互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的部分。

[0193] 糖:术语“糖”是指呈闭合和/或打开形式的单糖或多糖。在一些实施方案中,糖是单糖。在一些实施方案中,糖是多糖。糖包括但不限于核糖、脱氧核糖、呋喃戊糖、吡喃戊糖和吡喃己糖部分。如本文所用,术语“糖”还涵盖用于代替常规糖分子的结构类似物,诸如二醇、形成核酸类似物的主链的聚合物、二醇核酸(“GNA”)等。如本文所用,术语“糖”还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,诸如修饰的糖和核苷酸糖。

[0194] 修饰的糖:术语“修饰的糖”是指可替代糖的部分。修饰的糖模拟糖的空间排列、电子性质或某一其他物理化学性质。

[0195] 核碱基:术语“核碱基”是指涉及使一个核酸链以序列特异性方式与另一个互补链结合的氢键结的核酸的部分。最常见的天然存在的核碱基是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。在一些实施方案中,天然存在的核碱基是修饰的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,天然存在的核碱基是甲基化腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,核碱基是“修饰的核碱基”,例如除腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)以外的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基是甲基化腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案

中,修饰的核碱基模拟核碱基的空间排列、电子性质或某一其他物理化学性质,并且保留使一个核酸链以序列特异性方式与另一个核酸链结合的氢键结的性质。在一些实施方案中,修饰的核碱基可与全部五种天然存在的碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤)配对,而基本上不影响解链行为、由细胞内酶的识别或寡核苷酸双链体的活性。如本文所用,术语"核碱基"还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,诸如修饰的核碱基和核碱基类似物。

[0196] 修饰的核碱基:术语"修饰的核碱基"、"修饰的碱基"等是指在化学上与核碱基不同但能够执行核碱基的至少一种功能的化学部分。在一些实施方案中,修饰的核碱基是包含修饰的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基能够具有核碱基的至少一种功能,例如在聚合物中形成能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的部分。

[0197] 3'-末端帽:术语"3'-末端帽"是指与PNPLA3寡核苷酸(例如RNAi剂)的3'-末端结合的非核苷酸化学部分。在一些实施方案中,3'-末端帽替代了3'-末端二核苷酸。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的3'-末端帽执行以下功能中的至少一项:允许寡核苷酸指导的RNA干扰,保护寡核苷酸免于降解或降低寡核苷酸降解(例如,通过核酸酶)的量或速率,减少有义链的脱靶效应,或者增加寡核苷酸指导的RNA干扰的活性、持续时间或功效。通过将3'-末端帽描述为"非核苷酸的",意味着3'-末端帽不是与PNPLA3寡核苷酸的其余部分的糖部分连接的核苷酸部分或寡核苷酸部分,就像它是PNPLA3寡核苷酸链的一部分一样。本文描述了某些示例性3'-末端帽。本领域普通技术人员可以理解,根据本公开可以使用本领域已知的其他3'-末端帽。

[0198] 封闭基团:术语"封闭基团"是指掩蔽官能团的反应性的基团。官能团可随后通过移除封闭基团来去掩蔽。在一些实施方案中,封闭基团是保护基团。

[0199] 部分:术语"部分"是指分子的特定区段或官能团。化学部分常被认定是嵌入分子中或附接于分子的化学实体。

[0200] 固体支撑体:术语"固体支撑体"是指使得能够合成核酸的任何支撑体。在一些实施方案中,所述术语是指玻璃或聚合物,其不溶于用于执行来合成核酸的反应步骤中的介质,并且被衍生以包含反应性基团。在一些实施方案中,固体支撑体是高度交联聚苯乙烯(HCP)或可控孔度玻璃(CPG)。在一些实施方案中,固体支撑体是可控孔度玻璃(CPG)。在一些实施方案中,固体支撑体是可控孔度玻璃(CPG)和高度交联聚苯乙烯(HCP)的杂合支撑体。

[0201] 接头或连接部分:术语"接头"、"连接部分"等是指将一个化学部分与另一个连接的任何化学部分。在一些实施方案中,接头是将一个寡核苷酸与多聚体中的另一个寡核苷酸连接的部分。在一些实施方案中,接头是任选地位于末端核苷与固体支撑体之间或末端核苷与另一个核苷、核苷酸或核酸之间的部分。

[0202] 基因:如本文所用,术语"基因"、"重组基因"和"基因构建体"是指编码蛋白质或其一部分的DNA分子或DNA分子的一部分。DNA分子可含有编码蛋白质的开放阅读框(如外显子序列),并且还可包括内含子序列。如本文所用,术语"内含子"是指存在于给定基因中的不翻译成蛋白质并且在一些而非所有情况下存在于外显子之间的DNA序列。可能期望所述基因可操作地连接制(或者它可包含)一个或多个启动子、增强子、阻遏子和/或其他调控序列以调节基因的活性或表达,如本领域中所熟知的。

[0203] 互补DNA:如本文所用,“互补DNA”或“cDNA”包括通过反转录mRNA合成并且已从其中移除间插序列(内含子)的重组多核苷酸。

[0204] 寡核苷酸:术语“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物或寡聚物,并且可以含有天然和非天然核碱基、糖和核苷酸间键联的任何组合。

[0205] 寡核苷酸可以是单链或双链的。如本文所用,术语“寡核苷酸链”涵盖单链寡核苷酸。单链寡核苷酸可以具有双链区域(由单链寡核苷酸的两个部分形成),并且包含两条寡核苷酸链的双链寡核苷酸可以例如在两条寡核苷酸链彼此不互补的区域处具有单链区域。在一些实施方案中,寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。示例性寡核苷酸包括但不限于结构基因、包括控制和终止区域的基因、自我复制性系统(诸如病毒或质粒DNA)、单链和双链RNAi剂和其他RNA干扰试剂(RNAi剂或iRNA剂)、shRNA、反义寡核苷酸、核糖酶、微小RNA、微小RNA模拟物、超级微小RNA、适体、反义微小RNA、微小RNA拮抗剂、U1衔接头、成三链体寡核苷酸、G四链体寡核苷酸、RNA活化剂、免疫刺激性寡核苷酸和诱饵寡核苷酸。

[0206] 有效诱导RNA干扰的双链和单链寡核苷酸在本文中也称为RNAi剂或iRNA剂。在一些实施方案中,这些诱导RNA干扰的寡核苷酸与称为RNAi诱导的沉默复合物(RISC)的细胞质多蛋白质复合物缔合。在许多实施方案中,双链RNAi剂足够长使得它们可被内源性分子(例如被Dicer)切割,产生较小寡核苷酸,其可以进入RISC机构并且参与RISC介导的靶序列(例如,靶mRNA序列)的切割和/或翻译抑制。

[0207] 本公开的寡核苷酸可具有各种长度。在特定实施方案中,寡核苷酸的长度可在约2至约200个核苷酸的范围内。在各种相关实施方案中,单链、双链和三链寡核苷酸的长度可在约4至约10个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸、或约20至约30个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的长度是约10至约40个核苷酸。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的长度是约9至约39个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少4个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少5个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少6个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少7个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少8个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少9个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少10个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少11个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少12个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少15个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少20个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少25个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度是至少30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度是至少18个核苷酸的互补链的双链体。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度是至少21个核苷酸的互补链的双链体。在一些实施方案中,在长度上计数的每个核苷酸独立地包含选自以下的任选取代的核碱基:腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

[0208] 核苷酸间键联:如本文所用,短语“核苷酸间键联”一般是指连接PNPLA3寡核苷酸或核酸的核苷单元的键联。在一些实施方案中,核苷酸间键联是如存在于天然存在的DNA和RNA分子中的磷酸二酯键联(天然磷酸酯键联)。在一些实施方案中,术语“核苷酸间键联”包括修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,核苷酸间键联是“修饰的核苷酸间键联”,其中磷酸二酯键联的每个氧原子任选且独立地被有机或无机部分替代。在一些实施方案中,这种有机或无机部分选自但不限于=S、=Se、=NR’、-SR’、-SeR’、-N(R’)$_2$、B(R’)$_3$、-S-、-Se-和-N(R’)-,其中每个R’独立地如本公开所定义和描述。在一些实施方案中,核苷酸间键联是磷酸三酯键联、硫代磷酸二酯键联 或修饰的硫代磷酸三酯键联。

[0209] 本领域普通技术人员应了解由于在键联中存在酸或碱部分,在给定pH下,核苷酸间键联可作为阴离子或阳离子存在。

[0210] 在一些实施方案中,“全(Rp)”或“全(Sp)”用于指示寡核苷酸中的所有手性键联磷原子都分别具有相同的Rp或Sp构型。

[0211] 寡核苷酸类型:如本文所用,短语“寡核苷酸类型”用于定义具有特定碱基序列、主链键联样式(即,核苷酸间键联类型样式,例如磷酸酯、硫代磷酸酯等)、主链手性中心样式(即,键联磷立体化学样式(Rp/Sp))和主链磷修饰样式(例如,式I中的“-XLR^1”基团样式)的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,属于常见指定“类型”的寡核苷酸在结构上是彼此相同的。

[0212] 本领域技术人员将了解本公开的合成方法在PNPLA3寡核苷酸链合成过程中提供一定程度的控制,使得寡核苷酸链的各核苷酸单元可提前被设计和/或选择以具有在键联磷处的特定立体化学和/或在键联磷处的特定修饰和/或特定碱基和/或特定糖。在一些实施方案中,提前设计和/或选择PNPLA3寡核苷酸链以在键联磷处具有立体中心的特定组合。在一些实施方案中,设计和/或确定PNPLA3寡核苷酸链以在键联磷处具有修饰的特定组合。在一些实施方案中,设计和/或选择PNPLA3寡核苷酸链以具有碱基的特定组合。在一些实施方案中,设计和/或选择PNPLA3寡核苷酸链以具有一种或多种以上结构特征的特定组合。在一些实施方案中,本公开提供包含多种寡核苷酸分子或由多种寡核苷酸分子组成的组合物(例如,手性控制的寡核苷酸组合物)。在一些实施方案中,所有此类分子都属于相同类型(即,在结构上是彼此相同的)。然而,在许多实施方案中,所提供的组合物通常以预定相对量包含多种不同类型的寡核苷酸。

[0213] 手性控制:如本文所用,“手性控制”是指对PNPLA3寡核苷酸内的手性核苷酸间键联中的手性键联磷的立体化学设计的控制。在一些实施方案中,通过PNPLA3寡核苷酸的糖和碱基部分不存在的手性元件来实现控制,例如,在一些实施方案中,通过在如本公开所示的寡核苷酸制备过程中使用一种或多种手性助剂来实现控制,所述手性助剂通常是寡核苷酸制备过程中使用的手性亚磷酰胺的一部分。与手性控制相反,本领域普通技术人员了解,如果使用不使用手性助剂的常规寡核苷酸合成来形成手性核苷酸间键联,则此类常规寡核苷酸合成不能控制手性核苷酸间键联处的立体化学。在一些实施方案中,控制PNPLA3寡核苷酸内的手性核苷酸间键联中的每个手性键联磷的立体化学设计。

[0214] 手性控制的寡核苷酸组合物:如本文所用,术语“手性控制的寡核苷酸组合物”、

“手性控制的核酸组合物”等是指包含多个寡核苷酸(或核酸)的组合物,所述多个寡核苷酸(或核酸)共享1)共同的碱基序列,2)共同的主链键联样式,和3)共同的主链磷修饰样式,其中所述多个寡核苷酸(或核酸)在一个或多个手性核苷酸间键联(手性控制的核苷酸间键联)处具有相同的立体化学,并且所述组合物中多种寡核苷酸(或核酸)的水平是预定的(例如,通过手性控制的寡核苷酸制品以形成一个或多个手性核苷酸间键联)。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物中全部寡核苷酸的约1%-100%(例如,约5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80-100%、90-100%、95-100%、50%-90%,或者约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或者至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)是所述多个寡核苷酸。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物中共享共同的碱基序列的全部寡核苷酸的约1%-100%(例如,约5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80-100%、90-100%、95-100%、50%-90%,或者约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或者至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)是所述多个寡核苷酸。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸组合物中共享共同的碱基序列、共同的主链键联样式和共同的主链磷修饰样式的全部寡核苷酸的约1%-100%(例如,约5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80-100%、90-100%、95-100%、50%-90%,或者约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或者至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)是所述多个寡核苷酸。在一些实施方案中,预定水平是组合物中的全部寡核苷酸,或者组合物中共享共同的碱基序列的全部寡核苷酸(例如,多个寡核苷酸或PNPLA3寡核苷酸类型),或者组合物中共享共同的碱基序列、共同的主链键联样式和共同的主链磷修饰样式作为所述多个寡核苷酸的全部寡核苷酸,或者组合物中共享共同的碱基序列、共同的碱基修饰样式、共同糖修饰样式、共同的核苷酸间键联类型样式和/或共同的核苷酸间键联修饰样式的全部寡核苷酸的约1%-100%(例如,约5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80-100%、90-100%、95-100%、50%-90%,或者约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,或者至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)。在一些实施方案中,多个寡核苷酸在约1-50个(例如,约1-10、1-20、5-10、5-20、10-15、10-20、10-25、10-30个,或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个,或者至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)手性核苷酸间键联处共享相同的立体化学。在一些实施方案中,多个寡核苷酸在约1%-100%(例如,约5%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80-100%、90-100%、95-100%、50%-90%,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、

45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％，或者至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％)的手性核苷酸间键联处共享相同的立体化学。在一些实施方案中，每个手性核苷酸间键联都是手性控制的核苷酸间键联，并且所述组合物是完全手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，不是所有的手性核苷酸间键联都是手性控制的核苷酸间键联，并且所述组合物是部分手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含预定水平的单个寡核苷酸或核酸类型。例如，在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含多于一种寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物包含多种寡核苷酸类型。在一些实施方案中，手性控制的寡核苷酸组合物是寡核苷酸类型的寡核苷酸的组合物，所述组合物包含预定水平的多种寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[0215] 手性纯：如本文所用，短语“手性纯”用于描述PNPLA3寡核苷酸(如单链RNAi剂)的相对量，其中所有寡核苷酸都关于键联磷以单一非对映异构形式存在。

[0216] 手性均一：如本文所用，短语“手性均一”用于描述PNPLA3寡核苷酸分子或类型，其中所有核苷酸单元都在键联磷处具有相同的立体化学。例如，核苷酸单元都在键联磷处具有Rp立体化学的PNPLA3寡核苷酸是手性均一的。同样，核苷酸单元都在键联磷处具有Sp立体化学的PNPLA3寡核苷酸是手性均一的。

[0217] 预定：预定意指蓄意选择的，例如与随机发生或在没有控制的情况下实现相反。阅读本说明书的本领域普通技术人员将了解，本公开提供了允许选择待掺入寡核苷酸组合物中的特定化学和/或立体化学特征的技术，并且还允许受控制备具有此类化学和/或立体化学特征的寡核苷酸组合物。此类所提供的组合物如本文所述是“预定的”。因为可含有某些寡核苷酸的组合物碰巧已通过不能被控制来有意产生特定化学和/或立体化学特征的过程产生，所以它们不是“预定”组合物。在一些实施方案中，预定组合物是可有意再产生(例如，通过重复受控过程)的组合物。在一些实施方案中，组合物中多种寡核苷酸的预定水平意指控制组合物中多种寡核苷酸的绝对量和/或相对量(比率、百分比等)。在一些实施方案中，通过手性控制的寡核苷酸制备实现组合物中多种寡核苷酸的预定水平。

[0218] 键联磷：如本文所定义，短语“键联磷”用于指示所提及的特定磷原子是核苷酸间键联中存在的磷原子，所述磷原子对应于如存在于天然存在的DNA和RNA中的核苷酸间键联的磷酸二酯的磷原子。在一些实施方案中，键联磷原子在修饰的核苷酸间键联中，其中磷酸二酯键联的每个氧原子任选且独立地被有机或无机部分替代。在一些实施方案中，键联磷原子是式I的P^L。在一些实施方案中，键联磷原子是手性的。

[0219] P修饰：如本文所用，术语“P修饰”是指在键联磷处的除立体化学修饰之外的任何修饰。在一些实施方案中，P修饰包括添加、取代或移除共价连接于键联磷的侧挂部分。在一些实施方案中，“P修饰”是-X-L-R^1，其中X、L和R^1中的每个独立地如本公开所定义和描述的。

[0220] 出于本公开的目的，化学元素根据Handbook of Chemistry and Physics，第67版，1986-87内里封面的CAS版元素周期表来鉴定。

[0221] 本文所述的关于本公开的化合物和组合物的方法和结构也适用于这些化合物和组合物的药学上可接受的酸或碱加成盐和所有立体异构体形式。

附图说明

[0222] 图1.图1,包括图1A至1L,示出了各种ssRNAi格式和杂交格式的卡通图。

[0223] 图2.图2示出了各种反义寡核苷酸格式的卡通图。

[0224] 图3.图3A示出了示例性多聚体格式。寡核苷酸可以直接和/或通过接头接合。如图所示,多聚体可包含相同或不同结构/类型的寡核苷酸单体。在一些实施方案中,多聚体的单体是ssRNAi剂。在一些实施方案中,多聚体的单体是RNA酶H依赖性反义寡核苷酸(ASO)。单体可以通过各种位置接合,例如5'-末端、3'-末端或中间的位置。图3B示出了用于接合单体的示例性化学方法,所述单体可以通过各种途径执行其功能以形成多聚体。

具体实施方式

[0225] 合成寡核苷酸提供在广泛多种应用中可用的分子工具。例如,寡核苷酸可用于治疗、诊断、研究和新型纳米材料应用。天然存在的核酸(例如,未修饰的DNA或RNA)的使用例如因它们易受核酸内切酶和核酸外切酶影响而受限制。因此,已开发各种合成对应物来规避这些缺点。这些包括含有化学修饰(例如,碱基修饰、糖修饰、主链修饰等)的合成寡核苷酸,所述化学修饰尤其使这些分子不易降解并改善寡核苷酸的其他性质。从结构的角度来看,对核苷酸间磷酸酯键联的修饰可引入手性,并且寡核苷酸的某些性质可能会受到形成寡核苷酸主链的磷原子的构型的影响。例如,体外研究已显示反义寡核苷酸的性质(诸如结合亲和力、结合互补RNA的序列特异性、对核酸酶的稳定性)尤其受主链磷原子的手性的影响。

[0226] 本公开尤其涵盖以下认识:寡核苷酸的结构元件,诸如化学修饰(例如,糖、碱基和/或核苷酸间键联的修饰)或其样式、与脂质或其他部分的缀合和/或立体化学[例如,主链手性中心的立体化学(手性核苷酸间键联)和/或其样式],可以对性质和活性(例如,稳定性、特异性、选择性、降低靶基因产物(转录物和/或蛋白质)水平的活性等)具有显著影响。在一些实施方案中,可通过优化化学修饰(碱基、糖和/或核苷酸间键联部分的修饰)、化学修饰样式、立体化学和/或立体化学样式来调节寡核苷酸性质。

[0227] 在一些实施方案中,本公开证明包含具有受控结构元件(例如受控化学修饰和/或受控主链立体化学样式)的寡核苷酸的寡核苷酸组合物提供了意外的性质和活性,包括但不限于本文所述的那些性质和活性。在一些实施方案中,所提供的包含具有化学修饰(例如,碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰等)或其样式的寡核苷酸的组合物具有改善的性质和活性。此类改善的性质的非限制性实例包括:指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低;和/或指导RNA干扰;和/或指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,本公开提供了用于单链RNAi的技术(例如,寡核苷酸、组合物、方法等)。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是ssRNAi剂。

[0228] 在一些实施方案中,据报道RNA干扰是转录后的靶向基因沉默技术,其使用RNAi剂来靶向包含与RNAi剂互补的序列的RNA(例如基因转录物诸如信使RNA(mRNA)),用于由RISC(RNA诱导的沉默复合体)途径介导的切割。实质上,据报道,当核糖核酸酶III(Dicer)将长的dsRNA(双链RNA)(例如,引入哺乳动物细胞的外源dsRNA)切割成称为siRNA的较短片段时,就会出现一种类型的RNAi。siRNA(小干扰RNA或短抑制性RNA)通常长约21至23个核苷酸,并包含约19个碱基对双链体。据报道,然后较小的RNA片段介导靶mRNA的降解。据报道,

RNAi反应的特征还在于核酸内切酶复合物,通常称为RNA诱导的沉默复合物(RISC),其指导与siRNA的反义链互补的单链mRNA的切割。据报道,靶RNA的切割发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中间。据报道,将RNAi剂用于靶转录物导致基因活性、水平和/或表达的降低,例如靶基因或靶序列的"敲低"或"敲除"。人工siRNA既可以用作治疗剂,也可以用于实验用途。

[0229] 一方面,RNA干扰剂包括与靶RNA序列相互作用以指导靶RNA切割的单链RNA。不希望受理论的束缚,据报道,被称为Dicer的III型核酸内切酶将引入植物和无脊椎动物细胞内的长双链RNA分解为siRNA(Sharp等,Genes Dev.2001,15:485)。据报道,一种核糖核酸酶III样酶Dicer将dsRNA加工成19-23个碱基对的短干扰RNA,其具有两个碱基3'突出端的特征(Bernstein等,(2001)Nature 409:363)。据报道,然后将siRNA掺入RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,其中一种或多种解旋酶解开siRNA双链体,从而使互补的反义链能够引导靶标识别(Nykanen等,(2001)Cell 107:309)。与适当的靶mRNA结合后,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir等,(2001)Genes Dev.15:188)。因此,一方面,本公开涉及促进RISC复合物形成以实现靶基因沉默的单链RNA。

[0230] 在一些实施方案中,根据本公开,可以通过本领域已知的任何方法或本领域普通技术人员可以想到的任何方法来选择合适的RNAi剂。例如,选择标准可以包括以下步骤中的一个或多个:靶基因序列的初步分析和RNAi剂的设计;这种设计可以考虑物种(人、食蟹猴、小鼠等)之间的序列类似性以及与其他(非靶标)基因的差异性;RNAi剂的体外筛选(例如,在表达靶转录物的细胞中为10nM);测定细胞中的EC50或IC50;确定用RNAi剂处理的细胞的生存力,其中在一些实施方案中,需要靶标的RNAi剂不抑制这些细胞的生存力;用人PBMC(外周血单核细胞)进行测试,例如,测试TNF-α的水平以估计免疫原性,其中通常不太需要免疫刺激序列;人全血测定中的测试,其中将新鲜的人血用RNAi剂处理,并确定细胞因子/趋化因子水平[例如,TNF-α(肿瘤坏死因子-α)和/或MCP1(单核细胞趋化蛋白1)],其中通常不太需要免疫刺激序列;使用测试动物中的细胞或肿瘤确定体内基因敲低;以及优化RNAi剂的特异性修饰。

[0231] 据报道,所谓的规范siRNA结构是双链RNA分子,其中每条链长约21个核苷酸。据报道,这两条链是反义(或"前导")链,其识别并结合靶转录物中的互补序列,和有义(或"过客")链,其与反义链互补。据报道,有义链和反义链在很大程度上是互补的,通常在两个末端形成2个核苷酸的两个3'突出端。

[0232] 虽然据报道规范的siRNA结构是双链的,但RNAi剂也可以是单链的。在一些实施方案中,单链RNAi剂对应于双链siRNA的反义链,并且单链RNAi剂缺少相应的过客链。

[0233] 然而,已报道,并非所有测试的单链RNAi剂的结构元件都是有效的;据报道,将一些结构元件引入PNPLA3寡核苷酸内可以干扰单链RNA干扰活性。

[0234] 在一些实施方案中,本公开提供了可用作RNAi剂的寡核苷酸和组合物。在一些实施方案中,本公开提供了可用作单链RNAi剂的寡核苷酸和组合物。本公开尤其提供了能够指导RNA干扰的单链寡核苷酸的新型结构。不希望受任何特定理论的束缚,本公开指出单链RNAi剂具有优于双链RNAi剂的优点。例如,单链RNAi剂的商品成本较低,因为仅需构建一条链。另外地或可选地,仅施用一条链(反义链)来靶向靶转录物。dsRNA指导的脱靶效应的来源是将有义链加载到RISC中以及结合并敲低不需要的靶标(Jackson等

2003Nat.Biotech.21:635-637),与对应的双链RNAi剂相比,单链RNAi剂可引起更少的脱靶效应。另外,一些单链RNAi剂,包括本文中公开的一些,可以靶向先前未被双链RNAi剂成功靶向的特定序列(例如,与双链RNAi剂相比,它们可以显著降低序列和/或序列产物(转录物和/或蛋白质)的水平)。本公开尤其提供了可指导单链RNA干扰的寡核苷酸的新型格式(修饰、立体化学、其组合等)。

[0235] 寡核苷酸

[0236] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以指导靶产物水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以降低靶基因的转录物水平。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以降低靶基因的mRNA水平。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以降低靶基因编码的蛋白质水平。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过与靶基因mRNA结合后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的或根据本公开的本领域已知的一种或多种结构元件,例如碱基序列;修饰;立体化学;核苷酸间键联样式;主链键联样式;主链手性中心样式;主链磷修饰样式;附加的化学部分,包括但不限于一个或多个靶向部分、脂质部分和/或碳水化合物部分等;种子区域;种子后区域;5'-末端结构;5'-末端区域;5'核苷酸部分;3'-末端区域;3'-末端二核苷酸;3'-末端帽;等。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的种子区域是或包含从5'末端开始计数的第二至第八、第二至第七、第二至第六、第三至第八、第三至第七、第三至第七、或第四至第八、或第四至第七个核苷酸;并且寡核苷酸的种子后区域是紧接种子区域3'并介于种子区域与3'末端区域之间的区域。

[0237] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的组合物包含一个或多个脂质部分、一个或多个碳水化合物部分(除非另外指明,除了形成具有核苷酸间键联的寡核苷酸链的核苷单元的糖部分之外)和/或一个或多个靶向组分。

[0238] 在一些实施方案中,在特定等位基因(和/或其一种或多种产品(例如RNA和/或蛋白质产品))(疾病相关等位基因)的存在和/或活性与一种或多种疾病和/或病状的存在、发生率和/或严重性相关联(例如,相关)的情况下,同一基因(例如基因)的不同等位基因存在但并不如此相关联或者相关联程度较小(例如,表现出较小的显著性或统计学上不显著的相关性)。在一些此类实施方案中,如本文所述的寡核苷酸及其方法可以相对于一个或多个较少相关联/不相关联的等位基因优先或特异性地靶向相关联的等位基因。

[0239] 在一些实施方案中,靶序列是与如本文所述的PNPLA3寡核苷酸结合的序列。在许多实施方案中,靶序列与所提供的寡核苷酸或其中的连续残基的序列相同或精确互补(例如,所提供的寡核苷酸包括与靶序列相同或精确互补的靶向结合序列)。在一些实施方案

中,在PNPLA3寡核苷酸(其相关部分)与其靶序列之间容许少量差异/错配。在许多实施方案中,靶序列存在于靶基因内。在许多实施方案中,靶序列存在于由靶基因产生的转录物(例如,mRNA和/或前mRNA)中。

[0240] 在一些实施方案中,靶序列包括一个或多个等位基因位点(即,靶基因内发生等位基因变异的位置)。在一些此类实施方案中,所提供的寡核苷酸相对于一个或多个其他等位基因优先或特异性地与一个等位基因结合。在一些实施方案中,靶向结合序列与一个等位基因的靶序列相同或精确互补。在一些实施方案中,靶向结合序列与一个等位基因的靶序列相同。在一些实施方案中,靶向结合序列与一个等位基因的靶序列精确互补。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸优先与疾病相关等位基因结合。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸优先与疾病相关等位基因结合,并包含与疾病相关等位基因的靶序列相同或精确互补的靶结合序列,但其他等位基因并不如此。例如,在一些实施方案中,本文提供的PNPLA3寡核苷酸(或其靶向结合序列部分)具有与靶序列的特定等位基因形式相同或精确互补的序列。在一些实施方案中,靶序列是特定等位基因的序列。在一些实施方案中,本文提供的PNPLA3寡核苷酸(或其靶向结合序列部分)具有与疾病相关等位基因的等位基因位点相同或精确互补的序列。

[0241] 如本领域技术人员所理解的,根据本公开,各种等位基因位点可包括在靶序列中。在一些实施方案中,靶序列包含SNP。在一些实施方案中,靶序列包含突变。在一些实施方案中,SNP是PNPLA3中的SNP。

[0242] 根据本公开,可使用各种接头、脂质部分、碳水化合物部分和靶向部分,包括本领域已知的许多部分。在一些实施方案中,脂质部分是靶向部分。在一些实施方案中,碳水化合物部分是靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分是脂质部分。在一些实施方案中,靶向部分是碳水化合物部分。如本领域技术人员容易了解的,根据本公开,可使用包括本公开所述的那些接头在内的各种接头来连接两个部分,例如脂质/碳水化合物/靶向组分与PNPLA3寡核苷酸部分。如本领域技术人员容易了解的,描述用于连接两个部分的接头也可以用于连接其他部分,例如,用于连接脂质和PNPLA3寡核苷酸部分的接头也可用于将碳水化合物或靶标部分与PNPLA3寡核苷酸部分连接,并且反之亦然。

[0243] 在一些实施方案中,本公开提供了手性控制的寡核苷酸和寡核苷酸组合物。例如,在一些实施方案中,所提供的组合物含有预定水平的一种或多种单个寡核苷酸类型,其中PNPLA3寡核苷酸类型通过以下来定义:1)碱基序列;2)主链键联样式;3)主链手性中心样式;和4)主链P修饰样式。在一些实施方案中,特定寡核苷酸类型可以通过以下来定义:1A)碱基同一性;1B)碱基修饰样式;1C)糖修饰样式;2)主链键联样式;3)主链手性中心样式;和4)主链P修饰样式。在一些实施方案中,相同寡核苷酸类型的寡核苷酸是相同的。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,其中所述组合物包含预定水平的多个寡核苷酸,其中所述多个寡核苷酸共享共同的碱基序列,并且在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个手性核苷酸间键联(手性控制的核苷酸间键联)处包含相同的键联磷构型。

[0244] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含2-30个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含5-30个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含10-30个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提

供的寡核苷酸包含1个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含2个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含3个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含4个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含5个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含6个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含7个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含8个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含9个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含10个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含11个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含12个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含13个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含14个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有15个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有16个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有17个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有18个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有19个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有20个手性控制的核苷酸间键联。

[0245] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是单聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是P修饰单聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是立体单聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是具有构型Rp的立体单聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是具有构型Sp的立体单聚体。

[0246] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是交替聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是P修饰交替聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是立体交替聚体。

[0247] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是嵌段聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是P修饰嵌段聚体。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是立体嵌段聚体。

[0248] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是间隔聚体。

[0249] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是跳跃聚体。

[0250] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是半聚体。在一些实施方案中,半聚体是如下的PNPLA3寡核苷酸,其中5'-末端或3'-末端区域具有拥有其余寡核苷酸不具有的结构特征的序列。在一些实施方案中,5'-末端或3'-末端区域具有或包含2至20个核苷酸。在一些实施方案中,结构特征是碱基修饰。在一些实施方案中,结构特征是糖修饰。在一些实施方案中,结构特征是P修饰。在一些实施方案中,结构特征是手性核苷酸间键联的立体化学。在一些实施方案中,结构特征是或包括手性核苷酸间键联的碱基修饰、糖修饰、P修饰或立体化学或其组合。在一些实施方案中,半聚体是其中的5'-末端区域的每个糖部分共享共同的修饰的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,半聚体是其中的3'-末端区域的每个糖部分共享共同的修饰的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸中的任何其他糖部分不共享5'或3'-末端区域的共同的糖修饰。在一些实施方案中,示例性半聚体是如下的PNPLA3寡核苷酸,其在一个末端区域包含具有取代或未取代的2'-O-烷基糖修饰的核苷、双环糖修饰的核苷、β-D-核糖核苷或β-D-脱氧核糖核苷(例如,2'-MOE修饰的核苷,以及LNA™或ENA™双

环糖修饰的核苷)的序列,并且在另一个末端区域包含具有不同糖部分(诸如取代或未取代的2'-O-烷基糖修饰的核苷、双环糖修饰的核苷或天然核苷)的核苷的序列。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体、半聚体和跳跃聚体中的一个或多个的组合。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是单聚体、交替聚体、嵌段聚体、间隔聚体和跳跃聚体中的一个或多个的组合。例如,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是交替聚体与间隔聚体两者。在一些实施方案中,所提供的核苷酸是间隔聚体与跳跃聚体两者。化学和合成领域技术人员将认识到众多其他样式的组合是可用的,并且仅受限于为根据本公开方法合成提供的寡核苷酸所需的组成部分的商业可用性和/或合成可及性。在一些实施方案中,半聚体结构提供有利的益处。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是5'-半聚体,其在5'-末端序列中包含修饰的糖部分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是5'-半聚体,其在5'-末端序列中包含修饰的2'-糖部分。

[0251] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的核苷酸。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的核苷。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的LNA。

[0252] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的核碱基。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的天然核碱基。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的修饰的核碱基。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个5-甲基胞苷;5-羟甲基胞苷、5-甲酰基胞嘧啶或5-羧基胞嘧啶。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个5-甲基胞苷。

[0253] 在一些实施方案中,每个碱基(BA)独立地是任选取代的或受保护的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶或尿嘧啶的核碱基。如本领域技术人员所了解的,各种受保护的核碱基,包括本领域众所周知的那些核碱基,例如寡核苷酸制备中使用的那些核碱基(例如,WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO2017/015555和WO2017/062862的受保护的核碱基,其中的每个的受保护的核碱基通过引用并入本文),并且可以根据本公开使用。

[0254] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的糖。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个见于天然存在的DNA和RNA中的任选取代的糖。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的核糖或脱氧核糖。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的核糖或脱氧核糖,其中核糖或脱氧核糖部分的一个或多个羟基任选且独立地被以下替代:卤素、R'、-$N(R')_2$、-OR'或-SR',其中每个R'独立地如上所定义并如本文所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被以下取代:卤素、R'、-$N(R')_2$、-OR'或-SR',其中每个R'独立地如上所定义并如本文所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被卤素取代。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被一个或多个-F卤素取代。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'

位置任选且独立地被-OR'取代,其中每个R'独立地如上所定义并如本文所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被-OR'取代,其中每个R'独立地是任选取代的C_1-C_6脂族。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被-OR'取代,其中每个R'独立地是任选取代的C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被-OMe取代。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个任选取代的脱氧核糖,其中脱氧核糖的2'位置任选且独立地被-O-甲氧基乙基取代。

[0255] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中,所提供的寡核苷酸是部分杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中,所提供的寡核苷酸是完全杂交的寡核苷酸链。在某些实施方案中,所提供的寡核苷酸是双链寡核苷酸。在某些实施方案中,所提供的寡核苷酸是三链寡核苷酸(例如三链体)。

[0256] 在一些实施方案中,包含WO2012/030683中描绘的PNPLA3寡核苷酸的任一结构都可根据本公开的方法来修饰以提供其手性控制的组合物。例如,在一些实施方案中,手性控制的组合物包含在任一个或多个手性键联磷原子上的立体化学控制,其任选地通过掺入WO2012/030683或本公开所述的一种或多种P修饰。例如,在一些实施方案中,预先选择WO2012/030683的PNPLA3寡核苷酸的特定核苷酸单元以在所述核苷酸单元的键联磷处设置立体化学修饰并且/或者在所述核苷酸单元的键联磷处用手性控制进行P修饰。

[0257] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含核酸类似物,例如,GNA、LNA、PNA、TNA、F-HNA(F-THP或3'-氟代四氢吡喃)、MNA(甘露醇核酸,例如,Leumann 2002Bioorg.Med.Chem.10:841-854)、ANA(anitol核酸)和吗啉代。

[0258] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸被表征为能够间接或直接增加或降低蛋白质的活性或者抑制或促进蛋白质的表达。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的特征在于它可用于控制细胞增殖、病毒复制和/或任何其他细胞信号传导过程。

[0259] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的5'-末端和/或3'-末端被修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的5'-末端和/或3'-末端被末端帽部分修饰。包括末端帽部分在内的此类修饰的实例在本文中以及在本领域中广泛描述,例如但不限于美国专利申请公布US2009/0023675A1中所述的那些修饰。

[0260] 在一些实施方案中,特征在于1)共同的碱基序列和长度,2)共同的主链键联样式,以及3)共同的主链手性中心样式的PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸具有相同的化学结构。例如,它们具有相同的碱基序列、相同的核苷修饰样式、相同的主链键联样式(即,核苷酸间键联类型的样式,例如磷酸酯、硫代磷酸酯等)、相同的主链手性中心样式(即,键联磷立体化学样式(Rp/Sp))和相同的主链磷修饰样式(例如,式I中"-XLR^1"基团的样式)。

[0261] 单链RNAi剂和反义寡核苷酸

[0262] 在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了降低靶基因或其基因产物的表达和/或水平的寡核苷酸。阅读本公开的本领域普通技术人员将了解,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以充当RNAi剂。可选地或另外地,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过RNA酶H依赖性机制和/或另一种不涉及RNA干扰的生化机制起作用。

[0263] 本公开尤其定义了在PNPLA3寡核苷酸中可能是特别需要和/或有效的某些结构属性。本公开尤其定义了在充当RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸中可能是特别需要和/或有效的某些结构属性。在一些实施方案中,本公开定义了在通过RNA酶H依赖性机制和/或其他生化机制起作用的PNPLA3寡核苷酸中可能是特别需要和/或有效的某些结构属性。在一些实施方案中,本公开定义了在单链ssRNAi剂(ssRNAi或ssRNAi剂)中可能是特别需要和/或有效的某些结构属性;在一些此类实施方案中,如下文进一步描述的,此类结构属性可以与在双链RNAi剂(dsRNAi或dsRNAi剂)的对应链中特别需要和/或有效的那些结构属性不同。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是单链RNAi剂(例如,其可以被加载到RISC中并且/或者可以指导或增强RISC介导的靶标)。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是反义寡核苷酸(例如,其可以被加载到RNA酶H中并且/或者指导或增强RNA酶H介导的靶标的切割并且/或者通过不同的生化机制进行操作)。

[0264] 在一些实施方案中(包括在一些单链寡核苷酸实施方案中),充当RNAi剂的寡核苷酸可以具有与通过RNA酶H依赖性机制起作用的那些寡核苷酸不同的一种或多种结构属性和/或功能性质。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可以通过与靶基因mRNA结合后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除(例如跳跃),来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可执行功能或显著百分比的功能(例如,10%-100%,不小于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大),而与RNA干扰或RISC无关。

[0265] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO),其指导由RNA酶H而不是RISC(RNA干扰沉默复合物)介导的靶RNA的切割。

[0266] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是单链RNAi(ssRNAi)剂,其指导由RISC(RNA干扰沉默复合物)而不是酶RNA酶H介导的靶mRNA的切割。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可执行功能或显著百分比的功能(例如,10%-100%,不小于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大),而与RNA酶H无关。

[0267] 双链RNAi剂也可以使用RISC而不是酶RNA酶H来指导靶mRNA的切割。在一些实施方案中,单链RNAi剂与双链RNAi剂的不同之处在于,ssRNAi剂仅包含一条寡核苷酸链,并且一般不包含明显长度的双链区域,而dsRNAi剂包含明显长度的双链区域(例如,“规范”siRNA中至少约15bp或约19bp)。在一些实施方案中,dsRNAi包含形成双链区域(例如,在“规范”siRNA中)的两条分开的互补链(其未共价连接),或者长单链,其包含一起形成双链区域(例如,在shRNA或短发夹RNA中)的两条互补序列。在dsRNAi的一些实施方案中,过客链具有形成两条链的单链切口。在一些实施方案中,本公开证明有效的单链RNAi剂所需的序列和/或结构元件(化学修饰、立体化学等)可以与有效的双链RNAi剂所需的那些序列和/或结构元件不同。

[0268] 本公开尤其涵盖以下认识:可能适用于双链RNAi剂的某些设计(例如,序列和/或结构元件)可能不适用于单链RNAi剂(包括本文所述的所提供格式的单链RNAi剂),并且反之亦然。在一些实施方案中,本公开提供了有效ssRNAi的设计。在一些实施方案中,本发明证明某些碱基序列,当与根据本公开的结构元件(修饰、立体化学、附加的一个或多个化学部分等)组合时,可以例如在作为ssRNAi剂施用时提供具有意外的高活性的寡核苷酸,特别是与包含相同序列但是双链的并作为dsRNAi剂施用的寡核苷酸相比。在一些实施方案中,

本发明证明某些碱基序列,当与根据本公开的结构元件(修饰、立体化学、附加的一个或多个化学部分等)组合时,可以提供具有意外的高活性的寡核苷酸,例如,降低靶基因或其基因产物的表达和/或水平的能力。

[0269] 单链RNAi(ssRNAi)剂、双链RNAi(dsRNAi)剂与RNA酶H依赖性反义寡核苷酸(ASO)之间的结构和功能差异

[0270] 在一些实施方案中,单链RNAi(ssRNAi)剂、双链RNAi(dsRNAi)剂与RNA酶H依赖性反义寡核苷酸(ASO)都涉及药剂或寡核苷酸(或其部分)与互补(或基本上互补)靶RNA(例如,mRNA或前mRNA)的结合,接着是靶RNA的切割和/或靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,RNAi剂,无论是双链的还是单链的,都使用包括酶Ago-2(Argonaute-2)的RISC或RNA干扰沉默复合物。在一些实施方案中,RNA酶H依赖性反义寡核苷酸是单链的并且使用不同的酶RNA酶H。据报道,RNA酶H是切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶;参见美国专利号7,919,472中的那些接头。还参见Saetrom(2004Bioinformatics 20:3055-3063);Kretschmer-Kazemi Far等(2003Nucleic Acids 31:4417-4424);Bertrand等(2002)Biochem.Biophys.Res.Comm.296:1000-1004);Vickers等(2003J.Biol.Chem.278:7108)。在一些实施方案中,可以指导RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸包括但不限于由以下组成或包含以下的那些寡核苷酸:不包含2'-修饰的连续2'-脱氧核苷酸单元的区域。在一些实施方案中,可以指导RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸是间隔扩大的寡核苷酸或间隔聚体。在一些实施方案中,间隔聚体包含内部区域,其包含多个支持RNA酶H切割的核苷酸,并且位于具有多个在化学上与所述内部区域的核苷不同的核苷酸的外部区域之间。在一些实施方案中,间隔聚体包含与一个或两个侧翼侧接或相邻的一定范围内的不包含2'-修饰的2'-脱氧核苷酸。在一些实施方案中,间隔指导对应的RNA靶标的RNA酶H切割。在一些实施方案中,侧翼不指导RNA酶H切割或充当RNA酶H切割的底物。侧翼可以具有不同的长度(包括但不限于1至8nt)并且可以包括各种修饰或类似物(包括但不限于2'-修饰,包括但不限于2'-OMe和2'-MOE)。作为非限制性实例,参见美国专利号9,550,988;7,919,472;5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356和5,700,922。在一些实施方案中,一种或多种此类修饰或类似物的存在可与靶标的修饰的(例如,增加、减少或改变的)RNA酶H切割相关。

[0271] 在一些实施方案中,双链RNAi剂,甚至其反义链,在结构上与RNA酶H依赖性反义寡核苷酸不同。在一些实施方案中,关于5'-末端结构和总体双链体稳定性二者,RNA酶H依赖性反义寡核苷酸和siRNA寡核苷酸似乎具有完全相反的特征。

[0272] 据报道,双链RNAi剂可通过Dicer酶在细胞中天然产生,所述Dicer酶可将较大的RNA分子(诸如来自入侵病毒的双链RNA)切割成dsRNA。dsRNA剂的规范结构包括两条RNA链,每条约19至23nt长,将所述两条RNA链退火形成约19-21bp的双链区域和两个3'二核苷酸突出端。对于双链RNAi剂,据报道,有义链在将反义链掺入RISC之前已从双链体中解链。除了将双链RNAi剂天然分离成反义链和有义链外,尚未报道单链RNAi剂在人细胞中天然产生。

[0273] 本公开尤其提供了以下教义:在许多情况下,单链RNAi剂不只是双链RNAi剂的分离的反义链,因为例如,有效dsRNAi剂的反义链可能远不如dsRNAi剂有效,而ssRNAi剂在配制成dsRNAi剂时(例如,通过有义链退火)可能远不如ssRNAi剂有效。在一些实施方案中,双

链和单链RNAi剂在许多重要方面不同。双链RNAi剂的结构参数不一定反映在单链RNAi剂中。

[0274] 在一些实施方案中,本公开教导适用于双链RNAi剂的靶序列可能不适用于单链RNAi剂,并且反之亦然。例如,在至少一些情况下,双链RNAi剂的单链形式可能无效。

[0275] 在一些实施方案中,双链和单链RNAi剂在对手性控制的核苷酸间键联的掺入的敏感性上也不同。例如,Matranga等(2005Cell123:607-620)报道:将单个Sp核苷酸间键联(例如单个Sp PS)引入双链RNAi剂的有义链大大降低RISC组装和RNA干扰活性。相反,在一些实施方案中,本文所示的数据令人惊讶地证明,掺入Sp核苷酸间键联(例如,Sp PS)可以对单链RNAi剂执行两种功能:(a)它增加了针对核酸酶的稳定性;并且(b)不干扰RNA干扰活性。许多示例性寡核苷酸可以用作包含一个或多个手性控制的核苷酸间键联(例如,本文中示出为Sp核苷酸间键联或Sp PS(硫代磷酸酯))的有效单链RNAi剂。

[0276] 可选地或另外地,双链和单链RNAi剂在免疫原性方面可以不同。在一些实施方案中,据报道,一些单链RNAi剂比双链RNAi剂更具免疫原性。Sioud J.Mol.Biol.(2005)348,1079-1090。在一些实施方案中,据报道若干种双链RNAi剂不诱导免疫反应,而对应的单链RNAi剂却诱导免疫反应。在一些实施方案中,本公开提供了具有低免疫原性的寡核苷酸。在一些实施方案中,此类寡核苷酸可用作ssRNAi剂。

[0277] 本公开尤其涵盖以下认识:由双链RNAi剂衍生单链RNAi剂(包括碱基序列)的某些单链RNAi剂的常规设计常常不能提供有效的单链RNAi剂。在一些实施方案中,本公开令人惊讶地证明衍生自有效的RNA酶H依赖性ASO的碱基序列的ssRNAi剂可以产生有效的ssRNAi剂。

[0278] 在一些实施方案中,本公开提供了可用作有效的RNA酶H依赖性ASO的寡核苷酸,其包含没有2'-修饰的2'-脱氧核苷酸的区域,并且与RNA序列或其部分互补或基本上互补。在一些实施方案中,区域可以是例如约10nt的核心序列,其在一侧或两侧上侧接有侧翼,其中所示侧翼在化学上与所述核心不同,并且可以作为非限制性实例包含2'-修饰或核苷酸间键联修饰。

[0279] 寡核苷酸

[0280] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以通过与靶基因mRNA结合后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[0281] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有本文所述的结构元件或者其格式或部分。

[0282] 在一些实施方案中,所提供的能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的寡核苷酸具有本文所述的结构元件或者其格式或部分。

[0283] 在一些实施方案中,所提供的能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的寡核苷酸具有本文公开的任何寡核苷酸的格式,例如表1A或者图或表中或者本文公开的其他地方公开的寡核苷酸格式。

[0284] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有图1所示的任一格式。

[0285] 本公开提供的数据表明各种格式的各种寡核苷酸能够指导靶向多种不同物种中的多种不同基因中的多种不同序列中的任一种的靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低;产生的另外的数据支持所公开格式的和未示出的ssRNAi剂的功效。

[0286] 在一些实施方案中,所提供的能够指导RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸具有本文所述的结构元件或者其格式或部分。

[0287] 在一些实施方案中,所提供的能够指导RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸具有本文公开的任何寡核苷酸的格式,例如表1A或者图或表中或者本文公开的其他地方公开的寡核苷酸格式。

[0288] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有图1所示的任一格式。

[0289] 本公开提供的数据表明各种格式的各种寡核苷酸能够指导针对多种不同物种中的多种不同基因中的多种不同序列中的任一种的RNA酶H介导的敲低;产生的另外的数据支持所公开格式的和未示出的ssRNAi剂的功效。

[0290] 在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸具有本文所述的结构元件或者其格式或部分。

[0291] 在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸具有本文公开的任何寡核苷酸的格式,例如表1A或者图或表中或者本文公开的其他地方公开的寡核苷酸格式。

[0292] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂具有图1所示的任一格式。

[0293] 本公开提供的数据表明各种格式的各种RNAi剂能够指导针对多种不同基因中的任一种的多种不同序列中的任一种的RNA干扰;产生的另外的数据支持所公开格式的和未示出的ssRNAi剂的功效。

[0294] 在一些实施方案中,RNAi的靶标是转录物。在一些实施方案中,转录物是前mRNA。在一些实施方案中,转录物是成熟RNA。在一些实施方案中,转录物是mRNA。在一些实施方案中,转录物包含突变。在一些实施方案中,突变是移码。在一些实施方案中,转录物包含提前终止密码子。在一些实施方案中,RNAi的靶标是不是mRNA的RNA。在一些实施方案中,RNAi的靶标是非编码RNA。在一些实施方案中,RNAi的靶标是长非编码RNA。在一些实施方案中,所提供的组合物中的所提供的寡核苷酸,例如第一多个寡核苷酸,包含碱基修饰、糖修饰和/或核苷酸间键联修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含碱基修饰和糖修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含碱基修饰和核苷酸间键联修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含糖修饰和核苷酸间修饰。在一些实施方案中,所提供的组合物包含碱基修饰、糖修饰和核苷酸间键联修饰。示例性化学修饰,诸如碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联修饰等,在本领域中是众所周知的,包括但不限于本公开中描述的那些修饰。在一些实施方案中,修饰的碱基是取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,糖修饰是2'-修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-F修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR^1。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR^1,其中R^1是任选取代的烷基。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OMe。在

一些实施方案中,2'-修饰是2'-MOE。在一些实施方案中,修饰的糖部分是桥联的双环或多环。在一些实施方案中,修饰的糖部分是具有5-20个环原子的桥联的双环或多环,其中一个或多个环原子任选且独立地是杂原子。示例性的环结构是本领域众所周知的,诸如存在于BNA、LNA等中的那些结构。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸既包含一个或多个修饰的核苷酸间键联又包含一个或多个天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,同时包含修饰的核苷酸间键联和天然磷酸酯键联的寡核苷酸及其组合物提供了改善的性质,例如活性等。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联是手性核苷酸间键联。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联是取代的硫代磷酸酯键联。

[0295] 本公开尤其涵盖了以下认识:立体无规的寡核苷酸制品含有多个例如在寡核苷酸链内的各个主链手性中心的立体化学结构方面彼此不同的不同化学实体。在不控制主链手性中心的立体化学的情况下,立体无规的寡核苷酸制品提供了不受控制的组合物,其包含未定水平的寡核苷酸立体异构体。即使这些立体异构体可能具有相同的碱基序列,但至少由于它们的主链立体化学不同,它们是不同的化学实体,并且如本文所证明的它们可以具有不同的性质,例如活性等。本公开尤其提供了新的组合物,其是或含有目标寡核苷酸的特定立体异构体。在一些实施方案中,特定的立体异构体可以例如通过其碱基序列、其长度、其主链键联样式以及其主链手性中心样式来定义。如本领域所理解的,在一些实施方案中,碱基序列可以指PNPLA3寡核苷酸中核苷残基的同一性和/或修饰状态(例如,糖和/或碱基组分,相对于标准天然存在的核苷酸诸如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶和尿嘧啶而言)和/或此类残基的杂交特征(即,与特定互补残基杂交的能力)。在一些实施方案中,本公开提供了一种PNPLA3寡核苷酸组合物,其包含预定水平的在化学上相同的单个寡核苷酸类型的寡核苷酸,例如,它们具有相同的碱基序列、相同的核苷修饰样式(糖和碱基部分的修饰,如果有的话)、相同的主链手性中心样式和相同的主链磷修饰样式。本发明尤其证明特定寡核苷酸的各个立体异构体可表现出彼此不同的稳定性和/或活性。在一些实施方案中,通过在PNPLA3寡核苷酸内包含和/或定位特定手性结构而实现的性质改善可以与通过使用特定主链键联、残基修饰等(例如,通过使用某些类型的修饰的磷酸酯[例如,硫代磷酸酯、取代的硫代磷酸酯等]、糖修饰[例如2'-修饰等]和/或碱基修饰[例如甲基化等])而实现的性质改善可比或者甚至更好。本公开尤其认识到,在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的性质(例如活性等)可以通过优化其主链手性中心样式,任选地与寡核苷酸的一种或多种其他特征(例如,键联样式、核苷修饰样式等)的调节/优化组合来调节。如本公开中的各种实例所例示的,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物可以表现出改善的性质,例如改善的单链RNA干扰活性、RNA酶H介导的敲低、改善的递送等。

[0296] 在一些实施方案中,寡核苷酸性质可通过优化立体化学(主链手性中心样式)和化学修饰(碱基、糖和/或核苷酸间键联的修饰)或其样式来调节。

[0297] 在一些实施方案中,共同的主链手性中心样式(例如,单链RNAi剂中的主链手性中心样式)包括以下样式:OSOSO、OSSSO、OSSSOS、SOSO、SOSO、SOSOS、SOSOSO、SOSOSOSO、SOSSSO、SSOSSSOSS、SSSOSOSSS、SSSSOSOSSSS、SSSSS、SSSSSS、SSSSSSS、SSSSSSSS、SSSSSSSSS或RRR,其中S表示Sp构型的硫代磷酸酯,并且O表示磷酸二酯,其中R表示Rp构型的硫代磷酸酯。

[0298] 在一些实施方案中,非手性中心是磷酸二酯键联。在一些实施方案中,Sp构型的手性中心是硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,非手性中心是磷酸二酯键联。在一些实施方案中,Sp构型的手性中心是硫代磷酸酯键联。

[0299] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式并且能够指导RNA干扰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式并且能够指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式并且能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式并且能够指导RNA干扰,其中立体化学样式在种子和/或种子后区域中。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何立体化学样式并且能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中立体化学样式在种子和/或种子后区域中。

[0300] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰或修饰样式。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰或修饰样式并且能够指导RNA干扰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰样式并且能够指导RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰样式并且能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰样式并且能够指导RNA干扰,其中修饰样式在种子和/或种子后区域中。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述的任何修饰样式并且能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中修饰样式在种子和/或种子后区域中。在一些实施方案中,修饰或修饰样式是在糖的2'位置的修饰或修饰样式。在一些实施方案中,修饰或修饰样式是糖的修饰或修饰样式,例如在糖的2'位置,包括但不限于2'-脱氧、2'-F、2'-OMe、2'-MOE和2'-OR1,其中R^1是任选取代的C1-6烷基。

[0301] 在一些实施方案中,本公开尤其证明,2'-F修饰可以改善单链RNA干扰。在一些实施方案中,本公开尤其证明,Sp核苷酸间键联在5'-末端和3'-末端可以改善寡核苷酸稳定性。在一些实施方案中,本公开证明,除其他外,天然磷酸酯键联和/或Rp核苷酸间键联可以改善从系统中去除寡核苷酸。如本领域普通技术人员所了解的,根据本公开,本领域已知的各种测定可用于评估此类性质。

[0302] 在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的5%或更多的糖部分是修饰的。

[0303] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中:

[0304] 所述第一多个寡核苷酸具有相同的碱基序列;并且

[0305] 所述第一多个寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分,或者包含一个或多个天然磷酸酯键联和一个或多个修饰的核苷酸间键联。

[0306] 在一些实施方案中,所述第一多个寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。

[0307] 在一些实施方案中,所提供的组合物改变转录物单链RNA干扰,使得抑制不需要的靶标和/或生物学功能。在一些实施方案中,在此类情况下,所提供的组合物还可在杂交后

诱导转录物的切割。

[0308] 在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分和/或一个或多个修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约95%的未修饰的糖部分。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约50%的未修饰的糖部分。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约5%的未修饰的糖部分。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个糖部分独立地是修饰的。

[0309] 在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含两个或更多个修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含三个或更多个修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含四个或更多个修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含五个或更多个修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含十个或更多个修饰的核苷酸间键联。

[0310] 在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约30%的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约20%的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约10%的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含不超过约5%的天然磷酸酯键联。

[0311] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含增加水平的一种或多种同位素。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸例如被一种或多种元素(例如,氢、碳、氮等)的一种或多种同位素标记。在一些实施方案中,所提供的组合物中的所提供的寡核苷酸,例如第一多个寡核苷酸,包含碱基修饰、糖修饰和/或核苷酸间键联修饰,其中所述寡核苷酸包含富集水平的氘。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸在一个或多个位置处被氘标记(用-^{1}H替代-^{2}H)。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的一个或多个^{1}H或与寡核苷酸缀合的任何部分(例如,靶向部分、脂质部分等)被^{2}H取代。此类寡核苷酸可用于本文所述的任何组合物或方法中。

[0312] 本发明包括所有药学上可接受的同位素标记的化合物,其中一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数与自然界通常存在的原子质量或质量数不同的原子替代。

[0313] 适合于包含在本发明的化合物中的同位素的实例包括以下的同位素:氢,诸如^{2}H和^{3}H;碳,诸如^{11}C、^{13}C和^{14}C;氯,诸如^{36}Cl;氟,诸如^{18}F;碘,诸如^{123}I、^{124}I和^{125}I;氮,诸如^{13}N和^{15}N;氧,诸如^{15}O、^{17}O和^{18}O;磷,诸如^{32}P;以及硫,诸如^{35}S。

[0314] 某些同位素标记的式(I)的化合物,例如掺入放射性同位素的那些化合物,可用于药物和/或底物组织分布研究中。放射性同位素氘(即^{3}H)和碳-14(即^{14}C)鉴于其容易掺入和现成的检测手段而特别可用于此目的。

[0315] 被较重的同位素如氘(即^{2}H)取代可提供由较大的代谢稳定性产生的某些治疗优势(例如体内半衰期增加或剂量需求减少),并且因此在一些情况下可能为优选的。

[0316] 使用正电子发射同位素(诸如^{11}C、^{18}F、^{15}O和^{13}N)取代可用于正电子发射断层(PET)研究,用于检查底物受体占据。

[0317] 同位素标记的化合物一般可通过本领域技术人员已知的常规技术来制备,或者通过与所附实例和制备中所述的那些类似的过程使用适当同位素标记的试剂代替先前使用的未标记试剂来制备。

[0318] 本发明化合物可以含有不对称或手性的中心,且因此以不同的立体异构体形式存在。除非另外指明,否则预期本发明化合物的所有立体异构体形式及其混合物(包括外消旋混合物)均构成本发明的一部分。此外,本发明涵盖所有的几何和位置异构体。例如,如果本发明的化合物掺入了双键或稠环,则顺式和反式形式以及混合物均涵盖在本发明的范围内。

[0319] 本发明的手性化合物(及其手性前体)可以使用色谱法(通常是高压液相色谱(HPLC)或超临界流体色谱(SFC))在具有不对称固定相和流动性的树脂上以对映体富集的形式获得,所述流动相由烃(通常为庚烷或己烷)组成,其含有0%至50%的异丙醇(通常为2%至20%)和0%至5%的烷基胺(通常为0.1%二乙胺(DEA)或异丙胺)。浓缩洗脱液得到富集的混合物。

[0320] 通过本领域技术人员众所周知的方法,诸如通过色谱和/或分步结晶,可以基于非对映异构体混合物的物理化学差异将它们分离成其单个的非对映异构体。对映异构体可以通过以下进行分离:通过与适当的光学活性化合物(例如手性助剂,诸如手性醇或Mosher氏酰基氯)反应将对映异构体混合物转化成非对映异构体混合物,分离所述非对映异构体并将单个的非对映异构体转化(例如水解)成对应的纯对映异构体。也可使用手性HPLC柱来分离对映异构体。可选地,指定的立体异构体可以通过使用光学活性起始物质,通过使用光学活性试剂、底物、催化剂或溶剂的不对称合成,或通过不对称转化将一种立体异构体转化为另一种立体异构体来合成。

[0321] 在一些实施方案中,控制寡核苷酸的结构元件,诸如化学修饰(例如,糖、碱基和/或核苷酸间键联的修饰)或其样式、立体化学的改变(例如,主链手性核苷酸间键联的立体化学)或其样式、用相同元素的同位素取代原子、和/或与附加的化学部分(例如,脂质部分、靶向部分等)的缀合,可对所需的生物学作用产生重大影响。在一些实施方案中,所需的生物学作用增强超过2倍。

[0322] 在一些实施方案中,所需的生物学作用是指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所需的生物学作用是改善的单链RNA干扰。在一些实施方案中,所需的生物学作用是改善的RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所需的生物学作用是改善的单链RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低。

[0323] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[0324] 1)具有与转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

[0325] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联。

[0326] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物的特征在于,当其与单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0327] 在一些实施方案中,本公开提供了包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中PNPLA3寡核苷酸类型通过以下来定义:

[0328] 1)碱基序列;

[0329] 2)主链键联样式;

[0330] 3)主链手性中心样式;以及

[0331] 4)主链磷修饰样式,

[0332] 所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,

[0333] 所述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0334] 在一些实施方案中,连续的核苷单元中的每个独立地在修饰的核苷酸间键联之前和/或之后。在一些实施方案中,连续的核苷单元中的每个独立地在硫代磷酸酯键联之前和/或之后。在一些实施方案中,连续的核苷单元中的每个独立地在手性控制的修饰的核苷酸间键联之前和/或之后。在一些实施方案中,连续的核苷单元中的每个独立地在手性控制的硫代磷酸酯键键联之前和/或之后。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联具有式I的结构。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联具有式I-a的结构。

[0335] 在一些实施方案中,本公开提供了包含预定水平的第一多个寡核苷酸的单链RNAi剂,其中:

[0336] 所述第一多个寡核苷酸具有相同的碱基序列;

[0337] 所述第一多个寡核苷酸包含具有2、3、4、5、6、7个或更多个连续的Sp修饰的核苷酸间键联的种子区域,具有2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个连续的Sp修饰的核苷酸间键联的种子后区域。

[0338] 在一些实施方案中,种子区域包含2个或更多个连续的Sp修饰的核苷酸间键联。

[0339] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联具有式I的结构。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联具有式I-a的结构。

[0340] 如本公开所证明的,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物的特征在于,当其与单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[0341] 在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸通过具有以下来定义:

[0342] 1)共同的碱基序列和长度;

[0343] 2)共同的主链键联样式;和

[0344] 3)共同的主链手性中心样式,所述组合物是单个寡核苷酸的基本上纯的制品,因为所述组合物中预定水平的寡核苷酸具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式。

[0345] 在一些实施方案中,共同的碱基序列和长度可以被称为共同的碱基序列。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列的寡核苷酸可以具有相同的核苷修饰样式,例如糖修饰、碱基修饰等。在一些实施方案中,核苷修饰样式可以由位置和修饰的组合表示。在一些实施方案中,主链键联样式包括每个核苷酸间键联的位置和类型(例如,磷酸酯、硫代磷酸酯、取

代的硫代磷酸酯等)。PNPLA3寡核苷酸的主链手性中心样式可以通过从5'到3'的键联磷立体化学(Rp/Sp)的组合来指定。如上文所例示,非手性键联的位置可以例如由主链键联样式获得。

[0346] 如本领域普通技术人员所理解的,寡核苷酸的立体无规或外消旋制品是通过核苷酸单体的非对映立体选择性和/或低立体选择性偶联来制备的,通常不使用任何手性助剂、手性修饰试剂和/或手性催化剂。在一些实施方案中,在寡核苷酸的基本上外消旋(或手性不受控制)的制品中,所有或大多数偶联步骤都不是手性控制的,因为没有专门进行偶联步骤以提供增强的立体选择性。寡核苷酸的示例性的基本上外消旋的制品是硫代磷酸酯寡核苷酸的制品,其通过用二硫化四乙基秋兰姆或(TETD)或1,1-二氧化3H-1,2-苯二硫基-3-酮(BDTD)使由常用的亚磷酰胺寡核苷酸合成的亚磷酸三酯硫化(本领域中熟知的方法)来制备。在一些实施方案中,寡核苷酸的基本上外消旋的制品提供了基本上外消旋的寡核苷酸组合物(或手性不受控制的寡核苷酸组合物)。

[0347] 如本领域普通技术人员所理解的,在一些实施方案中,可以通过在相同或可比条件下二聚体形成的非对映立体选择性来评估偶联或键联的非对映立体选择性,其中所述二聚体具有相同的5'-和3'-核苷以及核苷酸间键联。

[0348] 在一些实施方案中,本公开提供了第一多个寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,因为相对于相同寡核苷酸的基本上外消旋的制品,所述组合物富含单个寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了第一多个寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,因为相对于相同寡核苷酸的基本上外消旋的制品,所述组合物富含单个寡核苷酸类型的寡核苷酸,其共享:

[0349] 1)共同的碱基序列和长度;

[0350] 2)共同的主链键联样式;和

[0351] 3)共同的主链手性中心样式。

[0352] 在一些实施方案中,本公开提供了包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中寡核苷酸属于特征在于以下的特定寡核苷酸类型:

[0353] 1)共同的碱基序列和长度;

[0354] 2)共同的主链键联样式;和

[0355] 3)共同的主链手性中心样式;

[0356] 所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[0357] 在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的碱基修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的核苷修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有相同的结构。

[0358] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的糖修饰样式。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的碱基修饰样式。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷

酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的核苷修饰样式。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸是相同的。

[0359] 在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的核苷修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的糖修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的碱基修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式和共同的核苷修饰样式。在一些实施方案中,具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式的寡核苷酸是相同的。

[0360] 在一些实施方案中,所提供的组合物中的寡核苷酸具有共同的主链磷修饰样式。在一些实施方案中,共同的碱基序列是PNPLA3寡核苷酸类型的碱基序列。在一些实施方案中,所提供的组合物是手性控制的PNPLA3寡核苷酸组合物,因为所述组合物含有预定水平的单个寡核苷酸类型的第一多个寡核苷酸,其中PNPLA3寡核苷酸类型通过以下来定义:

[0361] 1)碱基序列;

[0362] 2)主链键联样式;

[0363] 3)主链手性中心样式;以及

[0364] 4)主链磷修饰样式。

[0365] 如上文所指出并且如本领域所理解的,在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的碱基序列可以指寡核苷酸中核苷残基的同一性和/或修饰状态(例如,糖和/或碱基组分,相对于标准天然存在的核苷酸诸如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶和尿嘧啶而言)和/或此类残基的杂交特征(即,与特定互补残基杂交的能力)。

[0366] 在一些实施方案中,特定类型的寡核苷酸是相同的,因为它们具有相同的碱基序列(包括长度)、相同的糖和碱基部分的化学修饰样式、相同的主链键联样式(例如,天然磷酸酯键联、硫代磷酸酯键联、硫代磷酸三酯键联及其组合的样式)、相同的主链手性中心样式(例如,手性核苷酸间键联的立体化学样式(Rp/Sp))以及相同的主链磷修饰样式(例如,核苷酸间磷原子的修饰样式,诸如$-S^-$和式I的$-L-R^1$)。

[0367] 本公开尤其认识到寡核苷酸结构元件(例如,化学修饰样式、主链键联、主链手性中心和/或主链磷修饰)的组合可以提供令人惊讶地改善的性质,诸如生物活性。

[0368] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的(和/或立体化学上纯的)制品是RNAi剂寡核苷酸。

[0369] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的(和/或立体化学上纯的)制品具有包含一个或多个修饰的主链键联、碱基和/或糖的寡核苷酸。

[0370] 在一些实施方案中,所提供的组合物具有包含在糖部分处被修饰的一个或多个残基的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的组合物具有包含在糖部分的2'位置处被修饰(在本文中称为"2'-修饰")的一个或多个残基的寡核苷酸。此类修饰的实例在上文和本文

中进行了描述,并且包括但不限于2'-OMe、2'-MOE、2'-LNA、2'-F、FRNA、FANA、S-cEt等。在一些实施方案中,所提供的组合物具有包含一个或多个2'-修饰的残基的寡核苷酸。例如,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个残基,所述残基为2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)-修饰的残基。在一些实施方案中,所提供的组合物具有不包含任何2'-修饰的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的组合物是不包含任何2'-MOE残基的寡核苷酸。即,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸不是MOE修饰的。本公开描述了另外的示例性糖修饰。

[0371] 在一些实施方案中,一个或多个是一个。在一些实施方案中,一个或多个是两个。在一些实施方案中,一个或多个是三个。在一些实施方案中,一个或多个是四个。在一些实施方案中,一个或多个是五个。在一些实施方案中,一个或多个是六个。在一些实施方案中,一个或多个是七个。在一些实施方案中,一个或多个是八个。在一些实施方案中,一个或多个是九个。在一些实施方案中,一个或多个是十个。在一些实施方案中,一个或多个是至少一个。在一些实施方案中,一个或多个是至少两个。在一些实施方案中,一个或多个是至少三个。在一些实施方案中,一个或多个是至少四个。在一些实施方案中,一个或多个是至少五个。在一些实施方案中,一个或多个是至少六个。在一些实施方案中,一个或多个是至少七个。在一些实施方案中,一个或多个是至少八个。在一些实施方案中,一个或多个是至少九个。在一些实施方案中,一个或多个是至少十个。

[0372] 在一些实施方案中,没有2'-修饰的糖部分是存在于天然DNA核苷中的糖部分。

[0373] 本领域普通技术人员理解,靶转录物的各个区域可以由所提供的组合物和方法靶向。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含内含子序列。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含外显子序列。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的碱基序列包含内含子和外显子序列。

[0374] 如本领域普通技术人员所理解的,所提供的寡核苷酸和组合物尤其可以靶向大量的核酸聚合物。例如,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸和组合物可靶向核酸序列的转录物,其中寡核苷酸的共同碱基序列(例如,PNPLA3寡核苷酸类型的碱基序列)包括或是与所述转录物的序列互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括与靶标的序列互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列是与靶标的序列互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括或是与靶标的序列100%互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括与靶标的序列100%互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列是与靶标的序列100%互补的序列。

[0375] I

[0376] 在一些实施方案中,共同的碱基序列包括或是与特征序列元件互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括与特征序列元件互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列是与特征序列元件互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括或是与特征序列元件100%互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列包括与特征序列元件100%互补的序列。在一些实施方案中,共同的碱基序列是与特征序列元件100%互补的序列。在本文的一些实施方案中,特征序列元件作为非限制性实例是种子区域、种子后区域、或种子区域的一部分、或种子后区域的一部分、或3'-末端二核苷酸。

[0377] 在一些实施方案中,特征序列元件包括或是突变。在一些实施方案中,特征序列元件包括突变。在一些实施方案中,特征序列元件是突变。在一些实施方案中,特征序列元件

包括或是点突变。在一些实施方案中,特征序列元件包括点突变。在一些实施方案中,特征序列元件是点突变。在一些实施方案中,特征序列元件包括或是SNP。在一些实施方案中,特征序列元件包括SNP。在一些实施方案中,特征序列元件是SNP。

[0378] 在一些实施方案中,共同的碱基序列与靶序列100%匹配,而不与靶序列的相似序列100%匹配。

[0379] 例如,在一些实施方案中,共同的碱基序列与靶核酸序列的致病拷贝或等位基因中的突变匹配,但不与突变位点处的非致病拷贝或等位基因匹配;在一些其他实施方案中,共同的碱基序列与靶核酸序列的致病等位基因中的SNP匹配,但不与对应位点处的非致病等位基因匹配。

[0380] 本公开尤其认识到碱基序列可能对寡核苷酸性质有影响。在一些实施方案中,当具有碱基序列的寡核苷酸用于例如通过涉及RNA酶H的途径来抑制靶标时,碱基序列可能对靶标的切割样式有影响:例如,具有不同序列的结构上相似(全部为硫代磷酸酯键联、全部立体无规)的寡核苷酸可能具有不同的切割样式。

[0381] 在一些实施方案中,共同的碱基序列是包含SNP的碱基序列。

[0382] 如本领域普通技术人员所理解的,所提供的寡核苷酸组合物和方法具有本领域普通技术人员已知的各种用途。用于评估所提供的组合物及其性质和用途的方法也是本领域普通技术人员众所周知和实践的。示例性性质、用途和/或方法包括但不限于WO/2014/012081和WO/2015/107425中描述的那些。

[0383] 在一些实施方案中,手性核苷酸间键联具有式I的结构。在一些实施方案中,手性核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,所提供的组合物的单个寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联独立地具有式I的结构。在一些实施方案中,所提供的组合物的单个寡核苷酸中的每个手性核苷酸间键联独立地是硫代磷酸酯。

[0384] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸包含一个或多个修饰的碱基部分。如本领域普通技术人员已知的并且如本公开所述的,可以将各种修饰引入糖和/或部分。例如,在一些实施方案中,修饰是在US9006198、WO2014/012081和WO/2015/107425中描述的修饰,其中的每个的糖和碱基修饰通过引用并入本文。

[0385] 在一些实施方案中,糖修饰是2'-修饰。常用的2'-修饰包括但不限于2'-OR^1,其中R^1不是氢。在一些实施方案中,修饰是2'-OR,其中R是任选取代的脂族。在一些实施方案中,修饰是2'-OMe。在一些实施方案中,修饰是2'-O-MOE。在一些实施方案中,本公开证明,特定手性纯核苷酸间键联的包含和/或位置可以提供与通过使用修饰的主链键联、碱基和/或糖获得的稳定性改善可比的或更好的稳定性改善。在一些实施方案中,所提供的组合物的所提供的单个寡核苷酸在糖上没有修饰。在一些实施方案中,所提供的组合物的所提供的单个寡核苷酸在糖的2'-位置上没有修饰(即,在2'-位置处的两个基团是-H/-H或-H/-OH)。在一些实施方案中,所提供的组合物的所提供的单个寡核苷酸不具有任何2'-MOE修饰。

[0386] 在一些实施方案中,2'-修饰是-O-L-或-L-,其将糖部分的2'-碳与糖部分的另一个碳连接。在一些实施方案中,2'-修饰是-O-L-或-L-,其将糖部分的2'-碳与糖部分的4'-碳连接。在一些实施方案中,2'-修饰是S-cEt。在一些实施方案中,修饰的糖部分是LNA部分。

[0387] 在一些实施方案中,2'-修饰是-F。在一些实施例中,2'-修饰是FANA。在一些实施方案中,2'-修饰是FRNA。

[0388] 在一些实施方案中,糖修饰是5'-修饰,例如,R-5'-Me、S-5'-Me等。

[0389] 在一些实施方案中,糖修饰改变糖环的大小。在一些实施方案中,糖修饰是FHNA中的糖部分。

[0390] 在一些实施方案中,糖修饰用另一个环状或非环状部分替代糖部分。此类部分的实例是本领域众所周知的,包括但不限于用于吗啉代(任选地具有其二氨基磷酸酯键联)、二醇核酸等中的那些部分。

[0391] 在一些实施方案中,ssRNAi剂是或包含选自由以下组成的组的PNPLA3寡核苷酸:图1或本文其他地方所述的任何格式的任何ssRNAi。阅读本说明书的本领域技术人员将了解,本公开明确地不排除以下可能性,即本文所述的任何标记为ssRNAi剂的寡核苷酸也或者可选地可以通过另一种机制(例如,作为反义寡核苷酸;通过RNA酶H机制介导敲低;空间位阻翻译;或任何其他生化机制)起作用。

[0392] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸(ASO)是或包含选自由以下组成的组的PNPLA3寡核苷酸:图2所述的任何格式的任何寡核苷酸。阅读本说明书的本领域技术人员将了解,本公开明确地不排除以下可能性,即本文所述的任何标记为反义寡核苷酸(ASO)的寡核苷酸也或可选地可以通过另一种机制(例如,使用RISC作为ssRNAi)起作用;本公开还指出,各种ASO可以通过不同的机制(使用RNA酶H、在空间上阻断翻译或其他转录后过程、改变靶核酸的构象等)起作用。

[0393] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸是或包含选自由以下组成的组的PNPLA3寡核苷酸:WV-2111、WV-2113、WV-2114、WV-2148、WV-2149、WV-2152、WV-2153、WV-2156、WV-2157、WV-2387、WV-3069、WV-7523、WV-7524、WV-7525、WV-7526、WV-7527、WV-7528,以及图1L的格式S40至S42;或图1的格式30-32、66-69或101-103中的任一个的任何寡核苷酸。阅读本说明书的本领域技术人员将了解,本公开明确地不排除以下可能性,即本文所述的任何标记为杂交寡核苷酸的寡核苷酸也或者可选地可以通过另一种机制(例如,作为反义寡核苷酸;通过RNA酶H机制介导敲低;空间位阻翻译;或任何其他生化机制)起作用。

[0394] 手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物

[0395] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是手性控制的。

[0396] 本公开提供了具有高粗纯度和高非对映异构纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本公开提供了具有高粗纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本公开提供了具有高非对映异

构纯度的手性控制的寡核苷酸和手性控制的寡核苷酸组合物。

[0397] 在一些实施方案中,单链RNAi剂是PNPLA3寡核苷酸类型的基本上纯的制品,因为组合物中不是所述寡核苷酸类型的寡核苷酸是所述寡核苷酸类型的制备过程中形成的杂质,在一些情况下,在某些纯化程序之后形成。

[0398] 在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个关于手性键联磷是非对映异构纯的核苷酸间键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个具有式I的结构的非对映异构纯的核苷酸间键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个关于手性键联磷是非对映异构纯的核苷酸间键联以及一个或多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个具有式I的结构的非对映异构纯的核苷酸间键联以及一个或多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个具有式I-c的结构的非对映异构纯的核苷酸间键联以及一个或多个磷酸二酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,此类寡核苷酸是通过使用如本申请中所述的立体选择性寡核苷酸合成来制备以形成预设计的关于手性键联磷是非对映异构纯的核苷酸间键联。以下进一步描述示例性核苷酸间键联,包括具有式I的结构的那些。

[0399] 在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸内的至少两个单个核苷酸间键联具有相对于彼此不同的立体化学和/或不同的P修饰。

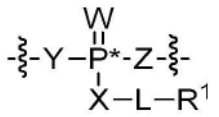
[0400] 核苷酸间键联

[0401] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述或本领域已知的任何核苷酸间键联。

[0402] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何核苷酸间键联。

[0403] 核苷酸间键联或未修饰的核苷酸间键联的非限制性实例是磷酸二酯;修饰的核苷酸间键联的非限制性实例包括其中磷酸二酯的一个或多个氧已被作为非限制性实例的硫(如硫代磷酸酯中的硫)、H、烷基或者不是氧的另一个部分或元素替代的那些核苷酸间键联。核苷酸间键联的非限制性实例是不包含磷但用于连接两个糖的部分。核苷酸间键联的非限制性实例是不包含磷但用于连接PNPLA3寡核苷酸主链中的两个糖的部分。本文公开了核苷酸、修饰的核苷酸、核苷酸类似物、核苷酸间键联、修饰的核苷酸间键联、碱基、修饰的碱基和碱基类似物、糖、修饰的糖和糖类似物以及核苷、修饰的核苷和核苷类似物的其他非限制性实例。

[0404] 在某些实施方案中,核苷酸间键联具有式I的结构:

[0405] 

(I)

[0406] 其中每个变量如下文所定义并描述。在一些实施方案中,式I的键联是手性的。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含一个或多个式I的修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含一个或多个式I的修饰的核苷酸间键联,并且其中所述寡核苷酸内式I的单个核苷酸间键联具有相对于彼此不同的P修饰。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含一个或多个式I的修饰的核苷酸间键联,并且其中所述寡核苷酸内式I的单个核苷酸间键联具有相对于彼此不同的-X-L-R^1。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含一个或多个式I的修饰的核苷酸间键联,并且其中所述寡核苷酸内式I的单个核苷酸间键联具有相对于彼此不同的X。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含一个或多个式I的修饰的核苷酸间键联,并且其中所述寡核苷酸内式I的单个核苷酸间键联具有相对于彼此不同的-L-R^1。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸是所提供的组合物中的特定寡核苷酸类型的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸是所提供的组合物中的PNPLA3寡核苷酸,其具有共同的碱基序列和长度、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸是手性控制的组合物中的特定寡核苷酸类型的PNPLA3寡核苷酸,并且所述手性控制的寡核苷酸属于所述类型。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸是包含预定水平的多个寡核苷酸的所提供的组合物中的PNPLA3寡核苷酸,所述多个寡核苷酸共享共同的碱基序列、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式,并且所述手性控制的寡核苷酸共享共同的碱基序列、共同的主链键联样式和共同的主链手性中心样式。

[0407] 在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸包含不同的核苷酸间磷键联。

[0408] 在一些实施方案中,硫代磷酸三酯键联包含例如用于控制反应的立体选择性的手性助剂。在一些实施方案中,硫代磷酸三酯键联不包含手性助剂。在一些实施方案中,有意维持硫代磷酸三酯键联指导向受试者施用,和/或在向受试者施用过程中有意维持硫代磷酸三酯键联。

[0409] 在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸连接到固体支撑体。在一些实施方案中,从固体支撑体中切割手性控制的寡核苷酸。

[0410] 在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个连续修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯核苷酸间键联和至少两个连续硫代磷酸三酯核苷酸间键联。

[0411] 在一些实施方案中,本公开提供了组合物(例如,手性控制的寡核苷酸组合物),其包含多种所提供的寡核苷酸或由多种所提供的寡核苷酸组成。在一些实施方案中,所有此类所提供的寡核苷酸都具有相同类型,即所有都具有相同碱基序列、主链键联样式(即核苷酸间键联类型样式,例如磷酸酯、硫代磷酸酯等)、主链手性中心样式(即键联磷立体化学样式(Rp/Sp))和主链磷修饰样式(例如,本文公开的式I中的“-XLR^1”基团样式)。在一些实施

方案中,所有相同类型的寡核苷酸是相同的。然而,在许多实施方案中,所提供的组合物通常包含预定相对量的多种寡核苷酸类型。

[0412] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何核苷酸间键联。在一些实施方案中,结合ASPGR的部分是例如GalNAc部分,是本文所述或本领域已知的任何GalNAc或者其变体或修饰。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何核苷酸间键联与本文所述的任何其他结构元件或修饰的组合,包括但不限于,碱基序列、糖、碱基(核碱基)或其部分;立体化学或其样式;附加的化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分等;种子区域;种子后区域;5'-末端结构;5'-末端区域;5'核苷酸部分;3'-末端区域;3'-末端二核苷酸;3'-末端帽;长度;附加化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、GalNAc等;其格式或任何结构元件,和/或本文所述的任何其他结构元件或修饰;并且在一些实施方案中,本公开涉及任何此类寡核苷酸的多聚体。

[0413] 在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷酸间磷键联。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸包含例如硫代磷酸酯或硫代磷酸三酯键联。

[0414] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联选自例如以下描述的那些:US 20110294124、US20120316224、US20140194610、US20150211006、US20150197540、WO 2015107425、PCT/US2016/043542和PCT/US2016/043598,Whittaker等2008Tetrahedron Letters 49:6984-6987。

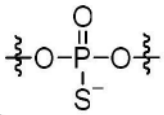
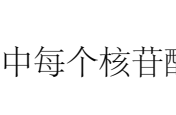
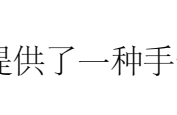
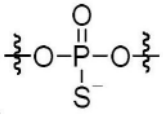
[0415] 核苷酸间键联的非限制性实例还包括本领域中所述的那些,包括但不限于以下任一项中所述的那些:Gryaznov,S.;Chen,J.-K.J.Am.Chem.Soc.1994,116,3143,Jones等J.Org.Chem.1993,58,2983,Koshkin等1998Tetrahedron 54:3607-3630,Lauritsen等2002Chem.Comm.5:530-531,Lauritsen等2003Bioo.Med.Chem.Lett.13:253-256,Mesmaeker等Angew.Chem.,Int.Ed.Engl.1994,33,226,Petersen等2003TRENDS Biotech.21:74-81,Schultz等1996Nucleic Acids Res.24:2966,Ts'o等Ann.N.Y.Acad.Sci.1988,507,220,以及Vasseur等J.Am.Chem.Soc.1992,114,4006。

[0416] 在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中一个或多个U被T替代。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过50%的同一性。

[0417] 在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述寡核苷酸具有本文所述的主链键联样式、主链手性中心样式和/或主链磷修饰样式。

[0418] 在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的

任何寡核苷酸中存在的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中一个或多个T被U取代。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过50%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过60%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过70%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过80%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过90%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸中存在的序列,其中所述序列与本文公开的任何寡核苷酸的序列具有超过95%的同一性。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列。

[0419] 本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中至少一个核苷酸间键联是  本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其包含本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中每个核苷酸间键联是  本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中至少一个核苷酸间键联是  本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中每个核苷酸间键联是  在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中每个胞嘧啶任选且独立地被5-甲基胞嘧啶替代。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中至少一个胞嘧啶任选且独立地被5-甲基胞嘧啶替代。在一些实施方案中,本公开提供了一种手性控制的寡核苷酸,其具有本文公开的任何寡核苷酸的序列,其中每个胞嘧啶任选且独立地被5-甲基胞嘧啶替代。

[0420] 碱基(核碱基)

[0421] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及

RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述或本领域已知的任何核碱基。

[0422] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸中存在的核碱基是天然核碱基或衍生自天然核碱基的修饰的核碱基。实例包括但不限于其相应的氨基由酰基保护基团保护的尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤;2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、氮杂胞嘧啶、嘧啶类似物(诸如假异胞嘧啶和假尿嘧啶)和其他修饰的核碱基,诸如8-取代的嘌呤、黄嘌呤或次黄嘌呤(后两个是天然降解产物)。示例性修饰的核碱基公开于Chiu和Rana,RNA,2003,9,1034-1048,Limbach等Nucleic Acids Research,1994,22,2183-2196以及Revankar和Rao,Comprehensive Natural Products Chemistry,第7卷,313中。在一些实施方案中,修饰的核碱基是取代的尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤。在一些实施方案中,修饰的核碱基是尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤的功能替代,例如就氢键和/或碱基配对而言。在一些实施方案中,核碱基是任选取代的尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶或鸟嘌呤。在一些实施方案中,核碱基是尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶或鸟嘌呤。

[0423] 在一些实施方案中,修饰的碱基是任选取代的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶。在一些实施方案中,修饰的核碱基独立地是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶,其被一种或多种修饰修饰,通过所述修饰:

[0424] (1)核碱基被一个或多个独立地选自以下的任选取代的基团修饰:酰基、卤素、氨基、叠氮化物、烷基、烯基、炔基、芳基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂环基、杂芳基、羧基、羟基、生物素、亲和素、链霉亲和素、取代的硅烷基及其组合;

[0425] (2)核碱基的一个或多个原子独立地被选自碳、氮和硫的不同原子替代;

[0426] (3)核碱基中的一个或多个双键独立地被氢化;或者

[0427] (4)一个或多个芳基或杂芳基环独立地插入核碱基中。

[0428] 本领域描述了各种另外的核碱基。糖

[0429] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含本文所述或本领域已知的任何糖。

[0430] 在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含除天然糖部分之外的一个或多个修饰的糖部分。

[0431] 最常见的天然存在的核苷酸包含连接到核碱基腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)的核糖。也涵盖修饰的核苷酸,其中核苷酸中的磷酸酯基团或键联磷可连接到糖或修饰的糖的各种位置。作为非限制性实例,磷酸酯基团或键联磷可连接到糖或修饰的糖的2”、3”、4”或5”羟基部分。在此背景中,还涵盖掺有如本文所述的修饰的核碱基的核苷酸。在一些实施方案中,根据本公开的方法使用包含未保护的-OH部分的核苷酸或修饰的核苷酸。

[0432] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何碱基(核碱基)、修饰的碱基或碱基类似物。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何碱基与本文所述的任何其他结构元件或修饰的组合,包括但不限于,碱基序列或其部分;糖;核苷酸间键联;立体化学或其样式;附加的化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、GalNAc部分等;5’-末端结构;5’-末端区域;5’核苷酸部分;种子区域;种子后区域;3’-末端区域;3’-末端二核苷酸;3’-末端帽;糖、碱基或核苷酸间键联的修饰样式;其格式或任何结构元件,和/或本文所述的任何其他结构元件或修饰;并且在一些实施方案中,本公开涉及任何此类寡核苷酸的多聚体。

[0433] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含任何糖。

[0434] 本领域描述了各种另外的糖。

[0435] PNPLA3寡核苷酸的碱基序列

[0436] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分,其中一部分是至少15个连续碱基的跨度或具有1-5个错配的至少15个连续碱基的跨度。

[0437] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H

介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分,其中一部分是15个连续碱基的跨度或具有1-5个错配的15个连续碱基的跨度。

[0438] 单链RNAi剂的序列与转录物靶标具有足够的长度和同一性,以介导靶标特异性RNA干扰。在一些实施方案中,RNAi剂与转录物靶序列的一部分互补。

[0439] 单链RNAi剂的碱基序列与靶转录物的碱基序列互补。如本文所用,“靶转录物序列”、“靶序列”、“靶基因”等是指在基因转录过程中形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,所述基因例如靶基因,包括作为初级转录产物的RNA加工的产物的mRNA。

[0440] 可以关于单链RNAi剂的链与靶序列之间或反义寡核苷酸与靶序列之间的碱基匹配在本文中使用术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”,如从其使用的上下文中可以理解的。当单链RNAi剂、反义寡核苷酸或其他寡核苷酸的每个碱基能够与靶链上的顺序碱基进行碱基配对时,当最大对齐时,单链RNAi剂或反义寡核苷酸或其他寡核苷酸的链与靶序列的链互补。作为非限制性实例,如果靶序列具有例如5’-GCAUAGCGAGCGAGGGAAAAC-3’的碱基序列,则具有5’GUUUUCCCUCGCUCGCUAUGC-3’的碱基序列的PNPLA3寡核苷酸与这种靶序列互补或完全互补。当然,要注意的是用T取代U或反之亦然,不会改变互补量。

[0441] 如本文所用,与靶序列“基本上互补”的多核苷酸在很大程度上或大部分是互补的,但不是100%互补的。在一些实施方案中,基本上互补的序列(例如,单链RNAi剂的链或反义寡核苷酸)与和靶序列100%互补的序列具有1、2、3、4或5个错配。在单链RNAi剂的情况下,本公开指出在许多情况下5’末端核苷酸(N1)与靶序列的互补序列具有错配。同样,在单链RNAi剂中,3’-末端二核苷酸,如果存在的话,可以与靶序列的互补序列错配。作为非限制性实例,如果靶序列具有例如5’-GCAUAGCGAGCGAGGGAAAAC-3’的碱基序列,则具有5’TUUUUCCCUCGCUCGCUAUTU-3’的碱基序列的单链RNAi剂与这种靶序列基本上互补。

[0442] 本公开在表1A和其他地方呈现了各种单链RNAi剂和反义寡核苷酸和其他寡核苷酸,其中的每个都具有限定的碱基序列。在一些实施方案中,本公开涵盖具有以下碱基序列的任何寡核苷酸,所述碱基序列是以下、包含以下或包含以下的一部分:本文公开的任何各种单链RNAi剂、反义寡核苷酸和其他寡核苷酸的碱基序列。在一些实施方案中,本公开涵盖具有以下碱基序列的任何寡核苷酸,所述碱基序列是以下、包含以下或包含以下的一部分:本文公开的任何各种单链RNAi剂、反义寡核苷酸和其他寡核苷酸的碱基序列,其具有任何化学修饰、立体化学、格式、结构特征(例如,如果所述寡核苷酸是单链RNAi剂,则是5’-末端结构、5’-末端区域、5’核苷酸部分、种子区域、种子后区域、3’-末端区域、3’-末端二核苷酸、3’-末端帽或其任何结构、样式或部分)和/或本文所述的任何其他修饰(例如,与诸如靶向部分、碳水化合物部分、GalNAc部分、脂质部分等的另一个部分的缀合;和/或多聚化)。

[0443] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的碱基序列是以下、包含以下或包含以下的一部分:本文公开的任何寡核苷酸的碱基序列。

[0444] 在一些实施方案中,本公开公开了本文所述序列的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开公开了本文所述序列的PNPLA3寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所述序列的PNPLA3寡核苷酸

是单链RNAi剂。在一些实施方案中,所述序列的PNPLA3寡核苷酸是指导RNA酶H介导的敲低的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,所述序列的PNPLA3寡核苷酸同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低。在一些实施方案中,所述序列的PNPLA3寡核苷酸包含本文所述的任何结构(例如,本文所述的任何5'-末端结构,5'-末端区域,5'核苷酸部分,种子区域,种子后区域,3'-末端二核苷酸,3'-末端帽或这些结构中的任一个的任何部分,或者任何化学、立体化学、附加化学部分等)。如果寡核苷酸是ssRNAi剂,则所述序列之前可以是T(作为非限制性实例,2'-脱氧T、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS T或5'-(S)-PH T)或者第一个核碱基被T(作为非限制性实例,2'-脱氧T、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS T或5'-(S)-PH T)替代,并且/或者之后是3'-末端二核苷酸(例如,作为非限制性实例:TT、UU、TU等)。在各种序列中,U可以被T替代,或反之亦然,或者序列可以包含U和T的混合物。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的长度不超过总计约49、45、40、30、35、25、23个核苷酸。在一些实施方案中,部分是具有0-3个错配的总计至少15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸的跨度。在一些实施方案中,部分是具有0-3个错配的总计至少15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸的跨度,其中具有0个错配的跨度是互补的,并且具有1个或多个错配的跨度是基本上互补的序列的非限制性实例。在一些实施方案中,其中上述序列以5'-末端的U开始,所述U可以缺失和/或被另一个碱基替代。在一些实施方案中,本公开涵盖具有以下碱基序列的任何寡核苷酸,所述碱基序列是以下或包含以下或包含以下的一部分:具有本文公开的格式或格式的一部分的本文公开的任何寡核苷酸。

[0445] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分,其中一部分是15个连续碱基的跨度或具有1-5个错配的15个连续碱基的跨度。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何碱基序列或其部分与本文所述的任何其他结构元件或修饰的组合,包括但不限于,糖;碱基;核苷酸间键联;立体化学或其样式;附加的化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、GalNAc部分等;5'-末端结构;5'-末端区域;5'核苷酸部分;种子区域;种子后区域;3'-末端区域;3'-末端二核苷酸;3'-末端帽;糖、碱基或核苷酸间键联的修饰样式;其格式或任何结构元件,和/或本文所述的任何其他结构元件或修饰;并且在一些实施方案中,本公开涉及任何此类寡核苷酸的多聚体。

[0446] 下表1A中公开了具有各种碱基序列的寡核苷酸的非限制性实例。

[0447]

表 1A.寡核苷酸。

PNPLA3 寡核苷酸。

WAVE ID	裸序列	序列	立体化学
WV-3367	AAGGGCATGAAGCAGGAACA	mA * mAmGmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3368	GAAGGGCATGAAGCAGGAAC	mG * mAmAmGmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3369	AGAAGGGCATGAAGCAGGAA	mA * mGmAmAmG * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3370	UAGAAGGGCATGAAGCAGGA	mU * mAmGmAmA * G * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3371	GUAGAAGGGCATGAAGCAGG	mG * mUmAmGmA * A * G * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3372	UGUAGAAGGGCATGAAGCAG	mU * mGmUmAmG * A * A * G * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3373	CUGUAGAAGGGCATGAAGCA	mC * mUmGmUmA * G * A * A * G * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3374	ACUGUAGAAGGGCATGAAGC	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * G * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3375	CACUGTAGAAGGGCAUGAAG	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * G * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3376	CCACUGTAGAAGGGCAUGAA	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * G * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3377	UUCCGACTCCTGGCCUUCCG	mU * mUmCmCmG * A * C * T * C * C * T * G * G * C * C * mUmUmCmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX

[0448]

WV-3378	UCCGACTCCTGGCCTUCCGC	mU * mCmCmGmA * C * T * C * C * T * G * G * C * C * T * T * mUmCmCmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3379	CCGACTCCTGGCCTTCCGCA	mC * mCmGmAmC * T * C * C * T * G * G * C * C * T * T * mCmCmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3380	ACCUGAGGATGGACCGCGGG	mA * mCmCmUmG * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * mGmCmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3381	UGUGCTTGGCTCCTGCCUGG	mU * mGmUmGmC * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * mCmCmUmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3382	CUGGACCTGAGGATGGACCG	mC * mUmGmGmA * C * C * C * T * G * A * G * G * A * T * G * mGmAmCmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3383	UGUUCCGACTCCTGGCCUUC	mU * mGmUmUmC * C * G * A * C * T * C * C * T * G * G * mCmCmUmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3384	GUUCCGACTCCTGGCCUUCC	mG * mUmUmCmC * G * A * C * T * C * C * T * G * G * C * mCmUmUmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3385	CGACUCCTGGCCTTCCGCAC	mC * mGmAmCmU * C * C * T * G * G * C * C * T * T * C * mCmGmCmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3386	CCUGCTGTGCTTGGCUCCUG	mC * mCmUmGmC * T * G * T * G * C * T * T * T * G * G * C * mUmCmCmU * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3387	UCUUGTTACCCCCGCCAUGG	mU * mCmUmUmG * T * T * A * C * C * C * C * C * C * G * C * mCmAmUmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3388	CCUGCCTCAGTGTCTCGGCC	mC * mCmUmGmC * C * T * C * A * G * T * G * T * C * T * mCmGmGmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3389	CCCUGCCTCAGTGTCUCGGC	mC * mCmCmUmG * C * C * T * C * A * G * T * G * T * C * mUmCmGmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3390	UUACCCCCGCCATGGAGACG	mU * mUmAmCmC * C * C * C * G * C * C * A * T * G * G * mAmGmAmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3391	ACCCCCGCCATGGAGACGUU	mA * mCmCmCmC * C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * mAmCmGmU * mU	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-3392	GACCUGAGGATGGACCG	mG * mAmCmCmU * G * A * G * G * A * T * G * G	XOOOXXXXXXXXXXOOOX

[0449]

	CGG	* A * C * mCmGmCmG * mG	OX
WV-3393	GGACCTGAGGATGGACC GCG	mG * mGmAmCmC * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * mCmCmGmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3394	UACCCCCGCCATGGAGA CGU	mU * mAmCmCmC * C * C * G * C * C * A * T * G * G * A * mGmAmCmG * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3395	GGGACCCTCTGCACTGG GCU	mG * mGmGmAmC * C * C * T * C * T * G * C * A * C * T * mGmGmGmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3396	CCUGGGCGAGAGGGTGU CCA	mC * mCmUmGmG * G * C * G * A * G * A * G * G * G * T * mGmUmCmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3397	CCCCCGCCATGGAGACG UUU	mC * mCmCmCmC * G * C * C * A * T * G * G * A * G * A * mCmGmUmU * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3398	UCUGCTGGACAGCCCUU GGG	mU * mCmUmGmC * T * G * G * A * C * C * A * G * G * C * C * C * mUmUmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3399	CUGCACTGGGCTTCCUG GUG	mC * mUmGmCmA * C * T * G * G * G * C * T * T * C * C * mUmGmGmU * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3400	UCCUGCTGTGCTTGGCU CCU	mU * mCmCmUmG * C * T * G * T * G * C * T * T * G * G * mCmUmCmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3401	CUCCUGCTGTGCTTGGC UCC	mC * mUmCmCmU * G * C * T * G * T * G * C * T * T * G * mGmCmUmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3402	UGGACCTGAGGATGGAC CGC	mU * mGmGmAmC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * mAmCmCmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3403	UACCCTGCCTCAGTGUC UCG	mU * mAmCmCmC * T * G * C * C * T * C * A * G * T * G * mUmCmUmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3404	AGGGACCCTCTGCACUG GGC	mA * mGmGmGmA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * mUmGmGmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3405	CUCAGGCAGCGGGTCGC CCC	mC * mUmCmAmG * G * C * A * G * C * G * G * G * T * C * mGmCmCmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3406	CCUCAGTGTCTCGGCCA GGG	mC * mCmUmCmA * G * T * G * T * C * T * C * G * G * C * mCmAmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0450]

WV-3407	AUUUGGGACCTGGAGGC GGG	mA * mUmUmUmG * G * G * A * C * C * T * G * G * A * G * mGmCmGmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3408	CUUGUTACCCCCGCCAU GGA	mC * mUmUmGmU * T * A * C * C * C * C * C * C * G * C * C * mAmUmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3409	ACAUGGGCCAGCCTACC CCC	mA * mCmAmUmG * G * G * C * C * C * A * G * C * C * T * A * mCmCmCmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3410	UGCUGTGCTTGGCTCCU GCC	mU * mGmCmUmG * T * G * C * T * T * G * G * C * T * C * mCmUmGmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3411	ACCUGTGAGGTCACCCA CUG	mA * mCmCmUmG * T * G * A * G * G * T * C * A * C * C * mCmAmCmU * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3412	AUGUUCCGACTCCTGGC CUU	mA * mUmGmUmU * C * C * G * A * C * T * C * C * T * G * mGmCmCmU * mU	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3413	CUCUGCTGGACAGCCCU UGG	mC * mUmCmUmG * C * T * G * G * A * C * A * G * C * C * mCmUmUmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3414	GCCUGGGCGAGAGGGUG UCC	mG * mCmCmUmG * G * G * C * G * A * G * A * G * G * G * mUmGmUmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3415	CUGGUGGACATTGGCCG GGA	mC * mUmGmGmU * G * G * A * C * A * T * T * G * G * C * mCmGmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3416	CUGCUCCAGCGGGATAC CGG	mC * mUmGmCmU * C * C * A * G * C * G * G * G * A * T * mAmCmCmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3417	UUGUUACCCCCGCCAUG GAG	mU * mUmGmUmU * A * C * C * C * C * C * G * C * C * A * mUmGmGmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3418	UGUUACCCCCGCCATGG AGA	mU * mGmUmUmA * C * C * C * C * C * G * C * C * A * T * mGmGmAmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3419	AGCGCTCTCTACCCTGCC UC	mA * mGmCmGmC * T * C * C * T * C * T * A * C * C * C * T * mGmCmCmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3420	UGGGCGAGAGGGTGTCC AGG	mU * mGmGmGmC * G * A * G * A * G * G * G * T * G * T * mCmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3421	AGGCUGGGATCCTCCAC	mA * mGmGmCmU * G * G * G * A * T * C * C * T * G * A * T * mCmCmUmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX

[0451]

	GUC	* C * C * mAmCmGmU * mC	OX
WV-3422	UGGUGGACATTGGCCGG GAG	mU * mGmGmUmG * G * A * C * A * T * T * G * G * C * C * mGmGmGmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3423	AGAGGCTGGGATCCTCC ACG	mA * mGmAmGmG * C * T * G * G * G * A * T * C * C * T * mCmCmAmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3424	GCUGGTGGACATTGGCC GGG	mG * mCmUmGmG * T * G * G * A * C * A * T * T * G * G * mCmCmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3425	UCUGCTCCAGCGGGAUA CCG	mU * mCmUmGmC * T * C * C * A * G * C * G * G * G * A * mUmAmCmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3426	UCUGCACTGGGCTTCCU GGU	mU * mCmUmGmC * A * C * T * G * G * G * C * T * T * C * mCmUmGmG * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3427	GCGCUCTCTACCCTGCCU CA	mG * mCmGmCmU * C * T * C * T * A * C * C * C * T * G * mCmCmUmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3428	CUGCCTCAGTGTCTCGGC CA	mC * mUmGmCmC * T * C * A * G * T * G * T * C * T * C * mGmGmCmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3429	GACUCCTGGCCTTCCGC ACA	mG * mAmCmUmC * C * T * G * G * C * C * T * T * C * C * mGmCmAmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3430	CGACCTCAGGATCCAUC CCU	mC * mGmAmCmC * T * C * A * G * G * A * T * C * C * A * mUmCmCmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3431	GGCUGGGATCCTCCACG UCA	mG * mGmCmUmG * G * G * A * T * C * C * T * C * C * A * mCmGmUmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3432	UCUGCTAGACTCGCCUC CUC	mU * mCmUmGmC * T * A * G * A * C * T * C * G * C * C * mUmCmCmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3433	AUCUUGTTACCCCCGCC AUG	mA * mUmCmUmU * G * T * T * A * C * C * C * C * C * G * mCmCmAmU * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3434	UGCACTGGGCTTCCTGG UGU	mU * mGmCmAmC * T * G * G * G * C * T * T * T * C * C * T * mGmGmUmG * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3435	UGCAGAGACCCTGTCGG AGG	mU * mGmCmAmG * A * G * A * C * C * C * T * G * T * C * mGmGmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0452]

WV-3436	CCCAGCACCTTGAGAUC CGG	mC * mCmCmAmG * C * A * C * C * T * T * G * A * G * A * mUmCmCmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3437	CCUGUGAGGTCACCCAC UGC	mC * mCmUmGmU * G * A * G * G * T * C * A * C * C * C * mAmCmUmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3438	CUGGGCATGGCGACCUC AGG	mC * mUmGmGmG * C * A * T * G * G * C * G * A * C * C * mUmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3439	CGAACTGCACCCCTTCCC AC	mC * mGmAmAmC * T * G * C * A * C * C * C * C * T * T * mCmCmCmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3440	AGCGAGCCTGGGCGAGA GGG	mA * mGmCmGmA * G * C * C * T * G * G * G * C * G * A * mGmAmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3441	GGGUGGCCTCTGCTTUG GUC	mG * mGmGmUmG * G * C * C * T * C * T * G * C * T * T * mUmGmGmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3442	UGCUCCAGCGGGATACC GGA	mU * mGmCmUmC * C * A * G * C * G * G * G * A * T * A * mCmCmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3443	AAGGGACCCTCTGCACU GGG	mA * mAmGmGmG * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * mCmUmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3444	CUGCUGTGCTTGGCTCC UGC	mC * mUmGmCmU * G * T * G * C * T * T * G * G * C * T * mCmCmUmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3445	GACGAACTGCACCCCUU CCC	mG * mAmCmGmA * A * C * T * G * C * A * C * C * C * C * mUmUmCmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3446	UGCUGTAGCGAGCCTGG GCG	mU * mGmCmUmG * T * A * G * C * G * A * G * C * C * T * mGmGmGmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3447	CACCCCTTCCCACAGCA UGG	mC * mAmCmCmC * C * T * T * C * C * C * A * C * A * G * mCmAmUmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3448	GACCCTCTGCACTGGGC UUC	mG * mAmCmCmC * T * C * T * G * C * A * C * C * T * G * G * mGmCmUmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3449	AGCUGGTGGACATTGGC CGG	mA * mGmCmUmG * G * T * G * G * A * C * A * T * T * G * mGmCmCmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3450	UCUCGGCCAGGGCATUC	mU * mCmUmCmG * G * C * C * A * G * G * G * C	XOOOXXXXXXXXXXOO

[0453]

	CCA	* A * T * mUmCmCmC * mA	OX
WV-3451	GGUCUCTGCTGGACAGC CCU	mG * mGmUmCmU * C * T * G * C * T * G * G * A * C * A * mGmCmCmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3452	CGGCCAGGGCATTCCCA GCG	mC * mGmGmCmC * A * G * G * G * C * A * T * T * C * C * mCmAmGmC * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3453	UGGGATCCTCCACGTCA CAG	mU * mGmGmGmA * T * C * C * T * C * C * A * C * G * T * mCmAmCmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3454	CCUGUTGGCTGCTCACU GGC	mC * mCmUmGmU * T * G * G * C * T * G * C * T * C * A * mCmUmGmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3455	GCCUGTTGGCTGCTCAC UGG	mG * mCmCmUmG * T * T * G * G * C * T * G * C * T * C * mAmCmUmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3456	CCAGCACCTTGAGATCC GGG	mC * mCmAmGmC * A * C * C * T * T * G * A * G * A * T * mCmCmGmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3457	GGGAGGCCTGTTGGCUG CUC	mG * mGmGmAmG * G * C * C * T * G * T * T * G * G * C * mUmGmCmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3458	CUCAGAGGCTGGGATCC UCC	mC * mUmCmAmG * A * G * G * C * T * G * G * G * A * T * mCmCmUmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3459	GCCUCAGTGTCTCGGCC AGG	mG * mCmCmUmC * A * G * T * G * T * C * T * C * G * G * mCmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3460	CACAUGGGCCAGCCTAC CCC	mC * mAmCmAmU * G * G * G * C * C * A * G * C * C * T * mAmCmCmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3461	GGUGGCCTCTGCTTTGG UCU	mG * mGmUmGmG * C * C * T * C * T * G * C * T * T * T * mGmGmUmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3462	ACGUUGTCACTCACTCC UCC	mA * mCmGmUmU * G * T * C * A * C * T * C * A * C * T * mCmCmUmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3858	UAGAAAGGCATGAAGCA GGA	mU * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-3859	GUAGAAAGGCATGAAGC AGG	mG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0454]

WV-3860	UGUAGAAAGGCATGAAG CAG	mU * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3861	CUGUAGAAAGGCATGAA GCA	mC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3862	ACUGUAGAAAGGCATGA AGC	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3863	CACUGTAGAAAGGCAUG AAG	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3864	CCACUGTAGAAAGGCAU GAA	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-3865	UAGAAAGGCA TGAAGCAGGAACAUA	mU * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmCmAmU * mA	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3866	GUAGAAAGGC ATGAAGCAGGAACAU	mG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmAmCmA * mU	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3867	UGUAGAAAGG CATGAAGCAGGAACA	mU * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3868	CUGUAGAAAG GCATGAAGCAGGAAC	mC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3869	ACUGUAGAAA GGCATGAAGCAGGAA	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3870	CACUGTAGAA AGGCATGAAGCAGGA	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3871	CCACUGTAGA AAGGCATGAAGCAGG	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3872	GCCACTGTAG AAAGGCATGAAGCAG	mG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3873	GGCCACTGTA GAAAGGCATGAAGCA	mG * mGmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3874	AGGCCACTGT	mA * mGmGmCmC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * C * T * G * T	XOOOXXXXXXXXXXXX XXXOOOX

[0455]

	AGAAAGGCATGAAGC	* A * A * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XXXOOOX
WV-3875	AAGGCCACTG TAGAAAGGCAUGAAG	mA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3876	UAAGGCCACT GTAGAAAGGCAUGAA	mU * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXX XXXOOOX
WV-3986	TCUGAGGAUGGACCGCG GGTU	T * fC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mCfC * mG * fC * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3987	TCUGAGGAUGGACCGCG GGTU	T * fC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mCfC * mGfCmGfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOO OXX
WV-3988	TCUGAGGAUGGACCGCG GGTU	POT * fC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mCfC * mG * fC * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3989	TACCUGAGGAUGGACCG CGTU	T * fA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mC * fC * mG * fC * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3990	TACCUGAGGAUGGACCG CGTU	T * fA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mCfCmGfCmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOO OXX
WV-3991	TGACCUGAGGAUGGACC GCTU	T * fG * mAfC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfG * mA * fC * mC * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3992	TGACCUGAGGAUGGACC GCTU	T * fG * mAfC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfG * mA * fC * mC * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3993	TUUGUUACCCCCGCCAU GGTU	T * fU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfC * mC * fA * mU * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3994	TUUGUUACCCCCGCCAU GGTU	T * fU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfAmUfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOO OXX
WV-3995	TCCCCGCCAUGGAGACG UUTU	T * fC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfG * mAfG * mA * fC * mG * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-3996	TCCCCGCCAUGGAGACG UUTU	T * fC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfG * mAfG * mAfCmGfUmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOO OXX
WV-3997	TACCCCCGCCAUGGAGA CGTU	T * fA * mCfC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfG * mA * fG * mA * fC * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX

[0456]

WV-3998	TACCCCCGCCAUGGAGA CGTU	T * fA * mCfC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfG * mAfGmAfCmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-3999	TCCCCCGCCAUGGAGAC GUTU	T * fC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfG * mGfA * mG * fA * mC * fG * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4000	TCCCCCGCCAUGGAGAC GUTU	T * fC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfG * mGfA * mGfAmCfGmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4001	TGCUCGGCCUCCAGUUC CATU	T * fG * mCfU * mCfG * mGfC * mCfU * mCfC * mAfG * mU * fU * mC * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4002	TGCUCGGCCUCCAGUUC CATU	T * fG * mCfU * mCfG * mGfC * mCfU * mCfC * mAfG * mUfUmCfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4003	TGGACCCUCUGCACUGG GCTU	T * fG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mAfC * mU * fG * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4004	TGGACCCUCUGCACUGG GCTU	T * fG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mAfC * mUfGmGfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4005	TGACCCUCUGCACUGGG CUTU	T * fG * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfA * mCfU * mG * fG * mG * fC * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4006	TGACCCUCUGCACUGGG CUTU	T * fG * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfA * mCfU * mGfGmGfCmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4018	TCAUGAAGCAGGAACAU ACTU	T * fC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mC * fA * mU * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4019	TGCAUGAAGCAGGAACA UATU	T * fG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfA * mA * fC * mA * fU * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4020	TGGCAUGAAGCAGGAAC AUTU	T * fG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mA * fA * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4021	TAGGCAUGAAGCAGGAA CATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mG * fA * mA * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4022	TAAGGCAUGAAGCAGGA ACTU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mG * fG * mA * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXX
WV-4023	TAAAGGCAUGAAGCAGG	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA *	XXOXOXOXOXOXOXXXX

[0457]

	AATU	mGfC * mA * fG * mG * fA * mA * T * mU	XXX
WV-4024	TGAAAGGCAUGAAGCAG GATU	T * fG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mC * fA * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4025	TAGAAAGGCAUGAAGCA GGTU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mG * fC * mA * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4026	TUAGAAAGGCAUGAAGC AGTU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mA * fG * mC * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4027	TGUAGAAAGGCAUGAAG CATU	T * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mA * fA * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4028	TUGUAGAAAGGCAUGAA GCTU	T * fU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mG * fA * mA * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4029	TCUGUAGAAAGGCAUGA AGTU	T * fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mU * fG * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4030	TACUGUAGAAAGGCAUG AATU	T * fA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mA * fU * mG * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4031	TCACUGUAGAAAGGCAU GATU	T * fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mC * fA * mU * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4032	TCCACUGUAGAAAGGCA UGTU	T * fC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mG * fC * mA * fU * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4033	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mG * fG * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4034	TGGCCACUGUAGAAAGG CATU	T * fG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mA * fG * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4035	TAGGCCACUGUAGAAAG GCTU	T * fA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * fA * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4036	TAAGGCCACUGUAGAAA GGTU	T * fA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mA * fA * mA * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4037	TUAAGGCCACUGUAGAA AGTU	T * fU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * fA * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXX

[0458]

WV-4038	TAUAAGGCCACUGUAGA AATU	T * fA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mA * fG * mA * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXX
WV-4039	TCAUGAAGCAGGAACAU ACTU	T * fC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mCfAmUfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4040	TGCAUGAAGCAGGAACA UATU	T * fG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfA * mAfCmAfUmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4041	TGGCAUGAAGCAGGAAC AUTU	T * fG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfAmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4042	TAGGCAUGAAGCAGGAA CATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfAmAfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4043	TAAGGCAUGAAGCAGGA ACTU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfGmAfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4044	TAAAGGCAUGAAGCAGG AATU	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfGmGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4045	TGAAAGGCAUGAAGCAG GATU	T * fG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfAmGfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4046	TAGAAAGGCAUGAAGCA GGTU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfCmAfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4047	TUAGAAAGGCAUGAAGC AGTU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfGmCfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4048	TGUAGAAAGGCAUGAAG CATU	T * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfAmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4049	TUGUAGAAAGGCAUGAA GCTU	T * fU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfAmAfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4050	TCUGUAGAAAGGCAUGA AGTU	T * fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfGmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4051	TACUGUAGAAAGGCAUG AATU	T * fA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfUmGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4052	TCACUGUAGAAAGGCAU	T * fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA *	XXOXOXOXOXOXOXOOO

[0459]

	GATU	mGfG * mCfAmUfGmA * T * mU	OXX
WV-4053	TCCACUGUAGAAAGGCA UGTU	T * fC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfCmAfUmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4054	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4055	TGGCCACUGUAGAAAGG CATU	T * fG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfGmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4056	TAGGCCACUGUAGAAAG GCTU	T * fA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfAmGfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4057	TAAGGCCACUGUAGAAA GGTU	T * fA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfAmAfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4058	TUAAGGCCACUGUAGAA AGTU	T * fU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfAmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4059	TAUAAGGCCACUGUAGA AATU	T * fA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfGmAfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-4060	TCAUGAAGCAGGAACAU ACCATU	T * fC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mC * fA * mU * fA * mC * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4061	TGCAUGAAGCAGGAACA UACCTU	T * fG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfA * mA * fC * mA * fU * mA * fC * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4062	TGGCAUGAAGCAGGAAC AUACTU	T * fG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mA * fA * mC * fA * mU * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4063	TAGGCAUGAAGCAGGAA CAUATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mG * fA * mA * fC * mA * fU * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4064	TAAGGCAUGAAGCAGGA ACAUTU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mG * fG * mA * fA * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX

[0460]

		mU	
WV-4065	TAAAGGCAUGAAGCAGG AACATU	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mA * fG * mG * fA * mA * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4066	TGAAAGGCAUGAAGCAG GAACTU	T * fG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mC * fA * mG * fG * mA * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4067	TAGAAAGGCAUGAAGCA GGAATU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mG * fC * mA * fG * mG * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4068	TUAGAAAGGCAUGAAGC AGGATU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mA * fG * mC * fA * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4069	TGUAGAAAGGCAUGAAG CAGGTU	T * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mA * fA * mG * fC * mA * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4070	TUGUAGAAAGGCAUGAA GCAGTU	T * fU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mG * fA * mA * fG * mC * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4071	TCUGUAGAAAGGCAUGA AGCATU	T * fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mU * fG * mA * fA * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4072	TACUGUAGAAAGGCAUG AAGCTU	T * fA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mA * fU * mG * fA * mA * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4073	TCACUGUAGAAAGGCAU GAAGTU	T * fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mC * fA * mU * fG * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-4074	TCCACUGUAGAAAGGCA	T * fC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA *	XXOXOXOXOXOXXXX

[0461]

	UGAATU	mAfG * mG * fC * mA * fU * mG * fA * mA * T * mU	XXXXX
WV-4075	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mG * fG * mC * fA * mU * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4076	TGGCCACUGUAGAAAGG CAUGTU	T * fG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mA * fG * mG * fC * mA * fU * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4077	TAGGCCACUGUAGAAAG GCAUTU	T * fA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * fA * mG * fG * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4078	TAAGGCCACUGUAGAAA GGCATU	T * fA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mA * fA * mA * fG * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4079	TUAAGGCCACUGUAGAA AGGCTU	T * fU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * fA * mA * fA * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4080	TAUAAGGCCACUGUAGA AAGGTU	T * fA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mA * fG * mA * fA * mA * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4081	TGAUAAGGCCACUGUAG AAAGTU	T * fG * mAfU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mU * fA * mG * fA * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4082	TGGAUAAGGCCACUGUA GAAATU	T * fG * mGfA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mG * fU * mA * fG * mA * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-4083	TCAUGAAGCAGGAACAU ACCATU	T * fC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mCfAmUfAmCfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4084	TGCAUGAAGCAGGAACA	T * fG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG *	XXOXOXOXOXOXOOO

[0462]

	UACCTU	mGfA * mAfCmAfUmAfCmC * T * mU	OOOXX
WV-4085	TGGCAUGAAGCAGGAAC AUACTU	T * fG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfAmCfAmUfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4086	TAGGCAUGAAGCAGGAA CAUATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfAmAfCmAfUmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4087	TAAGGCAUGAAGCAGGA ACAUTU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfGmAfAmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4088	TAAAGGCAUGAAGCAGG AACATU	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfGmGfAmAfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4089	TGAAAGGCAUGAAGCAG GAACTU	T * fG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfAmGfGmAfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4090	TAGAAAGGCAUGAAGCA GGAATU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfCmAfGmGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4091	TUAGAAAGGCAUGAAGC AGGATU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfGmCfAmGfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4092	TGUAGAAAGGCAUGAAG CAGGTU	T * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfAmGfCmAfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4093	TUGUAGAAAGGCAUGAA GCAGTU	T * fU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfAmAfGmCfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4094	TCUGUAGAAAGGCAUGA AGCATU	T * fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfGmAfAmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4095	TACUGUAGAAAGGCAUG AAGCTU	T * fA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfUmGfAmAfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4096	TCACUGUAGAAAGGCAU GAAGTU	T * fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfAmUfGmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4097	TCCACUGUAGAAAGGCA UGAATU	T * fC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfCmAfUmGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4098	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0463]

WV-4099	TGGCCACUGUAGAAAGG CAUGTU	T * fG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfGmGfCmAfUmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4100	TAGGCCACUGUAGAAAG GCAUTU	T * fA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4101	TAAGGCCACUGUAGAAA GGCATU	T * fA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfAmAfGmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4102	TUAAGGCCACUGUAGAA AGGCTU	T * fU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfAmAfAmGfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4103	TAUAAGGCCACUGUAGA AAGGTU	T * fA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfGmAfAmAfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4104	TGAUAAGGCCACUGUAG AAAGTU	T * fG * mAfU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfAmGfAmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-4105	TGGAUAAGGCCACUGUA GAAATU	T * fG * mGfA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfUmAfGmAfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-5305	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOOOO OOOXX
WV-5306	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOOOO OOOXX
WV-5307	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfAmGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOOOOOOO OOOXX
WV-5308	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfGmUfAmGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOOOOOOOOO OOOXX
WV-5309	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfCmUfGmUfAmG fAmAfAmGfGmCfA mUfGmA * T * mU	XXOXOOOOOOOOOOOOO OOOXX
WV-5310	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfCmAfCmUfGmUfA mGfAmAfAmGfGmC fAmUfGmA * T * mU	XXOOOOOOOOOOOOOOO OOOXX
WV-5311	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCC * mAC * mUG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0464]

WV-5312	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-5313	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-5314	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-5315	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOOOO OXX
WV-5316	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfAmAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOOOOOOO OXX
WV-5317	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfAmGfAmAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOOOOOOOOO OXX
WV-5318	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG mUfAmGfA mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOOOOOOOOOOO OXX
WV-5319	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC mUfGmUfAmGfA mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOOOOOOOOOOOOO OXX
WV-5320	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfCmA fCmUfGmUfAmG fAmAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOOOOOOOOOOOOOOO OXX
WV-5321	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCC * mAC * mUG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-5322	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-5323	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-5324	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-5325	TAGGCAUGAAGCAGGAA CATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfGmGfAmAfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOOOOO OXX
WV-5326	TAGGCAUGAAGCAGGAA	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC *	XXOXOXOXOXOOOOO

[0465]

	CAUATU	mAfGmGfAmAfCmAfUmA * T * mU	OOOXX
WV-6153	TCCUGAGGAUGGACCGC GGGGTU	T * fC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfG * mAfC * mC * fG * mC * fG * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6154	TGUGCUUGGCUCCUGCC UGGGTU	T * fG * mUfG * mCfU * mUfG * mGfC * mUfC * mCfU * mG * fC * mC * fU * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6155	TCUUGUUACCCCCGCCA UGGATU	T * fC * mUfU * mGfU * mUfA * mCfC * mCfC * mCfG * mC * fC * mA * fU * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6156	TUACCCCCGCCAUGGAG ACGUTU	T * fU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfG * mG * fA * mG * fA * mC * fG * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6157	TCCCCCGCCAUGGAGAC GUUUTU	T * fC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfG * mGfA * mG * fA * mC * fG * mU * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6158	TACCUGAGGAUGGACCG CGGGTU	T * fA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfA * mC * fC * mG * fC * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6159	TGACCUGAGGAUGGACC GCGGTU	T * fG * mAfC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfG * mA * fC * mC * fG * mC * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6160	TACCCCCGCCAUGGAGA CGUUTU	T * fA * mCfC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfG * mA * fG * mA * fC * mG * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6161	TGGACCCUCUGCACUGG GCUUTU	T * fG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mAfC * mU * fG * mG * fG * mC * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6162	TCUGCUGGACAGCCCUU	T * fC * mUfG * mCfU * mGfG * mAfC * mAfG *	XXOXOXOXOXOXXX

[0466]

	GGGGTU	mCfC * mC * fU * mU * fG * mG * fG * mG * T * mU	XXXXX
WV-6163	TUGCACUGGGCUUCCUG GUGUTU	T * fU * mGfC * mAfC * mUfG * mGfG * mCfU * mUfC * mC * fU * mG * fG * mU * fG * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6164	TGGACCUGAGGAUGGAC CGCGTU	T * fG * mGfA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mG * fA * mC * fC * mG * fC * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6165	TGGGACCCUCUGCACUG GGCUTU	T * fG * mGfG * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfA * mC * fU * mG * fG * mG * fC * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6166	TUUGUUACCCCCGCCAU GGAGTU	T * fU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfC * mC * fA * mU * fG * mG * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6167	TCCUGUGAGGUCACCCA CUGCTU	T * fC * mCfU * mGfU * mGfA * mGfG * mUfC * mAfC * mC * fC * mA * fC * mU * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6168	TUCUGCUGGACAGCCCU UGGGTU	T * fU * mCfU * mGfC * mUfG * mGfA * mCfA * mGfC * mC * fC * mU * fU * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6169	TUGCUCCAGCGGGAUAC CGGATU	T * fU * mGfC * mUfC * mCfA * mGfC * mGfG * mGfA * mU * fA * mC * fC * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6170	TGGCUGGGAUCCUCCAC GUCATU	T * fG * mGfC * mUfG * mGfG * mAfU * mCfC * mUfC * mC * fA * mC * fG * mU * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6171	TUCUUGUUACCCCCGCC AUGGTU	T * fU * mCfU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfC * mG * fC * mC * fA * mU * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXXX XXXXX

[0467]

WV-6172	TAGGGACCCUCUGCACU GGGCTU	T * fA * mGfG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mA * fC * mU * fG * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6173	TCUGUUGGCUGCUCACU GGCATU	T * fC * mUfG * mUfU * mGfG * mCfU * mGfC * mUfC * mA * fC * mU * fG * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6174	TCCUGAGGAUGGACCGC GGGGTU	T * fC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfG * mAfCmC * fG * mC * fG * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6175	TGUGCUUGGCUCCUGCC UGGGTU	T * fG * mUfG * mCfU * mUfG * mGfC * mUfC * mCfUmG * fC * mC * fU * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6176	TCUUGUUACCCCCGCCA UGGATU	T * fC * mUfU * mGfU * mUfA * mCfC * mCfC * mCfGmC * fC * mA * fU * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6177	TUACCCCCGCCAUGGAG ACGUTU	T * fU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfGmG * fA * mG * fA * mC * fG * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6178	TCCCCCGCCAUGGAGAC GUUUTU	T * fC * mCfC * mCfC * mGfC * mCfA * mUfG * mGfAmG * fA * mC * fG * mU * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6179	TACCUGAGGAUGGACCG CGGGTU	T * fA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA * mUfG * mGfAmC * fC * mG * fC * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6180	TGACCUGAGGAUGGACC GCGGTU	T * fG * mAfC * mCfU * mGfA * mGfG * mAfU * mGfGmA * fC * mC * fG * mC * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6181	TACCCCCGCCAUGGAGA CGUUTU	T * fA * mCfC * mCfC * mCfG * mCfC * mAfU * mGfGmA * fG * mA * fC * mG * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6182	TGGACCCUCUGCACUGG GCUUTU	T * fG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mAfCmU * fG * mG * fG * mC * fU * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6183	TCUGCUGGACAGCCCUU GGGGTU	T * fC * mUfG * mCfU * mGfG * mAfC * mAfG * mCfCmC * fU * mU * fG * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6184	TUGCACUGGGCUUCCUG GUGUTU	T * fU * mGfC * mAfC * mUfG * mGfG * mCfU * mUfCmC * fU * mG * fG * mU * fG * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOXXX XXXXX
WV-6185	TGGACCUGAGGAUGGAC	T * fG * mGfA * mCfC * mUfG * mAfG * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOOXXX

[0468]

	CGCGTU	mUfGmG * fA * mC * fC * mG * fC * mG * T * mU	XXXXX
WV-6186	TGGGACCCUCUGCACUG GGCUTU	T * fG * mGfG * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfAmC * fU * mG * fG * mG * fC * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6187	TUUGUUACCCCCGCCAU GGAGTU	T * fU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfC * mGfCmC * fA * mU * fG * mG * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6188	TCCUGUGAGGUCACCCA CUGCTU	T * fC * mCfU * mGfU * mGfA * mGfG * mUfC * mAfCmC * fC * mA * fC * mU * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6189	TUCUGCUGGACAGCCCU UGGGTU	T * fU * mCfU * mGfC * mUfG * mGfA * mCfA * mGfCmC * fC * mU * fU * mG * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6190	TUGCUCCAGCGGGAUAC CGGATU	T * fU * mGfC * mUfC * mCfA * mGfC * mGfG * mGfAmU * fA * mC * fC * mG * fG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6191	TGGCUGGGAUCCUCCAC GUCATU	T * fG * mGfC * mUfG * mGfG * mAfU * mCfC * mUfCmC * fA * mC * fG * mU * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6192	TUCUUGUUACCCCCGCC AUGGTU	T * fU * mCfU * mUfG * mUfU * mAfC * mCfC * mCfCmG * fC * mC * fA * mU * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6193	TAGGGACCCUCUGCACU GGGCTU	T * fA * mGfG * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfCmA * fC * mU * fG * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6194	TCUGUUGGCUGCUCACU GGCATU	T * fC * mUfG * mUfU * mGfG * mCfU * mGfC * mUfCmA * fC * mU * fG * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXX XXXXX
WV-6574	ACCCCGCGGU CCAUCCUCAGGUCCAGC	rArCrCrCrCrGrCrGrGrUrC rCrArUrCrCrUrCrA rGrGrUrCrCrCrArGrC	OOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOO
WV-6575	AUGACACCAG GAAGCCCAGUGCAGAGG	rArUrGrArCrArCrCrCrArGrG rArArGrGrCrCrCrArGrUrGrCrArGrArGrG	OOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOO
WV-6576	GAAGCCCAGU GCAGAGGGUCCCUUACU	rGrArArGrGrCrCrCrArArGrUrG rCrArGrArArGrGrGrUrCrCrCrUrUrArArCrU	OOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOO
WV-6577	AACGUCUCCA UGGCGGGGGUAACAAGA	rArArCrGrUrCrUrCrCrArU rGrGrCrGrGrGrGrGrUrArArCrArArGrA	OOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOO
WV-6585	TGCCACUGUAGAAAGGA AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmAfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0469]

WV-6586	TGCCACUGUAGAAAGGG AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmGfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6587	TGCCACUGUAGAAAGGU AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmUfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6588	TGCCACUGUAGAAGGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfG * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6589	TGCCACUGUAGAACGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfC * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6590	TGCCACUGUAGAAUGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfU * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6591	TGCCACUGUAGAAGGGG AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfG * mGfGmGfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6592	TGCCACUGUA GAAAGGCAUGAAGTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOOOXX
WV-6593	TGCCACUGUA GAAAGGCAUGAATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmAfA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOOXX
WV-6594	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOXX
WV-6595	TGCCACUGUAGAAAGGC ATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO XX
WV-6596	TGCCACUGUAGAAAGGC TU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOX X
WV-6597	TGCCACUGUAGAAAGGC AGG	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfA * G * mG	XXOXOXOXOXOXOOO XX
WV-6598	TGCCACUGUAGAAAGGC GG	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmC * G * mG	XXOXOXOXOXOXOOX X
WV-6599	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mC * fC * mA * fC * mU * fG * mU * fA * mG * fA * mA * fA * mG * fG * mC * fA * mU * fG * mA * T * mU	XXXXXXXXXXXXXXX XXXXX

[0470]

WV-6600	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * * fGmCfCmAfCmUfGmUfA mGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmAT * mU	XOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOX
WV-6601	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXO XOXXX
WV-6602	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mC * fCmA * fCmU * fGmU * fAmG * fAmA * fAmG * fGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXXOXOXOXOXOXOXOX OXOXX
WV-6603	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	TfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6604	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fGmCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XOOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6605	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mC * fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXXXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6606	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfCmAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOOOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6607	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mA * fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXXXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6608	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfCmUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOOOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6609	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mU * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXXXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6610	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfGmUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOOOXOXOXOOO OOOXX
WV-6611	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mU * fA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXXXOXOXOOO OOOXX
WV-6612	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfAmGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOOOXOXOOO OOOXX
WV-6613	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * fA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXXXOXOOO OOOXX
WV-6614	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA *	XXOXOXOXOXOOOXOOO

[0471]

	AUGATU	mGfAmAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOXX
WV-6615	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * fA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXOOO OOOXX
WV-6616	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mG * fGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXXOO OOOXX
WV-6617	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXO OOOXX
WV-6618	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmC * fAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOX OOOXX
WV-6619	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfA * mUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO XOOXX
WV-6620	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXOXX
WV-6621	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfG * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOXXX
WV-6622	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATA	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mA	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6623	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATG	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mG	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6624	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mC	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6625	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTA	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mA	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-6626	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTG	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mG	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-6627	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mC	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-6628	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mGmGmCmAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0472]

WV-6629	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCmC * mAfC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mGfGmCmAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6630	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCmC * mAfC * mUfG * fUmA * mGmA * mAfA * mGfGmCmAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6631	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCmC * mAfC * mUfG * mUfA * mGmA * mAfA * mGfGmCfAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6632	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * mG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6633	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * fCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6634	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCmC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6635	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * fAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6636	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAmC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6637	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * fUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6638	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUmG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6639	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * fUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6640	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUmA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6641	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * fGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6642	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGmA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6643	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOOO

[0473]

	AUGATU	fAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOXX
WV-6644	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAmA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6645	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * fGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6646	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGmGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6647	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGfCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6648	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCmAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6649	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAfUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6650	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6651	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGfA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6652	UGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	fU * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6653	AGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	fA * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6654	GGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	fG * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6655	CGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	fC * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6656	UGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	mU * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6657	AGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	mA * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0474]

WV-6658	GGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	mG * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6659	CGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	mC * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6660	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGfCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6661	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * Geo * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6662	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5CeofC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6663	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCm5Ceo * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6664	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * AeofC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6665	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAm5Ceo * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6666	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * TeofG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6667	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUGeo * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6668	TGCCACUGTAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * TeofA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6669	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUAeo * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6670	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * GeofA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6671	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGAeo * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6672	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOOO

[0475]

	AUGATU	AeofA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOXX
WV-6673	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAAeo * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6674	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * GeofGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6675	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGGeomCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6676	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGm5CeofAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6677	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCAeomUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6678	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfATeofGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6679	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUGeomA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6680	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGAeo * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6681	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5CeofC * AeofC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6682	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * AeofC * TeofG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6683	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5CeofC * mAfC * TeofG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6684	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5CeofC * AeofC * TeofG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6685	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	Teo * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6686	AGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	Aeo * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0476]

WV-6687	GGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	Geo * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6688	CGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	m5Ceo * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6689	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * lG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6690	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5lCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6691	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCm5lC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6692	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * lAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6693	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAm5lC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6694	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * lTfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6695	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUlG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6696	TGCCACUGTAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * lTfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6697	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUlA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6698	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * lGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6699	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGlA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6700	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * lAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6701	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOOO

[0477]

	AUGATU	mAlA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOXX
WV-6702	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * lGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6703	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGlGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6704	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGm5lCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6705	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmClAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6706	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAlTfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6707	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUlGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6708	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGlA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6709	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	lT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6710	AGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	lA * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6711	GGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	lG * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6712	CGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	m5lC * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6713	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5lCfC * lAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6714	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * lAfC * lTfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6715	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5lCfC * mAfC * lTfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0478]

WV-6716	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * m5lCfC * lAfC * lTfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6717	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * G * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6718	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * CfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6719	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * AfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6720	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * TfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6721	TGCCACUGTAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * TfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6722	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6723	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * GfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6724	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6725	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * AfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6726	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6727	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * GfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6728	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6729	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6730	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOOO

[0479]

	AUGATU	mAfA * mGfGmCAmUfGmA * T * mU	OOOXX
WV-6731	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfATfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6732	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6733	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6734	AGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	A * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6735	GGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	G * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6736	CGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	C * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6737	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * CfC * AfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6738	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * AfC * TfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6739	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * CfC * mAfC * TfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6740	TGCCACTGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * CfC * AfC * TfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6741	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCA * T * G * A * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO XXXXX
WV-6742	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * G * G * C * A * T * G * A * T * mU	XXOXOXOXOXOXXXX XXXXX
WV-6743	TGUCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mUfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6744	TGCUACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfU * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX

[0480]

WV-6745	TGCCGCUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mGfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6746	TGCCAUUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfU * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6747	TGCCACUGUGGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfG * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6748	TGCCACUGUAGGAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfG * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6749	TGCCACUGUAGAGAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mGfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6750	TGCCACUGUAGAAGGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfG * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6751	TGCCACUGUAGAAAGGU AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmUfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6752	TGCCACUGUAGAAAGGC GUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfGmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6753	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGGTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-6818	ACCUGAGGATGGACCGC GGG	mA * mC * mC * mU * mG * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * mG * mC * mG * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXX XX
WV-6819	ACCTGAGGATGGACCGC GGG	Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * Geo * m5Ceo * Geo * Geo * Geo Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXX XX
WV-6820	GGACCTGAGGATGGACC GCG	mG * mG * mA * mC * mC * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * mC * mC * mG * mC * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXX XX
WV-6821	GGACCTGAGGATGGACC GCG	Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXX XX
WV-6822	ACCUGAGGATGGACCGC	Mod001L001mA * mC * mC * mU * mG * A * G * G	OXXXXXXXXXXXXXXXX

[0481]

	GGG	* A * T * G * G * A * C * C * mG * mC * mG * mG * mG	XXX
WV-6823	ACCTGAGGATGGACCGC GGG	Mod001L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * Geo * m5Ceo * Geo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-6824	GGACCTGAGGATGGACC GCG	Mod001L001mG * mG * mA * mC * mC * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * mC * mC * mG * mC * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-6825	GGACCTGAGGATGGACC GCG	Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7113	ACCUGAGGATGGACCGC GGG	L001mA * mC * mC * mU * mG * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * mG * mC * mG * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7114	ACCTGAGGATGGACCGC GGG	L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * Geo * m5Ceo * Geo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7115	GGACCTGAGGATGGACC GCG	L001mG * mG * mA * mC * mC * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * mC * mC * mG * mC * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7116	GGACCTGAGGATGGACC GCG	L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7316	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfA * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXXXXXOXOXOOX OXOXX
WV-7317	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	VPT * fG * mCfC * mAfC * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfA * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXXXXXOXOXOOX OXOXX
WV-7403	CCCCCAGGCA GGAGCCAAGCACAGCAG	rCrCrCrCrCrArGrGrCrArGrGrA rGrCrCrArArArGrCrArCrArGrCrArG	OOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOOO
WV-7462	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXXXXXOXOXOOO OOOXX

[0482]

WV-7463	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOX OXOXX
WV-7464	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmCfAmUfGmA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOOOOO OSS
WV-7465	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS S
WV-7466	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmC * SfAmU * SfGmA * ST * SmU	SSOSOSSSSSSOSOSOOSOSO SS
WV-7467	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmCfAmUfGmA * ST * SmU	SSOSOSSSSSSOSOSOOOOOO SS
WV-7468	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmC * SfAmU * SfGmA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOOSOSO SS
WV-7469	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOOOO OOXS
WV-7470	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * SmCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SSOXOXOXOXOXOXOOOO OOXS
WV-7471	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mC * SfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXSXOXOXOXOXOXOOOO OOXS
WV-7472	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * SmAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOSOXOXOXOXOXOOOO OOXS
WV-7473	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mA * SfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXSXOXOXOXOXOOOO OOXS
WV-7474	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * SmUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOSOXOXOXOXOOOO OOXS

[0483]

WV-7475	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mU * SfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXSXOXOXOXOOO OOXS
WV-7476	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * SmUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOSOXOXOXOOO OOXS
WV-7477	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mU * SfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXSXOXOXOOO OOXS
WV-7478	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * SmGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOSOXOXOOO OOXS
WV-7479	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * SfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXSXOXOOO OOXS
WV-7480	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * SmAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOSOXOOO OOXS
WV-7481	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * SfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXSXOOO OOXS
WV-7482	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * SmGfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOSOOO OOXS
WV-7483	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mG * SfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXSOO OOXS
WV-7484	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * SmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXSOO OOXS
WV-7485	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmC * SfAmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOSO OOXS
WV-7486	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfA * SmUfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOOS OOXS
WV-7487	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * SfGmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOOO SOXS
WV-7488	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfG * SmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOOO OSXS
WV-7489	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	SXOXOXOXOXOXOXOOO

[0484]

	AUGATU	mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * ST * SmU	OOSS
WV-7509	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmCfAmU * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOOOSS
WV-7510	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmC * SfAmU * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOOSOSS
WV-7511	TGCCACUGUAGAAAGGC AUTU	T * SfG * SmCfC * SmA * SfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmGfGmC * SfAmU * ST * SmU	SSOSSSSSSSSOSOSOOSOSS
WV-7545	TGCCACUGUAGAAUGGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfU * mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7546	TGCCACUGUAGAAACGC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mCfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7547	TGCCACUGUAGAAAGCC AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfCmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7548	TGCCACUGUAGAAAGGG AUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmGfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7549	TGCCACUGUAGAAAGGC UUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfUmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7550	TGCCACUGUAGAAAGGC AATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7551	TGCCACUGUAGAAACGC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mCfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7552	TGCCACUGUAGAAAGCC AUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfCmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7553	TGCCACUGUAGAAAGGC UUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfUmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7554	TGCCACUGUAGAAAGGC AAGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmAfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7555	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA *	XXOXOXOXOXOXOXOOO

[0485]

	AUCATU	mAfA * mGfGmCfAmUfCmA * T * mU	OOOXX
WV-7556	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7576	UGUGCTTGGCTCCTGCC UGG	Mod001L001mU * mG * mU * mG * mC * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * mC * mC * mU * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7577	UCUUGTTACCCCCGCCA UGG	Mod001L001mU * mC * mU * mU * mG * T * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * mC * mA * mU * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7578	ACCCCCGCCATGGAGAC GUU	Mod001L001mA * mC * mC * mC * mC * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * mA * mC * mG * mU * mU	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7579	UACCCCCGCCATGGAGA CGU	Mod001L001mU * mA * mC * mC * mC * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * mG * mA * mC * mG * mU	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7580	CUGCACTGGGCTTCCUG GUG	Mod001L001mC * mU * mG * mC * mA * C * T * G * G * G * C * T * T * C * C * C * mU * mG * mG * mU * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7581	UGGACCTGAGGATGGAC CGC	Mod001L001mU * mG * mG * mA * mC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * mA * mC * mC * mG * mC	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7582	AGGGACCCTCTGCACUG GGC	Mod001L001mA * mG * mG * mG * mA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * mU * mG * mG * mG * mC	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7583	CUUGUTACCCCCGCCAU GGA	Mod001L001mC * mU * mU * mG * mU * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * mA * mU * mG * mG * mA	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7584	AGGCUGGGATCCTCCAC GUC	Mod001L001mA * mG * mG * mC * mU * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C * mA * mC * mG * mU *	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX

[0486]

		mC	
WV-7585	AAGGGACCCTCTGCACU GGG	Mod001L001mA * mA * mG * mG * mG * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * mC * mU * mG * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7586	TGTGCTTGGCTCCTGCCT GG	Mod001L001Teo * Geo * Teo * Geo * m5Ceo * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7587	TCTTGTTACCCCCGCCAT GG	Mod001L001Teo * m5Ceo * Teo * Teo * Geo * T * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7588	ACCCCCGCCATGGAGAC GTT	Mod001L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * Teo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7589	TACCCCCGCCATGGAGA CGT	Mod001L001Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * Geo * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7590	CTGCACTGGGCTTCCTGG TG	Mod001L001m5Ceo * Teo * Geo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * G * C * T * T * C * C * Teo * Geo * Geo * Teo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7591	TGGACCTGAGGATGGAC CGC	Mod001L001Teo * Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7592	AGGGACCCTCTGCACTG GGC	Mod001L001Aeo * Geo * Geo * Geo * Aeo * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * Teo * Geo * Geo * Geo * m5Ceo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7593	CTTGTTACCCCCGCCATG GA	Mod001L001m5Ceo * Teo * Teo * Geo * Teo * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * Aeo * Teo * Geo * Geo * Aeo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7594	AGGCTGGGATCCTCCAC	Mod001L001Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Teo * G *	OXXXXXXXXXXXXXXXXX

[0487]

	GTC	G * G * A * T * C * C * T * C * C * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * m5Ceo	XXX
WV-7595	AAGGGACCCTCTGCACT GGG	Mod001L001Aeo * Aeo * Geo * Geo * Geo * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * m5Ceo * Teo * Geo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7615	UGUGCTTGGCTCCTGCC UGG	L001mU * mG * mU * mG * mC * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * mC * mC * mU * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7616	UCUUGTTACCCCCGCCA UGG	L001mU * mC * mU * mU * mG * T * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * mC * mA * mU * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7617	ACCCCCGCCATGGAGAC GUU	L001mA * mC * mC * mC * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * mA * mC * mG * mU * mU	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7618	UACCCCCGCCATGGAGA CGU	L001mU * mA * mC * mC * mC * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * mG * mA * mC * mG * mU	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7619	CUGCACTGGGCTTCCUG GUG	L001mC * mU * mG * mC * mA * C * T * G * G * G * C * T * T * C * C * mU * mG * mG * mU * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7620	UGGACCTGAGGATGGAC CGC	L001mU * mG * mG * mA * mC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * mA * mC * mC * mG * mC	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7621	AGGGACCCTCTGCACUG GGC	L001mA * mG * mG * mG * mA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * mU * mG * mG * mG * mC	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7622	CUUGUTACCCCCGCCAU GGA	L001mC * mU * mU * mG * mU * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * mA * mU * mG * mG * mA	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7623	AGGCUGGGATCCTCCAC GUC	L001mA * mG * mG * mC * mU * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C * mA * mC * mG * mU * mC	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7624	AAGGGACCCTCTGCACU GGG	L001mA * mA * mG * mG * mG * A * C * C * C * T * C * T * G * C * C * A * mC * mU * mG * mG * mG	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7625	TGTGCTTGGCTCCTGCCT GG	L001Teo * Geo * Teo * Geo * m5Ceo * T * T * G * G * C * T * C * C * C * T * G * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7626	TCTTGTTACCCCCGCCAT	L001Teo * m5Ceo * Teo * Teo * Geo * T * T * A * C	OXXXXXXXXXXXXXXXX

[0488]

	GG	* C * C * C * m5C * G * C * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Geo	XXX
WV-7627	ACCCCCGCCATGGAGAC GTT	L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * Teo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7628	TACCCCCGCCATGGAGA CGT	L001Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * Geo * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7629	CTGCACTGGGCTTCCTGG TG	L001m5Ceo * Teo * Geo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * G * C * T * T * C * C * Teo * Geo * Geo * Teo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7630	TGGACCTGAGGATGGAC CGC	L001Teo * Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7631	AGGGACCCTCTGCACTG GGC	L001Aeo * Geo * Geo * Geo * Aeo * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * Teo * Geo * Geo * Geo * m5Ceo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7632	CTTGTTACCCCCGCCATG GA	L001m5Ceo * Teo * Teo * Geo * Teo * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * C * Aeo * Teo * Geo * Geo * Aeo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7633	AGGCTGGGATCCTCCAC GTC	L001Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Teo * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * m5Ceo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7634	AAGGGACCCTCTGCACT GGG	L001Aeo * Aeo * Geo * Geo * Geo * Geo * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * m5Ceo * Teo * Geo * Geo * Geo	OXXXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-7674	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUmG * SmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOOOO OSXS
WV-7675	TGCCACUGUAGAAAGGC	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA *	SSOSOSOSOSOSOSOSOS

[0489]

	AUGATU	SmGfA * SmAfA * SmGfG * SmCfA * SmUfG * SmAT * SmU	OS
WV-7676	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	T * SfGmC * SfCmA * SfCmU * SfGmU * SfAmG * SfAmA * SfAmG * SfGmC * SfAmU * SfGmA * ST * SmU	SOSOSOSOSOSOSOSOSOSO SS
WV-7776	TGCCACUGUAGAAAGGC ATTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * GeoGeom5CeoAeoTeo * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OXX
WV-7777	TGCCACUGUAGAAAGGC ATGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * GeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeo * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOOO OOOXX
WV-7778	CAUGAAGCAGGAACAUA CCA	mC * mAmUmGmA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mUmAmCmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7779	GCAUGAAGCAGGAACAU ACC	mG * mCmAmUmG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mAmUmAmC * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7780	GGCAUGAAGCAGGAACA UAC	mG * mGmCmAmU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mCmAmUmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7781	AGGCATGAAGCAGGAAC AUA	mA * mGmGmCmA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmCmAmU * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7782	AAGGCATGAAGCAGGAA CAU	mA * mAmGmGmC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmAmCmA * mU	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7783	AAAGGCATGAAGCAGGA ACA	mA * mAmAmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7784	GAAAGGCATGAAGCAGG AAC	mG * mAmAmAmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7785	AGAAAGGCATGAAGCAG GAA	mA * mGmAmAmA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7786	GCCACTGTAGAAAGGCA UGA	mG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mCmAmUmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7787	GGCCACTGTAGAAAGGC AUG	mG * mGmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mGmCmAmU * mG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0490]

WV-7788	AGGCCACTGTAGAAAGG CAU	mA * mGmGmCmC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mGmGmCmA * mU	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7789	AAGGCCACTGTAGAAAG GCA	mA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * mAmGmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7790	UAAGGCCACTGTAGAAA GGC	mU * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * mAmAmGmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7791	AUAAGGCCACTGTAGAA AGG	mA * mUmAmAmG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * mAmAmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7792	GAUAAGGCCACTGTAGA AAG	mG * mAmUmAmA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mGmAmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7793	GGAUAAGGCCACTGTAG AAA	mG * mGmAmUmA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mAmGmAmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7794	CATGAAGCAGGAACATA CCA	m5Ceo * AeoTeoGeoAeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * TeoAeom5Ceom5Ceo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7795	GCATGAAGCAGGAACAT ACC	Geo * m5CeoAeoTeoGeo * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * AeoTeoAeom5Ceo * m5Ceo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7796	GGCATGAAGCAGGAACA TAC	Geo * Geom5CeoAeoTeo * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * m5CeoAeoTeoAeo * m5Ceo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7797	AGGCATGAAGCAGGAAC ATA	Aeo * GeoGeom5CeoAeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeom5CeoAeoTeo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7798	AAGGCATGAAGCAGGAA CAT	Aeo * AeoGeoGeom5Ceo * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * AeoAeom5CeoAeo * Teo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7799	AAAGGCATGAAGCAGGA ACA	Aeo * AeoAeoGeoGeo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * GeoAeoAeom5Ceo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7800	GAAAGGCATGAAGCAGG AAC	Geo * AeoAeoAeoGeo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * GeoGeoAeoAeo * m5Ceo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7801	AGAAAGGCATGAAGCAG GAA	Aeo * GeoAeoAeoAeo * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * AeoGeoGeoAeo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7802	TAGAAAGGCATGAAGCA	Teo * AeoGeoAeoAeo * A * G * G * C * A * T * G *	XOOOXXXXXXXXXXOO

[0491]

	GGA	A * A * G * m5CeoAeoGeoGeo * Aeo	OX
WV-7803	GTAGAAAGGCATGAAGC AGG	Geo * TeoAeoGeoAeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geom5CeoAeoGeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7804	TGTAGAAAGGCATGAAG CAG	Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * AeoGeom5CeoAeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7805	CTGTAGAAAGGCATGAA GCA	m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5Ceo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7806	ACTGTAGAAAGGCATGA AGC	Aeo * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7807	CACTGTAGAAAGGCATG AAG	m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * TeoGeoAeoAeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7808	CCACTGTAGAAAGGCAT GAA	m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7809	GCCACTGTAGAAAGGCA TGA	Geo * m5Ceom5CeoAeom5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * A * G * G * m5CeoAeoTeoGeo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7810	GGCCACTGTAGAAAGGC ATG	Geo * Geom5Ceom5CeoAeo * C * T * G * T * A * G * A * A * A * A * G * Geom5CeoAeoTeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7811	AGGCCACTGTAGAAAGG CAT	Aeo * GeoGeom5Ceom5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * A * GeoGeom5CeoAeo * Teo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7812	AAGGCCACTGTAGAAAG GCA	Aeo * AeoGeoGeom5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * AeoGeoGeom5Ceo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7813	TAAGGCCACTGTAGAAA GGC	Teo * AeoAeoGeoGeo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * AeoAeoGeoGeo * m5Ceo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7814	ATAAGGCCACTGTAGAA AGG	Aeo * TeoAeoAeoGeo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * AeoAeoAeoGeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7815	GATAAGGCCACTGTAGA AAG	Geo * AeoTeoAeoAeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * GeoAeoAeoAeo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7816	GGATAAGGCCACTGTAG AAA	Geo * GeoAeoTeoAeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * AeoGeoAeoAeo * Aeo	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0492]

WV-7817	CAUGAAGCAGGAACAUA CCA	m5lC * mAmUmGmA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mUmAmCmC * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7818	GCAUGAAGCAGGAACAU ACC	lG * mCmAmUmG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mAmUmAmC * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7819	GGCAUGAAGCAGGAACA UAC	lG * mGmCmAmU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mCmAmUmA * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7820	AGGCATGAAGCAGGAAC AUA	lA * mGmGmCmA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmCmAmU * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7821	AAGGCATGAAGCAGGAA CAT	lA * mAmGmGmC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmAmCmA * lT	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7822	AAAGGCATGAAGCAGGA ACA	lA * mAmAmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7823	GAAAGGCATGAAGCAGG AAC	lG * mAmAmAmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7824	AGAAAGGCATGAAGCAG GAA	lA * mGmAmAmA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7825	TAGAAAGGCATGAAGCA GGA	lT * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7826	GUAGAAAGGCATGAAGC AGG	lG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7827	TGUAGAAAGGCATGAAG CAG	lT * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7828	CUGUAGAAAGGCATGAA GCA	m5lC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7829	ACUGUAGAAAGGCATGA AGC	lA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7830	CACUGTAGAAAGGCAUG AAG	m5lC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUmGmAmA * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7831	CCACUGTAGAAAGGCAU	m5lC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A *	XOOOXXXXXXXXXXOO

[0493]

	GAA	G * G * C * mAmUmGmA * lA	OX
WV-7832	GCCACTGTAGAAAGGCA UGA	lG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mCmAmUmG * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7833	GGCCACTGTAGAAAGGC AUG	lG * mGmCmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mGmCmAmU * lG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7834	AGGCCACTGTAGAAAGG CAT	lA * mGmGmCmC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mGmGmCmA * lT	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7835	AAGGCCACTGTAGAAAG GCA	lA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * mAmGmGmC * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7836	TAAGGCCACTGTAGAAA GGC	lT * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * mAmAmGmG * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7837	AUAAGGCCACTGTAGAA AGG	lA * mUmAmAmG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * mAmAmAmG * lG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7838	GAUAAGGCCACTGTAGA AAG	lG * mAmUmAmA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mGmAmAmA * lG	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7839	GGAUAAGGCCACTGTAG AAA	lG * mGmAmUmA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mAmGmAmA * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7840	CATGAAGCAGGAACATA CCA	m5lC * AeoTeoGeoAeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * TeoAeom5Ceom5Ceo * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7841	GCATGAAGCAGGAACAT ACC	lG * m5CeoAeoTeoGeo * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * AeoTeoAeom5Ceo * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7842	GGCATGAAGCAGGAACA TAC	lG * Geom5CeoAeoTeo * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * m5CeoAeoTeoAeo * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7843	AGGCATGAAGCAGGAAC ATA	lA * GeoGeom5CeoAeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeom5CeoAeoTeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7844	AAGGCATGAAGCAGGAA CAT	lA * AeoGeoGeom5Ceo * A * T * G * A * A * G * C * A * A * G * G * AeoAeom5CeoAeo * lT	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX
WV-7845	AAAGGCATGAAGCAGGA ACA	lA * AeoAeoGeoGeo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * GeoAeoAeom5Ceo * lA	XOOOXXXXXXXXXXXOO OX

[0494]

WV-7846	GAAAGGCATGAAGCAGG AAC	lG * AeoAeoAeoGeo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * GeoGeoAeoAeo * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7847	AGAAAGGCATGAAGCAG GAA	lA * GeoAeoAeoAeo * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * AeoGeoGeoAeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7848	TAGAAAGGCATGAAGCA GGA	lT * AeoGeoAeoAeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * m5CeoAeoGeoGeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7849	GTAGAAAGGCATGAAGC AGG	lG * TeoAeoGeoAeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geom5CeoAeoGeo * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7850	TGTAGAAAGGCATGAAG CAG	lT * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * AeoGeom5CeoAeo * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7851	CTGTAGAAAGGCATGAA GCA	m5lC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5Ceo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7852	ACTGTAGAAAGGCATGA AGC	lA * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7853	CACTGTAGAAAGGCATG AAG	m5lC * Aeom5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * A * G * G * C * A * TeoGeoAeoAeo * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7854	CCACTGTAGAAAGGCAT GAA	m5lC * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7855	GCCACTGTAGAAAGGCA TGA	lG * m5Ceom5CeoAeom5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5CeoAeoTeoGeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7856	GGCCACTGTAGAAAGGC ATG	lG * Geom5Ceom5CeoAeo * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * Geom5CeoAeoTeo * lG	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7857	AGGCCACTGTAGAAAGG CAT	lA * GeoGeom5Ceom5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * GeoGeom5CeoAeo * lT	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7858	AAGGCCACTGTAGAAAG GCA	lA * AeoGeoGeom5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * AeoGeoGeom5Ceo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7859	TAAGGCCACTGTAGAAA GGC	lT * AeoAeoGeoGeo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * AeoAeoGeoGeo * m5lC	XOOOXXXXXXXXXXOO OX
WV-7860	ATAAGGCCACTGTAGAA	lA * TeoAeoAeoGeo * G * C * C * A * C * T * G * T	XOOOXXXXXXXXXXOO

[0495]

	AGG	* A * G * AeoAeoAeoGeo * lG	OX
WV-7861	GATAAGGCCACTGTAGAAG	lG * AeoTeoAeoAeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * GeoAeoAeoAeo * lG	XOOOXXXXXXXXXXOOOX
WV-7862	GGATAAGGCCACTGTAGAAA	lG * GeoAeoTeoAeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * AeoGeoAeoAeo * lA	XOOOXXXXXXXXXXOOOX

WV-8030	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	OSSSSSSRSSRSSRSSSSSS
WV-8031	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmGmAm5CeomC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeomG * SmC * SmG	OSOOOSSRSSRSSRSSOOSS
WV-8032	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV-8033	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmGmAm5CeomC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeomGmC * SmG	OSOOOSSRSSRSSRSSOOOS
WV-8034	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001Geo * SGeo * SAeo * Sm5Ceo * Sm5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo * Sm5Ceo * SGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSSSSS
WV-8035	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001Geo * RGeo * RAeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	ORRRRRSRSSRSSRSSRRRR
WV-8036	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001Geo * SGeoAeom5Ceom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA *	OSOOOSSRSSRSSRSSOOOS

[0496]

		Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	
WV-8037	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * SGeoAeom5Ceom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	OSOOORSRSSRSSRSSO OOS
WV-8038	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * RGeoAeom5Ceom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OROOOSSRSSRSSRSSO OOR
WV-8039	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * RGeoAeom5Ceom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OROOORSRSSRSSRSSO OOR
WV-8040	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * RmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmG * RmC * RmG	ORRRRRSRSSRSSRSSR RRR
WV-8041	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmG * RmC * SmG	OSRRRRSRSSRSSRSSR RRS
WV-8042	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmGmAmCmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmCmCmGmC * SmG	OSOOOSSRSSRSSRSSO OOS
WV-8043	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo * Sm5Ceo * SGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSSSS S
WV-8044	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSRR RR
WV-8045	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSOO OS
WV-8046	GGACCTGAGGATGGA	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST *	OSSSSSSRSSRSSRSSOO

[0497]

	CCGCG	SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	OS
WV-8047	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSOO OR
WV-8048	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OSSSSSSRSSRSSRSSOO OR
WV-8049	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSSSSSOSOSSSSS SSSS
WV-8050	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA SGeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeoTGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOOO OOOOS
WV-8051	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8052	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RTGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSRRR RRRRS
WV-8053	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8054	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SmA * SmU * SG * SA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8055	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSSSSSOSOSSSSS SSSS

[0498]

WV-8056	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA SGeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeoTGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOOO OOOOS
WV-8057	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8058	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RTGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSRRR RRRRS
WV-8059	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8060	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SmA * SmU * SG * SA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8061	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8063	TGCCACUGUAGAAAG GCAUUTTTTTGGTAA TCCACTTTCAGAGG	VPT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * TGaNC6T * mUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	XXOXOXOXOXOXO OOOXXOOOOOXXXXX XXXXXXXXXXXXX
WV-8065	TGCCACUGUAGAAAG GCAUUTTTTTGGTAA TCCACTTTCAGAGG	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSOOOOOXXXXXXXX XXXXXXXXXX
WV-8067	TGCCACUGUAGAAAG GCAUUTTTTTGGTAA	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU *	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSOOOOOXXXXXXXX

[0499]

	TCCACTTTCAGAGG	ST * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * GeoL003Mod001	XXXXXXXXXXO
WV-8069	TGCCACUGUAGAAAG GCAUTUTTTTTGGTAA TCCACTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSOOOOOXXXXXXXX XXXXXXXXXXX
WV-8071	TGCCACUGUAGAAAG GCAUTUTTTTTGGTAA TCCACTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * ST * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * GeoL003Mod001	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSOOOOOXXXXXXXX XXXXXXXXXXO
WV-8072	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSRSSRSSS XXX
WV-8073	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSSSSRSSX XXX
WV-8074	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSRSSRSSX XXX
WV-8075	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8076	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmU * SfG * SmU * SfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	SSOSOSSSSSOSOSSSSS SSSS
WV-8077	TGCCACUGUAGAAAG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA *	SSOSOSOSOSOSOOO

[0500]

	GCATGATU	SmGfA * SmAfA * SGeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeoT * SmU	OOOOS
WV-8078	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8079	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RT * SmU	SSOSOSOSOSOSOSRRR RRRRS
WV-8080	TGCCACUGUAGAAAG GCATGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8081	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SG * SG * SC * SmA * SmU * SG * SA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8082	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * GeoAeom5Ceom5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceom5CeoGeom5Ceo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXX OOOX
WV-8083	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	mG * SmGmAm5CeomC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeomGmC * SmG	SOOOSSRSSRSSRSSOO OS
WV-8084	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * SGeo * SAeo * Sm5Ceo * Sm5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo * Sm5Ceo * SGeo	SSSSSSRSSRSSRSSSSSS
WV-8085	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * RGeo * RAeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	RRRRRSRSSRSSRRR RR
WV-8086	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * SGeoAeom5Ceom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	SOOOSSRSSRSSRSSOO OS
WV-8087	GGACCTGAGGATGGA	Geo * SGeoAeom5Ceom5Ceo * RT * SG * RA * SG *	SOOORSRSSRSSRSSOO

[0501]

	CCGCG	SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	OS
WV-8088	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * RGeoAeom5Ceom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	ROOOSSRSSRSSRSSOO OR
WV-8089	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Geo * RGeoAeom5Ceom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	ROOORSRSSRSSRSSOO OR
WV-8090	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	SSSSSSRSSRSSRSSSSSS
WV-8091	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	mG * RmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmG * RmC * RmG	RRRRRSRSSRSSRSSRR RR
WV-8092	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	mG * SmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmG * RmC * SmG	SRRRRSRSSRSSRSSRR RS
WV-8093	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	mG * SmGmAmCmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmCmCmGmC * SmG	SOOOSSRSSRSSRSSOO OS
WV-8094	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8095	TGCCACUGUAGAAAG GCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSS SSSS
WV-8096	CUGUGACGUGGAGGA UCCCAGCCUCUG	rCrUrGrUrGrArCrGrUrGrGrArGrGrArUrCrCrCrArGrCr CrUrCrUrG	OOOOOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOO
WV-8111	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * SmC * S	OSSSSSSRSSSSSRSSSSS S

[0502]

		SmC * SmG * SmC * SmG	
WV-8112	GGACCTGAGGATGGA CCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	OSSSSSSRSSSSSRSSRR RR
WV-8132	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	Mod001L001m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5Ceo * Aeo	OXOOOXXXXXXXXXX XOOOX
WV-8133	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * RAeo	OROOORSSSSRSSRSSO OOR
WV-8134	CCACTGTAGAAAGGC ATGAA	Mod001L001m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	OXOOOXXXXXXXXXX XOOOX
WV-8135	CCACTGTAGAAAGGC ATGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RAeo	OROOORSSSSSSSRSSO OOR
WV-8136	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	Mod001L001m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	OXXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8137	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeo * RGeo * RTeo * RAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * RAeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo	ORRRRRSSSSRSSRSSR RRR
WV-8138	CAUGAAGCAGGAACA UACCA	mC * mA * mU * mG * mA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mU * mA * mC * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-8139	GCAUGAAGCAGGAAC AUACC	mG * mC * mA * mU * mG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mA * mU * mA * mC * mC	XXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-8140	GGCAUGAAGCAGGAA CAUAC	mG * mG * mC * mA * mU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mC * mA * mU * mA * mC	XXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-8141	AGGCATGAAGCAGGA ACAUA	mA * mG * mG * mC * mA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mA * mC * mA * mU * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXX
WV-8142	AAGGCATGAAGCAGG	mA * mA * mG * mG * mC * A * T * G * A * A * G * C	XXXXXXXXXXXXXXX

[0503]

	AACAU	* A * G * G * mA * mA * mC * mA * mU	XXXX
WV-8143	AAAGGCATGAAGCAG GAACA	mA * mA * mA * mG * mG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mG * mA * mA * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8144	GAAAGGCATGAAGCA GGAAC	mG * mA * mA * mA * mG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mG * mG * mA * mA * mC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8145	AGAAAGGCATGAAGC AGGAA	mA * mG * mA * mA * mA * G * G * C * A * T * G * A * A * A * G * C * mA * mG * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8146	UAGAAAGGCATGAAG CAGGA	mU * mA * mG * mA * mA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * A * G * mC * mA * mG * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8147	GUAGAAAGGCATGAA GCAGG	mG * mU * mA * mG * mA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mG * mC * mA * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8148	UGUAGAAAGGCATGA AGCAG	mU * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8149	CUGUAGAAAGGCATG AAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8150	ACUGUAGAAAGGCAT GAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8151	CACUGTAGAAAGGCA UGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8152	CCACUGTAGAAAGGC AUGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8153	GCCACTGTAGAAAGG CAUGA	mG * mC * mC * mA * mC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mC * mA * mU * mG * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8154	GGCCACTGTAGAAAG GCAUG	mG * mG * mC * mC * mA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mC * mA * mU * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8155	AGGCCACTGTAGAAA GGCAU	mA * mG * mG * mC * mC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mG * mC * mA * mU	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8156	AAGGCCACTGTAGAA AGGCA	mA * mA * mG * mG * mC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * mG * mG * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX

[0504]

WV-8157	UAAGGCCACTGTAGA AAGGC	mU * mA * mA * mG * mG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * mA * mA * mG * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8158	AUAAGGCCACTGTAG AAAGG	mA * mU * mA * mA * mG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * mA * mA * mA * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8159	GAUAAGGCCACTGTA GAAAG	mG * mA * mU * mA * mA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mG * mA * mA * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8160	GGAUAAGGCCACTGT AGAAA	mG * mG * mA * mU * mA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mA * mG * mA * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8161	CATGAAGCAGGAACA TACCA	m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Aeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8162	GCATGAAGCAGGAAC ATACC	Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8163	GGCATGAAGCAGGAA CATAC	Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8164	AGGCATGAAGCAGGA ACATA	Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8165	AAGGCATGAAGCAGG AACAT	Aeo * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8166	AAAGGCATGAAGCAG GAACA	Aeo * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * Geo * Aeo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8167	GAAAGGCATGAAGCA GGAAC	Geo * Aeo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * Geo * Aeo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8168	AGAAAGGCATGAAGC AGGAA	Aeo * Geo * Aeo * Aeo * Aeo * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * Aeo * Geo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8169	TAGAAAGGCATGAAG CAGGA	Teo * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8170	GTAGAAAGGCATGAA GCAGG	Geo * Teo * Aeo * Geo * Aeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8171	TGTAGAAAGGCATGA	Teo * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * C *	XXXXXXXXXXXXXXX

[0505]

	AGCAG	A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo	XXXX
WV-8172	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8173	ACTGTAGAAAGGCAT GAAGC	Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8174	CACTGTAGAAAGGCAT GAAG	m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * Teo * Geo * Aeo * Aeo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8175	CCACTGTAGAAAGGC ATGAA	m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8176	GCCACTGTAGAAAGG CATGA	Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8177	GGCCACTGTAGAAAG GCATG	Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8178	AGGCCACTGTAGAAA GGCAT	Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * A * C * T * G * T * A * A * G * A * A * A * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8179	AAGGCCACTGTAGAA AGGCA	Aeo * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8180	TAAGGCCACTGTAGAA AGGC	Teo * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8181	ATAAGGCCACTGTAGA AAGG	Aeo * Teo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * Aeo * Aeo * Geo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8182	GATAAGGCCACTGTAG AAAG	Geo * Aeo * Teo * Aeo * Aeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * Geo * Aeo * Aeo * Aeo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8183	GGATAAGGCCACTGTA GAAA	Geo * Geo * Aeo * Teo * Aeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8184	CAUGAAGCAGGAACA UACCA	m5lC * mA * mU * mG * mA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mU * mA * mC * mC * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8185	GCAUGAAGCAGGAAC	lG * mC * mA * mU * mG * A * A * G * C * A * G * G	XXXXXXXXXXXXXXX

[0506]

	AUACC	* A * A * C * mA * mU * mA * mC * m5lC	XXXX
WV-8186	GGCAUGAAGCAGGAA CAUAC	lG * mG * mC * mA * mU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mC * mA * mU * mA * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8187	AGGCATGAAGCAGGA ACAUA	lA * mG * mG * mC * mA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mC * mA * mU * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8188	AAGGCATGAAGCAGG AACAT	lA * mA * mG * mG * mC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mA * mA * mC * mA * lT	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8189	AAAGGCATGAAGCAG GAACA	lA * mA * mA * mG * mG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mG * mA * mA * mC * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8190	GAAAGGCATGAAGCA GGAAC	lG * mA * mA * mA * mG * mG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mG * mG * mA * mA * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8191	AGAAAGGCATGAAGC AGGAA	lA * mG * mA * mA * mA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mA * mG * mG * mA * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8192	TAGAAAGGCATGAAG CAGGA	lT * mA * mG * mA * mA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mC * mA * mG * mG * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8193	GUAGAAAGGCATGAA GCAGG	lG * mU * mA * mG * mA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mG * mC * mA * mG * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8194	TGUAGAAAGGCATGA AGCAG	lT * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8195	CUGUAGAAAGGCATG AAGCA	m5lC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8196	ACUGUAGAAAGGCAT GAAGC	lA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8197	CACUGTAGAAAGGCA UGAAG	m5lC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8198	CCACUGTAGAAAGGC AUGAA	m5lC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8199	GCCACTGTAGAAAGG CAUGA	lG * mC * mC * mA * mC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mC * mA * mU * mG * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX

[0507]

WV-8200	GGCCACTGTAGAAAG GCAUG	lG * mG * mC * mC * mA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mG * mC * mA * mU * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8201	AGGCCACTGTAGAAA GGCAT	lA * mG * mG * mC * mC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mG * mC * mA * lT	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8202	AAGGCCACTGTAGAA AGGCA	lA * mA * mG * mG * mC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * mA * mG * mG * mC * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8203	TAAGGCCACTGTAGAA AGGC	lT * mA * mA * mG * mG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * mA * mA * mG * mG * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8204	AUAAGGCCACTGTAG AAAGG	lA * mU * mA * mA * mG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * mA * mA * mA * mG * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8205	GAUAAGGCCACTGTA GAAAG	lG * mA * mU * mA * mA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mG * mA * mA * mA * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8206	GGAUAAGGCCACTGT AGAAA	lG * mG * mA * mU * mA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mA * mG * mA * mA * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8207	CATGAAGCAGGAACA TACCA	m5lC * Aeo * Teo * Geo * Aeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8208	GCATGAAGCAGGAAC ATACC	lG * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8209	GGCATGAAGCAGGAA CATAC	lG * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8210	AGGCATGAAGCAGGA ACATA	lA * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8211	AAGGCATGAAGCAGG AACAT	lA * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * Aeo * Aeo * m5Ceo * Aeo * lT	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8212	AAAGGCATGAAGCAG GAACA	lA * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * Geo * Aeo * Aeo * m5Ceo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8213	GAAAGGCATGAAGCA GGAAC	lG * Aeo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * Geo * Geo * Aeo * Aeo * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8214	AGAAAGGCATGAAGC	lA * Geo * Aeo * Aeo * Aeo * G * G * C * A * T * G *	XXXXXXXXXXXXXXX

[0508]

	AGGAA	A * A * G * C * Aeo * Geo * Geo * Aeo * lA	XXXX
WV-8215	TAGAAAGGCATGAAG CAGGA	lT * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8216	GTAGAAAGGCATGAA GCAGG	lG * Teo * Aeo * Geo * Aeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8217	TGTAGAAAGGCATGA AGCAG	lT * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8218	CTGTAGAAAGGCATG AAGCA	m5lC * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8219	ACTGTAGAAAGGCAT GAAGC	lA * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * Geo * Aeo * Geo * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8220	CACTGTAGAAAGGCAT GAAG	m5lC * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * Teo * Geo * Aeo * Aeo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8221	CCACTGTAGAAAGGC ATGAA	m5lC * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8222	GCCACTGTAGAAAGG CATGA	lG * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8223	GGCCACTGTAGAAAG GCATG	lG * Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8224	AGGCCACTGTAGAAA GGCAT	lA * Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * Geo * m5Ceo * Aeo * lT	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8225	AAGGCCACTGTAGAA AGGCA	lA * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * lA	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8226	TAAGGCCACTGTAGAA AGGC	lT * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * Aeo * Geo * Geo * m5lC	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8227	ATAAGGCCACTGTAGA AAGG	lA * Teo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * Aeo * Aeo * Aeo * Geo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX
WV-8228	GATAAGGCCACTGTAG AAAG	lG * Aeo * Teo * Aeo * Aeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * Geo * Aeo * Aeo * Aeo * lG	XXXXXXXXXXXXXXX XXXX

[0509]

WV-8229	GGATAAGGCCACTGTA GAAA	lG * Geo * Aeo * Teo * Aeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * lA	XXXXXXXXXXXXXXXX XXXX

WV-8071	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * ST * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * GeoL003Mod001	SSO SO SO SO SO SO SO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXO
WV-8069	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSO SO SO SO SO SO SO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8067	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * ST * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * GeoL003Mod001	SSO SO SO SO SO SO SO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXO
WV-8065	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSO SO SO SO SO SO SO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXX

[0510]

WV-8063	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	VPT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * TGaNC6T * mUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	XXO XO XO XO XO XO XO XO XOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXX

WV-8233	UUGGUAUGUUCCUGCUUCAU GCCUUUCUACAGUGGCCUUAUCCC	rU rU rG rG rU rA rU rG rU rU rC rC rU rG rC rU rC rA rU rG rC rC rU rU rU rC rU rU rC rA rG rU rG rG rC rC rU rU rA rU rC rC rC	OOOOOOOOOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOOOOOOOOOO
WV-8234	UUGGUAUGUUCCUGCUUCAU CCCCUUCUACAGUGGCCUUAUCCC	rU rU rG rG rU rA rU rG rU rU rC rC rU rG rC rU rU rC rA rU rC rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rG rC rC rU rU rA rU rC rC rC	OOOOOOOOOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOOOOOOOOOO
WV-8235	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G AeoAeoGeom5Ceo * Aeo	OXOOOXXXXXXXXXXXXOOOX
WV-8236	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG SAeoAeoGeom5Ceo * RAeo	O ROOO RSSSS RSS RSSOOO R
WV-8237	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T	OXOOOXXXXXXXXXXXXOOOX

[0511]

		* A * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	
WV-8238	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RAeo	O ROOO RSSSSSSS RSSOOO R
WV-8239	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	OXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8240	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * RTeo * RGeo * RTeo * RAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * RAeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo	O R R R R RSSSS RSS RSS R R R R
WV-2477	CCUUCCCUGAAGGUUCCUCC	POmC * fC * mUfU * mCfC * mCfU * mGfA * mAfG * mGfU * mU * fC * mC * fU * mC * mC	XXOXOXOXOXOXOXXXXX

WV-8241	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8244	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeomGTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG *	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS

[0512]

		SmAmAmGmC * SmA	R OOOR SSSS RSS RSS OOOR
WV-8245	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * RAeo	
WV-8246	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5lC * STeomGTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmAmAmGmC * SlA	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8247	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5lC * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * RlA	R OOOR SSSS RSS RSS OOOR
WV-8248	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * Sm5CeomAm5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SmATeomGmA * SmA	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8249	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RAeo	R OOOR SSSSS SS RSS OOOR
WV-8250	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	m5lC * Sm5CeomAm5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmATeomGmA * SlA	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8251	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5lC * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RlA	R OOOR SSSSS SS RSS OOOR
WV-8252	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * RTeo * RGeo * RTeo * RAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * RAeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo	RRRRR SSSS RSS RSSRRRR
WV-8253	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceo * Rm5Ceo * RAeo * Rm5Ceo * RTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * RTeo *	RRRRR SSSSS SS RSSRRRR

[0513]

		RGeo * RAeo * RAeo	
WV-8255	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU TTTTTGGTAATCCACTTTCAGAGG	VPT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * AMC6T * mUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX OOOOO XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-8256	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	O SSSSS S RSS RSSR SSSSS S
WV-8257	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	O SSSSS S RSS RSS RSSRRRR
WV-8258	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	O SSSSS SR SSSSS R SSSSS S
WV-8259	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	O SSSSS SR SSSSS RSSRRRR
WV-8260	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOSOS OSOSO SSSSS SSSS
WV-8263	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX

[0514]

		* T * mU	
WV-8264	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PO5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8265	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PS5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8266	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PH5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8267	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8268	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PO5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8269	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PS5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8270	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PH5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8271	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8272	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	PO5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8273	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG	XX OXOX OXOX OXOX

[0515]

		* mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOOO OXX
WV-8274	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PH5MSdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8275	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8276	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8277	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8278	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PH5MRdT * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOO OXX
WV-8279	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * Aeo	O XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-8280	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5Ceo * RAeo * Rm5Ceo * RTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RAeo	ORRRRR SSSSS SS RSSRRRR
WV-8323	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * Aeo	O XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-8324	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * Rm5Ceo * RAeo *	ORRRRR SSSSS SS

[0516]

		Rm5Ceo * RTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RAeo	RSSRRRR
WV-8436	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mGmGmCmAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8437	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mGmGmCmAmUmG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO XXX
WV-8438	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mG * mG * mC * mA * mU * T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXX
WV-8439	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfA * mG * mG * mC * mA * mU * mG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX
WV-8440	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAmA * mGmGmCmAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX
WV-8441	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAmA * mGmGmCmAmUmG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO XXX
WV-8442	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAmA * mG * mG * mC * mA * mU * T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXX
WV-8443	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAmA * mG * mG * mC * mA * mU * mG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX
WV-8558	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC *	OR OOOR SSSS RSSR SSSSS S

[0517]

		SA * RT * SG * SAeo * SAeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo	OR OOOR SSSSS SSR SSSSS S
WV-8559	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * SAeo	
WV-8560	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OR OOOR SSSS RSSR SSSSS S
WV-8561	CCACTGTAGAAAGGCAUGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	OR OOOR SSSSS SSR SSSSS S
WV-8562	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * SAeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8563	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001mC * Sm5CeoAeom5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8564	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8565	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	Mod001L001mC * Sm5CeoAeom5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC *	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S

[0518]

		SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	
WV-8566	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8567	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8596	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8597	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV-8598	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8599	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV-8600	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8601	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8602	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	mC * Sm5CeoAeom5CeomU * SG * ST *	S OOO SSSSS SSSR

[0519]

		SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	SSSSS S
WV-8603	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8604	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * SAeo	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8605	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8606	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV-8607	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8608	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV-8609	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8620	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8621	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	L001mC * Sm5CeoAeom5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S

[0520]

WV-8622	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8623	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8624	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8625	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV-8626	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8627	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV-8628	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8689	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	Mod001L001mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8690	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8697	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	L001mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mA *	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX

[0521]

		mU * mG * mA * mA	
WV-8698	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8699	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8700	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8701	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8807	CUGCUUCAUGCCUUUCUACAGUGG	rC rU rG rC rU rU rC rA rU rG rC rC rU rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rG	OOOOO OOOOO OOOOO OOO
WV-8808	CUGCUUCAUCCCCUUCUACAGUGG	rC rU rG rC rU rU rC rA rU rC rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rG	OOOOO OOOOO OOOOO OOO
WV-8843	UGTAGAAAGGCATGAAGCAG	mU * GeoTeoAeomG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8844	UGUAGAAAGGCATGAAGCAG	mU * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC mAGeom5CeoAeo * mG	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8845	TGTAGAAAGGCATGAAGCAG	Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX

[0522]

		* mA * mG	
WV-8846	UGUAGAAAGGCATGAAGCAG	mU * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * AeoGeom5CeoAeo * Geo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8847	CUGUAGAAAGGCATGAAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAAeoGeom5Ceo * mA	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8848	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8849	CUGUAGAAAGGCATGAAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5Ceo * Aeo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8850	ACTGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * m5CeoTeoGeomU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8851	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGAeoAeoGeo * mC	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8852	ACTGTAGAAAGGCATGAAGC	Aeo * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8853	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8854	CACTGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * Aeom5CeoTeomG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8855	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G *	XXXXX XXXXX

[0523]

		A * A * A * G * G * C * A * mUGeoAeoAeo * mG	XXXXX OOOX
WV-8856	CACTGTAGAAAGGCAUGAAG	m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * C * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8857	CACUGTAGAAAGGCATGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * G * C * A * TeoGeoAeoAeo * Geo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8858	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * C * mATeoGeoAeo * mA	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8859	CCACTGTAGAAAGGCAUGAA	m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8860	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-9400	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9401	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9402	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

[0524]

WV-9403	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9404	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9405	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9406	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9407	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9431	TGTAGAAAGGGATGAAGCAG	Teo * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo	XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-9432	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * G * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-9433	ACTGTAGAAAGGGATGAAGC	Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * G * A * A * A * G * G * G * A * T * Geo * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo	XXXXX XXXXX XXXXXXXXX

[0525]

WV-9434	CACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * A * Teo * Geo * Aeo * Aeo * Geo	XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-9435	CCACTGTAGAAAGGGATGAA	m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * G * Aeo * Teo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-9436	TGTAGAAAGGGATGAAGCAG	Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * G * A * T * G * A * AeoGeom5CeoAeo * Geo	X OOO XXXXX XXXXX OOOX
WV-9437	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * A * T * G * AeoAeoGeom5Ceo * Aeo	X OOO XXXXX XXXXX OOOX
WV-9438	ACTGTAGAAAGGGATGAAGC	Aeo * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * G * G * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo	X OOO XXXXX XXXXX OOOX
WV-9439	CACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G * G * A * TeoGeoAeoAeo * Geo	X OOO XXXXX XXXXX OOOX
WV-9440	CCACTGTAGAAAGGGATGAA	m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * G * AeoTeoGeoAeo * Aeo	X OOO XXXXX XXXXX OOOX
WV-9441	UGTAGAAAGGGATGAAGCAG	mU * GeoTeoAeomG * A * A * A * G * G * G * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9442	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * G * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9443	ACTGUAGAAAGGGATGAAGC	mA * m5CeoTeoGeomU * A * G * A * A * A * G * G * G * A * T * mG * mA *	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX

[0526]

		mA * mG * mC	
WV-9444	CACTGTAGAAAGGGAUGAAG	mC * Aeom5CeoTeomG * T * A * G * A * A * A * G * G * G * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9445	CCACUGTAGAAAGGGAUGAA	mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * G * mA * mU * mG * mA * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9495	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9496	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9497	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9498	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9499	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9500	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

[0527]

		* SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	
WV-9501	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9502	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9550	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L001T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9551	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L0015MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9552	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L001T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9553	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L0015MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9554	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG *	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

[0528]

		SmA * ST * SmU	
WV-9555	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9556	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9670	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOR SSSSR SSSSR OOOS
WV-9671	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOR SSSSR SSSSS OOOS
WV-9672	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSR OOOS
WV-9859	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOR SSSS RSSRSR OOOS
WV-9860	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9861	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC *	OS OOR SSSS RSSRSR SSSS

[0529]

		SA * RT * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	
WV-9862	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOR SSSSR SSSSR SSSS
WV-9866	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9867	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9868	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9869	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOR SSSS RSSR SSSSS S
WV-9870	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-9883	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

[0530]

WV-9884	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9889	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOOR SSSS RSSRSR OOOS
WV-9890	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOOR SSSSR SSSSR OOOS
WV-9891	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9892	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOOR SSSS RSSR SSSSS S
WV-9893	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-9894	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-9895	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOOR SSSS RSSRSR SSSS
WV-9896	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOOR SSSSR SSSSR SSSS
WV-10247	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG *	OS OOOR SSSS RSSRSR

[0531]

		SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OOOS
WV-10248	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOOR SSSSR SSSSR OOOS
WV-10249	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-10250	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOR SSSS RSSR SSSSS S
WV-10251	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-10252	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-10253	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOR SSSS RSSRSR SSSS
WV-10254	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOR SSSSR SSSSR SSSS
WV-10320	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	VPT * fC * mCfU * mUfC * mCfC * mUfG * mAfA * mGfG * mU * fU * mC * fC * mU * fC * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX
WV-10321	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	VPT * fC * mCmU * mUmC * mCmC * mUmG * mAmA * mGfG * mU * mU * mC * mC * mU * mC * TGaNC6T *	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX

[0532]

		mU	
WV-10322	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	PO5MRdT * fC * mCfU * mUfC * mCfC * mUfG * mAfA * mGfG * mU * fU * mC * fC * mU * fC * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX
WV-10323	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	PO5MRdT * fC * mCmU * mUmC * mCmC * mUmG * mAmA * mGfG * mU * mU * mC * mC * mU * mC * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXX
WV-10324	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	VPT * SfC * SmCfU * SmUfC * SmCfC * SmUfG * SmAfA * SmGfG * SmU * SfU * SmC * SfC * SmU * SfC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10325	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	VPT * SfC * SmCmU * SmUmC * SmCmC * SmUmG * SmAmA * SmGfG * SmU * SmU * SmC * SmC * SmU * SmC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10326	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	PO5MRdT * SfC * SmCfU * SmUfC * SmCfC * SmUfG * SmAfA * SmGfG * SmU * SfU * SmC * SfC * SmU * SfC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10327	TCCUUCCCUGAAGGUUCCUCCTU	PO5MRdT * SfC * SmCmU * SmUmC * SmCmC * SmUmG * SmAmA * SmGfG * SmU * SmU * SmC * SmC * SmU * SmC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10432	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

[0533]

WV-10433	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS	
WV-10434	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS	
WV-10435	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS	
WV-11957	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SlA	OS OOOR SSSSR SSSSR OOOS	
WV-11958	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SlA	OS OOOR SSSSR SSSSS SSSS	
WV-11959	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SlA	S OOOR SSSSR SSSSR OOOS	
WV-11960	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SlA	S OOOR SSSSR SSSSS SSSS	
WV-11961	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SlA	OS OOOR SSSSR SSSSR OOOS	

[0534]

WV-11962	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5lC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SlA	OS OOOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-12070	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5ptzdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12071	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzpodT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12072	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5mvpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12073	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5pacetdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12098	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	OS OOOOO R SSSSR SSSSR OOOOO S
WV-12099	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OS OOOOO R SSSSR SSSSS SSSSS S
WV-12100	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo *	S OOOOO R SSSSR

[0535]

		RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * * ST * SG RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	SSSSR OOOOO S
WV-12101	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	S OOOOO R SSSSR SSSSS SSSSS S
WV-12102	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	OS OOOOO R SSSSR SSSSR OOOOO S
WV-12103	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OS OOOOO R SSSSR SSSSS SSSSS S
WV-12104	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5CeoAeoGeo * Geo	OX OOOOO XXXXX XXXXX OOOOO X
WV-12105	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001mC * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA * mG * mG	OX OOOOO XXXXX XXXXX XXXXXXX
WV-12106	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5CeoAeoGeo * Geo	X OOOOO XXXXX XXXXX OOOOO X
WV-12107	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	mC * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA * mG * mG	X OOOOO XXXXX XXXXX XXXXXXX

[0536]

WV-12108	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5CeoAeoGeo * Geo	OX OOOOO XXXXX XXXXX OOOOO X
WV-12109	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001mC * Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA * mG * mG	OX OOOOO XXXXX XXXXX XXXXXXX
WV-12115	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12116	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCn001fC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SSnXS OSOS OSOSO SSSSS SSSS
WV-12117	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAn001fC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SSOSnXS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12118	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUn001fG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOSnXS OSOSO SSSSS SSSS
WV-12119	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUn001fA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOSOSnXSOSO SSSSS SSSS
WV-12120	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGn001fA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA *	SS OSOS OSOSnXSO SSSSS SSSS

[0537]

		SmU * SmU	
WV-12121	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAn001fA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOS OSOSOSnX SSSSS SSSS
WV-12122	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAUU	T * SfG * SmCn001fC * SmAn001fC * SmUn001fG * SmUn001fA * SmGn001fA * SmAn001fA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SSnXSnXSnXSnXSnXSnX SSSSS SSSS
WV-12254	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5ptzdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12255	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5tzpodT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12256	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5mvpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12257	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5pacetdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12420	CCUGCUUCAUGCCUUUCUACAGUG	rC rC rU rG rC rU rU rU rC rA rU rG rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG	OOOOO OOOO OOOOO OOOO OOO
WV-12421	CCUGCUUCAUCCCCUUCUACAGUG	rC rC rU rG rC rU rU rC rA rU rC rC rC	OOOOO OOOO

[0538]

WV-12573	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * Stbclc6T * SmU	OOOOO OOOOO OOO SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12574	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * Sbbclc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12874	CUUCAUGCCUUUCUACAGUGGCCU	rC rU rU rC rA rU rG rC rC rU rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rG rC rC rU	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO OOO
WV-12875	CUUCAUCCCCUUCUACAGUGGCCU	rC rU rU rC rA rU rC rC rC rU rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rG rC rC rU	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO OOO

WV-9261	GCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	L009 * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9262	TCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	T * L009 * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9263	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * L009fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9264	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCL009 * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9265	TGCCCUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * L009fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9266	TGCCAUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAL009 * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX

[0539]

WV-9267	TGCCACGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * L009fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9268	TGCCACUUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUL009 * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9269	TGCCACUGAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * L009fA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9270	TGCCACUGUGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUL009 * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9271	TGCCACUGUAAAA GGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * L009fA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9272	TGCCACUGUAGAA GGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAL009 * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9273	GCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	L010 * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9274	TCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	T * L010 * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9275	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * L010fC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9276	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCL010 * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9277	TGCCCUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * L010fC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9278	TGCCAUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAL010 * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9279	TGCCACGUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * L010fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9280	TGCCACUUAGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUL010 * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9281	TGCCACUGAGAA	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * L010fA * mGfA * mAfA *	XXOXOXOXOXOX

[0540]

	AGGCAUGATU	mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OXOOOOOOXX
WV-9282	TGCCACUGUGAA AGGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUL010 * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9283	TGCCACUGUAAAA GGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * L010fA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX
WV-9284	TGCCACUGUAGAA GGCAUGATU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAL010 * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OXOOOOOOXX

WV-13443	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * Stbclc6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-13555	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSS SRSSSSRSSSSSS
WV-13556	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSS SRSSSSRSSSSSS
WV-13557	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOOORSSS SRSSSSRSSSSSS
WV-13558	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOOORSSS SRSSSSSSSSSSS
WV-13559	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSS SRSSSSSSSSSSS

[0541]

WV-13560	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSSS RSSSSRSSSSSS
WV-13561	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSS SRSSSSRSSSSSS
WV-13562	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOOORSSSSR SSSSRSSSSSS
WV-13563	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13564	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOOORSSS SRSSSSSSSSSS
WV-13565	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	SOOOOORSSSS RSSSSRSSSSSS
WV-13566	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	SOOOOORSSSS RSSSSRSSSSSS
WV-13567	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	ROOOOORSSSSR SSSSRSSSSSS
WV-13568	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	ROOOOORSSS SRSSSSSSSSSSS
WV-13569	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	SOOOOORSSSSR SSSSSSSSSSS

[0542]

		* SmG * SmG	
WV-13588	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-13589	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mrpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-13590	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mspdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-13591	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-13592	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mrpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS OSOSSSSSSSSS
WV-13593	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mspdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS

WV-13668	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13669	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRSSSSS

[0543]

WV-13670	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13671	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13672	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13673	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	L001mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13674	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13675	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13676	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13677	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13678	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	SOOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13679	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG	SOOOORSSSS RSSSSRSSSSS

[0544]

		* SmC * SmA * SmG	
WV-13680	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	ROOOORSSSS RSSSSRSSSSS
WV-13681	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	ROOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13682	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	SOOOORSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13800	CTGTAGAAAGGC ATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OROOORSSSSR SSSSRSSSS
WV-13801	CTGTAGAAAGGC ATGAAGCA	L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OROOORSSSS RSSSSRSSSS
WV-13802	CTGTAGAAAGGC ATGAAGCA	m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	ROOORSSSS RSSSSRSSSS
WV-14090	GCUUCAUGCCUU UCUACAGUGGCCU	rGrCrUrUrUrCrArUrGrCrCrUrUrUrC rUrArCrArGrUrGrGrCrCrU	OOOOO OOOOO OOOOO OOOO OOOO
WV-14091	GCUUCAUCCCCUUC U ACAGUGGCCU	rGrCrUrUrUrCrArUrCrCrCrCrUrUrC rUrArCrArGrUrGrGrCrCrU	OOOOO OOOOO OOOOO OOOO OOOO
WV-14102	TGCCACUGUAGAA A GGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * Saamc6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS
WV-14103	TGCCACUGUAGAA A GGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * Spac6dT * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSSSS

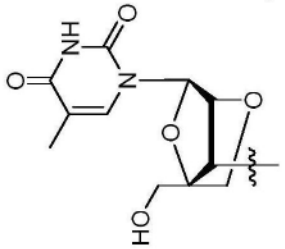
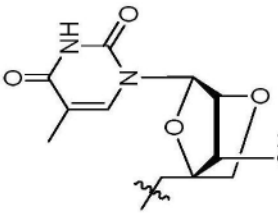
[0545]

WV-14336	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS
WV-14337	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	5mrpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS
WV-14338	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	5mspdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS
WV-14339	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS
WV-14340	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	5mrpdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS
WV-14341	TGCCACUGUAGAA A GGCAUTU	5mspdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOSO SOSSSSSSS

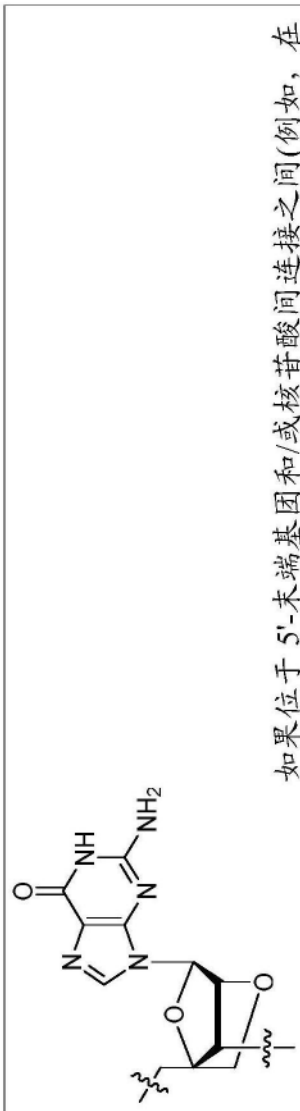
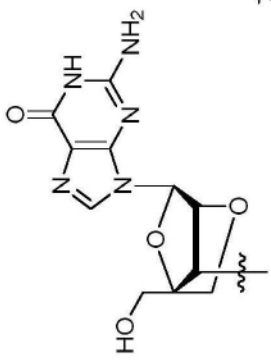
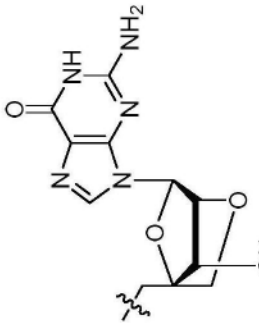
本公开指出，由于序列的长度，一些序列被分成多行；但是，这些序列与表 1A 中的所有寡核苷酸一样都是单链的(除非另外指出)。

表中列出的部分和修饰(或用于构建包含这些部分或修饰的寡核苷酸的化合物：

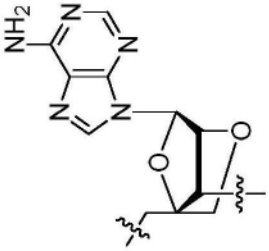
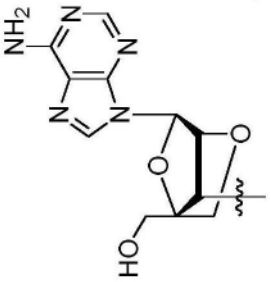
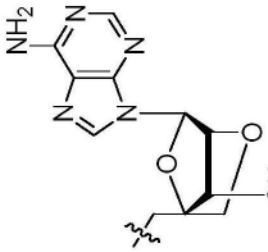
[0546]

IT	
	如果位于 5'-末端基团和/或核苷酸间连接之间(例如，在 WV-3819 中)； 
	如果位于 5'-末端且没有 5'-末端基团(例如，在 WV-3818 中)； 
	如果位于 3'-末端(例如，在 WV-7821 中)。

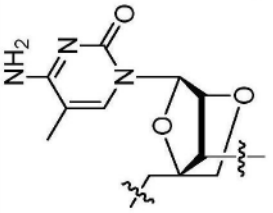
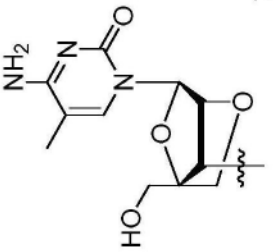
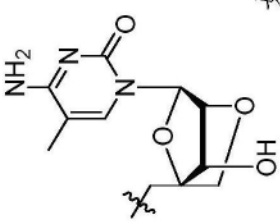
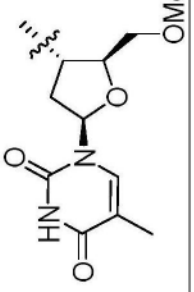
[0547]

IG	 如果位于 5'-末端基团和/或核苷酸间连接之间(例如，在 WV-6689 中)；  如果位于 5'-末端且没有 5'-末端基团(例如，在 WV-6711 中)；  如果位于 3'-末端(例如，在 WV-7827 中)。

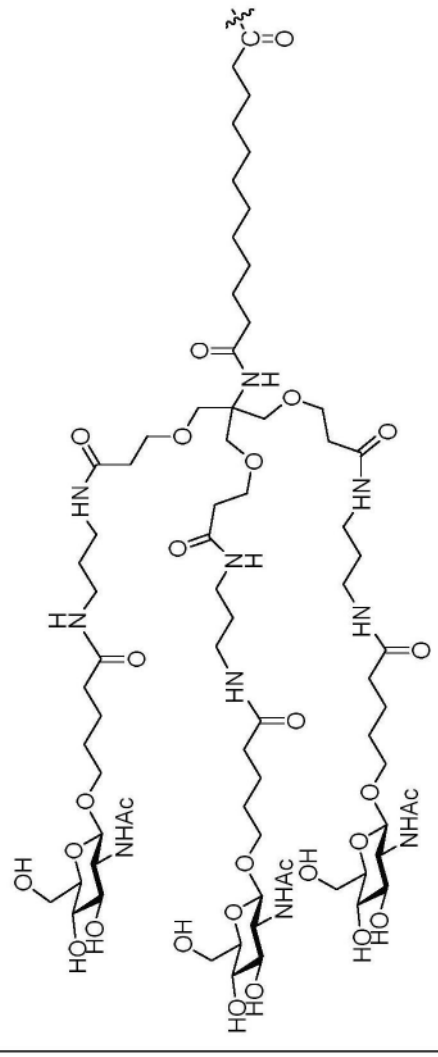
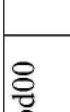
[0548]

IA	 如果位于 5'-末端基团和/或核苷酸间连接之间(例如，在 WV-6692 中)；  如果位于 5'-末端且没有 5'-末端基团(例如，在 WV-6710 中)；  如果位于 3'-末端(例如，在 WV-7817 中)。

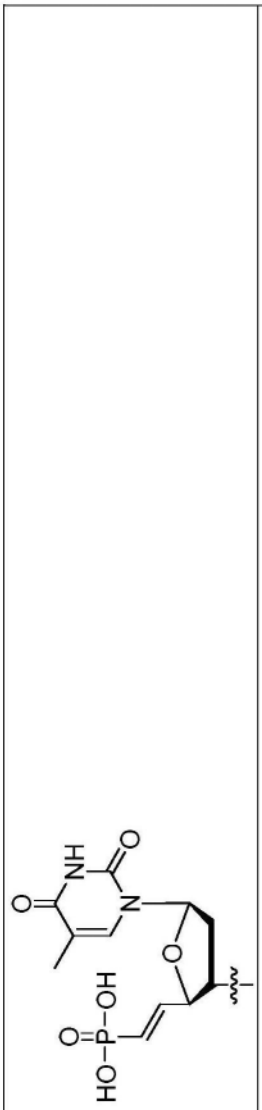
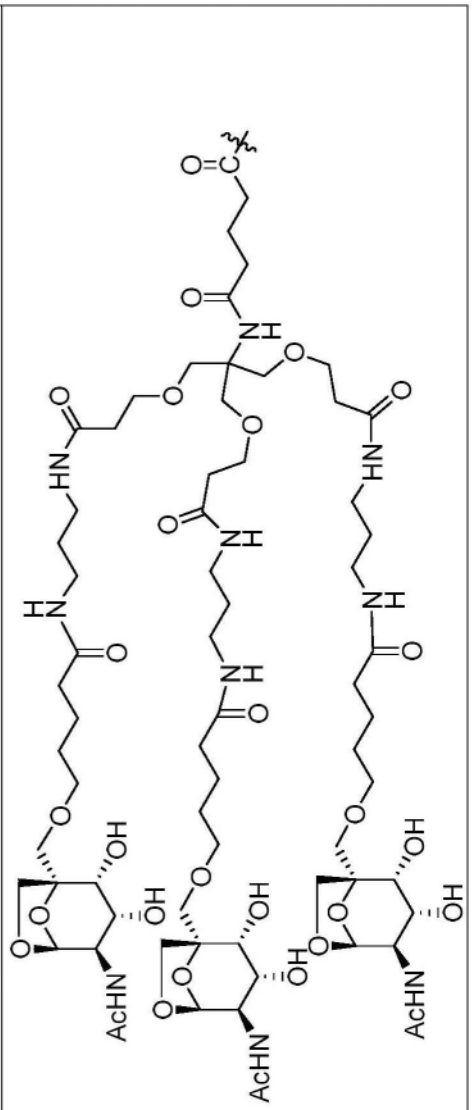
[0549]

lm5C	 如果位于 5'-末端基团和/或核苷酸间连接之间(例如，在 WV-6690 中)；  如果位于 5'-末端且没有 5'-末端基团(例如，在 WV-7817 中)；  如果位于 3'-末端(例如，在 WV-7818 中)。
MeOT	

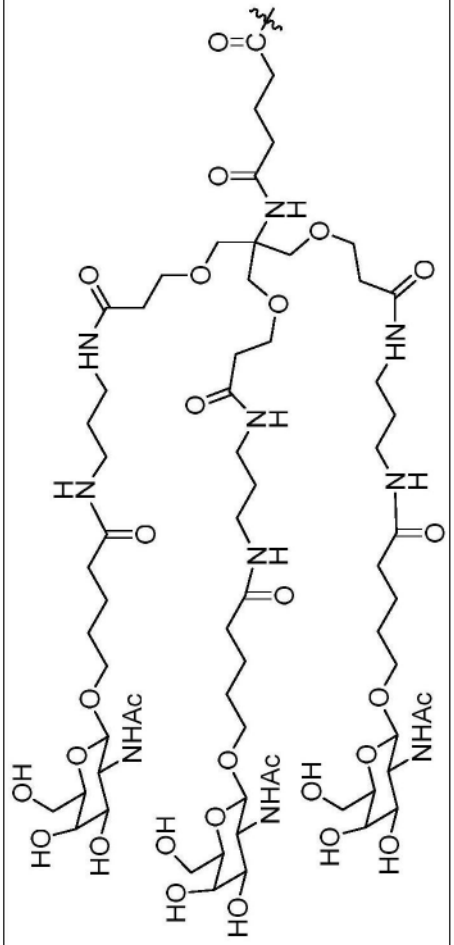
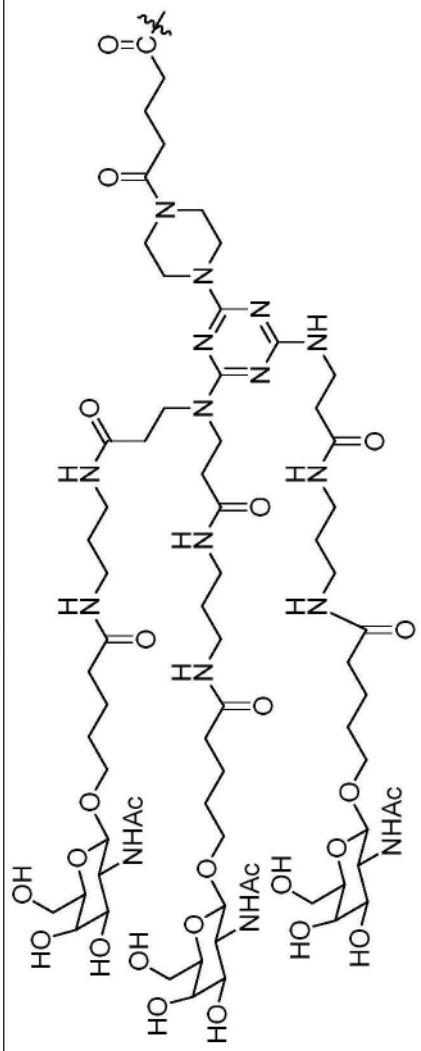
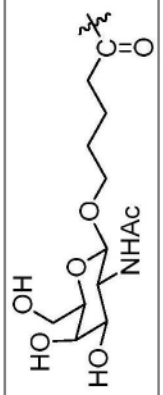
[0550]

Mod001	
Mod022	$CH_3CH_2CH_2$-；通过磷酸酯键联(O 或 PO)或硫代磷酸酯键联(*如果硫代磷酸酯不是手性控制的；如果是手性控制的且具有 Sp 构型，则也可以是 Sp；如果是手性控制的且具有 Rp 构型，则也可以是 Rp)连接到寡核苷酸链的 5'-末端，如图所示。
PH	
Mod023	 通过磷酸酯键联(O 或 PO)或硫代磷酸酯键联(*如果硫代磷酸酯不是手性控制的；如果是手性控制的且具有 Sp 构型，则也可以是 Sp；如果是手性控制的且具有 Rp 构型，则也可以是 Rp)连接到寡核苷酸链的 5'-末端，如图所示。

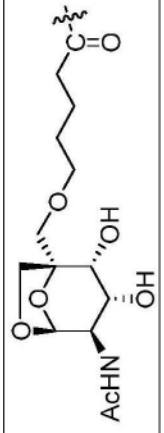
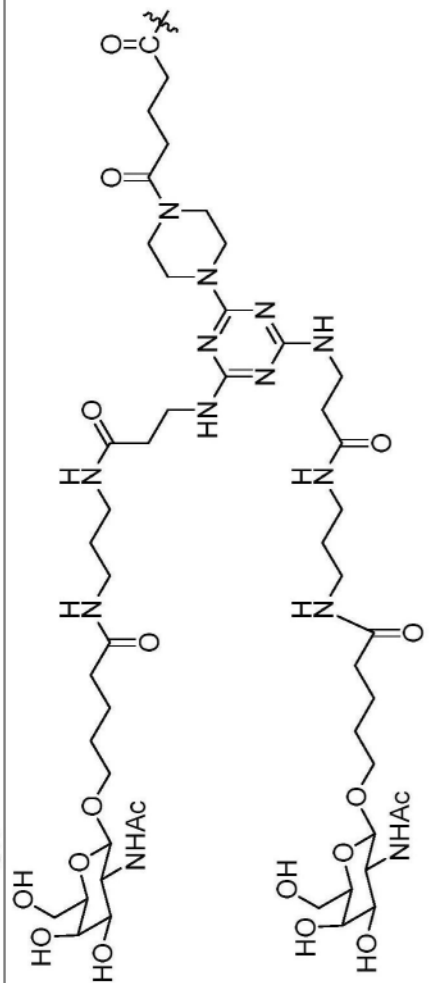
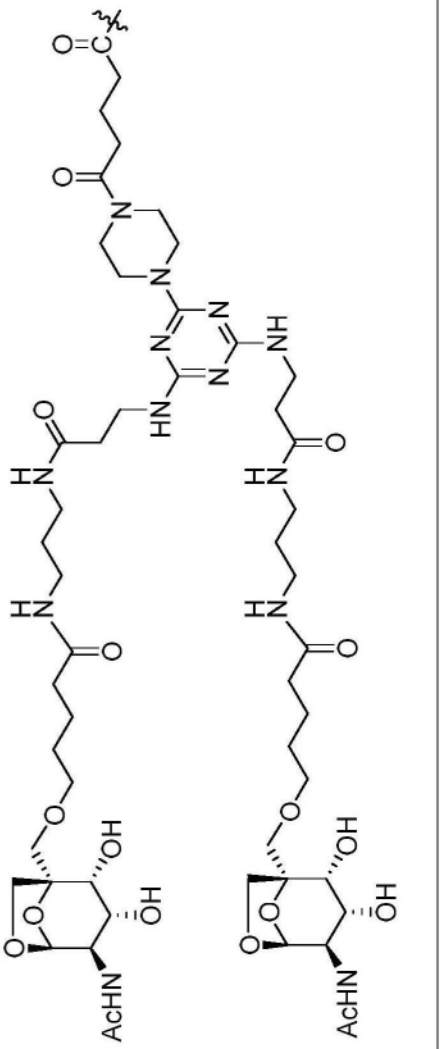
[0551]

VPT	
Mod034	

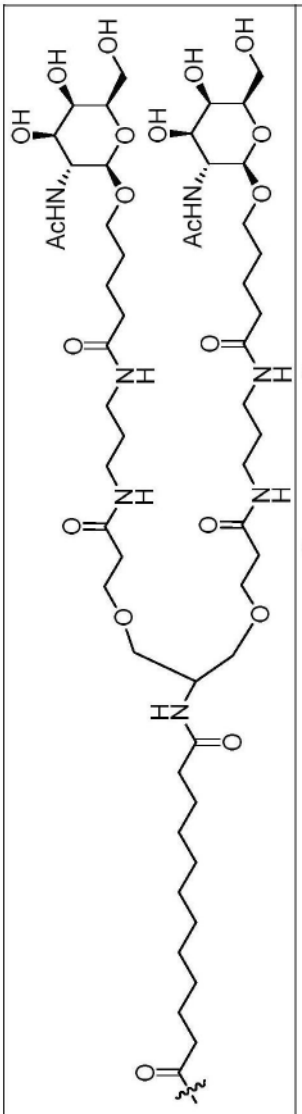
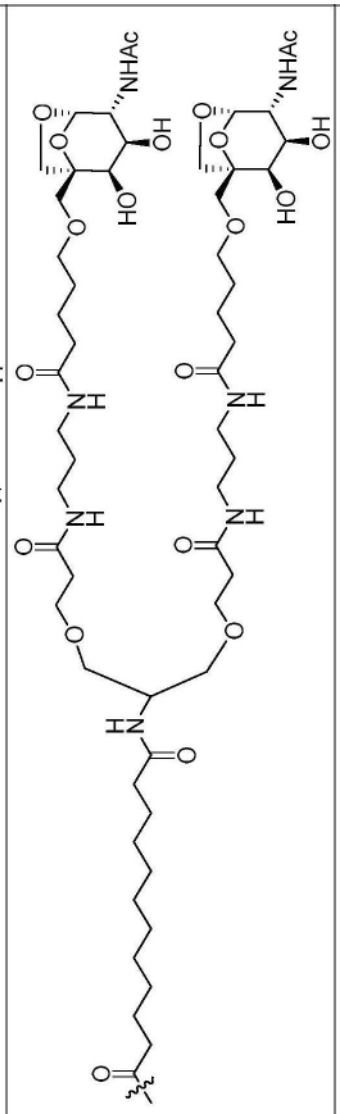
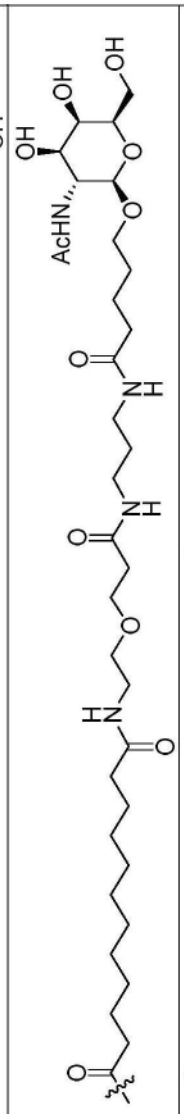
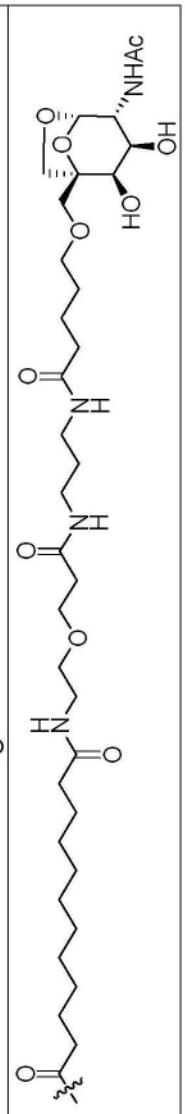
[0552]

Mod03 5	
Mod03 6	
Mod03 8	

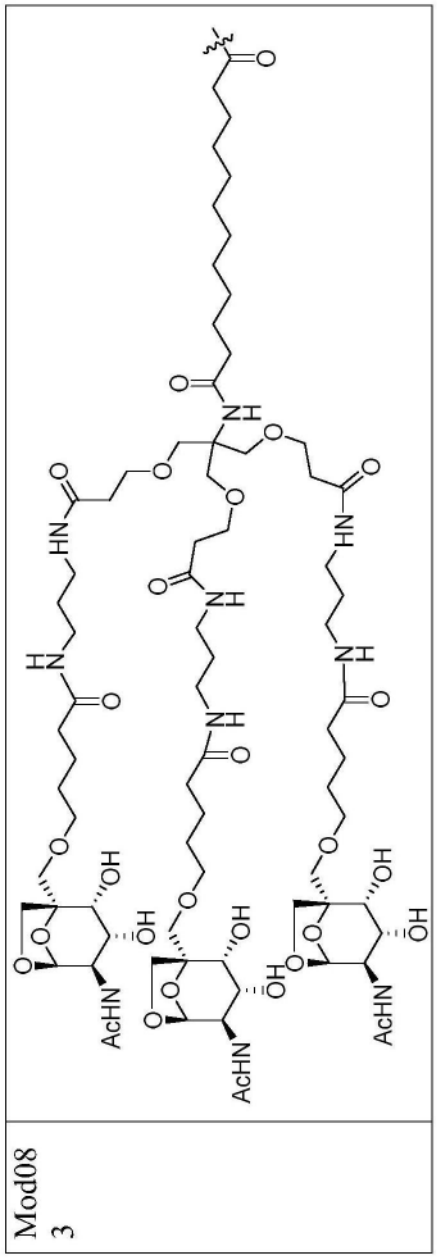
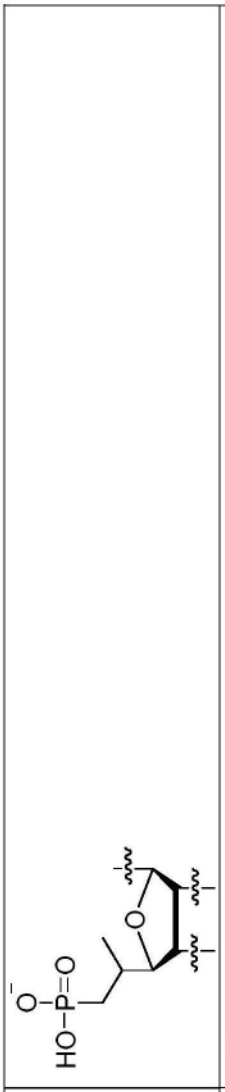
[0553]

Mod039	
Mod040	
Mod041	

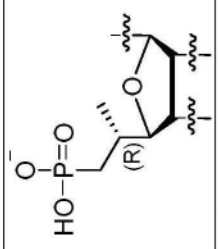
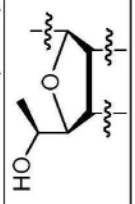
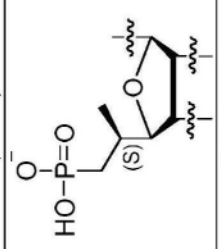
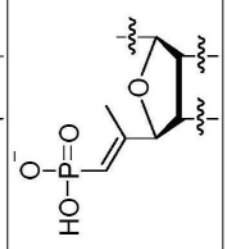
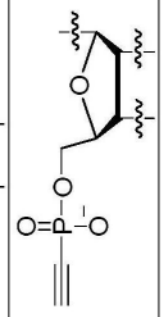
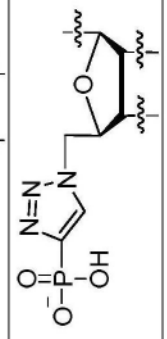
[0554]

Mod07 9	
Mod08 0	
Mod08 1	
Mod08 2	

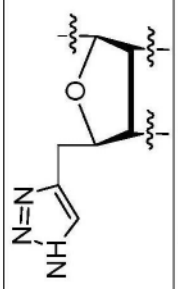
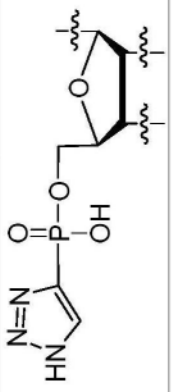
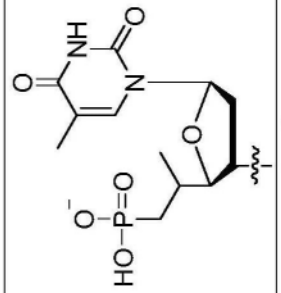
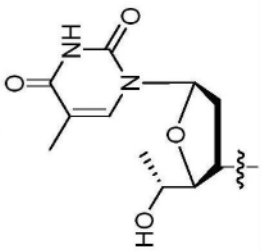
[0555]

Mod08 3	
5mp	
5MR	

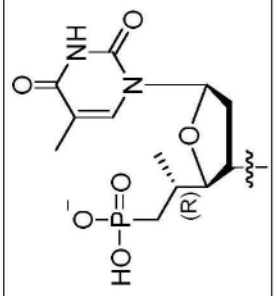
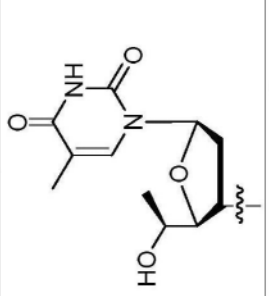
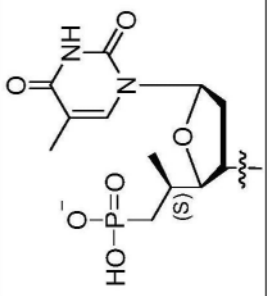
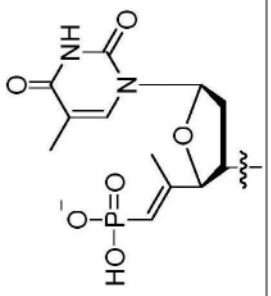
[0556]

5mrp	
5MS	
5msp	
5mvp	
5pacet	
5ptz	

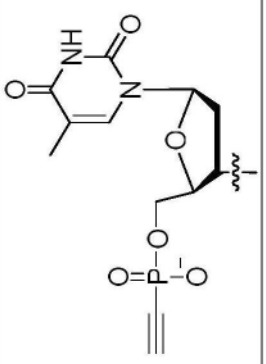
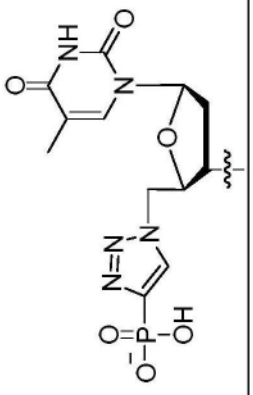
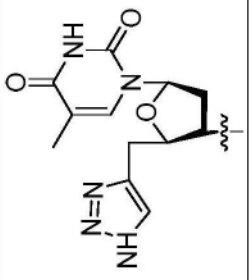
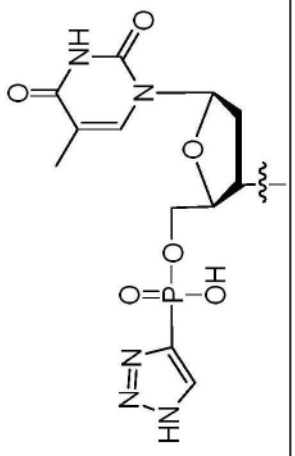
[0557]

5tz	
5tzpo	
5mpdT	
5MRdT	

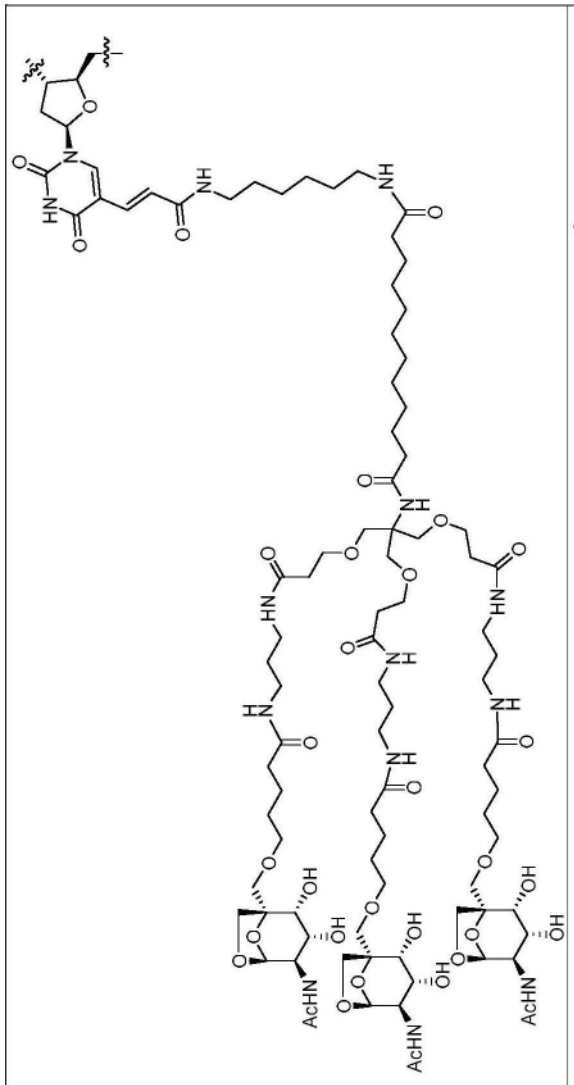
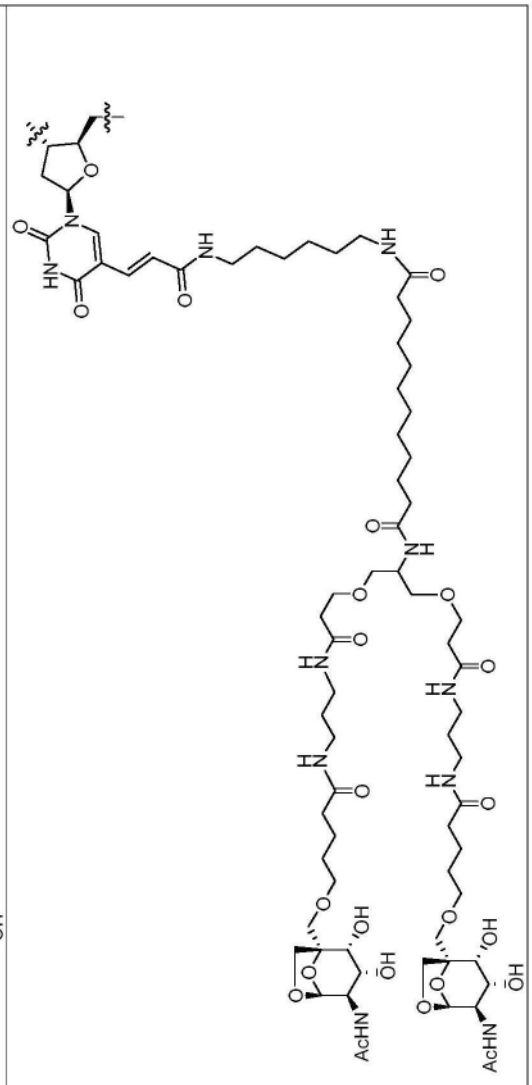
[0558]

5mrpdT	
5MSdT	
5mspdT	
5mvpdT	

[0559]

5pacetdT	
5ptzdT	
5tzdT	
5tzpodT	

[0560]

tbclc6T	
bbclc6T	

[0561]

L009	-$CH_2CH_2CH_2$-。如果 L009 存在于不具有 Mod 的寡核苷酸的 5'-末端，L009 通过所示的键联(例如，在 WV-9261 中，通过立体无规硫代磷酸酯键联(“*”))将一端连接到-OH，而另一端连接到寡核苷酸链的 5'-碳。

在一些实施方案中，接头，例如 L009、L010 等，可以代替糖，并且在任一端键合到核苷酸间键联。例如：

WV-9266 包含...* mAL009 * mUfG * ...，其从 5'到 3'表示：硫代磷酸酯(*)，与碱基(A)连接的 2'-OMe 糖(m)，磷酸二酯键联(未示出)，L009 接头(L009)，硫代磷酸酯(*)，与 U 碱基连接的 2'-OMe 糖(mU)，磷酸二酯键联(未示出)，与碱基(G)连接的 2'-F 糖(f)和硫代磷酸酯。

WV-9267 包含...* mAfC * L009fG * ...，其从 5'到 3'表示：硫代磷酸酯(*)，与碱基(A)连接的 2'-OMe 糖(m)，磷酸二酯(未示出)，与碱基(C)连接的 2'-F 糖(f)，硫代磷酸酯，L009 接头(L009)，磷酸二酯键联(未示出)，与碱基(G)连接的 2'-F 糖(f)和硫代磷酸酯。

L010	。L010 的连接方式通常与 DNA 中的连接方式相同(第一糖的 5'-碳通过核苷酸间键联与第二糖的 3'-碳连接，并且第一糖的 3'-碳通过核苷酸间键联与第三糖的 5'-碳连接)。如果 L010 存在于不具有 Mod 的寡核苷酸的 5'-末端，L010 通过所示的键联(例如，在 WV-9250 中，通过立体无规硫代磷酸酯键联(“*”))

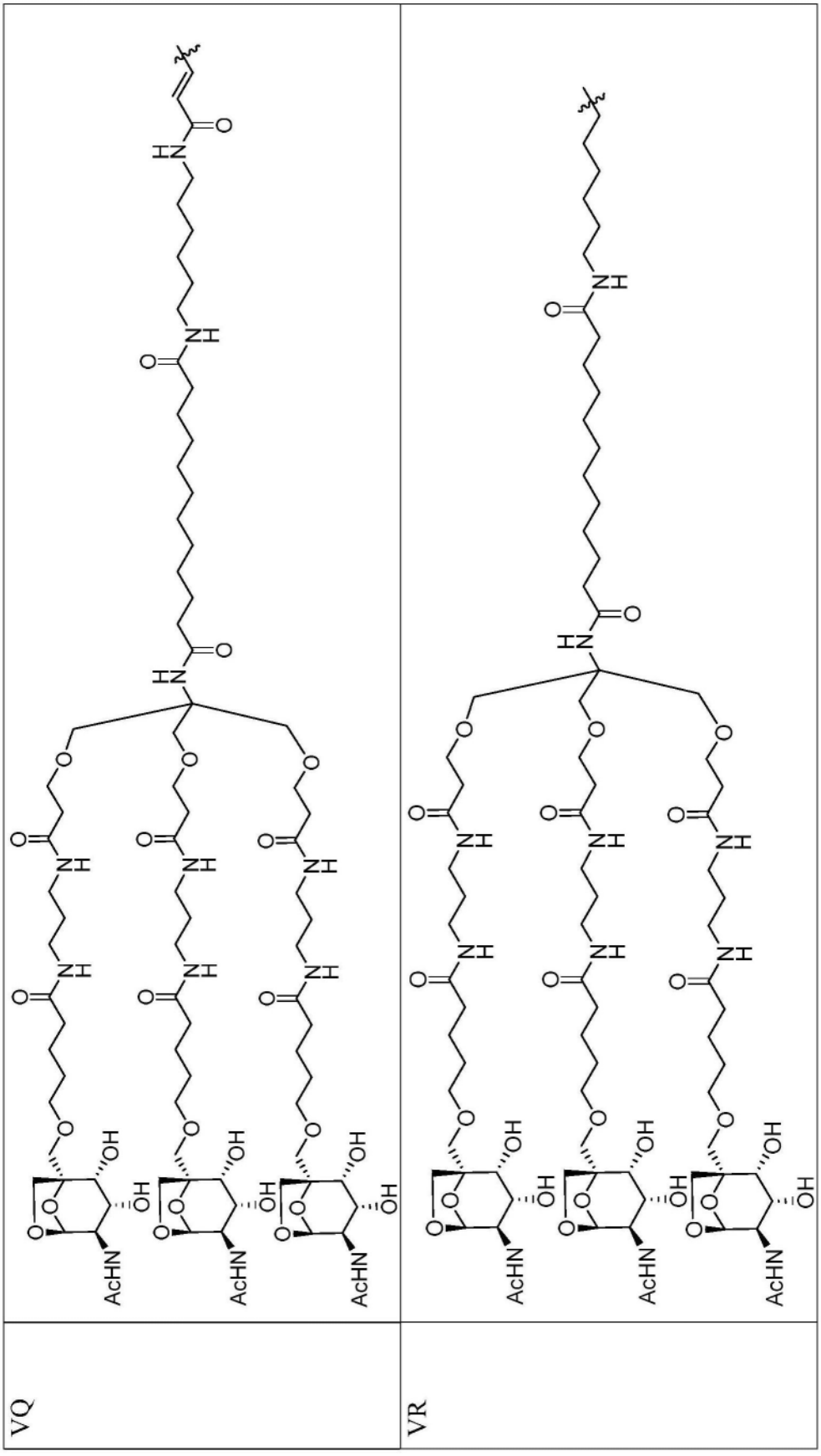
[0562]

将5'-碳连接到-OH，而将3'-碳连接到寡核苷酸链的5'-碳。

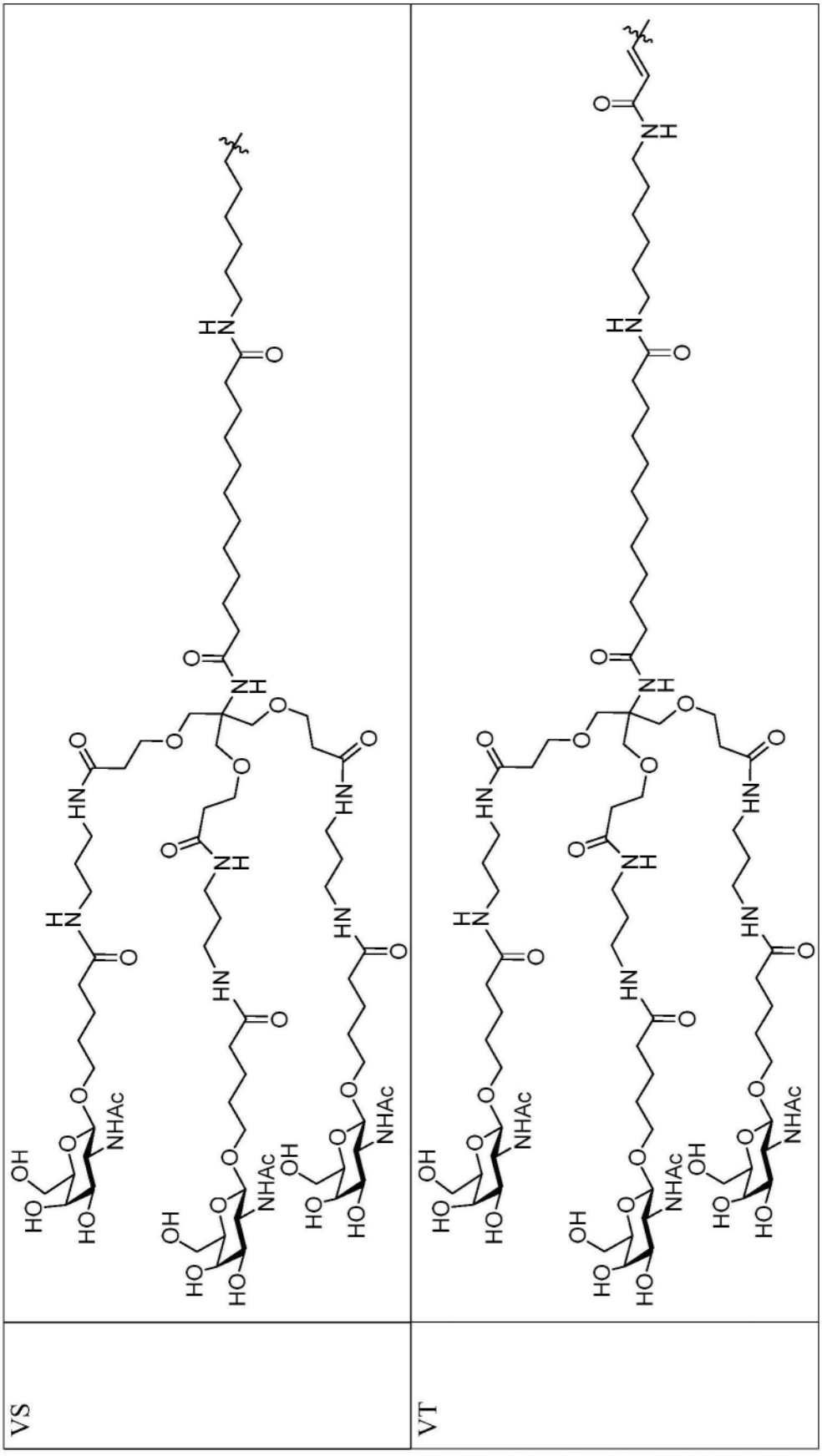
在一些实施方案中，L010可以代替糖，并且L010在任一端键合到核苷酸间键联。

n001，nX	
VPT	
VP	

[0563]

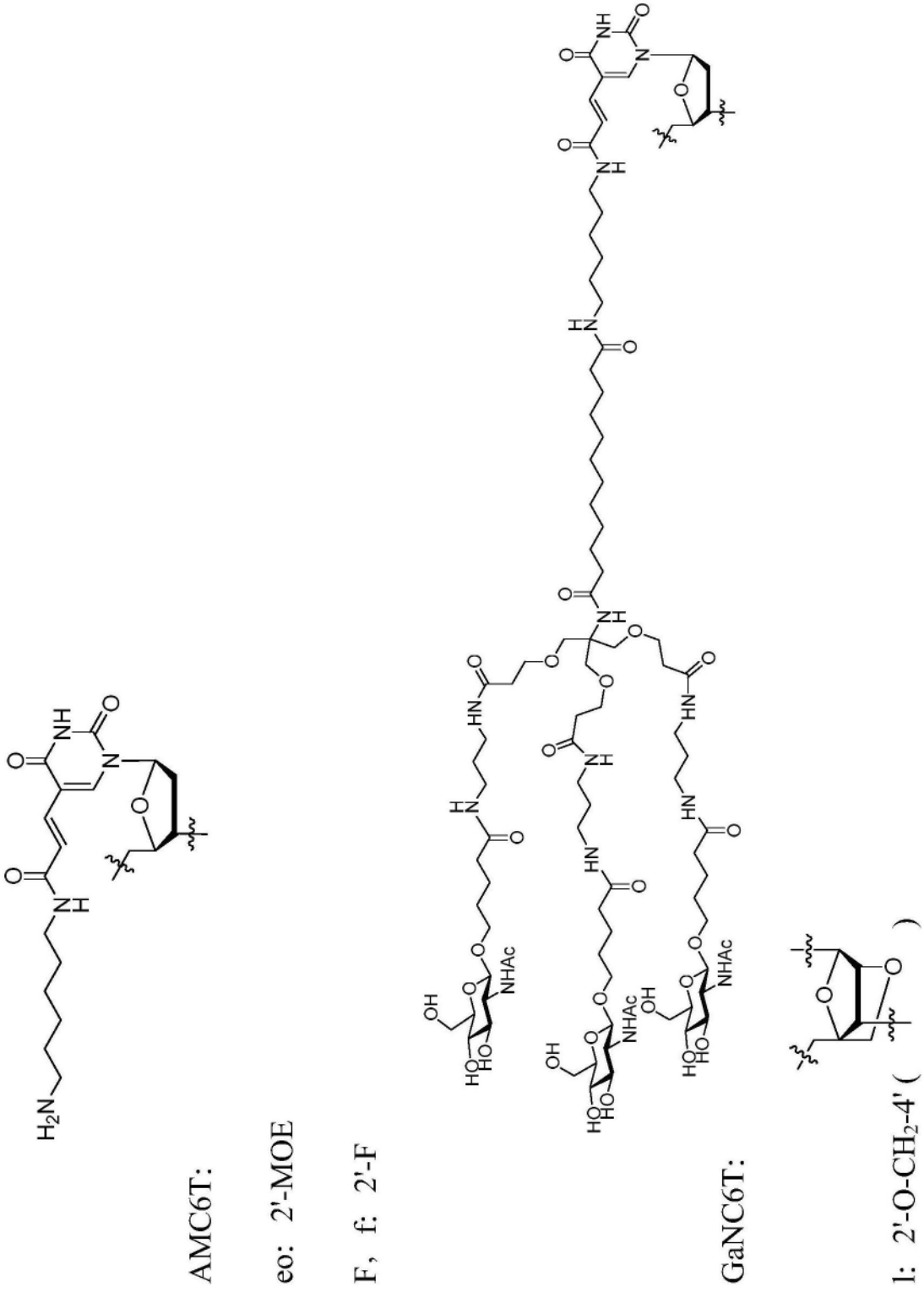


[0564]



另外的缩写：

[0565]



[0566]

lmU:

L001：-NH-$(CH_2)_6$-接头(C6 接头，C6 胺接头或 C6 氨基接头)；通过-NH-连接到 Mod (如果有的话) (如果没有 Mod，则连接到-H，例如在 WV-8240 中)，并且通过磷酸酯键联(O 或 PO)或硫代磷酸酯键联(*如果硫代磷酸酯不是手性控制的；如果是手性控制的且具有 Sp 构型，则也可以是 Sp；如果是手性控制的且具有 Rp 构型，则也可以是 Rp)连接到寡核苷酸链的 5'末端(例如在 WV-2406 中)或 3'-末端，如图所示。例如，在 WV-2406 中，L001 通过-NH-连接到 Mod001 (形成酰胺基-C(O)-NH-)并通过磷酸酯键联(**O**XXXXXXXXXXXXXXXXXX)连接到寡核苷酸链；在 WV-2422 中，L001 未连接到任何 Mod，而是通过-NH-连接到-H，并通过磷酸酯键联(**O**XXXXXXXXXXXXXXXXXX)连接到寡核苷酸链

L003：接头，通过其氨基连接到 Mod (如果有的话) (如果没有 Mod，则连接到-H，例如在 WV-2426 中)，并且通过磷酸酯键联(O 或 PO)或硫代磷酸酯键联(*如果硫代磷酸酯不是手性控制的；如果是手性控制的且具有 Sp 构型，则也可以是 Sp；如果是手性控制的且具有 Rp 构型，则也可以是 Rp)连接到寡核苷酸链的 5'末端(例如在 WV-2407 中)或 3'-末端(例如在 WV-8070 中)，如图所示。例如，在 WV-2407 中，L003 通过其氨基(形成酰胺基

)连接到

[0567]

Mod001，并通过磷酸酯键联(OXXXXXXXXXXXXXXXXXX)连接到寡核苷酸链的 5'-末端；在 WV-2426 中，L001 末连接到任何 Mod，而是通过-NH-连接到-H，并且通过磷酸酯键联(OXXXXXXXXXXXXXXXXXX)连接到寡核苷酸链；在 WV-8070 中，L003 通过其氨基(形成酰胺基)连接到 Mod001，并通过磷酸酯键联(...XXXXXXXXXXXXXXXXXO)连接到寡核苷酸链的 3'-末端

m: 2'-OMe

m5: C 的 5 位上的甲基(核碱基为 5-甲基胞嘧啶)

m5Ceo: 5-甲基 2'-甲氧基乙基 C

OMe: 2'-OMe

O，PO: 磷酸二酯(磷酸酯)；可以是末端基团(通常是“PO”；例如在 WV-4260 中：POT*fC * …)，或者键联，例如，接头与寡核苷酸链之间的键联，核苷酸间键联等。

*，PS: 硫代磷酸酯；可以是末端基团(通常是“PS”；例如在 WV-2653 中：PST*fA* …)，或者键联，例如，接头与寡核苷酸链之间的键联，核苷酸间键联等。

R，Rp: Rp 构象的硫代磷酸酯

[0568] S，Sp：Sp构象的硫代磷酸酯

X：立体无规硫代磷酸酯

[0569] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物是表1A中所列的或本文其他地方所述的单链RNAi剂。在一些实施方案中,证明了所提供的寡核苷酸的示例性性质。

[0570] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有图1所示的任一格式的结构。

[0571] 本公开提出了能够介导单链RNA干扰的寡核苷酸的许多非限制性实例(例如,单链RNAi剂)。实验数据(未示出)表明,各种推定的单链RNAi剂实际上能够介导RNA干扰。在一些实验中,使用了体外Ago-2测定,包括使用RNA测试底物WV-2372(其靶向不同的基因APOC3)。在寡核苷酸WV-1308和WV-2420存在的情况下,不存在代表RNA测试底物的条带,这表明这些寡核苷酸是能够介导RNA干扰的单链RNAi剂。其余泳道是对照:不存在阴性对照ASO WV-2134的底物;不存在阴性对照ASO WV-2134的底物,其不介导RNA干扰;不存在测试寡核苷酸WV-1308的底物;不存在测试寡核苷酸WV-2420的底物;仅底物;无底物,添加了WV-2134;以及无底物,添加了WV-1308。还进行了体外Ago-2测定(数据未示出),所述测定使用APOC3 mRNA作为Hep3B细胞3'RACE测定中的测试底物。在测试寡核苷酸WV-3021的存在下,检测到APOC3 mRNA的切割产物,所述产物对应于mRNA在对应于WV-3021的位置10与11之间的切口的位点处的切割。还检测到人工切割产物。实验数据(未示出)证明双机制寡核苷酸WV-2111能够同时通过RNA酶H和RNA干扰介导敲低。在实验中,若干种寡核苷酸能够介导RNA干扰。RNA测试底物是WV-2372。实验表明,在测试寡核苷酸WV-1308、WV-2114、WV-2386和WV-2387的存在下,RNA测试底物消失,这表明所有这些寡核苷酸都能够充当介导RNA干扰的单链RNAi剂。其余泳道是对照。因此,实验表明寡核苷酸WV-1308、WV-2114、WV-2386和WV-2387均能够介导RNA干扰。因此,实验表明若干种单链RNAi剂(例如WV-1308、WV-2420、WV-3021、WV-2111、WV-2114、WV-2386和WV-2387)能够介导RNA干扰。本公开提出了寡核苷酸的许多非限制性实例,其具有各种序列、格式、修饰、5'-末端区域、种子区域、种子后区域和3'-末端区域中的任一个,并且能够介导单链RNA干扰(例如,单链RNAi剂)。

[0572] 寡核苷酸的格式

[0573] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能

够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可具有本文所述或本领域已知的任何格式或其部分或其结构元件。

[0574] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可具有本文所述或本领域已知的任何格式或其结构元件。

[0575] 在一些实施方案中,能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的PNPLA3寡核苷酸可以具有本文所述或本领域已知的任何格式或其结构元件。

[0576] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可以具有本文所述或本领域已知的任何格式或其结构元件。

[0577] 各种ssRNAi格式的另外的非限制性实例由本文所述的各种单链RNAi剂来体现。

[0578] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何5'-末端代表的5'-末端。

[0579] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何5'-末端结构或5'-末端区域代表的5'-末端结构或5'-末端区域。

[0580] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何5'-核苷酸代表的5'-核苷酸。

[0581] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何5'-核苷代表的5'-核苷。

[0582] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子区域代表的种子区域。

[0583] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域代表的种子后区域。

[0584] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域或其组分代表的种子后区域或其组分。

[0585] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何3'-末端二核苷酸代表的3'-末端二核苷酸。

[0586] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子区域的核苷酸间键联样式代表的核苷酸间键联样式的种子区域。

[0587] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域的核苷酸间键联样式代表的核苷酸间键联样式的种子后区域。

[0588] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格

式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域或其组分的核苷酸间键联样式代表的核苷酸间键联样式的种子后区域或其组分。

[0589] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何3'-末端二核苷酸的核苷酸间键联样式代表的核苷酸间键联样式的3'-末端二核苷酸。

[0590] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子区域的化学修饰样式代表的化学修饰样式的种子区域。

[0591] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域的化学修饰样式代表的化学修饰样式的种子后区域。

[0592] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何种子后区域或其组分的化学修饰样式代表的化学修饰样式的种子后区域或其组分。

[0593] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含具有由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何3'-末端二核苷酸的化学修饰样式代表的化学修饰样式的3'-末端二核苷酸。

[0594] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的任何单链RNAi格式或者本文所述的任何单链RNAi剂或单链RNAi格式的任何化学修饰代表的化学修饰。

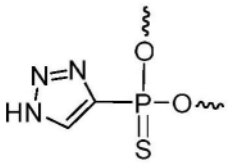
[0595] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的或本文所述的任何单链RNAi格式的任何化学修饰代表的化学修饰,其中所述化学修饰是包含磷酸酯、接头或靶向部分的部分的缀合。

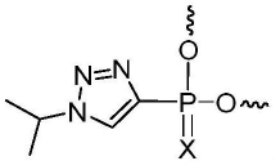
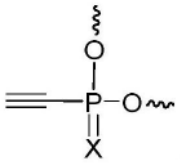
[0596] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含由图1中描绘的或本文所述的任何单链RNAi格式的任何化学修饰代表的化学修饰,其中所述化学修饰是包含磷酸酯、接头或靶向部分的部分的缀合,其中所述靶向部分包括GalNAc部分。在一些实施方案中,GalNAc是受保护的或去保护的GalNAc。

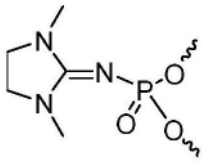
[0597] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够降低靶基因和/或其基因产物的表达、活性和/或水平,并具有本文所述的任何寡核苷酸的格式。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够通过RNA酶H介导的机制或与翻译的空间位阻有关的机制来降低靶基因和/或其基因产物的表达、活性和/或水平,并具有本文所述的任何寡核苷酸的格式。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够通过RNA酶H介导的机制或与翻译的空间位阻有关的机制来降低靶基因和/或其基因产物的表达、活性和/或水平,并具有非对称格式。在一些实施方案中,具有不对称格式的PNPLA3寡核苷酸包含第一翼、核心和第二翼,其中所述核心包含5个或更多个连续的2'-脱氧核苷酸的区域,所述区域可以与靶mRNA退火并形成RNA酶H识别的结构,并且其中所述第一翼和第二翼的结构不同。在一些实施方案中,所述第一翼和第二翼在其2'-修饰和/或核苷酸间键联或者核苷酸间键联的立体化学模式方面不同。

[0598] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够降低靶基因和/或其基因产物的表达、活性和/或水平,包含中性核苷酸间键联(例如,中性主链)。

[0599] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含中性主链。在一些实施方案中,PNPLA3寡

核苷酸包含核苷酸间键联,所述核苷酸间键联是三唑、中性三唑或炔。在一些实施方案中,核酸(包括但不限于PNPLA3寡核苷酸)包含核苷酸间键联,所述核苷酸间键联包含三唑、中性三唑或炔,其中所述核苷酸间键联是立体控制的并且呈Rp或Sp构型。在一些实施方案中包含三唑的核苷酸间键联具有下式:  在一些实施方案中包含中性三唑的核苷酸间键联具有下式:

[0600]  其中X是O或S。在一些实施方案中,包含炔的核苷酸间键联具有下式:  其中X是O或S。

[0601] 在一些实施方案中,核苷酸间键联包含环状胍。在一些实施方案中,核苷酸间键联包含环状胍部分并且具有以下结构:  在一些实施方案中,包含环状胍的中性核苷酸间键联或核苷酸间键联是立体化学控制的。在一些实施方案中,中性核苷酸间键联改善了PNPLA3寡核苷酸的活性、递送和/或稳定性和/或PNPLA3寡核苷酸进行内体逃逸的能力。

[0602] 如本领域技术人员所了解的,在一些情况下,~可用于指示连接位点(如);在一些情况下,~可用于指示立体无规的连接。

[0603] PNPLA3寡核苷酸的长度

[0604] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以具有任何长度,其中PNPLA3寡核苷酸的长度使得寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[0605] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸的长度使得寡核苷酸能够指导靶基因或其基

因产物的表达和/或水平的降低。

[0606] 在一些实施方案中,RNAi剂的长度使得RNAi剂能够以序列特异性方式指导特异性靶转录物的RNA干扰。在一些实施方案中,RNAi剂包含足够数量具有足够同一性的核碱基以识别靶转录物。在一些实施方案中,RNAi剂还具有适用于介导RNAi干扰的长度。

[0607] 序列的靶部分将至少足够长,以用作iRNA指导的在所述部分处或附近的切割的底物。例如,靶序列的长度通常是约9-36个核苷酸(“nt”),例如长度是约15-30个核苷酸,包括其间的所有子范围。表1A示出了各种长度的单链RNAi剂的实例。

[0608] 图1示出了长度是19至25的单链RNAi剂的非限制性实例。构建具有这些长度中的任一每个长度的单链RNAi剂,并且发现它们能够敲低靶基因。因此,所提供的单链RNAi剂可以具有多个不同长度中的任一个。

[0609] 长度是19个碱基的ssRNAi剂的格式的非限制性实例包括:图1的格式20-21。

[0610] 长度是20个碱基的ssRNAi剂的格式的非限制性实例包括:图1的格式19。

[0611] 包括单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸的5’-末端

[0612] 在一些实施方案中,寡核苷酸的5’-末端的结构使得PNPLA3寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[0613] 在一些实施方案中,RNAi剂的5’-末端的结构使得RNAi剂能够以序列特异性方式指导特异性靶转录物的RNA干扰。

[0614] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5’-末端区域、5’-末端结构、5’-末端基团、5’-末端核苷或5’-末端核苷酸。在一些实施方案中,所提供的能够指导RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5’-末端区域、5’-末端结构、5’-末端基团、5’-末端核苷或5’-末端核苷酸。在一些实施方案中,所提供的能够指导RNA干扰的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5’-末端区域、5’-末端结构、5’-末端基团、5’-末端核苷或5’-末端核苷酸。在一些实施方案中,所提供的能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5’-末端区域、5’-末端结构、5’-末端基团、5’-末端核苷或5’-末端核苷酸。

[0615] 本公开尤其认识到寡核苷酸的5’-末端结构,任选地与根据本公开的另外的特征组合,可以提供意料不到的优点。在一些实施方案中,本公开提供了5’-末端基团(对应于天然RNA中存在的核糖(或天然DNA中存在的脱氧核糖)的5’-HO-CH_2-),其可以令人惊讶地改善寡核苷酸的一种或多种性质和/或活性(例如,稳定性、活性、制造成本等)。

[0616] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的5’-OH基团是未修饰的,即它们作为游离的-OH存在。在一些实施方案中,5’-末端基团是5’-HO-CH_2-。本公开尤其证明所提供的具有游离5’-OH基团的寡核苷酸可以实现与在其他方面相同的包含5’-磷酸(或其衍生物)基团的寡核苷酸可比的性质和/或活性(例如,稳定性,用作ss-RNAi剂时的RNAi活性等),尽管有文献报道某些活性(例如,RNAi活性)需要存在5’-磷酸酯基团。

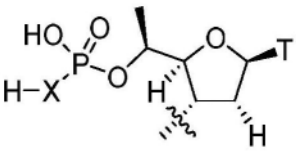
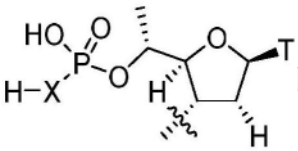
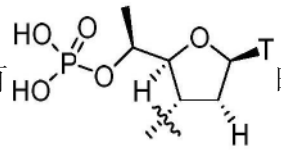
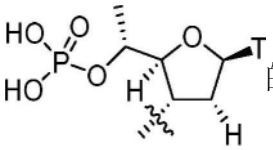
[0617] 在一些实施方案中,5’-末端基团不包含磷原子。在一些实施方案中,5’-末端基团不包含磷酸酯基团或者其衍生物或生物电子等排体。在一些实施方案中,5’-末端基团不包含酸性基团。在一些实施方案中,5’-末端基团不包含羧基。在一些实施方案中,5’-末端基团不包含磷原子或羧基。在一些实施方案中,5’-末端基团是5’-HO-CH_2-。除其他外,本公开证明,所提供的不具有5’-磷酸或者其衍生物或生物电子等排体的寡核苷酸可以令人惊讶

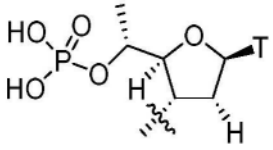
地实现与具有5'-磷酸但在其他方面相同的寡核苷酸可比的活性,例如在通过RNAi途径敲低靶基因的mRNA水平方面的活性。

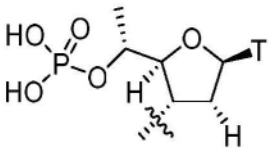
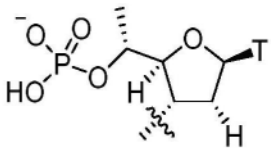
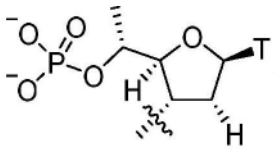
[0618] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸的5'-核苷单元(其包括糖和核碱基部分,但不包括所述5'-核苷单元与从5'-末端起的第二核苷单元之间的核苷酸间键联)不包含磷酸酯基团或者其衍生物或生物电子等排体。在一些实施方案中,5'-核苷单元不包含磷原子。在一些实施方案中,5'-核苷不包含酸性基团。在一些实施方案中,5'-核苷单元不包含-COOH基团或其盐形式。

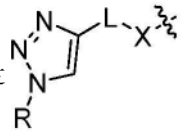
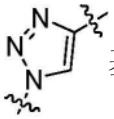
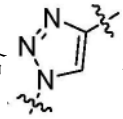
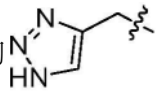
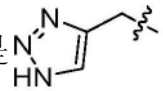
[0619] 在一些实施方案中,5'-末端基团是或包含磷酸酯基团或者其衍生物或生物电子等排体。在一些实施方案中,5'-核苷单元包含5'-基团,其是磷酸酯基团或者其衍生物或生物电子等排体。如本领域普通技术人员所了解的,许多此类基团在本领域中是已知的,并且可以根据本公开使用。

[0620] 在一些实施方案中,5'-末端基团是-CH_2-O-P(O)(OH)-(OH)或其盐形式。

[0621] 在一些实施方案中,所提供的5'-核苷单元具有  的结构或其盐形式。在一些实施方案中,所提供的5'-核苷单元具有  的结构或其盐形式。在一些实施方案中,X是O。在一些实施方案中,X是S。在一些实施方案中,R^E是-(R)-CH(CH_3)-O-P(O)(OH)-S-H或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-(R)-CH(CH_3)-O-P(O)(OH)-O-H或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-(S)-CH(CH_3)-O-P(O)(OH)-S-H或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-(S)-CH(CH_3)-O-P(O)(OH)-O-H或其盐形式。在一些实施方案中,所提供的5'-核苷单元具有  的结构或其盐形式。在一些实施方案中,所提供的5'-核苷单元具有  的结构或其盐形式。

[0622] 如本领域普通技术人员容易了解的,所提供的化合物,例如寡核苷酸或其部分结构,例如寡核苷酸的5'-末端结构、核苷酸间键联等,可以由于例如其中的一种或多种酸性和/或碱性部分而在某些pH(例如生理pH)下部分地(有时主要地)作为其一种或多种盐形式存在。在一些实施方案中,所提供的5'-核苷单元可以部分地(有时主要地)作为其一种或多种盐形式存在。例如,根据pH,  可以作为




或其任何组合存在。除非另有明确指明,否则当列举所提供的化合物或结构时,包括所有盐形式。

[0623] 在一些实施方案中,R^E是-L-P(O)(XR)$_2$或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-L-P(O)(XR)$_2$或其盐形式,其中每个X独立地是-O-、-S-或共价键。在一些实施方案中,R^E是-L-P(O)(OR)$_2$或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-L-P(O)(OR)(SR)或其盐形式。在一些实施方案中,R^E是-L-P(O)(OR)(R)或其盐形式。在一些实施方案中,L是共价键或二价的、任选取代的、直链或支链C_{1-6}脂族,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被-O-、-S-或-N(R')-取代。在一些实施方案中,R^E是-L-R^{5s}。在一些实施方案中,R^E是-X-L-R。在一些实施方案中,R^E是  。在一些实施方案中,R^E是-C(R)$_2$-。在一些实施方案中,X是-O-。在一些实施方案中,X是-S-。在一些实施方案中,X是-N(R)-。在一些实施方案中,L包含任选取代的、二价或多价的 基团。在一些实施方案中,L包含任选取代的  基团。在一些实施方案中,L包含  基团。在一些实施方案中,R独立地是-H或者选自C_{1-10}烷基、C_{1-10}烯丙基和C_{6-14}芳基的任选取代的基团。在一些实施方案中,R是-H。在一些实施方案中,R^E是任选取代的  。在一些实施方案中,R^E是  。

[0624] 文献中描述了许多磷酸酯衍生物和/或生物电子等排体以及5'-核苷单元,并且可以根据本公开来使用,例如,一些此类结构描述于例如US2016-0194349;US2016-0186175;US20130323836等中。在一些实施方案中,5'-末端基团R^E或5'-核苷单元描述于,例如,Allerson等2005J.Med.Chem.48:901-04;Lima等2012Cell 150:883-894;Prakash等2015Nucl.Acids Res.43:2993-3011;和/或Prakash等2016Bioorg.Med.Chem.Lett.26:26:2817-2820中,例如T-VP、T-PO等。

[0625] 桥接的吗啉代和环己烯基核苷酸和核苷描述于,例如,美国专利申请公布2016-0186175中,其可以根据本公开使用。

[0626] 在本公开中广泛描述了变量的示例性实施方案。对于具有两个或更多个变量的结构,除非另外指明,否则每个变量可以独立地是本文所述的任何实施方案。

[0627] 在一些实施方案中,能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的PNPLA3寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5'-末端。

[0628] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何5'-末端。

[0629] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸

或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何5'-末端。

[0630] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的5'-末端包含含磷部分(例如,5'-末端包含磷)。其中5'-末端包含含磷部分的ssRNAi格式的非限制性实例包括图1的格式1-15、20-21、23-31、80-82、92-95、97-102和104-107。

[0631] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的5'-末端不包含含磷部分(例如,5'-末端包含磷)。其中5'-末端不包含含磷部分的ssRNAi格式的非限制性实例包括图1的格式16-19、22、32-79、83-91、96和103。

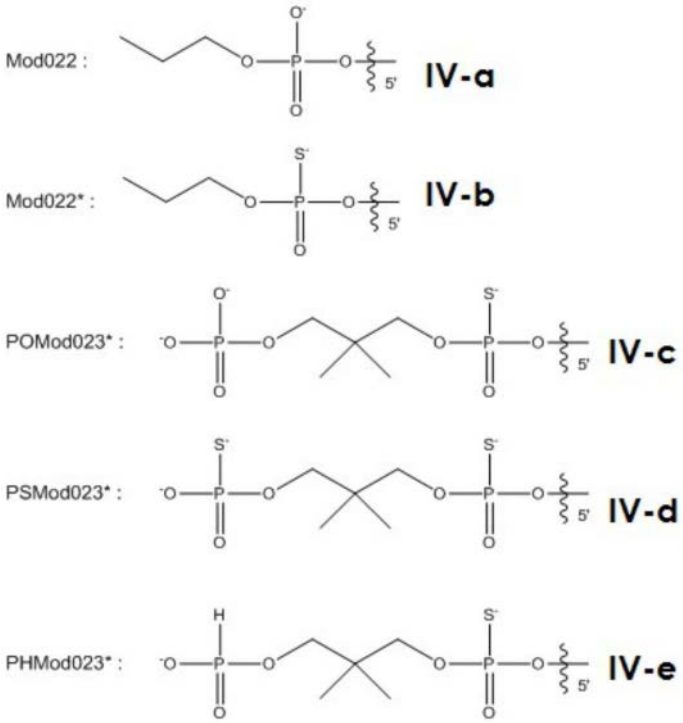
[0632] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的5'-末端具有包含磷酸酯(诸如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、H-膦酸酯)的部分,或与包含磷酸酯的核苷酸间键联类似或相同的其他部分。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的5'-末端具有包含磷酸酯但不是磷酸二酯的部分;在一些实施方案中,这种部分被称为磷酸酯模拟物、修饰的磷酸酯或磷酸酯类似物。

[0633] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的5'-末端不具有包含磷酸酯的部分。

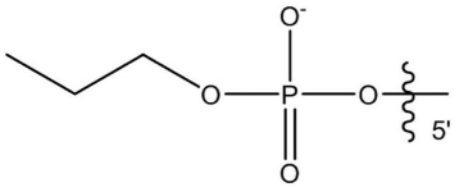
[0634] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有选自以下的结构:5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS T和5'-(S)-PH T。

[0635] 在所提供的单链RNAi剂的一些实施方案中,其在5'-末端结构处包含含磷部分,所述5'-末端结构由选自以下的结构表示:式IV-a(Mod022,也称为C3 PO和正丙基)、IV-b(Mod022*)、IV-c(POMod023*)、IV-d(PSMod023*)和IV-e(PHMod023*):

[0636]



[0637] 在所提供的单链RNAi剂的一些实施方案中,其在5'-末端结构处包含含磷部分,所述5'-末端结构由选自以下的结构表示:式IV-f(也称为正丙基C3 PO或Mod022)的结构:

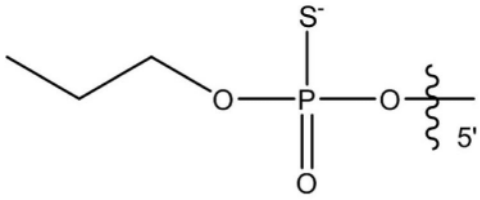
[0638] 

IV-f

[0639] 正丙基(Mod022)

[0640] 其中5'表示与糖的5'碳的连接点。

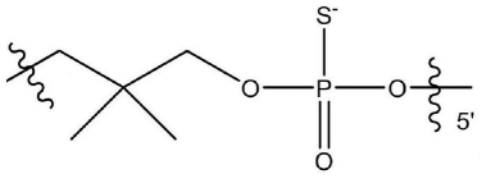
[0641] 在所提供的单链RNAi剂的一些实施方案中,其在5'-末端结构处包含含磷部分,所述5'-末端结构由选自以下的结构表示:(也称为C3 PS或Mod022*)结构:

[0642] 

[0643] 正丙基(Mod022*)

[0644] 其中5'表示与糖(例如N1)的5'碳的连接点。

[0645] 在所提供的单链RNAi剂的一些实施方案中,其在5'-末端结构处包含含磷部分,所述5'-末端结构由选自以下的结构表示:式IV-g(也称为二甲基C3或C3二甲基PS或Mod023*)的结构:

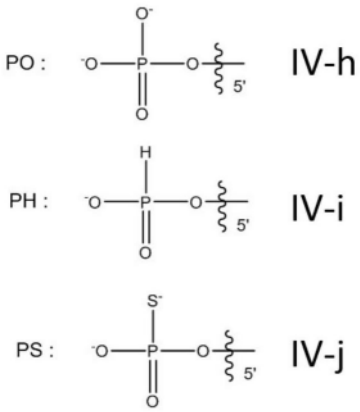
[0646] 

IV-g

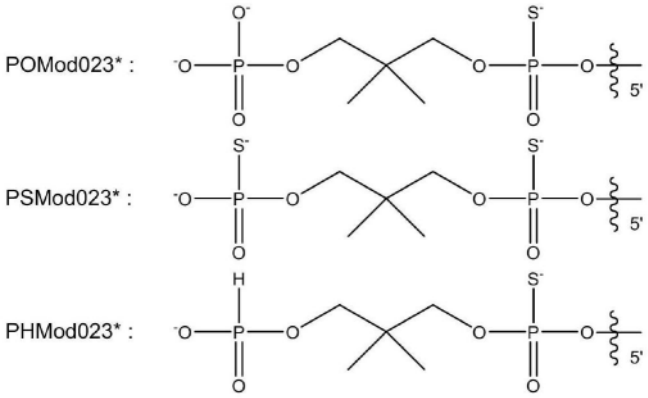
[0647] 二甲基C3(Mod023*)

[0648] 其中5'表示与糖(例如N1)的5'碳的连接点。

[0649] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'-末端结构,其选自以下中的任一个:PO(磷酸二酯),式IV-h;PH(H-膦酸酯),式IV-i;和PS(硫代磷酸酯),式IV-j:

[0650] 

[0651] 在所提供的单链RNAi剂的一些实施方案中,其在5'-末端结构处包含含磷部分,所述5'-末端结构由选自以下中的任一个的结构表示:

[0652] 

[0653] 其中5'表示与糖(例如N1)的5'碳的连接点。

[0654] 在一些实施方案中,式IV-a至IV-j中的任一个中的P如Sp或Rp构型中一样是立体无规的或是立体限定的。

[0655] 在一些实施方案中,5'-末端结构选自以下中的任一个:磷酸酯、磷酸酯类似物、5'-单磷酸酯((HO)2(O)P-O-5')、5'-二磷酸酯((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-三磷酸酯((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-鸟苷帽(7-甲基化或非甲基化)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-腺苷帽(Appp)、以及任何修饰或未修饰的核苷酸帽结构(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-单硫代磷酸酯(硫代磷酸酯;(HO)2(S)P-O-5')、5'-单二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯;(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫代磷酸酯((HO)2(O)P-S-5');氧/硫替代的单磷酸酯、二磷酸酯和三磷酸酯的任何另外的组合(例如5'-α-硫代三磷酸酯、5'-γ-硫代三磷酸酯等)、5'-氨基磷酸酯((HO)2(O)P-NH-5'、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'-烷基膦酸酯(R=烷基=甲基、乙基、异丙基、丙基等,例如RP(OH)(O)-O-5'-、(OH)2(O)P-5'-CH2-)、5'-烷基醚膦酸酯(R=烷基醚=甲氧基甲基(MeOCH2-)、乙氧基甲基等,例如RP(OH)(O)-O-5'-)。

[0656] 在一些实施方案中,包含含磷部分的5'-末端可以具有特别的优点,因为包含它们的单链RNAi剂在RNA干扰中可能更具活性。

[0657] 在一些实施方案中,5'末端结构具有以下的结构:5'-核苷酸或修饰的5'-核苷酸、5'-核苷酸类似物、5'-核苷或修饰的5'-核苷或5'-核苷类似物。

[0658] 在一些实施方案中,5'末端结构具有以下任一个的结构:5'-鸟苷帽、5'-腺苷帽、5'-单硫代磷酸酯、5'-单二硫代磷酸酯、5'-硫代磷酸酯、5'-氨基磷酸酯、5'-烷基膦酸酯和5'-烷基醚膦酸酯;5'-单磷酸酯、5'-二磷酸酯和5'-三磷酸酯;5'-三磷酸酯;单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯,其中所述单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯中的至少一个氧原子被硫原子取代;5'-α-硫代三磷酸酯和5'-γ-硫代三磷酸酯;烷基膦酸酯;烷基膦酸酯具有式:RP(OH)(O)--O-5'或$(OH)_2(O)P-5'-CH_2--$,其中R是C_1-C_3烷基;烷基醚膦酸酯;或具有下式的烷基醚膦酸酯:RP(OH)(O)--O-5',其中R是烷基醚。

[0659] 多种5'-核苷描述于例如公布为US2016-0194349 A1的美国专利申请14/959,714;公布为US2016-0186175 A1的美国专利申请14/983,907;或公布为US20130323836的美国专利申请13/696,796中。

[0660] 在一些实施方案中,5'-末端结构是乙烯基膦酸酯。

[0661] 在某些实施方案中,提供了寡聚化合物,其中所述5'-末端化合物具有式VIII-c,

其中G是F、OCH_3或$O(CH_2)_2$--OCH_3。

[0662] 在一些实施方案中,5'末端结构具有选自以下的结构:5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS T和5'-(S)-PH T。

[0663] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me OH T的结构。

[0664] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PO T的结构。

[0665] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PS T的结构。

[0666] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PH T的结构。

[0667] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me OH T的结构。

[0668] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PO T的结构。

[0669] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PS T的结构。

[0670] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PO T的结构。

[0671] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PS T的结构。

[0672] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(R)-Me PH T的结构。

[0673] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me OH T的结构。

[0674] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PO T的结构。

[0675] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PS T的结构。

[0676] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PH T的结构。

[0677] 在一些实施方案中,5'末端结构具有5'-(S)-Me PH T的结构。另外,一些参考文献,诸如EP 1520022 B1,第6段,已经报道了在RISC活性的siRNA双链体的靶互补链(例如,反义链)上需要5'磷酸酯。美国专利号8,729,036第2栏也指出,据报道5'磷酸酯对RNA干扰是必不可少的。美国专利号8,729,036第3栏还报道,单链反义siRNA触发HeLa S100提取物中的RNAi需要5'磷酸酯。然而,本公开已经证明不包含5'磷酸酯的各种单链RNAi剂能够指导RNA干扰。

[0678] 在一些实施方案中,5'-末端包含含磷酸酯的部分(诸如T-VP或T-PO)或如以下中所述的任何其他合适的RNAi剂5'-末端化合物:例如Allerson等2005J.Med.Chem.48:901-04;Lima等2012Cell 150:883-894;Prakash等2015Nucl.Acids Res.43:2993-3011;和/或Prakash等2016Bioorg.Med.Chem.Lett.26:26:2817-2820。

[0679] 在一些实施方案中,不包含含磷部分的5'-末端可以具有特别的优点,因为单链RNAi剂可以更容易地合成,并且可能不需要保护含磷部分免于降解。在一些实施方案中,所提供的不包含含磷部分的单链RNAi剂的5'-末端包含可以充当哺乳动物激酶底物的部分,所述哺乳动物激酶在靶细胞内能够在单链RNAi剂的5'-末端连接一个含磷部分。

[0680] 在一些实施方案中,5'-末端不包含含磷部分。

[0681] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧。

[0682] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧T。

[0683] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧U。

[0684] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧A。

[0685] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧G。

[0686] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧C。

[0687] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧。

[0688] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧T。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧U。

[0689] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧A。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧G。

[0690] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-脱氧C。

[0691] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe。

[0692] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe T。

[0693] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe U。

[0694] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe A。

[0695] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe G。

[0696] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe C。

[0697] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe。

[0698] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe T。

[0699] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe U。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe A。

[0700] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe G。

[0701] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-OMe C。

[0702] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F。

[0703] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F T。

[0704] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F U。

[0705] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F A。

[0706] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F G。

[0707] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F C。

[0708] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F。

[0709] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F T。

[0710] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F U。

[0711] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F A。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F G。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端OH,并且第一核苷是2'-F C。

[0712] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧。

[0713] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧T。

[0714] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧U。

[0715] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧A。

[0716] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧G。

[0717] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧C。

[0718] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧。

[0719] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧T。

[0720] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧U。

[0721] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧A。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧G。

[0722] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-脱氧C。

[0723] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F。

[0724] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F T。

[0725] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F U。

[0726] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F A。

[0727] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F G。

[0728] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F C。

[0729] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F。

[0730] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F T。

[0731] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F U。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F A。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F G。

[0732] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-F C。

[0733] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe。

[0734] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe T。

[0735] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe U。

[0736] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe A。

[0737] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe G。

[0738] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe C。

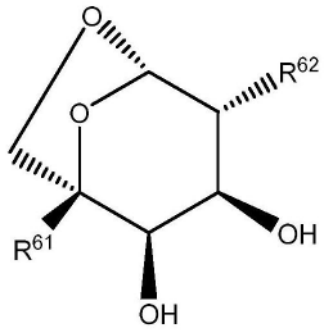
[0739] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe T。

[0740] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe U。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe A。在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe G。

[0741] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂包含5'末端磷酸酯,并且第一核苷是2'-OMe C。

[0742] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含与ASPGR结合的附加的组分。在一些实施方案中,所述附加的组分在寡核苷酸的5'末端上。

[0743] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含附加的组分,其是或包含式(K)化合物

[0744] 

(K)

[0745] 其中R是-CN、-CH_2-CN、-C≡CH、-CH_2-N_3、-CH_2-NH_2、-CH_2-N(R)-S(O)$_2$-R、-CH_2-CO_2H、-CO_2H、-CH_2-OH、-CH_2-SH、-CH=CH-R、-CH_2-R、-CH_2-S-R、-CH_2-N(R)-R、-CH_2-N(R)-C(O)-R、-CH_2-N(R)-C(O)-O-R、-CH_2-N(R)-C(O)-N(R)-R、-CH_2-O-R、-CH_2-O-C(O)-R、-CH_2-O-C(O)-N(R)-R、-CH_2-O-C(O)-O-R、-CH_2-S(O)-R、-CH_2-S(O)$_2$-R、-CH_2-S(O)$_2$-N(R)-R、-C(O)-NH_2、-C(O)-O-R、-C(O)-N(R)-R或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被R取代,

[0746] 或R是-Z-X-Y,其中X是接头或药物递送系统,Y不存在或是选自由以下组成的组的配体:小分子、氨基酸序列、核酸序列、抗体、寡聚物、聚合物、遗传衍生材料、脂质体、纳米颗粒、染料、荧光探针或其组合,并且Z不存在或是-C≡C-、-CH=CH-、-CH_2-、-CH_2-O-、-C(O)-N(R)-、-CH_2-S-、-CH_2-S(O)-、-CH_2-S(O)$_2$-、-CH_2-S(O)$_2$-N(R)-、-C(O)-O-、-CH_2-N(R)-、-CH_2-N(R)-C(O)-、-CH_2-N(R)-S(O)$_2$-、-CH_2-N(R)-C(O)-O-、-CH_2-N(R)-C(O)-N(R)-、-CH_2-O-C(O)-、-CH_2-O-C(O)-N(R)-、-CH_2-O-C(O)-O-或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被R取代;

[0747] R^{62}是-OH、-N_3、-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-R、-N(R)-C(O)-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-OR、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R取代,

[0748] 并且其中当R是-CH_2-OH时,R是-N_3、-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-R、-N(R)-C(O)-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-OR、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R取代;

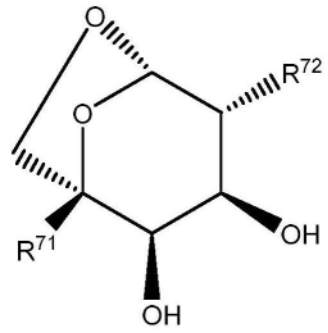
[0749] 每个R独立地是-H、-(C_1-C_5)烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基或(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基或环烷基的-CH_2-基团可以被选自-O-、-S-和-N(R)-的杂原子基团替代,并且所述

烷基的-CH_3可以被选自-N(R)$_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0750] 每个R独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R)-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R)$_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被一至六个卤基原子取代;并且

[0751] 每个R独立地是-H、-(C_3-C_{20})环烷基或(C_1-C_{20})烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R)-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R)$_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被一至六个卤基原子取代。

[0752] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含附加的组分,其是或包含式(M)化合物

[0753] 

(M)

[0754] 其中R是-CN、-CH_2-CN、-C≡CH、-CH_2-N_3、-CH_2-NH_2、-CH_2-N(R)-S(O)$_2$-R、-CH_2-CO_2H、-CO_2H、-CH_2-OH、-CH_2-SH、-CH=CH-R、-CH_2-R、-CH_2-S-R、-CH_2-N(R)-R、-CH_2-N(R)-C(O)-R、-CH_2-N(R)-C(O)-O-R、-CH_2-N(R)-C(O)-N(R)-R、-CH_2-O-R、-CH_2-O-C(O)-R、-CH_2-O-C(O)-N(R)-R、-CH_2-O-C(O)-O-R、-CH_2-S(O)-R、-CH_2-S(O)$_2$-R、-CH_2-S(O)$_2$-N(R)-R、-C(O)-NH_2、-C(O)-O-R、-C(O)-N(R)-R或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被R取代,

[0755] 或者R是-Z-X-Y、-Z-Y、-X-Y、-X、-Y或-Z-X,其中X是接头或药物递送系统,Y是R或是选自由以下组成的组的配体:小分子、氨基酸序列、核酸序列、抗体、寡聚物、聚合物、遗传衍生材料、脂质体、纳米颗粒、染料、荧光探针或其组合,并且Z是-C≡C-、-CH=CH-、-CH_2-、-CH_2-O-、-C(O)-N(R)-、-CH_2-S-、-CH_2-S(O)-、-CH_2-S(O)$_2$-、-CH_2-S(O)$_2$-N(R)-、-C(O)-O-、-CH_2-N(R)-、-CH_2-N(R)-C(O)-、-CH_2-N(R)-S(O)$_2$-、-CH_2-N(R)-C(O)-O-、-CH_2-N(R)-C(O)-N(R)-、-CH_2-O-C(O)-、-CH_2-O-C(O)-N(R)-、-CH_2-O-C(O)-O-或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被R取代;

[0756] R是-OH、-N_3、-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-R、-N(R)-C(O)-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-OR、-N(R)-S(O)$_2$-R、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R取代

[0757] 并且其中当R是-CH_2-OH时,R是-N_3、-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-R、-N(R)-C(O)-N(R)$_2$、-N(R)-C(O)-OR、N(R)-S(O)$_2$-R、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R取代;

[0758] 每个R独立地是-H、-(C_1-C_5)烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基或(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基或环烷基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-N(R)-的杂原子基团替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R)$_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其

中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0759] 每个R独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-或-N(R)-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-$N(R)_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;

[0760] 每个R独立地是-H、(C_3-C_{20})环烷基或(C_1-C_{60})烷基,其中所述环烷基的一至六个-CH_2-或所述烷基的一至二十个-CH_2-可以各自独立地被选自-O-、-S-或-N(R)-的杂原子替代,其中所述杂原子被至少两个碳原子隔开,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-$N(R)_2$、-OR和-S(R)的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且

[0761] 每个R独立地是-H、-C≡CH、-C=CH_2、-CH_3、-N_3、-$N(R)_2$、-OH、-S(O)-(R)、-$S(O)_2$-(R)、-C(O)-OH、-S-S-芳基,-S-S-杂芳基、杂环基、芳基或杂芳基,其中每个芳基或杂芳基任选地被R取代。

[0762] 在一些实施方案中,R^{61}或R^{71}是-X-Y,并且/或者R^{62}或R^{72}是-NH-C(O)-CH_3。

[0763] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含选自由以下组成的组的附加的组分:

[0764] (4-((2-((1-(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基)乙基)氨基)-4-氧丁基)氨基甲酸苯甲酯,

[0765] (4-((1,3-双((1-(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基)丙烷-2-基)氨基)-4-氧丁基)氨基甲酸苯甲酯,

[0766] (4-((1,3-双((1-(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基)-2-(((1-(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基)甲基)丙烷-2-基)氨基)-4-氧丁基)氨基甲酸苯甲酯,

[0767] N-(2-((1-(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基)乙基)-4-氨基丁酰胺,

[0768] 4-氨基-N-{1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]丙烷-2-基}丁酰胺,

[0769] 4-氨基-N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)丁酰胺,

[0770] 4-氨基-N-[1,31-双(1-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]甲基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)-2,6,10,14,18,22,26,30-八氧杂

三十一烷-16-基]丁酰胺，

[0771] 4-氨基-N-{1,31-双(1-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]甲基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)-16-[15-(1-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]甲基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)-2,6,10,14-四氧杂十五烷-1-基]-2,6,10,14,18,22,26,30-八氧杂三十一烷-16-基}丁酰胺，

[0772] N-{(1S,2R,3R,4R,5S)-1-[(己氧基)甲基]-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基}乙酰胺，

[0773] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(2,5,8,11,14-五氧杂十五烷-1-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺，

[0774] N-((1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-4-基)-2,2,2-三氟乙酰胺化合物，

[0775] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]-2,2,2-三氟乙酰胺，

[0776] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]丙酰胺，

[0777] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]甲烷磺酰胺，

[0778] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]-2,2-二氟乙酰胺，

[0779] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]-3,3,3-三氟丙酰胺，

[0780] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]-N-甲基乙酰胺，

[0781] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]-N-甲基甲烷磺酰胺，

[0782] [(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]甲基氨基甲酸叔丁酯，

[0783] (1S,2R,3R,4R,5S)-1-(羟甲基)-4-(甲基氨基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,3-二醇盐酸盐，

[0784] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(15-苯基-2,5,8,11,14-五氧杂十五烷-1-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺，

[0785] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-1-(13-叠氮基-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺，

[0786] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(2,5,8,11-四氧杂十四-13-烯-1-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺，

[0787] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(2,5,8,11-四氧杂十四-13-炔-1-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺，

[0788] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-1-(13-氨基-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基)-2,3-二羟基-

6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺,

[0789] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(13-羟基-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺,

[0790] 1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-油酸,

[0791] S-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}乙硫醇酯,

[0792] N-{(1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-[13-(吡啶-2-基二磺酰基)-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基]-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基}乙酰胺,

[0793] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)-6-(吡啶-2-基二磺酰基)己酰胺,

[0794] N-[(1S,2R,3R,4R,5S)-1-(13-{4-[(3-[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}-2-氨基丙氧基)甲基]-1H-1,2,3-三唑-1-基}-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-4-基]乙酰胺-盐酸盐,

[0795] 6-叠氮基-N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)己酰胺,

[0796] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)庚-6-酰胺,

[0797] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)庚-6-酰胺,

[0798] 7-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)

氨基]-7-氧庚酸(钠盐)，

[0799] {6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}氨基甲酸苯甲酯，

[0800] 6-氨基-N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)己酰胺乙酸盐，

[0801] N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺，

[0802] N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}-6-[(溴乙酰基)氨基]己酰胺，

[0803] 4-{[(2R)-5-(氨基甲酰氨基)-2-{[(2R)-2-环戊基-2-{[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]氨基}乙酰基]氨基}戊酰基]氨基}苯甲基{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}氨基甲酸酯，

[0804] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)-3,19-二氧代-1-(吡啶-2-基二磺酰基)-7,10,13,16-四氧杂-4,20-二氮杂二十六烷-26-酰胺，

[0805] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)-3,31-二氧代-1-(吡啶-2-基二磺酰基)-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧杂-4,32-二氮杂三

十八烷-38-酰胺，

[0806] N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}-6-(吡啶-2-基二磺酰基)己酰胺，

[0807] 2-(吡啶-2-基二磺酰基)乙基{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}氨基甲酸酯，

[0808] N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)己酰胺，

[0809] N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}-N'-(1,3-二羟基丙烷-2-基)庚二酰胺，

[0810] 6-叠氮基-N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}己酰胺，

[0811] 6-(苯甲氧基)-N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}己酰胺，

[0812] (1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-1-{13-[4-({3-[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}-2-({6[(6羟基己酰基)氨基]己酰基}氨基)丙氧基}甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三-1-基}-3-(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-2-基乙酸酯，

[0813] [6-({6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-

二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}氨基)-6-氧代己基]氨基甲酸苯甲酯,

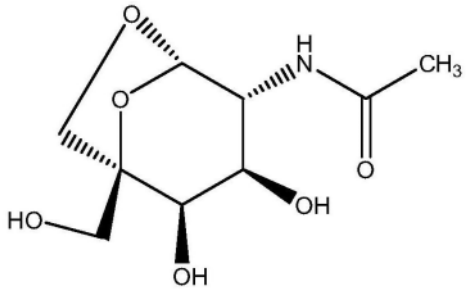
[0814] 6-氨基-N-{6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}己酰胺乙酸盐,

[0815] 4-(苯甲氧基)-N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-氨基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-氨基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)丁酰胺,

[0816] N-(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)-4-羟基丁酰胺,和

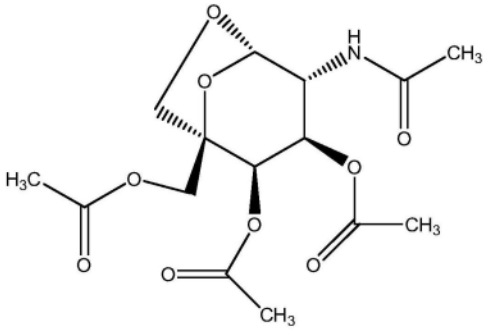
[0817] N-(2-{[6-({6-[(1,3-双[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]-2-{[(1-{1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-1-基]-2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基}-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲氧基]甲基}丙烷-2-基)氨基]-6-氧代己基}氨基)-6-氧代己基]氧基}-1,3-二噁烷-5-基)-6-(吡啶-2-基二磺酰基)己酰胺

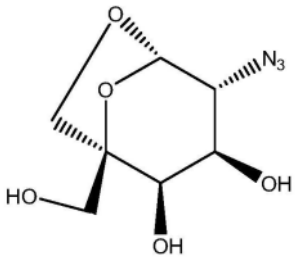
[0818] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含式(N)的附加的组分

[0819] 

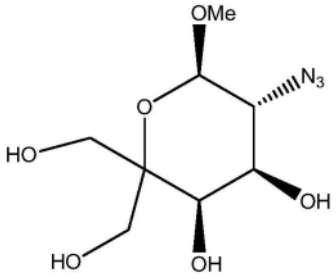
(N)。

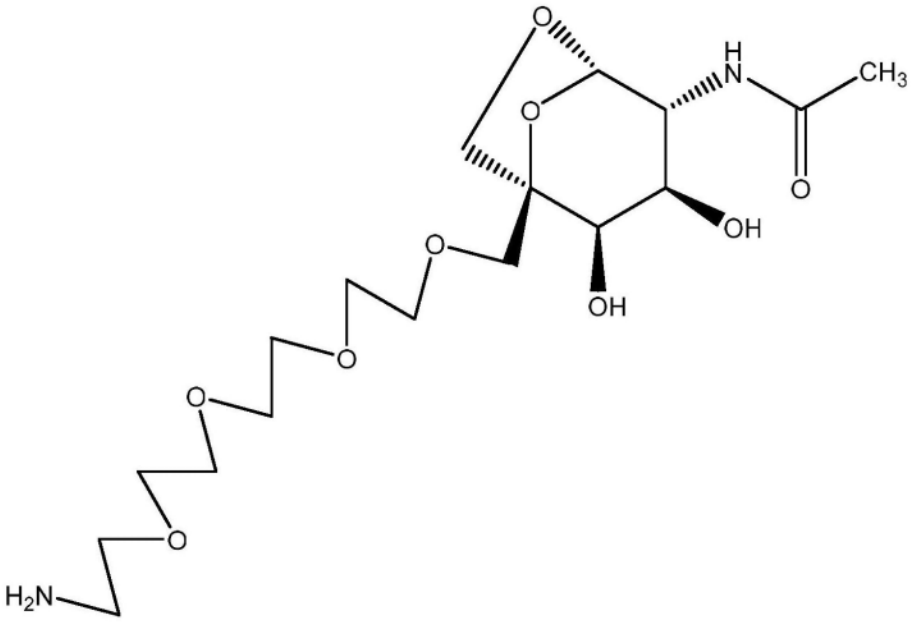
[0820] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含选自以下的附加的组分:



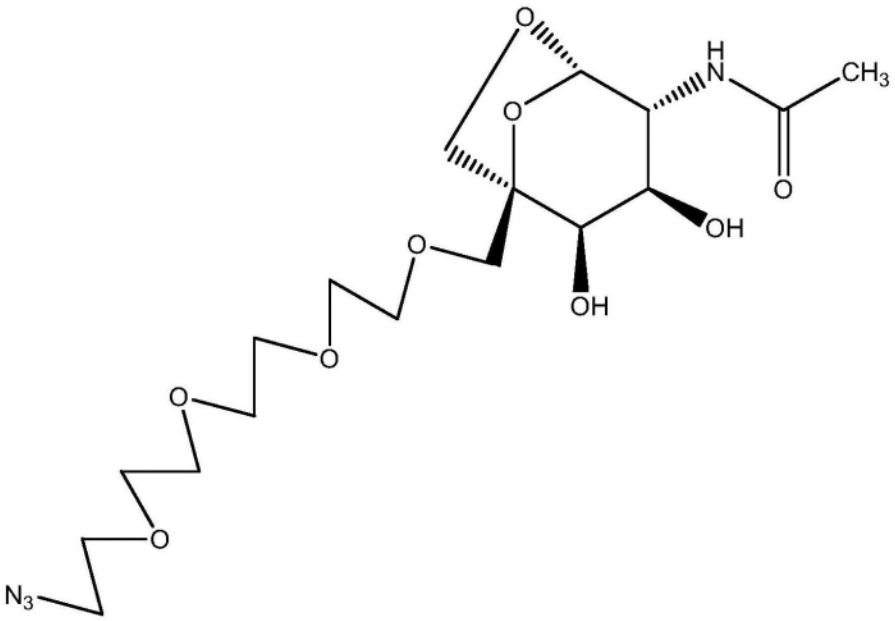


[0821]

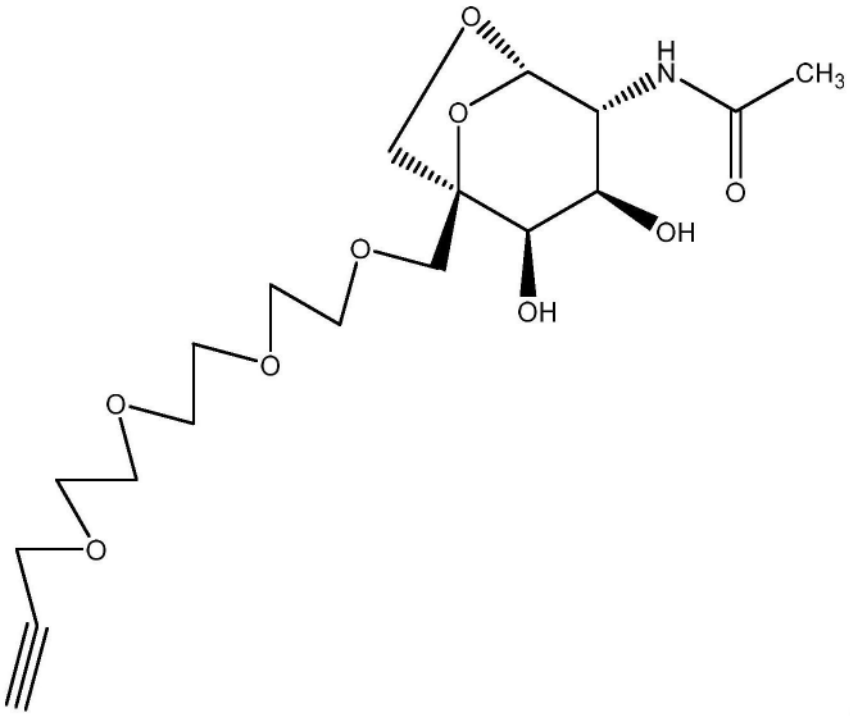




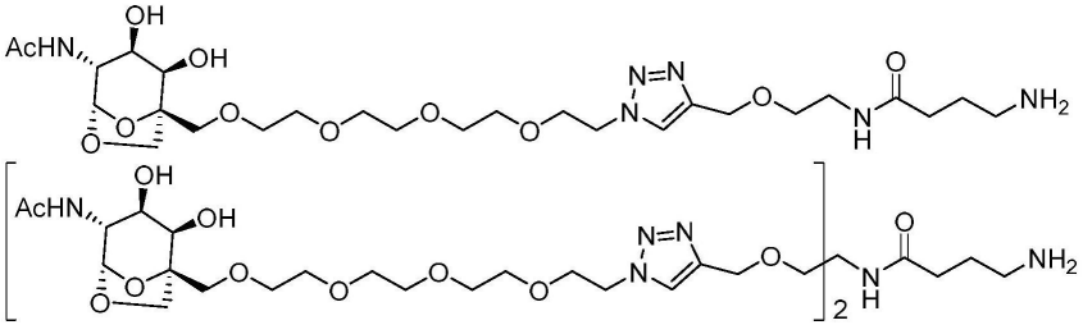
[0822]

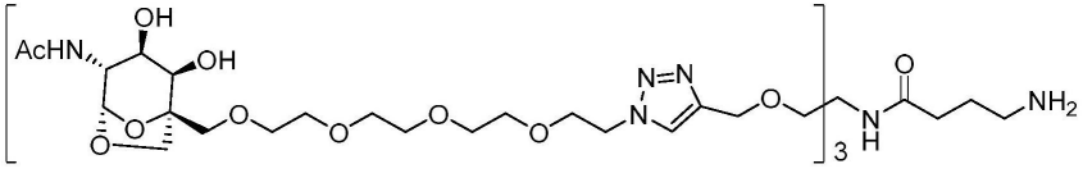


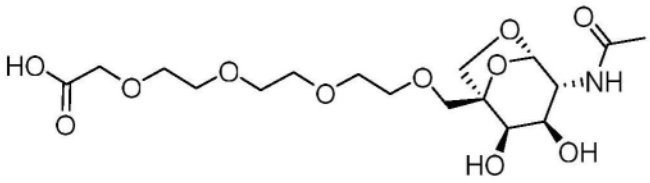
[0823] 以及

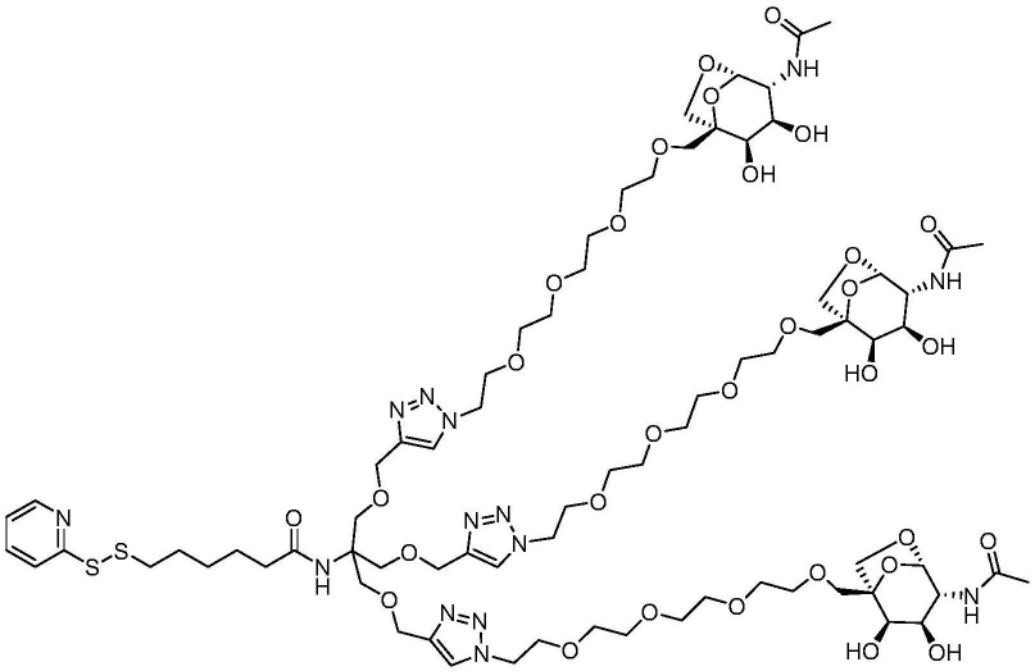
[0824] 

[0825] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含选自下式中的任一个的附加的组分:

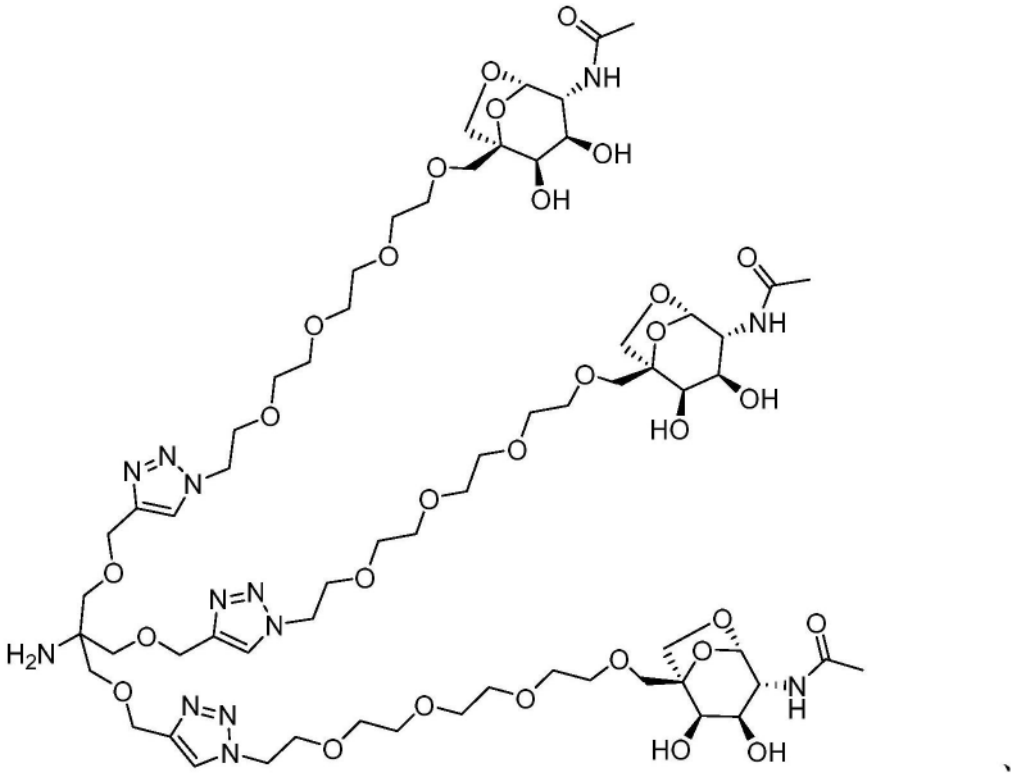


[0826] 

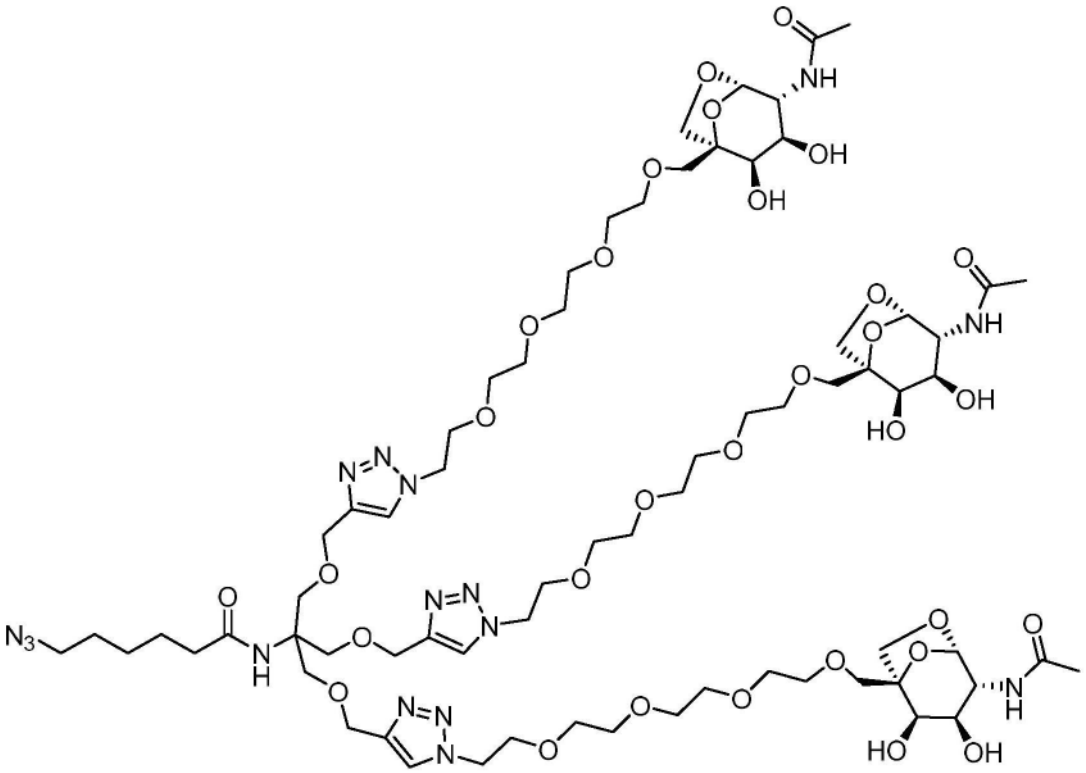




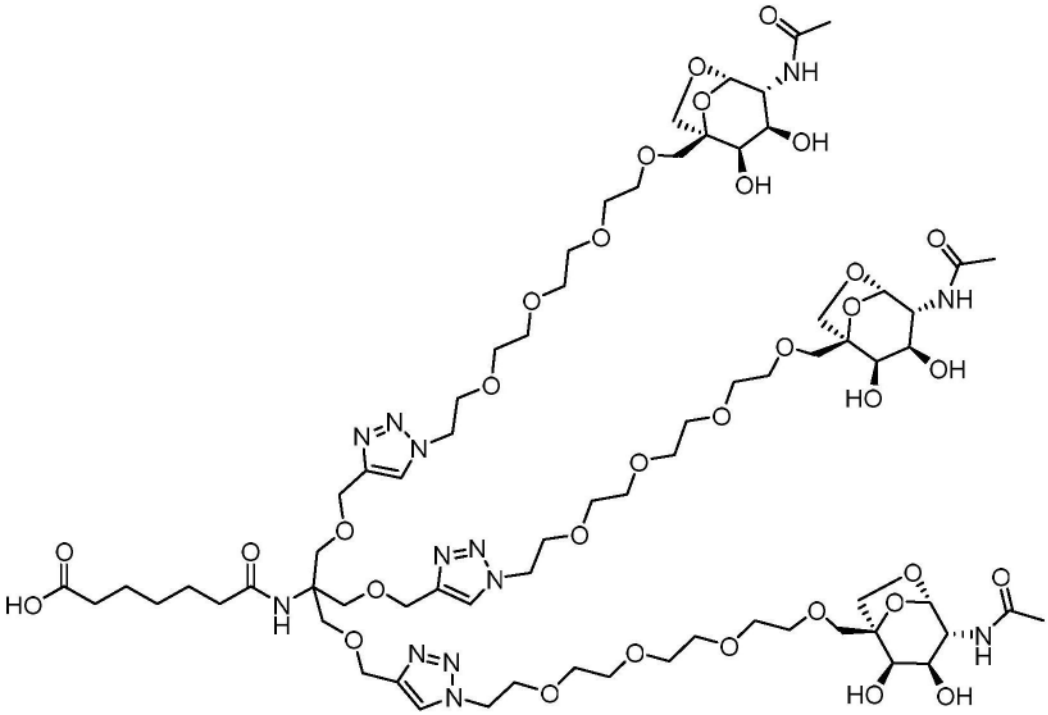
[0827]

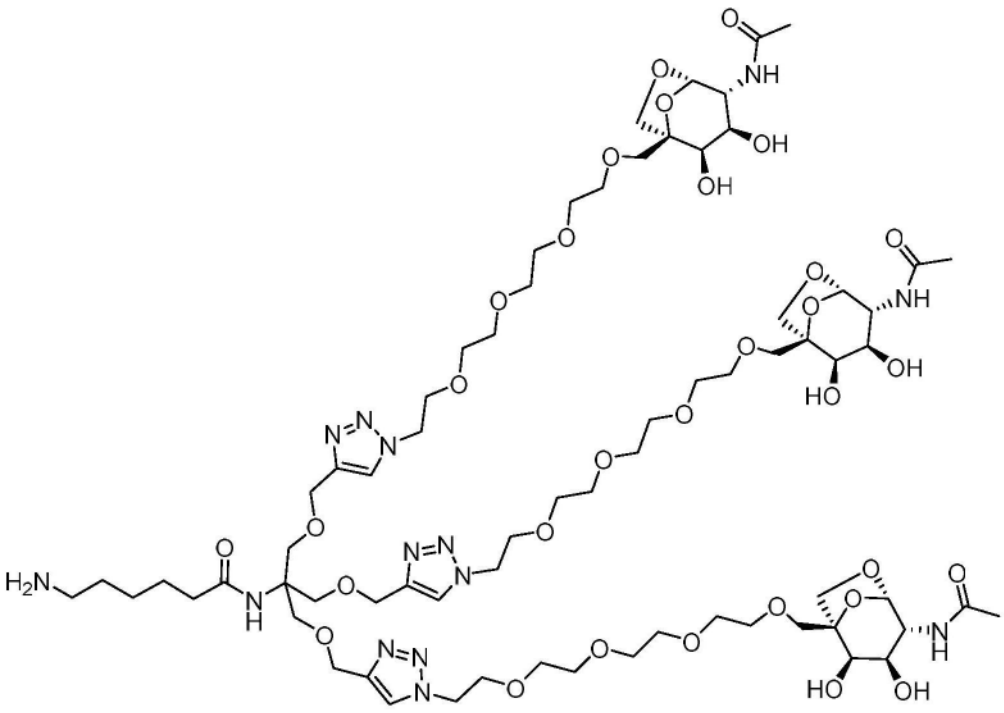


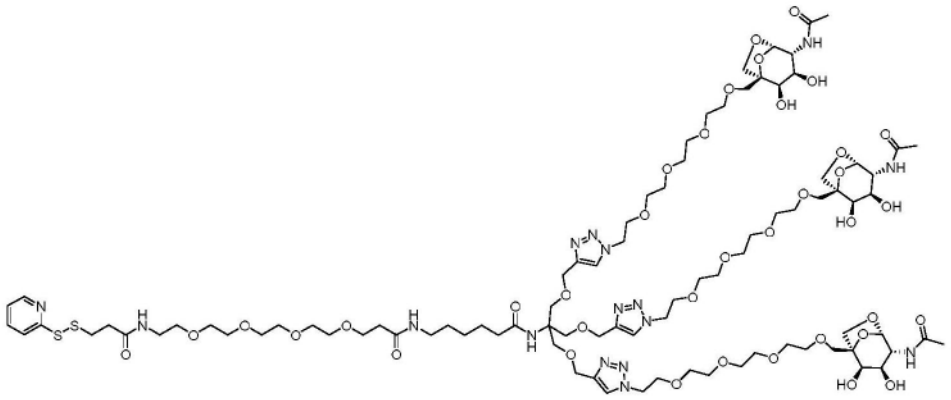
[0828]



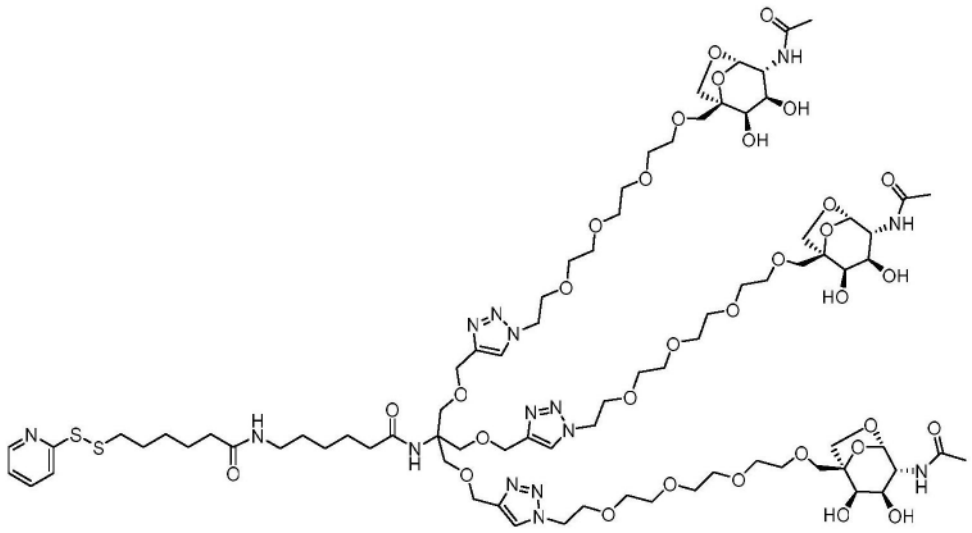
[0829]





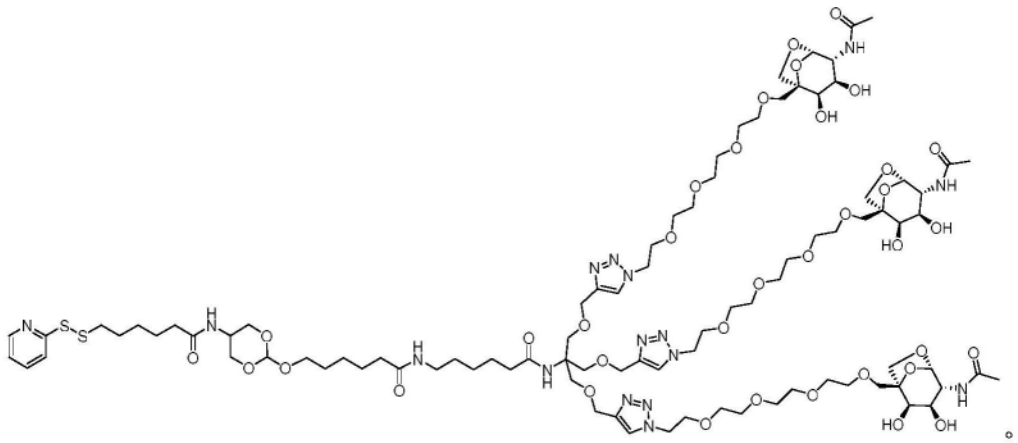


[0830]



[0831] 以及

[0832]



[0833] 在一些实施方案中,本公开涉及:具有式01的化合物:

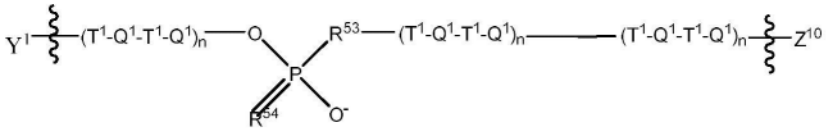
[0834] Y^1-L^1-$(Z^{10})_{za}$

[0835] 01

[0836] 或所述化合物的药学上可接受的盐,其中Y^1是靶向PNPLA3的寡核苷酸;

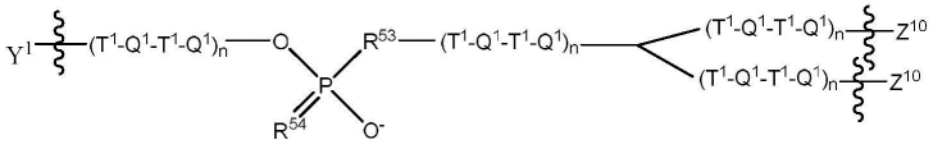
[0837] za为1、2或3;并且

[0838] L^1是式L11、L12、L13、L43、L44、L45、L46、L47、L48、L49、L50、L51、L52、L53或L54的化合物,其中与Y^1和Z^{10}的连接位点表示为:

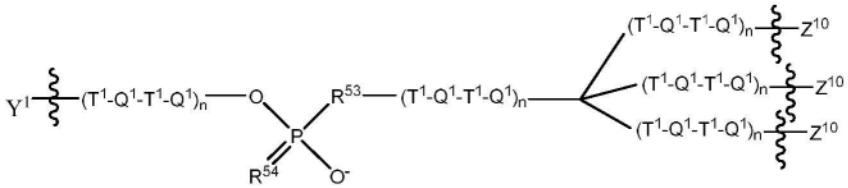


L11

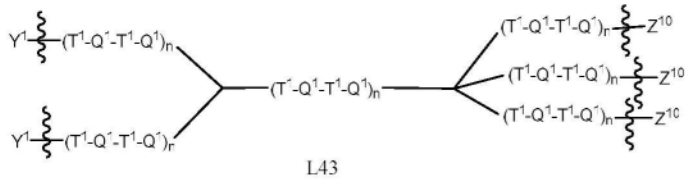
[0839]



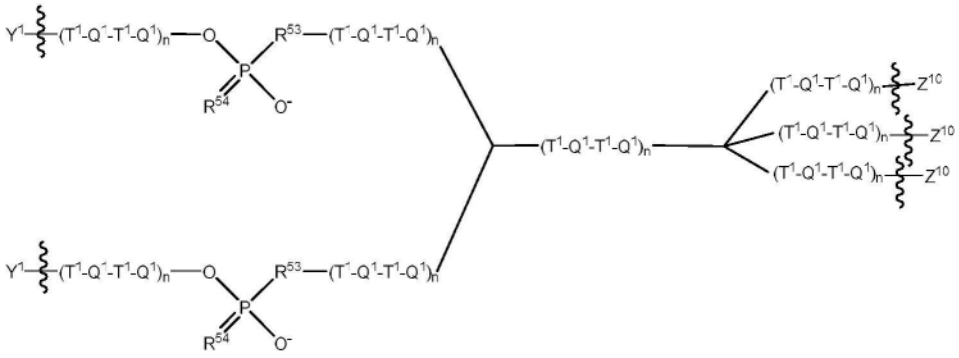
L12



L13

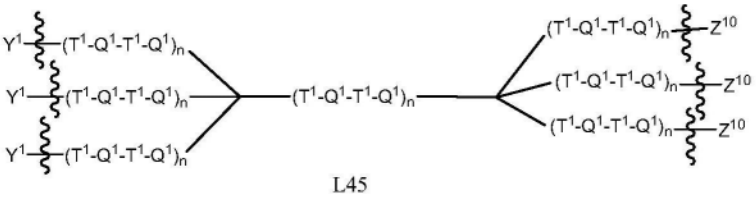


L43

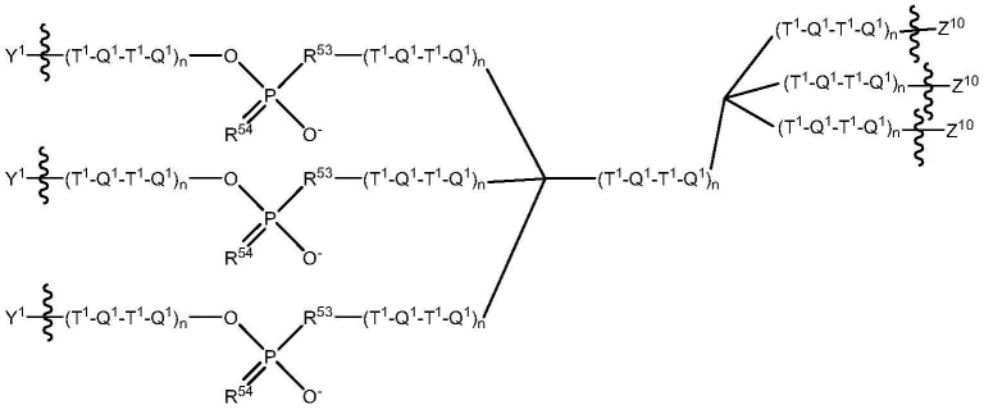


L44

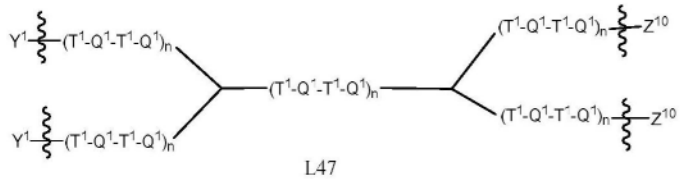
[0840]



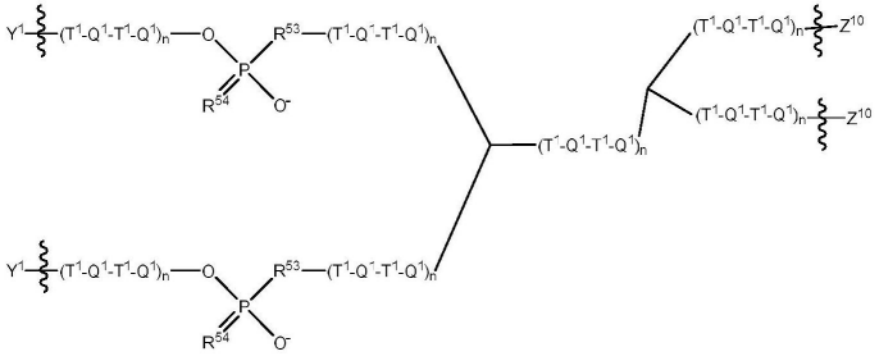
L45



L46

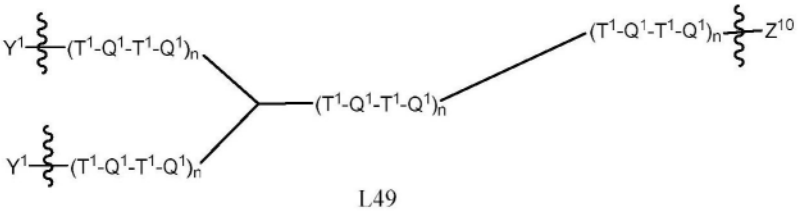


L47

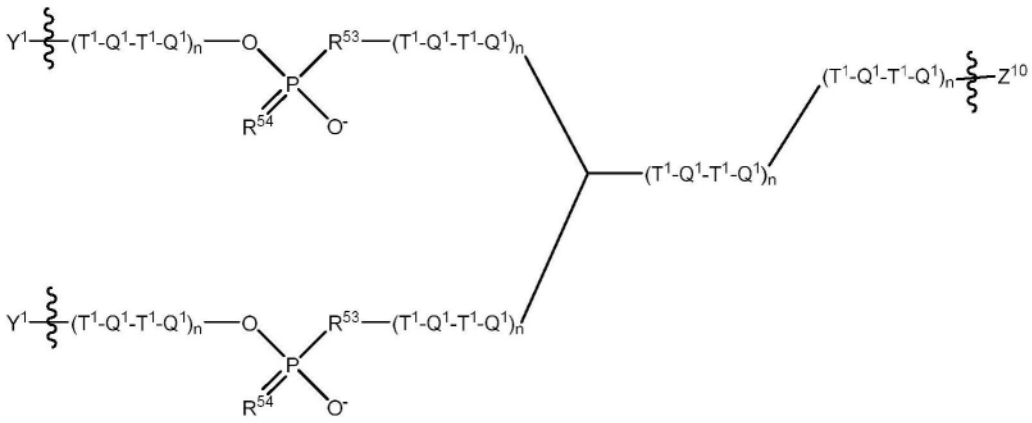


L48

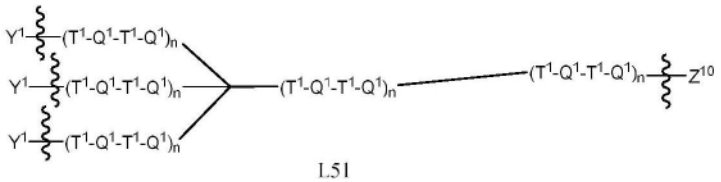
[0841]



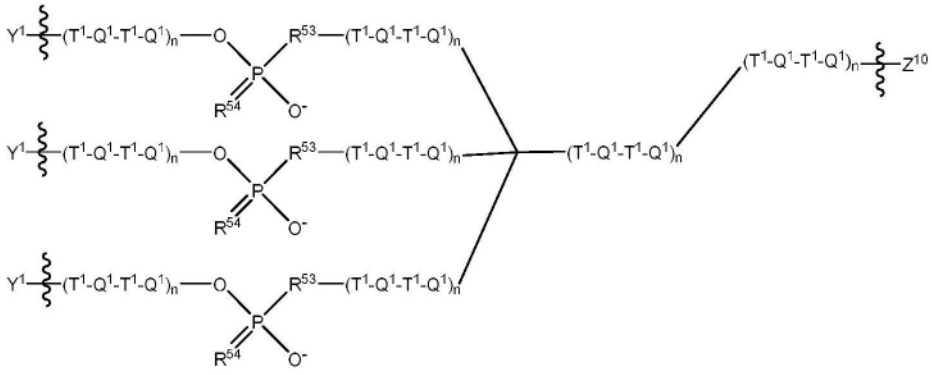
L49



L50

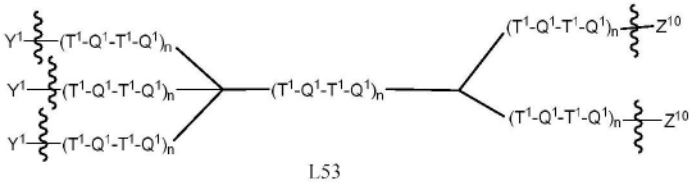


L51

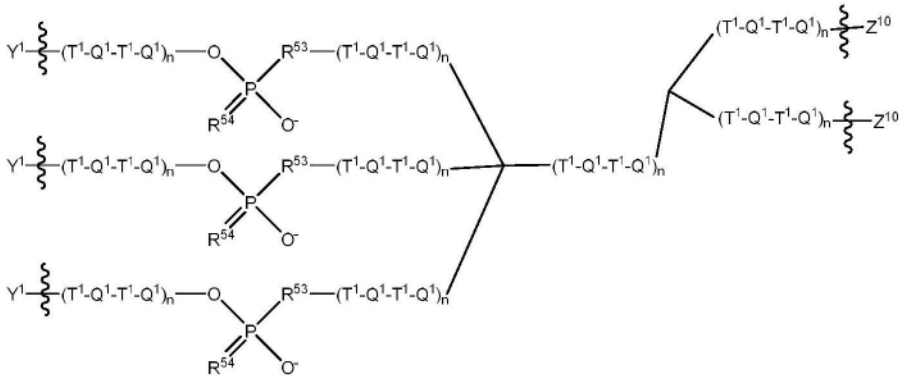


L52

[0842]



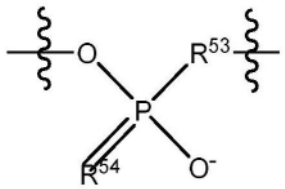
L53



L54

[0843] 其中每个T^1独立地不存在或者是亚烷基、亚烯基或亚炔基,其中所述亚烷基、亚烯基或亚炔基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0844] 每个Q^1独立地不存在或者是-C(O)-、-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-、-O-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-O-、-CH_2-、-NR^{49}C(O)NR^{49}-、二价杂芳基基团或者选自-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-与任何其他杂原子基团隔开,或下式的结构:

[0845] 

[0846] 其中R^{53}是-O或-NH-;并且R^{54}是-O或-S;

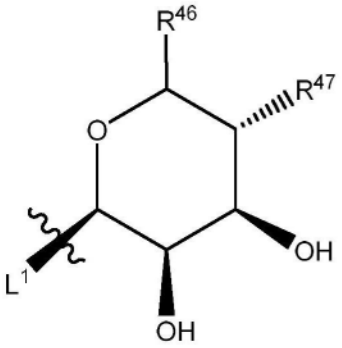
[0847] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})$_2$、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[0848] R^{53}是-O或-NH;

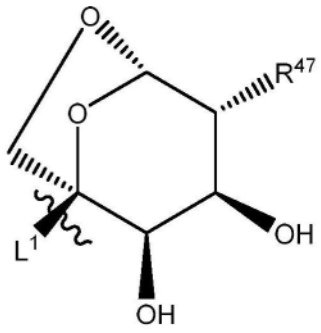
[0849] R^{54}是-O或-S;

[0850] 每个n独立地是0、1、2、3、4、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或40;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1;并且

[0851] 每个Z^{10}独立地是式Z12、Z13、Z14、Z15、Z16、Z17、Z18、Z19、Z20或Z21的化合物或者其几何或位置异构体,其中与L^1的连接位点表示为:



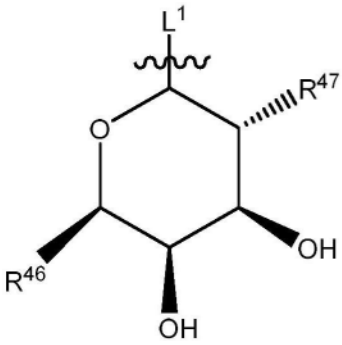
Z12



Z13

;

[0852]



Z16

[0853] 其中每个R^{46}独立地是-CN、-CH_2-CN、-C≡CH、-CH_2-N_3、-CH_2-NH_2、-CH_2-N(R^{52})-S(O)$_2$-R^{51}、-CH_2-CO_2H、-CO_2H、-CH_2-OH、-CH_2-SH、-CH=CH-R^{51}、-CH_2-R^{51}、-CH_2-S-R^{51}、-CH_2-N(R^{52})-R^{51}、-CH_2-N(R^{52})-C(O)-R^{51}、-CH_2-N(R^{52})-C(O)-O-R^{51}、-CH_2-N(R^{52})-C(O)-N(R^{52})-R^{51}、-CH_2-O-R^{51}、-CH_2-O-C(O)-R^{51}、-CH_2-O-C(O)-N(R^{52})-R^{51}、-CH_2-O-C(O)-O-R^{51}、-CH_2-S(O)-R^{51}、-CH_2-S(O)$_2$-R^{51}、-CH_2-S(O)$_2$-N(R^{52})-R^{51}、-C(O)-NH_2、-C(O)-O-R^{51}、-C(O)-N(R^{52})-R^{51}或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被R^{51}取代;

[0854] 每个R^{47}独立地是-OH、-N_3、-$N(R^{48})_2$、-$N(R^{48})$-C(O)-R^{48}、-$N(R^{48})$-C(O)-$N(R^{48})_2$、-$N(R^{48})$-C(O)-OR^{48}、-$N(R^{48})$-$S(O)_2$-R^{48}、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R^{48}取代;

[0855] 每个R^{48}独立地是-H、-$(C_1$-$C_5)$烷基、卤基取代的$(C_1$-$C_5)$烷基、卤基取代的-$(C_3$-$C_6)$环烷基、-$(C_1$-$C_5)$烯基、-$(C_1$-$C_5)$炔基、卤基取代的-$(C_1$-$C_5)$烯基、卤基取代的-$(C_1$-$C_5)$炔基或-$(C_3$-$C_6)$环烷基,其中所述烷基或环烷基的-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-$N(R^{52})$-的杂原子基团替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-$N(R^{52})_2$、-OR^{52}和-$S(R^{52})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0856] 每个R^{51}独立地是-H、-$(C_3$-$C_{20})$环烷基、-$(C_1$-$C_{60})$烯基、-$(C_1$-$C_{60})$炔基或-$(C_1$-$C_{60})$烷基,其中所述环烷基的一至六个-CH_2-或所述烷基的一至二十个-CH_2-可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-$N(R^{49})$-的杂原子替代,其中所述杂原子被至少两个碳原子隔开,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-$N(R^{49})_2$、-OR^{49}和-$S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;并且

[0857] 每个R^{52}独立地是-H、-$(C_1$-$C_{20})$烷基、-$(C_1$-$C_{20})$烯基、-$(C_1$-$C_{20})$炔基或-$(C_3$-$C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-$N(R^{49})$-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-$N(R^{49})_2$、-OR^{49}和-$S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。

[0858] 在一些实施方案中,Y^1包含至少15个碱基。

[0859] 在一些实施方案中,Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[0860] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个磷酸二酯核苷酸间键联。

[0861] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联。

[0862] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是手性控制的硫代磷酸酯。

[0863] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[0864] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Rp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[0865] 在一些实施方案中,Y^1,其中手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其在组合物中具有至少70%的非对映体纯度。

[0866] 在一些实施方案中,Y^1,其中手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%的非对映体纯度。

[0867] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个糖修饰。

[0868] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个碱基修饰。

[0869] 在一些实施方案中,Y^1还包含主链键联样式。

[0870] 在一些实施方案中,Y^1还包含主链手性中心样式。

[0871] 在一些实施方案中,Y^1还包含化学修饰样式。

[0872] 在一些实施方案中,Y^1还包括主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式。

[0873] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[0874] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式是表1A中列出的寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式,Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[0875] 在一些实施方案中,寡核苷酸能够介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[0876] 在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[0877] 在一些实施方案中:

[0878] 每个T^1独立地不存在或者是亚烷基,其中所述亚烷基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0879] 每个Q^1独立地不存在或是-C(O)、-C(O)-NR^{49}、-NR^{49}-C(O)或者选自-O-和-NR^{49}的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-和-NR^{49}与任何其他杂原子基团隔开;

[0880] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;

[0881] 每个n独立地是0、1、2、3或4;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1;

[0882] 每个R^{46}是-CH_2-OH;

[0883] 每个R^{47}是-N(R^{48})-C(O)-R^{48};并且

[0884] 每个R^{48}独立地是-H或-(C_1-C_5)烷基。

[0885] 在一些实施方案中,本公开涉及:具有式O2的化合物:

[0886] Y^1-L^2-(Z^{11})$_{za}$

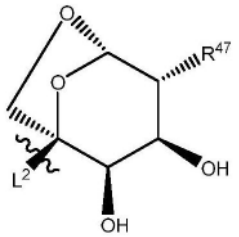
[0887] O2

[0888] 或其药学上可接受的盐,其中Y^1是靶向PNPLA3的寡核苷酸;

[0889] za为1、2或3;

[0890] L^2是连接基团;并且

[0891] Z^{11}是式(B)的化合物,其中与L^2的连接位点表示为:

[0892] 

(B) ;

[0893] 每个R^{47}独立地是-OH、$-N_3$、$-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$、$-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$、$-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被$R^{48}$取代;

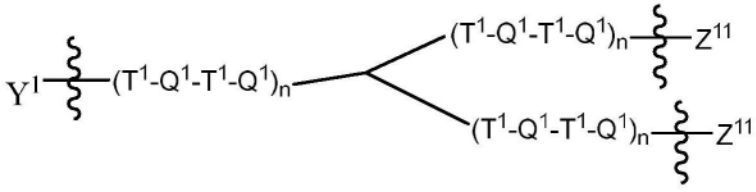
[0894] 每个R^{48}独立地是-H、$-(C_1-C_5)$烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的$-(C_3-C_6)$环烷基、$-(C_1-C_5)$烯基、$-(C_1-C_5)$炔基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$烯基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中所述烷基或环烷基的$-CH_2-$基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和$-N(R^{52})-$的杂原子基团替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{52})_2$、$-OR^{52}$和$-S(R^{52})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0895] 每个R^{49}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以被-O-、-S-或$-N(R^{49a})-$替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以被选自$-N(R^{49a})2$、$-OR^{49a}$和$-S(R^{49a})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、$-(C_1-C_6)$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基;

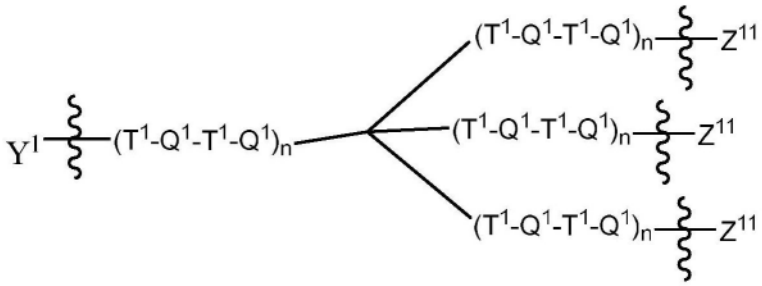
[0896] 每个R^{52}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基、$-(C_1-C_{20})$烯基、$-(C_1-C_{20})$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或$-N(R^{49})-$的杂原子替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和$-S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。

[0897] 在一些实施方案中,L^2是式L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13或L14的化合物,其中与Y^1和Z^{11}的连接位点表示为:

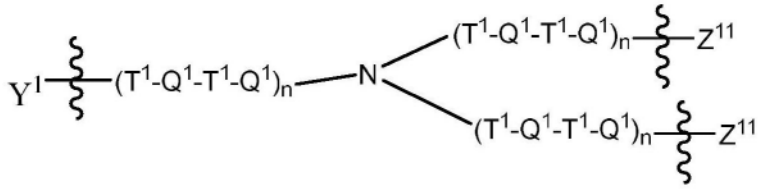
L1

[0898] 

L2

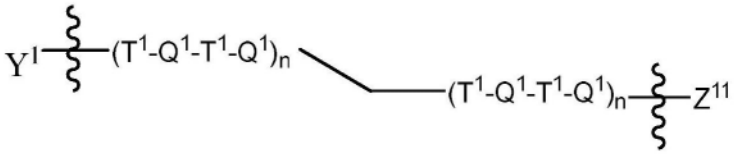


L3

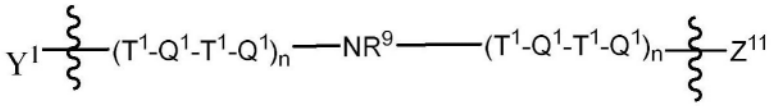


L4

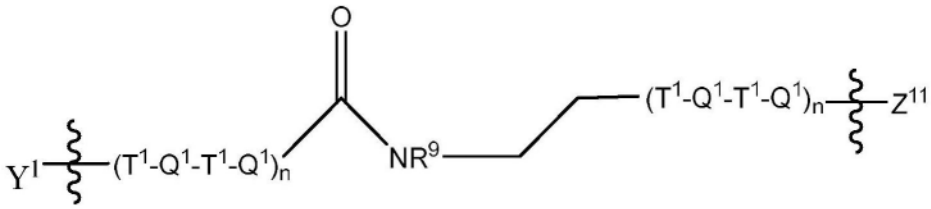
[0899]



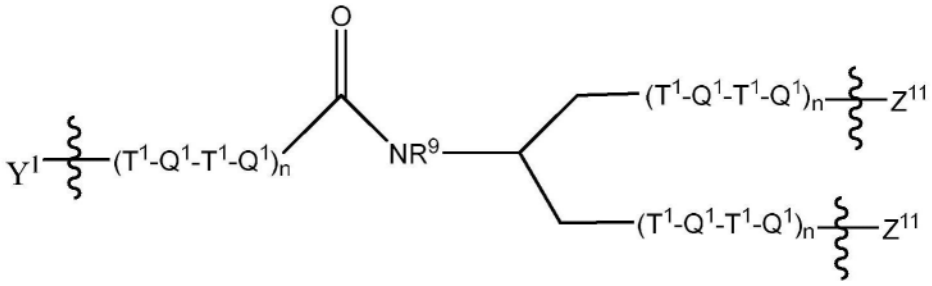
L5



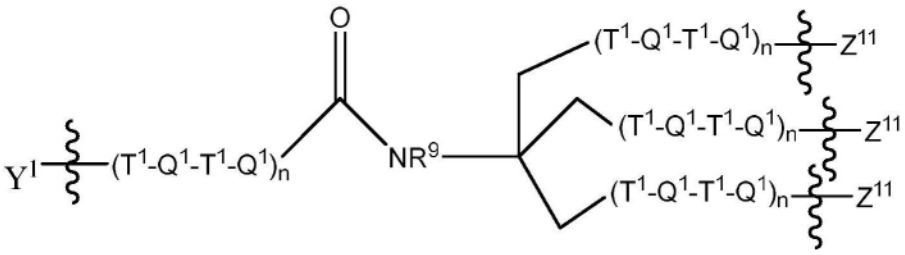
L6



L7

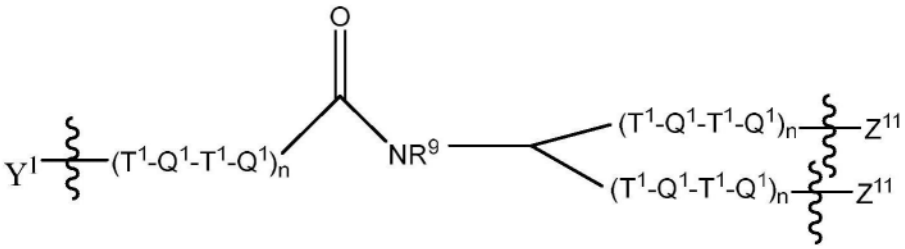


L8

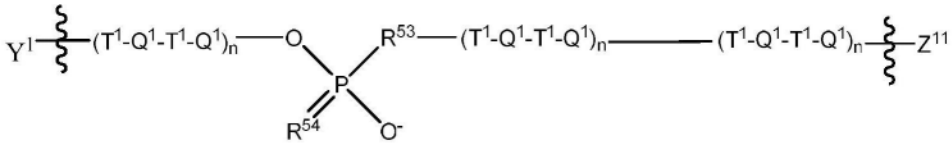


L9

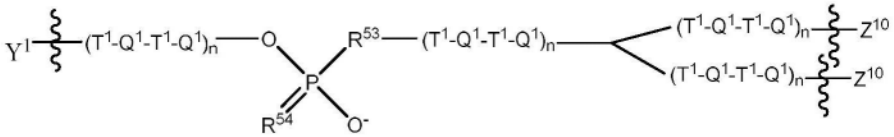
[0900]



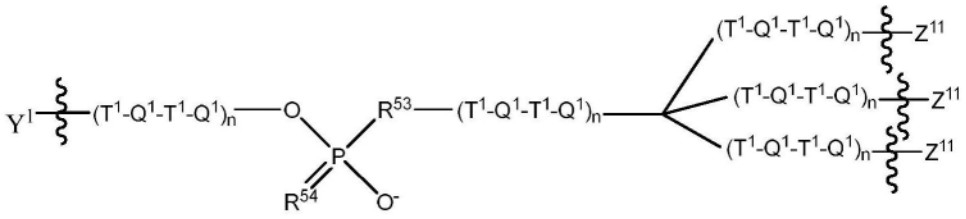
L10



L11

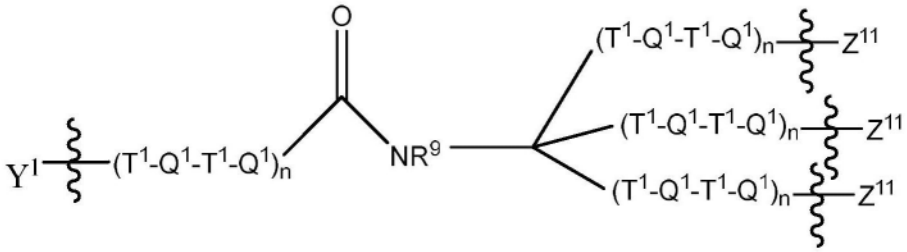


L12



L13

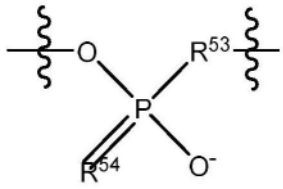
[0901]



L14

[0902] 其中每个T^1独立地不存在或者是亚烷基、亚烯基或亚炔基,其中所述亚烷基、亚烯基或亚炔基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0903] 每个Q^1独立地不存在或者是-C(O)-、-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-、-O-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-O-、-CH_2-、-NR^{49}C(O)NR^{49}-、二价杂芳基基团或者选自-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-与任何其他杂原子基团隔开,或下式的结构:

[0904] 

[0905] 其中R^{53}是-O或-NH;并且R^{54}是-O或-S;

[0906] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})2、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[0907] R^{53}是-O或-NH;

[0908] R^{54}是-O或-S;并且

[0909] 每个n独立地是0、1、2、3、4、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或40;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1。

[0910] 在一些实施方案中,Y^1包含至少15个碱基。

[0911] 在一些实施方案中,Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[0912] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个磷酸二酯核苷酸间键联。

[0913] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联。

[0914] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是手性控制的硫代磷酸酯。

[0915] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[0916] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Rp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[0917] 在一些实施方案中,Y^1,其中手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其在组合物中具有至少70%的非对映体纯度。

[0918] 在一些实施方案中,Y^1,其中手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%的非对映体纯度。

[0919] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个糖修饰。

[0920] 在一些实施方案中,Y^1包含至少1个碱基修饰。

[0921] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的主链键联样式。

[0922] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链手性中心样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的主链手性中心样式。

[0923] 在一些实施方案中,寡核苷酸的化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的化学修饰样式。

[0924] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[0925] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[0926] 在一些实施方案中,寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式是表1A中列出的寡核苷酸的Y^1的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式,并且Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[0927] 在一些实施方案中,寡核苷酸能够介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[0928] 在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[0929] 在一些实施方案中:每个R^{47}是-N(R^{48})-C(O)-R^{48};并且每个R^{48}独立地是-H或-(C_1-

C_5)烷基。

[0930] 在一些实施方案中：

[0931] 每个T^1独立地不存在或是亚烷基,其中

[0932] 所述亚烷基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开；

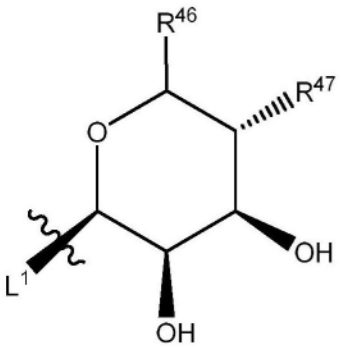
[0933] 每个Q^1独立地不存在或是C(O)、C(O)-NR^{49}、NR^{49}-C(O)或者选自O和NR^{49}的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团O和NR^{49}与任何其他杂原子基团隔开；

[0934] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代；

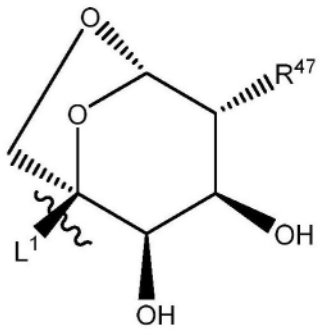
[0935] 每个n独立地是0、1、2、3或4；其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1。

[0936] 在一些实施方案中,本公开涉及：包含以下的化合物：(a)能够靶向PNPLA3的寡核苷酸；(b)连接基团；和(c)独立地选自Z^{10}和Z^{11}的1、2或3个部分；其中所述连接基团连接所述寡核苷酸和所述1、2或3个部分,并且其中：

[0937] 每个Z^{10}独立地是式Z12、Z13、Z14、Z15、Z16、Z17、Z18、Z19、Z20或Z21的化合物或者其几何或位置异构体,其中与L^1的连接位点表示为：



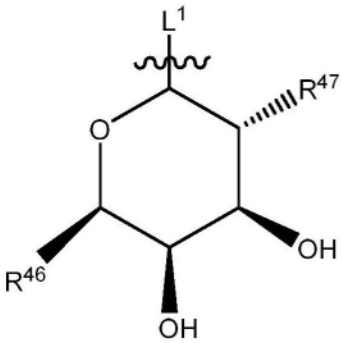
Z12



Z13

；

[0938]



Z16

[0939] 其中每个R^{46}独立地是-CN、-CH_2-CN、-C≡CH、-CH_2-N_3、-CH_2-NH_2、-CH_2-N(R^{52})-S(O)$_2$-R^{51}、-CH_2-CO_2H、-CO_2H、-CH_2-OH、-CH_2-SH、-CH=CH-R^{51}、-CH_2-R^{51}、-CH_2-S-R^{51}、-CH_2-N(R^{52})-

R^{51}、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-S(O)-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-N(R^{52})-R^{51}$、$-C(O)-NH_2$、$-C(O)-O-R^{51}$、$-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被$R^{51}$取代;

[0940] 每个R^{47}独立地是-OH、$-N_3$、$-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$、$-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$、$-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被$R^{48}$取代;

[0941] 每个R^{48}独立地是-H、$-(C_1-C_5)$烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的$-(C_3-C_6)$环烷基、$-(C_1-C_5)$烯基、$-(C_1-C_5)$炔基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$烯基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中所述烷基或环烷基的$-CH_2-$基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和$-N(R^{52})-$的杂原子基团替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{52})_2$、$-OR^{52}$和$-S(R^{52})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

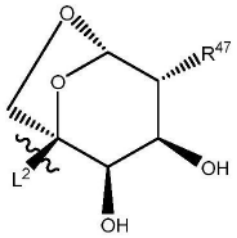
[0942] 每个R^{51}独立地是-H、$-(C_3-C_{20})$环烷基、$-(C_1-C_{60})$烯基、$-(C_1-C_{60})$炔基或$-(C_1-C_{60})$烷基,其中所述环烷基的一至六个$-CH_2-$或所述烷基的一至二十个$-CH_2-$可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和$-N(R^{49})-$的杂原子替代,其中所述杂原子被至少两个碳原子隔开,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和$-S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;并且

[0943] 每个R^{52}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基、$-(C_1-C_{20})$烯基、$-(C_1-C_{20})$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或$-N(R^{49})-$的杂原子替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和$-S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;

[0944] 每个R^{49}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以被-O-、-S-或$-N(R^{49a})-$替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以被选自$-N(R^{49a})_2$、$-OR^{49a}$和$-S(R^{49a})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、$-(C_1-C_6)$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基;

[0945] 每个R^{49a}独立地是-H、$-(C_1-C_6)$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基;

[0946] 并且Z^{11}是式(B)的化合物,其中与L^2的连接位点表示为:

[0947] 

(B) ;

[0948] 每个R^{47}独立地是-OH、$-N_3$、$-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$、$-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$、$-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被$R^{48}$取代;

[0949] 每个R^{48}独立地是-H、$-(C_1-C_5)$烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的$-(C_3-C_6)$

环烷基、-(C_1-C_5)烯基、-(C_1-C_5)炔基、卤基取代的-(C_1-C_5)烯基、卤基取代的-(C_1-C_5)炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基或环烷基的-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-N(R^{52})-的杂原子基团替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-N(R^{52})$_2$、-OR^{52}和-S(R^{52})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[0950] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})2、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[0951] 46.每个R^{52}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基、-(C_1-C_{20})烯基、-(C_1-C_{20})炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-N(R^{49})-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-N(R^{49})$_2$、-OR^{49}和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。手性控制的PNPLA3寡核苷酸组合物,包含特征在于以下的特定寡核苷酸类型的寡核苷酸:

[0952] a)共同的碱基序列和长度,其中所述碱基序列与PNPLA3靶基因互补;

[0953] b)共同的主链键联样式;

[0954] c)共同的主链手性中心样式,其中所述共同的主链手性中心样式包括至少一个包含手性控制的手性中心的核苷酸间键联;

[0955] 所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同的共同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;并且

[0956] 其中所述寡核苷酸组合物能够降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

[0957] 在一些实施方案中,寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

[0958] 在一些实施方案中,本公开涉及:包含前述权利要求中任一项所述的化合物的组合物。

[0959] 在一些实施方案中,本公开涉及:包含PNPLA3寡核苷酸的组合物,所述PNPLA3寡核苷酸是单链RNAi剂,其中所述单链RNAi剂与PNPLA3靶RNA序列互补或基本上互补,

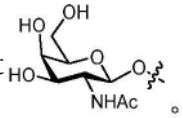
[0960] 具有约15至约49个核苷酸的长度,并且

[0961] 能够指导靶标特异性RNA干扰,

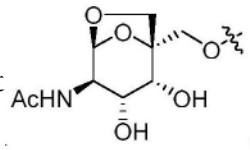
[0962] 其中所述单链RNAi剂包含至少一个非天然碱基、糖和/或核苷酸间键联,并且

[0963] 其中所述组合物能够降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

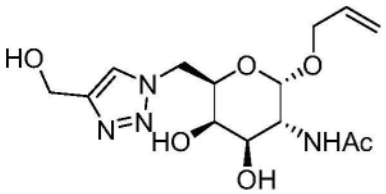
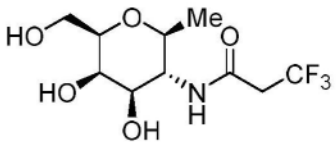
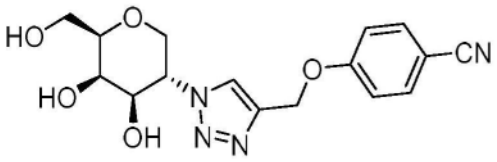
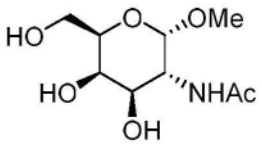
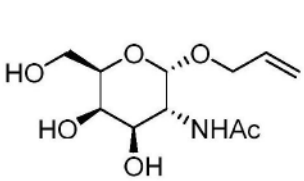
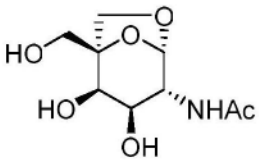
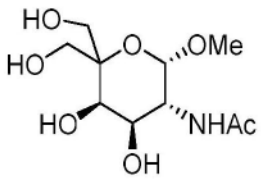
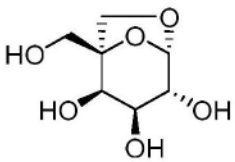
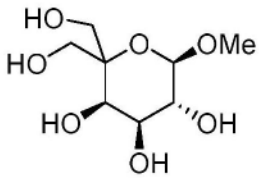
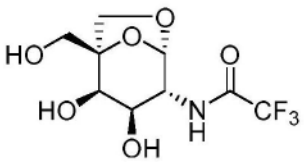
[0964] 在一些实施方案中,一个或多个寡核苷酸还包含桥接的双环缩酮。

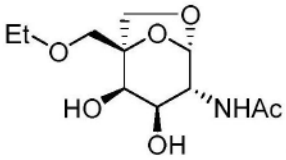
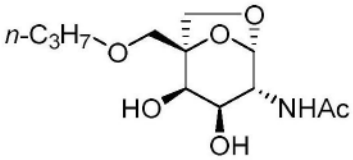
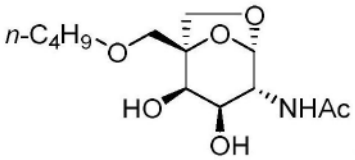
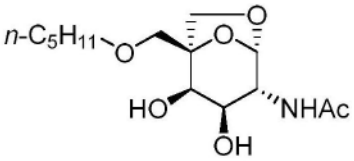
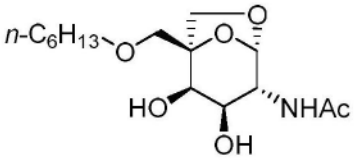
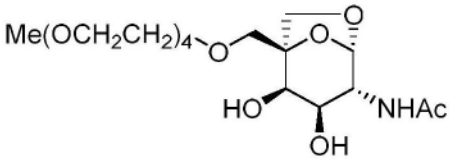
[0965] 在一些实施方案中,R^{CD}是 

。

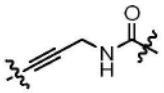
[0966] 在一些实施方案中,R^{CD}是  。

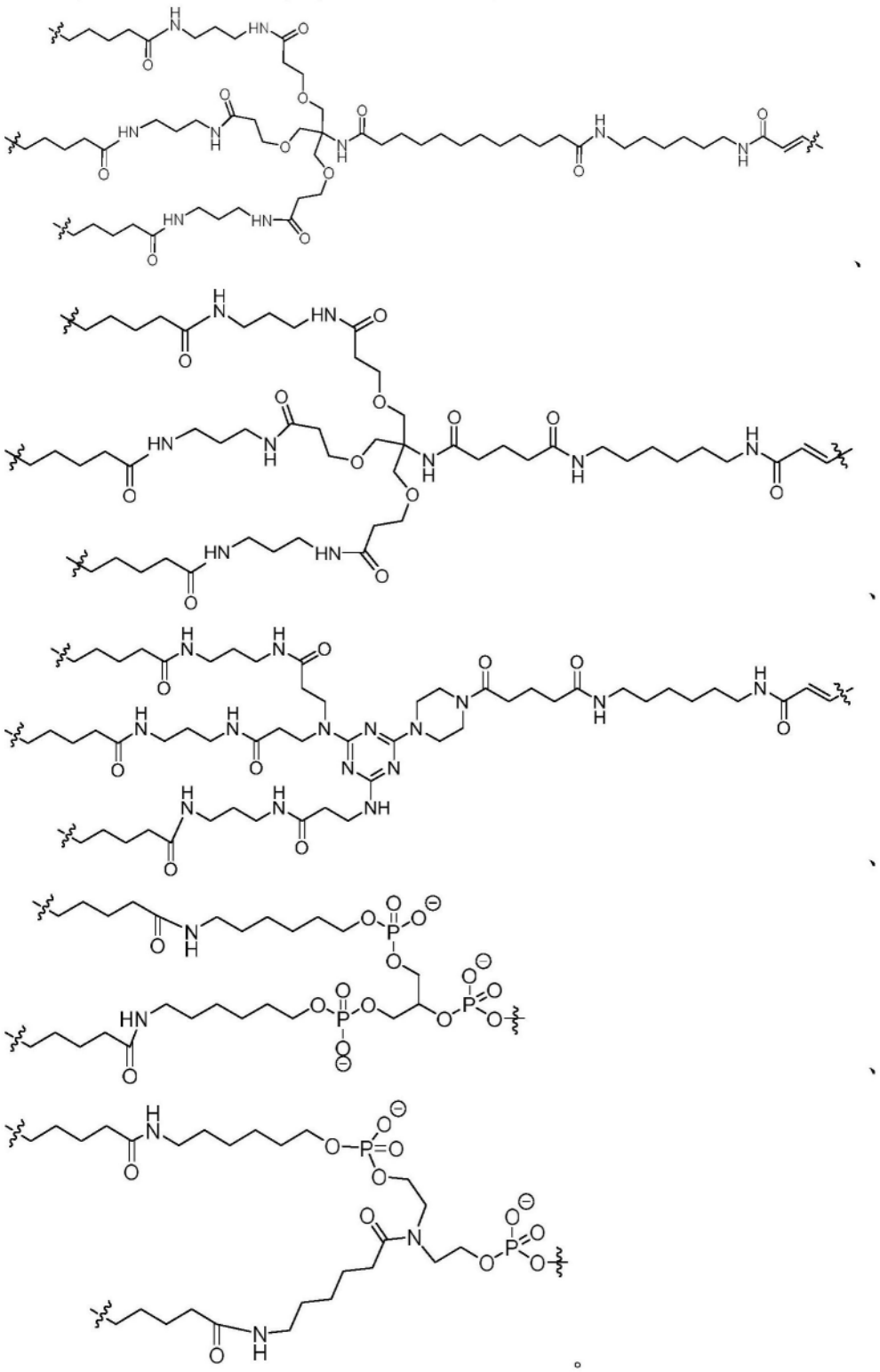
[0967] 在一些实施方案中,R^{CD}具有这样的结构使得R^{CD}-H为

 、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

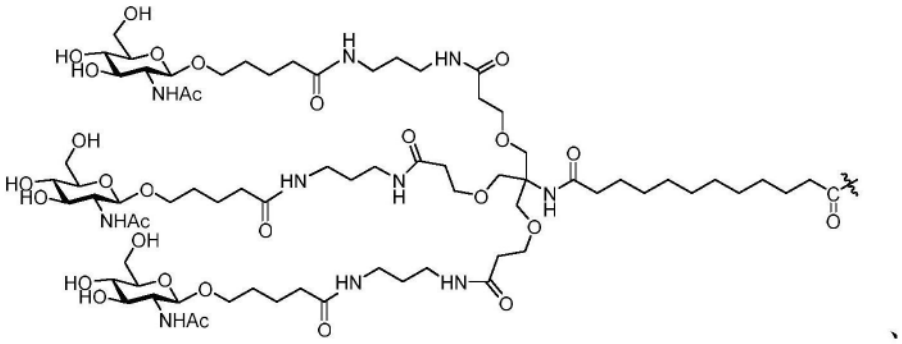
[0968]  、  、  、  、  、或  。

[0969] 在一些实施方案中,R^{CD}通过接头与一个或多个寡核苷酸连接。在一些实施方案中,接头是L^{M}。

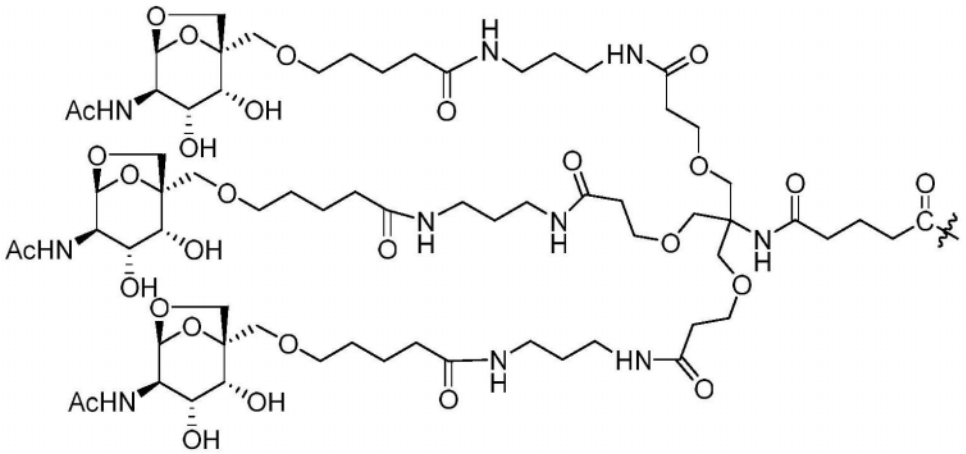
[0970] 在一些实施方案中,接头具有以下结构: 、  、

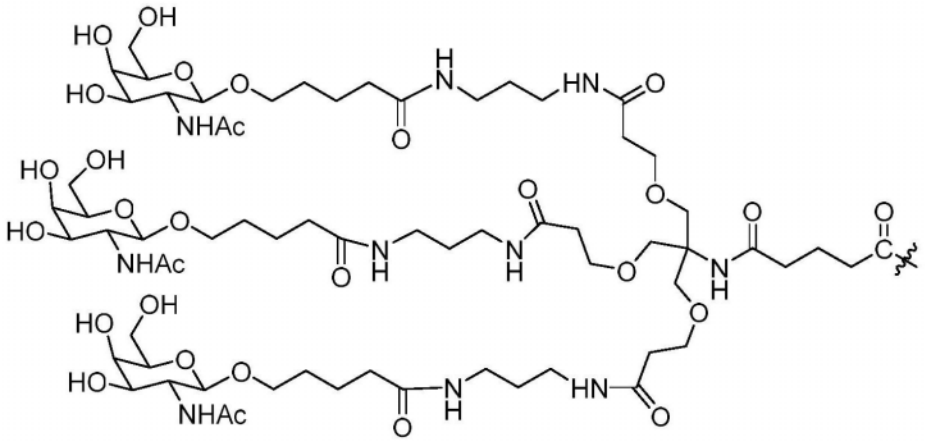
[0971] 

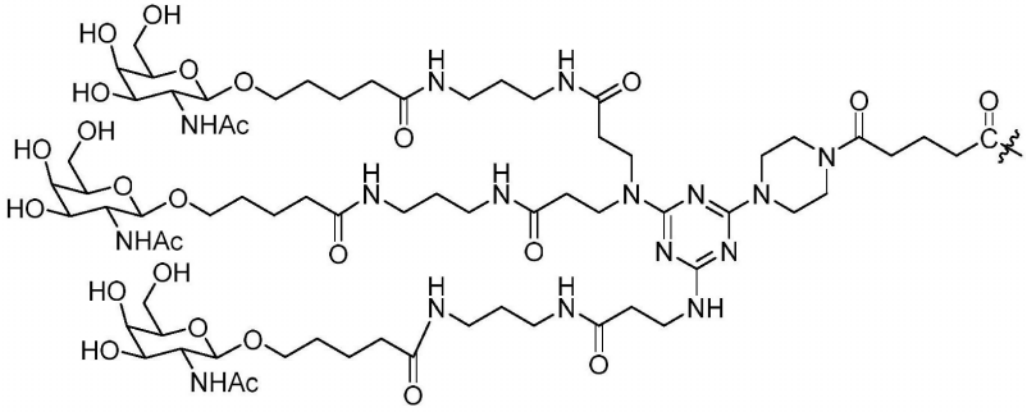
[0972] 在一些实施方案中,R^{CD}选自:

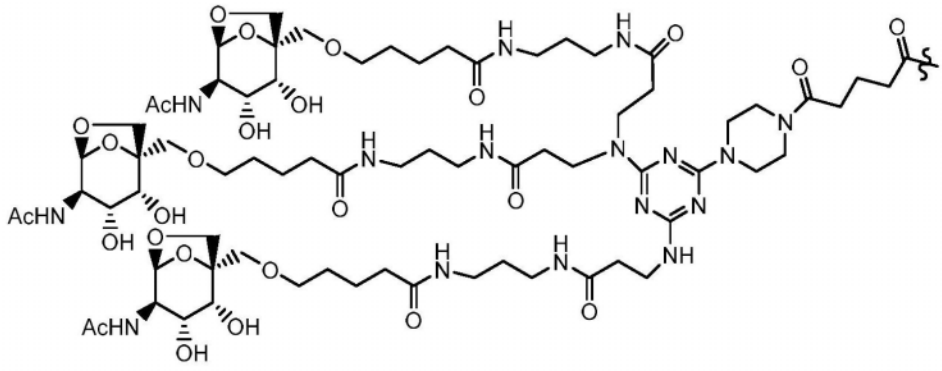
[0973] 

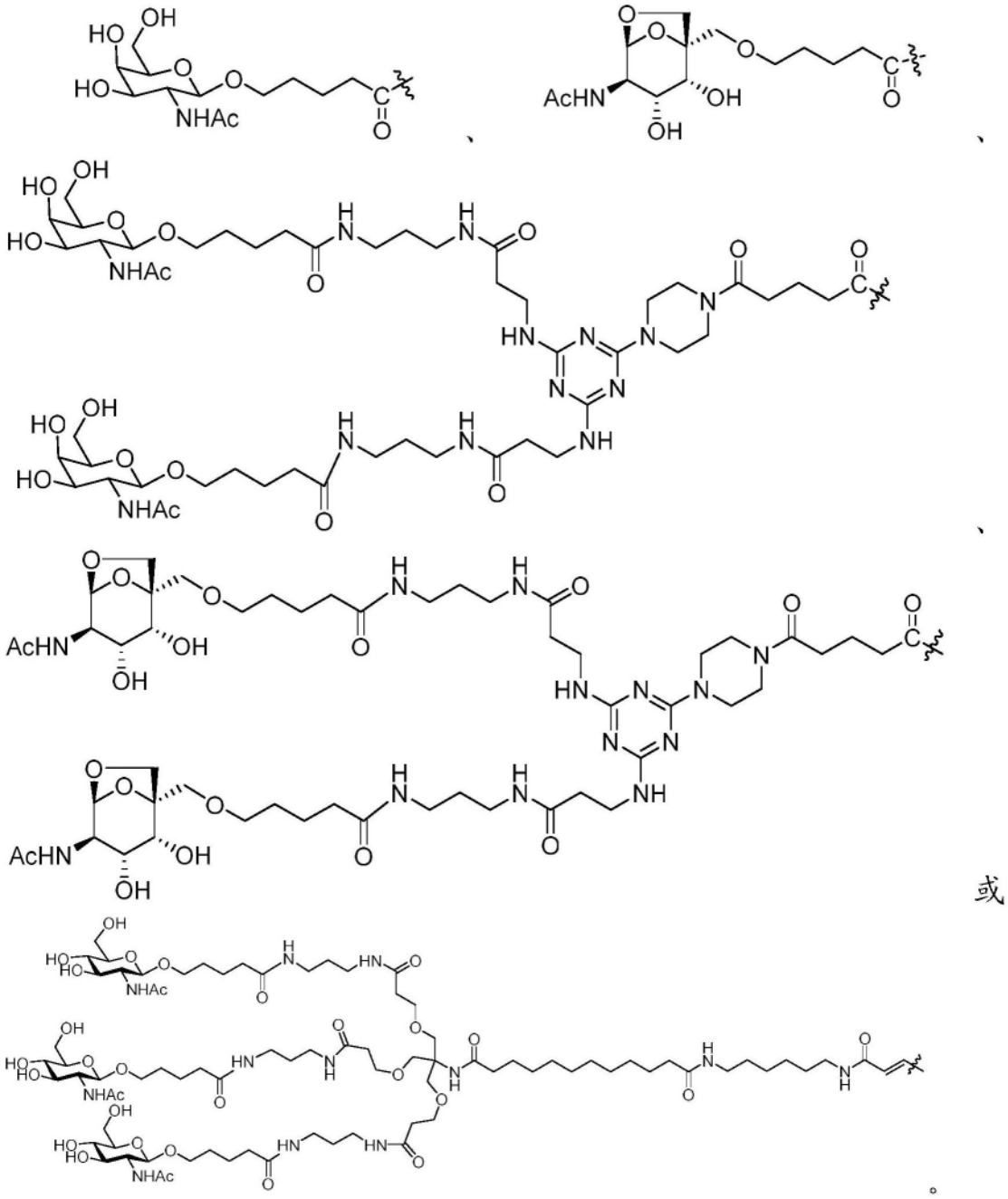
[0974]









[0975] 

或

[0976] 在一些实施方案中,本公开涉及:药物组合物,其包含与至少一种药学上可接受的赋形剂混合的治疗有效量的如前述权利要求中任一项所述的组合物。

[0977] 在一些实施方案中,所述组合物还包含选自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:抗炎剂、抗糖尿病剂和胆固醇/脂质调节剂。

[0978] 在一些实施方案中,所述另外的药剂选自由以下组成的组:乙酰-CoA羧化酶-(ACC)抑制剂,二酰基甘油O-酰基转移酶1(DGAT-1)抑制剂,二酰基甘油O-酰基转移酶2(DGAT-2)抑制剂,单酰基甘油O-酰基转移酶抑制剂,磷酸二酯酶(PDE)-10抑制剂,AMPK活化剂,磺酰脲,美各里替尼(meglitinide),α-淀粉酶抑制剂,α-葡萄糖苷水解酶抑制剂,α-葡萄糖苷酶抑制剂,PPAR γ 激动剂,PPARα/ γ 激动剂,双胍,胰高血糖素样肽1(GLP-1)调节剂,利拉鲁肽,阿比鲁肽,艾塞那肽,阿比鲁肽,利西拉肽(lixisenatide),度拉糖肽,索马鲁肽蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(PTP-1B)抑制剂,SIRT-1活化剂,二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂,胰

岛素促分泌素,脂肪酸氧化抑制剂,A2拮抗剂,c-jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂,葡萄糖激酶活化剂(GKa),胰岛素,胰岛素模拟物,糖原磷酸化酶抑制剂,VPAC2受体激动剂,SGLT2抑制剂,胰高血糖素受体调节剂,GPR119调节剂,FGF21衍生物或类似物,TGR5受体调节剂,GPBAR1受体调节剂,GPR40激动剂,GPR120调节剂,高亲和力烟酸受体(HM74A)活化剂,SGLT1抑制剂,肉碱棕榈酰转移酶酶的抑制剂或调节剂,果糖1,6-二磷酸酶的抑制剂,醛糖还原酶的抑制剂,盐皮质激素受体的抑制剂,TORC2的抑制剂,CCR2和/或CCR5的抑制剂,PKC同种型(例如PKCα、PKCβ、PKCγ)的抑制剂,脂肪酸合成酶的抑制剂,丝氨酸棕榈酰转移酶的抑制剂,GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、视黄醇结合蛋白4、糖皮质激素受体、生长抑素受体的调节剂,PDHK2或PDHK4的抑制剂或调节剂,MAP4K4的抑制剂,IL1家族(包括IL1β)的调节剂,HMG-CoA还原酶抑制剂,角鲨烯合成酶抑制剂,贝特类,胆汁酸螯合剂,ACAT抑制剂,MTP抑制剂,脂加氧酶抑制剂,胆固醇吸收抑制剂,PCSK9调节剂,胆固醇酯转移蛋白抑制剂和RXRα调节剂。

[0979] 在一些实施方案中,所述组合物还包含选自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:半胱胺或其药学上可接受的盐、胱胺或其药学上可接受的盐、抗氧化剂化合物、卵磷脂、维生素B复合物、胆汁盐制剂、大麻素-1(CB1)受体的拮抗剂、大麻素-1(CB1)受体的反向激动剂、过氧化物酶体增殖物活化受体活性调节剂、苯并硫氮杂䓬或苯并硫杂䓬化合物、抑制蛋白酪氨酸磷酸酶PTPRU的RNA反义构建体、杂原子连接的取代的哌啶及其衍生物、能够抑制硬脂酰辅酶αδ-9去饱和酶的氮杂环戊烷衍生物、具有脂联素的促分泌素或诱导剂活性的酰基酰胺化合物、季铵化合物、乙酸格拉替雷、五聚体蛋白、HMG-CoA还原酶抑制剂、正乙酰半胱氨酸、异黄酮化合物、大环内酯类抗生素、半乳糖凝集素抑制剂、抗体或其任意组合。

[0980] 在一些实施方案中,本公开涉及:用于在人类中降低非酒精性脂肪肝病或非酒精性脂肪性肝炎分级评分系统的严重性至少一个点、降低非酒精性脂肪性肝炎活性的血清标志物水平、降低非酒精性脂肪性肝炎疾病活性或降低非酒精性脂肪性肝炎的医学后果的方法,所述方法包括向需要此类降低的人施用治疗有效量的如前述权利要求中任一项所述的组合物的步骤。

[0981] 在一些实施方案中,本公开涉及:用于治疗人类中的脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述权利要求中任一项所述的组合物的步骤。

[0982] 在一些实施方案中,本公开涉及:用于治疗人类中的高脂血症、I型糖尿病、II型糖尿病、特发性I型糖尿病(Ib型)、成人潜伏性自身免疫性糖尿病(LADA)、早发2型糖尿病(EOD)、青年发病型非典型糖尿病(YOAD)、青年成熟期发病型糖尿病(MODY)、营养不良相关的糖尿病、妊娠糖尿病、冠心病、缺血性中风、血管成形术后的再狭窄、周围血管疾病、间歇性跛行、心肌梗塞、血脂异常、餐后脂血症、葡萄糖耐量(IGT)受损的病状、空腹血糖受损的病状、代谢性酸中毒、酮病、关节炎、肥胖、骨质疏松、高血压、充血性心力衰竭、左心室肥大、外周动脉疾病、糖尿病视网膜病变、黄斑变性、白内障、糖尿病肾病、肾小球硬化、慢性肾功能衰竭、糖尿病神经病、代谢综合征、X综合征、经前期综合征、心绞痛、血栓形成、动脉粥样硬化、短暂性脑缺血发作、中风、血管再狭窄、高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗、葡萄糖代谢受损、勃起功能障碍、皮肤和结缔组织病症、足溃疡和溃疡性结肠炎、内

皮功能障碍和血管顺应性受损、高载脂蛋白B脂蛋白血症、阿尔茨海默病、精神分裂症、认知受损、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、和肠易激综合征、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、或非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述权利要求中任一项所述的组合物的步骤。

[0983] 在一些实施方案中,本公开涉及:用于治疗人类中的脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的两种单独的药物组合物,其包含

[0984] a.如前述权利要求中任一项所述的第一组合物;和

[0985] b.第二组合物,其包含至少一种另外的药剂和至少一种药学上可接受的赋形剂,所述另外的药剂选自由以下组成的组:抗炎剂、抗糖尿病剂和胆固醇/脂质调节剂。

[0986] 在一些实施方案中,所述第一组合物和所述第二组合物同时施用。

[0987] 在一些实施方案中,所述第一组合物和所述第二组合物顺序施用和以任何顺序施用。

[0988] 在一些实施方案中,本公开涉及:用于降低人类中的门脉高压、肝蛋白合成能力、高胆红素血症或脑病的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述权利要求中任一项所述的组合物的步骤。

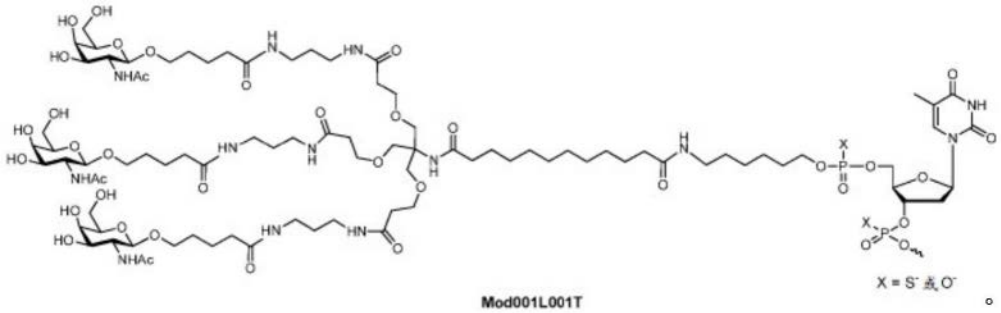
[0989] 在一些实施方案中,本公开涉及:降低细胞中的PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、活性和/或水平的方法,所述方法包括使细胞与前述权利要求中的任一项所述的化合物或组合物接触的步骤。

[0990] 在一些实施方案中,本公开涉及:降低患者中的PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、活性和/或水平的方法,所述方法包括使细胞与前述权利要求中的任一项所述的化合物或组合物接触的步骤。

[0991] 在一些实施方案中,如本文所用,GalNAc是指在结构上与GalNAc类似并且/或者执行GalNAc的至少一种功能(例如,与ASPGR结合)的化学实体。

[0992] 在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端包含GalNAc或者其变体或衍生物。

[0993] PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂(例如5'GalNAc部分)的5'-末端的GalNAc部分的非限制性实例如下所示,其中5'末端结构由以下表示:

[0994] 

[0995] 在一些实施方案中,GalNAc部分,例如GalNAc或者其变体或衍生物,在以下任一个中描述:Migawa等2016Bioorg.Med.Chem.Lett.26:2914-7;Ostergaard等2015Bioconjug.Chem.26:1451-1455;Prakash等2014Nucl.Acids Res.42:8796-8807;Prakash等2016J.Med.Chem.59:2718-33;Shemesh等2016Mol.Ther.Nucl.Acids 5:e319;St-Pierre

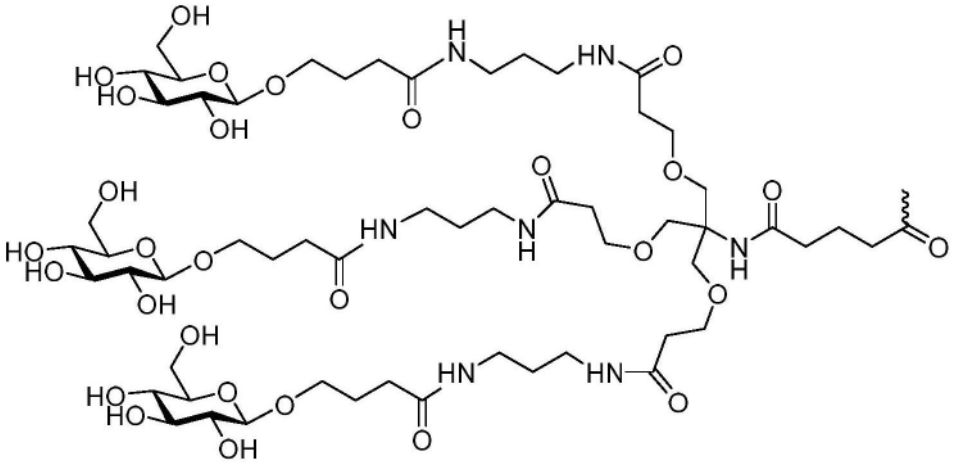
等2016 Bioorg.Med.Chem.24:2397-409,和/或Yu等2016 Mol.Ther.Nucl.Acids 5:e317。

[0996] 在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸缀合的化学部分(例如,附加的组分)与ASPGR结合。

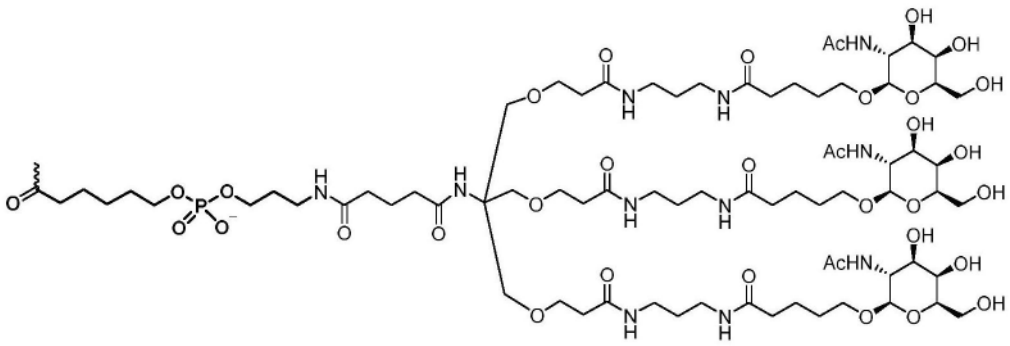
[0997] 在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸缀合的化学部分(例如,附加的组分)与ASPGR结合并且包含以下任一个:Mod031、Mod034、Mod035、Mod036、Mod038、Mod039、Mod040或Mod041。

[0998] 在一些实施方案中,附加的组分可以是或包含以下任一个:Mod079、Mod080、Mod081、Mod082或Mod083。在一些实施方案中,附加的组分可以是或包含以下任一个:

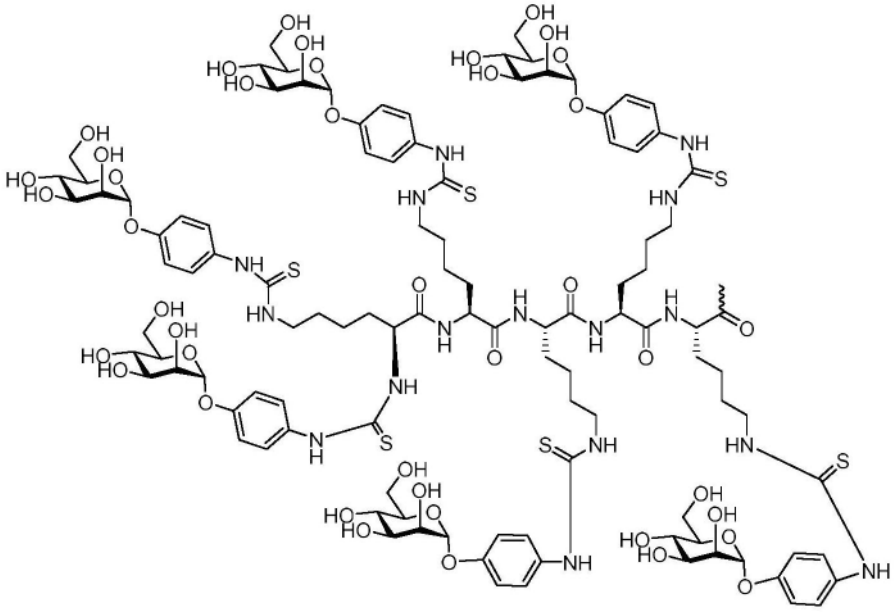
[0999] Mod059:

[1000] 

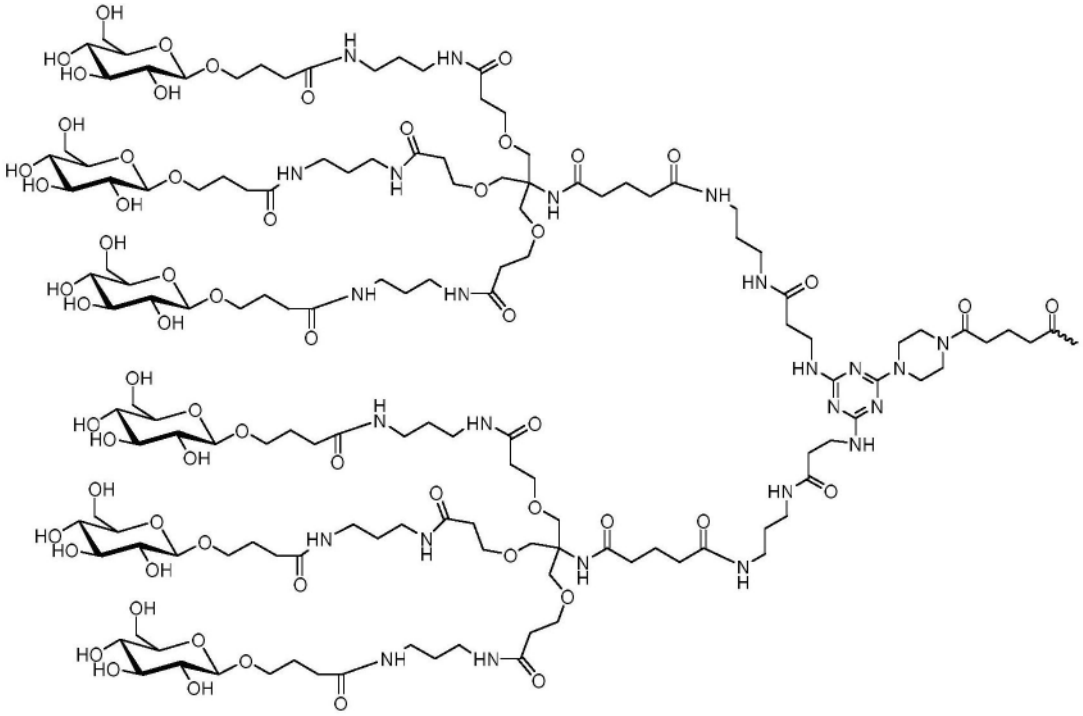
[1001] Mod060:

[1002] 

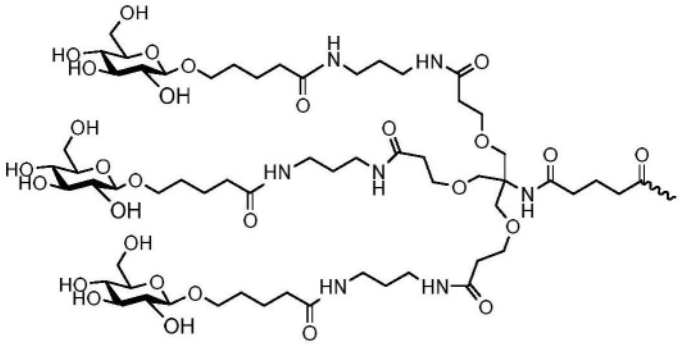
[1003] Mod065:

[1004] 

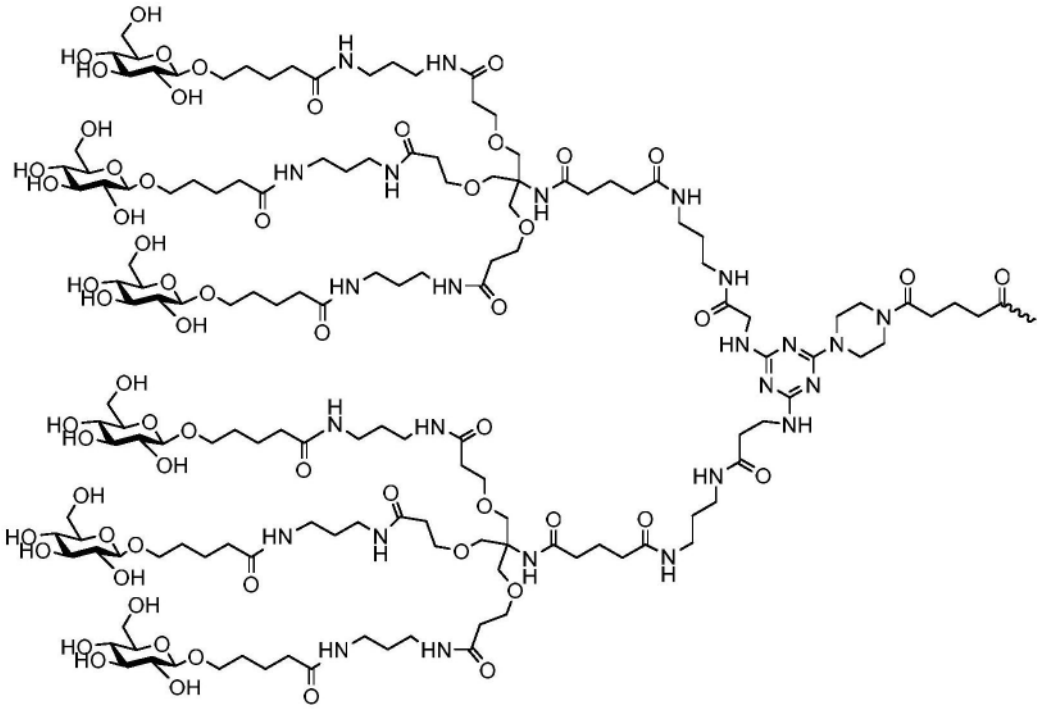
[1005] Mod070：

[1006] 

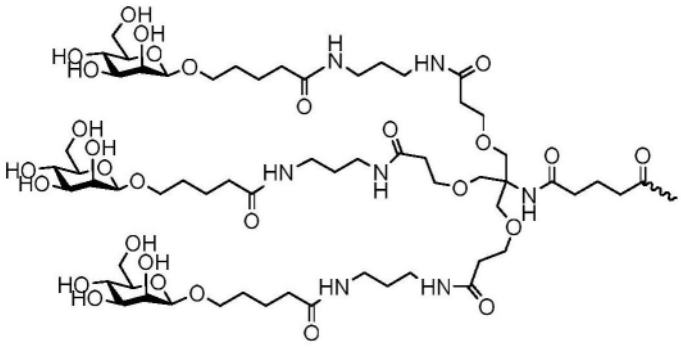
[1007] Mod071：



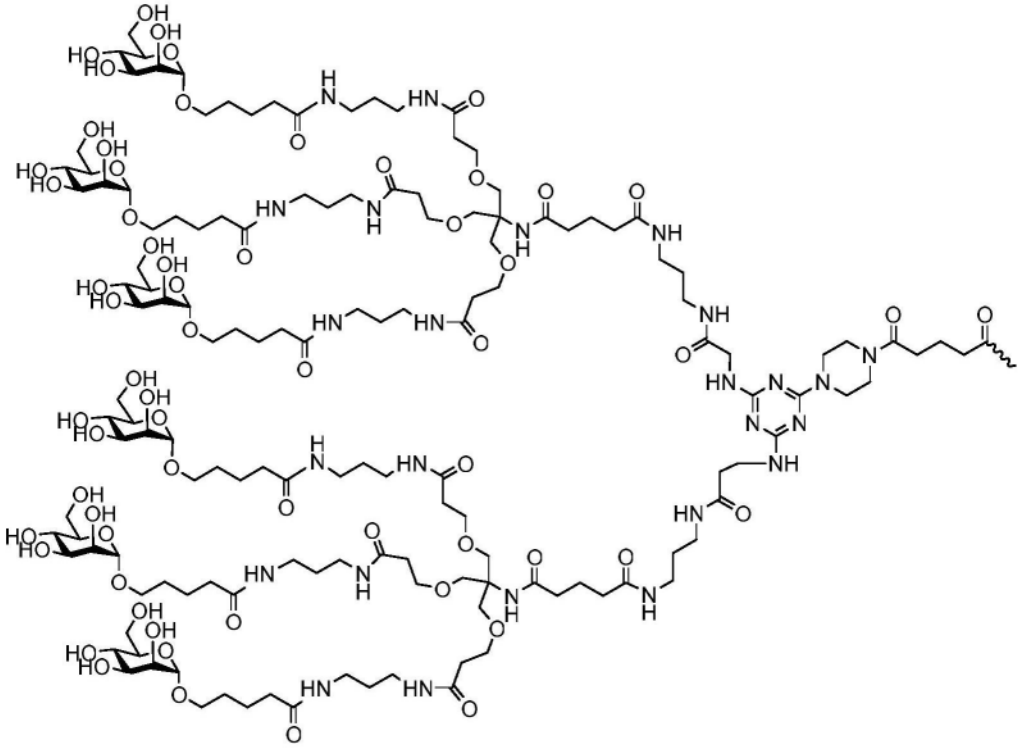
[1008] Mod072：

[1009] 

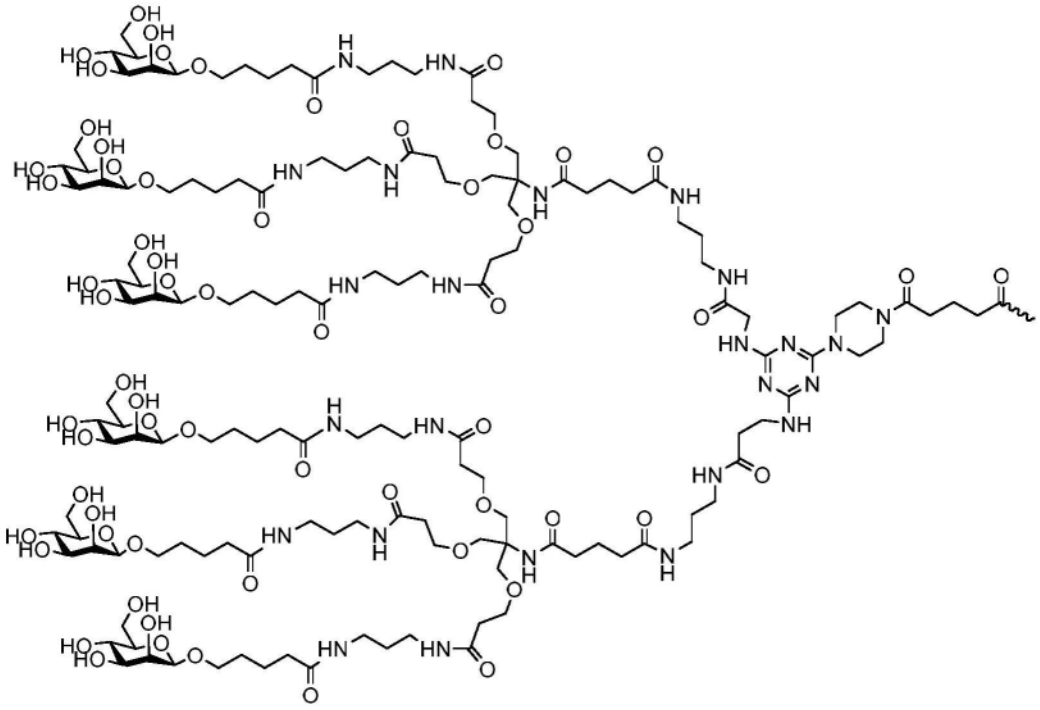
[1010] Mod073：



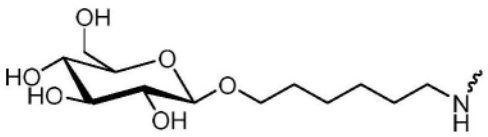
[1011] Mod074：

[1012] 

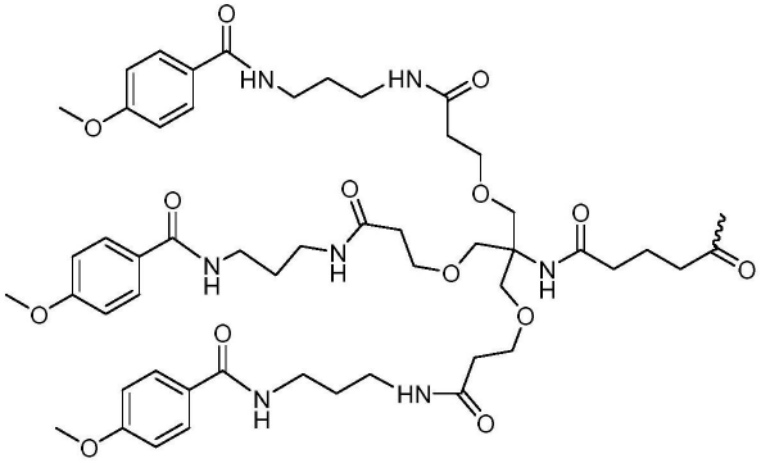
[1013] Mod075：

[1014] 

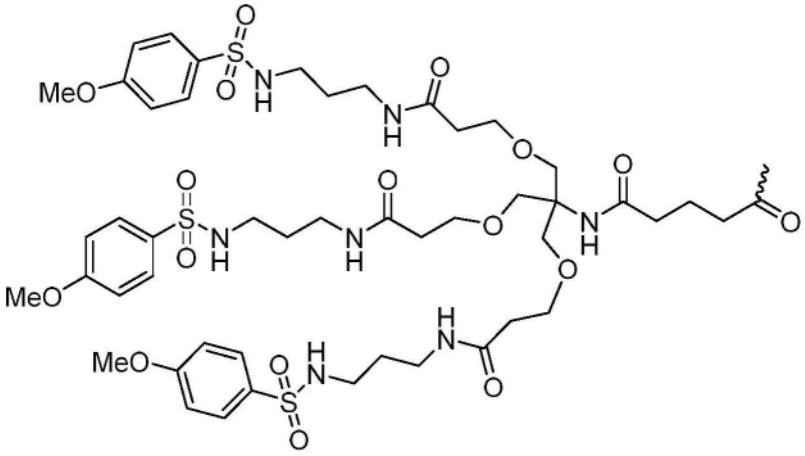
[1015] Mod076：



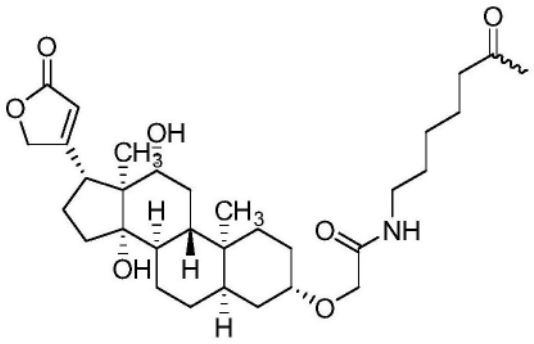
Mod077：



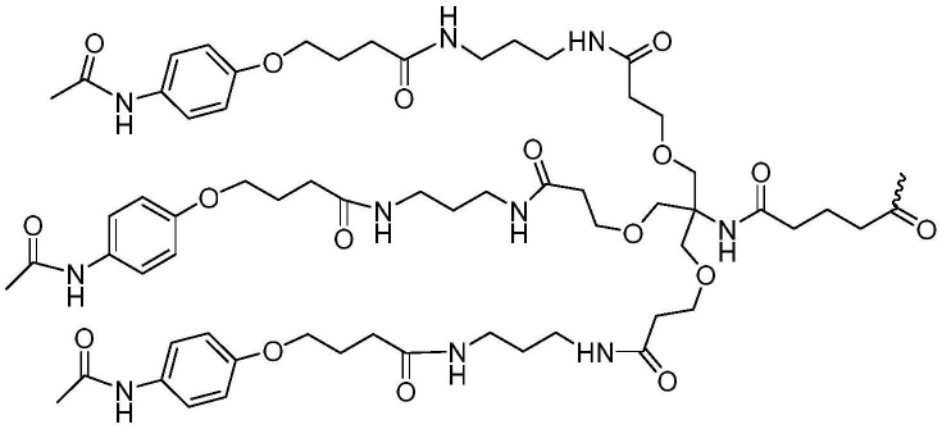
Mod084：



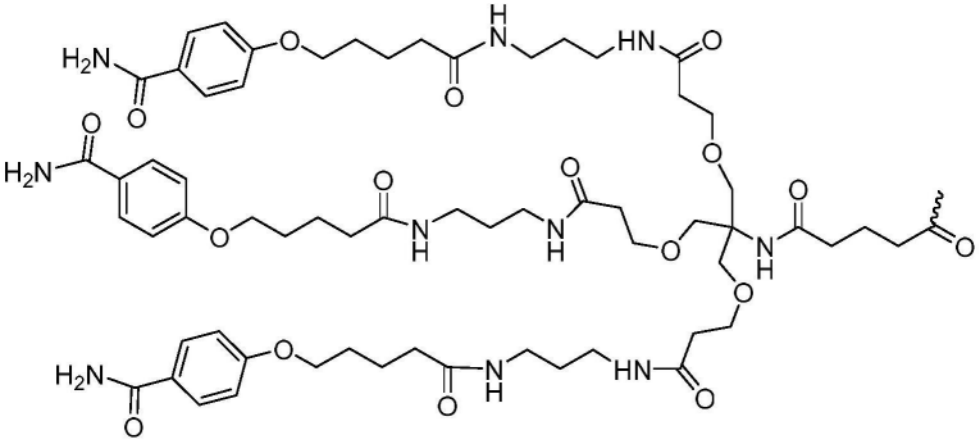
Mod085：



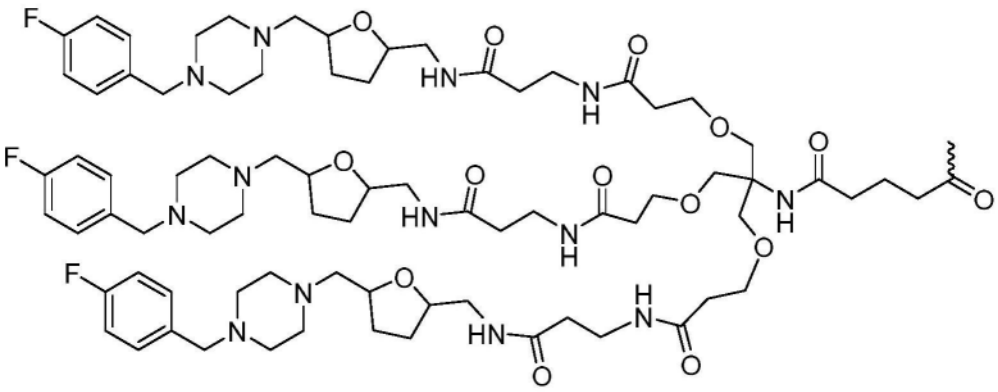
Mod087：

[1016] 

[1017] Mod088：

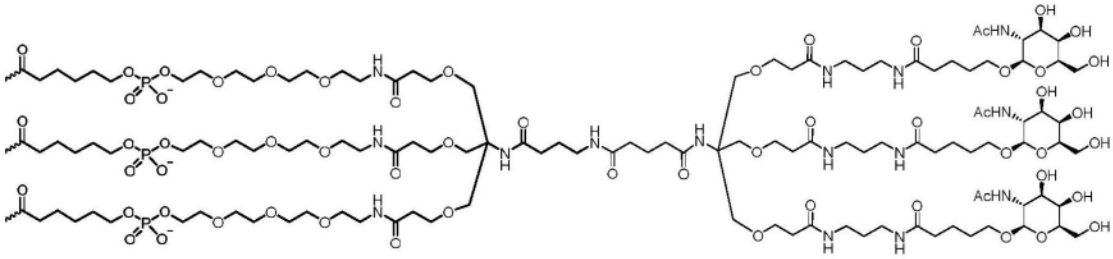
[1018] 

[1019] 或Mod089：

[1020] 

[1021] 在一些实施方案中,附加的组分可以是或包含：

[1022] Mod061：

[1023] 

[1024] 其中Mod061与三个相同或不相同的寡核苷酸缀合。

[1025] PNPLA3寡核苷酸的5’核苷或5’核苷酸

[1026] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何5'核苷或5'核苷酸。

[1027] 在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'核苷(例如,在N1中),例如在5'-末端的核苷,可以是本领域已知的任何核苷、修饰的核苷或通用核苷。

[1028] 在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'核苷酸(例如,在N1中),例如在5'-末端的核苷,可以包含碱基处的2'修饰。

[1029] 在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核苷可以包含2'-脱氧(DNA)、2'-F、2'-OMe或2'-MOE、或倒置的核苷或核苷酸。

[1030] 其中ssRNAi剂的5'-末端的核苷是2'-脱氧(DNA)的ssRNAi剂格式的非限制性实例包括:图1的格式1-5、16-18、22-29、32-78、84-93、97和103-107。

[1031] 其中ssRNAi剂的5'-末端的核苷为2'-F的ssRNAi剂格式的非限制性实例包括:图1的格式11-15、19、79-83和98-100。

[1032] 其中ssRNAi剂的5'-末端的核苷为2'-OMe的ssRNAi剂格式的非限制性实例包括:图1的格式6-10、20-21、30-31、94-96和101-102。

[1033] 在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核碱基是T。在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核碱基是U。在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核碱基是A。在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核碱基是G。在一些实施方案中,单链RNAi剂的5'-末端(例如,在N1中)的核碱基是C。

[1034] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂具有5'错配,其中单链RNAi剂的5'-末端(位置N1)的核碱基与靶转录物的对应位置具有错配。如本领域中已报道的,有效的双链siRNA不需要5'核苷酸部分与靶转录物的对应位置之间的互补性。本文所述的各种示例性单链RNAi剂也具有5'错配,并且仍然能够指导RNA干扰。已构建了有效ssRNAi剂,其在5'位置(N1)与靶mRNA序列具有错配。已经构建了有效ssRNAi剂,其在5'位置与靶mRNA序列具有错配并且ssRNAi的N1位置是T。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂在N1具有5'错配,其中N1中的核碱基是T。

[1035] 在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是LNA。

[1036] 在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是5'-H(脱氧)。已经构建了有效ssRNAi剂,其中在5'位置处的核苷是5'-H(脱氧)。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是脱氧T、A、G或C。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是脱氧T。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是脱氧A。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-F。已经构建了有效ssRNAi剂,其中

在5'位置处的核苷是2'-F。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-F A。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-F G。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-OMe。已经构建了有效ssRNAi剂,其中在5'位置处的核苷是2'-OMe。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-OMe U。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-OMe A。在一些实施方案中,在5'位置处的核苷是2'-OMe C。

[1037] 包括单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸的种子区域

[1038] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何种子区域或者其部分或结构元件。

[1039] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的种子区域是RNAi剂的一部分,其在RNAi剂与转录物靶标的结合中特别重要。Lim等2005Nature 433:769-773。据报道,在许多情况下,高RNAi活性需要RNAi剂反义链的种子区域与mRNA靶标之间完全互补。例如,据报道,种子区域中位置6处的单一错配消除了双链RNAi活性;Lim等2005Nature 433:769-773。相反,据报道,dsRNAi反义链更易于在种子区域外部错配,例如在5'位置处、在种子后区域中和3'-末端二核苷酸中错配。

[1040] 在一些实施方案中,种子区域中的每个核苷酸是2'-OMe。

[1041] 在一些实施方案中,种子区域中的每个核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的每个核苷酸是2'-OMe。

[1042] 在一些实施方案中,种子区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1043] 在一些实施方案中,种子区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1044] 在一些实施方案中,在位置2处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1045] 在一些实施方案中,在位置2处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且位置14处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1046] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中任何数量的N都可以是2'-脱氧、2'-F、2'-OMe和/或2'-OH,并且/或者在糖的2'位置处具有任何其他修饰。

[1047] 表1A、附图和本文其他地方提供了单链RNAi剂的种子区域的各种非限制性实例。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链

RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸独立地是2'-F。

[1048] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是2'-OMe。

[1049] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是2'-MOE。

[1050] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是2'-脱氧。

[1051] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-F。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-F。

[1052] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂

包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-OMe。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-OMe。

[1053] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-MOE。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-MOE。

[1054] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-脱氧。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸独立地是2'-脱氧。

[1055] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个核苷酸独立地是2'-脱氧。

[1056] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸间键联独立地是PO(磷酸二酯)。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是PO。

[1057] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸间键联独立地是PS(硫代磷酸酯)。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是PS。

[1058] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的

任何一个或多个核苷酸间键联独立地是Sp(呈Sp构型的硫代磷酸酯)。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是Sp。

[1059] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个核苷酸间键联独立地是Rp(呈Rp构型的硫代磷酸酯)。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何5个或更多个核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何6个或更多个核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中N2至N7中的7个独立地是Rp。

[1060] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PO。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PO。

[1061] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Sp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Sp。

[1062] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Rp。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是Rp。

[1063] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何一个或多个非连续核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi

剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何2个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何3个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PS。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域中的任何4个或更多个非连续核苷酸间键联独立地是PS。

[1064] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括图1所示的任何单链RNAi格式的种子区域中的核苷酸的2'修饰样式。

[1065] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fmfmfm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1066] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fmfmfmf,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1067] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfmf,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1068] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fmfmf,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1069] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfmf,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1070] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1071] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfmfm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1072] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fmfmf,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1073] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfmfm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1074] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMfmf,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1075] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMfmfm,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1076] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMfm,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1077] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMf,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1078] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfMf,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1079] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfMfm,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1080] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfM,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1081] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样

式包括:mfMfMf,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1082] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMfMfM,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1083] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfMfM,其中f是2'-F,m是2'-OMe,并且M是2'-MOE。

[1084] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fdfdfd,其中d是2'-脱氧,并且m是2'-OMe。

[1085] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fdfdfdf,其中d是2'-脱氧,并且m是2'-OMe。

[1086] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:dfdfdf,其中d是2'-脱氧,并且m是2'-OMe。

[1087] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fdfdf,其中d是2'-脱氧,并且m是2'-OMe。

[1088] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:ffmmmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1089] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:fmmmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1090] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:ffmmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1091] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:ffmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1092] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:ffmmmmmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1093] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:ffmmmmm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1094] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mmmm,其中m是2'-OMe。

[1095] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mmmmm,其中m是2'-OMe。

[1096] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mmmmmm,其中m是2'-OMe。

[1097] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸的2'修饰样式包括:mfmfm,其中f是2'-F,并且m是2'-OMe。

[1098] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括图1所示的任何单链RNAi格式的种子区域中的核苷酸间键联样式。

[1099] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XOXOXO,其中X是硫代磷酸酯,并且O是磷酸二酯。

[1100] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XOXOXOX,其中X是硫代磷酸酯,并且O是磷酸二酯。

[1101] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0X0X0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1102] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:X0X0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1103] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0X0X0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1104] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0X0X0X0,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1105] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0X0X0,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1106] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0X0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1107] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XX0X0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1108] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XX0X0X0,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1109] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XX0X0,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1110] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:XX0X,其中X是硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1111] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:000000,其中0是磷酸二酯。

[1112] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:00000,其中0是磷酸二酯。

[1113] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0000,其中0是磷酸二酯。

[1114] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:S0S0S0,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1115] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:S0S0S0S,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1116] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:0S0S0S,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1117] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域包含呈Sp构型的硫代磷酸酯。

[1118] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中所述种子区域包含呈Sp构型的硫代磷酸酯和磷酸二酯。

[1119] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:S0S0S,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且0是磷酸二酯。

[1120] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式

包括:SOSSSS,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且O是磷酸二酯。

[1121] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:SOSSS,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且O是磷酸二酯。

[1122] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括:SOSS,其中S是呈Sp构型的硫代磷酸酯,并且O是磷酸二酯。

[1123] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括图1所示的第一单链RNAi格式的种子区域中核苷酸间键联样式;并且核苷酸的2'修饰样式包括图1所示的第二单链RNAi格式的种子区域中的核苷酸的2'修饰样式。

[1124] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含种子区域,其中核苷酸间键联样式包括图1所示的第一单链RNAi格式的种子区域中核苷酸间键联样式;并且核苷酸的2'修饰样式包括图1所示的第一单链RNAi格式的种子区域中的核苷酸的2'修饰样式。

[1125] 包括单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸的种子后区域

[1126] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何种子后区域或者其部分或结构元件。

[1127] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少1个2'-F修饰的核苷酸序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少2至20个2'-F修饰的核苷酸序列。

[1128] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少1个2'-OMe修饰的核苷酸序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少2至20个2'-OMe修饰的核苷酸序列。

[1129] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含总计至少1个2'-OMe和/或2'-F修饰的核苷酸序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含总计至少2至20个2'-OMe和/或2'-F修饰的核苷酸序列。

[1130] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:具有2'-F和2'-OMe或2'-OMe和2'-F修饰的至少2至10个连续的核苷酸对。

[1131] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施

方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括fmfmfmfmfm。

[1132] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含交替的2'-修饰样式,其中所述样式包括mfmf、mfmfmf、mfmfmfmf、mfmfmfmfmf、mfmfmfmfmf、mfmfmfmfmfmf、mfmfmfmfmfmfmf、mfmfmfmfmfmfmfmf、mfmfmfmfmfmfmfmfmf,其中m是2'-OMe,并且f是2'-F。

[1133] 在一些实施方案中,种子区域中的每个核苷酸是2'-OMe。

[1134] 在一些实施方案中,种子区域中的每个核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的每个核苷酸是2'-OMe。

[1135] 在一些实施方案中,种子区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1136] 在一些实施方案中,种子区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1137] 在一些实施方案中,在位置2处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且种子后区域中的一个核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1138] 在一些实施方案中,在位置2处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe,并且位置14处(从5'-末端开始计数)的核苷酸是2'-F,而种子后区域中的每个其他核苷酸是2'-OMe。

[1139] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开建议,在至少一些情况下,减少2'-F核苷酸的数目(例如,用2'-OMe、2'-脱氧或任何其他不是2'-F的核苷酸替代它们)可以允许体外效能,并允许或增加稳定性,同时减少与2'-F相关的潜在毒性。

[1140] 在一些实施方案中,种子后区域包含至少1、2、3、4、5 6、7、8或9个硫代磷酸酯和/或至少1、2、3、4、5 6、7、8或9个磷酸二酯核苷酸间键联。

[1141] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含一组或多组连续的硫代磷酸酯和/或一组或多组连续的磷酸二酯。

[1142] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种修饰样式的一定范围的糖:mfmfmfmfmfm、mfmfmfmfmfm、mfmfmfmfm、mfmfmfm、mfmfm、mfm、fmfmfmfmfmfm、fmfmfmfmfm、fmfmfmfm、fmfmfm和fmfm,其中m是2'-OMe,并且f是2'-F。

[1143] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种修饰样式的一定范围的糖:dddfdfdfdfdfd、dddfdfdfdfd、dddfdfdfd、dddfdfd和dddfd,其中d是2'-脱氧,并且f是2'-F。

[1144] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种修饰样式的一定范围的糖:dfdfdfdfdfdfd、fdfdfdfdfdfd和fdfdfdfdfd。

[1145] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种修饰样式的一定范围的糖:fdfdfdfd、fdfdfd和fdfd。

[1146] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XOXOX OXOOOO、OXOXOXOOOO、XOXOXOXOOO、XOXOXOXOO、XOXOXOOOO、OXOXOXOO、XOXOXOOO、OXOXOOOO、OX OXOOO和XOXOOO,其中O是磷酸二酯,并且X是立体无规的硫代磷酸酯。

[1147] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有OOOOOOO样式的一定范围的核苷酸间键联。

[1148] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OOOOOO、OOOOO、OOOO和OOO。

[1149] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OOOOO OOOXXXXXX、OOOOOOOOXXXXX、OOOOOOOXXXX、OO OOOOOOXXX、OOOOOOOXX、OOOOOOOX、OOOOOOX XXXXX、OOOOOXXXXXX、OOOOXXXXXX、OOOXXXXXX、OOXXXXXX、OXXXXXX、OOOOOOX、OOOOOX、OOOOX和OOOX。

[1150] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OOOOO OOXXXXX、OOOOOOOXXXX、OOOOOOOXXX、OOOOOOXX XXX、OOOOOOXXXX、OOOOOXXXXX、OOOOOXXXX、OOO OOXXX、OOOOXXXX、OOOOXXX、OOOXXXXX、OOOXXXX和OOOXXX。

[1151] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含至少一个手性核苷酸间键联。在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含至少一个手性控制的核苷酸间键联。在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含至少一个手性控制的核苷酸间键联,其是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含至少一个手性控制的核苷酸间键联,其是呈Sp构型的硫代磷酸酯。在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含至少一个手性控制的核苷酸间键联,其是呈Rp构型的硫代磷酸酯。

[1152] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OSSSO SSSSSSSSSS、OSSSOSSSSSSSSS、OSSSOSSSSSSSS、OSSSOSSSS SSS、OSSSOSSSSSS、OSSSOSSSSS、OSSSOSSSS、OSSSOSSS、OSSSOSS、OSSSOS和OSSSO,其中O是磷酸二酯,并且S是呈Sp构型的硫代磷酸酯。

[1153] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OSOSO SOSSSSSSSS、OSOSOSOSSSSSSS、OSOSOSOSSSSSS、OSOSOSO SSSSS、OSOSOSOSSSS、OSOSOSOSSS和OSOSOSOSS。

[1154] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:SOSOS OSSSSSSSS、OSOSOSSSSSSSS、SOSOSSSSSSSS、OSOSSSSSSS S、SOSSSSSSSS和OSSSSSSSS。

[1155] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:SOSOS OSSSSSSSS、SOSOSOSSSSSSS、SOSOSOSSSSSS、SOSOSOSSSS S、SOSOSOSSSS、SOSOSOSSS、SSSSSSSS、SSSSSSS、SSSSS S、SSSSS、SSSS、SSS和SS。

[1156] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OSSSSSO、OSSSSS、OSSSS、SSSSSO、SSSSO和SSSO。

[1157] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:SOSOS OSOSOOOOOOS、SOSOSOSOSOOOOOO、SOSOSOSOSOOOO O、SOSOSOSOSOOOO、SOSOSOSOSOOO和SOSOSOSOSOO。

[1158] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OSOSO SOSOOOOOOS、SOSOSOSOOOOOOS、OSOSOSOOOOOOS、SOS OSOOOOOOS、OSOSOOOOOOS、SOSOOOOOOS和OSOOOOOO S。

[1159] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XOOOX OOXXXXX、XOOOXOOXXXX、XOOOXOOXXX、XOOOXOOX X、XOOOXOOX、XOOOXOO、OOOXOOXXXXX、OOXOOXXXXX、OXOOXXXXX、XOOXXXXX和OOXXXXX。

[1160] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XOXOX OXXXXXX、XOXOXOXXXXX、XOXOXOXXXX、XOXOXOXX X、XOXOXOXX、XOXOXOX、OXOXOXXXXXX、XOXOXXXXXX、OXOXXXXXX、XOXXXXXX和OXXXXXX。

[1161] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XXXOO OXOXOXXX、XXXOOOXOXOXX、XXXOOOXOXOX、XXXOO OXOXO、XXXOOOXOX、XXXOOOXO、XXOOOXOXOXXX、XOOOXOXOXXX、OOOXOXOXXX、OOXOXOXXX、OXOXOXX X、XOXOXXX、XXOOOXOXOXX、XXOOOXOXOX、XOOOXO XOXX和XOOOXOXOX。

[1162] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XOOOX OXO、XOOOXOX、XOOOXO、OOOXOXO、OOOXOX和OOOX O。

[1163] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:XOXOO OXOXOXXX、XOXOOOXOXOXX、XOXOOOXOXOX、XOXOO OXOXO、XOXOOOXOX、XOXOOOXO、XOXOOOX、OXOOOX OXOXXX、XOOOXOXOXXX、OOOXOXOXXX、OOXOXOXX X、OXOXOXXX、OXOOOXOXOXX、OXOOOXOXOX、XOOOX OXOXX和XOOOXOXOX。

[1164] 在一些实施方案中,单链RNAi剂包含种子后区域,所述种子后区域包含具有以下任一种样式的一定范围的核苷酸间键联:OOOOOS、OOOOSO、OOOSOO、OOSOOO、OOSOOOO、OSOOO OO和SOOOOOO。

[1165] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火的种子区域;和(b)包含2'-脱氧区域的种子后区域,其中所述杂交寡核苷酸能够同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中所述2'-脱氧区域包含至少5个连续的2'-脱氧。在一些实施方案中,2'-脱氧可以是DNA或修饰的核苷酸,例如具有2'-脱氧的修饰的核苷酸,其中所述DNA或修饰的核苷酸包含天然糖和/或天然碱基,和/或修饰的碱基和/或任何核苷酸间键联。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个核苷酸的连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1166] 作为单链RNAi剂中的种子后区域的非限制性实例:格式2、7、8、9、12和13(其每个包含一组6个连续的磷酸二酯;和一组6个连续的二硫代磷酸酯),格式3(6个连续的二硫代

磷酸酯),格式4、5和6,格式10和11;以及本文公开的各种其他单链RNAi剂。

[1167] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域在最3'位置处包含错配。

[1168] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂可在以下一个或多个处包含错配:5'位置、3'-末端二核苷酸中的一个或两个、以及位于种子区域与3'-末端区域之间的区域的最3'位置。

[1169] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何种子后区域或者其部分或结构元件。

[1170] 包括单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸的3'-末端区域

[1171] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何3'-末端区域。

[1172] 在一些实施方案中,寡核苷酸的3'-末端区域使得PNPLA3寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[1173] 在一些实施方案中,RNAi剂的3'-末端区域使得RNAi剂能够以序列特异性方式指导特异性靶转录物的RNA干扰。

[1174] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何3'-末端区域和/或3'-末端二核苷酸和/或3'-末端帽。在一些实施方案中,3'-末端区域可以包含GalNAc部分。在一些实施方案中,GalNAc部分是如本文所述或本领域已知的任何GalNAc或其变体、衍生物或修饰。

[1175] 在一些实施方案中,3'-末端区域和/或3'-末端二核苷酸和/或3'-末端帽执行两个功能:(a)降低寡核苷酸对核酸外切酶和/或核酸内切酶的敏感性;和(b)允许寡核苷酸的功能,其中所述功能是指导RNA干扰、指导RNA酶H介导的敲低或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低。

[1176] 因此,单链RNAi剂的3'-末端区域可以包含3'-末端二核苷酸和/或3'-末端帽。

[1177] 据报道,在哺乳动物细胞中,Dicer将双链RNA(dsRNA)加工成19-23个碱基对的siRNA,其包含一个双链区域,每条链终止于长度可以是1到4nt的单链3'突出端,但通常是3'-末端二核苷酸。Bernstein等2001Nature 409:363;Elbashir等2001Nature 411:494-498;Elbashir等2001EMBO J.20:6877。据报道,两个二核苷酸突出端不会有助于靶标特异性。然而,据报道它们确实有助于保护siRNA的末端免受核酸酶降解,并且有时还可以改善活性。Elbashir等2001Nature 411:494-498;Elbashir等2001EMBO J.20:6877-6888;以及

Kraynack等2006RNA 12:163-176。因此,据报道,对于3'-末端二核苷酸的功能性双链RNAi剂没有必要包含与靶基因序列互补的序列。

[1178] 据报道,在人工双链RNAi剂中,实验性地将3'单链二核苷酸突出端替代为各种部分,包括其他单链二核苷酸、核苷酸和3'-末端帽。据报道,一个21聚体的3'-末端二核苷酸经常被人工二核苷酸替代,例如UU、TT、dTdT、sdT、dTsdT、sdTsdT或sdTdT。据报道,用脱氧核糖核苷酸替代siRNA的每个末端上的多达四个核苷酸的耐受性良好,而用脱氧核糖核苷酸完全取代导致没有RNAi活性。国际PCT公布号WO 00/44914以及Beach等国际PCT公布号WO 01/68836初步报道,siRNA可以包括对磷酸糖主链或核苷的修饰,以包括氮或硫杂原子中的至少一个。Kreutzer等加拿大专利申请号2,359,180也报道,某些化学修饰用于dsRNA构建体以便抵消双链RNA依赖性蛋白激酶PKR的激活,特别是2'-氨基或2-O-甲基核苷酸以及含有2'-O或4'-C亚甲基桥的核苷酸。另外的3'-末端核苷酸突出端包括dT(脱氧胸苷),2'-O、4'-C-亚乙基胸苷(eT)和2-羟乙基磷酸酯(hp)。其他人工3'突出端(3'-末端二核苷酸)包括序列AA、CC、GG和UG的二核苷酸。Elbashir等2001EMBO J.20:6877-6888。在一些实施方案中,据报道3'-末端二核苷酸是AA。

[1179] 或者,据报道,在双链RNAi剂中,3'-末端二核苷酸中的一个或两个都可以缺失(而不是替代),留下包含两条19-nt链的功能性siRNA,形成19bp平末端双链体。据报道,在双链RNAi剂中缺失而不是替代3'-末端二核苷酸使链的末端易受核酸酶的破坏;为了弥补这一点,可以添加人工3'-末端帽。据报道,3'-末端帽是非核苷酸的;它们不是核苷酸,因为它们不包含核苷酸的所有成分(磷酸酯、糖和碱基)。据报道,有时双链RNAi剂中的二核苷酸突出端可以在功能上被3'-末端帽替代,留下具有一个或两个3'-末端帽的平末端19-bp双链体,其可以保护分子免受核酸酶的破坏。一般而言,据报道3'-末端帽不能阻止RNAi剂介导的RNA干扰;许多3'-末端帽也具有添加的优势,诸如增加的RNAi活性和/或对核酸酶的稳定性。

[1180] 不希望受任何特定理论的束缚,本申请指出,据报道,在至少一些情况下,推理出先前描述的3'-末端帽与PAZ结构域相互作用。在一些实施方案中,据报道,3'-末端帽是PAZ配体。WO 2015/051366据报道,Dicer是RNA酶III酶,并且由六个可识别结构域组成。据报道,在N-末端或附近是约550aa的DExH盒RNA解旋酶结构域,紧随其后的是称为DUF283的保守的约100aa的结构域;仅DUF283结构域的C末端是PAZ(对于Piwi/Argonaute/Zwille)结构域,其识别单链二核苷酸突出端。Myers等2005.in RNA interference Technology,Appasani编,Cambridge University Press,Cambridge UK,第29-54页;Bernstein等2001Nature 409:363-366;以及Schauer等2002Trends Plant Sci.7:487-491;Lingel等2003Nature 426:465-469;Song等2003Nature Struct.Biol.10:1026-1032;Yan等2003Nature 426:468-474;Lingel等2004Nature Struct.Mol.Biol.1 1:576-577;Ma等2004Nature 429:318-322。据报道,Dicer中的PAZ结构域还可以结合RNA来定位催化结构域以进行切割。Zhang等2004Cell 1 18:57-68。在一些实施方案中,3'-末端帽是与PAZ结构域相互作用的PAZ配体。

[1181] 在一些实施方案中,3'-末端帽可以允许两种功能:(1)允许RNA干扰;和(2)增加RNAi剂的活性持续时间和/或生物学半衰期,这可以例如通过增加与Dicer的PAZ结构域的结合来实现,和/或减少或防止RNAi剂的降解(例如,通过核酸酶,诸如血清或肠液中的那些

核酸酶)。

[1182] 表1A中列出的寡核苷酸中描述了各种3'-末端二核苷酸。

[1183] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸。倒数第二个核苷酸是2'-OMe,并且5'核苷酸是2'-OMe。

[1184] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧,并且5'核苷酸是2'-OMe。本文公开的具有这种结构的单链RNAi剂的非限制性实例包括:格式10、11、13和14,图1;以及本文公开的各种其他单链RNAi剂。

[1185] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧,并且5'核苷酸是2'-OMe,并且其中倒数第二个核苷酸包含接头。

[1186] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且其中倒数第二个核苷酸包含接头。

[1187] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧,并且5'核苷酸是2'-OMe,并且其中倒数第二个核苷酸包含与附加的化学部分缀合的接头。

[1188] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧T,并且5'核苷酸是2'-OMe U,并且其中倒数第二个核苷酸包含与附加的化学部分缀合的接头。

[1189] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且其中倒数第二个核苷酸包含与附加的化学部分缀合的接头,所述附加的化学部分选自:靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮和GalNAc部分。

[1190] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧,而5'核苷酸是2'-OMe,并且其中倒数第二个核苷酸包含与附加的化学部分缀合的接头,所述附加的化学部分选自:靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮和GalNAc部分。

[1191] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含一对3'-末端核苷酸,并且倒数第二个核苷酸是2'-脱氧T,而5'核苷酸是2'-OMe U,并且其中倒数第二个核苷酸包含与附加的化学部分缀合的接头,所述附加的化学部分选自:靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮和GalNAc部分。

[1192] 在一些实施方案中,3'-末端区域或3'-末端帽包含GN3或如以下中所述的任何其他合适的RNAi剂3'-末端区域化合物:例如Allerson等2005J.Med.Chem.48:901-04;Lima等2012Cell 150:883-894;Prakash等2015Nucl.Acids Res.43:2993-3011;和/或Prakash等2016Bioorg.Med.Chem.Lett.26:26:2817-2820。

[1193] 文献中描述了各种3'-末端帽。

[1194] 通常,将3'-末端帽连接到3'-末端核苷酸间键联。3'-末端核苷酸间键联可选自:磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和本文所述的任何核苷酸间键联。

[1195] 所提供的单链RNAi剂的3'-末端帽可以选自例如本文所述的任何3'-末端帽。

[1196] 在一些实施方案中,3'-末端帽选自:2',3'-换装磷酸酯、C3(或C6、C7、C12)氨基接头、硫醇接头、羧基接头、非核苷酸间隔基(C3、C6、C9、C12、无碱基、三甘醇、六甘醇)、生物素和荧光素。

[1197] 在一些实施方案中,3'-末端帽选自WO 2015/051366中所述的任何3'-末端帽,包括但不限于C3、氨基C3、C6、C8、C10和C12。在一些实施方案中,3'-末端帽选自:三甘醇、环己基、苯基、BP(联苯)、金刚烷和石胆酸(或石胆),如美国专利号8,097,716;8,084,600;8,344,128;8,404,831;和8,404,832中所述。

[1198] 例如,适用于所提供的RNAi剂的各种功能性3'-末端帽描述于,例如,EP 1520022 B1;美国专利号8,097,716、8,084,600;8,404,831;8,404,832和8,344,128;以及WO 2015/051366中。

[1199] 另外,本公开指出,本文公开了在单链RNAi剂中起作用的各种5'-末端结构和3'-末端区域及其组合。然而,值得注意的是,相反,许多5'-末端结构和3'-末端帽及其组合先前已被报道降低或消除了各种双链RNAi剂的RNA干扰能力。参见例如,Czauderna等2003Nucl.Acids Res.31:2705-2716;Hadwiger等2005,第194-206页,in RNA interference Technology,K.Appasani编,Cambridge University Press,Cambridge,UK;Deleavey等2009Curr.Prot.Nucl.Acid Chem.16.3.1 -16.3.22;Terrazas等2009Nucleic Acids Res.37:346-353;Harboth等2003Antisense Nucl.Acid Drug Dev 13:83-105;Song等2003Nature Med.9:347-351;美国专利号5,998,203;Lipardi等2001Cell 107:299-307;Schwarz等2002Mol.Cell 10:537-548;以及WO 2015/051366。

[1200] 双环缩酮,PNPLA3寡核苷酸的另外的任选的结构元件

[1201] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸,能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的PNPLA3寡核苷酸,可以包含本文所述或本领域已知的任何结构元件或其样式。

[1202] 双环缩酮,与PNPLA3寡核苷酸缀合的任选的附加的化学部分

[1203] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸可以包含本文所述或本领域已知的任何任选的附加的化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮、GalNAc部分等。

[1204] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸,所提供的能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的PNPLA3寡核苷酸,可以包含本文所述或本领域已知的任何任选的附加的化学部分,包括但不限于靶向部分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮、GalNAc部分等。

[1205] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸,可以包含本文所述或本领域已知的任何任选的附加的化学部分,包括但不限于靶向部

分、脂质部分、碳水化合物部分、双环缩酮、GalNAc部分等。

[1206] 在一些实施方案中,附加的化学部分与单链RNAi剂缀合。

[1207] 与PNPLA3寡核苷酸缀合的任选的附加的化学部分靶向部分

[1208] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物还包含靶向部分(例如,靶向化合物、药剂、配体或组分)。靶向部分可以与脂质或PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合,或者不与脂质或寡核苷酸或单链RNAi剂缀合。在一些实施方案中,靶向部分与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂与脂质和靶向部分二者缀合。如本文所述,在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是所提供的寡核苷酸。因此,在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物除脂质和寡核苷酸之外还包含靶元件。可以根据本公开使用各种靶向部分,例如脂质、抗体、肽、碳水化合物等。

[1209] 可以根据本公开通过多种类型的方法将靶向部分掺入所提供的技术中。在一些实施方案中,将靶向部分与所提供的寡核苷酸物理混合以形成所提供的组合物。在一些实施方案中,靶向部分与寡核苷酸化学缀合。

[1210] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含两个或更多个靶向部分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含两个或更多个缀合的靶向部分。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是相同的。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是不同的。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含不超过一个靶组分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含不同类型的缀合的靶向部分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含相同类型的靶向部分。

[1211] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含两个或更多个靶向部分。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含两个或更多个缀合的靶向部分。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是相同的。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是不同的。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含不超过一个靶组分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含不同类型的缀合的靶向部分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含相同类型的靶向部分。

[1212] 靶向部分可以任选地通过接头与寡核苷酸缀合。可以根据本公开使用本领域中各种类型的接头。在一些实施方案中,接头包含磷酸酯基团,其可以例如用于通过与寡核苷酸合成中所使用的化学过程类似的化学过程来缀合靶向部分。在一些实施方案中,接头包含酰胺、酯或醚基。在一些实施方案中,接头具有-L-的结构。与脂质相比,靶向部分可以通过相同或不同的接头缀合。

[1213] 靶向部分,任选地通过接头,可以在各种合适的位置与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过5'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过3'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个糖部分缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个碱基缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个核苷酸间键联掺入。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可以含有多个缀合的靶向部分,其通过其5'-OH、3'-OH、糖部分、碱基部分和/或核苷酸间键联独立地缀合。靶向部分和脂质可以在相同、相邻和/或隔开的位置缀合。在一些实施方案中,靶向组分在PNPLA3寡核苷酸的一端缀合,而脂质在另一端缀合。

[1214] 在一些实施方案中,所提供的组合物还包含靶向组分或部分。靶向组分可以掺入(靶向部分)或不掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,靶向组分是脂质。在一些实施方案中,靶向组分是碳水化合物或双环缩酮。在一些实施方案中,靶向组分是如本公开中所述的-R^{LD}。在一些实施方案中,靶向组分是如本公开中所述的-R^{CD}。

[1215] 可以通过根据本公开的许多类型的方法,例如针对脂质和碳水化合物所述的那些方法,将靶向组分掺入所提供的技术中。在一些实施方案中,将靶向组分与所提供的寡核苷酸物理混合以形成所提供的组合物。在一些实施方案中,靶向组分与寡核苷酸部分化学缀合。

[1216] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含两个或更多个靶向组分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含两个或更多个缀合的靶向组分。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向组分是相同的。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向组分是不同的。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含不超过一个靶向组分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含不同类型的缀合的靶向组分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含相同类型的靶向组分。

[1217] 靶向组分可以任选地通过接头与寡核苷酸缀合,例如,如针对脂质和碳水化合物所述。可以根据本公开使用本领域中各种类型的接头。在一些实施方案中,接头包含磷酸酯基团,其可以例如用于通过与寡核苷酸合成中所使用的化学过程类似的化学过程来缀合靶向组分。在一些实施方案中,接头包含酰胺、酯或醚基。在一些实施方案中,接头具有-L-的结构。与脂质相比,靶向组分可以通过相同或不同的接头缀合。

[1218] 靶向组分,任选地通过接头,可以在各种合适的位置与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,靶向组分通过5'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向组分通过3'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向组分通过一个或多个糖部分缀合。在一些实施方案中,靶向组分通过一个或多个碱基缀合。在一些实施方案中,靶向组分通过一个或多个核苷酸间键联掺入。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可以含有多个缀合的靶向组分,其通过其5'-OH、3'-OH、糖部分、碱基部分和/或核苷酸间键联独立地缀合。靶向组分和脂质可以在相同、相邻和/或隔开的位置缀合。在一些实施方案中,靶向组分在PNPLA3寡核苷酸的一端缀合,而脂质在另一端缀合。

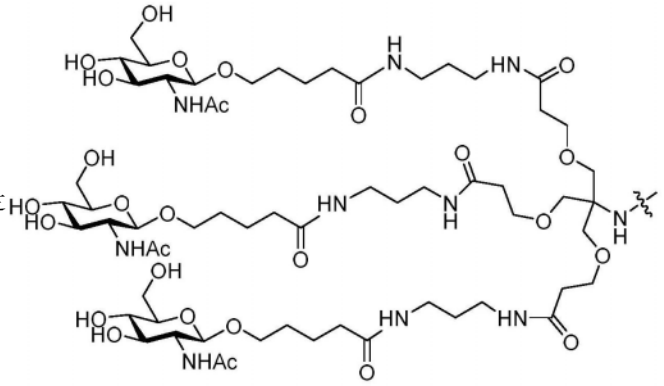
[1219] 在一些实施方案中,靶向组分与所靶向的细胞表面上的蛋白质相互作用。在一些实施方案中,这种相互作用促进内化到所靶向的细胞。在一些实施方案中,靶向组分包含糖部分。在一些实施方案中,靶向组分包含多肽部分。在一些实施方案中,靶向组分包含抗体。在一些实施方案中,靶向组分是抗体。在一些实施方案中,靶向组分包含抑制剂。在一些实施方案中,靶向组分是来自小分子抑制剂的部分。在一些实施方案中,抑制剂是所靶向的细胞表面上的蛋白质的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是在所靶向的细胞表面上表达的碳酸酐酶抑制剂。在一些实施方案中,碳酸酐酶是I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV或XVI。在一些实施方案中,碳酸酐酶是膜结合的。在一些实施方案中,碳酸酐酶是IV、IX、XII或XIV。在一些实施方案中,抑制剂是IV、IX、XII和/或XIV的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶III抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶IV抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶IX抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶XII抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂

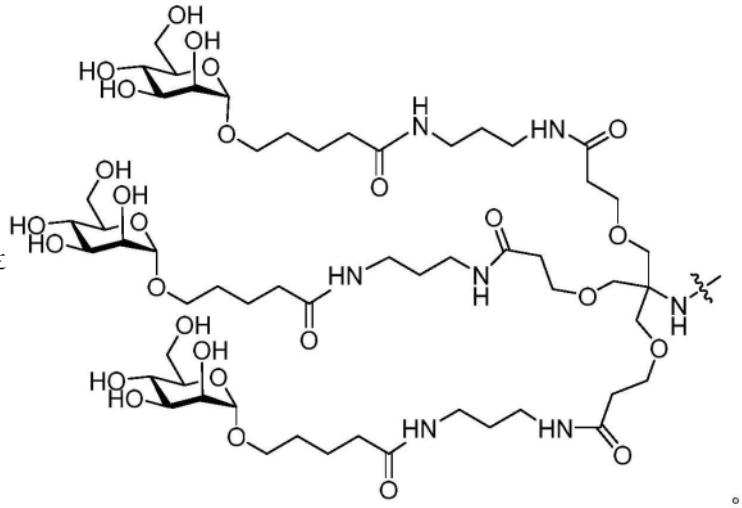
是碳酸酐酶XIV抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂包含或是磺酰胺(例如,Supuran,CT.Nature Rev Drug Discover 2008,7,168-181中所述的那些磺酰胺,所述磺酰胺以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,抑制剂是磺酰胺。在一些实施方案中,所靶向的细胞是肌细胞。

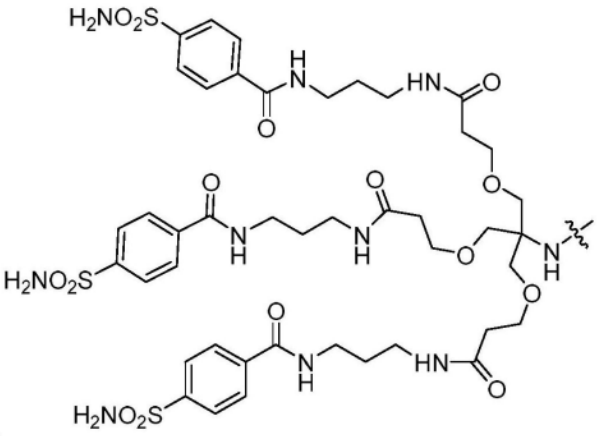
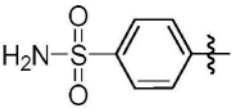
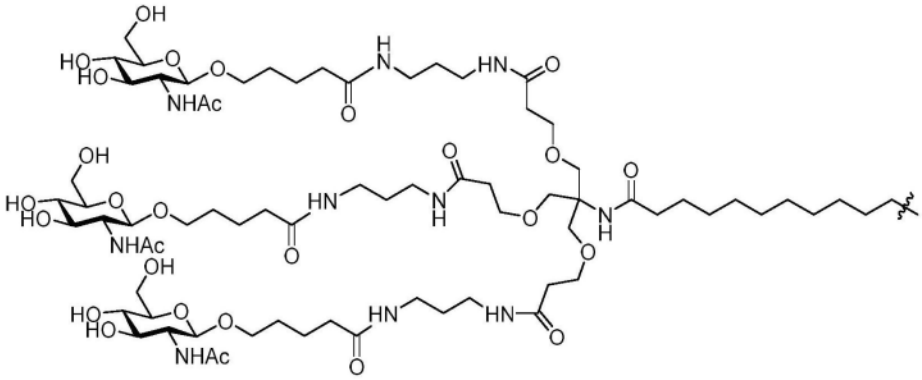
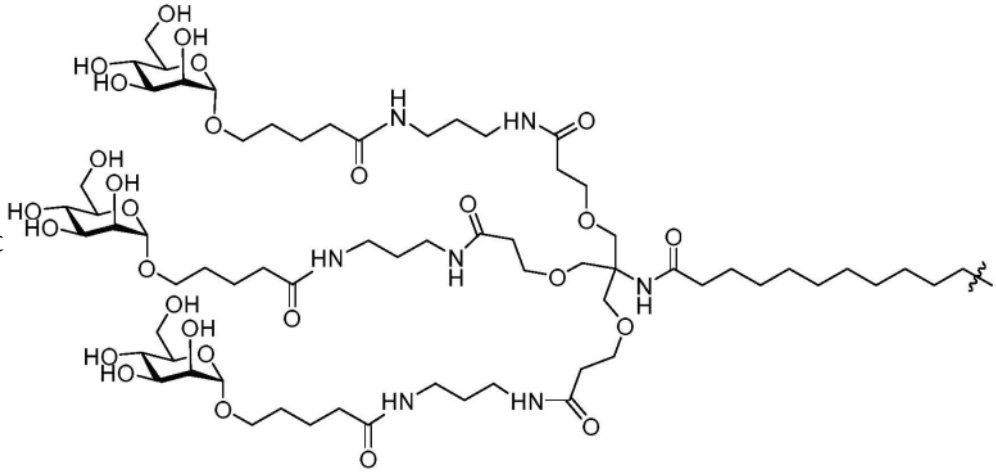
[1220] 在一些实施方案中,靶向组分是R^{TD},其中R^{TD}是如本公开所述的R^{LD}或R^{CD}。

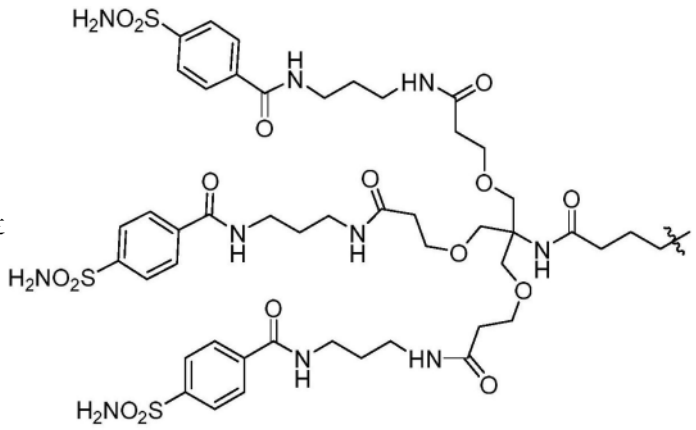
[1221] 在一些实施方案中,靶向组分是如本公开中所定义和描述的R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含R^{LD}的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。

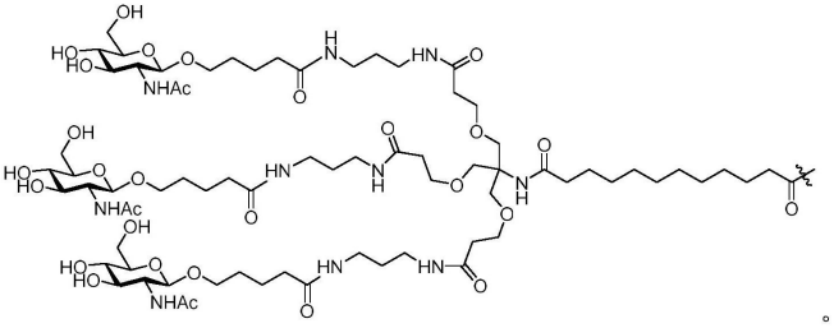
[1222] 在一些实施方案中,靶向组分是如本公开中所定义和描述的R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含R^{CD}的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。

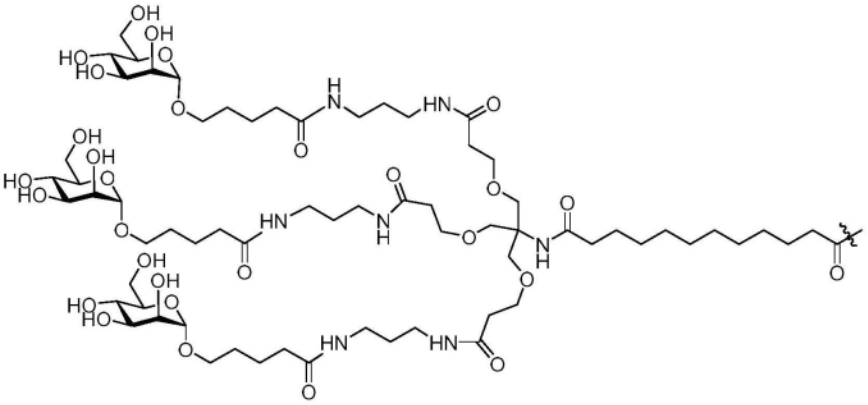
[1223] 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。

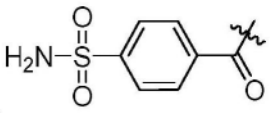
在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。在一

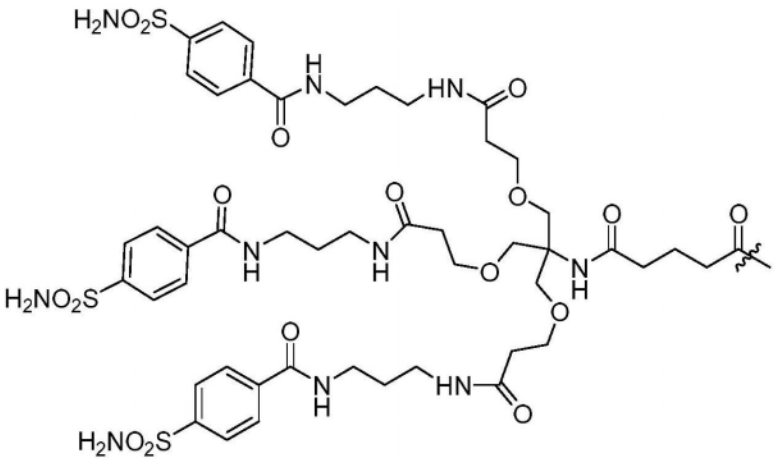
些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。在一

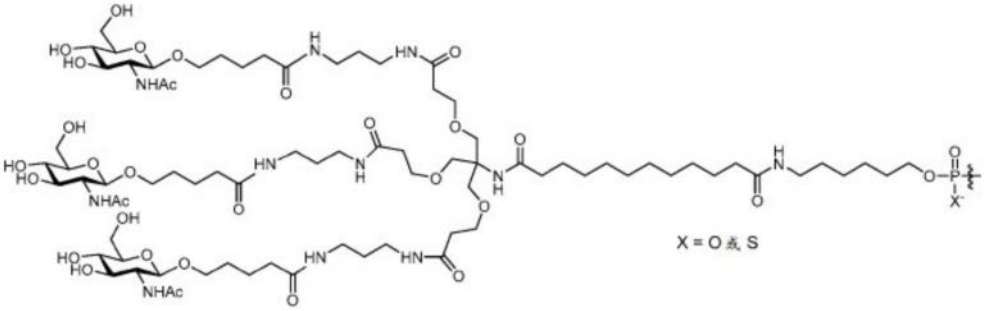
些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施

方案中,R^{TD}包含或是  在一些实

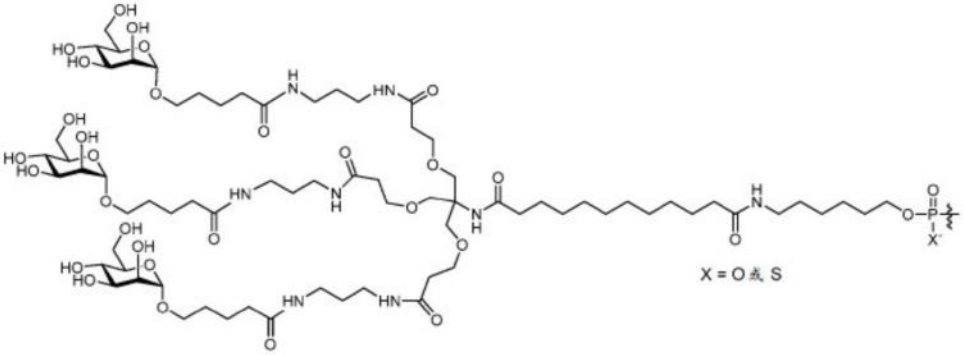
施方案中,R^{TD}包含或是  在

一些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是

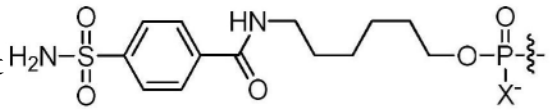
 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



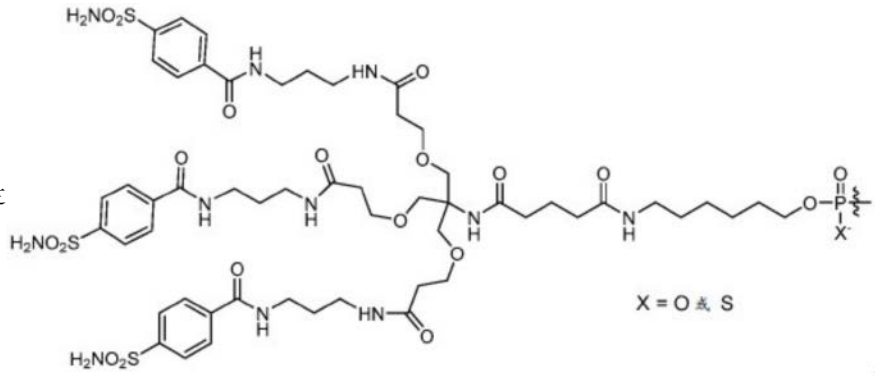
在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



。在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



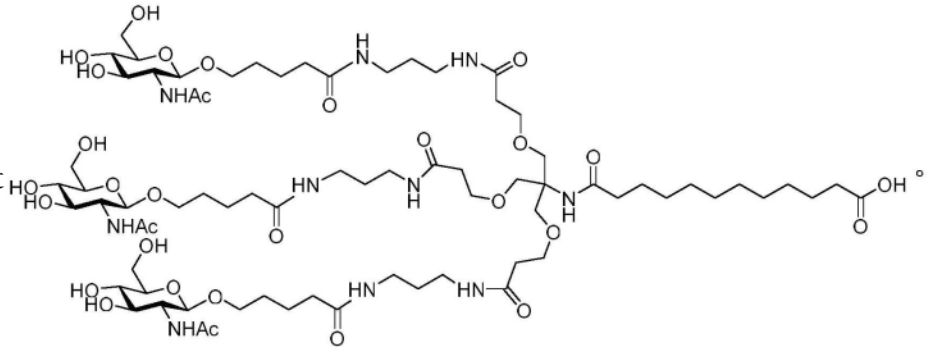
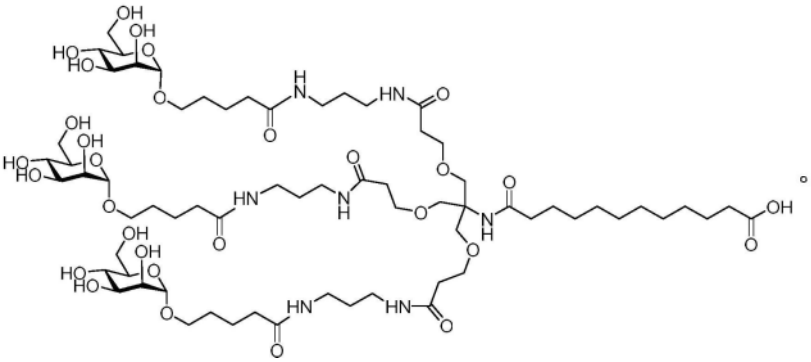
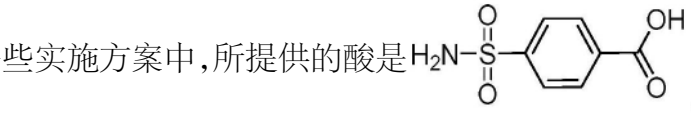
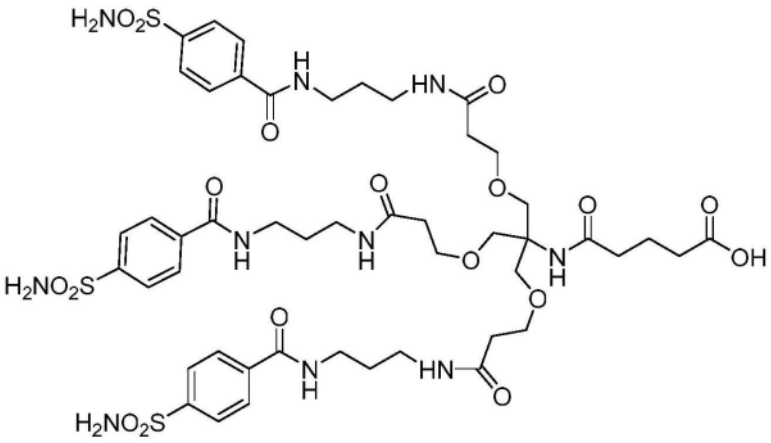
。在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



。

在一些实施方案中,R^{TD}是靶向组分,其包含或是脂质部分。在一些实施方案中,X是O。在一些实施方案中,X是S。

[1224] 在一些实施方案中,本公开提供了用于将各种部分与寡核苷酸部分缀合的技术(例如,试剂、方法等)。在一些实施方案中,本公开提供了用于将靶向组分与寡核苷酸部分缀合的技术。在一些实施方案中,本公开提供了包含用于缀合的靶向组分的酸,例如R^{LD}-COOH。在一些实施方案中,本公开提供了用于缀合的接头,例如L^{M}。本领域普通技术人员理解,根据本公开,许多已知和广泛实践的技术可用于与寡核苷酸部分的缀合。在一些实施方

案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是脂肪酸,其可以提供脂质部分作为靶向组分。在一些实施方案中,本公开提供了用于制备此类酸的方法和试剂。

[1225] 在一些实施方案中,靶向部分是脂质部分,例如胆固醇或其衍生物的部分(R^{TD}-H是任选取代的胆固醇或其衍生物)。

[1226] 在一些实施方案中,靶向部分是肽。在一些实施方案中,靶向部分是蛋白质或其结构域。在一些实施方案中,靶向部分是抗体或其部分。

[1227] 与PNPLA3寡核苷酸缀合的任选的附加的化学部分:脂质部分

[1228] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物还包含一个或多个脂质或脂质部分。在一些实施方案中,脂质是脂质部分。在一些实施方案中,脂质部分是或包含直接或间接与PNPLA3寡核苷酸缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质缀合可以实现一种或多种意料不到的大大改善的性质(例如,活性、毒性、分布、药代动力学等)。如本领域普通技

术人员所了解的,文献中描述了各种碳水化合物部分,并且可以根据本公开使用。

[1229] 脂质部分可以任选地通过一个或多个二价或多价接头(其可用于将两个或更多个碳水化合物部分连接到寡核苷酸)在各种位置处(例如糖单元、核苷酸间键联单元、核碱基单元等)掺入寡核苷酸中。在一些实施方案中,本公开提供了用于将脂质掺入寡核苷酸中的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于任选地通过一个或多个接头在核碱基单元处掺入(作为在核苷酸间键联和/或糖单元处掺入的替代和/或补充)脂质部分的技术,从而提供巨大的灵活性和/或改善的性质和/或活动。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含至少一个脂质部分,其任选地通过接头在核碱基单元处掺入寡核苷酸中。

[1230] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸具有以下结构:

[1231] A^{c}-[-L^{M}-(R^{D})$_{a}$]$_{b}$或[(A^{c})$_{a}$-L^{M}]$_{b}$-R^{D},

[1232] 其中:

[1233] A^{c}是PNPLA3寡核苷酸链([H]$_{b}$-A^{c}是PNPLA3寡核苷酸);

[1234] a是1-1000;

[1235] b是1-1000;

[1236] 每个L^{M}独立地是接头;并且

[1237] 每个R^{D}独立地是R^{LD}或R^{CD},

[1238] R^{CD}是选自以下的任选取代的直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_{2}$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_{2}$-、-S(O)$_{2}$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_{3}$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_{3}$]O-;并且一个或多个碳原子任选且独立地被Cy替代;

[1239] R^{LD}是选自C_{1-100}脂族基团的任选取代的直链或支链基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_{2}$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_{2}$-、-S(O)$_{2}$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_{3}$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_{3}$]O-;并且一个或多个碳原子任选且独立地被Cy替代;

[1240] L^{M}是共价键,或者选自以下的二价或多价的、任选取代的、直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_{2}$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_{2}$-、-S(O)$_{2}$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)

(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_3$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_3$]O-;并且一个或多个碳原子任选且独立地被Cy^L替代;

[1241] Cy^L是选自以下的任选取代的四价基团:C_{3-20}脂环族环,C_{6-20}芳基环,具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的5-20元杂芳基环,和具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基环;

[1242] 每个R'独立地是-R、-C(O)R、-C(O)OR或-S(O)$_2$R;并且

[1243] 每个R独立地是-H或选自以下的任选取代的基团:C_{1-30}脂族,具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的C_{1-30}杂脂族,C_{6-30}芳基,C_{6-30}芳基脂族,具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的C_{6-30}芳基杂脂族,具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的5-30元杂芳基,和具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的3-30元杂环基,或者

[1244] 两个R基团任选且独立地一起形成共价键,或者:

[1245] 同一原子上的两个或更多个R基团任选且独立地与所述原子一起形成任选取代的3-30元单环、双环或多环,其除了所述原子外,还具有0-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子;或者

[1246] 在两个或更多个原子上的两个或更多个R基团任选且独立地与它们的居间原子一起形成任选取代的3-30元单环、双环或多环,其除了所述居间原子之外,还具有0-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子。

[1247] 在一些实施方案中,R^{CD}是碳水化合物部分或双环缩酮。在一些实施方案中,R^{CD}包含至少一个单糖、二糖或多糖单元。在一些实施方案中,R^{CD}包含至少一个GalNAc部分或其衍生物。

[1248] 在一些实施方案中,R^{LD}是脂质部分。在一些实施方案中,R^{LD}包含一个或多个任选取代的C_{6-20}脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}包含一个或多个未取代的C_{6-20}脂族链。

[1249] 在一些实施方案中,至少一个L^M直接与所提供的寡核苷酸的糖单元结合。在一些实施方案中,L^M直接与糖单元结合,将脂质部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与糖单元结合,将碳水化合物部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与糖单元结合,将R^{LD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与糖单元结合,将R^{CD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。

[1250] 在一些实施方案中,至少一个L^M直接与所提供的寡核苷酸的核苷酸间键联单元结合。在一些实施方案中,L^M直接与核苷酸间键联单元结合,将脂质部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与核苷酸间键联单元结合,将碳水化合物部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与核苷酸间键联单元结合,将R^{LD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与核苷酸间键联单元结合,将R^{CD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。

[1251] 在一些实施方案中,至少一个L^M直接与所提供的寡核苷酸的核碱基单元结合。在一些实施方案中,L^M直接与核碱基单元结合,将脂质部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与核碱基单元结合,将碳水化合物部分掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案中,L^M直接与核碱基单元结合,将R^{LD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。在一些实施方案

中,L^M直接与核碱基单元结合,将R^{CD}基团掺入PNPLA3寡核苷酸中。

[1252] 在一些实施方案中,$[H]_b$-A^c是本公开所述的PNPLA3寡核苷酸。

[1253] 在一些实施方案中,将脂质掺入所提供的寡核苷酸中改善了分布和/或药代动力学。在一些实施方案中,将脂质掺入所提供的寡核苷酸中改善了选自以下的一种或多种药代动力学测量值:C_{max},施用后药物的峰值血浆浓度;t_{max},达到C_{max}的时间;C_{min},施用下一个剂量之前药物达到的最低(谷值)浓度;消除半衰期,药物浓度达到其初始值的一半所需的时间;消除速率常数,从体内清除药物的速率;曲线下面积,浓度-时间曲线的积分(单剂量之后或处于稳定状态);和清除率,单位时间内清除药物的血浆体积。不受任何特定理论的束缚,本公开指出,可以将药代动力学特征(诸如半衰期)的优化与最大化区分开。一般而言,在一些实施方案中,可能需要特定药物具有足够长的半衰期以允许其执行所需功能,但又足够短以使脱靶效应和其他毒性最小化。在一些实施方案中,优化的半衰期足够长以允许活性同时使毒性最小化;延长或最大化的半衰期可能是不需要的。

[1254] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物还包含一个或多个脂质。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物还包含一个或多个脂肪酸。在一些实施方案中,可以将脂质掺入所提供的组合物中的寡核苷酸中。在一些实施方案中,可以通过相同或不同的化学过程和/或位置将两个或更多个相同或不同的脂质掺入一个寡核苷酸中。

[1255] 根据本公开,许多脂质可以用于所提供的技术中。在一些实施方案中,脂质包含R^{LD}基团。在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{80}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是由碳和氢原子组成的烃基。在一些实施方案中,-Cy-是选自以下的任选取代的二价基团:C_{3-20}脂环族环,C_{6-20}芳基环,具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷和硅的杂原子的5-20元杂芳基环,和具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基环。

[1256] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是由碳和氢原子组成的烃基。

[1257] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{40}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团取代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-和-Cy-。在一些实施方案中,R^{LD}是由碳和氢原子组成的烃基。

[1258] R^{LD}的脂族基团可以具有各种合适的长度。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{80}。在一些

实施方案中,它是C_{10}-C_{75}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{70}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{65}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{60}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{50}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{40}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{35}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{30}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{25}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{24}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{23}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{21}。在一些实施方案中,它是C_{12}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{13}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{14}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{15}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{16}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{17}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{18}-C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{10}-C_{20}。在一些实施方案中,范围的下限是C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}或C_{18}。在一些实施方案中,范围的上限是C_{18}、C_{19}、C_{20}、C_{21}、C_{22}、C_{23}、C_{24}、C_{25}、C_{26}、C_{27}、C_{28}、C_{29}、C_{30}、C_{35}、C_{40}、C_{45}、C_{50}、C_{55}或C_{60}。在一些实施方案中,它是C_{10}。在一些实施方案中,它是C_{11}。在一些实施方案中,它是C_{12}。在一些实施方案中,它是C_{13}。在一些实施方案中,它是C_{14}。在一些实施方案中,它是C_{15}。在一些实施方案中,它是C_{16}。在一些实施方案中,它是C_{17}。在一些实施方案中,它是C_{18}。在一些实施方案中,它是C_{19}。在一些实施方案中,它是C_{20}。在一些实施方案中,它是C_{21}。在一些实施方案中,它是C_{22}。在一些实施方案中,它是C_{23}。在一些实施方案中,它是C_{24}。在一些实施方案中,它是C_{25}。在一些实施方案中,它是C_{30}。在一些实施方案中,它是C_{35}。在一些实施方案中,它是C_{40}。在一些实施方案中,它是C_{45}。在一些实施方案中,它是C_{50}。在一些实施方案中,它是C_{55}。在一些实施方案中,它是C_{60}。

[1259] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个R^{LD}基团。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个R^{LD}基团。

[1260] 在一些实施方案中,脂质任选地通过接头与生物活性剂缀合,作为包含R^{LD}基团的部分。在一些实施方案中,脂质任选地通过接头与生物活性剂缀合,作为包含不超过一个R^{LD}基团的部分。在一些实施方案中,脂质任选地通过接头与生物活性剂缀合,作为R^{LD}基团。在一些实施方案中,脂质任选地通过接头与生物活性剂缀合,作为包含两个或更多个R^{LD}基团的部分。

[1261] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{40}饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{40}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1262] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1263] 在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。

[1264] 在一些实施方案中,R^{LD}是未取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1265] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不

饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1266] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1267] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1268] 在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。

[1269] 在一些实施方案中,R^{LD}是未取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1270] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1271] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{80}饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{80}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1272] 在一些实施方案中,R^{LD}是任选取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1273] 在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-2}脂族基团取代。在一些实施方案中,R^{LD}是C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个甲基基团取代。

[1274] 在一些实施方案中,R^{LD}是未取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

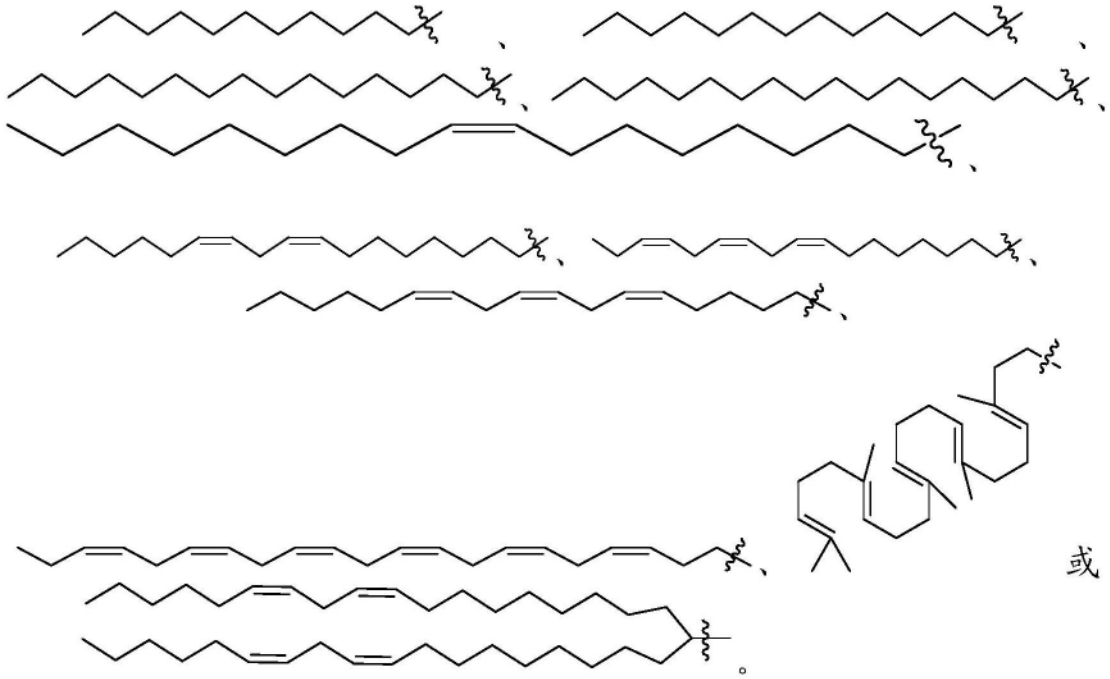
[1275] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1276] 在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{10}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{10}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{11}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{11}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是

或包含C_{12}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{12}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{13}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{13}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{14}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{14}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{15}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{15}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{16}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{16}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{17}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{17}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{18}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{18}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{19}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{19}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{20}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{20}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{21}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{21}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{22}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{22}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{23}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{23}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{24}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{24}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{25}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{25}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{26}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{26}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{27}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{27}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{28}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{28}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{29}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{29}部分不饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{30}饱和的直链脂族链。在一些实施方案中,R^{LD}是或包含C_{30}部分不饱和的直链脂族链。

[1277] 在一些实施方案中,R^{LD}衍生自胆固醇或其衍生物,例如,R^{LD}-H是任选取代的胆固醇或其衍生物。

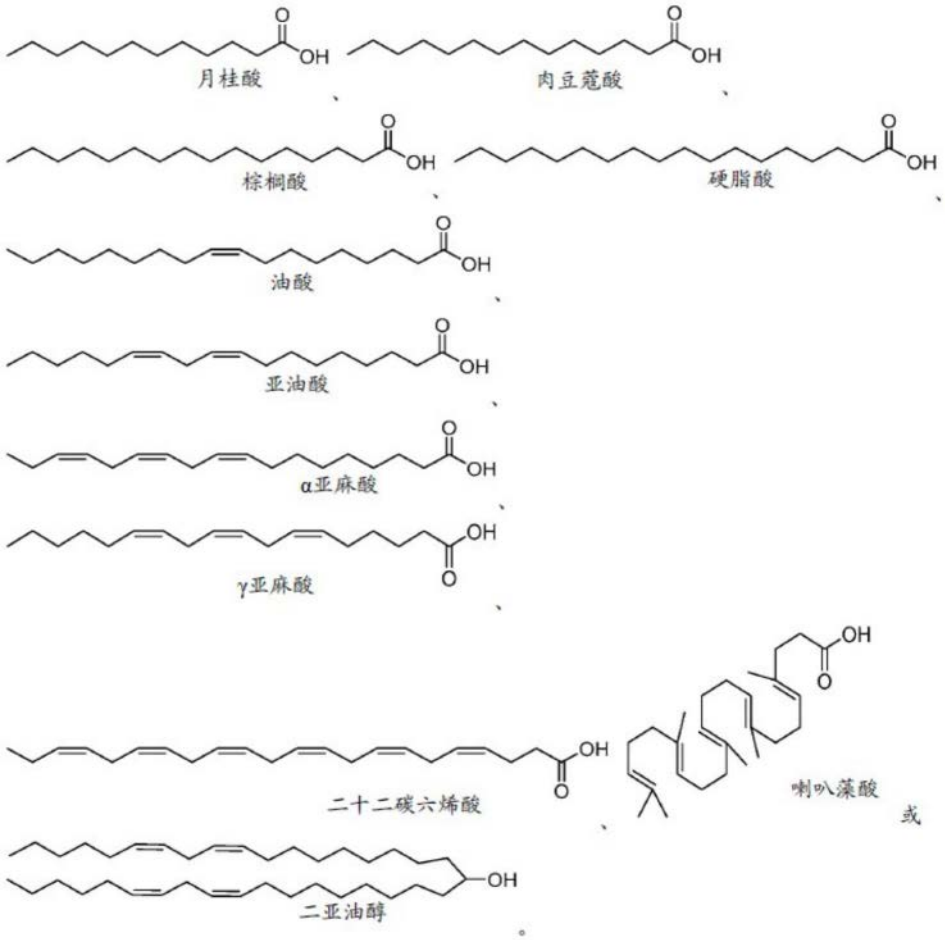
[1278] 在一些实施方案中,脂质具有R^{LD}-OH的结构。在一些实施方案中,脂质具有R^{LD}-C(O)OH的结构。在一些实施方案中,R^{LD}是

[1279] 

或

[1280] 在一些实施方案中,脂质是月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(DHA或顺式-DHA)、喇叭藻酸(turbinaric acid)、花生四烯酸和二亚油酸。在一些实施方案中,脂质是月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(DHA或顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。在一些实施方案中,脂质具有以下结构:

[1281]



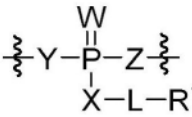
[1282] 在一些实施方案中,脂质是以下任一种、包含以下任一种或由以下任一种组成:至少部分疏水或两亲的分子、磷脂、甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯、脂溶性维生素、固醇、脂肪和蜡。在一些实施方案中,脂质是以下任一种:脂肪酸、甘油脂质、甘油磷脂、鞘脂、固醇脂质、孕烯醇酮脂质(prenol lipid)、糖脂、聚酮化合物和其他分子。

[1283] 可以根据本公开通过多种类型的方法将脂质掺入所提供的技术中。在一些实施方案中,将脂质与所提供的寡核苷酸物理混合以形成所提供的组合物。在一些实施方案中,脂质与寡核苷酸部分化学缀合。

[1284] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含两个或更多个脂质。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含两个或更多个缀合的脂质。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的脂质是相同的。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的脂质是不同的。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含不超过一个脂质。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含不同类型的缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含相同类型的脂质。

[1285] 脂质可以任选地通过接头与寡核苷酸缀合。可以根据本公开使用本领域中各种类型的接头。在一些实施方案中,接头是如本公开所述的L^M。在一些实施方案中,接头包含磷酸酯基团,其可以例如用于通过与寡核苷酸合成中所使用的化学过程类似的化学过程来缀合脂质。在一些实施方案中,接头包含酰胺、酯或醚基。

[1286] 在一些实施方案中,接头具有-L^M-的结构。在一些实施方案中,L^M是L^D。在一些实施

方案中,L^D是具有  的结构的T^D,其中每个变量独立地如所定义和描述。在一些实施方案中,T^D具有式I的结构。在一些实施方案中,具有PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-的T^D形成硫代磷酸酯键联(-OP(O)(S$^-$)O-)。在一些实施方案中,具有PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-的T^D形成Sp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,具有PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-的T^D形成Rp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,具有PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-的T^D形成磷酸酯键联(-OP(O)(O$^-$)O-)。在一些实施方案中,具有PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-的T^D形成二硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,L^D是-L-T^D-。在一些实施方案中,Y连接到-L-,并且-Z-是共价键,这样使得P直接连接到寡核苷酸部分的羟基。在一些实施方案中,P连接到5'-末端羟基(5'-O-)以形成磷酸酯基团(天然磷酸酯键联)或硫代磷酸酯基团(硫代磷酸酯键联)。在一些实施方案中,硫代磷酸酯键联是手性控制的并且可以是Rp或Sp。除非另外指明,否则接头中的手性中心(例如,T^D中的P)可以是立体无规的或手性控制的,并且它们不被认为是例如用于确定组合物是否是手性控制的主链手性中心的一部分。在一些实施方案中,L^D是-NH-$(CH_2)_6$-T^D-。在一些实施方案中,L^D是-C(O)-NH-$(CH_2)_6$-T^D-。

[1287] 在一些实施方案中,接头具有-L-的结构。在一些实施方案中,在与寡核苷酸缀合后,脂质形成具有-L-R^{LD}结构的部分,其中L和R^{LD}中的每个独立地如本文所定义和描述。

[1288] 在一些实施方案中,-L-包含二价脂族链。在一些实施方案中,-L-包含磷酸酯基团。在一些实施方案中,-L-包含硫代磷酸酯基团。在一些实施方案中,-L-具有结构-C(O)NH-$(CH_2)_6$-OP(=O)(S$^-$)-。在一些实施方案中,-L-具有结构-C(O)NH-$(CH_2)_6$-OP(=O)(O$^-$)-。

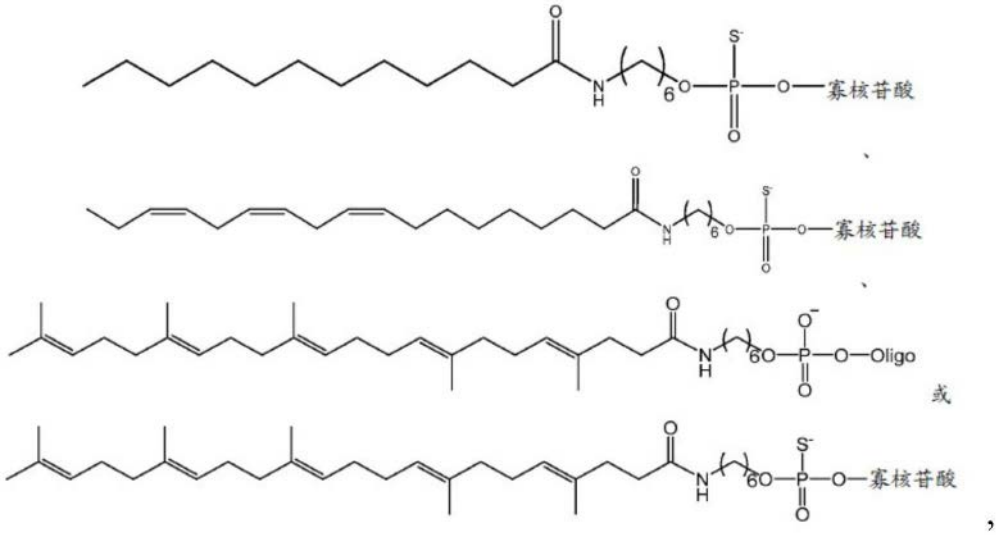
[1289] 脂质,任选地通过接头,可以在各种合适的位置掺入寡核苷酸中。在一些实施方案中,脂质通过5'-OH基团缀合。在一些实施方案中,脂质通过3'-OH基团缀合。在一些实施方案中,脂质通过一个或多个糖部分缀合。在一些实施方案中,脂质通过一个或多个碱基缀合。在一些实施方案中,脂质通过一个或多个核苷酸间键联掺入。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可以含有多个缀合的脂质,其通过其5'-OH、3'-OH、糖部分、碱基部分和/或核苷酸间键联独立地缀合。

[1290] 在一些实施方案中,接头是连接组合物的两个部分的部分;作为非限制性实例,接头将PNPLA3寡核苷酸部分与脂质物理连接。合适的接头的非限制性实例包括:不带电荷的接头;带电荷的接头;包含烷基的连接头;包含磷酸酯的接头;支链接头;非支链接头;包含至少一个切割基团的接头;包含至少一个氧化还原切割基团的接头;包含至少一个基于磷酸酯的切割基团的接头;包含至少一个酸切割基团的接头;包含至少一个基于酯的切割基团的接头;包含至少一个基于肽的切割基团的接头。

[1291] 在一些实施方案中,脂质任选地通过接头部分与活性化合物缀合。本领域普通技术人员了解,根据本公开,可以利用各种技术将脂质与活性化合物缀合。例如,对于包含羧基的脂质,此类脂质可通过羧基缀合。在一些实施方案中,脂质通过具有-L-结构的接头缀合,其中L如式I所定义和描述。在一些实施方案中,L包含磷酸二酯或修饰的磷酸二酯部分。在一些实施方案中,通过脂质缀合形成的化合物具有(R^{LD}-L-)$_a$-(活性化合物)的结构,其中a是1或大于1的整数,并且R^{LD}和L中的每个独立地如本文所定义和描述。在一些实施方案中,a是1。在一些实施方案中,a大于1。在一些实施方案中,a是1-50。在一些实施方案中,活性化

合物是PNPLA3寡核苷酸。例如,在一些实施方案中,缀合物具有以下任一种结构:

[1292]

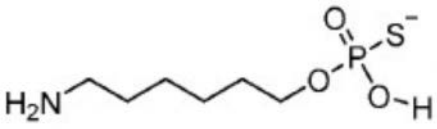


其中Oligo表示寡核苷酸。

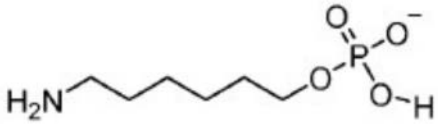
[1293] 在一些实施方案中,接头选自:不带电荷的接头;带电荷的接头;包含烷基的连接头;包含磷酸酯的接头;支链接头;非支链接头;包含至少一个切割基团的接头;包含至少一个氧化还原切割基团的接头;包含至少一个基于磷酸酯的切割基团的接头;包含至少一个酸切割基团的接头;包含至少一个基于酯的切割基团的接头;和包含至少一个基于肽的切割基团的接头。在一些实施方案中,接头,例如L^M,具有-L^{LD}-的结构。在一些实施方案中,接头,例如L^M,具有-L-的结构。在一些实施方案中,接头包含式I的键联。在一些实施方案中,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-L^I-,其中L^I具有如本文所述的式I的结构。在一些实施方案中,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=O)(SR^1)-O-。在一些实施方案中,R^1是-H,并且接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=O)(SH)-O-,在一些条件下,例如在一定pH下,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=O)(S^-)-O-。在一些实施方案中,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=S)(SR^1)-O-。在一些实施方案中,R^1是-H,并且接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=S)(SH)-O-,在一些条件下,例如在一定pH下,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=S)(S^-)-O-。在一些实施方案中,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=S)(OR^1)-O-,其中R^1是-CH_2CH_2CN。在一些实施方案中,接头是-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-P(=S)(SR^1)-O-,其中R^1是-CH_2CH_2CN。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸与接头缀合并形成H-接头-寡核苷酸的结构。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸与脂质缀合并形成脂质-接头-寡核苷酸的结构,例如R^{LD}-L^{LD}-寡核苷酸的结构。在一些实施方案中,接头的-O-端连接到PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,接头的-O-端连接至5'-末端寡核苷酸(-O-是5'-OH中的氧)。

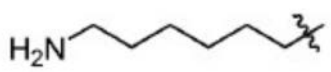
[1294] 在一些实施方案中,接头,例如L^M,包含PO(磷酸二酯键联)、PS(硫代磷酸酯键联)或PS2(二硫代磷酸酯键联)。包括PS接头的非限制性实例在下文中示出。在一些实施方案中,接头是-O-P(O)(OH)-O-[磷酸二酯]、-O-P(O)(SH)-O[硫代磷酸酯]或-O-P(S)(SH)-O-[二硫代磷酸酯]。在一些实施方案中,接头包含C6氨基部分(-NH-$(CH_2)_6$-),其在下文中示出。在一些实施方案中,接头包含与PO、PS或PS2结合的C6氨基。在一些实施方案中,接头是与PO、PS或PS2结合的C6氨基。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(OH)-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(OH)-,其中-C

(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(OH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(OH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(OH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(OH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(OH)-连接到PNP LA3寡核苷酸部分的3'-O-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(SH)-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(O)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(O)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分的3'-O-。在一些实施方案中,接头,例如$L^{L\ D}$或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(S)(SH)-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(S)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(S)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(S)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(S)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分的5'-O-。在一些实施方案中,接头,例如L^{LD}或L,是-C(O)-NH--$(CH_2)_6$-P(S)(SH)-,其中-C(O)-连接到脂质部分,并且-P(S)(SH)-连接到PNPLA3寡核苷酸部分的3'-O-。如本领域普通技术人员所了解的,在一定pH下,-P(O)(OH)-、-P(O)(SH)-、-P(S)(SH)-可以分别作为-P(O)(O^-)-、-P(O)(S^-)-、-P(S)(S^-)-存在。在一些实施方案中,脂质部分是R^{LD}。

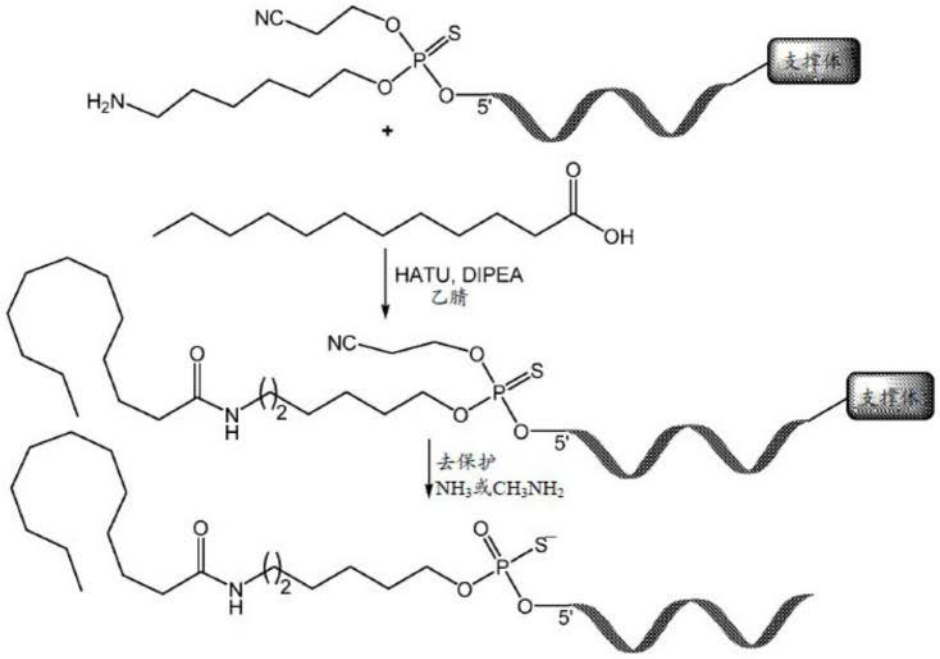


[1295]

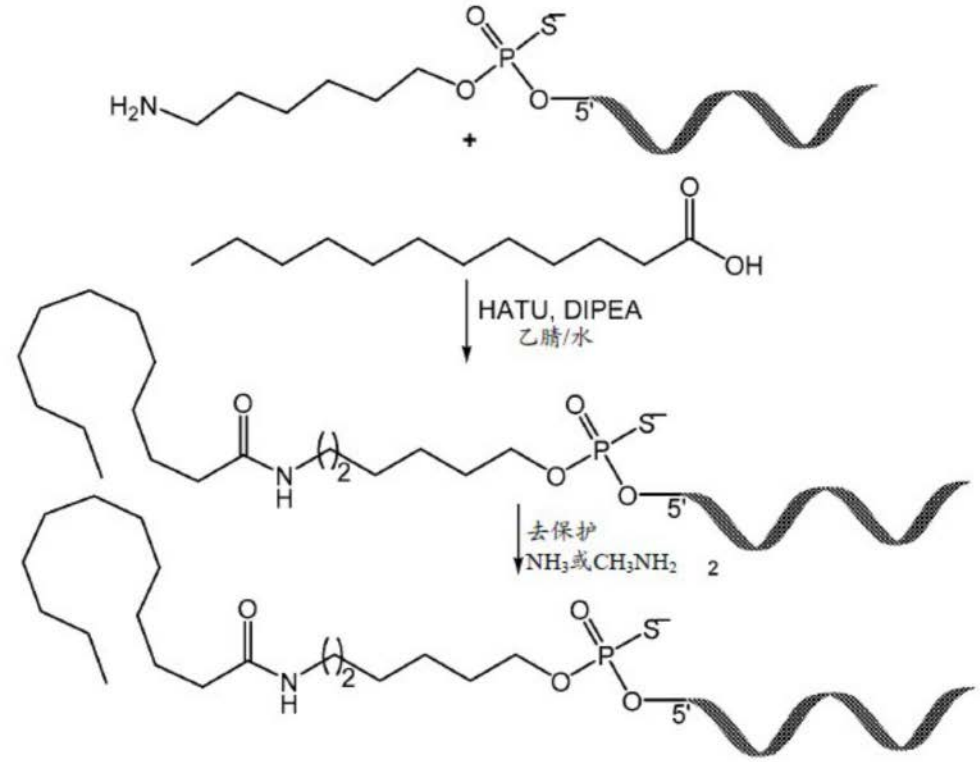




[1296] 根据本公开,各种化学过程和接头可用于缀合。例如,在一些实施方案中,脂质使用下述化学过程或类似过程掺入:

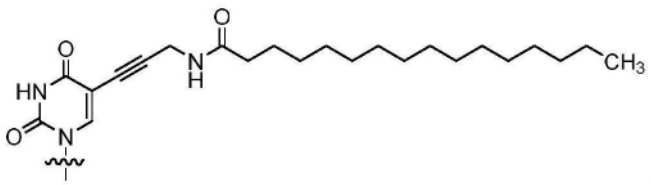


[1297]



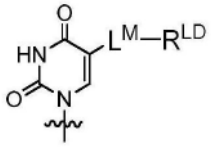
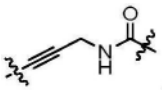
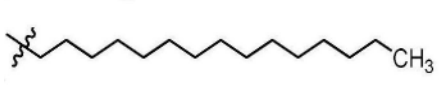
[1298] 在一些实施方案中,脂质直接通过核碱基掺入PNPLA3寡核苷酸,例如:

[1299]

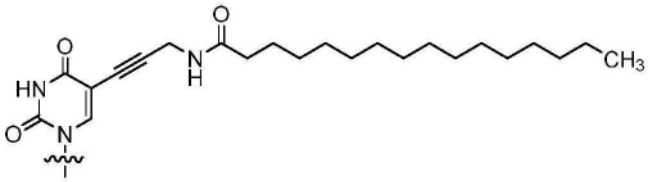


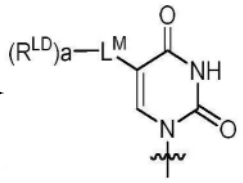
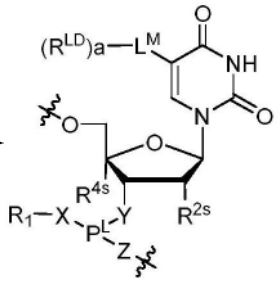
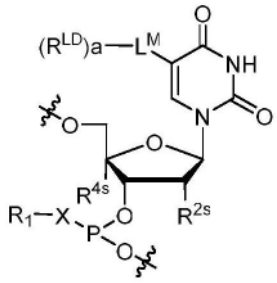
。

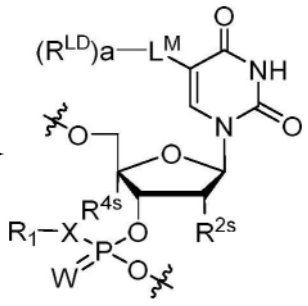
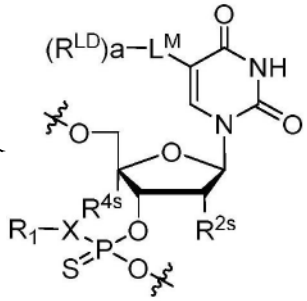
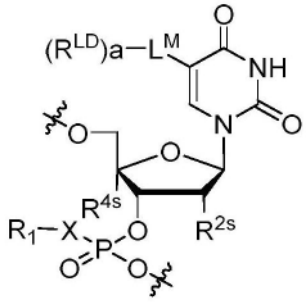
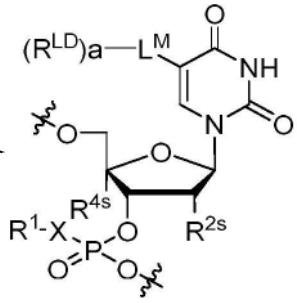
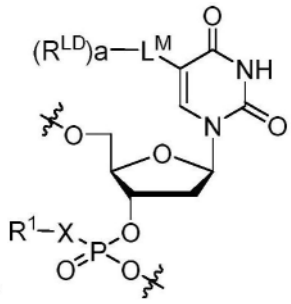
[1300] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含直接键合到核碱基的-L^M-R^{LD}。在一些

实施方案中,所提供的寡核苷酸包含  在一些实施方案中,接头(L^M)是 。在一些实施方案中,接头(L^M)是  。在一些实施方案中,脂质部分R^{LD}是  。

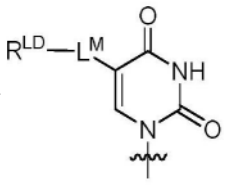
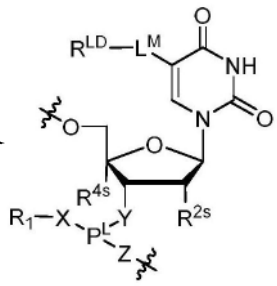
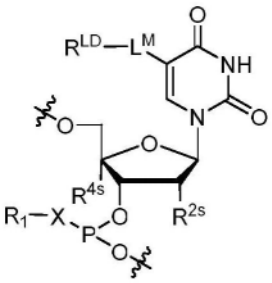
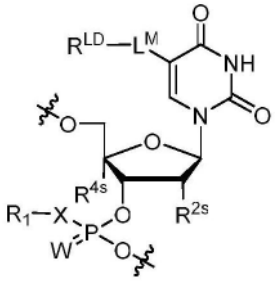
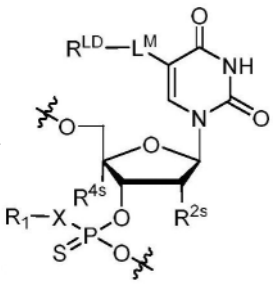
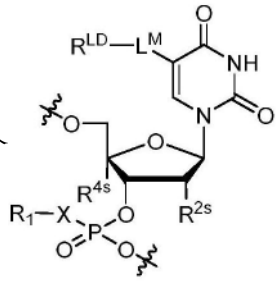
[1301] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含

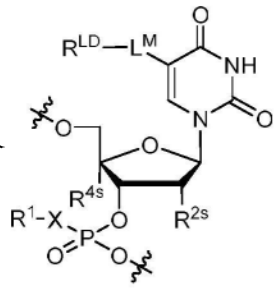
 。

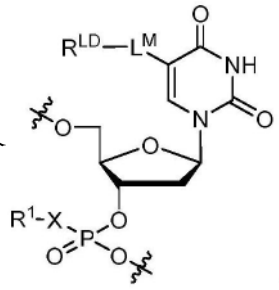
[1302] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含在核碱基处任选地通过接头连接到寡核苷酸部分的碳水化合物部分。在一些实施方案中,核碱基是T。在一些实施方案中,核碱基是受保护的T。在一些实施方案中,核碱基是任选取代的T。在一些实施方案中,连接是在T或任选取代的T的5-碳处。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个-L^M-(R^{LD})a,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个与核碱基键合的-L^M-(R^{LD})a,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡

核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中X是O或S,R^1是H,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,R^{2s}和R^{4s}是氢。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中X是O或S,R^1是H,其中每个变量独立地如本公开所述。

[1303] 在一些实施方案中,a是1。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个与核碱基键合的-L^M-R^{CD},其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,核碱基是

T。在一些实施方案中,核碱基是受保护的T。在一些实施方案中,核碱基是任选取代的T。在一些实施方案中,连接是在T或任选取代的T的5-碳处。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中每个变量独立地如

本公开所述。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  ,其中X是O或S,R^1是H,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,R^{2s}和R^{4s}是氢。

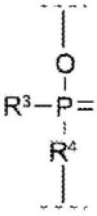
在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个  其中X是O或S,R^1是H,其中每个变量独立地如本公开所述。

[1304] 在一些实施方案中,本公开提供了包含PNPLA3寡核苷酸的组合物,所述PNPLA3寡核苷酸包含脂质部分,所述脂质部分包含或是C_{10}-C_{40}直链饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,本公开提供了包含PNPLA3寡核苷酸的组合物,所述PNPLA3寡核苷酸包含脂质部分,所述脂质部分包含或是C_{10}-C_{40}直链饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。

[1305] 在一些实施方案中,组合物包含PNPLA3寡核苷酸,所述PNPLA3寡核苷酸包含通过缀合选自以下的化合物而形成的脂质部分:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸、花生四烯酸和二亚油醇

[1306] 在一些实施方案中,接头是连接组合物的两个部分的部分;作为非限制性实例,接头将PNPLA3寡核苷酸与脂质物理连接。合适的接头的非限制性实例包括:不带电荷的接头;带电荷的接头;包含烷基的连接头;包含磷酸酯的接头;支链接头;非支链接头;包含至少一个切割基团的接头;包含至少一个氧化还原切割基团的接头;包含至少一个基于磷酸酯的切割基团的接头;包含至少一个酸切割基团的接头;包含至少一个基于酯的切割基团的接头;包含至少一个基于肽的切割基团的接头。在一些实施方案中,接头是不带电荷的接头或带电荷的接头。在一些实施方案中,接头包含烷基。

[1307] 在一些实施方案中,接头包含磷酸酯。在各种实施方案中,磷酸酯还可以通过用氮(桥联的氨基磷酸酯)、硫(桥联的硫代磷酸酯)和碳(桥联的亚甲基膦酸酯)替代桥联氧(即,将磷酸酯与核苷连接的氧)来修饰。替代可以发生在任一连接的氧处或两个连接的氧处。在一些实施方案中,桥联氧是核苷的3'-氧,用碳替代。在一些实施方案中,桥联氧是核苷的5'-氧,用氮替代。在各种实施方案中,包含磷酸酯的接头包含以下中的任一种或多种:二硫

代磷酸酯、氨基磷酸酯、硼代膦酸酯或式(I)的化合物： 
(I)，其中R^3选自OH、SH、NH_2、BH_3、CH_3、C_{1-6}烷基、C_{6-10}芳基、C_{1-6}烷氧基和C_{6-10}芳基氧基，其中C_{1-6}烷基和C_{6-10}芳基是未取代的或任选独立地被1至3个独立地选自卤素、羟基和NH_2的基团取代；并且R^4选自O、S、NH或CH_2。

[1308] 在一些实施方案中，接头包含直接键或诸如氧或硫的原子，诸如NR^1、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH的单元或诸如以下的原子链：取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、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、炔基异芳基，其中一个或多个亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、$N(R_1)_2$、C(O)、可切割连接基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代杂环中断或终止；其中R^1是氢、酰基、脂族或取代的脂族。

[1309] 在一些实施方案中，接头是支链接头。在一些实施方案中，支链接头的分支点可以是至少三价的，但是可以是四价、五价或六价原子或者具有此类多价的基团。在一些实施方案中，分支点是-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C或-N(Q)C(O)O-C；其中Q每次独立地出现是H或任选取代的烷基。在其他实施方案中，分支点是甘油或甘油衍生物。

[1310] 在一个实施方案中，接头包含至少一个可切割连接基团。作为非限制性实例，可切割连接基团在细胞外可以足够稳定，但是在进入靶细胞时其被切割以释放被所述接头保持在一起的两个部分。作为非限制性实例，可切割连接基团，诸如二硫键，可能对pH敏感。作为非限制性实例，接头可包括能够被酶切割的可切割连接基团。作为非限制性实例，接头可含有肽键，当靶向富含肽酶的细胞类型(诸如肝细胞和滑膜细胞)时，可使用所述肽键。作为非限制性实例，可通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评估候选可切割连接基团的适用性。在一些实施方案中，接头包含氧化还原可切割连接基团、基于磷酸酯的可切割连接基团，其可通过降解或水解磷酸酯基团的试剂来切割，接头包含酸可切割连接基团、基于酯的连接基团和/或基于肽的切割基团。

[1311] 可以使用本领域报道的任何接头，作为非限制性实例描述于美国专利申请号20150265708中的那些接头。

[1312] 在一些实施方案中，根据本公开，使用本领域已知的任何方法将脂质与PNPLA3寡核苷酸缀合。

[1313] 靶向部分

[1314] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物还包含靶向组分或部分。靶向部分可以与寡核苷酸部分缀合,或者不与PNPLA3寡核苷酸部分缀合。在一些实施方案中,靶向部分是脂质。在一些实施方案中,靶向部分是碳水化合物或双环缩酮。在一些实施方案中,靶向部分是如本公开中所述的-R^{LD}。在一些实施方案中,靶向部分是如本公开中所述的-R^{CD}。

[1315] 可以通过根据本公开的许多类型的方法,例如针对脂质和碳水化合物所述的那些方法,将靶向部分掺入所提供的技术中。在一些实施方案中,将靶向部分与所提供的寡核苷酸物理混合以形成所提供的组合物。在一些实施方案中,靶向部分与PNPLA3寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,靶向部分不与PNPLA3寡核苷酸缀合。

[1316] 在一些实施方案中,所提供的组合物包含两个或更多个靶向部分。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含两个或更多个缀合的靶向部分。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是相同的。在一些实施方案中,两个或更多个缀合的靶向部分是不同的。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含不超过一个靶向部分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含不同类型的缀合的靶向部分。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸包含相同类型的靶向部分。

[1317] 靶向部分可以任选地通过接头与寡核苷酸缀合,例如,如针对脂质和碳水化合物所述。可以根据本公开使用本领域中各种类型的接头。在一些实施方案中,接头包含磷酸酯基团,其可以例如用于通过与寡核苷酸合成中所使用的化学过程类似的化学过程来缀合靶向部分。在一些实施方案中,接头包含酰胺、酯或醚基。在一些实施方案中,接头具有-L-的结构。与脂质相比,靶向部分可以通过相同或不同的接头缀合。

[1318] 靶向部分,任选地通过接头,可以在各种合适的位置与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过5'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过3'-OH基团缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个糖部分缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个碱基缀合。在一些实施方案中,靶向部分通过一个或多个核苷酸间键联掺入。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可以含有多个缀合的靶向部分,其通过其5'-OH、3'-OH、糖部分、碱基部分和/或核苷酸间键联独立地缀合。靶向部分和脂质可以在相同、相邻和/或隔开的位置缀合。在一些实施方案中,靶向部分在PNPLA3寡核苷酸的一端缀合,而脂质在另一端缀合。

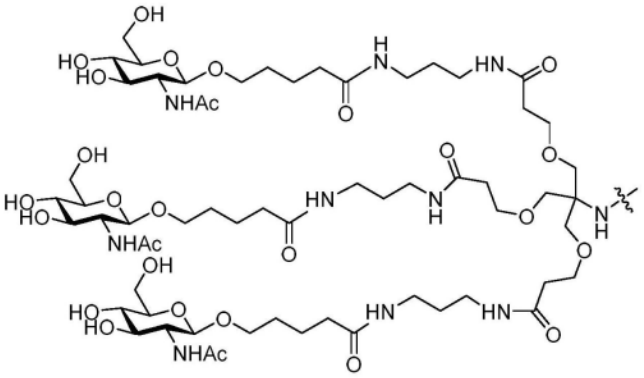
[1319] 在一些实施方案中,靶向部分与所靶向的细胞表面上的蛋白质相互作用。在一些实施方案中,这种相互作用促进内化到所靶向的细胞。在一些实施方案中,靶向部分包含糖部分。在一些实施方案中,靶向部分包含多肽部分。在一些实施方案中,靶向部分包含抗体。在一些实施方案中,靶向部分是抗体。在一些实施方案中,靶向部分包含抑制剂。在一些实施方案中,靶向部分是来自小分子抑制剂的部分。在一些实施方案中,抑制剂是所靶向的细胞表面上的蛋白质的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是在所靶向的细胞表面上表达的碳酸酐酶抑制剂。在一些实施方案中,碳酸酐酶是I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV或XVI。在一些实施方案中,碳酸酐酶是膜结合的。在一些实施方案中,碳酸酐酶是IV、IX、XII或XIV。在一些实施方案中,抑制剂是IV、IX、XII和/或XIV的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶III抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶IV抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐

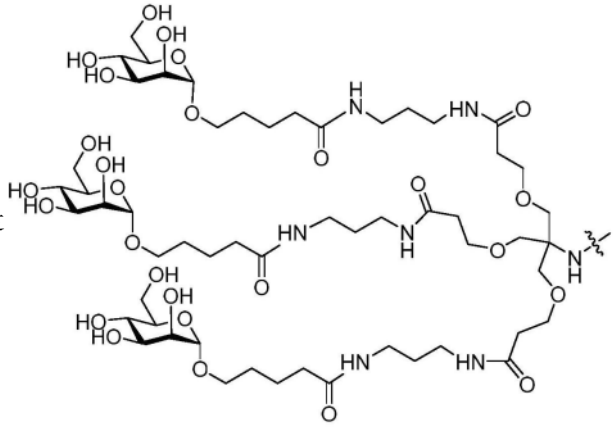
酶IX抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶XII抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂是碳酸酐酶XIV抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂包含或是磺酰胺(例如,Supuran,CT.Nature Rev Drug Discover 2008,7,168-181中所述的那些磺酰胺,所述磺酰胺以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,抑制剂是磺酰胺。在一些实施方案中,所靶向的细胞是肌细胞。

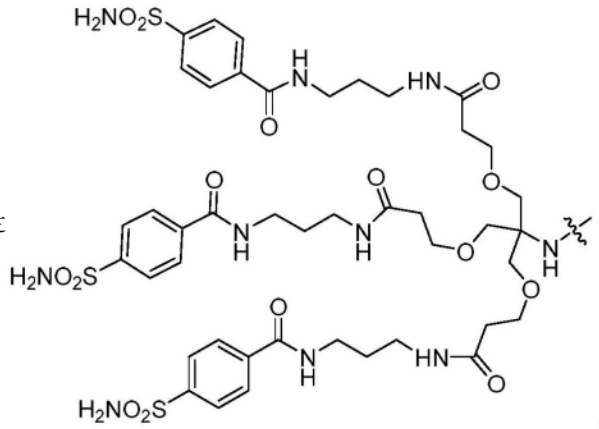
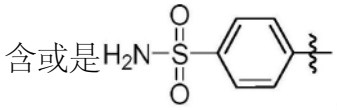
[1320] 在一些实施方案中,靶向部分是R^{TD},其中R^{TD}是如本公开所述的R^{LD}或R^{CD}。

[1321] 在一些实施方案中,靶向部分是如本公开中所定义和描述的R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含R^{LD}的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{LD}。

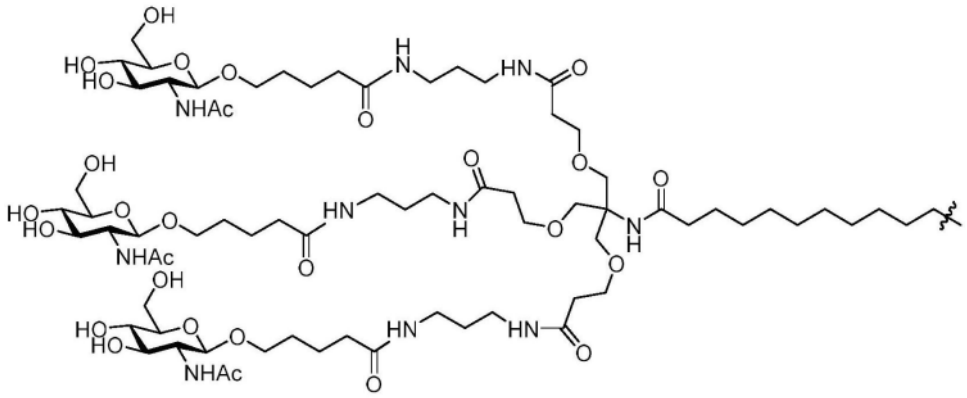
[1322] 在一些实施方案中,靶向部分是如本公开中所定义和描述的R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含R^{CD}的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了包含寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物,所述寡核苷酸包含R^{CD}。

[1323] 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。

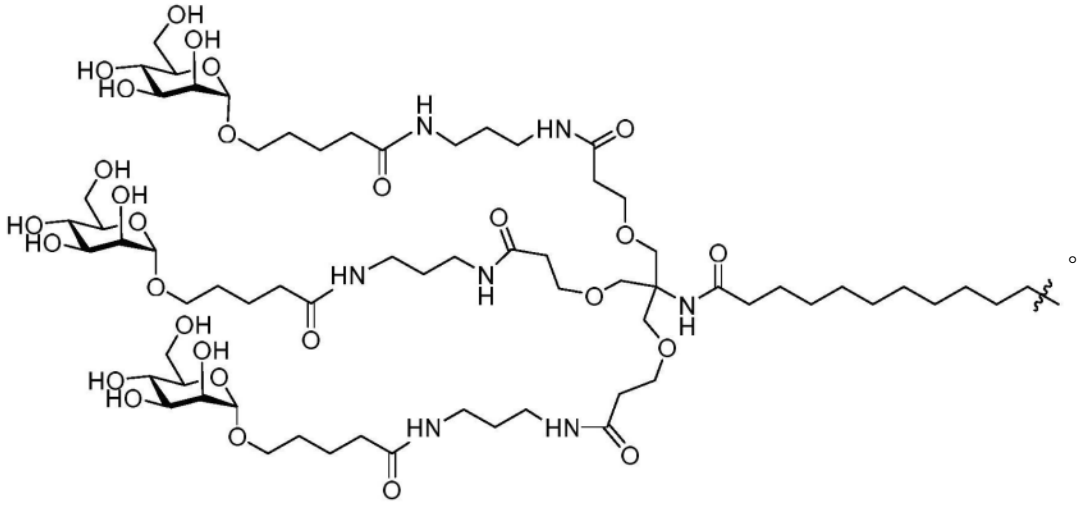
在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。在一些实施

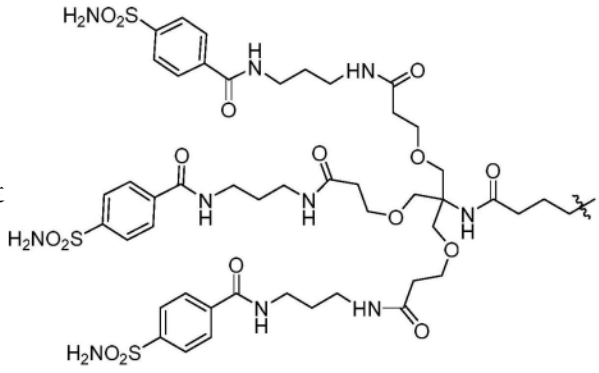
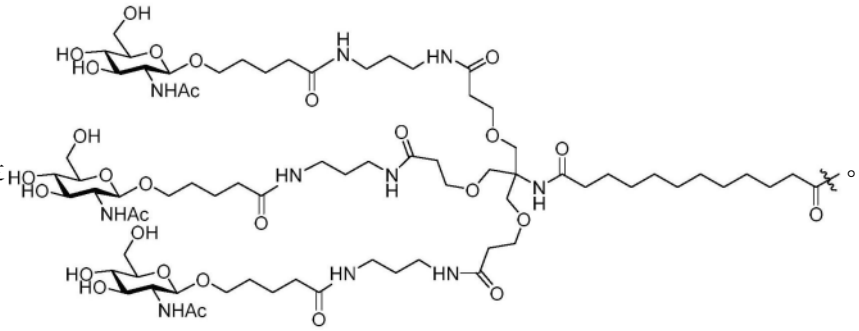
方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。

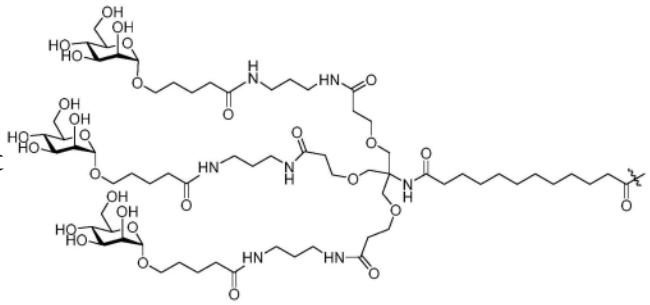
在一些实施方案中,R^{TD}包含或是

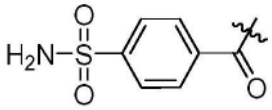
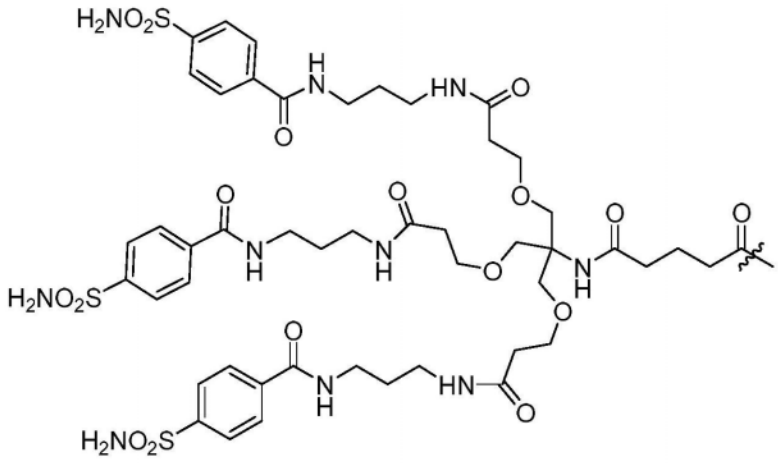


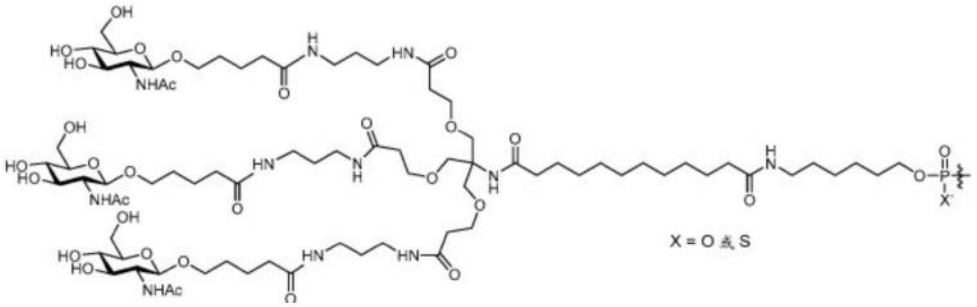
[1324] 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



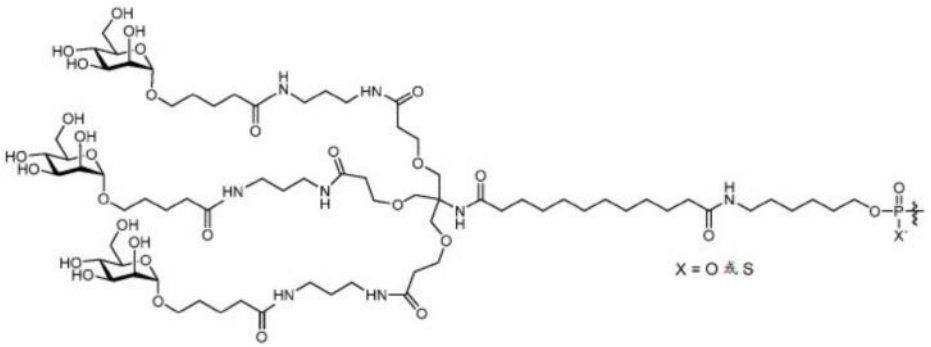
[1325] 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。

[1326] 在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。

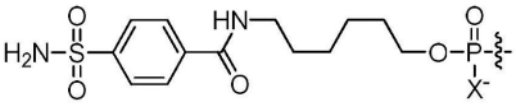
在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。在一些实施方案中,R^{TD}包含或是  。在一些实施方案中,R^{TD}包含或是



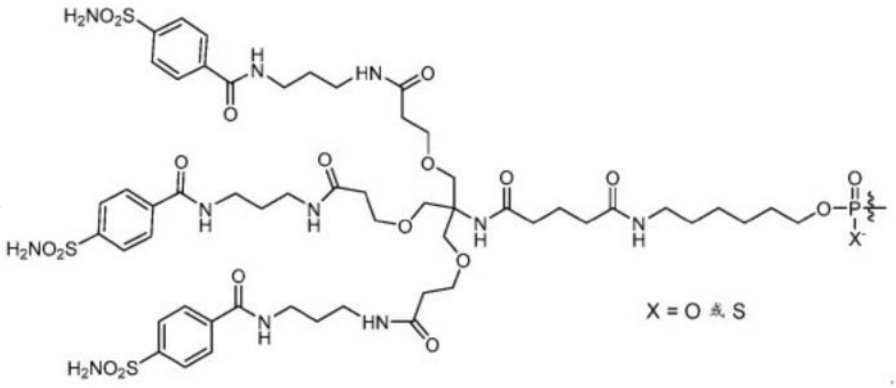
。在一些实施方案中，R^{TD}包含或是



。在一些实施方案中，R^{TD}包含或是

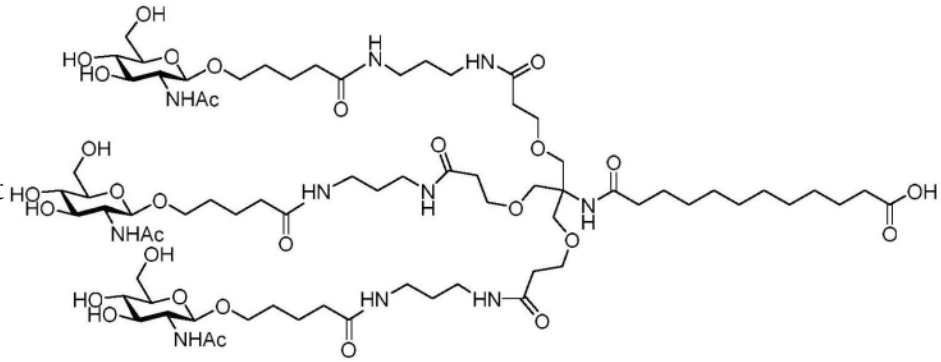


。在一些实施方案中，R^{TD}包含或是

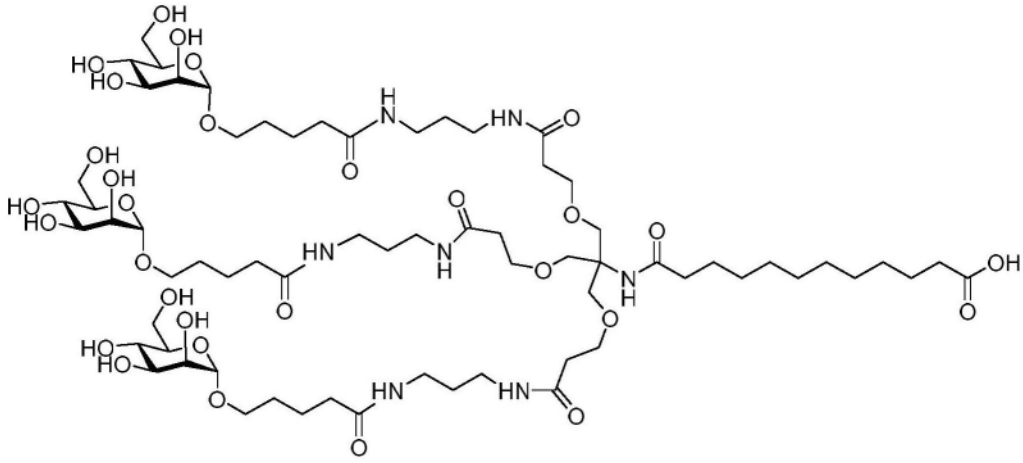


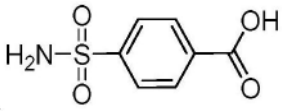
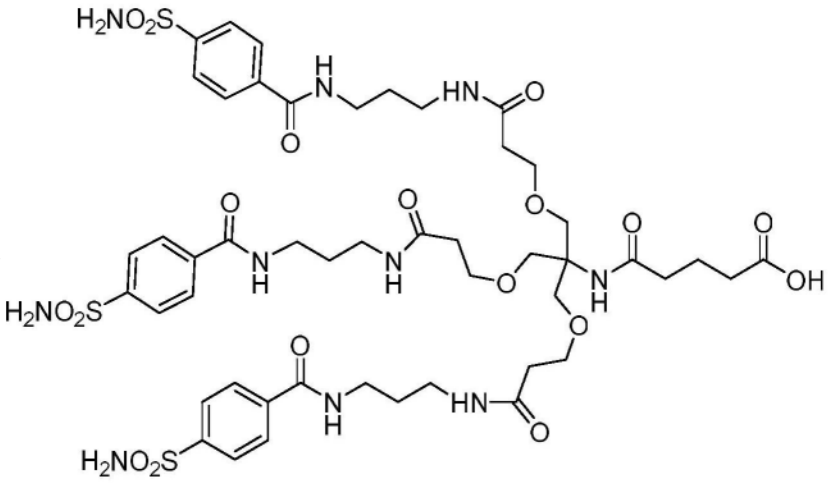
。在一些实施方案中，R^{TD}是靶向部分，其包含或是脂质部分。在一些实施方案中，X是O。在一些实施方案中，X是S。

[1327] 在一些实施方案中，本公开提供了用于将各种部分与寡核苷酸部分缀合的技术(例如，试剂、方法等)。在一些实施方案中，本公开提供了用于将靶向部分与寡核苷酸部分缀合的技术。在一些实施方案中，本公开提供了包含用于缀合的靶向部分的酸，例如R^{LD}-COOH。在一些实施方案中，本公开提供了用于缀合的接头，例如L^{M}。本领域普通技术人员理解，根据本公开，许多已知和广泛实践的技术可用于与寡核苷酸部分的缀合。在一些实施方

案中,所提供的酸是  。

在一些实施方案中,所提供的酸是

[1328] 

[1329] 。在一些实施方案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是  。在一些实施方案中,所提供的酸是脂肪酸,其可以提供脂质部分作为靶向部分。在一些实施方案中,本公开提供了用于制备此类酸的方法和试剂。

[1330] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸,能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低的PNPLA3寡核苷酸,可以包含本文所述或本领域已知的任何脂质。

[1331] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何脂质。

[1332] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含脂质部分。在一些实施方案中,脂质部分通过与脂质的缀合掺入。在一些实施方案中,脂质是脂肪酸。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸与脂肪酸缀合。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含与种子区域中的核苷酸缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含与种子后区域中的核苷酸缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸处(从5'-末端开始计数)缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在第9或第11个核苷酸处(从5'-末端开始计数)缀合的脂质。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸在碱基处与脂肪酸缀合。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在第9或第11个核苷酸处(从5'-末端开始计数)的碱基处缀合的脂质。

[1333] 在一些实施方案中,脂肪酸包含10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含10个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含11个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含12个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含13个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含14个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含15个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含16个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含17个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含18个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含19个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含20个或更多个碳原子。在一些实施方案中,脂肪酸包含30个或更多个碳原子。

[1334] 在一些实施方案中,脂质是棕榈酸。在一些实施方案中,脂质是硬脂酸或喇叭藻酸。在一些实施方案中,脂质是硬脂酸。在一些实施方案中,脂质是喇叭藻酸。

[1335] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{80}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。

[1336] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1337] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1338] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。

[1339] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。

[1340] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1341] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1342] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。

[1343] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{40}饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烯基、-C≡C-、C_1-C_6杂脂族部分、-C(R′)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R′)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR′)-、-C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)N(R′)-、-N(R′)C(O)-、-N(R′)C(O)O-、-OC(O)N(R′)-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R′)-、-N(R′)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。

[1344] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}饱和或部分不饱和的脂族链。

[1345] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1346] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。

[1347] 在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{80}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1348] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1349] 在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1350] 在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1351] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1352] 在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1353] 在一些实施方案中,脂质包含未取代的C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1354] 在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1355] 在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1356] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1357] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{30}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1358] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{20}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1359] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{16}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1360] 在一些实施方案中,脂质包含C_{12}-C_{16}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1361] 在一些实施方案中,脂质包含C_{14}-C_{16}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。

[1362] 在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。

[1363] 在一些实施方案中,脂质选自由以下组成的组:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(DHA或顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。

[1364] 在一些实施方案中,脂质不与寡核苷酸缀合。

[1365] 在一些实施方案中,脂质与寡核苷酸缀合。

[1366] 在一些实施方案中,脂质通过接头与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,接头具有-L-的结构。

[1367] 在一些实施方案中,靶向部分与PNPLA3寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分通过接头缀合。

[1368] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个脂质部分和一个或多个靶向部分。

[1369] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质部分,其中所述脂质是C_{16}直链。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是棕榈酸。

[1370] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含与碱基缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是与碱基缀合的C_{16}直链。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是与碱基缀合的棕榈酸。

[1371] 在一些实施方案中,本公开涉及手性控制的寡核苷酸组合物,其中所述组合物还包含脂质。在一些实施方案中,脂质是硬脂酸或喇叭藻酸。在一些实施方案中,脂质与寡核苷酸缀合。

[1372] 在一些实施方案中,脂质与PNPLA3寡核苷酸的缀合改善了寡核苷酸的至少一种性质。在一些实施方案中,所述性质是增加的活性(例如,增加的介导单链RNA干扰的能力)或改善的组织分布。在一些实施方案中,脂质缀合改善了活性。在一些实施方案中,脂质缀合改善了向一种或多种靶组织的递送。在一些实施方案中,所述组织是肌肉组织。在一些实施方案中,所述组织是骨骼肌、腓肠肌、三头肌、心脏或隔膜。

[1373] 在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C80饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C1-C6亚烷基、C1-C6亚烯基、C1-C6杂脂族部分、-C(R)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)2-、-S(O)2N(R)-、-N(R)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C1-4脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C1-C6亚烷基、C1-C6亚烯基、C1-C6杂脂族部分、-C(R)$_2$-、-Cy-、-O-、-

S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)2-、-S(O)$_2$N(R)-、-N(R)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C1-4脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C40饱和或部分不饱和的脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被选自以下的任选取代的基团替代:C1-C6亚烷基、C1-C6亚烯基、C1-C6杂脂族部分、-C(R)$_2$-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)2-、-S(O)$_2$N(R)-、-N(R)S(O)$_2$-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-和-C(O)O-,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C1-4脂族基团取代。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C10-C80直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含未取代的C10-C40直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含不超过一个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含两个或更多个任选取代的C10-C60直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C10-C40直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C10-C40直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C1-4脂族基团取代。在一些实施方案中,所述脂质选自由以下组成的组:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。在一些实施方案中,所述脂质不与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,所述脂质与寡核苷酸缀合。

[1374] 在一些实施方案中,脂质与PNPLA3寡核苷酸的缀合令人惊讶地改善了寡核苷酸的至少一种性质。在一些实施方案中,所述性质是增加的活性(例如,增加的介导单链RNA干扰的能力)或改善的组织分布。在一些实施方案中,所述组织是肌肉组织。在一些实施方案中,所述组织是骨骼肌、腓肠肌、三头肌、心脏或隔膜。在一些实施方案中,包含脂质部分的寡核苷酸形成例如胶束。在一些实施方案中,例如在一个或多个附图中示出了示例性的改善的性质。

[1375] 在一些实施方案中,当在小鼠中测定示例性寡核苷酸时,将测试的寡核苷酸经尾静脉以例如10mg/kg、30mg/kg等的测试量静脉内注射到雄性C57BL/10ScSnDMDmdx小鼠(4-5周龄)中。在一些实施方案中,组织在测试时间(例如在注射后第2、7和/或14天等)进行收获,在一些实施方案中,将组织在液氮中新鲜冷冻并在-80℃下保存直至分析。

[1376] 根据本公开,各种测定法可用于评估寡核苷酸水平。在一些实施方案中,使用测试制品系列稀释液作为标准曲线,使用杂交-ELISA来定量组织中的寡核苷酸水平:例如,在一个示例性程序中,用50l的在2.5%$NaHCO_3$(Gibco,25080-094)中的500nM的捕获探针在37℃下涂覆马来酸酐活化的96孔板(Pierce 15110)2小时。然后将板用PBST(PBS+0.1%吐温-20)洗涤3次,并在37℃下用5%脱脂乳-PBST封闭1小时。将测试制品寡核苷酸系列稀释到基质中。用裂解缓冲液(4M胍;0.33%N-月桂基肌氨酸;25mM柠檬酸钠;10mM DTT)稀释这种标准品和原始样品,使得所有样品中的寡核苷酸量均小于100ng/ml。将20l稀释的样品与180l在PBST中稀释的333nM的检测探针混合,然后在PCR仪中变性(65℃,10分钟,95℃,15分钟,4℃)。将50l变性样品一式三份分配在封闭的ELISA板中,并在4℃下温育过夜。PBST洗涤3次后,每孔加入50l在PBST中的1:2000链霉亲和素-AP,并在室温下温育1小时。用PBST彻底洗涤之后,加入100l的AttoPhos(Promega S1000),在室温下于黑暗中温育10分钟,并在酶标仪(Molecular Device,M5)荧光通道:Ex435nm,Em555nm上读数。根据标准曲线通过4参数回归计算样品中的寡核苷酸。

[1377] 如本公开中所描述和证明的,在一些实施方案中,脂质缀合改善了向组织的递送。在一些实施方案中,脂质缀合改善了向肌肉的递送。在一些实施方案中,脂质缀合包括与脂肪酸的缀合。在一些实施方案中,寡核苷酸与喇叭藻酸缀合。在一些实施方案中,与喇叭藻酸的缀合在改善寡核苷酸向肌肉的递送方面特别有效。

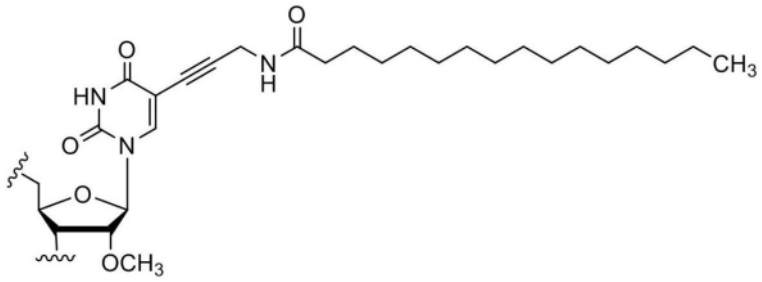
[1378] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸在血浆和组织匀浆中都是稳定的。

[1379] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在位置9或11处(从5'-末端开始计数)缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)缀合的C_{16}直链。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)缀合的棕榈酸。

[1380] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与碱基缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与碱基缀合的C_{16}直链。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与碱基缀合的棕榈酸。

[1381] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与U碱基缀合的脂质。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与U碱基缀合的C_{16}直链。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂包含脂质,其中所述脂质是在位置9或11处(从5'-末端开始计数)与U碱基缀合的棕榈酸。

[1382] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi包含ImU或5'-脂质-2'OMeU的结构。

[1383] 

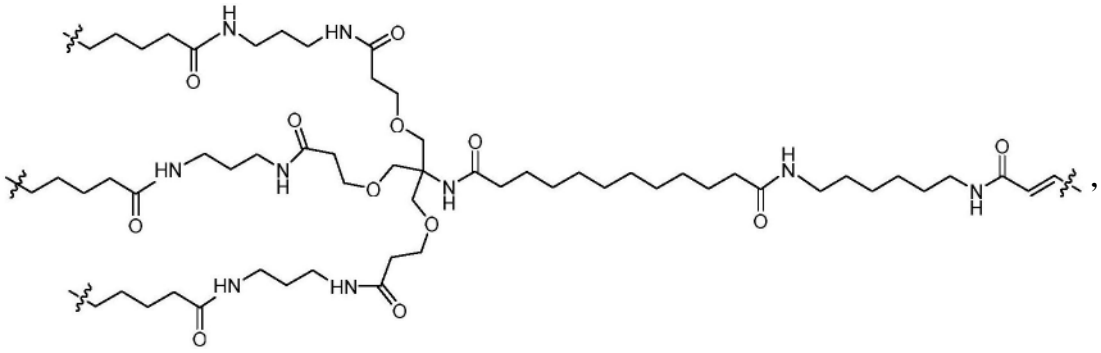
[1384] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含任何附加化学部分,其包括但不限于描述于以下任一个种的脂质:美国专利号5,614,503;5,780,009;6,074,863;6,258,581;6,489,117;6,677,445;6,828,435;6,846,921;7,416,849;7,494,982;7,981,871;8,106,022;8,148,344;8,318,508;8,389,707;8,450,467;8,507,455;8,703,731;8,828,956;8,901,046;9,107,904;9,352,048;9,370,581;9,370,582;9,387,257;9,388,415;9,388,416;9,393,316和9,404,112。

[1385] 与PNPLA3寡核苷酸缀合的任选的附加化学部分:碳水化合物部分或双环缩酮,包括但不限于GalNAc部分

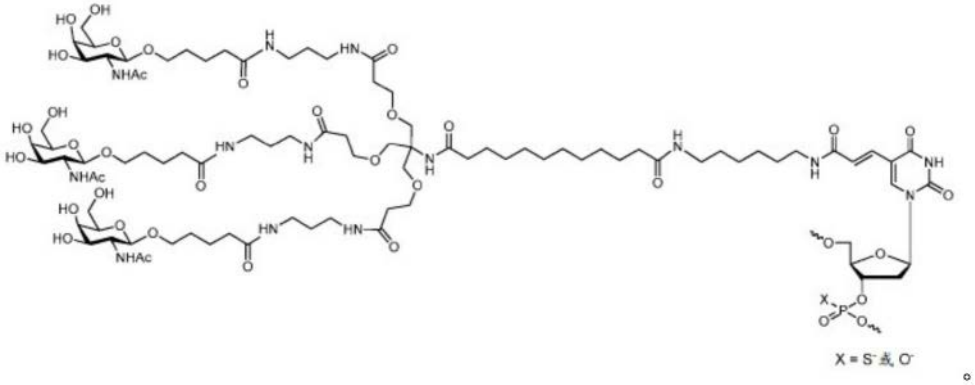
[1386] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物包含一个或多个碳水化合物或碳水化合物部分或双环缩酮部分。在一些实施方案中,碳水化合物部分是碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物部分是或包含直接或间接与PNPLA3寡核苷酸缀合的碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物部分有助于寡核苷酸靶向递送到所需位置,例如细胞、组织、器官等。在一些实施方案中,所提供的碳水化合物部分有助于向肝的递送。如本领域普通技术人员所了解的,文献中描述了各种碳水化合物部分,并且可以根据本公开使用。

[1387] 碳水化合物部分可以任选地通过一个或多个二价或多价接头(其可用于将两个或更多个碳水化合物部分连接到寡核苷酸)在各种位置处(例如糖单元、核苷酸间键联单元、核碱基单元等)掺入寡核苷酸中。在一些实施方案中,本公开提供了用于将碳水化合物掺入寡核苷酸中的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于任选地通过一个或多个接头在核碱基单元处掺入(作为在核苷酸间键联和/或糖单元处掺入的替代和/或补充)碳水化合物部分的技术,从而提供巨大的灵活性和/或改善的性质和/或活动。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含至少一个碳水化合物部分,其任选地通过接头在核碱基单元处掺入寡核苷酸中。

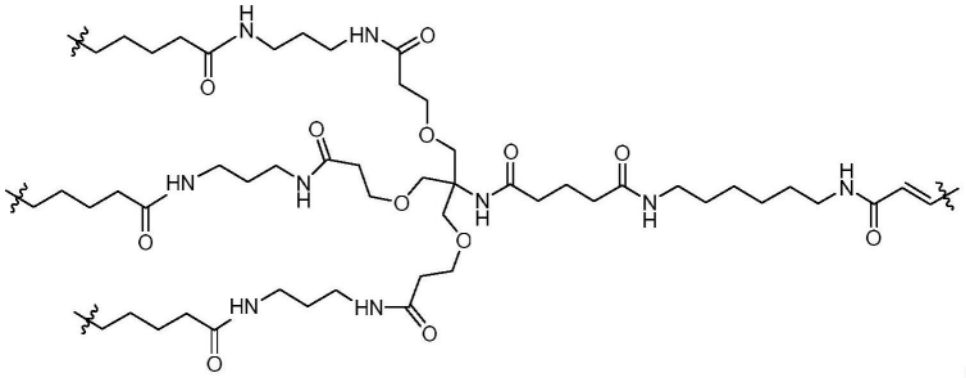
[1388] 在一些实施方案中,接头是L^M,其中L^M是共价键,或者选自以下的二价或多价的、任选取代的、直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_3$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_3$]O-;并且一个或多个碳原子任选且独立地被Cy替代。在一些实施方案中,L^M是二价的。在一些实施方案中,L^M是多价的。在一些实施方案中,L^M是



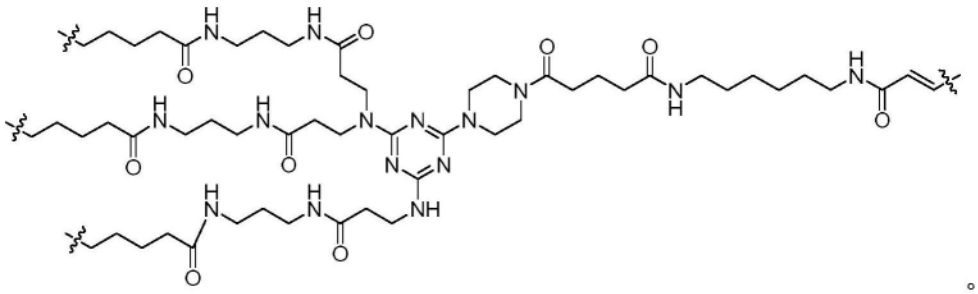
[1389] 其中L^M直接键合到核碱基,例如,在以下中:

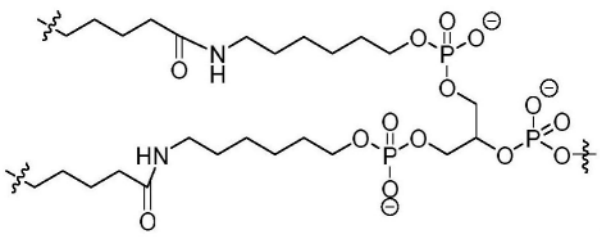
[1390] 

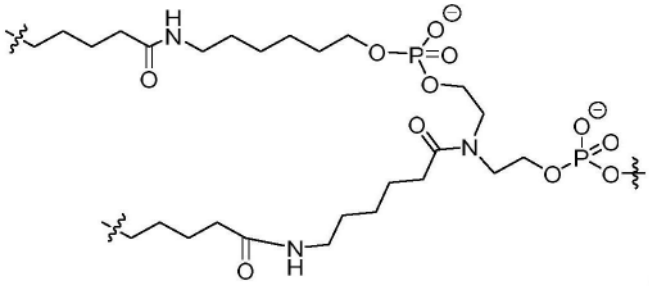
[1391] 在一些实施方案中,L^M是

[1392] 

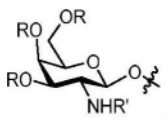
[1393] 在一些实施方案中,L^M是

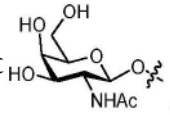
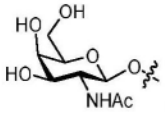
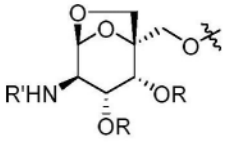
[1394] 

[1395] 在一些实施方案中,L^M是  在一些实施

方案中,L^M是  。

[1396] 在一些实施方案中,碳水化合物部分或双环缩酮或双环缩酮部分是R^{CD},其中R^{CD}是选自以下的任选取代的直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_3$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_3$]O-;并且一个或多个碳原子任选且独立地被Cy^L替代。在一些实施方案中,R^{CD}是选自以下的任选取代的直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_3$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_3$]O-;并且一个或多个碳原子独立地被四价单糖、二糖或多糖部分替代。在一些实施方案中,R^{CD}是选自以下的任选取代的直链或支链基团:C_{1-100}脂族基团和具有1-30个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的C_{1-100}杂脂族基团,其中一个或多个亚甲基单元任选且独立地被以下替代:C_{1-6}亚烷基、C_{1-6}亚烯基、-C≡C-、-C(R')$_2$-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)O-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$N(R')-、-C(O)S-、-C(O)O-、-P(O)(OR')-、-P(O)(SR')-、-P(O)(R')-、-P(O)(NR')-、-P(S)(OR')-、-P(S)(SR')-、-P(S)(R')-、-P(S)(NR')-、-P(R')-、-P(OR')-、-P(SR')-、-P(NR')-、-P(OR')[B(R')$_3$]-、-OP(O)(OR')O-、-OP(O)(SR')O-、-OP(O)(R')O-、-OP(O)(NR')O-、-OP(OR')O-、-OP(SR')O-、-OP(NR')O-、-OP(R')O-或-OP(OR')[B(R')$_3$]O-;并且一个或多个碳原子独立地被四价GalNac部分或四价的GalNac衍生物部分替代。

[1397] 在一些实施方案中,R^{CD}是任选取代的  。在一些实施方案中,R'是-C(O)R。在一些实施方案中,R^{CD}是单糖部分。在一些实施方案中,R^{CD}是单价GalNAc部分。在一些实

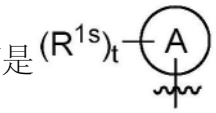
施方案中,R^{CD}是  。在一些实施方案中,R^{CD}是任选取代的  。在一些实施方案中,R^{CD}是任选取代的  。在一些实施方案中,R'是-C(O)R。在一些实施方案中,R^{CD}是任选取代的。在一些实施方案中,R^{CD}是二糖部分。在一些实施方案中,R^{CD}是多糖部分。

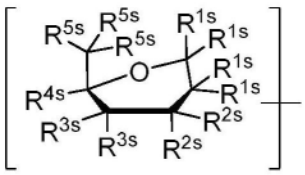
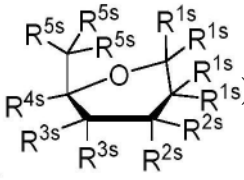
[1398] 在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是-H,或选自以下的任选取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是选自以下的任选取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是选自以下的任选取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中至少一个杂原子是氧。在一些实施方案中,R^{G}是取代的,并且每个R^{G}的至少一个取代基通过氧原子键合到R^{G}。在一些实施方案中,R^{G}是取代的,并且每个R^{G}的至少一个取代基通过氮原子键合到R^{G}。在一些实施方案中,R^{G}独立地是取代的,并且每个R^{G}的每个碳原子独立地通过氧或氮原子键合到取代基。在一些实施方案中,R^{G}独立地是取代的,并且每个R^{G}的每个碳原子独立地通过氧或氮原子键合到取代基。在一些实施方案中,R^{G}是具有1-10个氧原子的任选取代的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^{G}是具有一个氧原子的任选取代的3-6元杂环基。在一些实施方案中,每个R^{G}独立地是具有1-10个氧原子的任选取代的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^{G}独立地是具有一个氧原子的任选取代的3-6元杂环基。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的每个碳独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的两个或更多个碳原子独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的两个或更多个碳原子独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的三个或更多个碳原子独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的四个或更多个碳原子独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的五个或更多个碳原子独立地键合到氧或氮原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的两个或更多个碳原子独立地键合到氧原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的三个或更多个碳原子独立地键合到氧原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的四个或更多个碳原子独立地键合到氧原子。在一些实施方案中,R^{G}的杂环基环的五个或更多个碳原子独立地键合到氧原子。在一些实施方案中,R^{G}-H是包含a-CHO或-C(O)-基团的C_{3-20}多元醇。

[1399] 在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是-H,或选自以下的取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中1-20个取代基是R基团。在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是-H,或选自以下的取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中1-20个取代基是-OR或-$N(R)_2$基团。在一些实施方案中,R^{CD}具有R^{G}-L-的结构,其中R^{G}是-H,或选自以下的取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中1-20个取代基是-OH和-$N(R)_2$。在一

些实施方案中,R^{CD}具有R^G-L-的结构,其中R^G是-H,或选自以下的取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中1-20个取代基是-OH和-NHR。在一些实施方案中,R^{CD}具有R^G-L-的结构,其中R^G是-H,或选自以下的取代的基团:C_3-C_{20}脂环族,以及具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的3-20元杂环基,其中1-20个取代基是-OH和-NHC(O)R。

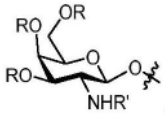
[1400] 在一些实施方案中,R^G是具有1-10个独立地选自氧、氮、硫、磷、硼和硅的杂原子的取代的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^G是具有1-10个独立地选自氧和氮的杂原子的取代的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^G是具有1-10个氧的取代的3-20元杂环基。在一些实施方案中,R^G是取代的 或 。在一些实施方案中,R^G是取代的 。在一些实施方案中,R^G是取代的 。

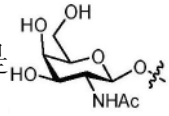
[1401] 在一些实施方案中,R^G是  ,其中每个变量独立地如本公开所述。在一些实施方案中,t是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,t是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,t是至少1。在一些实施方案中,t是至少2。在一些实施方案中,t是至少3。在一些实施方案中,t是至少4。在一些实施方案中,t是至少5。在一些实施方案中,t是至少6。在一些实施方案中,每个R^{1s}独立地是-OR'或-N(R')$_2$。在一些实施方案中,每个R'独立地是-C(O)R。在一些实施方案中,每个R^{1s}独立地是-OR'或-NHR'。在一些实施方案中,每个R^{1s}独立地是-OH或-NHR'。在一些实施方案中,每个R^{1s}独立地是-OH或-NHC(O)R。在一些实施方案中,环A是任选取代的 或 。在一些实施方案中,环A是任选取代的 。在一些实施方案中,环A是任选取代的 。

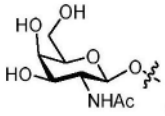
[1402] 在一些实施方案中,R^G是  ,其中每个变量独立地如本公开所述(即,R^G-H是 )。在一些实施方案中,R^{1s}、R^{2s}、R^{3s}、R^{4s}和R^{5s}中的至少1、2、3、4、5或6个独立地是-OR'或-N(R')$_2$。在一些实施方案中,R^{1s}、R^{2s}、R^{3s}、R^{4s}和R^{5s}中的至少1、2、3、4、5或6个独立地是-OR'或-NHR'。在一些实施方案中,R^{1s}、R^{2s}、R^{3s}、R^{4s}和R^{5s}中的至少1、2、3、4、5或6个独立地是-OH或-NHR'。在一些实施方案中,R^{1s}、R^{2s}、R^{3s}、R^{4s}和R^{5s}中的至少1、2、3、4、5或6个独立地是-OH或-NHC(O)R。在一些实施方案中,R^{1s}、R^{2s}、R^{3s}、R^{4s}和R^{5s}中的至少1、2、3、4、5或6个独立地是-OH。

[1403] 在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的每个环碳原子独立地是取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过1个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过2个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过3个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过4个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过5个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过6个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过7个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过8个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过9个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,不超过10个环碳原子是未取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过1个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过2个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过3个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过4个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过5个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过6个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过7个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过8个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过9个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,不超过10个环碳原子是未被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过1个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过2个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过3个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过4个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过5个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过6个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过7个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过8个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过9个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过10个环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过10%的环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,不超过20%的环碳原子是未被-OH取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的每个环碳原子独立地是取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少1个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少2个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少3个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少4个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少5个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少6个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少7个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少8个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少9个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,至少10个环碳原子是取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少1个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少2个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。

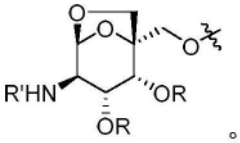
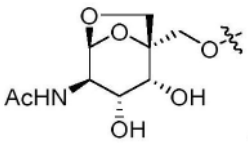
在一些实施方案中,至少3个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少4个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少5个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少6个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少7个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少8个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少9个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少10个环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少1个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少2个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少3个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少4个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少5个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少6个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少7个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少8个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少9个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少10个环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少10%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少20%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少30%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少40%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少50%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少60%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少70%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少80%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少90%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少95%的环碳原子是被-OH或-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,R^G的脂环族或杂环的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少10%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少20%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少30%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少40%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少50%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少60%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少70%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少80%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少90%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少95%的环碳原子是被-OH取代的。在一些实施方案中,至少一个环碳原子是被-N(R')$_2$取代的。在一些实施方案中,至少一个环碳原子是被-NHC(O)R取代的。在一些实施方案中,至少一个环碳原子是被-NHC(O)R取代的,其中R是任选取代的C_{1-6}脂族。在一些实施方案中,至少一个环碳原子是被-NHAc取代的。

[1404] 在一些实施方案中,R^G是任选取代的 

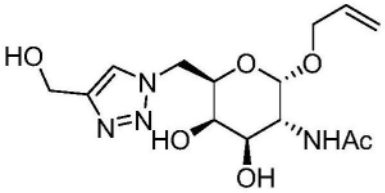
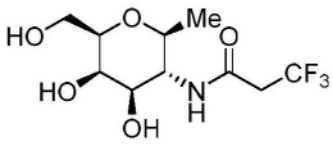
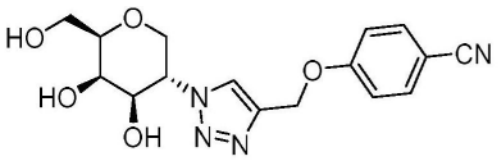
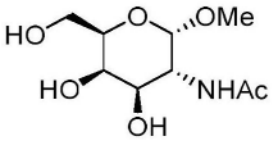
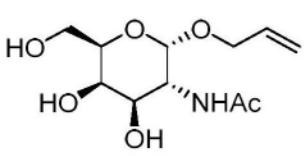
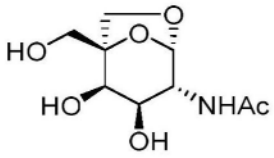
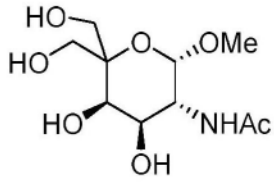
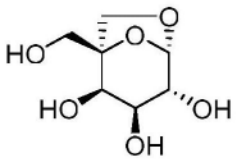
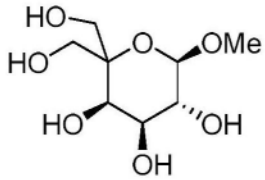
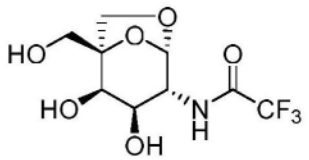
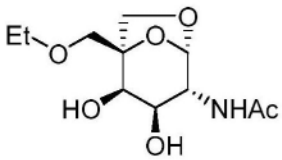
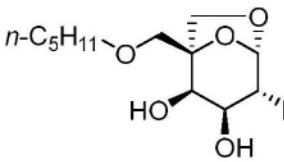
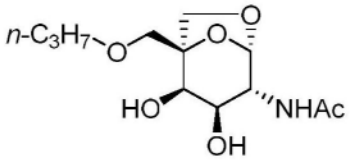
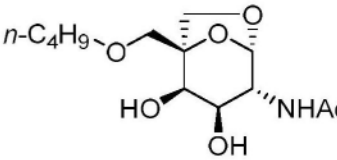
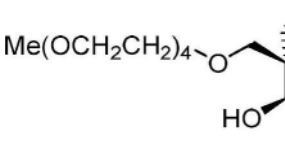
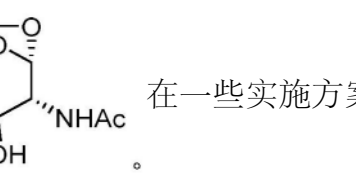
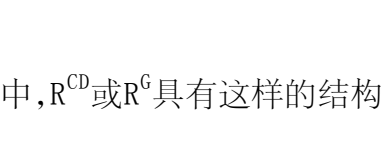
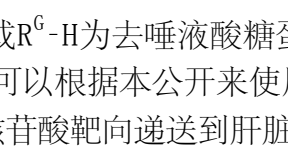
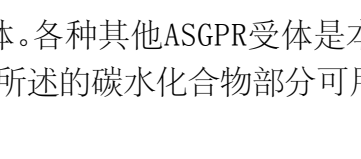
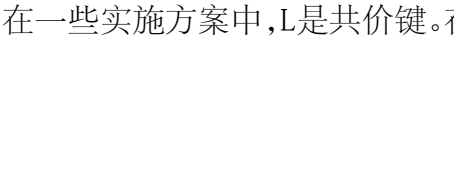
。在一些实施方案中,R'是-C(O)R。在一些实施方案中,R^G是 

。在一些实施方案中,R^G是任选取代的 

。

[1405] 在一些实施方案中,R^G是任选取代的  在一些实施方案中,R'是-C(O)R。在一些实施方案中,R^G是任选取代的  。

[1406] 在一些实施方案中,R^{CD}或R^G具有这样的结构使得R^{CD}-H或R^G-H为

 、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  或  在一些实施方案中,R^{CD}或R^G具有这样的结构使得R^{CD}-H或R^G-H为去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的配体。各种其他ASGPR受体是本领域已知的,并且可以根据本公开来使用。在一些实施方案中,所述的碳水化合物部分可用于将所提供的寡核苷酸靶向递送到肝脏。

[1407] 在一些实施方案中,L是共价键。在一些实施方案中,L是二价的任选取代的C_{1-6}脂

族,其中一个或多个亚甲基单元独立且任选地被-O-替代。在一些实施方案中,L是-O-CH_2-。

[1408] 在一些实施方案中,R^{CD}是R^G-H的寡聚或聚合部分,其中每个R^G独立地如本公开所述。

[1409] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含本文所述或本领域已知的任何靶向部分。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸是单链RNAi剂。

[1410] 在一些实施方案中,靶向部分是去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的配体。

[1411] 在一些实施方案中,靶向部分是公开于以下中的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的配体:Sanhueza等J.Am.Chem.Soc.,2017,139(9),第3528-3536页。

[1412] 在一些实施方案中,靶向部分是公开于以下中的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的配体:Liras等US20160207953。

[1413] 在一些实施方案中,靶向部分是公开于以下中的取代的6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,3-二醇衍生物:Liras等US20160207953。

[1414] 在一些实施方案中,靶向部分是公开于以下中的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的配体:Liras等US20150329555。

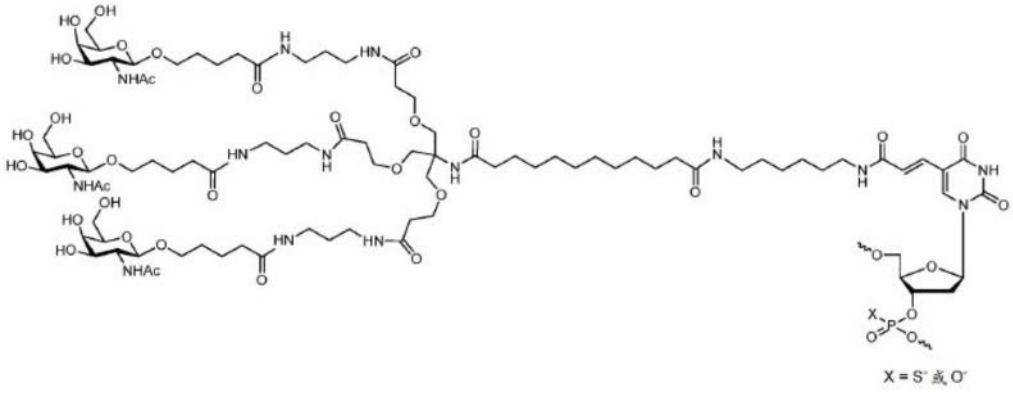
[1415] 在一些实施方案中,靶向部分是公开于以下中的取代的6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,3-二醇衍生物:Liras等US20150329555。

[1416] 在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的附加的化学部分是GalNAc部分。在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的附加的化学部分是GalNAc部分,其在任何位置处缀合。

[1417] 在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的附加的化学部分是通过接头与5'-H T缀合的GalNAc部分。在一些实施方案中,与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的附加的化学部分是通过接头与5'-H T缀合的GalNAc部分,其在任何位置处缀合。

[1418] 在一些实施方案中,附加的化学部分是在任何位置处的GaNC6T(也称为TGaNC6T,或GalNAc部分通过氨基C6接头与5'HT的缀合)。

[1419] 在一些实施方案中,附加的化学部分是GaNC6T,例如,GalNAc部分通过氨基C6接头与5'H T的缀合(例如,在倒数第二个或倒数第三个核苷酸[5'至3'计数]处;例如,3'-末端二核苷酸的5'核苷酸(例如,3'-末端二核苷酸的5'核苷酸是3'-末端二核苷酸的两个核苷酸,更靠近寡核苷酸的5'-末端的核苷酸)或紧靠3'-末端二核苷酸的5'核苷酸的5'的核苷酸:

[1420] 

[1421] 在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi剂包含将GalNAc部分与寡

核苷酸或单链RNAi剂缀合的接头。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi剂包含将GalNAc部分与寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的接头,其中所述接头连接在糖的2'位置。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi剂包含将GalNAc部分与寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的接头,其中所述接头连接到碱基。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi剂包含将GalNAc部分与寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的接头,其中所述接头连接到T碱基。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi剂包含将GalNAc部分与寡核苷酸或单链RNAi剂缀合的接头。

[1422] 在一些实施方案中,连接GalNAc部分的接头是可生物切割的接头。这种接头允许GalNAc部分的细胞内去除,使得GalNAc部分将不会干扰Ago-2活性或RNA干扰。

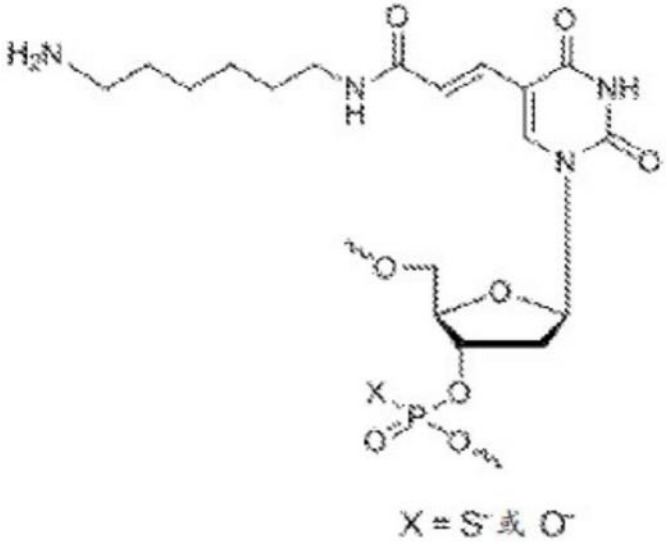
[1423] 在一些实施方案中,GalNAc部分在倒数第二个或倒数第三个核苷酸处与PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂缀合。

[1424] 在一些实施方案中,可以将GalNAc部分在单链RNAi剂的倒数第二个核苷酸(3'-末端二核苷酸的更5'位置)处或在单链RNAi剂的倒数第三个核苷酸(最接近3'-末端二核苷酸的5'的核苷酸)处缀合。不希望受任何特定理论的束缚,本公开表明单链RNAi剂的倒数第二个或倒数第三个核苷酸(例如3'-末端二核苷酸的更5'位置)可以与Ago-2的凹坑相邻,并且GalNAc部分可能能够插入所述凹坑,使得GalNAc部分不干扰Ago-2活性。不希望受任何特定理论的束缚,本公开表明如果GalNAc部分连接在倒数第二个或倒数第三个核苷酸处,则可能没有必要切割GalNAc部分以允许RNAi活性,因此可以接受使用更稳健的不可生物裂解的接头将GalNAc部分连接到寡核苷酸或单链RNAi剂。因此,更稳健的接头较不易被切割,从而增加了GalNAc部分将增加寡核苷酸或单链RNAi剂的递送的可能性。

[1425] 在一些实施方案中,GalNAc部分通过AMC6接头连接。

[1426] 在一些实施方案中,GalNAc部分通过连接在T碱基处的AMC6接头(AMC6T)连接。

[1427] 在一些实施方案中,AMC6T具有以下结构:

[1428] 

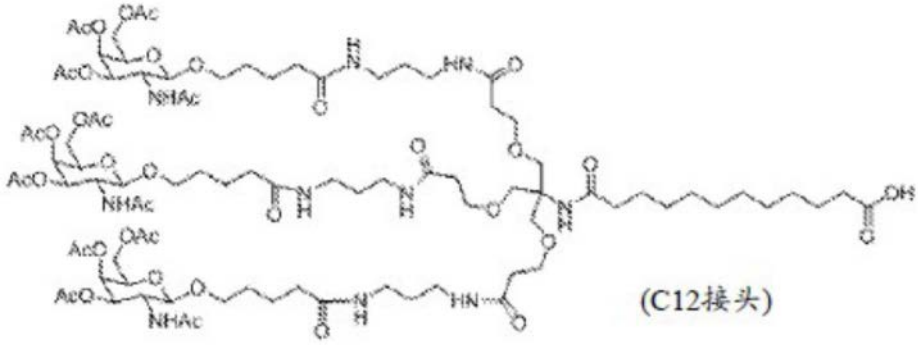
[1429] 在一些非限制性实例中,AMC6T是倒数第二个或倒数第三个核苷酸[5'至3'计数];例如3'-末端二核苷酸的5'核苷酸,或紧靠3'-末端二核苷酸的5'核苷酸的5'的核苷酸。

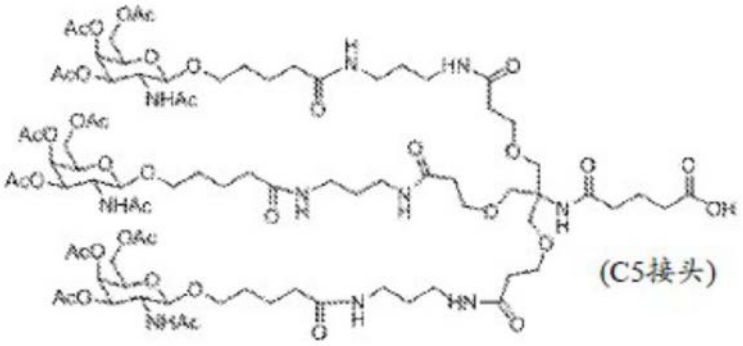
[1430] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,单链RNAi剂在倒数第二个或倒数第三个核苷酸处包含AMC6T。

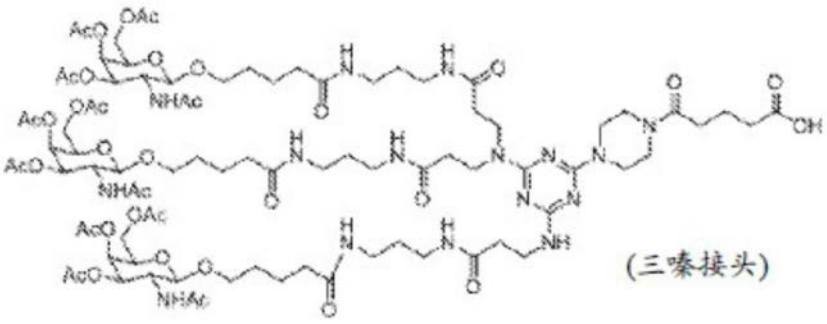
[1431] 如本文所公开的,GaNC6T是有效的单链RNAi剂中的组分。在一些非限制性实例中,GaNC6T在倒数第二个或倒数第三个核苷酸处[5'至3'计数];例如3'-末端二核苷酸的5'核苷酸,或紧靠3'-末端二核苷酸的5'核苷酸的5'的核苷酸。在本文公开的一些非限制性实例中,GaNC6T在21个核苷酸中的位置20(从5'-末端开始计数)或25个核苷酸中的位置24(从5'-末端开始计数)处。

[1432] 在一些实施方案中,将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂与三天线GalNAc酸缀合(例如,通过C10、C3或三嗪接头):

[1433]







[1434] 这些结构表示受保护的型式,因为它们包含-OAc(-O-乙酸酯基团)。在一些实施方案中,在化合物与寡核苷酸缀合后的去保护过程中除去Ac基团。在一些实施方案中,例如,如实施例37B中所述,用浓缩的氢氧化铵进行去保护。在这些结构的去保护版本中,-OAc被-OH替代。

[1435] 在一些实施方案中,GalNAc部分在5'-末端缀合。将这些附加的化学部分中的每一个(三天线GalNAc酸,其中的每个具有C12、C5或三嗪接头)与靶向因子XI(FXI)的PNPLA3寡核苷酸缀合,所述PNPLA3寡核苷酸通过RNA酶H机制起作用。

[1436] 构建了若干种寡核苷酸;每种都包含靶向因子XI(FXI)的PNPLA3寡核苷酸,所述PNPLA3寡核苷酸通过RNA酶H机制起作用,其中每种均与不同的三天线GalNAc酸缀合,其中

的每个具有C12、C5或三嗪接头。已经通过实验(数据未示出)揭示出三天线GalNAc酸改善寡核苷酸向肝脏的递送。

[1437] 在一些实施方案中,本公开涉及与三天线GalNAc酸的缀合的任何寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及通过C10、C3或三嗪接头与三天线GalNAc酸的缀合的任何寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及与三天线GalNAc酸缀合的任何寡核苷酸,其中所述寡核苷酸指导由RNA酶H或RNA干扰机制介导的靶转录物的敲低。在一些实施方案中,本公开涉及通过C10、C3或三嗪接头与三天线GalNAc酸缀合的任何寡核苷酸,其中所述寡核苷酸指导由RNA酶H或RNA干扰机制介导的靶转录物的敲低。

[1438] 在一些实施方案中,本公开涉及与三天线GalNAc酸缀合的任何寡核苷酸,其中所述寡核苷酸指导由RNA酶H或RNA干扰机制介导的靶转录物的敲低,其中RNA干扰机制由包含1、2或更多个链的RNAi剂指导。在一些实施方案中,本公开涉及通过C10、C3或三嗪接头与三天线GalNAc酸缀合的任何寡核苷酸,其中所述寡核苷酸指导由RNA酶H或RNA干扰机制介导的靶转录物的敲低,其中RNA干扰机制由包含1、2或更多个链的RNAi剂指导。

[1439] 另外,本公开示出,在所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸中,单链RNAi剂的5'-末端的第一核苷酸不必与靶转录物的序列的对应部分匹配。

[1440] 使用多种根据本公开的方法,制备并表征能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物是表1A中所列的PNPLA3寡核苷酸类型的单链RNAi剂。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物是图1中所示的任何格式所列的PNPLA3寡核苷酸类型的单链RNAi剂。

[1441] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够通过RNA酶H介导的敲低和RNA干扰来指导靶转录物的敲低。这种PNPLA3寡核苷酸在本文中描述为双重机制或杂交寡核苷酸。

[1442] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含任何附加化学部分,其包括但不限于在以下任一项中描述或引用的任何GalNAc部分:5,382,524;5,491,075;5,545,553;5,705,367;5,733,765;5,786,184;5,798,233;5,854,042;5,871,990;5,945,322;6,165,469;6,187,310;6,342,382;6,465,220;6,503,744;6,699,705;6,723,545;6,780,624;6,825,019;6,905,867;6,911,337;7,026,147;7,078,207;7,138,258;7,166,717;7,169,593;7,169,914;7,189,836;7,192,756;7,202,353;7,208,304;7,211,657;7,217,549;7,220,848;7,238,509;7,338,932;7,371,838;7,384,771;7,462,474;7,598,068;7,608,442;7,682,787;7,723,092;8,039,218;8,137,941;8,268,596;8,871,723;或9,222,080。

[1443] 双重机制或杂交寡核苷酸

[1444] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述或本领域已知的任何寡核苷酸的结构元件。

[1445] 如本文所公开的,一些寡核苷酸能够通过RNA酶H介导的敲低和RNA干扰来指导转录物靶标的敲低。

[1446] 如本文所公开的,一些寡核苷酸(包括但不限于本文所述的作为双重机制或杂交寡核苷酸或杂交RNAi剂的那些寡核苷)能够同时通过RNA酶H介导的敲低和RNA干扰来指导转录物靶标的敲低。

[1447] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开表明,杂交寡核苷酸可以对能够仅通过RNA酶H介导的敲低来指导敲低的PNPLA3寡核苷酸或能够仅通过RNA干扰来指导敲低的PNPLA3寡核苷酸具有特定的优势。例如,如果将若干种杂交寡核苷酸引入同一细胞,则一些但不是全部杂交寡核苷酸可参与RISC途径;那些不参与RISC途径的杂交寡核苷酸可以参与RNA酶H介导的途径。例如,如果将若干种杂交寡核苷酸引入同一细胞,则一些但不是全部杂交寡核苷酸可参与RNA酶H介导的途径;那些不参与RISC途径的杂交寡核苷酸可以参与RISC途径。不希望受任何特定理论的束缚,本公开表明,与能够仅通过RNA酶H介导的敲低来指导敲低的PNPLA3寡核苷酸或能够仅通过RNA干扰来指导敲低的PNPLA3寡核苷酸相比,杂交寡核苷酸能够介导更有效的敲低,因为所述杂交寡核苷酸能够同时通过两种途径指导敲低。在至少一些细胞中,细胞隔室与细胞隔室之间的RNA酶H活性和RNA干扰水平可能不同。在一些实施方案中,杂交寡核苷酸可通过RNA酶H介导的敲除或RNA干扰在各种细胞隔室中指导敲低。在一些实施方案中,如果RNA酶H被寡核苷酸饱和,则过量的寡核苷酸可用于RNA干扰介导的敲低。在一些实施方案中,如果Ago-2被寡核苷酸饱和,则过量的寡核苷酸可用于RNA酶H介导的敲除。

[1448] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含同时允许通过RNA酶H介导的敲低和通过RNA干扰的敲低的结构。

[1449] 据报道,RNA酶H和RNAi均涉及靶mRNA的敲低,但是它们涉及不同的机制。据报道,RNA酶H天然涉及单链DNA分子,所述分子与mRNA靶标结合并通过空间位阻翻译或通过RNA/DNA双链体充当RNA酶H(其切割mRNA靶标)的底物来降低表达。

[1450] 相比之下,据报道,RNAi天然涉及由Dicer天然产生的双链RNA分子,其带有两个3'突出端,包括反义链和有义链。在双链体解链时将链分开,并将反义链掺入包括Argonaute-2在内的RISC(RNA干扰沉默复合物)中。反义链充当RISC识别并切割互补mRNA靶标的向导。如本文所示,尽管单链RNAi剂不是由Dicer天然产生的,但是某些形式的单链RNAi剂也是有效的。

[1451] 据报道,RNA酶H和RISC天然更喜欢两种在结构上不同的分子。RNA酶H天然使用单链DNA分子靶向mRNA靶标,从而形成DNA/RNA双链体。据报道,RISC据报道天然使用单链RNA反义链靶向mRNA靶标,从而形成RNA/RNA双链体。Crooke等1995Biochem.J.312:599-608;以及Elbashir等Nature 2001 411:494。

[1452] Crooke等1995Biochem.J.312:599-608还报道,已结晶并研究了大肠杆菌RNA酶H1,并且据报道优选的底物是RNA/DNA双链体。在DNA链中,据报道2'-修饰(诸如2'-OMe和2'-F)降低或消除了RNA酶H活性。另外,据报道,对于RNA干扰,DNA完全替代RNA消除了双链RNAi剂的RNA干扰活性。Elbashir等2001EMBO J.20:6877-6888。因此,据报道,RNA酶H介导的敲低据报道需要一段DNA(2'-脱氧),而RNA干扰可通过用DNA(2'-脱氧)替代一段核苷酸来消除。

[1453] 相比之下,如本文所示,2'-OMe和2'-F修饰高度适用于单链RNAi剂。因此申请人设计并构建了若干种寡核苷酸,其包含:(a)包含2'-修饰的核苷酸的种子区域;和(b)包含2'-脱氧(2'-脱氧)核苷酸区段的种子后区域。本文示出它们同时通过RNAi和RNA酶H介导的敲低机制起作用。

[1454] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火并介

导RNA干扰的种子区域;和(b)包含2'-脱氧(2'-脱氧)区域能够使第二互补靶mRNA区域退火并指导RNA酶H介导的敲低的种子后区域。种子区域可以任选地包含RNA或修饰的核苷酸,例如,具有2'修饰(包括但不限于2'-F、2'-OMe和2'-MOE),其中所述RNA或修饰的核苷酸包含天然糖和/或天然碱基和/或修饰的碱基和/或核苷酸间键联。

[1455] 据报道,至少在一些情况下,有效用于RNA酶H介导的敲低的DNA(2'-脱氧)区域的最小长度为约5个连续的DNA(2'-脱氧);据报道,此最小脱氧长度与使用部分纯化的哺乳动物RNA酶H酶在体外有效激活RNA酶H所需的最小长度相关。Monia等1993JBC 268:14514-14522。

[1456] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火的种子区域;和(b)包含2'-脱氧区域的种子后区域,其中所述杂交寡核苷酸能够同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中所述2'-脱氧区域包含至少5个连续的2'-脱氧。在一些实施方案中,2'-脱氧可以是DNA或修饰的核苷酸,例如具有2'-脱氧的修饰的核苷酸,其中所述DNA或修饰的核苷酸包含天然糖和/或天然碱基,和/或修饰的碱基和/或任何核苷酸间键联。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个核苷酸的连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1457] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火的种子区域;和(b)包含2'-脱氧区域的种子后区域,其中所述杂交寡核苷酸能够同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中所述2'-脱氧区域包含至少5个连续的2'-脱氧。在一些实施方案中,2'-脱氧可以是DNA或修饰的核苷酸,例如具有2'-脱氧的修饰的核苷酸,其中所述DNA或修饰的核苷酸包含天然糖和/或天然碱基,和/或修饰的碱基和/或任何核苷酸间键联。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含一段连续的核苷酸,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含或是连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,2'-脱氧区域包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个核苷酸的连续的核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧,并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1458] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开指出WO 2015/107 425已经报道,可以通过指导RNA酶H切割的反义寡核苷酸中的硫代磷酸酯中的手性中心的排列来调节由RNA酶H介导的切割。例如,侧接至少2个或3个Sp的单个Rp的布置可以改变切割样式,使得切割位点的数目减少并且控制RNA酶H介导的切割的位点。

[1459] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火的种子区域;和(b)包含2'-脱氧区域的种子后区域,其中所述杂交寡核苷酸能够同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中所述2'-脱氧区域包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个核苷酸的连续核苷酸区段,其中每个核苷酸是2'-脱氧并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1460] 在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含(a)能够与第一互补靶mRNA区域退火的种子区域;和(b)包含2'-脱氧区域的种子后区域,其中所述杂交寡核苷酸能够同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,其中所述2'-脱氧区域包含至少9个核苷酸的连续核苷酸区段,其

中每个核苷酸是2'-脱氧并且每个核苷酸间键联是硫代磷酸酯。

[1461] 在一些实施方案中,第一和第二互补靶mRNA区域是相同靶mRNA的区域。

[1462] 在一些实施方案中,第一和第二互补靶mRNA区域是不同靶mRNA的区域。

[1463] 在杂交寡核苷酸的一些实施方案中,种子区域包含能够与互补靶mRNA区退火并指导RNA酶H介导的敲低的DNA区域。

[1464] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开指出,在许多情况下,RNA酶H切割与单链DNA结合的单链RNA靶标。在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含单链2'-脱氧部分,其能够结合靶RNA转录物,从而形成RNA酶H的底物。在一些实施方案中,杂交寡核苷酸包含单链2'-脱氧部分(其包含核苷酸间键联,其可以是本文所述或本领域已知的任何核苷酸间键联),其能够结合靶RNA转录物,从而形成RNA酶H的底物。

[1465] 在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少4个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少5个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少6个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少7个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少8个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少9个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:包含至少10至20个连续的2'-脱氧的核苷酸的序列。

[1466] 在杂交寡核苷酸的一些实施方案中,种子后区域包含:至少9个连续的2'-脱氧。在单链RNAi剂的一些实施方案中,种子后区域包含:至少10个连续的2'-脱氧。本文在附图和表中作为非限制性实例描述并示出了各种单链RNAi剂和反义寡核苷酸介导RNA干扰或RNA酶H敲低的能力。

[1467] 实验数据(未示出)和在本文其他地方的详细描述证明,推定的双重机制寡核苷酸能够介导RNA干扰和RNA酶H敲低。在两种不同的体外Ago-2测定中测试RNA干扰,并在体外RNA酶H测定中测试RNA酶H敲低。

[1468] 实验使用RNA酶H测定,其中WV-1868(ASO,介导RNA酶H敲低机制)作为阳性对照,并且WV-2110(单链RNAi剂)作为阴性对照。RNA分子WV-2372用作测试底物。在RNA酶H测定中,双重机制寡核苷酸WV-2111介导RNA酶H敲低。

[1469] 等位基因特异性抑制

[1470] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够介导等位基因特异性抑制(或等位基因特异性敲低)。

[1471] 在一些实施方案中,在一些疾病状态下,患者(例如人类患者)可包含相同基因的两个拷贝,其中一个拷贝是野生型(与疾病无关),而在另一条染色体上的另一个拷贝具有突变(与疾病有关)。在一些实施方案中,野生型和突变型等位基因可以通过突变处的特定序列来区分,或者可以通过有害突变之外(例如在SNP处)的序列来区分。同时将突变型和野生型等位基因敲低有时是不需要的,因为野生型基因的表达可能是必要的或有益的,而突变型基因的表达可能是有害的或与疾病有关的。

[1472] 在一些实施方案中,可以设计靶序列,其优先于野生型转录物识别突变型转录物

(例如,包含有害突变或靶向的SNP的转录物)。

[1473] 在一些实施方案中,在被称为等位基因特异性抑制或等位基因特异性敲低的过程中,等位基因特异性寡核苷酸使突变型等位基因的敲低最大化,同时使野生型等位基因的敲低最小化。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够选择性地靶向基因的突变型等位基因。在一些实施方案中,与野生型等位基因相比,PNPLA3寡核苷酸能够以至少2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、15-、20-、25-、30-、35-、40-、45-或50-倍的特异性敲低突变型等位基因。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够选择性地靶向基因的突变型等位基因,其中所述突变型等位基因由一个等位基因表示,而野生型等位基因由不同的等位基因表示。在一些实施方案中,突变可以是双突变(例如,经常在同一基因组中一起出现的两个非常接近的突变)。在一些实施方案中,突变在PNPLA3中。在一些实施方案中,突变是PNPLA3中的双突变。在一些实施方案中,I148M突变在PNPLA3中。在一些实施方案中,等位基因特异性寡核苷酸是反义寡核苷酸。在一些实施方案中,等位基因特异性寡核苷酸是PNPLA3寡核苷酸和单链RNAi剂。在一些实施方案中,等位基因特异性寡核苷酸是具有或包含本文所述的任何格式或结构的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1474] 在一些实施方案中,在被称为等位基因特异性抑制的过程中,等位基因特异性RNAi剂使突变型等位基因的敲低最大化,同时使野生型等位基因的敲低最小化。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够选择性地靶向基因的突变型等位基因。在一些实施方案中,与野生型等位基因相比,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够以至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍的特异性敲低突变型等位基因。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够选择性地靶向基因的突变型等位基因,其中所述突变型等位基因由一个等位基因表示,而野生型等位基因由不同的等位基因表示。在一些实施方案中,突变可以是双突变(例如,经常在同一基因组中一起出现的两个非常接近的突变)。在一些实施方案中,突变在PNPLA3中。在一些实施方案中,突变是PNPLA3中的双突变。在一些实施方案中,I148M突变在PNPLA3中。

[1475] 在一些实施方案中,设计等位基因特异性RNAi剂的方法的非限制性实例是将SNP或单核苷酸多态性掺入碱基序列中,其中突变型等位基因由SNP的一个等位基因表示,而野生型等位基因由所述SNP的不同的等位基因表示。在一些实施方案中,SNP可以位于并非疾病有关突变的位点的位置,但是仍然用于区分两个等位基因。

[1476] 在一些实施方案中,设计等位基因特异性RNAi剂的方法的非限制性实例是将突变掺入碱基序列中,其中突变型等位基因由一个等位基因表示,而野生型等位基因由不同的等位基因表示。在一些实施方案中,突变可以是双突变(例如,经常在同一基因组中一起出现的两个非常接近的突变)。在一些实施方案中,突变在PNPLA3中。在一些实施方案中,突变是PNPLA3中的双突变。在一些实施方案中,I148M突变在PNPLA3中。

[1477] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含在基因的突变型与野生型等位基因之间区分的SNP或其他序列,并且能够相对于野生型等位基因选择性地敲低突变型等位基因。

[1478] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂的靶序列表示靶转录物的一个等位基因。

[1479] 如本公开所示,所提供的单链RNAi剂能够指导等位基因特异性RNA干扰,其中

ssRNAi能够敲低具有一个序列(例如,突变型序列)的靶mRNA,但不能或不能显著地敲低不同序列相关的靶mRNA(例如突变型序列的野生型型式)。在一些实施方案中,突变型和野生型序列在一个碱基位置处不同。在一些实施方案中,突变型和野生型序列在两个碱基位置处不同。在一些实施方案中,突变型和野生型序列在三个碱基位置处不同。

[1480] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够指导针对靶基因的等位基因的RNA干扰,而在相同浓度下不能介导针对靶基因的不同等位基因的RNA干扰。

[1481] 在一些实施方案中,能够指导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂在其碱基序列中包含在特定位置处的一个或多个SNP。这些特定位置可以是已知或疑似对错配敏感的位置;例如,在这些位置中的一个或多个处的错配可以改变RNAi活性的水平。参见例如,Miller等2003Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:7195-7200;Brummelkamp等2002Cancer Cell 2:243;以及Naito等2004Nucl.Acids Res.32:W124-W129。在许多情况下,种子区域与mRNA靶标的完全互补对于高RNAi活性是必要的或有益的;相反,在许多情况下,在5'核苷酸部分或3'-末端二核苷酸处不需要互补。在一些实施方案中,等位基因特异性单链RNAi剂在种子区域中具有SNP。

[1482] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够介导等位基因特异性抑制。

[1483] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够介导等位基因特异性抑制。

[1484] 在一些实施方案中,单链RNAi剂能够介导等位基因特异性抑制。

[1485] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够介导PNPLA3的等位基因特异性抑制。

[1486] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸能够介导PNPLA3的等位基因特异性抑制。

[1487] 在一些实施方案中,单链RNAi剂能够介导PNPLA3的等位基因特异性抑制。

[1488] 在一些实施方案中,在一些实施方案中,等位基因特异性单链RNAi剂在种子区域中具有SNP,所述SNP位于种子与3'-末端二核苷酸之间。

[1489] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在任何位置包含一个或多个SNP的碱基序列。

[1490] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在选自3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19的任何位置包含一个或多个SNP的碱基序列。

[1491] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在种子区域内部的任何位置包含一个或多个SNP的碱基序列。

[1492] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在种子区域外部的任何位置包含一个或多个SNP的碱基序列。

[1493] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在种子后区域中的任何位置包含一个或多个SNP的碱基序列。

[1494] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在以下任一位置包含一个或多个SNP的碱基序列:8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18。

[1495] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在以下任一位置包含一个或多个SNP的碱基序列:14或17。

[1496] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有在以下任一位置包含一个

或多个SNP的碱基序列:9或10。

[1497] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有包含两个或更多个SNP的碱基序列。

[1498] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有包含两个SNP的碱基序列。

[1499] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂具有包含两个SNP(位置14和17各一个)的碱基序列。

[1500] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够指导针对基因的突变型等位基因的相对于同一基因的野生型等位基因的等位基因特异性抑制。

[1501] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂能够指导针对PNPLA3的突变型等位基因的相对于PNPLA3的野生型等位基因的等位基因特异性抑制。

[1502] 表70A示出了不同的PNPLA3单链RNAi剂指导的体外效能和等位基因特异性抑制。测试的寡核苷酸是:Huh7和Hep3B细胞中的WV-3387。表70B和表70C示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效力和IC50。测试的寡核苷酸是:WV-4054和WV-4098。WV-4054具有与在位置14和17处的一对SNP rs738408T和rs738409G互补的序列,并且能够介导针对包含这两个SNP的细胞(Huh7)的等位基因特异性RNA干扰。此寡核苷酸在不包含这些SNP而是具有rs738408C和rs738409C的不同细胞(Hep3B)中在测试浓度下不会介导显著的RNAi干扰。此外,单链RNAi剂WV-4098在测试浓度下还能够敲低互补序列(在Huh7细胞中具有SNP rs738408T和rs738409G),但不能敲低非互补序列(在Hep3B细胞中具有SNP rs738408C和rs738409C)。

[1503] 表71示出了单链RNAi剂指导的针对PNPLA3的体外效力和等位基因特异性敲低。测试的寡核苷酸是:表71A,WV-2477、WV-3387和WV-4054;表71B,非等位基因特异性对照ASO WV-3387;以及表71C,等位基因特异性ssRNAi WV-4054。

[1504] 表90A至90F示出了靶向PNPLA3的不同寡核苷酸的体外等位基因特异性抑制。表90A示出了测试的寡核苷酸中I148M的双突变,以及测试的寡核苷酸格式的卡通画。针对以下测试具有I148M双突变的寡核苷酸:Hep3B细胞(野生型)和Huh7细胞(具有双突变)。寡核苷酸与脂质体一起递送,并在48小时测试细胞。测试的寡核苷酸是:表90B,WV-7778至WV-7793;WV-3858至WV-3864;表90C,WV-7794至WV-7816;表90D,WV-7817至WV-7839;表90E,WV-7840至WV-7862;表90F,WV-993、WV-3390和WV-4054,其中WV-4054是单链RNAi剂。在这些数据中,所用的寡核苷酸是具有翼-核心-翼格式的反义寡核苷酸,其中所述核心是2'-脱氧硫代磷酸酯(立体化学是无规的),并且所述翼完全是2'-OMe,完全是2'-MOE,或者全部是具有5'和3'末端LNA的2'-OMe或全部是带有5'和3'末端LNA的2'-MOE。所述翼还是磷酸二酯以及5'和3'端立体无规的硫代磷酸酯。

[1505] 数据证明许多寡核苷酸能够指导等位基因特异性抑制(例如,等位基因特异性敲低)。表90B至90E中所示的寡核苷酸在Huh7细胞中示出突变型等位基因的显著敲低,而在Hep3B细胞中示出野生型等位基因的相对较少的敲低。即使在翼中,单个错配也足以介导等位基因特异性抑制;然而,在至少一些情况下,当DNA核心中同时存在两个错配时,等位基因特异性抑制作用增加。

[1506] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开指出,在许多情况下,引入立体控制的手性核苷酸间键联(代替立体无规的手核苷酸间键联)可以增加PNPLA3寡核苷酸的等位基因特

异性抑制、稳定性、功效、特异性、递送和/或白蛋白结合。

[1507] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个立体纯手性核苷酸间键联。

[1508] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个呈Sp构型的立体纯手性核苷酸间键联。

[1509] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个呈Sp构型的立体纯手性核苷酸间键联以及一个或多个呈Rp构型的立体纯手性核苷酸间键联。

[1510] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个立体纯硫代磷酸酯。

[1511] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个呈Sp构型的立体纯硫代磷酸酯。

[1512] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个呈Rp构型的立体纯硫代磷酸酯。

[1513] 在一些实施方案中,能够介导等位基因特异性抑制的PNPLA3寡核苷酸包含一个或多个呈Sp构型的立体纯硫代磷酸酯以及一个或多个呈Rp构型的立体纯硫代磷酸酯。

[1514] 在一些实施方案中,能够等位基因特异性抑制靶基因或其基因产物的PNPLA3寡核苷酸可包含本文所述的任何结构或格式。

[1515] 寡核苷酸的多聚体

[1516] 在一些实施方案中,多聚体包含以下中的两个或更多个:PNPLA3寡核苷酸、指导RNA干扰的PNPLA3寡核苷酸、指导RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸和/或同时指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的PNPLA3寡核苷酸可以具有本文所述或本领域已知的任何格式或其结构元件。

[1517] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物包含一种或多种所提供的寡核苷酸类型的组合。化学和医学领域技术人员将认识到对提供的组合物中的一种或多种类型的所提供的寡核苷酸中的每一种的选择以及量都将取决于所述组合物的预定用途。也就是说,相关领域技术人员将设计所提供的手性控制的寡核苷酸组合物以使其中含有的所提供的寡核苷酸的量和类型导致组合物总体上具有某些所需的特征(例如生物上所需的特征、治疗上所需的特征等)。

[1518] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸类型选自WO/2014/012081和WO/2015/107425中所述的那些类型,其中的每个的寡核苷酸、寡核苷酸类型、寡核苷酸组合物及其方法以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含选自WO/2014/012081和WO/2015/107425中所述的那些的PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸。

[1519] 在一些实施方案中,本公开涉及包含手性控制的寡核苷酸组合物的组合物,其中所述寡核苷酸的序列包含本文公开的任何手性控制的寡核苷酸组合物的序列或由其组成。

[1520] 在一些实施方案中,本公开涉及包含手性控制的寡核苷酸组合物的组合物,其中所述寡核苷酸的序列包含表1A中列出的或本文其他地方描述的任何单链RNAi剂组合物的序列或由其组成。

[1521] 在一些实施方案中,本公开涉及包含寡核苷酸(例如单链RNAi剂、反义寡核苷酸

和/或其他寡核苷酸)的多聚体的组合物,其至少一个具有如本文所述的结构、序列或其他特征。

[1522] 在一些实施方案中,本公开涉及包含单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸的多聚体的组合物,其中所述多聚体的大小为至少约16kD。

[1523] 在一些实施方案中,本公开涉及包含单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸的多聚体的组合物,并且还包含碳水化合物部分、脂质部分、靶向部分或其他化合物。

[1524] 在一些实施方案中,本公开涉及包含单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸的多聚体的组合物,并且还包含碳水化合物部分、脂质部分、靶向部分或其他化合物,其总重量大小为至少约16kD。

[1525] 在一些实施方案中,多聚体可包含至少2个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少3个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少4个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少5个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少6个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少7个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少8个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少9个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体可包含至少10个单链RNAi剂、反义寡核苷酸和/或其他寡核苷酸。

[1526] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开表明寡核苷酸的多聚化可以提供具有足以通过淋巴系统转运的总分子量的多聚体。Supersaxo等报道,药物的分子量与经淋巴吸收的剂量比例之间存在线性关系,并且分子量大于16kD的分子主要被淋巴管吸收,淋巴管从皮下注射部位汲取药物。Supersaxo等1990Pharm.Res.7:167-9。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有约8kD的分子量。在一些实施方案中,包含多个寡核苷酸的多聚体具有至少约16kD的分子量。

[1527] 不希望受到任何特定理论的束缚,本公开指出,据报道皮下注射被广泛用于药物(包括但不限于口服有效性有限的那些药物)递送,或用作改变或延长释放曲线的手段。McLennan等2005Drug Disc.Today:Technologies 2:89-96。据报道,皮下注射可将药物递送到皮肤真皮下的间隙区域,药物从此处进入循环系统或淋巴系统;据报道,转运受分子量、粒径、电荷、亲水性以及与间质中组分的相互作用的影响。据报道,药物制剂特征,诸如药物浓度、注射量、离子强度、粘度和pH值,也都在皮下注射部位扩散中发挥作用。McLennan等2005;Paniagua等2012Lymphology 45:144-153;以及Bagby等2012Pharmaceutics 4:276-295。

[1528] 在一些实施方案中,调节分子量、粒径、电荷、亲水性,以及与间质中组分的相互作用,药物浓度,注射体积,离子强度,粘度和/或pH中的一种或多种特征以改善或最大化包含PNPLA3寡核苷酸的组合物的功效、生物利用度或递送。

[1529] 如上所述,据报道分子量大于16kD的分子主要被淋巴管吸收。Supersaxo等1990Pharm.Res.7:167-9。在一些实施方案中,本公开涉及包含寡核苷酸的多聚体的组合物,其中所述多聚体具有至少约16kD的总分子量。在一些实施方案中,本公开涉及包含两种

或更多种不同类型或大小的寡核苷酸的多聚体的组合物,其中所述一种或多种不同类型的多聚体具有至少约16kD的总分子量。

[1530] 在一些实施方案中,多聚体中的每个寡核苷酸都可以靶向相同或不同的靶标。在一些实施方案中,其中多聚体中的每个寡核苷酸都可以靶向相同或不同的靶标,所述多聚体的施用可以用于治疗涉及过度表达或多个靶基因的疾病。在一些实施方案中,其中多聚体中的每个寡核苷酸都可以靶向相同或不同的靶标,所述多聚体的施用可以用于治疗涉及不同靶基因的过度表达的不同疾病。

[1531] 在一些实施方案中,多聚体中的每个寡核苷酸都可以靶向相同靶标中的相同序列。在一些实施方案中,多聚体中的每个寡核苷酸都可以靶向相同靶标中的不同序列。

[1532] 表89A中示出了多聚体的非限制性实例。

[1533] 在一些实施方案中,多聚体包含两个或更多个彼此直接连接(例如,通过键或直接键,诸如共价键)或通过接头连接的寡核苷酸。

[1534] 本文所述或本领域已知的任何接头可用于连接多聚体中的寡核苷酸。表89B和89C示出了构建多聚体和使用各种接头的各种方法。

[1535] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开指出,在至少一些情况下,呈Rp构型的硫代磷酸酯特别容易被核酸酶裂解。在多聚体类型2的一些实施方案中,多聚体基本上是单个长寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含多个较短的寡核苷酸,其通过短接头寡核苷酸连接。在多聚体类型2的一些实施方案中,多聚体基本上是单个长寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含多个较短的寡核苷酸,其通过短接头寡核苷酸连接,其中所述短接头寡核苷酸包含呈Rp构型的一个或多个核苷酸间键联。在多聚体类型2的一些实施方案中,多聚体基本上是单个长寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含多个较短的寡核苷酸,其通过短接头寡核苷酸连接,其中所述短接头寡核苷酸包含呈Rp构型的一个或多个硫代磷酸酯。

[1536] 接头的非限制性实例包括:可切割的接头或可生物降解的接头;不可切割或不可生物降解的接头;包含一个或多个具有呈Rp构型的手性中心的核苷酸间键联的接头;包含一个或多个具有呈Rp构型的手性磷的核苷酸间键联的接头;包含一个或多个呈Rp构型的硫代磷酸酯的接头;包含两个或更多个呈Rp构型的硫代磷酸酯的接头;包含三个或更多个呈Rp构型的硫代磷酸酯的接头;光可切割的接头;1-(5-(N--马来酰亚胺基甲基)-2-硝基苯基)乙醇N-羟基琥珀酰亚胺酯;包含马来酰亚胺基部分的接头;包含N-羟基琥珀酰亚胺酯部分的接头;在碱基处与PNPLA3寡核苷酸缀合的接头;在核苷酸间键联处与PNPLA3寡核苷酸缀合的接头;在糖处缀合的接头;磷酸二酯;磷酸三酯;膦酸甲酯;P3'→N5'氨基磷酸酯;N3'→P5'氨基磷酸酯;N3'→P5'硫代氨基磷酸酯;硫代磷酸酯键联;硫脲接头;C5或C6接头,如美国专利号9,572,891中所述;包含烷基、环烷基、芳基、杂环基和杂芳基的接头;包含取代的烷基、环烷基、芳基、杂环基和杂芳基的接头;具有美国专利号9,512,163的式(A)的结构的接头;包含C1-C12烃基链的接头;聚乙二醇接头;六甘醇接头;烃基链;取代的烃基链;包含以下中的一个或多个的接头:烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、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、烯基杂芳基或炔基异芳基;包含具有选自以下的氨基酸序列的肽的接头:ALAL、APISFFELG、FL、GFN、R/KXX、GRWHTVGLRW E、YL、GF和FF,其中X是任何氨基酸;包含式-(CH2)wS-S(CH2)m-的接头,其中n和m独立地是0至10的整数;包含低pH不稳定键的接头;包含低pH不稳定键的接头,所述键包含胺、亚胺、酯、苯甲亚胺、氨基酯、二原酸酯、聚磷酸酯、聚磷腈、乙缩醛、乙烯基醚、腙、叠氮甲基-甲基马来酸酐、硫代丙酸酯、被掩蔽的内吞内溶剂或柠康基(citraconyl group);支链接头;对切割剂(例如pH、氧化还原电势或降解分子的存在)敏感的可切割接头;氧化还原可切割接头;基于磷酸酯的可切割接头;包含以下的基于磷酸酯的可切割接头:--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--或--O--P(S)(H)--S--;酸可切割接头;基于酯的接头;基于肽的可切割接头;以及包含任何这些接头的部分。

[1537] 在一些实施方案中,接头包含比靶向寡核苷酸更易于被哺乳动物提取物中的肽链内切酶切割的多肽。在一些实施方案中,肽链内切酶是胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胃蛋白酶或肽链内切酶V8。在一些实施方案中,肽链内切酶是组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶L、组织蛋白酶C、木瓜蛋白酶、组织蛋白酶S或内体酸性胰岛素酶。

[1538] 各种接头和寡核苷酸的多聚化方法作为非限制性实例描述于:美国专利号9,370,582;9,371,348;9,512,163;9,572,891;和6,031,091;以及国际公布专利申请WO1998000435;WO2014043544;和WO2013040429。

[1539] 本公开还指出,本文所述的或本领域已知的任何接头可用于将一个或多个寡核苷酸彼此连接,或将一个或多个部分(作为非限制性实例,靶向部分、碳水化合物部分、GalNAc部分、脂质部分等)与一个或多个寡核苷酸(作为非限制性实例,单链RNAi剂、反义寡核苷酸、双链RNAi剂、能够指导或抑制外显子跳跃的PNPLA3寡核苷酸等)连接。

[1540] 用于制备寡核苷酸和组合物的示例性方法

[1541] 用于制备所提供的寡核苷酸和寡核苷酸组合物的方法是本领域众所周知的,包括但不限于描述于WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、PCT/US2016/043542和PCT/US2016/043598中的那些方法,其中的每个的方法和试剂以引用的方式并入本文。

[1542] 手性控制的寡核苷酸。

[1543] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸是手性控制的。

[1544] 在一些实施方案中,本公开提供了手性控制的寡核苷酸组合物,当与参考条件[例如,不存在组合物、存在参考组合物(例如,具有相同碱基序列、相同化学修饰等的寡核苷酸的立体无规组合物,另一种立体异构体的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂等),及其组合]相比时,所述组合物能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[1545] 在一些实施方案中,本公开提供了手性控制的寡核苷酸组合物,当与参考条件(例如,不存在组合物、存在参考组合物(例如,具有相同碱基序列、相同化学修饰等的寡核苷酸的立体无规组合物,另一种立体异构体的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂等),及其组合]相比时,所述组合物通过单链RNA干扰或RNA酶H介导改善的转录物的敲低。

[1546] 本公开尤其提供了手性控制的ssRNAi剂和手性控制的组合物,其包含一种或多种特定的核苷酸类型。在一些实施方案中,如本文所用,短语"寡核苷酸类型"定义具有特定碱基序列、主链键联样式、主链手性中心样式和主链磷修饰样式(例如"-XLR^1"基团)的PNPLA3寡核苷酸。常见指定"类型"的寡核苷酸在结构上关于碱基序列、主链键联样式、主链手性中心样式和主链磷修饰样式是彼此相同的。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸类型的寡核苷酸是相同的。

[1547] 在一些实施方案中,本公开中的所提供的手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂具有与对应的立体无规寡核苷酸或单链RNAi剂混合物不同的性质。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂具有与立体无规寡核苷酸或单链RNAi剂混合物的亲脂性不同的亲脂性。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂在HPLC上具有不同的保留时间。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂可具有与对应的立体无规寡核苷酸或单链RNAi剂混合物的峰保留时间不同的峰保留时间。在如本领域中一般所实施的使用HPLC纯化寡核苷酸或单链RNAi剂的过程中,某些手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂即使不完全损失,也将大部分损失。在如本领域中一般所实施的使用HPLC纯化寡核苷酸或单链RNAi剂的过程中,某些手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂即使不完全损失,也将大部分损失。一个后果是立体无规寡核苷酸或单链RNAi剂混合物的某些非对映异构体(某些手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂)在测定中未被测试。另一后果是在各批次之间,由于不可避免的仪器和人为误差,假定"纯"立体无规寡核苷酸或单链RNAi剂将具有不一致的组成,因为组合物中的非对映异构体以及它们的相对量和绝对量在各批次之间不同。本公开中提供的手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂和手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂组合物克服了此类问题,因为手性控制的寡核苷酸或单链RNAi剂以手性控制的方式合成为单一非对映体(非对映异构体),并且寡核苷酸或单链RNAi剂包含预定水平的一种或多种单独的寡核苷酸或单链RNAi剂类型。

[1548] 化学和合成领域技术人员将了解本公开的合成方法在合成所提供的单链RNAi剂的每个步骤过程在提供控制程度以使得单链RNAi剂的每个核苷酸单元可提前被设计和/或选择成在键联磷处具有特定立体化学并且/或者在键联磷和/或特定碱基和/或特定糖处具有特定修饰。在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂提前被设计和/或选择成在核苷酸间键联的键联磷处具有立体中心的特定组合。

[1549] 在一些实施方案中,使用本公开的方法制备的所提供的单链RNAi剂被设计和/或确定成具有键联磷修饰的特定组合。在一些实施方案中,使用本公开的方法制备的所提供的单链RNAi剂被设计和/或确定成具有碱基的特定组合。在一些实施方案中,使用本公开的方法制备的所提供的单链RNAi剂被设计和/或确定成具有糖的特定组合。在一些实施方案中,使用本本公开的方法制备的所提供的单链RNAi剂被设计和/或确定成具有一种或多种以上结构特征的特定组合。

[1550] 本公开的方法表现出高度手性控制。例如,本公开的方法有助于控制所提供的单

链RNAi剂内的每一单个键联磷的立体化学构型。在一些实施方案中,本公开的方法提供一种单链RNAi剂,其包含一个或多个独立地具有式I的结构的修饰的核苷酸间键联。

[1551] 在一些实施方案中,本公开的方法提供一种单链RNAi剂,其是单聚体。在一些实施方案中,本公开的方法提供一种单链RNAi剂,其是具有Rp构型的单聚体。在一些实施方案中,本公开的方法提供一种单链RNAi剂,其是具有Sp构型的单聚体。

[1552] 在一些实施方案中,本公开的方法提供一种手性控制的单链RNAi剂组合物,即含有预定水平的单独的单链RNAi剂类型的单链RNAi剂组合物。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含一种单链RNAi剂类型。在一些实施方案中,单链RNAi剂包含多于一种的单链RNAi剂类型。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂组合物包含多种寡核苷酸和/或单链RNAi剂类型。本文描述了根据本公开制备的示例性手性控制的寡核苷酸和单链RNAi剂组合物。

[1553] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含手性核苷酸间键联(例如,是立体控制的)。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含立体控制的手性核苷酸间键联和非立体控制的手性核苷酸间键联。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸包含立体控制的手性核苷酸间键联和不是手性的核苷酸间键联。表71A至71C中示出了立体控制的(手性控制的)寡核苷酸的格式的各种非限制性实例。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S1的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S2的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S3的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S4的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S5的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S6的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S7的结构。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸具有格式S8的结构。在一些实施方案中,

[1554] PNPLA3寡核苷酸具有格式S9的结构。在一些实施方案中,

[1555] PNPLA3寡核苷酸具有格式S10的结构。在一些实施方案中,

[1556] PNPLA3寡核苷酸具有格式S11的结构。在一些实施方案中,

[1557] PNPLA3寡核苷酸具有格式S12的结构。在一些实施方案中,

[1558] PNPLA3寡核苷酸具有格式S13的结构。在一些实施方案中,

[1559] PNPLA3寡核苷酸具有格式S14的结构。在一些实施方案中,

[1560] PNPLA3寡核苷酸具有格式S15的结构。在一些实施方案中,

[1561] PNPLA3寡核苷酸具有格式S16的结构。在一些实施方案中,

[1562] PNPLA3寡核苷酸具有格式S17的结构。在一些实施方案中,

[1563] PNPLA3寡核苷酸具有格式S18的结构。在一些实施方案中,

[1564] PNPLA3寡核苷酸具有格式S19的结构。在一些实施方案中,

[1565] PNPLA3寡核苷酸具有格式S20的结构。在一些实施方案中,

[1566] PNPLA3寡核苷酸具有格式S21的结构。在一些实施方案中,

[1567] PNPLA3寡核苷酸具有格式S22的结构。在一些实施方案中,

[1568] PNPLA3寡核苷酸具有格式S23的结构。在一些实施方案中,

[1569] PNPLA3寡核苷酸具有格式S24的结构。在一些实施方案中,

[1570] PNPLA3寡核苷酸具有格式S25的结构。在一些实施方案中,

[1571] PNPLA3寡核苷酸具有格式S26的结构。在一些实施方案中,

[1572] PNPLA3寡核苷酸具有格式S27的结构。在一些实施方案中，

[1573] PNPLA3寡核苷酸具有格式S28的结构。在一些实施方案中，

[1574] PNPLA3寡核苷酸具有格式S29的结构。在一些实施方案中，

[1575] PNPLA3寡核苷酸具有格式S30的结构。在一些实施方案中，

[1576] PNPLA3寡核苷酸具有格式S31的结构。在一些实施方案中，

[1577] PNPLA3寡核苷酸具有格式S32的结构。在一些实施方案中，

[1578] PNPLA3寡核苷酸具有格式S33的结构。在一些实施方案中，

[1579] PNPLA3寡核苷酸具有格式S34的结构。在一些实施方案中，

[1580] PNPLA3寡核苷酸具有格式S35的结构。在一些实施方案中，

[1581] PNPLA3寡核苷酸具有格式S36的结构。在一些实施方案中，

[1582] PNPLA3寡核苷酸具有格式S37的结构。在一些实施方案中，

[1583] PNPLA3寡核苷酸具有格式S38的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S39的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S40的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S41的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S42的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S43的结构。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸具有格式S44的结构。

[1584] 在一些实施方案中，本公开的方法提供了关于键联磷的构型手性纯的组合物。也就是说，在一些实施方案中，本公开的方法提供了组合物，其中的寡核苷酸关于键联磷的构型以单一非对映体的形式存在于所述组合物中。

[1585] 在一些实施方案中，本公开的方法提供了关于键联磷的构型手性一致的组合物。也就是说，在一些实施方案中，本公开的方法提供了组合物，其中的所有核苷酸单元关于键联磷的构型都具有相同立体化学，例如所有核苷酸单元在键联磷处都具有Rp构型，或所有核苷酸单元在键联磷处都具有Sp构型。

[1586] 在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含至少一个Sp(例如，呈Sp构型的具有手性中心的硫代磷酸酯或其他核苷酸间键联)。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含至少5个Sp。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含至少10个Sp。在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂包含至少15至25个Sp。

[1587] 如本文所示，掺入一个或多个Sp核苷酸间键联或者一个或多个Sp PS(硫代磷酸酯)对单链RNAi剂执行两种功能：(a)它增加了针对核酸酶的稳定性；并且(b)不干扰RNA干扰活性。尽管单链RNAi剂和双链RNAi剂在许多方面不同，但本公开指出，据报道，已尝试对双链RNAi剂进行许多化学修饰，其中所述修饰不能同时(a)使分子针对核酸酶稳定；和(b)允许RNA干扰活性。据报道，许多化学修饰执行一种功能，但不执行另一种功能。据报道，双链RNAi剂的一些化学修饰可使分子针对核酸酶稳定，但会干扰或消除RNAi活性。据报道，双链RNAi剂的其他化学修饰没有干扰RNAi的活性，但也没有使分子针对核酸酶稳定。参见例如，Czauderna等2003Nucl.Acids Res.31:2705-2716;Hadwiger等2005，第194-206页，in RNA interference Technology，K.Appasani编，Cambridge University Press，Cambridge，UK;Deleavey等2009Curr.Prot.Nucl.Acid Chem.16.3.1-16.3.22;Terrazas等2009Nucl.Acids Res.37:346-353;Schwarz等2002Mol.Cell 10:537-548;以及Lipardi等2001Cell 107:299-307。双链RNAi剂的化学修饰只有少数能够执行两种功能。此外，

Matranga等2005Cell 123:607-620表明:将单个Sp核苷酸间键联(例如单个Sp PS)引入双链RNAi剂的有义链大大降低RISC组装和RNA干扰活性。因此,具有单个Sp核苷酸间键联(例如单个Sp PS)的双链RNAi剂的化学修饰不能(b)允许RNA干扰活性。因此,本公开致力于测试将Sp核苷酸间键联或Sp PS掺入单链RNAi剂中的影响。本文所示的数据令人惊讶地表明,掺入Sp核苷酸间键联或Sp PS对单链RNAi剂执行两种功能:(a)它增加了针对核酸酶的稳定性;并且(b)不干扰RNA干扰活性。

[1588] 通过将5'-末端和/或3'-末端的立体无规硫代磷酸酯转化为呈Sp构型的硫代磷酸酯,增加了单链RNAi剂针对核酸酶的稳定性。通过将本文鉴定的核酸酶切割位点处的立体无规硫代磷酸酯转化为呈Sp构型的硫代磷酸酯,可以进一步增加稳定性。

[1589] 不希望受任何特定理论的束缚,本公开内容表明掺入呈Sp构型的硫代磷酸酯或其他手性核苷酸间键联可以保护单链RNAi剂免受核酸酶。实验揭示了在靶向不同基因APOC3的立体无规的单链RNAi剂WV-2817中鉴定出的核酸酶切割位点。这些主要切割位点位于两个嘧啶之间(5'-U'U-3'、5'-U'U-3'或5'-T'U-3',其中'表示切割位点)。还鉴定了立体无规单链RNAi剂WV-3242的另外的主要核酸酶切割位点:5'-U'U-3'、5'-C'U-3'和5'-T'U-3'。在六个主要核酸酶切割位点中,五个位于两个相邻的嘧啶之间,而一个与嘧啶相邻。

[1590] 还测试了包含多个Sp核苷酸间键联(例如,Sp PS)的单链RNAi剂,以确定Sp是否消除RNAi活性。本公开指出,先前的工作已经表明,如果转化成立体控制的型式,许多立体无规的寡核苷酸可以降低或完全丧失其酶活性或生物学活性。对于许多先前所述的寡核苷酸,Sp核苷酸间键联的引入可降低或消除活性。

[1591] 表44令人惊讶地示出,除了增加稳定性之外,用Sp核苷酸间键联(例如,Sp PS)替代多个核苷酸间键联(无论是立体无规还是磷酸二酯)并没有降低或消除单链RNAi剂的RNA干扰活性。这些结果也是令人惊讶的,因为据报道,已知在许多情况下将Sp PS引入立体无规寡核苷酸降低生物学活性。因此,引入一个或多个Sp核苷酸间键联或Sp PS既增加了单链RNAi剂的稳定性,又没有降低或消除RNAi活性。

[1592] 表69A至C也令人惊讶地示出,除了增加稳定性之外,用Sp核苷酸间键联(例如,Sp PS)替代多个核苷酸间键联(无论是立体无规还是磷酸二酯)增加单链RNAi剂的稳定性,并且同时没有降低或消除单链RNAi剂的RNA干扰活性。在一些情况下,活性增加。这些结果也是令人惊讶的,因为据报道,已知在许多情况下将Sp PS引入立体无规寡核苷酸降低生物学活性。因此,引入一个或多个Sp核苷酸间键联或Sp PS既增加了单链RNAi剂的稳定性,又没有降低或消除RNAi活性。

[1593] 在一些实施方案中或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi包含1个或多个Sp核苷酸间键联。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi在寡核苷酸或单链RNAi剂的5'和/或3'-末端包含1个或多个Sp核苷酸间键联。在一些实施方案中或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi在易于被核酸酶切割的位点处包含1个或多个Sp核苷酸间键联。

[1594] 在一些实施方案中或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi包含1个或多个Sp PS。在一些实施方案或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi在寡核苷酸或单链RNAi剂的5'和/或3'-末端包含1个或多个Sp PS。在一些实施方案中或单链RNAi剂中,寡核苷酸或单链RNAi在易于被核酸酶切割的位点处包含1个或多个Sp PS。

[1595] 本公开尤其认识到单链RNAi剂的立体选择性(而不是立体无规或外消旋)制备的

挑战。除其他事项外,本公开提供了用于立体选择性制备包含多个(例如,多于5、6、7、8、9或10个)核苷酸间键联的单链RNAi剂(并且特别是包含多个(例如,多于5、6、7、8、9或10个)手性核苷酸间键联的单链RNAi剂)的方法和试剂。在一些实施方案中,在单链RNAi剂的立体无规或外消旋制品中,至少一个手性核苷酸间键联形成为具有小于90:10、95:5、96:4、97:3或98:2的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于90:10、95:5、96:4、97:3或98:2的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于95:5的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于96:4的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于97:3的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于98:2的非对映选择性。在一些实施方案中,对于单链RNAi剂的立体选择性或手性控制的制品,每个手性核苷酸间键联都形成为具有大于99:1的非对映选择性。在一些实施方案中,单链RNAi剂中的手性核苷酸间键联的非对映选择性可以通过模型反应(例如,在基本相同或可比的条件下形成二聚体)来测量,其中所述二聚体具有与手性核苷酸间键联相同的核苷酸间键联,所述二聚体的5'-核苷与手性核苷酸间键联的5'-末端的核苷相同,并且所述二聚体的3'-核苷与手性核苷酸间键联的3'-末端的核苷相同。

[1596] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是被设计成包含多个寡核苷酸或单链RNAi剂类型的组合物。在一些实施方案中,本公开的方法允许产生手性控制的单链RNAi剂文库以使预先选择量的任一种或多种手性控制的单链RNAi剂类型可与任一种或多种其他手性控制的单链RNAi剂类型混合来产生手性控制的单链RNAi剂组合物。在一些实施方案中,预先选择量的单链RNAi剂类型是具有任一上述非对映异构纯度的组合物。

[1597] 在一些实施方案中,本公开提供了用于制备手性控制的单链RNAi剂的方法,其包括以下步骤:

[1598] (1)偶联;

[1599] (2)加帽;

[1600] (3)修饰;

[1601] (4)去封闭;以及

[1602] (5)重复步骤(1)-(4)直至达成所需长度。

[1603] 当描述所提供的方法时,用词"循环"具有其如本领域普通技术人员所理解的普通含义。在一些实施方案中,一轮步骤(1)-(4)被称为一个循环。

[1604] 在一些实施方案中,本公开提供了用于制备手性控制的单链RNAi剂组合物的方法,其包括以下步骤:

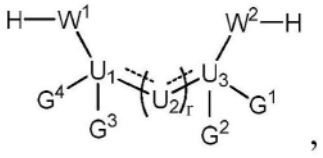
[1605] (a)提供一定量的第一手性控制的单链RNAi剂;以及

[1606] (b)任选地提供一定量的一种或多种另外的手性控制的单链RNAi剂。

[1607] 在一些实施方案中,第一手性控制的单链RNAi剂是如本文所述的单链RNAi剂类型。在一些实施方案中,一种或多种另外的手性控制的单链RNAi剂是如本文所述的一种或多种单链RNAi剂类型。

[1608] 相关化学和合成领域技术人员将认识到当使用本公开的方法合成时,所提供的单链RNAi剂的结构变化和立体化学构型具有一定程度的多面性和控制性。例如,在第一循环完成之后,随后循环可使用为所述随后循环单独选择的核苷酸单元来进行,在一些实施方案中,所述核苷酸单元包含与第一循环核碱基和/或糖不同的核碱基和/或糖。同样,随后循环的偶联步骤中使用的手性助剂可与第一循环中使用的手性助剂不同,以使第二循环产生具有不同立体化学构型的磷键联。在一些实施方案中,新形成的核苷酸间键联中的键联磷的立体化学是通过使用立体化学纯的亚磷酰胺来控制的。另外,随后循环的修饰步骤中使用的修饰试剂可与第一循环或先前循环中使用的修饰试剂不同。这种迭代组装方法的累积作用是使得所提供的单链RNAi剂的每种组分可在结构上和构型上被高度定制。这种方法的另一优势是加帽步骤使“n-1”杂质的形成最小化,否则这将使得分离所提供的单链RNAi剂极具挑战性,并且尤其是较长长度的单链RNAi剂。

[1609] 在一些实施方案中,本公开所述的示例方案中示出了用于制备手性受控的单链RNAi剂的方法的示例性循环。在一些实施方案中,方案I中示出了用于制备手性控制的单链RNAi剂的方法的示例性循环。在一些实施方案中,●表示固体支撑体,并且任选地表示连接到固体支撑体的增长的手性控制单链RNAi剂的一部分。例示的手性助剂具有式3-I的结构:

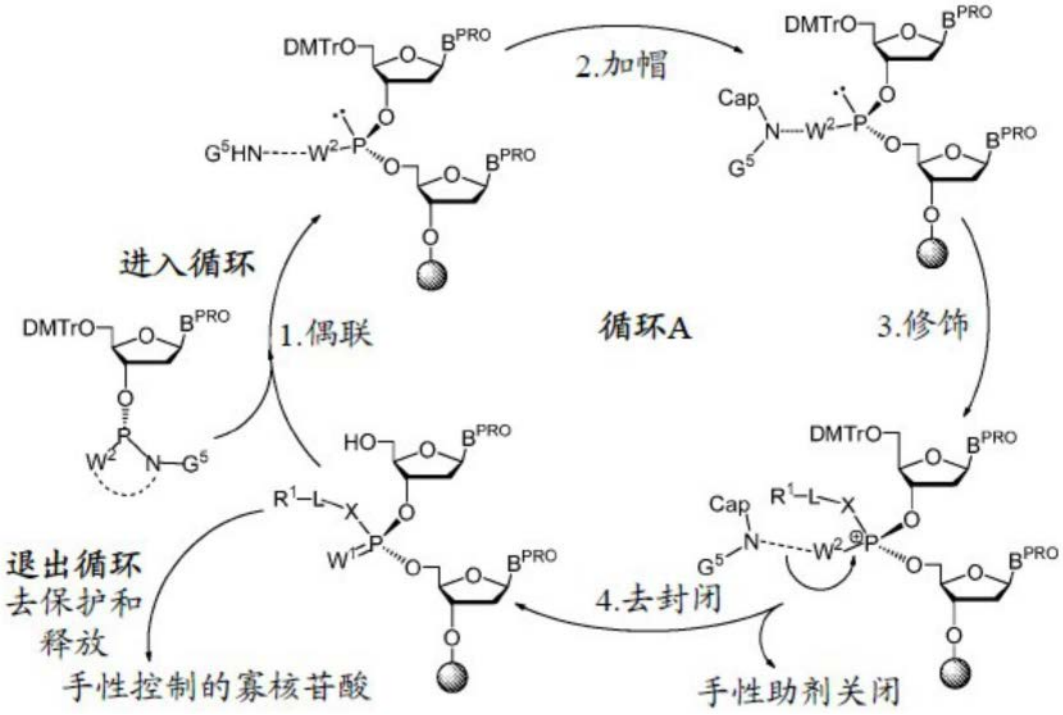
[1610] 

[1611] **式 3-I**

[1612] 下文对其进一步描述。“帽”是通过加帽步骤引入到氮原子的任何化学部分,并且在一些实施方案中,是氨基保护基团。本领域普通技术人员理解在第一循环中,在开始时可仅有一个核苷连接到固体支撑体,并且可任选地在去封闭之前进行循环退出。如本领域技术人员所理解的,B^{PRO}是单链RNAi剂合成中使用的受保护的碱基。下文进一步描述方案I的上述循环的每个步骤。

[1613] 方案I.手性控制的单链RNAi剂的合成。

[1614]



[1615] 在固体支撑体上合成

[1616] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂的合成是在固相上进行。在一些实施方案中,固体支撑体上存在的反应性基团是受保护的。在一些实施方案中,固体支撑体上存在的反应性基团是未保护的。在单链RNAi剂合成过程中,在若干个合成循环中用各种试剂处理固体支撑体以达成用单个核苷酸单元逐步延长增长的单链RNAi剂链。在链末端的直接连接到固体支撑体的核苷单元被称为如本文所用的“第一核苷”。第一核苷是通过接头部分结合于固体支撑体,所述接头部分即在CPG、聚合物或其他固体支撑体与核苷之间具有共价键的二价基团。接头在被进行来组装寡核苷酸链的合成循环过程中保持完整,并且在链组装之后被切割以从支撑体中释放寡核苷酸。

[1617] 用于固相核酸合成的固体支撑体包括描述于以下中的支撑体:例如美国专利4,659,774、5,141,813、4,458,066;Caruthers美国专利号4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679和5,132,418;Andrus等美国专利号5,047,524、5,262,530;以及Koster美国专利号4,725,677(重新发行为RE34,069)在一些实施方案中,固相是有机聚合物支撑体。在一些实施方案中,固相是无机聚合物支撑体。在一些实施方案中,有机聚合物支撑体是聚苯乙烯、氨基甲基聚苯乙烯、聚乙二醇-聚苯乙烯接枝共聚物、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、高度交联聚合物(HCP)、或其他合成聚合物、碳水化合物(诸如纤维素和淀粉或其他聚合碳水化合物)、或其他有机聚合物和任何共聚物、复合材料或以上无机或有机材料的组合。在一些实施方案中,无机聚合物支撑体是二氧化硅、氧化铝、作为硅胶支撑体的可控聚合玻璃(CPG)、或氨基丙基CPG。其他可用的固体支撑体包括氟固体支撑体(参见例如WO/2005/070859)、长链烷基胺(LCAA)可控孔度玻璃(CPG)固体支撑体(参见例如S.P.Adams,K.S.Kavka,E.J.Wykes,S.B.Holder和G.R.Galluppi,J.Am.Chem.Soc.,1983,105,661-663;G.R.Gough,M.J.Bruden和P.T.Gilham,Tetrahedron Lett.,1981,22,4177-4180)。膜支撑体和聚合物膜(参见例如,Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis,Peptides,Proteins and Nucleic Acids,第21章第157-162页,1994,Roger

Epton编以及美国专利号4,923,901)也可用于核酸的合成。一旦形成,膜即可被化学官能化以用于核酸合成中。除了将官能团连接到膜之外,使用连接到膜的接头或间隔子基团也用于一些实施方案中,以使膜与合成的链之间的空间位阻最小化。

[1618] 其他合适的固体支撑体包括本领域中通常已知适用于固相方法学中的那些支撑体,包括例如以Primer™ 200支撑体销售的玻璃、可控孔度玻璃(CPG)、草酰基-可控孔度玻璃(参见例如Alul等,Nucleic Acids Research,1991,19,1527)、TentaGel支撑体-一种氨基聚乙二醇衍生化支撑体(参见例如,Wright等,Tetrahedron Lett.,1993,34,3373)和Poros-一种聚苯乙烯/二乙烯苯共聚物。

[1619] 表面活化的聚合物已被证明用于在若干种固体支撑体介质上合成天然和修饰的核酸以及蛋白质。固体支撑体材料可以是在孔隙性方面合适地均一,具有足够胺含量和足够柔性以经受任何伴随操作而不丧失完整性的任何聚合物。合适的所选材料的实例包括尼龙、聚丙烯、聚酯、聚四氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯和硝酸纤维素。根据研究者的设计,其他材料可充当固体支撑体。考虑到一些设计,可选择例如涂覆的金属,特别是金或铂(参见例如,美国公布号20010055761)。在单链RNAi剂合成的一个实施方案中,例如使核苷锚定到用羟基或氨基残基官能化的固体支撑体。或者,固体支撑体被衍生以提供酸不稳定性三烷氧基三苯甲基,诸如三甲氧基三苯甲基(TMT)。不受理论束缚,预期存在三烷氧基三苯甲基保护基团将允许在通常在DNA合成仪上使用的条件下进行初始脱三苯甲基化。为用氨水较快释放溶液中的单链RNAi剂材料,任选地将二乙醇酸酯接头引于支撑体上。

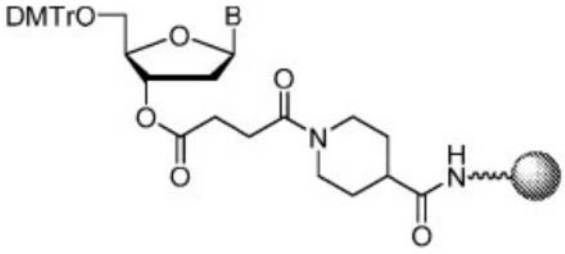
[1620] 在一些实施方案中,可替代地,从5'至3'方向合成所提供的单链RNAi剂。在一些实施方案中,核酸通过增长核酸的5'末端连接到固体支撑体,由此呈现它的3'基团用于反应,即使用5'-核苷亚磷酰胺或在酶促反应中(例如使用5'-三磷酸核苷进行连接和聚合)。当考虑5'至3'合成时,本公开的迭代步骤保持不变(即加帽和在手性磷上的修饰)。

[1621] 连接部分

[1622] 连接部分或接头任选地用于使固体支撑体与包含游离亲核部分的化合物连接。合适的接头是已知的,诸如用于在固相合成技术中将固体支撑体与初始核苷分子连接的官能团(例如羟基)的短分子。在一些实施方案中,连接部分是琥珀酰胺酸接头或琥珀酸酯接头(-CO-CH_2-CH_2-CO-)或草酰基接头(-CO-CO-)。在一些实施方案中,连接部分和核苷通过酯键键结在一起。在一些实施方案中,连接部分和核苷通过酰胺键键结在一起。在一些实施方案中,连接部分将核苷与另一个核苷酸或核酸连接。合适的接头公开于例如Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach,Ekstein,F.编,IRL Press,N.Y.,1991,第1章,以及Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis,Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28。

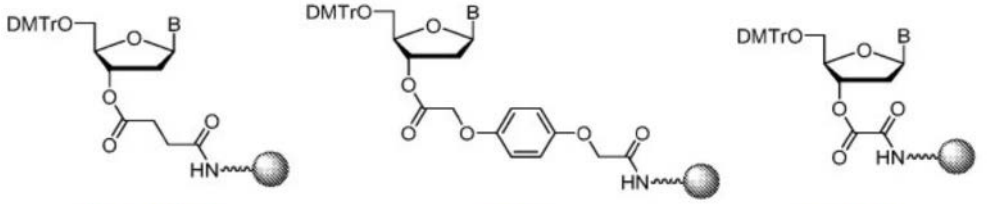
[1623] 接头部分用于将包含游离亲核部分的化合物与另一个核苷、核苷酸或核酸连接。在一些实施方案中,连接部分是磷酸二酯键联。在一些实施方案中,连接部分是H-膦酸酯部分。在一些实施方案中,连接部分是如本文所述的修饰的磷键联。在一些实施方案中,通用接头(UnyLinker)用于使寡核苷酸与固体支撑体连接(Ravikumar等,Org.Process Res.Dev.,2008,12(3),399-410)。在一些实施方案中,使用其他通用接头(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28)。在一些实施方案中,使用各种正交接头(诸如二硫键)(Pon,R.T.,Curr.Prot.Nucleic Acid Chem.,2000,3.1.1-3.1.28)。

[1624] 本公开尤其认识到接头可以被选择或设计成与在单链RNAi剂合成中采用的一组反应条件相容。在一些实施方案中,为了避免单链RNAi剂的降解以及避免脱硫,在去保护之前选择性地去除辅助基团。在一些实施方案中,DPSE基团可以被F^-离子选择性地去除。在一些实施方案中,本公开提供在DPSE去保护条件下(例如在MeCN中的0.1M TBAF、在THF或MeCN中的0.5M HF-Et_3N等)稳定的接头。在一些实施方案中,所提供的接头是SP接头。在一些实施方案中,本公开证明SP接头在DPSE去保护条件下(例如在MeCN中的0.1M TBAF、在THF或MeCN中的0.5M HF-Et_3N等)是稳定的;它们例如在无水碱性条件下(诸如在MeCN中的om1M DBU)也是稳定的。

[1625] 

琥珀酰-哌啶(SP)接头

[1626] 在一些实施方案中,示例性接头是:

[1627] 

琥珀酰接头 Q-接头 草酰接头

[1628] 在一些实施方案中,琥珀酰接头、Q-接头或草酰接头对于一种或多种使用F^-的DPSE-去保护条件是不稳定的。

[1629] 一般性条件-用于合成的溶剂

[1630] 所提供的寡核苷酸的合成一般在非质子性有机溶剂中进行。在一些实施方案中,溶剂是腈溶剂,例如像乙腈。在一些实施方案中,溶剂是碱性胺溶剂,例如像吡啶。在一些实施方案中,溶剂是醚溶剂,例如像四氢呋喃。在一些实施方案中,溶剂是卤化烃,例如像二氯甲烷。在一些实施方案中,使用溶剂的混合物。在某些实施方案中,溶剂是任一种或多种上述类别的溶剂的混合物。

[1631] 在一些实施方案中,当非质子性有机溶剂不是碱性的时,碱存在于反应步骤中。在其中存在碱的一些实施方案中,所述碱是胺碱,例如像吡啶、喹啉或N,N-二甲基苯胺。示例性其他胺碱包括吡咯烷、哌啶、N-甲基吡咯烷、吡啶、喹啉、N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)或N,N-二甲基苯胺。

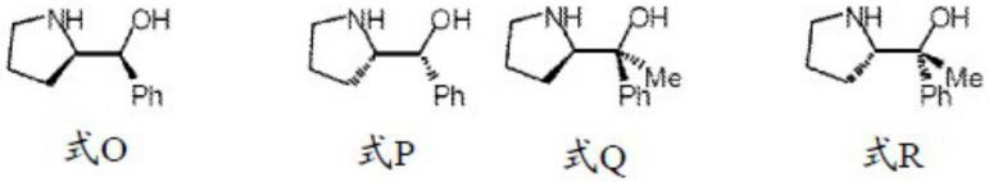
[1632] 在一些实施方案中,碱不是胺碱。

[1633] 在一些实施方案中,非质子性有机溶剂是无水的。在一些实施方案中,无水非质子性有机溶剂是新鲜蒸馏的。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是碱性胺溶剂,例如像吡啶。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是醚溶剂,例如像四氢呋喃。在一些实施方案中,新鲜蒸馏的无水非质子性有机溶剂是腈溶剂,例如像乙

腈。

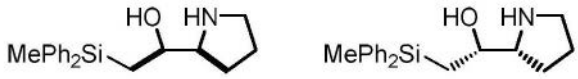
[1634] 手性试剂/手性助剂

[1635] 在一些实施方案中,手性试剂用于在产生手性控制的寡核苷酸时赋予立体选择性。许多不同手性试剂,也被本领域技术人员以及在本文中称为手性助剂,可根据本公开的方法加以使用。此类手性试剂的实例在本文中以及在上文引用的Wada I、II和III中加以描述。在本公开的一些实施方案中,手性试剂是具有下式中的一个的化合物:



式O 式P 式Q 式R

[1636]



DPSE

。

[1637] 如本文所证明,当用于制备手性核苷酸间键联时,为了获得立体选择性,一般使用立体化学纯的手性试剂。

[1638] 另外的手性助剂及其用途可见于,例如Wada I(JP4348077;WO2005/014609;WO2005/092909)、Wada II(WO2010/064146)、Wada III(WO2012/039448)、手性对照(WO2010/064146)等。

[1639] 活化

[1640] 将非手性H-膦酸酯部分用第一活化试剂处理以形成第一中间体。在一个实施方案中,在缩合步骤过程中向反应混合物中加入第一活化试剂。第一活化试剂的使用取决于反应条件,诸如用于反应的溶剂。第一活化试剂的实例是光气、氯甲酸三氯甲酯、双(三氯甲基)碳酸酯(BTC)、草酰氯、Ph_3PCl_2、$(PhO)_3PCl_2$、N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BopCl)、1,3-二甲基-2-(3-硝基-1,2,4-三唑-1-基)-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷鎓六氟磷酸盐(MNTP)或3-硝基-1,2,4-三唑-1-基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓六氟磷酸盐(PyNTP)。

[1641] 非手性H-膦酸酯部分的实例是以上方案中所示的化合物。DBU表示1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯。H^+DBU可以是例如铵离子、烷基铵离子、杂芳族亚铵离子或杂环亚铵离子,其中任一个是伯、仲、叔或季或单价金属离子。

[1642] 与手性试剂反应

[1643] 在第一活化步骤之后,活化的非手性H-膦酸酯部分与手性试剂反应。

[1644] 立体特异性缩合步骤

[1645] 将手性中间体用第二活化试剂和核苷处理以形成缩合的中间体。核苷可在固体支撑体上。第二活化试剂的实例是4,5-二氰基咪唑(DCI)、4,5-二氯咪唑、1-苯基咪唑鎓三氟甲磺酸盐(PhIMT)、苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(BIT)、苯并三唑、3-硝基-1,2,4-三唑(NT)、四唑、5-乙基硫基四唑(ETT)、5-苯甲基硫代四唑(BTT)、5-(4-硝基苯基)四唑、N-氰基甲基吡咯烷鎓三氟甲磺酸盐(CMPT)、N-氰基甲基哌啶鎓三氟甲磺酸盐、N-氰基甲基二甲基铵三氟甲磺酸盐。式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb'))的手性中间体可以单体形式分离。通常,手

性中间体Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')或(Z-Vb'))不被分离,并且在同一反应器中经受与核苷或修饰的核苷的反应以提供作为缩合的中间体的手性亚磷酸酯化合物。在其他实施方案中,当方法是通过固相合成进行时,包含化合物的固体支撑体被过滤去除副产物、杂质和/或试剂。

[1646] 加帽步骤

[1647] 如果最终核酸大于二聚体,那么未反应的-OH部分用封闭基团加帽,并且化合物中的手性助剂也可用封闭基团加帽以形成加帽的缩合的中间体。如果最终核酸是二聚体,则不必需加帽步骤。

[1648] 修饰步骤

[1649] 化合物通过与亲电子试剂反应进行修饰。加帽的缩合的中间体可执行修饰步骤。在一些实施方案中,修饰步骤使用硫亲电子试剂、硒亲电子试剂或硼酸化剂来进行。修饰步骤的实例是氧化和硫化步骤。

[1650] 在方法的一些实施方案中,硫亲电子试剂是具有下式中的一个的化合物:

[1651] S_8(式Z-B)、Z^{z1}-S-S-Z^{z2}或Z^{z1}-S-$_{Vz}$-Z^{z2};

[1652] 其中Z^{z1}和Z^{z2}独立地是烷基、氨基烷基、环烷基、杂环、环烷基烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、酰基、酰胺、酰亚胺或硫羰基,或Z^{z1}和Z^{z2}一起形成可被取代或未被取代的3至8元脂环族环或杂环;$_{Vz}$是SO_2、O或NR^f;并且R^f是氢、烷基、烯基、炔基或芳基。

[1653] 另外的硫亲电子试剂是本领域已知的。

[1654] 在一些实施方案中,在修饰步骤之后,手性辅助基团从增长的寡核苷酸链上脱落。在一些实施方案中,在修饰步骤之后,手性辅助基团保持与核苷酸间磷原子连接。

[1655] 在方法的一些实施方案中,修饰步骤是氧化步骤。在方法的一些实施方案中,修饰步骤是使用如本申请中在上文所述的类似条件进行的氧化步骤。在一些实施方案中,氧化步骤如例如JP 2010-265304A和WO2010/064146中所公开。

[1656] 链延长循环和去保护步骤

[1657] 将加帽的缩合的中间体去封闭以在增长核酸链的5'-末端去除封闭基团来提供化合物。任选地使化合物再进入链延长循环以形成缩合的中间体、加帽的缩合的中间体、修饰的加帽的缩合的中间体和5'-去保护的修饰的加帽中间体。在至少一轮链延长循环之后,通过去除手性助剂配体和其他保护基团,例如核碱基、修饰的核碱基、糖和修饰的糖保护基团,来进一步将5'-去保护的修饰的加帽中间体去封闭,以提供核酸。在其他实施方案中,包含5'-OH部分的核苷是来自如本文所述的先前链延长循环的中间体。在又其他实施方案中,包含5'-OH部分的核苷是由另一种已知核酸合成方法获得的中间体。在其中使用固体支撑体的实施方案中,然后从固体支撑体上切割磷原子修饰的核酸。在某些实施方案中,出于纯化目的使核酸保持连接在固体支撑体上,并且然后在纯化之后从固体支撑体上切割。

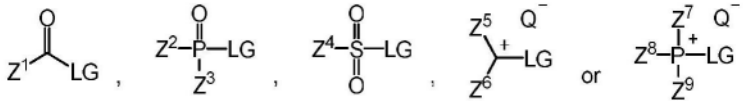
[1658] 在又其他实施方案中,包含5'-OH部分的核苷是由另一种已知核酸合成方法获得的中间体。在又其他实施方案中,包含5'-OH部分的核苷是由如本申请所述的另一种已知核酸合成方法获得的中间体。在又其他实施方案中,包含5'-OH部分的核苷是由另一种已知核酸合成方法获得的中间体,所述合成方法包括方案I所示的一个或多个循环。在一些实施方案中,本公开提供了使用稳定且可商购获得的材料作为起始物质的寡核苷酸合成方法。在

一些实施方案中,本公开提供了用以使用非手性起始物质产生立体控制的磷原子修饰的寡核苷酸衍生物的寡核苷酸合成方法。

[1659] 在一些实施方案中,本公开的方法在去保护步骤下不导致降解。此外,所述方法不需要特殊加帽剂来产生磷原子修饰的寡核苷酸衍生物。

[1660] 缩合试剂

[1661] 根据本公开的方法可用的缩合试剂(C_R)具有任一以下通式:

[1662] 

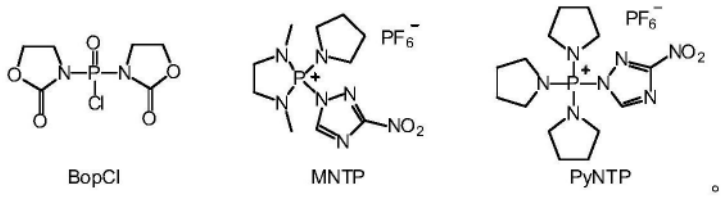
C_R1 C_R2 C_R3 C_R4 C_R5

[1663] 其中Z^1、Z^2、Z^3、Z^4、Z^5、Z^6、Z^7、Z^8和Z^9独立地是选自烷基、氨基烷基、环烷基、杂环、环烷基烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基氧基、芳基氧基或杂芳基氧基的任选取代的基团,或者其中Z^2和Z^3、Z^5和Z^6、Z^7和Z^8、Z^8和Z^9、Z^9和Z^7或Z^7和Z^8中的任一个与Z^9一起形成3至20元脂环族环或杂环;Q^-是反阴离子;并且LG是离去基团。

[1664] 在一些实施方案中,缩合试剂C_R的反离子是Cl^-、Br^-、BF_4^-、PF_6^-、TfO^-、Tf_2N^-、AsF_6^-、ClO_4^-或SbF_6^-,其中Tf是CF_3SO_2。在一些实施方案中,缩合试剂C_R的离去基团是F、Cl、Br、I、3-硝基-1,2,4-三唑、咪唑、烷基三唑、四唑、五氟苯或1-羟基苯并三唑。

[1665] 在一些实施方案中,缩合试剂选自WO/2006/066260中所述的那些缩合试剂。

[1666] 在一些实施方案中,缩合试剂是1,3-二甲基-2-(3-硝基-1,2,4-三唑-1-基)-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷鎓六氟磷酸盐(MNTP)或3-硝基-1,2,4-三唑-1-基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓六氟磷酸盐(PyNTP):

[1667] 

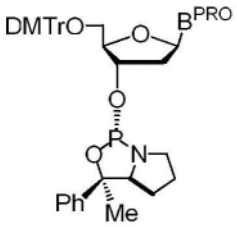
BopCl MNTP PyNTP 。

[1668] 核苷偶联搭配物的碱基和糖的选择

[1669] 如本文所述,供根据本公开的方法使用的核苷偶联搭配物可彼此相同,或可彼此不同。在一些实施方案中,用于合成所提供的寡核苷酸的核苷偶联搭配物彼此具有相同结构和/或立体化学构型。在一些实施方案中,用于合成所提供的寡核苷酸的每个核苷偶联搭配物与寡核苷酸的某些其他核苷偶联搭配物不具有相同结构和/或立体化学构型。本文描述了供根据本公开的方法使用的示例性核碱基和糖。相关化学和合成领域技术人员将认识到本文所述的核碱基和糖的任何组合都预期供根据本公开的方法使用。

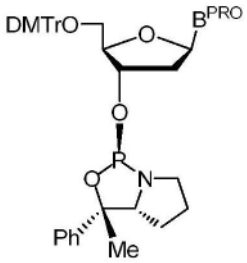
[1670] 偶联步骤

[1671] 供根据本公开使用的示例性偶联程序以及手性试剂和缩合试剂尤其概述于Wada I(JP4348077;WO2005/014609;WO2005/092909)、Wada II(WO2010/064146)、Wada III(WO2012/039448)和手性对照(WO2010/064146)中。供根据本公开使用的手性核苷偶联搭配物在本文中也称为“Wada亚酰胺化物”。在一些实施方案中,偶联搭配物具有结构



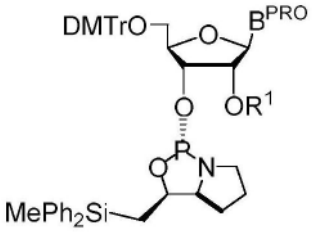
其中B^{PRO}是受保护的核碱基。在一些实施方案中，偶联搭配物具有结构

，

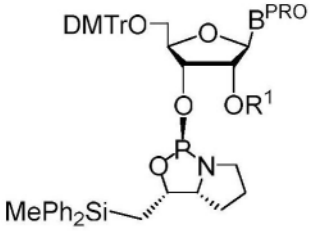


其中B^{PRO}是受保护的核碱基。在一些实施方案中，偶联搭配物具有结构

，



其中B^{PRO}是受保护的核碱基，并且R^1如本文所定义和描述。在一些实施方案中，偶联搭配物具有结构



其中B^{PRO}是受保护的核碱基，并且R^1如本文所定义和描述。在一些实施方案中，R^1是任选取代的C_{1-6}烷基。在一些实施方案中，R^1是Me。

[1672] 另外的实例描述于WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555和WO/2017/062862中，其中的每个的亚磷酰胺以引用的方式并入本文。

[1673] 在一些实施方案中，偶联步骤包括使PNPLA3寡核苷酸的核苷酸单元的游离羟基与核苷偶联搭配物在合适的条件下反应以实现偶联。在一些实施方案中，偶联步骤之前是去封闭步骤。例如，在一些实施方案中，增长的寡核苷酸的5'羟基被封闭(即受保护)，并且必须被去封闭以便随后与核苷偶联搭配物反应。

[1674] 一旦增长寡核苷酸的适当羟基已被去封闭，则洗涤并干燥支撑体以为递送包含手性试剂的溶液和包含活化剂的溶液做准备。在一些实施方案中，手性试剂和活化剂同时递送。在一些实施方案中，共递送包括递送一定量的呈溶液形式的手性试剂(例如亚磷酰胺溶液)和一定量的呈在诸如腈溶剂(例如乙腈)的极性非质子性溶剂中的溶液形式的活化剂(例如CMPT溶液)。

[1675] 在一些实施方案中，偶联步骤提供粗产物组合物，其中手性亚磷酸酯产物以非对映异构过量>95％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映异构过量>96％存在。在一些实施方案中，手性亚磷酸酯产物以非对映异构过量>97％存在。在一些实施方案

中,手性亚磷酸酯产物以非对映异构过量>98%存在。在一些实施方案中,手性亚磷酸酯产物以非对映异构过量>99%存在。

[1676] 加帽步骤:

[1677] 所提供的用于制备手性控制的寡核苷酸的方法包括加帽步骤。在一些实施方案中,加帽步骤是单一步骤。在一些实施方案中,加帽步骤是两个步骤。在一些实施方案中,加帽步骤超过两个步骤。在一些实施方案中,加帽步骤包括对手性助剂的游离胺加帽以及对任何残余未反应的5'羟基加帽的步骤。在一些实施方案中,手性助剂的游离胺和未反应的5'羟基是用相同加帽基团来加帽。在一些实施方案中,手性助剂的游离胺和未反应的5'羟基是用不同加帽基团来加帽。在某些实施方案中,用不同加帽基团加帽允许在合成寡核苷酸的过程中选择性去除一个加帽基团,而不是另一个加帽基团。在一些实施方案中,两个基团的加帽同时发生。在一些实施方案中,两个基团的加帽迭代发生。在某些实施方案中,加帽迭代发生,并且包括对游离胺加帽的第一步骤,之后是对游离5'羟基加帽的第二步骤,其中游离胺与5'羟基两者均用相同加帽基团加帽。例如,在一些实施方案中,手性助剂的游离胺是使用酸酐(例如苯氧基乙酸酐,即Pac_2O)加帽,随后用相同酸酐对5'羟基加帽。在某些实施方案中,用相同酸酐对5'羟基加帽发生在不同条件下(例如在一种或多种其他试剂存在下)。在一些实施方案中,对5'羟基加帽在胺碱存在下在醚溶剂(例如在THF中的NMI(N-甲基咪唑))中发生。短语"加帽基团"在本文中可与短语"保护基团"和"封闭基团"互换使用。在一些实施方案中,胺加帽基团的特征在于它有效地对胺加帽,使得它防止中间亚磷酸酯种类重排和/或分解。在一些实施方案中,选择能够保护手性助剂的胺以便防止核苷酸间键联磷的分子内切割的加帽基团。在一些实施方案中,5'羟基加帽基团的特征在于它有效地对羟基加帽,使得它防止出现由于未能在第一循环中反应但接着在一个或多个随后循环中反应的PNPLA3寡核苷酸链的反应而产生的"短聚体",例如"n-m"(m和n是整数,并且m<n;n是所靶向的寡核苷酸中的碱基的数目)杂质。存在此类短聚体(尤其"n-1")对粗寡核苷酸的纯度具有有害影响,并且使得寡核苷酸的最终纯化变得繁重,并且一般是低产率的。在一些实施方案中,特定帽基于它有利于在特定条件下的特定类型的反应的趋势来选择。例如,在一些实施方案中,选择能够促进E1消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。在一些实施方案中,选择能够促进E2消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。在一些实施方案中,选择能够促进β-消除反应的加帽基团,所述反应从增长的寡核苷酸上切割帽和/或助剂。

[1678] 修饰步骤:

[1679] 如本文所用,短语"修饰步骤(modifying step)"、修饰步骤(modification step)和"P修饰步骤(P-modification step)"可互换使用,并且一般是指用于安置修饰的核苷酸间键联的任一个或多个步骤。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间键联具有式I的结构。本公开的P修饰步骤发生在组装所提供的寡核苷酸过程中,而不是在所提供的寡核苷酸组装完成之后。因此,所提供的寡核苷酸的每个核苷酸单元可在安置核苷酸单元所处的循环过程中在键联磷处单独地进行修饰。在一些实施方案中,合适的P修饰试剂是硫亲电子试剂、硒亲电子试剂、氧亲电子试剂、硼酸化试剂或叠氮化物试剂。

[1680] 例如,在一些实施方案中,硒试剂是元素硒、硒盐或取代的二硒化物。在一些实施方案中,氧亲电子试剂是元素氧、过氧化物或取代的过氧化物。在一些实施方案中,硼酸化

试剂是硼烷-胺(例如,N,N-二异丙基乙胺(BH_3·DIPEA)、硼烷-吡啶(BH_3·Py)、硼烷-2-氯吡啶(BH_3·CPy)、硼烷-苯胺(BH_3·An))、硼烷醚试剂(例如硼烷四氢呋喃(BH_3·THF))、硼烷-二烷基硫醚试剂(例如BH_3·Me_2S)、苯胺-氰基硼烷或三苯基膦-羰基烷氧基硼烷。在一些实施方案中,叠氮化物试剂包含能够经受随后的还原以提供胺基团的叠氮化物基团。

[1681] 在一些实施方案中,P修饰试剂是如本文所述的硫化试剂。在一些实施方案中,修饰步骤包括使磷硫化以提供硫代磷酸酯键联或硫代磷酸三酯键联。在一些实施方案中,修饰步骤提供具有式I的核苷酸间键联的PNPLA3寡核苷酸。

[1682] 在一些实施方案中,本公开提供了硫化试剂以及制备和使用所述硫化试剂的方法。

[1683] 在一些实施方案中,此类硫化试剂是硫代磺酸酯试剂。

[1684] 各种硫化试剂和硫代磺酸酯试剂是本领域已知的。

[1685] 在一些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于与单一硫原子(例如-S^-或=S)相反,在硫化过程中转移到磷的部分是取代的硫(例如-SR)。

[1686] 在一些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于试剂的活性可通过用某一吸电子或供电子基团修饰试剂来调整。

[1687] 在一些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于它是结晶的。在一些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于它具有高结晶度。在某些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于试剂易于通过例如重结晶进行纯化。在某些实施方案中,供根据本公开使用的硫化试剂的特征在于它基本上不含含硫杂质。在一些实施方案中,基本上不含含硫杂质的硫化试剂表现出增加的效率。

[1688] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或多个磷酸二酯键联。为了合成此类手性控制的寡核苷酸,一个或多个修饰步骤任选地被氧化步骤替代以安置对应的磷酸二酯键联。在一些实施方案中,氧化步骤以类似于普通寡核苷酸合成的方式进行。在一些实施方案中,氧化步骤包括使用I_2。在一些实施方案中,氧化步骤包括使用I2和吡啶。在一些实施方案中,氧化步骤包括使用含0.02M I2的THF/吡啶/水(70:20:10-v/v/v)共溶剂系统。方案I-c中示出了示例性循环。

[1689] 在一些实施方案中,硫代磷酸酯是通过用硫化试剂(例如3-苯基-1,2,4-二噻唑啉-5-酮)的硫化直接形成的。在一些实施方案中,在直接安置硫代磷酸酯后,手性辅助基团仍然连接到核苷酸间磷原子。在一些实施方案中,需要另外的去保护步骤以去除手性助剂(例如,对于DPSE型手性助剂,使用TBAF、HF-Et_3N等)。

[1690] 在一些实施方案中,硫代磷酸酯前体用于合成包含硫代磷酸酯键联的手性控制的寡核苷酸。

[1691] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或多个磷酸二酯键联和一个或多个硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸包含一个或多个磷酸二酯键联和一个或多个硫代磷酸二酯键联,其中至少一个磷酸二酯键联是当从3'至5'合成时在所有硫代磷酸二酯键联之后进行安置。为了合成此类手性控制的寡核苷酸,在一些实施方案中,一个或多个修饰步骤任选地被氧化步骤替代以安置对应的磷酸二酯键联,并且安置硫代磷酸二酯键联中的每个的硫代磷酸酯前体。在一些实施方案中,硫代磷酸酯前体在达成所需寡核苷酸长度之后被转化成硫代磷酸二酯键联。在一些实施方案

中,在循环过程中或在循环退出之后的去保护/释放步骤使硫代磷酸酯前体转化成硫代磷酸二酯键联。

[1692] 在一些实施方案中,硫代磷酸酯前体是如本文所述的磷保护基团,例如,2-氰基乙基(CE或Cne)、2-三甲基硅烷基乙基、2-硝基乙基、2-磺酰基乙基、甲基、苯甲基、邻硝基苯甲基、2-(对硝基苯基)乙基(NPE或Npe)、2-苯基乙基、3-(N-叔丁基甲酰氨基)-1-丙基、4-氧代戊基、4-甲硫基-1-丁基、2-氰基-1,1-二甲基乙基、4-N-甲基氨基丁基、3-(2-吡啶基)-1-丙基、2-[N-甲基-N-(2-吡啶基)]氨基乙基、2-(N-甲酰基,N甲基)氨基乙基、4-[N-甲基-N-(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]丁基。下文进一步示出实例。

[1693] 如上文所指出,在一些实施方案中,硫化发生在从增长的寡核苷酸上切割手性试剂的条件下。在一些实施方案中,硫化发生在不从增长的寡核苷酸上切割手性试剂的条件下。

[1694] 在一些实施方案中,将硫化试剂溶解于合适的溶剂中,并递送到柱。在某些实施方案中,溶剂是极性非质子性溶剂,诸如腈溶剂。在一些实施方案中,溶剂是乙腈。在一些实施方案中,硫化试剂的溶液通过在腈溶剂(例如乙腈)中混合硫化试剂(例如如本文所述的硫代磺酸酯衍生物)与BSTFA(N,O-双-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺)来制备。在一些实施方案中,不包括BSTFA。例如,本发明人已发现反应性相对更大的通式R^{s2}-S-S(O)$_2$-R^{s3}的硫化试剂可常在不存在BSTFA的情况下成功参与硫化反应。仅给出一个实例,发明人已证明当R^{s2}是对硝基苯基且R^{s3}是甲基时,则不需要BSTFA。鉴于本公开,本领域技术人员将能够容易地确定不需要BSTFA的其他情况和/或硫化试剂。

[1695] 在一些实施方案中,硫化步骤是在室温下进行。在一些实施方案中,硫化步骤是在诸如约0℃、约5℃、约10℃或约15℃的较低温度下进行。在一些实施方案中,硫化步骤是在大于约20℃的高温下进行。

[1696] 在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约120分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约90分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约60分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约30分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约25分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约20分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约15分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约1分钟至约10分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约5分钟至约60分钟。

[1697] 在一些实施方案中,硫化反应运行约5分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约10分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约15分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约20分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约25分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约30分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约35分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约40分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约45分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约50分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约55分钟。在一些实施方案中,硫化反应运行约60分钟。

[1698] 出乎意料地发现,根据本公开的方法制备的某些硫化修饰产物出乎意料地稳定。在一些实施方案中,出乎意料地稳定的产物是硫代磷酸三酯。在一些实施方案中,出乎意料地稳定的产物是包含一个或多个具有式I-c的结构的核苷酸间键联的手性控制的寡核苷酸。

[1699] 相关领域技术人员将认识到本文所述的硫化方法和本文所述的硫化试剂也可用于修饰H-膦酸酯寡核苷酸,诸如Wada II(WO2010/064146)中所述的那些寡核苷酸的背景下。

[1700] 在一些实施方案中,硫化反应具有的逐步硫化效率为至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少98%的粗二核苷酸产物组合物。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少90%的粗四核苷酸产物组合物。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少70%的粗十二核苷酸产物组合物。在一些实施方案中,硫化反应提供纯度是至少50%的粗二十核苷酸产物组合物。

[1701] 一旦修饰键联磷的步骤完成,寡核苷酸即经受另一个去封闭步骤以为再进入循环做准备。在一些实施方案中,手性助剂在硫化之后保持完整,并且在随后去封闭步骤过程中进行去封闭,所述去封闭步骤必须发生在再进入循环之前。重复去封闭、偶联、加帽和修饰的过程直至增长的寡核苷酸达到所需长度,此时寡核苷酸可立刻从固体支撑体上切割,或出于纯化目的保持连接到支撑体并稍后切割。在一些实施方案中,一个或多个保护基团存在于一个或多个核苷酸碱基上,并且从支撑体上切割寡核苷酸以及将碱基去保护发生在单一步骤中。在一些实施方案中,一个或多个保护基团存在于一个或多个核苷酸碱基上,并且从支撑体上切割寡核苷酸以及将碱基去保护发生在一个以上步骤中。在一些实施方案中,去保护以及从支撑体上切割发生在使用例如一种或多种胺碱的碱性条件下。在某些实施方案中,一种或多种胺碱包括丙胺。在某些实施方案中,一种或多种胺碱包括吡啶。

[1702] 在一些实施方案中,从支撑体上切割和/或去保护发生在约30℃至约90℃的高温下。在一些实施方案中,从支撑体上切割和/或去保护发生在约40℃至约80℃的高温下。在一些实施方案中,从支撑体上切割和/或去保护发生在约50℃至约70℃的高温下。在一些实施方案中,从支撑体上切割和/或去保护发生在约60℃的高温下。在一些实施方案中,从支撑体上切割和/或去保护发生环境温度下。

[1703] 示例性纯化程序在本文中进行描述并且/或者一般是相关领域中已知的。

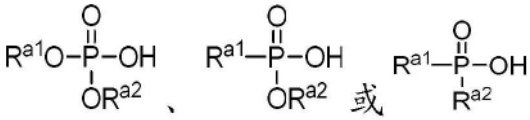
[1704] 值得注意的是,在每个循环过程中从增长的寡核苷酸去除手性助剂由于至少以下的原因而有益:(1)当在磷上安置潜在敏感性官能团时,助剂将不必在寡核苷酸合成结束时在单独步骤中去除;以及(2)倾向于经受副反应和/或受随后化学过程干扰的不稳定的磷-助剂中间体得以避免。因此,在每个循环过程中去除手性助剂使得总合成更有效。

[1705] 尽管上文描述了在循环背景下的去封闭步骤,但下文包括其他一般性方法。

[1706] 去封闭步骤

[1707] 在一些实施方案中,偶联步骤之前是去封闭步骤。例如,在一些实施方案中,增长的寡核苷酸的5'羟基被封闭(即受保护),并且必须被去封闭以便随后与核苷偶联搭配物反应。

[1708] 在一些实施方案中,酸化用于去除封闭基团。在一些实施方案中,酸是布仑斯特(Brønsted)酸或路易斯(Lewis)酸。可用的布仑斯特酸是在有机溶剂或水(在80%乙酸的情况下)中的pKa(25℃,在水中)值为-0.6(三氟乙酸)至4.76(乙酸)的羧酸、烷基磺酸、芳基磺酸、磷酸及其衍生物、膦酸及其衍生物、烷基膦酸及其衍生物、芳基膦酸及其衍生物、次膦酸、二烷基次膦酸和二芳基次膦酸。酸化步骤中使用的酸的浓度(1%至80%)取决于酸的酸性。必须考虑酸强度,因为强酸条件将导致去嘌呤/去嘧啶,其中嘌呤基或嘧啶基碱基从核

糖环和/或其他糖环上切割。在一些实施方案中，酸选自$R^{a1}COOH$、$R^{a1}SO_3H$、$R^{a3}SO_3H$、  其中R^{a1}和R^{a2}中的每个独立地是氢或任选取代的烷基或芳基，并且R^{a3}是任选取代的烷基或芳基。

[1709] 在一些实施方案中，酸化通过路易斯酸在有机溶剂中达成。此类可用的路易斯酸的实例是$Zn(X^a)_2$，其中X^a是Cl、Br、I或CF_3SO_3。

[1710] 在一些实施方案中，酸化步骤包括添加一定量的布仑斯特酸或路易斯酸以从缩合的中间体有效去除封闭基团而不去除嘌呤部分。

[1711] 可用于酸化步骤中的酸也包括但不限于在有机溶剂中的10％磷酸、在有机溶剂中的10％盐酸、在有机溶剂中的1％三氟乙酸、在有机溶剂中的3％二氯乙酸或三氯乙酸或在水中的80％乙酸。选择这个步骤中使用的任何布仑斯特酸或路易斯酸的浓度使得酸浓度不超过导致从糖部分上切割核碱基的浓度。

[1712] 在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的1％三氟乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的约0.1％至约8％三氟乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的3％二氯乙酸或三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的约0.1％至约10％二氯乙酸或三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的3％三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在有机溶剂中的约0.1％至约10％三氯乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在水中的80％乙酸。在一些实施方案中，酸化包括添加在水中的约50％至约90％、或约50％至约80％、约50％至约70％、约50％至约60％、约70％至约90％乙酸。在一些实施方案中，酸化包括向酸性溶剂中进一步添加阳离子清除剂。在某些实施方案中，阳离子清除剂可以是三乙基硅烷或三异丙基硅烷。在一些实施方案中，封闭基团通过酸化去封闭，所述酸化包括添加在有机溶剂中的1％三氟乙酸。在一些实施方案中，封闭基团通过酸化去封闭，所述酸化包括添加在有机溶剂中的3％二氯乙酸。在一些实施方案中，封闭基团通过酸化去封闭，所述酸化包括添加在有机溶剂中的3％三氯乙酸。在一些实施方案中，封闭基团通过酸化去封闭，所述酸化包括添加在二氯甲烷中的3％三氯乙酸。

[1713] 在某些实施方案中，本公开的方法是在合成仪上完成的，并且将增长的寡核苷酸的羟基去封闭的步骤包括向合成仪管柱中递送一定量的溶剂，所述管柱含有寡核苷酸所连接的固体支撑体。在一些实施方案中，溶剂是卤素化溶剂(例如二氯甲烷)。在某些实施方案中，溶剂包含一定量的酸。在一些实施方案中，溶剂包含一定量的有机酸，例如像三氯乙酸。在某些实施方案中，酸以约1％至约20％w/v的量存在。在某些实施方案中，酸以约1％至约10％w/v的量存在。在某些实施方案中，酸以约1％至约5％w/v的量存在。在某些实施方案中，酸以约1至约3％w/v的量存在。在某些实施方案中，酸以约3％w/v的量存在。本文还描述了用于将羟基去封闭的方法。在一些实施方案中，酸以3％w/v存在于二氯甲烷中。

[1714] 在一些实施方案中，手性助剂在去封闭步骤之前去除。在一些实施方案中，手性助剂在去封闭步骤期间去除。

[1715] 在一些实施方案中，循环退出在去封闭步骤之前进行。在一些实施方案中，循环退出在去封闭步骤之后进行。

[1716] 用于去除封闭基团/保护基团的一般性条件

[1717] 位于核碱基或糖部分上的官能团(诸如羟基或氨基部分)通常在合成过程中用封闭(保护)基团(部分)进行封闭,并且随后去封闭。一般来说,封闭基团致使分子的化学官能团对指定反应条件呈惰性,并且可稍后从分子中的此类官能团上去除而基本上不损害分子的其余部分(参见例如Green和Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第2版,John Wiley&Sons,New York,1991)。例如,氨基可用氮封闭基团进行封闭。化学官能团也可通过以前体形式包括它们进行封闭。因此,叠氮基可被视为胺的封闭形式,因为叠氮基易于转化为胺。核酸合成中使用的其他代表性保护基团是已知的(参见例如,Agrawal等编,Protocols for Oligonucleotide Conjugates,Humana Press,New Jersey,1994,第26卷,第1-72页)。

[1718] 各种方法是已知的,并且用于从核酸上去除封闭基团。在一些实施方案中,去除所有封闭基团。在一些实施方案中,去除一部分封闭基团。在一些实施方案中,可调整反应条件以选择性去除某些封闭基团。

[1719] 在一些实施方案中,核碱基封闭基团,如果存在,可在所提供的寡核苷酸组装之后用酸性试剂切割。在一些实施方案中,核碱基封闭基团,如果存在,可在既不是酸性也不是碱性的条件下切割,例如可用氟化物盐或氢氟酸络合物切割。在一些实施方案中,核碱基封闭基团,如果存在,可在所提供的寡核苷酸组装之后在碱或碱性溶剂存在下切割。在某些实施方案中,一个或多个核碱基封闭基团的特征在于它们可在所提供的寡核苷酸组装之后在碱或碱性溶剂存在下切割,但对在所提供的寡核苷酸组装过程中发生的一个或多个先前的去保护步骤的特定条件稳定。

[1720] 在一些实施方案中,不需要核碱基的封闭基团。在一些实施方案中,需要核碱基的封闭基团。在一些实施方案中,某些核碱基需要一个或多个封闭基团,而其他核碱基不需要一个或多个封闭基团。

[1721] 在一些实施方案中,寡核苷酸是在合成之后从固体支撑体上切割。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用丙胺。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用在吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用在吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用在无水吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用在无水吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用极性非质子性溶剂,诸如乙腈、NMP、DMSO、砜和/或二甲基吡啶。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割包括使用溶剂(例如极性非质子性溶剂)和一种或多种伯胺(例如C_{1-10}胺)和/或甲氧基胺、肼和纯无水氨中的一个或多个。

[1722] 在一些实施方案中,将寡核苷酸去保护包括使用丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸去保护包括使用在吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸去保护包括使用在吡啶中的20%丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸去保护包括使用在无水吡啶中的丙胺。在一些实施方案中,将寡核苷酸去保护包括使用在无水吡啶中的20%丙胺。

[1723] 在一些实施方案中,寡核苷酸在切割过程中去保护。

[1724] 在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约室温下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在高温下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在高于约30

℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃或100℃下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃或100℃下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约40℃-80℃下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约50℃-70℃下进行。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约60℃下进行。

[1725] 在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约0.1-5小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约3-10小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约5-15小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约10-20小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约15-25小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约20-40小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约2小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约5小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约10小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约15小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约18小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护进行约24小时。

[1726] 在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在室温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在室温下进行约5-48小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在室温下进行约10-24小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在室温下进行约18小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在高温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在高温下进行约0.5-5小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约60℃下进行约0.5-5小时。在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护在约60℃下进行约2小时。

[1727] 在一些实施方案中,从固体支撑体上切割寡核苷酸或将寡核苷酸去保护包括使用丙胺,并且在室温或高温下进行超过0.1小时、1小时、2小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、30小时或40小时。示例性条件是在室温下在吡啶中的20%丙胺进行约18小时,或者在60℃下在吡啶中的20%丙胺进行约18小时。

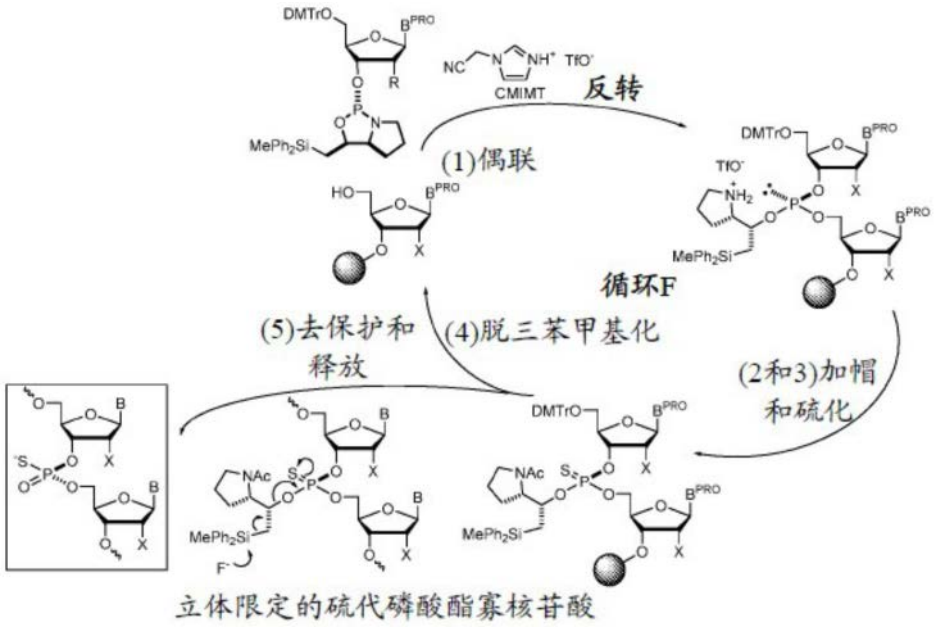
[1728] 在一些实施方案中,在从固体支撑体上切割之前,如果一个手性辅助基团仍连接在核苷酸间磷原子上,则进行去除所述手性辅助基团的步骤。在一些实施方案中,例如,一个或多个DPSE型手性辅助基团在寡核苷酸合成循环过程中保持与核苷酸间磷原子连接。用于去除残留的手性辅助基团的合适条件是本领域众所周知的,例如,在Wada I、Wada II、

Wada III、手性控制等中描述的那些条件。在一些实施方案中,用于去除DPSE型手性助剂的条件是TBAF或HF-Et_3N,例如,在MeCN中的0.1M TBAF、在THF或MeCN中的0.5M HF-Et_3N等。在一些实施方案中,本公开认识到,在去除手性辅助基团的过程中,接头可以被切割。在一些实施方案中,本公开提供了接头,诸如SP接头,其在手性辅助基团去除过程中提供了更好的稳定性。本公开提供的某些接头尤其提供了改善的产率和/或纯度。

[1729] 在一些实施方案中,方案I中示出了示例性循环。

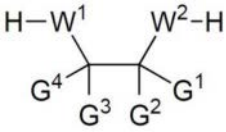
[1730] 方案I.使用DPSE手性助剂的示例性循环。

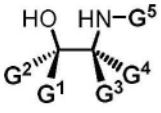
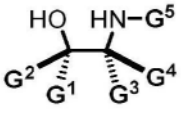
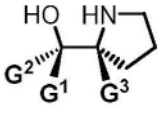
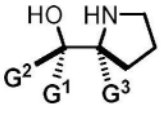
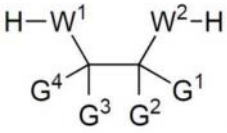
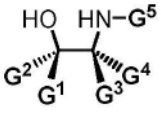
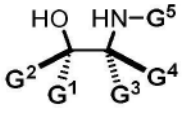
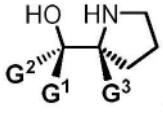
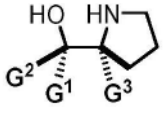
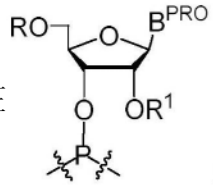
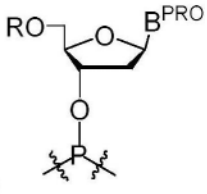
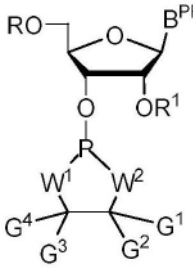
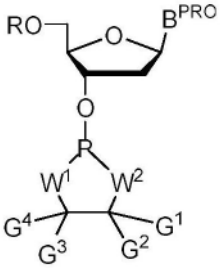
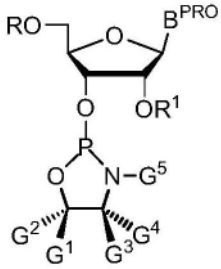
[1731]

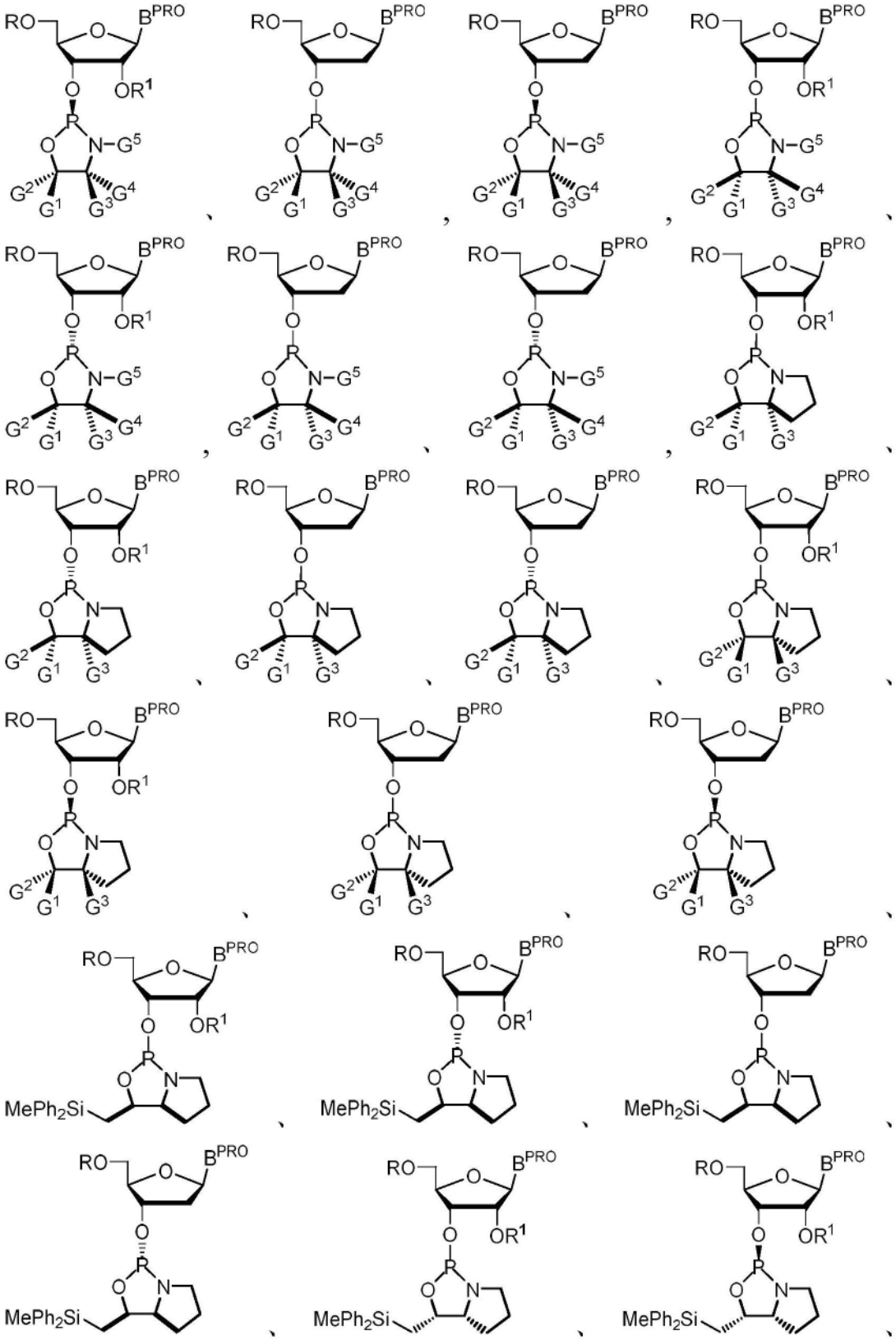


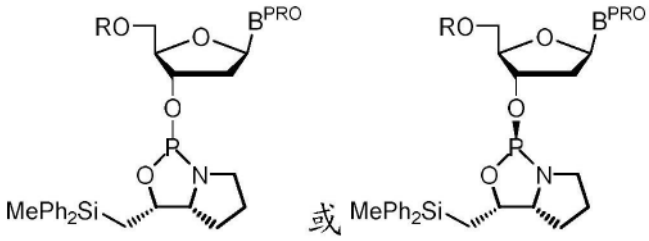
[1732] 在一些实施方案中,X是H或2'-修饰。在一些实施方案中,X是H或-OR^1,其中R^1不是氢。在一些实施方案中,X是H或-OR^1,其中R^1是任选取代的C_{1-6}烷基。在一些实施方案中,X是H。在一些实施方案中,X是-OMe。在一些实施方案中,X是-$OCH_2CH_2OCH_3$。在一些实施方案中,X是-F。

[1733] 本领域普通技术人员应了解,可以组合不同类型的循环以提供对寡核苷酸的化学修饰和立体化学的完全控制。在一些实施方案中,例如,PNPLA3寡核苷酸合成过程可以包含一个或多个循环A-F。在一些实施方案中,所提供的方法包括至少一个使用DPSE型手性助剂的循环。

[1734] 在一些实施方案中,本公开提供了用于制备所提供的寡核苷酸和寡核苷酸组合物的方法。在一些实施方案中,所提供的方法包括提供具有  的结构的所提供的手性试剂的步骤,其中W^1是-NG^5,W^2是O,G^1和G^3中的每个独立地是氢或选自C_{1-10}脂族、杂环基、杂芳基和芳基的任选取代的基团,G^2是-$C(R)_2Si(R)_3$,并且G^4和G^5一起形成具有高达约20个环原子的任选取代的单环或多环、稠合或未稠合的饱和、部分不饱和或不饱和的含杂原子的环,其中每个R独立地是氢或选自以下的任选取代的基团:C_1-C_6脂族、碳环基、芳基、杂芳基和杂环基。在一些实施方案中,所提供的手性试剂具有以下结构:

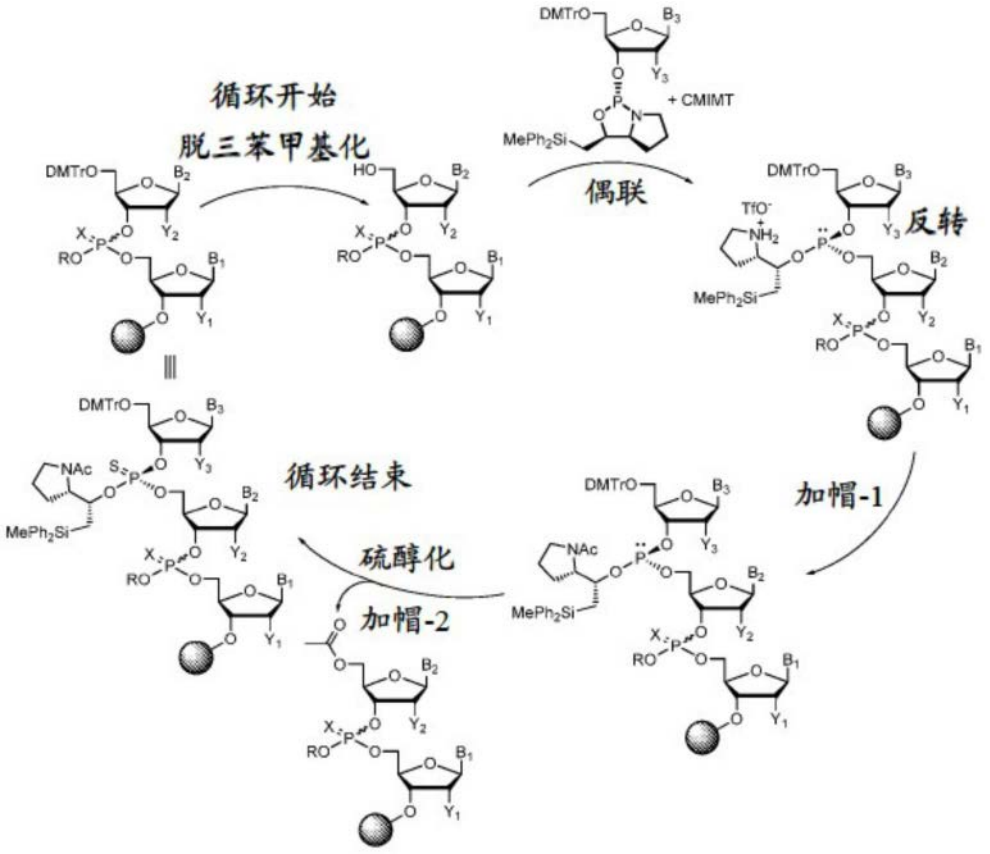

、 
、 
或 
。在一些实施方案中,所提供的方法包括提供亚磷酰胺,其包含来自具有以下结构的手性试剂的部分: 
、 
、 
、 
或 
,其中-W^1H和-W^2H或羟基和氨基与亚磷酰胺的磷原子形成键。在一些实施方案中,-W^1H和-W^2H或羟基和氨基与亚磷酰胺的磷原子形成键,例如在 
或 
中。在一些实施方案中,亚磷酰胺具有以下结构: 
、 
、 
、

[1735] 



。在一些实施方案中，R是保护基团。在一些实施方案中，R是DMTr。在一些实施方案中，G^2是-C(R)$_2$Si(R)$_3$，其中-C(R)$_2$-是任选取代的-CH_2-，并且-Si(R)$_3$中的每个R独立地是选自C_{1-10}脂族、杂环基、杂芳基和芳基的任选取代的基团。在一些实施方案中，-Si(R)$_3$中的至少一个R独立地是任选取代的C_{1-10}烷基。在一些实施方案中，-Si(R)$_3$中的至少一个R独立地是任选取代的苯基。在一些实施方案中，-Si(R)$_3$中的一个R独立地是任选取代的苯基，并且另外两个R中的每个独立地是任选取代的C_{1-10}烷基。在一些实施方案中，-Si(R)$_3$中的一个R独立地是任选取代的C_{1-10}烷基，并且另外两个R中的每个独立地是任选取代的苯基。在一些实施方案中，G^2是任选取代的-CH_2Si(Ph)(Me)$_2$。在一些实施方案中，G^2是任选取代的-CH_2Si(Me)(Ph)$_2$。在一些实施方案中，G^2是-CH_2Si(Me)(Ph)$_2$。在一些实施方案中，G^4和G^5一起形成任选取代的含有一个氮原子(G^5与其连接)的5-6元饱和环。在一些实施方案中，G^4和G^5一起形成任选取代的含有一个氮原子的5-元饱和环。在一些实施方案中，G^1为氢。在一些实施方案中，G^3为氢。在一些实施方案中，G^1和G^3两者都是氢。在一些实施方案中，G^1和G3两者都是氢，G^2是-C(R)$_2$Si(R)$_3$，其中-C(R)$_2$-是任选取代的-CH_2-，并且-Si(R)$_3$中的每个R独立地是选自C_{1-10}脂族、杂环基、杂芳基和芳基的任选取代的基团，并且G^4和G^5一起形成含有一个氮原子的任选取代的饱和5-元环。在一些实施方案中，所提供的方法还包括提供含氟试剂。在一些实施方案中，所提供的含氟试剂在合成后从寡核苷酸中去除手性试剂或由手性试剂形成的产物。根据本发明，可以使用各种已知的含氟试剂，包括用于去除-SiR_3基团的那些F^-源，例如TBAF、HF_3-Et_3N等。在一些实施方案中，与诸如浓缩氨的传统方法相比，含氟试剂提供更好的结果，例如，更短的处理时间、更低的温度、更少的脱硫等。在一些实施方案中，对于某些含氟试剂，本公开提供了用于改善的结果的接头，例如，在去除手性试剂(或在寡核苷酸合成过程中由其形成的产物)的过程中，寡核苷酸从支撑体上的切割较少。在一些实施方案中，所提供的接头是SP接头。在一些实施方案中，本公开证明可以使用HF-碱基络合物(诸如HF-NR_3)来控制在手性试剂(或在寡核苷酸合成过程中由其形成的产物)去除的过程中的切割。在一些实施方案中，HF-NR_3是HF-NEt_3。在一些实施方案中，HF-NR_3使得能够使用传统的接头，例如琥珀酰基接头。

[1736] 在一些实施方案中，用于产生PNPLA3寡核苷酸的方法包括至少一个使用DPSE型手性助剂的循环，诸如以下非限制性实例所示：

[1737] 

[1738] 脱三苯甲基化：

[1739] 寡核苷酸的合成开始于负载2'-F-U-DMTr的CPG固体支撑体(在甲苯中的3％二氯乙酸(DCA)用于从连接到固体支撑体上的初始核碱基中去除二甲氧基三苯甲基(DMTr)，接着是在波长436nm下的UV监视命令模式。线性流量，424厘米/小时，用于脱三苯甲基化。

[1740] 偶联：

[1741] 对于偶联步骤，将所有亚酰胺以0.2M的浓度溶解在乙腈(ACN)或20％异丁腈(IBN)/ACN中；使用前，将溶液在分子筛(3Å)NLT上干燥4小时(10％，v/v)。使用双活化剂(CMIMT和ETT)偶联方法来生产寡核苷酸。将两种活化剂均以0.6M的浓度溶解在ACN中。CMIMT已用于有效偶联立体限定的核苷酸，而ETT是用于偶联无规/标准亚酰胺/核苷酸的活化剂。在10分钟的循环时间内，2.5当量的亚酰胺用于偶联立体限定的核苷酸(线性循环模式，212厘米/小时)。在偶联步骤中，CMIMT活化剂与立体限定的亚酰胺的摩尔比保持在6.1:1(CMIMT/亚酰胺＝6.1/1)。用ETT活化剂偶联所有无规的亚酰胺8分钟。ETT与无规/标准亚酰胺的摩尔比为4.5:1。

[1742] 加帽1：

[1743] 加帽1是在硫醇化之前进行的步骤。1-1.5CV加帽B溶液在4分钟的接触时间内用于对DPSE上的助剂胺进行加帽。用加帽B溶液对DPSE手性助剂进行加帽有助于减少早期失效和FLP后杂质的情况。

[1744] 硫醇化：

[1745] 在加帽1步骤之后，在6分钟的接触时间内，用硫醇化试剂(在吡啶中的0.2M黄原氢化物(XH)(0.6CV))稳定磷三酯键P(III)，以形成稳定的P(V)键。

[1746] 氧化：

[1747] 应指出，对于标准核苷酸循环，加帽1步骤不是必需的。因此，在将标准的核苷酸偶联到固体支撑体上之后，将磷三酯键联P(III)在2分钟的接触时间内用0.05M的碘/水/吡啶溶液(3.5当量)氧化，以形成稳定的P(V)键。

[1748] 加帽2(硫醇化后/氧化-加帽)：

[1749] 一般来讲，在基于DMTr释放阳离子的偶联步骤中观察到97％-100％的偶联效率。将固体支撑体上残留的未偶合的羟基(通常是1％-3％，通过detrit监测器)用0.4CV的加帽A和加帽B溶液在0.8分钟内封闭，以防止形成缺失序列。如果任何辅助胺在预加帽步骤中保持未加帽，则也将在此步骤中加帽。

[1750] 循环重复

[1751] 重复合成循环(DPSE循环＝脱三苯甲基化->偶联->加帽1->硫醇化->加帽2和标准循环＝脱三苯甲基化->偶联->氧化->加帽2)，直到在固体支撑体上合成所需长度的寡核苷酸。

[1752] 在一些实施方案中，本公开包括一种用于制备针对所选择的靶序列的PNPLA3寡核苷酸组合物的方法，所述方法包括制备所提供的能够指导单链RNA干扰并包含第一多个寡核苷酸的寡核苷酸组合物，所述第一多个寡核苷酸中的每个具有与靶序列互补的碱基序列。在一些实施方案中，所提供的方法还包括提供药学上可接受的载体。

[1753] 如本领域普通技术人员所理解的，所提供的寡核苷酸也可以根据本公开使用所提供的试剂和方法通过已知的溶液相合成来制备。

[1754] 作为非限制性实例，所提供的寡核苷酸也可以通过本领域已知的任何过程来制备，所述过程包括但不限于以下描述的那些过程：JP 4348044；WO2005092909；USPN 9394333；WO2011005761；USPN 8470987；USPN 8859755；USPN 8822671；WO2013012758；EP 13817386；WO2014012081；WO2015107425；WO2017015555；和WO2017062862。

[1755] 包含本文公开的单链寡核苷酸的双链寡核苷酸

[1756] 在一些实施方案中，PNPLA3寡核苷酸是单链或双链寡核苷酸。在一些实施方案中，本公开涵盖一种双链寡核苷酸或分子，其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一个寡核苷酸。在一些实施方案中，本公开涉及包含这种双链寡核苷酸的组合物。

[1757] 在一些实施方案中，本公开涵盖一种双链分子，其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一个寡核苷酸，例如，所述分子的一个或两个末端具有3’或5’突出端。

[1758] 在一些实施方案中，本公开涵盖一种双链分子，其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之完全互补的另一个寡核苷酸。

[1759] 在一些实施方案中，本公开涵盖一种能够指导RNA干扰的双链分子，其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一种寡核苷酸。

[1760] 在一些实施方案中，本公开涵盖一种能够指导RNA干扰的双链分子，其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一个寡核苷酸，例如，所述能够指导RNA干扰的分子的一个或两个末端具有3’或5’突出端。

[1761] 在一些实施方案中，本公开涵盖一种能够指导RNA干扰的双链分子，其包含如本文

所公开的单链寡核苷酸以及与之完全互补的另一种寡核苷酸。

[1762] 在一些实施方案中,本公开涵盖一种能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的双链分子,其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一种寡核苷酸。

[1763] 在一些实施方案中,本公开涵盖一种能够指导RNA干扰RNA酶H介导的敲低的双链分子,其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之至少部分互补的另一个寡核苷酸,例如,所述能够指导RNA干扰RNA酶H介导的敲低的分子的一个或两个末端具有3'或5'突出端。

[1764] 在一些实施方案中,本公开涵盖一种能够指导RNA干扰和RNA酶H介导的敲低的双链分子,其包含如本文所公开的单链寡核苷酸以及与之完全互补的另一种寡核苷酸。

[1765] 所提供的第一寡核苷酸和寡核苷酸组合物可以具有本文公开的任何寡核苷酸的任何形式、结构元件或碱基序列,并且还包含与第一寡核苷酸至少部分互补的第二寡核苷酸或寡核苷酸链。在一些实施方案中,第一和/或第二寡核苷酸可包含本文公开的任何寡核苷酸的任何形式、结构元件或碱基序列(或与本文公开的任何寡核苷酸的碱基序列至少部分互补的碱基序列)。在一些实施方案中,结构元件是5'-末端结构、5'-末端区域、5'-核苷酸、种子区域、种子后区域、3'-末端区域、3-'末端二核苷酸、3'-末端帽、或这些结构中的任一个的任何部分、GC含量、长GC延伸和/或任何修饰、化学、立体化学、修饰的样式、化学或立体化学、或附加的化学部分(例如,包括但不限于靶向部分、脂质部分、GalNAc部分、碳水化合物部分等)、任何组分、或上述任一个的任何组合。

[1766] 生物学应用

[1767] 如本文所述,所提供的组合物和方法能够改善敲低,包括转录物的单链RNA干扰。在一些实施方案中,所提供的组合物和方法与参考样式相比,提供了改善的转录物单链RNA干扰,所述参考样式是参考条件的样式,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。改善可以是任何所需的生物学功能的改善。

[1768] 在一些实施方案中,本公开提供了用于改善靶转录物的单链RNA干扰的方法,其包括施用包含第一多个寡核苷酸的组合物,其中,靶转录物的单链RNA干扰与参考条件相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[1769] 在一些实施方案中,本公开提供了一种介导靶标的单链RNA干扰的方法,所述方法包括以下步骤:

[1770] 在足以产生一组单链RNA干扰产物的量、时间和条件下,将含有靶转录物的单链RNA干扰系统与包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物接触,所述一组单链RNA干扰产物与在参考条件下产生的一组不同,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[1771] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防疾病的组合物和方法,其包括但不限于在本公开中引用的参考文献中描述的那些。

[1772] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗或预防疾病的方法,其包括向受试者施用本文所述的PNPLA3寡核苷酸组合物。

[1773] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗或预防疾病的方法,其包括向受试者施用包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,所述第一多个寡核苷酸:

[1774] 1)具有与转录物中的靶序列互补的共同的碱基序列;并且

[1775] 2)包含一个或多个修饰的糖部分和修饰的核苷酸间键联,

[1776] 所述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[1777] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗或预防疾病的方法,其包括向受试者施用包含能够指导单链RNA干扰的第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸组合物,其中寡核苷酸属于通过以下来定义的特定寡核苷酸类型:

[1778] 1)碱基序列;

[1779] 2)主链键联样式;

[1780] 3)主链手性中心样式;以及

[1781] 4)主链磷修饰样式,

[1782] 所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含具有所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸,其中:

[1783] 所述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[1784] 在一些实施方案中,疾病是其中施用所提供能够指导单链RNA干扰的组合物可以修复、恢复或引入新的有益功能的疾病。

[1785] 在一些实施方案中,疾病是其中在施用所提供的组合物之后,通过改善基因转录物的单链RNA干扰系统有效地敲低基因的疾病。

[1786] 在一些实施方案中,疾病是癌症。

[1787] 在一些实施方案中,本公开提供了一种通过施用包含第一多个寡核苷酸的组合物来治疗疾病的组合物,所述第一多个寡核苷酸共享包含共同碱基序列的共同碱基序列,所述寡核苷酸序列与靶转录物中的靶序列互补,

[1788] 改善包括使用立体控制的寡核苷酸组合物作为寡核苷酸组合物,所立体控制的述寡核苷酸组合物的特征在于,当其与PNPLA3寡核苷酸或单链RNA干扰体系中的转录物接触时,转录物的RNAi介导的敲低与在参考条件下观察到的敲低相比得到改善,所述参考条件选自由不存在组合物、存在参考组合物及其组合组成的组。

[1789] 在一些实施方案中,疾病是癌症。

[1790] 在一些实施方案中,疾病治疗包括通过改善单链RNA干扰系统来敲低基因功能。

[1791] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂靶向靶mRNA转录物。

[1792] 在一些实施方案中,共同碱基序列能够与细胞中的转录物杂交。在一些实施方案中,共同碱基序列与本文所述或本领域已知的任何基因的转录物杂交。

[1793] 病症的治疗

[1794] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降

低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。

[1795] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸靶向PNPLA3。

[1796] 在一些实施方案中,PNPLA3是基因或其基因产物(包括但不限于转录物或蛋白质),也被称为:PNPLA3、脂肪营养蛋白、ADPN、C22orf20、酰基甘油O-酰基转移酶或非钙依赖性磷脂酶A2-ε、iPLA(2)ε、含有马铃薯糖蛋白(patatin)样磷脂酶结构域的蛋白3;外部ID:MGI:2151796;HomoloGene:11883;GeneCards:PNPLA3;物种:人;Entrez:80339;Ensembl:ENSG00000100344;UniProt:Q9NST1;RefSeq(mRNA):NM_025225;RefSeq(蛋白质):NP_079501;定位(UCSC):22号染色体:43.92-43.96Mb;物种:小鼠;Entrez:116939;Ensembl:ENSMUSG00000041653;UniProt:Q91WW7;RefSeq(mRNA):NM_054088;RefSeq(蛋白质):NP_473429.2NP_473429;定位(UCSC):15号染色体:84.17-84.19Mb。据报道,含有马铃薯糖蛋白样磷脂酶结构域的蛋白质3(PNPLA3),也称为脂肪营养蛋白(ADPN)、酰基甘油O-酰基转移酶或非钙依赖性磷脂酶A2-ε(iPLA(2)ε),是人类中由PNPLA3基因编码的酶。PNPLA3编码属于马铃薯糖蛋白样磷脂酶家族的一种481个氨基酸的蛋白。据报道,此家族的祖先马铃薯糖蛋白是马铃薯块茎的主要蛋白质,并且具有非特异性脂质酰基水解酶活性。据报道,PNPLA3(含有马铃薯糖蛋白样磷脂酶结构域的蛋白3)中的一个变体(I148M)与肝脂肪水平升高和肝炎症强烈相关联。据报道,PNPLA3-1148M的标记是SNP rs738409。据报道,在调整了BMI、糖尿病状况、乙醇使用以及全球和本地血统之后,PNPLA3-I148M与肝脂肪含量之间的关联仍然非常显著,并且与所有三个族群中肝脏TG含量的相关显著增加。据报道,PNPLA3-I148M等位基因的频率反映了三个族群中NAFLD的相对流行;频率最高的是西班牙裔(0.49),而频率较低的是欧洲裔美国人(0.23)和非裔美国人(0.17)。Collins等2003Genome Res.13(1):27-36;Collins等2005Genome Biol.5(10):R84;Dunham等1999Nature.402(6761):489-95;Gerhard等2004Genome Res.14(10B):2121-7;Jenkins等2005J.Biol.Chem.279(47):48968-75;Kienesberger等2009J.Lipid Res.50Suppl.:S63-8;Lake等2006J.Lipid Res.46(11):2477-87;Liu等2004J.Clin.Endocrinol.Metab.89(6):2684-9;Strausberg等2003Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.99(26):16899-903;Wilson等2006J Lipid Res.47(9):1940-9。

[1797] 在一些实施方案中,PNPLA3相关病症是与PNPLA3基因或其基因产物的异常或过度活性、水平和/或表达,或者其在组织或细胞间或细胞内的异常分布相关、由其引起或与其相关联的病症。PNPLA3相关病症的非限制性实例包括:肝脏疾病、脂肪肝(例如,肝脏中脂肪的积累或肝脂肪的增加或超正常)、肝脂肪变性(例如单纯性脂肪肝)、脂肪性肝炎、肝炎、非酒精性脂肪肝病(例如NAFLD)和/或与肝脏疾病相关或继发于肝脏疾病的一种或多种疾病和/或一种或多种症状或病状,其包括但不限于:炎症、肝细胞破坏(例如肝细胞坏死)、肝脏瘢痕形成(例如纤维化)、不可逆转的晚期肝脏瘢痕形成(例如肝硬化)、胰岛素抵抗、糖尿病、血脂异常、刺猬(Hh)信号途径中的蛋白质活性增加、疲劳、虚弱、恶心、腹痛、蜘蛛状血管、黄疸、瘙痒、水肿、腹水、精神错乱、肥胖、肝细胞癌。

[1798] 在一些实施方案中,PNPLA3相关病症的非限制性实例包括:高脂血症、I型糖尿病、II型糖尿病、特发性I型糖尿病(Ib型)、成人潜伏性自身免疫性糖尿病(LADA)、早发2型糖尿

病(EOD)、青年发病型非典型糖尿病(YOAD)、青年成熟期发病型糖尿病(MODY)、营养不良相关的糖尿病、妊娠糖尿病、冠心病、缺血性中风、血管成形术后的再狭窄、周围血管疾病、间歇性跛行、心肌梗塞、血脂异常、餐后脂血症、葡萄糖耐量(IGT)受损的病状、空腹血糖受损的病状、代谢性酸中毒、酮病、关节炎、肥胖、骨质疏松、高血压、充血性心力衰竭、左心室肥大、外周动脉疾病、糖尿病视网膜病变、黄斑变性、白内障、糖尿病肾病、肾小球硬化、慢性肾功能衰竭、糖尿病神经病、代谢综合征、X综合征、经前期综合征、心绞痛、血栓形成、动脉粥样硬化、短暂性脑缺血发作、中风、血管再狭窄、高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗、葡萄糖代谢受损、勃起功能障碍、皮肤和结缔组织病症、足溃疡和溃疡性结肠炎、内皮功能障碍和血管顺应性受损、高载脂蛋白B脂蛋白血症、阿尔茨海默病、精神分裂症、认知受损、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、和肠易激综合征、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、或非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。

[1799] 在一些实施方案中,PNPLA3相关病症的非限制性实例包括:脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌。

[1800] 本公开涉及使用本文公开的寡核苷酸的方法,所述寡核苷酸能够靶向PNPLA3并且可用于治疗PNPLA3相关病症和/或制备PNPLA3相关病症的治疗。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂的碱基序列可以包含碱基序列或由碱基序列组成,所述碱基序列具有与指定碱基序列的指定最大错配数。

[1801] PNPLA3相关病症的治疗

[1802] 在一些实施方案中,本公开涉及靶向PNPLA3的寡核苷酸(例如,包含PNPLA3靶序列或与PNPLA3靶序列互补的序列的PNPLA3寡核苷酸)。在一些实施方案中,本公开涉及指导PNPLA3的靶标特异性敲低的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及指导RNA酶H和/或RNA干扰介导的PNPLA3的靶标特异性敲低的PNPLA3寡核苷酸。本文公开了各种此类能够靶向PNPLA3的寡核苷酸。

[1803] 在一些实施方案中,PNPLA3相关病症的非限制性实例包括:肝脏疾病、脂肪肝(例如,肝脏中脂肪的积累或肝脂肪的增加或超正常)、肝脂肪变性(例如单纯性脂肪肝)、脂肪性肝炎、肝炎、非酒精性脂肪肝病(例如NAFLD)和/或与肝脏疾病相关或继发于肝脏疾病的一种或多种疾病和/或一种或多种症状或病状,其包括但不限于:炎症、肝细胞破坏(例如肝细胞坏死)、肝脏瘢痕形成(例如纤维化)、不可逆转的晚期肝脏瘢痕形成(例如肝硬化)、胰岛素抵抗、糖尿病、血脂异常、刺猬(Hh)信号途径中的蛋白质活性增加、疲劳、虚弱、恶心、腹痛、蜘蛛状血管、黄疸、瘙痒、水肿、腹水、精神错乱、肥胖、肝细胞癌。

[1804] 在一些实施方案中,本公开涉及一种在其患者中治疗或缓解PNPLA3相关病症的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的步骤。

[1805] 在一些实施方案中,本公开涉及一种在其患者中治疗或缓解PNPLA3相关病症的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的步骤,其中PNPLA3相关病症选自:肝脏疾病、脂肪肝、脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎和非酒精性脂肪肝病。

[1806] 在一些实施方案中,本公开涉及一种用于将降低PNPLA3基因表达的PNPLA3寡核苷酸引入细胞中的方法,所述方法包括使细胞与PNPLA3寡核苷酸接触。在一些实施方案中,寡

核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1807] 在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中减少PNPLA3基因表达的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用包含靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的核酸-脂质颗粒。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1808] 在一些实施方案中,本公开涉及一种用于体内递送靶向PNPLA3基因表达的PNPLA3寡核苷酸的方法,所述方法包括向哺乳动物施用靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物罹患和/或患有PNPLA3相关病症。在一些实施方案中,哺乳动物罹患和/或患有PNPLA3相关病症,其选自:肝脏疾病、脂肪肝、脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎和非酒精性脂肪肝病。

[1809] 在一些实施方案中,本公开的方法用于治疗人类中的以下疾病:高脂血症、I型糖尿病、II型糖尿病、特发性I型糖尿病(Ib型)、成人潜伏性自身免疫性糖尿病(LADA)、早发2型糖尿病(EOD)、青年发病型非典型糖尿病(YOAD)、青年成熟期发病型糖尿病(MODY)、营养不良相关的糖尿病、妊娠糖尿病、冠心病、缺血性中风、血管成形术后的再狭窄、周围血管疾病、间歇性跛行、心肌梗塞、血脂异常、餐后脂血症、葡萄糖耐量(IGT)受损的病状、空腹血糖受损的病状、代谢性酸中毒、酮病、关节炎、肥胖、骨质疏松、高血压、充血性心力衰竭、左心室肥大、外周动脉疾病、糖尿病视网膜病变、黄斑变性、白内障、糖尿病肾病、肾小球硬化、慢性肾功能衰竭、糖尿病神经病、代谢综合征、X综合征、经前期综合征、心绞痛、血栓形成、动脉粥样硬化、短暂性脑缺血发作、中风、血管再狭窄、高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平升高(高胆固醇血症)、胰岛素抵抗、葡萄糖代谢受损、勃起功能障碍、皮肤和结缔组织病症、足溃疡和溃疡性结肠炎、内皮功能障碍和血管顺应性受损、高载脂蛋白B脂蛋白血症、阿尔茨海默病、精神分裂症、认知受损、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、和肠易激综合征、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、或非酒精性脂肪肝病(NAFLD),其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的PNPLA3寡核苷酸。

[1810] 在一些实施方案中,所述方法降低门脉高压、肝蛋白合成能力、高胆红素血症或脑病,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的PNPLA3寡核苷酸。

[1811] 本公开还涉及一种用于在人类中治疗以下疾病的方法:降低非酒精性脂肪肝病或非酒精性脂肪性肝炎分级评分系统的严重性至少一个点、降低非酒精性脂肪性肝炎活性的血清标志物水平、降低非酒精性脂肪性肝炎疾病活性或降低非酒精性脂肪性肝炎的医学后果,所述方法向受试者施用治疗有效量的本公开的PNPLA3寡核苷酸。

[1812] 在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中治疗和/或缓解与PNPLA3相关病症相关联的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中降低对PNPLA3相关病症的易感性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中预防或延迟PNPLA3相关病症的发作的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中治疗和/或缓解与PNPLA3相关病症相关联的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的核酸-

脂质颗粒。在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中降低对PNPLA3相关病症的易感性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的核酸-脂质颗粒。在一些实施方案中,本公开涉及一种在需要其的哺乳动物中预防或延迟PNPLA3相关病症的发作的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的核酸-脂质颗粒。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物罹患和/或患有PNPLA3相关病症。在一些实施方案中,哺乳动物罹患和/或患有PNPLA3相关病症,其选自:肝脏疾病、脂肪肝、脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎和非酒精性脂肪肝病。

[1813] 在一些实施方案中,本公开涉及一种抑制细胞中的PNPLA3表达的方法,所述方法包括:(a)使细胞与靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸接触;和(b)将步骤(a)中产生的细胞维持足以使PNPLA3基因的mRNA转录物降解的时间,从而抑制PNPLA3基因在细胞中的表达。在一些实施方案中,PNPLA3表达被抑制至少30%。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1814] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗由PNPLA3表达介导的病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的人施用治疗有效量的靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1815] 在一些实施方案中,本公开涉及一种包含靶向PNPLA3的PNPLA3寡核苷酸的化合物,其用于在受试者中治疗PNPLA3相关病症。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。在一些实施方案中,PNPLA3相关病症选自:肝脏疾病、脂肪肝、脂肪变性、脂肪性肝炎、肝炎或非酒精性脂肪肝病。

[1816] 在一些实施方案中,向受试者施用第二药剂(例如,另外的治疗剂)。在一些实施方案中,所述第二药剂是PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸靶向PNPLA3。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1817] 本公开的寡核苷酸可单独施用或与一种或多种另外的治疗剂组合施用。“组合施用”或“组合疗法”意指向所治疗的哺乳动物同时施用本公开的寡核苷酸和一种或多种另外的治疗剂。当组合施用时,每种组分可以同时施用或在不同时间点以任何顺序依次施用。因此,可以分开但在时间上足够紧密地施用每种组分,以便提供所需的治疗效果。因此,本文所述的预防和治疗的组合物和方法包括使用组合剂。

[1818] 组合剂以治疗有效量向哺乳动物施用。“治疗有效量”意指本公开的PNPLA3寡核苷酸在向哺乳动物单独施用或与另外治疗剂组合施用时有效治疗所需疾病/病状(例如肥胖、糖尿病和心血管疾病)的量。

[1819] 因此,本公开的寡核苷酸可以与治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和/或非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的药剂(即,抗NASH和抗NAFLD剂)共同施用,所述药剂诸如奥利司他、TZD和其他胰岛素增敏剂、FGF21类似物、二甲双胍、Omega-3-酸乙基酯(例如Lovaza)、贝特类、HMG-CoA还原酶抑制剂、依泽替米贝、普罗布考、熊去氧胆酸、TGR5激动剂、FXR激动剂、维生素E、甜菜碱、己酮可可碱、CB1拮抗剂、肉碱、N-乙酰半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氯卡色林、纳曲酮与丁氨苯丙酮的组合、SGLT2抑制剂、苯丁胺、托吡酯、肠降血糖素(GLP和GIP)类似物和血管紧张素受体阻断剂。用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和/或非酒精性脂肪性肝

病(NAFLD)的优选药剂(即抗NASH和抗NAFLD剂)是乙酰-CoA羧化酶(ACC)抑制剂、已酮糖激酶(KHK)抑制剂、GLP-1受体激动剂、FXR激动剂、CB1拮抗剂、ASK1抑制剂、CCR2和/或CCR5抑制剂、PNPLA3抑制剂、DGAT1抑制剂、DGAT2抑制剂、FGF21类似物、FGF19类似物、SGLT2抑制剂、PPAR激动剂、AMPK活化剂、SCD1抑制剂或MPO抑制剂。2017年12月1日提交的共同转让的专利申请PCT/IB2017/057577涉及GLP-1受体激动剂。最优选的是FXR激动剂、细胞凋亡信号调节激酶1(ASK1)抑制剂、PPAR激动剂、GLP-1受体激动剂、SGLT抑制剂、ACC抑制剂和KHK抑制剂。

[1820] 此外,本公开的寡核苷酸可以与抗糖尿病剂共同施用,所述抗糖尿病剂包括:例如胰岛素、甲福明、DPPIV抑制剂(例如西他列汀)、GLP-1受体激动剂、类似物和模拟物、SGLT1和SGLT2抑制剂(例如埃格列净)。优选的药剂是甲福明、西他列汀和埃格列净。合适的抗糖尿剂包括乙酰-CoA羧化酶-(ACC)抑制剂(诸如WO2009144554、WO2003072197、WO2009144555和WO2008065508中所述的那些抑制剂)、二酰基甘油O-酰基转移酶1(DGAT-1)抑制剂(例如WO09016462或WO2010086820中所述的那些抑制剂)、AZD7687或LCQ908、二酰基甘油O-酰基转移酶2(DGAT-2)抑制剂(诸如WO2015/140658中所述的那些抑制剂)、单酰基甘油O-酰基转移酶抑制剂、磷酸二酯酶(PDE)-10抑制剂、AMPK活化剂、磺酰脲(例如,乙酸己脲、氯磺丙脲、氯磺丙脲、格列本脲、格列吡嗪、格列本脲、格列美脲、格列齐特、格列戊肽、格列喹酮、格列索脲、甲磺氮草脲和甲苯磺丁脲)、美各里替尼、α-淀粉酶抑制剂(例如,淀粉酶抑肽、萃他丁和AL-3688)、α-葡萄糖苷水解酶抑制剂(例如,阿卡波糖)、α-葡萄糖苷酶抑制剂(例如,脂解素、卡格列波糖、乙格列酯、米格列醇、伏格列波糖、普拉迪霉素-Q和萨尔布他汀)、PPARγ激动剂(例如巴拉格列酮、西格列酮、达格列酮、恩格列酮、伊格列酮、吡格列酮和罗格列酮)、PPARα/γ激动剂(例如CLX-0940、GW-1536、GW-1929、GW-2433、KRP-297、L-796449、LR-90、MK-0767和SB-219994)、双胍(例如甲福明)、胰高血糖素样肽1(GLP-1)受体激动剂(例如exendin-3和exendin-4)、利拉鲁肽、阿比鲁肽、艾塞那肽(Byetta®)、阿比鲁肽、利西拉肽、度拉糖肽、索马鲁肽、NN-9924、TTP-054、TTP-273、蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP-1B)抑制剂(例如曲妥司明、泪液提取物和Zhang,S.等Drug Discovery Today,12(9/10),373-381(2007)公开的化合物)、SIRT-1活化剂(例如白藜芦醇、GSK2245840或GSK184072)、二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂(例如WO2005116014中的那些抑制剂、西他列汀、维格列汀、阿格列汀、杜托列汀、利那列汀和沙格列汀)、胰岛素促分泌素、脂肪酸氧化抑制剂、A2拮抗剂、c-jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂、葡萄糖激酶活化剂(GKa)(诸如WO2010103437、WO2010103438、WO2010013161、WO2007122482中所述的那些活化剂、TTP-399、TTP-355、TTP-547、AZD1656、ARRY403、MK-0599、TAK-329、AZD5658或GKM-001)、胰岛素、胰岛素模拟物、糖原磷酸化酶抑制剂(例如GSK1362885)、VPAC2受体激动剂、SGLT2抑制剂(诸如E.C.Chao等Nature Reviews Drug Discovery 9,551-559(2010年七月)中所述那些抑制剂,包括达格列净、卡格列净、依帕列净、托格列净(CSG452)/埃格列净、ASP-1941、THR1474、TS-071、ISIS388626和LX4211以及WO2010023594中的那些抑制剂)、胰高血糖素受体调节剂(诸如Demong,D.E.等Annual Reports in Medicinal Chemistry 2008,43,119-137中所述的那些调节剂)、GPR119调节剂(特别是激动剂,诸如WO2010140092、WO2010128425、WO2010128414、WO2010106457、Jones,R.M.等in Medicinal Chemistry 2009,44,149-170中所述的那些调节剂(例如MBX-2982、GSK1292263、APD597和PSN821))、FGF21衍生物或类似物(诸如Kharitonenkov,A.等,

Current Opinion in Investigational Drugs 2009,10(4)359-364中所述的那些)、TGR5(也称为GPBAR1)受体调节剂(特别是激动剂,诸如Zhong,M.,Current Topics in Medicinal Chemistry,2010,10(4),386-396中所述的那些,以及INT777)、GPR40激动剂(诸如Medina,J.C.,Annual Reports in Medicinal Chemistry,2008,43,75-85中所述的那些,包括但不限于TAK-875)、GPR120调节剂(特别是激动剂)、高亲和力烟酸受体(HM74A)活化剂和SGLT1抑制剂(诸如GSK1614235)。可以与本公开的寡核苷酸组合的抗糖尿病剂的另一代表性列表可以在例如WO2011005611的第28页第35行至第30页第19行中找到。优选的抗糖尿病剂是甲福明和DPP-IV抑制剂(例如西他列汀、维格列汀、阿格列汀、杜托列汀、利那列汀和沙格列汀)。其他抗糖尿病剂可能包括肉碱棕榈酰基转移酶的抑制剂或调节剂,果糖1,6-二磷酸酶的抑制剂,醛糖还原酶的抑制剂、盐皮质激素受体的抑制剂,TORC2的抑制剂,CCR2和/或CCR5的抑制剂,PKC同种型(例如PKCα、PKCβ、PKCγ)的抑制剂,脂肪酸合成酶的抑制剂,丝氨酸棕榈酰转移酶的抑制剂,GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、视黄醇结合蛋白4、糖皮质激素受体、生长抑素受体(例如SSTR1、SSTR2、SSTR3和SSTR5)的调节剂,PDHK2或PDHK4的抑制剂或调节剂,MAP4K4的抑制剂,IL1家族(包括IL1β)的调节剂,RXRα调节剂。此外,合适的抗糖尿病剂包括由Carpino,P.A.,Goodwin,B.Expert Opin.Ther.Pat,2010,20(12),1627-51列出的机制。

[1821] 合适的抗肥胖剂包括11β-羟基类固醇脱氢酶-1(1型11β-HSD)抑制剂、硬脂酰-CoA去饱和酶-1(SCD-1)抑制剂、MCR-4激动剂、胆囊收缩素-A(CCK-A)激动剂、单胺再摄取抑制剂(诸如西布曲明)、拟交感神经基、β3肾上腺素能激动剂、多巴胺激动剂(诸如溴隐亭),刺激黑素细胞的激素类似物、5HT-2c激动剂、黑色素浓缩激素拮抗剂、瘦素(OB蛋白)、瘦素类似物、瘦素激动剂、甘丙肽拮抗剂、脂肪酶抑制剂(诸如四氢利普司他汀、即奥利司他)、厌食剂(诸如蛙皮素激动剂)、神经肽-Y拮抗剂(例如NPY Y5拮抗剂)、PYY3-36(包括其类似物)、拟甲状腺素剂、脱氢表雄酮或其类似物、糖皮质激素激动剂或拮抗剂、食欲素拮抗剂、胰高血糖素样肽1激动剂、睫状神经营养因子(诸如可从Regeneron Pharmaceuticals,Inc.,Tarrytown,NY和Procter&Gamble Company,Cincinnati,OH获得的Axokine™)、人豚鼠相关蛋白(AGRP)抑制剂、饥饿素拮抗剂、组胺3拮抗剂或反向激动剂、神经调节素U激动剂、MTP/ApoB抑制剂(例如肠道选择性MTP抑制剂,例如地洛他派)、阿片拮抗剂、食欲素拮抗剂、纳曲酮与丁氨苯丙酮的组合等。

[1822] 在本公开的组合方面中使用的优选的抗肥胖剂包括肠选择性MTP抑制剂(例如,地洛他派、米瑞他派和英普他派、R56918(登记号403987)和(登记号913541-47-6)、CCKa激动剂(例如,PCT公布号WO 2005/116034或US公布号2005-0267100 A1中所述的N-苯甲基-2-[4-(1H-吲哚-3-基甲基)-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-2,3,6,10b-四氮杂-苯并[e]奥苷菊环-6-基]-N-异丙基-乙酰胺)、5HT-2c激动剂(例如氯卡色林)、MCR4激动剂(例如,US 6,818,658中所述的化合物)、脂肪酶抑制剂(例如西替司他(Cetilistat))、PYY3-36(如本文所用,“PYY3-36”包括类似物,诸如聚乙二醇化的PYY3-36,例如美国公布2006/0178501中所述的那些)、阿片拮抗剂(例如纳曲酮)、纳曲酮与丁氨苯丙酮的组合、油酰-雌酮(登记号180003-17-2)、奥尼匹肽(TM30338)、普兰林肽(Symlin®)、特索芬辛(NS2330)、瘦素、利拉鲁肽、溴隐亭、奥利司他、艾塞那肽(Byetta®)、AOD-9604(登记号221231-10-3)、苯丁胺和托吡酯(商品名:Qsymia)、和西布曲明。优选地,本公开的寡核苷酸和组合疗法与运动和合理

饮食联合施用。

[1823] 本领域技术人员将认识到,本公开的寡核苷酸也可以与以下段落所述的心血管或脑血管治疗联合使用。本公开的寡核苷酸也可以与心血管疗法一起使用,所述心血管疗法包括PCI、支架、药物洗脱支架、干细胞疗法以及诸如植入的起搏器、除颤器或心脏再同步疗法的医疗设备。

[1824] 本公开的寡核苷酸可以与以下组合使用:胆固醇调节剂(包括降胆固醇剂)诸如脂肪酶抑制剂、HMG-CoA还原酶抑制剂、HMG-CoA合酶抑制剂、HMG-CoA还原酶基因表达抑制剂、HMG-CoA合酶基因表达抑制剂、MTP/Apo B分泌抑制剂、CETP抑制剂、胆汁酸吸收抑制剂、胆固醇吸收抑制剂、胆固醇合成抑制剂、角鲨烯合成酶抑制剂、角鲨烯环氧酶抑制剂、角鲨烯环化酶抑制剂、组合的角鲨烯环氧酶/角鲨烯环化酶抑制剂、贝特类、烟酸、离子交换树脂、抗氧化剂、ACAT抑制剂或胆汁酸螯合剂或诸如米泊美生的药剂。

[1825] 合适的降胆固醇/脂质剂和脂质分布疗法的实例包括:HMG-CoA还原酶抑制剂(例如普伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、NK-104(又名伊伐他汀(itavastatin)或尼伐他汀(nisvastatin)或尼贝他汀(nisbastatin))和ZD-4522(又名罗素伐他汀(rosuvastatin)或阿伐他汀(atavastatin)或维沙他汀(visastatin));角鲨烯合成酶抑制剂;胆汁酸螯合剂(诸如考来烯胺(questran));ACAT抑制剂;MTP抑制剂;脂氧合酶抑制剂;胆固醇吸收抑制剂;和胆固醇酯转移蛋白抑制剂。其他动脉粥样硬化剂包括PCSK9调节剂。

[1826] PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂的施用

[1827] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过不涉及RNA干扰或RISC(包括但不限于RNA酶H介导的敲低或基因表达的空间位阻)的生化机制来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过RNA干扰和/或RNA酶H介导的敲低指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸能够通过使靶基因mRNA退火后在空间上阻断翻译、和/或通过改变或干扰mRNA剪接和/或外显子包含或排除,来指导靶基因或其基因产物的表达和/或水平的降低。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸以任何给药方案并且以本文所述或本领域已知的任何方式与任何媒介物一起施用。

[1828] 在一些实施方案中,与在改善靶转录物的敲低方面具有可比的效果的其他可比的参考寡核苷酸组合物相比,所提供的寡核苷酸组合物以更低的剂量和/或频率施用。在一些实施方案中,与在改善靶转录物的敲低方面具有可比的效果的其他可比的立体无规的参考寡核苷酸组合物相比,立体控制的寡核苷酸组合物以更低的剂量和/或频率施用。

[1829] 在一些实施方案中,本公开认识到可以通过化学修饰和/或立体化学来优化寡核苷酸及其组合物的性质,例如改善的单链RNA干扰活性等。在一些实施方案中,本公开提供了用于通过化学修饰和立体化学来优化寡核苷酸性质的方法。

[1830] 通过控制化学修饰和/或立体化学,本公开提供了改善的寡核苷酸组合物和方法。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含化学修饰。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含碱基修饰、糖修饰、核苷酸间键联

修饰或其任何组合。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含碱基修饰。在一些实施方案中,所提供的能够指导单链RNA干扰的寡核苷酸包含糖修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含在糖部分上的2'-修饰。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷酸间键联和一个或多个天然磷酸酯键联。可将天然磷酸酯键掺入PNPLA3寡核苷酸的各个位置中。在一些实施方案中,将天然磷酸酯键联掺入5'-末端区域中。在一些实施方案中,将天然磷酸酯键联掺入PNPLA3寡核苷酸的中间。在一些实施方案中,本公开提供了一种方法,所述方法包括施用包含第一多个寡核苷酸的组合物,所述组合物与包含多个寡核苷酸的参考组合物相比表现出改善的递送,所述多个核苷酸中的每个也具有共同的碱基序列,但是在结构上与所述第一多个寡核苷酸不同,因为:

[1831] 参考多个寡核苷酸中的各个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同;并且/或者

[1832] 参考多个寡核苷酸中的至少一些寡核苷酸具有与由所述组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。

[1833] 在一些实施方案中,本公开提供了施用PNPLA3寡核苷酸组合物的方法,所述寡核苷酸组合物包含能够指导单链RNA干扰并具有共同核苷酸序列的第一多个寡核苷酸,所述改善包括:

[1834] 施用包含第一多个寡核苷酸的PNPLA3寡核苷酸,其特征在于相对于具有相同的共同核苷酸序列的参考寡核苷酸组合物而言改善的递送。

[1835] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸、组合物和方法提供了改善的全身递送。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸、组合物和方法提供了改善的细胞质递送。在一些实施方案中,改善的递送是向细胞群的递送。在一些实施方案中,改善的递送是向组织的递送。在一些实施方案中,改善的递送是向器官的递送。在一些实施方案中,改善的递送是向生物体的递送。在本公开中广泛描述了提供改善的递送的示例性结构元件(例如,化学修饰、立体化学、其组合等)、寡核苷酸、组合物和方法。

[1836] 在一些实施方案中,本公开提供了一种鉴定和/或表征PNPLA3寡核苷酸组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[1837] 提供至少一种包含第一多个寡核苷酸的组合物;和

[1838] 相对于参考组合物评估递送。

[1839] 在一些实施方案中,本公开提供了一种鉴定和/或表征PNPLA3寡核苷酸组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[1840] 提供至少一种包含第一多个寡核苷酸的组合物;和

[1841] 相对于参考组合物评估细胞摄取。

[1842] 在一些实施方案中,将所提供的寡核苷酸组合物的性质与参考寡核苷酸组合物进行比较。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸。

[1843] 在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是立体无规的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是其所有核苷酸间键联均为硫代磷酸酯的寡核苷酸的立体无规的组合物。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是具有所有磷酸酯键联的DNA寡核苷酸组合物。

[1844] 在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和相同化学修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和相同化学修饰样式的寡

核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和化学修饰的寡核苷酸的手性未控制的(或立体无规的)组合物。

[1845] 在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列但不同的化学修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列、碱基修饰、核苷酸间键联修饰但不同的糖修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物具有较少的2'-修饰的糖修饰。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列、碱基修饰、糖修饰但不同的核苷酸间键联修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物具有更多的核苷酸间键联修饰。在一些实施方案中,参考组合物具有较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物包含不具有天然磷酸酯键联的寡核苷酸。

[1846] 在一些实施方案中,参考组合物是包含参考多个寡核苷酸的组合物,其中各个参考多个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同。在一些实施方案中,参考组合物是包含参考多个寡核苷酸的组合物,其中与参考组合物相比,至少一些参考多个寡核苷酸具有与组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。

[1847] 在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其与参考组合物相比,能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列,但是缺少在寡核苷酸组合物的寡核苷酸中一个或多个修饰的糖部分中的至少一个。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列但没有修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列但不包含天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同化学修饰样式的PNPLA3寡核苷酸或寡核苷酸的单链RNAi剂。在一些实施方案中,参考组合物是另一种立体异构体的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1848] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物的参考寡核苷酸组合物是在不存在所提供的组合物中的脂质的可比组合物。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是立体无规的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是其所有核苷酸间键联均为硫代磷酸酯的寡核苷酸的立体无规的组合物。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物是具有所有磷酸酯键联的DNA寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和相同化学修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和相同化学修饰样式的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列和化学修饰的寡核苷酸的手性未控制的(或立体无规的)组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列但不同的化学修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列、碱基修饰、核苷酸间键联修饰但不同的糖修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物具有较少的2'-修饰的糖修饰。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同碱基序列、碱基修饰、糖修饰但不同的核苷酸间键联修饰的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,参考组合物具有更多的核苷酸间键联修饰。在一些实施方案中,参考组合物具有较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物包含不具有天然磷酸酯键联的寡核苷酸。在一些实施方案中,参考组合物是包含参考多个寡核苷酸的组合物,其中各个参考多个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同。在一些实施方案中,参考组合物是包含参考多个寡核苷酸的组合物,其中与参考组合物

相比,至少一些参考多个寡核苷酸具有与组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其与参考组合物相比,能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列,但是缺少在寡核苷酸组合物的寡核苷酸中一个或多个修饰的糖部分中的至少一个。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列但没有修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考寡核苷酸组合物包含参考多个寡核苷酸,其能够指导单链RNA干扰并且具有相同的共同核苷酸序列但不包含天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物是具有相同化学修饰样式的PNPLA3寡核苷酸或寡核苷酸的单链RNAi剂。在一些实施方案中,参考组合物是另一种立体异构体的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂。

[1849] 在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸包含参考多个寡核苷酸并不全部具有的一个或多个结构元件(例如,修饰、立体化学、样式等)。此类结构元件可以是本公开中所述的任一个。

[1850] 在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含更多的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在5'-末端区域处包含更多的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在3'-末端区域处包含更多的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含更多的Sp手性核苷酸间键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含更多的Sp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在5'-末端区域处包含更多的Sp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在3'-末端区域处包含更多的Sp硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含更多的修饰的碱基。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含更多的甲基化的碱基。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在5'-末端区域处包含更多的甲基化的碱基。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在3'-末端区域处包含更多的甲基化的碱基。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在5'-末端区域处包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,第一多个寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在3'-末端区域处包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸中的各个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸中的至少一些寡核苷酸具有与由所述组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。在一些实施方案中,参考组合物是共享碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品。在一些实施方案中,参考组合物是PNPLA3寡核苷酸或另一种寡核苷酸类型的单链RNAi剂。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸仅包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的修饰的糖部分,其中所述修饰

是2'-OR^1。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的修饰的糖部分,所述修饰是2'-OR^1。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的甲基化的碱基。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸在5'和/或3'末端区域处包含较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在5'-末端区域处包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,所提供的组合物的寡核苷酸与参考组合物的PNPLA3寡核苷酸相比,在3'-末端区域处包含较少的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸中的各个寡核苷酸在立体化学结构上彼此不同。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸中的至少一些寡核苷酸具有与由所述组合物的多个寡核苷酸表示的结构不同的结构。在一些实施方案中,参考组合物是共享碱基序列的寡核苷酸的基本上外消旋的制品。在一些实施方案中,参考组合物是PNPLA3寡核苷酸或另一种寡核苷酸类型的单链RNAi剂。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸仅包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的修饰的糖部分,其中所述修饰是2'-OR^1。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的修饰的糖部分,所述修饰是2'-OR^1。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的甲基化的碱基。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含更多的2'-MOE修饰。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸包含较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考组合物的寡核苷酸在5'和/或3'-末端区域处包含较少的天然磷酸酯键联。在一些实施方案中,参考说个寡核苷酸包含较少的包含-F的核苷酸单位。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸包含较少的2'-F修饰的糖部分。在一些实施方案中,参考多个寡核苷酸包含较少的手性控制的修饰的核苷酸间键联。

[1851] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含仅一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物具有仅一种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物包含两种或更多种寡核苷酸类型的寡核苷酸。在一些实施方案中,使用此类组合物,所提供的方法可以靶向多于一个靶标。在一些实施方案中,包含两种或更多种寡核苷酸类型的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂靶向两个或更多个靶标。在一些实施方案中,包含两种或更多种寡核苷酸类型的PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂靶向两个或更多个错配。在一些实施方案中,单一寡核苷酸类型靶向两个或更多个靶标,例如突变。在一些实施方案中,一种寡核苷酸类型的寡核苷酸的靶区域包含两个或更多个“靶位点”,诸如两个突变或SNP。

[1852] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸任选地包

含修饰的碱基或糖。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何修饰的碱基或糖。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何修饰的碱基。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含修饰的碱基和糖。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含修饰的碱基。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物中的寡核苷酸包含修饰的糖。用于寡核苷酸的修饰的碱基和糖是本领域众所周知的,包括但不限于本公开中所述的那些。在一些实施方案中,修饰的碱基是5-mC。在一些实施方案中,修饰的糖是2'-修饰的糖。寡核苷酸糖的合适的2'-修饰是本领域普通技术人员众所周知的。在一些实施方案中,2'-修饰包括但不限于2'-OR^1,其中R^1不是氢。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR^1,其中R^1是任选取代的C_{1-6}脂族。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-MOE。在一些实施方案中,修饰是2'-卤素。在一些实施方案中,修饰是2'-F。在一些实施方案中,修饰的碱基或糖可以进一步增强手性控制的寡核苷酸组合物的活性、稳定性和/或选择性,所述手性控制的寡核苷酸组合物的常见的主链手性中心样式提供了意料不到的活性、稳定性和/或选择性。

[1853] 在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何修饰的糖。在一些实施方案中,所提供的手性控制的寡核苷酸组合物不具有任何2'-修饰的糖。在一些实施方案中,本公开令人惊讶地发现,通过使用手性控制的寡核苷酸组合物,修饰的糖对于稳定性、活性和/或切割样式的控制不是必需的。此外,在一些实施方案中,本公开令人惊讶地发现,不具有修饰的糖的寡核苷酸的手性控制寡核苷酸组合物在稳定性、活性、周转率和/或切割样式的控制方面表现出更好的性质。例如,在一些实施方案中,令人惊讶地发现,与具有修饰的糖的寡核苷酸的组合物相比,没有修饰的糖的寡核苷酸的手性控制的寡核苷酸组合物从切割产物解离的速度更快并且提供显著增加的周转率。

[1854] 如本文详细讨论,本公开尤其提供了一种手性控制的寡核苷酸组合物,这是指所述组合物含有多个至少一种类型的寡核苷酸。特定"类型"的每个寡核苷酸分子由关于以下的预选(例如预定)结构元件组成:(1)碱基序列;(2)主链键联样式;(3)主链手性中心样式;和(4)主链P修饰部分的样式。在一些实施方案中,欧提供的寡核苷酸组合物含有在单一合成过程中制备的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的组合物含有在单一寡核苷酸分子内具有多于一种手性构型的寡核苷酸(例如其中沿寡核苷酸的不同残基具有不同立体化学);在一些类实施方案中,此类寡核苷酸可在单一合成过程中获得,而无需次级缀合步骤来产生具有一种以上手性构型的单个寡核苷酸分子。

[1855] 本文所提供的寡核苷酸组合物可以用作单链RNAi剂。此外,本文所提供的寡核苷酸组合物可出于研究和/或诊断目的用作试剂。本领域普通技术人员将容易地认识到本文中的本公开的内容不限于特定用途,而是可适用于其中需要使用合成寡核苷酸的任何情况。所提供的组合物尤其适用于多种治疗、诊断、农业和/或研究应用中。

[1856] 在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物包含包括一种或多种如本文详述的结构修饰的寡核苷酸和/或其残基。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物包含含有一个或多个修饰的核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸组合物包含含有一种或多种包括但不限于以下的人工核酸或残基的寡核苷酸:肽核酸(PNA)、吗啉代寡核苷酸和锁定核酸(LNA)、糖基核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、异核酸(XNA)、manitol核酸(MNA)、anitol核酸(ANA)和F-HNA及其任何组合。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包

含如在以下中所述的吗啉代:Braasch等2002Biochem.41:4503-4510,或美国专利号5,698,685;5,166,315;5,185,444;或5,034,506。在一些实施方案中,所提供的寡核苷酸包含如在以下中所述的F-HNA:美国专利号8,088,904;8,440,803;或8,796,437;或者WO 2017/011276。各种修饰的核苷酸,包括描述于例如WO 2016/154096和WO 2016/141236中的修饰的糖。

[1857] 在任一实施方案中,本公开可用于基因表达的基于寡核苷酸的调节、免疫反应等。因此,本公开的立体限定的寡核苷酸组合物,其包含预定类型的寡核苷酸(即,起始手性控制的以及任选的手性纯的),可以代替常规的立体无规或手性不纯的对应物使用。在一些实施方案中,所提供的组合物表现出增强的预定作用和/或降低的非所要副作用。下文明确讨论本公开的生物学应用和临床/治疗应用的某些实施方案。

[1858] 各种给药方案可用于施用所提供的手性控制的寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,施用多个相隔各种时间段的单位剂量。在一些实施方案中,给定组合物具有推荐的给药方案,其可涉及一个或多个剂量。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,其中的每个彼此相隔时长相同的时间段;在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,并且各个剂量相隔至少两种不同时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量都具有相同单位给药量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同量。在一些实施方案中,给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量,接着是以一个或多个以与所述第一给药量不同的第二给药量施用的另外的剂量。在一些实施方案中,给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量,接着是以一个或多个以与所述第一给药(或另一先前给药)量相同或不同的第二(或随后)给药量施用的另外的剂量。在一些实施方案中,给药方案包括施用至少一个单位剂量至少一天。在一些实施方案中,给药方案包括历经至少一天,并且有时超过一天的时间段施用一个以上剂量。在一些实施方案中,给药方案包括历经至少一周的时间段施用多个剂量。在一些实施方案中,所述时间段是至少2、3、4、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周或40周以上(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或100周以上)。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续一周以上。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续2、3、4、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周或40周以上(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或100周以上)。在一些实施方案中,给药方案包括每两周施用一个剂量,持续两周时间段以上。在一些实施方案中,给药方案包括每两周施用一个剂量,历经2、3、4、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周或40周以上(例如约45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100周或100周以上)的时间段。在一些实施方案中,给药方案包括每个月施用一个剂量,持续一个月。在一些实施方案中,给药方案包括每个月施用一个剂量,持续一个月以上。在一些实施方案中,给药方案包括每个月施用一个剂量,持续2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或12个月以上。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续约10周。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续约20周。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续约30周。在一些实施方案中,给药方案包括每周施用一个剂量,持续26周。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂根据与用于

具有相同序列的手性未控制的(例如立体无规的)寡核苷酸组合物和/或具有相同序列的不同手性控制的寡核苷酸组合物的给药方案不同的给药方案进行施用。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是根据相较于具有相同序列的手性未控制的(例如立体无规的)寡核苷酸组合物的给药方案减量的给药方案进行施用,因为它在给定时间单位内达成较低的总暴露水平,涉及一个或多个较低的单位剂量,并且/或者在给定时间单位内包括较小数目的剂量。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂根据与具有相同序列的手性未受控制的(例如立体无规的)寡核苷酸组合物相比延长更长的时间段的给药方案进行施用。不希望受理论的限制,申请人指出,在一些实施方案中,较短的给药方案和/或较长的各剂量之间的时间段,可能是由于手性控制的寡核苷酸组合物的稳定性、生物利用度和/或功效得到改善。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂与对应的手性未控制的寡核苷酸组合物相比,具有更长的给药方案。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂与对应的手性未控制的寡核苷酸组合物相比,在至少两个剂量之间的时间段较短。不希望受理论的限制,申请人指出,在一些实施方案中,较长的给药方案和/或较短的各剂量之间的时间段,可能是由于手性控制的寡核苷酸组合物的安全性得到改善。

[1859] 在一些实施方案中,由于其改善的递送(和其他性质),所提供的组合物可以以较低的剂量和/或以较低的频率进行施用,以达成生物学效果,例如临床功效。

[1860] 单剂量可以含有各种量的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量可含有如由应用所需的合适的各种量的某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300mg或300mg以上(例如约350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg或1000mg以上)某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约1mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约5mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约10mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约15mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约20mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约50mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约100mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约150mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约200mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约250mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,单剂量含有约300mg某一类型的手性控制的寡核苷酸。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸是以单剂量和/或以总剂量以低于手性未控制的寡核苷酸的量进行施用。在一些实施方案中,由于改善的功效,手性控制的寡核苷酸以单剂量和/或以总剂量以低于手性未控制的寡核苷酸的量进行施用。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸以单剂量和/或以总剂量以高于手性未控制的寡核苷酸的量进行施用。在一些实施方案中,由于改善的安全性,手性控制的寡核苷酸以单剂量和/或以总剂量以高于手性未控制的寡核苷酸的量进行施用。

[1861] 生物活性的寡核苷酸

[1862] 在一些实施方案中,本公开涵盖能够充当单链RNAi剂的寡核苷酸。

[1863] 在一些实施方案中,所提供的组合物包括一种或多种与以下的链完全或部分互补

的寡核苷酸:结构基因、基因控制和/或终止区域、和/或自我复制系统,诸如病毒或质粒DNA。在一些实施方案中,所提供的组合物包括一种或多种是或充当以下的寡核苷酸:RNAi剂或其他RNA干扰试剂(RNAi剂或iRNA剂)、shRNA、反义寡核苷酸、自切割RNA、核糖酶、其片段和/或其变体(猪肉肽基转移酶23S rRNA、RNA酶P、I组和II组内含子、GIR1分支核糖酶、先导酶、发夹核糖酶、锤头核糖酶、HDV核糖酶、哺乳动物CPEB3核糖酶、VS核糖酶、glmS核糖酶、CoTC核糖酶等)、微小RNA、微小RNA模拟物、超级微小RNA、适体、反义微小RNA、微小RNA拮抗剂、U1衔接头、成三链体寡核苷酸、RNA活化剂、长非编码RNA、短非编码RNA(例如piRNA)、免疫调节性寡核苷酸(猪肉免疫刺激性寡核苷酸、免疫抑制性寡核苷酸)、GNA、LNA、ENA、PNA、TNA、吗啉代寡核苷酸、G四链体(RNA和DNA)、抗病毒寡核苷酸和诱饵寡核苷酸。

[1864] 在一些实施方案中,所提供的组合物包括一种或多种杂交(例如嵌合)的寡核苷酸。在本公开的背景下,术语“杂交物”广泛指代寡核苷酸的混合的结构元件。杂交寡核苷酸可指例如(1)在单一分子内具有混合类别的核苷酸(例如部分DNA和部分RNA)的PNPLA3寡核苷酸分子(例如DNA-RNA);(2)不同类别的核酸的互补对,使得DNA:RNA碱基配对发生在分子内或分子间;或两者;(3)具有两个或更多个种类的主链或核苷酸间键联的PNPLA3寡核苷酸。

[1865] 在一些实施方案中,所提供的组合物包括一种或多种在单一分子内包含一个以上类别的核酸残基的寡核苷酸。例如,在本文所述的任一实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可包含DNA部分和RNA部分。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸可包含未修饰的部分和修饰的部分。

[1866] 所提供的寡核苷酸组合物可包括含有例如如本文所述的多种修饰中的任一种的寡核苷酸。在一些实施方案中,例如根据预定用途来选择特定修饰。在一些实施方案中,需要的是修饰双链寡核苷酸(或单链寡核苷酸的双链部分)的一个或两个链。在一些实施方案中,两个链(或部分)包括不同修饰。在一些实施方案中,两个链包括相同修饰。本领域技术人员将了解由本公开的方法所能够达成的修饰程度和类型允许进行众多修饰排列。本文描述了此类修饰的实例,并且不旨在具有限制性。

[1867] 如本文所用的短语“反义链”是指大致上或100%互补于目标靶标序列的PNPLA3寡核苷酸。短语“反义链”包括由两个单独链形成的两个寡核苷酸的反义区域,以及能够形成发夹或哑铃型结构的单分子寡核苷酸。关于诸如siRNA的双链RNAi剂,反义链是优先掺入RISC并且靶向RISC介导的RNA靶标的敲低的链。关于双链RNAi剂,术语“反义链”和“前导链”在本文中可互换使用;术语“有义链”或“过客链”在本文中可互换使用,是指不是反义链的链。

[1868] 短语“有义链”是指完全或部分与如信使RNA或DNA序列的靶标序列具有相同核苷序列的PNPLA3寡核苷酸。

[1869] “靶序列”是指其表达或活性待调节的任何核酸序列。靶核酸可以是DNA或RNA,诸如内源性DNA或RNA,病毒DNA或病毒RNA,或由基因、病毒、细菌、真菌、哺乳动物或植物编码的其他RNA。在一些实施方案中,靶序列与疾病或病症相关联。关于RNA干扰和RNA酶H介导的敲低,靶序列一般是RNA靶序列。

[1870] “可特异性杂交”和“互补”是指核酸可通过传统沃森-克里克(Watson-Crick)类型或其他非传统类型与另一条核酸序列形成一个或多个氢键。关于本公开的核酸分子,核酸

分子与其互补序列的结合自由能足以使核酸的相关功能发生,例如RNAi活性。核酸分子的结合自由能的测定是本领域众所周知的(参见例如,Turner等,1987,CSH Symp.Quant.Biol.LIT第123-133页;Frier等,1986,Proc.Nat.Acad.Sci.USA83:9373-9377;Turner等,1987,J.Am.Chem.Soc.109:3783-3785)

[1871] 互补百分比表示核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如沃森-克里克碱基配对)的连续残基的百分比(例如10个中的5、6、7、8、9、10个是50%、60%、70%、80%、90%和100%互补的)。"完全互补"或100%互补是指核酸序列的所有连续残基都将与第二核酸序列中的相同数目的连续残基进行氢键合。小于完全互补是指其中两个链的一些而非所有核苷单元可彼此进行氢键合的情况。"基本上互补"是指表现出90%或更大的互补的多核苷酸链,不包括被选择为非互补的多核苷酸链的区域,诸如突出端。特异性结合需要足够互补程度以避免寡聚化合物与非靶序列在需要特异性结合的条件下(例如在体内测定或治疗性治疗的情况下的生理条件下,或在体外测定的情况下进行测定的条件下)进行非特异性结合。在一些实施方案中,非靶序列与对应靶序列有至少5个核苷酸不同。

[1872] 当用作治疗剂时,所提供的寡核苷酸作为药物组合物进行施用。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的所提供的寡核苷酸或其药学上可接受的盐以及至少一种药学上可接受的非活性成分,其选自药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的赋形剂和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物被配制来用于静脉内注射、口服施用、经颊施用、吸入、经鼻施用、表面施用、经眼施用或经耳施用。在其他实施方案中,药物组合物是片剂、丸剂、胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾溶液、栓剂、混悬液、凝胶剂、胶体、分散液、混悬液、溶液、乳液、软膏剂、洗剂、滴眼剂或滴耳剂。

[1873] 药物组合物

[1874] 当用作治疗剂时,本文所述的所提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物是作为药物组合物进行施用。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的所提供的寡核苷酸或其药学上可接受的盐以及至少一种药学上可接受的非活性成分,其选自药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的赋形剂和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物被配制来用于静脉内注射、口服施用、经颊施用、吸入、经鼻施用、表面施用、经眼施用或经耳施用。在一些实施方案中,药物组合物是片剂、丸剂、胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾溶液、栓剂、混悬液、凝胶剂、胶体、分散液、混悬液、溶液、乳液、软膏剂、洗剂、滴眼剂或滴耳剂。

[1875] 在一些实施方案中,本公开提供一种药物组合物,其包含与药学上可接受的赋形剂混合的手性控制的寡核苷酸或其组合物。本领域技术人员将认识到药物组合物包括上述手性控制的寡核苷酸的药学上可接受的盐或其组合物。

[1876] 多种超分子纳米载体可用于递送核酸。示例性纳米载体包括但不限于脂质体、阳离子聚合物复合物和各种聚合物。核酸与各种聚阳离子的复合是用于细胞内递送的另一种方法;这包括使用PEG化聚阳离子、聚乙烯胺(PEI)复合物、阳离子嵌段共聚物和树枝状聚合物。包括PEI和聚酰氨基胺树枝状聚合物在内的若干阳离子纳米载体有助于从内体中释放内含物。其他方法包括使用聚合纳米颗粒、微球、脂质体、树枝状聚合物、可生物降解聚合物、缀合物、前药、无机胶体(诸如硫或铁)、抗体、植入物、可生物降解植入物、可生物降解微球、渗透控制植入物、脂质纳米颗粒、乳剂、油性溶液、水性溶液、可生物降解聚合物、聚(丙交酯-乙醇酸共聚物)、聚(乳酸)、液体储库、聚合物胶束、量子点和脂质复合物。在一些实施

方案中,PNPLA3寡核苷酸与另一个分子缀合。

[1877] 除本文所述的示例性递送策略之外,其他核酸递送策略也是已知的。

[1878] 在治疗和/或诊断性应用中,本公开的化合物可被配制来用于多种施用模式,包括全身性和表面或局部施用。技术和制剂一般可见于Remington,The Science and Practice of Pharmacy,(第20版2000)中。

[1879] 所提供的寡核苷酸及其组合物在广泛剂量范围内有效。例如,在治疗成人时,每天约0.01至约1000mg、约0.5至约100mg、约1至约50mg和约5至约100mg的剂量是可使用的剂量的实例。精确剂量将取决于施用途径、施用化合物的形式、待治疗的受试者、待治疗的受试者的体重以及主治医师的偏好和经验。

[1880] 药学上可接受的盐一般是本领域普通技术人员众所周知的,并且可例如包括但不限于乙酸盐、苯磺酸盐(benzenesulfonate)、苯磺酸盐(besylate)、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、乙二胺四乙酸钙盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰胺基苯肿酸盐、已基间苯二酚盐、海卓胺、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、杏仁酸盐、甲磺酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐(pamoate/embonate)、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐或茶氯酸盐。其他药学上可接受的盐可见于例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy(第20版2000)中。优选的药学上可接受的盐包括例如乙酸盐、苯甲酸盐、溴化物、碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、顺丁烯二酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐、水杨酸盐、丁二酸盐、硫酸盐或酒石酸盐。

[1881] 在一些实施方案中,所提供的单链RNAi剂配制成如以下中所述的药物组合物:美国申请号61/774759;2013年12月19日提交的61/918,175;61/918,927;61/918,182;61/918941;62/025224;62/046487;或国际申请号PCT/US04/042911;PCT/EP2010/070412;或PCT/I B2014/059503。

[1882] 根据所治疗的特定病状,此类药剂可被配制成液体或固体剂型,并且全身性或局部施用。药剂可例如以如为本领域技术人员所知的定时或持续低释放形式进行递送。用于配制和施用的技术可见于Remington,The Science and Practice of Pharmacy(第20版2000)中。合适的途径可包括口服、经颊、通过吸入喷雾剂、舌下、经直肠、经皮、经阴道、经粘膜、经鼻或经肠施用;胃肠外递送,包括肌肉内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接室内、静脉内、关节内、胸骨内、滑膜内、肝内、病变内、颅内、腹膜内、鼻内或眼内注射或其他递送模式。

[1883] 对于注射,本公开的药剂可在水性溶液中(诸如在生理可相容缓冲液,诸如亨克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer'ssolution)或生理盐水缓冲液中)进行配制和稀释。对于此类经粘膜施用,适合于待渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。此类渗透剂一般是本领域已知的。

[1884] 使用药学上可接受的惰性载体来将本文公开的用于实施本公开的化合物配制成适用于全身性施用的剂量在本公开的范围内。在适当选择载体和合适的制造规范下,可胃肠外施用,诸如通过静脉内注射,来施用本公开的组合物,特别是配制成溶液的那些组合物。

[1885] 使用本领域众所周知的药学上可接受的载体,可容易地将化合物配制成适用于口服施用的剂量。此类载体使得本公开的化合物能够被配制成供待治疗的受试者(例如患者)口服摄取的片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、混悬液等。

[1886] 对于经鼻或吸入递送,本公开的药剂也可通过本领域技术人员已知的方法来配制,并且可例如包括但不限于溶解、稀释或分散诸如盐水、防腐剂(诸如苯甲醇)、吸收促进剂和氟碳化合物的物质的实例。

[1887] 在某些实施方案中,寡核苷酸和组合物被递送至CNS。在某些实施方案中,寡核苷酸和组合物被递送至脑脊液。在某些实施方案中,寡核苷酸和组合物被施用于脑实质。在某些实施方案中,寡核苷酸和组合物通过鞘内施用或脑室内施用递送至动物/受试者。本文所述的寡核苷酸和组合物在中枢神经系统内的广泛分布可通过实质内施用、鞘内施用或脑室内施用来实现。

[1888] 在某些实施方案中,胃肠外施用是通过注射,例如通过注射器,泵等。在某些实施方案中,所述注射是大剂量注射。在某些实施方案中,将注射剂直接施用于组织,诸如纹状体、尾状体、皮质、海马体和小脑。

[1889] 在某些实施方案中,诸如通过大剂量注射来特异性地定位药剂的方法将中值有效浓度(EC50)降低了20、25、30、35、40、45或50倍。在某些实施方案中,反义化合物中的药剂如本文进一步描述。在一些实施方案中,所靶向的组织是脑组织。在一些实施方案中,所靶向的组织是纹状体组织。在某些实施方案中,需要降低EC50,因为它降低了在需要其的患者中达到药理学结果所需的剂量。

[1890] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸通过每月、每两个月、每90天、每3个月、每6个月、每年两次或每年一次注射或输注进行递送。

[1891] 适用于本公开的药物组合物包括其中含有有效量的活性成分以实现它的预定目的的组合物。确定有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其鉴于本文提供的详细公开内容。

[1892] 除活性成分之外,这些药物组合物可含有有助于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂的合适的药学上可接受的载体,包括赋形剂和助剂。被配制来供口服施用的制品可呈片剂、糖衣片、胶囊或溶液形式。

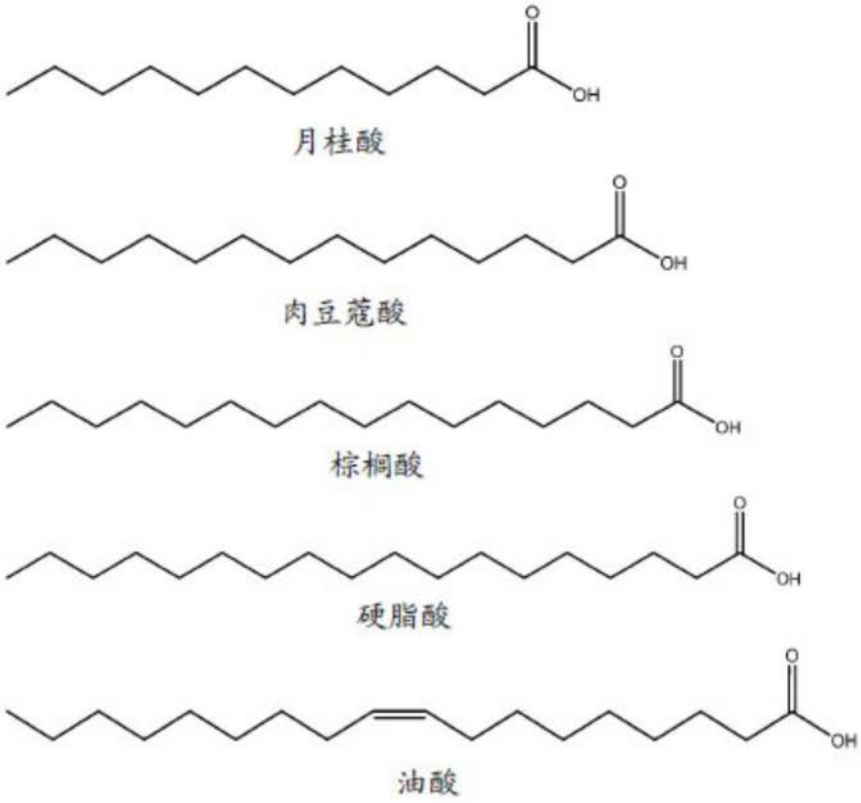
[1893] 供口服使用的药物制品可通过以下来获得:组合活性化合物与固体赋形剂,任选地研磨所得混合物,以及如果需要在添加合适的助剂之后加工颗粒的混合物,以获得片剂或糖衣片核心。合适的赋形剂特别是填充剂,诸如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制品,例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠(CMC)和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP:聚维酮)。如果需要,可添加崩解剂,诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或藻酸或其盐(诸如藻酸钠)。

[1894] 糖锭剂核设置有合适的包衣。出于这个目的,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇(PEG)和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可添加至片剂或糖衣片包衣中以鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

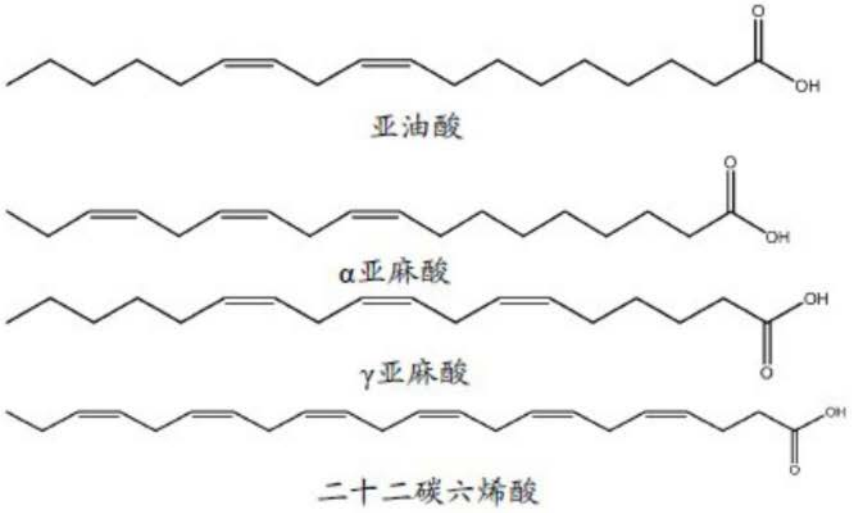
[1895] 可经口服使用的药物制剂包括由明胶制得的推入-配合型胶囊以及由明胶和塑化剂(如甘油或山梨糖醇)制得的软质密封胶囊。所述推入-配合型胶囊可以含有与填充剂(诸

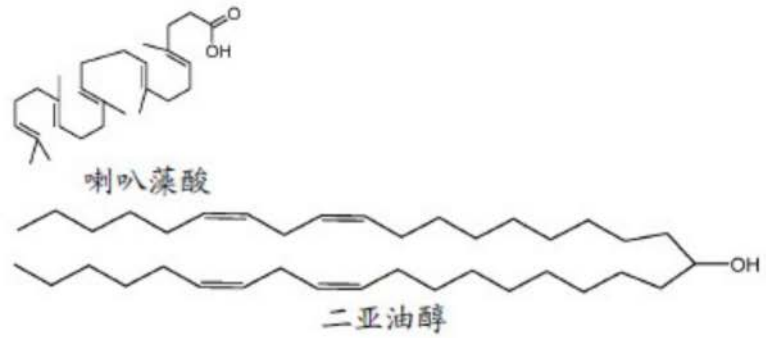
如乳糖)、粘合剂(诸如淀粉)和/或润滑剂(诸如滑石或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软质胶囊中,活性化合物可溶解或混悬在合适的液体,诸如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇(PEG)中。此外,可以添加稳定剂。

[1896] 组合物可以通过将活性化合物与脂质组合而获得。在一些实施方案中,所述脂质与活性化合物缀合。在一些实施方案中,所述脂质不与活性化合物缀合。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{40}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,所述脂质选自由以下组成的组:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。在一些实施方案中,脂质具有以下任一个的结构:



[1897]





[1898] 在一些实施方案中,活性化合物是本文所述的任何寡核苷酸或其他核酸。在一些实施方案中,活性化合物是包含表1A中列出的任何核酸的任何序列或由其组成的序列的核

酸。在一些实施方案中,组合物包含脂质和活性化合物,并且还包含选自以下的另一种组分:另一种脂质和靶向化合物或部分。在一些实施方案中,脂质包括但不限于:氨基脂质;两亲性脂质;阴离子脂质;载脂蛋白;阳离子脂质;低分子量阳离子脂质;阳离子脂质诸如CLinDMA和DLinDMA;可电离的阳离子脂质;伪装组分;辅助脂质;脂肽;中性脂质;中性两性离子脂质;疏水性小分子;疏水性维生素;PEG-脂质;用一种或多种亲水性聚合物修饰的不带电荷的脂质;磷脂;磷脂,诸如1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺;隐形脂质;固醇;胆固醇;和靶向脂质;以及本文所述或本领域报道的任何其他脂质。在一些实施方案中,组合物包含脂质和能够介导另一种脂质的至少一种功能的另一种脂质的一部分。在一些实施方案中,靶向化合物或部分能够将化合物(例如,包含脂质和活性化合物的组合物)靶向特定的细胞或组织或者细胞或组织的子集。在一些实施方案中,靶向部分被设计成利用特定靶标、受体、蛋白质或其他亚细胞组分的细胞或组织特异性表达;在一些实施方案中,靶向部分是将组合物靶向细胞或组织和/或与靶标、受体、蛋白质或其他亚细胞组分结合的配体(例如,小分子、抗体、肽、蛋白质、碳水化合物、适体等)。

[1899] 用于制备用于递送活性化合物的组合物的某些示例性脂质允许(例如,不阻止或干扰)活性化合物的功能。非限制性示例性脂质包括:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。

[1900] 如本公开中所述,脂质缀合,诸如与脂肪酸的缀合,可以改善寡核苷酸的一种或多种性质。

[1901] 在一些实施方案中,用于递送活性化合物的组合物能够根据需要将活性化合物靶向特定的细胞或组织。在一些实施方案中,用于递送活性化合物的组合物能够将活性化合物靶向肌肉细胞或组织。在一些实施方案中,本公开涉及与活性化合物的递送有关的组合物和方法,其中所述组合物包含活性化合物脂质。在肌肉细胞或组织的各种实施方案中,脂质选自:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。所用的示例性脂质包括硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA、喇叭藻酸和二亚油酸。在这些表中,“TBD”表示特定组合物对于递送是有效的,但是数值结果超出标准范围,并且因此最终结果仍有待确定;然而,表中标为“TBD”的组合物在递送活性化合物时是有效的。

[1902] 包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至腓肠肌组织:硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至心肌组织:硬脂酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至四头肌组织:硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至腓肠肌组织:硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至心肌组织:硬脂酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。包含活性化合物和以下任一种的组合物能够将活性化合物递送至腓肠肌组织:二亚油酸、硬脂酸、油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、顺式-DHA或喇叭藻酸。

[1903] 因此:包含脂质和活性化合物的组合物能够将活性化合物递送至肝外细胞和组织,例如肌肉细胞和组织,所述脂质选自:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、

α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。

[1904] 根据待治疗或预防的特定病状或疾病状态,通常被施用来治疗或预防所述病状的其他治疗剂可与本公开的寡核苷酸一起施用。例如,化学治疗剂或其他抗增殖剂可与本公开的寡核苷酸组合来治疗增殖性疾病和癌症。已知的化学治疗剂的实例包括但不限于阿霉素、地塞米松、长春新碱、环磷酰胺、氟尿嘧啶、拓扑替康、泰素、干扰素和铂衍生物。

[1905] 示例性用途

[1906] 在一些实施方案中,本公开涵盖包含脂质和PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂的组合物的用途。在一些实施方案中,本公开提供了用于将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送至靶标位置的方法,其包括施用所提供的组合物。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到细胞中。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到肌肉细胞中。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到组织内的细胞中。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到器官内的细胞中。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到受试者体内的细胞中,包括向受试者施用所提供的组合物。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到细胞质中。在一些实施方案中,所提供的方法将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送到细胞核中。

[1907] 在一些实施方案中,本公开涉及与将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送至细胞或组织或者哺乳动物(例如,人类受试者)体内的细胞或组织有关的方法,所述方法涉及包含生物剂和脂质的组合物的用途。选自以下的任一种或多种另外的组分:多核苷酸、染料、嵌合剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素或丝裂霉素C)、卟啉(例如TPPC4、texaphyrin或Sapphyrin)、多环芳烃(例如吩嗪或二氢吩嗪)、人工核酸内切酶、螯合剂、EDTA、烷基化剂、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、放射性标记的标记、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或叶酸)、合成核糖核酸酶、蛋白质(例如糖蛋白)或肽(例如对共配体具有特异性亲和力的分子)或抗体(例如抗体)、激素、激素受体、非肽物质、脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子或药物。在一些实施方案中,本公开涉及与包含PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂以及脂质的组合物有关的组合物或方法,所述脂质包含C_{10}-C_{60}直链饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,本公开涉及与包含PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂以及脂质的组合物有关的组合物或方法,所述脂质包含任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代的C_{10}-C_{60}直链饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,本公开提供了手性控制的寡核苷酸组合物和选自由以下组成的组的脂质:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸,其中所述组合物适合于将寡核苷酸递送至肌肉细胞或组织或者哺乳动物(例如人类受试者)体内的肌肉细胞或组织。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是包含一个或多个手性核苷酸间键联的PNPLA3寡核苷酸,并且所提供的组合物是PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂。在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是包含一个或多个手性核苷酸间键联的PNPLA3寡核苷酸,并且所提供的组合物是寡核苷酸的非手性控制的寡核苷酸组合物。

[1908] 在一些实施方案中,本公开涉及将PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂递送至细胞或组织的方法,其中所述方法包括以下步骤:提供包含PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂和脂质的

组合物;以及使细胞或组织与组合物接触;在一些实施方案中,本公开涉及向受试者施用PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:提供包含PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂和脂质的组合物;以及向受试者施用组合物。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链。在一些实施方案中,脂质包含C_{10}-C_{60}直链的饱和或部分不饱和的脂族链,其任选地被一个或多个C_{1-4}脂族基团取代。在一些实施方案中,所述脂质选自由以下组成的组:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸(顺式-DHA)、喇叭藻酸和二亚油酸。

[1909] 在一些实施方案中,PNPLA3寡核苷酸或单链RNAi剂是PNPLA3寡核苷酸,其序列是或包含与细胞核酸中的所靶向的元件基本上互补的元件。在一些实施方案中,所靶向的元件是或包括与肌肉疾病、病症或病状相关联的序列元件。在一些实施方案中,肌肉疾病、病症或病状是DMD。在一些实施方案中,细胞核酸是或包含转录物。在一些实施方案中,细胞核酸是或包含初级转录物。在一些实施方案中,细胞核酸是或包含基因组核酸。本公开涵盖以下认识:某些脂质和其他化合物可用于将单链RNAi剂递送至例如哺乳动物或人类受试者体内的细胞和组织。用于递送此类药剂的许多技术可能无法靶向所需的细胞或组织。

[1910] 将单链RNAi剂递送至肝外组织仍然困难。Juliano报道,尽管在临床水平上取得了进步,但体内寡核苷酸的有效递送仍然是一项重大挑战,特别是在肝外部位。Juliano 2016Nucl.Acids Res.Doi:10.1093/nar/gkw236。Lou也报道,向肝脏以外的器官递送RNAi剂仍然是使用所述技术治疗多种疾病的最大障碍。Lou 2014SciBX 7(48);doi:10.1038/scibx.2014.1394。

[1911] 本公开涵盖某些令人惊讶的发现,包括某些脂质和其他化合物在向特定细胞和组织(包括肝外的细胞和组织,作为非限制性实例包括肌肉细胞和组织)递送单链RNAi剂(包括寡核苷酸)方面特别有效。

[1912] 在一些实施方案中,所提供的组合物改变单链RNA干扰系统,使得抑制不需要的靶标和/或生物学功能。在一些实施方案中,在此类情况下,所提供的组合物还可在杂交后诱导转录物的切割。

[1913] 在一些实施方案中,所提供的组合物改变了单链RNA干扰系统,使得增强所需的靶标和/或生物学功能。在一些实施方案中,所提供的组合物通过掺入化学修饰、立体化学和/或其组合,有效地抑制或防止接触后靶转录物的切割。

[1914] 在一些实施方案中,多个寡核苷酸的每个寡核苷酸包含一个或多个修饰的糖部分和/或修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含两个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含三个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含四个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含五个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含十个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含约15个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含约20个或更多个修饰的糖部分。在一些实施方案中,多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含约25个或更多个修饰的糖部分。

[1915] 实施例

[1916] 前述是本公开的某些非限制实施方案的描述。因此,应了解本文描述的本公开的实施方案仅仅是说明本公开的原理的应用。本文提及说明的实施方案的细节不旨在限制权利要求书的范围。

[1917] 用于制备寡核苷酸和寡核苷酸组合物的某些方法是本领域众所周知的,并且可以根据本公开使用,所述方法包括但不限于描述于WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555和WO/2017/062862中的那些方法,其中的每个的方法和试剂以引用的方式并入本文。

[1918] 申请人在本文中描述了所提供的寡核苷酸及其组合物的某些实例,以及某些所提供的寡核苷酸及其组合物的制备、评估、测定和使用等的方法。

[1919] 实施例1.用于评估寡核苷酸的示例性方案。

[1920] 如本领域普通技术人员所理解的,可以使用许多技术(例如,试剂、方法等)来评估所提供的寡核苷酸的活性和性质。以下是一种示例性方案,其描述了使用Lipofectamine®2000(Invitrogen)在96孔板格式进行的寡核苷酸(使用某些可以充当ssRNAi的寡核苷酸作为实例)的反向转染,用于评估细胞中寡核苷酸活性:

[1921] 1.优选地以多个(例如8个)剂量制备每种ssRNAi,例如最终体积为25uL。示例性初始浓度可以为150nM;例如在无血清的Opti-MEM®培养基中连续稀释,通常稀释4倍。

[1922] 2.理想的是在使用前将Lipofectamine®2000温和混合,然后在另外的容器中在25μl无血清的Opti-MEM®培养基中稀释0.25μlLipofectamine®2000。进一步温和混合之后,可以在例如室温下温育5分钟。

[1923] 3.温育之后,可以将稀释的Lipofectamine®2000(例如25uL)加入到(稀释的)ssRNAi分子中(通常可比的体积,例如25uL)。理想的是将组合物温和混合,并且可以例如在室温下温育15分钟,以允许形成复合物。

[1924] 4.然后将复合物与细胞接触,例如,通过向每种ssRNAi分子-Lipofectamine®2000复合物中加入100μl不含抗生素的完全生长培养基和15,000个Hep3B细胞。这样得到的最终体积为150μl,并且最终寡核苷酸浓度为25、6.25、1.56、0.39、0.097、0.024、0.0061和0.0015nM。来回摇动所述板温和混合。

[1925] 5.将细胞例如在37℃下在CO_2培养箱中温育48小时。

[1926] 6.收获细胞,并且根据供应商提供的方案例如使用TurboCapture mRNA试剂盒(Qiagen)来分离mRNA。

[1927] 7.根据供应商提供的方案例如使用Roche cDNA合成试剂盒(Roche)来制备cDNA。

[1928] 8.根据供应商提供的方案例如通过使用与HPRT1探针多路复用的基因特异性Taqman探针的Taqman测定在LightCycler®480探针预混液(Roche)中定量靶标敲低。通常,例如相对于诸如HPRT1(次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1)的管家基因对数据进行标准化。

[1929] 9.如果使用多个剂量强度/浓度,则可以例如使用Prism软件针对每种ssRNAi剂制备剂量-反应曲线。如果需要,可以确定IC_{50}。

[1930] 类似的方案可用于靶向其他基因的不同寡核苷酸,并可使用不同的细胞。

[1931] 可选地或另外地,根据本公开,可以使用其他技术(例如,试剂、试剂盒、方法等)来评估寡核苷酸的一种或多种活性和性质。在表中提供了从各种类型的测定产生的某些数据,这些数据证明了例如当前所提供的技术出乎意料的高活性、稳定性、选择性等。

[1932] 各种模型可用于评估主题中所提供的技术。在一些实施方案中,所提供的技术在向动物施用时表现出高活性、稳定性和/或选择性。本领域技术人员意识到,被认为与某些相关的人类疾病、病症和/或病状有关和/或对其有预测作用的动物系统,这些疾病,疾病和/或病症可能受益于如本文所述的寡核苷酸疗法。

[1933] 实施例2.某些所提供的寡核苷酸的示例性IC50。

[1934] 下表中提供了使用诸如实施例1中提出的方案测量的某些寡核苷酸(其可以充当PNPLA3的反义寡核苷酸)的IC50。

[1935]

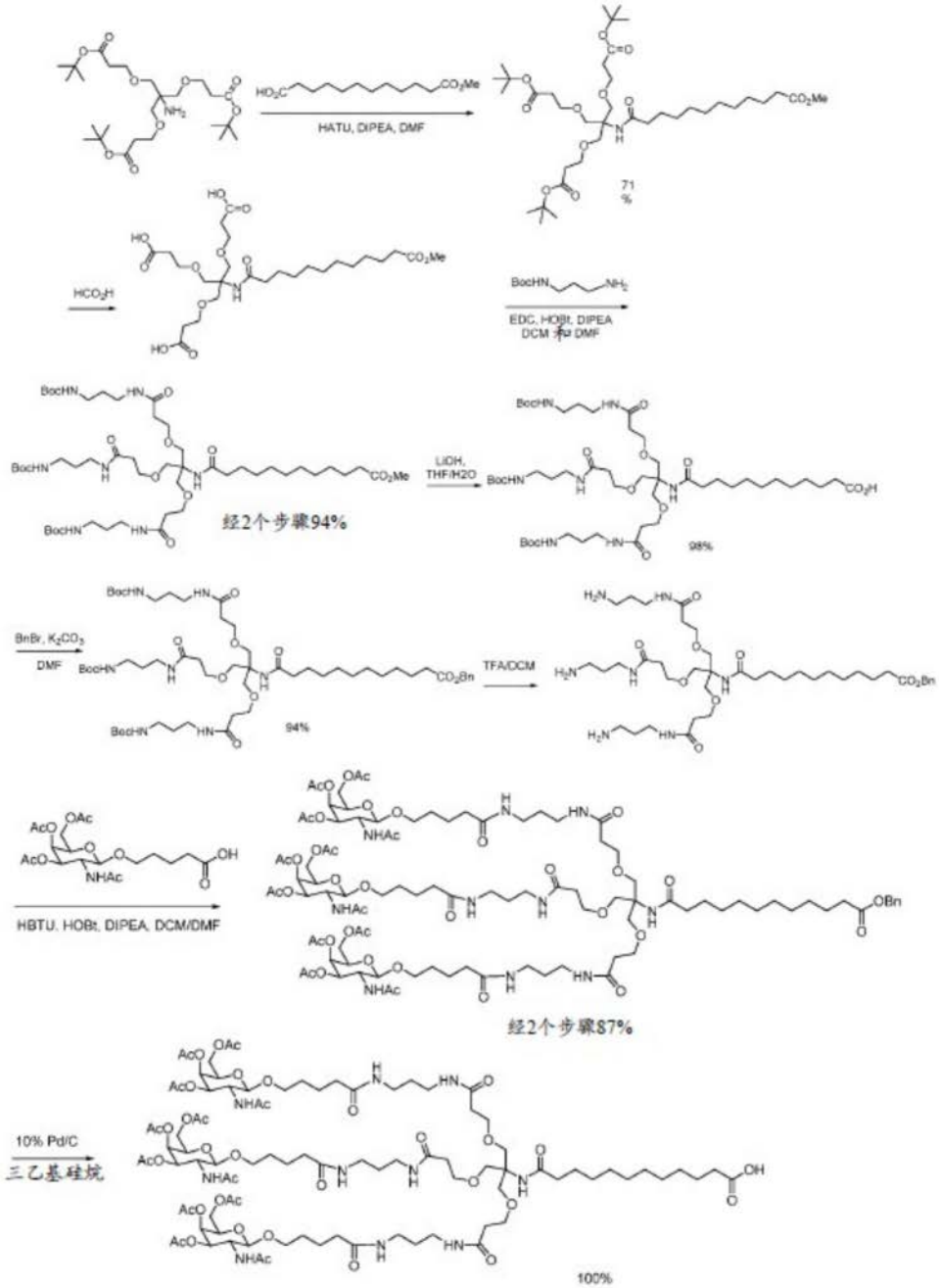
Wave ID	IC 50 (nM)	位置	寡核苷酸开始位置
WV-3380	1.5	CDS	1508
WV-3393	1.1	CDS	1510
WV-3402	1.7	CDS	1511
WV-3421	1.4	3'UTR	1721
WV-3399	0.77	3'UTR	1853
WV-3404	1.6	3'UTR	1862
WV-3443	1.6	3'UTR	1863
WV-3391	0.65	3'UTR	2129
WV-3394	1.4	3'UTR	2130
WV-3408	0.92	3'UTR	2135
WV-3387	1.2	3'UTR	2136
WV-3381	1.4	3'UTR	2656

[1936] 实施例3.用于掺入部分的示例性化合物-三天线GalNAc(具有C12、C5或三嗪接头)的合成。

[1937] 在一些实施方案中,本公开提供了用于将各种部分(例如,碳水化合物部分、脂质部分、靶向部分等)掺入所提供的寡核苷酸中的技术(例如,试剂、方法、缀合物等)。本文描述了掺入碳水化合物部分的某些实例。在一些实施方案中,碳水化合物部分可以充当靶向部分。

[1938] 实施例3-1.1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸的合成。

[1939]



[1940] 步骤1:向在DMF(45mL)中的3,3'-((2-氨基-2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.0g,9.89mmol)和12-甲氧基-12-氧代十二烷酸(2.416g,9.89mmol)的溶液中加入HATU(3.76g,9.89mmol)和DIPEA(2.58ml,14.83mmol)。将反应混合物在室温下搅拌5小时。将溶剂在减压下浓缩,并用盐水稀释,用EtOAc萃取,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(120g金硅胶柱)纯化,用在己烷中的10%EtOAc至在己烷中的40%EtOAc洗脱,以得到作为无色油状物的3,3'-((2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.13g,7.01mmol,70.9%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.03(s,1H),3.74-3.61(m,15H),2.45(t,J=6.3Hz,6H),2.31(td,J=7.5,3.9Hz,2H),2.19-2.10(m,2H),1.64-1.59(m,4H),1.46(s,27H),1.32-1.24(m,12H);MS(ESI),732.6(M+H)+。

[1941] 步骤2:将在甲酸(50mL)中的3,3'-((2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.0g,6.83mmol)的溶液在室温下搅拌48小时。将溶剂在减压下蒸发,与甲苯(3X)共蒸发,以得到白色固体,将其在高真空下干燥2天。LC-MS和H NMR表明反应未完成。将粗产物重新溶解在甲酸(50mL)中。将反应混合物在室温下搅拌24小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发,与甲苯(3X)共蒸发,在高真空下干燥以得到作为白色固体的3,3'-((2-((2-羧基乙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(4.00g)。MS(ESI):562.4$(M-H)^-$。

[1942] 步骤3:在0℃下向在DCM(60mL)和DMF(15mL)中的3,3'-((2-((2-羧基乙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(3.85g,6.83mmol)和HOBt(3.88g,28.7mmol)的溶液中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(4.76g,27.3mmol)、EDAC HCl盐(5.24g,27.3mmol)和DIPEA(8.33ml,47.8mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌15分钟,并在室温下搅拌20小时。LC-MS表明反应未完成。将(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(1.59g,9.12mmol)和EDC HCl盐(1.75g,9.13mol)加入反应混合物中。将反应混合物在室温下连续搅拌4小时。将溶剂蒸发,以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc(300mL)中,用水(1X)、饱和碳酸氢钠(2X)、10%柠檬酸(2X)和水洗涤,经硫酸钠干燥,并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为白色固体的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸甲酯(6.61g,6.40mmol,经2个步骤的产率94%)。MS(ESI):1033.5$(M+H)^+$。

[1943] 步骤4:向在THF(75mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸甲酯(6.56g,6.35mmol)的溶液中加入在水(25mL)中的水性LiOH(0.457g,19.06mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发,用1N HCl(45mL)酸化,用DCM(3X)萃取,经无水硫酸钠干燥,浓缩,以得到作为白色固体的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸(6.31g,6.20mmol,98%产率)。MS(ESI):1019.6$(M+H)^+$。

[1944] 步骤5:向在DMF(40mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸(6.31g,6.20mmol)和(溴甲基)苯(1.272g,7.44mmol)的溶液中加入K_2CO_3(2.57g,18.59mmol)。将混合物在40℃下搅拌4小时,并且在室温下搅拌过夜。将溶剂在减压下蒸发。将反应混合物用EtOAc稀释,用水洗涤,经无水硫酸钠干燥,在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为无色油状物的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸苯甲酯(6.41g,5.78mmol,93%产率)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.80(t,J=5.7Hz,3H),7.39-7.30(m,5H),6.95(s,1H),6.74(t,J=5.8Hz,3H),5.07(s,2H),3.53(J,J=7.3Hz,6H),3.51(s,6H),3.02(q,J=6.7Hz,6H),2.94-2.85(m,6H),2.29(dt,J=26.1,6.9Hz,8H),2.02(q,J=9.7,

8.6Hz,2H),1.56-1.39(m,10H),1.35(s,27H),1.20(brs,14H);MS(ESI):1019.6(M+H)$^+$。

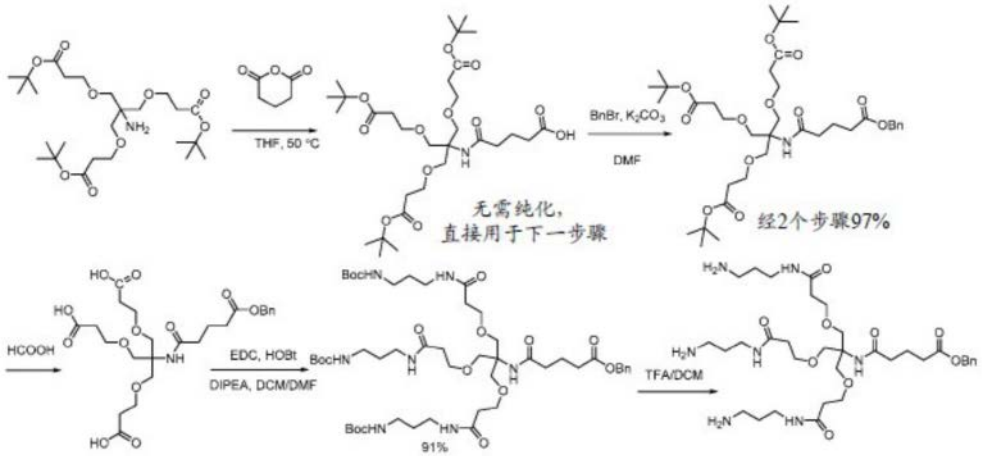
[1945] 步骤6:向在DCM(40mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸苯甲酯(2.42g,2.183mmol)的溶液中加入2,2,2-三氟乙酸(8ml,105mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。经溶剂在减压下蒸发,与甲苯(2X)共蒸发,与乙醚一起研磨,在高真空下干燥过夜。直接将TFA盐用于下一步骤。

[1946] 步骤7:向在DCM(25mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(3.91g,8.73mmol)、HBTU(3.48g,9.17mmol)和HOBT(1.239g,9.17mmol)的溶液中加入DIPEA(6.08ml,34.9mmol),之后加入在DMF(4.0mL)中的12-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯(1.764g,2.183mmol)。将混合物在室温下搅拌5小时。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金柱)纯化,用在DCM中的5%MeOH洗脱5柱值以除去HOBt,之后用在DCM中的5%至30%MeOH洗脱以得到作为白色固体的1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯(3.98g,87%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.82-7.74(m,6H),7.69(t,J=5.6Hz,3H),7.33-7.27(m,5H),6.94(s,1H),5.16(d,J=3.4Hz,3H),5.03(s,2H),4.92(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.43(d,J=8.4Hz,3H),4.02-3.95(m,9H),3.82(dt,J=11.2,8.8Hz,3H),3.65(dt,J=10.5,5.6Hz,3H),3.51-3.44(m,12H),3.36(dt,J=9.6,6.0Hz,3H),3.01-2.95(m,12H),2.29(t,J=7.4Hz,2H),2.23(t,J=6.3Hz,6H),2.05(s,9H),1.99(t,J=7.0Hz,8H),1.94(s,9H),1.84(s,9H),1.72(s,9H),1.50-1.14(m,34H);MS(ESI):1049.0(M/2+H)$^+$。

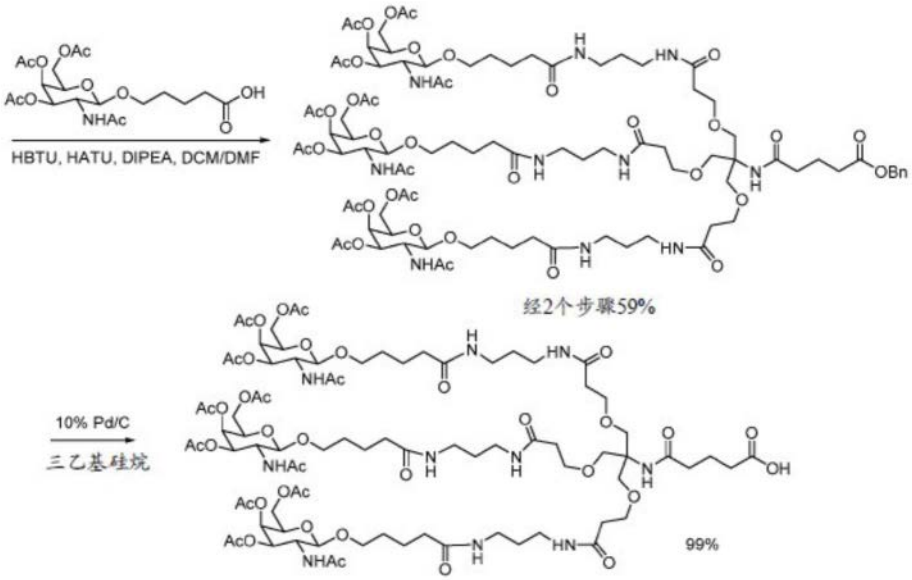
[1947] 步骤8:向用Ar冲洗的圆底烧瓶中加入10%Pd/C(165mg,0.835mmol)和EtOAc(15mL)。之后向在甲醇(15mL)中的苯甲基保护的tris-GalNAc(1.75g,0.835mmol)的溶液中逐滴加入三乙基硅烷(2.67ml,16.70mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明反应完成,用EtOAc稀释,并通过硅藻土过滤,用在EtOAc中的20%MeOH洗涤,在减压下浓缩以得到作为白色固体的1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸(1.67g,0.832mmol,100%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.95(s,1H),7.83-7.74(m,6H),7.69(t,J=5.7Hz,3H),6.93(s,1H),5.16(d,J=3.4Hz,3H),4.92(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.43(d,J=8.4Hz,3H),4.01-3.94(m,9H),3.82(dt,J=11.3,8.8Hz,3H),3.66(dt,J=10.7,5.6Hz,3H),3.54-3.43(m,12H),3.41-3.33(m,3H),3.03-2.94(m,12H),2.24(t,J=7.4Hz,10H),2.14(t,J=7.4Hz,2H),2.06(s,9H),2.00(t,J=7.2Hz,8H),1.95(s,9H),1.84(s,9H),1.73(s,9H),1.51-1.14(m,34H)。MS(ESI):1003.8(M/2+H)$^+$。

[1948] 实施例3-2.22-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基

甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-7,7-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,12,18-三氧代-9-氧杂-6,13,17-三氮杂二十二烷酸的合成。



[1949]



[1950] 步骤1:将在THF(40mL)中的3,3'-((2-氨基-2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(4.0g,7.91mmol)和二氢-2H-吡喃-2,6(3H)-二酮(0.903g,7.91mmol)的溶液在50℃下搅拌3小时,并在室温下搅拌3小时。LC-MS表明所需产物。将溶剂蒸发以得到所述酸,其无需纯化直接用于下一步骤。

[1951] 步骤2:向在DMF中的5-((9-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2,2,16,16-四甲基-4,14-二氧代-3,7,11,15-四氧杂十七烷-9-基)氨基)-5-氧代戊酸(4.90g,7.91mmol)和(溴甲基)苯(1.623g,9.49mmol)的溶液中加入无水K_2CO_3(3.27g,23.73mmol)。将混合物在40℃下搅拌4小时,并且在室温下搅拌过夜。将溶剂在减压下蒸发。将反应混合物用EtOAc稀释,用水洗涤,经无水硫酸钠干燥,在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO纯化,用在己烷中的10%EtOAc至在己烷中的50%EtOAc洗脱,以得到作为无色油状物的3,3'-((2-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰胺基)-2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.43g,7.65mmol,97%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.36-7.28(m,5H),6.10(s,1H),5.12(s,2H),3.70(s,6H),3.64(t,J=8.0Hz,6H),2.50-2.38(m,8H),2.22(t,J=7.3Hz,2H),1.95(p,J=7.4Hz,2H),1.45(s,27H);MS,710.5$(M+H)^+$。

[1952] 步骤3:将在甲酸(50mL)中的3,3'-((2-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰胺基)-2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.43g,7.65mmol)的溶液在室温下搅拌48小时。LC-MS表明反应未完成。将溶剂在减压下蒸发。将粗产物重新溶解在甲酸(50mL)中,并在室温下搅拌6小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发,在减压下与甲苯(3X)共蒸发,并在真空下干燥以得到作为白色固体的3,3'-((2-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰胺基)-2-((2-羧基乙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(4.22g,7.79mmol,102%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ12.11(s,3H),7.41-7.27(m,5H),6.97(s,1H),5.07(s,2H),3.55(t,J=6.4Hz,6H),3.53(s,6H),2.40(t,J=6.3Hz,6H),2.37-2.26(m,2H),2.08(t,J=7.3Hz,2H),1.70(p,J=7.4Hz,2H);MS,542.3$(M+H)^+$。

[1953] 步骤4:在0℃下向在DCM(60mL)和DMF(15mL)中的3,3'-((2-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰胺基)-2-((2-羧基乙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(4.10g,7.57mmol)和HOBt(4.60g,34.1mmol)的溶液中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(5.94g,34.1mmol)、EDAC HCl盐(6.53g,34.1mmol)和DIPEA(10.55ml,60.6mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌15分钟,并在室温下搅拌20小时。LC-MS表明反应未完成。将EDAC HCl盐(2.0g)和(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(1.0g)加入反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌4小时。将溶剂蒸发,以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc(300mL)中,用水(1X)、饱和碳酸氢钠(2X)、10%柠檬酸(2X)和水洗涤,经硫酸钠干燥,并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为白色固体的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十一烷-21-酸苯甲酯(6.99g,6.92mmol,91%产率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ7.38-7.33(m,5H),6.89(brs,3H),6.44(s,1H),5.23(brs,3H),5.12(s,2H),3.71-3.62(m,12H),3.29(q,J=6.2Hz,6H),3.14(q,J=6.5Hz,6H),2.43(dt,J=27.0,6.7Hz,8H),2.24(t,J=7.2Hz,2H),1.96(p,J=7.5Hz,2H),1.64-1.59(m,6H),1.43(d,J=5.8Hz,27H);MS(ESI):1011.5$(M+H)^+$。

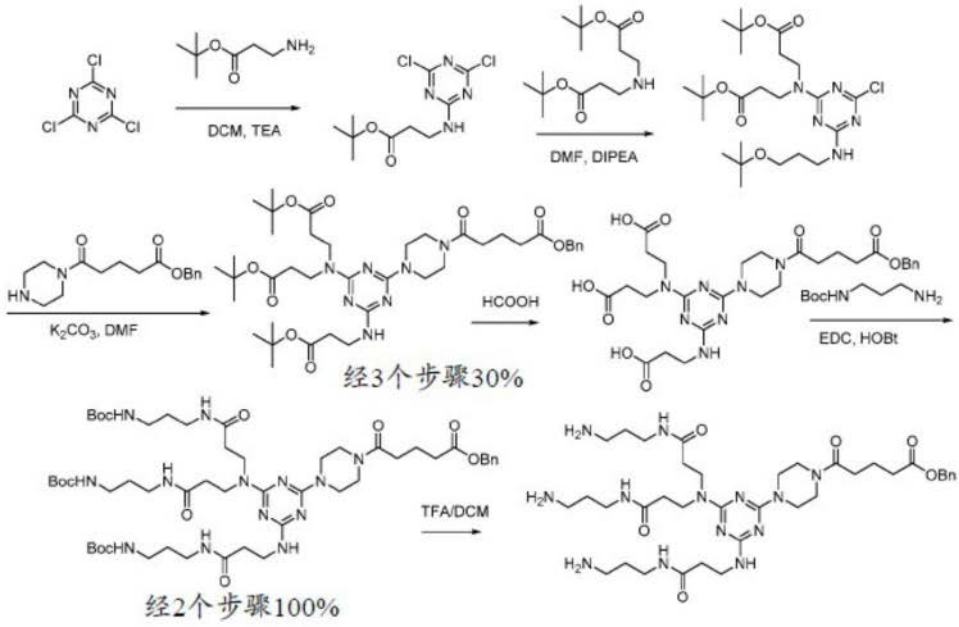
[1954] 步骤5:向在THF(5mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十一烷-21-酸苯甲酯(0.95g,0.940mmol)的溶液中加入TFA(5mL)。将反应混合物在室温下搅拌4小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发以得到作为无色油状物的5-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-5-氧代戊酸苯甲酯。无需纯化,直接用于下一步骤。

[1955] 步骤6:之后向在DCM(40mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(1.684g,3.76mmol)、HBTU(1.246g,3.29mmol)和HOBT(0.052g,0.376mmol)的溶液中加入在DMF(2.0mL)中的10-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰胺基)-N1,N19-二氯代-10-((3-((3-(氯铵基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-1,19-二铵(0.767g,0.940mmol)。将混合物在室温下搅拌5小时。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱以得到作为白色固体的22-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-7,7-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙

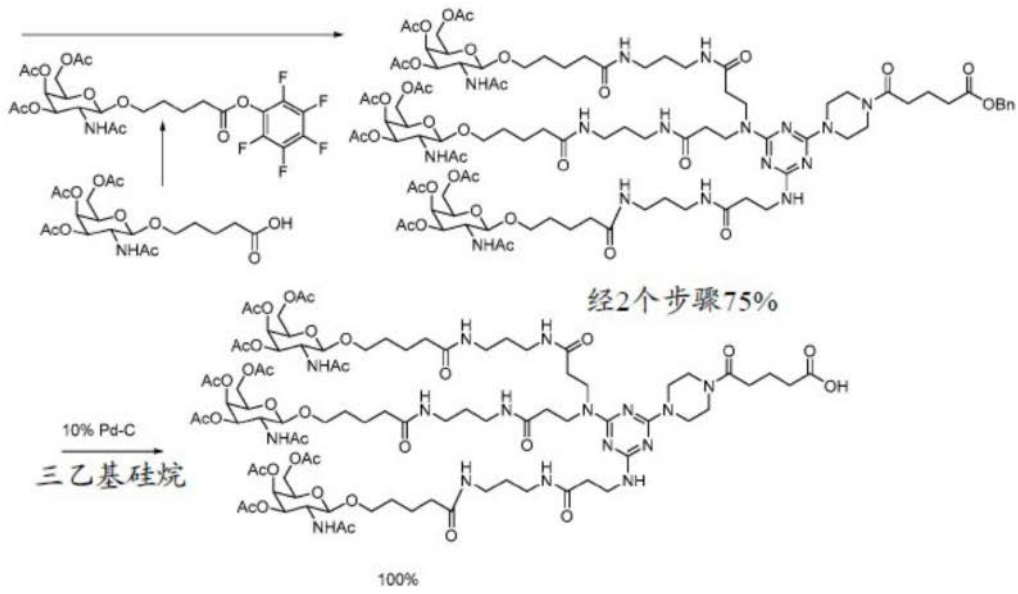
酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,12,18-三氧代-9-氧杂-6,13,17-三氮杂二十二烷酸苯甲酯(1.11g,0.556mmol,59%产率)。MS(ESI):1000.0$(M/2+H)^+$。

[1956] 步骤7:向用Ar冲洗的圆底烧瓶中加入10%Pd/C(100mg,0.500mmol)和EtOAc(10mL)。之后向在甲醇(10mL)中的22-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-7,7-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,12,18-三氧代-9-氧杂-6,13,17-三氮杂二十二烷酸苯甲酯(1.00g,0.500mmol)的溶液中逐滴加入三乙基硅烷(1.599ml,10.01mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明反应完成,用EtOAc稀释,并通过硅藻土过滤,用在EtOAc中的20%MeOH洗涤,在减压下浓缩以得到作为白色固体的22-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-7,7-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,12,18-三氧代-9-氧杂-6,13,17-三氮杂二十二烷-1-酸(0.9433g,0.494mmol,99%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.85-7.78(m,6H),7.72(t,J=5.7Hz,3H),7.03(s,1H),5.20(d,J=3.4Hz,3H),4.95(dd,J=11.2,3.5Hz,3H),4.47(d,J=8.3Hz,3H),4.05-3.99(m,9H),3.85(dt,J=11.0,8.8Hz,3H),3.69(dt,J=10.6,5.8Hz,3H),3.52(dd,J=12.3,5.6Hz,12H),3.39(dt,J=11.2,6.3Hz,3H),3.02(p,J=6.3Hz,12H),2.26(t,J=6.4Hz,6H),2.17(t,J=7.5Hz,2H),2.11-2.07(m,11H),2.03(t,J=7.1Hz,6H),1.98(s,9H),1.87(s,9H),1.76(s,9H),1.53-1.18(m,20H);MS(ESI):1909.4$(M+H)^+$。

[1957] 实施例3-3.5-(4-(4-((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-(双(3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸的合成。



[1958]



[1959] 步骤1至3:在0℃下向在DCM(25mL)中的固体试剂2,4,6-三氯代-1,3,5-三嗪(0.700g,3.80mmol)中加入3-氨基丙酸叔丁酯HCl盐(0.690g,3.80mmol)和TEA(0.635ml,4.56mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌1小时。LC-MS表明所需产物。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,其直接用于下一步骤。向在DMF(15mL)中的3-((4,6-二氯代-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)丙酸叔丁酯(1.114g,3.80mmol)的溶液中加入3,3'-氮杂二基二丙酸二叔丁酯(1.039g,3.80mmol)和DIPEA(1.324ml,7.60mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时。LC-MS表明所需产物。向上述反应混合物中加入5-氧代-5-(哌嗪-1-基)戊酸苯甲酯(1.103g,3.80mmol)和K_2CO_3(1.576g,11.40mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。用EtOAc稀释,过滤并在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金)纯化,用在己烷中的10%EtOAc至在己烷中的50%EtOAc洗脱,以得到作为无色油状物的3,3'-((4-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-6-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-

基)氮杂二基)二丙酸二叔丁酯(0.90g,30%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ7.43-7.31(m,5H),5.12(s,2H),3.81-3.66(m,8H),3.60(dd,J=7.6,4.8Hz,4H),3.40(t,J=5.1Hz,2H),2.57-2.44(m,8H),2.39(t,J=7.4Hz,2H),2.06-1.95(m,2H),1.45(s,9H),1.43(s,18H);MS(ESI):784.7(M+H)$^+$。

[1960] 步骤4:将在甲酸(20mL)中的3,3'-((4-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-6-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)氮杂二基)二丙酸二叔丁酯(0.90g,1.148mmol)的溶液在室温下搅拌过夜。LC-MS表明反应未完成并且将溶剂蒸发。向反应混合物中加入甲酸(20mL),并且在室温下将反应混合物搅拌过夜。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发,与甲苯(2X)共蒸发,并在真空下干燥过夜以得到作为白色固体的3,3'-((4-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-6-((2-羧基乙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)氮杂二基)二丙酸(0.75g,1.218mmol,106%产率)。MS(ESI),616.5(M+H)$^+$。

[1961] 步骤5:在0℃下向在DCM(60mL)和DMF(15mL)中的3,3'-((4-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-6-((2-羧基乙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)氮杂二基)二丙酸(0.707g,1.148mmol)和HOBt(0.651g,4.82mmol)的溶液中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.840g,4.82mmol)、EDAC HCl盐(0.924g,4.82mmol)和DIPEA(1.400ml,8.04mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌15分钟,并在室温下搅拌20小时。LC-MS表明反应未完成。将(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.28g)和EDC HCl盐(0.46g)加入反应混合物中。将反应混合物在室温下连续搅拌4小时。将溶剂蒸发,以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc(300mL)中,用水(1X)、饱和碳酸氢钠(2X)、10%柠檬酸(2X)和水洗涤,经硫酸钠干燥,并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为白色固体的5-(4-(4-(双(3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-((3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(1.24g,1.144mmol,100%产率)。MS(ESI):1084.8(M+H)$^+$。

[1962] 步骤6:向在DCM(5.0mL)中的5-(4-(4-(双(3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-((3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(328.3mg,0.303mmol)的溶液中加入TFA(3.0mL)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。将溶剂在减压下蒸发,其无需纯化直接用于下一步骤。MS(ESI):784.6(M+H)$^+$。

[1963] 步骤7:向在DCM(6mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(0.570g,1.273mmol)的溶液中加入DIPEA(0.40mL,2.296mmol)和2,2,2-三氟乙酸五氟苯基酯(0.535g,1.910mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,其直接用于下一步骤。MS(ESI):614.3(M+H)$^+$。向在DCM(15mL)和DMF(3mL)中的5-(4-(4-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-(双(3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(0.238g,0.303mmol)的溶液中加入DIPEA(0.633ml,3.64mmol)以及在DCM(6mL)中的(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰胺基-2-(乙酰氧基甲基)-6-((5-氧代-5-(五氟苯氧基)戊基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(0.781g,1.273mmol)的溶液。将反应混合物在室温下搅拌4小时。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金)纯化,用DCM至在DCM中的40%MeOH洗脱以得到作为白色

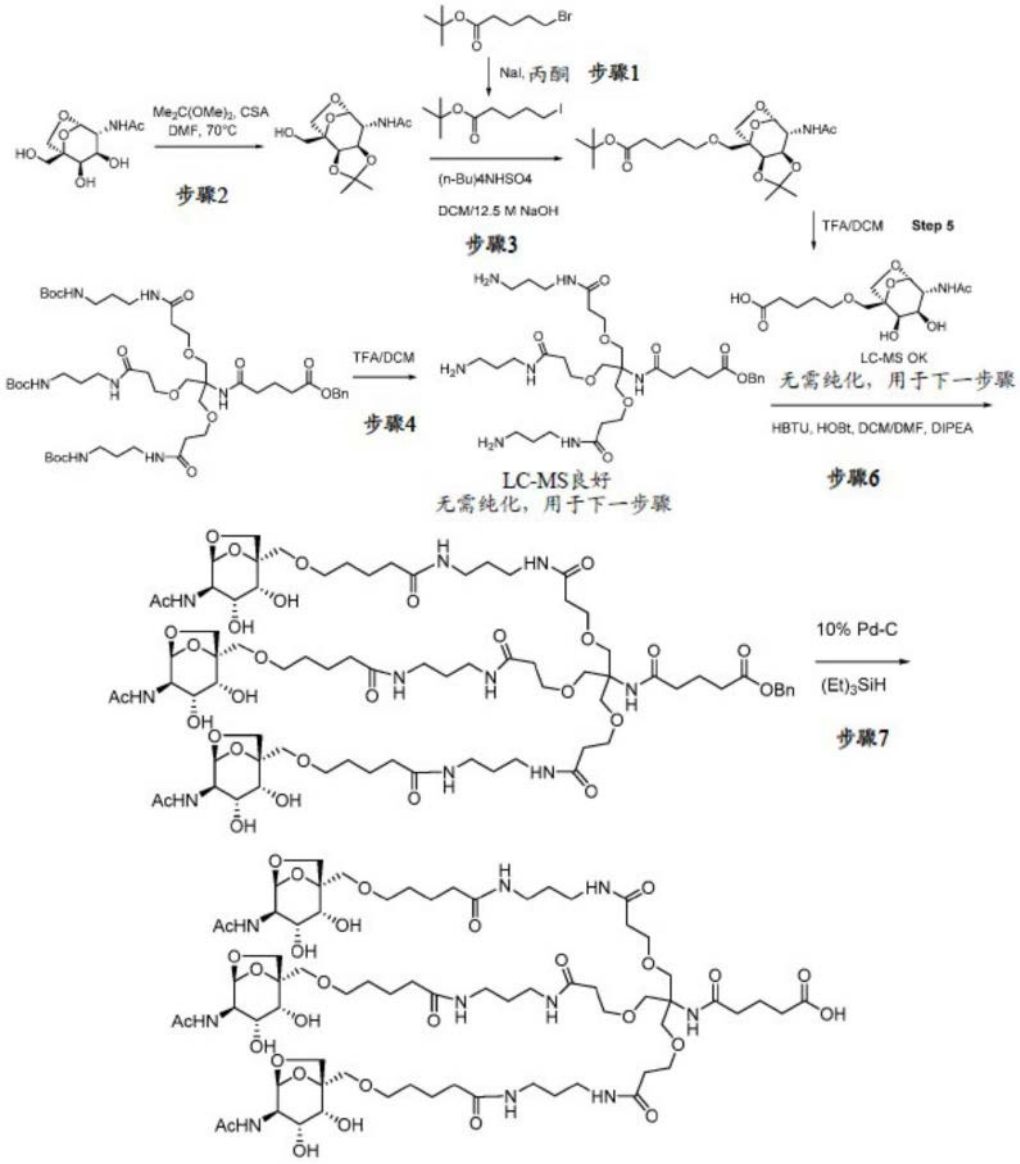
固体的5-(4-(4-((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-(双(3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(0.47g,0.227mmol,74.9%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.82-7.78(m,6H),7.70(t,J=5.7Hz,3H),7.35-7.28(m,5H),6.63(brs,1H),5.20(d,J=3.3Hz,3H),5.08(s,2H),4.95(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.47(d,J=8.4Hz,3H),4.05-3.96(m,9H),3.85(dt,J=11.1,8.8Hz,3H),3.72-3.53(m,12H),3.43-3.36(m,6H),3.05-2.97(m,12H),2.41-2.27(m,10H),2.08(s,9H),2.03(d,J=7.0Hz,6H),1.98(s,9H),1.87(s,9H),1.75(s,9H),1.47(s,9H),1.53-1.19(m,13H);MS(ESI):1037.0(M+H)/2$^+$。

[1964] 步骤8:向在EtOAc(10mL)中的5-(4-(4-((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-(双(3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(0.39g,0.188mmol)的溶液中加入10%Pd-C(50mg),之后在Ar下加入10mL MeOH。将三乙基硅烷(0.601ml,3.76mmol)缓慢加入反应混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2小时。通过硅藻土过滤,用在EtOAc中的50%MeOH洗涤,将溶剂在减压下蒸发以得到作为白色固体的5-(4-(4-((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-6-(双(3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸(0.373g,100%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.82-7.78(m,6H),7.71(t,J=5.7Hz,3H),6.64(s,1H),5.20(d,J=3.3Hz,3H),4.95(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.47(d,J=8.5Hz,3H),4.06-3.96(m,9H),3.85(dt,J=11.1,8.8Hz,3H),3.73-3.56(m,11H),3.45-3.35(m,5H),3.09-2.98(m,13H),2.37-2.28(m,10H),2.25(t,J=7.3Hz,2H),2.09(s,9H),2.03(t,J=7.0Hz,6H),1.98(s,9H),1.88(s,9H),1.76(s,9H),1.74-1.67(m,2H),1.55-1.40(m,15H);MS(ESI):1983.4(M+H)$^+$。

[1965] 实施例4A.用于掺入部分的示例性化合物。

[1966] 18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸的合成。

[1967]



[1968] 步骤1:向在丙酮(80mL)中的5-溴戊酸叔丁酯(4.0g,16.87mmol)的溶液加入NaI(7.59g,50.6mmol)。将反应混合物在57℃下搅拌2小时,过滤,并用EtOAc洗涤。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc中,用水、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g柱)纯化,用在己烷中的20％EtOAc至在己烷中的50％EtOAc洗脱,以得到作为黄色油状物的5-碘戊酸叔丁酯(4.54g,15.98mmol,95％产率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ3.19(t,J＝6.9Hz,2H),2.24(t,J＝7.3Hz,2H),1.86(p,J＝7.1Hz,2H),1.70(p,J＝7.4Hz,2H),1.45(s,9H)。

[1969] 步骤2:向在DMF(15mL)中的N-((1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟基甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-4-基)乙酰胺(600mg,2.57mmol)的溶液中加入2,2-二甲氧基丙烷(2087μl,17.03mmol),之后加入(+/-)-樟脑-10-磺酸(264mg,1.135mmol)。将反应混合物在70℃下搅拌24小时。将反应混合物冷却至室温,并且然后加入甲醇(2.5mL)。将反应混合物在室温下搅拌30分钟并且用TEA(0.10mL)中和。将溶剂蒸发,并将残余物与甲苯共蒸发。将残余物通过ISCO(24g金)纯化,用EtOAc至在EtOAc中的10％MeOH洗脱,以得到N-((3aR,4S,7S,8R,8aR)-4-(羟基甲基)-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁

庚因-8-基)乙酰胺(666mg,2.437mmol,95％产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ8.09(d,J＝8.1Hz,1H),5.15-5.05(m,2H),4.26(d,J＝5.8Hz,1H),4.09(dd,J＝7.3,5.8Hz,1H),3.80-3.60(m,5H),1.83(s,3H),1.37(s,3H),1.26(s,3H);MS,274.3(M+H)$^+$。

[1970] 步骤3:向在DCM(10.5mL)中的5-碘戊酸叔丁酯(1310mg,4.61mmol)和N-((3aR,4S,7S,8R,8aR)-4-(羟基甲基)-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-8-基)乙酰胺7(420mg,1.537mmol)的溶液中加入硫酸氢四丁铵(783mg,2.305mmol),之后加入12.5M氢氧化钠溶液(7mL)。将反应混合物在室温下搅拌24小时。将反应混合物用DCM和水稀释,用DCM(2X)萃取。将有机层用1N HCl溶液洗涤,并经硫酸钠干燥。将溶剂在减压下浓缩,以得到残余物。向所得的粗物质中加入乙酸乙酯(30mL),并超声处理5分钟。将所得的沉淀过滤,用乙酸乙酯(10mLX2)洗涤。LC-MS表明过滤器不含所需产物,并且是四丁基铵盐。将滤液在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g硅胶金柱)纯化,用在己烷中的50％EtOAc至EtOAc洗脱,以得到作为淡黄色油状物的5-(((3aR,4S,7S,8R,8aR)-8-乙酰胺基-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-4-基)甲氧基)戊酸叔丁酯(0.470g,1.094mm ol,71.2％产率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ5.56(d,J＝9.1Hz,1H),4.21(d,J＝5.9Hz,1H),4.12(dtd,J＝7.7,3.8,1.7Hz,1H),3.99(t,J＝6.3Hz,1H),3.90(d,J＝9.5Hz,1H),3.77(d,J＝2.0Hz,2H),3.67(d,J＝9.5Hz,1H),3.52(ddt,J＝30.5,9.2,5.8Hz,2H),2.23(t,J＝7.1Hz,2H),2.03(d,J＝14.5Hz,3H),1.65-1.55(m,7H),1.44(s,9H),1.35(s,3H);MS,452.4(M+Na)$^+$。

[1971] 步骤4:向在DCM(3mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十一烷-21-酸苯甲酯(0.168g,0.166mmol)的溶液中加入TFA(3mL)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发以得到作为无色油状物的5-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-5-氧代戊酸苯甲酯。MS,710.5(M+H)+。无需纯化,直接用于下一步骤。

[1972] 步骤5:向在DCM(5mL)中的5-(((3aR,4S,7S,8R,8aR)-8-乙酰胺基-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-4-基)甲氧基)戊酸叔丁酯(285mg,0.664mmol)的溶液中加入TFA(5mL),在室温下搅拌4小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发以得到5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸。MS(ESI):334.3(M+H)+。无需纯化,直接用于下一步骤。

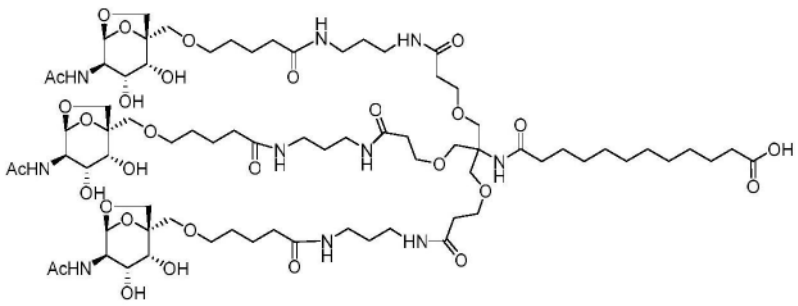
[1973] 步骤6:向在DCM(10mL)中的5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸(221mg,0.664mmol)的溶液中加入DIPEA(2313μl,13.28mmol)、HBTU(208mg,0.548mmol)、HOBT(67.3mg,0.498mmol)、在DMF(3.0mL)和DCM(5.0mL)中的5-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-5-氧代戊酸苯甲酯(118mg,0.166mmol)(GL08-02)的溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜。LC-MS表明所需产物。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(24g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的80％MeOH洗脱,以得到18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-

((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸苯甲酯(272mg,0.164mmol,99%产率)(在管30至42的产物(在DCM中的40%MeOH至在DCM中的60%MeOH))。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.89(d,J=7.8Hz,3H),7.81(t,J=5.7Hz,3H),7.75(s,3H),7.34(q,J=7.5,6.9Hz,5H),7.05(s,1H),5.07(s,5H),4.83(d,J=5.3Hz,3H),4.56(d,J=7.1Hz,3H),3.73(dd,J=23.3,9.2Hz,6H),3.64(d,J=7.0Hz,6H),3.58-3.35(m,27H),3.02(p,J=6.2Hz,12H),2.33(t,J=7.6Hz,2H),2.26(t,J=6.4Hz,6H),2.10(t,J=7.6Hz,2H),2.04(t,J=7.4Hz,6H),1.82(s,9H),1.72(q,J=7.6Hz,2H),1.52-1.39(m,18H);MS(ESI),1656.3(M+H)$^+$。

[1974] 步骤7:向在EtOAc(10mL)中的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸苯甲酯(270mg,0.163mmol)的溶液中加入10%Pd-C(50mg)和MeOH(5.0mL)和三乙基硅烷(1042μl,6.52mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,过滤,并浓缩以得到作为白色固体的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸(246mg,0.157mmol,96%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ11.99(brs,1H),7.89(d,J=7.9Hz,3H),7.82(t,J=5.4Hz,3H),7.75(t,J=5.7Hz,3H),7.03(s,1H),5.07(d,J=1.6Hz,3H),4.83(brs,3H),4.56(brs,3H),3.79-3.68(m,6H),3.64(d,J=7.2Hz,6H),3.58-3.34(m,27H),3.02(p,J=6.3Hz,12H),2.27(t,J=6.4Hz,6H),2.17(t,J=7.5Hz,2H),2.08(t,J=7.5Hz,2H),2.04(t,J=7.3Hz,6H),1.82(s,9H),1.65(p,J=7.5Hz,2H),1.54-1.40(m,18H);MS(ESI),1566.3(M+H)+。

[1975] 实施例4B.

[1976] 18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸的合成

[1977] 

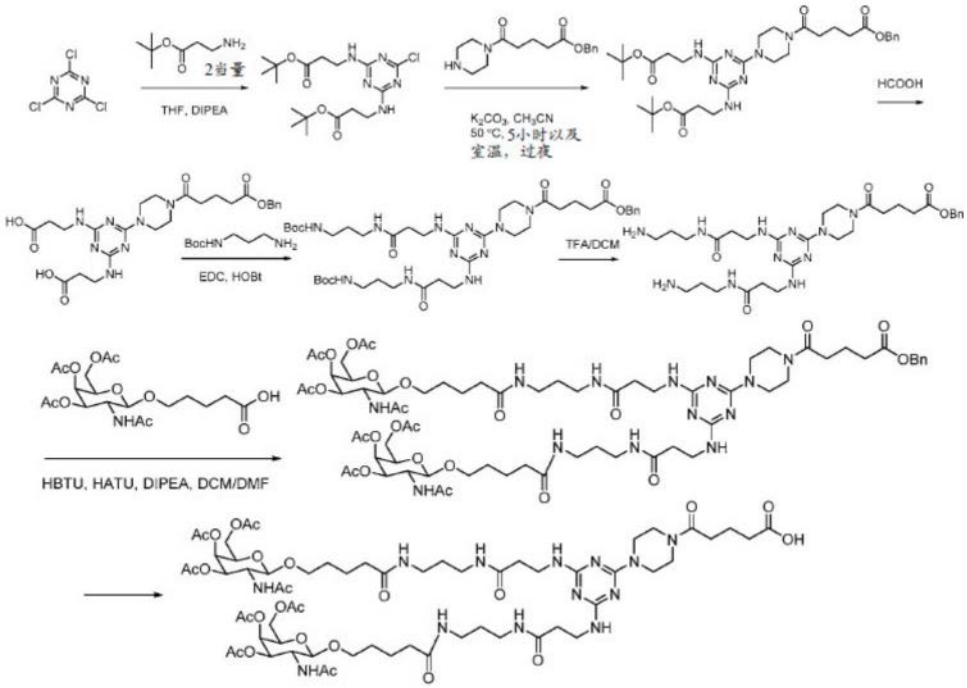
[1978] 使用与18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸相同的程序合成18,18-双(17-((1S,2R,

3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.90(d,J=7.8Hz,3H),7.83(t,J=5.7Hz,3H),7.76(t,J=5.7Hz,3H),6.98(d,J=6.2Hz,1H),5.09(s,3H),3.81-3.69(m,6H),3.69-3.62(m,6H),3.62-3.40(m,24H),3.04(p,J=6.1Hz,9H),2.28(t,J=6.4Hz,4H),2.18(t,J=7.3Hz,2H),2.06(t,J=7.7Hz,6H),1.84(s,6H),1.48(tq,J=14.9,7.4Hz,16H),1.23(s,8H)。MS(ESI),1664.0(M+H)$^+$。

[1979] 实施例5.用于掺入部分的示例性化合物。

[1980] 5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸的合成。

[1981]



[1982] 步骤1至2:向在THF(30mL)中的固体试剂2,4,6-三氯代-1,3,5-三嗪(0.500g,2.71mmol)中加入3-氨基丙酸叔丁酯HCl盐(0.985g,5.42mmol)和DIPEA(2.36ml,13.56mmol)。将反应混合物在室温下搅拌5小时。LC-MS表明所需产物;MS(ESI):402.4(M+H)$^+$。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,其直接用于下一步骤。向在乙腈(50mL)中的3,3'-((6-氯代-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))二丙酸二叔丁酯(1.052g,2.71mmol)的溶液中加入5-氧代-5-(哌嗪-1-基)戊酸苯甲酯(1.103g,3.80mmol)和K2CO3(2.248g,16.27mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜并且在50℃下搅拌。用EtOAc稀释,过滤并在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金)纯化,用在己烷中的20%EtOAc至在己烷中的50%EtOAc洗脱,以得到作为白色固体的3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))二丙酸二叔丁酯(1.13g,64%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.43-7.30(m,5H),5.15(s,2H),3.75(brs,4H),3.63(brs,6H),3.43(brs,2H),2.51(q,J=7.0,6.5Hz,6H),2.42(t,J=7.4Hz,2H),2.09-1.96(m,2H),1.48(s,

18H);MS(ESI):656.6(M+H)$^+$。

[1983] 步骤3:将在甲酸(20mL)中的3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))二丙酸二叔丁酯(1.10g,1.68mmol)的溶液在室温下搅拌过夜。LC-MS表明反应未完成并且将溶剂蒸发。向反应混合物中加入甲酸(20mL),并且将反应混合物在室温下搅拌5小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发,与甲苯(2X)共蒸发,并在真空下干燥过夜以得到作为白色固体的3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))二丙酸(0.91g,100%产率)。MS(ESI),544.2(M+H)$^+$。

[1984] 步骤4:在0℃下向在DCM(30mL)和DMF(3mL)中的3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))二丙酸(0.91g,1.68mmol)和HOBt(0.76g,4.36mmol)的溶液中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.840g,4.36mmol)、EDC HCl盐(0.836g,4.36mmol)和DIPEA(1.460ml,8.39mmo l)。将反应混合物在0℃下搅拌15分钟,并在室温下搅拌20小时。将溶剂蒸发,以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc(300mL)中,用水(1X)、饱和碳酸氢钠(2X)、10%柠檬酸(2X)和水洗涤,经硫酸钠干燥,并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为白色固体的5-(4-(4,6-双((3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(1.11g,77%产率)。MS(ESI):857.5(M+H)$^+$。

[1985] 步骤5:向在DCM(5.0mL)中的5-(4-(4,6-双((3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(212.3mg,0.250mmol)的溶液中加入TFA(3.0mL)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。将溶剂在减压下蒸发,其无需纯化直接用于下一步骤。MS(ESI):656.3(M+H)$^+$。

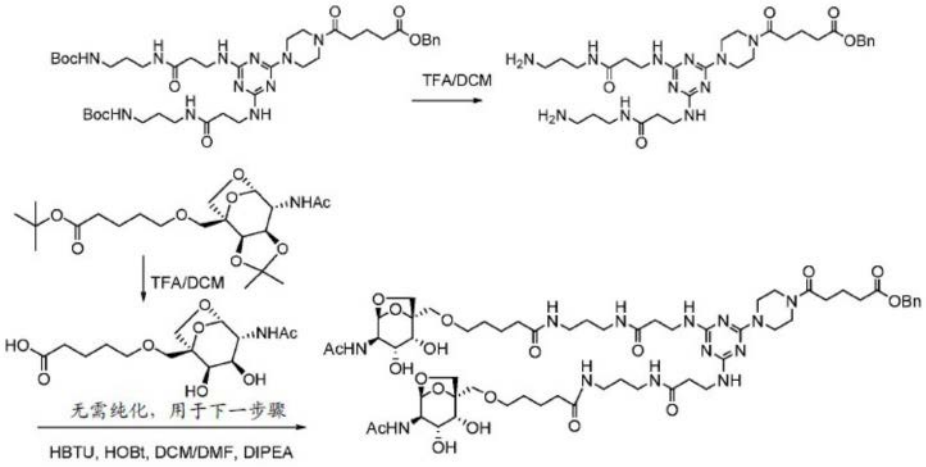
[1986] 步骤6:向在DCM(5mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(333mg,0.740mmol)的溶液中加入DIPEA(2.16ml,12.4mmol)、HBTU(235mg,0.620mmol)、HOBT(67mg,0.50mmol)、在DCM(3.0mL)中的5-(4-(4,6-双((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(163mg,0.250mmol)的溶液。将反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明所需产物。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(24g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的50%MeOH洗脱,以得到含有一些HOBt的(2R,2'R,3R,3'R,4R,4'R,5R,5'R,6R,6'R)-((((((3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))双(丙酰基))双(氮杂二基))双(丙烷-3,1-二基))双(氮杂二基))双(5-氧代戊烷-5,1-二基))双(氧基))双(5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-6,3,4-三基)四乙酸酯(460mg)。MS(ESI),1515.7(M+H)$^+$。

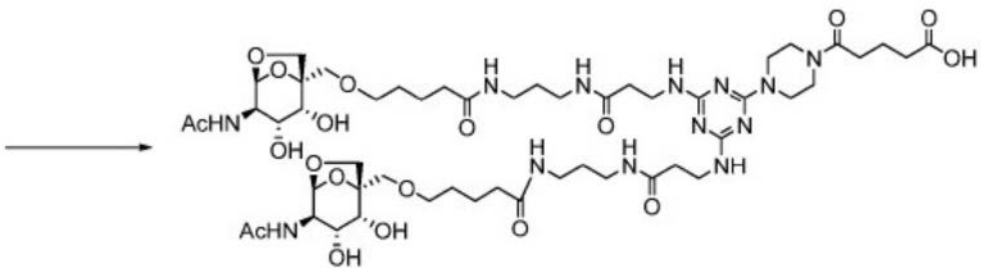
[1987] 步骤7:向在EtOAc(20mL)中的(2R,2'R,3R,3'R,4R,4'R,5R,5'R,6R,6'R)-((((((3,3'-((6-(4-(5-(苯甲氧基)-5-氧代戊酰基)哌嗪-1-基)-1,3,5-三嗪-2,4-二基)双(氮杂二基))双(丙酰基))双(氮杂二基))双(丙烷-3,1-二基))双(氮杂二基))双(5-氧代戊烷-5,1-二基))双(氧基))双(5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-6,3,4-三基)四乙酸酯(0.44g,0.290mmol)的溶液中加入10%Pd-C(40mg),之后在Ar下加入2.0mL MeOH。将三乙基硅烷(2.784ml,17.43mmol)缓慢加入反应混合物中。在室温下搅拌反应混合

物2小时,通过硅藻土过滤,用在EtOA c中的50%MeOH洗涤。将溶剂在减压下蒸发以得到作为白色固体的5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸(0.43g,100%产率)。MS(ESI):1425.0(M+H)$^+$。

[1988] 实施例6.用于掺入部分的示例性化合物。

[1989] 5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸的合成。

[1990] 



[1991] 步骤1:向在DCM(5.0mL)中的5-(4-(4,6-双((3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(212.3mg,0.250mmol)的溶液中加入TFA(3.0mL)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。将溶剂在减压下蒸发,其无需纯化直接用于下一步骤。MS(ESI):656.3(M+H)$^+$。

[1992] 步骤2:向在DCM(5mL)中的5-(((3aR,4S,7S,8R,8aR)-8-乙酰胺基-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-4-基)甲氧基)戊酸叔丁酯(373mg,0.870mmol)的溶液中加入TFA(5mL),在室温下搅拌4小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发以得到5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸。MS(ESI):334.3(M+H)+。无需纯化,直接用于下一步骤。

[1993] 步骤3:向在DCM(5mL)中的55-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸(289mg,0.870mmol)的溶液中加入DIPEA(2.16ml,12.4mmol)、HBTU(330mg,0.870mmol)、HOBT(67mg,0.50mmol)、在DCM(3.0mL)中的

5-(4-(4,6-双((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(163mg,0.250mmol)的溶液。将反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明所需产物。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(24g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的50%MeOH洗脱,以得到5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(227mg,71%)。MS(ESI),1287.0$(M+H)^+$。

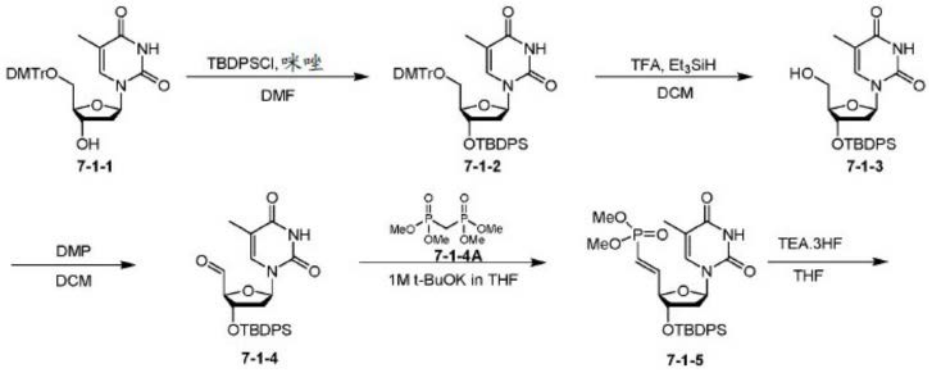
[1994] 步骤4:向在EtOAc(10mL)中的5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸苯甲酯(0.167g,0.130mmol)的溶液中加入10%Pd-C(50mg),之后在Ar下加入2.0mL MeOH。将三乙基硅烷(1.66ml,10.39mmol)缓慢加入反应混合物中。在室温下搅拌反应混合物2小时,通过硅藻土过滤,用在EtOAc中的50%MeOH洗涤。将溶剂在减压下蒸发以得到作为白色固体的5-(4-(4,6-双((3-((3-(5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-5-氧代戊酸(32mg,21%产率)。MS(ESI):1196.7$(M+H)^+$。

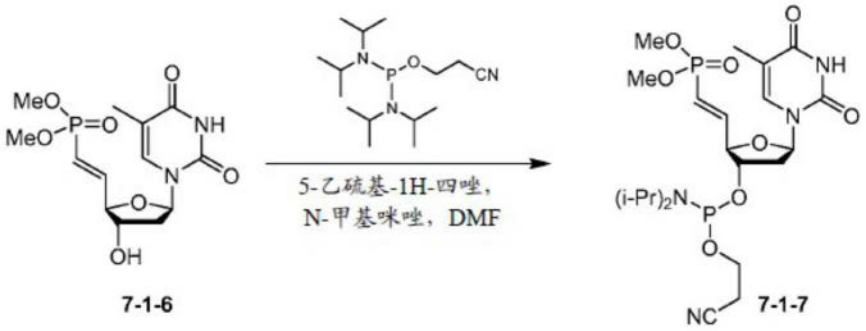
[1995] 实施例7.某些亚磷酰胺的示例性制备。

[1996] 在一些实施方案中,本公开提供了用于寡核苷酸制备的单体(亚磷酰胺)及其方法。在一些实施方案中,所提供的亚磷酰胺包括5'-末端结构,其提供了特殊和/或大大改善的活性和/或性质。在一些实施方案中,所提供的亚磷酰胺包含用于掺入寡核苷酸中的所需的化学部分,例如碳水化合物部分、脂质部分等。在一些实施方案中,所提供的亚磷酰胺包含用于掺入所需的化学部分(例如碳水化合物部分、脂质部分等)的接头/柄部。根据本公开,可以使用许多技术来制备亚磷酰胺,所述技术包括但不限于描述于WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555和WO/2017/062862中的那些技术,其中的每个的方法和试剂以引用的方式并入本文。以下作为实例提供某些亚磷酰胺的制备。

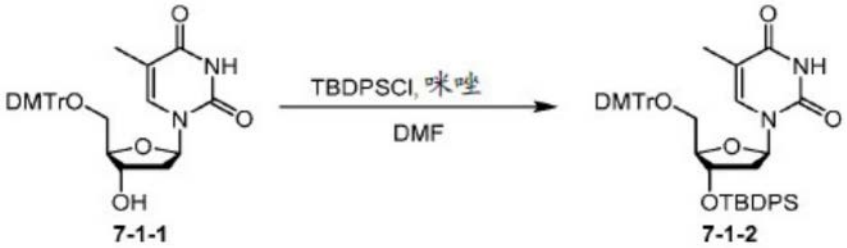
[1997] 实施例7-1.胸苷-5'-二甲基乙烯基膦酸酯-2'-脱氧-3'-CNE亚磷酰胺的制备。

[1998]



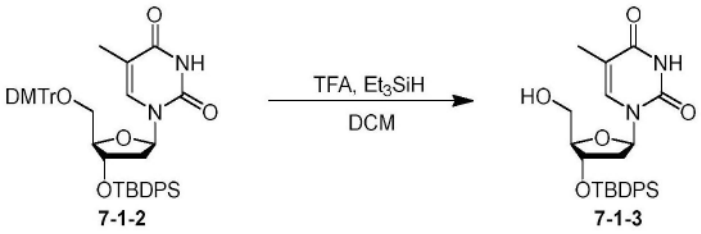
[1999] 

[2000] 化合物7-1-2的制备。

[2001] 

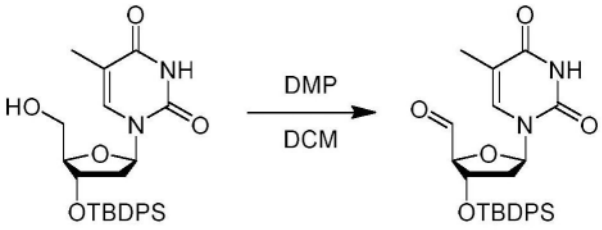
[2002] 向在DMF(100.00mL)中的化合物7-1-1(20.00g,36.72mmol,1.00当量)的溶液中加入咪唑(25.00g,367.20mmol,10.00当量),之后加入TBDPSCl(50.47g,183.60mmol,47.17mL,5.00当量)。将反应混合物在25℃下搅拌16小时。TLC(二氯甲烷:甲醇=1:1)表明化合物7-1-1完全消耗。加入EtOAc(300mL),并将混合物用水(60mL*3)洗涤。将有机相经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯=20:1、1:1、1:4)进行纯化。获得作为白色泡沫状固体的化合物7-1-2(30.00g)。^1H NMR:($CDCl_3$,400MHz)δ=8.165(s,1H),7.575-7.080(m,21H),6.718-6.741(m,4H),6.473(d,J=2.8Hz,1H),4.520-4.534(m,1H),4.037-4.043(d,J=2.4Hz,1H),3.758(s,6H),3.184-3.217(m,1H),2.841-2.874(m,1H),2.319-2.338(m,1H),2.025-2.078(m,1H),1.321(s,3H),1.021(s,9H)。

[2003] 化合物7-1-3的制备。

[2004] 

[2005] 向在DCM(250mL)中的化合物7-1-2(25.00g,31.93mmol,1.00当量)的溶液中加入TFA(8.37g,73.44mmol,5.44mL,2.30当量)。溶液的颜色变为红色。在25℃下加入Et_3SiH(8.17g,70.24mmol,11.19mL,2.20当量)。将反应混合物在25℃下搅拌2小时,并且红色溶液变为无色。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)表明化合物7-1-2完全消耗。将溶剂在减压下出去并且将残余物溶解在EtOAc(100mL)中。将有机相用$NaHCO_3$(40mL)、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯=20:1、1:1)进行纯化。获得作为白色固体的化合物7-1-3(9.80g,56.20％产率,88％纯度)。^1H NMR:($CDCl_3$,400MHz)δ=8.108(s,1H),7.643(s,1H),7.403-7.412(m,6H),7.269(d,J=4.8Hz,2H),6.217(d,J=5.6Hz,1H),4.451(s,1H),3.975(s,1H),3.631(d,J=12Hz,1H),3.255(s,1H),2.264-2.296(m,1H),2.136-2.184(m,1H),1.957(s,1H),1.859(s,3H),1.090(s,9H)。

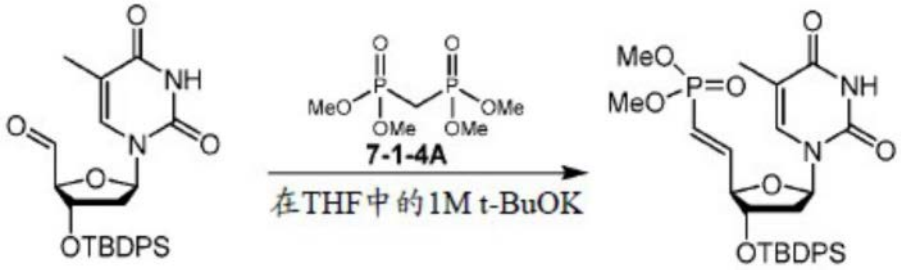
[2006] 化合物7-1-4的制备。

[2007] 

7-1-3 7-1-4

[2008] 在0℃下向在DCM(500mL)中的化合物7-1-3(18.00g,37.45mmol,1.00当量)的溶液中加入DMP(17.47g,41.20mmol,12.75mL,1.10当量)。将反应混合物在25℃下搅拌3小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)表明反应完成。依次加入Na_2SO_3(饱和,100mL)和$NaHCO_3$(饱和,100mL)。将混合物用DCM(100mL*3)萃取。将有机相经Na_2SO_4干燥并浓缩。获得作为黄色油状物的化合物7-1-4(17.92g,粗产物)。

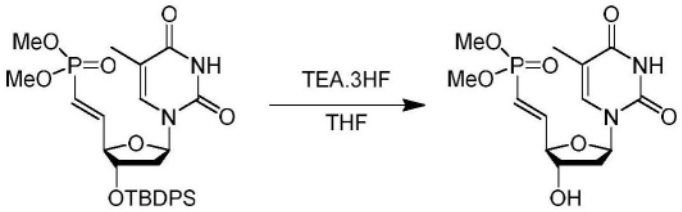
[2009] 化合物7-1-5的制备。

[2010] 

7-1-4 7-1-5

[2011] 在0℃下向在THF(29mL)中的化合物7-1-4A(16.08g,69.26mmol,1.85当量)的溶液中加入t-BuOK(1M,69.26mL,1.85当量)。将混合物在0℃下搅拌10分钟,然后加热至25℃持续30分钟。将上述混合物在0℃下加入在THF(36mL)中的化合物7-1-4(17.92g,37.44mmol,1.00当量)的溶液中。将反应混合物在0℃下搅拌1小时,并且然后在80分钟内加热至25℃。TLC(二氯甲烷:甲醇=20:1)表明反应完成。向反应混合物中加入水(200mL)并且用EtOAc(300mL*4)萃取。将有机相干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法(PE(10%DCM):EA=10:1、1:8)进行纯化。获得作为黄色固体的化合物7-1-5(15.00g)。

[2012] 化合物7-1-6的制备。

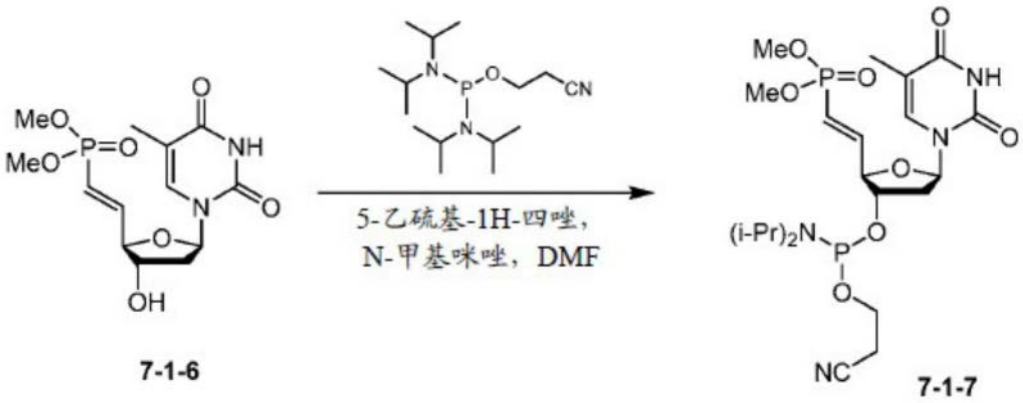
[2013] 

7-1-5 7-1-6

[2014] 在25℃下向在THF(60mL)中的化合物7-1-5(21.00g,35.92mmol,1.00当量)的溶液中加入N,N-二乙基乙胺;三氟化氢(28.95g,179.59mmol,29.24mL,5.00当量)。将反应混合物在25℃下搅拌20小时。TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1)表明反应完成。将反应混合物在减压下浓缩,并将混合物用Na_2CO_3(水性,饱和)中和直至pH=7。将水相冷冻干燥。将冷冻干燥的固体用DCM:MeOH=10:1(300mL*2)洗涤。将有机相浓缩。将获得的残余物通过硅胶柱色谱法

(二氯甲烷:甲醇＝100:1、100:8)进行纯化。获得作为白色固体的化合物7-1-6(5.20g,15.02mmol,41.81％产率)。^{1}H NMR:($CDCl_3$,400MHz)δ＝9.521(s,1H),7.120(s,1H),6.974-7.074(m,1H),6.372-6.405(m,1H),5.961-6.050(m,1H),4.684(s,1H),4.504-4.518(m,1H),4.393-4.409(m,1H),3.726-3.775(m,6H),3.151-3.180(m,2H),2.411-2.427(m,1H),1.930-2.218(m,1H),1.927(s,3H)。

[2015] 化合物7-1-7的制备。

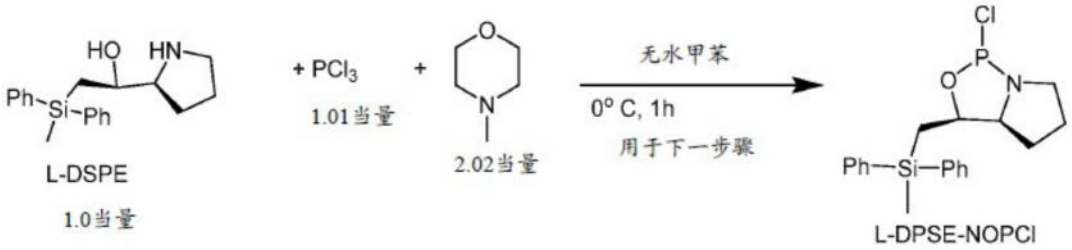
[2016] 

7-1-6 7-1-7

[2017] 向在DMF(23mL)中的化合物7-1-6(3.80g,10.97mmol,1.00当量)的溶液中加入5-乙基氢硫基-2H-四唑(1.43g,10.97mmol,1.00当量)、1-甲基咪唑(1.80g,21.94mmol,1.75mL,2.00当量)和3-双(二异丙基氨基)膦酰氧基丙腈(4.96g,16.46mmol,5.22mL,1.50当量)。在N_2下将反应混合物在25℃下搅拌3小时。TLC(二氯甲烷:甲醇＝10:1)表明反应完成。将反应混合物用EtOAc(200mL)稀释。将反应混合物用水性饱和的$NaHCO_3$溶液(20mL*4)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并在减压下浓缩。将柱用MeOH(20分钟)、EA(20分钟)、石油醚(20分钟)和石油醚/乙酸乙酯(20分钟)洗脱。将由此获得的残余物通过硅胶柱色谱法(用石油醚:EtOAc＝10:1、1:1并且然后用EtOAc/乙腈＝1000:1、100:2、100:4洗脱)进行纯化。获得作为黄色固体的化合物7-1-7(4.80g,8.78mmol,80.04％产率)。MS:LCMS,计算的C22H36N4O8P2,546.2008;在+Ve模式中观察,568.95;569.43[M+Na]。^{1}H NMR:($CDCl_3$,400MHz)δ＝9.489(s,1H),7.233(s,1H),6.835-7.035(m,1H),6.303-6.337(m,1H),5.931-5.983(m,1H),4.388-4.504(m,1H),3.703-3.846(m,1H),3.666-3.694(m,6H),3.533-3.559(m,2H),2.594-2.702(m,2H),2.162-2.578(m,2H),1.863(s,3H),1.111-1.189(m,12H)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ163.66,162.54,150.47,150.40,148.68,148.61,148.41,148.35,135.10,135.01,118.73,118.25,117.76,117.61,116.91,116.85,116.38,111.74,84.83,84.79,84.75,84.72,84.62,84.56,84.53,84.50,84.40,84.33,77.40,77.29,77.09,76.77,76.03,75.87,75.49,75.48,75.34,75.32,58.21,58.19,58.16,58.12,58.00,57.92,52.59,52.55,52.54,52.52,52.49,52.46,45.33,45.27,43.43,43.40,43.30,43.27,38.45,38.40,38.37,36.45,24.62,24.57,24.54,24.49,24.46,22.96,22.94,22.88,22.85,20.47,20.39,20.37,20.30,20.11,20.04,12.50,12.48。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ149.40,149.38,19.99,19.64,14.10。

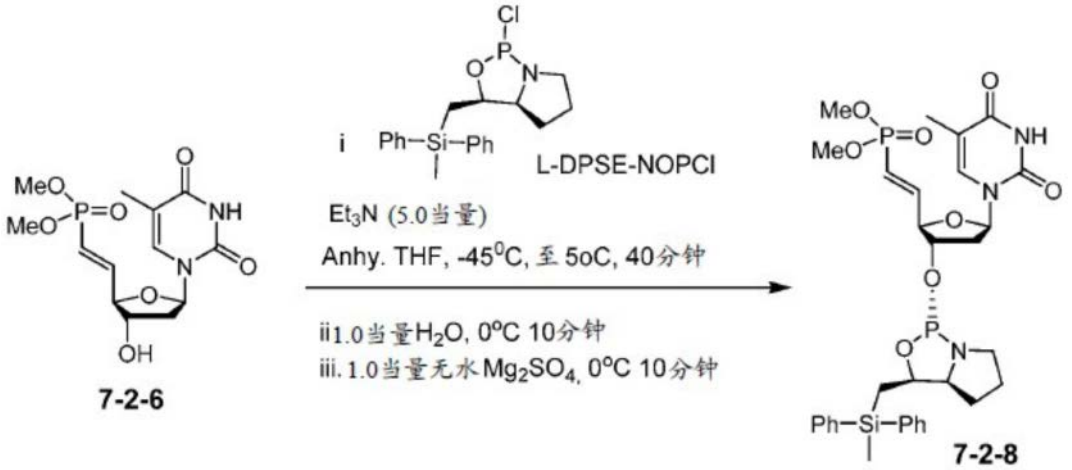
[2018] 实施例7-2.立体纯的L-DPSE-5'-DMT-5'VP-dT亚酰胺,7-2-8。

[2019] L-DPSE-NOPCl的制备。

[2020] 

[2021] 将L-DPSE(8.82g,28.5mmol)在旋转蒸发仪中与无水甲苯(60ml)在35℃下通过共沸蒸发进行干燥,并且在高真空下进一步干燥过夜。将溶剂在无水甲苯(50ml)中的这种干燥的L-DPSE和4-甲基吗啉(5.82g,6.33mL,57.5mmol)的溶液加入放置在250mL三颈圆底烧瓶中的在无水甲苯(25ml)中的PCl_3(4.0g,2.5mL,29.0mmol)的溶液中,将所述烧瓶在氩气下冷却至-5℃(开始温度:-2℃,最大温度:5℃,10分钟添加),并且将反应混合物在0℃下再搅拌40分钟。之后,将沉淀的白色固体在氩气下使用特殊的过滤管(Chemglass:Medium Frit,Airfree,Schlenk)进行真空过滤。将溶剂在浴温(25℃)下在氩气下通过旋转蒸发仪除去,并且获得粗油状混合物,并将其在真空下干燥过夜(~15小时),并用于下一步骤。

[2022] L-DPSE-5'-DMT-5'VP-dT亚酰胺的制备。

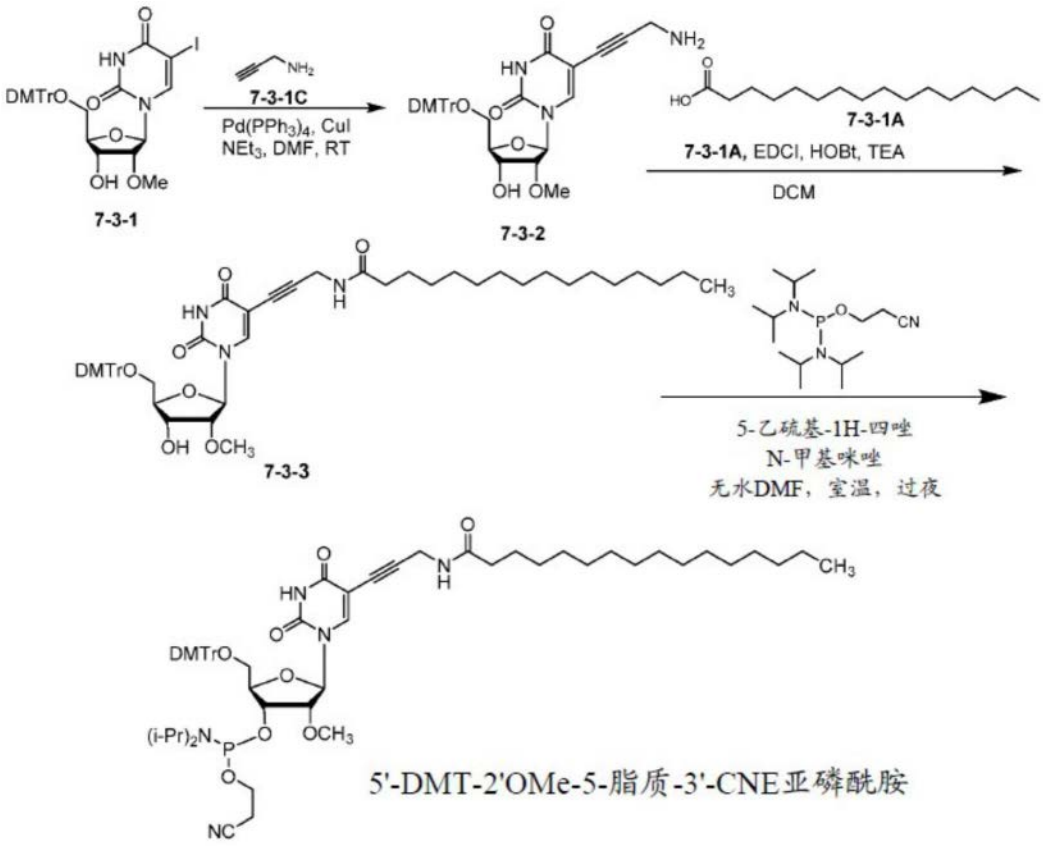
[2023] 

[2024] 将化合物7-2-6(7.0g,20.2mmol)通过与75mL的无水甲苯在45℃下共蒸发干燥两次,并在高真空下保持过夜。然后将干燥的化合物7-2-6在氩气下于250mL三颈烧瓶中溶解在干燥THF(70mL)中,之后添加三乙胺(14mL,101mmol),并将混合物冷却至-45℃。通过注射器向此冷却的混合物中逐滴加入来自前一步骤的粗L-DPSE-NOPCl(28.5mmol,1.4当量,在THF 50mL中)的溶液(~10分钟,保持内部温度-40℃至-35℃)。然后将反应混合物逐渐温热至5℃。在5℃下30分钟后,TLC和LC-MS分析表明SM完全转化为产物(总反应时间2小时)。将反应混合物在冰浴中冷却,并通过添加水(0.36mL,20.2mmol)淬灭并搅拌10分钟,之后加入无水Mg_2SO_4(3.0g,20.2mmol)。将反应通过无气Schlenk滤管过滤,用干燥THF(50mL)洗涤,并在28℃下在旋转蒸发下蒸发,以得到浅黄色固体的粗产物,将所述粗产物在高真空下干燥过夜。将干燥的粗产物通过120硅胶柱(用3个柱体积的乙酸乙酯与5%TEA将其预失活)进行纯化,使用乙酸乙酯/己烷混合物与5%TEA作为溶剂。柱纯化之后,将馏分通过TLC和LC-MS分析,并合并在一起。将溶剂在旋转蒸发仪中在28℃下蒸发,并将残余物在高真空下干燥,以得到作为白色固体的产物。产率:11.8g(87%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.46(ddt,J=16.5,7.6,2.7Hz,4H),7.33-7.17(m,6H),6.93-6.88(m,1H),6.75(ddd,J=22.6,17.2,

4.4Hz,1H),6.16(dd,J＝7.5,6.3Hz,1H),5.85(ddd,J＝19.2,17.1,1.8Hz,1H),4.71(dt,J＝8.7,5.7Hz,1H),4.38(dp,J＝10.7,3.6Hz,1H),4.15(tt,J＝5.6,2.7Hz,1H),3.68(dd,J＝11.1,3.7Hz,6H),3.55-3.29(m,2H),3.09(tdd,J＝10.8,8.8,4.3Hz,1H),2.11(ddd,J＝13.9,6.3,3.3Hz,1H),1.96(s,1H),1.87(d,J＝1.2Hz,3H),1.85-1.73(m,2H),1.70-1.49(m,2H),1.38(ddd,J＝15.9,10.4,6.3Hz,2H),1.26-1.11(m,2H),0.60(s,3H)。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ152.41,19.95。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ171.07,163.62,163.59,150.21,150.19,148.49,148.43,136.61,135.84,135.15,134.57,134.33,129.48,129.42,127.97,127.93,127.81,118.38,116.50,111.52,85.02,84.72,84.70,84.51,84.48,79.25,79.16,77.40,77.28,77.08,76.76,74.93,74.91,74.83,74.81,68.01,67.98,60.35,52.60,52.55,52.47,52.42,47.03,46.67,38.12,38.08,27.18,25.85,25.82,21.01,17.58,17.54,14.19,12.58,-3.00,-3.27。MS:LCMS,计算的C32H41N3O8P2Si,685.7255:在+Ve模式中观察:686.21[M+H],708.14[M+Na]。

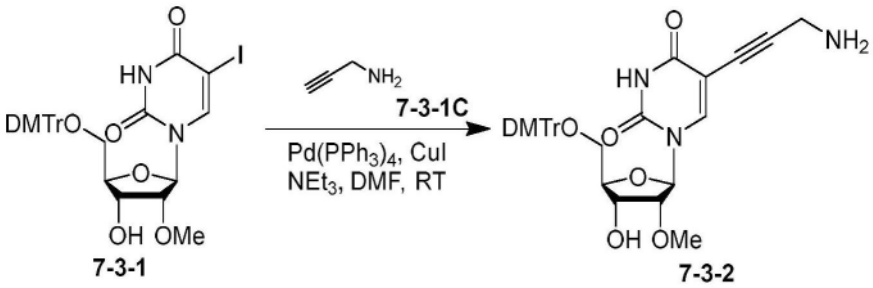
[2025] 实施例7-3.5'-DMT-2'OMe-5-脂质-3'-CNE亚磷酰胺的合成—通过核碱基掺入所需部分。

[2026]



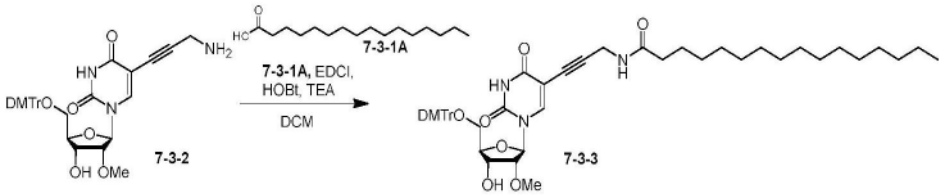
[2027] 化合物7-3-2的制备。

[2028]



[2029] 将在DMF(130mL)中的化合物7-3-1(13.00g,18.94mmol)、丙-2-炔-1-胺(2.09g,37.87mmol,2.43mL)、CuI(901.63mg,4.73mmol)、$Pd(PPh_3)_4$(2.19g,1.89mmol)和TEA(3.83g,37.87mmol,5.25mL)的混合物脱气并用N_2吹扫3次,并且然后将混合物在25℃下在N_2气氛和黑暗中搅拌12小时。LC-MS表明化合物7-3-1已完全消耗,并且检测到一个具有所需MS的主峰。将混合物在真空下浓缩。将残余物通过柱色谱(SiO_2,二氯甲烷/甲醇=100/1至0:1)进行纯化。获得作为黄色固体的化合物7-3-2(11.00g,粗产物)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ=8.23(s,1H),7.48-7.14(m,13H),6.83(br d,J=7.3Hz,5H),5.94(br s,1H),4.48(br t,J=5.8Hz,2H),4.05(br d,J=6.4Hz,2H),3.93(br d,J=2.9Hz,1H),3.81-3.70(m,8H),3.62(s,4H),3.52(br d,J=11.0Hz,2H),3.35(br d,J=9.0Hz,1H)。LCMS:($M+H^+$):614.2。TLC(二氯甲烷/甲醇=10:1)Rf=0.19。

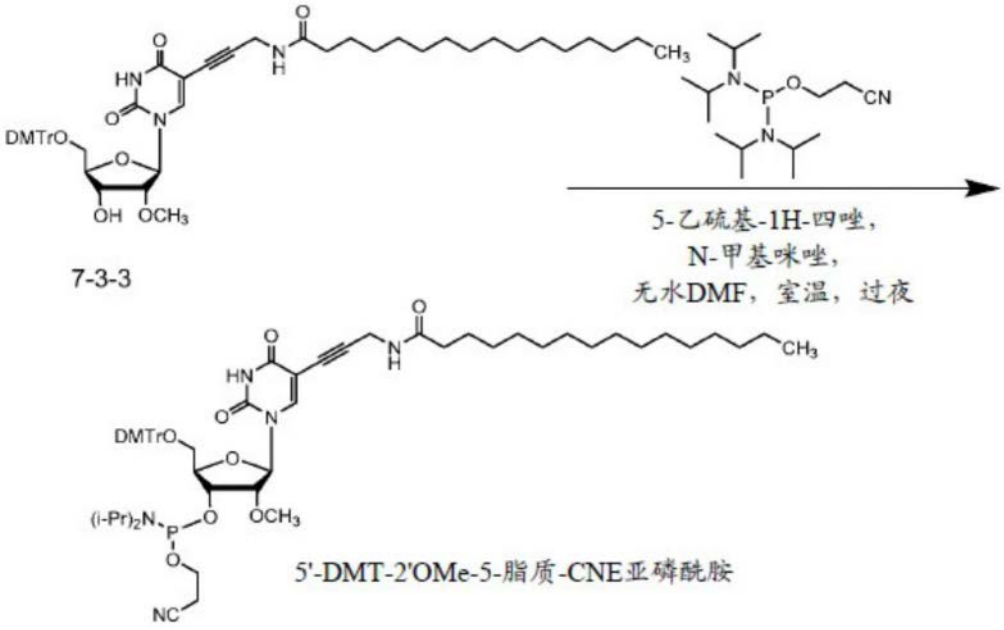
[2030] 化合物7-3-3的制备。

[2031] 

[2032] 向在DCM(130mL)中的棕榈酸(5.06g,19.72mmol)的溶液中加入TEA(3.63g,35.85mmol,4.97mL)、EDCI(5.15g,26.89mmol)、HOBt(3.63g,26.89mmol)和化合物7-3-3(11.00g,17.93mmol)。将混合物在25℃下搅拌1小时。LC-MS表明化合物7-3-3已完全消耗,并且检测到一个具有所需MS的主峰。将混合物在真空下浓缩。将残余物通过柱色谱法(SiO_2,二氯甲烷:乙酸乙酯=10/1至0:1二氯甲烷:乙酸乙酯=100/1至0:1)进行纯化。获得作为黄色固体的化合物7-3-3(6.20g,40.58%产率)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ=8.25(s,1H),7.50-7.14(m,10H),6.90-6.77(m,4H),5.93(d,J=2.0Hz,1H),5.01(br s,1H),4.53-4.44(m,1H),4.06(br d,J=6.8Hz,1H),3.94(dd,J=2.0,5.1Hz,1H),3.83-3.73(m,9H),3.63(s,3H),3.55-3.48(m,1H),3.39(dd,J=2.5,11.1Hz,1H),2.79(q,J=7.1Hz,1H),1.85-1.76(m,2H),1.50-1.41(m,2H),1.24(br s,22H),0.87(t,J=6.7Hz,3H)。^{13}CNMR(100MHz,$CDCl_3$):δ=172.37,162.32,158.66,158.58,158.55,149.58,144.63,142.49,135.55,135.44,130.14,130.00,129.94,128.08,127.86,126.91,113.51,113.35,99.62,89.56,87.56,86.85,83.77,83.68,74.14,68.49,61.77,58.82,55.24,45.30,36.10,31.89,29.84,29.67,29.63,29.49,29.37,29.33,25.42,22.66,14.79,14.11,9.74。LCMS:($M+H^+$):850.4。

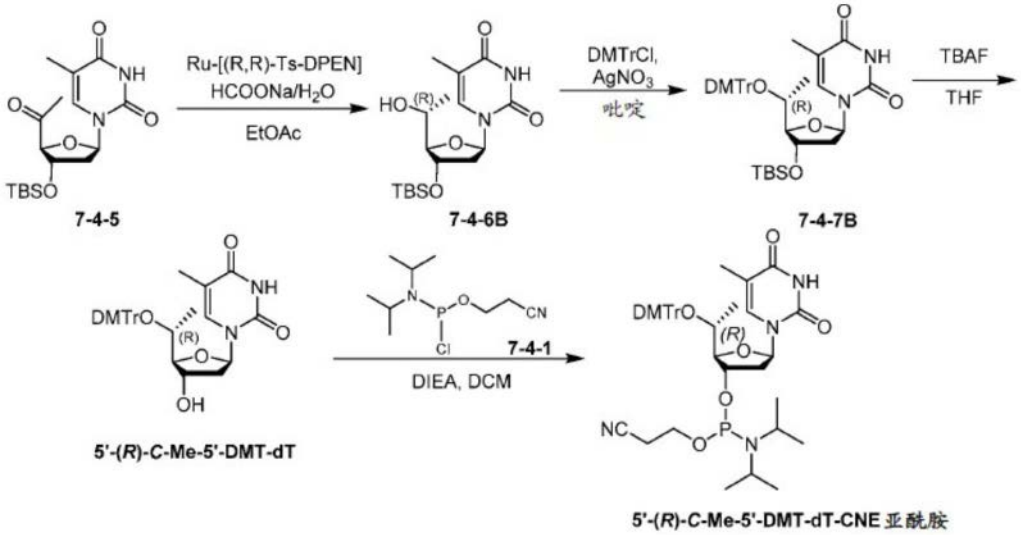
[2033] 5'-DMT-2'OMe-5-脂质-3'-CNE亚磷酰胺的制备。

[2034]

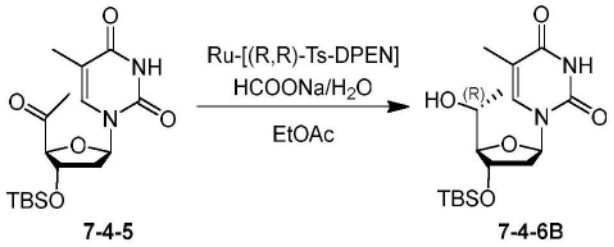


[2035] 将化合物7-3-3(2.8g,3.29mmol)与无水甲苯共蒸发两次(25mLx2),并在高真空下干燥过夜。将干燥的泡沫状固体溶解在无水DMF(5ml)中,并加入5-乙硫基-1H-四唑(0.43g,3.29mmol)、N-甲基咪唑(0.052mL,0.66mmol),之后加入2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(1.49g,4.93mmol)。将反应混合物在室温下在氩气气氛下搅拌过夜。在TLC表明反应完成之后,将反应用EtOAc(70mL)稀释并用水性饱和的$NaHCO_3$溶液(10mL)洗涤,并经Mg_2SO_4干燥。将溶剂在减压下蒸发,并在高真空下干燥过夜。将干燥的粗产物通过Combi-Flash Rf(Teledyne ISCO)使用80g硅胶柱(用3个柱体积的乙酸乙酯与5%TEA将其预失活)进行纯化,用含有5%TEA的己烷/乙酸乙酯/乙腈作为洗脱液,以得到作为泡沫状固体的5'-DMT-2'OMe-5-脂质-3'CNE亚磷酰胺。产率3.1g(90%)。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ150.58(s)150.26(s)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ172.20,172.18,161.78,161.66,158.70,158.68,149.45,149.35,144.71,144.57,142.69,142.62,137.91,135.63,135.53,135.49,135.40,130.16,130.11,128.08,128.06,128.01,127.00,126.97,117.71,117.51,113.39,113.36,113.32,99.75,99.46,89.30,89.26,88.49,88.00,87.05,86.84,83.86,83.04,82.98,82.93,82.66,77.39,77.27,77.07,76.75,74.45,74.30,69.88,69.77,69.64,62.10,61.24,58.94,58.92,58.65,58.47,58.44,57.97,57.76,55.30,55.27,43.35,43.32,43.23,43.19,36.11,36.09,33.26,31.90,29.88,29.67,29.65,29.63,29.58,29.50,29.37,29.33,25.41,24.70,24.64,24.61,24.57,24.54,24.50,22.66,20.47,20.40,20.34,20.27,14.82,14.09。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.40(dd,J=10.5,7.6Hz,2H),7.35-7.12(m,7H),6.78(ddd,J=9.0,4.2,2.7Hz,4H),4.82(dt,J=22.1,4.9Hz,1H),4.57-4.38(m,1H),4.24-4.10(m,1H),4.06-3.96(m,1H),3.86-3.67(m,7H),3.67-3.58(m,2H),3.57-3.39(m,6H),3.25(ddd,J=13.5,11.3,2.8Hz,1H),2.55(t,J=6.1Hz,1H),2.30(t,J=6.2Hz,1H),1.71(qd,J=7.4,7.0,1.4Hz,2H),1.38(dtt,J=10.5,7.7,2.8Hz,2H),1.09(dd,J=6.7,5.1Hz,17H),0.97(d,J=6.8Hz,3H),0.80(t,J=6.6Hz,3H)。MS:LCMS:计算的C59H82N5O10P;1051.5730;在+Ve模式中观察:m/z:1153.69[M+Et_3N]。

[2036] 实施例7-4.5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE亚酰胺的合成。

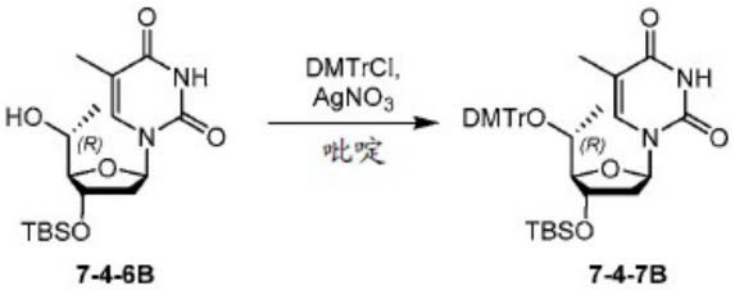
[2037] 

[2038] 化合物7-4-6B的制备。

[2039] 

[2040] 将在EtOAc(460.00mL)和甲酸钠(353.17g,5.19mol)的混合物中的化合物7-4-5(46.00g,124.83mmol)的溶液溶解在水(1.84L)中,并且然后加入[[(1R,2R)-2-氨基-1,2-二苯基-乙基]-(对甲苯磺酰基)氨基]-氯代-钌;1-异丙基-4-甲基-苯(1.59g,2.50mmol)。将所得的两相混合物在25℃下在N_2下搅拌12小时。TLC表明起始物质被消耗。将混合物用EtOAc(50mL*3)萃取。将组合的有机物用盐水(30mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以得到粗产物。将残余物通过从石油醚/乙酸乙酯=5:1中重结晶进行纯化,以得到作为白色固体的化合物7-4-6B(36.00g,77.83%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6):δ=11.31(s,1H),7.67(s,1H),6.16(dd,J=5.5,8.8Hz,1H),5.05(d,J=5.1Hz,1H),4.49(br d,J=5.1Hz,1H),3.78-3.70(m,1H),3.55(d,J=3.7Hz,1H),2.20-2.09(m,1H),1.96(br dd,J=5.7,13.0Hz,1H),1.77(s,3H),1.11(d,J=6.4Hz,3H),0.87(s,9H),0.09(s,6H)。HPLC:HPLC纯度:97.7%。SFC:SFC纯度:99.1%。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0.37。

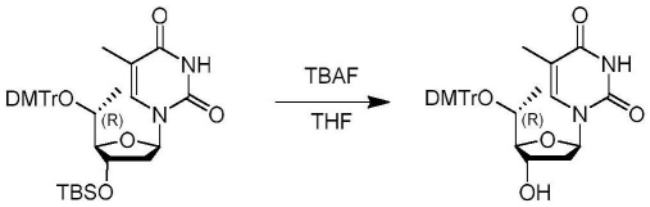
[2041] 化合物7-4-7B的制备。

[2042] 

[2043] 将化合物7-4-6B(18.00g,48.58mmol)通过在旋转蒸发仪上与吡啶(100mL)和甲苯(100mL*2)共沸蒸馏来干燥。将在吡啶(180.00mL)和THF(720.00mL)的混合物中的化合物7-

4-6B(18.00g,48.58mmol)和DMTCl(1.89g,5.59mmol)的溶液进行脱气并用N_2吹扫3次,并且然后加入$AgNO_3$(14.19g,83.56mmol)。将混合物在25℃下搅拌15小时。TLC表明起始物质被消耗。加入MeOH(5mL)并搅拌15分钟,并且然后将混合物过滤并将滤饼用甲苯(300mL*3)洗涤。浓缩滤液,以得到作为黄色油状物的化合物7-4-7B(65.38g,粗产物)。混合物无需任何纯化直接用于下一个步骤。TLC(石油醚/乙酸乙酯)Rf=0.63。

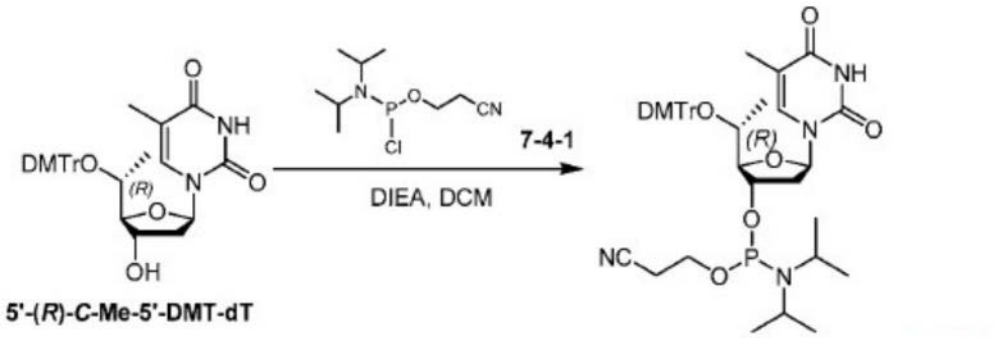
[2044] 5'-(R)-C-Me-5'-DMTr-dT的制备。

[2045] 

7-4-7B 5'-(*R*)-*C*-Me-5'-DMTr-dT

[2046] 向在THF(650.00mL)中的化合物7-4-7B(65.38g,97.16mmol)的溶液中加入TBAF(1M,184.60mL)。将混合物在25℃下搅拌12小时。TLC表明起始物质被消耗。将混合物浓缩以提供粗产物,并且然后加入饱和的NaCl(5%水性,200mL*2),并且将混合物用EtOAc(200mL*3)萃取。将组合的有机相经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物,将所述粗产物通过MPLC(石油醚:乙酸乙酯5:1、1:1、1:4,5%TEA)进行纯化,以提供作为白色固体的5'-(R)-C-Me-5'-DMTr-dT(47.50g,85.03mmol,87.52%产率)。^{1}HNMR(400MHz,DMSO-d6):δ=11.32(s,1H),7.46(br d,J=7.8Hz,2H),7.37-7.25(m,6H),7.23-7.16(m,1H),7.07(s,1H),6.89(dd,J=4.6,8.5Hz,4H),6.12(t,J=7.2Hz,1H),5.27(d,J=4.6Hz,1H),4.54-4.46(m,1H),3.73(d,J=1.8Hz,6H),3.62(t,J=2.9Hz,1H),3.40-3.34(m,1H),2.09-2.02(m,2H),1.40(s,3H),0.77(d,J=6.2Hz,3H)。^{13}CNMR(101MHz,DMSO-d6):δ=163.98,158.58,150.81,146.95,137.11,136.79,135.76,130.49,130.41,128.20,128.15,127.04,113.54,113.52,110.16,89.87,86.24,83.35,70.28,70.05,60.20,55.47,55.35,21.20,17.82,14.52,12.08。HPLC:HPLC纯度:98.7%。LC-MS:(M-H$^+$)=557.2;LCMS purity:98.9%。SFC:SFC纯度:100.0%。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1,5%TEA)Rf=0.02。

[2047] 5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺的制备。

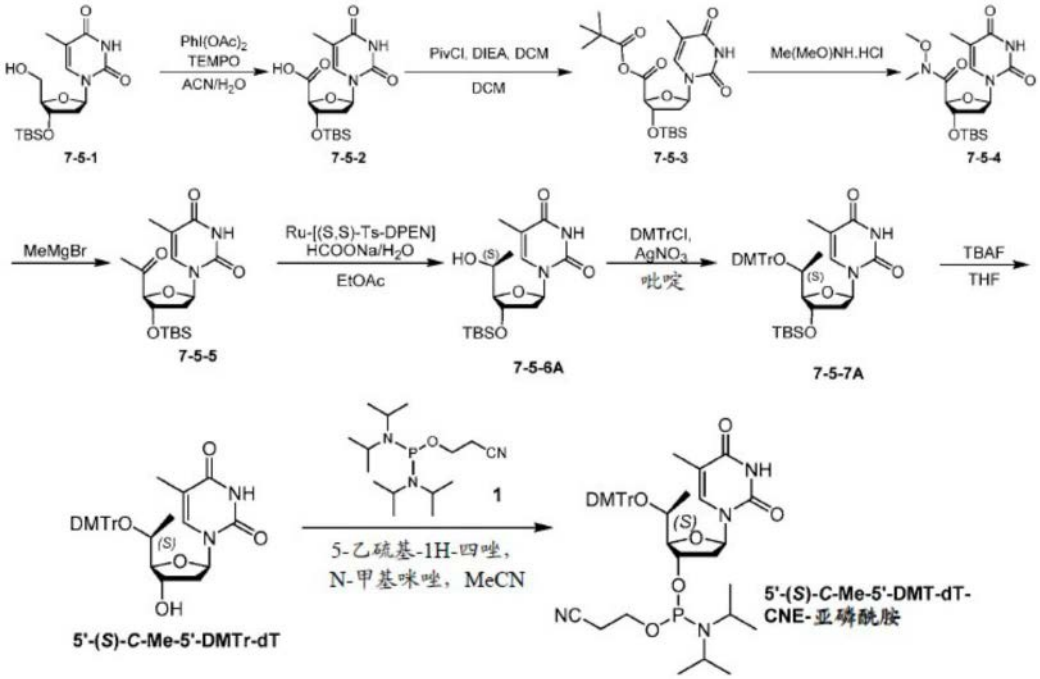
[2048] 

5'-(*R*)-*C*-Me-5'-DMT-dT 5'-(*R*)-*C*-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺

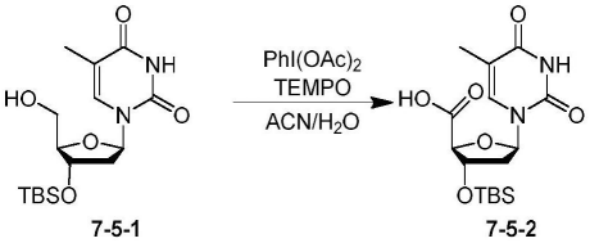
[2049] 将5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT(5g,8.95mmol)用甲苯(50mL)干燥。在0℃下在N_2下向在无水DCM(50mL)中的DIEA(1.39g,10.74mmol,1.87mL)和5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT(5g,8.95mmol)的溶液中加入化合物7-4-1(2.76g,9.40mmol)。将混合物在15℃下搅拌2小时。TLC表明起始物质被消耗,并且发现了两个新点。将混合物通过添加饱和水性$NaHCO_3$(20mL)

淬灭并且用DCM(30mL*3)萃取。将组合的有机相经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物,将所述粗产物在来自Teledyne的Combiflash仪器上进行纯化。首先通过用含有5%Et_3N的10%EtOAc/石油醚(300mL)洗脱,对40g硅胶柱进行预处理。将粗产物溶解在含有5%Et_3N的体积比为2:1的二氯甲烷:石油醚中,并装载到柱上。装载之后,使用以下梯度运行纯化过程:含有5%Et_3N的10%至50%EtOAc/石油醚。收集馏分。蒸发溶剂之后,获得作为白色固体的5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺(3.6g,53%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.11(br s,1H),7.53(br d,J=7.7Hz,3H),7.42(br t,J=8.2Hz,4H),7.32-7.17(m,4H),7.07-6.99(m,1H),6.84(br d,J=8.2Hz,4H),6.31(br dd,J=5.5,8.7Hz,1H),4.94(br s,1H),3.96-3.73(m,10H),3.72-3.41(m,4H),2.65(td,J=6.1,18.0Hz,2H),2.53-2.37(m,1H),2.10(br d,J=8.2Hz,1H),1.47(br s,4H),1.33-1.16(m,15H),1.00-0.90(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,氯仿-d)δ=148.81(s,1P),148.35(s,1P)。

[2050] 实施例7-5.5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE亚酰胺的合成。

[2051] 

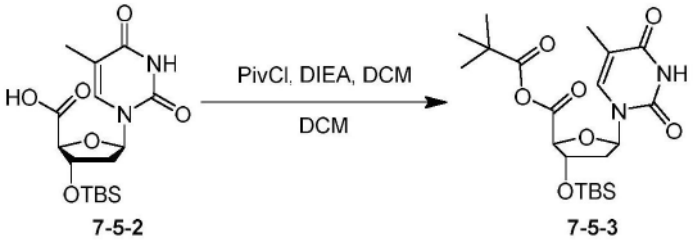
[2052] 化合物7-5-2的制备。

[2053] 

[2054] 在10℃下向在H_2O(250.00mL)和MeCN(250.00mL)的混合物中的化合物7-5-1(63.00g,176.72mmol)的溶液中加入PhI(OAc)$_2$(125.23g,388.79mmol)和TEMPO(5.56g,35.34mmol)。将混合物在25℃下搅拌2小时。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1,Rf=0)表明起始物质被消耗。将混合物浓缩,并加入MTBE(1mL)。将混合物搅拌0.5小时,并且然后过滤。将滤饼用MTBE(1L*2)洗涤,并干燥,以提供作为白色固体的化合物7-5-2(126g,96.23%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO):δ=11.21(s,1H),7.89(d,J=1.0Hz,1H),6.18(dd,J=5.9,8.6Hz,

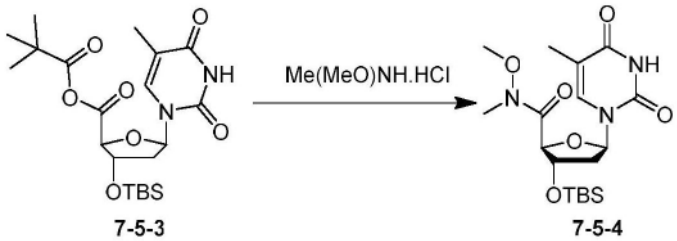
1H),4.61-4.41(m,1H),4.17(d,J=0.9Hz,1H),2.51-2.26(m,3H),2.09-1.85(m,2H),1.74-1.58(m,3H),0.90-0.58(m,10H),0.00(d,J=2.0Hz,6H)。LC-MS:($M+H^+$):371.1。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0。

[2055] 化合物7-5-3的制备。

[2056] 

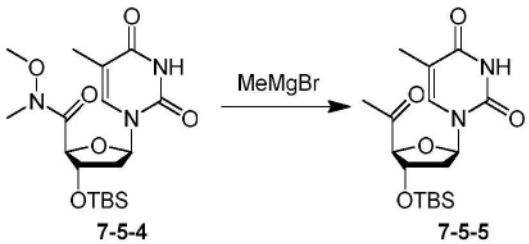
[2057] 向在DCM(500.00mL)中的化合物7-5-2(50.00g,134.96mmol)的溶液中加入DIEA(34.89g,269.92mmol,47.15mL)和2,2-二甲基丙酰氯(21.16g,175.45mmol)。将混合物在-10℃至0℃下搅拌1.5小时。TLC表明起始物质被消耗。在DCM中的混合物直接用于下一步骤。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0.15。

[2058] 化合物7-5-4的制备。

[2059] 

[2060] 向在DCM中的化合物7-5-3中加入TEA(40.94g,404.55mmol,56.08mL)和N-甲氧基甲胺盐酸盐(19.73g,202.27mmol)。将混合物在0℃下搅拌1小时。TLC表明起始物质被消耗。将混合物用HCl(1N,100mL)洗涤,并且然后用水性$NaHCO_3$(100mL)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物,将所述粗产物通过硅胶色谱法(石油醚/乙酸乙酯=30/1、0/1)进行纯化,以得到作为白色固体的化合物7-5-4(95.5g,85.63%产率)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ=8.29(s,1H),8.19(br s,1H),6.46(dd,J=5.1,9.3Hz,1H),4.71(s,1H),4.38(d,J=4.2Hz,1H),3.65(s,3H),3.15(s,3H),2.18-2.08(m,1H),2.00-1.90(m,1H),1.87(d,J=1.1Hz,3H),0.88-0.74(m,10H),0.00(d,J=3.7Hz,6H)。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0.43。

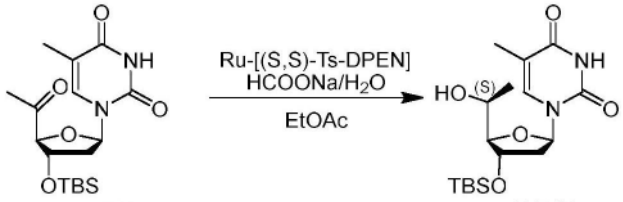
[2061] 化合物7-5-5的制备。

[2062] 

[2063] 在0℃下向在THF(1.20L)中的混合物7-5-4(115.00g,278.09mmol)的溶液中加入MeMgBr(3M,185.39mL)。将混合物在0℃下搅拌2小时。TLC表明起始物质被消耗。在0℃下向混合物中加入水(1L),并将混合物用EtOAc(300mL*2)萃取。将组合的有机相经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供作为白色固体的化合物7-5-5(100.00g,97.58%产率)。混合物无需进

一步纯化直接使用。^{1}HNMR(400MHz,$CDCl_3$):δ=8.81(br s,1H),7.95(s,1H),6.41(dd,J=5.6,8.1Hz,1H),4.60-4.40(m,2H),2.40-2.16(m,4H),1.98(s,3H),1.02-0.83(m,10H),0.14(d,J=3.3Hz,6H),0.20-0.00(m,1H)。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0.68。

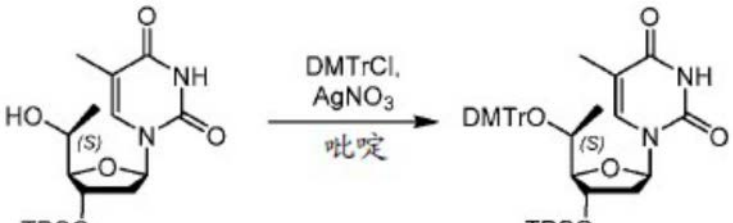
[2064] 化合物7-5-6A的制备。

[2065] 

7-5-5 7-5-6A

[2066] 将在EtOAc(460.00mL)和甲酸钠(353.17g,5.19mol)的混合物中的化合物7-5-5(46.00g,124.83mmol)的溶液溶解在水(1.84L)中,并且加入N-[(1S,2S)-2-氨基-1,2-二苯基-乙基]-4-甲基-苯磺酰胺氯钌;1-异丙基-4-甲基-苯(1.59g,2.50mmol)。将所得的两相混合物在25℃下在N_2下搅拌12小时。TLC表明起始物质被消耗。将混合物用EtOAc(500mL*3)萃取。将组合的有机物用盐水(300mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物。将混合物通过MPLC(石油醚/MTBE=10:1至1:1)纯化七次,以提供作为黄色油状物的化合物7-5-6A(25.6g,57.53%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6):δ=11.28(s,1H),7.85(s,1H),6.16(t,J=6.8Hz,1H),5.04(d,J=4.6Hz,1H),4.46-4.29(m,1H),3.79(br t,J=6.8Hz,1H),3.59(br s,1H),3.32(s,1H),2.21-2.09(m,1H),2.06-1.97(m,1H),1.76(s,3H),1.17-1.08(m,4H),0.91-0.81(m,10H),0.08(s,6H)。SFC:SFC纯度:98.6%。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1)Rf=0.38。

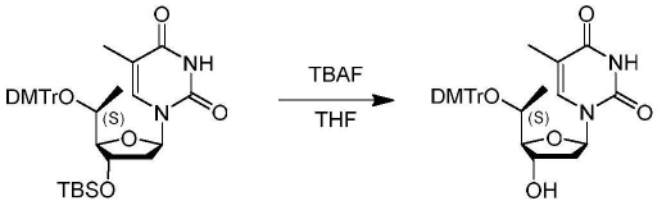
[2067] 化合物7-5-7A的制备。

[2068] 

7-5-6A 7-5-7A

[2069] 将化合物7-5-6A(12.80g,34.55mmol)通过在旋转蒸发仪上与吡啶(100mL)和甲苯(100mL*2)共沸蒸馏来干燥。将在吡啶(120.00mL)和THF(400.00mL)的混合物中的化合物7-5-6A(12.80g,34.55mmol)和DMTCl(1.89g,5.59mmol)的溶液进行脱气并用N_2吹扫3次,并且然后加入$AgNO_3$(10.09g,59.43mmol)。将混合物在25℃下搅拌15小时。TLC表明起始物质被消耗。加入MeOH(5mL)并搅拌15分钟,并且然后将混合物过滤并将滤饼用甲苯(300mL*3)洗涤。浓缩滤液,以得到作为黄色油状物的化合物7-7-7A(46.50g,粗产物)。混合物无需任何纯化直接用于下一个步骤。TLC(石油醚/乙酸乙酯)Rf=0.63。

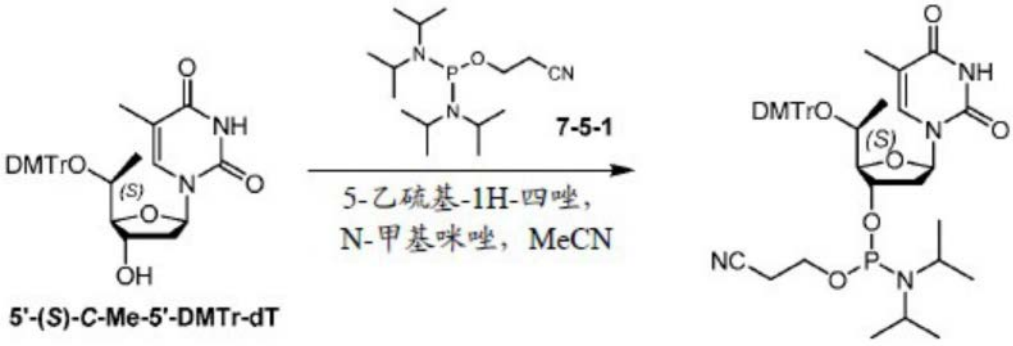
[2070] 5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT的制备。

[2071] 

7-5-7A 5'-(*S*)-*C*-Me-5'-DMT-dT

[2072] 向在THF(460.00mL)中的化合物7-5-7A(46.50g,69.11mmol)的溶液中加入TBAF(1M,131.31mL)。将混合物在25℃下搅拌5小时。TLC表明起始物质被消耗。浓缩混合物,并且然后加入饱和的NaCl(5%水性,200mL),并且将水相用EtOAc(200mL*3)萃取。将组合的有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物,将所述粗产物通过MPLC(石油醚/乙酸乙酯5:1、1:1、1:4,5%TEA)进行纯化,以提供作为白色固体的5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT(29.0g,75.12%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6):δ=11.35(s,1H),7.56(s,1H),7.58-7.53(m,1H),7.44(d,J=7.8Hz,2H),7.37-7.24(m,6H),7.23-7.17(m,1H),6.87(t,J=8.3Hz,4H),6.13(t,J=6.9Hz,1H),5.21(d,J=4.9Hz,1H),4.23(br s,1H),3.73(d,J=2.9Hz,6H),3.67(t,J=3.7Hz,1H),3.57-3.46(m,1H),2.23-2.04(m,2H),1.67(s,3H),1.70-1.65(m,1H),0.71(d,J=6.2Hz,3H)。^{13}CNMR(101MHz,DMSO-d6):δ=170.78,164.16,158.64,158.59,150.86,146.71,137.00,136.75,135.97,130.65,130.52,128.38,128.07,127.11,113.48,110.11,89.78,86.41,83.87,70.58,70.22,60.21,55.48,21.20,18.08,14.53,12.54。HPLC:HPLC纯度:98.4%。LCMS:(M-H+)=557.2;LCMS纯度:99.0%。SFC:SFC纯度:99.4%。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1:1,5%TEA)Rf=0.01。

[2073] 5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺的制备。

[2074] 

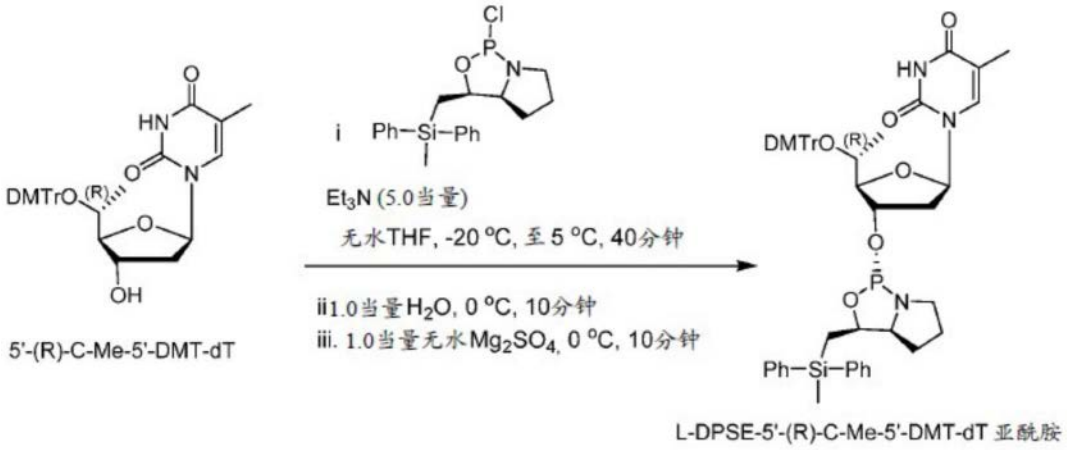
5'-(*S*)-*C*-Me-5'-DMTr-dT 5'-(*S*)-*C*-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺

[2075] 向在MeCN(50.00mL)中的5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT(5.00g,8.95mmol)的溶液中加入5-乙基氢硫基-2H-四唑(1.17g,8.95mmol)、1-甲基咪唑(1.47g,17.90mmol,1.43mL)和化合物7-5-1(4.05g,13.43mmol,4.26mL)。将反应混合物在20℃下在N_2下搅拌2小时。TLC和LC-MS表明一些起始物质被消耗,并形成了所需物质。将反应混合物在减压下浓缩,并且将残余物用EtOAc(20mL)稀释。将反应混合物用水性饱和$NaHCO_3$溶液(20mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以提供粗产物,将所述粗产物通过MPLC(石油醚5%TEA:乙酸乙酯10:1至1:1)进行纯化,以提供作为白色固体的5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-亚酰胺(4.3g,63.31%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.19(br s,1H),7.69-7.60(m,1H),7.54(s,1H),7.43-7.33(m,2H),7.32-7.07(m,8H),6.73(ddd,J=3.7,5.8,9.0Hz,4H),6.27-6.15(m,1H),

4.49-4.37(m,1H),3.82-3.65(m,8H),3.63-3.55(m,2H),3.53-3.39(m,3H),2.50(t,J＝6.3Hz,1H),2.46-2.31(m,1H),2.29-2.19(m,1H),2.16-2.04(m,1H),1.68(s,3H),1.20-1.00(m,13H),0.95(d,J＝6.8Hz,3H),0.92-0.74(m,4H)。^{31}P NMR(162MHz,氯仿-d)δ＝149.11(s,1P),148.99(s,1P)。

[2076] 实施例7-6.L-DPSE-5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT亚酰胺的合成。

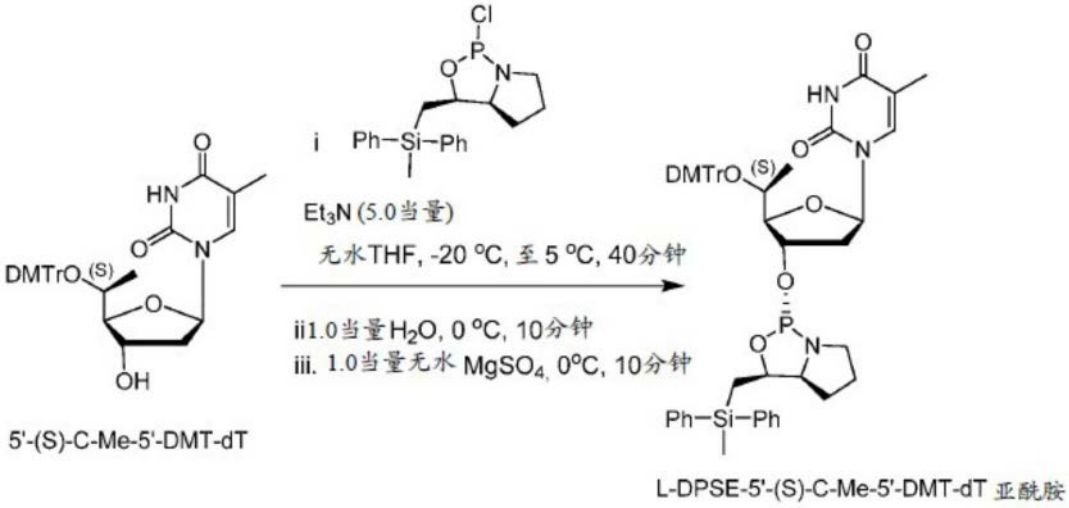
[2077]



[2078] 将5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT(11.17g,20mmol)通过与80mL的无水甲苯在45℃下共蒸发干燥两次,并在高真空下保持过夜。然后将干燥的5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT在氩气下于500mL三颈烧瓶中溶解在干燥THF(80mL)中,之后添加三乙胺(13.93mL,100mmol),并将混合物冷却至-40℃。通过注射器向此冷却的混合物中逐滴加入来自储备液的粗L-DPSE-NOPCl(30mmol,1.4当量,在THF 40mL中)的溶液(~15分钟,保持内部温度-40℃至-35℃)。然后将混合物逐渐温热至5℃。在5℃下30分钟后,TLC和LC-MS分析表明SM完全转化为产物(总反应时间2小时)。将反应混合物在冰浴中冷却,并通过添加水(0.36mL,20mmol)将反应淬灭。将混合物搅拌10分钟,之后添加无水Mg_2SO_4(3.0g,20mmol)。将反应通过无气Schlenk滤管过滤,用干燥THF(60mL)洗涤,并将溶剂在28℃下在旋转蒸发下蒸发,以得到作为灰白色固体的粗产物,将所述粗产物在高真空下干燥过夜。将干燥的粗产物通过使用220硅胶柱(用3个柱体积的乙酸乙酯与5%TEA将其预失活)的Combi-Flash Rf(Teledyne ISCO)进行纯化,使用含有5%TEA的乙酸乙酯/己烷混合物作为溶剂。将馏分通过TLC和LC-MS分析,并合并在一起。将溶剂在旋转蒸发仪中在28℃下蒸发,并将残余物在高真空下干燥,以得到作为白色固体的产物。产率:16.3g(91%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.50-7.36(m,6H),7.35-7.06(m,13H),6.85(d,J＝1.4Hz,1H),6.73(dq,J＝8.7,3.2Hz,4H),6.13(dd,J＝9.3,5.3Hz,1H),5.10(td,J＝7.8,7.1,3.4Hz,1H),4.80(dt,J＝8.6,5.8Hz,1H),4.04(q,J＝7.1Hz,1H),3.69(d,J＝2.3Hz,6H),3.57-3.36(m,3H),3.29-3.05(m,2H),2.05(dd,J＝13.6,5.5Hz,1H),1.96(s,2H),1.73-1.50(m,3H),1.47-1.32(m,2H),1.30(d,J＝1.2Hz,3H),1.17(t,J＝7.2Hz,2H),0.75(d,J＝6.5Hz,3H),0.60(s,3H)。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ151.34(s)。MS:LCMS:计算的C51H56N3O8PSi,897.3574;在+Ve模式中观察:m/z:898.52[M+H];999.95[M+Et3N]。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ171.12,163.83,158.65,158.61,150.21,146.50,136.96,136.71,136.59,135.94,135.54,134.60,134.34,130.24,130.15,129.45,129.39,128.02,127.96,127.94,127.88,127.79,126.86,113.17,113.11,110.93,89.27,89.25,86.48,83.68,79.09,78.99,77.42,77.30,77.10,76.78,71.78,71.70,70.26,68.39,68.36,

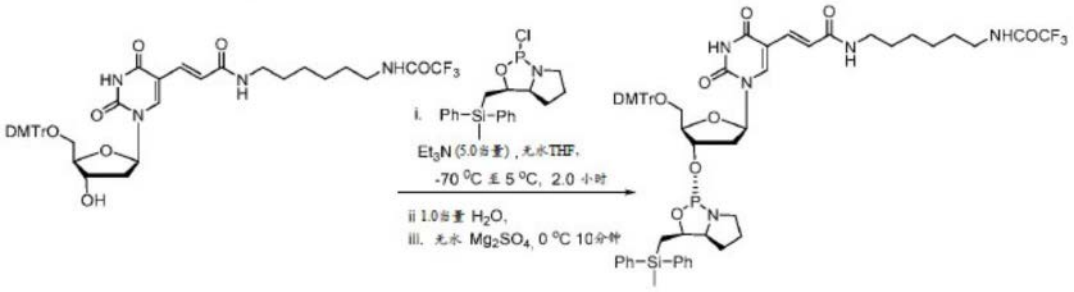
60.39,55.24,47.19,46.83,46.09,39.48,39.44,27.35,25.97,25.93,21.05,18.33,17.85,17.81,14.23,11.73,11.45。

[2079] 实施例7-7.L-DPSE-5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT亚酰胺的合成。

[2080] 

[2081] 将5'-(S)-C-Me-5'-OMT-dT(1.20g,2mmol)通过与20mL的无水甲苯在45℃下共蒸发干燥两次,并在高真空下保持过夜。然后将干燥的5'-(S)-C-Me-5'-OMT-dT在氩气下于100mL三颈烧瓶中溶解在干燥THF(20mL)中,之后添加三乙胺(1.4mL,10mmol),并将混合物冷却至-40℃。通过注射器向此冷却的混合物中逐滴加入来自储备液的粗L-DPSE-NOPCl(3mmol,1.5当量,在THF 3.0mL中)的溶液~5分钟(保持内部温度-40℃,然后逐渐温热至5℃)。在5℃下30分钟后,TLC和LC-MS分析表明SM完全转化为产物(总反应时间1.5小时)。将反应混合物在冰浴中冷却,并通过添加水(0.036mL,2mmol)将反应淬灭。将混合物搅拌10分钟,之后添加无水$MgSO_4$(0.3g,2mmol)。将反应通过无气Schlenk滤管过滤,并且用干燥THF(20mL)洗涤。将溶剂在28℃下在旋转蒸发下蒸发,以提供灰白色固体,将其在高真空下干燥过夜。将干燥的粗产物通过使用40g硅胶柱(用3个柱体积的乙酸乙酯与5%TEA将其预失活)的Combi-Flash Rf(Teledyne ISCO)进行纯化,使用含有5%TEA的乙酸乙酯/己烷混合物作为溶剂。柱纯化之后,将馏分通过TLC和LC-MS进行分析,并合并在一起,并且在28℃下在旋转蒸发仪中进行蒸发。将残余物在高真空下干燥,以得到作为白色固体的L-DPSE-5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT亚酰胺。产率:1.27g(70%)。^{31}PNMR(162MHz,$CDCl_3$)δ149.73(s)。MS:LC-MS;计算的:C51H56N3O8PSi,897.3574;在+Ve模式中观察:m/z:898.56[M+H]。

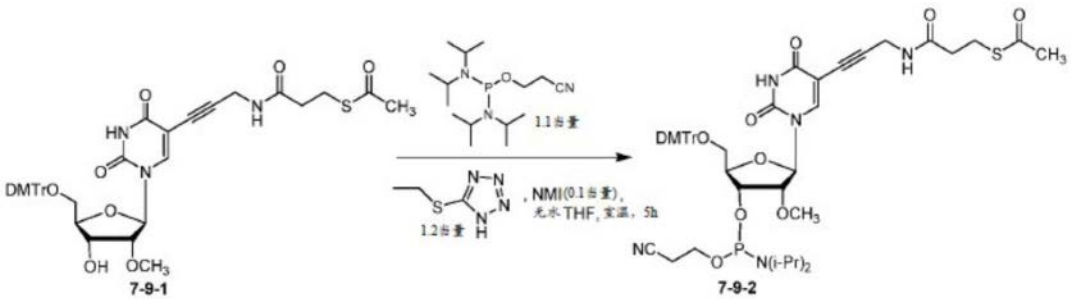
[2082] 实施例7-8.L-DPSE-5'-DMT-5-C6-氨基接头亚磷酰胺的合成—通过核碱基掺入所需部分。

[2083] 

[2084] 将5'-DMT-5-C6氨基TFA-dT(25g,31.5mmol,来自Berry&Associates Inc)通过与

100mL的无水甲苯在45℃下共蒸发干燥两次,并在高真空下保持过夜。然后将干燥物质在氩气下于500mL三颈烧瓶中溶解在干燥THF(100mL)中,之后添加三乙胺(21.92mL,157mmol),并且然后冷却至-70℃。通过注射器向此冷却的混合物中逐滴加入来自储备液的粗L-DPSE-NOPCl(44mmol,1.4当量,在THF 44mL中)的溶液(~15分钟,保持内部温度-60℃至-50℃)。将混合物逐渐温热至5℃。在5℃下30分钟后,TLC和LC-MS分析表明SM完全转化为产物(总反应时间2小时)。将反应混合物在冰浴中冷却,并通过添加水(0.56mL,31.5mmol)淬灭并搅拌10分钟,之后加入无水Mg_2SO_4(3.8g,31.5mmol)。将反应通过无气Schlenk滤管过滤,用干燥THF(80mL)洗涤,并在28℃下在旋转蒸发下蒸发,以得到作为灰白色固体的粗产物,将所述粗产物在高真空下干燥过夜。将干燥的粗产物通过使用220硅胶柱(用3个柱体积的乙酸乙酯与5%TEA将其预失活)的Combi-Flash Rf(Teledyne ISCO)进行纯化,使用含有5%TEA的乙酸乙酯/已烷混合物作为溶剂。柱纯化之后,将馏分通过TLC和LC-MS分析,并合并在一起。将溶剂在旋转蒸发仪中在28℃下蒸发,并将残余物在高真空下干燥,以得到作为白色固体的产物。产率:30g(88%)。MS:LC-MS;计算的:C60H67F3N5O10PSi,1133.4347;在+Ve模式中观察:1235.55(M+Et3N)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.78(s,1H),7.40(ddd,J=9.8,6.5,2.2Hz,5H),7.32(d,J=7.3Hz,2H),7.30-7.09(m,15H),6.99(d,J=15.5Hz,1H),6.76(dd,J=8.9,2.7Hz,4H),6.54(d,J=15.5Hz,1H),5.12(t,J=6.1Hz,1H),4.66-4.49(m,2H),4.04(q,J=7.1Hz,1H),3.81(q,J=3.0Hz,1H),3.67(s,6H),3.41(ddt,J=14.8,10.2,7.7Hz,1H),3.30-3.13(m,4H),3.12-2.91(m,4H),1.96(s,2H),1.92-1.69(m,2H),1.58(ddt,J=15.1,11.6,8.0Hz,1H),1.50-1.29(m,5H),1.18(tq,J=15.8,8.8,8.0Hz,9H),0.52(s,3H)。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ150.88(s)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ171.18,165.77,161.89,158.76,158.74,157.85,157.49,157.12,156.76,149.17,144.52,139.69,136.68,135.86,135.53,135.44,134.54,134.30,131.15,129.97,129.89,129.44,129.38,128.09,127.93,127.91,127.18,122.36,120.31,117.44,114.58,113.42,113.39,111.72,110.53,86.65,86.04,86.02,85.67,79.28,79.19,77.42,77.31,77.11,76.79,73.20,73.12,68.05,68.02,63.09,60.41,55.27,46.96,46.60,45.81,40.48,39.56,38.88,29.33,28.52,27.23,25.83,21.04,17.55,17.52,14.20。

[2085] 实施例7-9.5-炔基硫代乙酸酯-5'-DMT-3'CNE-2'OMe-U亚酰胺的合成。

[2086] 

[2087] 将化合物7-9-1(5.0g,6.72mmol)与无水甲苯共蒸发两次(40mL x2),并在高真空下干燥过夜。将干燥的黄色固体在氩气下溶解在无水THF(14ml,~0.5mmol/mL)中,并向溶液中加入5-乙硫基-1H-四唑(1.05g,8.07mmol)、N-甲基咪唑(0.045g,0.044mL,0.67mmol),之后加入2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(2.23g,2.34mL,7.39mmol)。将反应混合物在室温下在氩气下搅拌5小时。(溶剂体系:40%CH_3CN/EtOAC/5%TEA)用上述溶剂体系

预平衡的TLC表明反应在5小时内完成,这也被LC-MS确认。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释,并将溶液转移至分液漏斗,用水性饱和的$NaHCO_3$溶液(40mL)洗涤,并经无水Mg_2SO_4干燥。将干燥的溶液在浴温28℃下在旋转蒸发下蒸发,以得到作为灰黄色固体的粗产物,将所述粗产物在高真空下进一步干燥过夜。将干燥的粗产物在使用80g闪蒸硅胶柱的Combi-Flash Rf(Teledyne ISCO)中进行纯化,所述硅胶柱用2个柱体积(CV 125mL,60mL/min)乙酸乙酯与5%TEA预失活,之后用20%EtOAc/已烷平衡2个柱体积。使用含有5%TEA的已烷/EtOAc/CH3CN混合物作为溶剂体系来纯化化合物。纯化之后,通过TLC和LC-MS分析柱馏分。将所需的馏分合并在一起,并在旋转蒸发仪中在28℃下蒸发,并在高真空下干燥,得到作为白色固体的7-9-2-CNE亚酰胺。产率:4.8g(76%)。MS:LC-MS;计算的:C48H58N5O11PS,943.35;在+Ve模式中观察:m/z 1045.92(M+Et3N)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.36-8.07(m,1H),7.47-7.09(m,10H),6.78(dt,J=9.1,3.8Hz,4H),5.87(dd,J=26.6,3.1Hz,1H),4.73(d,J=14.9Hz,1H),4.57-4.30(m,1H),4.21-4.00(m,2H),3.86-3.32(m,17H),3.23(ddd,J=13.0,11.2,2.5Hz,1H),2.91(td,J=7.0,2.4Hz,2H),2.54(q,J=6.1Hz,1H),2.27(d,J=24.2Hz,4H),1.96(d,J=7.1Hz,3H),1.21-0.82(m,14H)。^{31}P NMR(162MHz,$CDCl_3$)δ150.60(s),150.24(s)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ195.80,169.61,161.45,158.70,158.68,149.06,144.75,144.61,142.82,135.67,135.58,135.48,135.38,130.18,130.16,130.12,128.14,128.11,128.09,128.02,127.01,117.69,117.53,113.42,113.38,113.34,99.60,99.33,88.98,88.95,88.50,88.06,87.06,86.85,83.89,82.99,82.62,77.34,77.22,77.02,76.70,74.55,74.40,69.74,69.62,62.04,61.26,60.38,58.97,58.59,58.47,58.45,57.89,57.68,55.34,55.31,43.33,43.21,35.44,35.41,30.54,29.95,24.71,24.65,24.63,24.58,24.56,24.49,21.04,20.50,20.43,20.38,20.31,14.20。

[2088] 如本领域技术人员容易了解的,根据本公开,化合物7-9-2可以作为亚磷酰胺用于寡核苷酸合成,从而将受保护的硫醇基掺入寡核苷酸中。去保护之后,根据本公开,通过形成一个或多个二硫键,游离硫醇基可用于连接寡核苷酸单体以形成多聚体。

[2089] 如本领域普通技术人员所了解的,根据本公开,许多技术(例如化学方法、试剂、接头、方法等)可用于制备寡核苷酸(包括具有各种5'-末端结构的那些寡核苷酸),并且用于将各种化学部分(例如,碳水化合物部分、脂质部分、靶向部分等)掺入寡核苷酸中,所述技术例如但不限于以下中描述的技术:WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555和WO/2017/062862。本文描述了用于制备寡核苷酸(包括包含各种部分的那些寡核苷酸)的示例性技术。

[2090] 如表61至73所示,构建并测试了各种寡核苷酸介导(包括在体外)PNPLA3敲低的能力。不希望受任何理论的束缚,本公开表明表61至73中的至少一些寡核苷酸可能能够介导通过RISC介导的ssRNAi机制的敲低。此外,这些表中的一些寡核苷酸具有杂交格式。此外,本文所述的至少一些寡核苷酸能够以等位基因特异性方式介导PNPLA3的敲低。

[2091] 表61.表61示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外功效。测试的寡核苷酸是:WV-4054和WV-4098。在纯合野生型(PNPLA3中的I/I aa)的Hep3B(I/I)细胞中以及在纯合突变型(PNPLA3中的M/M aa)的Huh7细胞中测试寡核苷酸。WV-4054在Huh7细胞中的IC50为0.239nM;并且WV-4098在Huh7细胞中的IC50为0.158nM。寡核苷酸WV-4054和WV-4098的长度

不同,但都能够介导PNPLA3的等位基因特异性敲低。WV-4098通过RNA干扰机制介导敲低的能力得到了以下发现的支持:AGO-2的CRISPR敲除(RNA干扰所必需)阻止WV-4098敲低基因表达的能力,而AGO-1、AGO-3和AGO-4的敲除(RNA干扰不需要)不会(数据未示出)。

[2092] 表61.寡核苷酸的活性。

[2093]

浓度(exp 10) (nM)	WV-4054-Hep3b		WV-4054-Huh7	
0.796	1.226	1.121	0.280	0.449
0.495	0.910	1.010	0.478	0.402
0.194	1.068	1.024	0.419	0.367
-0.107	0.843	1.160	0.405	0.449
-0.408	0.976	0.942	0.422	0.584
-0.709	0.798	0.917	0.750	0.601
-1.010	0.832	1.038	0.798	0.755
-1.612	1.053	0.923	0.969	0.792
-2.214	0.956	0.929	0.809	0.798

[2094] 表62.表62示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-2477(阳性对照)、WV-3380(阳性对照)、WV-4018、WV-4019、WV-4020、WV-4021、WV-4022、WV-4023、WV-4024和WV-4025,每个在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh)细胞中进行测试。使用Lipofectamine®2000转染试剂(ThermoFisher,Grand Island,NY)递送用于PNPLA3测定的寡核苷酸。在此表和其他表中,在2、8.25和33nM的浓度下测试寡核苷酸。

[2095] 表62.寡核苷酸的活性。

[2096]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4018-Hep	61.1	47.0		94.0	72.7	65.5
WV-4018-Huh	43.4	46.9	61.8	51.6	63.6	66.7
WV-4019-Hep	75.3	88.3	117.3	119.7	84.7	79.6
WV-4019-Huh	67.7	68.1	77.7	77.2	67.7	74.0
WV-4020-Hep	74.7	68.8	87.1	92.7	52.1	59.5
WV-4020-Huh	70.0	81.6	71.0	91.2	54.6	77.2
WV-4021-Hep	64.6	81.2	76.8	85.9	45.4	56.6
WV-4021-Huh	68.6	64.0	69.1	69.6	64.0	68.1
WV-4022-Hep	66.0	75.3		97.3	56.3	62.9
WV-4022-Huh	49.5	62.7	63.6	58.9	58.1	77.2
WV-4023-Hep	62.9	90.8	76.3	79.6	46.7	47.6
WV-4023-Huh	70.5	66.7	71.5	75.1	64.0	67.7
WV-4024-Hep	74.7	77.4	99.3	100.7	54.7	75.8
WV-4024-Huh	70.0	63.1	104.0	91.2	79.9	88.7
WV-4025-Hep	61.1	65.5	65.5		83.5	55.1
WV-4025-Huh	58.9	71.5	69.1	66.3	79.9	63.6

[2097] 表63.表63示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-2477(阳性对照)、WV-3380(阳性对照)、WV-4026、WV-4027、WV-4028、WV-4029、WV-4030、WV-4031、WV-4032和WV-4033,每个在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh)细胞中进行测试。

[2098] 表63.寡核苷酸的活性。

[2099]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4026-Hep		104.2	115.7	105.7	103.5	86.5
WV-4026-Huh	74.0	76.1	84.5	70.5	71.5	68.1
WV-4027-Hep	64.6	76.3	71.2	77.4	39.0	51.1

[2100]

WV-4027-Huh	69.1	75.1	55.7	69.1	60.1	61.4
WV-4028-Hep	79.0	71.2	102.8	107.2	70.2	53.6
WV-4028-Huh	74.0	70.0	64.5	65.4	83.9	76.7
WV-4029-Hep	79.6	87.7	81.8	100.0	57.8	79.6
WV-4029-Huh		74.0	74.6	79.4	116.2	102.6
WV-4030-Hep		85.9	93.3	105.0	68.8	80.1
WV-4030-Huh	51.6	67.7	75.1	69.1	71.5	
WV-4031-Hep	85.9	101.4	104.2	122.3	51.1	56.3
WV-4031-Huh	73.5	72.0	100.4	91.2	95.7	95.0
WV-4032-Hep	78.5	73.7		121.4	51.8	62.0
WV-4032-Huh	81.0	82.2	100.4	105.4	107.7	124.5
WV-4033-Hep	84.1	85.3	100.0		83.5	83.5
WV-4033-Huh	52.4	38.9	57.3	59.7	107.7	81.0

[2101] 表64.表64示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-2477(阳性对照)、WV-3380(阳性对照)、WV-4034、WV-4035、WV-4036、WV-4037、WV-4038、WV-4039、WV-4040、WV-4041,每个在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh)细胞中进行测试。

[2102] 表64.寡核苷酸的活性。

[2103]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4034-Hep	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
WV-4034-Huh	73.0	76.7	91.2	78.8	101.1	119.4
WV-4035-Hep	81.8	77.4	92.7	104.2	57.8	84.7
WV-4035-Huh	75.1	81.6	82.2	63.1	101.1	115.4
WV-4036-Hep	76.3	77.4	82.9	77.4	49.7	54.0
WV-4036-Huh	74.6	75.1	72.5	67.2	75.6	87.4
WV-4037-Hep	79.6	68.3	75.8	97.3	80.7	72.7
WV-4037-Huh	69.6	82.7	76.7	87.4	94.4	81.0
WV-4038-Hep	64.2	71.2	74.2	97.9	83.5	83.5
WV-4038-Huh	69.1	85.1	78.3	67.2	86.8	69.6
WV-4039-Hep	69.3	70.2	46.0	77.9	48.6	45.7
WV-4039-Huh	63.1	79.9	64.0	58.9	61.0	50.6
WV-4040-Hep	74.2	67.8	92.7	75.8	50.0	59.9
WV-4040-Huh	88.0	70.0	73.5	78.3	71.0	66.3
WV-4041-Hep	77.4	75.8	82.9	95.9	61.1	60.7
WV-4041-Huh	99.1	93.7	83.9	82.7	67.2	61.0

[2104] 表65.表65示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-3380(阳性对照)、WV-2477(阳性对照)、WV-4042、WV-4043、WV-4044、WV-4045、WV-4046、WV-4047、WV-4048和WV-4049,每个在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh)细胞中进行测试。

[2105] 表65.寡核苷酸的活性。

[2106]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1
WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4042-Hep	63.8	67.5	86.6	72.8	49.0	49.4
WV-4042-Huh		66.2		48.4	25.4	28.2
WV-4043-Hep	64.3	60.8	83.6	68.4	52.9	41.8
WV-4043-Huh	48.4	64.8	48.4	56.8	47.1	52.6
WV-4044-Hep	70.8	66.5	83.0	73.3	20.6	33.7
WV-4044-Huh	86.7	109.0	72.9	81.4	38.5	33.3
WV-4045-Hep	86.0	80.2	100.8	103.0	44.8	42.1
WV-4045-Huh	81.4	79.2	80.9	76.5	45.2	62.6
WV-4046-Hep	117.4	96.7	92.1	82.5	24.9	22.9
WV-4046-Huh	83.7	73.9	71.9	56.4	44.6	41.9
WV-4047-Hep	86.0	76.4	98.8	111.1	53.3	51.8
WV-4047-Huh	63.5	94.2	78.7	71.9	56.0	38.0
WV-4048-Hep	79.1	70.3	95.4	98.8	37.4	27.2
WV-4048-Huh	93.6	76.5	81.4	81.4	46.5	44.9
WV-4049-Hep		107.3	107.3	111.9	36.1	55.9
WV-4049-Huh	87.3	98.2	88.5	89.7	62.6	62.2

[2107] 表66.表66示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷

酸是:WV-2477(阳性对照)、WV-3380(阳性对照)、WV-4050、WV-4051、WV-4052、WV-4053、WV-4054、WV-4055、WV-4056、WV-4057,每个在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh)细胞中进行测试。

[2108] 表66.寡核苷酸的活性。

[2109]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1

[2110]

WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4050-Hep	71.8	75.9	98.8	75.9	54.8	55.2
WV-4050-Huh	69.0	80.9	63.0	57.6	46.8	57.6
WV-4051-Hep	73.8	80.8	92.8	69.4	40.4	59.1
WV-4051-Huh	67.1	74.9	54.9	58.8	47.4	37.5
WV-4052-Hep	79.1	77.0	113.4	97.4	51.5	44.8
WV-4052-Huh	67.1	67.1	84.9	80.3	75.5	52.6
WV-4053-Hep	89.0	69.8	100.0		63.4	57.1
WV-4053-Huh	56.0	64.3	76.0	68.0	84.3	59.2
WV-4054-Hep	100.0	100.0	100.0	100.0	106.6	111.9
WV-4054-Huh	30.6	31.7		38.8	53.0	47.8
WV-4055-Hep	92.1	105.8	100.0		58.7	72.3
WV-4055-Huh	69.9	80.9	95.5	81.4	77.6	71.9
WV-4056-Hep	86.6	81.3		116.6	54.0	65.6
WV-4056-Huh	84.9		78.7	101.0	62.2	76.5
WV-4057-Hep	105.8	95.4	110.3	105.1	46.1	50.8
WV-4057-Huh	87.9	79.8	107.5	92.3	72.9	50.5

[2111] 表67.表67示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-2477(阳性对照)、WV-3380(阳性对照)、WV-4058、WV-4059、WV-4060、WV-4061、WV-4062、WV-4063、WV-4064和WV-4065。寡核苷酸在Hep3B(Hep)和Huh7(Huh-7或Huh或P-Huh7或P-Huh-7)细胞中进行测试。

[2112] 表67.寡核苷酸的活性。

[2113]

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
对照	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1
WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4058-Hep	67.0	78.0	73.3	62.5	67.0	56.3
WV-4058-Huh	73.9	79.8	86.7	70.9	55.6	59.6
WV-4059-Hep	64.7	70.3	74.8	53.7	74.3	63.4
WV-4059-Huh	74.4	63.0	65.7	74.4	44.3	43.9
WV-4060-Hep	80.8	68.9		107.3	43.0	63.4
WV-4060-Huh	77.6	39.9	72.9	66.2	66.6	79.2
WV-4061-Hep	115.8	93.4		108.8	57.5	66.1
WV-4061-Huh	70.9	60.0	87.9	68.0	61.7	70.4

[2114]

WV-4062-Hep	97.4	91.5	111.9		78.0	59.5
WV-4062-Huh		81.4	94.2	83.2	101.7	82.6
WV-4063-Hep	86.6	82.5	98.1	119.9	47.0	54.0
WV-4063-Huh		79.2	76.5	77.6	58.8	75.5
WV-4064-Hep	72.8	83.6	111.1	91.5	61.2	56.3
WV-4064-Huh	71.4	59.2	53.4	52.6	50.1	66.2
WV-4065-Hep	109.6	107.3	87.2	101.5	33.7	68.4
WV-4065-Huh	92.3	86.1	89.1	97.5	67.1	76.0

[2115] 表68.表68示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能。测试的寡核苷酸是：WV-4098、WV-7462、WV-7464、WV-7467和WV-7469。

[2116] 表68.寡核苷酸的活性。

[2117] 提供了寡核苷酸的浓度(Conc.)。还提供了所使用的细胞和所使用的寡核苷酸。数字表示PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1)，其中100将表示100％mRNA水平(无敲低)，并且0将表示0％mRNA水平(或100％敲低)。示出了来自重复实验的数据。

[2118] 第1部分.在Hep3B细胞中的活性。

[2119]

浓度	WV-4098		WV-7462		WV-7464	
0.006	97.9	94.5	112.3	100.9	106.4	107.3
0.025	134.1	100.9	96.2	87.9	155.5	99.2
0.01	99.5	97.9	92.5	95.0	108.9	109.4
0.4	84.4	94.2	74.2	90.5	96.5	105.6
1.6	88.3	84.4	99.6	82.4	80.8	97.0
6.25	131.4	137.0	120.3	142.1	81.2	121.1

[2120]

浓度	WV-7467		WV-7469	
0.006	103.9	105.9	93.9	100.7
0.025	99.9	108.8	97.4	84.9
0.01	91.0	106.0	90.8	107.1
0.4	100.5	100.1	75.8	81.1
1.6	83.8	82.0	76.0	72.5
6.25	100.0	100.3	77.0	82.8

[2121] 第2部分.在Huh7(P-Huh7)细胞中的活性。

[2122]

浓度	WV-4098		WV-7462		WV-7464	
0.006	105.8	115.7	129.8	116.1	110.5	131.0
0.025	102.1	105.0	110.0	94.3	116.6	127.3
0.01	77.2	95.8	93.3	72.8	79.1	104.5
0.4	83.8	65.4	66.2	66.4	93.8	54.2
1.6	40.8	54.7	50.9	46.1	58.1	45.0
6.25	43.0	34.2	49.8	32.9	48.9	34.3

[2123]

浓度	WV-7467		WV-7469	
0.006	109.2	129.2	86.0	87.3
0.025	99.9	107.2	90.5	102.1
0.01	73.3	63.7	72.0	65.6
0.4	88.0	66.7	54.0	46.2
1.6	49.1	33.4	41.2	28.6
6.25	48.5	38.8	32.0	28.5

[2124] 表69.表69A和B示出了靶向PNPLA3的不同单链RNAi剂的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:表69A,WV-4098、WV-4075、WV-7465、WV-7466和WV-7468;以及表69B,WV-3380、WV-4098和WV-7469。

[2125] 表69A.寡核苷酸的活性。

[2126] 提供了寡核苷酸的浓度(Conc.)。还提供了所使用的细胞和所使用的寡核苷酸。数字表示PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),其中100将表示100%mRNA水平(无敲低),并且0将表示0%mRNA水平(或100%敲低)。示出了来自重复实验的数据。

[2127] 第1部分.在Hep3B细胞中的活性。

[2128]

浓度	WV-4098		WV-4075		WV-7463	
0.006	97.9	94.5	77.4	80.1	90.8	106.9
0.025	134.1	100.9	91.1	109.1	119.9	97.2
0.01	99.5	97.9	85.3	86.6	106.7	90.9
0.4	84.4	94.2	83.1	95.8	79.4	86.3
1.6	88.3	84.4	110.5	112.5	127.0	112.5
6.25	131.4	137.0	115.8	135.8	148.7	164.1

[2129]

浓度	WV-7465		WV-7466		WV-7468	
0.006	101.1	102.2	124.3	98.9	97.9	97.0
0.025	118.5	116.3	140.4	121.2	118.1	112.1
0.01	102.0	110.0	126.4	113.2	100.2	88.8
0.4	131.3	132.4	112.0	139.2	92.7	96.6
1.6	108.2	95.5	102.5	98.1	83.9	97.7
6.25	98.1	107.2	126.6	128.5	120.7	134.7

[2130] 第2部分.在Huh7细胞中的活性。

[2131]

浓度	WV-4098		WV-4075		WV-7463	
0.006	105.8	115.7	111.3	119.4	116.9	131.9
0.025	102.1	105.0	101.8	95.8	116.9	119.4
0.01	77.2	95.8	96.5	94.1	95.3	77.9
0.4	83.8	65.4	85.9	81.0	62.6	50.7
1.6	40.8	54.7	58.6	67.8	50.1	45.6
6.25	43.0	34.2	70.8	57.7	60.0	67.1

[2132]

浓度	WV-7465		WV-7466		WV-7468	
0.006	119.6	126.5	100.1	124.8	69.3	95.2
0.025	114.8	111.8	95.0	106.6	69.8	84.9
0.01	104.9	101.4	50.1	61.3	54.2	48.5
0.4	84.5	64.3	64.1	43.3	55.5	38.1
1.6	55.3	55.2	40.2	35.3	37.4	33.5
6.25	79.4	57.3	50.2	46.5	60.3	41.4

[2133] 表69B.寡核苷酸的活性。

[2134] 提供了寡核苷酸的浓度(Conc.)。还提供了所使用的细胞和所使用的寡核苷酸。数字表示PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),其中100将表示100%mRNA水平(无敲低),并且0将表示0%mRNA水平(或100%敲低)。示出了来自重复实验的数据。

[2135]

浓度	Hep3B-WV3380		Huh7-WV-3380	
0.006	83.9	88.2	87.5	101.8

[2136]

0.025	92.3	88.7	90.1	105.4
0.01	75.3	70.6	75.5	
0.4	40.2	49.4	79.1	69.3
1.6	22.6	20.8	52.2	52.2
6.25	5.3	4.4	18.6	15.5

[2137]

浓度	Hep3B-WV-4098		Huh7-WV-4098	
0.006	97.9	94.5	105.8	115.7
0.025	134.1	100.9	102.1	105.0
0.01	99.5	97.9	77.2	95.8
0.4	84.4	94.2	83.8	65.4
1.6	88.3	84.4	40.8	54.7
6.25	131.4	137.0	43.0	34.2

[2138]

浓度	Hep3B-WV-7469		Huh-WV-7469	
0.006	93.9	100.7	86.0	87.3
0.025	97.4	84.9	90.5	102.1
0.01	90.8	107.1	72.0	65.6
0.4	75.8	81.1	54.0	46.2
1.6	76.0	72.5	41.2	28.6
6.25	77.0	82.8	32.0	28.5

[2139] 表69C示出了大鼠肝匀浆稳定性测定(24小时)。测试的寡核苷酸是:WV-4098、WV-7463、WV-7462、WV-7316、WV-4075、WV-7469、WV-7464、WV-7468、WV-7467、WV-7466、WV-7465。

[2140] 表69C.寡核苷酸的稳定性。

[2141] 数字表示用大鼠肝匀浆处理24小时后剩余的全长寡核苷酸的百分比。100将表示剩余的全长寡核苷酸的100%;0将表示剩余的全长寡核苷酸的0%。不同的寡核苷酸具有不同数量的立体控制的硫代磷酸酯核苷酸间键联。示出了来自重复实验的数据。

[2142]

WV-4075			WV-4098			WV-7316		
23.5	23.5	24.3	19.2	18.3	17.4	16.8	18.7	18.3

[2143]

WV-7462			WV-7463			WV-7464		
21.1	20.7	21.4	15.0	16.2	15.4	45.7	43.6	45.8
WV-7465			WV-7466			WV-7467		
85.6	86.1	87.6	65.2	69.6	69.8	54.7	57.1	56.0

[2144]

WV-7468			WV-7469		
55.7	55.6	50.0	43.0	45.0	41.8

[2145] 表70.表70示出了不同单链RNAi剂的IC50。测试的寡核苷酸是:Huh7和Hep3B细胞中的WV-2477、WV-4054和WV-3387。WV-2477在两种细胞中均未显著敲低PNPLA3。WV-4054具有与一对SNP rs738408T和rs738409G互补的序列,并且能够介导针对包含这两个SNP的细胞(Huh7)的等位基因特异性RNA干扰。此寡核苷酸在不包含这些SNP而是具有rs738408C和rs738409C的不同细胞(Hep3B)中在测试浓度下不会介导显著的RNAi干扰。此外,单链RNAi

剂WV-4098在测试浓度下还能够敲低互补序列(在Huh7细胞中具有SNP rs738408T和rs738409G),但不能敲低非互补序列(在Hep3B细胞中具有SNP rs738408C和rs738409C)。

[2146] 表70.寡核苷酸的IC50。

[2147]

测试的寡核苷酸-细胞	IC50(nM)	95%CI
WV-4054-Hep3b	NA	---
WV-4054-Huh7	0.239	0.15至0.38
WV-4098-Hep3b	NA	----
WV-4098-Huh7	0.158	0.10至0.22

[2148] 表71.表71A至71D示出了立体控制的(例如手性控制的)寡核苷酸(例如单链RNAi剂)的格式的非限制性实例。

[2149] 表72.表72示出了ssRNAi WV-4054在原代食蟹猴肝细胞中的体外效能。

[2150] 表74.表74示出了在Hep3B 24小时测定中,反义寡核苷酸在RNA酶H介导的PNPLA3的敲低中的功效。测试的寡核苷酸是:WV-1868(阴性对照)、WV-3367、WV-3368、WV-3369、WV-3370、WV-3371、WV-3372、WV-3373、WV-3374、WV-3375、WV-3376、WV-3377、WV-3378、WV-3379和WV-3380。WV-1868是一种反义寡核苷酸(通过RNA酶H介导的敲低操作),而其他测试的寡核苷酸是RNAi剂。使用的细胞是PCH细胞。

[2151] 表73.表73示出了PNPLA3 ssRNAi剂WV-7467、WV-7469、WV-7466和WV-7468以及ASO WV-6825的结构。

[2152] 如表74至90所示,构建并测试了各种寡核苷酸介导(包括在体外)PNPLA3敲低的能力。不希望受任何理论的束缚,本公开表明表74至90中的至少一些寡核苷酸可能能够介导通过RNA酶H介导的机制的敲低。此外,这些表中的一些寡核苷酸具有杂交格式。

[2153] 表74.表74示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-1868和WV-3367至WV-3380。使用的细胞是Hep3B细胞。

[2154] 表74.寡核苷酸的活性。

[2155]

Wave ID	2.0nM	8.2nM	33nM
对照	.96	1.08	1.13
WV-1868	1.18	1.06	.85
WV-3367	1.07	1.04	.77
WV-3368	1.17	.96	.58
WV-3369	1.12	.98	1.03
WV-3370	1.23	.88	.67
WV-3371	1.24	1.19	.65
WV-3372	1.08	1.17	1.05
WV-3373	1.22	1.14	1.15
WV-3374	1.19	.99	.76
WV-3375	1.14	1.0	.63
WV-3376	1.14	.72	.39
WV-3377	.92	.52	.12
WV-3378	1.07	.48	.15

WV-3379	1.18	.45	.16
WV-3380	.31	.12	.06

[2156] 表75.表75示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-1868和WV-3381至WV-3394。

[2157] 表75.寡核苷酸的活性。

[2158]

Wave ID	2.0nM	8.2nM	33nM
对照	.95	1.07	1.12
WV-1868	1.18	1.07	.85
WV-3381	.48	.11	.18
WV-3382	.99	.33	.18
WV-3383	1.02	.55	.31
WV-3384	1.16	.42	.13
WV-3385	1.03	.42	.18
WV-3386	.57	.22	.23
WV-3387	.23	.08	.11
WV-3388	1.08	.95	1.03
WV-3389	1.07	1.15	.79
WV-3390	.63	.25	.05
WV-3391	.46	.18	.14
WV-3392	.42	.13	.08
WV-3393	.33	.11	.05
WV-3394	.46	.20	.10

[2159] 表76.表76A和B示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:表76A,WV-1868和WV-3395至WV-3408;表76B,WV-1868和WV-3409至WV-3422。

[2160] 表76A.寡核苷酸的活性。

[2161]

Wave ID	**2.0 nM**	**8.2 nM**	**33 nM**
对照	.96	1.07	1.12
WV-1868	1.18	1.06	.85
WV-3395	.33	.28	.33
WV-3396	1.02	.51	.23
WV-3397	.83	.37	.14
WV-3398	1.07	.22	.06
WV-3399	.4	.22	.26
WV-3400	.87	.52	.18
WV-3401	1.09	.43	.12
WV-3402	.37	.12	.06
WV-3403	1.2	1.08	.92
WV-3404	.29	.15	.25
WV-3405	.86	.33	.21
WV-3406	1.18	1.26	1.14

[2162]

WV-3407	.95	.56	.23
WV-3408	.31	.15	.21

[2163] 表76B.寡核苷酸的活性。

[2164]

Wave ID	2.0nM	8.2nM	33nM
对照	.96	1.07	1.12
WV-1868	1.17	1.06	.85
WV-3409	.6	.31	.45
WV-3410	.89	.23	.19
WV-3411	.63	.12	.07
WV-3412	.87	.34	.08
WV-3413	.85	.31	.05
WV-3414	1.07	.75	.32
WV-3415	1.02	.25	.44
WV-3416	.55	.28	.25
WV-3417	.68	.23	.31
WV-3418	.55	.15	.28
WV-3419	.81	.63	.38
WV-3420	1.12	.87	.27
WV-3421	.48	.17	.23
WV-3422	1.01	.6	.38

[2165] 表77.表77示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-1868和WV-3423至WV-3436。

[2166] 表77.寡核苷酸的活性。

[2167]

Wave ID	2.0nM	8.2nM	33nM
对照	1.05	1.15	1.03
WV-1868	1.07	1.07	1.03
WV-3423	.62	.42	.3
WV-3424	.69	.4	.2
WV-3425	1.02	.68	.35
WV-3426	.92	.46	.37
WV-3427	.87	.74	.6
WV-3428	1.08	.88	.97
WV-3429	1.02	.6	.37
WV-3430	1.13	.94	.48
WV-3431	.63	.38	.23
WV-3432	.97	.63	.31
WV-3433	.63	.26	.18
WV-3434	.81	.31	.2

WV-3435	.58	.33	.28
WV-3436	.93	.71	.5

[2168] 表78.表78示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-1868和WV-3437至WV-3450。

[2169] 表78.寡核苷酸的活性。

[2170]

Wave ID	2.0nM	8.2nM	33nM
对照	1.05	1.15	1.03
WV-1868	1.06	1.06	1.03
WV-3437	1.06	.54	.22
WV-3438	.93	.85	1
WV-3439	1.01	.75	.56
WV-3440	1.04	1.03	.67
WV-3441	1.16	.8	.38
WV-3442	1.03	.57	.29
WV-3443	.45	.25	.2
WV-3444	.65	.38	.23
WV-3445	1.18	.78	.42
WV-3446	.8	.45	.25
WV-3447	.86	.59	.25
WV-3448	.81	.52	.22
WV-3449	.74	.43	.2
WV-3450	.96	.95	.92

[2171] 表79.表79示出了在Hep3B 24小时测定中,反义寡核苷酸在RNA酶H介导的PNPLA3的敲低中的功效。测试的寡核苷酸是:WV-1868(对照)、WV-3451、WV-3452、WV-3453、WV-3454、WV-3455、WV-3456、WV-3457、WV-3458、WV-3459、WV-3460、WV-3461和WV-3462。WV-1868是一种反义寡核苷酸(通过RNA酶H介导的敲低操作),而其他测试的寡核苷酸是RNAi剂。

[2172] 表79.寡核苷酸的活性。

[2173]

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
对照	1.05	1.15	1.04
WV-1868	1.06	1.06	1.02
WV-3451	.97	.55	.24
WV-3452	1.01	.52	.18
WV-3453	.43	.19	.19
WV-3454	.51	.22	.1
WV-3455	.62	.35	.18

[2174]

WV-3456	.78	.52	.22
WV-3457	.74	.37	.11
WV-3458	.64	.28	.22
WV-3459	1.15	1.09	.9
WV-3460	.77	.4	.43
WV-3461	1.13	.54	.23
WV-3462	.93	.42	.2

[2175] 表81.表81示出了靶向PNPLA3的不同寡核苷酸的体外效能和IC_{50}。测试的寡核苷酸是:WV-2477(其通过RNA干扰介导的机制来敲低靶标)和WV-3387(其通过RNA酶H介导的敲低来敲低靶标)。

[2176] 表81.寡核苷酸的活性。

[2177]

浓度(nM)(exp 10)	WV-2477-Hep3b		WV-2447-Huh7		WV-3387-Hep3b		WV-3387-Huh7	
0.796	1.031		1.029	0.928	0.148	0.095	0.154	0.186
0.495		0.982		0.884	0.143	0.092	0.163	0.218
0.194	1.144	0.989	1.103	0.994	0.221	0.162	0.183	
-0.107	1.068	1.201	1.259	1.008	0.273	0.254	0.321	0.361
-0.408	1.193	1.075	0.947	1.111	0.350	0.385	0.515	0.490
-0.709	1.113	1.003		0.974	0.560	0.534	0.537	0.708
-1.010	1.193	1.010	0.866	0.902	0.644	0.704	0.652	0.974
-1.612		0.989	1.044	1.051	0.861	0.820	1.029	0.825
-2.214	1.185	0.976	0.954	1.051	0.929	0.956	0.947	0.866

[2178]

	IC50(nM)	95%CI
WV-2477-Hep3b	NA	---
WV-2477-Huh7	NA	---
WV-3387-Hep3b	0.205	0.16至0.254
WV-3387-Huh7	0.311	0.186至0.602

[2179] 表82.表82示出了在Hep3B测定中,反义寡核苷酸在RNA酶H介导的PNPLA3的敲低中的功效。测试的寡核苷酸是:WV-3380(阴性对照)、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3402、WV-3411、WV-3416、WV-3443和WV-3454。

[2180] 表82.寡核苷酸的活性。

[2181]

Wave ID	IC50(nM)
WV-3380	4.28
WV-3387	1.29
WV-3391	2.31
WV-3393	2.21
WV-3402	1.55
WV-3411	5.32
WV-3416	4.68

WV-3443	1.22
WV-3454	3.39

[2182] 表83.表83示出了Huh7细胞中PNPLA3的ASO的IC50。测试的寡核苷酸是:WV-3380、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3402、WV-3411、WV-3416、WV-3443和WV-3454。

[2183] 表83.寡核苷酸的活性。

[2184]

Wave ID	HEP3B IC50(nM)	Huh7 IC50(nM)
WV-3380	4.28	3.86
WV-3387	1.29	1.91
WV-3391	2.31	2.96
WV-3393	2.21	5.5
WV-3402	1.55	2.85
WV-3411	5.32	8.27
WV-3416	4.68	9.0
WV-3443	1.22	2.55
WV-3454	3.39	4.30

[2185] 表84.表84示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-3380、WV-3393、WV-3402、WV-3421、WV-3390、WV-3399、WV-3404、WV-3443、WV-3391、WV-3394、WV-3408、WV-3387和WV-3381。

[2186] 表84.寡核苷酸的IC50。

[2187]

Wave ID	**IC 50 nM**
WV-3380	1.5
WV-3393	1.1
WV-3402	1.7
WV-3421	1.4
WV-3399	0.77
WV-3404	1.6

[2188]

WV-3443	1.6
WV-3391	0.65
WV-3394	1.4
WV-3408	0.92
WV-3387	1.2
WV-3381	1.4

[2189] 表85.表85示出了PNPLA3的ASO的IC50。测试的寡核苷酸是:WV-3380、WV-3381、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3394、WV-3399、WV-3402、WV-3404、WV-3408、WV-3421和WV-3443。

[2190] 表85.寡核苷酸的IC50。

[2191] 寡核苷酸具有各种序列,并且位于PNPLA3的编码区段(CDS)或3'非翻译区(3'UTR)中。

[2192]

Wave ID	IC 50nM	位置

WV-3380	1.5	CDS
WV-3393	1.1	CDS
WV-3402	1.7	CDS
WV-3421	1.4	3'UTR
WV-3399	0.77	3'UTR
WV-3404	1.6	3'UTR
WV-3443	1.6	3'UTR
WV-3391	0.65	3'UTR
WV-3394	1.4	3'UTR
WV-3408	0.92	3'UTR
WV-3387	1.2	3'UTR
WV-3381	1.4	3'UTR

[2193] 表86.表86示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-3421、WV-3393、WV-3380和WV-3402。在表86和87所示的数据中,在食蟹猴细胞中测试具有人序列的寡核苷酸。椭圆表示错配,其中寡核苷酸序列与人序列匹配,但与食蟹猴序列具有错配。

[2194] 表86.寡核苷酸的活性。

[2195] 数字表示相对的PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/GAPDH)。1.0将表示100%mRNA水平或0%敲低;并且0.0将表示0.0%mRNA水平或100%敲低。数字是近似值,并且未包括误差线。对食蟹猴细胞进行体外处理。

[2196]

寡核苷酸	0nM	0.01nM	1nM	8nM	25nM
WV-3421	.99	.78	.52	.18	.12
WV-3380	1.01	1.12	.99	.55	.29
WV-3393	.99	1.02	.94	.48	.37
WV-3402	.96	1.01	.82	.56	.39

[2197] 表87.表87示出了PNPLA3的ASO的体外效能。测试的寡核苷酸是:WV-3404、WV-3399、WV-3443和WV-3421。

[2198] 表87.寡核苷酸的活性。

[2199] 数字表示相对的PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/GAPDH)。1.0将表示100%mRNA水平或0%敲低;并且0.0将表示0.0%mRNA水平或100%敲低。数字是近似值,并且未包括误差线。对食蟹猴细胞进行体外处理。

[2200]

寡核苷酸	0nM	0.01nM	1nM	8nM	25nM
WV-3404	1.01	.95	.81	.33	.36
WV-3443	1.01	1.07	1.14	.52	.39
WV-3399	1.04	.97	.83	.84	.80

[2201] 尽管不希望受任何特定理论的束缚,但是本公开指出,进一步的实验还提供了支持以下结论的附加数据:各种推定的单链RNAi剂实际上能够介导RNA干扰;以及被设计成能够通过RNA酶H介导的机制介导敲低的各种寡核苷酸实际上通过RNA酶H介导的机制介导敲低。不同靶标的PNPLA3寡核苷酸通过RNA酶H介导的机制指导敲低的发现支持以下想法,即具有相同或相似格式但具有PNPLA3且能够敲低PNPLA3的另一种寡核苷酸也可能通过RNA酶

H介导的机制指导敲低。

[2202] 在一项实验中,进行体外RNA酶H测定,其中APOC3寡核苷酸WV-1868(ASO,介导非PNPLA3基因APOC3的RNA酶H敲低机制)作为阳性对照,并且APOC3寡核苷酸WV-2110(单链RNAi剂)作为阴性对照。RNA分子WV-2372用作测试底物。在RNA酶H测定中,双重机制APOC3寡核苷酸WV-2111介导RNA酶H敲低(数据未示出)。

[2203] 在另一项实验中,进行了体外Ago-2测定(用于单链RNA干扰)。用另一种基因APOC3的单链RNAi剂进行这一测定,但其格式与针对PNPLA3寡核苷酸描述的各种格式相似或相同。不同靶标的PNPLA3寡核苷酸指导RNA干扰的发现支持以下想法,即具有相同或相似格式但具有PNPLA3且能够敲低PNPLA3的另一种寡核苷酸也可能通过指导RNA干扰来敲低PNPLA3。

[2204] RNA测试底物是WV-2372(APOC3)。在结果中,在APOC3寡核苷酸WV-1308和WV-2420存在的情况下,不存在表示RNA测试底物的条带,这表明这些寡核苷酸是能够介导RNA干扰的单链RNAi剂。使用各种对照:不存在阴性对照ASO WV-2134的底物;不存在阴性对照ASO WV-2134的底物,其不介导RNA干扰;不存在测试寡核苷酸WV-1308的底物;不存在测试寡核苷酸WV-2420的底物;仅底物;无底物,添加了WV-2134;以及无底物,添加了WV-1308(数据未示出)。

[2205] 在另一项实验中,在Hep3B细胞的3'RACE测定中,使用APOC3 mRNA作为测试底物,进行体外Ago-2测定(用于单链RNA干扰)。在测试寡核苷酸WV-3021的存在下,检测到APOC3 mRNA的切割产物,所述产物对应于mRNA在对应于WV-3021的位置10与11之间的切口的位点处的切割(数据未示出),所述结果与RNA干扰一致。还检测到人工切割产物。

[2206] 在其他实验中,双重机制(杂交格式)APOC3寡核苷酸WV-2111被证明能够通过RNA酶H和RNA干扰介导敲低。发现包含与APOC3寡核苷酸WV-2111的序列互补的序列GCUGGCCUCCCAAUAAAGCUGGACA的WV-2111的RNA底物在WV-2111的存在下在以下位置处被切割:GC/UGGC/C/U/CC/CAAUA//AAGCUGGACA,其中/表示在RNA酶H活性的典型位置的切割位点,并且//表示在Ago-2(RNA干扰)活性的典型位置的切割位点。这些数据支持WV-2111同时通过RNA酶H和RNA干扰机制介导敲低的想法。

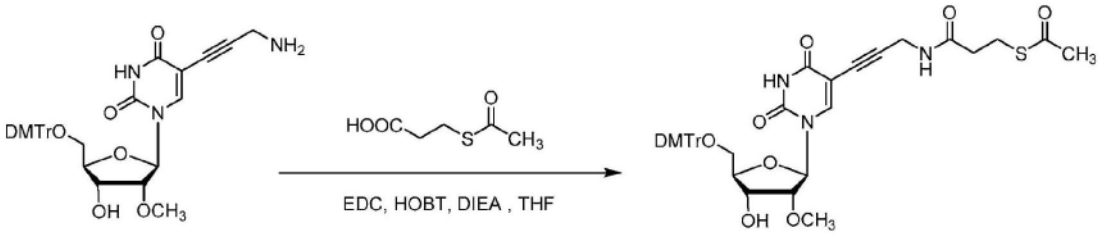
[2207] 还发现若干种寡核苷酸能够在Ago-2体外测定中介导RNA干扰。RNA测试底物是APOC3寡核苷酸WV-2372;在APOC3寡核苷酸WV-1308、WV-2114、WV-2386或WV-2387(每个单独测试)的存在下,此底物消失,表明这些寡核苷酸中的每个能够充当介导RNA干扰的单链RNAi剂。

[2208] 尽管不希望受任何特定理论的束缚,但本公开表明,本文中指定为单链RNAi剂的至少一些寡核苷酸通过RISC(RNA干扰沉默复合物)介导敲低;然而,在至少一些实验中,本文中指定为单链RNAi剂的寡核苷酸能够介导观察到的靶蛋白水平的敲低,其大于观察到的对应的mRNA水平的敲低,并且尽管不希望受任何特定理论的束缚,但本公开表明这一观察与以下推测相一致,即在本文中指定为能够敲低靶基因或蛋白质的单链RNAi剂的一些寡核苷酸可能能够通过RISC介导的机制和/或空间位阻来敲低靶基因或蛋白质。

[2209] 本公开提出了寡核苷酸的许多非限制性实例,其具有各种序列、格式、修饰、5'-末端区域、种子区域、种子后区域和3'-末端区域中的任一个,并且能够介导单链RNA干扰(例如,单链RNAi剂)。

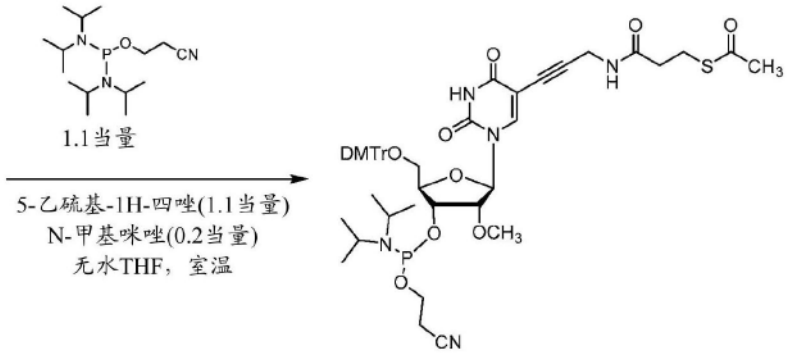
[2210] 图3.图3A和3B示出了示例性多聚体格式。寡核苷酸可以直接和/或通过接头接合。如图所示,多聚体可包含相同或不同结构/类型的寡核苷酸单体。在一些实施方案中,多聚体的单体是ssRNAi剂。在一些实施方案中,多聚体的单体是RNA酶H依赖性反义寡核苷酸(ASO)。单体可以通过各种位置接合,例如5'-末端、3'-末端或中间的位置。

[2211] 以下直接示出可用于通过形成二硫键连接寡核苷酸单体的亚磷酰胺。在掺入寡核苷酸单体中之后,硫酯可以被水解以释放游离的硫醇,其可以与另一个寡核苷酸单体的硫醇反应以形成二硫键,从而将寡核苷酸单体连接在一起。可以将多个硫醇基掺入寡核苷酸中,使得可以形成多个单体的多聚体。



WV-NU-016

[2212]



WV-NU-016-CNE

[2213] 表90示出了靶向PNPLA3的不同寡核苷酸的体外等位基因特异性抑制。示例性寡核苷酸与一个等位基因的靶序列完全互补,所述靶序列包含一个或两个SNP位点。一个SNP位点与蛋白质序列中的I148M改变相关联。在Hep3B细胞(野生型,C和C,I148)和Huh7细胞(具有双突变,T和G,M148)中评估了包含靶向结合序列的寡核苷酸,所述靶向结合序列与包含两个SNP的靶序列完全互补。在各种位置(8和11;9和12;10和13等)测试双突变,并进行了各种修饰以鉴定能够进行PNPLA3的等位基因特异性敲低的寡核苷酸。

[2214] 如表90B所示,测试WV-7778至WV-7793和WV-3858至WV-3864。在这些寡核苷酸中,翼中的第一个和最后一个核苷酸间键联是立体无规的PS,并且其他核苷酸间键联是PO;5'翼和3'翼包含2'-OMe。若干种寡核苷酸示出了PNPLA3的等位基因特异性敲低。

[2215] 表90B.寡核苷酸的活性。

[2216]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7778	92.8	86.9	63.6	52.7
WV-7779	92.6	85.8	59.2	48.0
WV-7780	102.3	97.1	36.4	34.8
WV-7781	111.8	102.4	46.1	38.9
WV-7782	108.5	94.7	43.3	35.0
WV-7783	110.2	97.5	36.6	33.7
WV-7784	105.0	95.9	41.2	41.9
WV-7785	108.7	107.4	73.8	57.5
WV-3858	103.3	103.6	55.1	52.3
WV-3859	94.7	96.1	41.8	41.2
WV-3860	104.2	94.1	46.7	45.6
WV-3861	101.8	99.2	47.1	45.2
WV-3862	97.1	96.5	44.0	42.3
WV-3863	99.7	86.0	42.0	51.5
WV-3864	97.8	96.8	53.5	38.9
WV-7786	99.1	104.3	37.0	38.0
WV-7787	84.2	87.5	23.0	25.1
WV-7788	80.4	88.0	35.5	28.5
WV-7789	82.7	85.7	25.4	25.5
WV-7790	80.8	85.1	27.4	29.8
WV-7791	87.1	80.1	40.8	42.1
WV-7792	78.1	73.1	42.5	46.5
WV-7793	68.3	65.1	49.9	44.9

[2217] 如表90C所示,测试了WV-7794至WV-7816。在这些寡核苷酸中,翼中的第一个和最后一个核苷酸间键联是立体无规的PS,并且其他核苷酸间键联是PO;5'翼和3'翼包含2'-MOE。若干种寡核苷酸示出了PNPLA3的等位基因特异性敲低。

[2218] 表90C.寡核苷酸的活性。

[2219]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7794	47.6	44.5	25.0	20.6
WV-7795	58.5	52.8	14.3	14.8
WV-7796	54.6	56.4	16.3	15.5
WV-7797	75.1	74.2	13.5	12.8
WV-7798	78.4	79.8	11.9	13.7
WV-7799	89.9	92.4	23.5	25.7
WV-7800	93.6	92.2	34.1	29.9
WV-7801	90.3	90.3	38.4	29.3
WV-7802	101.1	101.3	25.1	29.6
WV-7803	102.0	103.2	24.8	25.8
WV-7804	95.9	97.2	27.8	32.7
WV-7805	100.5	95.5	21.9	22.0
WV-7806	110.6	105.4	22.0	21.2
WV-7807	96.2	101.5	21.1	23.8
WV-7808	95.5	101.0	21.5	18.8
WV-7809	85.3	84.2	17.1	15.7
WV-7810	92.0	95.9	25.2	21.6
WV-7811	100.1	100.0	26.6	27.1
WV-7812	79.5	82.1	22.3	21.1
WV-7813	83.7	76.2	23.7	18.2
WV-7814	87.8	82.8	44.3	39.2
WV-7815	78.1	74.8	45.3	37.1
WV-7816	59.5	52.4	24.5	20.5

[2220] 如表90D所示,测试了WV-7817至WV-7839。在这些寡核苷酸中,第一个和最后一个核苷酸是LNA;5'翼在寡核苷酸的5'末端具有LNA,之后是若干个2'-OMe;并且3'翼在寡核苷酸的3'末端具有若干个2'-OMe,之后是LNA。若干种寡核苷酸示出了PNPLA3的等位基因特异性敲低。

[2221] 表90D.寡核苷酸的活性。

[2222]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7817	71.4	60.1	34.0	30.2
WV-7818	68.1	75.8	44.0	30.0
WV-7819	68.5	76.6	20.7	20.7
WV-7820	87.7	86.0	24.0	22.4
WV-7821	90.1	89.3	17.7	15.3
WV-7822	101.2	87.2	19.6	11.7
WV-7823	83.3	87.7	22.9	17.8

[2223]

WV-7824	99.0	101.9	31.1	31.6
WV-7825	94.0	89.5	28.7	22.6
WV-7826	95.6	87.5	21.2	17.6
WV-7827	113.3	104.4	22.1	19.3
WV-7828	108.1	102.8	25.7	23.6
WV-7829	99.8	97.9	20.5	21.7
WV-7830	95.9	87.8	18.5	19.2
WV-7831	89.8	89.2	21.3	23.4
WV-7832	76.2	71.7	9.4	11.8
WV-7833	68.2	76.8	14.1	10.4
WV-7834	69.5	71.2	17.4	16.5
WV-7835	69.6	68.7	11.0	9.4
WV-7836	59.8	67.8	18.3	21.0
WV-7837	60.8	63.7	25.6	28.4
WV-7838	48.2	50.5	16.8	13.5
WV-7839	35.0	39.1	10.5	11.8

[2224] 如表90E所示,测试了WV-7840至WV-7862。在这些寡核苷酸中,第一个和最后一个核苷酸是LNA;5'翼在寡核苷酸的5'末端具有LNA,之后是若干个2'-MOE;并且3'翼在寡核苷酸的3'末端具有若干个2'-MOE(或5-甲基2'-MOE),之后是LNA。若干种寡核苷酸示出了PNPLA3的等位基因特异性敲低。

[2225] 表90E.寡核苷酸的活性。

[2226]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7840	32.7	37.7	12.8	14.8
WV-7841	45.9	49.8	8.1	10.6
WV-7842	43.2	50.4	7.6	7.0
WV-7843	53.7	61.0	8.7	10.6
WV-7844	69.2	69.0	14.3	14.9
WV-7845	80.8	83.7	15.0	13.7
WV-7846	77.1	86.3	16.5	15.7
WV-7847	85.2	96.4	18.5	15.6
WV-7848	87.2	89.4	21.7	18.0
WV-7849	65.0	74.2	17.2	16.7
WV-7850	98.8	107.4	15.3	18.7
WV-7851	105.0	95.8	11.4	15.9
WV-7852	113.7	86.9	14.2	14.2
WV-7853	108.5	90.7	10.1	14.3
WV-7854	109.6	94.9	11.3	12.4
WV-7855	81.9	82.8	7.4	5.4

[2227]

WV-7856	86.3	82.0	11.5	11.2
WV-7857	95.3	78.1	14.6	15.6
WV-7858	63.0	66.3	8.6	9.8
WV-7859	65.4	61.5	12.9	15.9
WV-7860	69.4	70.0	30.4	34.2
WV-7861	51.9	49.0	14.8	26.8
WV-7862	37.4	41.3	10.4	11.2

[2228] 如表90F所示,测试了WV-993、WV-3390和WV-4054。

[2229] 表90F.寡核苷酸的活性。

[2230]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100.0	100.0	100.0	100.0
UT (未处理)	92.4	98.7	93.1	107.0
WV-993 10nM	108.0	117.8	115.8	137.6
WV-3390 2nM	84.5	84.1	46.5	57.6
WV-3390 10nM	50.0	53.9	15.7	24.4
WV-4054 2nM	95.8	95.1	30.0	35.7
WV-4054 10nM	85.5	91.8	30.2	37.5

[2231] 如表90G所示,测试了WV-3860至WV-3864。寡核苷酸在位置8和11(WV-3860);9和12(WV-3861);10和13(WV-3862);11和14(WV-3863);以及12和15(WV-3864)处具有错配(野生型与突变型等位基因之间)。若干种寡核苷酸表现出PNPLA3的等位基因特异性敲低,特别是在浓度为8nM时。

[2232] 表90G.寡核苷酸的活性。

[2233]

nM	WV-3860 Hep3B		WV-3861 Hep3B		WV-3862 Hep3B		WV-3863 Hep3B	
50	37.7	44.4	44.3	47.7	21.9	32.3	32.0	32.8
20	83.9	89.7	87.7	93.9	64.7	72.1	81.7	87.3
8	95.8	95.4	101.9	103.4	90.8	92.0	84.3	93.9
3.2	105.9	93.0	94.3	90.7	98.1	98.3	88.3	86.8
1.28	100.9	93.4	81.0	95.4	91.0	92.7	90.9	87.4
0.512	90.5	96.6	94.9	88.3	92.5	93.3	87.1	88.7
0.205	110.1	99.0	93.2	95.4	95.7	89.5	89.7	92.5

[2234]

0.082	96.6	95.6	94.8	96.2	95.3	97.8	86.7	93.9
0.033	98.5	88.1	98.0	95.3	103.7	93.2	93.3	87.8
0.013	97.1	95.6	91.1	92.4	100.9	90.9	91.7	90.9

[2235]

nM	WV-3864 Hep3B		WV-3860 Huh7		WV-3861 Huh7		WV-3862 Huh7	
50	31.8	43.9	11.4	9.3	12.4	8.4	6.8	8.4
20	98.4	99.4	23.7	25.9	25.9	24.4	16.8	14.0
8	100.7	107.4	47.9	51.3	46.0	44.0	40.7	42.6
3.2	94.9	102.7	84.1	67.6	63.7	68.7	56.9	77.6
1.28	96.3	95.6	100.5	83.9	80.4	83.7	77.3	81.0
0.512	89.7	102.4	100.5	97.3	85.9	87.5	78.0	85.6
0.205	96.3	93.8	101.6	99.9	83.7	76.6	73.4	85.7
0.082	89.5	92.1	81.4	87.3	85.3	84.1	78.9	89.3
0.033	92.7	94.2	114.4	90.6	100.4	87.6	87.5	84.6
0.013	91.7	106.0	107.0	93.7	82.3	88.1	78.3	91.6

[2236]

nM	WV-3863 Huh7		WV-3864 Huh7	
50	5.6	10.6	8.4	8.3
20	20.0	13.4	16.5	13.9
8	37.4	40.8	47.9	43.3
3.2	67.5	60.5	75.6	65.5
1.28	84.9	82.5	86.2	87.0
0.512	79.4	81.1	95.6	91.0
0.205	83.0	86.3	89.1	96.1
0.082	79.5	92.5	89.4	77.9
0.033	79.7	102.1	104.6	86.4
0.013	94.6	96.8	93.0	104.9

[2237] 如表90H所示,测试了WV-7804至WV-7808。寡核苷酸在位置8和11(WV-7804);9和12(WV-7805);10和13(WV-7806);11和14(WV-7807);以及12和15(WV-7808)处具有错配。一些寡核苷酸表现出PNPLA3的等位基因特异性敲低,特别是在浓度为3.2和8nM时。

[2238] 表90H.寡核苷酸的活性。

[2239]

[2240]

nM	WV-7804 Hep3B		WV-7805 Hep3B		WV-7806 Hep3B		WV-7807 Hep3B	
50	63.3	69.5	60.3	62.7	69.6	65.1	75.0	75.5
20	84.6	98.4	81.8	86.1	90.1	89.4	95.3	95.4
8	101.1	102.9	96.9	98.5	100.8	94.7	101.2	95.5
3.2	92.9	95.1	90.7	98.1	98.9	92.1		88.8
1.28	95.5	98.6	91.3	97.0	95.9	90.9	97.3	103.6
0.512	96.2	110.4	95.5	97.9	95.9	94.8	100.9	92.7
0.205	92.0	99.5	90.5	100.7	99.3	94.7	96.4	99.8
0.082	97.6	93.6	92.2	107.6	92.3	93.8	93.4	103.7
0.033	98.4	101.4	98.5	104.0	99.6	90.1	89.2	93.3
0.013	96.7	100.4	95.0	105.8	90.1	97.5	90.6	87.5

[2241]

nM	WV-7808 Hep3B		WV-7804 Huh7		WV-7805 Huh7		WV-7806 Huh7	
50	72.2		4.4	7.5	1.7	8.4	9.8	3.8
20	98.9		3.5	11.1	7.1	11.9	2.8	7.2
8	117.8		25.1	23.3	19.6	11.6	13.8	12.5
3.2	109.5		45.3	48.0	36.1	38.4	28.8	39.7
1.28	116.3		68.9	77.1	59.2	76.2	68.7	68.5
0.512	110.9		74.6	76.0	75.3	78.4	66.6	82.4
0.205	109.3		73.6	86.5	69.8	81.1	69.7	80.3
0.082	116.8		82.9	89.4	75.0	86.9	78.6	79.7
0.033	111.1		81.8	96.1	78.0	95.8	89.4	87.3
0.013	104.6		86.7	90.4	79.6	95.0	88.6	98.0

[2242]

nM	WV-7807 Huh7		WV-7808 Huh7	
50	3.0	3.9	1.8	1.4
20	12.6	9.1	1.9	5.2
8	25.1	14.9	14.2	9.1
3.2	46.9	41.5	37.1	33.2
1.28	78.0	70.4	63.6	65.2
0.512	85.3	73.7	71.0	77.4
0.205	98.8	68.5	79.2	92.3
0.082	92.6	75.3	88.0	71.2
0.033	85.6	81.9	84.1	83.5
0.013	85.5	94.7	95.3	78.1

[2243] 如表90I所示,测试了WV-7827至WV-7831。寡核苷酸在位置8和11(WV-7827);9和12(WV-7828);10和13(WV-7829);11和14(WV-7830);以及12和15(WV-7831)处具有错配。若干种寡核苷酸表现出PNPLA3的等位基因特异性敲低,特别是在浓度为3.2和8nM时。

[2244] 表90I.寡核苷酸的活性。

[2245]

nM	WV-7827 Hep3B		WV-7828 Hep3B		WV-7829 Hep3B		WV-7830 Hep3B	
50	37.01	34.29	36.95	32.75	25.05	33.48	36.76	54.22
20	79.06	85.05	85.88	77.16	82.21	79.79	79.33	87.62
8	97.28	89.87	93.46	91.76	99.65	98.83	97.94	97.83
3.2	94.15	89.12	97.63	90.63	92.57	92.37		104.59
1.28	97.02	95.4	94.2	88.81	93.55	94.13	100.19	113.12
0.512	105.31	93.06	97.26	96.7	95.81	104.04	107.33	109.89
0.205	107.16	97.39	92	91.65	103.76	102.33	104.56	100.78
0.082	100.92	101.71	94.43	88.97	93.95	105.59	94.95	110.09
0.033	98.82	95.76	92.83	92.84	91.46	103.11	97.7	93.54
0.013	96.78	93.38	92.91	90.28	86.25	104.33	96.73	98.6

[2246]

nM	WV-7831 Hep3B		WV-7827 Huh7		WV-7828 Huh7		WV-7829 Huh7	
50	53.44	62.49	3.75	3.01	2.29	1.48	5.61	7.19
20	97.35	92.9	6.33	5.79	16.31	9.08	16.41	9.26
8	103.88	103.69	13.45	13.44	9.77	24.96	31.07	18.62
3.2	104.8	99.48	34.11	44.07	31.43	31.51	54.15	31.49
1.28	99.77	102.88	57.91	67.23	63.32	69.34	78.28	65.69
0.512	102.56	99.81	80.58	87.32	83.18	75.78	94.09	75.96
0.205	111.83	98.89	71.87	84.73	74.94	76.52	87.05	90.6
0.082	102.02	93.55	74.43	76.07	82.31	87.03	97.43	87.48
0.033	93.54	101.84	77.64	80.62	89.1	89.96	108.41	81.93
0.013	101.47	100.78	77.47	74.02	83.14	79.83	100.58	88.97

[2247]

nM	WV-7830 Huh7		WV-7831 Huh7	
50	4.11	5.5	3.5	5.45
20	6.32	5.86	5.62	10.22
8	12.5	16.99	15.15	23.97
3.2	35.34	40.2	35	40.3
1.28	56.82	76.27	73.64	73.96
0.512	86.38	77.53	83.87	88.08
0.205	80.08	79.81	85.02	86.98
0.082	95.69	98.61	82.31	111.77

[2248]

0.033	86.65	93.2	85.86	85.82
0.013	94.2	85.75	81.84	93.28

[2249] 如表90J所示,测试了WV-993(阴性对照)、WV-3390(阳性对照)、WV-4054、WV-7850至WV-7854。寡核苷酸在位置8和11(WV-7850);9和12(WV-7851);10和13(WV-7852);11和14(WV-7853);以及12和15(WV-7854)处具有错配。若干种寡核苷酸表现出PNPLA3的高等位基因特异性敲低,特别是在浓度为3.2和8nM时。

[2250] 表90J.寡核苷酸的活性。

[2251]

nM	WV-7850 Hep3B		WV-7851 Hep3B		WV-7852 Hep3B		WV-7853 Hep3B	
50	38.95	43.11	38.2	54.32	34.89	44.6	28.33	29.79
20	65.77	72.48	80.99	84.09	69.74	74.87	66.38	50.49
8	92.95	82.91	93.58	96.06	89.54	101.29	85.15	81.31
3.2	91.26	86.61	90.46	94.37	97.29	91.77		96.08
1.28	111.06	94.39	98.64	92.99	89.98	111.31	96.26	97.11
0.512	106.14	87.28	94.61	94.09	96.79	95.82	109.19	105.33
0.205	84.62	87.72	100.09	99.5	111.54	99.81	95.06	94.02
0.082	97.3	89.13	90.19	87.13	92.11	100.64	95.93	104.77
0.033	88.83	89.09	96.09	101.92	96.1	95.83	95.56	95.83
0.013	91.98	92.51	100.59	92.81	98.94	109.53	99.05	97.36

[2252]

nM	WV-7854 Hep3B		WV-7850 Huh7		WV-7851 Huh7		WV-7852 Huh7	
50	16.7	18.84	2.74	4.3	2.13	1.26	8.39	7.43
20	63.04	59.9	5.33	5.88	6.09	4.64	7.76	5.84
8	82.27	80.67	11.67	9.74	1.12	14.86	9.96	10.6
3.2	92.77	89.43	25.14	13.84	31.45	25.89	28.6	25.4
1.28	90.63	83.96	57.25	62.49	55.19	52.3	49.96	56.13
0.512	88.27	86.56	75.21	73.3	81.73	81.67	72.77	87.64
0.205	89.69	88.92	71.16	74.28	91.84	94.95	82.61	85.11
0.082	95.16	89.43	84.71	75.77	91	79.62	96.22	83.67
0.033	99.41	94.3	80.67	93.66	84.27	79.5	72.16	70.12
0.013	88	96.49	96.84	104.2	86.94	81.37	94.13	88.49

[2253]

nM	WV-7853 Huh7		WV-7854 Huh7	
50	2.91	3.83	0.56	5.35
20	5.38	4.3	2.43	7.48
8	6.36	8.51	9.91	10.31
3.2	27.05	23.79	23.52	22.24
1.28	47.78	62.17	47.66	45.94
0.512	70.13	93.78	76.63	66.5
0.205	96.01	74.6	84.06	72.69
0.082	82.68	90.37	79.33	82.72
0.033	89.38	93.35	89.39	83.68
0.013	86.29	95.77	98.79	96.55

[2254] 如表90K和90L所示,测试了WV-3860至WV-3864、WV-7804至WV-7808、WV-7827至WV-7831以及WV-7850至WV-7854。WV-4054表现出高等位基因特异性活性。

[2255] 表90K.寡核苷酸的活性。

[2256]

nM	WV-3390 Hep3B		WV-3390 Huh7	
50	8.21	7.25	8.29	8.93
20	6.38	7.65	8.38	6.55
8	12.25	18.67	14.29	10.45
3.2	45.11	53.94	44.3	57.9
1.28	77.33	87.7	75.75	79.58
0.512	89.66	91.59	75.55	114.48
0.205	88.47	99.01	77.44	93.14
0.082	90.52	101.67	81.19	91
0.033	100.47	102.34	78.08	106.05
0.013	111.98	101.98	93.49	92.23

[2257]

nM	WV-4054 Hep3B		WV-4054 Huh7	
8	77.1	75.46	25.4	28.99
3.2	64.83	77.36	19.76	30.45
1.28	75.7	80.58	20.26	28
0.512	83.19	91.18	27.99	30.12
0.205	96.79	100.8	48.79	51.24
0.082	96.97	105.15	51.71	65.92
0.033	98.21	96.76	82.73	90.69
0.013	100.71	110.73	89.25	101.52

[2258]

nM	WV-993 Hep3B		WV-993 Huh7	
50	46.96	63.05	64.33	84.69
20	85.99	93.33	85.91	92.58
8	94.55	112.34	108.31	90.19
3.2	94.42	101.21	98.4	102.07
1.28	90.96	98.52	104.92	108.34
0.512	87.71	95.84	96.98	87.06
0.205	91.78	93.62	114.92	90.64
0.082	86.49	96.33	109.17	101.77
0.033	87.45	104.34	102.65	92.43
0.013	90.55	100.97	114.84	108.07

[2259] 表90L.Huh7细胞(突变型等位基因)中各种寡核苷酸的IC50。

[2260]

错配位置	寡核苷酸 2'OMe	IC_{50} (nM)	寡核苷酸 2'MOE	IC_{50} (nM)
8，11	WV-3860	10.6	WV-7804	4.0
9，12	WV-3861	10.4	WV-7805	3.0
10，13	WV-3862	10.6	WV-7806	2.6
11，14	WV-3863	7.8	WV-7807	4.0
12，15	WV-3864	9.5	WV-7808	2.9

[2261]

错配位置	寡核苷酸 2'MOE LNA	IC_{50} (nM)	寡核苷酸 2'OMe LNA	IC_{50} (nM)
8，11	WV-7850	1.6	WV-7827	3.8
9，12	WV-7851	2.2	WV-7828	2.8
10，13	WV-7852	1.9	WV-7829	3.0
11，14	WV-7853	1.8	WV-7830	2.6
12，15	WV-7854	1.3	WV-7831	3.3

[2262] 表91.寡核苷酸的活性。

[2263] PNPLA3 mRNA水平

[2264] (PNPLA3/HPRT1)

[2265]

浓度 (nM) exp 10	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7808	0.200	0.366	0.424	0.576	0.803	0.910	1.217	1.131
	0.081	0.221	0.374	0.613	0.987	1.050	1.314	1.080
WV-8690	0.199	0.388	0.503	0.808	0.897	1.000	1.148	1.068
	0.208	0.313	0.754	0.932	1.058	1.236	1.286	1.138
WV-8858	0.233	0.446	0.595	0.838	0.911	0.916	0.965	1.213
	0.240	0.340	0.727	1.036	1.039	1.403	0.874	
WV-8859	0.086	0.292	0.279	0.710	0.850	1.071	0.956	1.091
	0.083	0.217	0.505	0.754	0.981	1.258	1.131	1.454
WV-8860	0.234	0.386	0.385	0.751	0.867	0.947	1.358	1.057
	0.162	0.321	0.503	1.002	1.100	1.075	1.250	1.241

[2266] 表92.寡核苷酸的活性。

[2267]

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.115	-0.513	-0.911	-1.308
WV-7807	0.102	0.331	0.588	0.790	1.037	0.989	1.271	1.147
	0.137	0.397	0.453	0.814	1.160	1.099	1.257	1.027
WV-8854	0.117	0.375	0.678	0.831	0.962	1.021	1.258	1.277
	0.112	0.363	0.559	0.793	1.134	1.237	1.226	1.186
WV-8855	0.174	0.553	0.745	0.873	0.890	0.968	0.954	1.088
	0.181	0.462	0.690	0.737	1.102	1.168	0.930	1.006
WV-	0.055	0.239	0.496	0.779	0.815	0.937	1.029	1.027
8856	0.069	0.288	0.654	0.884	1.172	1.146	0.937	1.222
WV-8857	0.237	0.445	0.967	0.928	0.976	0.790	0.992	1.119
	0.188	0.504	0.783	0.932	1.031	1.046	1.086	1.067

[2268] 表93.寡核苷酸的活性。

[2269]

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7806	0.15	0.24	0.29	0.71	0.92	1.03	1.02	1.10
	0.14	0.16	0.30	0.56	0.67	0.84	1.02	0.89
WV-8850	0.57	0.61	0.59	1.09	1.08	1.04	1.11	1.29
	0.44	0.52	0.60	0.65	0.81	0.76	0.96	0.93
WV-8851	0.18	0.41	0.43	0.95	0.93	1.00	1.08	1.05
	0.17	0.27	0.63	0.71	0.70	1.01	0.90	0.85
WV-8852	0.55	0.29	0.32	0.83	1.04	1.23	0.90	1.28
	0.14	0.18	0.26	0.49	0.77	0.83	1.09	0.92
WV-8853	0.21	0.38	0.41	0.76	1.24	0.92	1.08	0.93
	0.13	0.20	0.44	0.61	0.94	0.64	0.87	0.95

[2270] 表94.寡核苷酸的活性。

[2271]

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7805	0.29	0.33	0.44	0.72	0.95	0.96	0.93	0.99
	0.15	0.27	0.41	0.73	1.12	1.19	0.78	0.87
WV-8609	0.33	0.37	0.48	0.90	0.84	0.81	1.02	1.04
	0.13	0.29	0.56	0.76	0.89	1.15	1.07	0.91
WV-8847	0.24	0.37	0.58	0.78	0.89	1.20	0.91	0.97
	0.14	0.23	0.64	0.79	0.90	1.16	0.94	1.19
WV-8848	0.19	0.32	0.47	0.69	0.93	0.88	0.92	0.92
	0.19	0.16	0.46	0.74	0.88	0.79	1.03	1.09
WV-8849	0.24	0.39	0.55	0.79	1.17	0.97	1.16	0.95
	0.28	0.29	0.54	0.82	1.05	1.13	1.17	1.05

[2272] 表95.

[2273]

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7804	0.29	0.37	0.51	0.81	0.85	1.16	0.87	0.89
	0.19	0.22	0.47	0.82	0.85	0.94	1.05	1.06
WV-8843	0.53	0.72	0.62	1.00	0.98	0.85	0.92	0.98
	0.45	0.51	0.61	0.93	0.93	1.01	0.90	1.01
WV-8844	0.25	0.44	0.58	0.78	0.71	0.86	0.86	1.00
	0.22	0.21	0.48	0.76	1.02	1.06	0.74	1.16
WV-8845	0.23	0.42	0.52	0.82	0.99	0.87	0.77	1.11
	0.17	0.25	0.44	0.76	0.90	0.97	0.99	0.88
WV-8846	0.20	0.38	0.55	0.60	0.90	0.76	0.88	0.98
	0.17	0.25	0.39	0.71	1.11	0.92	0.83	1.04

[2274] 表98.寡核苷酸的活性。10nM。

[2275]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7794	47.6	44.5	25.0	20.6
WV-7795	58.5	52.8	14.3	14.8
WV-7796	54.6	56.4	16.3	15.5
WV-7797	75.1	74.2	13.5	12.8
WV-7798	78.4	79.8	11.9	13.7
WV-7799	89.9	92.4	23.5	25.7
WV-7800	93.6	92.2	34.1	29.9
WV-7801	90.3	90.3	38.4	29.3
WV-7802	101.1	101.3	25.1	29.6
WV-7803	102.0	103.2	24.8	25.8
WV-7804	95.9	97.2	27.8	32.7
WV-7805	100.5	95.5	21.9	22.0
WV-7806	110.6	105.4	22.0	21.2
WV-7807	96.2	101.5	21.1	23.8
WV-7808	95.5	101.0	21.5	18.8
WV-7809	85.3	84.2	17.1	15.7
WV-7810	92.0	95.9	25.2	21.6
WV-7811	100.1	100.0	26.6	27.1
WV-7812	79.5	82.1	22.3	21.1
WV-7813	83.7	76.2	23.7	18.2
WV-7814	87.8	82.8	44.3	39.2
WV-7815	78.1	74.8	45.3	37.1
WV-7816	59.5	52.4	24.5	20.5

[2276] 表99.寡核苷酸的活性。10nM。

[2277]

	Hep3B		Huh7	
模拟	100	100	100	100
WV-7778	92.8	86.9	63.6	52.7
WV-7779	92.6	85.8	59.2	48.0
WV-7780	102.3	97.1	36.4	34.8
WV-7781	111.8	102.4	46.1	38.9
WV-7782	108.5	94.7	43.3	35.0
WV-7783	110.2	97.5	36.6	33.7
WV-7784	105.0	95.9	41.2	41.9
WV-7785	108.7	107.4	73.8	57.5
WV-3858	103.3	103.6	55.1	52.3
WV-3859	94.7	96.1	41.8	41.2
WV-3860	104.2	94.1	46.7	45.6
WV-3861	101.8	99.2	47.1	45.2

[2278]

WV-3862	97.1	96.5	44.0	42.3
WV-3863	99.7	86.0	42.0	51.5
WV-3864	97.8	96.8	53.5	38.9
WV-7786	99.1	104.3	37.0	38.0
WV-7787	84.2	87.5	23.0	25.1
WV-7788	80.4	88.0	35.5	28.5
WV-7789	82.7	85.7	25.4	25.5
WV-7790	80.8	85.1	27.4	29.8
WV-7791	87.1	80.1	40.8	42.1
WV-7792	78.1	73.1	42.5	46.5
WV-7793	68.3	65.1	49.9	44.9

[2279] 表100.寡核苷酸的活性。

[2280] %剩余的mRNA

[2281] (RhPNPLA3/hSFRS9)

[2282] 48小时的猴子肝细胞。

[2283]

	10nM		3nM		1nM	
模拟	100	100	100	100	100	100
WV-3421	28.7	35.4	44.6	31.8	61.3	53.8
WV-7794	64.1	74.4	104.3	96.2	115.5	121.3
WV-7795	80.8	88.4	130.2	115.9	109.0	130.0
WV-7796	51.3	53.4	83.8	95.5	106.9	103.3
WV-7797	51.4	48.5	97.3	81.4	115.1	126.7
WV-7798	65.2	56.8	84.8	86.8	106.8	104.0
WV-7799	96.5	102.5	104.7	117.6	108.9	129.6
WV-7800	66.1	78.8	113.3	111.3	114.9	128.1
WV-7801	113.1	117.7	116.0	112.7	113.3	118.5
WV-7802	101.6	110.7	105.8	120.3	113.3	123.9
WV-7803	52.5	59.6	73.6	79.4	106.5	129.4
WV-7804	95.5	91.3	111.3	137.4	116.5	122.1
WV-7805	84.7	97.8	111.7	111.1	114.3	118.7
WV-7806	91.2	87.2	129.7	121.3	124.8	121.8
WV-7807	64.5	89.2	108.5	119.7	108.6	123.7
WV-7808	39.4	48.1	94.7	105.8	105.1	125.5
WV-7809	46.5	36.8	77.0	64.9	85.1	101.2
WV-7810	46.7	46.5	62.1	78.5	75.8	94.7
WV-7811	70.4	78.7	88.2	84.0	101.1	96.6
WV-7812	47.2	53.3	74.5	80.7	97.7	77.8
WV-7813	43.0	38.3	76.5	71.2	97.0	89.7

[2284]

WV-7814	49.8	51.2	102.8	96.1	105.9	131.8
WV-7815	56.0	52.5	88.3	83.8	83.4	94.9
WV-7816	29.3	19.7	51.5	57.5	84.4	68.4

[2285] 表101.寡核苷酸的活性。

[2286] PNPLA3 mRNA水平

[2287] (PNPLA3/GAPDH)

[2288]

	0.12nM	0.4nM	1.1nM
WV-993	99.8	77.9	74.5
WV-3421	74.9	44.6	24.0
WV-7805	105.4	99.2	83.8
WV-9890	108.6	78.4	78.3
WV-12100	104.6	102.7	93.2
WV-9893	93.7	103.8	79.8
WV-12101	124.1	67.6	36.6

[2289] 表102A.寡核苷酸的活性。

[2290] 原代食蟹猴肝细胞。

[2291]

浓度 (nM)	WV-9893		WV-3421		WV-12101	
1.079181	116.7	90.2	13.6	6.5	20.1	27.6
0.681241	135.5	98.9	13.9	5.4	20.1	
0.283301	86.5	126.1	32.9	23.7	11.0	37.7
-0.11464	105.3	108.9	70.7	46.7	40.7	
-0.51258	121.9	114.1	89.3	81.5	70.0	97.1
-0.91052	112.7	137.8	124.2	113.7	81.7	114.1
-1.30846	116.0	110.1	134.7	80.5	81.0	72.6
-1.7064	120.5	106.7	105.7	140.0	82.5	77.1
-2.10434	120.5	108.0	131.0	95.2	98.4	88.2
-2.50228	94.8	99.6	89.2	85.4	106.7	89.7

[2292] 表102B.寡核苷酸的Tm。

[2293] 在与完全互补或除了两个错配(表示突变型等位基因)之外完全互补的RNA形成双链体的同时,测量各种寡核苷酸的Tm。使用的条件是在1X PBS(pH 7.2)中的1μM双链体;温度范围:15℃-90℃;温度速率:0.5℃/分钟;测量间隔:0.5℃。

[2294]

ASO	长度	双链体 Tm (℃) WV-12420 完全匹配	双链体 Tm (℃) WV-12421 两个错配	Δ 差值 完全匹配相对于两个错配
WV-7805	20 聚体	63.52	47.62	15.9
WV-9891	20 聚体	61.62	44.77	16.9
WV-9890	20 聚体	61.57	46.67	14.9
WV-9893	20 聚体	58.67	43.52	15.2
WV-12106	24 聚体	71.52	59.72	11.8
WV-12107	24 聚体	69.57	57.77	11.8
WV-12100	24 聚体	70.77	59.57	11.2
WV-12101	24 聚体	67.52	56.62	10.9

[2295] 表103.寡核苷酸的活性。

[2296] Huh7细胞。

[2297]

浓度(nM)	1	0.52288	0.04576	-0.4314	-0.9085	-1.3856	-1.8627
WV-7805	7.0	23.5	64.7	80.4	88.2	92.5	99.5
	5.1	24.7	78.9	74.1	86.7		
WV-9890	1.6	35.0		90.4	90.3	92.6	104.6
	13.1	29.2	73.7	88.5	87.1	95.8	105.5
WV-12100	12.4	33.8	63.6	90.6		102.3	101.5
	10.2	27.6	76.6	80.0	83.6	80.7	85.0
WV-9893	10.4	28.7	74.3	86.3	87.7	116.1	93.8
	4.3	36.4	80.4	91.5	110.3	108.6	106.5
WV-12101		4.6	19.8	60.3	85.8	92.0	108.3
		6.8	19.2	60.0	81.1	81.0	85.6

[2298] 表104.寡核苷酸的活性。

[2299] nM

[2300]

浓度 (nM)	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.20	0.081	0.032	0.013
WV-7850 Hep3B	39.0	65.8	93.0	91.3	111.1	106.1	84.6	97.3	88.8	92.0
	43.1	72.5	82.9	86.6	94.4	87.3	87.7	89.1	89.1	92.5
WV-7851 Hep3B	38.2	81.0	93.6	90.5	98.6	94.6	100.1	90.2	96.1	100.6
	54.3	84.1	96.1	94.4	93.0	94.1	99.5	87.1	101.9	92.8

[2301]

WV-7852	34.9	69.7	89.5	97.3	90.0	96.8	111.5	92.1	96.1	98.9
Hep3B	44.6	74.9	101.3	91.8	111.3	95.8	99.8	100.6	95.8	109.5
WV-7853	28.3	66.4	85.2		96.3	109.2	95.1	95.9	95.6	99.1
Hep3B	29.8	50.5	81.3	96.1	97.1	105.3	94.0	104.8	95.8	97.4
WV-7854	16.7	63.0	82.3	92.8	90.6	88.3	89.7	95.2	99.4	88.0
Hep3B	18.8	59.9	80.7	89.4	84.0	86.6	88.9	89.4	94.3	96.5
WV-7850	2.7	5.3	11.7	25.1	57.3	75.2	71.2	84.7	80.7	96.8
Huh7	4.3	5.9	9.7	13.8	62.5	73.3	74.3	75.8	93.7	104.2
WV-7851	2.1	6.1	1.1	31.5	55.2	81.7	91.8	91.0	84.3	86.9
Huh7	1.3	4.6	14.9	25.9	52.3	81.7	95.0	79.6	79.5	81.4
WV-7852	8.4	7.8	10.0	28.6	50.0	72.8	82.6	96.2	72.2	94.1
Huh7	7.4	5.8	10.6	25.4	56.1	87.6	85.1	83.7	70.1	88.5
WV-7853	2.9	5.4	6.4	27.1	47.8	70.1	96.0	82.7	89.4	86.3
Huh7	3.8	4.3	8.5	23.8	62.2	93.8	74.6	90.4	93.4	95.8
WV-7854	0.6	2.4	9.9	23.5	47.7	76.6	84.1	79.3	89.4	98.8
Huh7	5.4	7.5	10.3	22.2	45.9	66.5	72.7	82.7	83.7	96.6

[2302] 表105.寡核苷酸的活性。

[2303]

nM	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-7827	37.0	79.1	97.3	94.2	97.0	105.3	107.2	100.9	98.8	96.8
Hep3B	34.3	85.1	89.9	89.1	95.4	93.1	97.4	101.7	95.8	93.4
WV-7828	37.0	85.9	93.5	97.6	94.2	97.3	92.0	94.4	92.8	92.9
Hep3B	32.8	77.2	91.8	90.6	88.8	96.7	91.7	89.0	92.8	90.3
WV-7829	25.1	82.2	99.7	92.6	93.6	95.8	103.8	94.0	91.5	86.3
Hep3B	33.5	79.8	98.8	92.4	94.1	104.0	102.3	105.6	103.1	104.3
WV-7830	36.8	79.3	97.9		100.2	107.3	104.6	95.0	97.7	96.7
Hep3B	54.2	87.6	97.8	104.6	113.1	109.9	100.8	110.1	93.5	98.6
WV-7831	53.4	97.4	103.9	104.8	99.8	102.6	111.8	102.0	93.5	101.5
Hep3B	62.5	92.9	103.7	99.5	102.9	99.8	98.9	93.6	101.8	100.8
WV-7827	3.8	6.3	13.5	34.1	57.9	80.6	71.9	74.4	77.6	77.5
Huh7	3.0	5.8	13.4	44.1	67.2	87.3	84.7	76.1	80.6	74.0
WV-7828	2.3	16.3	9.8	31.4	63.3	83.2	74.9	82.3	89.1	83.1
Huh7	1.5	9.1	25.0	31.5	69.3	75.8	76.5	87.0	90.0	79.8
WV-7829	5.6	16.4	31.1	54.2	78.3	94.1	87.1	97.4	108.4	100.6
Huh7	7.2	9.3	18.6	31.5	65.7	76.0	90.6	87.5	81.9	89.0
WV-7830	4.1	6.3	12.5	35.3	56.8	86.4	80.1	95.7	86.7	94.2
Huh7	5.5	5.9	17.0	40.2	76.3	77.5	79.8	98.6	93.2	85.8

[2304]

WV-7831	3.5	5.6	15.2	35.0	73.6	83.9	85.0	82.3	85.9	81.8
Huh7	5.5	10.2	24.0	40.3	74.0	88.1	87.0	111.8	85.8	93.3

[2305] 表106.寡核苷酸的活性。

[2306]

nM	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-7804	63.3	84.6	101.1	92.9	95.5	96.2	92.0	97.6	98.4	96.7
Hep3B	69.5	98.4	102.9	95.1	98.6	110.4	99.5	93.6	101.4	100.4
WV-7805	60.3	81.8	96.9	90.7	91.3	95.5	90.5	92.2	98.5	95.0
Hep3B	62.7	86.1	98.5	98.1	97.0	97.9	100.7	107.6	104.0	105.8
WV-7806	69.6	90.1	100.8	98.9	95.9	95.9	99.3	92.3	99.6	90.1
Hep3B	65.1	89.4	94.7	92.1	90.9	94.8	94.7	93.8	90.1	97.5
WV-7807	75.0	95.3	101.2		97.3	100.9	96.4	93.4	89.2	90.6
Hep3B	75.5	95.4	95.5	88.8	103.6	92.7	99.8	103.7	93.3	87.5
WV-7808	72.2	98.9	117.8	109.5	116.3	110.9	109.3	116.8	111.1	104.6
Hep3B										
WV-7804	4.4	3.5	25.1	45.3	68.9	74.6	73.6	82.9	81.8	86.7
Huh7	7.5	11.1	23.3	48.0	77.1	76.0	86.5	89.4	96.1	90.4
WV-7805	1.7	7.1	19.6	36.1	59.2	75.3	69.8	75.0	78.0	79.6
Huh7	8.4	11.9	11.6	38.4	76.2	78.4	81.1	86.9	95.8	95.0
WV-7806	9.8	2.8	13.8	28.8	68.7	66.6	69.7	78.6	89.4	88.6
Huh7	3.8	7.2	12.5	39.7	68.5	82.4	80.3	79.7	87.3	98.0
WV-7807	3.0	12.6	25.1	46.9	78.0	85.3	98.8	92.6	85.6	85.5
Huh7	3.9	9.1	14.9	41.5	70.4	73.7	68.5	75.3	81.9	94.7
WV-7808	1.8	1.9	14.2	37.1	63.6	71.0	79.2	88.0	84.1	95.3
Huh7	1.4	5.2	9.1	33.2	65.2	77.4	92.3	71.2	83.5	78.1

[2307] 表107.寡核苷酸的活性。

[2308]

nM	WV-7805 Hep3B		WV-7805 Huh7	
20	81.8	86.1	7.1	11.9
8	96.9	98.5	19.6	11.6
3.2	90.7	98.1	36.1	38.4
1.28	91.3	97.0	59.2	76.2
0.512	95.5	97.9	75.3	78.4
0.2048	90.5	100.7	69.8	81.1
0.08192	92.2	107.6	75.0	86.9
0.032768	98.5	104.0	78.0	95.8
0.013107	95.0	105.8	79.6	95.0

[2309] 表108.寡核苷酸的活性。

[2310] 在PNPLA3寡核苷酸的一些测试中,APOC3寡核苷酸WV-1868(其靶向APOC3,不同于PNPLA2的基因)被用作阴性对照。

[2311]

nM	2		8.25		33	
对照	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038
WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023
WV-3451	0.962	0.975	0.484	0.617	0.218	0.256
WV-3452	1.060	0.948	0.526	0.505	0.189	0.172
WV-3453	0.388	0.487	0.181	0.197	0.217	0.156
WV-3454	0.509	0.502	0.260	0.186	0.138	0.064
WV-3455	0.613	0.617	0.342	0.347	0.197	0.155
WV-3456	0.724	0.843	0.468	0.545	0.218	0.223
WV-3457	0.714	0.776	0.367	0.362	0.132	0.096
WV-3458	0.672	0.618	0.251	0.309	0.256	0.180
WV-3459	1.184	1.105	1.097	1.067	0.820	0.975
WV-3460	0.849	0.689	0.436	0.367	0.461	0.382
WV-3461	0.989	1.243	0.471	0.600	0.261	0.198
WV-3462	0.833	1.040	0.417	0.446	0.286	0.120

[2312]

	2		8.25		33	
对照	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038
WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023
WV-3437	1.045	1.067	0.564	0.501	0.256	0.181
WV-3438	0.861	0.989	0.935	0.760	1.009	0.982
WV-3439	1.009	1.016	0.770	0.734	0.576	0.530
WV-3440		1.038	1.060	0.982	0.729	0.613
WV-3441	1.082	1.234	0.680	0.903	0.313	0.433
WV-3442	1.120	0.935	0.477	0.643	0.223	0.347
WV-3443	0.477	0.410	0.278	0.204	0.229	0.171
WV-3444	0.714	0.592	0.350	0.396	0.234	0.209
WV-3445	1.304	1.060	0.776	0.760	0.439	0.388
WV-3446	0.849	0.729	0.455	0.430	0.247	0.235
WV-3447	0.786	0.929	0.568	0.604	0.201	0.292
WV-3448	0.776	0.837	0.458	0.568	0.218	0.226
WV-3449	0.776	0.704	0.404	0.449	0.252	0.130
WV-3450	1.084	0.851	1.077	0.839	0.924	0.905

[2313]

	2		8.25		33	
对照	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038

[2314]

WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023
WV-3423	0.634	0.600	0.407	0.419	0.315	0.280
WV-3424	0.634	0.754	0.350	0.445	0.124	0.286
WV-3425	1.002	1.023	0.729	0.643	0.347	0.345
WV-3426	1.023	0.797	0.487	0.427	0.364	0.367
WV-3427	0.849	0.897	0.709	0.781	0.621	0.572
WV-3428	1.052	1.089	0.831	0.922	0.942	1.002
WV-3429	1.060	0.982	0.588	0.604	0.401	0.340
WV-3430	1.074	1.184	0.935	0.942	0.505	0.449
WV-3431	0.600	0.675	0.391	0.364	0.208	0.237
WV-3432	0.975	0.955	0.630	0.639	0.276	0.326
WV-3433	0.596	0.685	0.240	0.270	0.215	0.146
WV-3434	0.885	0.714	0.261	0.342	0.206	0.193
WV-3435	0.584	0.584	0.350	0.311	0.288	0.261
WV-3436	1.074	0.797	0.760	0.661	0.515	0.477

[2315]

	2		8.25		33	
对照	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3409	0.690	0.498	0.329	0.274	0.488	0.405
WV-3410	0.832	0.936	0.217	0.231	0.241	0.134
WV-3411	0.685	0.588	0.114	0.116	0.037	0.108
WV-3412		0.873	0.383	0.286	0.089	0.070
WV-3413	0.855	0.838	0.336	0.263	0.030	0.071
WV-3414	1.105	1.024	0.798	0.709	0.290	0.333
WV-3415	1.024		0.298	0.185	0.484	0.393
WV-3416	0.541	0.568	0.273	0.260	0.246	0.241
WV-3417	0.734	0.622	0.331	0.137	0.298	0.300
WV-3418	0.530	0.568	0.185	0.114	0.258	0.298
WV-3419	0.962	0.639	0.680	0.588	0.377	0.362
WV-3420		1.113	0.956	0.771	0.375	0.159
WV-3421	0.502	0.443	0.169	0.148	0.218	0.228
WV-3422	0.923	1.083	0.680	0.516	0.365	0.372

[2316]

	2		8.25		33	
对照	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3395	0.419	0.247	0.336	0.198	0.338	0.331
WV-3396	1.024	0.982	0.452	0.553	0.249	0.195
WV-3397	0.685	0.976	0.365		0.182	0.096

[2317]

WV-3398	1.053		0.159	0.273	0.061	0.052
WV-3399	0.357	0.440	0.284	0.141	0.221	0.282
WV-3400	0.867	0.861	0.553	0.458	0.184	0.160
WV-3401	1.252	0.904	0.481	0.383	0.133	0.093
WV-3402	0.437	0.302	0.122	0.096	0.070	0.046
WV-3403	1.176	1.218	1.003	1.144	0.879	0.929
WV-3404	0.195	0.367	0.155	0.135	0.269	0.215
WV-3405	1.024	0.695	0.377	0.258	0.194	0.208
WV-3406	1.287	1.075	1.314	1.201	1.314	0.969
WV-3407	0.949	0.917	0.609	0.498	0.326	0.125
WV-3408	0.239	0.360	0.107	0.187	0.265	0.161

[2318]

	2		8.25		33	
对照	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3381	0.560	0.391	0.103	0.108	0.146	0.199
WV-3382	0.949	1.024	0.393	0.271	0.132	0.211
WV-3383	1.031	0.996	0.617	0.458	0.455	0.133
WV-3384	1.252	1.060	0.402	0.416	0.136	0.133
WV-3385	0.962	1.098	0.407	0.410	0.221	0.123
WV-3386	0.680	0.440	0.186	0.246	0.265	0.176
WV-3387	0.269	0.191	0.100	0.067	0.081	0.141
WV-3388	1.168	0.982	0.849	1.053	1.168	0.892
WV-3389	1.083	1.031	1.399	0.879	0.771	0.804
WV-3390	0.676	0.580	0.226	0.265	0.035	0.051
WV-3391	0.505	0.396	0.187	0.153	0.107	0.176
WV-3392	0.462	0.362	0.139	0.116	0.093	0.070
WV-3393	0.273	0.391	0.102	0.111	0.060	0.044
WV-3394	0.509	0.405	0.263	0.133	0.109	0.097

[2319] 表109A.寡核苷酸的活性。

[2320]

浓度(nM)	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8148	111.7	111.5	102.6	105.8	102.9	103.1	92	96.5	99.6	118.7
Hep3B	97.3	114.3	107.8	106.6	105.8	106.6	90.9	100.8	95.3	105.5
WV-8149	128.4	118	104.2	99.8	104.8	103.2	97.1	102.1	104.6	96.5
Hep3B	135.8	131.3	108.8	108.5	94.5	106.1	107.8	99.3	103.3	102.4
WV-8150	120.7	123.7	115	99.8	98.6	100.9	88.5	92.3	103.1	102
Hep3B	113	111.8	98.4	102.1	102.3	100	103	100.8	104	107.9
WV-8151	112.3	147	108.4	103.4	104.6	104.6	111.1	100.1	102.4	100
Hep3B	119.6	124.3	106.6	101.6	110.1	104.1	113.7	100.3	100.3	104.7
WV-8152	119.1	139.2	113	107	112.7	121	112.4	111.7	88.5	114.7
Hep3B	133.7	149	118.1	103.2	101.7	101.8	102.5	94.6	98.3	104.2
WV-8148	26.6	41.6	64.4	90.6	91.8	86.5	98.2	90.5	99.6	94.1
Huh7	35.5	54	65.7	87.4	85.8	87.5	86.8	100.9	99.3	90.2
WV-8149	23.2	33.1	64.6	83.6	87.2	94.4	82.9	94.8	79.1	92.5
Huh7	27.5	44.3	65.5	89.5	84.5	87.9	82.9	92	94.6	85.1
WV-8150	26.3	26.6	55	80.4	86.7	91.5	86.9	90.1	88.4	84.7
Huh7	20	29.6	52.7	92.1	83.4	91.9	97	84	86.9	93.5
WV-8151	13.4	28.7	59.7	82	90.6	92.4	90.2	84.4	78.1	85.7
Huh7	23.6	32.8	63.6	77.7	101.1	92.6	91.6	100.9	83.4	90.2
WV-8152	13.2	36.7	58.3	90.9	94.4	95.7	76.1	84.3	90.3	85.2
Huh7	18.1	47.5	61	84.7	93.9	86.2	96	92.6	84	90.1

[2321]

nM	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8194	102.9	103.8	85.5	90.8	90.8	102.3	96.8	101.1	95.8	95.5
Hep3B	93.3	95.7	87.8	90	78.5	77.4	86.4	78.1	81	88.2
WV-8195	107.9	103.7	96.6	91.5	91.7	92.1	94.1	105.6	107.4	95.7
Hep3B	123	101.5	92.9	89.4	92	86	88.3	101.9	104.3	99.3
WV-8196	86.5	108.1	106	90.1	96.1	87.3	93.3	87.9	100.1	103.5
Hep3B	112.8	126.8	98.2	86.9	83.2	82.4	88.8	95.5	92.8	101.9
WV-8197	140.8	123.5	108.9	87	91.5	92.8	106.1	98.1	107.7	94.5
Hep3B	143.8	132.1	98.1	85.6	85.3	80.7	84.6	88	95.2	93.5
WV-8198	99.5	101	89.4	85.4	88.6	94.9	88.4	95.8	95	97.2
Hep3B	119.8	90.9	85.3	95.8	93.3	80.1	82.9	82.4	86.9	88
WV-8194	8.1	13.3	32.2	69.5	91.6	100.4	89.2	91.8	90.4	81.5
Huh7	7.4	31.2	38	76	86.9	93.6	92.5	92	87.5	104.3
WV-8195	7.3	27	41.1	64.1	83.2	96.5	95.1	84.7	89.8	87.3
Huh7	14	20	37.1	57.8	95	94.3	85.4	90.7	97.6	85.8
WV-8196	8.9	19.5	26.7	64.4	78.5	88.3	83.2	88.1	81.1	81.1
Huh7	14.3	19.9	37.1	57.3	91.7	91.8	88.5	84.5	84	91.9
WV-8197	4.1	27.3	40.8	65.6	88.8	91.7	95.6	96	90.6	93.3
Huh7	14.8	26.8	44	62.4	83.9	96.5	89.1	97.9	92.9	81.8
WV-8198	7.9	19.9	36.5	68.6	94.6	90.6	90	94	90.9	89.9
Huh7	6.9	26.7	47.9	63.8	83.1	99.5	97.2	97.1	88.1	97.8

[2322]

浓度(nM)	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8171	102.4	98.1	108.8	104.7	111.4	107.4	102.2	112	95.9	92.4
Hep3B	94.9	94.6	89.8	102.6	97.2	101.8	96.4	98.9	97.7	90.6
WV-8172	105	105.3	116.3	108.9	120	105.5	101.4	100.9	94.3	99.9
Hep3B	92.8	90.5	92.7	90.1	96.8	90.6	97.9	92.5	96.7	84.7
WV-8173	96.9	90.2	99.1	108.6	107.1	103.6	105.9	100.6	95.6	100.2
Hep3B	104.3	96.4	99	98.2	99.9	103.3	95.7	96.4	97.7	95.1
WV-8174	98	85.2	93.3	96.1	83.8	84.7	83	86.3	93.7	105.9
Hep3B	115.5	112.5	95.7	98.7	86.6	97.4	93.6	82.7	90.4	99.2
WV-8175	98.2	91	90.6	88	95.9	94.2	86.7	96	106.2	91.3
Hep3B	102.6	91.1	89.4	87.1	93.7	98.8	102.7	83.9	95.7	88.1
WV-8171	22.1	39.4	56.7	76.8	76	87.5	75.8	95.2	83.1	77.8
Huh7	19.2	58.8	66.5	77.9	89.6	88.9	93.8	91	90.8	97.2
WV-8172	13.9	30	54.5	80.4	88.1	87.6	79.8	85.4	82	98.4
Huh7	20.6	43.1	54.6	78.4	89.4	92.4	93.6	99.8	109.4	105.5
WV-8173	37.2	44.1	78.6	106.3	113.7	106.6	105.3	103.7	97.6	93.3
Huh7	41	75.8	85.6	100.6	111.3	103.2	114.4	117.5	107.3	107.7
WV-8174	30.2	47.6	66.3	69.3	92.1	85.6	85.6	76.1	87.3	89.8
Huh7	19	40.9	52.4	77.2	92.2	96.6	88.8	92	92.1	91.8
WV-8175	11.5	26.5	45.9	69.1	86.1	85.6	82.6	92.9	97	83.7

[2323]

Huh7	12.5	26.7	45.2	77.6	86.4	94.5	102.9	91.7	92	85.9
nM	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8217	88.4	85.5	87.5	86.9	89.2	90	98.6	98.5	97.1	86.5
Hep3B	93.3	83.5	76.7	80.1	78	77.9	77.6	74.8	79.8	86.6
WV-8218	100.6	94.9	92	93.1	99.6	96	98.2	95.5	92.9	87.4
Hep3B	99.3	96.4	99.2	96.3	95.5	100.8	100.5	93.6	96.7	96.3
WV-8219	147.3	128.9	107.6	106.1	104.8	106.8	98.6	101.5	96.5	110.7
Hep3B	126.8	103.2	94.8	93.5	94.2	96	100.6	103.3	96.7	102.9
WV-8220	104.2	115.4	103.9	97	106.9	102.2	99.4	105.1	99.1	95.3
Hep3B	100	89.8	96.8	95.5	107.4	106.4	104.3	95.9	117	101
WV-8221Hep3B	110.2	104.7	97.7	102.6	104.1	106.4	102.6	100.3	102	98.4
	94.5	98.5	101.6	99.7	99.4	108.4	103	107.1	100.3	103.3
WV-8217	26.8	37.9	58.2	81.9	94	101.3	112	105.2	97.8	28.2
Huh7	27.7	41	57.6	90.7	109.2	102.4	110.5	109.9	105.5	105.2
WV-8218	21.6	45.8	56.1	77.7	86.9	97.3	82.6	88.5	86.1	73.9
Huh7	20.9	28.8	55.3	78.1	106.9	107.3	107.6	95.6	104.1	82.8
WV-8219	31.5	31	42.7	62.7	92	91.7	85.7	75.7	77.2	85.7
Huh7	26	31.8	47.9	75	85.5	92.1	83.6	89.7	93.1	91.3
WV-8220	4.8	16.3	31.8	66.1	78.6	77.8	79.7	71.7	81.1	80.3
Huh7	11.8	30.1	54.4	77.4	105.6	98.6	90.5	85.7	93.9	85.5
WV-8221	6.2	21.4	31.8	48.6	78.3	85.8	75.5	83.8	85.3	93
Huh7	4.6	19.1	35.2	59.6	104.8	105.8	99.2	100.1	93.2	88.7

[2324] 表109B.寡核苷酸的活性。

[2325] Huh7细胞(突变型等位基因)中的IC50：

[2326]

寡核苷酸	IC50(nM)	寡核苷酸	IC50(nM)
WV-8148	7.3	WV-8197	3.2

WV-8149	9.2	WV-8198	3.5
WV-8150	5.5	WV-8217	5.4
WV-8151	7.9	WV-8218	5.9
WV-8152	12.6	WV-8219	3.1
WV-8171	11.2	WV-8220	5.5
WV-8172	5.2	WV-8221	2.6
WV-8173	12	WV-8194	3.5
WV-8174	6.6	WV-8195	3
WV-8175	4.2	WV-8196	2.8

[2327] 表110.寡核苷酸的活性。

[2328] Huh7细胞：

[2329]

	50	20	8	3.2	1.28	0.512	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-3861	23.1	43.8	72.8	101.4	102.4	103.3	85.5	91.9	93.7	92.0

	30.1	52.2	89.3	103.4	95.9	93.4	99.4	104.5	89.7	104.8
	8.0	13.3	32.7	65.4	87.0	83.1	91.2	84.1	76.1	85.3
WV-7805	10.1	22.7	49.1	82.1	87.8	81.8	82.5	77.8	87.9	79.1
	5.3	15.3	26.8	60.5	88.1	85.0	92.1	85.8	84.2	90.3
WV-7828	4.3	10.0	41.1	54.4	79.6	90.2	89.0	90.2	99.3	83.6
	4.1	4.4	20.0	42.9	63.8	85.3	77.7	79.3	84.6	93.4
WV-7851	6.7	6.6	20.3	47.5	86.7	79.7	97.4	97.4	85.0	89.4
	18.4	29.4	35.5	71.2	88.8	91.2	75.3	84.9	86.5	90.6
WV-8149	46.2	21.9	47.2	80.7	86.5	93.9	83.9	90.5	101.4	95.3
	20.5	13.7	30.4	53.8	73.3	85.2	74.8	80.7	87.0	84.4
WV-8172	20.3	21.9	41.3	59.0	78.7	83.5	91.1	92.5	91.8	104.3
	23.2	11.4	15.4	64.8	71.9	74.1	82.8	87.0	88.5	76.4
WV-8195	22.7	14.6	23.5	62.1	80.2	85.0	99.0	99.6	104.0	100.4
	6.6	13.1	13.4	53.7	73.0	93.6	94.6	93.8	88.0	92.3
WV-8218	20.2	14.0	30.6	57.7	97.4	117.6	99.8	101.2	114.2	109.0

[2330]

	50	20	8	3.2	1.28	0.512	0.204	0.081	0.032	0.013
	3.7	22.4	60.6	94.6	92.3	99.2	88.2	97.2	92.0	104.1
WV-3864	18.9	27.5	68.5	114.8	95.1	113.1	100.1	117.6	110.2	118.9
	6.6	12.6	34.8	66.1	73.0	88.8	93.9	90.6	91.2	94.2
WV-7808	6.4	14.2	32.3	80.2	106.0	106.7	107.6	89.2	103.4	97.6
	4.8	7.9	27.1	62.1	80.6	82.5	91.4	92.8	93.6	93.7
WV-7831	8.0	13.1	29.4	62.2	90.7	122.5	105.5	120.7	115.5	97.9
	2.0	7.1	21.5	49.2	74.1	83.3	116.8	75.8	83.4	95.0
WV-7854	5.0	5.3	17.0	50.4	100.7	99.7	103.2	99.8	101.7	90.1
		14.4	33.7	80.7	82.8	80.8	84.3	86.5	89.7	88.2
WV-8152		23.4	40.1	77.3	106.3	96.3	97.7	99.9	97.1	79.5
	17.6	13.5	18.2	48.5	69.7	87.0	72.8	91.4	86.5	81.6
WV-8175	22.4	16.5	19.2	51.1	108.5	89.7	87.4	102.0	91.2	95.4
	16.6	8.3	15.1	43.7	78.0	81.9	82.7	75.3	91.5	88.2
WV-8198	7.1	5.1	23.9	46.3	93.6	103.2	103.6	93.8	125.9	96.0
	16.0	9.6	12.4	31.8	73.1	101.6	96.7	77.9	86.7	94.3
WV-8221	13.0	10.9	16.2	44.1	85.5	102.0	110.9	123.8	101.9	102.9

[2331] 表111.寡核苷酸的活性。

[2332] 还制备和测试了若干种具有无碱基位点的PNPLA3 ssRNAi剂,特别是(磷烷基(phosphaneyl))氧基)丙-1-醇(PS)或3'-(磷烷基)氧基)四氢呋喃。示出了以2nM施用寡核苷酸的结果,并且还在0、0.05、0.128、0.32和0.8nM下测试了寡核苷酸(数据未示出)。数字是近似值并且表示残余的PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),其中100将表示100%残余的mRNA水平(0%敲低),并且0将表示0%残余的mRNA水平(100%敲低)。在本文的各个表中,除非另外指出,否则测量mRNA的水平。

[2333]

寡核苷酸	2nM	寡核苷酸	2nM
WV-4098	30	WV-9277	44
WV-9273	72	WV-9278	55

WV-9274	73	WV-9279	39
WV-9275	74	WV-9280	82
WV-9276	52	WV-9281	68

[2334] 表112.寡核苷酸的活性。

[2335] 还制备和测试了若干种具有C3修饰的APOC3 ssRNAi剂。示出了以2nM施用寡核苷酸的结果,并且还在0、0.05、0.128、0.32和0.8nM下测试了寡核苷酸(数据未示出)。数字是近似值并且表示残余的PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),其中100将表示100%残余的mRNA水平(0%敲低),并且0将表示0%残余的mRNA水平(100%敲低)。在本文的各个表中,除非另外指出,否则测量mRNA的水平。

[2336]

寡核苷酸	2nM	寡核苷酸	2nM
WV-4098	31	WV-4098	31
WV-9261	62	WV-9272	81
WV-9262	69	WV-9284	75
WV-9263	72		
WV-9264	62		
WV-9265	56		
WV-9266	64		
WV-9267	43		
WV-9268	69		
WV-9269	71		

[2337] 表113.寡核苷酸的活性。

[2338] 示出了25nM的数据;还在0、1.6和6.2nM下测试了寡核苷酸(数据未示出)。在原代食蟹猴肝细胞中体外测试了寡核苷酸。

[2339]

寡核苷酸	25 nM
WV-3421	13
WV-9434	63
WV-9439	55
WV-9444	37

[2340]

WV-3421	12
WV-9435	62
WV-9440	37
WV-9445	34
WV-3421	17
WV-9431	92
WV-9436	70
WV-9441	73
WV-9432	53
WV-9437	36
WV-9442	54
WV-9433	77
WV-9438	44
WV-9443	69

[2341] 表114.寡核苷酸的活性。

[2342] 原代食蟹猴肝细胞。示出了4nM的数据。还在0、0.1、0.25、0.66、1.6和10nM下测试了寡核苷酸(数据未示出)。数字表示残余的PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),并且数字是近似值。

[2343]

	Hep3b (野生型)	**Huh7 (突变型)**
WV-9890	**88**	**37**
WV-12100	**103**	**27**
WV-9893	**67**	**10**
WV-12101	**69**	**8**

[2344] WV-9893和WV-12101具有不对称格式。

[2345] 测试了另外的具有不对称格式但是立体随机的寡核苷酸,其在P9/P12(位置9和12)处具有双突变。WV-8609、WV-8847、WV-8848、WV-8849的IC50均为约4至5nM。

[2346] 表115A.寡核苷酸的活性。

[2347] 在第2天在大鼠肝匀浆中测试了若干种PNPLA3寡核苷酸(其中一些具有不对称结构)的稳定性。数字表示剩余的全长寡核苷酸的百分比;数字是近似值。

[2348]

WV-7805	**58**

[2349]

WV-8603	**46**
WV-8608	**73**
WV-9889	**69**
WV-9890	**76**
WV-8609	**26**
WV-8601	**61**
WV-8605	**65**
WV-8606	**105**
WV-9891	**43**
WV-9892	**52**
WV-9893	**115**

[2350] 表115B.寡核苷酸的活性。

[2351] 还制备了若干种寡核苷酸,其靶向不同基因因子XI(FXI或F11)的小鼠同源物,并包含附加的组分,所述组分使作为GalNAc或PFE配体的三天线、双天线或单天线配体。将这些以0.3、1或3mpK QDx3施用于小鼠。下面的数字表示mFXI/mHPRT1 mRNA相对于3mpk的对照的水平。还以0.3和1mpk向小鼠施用寡核苷酸(数据未示出)。

[2352]

寡核苷酸	配体	mFX1/mHPRT1
WV-3969	Tri-GalNAc	23
WV-5287	Tri-PFE配体	22
WV-7299	Bi-GalNAc	22
WV-7300	Bi-PFE配体	20
WV-7297	Mono-GalNAc	74
WV-7298	Mono-PFE配体	43

[2353] 表115C.寡核苷酸。

[2354]

寡核苷酸	序列	裸序列	立体化学
WV-7297	Mod038L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	OXXXXXXXXXX XXXXXXXXX
WV-7298	Mod039L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	OXXXXXXXXXX XXXXXXXXX
WV-7299	Mod040L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	OXXXXXXXXXX XXXXXXXXX

[2355]

WV-7300	Mod041L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	OXXXXXXXXXX XXXXXXXXX
WV-5287	Mod034L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	OXXXXXXXXXX XXXXXXXXX

[2356] 此表中的各种组分(例如,*、Mod038等)与表1A中的那些组分相同。所有这些寡核苷酸都是单链的,尽管所述序列被分成多行用于格式化。

[2357] 构建了包含三天线、双天线或单天线配体的各种寡核苷酸,所述配体是PFE配体或GalNAc。

[2358] 在一些实验中,构建了包含与单天线、双天线或三天线GalNAc(也称为Ref.GalNAc或参考GalNAc)或PFE配体(也称为PFE ASPGR配体、PFE GalNAc、桥联的双环缩酮或双环配体)缀合的寡核苷酸的化合物。

[2359] 在一些实施方案中,寡核苷酸是PNPLA3寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸靶

向不同的基因APOC3。

[2360] 此类APOC3寡核苷酸包括：

[2361] 表115D.寡核苷酸。

[2362]

寡核苷酸	配体	配体和接头的替代名称(L001是接头)	描述配体的示例性合成的实例	描述具有配体的寡核苷酸的示例性合成的实例
WV-8877	无	-	-	-
WV-7107	无	-	-	37A
WV-6558	Ref. GalNAc 三天线	Mod001L001	38 (受保护的型式)	37A，37B
WV-9542	PFE 配体三天线	Mod083L001	31，40	37C
WV-9543	Ref. GalNAc 双天线	Mod079L001	35 (受保护的型式)	37D
WV-9544	PFE 配体双天线	Mod080L001	32，33	37E
WV-9545	Ref. GalNAc 单天线	Mod081L001	36 (受保护的型式)	37F
WV-9546	PFE 配体单天线	Mod082L001	34	37G

[2363]

[2364] Ref.GalNAc三天线也称为Tri-GalNAc;PFE配体三天线也称为Tri-PFE配体;Ref.GalNAc双天线也称为Bis-GalNAc;PFE配体双天线也称为Bis-PFE配体;Ref.GalNAc单天线也称为Mono-GalNAc;并且PFE配体单天线也称为Mono-PFE配体。在表1A的图注说明和本文的其他文本中提供了Mod001、Mod079、Mod080、Mod081、Mod082、Mod083和L001的结构。配体也描述于实施例27中。Mod083也描述于实施例4A和4B中。

[2365] 实施例29、35和36中的GalNAc结构表示受保护的型式,因为它们包含-OAc(-O-乙酸酯基团)。在所列的寡核苷酸的构造中,在化合物与寡核苷酸缀合后的去保护过程中除去Ac基团。例如,如实施例37B中所述,例如用浓缩的氢氧化铵进行去保护。在这些结构的去保护版本中,-OAc被-OH替代。

[2366] WV-8877(阴性对照)靶向不是APOC3或PNPLA3的不同基因。

[2367] 将APOC3寡核苷酸WV-7107以不同的化合价(单、双或三天线)与GalNAc或PFE配体缀合,并在第1天将阴性对照单独施用于携带人APOC3转基因(B6.Cg-Tg(APOC3)2Bres/J)的Tg(转基因)小鼠,并通过血清hAPOC3蛋白质减少监测APOC3敲低。

[2368]

WAVE ID	序列	裸序列	立体化学
WV-6558	Mod001L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSS RS SRSSROOOS
WV-9542	Mod083L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSS RS SRSSROOOS
WV-9543	Mod079L001Aeo *	AGCTTCTTGTC	OSOOORSSS

[2369]

WAVE ID	序列	裸序列	立体化学
	SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	CAGCTTTAT	RS SRSSROOOS
WV-9544	Mod080L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSS RS SRSSROOOS
WV-9545	Mod081L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSS RS SRSSROOOS
WV-9546	Mod082L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSS RS SRSSROOOS

[2370] 此表中的各种组分(例如,*、Mod083等)与表1A中的那些组分相同。所有这些寡核苷酸都是单链的,尽管所述序列被分成多行用于格式化。

[2371] 包含各种配体(包括但不限于Ref.GalNAc三天线、PFE配体三天线、Ref.GalNAc双天线、PFE配体双天线、Ref.GalNAc单天线、PFE配体单天线)的PNPLA3寡核苷酸通过类似于针对对应的APOC3寡核苷酸所描述的方法来构建。

[2372] 表115E.寡核苷酸的活性

[2373] 所有寡核苷酸在第1天以3mg/kg单剂量(皮下)施用于动物。此外,WV-6558和WV-9542也在第1天以1mg/kg单剂量(皮下)施用于动物。在第0、8、15、22、29、36、43和50天收集血清。每组含有5只动物。PBS和WV-8877(其靶向不是APOC3的基因)是阴性对照。

[2374] 数字表示相对的APOC3蛋白质水平,其中1.00表示相对于PBS的100%。

[2375] 在包括这一研究在内的各种体内研究中,测试的动物是表达人APOC3基因的转基因小鼠。

[2376]

天数	0	8	15	22	29	36	43	50
	1.52	0.95	1.50	0.56	0.96	1.07	1.57	1.74
	0.59	0.73	0.74	0.87	0.90	0.90	0.73	0.71
PBS	1.21	0.99	1.10	1.34	0.89	0.82	0.62	0.78

[2377]

	0.67	1.14	0.89	0.99	0.89	0.86	0.95	0.86
	1.01	1.20	0.76	1.24	1.35	1.36	1.13	0.91
	1.56	1.24	1.67	1.59	2.37	1.56	1.47	2.27
	0.78	0.73	0.85	0.80	1.15	0.61	0.75	1.19
	1.08	0.81	1.42		1.84	1.21	1.73	3.05
WV-8877	0.71	1.21	0.74	0.62	1.02	1.07	0.95	1.48
	1.28	1.21	0.60	0.80	1.13	1.50	0.86	
	2.74	0.06	0.05	0.06	0.11	0.38	0.69	1.43
	1.15	0.17	0.05	0.04	0.09	0.27	0.01	0.81
	0.38	0.04	0.05	0.10	0.18	0.45	0.53	1.07
WV-6558	0.44							
	0.41	0.04	0.04	0.08	0.09	0.11	0.13	0.22
	1.10	0.23	0.05	0.07	0.13	0.23	0.32	0.78
	0.71	0.03	0.02	0.04	0.06	0.09	0.20	0.28
	0.59	0.05	0.04	0.08	0.16	0.72	0.90	0.80
WV-9542	0.32	0.03	0.02	0.04	0.09	0.37	0.54	0.55
	0.40	0.03	0.03	0.06	0.21	0.39	0.49	0.58
	0.48	0.03	0.05	0.09	0.08	0.21	0.27	0.49
	1.19	0.06	0.06	0.09	0.06	0.09	0.57	0.96
	0.79	0.05	0.04	0.17	0.06	0.15	0.42	0.80
WV-9543	0.79	0.09	0.03	0.28	0.20	0.17	0.28	0.59
	0.48	0.04	0.02	0.08	0.06	0.12	0.17	0.32
	0.91		0.04	0.06	0.06	0.19	0.26	0.67
	0.94	0.10	0.03	0.08	0.09	0.15	0.34	0.76
	1.72	0.19	0.04	0.07	0.09	0.25	0.60	0.83
WV-9544	1.92	0.28	0.07	0.10	0.11	0.13	0.26	0.56
	0.81	0.04	0.05	0.11	0.12	0.20	0.32	0.73
	0.49	0.03	0.07	0.16	0.21	0.32	0.66	0.60
	1.14	0.22	0.04	0.10	0.15	0.58	0.76	0.97
	0.58	0.03	0.04	0.15	0.27	0.67	1.16	0.97
WV-9545	0.64	0.03	0.04	0.19	0.42	0.98	1.38	0.96
	0.60	0.05	0.03	0.08				
	3.33	0.20	0.06	0.27	0.24	0.49	1.13	1.31
	1.03	0.11	0.04	0.09	0.14	0.46	0.55	0.68
	1.20	0.28	0.12	0.20	0.31	0.95	1.75	1.39
WV-9546	0.71	0.15	0.04	0.19	0.39	0.26	0.75	0.36
	0.18	0.04	0.02	0.20	0.28	0.21	0.56	0.56

[2378] 表115F.部分I.肝脏中的寡核苷酸积累

[2379] 在单次3mg/kg剂量30分钟之后,还分析了肝脏中的寡核苷酸积累。数字表示μg寡核苷酸/g组织。测试的动物是表达人APOC3基因的转基因小鼠。

[2380]

PBS	WV-6558	WV-9542	WV-9543	WV-9544	WV-9545	WV-9546
0	2.95	1.73	3.52	3.82	2.02	4.27
0	2.46	1.69	2.49	4.19	1.99	1.37
0	2.48	0.45	1.14	2.74	1.30	1.29
0	1.85	1.09	2.12	2.26	1.14	1.25
0	1.79	1.43	4.26	1.88	1.07	0.82

[2381] 在同一实验中:在单次1mg/kg剂量30分钟之后,还分析了WV-6558和WV-9542在肝脏中的寡核苷酸积累。数字表示μg寡核苷酸/g组织。

[2382]

PBS	WV-6558 1mpk	WV-9542 1mpk
0	1.92	0.46
0	1.77	1.08
0	1.43	0.56
0	0.68	0.30
0	0.18	0.67

[2383] 表115F.部分II.肝脏中的寡核苷酸积累

[2384] 在单次3mg/kg剂量8天之后,还分析了肝脏中的寡核苷酸积累。数字表示μg寡核苷酸/g组织。测试的动物是表达人APOC3基因的转基因小鼠。

[2385]

PBS	WV-6558	WV-9542	WV-9543	WV-9544	WV-9545	WV-9546
0	3.30	2.93	6.83	4.56	3.55	3.83
0	3.49	2.20	6.56	4.45	2.23	4.05
0	3.18	1.34	4.58	2.72	1.94	2.28
0	2.41	1.61	3.87	2.31	3.03	2.12
0	1.43	2.90	4.10	2.36	1.85	3.50

[2386] 在同一实验中:在单次1mg/kg(1mpk)剂量8天之后,还分析了WV-6558和WV-9542在肝脏中的寡核苷酸积累。数字表示μg寡核苷酸/g组织。

[2387]

PBS	WV-6558 1mpk	WV-9542 1mpk
0	0.72	1.08
0	0.74	1.20
0	0.60	0.75
0	0.55	0.57
0	0.63	0.63

[2388] 数据示出了与APOC3寡核苷酸缀合的各种配体的功效;这些相同的配体也可以缀合到PNPLA3寡核苷酸上。

[2389] 表116.寡核苷酸的活性。

[2390] 在大鼠肝匀浆中测试了各种PNPLA3 RNAi剂的稳定性。数字表示在第5天剩余的全长寡核苷酸的百分比;还在第2天测试了寡核苷酸(数据未示出);并且数字是近似值。一些寡核苷酸包含5'-DNA-T,而一些寡核苷酸包含5'-Rc-Me-T。

[2391]

WV-8095	62
WV-9495	61
WV-9499	86
WV-8701	49
WV-9496	71
WV-9500	99

[2392] 表117.寡核苷酸的活性。

[2393] 还测试了各种具有附加的组分(三天线GalNAc缀合物)的PNPLA3寡核苷酸(包括但不限于WV-7805、WV-8132、WV-8566、WV-8599、WV-9859和WV-9670)的功效。在Huh7-148 OE细胞(其包含PNPLA3突变型等位基因)上在10nM下在体外测试了寡核苷酸。数字表示PNPLA3 mRNA水平(PNPLA3/HPRT1),并且数字是近似值。在许多情况下,寡核苷酸在食蟹猴(非人灵长类动物或NHP)肝细胞中未表现出野生型PNPLA3的显著敲低。例如,当在高达10nM下进行测试时,WV-8132、WV-8600、WV-9868和WV-9860在食蟹猴(非人灵长类动物或NHP)肝细胞中未表现出野生型PNPLA3的显著敲低(数据未示出)。

[2394] 表118.寡核苷酸的活性。

[2395] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2396]

阴性对照	100	阴性对照	100
WV-993	117	WV-993	117
WV-7805	20	WV-8600	47
WV-8132	54	WV-8564	47
WV-8566	67	WV-8596	62
WV-8599	82	WV-8597	38
WV-9859	56		
WV-9670	57		

[2397]

阴性对照	100	阴性对照	100
WV-993	117	WV-993	117
WV-9868	48	WV-9860	65
WV-9869	50	WV-9861	58
WV-9870	53	WV-9862	62

[2398] 表119.寡核苷酸的活性。

[2399] 在体外RNA酶H测定中测试各种PNPLA3寡核苷酸。

[2400] 将PNPLA3寡核苷酸在靶RNA的存在下温育,所述靶RNA是野生型等位基因(WV-8808)或148等位基因(WV-8807)。数字表示剩余的靶RNA(WV-8808或WV-8807)的百分比。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2401]

时间(分钟)	0	5	10	15	20	30	45	60
W-7805+WV-8807	100.0	94.1	93.4	88.6	90.6	82.8	74.5	73.4

WV-8603+WV-8807	100.0	93.1	89.7	84.4	91.0	82.4	73.0	66.4
WV-8608+WV-8807	100.0	95.4	92.2	89.8	87.4	81.4	79.7	72.1
WV-9889+WV-8807	100.0	90.9	87.7	81.9	85.7	74.4	72.9	66.4
WV-9890+WV-8807	100.0	92.7	89.6	85.4	88.7	77.0	75.8	66.8
WV-7805+WV-8808	100.0	99.5	97.7	98.1	96.9	96.2	95.6	93.4
WV-8603+WV-8808	100.0	102.2	99.4	100.3	99.1	98,5	99.2	95.6
WV-8608+WV-8808	100.0	98.8	97.5	96.9	95.9	96.9	95.5	94.1
WV-9889+WV-8808	100.0	99.9	99.2	99.5	98.6	97.8	97.2	96.3
WV-9890+WV-8808	100.0	107.5	100.7	100.8	99.1	104.2	98.3	97.5
时间(分钟)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-8601+WV-8807	100.0	93.1	90.9	90.4	91.4	88.2	85.6	80.1
WV-8605+WV-8807	100.0	98.3	96.0	96.4	96.0	96.0	87.1	86.7
WV-8606+WV-8807	100.0	90.1	91.6	90.7	90.9	86.6	82.4	79.1
WV-8609+WV-8807	100.0	92.1	89.0	83.8	85.5	75.6	75.7	69.0
WV-8601+WV-8808	100.0	99.0	100.2	100.2	97.8	97.6	97.2	94.1
WV-8605+WV-8808	100.0	100.7	99.7	100.9	98.4	99.1	98.5	94.6
WV-8606+WV-8808	100.0	101.2	97.6	98.1	96.3	97.0	96.5	93.9
WV-8609+WV-8808	100.0	96.7	93.7	98.6	96.8	95.6	96.2	94.5
时间(分钟)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-9891+WV-8807	100.0	91.6	88.3	86.1	87.9	79.8	75.6	75.2
WV-9892+WV-8807	100.0	93.2	86.9	83.5	84.3	74.2	64.2	58.6
WV-9893+WV-8807	100.0	94.6	88.6	86.6	88.6	77.4	69.0	65.6
WV-9891+WV-8808	100.0	98.3	98.6	96.9	95.0	94.2	92.8	89.8
WV-9892+WV-8808	100.0	100.7	101.8	100.7	99.3	97.9	97.4	95.7
WV-9893+WV-8808	100.0	100.1	100.3	100.2	99.3	96.3	96.1	93.5
时间(分钟)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-9894+WV-8807	100.0	96.2	90.1	85.1	84.7	79.5	76.8	74.9
WV-9895+WV-8807	100.0	97.0	92.5	87.1	84.3	77.0	71.8	70.7
WV-9896+WV-8807	100.0	98.2	93.2	86.0	81.8	74.8	69.2	70.0
WV-9894+WV-8808	100.0	98.8	97.1	97.4	96.1	94.0	95.4	91.4
WV-9895+WV-8808	100.0	99.9	97.1	98.5	99.3	96.1	96.4	93.6
WV-9896+WV-8808	100.0	99.2	99.0	98.3	96.4	95.6	93.8	90.6

[2402] PNPLA3寡核苷酸WV-980、WV-9893、WV-8606和WV-7805还显著降低了具有PNLA3148突变的Huh7细胞中的PNPLA3148突变mRNA水平(相对于HPRT1,在12.5nM下达到约25％至55％的残余的突变型PNPLA3),但是这些寡核苷酸并没有显著降低具有野生型PNPLA3的Huh7细胞中的野生型PNPLA3水平(在12.5nM下约有90％或更多的残余野生型PNPLA3水平)。

[2403] 表120.寡核苷酸的活性。

[2404] 用寡核苷酸处理之后,在48小时在Hep3B细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,1.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3

mRNA。

[2405]

浓度 (nM) (exp10)	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV-3380	0.059	0.193	0.568	0.809	0.809	0.917	1.032	0.983
	0.092	0.365	0.720	0.862		1.004	1.121	
WV-3986	0.379	0.444	0.673	0.790	0.870	0.870	0.993	0.933
	0.486	0.551	0.752	0.901	1.007	0.939	0.876	1.140
WV-3987	0.400	0.521	0.742	0.870	0.959	0.889	0.986	0.952
	0.451	0.594	0.914	0.966	1.086	0.972	1.021	1.072
WV-3988	0.496	0.521	0.742	1.021	0.946	1.079	0.907	0.959
	0.328	0.615	0.920	1.057	1.064	0.979	0.901	1.133

[2406]

浓度 (nM) (exp10)	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV-3393	0.115	0.165	0.438	0.795	0.882	1.028	1.086	0.986
	0.080	0.218	0.555	0.835	0.952	1.064	0.933	1.057
WV-3989	0.316	0.279	0.547	0.790	0.852	0.993	0.966	1.000
	0.295	0.412	0.651	0.889	1.049	1.140	0.986	1.173
WV-3990	0.259	0.444	0.624	0.979	1.109	1.021	1.007	0.993
	0.274	0.559	0.779	0.959	1.079	1.042	1.049	1.164

[2407] 表121.寡核苷酸的活性。

[2408] 用寡核苷酸处理之后,在48小时在Hep3B细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,1.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2409]

浓度 (nM) (exp10)	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV-3402	0.146	0.207	0.457	0.907	0.933	0.959	0.939	0.952
	0.104	0.319	0.697	0.914	0.926	1.028	1.094	1.102
WV-3991	0.216	0.423	0.582	0.858	0.907	0.966	0.870	0.966
	0.303	0.500	0.722	1.049	0.895	0.979	1.042	1.035
WV-3992	0.303	0.384	0.594	0.823	0.818	0.907	0.847	0.852
	0.321	0.423	0.673	0.914	0.933	0.907	0.959	1.057

[2410] 表122.寡核苷酸的活性。

[2411] 用寡核苷酸处理之后,在48小时在Hep3B细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,1.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2412]

浓度 (nM) (exp 10)	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV-3387	0.091	0.205	0.527	0.811	1.070	0.881	0.977	0.971
	0.081	0.135	0.391	0.851	1.033	0.964	0.944	1.070
WV-3993	0.998	0.912	1.026	1.062	1.308	1.019	1.019	0.957
	0.869	0.912	1.123	1.077	1.084	1.048	1.055	1.100
WV-3994	0.944	0.991	1.195	1.040	1.107	1.012	1.123	0.971
	0.857	0.991	1.146	1.077	1.092	1.138	1.033	1.154

[2413] 表123.寡核苷酸的活性。

[2414] 用寡核苷酸处理之后,在48小时在Hep3B细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,1.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2415]

浓度 (nM) (exp10)	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV-3391	0.176	0.264	0.502	0.912	0.944	1.170	1.077	0.887
	0.141	0.230	0.531	0.788	1.040	1.146	1.005	1.005
WV-3995	0.925	1.026	0.977	1.131	1.162	0.984	1.123	0.811
	0.751	0.957		1.123		1.162	1.062	0.971
WV-3996	0.893	0.899	0.833	0.991	1.203	1.146	1.138	0.964
	0.875	0.899	0.851	1.187		1.123	1.040	1.131

[2416] 表124.寡核苷酸的活性。

[2417] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2418]

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
对照	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8

[2419]

WV-6585	58.8	56.9	71.3	90.8	89.4	79.0
WV-6586	82.1	53.7	82.5	79.5	89.0	66.2
WV-6587	49.9	45.3	103.1	56.0	74.7	77.9
WV-6588	58.6	60.9	82.1	84.9	86.5	85.3
WV-6589	61.8	51.3	92.2	94.4	77.8	83.5
WV-6590	63.7	64.3	62.9	83.9	85.5	60.8
WV-6591	83.3	71.4	74.7	75.2	76.3	94.2
WV-6592	49.7	39.8	51.4	40.4	54.3	39.4
WV-6593	68.1	77.7	58.3	89.3	64.6	70.7
WV-6594	82.1	53.7	58.7	59.1	61.6	62.2
WV-4054	58.7	35.6	55.3	49.8	66.0	60.3
WV-6595	40.9	52.4	58.0	54.5	60.5	56.2
WV-6596	48.6	40.2	57.2	49.4	46.9	49.2
WV-6597	27.7	31.4	41.8	52.7	61.3	45.0
WV-6598	40.1	35.4	59.1	53.6	44.5	42.3
WV-6599	37.3	54.3	73.0	61.8	76.6	69.6
WV-6600	64.7	67.5	88.7	105.6	95.3	115.7
WV-6601	74.2	48.0	64.4	51.4	97.0	81.9
WV-6602	64.7	51.6	64.0	63.3	95.8	64.1
WV-6603	57.8	40.4	85.7	73.9	67.1	71.1
WV-6604	50.7	50.5	57.8	47.0	72.0	47.1
WV-6605	52.1	52.5	58.2	57.8	58.9	57.8
WV-6606	27.1	56.6	52.4	51.1	77.7	53.9
WV-6607	35.7	41.6	44.0	37.0	76.2	53.7

[2420] 表125.寡核苷酸的活性。

[2421] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2422]

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
对照	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6608	74.0	71.3	64.3	80.2	90.8	81.4
WV-6609	88.6	51.9	71.6	57.7	66.3	61.2
WV-6610	51.1	59.5	65.1	51.7	61.2	60.6
WV-6611	40.9	47.5	61.7	57.3	63.2	75.1
WV-6612	50.9	59.8	50.6	53.3	75.4	54.3
WV-6613	39.0	49.1	49.5	35.6	53.8	43.5
WV-6614	51.6	65.2	43.6	59.6	47.8	67.1

[2423]

WV-6615	45.7	70.0	40.0	41.6	44.1	53.2
WV-5305	61.4	82.3	73.1	100.3	83.3	101.0
WV-6616	63.6	49.3	67.0	74.3	62.0	70.1
WV-6617	67.5	45.2	44.0	54.6	54.9	59.2
WV-6618	53.4	44.2	45.4	46.4	66.5	32.9
WV-6619	56.7	28.9	64.4	50.3	49.7	42.9
WV-6620	61.8	55.6	57.8	90.1	37.8	52.5
WV-6621	63.3	51.1	55.0	73.3	31.4	54.7
WV-6622	67.5	34.7	55.2	48.0	27.4	61.7
WV-6623	57.1	56.5	73.3	88.7	78.4	95.9

[2424] 表126.寡核苷酸的活性。

[2425] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2426]

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
对照	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6624	59.2	71.5	52.2	78.3	64.7	59.0
WV-6625	53.7	50.7	49.4	41.9	53.1	51.1
WV-6626	62.3	58.2	65.0	70.4	39.7	53.9
WV-6627	57.5	51.1	66.9	59.1	49.2	52.9
WV-6628	44.8	48.6	61.5	59.8	50.4	63.3
WV-6629	61.4	54.4	59.5	86.7	52.5	58.3
WV-6630	40.8	54.1	44.5	46.3	56.3	54.3
WV-6631	61.0	61.4	47.6	111.2	75.1	70.1
WV-6632	67.5	96.3	93.1	79.0	84.8	86.5
WV-6633	61.1	56.4	51.8	37.1	40.6	46.0
WV-6634	66.7	65.7	52.8	51.9	39.1	39.0
WV-6635	90.3	63.6	72.6	68.6	66.7	70.6
WV-6636	68.0	40.3	57.7	55.9	45.1	50.6
WV-6637	68.0	46.2	46.9	60.4	40.2	69.4
WV-6638	46.2	38.0	64.8	41.3	40.3	32.9

[2427] 表127.寡核苷酸的活性。

[2428] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100％PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0％PNPLA3 mRNA。

[2429]

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
对照	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6639	94.8	81.0	113.1	90.2	68.5	69.4
WV-6640	91.3	78.0	60.4	87.5	87.7	61.7
WV-6641	76.4	113.6	83.1	87.6	59.6	65.0
WV-6642	95.0	104.3	90.6	98.5	74.8	73.5
WV-6643	126.6	90.1	96.8	77.1	60.0	75.3
WV-6644	125.8	94.5	89.9	85.1	81.4	63.5
WV-6645	93.1	74.3	97.7	66.4	68.9	40.8
WV-6646	83.5	80.4	85.1	60.9	56.7	33.7
WV-6647	92.9	77.8	91.8	79.8	125.9	62.3
WV-6648	104.4	88.7	92.0	111.5	67.3	73.3
WV-6649	106.9	85.8	79.7	85.5	78.4	74.5
WV-6650	94.6	79.2	87.4	91.5	66.5	97.9
WV-6651	116.4	74.8	92.2	96.8	58.0	57.3
WV-6652	114.1	70.2	110.9	94.0	88.6	66.4
WV-6653	116.1	89.1	90.0	100.0	77.3	72.9
WV-6654	84.9	99.0	101.1	128.1	67.4	70.9
WV-6655	102.0	99.5	116.9	83.8	114.7	85.6
WV-6656	115.3	119.9	114.7	85.2	101.0	108.4
WV-6657	88.6	94.1	114.1	109.7	94.6	100.4
WV-6658	114.4	92.2	131.2	134.7	133.3	90.6
WV-6659	116.9	104.2	122.1	96.6	99.8	122.3
WV-6660	104.7	79.5	124.1	100.2	79.7	88.5

[2430] 表129.寡核苷酸的活性。

[2431] 用寡核苷酸处理之后,在细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2432]

	0	0.1nM	0.4 nM	3.0 nM	12.5 nM
	96.1	76.8	61.7	58.2	53.6
WV-4098	105.7	73.2	58.3	47.9	57.9
	107.4	92.5	117.0	85.0	74.7
WV-7776	85.4	93.1	102.7	73.4	62.5
WV-7777	107.4	107.4	88.2	63.2	71.7

[2433]

	90.9	90.9	73.4	73.1	59.8

[2434] 表130.寡核苷酸的活性。

[2435] 在Huh7细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。示出了残余的PNPLA3 mRNA水平,其中PNPLA3相对于HPRT1。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2436]

	WV-4098	WV-7465	WV-8076
	103.4	112.5	101.0
0	86.2	95.5	109.7
0.02	82.5	62.8	67.2
nM	91.2	61.6	79.1
0.1	54.4	39.5	46.5
nM	56.3	48.4	72.2
0.4	49.6	31.2	46.6
nM	48.1	42.7	43.9
3.125	21.9	39.2	82.0
nM	33.7	37.1	79.7

[2437] 表131.寡核苷酸的活性。

[2438] 在Huh7细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。示出了残余的PNPLA3 mRNA水平,其中PNPLA3相对于HPRT1。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2439]

	WV-4098	WV-8080	WV-8081
	103.4	83.3	79.2
0	86.2	109.8	89.9
0.02	82.5	58.1	97.2
nM	91.2	89.1	92.4
0.1	54.4	71.2	91.7
nM	56.3	72.1	95.5
0.4	49.6	79.8	94.4
nM	48.1	97.9	108.2
3.125	21.9	59.3	115.6
nM	33.7	62.0	122.4

[2440] 表132.寡核苷酸的活性。

[2441] 在Huh7细胞中体外测试各种PNPLA3寡核苷酸。示出了残余的PNPLA3 mRNA水平,其中PNPLA3相对于HPRT1。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2442]

	WV-4098	WV-8077	WV-8078	WV-8079
	103.4	108.4	94.0	80.9
0	86.2	107.6	98.3	87.7
0.02	82.5	102.1	96.4	71.1
nM	91.2		99.8	69.3
0.1	54.4	87.6	93.9	75.6
nM	56.3	87.9	118.3	97.5
0.4	49.6	83.4	91.0	88.6
nM	48.1	97.1	116.6	120.6
3.125	21.9	79.8	73.7	105.4
nM	33.7	74.8	87.7	

[2443] 表133.寡核苷酸的活性。

[2444] 在Huh7细胞中测试各种PNPLA3寡核苷酸。示出了残余的PNPLA3 mRNA水平,其中PNPLA3相对于HPRT1。在此表中,100.00表示用寡核苷酸处理之后的100%PNPLA3 mRNA水平,并且0.00代表0%PNPLA3 mRNA。

[2445]

	WV-4098	WV-7465
	103.4	112.5
0	86.2	95.5
0.02	82.5	62.8
nM	91.2	61.6
0.1	54.4	39.5
nM	56.3	48.4
0.4	49.6	31.2
nM	48.1	42.7
3.125	21.9	39.2
nM	33.7	37.1

[2446] 还在体外测试了若干种PNPLA3寡核苷酸的细胞因子释放,包括WV-8061、WV-8291、WV-8698和WV-8700。4种PNPLA3 ssRNAi剂均未在任何供体样品中诱导细胞因子释放(IL-1β、IL-6、MCP-1、IL-12p40、IL-12p70、IL-1α、MIP-1α、MIP-1β、TNFα)。相反,即使在低浓度(0.78ug/ml)下,阳性对照也诱导细胞因子活化。

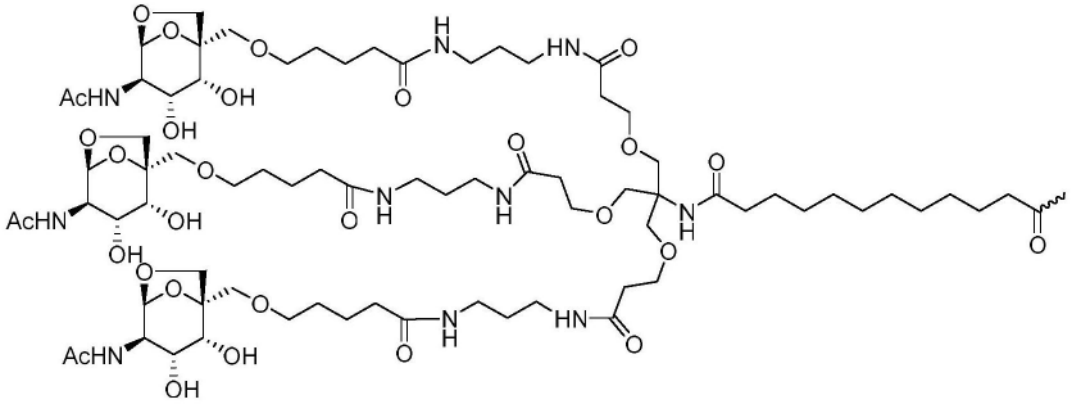
[2447] 实施例27.寡核苷酸的示例性的附加的组分。

[2448] 设计和构建了各种包含各种附加的组分的寡核苷酸。本文所述的各种另外的PNPLA3寡核苷酸也可以与这些附加的组分缀合。

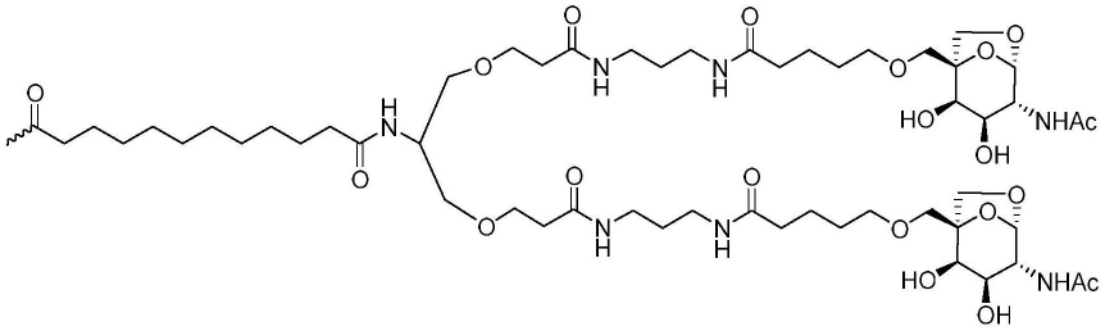
[2449] 这些附加的组分包括本文列出的那些组分:

[2450] 三天线配体也称为Tri-PFE ASPGR配体或Tri-PFE配体或Tri-PFE:

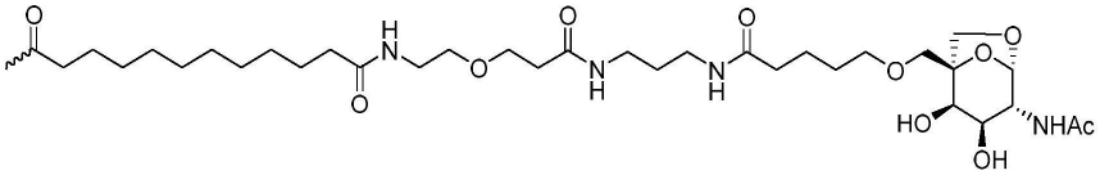
[2451]



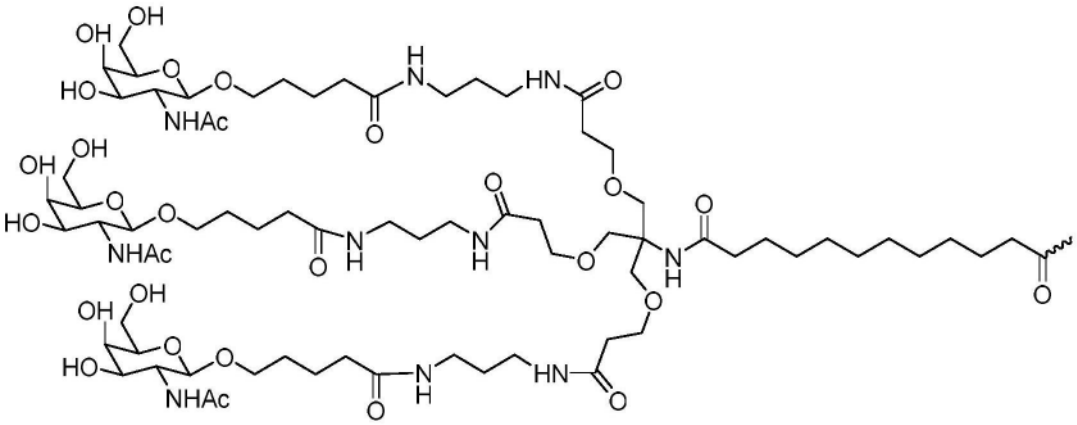
[2452] 双天线(或二天线)配体,也称为双(或二)天线PFE配体或双(或二)天线PFE ASPGR配体或双-PFE:

[2453] 

[2454] 单天线配体,也称为单天线PFE配体或单天线PFE ASPGR配体或单PFE:

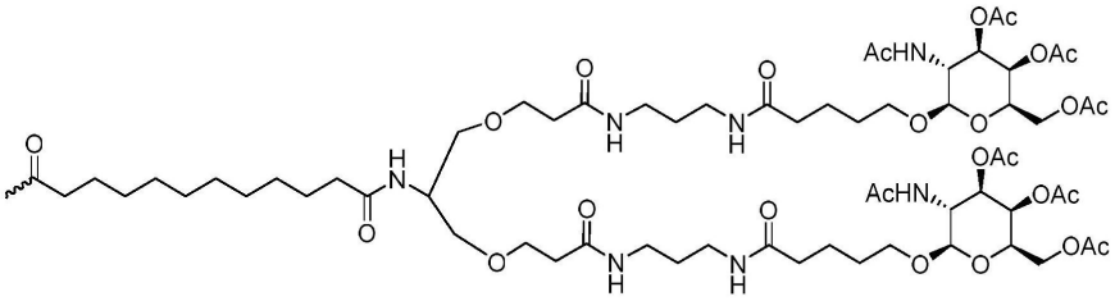
[2455] 

[2456] 三天线GalNAc或Tri-GalNAc:

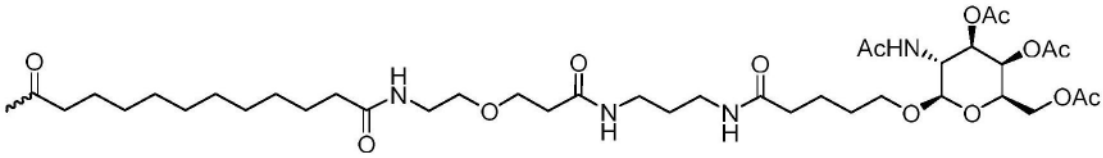
[2457] 

[2458] 以下的受保护的型式:

[2459] 双天线(或二天线)GalNAc或bis-GalNAc:

[2460] 

[2461] 单天线GalNAc或Mono-GalNAc:

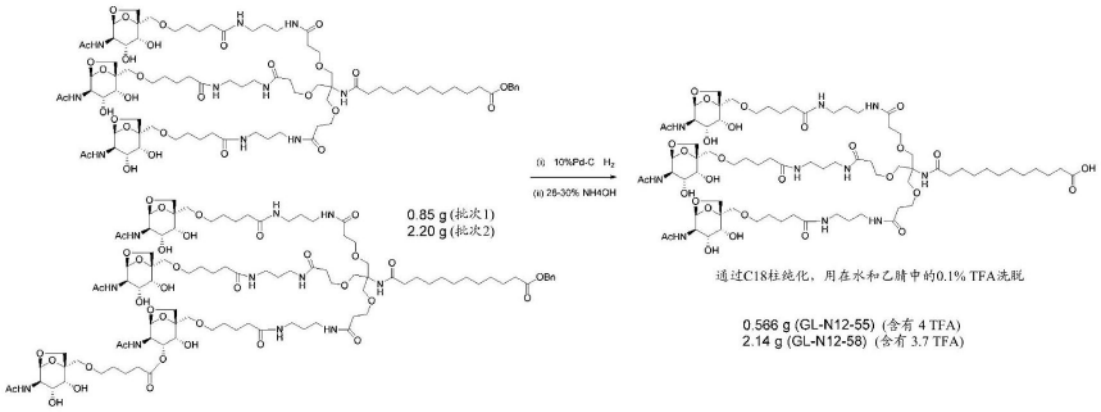
[2462] 

[2463] 这些结构表示受保护的型式,因为它们包含-OAc(-O-乙酸酯基团)。在一些实施方案中,在化合物与寡核苷酸缀合后的去保护过程中除去Ac基团。在一些实施方案中,例如,如实施例37B中所述,用浓缩的氢氧化铵进行去保护。在这些结构的去保护版本中,-OAc被-

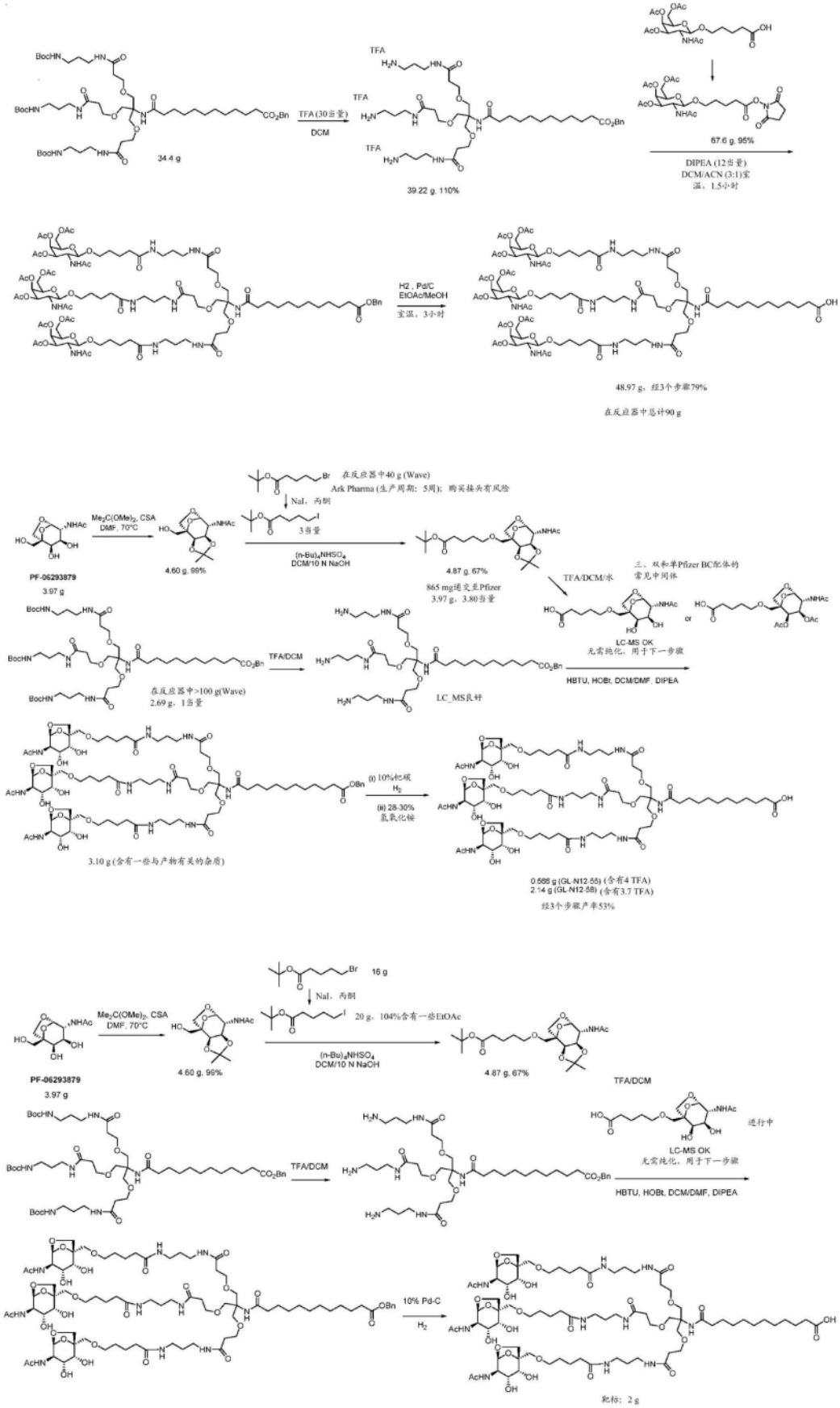
OH替代。

[2464] 下面描述了用于生产各种附加的组分的过程的一些非限制性实例：

[2465]



[2466]



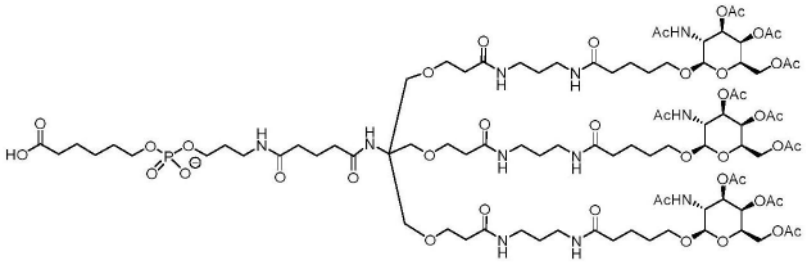
[2467] 本文所述的各种附加的组分可以与本文所述的各种寡核苷酸缀合。

[2468] 实施例28.示例性分析方法。

[2469] 1.5分钟运行LRMS(低分辨率质谱):Waters Acqity HSS T3,2.1mm x50mm,C18,1.7μm;流动相:A:在水中的0.1％甲酸(v/v);流动相B:在乙腈中的0.1％甲酸(v/v);流速-1.25ml/分钟;初始状态:A-95％:B-5％;保持初始0.0-0.1分钟;在0.1-1.0分钟内线性升至A-5％:B-95％;在1.0-1.1分钟内保持在A-5％:B-95％;返回初始状态1.1-1.5分钟。

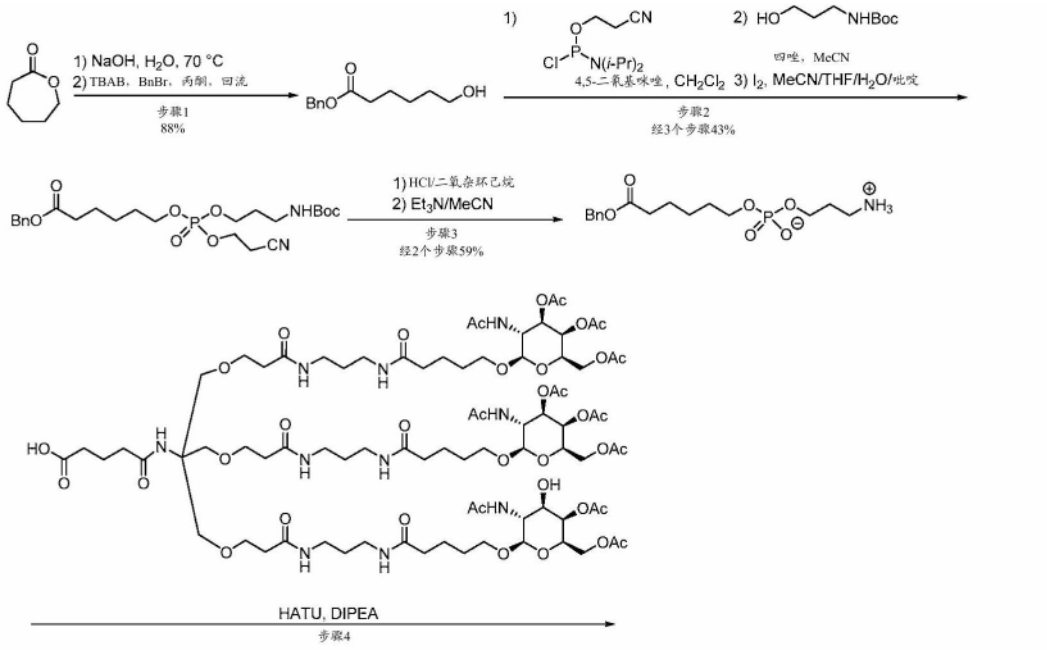
[2470] :3.0分钟运行LRMS(低分辨率质谱):Waters Acqity HSS T3,2.1mm x50mm,C18,1.7μm;流动相:A:在水中的0.1％甲酸(v/v);流动相B:在乙腈中的0.1％甲酸(v/v);流速-1.25ml/分钟;初始状态:A-95％:B-5％;保持初始0.0-0.1分钟;在0.1-2.6分钟内线性升至A-5％:B-95％;在2.6-2.95分钟内保持在A-5％:B-95％;返回初始状态2.95-3.0分钟。

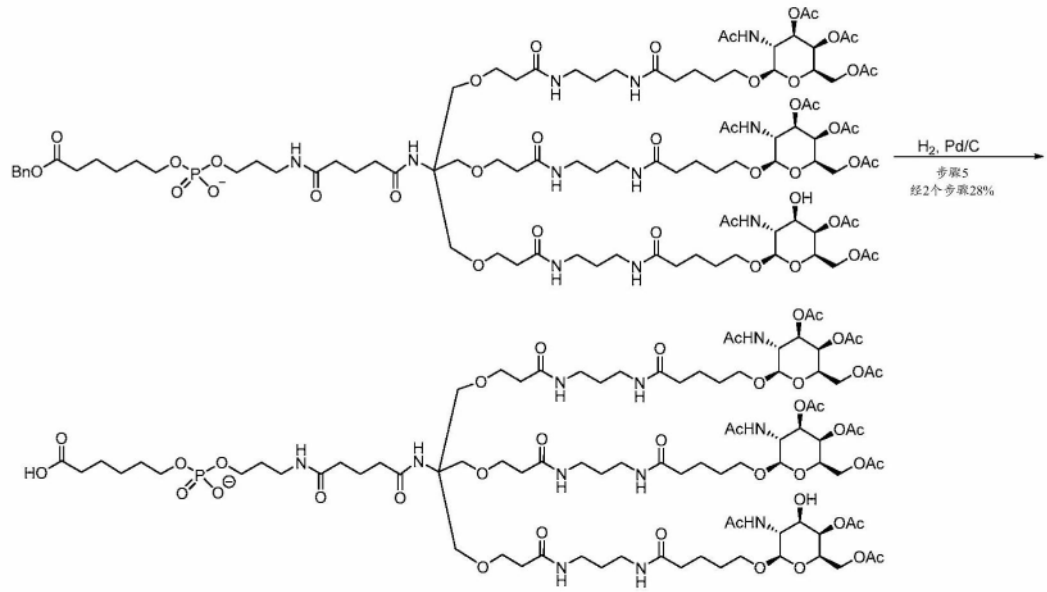
[2471] 5,9,16,22-四氧代-11,11-双{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-26-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-13-氧杂-4,10,17,21-四氮杂二十六烷-1-基磷酸5-羧基戊酯

[2472] 

[2473] 反应方案:

[2474]





[2475] 步骤1:6-羟基己酸酯。将在水(401mL)中的氢氧化钠(9.02g,226mmol)和6-己内酯(25mL,0.23mmol)的混合物在70℃下加热过夜。TLC表明起始物质完全消耗。在50℃下用旋转蒸发仪小心除去水,并将所得的白色固体与甲苯共沸。在高真空下干燥过夜之后,将固体悬浮在丙酮(100mL)中,并加入四丁基溴化铵(3.64g,11.3mmol)和苯甲基溴(32.2mL,271mmol)。将反应混合物在回流下加热,直到TLC分析表明中间体羧酸被完全消耗(96小时)。在真空下除去溶剂,并将残余物在水性盐酸和乙酸乙酯之间分配。将水层用乙酸乙酯(x2)萃取。将合并的有机萃取物用饱和碳酸氢钠(x2)、盐水洗涤,经硫酸钠干燥过滤并在真空下浓缩。将粗残余物通过硅胶塞(在庚烷中的20%-70%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为无色油状物的标题化合物(43.9g,88%)。^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δppm 7.40-7.30(m,5H),5.12(s,2H),3.63(t,2H),2.38(t,2H),1.73-1.65(m,2H),1.62-1.53(m,2H),1.44-1.35(m,2H),1.28(br.s.,1H)。

[2476] 步骤2:6-(((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)己

酸苯甲酯。向在0℃下的无水二氯甲烷(150mL)中的2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺(20.3g,67.5mmol)的溶液中缓慢加入0℃下的4,5-二氰基咪唑(在乙腈中1M,31.5mL,31.5mmol)。然后在惰性气氛下在0℃下将6-羟基己酸酯(10.0g,45.0mmol)逐滴加入混合物中。将混合物在0℃下搅拌,直到TLC分析表明起始物质被消耗(1小时)。用饱和碳酸氢钠(80mL)淬灭反应。然后分离两相混合物,并且将水层用二氯甲烷(2x60mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩至干,以得到作为浅黄色油状物的粗产物(23.0g,>100%),其直接用于下一步骤。将此粗物质溶解在乙腈(50mL)中,并在10分钟内逐滴加入在无水乙腈(300mL)中的3-(Boc-氨基)-1-丙醇(10.0g,57.2mmol)和四唑(19.1g,272mmol)的溶液中。将所得的无色溶液在环境温度下搅拌1.5小时。TLC表明起始物质完全消耗。然后将I_2的溶液(在THF/H_2O/吡啶(78:20:2)中0.4M,90mL,54.4mmol)缓慢加入上述反应混合物中,并且在加入结束时,棕色不消失。将混合物在环境温度下搅拌直到TLC分析表明反应完成(1小时)。将混合物用饱和亚硫酸钠淬灭并在真空下浓缩以除去有机溶剂。将剩余的混合物用水稀释并用乙酸乙酯(x2)萃取。将合并的有机相用饱和氯化铵和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并在真空下浓缩。将粗物质通过硅胶快速色谱(在石油醚中的20-75乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为无色油状物的标题化合物(10.0g,经三个步骤43%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.41-7.28(m,5H),5.11(s,2H),4.23(ddd,2H),4.18-4.04(m,4H),3.24(q,2H),2.75(ddd,2H),2.38(t,2H),1.87(dq,2H),1.76-1.64(m,4H),1.43(s,9H),1.31-1.20(m,2H)。

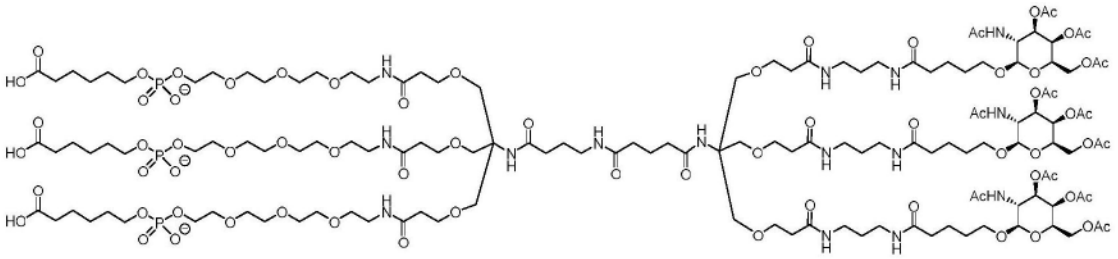
[2477] 步骤3:(6-(苯甲氧基)-6-氧代己基)磷酸3-铵丙酯。在0℃下向在无水1,4-二氧杂环己烷(36mL)中的6-(((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)己酸苯甲酯(9.00g,17.6mmol)的溶液中逐滴加入盐酸(100mL,400mmol,在二氧杂环己烷中的4M)。将所得的无色溶液在环境温度下搅拌1.5小时。将混合物浓缩至干,以得到作为无色胶状物的粗产物(7.90g),其直接用于下一步骤。向此粗物质的乙腈(72mL)溶液中加入三乙胺(36mL,0.26mmol)。将所得的白色悬浮液在25℃下搅拌16小时。然后将混合物浓缩,并将粗物质通过硅胶快速色谱纯化(在二氯甲烷中的5-50%的甲醇,1%氢氧化铵),以得到作为白色固体的标题化合物(3.70g,经两个步骤59%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.41-7.27(m,5H),5.11(s,2H),3.95(dt,2H),3.85(q,2H),3.08(t,2H),2.39(t,2H),1.94(dq,2H),1.78-1.56(m,4H),1.51-1.34(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{16}H_{27}NO_6P^+$(M+H)$^+$360.1;保留时间=0.677分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2478] 步骤4:26-{[4,6-二-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-5,9,16,22-四氧代-11,11-双{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-13-氧杂-4,10,17,21-四氮杂二十六烷-1-基磷酸6-(苯甲氧基)-6-氧代己酯。将在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的N,N-二异丙基乙胺(305mg,2.36mmol,0.41mL)和6-(苯甲氧基)-6-氧代己基磷酸3-铵丙酯(297mg,0.825mmol)的溶液加入在DMF(10mL)中的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸(1.50g,0.790mmol)的溶液中。然后在室温下将1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-

1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸酯(328mg,0.065mmol)加入反应混合物中。1小时后,将反应用饱和氯化铵(30mL)淬灭,并用二氯甲烷(4x30mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。粗产物不经进一步纯化直接使用。LCMS(m/z)对于$C_{98}H_{155}N_{11}O_{43}PNa_2^{2+}$(M+2Na)$^{2+}$1125.5;保留时间=0.71分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

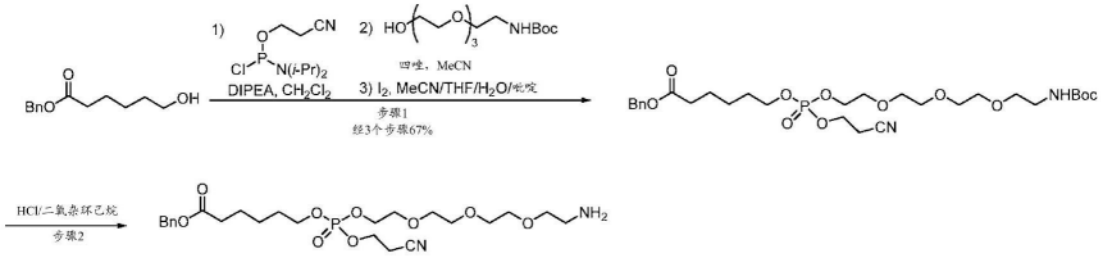
[2479] 步骤5:实施例29.将粗tris-苯甲酯26-{[4,6-二-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-5,9,16,22-四氧代-11,11-双{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-13-氧杂-4,10,17,21-四氮杂二十六烷-1-基磷酸6-(苯甲氧基)-6-氧代己酯(1.77g,0.790mmol)溶解在甲醇(0.05M)中,并使用H立方体(H-cube,10%Pd/C,在60℃下在全H_2下以1.0mL/分钟的流速)进行氢化。干净地获得产物,并将大块物质通过制备型HPLC[柱:Phenomenex Gemini XB C18 150mm x3.0mm 5μm.梯度条件:流动相A=0.1%在水中的10mM乙酸三乙铵pH7,流动相B=0.1%在乙腈中的10mM乙酸三乙铵pH7(22-100-22%B/A,27.0mL/分钟)]进行纯化。获得作为白色固体的大块物质,其含有乙酸三乙铵(14当量,通过^{1}H NMR积分)(475mg)。计算出产品的纯度为49重量%,并且确定产率为233mg(14%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3OD)δ5.34(d,3H),5.07(dd,3H),4.57(d,3H),4.22-4.05(m,9H),4.02(t,3H),3.94-3.81(m,7H),3.72-3.63(m,12H),3.54(dt,3H),3.35(s,6H),3.26-3.20(m,17H),3.19(q,84H,乙酸三乙铵),2.43(t,6H),2.30-2.17(m,13H),2.14(s,9H),2.03(s,9H),1.95(s,9H),1.93(s,9H),1.93(s,42H,乙酸三乙铵),1.90-1.78(m,4H),1.74-1.57(m,22H),1.49-1.38(m,2H),1.30(t,126H)。LCMS(m/z)对于$C_{93}H_{154}N_{11}O_{44}P^{2+}$(M+2H)$^{2+}$1080.5;保留时间:0.65分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

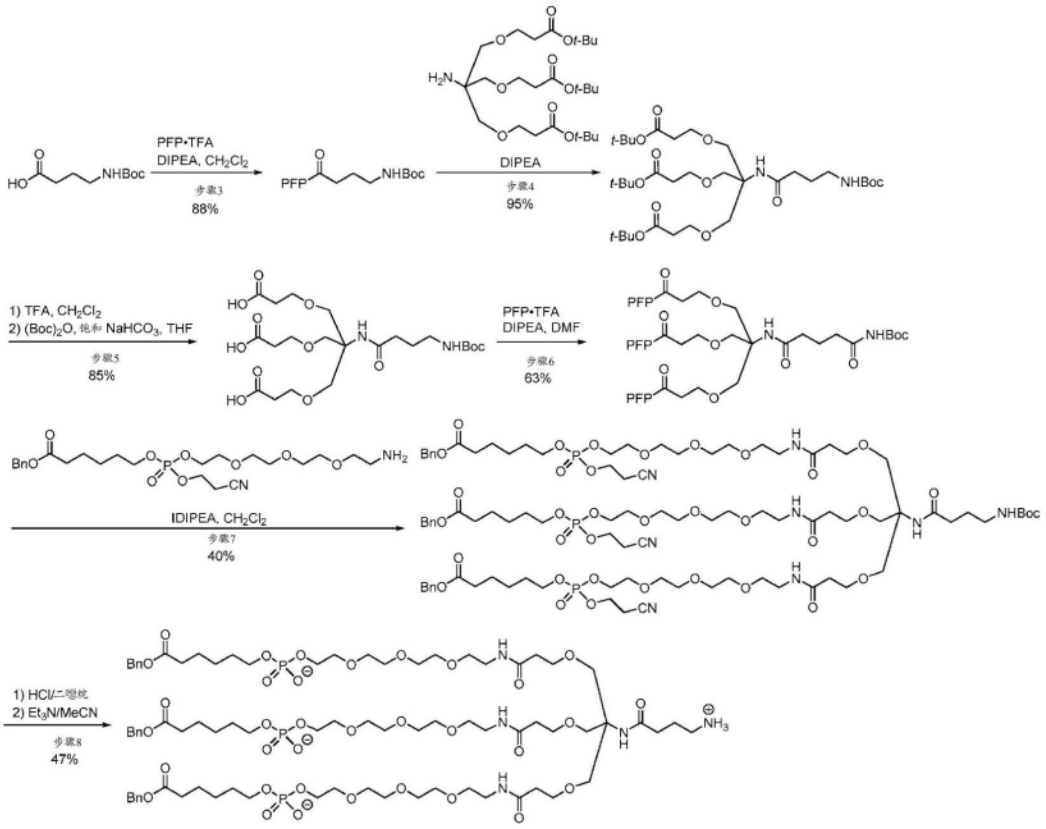
[2480] 18-{[27-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-12,12-双({3-[(3-{[5-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)戊酰基]氨基}丙基)氨基]-3-氧代丙氧基}甲基)-6,10,17,23-四氧代-14-氧杂-5,11,18,22-四氮杂二十七烷-1-酰基]氨基}-43-羧基-18-(25-羧基-19,19-二氧化-5-氧代-2,9,12,15,18,20-六氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十五烷-1-基)-37,37-二氧化-13,23-二氧代-3,6,9,16,20,27,30,33,36,38-十氧杂-12,24-二氮杂-37-λ～5～-磷脂酰四十三烷-1-基5-羧基苯基磷酸酯

[2481] 

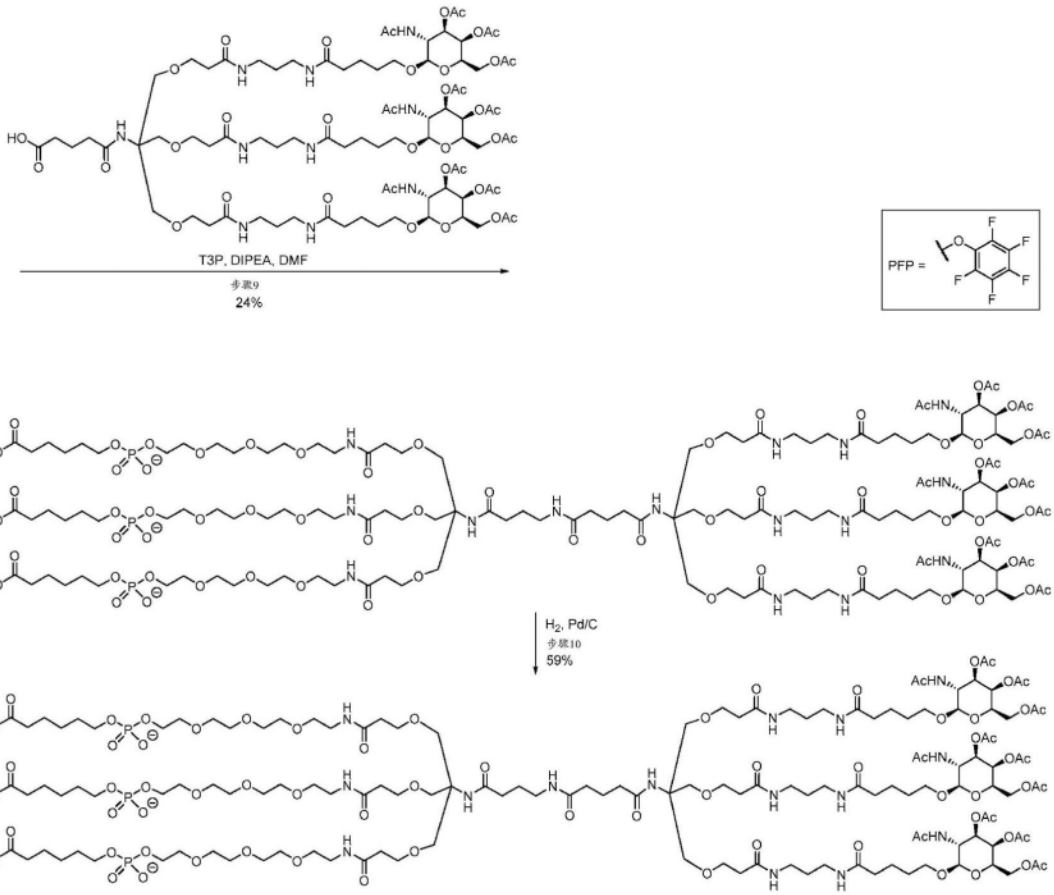
[2482] 反应方案:

[2483]


1)
2)
NHBoc
四唑，MeCN
DIPEA, CH2Cl2
3) I2, MeCN/THF/H2O/吡啶
步骤1
经3个步骤67%
BnO
OH
CN
HCl/二氧杂环己烷
步骤2
NH2



[2484]



[2485] 步骤1:6-(((2-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)己酸苯甲酯。此化合物由(2-(2-(2-(2-羟基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨

基甲酸叔丁酯(6.03g,20.5mmol)和2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺(6.87mL,30.8mmol)和6-羟基己酸酯(6.85g,30.8mmol)以类似于实施例29步骤2的方式制备。通过硅胶快速色谱(在庚烷中的50%-100%乙酸乙酯,然后是在乙酸乙酯中的5%甲醇)纯化之后,获得作为黄色油状物的标题化合物(8.64g,经三个步骤67%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.40-7.31(m,5H),5.11(s,2H),5.04(s,1H),4.31-4.15(m,4H),4.08(q,2H),3.71(ddd,2H),3.69-3.58(m,8H),3.53(t,2H),3.31(q,2H),2.77(t,2H),2.37(t,2H),1.76-1.63(m,4H),1.44(s,9H),1.48-1.36(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{29}H_{47}N_2NaO_{11}P^+$(M+Na)$^+$653.5;保留时间=0.93分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2486] 步骤2:2-(2-(2-(2-((((6-(苯甲氧基)-6-氧代己基)氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙烷-1-氯化铵。在0℃下向在1,4-二氧杂环己烷(33mL)中的6-(((2-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)己酸苯甲酯(8.64g,14.1mmol)的溶液中加入盐酸的溶液(在1,4-二氧杂环己烷4M,87mL,348mmol)。将所得的混合物在环境温度搅拌1小时。在真空下除去溶剂,以得到8.76g(>100%)的作为黄色油状物的标题化合物。粗产物不经进一步纯化即使用。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm7.45-7.26(m,5H),5.12(s,2H),4.29-4.19(m,4H),4.12(q,2H),3.79-3.69(m,4H),3.67(m,8H),3.13(t,2H),2.88(ddd,2H),2.41(t,2H),1.81-1.59(m,4H),1.51-1.37(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{24}H_{40}N_2O_9P^+$(M+H)$^+$531.5;保留时间=0.70分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2487] 步骤3:4-[(叔丁氧基羰基)氨基]丁酸五氟苯酯。在环境温度下向在二氯甲烷中的4-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(12.0g,59.0mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(20.6mL,118mmol),之后在0℃下加入三氟乙酸五氟苯酯(12.2mL,70.9mmol)。将反应混合物温热至环境温度并搅拌17小时。然后将反应混合物浓缩。将粗物质通过硅胶快速色谱(在庚烷中的10%-60%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为白色固体的标题化合物(19.1g,88%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 4.65(s,1H),3.25(q,2H),2.72(t,2H),1.96(p,2H),1.45(s,9H)。LCMS(m/z)对于$C_{15}H_{16}F_5NNaO_4^+$(M+Na)$^+$392.3;保留时间=1.01分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2488] 步骤4:11,11-双[(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)甲基]-2,2-二甲基-4,9-二氧代-3,13-二氧杂-5,10-二氮杂十六烷-16-酸叔丁酯。向在THF(25mL)中的4-[(叔丁氧基羰基)氨基]丁酸五氟苯酯(9.68g,26.2mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(13.0g,101mmol,17.6mL)。然后将3-{2-氨基-3-(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)-2-[(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)甲基]丙氧基}丙酸叔丁酯[1](10.2g,20.2mmol)以缓流形式作为在THF(50mL)中的溶液加入反应中,并将反应在50℃下搅拌78小时。将反应浓缩并通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的0%-20%甲醇,并且再用在庚烷中的0%-100%乙酸乙酯)纯化两次,以得到作为无色油状物的标题化合物(13.3g,95%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 6.27-6.13(m,1H),5.02-4.84(m,1H),3.70(s,6H),3.64(t,6H),3.16(q,2H),2.45(t,6H),2.20(t,2H),1.78(quin,2H),1.45(s,36H)。

[2489] 步骤5:11,11-双[(2-羧基乙氧基)甲基]-2,2-二甲基-4,9-二氧代-3,13-二氧杂-5,10-二氮杂十六烷-16-酸。向在二氯甲烷(100mL)中的11,11-双[(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)甲基]-2,2-二甲基-4,9-二氧代-3,13-二氧杂-5,10-二氮杂十六烷-16-酸叔丁酯(13.3g,19.2mmol)的溶液中加入三氟乙酸(46g,0.40mol,30mL),并将所得的溶液在室温下

搅拌。20小时后,浓缩反应混合物。然后将所得的残余物悬浮在四氢呋喃(30mL)和饱和水性碳酸氢钠(160mL)的混合物中,向其中加入二碳酸二叔丁酯(12.6g,57.7mmol)。将所得的悬浮液加热至40℃。将二碳酸二叔丁酯两个另外的等分试样(3.70g,各17.0mmol)加入反应混合物中,一个在30分钟然后第二个在90分钟加入,并且在40℃下搅拌反应。20小时后,将反应混合物用乙酸乙酯洗涤一次,并丢弃洗涤液。用1N盐酸将水层的pH值调节至pH=3。然后将水层用乙酸乙酯(x2)萃取,并将合并的萃取物经硫酸镁干燥,过滤并浓缩,以得到作为油状物的标题化合物,其无需纯化即用于随后的步骤。[1]HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 4.45-4.30(m,12H),3.70(q,2H),3.23(t,6H),2.84(t,2H),2.34(quin,2H),2.18(s,9H)。

[1]此化合物根据文献报道的程序制备: Cardonna, C. M.; Gawley, R. E. *J. Org.Chem.*2002, 67, 1411。

[2490] 步骤6:3-(2-[(4-氨基丁酰基)氨基]-3-[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]-2-{[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]甲基}丙氧基)丙酸五氟苯酯。向在N,N-二甲基甲酰胺(100mL)中的11,11-双[(2-羧基乙氧基)甲基]-2,2-二甲基-4,9-二氧代-3,13-二氧杂-5,10-二氮杂十六烷-16-酸(7.49g,13.0mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(17.0g,132mmol,23.0mL)。然后在15分钟内将三氟乙酸五氟苯酯(20.4g,72.7mmol,12.5mL)逐滴加入反应混合物中,得到浅粉红色溶液,其随时间推移而变成黄色。1小时后,用饱和碳酸氢钠淬灭反应。将所得的混合物用乙酸乙酯(x2)萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物通过硅胶色谱(在庚烷中的0%-80%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为无色油状物的标题化合物(8.76g,经2个步骤63%)。^{1}H NMR(400MHz,$(CD_3)_2SO$)δppm 7.10(s,1H),6.73(t,1H),3.70(t,6H),3.64(s,6H),2.98(t,6H),2.87(q,2H),2.03(t,2H),1.53(quin,2H),1.36(s,9H)。

[2491] 步骤7:27-({4-[(叔丁氧基羧基)氨基]丁酰基}氨基)-8,46-双(2-氰基乙氧基)-27-[19-(2-氰基乙氧基)-19-氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,9,12,15,18,20,27-六氧杂-6-氮杂-19-λ~5~-磷脂酰二十八烷-1-基]-22,32-二氧代-7,9,12,15,18,25,29,36,39,42,45,47-十氧杂-21,33-二氮杂-8,46-二磷脂酰五十三烷-1,53-二酸二苯甲酯8,46-二氧化物。两种起始物质均与甲苯共沸两次,并在使用前放置在高真空下过夜。向在二氯甲烷(15mL)中的3-(2-[(4-氨基丁酰基)氨基]-3-[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]-2-{[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]甲基}丙氧基)丙酸五氟苯酯(3.97g,3.89mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(6.8mL,39mmol)。然后在0℃下加入在二氯甲烷(25mL)中的2-(2-(2-(2-((((6-(苯甲氧基)-6-氧代己基)氧基)(2-氰基乙氧基)磷酰基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙烷-1-氯化铵(8.76g粗,14.0mmol)的溶液。将反应混合物温热至环境温度并搅拌直到TLC分析表明起始物质消耗(15小时)。在真空下除去溶剂,并将残留物重新溶解在乙酸乙酯中。将溶液用水、饱和碳酸氢钠、然后再次用水洗涤,并将合并的水层用乙酸乙酯萃取一次。将合并的有机萃取物用硫酸镁干燥,过滤并在真空下浓缩。将粗物质通过硅胶快速色谱(在二氯甲烷中的0%-22%甲醇)进行纯化,以得到作为无色胶状物的标题化合物(3.23g,40%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.38-7.30(m,15H),6.71(s,3H),6.52(s,1H),5.19(t,1H),5.11(s,6H),4.32-4.14(m,12H),4.08(q,6H),3.76-3.60(m,42H),3.55(t,6H),3.43(q,6H),3.14(dd,2H),2.77(t,6H),2.42(t,6H),2.38(t,6H),2.23(t,2H),1.79-1.64(m,14H),1.46-1.38(m,15H)。LCMS(m/z)对于$C_{94}H_{151}F_5N_8O_{36}P_3^{2+}$ $(M+2H)^{2+}$1031.0;保留时间=1.00

分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2492] 步骤8:29-[(4-铵丁氧基)氨基]-29-(19,19-二氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,9,12,15,18,20,27-六氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十八烷-1-基)-10,10-二氧化-3,24,34-三氧代-1-苯基-2,9,11,14,17,20,27,31,38,41,44-十一氧杂-23,35-二氮杂-10-λ～5～-磷脂酰四十六烷-46-基6-(苯甲氧基)-6-氧代己基磷酸酯。在0℃下向在1,4-二氧杂环己烷(18mL)中的27-({4-[(叔丁氧基羧基)氨基]丁酰基}氨基)-8,46-双(2-氰基乙氧基)-27-[19-(2-氰基乙氧基)-19-氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,9,12,15,18,20,27-六氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十八烷-1-基]-22,32-二氧代-7,9,12,15,18,25,29,36,39,42,45,47-十氧杂-21,33-二氮杂-8,46-二磷脂酰五十三烷-1,53-二酸二苯甲酯8,46-二氧化物(3.22g,1.56mmol)的溶液中加入盐酸的溶液(在1,4-二氧杂环己烷4M,16mL,63mmol)。将所得的混合物在环境温度搅拌1小时。然后除去溶剂,以得到油状残余物。将此残余物悬浮在乙腈(18mL)中,并加入三乙胺(12mL,86mmol)。将反应混合物在环境温度下搅拌40小时,并且随后在真空下浓缩。将粗物质通过使用Phenomenex NX-C18柱的反相HPLC(在水中的5%-100%乙腈,含0.1%氢氧化钠)进行纯化并冻干,以得到作为无色油状物的标题化合物(1.33g,经两个步骤47%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.41-7.27(m,15H),5.11(s,6H),4.03-3.92(m,6H),3.85(q,6H),3.71-3.58(m,42H),3.55(t,6H),3.38(t,6H),2.99(t,2H),2.44(t,6H),2.42-2.29(m,8H),1.92(p,2H),1.72-1.57(m,12H),1.48-1.37(m,6H)。LCMS(m/z)对于$C_{80}H_{134}N_5O_{34}P_3^{2+}$(M+2H)$^{2+}$901.5;保留时间=0.77分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

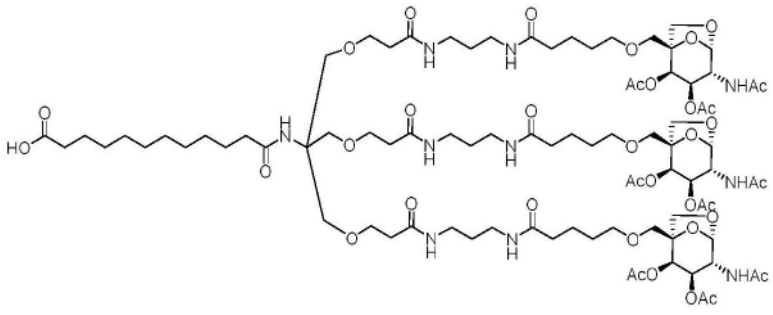
[2493] 步骤9:29-{[27-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-12,12-双({3-[(3-{[5-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)戊酰基]氨基}丙基)氨基]-3-氧代丙氧基}甲基)-6,10,17,23-四氧代-14-氧杂-5,11,18,22-四氮杂二十七烷-1-酰基]氨基}-29-(19,19-二氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,

[2494] 9,12,15,18,20,27-七氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十八烷-1-基)-10,10-二氧化-3,24,34-三氧代-1-苯基-2,9,11,14,17,20,27,31,38,41,44-十一氧杂-23,35-二氮杂-10-λ～5～-磷脂酰四十六烷-46-基6-(苯甲氧基)-6-氧代己基磷酸酯。两种起始物质均与甲苯共沸三次,并在使用前放置在高真空下过夜。向在无水二甲基甲酰胺(0.5mL)中的胺29-[(4-铵丁氧基)氨基]-29-(19,19-二氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,9,12,15,18,20,27-六氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十八烷-1-基)-10,10-二氧化-3,24,34-散养带-1-苯基-2,9,11,14,17,20,27,31,38,41,44-十一氧杂-23,35-二氮杂-10-λ～5～-磷脂酰四十六烷-46-基6-(苯甲氧基)-6-氧代己基磷酸酯(270mg,0.147mmol)的溶液中加入在二甲基甲酰胺(1.5mL)中的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸(337mg,0.177mmol),N,N-二异丙基乙胺(0.21mL,1.18mmol),然后加入丙基膦酸酐溶液(在乙酸乙酯中50重量%,0.26mL,0.44mmol)。将反应混合物在50℃下搅拌17小时。冷却至环境温度后,加入水,并将混合物用85:15CH_2Cl_2:i-PrOH(100mL x3)萃取。将有机萃取物经硫酸钠干燥,过滤并在真空下浓缩。

将粗物质通过使用Phenomen ex NX-C18柱的反相HPLC(在水中的35-100乙腈,含有10mM乙酸三乙铵)进行纯化并冷冻干燥,以得到202mg含有乙酸三乙铵的所需产物(12.3当量,基于^{1}H NMR积分)。计算此产物的纯度为66重量%,并且确定产率为133mg(24%)。此物质不经过进一步纯化即用于下一步骤。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.43-7.24(m,15H),5.33(d,3H),5.11(s,6H),5.07(dd,3H),4.57(d,3H),4.22-3.80(m,25H),3.75-3.57(m,59H),3.57-3.47(m,12H),3.41-3.34(m,12H),3.20(q,74H,乙酸三乙铵),2.48-2.35(m,18H),2.27-2.17(m,12H),2.14(s,9H),2.02(s,9H),1.96,(s,111H,乙酸三乙铵)1.95(s,9H),1.93(s,9H),1.77-1.54(m,33H),1.44(m 9H),1.31(t,111H,乙酸三乙铵)。LCMS(m/z)对于$C_{164}H_{266}N_{15}O_{72}P_3^{2+}$(M+2H)$^{2+}$1845.8;保留时间=1.07分钟(UPLC 3分钟方法)。

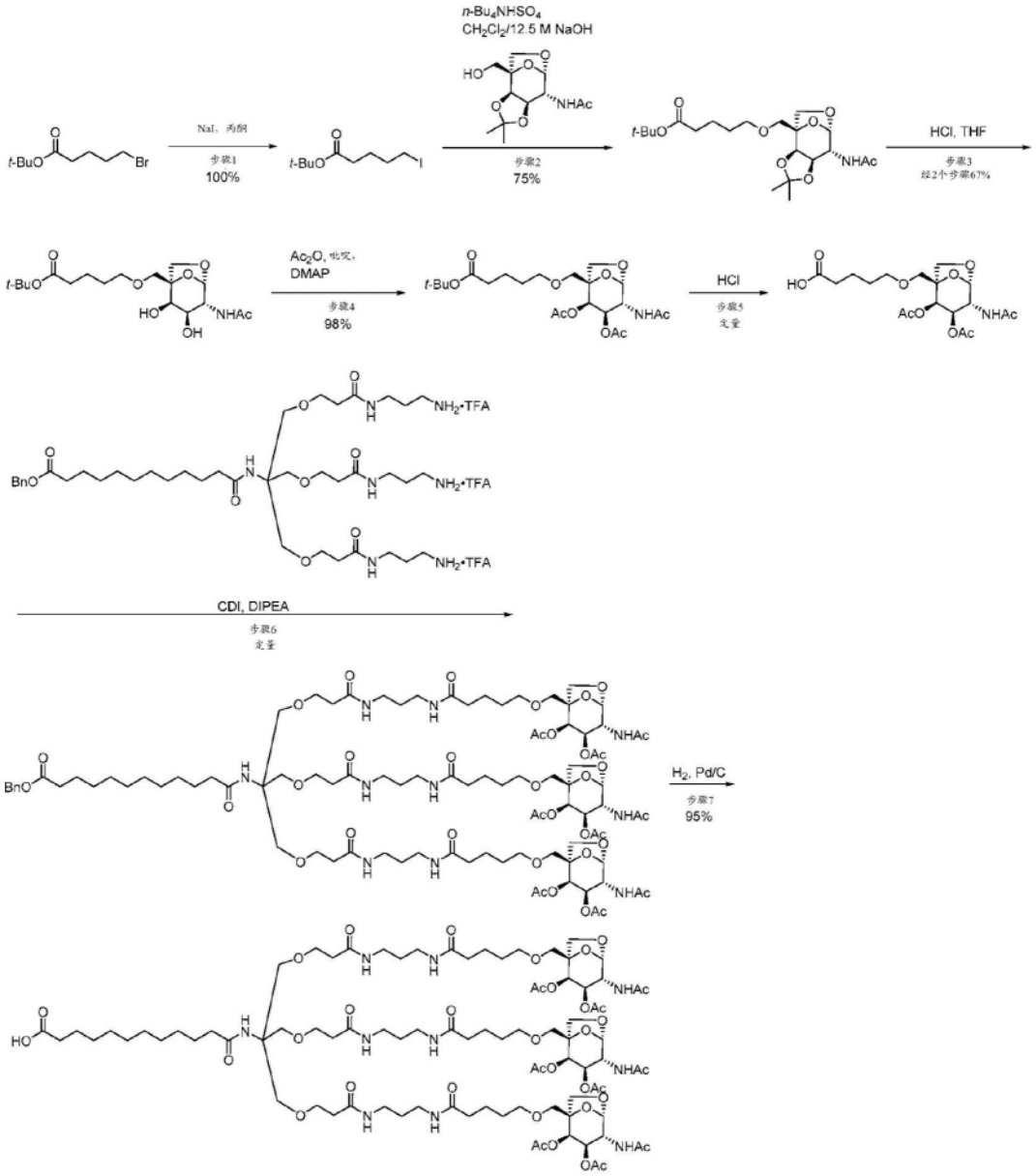
[2495] 步骤10:实施例30.将在甲醇(2mL)中的29-{[27-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-12,12-双({3-[(3-{[5-({(2R,3R,4R,5R,6R)-3-(乙酰氨基)-4,5-双(乙酰氧基)-6-[(乙酰氧基)甲基]四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)戊酰基]氨基}丙基)氨基]-3-氧代丙氧基}甲基)-6,10,17,23-四氧代-14-氧杂-5,11,18,22-四氮杂二十七烷-1-酰基]氨基}-29-(19,19-二氧化-5,26-二氧代-28-苯基-2,9,12,15,18,20,27-七氧杂-6-氮杂-19-λ～5～-磷脂酰二十八烷-1-基)-10,10-二氧化-3,24,34-三氧代-1-苯基-2,9,11,14,17,20,27,31,38,41,44-十一氧杂-23,35-二氮杂-10-λ～5～-磷脂酰四十六烷-46-基6-(苯甲氧基)-6-氧代己基磷酸酯(200mg,0.0330mmol,66重量%)和10%钯碳(7.0mg,0.0066mmol)的混合物在25℃下在氮气压(50psi)下搅拌20小时。将催化剂通过0.45um尼龙丙烯醛树脂过滤,并用甲醇(40mL)洗涤。然后浓缩滤液,并将所得的油状物溶解在乙腈和水的1:1混合物(22mL)中,用盐酸(1N)调节至pH 5.70。将溶液冻干过夜,以得到作为吸湿性白色固体的标题化合物(13当量的三乙胺盐酸盐)(110mg,59%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3OD)δppm 5.34(d,3H),5.07(dd,3H),4.57(d,3H),4.20-3.91(m,14H),3.93-3.84(m,9H),3.75-3.62(m,63H),3.60-3.50(m,10H),3.43-3.35(m,8H),3.27-3.14(m,80H,三乙胺盐酸盐),3.12-2.90(m,2H),2.57-2.38(m,12H),2.30-2.20(m,18H),2.14(s,9H),2.03(s,9H),1.95-1.94(m,18H),1.89-1.83(m,1H),1.73-1.55(m,34H),1.46-1.40(m,9H),1.31(t,120H,三乙胺盐酸盐)。LCMS(m/z)对于$C_{143}H_{249}N_{15}O_{72}P_3^{3+}$(M+3H)$^{3+}$1141.2;保留时间=1.06分钟(UPLC 3分钟方法)。

[2496] 1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18,18-双{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸

[2497] 

[2498] 合成方案:

[2499]



[2500] 步骤1:5-碘戊酸叔丁酯。向在丙酮(400mL)中的5-溴戊酸叔丁酯(60.0g,250mmol)的溶液加入碘化钠(94.8g,633mmol)。将反应混合物在57℃下搅拌4小时,冷却至室温,过滤并用二氯甲烷洗涤。在减压下蒸发溶剂以得到残余物,将残余物溶解在二氯甲烷中,用饱和碳酸氢钠(200mL)和盐水(100mL)洗涤。将分离的有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以得到作为黄色油状物的标题化合物(69.3g,100%)。^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δppm 3.20(t,2H),2.25(t,2H),1.86(p,2H),1.70(p,2H),1.45(s,9H)。

[2501] 步骤2:5-{[(1S,2R,6R,7R,8S)-7-(乙酰氨基)-4,4-二甲基-3,5,9,11-四氧杂三环[6.2.1.0～2,6～]十一烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯。向在二氯甲烷(210mL)中的5-碘戊酸叔丁酯(59g,0.21mol)和N-((3aR,4S,7S,8R,8aR)-4-(羟基甲基)-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-8-基)乙酰胺(20g,69mmol)的溶液中加入硫酸氢四丁铵(35.3g,104mmol),之后在冰浴中加入12.5M氢氧化钠溶液(160mL)。将反应混合物在室温下搅拌24小时。将反应混合物在二氯甲烷(200mL)和水(200mL)之间分配。将分离的有机相用1N盐酸(300mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将粗产物在环境温度下在乙醚

(500mL)中研磨30分钟。通过过滤除去所得的固体,并将滤饼用二乙醚(100mL)冲洗。浓缩滤液,并在真空下干燥过夜,以得到作为黄色油状物的标题化合物的粗产物(50.9g,45.5重量%纯,通过qNMR以1,3,5-三甲氧基苯为内标确定),其无需纯化即用于下一步骤。LCMS(m/z)对于$C_{21}H_{36}NO_8^+$(M+H)$^+$430.3;保留时间=0.88分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2502] 步骤3:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯。在5分钟内通过加料漏斗向在四氢呋喃(105mL)中的5-{[(1S,2R,6R,7R,8S)-7-(乙酰氨基)-4,4-二甲基-3,5,9,11-四氧杂三环[6.2.1.0~2,6~]十一烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯(50.9g,45.5wt%,53.9mmol)的粗产物的冰冷溶液中加入在水(49mL)中的浓缩的盐酸(16mL)的溶液。将反应溶液在室温下在氮气下搅拌6小时。将反应混合物用2-甲基-四氢呋喃(300mL)稀释,并用盐水(100mL)洗涤。将水相用二氯甲烷(300mL)萃取。将每个分离的有机相用饱和碳酸氢钠(75mL)和盐水(75mL)的混合物、然后用盐水(120mL)洗涤。将有机相合并,经硫酸钠干燥,过滤,浓缩,并与庚烷(100mL)、然后与甲基叔丁基醚(100mL)共沸。将所得的粗产物在室温下在甲基叔丁基醚(200mL)中研磨15分钟。通过过滤收集所得的沉淀物,将其用甲基叔丁基醚(200mL)冲洗,并在真空下干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(17.9g,经2个步骤66%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 5.79(d,1H),5.36(d,1H),4.07-3.88(m,4H),3.79-3.62(m,4H),3.60-3.46(m,2H),3.37(d,1H),2.30-2.19(m,2H),2.07(s,3H),1.75-1.51(m,4H),1.45(s,9H)。LCMS(m/z)对于$C_{18}H_{32}NO_8^+$(M+H)$^+$390.5;保留时间=0.70分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2503] 步骤4:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯。向在二氯甲烷(150mL)中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯(18.6g,49.7mmol)和吡啶(14.0g,183mmol)和二甲基氨基吡啶(1.12g,9.16mmol)的冰冷溶液中逐滴加入乙酸酐(18.7g,183mmol)。将混合物在室温搅拌2.5小时。将反应混合物用盐酸(1N,150mL)淬灭,并用二氯甲烷(200mL)萃取。将有机相用盐酸(1N,150mL)、饱和碳酸氢钠(150mL)洗涤,经硫酸钠干燥,浓缩,并与庚烷(4x100mL)共沸,得到粗产物,将粗产物通过硅胶塞(210g硅胶,100%庚烷(1L),然后是在庚烷中的25%乙酸乙酯(2L),之后是100%乙酸乙酯(2L))进行纯化,以得到作为白色固体的标题化合物(21.2g,98%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm5.65(d,1H),5.41-5.39(m,2H),5.09(dd,1H),4.34(t,1H),3.93(d,1H),3.75(d,1H),3.65(d,1H),3.50(d,1H),3.45(td,1H),3。38(td,1H),2.21(t,2H),2.17(s,3H),2.00(s,3H),1.98(s,3H),1.64-1.52(m,4H),1.44(s,9H)。LCMS(m/z)对于$C_{22}H_{35}NNaO_{10}^+$(M+Na)$^+$496.1;保留时间=0.85分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2504] 步骤5:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸。向放置在冰浴中的在二氯甲烷(110mL)中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯(21.1g,44.6mmol)的溶液中加入盐酸(11g,0.31mol,78mL,在1,4-二氧杂环己烷中4.0M)。除去冷却浴,并将反应在环境温度下在氮气下搅拌4小时。浓缩反应混合物,并与乙醚(200mL)、乙酸乙酯(200mL)和庚烷(3x200mL)共沸,并且最后在真空下干燥过夜,以得到作为白色固体的标题化合物(18.6g,定量)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3CN)δppm8.84(br.s.,1H),6.50(d,1H),5.35(d,1H),5.30(d,1H),5.00(dd,1H),4.17-4.07(m,1H),3.93

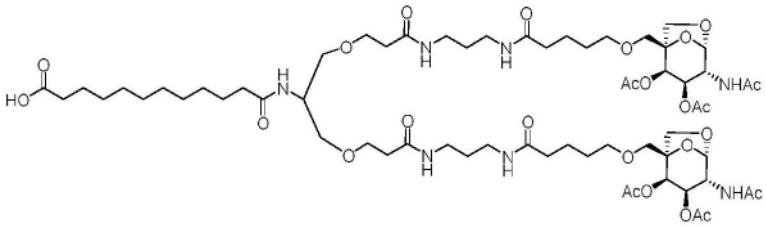
(d,1H),3.78-3.56(m,2H),3.52(d,1H),3.49-3.34(m,2H),2.26(t,2H),2.12(s,3H),1.92(s,3H),1.85(s,3H),1.60-1.47(m,4H)。LCMS(m/z)对于$C_{18}H_{28}NO_{10}^{+}$(M+H)$^{+}$418.0;保留时间=0.60分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2505] 步骤6:1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18,18-双{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯。向在乙腈(6mL)中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸(1.53g,3.63mmol)的溶液中加入1,1'-羰基二咪唑(0.580g,3.56mmol),并将反应混合物在室温下搅拌。3小时后,将12-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯tris-三氟乙酸盐(1.58g,1.03mmol,75.4重量%)作为在乙腈(6mL)中的溶液加入反应混合物中,之后加入N,N-二异丙基乙胺(0.540g,4.14mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩,用二氯甲烷(70mL)稀释,用盐酸(1N,30mL)、盐水(30mL)和饱和碳酸氢钠(30mL)洗涤。将有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物通过硅胶塞(20g硅胶,用二氯甲烷(100mL)、在二氯甲烷(200mL)中的10%甲醇、之后是在二氯甲烷(200mL)中的25%甲醇来洗脱)进行纯化,以得到作为白色玻璃的标题化合物(2.25g,定量产率)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3OD)δppmδ7.73-7.30(m,5H),5.44(d,3H),5.32(s,3H),5.12-5.09(m,5H),4.18(d,3H),4.00(d,3H),3.71(dd,6H),3.68-3.67(m,12H),3.51-3.45(m,6H),3.41-3.38(m,3H),3.21(q,12H),2.42(t,6H),2.35(t,2H),2.22-2.17(m,6H),2.16(s,9H),1.94(s,18H),1.72-1.58(m,16H),1.58-1.42(m,8H),1.38-1.29(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{95}H_{150}N_{10}O_{36}^{2+}$(M+2H)$^{2+}$1004.7;保留时间=0.86分钟(UPLC 3分钟方法)。

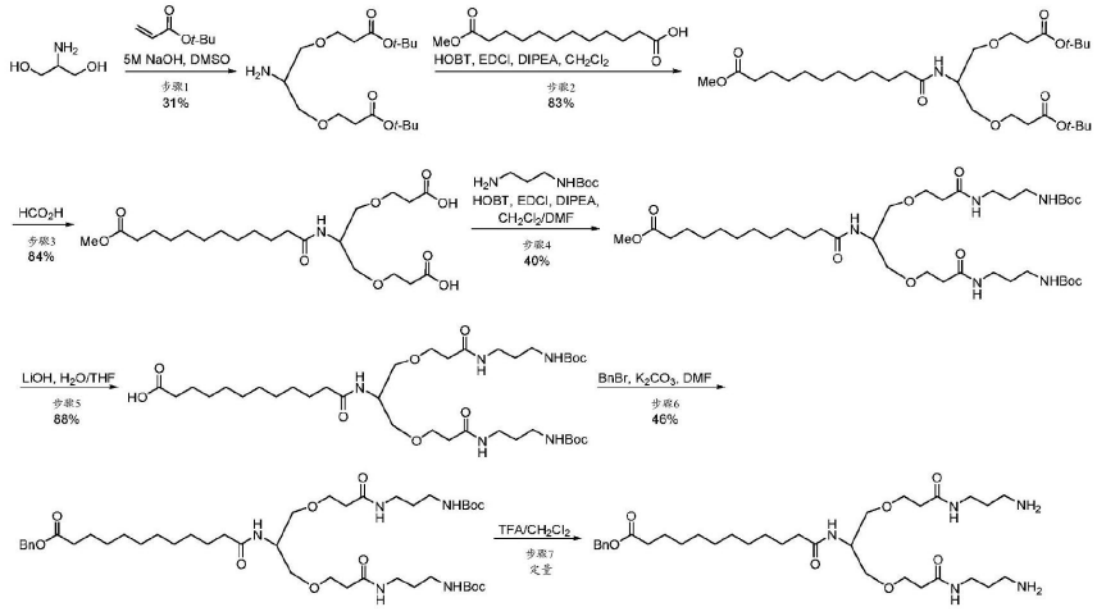
[2506] 步骤7:实施例31.将在甲醇(14mL)中的1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18,18-双{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯(2.36g,1.18mmol)和10%钯碳(0.376mg)的混合物在25℃下在搅拌的Parr反应器中在氮气压力下(50psi)搅拌4.5小时。通过硅藻土过滤反应混合物以除去催化剂。将硅藻土用甲醇(20mL)洗涤,并将合并的滤液浓缩,并与甲基叔丁基醚(3x20mL)共沸。将粗产物在甲基叔丁基醚(20mL)中研磨过夜。通过过滤收集所得的白色固体,将其在真空下干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(2.14g,95%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3OD)δppm 5.45(d,3H),5.32(s,3H),5.11(dd,3H),4.18(d,3H),4.01(d,3H),3.72(dd,6H),3.70-3.64(m,12H),3.52-3.47(m,6H),3.42-3.39(m,3H),3.22(q,12H),2.42(t,6H),2.28(t,2H),2.19(t,6H)2.16(s,9H)1.95(s,18H)1.73-1.50(m,24H)1.38-1.29(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{88}H_{143}N_{10}O_{36}^{+}$1916.2(M+H)$^{+}$;保留时间=1.35分钟(UPLC 3分钟方法)。

[2507] 1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-

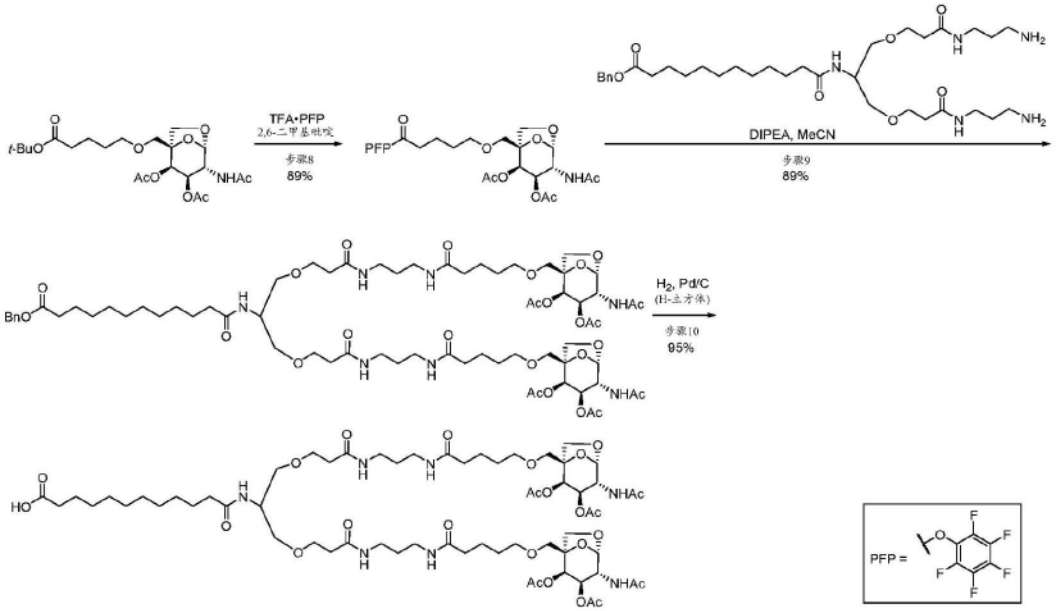
7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸

[2508] 

[2509] 反应方案：



[2510]



[2511] 步骤1:3,3'-[(2-氨基丙烷-1,3-二基)双(氧基)]二丙酸二叔丁酯。在-5℃下在1小时内向在二甲亚砜(1.5L)中的2-氨基-1,3-丙二醇(500g,5.49mol)的搅拌的悬浮液中逐滴加入2-丙酸1,1-二甲基乙酯(1.44kg,11.3mol)。然后将反应混合物温热至25℃,并在此温度下继续搅拌指导TLC分析表明起始物质被消耗(16小时)。将反应混合物用水(3L)稀释,

并且将混合物用乙酸乙酯(5L x1,2.5L x2)萃取。将合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并在真空下浓缩,以得到残余物(1.30kg)。将粗产物通过柱色谱(在石油醚中的5%乙酸乙酯,然后是在二氯甲烷中的10%甲醇)进行纯化,以得到作为黄色油状物的标题化合物(600g,31%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 3.69-3.60(m,4H),3.45-3.37(m,2H),3.29(dd,2H),3.18-3.00(m,1H),2.44(t,4H),1.42(s,18H)。

[2512] 步骤2:12-氧代-12-[(2,2,16,16-四甲基-4,14-二氧代-3,7,11,15-四氧杂十七烷-9-基)氨基]十二烷酸甲酯。此反应分2批平行进行。在20℃下向在二氯甲烷(1.6L)中的3,3'-[(2-氨基丙烷-1,3-二基)双(氧基)]二丙酸二叔丁酯(182g,0.524mol)的搅拌的溶液中加入1,12-十二烷二酸单甲酯(128g,0.524mmol)、羟基苯并三唑(70.7g,0.524mmol)、二异丙基乙胺(271g,2.10mol)和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(201g,1.05mol),并且将反应在室温下搅拌直到TLC分析表明起始物质被消耗(12小时)。合并两批此反应混合物,将其用水(2L)稀释,并在室温下搅拌10分钟。将有机层分离,并经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的粗残余物通过硅胶色谱(在石油醚中的20%-50%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为浅黄色油状物的标题化合物(500g,83%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 6.21(d,1H),4.14-4.03(m,1H),3.68-3.54(m,7H),3.49(dd,2H),3.32(dd,2H),2.49-2.30(m,4H),2.21(t,2H),2.10(t,2H),1.53(br.s.,4H),1.37(s,18H),1.09-1.27(m,12H)。

[2513] 步骤3:3,3'-[{2-[(12-甲氧基-12-氧代十二烷酰基)氨基]丙烷-1,3-二基}双(氧基)]二丙酸。将在甲酸(2.5L)中的12-氧代-12-[(2,2,16,16-四甲基-4,14-二氧代-3,7,11,15-四氧杂十七烷-9-基)氨基]十二烷酸甲酯(546g,0.950mol)的溶液在30℃-35℃下搅拌,直到TLC分析表明起始物质被消耗(18小时)。浓缩混合物以得到粗残余物,将粗残余物在20℃下在石油醚/乙酸乙酯(10:1,1.5L)中研磨12小时。将所得的浆液过滤,并将滤饼在真空下干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(370g,84%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 10.02(br.s.,2H),6.33(d,1H),4.27-4.16(m,1H),3.73(t,4H),3.66(s,3H),3.59(dd,2H),3.45(dd,2H),2.59(t,4H),2.30(t,2H),2.20(t,2H),1.66-1.53(m,4H),1.26(br.s.,12H)。

[2514] 步骤4:15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸甲酯。在0℃-5℃下向在DCM/DMF(2L/250mL)中的3,3'-[{2-[(12-甲氧基-12-氧代十二烷酰基)氨基]丙烷-1,3-二基}双(氧基)]二丙酸(280g,0.606mmol)的搅拌的溶液中加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(348g,1.82mol)、羟基苯并三唑(205g,1.52mol)和二异丙基乙胺(470g,3.64mol)。然后在0℃-5℃下在20分钟内分4份向反应混合物中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(243g,1.39mol)。然后将反应温热至25℃,并在此温度下继续搅拌直到TLC分析表明起始物质被消耗(12小时)。浓缩反应混合物,并将所得的残余物用水(2L)稀释。然后将混合物用乙酸乙酯(2L x1,700mL x2)萃取,并且将合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得残余物通过硅胶色谱(100%乙酸乙酯,然后是在二氯甲烷中的10%甲醇)进行纯化,以得到白色固体,将其在15℃下在石油醚/乙酸乙酯(1:2,1L)中研磨。16小时后,将浆液过滤并将滤饼用乙酸乙酯(200mL)洗涤,并且随后在真空下干燥。将所得的固体再次在15℃下在石油醚/乙酸乙酯(1:3,600mL)中研磨24小时。将浆液过滤并将滤饼用乙酸乙酯(200mL)洗涤。将滤饼在真空下干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(190g,40%)。^{1}H NMR(400MHz,$(CD_3)_2SO$)δppm 7.81(t,2H),7.63(d,1H),6.76(t,2H),4.01-3.85(m,1H),

3.64-3.48(m,7H),3.41-3.22(m,4H),3.02(q,4H),2.90(q,4H),2.28(t,6H),2.05(t,2H),1.57-1.43(m,8H),1.37(s,18H),1.22(br.s.,12H)。

[2515] 步骤5:15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸。在20℃下向在四氢呋喃(1.2L)中的15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸甲酯(220g,284mmol)的搅拌的溶液中加入在水(400mL)中的氢氧化锂一水合物(35.7g,853mmol)的溶液。然后将反应混合物加热至28℃,直到TLC分析表明起始物质被消耗(18小时)。浓缩反应混合物,并将所得的残余物用水(2L)稀释。然后将混合物用二氯甲烷(1L x2)洗涤,并用水性盐酸(1N,900mL)酸化至pH<4。将混合物用二氯甲烷(1L x2)萃取,并且将合并的有机层经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以得到作为浅黄色胶状物的标题化合物(190g,88%)。^{1}H NMR(400MHz,$(CD_3)_2SO$)δppm 11.97(br.s.,1H),7.81(t,2H),7.62(d,1H),6.75(t,2H),3.98-3.87(m,1H),3.56(t,4H),3.38-3.24(m,4H),3.02(q,4H),2.90(q,4H),2.28(t,4H),2.18(t,2H),2.05(t,2H),1.57-1.41(m,8H),1.37(s,18H),1.23(br.s.,12H)。

[2516] 步骤6:15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸苯甲酯。在20℃下向在N,N-二甲基甲酰胺(800mL)中的15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸(196g,258mmol)的搅拌的溶液中加入碳酸钾(107g,773mmol)和苯甲基溴(52.9g,309mmol)。然后将反应混合物加热至35℃,直到TLC分析表明起始物质被消耗(12小时)。将混合物用水(1.5L)稀释并且用甲基叔丁基醚(1L x1,500mL x2)萃取。将合并的有机层用5%水性氯化锂(800mL x2)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物首先通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的10%甲醇)进行纯化,并且随后通过制备型HPLC(prepL-LD,Phenomenex Luna C18 250*80mm*10um,用10mM碳酸氢铵改性的在水中的30%-100%乙腈,250mL/分钟)进行纯化,以得到作为白色固体的标题化合物(100g,46%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.41-7.28(m,5H),6.86(t,2H),6.61(d,1H),5.21(t,2H),5.11(s,2H),4.26-4.14(m,1H),3.81-3.72(m,2H),3.72-3.63(m,2H),3.58(dd,2H),3.41(dd,2H),3.36-3.24(m,4H),3.16(q,4H),2.52-2.38(m,4H),2.35(t,2H),2.19(t,2H),1.68-1.55(m,8H),1.43(s,18H),1.34-1.20(m,12H)。

[2517] 步骤7:12-[(1,3-双{3-[(3-氨基丙基)氨基]-3-氧代丙氧基}丙烷-2-基)氨基]-12-氧代十二烷酸苯甲酯。将在二氯甲烷(35mL)中的15-(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷-1-基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十八烷-28-酸苯甲酯(5.0g,5.9mmol)的搅拌的溶液在冰浴中冷却。在15分钟内逐滴加入三氟乙酸(8.8mL,0.12mol)。再过15分钟后,去除冰浴,并将反应在环境温度下搅拌2小时。将反应浓缩,并加入乙腈(20mL)。将溶液浓缩并在高真空泵上干燥过夜。将所得的油状物溶解在二氯甲烷(125mL)中,并加入MP-碳酸酯树脂(Biotage)(18g,3.1mmol/g)以使基体物质游离。将混合物在环境温度下在氮气下搅拌2.5小时。然后滤出树脂,并用二氯甲烷(25mL)、接着是甲醇(25mL)洗涤。将合并的滤液浓缩并在真空下干燥过夜,以得到作为白色固体的标题化合物(4.1g,定量)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.40-7.28(m,5H),5.11

(s,2H),4.17-4.06(m,1H),3.70(t,4H),3.46(d,4H),3.30-3.28(m,4H,与甲醇转化重叠),2.95(t,4H),2.46(t,4H),2.36(t,2H),2.20(t,2H),1.85(m,4H),1.61(d,4H),1.30(br.s.,12H)。

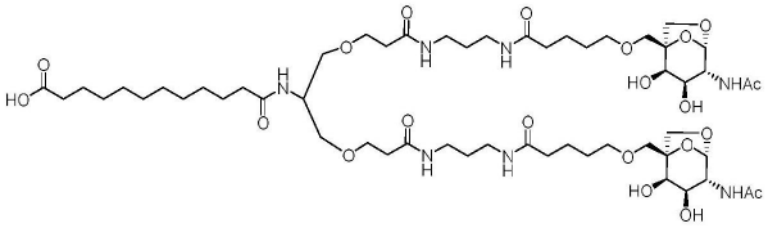
[2518] 步骤8:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸五氟苯酯。将放置在冰浴中的在二氯甲烷(8mL)中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯(0.990g,2.04mmol)的溶液中加入三氟乙酸(1.90g,170mmol),并将反应在环境温度下在氮气下搅拌过夜。如通过LCMS[(m/z)for $C_{18}H_{28}NO10^{+}$(M+H)$^{+}$418.0]所确认的,酯的去保护完成。将反应混合物冷却至0℃,并通过加料漏斗依次加入2,6-二甲基吡啶(2.18g,20.5mmol),之后加入三氟乙酸五氟苯酯(0.86g,3.06mmol mL),并将反应混合物在环境温度下搅拌。3小时后,通过加入盐酸(1N,150mL)淬灭反应,并用二氯甲烷(200mL)萃取。将有机相用盐酸(1N,3x150mL)和饱和碳酸氢钠(150mL)洗涤,然后随后经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱(在庚烷中的25%-75%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为白色固体的标题化合物(1.03g,87%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN)δppm 6.49(d,1H),5.36(d,1H),5.30(s,1H),5.01(dd,1H),4.10(t,1H),3.94(d,1H),3.69(dd,2H),3.55-3.46(m,2H),3.46-3.36(m,1H),2.72(t,2H),2.12(s,3H),1.91(s,3H),1.85(s,3H),1.80-1.68(m,2H),1.66-1.53(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{24}H_{27}F_5NO_{10}^{+}$(M+H)$^{+}$584.8;保留时间=0.94分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2519] 步骤9:1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯。向在乙腈(18mL)和二甲基甲酰胺(8mL)的混合物中的12-[(1,3-双{3-[(3-氨基丙基)氨基]-3-氧代丙氧基}丙烷-2-基)氨基]-12-氧代十二烷酸苯甲酯(1.05g,1.31mmol)的悬浮液中加入N,N-二异丙基乙胺(1.83ml,10.5mmol)。然后将所得的混合物加入在乙腈(5mL)中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸五氟苯酯(1.75g,3.00mmol)的溶液中,并且将反应在环境温度下在氮气下搅拌2小时。然后将反应用1N盐酸(50ml)稀释,并用二氯甲烷(2x125mL)萃取。将合并的二氯甲烷萃取物经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物通过柱色谱(在庚烷中的20%-100%乙酸乙酯,并且然后是在二氯甲烷中的0%-30%甲醇)进行纯化,以得到作为白色固体的标题化合物(1.71g,89%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3OD)δppm7.37-7.28(m,5H),5.46(d,2H),5.34(s,2H),5.17-5.07(m,4H),4.20(d,2H),4.15-4.09(m,1H),4.02(d,2H),3.67-3.79(m,8H),3.57-3.18(m,18H,与甲醇峰重叠),2.45(t,4H),2.38(t,2H),2.25-2.12(m,12H),1.96(s,12H),1.76-1.48(m,14H),1.43-1.25(m,14H)。

[2520] 步骤10:实施例32.使在甲醇(24mL)中的1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-双(乙酰氧基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯(1.71g,1.18mmol)在25℃和1mL/分钟流速下在全H_2(20巴)下通过H立方体

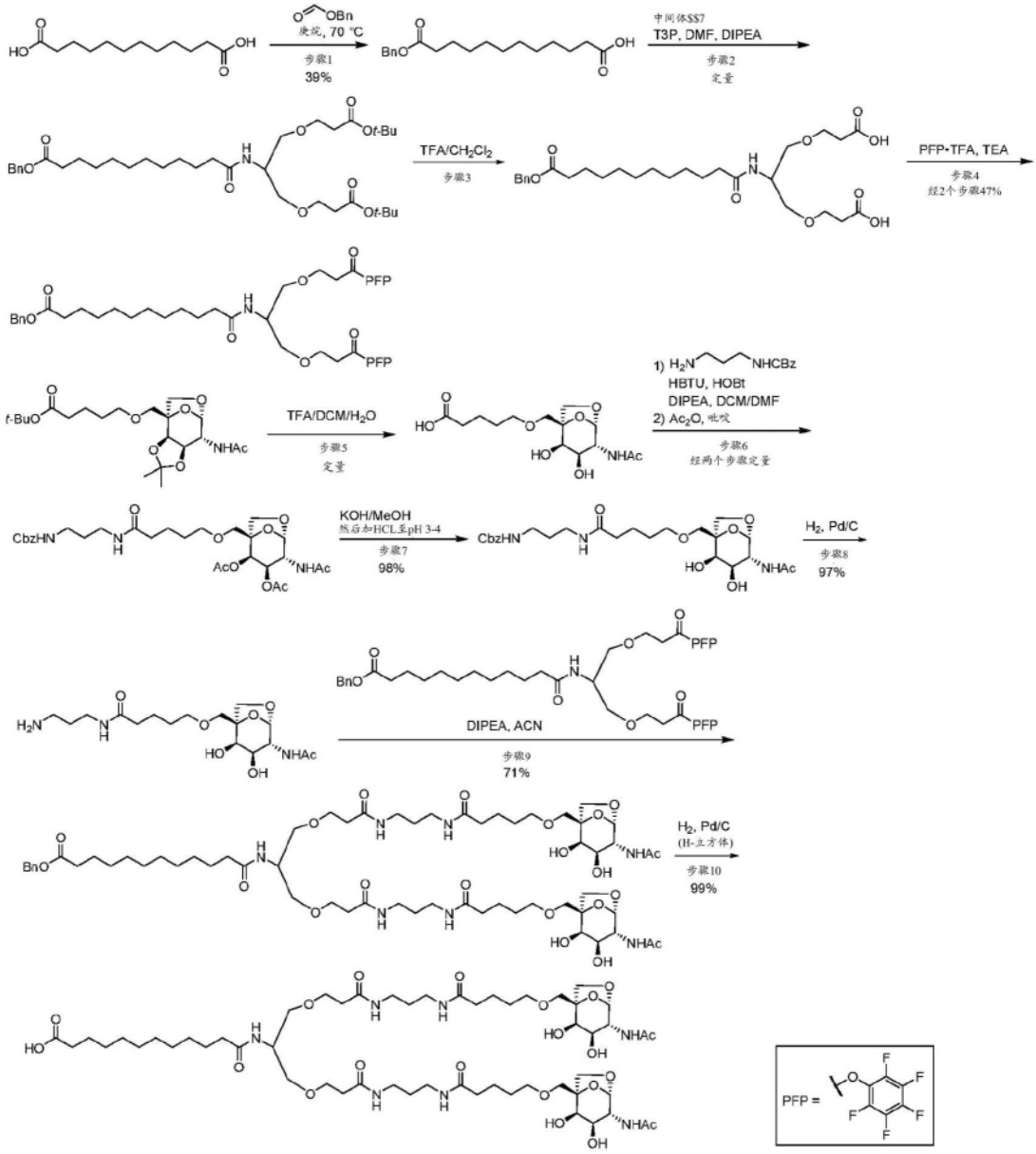
上的小10％Pd/C Catcart。将Catcart用另外的甲醇(10mL)冲洗,并将流出物浓缩成油。将残余物溶解在二氯甲烷中并浓缩(2x25mL),以得到粘性白色泡沫。将物质在真空泵上干燥过夜,并且随后溶解在乙腈/水(3.8mL,1:1)中,并冻干成白色固体(1.52g,95％)。^{1}H NMR (400MHz,CD_3OD)δppm 5.44(d,2H),5.32(s,2H),5.12-5.09(m,2H),4.18(d,2H),4.13-4.10(m,1H)4.01(d,2H)3.79-3.67(m,8H),3.56-3.35(m,10H),3.26-3.14(m,8H),2.43(t,4H),2.28(t,2H),2.23-2.14(m,12H)1.97-1.92(m,12H),1.74-1.50(m,14H),1.41-1.28(m,14H)。LCMS(m/z)对于$C_{63}H_{104}N_7O_{25}^{+}$(M+H)$^{+}$1359.1;保留时间＝0.80分钟(UPLC 1.5分钟运行)。

[2521] 1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸

[2522] 

[2523] 反应方案：

[2524]



[2525] 步骤1:12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酸。将十二烷二酸((15.0g,65.0mmol)和Dowex-H型(65g)加入庚烷(0.52L)和甲酸苯甲酯(142g,1.04mol,130mL)的混合物中,并将反应加热至回流24小时。然后将反应冷却,并滤出树脂。将滤液在真空下浓缩,并所得的残余物通过硅胶色谱(在庚烷中的0%-20%乙酸乙酯)进行纯化,以得到泥状残余物。将分离物浆化过夜(在庚烷中的5%乙酸乙酯,20mL)。将混合物通过真空过滤进行过滤,并将所得的固体用庚烷洗涤,以得到作为白色固体的标题化合物(6.66g,39%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.36(s,5H),5.12(s,2H),2.42-2.30(m,4H),1.75-1.54(m,4H),1.45-1.16(m,12H)。

[2526] 步骤2:12-氧代-12-[(2,2,16,16-四甲基-4,14-二氧代-3,7,11,15-四氧杂十七烷-9-基)氨基]十二烷酸苯甲酯。向在二甲基甲酰胺(8mL)中的12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酸(0.95g,2.98mmol)、3,3'-[(2-氨基丙烷-1,3-二基)双(氧基)]二丙酸二叔丁酯(1.03g,2.98mmol)和N,N-二异丙基乙胺(1.2g,8.9mmol,1.6mL)的悬浮液中加入正丙基膦酸酐、环状三聚体(2.3g,3.6mmol,2.0mL,在乙酸乙酯中50%),并将反应混合物在室温下搅

拌过夜。将反应混合物用乙酸乙酯(100mL)稀释,并用盐酸(1N,30mL)、饱和碳酸氢钠(30mL)和盐水(30mL)洗涤。将有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以得到残余物,然后将其与庚烷(3x40mL)共沸,以得到作为固体的标题化合物(2.0g,100%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN)δppm 7.41-7.31(m,5H),6.34(d,1H),5.08(s,2H),4.01(td,1H),3.67-3.58(m,4H),3.44(dd,2H),3.36(dd,2H),2.40(t,4H),2.33(t,2H),2.09(t,2H),1.61-1.49(m,4H),1.43(s,18H),1.30-1.25(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{36}H_{60}NO_9^+$(M+H)$^+$650.5;保留时间=1.23分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2527] 步骤3:3,3'-[(2-{[12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酰基]氨基}丙烷-1,3-二基)双(氧基)]二丙酸。将在三氟乙酸(15g,130mmol,10.0mL)中的12-氧代-12-[(2,2,16,16-四甲基-4,14-二氧代-3,7,11,15-四氧杂十七烷-9-基)氨基]十二烷酸酯(1.60g,2.47mmol)的溶液在环境温度下搅拌过夜。浓缩反应混合物,并将所得的残余物在20℃下与二乙醚(4x70mL)共沸,并且随后在真空下干燥过夜,以得到作为胶状物的标题化合物(4.03g,99%,2.11当量TFA)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN)δppm 7.52-7.24(m,5H),6.89(d,1H),5.14-5.04(m,2H),4.15-4.01(m,1H),3.65(t,4H),3.49-3.46(m,2H),3.44-3.41(m,2H),2.50(t,4H),2.33(t,2H),2.21(t,2H),1.57(td,4H),1.23-1.32(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{28}H_{44}NO_9^+$(M+H)$^+$538.6;保留时间=0.92分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2528] 步骤4:12-({1,3-双[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]丙烷-2-基}氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯。在冰浴中向在二甲基甲酰胺(10mL)中的3,3'-[(2-{[12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酰基]氨基}丙烷-1,3-二基)双(氧基)]二丙酸(1.57g,2.41mmol,1当量TFA)、二异丙基乙胺(3.11g,24.1mmol,4.20mL)的悬浮液中逐滴加入三氟乙酸五氟苯酯(5.40g,19.3mmol,3.31mL)。将所得的溶液在环境温度下搅拌。将反应混合物浓缩并与庚烷(2x20mL)共沸。将所得残余物用乙酸乙酯(80mL)稀释,用10%柠檬酸(30mL)、饱和碳酸氢钠(30mL)和盐水(30mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱(在庚烷中的0%-60%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为固体的标题化合物(983mg,47%)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN-d_3)δppm 7.44-7.24(m,5H),6.23(d,1H),5.08(s,2H),4.08(td,1H),3.81-3.76(m,4H),3.53-3.42(m,4H),2.92(t,4H),2.32(t,2H),2.07(t,2H),1.62-1.46(m,4H),1.32-1.19(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{40}H_{42}NO_9^+$(M+H)$^+$870.6;保留时间=1.23分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2529] 步骤5:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸。向在二氯甲烷(15mL)和水(2mL)中的5-{[(1S,2R,6R,7R,8S)-7-(乙酰氨基)-4,4-二甲基-3,5,9,11-四氧杂三环[6.2.1.0~2,6~]十一烷-1-基]甲氧基}戊酸叔丁酯(2.09g,4.87mmol)的溶液中加入三氟乙酸(22g,200mmol,15mL),并将反应混合物在环境温度下搅拌过夜。将粗产物浓缩,与甲苯(3x50mL)共沸,然后与庚烷(3x50ml)共沸,并在真空下干燥,以得到作为胶状物的标题化合物(2.08g,定量,0.83当量TFA)。LCMS(m/z)对于$C_{14}H_{24}NO_8^+$(M+H)$^+$334.2;保留时间=0.45分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2530] 步骤6:(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-1-(3,9-二氧代-1-苯基-2,14-二氧杂-4,8-二氮杂十五烷-15-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,3-二基二乙酸酯。向在二氯甲烷(12mL)和二甲基甲酰胺(5mL)中的含有约1当量TFA(1.0g,2.05mmol)的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酸的溶

液中加入二异丙基乙胺(1.59g,12.3mmol)、邻-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(0.93g,2.46mmol)和1H-苯并三唑-1-醇(277mg,2.05mmol)。将混浊的混合物在室温下搅拌20分钟。然后加入正-(3-氨基丙基)氨基甲酸苯甲酯盐酸盐(502mg,2mmol)。将所得的混合物在环境温度下搅拌过夜。通过LCMS[$C_{25}H_{38}N_3O_9^+$,$(M+H)^+$524.5]确认酰胺产物的形成。将反应混合物浓缩至5mL并且用吡啶(6mL)稀释。向此溶液中加入乙酸酐(6.0g,60mmol),并将反应混合物在50℃下搅拌过夜。将反应混合物冷却至室温,用乙酸乙酯(70mL)稀释,用盐酸(1N,30mL)、饱和碳酸氢钠(30mL)和盐水(30mL)洗涤。将分离的有机相经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的0%-15%甲醇)进行纯化,以得到作为玻璃的标题化合物(1.28g,100%)。LCMS(m/z)对于$C_{29}H_{42}N_3O_{11}^+$,$(M+H)^+$608.5;保留时间=0.70分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

[2531] 步骤7:{3-[(5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基甲酸苯甲酯。向在甲醇(8mL)中的(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-1-(3,9-二氧代-1-苯基-2,14-二氧杂-4,8-二氮杂十五烷-15-基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-2,3-二基二乙酸酯(1.5g,2.47mmol)的悬浮液中加入氢氧化钾(在甲醇中1M,5.3mL,5.3mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时。然后将反应混合物逐滴用盐酸(在二氧杂环己烷中4.0M,1.5mL)处理。将所得的浆液浓缩并在乙醇(15mL)中研磨10分钟。通过过滤除去所得的氯化钾沉淀,用乙醇(5mL)冲洗。将滤液浓缩,通过真空干燥,以得到作为胶状物的标题化合物(1.28g,98%)。^{1}H NMR(600MHz,MATHANOL-d_4)δppm 7.41-7.25(m,5H),5.21(s,1H),5.07(s,2H),3.93(dd,2H),3.86(d,1H),3.77(d,1H),3.71(dd,1H),3.65(d,1H),3.58(d,1H),3.53-3.46(m,2H),3.20(t,2H),3.15(t,2H),2.20(t,2H),1.99(s,3H),1.70-1.62(m,4H),1.61-1.53(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{25}H_{38}N_3O_9^+$,$(M+H)^+$524.5;保留时间=0.64分钟(UPLC 1.5分钟方法)。

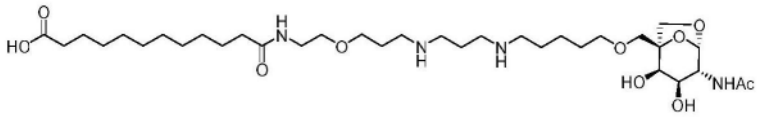
[2532] 步骤8:5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}-N-(3-氨基丙基)戊酰胺。将在甲醇(20mL)中的{3-[(5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基甲酸苯甲酯(1.60g,2.4mmol)和10%钯碳(200mg)的混合物在环境温度下在氮气压力(50psi)下在Parr反应器中搅拌过夜。将反应混合物通过硅藻土过滤。将硅藻土用甲醇(50mL)洗涤,并将合并的滤液浓缩,并在真空下干燥,以得到作为固体的标题化合物(925mg,97%)。^{1}H NMR(600MHz,MATHANOL-d_4)δppm 5.21(s,1H),3.94(d,1H),3.90(d,1H),3.86(d,1H),3.77(d,1H),3.71(dd,1H),3.65(d,1H),3.61(d,1H),3.58-3.46(m,2H),3.26(t,2H),2.82(t,2H),2.22(t,2H),1.99(s,3H),1.76(quin,2H),1.68(quin,2H),1.63-1.56(m,2H)。LCMS(m/z)对于$C_{17}H_{32}N_3O_7^+$,$(M+H)^+$390.5;保留时间=0.47分钟(UPLC 1.5分钟方法)

[2533] 步骤9:1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯。将在二氯甲烷(8mL)和二甲基甲酰胺(3mL)的混合物中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}-N-(3-氨基丙基)戊酰胺(607mg,1.40mmol)和

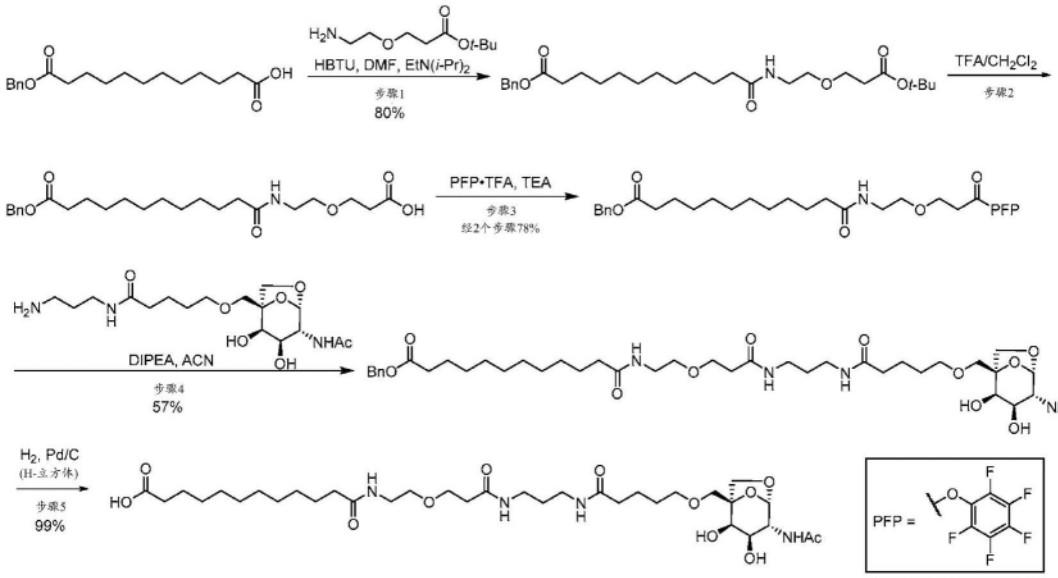
12-({1,3-双[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]丙烷-2-基}氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯(500mg,0.58mmol)和N,N-二异丙基乙胺(200mg,2.0mmol)的混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩,与庚烷(3x10mL)共沸,并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的0%-40%甲醇)进行纯化,以得到作为玻璃的标题化合物(520mg,71%)。^{1}H NMR(600MHz,甲醇-d_4)δppm 7.37-7.29(m,5H),5.21(s,2H),5.11(s,2H),4.11(t,1H),3.94(dd,4H),3.87(d,2H),3.77(d,2H),3.75-3.67(m,6H),3.64(d,2H),3.57(d,2H),3.55-3.42(m,8H),3.23-3.19(m,8H),2.43(t,4H),2.36(t,2H),2.20(q,6H),1.98(s,6H),1.72-1.54(m,16H),1.35-1.28(m,12H)。LCMS $C_{62}H_{102}N_7O_{21}^+$,$(M+H)^+$1280.3;保留时间=1.45分钟(UPLC 3分钟方法)。

[2534] 步骤10:实施例33.1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18,18-双{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸。使在甲醇(16mL)中的1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-18-{17-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷-1-基}-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯(520mg,0,41mmol)在25℃下在全H_2下以1mL/分钟的流速通过ThalesNano H-立方体Pro™上的10%Pd/C30x4 CatCart®。将体系通过甲醇(20mL)冲洗。将滤液浓缩,与二氯甲烷(20mL)共沸,然后与庚烷(20mL)共沸。将所得的残余物溶解在乙腈/水(1:1,20mL)中,并冷冻干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(477mg,99%)。^{1}H NMR(600MHz,甲醇-d_4)δppm 5.21(s,2H),4.11(t,1H),3.98-3.87(m,4H),3.87(d,2H),3.78(d,2H),3.74-3.67(m,6H),3.65(d,2H),3.58(d,2H),3.55-3.45(m,8H),3.21(q,8H),2.43(t,4H),2.27(t,2H),2.23-2.16(m,6H),1.99(s,6H),1.72-1.62(m,8H),1.63-1.54(m,8H),1.35-1.28(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{55}H_{96}N_7O_{21}^+$,$(M+H)^+$1190.7;保留时间=1.07分钟(UPLC 3分钟方法)。

[2535] 1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸

[2536] 

[2537] 反应方案:



[2538]

[2539] 步骤1:12-{[2-(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)乙基]氨基}-12-氧代十二烷酸苯甲酯。将12-苯甲氧基-12-氧代十二烷酸(2.33g,7.26mmol)、3-(2-氨基乙氧基)丙酸叔丁酯(1.25g,6.60mmol)和N,N-二异丙基乙胺(2.3ml,13mmol)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(35mL)中。向此溶液中加入N,N,N',N'-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸盐、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(2.75g,7.26mmol),并且将反应在环境温度下搅拌16小时。将反应浓缩,并将残余物溶解在乙酸乙酯(100mL)中,并依次用饱和碳酸氢钠、水和盐水(各25mL)洗涤。然后将有机层经硫酸钠干燥,过滤并浓缩成无色油状物。将残余物通过硅胶色谱(在庚烷中的0%-100%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为白色固体的所需产物(2.58g,80%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.41-7.30(m,5H),6.18(br.s.,1H),5.12(s,2H),3.69(t,2H),3.57-3.51(m,2H),3.49-3.42(m,2H),2.49(t,2H),2.36(t,2H),2.23-2.14(m,2H),1.63(d,4H),1.47(s,9H),1.36-1.22(m,12H)。

[2540] 步骤2:3-(2-{[12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酰基]氨基}乙氧基)丙酸。将12-{[2-(3-叔丁氧基-3-氧代丙氧基)乙基]氨基}-12-氧代十二烷酸苯甲酯(2.58g,5.25mmol)溶解在二氯甲烷(12mL)中。向其中加入三氟乙酸(20ml,0.27mol)。在环境温度下搅拌2小时后,将反应浓缩。将所得的残余物溶解在甲苯中并浓缩(2x20mL),并且随后在真空泵上干燥,以得到固体(2.21g)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm7.41-7.30(m,5H)6.08(br.s.,1H)5.12(s,2H)3.74(t,2H)3.61-3.51(m,2H)3.50-3.40(m,2H)2.64(t,2H)2.36(t,2H)2.25-2.11(m,2H)1.72-1.54(m,4H)1.27(m,12H)。

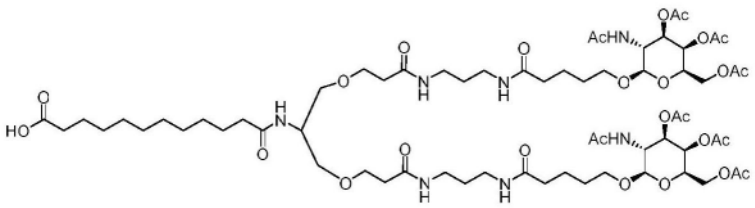
[2541] 步骤3:12-氧代-12-({2-[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]乙基}氨基)十二烷酸苯甲酯。向在二甲基甲酰胺(24mL)中的3-(2-{[12-(苯甲氧基)-12-氧代十二烷酰基]氨基}乙氧基)丙酸(2.20g,5.05mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(3.52ml,20.2mmol)。然后向其中以缓流形式加入五氟苯酚-2,2,2-三氟乙酸酯(1.74mL,10.1mmol)。反应变为紫色,并在环境温度下搅拌18小时。将反应混合物在旋转蒸发仪(50℃,高真空泵)上浓缩至1/3体积,并将所得的浓缩物用乙酸乙酯(300mL)稀释,用10%柠檬酸(100mL)、饱和钠碳酸氢钠(100mL)和盐水(100mL)洗涤。将有机层经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将残余物通过硅胶色谱(在庚烷中的0%-100%乙酸乙酯)进行纯化,以得到作为黄色固体的所需产物(2.46g,经2

个步骤78%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.41-7.30(m,5H),5.85(br.s.,1H)5.12(s,2H),3.85(t,2H),3.64-3.54(m,2H),3.52-3.43(m,2H),2.94(t,2H),2.36(t,2H),2.16(t,2H),1.70-1.60(m,4H),1.26(m,12H)。

[2542] 步骤4:1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-20-氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯。将在二氯甲烷(3.3mL)和二甲基甲酰胺(0.7mL)的混合物中的5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]甲氧基}-N-(3-氨基丙基)戊酰胺(172mg,0.440mmol)和12-氧代-12-({2-[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]乙基}氨基)十二烷酸苯甲酯(220mg,0.402mmol)、N,N-二异丙基乙胺(95mg,0.73mmol)的混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩,与庚烷(3x10mL)共沸,并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的0%-25%甲醇)进行纯化,以得到作为油状物的标题化合物(185mg,57%)。^{1}HNMR(600MHz,甲醇-d_4)δppm 7.39-7.28(m,5H),5.21(s,1H),5.11(s,2H),3.99-3.89(m,2H),3.87(d,1H),3.77(d,1H),3.75-3.67(m,3H),3.64(d,1H),3.57(d,1H),3.55-3.44(m,4H),3.38-3.32(m,2H),3.26-3.16(m,4H),2.44(t,2H),2.36(t,2H),2.19(td,4H),1.99(s,3H),1.70--1.55(m,10H),1.33-1.25(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{41}H_{67}N_4O_{12}^+$,$(M+H)^+$807.8;保留时间=1.60分钟(UPLC 3分钟方法)。

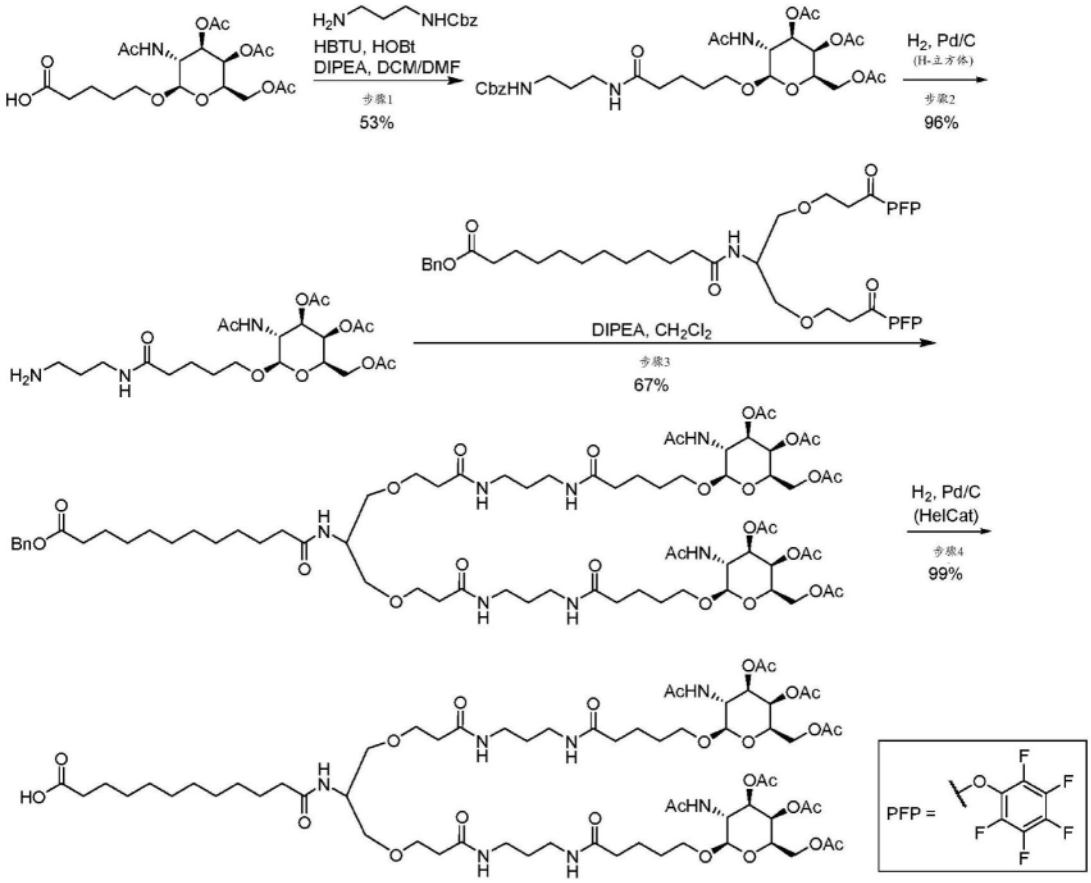
[2543] 步骤5:实施例34.使在甲醇(22mL)中的1-[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(乙酰氨基)-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基]-20-氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸苯甲酯(0.22g,0.25mmol)在25℃下在全H_2下以1mL/分钟的流速通过ThalesNano H-立方体Pro™上的10%Pd/C 30x4 CatCart®。将体系通过甲醇(40mL)冲洗。将滤液浓缩,与二氯甲烷(20mL)共沸,然后与庚烷(20mL)共沸。将所得的残余物溶解在乙腈/水(1:1,20mL)中,并冷冻干燥,以得到作为白色固体的标题化合物(177mg,99%)。^{1}HNMR(600MHz,甲醇-d_4)δppm 5.20(s,1H),4.01-3.89(m,2H),3.87(d,1H),3.77(d,1H),3.75-3.68(m,3H),3.65(d,1H),3.57(d,1H),3.55-3.45(m,4H),3.34(t,2H),3.27-3.14(m,4H),2.44(t,2H),2.28(t,2H),2.20(td,4H),1.98(s,3H),1.67(t,4H),1.63-1.54(m,6H),1.35-1.28(m,12H)。$C_{34}H_{61}N_4O_{12}^+$,$(M+H)^+$717.7;保留时间=1.12分钟(UPCL 3分钟方法)。

[2544] 5,11,18-三氧代-16-{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸

[2545] 

[2546] 反应方案:

[2547]



[2548] 步骤1:{3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基甲酸苯甲酯。向在N,N-二甲基甲酰胺(3.5mL)中的(3-氨基丙基)氨基甲酸苯甲酯盐酸盐(0.713g,2.01mmol)的溶液中加入N,N-二异丙基乙胺(1.38mL,7.95mmol)。然后将所得的混合物加入在二甲基甲酰胺(10mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(1.19g,2.65mmol)的溶液中。然后加入1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸酯(1.11g,2.91mmol),并将反应混合物在环境温度下在氮气气氛下搅拌(2.5小时)。将反应用饱和氯化铵(50mL)淬灭,并用二氯甲烷(4x75mL)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将所得的油状物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的2%-6%甲醇)进行纯化,以得到作为白色泡沫的所需产物(0.904g,53%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.41-7.25(m,5H),5.33(d,1H),5.12-5.02(m,3H),4.54(d,1H),4.19-4.03(m,3H),4.03-3.97(m,1H),3.91-3.82(m,1H),3.60-3.46(m,2H),3.11-3.25(m,4H),2.16-2.23(m,2H),2.13(s,3H),2.02(s,3H),1.95(s,3H),1.92(s,3H),1.73-1.53(m,6H),1.40-1.34(m,2H)。

[2549] 步骤2:N-(3-氨基丙基)-5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰胺乙酸盐。{3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基甲酸苯甲酯

[2550] 将5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酸(1.01g,1.59mmol)溶解在甲醇(30mL)和冰乙酸(91uL,1.6mmol)的混合物中。在氮气下向其中加入10%Pd/C(0.2g,湿),并将反应混合物在50psi氢气下放置在密封的搅拌的Parr反

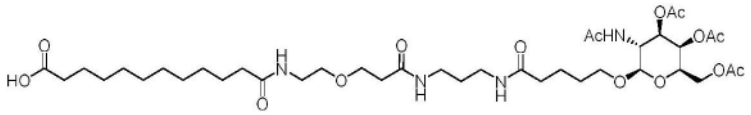
应器中。16小时后,用氮气(x4)吹扫顶部空间,并通过0.45um尼龙注射过滤器过滤。将过滤器用甲醇洗涤,并将合并的滤液浓缩,以得到作为白色泡沫的标题化合物(0.86g mg,96%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 5.34(d,1H),5.06-5.02(m,1H),4.52(d,1H),4.19-4.05(m,3H),4.04-3.98(m,1H),3.92-3.84(m,1H),3.56-3.47(m,1H),2.98-2.89(m,2H),2.23(t,2H),2.14(s,3H),2.06(d,1H),2.03(s,3H),1.94(d,5H),1.91(s,3H),1.83(m,2H),1.74-1.54(m,4H),1.39-1.31(m,1H)。

[2551] 步骤3:5,11,18-三氧代-16-{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯。

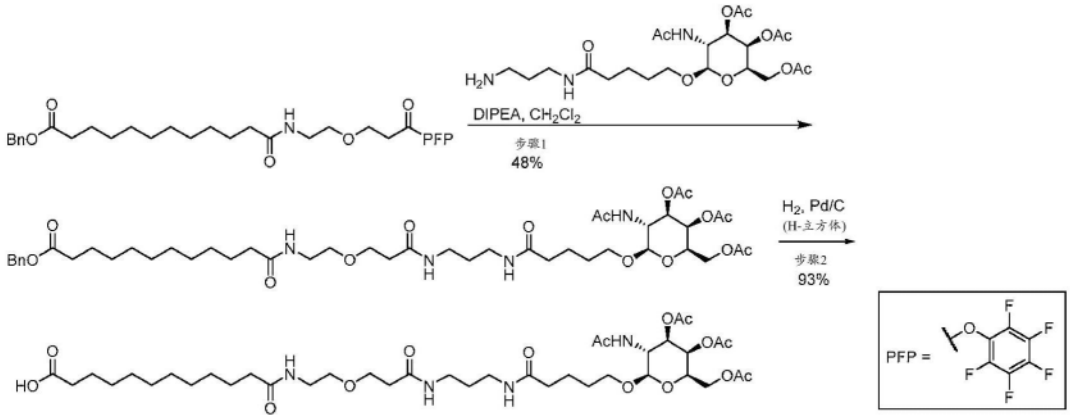
[2552] 将12-({1,3-双[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]丙烷-2-基}氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯(150mg,0.172mmol)、N-(3-氨基丙基)-5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰胺乙酸盐(233mg,0.414mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.15ml,0.862mmol)溶解在二氯甲烷(3.5mL)中并在环境温度下搅拌64小时。将反应混合物浓缩并加入庚烷,并将残余物再次浓缩(x3)。将所得的残余物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的4%-14%甲醇)进行纯化,以得到作为无色玻璃的所需产物(175mg,67%)。然后将化合物溶解在乙腈和水的混合物(1:1,30mL)中,并冷冻干燥,以得到白色固体。^{1}HNMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm 7.42-7.37(m,5H),7.15(br.s.,2H)6.94-6.84(m,3H),6.51-6.45(m,2H),5.38(d,2H),5.20(d,2H),5.14(s,2H),4.65-4.57(m,2H),4.27-4.06(m,8H),4.02-3.90(m,4H),3.73(br.s.,6H),3.63-3.42(m,8H),3.37-3.26(m,8H),2.47(br.s.,5H),2.38(t,3H),2.34-2.15(m,15H),2.12(s,6H),2.03(s,6H),1.98(s,6H),1.78(br.s.,4H)1.28(d,14H)。

[2553] 步骤4:实施例35.向在甲醇(5mL)中的5,11,18-三氧代-16-{[3-氧代-3-({3-[(5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰基)氨基]丙基}氨基)丙氧基]甲基}-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯(282mg,0.187mmol)的溶液中加入10%Pd/C(30mg,湿)。将混合物在50psi氢气下放置在HelCat中,并在环境温度下搅拌16小时。然后将顶部空间用氮气(x3)吹扫,并将溶液通过0.2um尼龙注射过滤器过滤。将过滤器用甲醇洗涤,并将合并的滤液浓缩,以得到作为白色泡沫的标题化合物,然后将其溶解在乙腈和水的混合物(1:1,20mL)中,并冷冻干燥成白色固体(262mg,99%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 5.33(d,2H),5.08-5.04(m,2H),4.55(d,2H)4.21-3.98(m,10H),3.91-3.83(m,2H),3.69(t,4H)3.60-3.44(m,8H),3.24-3.19(m,8H),2.43(t,4H),2.31-2.16(m,8H),2.14(s,6H),2.06-2.00(m,6H),1.94(d,10H),1.73-1.55(m,15H),1.40-1.28(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{65}H_{108}N_7O_{27}^{+}$(M+H)$^{+}$1419.7;保留时间=1.34分钟(UPLC 3.0分钟运行)。

[2554] 5,11,18-三氧代-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸

[2555] 

[2556] 反应方案：

[2557] 

[2558] 步骤1:5,11,18-三氧代-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯。向在二氯甲烷(5mL)中的12-氧代-12-({2-[3-氧代-3-(五氟苯氧基)丙氧基]乙基}氨基)十二烷酸苯甲酯(164mg,0.291mmol)和N,N-二异丙基乙胺(200uL,1.32mmol)的溶液中加入N-(3-氨基丙基)-5-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}戊酰胺乙酸盐(159mg,0.264mmol),并且将反应在环境温度下搅拌16小时。浓缩反应混合物,并将所得的残余物溶解在庚烷中并浓缩(3x10ml)。将所得的残余物通过硅胶色谱(在二氯甲烷中的0%-10%甲醇)进行纯化,以得到作为无色玻璃的标题化合物(116mg,48%)。LCMS(m/z)对于$C_{48}H_{72}N_4O_{15}^+$(M+H)$^+$921.8;保留时间=0.91分钟(UPLC 1.3分钟运行)。

[2559] 步骤2:实施例36.在氮气下向在甲醇(5mL)中的5,11,18-三氧代-1-{[3,4,6-三-O-乙酰基-2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基}-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯(196mg,0.213mmol)的溶液中加入10%Pd/C(25mg,湿)。将反应在50psi氢气下放置在HelCat中,并在环境温度下搅拌16小时。将顶部空间用氮气(x3)吹扫,并将溶液通过0.2um尼龙注射过滤器过滤。将过滤器用甲醇洗涤,并将合并的滤液浓缩,以得到作为无色玻璃的标题化合物,然后将其溶解在乙腈和水的混合物(1:1,20mL)中,并冷冻干燥以得到白色固体(165mg,93%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm8.01-7.91(m,1H),5.33(d,1H),5.06(m,1H),4.55(d,1H),4.19-3.98(m,4H),3.91-3.84(m,1H),3.76-3.67(m,2H),3.57-3.47(m,4H),3.25-3.18(m,4H),2.44(t,2H),2.30-2.16(m,6H),2.14(s,3H),2.02(s,3H),1.95(s,3H),1.93(s,3H),1.73-1.54(m,10H),1.39-1.28(m,12H)。LCMS(m/z)对于$C_{39}H_{67}N_4O_{15}^+$(M+H)$^+$831.8;保留时间=1.30分钟(UPLC 3.0分钟运行。

[2560] 实施例37.寡核苷酸的合成

[2561] 本文描述了各种寡核苷酸的合成。WV寡核苷酸名称后小数点后的两位数字表示批号。例如,WV-7107.03表示WV-7107的批次03。

[2562] 实施例37A.WV-7107和WV-6558的合成。

[2563] 具有序列5'-Mod001L001Aeo*SGeom5CeoTeoTeo*RC*ST*ST*SG*RT*SC*SC*RA*SG*SC*RTeoTeoTeoAeo*STeo-3'的WV-6558是具有序列5'-L001Aeo*SGeom5CeoTeoTeo*RC*ST*

ST*SG*RT*SC*SC*RA*SG*SC*RTeoTeoTeoAeo*STeo-3'的WV-7107的GalNAc缀合物。对WV-7107执行GalNAc缀合步骤以制备WV-6558。

[2564] WV-7107的固相合成：

[2565] WV-7107的合成在ÄKTA OP100合成仪(GE healthcare)上使用6.0cm直径不锈钢柱反应器在3300μmol规模下使用CPG支撑体(载量72umol/g)进行。所述过程由五个步骤组成:脱三苯甲基化、偶联、加帽1、氧化/硫醇化和加帽2。用在甲苯中的3％DCA进行脱三苯甲基化,并将UV观察命令设置在436nm。脱三苯甲基化之后,使用至少4个柱体积(CV)的ACN洗掉脱三苯甲基化试剂。

[2566] 制备所有亚磷酰胺和活化剂溶液(CMIMT和ETT),并在合成之前经3Å分子筛干燥至少4小时。

[2567] 使用0.2M的亚酰胺溶液和0.6M CMIMT进行立体限定的亚酰胺偶联。除了溶解在异丁腈(IBN)中的dC-L和dC-D亚酰胺之外,所有亚酰胺均溶解在ACN中。将立体限定的MOE亚酰胺溶解在体积比20％IBN/ACN中。将CMIMT溶解在ACN中。使用4当量,通过将40％(按体积计)的相应的亚酰胺溶液与67％的CMIMT活化剂在线混合,然后添加到柱中,进行偶联。然后将偶联混合物再循环至少10分钟,以使偶联效率最大化。

[2568] 使用在ACN中的0.2M的亚酰胺溶液和0.6M ETT进行标准的立体无规的亚酰胺偶联。将MOE-T亚酰胺溶解在体积比20％IBN/ACN中。使用4当量,通过将40％(按体积计)的相应的亚酰胺溶液与60％的ETT活化剂在线混合,然后添加到柱中,进行偶联。然后将偶联混合物再循环至少6分钟,以使偶联效率最大化。

[2569] 在两种情况下偶联后,用2CV的ACN洗涤柱。

[2570] 对于立体限定的偶联,然后将柱用加帽1溶液(乙酸酐、二甲基吡啶、ACN)混合物处理1CV,以在4分钟内使手性助剂胺乙酰化。在此步骤之后,将柱用ACN洗涤至少2CV。然后用在吡啶中的0.2M黄原氢化物进行硫醇化2CV,接触时间为6分钟。在使用ACN进行2CV硫醇化洗涤步骤之后,使用在线混合(1:1)的0.5CV的加帽A和加帽B试剂进行加帽2,之后进行2CV ACN洗涤。

[2571] 对于立体无规偶联循环,没有加帽1步骤。使用在/吡啶/H2O(9:1)中的50mM碘进行氧化2.5分钟和3.5当量。在2CV ACN洗涤之后,使用在线混合(1:1)的0.5CV的加帽A和加帽B试剂进行加帽2,之后进行2CV ACN洗涤。

[2572] WV-7107的切割和去保护：

[2573] 在此步骤中使用了上文合成的物质的67％(或2200μmol)。通过用1M TEA.HF溶液处理寡核苷酸结合的固体支撑体来除去WV-7107上的DPSE保护基团以制备每mmol寡核苷酸100mL溶液,所述溶液通过以39:8:1:2.5的体积比混合DMSO、水、TEA和TEA.3HF制成。然后将混合物在培养摇床中在25℃下摇动6小时。将混合物冷却(冰浴),然后每mmol寡核苷酸加入200mL氨水。然后将混合物在45℃下摇动16小时。然后将混合物过滤(0.2-1.2μm过滤器),并用水冲洗滤饼。获得滤液并通过UPLC分析,并且获得纯度为30.8％FLP。使用Nano Drop 1分光光度计(Thermo Scientific)进行定量,并且获得的产率为约101,200OD/mmol。

[2574] WV-7107的纯化和脱盐：

[2575] 将粗WV-7107装载到填充有Source 15Q(GE healthcare)的Agilent Load&Lock柱

(5cm X 32cm)上。使用20mM NaOH和2.5MNaCl作为洗脱液,在ÄKTA 150Pure(GE Healthcare)上进行纯化。分析馏分并合并,以获得纯度≥70%的物质。然后将纯化的物质在2K再生纤维素膜上脱盐,之后冻干,以获得作为白色粉末的WV-7107。然后将这种物质用于缀合实验。

[2576] 实施例37B.WV-6558的合成

[2577] GalNAc缀合的方案

[2578] 前体物质:WV-7107.03

[2579] 最终缀合产物:WV-6558.03

[2580] 用于缀合的试剂

[2581]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.03	7191.7	1	400	-	55.62
三天线 GalNAc 批号: GL-N12-26	2005	1.6	178.4	-	88.99
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.4	29.75	-	77.87
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	-	98.83	556.2
乙腈	-	-	-	4000	-

[2582]

[2583] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2584]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	50	8	400

[2585] 称量1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸(1.6当量)和HATU(1.4当量),并转移至50ml塑料管中。将物质溶解在无水乙腈中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将澄清的混合物在37℃下搅拌20分钟。用8mL水将冻干的WV-7107样品重构至50mg/mL的浓度。然后将GalNac混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌60分钟。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应完成。将溶液在真空下(通过速度真空)浓缩以除去乙腈,并将所得的GalNAc缀合的寡核苷酸用浓缩的氢氧化铵(5mL)处理,用于通过在37℃下温育1小时进行去保护。通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-6558的形成。通过阴离子交换

色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:8802.4(解卷积的),目标质量:8801.6。

[2586] 实施例37C.WV-9542的合成

[2587] PFE缀合的方案

[2588] 前体物质:WV-7107.02

[2589] 最终缀合产物:WV-9542.01

[2590] 用于缀合的试剂

[2591]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.02	7191.7	1	1700	-	236.38
三天线 PFE ASGPR 配体 批号: GL-N12-58	2065.8	1.6	781.3	-	378.21
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.2	108.36	-	283.66
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	304.93	420.02	2363.84
DMF	-	-	-	13000	-

[2592] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2593]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	60	13	1800

[2594] 称量三天线PFE ASGPR配体(18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸)(1.6当量)和HATU(1.2当量),并转移至50mL管中。将物质溶解在无水二甲基甲酰胺中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将溶液超声处理直至其变澄清,并在37℃下搅拌20分钟。用13mL水重构WV-7107样品。然后将三天线PFE配体混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌1小时。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应未完成。称出第二次添加的三天线PFE配体(1.2当量)和HATU(1当量),并溶解在具有DIEA(15当量)的5mL DMF中。将配体在37℃下温育20分钟进行活化。然后将活化的配体加入反应混合物中,并在37℃下温育1小时。反应完成并且通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-9542的形成。通过阴离子交换色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:8837.6(解卷积的),目标质量:8837.6。

[2595] 实施例37D.WV-9543的合成

[2596] PFE缀合的方案

[2597] 前体物质:WV-7107.02

[2598] 最终缀合产物:WV-9543.01

[2599] 用于缀合的试剂

[2600]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.02	7191.7	1	90	-	12.51
双天线 GalNAc 批号: PF-07075575	1418.59	2	35.5	-	25.03
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.8	8.6	-	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14

[2601]

二甲基甲酰胺	-	-	-	1500	-

[2602] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2603]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	60	1.5	90

[2604] 称量双天线GalNAc(1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16-((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸)(2.0当量)和HATU(1.8当量),并转移至50mL管中。将物质溶解在二甲基甲酰胺(1.5mL)中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将溶液超声处理直至其变澄清,并在37℃下搅拌20分钟。用1.5mL水重构WV-7107样品。然后将双天线GalNAc混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌1小时。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应完成。将混合物用浓缩的氢氧化铵(2mL)处理,用于通过在37℃下温育1小时进行去保护。通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-9543的形成。通过阴离子交换色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:8342.6(解卷积的),目标质量:8340.1。

[2605] 实施例37E.WV-9544的合成

[2606] PFE缀合的方案

[2607] 前体物质:WV-7107.02

[2608] 最终缀合产物:WV-9544.01

[2609] 用于缀合的试剂

[2610]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.02	7191.7	1	90	-	12.51
双天线 PFE ASGPR 配体 批号: PF-07075667	1190.39	2	29.8	-	25.03
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.8	8.6	-	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
二甲基甲酰胺	-	-	-	1500	-

[2611]

[2612] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2613]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	60	1.5	90

[2614] 称量双天线PFE ASGPR配体(18-(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸)(2.0当量)和HATU(1.8当量),并转移至50mL管中。将物质溶解在二甲基甲酰胺(1.5mL)中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将溶液超声处理直至其变澄清,并在37℃下搅拌20分钟。用1.5mL水重构WV-7107样品。然后将双天线PFE ASGPR配体混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌1小时。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应完成。通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-9544的形成。通过阴离子交换色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:8367.2(解卷积的),目标质量:8364.1。

[2615] 实施例37F.WV-9545的合成

[2616] PFE缀合的方案

[2617] 前体物质:WV-7107.02

[2618] 最终缀合产物:WV-9545.01

[2619] 用于缀合的试剂

[2620]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.02	7191.7	1	90	-	12.51
Mono GalNAc 批号: PF-07075574	830.97	2	20.8	-	25.03
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.8	8.6	-	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
二甲基甲酰胺	-	-	-	1500	-

[2621] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2622]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	60	1.5	90

[2623] 称量Mono GalNAc(1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸)(2.0当量)和HATU(1.8当量),并转移至50mL管中。将物质溶解在二甲基甲酰胺(1.5mL)中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将溶液超声处理直至其变澄清,并在37℃下搅拌20分钟。用1.5mL水重构WV-7107样品。然后将Mono GalNAc配体混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌1小时。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应完成。将混合物用浓缩的氢氧化铵(2mL)处理,用于通过在37℃下温育1小时进行去保护。通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-9545的形成。通过阴离子交换色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:7881.3(解卷积的),目标质量:7878.6。

[2624] 实施例37G.WV-9546的合成

[2625] PFE缀合的方案

[2626] 前体物质:WV-7107.02

[2627] 最终缀合产物:WV-9546.01

[2628] 用于缀合的试剂

[2629]

寡核苷酸/试剂	MW	与寡核苷酸的当量	mg	μL	μmole
WV-7107.02	7191.7	1	90	-	12.51
Mono PFE ASGPR 配体 批号: PF-07075666	716.87	2	17.9	-	25.03
HATU P/N Sigma 445460 批号: MKBV8272V	382	1.8	8.6	-	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 批号: SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
二甲基甲酰胺	-	-	-	1500	-

[2630] 表2中示出:水性寡核苷酸溶液

[2631]

寡核苷酸/溶剂	浓度(mg/mL)	总体积(mL)	总 mg
在水中的 WV-7107.01	60	1.5	90

[2632] 称量Mono PFE ASGPR配体(1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸)(2.0当量)和HATU(1.8当量),并转移至50mL管中。将物质溶解在二甲基甲酰胺(1.5mL)中,然后向管中加入DIEA(d=0.742)(10当量)。将溶液超声处理直至其变澄清,并在37℃下搅拌20分钟。用1.5mL水重构WV-7107样品。然后将Mono GalNAc配体混合物加入样品WV-7107中,并在37℃下搅拌1小时。通过UPLC监测反应进展。温育1小时后反应完成。通过UPLC和质谱法确认最终产物WV-9546的形成。通过阴离子交换色谱法纯化缀合的样品。观察的质量:7893.1(解卷积的),目标质量:7890.6。

[2633] 实施例37H.IEX纯化条件

[2634] 对于样品WV-9542

[2635]

缓冲液 A	20 mM 氢氧化钠
缓冲液 B	在 20 mM 氢氧化钠中的 2.5 N 氯化钠
柱	2.5cm X 33cm Source 15Q
梯度	

%B	柱体积(160 mL)
0	2
0-15	2
15	1
15-90	15
100	1

[2636] 对于样品WV-6558、WV-9542-WV-9546

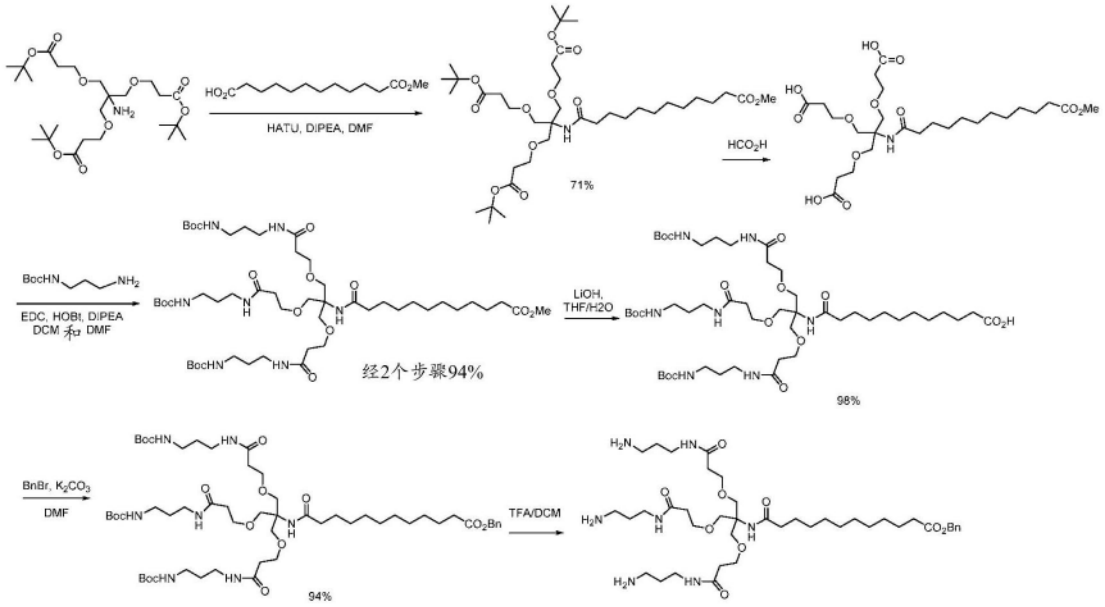
[2637]

缓冲液 A	20 mM 氢氧化钠
缓冲液 B	在 20 mM 氢氧化钠中的 2.5 N 氯化钠
柱	2.0 cm X 10cm Source 15Q
梯度	

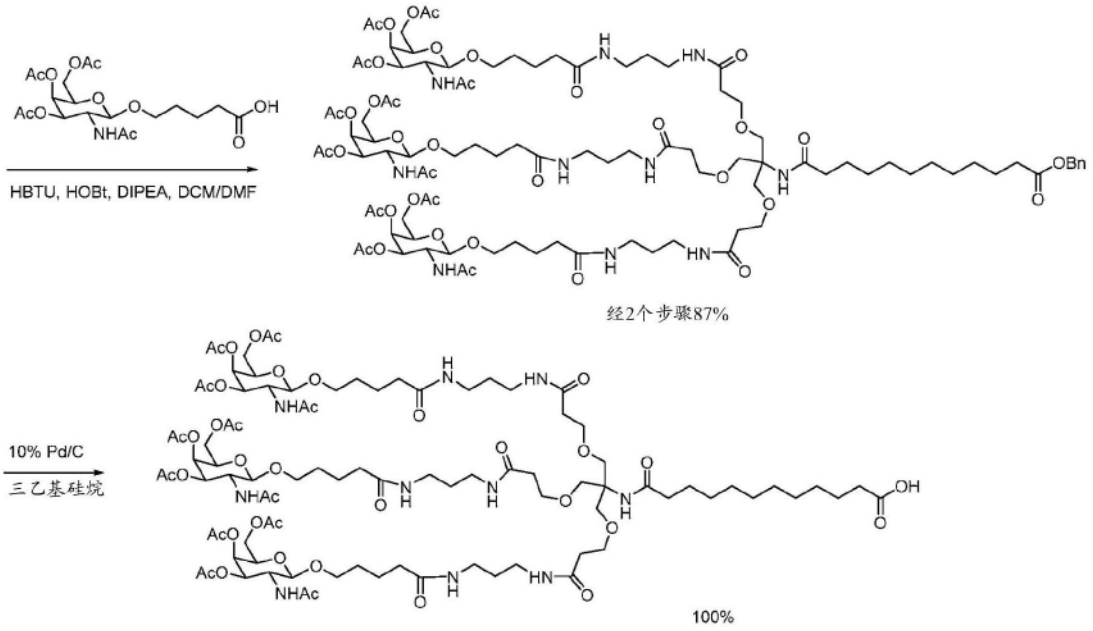
%B	柱体积(160 mL)
0	2
0-20	5
20	1
20-90	15
100	1

[2638] 实施例38.配体的合成。

[2639] 1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸的合成



[2640]



[2641] 步骤1:向在DMF(45mL)中的3,3'-((2-氨基-2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.0g,9.89mmol)和12-甲氧基-12-氧代十二烷酸(2.416g,9.89mmol)的溶液中加入HATU(3.76g,9.89mmol)和DIPEA(2.58ml,14.83mmol)。将反应混合物在室温下搅拌5小时。将溶剂在减压下浓缩,并用盐水稀释,用EtOAc萃取,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(120g金硅胶柱)纯化,用在己烷中的10%EtOAc至在己烷中的40%EtOAc洗脱,以得到作为无色油状物的3,3'-((2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.13g,7.01mmol,70.9%产率)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.03(s,1H),3.74-3.61(m,15H),2.45(t,J=6.3Hz,6H),2.31(td,J=7.5,3.9Hz,2H),2.19-2.10(m,2H),1.64-1.59(m,4H),1.46(s,27H),1.32-1.24(m,12H);MS(ESI),732.6$(M+H)^+$。

[2642] 步骤2:将在甲酸(50mL)中的3,3'-((2-((3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)甲基)-2-

(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二叔丁酯(5.0g,6.83mmol)的溶液在室温下搅拌48小时。将溶剂在减压下蒸发,与甲苯(3X)共蒸发,以得到白色固体,将其在高真空下干燥2天。LC-MS和H NMR表明反应未完成。将粗产物重新溶解在甲酸(50mL)中。将反应混合物在室温下搅拌24小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发,与甲苯(3X)共蒸发,在高真空下干燥以得到作为白色固体的3,3'-((2-((2-羧基乙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(4.00g)。MS(ESI):562.4$(M-H)^-$。

[2643] 步骤3:在0℃下向在DCM(60mL)和DMF(15mL)中的3,3'-((2-((2-羧基乙氧基)甲基)-2-(12-甲氧基-12-氧代十二酰胺基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸(3.85g,6.83mmol)和HOBt(3.88g,28.7mmol)的溶液中加入(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(4.76g,27.3mmol)、EDAC HCl盐(5.24g,27.3mmol)和DIPEA(8.33ml,47.8mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌15分钟,并在室温下搅拌20小时。LC-MS表明反应未完成。将(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(1.59g,9.12mmol)和EDC HCl盐(1.75g,9.13mol)加入反应混合物中。将反应混合物在室温下连续搅拌4小时。将溶剂蒸发,以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc(300mL)中,用水(1X)、饱和碳酸氢钠(2X)、10%柠檬酸(2X)和水洗涤,经硫酸钠干燥,并浓缩,以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为白色固体的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸甲酯(6.61g,6.40mmol,经2个步骤的产率94%)。MS(ESI):1033.5(M+H)+。

[2644] 步骤4:向在THF(75mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸甲酯(6.56g,6.35mmol)的溶液中加入在水(25mL)中的水性LiOH(0.457g,19.06mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发,用1N HCl(45mL)酸化,用DCM(3X)萃取,经无水硫酸钠干燥,浓缩,以得到作为白色固体的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸(6.31g,6.20mmol,98%产率)。MS(ESI):1019.6$(M+H)^+$。

[2645] 步骤5:向在DMF(40mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸(6.31g,6.20mmol)和(溴甲基)苯(1.272g,7.44mmol)的溶液中加入K_2CO_3(2.57g,18.59mmol)。将混合物在40℃下搅拌4小时,并且在室温下搅拌过夜。将溶剂在减压下蒸发。将反应混合物用EtOAc稀释,用水洗涤,经无水硫酸钠干燥,在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(80g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的30%MeOH洗脱,以得到作为无色油状物的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸苯甲酯(6.41g,5.78mmol,93%产率)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.80(t,J=5.7Hz,3H),7.39-7.30(m,5H),6.95(s,1H),6.74(t,J=5.8Hz,3H),5.07(s,2H),3.53(J,J=7.3Hz,6H),3.51(s,6H),3.02(q,J=6.7Hz,6H),2.94-2.85(m,6H),2.29(dt,J=26.1,6.9Hz,8H),2.02(q,J=9.7,8.6Hz,2H),1.56-1.39(m,10H),1.35(s,27H),1.20(brs,14H);MS(ESI):1019.6$(M+H)^+$。

[2646] 步骤6:向在DCM(40mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂十八烷-28-酸苯甲酯(2.42g,2.183mmol)的溶液中加入2,2,2-三氟乙酸(8ml,105mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。经溶剂在减压下蒸发,与甲苯(2X)共蒸发,与乙醚一起研磨,在高真空下干燥过夜。直接将TFA盐用于下一步骤。

[2647] 步骤7:向在DCM(25mL)中的5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(3.91g,8.73mmol)、HBTU(3.48g,9.17mmol)和HOBT(1.239g,9.17mmol)的溶液中加入DIPEA(6.08ml,34.9mmol),之后加入在DMF(4.0mL)中的12-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-12-氧代十二烷酸苯甲酯(1.764g,2.183mmol)。将混合物在室温下搅拌5小时。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g金柱)纯化,用在DCM中的5%MeOH洗脱5柱值以除去HOBt,之后用在DCM中的5%至30%MeOH洗脱以得到作为白色固体的1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸苯甲酯(3.98g,87%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.82-7.74(m,6H),7.69(t,J=5.6Hz,3H),7.33-7.27(m,5H),6.94(s,1H),5.16(d,J=3.4Hz,3H),5.03(s,2H),4.92(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.43(d,J=8.4Hz,3H),4.02-3.95(m,9H),3.82(dt,J=11.2,8.8Hz,3H),3.65(dt,J=10.5,5.6Hz,3H),3.51-3.44(m,12H),3.36(dt,J=9.6,6.0Hz,3H),3.01-2.95(m,12H),2.29(t,J=7.4Hz,2H),2.23(t,J=6.3Hz,6H),2.05(s,9H),1.99(t,J=7.0Hz,8H),1.94(s,9H),1.84(s,9H),1.72(s,9H),1.50-1.14(m,34H);MS(ESI):1049.0(M/2+H)+。

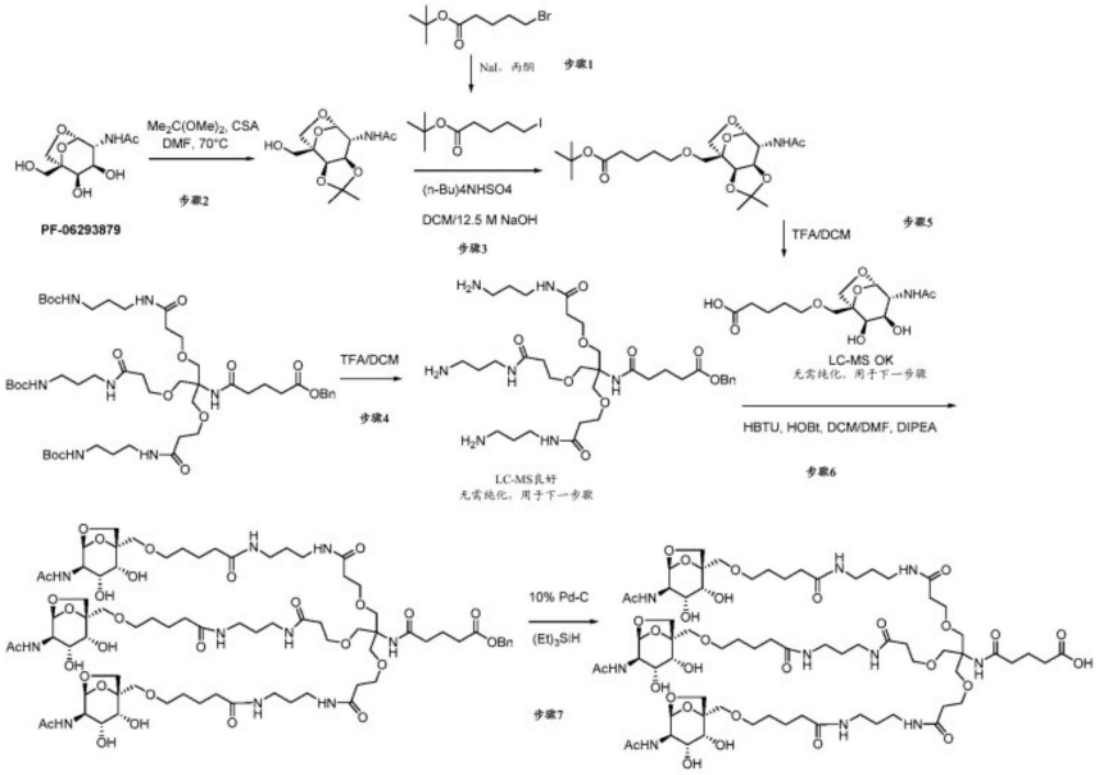
[2648] 步骤8:向用Ar冲洗的圆底烧瓶中加入10%Pd/C(165mg,0.835mmol)和EtOAc(15mL)。之后向在甲醇(15mL)中的苯甲基保护的tris-GalNAc(1.75g,0.835mmol)的溶液中逐滴加入三乙基硅烷(2.67ml,16.70mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明反应完成,用EtOAc稀释,并通过硅藻土过滤,用在EtOAc中的20%MeOH洗涤,在减压下浓缩以得到作为白色固体的1-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16,16-双((3-((3-(5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酰胺基)丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,11,18-三氧代-14-氧杂-6,10,17-三氮杂二十九烷-29-酸(1.67g,0.832mmol,100%产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.95(s,1H),7.83-7.74(m,6H),7.69(t,J=5.7Hz,3H),6.93(s,1H),5.16(d,J=3.4Hz,3H),4.92(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.43(d,J=8.4Hz,3H),4.01-3.94(m,9H),3.82(dt,J=11.3,8.8Hz,3H),3.66(dt,J=10.7,5.6Hz,3H),3.54-3.43(m,12H),3.41-3.33(m,3H),3.03-2.94(m,12H),2.24(t,J=7.4Hz,10H),2.14(t,J=7.4Hz,2H),2.06(s,9H),2.00(t,J=7.2Hz,8H),1.95(s,9H),1.84(s,9H),1.73(s,9H),1.51-1.14(m,34H)。MS(ESI):1003.8(M/2+H)+。

[2649] 实施例39.配体的合成。

[2650] 18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环

[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸的合成

[2651]



[2652] 步骤1:向在丙酮(80mL)中的5-溴戊酸叔丁酯(4.0g,16.87mmol)的溶液加入NaI(7.59g,50.6mmol)。将反应混合物在57℃下搅拌2小时,过滤,并用EtOAc洗涤。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物溶解在EtOAc中,用水、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g柱)纯化,用在己烷中的20%EtOAc至在己烷中的50%EtOAc洗脱,以得到作为黄色油状物的5-碘戊酸叔丁酯6(4.54g,15.98mmol,95%产率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ3.19(t,J=6.9Hz,2H),2.24(t,J=7.3Hz,2H),1.86(p,J=7.1Hz,2H),1.70(p,J=7.4Hz,2H),1.45(s,9H)。

[2653] 步骤2:向在DMF(15mL)中的N-((1S,2R,3R,4R,5S)-2,3-二羟基-1-(羟基甲基)-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-4-基)乙酰胺(600mg,2.57mmol)的溶液中加入2,2-二甲氧基丙烷(2087μl,17.03mmol),之后加入(+/-)-樟脑-10-磺酸(264mg,1.135mmol)。将反应混合物在70℃下搅拌24小时。将反应混合物冷却至室温,并且然后加入甲醇(2.5mL)。将反应混合物在室温下搅拌30分钟并且用TEA(0.10mL)中和。将溶剂蒸发,并将残余物与甲苯共蒸发。将残余物通过ISCO(24g金)纯化,用EtOAc至在EtOAc中的10%MeOH洗脱,以得到N-((3aR,4S,7S,8R,8aR)-4-(羟基甲基)-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-8-基)乙酰胺7(666mg,2.437mmol,95%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ8.09(d,J=8.1Hz,1H),5.15-5.05(m,2H),4.26(d,J=5.8Hz,1H),4.09(dd,J=7.3,5.8Hz,1H),3.80-3.60(m,5H),1.83(s,3H),1.37(s,3H),1.26(s,3H);MS,274.3$(M+H)^+$。

[2654] 步骤3:向在DCM(10.5mL)中的5-碘戊酸叔丁酯(1310mg,4.61mmol)和N-((3aR,4S,7S,8R,8aR)-4-(羟基甲基)-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚

因-8-基)乙酰胺7(420mg,1.537mmol)的溶液中加入硫酸氢四丁铵(783mg,2.305mmol),之后加入12.5M氢氧化钠溶液(7mL)。将反应混合物在室温下搅拌24小时。将反应混合物用DCM和水稀释,用DCM(2X)萃取。

[2655] 将有机层用1N HCl溶液洗涤,并经硫酸钠干燥。将溶剂在减压下浓缩,以得到残余物。向所得的粗物质中加入乙酸乙酯(30mL),并超声处理5分钟。将所得的沉淀过滤,用乙酸乙酯(10mLX2)洗涤。LC_MS表明过滤器不含所需产物,并且是四丁基铵盐。将滤液在减压下浓缩以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(40g硅胶金柱)纯化,用在己烷中的50%EtOAc至EtOAc洗脱,以得到作为淡黄色油状物的5-(((3aR,4S,7S,8R,8aR)-8-乙酰胺基-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-4-基)甲氧基)戊酸叔丁酯(0.470g,1.094mmol,71.2%产率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ5.56(d,J=9.1Hz,1H),4.21(d,J=5.9Hz,1H),4.12(dtd,J=7.7,3.8,1.7Hz,1H),3.99(t,J=6.3Hz,1H),3.90(d,J=9.5Hz,1H),3.77(d,J=2.0Hz,2H),3.67(d,J=9.5Hz,1H),3.52(ddt,J=30.5,9.2,5.8Hz,2H),2.23(t,J=7.1Hz,2H),2.03(d,J=14.5Hz,3H),1.65-1.55(m,7H),1.44(s,9H),1.35(s,3H);MS,452.4(M+Na)$^+$。

[2656] 步骤4:向在DCM(3mL)中的15,15-双(13,13-二甲基-5,11-二氧代-2,12-二氧杂-6,10-二氮杂十四烷基)-2,2-二甲基-4,10,17-三氧代-3,13-二氧杂-5,9,16-三氮杂二十一烷-21-酸苯甲酯(0.168g,0.166mmol)的溶液中加入TFA(3mL)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂在减压下蒸发以得到作为无色油状物的5-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-5-氧代戊酸苯甲酯。MS,710.5(M+H)$^+$。无需纯化,直接用于下一步骤。

[2657] 步骤5:向在DCM(5mL)中的5-(((3aR,4S,7S,8R,8aR)-8-乙酰胺基-2,2-二甲基六氢-4,7-环氧[1,3]二氧杂环戊烯[4,5-d]噁庚因-4-基)甲氧基)戊酸叔丁酯(285mg,0.664mmol)的溶液中加入TFA(5mL),在室温下搅拌4小时。LC-MS表明反应完成。将溶剂蒸发以得到5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸。MS(ESI):334.3(M+H)+。无需纯化,直接用于下一步骤。

[2658] 步骤6:向在DCM(10mL)中的5-(((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)甲氧基)戊酸(221mg,0.664mmol)的溶液中加入DIPEA(2313μl,13.28mmol)、HBTU(208mg,0.548mmol)、HOBT(67.3mg,0.498mmol)、在DMF(3.0mL)和DCM(5.0mL)中的5-((1,19-二氨基-10-((3-((3-氨基丙基)氨基)-3-氧代丙氧基)甲基)-5,15-二氧代-8,12-二氧杂-4,16-二氮杂十九烷-10-基)氨基)-5-氧代戊酸苯甲酯(118mg,0.166mmol)(GL08-02)的溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜。LC-MS表明所需产物。将溶剂在减压下蒸发以得到残余物,将所述残余物通过ISCO(24g金柱)纯化,用DCM至在DCM中的80%MeOH洗脱,以得到18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸苯甲酯(272mg,0.164mmol,99%产率)(在管30至42的产物(在DCM中的40%MeOH至在DCM中的60%MeOH))

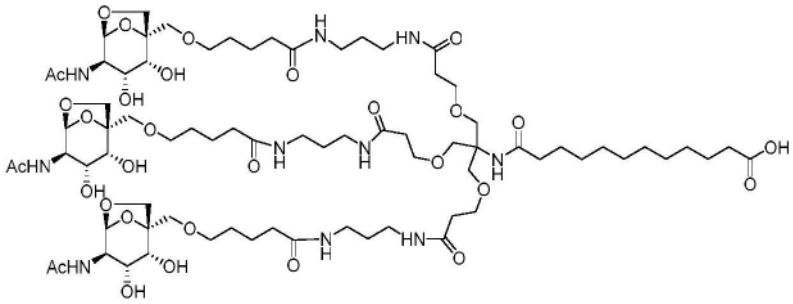
[2659] ^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.89(d,J=7.8Hz,3H),7.81(t,J=5.7Hz,3H),7.75(s,

3H),7.34(q,J＝7.5,6.9Hz,5H),7.05(s,1H),5.07(s,5H),4.83(d,J＝5.3Hz,3H),4.56(d,J＝7.1Hz,3H),3.73(dd,J＝23.3,9.2Hz,6H),3.64(d,J＝7.0Hz,6H),3.58-3.35(m,27H),3.02(p,J＝6.2Hz,12H),2.33(t,J＝7.6Hz,2H),2.26(t,J＝6.4Hz,6H),2.10(t,J＝7.6Hz,2H),2.04(t,J＝7.4Hz,6H),1.82(s,9H),1.72(q,J＝7.6Hz,2H),1.52-1.39(m,18H);MS(ESI),1656.3(M+H)$^+$。

[2660] 步骤7:向在EtOAc(10mL)中的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸苯甲酯(270mg,0.163mmol)的溶液中加入10％Pd-C(50mg)和MeOH(5.0mL)和三乙基硅烷(1042μl,6.52mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,过滤,并浓缩以得到作为白色固体的18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸(246mg,0.157mmol,96％产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ 11.99(brs,1H),7.89(d,J＝7.9Hz,3H),7.82(t,J＝5.4Hz,3H),7.75(t,J＝5.7Hz,3H),7.03(s,1H),5.07(d,J＝1.6Hz,3H),4.83(brs,3H),4.56(brs,3H),3.79-3.68(m,6H),3.64(d,J＝7.2Hz,6H),3.58-3.34(m,27H),3.02(p,J＝6.3Hz,12H),2.27(t,J＝6.4Hz,6H),2.17(t,J＝7.5Hz,2H),2.08(t,J＝7.5Hz,2H),2.04(t,J＝7.3Hz,6H),1.82(s,9H),1.65(p,J＝7.5Hz,2H),1.54-1.40(m,18H);MS(ESI),1566.3(M+H)+。

[2661] 实施例40.配体的合成

[2662] 18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一烷-31-酸的合成

[2663] 

[2664] 使用与18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂二十四烷-24-酸相同的程序合成18,18-双(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-5,11-二氧代-2,16-二氧杂-6,10-二氮杂十七烷基)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-乙酰胺基-2,3-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛烷-1-基)-7,13,20-三氧代-2,16-二氧杂-8,12,19-三氮杂三十一

烷-31-酸。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.90(d,J=7.8Hz,3H),7.83(t,J=5.7Hz,3H),7.76(t,J=5.7Hz,3H),6.98(d,J=6.2Hz,1H),5.09(s,3H),3.81-3.69(m,6H),3.69-3.62(m,6H),3.62-3.40(m,24H),3.04(p,J=6.1Hz,9H),2.28(t,J=6.4Hz,4H),2.18(t,J=7.3Hz,2H),2.06(t,J=7.7Hz,6H),1.84(s,6H),1.48(tq,J=14.9,7.4Hz,16H),1.23(s,8H)。MS(ESI),1664.0(M+H)$^+$。

[2665] 等效方案

[2666] 已描述本公开的一些说明性实施方案,对于本领域技术人员而言应显而易见的是前述事项仅是说明性而非限制性的,已仅通过举例方式加以呈现。众多修改和其他说明性实施方案在本领域普通技术人员的能力范围内,并且预期属于本公开的范围。具体来说,尽管本文呈现的许多实例涉及方法动作或系统要素的特定组合,但应了解那些动作和那些要素可以其他方式组合以达成相同目标。仅与一个实施方案关联讨论的动作、要素和特征不旨在从其他实施方案中的类似作用排除。此外,对于例如在要求保护的发明中叙述的一个或多个手段加功能限制,如果存在的话,手段不旨在限于本文公开的用于执行叙述的功能的手段,而是旨在在范围方面涵盖目前已知或稍后开发的用于执行叙述的功能的任何手段。

[2667] 在权利要求中使用顺序术语,诸如“第一”、“第二”、“第三”等来修饰权利要求要素本身并不意味一个权利要求要素超过另一个的任何优先、居先或次序或执行方法的动作所依的时序,而是仅用作区分具有某一名称的一个权利要求要素与(如果不使用顺序术语,那么将)具有相同名称的另一要素以区分所述权利要求要素的标记。类似地,使用a)、b)等或i)、ii)等本身并不意味权利要求中的步骤的任何优先、居先或次序。类似地,在说明书中使用这些术语本身并不意味任何需要的优先、居先或次序。使用任何此类术语均不表示所描述的(包括要求保护的)发明中的要素的数量。

[2668] 前述书面说明足以使本领域技术人员能够实践本公开中描述的任何发明。本公开在范围方面不受提供的实施例限制,实施例旨在作为对所描述的发明的一个或多个方面的说明,并且其他功能等效实施方案在所描述的发明的范围内。除本文所示和所述的那些修改之外,根据先前描述,所描述的发明的各种修改将变得对于本领域技术人员而言显而易见,并且属于所描述的发明的范围内。所描述的发明的优点和目标未必由所描述的发明的各实施方案所涵盖。

[2669] 前述书面说明被视为足以使得本领域技术人员能够实施本发明。本公开在范围方面不受提供的实施例限制,因为实施例旨在作为对本发明的一个方面的单一说明,并且其他功能等效实施方案在本发明的范围内。除本文所示和所述的那些修改之外,根据先前描述,本发明的各种修改将变得对于本领域技术人员而言显而易见,并且属于随附实施方案的范围内。本发明的优点和目标未必由本发明的各实施方案所涵盖。

[2670] 在整个申请中,引用了各种出版物。这些出版物的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[2671] 实施方案

[2672] 1.一种具有式01的化合物:

[2673] Y^1-L^1-$(Z^{10})_{za}$

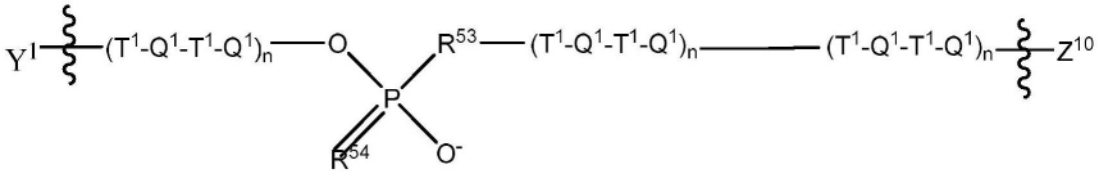
[2674] 01

[2675] 或所述化合物的药学上可接受的盐,其中Y^1是靶向PNPLA3的寡核苷酸;

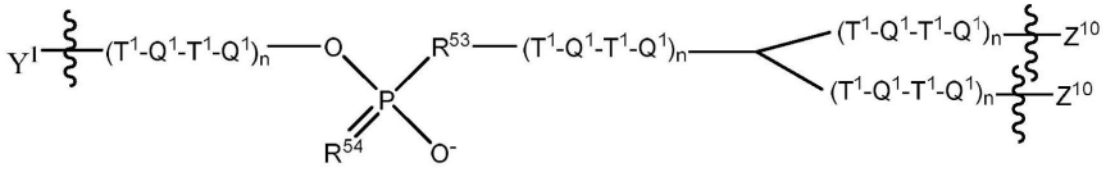
[2676] za为1、2或3;并且

[2677] L^1是式L11、L12、L13、L43、L44、L45、L46、L47、L48、L49、L50、L51、L52、L53或L54的化合物,其中与Y^1和Z^{10}的连接位点表示为:

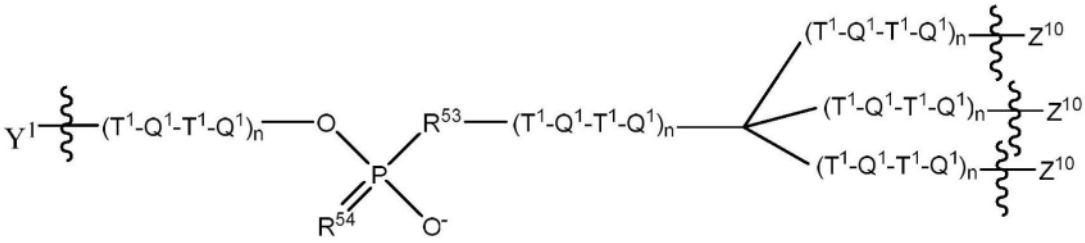
[2678]



L11

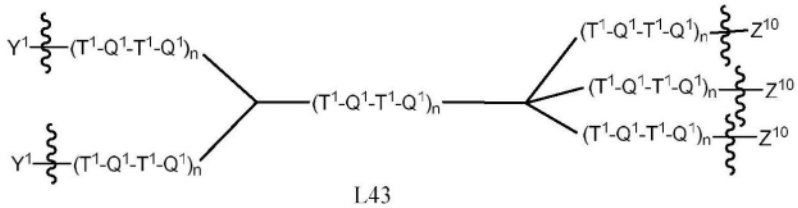


L12

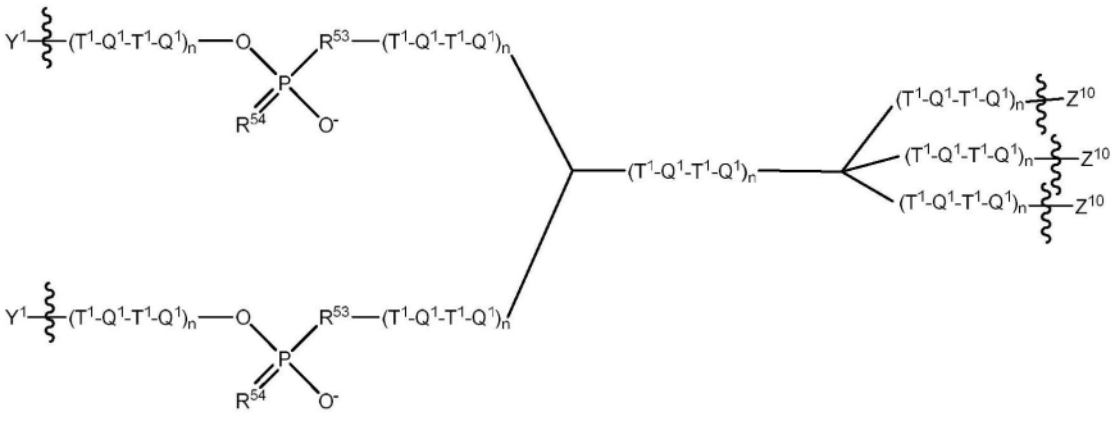


L13

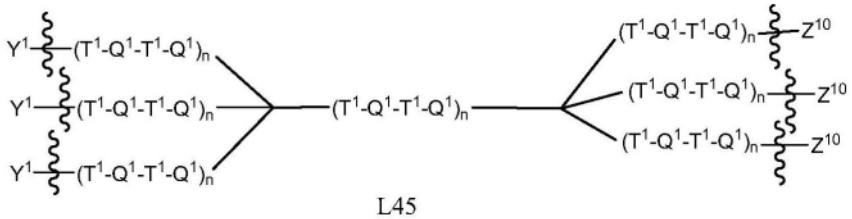
[2679]



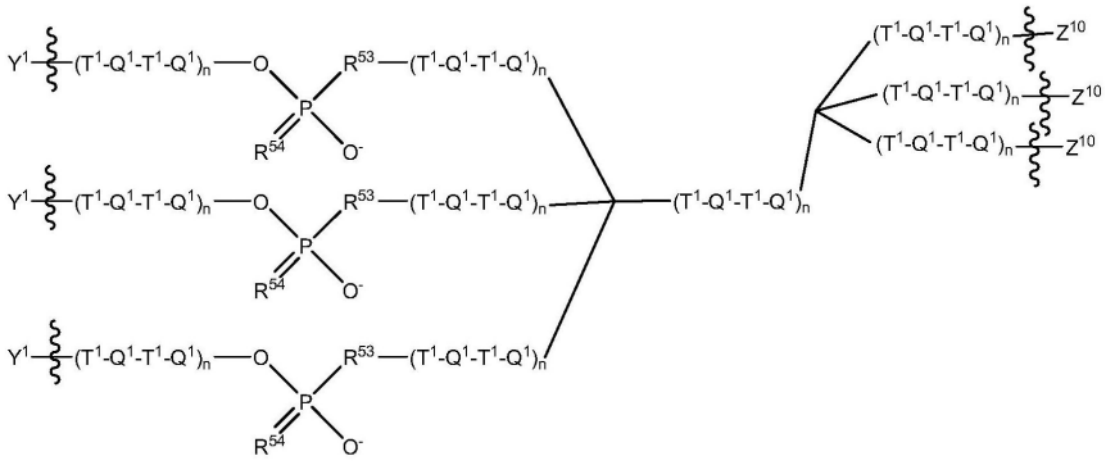
L43



L44

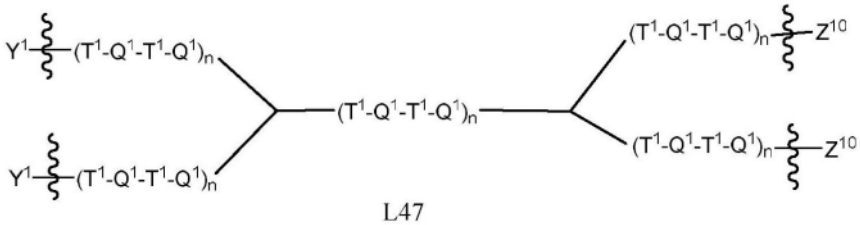


L45

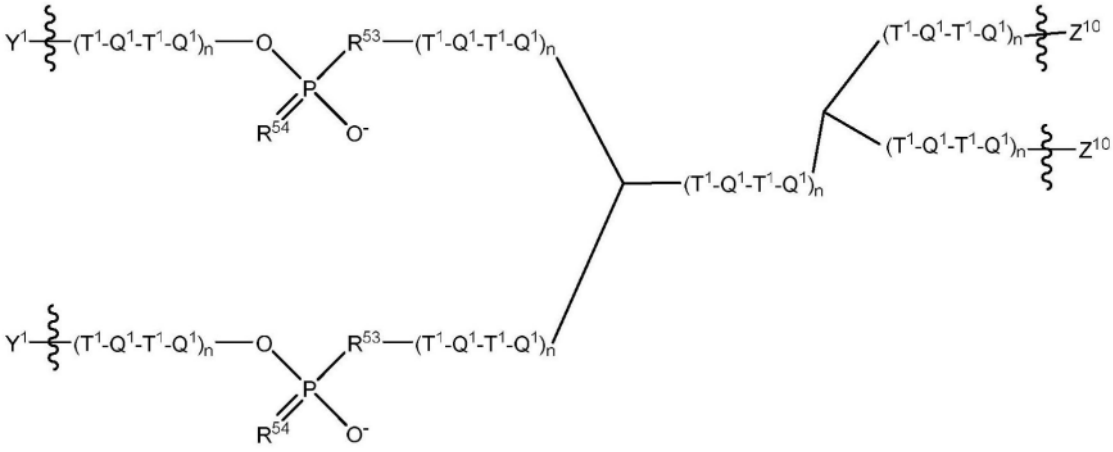


L46

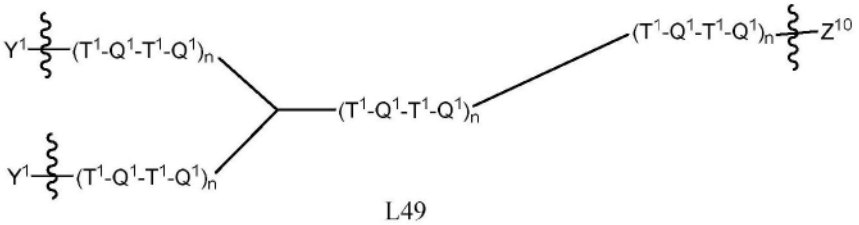
[2680]



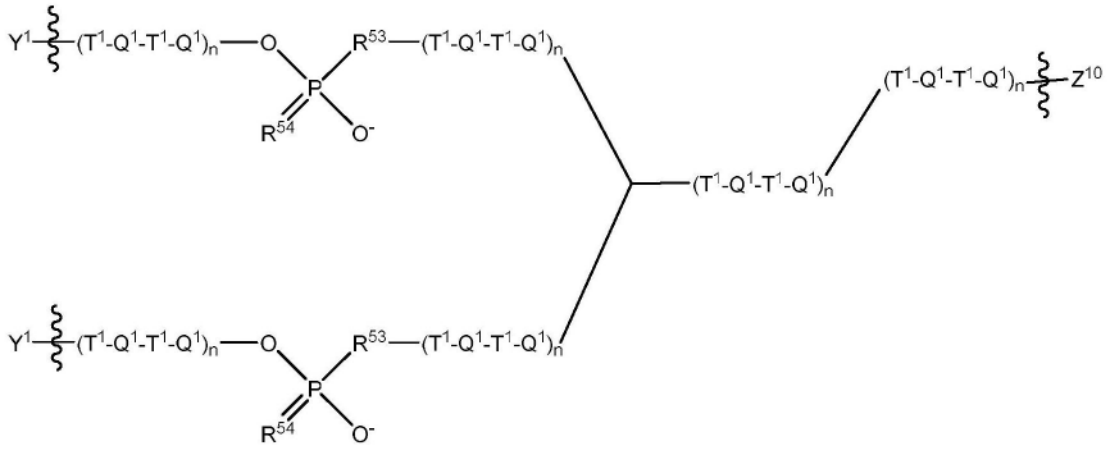
L47



L48

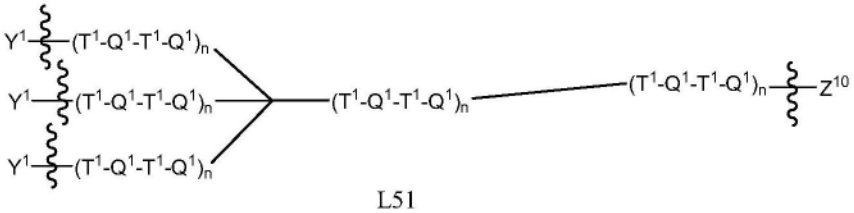


L49

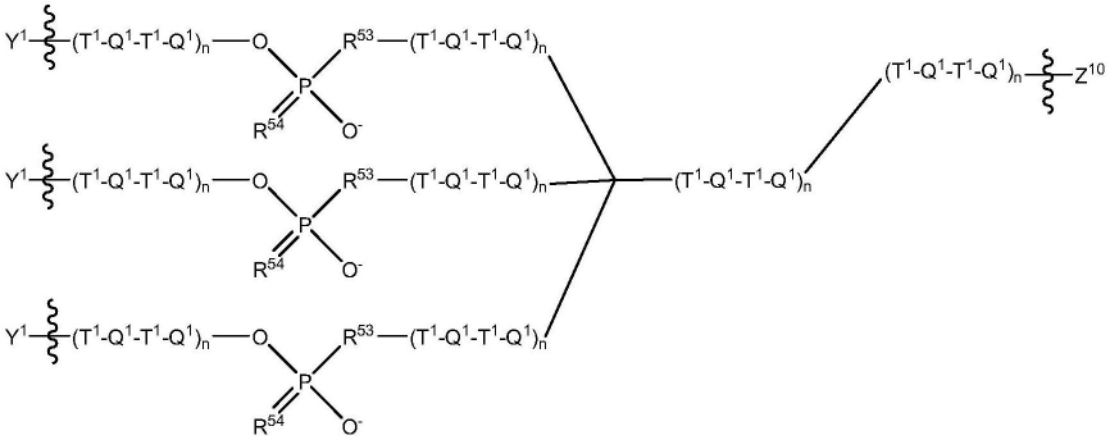


L50

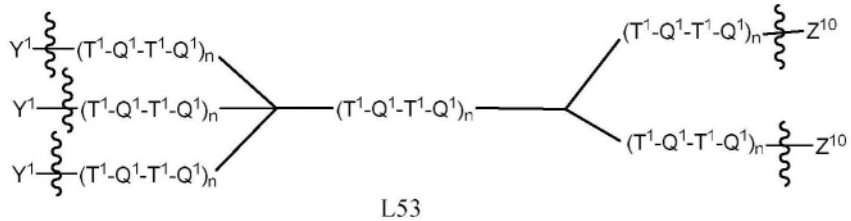
[2681]



L51

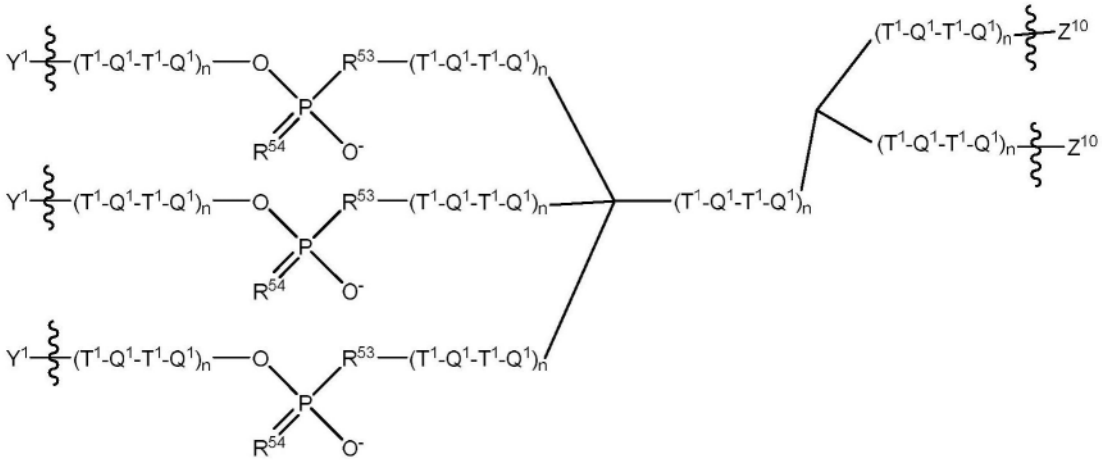


L52



L53

[2682]

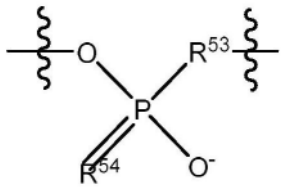


L54

[2683] 其中每个T^1独立地不存在或者是亚烷基、亚烯基或亚炔基,其中所述亚烷基、亚烯基或亚炔基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[2684] 每个Q^1独立地不存在或者是-C(O)-、-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-、-O-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-O-、-CH_2-、-NR^{49}C(O)NR^{49}-、二价杂芳基基团或者选自-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-与任何其他杂原子基团隔开,或下式的结构:

[2685]



[2686] 其中R^{53}是-O或-NH-;并且R^{54}是-O或-S;

[2687] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})$_2$、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

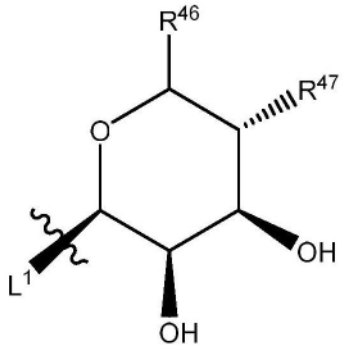
[2688] R^{53}是-O或-NH;

[2689] R^{54}是-O或-S;

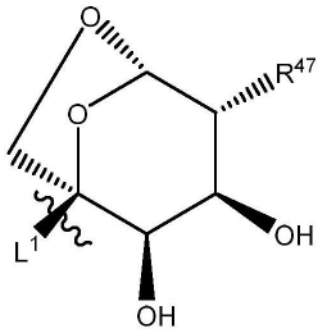
[2690] 每个n独立地是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1;并且

[2691] 每个Z^{10}独立地是式Z12、Z13、Z14、Z15、Z16、Z17、Z18、Z19、Z20或Z21的化合物或者

其几何或位置异构体,其中与L^1的连接位点表示为:

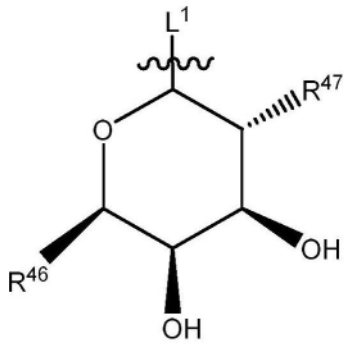
[2692] 

Z12



Z13

;

[2693] 

Z16

[2694] 其中每个R^{46}独立地是-CN、$-CH_2-CN$、-C≡CH、$-CH_2-N_3$、$-CH_2-NH_2$、$-CH_2-N(R^{52})-S(O)_2-R^{51}$、$-CH_2-CO_2H$、$-CO_2H$、$-CH_2-OH$、$-CH_2-SH$、$-CH=CH-R^{51}$、$-CH_2-R^{51}$、$-CH_2-S-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-S(O)-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-N(R^{52})-R^{51}$、$-C(O)-NH_2$、$-C(O)-O-R^{51}$、$-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被$R^{51}$取代;

[2695] 每个R^{47}独立地是-OH、$-N_3$、$-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$、$-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$、$-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被$R^{48}$取代;

[2696] 每个R^{48}独立地是-H、$-(C_1-C_5)$烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的$-(C_3-C_6)$环烷基、$-(C_1-C_5)$烯基、$-(C_1-C_5)$炔基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$烯基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中所述烷基或环烷基的$-CH_2-$基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和$-N(R^{52})-$的杂原子基团替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{52})_2$、$-OR^{52}$和$-S(R^{52})$的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[2697] 每个R^{51}独立地是-H、$-(C_3-C_{20})$环烷基、$-(C_1-C_{60})$烯基、$-(C_1-C_{60})$炔基或$-(C_1-C_{60})$烷基,其中所述环烷基的一至六个$-CH_2-$或所述烷基的一至二十个$-CH_2-$可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和$-N(R^{49})-$的杂原子替代,其中所述杂原子被至少两个碳原子隔开,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和$-S(R^{49})$的杂原子基团替代,其中所

述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;并且

[2698] 每个R^{52}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基、-(C_1-C_{20})烯基、-(C_1-C_{20})炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-N(R^{49})-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-N(R^{49})$_2$、-OR^{49}和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。

[2699] 2.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少15个碱基。

[2700] 3.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者所述Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[2701] 4.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个磷酸二酯核苷酸间键联。

[2702] 5.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联。

[2703] 6.如前述实施方案中任一项所述的化合物,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是手性控制的硫代磷酸酯。

[2704] 7.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[2705] 8.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Rp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[2706] 9.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1,其中所述手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其在所述组合物中具有至少70%的非对映体纯度。

[2707] 10.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1,其中所述手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%的非对映体纯度。

[2708] 11.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个糖修饰。

[2709] 12.如前述实施方案中任一项所述的化合物,Y^1包含至少1个碱基修饰。

[2710] 13.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1还包含主链键联样式。

[2711] 14.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1还包含主链手性中心样式。

[2712] 15.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1还包含化学修饰样式。

[2713] 16.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1还包括主链键联样式、主链手性中心样式和化学修饰样式。

[2714] 17.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述主链键联样式、所述主链手性中心样式和所述化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[2715] 18.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述主链键联样式、所述主链手性中心样式和所述化学修饰样式是表1A中列出的寡核苷酸的寡核苷酸的

主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式，所述Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列，或者所述Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[2716] 19.如前述实施方案中任一项所述的化合物，其中所述寡核苷酸能够介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[2717] 20.如前述实施方案中任一项所述的化合物，其中所述寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[2718] 21.如前述实施方案中任一项所述的化合物，其中：

[2719] 每个T^1独立地不存在或者是亚烷基，其中所述亚烷基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代，其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开；

[2720] 每个Q^1独立地不存在或是-C(O)、-C(O)-NR^{49}、-NR^{49}-C(O)或者选自-O-和-NR^{49}的杂原子基团，其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-和-NR^{49}与任何其他杂原子基团隔开；

[2721] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基，其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代；

[2722] 每个n独立地是0、1、2、3或4；其中，如果n大于0，则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1；

[2723] 每个R^{46}是-CH_2-OH；

[2724] 每个R^{47}是-N(R^{48})-C(O)-R^{48}；并且

[2725] 每个R^{48}独立地是-H或-(C_1-C_5)烷基。

[2726] 22.一种具有式02的化合物：

[2727] Y^1-L^2-(Z^{11})$_{za}$

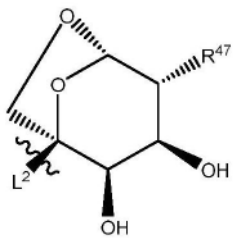
[2728] 02

[2729] 或其药学上可接受的盐，其中Y^1是靶向PNPLA3的寡核苷酸；

[2730] za为1、2或3；

[2731] L^2是连接基团；并且

[2732] Z^{11}是式(B)的化合物，其中与L^2的连接位点表示为：

[2733] 

(B) ；

[2734] 每个R^{47}独立地是-OH、-N_3、-N(R^{48})$_2$、-N(R^{48})-C(O)-R^{48}、-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})$_2$、-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}、-N(R^{48})-S(O)$_2$-R^{48}、四唑或三唑，其中所述四唑和三唑任选地被R^{48}取代；

[2735] 每个R^{48}独立地是-H、-(C_1-C_5)烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的-(C_3-C_6)环烷基、-(C_1-C_5)烯基、-(C_1-C_5)炔基、卤基取代的-(C_1-C_5)烯基、卤基取代的-(C_1-C_5)炔基

或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基或环烷基的-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-N(R^{52})-的杂原子基团替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-N(R^{52})$_2$、-OR^{52}和-S(R^{52})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

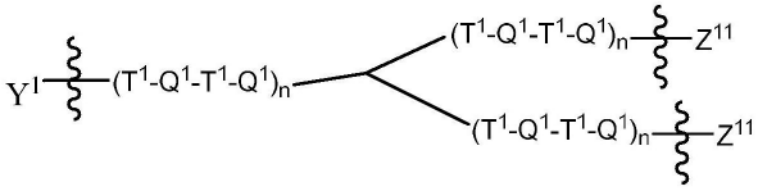
[2736] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})2、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[2737] 每个R^{52}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基、-(C_1-C_{20})烯基、-(C_1-C_{20})炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-N(R^{49})-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-N(R^{49})$_2$、-OR^{49}和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。

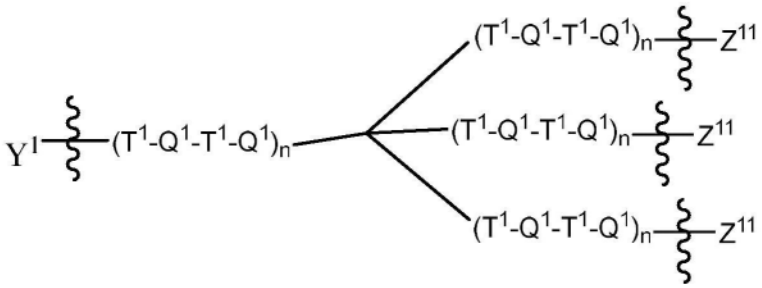
[2738] 23.如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中L^2是式L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13或L14的化合物,其中与Y^1和Z^{11}的连接位点表示为:

L1

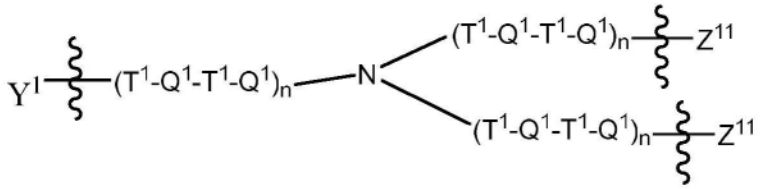
[2739]



L2

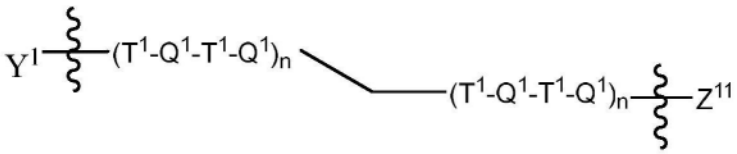


L3

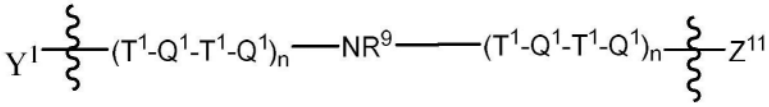


L4

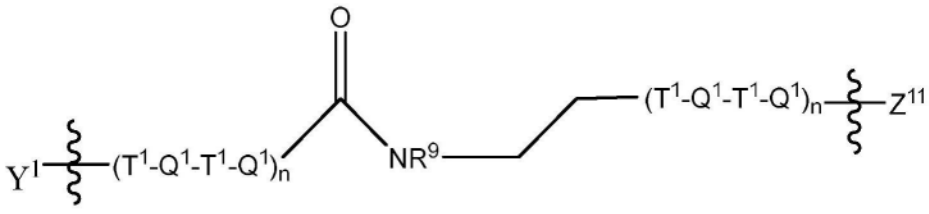
[2740]



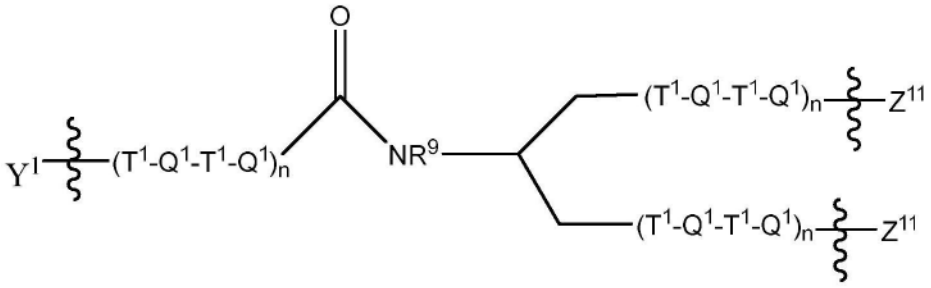
L5



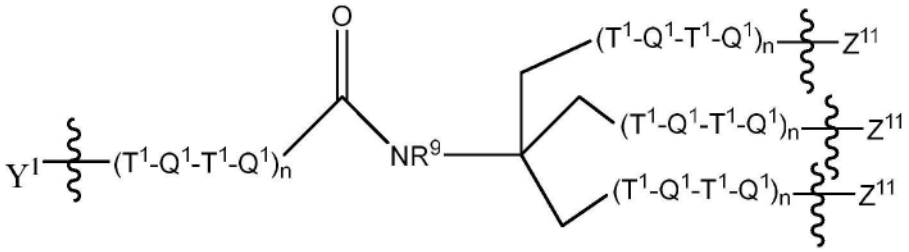
L6



L7

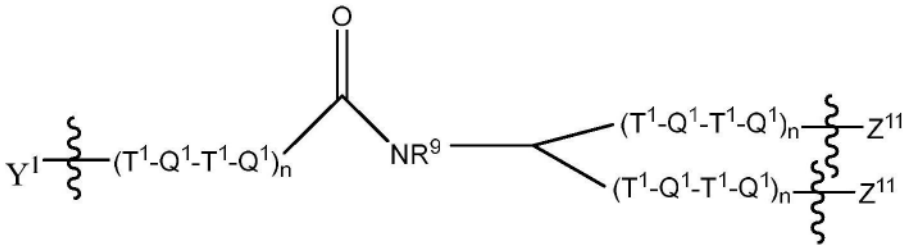


L8

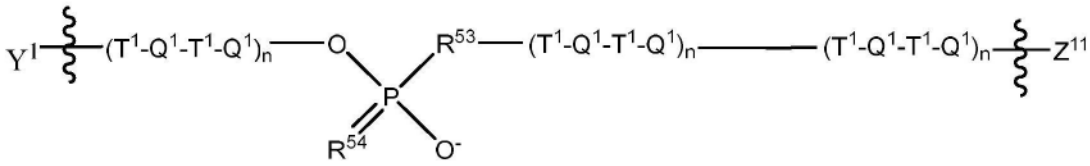


L9

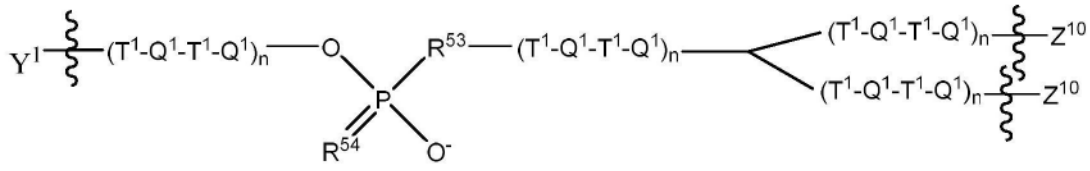
[2741]



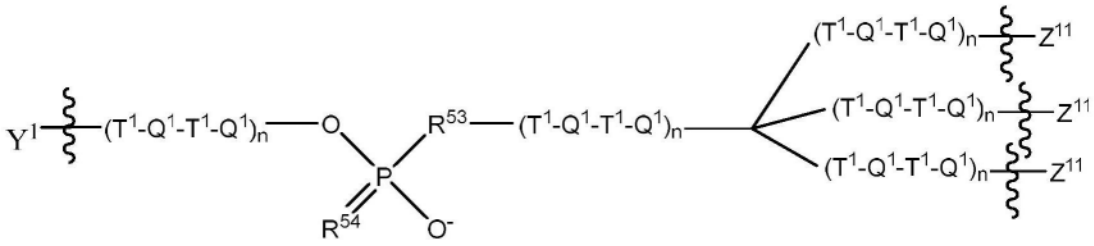
L10



L11

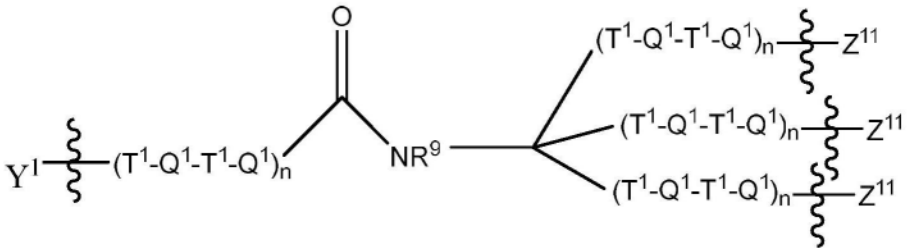


L12



L13

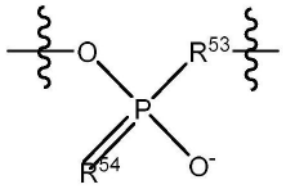
[2742]



L14

[2743] 其中每个T^1独立地不存在或者是亚烷基、亚烯基或亚炔基,其中所述亚烷基、亚烯基或亚炔基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[2744] 每个Q^1独立地不存在或者是-C(O)-、-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-、-O-C(O)-NR^{49}-、-NR^{49}-C(O)-O-、-CH_2-、-NR^{49}C(O)NR^{49}-、二价杂芳基基团或者选自-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团-O-、-S-、-S-S-、-S(O)-、-S$(O)_2$-和-NR^{49}-与任何其他杂原子基团隔开,或下式的结构:

[2745] 

[2746] 其中R^{53}是-O或-NH;并且R^{54}是-O或-S;

[2747] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})2、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[2748] R^{53}是-O或-NH;

[2749] R^{54}是-O或-S;并且

[2750] 每个n独立地是0、1、2、3、4、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或40;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1。

[2751] 24.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少15个碱基。

[2752] 25.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述Y^1的碱基序列包含或是表

1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者所述Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[2753] 26.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个磷酸二酯核苷酸间键联。

[2754] 27.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联。

[2755] 28.如前述实施方案中任一项所述的化合物,Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是手性控制的硫代磷酸酯。

[2756] 29.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[2757] 30.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个手性控制的修饰的核苷酸间键联,其是呈Rp构型的手性控制的硫代磷酸酯。

[2758] 31.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1,其中所述手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其在所述组合物中具有至少70%的非对映体纯度。

[2759] 32.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1,其中所述手性控制的修饰的核苷酸间键联或手性控制的硫代磷酸酯包含磷手性中心,其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%的非对映体纯度。

[2760] 33.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个糖修饰。

[2761] 34.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中Y^1包含至少1个碱基修饰。

[2762] 35.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的主链键联样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的主链键联样式。

[2763] 36.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的主链手性中心样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的主链手性中心样式。

[2764] 37.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的化学修饰样式。

[2765] 38.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述主链键联样式、所述主链手性中心样式和/或所述化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[2766] 39.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述主链键联样式、所述主链手性中心样式和所述化学修饰样式是表1A中列出的任何寡核苷酸的寡核苷酸的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式。

[2767] 40.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸的所述主链键联样式、所述主链手性中心样式和所述化学修饰样式是表1A中列出的寡核苷酸的Y^1的主链键联样式、主链手性中心样式和/或化学修饰样式,并且所述Y^1的碱基序列包含或是表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的碱基序列,或者所述Y^1的碱基序列包含表1A中列出的任何PNPLA3寡核苷酸的序列的15个连续碱基。

[2768] 41.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸能够介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[2769] 42.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制介导PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性的降低。

[2770] 43.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中:

[2771] 每个R^{47}是-N(R^{48})-C(O)-R^{48};并且

[2772] 每个R^{48}独立地是-H或-(C_1-C_5)烷基。

[2773] 44.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中:

[2774] 每个T^1独立地不存在或是亚烷基,其中

[2775] 所述亚烷基的一个或多个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-和-N(R^{49})-的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[2776] 每个Q^1独立地不存在或是C(O)、C(O)-NR^{49}、NR^{49}-C(O)或者选自O和NR^{49}的杂原子基团,其中至少两个碳原子将杂原子基团O和NR^{49}与任何其他杂原子基团隔开;

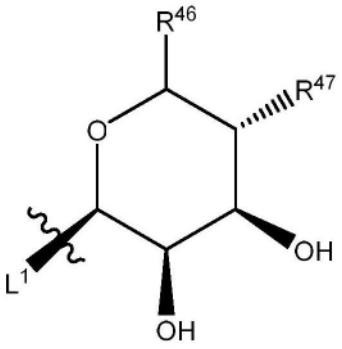
[2777] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;

[2778] 每个n独立地是0、1、2、3或4;其中,如果n大于0,则独立地选择每个(T^1-Q^1-T^1-Q^1)的每个T^1和每个Q^1。

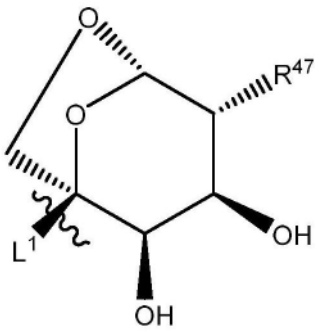
[2779] 45.一种包含化合物的组合物,其包含:(a)能够靶向PNPLA3的寡核苷酸;(b)连接基团;和(c)独立地选自Z^{10}和Z^{11}的1、2或3个部分;其中所述连接基团连接所述寡核苷酸和所述1、2或3个部分,并且其中:

[2780] 每个Z^{10}独立地是式Z12、Z13、Z14、Z15、Z16、Z17、Z18、Z19、Z20或Z21的化合物或者其几何或位置异构体,其中与L^1的连接位点表示为:

[2781]

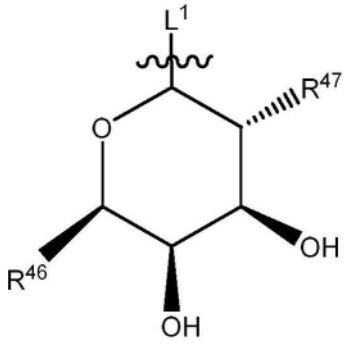


Z12



Z13

;

[2782] 

Z16

[2783] 其中每个R^{46}独立地是-CN、$-CH_2-CN$、-C≡CH、$-CH_2-N_3$、$-CH_2-NH_2$、$-CH_2-N(R^{52})-S(O)_2-R^{51}$、$-CH_2-CO_2H$、$-CO_2H$、$-CH_2-OH$、$-CH_2-SH$、$-CH=CH-R^{51}$、$-CH_2-R^{51}$、$-CH_2-S-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-N(R^{52})-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-N(R^{52})-R^{51}$、$-CH_2-O-C(O)-O-R^{51}$、$-CH_2-S(O)-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-R^{51}$、$-CH_2-S(O)_2-N(R^{52})-R^{51}$、-C(O)$-NH_2$、-C(O)-O-$R^{51}$、-C(O)-N($R^{52}$)-$R^{51}$或者芳基或杂芳基,其中所述芳基或杂芳基任选地被$R^{51}$取代;

[2784] 每个R^{47}独立地是-OH、$-N_3$、$-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$、$-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$、$-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$、$-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被$R^{48}$取代;

[2785] 每个R^{48}独立地是-H、$-(C_1-C_5)$烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的$-(C_3-C_6)$环烷基、$-(C_1-C_5)$烯基、$-(C_1-C_5)$炔基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$烯基、卤基取代的$-(C_1-C_5)$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中所述烷基或环烷基的$-CH_2-$基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-N(R^{52})-的杂原子基团替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{52})_2$、$-OR^{52}$和-S(R^{52})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

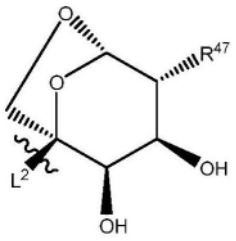
[2786] 每个R^{51}独立地是-H、$-(C_3-C_{20})$环烷基、$-(C_1-C_{60})$烯基、$-(C_1-C_{60})$炔基或$-(C_1-C_{60})$烷基,其中所述环烷基的一至六个$-CH_2-$或所述烷基的一至二十个$-CH_2-$可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-和-N(R^{49})-的杂原子替代,其中所述杂原子被至少两个碳原子隔开,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;并且

[2787] 每个R^{52}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基、$-(C_1-C_{20})$烯基、$-(C_1-C_{20})$炔基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-N(R^{49})-的杂原子替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以各自独立地被选自$-N(R^{49})_2$、$-OR^{49}$和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代;

[2788] 每个R^{49}独立地是-H、$-(C_1-C_{20})$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个$-CH_2-$基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的$-CH_3$可以被选自$-N(R^{49a})_2$、$-OR^{49a}$和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、$-(C_1-C_6)$烷基或$-(C_3-C_6)$环烷基;

[2789] 每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[2790] 并且Z^{11}是式(B)的化合物,其中与L^2的连接位点表示为:

[2791] 

(B) ;

[2792] 每个R^{47}独立地是-OH、-N_3、-$N(R^{48})_2$、-$N(R^{48})$-C(O)-R^{48}、-$N(R^{48})$-C(O)-$N(R^{48})_2$、-$N(R^{48})$-C(O)-OR^{48}、-$N(R^{48})$-S(O)$_2$-R^{48}、四唑或三唑,其中所述四唑和三唑任选地被R^{48}取代;

[2793] 每个R^{48}独立地是-H、-(C_1-C_5)烷基、卤基取代的(C_1-C_5)烷基、卤基取代的-(C_3-C_6)环烷基、-(C_1-C_5)烯基、-(C_1-C_5)炔基、卤基取代的-(C_1-C_5)烯基、卤基取代的-(C_1-C_5)炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中所述烷基或环烷基的-CH_2-基团可以各自独立地被选自-O-、-S-和-N(R^{52})-的杂原子基团替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-$N(R^{52})_2$、-OR^{52}和-S(R^{52})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;

[2794] 每个R^{49}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以被-O-、-S-或-N(R^{49a})-替代,并且所述烷基的-CH_3可以被选自-N(R^{49a})2、-OR^{49a}和-S(R^{49a})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基和环烷基可以被卤基原子取代;并且其中每个R^{49a}独立地是-H、-(C_1-C_6)烷基或-(C_3-C_6)环烷基;

[2795] 每个R^{52}独立地是-H、-(C_1-C_{20})烷基、-(C_1-C_{20})烯基、-(C_1-C_{20})炔基或-(C_3-C_6)环烷基,其中被至少两个碳原子隔开的所述烷基或环烷基的一至六个-CH_2-基团可以各自独立地被独立地选自-O-、-S-或-N(R^{49})-的杂原子替代,并且所述烷基的-CH_3可以各自独立地被选自-$N(R^{49})_2$、-OR^{49}和-S(R^{49})的杂原子基团替代,其中所述杂原子基团被至少2个碳原子隔开;并且其中所述烷基、烯基、炔基和环烷基可以被卤基原子取代。

[2796] 47.一种手性控制的PNPLA3寡核苷酸组合物,其包含特征在于以下的特定寡核苷酸类型的寡核苷酸:

[2797] a)共同的碱基序列和长度,其中所述碱基序列与PNPLA3靶基因互补;

[2798] b)共同的主链键联样式;

[2799] c)共同的主链手性中心样式,其中所述共同的主链手性中心样式包括至少一个包含手性控制的手性中心的核苷酸间键联;

[2800] 所述组合物是手性控制的,因为相对于具有相同的共同碱基序列和长度的寡核苷酸的基本上外消旋的制品而言,所述组合物富含所述特定寡核苷酸类型的寡核苷酸;并且

[2801] 其中所述寡核苷酸组合物能够降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

[2802] 48.如前述实施方案中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸能够通过由RNA酶H、空间位阻和/或RNA干扰介导的机制降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

[2803] 49.一种组合物,其包含如前述实施方案中任一项所述的化合物。

[2804] 50.一种包含为单链RNAi剂的PNPLA3寡核苷酸的组合物,其中所述单链RNAi剂与PNPLA3靶RNA序列互补或基本上互补,

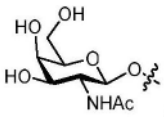
[2805] 具有约15至约49个核苷酸的长度,并且

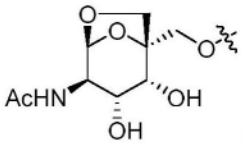
[2806] 能够指导靶标特异性RNA干扰,

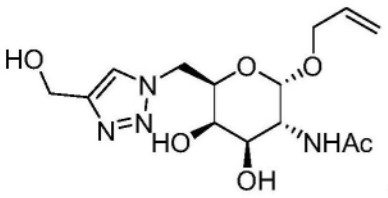
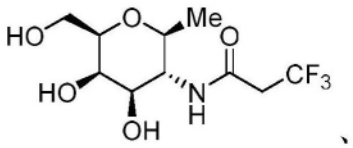
[2807] 其中所述单链RNAi剂包含至少一个非天然碱基、糖和/或核苷酸间键联,并且

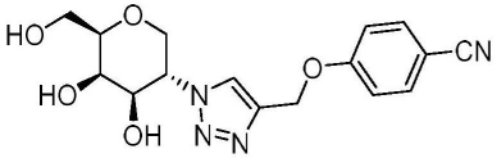
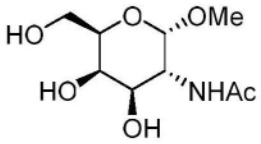
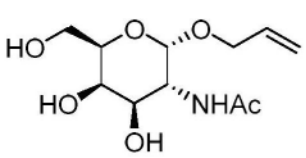
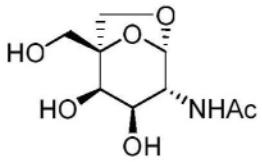
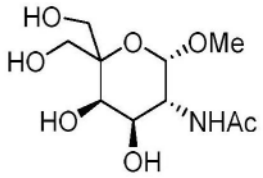
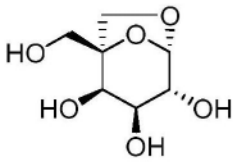
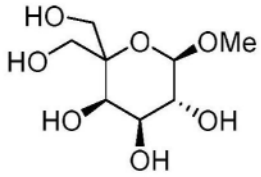
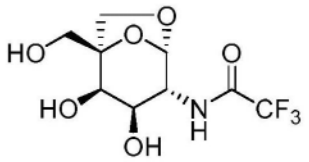
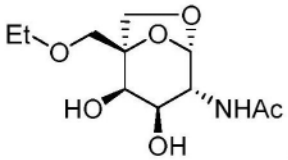
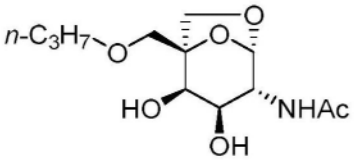
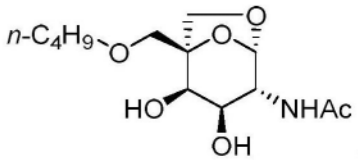
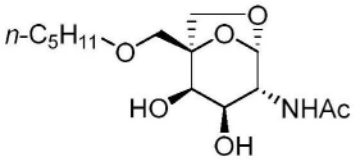
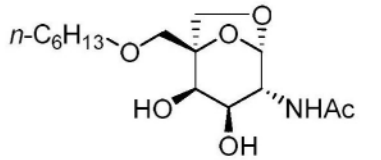
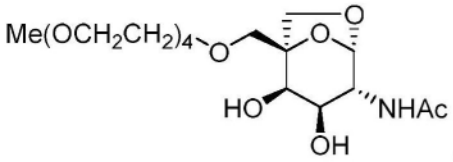
[2808] 其中所述组合物能够降低PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、水平和/或活性。

[2809] 51.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个寡核苷酸还包含桥接的双环缩酮。

[2810] 52.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中R^{CD}是  。

[2811] 53.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中R^{CD}是  。

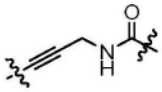
[2812] 54.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中R^{CD}具有这样的结构使得R^{CD}-H为  、  、

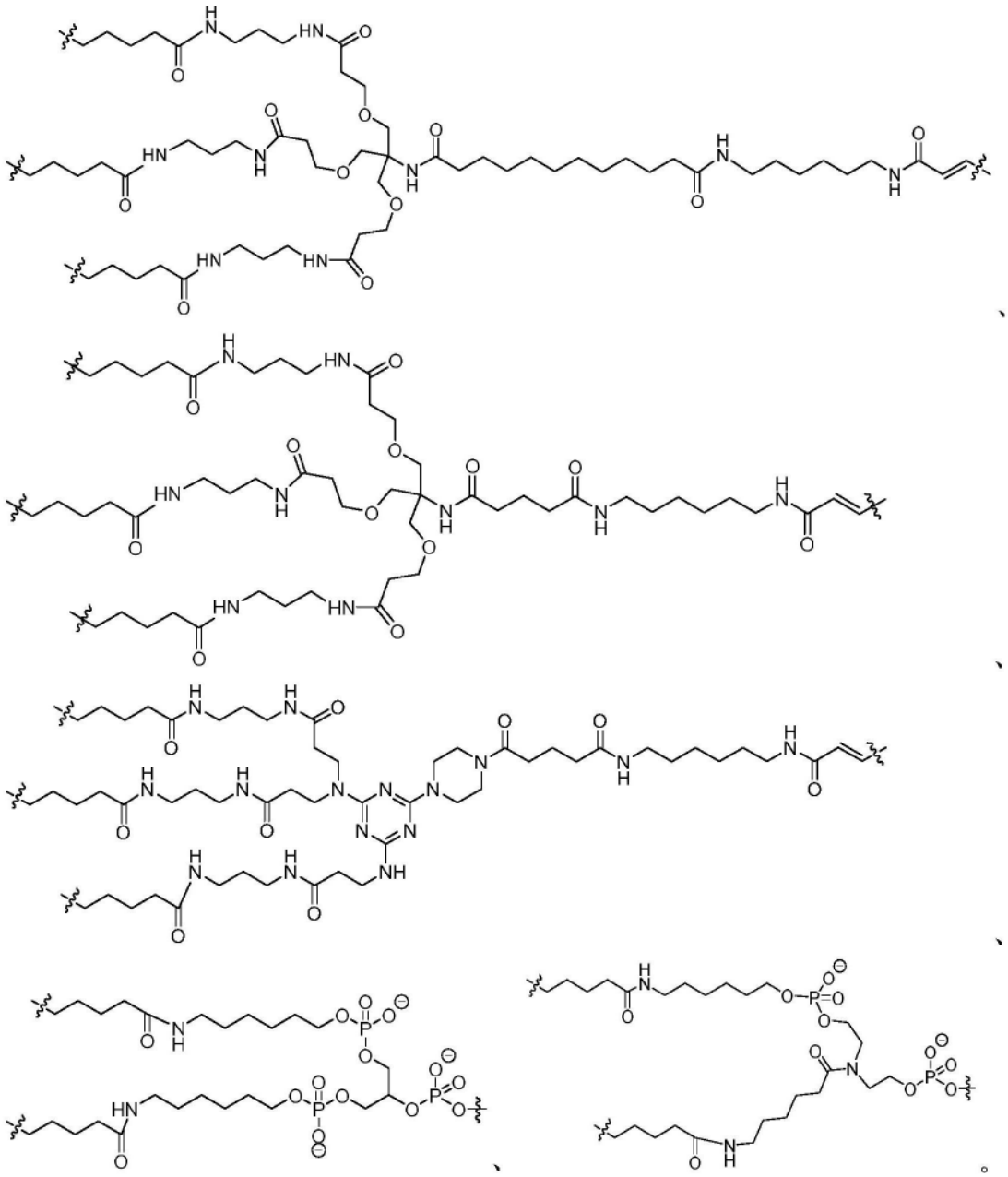

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

或

。

[2813] 55.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中R^{CD}通过接头与所述一个或多个寡核苷酸连接。

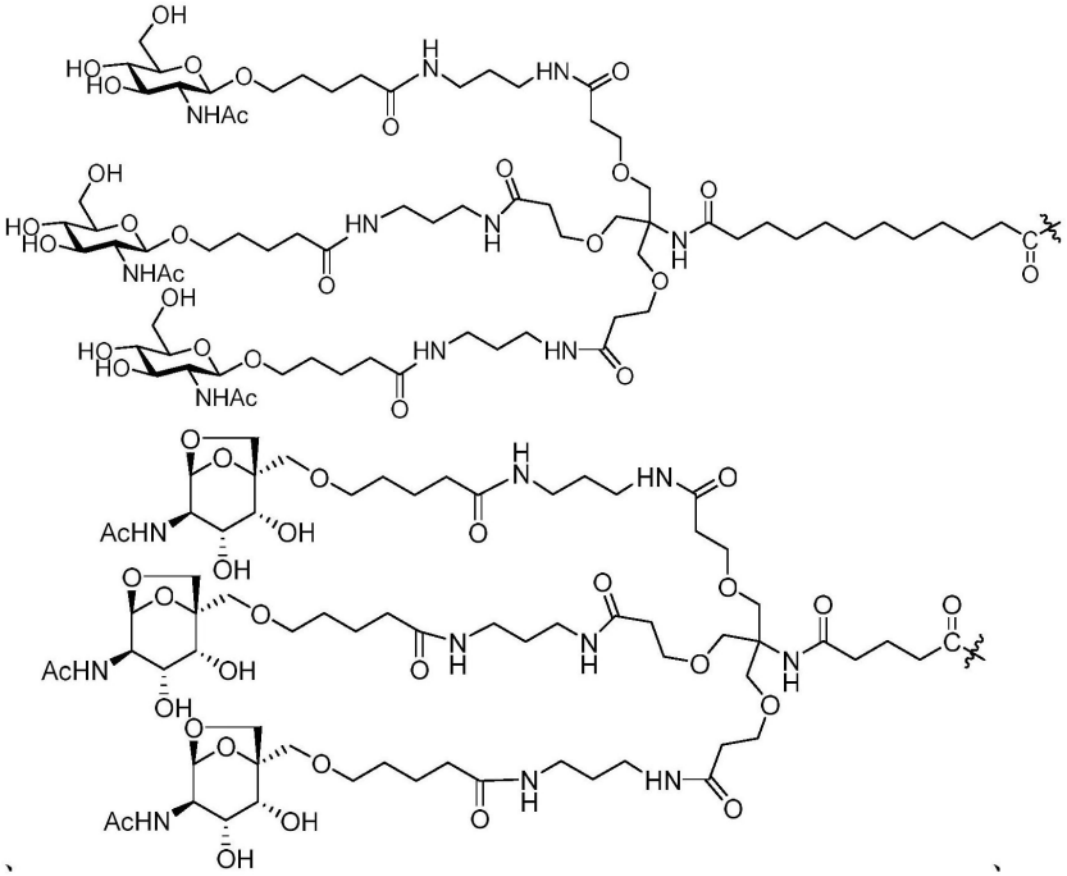
[2814] 56.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述接头是L^{M}。

[2815] 57.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述接头具有以下结构:

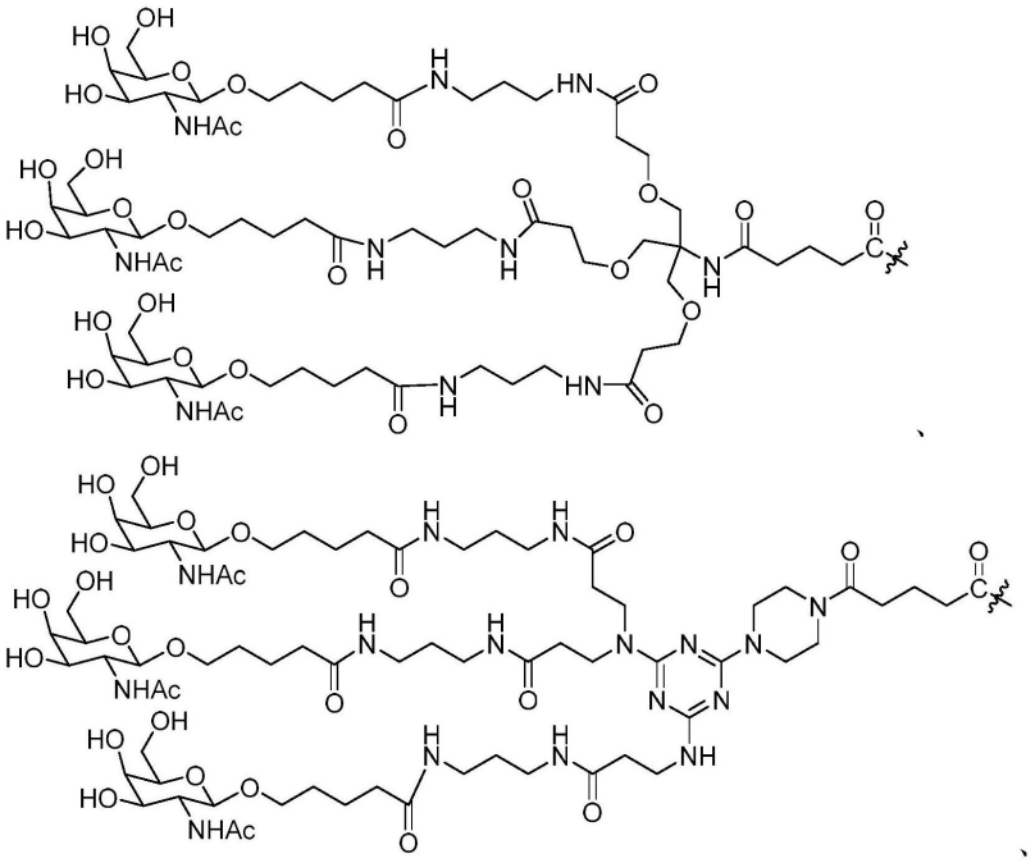
、

、



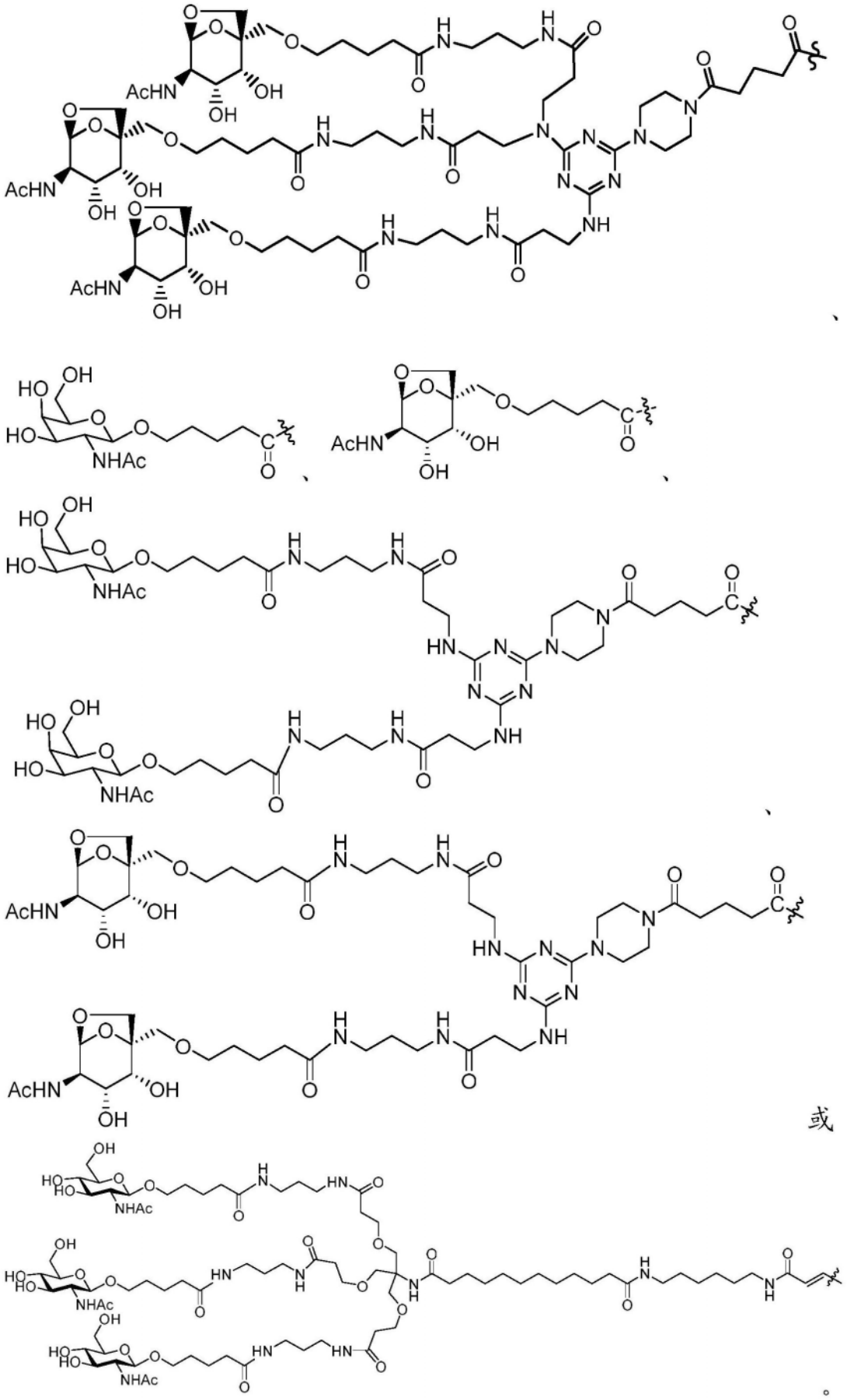
[2816] 58.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中R^{CD}选自:



[2817]



[2818]



或

[2819] 60.一种药物组合物,其包含与至少一种药学上可接受的赋形剂混合的治疗有效

量的如前述实施方案中任一项所述的组合物。

[2820] 61.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含选自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:抗炎剂、抗糖尿病剂和胆固醇/脂质调节剂。

[2821] 62.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述另外的药剂选自由以下组成的组:乙酰-CoA羧化酶-(ACC)抑制剂,二酰基甘油O-酰基转移酶1(DGAT-1)抑制剂,二酰基甘油O-酰基转移酶2(DGAT-2)抑制剂,单酰基甘油O-酰基转移酶抑制剂,磷酸二酯酶(PDE)-10抑制剂,AMPK活化剂,磺酰脲,美各里替尼,α-淀粉酶抑制剂,α-葡萄糖苷水解酶抑制剂,α-葡萄糖苷酶抑制剂,PPARγ激动剂,PPARα/γ激动剂,双胍,胰高血糖素样肽1(GLP-1)调节剂,利拉鲁肽,阿比鲁肽,艾塞那肽,阿比鲁肽,利西拉肽,度拉糖肽,索马鲁肽蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(PTP-1B)抑制剂,SIRT-1活化剂,二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂,胰岛素促分泌素,脂肪酸氧化抑制剂,A2拮抗剂,c-jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂,葡萄糖激酶活化剂(GKa),胰岛素,胰岛素模拟物,糖原磷酸化酶抑制剂,VPAC2受体激动剂,SGLT2抑制剂,胰高血糖素受体调节剂,GPR119调节剂,FGF21衍生物或类似物,TGR5受体调节剂,GPBAR1受体调节剂,GPR40激动剂,GPR120调节剂,高亲和力烟酸受体(HM74A)活化剂,SGLT1抑制剂,肉碱棕榈酰转移酶酶的抑制剂或调节剂,果糖1,6-二磷酸酶的抑制剂,醛糖还原酶的抑制剂,盐皮质激素受体的抑制剂,TORC2的抑制剂,CCR2和/或CCR5的抑制剂,PKC同种型(例如PKCα、PKCβ、PKCγ)的抑制剂,脂肪酸合成酶的抑制剂,丝氨酸棕榈酰转移酶的抑制剂,GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、视黄醇结合蛋白4、糖皮质激素受体、生长抑素受体的调节剂,PDHK2或PDHK4的抑制剂或调节剂,MAP4K4的抑制剂,IL1家族(包括IL1β)的调节剂,HMG--CoA还原酶抑制剂,角鲨烯合成酶抑制剂,贝特类,胆汁酸螯合剂,ACAT抑制剂,MTP抑制剂,脂加氧酶抑制剂,胆固醇吸收抑制剂,PCSK9调节剂,胆固醇酯转移蛋白抑制剂和RXRα调节剂。

[2822] 63.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含选自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:半胱胺或其药学上可接受的盐、胱胺或其药学上可接受的盐、抗氧化剂化合物、卵磷脂、维生素B复合物、胆汁盐制剂、大麻素-1(CB1)受体的拮抗剂、大麻素-1(CB1)受体的反向激动剂、过氧化物酶体增殖物活化受体活性调节剂、苯并硫氮杂䓬或苯并硫杂䓬化合物、抑制蛋白酪氨酸磷酸酶PTPRU的RNA反义构建体、杂原子连接的取代的哌啶及其衍生物、能够抑制硬脂酰辅酶αδ-9去饱和酶的氮杂环戊烷衍生物、具有脂联素的促分泌素或诱导剂活性的酰基酰胺化合物、季铵化合物、乙酸格拉替雷、五聚体蛋白、HMG-CoA还原酶抑制剂、正乙酰半胱氨酸、异黄酮化合物、大环内酯类抗生素、半乳糖凝集素抑制剂、抗体或其任意组合。

[2823] 64.一种用于在人类中降低非酒精性脂肪肝病或非酒精性脂肪性肝炎分级评分系统的严重性至少一个点、降低非酒精性脂肪性肝炎活性的血清标志物水平、降低非酒精性脂肪性肝炎疾病活性或降低非酒精性脂肪性肝炎的医学后果的方法,所述方法包括向需要此类降低的人施用治疗有效量的如前述实施方案中任一项所述的组合物的步骤。

[2824] 65.一种用于治疗人类中的脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述实施方案中任一项所述的组合物的步骤。

[2825] 66.一种用于治疗人类中的高脂血症、I型糖尿病、II型糖尿病、特发性I型糖尿病(Ib型)、成人潜伏性自身免疫性糖尿病(LADA)、早发2型糖尿病(EOD)、青年发病型非典型糖尿病(YOAD)、青年成熟期发病型糖尿病(MODY)、营养不良相关的糖尿病、妊娠糖尿病、冠心病、缺血性中风、血管成形术后的再狭窄、周围血管疾病、间歇性跛行、心肌梗塞、血脂异常、餐后脂血症、葡萄糖耐量(IGT)受损的病状、空腹血糖受损的病状、代谢性酸中毒、酮病、关节炎、肥胖、骨质疏松、高血压、充血性心力衰竭、左心室肥大、外周动脉疾病、糖尿病视网膜病变、黄斑变性、白内障、糖尿病肾病、肾小球硬化、慢性肾功能衰竭、糖尿病神经病、代谢综合征、X综合征、经前期综合征、心绞痛、血栓形成、动脉粥样硬化、短暂性脑缺血发作、中风、血管再狭窄、高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗、葡萄糖代谢受损、勃起功能障碍、皮肤和结缔组织病症、足溃疡和溃疡性结肠炎、内皮功能障碍和血管顺应性受损、高载脂蛋白B脂蛋白血症、阿尔茨海默病、精神分裂症、认知受损、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、和肠易激综合征、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、或非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述实施方案中任一项所述的组合物的步骤。

[2826] 67.一种用于治疗人类中的脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎合并肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化、或非酒精性脂肪性肝炎合并肝硬化和肝细胞癌的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的两种单独的药物组合物,其包含

[2827] a.如前述实施方案中任一项所述的第一组合物;和

[2828] b.第二组合物,其包含至少一种另外的药剂和至少一种药学上可接受的赋形剂,所述另外的药剂选自由以下组成的组:抗炎剂、抗糖尿病剂和胆固醇/脂质调节剂。

[2829] 68.如前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述第一组合物和所述第二组合物同时施用。

[2830] 69.如前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述第一组合物和所述第二组合物顺序施用和以任何顺序施用。

[2831] 70.一种用于降低人类中的门脉高压、肝蛋白合成能力、高胆红素血症或脑病的方法,所述方法包括向需要此类治疗的人施用治疗有效量的如前述实施方案中任一项所述的组合物的步骤。

[2832] 71.一种降低细胞中的PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、活性和/或水平的方法,所述方法包括使所述细胞与前述实施方案中的任一项所述的化合物或组合物接触的步骤。

[2833] 72.一种降低患者中的PNPLA3靶基因或其基因产物的表达、活性和/或水平的方法,所述方法包括使所述细胞与前述实施方案中的任一项所述的化合物或组合物接触的步骤。

[0001] 序列表

[0002] <110> 波涛生命科学有限公司(WAVE LIFE SCIENCES LTD.)

[0003] <120> 寡核苷酸组合物及其使用方法

[0004] <130> 2010581-0540

[0005] <140> PCT/US2018/035721

[0006] <141> 2018-06-01

[0007] <150> 62/670,698

[0008] <151> 2018-05-11

[0009] <150> 62/514,769

[0010] <151> 2017-06-02

[0011] <160> 1142

[0012] <170> PatentIn version 3.5

[0013] <210> 1

[0014] <211> 21

[0015] <212> RNA

[0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0017] <220>

[0018] <223> 人工序列的描述:合成

[0019] 寡核苷酸

[0020] <400> 1

[0021] gcauagcgag cgagggaaaa c 21

[0022] <210> 2

[0023] <211> 21

[0024] <212> RNA

[0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0026] <220>

[0027] <223> 人工序列的描述:合成

[0028] 寡核苷酸

[0029] <400> 2

[0030] guuuucccuc gcucgcuaug c 21

[0031] <210> 3

[0032] <211> 21

[0033] <212> RNA

[0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0035] <220>

[0036] <223> 人工序列的描述:合成

[0037] 寡核苷酸

[0038] <400> 3

[0039] gcauagcgag cgagggaaaa c 21

[0040] <210> 4

[0041] <211> 21

[0042] <212> DNA

[0043] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0044] <220>

[0045] <223> 人工序列的描述:合成

[0046] 寡核苷酸

[0047] <220>

[0048] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0049] 寡核苷酸

[0050] <400> 4

[0051] tuuuucccuc gcucgcuaut u 21

[0052] <210> 5

[0053] <211> 20

[0054] <212> DNA

[0055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0056] <220>

[0057] <223> 人工序列的描述:合成

[0058] 寡核苷酸

[0059] <400> 5

[0060] aagggcatga agcaggaaca 20

[0061] <210> 6

[0062] <211> 20

[0063] <212> DNA

[0064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0065] <220>

[0066] <223> 人工序列的描述:合成

[0067] 寡核苷酸

[0068] <400> 6

[0069] gaagggcatg aagcaggaac 20

[0070] <210> 7

[0071] <211> 20

[0072] <212> DNA

[0073] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0074] <220>

[0075] <223> 人工序列的描述:合成

[0076] 寡核苷酸

[0077] <400> 7

[0078] agaagggcat gaagcaggaa 20

[0079] <210> 8

[0080] <211> 20

[0081] <212> DNA

[0082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0083] <220>

[0084] <223> 人工序列的描述:合成

[0085] 寡核苷酸

[0086] <220>

[0087] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0088] 寡核苷酸

[0089] <400> 8

[0090] uagaagggca tgaagcagga 20

[0091] <210> 9

[0092] <211> 20

[0093] <212> DNA

[0094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0095] <220>

[0096] <223> 人工序列的描述:合成

[0097] 寡核苷酸

[0098] <220>

[0099] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0100] 寡核苷酸

[0101] <400> 9

[0102] guagaagggc atgaagcagg 20

[0103] <210> 10

[0104] <211> 20

[0105] <212> DNA

[0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0107] <220>

[0108] <223> 人工序列的描述:合成

[0109] 寡核苷酸

[0110] <220>

[0111] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0112] 寡核苷酸

[0113] <400> 10

[0114] uguagaaggg catgaagcag 20

[0115] <210> 11

[0116] <211> 20

[0117] <212> DNA

[0118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0119] <220>

[0120] <223> 人工序列的描述:合成

[0121] 寡核苷酸

[0122] <220>

[0123] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0124] 寡核苷酸

[0125] <400> 11

[0126] cuguagaagg gcatgaagca 20

[0127] <210> 12

[0128] <211> 20

[0129] <212> DNA

[0130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0131] <220>

[0132] <223> 人工序列的描述:合成

[0133] 寡核苷酸

[0134] <220>

[0135] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0136] 寡核苷酸

[0137] <400> 12

[0138] acuguagaag ggcatgaagc 20

[0139] <210> 13

[0140] <211> 20

[0141] <212> DNA

[0142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0143] <220>

[0144] <223> 人工序列的描述:合成

[0145] 寡核苷酸

[0146] <220>

[0147] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0148] 寡核苷酸

[0149] <400> 13

[0150] cacugtagaa gggcaugaag 20

[0151] <210> 14

[0152] <211> 20

[0153] <212> DNA

[0154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0155] <220>

[0156] <223> 人工序列的描述:合成

[0157] 寡核苷酸

[0158] <220>

[0159] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0160] 寡核苷酸

[0161] <400> 14

[0162] ccacugtaga agggcaugaa 20

[0163] <210> 15

[0164] <211> 20

[0165] <212> DNA

[0166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0167] <220>

[0168] <223> 人工序列的描述:合成

[0169] 寡核苷酸

[0170] <220>

[0171] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0172] 寡核苷酸

[0173] <400> 15

[0174] uuccgactcc tggccuuccg 20

[0175] <210> 16

[0176] <211> 20

[0177] <212> DNA

[0178] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0179] <220>

[0180] <223> 人工序列的描述:合成

[0181] 寡核苷酸

[0182] <220>

[0183] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0184] 寡核苷酸

[0185] <400> 16

[0186] uccgactcct ggcctuccgc 20

[0187] <210> 17

[0188] <211> 20

[0189] <212> DNA

[0190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0191] <220>

[0192] <223> 人工序列的描述:合成

[0193] 寡核苷酸

[0194] <400> 17

[0195] ccgactcctg gccttccgca 20

[0196] <210> 18

[0197] <211> 20

[0198] <212> DNA

[0199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0200] <220>

[0201] <223> 人工序列的描述:合成

[0202] 寡核苷酸

[0203] <220>

[0204] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0205] 寡核苷酸

[0206] <400> 18

[0207] accugaggat ggaccgcggg 20

[0208] <210> 19

[0209] <211> 20

[0210] <212> DNA

[0211] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0212] <220>

[0213] <223> 人工序列的描述:合成

[0214] 寡核苷酸

[0215] <220>

[0216] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0217] 寡核苷酸

[0218] <400> 19

[0219] ugugcttggc tcctgccugg 20

[0220] <210> 20

[0221] <211> 20

[0222] <212> DNA

[0223] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0224] <220>

[0225] <223> 人工序列的描述:合成

[0226] 寡核苷酸

[0227] <220>

[0228] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0229] 寡核苷酸

[0230] <400> 20

[0231] cuggacctga ggatggaccg 20

[0232] <210> 21

[0233] <211> 20

[0234] <212> DNA

[0235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0236] <220>

[0237] <223> 人工序列的描述:合成

[0238] 寡核苷酸

[0239] <220>

[0240] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0241] 寡核苷酸

[0242] <400> 21

[0243] uguuccgact cctggccuuc 20

[0244] <210> 22

[0245] <211> 20

[0246] <212> DNA

[0247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0248] <220>

[0249] <223> 人工序列的描述:合成

[0250] 寡核苷酸

[0251] <220>

[0252] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0253] 寡核苷酸

[0254] <400> 22

[0255] guuccgactc ctggccuucc 20

[0256] <210> 23

[0257] <211> 20

[0258] <212> DNA

[0259] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0260] <220>

[0261] <223> 人工序列的描述:合成

[0262] 寡核苷酸

[0263] <220>

[0264] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0265] 寡核苷酸

[0266] <400> 23

[0267] cgacucctgg ccttccgcac 20

[0268] <210> 24

[0269] <211> 20

[0270] <212> DNA

[0271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0272] <220>

[0273] <223> 人工序列的描述:合成

[0274] 寡核苷酸

[0275] <220>

[0276] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0277] 寡核苷酸

[0278] <400> 24

[0279] ccugctgtgc ttggcuccug 20

[0280] <210> 25

[0281] <211> 20

[0282] <212> DNA

[0283] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0284] <220>

[0285] <223> 人工序列的描述:合成

[0286] 寡核苷酸

[0287] <220>

[0288] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0289] 寡核苷酸

[0290] <400> 25

[0291] ucuugttacc cccgccaugg 20

[0292] <210> 26

[0293] <211> 20

[0294] <212> DNA

[0295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0296] <220>

[0297] <223> 人工序列的描述:合成

[0298] 寡核苷酸

[0299] <220>

[0300] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0301] 寡核苷酸

[0302] <400> 26

[0303] ccugcctcag tgtctcggcc 20

[0304] <210> 27

[0305] <211> 20

[0306] <212> DNA

[0307] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0308] <220>

[0309] <223> 人工序列的描述:合成

[0310] 寡核苷酸

[0311] <220>

[0312] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0313] 寡核苷酸

[0314] <400> 27

[0315] cccugcctca gtgtcucggc 20

[0316] <210> 28

[0317] <211> 20

[0318] <212> DNA

[0319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0320] <220>

[0321] <223> 人工序列的描述:合成

[0322] 寡核苷酸

[0323] <220>

[0324] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0325] 寡核苷酸

[0326] <400> 28

[0327] uuacccccgc catggagacg 20

[0328] <210> 29

[0329] <211> 20

[0330] <212> DNA

[0331] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0332] <220>

[0333] <223> 人工序列的描述:合成

[0334] 寡核苷酸

[0335] <220>

[0336] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0337] 寡核苷酸

[0338] <400> 29

[0339] acccccgcca tggagacguu 20

[0340] <210> 30

[0341] <211> 20

[0342] <212> DNA

[0343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0344] <220>

[0345] <223> 人工序列的描述:合成

[0346] 寡核苷酸

[0347] <220>

[0348] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0349] 寡核苷酸

[0350] <400> 30

[0351] gaccugagga tggaccgcgg 20

[0352] <210> 31

[0353] <211> 20

[0354] <212> DNA

[0355] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0356] <220>

[0357] <223> 人工序列的描述:合成

[0358] 寡核苷酸

[0359] <400> 31

[0360] ggacctgagg atggaccgcg 20

[0361] <210> 32

[0362] <211> 20

[0363] <212> DNA

[0364] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0365] <220>

[0366] <223> 人工序列的描述:合成

[0367] 寡核苷酸

[0368] <220>

[0369] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0370] 寡核苷酸

[0371] <400> 32

[0372] uacccccgcc atggagacgu 20

[0373] <210> 33

[0374] <211> 20

[0375] <212> DNA

[0376] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0377] <220>

[0378] <223> 人工序列的描述:合成

[0379] 寡核苷酸

[0380] <220>

[0381] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0382] 寡核苷酸

[0383] <400> 33

[0384] gggaccctct gcactgggcu 20

[0385] <210> 34

[0386] <211> 20

[0387] <212> DNA

[0388] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0389] <220>

[0390] <223> 人工序列的描述:合成

[0391] 寡核苷酸

[0392] <220>

[0393] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0394] 寡核苷酸

[0395] <400> 34

[0396] ccugggcgag agggtgucca 20

[0397] <210> 35

[0398] <211> 20

[0399] <212> DNA

[0400] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0401] <220>

[0402] <223> 人工序列的描述:合成

[0403] 寡核苷酸

[0404] <220>

[0405] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0406] 寡核苷酸

[0407] <400> 35

[0408] cccccgccat ggagacguuu 20

[0409] <210> 36

[0410] <211> 20

[0411] <212> DNA

[0412] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0413] <220>

[0414] <223> 人工序列的描述:合成

[0415] 寡核苷酸

[0416] <220>

[0417] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0418] 寡核苷酸

[0419] <400> 36

[0420] ucugctggac agcccuuggg 20

[0421] <210> 37

[0422] <211> 20

[0423] <212> DNA

[0424] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0425] <220>

[0426] <223> 人工序列的描述:合成

[0427] 寡核苷酸

[0428] <220>

[0429] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0430] 寡核苷酸

[0431] <400> 37

[0432] cugcactggg cttccuggug 20

[0433] <210> 38

[0434] <211> 20

[0435] <212> DNA

[0436] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0437] <220>

[0438] <223> 人工序列的描述:合成

[0439] 寡核苷酸

[0440] <220>

[0441] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0442] 寡核苷酸

[0443] <400> 38

[0444] uccugctgtg cttggcuccu 20

[0445] <210> 39

[0446] <211> 20

[0447] <212> DNA

[0448] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0449] <220>

[0450] <223> 人工序列的描述:合成

[0451] 寡核苷酸

[0452] <220>

[0453] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0454] 寡核苷酸

[0455] <400> 39

[0456] cuccugctgt gcttggcucc 20

[0457] <210> 40

[0458] <211> 20

[0459] <212> DNA

[0460] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0461] <220>

[0462] <223> 人工序列的描述:合成

[0463] 寡核苷酸

[0464] <220>

[0465] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0466] 寡核苷酸

[0467] <400> 40

[0468] uggacctgag gatggaccgc 20

[0469] <210> 41

[0470] <211> 20

[0471] <212> DNA

[0472] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0473] <220>

[0474] <223> 人工序列的描述:合成

[0475] 寡核苷酸

[0476] <220>

[0477] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0478] 寡核苷酸

[0479] <400> 41

[0480] uaccctgcct cagtgucucg 20

[0481] <210> 42

[0482] <211> 20

[0483] <212> DNA

[0484] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0485] <220>

[0486] <223> 人工序列的描述:合成

[0487] 寡核苷酸

[0488] <220>

[0489] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0490] 寡核苷酸

[0491] <400> 42

[0492] agggaccctc tgcacugggc 20

[0493] <210> 43

[0494] <211> 20

[0495] <212> DNA

[0496] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0497] <220>

[0498] <223> 人工序列的描述:合成

[0499] 寡核苷酸

[0500] <220>

[0501] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0502] 寡核苷酸

[0503] <400> 43

[0504] cucaggcagc gggtcgcccc 20

[0505] <210> 44

[0506] <211> 20

[0507] <212> DNA
[0508] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0509] <220>
[0510] <223> 人工序列的描述:合成
[0511] 寡核苷酸
[0512] <220>
[0513] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[0514] 寡核苷酸
[0515] <400> 44
[0516] ccucagtgtc tcggccaggg 20
[0517] <210> 45
[0518] <211> 20
[0519] <212> DNA
[0520] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0521] <220>
[0522] <223> 人工序列的描述:合成
[0523] 寡核苷酸
[0524] <220>
[0525] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[0526] 寡核苷酸
[0527] <400> 45
[0528] auuugggacc tggaggcggg 20
[0529] <210> 46
[0530] <211> 20
[0531] <212> DNA
[0532] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0533] <220>
[0534] <223> 人工序列的描述:合成
[0535] 寡核苷酸
[0536] <220>
[0537] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[0538] 寡核苷酸
[0539] <400> 46
[0540] cuugutaccc ccgccaugga 20
[0541] <210> 47
[0542] <211> 20
[0543] <212> DNA
[0544] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0545] <220>

[0546] <223> 人工序列的描述:合成

[0547] 寡核苷酸

[0548] <220>

[0549] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0550] 寡核苷酸

[0551] <400> 47

[0552] acaugggcca gcctaccccc 20

[0553] <210> 48

[0554] <211> 20

[0555] <212> DNA

[0556] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0557] <220>

[0558] <223> 人工序列的描述:合成

[0559] 寡核苷酸

[0560] <220>

[0561] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0562] 寡核苷酸

[0563] <400> 48

[0564] ugcugtgctt ggctccugcc 20

[0565] <210> 49

[0566] <211> 20

[0567] <212> DNA

[0568] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0569] <220>

[0570] <223> 人工序列的描述:合成

[0571] 寡核苷酸

[0572] <220>

[0573] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0574] 寡核苷酸

[0575] <400> 49

[0576] accugtgagg tcacccacug 20

[0577] <210> 50

[0578] <211> 20

[0579] <212> DNA

[0580] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0581] <220>

[0582] <223> 人工序列的描述:合成

[0583] 寡核苷酸

[0584] <220>

[0585] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0586] 寡核苷酸

[0587] <400> 50

[0588] auguuccgac tcctggccuu 20

[0589] <210> 51

[0590] <211> 20

[0591] <212> DNA

[0592] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0593] <220>

[0594] <223> 人工序列的描述:合成

[0595] 寡核苷酸

[0596] <220>

[0597] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0598] 寡核苷酸

[0599] <400> 51

[0600] cucugctgga cagcccuugg 20

[0601] <210> 52

[0602] <211> 20

[0603] <212> RNA

[0604] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0605] <220>

[0606] <223> 人工序列的描述:合成

[0607] 寡核苷酸

[0608] <400> 52

[0609] gccugggcga gaggugucc 20

[0610] <210> 53

[0611] <211> 20

[0612] <212> DNA

[0613] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0614] <220>

[0615] <223> 人工序列的描述:合成

[0616] 寡核苷酸

[0617] <220>

[0618] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0619] 寡核苷酸

[0620] <400> 53

[0621] cugguggaca ttggccggga 20

[0622] <210> 54

[0623] <211> 20

[0624] <212> DNA
[0625] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0626] <220>
[0627] <223> 人工序列的描述:合成
[0628] 寡核苷酸
[0629] <220>
[0630] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[0631] 寡核苷酸
[0632] <400> 54
[0633] cugcuccagc gggataccgg 20
[0634] <210> 55
[0635] <211> 20
[0636] <212> RNA
[0637] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0638] <220>
[0639] <223> 人工序列的描述:合成
[0640] 寡核苷酸
[0641] <400> 55
[0642] uuguuacccc cgccauggag 20
[0643] <210> 56
[0644] <211> 20
[0645] <212> DNA
[0646] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0647] <220>
[0648] <223> 人工序列的描述:合成
[0649] 寡核苷酸
[0650] <220>
[0651] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[0652] 寡核苷酸
[0653] <400> 56
[0654] uguuaccccc gccatggaga 20
[0655] <210> 57
[0656] <211> 20
[0657] <212> DNA
[0658] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0659] <220>
[0660] <223> 人工序列的描述:合成
[0661] 寡核苷酸
[0662] <220>

[0663] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0664] 寡核苷酸

[0665] <400> 57

[0666] agcgctctct accctgccuc 20

[0667] <210> 58

[0668] <211> 20

[0669] <212> DNA

[0670] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0671] <220>

[0672] <223> 人工序列的描述:合成

[0673] 寡核苷酸

[0674] <220>

[0675] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0676] 寡核苷酸

[0677] <400> 58

[0678] ugggcgagag ggtgtccagg 20

[0679] <210> 59

[0680] <211> 20

[0681] <212> DNA

[0682] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0683] <220>

[0684] <223> 人工序列的描述:合成

[0685] 寡核苷酸

[0686] <220>

[0687] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0688] 寡核苷酸

[0689] <400> 59

[0690] aggcugggat cctccacguc 20

[0691] <210> 60

[0692] <211> 20

[0693] <212> DNA

[0694] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0695] <220>

[0696] <223> 人工序列的描述:合成

[0697] 寡核苷酸

[0698] <220>

[0699] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0700] 寡核苷酸

[0701] <400> 60

[0702] ugguggacat tggccgggag 20

[0703] <210> 61

[0704] <211> 20

[0705] <212> DNA

[0706] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0707] <220>

[0708] <223> 人工序列的描述:合成

[0709] 寡核苷酸

[0710] <400> 61

[0711] agaggctggg atcctccacg 20

[0712] <210> 62

[0713] <211> 20

[0714] <212> DNA

[0715] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0716] <220>

[0717] <223> 人工序列的描述:合成

[0718] 寡核苷酸

[0719] <220>

[0720] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0721] 寡核苷酸

[0722] <400> 62

[0723] gcuggtggac attggccggg 20

[0724] <210> 63

[0725] <211> 20

[0726] <212> DNA

[0727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0728] <220>

[0729] <223> 人工序列的描述:合成

[0730] 寡核苷酸

[0731] <220>

[0732] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0733] 寡核苷酸

[0734] <400> 63

[0735] ucugctccag cgggauaccg 20

[0736] <210> 64

[0737] <211> 20

[0738] <212> DNA

[0739] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0740] <220>

[0741] <223> 人工序列的描述:合成

[0742] 寡核苷酸

[0743] <220>

[0744] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0745] 寡核苷酸

[0746] <400> 64

[0747] ucugcactgg gcttccuggu 20

[0748] <210> 65

[0749] <211> 20

[0750] <212> DNA

[0751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0752] <220>

[0753] <223> 人工序列的描述:合成

[0754] 寡核苷酸

[0755] <220>

[0756] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0757] 寡核苷酸

[0758] <400> 65

[0759] gcgcuctcta ccctgccuca 20

[0760] <210> 66

[0761] <211> 20

[0762] <212> DNA

[0763] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0764] <220>

[0765] <223> 人工序列的描述:合成

[0766] 寡核苷酸

[0767] <220>

[0768] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0769] 寡核苷酸

[0770] <400> 66

[0771] cugcctcagt gtctcggcca 20

[0772] <210> 67

[0773] <211> 20

[0774] <212> DNA

[0775] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0776] <220>

[0777] <223> 人工序列的描述:合成

[0778] 寡核苷酸

[0779] <220>

[0780] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0781] 寡核苷酸

[0782] <400> 67

[0783] gacucctggc cttccgcaca 20

[0784] <210> 68

[0785] <211> 20

[0786] <212> DNA

[0787] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0788] <220>

[0789] <223> 人工序列的描述:合成

[0790] 寡核苷酸

[0791] <220>

[0792] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0793] 寡核苷酸

[0794] <400> 68

[0795] cgacctcagg atccaucccu 20

[0796] <210> 69

[0797] <211> 20

[0798] <212> DNA

[0799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0800] <220>

[0801] <223> 人工序列的描述:合成

[0802] 寡核苷酸

[0803] <220>

[0804] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0805] 寡核苷酸

[0806] <400> 69

[0807] ggcugggatc ctccacguca 20

[0808] <210> 70

[0809] <211> 20

[0810] <212> DNA

[0811] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0812] <220>

[0813] <223> 人工序列的描述:合成

[0814] 寡核苷酸

[0815] <220>

[0816] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0817] 寡核苷酸

[0818] <400> 70

[0819] ucugctagac tcgccuccuc 20

[0820] <210> 71

[0821] <211> 20

[0822] <212> DNA

[0823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0824] <220>

[0825] <223> 人工序列的描述:合成

[0826] 寡核苷酸

[0827] <220>

[0828] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0829] 寡核苷酸

[0830] <400> 71

[0831] aucuugttac ccccgccaug 20

[0832] <210> 72

[0833] <211> 20

[0834] <212> DNA

[0835] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0836] <220>

[0837] <223> 人工序列的描述:合成

[0838] 寡核苷酸

[0839] <220>

[0840] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0841] 寡核苷酸

[0842] <400> 72

[0843] ugcactgggc ttcctggugu 20

[0844] <210> 73

[0845] <211> 20

[0846] <212> DNA

[0847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0848] <220>

[0849] <223> 人工序列的描述:合成

[0850] 寡核苷酸

[0851] <220>

[0852] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0853] 寡核苷酸

[0854] <400> 73

[0855] ugcagagacc ctgtcggagg 20

[0856] <210> 74

[0857] <211> 20

[0858] <212> DNA

[0859] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0860] <220>

[0861] <223> 人工序列的描述:合成

[0862] 寡核苷酸

[0863] <220>

[0864] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0865] 寡核苷酸

[0866] <400> 74

[0867] cccagcacct tgagauccgg 20

[0868] <210> 75

[0869] <211> 20

[0870] <212> DNA

[0871] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0872] <220>

[0873] <223> 人工序列的描述:合成

[0874] 寡核苷酸

[0875] <220>

[0876] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0877] 寡核苷酸

[0878] <400> 75

[0879] ccugugaggt cacccacugc 20

[0880] <210> 76

[0881] <211> 20

[0882] <212> DNA

[0883] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0884] <220>

[0885] <223> 人工序列的描述:合成

[0886] 寡核苷酸

[0887] <220>

[0888] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0889] 寡核苷酸

[0890] <400> 76

[0891] cugggcatgg cgaccucagg 20

[0892] <210> 77

[0893] <211> 20

[0894] <212> DNA

[0895] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0896] <220>

[0897] <223> 人工序列的描述:合成

[0898] 寡核苷酸

[0899] <400> 77

[0900] cgaactgcac cccttcccac 20

[0901] <210> 78

[0902] <211> 20

[0903] <212> DNA

[0904] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0905] <220>

[0906] <223> 人工序列的描述:合成

[0907] 寡核苷酸

[0908] <400> 78

[0909] agcgagcctg ggcgagaggg 20

[0910] <210> 79

[0911] <211> 20

[0912] <212> DNA

[0913] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0914] <220>

[0915] <223> 人工序列的描述:合成

[0916] 寡核苷酸

[0917] <220>

[0918] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0919] 寡核苷酸

[0920] <400> 79

[0921] ggguggcctc tgcttugguc 20

[0922] <210> 80

[0923] <211> 20

[0924] <212> DNA

[0925] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0926] <220>

[0927] <223> 人工序列的描述:合成

[0928] 寡核苷酸

[0929] <220>

[0930] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0931] 寡核苷酸

[0932] <400> 80

[0933] ugcuccagcg ggataccgga 20

[0934] <210> 81

[0935] <211> 20

[0936] <212> DNA

[0937] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0938] <220>

[0939] <223> 人工序列的描述:合成

[0940] 寡核苷酸

[0941] <220>

[0942] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0943] 寡核苷酸

[0944] <400> 81

[0945] aagggaccct ctgcacuggg 20

[0946] <210> 82

[0947] <211> 20

[0948] <212> DNA

[0949] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0950] <220>

[0951] <223> 人工序列的描述:合成

[0952] 寡核苷酸

[0953] <220>

[0954] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0955] 寡核苷酸

[0956] <400> 82

[0957] cugcugtgct tggctccugc 20

[0958] <210> 83

[0959] <211> 20

[0960] <212> DNA

[0961] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0962] <220>

[0963] <223> 人工序列的描述:合成

[0964] 寡核苷酸

[0965] <220>

[0966] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0967] 寡核苷酸

[0968] <400> 83

[0969] gacgaactgc accccuuccc 20

[0970] <210> 84

[0971] <211> 20

[0972] <212> DNA

[0973] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0974] <220>

[0975] <223> 人工序列的描述:合成

[0976] 寡核苷酸

[0977] <220>

[0978] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0979] 寡核苷酸

[0980] <400> 84

[0981] ugcugtagcg agcctgggcg 20

[0982] <210> 85

[0983] <211> 20

[0984] <212> DNA

[0985] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0986] <220>

[0987] <223> 人工序列的描述:合成

[0988] 寡核苷酸

[0989] <220>

[0990] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[0991] 寡核苷酸

[0992] <400> 85

[0993] caccccttcc cacagcaugg 20

[0994] <210> 86

[0995] <211> 20

[0996] <212> DNA

[0997] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0998] <220>

[0999] <223> 人工序列的描述:合成

[1000] 寡核苷酸

[1001] <220>

[1002] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1003] 寡核苷酸

[1004] <400> 86

[1005] gaccctctgc actgggcuuc 20

[1006] <210> 87

[1007] <211> 20

[1008] <212> DNA

[1009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1010] <220>

[1011] <223> 人工序列的描述:合成

[1012] 寡核苷酸

[1013] <220>

[1014] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1015] 寡核苷酸

[1016] <400> 87

[1017] agcuggtgga cattggccgg 20

[1018] <210> 88

[1019] <211> 20

[1020] <212> DNA

[1021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1022] <220>

[1023] <223> 人工序列的描述:合成

[1024] 寡核苷酸

[1025] <220>

[1026] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1027] 寡核苷酸

[1028] <400> 88

[1029] ucucggccag ggcatuccca 20

[1030] <210> 89

[1031] <211> 20

[1032] <212> DNA

[1033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1034] <220>

[1035] <223> 人工序列的描述:合成

[1036] 寡核苷酸

[1037] <220>

[1038] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1039] 寡核苷酸

[1040] <400> 89

[1041] ggucuctgct ggacagcccu 20

[1042] <210> 90

[1043] <211> 20

[1044] <212> DNA

[1045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1046] <220>

[1047] <223> 人工序列的描述:合成

[1048] 寡核苷酸

[1049] <400> 90

[1050] cggccagggc attcccagcg 20

[1051] <210> 91

[1052] <211> 20

[1053] <212> DNA
[1054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1055] <220>
[1056] <223> 人工序列的描述:合成
[1057] 寡核苷酸
[1058] <220>
[1059] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1060] 寡核苷酸
[1061] <400> 91
[1062] ugggatcctc cacgtcacag 20
[1063] <210> 92
[1064] <211> 20
[1065] <212> DNA
[1066] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1067] <220>
[1068] <223> 人工序列的描述:合成
[1069] 寡核苷酸
[1070] <220>
[1071] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1072] 寡核苷酸
[1073] <400> 92
[1074] ccugutggct gctcacuggc 20
[1075] <210> 93
[1076] <211> 20
[1077] <212> DNA
[1078] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1079] <220>
[1080] <223> 人工序列的描述:合成
[1081] 寡核苷酸
[1082] <220>
[1083] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1084] 寡核苷酸
[1085] <400> 93
[1086] gccugttggc tgctcacugg 20
[1087] <210> 94
[1088] <211> 20
[1089] <212> DNA
[1090] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1091] <220>

[1092] <223> 人工序列的描述:合成

[1093] 寡核苷酸

[1094] <400> 94

[1095] ccagcacctt gagatccggg 20

[1096] <210> 95

[1097] <211> 20

[1098] <212> DNA

[1099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1100] <220>

[1101] <223> 人工序列的描述:合成

[1102] 寡核苷酸

[1103] <220>

[1104] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1105] 寡核苷酸

[1106] <400> 95

[1107] gggaggcctg ttggcugcuc 20

[1108] <210> 96

[1109] <211> 20

[1110] <212> DNA

[1111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1112] <220>

[1113] <223> 人工序列的描述:合成

[1114] 寡核苷酸

[1115] <220>

[1116] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1117] 寡核苷酸

[1118] <400> 96

[1119] cucagaggct gggatccucc 20

[1120] <210> 97

[1121] <211> 20

[1122] <212> DNA

[1123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1124] <220>

[1125] <223> 人工序列的描述:合成

[1126] 寡核苷酸

[1127] <220>

[1128] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1129] 寡核苷酸

[1130] <400> 97

[1131] gccucagtgt ctcggccagg 20

[1132] <210> 98

[1133] <211> 20

[1134] <212> DNA

[1135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1136] <220>

[1137] <223> 人工序列的描述:合成

[1138] 寡核苷酸

[1139] <220>

[1140] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1141] 寡核苷酸

[1142] <400> 98

[1143] cacaugggcc agcctacccc 20

[1144] <210> 99

[1145] <211> 20

[1146] <212> DNA

[1147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1148] <220>

[1149] <223> 人工序列的描述:合成

[1150] 寡核苷酸

[1151] <220>

[1152] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1153] 寡核苷酸

[1154] <400> 99

[1155] gguggcctct gctttggucu 20

[1156] <210> 100

[1157] <211> 20

[1158] <212> DNA

[1159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1160] <220>

[1161] <223> 人工序列的描述:合成

[1162] 寡核苷酸

[1163] <220>

[1164] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1165] 寡核苷酸

[1166] <400> 100

[1167] acguugtcac tcactccucc 20

[1168] <210> 101

[1169] <211> 20

[1170] <212> DNA
[1171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1172] <220>
[1173] <223> 人工序列的描述:合成
[1174] 寡核苷酸
[1175] <220>
[1176] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1177] 寡核苷酸
[1178] <400> 101
[1179] uagaaaggca tgaagcagga 20
[1180] <210> 102
[1181] <211> 20
[1182] <212> DNA
[1183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1184] <220>
[1185] <223> 人工序列的描述:合成
[1186] 寡核苷酸
[1187] <220>
[1188] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1189] 寡核苷酸
[1190] <400> 102
[1191] guagaaaggc atgaagcagg 20
[1192] <210> 103
[1193] <211> 20
[1194] <212> DNA
[1195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1196] <220>
[1197] <223> 人工序列的描述:合成
[1198] 寡核苷酸
[1199] <220>
[1200] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1201] 寡核苷酸
[1202] <400> 103
[1203] uguagaaagg catgaagcag 20
[1204] <210> 104
[1205] <211> 20
[1206] <212> DNA
[1207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1208] <220>

[1209] <223> 人工序列的描述:合成

[1210] 寡核苷酸

[1211] <220>

[1212] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1213] 寡核苷酸

[1214] <400> 104

[1215] cuguagaaag gcatgaagca 20

[1216] <210> 105

[1217] <211> 20

[1218] <212> DNA

[1219] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1220] <220>

[1221] <223> 人工序列的描述:合成

[1222] 寡核苷酸

[1223] <220>

[1224] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1225] 寡核苷酸

[1226] <400> 105

[1227] acuguagaaa ggcatgaagc 20

[1228] <210> 106

[1229] <211> 20

[1230] <212> DNA

[1231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1232] <220>

[1233] <223> 人工序列的描述:合成

[1234] 寡核苷酸

[1235] <220>

[1236] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1237] 寡核苷酸

[1238] <400> 106

[1239] cacugtagaa aggcaugaag 20

[1240] <210> 107

[1241] <211> 20

[1242] <212> DNA

[1243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1244] <220>

[1245] <223> 人工序列的描述:合成

[1246] 寡核苷酸

[1247] <220>

[1248] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1249] 寡核苷酸

[1250] <400> 107

[1251] ccacugtaga aaggcaugaa 20

[1252] <210> 108

[1253] <211> 25

[1254] <212> DNA

[1255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1256] <220>

[1257] <223> 人工序列的描述:合成

[1258] 寡核苷酸

[1259] <220>

[1260] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1261] 寡核苷酸

[1262] <400> 108

[1263] uagaaaggca tgaagcagga acaua 25

[1264] <210> 109

[1265] <211> 25

[1266] <212> DNA

[1267] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1268] <220>

[1269] <223> 人工序列的描述:合成

[1270] 寡核苷酸

[1271] <220>

[1272] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1273] 寡核苷酸

[1274] <400> 109

[1275] guagaaaggc atgaagcagg aacau 25

[1276] <210> 110

[1277] <211> 25

[1278] <212> DNA

[1279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1280] <220>

[1281] <223> 人工序列的描述:合成

[1282] 寡核苷酸

[1283] <220>

[1284] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1285] 寡核苷酸

[1286] <400> 110

[1287] uguagaaagg catgaagcag gaaca 25
[1288] <210> 111
[1289] <211> 25
[1290] <212> DNA
[1291] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1292] <220>
[1293] <223> 人工序列的描述:合成
[1294] 寡核苷酸
[1295] <220>
[1296] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1297] 寡核苷酸
[1298] <400> 111
[1299] cuguagaaag gcatgaagca ggaac 25
[1300] <210> 112
[1301] <211> 25
[1302] <212> DNA
[1303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1304] <220>
[1305] <223> 人工序列的描述:合成
[1306] 寡核苷酸
[1307] <220>
[1308] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1309] 寡核苷酸
[1310] <400> 112
[1311] acuguagaaa ggcatgaagc aggaa 25
[1312] <210> 113
[1313] <211> 25
[1314] <212> DNA
[1315] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1316] <220>
[1317] <223> 人工序列的描述:合成
[1318] 寡核苷酸
[1319] <220>
[1320] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1321] 寡核苷酸
[1322] <400> 113
[1323] cacugtagaa aggcatgaag cagga 25
[1324] <210> 114
[1325] <211> 25

[1326] <212> DNA
[1327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1328] <220>
[1329] <223> 人工序列的描述:合成
[1330] 寡核苷酸
[1331] <220>
[1332] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1333] 寡核苷酸
[1334] <400> 114
[1335] ccacugtaga aaggcatgaa gcagg 25
[1336] <210> 115
[1337] <211> 25
[1338] <212> DNA
[1339] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1340] <220>
[1341] <223> 人工序列的描述:合成
[1342] 寡核苷酸
[1343] <400> 115
[1344] gccactgtag aaaggcatga agcag 25
[1345] <210> 116
[1346] <211> 25
[1347] <212> DNA
[1348] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1349] <220>
[1350] <223> 人工序列的描述:合成
[1351] 寡核苷酸
[1352] <400> 116
[1353] ggccactgta gaaaggcatg aagca 25
[1354] <210> 117
[1355] <211> 25
[1356] <212> DNA
[1357] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1358] <220>
[1359] <223> 人工序列的描述:合成
[1360] 寡核苷酸
[1361] <400> 117
[1362] aggccactgt agaaaggcat gaagc 25
[1363] <210> 118
[1364] <211> 25

[1365] <212> DNA
[1366] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1367] <220>
[1368] <223> 人工序列的描述:合成
[1369] 寡核苷酸
[1370] <220>
[1371] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1372] 寡核苷酸
[1373] <400> 118
[1374] aaggccactg tagaaaggca ugaag 25
[1375] <210> 119
[1376] <211> 25
[1377] <212> DNA
[1378] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1379] <220>
[1380] <223> 人工序列的描述:合成
[1381] 寡核苷酸
[1382] <220>
[1383] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1384] 寡核苷酸
[1385] <400> 119
[1386] uaaggccact gtagaaaggc augaa 25
[1387] <210> 120
[1388] <211> 21
[1389] <212> DNA
[1390] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1391] <220>
[1392] <223> 人工序列的描述:合成
[1393] 寡核苷酸
[1394] <220>
[1395] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1396] 寡核苷酸
[1397] <400> 120
[1398] tcugaggaug gaccgcgggt u 21
[1399] <210> 121
[1400] <211> 21
[1401] <212> DNA
[1402] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1403] <220>

[1404] <223> 人工序列的描述:合成

[1405] 寡核苷酸

[1406] <220>

[1407] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1408] 寡核苷酸

[1409] <400> 121

[1410] tcugaggaug gaccgcgggt u 21

[1411] <210> 122

[1412] <211> 21

[1413] <212> DNA

[1414] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1415] <220>

[1416] <223> 人工序列的描述:合成

[1417] 寡核苷酸

[1418] <220>

[1419] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1420] 寡核苷酸

[1421] <400> 122

[1422] tcugaggaug gaccgcgggt u 21

[1423] <210> 123

[1424] <211> 21

[1425] <212> DNA

[1426] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1427] <220>

[1428] <223> 人工序列的描述:合成

[1429] 寡核苷酸

[1430] <220>

[1431] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1432] 寡核苷酸

[1433] <400> 123

[1434] taccugagga uggaccgcgt u 21

[1435] <210> 124

[1436] <211> 21

[1437] <212> DNA

[1438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1439] <220>

[1440] <223> 人工序列的描述:合成

[1441] 寡核苷酸

[1442] <220>

[1443] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1444] 寡核苷酸

[1445] <400> 124

[1446] taccugagga uggaccgcgt u 21

[1447] <210> 125

[1448] <211> 21

[1449] <212> DNA

[1450] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1451] <220>

[1452] <223> 人工序列的描述:合成

[1453] 寡核苷酸

[1454] <220>

[1455] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1456] 寡核苷酸

[1457] <400> 125

[1458] tgaccugagg auggaccgct u 21

[1459] <210> 126

[1460] <211> 21

[1461] <212> DNA

[1462] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1463] <220>

[1464] <223> 人工序列的描述:合成

[1465] 寡核苷酸

[1466] <220>

[1467] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1468] 寡核苷酸

[1469] <400> 126

[1470] tgaccugagg auggaccgct u 21

[1471] <210> 127

[1472] <211> 21

[1473] <212> DNA

[1474] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1475] <220>

[1476] <223> 人工序列的描述:合成

[1477] 寡核苷酸

[1478] <220>

[1479] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1480] 寡核苷酸

[1481] <400> 127

[1482] tuuguuaccc ccgccauggt u 21
[1483] <210> 128
[1484] <211> 21
[1485] <212> DNA
[1486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1487] <220>
[1488] <223> 人工序列的描述:合成
[1489] 寡核苷酸
[1490] <220>
[1491] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1492] 寡核苷酸
[1493] <400> 128
[1494] tuuguuaccc ccgccauggt u 21
[1495] <210> 129
[1496] <211> 21
[1497] <212> DNA
[1498] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1499] <220>
[1500] <223> 人工序列的描述:合成
[1501] 寡核苷酸
[1502] <220>
[1503] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1504] 寡核苷酸
[1505] <400> 129
[1506] tccccgccau ggagacguut u 21
[1507] <210> 130
[1508] <211> 21
[1509] <212> DNA
[1510] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1511] <220>
[1512] <223> 人工序列的描述:合成
[1513] 寡核苷酸
[1514] <220>
[1515] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1516] 寡核苷酸
[1517] <400> 130
[1518] tccccgccau ggagacguut u 21
[1519] <210> 131
[1520] <211> 21

[1521] <212> DNA
[1522] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1523] <220>
[1524] <223> 人工序列的描述:合成
[1525] 寡核苷酸
[1526] <220>
[1527] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1528] 寡核苷酸
[1529] <400> 131
[1530] taccccgcc auggagacgt u 21
[1531] <210> 132
[1532] <211> 21
[1533] <212> DNA
[1534] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1535] <220>
[1536] <223> 人工序列的描述:合成
[1537] 寡核苷酸
[1538] <220>
[1539] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1540] 寡核苷酸
[1541] <400> 132
[1542] taccccgcc auggagacgt u 21
[1543] <210> 133
[1544] <211> 21
[1545] <212> DNA
[1546] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1547] <220>
[1548] <223> 人工序列的描述:合成
[1549] 寡核苷酸
[1550] <220>
[1551] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1552] 寡核苷酸
[1553] <400> 133
[1554] tcccccgcca uggagacgut u 21
[1555] <210> 134
[1556] <211> 21
[1557] <212> DNA
[1558] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1559] <220>

[1560] <223> 人工序列的描述:合成

[1561] 寡核苷酸

[1562] <220>

[1563] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1564] 寡核苷酸

[1565] <400> 134

[1566] tcccccgcca uggagacgut u 21

[1567] <210> 135

[1568] <211> 21

[1569] <212> DNA

[1570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1571] <220>

[1572] <223> 人工序列的描述:合成

[1573] 寡核苷酸

[1574] <220>

[1575] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1576] 寡核苷酸

[1577] <400> 135

[1578] tgcucggccu ccaguuccat u 21

[1579] <210> 136

[1580] <211> 21

[1581] <212> DNA

[1582] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1583] <220>

[1584] <223> 人工序列的描述:合成

[1585] 寡核苷酸

[1586] <220>

[1587] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1588] 寡核苷酸

[1589] <400> 136

[1590] tgcucggccu ccaguuccat u 21

[1591] <210> 137

[1592] <211> 21

[1593] <212> DNA

[1594] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1595] <220>

[1596] <223> 人工序列的描述:合成

[1597] 寡核苷酸

[1598] <220>

[1599] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1600] 寡核苷酸

[1601] <400> 137

[1602] tggacccucu gcacugggct u 21

[1603] <210> 138

[1604] <211> 21

[1605] <212> DNA

[1606] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1607] <220>

[1608] <223> 人工序列的描述:合成

[1609] 寡核苷酸

[1610] <220>

[1611] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1612] 寡核苷酸

[1613] <400> 138

[1614] tggacccucu gcacugggct u 21

[1615] <210> 139

[1616] <211> 21

[1617] <212> DNA

[1618] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1619] <220>

[1620] <223> 人工序列的描述:合成

[1621] 寡核苷酸

[1622] <220>

[1623] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1624] 寡核苷酸

[1625] <400> 139

[1626] tgacccucug cacugggcut u 21

[1627] <210> 140

[1628] <211> 21

[1629] <212> DNA

[1630] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1631] <220>

[1632] <223> 人工序列的描述:合成

[1633] 寡核苷酸

[1634] <220>

[1635] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1636] 寡核苷酸

[1637] <400> 140

[1638] tgacccucug cacugggcut u 21
[1639] <210> 141
[1640] <211> 21
[1641] <212> DNA
[1642] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1643] <220>
[1644] <223> 人工序列的描述:合成
[1645] 寡核苷酸
[1646] <220>
[1647] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1648] 寡核苷酸
[1649] <400> 141
[1650] tcaugaagca ggaacauact u 21
[1651] <210> 142
[1652] <211> 21
[1653] <212> DNA
[1654] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1655] <220>
[1656] <223> 人工序列的描述:合成
[1657] 寡核苷酸
[1658] <220>
[1659] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1660] 寡核苷酸
[1661] <400> 142
[1662] tgcaugaagc aggaacauat u 21
[1663] <210> 143
[1664] <211> 21
[1665] <212> DNA
[1666] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1667] <220>
[1668] <223> 人工序列的描述:合成
[1669] 寡核苷酸
[1670] <220>
[1671] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1672] 寡核苷酸
[1673] <400> 143
[1674] tggcaugaag caggaacaut u 21
[1675] <210> 144
[1676] <211> 21

[1677] <212> DNA
[1678] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1679] <220>
[1680] <223> 人工序列的描述:合成
[1681] 寡核苷酸
[1682] <220>
[1683] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1684] 寡核苷酸
[1685] <400> 144
[1686] taggcaugaa gcaggaacat u 21
[1687] <210> 145
[1688] <211> 21
[1689] <212> DNA
[1690] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1691] <220>
[1692] <223> 人工序列的描述:合成
[1693] 寡核苷酸
[1694] <220>
[1695] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1696] 寡核苷酸
[1697] <400> 145
[1698] taaggcauga agcaggaact u 21
[1699] <210> 146
[1700] <211> 21
[1701] <212> DNA
[1702] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1703] <220>
[1704] <223> 人工序列的描述:合成
[1705] 寡核苷酸
[1706] <220>
[1707] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1708] 寡核苷酸
[1709] <400> 146
[1710] taaaggcaug aagcaggaat u 21
[1711] <210> 147
[1712] <211> 21
[1713] <212> DNA
[1714] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1715] <220>

[1716] <223> 人工序列的描述:合成

[1717] 寡核苷酸

[1718] <220>

[1719] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1720] 寡核苷酸

[1721] <400> 147

[1722] tgaaaggcau gaagcaggat u 21

[1723] <210> 148

[1724] <211> 21

[1725] <212> DNA

[1726] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1727] <220>

[1728] <223> 人工序列的描述:合成

[1729] 寡核苷酸

[1730] <220>

[1731] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1732] 寡核苷酸

[1733] <400> 148

[1734] tagaaaggca ugaagcaggt u 21

[1735] <210> 149

[1736] <211> 21

[1737] <212> DNA

[1738] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1739] <220>

[1740] <223> 人工序列的描述:合成

[1741] 寡核苷酸

[1742] <220>

[1743] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1744] 寡核苷酸

[1745] <400> 149

[1746] tuagaaaggc augaagcagt u 21

[1747] <210> 150

[1748] <211> 21

[1749] <212> DNA

[1750] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1751] <220>

[1752] <223> 人工序列的描述:合成

[1753] 寡核苷酸

[1754] <220>

[1755] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1756] 寡核苷酸

[1757] <400> 150

[1758] tguagaaagg caugaagcat u 21

[1759] <210> 151

[1760] <211> 21

[1761] <212> DNA

[1762] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1763] <220>

[1764] <223> 人工序列的描述:合成

[1765] 寡核苷酸

[1766] <220>

[1767] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1768] 寡核苷酸

[1769] <400> 151

[1770] tuguagaaag gcaugaagct u 21

[1771] <210> 152

[1772] <211> 21

[1773] <212> DNA

[1774] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1775] <220>

[1776] <223> 人工序列的描述:合成

[1777] 寡核苷酸

[1778] <220>

[1779] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1780] 寡核苷酸

[1781] <400> 152

[1782] tcuguagaaa ggcaugaagt u 21

[1783] <210> 153

[1784] <211> 21

[1785] <212> DNA

[1786] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1787] <220>

[1788] <223> 人工序列的描述:合成

[1789] 寡核苷酸

[1790] <220>

[1791] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1792] 寡核苷酸

[1793] <400> 153

[1794] tacuguagaa aggcaugaat u 21
[1795] <210> 154
[1796] <211> 21
[1797] <212> DNA
[1798] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1799] <220>
[1800] <223> 人工序列的描述:合成
[1801] 寡核苷酸
[1802] <220>
[1803] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1804] 寡核苷酸
[1805] <400> 154
[1806] tcacuguaga aaggcaugat u 21
[1807] <210> 155
[1808] <211> 21
[1809] <212> DNA
[1810] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1811] <220>
[1812] <223> 人工序列的描述:合成
[1813] 寡核苷酸
[1814] <220>
[1815] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1816] 寡核苷酸
[1817] <400> 155
[1818] tccacuguag aaaggcaugt u 21
[1819] <210> 156
[1820] <211> 21
[1821] <212> DNA
[1822] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1823] <220>
[1824] <223> 人工序列的描述:合成
[1825] 寡核苷酸
[1826] <220>
[1827] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1828] 寡核苷酸
[1829] <400> 156
[1830] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[1831] <210> 157
[1832] <211> 21

[1833] <212> DNA
[1834] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1835] <220>
[1836] <223> 人工序列的描述:合成
[1837] 寡核苷酸
[1838] <220>
[1839] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1840] 寡核苷酸
[1841] <400> 157
[1842] tggccacugu agaaaggcat u 21
[1843] <210> 158
[1844] <211> 21
[1845] <212> DNA
[1846] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1847] <220>
[1848] <223> 人工序列的描述:合成
[1849] 寡核苷酸
[1850] <220>
[1851] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1852] 寡核苷酸
[1853] <400> 158
[1854] taggccacug uagaaaggct u 21
[1855] <210> 159
[1856] <211> 21
[1857] <212> DNA
[1858] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1859] <220>
[1860] <223> 人工序列的描述:合成
[1861] 寡核苷酸
[1862] <220>
[1863] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1864] 寡核苷酸
[1865] <400> 159
[1866] taaggccacu guagaaaggt u 21
[1867] <210> 160
[1868] <211> 21
[1869] <212> DNA
[1870] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1871] <220>

[1872] <223> 人工序列的描述:合成

[1873] 寡核苷酸

[1874] <220>

[1875] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1876] 寡核苷酸

[1877] <400> 160

[1878] tuaaggccac uguagaaagt u 21

[1879] <210> 161

[1880] <211> 21

[1881] <212> DNA

[1882] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1883] <220>

[1884] <223> 人工序列的描述:合成

[1885] 寡核苷酸

[1886] <220>

[1887] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1888] 寡核苷酸

[1889] <400> 161

[1890] tauaaggcca cuguagaaat u 21

[1891] <210> 162

[1892] <211> 21

[1893] <212> DNA

[1894] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1895] <220>

[1896] <223> 人工序列的描述:合成

[1897] 寡核苷酸

[1898] <220>

[1899] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1900] 寡核苷酸

[1901] <400> 162

[1902] tcaugaagca ggaacauact u 21

[1903] <210> 163

[1904] <211> 21

[1905] <212> DNA

[1906] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1907] <220>

[1908] <223> 人工序列的描述:合成

[1909] 寡核苷酸

[1910] <220>

[1911] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1912] 寡核苷酸

[1913] <400> 163

[1914] tgcaugaagc aggaacauat u 21

[1915] <210> 164

[1916] <211> 21

[1917] <212> DNA

[1918] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1919] <220>

[1920] <223> 人工序列的描述:合成

[1921] 寡核苷酸

[1922] <220>

[1923] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1924] 寡核苷酸

[1925] <400> 164

[1926] tggcaugaag caggaacaut u 21

[1927] <210> 165

[1928] <211> 21

[1929] <212> DNA

[1930] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1931] <220>

[1932] <223> 人工序列的描述:合成

[1933] 寡核苷酸

[1934] <220>

[1935] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1936] 寡核苷酸

[1937] <400> 165

[1938] taggcaugaa gcaggaacat u 21

[1939] <210> 166

[1940] <211> 21

[1941] <212> DNA

[1942] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1943] <220>

[1944] <223> 人工序列的描述:合成

[1945] 寡核苷酸

[1946] <220>

[1947] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[1948] 寡核苷酸

[1949] <400> 166

[1950] taaggcauga agcaggaact u 21
[1951] <210> 167
[1952] <211> 21
[1953] <212> DNA
[1954] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1955] <220>
[1956] <223> 人工序列的描述:合成
[1957] 寡核苷酸
[1958] <220>
[1959] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1960] 寡核苷酸
[1961] <400> 167
[1962] taaaggcaug aagcaggaat u 21
[1963] <210> 168
[1964] <211> 21
[1965] <212> DNA
[1966] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1967] <220>
[1968] <223> 人工序列的描述:合成
[1969] 寡核苷酸
[1970] <220>
[1971] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1972] 寡核苷酸
[1973] <400> 168
[1974] tgaaaggcau gaagcaggat u 21
[1975] <210> 169
[1976] <211> 21
[1977] <212> DNA
[1978] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1979] <220>
[1980] <223> 人工序列的描述:合成
[1981] 寡核苷酸
[1982] <220>
[1983] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1984] 寡核苷酸
[1985] <400> 169
[1986] tagaaaggca ugaagcaggt u 21
[1987] <210> 170
[1988] <211> 21

[1989] <212> DNA
[1990] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1991] <220>
[1992] <223> 人工序列的描述:合成
[1993] 寡核苷酸
[1994] <220>
[1995] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[1996] 寡核苷酸
[1997] <400> 170
[1998] tuagaaaggc augaagcagt u 21
[1999] <210> 171
[2000] <211> 21
[2001] <212> DNA
[2002] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2003] <220>
[2004] <223> 人工序列的描述:合成
[2005] 寡核苷酸
[2006] <220>
[2007] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2008] 寡核苷酸
[2009] <400> 171
[2010] tguagaaagg caugaagcat u 21
[2011] <210> 172
[2012] <211> 21
[2013] <212> DNA
[2014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2015] <220>
[2016] <223> 人工序列的描述:合成
[2017] 寡核苷酸
[2018] <220>
[2019] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2020] 寡核苷酸
[2021] <400> 172
[2022] tuguagaaag gcaugaagct u 21
[2023] <210> 173
[2024] <211> 21
[2025] <212> DNA
[2026] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2027] <220>

[2028] <223> 人工序列的描述:合成

[2029] 寡核苷酸

[2030] <220>

[2031] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2032] 寡核苷酸

[2033] <400> 173

[2034] tcuguagaaa ggcaugaagt u 21

[2035] <210> 174

[2036] <211> 21

[2037] <212> DNA

[2038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2039] <220>

[2040] <223> 人工序列的描述:合成

[2041] 寡核苷酸

[2042] <220>

[2043] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2044] 寡核苷酸

[2045] <400> 174

[2046] tacuguagaa aggcaugaat u 21

[2047] <210> 175

[2048] <211> 21

[2049] <212> DNA

[2050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2051] <220>

[2052] <223> 人工序列的描述:合成

[2053] 寡核苷酸

[2054] <220>

[2055] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2056] 寡核苷酸

[2057] <400> 175

[2058] tcacuguaga aaggcaugat u 21

[2059] <210> 176

[2060] <211> 21

[2061] <212> DNA

[2062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2063] <220>

[2064] <223> 人工序列的描述:合成

[2065] 寡核苷酸

[2066] <220>

[2067] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2068] 寡核苷酸

[2069] <400> 176

[2070] tccacuguag aaaggcaugt u 21

[2071] <210> 177

[2072] <211> 21

[2073] <212> DNA

[2074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2075] <220>

[2076] <223> 人工序列的描述:合成

[2077] 寡核苷酸

[2078] <220>

[2079] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2080] 寡核苷酸

[2081] <400> 177

[2082] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2083] <210> 178

[2084] <211> 21

[2085] <212> DNA

[2086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2087] <220>

[2088] <223> 人工序列的描述:合成

[2089] 寡核苷酸

[2090] <220>

[2091] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2092] 寡核苷酸

[2093] <400> 178

[2094] tggccacugu agaaaggcat u 21

[2095] <210> 179

[2096] <211> 21

[2097] <212> DNA

[2098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2099] <220>

[2100] <223> 人工序列的描述:合成

[2101] 寡核苷酸

[2102] <220>

[2103] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2104] 寡核苷酸

[2105] <400> 179

[2106] taggccacug uagaaaggct u 21
[2107] <210> 180
[2108] <211> 21
[2109] <212> DNA
[2110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2111] <220>
[2112] <223> 人工序列的描述:合成
[2113] 寡核苷酸
[2114] <220>
[2115] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2116] 寡核苷酸
[2117] <400> 180
[2118] taaggccacu guagaaaggt u 21
[2119] <210> 181
[2120] <211> 21
[2121] <212> DNA
[2122] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2123] <220>
[2124] <223> 人工序列的描述:合成
[2125] 寡核苷酸
[2126] <220>
[2127] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2128] 寡核苷酸
[2129] <400> 181
[2130] tuaaggccac uguagaaagt u 21
[2131] <210> 182
[2132] <211> 21
[2133] <212> DNA
[2134] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2135] <220>
[2136] <223> 人工序列的描述:合成
[2137] 寡核苷酸
[2138] <220>
[2139] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2140] 寡核苷酸
[2141] <400> 182
[2142] tauaaggcca cuguagaaat u 21
[2143] <210> 183
[2144] <211> 23

[2145] <212> DNA
[2146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2147] <220>
[2148] <223> 人工序列的描述:合成
[2149] 寡核苷酸
[2150] <220>
[2151] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2152] 寡核苷酸
[2153] <400> 183
[2154] tcaugaagca ggaacauacc atu 23
[2155] <210> 184
[2156] <211> 23
[2157] <212> DNA
[2158] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2159] <220>
[2160] <223> 人工序列的描述:合成
[2161] 寡核苷酸
[2162] <220>
[2163] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2164] 寡核苷酸
[2165] <400> 184
[2166] tgcaugaagc aggaacauac ctu 23
[2167] <210> 185
[2168] <211> 23
[2169] <212> DNA
[2170] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2171] <220>
[2172] <223> 人工序列的描述:合成
[2173] 寡核苷酸
[2174] <220>
[2175] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2176] 寡核苷酸
[2177] <400> 185
[2178] tggcaugaag caggaacaua ctu 23
[2179] <210> 186
[2180] <211> 23
[2181] <212> DNA
[2182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2183] <220>

[2184] <223> 人工序列的描述:合成

[2185] 寡核苷酸

[2186] <220>

[2187] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2188] 寡核苷酸

[2189] <400> 186

[2190] taggcaugaa gcaggaacau atu 23

[2191] <210> 187

[2192] <211> 23

[2193] <212> DNA

[2194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2195] <220>

[2196] <223> 人工序列的描述:合成

[2197] 寡核苷酸

[2198] <220>

[2199] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2200] 寡核苷酸

[2201] <400> 187

[2202] taaggcauga agcaggaaca utu 23

[2203] <210> 188

[2204] <211> 23

[2205] <212> DNA

[2206] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2207] <220>

[2208] <223> 人工序列的描述:合成

[2209] 寡核苷酸

[2210] <220>

[2211] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2212] 寡核苷酸

[2213] <400> 188

[2214] taaaggcaug aagcaggaac atu 23

[2215] <210> 189

[2216] <211> 23

[2217] <212> DNA

[2218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2219] <220>

[2220] <223> 人工序列的描述:合成

[2221] 寡核苷酸

[2222] <220>

[2223] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2224] 寡核苷酸

[2225] <400> 189

[2226] tgaaaggcau gaagcaggaa ctu 23

[2227] <210> 190

[2228] <211> 23

[2229] <212> DNA

[2230] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2231] <220>

[2232] <223> 人工序列的描述:合成

[2233] 寡核苷酸

[2234] <220>

[2235] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2236] 寡核苷酸

[2237] <400> 190

[2238] tagaaaggca ugaagcagga atu 23

[2239] <210> 191

[2240] <211> 23

[2241] <212> DNA

[2242] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2243] <220>

[2244] <223> 人工序列的描述:合成

[2245] 寡核苷酸

[2246] <220>

[2247] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2248] 寡核苷酸

[2249] <400> 191

[2250] tuagaaaggc augaagcagg atu 23

[2251] <210> 192

[2252] <211> 23

[2253] <212> DNA

[2254] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2255] <220>

[2256] <223> 人工序列的描述:合成

[2257] 寡核苷酸

[2258] <220>

[2259] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2260] 寡核苷酸

[2261] <400> 192

[2262] tguagaaagg caugaagcag gtu 23
[2263] <210> 193
[2264] <211> 23
[2265] <212> DNA
[2266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2267] <220>
[2268] <223> 人工序列的描述:合成
[2269] 寡核苷酸
[2270] <220>
[2271] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2272] 寡核苷酸
[2273] <400> 193
[2274] tuguagaaag gcaugaagca gtu 23
[2275] <210> 194
[2276] <211> 23
[2277] <212> DNA
[2278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2279] <220>
[2280] <223> 人工序列的描述:合成
[2281] 寡核苷酸
[2282] <220>
[2283] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2284] 寡核苷酸
[2285] <400> 194
[2286] tcuguagaaa ggcaugaagc atu 23
[2287] <210> 195
[2288] <211> 23
[2289] <212> DNA
[2290] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2291] <220>
[2292] <223> 人工序列的描述:合成
[2293] 寡核苷酸
[2294] <220>
[2295] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2296] 寡核苷酸
[2297] <400> 195
[2298] tacuguagaa aggcaugaag ctu 23
[2299] <210> 196
[2300] <211> 23

[2301] <212> DNA
[2302] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2303] <220>
[2304] <223> 人工序列的描述:合成
[2305] 寡核苷酸
[2306] <220>
[2307] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2308] 寡核苷酸
[2309] <400> 196
[2310] tcacuguaga aaggcaugaa gtu 23
[2311] <210> 197
[2312] <211> 23
[2313] <212> DNA
[2314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2315] <220>
[2316] <223> 人工序列的描述:合成
[2317] 寡核苷酸
[2318] <220>
[2319] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2320] 寡核苷酸
[2321] <400> 197
[2322] tccacuguag aaaggcauga atu 23
[2323] <210> 198
[2324] <211> 23
[2325] <212> DNA
[2326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2327] <220>
[2328] <223> 人工序列的描述:合成
[2329] 寡核苷酸
[2330] <220>
[2331] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2332] 寡核苷酸
[2333] <400> 198
[2334] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2335] <210> 199
[2336] <211> 23
[2337] <212> DNA
[2338] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2339] <220>

[2340] <223> 人工序列的描述:合成

[2341] 寡核苷酸

[2342] <220>

[2343] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2344] 寡核苷酸

[2345] <400> 199

[2346] tggccacugu agaaaggcau gtu 23

[2347] <210> 200

[2348] <211> 23

[2349] <212> DNA

[2350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2351] <220>

[2352] <223> 人工序列的描述:合成

[2353] 寡核苷酸

[2354] <220>

[2355] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2356] 寡核苷酸

[2357] <400> 200

[2358] taggccacug uagaaaggca utu 23

[2359] <210> 201

[2360] <211> 23

[2361] <212> DNA

[2362] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2363] <220>

[2364] <223> 人工序列的描述:合成

[2365] 寡核苷酸

[2366] <220>

[2367] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2368] 寡核苷酸

[2369] <400> 201

[2370] taaggccacu guagaaaggc atu 23

[2371] <210> 202

[2372] <211> 23

[2373] <212> DNA

[2374] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2375] <220>

[2376] <223> 人工序列的描述:合成

[2377] 寡核苷酸

[2378] <220>

[2379] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2380] 寡核苷酸

[2381] <400> 202

[2382] tuaaggccac uguagaaagg ctu 23

[2383] <210> 203

[2384] <211> 23

[2385] <212> DNA

[2386] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2387] <220>

[2388] <223> 人工序列的描述:合成

[2389] 寡核苷酸

[2390] <220>

[2391] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2392] 寡核苷酸

[2393] <400> 203

[2394] tauaaggcca cuguagaaag gtu 23

[2395] <210> 204

[2396] <211> 23

[2397] <212> DNA

[2398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2399] <220>

[2400] <223> 人工序列的描述:合成

[2401] 寡核苷酸

[2402] <220>

[2403] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2404] 寡核苷酸

[2405] <400> 204

[2406] tgauaaggcc acuguagaaa gtu 23

[2407] <210> 205

[2408] <211> 23

[2409] <212> DNA

[2410] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2411] <220>

[2412] <223> 人工序列的描述:合成

[2413] 寡核苷酸

[2414] <220>

[2415] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2416] 寡核苷酸

[2417] <400> 205

[2418] tggauaaggc cacuguagaa atu 23
[2419] <210> 206
[2420] <211> 23
[2421] <212> DNA
[2422] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2423] <220>
[2424] <223> 人工序列的描述:合成
[2425] 寡核苷酸
[2426] <220>
[2427] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2428] 寡核苷酸
[2429] <400> 206
[2430] tcaugaagca ggaacauacc atu 23
[2431] <210> 207
[2432] <211> 23
[2433] <212> DNA
[2434] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2435] <220>
[2436] <223> 人工序列的描述:合成
[2437] 寡核苷酸
[2438] <220>
[2439] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2440] 寡核苷酸
[2441] <400> 207
[2442] tgcaugaagc aggaacauac ctu 23
[2443] <210> 208
[2444] <211> 23
[2445] <212> DNA
[2446] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2447] <220>
[2448] <223> 人工序列的描述:合成
[2449] 寡核苷酸
[2450] <220>
[2451] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2452] 寡核苷酸
[2453] <400> 208
[2454] tggcaugaag caggaacaua ctu 23
[2455] <210> 209
[2456] <211> 23

[2457] <212> DNA
[2458] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2459] <220>
[2460] <223> 人工序列的描述:合成
[2461] 寡核苷酸
[2462] <220>
[2463] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2464] 寡核苷酸
[2465] <400> 209
[2466] taggcaugaa gcaggaacau atu 23
[2467] <210> 210
[2468] <211> 23
[2469] <212> DNA
[2470] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2471] <220>
[2472] <223> 人工序列的描述:合成
[2473] 寡核苷酸
[2474] <220>
[2475] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2476] 寡核苷酸
[2477] <400> 210
[2478] taaggcauga agcaggaaca utu 23
[2479] <210> 211
[2480] <211> 23
[2481] <212> DNA
[2482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2483] <220>
[2484] <223> 人工序列的描述:合成
[2485] 寡核苷酸
[2486] <220>
[2487] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2488] 寡核苷酸
[2489] <400> 211
[2490] taaaggcaug aagcaggaac atu 23
[2491] <210> 212
[2492] <211> 23
[2493] <212> DNA
[2494] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2495] <220>

[2496] <223> 人工序列的描述:合成

[2497] 寡核苷酸

[2498] <220>

[2499] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2500] 寡核苷酸

[2501] <400> 212

[2502] tgaaaggcau gaagcaggaa ctu 23

[2503] <210> 213

[2504] <211> 23

[2505] <212> DNA

[2506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2507] <220>

[2508] <223> 人工序列的描述:合成

[2509] 寡核苷酸

[2510] <220>

[2511] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2512] 寡核苷酸

[2513] <400> 213

[2514] tagaaaggca ugaagcagga atu 23

[2515] <210> 214

[2516] <211> 23

[2517] <212> DNA

[2518] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2519] <220>

[2520] <223> 人工序列的描述:合成

[2521] 寡核苷酸

[2522] <220>

[2523] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2524] 寡核苷酸

[2525] <400> 214

[2526] tuagaaaggc augaagcagg atu 23

[2527] <210> 215

[2528] <211> 23

[2529] <212> DNA

[2530] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2531] <220>

[2532] <223> 人工序列的描述:合成

[2533] 寡核苷酸

[2534] <220>

[2535] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2536] 寡核苷酸

[2537] <400> 215

[2538] tguagaaagg caugaagcag gtu 23

[2539] <210> 216

[2540] <211> 23

[2541] <212> DNA

[2542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2543] <220>

[2544] <223> 人工序列的描述:合成

[2545] 寡核苷酸

[2546] <220>

[2547] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2548] 寡核苷酸

[2549] <400> 216

[2550] tuguagaaag gcaugaagca gtu 23

[2551] <210> 217

[2552] <211> 23

[2553] <212> DNA

[2554] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2555] <220>

[2556] <223> 人工序列的描述:合成

[2557] 寡核苷酸

[2558] <220>

[2559] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2560] 寡核苷酸

[2561] <400> 217

[2562] tcuguagaaa ggcaugaagc atu 23

[2563] <210> 218

[2564] <211> 23

[2565] <212> DNA

[2566] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2567] <220>

[2568] <223> 人工序列的描述:合成

[2569] 寡核苷酸

[2570] <220>

[2571] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2572] 寡核苷酸

[2573] <400> 218

[2574] tacuguagaa aggcaugaag ctu 23
[2575] <210> 219
[2576] <211> 23
[2577] <212> DNA
[2578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2579] <220>
[2580] <223> 人工序列的描述:合成
[2581] 寡核苷酸
[2582] <220>
[2583] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2584] 寡核苷酸
[2585] <400> 219
[2586] tcacuguaga aaggcaugaa gtu 23
[2587] <210> 220
[2588] <211> 23
[2589] <212> DNA
[2590] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2591] <220>
[2592] <223> 人工序列的描述:合成
[2593] 寡核苷酸
[2594] <220>
[2595] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2596] 寡核苷酸
[2597] <400> 220
[2598] tccacuguag aaaggcauga atu 23
[2599] <210> 221
[2600] <211> 23
[2601] <212> DNA
[2602] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2603] <220>
[2604] <223> 人工序列的描述:合成
[2605] 寡核苷酸
[2606] <220>
[2607] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2608] 寡核苷酸
[2609] <400> 221
[2610] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2611] <210> 222
[2612] <211> 23

[2613] <212> DNA
[2614] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2615] <220>
[2616] <223> 人工序列的描述:合成
[2617] 寡核苷酸
[2618] <220>
[2619] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2620] 寡核苷酸
[2621] <400> 222
[2622] tggccacugu agaaaggcau gtu 23
[2623] <210> 223
[2624] <211> 23
[2625] <212> DNA
[2626] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2627] <220>
[2628] <223> 人工序列的描述:合成
[2629] 寡核苷酸
[2630] <220>
[2631] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2632] 寡核苷酸
[2633] <400> 223
[2634] taggccacug uagaaaggca utu 23
[2635] <210> 224
[2636] <211> 23
[2637] <212> DNA
[2638] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2639] <220>
[2640] <223> 人工序列的描述:合成
[2641] 寡核苷酸
[2642] <220>
[2643] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2644] 寡核苷酸
[2645] <400> 224
[2646] taaggccacu guagaaaggc atu 23
[2647] <210> 225
[2648] <211> 23
[2649] <212> DNA
[2650] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2651] <220>

[2652] <223> 人工序列的描述:合成

[2653] 寡核苷酸

[2654] <220>

[2655] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2656] 寡核苷酸

[2657] <400> 225

[2658] tuaaggccac uguagaaagg ctu 23

[2659] <210> 226

[2660] <211> 23

[2661] <212> DNA

[2662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2663] <220>

[2664] <223> 人工序列的描述:合成

[2665] 寡核苷酸

[2666] <220>

[2667] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2668] 寡核苷酸

[2669] <400> 226

[2670] tauaaggcca cuguagaaag gtu 23

[2671] <210> 227

[2672] <211> 23

[2673] <212> DNA

[2674] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2675] <220>

[2676] <223> 人工序列的描述:合成

[2677] 寡核苷酸

[2678] <220>

[2679] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2680] 寡核苷酸

[2681] <400> 227

[2682] tgauaaggcc acuguagaaa gtu 23

[2683] <210> 228

[2684] <211> 23

[2685] <212> DNA

[2686] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2687] <220>

[2688] <223> 人工序列的描述:合成

[2689] 寡核苷酸

[2690] <220>

[2691] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2692] 寡核苷酸
[2693] <400> 228
[2694] tggauaaggc cacuguagaa atu 23
[2695] <210> 229
[2696] <211> 23
[2697] <212> DNA
[2698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2699] <220>
[2700] <223> 人工序列的描述:合成
[2701] 寡核苷酸
[2702] <220>
[2703] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2704] 寡核苷酸
[2705] <400> 229
[2706] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2707] <210> 230
[2708] <211> 23
[2709] <212> DNA
[2710] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2711] <220>
[2712] <223> 人工序列的描述:合成
[2713] 寡核苷酸
[2714] <220>
[2715] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2716] 寡核苷酸
[2717] <400> 230
[2718] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2719] <210> 231
[2720] <211> 23
[2721] <212> DNA
[2722] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2723] <220>
[2724] <223> 人工序列的描述:合成
[2725] 寡核苷酸
[2726] <220>
[2727] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2728] 寡核苷酸
[2729] <400> 231

[2730] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2731] <210> 232
[2732] <211> 23
[2733] <212> DNA
[2734] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2735] <220>
[2736] <223> 人工序列的描述:合成
[2737] 寡核苷酸
[2738] <220>
[2739] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2740] 寡核苷酸
[2741] <400> 232
[2742] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2743] <210> 233
[2744] <211> 23
[2745] <212> DNA
[2746] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2747] <220>
[2748] <223> 人工序列的描述:合成
[2749] 寡核苷酸
[2750] <220>
[2751] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2752] 寡核苷酸
[2753] <400> 233
[2754] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2755] <210> 234
[2756] <211> 23
[2757] <212> DNA
[2758] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2759] <220>
[2760] <223> 人工序列的描述:合成
[2761] 寡核苷酸
[2762] <220>
[2763] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2764] 寡核苷酸
[2765] <400> 234
[2766] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2767] <210> 235
[2768] <211> 23

[2769] <212> DNA
[2770] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2771] <220>
[2772] <223> 人工序列的描述:合成
[2773] 寡核苷酸
[2774] <220>
[2775] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2776] 寡核苷酸
[2777] <400> 235
[2778] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2779] <210> 236
[2780] <211> 23
[2781] <212> DNA
[2782] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2783] <220>
[2784] <223> 人工序列的描述:合成
[2785] 寡核苷酸
[2786] <220>
[2787] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2788] 寡核苷酸
[2789] <400> 236
[2790] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2791] <210> 237
[2792] <211> 23
[2793] <212> DNA
[2794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2795] <220>
[2796] <223> 人工序列的描述:合成
[2797] 寡核苷酸
[2798] <220>
[2799] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2800] 寡核苷酸
[2801] <400> 237
[2802] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[2803] <210> 238
[2804] <211> 23
[2805] <212> DNA
[2806] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2807] <220>

[2808] <223> 人工序列的描述:合成

[2809] 寡核苷酸

[2810] <220>

[2811] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2812] 寡核苷酸

[2813] <400> 238

[2814] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[2815] <210> 239

[2816] <211> 21

[2817] <212> DNA

[2818] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2819] <220>

[2820] <223> 人工序列的描述:合成

[2821] 寡核苷酸

[2822] <220>

[2823] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2824] 寡核苷酸

[2825] <400> 239

[2826] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2827] <210> 240

[2828] <211> 21

[2829] <212> DNA

[2830] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2831] <220>

[2832] <223> 人工序列的描述:合成

[2833] 寡核苷酸

[2834] <220>

[2835] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2836] 寡核苷酸

[2837] <400> 240

[2838] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2839] <210> 241

[2840] <211> 21

[2841] <212> DNA

[2842] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2843] <220>

[2844] <223> 人工序列的描述:合成

[2845] 寡核苷酸

[2846] <220>

[2847] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2848] 寡核苷酸

[2849] <400> 241

[2850] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2851] <210> 242

[2852] <211> 21

[2853] <212> DNA

[2854] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2855] <220>

[2856] <223> 人工序列的描述:合成

[2857] 寡核苷酸

[2858] <220>

[2859] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2860] 寡核苷酸

[2861] <400> 242

[2862] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2863] <210> 243

[2864] <211> 21

[2865] <212> DNA

[2866] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2867] <220>

[2868] <223> 人工序列的描述:合成

[2869] 寡核苷酸

[2870] <220>

[2871] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2872] 寡核苷酸

[2873] <400> 243

[2874] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2875] <210> 244

[2876] <211> 21

[2877] <212> DNA

[2878] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2879] <220>

[2880] <223> 人工序列的描述:合成

[2881] 寡核苷酸

[2882] <220>

[2883] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2884] 寡核苷酸

[2885] <400> 244

[2886] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2887] <210> 245

[2888] <211> 21

[2889] <212> DNA

[2890] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2891] <220>

[2892] <223> 人工序列的描述:合成

[2893] 寡核苷酸

[2894] <220>

[2895] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2896] 寡核苷酸

[2897] <400> 245

[2898] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2899] <210> 246

[2900] <211> 21

[2901] <212> DNA

[2902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2903] <220>

[2904] <223> 人工序列的描述:合成

[2905] 寡核苷酸

[2906] <220>

[2907] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2908] 寡核苷酸

[2909] <400> 246

[2910] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2911] <210> 247

[2912] <211> 21

[2913] <212> DNA

[2914] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2915] <220>

[2916] <223> 人工序列的描述:合成

[2917] 寡核苷酸

[2918] <220>

[2919] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2920] 寡核苷酸

[2921] <400> 247

[2922] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[2923] <210> 248

[2924] <211> 21

[2925] <212> DNA
[2926] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2927] <220>
[2928] <223> 人工序列的描述:合成
[2929] 寡核苷酸
[2930] <220>
[2931] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2932] 寡核苷酸
[2933] <400> 248
[2934] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[2935] <210> 249
[2936] <211> 21
[2937] <212> DNA
[2938] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2939] <220>
[2940] <223> 人工序列的描述:合成
[2941] 寡核苷酸
[2942] <220>
[2943] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2944] 寡核苷酸
[2945] <400> 249
[2946] taggcaugaa gcaggaacat u 21
[2947] <210> 250
[2948] <211> 23
[2949] <212> DNA
[2950] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2951] <220>
[2952] <223> 人工序列的描述:合成
[2953] 寡核苷酸
[2954] <220>
[2955] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[2956] 寡核苷酸
[2957] <400> 250
[2958] taggcaugaa gcaggaacau atu 23
[2959] <210> 251
[2960] <211> 23
[2961] <212> DNA
[2962] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2963] <220>

[2964] <223> 人工序列的描述:合成

[2965] 寡核苷酸

[2966] <220>

[2967] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2968] 寡核苷酸

[2969] <400> 251

[2970] tccugaggau ggaccgcggg gtu 23

[2971] <210> 252

[2972] <211> 23

[2973] <212> DNA

[2974] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2975] <220>

[2976] <223> 人工序列的描述:合成

[2977] 寡核苷酸

[2978] <220>

[2979] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2980] 寡核苷酸

[2981] <400> 252

[2982] tgugcuuggc uccugccugg gtu 23

[2983] <210> 253

[2984] <211> 23

[2985] <212> DNA

[2986] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2987] <220>

[2988] <223> 人工序列的描述:合成

[2989] 寡核苷酸

[2990] <220>

[2991] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[2992] 寡核苷酸

[2993] <400> 253

[2994] tcuuguuacc cccgccaugg atu 23

[2995] <210> 254

[2996] <211> 23

[2997] <212> DNA

[2998] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2999] <220>

[3000] <223> 人工序列的描述:合成

[3001] 寡核苷酸

[3002] <220>

[3003] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3004] 寡核苷酸

[3005] <400> 254

[3006] tuacccccgc cauggagacg utu 23

[3007] <210> 255

[3008] <211> 23

[3009] <212> DNA

[3010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3011] <220>

[3012] <223> 人工序列的描述:合成

[3013] 寡核苷酸

[3014] <220>

[3015] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3016] 寡核苷酸

[3017] <400> 255

[3018] tcccccgcca uggagacguu utu 23

[3019] <210> 256

[3020] <211> 23

[3021] <212> DNA

[3022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3023] <220>

[3024] <223> 人工序列的描述:合成

[3025] 寡核苷酸

[3026] <220>

[3027] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3028] 寡核苷酸

[3029] <400> 256

[3030] taccugagga uggaccgcgg gtu 23

[3031] <210> 257

[3032] <211> 23

[3033] <212> DNA

[3034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3035] <220>

[3036] <223> 人工序列的描述:合成

[3037] 寡核苷酸

[3038] <220>

[3039] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3040] 寡核苷酸

[3041] <400> 257

[3042] tgaccugagg auggaccgcg gtu 23

[3043] <210> 258

[3044] <211> 23

[3045] <212> DNA

[3046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3047] <220>

[3048] <223> 人工序列的描述:合成

[3049] 寡核苷酸

[3050] <220>

[3051] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3052] 寡核苷酸

[3053] <400> 258

[3054] taccccgcc auggagacgu utu 23

[3055] <210> 259

[3056] <211> 23

[3057] <212> DNA

[3058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3059] <220>

[3060] <223> 人工序列的描述:合成

[3061] 寡核苷酸

[3062] <220>

[3063] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3064] 寡核苷酸

[3065] <400> 259

[3066] tggacccucu gcacugggcu utu 23

[3067] <210> 260

[3068] <211> 23

[3069] <212> DNA

[3070] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3071] <220>

[3072] <223> 人工序列的描述:合成

[3073] 寡核苷酸

[3074] <220>

[3075] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3076] 寡核苷酸

[3077] <400> 260

[3078] tcugcuggac agcccuuggg gtu 23

[3079] <210> 261

[3080] <211> 23

[3081] <212> DNA
[3082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3083] <220>
[3084] <223> 人工序列的描述:合成
[3085] 寡核苷酸
[3086] <220>
[3087] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3088] 寡核苷酸
[3089] <400> 261
[3090] tugcacuggg cuuccuggug utu 23
[3091] <210> 262
[3092] <211> 23
[3093] <212> DNA
[3094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3095] <220>
[3096] <223> 人工序列的描述:合成
[3097] 寡核苷酸
[3098] <220>
[3099] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3100] 寡核苷酸
[3101] <400> 262
[3102] tggaccugag gauggaccgc gtu 23
[3103] <210> 263
[3104] <211> 23
[3105] <212> DNA
[3106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3107] <220>
[3108] <223> 人工序列的描述:合成
[3109] 寡核苷酸
[3110] <220>
[3111] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3112] 寡核苷酸
[3113] <400> 263
[3114] tgggacccuc ugcacugggc utu 23
[3115] <210> 264
[3116] <211> 23
[3117] <212> DNA
[3118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3119] <220>

[3120] <223> 人工序列的描述:合成

[3121] 寡核苷酸

[3122] <220>

[3123] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3124] 寡核苷酸

[3125] <400> 264

[3126] tuuguuaccc ccgccaugga gtu 23

[3127] <210> 265

[3128] <211> 23

[3129] <212> DNA

[3130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3131] <220>

[3132] <223> 人工序列的描述:合成

[3133] 寡核苷酸

[3134] <220>

[3135] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3136] 寡核苷酸

[3137] <400> 265

[3138] tccugugagg ucacccacug ctu 23

[3139] <210> 266

[3140] <211> 23

[3141] <212> DNA

[3142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3143] <220>

[3144] <223> 人工序列的描述:合成

[3145] 寡核苷酸

[3146] <220>

[3147] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3148] 寡核苷酸

[3149] <400> 266

[3150] tucugcugga cagcccuugg gtu 23

[3151] <210> 267

[3152] <211> 23

[3153] <212> DNA

[3154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3155] <220>

[3156] <223> 人工序列的描述:合成

[3157] 寡核苷酸

[3158] <220>

[3159] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3160] 寡核苷酸

[3161] <400> 267

[3162] tugcuccagc gggauaccgg atu 23

[3163] <210> 268

[3164] <211> 23

[3165] <212> DNA

[3166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3167] <220>

[3168] <223> 人工序列的描述:合成

[3169] 寡核苷酸

[3170] <220>

[3171] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3172] 寡核苷酸

[3173] <400> 268

[3174] tggcugggau ccuccacguc atu 23

[3175] <210> 269

[3176] <211> 23

[3177] <212> DNA

[3178] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3179] <220>

[3180] <223> 人工序列的描述:合成

[3181] 寡核苷酸

[3182] <220>

[3183] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3184] 寡核苷酸

[3185] <400> 269

[3186] tucuuguuac ccccgccaug gtu 23

[3187] <210> 270

[3188] <211> 23

[3189] <212> DNA

[3190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3191] <220>

[3192] <223> 人工序列的描述:合成

[3193] 寡核苷酸

[3194] <220>

[3195] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3196] 寡核苷酸

[3197] <400> 270

[3198] tagggacccu cugcacuggg ctu 23

[3199] <210> 271

[3200] <211> 23

[3201] <212> DNA

[3202] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3203] <220>

[3204] <223> 人工序列的描述:合成

[3205] 寡核苷酸

[3206] <220>

[3207] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3208] 寡核苷酸

[3209] <400> 271

[3210] tcuguuggcu gcucacuggc atu 23

[3211] <210> 272

[3212] <211> 23

[3213] <212> DNA

[3214] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3215] <220>

[3216] <223> 人工序列的描述:合成

[3217] 寡核苷酸

[3218] <220>

[3219] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3220] 寡核苷酸

[3221] <400> 272

[3222] tccugaggau ggaccgcggg gtu 23

[3223] <210> 273

[3224] <211> 23

[3225] <212> DNA

[3226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3227] <220>

[3228] <223> 人工序列的描述:合成

[3229] 寡核苷酸

[3230] <220>

[3231] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3232] 寡核苷酸

[3233] <400> 273

[3234] tgugcuuggc uccugccugg gtu 23

[3235] <210> 274

[3236] <211> 23

[3237] <212> DNA
[3238] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3239] <220>
[3240] <223> 人工序列的描述:合成
[3241] 寡核苷酸
[3242] <220>
[3243] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3244] 寡核苷酸
[3245] <400> 274
[3246] tcuuguuacc cccgccaugg atu 23
[3247] <210> 275
[3248] <211> 23
[3249] <212> DNA
[3250] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3251] <220>
[3252] <223> 人工序列的描述:合成
[3253] 寡核苷酸
[3254] <220>
[3255] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3256] 寡核苷酸
[3257] <400> 275
[3258] tuacccccgc cauggagacg utu 23
[3259] <210> 276
[3260] <211> 23
[3261] <212> DNA
[3262] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3263] <220>
[3264] <223> 人工序列的描述:合成
[3265] 寡核苷酸
[3266] <220>
[3267] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3268] 寡核苷酸
[3269] <400> 276
[3270] tcccccgcca uggagacguu utu 23
[3271] <210> 277
[3272] <211> 23
[3273] <212> DNA
[3274] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3275] <220>

[3276] <223> 人工序列的描述:合成

[3277] 寡核苷酸

[3278] <220>

[3279] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3280] 寡核苷酸

[3281] <400> 277

[3282] taccugagga uggaccgcgg gtu 23

[3283] <210> 278

[3284] <211> 23

[3285] <212> DNA

[3286] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3287] <220>

[3288] <223> 人工序列的描述:合成

[3289] 寡核苷酸

[3290] <220>

[3291] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3292] 寡核苷酸

[3293] <400> 278

[3294] tgaccugagg auggaccgcg gtu 23

[3295] <210> 279

[3296] <211> 23

[3297] <212> DNA

[3298] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3299] <220>

[3300] <223> 人工序列的描述:合成

[3301] 寡核苷酸

[3302] <220>

[3303] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3304] 寡核苷酸

[3305] <400> 279

[3306] tacccccgcc auggagacgu utu 23

[3307] <210> 280

[3308] <211> 23

[3309] <212> DNA

[3310] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3311] <220>

[3312] <223> 人工序列的描述:合成

[3313] 寡核苷酸

[3314] <220>

[3315] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3316] 寡核苷酸

[3317] <400> 280

[3318] tggacccucu gcacugggcu utu 23

[3319] <210> 281

[3320] <211> 23

[3321] <212> DNA

[3322] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3323] <220>

[3324] <223> 人工序列的描述:合成

[3325] 寡核苷酸

[3326] <220>

[3327] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3328] 寡核苷酸

[3329] <400> 281

[3330] tcugcuggac agcccuuggg gtu 23

[3331] <210> 282

[3332] <211> 23

[3333] <212> DNA

[3334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3335] <220>

[3336] <223> 人工序列的描述:合成

[3337] 寡核苷酸

[3338] <220>

[3339] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3340] 寡核苷酸

[3341] <400> 282

[3342] tugcacuggg cuuccuggug utu 23

[3343] <210> 283

[3344] <211> 23

[3345] <212> DNA

[3346] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3347] <220>

[3348] <223> 人工序列的描述:合成

[3349] 寡核苷酸

[3350] <220>

[3351] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3352] 寡核苷酸

[3353] <400> 283

[3354] tggaccugag gauggaccgc gtu 23
[3355] <210> 284
[3356] <211> 23
[3357] <212> DNA
[3358] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3359] <220>
[3360] <223> 人工序列的描述:合成
[3361] 寡核苷酸
[3362] <220>
[3363] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3364] 寡核苷酸
[3365] <400> 284
[3366] tgggacccuc ugcacugggc utu 23
[3367] <210> 285
[3368] <211> 23
[3369] <212> DNA
[3370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3371] <220>
[3372] <223> 人工序列的描述:合成
[3373] 寡核苷酸
[3374] <220>
[3375] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3376] 寡核苷酸
[3377] <400> 285
[3378] tuuguuaccc ccgccaugga gtu 23
[3379] <210> 286
[3380] <211> 23
[3381] <212> DNA
[3382] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3383] <220>
[3384] <223> 人工序列的描述:合成
[3385] 寡核苷酸
[3386] <220>
[3387] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3388] 寡核苷酸
[3389] <400> 286
[3390] tccugugagg ucacccacug ctu 23
[3391] <210> 287
[3392] <211> 23

[3393] <212> DNA
[3394] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3395] <220>
[3396] <223> 人工序列的描述:合成
[3397] 寡核苷酸
[3398] <220>
[3399] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3400] 寡核苷酸
[3401] <400> 287
[3402] tucugcugga cagcccuugg gtu 23
[3403] <210> 288
[3404] <211> 23
[3405] <212> DNA
[3406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3407] <220>
[3408] <223> 人工序列的描述:合成
[3409] 寡核苷酸
[3410] <220>
[3411] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3412] 寡核苷酸
[3413] <400> 288
[3414] tugcuccagc gggauaccgg atu 23
[3415] <210> 289
[3416] <211> 23
[3417] <212> DNA
[3418] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3419] <220>
[3420] <223> 人工序列的描述:合成
[3421] 寡核苷酸
[3422] <220>
[3423] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3424] 寡核苷酸
[3425] <400> 289
[3426] tggcugggau ccuccacguc atu 23
[3427] <210> 290
[3428] <211> 23
[3429] <212> DNA
[3430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3431] <220>

[3432] <223> 人工序列的描述:合成

[3433] 寡核苷酸

[3434] <220>

[3435] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3436] 寡核苷酸

[3437] <400> 290

[3438] tucuuguuac ccccgccaug gtu 23

[3439] <210> 291

[3440] <211> 23

[3441] <212> DNA

[3442] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3443] <220>

[3444] <223> 人工序列的描述:合成

[3445] 寡核苷酸

[3446] <220>

[3447] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3448] 寡核苷酸

[3449] <400> 291

[3450] tagggacccu cugcacuggg ctu 23

[3451] <210> 292

[3452] <211> 23

[3453] <212> DNA

[3454] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3455] <220>

[3456] <223> 人工序列的描述:合成

[3457] 寡核苷酸

[3458] <220>

[3459] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3460] 寡核苷酸

[3461] <400> 292

[3462] tcuguuggcu gcucacuggc atu 23

[3463] <210> 293

[3464] <211> 27

[3465] <212> RNA

[3466] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3467] <220>

[3468] <223> 人工序列的描述:合成

[3469] 寡核苷酸

[3470] <400> 293

[3471] accccgcggu ccauccucag guccagc 27
[3472] <210> 294
[3473] <211> 27
[3474] <212> RNA
[3475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3476] <220>
[3477] <223> 人工序列的描述:合成
[3478] 寡核苷酸
[3479] <400> 294
[3480] augacaccag gaagcccagu gcagagg 27
[3481] <210> 295
[3482] <211> 27
[3483] <212> RNA
[3484] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3485] <220>
[3486] <223> 人工序列的描述:合成
[3487] 寡核苷酸
[3488] <400> 295
[3489] gaagcccagu gcagaggguc ccuuacu 27
[3490] <210> 296
[3491] <211> 27
[3492] <212> RNA
[3493] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3494] <220>
[3495] <223> 人工序列的描述:合成
[3496] 寡核苷酸
[3497] <400> 296
[3498] aacgucucca uggcgggggu aacaaga 27
[3499] <210> 297
[3500] <211> 23
[3501] <212> DNA
[3502] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3503] <220>
[3504] <223> 人工序列的描述:合成
[3505] 寡核苷酸
[3506] <220>
[3507] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3508] 寡核苷酸
[3509] <400> 297

[3510] tgccacugua gaaaggaaug atu 23
[3511] <210> 298
[3512] <211> 23
[3513] <212> DNA
[3514] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3515] <220>
[3516] <223> 人工序列的描述:合成
[3517] 寡核苷酸
[3518] <220>
[3519] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3520] 寡核苷酸
[3521] <400> 298
[3522] tgccacugua gaaagggaug atu 23
[3523] <210> 299
[3524] <211> 23
[3525] <212> DNA
[3526] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3527] <220>
[3528] <223> 人工序列的描述:合成
[3529] 寡核苷酸
[3530] <220>
[3531] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3532] 寡核苷酸
[3533] <400> 299
[3534] tgccacugua gaaagguaug atu 23
[3535] <210> 300
[3536] <211> 23
[3537] <212> DNA
[3538] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3539] <220>
[3540] <223> 人工序列的描述:合成
[3541] 寡核苷酸
[3542] <220>
[3543] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3544] 寡核苷酸
[3545] <400> 300
[3546] tgccacugua gaagggcaug atu 23
[3547] <210> 301
[3548] <211> 23

[3549] <212> DNA
[3550] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3551] <220>
[3552] <223> 人工序列的描述:合成
[3553] 寡核苷酸
[3554] <220>
[3555] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3556] 寡核苷酸
[3557] <400> 301
[3558] tgccacugua gaacggcaug atu 23
[3559] <210> 302
[3560] <211> 23
[3561] <212> DNA
[3562] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3563] <220>
[3564] <223> 人工序列的描述:合成
[3565] 寡核苷酸
[3566] <220>
[3567] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3568] 寡核苷酸
[3569] <400> 302
[3570] tgccacugua gaauggcaug atu 23
[3571] <210> 303
[3572] <211> 23
[3573] <212> DNA
[3574] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3575] <220>
[3576] <223> 人工序列的描述:合成
[3577] 寡核苷酸
[3578] <220>
[3579] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3580] 寡核苷酸
[3581] <400> 303
[3582] tgccacugua gaaggggaug atu 23
[3583] <210> 304
[3584] <211> 25
[3585] <212> DNA
[3586] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3587] <220>

[3588] <223> 人工序列的描述:合成

[3589] 寡核苷酸

[3590] <220>

[3591] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3592] 寡核苷酸

[3593] <400> 304

[3594] tgccacugua gaaaggcaug aagtu 25

[3595] <210> 305

[3596] <211> 24

[3597] <212> DNA

[3598] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3599] <220>

[3600] <223> 人工序列的描述:合成

[3601] 寡核苷酸

[3602] <220>

[3603] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3604] 寡核苷酸

[3605] <400> 305

[3606] tgccacugua gaaaggcaug aatu 24

[3607] <210> 306

[3608] <211> 22

[3609] <212> DNA

[3610] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3611] <220>

[3612] <223> 人工序列的描述:合成

[3613] 寡核苷酸

[3614] <220>

[3615] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3616] 寡核苷酸

[3617] <400> 306

[3618] tgccacugua gaaaggcaug tu 22

[3619] <210> 307

[3620] <211> 20

[3621] <212> DNA

[3622] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3623] <220>

[3624] <223> 人工序列的描述:合成

[3625] 寡核苷酸

[3626] <220>

[3627] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3628] 寡核苷酸

[3629] <400> 307

[3630] tgccacugua gaaaggcatu 20

[3631] <210> 308

[3632] <211> 19

[3633] <212> DNA

[3634] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3635] <220>

[3636] <223> 人工序列的描述:合成

[3637] 寡核苷酸

[3638] <220>

[3639] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3640] 寡核苷酸

[3641] <400> 308

[3642] tgccacugua gaaaggctu 19

[3643] <210> 309

[3644] <211> 20

[3645] <212> DNA

[3646] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3647] <220>

[3648] <223> 人工序列的描述:合成

[3649] 寡核苷酸

[3650] <220>

[3651] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3652] 寡核苷酸

[3653] <400> 309

[3654] tgccacugua gaaaggcagg 20

[3655] <210> 310

[3656] <211> 19

[3657] <212> DNA

[3658] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3659] <220>

[3660] <223> 人工序列的描述:合成

[3661] 寡核苷酸

[3662] <220>

[3663] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3664] 寡核苷酸

[3665] <400> 310

[3666] tgccacugua gaaaggcgg 19
[3667] <210> 311
[3668] <211> 23
[3669] <212> DNA
[3670] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3671] <220>
[3672] <223> 人工序列的描述:合成
[3673] 寡核苷酸
[3674] <220>
[3675] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3676] 寡核苷酸
[3677] <400> 311
[3678] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3679] <210> 312
[3680] <211> 23
[3681] <212> DNA
[3682] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3683] <220>
[3684] <223> 人工序列的描述:合成
[3685] 寡核苷酸
[3686] <220>
[3687] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3688] 寡核苷酸
[3689] <400> 312
[3690] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3691] <210> 313
[3692] <211> 23
[3693] <212> DNA
[3694] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3695] <220>
[3696] <223> 人工序列的描述:合成
[3697] 寡核苷酸
[3698] <220>
[3699] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3700] 寡核苷酸
[3701] <400> 313
[3702] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3703] <210> 314
[3704] <211> 23

[3705] <212> DNA
[3706] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3707] <220>
[3708] <223> 人工序列的描述:合成
[3709] 寡核苷酸
[3710] <220>
[3711] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3712] 寡核苷酸
[3713] <400> 314
[3714] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3715] <210> 315
[3716] <211> 23
[3717] <212> DNA
[3718] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3719] <220>
[3720] <223> 人工序列的描述:合成
[3721] 寡核苷酸
[3722] <220>
[3723] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3724] 寡核苷酸
[3725] <400> 315
[3726] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3727] <210> 316
[3728] <211> 23
[3729] <212> DNA
[3730] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3731] <220>
[3732] <223> 人工序列的描述:合成
[3733] 寡核苷酸
[3734] <220>
[3735] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3736] 寡核苷酸
[3737] <400> 316
[3738] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3739] <210> 317
[3740] <211> 23
[3741] <212> DNA
[3742] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3743] <220>

[3744] <223> 人工序列的描述:合成

[3745] 寡核苷酸

[3746] <220>

[3747] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3748] 寡核苷酸

[3749] <400> 317

[3750] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3751] <210> 318

[3752] <211> 23

[3753] <212> DNA

[3754] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3755] <220>

[3756] <223> 人工序列的描述:合成

[3757] 寡核苷酸

[3758] <220>

[3759] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3760] 寡核苷酸

[3761] <400> 318

[3762] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3763] <210> 319

[3764] <211> 23

[3765] <212> DNA

[3766] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3767] <220>

[3768] <223> 人工序列的描述:合成

[3769] 寡核苷酸

[3770] <220>

[3771] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3772] 寡核苷酸

[3773] <400> 319

[3774] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3775] <210> 320

[3776] <211> 23

[3777] <212> DNA

[3778] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3779] <220>

[3780] <223> 人工序列的描述:合成

[3781] 寡核苷酸

[3782] <220>

[3783] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3784] 寡核苷酸

[3785] <400> 320

[3786] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3787] <210> 321

[3788] <211> 23

[3789] <212> DNA

[3790] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3791] <220>

[3792] <223> 人工序列的描述:合成

[3793] 寡核苷酸

[3794] <220>

[3795] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3796] 寡核苷酸

[3797] <400> 321

[3798] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3799] <210> 322

[3800] <211> 23

[3801] <212> DNA

[3802] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3803] <220>

[3804] <223> 人工序列的描述:合成

[3805] 寡核苷酸

[3806] <220>

[3807] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3808] 寡核苷酸

[3809] <400> 322

[3810] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3811] <210> 323

[3812] <211> 23

[3813] <212> DNA

[3814] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3815] <220>

[3816] <223> 人工序列的描述:合成

[3817] 寡核苷酸

[3818] <220>

[3819] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3820] 寡核苷酸

[3821] <400> 323

[3822] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3823] <210> 324

[3824] <211> 23

[3825] <212> DNA

[3826] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3827] <220>

[3828] <223> 人工序列的描述:合成

[3829] 寡核苷酸

[3830] <220>

[3831] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3832] 寡核苷酸

[3833] <400> 324

[3834] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3835] <210> 325

[3836] <211> 23

[3837] <212> DNA

[3838] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3839] <220>

[3840] <223> 人工序列的描述:合成

[3841] 寡核苷酸

[3842] <220>

[3843] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3844] 寡核苷酸

[3845] <400> 325

[3846] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3847] <210> 326

[3848] <211> 23

[3849] <212> DNA

[3850] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3851] <220>

[3852] <223> 人工序列的描述:合成

[3853] 寡核苷酸

[3854] <220>

[3855] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3856] 寡核苷酸

[3857] <400> 326

[3858] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3859] <210> 327

[3860] <211> 23

[3861] <212> DNA
[3862] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3863] <220>
[3864] <223> 人工序列的描述:合成
[3865] 寡核苷酸
[3866] <220>
[3867] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3868] 寡核苷酸
[3869] <400> 327
[3870] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3871] <210> 328
[3872] <211> 23
[3873] <212> DNA
[3874] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3875] <220>
[3876] <223> 人工序列的描述:合成
[3877] 寡核苷酸
[3878] <220>
[3879] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3880] 寡核苷酸
[3881] <400> 328
[3882] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3883] <210> 329
[3884] <211> 23
[3885] <212> DNA
[3886] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3887] <220>
[3888] <223> 人工序列的描述:合成
[3889] 寡核苷酸
[3890] <220>
[3891] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3892] 寡核苷酸
[3893] <400> 329
[3894] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[3895] <210> 330
[3896] <211> 23
[3897] <212> DNA
[3898] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3899] <220>

[3900] <223> 人工序列的描述:合成

[3901] 寡核苷酸

[3902] <220>

[3903] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3904] 寡核苷酸

[3905] <400> 330

[3906] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3907] <210> 331

[3908] <211> 23

[3909] <212> DNA

[3910] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3911] <220>

[3912] <223> 人工序列的描述:合成

[3913] 寡核苷酸

[3914] <220>

[3915] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3916] 寡核苷酸

[3917] <400> 331

[3918] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3919] <210> 332

[3920] <211> 23

[3921] <212> DNA

[3922] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3923] <220>

[3924] <223> 人工序列的描述:合成

[3925] 寡核苷酸

[3926] <220>

[3927] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3928] 寡核苷酸

[3929] <400> 332

[3930] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3931] <210> 333

[3932] <211> 23

[3933] <212> DNA

[3934] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3935] <220>

[3936] <223> 人工序列的描述:合成

[3937] 寡核苷酸

[3938] <220>

[3939] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3940] 寡核苷酸

[3941] <400> 333

[3942] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[3943] <210> 334

[3944] <211> 23

[3945] <212> DNA

[3946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3947] <220>

[3948] <223> 人工序列的描述:合成

[3949] 寡核苷酸

[3950] <220>

[3951] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3952] 寡核苷酸

[3953] <400> 334

[3954] tgccacugua gaaaggcaug ata 23

[3955] <210> 335

[3956] <211> 23

[3957] <212> DNA

[3958] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3959] <220>

[3960] <223> 人工序列的描述:合成

[3961] 寡核苷酸

[3962] <220>

[3963] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3964] 寡核苷酸

[3965] <400> 335

[3966] tgccacugua gaaaggcaug atg 23

[3967] <210> 336

[3968] <211> 23

[3969] <212> DNA

[3970] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[3971] <220>

[3972] <223> 人工序列的描述:合成

[3973] 寡核苷酸

[3974] <220>

[3975] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[3976] 寡核苷酸

[3977] <400> 336

[3978] tgccacugua gaaaggcaug atc 23
[3979] <210> 337
[3980] <211> 21
[3981] <212> DNA
[3982] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3983] <220>
[3984] <223> 人工序列的描述:合成
[3985] 寡核苷酸
[3986] <220>
[3987] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[3988] 寡核苷酸
[3989] <400> 337
[3990] tgccacugua gaaaggcaut a 21
[3991] <210> 338
[3992] <211> 21
[3993] <212> DNA
[3994] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3995] <220>
[3996] <223> 人工序列的描述:合成
[3997] 寡核苷酸
[3998] <220>
[3999] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4000] 寡核苷酸
[4001] <400> 338
[4002] tgccacugua gaaaggcaut g 21
[4003] <210> 339
[4004] <211> 21
[4005] <212> DNA
[4006] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4007] <220>
[4008] <223> 人工序列的描述:合成
[4009] 寡核苷酸
[4010] <220>
[4011] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4012] 寡核苷酸
[4013] <400> 339
[4014] tgccacugua gaaaggcaut c 21
[4015] <210> 340
[4016] <211> 23

[4017] <212> DNA
[4018] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4019] <220>
[4020] <223> 人工序列的描述:合成
[4021] 寡核苷酸
[4022] <220>
[4023] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4024] 寡核苷酸
[4025] <400> 340
[4026] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4027] <210> 341
[4028] <211> 23
[4029] <212> DNA
[4030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4031] <220>
[4032] <223> 人工序列的描述:合成
[4033] 寡核苷酸
[4034] <220>
[4035] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4036] 寡核苷酸
[4037] <400> 341
[4038] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4039] <210> 342
[4040] <211> 23
[4041] <212> DNA
[4042] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4043] <220>
[4044] <223> 人工序列的描述:合成
[4045] 寡核苷酸
[4046] <220>
[4047] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4048] 寡核苷酸
[4049] <400> 342
[4050] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4051] <210> 343
[4052] <211> 23
[4053] <212> DNA
[4054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4055] <220>

[4056] <223> 人工序列的描述:合成

[4057] 寡核苷酸

[4058] <220>

[4059] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4060] 寡核苷酸

[4061] <400> 343

[4062] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4063] <210> 344

[4064] <211> 23

[4065] <212> DNA

[4066] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4067] <220>

[4068] <223> 人工序列的描述:合成

[4069] 寡核苷酸

[4070] <220>

[4071] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4072] 寡核苷酸

[4073] <400> 344

[4074] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4075] <210> 345

[4076] <211> 23

[4077] <212> DNA

[4078] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4079] <220>

[4080] <223> 人工序列的描述:合成

[4081] 寡核苷酸

[4082] <220>

[4083] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4084] 寡核苷酸

[4085] <400> 345

[4086] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4087] <210> 346

[4088] <211> 23

[4089] <212> DNA

[4090] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4091] <220>

[4092] <223> 人工序列的描述:合成

[4093] 寡核苷酸

[4094] <220>

[4095] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4096] 寡核苷酸
[4097] <400> 346
[4098] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4099] <210> 347
[4100] <211> 23
[4101] <212> DNA
[4102] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4103] <220>
[4104] <223> 人工序列的描述:合成
[4105] 寡核苷酸
[4106] <220>
[4107] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4108] 寡核苷酸
[4109] <400> 347
[4110] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4111] <210> 348
[4112] <211> 23
[4113] <212> DNA
[4114] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4115] <220>
[4116] <223> 人工序列的描述:合成
[4117] 寡核苷酸
[4118] <220>
[4119] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4120] 寡核苷酸
[4121] <400> 348
[4122] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4123] <210> 349
[4124] <211> 23
[4125] <212> DNA
[4126] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4127] <220>
[4128] <223> 人工序列的描述:合成
[4129] 寡核苷酸
[4130] <220>
[4131] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4132] 寡核苷酸
[4133] <400> 349

[4134] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4135] <210> 350
[4136] <211> 23
[4137] <212> DNA
[4138] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4139] <220>
[4140] <223> 人工序列的描述:合成
[4141] 寡核苷酸
[4142] <220>
[4143] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4144] 寡核苷酸
[4145] <400> 350
[4146] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4147] <210> 351
[4148] <211> 23
[4149] <212> DNA
[4150] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4151] <220>
[4152] <223> 人工序列的描述:合成
[4153] 寡核苷酸
[4154] <220>
[4155] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4156] 寡核苷酸
[4157] <400> 351
[4158] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4159] <210> 352
[4160] <211> 23
[4161] <212> DNA
[4162] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4163] <220>
[4164] <223> 人工序列的描述:合成
[4165] 寡核苷酸
[4166] <220>
[4167] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4168] 寡核苷酸
[4169] <400> 352
[4170] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4171] <210> 353
[4172] <211> 23

[4173] <212> DNA
[4174] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4175] <220>
[4176] <223> 人工序列的描述:合成
[4177] 寡核苷酸
[4178] <220>
[4179] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4180] 寡核苷酸
[4181] <400> 353
[4182] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4183] <210> 354
[4184] <211> 23
[4185] <212> DNA
[4186] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4187] <220>
[4188] <223> 人工序列的描述:合成
[4189] 寡核苷酸
[4190] <220>
[4191] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4192] 寡核苷酸
[4193] <400> 354
[4194] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4195] <210> 355
[4196] <211> 23
[4197] <212> DNA
[4198] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4199] <220>
[4200] <223> 人工序列的描述:合成
[4201] 寡核苷酸
[4202] <220>
[4203] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4204] 寡核苷酸
[4205] <400> 355
[4206] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4207] <210> 356
[4208] <211> 23
[4209] <212> DNA
[4210] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4211] <220>

[4212] <223> 人工序列的描述:合成

[4213] 寡核苷酸

[4214] <220>

[4215] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4216] 寡核苷酸

[4217] <400> 356

[4218] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4219] <210> 357

[4220] <211> 23

[4221] <212> DNA

[4222] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4223] <220>

[4224] <223> 人工序列的描述:合成

[4225] 寡核苷酸

[4226] <220>

[4227] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4228] 寡核苷酸

[4229] <400> 357

[4230] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4231] <210> 358

[4232] <211> 23

[4233] <212> DNA

[4234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4235] <220>

[4236] <223> 人工序列的描述:合成

[4237] 寡核苷酸

[4238] <220>

[4239] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4240] 寡核苷酸

[4241] <400> 358

[4242] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4243] <210> 359

[4244] <211> 23

[4245] <212> DNA

[4246] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4247] <220>

[4248] <223> 人工序列的描述:合成

[4249] 寡核苷酸

[4250] <220>

[4251] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4252] 寡核苷酸

[4253] <400> 359

[4254] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4255] <210> 360

[4256] <211> 23

[4257] <212> DNA

[4258] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4259] <220>

[4260] <223> 人工序列的描述:合成

[4261] 寡核苷酸

[4262] <220>

[4263] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4264] 寡核苷酸

[4265] <400> 360

[4266] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4267] <210> 361

[4268] <211> 23

[4269] <212> DNA

[4270] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4271] <220>

[4272] <223> 人工序列的描述:合成

[4273] 寡核苷酸

[4274] <220>

[4275] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4276] 寡核苷酸

[4277] <400> 361

[4278] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4279] <210> 362

[4280] <211> 23

[4281] <212> DNA

[4282] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4283] <220>

[4284] <223> 人工序列的描述:合成

[4285] 寡核苷酸

[4286] <220>

[4287] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4288] 寡核苷酸

[4289] <400> 362

[4290] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4291] <210> 363
[4292] <211> 23
[4293] <212> DNA
[4294] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4295] <220>
[4296] <223> 人工序列的描述:合成
[4297] 寡核苷酸
[4298] <220>
[4299] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4300] 寡核苷酸
[4301] <400> 363
[4302] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4303] <210> 364
[4304] <211> 23
[4305] <212> DNA
[4306] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4307] <220>
[4308] <223> 人工序列的描述:合成
[4309] 寡核苷酸
[4310] <220>
[4311] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4312] 寡核苷酸
[4313] <400> 364
[4314] ugccacugua gaaaggcaug atu 23
[4315] <210> 365
[4316] <211> 23
[4317] <212> DNA
[4318] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4319] <220>
[4320] <223> 人工序列的描述:合成
[4321] 寡核苷酸
[4322] <220>
[4323] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4324] 寡核苷酸
[4325] <400> 365
[4326] agccacugua gaaaggcaug atu 23
[4327] <210> 366
[4328] <211> 23

[4329] <212> DNA
[4330] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4331] <220>
[4332] <223> 人工序列的描述:合成
[4333] 寡核苷酸
[4334] <220>
[4335] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4336] 寡核苷酸
[4337] <400> 366
[4338] ggccacugua gaaaggcaug atu 23
[4339] <210> 367
[4340] <211> 23
[4341] <212> DNA
[4342] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4343] <220>
[4344] <223> 人工序列的描述:合成
[4345] 寡核苷酸
[4346] <220>
[4347] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4348] 寡核苷酸
[4349] <400> 367
[4350] cgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4351] <210> 368
[4352] <211> 23
[4353] <212> DNA
[4354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4355] <220>
[4356] <223> 人工序列的描述:合成
[4357] 寡核苷酸
[4358] <220>
[4359] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4360] 寡核苷酸
[4361] <400> 368
[4362] ugccacugua gaaaggcaug atu 23
[4363] <210> 369
[4364] <211> 23
[4365] <212> DNA
[4366] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4367] <220>

[4368] <223> 人工序列的描述:合成

[4369] 寡核苷酸

[4370] <220>

[4371] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4372] 寡核苷酸

[4373] <400> 369

[4374] agccacugua gaaaggcaug atu 23

[4375] <210> 370

[4376] <211> 23

[4377] <212> DNA

[4378] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4379] <220>

[4380] <223> 人工序列的描述:合成

[4381] 寡核苷酸

[4382] <220>

[4383] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4384] 寡核苷酸

[4385] <400> 370

[4386] ggccacugua gaaaggcaug atu 23

[4387] <210> 371

[4388] <211> 23

[4389] <212> DNA

[4390] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4391] <220>

[4392] <223> 人工序列的描述:合成

[4393] 寡核苷酸

[4394] <220>

[4395] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4396] 寡核苷酸

[4397] <400> 371

[4398] cgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4399] <210> 372

[4400] <211> 23

[4401] <212> DNA

[4402] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4403] <220>

[4404] <223> 人工序列的描述:合成

[4405] 寡核苷酸

[4406] <220>

[4407] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4408] 寡核苷酸
[4409] <400> 372
[4410] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4411] <210> 373
[4412] <211> 23
[4413] <212> DNA
[4414] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4415] <220>
[4416] <223> 人工序列的描述:合成
[4417] 寡核苷酸
[4418] <220>
[4419] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4420] 寡核苷酸
[4421] <400> 373
[4422] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4423] <210> 374
[4424] <211> 23
[4425] <212> DNA
[4426] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4427] <220>
[4428] <223> 人工序列的描述:合成
[4429] 寡核苷酸
[4430] <220>
[4431] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4432] 寡核苷酸
[4433] <400> 374
[4434] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4435] <210> 375
[4436] <211> 23
[4437] <212> DNA
[4438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4439] <220>
[4440] <223> 人工序列的描述:合成
[4441] 寡核苷酸
[4442] <220>
[4443] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4444] 寡核苷酸
[4445] <400> 375

[4446] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4447] <210> 376
[4448] <211> 23
[4449] <212> DNA
[4450] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4451] <220>
[4452] <223> 人工序列的描述:合成
[4453] 寡核苷酸
[4454] <220>
[4455] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4456] 寡核苷酸
[4457] <400> 376
[4458] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4459] <210> 377
[4460] <211> 23
[4461] <212> DNA
[4462] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4463] <220>
[4464] <223> 人工序列的描述:合成
[4465] 寡核苷酸
[4466] <220>
[4467] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4468] 寡核苷酸
[4469] <400> 377
[4470] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4471] <210> 378
[4472] <211> 23
[4473] <212> DNA
[4474] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4475] <220>
[4476] <223> 人工序列的描述:合成
[4477] 寡核苷酸
[4478] <220>
[4479] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4480] 寡核苷酸
[4481] <400> 378
[4482] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[4483] <210> 379
[4484] <211> 23

[4485] <212> DNA
[4486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4487] <220>
[4488] <223> 人工序列的描述:合成
[4489] 寡核苷酸
[4490] <220>
[4491] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4492] 寡核苷酸
[4493] <400> 379
[4494] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4495] <210> 380
[4496] <211> 23
[4497] <212> DNA
[4498] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4499] <220>
[4500] <223> 人工序列的描述:合成
[4501] 寡核苷酸
[4502] <220>
[4503] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4504] 寡核苷酸
[4505] <400> 380
[4506] tgccacugta gaaaggcaug atu 23
[4507] <210> 381
[4508] <211> 23
[4509] <212> DNA
[4510] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4511] <220>
[4512] <223> 人工序列的描述:合成
[4513] 寡核苷酸
[4514] <220>
[4515] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4516] 寡核苷酸
[4517] <400> 381
[4518] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4519] <210> 382
[4520] <211> 23
[4521] <212> DNA
[4522] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4523] <220>

[4524] <223> 人工序列的描述:合成

[4525] 寡核苷酸

[4526] <220>

[4527] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4528] 寡核苷酸

[4529] <400> 382

[4530] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4531] <210> 383

[4532] <211> 23

[4533] <212> DNA

[4534] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4535] <220>

[4536] <223> 人工序列的描述:合成

[4537] 寡核苷酸

[4538] <220>

[4539] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4540] 寡核苷酸

[4541] <400> 383

[4542] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4543] <210> 384

[4544] <211> 23

[4545] <212> DNA

[4546] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4547] <220>

[4548] <223> 人工序列的描述:合成

[4549] 寡核苷酸

[4550] <220>

[4551] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4552] 寡核苷酸

[4553] <400> 384

[4554] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4555] <210> 385

[4556] <211> 23

[4557] <212> DNA

[4558] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4559] <220>

[4560] <223> 人工序列的描述:合成

[4561] 寡核苷酸

[4562] <220>

[4563] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4564] 寡核苷酸

[4565] <400> 385

[4566] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4567] <210> 386

[4568] <211> 23

[4569] <212> DNA

[4570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4571] <220>

[4572] <223> 人工序列的描述:合成

[4573] 寡核苷酸

[4574] <220>

[4575] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4576] 寡核苷酸

[4577] <400> 386

[4578] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4579] <210> 387

[4580] <211> 23

[4581] <212> DNA

[4582] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4583] <220>

[4584] <223> 人工序列的描述:合成

[4585] 寡核苷酸

[4586] <220>

[4587] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4588] 寡核苷酸

[4589] <400> 387

[4590] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4591] <210> 388

[4592] <211> 23

[4593] <212> DNA

[4594] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4595] <220>

[4596] <223> 人工序列的描述:合成

[4597] 寡核苷酸

[4598] <220>

[4599] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4600] 寡核苷酸

[4601] <400> 388

[4602] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4603] <210> 389
[4604] <211> 23
[4605] <212> DNA
[4606] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4607] <220>
[4608] <223> 人工序列的描述:合成
[4609] 寡核苷酸
[4610] <220>
[4611] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4612] 寡核苷酸
[4613] <400> 389
[4614] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4615] <210> 390
[4616] <211> 23
[4617] <212> DNA
[4618] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4619] <220>
[4620] <223> 人工序列的描述:合成
[4621] 寡核苷酸
[4622] <220>
[4623] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4624] 寡核苷酸
[4625] <400> 390
[4626] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[4627] <210> 391
[4628] <211> 23
[4629] <212> DNA
[4630] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4631] <220>
[4632] <223> 人工序列的描述:合成
[4633] 寡核苷酸
[4634] <220>
[4635] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4636] 寡核苷酸
[4637] <400> 391
[4638] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4639] <210> 392
[4640] <211> 23

[4641] <212> DNA
[4642] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4643] <220>
[4644] <223> 人工序列的描述:合成
[4645] 寡核苷酸
[4646] <220>
[4647] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4648] 寡核苷酸
[4649] <400> 392
[4650] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4651] <210> 393
[4652] <211> 23
[4653] <212> DNA
[4654] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4655] <220>
[4656] <223> 人工序列的描述:合成
[4657] 寡核苷酸
[4658] <220>
[4659] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4660] 寡核苷酸
[4661] <400> 393
[4662] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4663] <210> 394
[4664] <211> 23
[4665] <212> DNA
[4666] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4667] <220>
[4668] <223> 人工序列的描述:合成
[4669] 寡核苷酸
[4670] <220>
[4671] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4672] 寡核苷酸
[4673] <400> 394
[4674] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[4675] <210> 395
[4676] <211> 23
[4677] <212> DNA
[4678] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4679] <220>

[4680] <223> 人工序列的描述:合成

[4681] 寡核苷酸

[4682] <220>

[4683] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4684] 寡核苷酸

[4685] <400> 395

[4686] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[4687] <210> 396

[4688] <211> 23

[4689] <212> DNA

[4690] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4691] <220>

[4692] <223> 人工序列的描述:合成

[4693] 寡核苷酸

[4694] <220>

[4695] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4696] 寡核苷酸

[4697] <400> 396

[4698] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[4699] <210> 397

[4700] <211> 23

[4701] <212> DNA

[4702] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4703] <220>

[4704] <223> 人工序列的描述:合成

[4705] 寡核苷酸

[4706] <220>

[4707] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4708] 寡核苷酸

[4709] <400> 397

[4710] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4711] <210> 398

[4712] <211> 23

[4713] <212> DNA

[4714] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4715] <220>

[4716] <223> 人工序列的描述:合成

[4717] 寡核苷酸

[4718] <220>

[4719] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4720] 寡核苷酸

[4721] <400> 398

[4722] agccacugua gaaaggcaug atu 23

[4723] <210> 399

[4724] <211> 23

[4725] <212> DNA

[4726] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4727] <220>

[4728] <223> 人工序列的描述:合成

[4729] 寡核苷酸

[4730] <220>

[4731] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4732] 寡核苷酸

[4733] <400> 399

[4734] ggccacugua gaaaggcaug atu 23

[4735] <210> 400

[4736] <211> 23

[4737] <212> DNA

[4738] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4739] <220>

[4740] <223> 人工序列的描述:合成

[4741] 寡核苷酸

[4742] <220>

[4743] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4744] 寡核苷酸

[4745] <400> 400

[4746] cgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4747] <210> 401

[4748] <211> 23

[4749] <212> DNA

[4750] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[4751] <220>

[4752] <223> 人工序列的描述:合成

[4753] 寡核苷酸

[4754] <220>

[4755] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4756] 寡核苷酸

[4757] <400> 401

[4758] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4759] <210> 402
[4760] <211> 23
[4761] <212> DNA
[4762] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4763] <220>
[4764] <223> 人工序列的描述:合成
[4765] 寡核苷酸
[4766] <220>
[4767] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4768] 寡核苷酸
[4769] <400> 402
[4770] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4771] <210> 403
[4772] <211> 23
[4773] <212> DNA
[4774] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4775] <220>
[4776] <223> 人工序列的描述:合成
[4777] 寡核苷酸
[4778] <220>
[4779] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4780] 寡核苷酸
[4781] <400> 403
[4782] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4783] <210> 404
[4784] <211> 23
[4785] <212> DNA
[4786] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4787] <220>
[4788] <223> 人工序列的描述:合成
[4789] 寡核苷酸
[4790] <220>
[4791] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4792] 寡核苷酸
[4793] <400> 404
[4794] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4795] <210> 405
[4796] <211> 23

[4797] <212> DNA
[4798] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4799] <220>
[4800] <223> 人工序列的描述:合成
[4801] 寡核苷酸
[4802] <220>
[4803] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4804] 寡核苷酸
[4805] <400> 405
[4806] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4807] <210> 406
[4808] <211> 23
[4809] <212> DNA
[4810] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4811] <220>
[4812] <223> 人工序列的描述:合成
[4813] 寡核苷酸
[4814] <220>
[4815] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4816] 寡核苷酸
[4817] <400> 406
[4818] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[4819] <210> 407
[4820] <211> 23
[4821] <212> DNA
[4822] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4823] <220>
[4824] <223> 人工序列的描述:合成
[4825] 寡核苷酸
[4826] <220>
[4827] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4828] 寡核苷酸
[4829] <400> 407
[4830] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4831] <210> 408
[4832] <211> 23
[4833] <212> DNA
[4834] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4835] <220>

[4836] <223> 人工序列的描述:合成
[4837] 寡核苷酸
[4838] <220>
[4839] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4840] 寡核苷酸
[4841] <400> 408
[4842] tgccacugta gaaaggcaug atu 23
[4843] <210> 409
[4844] <211> 23
[4845] <212> DNA
[4846] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4847] <220>
[4848] <223> 人工序列的描述:合成
[4849] 寡核苷酸
[4850] <220>
[4851] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4852] 寡核苷酸
[4853] <400> 409
[4854] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4855] <210> 410
[4856] <211> 23
[4857] <212> DNA
[4858] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4859] <220>
[4860] <223> 人工序列的描述:合成
[4861] 寡核苷酸
[4862] <220>
[4863] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4864] 寡核苷酸
[4865] <400> 410
[4866] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4867] <210> 411
[4868] <211> 23
[4869] <212> DNA
[4870] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4871] <220>
[4872] <223> 人工序列的描述:合成
[4873] 寡核苷酸
[4874] <220>

[4875] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4876] 寡核苷酸
[4877] <400> 411
[4878] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4879] <210> 412
[4880] <211> 23
[4881] <212> DNA
[4882] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4883] <220>
[4884] <223> 人工序列的描述:合成
[4885] 寡核苷酸
[4886] <220>
[4887] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4888] 寡核苷酸
[4889] <400> 412
[4890] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4891] <210> 413
[4892] <211> 23
[4893] <212> DNA
[4894] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4895] <220>
[4896] <223> 人工序列的描述:合成
[4897] 寡核苷酸
[4898] <220>
[4899] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4900] 寡核苷酸
[4901] <400> 413
[4902] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4903] <210> 414
[4904] <211> 23
[4905] <212> DNA
[4906] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4907] <220>
[4908] <223> 人工序列的描述:合成
[4909] 寡核苷酸
[4910] <220>
[4911] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4912] 寡核苷酸
[4913] <400> 414

[4914] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4915] <210> 415
[4916] <211> 23
[4917] <212> DNA
[4918] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4919] <220>
[4920] <223> 人工序列的描述:合成
[4921] 寡核苷酸
[4922] <220>
[4923] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4924] 寡核苷酸
[4925] <400> 415
[4926] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4927] <210> 416
[4928] <211> 23
[4929] <212> DNA
[4930] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4931] <220>
[4932] <223> 人工序列的描述:合成
[4933] 寡核苷酸
[4934] <220>
[4935] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4936] 寡核苷酸
[4937] <400> 416
[4938] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4939] <210> 417
[4940] <211> 23
[4941] <212> DNA
[4942] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4943] <220>
[4944] <223> 人工序列的描述:合成
[4945] 寡核苷酸
[4946] <220>
[4947] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4948] 寡核苷酸
[4949] <400> 417
[4950] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4951] <210> 418
[4952] <211> 23

[4953] <212> DNA
[4954] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4955] <220>
[4956] <223> 人工序列的描述:合成
[4957] 寡核苷酸
[4958] <220>
[4959] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4960] 寡核苷酸
[4961] <400> 418
[4962] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[4963] <210> 419
[4964] <211> 23
[4965] <212> DNA
[4966] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4967] <220>
[4968] <223> 人工序列的描述:合成
[4969] 寡核苷酸
[4970] <220>
[4971] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4972] 寡核苷酸
[4973] <400> 419
[4974] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4975] <210> 420
[4976] <211> 23
[4977] <212> DNA
[4978] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4979] <220>
[4980] <223> 人工序列的描述:合成
[4981] 寡核苷酸
[4982] <220>
[4983] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[4984] 寡核苷酸
[4985] <400> 420
[4986] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[4987] <210> 421
[4988] <211> 23
[4989] <212> DNA
[4990] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[4991] <220>

[4992] <223> 人工序列的描述:合成

[4993] 寡核苷酸

[4994] <220>

[4995] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[4996] 寡核苷酸

[4997] <400> 421

[4998] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[4999] <210> 422

[5000] <211> 23

[5001] <212> DNA

[5002] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5003] <220>

[5004] <223> 人工序列的描述:合成

[5005] 寡核苷酸

[5006] <220>

[5007] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5008] 寡核苷酸

[5009] <400> 422

[5010] agccacugua gaaaggcaug atu 23

[5011] <210> 423

[5012] <211> 23

[5013] <212> DNA

[5014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5015] <220>

[5016] <223> 人工序列的描述:合成

[5017] 寡核苷酸

[5018] <220>

[5019] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5020] 寡核苷酸

[5021] <400> 423

[5022] ggccacugua gaaaggcaug atu 23

[5023] <210> 424

[5024] <211> 23

[5025] <212> DNA

[5026] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5027] <220>

[5028] <223> 人工序列的描述:合成

[5029] 寡核苷酸

[5030] <220>

[5031] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5032] 寡核苷酸

[5033] <400> 424

[5034] cgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5035] <210> 425

[5036] <211> 23

[5037] <212> DNA

[5038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5039] <220>

[5040] <223> 人工序列的描述:合成

[5041] 寡核苷酸

[5042] <220>

[5043] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5044] 寡核苷酸

[5045] <400> 425

[5046] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5047] <210> 426

[5048] <211> 23

[5049] <212> DNA

[5050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5051] <220>

[5052] <223> 人工序列的描述:合成

[5053] 寡核苷酸

[5054] <220>

[5055] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5056] 寡核苷酸

[5057] <400> 426

[5058] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[5059] <210> 427

[5060] <211> 23

[5061] <212> DNA

[5062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5063] <220>

[5064] <223> 人工序列的描述:合成

[5065] 寡核苷酸

[5066] <220>

[5067] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5068] 寡核苷酸

[5069] <400> 427

[5070] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[5071] <210> 428
[5072] <211> 23
[5073] <212> DNA
[5074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5075] <220>
[5076] <223> 人工序列的描述:合成
[5077] 寡核苷酸
[5078] <220>
[5079] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5080] 寡核苷酸
[5081] <400> 428
[5082] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[5083] <210> 429
[5084] <211> 23
[5085] <212> DNA
[5086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5087] <220>
[5088] <223> 人工序列的描述:合成
[5089] 寡核苷酸
[5090] <220>
[5091] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5092] 寡核苷酸
[5093] <400> 429
[5094] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5095] <210> 430
[5096] <211> 23
[5097] <212> DNA
[5098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5099] <220>
[5100] <223> 人工序列的描述:合成
[5101] 寡核苷酸
[5102] <220>
[5103] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5104] 寡核苷酸
[5105] <400> 430
[5106] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5107] <210> 431
[5108] <211> 23

[5109] <212> DNA
[5110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5111] <220>
[5112] <223> 人工序列的描述:合成
[5113] 寡核苷酸
[5114] <220>
[5115] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5116] 寡核苷酸
[5117] <400> 431
[5118] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5119] <210> 432
[5120] <211> 23
[5121] <212> DNA
[5122] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5123] <220>
[5124] <223> 人工序列的描述:合成
[5125] 寡核苷酸
[5126] <220>
[5127] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5128] 寡核苷酸
[5129] <400> 432
[5130] tgccactgua gaaaggcaug atu 23
[5131] <210> 433
[5132] <211> 23
[5133] <212> DNA
[5134] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5135] <220>
[5136] <223> 人工序列的描述:合成
[5137] 寡核苷酸
[5138] <220>
[5139] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5140] 寡核苷酸
[5141] <400> 433
[5142] tgccacugta gaaaggcaug atu 23
[5143] <210> 434
[5144] <211> 23
[5145] <212> DNA
[5146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5147] <220>

[5148] <223> 人工序列的描述:合成

[5149] 寡核苷酸

[5150] <220>

[5151] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5152] 寡核苷酸

[5153] <400> 434

[5154] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5155] <210> 435

[5156] <211> 23

[5157] <212> DNA

[5158] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5159] <220>

[5160] <223> 人工序列的描述:合成

[5161] 寡核苷酸

[5162] <220>

[5163] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5164] 寡核苷酸

[5165] <400> 435

[5166] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5167] <210> 436

[5168] <211> 23

[5169] <212> DNA

[5170] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5171] <220>

[5172] <223> 人工序列的描述:合成

[5173] 寡核苷酸

[5174] <220>

[5175] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5176] 寡核苷酸

[5177] <400> 436

[5178] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5179] <210> 437

[5180] <211> 23

[5181] <212> DNA

[5182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5183] <220>

[5184] <223> 人工序列的描述:合成

[5185] 寡核苷酸

[5186] <220>

[5187] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5188] 寡核苷酸

[5189] <400> 437

[5190] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5191] <210> 438

[5192] <211> 23

[5193] <212> DNA

[5194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5195] <220>

[5196] <223> 人工序列的描述:合成

[5197] 寡核苷酸

[5198] <220>

[5199] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5200] 寡核苷酸

[5201] <400> 438

[5202] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5203] <210> 439

[5204] <211> 23

[5205] <212> DNA

[5206] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5207] <220>

[5208] <223> 人工序列的描述:合成

[5209] 寡核苷酸

[5210] <220>

[5211] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5212] 寡核苷酸

[5213] <400> 439

[5214] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5215] <210> 440

[5216] <211> 23

[5217] <212> DNA

[5218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5219] <220>

[5220] <223> 人工序列的描述:合成

[5221] 寡核苷酸

[5222] <220>

[5223] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5224] 寡核苷酸

[5225] <400> 440

[5226] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5227] <210> 441
[5228] <211> 23
[5229] <212> DNA
[5230] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5231] <220>
[5232] <223> 人工序列的描述:合成
[5233] 寡核苷酸
[5234] <220>
[5235] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5236] 寡核苷酸
[5237] <400> 441
[5238] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5239] <210> 442
[5240] <211> 23
[5241] <212> DNA
[5242] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5243] <220>
[5244] <223> 人工序列的描述:合成
[5245] 寡核苷酸
[5246] <220>
[5247] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5248] 寡核苷酸
[5249] <400> 442
[5250] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5251] <210> 443
[5252] <211> 23
[5253] <212> DNA
[5254] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5255] <220>
[5256] <223> 人工序列的描述:合成
[5257] 寡核苷酸
[5258] <220>
[5259] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5260] 寡核苷酸
[5261] <400> 443
[5262] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[5263] <210> 444
[5264] <211> 23

[5265] <212> DNA
[5266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5267] <220>
[5268] <223> 人工序列的描述:合成
[5269] 寡核苷酸
[5270] <220>
[5271] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5272] 寡核苷酸
[5273] <400> 444
[5274] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5275] <210> 445
[5276] <211> 23
[5277] <212> DNA
[5278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5279] <220>
[5280] <223> 人工序列的描述:合成
[5281] 寡核苷酸
[5282] <220>
[5283] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5284] 寡核苷酸
[5285] <400> 445
[5286] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5287] <210> 446
[5288] <211> 23
[5289] <212> DNA
[5290] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5291] <220>
[5292] <223> 人工序列的描述:合成
[5293] 寡核苷酸
[5294] <220>
[5295] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5296] 寡核苷酸
[5297] <400> 446
[5298] agccacugua gaaaggcaug atu 23
[5299] <210> 447
[5300] <211> 23
[5301] <212> DNA
[5302] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5303] <220>

[5304] <223> 人工序列的描述:合成

[5305] 寡核苷酸

[5306] <220>

[5307] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5308] 寡核苷酸

[5309] <400> 447

[5310] ggccacugua gaaaggcaug atu 23

[5311] <210> 448

[5312] <211> 23

[5313] <212> DNA

[5314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5315] <220>

[5316] <223> 人工序列的描述:合成

[5317] 寡核苷酸

[5318] <220>

[5319] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5320] 寡核苷酸

[5321] <400> 448

[5322] cgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5323] <210> 449

[5324] <211> 23

[5325] <212> DNA

[5326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5327] <220>

[5328] <223> 人工序列的描述:合成

[5329] 寡核苷酸

[5330] <220>

[5331] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5332] 寡核苷酸

[5333] <400> 449

[5334] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5335] <210> 450

[5336] <211> 23

[5337] <212> DNA

[5338] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5339] <220>

[5340] <223> 人工序列的描述:合成

[5341] 寡核苷酸

[5342] <220>

[5343] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5344] 寡核苷酸

[5345] <400> 450

[5346] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[5347] <210> 451

[5348] <211> 23

[5349] <212> DNA

[5350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5351] <220>

[5352] <223> 人工序列的描述:合成

[5353] 寡核苷酸

[5354] <220>

[5355] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5356] 寡核苷酸

[5357] <400> 451

[5358] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[5359] <210> 452

[5360] <211> 23

[5361] <212> DNA

[5362] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5363] <220>

[5364] <223> 人工序列的描述:合成

[5365] 寡核苷酸

[5366] <220>

[5367] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5368] 寡核苷酸

[5369] <400> 452

[5370] tgccactgua gaaaggcaug atu 23

[5371] <210> 453

[5372] <211> 23

[5373] <212> DNA

[5374] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5375] <220>

[5376] <223> 人工序列的描述:合成

[5377] 寡核苷酸

[5378] <220>

[5379] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5380] 寡核苷酸

[5381] <400> 453

[5382] tgccacugua gaaaggcatg atu 23

[5383] <210> 454

[5384] <211> 23

[5385] <212> DNA

[5386] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5387] <220>

[5388] <223> 人工序列的描述:合成

[5389] 寡核苷酸

[5390] <220>

[5391] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5392] 寡核苷酸

[5393] <400> 454

[5394] tgccacugua gaaaggcatg atu 23

[5395] <210> 455

[5396] <211> 23

[5397] <212> DNA

[5398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5399] <220>

[5400] <223> 人工序列的描述:合成

[5401] 寡核苷酸

[5402] <220>

[5403] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5404] 寡核苷酸

[5405] <400> 455

[5406] tgucacugua gaaaggcaug atu 23

[5407] <210> 456

[5408] <211> 23

[5409] <212> DNA

[5410] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5411] <220>

[5412] <223> 人工序列的描述:合成

[5413] 寡核苷酸

[5414] <220>

[5415] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5416] 寡核苷酸

[5417] <400> 456

[5418] tgcuacugua gaaaggcaug atu 23

[5419] <210> 457

[5420] <211> 23

[5421] <212> DNA
[5422] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5423] <220>
[5424] <223> 人工序列的描述:合成
[5425] 寡核苷酸
[5426] <220>
[5427] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5428] 寡核苷酸
[5429] <400> 457
[5430] tgccgcugua gaaaggcaug atu 23
[5431] <210> 458
[5432] <211> 23
[5433] <212> DNA
[5434] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5435] <220>
[5436] <223> 人工序列的描述:合成
[5437] 寡核苷酸
[5438] <220>
[5439] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5440] 寡核苷酸
[5441] <400> 458
[5442] tgccauugua gaaaggcaug atu 23
[5443] <210> 459
[5444] <211> 23
[5445] <212> DNA
[5446] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5447] <220>
[5448] <223> 人工序列的描述:合成
[5449] 寡核苷酸
[5450] <220>
[5451] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5452] 寡核苷酸
[5453] <400> 459
[5454] tgccacugug gaaaggcaug atu 23
[5455] <210> 460
[5456] <211> 23
[5457] <212> DNA
[5458] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5459] <220>

[5460] <223> 人工序列的描述:合成

[5461] 寡核苷酸

[5462] <220>

[5463] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5464] 寡核苷酸

[5465] <400> 460

[5466] tgccacugua ggaaggcaug atu 23

[5467] <210> 461

[5468] <211> 23

[5469] <212> DNA

[5470] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5471] <220>

[5472] <223> 人工序列的描述:合成

[5473] 寡核苷酸

[5474] <220>

[5475] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5476] 寡核苷酸

[5477] <400> 461

[5478] tgccacugua gagaggcaug atu 23

[5479] <210> 462

[5480] <211> 23

[5481] <212> DNA

[5482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5483] <220>

[5484] <223> 人工序列的描述:合成

[5485] 寡核苷酸

[5486] <220>

[5487] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5488] 寡核苷酸

[5489] <400> 462

[5490] tgccacugua gaagggcaug atu 23

[5491] <210> 463

[5492] <211> 23

[5493] <212> DNA

[5494] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5495] <220>

[5496] <223> 人工序列的描述:合成

[5497] 寡核苷酸

[5498] <220>

[5499] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5500] 寡核苷酸

[5501] <400> 463

[5502] tgccacugua gaaagguaug atu 23

[5503] <210> 464

[5504] <211> 23

[5505] <212> DNA

[5506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5507] <220>

[5508] <223> 人工序列的描述:合成

[5509] 寡核苷酸

[5510] <220>

[5511] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5512] 寡核苷酸

[5513] <400> 464

[5514] tgccacugua gaaaggcgug atu 23

[5515] <210> 465

[5516] <211> 23

[5517] <212> DNA

[5518] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5519] <220>

[5520] <223> 人工序列的描述:合成

[5521] 寡核苷酸

[5522] <220>

[5523] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5524] 寡核苷酸

[5525] <400> 465

[5526] tgccacugua gaaaggcaug gtu 23

[5527] <210> 466

[5528] <211> 20

[5529] <212> DNA

[5530] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5531] <220>

[5532] <223> 人工序列的描述:合成

[5533] 寡核苷酸

[5534] <220>

[5535] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5536] 寡核苷酸

[5537] <400> 466

[5538] accugaggat ggaccgcggg 20
[5539] <210> 467
[5540] <211> 20
[5541] <212> DNA
[5542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5543] <220>
[5544] <223> 人工序列的描述:合成
[5545] 寡核苷酸
[5546] <400> 467
[5547] acctgaggat ggaccgcggg 20
[5548] <210> 468
[5549] <211> 20
[5550] <212> DNA
[5551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5552] <220>
[5553] <223> 人工序列的描述:合成
[5554] 寡核苷酸
[5555] <400> 468
[5556] ggacctgagg atggaccgcg 20
[5557] <210> 469
[5558] <211> 20
[5559] <212> DNA
[5560] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5561] <220>
[5562] <223> 人工序列的描述:合成
[5563] 寡核苷酸
[5564] <400> 469
[5565] ggacctgagg atggaccgcg 20
[5566] <210> 470
[5567] <211> 20
[5568] <212> DNA
[5569] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5570] <220>
[5571] <223> 人工序列的描述:合成
[5572] 寡核苷酸
[5573] <220>
[5574] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5575] 寡核苷酸
[5576] <400> 470

[5577] accugaggat ggaccgcggg 20
[5578] <210> 471
[5579] <211> 20
[5580] <212> DNA
[5581] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5582] <220>
[5583] <223> 人工序列的描述:合成
[5584] 寡核苷酸
[5585] <400> 471
[5586] acctgaggat ggaccgcggg 20
[5587] <210> 472
[5588] <211> 20
[5589] <212> DNA
[5590] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5591] <220>
[5592] <223> 人工序列的描述:合成
[5593] 寡核苷酸
[5594] <400> 472
[5595] ggacctgagg atggaccgcg 20
[5596] <210> 473
[5597] <211> 20
[5598] <212> DNA
[5599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5600] <220>
[5601] <223> 人工序列的描述:合成
[5602] 寡核苷酸
[5603] <400> 473
[5604] ggacctgagg atggaccgcg 20
[5605] <210> 474
[5606] <211> 20
[5607] <212> DNA
[5608] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5609] <220>
[5610] <223> 人工序列的描述:合成
[5611] 寡核苷酸
[5612] <220>
[5613] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5614] 寡核苷酸
[5615] <400> 474

[5616] accugaggat ggaccgcggg 20

[5617] <210> 475

[5618] <211> 20

[5619] <212> DNA

[5620] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5621] <220>

[5622] <223> 人工序列的描述:合成

[5623] 寡核苷酸

[5624] <400> 475

[5625] acctgaggat ggaccgcggg 20

[5626] <210> 476

[5627] <211> 20

[5628] <212> DNA

[5629] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5630] <220>

[5631] <223> 人工序列的描述:合成

[5632] 寡核苷酸

[5633] <400> 476

[5634] ggacctgagg atggaccgcg 20

[5635] <210> 477

[5636] <211> 20

[5637] <212> DNA

[5638] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5639] <220>

[5640] <223> 人工序列的描述:合成

[5641] 寡核苷酸

[5642] <400> 477

[5643] ggacctgagg atggaccgcg 20

[5644] <210> 478

[5645] <211> 23

[5646] <212> DNA

[5647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5648] <220>

[5649] <223> 人工序列的描述:合成

[5650] 寡核苷酸

[5651] <220>

[5652] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5653] 寡核苷酸

[5654] <400> 478

[5655] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5656] <210> 479
[5657] <211> 23
[5658] <212> DNA
[5659] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5660] <220>
[5661] <223> 人工序列的描述:合成
[5662] 寡核苷酸
[5663] <220>
[5664] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5665] 寡核苷酸
[5666] <400> 479
[5667] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5668] <210> 480
[5669] <211> 27
[5670] <212> DNA
[5671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5672] <220>
[5673] <223> 人工序列的描述:合成
[5674] 寡核苷酸
[5675] <400> 480
[5676] cccccaggca ggagccaagc acagcag 27
[5677] <210> 481
[5678] <211> 23
[5679] <212> DNA
[5680] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5681] <220>
[5682] <223> 人工序列的描述:合成
[5683] 寡核苷酸
[5684] <220>
[5685] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5686] 寡核苷酸
[5687] <400> 481
[5688] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5689] <210> 482
[5690] <211> 23
[5691] <212> DNA
[5692] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5693] <220>

[5694] <223> 人工序列的描述:合成
[5695] 寡核苷酸
[5696] <220>
[5697] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5698] 寡核苷酸
[5699] <400> 482
[5700] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5701] <210> 483
[5702] <211> 23
[5703] <212> DNA
[5704] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5705] <220>
[5706] <223> 人工序列的描述:合成
[5707] 寡核苷酸
[5708] <220>
[5709] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5710] 寡核苷酸
[5711] <400> 483
[5712] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5713] <210> 484
[5714] <211> 23
[5715] <212> DNA
[5716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5717] <220>
[5718] <223> 人工序列的描述:合成
[5719] 寡核苷酸
[5720] <220>
[5721] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5722] 寡核苷酸
[5723] <400> 484
[5724] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5725] <210> 485
[5726] <211> 23
[5727] <212> DNA
[5728] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5729] <220>
[5730] <223> 人工序列的描述:合成
[5731] 寡核苷酸
[5732] <220>

[5733] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5734] 寡核苷酸
[5735] <400> 485
[5736] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5737] <210> 486
[5738] <211> 23
[5739] <212> DNA
[5740] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5741] <220>
[5742] <223> 人工序列的描述:合成
[5743] 寡核苷酸
[5744] <220>
[5745] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5746] 寡核苷酸
[5747] <400> 486
[5748] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5749] <210> 487
[5750] <211> 23
[5751] <212> DNA
[5752] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5753] <220>
[5754] <223> 人工序列的描述:合成
[5755] 寡核苷酸
[5756] <220>
[5757] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5758] 寡核苷酸
[5759] <400> 487
[5760] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5761] <210> 488
[5762] <211> 23
[5763] <212> DNA
[5764] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5765] <220>
[5766] <223> 人工序列的描述:合成
[5767] 寡核苷酸
[5768] <220>
[5769] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5770] 寡核苷酸
[5771] <400> 488

[5772] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5773] <210> 489
[5774] <211> 23
[5775] <212> DNA
[5776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5777] <220>
[5778] <223> 人工序列的描述:合成
[5779] 寡核苷酸
[5780] <220>
[5781] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5782] 寡核苷酸
[5783] <400> 489
[5784] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5785] <210> 490
[5786] <211> 23
[5787] <212> DNA
[5788] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5789] <220>
[5790] <223> 人工序列的描述:合成
[5791] 寡核苷酸
[5792] <220>
[5793] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5794] 寡核苷酸
[5795] <400> 490
[5796] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5797] <210> 491
[5798] <211> 23
[5799] <212> DNA
[5800] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5801] <220>
[5802] <223> 人工序列的描述:合成
[5803] 寡核苷酸
[5804] <220>
[5805] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5806] 寡核苷酸
[5807] <400> 491
[5808] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5809] <210> 492
[5810] <211> 23

[5811] <212> DNA
[5812] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5813] <220>
[5814] <223> 人工序列的描述:合成
[5815] 寡核苷酸
[5816] <220>
[5817] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5818] 寡核苷酸
[5819] <400> 492
[5820] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5821] <210> 493
[5822] <211> 23
[5823] <212> DNA
[5824] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5825] <220>
[5826] <223> 人工序列的描述:合成
[5827] 寡核苷酸
[5828] <220>
[5829] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5830] 寡核苷酸
[5831] <400> 493
[5832] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5833] <210> 494
[5834] <211> 23
[5835] <212> DNA
[5836] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5837] <220>
[5838] <223> 人工序列的描述:合成
[5839] 寡核苷酸
[5840] <220>
[5841] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5842] 寡核苷酸
[5843] <400> 494
[5844] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5845] <210> 495
[5846] <211> 23
[5847] <212> DNA
[5848] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5849] <220>

[5850] <223> 人工序列的描述:合成
[5851] 寡核苷酸
[5852] <220>
[5853] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5854] 寡核苷酸
[5855] <400> 495
[5856] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5857] <210> 496
[5858] <211> 23
[5859] <212> DNA
[5860] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5861] <220>
[5862] <223> 人工序列的描述:合成
[5863] 寡核苷酸
[5864] <220>
[5865] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5866] 寡核苷酸
[5867] <400> 496
[5868] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5869] <210> 497
[5870] <211> 23
[5871] <212> DNA
[5872] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5873] <220>
[5874] <223> 人工序列的描述:合成
[5875] 寡核苷酸
[5876] <220>
[5877] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5878] 寡核苷酸
[5879] <400> 497
[5880] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5881] <210> 498
[5882] <211> 23
[5883] <212> DNA
[5884] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5885] <220>
[5886] <223> 人工序列的描述:合成
[5887] 寡核苷酸
[5888] <220>

[5889] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5890] 寡核苷酸

[5891] <400> 498

[5892] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5893] <210> 499

[5894] <211> 23

[5895] <212> DNA

[5896] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5897] <220>

[5898] <223> 人工序列的描述:合成

[5899] 寡核苷酸

[5900] <220>

[5901] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5902] 寡核苷酸

[5903] <400> 499

[5904] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5905] <210> 500

[5906] <211> 23

[5907] <212> DNA

[5908] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5909] <220>

[5910] <223> 人工序列的描述:合成

[5911] 寡核苷酸

[5912] <220>

[5913] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5914] 寡核苷酸

[5915] <400> 500

[5916] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[5917] <210> 501

[5918] <211> 23

[5919] <212> DNA

[5920] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[5921] <220>

[5922] <223> 人工序列的描述:合成

[5923] 寡核苷酸

[5924] <220>

[5925] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[5926] 寡核苷酸

[5927] <400> 501

[5928] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5929] <210> 502
[5930] <211> 23
[5931] <212> DNA
[5932] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5933] <220>
[5934] <223> 人工序列的描述:合成
[5935] 寡核苷酸
[5936] <220>
[5937] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5938] 寡核苷酸
[5939] <400> 502
[5940] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5941] <210> 503
[5942] <211> 23
[5943] <212> DNA
[5944] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5945] <220>
[5946] <223> 人工序列的描述:合成
[5947] 寡核苷酸
[5948] <220>
[5949] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5950] 寡核苷酸
[5951] <400> 503
[5952] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5953] <210> 504
[5954] <211> 23
[5955] <212> DNA
[5956] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5957] <220>
[5958] <223> 人工序列的描述:合成
[5959] 寡核苷酸
[5960] <220>
[5961] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5962] 寡核苷酸
[5963] <400> 504
[5964] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5965] <210> 505
[5966] <211> 23

[5967] <212> DNA
[5968] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5969] <220>
[5970] <223> 人工序列的描述:合成
[5971] 寡核苷酸
[5972] <220>
[5973] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5974] 寡核苷酸
[5975] <400> 505
[5976] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5977] <210> 506
[5978] <211> 23
[5979] <212> DNA
[5980] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5981] <220>
[5982] <223> 人工序列的描述:合成
[5983] 寡核苷酸
[5984] <220>
[5985] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5986] 寡核苷酸
[5987] <400> 506
[5988] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[5989] <210> 507
[5990] <211> 23
[5991] <212> DNA
[5992] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[5993] <220>
[5994] <223> 人工序列的描述:合成
[5995] 寡核苷酸
[5996] <220>
[5997] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[5998] 寡核苷酸
[5999] <400> 507
[6000] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[6001] <210> 508
[6002] <211> 23
[6003] <212> DNA
[6004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6005] <220>

[6006] <223> 人工序列的描述:合成

[6007] 寡核苷酸

[6008] <220>

[6009] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6010] 寡核苷酸

[6011] <400> 508

[6012] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[6013] <210> 509

[6014] <211> 21

[6015] <212> DNA

[6016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6017] <220>

[6018] <223> 人工序列的描述:合成

[6019] 寡核苷酸

[6020] <220>

[6021] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6022] 寡核苷酸

[6023] <400> 509

[6024] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[6025] <210> 510

[6026] <211> 21

[6027] <212> DNA

[6028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6029] <220>

[6030] <223> 人工序列的描述:合成

[6031] 寡核苷酸

[6032] <220>

[6033] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6034] 寡核苷酸

[6035] <400> 510

[6036] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[6037] <210> 511

[6038] <211> 21

[6039] <212> DNA

[6040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6041] <220>

[6042] <223> 人工序列的描述:合成

[6043] 寡核苷酸

[6044] <220>

[6045] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6046] 寡核苷酸

[6047] <400> 511

[6048] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[6049] <210> 512

[6050] <211> 21

[6051] <212> DNA

[6052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6053] <220>

[6054] <223> 人工序列的描述:合成

[6055] 寡核苷酸

[6056] <220>

[6057] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6058] 寡核苷酸

[6059] <400> 512

[6060] tgccacugua gaauggcaut u 21

[6061] <210> 513

[6062] <211> 21

[6063] <212> DNA

[6064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6065] <220>

[6066] <223> 人工序列的描述:合成

[6067] 寡核苷酸

[6068] <220>

[6069] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6070] 寡核苷酸

[6071] <400> 513

[6072] tgccacugua gaaacgcaut u 21

[6073] <210> 514

[6074] <211> 21

[6075] <212> DNA

[6076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6077] <220>

[6078] <223> 人工序列的描述:合成

[6079] 寡核苷酸

[6080] <220>

[6081] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6082] 寡核苷酸

[6083] <400> 514

[6084] tgccacugua gaaagccaut u 21
[6085] <210> 515
[6086] <211> 21
[6087] <212> DNA
[6088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6089] <220>
[6090] <223> 人工序列的描述:合成
[6091] 寡核苷酸
[6092] <220>
[6093] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6094] 寡核苷酸
[6095] <400> 515
[6096] tgccacugua gaaagggaut u 21
[6097] <210> 516
[6098] <211> 21
[6099] <212> DNA
[6100] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6101] <220>
[6102] <223> 人工序列的描述:合成
[6103] 寡核苷酸
[6104] <220>
[6105] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6106] 寡核苷酸
[6107] <400> 516
[6108] tgccacugua gaaaggcuut u 21
[6109] <210> 517
[6110] <211> 21
[6111] <212> DNA
[6112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6113] <220>
[6114] <223> 人工序列的描述:合成
[6115] 寡核苷酸
[6116] <220>
[6117] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6118] 寡核苷酸
[6119] <400> 517
[6120] tgccacugua gaaaggcaat u 21
[6121] <210> 518
[6122] <211> 23

[6123] <212> DNA
[6124] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6125] <220>
[6126] <223> 人工序列的描述:合成
[6127] 寡核苷酸
[6128] <220>
[6129] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6130] 寡核苷酸
[6131] <400> 518
[6132] tgccacugua gaaacgcaug atu 23
[6133] <210> 519
[6134] <211> 23
[6135] <212> DNA
[6136] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6137] <220>
[6138] <223> 人工序列的描述:合成
[6139] 寡核苷酸
[6140] <220>
[6141] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6142] 寡核苷酸
[6143] <400> 519
[6144] tgccacugua gaaagccaug atu 23
[6145] <210> 520
[6146] <211> 23
[6147] <212> DNA
[6148] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6149] <220>
[6150] <223> 人工序列的描述:合成
[6151] 寡核苷酸
[6152] <220>
[6153] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6154] 寡核苷酸
[6155] <400> 520
[6156] tgccacugua gaaaggcuug atu 23
[6157] <210> 521
[6158] <211> 23
[6159] <212> DNA
[6160] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6161] <220>

[6162] <223> 人工序列的描述:合成

[6163] 寡核苷酸

[6164] <220>

[6165] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6166] 寡核苷酸

[6167] <400> 521

[6168] tgccacugua gaaaggcaag atu 23

[6169] <210> 522

[6170] <211> 23

[6171] <212> DNA

[6172] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6173] <220>

[6174] <223> 人工序列的描述:合成

[6175] 寡核苷酸

[6176] <220>

[6177] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6178] 寡核苷酸

[6179] <400> 522

[6180] tgccacugua gaaaggcauc atu 23

[6181] <210> 523

[6182] <211> 23

[6183] <212> DNA

[6184] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6185] <220>

[6186] <223> 人工序列的描述:合成

[6187] 寡核苷酸

[6188] <220>

[6189] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6190] 寡核苷酸

[6191] <400> 523

[6192] tgccacugua gaaaggcaug utu 23

[6193] <210> 524

[6194] <211> 20

[6195] <212> DNA

[6196] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6197] <220>

[6198] <223> 人工序列的描述:合成

[6199] 寡核苷酸

[6200] <220>

[6201] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6202] 寡核苷酸

[6203] <400> 524

[6204] ugugcttggc tcctgccugg 20

[6205] <210> 525

[6206] <211> 20

[6207] <212> DNA

[6208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6209] <220>

[6210] <223> 人工序列的描述:合成

[6211] 寡核苷酸

[6212] <220>

[6213] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6214] 寡核苷酸

[6215] <400> 525

[6216] ucuugttacc cccgccaugg 20

[6217] <210> 526

[6218] <211> 20

[6219] <212> DNA

[6220] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6221] <220>

[6222] <223> 人工序列的描述:合成

[6223] 寡核苷酸

[6224] <220>

[6225] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6226] 寡核苷酸

[6227] <400> 526

[6228] acccccgcca tggagacguu 20

[6229] <210> 527

[6230] <211> 20

[6231] <212> DNA

[6232] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6233] <220>

[6234] <223> 人工序列的描述:合成

[6235] 寡核苷酸

[6236] <220>

[6237] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6238] 寡核苷酸

[6239] <400> 527

[6240] uacccccgcc atggagacgu 20
[6241] <210> 528
[6242] <211> 20
[6243] <212> DNA
[6244] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6245] <220>
[6246] <223> 人工序列的描述:合成
[6247] 寡核苷酸
[6248] <220>
[6249] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6250] 寡核苷酸
[6251] <400> 528
[6252] cugcactggg cttccuggug 20
[6253] <210> 529
[6254] <211> 20
[6255] <212> DNA
[6256] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6257] <220>
[6258] <223> 人工序列的描述:合成
[6259] 寡核苷酸
[6260] <220>
[6261] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6262] 寡核苷酸
[6263] <400> 529
[6264] uggacctgag gatggaccgc 20
[6265] <210> 530
[6266] <211> 20
[6267] <212> DNA
[6268] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6269] <220>
[6270] <223> 人工序列的描述:合成
[6271] 寡核苷酸
[6272] <220>
[6273] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6274] 寡核苷酸
[6275] <400> 530
[6276] agggaccctc tgcacugggc 20
[6277] <210> 531
[6278] <211> 20

[6279] <212> DNA
[6280] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6281] <220>
[6282] <223> 人工序列的描述:合成
[6283] 寡核苷酸
[6284] <220>
[6285] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6286] 寡核苷酸
[6287] <400> 531
[6288] cuugutaccc ccgccaugga 20
[6289] <210> 532
[6290] <211> 20
[6291] <212> DNA
[6292] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6293] <220>
[6294] <223> 人工序列的描述:合成
[6295] 寡核苷酸
[6296] <220>
[6297] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6298] 寡核苷酸
[6299] <400> 532
[6300] aggcugggat cctccacguc 20
[6301] <210> 533
[6302] <211> 20
[6303] <212> DNA
[6304] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6305] <220>
[6306] <223> 人工序列的描述:合成
[6307] 寡核苷酸
[6308] <220>
[6309] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6310] 寡核苷酸
[6311] <400> 533
[6312] aagggaccct ctgcacuggg 20
[6313] <210> 534
[6314] <211> 20
[6315] <212> DNA
[6316] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6317] <220>

[6318] <223> 人工序列的描述:合成

[6319] 寡核苷酸

[6320] <400> 534

[6321] tgtgcttggc tcctgcctgg 20

[6322] <210> 535

[6323] <211> 20

[6324] <212> DNA

[6325] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6326] <220>

[6327] <223> 人工序列的描述:合成

[6328] 寡核苷酸

[6329] <400> 535

[6330] tcttgttacc cccgccatgg 20

[6331] <210> 536

[6332] <211> 20

[6333] <212> DNA

[6334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6335] <220>

[6336] <223> 人工序列的描述:合成

[6337] 寡核苷酸

[6338] <400> 536

[6339] acccccgcca tggagacgtt 20

[6340] <210> 537

[6341] <211> 20

[6342] <212> DNA

[6343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6344] <220>

[6345] <223> 人工序列的描述:合成

[6346] 寡核苷酸

[6347] <400> 537

[6348] taccccgcc atggagacgt 20

[6349] <210> 538

[6350] <211> 20

[6351] <212> DNA

[6352] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6353] <220>

[6354] <223> 人工序列的描述:合成

[6355] 寡核苷酸

[6356] <400> 538

[6357] ctgcactggg cttcctggtg 20
[6358] <210> 539
[6359] <211> 20
[6360] <212> DNA
[6361] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6362] <220>
[6363] <223> 人工序列的描述:合成
[6364] 寡核苷酸
[6365] <400> 539
[6366] tggacctgag gatggaccgc 20
[6367] <210> 540
[6368] <211> 20
[6369] <212> DNA
[6370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6371] <220>
[6372] <223> 人工序列的描述:合成
[6373] 寡核苷酸
[6374] <400> 540
[6375] agggaccctc tgcactgggc 20
[6376] <210> 541
[6377] <211> 20
[6378] <212> DNA
[6379] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6380] <220>
[6381] <223> 人工序列的描述:合成
[6382] 寡核苷酸
[6383] <400> 541
[6384] cttgttaccc ccgccatgga 20
[6385] <210> 542
[6386] <211> 20
[6387] <212> DNA
[6388] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6389] <220>
[6390] <223> 人工序列的描述:合成
[6391] 寡核苷酸
[6392] <400> 542
[6393] aggctgggat cctccacgtc 20
[6394] <210> 543
[6395] <211> 20

[6396] <212> DNA
[6397] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6398] <220>
[6399] <223> 人工序列的描述:合成
[6400] 寡核苷酸
[6401] <400> 543
[6402] aagggaccct ctgcactggg 20
[6403] <210> 544
[6404] <211> 20
[6405] <212> DNA
[6406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6407] <220>
[6408] <223> 人工序列的描述:合成
[6409] 寡核苷酸
[6410] <220>
[6411] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6412] 寡核苷酸
[6413] <400> 544
[6414] ugugcttggc tcctgccugg 20
[6415] <210> 545
[6416] <211> 20
[6417] <212> DNA
[6418] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6419] <220>
[6420] <223> 人工序列的描述:合成
[6421] 寡核苷酸
[6422] <220>
[6423] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6424] 寡核苷酸
[6425] <400> 545
[6426] ucuugttacc cccgccaugg 20
[6427] <210> 546
[6428] <211> 20
[6429] <212> DNA
[6430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6431] <220>
[6432] <223> 人工序列的描述:合成
[6433] 寡核苷酸
[6434] <220>

[6435] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6436] 寡核苷酸

[6437] <400> 546

[6438] acccccgcca tggagacguu 20

[6439] <210> 547

[6440] <211> 20

[6441] <212> DNA

[6442] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6443] <220>

[6444] <223> 人工序列的描述:合成

[6445] 寡核苷酸

[6446] <220>

[6447] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6448] 寡核苷酸

[6449] <400> 547

[6450] uacccccgcc atggagacgu 20

[6451] <210> 548

[6452] <211> 20

[6453] <212> DNA

[6454] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6455] <220>

[6456] <223> 人工序列的描述:合成

[6457] 寡核苷酸

[6458] <220>

[6459] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6460] 寡核苷酸

[6461] <400> 548

[6462] cugcactggg cttccuggug 20

[6463] <210> 549

[6464] <211> 20

[6465] <212> DNA

[6466] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6467] <220>

[6468] <223> 人工序列的描述:合成

[6469] 寡核苷酸

[6470] <220>

[6471] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6472] 寡核苷酸

[6473] <400> 549

[6474] uggacctgag gatggaccgc 20
[6475] <210> 550
[6476] <211> 20
[6477] <212> DNA
[6478] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6479] <220>
[6480] <223> 人工序列的描述:合成
[6481] 寡核苷酸
[6482] <220>
[6483] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6484] 寡核苷酸
[6485] <400> 550
[6486] agggaccctc tgcacugggc 20
[6487] <210> 551
[6488] <211> 20
[6489] <212> DNA
[6490] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6491] <220>
[6492] <223> 人工序列的描述:合成
[6493] 寡核苷酸
[6494] <220>
[6495] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6496] 寡核苷酸
[6497] <400> 551
[6498] cuugutaccc ccgccaugga 20
[6499] <210> 552
[6500] <211> 20
[6501] <212> DNA
[6502] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6503] <220>
[6504] <223> 人工序列的描述:合成
[6505] 寡核苷酸
[6506] <220>
[6507] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6508] 寡核苷酸
[6509] <400> 552
[6510] aggcugggat cctccacguc 20
[6511] <210> 553
[6512] <211> 20

[6513] <212> DNA
[6514] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6515] <220>
[6516] <223> 人工序列的描述:合成
[6517] 寡核苷酸
[6518] <220>
[6519] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6520] 寡核苷酸
[6521] <400> 553
[6522] aagggaccct ctgcacuggg 20
[6523] <210> 554
[6524] <211> 20
[6525] <212> DNA
[6526] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6527] <220>
[6528] <223> 人工序列的描述:合成
[6529] 寡核苷酸
[6530] <400> 554
[6531] tgtgcttggc tcctgcctgg 20
[6532] <210> 555
[6533] <211> 20
[6534] <212> DNA
[6535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6536] <220>
[6537] <223> 人工序列的描述:合成
[6538] 寡核苷酸
[6539] <400> 555
[6540] tcttgttacc cccgccatgg 20
[6541] <210> 556
[6542] <211> 20
[6543] <212> DNA
[6544] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6545] <220>
[6546] <223> 人工序列的描述:合成
[6547] 寡核苷酸
[6548] <400> 556
[6549] acccccgcca tggagacgtt 20
[6550] <210> 557
[6551] <211> 20

[6552] <212> DNA
[6553] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6554] <220>
[6555] <223> 人工序列的描述:合成
[6556] 寡核苷酸
[6557] <400> 557
[6558] taccccgcc atggagacgt 20
[6559] <210> 558
[6560] <211> 20
[6561] <212> DNA
[6562] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6563] <220>
[6564] <223> 人工序列的描述:合成
[6565] 寡核苷酸
[6566] <400> 558
[6567] ctgcactggg cttcctggtg 20
[6568] <210> 559
[6569] <211> 20
[6570] <212> DNA
[6571] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6572] <220>
[6573] <223> 人工序列的描述:合成
[6574] 寡核苷酸
[6575] <400> 559
[6576] tggacctgag gatggaccgc 20
[6577] <210> 560
[6578] <211> 20
[6579] <212> DNA
[6580] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6581] <220>
[6582] <223> 人工序列的描述:合成
[6583] 寡核苷酸
[6584] <400> 560
[6585] agggaccctc tgcactgggc 20
[6586] <210> 561
[6587] <211> 20
[6588] <212> DNA
[6589] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6590] <220>

[6591] <223> 人工序列的描述:合成

[6592] 寡核苷酸

[6593] <400> 561

[6594] cttgttaccc ccgccatgga 20

[6595] <210> 562

[6596] <211> 20

[6597] <212> DNA

[6598] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6599] <220>

[6600] <223> 人工序列的描述:合成

[6601] 寡核苷酸

[6602] <400> 562

[6603] aggctgggat cctccacgtc 20

[6604] <210> 563

[6605] <211> 20

[6606] <212> DNA

[6607] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6608] <220>

[6609] <223> 人工序列的描述:合成

[6610] 寡核苷酸

[6611] <400> 563

[6612] aagggaccct ctgcactggg 20

[6613] <210> 564

[6614] <211> 23

[6615] <212> DNA

[6616] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6617] <220>

[6618] <223> 人工序列的描述:合成

[6619] 寡核苷酸

[6620] <220>

[6621] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6622] 寡核苷酸

[6623] <400> 564

[6624] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[6625] <210> 565

[6626] <211> 23

[6627] <212> DNA

[6628] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6629] <220>

[6630] <223> 人工序列的描述:合成

[6631] 寡核苷酸

[6632] <220>

[6633] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6634] 寡核苷酸

[6635] <400> 565

[6636] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[6637] <210> 566

[6638] <211> 23

[6639] <212> DNA

[6640] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6641] <220>

[6642] <223> 人工序列的描述:合成

[6643] 寡核苷酸

[6644] <220>

[6645] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6646] 寡核苷酸

[6647] <400> 566

[6648] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[6649] <210> 567

[6650] <211> 21

[6651] <212> DNA

[6652] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6653] <220>

[6654] <223> 人工序列的描述:合成

[6655] 寡核苷酸

[6656] <220>

[6657] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6658] 寡核苷酸

[6659] <400> 567

[6660] tgccacugua gaaaggcatt u 21

[6661] <210> 568

[6662] <211> 23

[6663] <212> DNA

[6664] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6665] <220>

[6666] <223> 人工序列的描述:合成

[6667] 寡核苷酸

[6668] <220>

[6669] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6670] 寡核苷酸
[6671] <400> 568
[6672] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[6673] <210> 569
[6674] <211> 20
[6675] <212> RNA
[6676] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6677] <220>
[6678] <223> 人工序列的描述:合成
[6679] 寡核苷酸
[6680] <400> 569
[6681] caugaagcag gaacauacca 20
[6682] <210> 570
[6683] <211> 20
[6684] <212> RNA
[6685] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6686] <220>
[6687] <223> 人工序列的描述:合成
[6688] 寡核苷酸
[6689] <400> 570
[6690] gcaugaagca ggaacauacc 20
[6691] <210> 571
[6692] <211> 20
[6693] <212> RNA
[6694] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6695] <220>
[6696] <223> 人工序列的描述:合成
[6697] 寡核苷酸
[6698] <400> 571
[6699] ggcaugaagc aggaacauac 20
[6700] <210> 572
[6701] <211> 20
[6702] <212> DNA
[6703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6704] <220>
[6705] <223> 人工序列的描述:合成
[6706] 寡核苷酸
[6707] <220>

[6708] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6709] 寡核苷酸

[6710] <400> 572

[6711] aggcatgaag caggaacaua 20

[6712] <210> 573

[6713] <211> 20

[6714] <212> DNA

[6715] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6716] <220>

[6717] <223> 人工序列的描述:合成

[6718] 寡核苷酸

[6719] <220>

[6720] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6721] 寡核苷酸

[6722] <400> 573

[6723] aaggcatgaa gcaggaacau 20

[6724] <210> 574

[6725] <211> 20

[6726] <212> DNA

[6727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6728] <220>

[6729] <223> 人工序列的描述:合成

[6730] 寡核苷酸

[6731] <400> 574

[6732] aaaggcatga agcaggaaca 20

[6733] <210> 575

[6734] <211> 20

[6735] <212> DNA

[6736] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6737] <220>

[6738] <223> 人工序列的描述:合成

[6739] 寡核苷酸

[6740] <400> 575

[6741] gaaaggcatg aagcaggaac 20

[6742] <210> 576

[6743] <211> 20

[6744] <212> DNA

[6745] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6746] <220>

[6747] <223> 人工序列的描述:合成

[6748] 寡核苷酸

[6749] <400> 576

[6750] agaaaggcat gaagcaggaa 20

[6751] <210> 577

[6752] <211> 20

[6753] <212> DNA

[6754] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6755] <220>

[6756] <223> 人工序列的描述:合成

[6757] 寡核苷酸

[6758] <220>

[6759] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6760] 寡核苷酸

[6761] <400> 577

[6762] gccactgtag aaaggcauga 20

[6763] <210> 578

[6764] <211> 20

[6765] <212> DNA

[6766] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6767] <220>

[6768] <223> 人工序列的描述:合成

[6769] 寡核苷酸

[6770] <220>

[6771] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6772] 寡核苷酸

[6773] <400> 578

[6774] ggccactgta gaaaggcaug 20

[6775] <210> 579

[6776] <211> 20

[6777] <212> DNA

[6778] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6779] <220>

[6780] <223> 人工序列的描述:合成

[6781] 寡核苷酸

[6782] <220>

[6783] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6784] 寡核苷酸

[6785] <400> 579

[6786] aggccactgt agaaaggcau 20
[6787] <210> 580
[6788] <211> 20
[6789] <212> DNA
[6790] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6791] <220>
[6792] <223> 人工序列的描述:合成
[6793] 寡核苷酸
[6794] <400> 580
[6795] aaggccactg tagaaaggca 20
[6796] <210> 581
[6797] <211> 20
[6798] <212> DNA
[6799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6800] <220>
[6801] <223> 人工序列的描述:合成
[6802] 寡核苷酸
[6803] <220>
[6804] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6805] 寡核苷酸
[6806] <400> 581
[6807] uaaggccact gtagaaaggc 20
[6808] <210> 582
[6809] <211> 20
[6810] <212> DNA
[6811] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6812] <220>
[6813] <223> 人工序列的描述:合成
[6814] 寡核苷酸
[6815] <220>
[6816] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[6817] 寡核苷酸
[6818] <400> 582
[6819] auaaggccac tgtagaaagg 20
[6820] <210> 583
[6821] <211> 20
[6822] <212> DNA
[6823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6824] <220>

[6825] <223> 人工序列的描述:合成

[6826] 寡核苷酸

[6827] <220>

[6828] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6829] 寡核苷酸

[6830] <400> 583

[6831] gauaaggcca ctgtagaaag 20

[6832] <210> 584

[6833] <211> 20

[6834] <212> DNA

[6835] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6836] <220>

[6837] <223> 人工序列的描述:合成

[6838] 寡核苷酸

[6839] <220>

[6840] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[6841] 寡核苷酸

[6842] <400> 584

[6843] ggauaaggcc actgtagaaa 20

[6844] <210> 585

[6845] <211> 20

[6846] <212> DNA

[6847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6848] <220>

[6849] <223> 人工序列的描述:合成

[6850] 寡核苷酸

[6851] <400> 585

[6852] catgaagcag gaacatacca 20

[6853] <210> 586

[6854] <211> 20

[6855] <212> DNA

[6856] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6857] <220>

[6858] <223> 人工序列的描述:合成

[6859] 寡核苷酸

[6860] <400> 586

[6861] gcatgaagca ggaacatacc 20

[6862] <210> 587

[6863] <211> 20

[6864] <212> DNA
[6865] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6866] <220>
[6867] <223> 人工序列的描述:合成
[6868] 寡核苷酸
[6869] <400> 587
[6870] ggcatgaagc aggaacatac 20
[6871] <210> 588
[6872] <211> 20
[6873] <212> DNA
[6874] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6875] <220>
[6876] <223> 人工序列的描述:合成
[6877] 寡核苷酸
[6878] <400> 588
[6879] aggcatgaag caggaacata 20
[6880] <210> 589
[6881] <211> 20
[6882] <212> DNA
[6883] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6884] <220>
[6885] <223> 人工序列的描述:合成
[6886] 寡核苷酸
[6887] <400> 589
[6888] aaggcatgaa gcaggaacat 20
[6889] <210> 590
[6890] <211> 20
[6891] <212> DNA
[6892] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6893] <220>
[6894] <223> 人工序列的描述:合成
[6895] 寡核苷酸
[6896] <400> 590
[6897] aaaggcatga agcaggaaca 20
[6898] <210> 591
[6899] <211> 20
[6900] <212> DNA
[6901] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6902] <220>

[6903] <223> 人工序列的描述:合成

[6904] 寡核苷酸

[6905] <400> 591

[6906] gaaaggcatg aagcaggaac 20

[6907] <210> 592

[6908] <211> 20

[6909] <212> DNA

[6910] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6911] <220>

[6912] <223> 人工序列的描述:合成

[6913] 寡核苷酸

[6914] <400> 592

[6915] agaaaggcat gaagcaggaa 20

[6916] <210> 593

[6917] <211> 20

[6918] <212> DNA

[6919] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6920] <220>

[6921] <223> 人工序列的描述:合成

[6922] 寡核苷酸

[6923] <400> 593

[6924] tagaaaggca tgaagcagga 20

[6925] <210> 594

[6926] <211> 20

[6927] <212> DNA

[6928] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6929] <220>

[6930] <223> 人工序列的描述:合成

[6931] 寡核苷酸

[6932] <400> 594

[6933] gtagaaaggc atgaagcagg 20

[6934] <210> 595

[6935] <211> 20

[6936] <212> DNA

[6937] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[6938] <220>

[6939] <223> 人工序列的描述:合成

[6940] 寡核苷酸

[6941] <400> 595

[6942] tgtagaaagg catgaagcag 20
[6943] <210> 596
[6944] <211> 20
[6945] <212> DNA
[6946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6947] <220>
[6948] <223> 人工序列的描述:合成
[6949] 寡核苷酸
[6950] <400> 596
[6951] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[6952] <210> 597
[6953] <211> 20
[6954] <212> DNA
[6955] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6956] <220>
[6957] <223> 人工序列的描述:合成
[6958] 寡核苷酸
[6959] <400> 597
[6960] actgtagaaa ggcatgaagc 20
[6961] <210> 598
[6962] <211> 20
[6963] <212> DNA
[6964] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6965] <220>
[6966] <223> 人工序列的描述:合成
[6967] 寡核苷酸
[6968] <400> 598
[6969] cactgtagaa aggcatgaag 20
[6970] <210> 599
[6971] <211> 20
[6972] <212> DNA
[6973] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6974] <220>
[6975] <223> 人工序列的描述:合成
[6976] 寡核苷酸
[6977] <400> 599
[6978] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[6979] <210> 600
[6980] <211> 20

[6981] <212> DNA
[6982] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6983] <220>
[6984] <223> 人工序列的描述:合成
[6985] 寡核苷酸
[6986] <400> 600
[6987] gccactgtag aaaggcatga 20
[6988] <210> 601
[6989] <211> 20
[6990] <212> DNA
[6991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[6992] <220>
[6993] <223> 人工序列的描述:合成
[6994] 寡核苷酸
[6995] <400> 601
[6996] ggccactgta gaaaggcatg 20
[6997] <210> 602
[6998] <211> 20
[6999] <212> DNA
[7000] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7001] <220>
[7002] <223> 人工序列的描述:合成
[7003] 寡核苷酸
[7004] <400> 602
[7005] aggccactgt agaaaggcat 20
[7006] <210> 603
[7007] <211> 20
[7008] <212> DNA
[7009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7010] <220>
[7011] <223> 人工序列的描述:合成
[7012] 寡核苷酸
[7013] <400> 603
[7014] aaggccactg tagaaaggca 20
[7015] <210> 604
[7016] <211> 20
[7017] <212> DNA
[7018] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7019] <220>

[7020] <223> 人工序列的描述:合成

[7021] 寡核苷酸

[7022] <400> 604

[7023] taaggccact gtagaaaggc 20

[7024] <210> 605

[7025] <211> 20

[7026] <212> DNA

[7027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7028] <220>

[7029] <223> 人工序列的描述:合成

[7030] 寡核苷酸

[7031] <400> 605

[7032] ataaggccac tgtagaaagg 20

[7033] <210> 606

[7034] <211> 20

[7035] <212> DNA

[7036] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7037] <220>

[7038] <223> 人工序列的描述:合成

[7039] 寡核苷酸

[7040] <400> 606

[7041] gataaggcca ctgtagaaag 20

[7042] <210> 607

[7043] <211> 20

[7044] <212> DNA

[7045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7046] <220>

[7047] <223> 人工序列的描述:合成

[7048] 寡核苷酸

[7049] <400> 607

[7050] ggataaggcc actgtagaaa 20

[7051] <210> 608

[7052] <211> 20

[7053] <212> RNA

[7054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7055] <220>

[7056] <223> 人工序列的描述:合成

[7057] 寡核苷酸

[7058] <400> 608

[7059] caugaagcag gaacauacca 20
[7060] <210> 609
[7061] <211> 20
[7062] <212> RNA
[7063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7064] <220>
[7065] <223> 人工序列的描述:合成
[7066] 寡核苷酸
[7067] <400> 609
[7068] gcaugaagca ggaacauacc 20
[7069] <210> 610
[7070] <211> 20
[7071] <212> RNA
[7072] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7073] <220>
[7074] <223> 人工序列的描述:合成
[7075] 寡核苷酸
[7076] <400> 610
[7077] ggcaugaagc aggaacauac 20
[7078] <210> 611
[7079] <211> 20
[7080] <212> DNA
[7081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7082] <220>
[7083] <223> 人工序列的描述:合成
[7084] 寡核苷酸
[7085] <220>
[7086] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7087] 寡核苷酸
[7088] <400> 611
[7089] aggcatgaag caggaacaua 20
[7090] <210> 612
[7091] <211> 20
[7092] <212> DNA
[7093] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7094] <220>
[7095] <223> 人工序列的描述:合成
[7096] 寡核苷酸
[7097] <400> 612

[7098] aaggcatgaa gcaggaacat 20
[7099] <210> 613
[7100] <211> 20
[7101] <212> DNA
[7102] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7103] <220>
[7104] <223> 人工序列的描述:合成
[7105] 寡核苷酸
[7106] <400> 613
[7107] aaaggcatga agcaggaaca 20
[7108] <210> 614
[7109] <211> 20
[7110] <212> DNA
[7111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7112] <220>
[7113] <223> 人工序列的描述:合成
[7114] 寡核苷酸
[7115] <400> 614
[7116] gaaaggcatg aagcaggaac 20
[7117] <210> 615
[7118] <211> 20
[7119] <212> DNA
[7120] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7121] <220>
[7122] <223> 人工序列的描述:合成
[7123] 寡核苷酸
[7124] <400> 615
[7125] agaaaggcat gaagcaggaa 20
[7126] <210> 616
[7127] <211> 20
[7128] <212> DNA
[7129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7130] <220>
[7131] <223> 人工序列的描述:合成
[7132] 寡核苷酸
[7133] <400> 616
[7134] tagaaaggca tgaagcagga 20
[7135] <210> 617
[7136] <211> 20

[7137] <212> DNA
[7138] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7139] <220>
[7140] <223> 人工序列的描述:合成
[7141] 寡核苷酸
[7142] <220>
[7143] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7144] 寡核苷酸
[7145] <400> 617
[7146] guagaaaggc atgaagcagg 20
[7147] <210> 618
[7148] <211> 20
[7149] <212> DNA
[7150] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7151] <220>
[7152] <223> 人工序列的描述:合成
[7153] 寡核苷酸
[7154] <220>
[7155] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7156] 寡核苷酸
[7157] <400> 618
[7158] tguagaaagg catgaagcag 20
[7159] <210> 619
[7160] <211> 20
[7161] <212> DNA
[7162] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7163] <220>
[7164] <223> 人工序列的描述:合成
[7165] 寡核苷酸
[7166] <220>
[7167] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7168] 寡核苷酸
[7169] <400> 619
[7170] cuguagaaag gcatgaagca 20
[7171] <210> 620
[7172] <211> 20
[7173] <212> DNA
[7174] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7175] <220>

[7176] <223> 人工序列的描述:合成

[7177] 寡核苷酸

[7178] <220>

[7179] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7180] 寡核苷酸

[7181] <400> 620

[7182] acuguagaaa ggcatgaagc 20

[7183] <210> 621

[7184] <211> 20

[7185] <212> DNA

[7186] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7187] <220>

[7188] <223> 人工序列的描述:合成

[7189] 寡核苷酸

[7190] <220>

[7191] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7192] 寡核苷酸

[7193] <400> 621

[7194] cacugtagaa aggcaugaag 20

[7195] <210> 622

[7196] <211> 20

[7197] <212> DNA

[7198] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7199] <220>

[7200] <223> 人工序列的描述:合成

[7201] 寡核苷酸

[7202] <220>

[7203] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7204] 寡核苷酸

[7205] <400> 622

[7206] ccacugtaga aaggcaugaa 20

[7207] <210> 623

[7208] <211> 20

[7209] <212> DNA

[7210] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7211] <220>

[7212] <223> 人工序列的描述:合成

[7213] 寡核苷酸

[7214] <220>

[7215] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7216] 寡核苷酸

[7217] <400> 623

[7218] gccactgtag aaaggcauga 20

[7219] <210> 624

[7220] <211> 20

[7221] <212> DNA

[7222] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7223] <220>

[7224] <223> 人工序列的描述:合成

[7225] 寡核苷酸

[7226] <220>

[7227] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7228] 寡核苷酸

[7229] <400> 624

[7230] ggccactgta gaaaggcaug 20

[7231] <210> 625

[7232] <211> 20

[7233] <212> DNA

[7234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7235] <220>

[7236] <223> 人工序列的描述:合成

[7237] 寡核苷酸

[7238] <400> 625

[7239] aggccactgt agaaaggcat 20

[7240] <210> 626

[7241] <211> 20

[7242] <212> DNA

[7243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7244] <220>

[7245] <223> 人工序列的描述:合成

[7246] 寡核苷酸

[7247] <400> 626

[7248] aaggccactg tagaaaggca 20

[7249] <210> 627

[7250] <211> 20

[7251] <212> DNA

[7252] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7253] <220>

[7254] <223> 人工序列的描述:合成

[7255] 寡核苷酸

[7256] <400> 627

[7257] taaggccact gtagaaaggc 20

[7258] <210> 628

[7259] <211> 20

[7260] <212> DNA

[7261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7262] <220>

[7263] <223> 人工序列的描述:合成

[7264] 寡核苷酸

[7265] <220>

[7266] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7267] 寡核苷酸

[7268] <400> 628

[7269] auaaggccac tgtagaaagg 20

[7270] <210> 629

[7271] <211> 20

[7272] <212> DNA

[7273] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7274] <220>

[7275] <223> 人工序列的描述:合成

[7276] 寡核苷酸

[7277] <220>

[7278] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7279] 寡核苷酸

[7280] <400> 629

[7281] gauaaggcca ctgtagaaag 20

[7282] <210> 630

[7283] <211> 20

[7284] <212> DNA

[7285] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7286] <220>

[7287] <223> 人工序列的描述:合成

[7288] 寡核苷酸

[7289] <220>

[7290] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7291] 寡核苷酸

[7292] <400> 630

[7293] ggauaaggcc actgtagaaa 20
[7294] <210> 631
[7295] <211> 20
[7296] <212> DNA
[7297] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7298] <220>
[7299] <223> 人工序列的描述:合成
[7300] 寡核苷酸
[7301] <400> 631
[7302] catgaagcag gaacatacca 20
[7303] <210> 632
[7304] <211> 20
[7305] <212> DNA
[7306] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7307] <220>
[7308] <223> 人工序列的描述:合成
[7309] 寡核苷酸
[7310] <400> 632
[7311] gcatgaagca ggaacatacc 20
[7312] <210> 633
[7313] <211> 20
[7314] <212> DNA
[7315] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7316] <220>
[7317] <223> 人工序列的描述:合成
[7318] 寡核苷酸
[7319] <400> 633
[7320] ggcatgaagc aggaacatac 20
[7321] <210> 634
[7322] <211> 20
[7323] <212> DNA
[7324] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7325] <220>
[7326] <223> 人工序列的描述:合成
[7327] 寡核苷酸
[7328] <400> 634
[7329] aggcatgaag caggaacata 20
[7330] <210> 635
[7331] <211> 20

[7332] <212> DNA
[7333] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7334] <220>
[7335] <223> 人工序列的描述:合成
[7336] 寡核苷酸
[7337] <400> 635
[7338] aaggcatgaa gcaggaacat 20
[7339] <210> 636
[7340] <211> 20
[7341] <212> DNA
[7342] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7343] <220>
[7344] <223> 人工序列的描述:合成
[7345] 寡核苷酸
[7346] <400> 636
[7347] aaaggcatga agcaggaaca 20
[7348] <210> 637
[7349] <211> 20
[7350] <212> DNA
[7351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7352] <220>
[7353] <223> 人工序列的描述:合成
[7354] 寡核苷酸
[7355] <400> 637
[7356] gaaaggcatg aagcaggaac 20
[7357] <210> 638
[7358] <211> 20
[7359] <212> DNA
[7360] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7361] <220>
[7362] <223> 人工序列的描述:合成
[7363] 寡核苷酸
[7364] <400> 638
[7365] agaaaggcat gaagcaggaa 20
[7366] <210> 639
[7367] <211> 20
[7368] <212> DNA
[7369] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7370] <220>

[7371] <223> 人工序列的描述:合成

[7372] 寡核苷酸

[7373] <400> 639

[7374] tagaaaggca tgaagcagga 20

[7375] <210> 640

[7376] <211> 20

[7377] <212> DNA

[7378] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7379] <220>

[7380] <223> 人工序列的描述:合成

[7381] 寡核苷酸

[7382] <400> 640

[7383] gtagaaaggc atgaagcagg 20

[7384] <210> 641

[7385] <211> 20

[7386] <212> DNA

[7387] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7388] <220>

[7389] <223> 人工序列的描述:合成

[7390] 寡核苷酸

[7391] <400> 641

[7392] tgtagaaagg catgaagcag 20

[7393] <210> 642

[7394] <211> 20

[7395] <212> DNA

[7396] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7397] <220>

[7398] <223> 人工序列的描述:合成

[7399] 寡核苷酸

[7400] <400> 642

[7401] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[7402] <210> 643

[7403] <211> 20

[7404] <212> DNA

[7405] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7406] <220>

[7407] <223> 人工序列的描述:合成

[7408] 寡核苷酸

[7409] <400> 643

[7410] actgtagaaa ggcatgaagc 20
[7411] <210> 644
[7412] <211> 20
[7413] <212> DNA
[7414] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7415] <220>
[7416] <223> 人工序列的描述:合成
[7417] 寡核苷酸
[7418] <400> 644
[7419] cactgtagaa aggcatgaag 20
[7420] <210> 645
[7421] <211> 20
[7422] <212> DNA
[7423] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7424] <220>
[7425] <223> 人工序列的描述:合成
[7426] 寡核苷酸
[7427] <400> 645
[7428] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[7429] <210> 646
[7430] <211> 20
[7431] <212> DNA
[7432] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7433] <220>
[7434] <223> 人工序列的描述:合成
[7435] 寡核苷酸
[7436] <400> 646
[7437] gccactgtag aaaggcatga 20
[7438] <210> 647
[7439] <211> 20
[7440] <212> DNA
[7441] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7442] <220>
[7443] <223> 人工序列的描述:合成
[7444] 寡核苷酸
[7445] <400> 647
[7446] ggccactgta gaaaggcatg 20
[7447] <210> 648
[7448] <211> 20

[7449] <212> DNA
[7450] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7451] <220>
[7452] <223> 人工序列的描述:合成
[7453] 寡核苷酸
[7454] <400> 648
[7455] aggccactgt agaaaggcat 20
[7456] <210> 649
[7457] <211> 20
[7458] <212> DNA
[7459] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7460] <220>
[7461] <223> 人工序列的描述:合成
[7462] 寡核苷酸
[7463] <400> 649
[7464] aaggccactg tagaaaggca 20
[7465] <210> 650
[7466] <211> 20
[7467] <212> DNA
[7468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7469] <220>
[7470] <223> 人工序列的描述:合成
[7471] 寡核苷酸
[7472] <400> 650
[7473] taaggccact gtagaaaggc 20
[7474] <210> 651
[7475] <211> 20
[7476] <212> DNA
[7477] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7478] <220>
[7479] <223> 人工序列的描述:合成
[7480] 寡核苷酸
[7481] <400> 651
[7482] ataaggccac tgtagaaagg 20
[7483] <210> 652
[7484] <211> 20
[7485] <212> DNA
[7486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7487] <220>

[7488] <223> 人工序列的描述:合成

[7489] 寡核苷酸

[7490] <400> 652

[7491] gataaggcca ctgtagaaag 20

[7492] <210> 653

[7493] <211> 20

[7494] <212> DNA

[7495] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7496] <220>

[7497] <223> 人工序列的描述:合成

[7498] 寡核苷酸

[7499] <400> 653

[7500] ggataaggcc actgtagaaa 20

[7501] <210> 654

[7502] <211> 20

[7503] <212> DNA

[7504] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7505] <220>

[7506] <223> 人工序列的描述:合成

[7507] 寡核苷酸

[7508] <400> 654

[7509] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7510] <210> 655

[7511] <211> 20

[7512] <212> DNA

[7513] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7514] <220>

[7515] <223> 人工序列的描述:合成

[7516] 寡核苷酸

[7517] <400> 655

[7518] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7519] <210> 656

[7520] <211> 23

[7521] <212> DNA

[7522] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7523] <220>

[7524] <223> 人工序列的描述:合成

[7525] 寡核苷酸

[7526] <220>

[7527] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7528] 寡核苷酸
[7529] <400> 656
[7530] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7531] <210> 657
[7532] <211> 20
[7533] <212> DNA
[7534] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7535] <220>
[7536] <223> 人工序列的描述:合成
[7537] 寡核苷酸
[7538] <400> 657
[7539] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7540] <210> 658
[7541] <211> 20
[7542] <212> DNA
[7543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7544] <220>
[7545] <223> 人工序列的描述:合成
[7546] 寡核苷酸
[7547] <400> 658
[7548] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7549] <210> 659
[7550] <211> 20
[7551] <212> DNA
[7552] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7553] <220>
[7554] <223> 人工序列的描述:合成
[7555] 寡核苷酸
[7556] <400> 659
[7557] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7558] <210> 660
[7559] <211> 20
[7560] <212> DNA
[7561] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7562] <220>
[7563] <223> 人工序列的描述:合成
[7564] 寡核苷酸
[7565] <400> 660

[7566] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7567] <210> 661
[7568] <211> 20
[7569] <212> DNA
[7570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7571] <220>
[7572] <223> 人工序列的描述:合成
[7573] 寡核苷酸
[7574] <400> 661
[7575] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7576] <210> 662
[7577] <211> 20
[7578] <212> DNA
[7579] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7580] <220>
[7581] <223> 人工序列的描述:合成
[7582] 寡核苷酸
[7583] <400> 662
[7584] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7585] <210> 663
[7586] <211> 20
[7587] <212> DNA
[7588] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7589] <220>
[7590] <223> 人工序列的描述:合成
[7591] 寡核苷酸
[7592] <400> 663
[7593] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7594] <210> 664
[7595] <211> 20
[7596] <212> DNA
[7597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7598] <220>
[7599] <223> 人工序列的描述:合成
[7600] 寡核苷酸
[7601] <400> 664
[7602] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7603] <210> 665
[7604] <211> 20

[7605] <212> DNA
[7606] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7607] <220>
[7608] <223> 人工序列的描述:合成
[7609] 寡核苷酸
[7610] <400> 665
[7611] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7612] <210> 666
[7613] <211> 20
[7614] <212> DNA
[7615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7616] <220>
[7617] <223> 人工序列的描述:合成
[7618] 寡核苷酸
[7619] <400> 666
[7620] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7621] <210> 667
[7622] <211> 20
[7623] <212> DNA
[7624] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7625] <220>
[7626] <223> 人工序列的描述:合成
[7627] 寡核苷酸
[7628] <400> 667
[7629] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7630] <210> 668
[7631] <211> 20
[7632] <212> DNA
[7633] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7634] <220>
[7635] <223> 人工序列的描述:合成
[7636] 寡核苷酸
[7637] <400> 668
[7638] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7639] <210> 669
[7640] <211> 20
[7641] <212> DNA
[7642] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7643] <220>

[7644] <223> 人工序列的描述:合成

[7645] 寡核苷酸

[7646] <400> 669

[7647] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7648] <210> 670

[7649] <211> 20

[7650] <212> DNA

[7651] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7652] <220>

[7653] <223> 人工序列的描述:合成

[7654] 寡核苷酸

[7655] <400> 670

[7656] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7657] <210> 671

[7658] <211> 20

[7659] <212> DNA

[7660] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7661] <220>

[7662] <223> 人工序列的描述:合成

[7663] 寡核苷酸

[7664] <400> 671

[7665] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7666] <210> 672

[7667] <211> 20

[7668] <212> DNA

[7669] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7670] <220>

[7671] <223> 人工序列的描述:合成

[7672] 寡核苷酸

[7673] <400> 672

[7674] ggacctgagg atggaccgcg 20

[7675] <210> 673

[7676] <211> 23

[7677] <212> DNA

[7678] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7679] <220>

[7680] <223> 人工序列的描述:合成

[7681] 寡核苷酸

[7682] <220>

[7683] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7684] 寡核苷酸
[7685] <400> 673
[7686] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7687] <210> 674
[7688] <211> 23
[7689] <212> DNA
[7690] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7691] <220>
[7692] <223> 人工序列的描述:合成
[7693] 寡核苷酸
[7694] <220>
[7695] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7696] 寡核苷酸
[7697] <400> 674
[7698] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7699] <210> 675
[7700] <211> 23
[7701] <212> DNA
[7702] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7703] <220>
[7704] <223> 人工序列的描述:合成
[7705] 寡核苷酸
[7706] <220>
[7707] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7708] 寡核苷酸
[7709] <400> 675
[7710] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7711] <210> 676
[7712] <211> 23
[7713] <212> DNA
[7714] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7715] <220>
[7716] <223> 人工序列的描述:合成
[7717] 寡核苷酸
[7718] <220>
[7719] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7720] 寡核苷酸
[7721] <400> 676

[7722] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7723] <210> 677
[7724] <211> 23
[7725] <212> DNA
[7726] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7727] <220>
[7728] <223> 人工序列的描述:合成
[7729] 寡核苷酸
[7730] <220>
[7731] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7732] 寡核苷酸
[7733] <400> 677
[7734] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7735] <210> 678
[7736] <211> 23
[7737] <212> DNA
[7738] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7739] <220>
[7740] <223> 人工序列的描述:合成
[7741] 寡核苷酸
[7742] <220>
[7743] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7744] 寡核苷酸
[7745] <400> 678
[7746] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7747] <210> 679
[7748] <211> 23
[7749] <212> DNA
[7750] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7751] <220>
[7752] <223> 人工序列的描述:合成
[7753] 寡核苷酸
[7754] <220>
[7755] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7756] 寡核苷酸
[7757] <400> 679
[7758] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7759] <210> 680
[7760] <211> 23

[7761] <212> DNA
[7762] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7763] <220>
[7764] <223> 人工序列的描述:合成
[7765] 寡核苷酸
[7766] <220>
[7767] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7768] 寡核苷酸
[7769] <400> 680
[7770] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7771] <210> 681
[7772] <211> 23
[7773] <212> DNA
[7774] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7775] <220>
[7776] <223> 人工序列的描述:合成
[7777] 寡核苷酸
[7778] <220>
[7779] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7780] 寡核苷酸
[7781] <400> 681
[7782] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7783] <210> 682
[7784] <211> 23
[7785] <212> DNA
[7786] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7787] <220>
[7788] <223> 人工序列的描述:合成
[7789] 寡核苷酸
[7790] <220>
[7791] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7792] 寡核苷酸
[7793] <400> 682
[7794] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7795] <210> 683
[7796] <211> 23
[7797] <212> DNA
[7798] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7799] <220>

[7800] <223> 人工序列的描述:合成
[7801] 寡核苷酸
[7802] <220>
[7803] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7804] 寡核苷酸
[7805] <400> 683
[7806] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7807] <210> 684
[7808] <211> 23
[7809] <212> DNA
[7810] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7811] <220>
[7812] <223> 人工序列的描述:合成
[7813] 寡核苷酸
[7814] <220>
[7815] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7816] 寡核苷酸
[7817] <400> 684
[7818] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7819] <210> 685
[7820] <211> 23
[7821] <212> DNA
[7822] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7823] <220>
[7824] <223> 人工序列的描述:合成
[7825] 寡核苷酸
[7826] <220>
[7827] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7828] 寡核苷酸
[7829] <400> 685
[7830] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7831] <210> 686
[7832] <211> 45
[7833] <212> DNA
[7834] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7835] <220>
[7836] <223> 人工序列的描述:合成
[7837] 寡核苷酸
[7838] <220>

[7839] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7840] 寡核苷酸

[7841] <400> 686

[7842] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[7843] <210> 687

[7844] <211> 45

[7845] <212> DNA

[7846] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7847] <220>

[7848] <223> 人工序列的描述:合成

[7849] 寡核苷酸

[7850] <220>

[7851] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7852] 寡核苷酸

[7853] <400> 687

[7854] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[7855] <210> 688

[7856] <211> 45

[7857] <212> DNA

[7858] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7859] <220>

[7860] <223> 人工序列的描述:合成

[7861] 寡核苷酸

[7862] <220>

[7863] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7864] 寡核苷酸

[7865] <400> 688

[7866] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[7867] <210> 689

[7868] <211> 45

[7869] <212> DNA

[7870] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[7871] <220>

[7872] <223> 人工序列的描述:合成

[7873] 寡核苷酸

[7874] <220>

[7875] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7876] 寡核苷酸

[7877] <400> 689

[7878] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45
[7879] <210> 690
[7880] <211> 45
[7881] <212> DNA
[7882] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7883] <220>
[7884] <223> 人工序列的描述:合成
[7885] 寡核苷酸
[7886] <220>
[7887] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7888] 寡核苷酸
[7889] <400> 690
[7890] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45
[7891] <210> 691
[7892] <211> 20
[7893] <212> DNA
[7894] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7895] <220>
[7896] <223> 人工序列的描述:合成
[7897] 寡核苷酸
[7898] <400> 691
[7899] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7900] <210> 692
[7901] <211> 20
[7902] <212> DNA
[7903] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7904] <220>
[7905] <223> 人工序列的描述:合成
[7906] 寡核苷酸
[7907] <400> 692
[7908] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7909] <210> 693
[7910] <211> 20
[7911] <212> DNA
[7912] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7913] <220>
[7914] <223> 人工序列的描述:合成
[7915] 寡核苷酸
[7916] <400> 693

[7917] ggacctgagg atggaccgcg 20
[7918] <210> 694
[7919] <211> 23
[7920] <212> DNA
[7921] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7922] <220>
[7923] <223> 人工序列的描述:合成
[7924] 寡核苷酸
[7925] <220>
[7926] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7927] 寡核苷酸
[7928] <400> 694
[7929] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7930] <210> 695
[7931] <211> 23
[7932] <212> DNA
[7933] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7934] <220>
[7935] <223> 人工序列的描述:合成
[7936] 寡核苷酸
[7937] <220>
[7938] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7939] 寡核苷酸
[7940] <400> 695
[7941] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[7942] <210> 696
[7943] <211> 23
[7944] <212> DNA
[7945] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7946] <220>
[7947] <223> 人工序列的描述:合成
[7948] 寡核苷酸
[7949] <220>
[7950] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7951] 寡核苷酸
[7952] <400> 696
[7953] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7954] <210> 697
[7955] <211> 23

[7956] <212> DNA
[7957] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7958] <220>
[7959] <223> 人工序列的描述:合成
[7960] 寡核苷酸
[7961] <220>
[7962] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7963] 寡核苷酸
[7964] <400> 697
[7965] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7966] <210> 698
[7967] <211> 23
[7968] <212> DNA
[7969] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7970] <220>
[7971] <223> 人工序列的描述:合成
[7972] 寡核苷酸
[7973] <220>
[7974] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7975] 寡核苷酸
[7976] <400> 698
[7977] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7978] <210> 699
[7979] <211> 23
[7980] <212> DNA
[7981] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7982] <220>
[7983] <223> 人工序列的描述:合成
[7984] 寡核苷酸
[7985] <220>
[7986] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[7987] 寡核苷酸
[7988] <400> 699
[7989] tgccacugua gaaaggcatg atu 23
[7990] <210> 700
[7991] <211> 23
[7992] <212> DNA
[7993] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[7994] <220>

[7995] <223> 人工序列的描述:合成

[7996] 寡核苷酸

[7997] <220>

[7998] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[7999] 寡核苷酸

[8000] <400> 700

[8001] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[8002] <210> 701

[8003] <211> 20

[8004] <212> DNA

[8005] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8006] <220>

[8007] <223> 人工序列的描述:合成

[8008] 寡核苷酸

[8009] <400> 701

[8010] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8011] <210> 702

[8012] <211> 20

[8013] <212> DNA

[8014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8015] <220>

[8016] <223> 人工序列的描述:合成

[8017] 寡核苷酸

[8018] <400> 702

[8019] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8020] <210> 703

[8021] <211> 20

[8022] <212> DNA

[8023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8024] <220>

[8025] <223> 人工序列的描述:合成

[8026] 寡核苷酸

[8027] <400> 703

[8028] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8029] <210> 704

[8030] <211> 20

[8031] <212> DNA

[8032] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8033] <220>

[8034] <223> 人工序列的描述:合成

[8035] 寡核苷酸

[8036] <400> 704

[8037] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8038] <210> 705

[8039] <211> 20

[8040] <212> DNA

[8041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8042] <220>

[8043] <223> 人工序列的描述:合成

[8044] 寡核苷酸

[8045] <400> 705

[8046] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8047] <210> 706

[8048] <211> 20

[8049] <212> DNA

[8050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8051] <220>

[8052] <223> 人工序列的描述:合成

[8053] 寡核苷酸

[8054] <400> 706

[8055] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8056] <210> 707

[8057] <211> 20

[8058] <212> DNA

[8059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8060] <220>

[8061] <223> 人工序列的描述:合成

[8062] 寡核苷酸

[8063] <400> 707

[8064] ggacctgagg atggaccgcg 20

[8065] <210> 708

[8066] <211> 20

[8067] <212> DNA

[8068] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8069] <220>

[8070] <223> 人工序列的描述:合成

[8071] 寡核苷酸

[8072] <400> 708

[8073] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8074] <210> 709
[8075] <211> 20
[8076] <212> DNA
[8077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8078] <220>
[8079] <223> 人工序列的描述:合成
[8080] 寡核苷酸
[8081] <400> 709
[8082] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8083] <210> 710
[8084] <211> 20
[8085] <212> DNA
[8086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8087] <220>
[8088] <223> 人工序列的描述:合成
[8089] 寡核苷酸
[8090] <400> 710
[8091] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8092] <210> 711
[8093] <211> 20
[8094] <212> DNA
[8095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8096] <220>
[8097] <223> 人工序列的描述:合成
[8098] 寡核苷酸
[8099] <400> 711
[8100] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8101] <210> 712
[8102] <211> 20
[8103] <212> DNA
[8104] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8105] <220>
[8106] <223> 人工序列的描述:合成
[8107] 寡核苷酸
[8108] <400> 712
[8109] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8110] <210> 713
[8111] <211> 23

[8112] <212> DNA
[8113] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8114] <220>
[8115] <223> 人工序列的描述:合成
[8116] 寡核苷酸
[8117] <220>
[8118] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8119] 寡核苷酸
[8120] <400> 713
[8121] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[8122] <210> 714
[8123] <211> 23
[8124] <212> DNA
[8125] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8126] <220>
[8127] <223> 人工序列的描述:合成
[8128] 寡核苷酸
[8129] <220>
[8130] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8131] 寡核苷酸
[8132] <400> 714
[8133] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[8134] <210> 715
[8135] <211> 27
[8136] <212> RNA
[8137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8138] <220>
[8139] <223> 人工序列的描述:合成
[8140] 寡核苷酸
[8141] <400> 715
[8142] cugugacgug gaggauccca gccucug 27
[8143] <210> 716
[8144] <211> 20
[8145] <212> DNA
[8146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8147] <220>
[8148] <223> 人工序列的描述:合成
[8149] 寡核苷酸
[8150] <400> 716

[8151] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8152] <210> 717
[8153] <211> 20
[8154] <212> DNA
[8155] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8156] <220>
[8157] <223> 人工序列的描述:合成
[8158] 寡核苷酸
[8159] <400> 717
[8160] ggacctgagg atggaccgcg 20
[8161] <210> 718
[8162] <211> 20
[8163] <212> DNA
[8164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8165] <220>
[8166] <223> 人工序列的描述:合成
[8167] 寡核苷酸
[8168] <400> 718
[8169] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[8170] <210> 719
[8171] <211> 20
[8172] <212> DNA
[8173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8174] <220>
[8175] <223> 人工序列的描述:合成
[8176] 寡核苷酸
[8177] <400> 719
[8178] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[8179] <210> 720
[8180] <211> 20
[8181] <212> DNA
[8182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8183] <220>
[8184] <223> 人工序列的描述:合成
[8185] 寡核苷酸
[8186] <400> 720
[8187] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[8188] <210> 721
[8189] <211> 20

[8190] <212> DNA
[8191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8192] <220>
[8193] <223> 人工序列的描述:合成
[8194] 寡核苷酸
[8195] <400> 721
[8196] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[8197] <210> 722
[8198] <211> 20
[8199] <212> DNA
[8200] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8201] <220>
[8202] <223> 人工序列的描述:合成
[8203] 寡核苷酸
[8204] <400> 722
[8205] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[8206] <210> 723
[8207] <211> 20
[8208] <212> DNA
[8209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8210] <220>
[8211] <223> 人工序列的描述:合成
[8212] 寡核苷酸
[8213] <400> 723
[8214] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[8215] <210> 724
[8216] <211> 20
[8217] <212> RNA
[8218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8219] <220>
[8220] <223> 人工序列的描述:合成
[8221] 寡核苷酸
[8222] <400> 724
[8223] caugaagcag gaacauacca 20
[8224] <210> 725
[8225] <211> 20
[8226] <212> RNA
[8227] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8228] <220>

[8229] <223> 人工序列的描述:合成

[8230] 寡核苷酸

[8231] <400> 725

[8232] gcaugaagca ggaacauacc 20

[8233] <210> 726

[8234] <211> 20

[8235] <212> RNA

[8236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8237] <220>

[8238] <223> 人工序列的描述:合成

[8239] 寡核苷酸

[8240] <400> 726

[8241] ggcaugaagc aggaacauac 20

[8242] <210> 727

[8243] <211> 20

[8244] <212> DNA

[8245] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8246] <220>

[8247] <223> 人工序列的描述:合成

[8248] 寡核苷酸

[8249] <220>

[8250] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8251] 寡核苷酸

[8252] <400> 727

[8253] aggcatgaag caggaacaua 20

[8254] <210> 728

[8255] <211> 20

[8256] <212> DNA

[8257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8258] <220>

[8259] <223> 人工序列的描述:合成

[8260] 寡核苷酸

[8261] <220>

[8262] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8263] 寡核苷酸

[8264] <400> 728

[8265] aaggcatgaa gcaggaacau 20

[8266] <210> 729

[8267] <211> 20

[8268] <212> DNA
[8269] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8270] <220>
[8271] <223> 人工序列的描述:合成
[8272] 寡核苷酸
[8273] <400> 729
[8274] aaaggcatga agcaggaaca 20
[8275] <210> 730
[8276] <211> 20
[8277] <212> DNA
[8278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8279] <220>
[8280] <223> 人工序列的描述:合成
[8281] 寡核苷酸
[8282] <400> 730
[8283] gaaaggcatg aagcaggaac 20
[8284] <210> 731
[8285] <211> 20
[8286] <212> DNA
[8287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8288] <220>
[8289] <223> 人工序列的描述:合成
[8290] 寡核苷酸
[8291] <400> 731
[8292] agaaaggcat gaagcaggaa 20
[8293] <210> 732
[8294] <211> 20
[8295] <212> DNA
[8296] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8297] <220>
[8298] <223> 人工序列的描述:合成
[8299] 寡核苷酸
[8300] <220>
[8301] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8302] 寡核苷酸
[8303] <400> 732
[8304] uagaaaggca tgaagcagga 20
[8305] <210> 733
[8306] <211> 20

[8307] <212> DNA
[8308] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8309] <220>
[8310] <223> 人工序列的描述:合成
[8311] 寡核苷酸
[8312] <220>
[8313] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8314] 寡核苷酸
[8315] <400> 733
[8316] guagaaaggc atgaagcagg 20
[8317] <210> 734
[8318] <211> 20
[8319] <212> DNA
[8320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8321] <220>
[8322] <223> 人工序列的描述:合成
[8323] 寡核苷酸
[8324] <220>
[8325] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8326] 寡核苷酸
[8327] <400> 734
[8328] uguagaaagg catgaagcag 20
[8329] <210> 735
[8330] <211> 20
[8331] <212> DNA
[8332] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8333] <220>
[8334] <223> 人工序列的描述:合成
[8335] 寡核苷酸
[8336] <220>
[8337] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8338] 寡核苷酸
[8339] <400> 735
[8340] cuguagaaag gcatgaagca 20
[8341] <210> 736
[8342] <211> 20
[8343] <212> DNA
[8344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8345] <220>

[8346] <223> 人工序列的描述:合成

[8347] 寡核苷酸

[8348] <220>

[8349] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8350] 寡核苷酸

[8351] <400> 736

[8352] acuguagaaa ggcatgaagc 20

[8353] <210> 737

[8354] <211> 20

[8355] <212> DNA

[8356] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8357] <220>

[8358] <223> 人工序列的描述:合成

[8359] 寡核苷酸

[8360] <220>

[8361] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8362] 寡核苷酸

[8363] <400> 737

[8364] cacugtagaa aggcaugaag 20

[8365] <210> 738

[8366] <211> 20

[8367] <212> DNA

[8368] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8369] <220>

[8370] <223> 人工序列的描述:合成

[8371] 寡核苷酸

[8372] <220>

[8373] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8374] 寡核苷酸

[8375] <400> 738

[8376] ccacugtaga aaggcaugaa 20

[8377] <210> 739

[8378] <211> 20

[8379] <212> DNA

[8380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8381] <220>

[8382] <223> 人工序列的描述:合成

[8383] 寡核苷酸

[8384] <220>

[8385] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8386] 寡核苷酸
[8387] <400> 739
[8388] gccactgtag aaaggcauga 20
[8389] <210> 740
[8390] <211> 20
[8391] <212> DNA
[8392] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8393] <220>
[8394] <223> 人工序列的描述:合成
[8395] 寡核苷酸
[8396] <220>
[8397] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8398] 寡核苷酸
[8399] <400> 740
[8400] ggccactgta gaaaggcaug 20
[8401] <210> 741
[8402] <211> 20
[8403] <212> DNA
[8404] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8405] <220>
[8406] <223> 人工序列的描述:合成
[8407] 寡核苷酸
[8408] <220>
[8409] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8410] 寡核苷酸
[8411] <400> 741
[8412] aggccactgt agaaaggcau 20
[8413] <210> 742
[8414] <211> 20
[8415] <212> DNA
[8416] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8417] <220>
[8418] <223> 人工序列的描述:合成
[8419] 寡核苷酸
[8420] <400> 742
[8421] aaggccactg tagaaaggca 20
[8422] <210> 743
[8423] <211> 20

[8424] <212> DNA
[8425] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8426] <220>
[8427] <223> 人工序列的描述:合成
[8428] 寡核苷酸
[8429] <220>
[8430] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8431] 寡核苷酸
[8432] <400> 743
[8433] uaaggccact gtagaaaggc 20
[8434] <210> 744
[8435] <211> 20
[8436] <212> DNA
[8437] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8438] <220>
[8439] <223> 人工序列的描述:合成
[8440] 寡核苷酸
[8441] <220>
[8442] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8443] 寡核苷酸
[8444] <400> 744
[8445] auaaggccac tgtagaaagg 20
[8446] <210> 745
[8447] <211> 20
[8448] <212> DNA
[8449] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8450] <220>
[8451] <223> 人工序列的描述:合成
[8452] 寡核苷酸
[8453] <220>
[8454] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8455] 寡核苷酸
[8456] <400> 745
[8457] gauaaggcca ctgtagaaag 20
[8458] <210> 746
[8459] <211> 20
[8460] <212> DNA
[8461] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8462] <220>

[8463] <223> 人工序列的描述:合成

[8464] 寡核苷酸

[8465] <220>

[8466] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8467] 寡核苷酸

[8468] <400> 746

[8469] ggauaaggcc actgtagaaa 20

[8470] <210> 747

[8471] <211> 20

[8472] <212> DNA

[8473] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8474] <220>

[8475] <223> 人工序列的描述:合成

[8476] 寡核苷酸

[8477] <400> 747

[8478] catgaagcag gaacatacca 20

[8479] <210> 748

[8480] <211> 20

[8481] <212> DNA

[8482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8483] <220>

[8484] <223> 人工序列的描述:合成

[8485] 寡核苷酸

[8486] <400> 748

[8487] gcatgaagca ggaacatacc 20

[8488] <210> 749

[8489] <211> 20

[8490] <212> DNA

[8491] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8492] <220>

[8493] <223> 人工序列的描述:合成

[8494] 寡核苷酸

[8495] <400> 749

[8496] ggcatgaagc aggaacatac 20

[8497] <210> 750

[8498] <211> 20

[8499] <212> DNA

[8500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8501] <220>

[8502] <223> 人工序列的描述:合成

[8503] 寡核苷酸

[8504] <400> 750

[8505] aggcatgaag caggaacata 20

[8506] <210> 751

[8507] <211> 20

[8508] <212> DNA

[8509] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8510] <220>

[8511] <223> 人工序列的描述:合成

[8512] 寡核苷酸

[8513] <400> 751

[8514] aaggcatgaa gcaggaacat 20

[8515] <210> 752

[8516] <211> 20

[8517] <212> DNA

[8518] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8519] <220>

[8520] <223> 人工序列的描述:合成

[8521] 寡核苷酸

[8522] <400> 752

[8523] aaaggcatga agcaggaaca 20

[8524] <210> 753

[8525] <211> 20

[8526] <212> DNA

[8527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8528] <220>

[8529] <223> 人工序列的描述:合成

[8530] 寡核苷酸

[8531] <400> 753

[8532] gaaaggcatg aagcaggaac 20

[8533] <210> 754

[8534] <211> 20

[8535] <212> DNA

[8536] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8537] <220>

[8538] <223> 人工序列的描述:合成

[8539] 寡核苷酸

[8540] <400> 754

[8541] agaaaggcat gaagcaggaa 20
[8542] <210> 755
[8543] <211> 20
[8544] <212> DNA
[8545] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8546] <220>
[8547] <223> 人工序列的描述:合成
[8548] 寡核苷酸
[8549] <400> 755
[8550] tagaaaggca tgaagcagga 20
[8551] <210> 756
[8552] <211> 20
[8553] <212> DNA
[8554] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8555] <220>
[8556] <223> 人工序列的描述:合成
[8557] 寡核苷酸
[8558] <400> 756
[8559] gtagaaaggc atgaagcagg 20
[8560] <210> 757
[8561] <211> 20
[8562] <212> DNA
[8563] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8564] <220>
[8565] <223> 人工序列的描述:合成
[8566] 寡核苷酸
[8567] <400> 757
[8568] tgtagaaagg catgaagcag 20
[8569] <210> 758
[8570] <211> 20
[8571] <212> DNA
[8572] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8573] <220>
[8574] <223> 人工序列的描述:合成
[8575] 寡核苷酸
[8576] <400> 758
[8577] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[8578] <210> 759
[8579] <211> 20

[8580] <212> DNA
[8581] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8582] <220>
[8583] <223> 人工序列的描述:合成
[8584] 寡核苷酸
[8585] <400> 759
[8586] actgtagaaa ggcatgaagc 20
[8587] <210> 760
[8588] <211> 20
[8589] <212> DNA
[8590] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8591] <220>
[8592] <223> 人工序列的描述:合成
[8593] 寡核苷酸
[8594] <400> 760
[8595] cactgtagaa aggcatgaag 20
[8596] <210> 761
[8597] <211> 20
[8598] <212> DNA
[8599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8600] <220>
[8601] <223> 人工序列的描述:合成
[8602] 寡核苷酸
[8603] <400> 761
[8604] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[8605] <210> 762
[8606] <211> 20
[8607] <212> DNA
[8608] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8609] <220>
[8610] <223> 人工序列的描述:合成
[8611] 寡核苷酸
[8612] <400> 762
[8613] gccactgtag aaaggcatga 20
[8614] <210> 763
[8615] <211> 20
[8616] <212> DNA
[8617] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8618] <220>

[8619] <223> 人工序列的描述:合成

[8620] 寡核苷酸

[8621] <400> 763

[8622] ggccactgta gaaaggcatg 20

[8623] <210> 764

[8624] <211> 20

[8625] <212> DNA

[8626] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8627] <220>

[8628] <223> 人工序列的描述:合成

[8629] 寡核苷酸

[8630] <400> 764

[8631] aggccactgt agaaaggcat 20

[8632] <210> 765

[8633] <211> 20

[8634] <212> DNA

[8635] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8636] <220>

[8637] <223> 人工序列的描述:合成

[8638] 寡核苷酸

[8639] <400> 765

[8640] aaggccactg tagaaaggca 20

[8641] <210> 766

[8642] <211> 20

[8643] <212> DNA

[8644] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8645] <220>

[8646] <223> 人工序列的描述:合成

[8647] 寡核苷酸

[8648] <400> 766

[8649] taaggccact gtagaaaggc 20

[8650] <210> 767

[8651] <211> 20

[8652] <212> DNA

[8653] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8654] <220>

[8655] <223> 人工序列的描述:合成

[8656] 寡核苷酸

[8657] <400> 767

[8658] ataaggccac tgtagaaagg 20
[8659] <210> 768
[8660] <211> 20
[8661] <212> DNA
[8662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8663] <220>
[8664] <223> 人工序列的描述:合成
[8665] 寡核苷酸
[8666] <400> 768
[8667] gataaggcca ctgtagaaag 20
[8668] <210> 769
[8669] <211> 20
[8670] <212> DNA
[8671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8672] <220>
[8673] <223> 人工序列的描述:合成
[8674] 寡核苷酸
[8675] <400> 769
[8676] ggataaggcc actgtagaaa 20
[8677] <210> 770
[8678] <211> 20
[8679] <212> RNA
[8680] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8681] <220>
[8682] <223> 人工序列的描述:合成
[8683] 寡核苷酸
[8684] <400> 770
[8685] caugaagcag gaacauacca 20
[8686] <210> 771
[8687] <211> 20
[8688] <212> RNA
[8689] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8690] <220>
[8691] <223> 人工序列的描述:合成
[8692] 寡核苷酸
[8693] <400> 771
[8694] gcaugaagca ggaacauacc 20
[8695] <210> 772
[8696] <211> 20

[8697] <212> RNA
[8698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8699] <220>
[8700] <223> 人工序列的描述:合成
[8701] 寡核苷酸
[8702] <400> 772
[8703] ggcaugaagc aggaacauac 20
[8704] <210> 773
[8705] <211> 20
[8706] <212> DNA
[8707] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8708] <220>
[8709] <223> 人工序列的描述:合成
[8710] 寡核苷酸
[8711] <220>
[8712] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8713] 寡核苷酸
[8714] <400> 773
[8715] aggcatgaag caggaacaua 20
[8716] <210> 774
[8717] <211> 20
[8718] <212> DNA
[8719] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8720] <220>
[8721] <223> 人工序列的描述:合成
[8722] 寡核苷酸
[8723] <400> 774
[8724] aaggcatgaa gcaggaacat 20
[8725] <210> 775
[8726] <211> 20
[8727] <212> DNA
[8728] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8729] <220>
[8730] <223> 人工序列的描述:合成
[8731] 寡核苷酸
[8732] <400> 775
[8733] aaaggcatga agcaggaaca 20
[8734] <210> 776
[8735] <211> 20

[8736] <212> DNA
[8737] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8738] <220>
[8739] <223> 人工序列的描述:合成
[8740] 寡核苷酸
[8741] <400> 776
[8742] gaaaggcatg aagcaggaac 20
[8743] <210> 777
[8744] <211> 20
[8745] <212> DNA
[8746] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8747] <220>
[8748] <223> 人工序列的描述:合成
[8749] 寡核苷酸
[8750] <400> 777
[8751] agaaaggcat gaagcaggaa 20
[8752] <210> 778
[8753] <211> 20
[8754] <212> DNA
[8755] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8756] <220>
[8757] <223> 人工序列的描述:合成
[8758] 寡核苷酸
[8759] <400> 778
[8760] tagaaaggca tgaagcagga 20
[8761] <210> 779
[8762] <211> 20
[8763] <212> DNA
[8764] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8765] <220>
[8766] <223> 人工序列的描述:合成
[8767] 寡核苷酸
[8768] <220>
[8769] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8770] 寡核苷酸
[8771] <400> 779
[8772] guagaaaggc atgaagcagg 20
[8773] <210> 780
[8774] <211> 20

[8775] <212> DNA
[8776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8777] <220>
[8778] <223> 人工序列的描述:合成
[8779] 寡核苷酸
[8780] <220>
[8781] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8782] 寡核苷酸
[8783] <400> 780
[8784] tguagaaagg catgaagcag 20
[8785] <210> 781
[8786] <211> 20
[8787] <212> DNA
[8788] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8789] <220>
[8790] <223> 人工序列的描述:合成
[8791] 寡核苷酸
[8792] <220>
[8793] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8794] 寡核苷酸
[8795] <400> 781
[8796] cuguagaaag gcatgaagca 20
[8797] <210> 782
[8798] <211> 20
[8799] <212> DNA
[8800] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8801] <220>
[8802] <223> 人工序列的描述:合成
[8803] 寡核苷酸
[8804] <220>
[8805] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8806] 寡核苷酸
[8807] <400> 782
[8808] acuguagaaa ggcatgaagc 20
[8809] <210> 783
[8810] <211> 20
[8811] <212> DNA
[8812] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8813] <220>

[8814] <223> 人工序列的描述:合成

[8815] 寡核苷酸

[8816] <220>

[8817] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8818] 寡核苷酸

[8819] <400> 783

[8820] cacugtagaa aggcaugaag 20

[8821] <210> 784

[8822] <211> 20

[8823] <212> DNA

[8824] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8825] <220>

[8826] <223> 人工序列的描述:合成

[8827] 寡核苷酸

[8828] <220>

[8829] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8830] 寡核苷酸

[8831] <400> 784

[8832] ccacugtaga aaggcaugaa 20

[8833] <210> 785

[8834] <211> 20

[8835] <212> DNA

[8836] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8837] <220>

[8838] <223> 人工序列的描述:合成

[8839] 寡核苷酸

[8840] <220>

[8841] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8842] 寡核苷酸

[8843] <400> 785

[8844] gccactgtag aaaggcauga 20

[8845] <210> 786

[8846] <211> 20

[8847] <212> DNA

[8848] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8849] <220>

[8850] <223> 人工序列的描述:合成

[8851] 寡核苷酸

[8852] <220>

[8853] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[8854] 寡核苷酸
[8855] <400> 786
[8856] ggccactgta gaaaggcaug 20
[8857] <210> 787
[8858] <211> 20
[8859] <212> DNA
[8860] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8861] <220>
[8862] <223> 人工序列的描述:合成
[8863] 寡核苷酸
[8864] <400> 787
[8865] aggccactgt agaaaggcat 20
[8866] <210> 788
[8867] <211> 20
[8868] <212> DNA
[8869] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8870] <220>
[8871] <223> 人工序列的描述:合成
[8872] 寡核苷酸
[8873] <400> 788
[8874] aaggccactg tagaaaggca 20
[8875] <210> 789
[8876] <211> 20
[8877] <212> DNA
[8878] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8879] <220>
[8880] <223> 人工序列的描述:合成
[8881] 寡核苷酸
[8882] <400> 789
[8883] taaggccact gtagaaaggc 20
[8884] <210> 790
[8885] <211> 20
[8886] <212> DNA
[8887] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8888] <220>
[8889] <223> 人工序列的描述:合成
[8890] 寡核苷酸
[8891] <220>

[8892] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8893] 寡核苷酸

[8894] <400> 790

[8895] auaaggccac tgtagaaagg 20

[8896] <210> 791

[8897] <211> 20

[8898] <212> DNA

[8899] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8900] <220>

[8901] <223> 人工序列的描述:合成

[8902] 寡核苷酸

[8903] <220>

[8904] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8905] 寡核苷酸

[8906] <400> 791

[8907] gauaaggcca ctgtagaaag 20

[8908] <210> 792

[8909] <211> 20

[8910] <212> DNA

[8911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8912] <220>

[8913] <223> 人工序列的描述:合成

[8914] 寡核苷酸

[8915] <220>

[8916] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[8917] 寡核苷酸

[8918] <400> 792

[8919] ggauaaggcc actgtagaaa 20

[8920] <210> 793

[8921] <211> 20

[8922] <212> DNA

[8923] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8924] <220>

[8925] <223> 人工序列的描述:合成

[8926] 寡核苷酸

[8927] <400> 793

[8928] catgaagcag gaacatacca 20

[8929] <210> 794

[8930] <211> 20

[8931] <212> DNA
[8932] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8933] <220>
[8934] <223> 人工序列的描述:合成
[8935] 寡核苷酸
[8936] <400> 794
[8937] gcatgaagca ggaacatacc 20
[8938] <210> 795
[8939] <211> 20
[8940] <212> DNA
[8941] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8942] <220>
[8943] <223> 人工序列的描述:合成
[8944] 寡核苷酸
[8945] <400> 795
[8946] ggcatgaagc aggaacatac 20
[8947] <210> 796
[8948] <211> 20
[8949] <212> DNA
[8950] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8951] <220>
[8952] <223> 人工序列的描述:合成
[8953] 寡核苷酸
[8954] <400> 796
[8955] aggcatgaag caggaacata 20
[8956] <210> 797
[8957] <211> 20
[8958] <212> DNA
[8959] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8960] <220>
[8961] <223> 人工序列的描述:合成
[8962] 寡核苷酸
[8963] <400> 797
[8964] aaggcatgaa gcaggaacat 20
[8965] <210> 798
[8966] <211> 20
[8967] <212> DNA
[8968] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[8969] <220>

[8970] <223> 人工序列的描述:合成

[8971] 寡核苷酸

[8972] <400> 798

[8973] aaaggcatga agcaggaaca 20

[8974] <210> 799

[8975] <211> 20

[8976] <212> DNA

[8977] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8978] <220>

[8979] <223> 人工序列的描述:合成

[8980] 寡核苷酸

[8981] <400> 799

[8982] gaaaggcatg aagcaggaac 20

[8983] <210> 800

[8984] <211> 20

[8985] <212> DNA

[8986] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8987] <220>

[8988] <223> 人工序列的描述:合成

[8989] 寡核苷酸

[8990] <400> 800

[8991] agaaaggcat gaagcaggaa 20

[8992] <210> 801

[8993] <211> 20

[8994] <212> DNA

[8995] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[8996] <220>

[8997] <223> 人工序列的描述:合成

[8998] 寡核苷酸

[8999] <400> 801

[9000] tagaaaggca tgaagcagga 20

[9001] <210> 802

[9002] <211> 20

[9003] <212> DNA

[9004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9005] <220>

[9006] <223> 人工序列的描述:合成

[9007] 寡核苷酸

[9008] <400> 802

[9009] gtagaaaggc atgaagcagg 20
[9010] <210> 803
[9011] <211> 20
[9012] <212> DNA
[9013] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9014] <220>
[9015] <223> 人工序列的描述:合成
[9016] 寡核苷酸
[9017] <400> 803
[9018] tgtagaaagg catgaagcag 20
[9019] <210> 804
[9020] <211> 20
[9021] <212> DNA
[9022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9023] <220>
[9024] <223> 人工序列的描述:合成
[9025] 寡核苷酸
[9026] <400> 804
[9027] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9028] <210> 805
[9029] <211> 20
[9030] <212> DNA
[9031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9032] <220>
[9033] <223> 人工序列的描述:合成
[9034] 寡核苷酸
[9035] <400> 805
[9036] actgtagaaa ggcatgaagc 20
[9037] <210> 806
[9038] <211> 20
[9039] <212> DNA
[9040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9041] <220>
[9042] <223> 人工序列的描述:合成
[9043] 寡核苷酸
[9044] <400> 806
[9045] cactgtagaa aggcatgaag 20
[9046] <210> 807
[9047] <211> 20

[9048] <212> DNA
[9049] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9050] <220>
[9051] <223> 人工序列的描述:合成
[9052] 寡核苷酸
[9053] <400> 807
[9054] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[9055] <210> 808
[9056] <211> 20
[9057] <212> DNA
[9058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9059] <220>
[9060] <223> 人工序列的描述:合成
[9061] 寡核苷酸
[9062] <400> 808
[9063] gccactgtag aaaggcatga 20
[9064] <210> 809
[9065] <211> 20
[9066] <212> DNA
[9067] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9068] <220>
[9069] <223> 人工序列的描述:合成
[9070] 寡核苷酸
[9071] <400> 809
[9072] ggccactgta gaaaggcatg 20
[9073] <210> 810
[9074] <211> 20
[9075] <212> DNA
[9076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9077] <220>
[9078] <223> 人工序列的描述:合成
[9079] 寡核苷酸
[9080] <400> 810
[9081] aggccactgt agaaaggcat 20
[9082] <210> 811
[9083] <211> 20
[9084] <212> DNA
[9085] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9086] <220>

[9087] <223> 人工序列的描述:合成

[9088] 寡核苷酸

[9089] <400> 811

[9090] aaggccactg tagaaaggca 20

[9091] <210> 812

[9092] <211> 20

[9093] <212> DNA

[9094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9095] <220>

[9096] <223> 人工序列的描述:合成

[9097] 寡核苷酸

[9098] <400> 812

[9099] taaggccact gtagaaaggc 20

[9100] <210> 813

[9101] <211> 20

[9102] <212> DNA

[9103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9104] <220>

[9105] <223> 人工序列的描述:合成

[9106] 寡核苷酸

[9107] <400> 813

[9108] ataaggccac tgtagaaagg 20

[9109] <210> 814

[9110] <211> 20

[9111] <212> DNA

[9112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9113] <220>

[9114] <223> 人工序列的描述:合成

[9115] 寡核苷酸

[9116] <400> 814

[9117] gataaggcca ctgtagaaag 20

[9118] <210> 815

[9119] <211> 20

[9120] <212> DNA

[9121] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9122] <220>

[9123] <223> 人工序列的描述:合成

[9124] 寡核苷酸

[9125] <400> 815

[9126] ggataaggcc actgtagaaa 20

[9127] <210> 816

[9128] <211> 45

[9129] <212> DNA

[9130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9131] <220>

[9132] <223> 人工序列的描述:合成

[9133] 寡核苷酸

[9134] <220>

[9135] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9136] 寡核苷酸

[9137] <400> 816

[9138] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[9139] <210> 817

[9140] <211> 45

[9141] <212> DNA

[9142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9143] <220>

[9144] <223> 人工序列的描述:合成

[9145] 寡核苷酸

[9146] <220>

[9147] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9148] 寡核苷酸

[9149] <400> 817

[9150] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[9151] <210> 818

[9152] <211> 45

[9153] <212> DNA

[9154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9155] <220>

[9156] <223> 人工序列的描述:合成

[9157] 寡核苷酸

[9158] <220>

[9159] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9160] 寡核苷酸

[9161] <400> 818

[9162] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45

[9163] <210> 819

[9164] <211> 45

[9165] <212> DNA
[9166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9167] <220>
[9168] <223> 人工序列的描述:合成
[9169] 寡核苷酸
[9170] <220>
[9171] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9172] 寡核苷酸
[9173] <400> 819
[9174] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45
[9175] <210> 820
[9176] <211> 45
[9177] <212> DNA
[9178] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9179] <220>
[9180] <223> 人工序列的描述:合成
[9181] 寡核苷酸
[9182] <220>
[9183] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9184] 寡核苷酸
[9185] <400> 820
[9186] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45
[9187] <210> 821
[9188] <211> 44
[9189] <212> RNA
[9190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9191] <220>
[9192] <223> 人工序列的描述:合成
[9193] 寡核苷酸
[9194] <400> 821
[9195] uugguauguu ccugcuucau gccuuucuac aguggccuua uccc 44
[9196] <210> 822
[9197] <211> 44
[9198] <212> RNA
[9199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9200] <220>
[9201] <223> 人工序列的描述:合成
[9202] 寡核苷酸
[9203] <400> 822

[9204] uugguauguu ccugcuucau ccccuucuac aguggccuua uccc 44

[9205] <210> 823

[9206] <211> 20

[9207] <212> DNA

[9208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9209] <220>

[9210] <223> 人工序列的描述:合成

[9211] 寡核苷酸

[9212] <400> 823

[9213] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9214] <210> 824

[9215] <211> 20

[9216] <212> DNA

[9217] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9218] <220>

[9219] <223> 人工序列的描述:合成

[9220] 寡核苷酸

[9221] <400> 824

[9222] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9223] <210> 825

[9224] <211> 20

[9225] <212> DNA

[9226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9227] <220>

[9228] <223> 人工序列的描述:合成

[9229] 寡核苷酸

[9230] <400> 825

[9231] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9232] <210> 826

[9233] <211> 20

[9234] <212> DNA

[9235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9236] <220>

[9237] <223> 人工序列的描述:合成

[9238] 寡核苷酸

[9239] <400> 826

[9240] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9241] <210> 827

[9242] <211> 20

[9243] <212> DNA
[9244] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9245] <220>
[9246] <223> 人工序列的描述:合成
[9247] 寡核苷酸
[9248] <400> 827
[9249] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9250] <210> 828
[9251] <211> 20
[9252] <212> DNA
[9253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9254] <220>
[9255] <223> 人工序列的描述:合成
[9256] 寡核苷酸
[9257] <400> 828
[9258] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9259] <210> 829
[9260] <211> 20
[9261] <212> RNA
[9262] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9263] <220>
[9264] <223> 人工序列的描述:合成
[9265] 寡核苷酸
[9266] <400> 829
[9267] ccuucccuga agguuccucc 20
[9268] <210> 830
[9269] <211> 23
[9270] <212> DNA
[9271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9272] <220>
[9273] <223> 人工序列的描述:合成
[9274] 寡核苷酸
[9275] <220>
[9276] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9277] 寡核苷酸
[9278] <400> 830
[9279] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9280] <210> 831
[9281] <211> 20

[9282] <212> DNA
[9283] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9284] <220>
[9285] <223> 人工序列的描述:合成
[9286] 寡核苷酸
[9287] <400> 831
[9288] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9289] <210> 832
[9290] <211> 20
[9291] <212> DNA
[9292] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9293] <220>
[9294] <223> 人工序列的描述:合成
[9295] 寡核苷酸
[9296] <400> 832
[9297] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9298] <210> 833
[9299] <211> 20
[9300] <212> DNA
[9301] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9302] <220>
[9303] <223> 人工序列的描述:合成
[9304] 寡核苷酸
[9305] <400> 833
[9306] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9307] <210> 834
[9308] <211> 20
[9309] <212> DNA
[9310] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9311] <220>
[9312] <223> 人工序列的描述:合成
[9313] 寡核苷酸
[9314] <400> 834
[9315] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9316] <210> 835
[9317] <211> 20
[9318] <212> DNA
[9319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9320] <220>

[9321] <223> 人工序列的描述:合成

[9322] 寡核苷酸

[9323] <220>

[9324] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9325] 寡核苷酸

[9326] <400> 835

[9327] ccacugtaga aaggcatgaa 20

[9328] <210> 836

[9329] <211> 20

[9330] <212> DNA

[9331] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9332] <220>

[9333] <223> 人工序列的描述:合成

[9334] 寡核苷酸

[9335] <400> 836

[9336] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9337] <210> 837

[9338] <211> 20

[9339] <212> DNA

[9340] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9341] <220>

[9342] <223> 人工序列的描述:合成

[9343] 寡核苷酸

[9344] <220>

[9345] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9346] 寡核苷酸

[9347] <400> 837

[9348] ccacugtaga aaggcatgaa 20

[9349] <210> 838

[9350] <211> 20

[9351] <212> DNA

[9352] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9353] <220>

[9354] <223> 人工序列的描述:合成

[9355] 寡核苷酸

[9356] <400> 838

[9357] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9358] <210> 839

[9359] <211> 20

[9360] <212> DNA
[9361] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9362] <220>
[9363] <223> 人工序列的描述:合成
[9364] 寡核苷酸
[9365] <400> 839
[9366] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9367] <210> 840
[9368] <211> 20
[9369] <212> DNA
[9370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9371] <220>
[9372] <223> 人工序列的描述:合成
[9373] 寡核苷酸
[9374] <400> 840
[9375] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[9376] <210> 841
[9377] <211> 45
[9378] <212> DNA
[9379] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9380] <220>
[9381] <223> 人工序列的描述:合成
[9382] 寡核苷酸
[9383] <220>
[9384] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9385] 寡核苷酸
[9386] <400> 841
[9387] tgccacugua gaaaggcaut utttttggta atccactttc agagg 45
[9388] <210> 842
[9389] <211> 20
[9390] <212> DNA
[9391] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9392] <220>
[9393] <223> 人工序列的描述:合成
[9394] 寡核苷酸
[9395] <400> 842
[9396] ggacctgagg atggaccgcg 20
[9397] <210> 843
[9398] <211> 20

[9399] <212> DNA
[9400] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9401] <220>
[9402] <223> 人工序列的描述:合成
[9403] 寡核苷酸
[9404] <400> 843
[9405] ggacctgagg atggaccgcg 20
[9406] <210> 844
[9407] <211> 20
[9408] <212> DNA
[9409] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9410] <220>
[9411] <223> 人工序列的描述:合成
[9412] 寡核苷酸
[9413] <400> 844
[9414] ggacctgagg atggaccgcg 20
[9415] <210> 845
[9416] <211> 20
[9417] <212> DNA
[9418] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9419] <220>
[9420] <223> 人工序列的描述:合成
[9421] 寡核苷酸
[9422] <400> 845
[9423] ggacctgagg atggaccgcg 20
[9424] <210> 846
[9425] <211> 23
[9426] <212> DNA
[9427] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9428] <220>
[9429] <223> 人工序列的描述:合成
[9430] 寡核苷酸
[9431] <220>
[9432] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9433] 寡核苷酸
[9434] <400> 846
[9435] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9436] <210> 847
[9437] <211> 21

[9438] <212> DNA
[9439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9440] <220>
[9441] <223> 人工序列的描述:合成
[9442] 寡核苷酸
[9443] <220>
[9444] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9445] 寡核苷酸
[9446] <400> 847
[9447] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[9448] <210> 848
[9449] <211> 21
[9450] <212> DNA
[9451] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9452] <220>
[9453] <223> 人工序列的描述:合成
[9454] 寡核苷酸
[9455] <220>
[9456] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9457] 寡核苷酸
[9458] <400> 848
[9459] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[9460] <210> 849
[9461] <211> 21
[9462] <212> DNA
[9463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9464] <220>
[9465] <223> 人工序列的描述:合成
[9466] 寡核苷酸
[9467] <220>
[9468] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9469] 寡核苷酸
[9470] <400> 849
[9471] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[9472] <210> 850
[9473] <211> 21
[9474] <212> DNA
[9475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9476] <220>

[9477] <223> 人工序列的描述:合成

[9478] 寡核苷酸

[9479] <220>

[9480] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9481] 寡核苷酸

[9482] <400> 850

[9483] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9484] <210> 851

[9485] <211> 21

[9486] <212> DNA

[9487] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9488] <220>

[9489] <223> 人工序列的描述:合成

[9490] 寡核苷酸

[9491] <220>

[9492] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9493] 寡核苷酸

[9494] <400> 851

[9495] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9496] <210> 852

[9497] <211> 21

[9498] <212> DNA

[9499] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9500] <220>

[9501] <223> 人工序列的描述:合成

[9502] 寡核苷酸

[9503] <220>

[9504] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9505] 寡核苷酸

[9506] <400> 852

[9507] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9508] <210> 853

[9509] <211> 21

[9510] <212> DNA

[9511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9512] <220>

[9513] <223> 人工序列的描述:合成

[9514] 寡核苷酸

[9515] <220>

[9516] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9517] 寡核苷酸

[9518] <400> 853

[9519] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9520] <210> 854

[9521] <211> 21

[9522] <212> DNA

[9523] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9524] <220>

[9525] <223> 人工序列的描述:合成

[9526] 寡核苷酸

[9527] <220>

[9528] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9529] 寡核苷酸

[9530] <400> 854

[9531] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9532] <210> 855

[9533] <211> 23

[9534] <212> DNA

[9535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9536] <220>

[9537] <223> 人工序列的描述:合成

[9538] 寡核苷酸

[9539] <220>

[9540] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9541] 寡核苷酸

[9542] <400> 855

[9543] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[9544] <210> 856

[9545] <211> 23

[9546] <212> DNA

[9547] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9548] <220>

[9549] <223> 人工序列的描述:合成

[9550] 寡核苷酸

[9551] <220>

[9552] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9553] 寡核苷酸

[9554] <400> 856

[9555] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9556] <210> 857
[9557] <211> 23
[9558] <212> DNA
[9559] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9560] <220>
[9561] <223> 人工序列的描述:合成
[9562] 寡核苷酸
[9563] <220>
[9564] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9565] 寡核苷酸
[9566] <400> 857
[9567] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9568] <210> 858
[9569] <211> 23
[9570] <212> DNA
[9571] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9572] <220>
[9573] <223> 人工序列的描述:合成
[9574] 寡核苷酸
[9575] <220>
[9576] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9577] 寡核苷酸
[9578] <400> 858
[9579] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9580] <210> 859
[9581] <211> 23
[9582] <212> DNA
[9583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9584] <220>
[9585] <223> 人工序列的描述:合成
[9586] 寡核苷酸
[9587] <220>
[9588] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9589] 寡核苷酸
[9590] <400> 859
[9591] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9592] <210> 860
[9593] <211> 23

[9594] <212> DNA
[9595] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9596] <220>
[9597] <223> 人工序列的描述:合成
[9598] 寡核苷酸
[9599] <220>
[9600] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9601] 寡核苷酸
[9602] <400> 860
[9603] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9604] <210> 861
[9605] <211> 23
[9606] <212> DNA
[9607] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9608] <220>
[9609] <223> 人工序列的描述:合成
[9610] 寡核苷酸
[9611] <220>
[9612] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9613] 寡核苷酸
[9614] <400> 861
[9615] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9616] <210> 862
[9617] <211> 23
[9618] <212> DNA
[9619] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9620] <220>
[9621] <223> 人工序列的描述:合成
[9622] 寡核苷酸
[9623] <220>
[9624] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9625] 寡核苷酸
[9626] <400> 862
[9627] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9628] <210> 863
[9629] <211> 20
[9630] <212> DNA
[9631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9632] <220>

[9633] <223> 人工序列的描述:合成

[9634] 寡核苷酸

[9635] <400> 863

[9636] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9637] <210> 864

[9638] <211> 20

[9639] <212> DNA

[9640] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9641] <220>

[9642] <223> 人工序列的描述:合成

[9643] 寡核苷酸

[9644] <400> 864

[9645] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9646] <210> 865

[9647] <211> 20

[9648] <212> DNA

[9649] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9650] <220>

[9651] <223> 人工序列的描述:合成

[9652] 寡核苷酸

[9653] <400> 865

[9654] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9655] <210> 866

[9656] <211> 20

[9657] <212> DNA

[9658] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9659] <220>

[9660] <223> 人工序列的描述:合成

[9661] 寡核苷酸

[9662] <400> 866

[9663] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[9664] <210> 867

[9665] <211> 21

[9666] <212> DNA

[9667] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9668] <220>

[9669] <223> 人工序列的描述:合成

[9670] 寡核苷酸

[9671] <220>

[9672] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9673] 寡核苷酸

[9674] <400> 867

[9675] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9676] <210> 868

[9677] <211> 23

[9678] <212> DNA

[9679] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9680] <220>

[9681] <223> 人工序列的描述:合成

[9682] 寡核苷酸

[9683] <220>

[9684] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9685] 寡核苷酸

[9686] <400> 868

[9687] tgccacugua gaaaggcaug atu 23

[9688] <210> 869

[9689] <211> 21

[9690] <212> DNA

[9691] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9692] <220>

[9693] <223> 人工序列的描述:合成

[9694] 寡核苷酸

[9695] <220>

[9696] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9697] 寡核苷酸

[9698] <400> 869

[9699] tgccacugua gaaaggcaut u 21

[9700] <210> 870

[9701] <211> 23

[9702] <212> DNA

[9703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9704] <220>

[9705] <223> 人工序列的描述:合成

[9706] 寡核苷酸

[9707] <220>

[9708] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成

[9709] 寡核苷酸

[9710] <400> 870

[9711] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9712] <210> 871
[9713] <211> 21
[9714] <212> DNA
[9715] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9716] <220>
[9717] <223> 人工序列的描述:合成
[9718] 寡核苷酸
[9719] <220>
[9720] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9721] 寡核苷酸
[9722] <400> 871
[9723] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[9724] <210> 872
[9725] <211> 23
[9726] <212> DNA
[9727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9728] <220>
[9729] <223> 人工序列的描述:合成
[9730] 寡核苷酸
[9731] <220>
[9732] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9733] 寡核苷酸
[9734] <400> 872
[9735] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9736] <210> 873
[9737] <211> 21
[9738] <212> DNA
[9739] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9740] <220>
[9741] <223> 人工序列的描述:合成
[9742] 寡核苷酸
[9743] <220>
[9744] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9745] 寡核苷酸
[9746] <400> 873
[9747] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[9748] <210> 874
[9749] <211> 23

[9750] <212> DNA
[9751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9752] <220>
[9753] <223> 人工序列的描述:合成
[9754] 寡核苷酸
[9755] <220>
[9756] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9757] 寡核苷酸
[9758] <400> 874
[9759] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[9760] <210> 875
[9761] <211> 20
[9762] <212> DNA
[9763] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9764] <220>
[9765] <223> 人工序列的描述:合成
[9766] 寡核苷酸
[9767] <400> 875
[9768] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9769] <210> 876
[9770] <211> 20
[9771] <212> DNA
[9772] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9773] <220>
[9774] <223> 人工序列的描述:合成
[9775] 寡核苷酸
[9776] <400> 876
[9777] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[9778] <210> 877
[9779] <211> 20
[9780] <212> DNA
[9781] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9782] <220>
[9783] <223> 人工序列的描述:合成
[9784] 寡核苷酸
[9785] <400> 877
[9786] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9787] <210> 878
[9788] <211> 20

[9789] <212> DNA
[9790] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9791] <220>
[9792] <223> 人工序列的描述:合成
[9793] 寡核苷酸
[9794] <220>
[9795] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9796] 寡核苷酸
[9797] <400> 878
[9798] ccactgtaga aaggcaugaa 20
[9799] <210> 879
[9800] <211> 20
[9801] <212> DNA
[9802] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9803] <220>
[9804] <223> 人工序列的描述:合成
[9805] 寡核苷酸
[9806] <400> 879
[9807] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9808] <210> 880
[9809] <211> 20
[9810] <212> DNA
[9811] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9812] <220>
[9813] <223> 人工序列的描述:合成
[9814] 寡核苷酸
[9815] <220>
[9816] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9817] 寡核苷酸
[9818] <400> 880
[9819] ccacugtaga aaggcatgaa 20
[9820] <210> 881
[9821] <211> 20
[9822] <212> DNA
[9823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9824] <220>
[9825] <223> 人工序列的描述:合成
[9826] 寡核苷酸
[9827] <400> 881

[9828] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9829] <210> 882
[9830] <211> 20
[9831] <212> DNA
[9832] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9833] <220>
[9834] <223> 人工序列的描述:合成
[9835] 寡核苷酸
[9836] <220>
[9837] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9838] 寡核苷酸
[9839] <400> 882
[9840] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[9841] <210> 883
[9842] <211> 20
[9843] <212> DNA
[9844] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9845] <220>
[9846] <223> 人工序列的描述:合成
[9847] 寡核苷酸
[9848] <400> 883
[9849] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9850] <210> 884
[9851] <211> 20
[9852] <212> DNA
[9853] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9854] <220>
[9855] <223> 人工序列的描述:合成
[9856] 寡核苷酸
[9857] <400> 884
[9858] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[9859] <210> 885
[9860] <211> 20
[9861] <212> DNA
[9862] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9863] <220>
[9864] <223> 人工序列的描述:合成
[9865] 寡核苷酸
[9866] <400> 885

[9867] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9868] <210> 886

[9869] <211> 20

[9870] <212> DNA

[9871] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9872] <220>

[9873] <223> 人工序列的描述:合成

[9874] 寡核苷酸

[9875] <400> 886

[9876] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9877] <210> 887

[9878] <211> 20

[9879] <212> DNA

[9880] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9881] <220>

[9882] <223> 人工序列的描述:合成

[9883] 寡核苷酸

[9884] <400> 887

[9885] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9886] <210> 888

[9887] <211> 20

[9888] <212> DNA

[9889] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9890] <220>

[9891] <223> 人工序列的描述:合成

[9892] 寡核苷酸

[9893] <400> 888

[9894] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9895] <210> 889

[9896] <211> 20

[9897] <212> DNA

[9898] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[9899] <220>

[9900] <223> 人工序列的描述:合成

[9901] 寡核苷酸

[9902] <400> 889

[9903] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[9904] <210> 890

[9905] <211> 20

[9906] <212> DNA
[9907] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9908] <220>
[9909] <223> 人工序列的描述:合成
[9910] 寡核苷酸
[9911] <400> 890
[9912] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9913] <210> 891
[9914] <211> 20
[9915] <212> DNA
[9916] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9917] <220>
[9918] <223> 人工序列的描述:合成
[9919] 寡核苷酸
[9920] <220>
[9921] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[9922] 寡核苷酸
[9923] <400> 891
[9924] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[9925] <210> 892
[9926] <211> 20
[9927] <212> DNA
[9928] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9929] <220>
[9930] <223> 人工序列的描述:合成
[9931] 寡核苷酸
[9932] <400> 892
[9933] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9934] <210> 893
[9935] <211> 20
[9936] <212> DNA
[9937] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9938] <220>
[9939] <223> 人工序列的描述:合成
[9940] 寡核苷酸
[9941] <400> 893
[9942] ccactgtaga aaggcatgaa 20
[9943] <210> 894
[9944] <211> 20

[9945] <212> DNA
[9946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9947] <220>
[9948] <223> 人工序列的描述:合成
[9949] 寡核苷酸
[9950] <400> 894
[9951] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9952] <210> 895
[9953] <211> 20
[9954] <212> DNA
[9955] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9956] <220>
[9957] <223> 人工序列的描述:合成
[9958] 寡核苷酸
[9959] <400> 895
[9960] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9961] <210> 896
[9962] <211> 20
[9963] <212> DNA
[9964] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9965] <220>
[9966] <223> 人工序列的描述:合成
[9967] 寡核苷酸
[9968] <400> 896
[9969] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9970] <210> 897
[9971] <211> 20
[9972] <212> DNA
[9973] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9974] <220>
[9975] <223> 人工序列的描述:合成
[9976] 寡核苷酸
[9977] <400> 897
[9978] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9979] <210> 898
[9980] <211> 20
[9981] <212> DNA
[9982] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9983] <220>

[9984] <223> 人工序列的描述:合成
[9985] 寡核苷酸
[9986] <400> 898
[9987] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9988] <210> 899
[9989] <211> 20
[9990] <212> DNA
[9991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[9992] <220>
[9993] <223> 人工序列的描述:合成
[9994] 寡核苷酸
[9995] <400> 899
[9996] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[9997] <210> 900
[9998] <211> 20
[9999] <212> DNA
[10000] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10001] <220>
[10002] <223> 人工序列的描述:合成
[10003] 寡核苷酸
[10004] <220>
[10005] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10006] 寡核苷酸
[10007] <400> 900
[10008] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[10009] <210> 901
[10010] <211> 20
[10011] <212> DNA
[10012] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10013] <220>
[10014] <223> 人工序列的描述:合成
[10015] 寡核苷酸
[10016] <400> 901
[10017] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10018] <210> 902
[10019] <211> 20
[10020] <212> DNA
[10021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10022] <220>

[10023] <223> 人工序列的描述:合成

[10024] 寡核苷酸

[10025] <400> 902

[10026] ccactgtaga aaggcatgaa 20

[10027] <210> 903

[10028] <211> 20

[10029] <212> DNA

[10030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10031] <220>

[10032] <223> 人工序列的描述:合成

[10033] 寡核苷酸

[10034] <400> 903

[10035] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[10036] <210> 904

[10037] <211> 20

[10038] <212> DNA

[10039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10040] <220>

[10041] <223> 人工序列的描述:合成

[10042] 寡核苷酸

[10043] <400> 904

[10044] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[10045] <210> 905

[10046] <211> 20

[10047] <212> DNA

[10048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10049] <220>

[10050] <223> 人工序列的描述:合成

[10051] 寡核苷酸

[10052] <400> 905

[10053] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[10054] <210> 906

[10055] <211> 20

[10056] <212> DNA

[10057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10058] <220>

[10059] <223> 人工序列的描述:合成

[10060] 寡核苷酸

[10061] <400> 906

[10062] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10063] <210> 907
[10064] <211> 20
[10065] <212> DNA
[10066] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10067] <220>
[10068] <223> 人工序列的描述:合成
[10069] 寡核苷酸
[10070] <400> 907
[10071] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10072] <210> 908
[10073] <211> 20
[10074] <212> DNA
[10075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10076] <220>
[10077] <223> 人工序列的描述:合成
[10078] 寡核苷酸
[10079] <220>
[10080] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10081] 寡核苷酸
[10082] <400> 908
[10083] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[10084] <210> 909
[10085] <211> 20
[10086] <212> DNA
[10087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10088] <220>
[10089] <223> 人工序列的描述:合成
[10090] 寡核苷酸
[10091] <220>
[10092] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10093] 寡核苷酸
[10094] <400> 909
[10095] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[10096] <210> 910
[10097] <211> 20
[10098] <212> DNA
[10099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10100] <220>

[10101] <223> 人工序列的描述:合成
[10102] 寡核苷酸
[10103] <220>
[10104] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10105] 寡核苷酸
[10106] <400> 910
[10107] ccacugtaga aaggcaugaa 20
[10108] <210> 911
[10109] <211> 23
[10110] <212> DNA
[10111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10112] <220>
[10113] <223> 人工序列的描述:合成
[10114] 寡核苷酸
[10115] <220>
[10116] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10117] 寡核苷酸
[10118] <400> 911
[10119] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10120] <210> 912
[10121] <211> 23
[10122] <212> DNA
[10123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10124] <220>
[10125] <223> 人工序列的描述:合成
[10126] 寡核苷酸
[10127] <220>
[10128] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10129] 寡核苷酸
[10130] <400> 912
[10131] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10132] <210> 913
[10133] <211> 23
[10134] <212> DNA
[10135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10136] <220>
[10137] <223> 人工序列的描述:合成
[10138] 寡核苷酸
[10139] <220>

[10140] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10141] 寡核苷酸
[10142] <400> 913
[10143] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10144] <210> 914
[10145] <211> 23
[10146] <212> DNA
[10147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10148] <220>
[10149] <223> 人工序列的描述:合成
[10150] 寡核苷酸
[10151] <220>
[10152] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10153] 寡核苷酸
[10154] <400> 914
[10155] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10156] <210> 915
[10157] <211> 24
[10158] <212> RNA
[10159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10160] <220>
[10161] <223> 人工序列的描述:合成
[10162] 寡核苷酸
[10163] <400> 915
[10164] cugcuucaug ccuuucuaca gugg 24
[10165] <210> 916
[10166] <211> 24
[10167] <212> RNA
[10168] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10169] <220>
[10170] <223> 人工序列的描述:合成
[10171] 寡核苷酸
[10172] <400> 916
[10173] cugcuucauc cccuucuaca gugg 24
[10174] <210> 917
[10175] <211> 20
[10176] <212> DNA
[10177] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10178] <220>

[10179] <223> 人工序列的描述:合成
[10180] 寡核苷酸
[10181] <220>
[10182] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10183] 寡核苷酸
[10184] <400> 917
[10185] ugtagaaagg catgaagcag 20
[10186] <210> 918
[10187] <211> 20
[10188] <212> DNA
[10189] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10190] <220>
[10191] <223> 人工序列的描述:合成
[10192] 寡核苷酸
[10193] <220>
[10194] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10195] 寡核苷酸
[10196] <400> 918
[10197] uguagaaagg catgaagcag 20
[10198] <210> 919
[10199] <211> 20
[10200] <212> DNA
[10201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10202] <220>
[10203] <223> 人工序列的描述:合成
[10204] 寡核苷酸
[10205] <400> 919
[10206] tgtagaaagg catgaagcag 20
[10207] <210> 920
[10208] <211> 20
[10209] <212> DNA
[10210] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10211] <220>
[10212] <223> 人工序列的描述:合成
[10213] 寡核苷酸
[10214] <220>
[10215] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10216] 寡核苷酸
[10217] <400> 920

[10218] uguagaaagg catgaagcag 20
[10219] <210> 921
[10220] <211> 20
[10221] <212> DNA
[10222] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10223] <220>
[10224] <223> 人工序列的描述:合成
[10225] 寡核苷酸
[10226] <220>
[10227] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10228] 寡核苷酸
[10229] <400> 921
[10230] cuguagaaag gcatgaagca 20
[10231] <210> 922
[10232] <211> 20
[10233] <212> DNA
[10234] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10235] <220>
[10236] <223> 人工序列的描述:合成
[10237] 寡核苷酸
[10238] <400> 922
[10239] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10240] <210> 923
[10241] <211> 20
[10242] <212> DNA
[10243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10244] <220>
[10245] <223> 人工序列的描述:合成
[10246] 寡核苷酸
[10247] <220>
[10248] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10249] 寡核苷酸
[10250] <400> 923
[10251] cuguagaaag gcatgaagca 20
[10252] <210> 924
[10253] <211> 20
[10254] <212> DNA
[10255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10256] <220>

[10257] <223> 人工序列的描述:合成
[10258] 寡核苷酸
[10259] <220>
[10260] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10261] 寡核苷酸
[10262] <400> 924
[10263] actguagaaa ggcatgaagc 20
[10264] <210> 925
[10265] <211> 20
[10266] <212> DNA
[10267] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10268] <220>
[10269] <223> 人工序列的描述:合成
[10270] 寡核苷酸
[10271] <220>
[10272] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10273] 寡核苷酸
[10274] <400> 925
[10275] acuguagaaa ggcatgaagc 20
[10276] <210> 926
[10277] <211> 20
[10278] <212> DNA
[10279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10280] <220>
[10281] <223> 人工序列的描述:合成
[10282] 寡核苷酸
[10283] <400> 926
[10284] actgtagaaa ggcatgaagc 20
[10285] <210> 927
[10286] <211> 20
[10287] <212> DNA
[10288] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10289] <220>
[10290] <223> 人工序列的描述:合成
[10291] 寡核苷酸
[10292] <220>
[10293] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10294] 寡核苷酸
[10295] <400> 927

[10296] acuguagaaa ggcatgaagc 20
[10297] <210> 928
[10298] <211> 20
[10299] <212> DNA
[10300] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10301] <220>
[10302] <223> 人工序列的描述:合成
[10303] 寡核苷酸
[10304] <220>
[10305] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10306] 寡核苷酸
[10307] <400> 928
[10308] cactgtagaa aggcaugaag 20
[10309] <210> 929
[10310] <211> 20
[10311] <212> DNA
[10312] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10313] <220>
[10314] <223> 人工序列的描述:合成
[10315] 寡核苷酸
[10316] <220>
[10317] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10318] 寡核苷酸
[10319] <400> 929
[10320] cacugtagaa aggcaugaag 20
[10321] <210> 930
[10322] <211> 20
[10323] <212> DNA
[10324] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10325] <220>
[10326] <223> 人工序列的描述:合成
[10327] 寡核苷酸
[10328] <220>
[10329] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10330] 寡核苷酸
[10331] <400> 930
[10332] cactgtagaa aggcaugaag 20
[10333] <210> 931
[10334] <211> 20

[10335] <212> DNA
[10336] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10337] <220>
[10338] <223> 人工序列的描述:合成
[10339] 寡核苷酸
[10340] <220>
[10341] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10342] 寡核苷酸
[10343] <400> 931
[10344] cacugtagaa aggcatgaag 20
[10345] <210> 932
[10346] <211> 20
[10347] <212> DNA
[10348] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10349] <220>
[10350] <223> 人工序列的描述:合成
[10351] 寡核苷酸
[10352] <220>
[10353] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10354] 寡核苷酸
[10355] <400> 932
[10356] ccacugtaga aaggcatgaa 20
[10357] <210> 933
[10358] <211> 20
[10359] <212> DNA
[10360] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10361] <220>
[10362] <223> 人工序列的描述:合成
[10363] 寡核苷酸
[10364] <220>
[10365] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10366] 寡核苷酸
[10367] <400> 933
[10368] ccactgtaga aaggcaugaa 20
[10369] <210> 934
[10370] <211> 20
[10371] <212> DNA
[10372] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10373] <220>

[10374] <223> 人工序列的描述:合成
[10375] 寡核苷酸
[10376] <220>
[10377] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10378] 寡核苷酸
[10379] <400> 934
[10380] ccacugtaga aaggcatgaa 20
[10381] <210> 935
[10382] <211> 23
[10383] <212> DNA
[10384] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10385] <220>
[10386] <223> 人工序列的描述:合成
[10387] 寡核苷酸
[10388] <220>
[10389] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10390] 寡核苷酸
[10391] <400> 935
[10392] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10393] <210> 936
[10394] <211> 23
[10395] <212> DNA
[10396] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10397] <220>
[10398] <223> 人工序列的描述:合成
[10399] 寡核苷酸
[10400] <220>
[10401] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10402] 寡核苷酸
[10403] <400> 936
[10404] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10405] <210> 937
[10406] <211> 23
[10407] <212> DNA
[10408] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10409] <220>
[10410] <223> 人工序列的描述:合成
[10411] 寡核苷酸
[10412] <220>

[10413] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10414] 寡核苷酸
[10415] <400> 937
[10416] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10417] <210> 938
[10418] <211> 23
[10419] <212> DNA
[10420] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10421] <220>
[10422] <223> 人工序列的描述:合成
[10423] 寡核苷酸
[10424] <220>
[10425] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10426] 寡核苷酸
[10427] <400> 938
[10428] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10429] <210> 939
[10430] <211> 23
[10431] <212> DNA
[10432] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10433] <220>
[10434] <223> 人工序列的描述:合成
[10435] 寡核苷酸
[10436] <220>
[10437] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10438] 寡核苷酸
[10439] <400> 939
[10440] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10441] <210> 940
[10442] <211> 23
[10443] <212> DNA
[10444] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10445] <220>
[10446] <223> 人工序列的描述:合成
[10447] 寡核苷酸
[10448] <220>
[10449] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10450] 寡核苷酸
[10451] <400> 940

[10452] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10453] <210> 941
[10454] <211> 23
[10455] <212> DNA
[10456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10457] <220>
[10458] <223> 人工序列的描述:合成
[10459] 寡核苷酸
[10460] <220>
[10461] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10462] 寡核苷酸
[10463] <400> 941
[10464] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10465] <210> 942
[10466] <211> 23
[10467] <212> DNA
[10468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10469] <220>
[10470] <223> 人工序列的描述:合成
[10471] 寡核苷酸
[10472] <220>
[10473] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10474] 寡核苷酸
[10475] <400> 942
[10476] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10477] <210> 943
[10478] <211> 20
[10479] <212> DNA
[10480] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10481] <220>
[10482] <223> 人工序列的描述:合成
[10483] 寡核苷酸
[10484] <400> 943
[10485] tgtagaaagg gatgaagcag 20
[10486] <210> 944
[10487] <211> 20
[10488] <212> DNA
[10489] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10490] <220>

[10491] <223> 人工序列的描述:合成

[10492] 寡核苷酸

[10493] <400> 944

[10494] ctgtagaaag ggatgaagca 20

[10495] <210> 945

[10496] <211> 20

[10497] <212> DNA

[10498] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10499] <220>

[10500] <223> 人工序列的描述:合成

[10501] 寡核苷酸

[10502] <400> 945

[10503] actgtagaaa gggatgaagc 20

[10504] <210> 946

[10505] <211> 20

[10506] <212> DNA

[10507] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10508] <220>

[10509] <223> 人工序列的描述:合成

[10510] 寡核苷酸

[10511] <400> 946

[10512] cactgtagaa agggatgaag 20

[10513] <210> 947

[10514] <211> 20

[10515] <212> DNA

[10516] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10517] <220>

[10518] <223> 人工序列的描述:合成

[10519] 寡核苷酸

[10520] <400> 947

[10521] ccactgtaga aagggatgaa 20

[10522] <210> 948

[10523] <211> 20

[10524] <212> DNA

[10525] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[10526] <220>

[10527] <223> 人工序列的描述:合成

[10528] 寡核苷酸

[10529] <400> 948

[10530] tgtagaaagg gatgaagcag 20
[10531] <210> 949
[10532] <211> 20
[10533] <212> DNA
[10534] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10535] <220>
[10536] <223> 人工序列的描述:合成
[10537] 寡核苷酸
[10538] <400> 949
[10539] ctgtagaaag ggatgaagca 20
[10540] <210> 950
[10541] <211> 20
[10542] <212> DNA
[10543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10544] <220>
[10545] <223> 人工序列的描述:合成
[10546] 寡核苷酸
[10547] <400> 950
[10548] actgtagaaa gggatgaagc 20
[10549] <210> 951
[10550] <211> 20
[10551] <212> DNA
[10552] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10553] <220>
[10554] <223> 人工序列的描述:合成
[10555] 寡核苷酸
[10556] <400> 951
[10557] cactgtagaa agggatgaag 20
[10558] <210> 952
[10559] <211> 20
[10560] <212> DNA
[10561] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10562] <220>
[10563] <223> 人工序列的描述:合成
[10564] 寡核苷酸
[10565] <400> 952
[10566] ccactgtaga aagggatgaa 20
[10567] <210> 953
[10568] <211> 20

[10569] <212> DNA
[10570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10571] <220>
[10572] <223> 人工序列的描述:合成
[10573] 寡核苷酸
[10574] <220>
[10575] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10576] 寡核苷酸
[10577] <400> 953
[10578] ugtagaaagg gatgaagcag 20
[10579] <210> 954
[10580] <211> 20
[10581] <212> DNA
[10582] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10583] <220>
[10584] <223> 人工序列的描述:合成
[10585] 寡核苷酸
[10586] <400> 954
[10587] ctgtagaaag ggatgaagca 20
[10588] <210> 955
[10589] <211> 20
[10590] <212> DNA
[10591] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10592] <220>
[10593] <223> 人工序列的描述:合成
[10594] 寡核苷酸
[10595] <220>
[10596] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10597] 寡核苷酸
[10598] <400> 955
[10599] actguagaaa gggatgaagc 20
[10600] <210> 956
[10601] <211> 20
[10602] <212> DNA
[10603] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10604] <220>
[10605] <223> 人工序列的描述:合成
[10606] 寡核苷酸
[10607] <220>

[10608] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10609] 寡核苷酸
[10610] <400> 956
[10611] cactgtagaa agggaugaag 20
[10612] <210> 957
[10613] <211> 20
[10614] <212> DNA
[10615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10616] <220>
[10617] <223> 人工序列的描述:合成
[10618] 寡核苷酸
[10619] <220>
[10620] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10621] 寡核苷酸
[10622] <400> 957
[10623] ccacugtaga aagggaugaa 20
[10624] <210> 958
[10625] <211> 23
[10626] <212> DNA
[10627] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10628] <220>
[10629] <223> 人工序列的描述:合成
[10630] 寡核苷酸
[10631] <220>
[10632] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10633] 寡核苷酸
[10634] <400> 958
[10635] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10636] <210> 959
[10637] <211> 23
[10638] <212> DNA
[10639] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10640] <220>
[10641] <223> 人工序列的描述:合成
[10642] 寡核苷酸
[10643] <220>
[10644] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10645] 寡核苷酸
[10646] <400> 959

[10647] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10648] <210> 960
[10649] <211> 23
[10650] <212> DNA
[10651] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10652] <220>
[10653] <223> 人工序列的描述:合成
[10654] 寡核苷酸
[10655] <220>
[10656] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10657] 寡核苷酸
[10658] <400> 960
[10659] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10660] <210> 961
[10661] <211> 23
[10662] <212> DNA
[10663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10664] <220>
[10665] <223> 人工序列的描述:合成
[10666] 寡核苷酸
[10667] <220>
[10668] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10669] 寡核苷酸
[10670] <400> 961
[10671] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10672] <210> 962
[10673] <211> 23
[10674] <212> DNA
[10675] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10676] <220>
[10677] <223> 人工序列的描述:合成
[10678] 寡核苷酸
[10679] <220>
[10680] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10681] 寡核苷酸
[10682] <400> 962
[10683] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10684] <210> 963
[10685] <211> 23

[10686] <212> DNA
[10687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10688] <220>
[10689] <223> 人工序列的描述:合成
[10690] 寡核苷酸
[10691] <220>
[10692] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10693] 寡核苷酸
[10694] <400> 963
[10695] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10696] <210> 964
[10697] <211> 23
[10698] <212> DNA
[10699] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10700] <220>
[10701] <223> 人工序列的描述:合成
[10702] 寡核苷酸
[10703] <220>
[10704] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10705] 寡核苷酸
[10706] <400> 964
[10707] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10708] <210> 965
[10709] <211> 23
[10710] <212> DNA
[10711] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10712] <220>
[10713] <223> 人工序列的描述:合成
[10714] 寡核苷酸
[10715] <220>
[10716] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10717] 寡核苷酸
[10718] <400> 965
[10719] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10720] <210> 966
[10721] <211> 23
[10722] <212> DNA
[10723] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10724] <220>

[10725] <223> 人工序列的描述:合成
[10726] 寡核苷酸
[10727] <220>
[10728] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10729] 寡核苷酸
[10730] <400> 966
[10731] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10732] <210> 967
[10733] <211> 23
[10734] <212> DNA
[10735] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10736] <220>
[10737] <223> 人工序列的描述:合成
[10738] 寡核苷酸
[10739] <220>
[10740] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10741] 寡核苷酸
[10742] <400> 967
[10743] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10744] <210> 968
[10745] <211> 23
[10746] <212> DNA
[10747] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10748] <220>
[10749] <223> 人工序列的描述:合成
[10750] 寡核苷酸
[10751] <220>
[10752] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10753] 寡核苷酸
[10754] <400> 968
[10755] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10756] <210> 969
[10757] <211> 23
[10758] <212> DNA
[10759] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10760] <220>
[10761] <223> 人工序列的描述:合成
[10762] 寡核苷酸
[10763] <220>

[10764] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10765] 寡核苷酸
[10766] <400> 969
[10767] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10768] <210> 970
[10769] <211> 23
[10770] <212> DNA
[10771] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10772] <220>
[10773] <223> 人工序列的描述:合成
[10774] 寡核苷酸
[10775] <220>
[10776] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10777] 寡核苷酸
[10778] <400> 970
[10779] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10780] <210> 971
[10781] <211> 23
[10782] <212> DNA
[10783] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10784] <220>
[10785] <223> 人工序列的描述:合成
[10786] 寡核苷酸
[10787] <220>
[10788] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10789] 寡核苷酸
[10790] <400> 971
[10791] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10792] <210> 972
[10793] <211> 23
[10794] <212> DNA
[10795] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10796] <220>
[10797] <223> 人工序列的描述:合成
[10798] 寡核苷酸
[10799] <220>
[10800] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10801] 寡核苷酸
[10802] <400> 972

[10803] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10804] <210> 973
[10805] <211> 20
[10806] <212> DNA
[10807] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10808] <220>
[10809] <223> 人工序列的描述:合成
[10810] 寡核苷酸
[10811] <400> 973
[10812] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10813] <210> 974
[10814] <211> 20
[10815] <212> DNA
[10816] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10817] <220>
[10818] <223> 人工序列的描述:合成
[10819] 寡核苷酸
[10820] <400> 974
[10821] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10822] <210> 975
[10823] <211> 20
[10824] <212> DNA
[10825] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10826] <220>
[10827] <223> 人工序列的描述:合成
[10828] 寡核苷酸
[10829] <400> 975
[10830] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10831] <210> 976
[10832] <211> 20
[10833] <212> DNA
[10834] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10835] <220>
[10836] <223> 人工序列的描述:合成
[10837] 寡核苷酸
[10838] <400> 976
[10839] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10840] <210> 977
[10841] <211> 20

[10842] <212> DNA
[10843] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10844] <220>
[10845] <223> 人工序列的描述:合成
[10846] 寡核苷酸
[10847] <400> 977
[10848] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10849] <210> 978
[10850] <211> 20
[10851] <212> DNA
[10852] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10853] <220>
[10854] <223> 人工序列的描述:合成
[10855] 寡核苷酸
[10856] <400> 978
[10857] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10858] <210> 979
[10859] <211> 20
[10860] <212> DNA
[10861] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10862] <220>
[10863] <223> 人工序列的描述:合成
[10864] 寡核苷酸
[10865] <400> 979
[10866] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10867] <210> 980
[10868] <211> 23
[10869] <212> DNA
[10870] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10871] <220>
[10872] <223> 人工序列的描述:合成
[10873] 寡核苷酸
[10874] <220>
[10875] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10876] 寡核苷酸
[10877] <400> 980
[10878] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10879] <210> 981
[10880] <211> 23

[10881] <212> DNA
[10882] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10883] <220>
[10884] <223> 人工序列的描述:合成
[10885] 寡核苷酸
[10886] <220>
[10887] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10888] 寡核苷酸
[10889] <400> 981
[10890] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10891] <210> 982
[10892] <211> 20
[10893] <212> DNA
[10894] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10895] <220>
[10896] <223> 人工序列的描述:合成
[10897] 寡核苷酸
[10898] <400> 982
[10899] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10900] <210> 983
[10901] <211> 20
[10902] <212> DNA
[10903] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10904] <220>
[10905] <223> 人工序列的描述:合成
[10906] 寡核苷酸
[10907] <400> 983
[10908] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10909] <210> 984
[10910] <211> 20
[10911] <212> DNA
[10912] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10913] <220>
[10914] <223> 人工序列的描述:合成
[10915] 寡核苷酸
[10916] <400> 984
[10917] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10918] <210> 985
[10919] <211> 23

[10920] <212> DNA
[10921] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10922] <220>
[10923] <223> 人工序列的描述:合成
[10924] 寡核苷酸
[10925] <220>
[10926] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10927] 寡核苷酸
[10928] <400> 985
[10929] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10930] <210> 986
[10931] <211> 23
[10932] <212> DNA
[10933] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10934] <220>
[10935] <223> 人工序列的描述:合成
[10936] 寡核苷酸
[10937] <220>
[10938] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[10939] 寡核苷酸
[10940] <400> 986
[10941] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[10942] <210> 987
[10943] <211> 20
[10944] <212> DNA
[10945] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10946] <220>
[10947] <223> 人工序列的描述:合成
[10948] 寡核苷酸
[10949] <400> 987
[10950] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10951] <210> 988
[10952] <211> 20
[10953] <212> DNA
[10954] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10955] <220>
[10956] <223> 人工序列的描述:合成
[10957] 寡核苷酸
[10958] <400> 988

[10959] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10960] <210> 989
[10961] <211> 20
[10962] <212> DNA
[10963] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10964] <220>
[10965] <223> 人工序列的描述:合成
[10966] 寡核苷酸
[10967] <400> 989
[10968] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10969] <210> 990
[10970] <211> 20
[10971] <212> DNA
[10972] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10973] <220>
[10974] <223> 人工序列的描述:合成
[10975] 寡核苷酸
[10976] <400> 990
[10977] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10978] <210> 991
[10979] <211> 20
[10980] <212> DNA
[10981] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10982] <220>
[10983] <223> 人工序列的描述:合成
[10984] 寡核苷酸
[10985] <400> 991
[10986] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10987] <210> 992
[10988] <211> 20
[10989] <212> DNA
[10990] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[10991] <220>
[10992] <223> 人工序列的描述:合成
[10993] 寡核苷酸
[10994] <400> 992
[10995] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[10996] <210> 993
[10997] <211> 20

[10998] <212> DNA
[10999] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11000] <220>
[11001] <223> 人工序列的描述:合成
[11002] 寡核苷酸
[11003] <400> 993
[11004] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11005] <210> 994
[11006] <211> 20
[11007] <212> DNA
[11008] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11009] <220>
[11010] <223> 人工序列的描述:合成
[11011] 寡核苷酸
[11012] <400> 994
[11013] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11014] <210> 995
[11015] <211> 20
[11016] <212> DNA
[11017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11018] <220>
[11019] <223> 人工序列的描述:合成
[11020] 寡核苷酸
[11021] <400> 995
[11022] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11023] <210> 996
[11024] <211> 20
[11025] <212> DNA
[11026] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11027] <220>
[11028] <223> 人工序列的描述:合成
[11029] 寡核苷酸
[11030] <400> 996
[11031] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11032] <210> 997
[11033] <211> 20
[11034] <212> DNA
[11035] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11036] <220>

[11037] <223> 人工序列的描述:合成

[11038] 寡核苷酸

[11039] <400> 997

[11040] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[11041] <210> 998

[11042] <211> 20

[11043] <212> DNA

[11044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[11045] <220>

[11046] <223> 人工序列的描述:合成

[11047] 寡核苷酸

[11048] <400> 998

[11049] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[11050] <210> 999

[11051] <211> 20

[11052] <212> DNA

[11053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[11054] <220>

[11055] <223> 人工序列的描述:合成

[11056] 寡核苷酸

[11057] <400> 999

[11058] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[11059] <210> 1000

[11060] <211> 20

[11061] <212> DNA

[11062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[11063] <220>

[11064] <223> 人工序列的描述:合成

[11065] 寡核苷酸

[11066] <400> 1000

[11067] ctgtagaaag gcatgaagca 20

[11068] <210> 1001

[11069] <211> 20

[11070] <212> DNA

[11071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[11072] <220>

[11073] <223> 人工序列的描述:合成

[11074] 寡核苷酸

[11075] <400> 1001

[11076] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11077] <210> 1002
[11078] <211> 20
[11079] <212> DNA
[11080] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11081] <220>
[11082] <223> 人工序列的描述:合成
[11083] 寡核苷酸
[11084] <400> 1002
[11085] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11086] <210> 1003
[11087] <211> 23
[11088] <212> DNA
[11089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11090] <220>
[11091] <223> 人工序列的描述:合成
[11092] 寡核苷酸
[11093] <220>
[11094] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11095] 寡核苷酸
[11096] <400> 1003
[11097] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11098] <210> 1004
[11099] <211> 23
[11100] <212> DNA
[11101] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11102] <220>
[11103] <223> 人工序列的描述:合成
[11104] 寡核苷酸
[11105] <220>
[11106] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11107] 寡核苷酸
[11108] <400> 1004
[11109] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11110] <210> 1005
[11111] <211> 23
[11112] <212> DNA
[11113] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11114] <220>

[11115] <223> 人工序列的描述:合成
[11116] 寡核苷酸
[11117] <220>
[11118] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11119] 寡核苷酸
[11120] <400> 1005
[11121] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11122] <210> 1006
[11123] <211> 23
[11124] <212> DNA
[11125] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11126] <220>
[11127] <223> 人工序列的描述:合成
[11128] 寡核苷酸
[11129] <220>
[11130] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11131] 寡核苷酸
[11132] <400> 1006
[11133] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11134] <210> 1007
[11135] <211> 23
[11136] <212> DNA
[11137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11138] <220>
[11139] <223> 人工序列的描述:合成
[11140] 寡核苷酸
[11141] <220>
[11142] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11143] 寡核苷酸
[11144] <400> 1007
[11145] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11146] <210> 1008
[11147] <211> 23
[11148] <212> DNA
[11149] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11150] <220>
[11151] <223> 人工序列的描述:合成
[11152] 寡核苷酸
[11153] <220>

[11154] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11155] 寡核苷酸
[11156] <400> 1008
[11157] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11158] <210> 1009
[11159] <211> 23
[11160] <212> DNA
[11161] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11162] <220>
[11163] <223> 人工序列的描述:合成
[11164] 寡核苷酸
[11165] <220>
[11166] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11167] 寡核苷酸
[11168] <400> 1009
[11169] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11170] <210> 1010
[11171] <211> 23
[11172] <212> DNA
[11173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11174] <220>
[11175] <223> 人工序列的描述:合成
[11176] 寡核苷酸
[11177] <220>
[11178] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11179] 寡核苷酸
[11180] <400> 1010
[11181] tccuucccug aagguuccuc ctu 23
[11182] <210> 1011
[11183] <211> 23
[11184] <212> DNA
[11185] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11186] <220>
[11187] <223> 人工序列的描述:合成
[11188] 寡核苷酸
[11189] <220>
[11190] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11191] 寡核苷酸
[11192] <400> 1011

[11193] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11194] <210> 1012
[11195] <211> 23
[11196] <212> DNA
[11197] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11198] <220>
[11199] <223> 人工序列的描述:合成
[11200] 寡核苷酸
[11201] <220>
[11202] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11203] 寡核苷酸
[11204] <400> 1012
[11205] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11206] <210> 1013
[11207] <211> 23
[11208] <212> DNA
[11209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11210] <220>
[11211] <223> 人工序列的描述:合成
[11212] 寡核苷酸
[11213] <220>
[11214] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11215] 寡核苷酸
[11216] <400> 1013
[11217] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11218] <210> 1014
[11219] <211> 23
[11220] <212> DNA
[11221] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11222] <220>
[11223] <223> 人工序列的描述:合成
[11224] 寡核苷酸
[11225] <220>
[11226] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11227] 寡核苷酸
[11228] <400> 1014
[11229] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11230] <210> 1015
[11231] <211> 20

[11232] <212> DNA
[11233] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11234] <220>
[11235] <223> 人工序列的描述:合成
[11236] 寡核苷酸
[11237] <400> 1015
[11238] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11239] <210> 1016
[11240] <211> 20
[11241] <212> DNA
[11242] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11243] <220>
[11244] <223> 人工序列的描述:合成
[11245] 寡核苷酸
[11246] <400> 1016
[11247] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11248] <210> 1017
[11249] <211> 20
[11250] <212> DNA
[11251] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11252] <220>
[11253] <223> 人工序列的描述:合成
[11254] 寡核苷酸
[11255] <400> 1017
[11256] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11257] <210> 1018
[11258] <211> 20
[11259] <212> DNA
[11260] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11261] <220>
[11262] <223> 人工序列的描述:合成
[11263] 寡核苷酸
[11264] <400> 1018
[11265] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11266] <210> 1019
[11267] <211> 20
[11268] <212> DNA
[11269] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11270] <220>

[11271] <223> 人工序列的描述:合成
[11272] 寡核苷酸
[11273] <400> 1019
[11274] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11275] <210> 1020
[11276] <211> 20
[11277] <212> DNA
[11278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11279] <220>
[11280] <223> 人工序列的描述:合成
[11281] 寡核苷酸
[11282] <400> 1020
[11283] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[11284] <210> 1021
[11285] <211> 23
[11286] <212> DNA
[11287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11288] <220>
[11289] <223> 人工序列的描述:合成
[11290] 寡核苷酸
[11291] <220>
[11292] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11293] 寡核苷酸
[11294] <400> 1021
[11295] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11296] <210> 1022
[11297] <211> 23
[11298] <212> DNA
[11299] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11300] <220>
[11301] <223> 人工序列的描述:合成
[11302] 寡核苷酸
[11303] <220>
[11304] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11305] 寡核苷酸
[11306] <400> 1022
[11307] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11308] <210> 1023
[11309] <211> 23

[11310] <212> DNA
[11311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11312] <220>
[11313] <223> 人工序列的描述:合成
[11314] 寡核苷酸
[11315] <220>
[11316] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11317] 寡核苷酸
[11318] <400> 1023
[11319] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11320] <210> 1024
[11321] <211> 23
[11322] <212> DNA
[11323] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11324] <220>
[11325] <223> 人工序列的描述:合成
[11326] 寡核苷酸
[11327] <220>
[11328] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11329] 寡核苷酸
[11330] <400> 1024
[11331] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11332] <210> 1025
[11333] <211> 24
[11334] <212> DNA
[11335] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11336] <220>
[11337] <223> 人工序列的描述:合成
[11338] 寡核苷酸
[11339] <400> 1025
[11340] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11341] <210> 1026
[11342] <211> 24
[11343] <212> DNA
[11344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11345] <220>
[11346] <223> 人工序列的描述:合成
[11347] 寡核苷酸
[11348] <400> 1026

[11349] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11350] <210> 1027
[11351] <211> 24
[11352] <212> DNA
[11353] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11354] <220>
[11355] <223> 人工序列的描述:合成
[11356] 寡核苷酸
[11357] <400> 1027
[11358] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11359] <210> 1028
[11360] <211> 24
[11361] <212> DNA
[11362] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11363] <220>
[11364] <223> 人工序列的描述:合成
[11365] 寡核苷酸
[11366] <400> 1028
[11367] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11368] <210> 1029
[11369] <211> 24
[11370] <212> DNA
[11371] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11372] <220>
[11373] <223> 人工序列的描述:合成
[11374] 寡核苷酸
[11375] <400> 1029
[11376] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11377] <210> 1030
[11378] <211> 24
[11379] <212> DNA
[11380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11381] <220>
[11382] <223> 人工序列的描述:合成
[11383] 寡核苷酸
[11384] <400> 1030
[11385] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11386] <210> 1031
[11387] <211> 24

[11388] <212> DNA
[11389] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11390] <220>
[11391] <223> 人工序列的描述:合成
[11392] 寡核苷酸
[11393] <400> 1031
[11394] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11395] <210> 1032
[11396] <211> 24
[11397] <212> DNA
[11398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11399] <220>
[11400] <223> 人工序列的描述:合成
[11401] 寡核苷酸
[11402] <400> 1032
[11403] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11404] <210> 1033
[11405] <211> 24
[11406] <212> DNA
[11407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11408] <220>
[11409] <223> 人工序列的描述:合成
[11410] 寡核苷酸
[11411] <400> 1033
[11412] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11413] <210> 1034
[11414] <211> 24
[11415] <212> DNA
[11416] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11417] <220>
[11418] <223> 人工序列的描述:合成
[11419] 寡核苷酸
[11420] <400> 1034
[11421] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11422] <210> 1035
[11423] <211> 24
[11424] <212> DNA
[11425] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11426] <220>

[11427] <223> 人工序列的描述:合成
[11428] 寡核苷酸
[11429] <400> 1035
[11430] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11431] <210> 1036
[11432] <211> 24
[11433] <212> DNA
[11434] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11435] <220>
[11436] <223> 人工序列的描述:合成
[11437] 寡核苷酸
[11438] <400> 1036
[11439] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11440] <210> 1037
[11441] <211> 23
[11442] <212> DNA
[11443] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11444] <220>
[11445] <223> 人工序列的描述:合成
[11446] 寡核苷酸
[11447] <220>
[11448] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11449] 寡核苷酸
[11450] <400> 1037
[11451] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11452] <210> 1038
[11453] <211> 23
[11454] <212> DNA
[11455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11456] <220>
[11457] <223> 人工序列的描述:合成
[11458] 寡核苷酸
[11459] <220>
[11460] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11461] 寡核苷酸
[11462] <400> 1038
[11463] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11464] <210> 1039
[11465] <211> 23

[11466] <212> DNA
[11467] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11468] <220>
[11469] <223> 人工序列的描述:合成
[11470] 寡核苷酸
[11471] <220>
[11472] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11473] 寡核苷酸
[11474] <400> 1039
[11475] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11476] <210> 1040
[11477] <211> 23
[11478] <212> DNA
[11479] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11480] <220>
[11481] <223> 人工序列的描述:合成
[11482] 寡核苷酸
[11483] <220>
[11484] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11485] 寡核苷酸
[11486] <400> 1040
[11487] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11488] <210> 1041
[11489] <211> 23
[11490] <212> DNA
[11491] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11492] <220>
[11493] <223> 人工序列的描述:合成
[11494] 寡核苷酸
[11495] <220>
[11496] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11497] 寡核苷酸
[11498] <400> 1041
[11499] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11500] <210> 1042
[11501] <211> 23
[11502] <212> DNA
[11503] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11504] <220>

[11505] <223> 人工序列的描述:合成
[11506] 寡核苷酸
[11507] <220>
[11508] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11509] 寡核苷酸
[11510] <400> 1042
[11511] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11512] <210> 1043
[11513] <211> 23
[11514] <212> DNA
[11515] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11516] <220>
[11517] <223> 人工序列的描述:合成
[11518] 寡核苷酸
[11519] <220>
[11520] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11521] 寡核苷酸
[11522] <400> 1043
[11523] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11524] <210> 1044
[11525] <211> 23
[11526] <212> DNA
[11527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11528] <220>
[11529] <223> 人工序列的描述:合成
[11530] 寡核苷酸
[11531] <220>
[11532] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11533] 寡核苷酸
[11534] <400> 1044
[11535] tgccacugua gaaaggcaug auu 23
[11536] <210> 1045
[11537] <211> 23
[11538] <212> DNA
[11539] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11540] <220>
[11541] <223> 人工序列的描述:合成
[11542] 寡核苷酸
[11543] <220>

[11544] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11545] 寡核苷酸
[11546] <400> 1045
[11547] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11548] <210> 1046
[11549] <211> 23
[11550] <212> DNA
[11551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11552] <220>
[11553] <223> 人工序列的描述:合成
[11554] 寡核苷酸
[11555] <220>
[11556] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11557] 寡核苷酸
[11558] <400> 1046
[11559] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11560] <210> 1047
[11561] <211> 23
[11562] <212> DNA
[11563] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11564] <220>
[11565] <223> 人工序列的描述:合成
[11566] 寡核苷酸
[11567] <220>
[11568] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11569] 寡核苷酸
[11570] <400> 1047
[11571] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11572] <210> 1048
[11573] <211> 23
[11574] <212> DNA
[11575] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11576] <220>
[11577] <223> 人工序列的描述:合成
[11578] 寡核苷酸
[11579] <220>
[11580] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11581] 寡核苷酸
[11582] <400> 1048

[11583] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11584] <210> 1049
[11585] <211> 24
[11586] <212> RNA
[11587] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11588] <220>
[11589] <223> 人工序列的描述:合成
[11590] 寡核苷酸
[11591] <400> 1049
[11592] ccugcuucau gccuuucuac agug 24
[11593] <210> 1050
[11594] <211> 24
[11595] <212> RNA
[11596] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11597] <220>
[11598] <223> 人工序列的描述:合成
[11599] 寡核苷酸
[11600] <400> 1050
[11601] ccugcuucau ccccuucuac agug 24
[11602] <210> 1051
[11603] <211> 23
[11604] <212> DNA
[11605] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11606] <220>
[11607] <223> 人工序列的描述:合成
[11608] 寡核苷酸
[11609] <220>
[11610] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11611] 寡核苷酸
[11612] <400> 1051
[11613] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11614] <210> 1052
[11615] <211> 23
[11616] <212> DNA
[11617] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11618] <220>
[11619] <223> 人工序列的描述:合成
[11620] 寡核苷酸
[11621] <220>

[11622] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11623] 寡核苷酸
[11624] <400> 1052
[11625] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11626] <210> 1053
[11627] <211> 24
[11628] <212> RNA
[11629] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11630] <220>
[11631] <223> 人工序列的描述:合成
[11632] 寡核苷酸
[11633] <400> 1053
[11634] cuucaugccu uucuacagug gccu 24
[11635] <210> 1054
[11636] <211> 24
[11637] <212> RNA
[11638] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11639] <220>
[11640] <223> 人工序列的描述:合成
[11641] 寡核苷酸
[11642] <400> 1054
[11643] cuucaucccc uucuacagug gccu 24
[11644] <210> 1055
[11645] <211> 22
[11646] <212> DNA
[11647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11648] <220>
[11649] <223> 人工序列的描述:合成
[11650] 寡核苷酸
[11651] <220>
[11652] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11653] 寡核苷酸
[11654] <400> 1055
[11655] gccacuguag aaaggcauga tu 22
[11656] <210> 1056
[11657] <211> 22
[11658] <212> DNA
[11659] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11660] <220>

[11661] <223> 人工序列的描述:合成
[11662] 寡核苷酸
[11663] <220>
[11664] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11665] 寡核苷酸
[11666] <400> 1056
[11667] tccacuguag aaaggcauga tu 22
[11668] <210> 1057
[11669] <211> 22
[11670] <212> DNA
[11671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11672] <220>
[11673] <223> 人工序列的描述:合成
[11674] 寡核苷酸
[11675] <220>
[11676] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11677] 寡核苷酸
[11678] <400> 1057
[11679] tgcacuguag aaaggcauga tu 22
[11680] <210> 1058
[11681] <211> 22
[11682] <212> DNA
[11683] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11684] <220>
[11685] <223> 人工序列的描述:合成
[11686] 寡核苷酸
[11687] <220>
[11688] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11689] 寡核苷酸
[11690] <400> 1058
[11691] tgcacuguag aaaggcauga tu 22
[11692] <210> 1059
[11693] <211> 22
[11694] <212> DNA
[11695] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11696] <220>
[11697] <223> 人工序列的描述:合成
[11698] 寡核苷酸
[11699] <220>

[11700] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11701] 寡核苷酸
[11702] <400> 1059
[11703] tgcccuguag aaaggcauga tu 22
[11704] <210> 1060
[11705] <211> 22
[11706] <212> DNA
[11707] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11708] <220>
[11709] <223> 人工序列的描述:合成
[11710] 寡核苷酸
[11711] <220>
[11712] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11713] 寡核苷酸
[11714] <400> 1060
[11715] tgccauguag aaaggcauga tu 22
[11716] <210> 1061
[11717] <211> 22
[11718] <212> DNA
[11719] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11720] <220>
[11721] <223> 人工序列的描述:合成
[11722] 寡核苷酸
[11723] <220>
[11724] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11725] 寡核苷酸
[11726] <400> 1061
[11727] tgccacguag aaaggcauga tu 22
[11728] <210> 1062
[11729] <211> 22
[11730] <212> DNA
[11731] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11732] <220>
[11733] <223> 人工序列的描述:合成
[11734] 寡核苷酸
[11735] <220>
[11736] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11737] 寡核苷酸
[11738] <400> 1062

[11739] tgccacuuag aaaggcauga tu 22
[11740] <210> 1063
[11741] <211> 22
[11742] <212> DNA
[11743] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11744] <220>
[11745] <223> 人工序列的描述:合成
[11746] 寡核苷酸
[11747] <220>
[11748] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11749] 寡核苷酸
[11750] <400> 1063
[11751] tgccacugag aaaggcauga tu 22
[11752] <210> 1064
[11753] <211> 22
[11754] <212> DNA
[11755] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11756] <220>
[11757] <223> 人工序列的描述:合成
[11758] 寡核苷酸
[11759] <220>
[11760] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11761] 寡核苷酸
[11762] <400> 1064
[11763] tgccacugug aaaggcauga tu 22
[11764] <210> 1065
[11765] <211> 22
[11766] <212> DNA
[11767] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11768] <220>
[11769] <223> 人工序列的描述:合成
[11770] 寡核苷酸
[11771] <220>
[11772] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11773] 寡核苷酸
[11774] <400> 1065
[11775] tgccacugua aaaggcauga tu 22
[11776] <210> 1066
[11777] <211> 22

[11778] <212> DNA
[11779] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11780] <220>
[11781] <223> 人工序列的描述:合成
[11782] 寡核苷酸
[11783] <220>
[11784] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11785] 寡核苷酸
[11786] <400> 1066
[11787] tgccacugua gaaggcauga tu 22
[11788] <210> 1067
[11789] <211> 22
[11790] <212> DNA
[11791] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11792] <220>
[11793] <223> 人工序列的描述:合成
[11794] 寡核苷酸
[11795] <220>
[11796] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11797] 寡核苷酸
[11798] <400> 1067
[11799] gccacuguag aaaggcauga tu 22
[11800] <210> 1068
[11801] <211> 22
[11802] <212> DNA
[11803] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11804] <220>
[11805] <223> 人工序列的描述:合成
[11806] 寡核苷酸
[11807] <220>
[11808] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11809] 寡核苷酸
[11810] <400> 1068
[11811] tccacuguag aaaggcauga tu 22
[11812] <210> 1069
[11813] <211> 22
[11814] <212> DNA
[11815] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11816] <220>

[11817] <223> 人工序列的描述:合成
[11818] 寡核苷酸
[11819] <220>
[11820] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11821] 寡核苷酸
[11822] <400> 1069
[11823] tgcacuguag aaaggcauga tu 22
[11824] <210> 1070
[11825] <211> 22
[11826] <212> DNA
[11827] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11828] <220>
[11829] <223> 人工序列的描述:合成
[11830] 寡核苷酸
[11831] <220>
[11832] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11833] 寡核苷酸
[11834] <400> 1070
[11835] tgcacuguag aaaggcauga tu 22
[11836] <210> 1071
[11837] <211> 22
[11838] <212> DNA
[11839] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11840] <220>
[11841] <223> 人工序列的描述:合成
[11842] 寡核苷酸
[11843] <220>
[11844] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11845] 寡核苷酸
[11846] <400> 1071
[11847] tgcccuguag aaaggcauga tu 22
[11848] <210> 1072
[11849] <211> 22
[11850] <212> DNA
[11851] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11852] <220>
[11853] <223> 人工序列的描述:合成
[11854] 寡核苷酸
[11855] <220>

[11856] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11857] 寡核苷酸
[11858] <400> 1072
[11859] tgccauguag aaaggcauga tu 22
[11860] <210> 1073
[11861] <211> 22
[11862] <212> DNA
[11863] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11864] <220>
[11865] <223> 人工序列的描述:合成
[11866] 寡核苷酸
[11867] <220>
[11868] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11869] 寡核苷酸
[11870] <400> 1073
[11871] tgccacguag aaaggcauga tu 22
[11872] <210> 1074
[11873] <211> 22
[11874] <212> DNA
[11875] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11876] <220>
[11877] <223> 人工序列的描述:合成
[11878] 寡核苷酸
[11879] <220>
[11880] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11881] 寡核苷酸
[11882] <400> 1074
[11883] tgccacuuag aaaggcauga tu 22
[11884] <210> 1075
[11885] <211> 22
[11886] <212> DNA
[11887] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11888] <220>
[11889] <223> 人工序列的描述:合成
[11890] 寡核苷酸
[11891] <220>
[11892] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11893] 寡核苷酸
[11894] <400> 1075

[11895] tgccacugag aaaggcauga tu 22
[11896] <210> 1076
[11897] <211> 22
[11898] <212> DNA
[11899] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11900] <220>
[11901] <223> 人工序列的描述:合成
[11902] 寡核苷酸
[11903] <220>
[11904] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11905] 寡核苷酸
[11906] <400> 1076
[11907] tgccacugug aaaggcauga tu 22
[11908] <210> 1077
[11909] <211> 22
[11910] <212> DNA
[11911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11912] <220>
[11913] <223> 人工序列的描述:合成
[11914] 寡核苷酸
[11915] <220>
[11916] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11917] 寡核苷酸
[11918] <400> 1077
[11919] tgccacugua aaaggcauga tu 22
[11920] <210> 1078
[11921] <211> 22
[11922] <212> DNA
[11923] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11924] <220>
[11925] <223> 人工序列的描述:合成
[11926] 寡核苷酸
[11927] <220>
[11928] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11929] 寡核苷酸
[11930] <400> 1078
[11931] tgccacugua gaaggcauga tu 22
[11932] <210> 1079
[11933] <211> 23

[11934] <212> DNA
[11935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11936] <220>
[11937] <223> 人工序列的描述:合成
[11938] 寡核苷酸
[11939] <220>
[11940] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[11941] 寡核苷酸
[11942] <400> 1079
[11943] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[11944] <210> 1080
[11945] <211> 24
[11946] <212> DNA
[11947] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11948] <220>
[11949] <223> 人工序列的描述:合成
[11950] 寡核苷酸
[11951] <400> 1080
[11952] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11953] <210> 1081
[11954] <211> 24
[11955] <212> DNA
[11956] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11957] <220>
[11958] <223> 人工序列的描述:合成
[11959] 寡核苷酸
[11960] <400> 1081
[11961] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11962] <210> 1082
[11963] <211> 24
[11964] <212> DNA
[11965] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11966] <220>
[11967] <223> 人工序列的描述:合成
[11968] 寡核苷酸
[11969] <400> 1082
[11970] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11971] <210> 1083
[11972] <211> 24

[11973] <212> DNA
[11974] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11975] <220>
[11976] <223> 人工序列的描述:合成
[11977] 寡核苷酸
[11978] <400> 1083
[11979] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11980] <210> 1084
[11981] <211> 24
[11982] <212> DNA
[11983] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11984] <220>
[11985] <223> 人工序列的描述:合成
[11986] 寡核苷酸
[11987] <400> 1084
[11988] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11989] <210> 1085
[11990] <211> 24
[11991] <212> DNA
[11992] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[11993] <220>
[11994] <223> 人工序列的描述:合成
[11995] 寡核苷酸
[11996] <400> 1085
[11997] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[11998] <210> 1086
[11999] <211> 24
[12000] <212> DNA
[12001] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12002] <220>
[12003] <223> 人工序列的描述:合成
[12004] 寡核苷酸
[12005] <400> 1086
[12006] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[12007] <210> 1087
[12008] <211> 24
[12009] <212> DNA
[12010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12011] <220>

[12012] <223> 人工序列的描述:合成

[12013] 寡核苷酸

[12014] <400> 1087

[12015] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24

[12016] <210> 1088

[12017] <211> 24

[12018] <212> DNA

[12019] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12020] <220>

[12021] <223> 人工序列的描述:合成

[12022] 寡核苷酸

[12023] <400> 1088

[12024] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24

[12025] <210> 1089

[12026] <211> 24

[12027] <212> DNA

[12028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12029] <220>

[12030] <223> 人工序列的描述:合成

[12031] 寡核苷酸

[12032] <400> 1089

[12033] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24

[12034] <210> 1090

[12035] <211> 24

[12036] <212> DNA

[12037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12038] <220>

[12039] <223> 人工序列的描述:合成

[12040] 寡核苷酸

[12041] <400> 1090

[12042] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24

[12043] <210> 1091

[12044] <211> 24

[12045] <212> DNA

[12046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12047] <220>

[12048] <223> 人工序列的描述:合成

[12049] 寡核苷酸

[12050] <400> 1091

[12051] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[12052] <210> 1092
[12053] <211> 24
[12054] <212> DNA
[12055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12056] <220>
[12057] <223> 人工序列的描述:合成
[12058] 寡核苷酸
[12059] <400> 1092
[12060] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[12061] <210> 1093
[12062] <211> 24
[12063] <212> DNA
[12064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12065] <220>
[12066] <223> 人工序列的描述:合成
[12067] 寡核苷酸
[12068] <400> 1093
[12069] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[12070] <210> 1094
[12071] <211> 24
[12072] <212> DNA
[12073] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12074] <220>
[12075] <223> 人工序列的描述:合成
[12076] 寡核苷酸
[12077] <400> 1094
[12078] cactgtagaa aggcatgaag cagg 24
[12079] <210> 1095
[12080] <211> 23
[12081] <212> DNA
[12082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12083] <220>
[12084] <223> 人工序列的描述:合成
[12085] 寡核苷酸
[12086] <220>
[12087] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12088] 寡核苷酸
[12089] <400> 1095

[12090] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12091] <210> 1096
[12092] <211> 23
[12093] <212> DNA
[12094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12095] <220>
[12096] <223> 人工序列的描述:合成
[12097] 寡核苷酸
[12098] <220>
[12099] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12100] 寡核苷酸
[12101] <400> 1096
[12102] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12103] <210> 1097
[12104] <211> 23
[12105] <212> DNA
[12106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12107] <220>
[12108] <223> 人工序列的描述:合成
[12109] 寡核苷酸
[12110] <220>
[12111] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12112] 寡核苷酸
[12113] <400> 1097
[12114] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12115] <210> 1098
[12116] <211> 23
[12117] <212> DNA
[12118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12119] <220>
[12120] <223> 人工序列的描述:合成
[12121] 寡核苷酸
[12122] <220>
[12123] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12124] 寡核苷酸
[12125] <400> 1098
[12126] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12127] <210> 1099
[12128] <211> 23

[12129] <212> DNA
[12130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12131] <220>
[12132] <223> 人工序列的描述:合成
[12133] 寡核苷酸
[12134] <220>
[12135] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12136] 寡核苷酸
[12137] <400> 1099
[12138] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12139] <210> 1100
[12140] <211> 23
[12141] <212> DNA
[12142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12143] <220>
[12144] <223> 人工序列的描述:合成
[12145] 寡核苷酸
[12146] <220>
[12147] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12148] 寡核苷酸
[12149] <400> 1100
[12150] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12151] <210> 1101
[12152] <211> 22
[12153] <212> DNA
[12154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12155] <220>
[12156] <223> 人工序列的描述:合成
[12157] 寡核苷酸
[12158] <400> 1101
[12159] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12160] <210> 1102
[12161] <211> 22
[12162] <212> DNA
[12163] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12164] <220>
[12165] <223> 人工序列的描述:合成
[12166] 寡核苷酸
[12167] <400> 1102

[12168] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12169] <210> 1103
[12170] <211> 22
[12171] <212> DNA
[12172] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12173] <220>
[12174] <223> 人工序列的描述:合成
[12175] 寡核苷酸
[12176] <400> 1103
[12177] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12178] <210> 1104
[12179] <211> 22
[12180] <212> DNA
[12181] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12182] <220>
[12183] <223> 人工序列的描述:合成
[12184] 寡核苷酸
[12185] <400> 1104
[12186] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12187] <210> 1105
[12188] <211> 22
[12189] <212> DNA
[12190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12191] <220>
[12192] <223> 人工序列的描述:合成
[12193] 寡核苷酸
[12194] <400> 1105
[12195] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12196] <210> 1106
[12197] <211> 22
[12198] <212> DNA
[12199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12200] <220>
[12201] <223> 人工序列的描述:合成
[12202] 寡核苷酸
[12203] <400> 1106
[12204] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12205] <210> 1107
[12206] <211> 22

[12207] <212> DNA
[12208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12209] <220>
[12210] <223> 人工序列的描述:合成
[12211] 寡核苷酸
[12212] <400> 1107
[12213] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12214] <210> 1108
[12215] <211> 22
[12216] <212> DNA
[12217] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12218] <220>
[12219] <223> 人工序列的描述:合成
[12220] 寡核苷酸
[12221] <400> 1108
[12222] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12223] <210> 1109
[12224] <211> 22
[12225] <212> DNA
[12226] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12227] <220>
[12228] <223> 人工序列的描述:合成
[12229] 寡核苷酸
[12230] <400> 1109
[12231] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12232] <210> 1110
[12233] <211> 22
[12234] <212> DNA
[12235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12236] <220>
[12237] <223> 人工序列的描述:合成
[12238] 寡核苷酸
[12239] <400> 1110
[12240] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12241] <210> 1111
[12242] <211> 22
[12243] <212> DNA
[12244] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12245] <220>

[12246] <223> 人工序列的描述:合成

[12247] 寡核苷酸

[12248] <400> 1111

[12249] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22

[12250] <210> 1112

[12251] <211> 22

[12252] <212> DNA

[12253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12254] <220>

[12255] <223> 人工序列的描述:合成

[12256] 寡核苷酸

[12257] <400> 1112

[12258] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22

[12259] <210> 1113

[12260] <211> 22

[12261] <212> DNA

[12262] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12263] <220>

[12264] <223> 人工序列的描述:合成

[12265] 寡核苷酸

[12266] <400> 1113

[12267] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22

[12268] <210> 1114

[12269] <211> 22

[12270] <212> DNA

[12271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12272] <220>

[12273] <223> 人工序列的描述:合成

[12274] 寡核苷酸

[12275] <400> 1114

[12276] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22

[12277] <210> 1115

[12278] <211> 22

[12279] <212> DNA

[12280] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12281] <220>

[12282] <223> 人工序列的描述:合成

[12283] 寡核苷酸

[12284] <400> 1115

[12285] actgtagaaa ggcatgaagc ag 22
[12286] <210> 1116
[12287] <211> 20
[12288] <212> DNA
[12289] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12290] <220>
[12291] <223> 人工序列的描述:合成
[12292] 寡核苷酸
[12293] <400> 1116
[12294] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[12295] <210> 1117
[12296] <211> 20
[12297] <212> DNA
[12298] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12299] <220>
[12300] <223> 人工序列的描述:合成
[12301] 寡核苷酸
[12302] <400> 1117
[12303] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[12304] <210> 1118
[12305] <211> 20
[12306] <212> DNA
[12307] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12308] <220>
[12309] <223> 人工序列的描述:合成
[12310] 寡核苷酸
[12311] <400> 1118
[12312] ctgtagaaag gcatgaagca 20
[12313] <210> 1119
[12314] <211> 25
[12315] <212> RNA
[12316] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12317] <220>
[12318] <223> 人工序列的描述:合成
[12319] 寡核苷酸
[12320] <400> 1119
[12321] gcuucaugcc uuucuacagu ggccu 25
[12322] <210> 1120
[12323] <211> 25

[12324] <212> RNA
[12325] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12326] <220>
[12327] <223> 人工序列的描述:合成
[12328] 寡核苷酸
[12329] <400> 1120
[12330] gcuucauccc cuucuacagu ggccu 25
[12331] <210> 1121
[12332] <211> 23
[12333] <212> DNA
[12334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12335] <220>
[12336] <223> 人工序列的描述:合成
[12337] 寡核苷酸
[12338] <220>
[12339] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12340] 寡核苷酸
[12341] <400> 1121
[12342] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12343] <210> 1122
[12344] <211> 23
[12345] <212> DNA
[12346] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12347] <220>
[12348] <223> 人工序列的描述:合成
[12349] 寡核苷酸
[12350] <220>
[12351] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12352] 寡核苷酸
[12353] <400> 1122
[12354] tgccacugua gaaaggcaug atu 23
[12355] <210> 1123
[12356] <211> 21
[12357] <212> DNA
[12358] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12359] <220>
[12360] <223> 人工序列的描述:合成
[12361] 寡核苷酸
[12362] <220>

[12363] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12364] 寡核苷酸
[12365] <400> 1123
[12366] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12367] <210> 1124
[12368] <211> 21
[12369] <212> DNA
[12370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12371] <220>
[12372] <223> 人工序列的描述:合成
[12373] 寡核苷酸
[12374] <220>
[12375] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12376] 寡核苷酸
[12377] <400> 1124
[12378] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12379] <210> 1125
[12380] <211> 21
[12381] <212> DNA
[12382] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12383] <220>
[12384] <223> 人工序列的描述:合成
[12385] 寡核苷酸
[12386] <220>
[12387] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12388] 寡核苷酸
[12389] <400> 1125
[12390] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12391] <210> 1126
[12392] <211> 21
[12393] <212> DNA
[12394] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12395] <220>
[12396] <223> 人工序列的描述:合成
[12397] 寡核苷酸
[12398] <220>
[12399] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12400] 寡核苷酸
[12401] <400> 1126

[12402] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12403] <210> 1127
[12404] <211> 21
[12405] <212> DNA
[12406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12407] <220>
[12408] <223> 人工序列的描述:合成
[12409] 寡核苷酸
[12410] <220>
[12411] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12412] 寡核苷酸
[12413] <400> 1127
[12414] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12415] <210> 1128
[12416] <211> 21
[12417] <212> DNA
[12418] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12419] <220>
[12420] <223> 人工序列的描述:合成
[12421] 寡核苷酸
[12422] <220>
[12423] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成
[12424] 寡核苷酸
[12425] <400> 1128
[12426] tgccacugua gaaaggcaut u 21
[12427] <210> 1129
[12428] <211> 25
[12429] <212> RNA
[12430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12431] <220>
[12432] <223> 人工序列的描述:合成
[12433] 寡核苷酸
[12434] <400> 1129
[12435] gcuggccucc caauaaagcu ggaca 25
[12436] <210> 1130
[12437] <211> 25
[12438] <212> RNA
[12439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12440] <220>

[12441] <223> 人工序列的描述:合成

[12442] 寡核苷酸

[12443] <400> 1130

[12444] gcuggccucc caauaaagcu ggaca 25

[12445] <210> 1131

[12446] <211> 20

[12447] <212> DNA

[12448] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12449] <220>

[12450] <223> 人工序列的描述:合成

[12451] 寡核苷酸

[12452] <400> 1131

[12453] tggtaatcca ctttcagagg 20

[12454] <210> 1132

[12455] <211> 20

[12456] <212> DNA

[12457] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12458] <220>

[12459] <223> 人工序列的描述:合成

[12460] 寡核苷酸

[12461] <400> 1132

[12462] tggtaatcca ctttcagagg 20

[12463] <210> 1133

[12464] <211> 20

[12465] <212> DNA

[12466] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12467] <220>

[12468] <223> 人工序列的描述:合成

[12469] 寡核苷酸

[12470] <400> 1133

[12471] tggtaatcca ctttcagagg 20

[12472] <210> 1134

[12473] <211> 20

[12474] <212> DNA

[12475] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[12476] <220>

[12477] <223> 人工序列的描述:合成

[12478] 寡核苷酸

[12479] <400> 1134

[12480] tggtaatcca ctttcagagg 20
[12481] <210> 1135
[12482] <211> 20
[12483] <212> DNA
[12484] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12485] <220>
[12486] <223> 人工序列的描述:合成
[12487] 寡核苷酸
[12488] <400> 1135
[12489] tggtaatcca ctttcagagg 20
[12490] <210> 1136
[12491] <211> 20
[12492] <212> DNA
[12493] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12494] <220>
[12495] <223> 人工序列的描述:合成
[12496] 寡核苷酸
[12497] <400> 1136
[12498] agcttcttgt ccagctttat 20
[12499] <210> 1137
[12500] <211> 20
[12501] <212> DNA
[12502] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12503] <220>
[12504] <223> 人工序列的描述:合成
[12505] 寡核苷酸
[12506] <400> 1137
[12507] agcttcttgt ccagctttat 20
[12508] <210> 1138
[12509] <211> 20
[12510] <212> DNA
[12511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12512] <220>
[12513] <223> 人工序列的描述:合成
[12514] 寡核苷酸
[12515] <400> 1138
[12516] agcttcttgt ccagctttat 20
[12517] <210> 1139
[12518] <211> 20

[12519] <212> DNA
[12520] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12521] <220>
[12522] <223> 人工序列的描述:合成
[12523] 寡核苷酸
[12524] <400> 1139
[12525] agcttcttgt ccagctttat 20
[12526] <210> 1140
[12527] <211> 20
[12528] <212> DNA
[12529] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12530] <220>
[12531] <223> 人工序列的描述:合成
[12532] 寡核苷酸
[12533] <400> 1140
[12534] agcttcttgt ccagctttat 20
[12535] <210> 1141
[12536] <211> 20
[12537] <212> DNA
[12538] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12539] <220>
[12540] <223> 人工序列的描述:合成
[12541] 寡核苷酸
[12542] <400> 1141
[12543] agcttcttgt ccagctttat 20
[12544] <210> 1142
[12545] <211> 20
[12546] <212> DNA
[12547] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[12548] <220>
[12549] <223> 人工序列的描述:合成
[12550] 寡核苷酸
[12551] <400> 1142
[12552] agcttcttgt ccagctttat 20

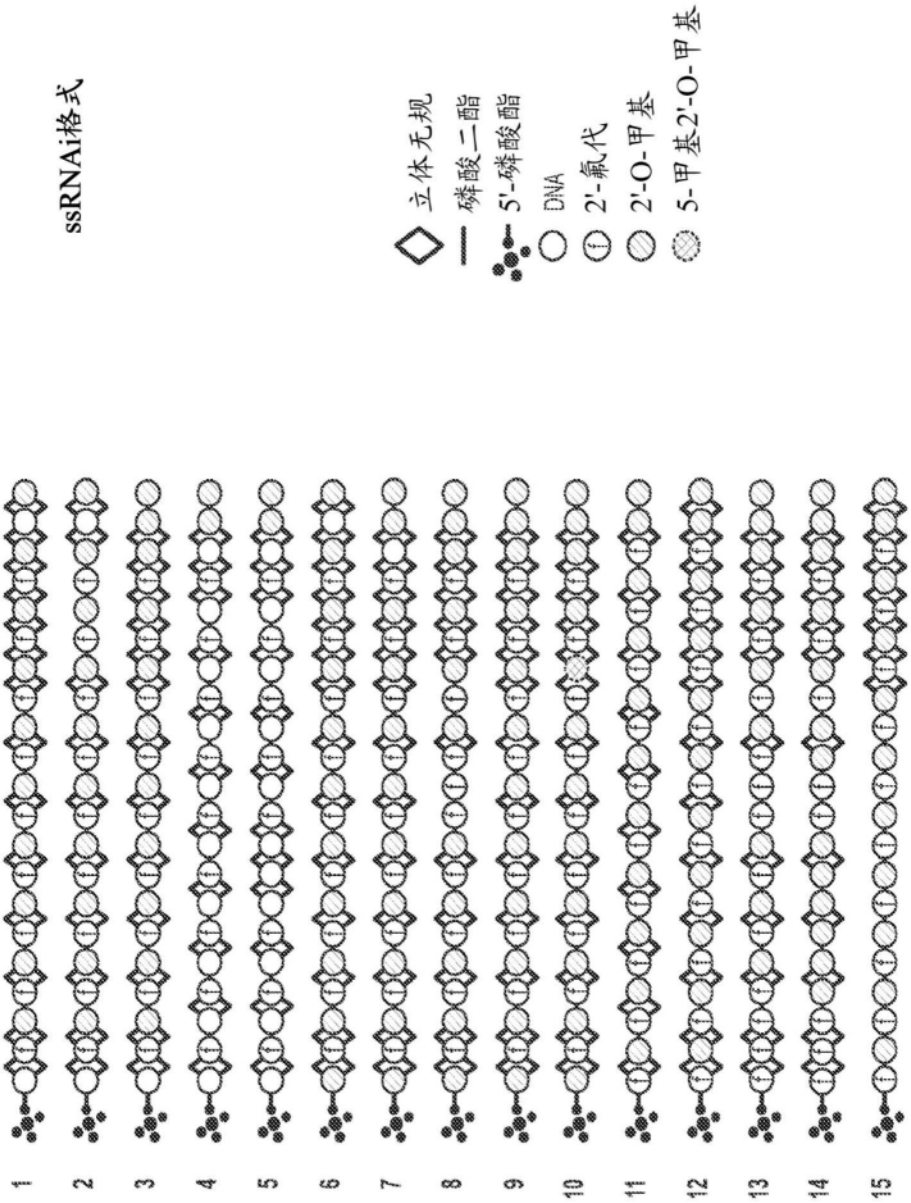

ssRNAi格式
立体无规
磷酸二酯
5'-磷酸酯
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
5-甲基2'-O-甲基
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

图1A

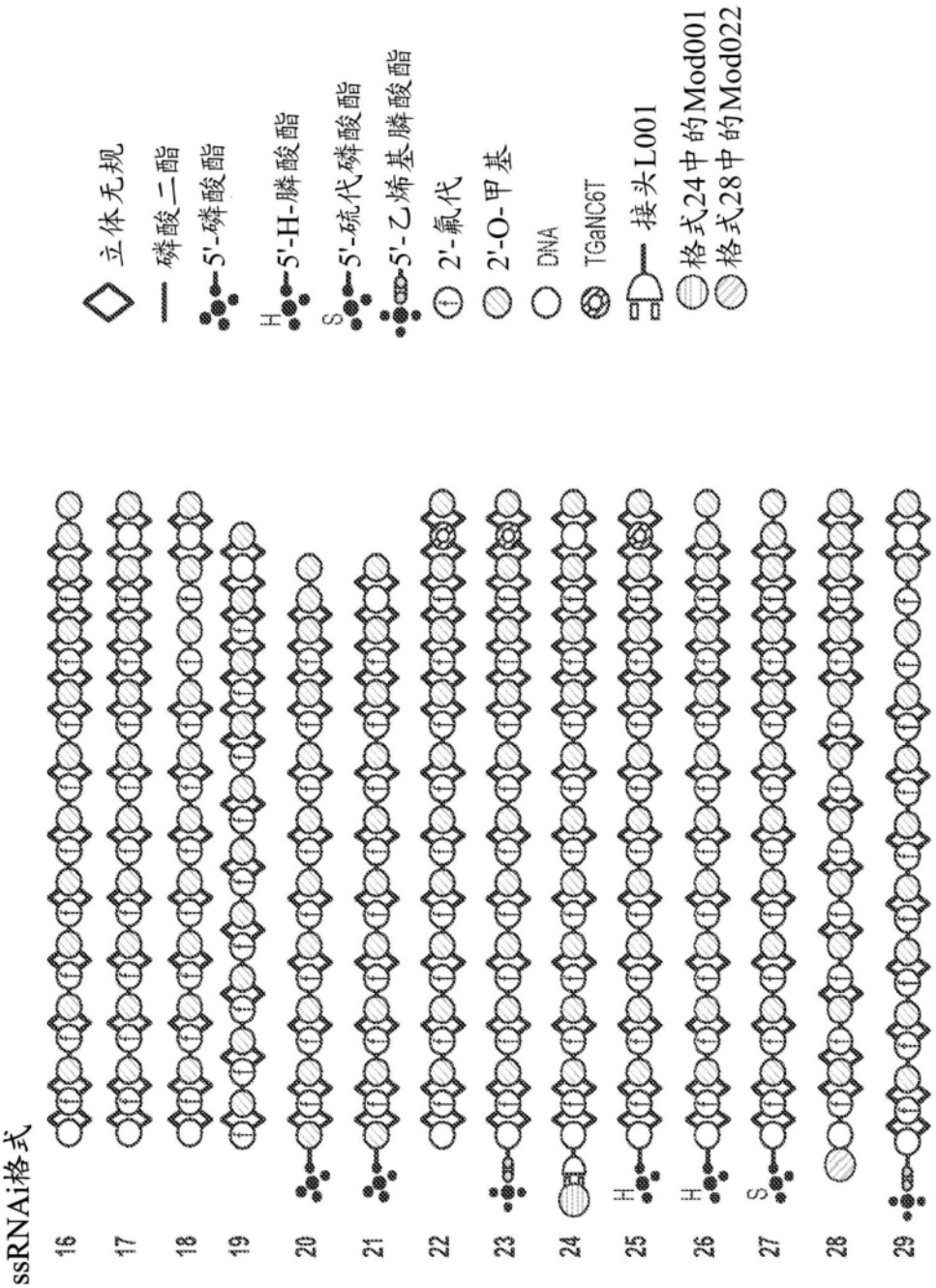

ssRNAi格式
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
立体无规
磷酸二酯
5'-磷酸酯
H 5'-H-膦酸酯
S 5'-硫代磷酸酯
5'-乙烯基膦酸酯
2'-氟代
2'-O-甲基
DNA
TGaNC6T
接头L001
格式24中的Mod001
格式28中的Mod022

图1B

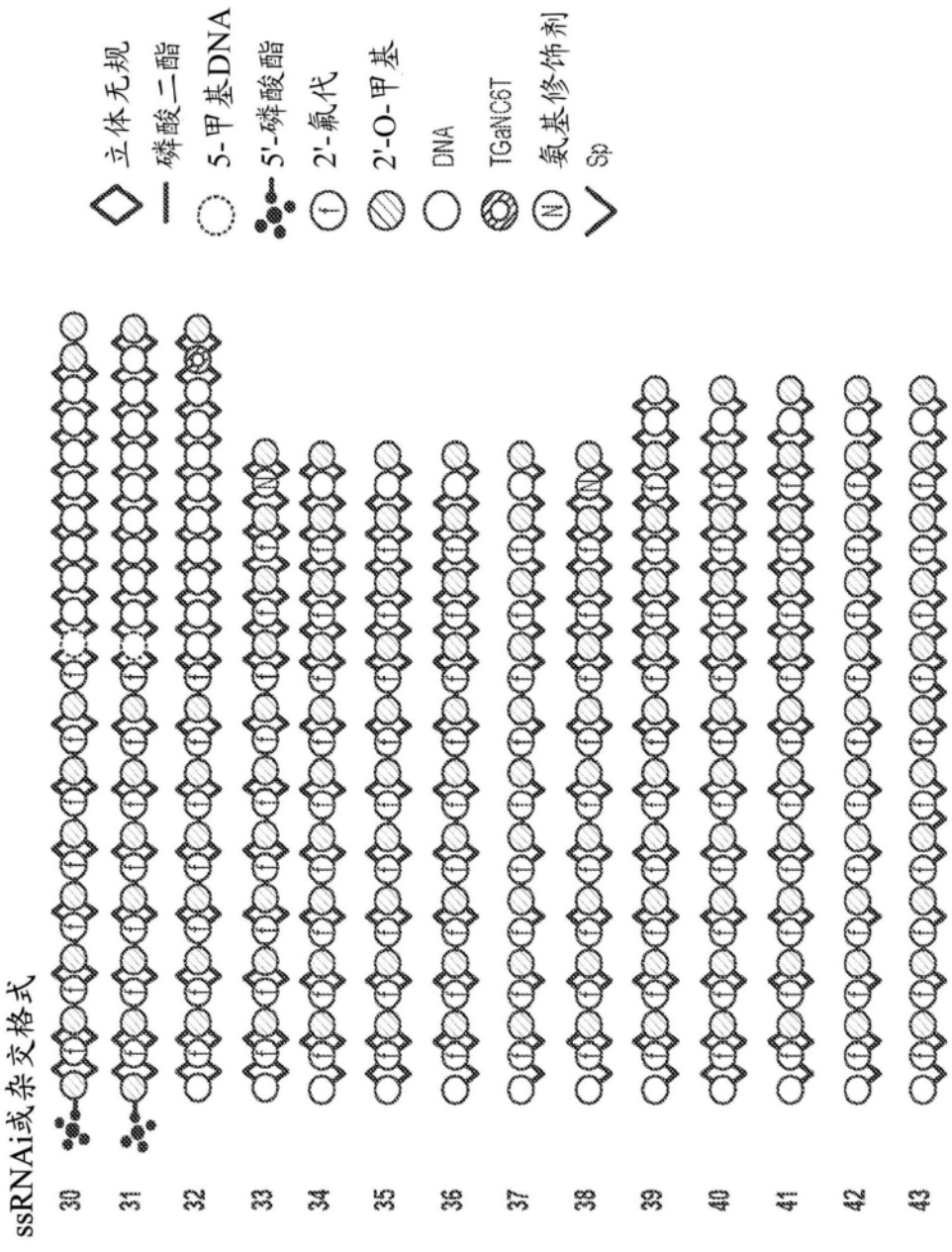

立体无规
磷酸二酯
5-甲基DNA
5'-磷酸酯
2'-氟代
2'-O-甲基
DNA
TGaNC6T
氨基修饰剂
Sp
ssRNAi或杂交格式
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

图1C

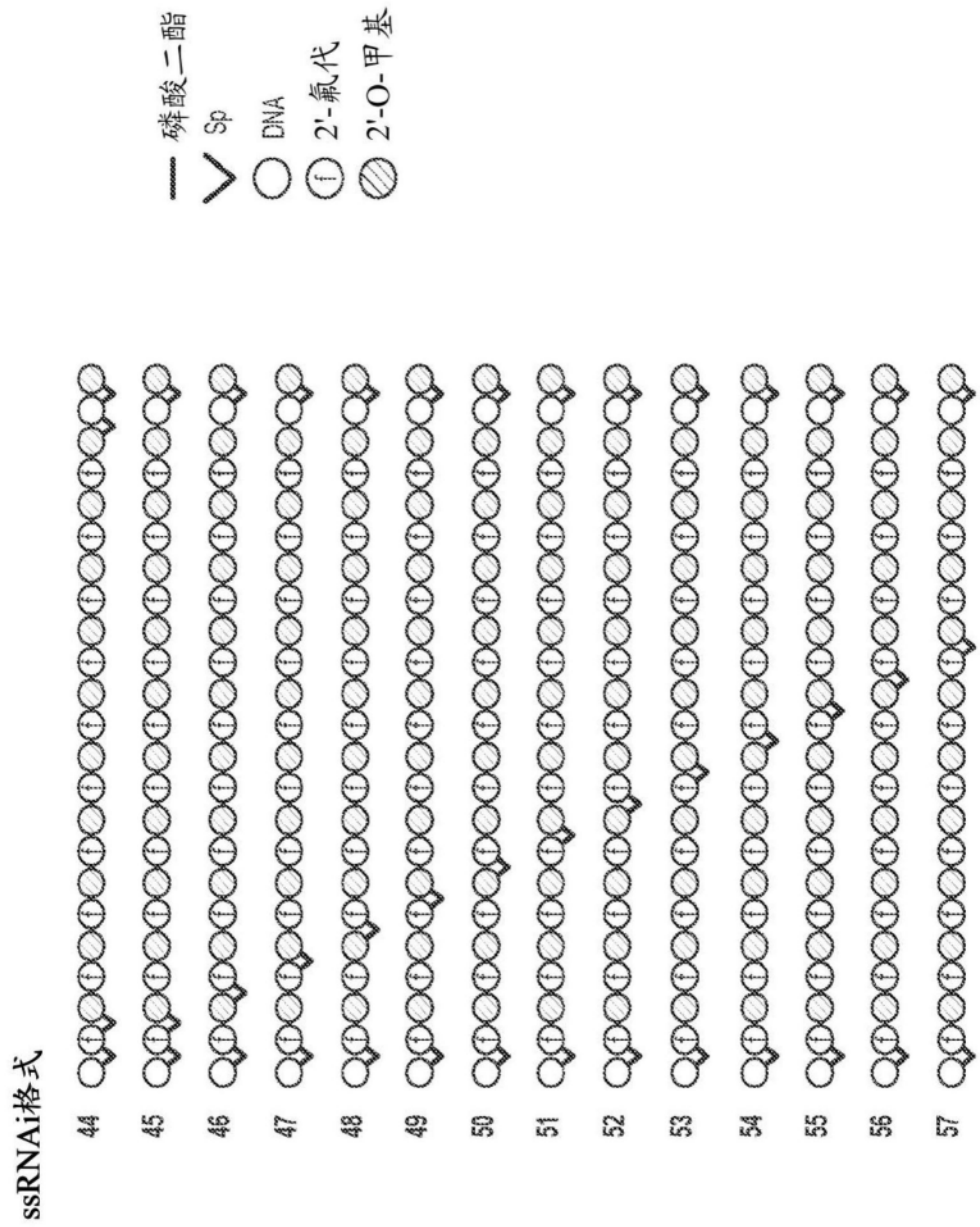

磷酸二酯
Sp
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
ssRNAi格式
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

图1D

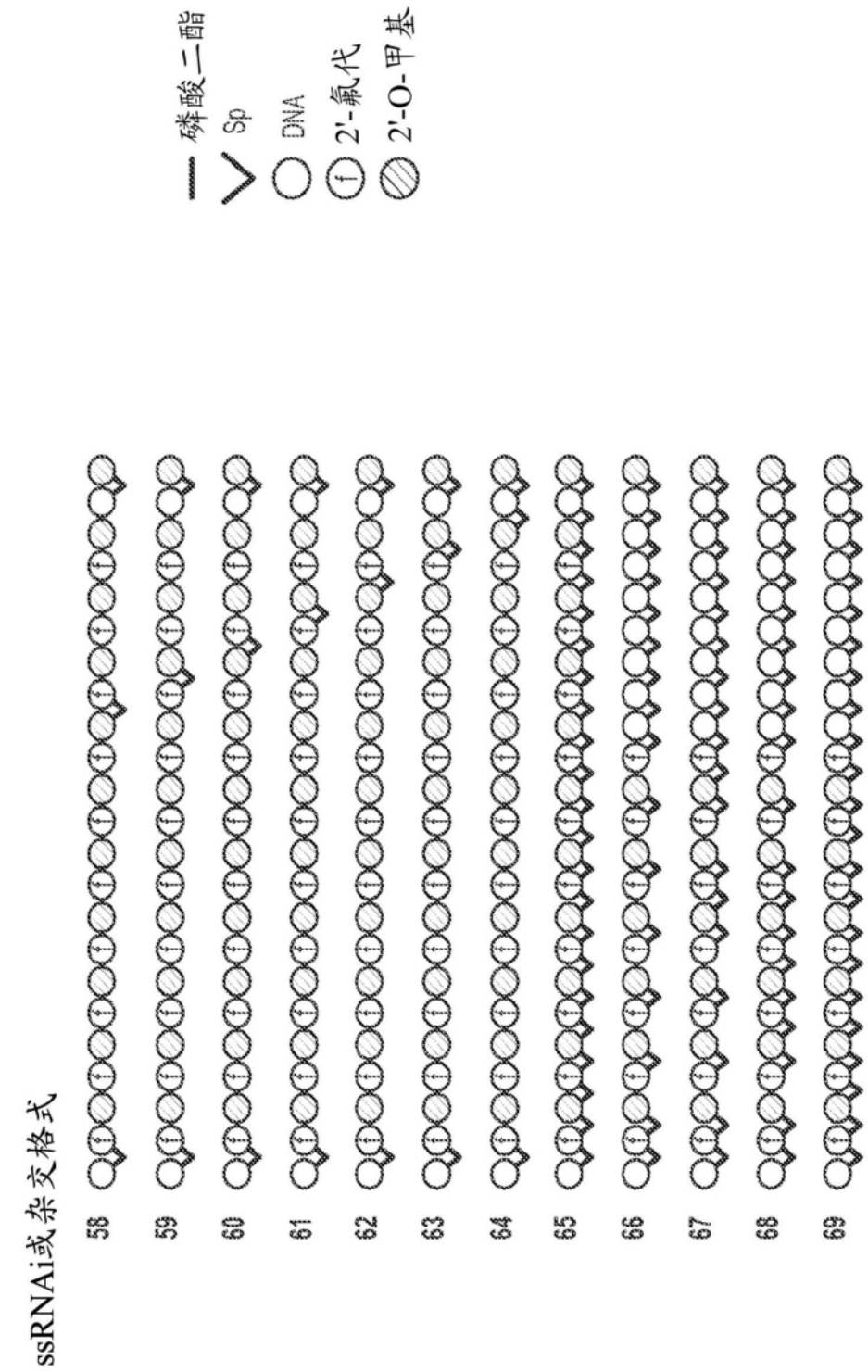

磷酸二酯
Sp
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
ssRNAi或杂交格式
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69

图1E

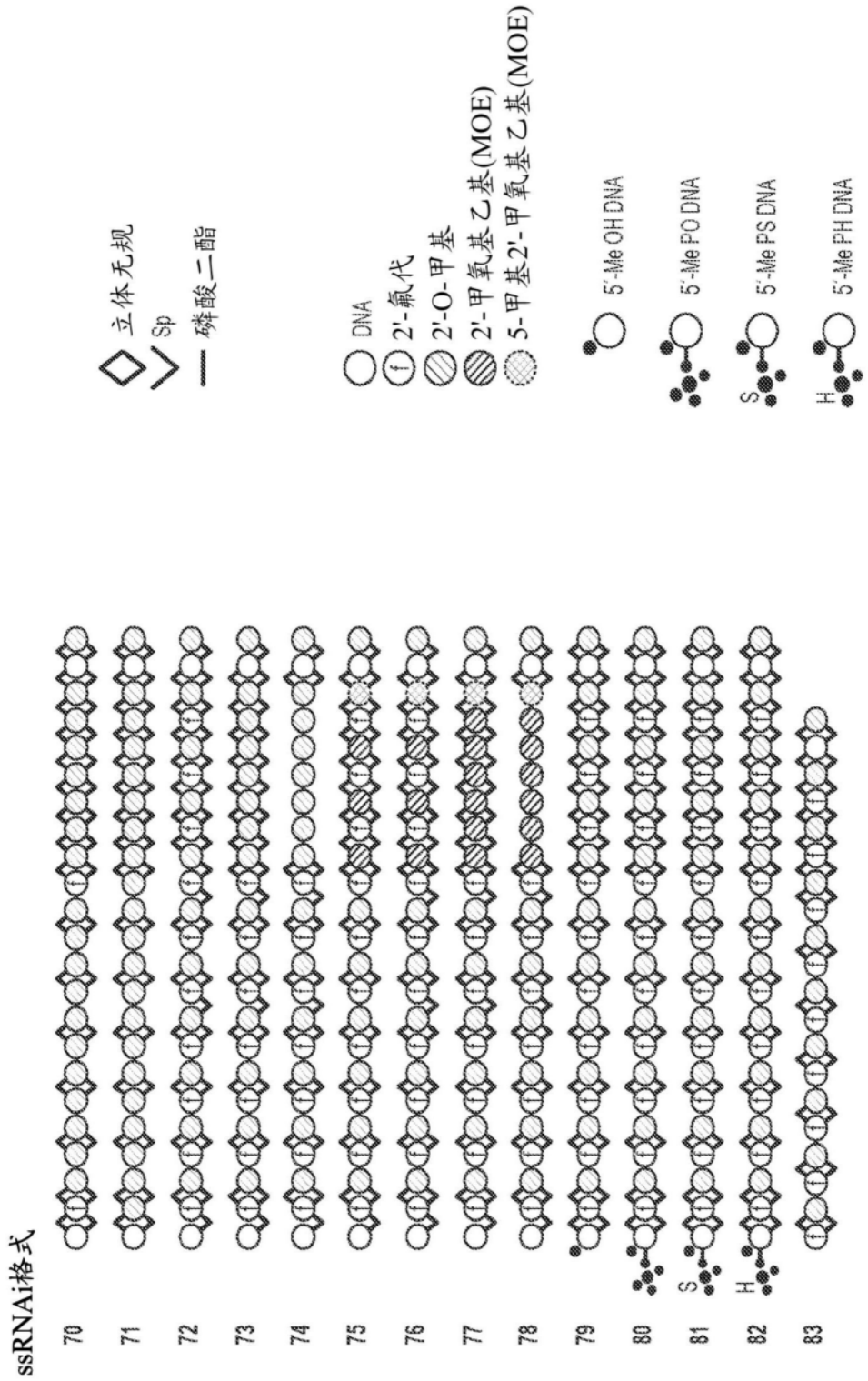

立体无规
Sp
磷酸二酯
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
2'-甲氧基乙基(MOE)
5-甲基2'-甲氧基乙基(MOE)
5'-Me OH DNA
5'-Me PO DNA
5'-Me PS DNA
5'-Me PH DNA
ssRNAi格式
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83

图1F

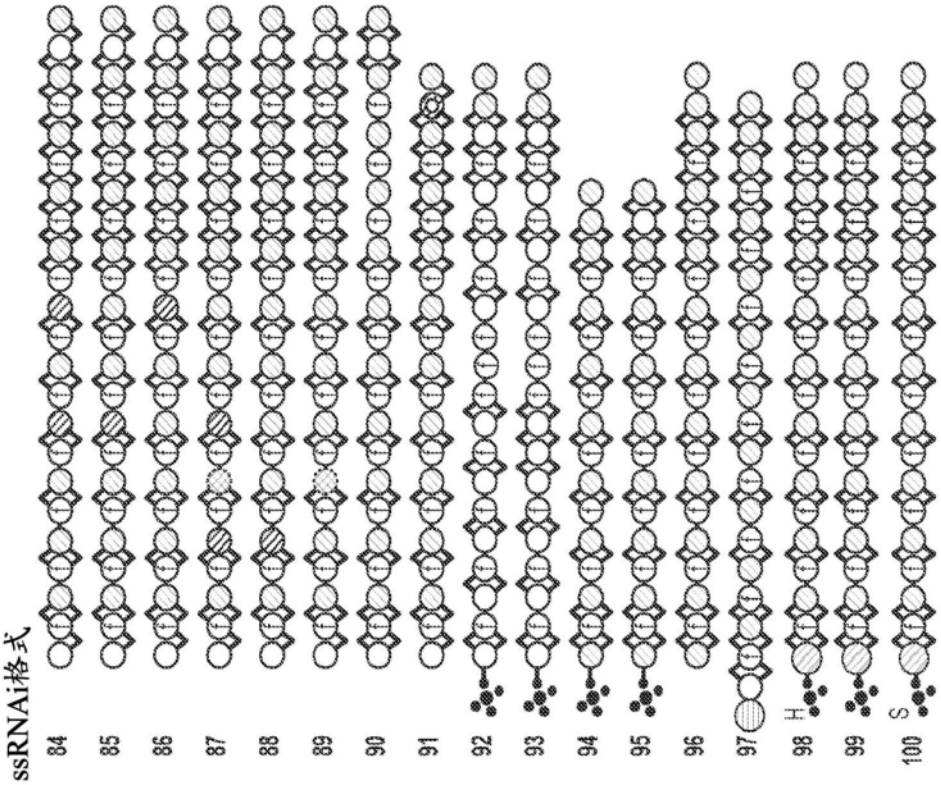

ssRNAi格式
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
立体无规
Sp
磷酸二酯
5'-磷酸酯
5'-H-膦酸酯
5'-硫代磷酸酯
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
2'-甲氧基乙基(MOE)
5-甲基2'-甲氧基乙基(MOE)
TGaNC6T
格式98和100中的Mod
格式97中的Mod

图1G

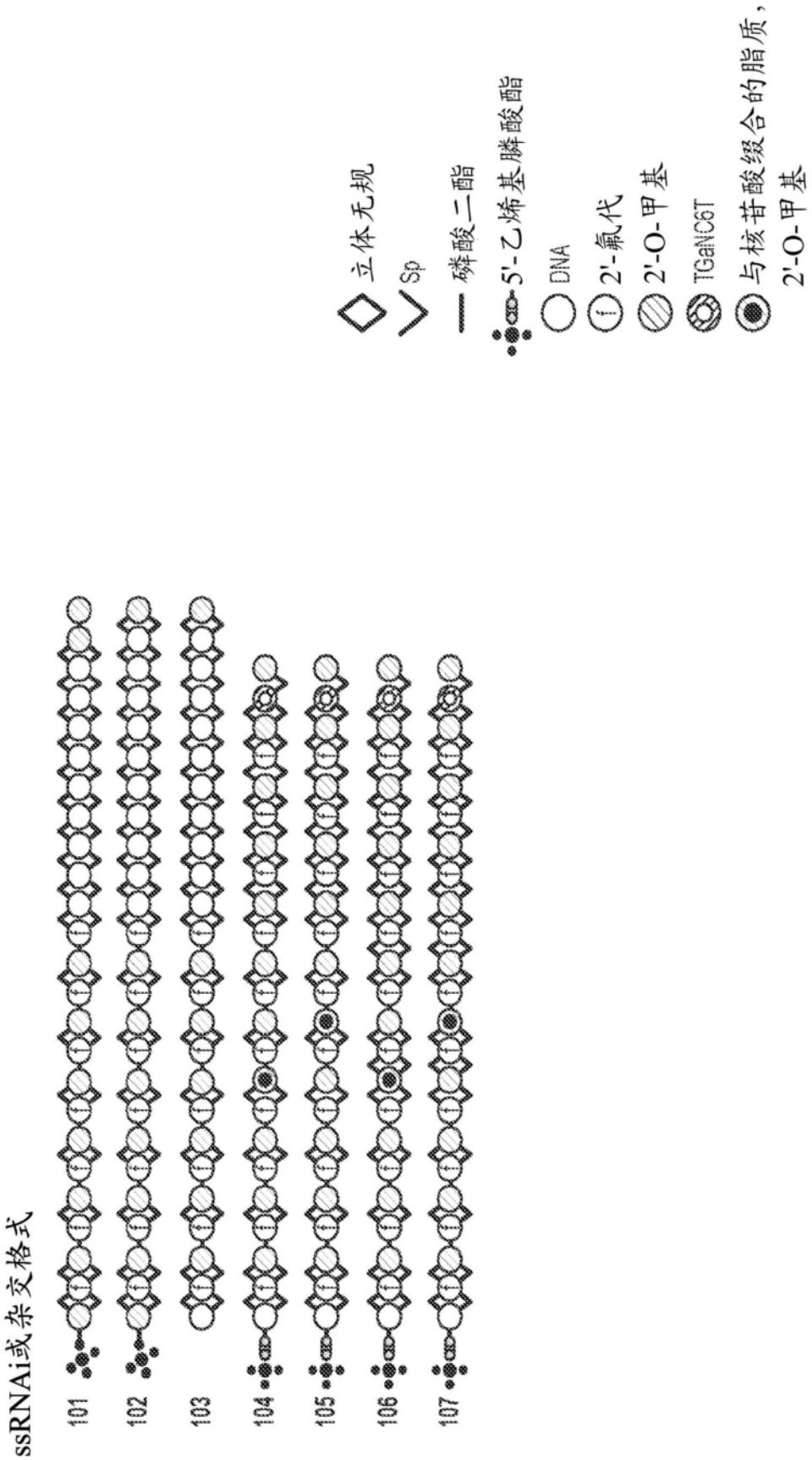

ssRNAi或杂交格式
101
102
103
104
105
106
107
立体无规
Sp
磷酸二酯
5'-乙烯基膦酸酯
DNA
2'-氟代
2'-O-甲基
TGaNC6T
与核苷酸缀合的脂质，
2'-O-甲基

图1H

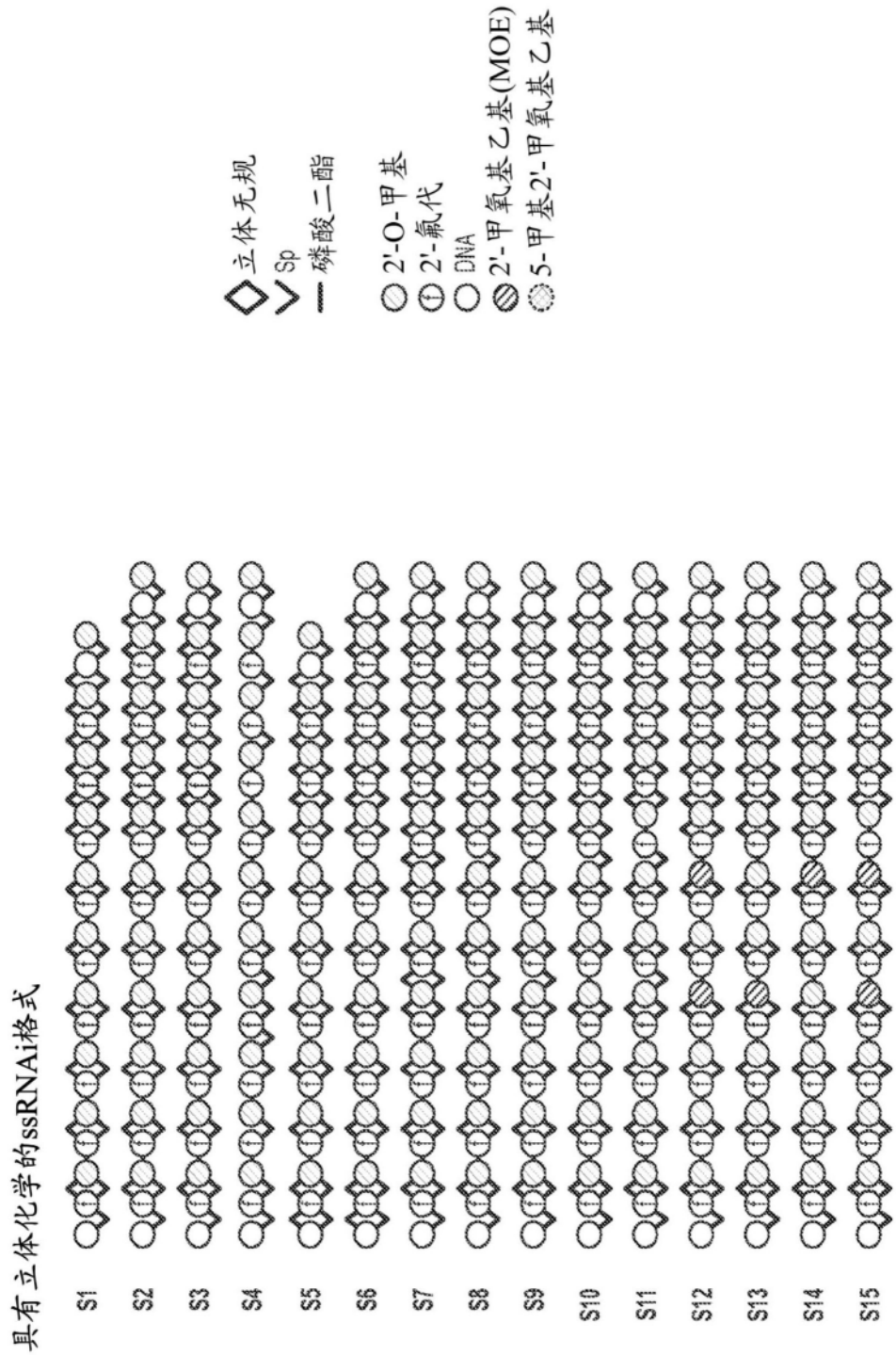

具有立体化学的ssRNAi格式
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
S13
S14
S15
立体无规
Sp
磷酸二酯
2'-O-甲基
2'-氟代
DNA
2'-甲氧基乙基(MOE)
5-甲基2'-甲氧基乙基

图1I

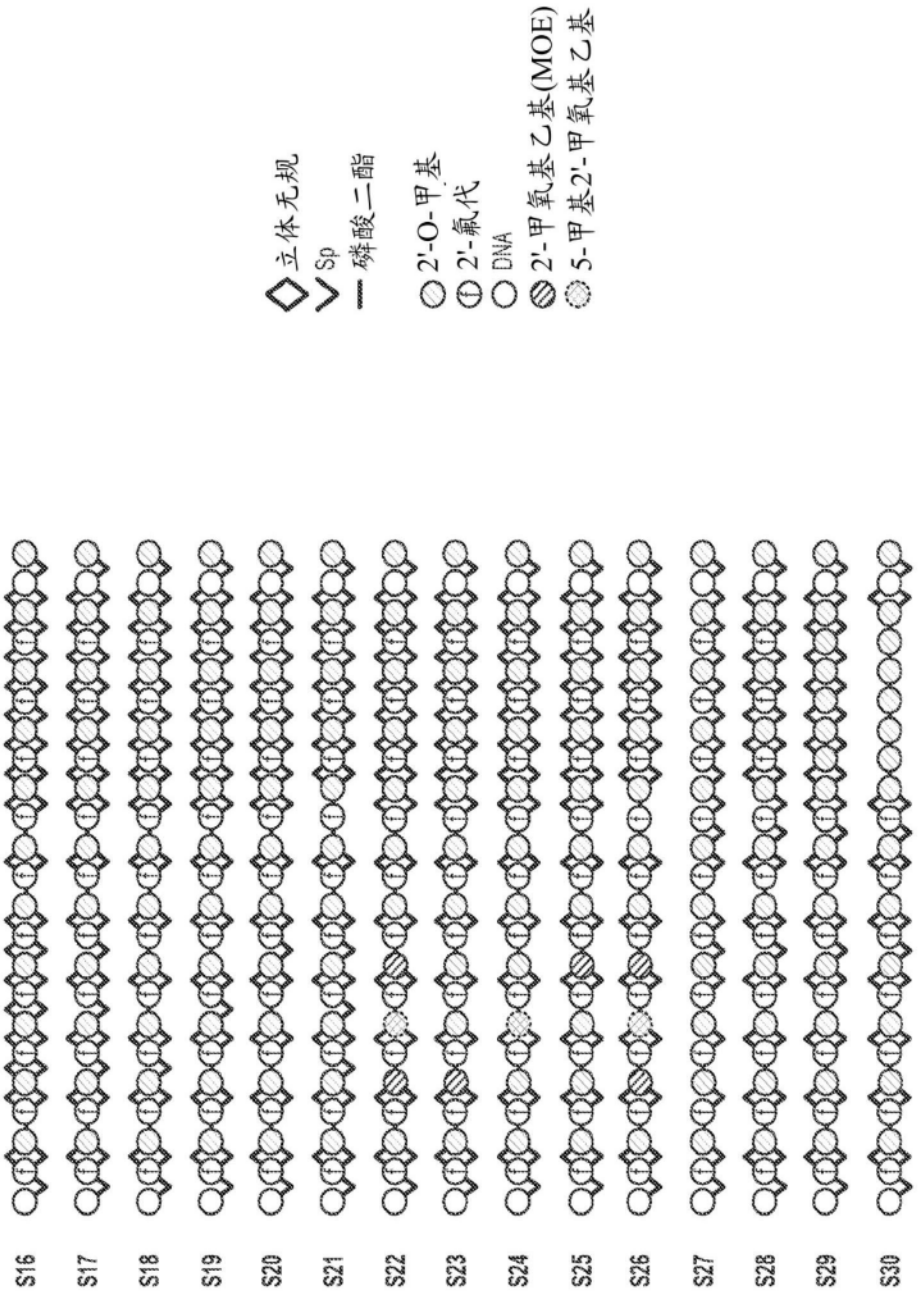

立体无规
Sp
磷酸二酯
2'-O-甲基
2'-氟代
DNA
2'-甲氧基乙基(MOE)
5-甲基2'-甲氧基乙基
S16
S17
S18
S19
S20
S21
S22
S23
S24
S25
S26
S27
S28
S29
S30

图1J

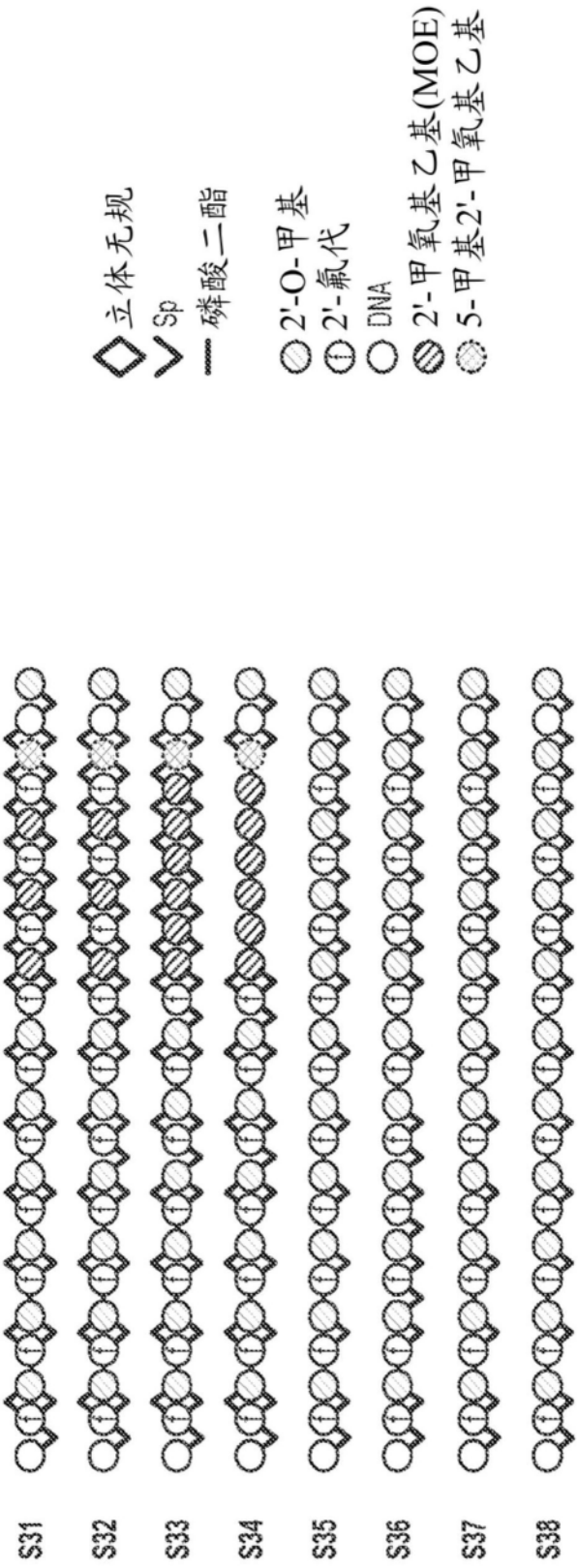

立体无规
Sp
磷酸二酯
2'-O-甲基
2'-氟代
DNA
2'-甲氧基乙基(MOE)
5-甲基2'-甲氧基乙基
S31
S32
S33
S34
S35
S36
S37
S38

图1K

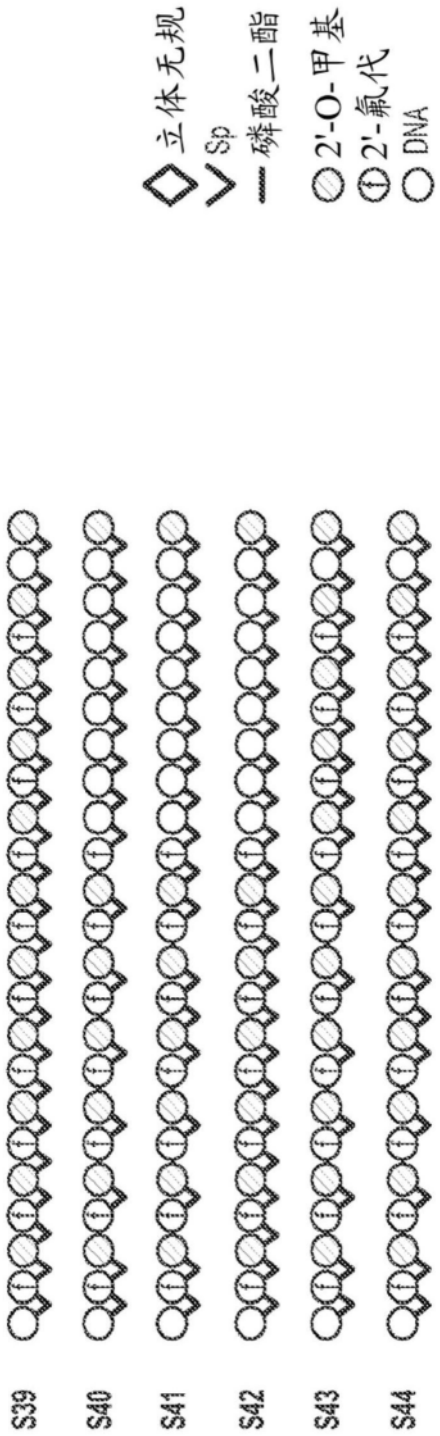


图1L

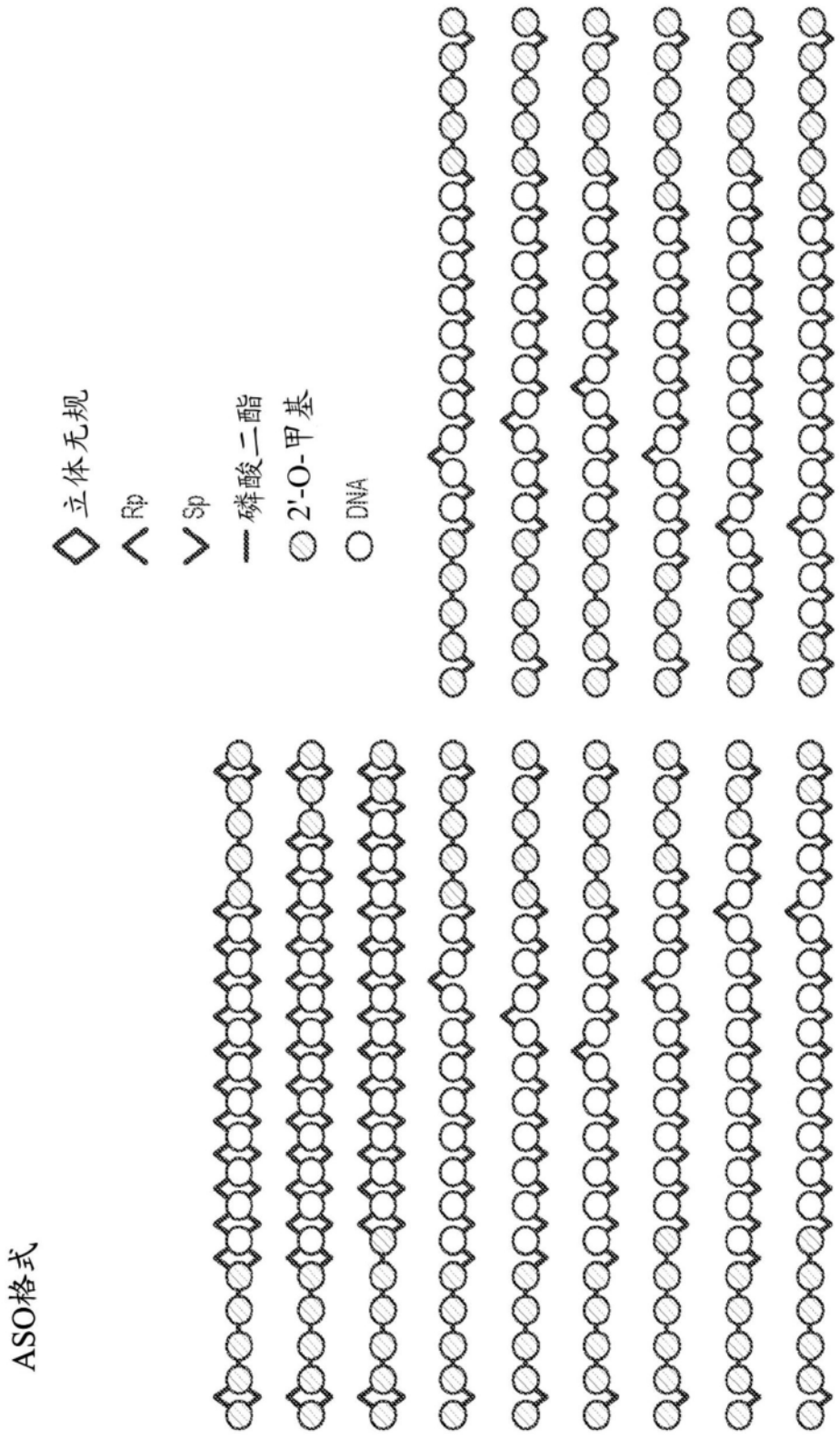


图2

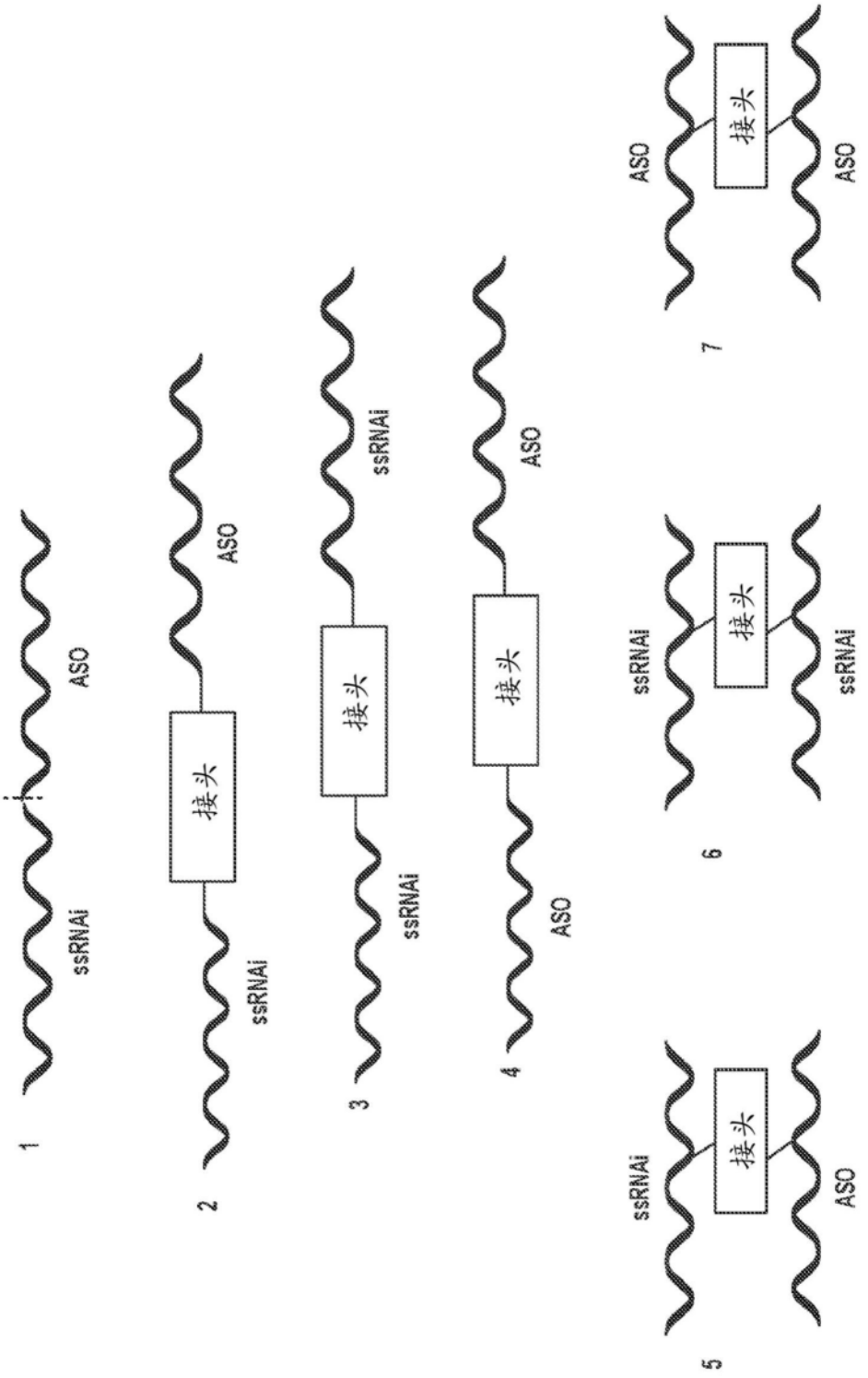

1
ssRNAi
ASO
2
ssRNAi
接头
ASO
3
ssRNAi
接头
ssRNAi
4
ASO
接头
ASO
5
ssRNAi
接头
ASO
6
ssRNAi
接头
ssRNAi
7
ASO
接头
ASO

图3A

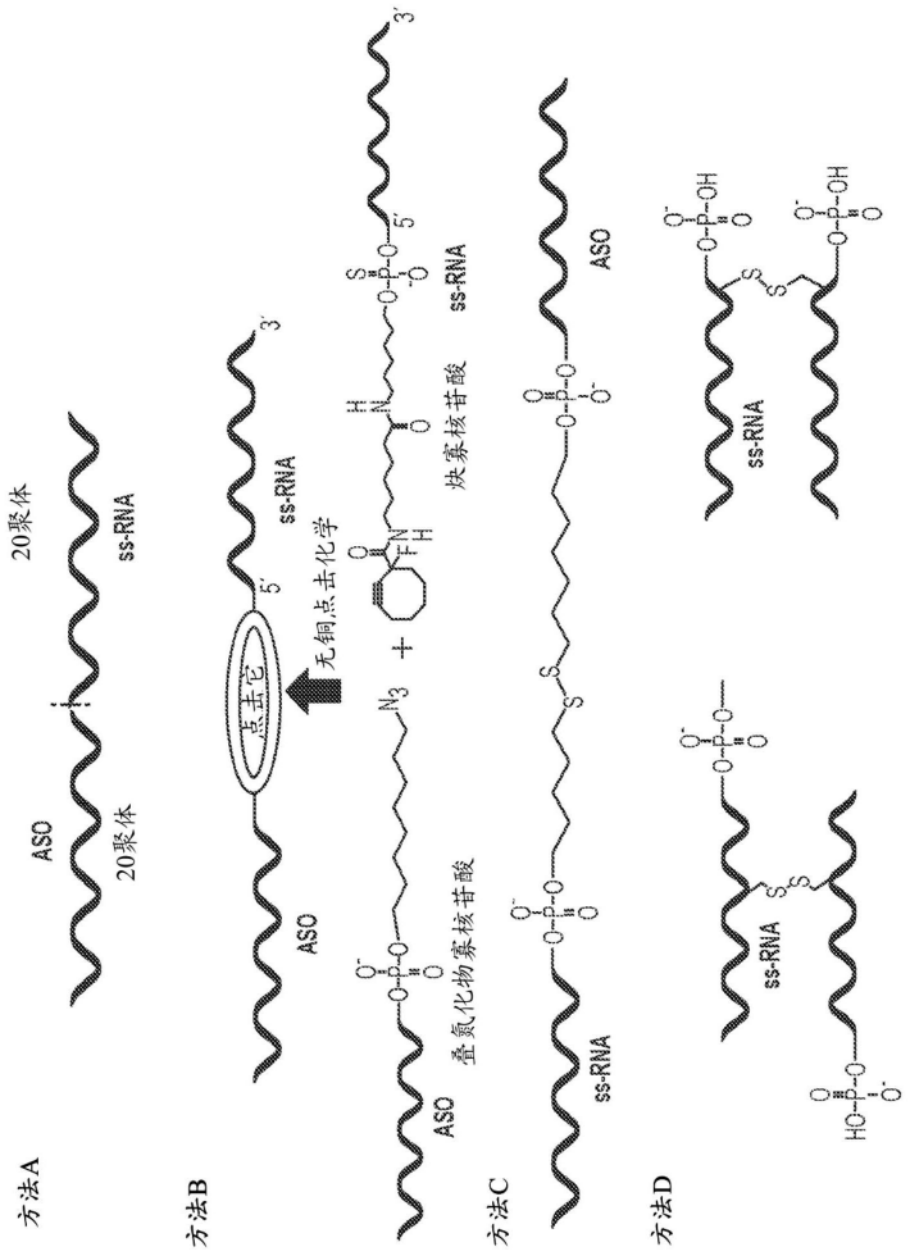

方法A
20聚体
ASO
20聚体
ss-RNA
方法B
点击它
无铜点击化学
ASO
5'
ss-RNA
3'
炔寡核苷酸
ss-RNA
叠氮化物寡核苷酸
ASO
方法C
ASO
ss-RNA
方法D
ss-RNA
ss-RNA

图3B