



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117203336 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280025765.3

(22) 申请日 2022.03.28

(30) 优先权数据

63/167,140 2021.03.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/022093 2022.03.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/212231 EN 2022.10.06

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·M·桑达拉潘迪安

J·D·马克辛尼克

M·K·施莱格尔 A·卡斯托雷诺

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

权利要求书12页 说明书131页
序列表81页 附图47页

(54) 发明名称

亨廷顿蛋白 (HTT) iRNA 药剂组合物以及其使用方法

(57) 摘要

本公开涉及靶向亨廷顿蛋白 (HTT) 基因的双链核糖核酸 (dsRNAi) 药剂和组合物, 以及抑制 HTT 基因的表达的方法, 以及使用此类 dsRNAi 药剂和组合物治疗患有 HTT 相关疾病或病症, 例如亨廷顿氏病的受试者的方法。

1. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (Huntingtin, HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中 dsRNA 包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述反义链包括与编码 HTT 的 mRNA 互补的区, 并且其中所述互补区包括与表 2 至表 5 中的任一个中的任一个反义核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸, 除了双链体 AD-1019465 和 AD-1019476 之外。

2. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述 dsRNA 包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: SEQ ID NO: 1 的核苷酸 26-77; 或 142-202, 并且所述反义链包括来自 SEQ ID NO: 6 的对应核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸。

3. 根据权利要求 2 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述有义链包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: SEQ ID NO: 1 的核苷酸 27-49; 147-169; 或 173-195。

4. 根据权利要求 3 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述有义链包括与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 147-169 相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的 dsRNA 药剂, 其中所述反义链包括与选自以下组成的组的双链体的任一个反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: AD-1498524、AD-1498526 或 AD-1498528。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的 dsRNA 药剂, 其中所述反义链包括与 AD-1498524 的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸。

7. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述 dsRNA 包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: SEQ ID NO: 1 的核苷酸 4391-4669; 或 6009-6037, 并且所述反义链包括来自 SEQ ID NO: 6 的对应核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸。

8. 根据权利要求 2 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述有义链包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: SEQ ID NO: 1 的核苷酸 4398-4420; 4403-4425; 或 6512-6534。

9. 根据权利要求 8 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述有义链包括与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 4398-4420 相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述反义链包括与选自以下组成的组的双链体的任一个反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸: AD-1271085、AD-1271083 或 AD-1271084。

11. 根据权利要求 10 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述反义链包括与 AD-1271085 的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的 dsRNA 药剂, 其中所述有义链、所述反义链或所述有义链和所述反义链两者与一个或多个亲脂性部分缀合。

13. 根据权利要求 12 所述的 dsRNA 药剂, 其中所述亲脂性部分与所述 dsRNA 药剂的所述双链区中的一个或多个内部位置缀合。

14. 根据权利要求12或13所述的dsRNA药剂,其中所述一个或多个亲脂性部分与所述反义链上的一个或多个内部位置缀合。

15. 根据权利要求12或13所述的dsRNA药剂,其中所述一个或多个亲脂性部分通过接头或载体与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合。

16. 根据权利要求12至15中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分的通过logKow测量的亲脂性超过0。

17. 根据权利要求12至16中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂的通过所述dsRNA药剂的血浆蛋白结合测定中的未结合级分测量的疏水性超过0.2。

18. 根据权利要求17所述的dsRNA药剂,其中所述血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率偏移测定。

19. 根据权利要求13至15中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含除了距离所述有义链或所述反义链的每一端的末端两个位置以外的所有位置。

20. 根据权利要求19所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含除了距离所述有义链或所述反义链的每一端的末端三个位置以外的所有位置。

21. 根据权利要求13至20中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区。

22. 根据权利要求21所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含从所述有义链的5'端开始计数的除位置9至12以外的所有位置。

23. 根据权利要求21所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含从所述有义链的3'端开始计数的除位置11至13以外的所有位置。

24. 根据权利要求13至20中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置不包括所述反义链的切割位点区。

25. 根据权利要求24所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含从所述反义链的5'端开始计数的除位置12至14以外的所有位置。

26. 根据权利要求13至25中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述内部位置包含从3'端开始计数的除所述有义链上的位置11至13和从5'端开始计数的所述反义链上的位置12至14以外的所有位置。

27. 根据权利要求12至26中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述一个或多个亲脂性部分与选自以下组成的组的所述内部位置中的一个或多个内部位置缀合:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置4至8和13至18,以及所述反义链上的位置6至10和15至18。

28. 根据权利要求27所述的dsRNA药剂,其中所述一个或多个亲脂性部分与选自以下组成的组的所述内部位置中的一个或多个内部位置缀合:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置5、6、7、15和17,以及所述反义链上的位置15和17。

29. 根据权利要求13所述的dsRNA药剂,其中所述双链区中的所述位置不包括所述有义链的切割位点区。

30. 根据权利要求12至29中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的长度为21个核苷酸,所述反义链的长度为23个核苷酸,并且所述亲脂性部分与所述有义链的位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或所述反义链的位置16缀合。

31. 根据权利要求21至30中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的长度为21个核

苷酸,所述反义链的长度为23个核苷酸,并且所述亲脂性部分与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或所述反义链的位置16缀合。

32. 根据权利要求12至31中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分是脂肪族、脂环族或聚脂环族化合物。

33. 根据权利要求32所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分选自由以下组成的组:脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶基氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪。

34. 根据权利要求33所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C4-C30烃链,以及选自由以下组成的组的任选的官能团:羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮化物和炔烃。

35. 根据权利要求34所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C6-C18烃链。

36. 根据权利要求35所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C16烃链。

37. 根据权利要求36所述的dsRNA药剂,其中所述饱和或不饱和C16烃链与从所述链的5'端开始计数的位置6缀合。

38. 根据权利要求12至37中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分通过置换所述内部位置或所述双链区中的一个或多个核苷酸的载体缀合。

39. 根据权利要求38所述的dsRNA药剂,其中所述载体是选自由以下组成的组的环状基团:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基;或是基于丝氨酸主链或乙二醇胺主链的无环部分。

40. 根据权利要求12至39中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性部分通过含有醚、硫醚、脲、碳酸盐、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物或氨基甲酸酯的接头与所述dsRNA药剂缀合。

41. 根据权利要求12至40中任一项所述的双链iRNA药剂,其中所述亲脂性部分与核碱基、糖部分或核苷间键缀合。

42. 根据权利要求1至41中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂包括至少一个经修饰的核苷酸。

43. 根据权利要求42所述的dsRNA药剂,其中不超过五个有义链核苷酸和所述反义链的不超过五个核苷酸是未经修饰的核苷酸。

44. 根据权利要求43所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。

45. 根据权利要求42至44中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自以下的组:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、2'-5'-连接的核糖核苷酸(3'-RNA)、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、

2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包括核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包括5'-硫代磷酸酯基的核苷酸、包括5'-甲基磷酸酯基的核苷酸、包括5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包括乙烯基磷酸酯的核苷酸、包括腺苷-乙二醇核酸(GNA)的核苷酸、包括胸苷-乙二醇核酸(GNA) S-异构体的核苷酸、包括2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧胸苷-3'磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯的核苷酸和与胆甾醇基衍生物、十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸；胞苷-2'-磷酸酯、鸟苷-2'-磷酸酯、尿苷-2'-磷酸酯、腺苷-2'-磷酸酯、2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯、2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸酯和2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯,以及其组合。

46. 根据权利要求45所述的dsRNA药剂,其中所述经修饰的核苷酸选自以下组成的组:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)、锁定核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯和包括核苷酸的非天然碱基。

47. 根据权利要求45所述的dsRNA药剂,其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自以下组成的组:脱氧核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、乙二醇修饰的核苷酸(GNA)和乙烯基磷酸酯核苷酸;以及其组合。

48. 根据权利要求45所述的dsRNA药剂,其中所述核苷酸上的至少一个修饰是热不稳定核苷酸修饰。

49. 根据权利要求48所述的dsRNA,其中所述热不稳定核苷酸修饰选自以下组成的组:无碱基修饰;与所述双链体中的相对核苷酸的错配;以及不稳定糖修饰、2'-脱氧修饰、无环核苷酸、2'-5'-连接的核糖核苷酸(3'-RNA)、解锁核酸(UNA)和甘油核酸(GNA)。

50. 根据权利要求45所述的dsRNA药剂,其中所述经修饰的核苷酸包括3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)的短序列。

51. 根据权利要求45所述的dsRNA药剂,其中所述核苷酸上的所述修饰是2'-O-甲基、GNA和2'氟修饰。

52. 根据权利要求1至51中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。

53. 根据权利要求52所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂包括6个至8个硫代磷酸酯核苷酸间键。

54. 根据权利要求1至53中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度不超过30个核苷酸。

55. 根据权利要求1至54中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包括至少1个核苷酸的3'突出端。

56. 根据权利要求1至54中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包括至少2个核苷酸的3'突出端。

57. 根据权利要求1至56中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为15个至30个核苷酸对。

58. 根据权利要求57所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为17个至23个核苷酸

对。

59. 根据权利要求57所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为17个至25个核苷酸对。

60. 根据权利要求57所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为23个至27个核苷酸对。

61. 根据权利要求57所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为19个至21个核苷酸对。

62. 根据权利要求57所述的dsRNA药剂,其中所述双链区的长度为21个至23个核苷酸对。

63. 根据权利要求1至62中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度为19个至30个核苷酸。

64. 根据权利要求1至62中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度为19个至23个核苷酸。

65. 根据权利要求1至62中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度为21个至23个核苷酸。

66. 根据权利要求12至65中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述亲脂性分子或靶向配体通过选自以下组成的组的生物可切割接头缀合:DNA、RNA、二硫化物、酰胺、半乳糖胺的官能化单糖或寡糖、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖以及其组合。

67. 根据权利要求12至66中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的3'端通过端盖保护,所述端盖是具有胺的环状基团,所述环状基团选自以下组成的组:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。

68. 根据权利要求1至67中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括:

发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及

发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

69. 根据权利要求1至67中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括:

发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及

发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

70. 根据权利要求1至67中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括:

发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键、第二核苷酸间键和第三核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及

发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

71.根据权利要求1至67中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括:

发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的3'端处的第三核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及

发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

72.根据权利要求1至67中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括:

发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;

发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及

发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

73.根据权利要求1至72中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包括在所述反义链的5'端处的磷酸酯或磷酸酯模拟物。

74.根据权利要求73所述的dsRNA药剂,其中所述磷酸酯模拟物是5'-乙烯基磷酸酯(VP)。

75.根据权利要求1至74中任一项所述的dsRNA药剂,其中在所述双链体的所述反义链的5'端的1位置处的碱基对是AU碱基对。

76.根据权利要求1至75中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链具有总计21个核苷酸,并且所述反义链具有总计23个核苷酸。

77.根据权利要求1至76中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UAUCAGCUUUCCAGGGUCGCCG-3'(SEQ ID NO:53)。

78.根据权利要求1至77中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3'(SEQ ID NO:40),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UAUCAGCUUUCCAGGGU CGCCG-3'(SEQ ID NO:53)。

79.一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfA faaagcugasusa-3'(SEQ ID NO:65)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3'(SEQ ID NO:79)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Chd)是2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-磷酸酯; C2p是胞苷-2'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙基磷酸酯。

80. 根据权利要求79所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

81. 根据权利要求79或80所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

82. 根据权利要求79至81中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

83. 根据权利要求79至82中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsgac (Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79)。

84. 根据权利要求79至83中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链由核苷酸序列5'-gscsgac (Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 组成, 并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 组成。

85. 根据1至76中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO:57)。

86. 根据权利要求1至73和85中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括核苷酸序列5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO:44), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UAGGACTUGAGGGACUCGA AGGC-3' (SEQ ID NO:57)。

87. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd) GfuCfCfC fucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsaggac (Tgn) ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Ahd)是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯; Tgn是胸苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体; 并且VP是5'-乙基磷酸酯。

88. 根据权利要求87所述的dsRNA, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg

(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

89. 根据权利要求87或88所述的dsRNA,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

90. 根据权利要求87至89中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

91. 根据权利要求87至90中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-csusucg (Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83)。

92. 根据权利要求87至91中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链由核苷酸序列5'-csusucg (Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 组成,并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 组成。

93. 根据权利要求1至76中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UAAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO:59)。

94. 根据权利要求1至76和93中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO:46),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UAAAAAGCAGAACCUGA CCGGCC-3' (SEQ ID NO:59)。

95. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu (Chd) AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基 (2'-OMe) A、G、C和U;s是硫代磷酸酯键;Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U;(Chd)是2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-磷酸酯;并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

96. 根据权利要求95所述的dsRNA,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu (Chd) AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

97. 根据权利要求95或96所述的dsRNA,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu (Chd) AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

98. 根据权利要求95至97中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包括与核苷酸序列

5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccgscsc-3'(SEQ ID NO:85)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

99.根据权利要求95至98中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccgscsc-3'(SEQ ID NO:85)。

100.根据权利要求95至98中任一项所述的dsRNA,其中所述有义链由核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)组成,并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusUfSaadAadGcagaacCfudGaccgscsc-3'(SEQ ID NO:85)组成。

101.根据权利要求1至76中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3'(SEQ ID NO:16)。

102.根据权利要求1至76和101中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3'(SEQ ID NO:15),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3'(SEQ ID NO:16)。

103.一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfA fucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U;s是硫代磷酸酯键;Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U;(Uhd)是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯;并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

104.根据权利要求103所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

105.根据权利要求103或104所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

106.根据权利要求103至105中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

107.根据权利要求103至106中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)。

108.根据权利要求103至107中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链由核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)组成,并且所述反义链由

核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauua UfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18) 组成。

109. 根据权利要求1至76中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UCAGGAAUCCGAUUCACCAGCUC-3' (SEQ ID NO:30)。

110. 根据权利要求1至76和109中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括核苷酸序列5'-GCUGGUGAAUCGGAUUCUGA-3' (SEQ ID NO:26), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UCAGGAAUCCGAUUCACC AGCUC-3' (SEQ ID NO:30)。

111. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基 (2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Uhd) 是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

112. 根据权利要求111所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

113. 根据权利要求111或112所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

114. 根据权利要求111至113中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

115. 根据权利要求111至114中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22)。

116. 根据权利要求111至115中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链由核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfC fggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21) 组成, 并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc u-3' (SEQ ID NO:22) 组成。

117. 根据权利要求1至76中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述反义链包括核苷酸序列5'-UACAAACGAAUGUGAUUAUGAAU-3' (SEQ ID NO:29)。

118. 根据权利要求1至76和117中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链包括核苷酸序列5'-UCAUAAUCACAUUCGUUUGUA-3' (SEQ ID NO:25), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UACAAACGAAUGUGAUUAUGAAU-3' (SEQ ID NO:29)。

119. 一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,

其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe) A、G、C和U;s是硫代磷酸酯键;Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U;(Uhd)是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯;并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

120.根据权利要求119所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

121.根据权利要求119或120所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

122.根据权利要求119至121中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

123.根据权利要求119至122中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链包括核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20)。

124.根据权利要求119至123中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链由核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19) 组成,并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20) 组成。

125.一种细胞,其含有根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂。

126.一种用于抑制编码HTT的基因的表达的药物组合物,所述药物组合物包括根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂。

127.一种药物组合物,其包括根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂以及脂质调配物。

128.一种组合物,其包括两种或更多种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的dsRNA药剂,

其中每种dsRNA药剂独立地包括形成双链区的有义链和反义链,

其中所述反义链中的每一个独立地包括与编码HTT的mRNA互补的区,并且其中所述互补区中的每一个独立地包括与表2至表5中的任一个中的任一个反义核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

129.一种抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)基因的表达的方法,所述方法包括:

(a)使所述细胞与根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂、或根据权利要求128所述的组合物或根据权利要求126或127的权利要求所述的药物组合物接触;以及

(b)将在步骤(a)中产生的细胞维持足以使所述HTT基因的mRNA转录物降解的时间,由

此抑制所述细胞中的所述HTT基因的表达。

130. 根据权利要求129所述的方法, 其中所述细胞在受试者体内。

131. 根据权利要求130所述的方法, 其中所述受试者是人。

132. 根据权利要求129至131中任一项所述的方法, 其中HTT的表达被抑制至少50%。

133. 根据权利要求129至132中任一项所述的方法, 其中所述受试者已被诊断患有HTT相关疾病。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中核苷酸重复扩增疾病是亨廷顿氏病(Huntington's disease)。

135. 一种治疗被诊断患有HTT相关疾病的受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂、或根据权利要求128所述的组合物或根据权利要求126或127的权利要求所述的药物组合物, 由此治疗所述受试者。

136. 根据权利要求135所述的方法, 其中治疗包括改善所述疾病的至少一种体征或症状。

137. 根据权利要求135所述的方法, 其中治疗包括预防所述疾病的进展。

138. 根据权利要求135所述的方法, 其中所述HTT相关疾病是亨廷顿氏病。

139. 根据权利要求135至138中任一项所述的方法, 其中所述dsRNA药剂以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量施用于所述受试者。

140. 根据权利要求135至139中任一项所述的方法, 其中所述dsRNA药剂鞘内施用于所述受试者。

141. 根据权利要求135至140中任一项所述的方法, 其进一步包括测量从所述受试者获得的样品中的HTT的水平。

142. 根据权利要求135至141中任一项所述的方法, 其进一步包括向所述受试者施用适用于治疗或预防HTT相关病症的另外的药剂。

143. 一种试剂盒, 其包括根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂、或根据权利要求128所述的组合物或根据权利要求126或127的权利要求所述的药物组合物。

144. 一种小瓶, 其包括根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂、或根据权利要求128所述的组合物或根据权利要求126或127的权利要求所述的药物组合物。

145. 一种注射器, 其包括根据权利要求1至124中任一项所述的dsRNA药剂、或根据权利要求128所述的组合物或根据权利要求126或127的权利要求所述的药物组合物。

亨廷顿蛋白 (HTT) iRNA 药剂组合物以及其使用方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年3月29日提交的美国临时申请第63/167,140号的优先权的权益,所述美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且特此以全文引用的方式并入。创建于2022年3月22日的所述ASCII副本命名为121301-_14420_SL.txt并且大小为198,616字节。

背景技术

[0005] 亨廷顿氏病 (Huntington's disease) 是一种进行性神经退行性病症,其特征存在于运动障碍、认知丧失和精神表现 (Martin和Gusella (1986)《新英格兰医学杂志 (N.Engl.J.Med.)》315:1267-1276)。其是以常染色体显性遗传的方式遗传的,并且在大多数欧洲起源的群体中影响约1/10,000的个体 (Harper, P.S. 等人,《亨廷顿氏病 (Huntington's Disease)》,费城的桑德斯出版社 (W.B.Saunders, Philadelphia), 1991)。亨廷顿氏病的标志是一种独特的舞蹈性运动障碍,通常在生命的第四到第五个十年有微妙而隐蔽的发作,并且在10年至20年的过程中逐渐恶化,直到死亡。偶尔,亨廷顿氏病在青少年中表达,通常表现为更严重的症状,包含僵硬和更快的病程。亨廷顿氏病的青少年发病与疾病等位基因的亲本传播优势相关。亨廷顿氏病的神经病理学也显示出独特的模式,其中神经元的选择性丧失在脑的尾状核和壳核区最为严重。

[0006] 亨廷顿氏病已被证明是由一种名为IT15或亨廷顿蛋白 (Huntingtin, HTT) 的基因的外显子1中谷氨酰胺重复扩增引起的。尽管此基因广泛表达,并且正常发育所必需的,但亨廷顿氏病的病理学仅限于脑,原因尚不清楚。在患有HD (一种常染色体显性遗传疾病) 的患者中,多聚谷氨酰胺重复的扩增导致野生型转录物、具有扩增的多聚谷氨酰胺重复的全长突变体转录物以及具有扩增的多聚谷氨酰胺重复的截短突变体转录物。已经表明,尽管亨廷顿蛋白基因产物在患者和对照中的表达水平相似,但诱导毒性的是多聚谷氨酰胺重复的扩增以及全长突变体转录物和截短突变体转录物的存在。

[0007] 目前还没有可用的针对亨廷顿氏病的有效治疗。抗精神病药物 (例如,氯丙嗪 (chlorpromazine)) 或利血平 (reserpine) 通常只能部分抑制舞蹈动作和烦躁行为,直到出现嗜睡、低血压或帕金森氏病 (parkinsonism) 的不良反应。另外,尽管在RNAi和亨廷顿氏病治疗领域取得了重大进展,但仍然需要一种能够利用细胞自身的RNAi机制选择性有效地沉默HD基因的药剂,所述药剂具有高生物活性和体内稳定性,并且可以有效抑制靶向亨廷顿蛋白基因的表达。

发明内容

[0008] 本公开提供了RNAi药剂组合物,所述组合物影响对亨廷顿蛋白 (HTT) 基因的RNA转录物的RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 介导的切割。所述HTT基因可以在细胞内,例如受试者

(如人)体内的细胞。本公开还提供了使用本公开的所述RNAi药剂组合物用于抑制HTT基因的表达或用于治疗将受益于抑制或减少HTT基因表达的受试者的方法,例如患有或易于患有HTT相关疾病的受试者。

[0009] 一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂,其中dsRNA包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述反义链包括与编码HTT的mRNA互补的区,并且其中所述互补区包括与表2至表5的任一个中的任一个反义核苷酸序列相差不超过3个,例如3个、2个、1个或0个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0010] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂,其中所述dsRNA包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸4391-4669;6500-6540;或6009-6037的任一个核苷酸序列相差不超过三个,例如3个、2个、1个或0个核苷酸的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个连续核苷酸;并且所述反义链包括来自SEQ ID NO:6的对应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0011] 在一个实施例中,所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸4398-4420;4403-4425;或6512-6534的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个连续核苷酸。

[0012] 在一个实施例中,所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸4398-4420相差不超过三个核苷酸的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个连续核苷酸。

[0013] 在一个实施例中,所述反义链包括与选自以下组成的组的双链体的任一个反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连续核苷酸:AD-1271085、AD-1271083或AD-1271084。

[0014] 在一个实施例中,所述反义链包括与AD-1271085的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连续核苷酸。

[0015] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO:15)。

[0016] 在一个实施例中,所述有义链由核苷酸序列由5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO:15) 组成。

[0017] 在一个实施例中,所述反义链包括核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO:16)。

[0018] 在一个实施例中,所述反义链由核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO:15) 组成。

[0019] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO:15) 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO:16)。

[0020] 在一个实施例中,所述有义链由核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO:15) 组成并且所述反义链由核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO:16) 组成。

[0021] 一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核

糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸26-77;或142-202相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括来自SEQ ID NO:6的对应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0022] 在一个实施例中,所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸27-49;55-77;147-169;或173-195的核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0023] 在一个实施例中,所述有义链包括与SEQ ID NO:1的核苷酸147-169相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0024] 在一个实施例中,所述反义链包括与选自以下组成的组的双链体的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-1019448、AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528。

[0025] 在一个实施例中,所述反义链包括与AD-1498524的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0026] 所述有义链、所述反义链或所述有义链和所述反义链两者可以与一个或多个亲脂性部分缀合。在一些实施例中,所述亲脂性部分与所述dsRNA药剂的所述双链区中的一个或多个内部位置缀合,例如一个或多个亲脂性部分可以与所述反义链上的一个或多个内部位置缀合。在一些实施例中,所述一个或多个亲脂性部分通过接头或载体与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合。

[0027] 在一些实施例中,所述亲脂性部分的通过logKow测量的亲脂性超过0。

[0028] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂的通过所述dsRNA药剂的血浆蛋白结合测定中的未结合级分测量的疏水性超过0.2。在一些实施例中,所述血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率偏移测定。

[0029] 在一些实施例中,所述内部位置包含除了距离所述有义链或所述反义链的每一端的末端两个位置以外的所有位置。在其它实施例中,所述内部位置包含除了距离所述有义链或所述反义链的每一端的末端三个位置以外的所有位置。

[0030] 在一些实施例中,所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区,如所述内部位置包含从所述有义链的5'端开始计数的除位置9至12以外的所有位置,或所述内部位置包含从所述有义链的3'端开始计数的除位置11至13以外的所有位置。

[0031] 在一些实施例中,所述内部位置不包括所述反义链的切割位点区。在其它实施例中,所述内部位置包含从所述反义链的5'端开始计数的除位置12至14以外的所有位置。在一些实施例中,所述内部位置包含从3'端开始计数的除所述有义链上的位置11至13和从5'端开始计数的所述反义链上的位置12至14以外的所有位置。

[0032] 在一些实施例中,所述一个或多个亲脂性部分与一个或多个所述内部位置缀合,所述一个或多个所述内部位置选自以下组成的组:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置4至8和13至18,以及所述反义链上的位置6至10和15至18。

[0033] 在一些实施例中,所述一个或多个亲脂性部分与一个或多个所述内部位置缀合,所述一个或多个所述内部位置选自以下组成的组:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置5、6、7、15和17,以及所述反义链上的位置15和17。

[0034] 在一些实施例中,所述双链区中的所述位置不包括所述有义链的切割位点区。

[0035] 在一些实施例中,所述有义链的长度为21个核苷酸,所述反义链的长度为23个核

苷酸,并且所述亲脂性部分与所述有义链的位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或所述反义链的位置16缀合。

[0036] 在其它实施例中,所述有义链的长度为21个核苷酸,所述反义链的长度为23个核苷酸,并且所述亲脂性部分与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或所述反义链的位置16缀合。

[0037] 在一些实施例中,所述亲脂性部分是脂肪族、脂环族或聚脂环族化合物。

[0038] 在一些实施例中,所述亲脂性部分选自由以下组成的组:脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-芑丁酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶基氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪。

[0039] 在一些实施例中,所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C4-C30烃链,以及选自由以下组成的组的任选的官能团:羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮化物和炔烃。

[0040] 在一些实施例中,所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C6-C18烃链。

[0041] 在一些实施例中,所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C16烃链。在一些实施例中,所述饱和或不饱和C16烃链与从所述链的5'端开始计数的位置6缀合。

[0042] 在一些实施例中,所述亲脂性部分通过置换所述内部位置或所述双链区中的一个或多个核苷酸的载体缀合。在一些实施例中,所述载体是选自由以下组成的组的环状基团:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基;或是基于丝氨酸主链或二乙醇胺主链的无环部分。

[0043] 在一些实施例中,所述亲脂性部分通过含有醚、硫醚、脲、碳酸盐、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物或氨基甲酸酯的接头与所述dsRNA药剂缀合。

[0044] 在一些实施例中,所述亲脂性部分与核碱基、糖部分或核苷间键缀合。

[0045] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂包括至少一个经修饰的核苷酸。在一些实施例中,不超过五个有义链核苷酸和不超过五个所述反义链的核苷酸是未经修饰的核苷酸。在其它实施例中,所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸包括修饰。

[0046] 在一些实施例中,所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自以下的组:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包括核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包括5'-硫代磷酸酯基的核苷酸、包括5'-甲基磷酸酯基的核苷酸、包括5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包括乙烯基磷酸酯的核苷酸、包括腺苷-乙二醇核酸(GNA)的核苷酸、包括胸苷-乙二醇核酸(GNA)S-异构体的核苷酸、包括2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧胸苷-3'磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯的核苷酸和与胆甾醇基衍生物和十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸;以及其组合。

[0047] 在其它实施例中,所述经修饰的核苷酸选自由以下组成的组:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)、锁定核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯和包括核苷酸的非天然碱基。

[0048] 在一些实施例中,所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自由以下组成的组:脱氧核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、乙二醇修饰的核苷酸(GNA)和乙烯基膦酸酯核苷酸;以及其组合。

[0049] 在一些实施例中,所述核苷酸上的至少一个所述修饰是热不稳定核苷酸修饰。在一些实施例中,所述热不稳定核苷酸修饰选自由以下组成的组:无碱基修饰;与所述双链体中的相对核苷酸的错配;以及不稳定糖修饰、2'-脱氧修饰、无环核苷酸、解锁核酸(UNA)和甘油核酸(GNA)

[0050] 在一些实施例中,所述经修饰的核苷酸包括3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)的短序列。

[0051] 在一些实施例中,所述核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、GNA和2'氟修饰。

[0052] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施例中,所述dsRNA药剂包括6个至8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施例中,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯的核苷酸间键位于一条链的3'末端处。任选地,所述链是所述反义链。在另一个实施例中,所述链是所述有义链。在一个相关实施例中,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键位于一条链的5'末端处。任选地,所述链是所述反义链。在另一个实施例中,所述链是所述有义链。在另一个实施例中,所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键位于一条链的5'和3'末端两者处。任选地,所述链是所述反义链。在另一个实施例中,所述链是所述有义链。

[0053] 在一些实施例中,每条链的长度不超过30个核苷酸。

[0054] 在一些实施例中,至少一条链包括至少1个核苷酸的3'突出端或至少2个核苷酸的3'突出端。

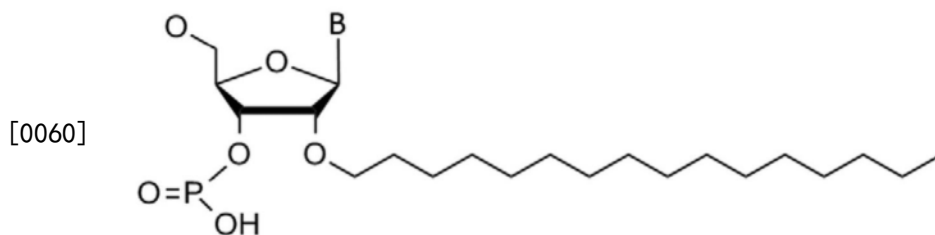
[0055] 所述双链区可以是长度为15个至30个核苷酸对;长度为17个至23个核苷酸对;长度为17个至25个核苷酸对;长度为23个至27个核苷酸对;长度为19个至21个核苷酸对;或长度为21个至23个核苷酸对。

[0056] 每条链可以是19个至30个核苷酸;19个至23个核苷酸;或21个至23个核苷酸。

[0057] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括靶向肝组织的靶向配体。在一些实施例中,所述靶向配体是GalNAc缀合物。在其它实施例中,所述dsRNA药剂不包括靶向肝组织的靶向配体,如GalNAc缀合物。

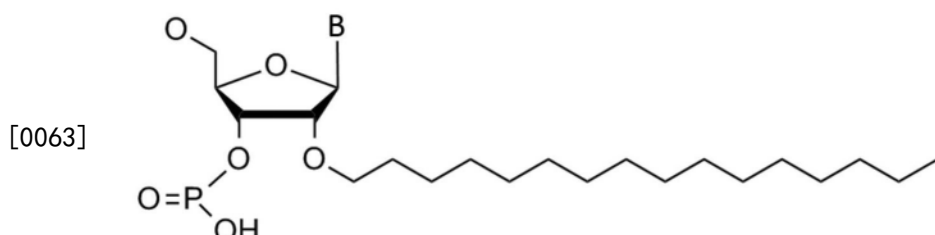
[0058] 在某些实施例中,所述双链RNAi药剂进一步包含靶向介导向CNS组织的递送的受体的靶向配体,例如亲水性配体。

[0059] 在某些实施例中,所述靶向配体是C16配体。在一个实施例中,所述配体是



[0061] 其中B是核苷酸碱基或核苷酸碱基类似物,任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0062] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包含靶向介导向CNS组织的递送的受体的靶向配体,例如亲水性配体,例如C16配体,



[0064] 其中B是核苷酸碱基或核苷酸碱基类似物,任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶,并且不包括靶向肝组织的靶向配体,如GalNAc缀合物。

[0065] 在一些实施例中,所述亲脂性分子或靶向配体通过选自以下组成的组的生物可切割接头缀合:DNA、RNA、二硫化物、酰胺、半乳糖胺的官能化单糖或寡糖、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖以及其组合。

[0066] 在一些实施例中,所述有义链的3'端通过端盖保护,所述端盖是具有胺的环状基团,所述环状基团选自以下组成的组:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。

[0067] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰,以及发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0068] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰,以及发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0069] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键、第二核苷酸间键和第三核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰,以及发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0070] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括发生在所述反义链的3'端处的第一

核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的3'端处的第三核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰,以及发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0071] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括发生在所述反义链的3'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Sp构型的键磷原子的末端手性修饰、发生在所述反义链的5'端处的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处,具有呈Rp构型的键磷原子的末端手性修饰,以及发生在所述有义链的5'端处的第一核苷酸间键处,具有呈Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0072] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括在所述反义链的5'端处磷酸酯或磷酸酯模拟物。在一些实施例中,所述磷酸酯模拟物是5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

[0073] 在一些实施例中,在所述双链体的所述反义链的5'端的1位置处的碱基对是AU碱基对。

[0074] 在一些实施例中,所述有义链具有总计21个核苷酸,并且所述反义链具有总计23个核苷酸。

[0075] 在一个实施例中,所述反义链包括核苷酸序列5'-UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO:53)。

[0076] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3' (SEQ ID NO:40)。

[0077] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3' (SEQ ID NO:40)并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO:53)。

[0078] 在一个实施例中,所述反义链包括核苷酸序列5'-UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO:57)。

[0079] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO:44)。

[0080] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO:44)并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO:57)。

[0081] 在一个实施例中,所述反义链包括核苷酸序列5'-UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO:59)。

[0082] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO:46)。

[0083] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO:46)并且所述反义链包括核苷酸序列5'-UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO:59)。

[0084] 一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有

义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 其中a、g、c和u是2'-O-甲基 (2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Chd) 是2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-磷酸酯; C2p是胞苷-2'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基磷酸酯。

[0085] 在一个实施例中, 所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0086] 在一个实施例中, 所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0087] 在一个实施例中, 所述有义链包括与核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0088] 在一个实施例中, 所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), 并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79)。

[0089] 在一个实施例中, 所述有义链由核苷酸序列5'-gscsgac (Chd) CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65) 组成, 并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusAfsucdAg (C2p) uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79) 组成。

[0090] 另一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd) GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn) ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 其中a、g、c和u是2'-O-甲基 (2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Ahd) 是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯; Tgn是胸苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体; 并且VP是5'-乙烯基磷酸酯。

[0091] 在一个实施例中, 所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd) GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn) ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83) 相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0092] 在一个实施例中, 所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg (Ahd) GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac (Tgn) ugagggAfcUfcgaagsgsc-3'

(SEQ ID NO:83) 相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0093] 在一个实施例中,所述有义链包括与核苷酸序列5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3'(SEQ ID NO:70)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3'(SEQ ID NO:83)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0094] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3'(SEQ ID NO:70),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3'(SEQ ID NO:83)。

[0095] 在一个实施例中,所述有义链由核苷酸序列5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3'(SEQ ID NO:70)组成,并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3'(SEQ ID NO:83)组成。

[0096] 一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)相差不超过4个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U;s是硫代磷酸酯键;Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U;(Chd)是2'-O-十六烷基-胞嘧啶-3'-磷酸酯;并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0097] 在一个实施例中,所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0098] 在一个实施例中,所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)相差不超过2个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0099] 在一个实施例中,所述有义链包括与核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)相差不超过1个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0100] 在一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72),并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)。

[0101] 在一个实施例中,所述有义链由核苷酸序列5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3'(SEQ ID NO:72)组成,并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3'(SEQ ID NO:85)组成。

[0102] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)基因的表达式的双链RNAi药剂,其中所述双链RNAi药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3'(SEQ ID NO:15)相差不超过3个核苷

酸(即相差3个、2个、1个或0个核苷酸)的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3'(SEQ ID NO:16)相差不超过3个核苷酸(即相差3个、2个、1个或0个核苷酸)的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连续核苷酸,其中所述有义链的基本上所有,例如不少于18个、19个、20个或21个核苷酸和所述反义链的基本上所有,例如不少于20个、21个、22个或23个核苷酸包括选自以下组成的组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰和2'-O-十六烷基修饰,其中所述dsRNA药剂包括六个至八个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述有义链包括一个或多个乙烯基磷酸酯(VP)修饰,例如在所述反义链的5'末端处的单个VP修饰,并且其中所述dsRNA药剂不包括靶向肝组织的配体,例如GalNAc配体。在一个实施例中,所述dsRNA药剂包括八个硫代磷酸酯核苷酸间键。

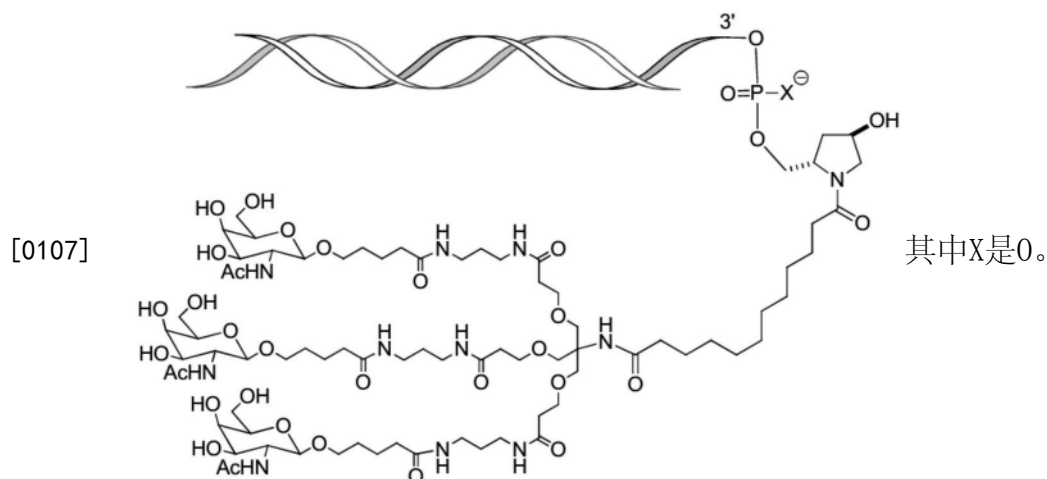
[0103] 另一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)基因的表达式的双链RNAi药剂,其中所述双链RNAi药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包括与核苷酸序列5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3'(SEQ ID NO:15)相差不超过3个核苷酸(即相差3个、2个、1个或0个核苷酸)的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个连续核苷酸,并且所述反义链包括与核苷酸序列5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3'(SEQ ID NO:16)相差不超过3个核苷酸(即相差3个、2个、1个或0个核苷酸)的至少15个,例如15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连续核苷酸,其中基本上所有,例如不少于18个、19个、20个或21个所述有义链的核苷酸和基本上所有,例如不少于20个、21个、22个或23个所述反义链的核苷酸包括选自以下组成的组的核苷酸修饰:2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰和2'-O-十六烷基修饰,其中所述有义链包括四个硫代磷酸酯核苷酸间键,例如在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端处的两个磷酸酯核苷酸间键,并且其中所述反义链包括四个硫代磷酸酯核苷酸间键,例如在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且其中所述有义链包括一个或多个乙烯基磷酸酯(VP)修饰,例如在所述反义链的5'末端处的单个VP修饰。

[0104] 在另一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18),其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的A、C、G和U;Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟修饰的A、C、G和U;s是硫代磷酸酯键;并且VP是乙烯基磷酸酯。在一个实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括配体,如N-[三(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基)]-4-羟脯氨酸。

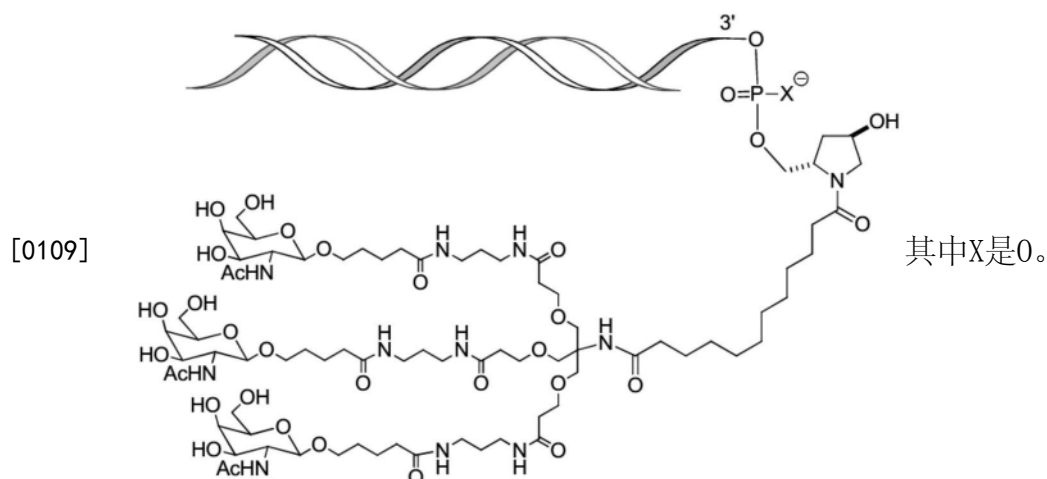
[0105] 在一个实施例中,所述有义链由核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)组成并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18),其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的A、C、G和U;Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟修饰的A、C、G和U;s是硫代磷酸酯键;并且VP是乙烯基磷酸酯。在一个实施例中,所述dsRNA药剂进一步包括配体,如N-[三(GalNAc-烷基)-酰胺基癸酰基)]-4-羟脯氨酸。

[0106] 在另一个实施例中,所述有义链包括核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3'(SEQ ID NO:17)并且所述反义链包括核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3'(SEQ ID NO:18)组成,其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基

(2'-OMe) 修饰的A、C、G和U; Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟修饰的A、C、G和U; s是硫代磷酸酯键; 并且VP是乙烯基磷酸酯, 并且其中配体与所述有义链的3'端缀合, 如以下示意图所示:



[0108] 在一个实施例中, 所述有义链由核苷酸序列5'-gscsuau (Uhd) CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17) 组成并且所述反义链由核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18) 组成, 其中a、c、g和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe) 修饰的A、C、G和U; Af、Cf、Gf和Uf分别是2'-氟修饰的A、C、G和U; s是硫代磷酸酯键; 并且VP是乙烯基磷酸酯, 并且其中配体与所述有义链的3'端缀合, 如以下示意图所示:



[0110] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括经修饰的核苷酸序列5'-uscsaua (Ahd) UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO: 19), 并且所述反义链包括经修饰的核苷酸序列5'-VPusAfscaaAfcGfAfauguGfaUfuaugasa su-3' (SEQ ID NO:20), 其中a、g、c和u是2'-O-甲基(2'-OMe) A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U; (Ahd) 是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基磷酸酯。

[0111] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白 (HTT) 的表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括经修饰的核苷酸序列5'-gscsugg (Uhd) GfaAfUfCfsgauuccusgsa-3' (SEQ ID NO: 21), 并且所述反义链包括经修饰的核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsu

sc-3' (SEQ ID NO:22), 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf分别是2'-氟A、C、G和U; (Uhd) 是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0112] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括经修饰的核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), 并且所述反义链包括经修饰的核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18), 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Uf分别是2'-氟A、C和U; dG和dT分别是2'-脱氧G和T; (Uhd) 是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0113] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包括经修饰的核苷酸序列5'-usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGfauagaaggcscsa-3' (SEQ ID NO:23), 并且所述反义链包括经修饰的核苷酸序列5'-VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg-3' (SEQ ID NO:24), 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf分别是2'-氟A、C、G和U; (Ahd) 是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯; Tgn是胸苷-乙二醇核酸(GNA)S-异构体; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0114] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链由经修饰的核苷酸序列5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19)组成, 并且所述反义链由经修饰的核苷酸序列5'-VPusAfscaaAfcGfAfauguGfaUfuaugasa su-3' (SEQ ID NO:20)组成, 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf分别是2'-氟A、C、G和U; (Ahd) 是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0115] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链由经修饰的核苷酸序列5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfsggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21)组成, 并且所述反义链由经修饰的核苷酸序列5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsu sc-3' (SEQ ID NO:22)组成, 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Gf、Uf分别是2'-氟A、C、G和U; (Uhd) 是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0116] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂, 其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链由经修饰的核苷酸序列5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17)组成, 并且所述反义链由经修饰的核苷酸序列5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18)组成, 其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U; s是硫代磷酸酯键; Af、Cf、Uf分别是2'-氟A、C和U; dG和dT分别是2'-脱氧G和T; (Uhd) 是2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯; 并且VP是5'-乙烯基膦酸酯。

[0117] 一方面, 本发明提供了一种用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的双链核

糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链由经修饰的核苷酸序列5'-usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGfaugaaggcscsa-3'(SEQ ID NO:23)组成,并且所述反义链由经修饰的核苷酸序列5'-VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg-3'(SEQ ID NO:24)组成,其中a、g、c和u分别是2'-O-甲基(2'-OMe)A、G、C和U;s是硫代磷酸酯键;Af、Cf、Gf、Uf是2'-氟A、C、G和U;(Ahd)是2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯;Tgn是胸苷-乙二醇核酸(GNA)S-异构体;并且VP是5'-乙烯基磷酸酯。

[0118] 本发明进一步提供了含有本发明的任何dsRNA药剂的细胞和用于抑制编码HTT的基因的表达的药物组合物,所述药物组合物包括本发明任何dsRNA药剂。

[0119] 在一个实施例中,所述双链RNAi药剂位于未缓冲的溶液中。任选地,所述未缓冲的溶液是盐水或水。在另一个实施例中,所述双链RNAi药剂位于缓冲溶液中。任选地,所述缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。在另一个实施例中,所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。本公开的另一方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本公开的双链RNAi药剂和脂质调配物。在一个实施例中,所述脂质调配物包含脂质纳米颗粒(LNP)。

[0120] 本发明提供了一种组合物,所述组合物包括用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的两种或更多种dsRNA药剂,如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂。

[0121] 一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的两种或更多种dsRNA药剂,其中每种dsRNA药剂独立地包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述反义链中的每一个独立地包括与编码HTT的mRNA互补的区,并且其中所述互补区中的每一个独立地包括与表2至表5中的任一个中的任一个反义核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0122] 另一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的两种或更多种dsRNA药剂,其中每种dsRNA药剂独立地包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链中的每一个独立地包括核苷酸序列,所述核苷酸序列包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸4391-4669;6500-6540;或6009-6037,并且所述反义链中的每一个独立地包括核苷酸序列,所述核苷酸序列包括来自SEQ ID NO:6的对应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0123] 在一个实施例中,所述有义链中的每一个独立地包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸4398-4420;4403-4425;或6512-6534的。

[0124] 在一个实施例中,所述有义链中的一个包括与SEQ ID NO:1的核苷酸4398-4420相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0125] 在一个实施例中,所述反义链中的每一个独立地包括与选自以下组成的组的双链体的任一个反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-1271085、AD-1271083或AD-1271084。

[0126] 在一个实施例中,所述反义链中的一个包括与AD-1271085的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0127] 一方面,本发明提供了一种包括用于抑制细胞中的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的两种或更多种dsRNA药剂的组合物,其中每种dsRNA药剂独立地包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链中的每一个独立地包括核苷酸序列,所述核苷酸序列包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸26-77;或142-202,并且所述反义链中的每一个独立地包括核苷酸序列,所述核苷酸序列包括来自SEQ ID NO:6的对应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0128] 在一个实施例中,所述有义链中的每一个独立地包括与以下的任一个核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸27-49;55-77;147-169;或173-195。

[0129] 在一个实施例中,所述有义链中的一个包括与SEQ ID NO:1的核苷酸147-169相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0130] 在一个实施例中,所述反义链中的每一个独立地包括与选自以下组成的组的双链体的任一个反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-1019448;AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528。

[0131] 在一个实施例中,所述反义链中的一个包括与AD-1498524的反义链核苷酸序列相差不超过三个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0132] 在一个实施例中,所述有义链中的至少一个或所述反义链中的至少一个与一个或多个亲脂性部分独立地缀合。

[0133] 在一个实施例中,所述dsRNA药剂中的每一个的所有所述有义链或所有所述反义链与一个或多个亲脂性部分独立地缀合。

[0134] 在一个实施例中,每个亲脂性部分与所述dsRNA药剂的所述双链区中的一个或多个位置独立地缀合。

[0135] 在一个实施例中,每个亲脂性部分通过接头或载体独立地缀合。

[0136] 在一个实施例中,通过logKow测量的每个亲脂性部分的亲脂性独立地超过0。

[0137] 在一个实施例中,通过所述双链RNAi药剂的血浆蛋白结合测定中的未结合级分测量的每个双链RNAi药剂的疏水性独立地超过0.2。

[0138] 在一个实施例中,所述血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率偏移测定。

[0139] 在一个实施例中,所述dsRNA药剂中的每一个独立地包括至少一个经修饰的核苷酸。

[0140] 在一个实施例中,每种dsRNA药剂的每个有义链和每个反义链独立地包括不超过五个未经修饰的核苷酸。

[0141] 在一个实施例中,每个有义链的所有核苷酸和每个反义链的所有核苷酸独立地包括修饰。

[0142] 在一个实施例中,所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自以下组成的组:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包括

核苷酸的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包括5'-硫代磷酸酯基的核苷酸、包括5'-甲基磷酸酯基的核苷酸、包括5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包括乙烯基磷酸酯的核苷酸、包括腺苷-乙二醇核酸(GNA)的核苷酸、包括胸苷-乙二醇核酸(GNA) S-异构体的核苷酸、包括2'-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧胸苷-3'-磷酸酯的核苷酸、包括2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯的核苷酸、2'-O-十六烷基核苷酸、包括2'-磷酸酯的核苷酸、胞苷-2'-磷酸酯核苷酸、鸟苷-2'-磷酸酯核苷酸、2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯核苷酸、5'-乙烯基磷酸酯(VP)、2'-脱氧腺苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-脱氧胞苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-脱氧胸苷-3'-磷酸酯核苷酸、2'-脱氧尿苷核苷酸和与胆甾醇衍生物和十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸;以及其组合。

[0143] 在一个实施例中,所述经修饰的核苷酸独立地选自以下组成的组:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)、锁定核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯和包括核苷酸的非天然碱基。

[0144] 在另一个实施例中,所述经修饰的核苷酸包括3'末端脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dT)的短序列。

[0145] 在一个实施例中,核苷酸上的修饰各自独立地选自以下组成的组:2'-O-甲基修饰、2'-脱氧修饰或2'-氟修饰。

[0146] 在一个实施例中,所述dsRNA药剂中的至少一种进一步包括至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0147] 在一个实施例中,所述dsRNA药剂中的至少一种包括6个至8个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0148] 在一个实施例中,每种dsRNA药剂的每条链的长度独立地不超过30个核苷酸。

[0149] 在一个实施例中,其中至少一种dsRNA药剂的至少一条链独立地包括至少1个核苷酸的3'突出端。

[0150] 在另一个实施例中,至少一种dsRNA药剂的至少一条链独立地包括至少2个核苷酸的3'突出端。

[0151] 每种dsRNA药剂的所述双链区可以独立地是长度为15个至30个核苷酸对;长度为17个至23个核苷酸对;长度为17个至25个核苷酸对;长度为23个至27个核苷酸对;长度为19个至21个核苷酸对;或长度为21个至23个核苷酸对。

[0152] 每种dsRNA药剂的每条链可以独立地具有19个至30个核苷酸;长度为19个至23个核苷酸;或长度为21个至23个核苷酸。

[0153] 在一个实施例中,每种dsRNA药剂包括与至少一条链上的一个或多个内部位置独立地缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0154] 在一个实施例中,所述一个或多个亲脂性部分通过接头或载体与至少一条链上的一个或多个内部位置各自独立地缀合。

[0155] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含除了距离所述至少一条链的每一端的末端两个位置以外的所有位置。

[0156] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含除了距离所述至少一条链的每一端的末端三个位置以外的所有位置。

[0157] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地不包括所述有义链的切割位点区。

[0158] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含从所述有义链的5'端开始计数的除位置9至12以外的所有位置。

[0159] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含从所述有义链的3'端开始计数的除位置11至13以外的所有位置。

[0160] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地不包括所述反义链的切割位点区。

[0161] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含从所述反义链的5'端开始计数的除位置12至14以外的所有位置。

[0162] 在一个实施例中,所述内部位置中的每一个独立地包含从3'端开始计数的除所述有义链上的位置11至13和从5'端开始计数的所述反义链上的位置12至14以外的所有位置。

[0163] 在一个实施例中,所述一个或多个亲脂性部分中的每一个与选自自由以下组成的组的一个或多个所述内部位置独立地缀合:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置4至8和13至18,以及所述反义链上的位置6至10和15至18。

[0164] 在一个实施例中,所述一个或多个亲脂性部分与选自自由以下组成的组的一个或多个所述内部位置各自独立地缀合:从每条链的5'端开始计数的所述有义链上的位置5、6、7、15和17,以及所述反义链上的位置15和17。

[0165] 在一个实施例中,所述双链区中的所述位置中的每一个独立地不包括所述有义链的切割位点区。

[0166] 在一个实施例中,所述有义链中的每一个的长度独立地为21个核苷酸,所述反义链中的每一个的长度独立地为23个核苷酸,并且所述亲脂性部分中的每一个与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或所述反义链的位置16独立地缀合。

[0167] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1或位置7独立地缀合。

[0168] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个与所述有义链的位置21、位置20或位置15独立地缀合。

[0169] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个与所述有义链的位置20或位置15独立地缀合。

[0170] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个与所述反义链的位置16独立地缀合。

[0171] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个独立地是脂肪族、脂环族或聚脂环族化合物。

[0172] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个独立地选自自由以下组成的组:脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶基氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油

酰基) 石胆酸、03- (油酰基) 胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪。

[0173] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个独立地含有饱和或不饱和C4-C30烃链,以及选自由以下组成的组的任选的官能团:羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮化物和炔烃。

[0174] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个独立地含有饱和或不饱和C6-C18烃链。

[0175] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个独立地含有饱和或不饱和C16烃链。

[0176] 在一个实施例中,所述饱和或不饱和C16烃链中的每一个与从所述链的5'端开始计数的位置6独立地缀合。

[0177] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个通过置换所述内部位置或所述双链区中的一个或多个核苷酸的载体独立地缀合。

[0178] 在一个实施例中,所述载体中的每一个独立地是选自由以下组成的组的环状基团:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基;或是基于丝氨酸主链或二乙醇胺主链的无环部分。

[0179] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个通过含有醚、硫醚、脲、碳酸盐、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物或氨基甲酸酯的接头与所述双链iRNA药剂独立地缀合。

[0180] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个与核碱基、糖部分或核苷间键独立地缀合。

[0181] 在一个实施例中,所述亲脂性部分中的每一个或一个或多个靶向配体通过选自由以下组成的组的生物可切割接头独立地缀合:DNA、RNA、二硫化物、酰胺、半乳糖胺的官能化单糖或寡糖、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖以及其组合。

[0182] 在一个实施例中,所述有义链中的至少一个的3'端通过端盖独立地保护,所述端盖是具有胺的环状基团,所述环状基团选自由以下组成的组:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。

[0183] 在一个实施例中,至少一种所述dsRNA药剂进一步包括在所述反义链的5'端处磷酸酯或磷酸酯模拟物。

[0184] 在一个实施例中,所述磷酸酯模拟物中的每一个独立地是5'-乙烯基磷酸酯(VP)。

[0185] 在一个实施例中,所述有义链中的每一个独立地具有总计21个核苷酸,并且所述反义链中的每一个独立地具有总计23个核苷酸。

[0186] 在另一个实施例中,所述RNAi药剂是其药学上可接受的盐。本文中RNAi药剂中的每一种的“药学上可接受的盐”包含但不限于钠盐、钙盐、锂盐、钾盐、铵盐、镁盐以及其混合物。本领域技术人员将理解,当所述RNAi药剂以聚阳离子盐的形式提供时,所述聚阳离子盐在任选地经修饰的磷酸二酯主链和/或任何其它酸性修饰(例如,5'末端磷酸酯基团)的每个游离酸基团具有一个阳离子。例如,长度为“n”个核苷酸的寡核苷酸含有n-1个任选地经修饰的二磷酸酯,因此长度为21nt的寡核苷酸可以作为具有至多20个阳离子(例如,20个钠阳离子)的盐提供。类似地,可以以具有至多42个阳离子(例如,42个钠阳离子)的盐的形式

提供具有长度为21nt的有义链和长度为23nt的反义链的RNAi药剂。在前述实例中,其中所述RNAi药剂还包含5'末端磷酸酯或5'末端乙烯基磷酸酯基团, RNAi药剂可以以具有多达44个阳离子(例如,44个钠阳离子)的盐的形式提供。

[0187] 本发明还提供包括本发明的组合物的细胞和药物组合物,例如包括脂质调配物。

[0188] 本公开的另外的方面提供了一种抑制细胞中HTT基因的表达的方法,所述方法包含(a)使所述细胞与本公开的双链RNAi药剂、本发明的组合物或本公开的药物组合物接触;以及(b)将步骤(a)中产生的所述细胞维持足够的时间以获得HTT基因的mRNA转录物的降解,由此抑制所述HTT基因在所述细胞中的表达。

[0189] 在一个实施例中,使所述细胞与两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂(或本发明的组合物)接触,如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂。

[0190] 在一个实施例中,所述细胞位于受试者体内。任选地,所述受试者是人。

[0191] 在某些实施例中,所述受试者是恒河猴、食蟹猴、小鼠或大鼠。在某些实施例中,HTT表达被所述RNAi药剂抑制至少约50%。

[0192] 在某些实施例中,所述人受试者已被诊断患有HTT相关疾病,例如亨廷顿氏病。

[0193] 本公开的另一方面提供了治疗被诊断患有HTT相关疾病,例如亨廷顿氏病的受试者的方法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的本公开的双链RNAi药剂、本发明的组合物或本公开的药物组合物,由此治疗所述受试者。

[0194] 在一个实施例中,向所述受试者施用两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂(或本发明的组合物)接触,如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂。

[0195] 所述第一和第二dsRNA药剂可以存在于相同或分离的组合物中。

[0196] 所述第一和第二dsRNA药剂可以在相同时间或不同时间向所述受试者施用。

[0197] 在一个实施例中,治疗包括改善所述疾病的至少一种体征或症状。在另一个实施例中,治疗包括预防所述疾病的进展。

[0198] 在一些实施例中,所述dsRNA药剂以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量向所述受试者施用。

[0199] 在一些实施例中,向所述受试者鞘内施用所述dsRNA药剂。在一个实施例中,所述方法降低了脑(例如,纹状体)或脊柱组织中HTT基因的表达。任选地,所述脑或脊柱组织是纹状体、皮质、小脑、颈椎、腰椎或胸椎。

[0200] 在一些实施例中,所述方法进一步包括测量从所述受试者获得的样品中的HTT水平。

[0201] 本公开的另一方面提供了一种抑制受试者的亨廷顿蛋白(HTT)的表达的方法,所述方法涉及:向所述受试者施用治疗有效量的本公开的双链RNAi药剂或本公开的药物组合物,由此抑制所述受试者的HTT的表达。

[0202] 在一些实施例中,所述方法进一步包括向所述受试者施用适于治疗或预防HTT相关病症的另外的药剂。

附图说明

[0203] 图1是描绘鞘内施用单次60mg剂量的指示的双链体后24小时,CSF中siRNA大于1000ng/mL的非人灵长类动物的脑和脊椎的指示区中HTT敲低的图。

[0204] 图2是描绘鞘内施用单次60mg剂量的指示的双链体后24小时,非人灵长类动物(每组n=5)的脑和脊椎的指示区中HTT mRNA表达的抑制的表。

[0205] 图3A是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体后24小时,指示的非人灵长类动物(参见图2)的CSF中siRNA的浓度的图。

[0206] 图3B是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体后45天,指示的非人灵长类动物(参见图2)的前额叶皮质中siRNA的浓度的图。

[0207] 图3C是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体后45天,指示的非人灵长类动物(参见图2)的纹状体(尾状核)中siRNA的浓度的图。

[0208] 图3D是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体后45天,指示的非人灵长类动物(参见图2)的纹状体(壳核)中siRNA的浓度的图。

[0209] 图3E是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体后45天,指示的非人灵长类动物(参见图2)的胸椎中siRNA的浓度的图。

[0210] 图4A是描绘鞘内施用单次60mg剂量的所有测试的双链体的非人灵长类动物的脑和脊髓组织中的siRNA浓度与HTT的敲低水平的相关性的图。

[0211] 图4B是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体AD-1019465的非人灵长类动物的脑和脊髓组织中的siRNA浓度与HTT的敲低水平的相关性的图。

[0212] 图4C是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体AD-1271082的非人灵长类动物的脑和脊髓组织中的siRNA浓度与HTT的敲低水平的相关性的图。

[0213] 图4D是描绘鞘内施用单次60mg剂量的双链体AD-1271085的非人灵长类动物的脑和脊髓组织中的siRNA浓度与HTT的敲低水平的相关性的图。

[0214] 图5A是描绘单次鞘内60mg剂量的双链体后,血浆样品中siRNA的浓度随时间变化的图。

[0215] 图5B是描绘单次鞘内施用60mg的所有测试的双链体后在指示的时间CSF和血浆中siRNA的浓度的图(参见图2)。

[0216] 图6A是描绘通过脑室内注射(ICV)施用了单次300 μ g/kg剂量的指示的双链体或人工CSF(aCSF)对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT mRNA敲低水平的图。为了进行比较,还示出了反义寡核苷酸Tominersen(罗氏公司(Roche),也称为IONIS-HTTRx和RG6042)的作用。

[0217] 图6B是蛋白质印迹和图,描绘了通过脑室内注射(ICV)施用了单次300 μ g/kg剂量的指示的双链体或人工CSF(aCSF)对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白敲低的水平。下图对人蛋白质水平进行了定量。为了进行比较,图中还示出了反义寡核苷酸Tominersen(罗氏公司,也称为IONIS-HTTRx和RG6042)的作用。

[0218] 图7示意性地描绘了通过QuantiGene面板的每次测定评估的Htt转录物的部分。来自Papadopoulou等人,(2019)《科学报告(Scientific Reports)》第9卷,文章编号16137。

[0219] 图8A是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照后,Q175KI小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1和polyA位点1(680bp变体)表达的平均荧光强度

(MFI),以及野生型小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1与polyA位点1(680bp变体)表达的水平的图。平均值 $\pm$ SD,*** $p<0.001$ (使用邓尼特多重比较测试(Dunnett's multiple comparisons test)的ANOVA)并且### $p<0.001$ (使用Si对照对WT的非配对t测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0220] 图8B是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照后,Q175KI小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1和polyA位点2(1145bp变体)表达的平均荧光强度(MFI),以及野生型小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1与polyA位点1(680bp变体)表达的水平的图。平均值 $\pm$ SD,* $p<0.05$ (使用邓尼特多重比较测试的ANOVA)并且^{##} $p<0.01$;^{###} $p<0.001$ (使用Si对照对WT的非配对t测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0221] 图8C是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照后Q175 KI小鼠的脊髓和纹状体中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的平均荧光强度(MFI),以及野生型小鼠的脊髓和纹状体中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的水平的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组 $n=3$ 至6。成对比较如所示的:* $p<0.05$;** $p<0.01$;**** $p<0.0001$ (使用邓尼特多重比较测试的ANOVA)并且#### $p<0.0001$;##### $p<0.0001$ (使用Si对照对WT的非配对t测试)。第1组与第6组之间的比较用作模型(基因型)效应的对照。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0222] 图8D是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照后Q175 KI小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1在其3'端表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI),以及野生型小鼠的脊髓和纹状体中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的水平的图。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0223] 图8E是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照后Q175 KI小鼠的脊髓和纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子3表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI),以及野生型小鼠的脊髓和纹状体中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的水平的图。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0224] 图8F是描绘单次侧脑室内注射300 μ g指示的药剂、非靶向对照剂或aCSF对照后,杂合Q175 KI小鼠的脊髓和纹状体中突变体亨廷顿蛋白的浓度的图。突变体亨廷顿蛋白的浓度示出为每毫克总蛋白的突变体亨廷顿蛋白的飞摩尔。

[0225] 图8G是描绘单次侧脑室内注射300 μ g指示的药剂、非靶向对照剂或aCSF对照后,杂合Q175 KI小鼠的脊髓和纹状体中野生型亨廷顿蛋白的浓度的图。野生型亨廷顿蛋白的浓度示出为每毫克总蛋白的野生型亨廷顿蛋白的飞摩尔。

[0226] 图9描绘了鞘内施用单次60mg剂量的AD-1019465($n=5$)、AD-1271082($n=5$)或AD-1271085($n=5$)的非人灵长类动物在给药后第45天的前额叶皮质、海马体、纹状体尾状核、腰椎和胸椎组织中剩余的HTT蛋白的百分比。剩余的HTT蛋白的百分比是相对于施用人工CSF(aCSF)的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白的水平。

[0227] 图10A是描绘通过脑室内注射(ICV)施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链体或人工CSF(aCSF)对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT mRNA敲低水平的图。为了进行比较,还示出了反义寡核苷酸A-1800326(Tominersen;罗氏公司,也称为IONIS-HTTRx和RG6042)的作用。

[0228] 图10B是描绘通过脑室内注射(ICV)施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链

体或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128的额叶皮质中野生型小鼠HTT mRNA敲低水平的图。为了进行比较,还示出了反义寡核苷酸A-1800326 (Tominersen; 罗氏公司,也称为IONIS-HTTRx和RG6042) 的作用。

[0229] 图10C是蛋白质印迹,描绘了通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链体或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128小鼠的额叶皮质中突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白敲低的水平。“a-CSF”是指人工CSF; “476-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1019476; 并且“476-300”是指300 μ g/kg剂量的AD-1019476。MAB2166 (EMD密理博公司 (EMD Millipore)) 用于蛋白质检测。

[0230] 图10D是蛋白质印迹,描绘了通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链体或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128小鼠的额叶皮质中突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白敲低的水平。“a-CSF”是指人工CSF; “079-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1443079; “079-300”是指300 μ g/kg剂量的AD-1443079; “080-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1443080; 并且“080-300”是指300 μ g/kg剂量AD-1443080。MAB2166 (EMD密理博公司) 用于蛋白质检测。

[0231] 图10E是蛋白质印迹和图,描绘了通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链体或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白敲低的水平。用D7F7抗体重新分析图10C中的裂解物,以证实观察到的HTT蛋白敲低。突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白水平在下图中定量。“a-CSF”是指人工CSF; “476-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1019476; 并且“476-300”是指300 μ g/kg剂量的AD-1019476。

[0232] 图10F是蛋白质印迹和图,描绘了通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次300 μ g或600 μ g剂量的指示的双链体或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白敲低的水平。用D7F7抗体重新分析图10D中的裂解物,以证实观察到的HTT蛋白敲低。突变体人HTT蛋白和小鼠野生型蛋白水平在下图中定量。并排示出了来自两种印迹的定量 (图10E和图10F印迹) 以进行比较。“a-CSF”是指人工CSF; “079-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1443079; “079-300”是指300 μ g/kg剂量的AD-1443079; “080-600”是指600 μ g/kg剂量的AD-1443080; 并且“080-300”是指300 μ g/kg剂量AD-1443080。

[0233] 图11A是描绘通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次37.5 μ g、75 μ g、150 μ g或300 μ g剂量的AD-1019476或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128的额叶皮质中突变体人HTT蛋白的水平。使用了两种不同的抗体, MAB2166 (EMD密理博公司) 和D7F7 (细胞信号传导公司 (Cell Signaling)), 并且来自两种抗体的结果表明HTT蛋白的敲低相似。

[0234] 图11B是描绘通过脑室内注射 (ICV) 施用了单次37.5 μ g、75 μ g、150 μ g或300 μ g剂量的AD-1019476或人工CSF (aCSF) 对照的YAC128的额叶皮质中小鼠野生型蛋白的水平。使用了两种不同的抗体, MAB2166 (EMD密理博公司) 和D7F7 (细胞信号传导公司), 并且来自两种抗体的结果表明HTT蛋白的敲低相似。

[0235] 图12A是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照 (Si对照) 10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的脊髓中Htt (小鼠内源性)、内含子1和polyA位点1 (680bp变体) 表达的平均荧光强度 (MFI) 的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现, 每组n=3至10。统计显著性: ****p<0.0001, Q175 HET Si对照10个月与Q175 WT Si对照10个月; *p<0.05, ***

$p < 0.001$, Q175 WT Si对照12个月和Q175 HET AD-1498524 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正(Welch correction)/韦尔奇ANOVA测试的非配对t测试,邓尼特T3多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0236] 图12B是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的脊髓中Htt(小鼠内源性)、内含子1和polyA位点2(1145bp变体)表达的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。统计显著性:** $p < 0.01$, Q175 HET Si对照10个月与Q175 WT Si对照10个月;* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, Q175 WT Si对照12个月, Q175 HET AD-1498524 12个月和Q175 HET AD-1271085 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试,邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0237] 图12C是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的脊髓中Htt(小鼠内源性)、内含子1在其3'端表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。统计显著性:* $p < 0.05$, Q175 HET AD-1019448 10个月与Q175 HET Si对照10个月(普通单向ANOVA,邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0238] 图12D是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的脊髓中Htt(小鼠内源性)、内含子3表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。无统计显著性: $p > 0.05$ (具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0239] 图12E是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的脊髓中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。统计显著性:** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Q175 WT Si对照10个月, Q175 HET AD-1271085 10个月, Q175 HET AD-1498524 10个月, Q175 HET AD-1019448 10个月与Q175 HET Si对照10个月;*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Q175 WT Si对照12个月, Q175 HET AD-1271085 12个月和Q175 HET AD-1498524 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试,邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0240] 图12F是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1和polyA位点1(680bp变体)表达的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。统计显著性:**** $p < 0.0001$, Q175 HET Si对照10个月与Q175 WT Si对照10个月;**** $p < 0.0001$, Q175 WT Si对照12个月和Q175 HET AD-1498524 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正(Welch correction)/韦尔奇ANOVA测试的非配对t测试,邓尼特T3多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0241] 图12G是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后Q175 WT和HET小鼠的纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1和polyA位点2(1145bp变体)表达的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现,每组n=3至10。

统计显著性:** $p < 0.001$, Q175 HET Si对照10个月与Q175 WT Si对照10个月;* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, Q175 WT Si对照12个月和Q175 HET AD-1498524 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试, 邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0242] 图12H是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后的Q175 WT和HET小鼠的纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子1在其3'端表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现, 每组 $n = 3$ 至10。统计显著性:* $p < 0.05$, Q175 HET AD-1271085 10个月和Q175 HET AD-1019448 10个月与Q175 HET Si对照10个月(普通单向ANOVA, 邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0243] 图12I是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后的Q175 WT和HET小鼠的纹状体中Htt(小鼠内源性)、内含子3表达(作为用于检测保留的内含子区表达的阴性对照)的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现, 每组 $n = 3$ 至10。无统计显著性: $p > 0.05$ (具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0244] 图12J是描绘在单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)10个月和12个月后的Q175 WT和HET小鼠的纹状体中亨廷顿蛋白、全长(总)表达的平均荧光强度(MFI)的图。数据以具有SD的平均值的形式呈现, 每组 $n = 3$ 至10。统计显著性:** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Q175 WT Si对照10个月, Q175 HET AD-1271085 10个月, Q175 HET AD-1498524 10个月, Q175 HET AD-1019448 10个月与Q175 HET Si对照10个月;**** $p < 0.0001$, Q175 WT Si对照12个月, Q175 HET AD-1271085 12个月和Q175 HET AD-1498524 12个月与Q175 HET Si对照12个月(具有韦尔奇校正/普通单向ANOVA的非配对t测试, 邓尼特多重比较测试)。相对于3个参考基因的几何平均值归一化。

[0245] 图12K是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或CSF对照(Si对照)后WT和Q175 HET小鼠的纹状体中突变体亨廷顿蛋白的浓度(顶部)和总HTT蛋白的浓度(底部)的图。突变体和总亨廷顿蛋白的浓度示出为每毫克总蛋白的突变体亨廷顿蛋白的飞摩尔。统计显著性:Q175 Het Si对照与治疗:在相应的时间点进行比较的单向ANOVA和随后的邓尼特多重比较测试。 $p \leq 0.05$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 。

[0246] 图12L是描绘单次脑室内注射300 μ g指示的药剂或aCSF对照(Si对照)后WT和Q175 HET小鼠的脊髓中突变体亨廷顿蛋白的浓度(顶部)和总HTT蛋白的浓度(底部)的图。突变体和总亨廷顿蛋白的浓度示出为每毫克总蛋白的突变体亨廷顿蛋白的飞摩尔。统计显著性:Q175 Het Si对照与治疗:在相应的时间点进行比较的单向ANOVA和随后的邓尼特多重比较测试。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 。

[0247] 图13A是描绘鞘内施用单次3mg或10mg剂量的AD-1271085 ($n = 8$)的非人灵长类动物在给药后第33天的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核、纹状体尾状核和腰椎(脊柱L1-L3)组织中剩余的HTT转录物百分比的图。剩余的HTT转录物的百分比是相对于施用人CSF(aCSF)的非人灵长类动物的对应组织中HTT转录物的水平。

[0248] 图13B是描绘鞘内施用单次3mg或10mg剂量的AD-1271085 ($n = 8$)的非人灵长类动物在给药后第33天的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核和纹状体尾状核组织中剩余的HTT转

录物百分比的图。剩余的HTT转录物的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT转录物的水平。

[0249] 图13C是描绘鞘内施用单次3mg或10mg剂量的AD-1271085 (n=8) 的非人灵长类动物在给药后第33天的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核、纹状体尾状核和腰椎(脊柱L1-L3) 组织中剩余的HTT蛋白百分比的图。剩余的HTT蛋白的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白的水平。

[0250] 图13D是描绘鞘内施用单次3mg或10mg剂量的AD-1271085 (n=8) 的非人灵长类动物在给药后第33天的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核和纹状体尾状核组织中剩余的HTT蛋白百分比的图。剩余的HTT蛋白的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白的水平。

[0251] 图13E是描绘鞘内施用单次3mg或10mg剂量的AD-1271085 (n=8) 在给药后第33天非人灵长类动物的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核、纹状体尾状核和腰椎(脊柱L1-L3) 组织中剩余的HTT转录物和蛋白百分比的影响的相关性的图。剩余的HTT蛋白和转录物的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白和转录物的水平。

[0252] 图14A是描绘鞘内施用单次60mg剂量的AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528 (n=5) 的非人灵长类动物在给药后第59天的纹状体尾状核、纹状体壳核、海马体、前额叶皮质和腰椎组织中剩余的HTT蛋白百分比的图。剩余的HTT蛋白的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白的水平。

[0253] 图14B是描绘鞘内施用单次60mg剂量的AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528 (n=5) 的非人灵长类动物在给药后第59天的纹状体尾状核、纹状体壳核、海马体、前额叶皮质和腰椎组织中剩余的HTT转录物百分比的图。剩余的HTT转录物的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT转录物的水平。

[0254] 图14C是描绘鞘内施用单次60mg剂量的AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528 (n=5) 的非人灵长类动物在给药后第59天的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核和腰椎组织中剩余的HTT转录物百分比的图。剩余的HTT转录物的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT转录物的水平。

[0255] 图14D是描绘鞘内施用单次60mg剂量的AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528 (n=5) 在给药后第59天非人灵长类动物的组织中剩余的HTT转录物和蛋白百分比的影响的相关性的图。剩余的HTT蛋白和转录物的百分比是相对于施用人工CSF (aCSF) 的非人灵长类动物的对应组织中HTT蛋白和转录物的水平。

[0256] 图15是指示的双链体的结构的示意图。

具体实施方式

[0257] 本公开提供了RNAi组合物,所述组合物影响对亨廷顿蛋白 (HTT) 基因的RNA转录物的RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 介导的切割。所述HTT基因可以在细胞内,例如受试者(如人)体内的细胞。这些iRNA的使用使得能够在哺乳动物中靶向降解对应基因 (HTT基因) 的mRNA。

[0258] 本发明的iRNA已经被设计为靶向全长HTT基因,包含在其它哺乳动物物种的HTT直系同源物中为保守的基因部分,例如由此靶向全长野生型转录物和全长突变体转录物。不

旨在受理论的限制,据信上述特性和特定靶位点的组合或子组合或这些iRNA的特定修饰赋予本发明的iRNA改进的功效、稳定性、效力、耐久性和安全性。

[0259] 因此,本公开还提供了使用本公开的RNAi组合物的方法,包含包括一种或多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂的组合物,用于抑制HTT基因的表达或用于治疗患有将受益于抑制或减少HTT基因的表达的病症的受试者,例如HTT相关疾病,例如亨廷顿氏病(HD)。

[0260] 本公开的RNAi药剂包含RNA链(反义链),所述链具有长度为约30个核苷酸或更短的区,例如,长度为15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21个至22个核苷酸,所述区与HTT基因的mRNA转录物的至少一部分基本互补。在某些实施例中,本公开的RNAi药剂包含具有长度为约21个至23个核苷酸的区的RNA链(反义链),所述区与HTT基因的mRNA转录物的至少一部分基本互补。

[0261] 在某些实施例中,本公开的RNAi药剂包含RNA链(反义链),所述链可以包含较长的长度,例如至多66个核苷酸,例如长度为36个至66个、26个至36个、25个至36个、31个至60个、22个至43个、27个至53个核苷酸,具有与HTT基因的mRNA转录物的至少一部分基本互补的至少19个连续核苷酸的区。这些具有较长长度的反义链的RNAi药剂优选地包含长度为20个至60个核苷酸的第二RNA链(有义链),其中有义链和反义链形成18个至30个连续核苷酸的双链体。

[0262] 这些RNAi药剂的使用使得能够在哺乳动物中靶向降解HTT基因的mRNA。因此,包含这些RNAi药剂的方法和组合物可用于治疗将受益于HTT蛋白的水平或活性降低的受试者,如患有HTT相关疾病(如亨廷顿氏病(HD))的受试者。

[0263] 以下详细描述公开了如何制备和使用含有RNAi药剂的组合物以抑制HTT基因的表达,以及用于治疗患有将受益于所述基因的表达的抑制或减少的疾病和病症的受试者的组合物和方法。

[0264] I. 定义

[0265] 为了更容易理解本公开,首先定义某些术语。另外,应该注意的是,每当引用参数的值或值的范围时,意图是所引用的值中间的值和范围也旨在是本公开的一部分。

[0266] 冠词“一个/一种(a/an)”在本文中指代冠词的一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)语法宾语。举例来说,“要素”是指一个要素或多于一个要素,例如,多个要素。

[0267] 术语“包含”在本文中用于意指短语“包含但不限于”,并且可与之互换使用。除非上下文另外清楚地指出,否则术语“或”在本文中用于意指术语“和/或”,并且可与之互换使用。

[0268] 术语“约”在本文中用于意指在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以被理解为平均值的约2个标准偏差。在某些实施例中,约意指 $\pm 10\%$ 。在某些实施例中,约意指 $\pm 5\%$ 。当“约”出现在一系列数字或范围之前时,应当理解“约”可以修饰所述系列或范围中的数字中的每个数字。

[0269] 一个数或一系列数之前的术语“至少”、“不少于”或“或更多”应理解为包含与术语“至少”相邻的数,以及逻辑上可以包含的所有后续数或整数,如从上下文中可以清楚地看出的。例如,核酸分子中的核苷酸数量必须是整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子中的至少18个核苷酸”意指18个、19个、20个或21个核苷酸具有所指示的特性。当“至少”出现在一系列数字或范围之前时,应当理解,“至少”可以修饰所述系列或范围中的数字中的每个数字。

[0270] 如本文所使用的,“不超过”或“少于”被理解为与短语相邻的值和逻辑较低的值或整数,从上下文来看是逻辑的到零。例如,具有“不超过2个核苷酸”的突出端的双链体具有2个、1个或0个核苷酸突出端。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,应当理解,“不超过”可以修饰所述系列或范围中的数字中的每个数字。

[0271] 如本文所使用的,检测方法可以包含确定存在的分析物的量低于所述方法的检测水平。

[0272] 在指示的靶位点与有义链或反义链的核苷酸序列之间发生冲突的情况下,指示的序列优先。

[0273] 如果化学结构与化学名称之间发生冲突,则以化学结构为准。

[0274] 术语“HTT”或“亨廷顿蛋白(huntingtin)”,也称为“亨廷顿蛋白(Huntingtin)”、“亨廷顿氏病蛋白”“IT15”、“HD”、“HD蛋白”或“LOMARS”是指编码正常发育所需的广泛表达的蛋白HTT和与亨廷顿氏病相关的疾病基因的众所周知的基因,所述亨廷顿氏病是一种神经退行性病症,其特征不在于由亨廷顿蛋白基因中扩增的、不稳定的三核苷酸(CAG)重复引起的纹状体神经元丧失,所述亨廷顿蛋白基因在蛋白质产物中翻译为多聚谷氨酰胺重复。

[0275] HTT的示例性核苷酸和氨基酸序列可以在例如以下中找到:GenBank登录号NM_002111.8(智人(*Homo sapiens*)HTT,SEQ ID NO:1,反向补体,SEQ ID NO:6);GenBank登录号NM_010414.3(小家鼠(*Mus musculus*)HTT,SEQ ID NO:2;反向补体,SEQ ID NO:7);GenBank登录号:NM_024357.3(褐家鼠(*Rattus norvegicus*)HTT,SEQ ID NO:3,反向补体,SEQ ID NO:8);GenBank登录号:XM_015449989.1(食蟹猴(*Macaca fascicularis*)HTT,SEQ ID NO:4,反向补体,SEQ ID NO:9);和GenBank登录号:XM_028848247.1(猕猴(*Macaca mulatta*)HTT,SEQ ID NO:5,反向补体,SEQ ID NO:10)。

[0276] HTT序列的另外的实例可以在公开可用的数据库中找到,例如GenBank、OMIM和UniProt。

[0277] 关于HTT的另外的信息可以在例如www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064找到。

[0278] 截至提交本申请之日,上述GenBank登录号和基因数据库号中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0279] 如本文所使用的,术语HTT也指HTT基因的变型,包含SNP数据库中提供的变体。HTT基因内的许多序列变型已经被鉴定,并且可以在例如NCBI dbSNP和UniProt中找到(参见例如,www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=3064,截至提交本申请之日,其全部内容通过引用并入本文。

[0280] 如本文所使用的,“靶序列”是指在HTT基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包含作为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。在一个实施例中,序列的靶部分将至少足够长,以在HTT基因转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的该部分处或附近用作RNAi定向切割的底物。

[0281] 靶序列的长度为约15个至30个核苷酸。例如,靶序列的长度可以为约15个至30个核苷酸15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21个至22个核苷酸。在某些实施例中,靶序列的长度为19个至23个核苷酸,任选地长度为21个至23个核苷酸,上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0282] 如本文所使用的,术语“包括序列的链”是指包括核苷酸链的寡核苷酸,所述核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法指代的序列描述。

[0283] 在经修饰的或未经修饰的核苷酸的上下文中,“G”、“C”、“A”、“T”和“U”通常分别代表含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,可以理解的是,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指经修饰的核苷酸,如下文进一步详述的,或替代的替代部分(参见例如,表1)。本领域技术人员清楚地知道,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷和尿嘧啶可以被其它部分取代,而不会实质性改变包括含有此类替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。例如但不限于,包括肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此,在本公开特征的dsRNA的核苷酸序列中,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以被含有例如肌苷的核苷酸取代。在另一个实例中,寡核苷酸中任何位置的腺嘌呤和胞嘧啶都可以分别被鸟嘌呤和尿嘧啶取代,以与靶mRNA形成G-U摆动碱基配对。含有此类取代部分的序列适用于公开内容特征的组合物和方法。

[0284] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi药剂”、“iRNA药剂”和“RNA干扰剂”是指含有如本文所定义的RNA的药剂,并且其通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)通路介导RNA转录物的靶向切割。RNA干扰(RNAi)是一种指导mRNA的序列特异性降解的过程。RNAi调节,例如抑制细胞中HTT的表达,例如受试者(如哺乳动物受试者)体内的细胞。

[0285] 在一个实施例中,本公开的RNAi药剂包含单链RNAi,其与靶RNA序列(例如,HTT靶mRNA序列)相互作用以引导靶RNA的切割。不希望受理论束缚,据信引入细胞中的长双链RNA被称为Dicer的III型核酸内切酶分解为包括有义链和反义链的双链短干扰RNA(siRNA)(Sharp等人,(2001)《基因与发育(Genes Dev.)》15:485)。Dicer,即核糖核酸酶-III样酶使用特性两个碱基3'突出端将这些dsRNA加工成19个至23个碱基对短干扰RNA(Bernstein等人,(2001)《自然(Nature)》409:363)。然后将这些siRNA掺入到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指导靶识别(Nykanen等人,(2001)《细胞(Cell)》107:309)。在与适当的靶mRNA结合后,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶以诱导沉默(Elbashir等人,(2001)《基因与发育》15:188)。因此,一方面本公开涉及在细胞内产生的单链RNA(ssRNA)(siRNA双链体的反义链),并且其促进RISC复合物的形成以影响靶基因,即HTT基因的沉默。因此,术语“siRNA”在本文中也用于指如上所述的RNAi。

[0286] 在另一个实施例中,RNAi药剂可以是单链RNA,其被引入细胞或生物体中以抑制靶mRNA。单链RNAi药剂与RISC核酸内切酶Argonaute 2结合,然后所述核酸内切酶切割靶mRNA。单链siRNA通常为15个至30个核苷酸,并且经过化学修饰。单链RNA的设计和测试在美

国专利第8,101,348号和Lima等人,(2012)《细胞》150:883-894中进行了描述,所述文献中每一个的全部内容通过引用并入本文。本文所描述的任何反义核苷酸序列可以作为本文所描述的单链siRNA使用,或通过Lima等人,(2012)《细胞》150:883-894中所描述的方法进行化学修饰。

[0287] 在另一个实施例中,用于本公开的组合物、用途和方法的“RNAi 药剂”是双链RNA,并且在本文中称为“双链RNAi 药剂”、“双链RNA (dsRNA) 分子”、“dsRNA 药剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指核糖核酸分子的复合物,具有双链体结构,所述双链体结构包括两条反平行且基本互补的核酸链,相对于靶RNA (即HTT基因) 具有“有义”和“反义”取向。在本公开的一些实施例中,双链RNA (dsRNA) 通过本文中称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制触发靶RNA (例如,mRNA) 的降解。

[0288] 通常,dsRNA分子可以包含核糖核苷酸,但如本文详细描述,每条链或两条链也可以包含一种或多种非核糖核苷酸,例如脱氧核糖核苷酸、经修饰的核苷酸。另外,如本说明中所使用的,“RNAi 药剂”可以包含具有化学修饰的核糖核苷酸;RNAi 药剂可以包含在多个核苷酸处的实质性修饰。如本文所使用的,术语“经修饰的核苷酸”是指独立地具有经修饰的糖部分、经修饰的核苷酸间键或经修饰的核碱基的核苷酸。因此,术语经修饰的核苷酸涵盖对核苷间键、糖部分或核碱基的取代、添加或去除,例如官能团或原子。适用于本公开的药剂的修饰包含本文所公开的或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书和权利要求的目的,如在siRNA类型分子中使用的,任何此类修饰都被“RNAi 药剂”涵盖。

[0289] 在本公开的某些实施例中,如果存在于RNAi 药剂内,则包含脱氧核苷酸可以被认为构成经修饰的核苷酸。

[0290] 双链体区可以是允许通过RISC通路特异性降解期望的靶RNA的任何长度,并且所述长度可以在约15个至36个碱基对的范围内,例如长度为约15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个或36个碱基对,如长度为约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21个至22个碱基对。在某些实施例中,双链体区的长度为19个至21个碱基对,例如,长度为21个碱基对。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0291] 形成双链体结构的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分,或其可以是单独的RNA分子。如果这两条链是一个较大分子的一部分,并且因此在一条链的3'端和形成双链体结构的相应的另一条链的5'端之间通过不间断的核苷酸链连接,则连接的RNA链被称为“发夹环”发夹环可以包括至少一个未配对的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可以包括至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对的核苷酸或不指向dsRNA的靶位点的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可以是10个或更少个核苷酸。在一些实施例中,发夹环可以是8个或更少个未配对的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可以是4个至10个未配对的核苷酸。在一些实施例中,发夹环可以是4个至8个核苷酸。

[0292] 在dsRNA的两条基本互补的链包括单独的RNA分子的情况下,那些分子不必但可以共价连接。在某些实施例中,当两条链通过除一条链的3'-端与形成双链体结构的相应的另一条链的5'-端之间的不间断核苷酸链以外的其它方式共价连接时,连接结构被称为“接头”(尽管应注意,本文其它地方定义的某些其它结构也可以称为“接头”)。RNA链可以具有相同或不同数量的核苷酸。碱基对的最大数量是dsRNA的最短链中的核苷酸数量减去双链体中存在的任何突出端。除了双链体结构外,RNAi可以包括一个或多个核苷酸突出端。在RNAi药剂的一个实施例中,至少一条链包括至少1个核苷酸的3'突出端。在另一个实施例中,至少一条链包括至少2个核苷酸的3'突出端,例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个核苷酸。在其它实施例中,RNAi药剂的至少一条链包括至少1个核苷酸的5'突出端。在某些实施例中,至少一条链包括至少2个核苷酸的5'突出端,例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个核苷酸。在其它实施例中,RNAi药剂的一条链的3'端和5'端两者都包括至少1个核苷酸的突出端。

[0293] 在一个实施例中,本公开的RNAi药剂是dsRNA,其每条链独立地包括19个至23个核苷酸,其与靶RNA序列(例如,HTT靶mRNA序列)相互作用以引导靶RNA的切割。

[0294] 如本文所使用的,术语“核苷酸突出端”是指从RNAi药剂(例如,dsRNA)的双链体结构突出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA的一条链的3'端延伸超过另一条链的5'端时,反之亦然,则存在核苷酸突出端。dsRNA可以包括至少一个核苷酸的突出端;可替代地,突出端可以包括至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包括以下或由以下组成:核苷酸/核苷类似物,包含脱氧核苷酸/核苷。突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'端、3'端或两端上。

[0295] 在一个实施例中,dsRNA的反义链在3'端或5'端处的突出端具有1个至10个核苷酸,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在一个实施例中,dsRNA的有义链在3'端或5'端处的突出端具有1个至10个核苷酸,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在另一个实施例中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸盐替代。

[0296] 在某些实施例中,dsRNA的反义链在3'端或5'端处的突出端具有1个至10个核苷酸,例如0个至3个、1个至3个、2个至4个、2个至5个、4个至10个、5个至10个,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在一个实施例中,dsRNA的有义链在3'端或5'端处的突出端具有1个至10个核苷酸,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在另一个实施例中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸盐替代。

[0297] 在某些实施例中,有义链或反义链上的突出端可以包含长于10个核苷酸的延伸长度,例如长度为1个至30个核苷酸,2个至30个核苷酸、10个至30个核苷酸或10个至15个核苷酸。在某些实施例中,延伸的突出端在双链体的有义链上。在某些实施例中,在双链体的有义链的3'端上存在延伸的突出端。在某些实施例中,在双链体的有义链的5'端上存在延伸的突出端。在某些实施例中,延伸的突出端在双链体的反义链上。在某些实施例中,在双链体的反义链的3'端上存在延伸的突出端。在某些实施例中,在双链体的反义链的5'端上存在延伸的突出端。在某些实施例中,突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸盐替代。在某些实施例中,突出端包含自互补部分,使得突出端能够形成在生理条件下稳定的发夹

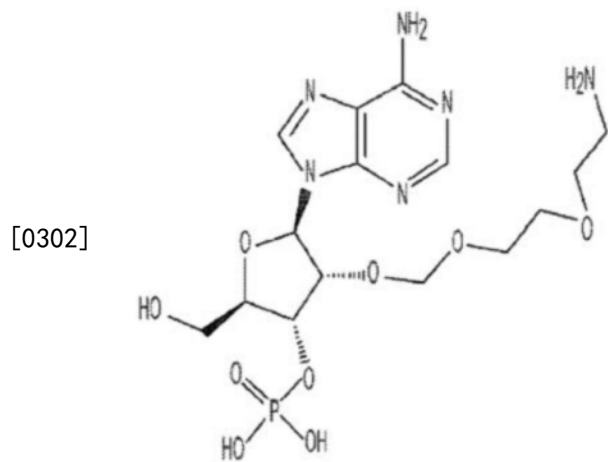
结构。

[0298] 在某些实施例中,至少一条链的至少一端延伸超过双链体靶向区,包含其中一条链包含热力学稳定四环结构的结构(参见例如,美国专利第8,513,207号和第8,927,705号,以及W02010033225,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文)。此类结构可以包含单链延伸(在分子的一侧或两侧)以及双链延伸。

[0299] 在某些实施例中,有义链的3'端和反义链的5'端由包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或两者的多核苷酸序列连接,任选地其中所述多核苷酸序列包括四环序列。在某些实施例中,有义链的长度为25个至35个核苷酸。

[0300] 四环可以含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、经修饰的核苷酸以及其组合。通常,四环具有4个至5个核苷酸。在一些实施例中,环包括被阐述为GAAA的序列。在一些实施例中,环(GAAA)的核苷酸中的至少一个包括核苷酸修饰。在一些实施例中,经修饰的核苷酸包括2'-修饰。在一些实施例中,2'-修饰是选自由以下组成的组的修饰:2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氨基二乙氧基甲醇、2'-adem和2'-脱氧-2'-氟-d-阿拉伯壬酸。在一些实施例中,环的所有核苷酸都是经修饰的。在一些实施例中,GAAA序列中的G包括2'-OH。在一些实施例中,GAAA序列中的每个核苷酸包括2'-O-甲基修饰。在一些实施例中,GAAA序列中的每个A包括2'-OH,并且GAAA序列中的G包括2'-O-甲基修饰。在优选的实施例中,在一些实施例中,GAAA序列中的每个A包括2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰,并且GAAA序列中的G包括2'-O-甲基修饰;或GAAA序列中的每个A包括2'-adem修饰,并且GAAA序列中的G包括2'-O-甲基修饰。参见例如,PCT公开第WO 2020/206350号,所述文献的全部内容通过引用并入本文。

[0301] 示例性2'-adem修饰的核苷酸如下所示:



[0303] 如本文所使用的,关于dsRNA的术语“平端”或“平末端”是指在dsRNA的给定末端处没有未配对的核苷酸或核苷酸类似物,即没有核苷酸突出端。dsRNA的一端或两端可以是平端的。当dsRNA的两端都是平端的时,所述dsRNA被称为“平末端”。为了清楚起见,“平末端”dsRNA是两端均为平端的dsRNA,即在分子的任一端处都没有核苷酸突出端。最常见的此类分子将在其整个长度上是双链的。

[0304] 术语“反义链”或“引导链”是指RNAi药剂的链,例如dsRNA,其包含与靶序列(例如,HTT mRNA)基本互补的区。

[0305] 如本文所使用的,术语“互补区”是指反义链上与本文所定义的序列(例如靶序列,

例如HTT核苷酸序列)基本互补的区。在互补区与靶序列不完全互补的情况下,错配可以处于分子的内部或末端区中。通常,最可容忍的错配在末端区,例如在RNAi药剂的5'或3'末端的5个、4个、3个或2个核苷酸内。在一些实施例中,本发明的双链RNA药剂包含反义链中的核苷酸错配。在一些实施例中,本发明的双链RNA药剂的反义链包含与靶mRNA的不超过4个错配,例如,反义链包含与靶mRNA的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施例中,本发明的反义链双链RNA药剂包含与有义链的不超过4个错配,例如,反义链包含与有义链的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施例中,本发明的双链RNA药剂包含有义链中的核苷酸错配。在一些实施例中,本发明的双链RNA药剂的有义链包含与反义链的不超过4个错配,例如,有义链包含与反义链的4个、3个、2个、1个或0个错配。在一些实施例中,核苷酸错配在例如距离iRNA的3'端5个、4个、3个核苷酸内。在另一个实施例中,核苷酸错配在例如在iRNA药剂的3'末端核苷酸中。在一些实施例中,错配不在种子区中。

[0306] 因此,如本文所描述的RNAi药剂可以含有与靶序列的一个或多个错配。在一个实施例中,如本文所描述的RNAi药剂含有不超过3个错配(即3个、2个、1个或0个错配)。在一个实施例中,如本文所描述的RNAi药剂含有不超过2个错配。在一个实施例中,如本文所描述的RNAi药剂含有不超过1个错配。在一个实施例中,如本文所描述的RNAi药剂含有0个错配。在某些实施例中,如果RNAi药剂的反义链含有与靶序列的错配,则错配可以任选地被限制在距互补区的5'-或3'端的最后5个核苷酸内。例如,在此类实施例中,对于23个核苷酸的RNAi药剂,与HTT基因的区互补的链通常在中心13个核苷酸内不含有任何错配。本文所述的方法或本领域已知的方法可以用于确定包括与靶序列的错配的RNAi药剂是否有效抑制HTT基因的表达。考虑具有错配的RNAi药剂在抑制HTT基因表达方面的功效很重要,特别是如果已知HTT基因中的特定互补区在群体内具有多态性序列变异。

[0307] 如本文所使用的,术语“有义链”或“随从链”是指包含与如本文所定义的术语的反义链的区基本互补的区的RNAi药剂的链。

[0308] 如本文所使用的,术语“切割区”是指紧邻切割位点的区。切割位点是靶上发生切割的位点。在一些实施例中,切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括三个碱基。在一些实施例中,切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括两个碱基。在一些实施例中,切割位点特异性地出现在反义链的核苷酸10和11结合的位点处,并且切割区包括核苷酸11、12和13。

[0309] 如本文所使用的,并且除非另外指明,否则术语“互补”当用于相对于第二核苷酸序列描述第一核苷酸序列时是指包括第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包括第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力,如技术人员将理解的。

[0310] RNAi药剂内(例如,如本文所描述的dsRNA内)的互补序列包含包括第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包括第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长上的碱基配对。此类序列在本文中可以被彼此“完全互补”。然而,当第一序列在本文中被称为相对于第二序列“基本互补”时,这两个序列可以是完全互补的,或其可以形成一个或多个,但通常不超过5个、4个、3个或2个杂交后错配的碱基对用于至多30个碱基对的双链体,同时保留在与其最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如通过RISC通路抑制基因表达。然而,在两个寡核苷酸被设计以在杂交时形成一个或多个单链突出端

的情况下,此类突出端不应视为相对于互补性的确定的错配。例如,包括一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA,其中较长的寡核苷酸包括与较短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列,仍可以被称为出于本文所描述的目的“完全互补”。

[0311] 如本文所使用的,“互补”序列还可以包含非沃森-克里克碱基对(non-Watson-Crick base pair)或由非天然和经修饰的核苷酸形成的碱基对,或完全由其形成,只要满足关于其杂交能力的以上要求即可。此类非沃森-克里克碱基对包含但不限于G:U摆动碱基配对或胡斯坦碱基配对(Hoogsteen base pairing)。

[0312] 本文中的术语“互补”、“完全互补”和“基本互补”可以相对于dsRNA的有义链和反义链之间或RNAi药剂的反义链与靶序列之间的碱基匹配使用,如根据其使用的上下文所理解的。

[0313] 如本文所使用的,与信使RNA(mRNA)的“至少部分基本上互补”的多核苷酸是指与所关注的mRNA(例如,编码HTT的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果序列与编码HTT的mRNA的不间断部分基本互补,则多核苷酸与HTT mRNA的至少一部分互补。

[0314] 因此,在一些实施例中,本文所公开的反义多核苷酸与靶HTT序列完全互补。在其它实施例中,本文所公开的反义多核苷酸与靶补体组分HTT序列基本互补,并且包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与SEQ ID NO:1-5中任一个的核苷酸序列或SEQ ID NO:1-5中任一个的片段的等效区至少80%互补,如约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0315] 在其它实施例中,本文所公开的反义多核苷酸与靶HTT序列基本互补,并且包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与表2至表5中的任一个的任一个中的任一个有义链核苷酸序列,或表2至表5中的任一个中的任一个有义链核苷酸序列的片段至少约80%互补,如约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%互补。

[0316] 在一个实施例中,本公开的RNAi药剂包含与反义多核苷酸基本互补的有义链,所述反义多核苷酸反过来与靶HTT序列相同,并且其中所述有义链多核苷酸包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与SEQ ID NO:6-10,或SEQ ID NO:6-10中的任一个的片段至少约80%互补,如约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%互补。

[0317] 在一些实施例中,本发明的iRNA包含与反义多核苷酸基本互补的有义链,所述反义多核苷酸反过来与靶HTT序列互补,并且其中所述有义链多核苷酸包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与表2至表5中的任一个的任一个中的任一个反义链核苷酸序列或表2至表5中的任一个中的任一个反义链核苷酸序列的片段至少约80%互补,如约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%互补。

[0318] 在一个实施例中,HTT基因的表达的至少部分抑制通过HTT mRNA的量的减少来评估,所述HTT mRNA可以从转录HTT基因的第一细胞或细胞组中分离或检测,并且所述第一细胞或细胞组已经被处理以使HTT基因的表达受抑制,如与基本上与第一细胞或细胞组相同但未被如此处理的第二细胞或细胞组(对照细胞)相比较的。抑制程度可以用以下方式表

示:

$$[0319] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \bullet 100\%$$

[0320] 如本文所使用的,短语“使细胞与RNAi药剂(如dsRNA)接触”包含通过任何可能的方式接触细胞。使细胞与RNAi药剂接触包含使细胞在体外与RNAi药剂接触或使细胞在体内与RNAi药剂接触。可以直接或间接地进行接触。因此,例如可以通过执行所述方法的个体使RNAi药剂与细胞物理接触,或可替代地,可以使RNAi药剂处于允许或使其随后与细胞接触的情况。

[0321] 体外接触细胞可以通过例如将细胞与RNAi药剂一起温育来进行。体内接触细胞可以通过例如将RNAi药剂注射到细胞所在的组织中或其附近,或通过将RNAi药剂注射到另一个区域中,例如中枢神经系统(CNS),任选地通过鞘内、玻璃体内或其它注射,或到血流或皮下空间,使得药剂随后到达待接触细胞所在的组织来进行。例如,RNAi药剂可以含有配体或与配体偶联,例如,一个或多个亲脂性部分,如下所述并进一步详细描述,例如PCT/US2019/031170中,所述文献通过引用并入本文,其在所关注的位点(例如,CNS)处引导或以其它方式稳定RNAi药剂。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如,细胞也可以与RNAi药剂体外接触,并且随后移植到受试者体内。

[0322] 在一个实施例中,使细胞与RNAi药剂接触包含通过促进或影响细胞的摄取或吸收来“引入”或“将RNAi药剂递送到细胞中”。RNAi药剂的吸收或摄取可以通过无辅助的扩散或活性细胞过程发生,或通过辅助剂或装置发生。将RNAi药剂引入细胞中可以是体外的或体内的。例如,对于体内引入,可以将RNAi药剂注射到组织部位中或全身施用。体外引入细胞包含本领域已知的方法,如电穿孔和脂质转染。另外的方法在下文中描述或在本领域中是已知的。

[0323] 术语“亲脂性”或“亲脂性部分”广义上是指对脂质具有亲和力的任何化合物或化学部分。用于表征亲脂性部分的亲脂性的一种方法是通过辛醇-水分配系数 $\log K_{ow}$,其中 K_{ow} 是处于平衡状态的两相系统的辛醇相中化学品的浓度与其水相中的浓度的比率。辛醇-水分配系数是实验室测量的物质特性。然而,其也可以通过使用归因于化学品的结构组分的系数来预测,所述系数是使用第一原则或经验方法计算的(参见例如,Tetko等人,《化学信息计算科学(J.Chem.Inf.Comput.Sci.)》41:1407-21(2001),所述文献通过全文引用的方式并入本文)。其提供了物质倾向于非水或油性环境而不是水的热力学测量(即其亲水性/亲脂性平衡)。原则上,当化学物质的 $\log K_{ow}$ 超过0时,其为亲脂性的。通常,亲脂性部分具有超过1、超过1.5、超过2、超过3、超过4、超过5或超过10的 $\log K_{ow}$ 。例如,6-氨基己醇的 $\log K_{ow}$ 被预测为例如大约0.7。使用相同的方法,N-(己-6-醇)氨基甲酸胆固醇酯的 $\log K_{ow}$ 预测为10.7。

[0324] 分子的亲脂性可以根据其携带的官能团而改变。例如,将羟基或胺基添加到亲脂性部分的末端可以增加或降低亲脂性部分的分配系数(例如, $\log K_{ow}$)值。

[0325] 可替代地,与一个或多个亲脂性部分缀合的双链RNAi药剂的疏水性可以通过其蛋白质结合特征来测量。例如,在某些实施例中,双链RNAi药剂的血浆蛋白结合测定中的未结合级分可以被确定为与双链RNAi药剂的相对疏水性正相关,其然后可以与双链RNAi药剂的沉默活性正相关。

[0326] 在一个实施例中,所确定的血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率偏移测定(EMSA)。此结合测定的示例性方案在例如PCT/US2019/031170中详细说明。通过结合测定中未结合的siRNA的级分测量的双链RNAi药剂的疏水性,对于siRNA的增强的体内递送而言超过0.15、超过0.2、超过0.25、超过0.3、超过0.35、超过0.4、超过0.45或超过0.5。

[0327] 因此,将亲脂性部分与双链RNAi药剂的内部位置缀合为siRNA的增强的体内递送提供了最佳的疏水性。

[0328] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是包括脂质层的囊泡,所述脂质层封装药物活性分子,如核酸分子,例如rNAi药剂或从其转录RNAi药剂的质粒。LNP在例如美国专利第6,858,225号、第6,815,432号、第8,158,601号和第8,058,069号中进行了描述,所述美国专利的全部内容特此通过引用并入本文。

[0329] 如本文所使用的,“受试者”是动物,如哺乳动物,包含灵长类动物(如人、非人灵长类动物,例如猴子和黑猩猩)或非灵长类动物(如大鼠或小鼠)。在优选实施例中,受试者是人,如正在治疗或评估将受益于HTT表达减少的疾病、病症或病状的人;处于将受益于HTT表达减少的疾病、病症或病状的风险中的人;患有将受益于HTT表达减少的疾病、病症或病状的人;或正在治疗将受益于HTT表达减少的疾病、病症或病状的人,如本文所描述的。在一些实施例中,受试者是女性人类。在其它实施例中,受试者是男性人类。在一个实施例中,受试者是成年受试者。在一个实施例中,受试者是儿科受试者。在另一个实施例中,受试者是青少年受试者,即年龄为20岁以下的受试者。

[0330] 如本文所使用的,术语“治疗”(“treating”或“treatment”)是指有益或期望的结果,包括但不限于减轻或改善与HTT基因表达或HTT蛋白产生相关的一种或多种体征或症状,例如HTT相关疾病,如亨廷顿氏病。“治疗”也可以意指与没有治疗的预期存活期相比,延长存活期。

[0331] 在受试者或疾病标志物或症状中HTT水平的上下文中,术语“较低”是指此类水平在统计学上显著降低。降低可以是例如至少10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在某些实施例中,降低为至少20%。在某些实施例中,疾病标志物,例如蛋白质或基因表达水平的降低为至少50%。受试者的HTT水平的“较低”是优选地降到没有此类病症的个体的正常范围内的被接受的水平。在某些实施例中,“较低”是患有疾病的受试者的标志物或症状的水平与个体在正常范围内接受的水平之间的差异的降低,例如,肥胖个体与具有在正常范围内接受的体重的个体之间的体重降低的水平。

[0332] 如本文所使用的,当用于提及将受益于HTT基因表达或HTT蛋白产生的减少的疾病、病症或其病状时,“预防”(“prevention”或“preventing”)是指受试者将出现与此类疾病、病症或病状相关的症状(例如,HTT相关疾病的症状)的可能性的降低。未能发展出疾病、病症或病状,或与此类疾病、病症或病状相关的症状发展减少(例如,在该疾病或病症的临床接受的量表上至少减少约10%),或延迟症状的表现(例如,几天、几周、几个月或几年)被认为是有效的预防。

[0333] 如本文所使用的,术语“HTT相关疾病”或“HTT相关病症”被理解为将受益于HTT的表达和/或活性减少的任何疾病或病症。示例性HTT相关疾病包含亨廷顿氏病。

[0334] “亨廷顿氏病”也称为HD、亨廷顿氏舞蹈病、大舞蹈病、慢性进行性舞蹈病和遗传性

舞蹈病,是一种常染色体显性遗传病症,其特征在于舞蹈动作和进行性智力退化,通常开始于中年(35岁至50岁)。疾病对两性的影响是平等的。尾状核萎缩,小细胞群体退化,和神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)和物质P的水平降低。这种变性导致CT扫描中出现特征性的“箱形心室”。

[0335] HD的症状和体征是隐性发展的。HD的最明显症状是被称为舞蹈病的异常身体运动和缺乏协调,但其也会影响一些心理能力和性格的一些方面。这些身体症状通常在人的四十多岁时就会引起注意,但在任何年龄都可能发生。如果发病年龄低于20岁,则称为青少年HD。

[0336] 痴呆症或精神障碍,从冷漠和易怒到全面的双相情感障碍或精神分裂症样障碍可能先于运动障碍或在其过程期间发展。快感缺失或避群行为可能是第一种行为表现。运动表现包含四肢轻快移动、步态轻快、运动保持困难(无法维持运动行为,如舌头突出)、面部扮鬼脸、共济失调和肌张力障碍。

[0337] HD是由亨廷顿蛋白(HTT)基因中的三核苷酸重复扩增引起的,并且是若干种多聚谷氨酰胺扩增(或PolyQ扩增)疾病之一。这会产生延伸形式的突变体亨廷顿蛋白(mHtt),其导致脑的选择性区域中的细胞死亡。

[0338] 如本文所使用的,“治疗有效量”旨在包含当向患有HTT相关疾病的受试者施用时足以影响疾病的治疗(例如,通过减少、改善或维持现有疾病或一种或多种疾病症状)的RNAi药剂的量。“治疗有效量”可能因RNAi药剂、药剂如何施用、疾病和其严重程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)以及待治疗受试者的其它个体特征而异。

[0339] 如本文所使用的,“预防有效量”旨在包含当向患有HTT相关病症的受试者施用时足以预防或改善疾病或所述疾病的一种或多种症状的RNAi药剂的量。改善疾病包含减缓疾病的进程或降低后发疾病的严重程度。“预防有效量”可能因RNAi药剂、药剂如何施用、疾病的风险程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)以及待治疗患者的其它个体特征而异。

[0340] “治疗有效量”或“预防有效量”还包含一定量的RNAi药剂,所述药剂以适用于任何治疗的合理收益/风险比产生一些期望的局部或全身性效果。本公开的方法中采用的RNAi药剂可以以足够的量施用,以产生适用于此类治疗的合理益处/风险比。

[0341] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在正确医学判断的范围内适合于与人受试者和动物受试者的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏应答或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料(包含盐)、组合物或剂型。

[0342] 如本文所使用的,短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如,润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、或溶剂封装材料(涉及将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运送到身体的另一个器官或部分)。在与调配物的其它成分相容并且对被治疗的受试者无害的意义上讲,每种载体必须是“可接受的”。可以充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包含:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂

蜡类；(9) 油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油；(10) 二醇，如丙二醇；(11) 多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原的水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH缓冲溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯或聚酸酐；(22) 填充剂，如多肽和氨基酸；(23) 血清组分，如血清白蛋白、HDL和LDL；以及(22) 药物调配物中所用的其它无毒可相容物质。

[0343] 如本文所使用的，术语“样品”包含从受试者分离的类似流体、细胞或组织的集合，以及受试者体内存在的流体、细胞和组织。生物流体的实例包含血液、血清和浆膜流体、血浆、脑脊液、眼流体、淋巴、尿液、唾液等。组织样品可以包含来自组织、器官或局部区的样品。例如，样品可以源自特定的器官、器官的一部分或这些器官内的液体或细胞。在某些实施例中，样品可以源自脑（例如，整个脑或脑的某些部分，例如纹状体，或脑中的某些类型的细胞，例如神经元和神经胶质细胞（星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞））。在一些实施例中，“源自受试者的样品”指的是从受试者抽取的血液或源自其的血浆或血清。在另外的实施例中，“源自受试者的样品”是指源自受试者的脑组织（或其亚组分）或视网膜组织（或其亚组分）。

[0344] II. 本公开的RNAi药剂

[0345] 本文描述了抑制HTT基因的表达的RNAi药剂。在一个实施例中，RNAi药剂包含双链核糖核酸(dsRNA)分子，用于抑制细胞中HTT基因的表达，如受试者（例如，哺乳动物）体内的细胞，如患有HTT相关疾病（例如，亨廷顿氏病）的人。dsRNA包含具有互补区的反义链，所述互补区与在HTT基因的表达中形成的mRNA的至少一部分互补。互补区的长度约为15个至30个核苷酸或更少。在与表达HTT基因的细胞接触时，RNAi药剂抑制HTT基因（例如，人基因、灵长类动物基因、非灵长类动物基因）的表达至少50%，如通过例如PCR或基于支链DNA(bDNA)的方法或通过基于蛋白质的方法（如通过免疫荧光分析，使用例如蛋白质印迹或流式细胞术技术）所测定的。在一个中，使用双荧光素酶测定方法测定Cos7细胞中的敲低水平。

[0346] dsRNA包含两条互补并且在将使用dsRNA的条件下杂交以形成双链体结构的RNA链。dsRNA的一条链（反义链）包含与靶序列基本上互补且通常完全互补的互补区。靶序列可以源自HTT基因表达期间形成的mRNA的序列。另一条链（有义链）包含与反义链互补的区，使得两条链在适当条件下组合时杂交并形成双链体结构。如本文中其它地方所描述且如本领域已知的，dsRNA的互补序列相对于位于单独寡核苷酸上还可以作为单一核酸分子的自身互补区被包含在内。

[0347] 通常，双链体结构的长度为15个至30个碱基对，例如，长度为或21个至22个碱基对，15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23。在某些优选实施例中，双链体结构的长度为18个至25个碱基对，例如，长度为18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-25、21-24、21-23、21-22、22-25、22-24、22-23、23-25、23-24或24个至25个碱基对，例如长度为19个至21个碱基对。上述范围和长度中

间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0348] 类似地,与靶序列互补的区的长度为15个至30个核苷酸,例如长度为15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21个至22个核苷酸,如长度为19个至23个核苷酸,或长度为21个至23个核苷酸。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0349] 在一些实施例中,双链体结构的长度为19个至30个碱基对。类似地,与靶序列互补的区的长度为19个至30个核苷酸。

[0350] 在一些实施例中,dsRNA的长度为15至23个核苷酸、长度为19个至23个核苷酸或长度为25个至30个核苷酸。一般来说,dsRNA足够长以用作Dicer酶的底物。例如,本领域众所周知,长于约21个至23个核苷酸的dsRNA可以用作Dicer的底物。如普通技术人员还将认识到的,靶向切割的RNA的区通常将是较大RNA分子的部分,通常是mRNA分子。在相关情况下,mRNA靶的一“部分”是mRNA靶的连续序列,其长度足以使其成为RNAi定向切割(即通过RISC通路切割)的底物。

[0351] 本领域技术人员还将认识到,双链体区是dsRNA的主要功能部分,例如约15个至36个碱基对(例如15-36、15-35、15-34、15-33、15-32、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21个至22个碱基对,例如19个至21个碱基对)的双链体区。因此,在一个实施例中,在其被加工成靶向所需RNA进行切割的例如15个至30个碱基对的功能性双链体的程度上,具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此,普通技术人员将认识到,在一个实施例中,miRNA是dsRNA。在另一个实施例中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施例中,可用于靶向HTT表达的RNAi药剂不是通过切割较大的dsRNA在靶细胞中产生的。

[0352] 如本文所描述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端,例如,1个、2个、3个或4个核苷酸。核苷酸突出端可以包括以下或由以下组成:核苷酸/核苷类似物,包含脱氧核苷酸/核苷。突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'端、3'端或两端上。

[0353] dsRNA可以通过本领域已知的标准方法合成。本发明的双链RNAi化合物可以使用两步程序制备。首先,单独制备双链RNA分子的单个链。然后,对组分链进行退火。siRNA化合物的单个链可以使用溶液相或固相有机合成或两者制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。类似地,本发明的单链寡核苷酸可以使用溶液相或固相有机合成或两者制备。

[0354] 一方面,本公开的dsRNA包含至少两个核苷酸序列,有义序列和反义序列。HTT的有义链序列可以选自表2至5中的任一个中提供的序列组,并且有义链的反义链的对应核苷酸序列可以选自表2至表5中任一个的序列组。在这方面,两个序列中的一个序列与两个序列

中的另一个序列互补,其中所述序列中的一个序列与在HTT基因表达中产生的mRNA序列基本上互补。因此,在这方面,dsRNA将包含两个寡核苷酸,其中一个寡核苷酸在表2至表5中的任一个中被描述为有义链(随从链),并且第二个寡核苷酸被描述为表2至表5中的任一个中的有义链的对应反义链(引导链)。

[0355] 在一个实施例中,dsRNA的基本互补序列包含在分离的寡核苷酸上。在另一个实施例中,dsRNA的基本互补序列包含在单个寡核苷酸上。

[0356] 应当理解、尽管表2至表5中的一些序列被描述为经修饰的或缀合的序列,但本公开的RNAi药剂的RNA,例如本公开的dsRNA可以包括表2至表5中的任一个中所述的未经修饰的、未缀合的或与其中所述的不同的经修饰的或缀合的序列中的任一个。例如,尽管表3中所示的本发明的药剂的有义链与C16配体缀合,但这些药剂可以与引导递送到肝脏的部分缀合,例如GalNAc配体,如本文所描述的。亲脂性配体可以包含在本申请中提供的任何位置中。

[0357] 本领域技术人员充分了解,具有约20个至23个碱基对(例如,21个碱基对)的双链体结构的dsRNA已被誉为在诱导RNA干扰方面特别有效(Elbashir等人,(2001)《欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J.)》,20:6877-6888)。然而,其它人已经发现,较短或较长的RNA双链体结构也可以是有有效的(Chu和Rana (2007)《RNA》14:1714-1719;Kim等人,(2005)《自然生物技术(Nat Biotech)》23:222-226)。在上述实施例中,由于本文所提供的寡核苷酸序列的性质,本文所描述的dsRNA可以包含至少一条长度为最少21个核苷酸的链。可以合理地预期,与上述dsRNA相比,在一端或两端仅减去很少核苷酸的较短的双链体可以类似地有效。因此,具有源自本文所提供的序列之一的至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的序列,并且其抑制HTT基因的表达能力与包括完整序列的dsRNA相差不超过10%、15%、20%、25%或30%的抑制(使用本文实例中提供的具有Cos7和10nM浓度的RNA药剂的体外测定和PCR测定)的dsRNA被认为在本公开的范围內。

[0358] 另外,本文所描述的RNA鉴定了HTT转录物中对RISC介导的切割敏感的位点。如此,本公开进一步以靶向此位点内的RNAi药剂为特征。如本文所使用的,如果RNAi药剂促进转录物在所述特定位点内任何位置的切割,则RNAi药剂被称为靶向RNA转录物的特定位点内。此类RNAi药剂将通常包含来自本文所提供的序列之一的至少约15个连续核苷酸,优选地至少19个核苷酸,所述序列与取自HTT基因中与所选序列相邻的区的另外的核苷酸序列偶联。

[0359] III. 本公开的经修饰的RNAi药剂

[0360] 在一个实施例中,本公开的RNAi药剂的RNA,例如dsRNA,是未经修饰的,并且不包括例如本领域已知的和本文所描述的化学修饰或缀合。在优选实施例中,本公开的RNAi药剂的RNA,例如dsRNA被化学修饰以增强稳定性或其它有益特征。在本公开的某些实施例中,本公开的RNAi药剂的基本上所有核苷酸都是经修饰的。在本公开的其它实施例中,本公开的RNAi药剂的所有核苷酸都是经修饰的。其中“基本所有核苷酸都是经修饰的”的本公开的RNAi药剂在很大程度上但不是完全为经修饰的,并且可以包含不超过5个、4个、3个、2个或未经修饰的核苷酸。在本公开的仍其它实施例中,本公开的RNAi药剂可以包含不超过5个、4个、3个、2个或1个经修饰的核苷酸。

[0361] 本公开特征的核酸可以通过本领域公认的方法合成或修饰,例如“核酸化学中的当前实验方案(Current protocols in nucleic acid chemistry),”Beaucage,S.L等人,

(编辑),美国纽约州纽约的约翰威利父子公司(John Wiley&Sons, Inc., New York, NY, USA)中描述的那些方法,所述方法特此通过引用并入本文。修饰包含例如端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、缀合、反向连接等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);碱基修饰,例如,用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伙伴库碱基配对的碱基替换、去除碱基(无碱基核苷酸)或缀合的碱基;糖修饰(例如,在2'位置或4'位置处)或糖的置换;或主链修饰,包含磷酸二酯键的修饰或置换。可用于本文所描述的实施例的RNAi药剂的具体实例包含但不限于含有经修饰的主链或不含天然核苷间键的RNA。除此之外,具有经修饰的主链的RNA包含在主链中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提及的,在其核苷间主链中不具有磷原子的经修饰的RNA也可以被视为寡核苷。在一些实施例中,经修饰的RNAi药剂将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0362] 经修饰的RNA主链包含例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包含3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包含3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酸胺酯)、硫代羰基磷酰胺酯、硫代羰基烷基磷酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯、以及具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、这些酯的2'-5'连接类似物、以及具有反向极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。也包含了各种盐、混合盐和游离酸形式。在本发明的一些实施例中,本发明的dsRNA药剂是游离酸形式。在本发明的其它实施例中,本发明的dsRNA药剂是盐形式。在一个实施例中,本发明的dsRNA药剂是钠盐形式。在某些实施例中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的基本上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。其中基本上所有的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键都具有钠抗衡离子的药剂包含不超过5个、4个、3个、2个或1个不具有钠抗衡离子的磷酸二酯键和/或硫代磷酸酯键。在一些实施例中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。

[0363] 教导制备上述含磷键的代表性美国专利包含但不限于美国专利第3,687,808号;第4,469,863号;第4,476,301号;第5,023,243号;第5,177,195号;第5,188,897号;第5,264,423号;第5,276,019号;第5,278,302号;第5,286,717号;第5,321,131号;第5,399,676号;第5,405,939号;第5,453,496号;第5,455,233号;第5,466,677号;第5,476,925号;第5,519,126号;第5,536,821号;第5,541,316号;第5,550,111号;第5,563,253号;第5,571,799号;第5,587,361号;第5,625,050号;第6,028,188号;第6,124,445号;第6,160,109号;第6,169,170号;第6,172,209号;第6,239,265号;第6,277,603号;第6,326,199号;第6,346,614号;第6,444,423号;第6,531,590号;第6,534,639号;第6,608,035号;第6,683,167号;第6,858,715号;第6,867,294号;第6,878,805号;第7,015,315号;第7,041,816号;第7,273,933号;第7,321,029号;以及美国专利RE39464,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0364] 其中不包含磷原子的经修饰的RNA主链具有由以下形成的主链:短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键。这些包含具有吗啉代键的那些(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和磺酰胺主

链;酰胺主链;和其它具有混合的N、O、S和CH₂组分部分的主链。

[0365] 教导制备上述寡核苷的代表性美国专利包含但不限于美国专利第5,034,506号;第5,166,315号;第5,185,444号;第5,214,134号;第5,216,141号;第5,235,033号;第5,64,562号;第5,264,564号;第5,405,938号;第5,434,257号;第5,466,677号;第5,470,967号;第5,489,677号;第5,541,307号;第5,561,225号;第5,596,086号;第5,602,240号;第5,608,046号;第5,610,289号;第5,618,704号;第5,623,070号;第5,663,312号;第5,633,360号;第5,677,437号;以及第5,677,439号,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0366] 在其它实施例中,合适的RNA模拟物被考虑用于RNAi药剂,其中核苷酸单元的糖和核苷间键,即主链被新基团替代。维持碱基单元以与适当的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物(即已示出具有极佳杂交特性的RNA模拟物)被称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中, RNA的糖主链被含酰胺的主链替代,尤其是氨基乙基甘氨酸主链。核碱基被保留并且直接或间接地与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包含但不限于美国专利第5,539,082号;第5,714,331号;以及第5,719,262号,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。适用于本公开的RNAi药剂的另外的PNA化合物在例如Nielsen等人,《科学(Science)》,1991,254,1497-1500中进行了描述。

[0367] 本公开特征的一些实施例包含具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷,特别是上文引用的美国专利第5,489,677号的--CH₂--NH--CH₂--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链],--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--and--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其中天然磷酸二酯主链表示为--O--P--O--CH₂--],以及上文引用的美国专利第5,602,240号的酰胺主链。在一些实施例中,本文特征的RNA具有上文引用的US5,034,506的吗啉代主链结构。

[0368] 经修饰的RNA还可以包括一个或多个经取代的糖部分。本文特征的RNAi药剂,例如dsRNA可以在2'位置处包含以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代的或未经取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。示例性合适的修饰包含O[(CH₂)_n]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m为1至约10。在其它实施例中, dsRNA在2'位置处包含以下之一:C₁至C₁₀低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ON₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入子、用于改善RNAi药剂的药代动力学特性的基团、或用于改善RNAi药剂的药效动力学特性的基团以及具有类似特性的其它取代基。在一些实施例中,修饰包含2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃),也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE(Martin等人,《瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta)》,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基基团。另一个示例性修饰是2'-二甲氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,也称为2'-DMAOE,如下文实例中描述的,以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂。另外的示例性修饰包含:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(这三个家族中的R和S异构体两者);2'-烷氧基烷基;以及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0369] 其它修饰包含2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-O-十六烷基)和2'-氟(2'-F)。类似修饰也可以在RNAi药剂的RNA上的其它位置处进行,具体地,3'末端核苷酸上的糖的3'位置处或2'-5'连接的dsRNA以及5'末端核苷酸的5'位置中。RNAi药剂还可以具有糖模拟物,如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教导此类经修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包含但不限于美国专利第4,981,957号;第5,118,800号;第5,319,080号;第5,359,044号;第5,393,878号;第5,446,137号;第5,466,786号;第5,514,785号;第5,519,134号;第5,567,811号;第5,576,427号;第5,591,722号;第5,597,909号;第5,610,300号;第5,627,053号;第5,639,873号;第5,646,265号;第5,658,873号;第5,670,633号;以及第5,700,920号,其中某些与本申请共同拥有。上述各项的全部内容特此通过引用并入本文。

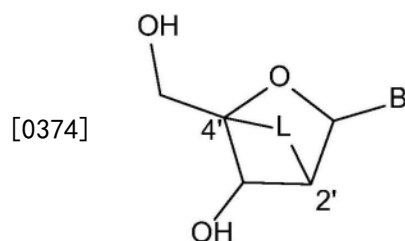
[0370] 本公开的RNAi药剂还可以包含核碱基(在本领域中通常被简称为“碱基”)修饰或取代。如本文所使用的,“未经修饰的”或“天然”核碱基包含嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包含其它合成和天然核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基,具体地5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包含美国专利第3,687,808号中公开的那些,在《生物化学、生物技术和医学中经修饰的核苷(Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine)》,Herdewijn, P. 编辑, Wiley-VCH出版社(Wiley-VCH), 2008年中公开的那些;在《聚合物科学与工程化简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering)》,第858-859页, Kroschwitz, J.L 编辑, 约翰威利父子公司, 1990中公开的那些, Englisch等人, (1991)《化学应用国际版(Angewandte Chemie, International Edition)》, 30:613中公开的那些, 以及Sanghvi, Y. S., 第15章,《dsRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications)》,第289-302页, Crooke, S.T. 和Lebleu, B. 编辑, CRC出版社(CRC Press), 1993中公开的那些。这些核碱基中的某些核碱基对提高本公开特征的寡聚化物的结合亲和力特别有用。这些包含5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包含2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经示出5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性提高0.6°C至1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和Lebleu, B. 编辑,《dsRNA研究与应用》, CRC出版社, 波卡拉顿(Boca Raton), 1993, 第276-278页), 并且是示例性碱基取代, 甚至更具体地在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0371] 教导制备某些上述经修饰的核碱基以及其它经修饰的核碱基的代表性美国专利包含但不限于上述美国专利第3,687,808号、第4,845,205号;第5,130,30号;第5,134,066号;第5,175,273号;第5,367,066号;第5,432,272号;第5,457,187号;第5,459,255号;第5,484,908号;第5,502,177号;第5,525,711号;第5,552,540号;第5,587,469号;第5,594,121号、5,596,091号;第5,614,617号;第5,681,941号;第5,750,692号;第6,015,886号;第6,

147,200号;第6,166,197号;第6,222,025号;第6,235,887号;第6,380,368号;第6,528,640号;第6,639,062号;第6,617,438号;第7,045,610号;第7,427,672号;以及第7,495,088号,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0372] 在一些实施例中,本公开的RNAi药剂也可以被修饰以包含一个或多个双环糖部分。“双环糖”是由两个碳(无论是相邻的或是非相邻的)桥接形成的环修饰的呋喃糖基环。“双环核苷”(“BNA”)是一种具有糖部分的核苷,搜书糖部分包括通过桥接糖环的两个碳(无论是相邻的或是非相邻的)而形成的环,由此形成双环系统。在某些实施例中,桥任选地通过2'-无环氧原子连接糖环的4'-碳和2'-碳。因此,在一些实施例中,本发明的药剂可以包含一种或多种锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包括连接2'和4'碳的额外桥。换言之,LNA是包括双环糖部分的核苷酸,所述双环糖部分包括4'-CH₂-O-2'桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。向siRNA中添加锁定核酸已被证明可增加血清中的siRNA稳定性,并且减少脱靶效应(Elmen, J.等人, (2005)《核酸研究(Nucleic Acids Research)》33(1):439-447;Mook, OR.等人, (2007)《分子癌症治疗学(Mol Canc Ther)》6(3):833-843;Grunweller, A.等人, (2003)《核酸研究》31(12):3185-3193)。用于本发明的多核苷酸的双环核苷的实例包含但不限于包括4'和2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施例中,本发明的反义多核苷酸药剂包含一种或多种包括4'至2'桥的双环核苷。

[0373] 锁核苷可以由以下结构表示(省略立体化学),



[0375] 其中B是核碱基或经修饰的核碱基,并且L是将核糖环的2'-碳与4'-碳连接的连接基团。此类4'至2'桥接的双环核苷的实例包含但不限于4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (也称为“约束乙基”或“cEt”)和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (以及其类似物;参见例如美国专利第7,399,845号); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (以及其类似物;参见例如美国专利第8,278,283号); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (以及其类似物;参见例如美国专利第8,278,425号); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (参见例如美国专利公开第2004/0171570号); 4'-CH₂-N(R)-O-2', 其中R是H、C1-C12烷基或氮保护基团(参见例如美国专利第7,427,672号); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (参见例如Chattopadhyaya等人,《有机化学杂志(J.Org.Chem.)》,2009,74,118-134); 以及4'-CH₂-C(-CH₂)-2' (以及其类似物;参见例如,美国专利第8,278,426号)。上述各项的全部内容特此通过引用并入本文。

[0376] 教导制备锁定核酸核苷酸的其它代表性美国专利和美国专利公开包含但不限于以下:美国专利第6,268,490号;第6,525,191号;第6,670,461号;第6,770,748号;第6,794,499号;第6,998,484号;第7,053,207号;第7,034,133;7,084,125号;第7,399,845号;第7,427,672号;第7,569,686号;第7,741,457号;第8,022,193号;第8,030,467号;第8,278,425号;第8,278,426号;第8,278,283号;US2008/0039618;以及US2009/0012281,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0377] 可以制备具有一种或多种立体化学糖构型的任何前述双环核苷,包含例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0378] iRNA的RNA也可以被修饰以包含一个或多个约束乙基核苷酸。如本文所使用的,“约束乙基核苷酸”或“cEt”为包括包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥(即前述结构中的L)的双环糖部分的锁定核酸。在一个实施例中,约束乙基核苷酸处于本文中称为“S-cEt”的S构象。

[0379] 本发明的iRNA还可以包含一个或多个“构象限制性核苷酸”(“CRN”)。CRN是具有连接核糖的C2'和C4'碳或核糖的C3和-C5'碳的接头的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定为稳定的构象,并且增加对mRNA的杂交亲和力。接头具有足够的长度以将氧放置在稳定性和亲和力的最佳位置,从而导致较少的核糖环褶皱。

[0380] 教导上述某些CRN的制备的代表性出版物包含但不限于美国专利公开第2013/0190383号;以及PCT公开WO 2013/036868,所述文献中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0381] 在一些实施例中,本发明的iRNA包括一种或多种为UNA(解锁核酸)核苷酸的单体。UNA是未锁定的无环核酸,其中糖的任何键都已被去除,形成未锁定的“糖”残基。在一个实例中,UNA还涵盖C1'-C4'之间的键已被去除的单体(即C1'与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一个实例中,糖的C2'-C3'键(即C2'与C3'碳之间的共价碳-碳键)已被去除(参见《核酸研讨会丛刊(Nuc.Acids Symp.Series)》,52,133-134(2008)和Fluiter等人,《分子生物系统(Mol.Biosyst.)》,2009,10,1039,特此通过引用并入)。

[0382] 教导UNA的制备的代表性美国公开包含但不限于美国专利第8,314,227号;以及美国专利公开第2013/0096289号;第2013/0011922号;和第2011/0313020号,所述文献中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0383] 对RNA分子末端的潜在稳定修饰可以包含N-(乙酰氨基己酰基)-4-羟脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟脯氨酸)(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟脯氨酸)(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷酰基-尿苷-3'-磷酸酯、反向2'-脱氧修饰的核糖核苷酸,如反向dT(idT)、反向dA(idA)和反向无碱基2'-脱氧核糖核苷酸(iAb)等。此修饰的公开内容可以在WO 2011/005861中找到。

[0384] 在一个实例中,寡核苷酸的3'或5'末端与反向2'-脱氧修饰的核糖核苷酸连接,如反向dT(idT)、反向dA(idA)或反向无碱基2'-脱氧核糖核苷酸(iAb)。在一个特定实例中,反向2'-脱氧修饰的核糖核苷酸与寡核苷酸的3'端连接,如本文所描述的有义链的3'端,其中连接是通过3'-3'磷酸二酯键或3'-3'-硫代磷酸酯键。

[0385] 在另一个实例中,有义链的3'端通过3'-3'-硫代磷酸酯键与反向无碱基核糖核苷酸(iAb)连接。在另一个实例中,有义链的3'端通过3'-3'-硫代磷酸酯键与反向dA(idA)连接。

[0386] 在一个特定实例中,反向2'-脱氧修饰的核糖核苷酸与寡核苷酸的3'端连接,如本文所描述的有义链的3'端,其中连接是通过3'-3'磷酸二酯键或3'-3'-硫代磷酸酯键。

[0387] 在另一个实例中,有义链的3'末端核苷酸是反向dA(idA),并且通过3'-3'-键(例如,3'-3'-硫代磷酸酯键)与前述核苷酸连接。

[0388] 本发明的iRNA的核苷酸的其它修饰包含5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物,例如iRNA的反义链上的5'末端磷酸酯或磷酸酯模拟物。合适的磷酸酯模拟物公开于例如美国专利公开

第2012/0157511号中,所述美国专利公开的全部内容通过引用并入本文。

[0389] A.包括本公开的基序的经修饰RNAi药剂

[0390] 在本公开的某些方面,本公开的双链RNAi药剂包含具有化学修饰的药剂,如在例如W0 2013/075035中公开的,所述文献中的全部内容通过引用并入本文。如本文和W0 2013/075035所示,通过将在三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的一个或多个基序引入RNAi药剂的有义链或反义链,特别是在切割位点处或附近,可以获得优异的结果。在一些实施例中,RNAi药剂的有义链和反义链可以以其它方式被完全修饰。这些基序的引入中断了有义或反义链的修饰模式(如果存在的话)。RNAi药剂可以任选地与亲脂性配体缀合,例如C16配体,例如在有义链上。RNAi药剂可以任选地用(S)-乙二醇核酸(GNA)修饰来修饰,例如在反义链的一个或多个残基上。产生的RNAi药剂呈现出优异的基因沉默活性。

[0391] 因此,本公开提供了能够在体内抑制靶基因(即HTT基因)的表达的双链RNAi药剂。RNAi药剂包括有义链和反义链。RNAi药剂的每条链可以是长度为15个至30个核苷酸。例如,每条链可以是长度为16个至30个核苷酸、长度为17个至30个核苷酸、长度为25个至30个核苷酸、长度为27个至30个核苷酸、长度为17个至23个核苷酸、长度为17个至21个核苷酸、长度为17个至19个核苷酸、长度为19个至25个核苷酸、长度为19个至23个核苷酸、长度为19个至21个核苷酸、长度为21个至25个核苷酸或长度为21个至23个核苷酸。在某些实施例中,每条链的长度为19个至23个核苷酸。

[0392] 有义链和反义链通常形成双链体双链RNA(“dsRNA”),本文也称为“RNAi药剂”RNAi药剂的双链体区的长度可以是15个至30个核苷酸对。例如,双链体区可以是长度为16个至30个核苷酸对、长度为17个至30个核苷酸对、长度为27个至30个核苷酸对、长度为17个至23个核苷酸对、长度为17个至21个核苷酸对、长度为17个至19个核苷酸对、长度为19个至25个核苷酸对、长度为19个至23个核苷酸对、长度为19个至21个核苷酸对、长度为21个至25个核苷酸对或长度为21个至23个核苷酸对。在另一个实例中,双链体区的长度选自15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个和27个核苷酸。在优选实施例中,双链体区的长度为19个至21个核苷酸对。

[0393] 在一个实施例中,RNAi药剂可以在一条或两条链的3'端、5'端或两端含有一个或多个突出端区或封端基团。突出端的长度可以为1个至6个核苷酸,例如长度为2个至6个核苷酸、长度为1个至5个核苷酸、长度为2个至5个核苷酸、长度为1个至4个核苷酸、长度为2个至4个核苷酸、长度为1个至3个核苷酸、长度为2个至3个核苷酸或长度为1个至2个核苷酸。在优选实施例中,核苷酸突出端区的长度为2个核苷酸。突出端可以是一条链比另一条链长的结果,或是两条相同长度的链交错的结果。突出端可以与靶mRNA形成错配,或其可以与被靶向的基因序列互补,或可以是另一个序列。第一链和第二链也可以连接,例如通过另外的碱基形成发夹,或通过其它非碱基接头。

[0394] 在一个实施例中,RNAi药剂的突出端区中的核苷酸可以各自独立地是经修饰的或未经修饰的核苷酸,包含但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-O-甲基、胸苷(T)以及其任何组合。

[0395] 例如,TT可以是任一条链上任一端的突出端序列。突出端可以与靶mRNA形成错配,或其可以与被靶向的基因序列互补,或可以是另一个序列。

[0396] RNAi药剂的有义链、反义链或两条链上的5'或3'突出端可以被磷酸化。在一些实

施例中,突出端区含有在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯的两个核苷酸,其中两个核苷酸可以是相同的或不同的。在一个实施例中,突出端存在于有义链、反义链或两条链的3'端处。在一个实施例中,这种3'突出端存在于反义链中。在一个实施例中,这种3'突出端存在于有义链中。

[0397] RNAi试剂可能只含有单个突出端,这可以增强RNAi的干扰活性,而不会影响其整体稳定性。例如,单链突出端可以位于有义链的3'末端处,或可替代地,位于反义链的3'末端处。RNAi也可能具有平端,位于反义链的5'端(或有义链的3'端)处,反之亦然。通常,RNAi的反义链在3'端处有核苷酸突出端,并且5'端是平的。虽然不希望受理论的束缚,但反义链5'端的不对称平端和反义链3'端突出端有利于引导链装载到RISC过程中。

[0398] 在一个实施例中,RNAi试剂是长度为19个核苷酸的双端钝化剂,其中所述有义链在从5'端开始的位置7、8、9处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在从5'端开始的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0399] 在另一个实施例中,RNAi试剂是长度为20个核苷酸的双端钝化剂,其中所述有义链在从5'端开始的位置8、9、10的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在从5'端开始的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0400] 在又一个实施例中,RNAi试剂是长度为21个核苷酸的双端钝化剂,其中所述有义链在从5'端开始的位置9、10、11处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序。反义链在从5'端开始的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0401] 在一个实施例中,RNAi试剂包括21个核苷酸的有义链和23个核苷酸的反义链,其中所述有义链在从5'端开始的位置9、10、11处的三个连续核苷酸上含有三个2'-F修饰的至少一个基序;所述反义链在从5'端开始的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序,其中所述RNAi试剂的一端是平的,而另一端包括2个核苷酸的突出端。优选地,2个核苷酸的突出端位于反义链的3'端处。当2个核苷酸的突出端位于反义链的3'端处时,在末端三个核苷酸之间可能存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。在一个实施例中,RNAi试剂在有义链的5'端和反义链的5'端两者的末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施例中,RNAi试剂的有义链和反义链中的每个核苷酸,包含为基序一部分的核苷酸,都是经修饰的核苷酸。在一个实施例中,每个残基用2'-O-甲基或3'-氟独立地修饰,例如在交替基序中。任选地,RNAi试剂进一步包括配体(例如,亲脂性配体,任选地C16配体)。

[0402] 在一个实施例中,RNAi试剂包括有义链和反义链,其中所述有义链的长度为25个至30个核苷酸残基,其中从第一链的5'末端核苷酸(位置1)位置1开始至位置23,包括至少8个核糖核苷酸;反义链的长度为36个至66个核苷酸残基,并且从3'末端核苷酸开始,在与有义链的位置1至23配对以形成双链体的位置中包括至少8个核糖核苷酸;其中至少反义链的3'末端核苷酸与有义链不配对,并且至多6个连续3'末端核苷酸与有义链不配对,由此形成1个至6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包括10个至30个与有义链不配对的

连续核苷酸,由此形成10个至30个核苷酸单链5'突出端;其中当有义链和反义链比对以获得最大互补性时,至少有义链5'末端和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,由此在有义链与反义链之间形成基本上双链的区;并且反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补,以在将双链核酸引入哺乳动物细胞时减少靶基因表达;并且其中所述有义链含有在三个连续核苷酸上的三个2'-F修饰的至少一个基序,其中至少一个所述基序出现在切割位点处或附近。反义链在切割位点处或其附近的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0403] 在一个实施例中, RNAi 药剂包括有义链和反义链, 其中所述 RNAi 药剂包括长度为至少25个和最多29个核苷酸的第一链和长度为最多30个核苷酸的第二链, 在从5'端起的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序; 其中所述第一链的3'端和所述第二链的5'端形成平端, 并且所述第二链在其3'端处比所述第一链长1个至4个核苷酸, 其中所述双链体区的长度为至少25个核苷酸, 并且所述第二链沿着所述第二链长度的至少19个核苷酸与靶 mRNA 充分互补, 以在将所述 RNAi 药剂引入哺乳动物细胞中时减少靶基因表达, 并且其中所述 RNAi 药剂的 dicer 切割优先地产生包括所述第二链的3'端的 siRNA, 由此减少所述靶基因在哺乳动物中的表达。任选地, RNAi 药剂进一步包括配体。

[0404] 在一个实施例中, RNAi 药剂的有义链含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的至少一个基序, 其中一个基序出现在有义链中的切割位点处。

[0405] 在一个实施例中, RNAi 药剂的反义链也可以含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的至少一个基序, 其中一个基序出现在反义链中的切割位点处或附近。

[0406] 对于具有长度为17个至23个核苷酸的双链体区的 RNAi 药剂, 反义链的切割位点通常在距离5'端的10、11和12位置附近。因此, 三个相同修饰的基序可以出现在反义链的9、10、11位置; 10、11、12位置; 11、12、13位置; 12、13、14位置; 或13、14、15位置, 计数从反义链的5'端的第1个核苷酸开始, 或计数从反义链的5'端双链体区内的第1个配对核苷酸开始。反义链中的切割位点也可以根据 RNAi 的双链体区从5'端开始的长度而改变。

[0407] RNAi 药剂的有义链可以在链的切割位点处的三个连续核苷酸上含有三个相同修饰的至少一个基序; 并且反义链可以在链的切割位点处或附近的三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当有义链和反义链形成 dsRNA 双链体时, 有义链与反义链可以如此排列, 使得有义链上的三个核苷酸的一个基序与反义链上的三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠, 即有义链中的基序的三个核苷酸中的至少一个与反义链中基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。可替代地, 至少两个核苷酸可以重叠, 或所有三个核苷酸都可以重叠。

[0408] 在一个实施例中, RNAi 药剂的有义链可以含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的多于一个的基序。第一个基序可以出现在链的切割位点处或附近, 并且其它基序可以是翼修饰。本文中的术语“翼修饰”是指出现在链的另一部分处的基序, 所述部分在同一链的切割位点处或附近与基序分离。翼修饰要么与第一基序相邻, 或被至少一个或多个核苷酸分开。当基序彼此紧邻时, 则基序的化学性质彼此不同, 并且当基序由一个或多个核苷酸分开时, 化学性质可以相同或不同。可能存在两个或更多个翼修饰。例如, 当存在两个翼修饰时, 每个翼修饰可以出现在相对于第一基序的一端, 所述第一基序位于切割位点处或附

近,或在前导基序的任一侧。

[0409] 与有义链一样, RNAi 药剂的反义链可以含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的多于一个基序, 其中至少一个基序出现在链的切割位点处或附近。此反义链还可以含有与可能存在于有义链上的翼修饰相似的排列的一个或多个翼修饰。

[0410] 在一个实施例中, RNAi 药剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的 3' 端、5' 端或两端处的第一个或前两个末端核苷酸。

[0411] 在另一个实施例中, RNAi 药剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的 3' 端、5' 端或两端处双链体区内的第一个或前两个配对核苷酸。

[0412] 当 RNAi 药剂的有义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时, 翼修饰可以落在双链体区的同一端, 并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0413] 当 RNAi 药剂的有义链和反义链各自含有至少两个翼修饰时, 有义链和反义链可以如此排列, 使得各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的一端, 具有一个、两个或三个核苷酸的重叠; 各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的另一端, 具有一个、两个或三个核苷酸的重叠; 两个修饰一条链落在前导基序的每一侧, 在双链体区中具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0414] 在一个实施例中, RNAi 药剂包括与靶标、在双链体内或其组合的错配。所述错配可能发生在突出端区或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或熔化的倾向进行排序 (例如, 根据特定配对的缔合或离解的自由能, 最简单的方法是在单个配对的基础上检查配对, 尽管也可以使用下一个临近点或类似分析)。在促进解离方面: A:U 优于 G:C; G:U 优于 G:C; 并且 I:C 优于 G:C (I = 肌苷)。错配, 例如非规范或规范外配对 (如本文其它地方所述) 优于规范 (A:T、A:U、G:C) 配对; 并且包含通用碱基的配对优于规范配对。

[0415] 在一个实施例中, RNAi 药剂在从反义链的 5' 端开始的双链体区内包括前 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个碱基对中的至少一个, 所述双链体区独立地选自以下的组: A:U、G:U、I:C 和错配对, 例如非规范或规范外配对或包含通用碱基的配对, 以促进双链体的 5' 端处反义链的解离。

[0416] 在一个实施例中, 反义链中从 5' 端开始的双链体区内 1 位置处的核苷酸选自由以下组成的组: A、dA、dU、U 和 dT。可替代地, 从反义链的 5' 端开始的双链体区内的前 1 个、2 个或 3 个碱基对中的至少一个是 AU 碱基对。例如, 从反义链 5' 端起的双链体区内的第一个碱基对是 AU 碱基对。

[0417] 在另一个实施例中, 有义链的 3' 端处的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶 (dT)。在另一个实施例中, 反义链的 3' 端处的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶 (dT)。在一个实施例中, 存在脱氧胸腺嘧啶核苷酸的短序列, 例如, 在有义链或反义链的 3' 端上有两个 dT 核苷酸。

[0418] 在一个实施例中, 有义链序列可以由式 (I) 表示:

[0419] $5' n_p - N_a - (X \ X \ X)_i - N_b - Y \ Y \ Y - N_b - (Z \ Z \ Z)_j - N_a - n_q \ 3' \text{ (I)}$

[0420] 其中:

[0421] i 和 j 各自独立地为 0 或 1;

[0422] p 和 q 各自独立地为 0 至 6;

[0423] 每个 N_a 独立地表示包括 0 个至 25 个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列, 每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

- [0424] 每个 N_b 独立地表示包括0个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；
- [0425] 每个 n_p 和 n_q 独立地表示突出端核苷酸；
- [0426] 其中 N_b 和 Y 不具有相同的修饰；并且
- [0427] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。优选地，YYY全部是2'-F修饰的核苷酸。
- [0428] 在一个实施例中， N_a 或 N_b 包括交替模式的修饰。
- [0429] 在一个实施例中，YYY基序出现在有义链的切割位点处或附近。例如，当RNAi药剂具有长度为17个至23个核苷酸的双链体区时，YYY基序可以出现在有义链的切割位点处或附近（例如，可以出现在位置6、7、8；7、8、9；8、9、10；9、10、11；10、11、12或11、12、13处），计数从第1个核苷酸开始，从5'端开始；或任选地，计数从5'端开始，从双链体区内的第1配对核苷酸开始。
- [0430] 在一个实施例中， i 是1并且 j 是0，或 i 是0并且 j 是1，或 i 和 j 两者都是1。因此，有义链可以由下式表示：
- [0431] $5'n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q\ 3'$ (Ib)；
- [0432] $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q\ 3'$ (Ic)；或
- [0433] $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q\ 3'$ (Id)。
- [0434] 当有义链由式 (Ib) 表示时， N_b 表示包括0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0435] 每个 N_a 可以独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0436] 当有义链表示为式 (Ic) 时， N_b 表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 可以独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0437] 当有义链表示为式 (Id) 时每个 N_b 独立地表示包括0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地， N_b 为0、1、2、3、4、5或6。每个 N_a 可以独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0438] X、Y和Z中的每一个可以彼此相同或不同。
- [0439] 在其它实施例中， i 是0并且 j 是0，并且有义链可以由下式表示：
- [0440] $5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q\ 3'$ (Ia)。
- [0441] 当有义链由式 (Ia) 表示时，每个 N_a 可以独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0442] 在一个实施例中，RNAi的反义链序列可以由式 (II) 表示：
- [0443] $5'n_q-N_a'-(Z'Z'Z')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(X'X'X')_l-N_a'-n_p'\ 3'$ (II)
- [0444] 其中：
- [0445] k 和 l 各自独立地为0或1；
- [0446] p' 和 q' 各自独立地为0至6；
- [0447] 每个 N_a' 独立地表示包括0个至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸；

- [0448] 每个 N_b' 独立地表示包括0个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；
- [0449] 每个 n_p' 和 n_q' 独立地表示突出端核苷酸；
- [0450] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同的修饰；
- [0451] 并且
- [0452] $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。
- [0453] 在一个实施例中， N_a' 或 N_b' 包括交替模式的修饰。
- [0454] $Y'Y'Y'$ 基序出现在反义链的切割位点处或附近。例如，当RNAi药剂具有长度为17个至23个核苷酸的双链体区时， $Y'Y'Y'$ 基序可以出现在反义链的位置9、10、11；10、11、12；11、12、13；12、13、14；或13、14、15处，计数从第1个核苷酸开始，从5'端开始；或任选地，计数从5'端开始，从双链体区内的第1配对核苷酸开始。优选地， $Y'Y'Y'$ 基序出现在位置11、12、13处。
- [0455] 在一个实施例中， $Y'Y'Y'$ 基序全部是2'-OMe修饰的核苷酸。
- [0456] 在一个实施例中，k是1并且l是0，或k是0并且l是1，或k和l两者都是1。
- [0457] 因此，反义链可以由下式表示：
- [0458] $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p,3'$ (IIb)；
- [0459] $5'n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p,3'$ (IIc)；或
- [0460] $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p,3'$ (IId)。
- [0461] 当反义链表示由式(IIb)表示时， N_b' 表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0462] 当反义链表示为式(IIc)时， N_b' 表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0463] 当反义链表示为式(IId)时，每个 N_b' 独立地表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a' 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地， N_b' 为0、1、2、3、4、5或6。
- [0464] 在其它实施例中，k是0并且l是0，并且反义链可以由下式表示：
- [0465] $5'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q,3'$ (Ia)。
- [0466] 当反义链表示为式(IIa)时，每个 N_a' 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0467] X' 、 Y' 和 Z' 中的每一个可以彼此相同或不同。
- [0468] 有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地用LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟修饰。例如，有义链和反义链的每个核苷酸独立地用2'-O-甲基或2'-氟修饰。特别地，每个X、Y、Z、X'、Y'和Z'可以表示2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。
- [0469] 在一个实施例中，当双链体区为21nt时，RNAi药剂的有义链可以含有出现在链的9、10和11位置处的YYY基序，计数从5'端的第1个核苷酸开始，或任选地，计数从5'端的双链

体区内的第1配对核苷酸开始;并且Y表示2'-F修饰。有义链可以另外含有XXX基序或ZZZ基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0470] 在一个实施例中,反义链可以含有出现在链的位置11、12、13处的Y'Y'Y'基序,计数从5'端的第1个核苷酸开始,或任选地,计数从5'端的双链体区内的第1配对核苷酸开始;并且Y'表示2'-O-甲基修饰。反义链可以另外含有X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0471] 由上述式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中的任一个表示的有义链与分别由式(IIa)、(IIb)、(IIc)和(IId)中的任一个表示的反义链形成双链体。

[0472] 因此,用于本公开的方法中的RNAi药剂可以包括有义链和反义链,每条链具有14个至30个核苷酸, RNAi双链体由式(III)表示:

[0473] 有义: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

[0474] 反义: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$

[0475] (III)

[0476] 其中:

[0477] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0478] p、p'、q和q'各自独立地为0至6;

[0479] 每个 N_a 和 N_a' 独立地表示包括0个至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0480] 每个 N_b 和 N_b' 独立地表示包括0个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0481] 其中

[0482] 每个可能存在或不存在的 n_p' 、 n_p 、 n_q' 和 n_q 独立地表示突出端核苷酸;并且

[0483] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。

[0484] 在一个实施例中,i是0并且j是0;或i是1并且j是0;或i是0并且j是1;或i和j两者都是0;或i和j两者都是1。在另一个实施例中,k是0并且l是0;或k是1并且l是0;k是0并且l是1;或k和l两者都是0;或k和l两者都是1。

[0485] 形成RNAi双链体的有义链和反义链的示例性组合包含下式:

[0486] $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0487] $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$

[0488] (IIIa)

[0489] $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0490] $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$

[0491] (IIIb)

[0492] $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

[0493] $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$

[0494] (IIIc)

[0495] $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

[0496] $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$

[0497] (IIIId)

[0498] 当RNAi药剂由式(IIIa)表示时,每个 N_a 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0499] 当RNAi药剂由式(IIIb)表示时,每个 N_b 独立地表示包括1个至10个、1个至7个、1个至5个或1个至4个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0500] 当RNAi药剂表示为式(IIIc)时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0501] 当RNAi药剂表示为式(IIId)时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示包括0个至10个、0个至7个、0个至10个、0个至7个、0个至5个、0个至4个、0个至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 N_a 、 N_a' 独立地表示包括2个至20个、2个至15个或2个至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。 N_a 、 N_a' 、 N_b 和 N_b' 中的每一个独立地包括交替模式的修饰。

[0502] 在一个实施例中,当RNAi药剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰。在另一个实施例中,当RNAi药剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰,并且 $n_p' > 0$,并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸a连接。在又一个实施例中,当RNAi药剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰,并且 $n_p' > 0$,并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,并且有义链与通过二价或三价支链接头(下文描述的)连接的一个或多个C16(或相关)部分缀合。在另一个实施例中,当RNAi药剂由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰,并且 $n_p' > 0$,并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,有义链包括至少一个硫代磷酸酯键,并且有义链任选地与通过二价或三价支链接头连接的一个或多个亲脂性,例如C16(或相关)部分缀合。

[0503] 在一个实施例中,当RNAi药剂由式(IIIa)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰,并且 $n_p' > 0$,并且至少一个 n_p' 通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,有义链包括至少一个硫代磷酸酯键,并且有义链与通过二价或三价支链接头连接的一个或多个亲脂性,例如C16(或相关)部分缀合。

[0504] 在一个实施例中, RNAi药剂是含有至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚体,其中所述双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地,多聚体进一步包括配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每个双链体可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

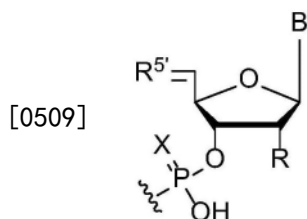
[0505] 在一个实施例中, RNAi药剂是含有三个、四个、五个、六个或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚体,其中所述双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地,多聚体进一步包括配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每个双链体可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

[0506] 在一个实施例中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的两种RNAi药剂在5'端处以及一个或两个3'处彼此连接,并且任选地与配体缀合。每种药剂可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每种药剂可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

[0507] 各种出版物描述了可以用于本公开的方法的多聚体RNAi药剂。此类出版物包含W02007/091269、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887和W02011/031520;以及US

7858769,所述文献中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0508] 在某些实施例中,本公开的组合物和方法包含如本文所描述的RNAi药剂的乙烯基磷酸酯(VP)修饰。在示例性实施例中,本公开的5'乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸具有以下结构:



[0510] 其中X为O或S;

[0511] R是氢、羟基、氟或 C_{1-20} 烷氧基(例如,甲氧基或正十六烷氧基);

[0512] $R^{5'}$ 是 $=C(H)-P(O)(OH)_2$,并且C5'碳与 $R^{5'}$ 之间的双键处于E或Z方向(例如,E方向);并且

[0513] B是核碱基或经修饰的核碱基,任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0514] 在一个实施例中, $R^{5'}$ 是 $=C(H)-P(O)(OH)_2$,并且C5'碳与 $R^{5'}$ 之间的双键处于E方向。在另一个实施例中,R是甲氧基并且 $R^{5'}$ 是 $=C(H)-P(O)(OH)_2$,并且C5'碳与 $R^{5'}$ 之间的双键处于E方向。在另一个实施例中,X是S,R是甲氧基并且 $R^{5'}$ 是 $=C(H)-P(O)(OH)_2$,并且C5'碳与 $R^{5'}$ 之间的双键处于E方向。

[0515] 本公开的乙烯基磷酸酯可以与本公开的dsRNA的反义链或有义链连接。在某些实施例中,本公开的乙烯基磷酸酯与dsRNA的反义链连接,任选地在dsRNA反义链的5'端处。

[0516] 乙烯基磷酸酯修饰也设想用于本公开的组合物和方法。示例性乙烯基磷酸酯结构包含前述结构,其中 $R^{5'}$ 是 $=C(H)-OP(O)(OH)_2$,并且C5'碳与 $R^{5'}$ 之间的双键处于E或Z方向(例如,E方向)。

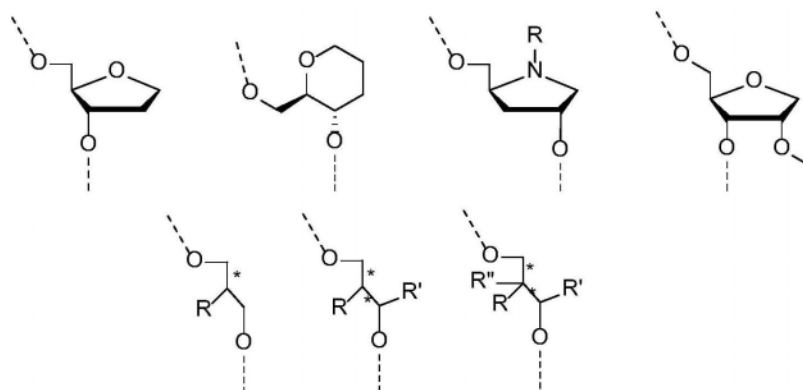
[0517] i. 热不稳定修饰

[0518] 在某些实施例中,dsRNA分子可以通过在反义链的种子区(即反义链5'-端的位置2至9)掺入热不稳定修饰来优化RNA干扰,以减少或抑制脱靶基因沉默。已经发现,具有反义链的dsRNA具有降低脱靶基因沉默活性的作用,所述反义链包括前9个核苷酸位置内的双链体的至少一个热不稳定修饰,从所述反义链的5'端开始计数。因此,在一些实施例中,反义链在反义链的5'区的前9个核苷酸位置内包括至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)双链体的热不稳定修饰。在一些实施例中,双链体的一个或多个热不稳定修饰位于从反义链5'-端起的位置2至9处,或优选地位置4至8。在一些另外的实施例中,双链体的热不稳定修饰位于从反义链的5'端起的位置6、7或8处。在仍一些另外的实施例中,双链体的热不稳定修饰位于从反义链的5'端起的位置7处。术语“热不稳定修饰”包含将导致dsRNA的总熔融温度(T_m)低于(优选地, T_m 低一度、两度、三度或四度)没有此类修饰的dsRNA的 T_m 的修饰。在一些实施例中,双链体的热不稳定修饰位于从反义链的5'端起的位置2、3、4、5或9处。

[0519] 热不稳定修饰可以包含但不限于无碱基修饰;与相对链中的相对核苷酸的错配;以及糖修饰,如2'-脱氧修饰、无环核苷酸,例如解锁核酸(UNA)或乙二醇核酸(GNA);以及2'-5'-连接的核糖核苷酸(“3'-RNA”)。

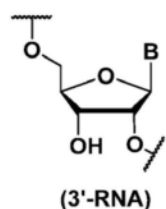
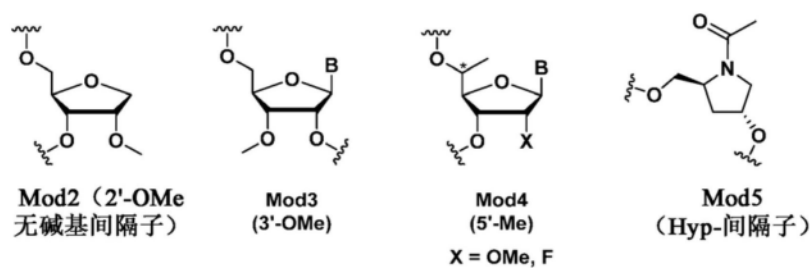
[0520] 例示的无碱基修饰包含但不限于以下:

[0521]



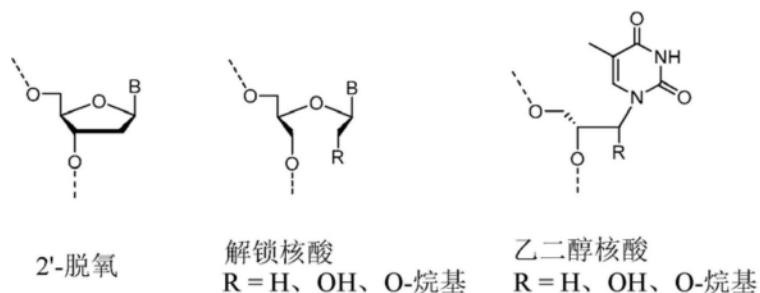
[0522] 其中R=H、Me、Et或OMe; R'=H、Me、Et或OMe; R''=H、Me、Et或OMe

[0523]

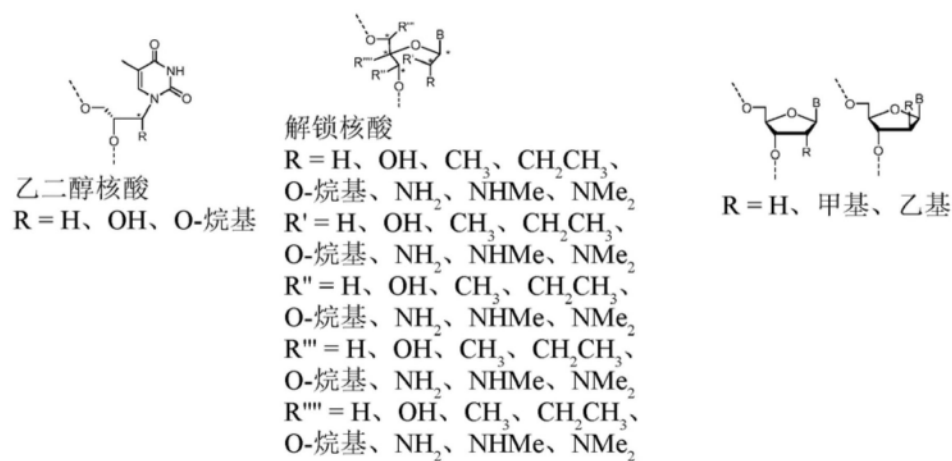


[0524] 其中B是经修饰的或未经修饰的核碱基。

[0525] 例示的糖修饰包含但不限于以下:

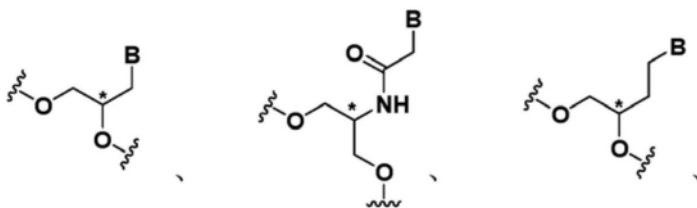


[0526]

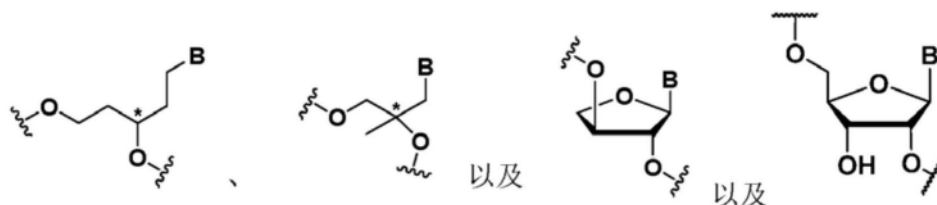


[0527] 其中B是经修饰的或未经修饰的核碱基。

[0528] 在一些实施例中,双链体的热不稳定修饰选自自由以下组成的组:

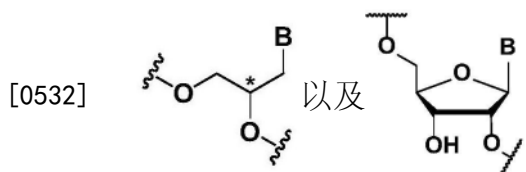


[0529]



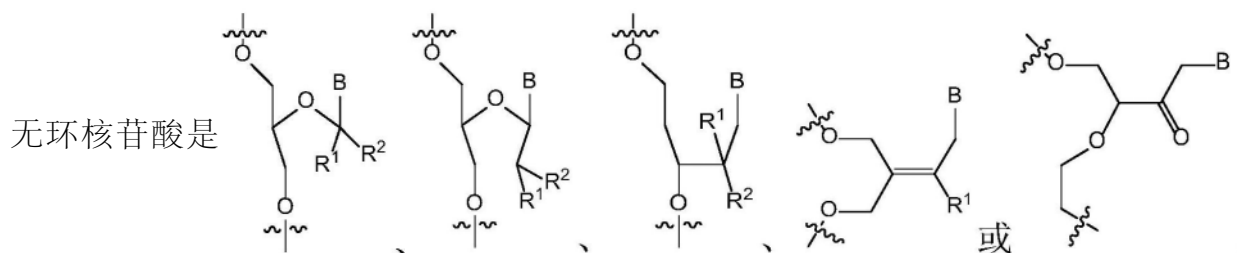
[0530] 其中B是经修饰的或未经修饰的核碱基,并且每个结构上的星号表示R、S或外消旋。

[0531] 在一些实施例中,双链体的热不稳定修饰选自自由以下组成的组:



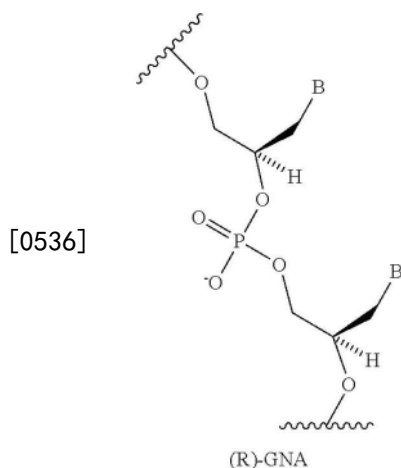
[0533] 其中B是经修饰的或未经修饰的核碱基,并且星号表示R、S或外消旋(例如,S)。

[0534] 术语“无环核苷酸”是指具有无环核糖糖的任何核苷酸,例如其中核糖碳之间的任何键(例如,C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'或C1'-O4')不存在或核糖碳或氧中的至少一个(例如,C1'、C2'、C3'、C4'或O4')独立地或组合地不存在于核苷酸中。在一些实施例中,



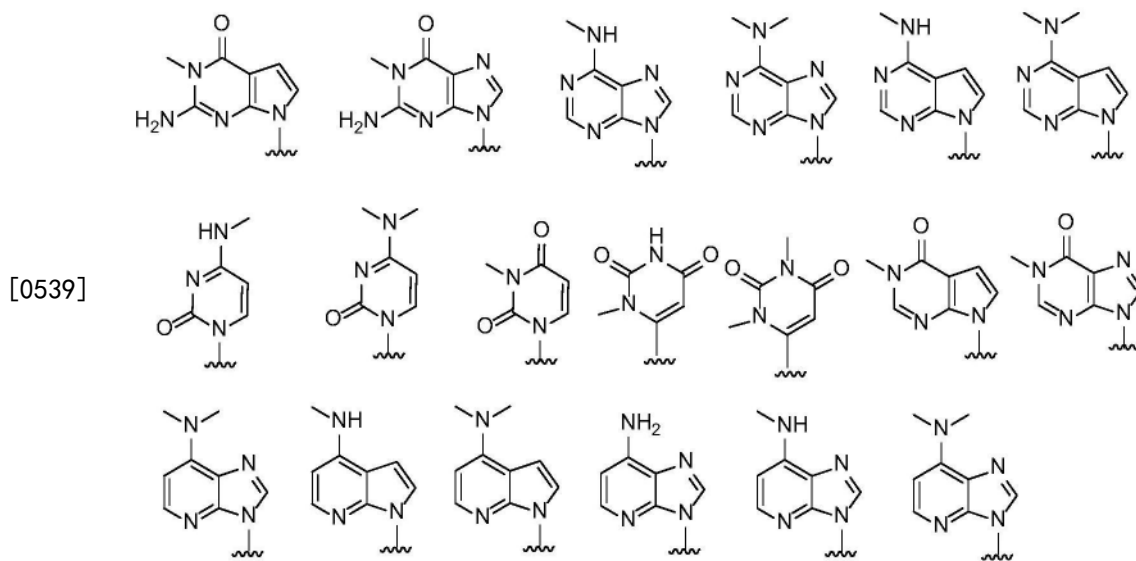
其中B是经修饰的或未经修饰的核碱基, R^1 和 R^2 独立地为H、卤素、 OR_3 或烷基;并且 R_3 是H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖。术语“UNA”是指解锁无环核酸,其中糖的任何键都已被去除,形成解锁“糖”残基。在一个实例中,UNA还涵盖C1'-C4'之间的键被去除的单体(即C1'与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一个实例中,糖的C2'-C3'键(即C2'与C3'碳之间的共价碳-碳键)被去除(参见Mikhailov等人,《四面体快报(Tetrahedron Letters)》,26(17):2059(1985);以及Fluiter等人,《分子生物系统(Mol.Biosyst.)》,10:1039(2009),所述文献特此通过全文引用的方式并入本文)。无环衍生物在不影响沃森-克里克配对的情况下提供了更大的主链灵活性。无环核苷酸可以通过2'-5'或3'-5'键连接。

[0535] 术语“GNA”是指乙二醇核酸,所述乙二醇核酸是一种类似于DNA或RNA的聚合物,但其“主链”的组成不同,因为其由磷酸二酯键连接的重复甘油单元组成:



[0537] 双链体的热不稳定修饰可以是热不稳定核苷酸与dsRNA双链体内相对链中的相对核苷酸之间的错配(即非互补碱基对)。示例性错配碱基对包含G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T、U:T或其组合。本领域已知的其它错配碱基配对也适用于本发明。错配可以发生在为天然存在的核苷酸或经修饰的核苷酸的核苷酸之间,即错配碱基配对可以发生在来自相应的核苷酸的核碱基之间,而与核苷酸的核糖糖上的修饰无关。在某些实施例中,dsRNA分子在错配配对中含有至少一个核碱基,所述核碱基为2'-脱氧核碱基;例如2'-脱氧核碱基是在有义链中。

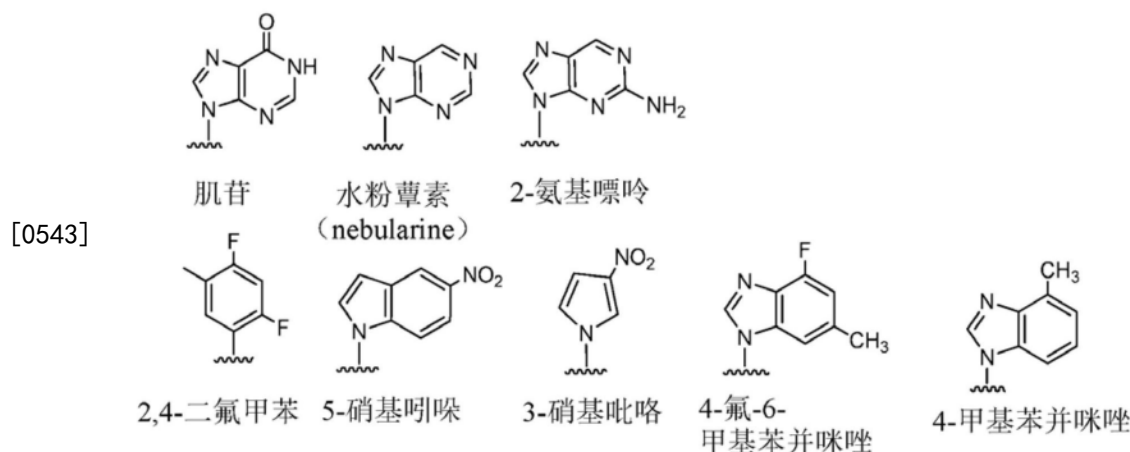
[0538] 在一些实施例中,反义链的种子区中的双链体的热不稳定修饰包含与靶mRNA上的互补碱基具有受损W-C-H-键合的核苷酸,如:



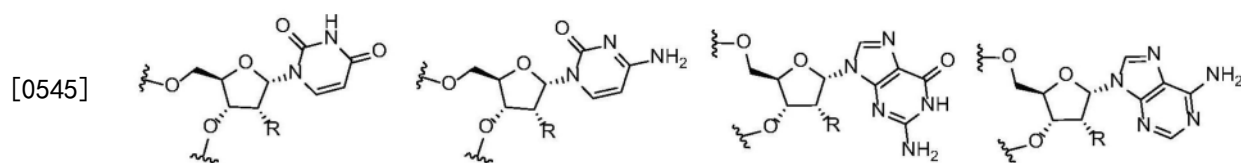
[0540] 在W0 2011/133876中详细描述了无碱基核苷酸、无环核苷酸修饰(包含UNA和GNA)和错配修饰的更多实例,所述文献通过全文引用的方式并入本文。

[0541] 热不稳定修饰还可以包含减少的或消除了与相对碱基形成氢键的能力的通用碱基和磷酸酯修饰。

[0542] 在一些实施例中,双链体的热不稳定修饰包含具有非规范碱基的核苷酸,如但不限于具有受损的或完全消除了与相对链中的碱基形成氢键的能力的核碱基修饰。已经评估了这些核碱基修饰对dsRNA双链体的中心区的不稳定,如W0 2010/0011895中所描述的,所述文献通过全文引用的方式并入本文。示例性核碱基修饰是:

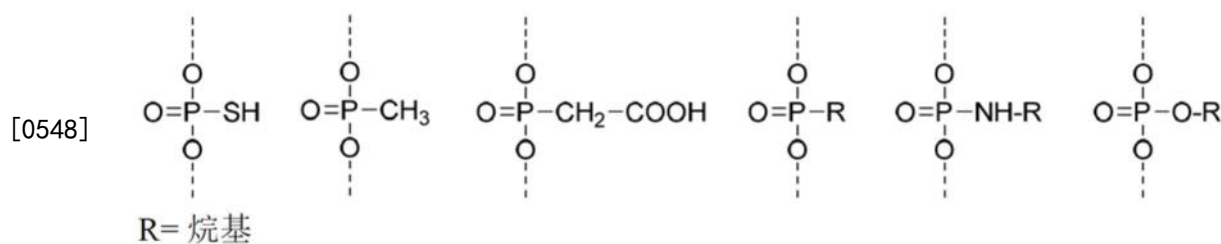


[0544] 在一些实施例中,反义链的种子区中的双链体的热不稳定修饰包含与靶mRNA上的碱基互补的一个或多个 α -核苷酸,如:



[0546] 其中R是H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂或O-烷基。

[0547] 与天然磷酸二酯键相比,已知降低dsRNA双链体热稳定性的示例性磷酸酯修饰是:



[0549] R基团的烷基可以是C₁-C₆烷基。R基团的具体烷基包含但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基和己基。

[0550] 如本领域技术人员将认识到的,鉴于核碱基的功能作用是定义本公开的RNAi药剂的特异性,而核碱基修饰可以以如本文所描述的各种方式进行,例如将不稳定修饰引入本公开的RNAi药剂中,例如为了相对于脱靶效应增强在靶效应,对于非核碱基修饰,例如对多核糖核苷酸的糖基或磷酸酯主链的修饰,本公开的RNAi药剂上可用的和通常存在的修饰的范围往往要大得多。此类修饰在本公开的其它部分中进行了更详细的描述,并且明确考虑用于本公开的RNAi药剂,其具有如上所述或本文其它地方所述的天然核碱基或经修饰的核碱基。

[0551] 除了包括热不稳定修饰的反义链外,dsRNA还可以包括一个或多个稳定修饰。例如,dsRNA可以包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。不受限制地,所有稳定修饰都可以存在于一条链中。在一些实施例中,有义链和反义链两者均包括至少两个稳定修饰。稳定修饰可以发生在有义链或反义链的任何核苷酸上。例如,稳定修饰可以发生在有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个稳定修饰可以在有义链或反义链上以交替模式发生;或有义链或反义链两者包括交替模式的稳定修饰。有义链上的稳定修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上稳定修饰的

交替模式可以相对于反义链上稳定修饰的交替模式具有偏移。

[0552] 在一些实施例中,反义链包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。不受限制地,反义链中的稳定修饰可以存在于任何位置处。在一些实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、6、8、9、14和16处的稳定修饰。在一些其它实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、6、14和16处的稳定修饰。在仍一些其它实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、14和16处的稳定修饰。

[0553] 在一些实施例中,反义链包括与不稳定修饰相邻的至少一个稳定修饰。例如,稳定修饰可以是不稳定修饰的5'端或3'端处的核苷酸,即距离不稳定修饰的位置-1或+1的位置处。在一些实施例中,反义链包括不稳定修饰的5'端和3'端中的每一个处的稳定修饰,即从距离不稳定修饰的位置-1和+1的位置。

[0554] 在一些实施例中,反义链包括不稳定修饰的3'端处的至少两个稳定修饰,即距离不稳定修饰的位置+1或+2的位置处。

[0555] 在一些实施例中,有义链包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)稳定修饰。不受限制地,有义链中的稳定修饰可以存在于任何位置处。在一些实施例中,有义链包括从5'端起的位置7、10和11处的稳定修饰。在一些其它实施例中,有义链包括从5'端起的位置7、9、10和11处的稳定修饰。在一些实施例中,有义链包括从反义链的5'端开始计数,与反义链的位置11、12和15相对或互补的位置处的稳定修饰。在一些其它实施例中,有义链包括从反义链的5'端开始计数,与反义链的位置11、12、13和15相对或互补的位置处的稳定修饰。在一些实施例中,有义链包括两个、三个或四个稳定修饰的嵌段。

[0556] 在一些实施例中,有义链不包括与反义链中的双链体的热不稳定修饰相对或互补的位置中的稳定修饰。

[0557] 示例性的热稳定修饰包含但不限于2'-氟修饰。其它热稳定修饰包含但不限于LNA。

[0558] 在一些实施例中,本公开的dsRNA包括至少四个(例如,四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。不受限制地,所有2'-氟核苷酸都可以存在于一条链中。在一些实施例中,有义链和反义链两者均包括至少两个2'-氟核苷酸。2'-氟修饰可以发生在有义链或反义链的任何核苷酸上。例如,2'-氟修饰可以发生在有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个2'-氟修饰可以在有义链或反义链上以交替模式发生;或有义链或反义链两者包括交替模式的2'-氟修饰。有义链上的2'-氟修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上2'-氟修饰的交替模式可以相对于反义链上2'-氟修饰的交替模式具有偏移。

[0559] 在一些实施例中,反义链包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。不受限制地,反义链中的2'-氟修饰可以存在于任何位置处。在一些实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、6、8、9、14和16处的2'-氟核苷酸。在一些其它实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、6、14和16处的2'-氟核苷酸。在仍一些其它实施例中,反义链包括从5'端起的位置2、14和16处的2'-氟核苷酸。

[0560] 在一些实施例中,反义链包括与不稳定修饰相邻的至少一个2'-氟核苷酸。例如,2'-氟核苷酸可以是不稳定修饰的5'端或3'端处的核苷酸,即距离不稳定修饰的位置-1或+

1的位置处。在一些实施例中,反义链包括不稳定修饰的5'端和3'端中的每一个处的2'-氟核苷酸,即从距离不稳定修饰的位置-1和+1的位置。

[0561] 在一些实施例中,反义链包括不稳定修饰的3'端处的至少两个2'-氟核苷酸,即距离不稳定修饰的位置+1或+2的位置处。

[0562] 在一些实施例中,有义链包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)2'-氟核苷酸。不受限制地,有义链中的2'-氟修饰可以存在于任何位置处。在一些实施例中,反义链包括从5'端起的位置7、10和11处的2'-氟核苷酸。在一些其它实施例中,有义链包括从5'端起的位置7、9、10和11处的2'-氟核苷酸。在一些实施例中,有义链包括从反义链的5'端开始计数,与反义链的位置11、12和15相对或互补的位置处的2'-氟核苷酸。在一些其它实施例中,有义链包括从反义链的5'端开始计数,与反义链的位置11、12、13和15相对或互补的位置处的2'-氟核苷酸。在一些实施例中,有义链包括两个、三个或四个2'-氟核苷酸的嵌段。

[0563] 在一些实施例中,有义链不包括与反义链中的双链体的热不稳定修饰相对或互补的位置中的2'-氟核苷酸。

[0564] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括21个核苷酸(nt)的有义链和23个核苷酸(nt)的反义链,其中所述反义链包括至少一个热不稳定核苷酸,其中所述至少一个热不稳定核苷酸出现在反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处),其中所述dsRNA的一端是平端,而另一端包括2nt突出端,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个): (i) 所述反义链包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰; (ii) 所述反义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (iii) 所述有义链与配体缀合; (iv) 所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰; (v) 所述有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (vi) 所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰; 以及 (vii) 所述dsRNA包括所述反义链的5'端处的平端。优选地,2nt突出端位于反义的3'端处。

[0565] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括有义链和反义链,其中所述有义链的长度为25个至30个核苷酸残基,其中从所述有义链的5'末端核苷酸(位置1)位置1开始至位置23,包括至少8个核糖核苷酸;反义链的长度为36个至66个核苷酸残基,并且从3'末端核苷酸开始,在与有义链的位置1至23配对以形成双链体的位置中的至少8个核糖核苷酸;其中至少反义链的3'末端核苷酸与有义链不配对,并且至多6个连续3'末端核苷酸与有义链不配对,由此形成1个至6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包括10个至30个与有义链不配对的连续核苷酸,由此形成10个至30个核苷酸单链5'突出端;其中当有义链和反义链比对以获得最大互补性时,至少有义链5'末端和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,由此在有义链与反义链之间形成基本上双链的区;并且反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补,以在将所述双链核酸引入哺乳动物细胞时减少靶基因表达;并且其中所述反义链含有至少一个热不稳定核苷酸,其中至少一个热不稳定核苷酸在所述反义链的种子区(即在所述反义链的5'端的位置2至9处)中。例如,热不稳定核苷酸出现在与有义链的5'端的位置14至17相对或互补的位置之间,并且其中dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个): (i) 所述反义链包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰; (ii) 所述反义链包括1个、2个、3个、4个

或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(iii)所述有义链与配体缀合；(iv)所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰；(v)所述有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；以及(vi)所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰；以及(vii)所述dsRNA包括长度为12个至30个核苷酸对的双链体区。

[0566] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括有义链和反义链,其中所述dsRNA分子包括长度为至少25个且最多29个核苷酸的有义链以及长度为最多30个核苷酸的反义链,其中所述有义链包括在从5'端起的位置11处易受酶降解的经修饰的核苷酸,其中所述有义链的3'端和所述反义链的5'端形成平端,并且所述反义链在其3'端处比所述有义链长1个至4个核苷酸,其中长度为至少25个核苷酸的双链体区和所述反义链与靶mRNA沿着所述反义链长度的至少19nt充分互补以在将所述dsRNA分子引入哺乳动物细胞时降低靶基因表达,并且其中所述dsRNA的dicer切割优先地产生包括所述反义链的所述3'端的siRNA,由此减少所述哺乳动物的所述靶基因的表达,其中所述反义链含有至少一个热不稳定核苷酸,其中所述至少一个热不稳定核苷酸在所述反义链的种子区(即在所述反义链的5'端的位置2至9处)中,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个):(i)所述反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰；(ii)所述反义包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(iii)所述有义链与配体缀合；(iv)所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰；(v)所述有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；以及(vi)所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰；以及(vii)所述dsRNA具有长度为12个至29个核苷酸对的双链体区。

[0567] 在一些实施例中,dsRNA分子的有义链和反义链中的每个核苷酸都可以是经修饰的。每个核苷酸可以用相同或不同的修饰进行修饰,所述修饰可以包含一个或两个非连接磷酸酯氧或一个或多个连接磷酸酯氧的一种或多种改变;核糖的成分的改变,例如,核糖上的2'羟基的改变;用“去磷酸”接头大规模取代磷酸酯部分;天然存在的碱基的修饰或替换;以及核糖-磷酸酯主链的替换或修饰。

[0568] 由于核酸是亚基的聚合物,许多修饰发生在核酸内重复的位置,例如碱基或磷酸酯部分的修饰,或磷酸酯部分的非连接0。在一些情况下,修饰将发生在核酸中的所有主体位置,但在许多情况下不会。例如,修饰可以仅发生在3'或5'末端位置处,可以仅发生于末端区中,例如,在末端核苷酸上的位置处或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中。修饰可以发生在双链区、单链区或两者中。修饰可以只发生在RNA的双链区中,或可以只发生于RNA的单链区中。例如,非连接0位置处的硫代磷酸酯修饰可以仅发生在一个或两个末端处,可以仅发生于末端区中,例如,在末端核苷酸上的位置处或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中,或可以发生在双链和单链区中,特别是在末端处。一个或多个5'端可以被磷酸化。

[0569] 例如,为增强稳定性,可以在突出端中包含特定的碱基,或在单链突出端中,例如在5'或3'突出端中或在两者中包含经修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,在突出端中包含嘌呤核苷酸可以是期望的。在一些实施例中,3'或5'突出端中的所有或一些碱基可以被修饰,例如,通过本文所描述的修饰。修饰可以包含,例如使用本领域已知的修饰在核糖糖的2'位置处的修饰,例如,用脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修饰代替核碱基的核糖,以及磷酸酯基团的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出端不需要与靶序列同

源。

[0570] 在一些实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地用LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧或2'-氟修饰。链可以含有多于一种修饰。在一些实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地用2'-O-甲基或2'-氟修饰。应理解,这些修饰是对反义链中存在的双链体的至少一个热不稳定修饰的补充。

[0571] 在有义链和反义链上通常存在至少两种不同的修饰。这两种修饰可以是2'-脱氧、2'-O-甲基或2'-氟修饰、无环核苷酸或其它修饰。在一些实施例中,有义链和反义链各自包括选自2'-O-甲基或2'-脱氧的两种不同修饰的核苷酸。在一些实施例中,有义链和反义链的每个残基独立地用2'-O-甲基核苷酸、2'-O-脱氧核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)核苷酸、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)核苷酸、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)核苷酸或2'-ara-F核苷酸修饰。同样,应理解,这些修饰是对反义链中存在的双链体的至少一个热不稳定修饰的补充。

[0572] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括交替模式的修饰,特别是在B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'区中。如本文所使用的,术语“交替基序”或“交替模式”是指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰发生在一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每三个核苷酸一个,或类似的模式。例如,如果A、B和C各自表示核苷酸的一种修饰类型,则交替基序可以是“ABABABABABAB...”、“AABBAABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0573] 包含在交替基序中的修饰的类型可以是相同的或不同的。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸上的一种修饰类型,则交替模式,即每隔一个核苷酸上的修饰可以是相同的,但每个有义链或反义链可以选自交替基序内的若干种修饰可能性,如“ABABAB...”、“ACACAC...”、“BDBDBD...”或“CDCDCD...”等。

[0574] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括相对于反义链上的交替基序的修饰模式,有义链上交替基序的修饰模式发生了偏移。所述偏移可以使得有义链的核苷酸的经修饰的基团对应于反义链的核苷酸的不同经修饰的基团,并且反之亦然。例如,当与dsRNA双链体中的反义链配对时,有义链中的交替基序可以从链的5'到3'以“ABABAB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从链的3'到5'以“BABABA”开始。作为另一个实例,有义链中的交替基序可以从链的5'到3'以“AABBAABB”开始,并且反义链中的交替基序在双链体区内可以从链的3'到5'以“BBAABBAA”开始,因此在有义链与反义链之间存在修饰模式的完全或部分转移。

[0575] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序是从链的5'到3'的“ABABAB”,其中每个A是未经修饰的核糖核苷酸,并且每个B是2'-O甲基修饰的核苷酸。

[0576] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序是从链的5'到3'的“ABABAB”,其中每个A是2'-脱氧-2'-氟修饰的核糖核苷酸,并且每个B是2'-O甲基修饰的核苷酸。

[0577] 在另一个特定实例中,反义链中的交替基序是从链的3'到5'的“BABABA”,其中每个A是2'-脱氧-2'-氟修饰的核糖核苷酸,并且每个B是2'-O甲基修饰的核苷酸。

[0578] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序是从链的5'到3'的“ABABAB”,并且反义链中交替基序是从链的3'到5'的“BABABA”,其中每个A是未经修饰的核糖核苷酸,并且每个B是2'-O甲基修饰的核苷酸。

[0579] 在一个特定实例中,有义链中的交替基序是从链的5'到3'的“ABABAB”,并且反义链中交替基序是从链的3'到5'的“BABABA”,其中每个A是2'-脱氧-2'-氟修饰的核糖核苷酸,并且每个B是2'-O甲基修饰的核苷酸。

[0580] 本公开的dsRNA分子可以进一步包括至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰可以发生在链的任何位置中的有义链或反义链或两条链的任何核苷酸上。例如,核苷酸间键修饰可以发生在有义链或反义链上的每个核苷酸上;每个核苷酸间键修饰可以在有义链或反义链上以交替模式发生;或有义链或反义链以交替模式包括两种核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上核苷酸间键修饰的交替模式可以相对于反义链上核苷酸间键修饰的交替模式具有偏移。

[0581] 在一些实施例中,dsRNA分子包括突出端区中的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,突出端区包括两个核苷酸,所述两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。还可以进行核苷酸间键修饰,以将突出端核苷酸与双链体区内的末端配对核苷酸连接。例如,至少2个、3个、4个或所有突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接,并且任选地,可以存在另外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键,将突出端核苷酸与紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸连接。例如,在末端三个核苷酸之间可能存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是与突出端核苷酸相邻的配对核苷酸。优选地,这些末端三个核苷酸可以位于反义链的3'端处。

[0582] 在一些实施例中,dsRNA分子的有义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个磷酸酯核苷酸间键分离的两个至十个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的1个至10个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述有义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的反义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0583] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个或18个磷酸酯核苷酸间键分离的两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0584] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个磷酸酯核苷酸间键分离的三个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0585] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个或14个磷酸酯核苷酸间键分离的四个硫代磷酸酯或甲基膦

酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0586] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个磷酸酯核苷酸间键分离的五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0587] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个磷酸酯核苷酸间键分离的六个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0588] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个磷酸酯核苷酸间键分离的七个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0589] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个、4个、5个或6个磷酸酯核苷酸间键分离的八个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0590] 在一些实施例中,dsRNA分子的反义链包括由1个、2个、3个或4个磷酸酯核苷酸间键分离的九个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段,其中所述硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键中的一个位于寡核苷酸序列中的任何位置处,并且所述反义链与包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任何组合的有义链或包括硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0591] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义或反义链的末端位置1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸可以通过有义或反义链的一端或两端处的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接。

[0592] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括每个有义或反义链的双链体的内部区的1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸可以通过从有义链的5'端开始计数的双链体区的位置8至16处的硫代磷酸酯甲基膦酸酯核苷酸间键连接;dsRNA分子可以任选地进一步包括末端位置1至10内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。

[0593] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的一个至

五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个至五个(从5'端开始计数)。

[0594] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0595] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0596] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0597] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0598] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0599] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0600] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0601] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0602] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0603] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫

代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0604] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1至5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18至23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0605] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置20和21处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个(从5'端开始计数)。

[0606] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置20和21处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0607] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21和22处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0608] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21和22处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0609] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置22和23处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0610] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子进一步包括有义链的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数),以及反义链的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置23和23处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰(从5'端开始计数)。

[0611] 在一些实施例中,本公开的化合物包括主链手性中心的模式。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少5个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少6个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少7个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少8个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少9个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少10个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少11个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈 S_p 构型的至少12个核苷酸间键。

在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少13个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少14个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少15个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少16个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少17个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少18个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少19个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过8个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过7个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过6个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过5个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过4个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过3个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过2个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Rp构型的不超过1个核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过8个非手性的核苷酸间键(作为非限制性实例,磷酸二酯)。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过3个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过2个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括不超过1个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少10个核苷酸间键和不超过8个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少11个核苷酸间键和不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少12个核苷酸间键和不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少13个核苷酸间键和不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少14个核苷酸间键和不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,主链手性中心的常见模式包括呈Sp构型的至少15个核苷酸间键和不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施例中,呈Sp构型的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。在一些实施例中,呈Rp构型的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。在一些实施例中,非手性的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。

[0612] 在一些实施例中,本公开的化合物包括为立体化学嵌段的嵌段。在一些实施例中,嵌段是Rp嵌段,因为所述嵌段的每个核苷酸间键是Rp。在一些实施例中,5'-嵌段是Rp嵌段。在一些实施例中,3'-嵌段是Rp嵌段。在一些实施例中,嵌段是Sp嵌段,因为所述嵌段的每个核苷酸间键是Sp。在一些实施例中,5'-嵌段是Sp嵌段。在一些实施例中,3'-嵌段是Sp嵌段。在一些实施例中,所提供的寡核苷酸包括Rp和Sp嵌段两者。在一些实施例中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个Rp嵌段但不包括Sp嵌段。在一些实施例中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个Sp嵌段但不包括Rp嵌段。在一些实施例中,所提供的寡核苷酸包括一个或多个PO

嵌段,其中天然磷酸酯键中的每个核苷酸间键。

[0613] 在一些实施例中,本公开的化合物包括为Sp嵌段的5'-嵌段,其中每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,5'-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是经修饰的核苷酸间键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,5'-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,5'-嵌段包括4个或更多个核苷单元。在一些实施例中,5'-嵌段包括5个或更多个核苷单元。在一些实施例中,5'-嵌段包括6个或更多个核苷单元。在一些实施例中,5'-嵌段包括7个或更多个核苷单元。在一些实施例中,3'-嵌段是Sp嵌段,其中每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,3'-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是经修饰的核苷酸间键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,3'-嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯键,并且每个糖部分包括2'-F修饰。在一些实施例中,3'-嵌段包括4个或更多个核苷单元。在一些实施例中,3'-嵌段包括5个或更多个核苷单元。在一些实施例中,3'-嵌段包括6个或更多个核苷单元。在一些实施例中,3'-嵌段包括7个或更多个核苷单元。

[0614] 在一些实施例中,本公开的化合物在一个区中包括一种类型的核苷,或寡核苷酸之后是特定类型的核苷酸间键,例如天然磷酸酯键、经修饰的核苷酸间键、Rp手性核苷酸间键、Sp手性核苷酸间键等。在一些实施例中,A之后是Sp。在一些实施例中,A之后是Rp。在一些实施例中,A之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施例中,U之后是Sp。在一些实施例中,U之后是Rp。在一些实施例中,U之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施例中,C之后是Sp。在一些实施例中,C之后是Rp。在一些实施例中,C之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施例中,G之后是Sp。在一些实施例中,G之后是Rp。在一些实施例中,G之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施例中,C和U之后是Sp。在一些实施例中,C和U之后是Rp。在一些实施例中,C和U之后是天然磷酸酯键(P0)。在一些实施例中,A和G之后是Sp。在一些实施例中,A和G之后是Rp。

[0615] 在一些实施例中,反义链包括核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处)中的双链体的至少一个热不稳定修饰,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个): (i) 所述反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰; (ii) 所述反义包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (iii) 所述有义链与配体缀合; (iv) 所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰; (v) 所述有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (vi) 所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰; (vii) 所述dsRNA包括长度为12个至40个核苷酸对的双链体区;以及 (viii) 所述dsRNA具有在所述反义链的5'端处的平端。

[0616] 在一些实施例中,反义链包括核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处)中的双链体的至少一个热不稳定修饰,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个): (i) 所述反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰; (ii) 所述有义链与配体缀合; (iii) 所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰; (iv) 所述有义链包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键; (v) 所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰; (vi) 所述dsRNA包括长度为12个至40个核苷酸对的双链体区; (vii) 所述dsRNA

包括长度为12个至40个核苷酸对的双链体区;以及(viii)所述dsRNA具有在所述反义链的5'端处的平端。

[0617] 在一些实施例中,有义链包括核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处)中的双链体的至少一个热不稳定修饰,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部八个):(i)所述反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)所述反义包括1个、2个、3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)所述有义链与配体缀合;(iv)所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(v)所述有义链包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vii)所述dsRNA包括长度为12个至40个核苷酸对的双链体区;以及(viii)所述dsRNA具有在所述反义链的5'端处的平端。

[0618] 在一些实施例中,有义链包括核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,反义链包括核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链含有位于反义链的种子区(即反义链的5'端的位置2至9处)中的双链体的至少一个热不稳定修饰,并且其中所述dsRNA任选地进一步具有以下特征中的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个):(i)所述反义包括2个、3个、4个、5个或6个2'-氟修饰;(ii)所述有义链与配体缀合;(iii)所述有义链包括2个、3个、4个或5个2'-氟修饰;(iv)所述有义链包括3个、4个或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(v)所述dsRNA包括至少四个2'-氟修饰;(vi)所述dsRNA包括长度为12个至40个核苷酸对的双链体区;以及(vii)所述dsRNA具有在所述反义链的5'端处的平端。

[0619] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子包括与靶标、在双链体内或其组合的错配。所述错配可以发生在突出端区或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或熔化的倾向进行排序(例如,根据特定配对的缔合或离解的自由能,最简单的方法是在单个配对的基础上检查配对,尽管也可以使用下一个临近点或类似分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例如非规范或规范外配对(如本文其它地方所述)优于规范(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于规范配对。

[0620] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子在从反义链的5'端开始的双链体区内包括前1个、2个、3个、4个或5个碱基对中的至少一个,所述双链体区可以独立地选自以下的组:A:U、G:U、I:C和错配对,例如非规范或规范外配对或包含通用碱基的配对,以促进双链体的5'端处反义链的解离。

[0621] 在一些实施例中,反义链中从5'端开始的双链体区内1位置处的核苷酸选自以下组成的组:A、dA、dU、U和dT。可替代地,从反义链的5'端开始的双链体区内的前1个、2个或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从反义链5'端起的双链体区内的第一个碱基对是AU碱基对。

[0622] 发现了在单链或双链寡核苷酸的任何位置,将4'-修饰的或5'-修饰的核苷酸引入二核苷酸的磷酸二酯(PO)、硫代磷酸酯(PS)或二硫代磷酸酯(PS2)键的3'端可以对核苷酸间键施加空间效应,并且从而保护或稳定其免受核酸酶的作用。

[0623] 在一些实施例中,在单链或双链siRNA的任何位置处的二核苷酸的3'端处引入5'-

修饰的核苷。例如,可以在单链或双链siRNA的任何位置处的二核苷酸的3'端处引入5'-烷基化核苷。核糖糖的5'位置处的烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性5'-烷基化核苷是5'-甲基核苷。5'-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0624] 在一些实施例中,在单链或双链siRNA的任何位置处的二核苷酸的3'端处引入4'-修饰的核苷。例如,可以在单链或双链siRNA的任何位置处的二核苷酸的3'端处引入4'-烷基化核苷。核糖糖的4'位置处的烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性4'-烷基化核苷是4'-甲基核苷。4'-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。可替代地,可以在单链或双链siRNA的任何位置处的二核苷酸的3'端处引入4'-O-烷基化核苷。核糖糖的4'-O-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性4'-O-烷基化核苷是4'-O-甲基核苷。4'-O-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0625] 在一些实施例中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入5'-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。5'-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性5'-烷基化核苷是5'-甲基核苷。5'-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0626] 在一些实施例中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入4'-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。4'-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性4'-烷基化核苷是4'-甲基核苷。4'-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0627] 在一些实施例中,在dsRNA的有义链或反义链上的任何位置处引入4'-O-烷基化核苷,并且此类修饰维持或提高dsRNA的效力。5'-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性4'-O-烷基化核苷是4'-O-甲基核苷。4'-O-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0628] 在一些实施例中,本公开的dsRNA分子可以包括2'-5'键(具有2'-H、2'-OH和2'-OMe,并且具有P=O或P=S)。例如,2'-5'键修饰可以用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可以用于有义链的5'端以避免有义链被RISC激活。

[0629] 在另一个实施例中,本公开的dsRNA分子可以包括L糖(例如,具有2'-H、2'-OH和2'-OMe的L核糖、L-阿拉伯糖)。例如,这些L糖修饰可以用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可以用于有义链的5'端以避免有义链被RISC激活。

[0630] 各种出版物描述了多聚体siRNA,其都可以与本公开的dsRNA一起使用。此类出版物包含W02007/091269、US 7858769、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887和W02011/031520,所述出版物特此通过全文引用的方式并入。

[0631] 如下文更详细描述,含有一个或多个碳水化合物部分与RNAi药剂的缀合的RNAi药剂可以优化RNAi药剂的一个或多个特性。在许多情况下,碳水化合物部分将与RNAi药剂的经修饰的亚基连接。例如,dsRNA药剂的一个或多个核糖核苷酸亚基的核糖糖可以被另一个部分替代,例如,与碳水化合物配体连接的非碳水化合物(优选地,环状)载体。其中亚基的核糖糖已经被如此替代的核糖核苷酸亚基在本文中被称为核糖替代修饰亚基(RRMS)。环状载体可以是碳环系统,即所有环原子都是碳原子,或杂环系统,即一个或多个环原子可以是杂原子,例如氮、氧、硫。环状载体可以是单环系统,或可以含有两个或多个环,例如稠环。环状载体可以是完全饱和的环系统,或其可以含有一个或多个双键。

[0632] 配体可以通过载体与多核苷酸连接。载体包含(i)至少一个“主链连接点”,优选地两个“骨干连接点”以及(ii)至少一个“系链连接点”,如本文所使用的,“主链连接点”是指官能团,例如羟基,或通常是可用于并适合将载体结合到主链中的键,例如核糖核酸的磷酸

酯或经修饰的磷酸酯(例如,含硫)主链。在一些实施例中,“系链连接点”(TAP)是指连接所选部分的环状载体的组成环原子,例如碳原子或杂原子(不同于提供主链连接点的原子)。所述部分可以是例如碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖和多糖。任选地,所选择的部分通过中间系链与环状载体连接。因此,环状载体将通常包含官能团,例如氨基,或通常提供适合于另一个化学实体(例如,组成环的配体)的结合或系留的键。

[0633] RNAi 药剂可以通过载体与配体缀合,其中所述载体可以是环状基团或无环基团;优选地,所述环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基;优选地,所述无环基团选自丝氨酸主链或二乙醇胺主链。

[0634] 在某些特定实施例中,用于本公开的方法中的RNAi 药剂是选自表2至表5中的一个所列出的药剂的组的药剂。这些药剂可以进一步包括配体。

[0635] IV. 与配体缀合的iRNA

[0636] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及将一种或多种配体、部分或缀合物与iRNA化学连接,所述一种或多种配体、部分或缀合物增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取(例如,进入细胞)。此类部分包含但不限于脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acid.Sci.USA)》,1989,86:6553-6556),胆酸(Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报(Biorg.Med.Chem.Lett.)》,1994,4:1053-1060),硫醚,例如,绿柱石-S-三苯基甲硫醇(Manoharan等人,《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》,1992,660:306-309;Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报》,1993,3:2765-2770),硫代胆固醇(Oberhauser等人,《核酸研究》,1992,20:533-538),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,《欧洲分子生物学组织杂志》,1991,10:1111-1118;Kabanov等人,《FEBS快报(FEBS Lett.)》,1990,259:327-330;Svinarchuk等人,《生物化学(Biochimie)》,1993,75:49-54),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸酯(Manoharan等人,《四面体快报(Tetrahedron Lett.)》,1995,36:3651-3654;Shea等人,《核酸研究》,1990,18:3777-3783),磷脂、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,《核苷与核苷酸(Nucleosides&Nucleotides)》,1995,14:969-973)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,《四面体快报》,1995,36:3651-3654),棕榈基部分(Mishra等人,《生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta)》,1995,1264:229-237),或十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分(Crooke等人,《药理和实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.)》,1996,277:923-937)。

[0637] 在某些实施例中,配体改变其掺入的iRNA药剂的分布、靶向或寿命。在一些实施例中,例如,与不存在此类配体的物种相比,配体为选定靶标(例如,分子、细胞或细胞类型)、区室(例如,细胞或器官区室、组织、器官或身体区)提供增强的亲和力。典型的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0638] 配体可以包含天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,右旋糖酐、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组分子或合成分子,如合成聚合物,例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包含聚氨基酸,即聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟

丙基) 甲基丙烯酸酰胺共聚物 (HMPA)、聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯醇 (PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酸酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包含: 聚乙烯亚胺、聚赖氨酸 (PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0639] 配体还可以包含靶向基团, 例如细胞或组织靶向剂, 例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质, 例如与特定细胞类型 (如肾细胞) 结合的抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化多氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双磷酸酯、聚谷氨酸酯、聚天冬氨酸酯、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素或RGD肽或RGD肽模拟物。在某些实施例中, 配体是多价半乳糖, 例如, N-乙酰基-半乳糖胺。

[0640] 配体的其它实例包含染料、嵌入剂 (例如, 吖啶)、交联剂 (例如, 补骨脂烯、丝裂霉素C(mitomycin C))、卟啉 (TPPC4、德克萨斯卟啉 (texaphyrin)、扩环卟啉 (Sapphyrin))、多环芳香族烃 (例如, 吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶 (例如, EDTA)、亲脂性分子 (例如, 胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-(十六烷基) 甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基) 石胆酸、03-(油酰基) 胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪)、肽缀合物 (例如, 触角足突变肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG (例如, PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原 (例如, 生物素)、转运/吸收促进剂 (例如, 阿司匹林 (aspirin)、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶 (例如, 咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环化合物的Eu³⁺络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0641] 配体可以是蛋白质 (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, 与特定细胞类型, 如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体)。配体还可以包含激素和激素受体。配体还可以包含非肽物质, 如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38 MAP激酶的激活剂或NF- κ B的激活剂。

[0642] 配体可以是物质, 例如药物, 其可以例如通过破坏细胞的细胞骨架, 例如通过破坏细胞的微管、微丝或中间丝来增加iRNA药剂摄取到细胞中。药物可以是例如分类单元 (taxon)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、细胞松弛素 (cytochalasin)、诺考达唑 (nocodazole)、杰斯内酯 (japlakinolide)、拉春库林A (latrunculin A)、毒伞素 (phalloidin)、斯文赫利A (swinholid A)、印丹诺辛 (indanocine) 或麦司文 (myoservin)。

[0643] 在一些实施例中, 与如本文所描述的iRNA连接的配体充当药代动力学调节剂 (PK调节剂)。PK调节剂包含亲脂性物质、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包含但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生 (naproxen)、布洛芬 (ibuprofen)、维生素E、生物素。还已知包括许多硫代磷酸酯键的与血清蛋白结合的寡核苷酸, 因此在主链中包括多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸 (例如, 具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸) 也适于本发明作为配体 (例如, 作为PK调节配体)。另外, 与血清组分 (例如, 血清蛋白) 结合的适体也适于用作本文所述的实施例中的PK调节配体。

[0644] 本发明的配体缀合的iRNA可以通过使用具有侧反应功能的寡核苷酸来合成,如源自连接分子连接到寡核苷酸上的寡核苷酸(如下文所描述的)。这种反应性寡核苷酸可以直接与可商购获得的配体、合成的带有多种保护基团中的任一种的配体、或具有与其连接的部分的连接部分的配体反应。

[0645] 本发明的缀合物中使用的寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术方便且常规地制备。用于此类合成的设备由若干个供应商销售,例如,包含Applied Biosystems®(加利福尼亚州福斯特市(Foster City, Calif.))。可以另外或可替代地采用本领域已知的用于此类合成的任何其它方式。使用类似技术来制备其它寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化的衍生物)也是已知的。

[0646] 在本发明的配体缀合的寡核苷酸和带有序列特异性连接的核苷的配体分子中,寡核苷酸和寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体或已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已经带有配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合物前体或带有构建块的非核苷配体组装在合适的DNA合成器上。

[0647] 当使用已经带有连接部分的核苷酸缀合物前体时,通常完成序列特异性连接核苷的合成,并且然后配体分子与连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过自动合成器合成,使用源自配体-核苷缀合物的磷腈以及可商购获得的和常规用于寡核苷酸合成的标准磷腈和非标准磷酸胺。

[0648] A. 脂质缀合物

[0649] 在某些实施例中,配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。此类脂质或基于脂质的分子通常可以与血清蛋白,如人血清白蛋白(HSA)结合。HSA结合配体允许缀合物分布到靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是肝,包含肝的实质细胞。可以与HSA结合的其它分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性,(b)增加靶向或转运到靶细胞或细胞膜中,或(c)可以用于调节与血清蛋白,例如HSA的结合HSA。

[0650] 基于脂质的配体可以用于调节,例如控制(例如,抑制)缀合物与靶组织的结合。例如,更强地与HSA结合的脂质或基于脂质的配体将较不可能被靶向到肾脏,并且因此较不可能从身体清除。较不强烈地与HSA结合的脂质或基于脂质的配体可以用于将缀合物靶向到肾脏。

[0651] 在某些实施例中,基于脂质的配体与HSA结合。例如,配体可以以足够的亲和力与HSA结合,从而增强缀合物在非肾组织中的分布。然而,亲和力通常不会强到HSA配体结合不能被逆转。

[0652] 在某些实施例中,基于脂质的配体与HSA微弱地结合或根本不结合,使得缀合物在肾脏中的分布增强。靶向到肾细胞的其它部分也可以代替基于脂质的配体或除其之外使用。

[0653] 另一方面,配体是被靶细胞(例如,增殖细胞)摄取的部分,例如维生素。这些对于治疗以不期望的细胞增殖为特征的疾病特别有用,例如恶性或非恶性类型的疾病,例如癌细胞。示例性维生素包含维生素A、E和K。包含的其它示例性维生素是B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或被癌细胞摄取的其它维生素或营养素。还包含HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0654] B. 细胞渗透剂

[0655] 另一方面,配体是细胞渗透剂,如螺旋细胞渗透剂。在某些实施例中,药剂为两亲性的。示例性药剂为肽,如tat或触角足突变肽。如果药剂为肽,那么其可以被修饰,包含肽基模拟物、反演体、非肽或假肽键和使用D-氨基酸。螺旋剂通常是 α -螺旋剂,并且可以具有亲脂性和疏脂性相。

[0656] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的所定义三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA药剂的连接可能影响iRNA的药代动力学分布,如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟物部分的长度可以为约5个至50个氨基酸,例如约5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸长。

[0657] 肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状体肽、约束肽或交联肽。在另一个替代方案中,肽部分可以包含疏水性膜易位序列(MTS)。示例性疏水性含MTS肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:11)的RFGF。含疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:12))也可以是靶向部分。肽部分可以是“递送”肽,所述肽可以携带包含肽、寡核苷酸和蛋白质在内的大极性分子穿过细胞膜。例如,来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:13))和果蝇触角足突变(*Drosophila Antennapedia*)蛋白(RQIKIWFAQNRRMKWKK(SEQ ID NO:14))的序列已被发现能够起到递送肽的作用。肽或肽模拟物可以由DNA的随机序列编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等人,《自然》,354:82-84,1991)。通常,通过掺入的单体单元与dsRNA药剂连接的肽或肽模拟物的实例是细胞靶向肽,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可以在约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。肽部分可以具有结构修饰,如增加稳定性或直接构象特性。可以使用下面描述的任何结构修饰。

[0658] 用于本发明的组合物和方法的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。含有RGD的肽和肽二聚体可以包含D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD,还可以使用靶向整合素配体的其它部分。此配体的优选的缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0659] RGD肽部分可以用于靶向特定细胞类型,例如肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳腺癌肿瘤细胞(Zitzmann等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,62:5139-43,2002)。RGD肽可以促进dsRNA药剂靶向多种其它组织的肿瘤,包含肺、肾、脾或肝的肿瘤(Aoki等人,《癌症基因疗法(Cancer Gene Therapy)》8:783-787,2001)。通常,RGD肽将促进iRNA药剂靶向肾。RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。例如,糖基化RGD肽可以将iRNA药剂递送到表达 $\alpha_v\beta_3$ 的肿瘤细胞(Haubner等人,《核医学杂志(Jour.Nucl.Med.)》,42:326-336,2001)。

[0660] “细胞渗透肽”能够渗透细胞,例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以是例如 α -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如, α -防御素、 β -防御素或细菌素)或仅含有一个或两个主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吲哚西丁(indolicidin))。细胞渗透肽还可以包含核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二分两亲性肽,如MPG,其源自HIV-1gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(Simeoni等人,《核酸研究》31:2717-2724,2003)。

[0661] C.碳水化合物缀合物

[0662] 在本发明的组合物和方法的一些实施例中,iRNA进一步包括碳水化合物。碳水化合物缀合的iRNA对于核酸的体内递送以及适于如本文所描述的体内治疗用途的组合物而言是有利的。如本文所使用的,“碳水化合物”是指化合物,所述化合物是碳水化合物,所述碳水化合物本身由一个或多个单糖单元构成,所述单糖单元具有至少6个碳原子(可以是直链、支链或环状),其中氧、氮或硫原子与每个碳原子结合;或是具有碳水化合物部分作为其部分的化合物,所述碳水化合物部分由一个或多个单糖单元构成,每个单糖单元具有至少六个碳原子(可以是直链、支链或环状),其中氧、氮或硫原子与每个碳原子结合。代表性碳水化合物包含糖(单糖、二糖、三糖和含有约4个、5个、6个、7个、8个或9个单糖单元的寡糖)和多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。特定单糖包含C5及以上(例如,C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖包含具有两个或三个单糖单元(例如,C5、C6、C7或C8)的糖。

[0663] 在某些实施例中,碳水化合物缀合物包括单糖。

[0664] 在某些实施例中,单糖是N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)。包括一种或多种N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物的GalNAc缀合物在例如US 8,106,022中进行了描述,所述文献的完整内容特此通过引用的方式并入本文。在一些实施例中,GalNAc缀合物用作将iRNA靶向特定细胞的配体。在一些实施例中,GalNAc缀合物将iRNA靶向肝细胞,例如,通过充当肝细胞(例如,肝细胞(hepatocyte))的去唾液酸糖蛋白受体的配体。

[0665] 在一些实施例中,碳水化合物缀合物包括一种或多种GalNAc衍生物。GalNAc衍生物可以通过接头连接,例如二价或三价支链接头。在一些实施例中,GalNAc缀合物与有义链的3'端缀合。在一些实施例中,GalNAc缀合物通过接头,例如本文所描述的接头与iRNA药剂缀合(例如,与有义链的3'端)。在一些实施例中,GalNAc缀合物与有义链的5'端缀合。在一些实施例中,GalNAc缀合物通过接头,例如本文所描述的接头与iRNA药剂缀合(例如,与有义链的5'端)。

[0666] 在本发明的某些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA药剂连接。在一些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA药剂连接。在本发明的又其它实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA药剂连接。在本发明的其它实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过四价接头与本发明的iRNA药剂连接。

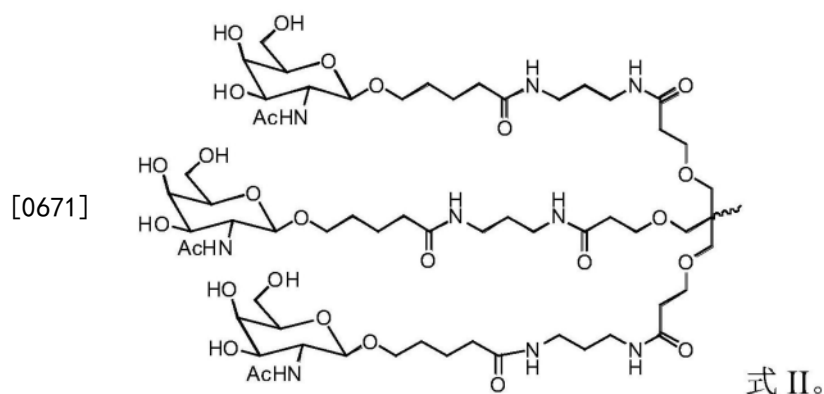
[0667] 在某些实施例中,本发明的双链RNAi药剂包括与iRNA药剂连接的一种GalNAc或GalNAc衍生物。在某些实施例中,本发明的双链RNAi药剂包括多个(例如,2个、3个、4个、5个或6个)GalNAc或GalNAc衍生物,每个所述衍生物通过多个单价接头独立地与双链RNAi药剂的多个核苷酸连接。

[0668] 在一些实施例中,例如,当本发明的iRNA药剂的两条链是一个较大分子的一部分时,所述较大分子由一条链的3'端和相应的另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链连接,形成包括多个未配对核苷酸的发夹环,发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包括通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。发夹环也可以由双链体的一条链中的延伸突出端形成。

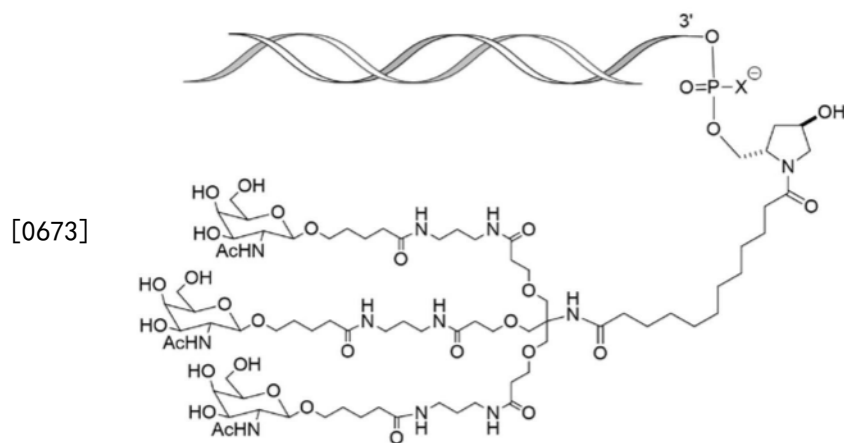
[0669] 在一些实施例中,例如,当本发明的iRNA药剂的两条链是一个较大分子的一部分时,所述较大分子由一条链的3'端和相应的另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链连接,

形成包括多个未配对核苷酸的发夹环,发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包括通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。发夹环也可以由双链体的一条链中的延伸突出端形成。

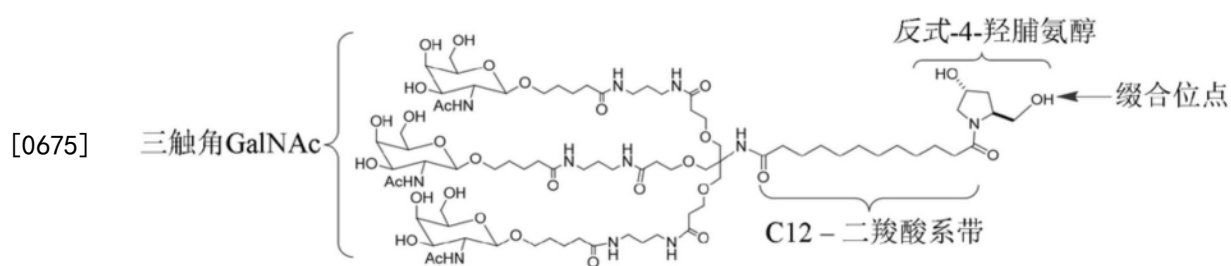
[0670] 在一些实施例中,GalNAc缀合物是



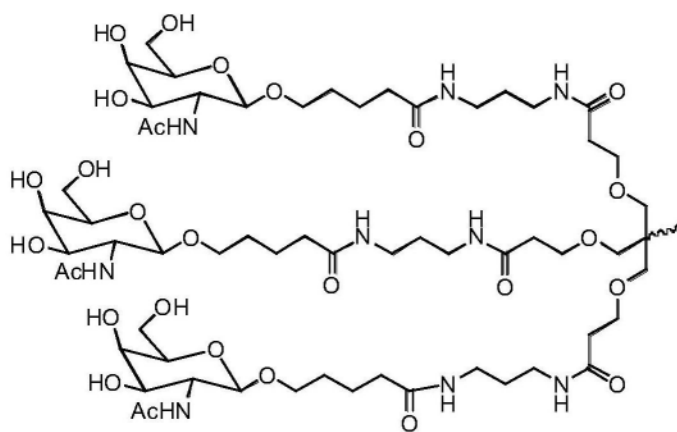
[0672] 在一些实施例中, RNAi 药剂通过接头与碳水化合物缀合物连接, 如以下示意图所示, 其中X是O或S



[0674] 在一些实施例中, RNAi 药剂与如表1中定义的L96缀合, 并且如下所示:

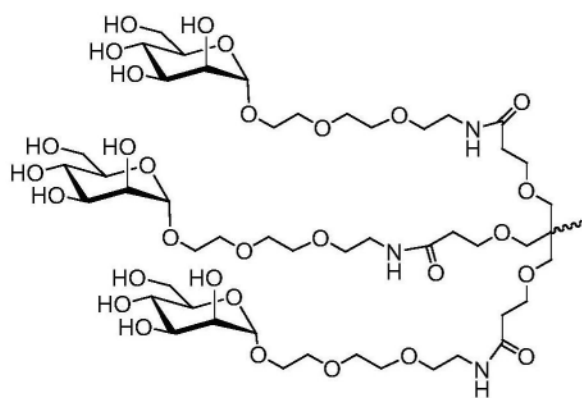


[0676] 在某些实施例中,用于本发明的组合物和方法的碳水化合物缀合物选自由以下组成的组:

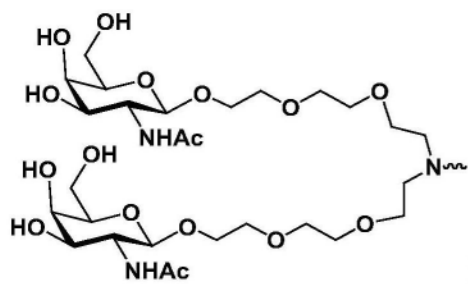


式 II,

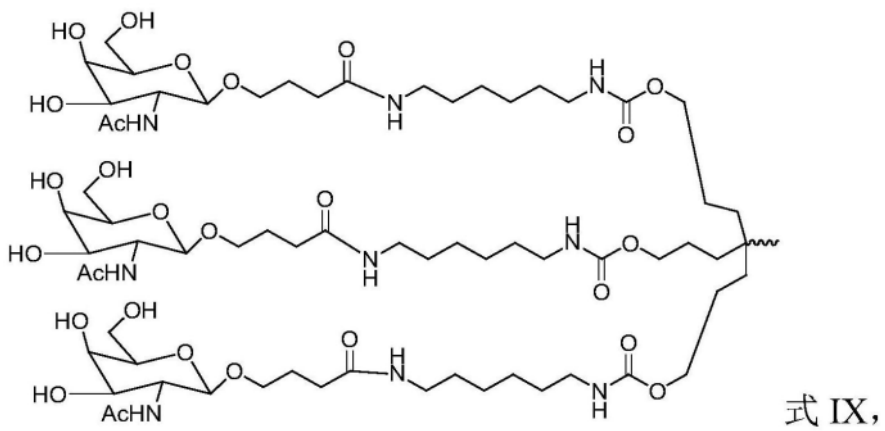
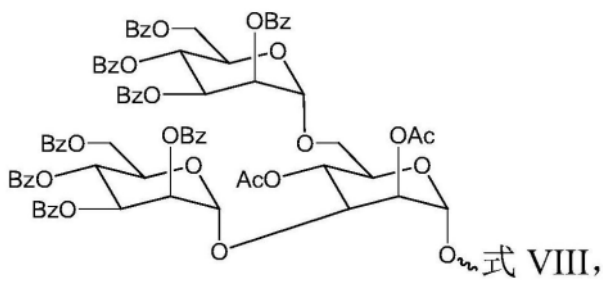
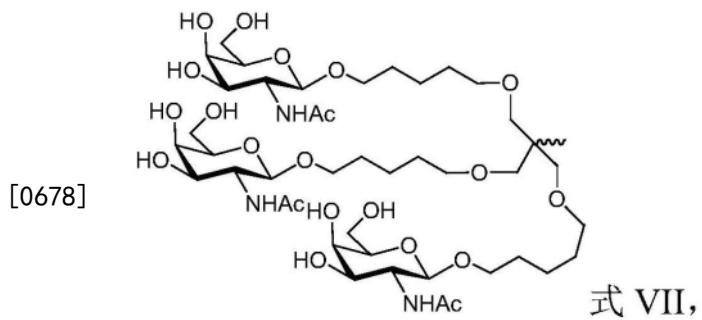
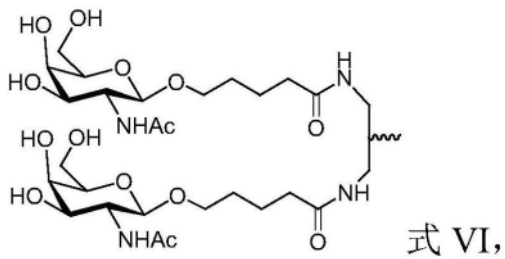
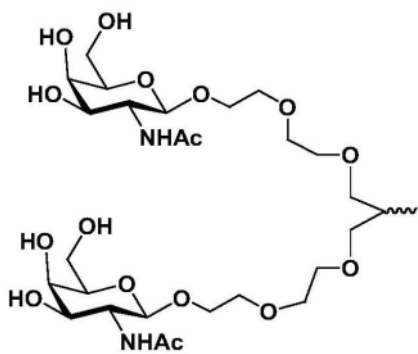
[0677]

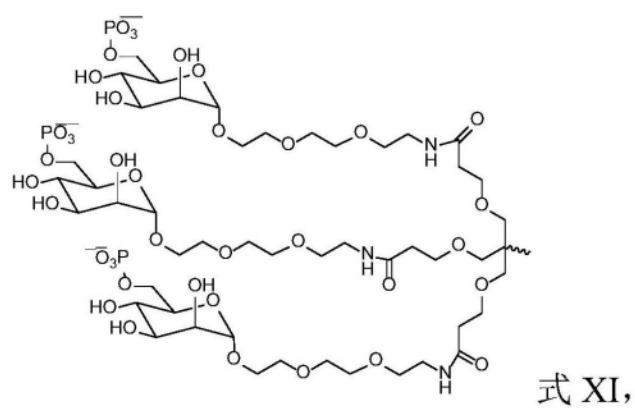
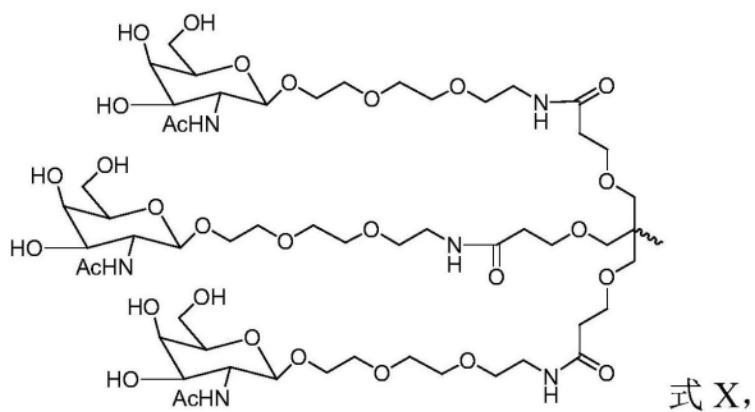


式 III,

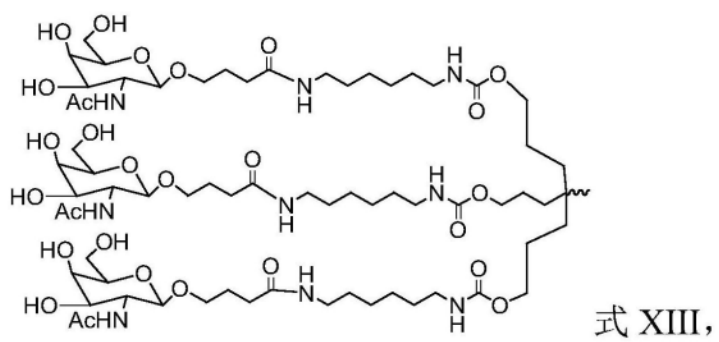
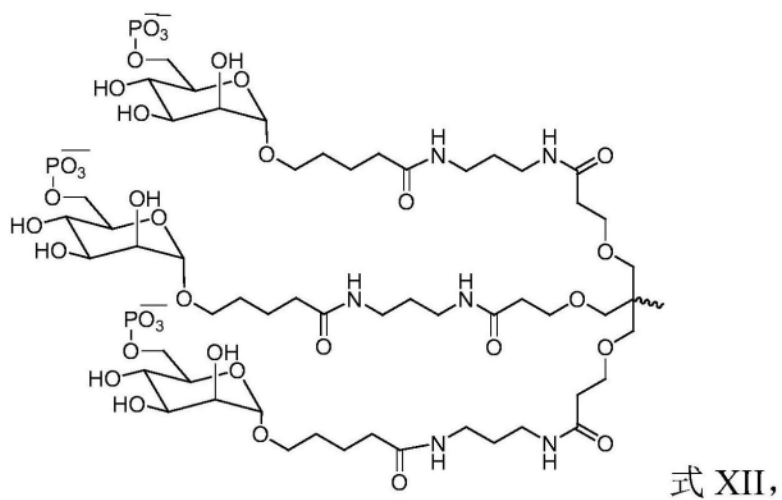


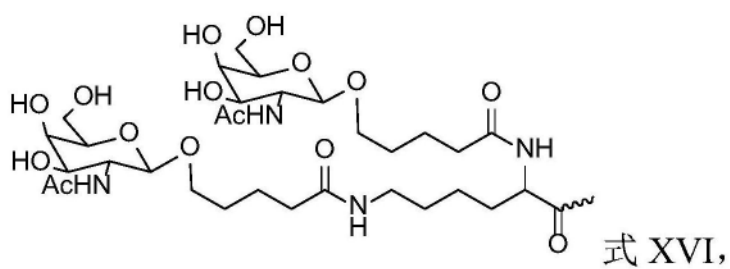
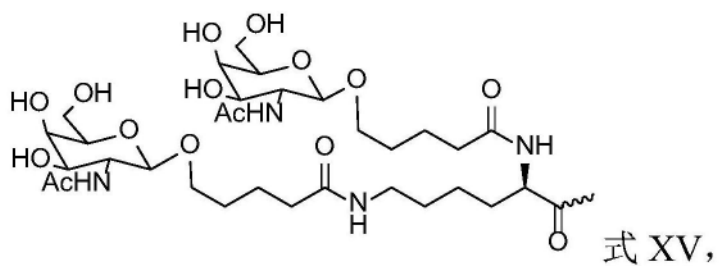
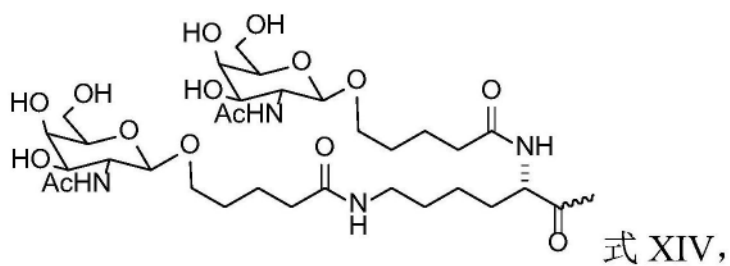
式 IV,



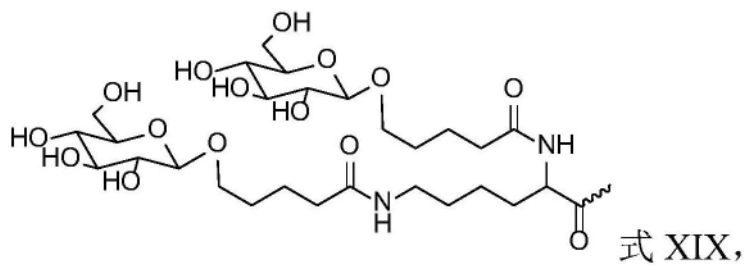
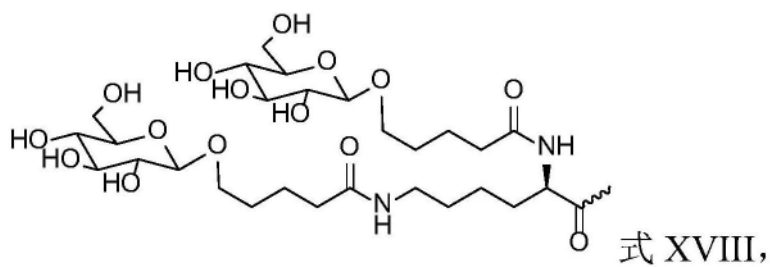
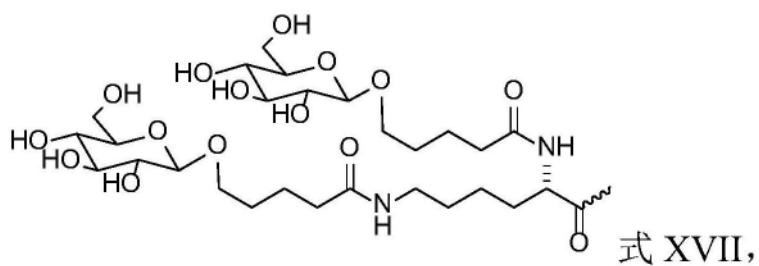


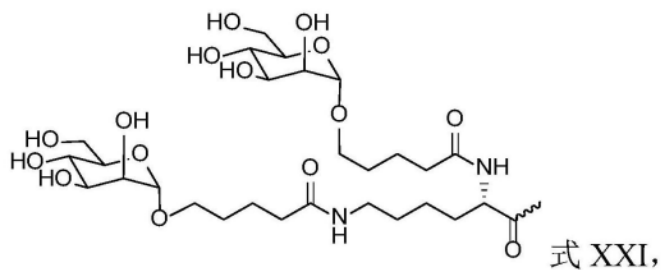
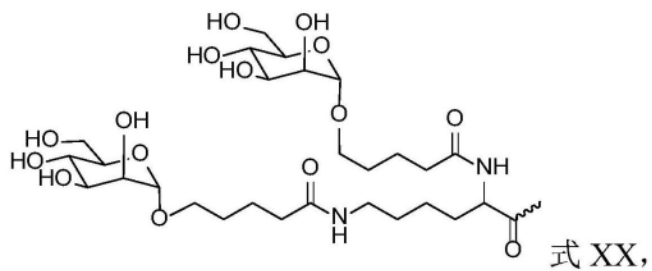
[0679]



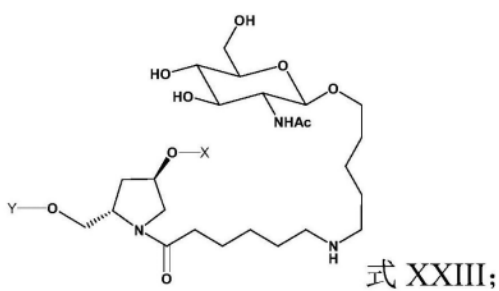
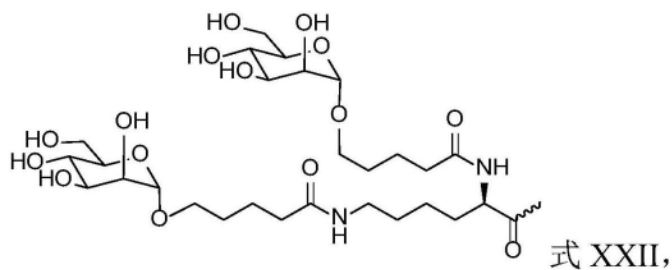


[0680]

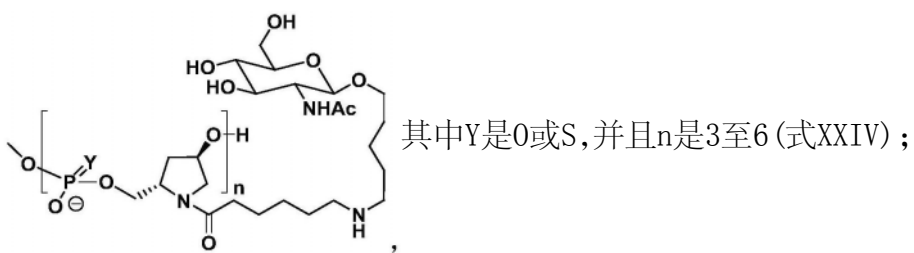




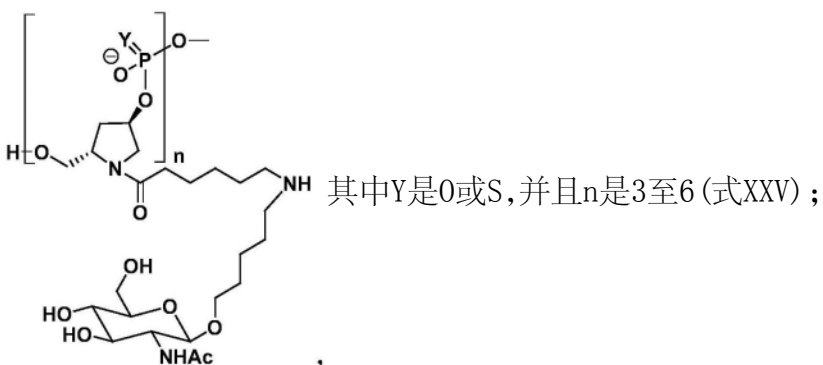
[0681]



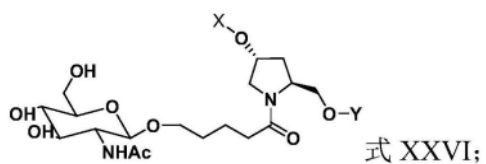
[0682]



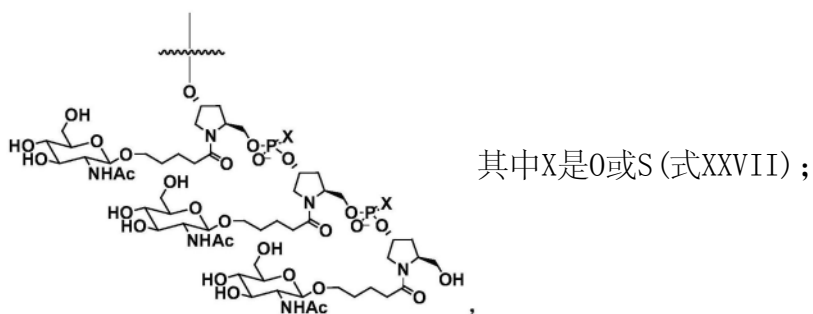
[0683]



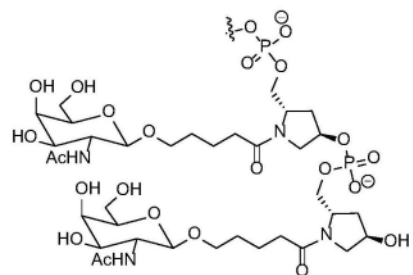
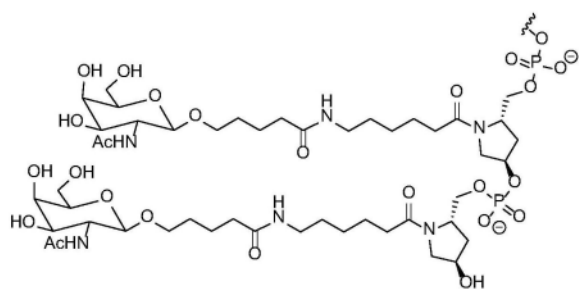
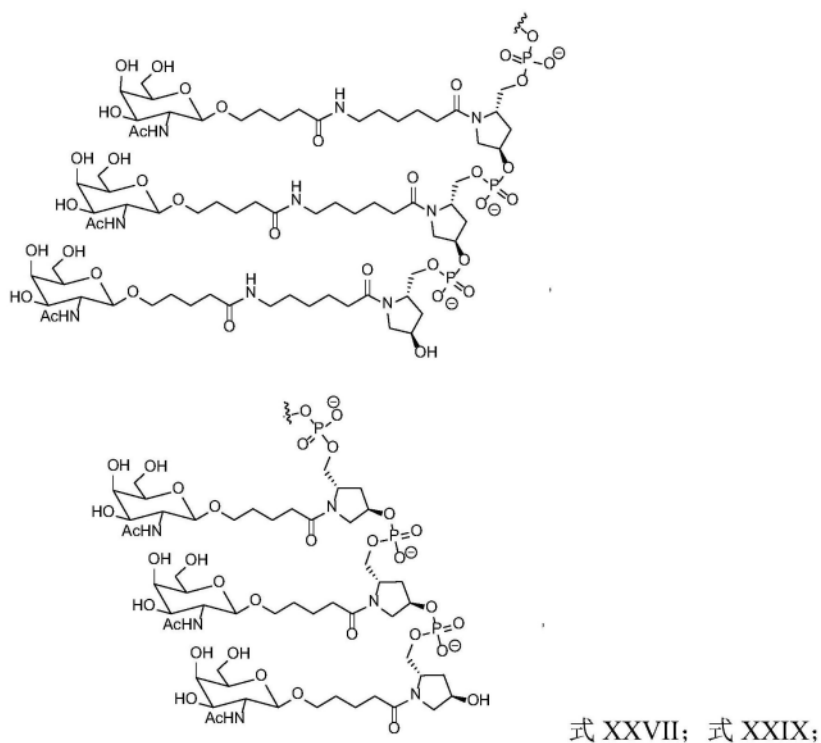
[0684]



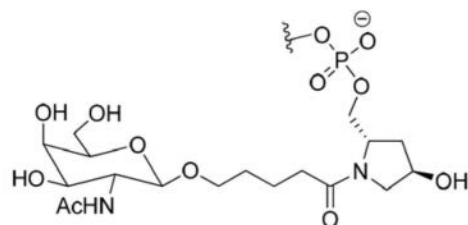
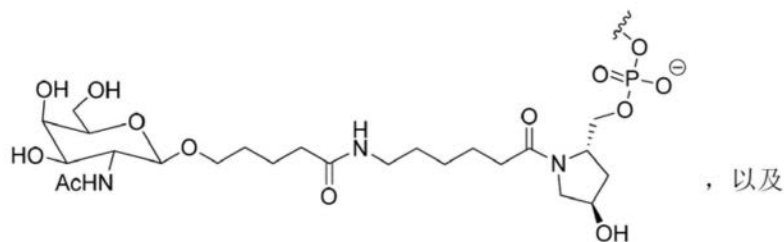
[0685]



[0686]



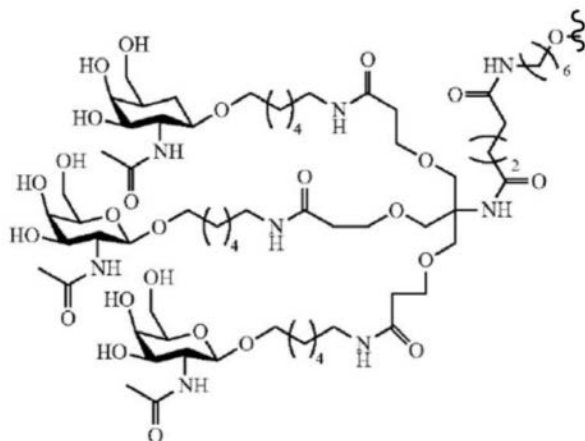
式 XXXI;



[0687]

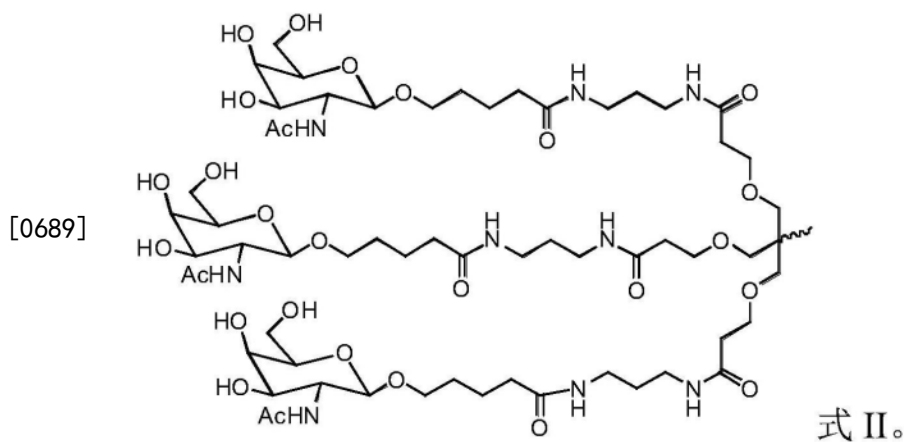
式 XXXII;

式 XXXIII。

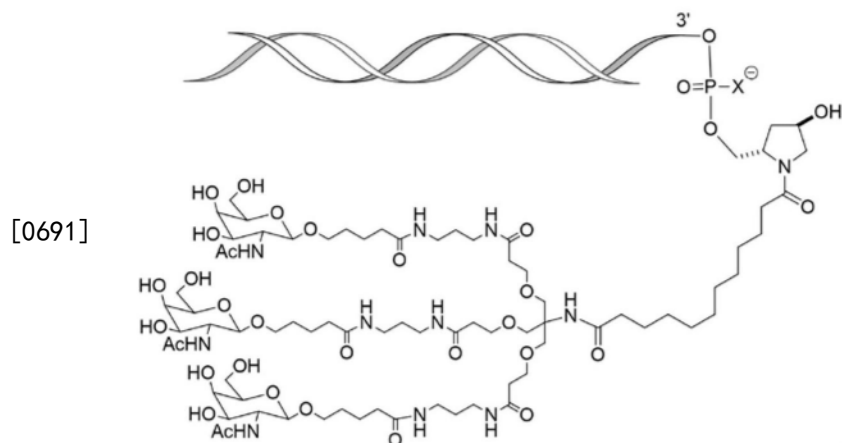


式 XXXIV。

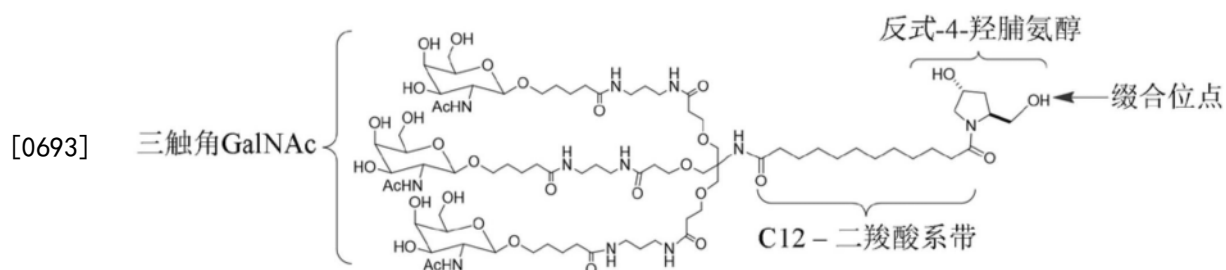
[0688] 在某些实施例中,用于本发明的组合物和方法的碳水化合物缀合物是单糖。在某些实施例中,单糖是N-乙酰基半乳糖胺,如



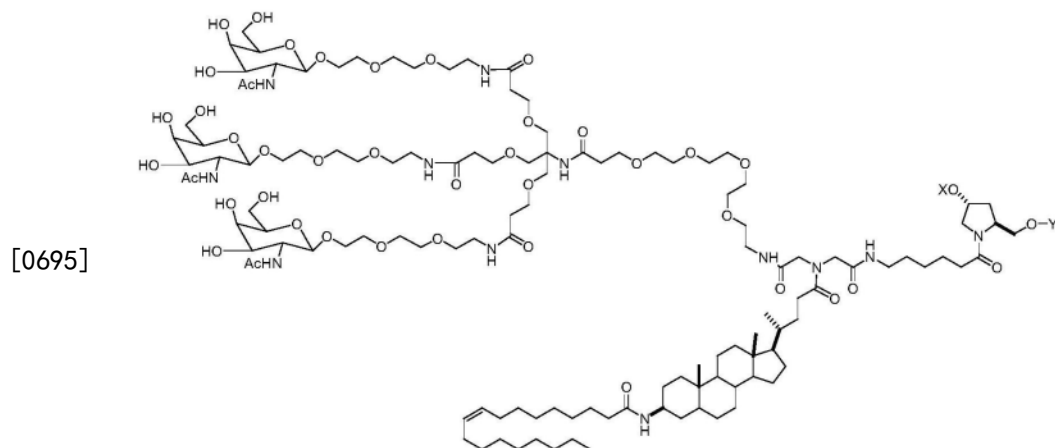
[0690] 在一些实施例中, RNAi 药剂通过接头与碳水化合物缀合物连接, 如下示意图所示, 其中 X 是 O 或 S



[0692] 在一些实施例中, RNAi 药剂与如表1中定义的L96缀合, 并且如下所示:



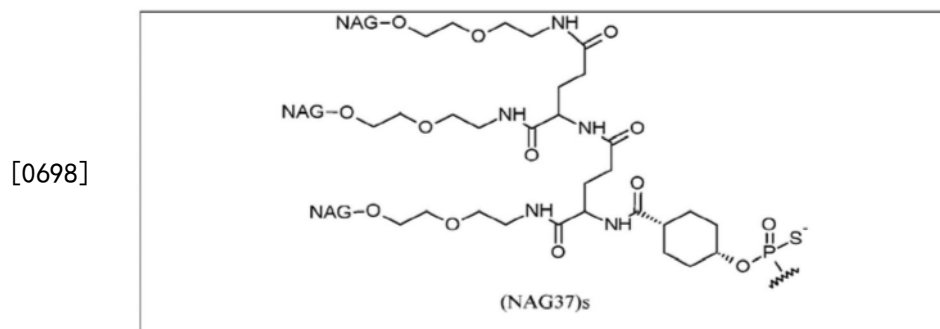
[0694] 用于本文所描述的实施例中的另一代表性碳水化合物缀合物包含但不限于:



(式 XXXVI),

[0696] 当X或Y中的一个为寡核苷酸时, 另一个为氢。

[0697] 在一些实施例中, 合适的配体是W0 2019/055633中公开的配体, 所述文献的全部内容通过引用并入本文。在一个实施例中, 配体包括以下结构:



[0699] 在某些实施例中,本公开的RNAi药剂可以包含GalNAc配体,即使此类GalNAc配体目前预计对于本公开的优选鞘内/CNS递送途径具有有限的价值。

[0700] 在本发明的某些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA药剂连接。在一些实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA药剂连接。在本发明的又其它实施例中,GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA药剂连接。

[0701] 在一个实施例中,本发明的双链RNAi药剂包括与iRNA药剂连接的一种或多种GalNAc或GalNAc衍生物。GalNAc可以通过有义链或反义链上的接头与任何核苷酸连接。GalNAc可以与有义链的5'端、有义链的3'端、反义链的5'端或反义链的3'端连接。在一个实施例中,GalNAc例如通过三价接头与有义链的3'端连接。

[0702] 在其它实施例中,本发明的双链RNAi药剂包括多个(例如,2个、3个、4个、5个或6个)GalNAc或GalNAc衍生物,每个所述衍生物通过多个接头(例如,单价接头)独立地与双链RNAi药剂的多个核苷酸连接。

[0703] 在一些实施例中,例如,当本发明的iRNA药剂的两条链是一个较大分子的一部分时,所述较大分子由一条链的3'端和相应的另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链连接,形成包括多个未配对核苷酸的发夹环,发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包括通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0704] 在一些实施例中,碳水化合物缀合物进一步包括一个或多个如上文所描述的另外的配体,如但不限于PK调节剂或细胞渗透肽。

[0705] 适用于本发明的另外的碳水化合物缀合物和接头包含WO 2014/179620和WO 2014/179627中所描述的那些,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0706] D. 接头

[0707] 在一些实施例中,本文所述的缀合物或配体可以通过各种接头与iRNA寡核苷酸连接,所述接头可以是可切割的或不可切割的。

[0708] 术语“接头”或“连接基团”意指连接化合物两部分的有机部分,例如,共价连接化合物的两部分。接头通常包括直接键或原子,如氧或硫;单元,如NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH或原子链,如但不限于经取代的或未经取代的烷基、经取代的或未经取代的烯基、经取代的或未经取代的炔基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳烷基、烷基芳烯基、烷基芳炔基、烯基芳烷基、烯基芳烯基、烯基芳炔基、炔基芳烷基、炔基芳烯基、炔基芳炔基、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、烷基杂环烷基、烷基杂环烯基、烷基杂环炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烯基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,所述一个或多个亚甲基可以被以下中断或封端:O、S、S(O)、SO₂、N(R₈)、C(O)、经取代的或未经取代的芳基、经取代的或未经取代的杂芳基、经取代的或未经取代的杂环基;其中R₈是氢、酰基、脂肪族或经取代的脂肪族。在某些实施例中,接头介于约1个至24个原子、2个至24个、3个至24个、4个至24个、5个至24个、6个至24个、6个至18个、7个至18个、8个至18个原子、7个至17个、8个至17个、6个至16个、7个至16个或8个至16个原子之间。

[0709] 可切割连接基团是在细胞外部充分稳定的连接基团,但其在进入靶细胞之后切割以释放接头保持在一起的两个部分。在优选实施例中,可切割连接基团在靶细胞中或在第一参考条件下(其可以例如被选择以模拟或代表细胞内条件)的切割是在受试者的血液或第二参考条件下(其可以例如被选择以模拟或代表在血液或血清中发现的条件)的切割速度的至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少约100倍。

[0710] 可切割连接基团易受切割剂(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)影响。一般来说,切割剂在细胞内部比在血清或血液中更普遍,或以更高的水平或活性找到。此类降解剂的实例包含:针对特定底物选择的或不具有底物特异性的氧化还原剂,包含例如存在于细胞中的氧化或还原酶或还原剂,如硫醇,所述氧化或还原酶或还原剂可以通过还原降解氧化还原可切割连接基团;酯酶;可以产生酸性环境的核内体或药剂,例如,产生pH为五或更低的那些核内体或药剂;可以通过充当广义酸、肽酶(其可以是底物特异性的)和磷酸酶来水解或降解酸可切割连接基团的酶。

[0711] 可切割键基团,如二硫键可能对pH敏感。人血清的pH为7.4,而细胞内pH的平均值略低,范围为约7.1-7.3。核内体具有更酸性的pH,范围为5.5-6.0,并且溶酶体具有甚至更酸性的pH,为约5.0。一些接头将具有可切割连接基团,所述连接基团在优选的pH下切割,由此从细胞内的配体释放阳离子脂质,或释放到细胞的期望的区室中。

[0712] 接头可以包含可由特定酶切割的可切割连接基团。并入到接头中的可切割连接基团的类型可以取决于所靶向的细胞。例如,肝脏靶向配体可以通过包含酯基的接头与阳离子脂质连接。肝细胞富含酯酶,并且因此接头在肝细胞中将比在非富含酯酶的细胞类型中更高效地切割。其它富含酯酶的细胞类型包含肺、肾皮质和睾丸中的细胞。

[0713] 当靶向富含肽酶的细胞类型,如肝细胞和滑膜细胞时,可以使用含有肽键的接头。

[0714] 一般来说,可以通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评价候选可切割连接基团的适合性。还将期望测试候选可切割连接基团抵抗在血液或当与其它非靶组织接触时切割的能力。因此,可以确定第一条件与第二条件之间对切割的相对易感性,其中选择第一条件以指示靶细胞中的切割,并且选择第二条件以指示其它组织或生物流体,例如血液或血清中的切割。评价可以在无细胞系统、在细胞、在细胞培养物、在器官或组织培养物或在整只动物中进行。在无细胞或培养条件下进行初始评价并且通过在整只动物中进一步评价来确认可以是有用的。在优选实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的切割是在血液或血清中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度的至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。

[0715] i. 氧化还原可切割连接基团

[0716] 在某些实施例中,可切割连接基团是在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连接基团。还原性可切割连接基团的实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定候选可切割连接基团是否是合适的“还原性可切割连接基团”,或例如是否适合与特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考本文所描述的方法。例如,可以通过使用本领域已知的试剂与二硫苏糖醇(DTT)或其它还原剂一起温育来评估候选物,这模拟将在细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率。候选物还可以在被选择以模拟血液或血清条件的条件下评价。在一个中,候

选化合物在血液中被切割至多约10%。在其它实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的降解是在血液中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度的至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。候选化合物的切割速率可以使用标准酶动力学测定在被选择以模拟细胞内介质的条件下确定并且与被选择以模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0717] ii. 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0718] 在某些实施例中,可切割接头包括基于磷酸酯的可切割连接基团。基于磷酸酯的可切割连接基团被降解或水解磷酸酯基团的药剂切割。细胞中使磷酸酯基团切割的药剂的实例为细胞中的酶,如磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为-O-P(O) (ORk) -O-、-O-P(S) (ORk) -O-、-O-P(S) (SRk) -O-、-S-P(O) (ORk) -O-、-O-P(O) (ORk) -S-、-S-P(O) (ORk) -S-、-O-P(S) (ORk) -S-、-S-P(S) (ORk) -O-、-O-P(O) (Rk) -O-、-O-P(S) (Rk) -O-、-S-P(O) (Rk) -O-、-S-P(S) (Rk) -O-、-S-P(O) (Rk) -S-、-O-P(S) (Rk) -S-。优选实施例是-O-P(O) (OH) -O-、-O-P(S) (OH) -O-、-O-P(S) (SH) -O-、-S-P(O) (OH) -O-、-O-P(O) (OH) -S-、-S-P(O) (OH) -S-、-O-P(S) (OH) -S-、-S-P(S) (OH) -O-、-O-P(O) (H) -O-、-O-P(S) (H) -O-、-S-P(O) (H) -O-、-S-P(S) (H) -O-、-S-P(O) (H) -S-、-O-P(S) (H) -S-。优选实施例是-O-P(O) (OH) -O-。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0719] iii. 酸可切割连接基团

[0720] 在某些实施例中,可切割接头包括酸可切割连接基团。酸可切割连接基团是在酸性条件下被切割的连接基团。在优选实施例中,酸可切割连接基团在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的酸性环境中或通过可以充当广义酸的药剂(如酶)被切割。在细胞中,特定低pH细胞器,如核内体和溶酶体可以提供酸可切割连接基团的切割环境。酸可切割连接基团的实例包含但不限于脞、酯和氨基酸的酯。酸可切割基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。优选实施例是与酯的氧连接的碳(烷氧基)为芳基、经取代的烷基或叔烷基,如二甲基戊基或叔丁基。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

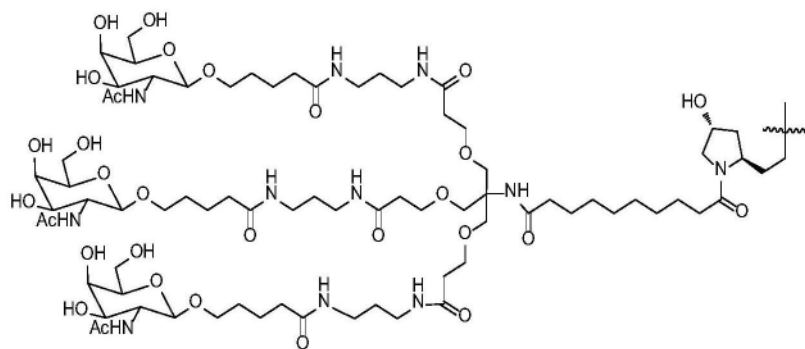
[0721] iv. 基于酯的可切割连接基团

[0722] 在某些实施例中,可切割接头包括基于酯的可切割连接基团。基于酯的可切割连接基团通过细胞中的酶,如酯酶和酰胺酶切割。基于酯的可切割连接基团的实例包含但不限于亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可切割连接基团具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

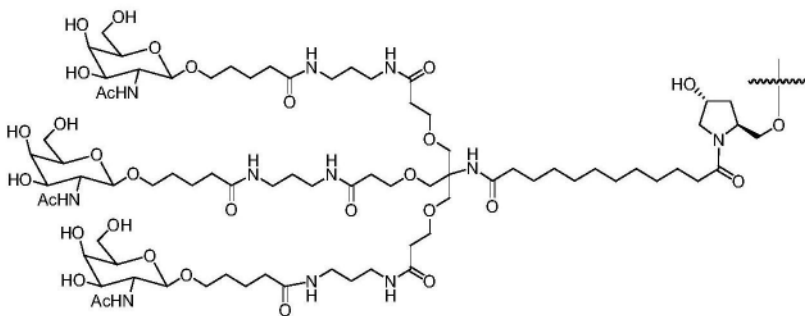
[0723] v. 基于肽的可切割连接基团

[0724] 在又一个实施例中,可切割接头包括基于肽的可切割连接基团。基于肽的可切割连接基团通过细胞中的酶,如肽酶和蛋白酶切割。基于肽的可切割连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包含酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于在产生肽和蛋白质的氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键)并且不包含整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有通式-NHCHRA(C(O)NHCHRB(C(O)-,其中RA和RB为两个相邻氨基酸的R基团。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评价这些候选物。

[0725] 在一些实施例中,本发明的iRNA通过接头与碳水化合物缀合。iRNA碳水化合物缀合物与本发明的组合物和方法的接头的非限制性实例包含但不限于:

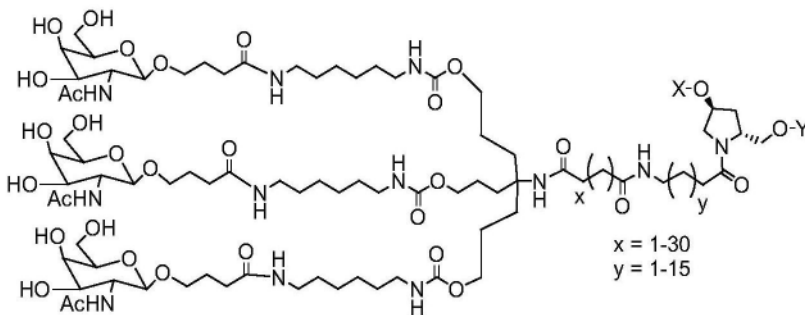


(式 XXXVII),

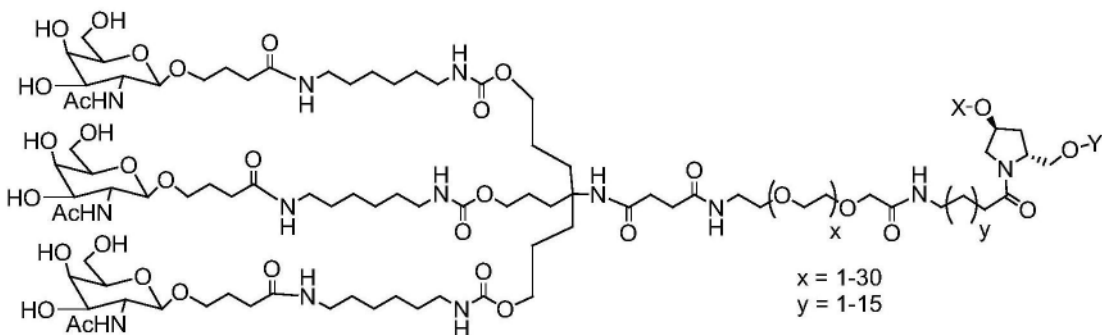


(式 XXXVIII),

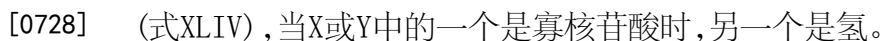
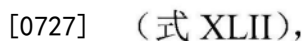
[0726]



(式 XXXIX),



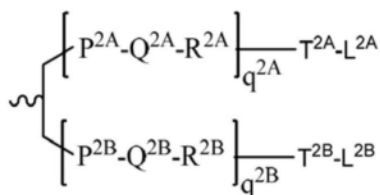
(式 XL),



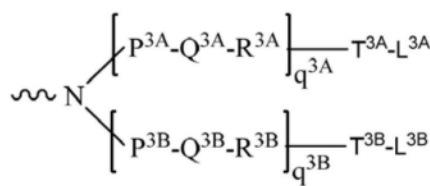
[0729] 在本发明的组合物和方法的某些实施例中,配体为通过二价或三价支链接头连接的一个或多个“GalNAc”(N-乙酰基半乳糖胺)衍生物。

[0730] 在某些实施例中,本发明的dsRNA与二价或三价支链接头缀合,所述二价或三价支链接头选自由式(XLV)至(XLVI)中任一项所示的结构组成的组:

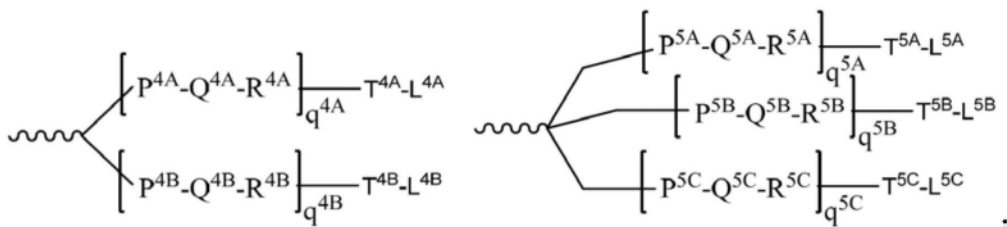
式 XXXV



式 XLVI



[0731]



式 XLVII

式 XLVIII

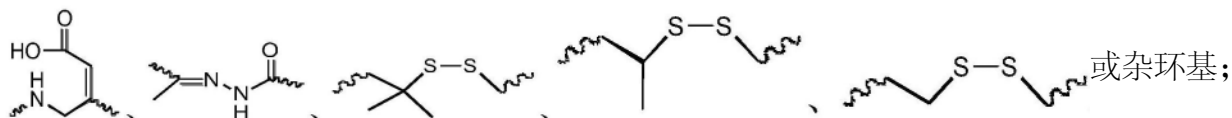
[0732] 其中:

[0733] $\text{q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{q}^{5\text{B}}$ 和 $\text{q}^{5\text{C}}$ 在每次出现时独立地表示0-20,并且其中重复单元可以相同或不同;

[0734] $\text{P}^{2\text{A}}$ 、 $\text{P}^{2\text{B}}$ 、 $\text{P}^{3\text{A}}$ 、 $\text{P}^{3\text{B}}$ 、 $\text{P}^{4\text{A}}$ 、 $\text{P}^{4\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{A}}$ 、 $\text{P}^{5\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{C}}$ 、 $\text{T}^{2\text{A}}$ 、 $\text{T}^{2\text{B}}$ 、 $\text{T}^{3\text{A}}$ 、 $\text{T}^{3\text{B}}$ 、 $\text{T}^{4\text{A}}$ 、 $\text{T}^{4\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{A}}$ 、 $\text{T}^{5\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{C}}$ 在每次出现时各自独立地为不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 CH_2 、 CH_2NH 或 CH_2O ;

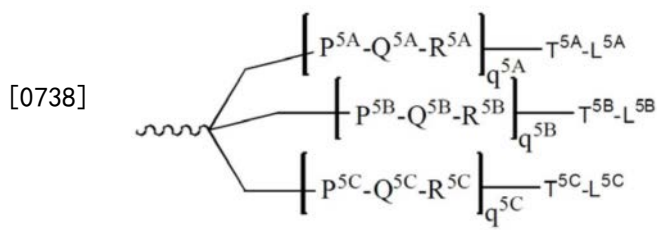
[0735] $\text{Q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{C}}$ 在每次出现时独立地为不存在、亚烷基、经取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可以被以下中的一个或多个中断或封端:O、S、S(O)、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}\equiv\text{C}$ 或C(O);

[0736] $\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ 每次出现时各自独立地为不存在、NH、O、S、 CH_2 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、CO、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、



[0737] $\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 和 $\text{L}^{5\text{C}}$ 表示配体;即每次出现时各自独立地为单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;并且 R^{a} 是H或氨基酸侧链。三价缀合的GalNAc衍生物特别适用于与RNAi药剂一起使用以抑制靶基因的表达,如式(XLIX)的表达:

式 XLIX



[0739] 其中 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 和 $\text{L}^{5\text{C}}$ 表示单糖,如GalNAc衍生物。

[0740] 适合的缀合GalNAc衍生物的二价和三价支链接头基团的实例包含但不限于上文所提及的式II、式VII、式XI、式X和式XIII的结构。

[0741] 教导RNA缀合物的制备的代表性美国专利包含但不限于美国专利第4,828,979号;

第4,948,882号;第5,218,105号;第5,525,465号;第5,541,313号;第5,545,730号;第5,552,538号;第5,578,717号;第5,580,731号;第5,591,584号;第5,109,124号;第5,118,802号;第5,138,045号;第5,414,077号;第5,486,603号;第5,512,439号;第5,578,718号;第5,608,046号;第4,587,044号;第4,605,735号;第4,667,025号;第4,762,779号;第4,789,737号;第4,824,941号;第4,835,263号;第4,876,335号;第4,904,582号;第4,958,013号;第5,082,830号;第5,112,963号;第5,214,136号;第5,082,830号;第5,112,963号;第5,214,136号;第5,245,022号;第5,254,469号;第5,258,506号;第5,262,536号;第5,272,250号;第5,292,873号;第5,317,098号;第5,371,241号;第5,391,723号;第5,416,203号;第5,451,463号;第5,510,475号;第5,512,667号;第5,514,785号;第5,565,552号;第5,567,810号;第5,574,142号;第5,585,481号;第5,587,371号;第5,595,726号;第5,597,696号;第5,599,923号;第5,599,928号;第5,688,941号;第6,294,664号;第6,320,017号;第6,576,752号;第6,783,931号;第6,900,297号;第7,037,646号;以及第8,106,022号,所述美国专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0742] 不需要均匀地修饰给定化合物中的所有位置,并且事实上,可以将上述修饰中的多于一个修饰并入单一化合物中或甚至iRNA内的单个核苷处。本发明还包含作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0743] 在本发明的上下文中,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”是iRNA化合物,优选地dsRNA药剂,其含有两个或更多个化学上不同的区,每个区由至少一个单体单元构成,即在dsRNA化合物的情况下的核苷酸。这些iRNA通常含有至少一个区,其中RNA被修饰以赋予iRNA增加的对核酸酶降解的抗性、增加的细胞摄取或增加的对靶核酸的结合亲和力。iRNA的另外的区可以作为能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。举例来说,RNase H是细胞核酸内切酶,所述细胞核酸内切酶切割RNA:DNA双链体的RNA链。因此,RNase H的激活使RNA靶标切割,由此大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交到同一靶标区的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,当使用嵌合dsRNA时,使用更短的iRNA通常可以获得相当的结果。可以通过凝胶电泳和必要时本领域已知的相关核酸杂交技术常规检测RNA靶标的切割。

[0744] 在某些情况下,iRNA的RNA可以被非配体基团修饰。许多非配体分子已与iRNA缀合以增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且进行此类缀合的程序可在科学文献中获得。此类非配体部分已经包含脂质部分,如胆固醇(Kubo,T.等人,《生物化学和生物物理研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》,2007,365(1):54-61;Letsinger等人,《美国国家科学院院刊》,1989,86:6553),胆酸(Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报》,1994,4:1053),硫醚,例如,己基-S-三苯基甲硫醇(Manoharan等人,《纽约科学院年鉴》,1992,660:306;Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报》,1993,3:2765),硫代胆固醇(Oberhauser等人,《核酸研究》,1992,20:533),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,《欧洲分子生物学组织杂志》,1991,10:111;Kabanov等人,《FEBS快报》,1990,259:327;Svinarchuk等人,《生物化学》,1993,75:49),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸酯(Manoharan等人,《四面体快报》,1995,36:3651;Shea等人,《核酸研究》,1990,18:3777),磷脂、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,《核苷与核苷酸》,1995,14:969)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,《四面体快报》,1995,36:3651),棕榈基部分(Mishra等人,《生物化学与生物物理学报》,1995,1264:

229),或十八胺或己基氨基-羰基-羰基氧基胆固醇部分(Crooke等人,《药理和实验治疗学杂志》,1996,277:923)。上面列出了教导制备此类RNA缀合物的代表性美国专利。典型的缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置处具有氨基接头的RNA。随后使用适当偶联试剂或激活试剂使氨基与所缀合的分子反应。缀合反应可以在RNA仍与固相载体结合的情况下或在RNA切割之后在溶液相中进行。通过HPLC纯化RNA缀合物通常产生纯缀合物。

[0745] V. 本公开的RNAi药剂的递送

[0746] 将本公开的RNAi药剂递送到细胞,例如受试者(如人受试者(例如,有需要的受试者,如患有HTT相关病症(例如,亨廷顿氏病)的受试者))体内的细胞可以通过多种不同方式实现。例如,可以通过在体外或体内使细胞与本公开的RNAi药剂接触来进行递送。还可以通过向受试者施用包括RNAi药剂(例如,dsRNA)的组合物直接进行体内递送。可替代地,体内递送可以通过施用一种或多种编码和引导RNAi药剂的表达的载体间接进行。下文将进一步讨论这些替代方案。

[0747] 通常,任何递送核酸分子的方法(体外或体内)都可以适于与本公开的RNAi药剂一起使用(参见例如,Akhtar S.和Julian RL.,(1992)《细胞生物学趋势(Trends Cell.Biol.)》2(5):139-144和W094/02595,所述文献通过全文引用的方式并入本文)。对于体内递送,为递送RNAi药剂需要考虑的因素包含例如,递送的药剂的生物稳定性、非特异性效应的预防以及递送的药剂在靶组织中的积累。可以通过局部施用,例如通过直接注射或植入到组织中或局部施用制剂来最小化RNAi药剂的非特异性效应。对治疗位点的局部施用使药剂的局部浓度最大化,限制药剂暴露于全身组织,所述全身组织可能被药剂伤害或可能降解药剂,并允许施用较低的总剂量的RNAi药剂。若干研究表明,当局部施用RNAi药剂时,基因产物的成功敲低。例如,在食蟹猴中通过玻璃体内注射(Tolentino,MJ.等人,(2004)《视网膜(Retina)》24:132-138)和在小鼠中通过视网膜下注射(Reich,SJ.等人,(2003)《分子视觉(Mol.Vis.)》9:210-216)眼内递送VEGF dsRNA两者均表明在年龄相关性黄斑变性的实验模型中预防新生血管形成。另外,在小鼠中直接瘤内注射dsRNA减小了肿瘤体积(Pille,J.等人,(2005)《分子疗法(Mol.Ther.)》11:267-274),并且可以延长荷瘤小鼠的存活期(Kim,WJ.等人,(2006)《分子疗法》14:343-350;Li,S.等人,(2007)《分子疗法》15:515-523)。RNA干扰也显示出通过直接注射局部递送到CNS的成功(Dorn,G.等人,(2004)《核酸(Nucleic Acids)》32:e49;Tan,PH.等人,(2005)《基因疗法》12:59-66;Makimura,H.等人,(2002)《BMC神经科学(BMC Neurosci.)》3:18;Shishkina,GT等人,(2004)《神经科学(Neuroscience)》129:521-528;Thakker,ER.等人,(2004)《美国国家科学院院刊》101:17270-17275;Akaneya,Y.等人,(2005)《神经生理学杂志(J.Neurophysiol.)》93:594-602),并且通过鼻内施用到达肺部(Howard,KA.等人,(2006)《分子疗法》14:476-484;Zhang,X.等人,(2004)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》279:10677-10684;Bitko,V.等人,(2005)《自然医学(Nat.Med.)》11:50-55)。为了全身地施用RNAi药剂以治疗疾病,可以修饰RNA或可替代地使用药物递送系统递送;这两种方法都用于防止dsRNA在体内被内切和外切核酸酶快速降解。RNA或药物载体的修饰也可以允许RNAi药剂靶向靶组织,并且避免不期望的脱靶效应(例如,不希望受理论束缚,本文所描述的GNA的使用已被鉴定为使dsRNA的种子区不稳定,导致相对于脱靶效应,此类dsRNA对在靶有效性的偏好增强,因为此类脱靶效应因此类种子区不稳定而显著减弱)。RNAi药剂可以通过与亲脂性基团(如胆固醇)的化学缀

合进行修饰,以增强细胞摄取并防止降解。例如,将针对与亲脂性胆固醇部分缀合的ApoB的RNAi药剂全身注射到小鼠体内,并且引起肝脏和空肠两者中apoB mRNA的敲低(Soutschek, J.等人,(2004)《自然》432:173-178)。在前列腺癌的小鼠模型中,RNAi药剂与适体的缀合已被证明可以抑制肿瘤生长并介导肿瘤消退(McNamara, JO.等人,(2006)《自然生物技术》24:1005-1015)。在替代性实施例中,可以使用药物递送系统(如纳米颗粒、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统)递送RNAi药剂。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)分子RNAi药剂的结合,并且还在带负电荷的细胞膜处增强相互作用以允许细胞高效地摄取RNAi药剂。阳离子脂质、树状物或聚合物可以与RNAi药剂结合或被诱导以形成包裹RNAi药剂的囊泡或胶束(参见例如, Kim SH.等人,(2008)《控释杂志(Journal of Controlled Release)》129(2):107-116)。当全身施用,囊泡或胶束的形成进一步防止RNAi药剂的降解。用于制备和施用阳离子RNAi药剂复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见例如, Sorensen, DR等人,(2003)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》327:761-766; Verma, UN.等人,(2003)《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》9:1291-1300; Arnold, AS等人,(2007)《高血压杂志(J.Hypertens.)》25:197-205,所述文献通过全文引用的方式并入本文)。可用于RNAi药剂的全身递送的药物递送系统的一些非限制性实例包含DOTAP(Sorensen, DR.等人(2003),同上; Verma, UN.等人,(2003),同上), Oligofectamine, “固体核酸脂质颗粒(solid nucleic acid lipid particles)” (Zimmermann, TS.等人,(2006)《自然》441:111-114), 心磷脂(Chien, PY.等人,(2005)《癌症基因疗法》12:321-328; Pal, A.等人,(2005)《国际肿瘤学杂志(Int J.Oncol.)》26:1087-1091), 聚乙烯亚胺(Bonnet ME.等人,(2008)《药学研究(Pharm.Res.)》8月16日印刷前的电子出版物; Aigner, A. (2006)《生物医学与生物技术杂志(J.Biomed.Biotechnol.)》71659), Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu, S. (2006)《分子药理学(Mol.Pharm.)》3:472-487)以及聚酰胺型胺(Tomalia, DA.等人,(2007)《生化学会会刊(Biochem.Soc.Trans.)》35:61-67; Yoo, H.等人(1999)《药学研究》16:1799-1804)。在一些实施例中, RNAi药剂与环糊精药剂形成用于全身施用的复合物。施用方法以及RNAi药剂和环糊精的药物组合物可以在美国专利第7,427,605号中找到,所述专利通过引用整体并入本文。

[0748] 本公开的某些方面涉及减少细胞中HTT靶基因表达的方法,包括使所述细胞与本公开的双链RNAi药剂接触。在一个实施例中,所述细胞是肝外细胞,任选地CNS细胞。

[0749] 本公开的另一方面涉及一种减少受试者的HTT靶基因的表达的方法,包括向受试者施用本公开的双链RNAi药剂。

[0750] 本公开的另一方面涉及治疗患有CNS病症的受试者的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开的双链靶向HTT的RNAi药剂,由此治疗所述受试者。可以通过本公开的方法治疗的示例性CNS病症包含亨廷顿氏病。

[0751] 在一个实施例中,鞘内施用双链RNAi药剂。通过鞘内施用双链RNAi药剂,所述方法可以减少脑(例如,纹状体)或脊柱组织(例如皮质、小脑、颈椎、腰椎和胸椎)中HTT靶基因的表达。

[0752] 为了便于说明,本部分中主要讨论了经修饰的siRNA化合物的调配物、组合物和方法。然而可以理解,这些调配物、组合物和方法可以与其它siRNA化合物,例如未经修饰的siRNA化合物一起实践,并且此类实践在本公开范围内。包含RNAi药剂的组合物可以通过多种途径向受试者递送。示例性途径包含:鞘内、静脉内、局部、直肠、肛门、阴道、鼻腔、肺部和眼部。

[0753] 本公开的RNAi药剂可以掺入适合施用的药物组合物中。此类组合物通常包含一种或多种RNAi药剂和药学上可接受的载体。如本文所使用的,语言“药学上可接受的载体”旨在包含与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸附延迟剂等。将此类培养基和药剂用于药物活性物质是本领域公知的。除了任何常规介质或药剂与活性化合物不相容的情况之外,设想介质或药剂在组合物中的使用。补充的活性化合物也可以并入所述组合物中。

[0754] 取决于期望局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域,可以以许多方式施用本公开的药物组合物。施用可以是局部(包含眼科、阴道、直肠、鼻内、透皮)、口服或肠胃外。肠胃外施用包含静脉滴注、皮下、腹膜内或肌肉注射,或鞘内或脑室内施用。

[0755] 可以选择施用的通路和位点来增强靶向。例如,为了靶向肌肉细胞,肌肉注射到所关注的肌肉中是合乎逻辑的选择。肺细胞可以通过施用气溶胶形式的RNAi药剂来被靶向。可以通过用RNAi药剂涂覆球囊导管并机械地引入RNA来靶向血管内皮细胞。

[0756] 用于局部施用的调配物可以包含透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必要的或期望的。带涂层的避孕套、手套等也可能是有用的。

[0757] 用于口服施用的组合物包含粉末或微粒、在水、糖浆、酏剂或非水性介质中的悬浮液或溶液、片剂、胶囊、含片或锭剂。在片剂的情况下,可以使用的载体包含乳糖、柠檬酸钠和磷酸盐。片剂中通常使用各种崩解剂,如淀粉,以及润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂是乳糖和高分子量聚乙二醇。当口服需要水性悬浮液时,核酸组合物可以与乳化剂和悬浮剂组合。如果期望,可以添加某些甜味剂或调味剂。

[0758] 用于鞘内或脑室内施用的组合物可以包含还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂的无菌水溶液。

[0759] 用于肠胃外施用的调配物可以包含还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂的无菌水溶液。脑室内注射可以通过脑室内导管来促进,例如,与储器连接。对于静脉内使用,可以控制溶质的总浓度以使调配物具有等渗性。

[0760] 在一个实施例中,siRNA化合物(例如,双链siRNA化合物或ssiRNA化合物)组合物的施用是肠胃外的,例如,静脉内(例如,作为团注或扩散输注)、皮内、腹膜内、肌肉内、鞘内、脑室内、颅内、皮下、经粘膜、经颊、舌下、内窥镜、直肠、口腔、阴道、局部、肺部、鼻内、尿道或眼部。施用可以由受试者提供,也可以由另一个人提供,例如医疗保健提供者。药物可以以测量剂量提供,或在递送计量的剂量的分配器中提供。下文将更详细地讨论选定的递送模式。

[0761] A. 鞘内施用。

[0762] 在一个实施例中,双链RNAi药剂通过鞘内注射(即注射到沐浴脑和脊髓组织的脊髓液中)递送。将RNAi药剂鞘内注射到脊髓液中可以以团注的方式进行,也可以通过植入皮肤下的微型泵进行,从而向脊髓液中提供siRNA的定期和持续递送。脊髓液从产生其的脉络丛开始循环,向下绕过脊髓和背根神经节,向上经过小脑和皮质到达蛛网膜颗粒,在那里流体可以离开CNS,这取决于注射的化合物的大小、稳定性和溶解性,鞘内递送的分子可以命中整个CNS的靶点。

[0763] 在一些实施例中,鞘内施用是通过泵进行的。所述泵可以通过外科手术植入的渗透泵。在一个实施例中,将渗透泵植入椎管的蛛网膜下腔以促进鞘内施用。

[0764] 在一些实施例中,鞘内施用是通过用于药物的鞘内递送系统进行的,所述鞘内递送系统包含含有一定体积药剂的储器和被配置成递送所述储器中含有的药剂的一部分的泵。关于这种鞘内递送系统的更多细节可以在WO 2015/116658中找到,所述文献通过全文引用的方式并入。

[0765] 鞘内注射的RNAi药剂的量可能在一个靶基因与另一个靶基因之间有差异,并且必须针对每个靶基因单独确定必须应用的适当量。通常,此量的范围为10 μ g至2mg,优选地50 μ g至1500 μ g,更优选地100 μ g至1000 μ g。

[0766] B. 本公开的载体编码的RNAi药剂

[0767] 靶向HTT基因的RNAi药剂可以从插入DNA或RNA载体的转录单元表达(参见例如, Couture, A等人,《TIG.》(1996), 12:5-10; WO 00/22113、WO 00/22114和US 6,054,299)。表达优选地是持续的(数月或更长时间),这取决于所使用的特定构建体和靶组织或细胞类型。这些转基因可以作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入,其可以是整合或非整合载体。还可以构建转基因以允许其作为染色体外质粒遗传(Gassmann等人, (1995)《美国国家科学院院刊》92:1292)。

[0768] RNAi药剂的一条或多条单独的链可以从表达载体上的启动子转录。在要表达两条单独的链以产生例如dsRNA的情况下,可以将两个单独的表达载体共同引入(例如,通过转染或感染)到靶细胞中。可替代地,dsRNA的每个单独的链都可以通过启动子转录,这两个启动子都位于同一表达质粒上。在一个实施例中,dsRNA被表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸,使得dsRNA具有茎和环结构。

[0769] RNAi药剂表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体,优选地与脊椎动物细胞相容的那些表达载体可以用于产生用于表达如本文所描述的RNAi药剂的重组构建体。RNAi药剂表达载体的递送可以是全身的,如通过静脉内或肌肉内施用,通过施用从患者体内移植的靶细胞,然后重新引入患者体内,或通过允许引入期望的靶细胞的任何其它方式。

[0770] 可以与本文所描述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包含但不限于(a)腺病毒载体;(b)逆转录病毒载体,包含但不限于慢病毒载体、莫罗尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus)等;(c)腺相关病毒载体;(d)单纯性疱疹病毒载体;(e)SV 40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头瘤病毒载体;(h)小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体,如正痘(例如,牛痘病毒载体)或禽痘(例如,金丝雀痘或禽痘);以及(j)辅助依赖性或不肠腺病毒。复制缺陷病毒也可能是有利的。不同的载体将或不会被并入到细胞的基因组中。如果期望,构建体可以包含用于转染的病毒序列。可替代地,构建体可以被并入能够附加型复制的载体中,例如EPV和EBV载体。用于重组表达RNAi药剂的构建体将通常需要调节元件,例如启动子、增强子等,以确保RNAi药剂在靶细胞中的表达。对于载体和构建体要考虑的其它方面是本领域已知的。

[0771] VI. 本发明的组合物

[0772] 本公开还包含组合物,包含药物组合物和调配物,所述药物组合物和调配物包含本公开的RNAi药剂。

[0773] 例如,在一个实施例中,本发明提供了包括两种或更多种,例如2种、3种或4种dsRNA药剂的组合物,如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂,例如包括形成双链区的有义链和反义链的dsRNA药剂,其中所述有义链中的每

一个或所述反义链中的每一个是独立地选自表2至表5中的任一个中的有义链和反义链的中的任一个组成的组的有义链或反义链。

[0774] 在另一个实施例中,本文提供了药物组合物,所述药物组合物含有如本文所描述的RNAi药剂或组合物以及药学上可接受的载体。含有RNAi药剂或组合物的药物组合物可用于治疗与HTT的表达或活性相关的疾病或病症,例如亨廷顿氏病。

[0775] 在一些实施例中,本发明的药物组合物是无菌的。在另一个实施例中,本发明的药物组合物是不含热原或无热原的。

[0776] 此类药物组合物基于递送模式调配。一个实例是调配用于通过肠胃外递送进行全身施用的组合物,例如通过静脉内(IV)、肌肉(IM)或用于皮下(subQ)递送。另一个实例是调配用于直接递送到CNS中的组合物,例如,通过鞘内或玻璃体内注射途径,任选地通过输注到脑(例如,纹状体)中,如通过连续泵输注。

[0777] 本公开的药物组合物可以以足以抑制HTT基因的表达的剂量施用。通常,本公开的RNAi药剂的合适剂量的范围将为约0.001至约200.0毫克/受体的千克体重/天,通常范围为约1至50毫克/千克体重/天。

[0778] 重复剂量方案可以包含定期施用治疗量的RNAi药剂,如每月至每六个月一次。在某些实施例中,RNAi药剂约每季度施用一次(即约每三个月施用一次)至约每年施用两次。

[0779] 在初始治疗方案(例如,负荷剂量)之后,可以在不太频繁的基础上施用治疗。

[0780] 在其它实施例中,单剂量的药物组合物可以是持久的,使得随后的剂量以不超过1个月、2个月、3个月或4个月或更长的间隔施用。在本公开的一些实施例中,单剂量的本公开的药物组合物每月施用一次。在本公开的其它实施例中,单剂量的本公开的药物组合物每季度施用一次至每年施用两次。

[0781] 本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排,这些因素包含但不限于疾病或病症的严重性、之前的治疗、所述受试者的总体健康或年龄以及存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的组合物对受试者进行的治疗可以包含单次治疗或系列治疗。

[0782] 小鼠遗传学的进步已经产生了许多用于研究各种人类疾病的小鼠模型,如HD,所述模型将受益于HTT的表达的减少。此类模型可以用于RNAi药剂的体内测试,以及用于确定治疗有效剂量。合适的啮齿动物模型是本领域已知的,并且包含例如在例如以下中描述的那些:Cepeda等人,《ASN神经(ASN Neuro)》(2010)2(2):e00033)和Pouladi等人,《自然评论(Nat Reviews)》(2013)14:708)。

[0783] 取决于期望局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域,可以以许多方式施用本公开的药物组合物。施用可以是局部的(例如,通过透皮贴剂)、肺部的(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包含通过雾化器);气管内的、鼻内的、表皮和透皮的、口服的或肠胃外的。肠胃外施用包含静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉注射或输注;皮下(例如,通过植入的装置);或颅内(例如,通过实质内、鞘内或脑室内施用)。

[0784] RNAi药剂可以以靶向特定组织的方式递送,如CNS(例如,脑的神经元、神经胶质或血管组织)。

[0785] 用于局部施用的药物组合物和调配物可以包含透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉末。常规的药物载体、水性基质、粉末或油性基质、增稠

剂等可以是必要的或期望的。带涂层的避孕套、手套等也可以是有用的。合适的局部调配物包含其中本公开特征的RNAi药剂与局部递送剂,如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些调配物。合适的脂质和脂质体包含中性的(例如,二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、负性的(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子的(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本公开特征的RNAi药剂可以被封装在脂质体中或可以与其形成复合物,具体地与阳离子脂质体。可替代地, RNAi药剂可以与脂质复合,具体地与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸和酯包含但不限于花生四烯酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或C₁₋₂₀烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部调配物详细描述于US 6,747,014中,所述文献通过引用并入本文。

[0786] A. 包括膜分子组装体的RNAi药剂调配物

[0787] 用于本公开的组合物和方法的RNAi药剂可以被调配成以膜分子组装体(例如,脂质体或胶束)形式递送。如本文所使用的,术语“脂质体”是指由排列在至少一个双层中(例如,一个双层或多个双层)的两亲性脂质组成的囊泡。脂质体包含具有由亲脂性材料形成的膜和水性内部的单层和多层囊泡。水性部分含有RNAi药剂组合物。亲脂性材料将水性内部与水性外部分离,所述水性外部通常不包含RNAi药剂组合物,尽管在一些实例中其可以。脂质体可用于将活性成分转移和递送到作用位点。由于脂质体膜在结构上与生物膜相似,当脂质体应用于组织时,脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体和细胞融合的进展,包含RNAi药剂的内部水性内容物被递送到细胞中,其中RNAi药剂可以与靶RNA特异性结合并可以介导RNAi。在一些情况下,脂质体也被特异性靶向,例如将RNAi药剂引导到特定的细胞类型。

[0788] 含有RNAi药剂的脂质体可以通过多种方法制备。在一个实例中,脂质体的脂质组分溶解在洗涤剂中,从而与脂质组分形成胶束。例如,脂质组分可以是两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。洗涤剂可以具有高临界胶束浓度,并且可以是非离子的。示例性洗涤剂包含胆酸盐、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和肌氨酸月桂酰酯。然后将RNAi药剂制剂添加到包含脂质组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与RNAi药剂相互作用,并且在RNAi药剂周围缩合以形成脂质体。缩合后,例如通过透析去除洗涤剂,以产生RNAi药剂的脂质体制剂。

[0789] 如果需要,可以在缩合反应期间,例如通过控制添加来添加有助于缩合的载体化合物。例如,载体化合物可以是除核酸以外的聚合物(例如,精胺或亚精胺)。也可以调节pH以利于缩合。

[0790] 在例如W0 96/37194中进一步描述了用于产生稳定的多核苷酸递送媒剂的方法,所述媒剂合并了多核苷酸/阳离子脂质复合物作为递送媒剂的结构组分,所述文献的全部内容通过引用并入本文。脂质体形成也可以包含以下中描述的示例性方法的一个或多个方面: Felgner, P.L.等人, (1987)《美国国家科学院院刊》8:7413-7417; 美国专利第4,897,355号; 美国专利第5,171,678号; Bangham等人, (1965)《分子生物学杂志 (M.Mol.Biol.)》23:238; Olson等人, (1979)《生物化学与生物物理学报》557:9; Szoka等人, (1978)《美国国家科学院院刊》75:4194; Mayhew等人, (1984)《生物化学与生物物理学报》775:169; Kim等人, (1983)《生物化学与生物物理学报》728:339; 以及Fukunaga等人, (1984)《内分泌学 (Endocrinol.)》

115:757。用于制备用作递送媒剂的合适大小的脂质聚集体的常用技术包含超声处理和冻融加挤压(参见例如,Mayer等人,(1986)《生物化学与生物物理学报》858:161。当期望持续较小(50nm至200nm)且相对均匀的聚集体时,可以使用微流体化(Mayhew等人,(1984)《生物化学与生物物理学报》775:169。这些方法很容易适用于将RNAi药剂制剂包装到脂质体中。

[0791] 脂质体分为两个广泛的类别。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的核酸分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电荷的核酸/脂质体复合物与带负电荷的细胞表面结合并且内化于核内体中。由于核内体中的酸性pH,脂质体破裂,从而将其内容物释放到细胞质中(Wang等人,(1987)《生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》,147:980-985)。

[0792] 对pH敏感的或带负电荷的脂质体截留核酸而不是与其复合。由于核酸和脂质两者均带有类似的电荷,所以会出现排斥而非复合物形成。然而,一些核酸包埋于这些脂质体的水性内部内。对pH敏感的脂质体已被用于将编码胸苷激酶基因的核酸递送到培养中的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou等人,(1992)《控释杂志》,19:269-274)。

[0793] 一种主要类型的脂质体组合物包含除天然来源的磷脂酰胆碱之外的磷脂。中性脂质体组合物例如可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成,而阴离子融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一种类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)形成,例如大豆PC和鸡蛋PC。另一种类型由磷脂或磷脂酰胆碱或胆固醇的混合物形成。

[0794] 在体外和体内将脂质体引入细胞中的其它方法的实例包含美国专利第5,283,185号;美国专利第5,171,678号;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;Felgner,(1994)《生物化学杂志》269:2550;Nabel,(1993)《美国国家科学院院刊》90:11307;Nabel,(1992)《人类基因疗法(Human Gene Ther.)》3:649;Gershon,(1993)《生物化学(Biochem)》32:7143;以及Strauss,(1992)《欧洲分子生物学组织杂志》11:417。

[0795] 还对非离子脂质体系统进行了检查,以确定其在向皮肤递送药物中的效用,特别是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包括NovasomeTM I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和NovasomeTM II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子脂质体调配物将环孢菌素A(cyclosporin-A)递送到小鼠皮肤的真皮中。结果表明,此类非离子脂质体系统在促进环孢菌素A沉积到皮肤的不同层中是有效的(Hu等人,(1994)《S.T.P.制药科学(S.T.P.Pharma.Sci.)》,4(6):466)。

[0796] 脂质体还包含“空间稳定的”脂质体,如本文所使用的,所述术语是指包括一种或多种特殊脂质的脂质体,当掺入脂质体中时,相对于缺乏此类特殊脂质的脂质体,所述脂质体导致提高的循环寿命。空间稳定的脂质体的实例是其中脂质体(A)的囊泡形成脂质部分的一部分包括一种或多种糖脂,如单唾液酸神经节苷脂G_{M1},或(B)用一种或多种亲水性聚合物衍生的脂质体,如聚乙二醇(PEG)部分。尽管不希望受到任何特定理论的束缚,但本领域认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG衍生的脂质的空间稳定的脂质体,这些空间稳定的脂质体的增强的循环半衰期源自减少进入网状内皮系统(RES)的细胞的摄取(Allen等人,(1987)《FEBS快报(FEBS Letters)》,223:42;Wu等人,(1993)《癌症研究》,53:3765)。

[0797] 包括一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos等人,《纽约科学院年鉴》,(1987),507:64报道了单唾液酸神经节苷脂G_{M1}、硫酸半乳糖脑苷酯和磷脂

酰肌醇改善脂质体血液半衰期的能力。这些发现在以下中进行了阐述: Gabizon等人, (《美国国家科学院院刊》(1988), 85, :6949)。Allen等人的美国专利第4,837,028号和W0 88/04924两者中公开了脂质体,其包括(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂 G_{M1} 或硫酸半乳糖脑苷酯。美国专利第5,543,152号(Webb等人)公开了包括鞘磷脂的脂质体。W0 97/13499(Lim等人)中公开了包括1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体。

[0798] 在一个实施例中,使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优点。非阳离子脂质体尽管不能与质膜有效融合,但在体内被巨噬细胞吸收,并且可以用于向巨噬细胞递送RNAi药剂。

[0799] 脂质体的另外的优点包含:从天然磷脂中获得的脂质体具有生物相容性且可生物降解;脂质体可以掺入多种水溶性和脂溶性药物;脂质体可以保护其内部区室中封装的RNAi药剂免受代谢和降解(Rosoff,《药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)》,Lieberman,Rieger和Banker(编辑),1988,第1卷,第245页)。制备脂质体调配物的重要考虑因素是脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的水性体积。

[0800] 带正电的合成阳离子脂质N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可以用于形成小脂质体,所述小脂质体与核酸自发相互作用以形成脂质-核酸复合物,所述复合物能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电荷的脂质融合,导致RNAi药剂的递送(参见例如,Felgner,P.L.等人,(1987)《美国国家科学院院刊》8:7413-7417,以及美国专利第4,897,355号中关于DOTMA以及其与DNA的使用的描述)。

[0801] DOTMA类似物,1,2-双(油酰基氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可以与磷脂组合使用,以形成DNA络合囊泡。LipofectinTM(马里兰州盖瑟斯堡的贝特斯达研究实验室(Bethesda Research Laboratories,Gaithersburg,Md.))是一种用于将高阴离子核酸递送到活组织培养细胞中的有效药剂,所述细胞包括带正电荷的DOTMA脂质体,所述脂质体与带负电荷的多核苷酸自发相互作用以形成复合物。当使用足够的带正电荷的脂质体时,所得复合物上的净电荷也是正的。以这种方式制备的带正电荷的复合物自发地与带负电荷的细胞表面连接,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送到例如组织培养细胞中。另一种可商购获得的阳离子脂质,1,2-双(油酰基氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷(“DOTAP”)(印第安纳州印第安纳波利斯的宝灵曼公司(Boehringer Mannheim,Indianapolis,Indiana))与DOTMA的不同之处在于,油酰基部分通过酯而不是醚键连接。

[0802] 其它报道的阳离子脂质化合物包含与多种部分缀合的那些,包含例如与两种类型的脂质之一缀合的羧精胺,并且包含如5-羧基精胺基甘氨酸二十八烷基酰胺(“DOGS”)(TransfectamineTM,威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega,Madison,Wisconsin))和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基精酰基-酰胺(“DPPES”)等化合物(参见例如,美国专利第5,171,678号)。

[0803] 另一种阳离子脂质缀合物包含脂质与胆固醇的衍生化(“DC-Chol”),其已与DOPE组合调配成脂质体(参见,Gao,X.和Huang,L.,(1991)《生物化学与生物物理学研究通讯》179:280)。据报道,通过将聚赖氨酸与DOPE缀合制备的脂聚赖氨酸在血清存在下对转染有效(Zhou,X.等人,(1991)《生物化学与生物物理学报》1065:8)。对于某些细胞系,这些含有缀合的阳离子脂质的脂质体据说表现出比所述含有DOTMA的组合物更低的毒性并提供更有效的转染。其它可商购获得的阳离子脂质产品包含DMRIE和DMRIE-HP(加利福尼亚州拉荷亚

市的Vical公司(Vical, La Jolla, California))和Lipofectamine (DOSPA) (马里兰州盖瑟斯堡的生命技术有限公司(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland))。WO 98/39359和WO 96/37194中描述了适用于递送寡核苷酸的其它阳离子脂质。

[0804] 脂质体调配物特别适合局部施用,脂质体呈现出超过其它调配物的若干个优点。此类优点包含减少了与施用的药物的高全身吸收相关的副作用,增加了施用的药物在期望的靶标的积聚,以及将RNAi药剂施用到皮肤中的能力。在一些实施例,脂质体用于将RNAi药剂递送到表皮细胞,并且还用于增强RNAi药剂向真皮组织中的渗透,例如到皮肤中。例如,脂质体可以局部应用。已经记录了将调配成脂质体的药物局部递送到皮肤(参见例如,Weiner等人,(1992)《药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting)》,第2卷,405-410和du Plessis等人,(1992)《抗病毒研究(Antiviral Research)》,18:259-265;Mannino,R.J.和Fould-Fogerite,S.,(1998)《生物技术(Biotechniques)》6:682-690;Itani,T.等人,(1987)《基因(Gene)》56:267-276;Nicolau,C.等人,(1987)《酶学方法(Meth.Enzymol.)》149:157-176;Straubinger,R.M.和Papahadjopoulos,D.(1983)《酶学方法》101:512-527;Wang,C.Y.和Huang,L.,(1987)《美国国家科学院院刊》84:7851-7855)。

[0805] 还对非离子脂质体系统进行了检查,以确定其在向皮肤递送药物中的效用,特别是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包括Novasome I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和Novasome II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子脂质体调配物将药物递送到小鼠皮肤的真皮中。具有RNAi药剂的此类调配物可用于治疗皮肤病学病症。

[0806] 包含RNAi药剂的脂质体可以被制成高度可变形的。此类可变形性可以使脂质体渗透穿过小于脂质体平均半径的孔。例如,传递体是一类可变形的脂质体。传递体可以通过在标准脂质体组合物中添加表面边缘激活剂(通常是表面活性剂)来制备。包含RNAi药剂的传递体可以例如通过感染皮下递送,以便将RNAi药剂递送到皮肤中的角质细胞。为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适当的透皮梯度的影响下穿过一系列直径小于50nm的细孔。另外,由于脂质特性,这些传递体可以自我优化(适应孔的形状,例如皮肤中的孔)、自我修复,并且可以经常在不碎裂的情况下达到其靶标,并且经常自我装载。

[0807] 适用于本公开的其它调配物在以下中进行了描述:于2008年1月2日提交的美国临时申请序列号61/018,616;于2008年1月2日提交的61/018,611;于2008年3月26日提交的61/039,748;于2008年4月22日提交的61/047,087和于2008年5月8日提交的61/051,528。于2007年10月3日提交的PCT申请第PCT/US2007/080331号也描述了适用于本公开的调配物。

[0808] 传递体是又另一种类型的脂质体,是高度可变形的脂质聚集体,是药物递送媒剂的有吸引力的候选者。传递体可以被描述为脂滴,其可高度可变形,使得其很容易渗透穿过比液滴小的孔。传递体能够适应其使用的环境,例如其是自我优化的(适应皮肤中孔的形状)、自我修复的,经常在不碎裂的情况下达到其靶标,并且经常自我装载。为了制备传递体,可以向标准脂质体组合物添加表面边缘激活剂,通常是表面活性剂。传递体已被用于将血清白蛋白递送到皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已被证明与皮下注射含有血清白蛋白的溶液一样有效。

[0809] 表面活性剂广泛应用于本文所描述的调配物中,尤其是乳液(包含微乳液)和脂质体。对许多不同类型的表面活性剂(天然和合成两者)的特性进行分类和排序的最常见方式

是通过使用亲水/亲脂平衡 (HLB)。亲水基团 (也称为“头”) 的性质为调配物中使用的不同表面活性剂的分类提供了最有力的方法 (Rieger,《药物剂型》,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司 (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.), 1988, 第285页)。

[0810] 如果表面活性剂分子未离子化,则将其归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆品中有着广泛的应用,并且可用于多种pH值。通常,根据其结构,其HLB值的范围为2至约18。非离子表面活性剂包含非离子酯,如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子烷醇酰胺和醚,如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物也包含在此类别中。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类别中最受欢迎的成员。

[0811] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有负电荷,则表面活性剂被分类为阴离子。阴离子表面活性剂包含羧酸酯,如皂类、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯,如烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯,磺酸酯,如烷基苯磺酸酯、酰基异硫辛酸酯、酰基牛磺酸酯和磺基琥珀酸酯,以及磷酸酯。阴离子表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸酯和皂类。

[0812] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有正电荷,则表面活性剂被分类为阳离子。阳离子表面活性剂包含季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是此类别化合物中使用最多的成员。

[0813] 如果表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,则表面活性剂被归类为两性。两性表面活性剂包含丙烯酸衍生物、经取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱和磷脂。

[0814] 对表面活性剂在药物产品、调配物和乳液中的应用进行了综述 (Rieger,《药物剂型》,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司,1988,第285页)。

[0815] 用于本公开的方法中的RNAi药剂也可以作为胶束调配物提供。“胶束”在本文中被定义为特定类型的分子组装体,其中两亲性分子以球形结构排列,使得分子的所有疏水部分向内,使亲水部分与周围的水相接触。如果环境是疏水的,则存在相反的排列。

[0816] 适合通过透皮膜递送的混合胶束调配物可以通过混合siRNA组合物的水溶液、碱金属C₈至C₂₂烷基硫酸酯与胶束形成化合物来制备。示例性胶束形成化合物包含卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、单油酸甘油酯、单油酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧代胆酸基甘氨酸以及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚以及其类似物、聚多卡醇烷基醚以及其类似物、鹅脱氧胆酸酯、脱氧胆酸酯以及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸酯的同时或之后添加。基本上任何种类的成分混合都会形成混合的胶束,但为了提供更小大小的胶束而剧烈混合。

[0817] 在一种方法中,制备含有siRNA组合物和至少碱金属烷基硫酸酯的第一胶束混合物。然后将第一胶束混合物与至少三种胶束形成化合物混合以形成混合的胶束混合物。在另一种方法中,通过将siRNA混合物、碱金属烷基硫酸酯和至少一种胶束形成化合物混合,然后在剧烈混合的情况下添加剩余的胶束形成化合物来制备胶束混合物。

[0818] 苯酚或间甲酚可以添加到混合的胶束混合物中,以稳定调配物并防止细菌生长。可替代地,苯酚或间甲酚可以与胶束形成成分一起添加。在形成混合的胶束混合物之后,也可以添加等渗剂,如甘油。

[0819] 为了将胶束调配物作为喷雾递送,可以将所述调配物放入气溶胶分配器中,并且

在分配器中装入推进剂。处于压力下的推进剂在分配器中呈液体形式。调节成分的比率,使水相和推进剂相成为一个相,即有一个相。如果有两个相,则有必要在分配一部分内容物之前摇动分配器,例如通过计量阀。分配的剂量的药剂以精细喷雾的形式从计量阀推进。

[0820] 推进剂可以包含含氢氯氟烃、含氢氟碳化合物、二甲醚和二乙醚。在某些实施例中,可以使用HFA134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0821] 基本成分的具体浓度可以通过相对简单的实验来确定。为了通过口腔吸收,通常期望通过注射或通过胃肠道施用增加剂量,例如至少两倍或三倍。

[0822] B. 脂质颗粒

[0823] RNAi药剂,例如本公开中的dsRNA可以完全封装在脂质调配物中,例如LNP或其它核酸脂质颗粒中。

[0824] 如本文所使用的,术语“LNP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP对于全身应用非常有用,因为其在静脉内(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命并在远隔位点(例如,与施用位点物理分离的位点)累积。LNP包含“pSPLP”,其包含W000/03683中所述的封装的缩合剂-核酸复合物。本公开的颗粒的平均直径通常为约50nm至约150nm、更通常地为约60nm至约130nm、更通常地为约70nm至约110nm、最通常地为约70nm至约90nm,并且基本无毒。另外,核酸当存在于本公开的核酸-脂质颗粒中时在水溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒以及其制备方法在例如以下中公开:美国专利第5,976,567号;第5,981,501号;第6,534,484号;第6,586,410号;第6,815,432号;美国专利公开第2010/0324120号和WO 96/40964。

[0825] 在一个实施例中,脂质与药物的比率(质量/质量比)(例如,脂质与dsRNA的比率)将在约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。上述范围中间的范围也被认为是本公开的一部分。

[0826] 本领域已经描述了用于递送RNAi药剂的某些特定LNP调配物,包含例如“LNP01”调配物,如例如在WO 2008/042973中描述的,所述文献特此通过引用并入。

[0827] 在下表中鉴定了另外的示例性脂质-dsRNA调配物。

[0828]

	可电离/阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质缀合物 脂质:siRNA 比率
SNALP-1	1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA 约 7:1
2-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA 约 7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 6:1

[0829]

LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊烯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-4-(二甲基氨基)丁酸三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂二基)二十二烷-2-醇 (Tech G1)	Tech G1/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
[0830] LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1

[0831] DSPC:二硬脂酰基磷脂酰胆碱

[0832] DPPC:二棕榈酰基磷脂酰胆碱

[0833] PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰基甘油(C14-PEG或PEG-C14)(平均摩尔重量为2000的PEG)

[0834] PEG-DSG:PEG-联苯乙烯基甘油(C18-PEG或PEG-C18)(平均摩尔重量为2000的PEG)
PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙胺(平均摩尔重量为2000的PEG)

[0835] 在WO 2009/127060中描述了包括SNALP(1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的调配物,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0836] 包括XTC的调配物在WO 2010/088537中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0837] 例如,在美国专利公开第2010/0324120号中描述了包括MC3的调配物,所述文献的全部内容特此通过引用并入。

[0838] 包括ALNY-100的调配物在WO 2010/054406中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0839] 包括C12-200的调配物在WO 2010/129709中进行了描述,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0840] 用于口服施用的组合物和调配物包含粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、在水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或微型片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是期望的。在一些实施例中,口服调配物是其中本公开特征的dsRNA与一种或多种增渗剂表面活性剂和螯合剂一起施用的那些调配物。合适的表面活性剂包含脂肪酸或其酯或盐、胆汁酸或其盐。合适的胆汁酸/盐包含鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡胆酸、甘胆酸、甘脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺基-24,25-二氢-富西酸钠和甘二氢富西酸钠。合适的脂肪酸包含花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癩酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸、三癩酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癩酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如,钠)。在一些实施例中,使用增渗剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。示例性组合是月桂酸、癩酸和UDCA的钠盐。另外的增渗剂包含聚氧乙烯-9-十二烷基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。本公开特征的dsRNA可以口服、以包含喷雾干燥颗粒的颗粒形式递送,或复合以形成微型或纳米颗粒。dsRNA络合剂包含聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯;聚氧乙烷、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生的聚胺、支链淀粉、纤维素和淀粉。合适的络合剂包含壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精蛋白、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如,对氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-右旋糖酐、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、藻酸酯和聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服调配物以及其制备在以下中详细描述:美国专利6,887,906、U.S.2003/0027780和美国专利第6,747,014号,所述文献中的每一个通过引用并入本文。

[0841] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、脑室内或肝内施用的组合物和调配物可以包

含无菌水溶液,所述无菌水溶液也可以含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂,如但不限于增渗剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂。

[0842] 本公开的药物组合物包含但不限于溶液、乳液和含有脂质体的调配物。这些组合物可以由多种组分产生,所述组分包含但不限于预成型液体、自乳化固体和自乳化半固体。特别优选的是在治疗HTT相关疾病或病症时靶向脑的调配物。

[0843] 本公开的药物调配物可以方便地以单位剂型存在,可以根据制药工业中众所周知的常规技术制备。此类技术包含使活性成分与药物载体或赋形剂缔合的步骤。一般而言,通过使活性成分与液体载体或精细固体载体或两者均匀充分地缔合并且然后在必要时使产物成形来制备所述调配物。

[0844] 本公开的组合物可以调配成许多可能的剂型中的任一种,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本公开的组合物也可以被调配成在水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步含有增加悬浮液粘度的物质,包含例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0845] C. 另外的调配物

[0846] i. 乳液

[0847] 本公开的组合物可以制备并调配成乳液。乳液通常是一种液体以液滴的形式分散在另一种液体中的非均相系统,通常直径超过 $0.1\mu\text{m}$ (参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY) (第8版); Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.), 第1卷, 第199页; Rosoff, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页; Block, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第2卷, 第335页; Higuchi 等人, 《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》, 宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Co., Easton, Pa.), 1985, 第301页)。乳液通常是两相系统, 包括两个相互紧密混合和分散的不混溶液相。通常, 乳液可以是油包水(w/w) 或水包油(w/w) 类型。当水相被精细地分成微小的液滴并分散到本体油相中时, 所得到的组合物被称为油包水(w/o) 乳液。可替代地, 当油相被精细地分成微小的液滴并分散到本体水相中时, 所得到的组合物被称为水包油(o/w) 乳液。除了分散相和活性药物之外, 乳液还可以含有另外的组分, 所述活性药物可以以溶液的形式存在于水相、油相中或其本身作为单独的相。药物赋形剂, 如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂也可以根据需要存在于乳液中。药物乳液也可以是包含多于两相的多种乳液, 例如在油包水包油(o/w/o) 和水包油包水(w/o/w) 乳液的情况下。此类复杂的调配物通常提供简单的二元乳液所没有的某些优点。其中o/w乳液的单个油滴包围小水滴的多重乳液构成w/o/w乳液。类似地, 包围在油状连续相中稳定的水滴中的油滴系统提供o/w/o乳液。

[0848] 乳液的特征在于几乎没有或没有热力学稳定性。通常, 乳液的分散或不连续相很好地分散到外部或连续相中, 并且通过乳化剂或调配物的粘度维持这种形式。乳液的任何一个相都可以是半固体或固体, 如同乳液型软膏基质和乳膏的情况一样。稳定乳液的其它

方法需要使用可以并入乳液任一相中的乳化剂。乳化剂可以大致分为四类：合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收碱和精细分散的固体（参见例如，《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》，Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司（第8版）；Idson,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第199页）。

[0849] 已发现合成表面活性剂（也称为表面活性剂）在乳液调配物中具有广泛的适用性，并且已在文献中进行了综述（参见例如，《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》，Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司（第8版）；Rieger,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第285页；Idson,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第199页）。表面活性剂通常是两亲性的，并且包括亲水性和疏水性部分。表面活性剂的亲水性与疏水性的比率被称为亲水/亲脂平衡（HLB），并且是在调配物的制备中对表面活性剂进行分类和选择的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质分为不同的类别：非离子、阴离子、阳离子和两性（参见例如，《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》，Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司（第8版）；Rieger,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第285页）。

[0850] 乳液调配物中使用的天然存在的乳化剂包含羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收碱具有亲水特性，使得其可以吸收水形成w/o乳液，但仍保持其半固体稠度，如无水羊毛脂和亲水性矿脂。精细分散的固体也被用作良好的乳化剂，特别是与表面活性剂和粘性制剂组合使用。这些包含极性无机固体，如重金属氢氧化物，非溶胀粘土，如膨润土、凹凸棒石、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸镁铝，颜料和非极性固体，如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0851] 乳液调配物中还包含多种非乳化材料，并且有助于乳液的特性。这些包含脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酸酯、保湿剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂（Block,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第335页；Idson,《药物剂型》，Lieberman, Rieger 和 Banker（编辑），1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，第1卷，第199页）。

[0852] 亲水胶体或水胶体包含天然存在的树胶和合成聚合物，如多糖（例如，阿拉伯胶、琼脂、藻酸、角叉菜胶、瓜尔豆胶、卡拉亚胶和黄芪胶）、纤维素衍生物（例如，羧甲基纤维素和羧丙基纤维素）以及合成聚合物（例如，碳聚合物、纤维素醚和羧乙烯基聚合物）。这些在水中分散或膨胀以形成胶体溶液，所述胶体溶液通过在分散相液滴周围形成强界面膜并通过增加外部相的粘度来稳定乳液。

[0853] 由于乳液通常含有许多成分，如碳水化合物、蛋白质、甾醇和磷脂，所述成分可以很容易地支持微生物的生长，因此这些调配物通常掺入防腐剂。乳液调配物中包含的常用的防腐剂包含尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。抗氧化剂通常也被添加到乳液调配物中，以防止调配物变质。所使用的抗氧化剂可以是自由基清除剂，如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯，或还原剂，如抗坏

血酸和焦亚硫酸钠,以及抗氧化剂增效剂,如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0854] 乳液调配物通过皮肤、口服和肠胃外途径的应用以及其制造方法已经在文献中进行了综述(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》,Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。用于口服递送的乳液调配物由于易于调配以及从吸收和生物利用度的角度来看的功效而被非常广泛地使用(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rosoff, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页; Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。矿物油基泻药、油溶性维生素和高脂肪营养制剂通常是作为o/w乳液口服施用的材料。

[0855] ii. 微乳液

[0856] 在本公开的一个实施例中, RNAi 药剂和核酸的组合物被调配为微乳液。微乳液可以定义为水、油和两亲物的系统, 其是单一的光学各向同性和热力学稳定的液体溶液(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rosoff, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页)。通常, 微乳液是通过首先将油分散在表面活性剂水溶液中, 并且然后添加足量的第四组分(通常是中链长醇)以形成透明系统而制备的系统。因此, 微乳液也被描述为两种不混溶液体的热力学稳定、各向同性透明的分散体, 所述两种不混溶液体通过表面活性剂的界面膜来稳定(Leung 和 Shah, 《药物的控制释放: 聚合物和聚集系统 (Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems)》, Rosoff, M. 编辑, 1989, 纽约的 VCH 出版社 (VCH Publishers, New York), 第185-215页)。微乳液通常通过三种至五种组分的组合制备, 所述组分包含油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质。微乳液是油包水(w/o)还是水包油(o/w)类型取决于所用的油和表面活性剂的特性, 以及表面活性剂分子的极性头和烃尾的结构和几何堆积(Schott, 《雷明顿药物科学》, 宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司, 1985, 第271页)。

[0857] 利用相图的现象学方法已经得到了广泛的研究, 并且为本领域技术人员提供了关于如何调配微乳液的全面知识(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版), 纽约州纽约; Rieger, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页; Block, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第335页)。与传统乳液相比, 微乳液提供了将水不溶性药物溶解在自发形成的热力学稳定液滴调配物中的优点。

[0858] 用于制备微乳液的表面活性剂包含但不限于离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油醚、聚甘油脂肪酸酯、单月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(MO310)、单油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、单癸酸十甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(MO750)、连续油酸十甘油酯(SO750)、十油酸十甘油酯(DA0750), 单独或与助

表面活性剂组合。助表面活性剂,通常是短链醇,如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,通过渗透到表面活性剂膜中,并且由于表面活性剂分子之间产生的空隙空间而产生无序膜,从而增加界面流动性。然而,可以在不使用助表面活性剂的情况下制备微乳液,并且本领域已知无醇自乳化微乳液系统。水相通常可以是但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包含但不限于材料,如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中链(C8-C12)单、二和三甘油酯、聚氧乙烯化甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇化甘油酯、饱和聚乙二醇化C8-C10甘油酯、植物油和硅酮油。

[0859] 从药物增溶和增强药物吸收的角度来看,微乳液尤其引人关注。已经提出了基于脂质的微乳液(o/w和w/o两者)来提高包含肽在内的药物的口服生物利用度(参见例如,美国专利第6,191,105号;第7,063,860号;第7,070,802号;第7,157,099号;Constantinides等人,《药物研究(Pharmaceutical Research)》,1994,11,1385-1390;Ritschel,《实验和临床药理学的方法和发现(Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.)》,1993,13,205)。微乳液具有改善药物增溶、保护药物免受酶水解、由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性的改变而可能增强药物吸收、易于制备、相对于固体剂型易于口服施用、提高临床效力以及降低的毒性等优点(参见例如,美国专利第6,191,105号;第7,063,860号;第7,070,802号;第7,157,099号;Constantinides等人,《药物研究》,1994,11,1385;Ho等人,《药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)》,1996,85,138-143)。当微乳液的组分在环境温度下聚集在一起时,通常可以自发形成微乳液。这在调配不耐热药物、肽或RNAi药剂时尤其有利。微乳液在化妆品和药物应用两者中对活性组分的透皮递送也很有效。预期本公开的微乳液组合物和调配物将促进RNAi药剂和核酸从胃肠道的增加的全身吸收,以及改善RNAi药剂和核酸的局部细胞摄取。

[0860] 本公开的微乳液还可以含有另外的组分和添加剂,如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(Grill 3)、Labrasol和增渗剂,以改善调配物的特性并增强本公开的RNAi药剂和核酸的吸收。本公开的微乳液中使用的增渗剂可以分为五大类之一——表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂(Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems)》,1991,第92页)。这些类别中的每一个都已经在上文进行了讨论。

[0861] iii.微颗粒

[0862] 本公开的RNAi药剂可以掺入到颗粒中,例如微颗粒中。微颗粒可以通过喷雾干燥生产,但也可以通过其它方法生产,包含冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合。

[0863] iv.增渗剂

[0864] 在一个实施例中,本公开使用各种增渗剂来实现核酸,特别是RNAi药剂到动物皮肤的有效递送。大多数药物以电离和非电离两种形式存在于溶液中。然而,通常只有脂溶性或亲脂性药物容易穿过细胞膜。已经发现,如果用增渗剂处理待穿过的膜,即使是非亲脂性药物也可以穿过细胞膜。除了有助于非亲脂性药物穿过细胞膜的扩散外,增渗剂还可以增强亲脂性药物的渗透性。

[0865] 增渗剂可以分为五大类之一,即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂(参见例如,Malmsten,M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants

and polymers in drug delivery)》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司(Informa Health Care, New York, NY), 2002; Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页)。下面更详细地描述上述每一类增渗剂。

[0866] 表面活性剂(surfactant)(或“表面活性剂(surface-active agent)”)是化学实体,当其溶解在水溶液中时,会降低溶液的表面张力或水溶液与另一种液体之间的界面张力,从而增强RNAi药剂通过粘膜的吸收。除了胆汁盐和脂肪酸之外,这些增渗剂还包含例如,十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-十二烷基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚(参见例如, Malmsten, M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司, 2002; Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页);以及全氟化学乳液,如FC-43。Takahashi等人,《药学和药理学杂志(J. Pharm. Pharmacol.)》,1988, 40, 252)。

[0867] 作为增渗剂的各种脂肪酸以及其衍生物包含例如,油酸、月桂酸、癩酸(正癩酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸、三癩酸、单油酸甘油酯(1-单油酰基-rac-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癩酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮,酰基肉碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯(例如,甲基、异丙基和叔丁基)以及其单甘油酯和二甘油酯(即油酸酯、月桂酸酯、癩酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(参见例如, Touitou, E.等人,《药物递送的增强(Enhancement in Drug Delivery)》,马萨诸塞州丹弗斯的CRC出版社(CRC Press, Danvers, MA), 2006; Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页; Muranishi,《治疗药物载体系统的关键综述》,1990, 7, 1-33; El Hariri等人,《药学和药理学杂志》,1992, 44, 651-654)。

[0868] 胆汁的生理作用包含促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如, Malmsten, M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司, 2002; Brunton, 第38章:《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第9版, Hardman等人,编辑,纽约的麦格劳·希尔出版社(McGraw-Hill, New York), 1996, 第934-935页)。各种天然胆汁盐以及其合成衍生物作为增渗剂。因此,术语“胆汁盐”包含胆汁的任何天然存在的组分以及其任何合成衍生物。合适的胆汁盐包含例如,胆酸(或其药学上可接受的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡胆酸(葡胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、甘脱氧胆酸(甘脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺基-24,25-二氢-富西酸钠(STDHF)、甘二氢富西酸钠和聚氧乙烯-9-十二烷基醚(POE)(参见例如, Malmsten, M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司, 2002; Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页; Swinyard, 第39章:《雷明顿药物科学》,第18版, Gennaro编辑,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司, 1990, 第782-783页; Muranishi,《治疗药物载体系统的关键综述》,1990, 7, 1-33; Yamamoto等人,《药理和实验治疗学杂志(J. Pharm. Exp. Ther.)》,1992, 263, 25; Yamashita等人,《药物科学杂志》,1990, 79, 579-583)。

[0869] 如与本公开结合使用的螯合剂可以定义为通过与溶液形成复合物来从溶液中去金属离子的化合物,其结果是增强了RNAi药剂通过粘膜的吸收。关于其本公开中作为增渗剂的用途,螯合剂还具有作为DNase抑制剂的另外的优点,因为大多数表征的DNA核酸酶需要二价金属离子进行催化,并且因此被螯合剂抑制(Jarrett,《色谱杂志

(J.Chromatogr.)》,1993,618,315-339)。合适的螯合剂包含但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸酯(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸酯和高香草酸酯)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、 β -二酮(烯胺)的月桂醇聚醚-9和N-氨基酰基衍生物(参见例如,Katdare,A.等人,《用于药物、生物技术和药物递送的赋形剂开发(Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery)》,马萨诸塞州丹弗斯的CRC出版社,2006;Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页;Muranishi,《治疗药物载体系统的关键综述》,1990,7,1-33;Buur等人,《控释杂志(J.Control Rel.)》,1990,14,43-51)。

[0870] 如本文所使用的,非螯合非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或表面活性剂表现出不显著的活性,但仍然增强RNAi药剂通过消化道粘膜的吸收的化合物(参见例如,Muranishi,《治疗药物载体系统的关键综述》,1990,7,1-33)。此类增渗剂包含例如,不饱和环脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(Lee等人,《治疗药物载体系统的关键综述》,1991,第92页);和非甾体抗炎剂,如双氯芬酸钠、吲哚美辛和苯基丁氮酮(Yamashita等人,《药学和药理学杂志》,1987,39,621-626)。

[0871] 在细胞水平上增强RNAi药剂的摄取的药剂也可以添加到本公开的药物和其它组合物中。例如,阳离子脂质,如lipofectin(Junichi等人,美国专利第5,705,188号)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子,如聚赖氨酸(WO 97/30731)也已知可增强dsRNA的细胞摄取。

[0872] 其它药剂可以用于增强施用的核酸的渗透,包含二醇,如乙二醇和丙二醇,吡咯,如2-吡咯、氮酮和萜烯,如柠檬烯和薄荷酮。

[0873] vi.赋形剂

[0874] 与载体化合物相比,“药物载体”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其它用于将一种或多种核酸递送到动物的药理学惰性媒剂。赋形剂可以是液体的或固体的并且在考虑计划的施用方式的情况下被选择,以便在与核酸和给定药物组合物的其它组分组合时提供期望的体积、一致性等。典型的药物载体包含但不限于结合剂(例如,预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其它糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶体二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟乙酸淀粉钠等);以及润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0875] 适于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用于调配本公开的组合物。适合的药学上可接受的载体包含但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0876] 用于局部施用核酸的调配物可以包含无菌和非无菌水溶液、普通溶剂(如醇)中的非水溶液或核酸在液体或固体油基中的溶液。所述溶液还可以含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂。可以使用适于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0877] 适合的药学上可接受的赋形剂包含但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0878] vii. 其它组分

[0879] 本公开的组合物可以另外含有在药物组合物中常规存在的其它附属组分,处于其现有技术确定的使用水平。因此,例如,组合物可以含有另外的相容性药物活性材料,例如,止痒药、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可以含有可用于物理调配本公开的组合物的各种剂型的另外的材料,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、不透明剂、增稠剂和稳定剂。然而,这种材料,在添加时,不应该不适当地干扰本公开的组合物的成分的生物活性。调配物可以进行灭菌,并且如果期望的话,可以与不与所述调配物的核酸有害地相互作用的助剂,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、调味剂或芳香物质等混合。

[0880] 含水悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质包含例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0881] 在一些实施例中,本公开特征的药物组合物包含(a)一种或多种RNAi药剂和(b)通过非RNAi机制发挥作用并且可用于治疗HTT相关病症的一种或多种药剂。此类药剂的实例包含但不限于单胺抑制剂、利血平、抗惊厥剂、抗精神病药剂和抗抑郁药。

[0882] 此类化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物中的标准制药程序来确定,例如用于确定LD₅₀(对50%群体致死的剂量)和ED₅₀(对50%群体治疗有效的剂量)。在毒性作用和治疗作用之间的剂量比为治疗指数,并且其可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出高治疗指数的化合物是优选的。

[0883] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于调配用于在人中使用的剂量范围。本公开中本文特征的组合物的剂量通常在包含ED₅₀的循环浓度范围内,几乎没有或没有毒性。根据所采用的剂型和所利用的施用途径,剂量可以在此范围内变化。对于本公开特征的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以最初根据细胞培养测定估计。可以在动物模型中调配剂量,以达到化合物的循环血浆浓度范围,或在适当的情况下,达到靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(,例如,实现多肽浓度的降低),所述范围包含细胞培养中确定的IC₅₀(即达到症状的一半最大抑制的测试化合物的浓度)。可以使用此类信息来更精确地确定人体中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0884] 除了其施用之外,如上所述,本公开中特征的RNAi药剂可以与其它已知药剂组合施用,所述其它已知药剂在治疗由核苷酸重复表达介导的病理过程中有效。在任何情况下,施用医师可以基于使用本领域已知或本文所描述的功​​效的标准测量观察到的结果来调节RNAi药剂施用的量和时间。

[0885] VII. 试剂盒

[0886] 在某些方面,本公开提供了试剂盒,所述试剂盒包含含有siRNA化合物(例如,双链siRNA化合物或ssRNA化合物(例如,前体,例如可以加工成ssRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物的DNA,例如双链siRNA化合物或ssRNA化合物,或其前体))的药物调配物的合适容器。

[0887] 此类试剂盒包含一种或多种dsRNA药剂和使用说明书,例如,施用预防或治疗有效量的dsRNA药剂的说明书。dsRNA药剂可以在小瓶或预先填充的注射器中。试剂盒可以任选地进一步包括用于施用dsRNA药剂的装置(例如,注射装置,如预填充注射器),或用于测量C3的抑制的装置(例如,用于测量HTT mRNA、HTT蛋白和/或HTT活性的抑制的装置)。用于测

量HTT的抑制的此类装置可以包括用于从受试者获得样品(例如,CSF和/或血浆样品)的装置。本发明的试剂盒可以任选地进一步包括用于确定治疗有效量或预防有效量的装置。

[0888] 在某些实施例中,药物调配物的各个组分可以提供在一个容器中,例如小瓶或预填充的注射器。可替代地,可能期望在两个或更多个容器中单独提供药物调配物的组分,例如,一个容器用于siRNA化合物制剂,并且至少另一个用于载体化合物。试剂盒可以包装在许多不同的配置中,如单个盒子中的一个或多个容器。可以将不同的组分组合,例如,根据随试剂盒提供的说明书。这些组分可以根据本文所描述的方法进行组合,例如,以制备和施用药物组合物。试剂盒还可以包含递送装置。

[0889] VII. 用于抑制HTT表达的方法

[0890] 本公开还提供了抑制细胞中HTT基因的表达的方法。所述方法包含使细胞与RNAi药剂接触,例如双链RNAi药剂、包括本发明的dsRNA药剂的组合物或包括本发明的dsRNA药剂的组合物,其量有效地抑制细胞中HTT的表达,由此抑制细胞中HTT的表达。在一些实施例中,所述方法包含使细胞与两种或更多种双链RNAi药剂接触,如本文所描述的,例如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂,例如选自表2至表5中的dsRNA药剂组的任何两种或更多种,例如2种、3种或4种dsRNA药剂。在包含两种或更多种dsRNA药剂的方法的某些实施例中,两种或更多种dsRNA药剂可以存在于相同的组合物中、在单独的组合物中或其任何组合中。在一些实施例中,本发明的方法包含使细胞与包括两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂的组合物接触,例如,靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂,例如选自表2至表5中的dsRNA药剂组的任何两种或更多种dsRNA药剂。在本公开的某些实施例中,HTT在CNS(例如,脑)细胞中被优先抑制。

[0891] 在本发明的方法的一些实施例中,所述方法包含使细胞与两种或更多种dsRNA药剂接触,如本文描述的,例如,选自表2至表5中的dsRNA药剂组的任何两种或更多种,例如2种、3种或4种dsRNA药剂,细胞可以在第一时间与第一药剂(或包括第一药剂的组合物),在第二时间与第二药剂(或包括第二药剂的组合物),在第三时间与第三药剂(或包括第三药剂的组合物),以及在第四时间与第四药剂(或包括第四药剂的组合物)接触;或细胞可以同时与所有药剂(或包括所有药剂的组合物)接触。可替代地,细胞可以在第一时间与第一药剂(或包括第一药剂的组合物)并且在第二时间与第二、第三和/或第四药剂(或包括第二、第三和/或第四药剂的组合物)接触。也可以考虑将细胞与本发明的两种或更多种药剂(或包括两种或更多dsRNA药剂的组合物)接触的其它组合。

[0892] 细胞与RNAi药剂,例如双链RNAi药剂的接触可以在体外或体内进行。使细胞与RNAi药剂体内接触包含使受试者(例如,人受试者)体内的细胞或细胞组与RNAi药剂接触。体外和体内接触细胞方法的组合也是可能的。

[0893] 如上文所讨论的,接触细胞可以是直接的或间接的。此外,接触细胞可以通过靶向配体实现,包含本文所描述的或本领域已知的任何配体。在一些实施例中,靶向配体是碳水化合物部分,例如GalNAc配体,或将RNAi药剂引导到所关注的位点的任何其它配体。

[0894] 如本文所使用的,术语“抑制(inhibiting)”可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑制(suppressing)”和其它类似术语互换使用,并且包含任何水平的抑制。在某些实施例中,可以在细胞培养条件下评估抑制水平,例如,对于本公开的RNAi药剂,例如,其中细胞培养中

的细胞通过Lipofectamine™介导的转染以10nM或更低、1nM或更低等的细胞附近的浓度转染。给定RNAi药剂的敲低可以通过比较细胞培养中预处理的水平与细胞培养中后处理的水平来确定,任选地还可以与用乱序或其它形式的对照RNAi药剂平行处理的细胞进行比较。细胞培养中的敲低,例如优选地50%或更多可以由此被鉴定为已经发生的“抑制(inhibiting)”或“减少”、“下调”或“抑制(suppressing)”等的指示。明确设想,在本领域所描述的适当控制的条件下,也可以在本公开的RNAi药剂的体内系统中评估靶向的mRNA或编码的蛋白水平(以及因此由本公开的RNAi药剂引起的“抑制”程度等)。

[0895] 如本文所用的,短语“抑制HTT基因的表达”或“抑制HTT的表达”包含抑制任何HTT基因(例如,小鼠HTT基因、大鼠HTT基因,猴HTT基因或人HTT基因)以及编码HTT蛋白的HTT基因变体或突变体的表达。因此,在基因操纵的细胞、细胞组或生物体的背景下,HTT基因可以是野生型HTT基因、突变体HTT基因或转基因HTT基因。

[0896] “抑制HTT基因的表达”包含对HTT基因的任何水平的抑制,例如至少部分抑制HTT基因的表达,如抑制至少20%。在某些实施例中,抑制至少30%、至少40%、优选地至少50%、至少约60%、至少70%、至少约80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%;或低于测定方法的检测水平。

[0897] HTT基因的表达可以基于与HTT基因表达相关的任何变量的水平来评估,例如HTT mRNA水平或HTT蛋白水平,或例如HTT突变体蛋白的水平。

[0898] 可以通过与对照水平相比这些变量中的一个或多个的绝对或相对水平的降低来评估抑制。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如,给药前基线水平,或从未经治疗或用对照(例如,仅缓冲液对照或无活性药剂对照)治疗的类似受试者、细胞或样品中确定的水平。

[0899] 在本公开的方法的一些实施例中,HTT基因的表达被抑制至少20%、30%、40%,优选地至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%,或低于测定的检测水平。在某些实施例中,所述方法包含对HTT的表达的临床相关抑制,例如,如用减少HTT的表达的药剂治疗受试者后的临床相关结果所证明的。

[0900] HTT基因的表达的抑制可以通过第一细胞或细胞组(例如,此类细胞可以存在于源自受试者的样品中)表达的mRNA的量的减少来表现,在所述细胞或细胞组中,HTT的基因被转录并且已经被处理(例如,通过使一个或多个细胞与本公开的RNAi药剂接触,或通过向存在或曾经存在所述细胞的受试者施用本公开的RNAi药剂),从而与基本上与第一细胞或细胞组相同但尚未如此处理的第二细胞或细胞组(未用RNAi药剂处理或未用靶向所关注的基因的RNAi药剂处理的对照细胞)相比,HTT基因的表达受到抑制。抑制程度可以用以下方式表示:

$$[0901] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \cdot 100\%$$

[0902] 在其它实施例中,可以根据与HTT基因表达(例如,HTT蛋白表达)功能性相关的参数的减少来评估HTT基因的表达的抑制。HTT基因沉默可以在任何表达HTT的细胞中确定,无论是内源性的还是来自表达构建体的异源性的,并且通过本领域已知的任何测定。

[0903] HTT蛋白的表达的抑制可以通过细胞或细胞组(例如,源自受试者的样品中表达的蛋白质水平)表达的HTT蛋白水平的降低来表现。如上文所解释的,为了评估mRNA抑制,处理

的细胞或细胞组中蛋白质表达水平的抑制可以类似地表达为对照细胞或细胞组中蛋白质水平的百分比。

[0904] 可以用于评估HTT基因的表达抑制的对照细胞或细胞组包含尚未与本公开的RNAi药剂接触的细胞或细胞组。例如,在用RNAi药剂治疗受试者之前,对照细胞或细胞组可以源自个体受试者(例如,人或动物受试者)。

[0905] 细胞或细胞组表达的HTT mRNA的水平可以使用本领域已知的用于评估mRNA表达的任何方法来确定。在一个实施例中,通过检测转录的多核苷酸或其部分,例如HTT基因的mRNA来确定样品中HTT的表达水平。可以使用RNA提取技术从细胞中提取RNA,包含例如使用酸酚/异硫氰酸胍提取(RNazol B;生物起源公司(Biogenesis))、RNeasy™ RNA制备试剂盒(Qiagen®)或PAXgene(瑞士的PreAnalytix)。利用核糖核酸杂交的典型分析形式包含核运行测定、RT-PCR、RNase保护测定、northern印迹、原位杂交和微阵列分析。循环HTT mRNA可以使用W02012/177906中描述的方法来检测,所述文献的全部内容特此通过引用并入本文。

[0906] 在一些实施例中,使用核酸探针确定HTT的表达水平。如本文所使用的,术语“探针”是指能够与特定HTT核酸或蛋白质或其片段选择性地结合的任何分子。探针可以由本领域技术人员合成,或源自适当的生物制剂。探针可以专门设计成被标记。可以用作探针的分子的实例包含但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0907] 分离的mRNA可以用于杂交或扩增测定,包含但不限于Southern分析或northern分析、聚合酶链式反应(PCR)分析和探针阵列。一种用于确定mRNA水平的方法涉及将分离的mRNA与可以与HTT mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。在一个实施例中,mRNA被固定在固体表面上并与探针接触,例如通过在琼脂糖凝胶上运行分离的mRNA并将mRNA从凝胶转移到膜,如硝酸纤维素。在替代性实施例中,探针固定在固体表面上,并且mRNA与探针接触,例如,在Affymetrix®基因芯片阵列中。本领域技术人员可以容易地将已知的mRNA检测方法用于确定HTT mRNA的水平。

[0908] 用于确定样品中HTT的表达水平的替代性方法涉及样品中例如mRNA的核酸扩增或逆转录酶(以制备cDNA)的过程,例如通过RT-PCR(Mullis,1987,美国专利第4,683,202号中所述的实验实施例)、连接酶链式反应(Barany(1991)《美国国家科学院院刊》88:189-193)、自持序列复制(Guatelli等人,(1990)《美国国家科学院院刊》87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人,(1989)《美国国家科学院院刊》86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi等人,(1988)《生物/技术(Bio/Technology)》6:1197)、滚环复制(Lizardi等人,美国专利第5,854,033号)或任何其它核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员众所周知的技术检测扩增的分子。如果此类核酸分子以非常低的数量存在,则这些检测方案对于检测核酸分子特别有用。在本公开的特定方面,HTT的表达的水平通过定量荧光RT-PCR(即TaqMan™系统)、通过Dual-Glo®荧光素酶测定或通过用于测量HTT表达或mRNA水平的其它领域公认的方法来确定。

[0909] HTT mRNA的表达水平可以使用膜印迹(如用于杂交分析,如northern、Southern、斑点等)或微孔、样品管、凝胶、珠或纤维(或任何包括结合核酸的固相载体)来监测。参见美国专利第5,770,722号、第5,874,219号、第5,744,305号、第5,677,195号和第5,445,934号,

所述美国专利通过引用并入本文。HTT表达水平的确定也可以包括在溶液中使用核酸探针。

[0910] 在一些实施例中,使用支链DNA (bDNA) 测定或实时PCR (qPCR) 来评估mRNA表达的水平。此PCR方法的使用在本文给出的实例中进行了描述和例示。此类方法也可以用于检测HTT核酸。

[0911] HTT蛋白表达的水平可以使用本领域已知的任何用于测量蛋白质水平的方法来确定。此类方法包含,例如,电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法 (HPLC)、薄层色谱法 (TLC)、超扩散色谱法、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散 (单或双)、免疫电泳、蛋白质印迹、放射免疫测定 (RIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光测定、电化学发光测定等。此类测定也可以用于检测指示HTT蛋白的存在或复制的蛋白质。

[0912] 在一些实施例中,本公开的方法在治疗HTT相关疾病中的功效通过HTT mRNA水平的降低来评估 (例如,通过评估CSF样品和/或血浆样品的HTT水平,通过脑活检,或其它方式)。

[0913] 在本公开的方法的一些实施例中,向受试者施用RNAi药剂,从而将RNAi药剂递送到受试者体内的特定位点。HTT的表达的抑制可以使用源自受试者体内特定部位 (例如,CNS细胞) 的样品中HTT mRNA或HTT蛋白的水平或水平变化的测量来评估。在某些实施例中,所述方法包含对HTT的表达的临床相关抑制,例如,如用减少HTT的表达的药剂治疗受试者后的临床相关结果所证明的,例如尾状核萎缩的稳定或抑制 (例如,如通过体积MRI (vMRI) 评估的),来自受试者的CSF样品中神经丝轻链 (Nf1) 水平的稳定或降低,突变体HTT mRNA或切割的突变体HTT蛋白的减少,例如全长突变体HTT mRNA或蛋白和切割的突变体HTT mRNA或蛋白中的一种或两者,以及统一亨廷顿氏病评定量表 (UHDRS) 评分的稳定或改善。

[0914] 如本文所使用的,术语检测或确定分析物的水平被理解为执行步骤以确定是否存在材料 (例如,蛋白质、RNA)。如本文所使用的,检测或确定的方法包含检测或确定低于所使用的方法的检测水平的分析物水平。

[0915] IX. HTT相关疾病的治疗或预防方法

[0916] 本公开还提供了使用本公开的RNAi药剂、两种或更多种 (例如,2种、3种或4种) 本公开的双链RNAi药剂 (例如,每种药剂独立地靶向人HTT基因的一部分,如靶向人HTT的外显子1的第一dsRNA药剂和靶向全长人HTT的第二dsRNA药剂)、含有本公开的RNAi药剂的组合物 (如药物组合物)、两种或更多种,例如2种、3种或4种组合物 (如药物组合物),每种独立地包括本发明的dsRNA药剂,或包括两种或更多种,例如2种、3种或4种本公开的dsRNA药剂的组合物以减少或抑制细胞中HTT表达的方法。所述方法包含使细胞与本公开的dsRNA、本公开的组合物或本公开的药物组合物接触,并且将细胞维持足够的时间以获得HTT基因的mRNA转录物的降解,由此抑制HTT基因在细胞中的表达。基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法进行评估。例如,HTT的表达的减少可以使用本领域普通技术人员常规的方法,通过确定HTT的mRNA表达水平来确定,例如northern印迹、qRT-PCR;通过使用本领域普通技术人员常规的方法,如蛋白质印迹、免疫技术确定HTT的蛋白质水平来确定。

[0917] 在本公开的方法中,细胞可以在体外或体内接触,即细胞可以在受试者体内。

[0918] 适用于使用本公开的方法进行处理的细胞可以是表达HTT基因的任何细胞。适用于本公开的方法的细胞可以是哺乳动物细胞,例如灵长类细胞 (如人细胞或非人灵长类动

物细胞,例如猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类动物细胞(如大鼠细胞或小鼠细胞)。在一个实施例中,细胞是人细胞,例如人CNS细胞。

[0919] HTT表达在细胞中被抑制至少约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或约100%,即低于检测水平。在优选的实施例中,HTT表达被抑制至少50%。

[0920] 本公开的体内方法可以包含向受试者施用

[0921] 含有RNAi药剂的组合物,其中所述RNAi药剂包含与待治疗的哺乳动物的HTT基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。在一些实施例中,向受试者施用两种或更多种,例如2种、3种或4种组合物,每种组合物独立地包括本发明的RNAi药剂。组合物可以相同或不同。在其它实施例中,向受试者施用包括两种或更多种,例如2种、3种或4种dsRNA药剂的组合物,每种药剂独立地靶向HTT基因的一部分。

[0922] 当待治疗的生物体是如人等哺乳动物时,组合物可以通过本领域已知的任何方式施用,包含但不限于口服、腹膜内或肠胃外途径,包含颅内(例如,脑室内、脑实质内和鞘内)、静脉内、肌内、玻璃体内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、鼻内、直肠和局部(包含经颊和舌下)施用。在某些实施例中,组合物通过静脉输注或注射施用。在某些实施例中,组合物通过皮下注射施用。在某些实施例中,组合物通过鞘内注射施用。

[0923] 在一些实施例中,通过贮库注射进行施用。贮库注射可以在长时间段内以一致的方式释放RNAi药剂。因此,贮库注射可以减少获得期望的效果(例如,HTT的期望的抑制,或治疗或预防效果)所需的给药频率。贮库注射也可以提供更一致的血清浓度。贮库注射可以包含皮下注射或肌内注射。在优选实施例中,贮库注射是皮下注射。

[0924] 在一些实施例中,通过泵进行施用。泵可以是外部泵或外科植入的泵。在某些实施例中,泵是皮下植入的渗透泵。在其它实施例中,泵是输注泵。输注泵可以用于颅内、静脉内、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施例中,输注泵是皮下输注泵。在其它实施例中,泵是外科手术植入的泵,所述外科手术植入的泵将RNAi药剂递送到CNS。

[0925] 可以基于是否期望局部或全身治疗以及基于待治疗的区域来选择施用模式。可以选择施用的通路和位点来增强靶向。

[0926] 一方面,本公开还提供了用于抑制哺乳动物的HTT基因的表达的方法。所述方法包含向哺乳动物施用包括靶向哺乳动物的细胞中的HTT基因的dsRNA的组合物,并且维持哺乳动物足够的时间以获得HTT基因的mRNA转录物的降解,由此抑制细胞中HTT基因的表达。基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,qRT-PCR)来评估。在一些实施例中,dsRNA存在于组合物中,如药物组合物。在一些实施例中,向哺乳动物施用两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂。在一些实施例中,向受试者施用的每种dsRNA药剂独立地存在于组合物中。在其它实施例中,向哺乳动物施用包括两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA的组合物。

[0927] 蛋白质产生的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,ELISA)来评估。在一个实施例中,CNS活检样品或脑脊液(CSF)样品用作组织材料,用于监测HTT基因或蛋白质表达(或因此的替代物)的减少。

[0928] 本公开进一步提供了治疗有需要的受试者的方法。本公开的治疗方法包含以治疗有效量的靶向HTT基因的RNAi药剂或包括靶向aHTT基因的RNAi药剂的药物组合物向受试者

(例如,将受益于HTT表达抑制的受试者)施用本公开的RNAi药剂。在一些实施例中,向受试者施用治疗有效量的两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂。在一些实施例中,向受试者施用的每种dsRNA药剂独立地存在于组合物中。在其它实施例中,向受试者施用包括两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA的组合物。

[0929] 另外,本公开提供了在受试者中预防、治疗或抑制HTT相关疾病或病症(例如,亨廷顿氏病)的进展的方法,如HTT相关疾病或病症的进展。所述方法包含向受试者施用治疗有效量的任何RNAi药剂,例如dsRNA药剂,或本文所提供的药物组合物,由此预防、治疗或抑制受试者的HTT相关疾病或病症的进展。在一些实施例中,向受试者施用治疗有效量的两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA药剂。在一些实施例中,向受试者施用的每种dsRNA药剂独立地存在于组合物中。在其它实施例中,向受试者施用包括两种或更多种,例如2种、3种或4种本发明的dsRNA的组合物。

[0930] 在本发明的方法的一些实施例中,所述方法包含施用两种或更多种dsRNA药剂,如本文描述的,例如,选自表2至表5中的dsRNA药剂组的任何两种或更多种,例如2种、3种或4种dsRNA药剂,可以在第一时间向受试者施用第一药剂(或包括第一药剂的组合物),在第二时间施用第二药剂(或包括第二药剂的组合物),在第三时间施用第三药剂(或包括第三药剂的组合物),以及在第四时间施用第四药剂(或包括第四药剂的组合物);或可以同时向受试者施用所有药剂(或包括所有药剂的组合物)。可替代地,可以在第一时间向受试者施用第一药剂(或包括第一药剂的组合物)并且在第二时间施用第二、第三和/或第四药剂(或包括第二、第三和/或第四药剂的组合物)。也可以考虑将细胞与两种或更多种本发明的药剂接触的其它组合。

[0931] 本公开的RNAi药剂可以作为“游离RNAi药剂”施用。在不存在药物组合物的情况下施用游离RNAi药剂。裸露的RNAi药剂可以在合适的缓冲溶液中。缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任何组合。在一个实施例中,缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节含有RNAi药剂的缓冲溶液的pH和渗透压,使得其适合向受试者施用。

[0932] 可替代地,本公开的RNAi药剂可以作为药物组合物,如dsRNA脂质体调配物施用。

[0933] 从HTT基因表达的减少或抑制中受益的受试者是那些患有HTT相关疾病的受试者,例如亨廷顿氏病。

[0934] 本公开进一步提供了RNAi药剂或其药物组合物用于例如治疗将受益于HTT表达的减少或抑制的受试者(例如,患有HTT相关病症的受试者)的方法和用途,其与其它药物或其它治疗方法组合,例如,与已知药物或已知治疗方法组合,例如目前用于治疗这些病症的那些药物或治疗方法。例如,在某些实施例中,靶向HTT的RNAi药剂与例如本文其它地方描述的或本领域已知的用于治疗HTT相关病症的药剂组合施用。例如,适用于治疗将受益于HTT表达减少的受试者(例如,患有HTT相关病症的受试者)的另外的药剂可以包含目前用于治疗HTT的症状的药剂。RNAi药剂和另外的治疗剂可以同时或以相同的组合施用,例如鞘内,或另外的治疗剂可以作为单独的组合物的一部分或在单独的时间施用,或通过本领域已知或本文所描述的另一种方法施用。

[0935] 示例性另外的治疗剂包含例如,单胺抑制剂,例如丁苯那嗪(Xenazine)、氘代丁苯那嗪(Austedo)和利血平,抗惊厥剂,例如丙戊酸(Depakote、Depakene、Depacon)和氯硝西

泮 (Klonopin), 抗精神病药剂, 例如利培酮 (Risperdal) 和氟哌啶醇 (Haldol), 以及抗抑郁药, 例如帕罗西汀 (Paxil)。

[0936] 在一个实施例中, 所述方法包含施用本文特征的组合, 使得靶HTT基因的表达降低至少一个月。在优选实施例中, 表达降低至少2个月、3个月或6个月。

[0937] 优选地, 可用于本文特征的方法和组合物的RNAi药剂特异性靶向靶HTT基因的RNA (初级或加工的)。使用RNAi药剂抑制这些基因的表达的组合和方法可以如本文所描述的制备和进行。

[0938] 根据本公开的方法施用dsRNA可以导致患有HTT相关病症的患者的此类疾病或病症的严重程度、体征、症状或标志物的降低。在此上下文中, “减少”意指此类水平在统计学上显著或临床上显著减少。减少可以是例如至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0939] 可以例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活质量、维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标志物水平或适用于正在治疗或以预防为目标的给定疾病的任何其它可测量参数来评估疾病的治疗或预防功效。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如, 可以通过例如对受试者的定期监测来评估HTT相关病症的治疗功效。后期读数与初始读数的比较为医师提供了治疗是否有效的指示。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。关于靶向HTT的RNAi药剂或其药物组合物的施用, “有效对抗”HTT相关病症表明, 以临床适当的方式施用对至少一部分具有统计学意义的患者产生有益效果, 如症状的改善、治愈、疾病的减少、寿命的延长, 生活质量的改善或熟悉治疗HTT相关病症和相关原因的医生通常认为是积极的其它效果。

[0940] 当疾病状态的一个或多个参数有统计上显著的改善时, 或由于没有恶化或出现预期的症状, 治疗或预防效果是明显的。例如, 疾病的可测量参数的至少10%的有利变化, 并且优选地至少20%、30%、40%、50%或更多的有利变化可以指示有效的治疗。也可以使用本领域已知的给定疾病的实验动物模型来判断给定RNAi药剂药物或该药物的调配物的功效。当使用实验动物模型时, 当观察到标志物或症状在统计学上显著减少时, 就证明了治疗的功效。

[0941] 可替代地, 功效可以通过由诊断领域的技术人员基于临床上可接受的疾病严重程度分级量表确定的疾病严重度的降低来测量。任何导致例如使用适当量表测量的疾病严重程度减轻的积极变化表示使用本文所描述的RNAi药剂或RNAi药剂调配物的充分治疗。

[0942] 可以向受试者施用治疗量的dsRNA, 如约0.01mg/kg至约200mg/kg。

[0943] RNAi药剂可以定期鞘内、通过玻璃体内注射或通过静脉内输注施用一段时间。在某些实施例中, 在初始治疗方案之后, 可以在不太频繁的基础上施用治疗。RNAi药剂的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其它区室中的HTT水平降低至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少约99%或更多。在优选实施例中, RNAi药剂的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其它区室中的HTT水平降低至少50%。

[0944] 在施用全剂量的RNAi药剂之前, 可以向患者施用较小的剂量, 如5%的输注反应, 并且监测不良反应, 如过敏反应。在另一个实例中, 可以监测患者不期望的免疫刺激作用,

如增加的细胞因子(例如,TNF- α 或INF- α)水平。

[0945] 可替代地, RNAi 药剂可以皮下施用,即通过皮下注射。一次或多次注射可以用于向受试者递送期望的,例如每月剂量的 RNAi 药剂。注射可以在一个时间段内重复进行。可以定期重复施用。在某些实施例中,在初始治疗方案之后,可以在不太频繁的基础上施用治疗。重复剂量方案可以包含定期施用治疗量的 RNAi 药剂,如每月或延长到每季度一次、每年两次、每年一次。在某些实施例中, RNAi 药剂约每月施用一次至约每季度施用一次(即约每三个月施用一次)。

[0946] 除非另有定义,否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管类似或等效于本文所描述的方法和材料可以用于实践或测试本发明特征的 RNAi 药剂和方法,但下文描述了合适的方法和材料。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,将以本说明书(包含定义)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不旨在进行限制。

[0947] 实例

[0948] 实例1. RNAi 药剂设计、合成、选择和体外评估

[0949] 此实例描述了用于 HTT RNAi 药剂的设计、合成、选择和体外评估的方法。

[0950] 试剂来源

[0951] 在本文没有具体给出药剂来源的情况下,此类试剂可以从任何分子生物学试剂供应商处获得,其质量/纯度标准适用于分子生物学。

[0952] 生物信息学

[0953] 靶向人亨廷顿蛋白转录物的 siRNA (HTT; 人 NCBI refseq ID NM_002111.8; NCBI Gene ID: 3064) 是使用定制 R 和 Python 脚本设计的。人 NM_002111 REFSEQ mRNA, 版本 8, 具有 13,498 个碱基的长度。

[0954] 未经修饰的 HTT 有义和反义链核苷酸序列的详细列表在表 2 中示出。经修饰的 HTT 有义和反义链核苷酸序列的详细列表在表 3 中示出。

[0955] 应理解,在整个应用程序中,没有小数的双链体名称等效于具有仅引用双链体的批号的具有小数的双链体名称。例如,AD-564727 等效于 AD-564727.1。

[0956] 使用 DYNABEADS mRNA 分离试剂盒的总 RNA 分离

[0957] 使用 DYNABEADS (英杰公司 (Invitrogen), 目录号 61012) 在 BioTek-EL406 平台上使用自动化方案分离 RNA。简而言之,将 70 μ L 的裂解/结合缓冲液和 10 μ L 的含有 3 μ L 磁珠的裂解缓冲液添加到具有细胞的板中。在室温下将板在电磁振荡器上温育 10 分钟,并且然后捕获磁珠并去除上清液。然后用 150 μ L 洗涤缓冲液 A 洗涤珠结合 RNA 2 次,并且用洗涤缓冲液 B 洗涤一次。然后用 150 μ L 洗脱缓冲液洗涤珠,重新捕获并去除上清液。

[0958] 使用 ABI 高容量 cDNA 逆转录试剂盒 (加利福尼亚州福斯特市的应用生物系统公司 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 目录号 4368813) 进行 cDNA 合成

[0959] 向上述分离的 RNA 中添加 10 μ L 主混合物,所述主混合物每次反应含有 1 μ L 10X 缓冲液、0.4 μ L 25X dNTP、1 μ L 10x 随机引物、0.5 μ L 逆转录酶、0.5 μ L RNase 抑制剂和 6.6 μ L H₂O。将板密封、混合,并且在电磁振荡器上在室温下温育 10 分钟,然后在 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时。

[0960] 实时 PCR

[0961] 将二 μ L的cDNA添加到主混合物中,所述主混合物在384孔板(罗氏公司目录号04887301001)中每孔含有0.5 μ L的人或小鼠GAPDH TaqMan探针(赛默飞世尔公司(ThermoFisher)目录4352934E或4351309)和0.5 μ L的适当的HTT探针(可商购获得,例如来自赛默飞世尔公司)和5 μ LLightcycler 480探针主混合物(罗氏公司目录号04887301001)。实时PCR是在LightCycler480实时PCR系统(罗氏公司)中进行的。用N=4测试每个双链体,并且将数据相对于用非靶向对照siRNA转染的细胞归一化。为了计算相对折叠变化,使用 $\Delta\Delta$ Ct方法分析实时数据,并且将其相对于使用适当对照进行的分析归一化。

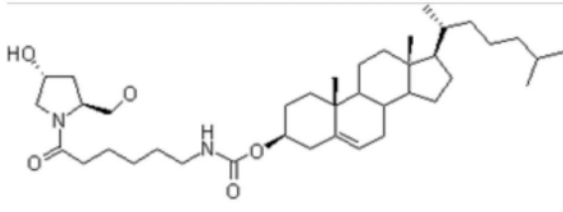
[0962] 表1.用于核酸序列表示的核苷酸单体的缩略语。应理解,当这些单体存在于寡核苷酸中时,通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接;并且应理解,当核苷酸含有2'-氟修饰时,则氟替换亲本核苷酸中该位置处的羟基(即,其为2'-脱氧-2'-氟核苷酸)。

[0963]

缩略语	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸酯
Ab	β -L-腺苷-3'-磷酸酯
Abs	β -L-腺苷-3'-硫代磷酸酯
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸酯
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸酯
Cb	β -L-胞苷-3'-磷酸酯
Cbs	β -L-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸酯
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸酯
Gb	β -L-鸟苷-3'-磷酸酯
Gbs	β -L-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯

缩略语	核苷酸
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸酯
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸酯
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任何核苷酸，经修饰的或未经修饰的
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键
[0964] L96	N-[三(GalNAc 烷基)-酰胺基癸酰基]-4-羟脯氨酸 Hyp-(GalNAc-烷基)₃
Y34	2-羟甲基-四氢呋喃-4-甲氧基-3-磷酸酯（无碱基 2'-OMe 呋喃糖）
Y44	反向无碱基 DNA（2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯）

[0965]

缩略语	核苷酸
L10	N-(胆甾醇甲酰胺多己酰基)-4-羟脯氨酸 (Hyp-C6-Chol) 
(Agn)	腺苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体
(Cgn)	胞苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体
(Ggn)	鸟苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体
(Tgn)	胸苷-乙二醇核酸 (GNA) S-异构体
P	磷酸酯
VP	乙烯基磷酸酯
dA	2'-脱氧腺苷-3'-磷酸酯
dAs	2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸酯
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸酯
dCs	2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸酯
dG	2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯
dGs	2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸酯
dT	2'-脱氧胸苷-3'-磷酸酯
dTs	2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸酯
dU	2'-脱氧尿苷
dUs	2'-脱氧尿苷-3'-硫代磷酸酯
(Ahd)	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯
(Ahds)	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯
(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Ghd)	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸酯
(Ghds)	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯
(Uhds)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸酯
(C2p)	胞苷-2'-磷酸酯
(G2p)	鸟苷-2'-磷酸酯
(U2p)	尿苷-2'-磷酸酯
(A2p)	腺苷-2'-磷酸酯

[0966] 表2.HTT dsRNA药剂的未经修饰的有义和反义链序列

[0967]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	NM_002111.8 中的反义范围
AD-1271085 (FL)	GCUAUUCAUAA UCACAUUCGA	15	UCGAAUGUGAUU AUGAAUAGCAU	16	4398-4420
AD-1271083 (FL)	UCAUAAUCACA UUCGUUUGUA	25	UACAAACGAAUG UGAUUAUGAAU	29	4403-4425

[0968]	AD-1271084 (FL)	GCUGGUGAAUC GGAUCCUGA	26	UCAGGAAUCCGA UUCACCAGCUC	30	6512-6534
	AD-1271082 (Exon 1)	UGGAAAAGCUG AUGAAGGCCA	27	UGGCCUTCAUCA GCUUUUCCAGG	31	154-176
	AD-1019465 (Exon 1)	CCAUGGCGACCC UGGAAAAGA	28	UCUUUCCAGGG UCGCCAUGGCG	32	142-164

[0969] 表3.HTT dsRNA药剂的经修饰的有义和反义链序列

[0970]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-1271085 (FL)	gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa	17	VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfaugcsasu	18
AD-1271083 (FL)	uscsaua(Ahd)UfcAfCfAf uucguuugsusa	19	VPusAfscaaAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu	20
AD-1271084 (FL)	gscsugg(Uhd)GfaAfUfCf ggauuccusgsa	21	VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc	22
AD-1271082 (Exon 1)	usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGf augaaggcscsa	23	VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg	24

[0971] 实例2.靶向HTT的RNAi药剂的体内评估

[0972] 在非人灵长类动物体内评估了靶向全长 (FL) 人HTT或人HTT外显子1的所关注的双链体。使用本领域已知的方法合成并制备了双链体。

[0973] 上表2中提供了所关注的双链体的有义链和反义链的未经修饰的核苷酸序列。上表3中提供了所关注的双链体的有义链和反义链的经修饰的核苷酸序列。

[0974] 雄性非人灵长类动物, 体重3kg至4kg, 鞘内施用单次60mg, 体积为2ml的AD-1019465 (靶向人HTT的外显子1; 参见PCT申请: 第PCT/US2020/057849号, 所述文献的全部内容通过引用并入本文)、AD-1271082 (靶向人HTT的外显子1) 或AD-1271085 (靶向全长人HTT) (每个双链体n=5), 在约3分钟内通过手动团注, 然后在第1天冲洗0.3mL人工CSF (aCSF) 或人工aCSF。在给药前第-7天、并且在给药后0.5小时、2小时、8小时、24小时以及给药后第8天、第15天、第36天和第43天收集血浆样品。在给药前第-7天和给药后第2天、第8天、第15天、第36天、第43天从小脑延髓池收集脑脊液 (CSF) 样品, 并且在给药后第1天从腰椎鞘内空间收集。在给药后第43天, 处死动物, 用盐水灌注并收集组织。对组织进行福尔马林固定和快速冷冻, 以进行siRNA水平、免疫宿主化学 (IHC) 分析和原位杂交 (ISH) 分析。收集的组织包含脑 (前额叶皮质、颞叶皮质、海马体、脑干、小脑、纹状体 (尾状核和壳核/苍白球)、脊髓 (颈、胸、腰)、肝脏、肾脏和心脏。

[0975] 如图1所描绘的, 在给药后24小时, CSF中的siRNA >1000ng/mL的动物中, 整个脑和脊柱中的HTT mRNA被有效敲低, 表明鞘内施用成功。施用靶向全长HTT的双链体 (AD-1271085) 在皮质和海马体中敲低HTT mRNA约80%, 并且在纹状体中敲低约60%, 并且施用靶向HTT的外显子1的双链体 (AD-1271082和AD-1019465) 在皮质和海马体中敲低HTT mRNA约60%至70%, 并且在纹状体中敲低约30%。

[0976] 图2是图1所描绘的图的表格值。由于鞘内给药的固有技术变异性, 给药后24小时CSF中的siRNA水平被用作成功给药的指标。将siRNA水平<1000ng/ml的动物从分析中去除。

[0977] 图3A-3E表明, 除了来自小脑延髓池的CSF (图3A) 外, 鞘内施用后, 可以在整个脑的区中检测到siRNA。特别是, 鞘内施用双链体后, 在所有动物的胸椎样品中检测到最高浓度的siRNA, 范围为2154ng/g至25030ng/g (图3E)。在前额叶皮质样品中检测到次最高浓度的

siRNA,范围为104ng/g至26681ng/g,其中2个样品的siRNA浓度低于定量下限(LLOQ)(图3B)。尾状核中的siRNA浓度在204ng/g至2953ng/g的范围内,其中7个样品的siRNA水平为LLOQ(图3C),并且最后在壳核中,siRNA的浓度范围为134ng/g至2463ng/g,其中8个样品的siRNA浓度为LLOQ(图3D)。

[0978] 另外,如图4A-4D所示,对于所有测试的双链体,组织siRNA水平与HTT转录物敲低相关。此外,如图5A所示,除了影响脑和脊髓组织外,鞘内施用双链体还导致来自施用单次60mg剂量的双链体的非人灵长类动物的血浆样品中siRNA水平升高。另外,如图5B所示,鞘内给药后30最快分钟,低CSF水平与较高的血浆水平相关,并且反之亦然。这些数据表明,鞘内给药后最快30分钟可以收集血浆样品,以确定IT施用的质量,作为24小时CSF测试的替代方案。

[0979] 实例3.靶向全长HTT的RNAi药剂的体内评估

[0980] 靶向全长人HTT的所关注的双链体(AD-1271085、AD-1271084和AD-1271083)或反义寡核苷酸药剂Tominersen在亨廷顿氏病(HD)的现有技术认可的小鼠模型,即HD的YAC128小鼠模型中进行评估。YAC128小鼠携带酵母人工染色体(YAC),所述染色体含有整个人HD基因,所述基因在其基因组中含有128个CAG重复。YAC128小鼠出现运动异常和年龄依赖性脑萎缩,包含与纹状体神经元丧失相关的皮质和纹状体萎缩。YAC128小鼠表现出最初的多动,随后出现运动障碍和最终的运动功能减退(参见例如,Slow等人,(2003)《人类分子遗传学(Human Molecular Genetics)》12(13):1555;Van Raamsdonk等人,(2005)《人类分子遗传学》14(24):3823;以及Carroll等人,(2011)《疾病神经生物学(Neurobiology of Disease)》43:257-265)。

[0981] 在第0天,YAC128小鼠(7周龄至13周龄,27.7±3.4克,n=36)通过脑室内注射(ICV)施用单次300μg/kg剂量的所关注的药剂或人工CSF(aCSF)对照。在给药后第14天,处死动物,收集额叶皮质样品并在液氮中快速冷冻,并且提取mRNA并通过RT-QPCR方法进行分析。

[0982] 这些药剂对全长突变体人HTT mRNA的影响如图6A所示。这些数据表明,所测试的示例性双链体有效地降低了体内突变体人HTT信使RNA的水平。

[0983] 使用蛋白质印迹分析确定人全长突变体HTT蛋白水平。

[0984] 简而言之,将额叶皮质样品与蛋白酶抑制剂一起在RIPA缓冲液中均质化。按照制造商的说明,使用Pierce BCA试剂盒对总蛋白质进行定量。μ通过在4x LDS缓冲液中煮沸使八十g总细胞裂解物变性,并且在3%至8%三乙酸盐梯度凝胶中进行SDS-PAGE,并且转移到PVDF膜上。在室温下用Odyssey封闭缓冲液封闭印迹1小时,并且在4℃下与特异性抗体杂交过夜。使用了以下抗体:HTT(密理博公司(Millipore),目录号MAB2166)、Calnexin(密理博-西格玛(Millipore-Sigma),目录号C4731)、荧光缀合的次级抗体(Licor公司(Licor),山羊抗兔,目录号926-32211和驴抗小鼠,目录号926-680721:5000)。使用Biorad Chemidoc MP成像系统进行蛋白质条带的检测。将每个HTT带的密度相对于Calnexin上样对照归一化,并且使用归一化的强度来定量siRNA处理的样品中相对于媒介(1X PBS)处理的对照的HTT敲低。

[0985] 这些药剂对突变体人HTT蛋白水平的影响在图6B中示出。这些数据表明,所测试的示例性双链体药剂有效地降低了体内全长突变体人HTT信使RNA的水平。

[0986] 实例4.靶向全长HTT或外显子1HTT的RNAi药剂的体内评估

[0987] 靶向全长人HTT (AD-1271085) 或人HTT的外显子1 (AD-1271082或AD-1019465) 的所关注的双链体在亨廷顿氏病 (HD) 的现有技术认可的小鼠模型中进行了评估,即HD的Q175DN杂合小鼠模型 (参见例如,Menalled等人, (2012)《公共科学图书馆·综合 (PLoS One) 》7 (12):e49838.doi:10.1371/journal.pone.0049838)。在Q175DN小鼠中,小鼠HTT外显子1被具有约180个至220个CAG道重复的人外显子1HTT序列的敲入取代。这种HD的小鼠模型表现出运动、认知、分子和电生理异常,包含体内若干种纹状体标志物和HD标志的减少,与患有HD的患者相似。例如,纯合小鼠在发病早期 (分别为8周龄和4周龄) 表现出运动和握力异常,其随后在30周龄出现转棒仪和攀爬活动缺陷,并且在1岁左右出现认知缺陷。约4.5个月龄的杂合小鼠也有明显的行为缺陷,尤其是在昼夜循环的黑暗阶段。在杂合和纯合两者中都观察到体重降低,同时纯合的存活率显著降低。另外,从12周龄开始,纹状体基因标志物提前并显著减少。

[0988] 在第0天,通过脑室内注射 (ICV) 向大约五周龄的杂合Q175DN小鼠 (也称为Q175 KI小鼠) (混合性别) 施用单次300μg剂量的所关注的药剂、人工CSF (aCSF) 对照或非HTT靶向dsRNA药剂 (对照)。野生型小鼠也包含在研究组中,以控制基线Htt转录物表达。下表中总结了研究设计。

[0989]

组ID	处理	测试制品, ICV	基因型	组大小 (n)	靶标
1	Si对照	aCSF	Q175 KI	n=5	对照
2	Si1	AD-1271085	Q175 KI	n=5	HTT-FL
3	Si2	AD-1271082	Q175 KI	n=5	HTT-Ex1
4	Si3	AD-1019465	Q175 KI	n=6	HTT-Ex1
5	Si4	AD-1025211	Q175 KI	n=3	SNCA (非靶向对照)
6	无	无	WT	n=3	对照

[0990] 在注射后4周,对小鼠进行脑和脊髓的样品收集。来自每只小鼠的一个脊髓样品 (腰部区) 和一个纹状体样品用于Htt变体RNA水平的QuantiGene分析。使用三只未经处理的WT小鼠作为QuantiGene分析的参考对照。来自每只小鼠的脊髓样品 (腰部区) 的一个另外的样品和一个纹状体样品用于中尺度发现 (MSD) 分析,以确定Htt野生型和突变体蛋白水平。

[0991] 下表提供了用于Htt转录物评估的QuantiGene面板。Atp5b、Eif4a2和Gapdh的表达水平用作参考基因对照。图7中描绘了QuantiGene面板的每个测定评估的Htt转录物部分的示意图。

[0992]	靶符号	名称	GenBank 登录
	Htt-I1-pA1	Htt (小鼠内源性), 具有 polyA 位点 1 的内含子 1 (680 bp 变体)	
	Htt-I1-pA2	Htt (小鼠内源性), 具有 polyA 位点 2 的内含子 1 (1145 bp 变体)	
	Htt-I1-3'	Htt (小鼠内源性), 位于其 3'端处的内含子 1	
	Htt-I3	Htt (小鼠内源性), 内含子 3	
	Htt-FL-(Exons_50-53)	亨廷顿蛋白, 全长 (总计)	NM_010414
	Atp5b	ATP 合酶, H ⁺ 转运线粒体 F1 复合物, β 亚基	NM_016774
	Eif4a2	真核翻译起始因子 4A2	NM_013506
	Gapdh	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	NM_001289726

[0993] 此研究中进行的统计比较为

[0994] (1) 处理第2组至第5组与Si对照处理的Q175 KI小鼠 (使用邓尼特多重比较测试的ANOVA); 以及

[0995] (2) 处理第1组 (Si对照) 与处理第6组 (WT未处理的小鼠): 未配对t测试。此比较用作模型 (基因型) 效应的对照, 以验证Q175动物的Htt内含子转录物 (Htt-I1-pA1和Htt-I1-pA2) 如预期的那样增加 (在给定年龄)。

[0996] 图8A-8E描绘了QuantiGene分析的结果。

[0997] 如图8A和8B所描绘的, 施用所有药剂AD-1271085、AD-1271082或AD-1019465抑制纹状体和脊髓中具有polyA位点1 (680bp变体) 的内源性小鼠Htt内含子1和具有polyA位点2 (1145bp变体) 的内源小鼠Htt内含子1的表达。与aCSF对照相比, 脑室内注射AD-1271082 (靶向人HTT的外显子1) 抑制纹状体中具有polyA位点1 (680bp变体) 的内源性小鼠Htt内含子1的表达约30%, 并且抑制纹状体中具有polyA位点2 (1145bp变体) 的内源性小鼠Htt内含子1的表达约18%。图8C类似地表明, 所有药剂的施用都抑制脊髓和纹状体中全长Htt的表达。与对照aCSF相比, AD-1271085的施用抑制了纹状体中全长Htt表达约52%, AD-1271082的施用抑制了纹状体中全长Htt表达约39%, AD-1019465的施用抑制了纹状体中全长Htt表达约18%。另外, 并且如所预期的, 使用对下游内含子的测定, 没有一种药剂抑制Htt表达 (参见图8D和8E)。

[0998] 图8F中描绘了检测突变体HTT蛋白的MSD分析的结果, 并且图8G中描绘了检测野生型HTT外显子1蛋白的MSD分析的结果。

[0999] 如图8F和8G所描绘的, 所有测试的双链体都显示出一定水平的Htt蛋白敲低, 如基于其对转录物和靶向特异性的不同效力影响所预期的。特别是, 仅用AD-1271085观察到野生型Htt蛋白的敲低, 因为这种双链体仅靶向小鼠野生型基因 (图8G)。AD-1019465和AD-102521两者都仅靶向人HTT外显子1, 而且其似乎对全长小鼠蛋白没有影响 (图8G)。然而, 对数据的仔细审查, 特别是图8G中第3组和第4组的数据显示, 有一个离群点偏离了平均值, 并且因此存在蛋白质KD (由图8C中的转录物KD反映)。此外, 如图8F所描绘的, AD-1019465和AD-102521两者都能有效地敲低脊髓和纹状体中的突变体Htt。

[1000] 这些数据进一步表明, 所测试的示例性双链体药剂在体内有效降低了Htt信使RNA和Htt蛋白的水平。

[1001] 实例5. 使用靶向全长HTT或外显子1HTT的RNAi药剂在体内敲低HTT蛋白。

[1002] 评估了靶向全长人HTT (AD-1271085) 或人HTT的外显子1 (AD-1271082或AD-1019465) 的所关注的双链体在非人灵长类动物的各种神经组织中敲低野生型HTT蛋白的能力。具体而言,在第1天体重为3kg至4kg的雄性非人灵长类动物在大约3分钟内通过手动团注,然后冲洗0.3mL的人工CSF (aCSF) 或人工aCSF (n=5),鞘内施用单次60mg,体积为2ml的AD-1019465 (n=5)、AD-1271082 (n=5) 或AD-1271085 (n=5)。在给药后第45天,处死动物,用盐水灌注并收集组织。对组织进行快速冷冻,以进行中尺度发现 (MSD) 分析。收集的组织包含前额叶皮质、海马体、纹状体尾状核、腰椎和胸椎。

[1003] 如图9所描绘的,在HTT转录物被抑制后,HTT蛋白也被降低到不同的水平,这可能反映了所测试的siRNA双链体的不同效力。在施用AD-1271085的动物的前额叶皮质和海马体组织中观察到最大抑制。

[1004] 这些数据进一步表明所测试的示例性双链体药剂在体内有效降低了HTT蛋白的水平。

[1005] 在另一项评估单次鞘内施用60mg剂量的AD-1271085在168天时间段内 (从给药后第49天开始) 敲低非人灵长类动物各种神经组织中野生型HTT蛋白的能力的研究中,15只施用双链体的动物中,有三只出现了先前研究中未观察到的迟发性‘不良’临床体征 (长时间震颤、癫痫发作、协调性丧失和活动减少)。所述动物被实施了安乐死,并且研究停止。随后注意到,在此研究中,剂量减少介导了明显的不良反应。参见例如下面的实例10。

[1006] 实例6. 靶向人HTT外显子1的双链体的结构-活性分析

[1007] 对靶向人HTT外显子1的双链体进行了结构-活性分析,并且在YAC128小鼠中评估了这些药剂的功效。

[1008] 基于此分析设计和合成的未经修饰的HTT有义和反义链核苷酸序列的详细列表在表4中示出。基于此分析设计和合成的经修饰的HTT有义和反义链核苷酸序列的详细列表在表5中示出。

[1009] 在第0天和第14天,向YAC128小鼠 (7周龄至13周龄, 27.7 ± 3.4 克, n=36) 施用300 μ g/kg剂量的AD-1019476、600 μ g/kg剂量的AD-1019476、300 μ g/kg剂量AD-1443080、600 μ g/kg剂量的AD-1443080、600 μ g/kg剂量的AD-1443079、300 μ g/kg剂量的A-1800326 (反义寡核苷酸, Tominersen), 或通过脑室内注射 (ICV) 施用人工CSF (aCSF) 对照。

[1010] 在给药后第28天,处死动物,并且收集整个半球样品并在液氮中快速冷冻。从样品中提取mRNA和蛋白质,并且通过如文所描述的RT-QPCR方法或蛋白质印迹方法进行分析。

[1011] 这些药剂对突变体全长人HTT mRNA的影响在图10A中示出,并且这些药剂对野生型全长小鼠HTT mRNA的影响在图10B中示出,并且表明这些药剂不会敲低人突变体转录物。然而,如图10C和10D所描绘的,对所有测试的药剂和剂量使用抗体MAB2166 (密理博公司, 目录号MAB2166; 与跨度为人HTT蛋白的氨基酸445至459的15-aa区结合), 野生型全长小鼠和突变体全长人HTT蛋白几乎都无法检测到,表明药剂在降低蛋白质水平方面的显著功效。

[1012] 为了证实药剂对野生型全长小鼠HTT蛋白和突变体全长人HTT蛋白水平的影响,使用第二抗体D7F7 (细胞信号传导技术公司) 重复蛋白质印迹分析,并且如图10E和10F所描绘的,所测试的药剂和剂量再次表明了降低野生型全长小鼠HTT蛋白和突变体全长人HTT蛋白方面的显著功效。

[1013] 实例7. 靶向人HTT外显子1的双链体的剂量应答分析

[1014] 进行剂量应答分析以鉴定药剂的最佳剂量,以区分药剂的效力。

[1015] 在第0天,YAC128小鼠(雄性和雌性,6周龄,n=3,300 μ g剂量除外,其中n=2)通过脑室内注射(ICV)施用单次37.5 μ g、75 μ g、150 μ g或300 μ g剂量的AD-1019476或人工CSF(aCSF)对照。在给药后第14天,处死动物,收集脑的两个半球,并且在液氮中快速冷冻。提取蛋白质并使用抗体MAB2166或D7F7通过蛋白质印迹进行分析。

[1016] 图11A和11B中提供了此分析的结果,并且表明单次75 μ g剂量的AD-1019476提供了最大敲低功效。

[1017] 实例8.靶向全长HTT或外显子1HTT的RNAi药剂的体内评估

[1018] 靶向全长人HTT(AD-1271085)或人HTT的外显子1(AD-1498524或AD-1019448)的所关注的双链体在HD的Q175DN杂合小鼠模型中进行了评估。Q175DN小鼠携带具有约180个至220个CAG道重复的人外显子1HTT序列的敲入,其取代了小鼠HTT外显子1。

[1019] 在第0天,通过脑室内注射(ICV)向大约9个月大的杂合Q175DN小鼠(也称为Q175 HET小鼠)(混合性别)施用单次300 μ g剂量的所关注的药剂或人工CSF(aCSF)对照。野生型小鼠也包含在研究组中,以控制基线Htt转录物表达。下表中总结了研究设计。

[1020]

组 ID	处理	测试制品, ICV	基因型	10 mo 的组大小 (n)	12 mo 的组大小 (n)	靶标
1	Si 对照	aCSF	Q175 WT	n = 3	n = 4	对照
2	Si 对照	aCSF	Q175 HET	n = 6	n = 5	对照
3	Si1	AD-1271085	Q175 HET	n = 4	n = 10	HTT-FL
4	Si2	AD-1498524	Q175 HET	n = 5	n = 10	HTT-Ex1
5	Si3	AD-1019448	Q175 HET	n = 5		HTT-Ex1

[1021] 在给药后1个月或3个月(分别为10月龄或12月龄的小鼠),对小鼠进行组织收集,所述组织收集包含脊髓和纹状体组织样品。来自每只小鼠的一个脊髓样品和一个纹状体样品用于Htt变体RNA水平的QuantiGene分析。使用Si对照处理的WT小鼠作为QuantiGene分析的参考对照。

[1022] 下表提供了用于Htt转录物评估的QuantiGene面板。Atp5b、Eif4a2和Gapdh的表达水平用作参考基因对照。图7中描绘了QuantiGene面板的每个测定评估的Htt转录物部分的示意图。

[1023]	靶符号	名称	GenBank 登录
	Htt-I1-pA1	Htt (小鼠内源性), 具有 polyA 位点 1 的内含子 1 (680 bp 变体)	
	Htt-I1-pA2	Htt (小鼠内源性), 具有 polyA 位点 2 的内含子 1 (1145 bp 变体)	
	Htt-I1-3'	Htt (小鼠内源性), 位于其 3'端处的内含子 1	
	Htt-I3	Htt (小鼠内源性), 内含子 3	
	Htt-FL-(Exons_50-53)	亨廷顿蛋白, 全长 (总计)	NM_010414
[1024]	Atp5b	ATP 合酶, H ⁺ 转运线粒体 F1 复合物, β 亚基	NM_016774
	Eif4a2	真核翻译起始因子 4A2	NM_013506
	Gapdh	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	NM_001289726

[1025] 图12A-12J描绘了QuantiGene分析的结果。

[1026] 如图12A、12B、12F和12G所示,与Si对照处理的WT小鼠相比,在Si对照处理的Q175 HET小鼠中观察到含有HTT的内含子序列(使用Htt-I1-pA1和Htt-I1-pA2)的表达显著更高,证实了杂合动物中存在由扩增的CAG重复插入物产生的突变体HTT片段。这种影响在脊髓和纹状体组织以及两个终点处(10月龄和12月龄)都可见。相反,在Si对照处理的WT小鼠中,全长Htt(使用Htt-FL-(外显子50-53))在两个组织和两个终点处的表达均较高(图12E和12J)。

[1027] 测试的药剂表现出降低内含子/剪接变体(Htt-I1-pA1和Htt-I1-pA2)探针检测到的转录物表达以及全长HTT转录物表达的两者的可变趋势,特别是AD-1498524的施用在12个月大(给药后3个月)的队列中产生了显著的效果。

[1028] 相对于Si对照处理的Q175 HET,所有药剂在两种组织和两个年龄队列中对全长HTT转录物(Htt-FL-(外显子_50-53))的表达都表现出降低的作用。如与WT动物比较的,这导致全长形式进一步降低。

[1029] 在Htt-I1-3'的一些比较中观察到的具有统计学显著效应(代表未在隐蔽poly(A)信号处终止的不完全剪接的内含子1序列)可能表明了药剂的一些效应。然而,Htt-I1-3'的净荧光和归一化表达水平(与其它靶标相比)总体较低,这表明此靶标的低水平可能不是很有生物学意义。

[1030] 对在注射后1个月和3个月通过脑室内注射(ICV)施用单次300 μ g剂量的靶向全长人HTT(AD-1271085)或人HTT的外显子1(AD-1498524或AD-1019448)的所关注的双链体或人工CSF(aCSF)对照的Q175DN小鼠收集的另外的组织样品(54个右皮质组织样品和54个颈脊髓组织样品)进行中尺度发现(MSD)分析以确定突变体、野生型和总HTT蛋白水平。

[1031] 根据标准程序对所有皮质和脊髓组织样品进行均质化。将皮质样品在300 μ l MSD裂解缓冲液1中均质化,所述裂解缓冲液装在来自MP生物医疗公司(MP Biomedicals)的2-mL裂解基质D管中(目录号6913)。将脊髓样品在250 μ l MSD裂解缓冲液1中均质化,所述裂解缓冲液装在来自MP生物医疗公司的2-mL裂解基质Z管中(目录号6961)。将组织转移到含有MSD裂解缓冲液1的组织均质化管中。使用FastPrep-24高速台式均质器,以6米/秒(皮质)或6.5米/秒(脊髓)的速度,在30秒内对组织进行三轮均质化。将试管在4 $^{\circ}$ C下以20,800g离心20分钟。将上清液转移到1.5-mL Eppendorf管中,并且在4 $^{\circ}$ C下以20,800g再次离心20分钟。将裂解物等分并储存在-80 $^{\circ}$ C下,用于随后的蛋白质确定和MSD分析。

[1032] 进行BCA分析以确定所有样品的总蛋白质浓度。在MSD分析之后,在数据分析期间,使用来自每个单个样品的BCA结果来校正上样的蛋白质的实际量。

[1033] 下表中提供了突变体HTT和总HTT确定的MSD测定。将所有皮质和脊髓样品上样到涂覆的/封闭的MSD板上,并且在板间技术复制中进行测试。在与检测抗体和链霉亲和素-SulfoTag(MSD)连续温育后,在MSD S600成像仪上读取板。MSD软件用于从标准曲线计算HTT浓度。上样的蛋白质浓度用于反向计算fmol/mg总HTT蛋白

MSD 测定	抗体浓度 (捕获/检测; µg/mL)	上样的蛋白质 (µg/孔)		S 标准参考蛋白质	标准参考浓度范围 (5 倍系列)
		皮质	脊髓		
[1034] 具有扩增的 polyQ 道的人 HTT (突变体 HTT (mHTT))	1.5 / 0.625	2	1	HTT-Q73 (1-3144)	0.05 pM 至 4000 pM
总 (扩增的和 WT) 小鼠 HTT	8.0 / 0.4	10	10	HTT-Q7 (1-3120)	0.05 pM 至 4000 pM

[1035] 图12K中描绘了在皮质样品中检测突变体HTT和总HTT蛋白的MSD分析的结果,并且图12L中描绘了在脊髓样品中检测突变体HTT和总HTT蛋白的MSD结果。

[1036] 如图12K所描绘的,与Q175 HET Si对照组相比,用药剂 (AD-1271085、AD-1498524或AD-1019448) 处理的Q175 HET小鼠的突变体HTT水平显著降低。如所预期的,在任何WT样品中都无法检测到突变体HTT。类似地,与Q175 HET Si对照组相比,用药剂 (AD-1271085、AD-1498524或AD-1019448) 处理的Q175 Het小鼠的总小鼠HTT水平显著降低。如所预期的,WT组的总小鼠HTT水平大约是Q175 Het组的两倍。在突变体HTT或总小鼠HTT水平的10个月和12个月终点之间没有观察到统计学差异 (双尾未配对t测试),除了Q175 Het Si对照组的突变体HTT(**)和总小鼠HTT(*)水平。

[1037] 在脊髓组织中也显示出类似的结果。如图12L所描绘的,与Q175 HET Si对照组相比,用药剂 (AD-1271085、AD-1498524或AD-1019448) 处理的Q175 Het小鼠的突变体HTT水平显著降低。如所预期的,在任何WT样品中都无法检测到突变体HTT。与Q175 HET Si对照组相比,用药剂 (AD-1271085、AD-1498524或AD-1019448) 处理的Q175 Het小鼠的总小鼠HTT水平显著降低。WT组的总小鼠HTT水平大约是Q175 Het组的两倍。在突变体HTT或总小鼠HTT水平的10个月和12个月终点之间没有观察到统计学差异 (双尾未配对t测试),除了Q175 Het AD-1498524组的mHTT(****)水平。

[1038] 因此,与Si对照组相比,所有测试的双链体都显示出突变体HTT和总小鼠HTT蛋白水平的显著降低。特别是,在施用AD-1271085或AD-1498524,随后是AD-1019448后,观察到对突变体HTT和总HTT蛋白水平两者的最强抑制。

[1039] 总之,这些数据进一步表明所测试的示例性双链体药剂在体内有效降低了突变体HTT信使RNA和突变体HTT蛋白的水平。

[1040] 实例9. 使用靶向全长HTT的RNAi药剂的体内HTT蛋白敲低

[1041] 评估了以低剂量 (例如,3mg和10mg) 向非人灵长类动物施用靶向全长人HTT的所关注的双链体 (AD-1271085) 在各种神经组织中敲低野生型HTT转录物和蛋白质的能力。

[1042] 具体而言,在第1天,雌性非人灵长类动物在大约3分钟内通过手动团注鞘内施用单次3mg剂量或单次10mg剂量,体积为2ml的AD-1271085 (n=8) 的,然后冲洗0.3mL人工CSF (aCSF) 或人工aCSF (n=3)。在给药后第33天,处死动物,用盐水灌注并收集组织。对组织进行快速冷冻,以进行中尺度发现 (MSD) 分析。收集的组织包含前额叶皮质、海马体、纹状体壳核、纹状体尾状核和脊柱L1-L3 (腰椎)。下表中提供了实验设计:

组编号	测试材料	剂量水平 (mg/剂量)	剂量体积 (mL/剂量)	剂量浓度 (mg/mL)	主研究雌性的数量
[1043]	1	aCSF	0	2	0
	2	AD-1271085	3	2	1.5
	3	AD-1271085	10	2	5

[1044] 如图13A所描绘的,施用3mg剂量的AD-1271085导致前额叶皮质和海马体中的HTT转录物水平降低约55%。施用10mg剂量的AD-1271085导致前额叶皮质和海马体中HTT转录物水平降低约70%,并且纹状体尾状核中降低约20%。图13B中示出了每只动物的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核和纹状体尾状核样品中的HTT转录物水平。

[1045] 在HTT转录物被抑制后,HTT蛋白也减少(图13C)。在施用3mg剂量AD-1271085的动物中,在前额叶皮质和海马体中观察到约65%的抑制,并且在纹状体尾状核中观察到约40%至50%的抑制。施用10mg剂量的AD-1271085导致前额叶皮质和海马体中HTT蛋白水平降低约80%,并且纹状体尾状核中丧失约50%至60%。图13D中示出了每只动物的前额叶皮质、海马体、纹状体壳核和纹状体尾状核样品中的HTT蛋白水平。

[1046] 图13E描绘了AD-1271085对前额叶皮质、海马体、纹状体尾状核、纹状体壳核和腰椎组织样品中HTT转录物和蛋白降低的影响的相关性。

[1047] 另外,H&E的组织病理学分析;并且在第33天终末处死时来自检查的脑和脊髓的IBA-1染色的皮质或海马体切片表明,在施用3mg/kg或10mg/剂量后,没有AD-1271085相关的神经元/神经胶质细胞坏死的显微镜证据。

[1048] 这些数据进一步证明,示例性双链体药剂AD-1271085在体内有效降低了HTT转录物和蛋白的水平,即使在3mg和10mg的较低剂量下也是如此。

[1049] 实例10.靶向HTT的外显子1的RNAi药剂在体内的HTT蛋白敲低

[1050] 评估了靶向人HTT的外显子1的所关注的双链体(AD-1498524、AD-1498526或AD-1498528)在非人灵长类动物的各种神经组织中敲低野生型HTT转录物和蛋白的能力。具体而言,在第1天,雌性非人灵长类动物在大约3分钟内通过手动团注鞘内施用单次60mg剂量,体积为2mL的药剂(n=5)的,然后冲洗0.3mL人工CSF(aCSF)或人工aCSF(n=3)。在给药后第59天,处死动物,用盐水灌注并收集组织。收集的组织包含前额叶皮质、海马体、纹状体壳核、纹状体尾状核和腰椎。通过RT-PCR分析确定转录物水平,并且通过液相色谱法质谱法(LC/MS)定量蛋白质水平。

[1051] 下表中提供了实验设计:

组编号	测试材料	剂量水平 (mg/剂量)	剂量体积 (mL/剂量)	剂量浓度 (mg/mL)	主研究雌性的数量
[1052]	1	aCSF	0	2	0
	2	AD-1498524	60	2	30
[1053]	3	AD-1498526	60	2	30
	4	AD-1498526	60	2	30

[1054] 如图14A所描绘的,施用测试的药剂后,HTT蛋白减少。在施用AD-1498524的动物中观察到显著的抑制,特别是在前额叶皮质和纹状体尾状核组织中。在所有测试的药剂的转录水平上都观察到了类似的抑制作用,并且施用AD-1498524的动物在所有组织样品中表现出最显著的HTT转录物水平降低(图14B)。图14C中也描绘了每个组织样品中的HTT mRNA水

平。图14D示出了抑制作用对组织样品中HTT转录物和蛋白水平的影响的相关性。

[1055] 这些数据进一步证明所测试的示例性双链体药剂在体内有效降低了HTT信使RNA和HTT蛋白的水平。

[1056] 表4.HTT外显子1dsRNA药剂的未经修饰的有义和反义链序列

[1057]

双链体名称	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	NM_002111.8 中的范围	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	NM_002111.8 中的范围
AD-1498532	CUUCGAGUCCC UCAAGUCA	35	175-193	UGACTUGAGGGA CUCGAAGGC	47	173-193
AD-1019465	CCAUGGCGACC CUGGAAAAGA	28	144-164	UCUUUUCAGGG UCGCCAUGGCG	32	142-164
AD-1498529	ACCCUGGAAAA GCUGAUGAAA	36	152-172	UUUCAUCAGCUU UUCAGGGUCG	48	150-172
AD-1498531	CCUGGAAAAGC UGAUGAAA	37	154-172	UUUCAUCAGCUU UUCAGGGU	49	152-172
AD-1019476	CUGAUGAAGGC CUUCGAGUCA	38	164-184	UGACUCGAAGGC CUUCAUCAGCU	50	162-184
AD-1443079	CUGAAGAAGGC CUUCGAGUCA	39	164-184	UGACTCGAAGGC CUUCUUCAGCU	51	162-184
AD-1443080	GCGACCCUGGA AAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUC CAGGGUCGCCA	52	147-169
AD-1498521	GCGACCCUGGA AAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUC CAGGGUCGCCG	53	147-169
AD-1498522	UCCCUCAAGUC CUUCCAGCAA	41	182-202	UUGCUGGAAGG ACUUGAGGGACU	54	180-202
AD-1498523	UCCACAAGUC CUUCCAGCAA	42	182-202	UUGCTGGAAGGA CUUGUGGGACU	55	180-202
AD-1498524	GCGACCCUGGA AAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUC CAGGGUCGCCG	53	147-169
AD-1498525	UCAGGUUCUGC UUUUACCA	43	33-51	UGGUAAAAGCA GAACCUGAGC	56	31-51
AD-1498526	CUUCGAGUCCC UCAAGUCCUA	44	175-195	UAGGACTUGAGG GACUCGAAGGC	57	173-195
AD-1498527	GCCGCUCAGGU UCUGCUUUUA	45	28-48	UAAAAGCAGAAC CUGAGCGGCCG	58	26-48

[1058]

AD-1498528	CCGGUCAGGUU CUGCUUUUAA	46	29-49	UUAAAAGCAGA ACCUGACCGGCC	59	27-49
AD-1019448	CCAGAGCCCCA UUCAUUGCCA	97	57-77	UGGCAAUGAAU GGGGCUCUGGGC	98	55-77

[1059] 表5.HTT外显子1dsRNA药剂的经修饰的有义和反义链序列

[1060]

双链体名称	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列	SEQ ID NO:
AD-1498532	csusu(Chd)GfaGfUfCfcucaaguscsa	60	VPusdGsacdTu(G2p)aggacUfcGfaagsgsc	73	GCCUUCGAGUCCC UCAAGUCC	
AD-1019465	cscsaug(Ghd)CfgAfCfCfcuggaaaasgsa	33	VPusCfsuuUfcCfAfggguCfGcfcauggscsg	34	CGCCAUGGCGACC CUGGAAAAGC	
AD-1498529	ascscu(Ghd)GfaAfAfAfgcugaugasasa	61	VPusUfsucau(C2p)agcuuuUfcCfaggguscsg	74	CGACCCUGGAAAA GCUGAUGAAG	
AD-1498531	cscsuggaAfAfAfgcu ga(Uhd)gasasa	62	VPusUfsucdAu(C2p)agcuuuUfcCfagggsgsu	75	ACCCUGGAAAAGC UGAUGAAG	
AD-1019476	csusgau(Ghd)AfaGfGfCfcuucgaguscsa	63	VPusGfsacuCfgAfAfggccUfuCfaucagscsu	76	AGCUGAUGAAGGC CUUCGAGUCC	
AD-1443079	csusga(Ahd)gAfaGfGfCfcuucgaguscsa	64	VPusdGsacdTc(G2p)aa ggccUfuCfuucagscsu	77	AGCUGAUGAAGGC CUUCGAGUCC	
AD-1443080	gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa	65	VPusAfsucag(C2p)uuu uccAfgGfgucgscsa	78	UGGCGACCCUGGA AAAGCUGAUG	
AD-1498521	gscsgac(Chd)CfudGgAfaaagcugasusa	66	VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgscsg	79	UGGCGACCCUGGA AAAGCUGAUG	
AD-1498522	uscscu(Chd)AfaGfUfCfcuuccagcsasa	67	VPusUfsgcug(G2p)aag gacUfuGfagggascsu	80	AGUCCCUCAAGUC CUUCCAGCAG	
AD-1498523	uscscu(Chd)AfaGfUfCfcuuccagcsasa	68	VPusUfsgcdTg(G2p)aa ggacUfudGugggascsu	81	AGUCCCUCAAGUC CUUCCAGCAG	
AD-1498524	gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa	65	VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgscsg	79	UGGCGACCCUGGA AAAGCUGAUG	
AD-1498525	uscsgguUfCfUfgcu u(Uhd)uacscsa	69	VPusdGsgudAa(A2p)agcagaAfcCfugasgsc	82	GCUCAGGUUCUGC UUUUACCU	
AD-1498526	csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaagucscsa	70	VPusAfsggac(Tgn)uga gggAfcUfcgaagsgsc	83	GCCUUCGAGUCCC UCAAGUCCU	
AD-1498527	gscscg(Uhd)CfadGgUfucugcuuusasa	71	VPusAfsaadAg(C2p)agaadCcUfgAfgcgscsg	84	CGGCCGCUCAGGU UCUGCUUUUA	
AD-1498528	cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuusasa	72	VPusUfsaadAadGcagaa cCfudGaccgscsc	85	GGCCGCUCAGGU CUGCUUUUAC	
AD-1019448	cscsaga(Ghd)CfcCfCfAfucauugscsa	99	VPusGfsgcaAfuGfAfauggGfgCfucuggsgsc	100	GCCCAGAGCCCCA UUCAUUGCCC	

序列表

<110> 阿尔尼拉姆医药品有限公司(ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 亨廷顿蛋白 (HTT) IRNA药剂组合物以及其使用方法

<130> 121301-14420

<140>

<141>

<150> 63/167,140

<151> 2021-03-29

<160> 101

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 13498

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

gctgccggga cgggtccaag atggacggcc gctcaggttc tgcttttacc tgcggcccag	60
agccccattc attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cggcccagg cctccgggga	120
ctgccgtgcc gggcgggaga ccgcatggc gaccctggaa aagctgatga aggccttcga	180
gtccctcaag tccttccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca	240
gcagcagcag cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgctctctca	300
gcttcctcag ccgccgccgc aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cgccccgcc	360
gccgcccccg ccgccaccgc gccggctgt ggctgaggag ccgctgcacc gaccaaagaa	420
agaactttca gctaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat	480
agtggcacag tctgtcagaa attctccaga atttcagaaa cttctgggca tcgctatgga	540
actttttctg ctgtgcagtg atgacgcaga gtcagatgtc aggatggtgg ctgacgaatg	600
cctcaacaaa gttatcaaag ctttgatgga ttctaattctt ccaaggttac agctcgagct	660
ctataaggaa attaaaaaga atggtgcccc tcggagtttg cgtgctgccc tgtggaggtt	720
tgctgagctg gctcacctgg ttcggcctca gaaatgcagg ccttacctgg tgaaccttct	780
gccgtgcctg actcgaacaa gcaagagacc cgaagaatca gtccaggaga cttggctgc	840
agctgttccc aaaattatgg cttcttttgg caattttgca aatgacaatg aaattaaggt	900
tttggttaaag gccttcatag cgaacctgaa gtcaagctcc cccaccattc ggcgacagc	960
ggctggatca gcagtgcagca tctgccagca ctcaagaagg acacaatatt tctatagttg	1020
gctactaaat gtgtctcttag gcttactcgt tctgtcagag gatgaacact ccactctgct	1080
gattcttggc gtgtgctca ccctgaggta tttggtgccc ttgctgcagc agcaggtcaa	1140
ggacacaagc ctgaaaggca gcttcggagt gacaaggaaa gaaatggaag tctctcttc	1200
tgcagagcag cttgtccagg tttatgaact gacgttacat catacacagc accaagacca	1260
caatgttgtg accggagccc tggagctgtt gcagcagctc ttcagaacgc ctccaccga	1320
gcttctgcaa accctgaccg cagtcggggg cattgggcag ctcaccgctg ctaaggagga	1380

gtctggtggc	cgaagccgta	gtgggagtat	tgtggaactt	atagctggag	ggggttcctc	1440
atgcagccct	gtcctttcaa	gaaaacaaaa	aggcaaagt	ctcttaggag	aagaagaagc	1500
cttgaggat	gactctgaat	cgagatcgga	tgtcagcagc	tctgccttaa	cagcctcagt	1560
gaaggatgag	atcagtggag	agctggctgc	ttcttcagg	gtttccactc	cagggtcagc	1620
aggtcatgac	atcatcacag	aacagccacg	gtcacagcac	acactgcagg	cggactcagt	1680
ggatctggcc	agctgtgact	tgacaagctc	tgccactgat	ggggatgagg	aggatatctt	1740
gagccacagc	tccagccagg	tcagcgccgt	cccactgtac	cctgccatgg	acctgaatga	1800
tgggacccag	gcctcgctgc	ccatcagcga	cagctcccag	accaccaccg	aagggcctga	1860
ttcagctgtt	acccttcag	acagttctga	aattgtgtta	gacggtaccg	acaaccagta	1920
tttgggcctg	cagattggac	agccccagga	tgaagatgag	gaagccacag	gtattcttcc	1980
tgatgaagcc	tcggaggcct	tcaggaaactc	ttccatggcc	cttcaacagg	cacatttatt	2040
gaaaaacatg	agtcactgca	ggcagccttc	tgacagcagt	gttgataaat	ttgtgttgag	2100
agatgaagct	actgaaccgg	gtgatcaaga	aaacaagcct	tgccgcatca	aaggtgacat	2160
tggacagtcc	actgatgatg	actctgcacc	tcttgtccat	tgtgtccgcc	ttttatctgc	2220
ttcgtttttg	ctaacagggg	gaaaaaatgt	gctggttccg	gacagggatg	tgagggtcag	2280
cgtgaaggcc	ctggccctca	gctgtgtggg	agcagctgtg	gccctccacc	cggaatcttt	2340
cttcagcaaa	ctctataaag	ttcctcttga	caccacggaa	taccctgagg	aacagtatgt	2400
ctcagacatc	ttgaactaca	tcgatcatgg	agaccacag	gttcgaggag	ccactgccat	2460
tctctgtggg	accctcatct	gtccatcct	cagcaggtcc	cgcttcacg	tgggagattg	2520
gatgggcacc	attagaacct	tcacaggaaa	tacattttct	ttggcggatt	gcattccttt	2580
gctgcggaaa	acactgaagg	atgagtcttc	tgttacttgc	aagttagctt	gtacagctgt	2640
gaggaactgt	gtcatgagtc	tctgcagcag	cagctacagt	gagttaggac	tgcagctgat	2700
catcgatgtg	ctgactctga	ggaacagttc	ctattggctg	gtgaggacag	agcttctgga	2760
aacccttgca	gagattgact	tcaggctggg	gagctttttg	gaggcaaaag	cagaaaactt	2820
acacagaggg	gctcatcatt	atacagggct	tttaaaactg	caagaacgag	tgctcaataa	2880
tgttgtcatc	catttgcttg	gagatgaaga	cccagggtg	cgacatgttg	ccgcagcatc	2940
actaattagg	cttgtcccaa	agctgtttta	taaatgtgac	caaggacaag	ctgatccagt	3000
agtggccgtg	gcaagagatc	aaagcagtgt	ttacctgaaa	cttctcatgc	atgagacgca	3060
gcctccatct	catttctccg	tcagcacaat	aaccagaata	tatagaggct	ataacctact	3120
accaagcata	acagacgtca	ctatggaaaa	taacctttca	agagttattg	cagcagtttc	3180
tcatgaacta	atcacatcaa	ccaccagagc	actcacattt	ggatgctgtg	aagctttgtg	3240
tcttctttcc	actgccttcc	cagtttgcac	ttggagttta	ggttggcact	gtggagtgcc	3300
tccactgagt	gcctcagatg	agtctaggaa	gagctgtacc	gttgggatgg	ccacaatgat	3360
tctgaccctg	ctctcgctcag	cttggttccc	attggatctc	tcagcccatc	aagatgcttt	3420
gattttggcc	ggaaacttgc	ttgcagccag	tgctcccaaa	tctctgagaa	gttcatgggc	3480
ctctgaagaa	gaagccaacc	cagcagccac	caagcaagag	gaggtctggc	cagccctggg	3540
ggaccggggc	ctggtgcca	tgggtggagca	gctcttctct	cacctgctga	aggtgattaa	3600
catttgtgcc	cacgtcctgg	atgacgtggc	tcctggacct	gcaataaagg	cagccttgcc	3660
ttctctaaca	aacccccctt	ctctaagtcc	catccgacga	aagggaagg	agaaagaacc	3720

aggagaacaa	gcatctgtac	cgttgagtcc	caagaaaggc	agtgaggcca	gtgcagcttc	3780
tagacaatct	gataccctcag	gtcctgttac	aacaagtaaa	tcctcatcac	tggggagttt	3840
ctatcatctt	ccttcatacc	tcaaactgca	tgatgtcctg	aaagctacac	acgctaacta	3900
caaggtcacg	ctggatcttc	agaacagcac	ggaaaagttt	ggagggtttc	tccgctcagc	3960
cttggatgtt	ctttctcaga	tactagagct	ggccacactg	caggacattg	ggaagtgtgt	4020
tgaagagatc	ctaggatacc	tgaaatcctg	ctttagtcga	gaaccaatga	tggaactgtt	4080
ttgtgttcaa	caattgttga	agactctctt	tggcacaaac	ttggcctccc	agtttcatgg	4140
cttatcttcc	aaccccagca	agtcacaagg	ccgagcacag	cgccttggct	cctccagtgt	4200
gaggccaggc	ttgtaccact	actgcttcat	ggccccgtac	accacttca	cccaggccct	4260
cgctgacgcc	agcctgagga	acatggtgca	ggcggagcag	gagaacgaca	cctcgggatg	4320
gtttgatgtc	ctccagaaaag	tgtctacca	gttgaagaca	aacctcacga	gtgtcacaaa	4380
gaaccgtgca	gataagaatg	ctattcataa	tcacattcgt	ttgtttgaac	ctcttgttat	4440
aaaagcttta	aaacagtaca	cgactacaac	atgtgtgcag	ttacagaagc	aggtttttaga	4500
tttgcctggc	cagctggttc	agttacgggt	taattactgt	cttctggatt	cagatcaggt	4560
gtttattggc	tttgtattga	aacagtttga	atacattgaa	gtgggccagt	tcagggaatc	4620
agaggcaatc	attccaaaca	tctttttctt	cttgggtatta	ctatcttatg	aacgctatca	4680
ttcaaaacag	atcattggaa	ttcctaaaat	cattcagctc	tgtgatggca	tcattggccag	4740
tggaaggaag	gctgtgacac	atgccatacc	ggctctgcag	cccatagtcc	acgacctctt	4800
tgtattaaga	ggaacaaata	aagctgatgc	aggaaaagag	cttgaaaccc	aaaaagaggt	4860
ggtggtgtca	atgttactga	gactcatcca	gtaccatcag	gtgttgaga	tgttcattct	4920
tgctctgcag	cagtgccaca	aggagaatga	agacaagtgg	aagcgactgt	ctcgacagat	4980
agctgacatc	atcctcccaa	tgtagccaa	acagcagatg	cacattgact	ctcatgaagc	5040
ccttggagtg	ttaaatacat	tatttgagat	tttggccctt	tcctccctcc	gtccggtaga	5100
catgctttta	cggagtatgt	tcgtcactcc	aaacacaatg	gcgtccgtga	gcaactgtca	5160
actgtggata	tcgggaattc	tgcccatitt	gagggttctg	atttcccagt	caactgaaga	5220
tattgttctt	tctcgtattc	aggagctctc	cttctctccg	tatttaattct	cctgtacagt	5280
aattaatagg	ttaagagatg	gggacagtac	ttcaacgcta	gaagaacaca	gtgaaggga	5340
acaaataaag	aatttgccag	aagaaacatt	ttcaaggttt	ctattacaac	tggttggtat	5400
tcttttagaa	gacattgtta	caaaacagct	gaaggtggaa	atgagtgagc	agcaacatac	5460
tttctattgc	caggaaactag	gcacactgct	aatgtgtctg	atccacatct	tcaagtctgg	5520
aatgttccgg	agaatcacag	cagctgccac	taggctgttc	cgcagtgatg	gctgtggcgg	5580
cagtttctac	accctggaca	gcttgaactt	gcgggctcgt	tccatgatca	ccaccacccc	5640
ggccctgggt	ctgctctggt	gtcagatact	gctgcttgct	aaccacaccg	actaccgctg	5700
gtgggcagaa	gtgcagcaga	ccccgaaaag	acacagtctg	tccagcaca	agttacttag	5760
tccccagatg	tctggagaag	aggaggattc	tgacttggca	gccaaacttg	gaatgtgcaa	5820
tagagaaata	gtacgaagag	gggtctctcat	tctcttctgt	gattatgtct	gtcagaacct	5880
ccatgactcc	gagcacttaa	cgtggctcat	tgtaaatcac	attcaagatc	tgatcagcct	5940
ttcccacgag	cctccagtac	aggacttcat	cagtgccgtt	catcggaact	ctgctgccag	6000
cggcctgttc	atccaggcaa	ttcagtctcg	ttgtgaaaac	ctttcaactc	caacctatgt	6060

gaagaaaact	cttcagtgtc	tggaggggat	ccatctcagc	cagtcgggag	ctgtgctcac	6120
gctgtatgtg	gacaggcttc	tgtgcacccc	tttccgtgtg	ctggctcgca	tggctgacat	6180
ccttgcttgt	cgccgggtag	aaatgcttct	ggctgcaa	ttacagagca	gcatggccca	6240
gttgccaatg	gaagaactca	acagaatcca	ggaatacctt	cagagcagcg	ggctcgctca	6300
gagacaccaa	aggctctatt	ccctgctgga	caggtttctg	ctctccacca	tgcaagactc	6360
acttagtccc	tctcctccag	tctcttccca	cccgtggac	ggggatgggc	acgtgtcact	6420
ggaaacagtg	agtccggaca	aagactggta	cgttcatctt	gtcaaataccc	agtgttggac	6480
caggtcagat	tctgcaactg	tggaagggtg	agagctgggt	aatcggattc	ctgctgaaga	6540
tatgaatgcc	ttcatgatga	actcggagtt	caacctaaag	ctgctagctc	catgcttaag	6600
cctagggatg	agtgaatatt	ctgggtggca	gaagagtgc	ctttttgaag	cagcccgtga	6660
ggtgactctg	gcccgtgtga	gcggcacctg	gcagcagctc	cctgctgtcc	atcatgtctt	6720
ccagccccgag	ctgcctgcag	agccggcggc	ctactggagc	aagttgaatg	atctgtttgg	6780
ggatgctgca	ctgtatcagt	ccctgcccac	tctggcccgg	gccctggcac	agtacctggt	6840
ggtggtctcc	aaactgcccc	gtcatttgca	ccttctctct	gagaaagaga	aggacattgt	6900
gaaattcgtg	gtggcaaccc	ttgaggccct	gtcctggcat	ttgatccatg	agcagatccc	6960
gctgagtctg	gatctccagg	cagggtgga	ctgctgctgc	ctggccctgc	agctgcctgg	7020
cctctggagc	gtggtctcct	ccacagagtt	tgtgaccac	gcctgctccc	tcatctactg	7080
tgtgcacttc	atcctggagg	ccgttgca	gcagcctgga	gagcagcttc	ttagtccaga	7140
aagaaggaca	aataccccaa	aagccatcag	cgaggaggag	gaggaagtag	atccaaacac	7200
acagaatcct	aagtatatca	ctgcagcctg	tgagatgggt	gcagaaatgg	tggagtctct	7260
gcagtcgggtg	ttggccttgg	gtcataaaa	gaatagcggc	gtgccggcgt	ttctcacgcc	7320
attgctaagg	aacatcatca	tcagcctggc	ccgcctgccc	cttgtcaaca	gctacacacg	7380
tgtgccccca	ctgggtgtga	agcttggtatg	gtcacccaaa	ccgggagggg	atgttggcac	7440
agcattccct	gagatccccg	tggagtctct	ccaggaaaag	gaagtcttta	aggagtctcat	7500
ctaccgcac	aacacactag	gctggaccag	tcgtactcag	tttgaagaaa	cttggggccac	7560
cctccttgggt	gtcctgggtga	cgcagcccct	cgtgatggag	caggaggaga	gcccaccaga	7620
agaagacaca	gagaggaccc	agatcaacgt	cctggccgtg	caggccatca	cctcactggt	7680
gctcagtgtg	atgactgtgc	ctgtggccgg	caaccagct	gtaagctgct	tggagcagca	7740
gccccggaac	aagcctctga	aagctctcga	caccaggttt	gggaggaagc	tgagcattat	7800
cagagggatt	gtggagcaag	agattcaagc	aatggtttca	aagagagaga	atattgccac	7860
ccatcattta	tatcaggcat	gggatcctgt	cccttctctg	tctccggcta	ctacaggtgc	7920
cctcatcagc	cacgagaagc	tgctgtctaca	gatcaacccc	gagcgggagc	tggggagcat	7980
gagctacaaa	ctcgccaggg	tgtccataca	ctccgtgtgg	ctggggaaca	gcatcacacc	8040
cctgagggag	gaggaatggg	acgaggaaga	ggaggaggag	gccgacgccc	ctgcaccttc	8100
gtcaccaccc	acgtctccag	tcaactccag	gaaacaccgg	gctggagttg	acatccactc	8160
ctgttcgcag	tttttgcttg	agttgtacag	ccgtgtggatc	ctgccgtcca	gctcagccag	8220
gaggaccccc	gccatcctga	tcagttaggt	ggtcagatcc	cttctagtgg	tctcagactt	8280
gttcaccgag	cgcaaccagt	ttgagctgat	gtatgtgacg	ctgacagaac	tgcaagggtg	8340
gcacccttca	gaagacgaga	tcctcgctca	gtacctgggtg	cctgccacct	gcaaggcagc	8400

tgccgtcctt	gggatggaca	aggccgtggc	ggagcctgtc	agccgcctgc	tggagagcac	8460
gctcaggagc	agccacctgc	ccagcagggt	tggagccctg	cacggcgtcc	tctatgtgct	8520
ggagtgcgac	ctgctggacg	acactgccaa	gcagctcatc	ccggtcatca	gcgactatct	8580
cctctccaac	ctgaaaggga	tcgcccactg	cgtgaacatt	cacagccagc	agcacgtact	8640
ggatcatgtgt	gccactgcgt	tttacctcat	tgagaactat	cctctggacg	tagggccgga	8700
attttcagca	tcaataatac	agatgtgtgg	ggtgatgctg	tctggaagtg	aggagtccac	8760
cccctccatc	atttaccact	gtgccctcag	aggcctggag	cgcctcctgc	tctctgagca	8820
gctctcccg	ctggatgcag	aatcgctggg	caagctgagt	gtggacagag	tgaacgtgca	8880
cagcccgcac	cgggccatgg	cggctctggg	cctgatgctc	acctgcatgt	acacaggaaa	8940
ggagaaaagtc	agtccgggta	gaacttcaga	ccctaatect	gcagcccccg	acagcgagtc	9000
agtgattgtt	gctatggagc	gggtatctgt	tctttttgat	aggatcagga	aaggctttcc	9060
ttgtgaagcc	agagtgggtg	ccaggatcct	gccccagttt	ctagacgact	tcttcccacc	9120
ccaggacatc	atgaacaaag	tcatcggaga	gtttctgtcc	aaccagcagc	cataccccca	9180
gttcatggcc	accgtgggtg	ataaggtgtt	tcagactctg	cacagcaccg	ggcagtcgtc	9240
catggtccgg	gactgggtca	tgctgtccct	ctccaacttc	acgcagaggg	ccccggtcgc	9300
catggccacg	tggagcctct	cctgtctctt	tgtcagcgcg	tccaccagcc	cgtgggtcgc	9360
ggcgatcctc	ccacatgtca	tcagcaggat	gggcaagctg	gagcaggtgg	acgtgaacct	9420
tttctgcctg	gtcgccacag	acttctacag	acaccagata	gaggaggagc	tcgaccgcag	9480
ggccttccag	tctgtgcttg	aggtgggttg	agccccagga	agcccatatc	accggctgct	9540
gacttgttta	cgaaatgtcc	acaaggtcac	cacctgctga	gcgccatggg	gggagagact	9600
gtgaggcgcc	agctggggcc	ggagcctttg	gaagtctgcg	cccttggtgc	ctgcctccac	9660
cagaccagct	tggtccttat	gggcttccgc	acatgcccg	ggcggccagg	caacgtgcgt	9720
gtctctgcca	tgtggcagaa	gtgctctttg	tggcagtggc	caggcaggga	gtgtctgcag	9780
tcctgggtggg	gctgagcctg	aggccttcca	gaaagcagga	gcagctgtgc	tgcaccccat	9840
gtgggtgacc	aggctccttc	tcctgatagt	cacctgctgg	ttgttgccag	gttgacagctg	9900
ctcttgcatc	tgggccagaa	gtcctccctc	ctgcaggctg	gctgttggcc	cctctgctgt	9960
cctgcagtag	aaggtgccgt	gagcaggctt	tgggaacact	ggcctgggtc	tccttggtgg	10020
ggtgtgcatg	ccacgccccg	tgtctggatg	cacagatgcc	atggcctgtg	ctgggccagt	10080
ggctgggggt	gctagacacc	cggcaccatt	ctcccttctc	tcttttcttc	tcaggattta	10140
aaatttaatt	atatcagtaa	agagattaat	tttaacgtaa	ctctttctat	gcccggtgaa	10200
agtatgtgaa	tcgcaaggcc	tgtgctgcat	gcgacagcgt	ccgggggtgg	ggacagggcc	10260
cccgccacg	ctccctctcc	tgtagccact	ggcatagccc	tcctgagcac	ccgctgacat	10320
ttccgttgta	catgttcctg	tttatgcatt	cacaaggtga	ctgggatgta	gagaggcggt	10380
agtgggcagg	tggccacagc	aggactgagg	acaggccccc	attatcctag	gggtgcgctc	10440
acctgcagcc	cctcctcctc	gggcacagac	gactgtcggt	ctccaccac	cagtcaggga	10500
cagcagcctc	cctgtcactc	agctgagaag	gccagccctc	cctggctgtg	agcagcctcc	10560
actgtgtcca	gagacatggg	cctcccactc	ctgttccttg	ctagccctgg	ggtggcgctct	10620
gcctaggagc	tggctggcag	gtgttgggac	ctgctgctcc	atggatgcat	gccctaagag	10680
tgtcactgag	ctgtgttttg	tctgagcctc	tctcggtcaa	cagcaaagct	tggtgtcttg	10740

gcactgttag	tgacagagcc	cagcatccct	tctgcccccg	ttccagctga	catcttgcac	10800
ggtgacccct	tttagtcagg	agagtgcaga	tctgtgtctca	tcggagactg	ccccacggcc	10860
ctgtcagagc	cgccactcct	atccccaggc	caggtccctg	gaccagcctc	ctgtttgcag	10920
gcccagagga	gccaagtcac	taaaatggaa	gtggattctg	gatggccggg	ctgctgctga	10980
tgtaggagct	ggatttggga	gctctgcttg	ccgactggct	gtgagacgag	gcaggggctc	11040
tgtttcctca	gccctagagg	cgagccaggc	aaggttggcg	actgtcatgt	ggcttggttt	11100
ggtcatgccc	gtcgatgttt	tgggtattga	atgtggtaag	tggaggaaat	gttggaactc	11160
tgtgcagggtg	ctgccttgag	acccccaaagc	ttccacctgt	ccctctccta	tgtggcagct	11220
ggggagcagc	tgagatgtgg	acttgtatgc	tgccccacata	cgtgaggggg	agctgaaagg	11280
gagccccctcc	tctgagcagc	ctctgccagg	cctgtatgag	gcttttccca	ccagctccca	11340
acagaggcct	ccccagcca	ggaccacctc	gtctctgtgg	cggggcagca	ggagcggtag	11400
aaaggggtcc	gatgtttgag	gaggccctta	agggaagcta	ctgaattata	acacgtaaga	11460
aaatcaccat	tccgtattgg	ttgggggctc	ctgtttctca	tcctagcttt	ttcctggaaa	11520
gcccgttaga	aggtttggga	acgaggggaa	agttctcaga	actgttggct	gtccccacc	11580
cgctcccgc	ctccccgcga	ggttatgtca	gcagctctga	gacagcagta	tcacaggcca	11640
gatgttggtc	ctggctagat	gtttacattt	gtaagaaata	acactgtgaa	tgtaaaacag	11700
agccattccc	ttggaatgca	tatcgctggg	ctcaacatag	agtttgtctt	cctcttgttt	11760
acgacgtgat	ctaaaccagt	ccttagcaag	gggctcagaa	caccccgtc	tggcagtagg	11820
tgtccccac	ccccaaagac	ctgcctgtgt	gctccggaga	tgaatatgag	ctcattagta	11880
aaaatgactt	caccacgca	tatacataaa	gtatccatgc	atgtgcatat	agacacatct	11940
ataattttac	acacacacct	ctcaagacgg	agatgcatgg	cctctaagag	tgcccgtgtc	12000
ggttcttcct	ggaagttgac	tttccttaga	cccgccaggt	caagttagcc	gcgtgacgga	12060
catccaggcg	tgggacgtgg	tcagggcagg	gctcattcat	tgcccactag	gatccactg	12120
gcgaagatgg	tctccatata	agctctctgc	agaagggagg	aagactttat	catgttccta	12180
aaaatctgtg	gcaagcaccc	atcgtattat	ccaaattttg	ttgcaaagt	gattaatttg	12240
gttgtcaagt	tttgggggtg	ggctgtgggg	agattgcttt	tgttttcctg	ctggtaatat	12300
cgggaaagat	tttaatgaaa	ccagggtaga	attgtttggc	aatgcactga	agcgtgtttc	12360
tttccccaaa	tgtgcctccc	ttccgtgcg	ggcccagctg	agtctatgta	ggtgatgttt	12420
ccagctgcca	agtgtctttt	gttactgtcc	accctcattt	ctgccagcgc	atgtgtcctt	12480
tcaaggggaa	aatgtgaagc	tgaacccct	ccagacaccc	agaatgtagc	atctgagaag	12540
gccctgtgcc	ctaaaggaca	cccctcgccc	ccatcttcat	ggaggggggtc	atttcagagc	12600
cctcgagacc	aatgaacagc	tcctcctctt	ggagctgaga	tgagccccac	gtggagctcg	12660
ggacggatag	tagacagcaa	taactcggtg	tgtggccgcc	tggcaggtgg	aacttctctc	12720
cgttgccggg	tggagtgagg	ttagttctgt	gtgtctgggtg	ggtggagtca	ggcttctctt	12780
gctacctgtg	agcatccttc	ccagcagaca	tcctcatcgg	gctttgtccc	tccccgctt	12840
cctccctctg	cggggaggac	ccgggaccac	agctgctggc	cagggtagac	ttggagctgt	12900
cctccagagg	ggtcacgtgt	aggagtgaga	agaaggaaga	tcttgagagc	tgctgaggga	12960
ccttgagag	ctcaggatgg	ctcagacgag	gacactcgct	tgccgggcct	gggcctcctg	13020
ggaaggaggg	agctgctcag	aatgccgcat	gacaactgaa	ggcaacctgg	aaggttcagg	13080

ggccgctctt	cccccatgtg	cctgtcacgc	tctggtgcag	tcaaaggaac	gccttcccct	13140
cagttgtttc	taagagcaga	gtctcccgct	gcaatctggg	tggtactgc	cagccttgga	13200
ggatcgtggc	caacgtggac	ctgcctacgg	agggtgggct	ctgaccaag	tggggcctcc	13260
ttgtccaggt	ctcactgctt	tgcaccgtgg	tcagagggac	tgtcagctga	gcttgagctc	13320
ccctggagcc	agcagggtg	tgatgggcga	gtcccgagc	cccaccaga	cctgaatgct	13380
tctgagagca	aagggaagga	ctgacgagag	atgtatattt	aattttttaa	ctgctgcaaa	13440
cattgtacat	ccaaattaaa	ggaaaaaat	ggaaaccatc	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	13498
<210>	2					
<211>	13237					
<212>	DNA					
<213>	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)					
<400>	2					
gcactgccg	cgagggttgc	cgggacgggc	ccaagatggc	tgagcgctt	ggttccgctt	60
ctgcctgccg	cgcagagccc	cattcattgc	cttctgtcta	agtggcgccg	cgtagtgcca	120
gtaggctcca	agtcttcagg	gtctgtccca	tcgggcagga	agccgtcatg	gcaaccctgg	180
aaaagctgat	gaaggctttc	gagtcgtca	agtcgtttca	gcagcaacag	cagcagcagc	240
caccgccgca	ggcgccgccg	ccaccgccgc	cgccgcctcc	gcctcaaccc	cctcagccgc	300
cgcctcaggg	gcagccgccg	ccgccaccac	cgccgctgcc	aggtccggca	gaggaaccgc	360
tgcaccgacc	aaagaaggaa	ctctcagcca	ccaagaaaga	ccgtgtgaat	cattgtctaa	420
caatatgtga	aaacattgtg	gcacagtctc	tcagaaattc	tccagaattt	cagaaactct	480
tgggcatcgc	tatggaactg	tttctgtctg	gcagtacga	tgccgagtca	gatgtcagaa	540
tggtggctga	tgagtgcctc	aacaaagtca	tcaaagcttt	gatggattct	aatcttccaa	600
ggctacagtt	agaactctat	aaggaaatta	aaaagaatgg	tgctcctcga	agtttgcgtg	660
ctgccctgtg	gaggtttgct	gagctggctc	acctggttcg	acctcagaag	tgcaggcctt	720
acctggtgaa	tcttcttcca	tgcctgacct	gaacaagcaa	aagaccggag	gaatcagttc	780
aggagacctt	ggctgcagct	gttcctaaaa	ttatggcttc	ttttggcaat	ttcgcaaatg	840
acaatgaaat	taaggttctg	ttgaaagctt	tcatagcaaa	tctgaagtca	agctctccca	900
ccgtgcggcg	gacagcagcc	ggctcagccg	tgagcatctg	ccaacattct	aggaggacac	960
agtacttcta	caactggctc	cttaatgtcc	tcctaggtct	gctggttccc	atggaagaag	1020
agcactccac	tctcctgate	ctcgggtgtg	tgctcacatt	gaggtgtcta	gtgcccttgc	1080
tccagcagca	ggtcaaggac	acaagtctaa	aaggcagctt	tggggtgaca	cggaaagaaa	1140
tggaagtctc	tccttctaca	gagcagcttg	tccaggttta	tgaactgact	ttgcatcata	1200
ctcagcacca	agaccacaat	gtggtgacag	gggactgga	gctcctgcag	cagctcttcc	1260
gtaccctccc	acctgaactc	ctgcaagcac	tgaccacacc	aggagggtct	gggcagctca	1320
ctctggttca	agaagaggcc	cggggccgag	gccgcagcgg	gagcatcgtg	gagcttttag	1380
ctggaggggg	ttcctcgtgc	agccctgtcc	tctcaagaaa	gcagaaaggc	aaagtgtctt	1440
taggagagga	agaagccttg	gaagatgact	cggagtccag	gtcagatgtc	agcagctcag	1500
cctttgcagc	ctctgtgaag	agtgagattg	gtggagagct	cgctgcttct	tcaggtgttt	1560
ccactcctgg	ttctgttggg	cacgacatca	tactgagca	gcctagatcc	cagcacacac	1620

ttcaagcaga	ctctgtggat	ttgtccggct	gtgacctgac	cagtgtgtgct	actgatgggg	1680
atgaggagga	catcttgagc	cacagctcca	gccagttcag	tgctgtccca	tccgacctg	1740
ccatggacct	gaatgatggg	accagggcct	cctcacccat	cagtgacagt	tctcagacca	1800
ccactgaagg	acctgattca	gctgtgactc	cttcggacag	ttctgaaatt	gtgttagatg	1860
gtgccgatag	ccagtattta	ggcatgcaga	taggacagcc	acaggaggac	gatgaggagg	1920
gagctgcagg	tgttctttct	ggtgaagtct	cagatgtttt	cagaaactct	tctctggccc	1980
ttcaacaggc	acacttgttg	gaaagaatgg	gccatagcag	gcagccttcc	gacagcagta	2040
tagataagta	tgtacaaga	gatgaggttg	ctgaagccag	tgatccagaa	agcaagcctt	2100
gccgaatcaa	aggtgacata	ggacagccta	atgatgatga	ttctgctcct	ctggtacatt	2160
gtgtccgtct	tttatctgct	tcctttttgt	taactggtga	aaagaaagca	ctggttccag	2220
acagagacgt	gagagtcagt	gtgaaggccc	tggccctcag	ctgcattggg	gcggctgtgg	2280
cccttcatcc	agagtcgttc	ttcagcagac	tgtacaaagt	acctcttaat	accacggaaa	2340
gtactgagga	acagtatgtt	tctgacatct	tgaactacat	cgatcatgga	gacccacagg	2400
tccgaggagc	tactgccatt	ctctgtggga	cccttgtcta	ctccatcctc	agtaggtccc	2460
gtctccgtgt	tggtgactgg	ctgggcaaca	tcagaaccct	gacaggaaat	acattttctc	2520
tggtggactg	cattccttta	ctgcagaaaa	cgttgaagga	tgaatcttct	gttacttgca	2580
agttggcttg	tacagctgtg	aggcactgtg	tcctgagtct	ttgcagcagc	agctacagtg	2640
acttgggatt	acaactgctt	attgatatgc	tgcctctgaa	gaacagctcc	tactggctgg	2700
tgaggaccga	actgctggac	actctggcag	agattgactt	caggctcgtg	agtttttttg	2760
aggcaaaagc	agaaagttta	caccgagggg	ctcatcatta	tacagggttt	ctaaaactac	2820
aagaacgagt	actcaataat	gtggtcattt	atttgcttgg	agatgaagac	cccagggttc	2880
gacatgttgc	tgcaacatca	ttaacaaggc	ttgtcccaaa	gctgttttac	aagtgtgacc	2940
aaggacaagc	tgatccagtt	gtggctgtag	cgagggatca	gagcagtgtc	tacctgaagc	3000
tcctcatgca	tgagaccag	ccaccatcac	acttttctgt	cagcaccatc	accagaatct	3060
atagaggcta	tagcttactg	ccaagtataa	cagatgtcac	catggaaaac	aatctctcaa	3120
gagttgttgc	cgcagtttct	catgaactca	ttacgtcaac	aacacgggca	ctcacatttg	3180
gatgtgtgta	agccttgtgt	cttctctcag	cagcctttcc	agtttgact	tggagtttag	3240
gatggcactg	tggagtggcc	ccactgagtg	cctctgatga	gtccaggaag	agctgcactg	3300
ttgggatggc	ctccatgatt	ctcaccttgc	tttcatcagc	ttggttccca	ctggatctct	3360
cagcccatca	ggatgccttg	attttggctg	gaaacttgct	agcagcgagt	gcccccaagt	3420
ctctgagaag	ttcatggacc	tctgaagaag	aagccaactc	agcagccacc	agacaggagg	3480
aaatctggcc	tgctctgggg	gatcggactc	tagtgccctt	ggtggagcag	cttttctccc	3540
acctgctgaa	ggtgatcaat	atctgtgtct	atgtcttggg	cgatgtgact	cctggaccag	3600
caatcaaggc	agccttgcc	tctctaacaa	accccccttc	tctaagtcct	attcgacgga	3660
aagggaagga	gaaagaacct	ggagaacaag	cttctactcc	aatgagtccc	aagaaagtgt	3720
gtgaggccag	tgcagcctct	cgacaatcag	acacctcagg	acctgtcaca	gcaagtaaat	3780
catcctcact	ggggagtttc	taccatctcc	cctcctacct	caaactgcat	gatgtcctga	3840
aagccactca	cgccaactat	aaggtcacct	tagatcttca	gaacagcact	gaaaagtttg	3900
gggggttcct	gcgtcttgcc	ttggacgtcc	tttctcagat	tctagagctg	gcgacactgc	3960

aggacattgg	aaagtgtgtt	gaagaggtcc	ttggatacct	gaaatcctgc	tttagtcgag	4020
aaccaatgat	ggcaactgtc	tgtgtgcagc	agctattgaa	gactctcttt	gggacaaact	4080
tagcctcaca	gtttgatggc	ttatcttcca	accccagcaa	gtctcagtgc	cgagctcagc	4140
gccttggctc	ttcaagtgtg	aggcccggct	tatatcacta	ctgcttcatg	gcaccataca	4200
cgcacttcac	acaggccttg	gctgacgcaa	gcctgaggaa	catggtgcag	gcgagacagg	4260
agcgtgatgc	ctcgggggtg	tttgatgtac	tccagaaagt	gtctgccccaa	ttgaagacga	4320
acctaacaag	cgtcacaaag	aaccgtgcag	ataagaatgc	tattcataat	cacattaggt	4380
tatttgagcc	tcttgttata	aaagcattga	agcagtacac	cacgacaaca	tctgtacaat	4440
tgcagaagca	ggttttggat	ttgctggcac	agctggttca	gctacgggtc	aattactgtc	4500
tactggattc	agaccagggtg	ttcatcgggt	ttgtgctgaa	gcagtttgag	tacattgaag	4560
tgggccagtt	cagggaatca	gaggcaatta	ttccaaatat	atctttcttc	ctggtattac	4620
tgtcttatga	gcgtaccat	tcaaaacaga	tcattggaat	tcctaaaatc	atccagctgt	4680
gtgatggcat	catggccagt	ggaaggaagg	ccgttacaca	tgctatacct	gctctgcagc	4740
ccattgtcca	tgacctcttt	gtgttacgag	gaacaaataa	agctgatgca	gggaaagagc	4800
ttgagacaca	gaaggagggtg	gtggtctcca	tgctgttacg	actcatccag	taccatcagg	4860
tgctggagat	gttcatcctt	gtcctgcagc	agtgccacaa	ggagaatgag	gacaagtgga	4920
aacggctctc	tcggcaggtc	gcagacatca	tcctgccccat	gttgccaag	cagcagatgc	4980
atattgactc	tcatgaagcc	cttgagagtgt	taaatacctt	gtttgagatt	ttggctcctt	5040
cctccctacg	tcctgtggac	atgcttttgc	ggagtatgtt	catcactcca	agcacaatgg	5100
catctgtaag	cactgtgcag	ctgtggatat	ctggaatcct	cgccattctg	agggttctca	5160
tttcccagtc	aaccgaggac	attgttcttt	gtcgtattca	ggagctctcc	ttctctccac	5220
acttgctctc	ctgtccagtg	attaacaggt	taaggggtgg	aggcggtaat	gtaacactag	5280
gagaatgcag	cgaagggaag	caaaagagtt	tgccagaaga	tacattctca	aggtttcttt	5340
tacagctggg	tggtattctt	ctagaagaca	tcgttacaaa	acagctcaaa	gtggacatga	5400
gtgaacagca	gcatacgttc	tactgccaag	agctaggcac	actgctcatg	tgtctgatcc	5460
acatatccaa	atctggaatg	ttccggagaa	tcacagcagc	tgccactaga	ctcttcacca	5520
gtgatggctg	tgaaggcagc	ttctatactc	tagagagcct	gaatgcacgg	gtccgatcca	5580
tggtgcccac	gcacccagcc	ctggtaactgc	tctgggtgtca	gacccacttt	ctcatcaacc	5640
acactgacca	ccggtgggtg	gcagagggtc	agcagacacc	caagagacac	agtctgtcct	5700
gcacgaagtc	acttaacccc	cagaagtctg	gcgaagagga	ggattctggc	tcggcagctc	5760
agctgggaat	gtgcaataga	gaaatagtgc	gaagaggggc	ccttattctc	ttctgtgatt	5820
atgtctgtca	gaatctccat	gactcagaac	acttaacatg	gctcattgtg	aatcacattc	5880
aagatctgat	cagcttgtct	catgagcctc	cagtacaaga	ctttattagt	gccattcatc	5940
gtaattctgc	agctagtggg	ctttttatcc	aggcaattca	gtctcgtgtg	gaaaatcttt	6000
caacgccaac	cactctgaag	aaaacacttc	agtgcttggg	aggcatccat	ctcagccagt	6060
ctgggtgctgt	gctcacacta	tatgtggaca	ggctcctggg	caccccttc	cgtgcgtgg	6120
ctcgcattgg	cgacaccctg	gcctgtcgcc	gggtagaaat	gcttttggct	gcaaatttac	6180
agagcagcat	ggcccagttg	ccagaggagg	aactaaacag	aatccaagaa	cacctccaga	6240
acagtgggct	tgcacaaaga	caccaaaggc	tctattcact	gctggacaga	ttccgactct	6300

ctactgtgca	ggactcactt	agcccccttg	ccccagtcac	ttcccaccca	ctggatgggg	6360
atgggcacac	atctctggaa	acagtgagtc	cagacaaaga	ctggtacctc	cagcttgtca	6420
gatccccagt	ttggaccaga	tcagattctg	cactgctgga	aggtgcagag	ctggtcaacc	6480
gtatccctgc	tgaagatatg	aatgacttca	tgatgagctc	ggagttcaac	ctaagccttt	6540
tggtcccttg	tttaagcctt	ggcatgagcg	agattgctaa	tggccaaaag	agtcccctct	6600
ttgaagcagc	ccgtgggggtg	attctgaacc	gggtgaccag	tgttgttcag	cagcttcctg	6660
ctgtccatca	agtcttccag	cccttcctgc	ctatagagcc	cacggcctac	tggaacaagt	6720
tgaatgatct	gcttggtgat	accacatcat	accagtctct	gaccatactt	gcccgtgccc	6780
tggcacagta	cctgggtgggtg	ctctccaaag	tgctgctca	tttgacacct	cctcctgaga	6840
aggaggggga	cacggtgaag	tttgtggtaa	tgacagttga	ggccctgtca	tggcatttga	6900
tccatgagca	gatccccactg	agtctggacc	tccaagccgg	gctagactgc	tgctgcctgg	6960
cactacaggt	gcctggcctc	tgggggggtgc	tgtctctccc	agagtacgtg	actcatgcct	7020
gctccctcat	ccattgtgtg	cgattcatcc	tggaagccat	tgcagtacaa	cctggagacc	7080
agcttctcgg	tcctgaaagc	aggtcacata	ctccaagagc	tgtcagaaag	gaggaagtag	7140
actcagatat	acaaaacctc	agtcatgtca	cttcggcctg	cgagatgggtg	gcagacatgg	7200
tggaatccct	gcagtcagtg	ctggccttgg	gccacaagag	gaacagcacc	ctgccttcat	7260
ttctcacagc	tgtgctgaag	aacattgtta	tcagtctggc	ccgactcccc	ctagttaaca	7320
gctatactcg	tgtgcctcct	ctggtatgga	aactcgggtg	gtcacccaag	cctggagggg	7380
atitttggcac	agtgtttcct	gagatccctg	tagagttcct	ccaggagaag	gagatcctca	7440
aggagttcac	ctaccgcac	aacaccctag	ggtggaccaa	tcgtaccag	ttcgaagaaa	7500
cttgggccac	cctccttgggt	gtcctgggtga	ctcagccct	ggtgatggaa	caggaagaga	7560
gcccaccaga	ggaagacaca	gaaagaacct	agatccatgt	cctggctgtg	caggccatca	7620
cctctctagt	gctcagtgca	atgaccgtgc	ctgtggctgg	caatccagct	gtaagctgct	7680
tggagcaaca	gccccggaac	aagccactga	aggctctcga	taccagattt	ggaagaaagc	7740
tgagcatgat	cagaggggatt	gtagaacaag	aaatccaaga	gatggtttcc	cagagagaga	7800
atactgccac	tcaccattct	caccaggcgt	gggatcctgt	cccttctctg	ttaccagcta	7860
ctacaggtgc	tcttatcagc	catgacaagc	tgctgctgca	gatcaacca	gagcgggagc	7920
caggcaacat	gagctacaag	ctgggccagg	tgtccataca	ctccgtgtgg	ctgggaaata	7980
acatcacacc	cctgagagag	gaggaatggg	atgaggaaga	agaggaagaa	agtgatgtcc	8040
ctgcaccaac	gtcaccacct	gtgtctccag	tcaattccag	aaaacaccgt	gccggggttg	8100
atattcactc	ctgttcgcag	tttctgcttg	aattgtacag	ccgatggatc	ctgccatcca	8160
gtgcagccag	aaggaccccc	gtcatcctga	tcagtgaagt	ggttcgatct	cttctttag	8220
tgtcagactt	attcaccgaa	cgtaccagct	ttgaaatgat	gtatctgacg	ctgacagaac	8280
tacggagagt	gcacccttca	gaagatgaga	tcctcattca	gtacctggtg	cctgccacct	8340
gtaaggcagc	tgctgtcctt	ggaatggaca	aaactgtggc	agagccagtc	agccgcctac	8400
tggagagcac	actgaggagc	agccacctgc	ccagccagat	cggagccctg	cacggcatcc	8460
tctatgtgtt	ggagtgtgac	ctcttggatg	acactgcaaa	gcagctcatt	ccagttgtta	8520
gtgactatct	gctgtccaac	ctcaaaggaa	tagccactg	cgtgaacatt	cacagccagc	8580
agcatgtgct	ggtaatgtgt	gccactgctt	tctacctgat	ggaaaactac	cctctggatg	8640

tgggaccaga	attttcagca	tctgtgatac	agatgtgtgg	agtaatgctg	tctggaagtg	8700
aggagtccac	ccccccatc	atttaccact	gtgccctccg	gggtctggag	cggctcctgc	8760
tgtctgagca	gctatctcgg	ctagacacag	agtccttggg	caagctaagt	gtggacagag	8820
tgaatgtaca	aagcccacac	agggccatgg	cagccctagg	cctgatgctc	acctgcatgt	8880
acacaggaaa	ggaaaaagcc	agtccaggca	gagcttctga	ccccagccct	gctacacctg	8940
acagcgagtc	tgtgattgta	gctatggagc	gagtgtctgt	tctctttgat	aggatccgca	9000
agggatttcc	ctgtgaagcc	agggttgtgg	caaggatcct	gcctcagttc	ctagatgact	9060
tctttccacc	tcaagatgtc	atgaacaaag	tcattggaga	gttcctgtcc	aatcagcagc	9120
catacccaca	gttcatggcc	actgtagttt	acaaggtttt	tcagactctg	cacagtgtctg	9180
ggcagtcatc	catgggtccg	gactgggtca	tgctgtccct	gtccaacttc	acacaaagaa	9240
ctccagttgc	catggccatg	tggagcctct	cctgcttctc	tgttagcgca	tctaccagcc	9300
catgggtttc	tgcgatcctt	ccacatgtca	tcagcaggat	gggcaaactg	gaacaggtgg	9360
atgtgaacct	tttctgcctg	gttgccacag	acttctacag	acaccagata	gaggaggaat	9420
tcgaccgcag	ggctttccag	tctgtgtttg	aggtgggtgg	tgcaccagga	agtccatacc	9480
acaggctgct	tgcttgtttg	caaaatgttc	acaaggtcac	cacctgctga	gtagtgcctg	9540
tgggacaaaa	ggctgaaaaga	aggcagctgc	tggggcctga	gcctccagga	gcctgtctca	9600
agcttctgct	ggggctgcct	tggccgtgca	ggcttccact	tgtgtcaagt	ggacagccag	9660
gcaatggcag	gagtgccttg	caatgagggc	tatgcaggga	acatgcacta	tgttgggggtt	9720
gagcctgagt	cctgggtcct	ggcctcgctg	cagctggtga	cagtgcctag	ttgaccaggt	9780
gtttgtcttt	ttcctagtgt	tcccctggcc	atagtcgcca	ggttgacgct	gccctggtat	9840
gtggatcaga	agtcctagct	cttgccagat	ggttctgagc	ccgcctgctc	cactgggctg	9900
gagagctccc	tcccacattt	accagtagg	catacctgcc	acaccagtgt	ctggacacaa	9960
aatgaatggg	gtgtggggct	gggaactggg	gctgccaggt	gtccagcacc	attttccttt	10020
ctgtgttttc	ttctcaggag	ttaaaattta	attatatcag	taaagagatt	aattttaatg	10080
taacttttcc	tatgcccgtg	taaagtgtgt	gacttggcaa	ggcctgtgct	gcatgtgaca	10140
aagtttatgg	aagtggaggg	gccttctggc	cgccactccc	tctcctgtag	ctactcagtc	10200
tagtcgggca	ggtccctcct	gtagccctcc	caacacctg	tggcacttgc	acttcataca	10260
gctccctttt	cttatgcatt	ccattaagcc	agcacagaga	gaggtgttgg	tattgactgc	10320
ctgtgtgaga	atcctgcctg	tggcctaact	gaggaactga	aaaactgact	tccactgtta	10380
gagttataag	aggcttgcct	tgtggcagct	gcctcctctc	ccccttccca	ggcatgactg	10440
tcaagctatc	tcctccctgg	tgttgatgca	ctctcctagt	ctctcagcct	gggtagaaac	10500
agcatctgct	ggacccaaa	tggctatccc	aataacctca	tccttggttg	tggctgacct	10560
gcactgtagc	ctgcccacac	accagctgac	cattgtggat	gctgtctgtc	cctttgtatc	10620
ttctgcatgg	ttgggacctg	agaagtgtg	acctgattac	cccaaagggtg	tctctgagct	10680
atggtttgtt	ggtttgtctc	agtttctcat	agtcaaggga	aagcttggtg	tcctagcaac	10740
agttaagaat	ggaccagag	cctcttttgc	cccttcccat	cttgcccttct	gtcagcccag	10800
tagagtacag	acctatgcct	gtcagagccc	aggaggact	cagctgacaa	gatgaggcac	10860
caaaggggaag	gttcaaaaatc	aggtcagcct	ctggcctcag	acagcttccc	atgctggtca	10920
gagccacctc	ttcccaaagc	ccaagcccag	agtaaccagg	tcattgttaat	gaaaatgagc	10980

taccttcatt	tcctggcttg	gtttgggaac	tctgtttgct	gtttgactat	atgaccaagc	11040
agattttctg	ctgttccgct	aagtcataatc	tgtattttctc	agctgtagag	taggggagtg	11100
gaatagtttg	gagatgtttc	taggctacac	aggaggaaag	agcttgcagc	ctgtgattaa	11160
ctaactgtgc	ttcagtccat	ggattgcttt	cttgagaccc	ttgaatttcc	ctctatcttt	11220
ccatcatgac	aagtagcctt	gctgctggga	tgcaaggttc	cctaccaaac	acaggttgtg	11280
gggagcctca	cacttggcct	gactctcctc	ctatctgccc	tggcaaaaac	caccccaagg	11340
cgtggtaaca	ggaacagtgg	acatggatta	ggtctttcaa	gaggacgtta	agggaagcta	11400
ctgaatttta	atgaaaagaaa	ttcaccaatg	cccctttgct	gatttagggc	ttcttcttgt	11460
caccctcaat	ttcccgccta	gaagtgctcg	gggaccatgt	gaaagtctt	acagtgtgc	11520
tgccacactc	tgaggttgg	ccaaccgctc	tgagatgagc	atggtgcagg	cctgattact	11580
cctcatggta	gatgttcata	aggaaactca	atataaaatc	tagagccatt	caccagggga	11640
ttatatcagt	gagctcaacc	tcaagtttag	ttggcctctt	gtttagtgtg	atcagaaaca	11700
attcttagta	tggggcaagg	acagcctctg	ccacaaagtt	gttgtctgct	catgggtgcc	11760
acaacctaga	gatgcacctg	ggtacaggca	ggtatgtatt	tgtgtacaca	cataaacaca	11820
cacacaatcc	tcaaagacat	atgcaaggcc	tctaaaaatg	cctgcctgtt	ttttctgaaa	11880
gcagactttt	cttgcaactg	ccacatacag	tcagctttgt	gagtctagca	tctgagaatg	11940
ggactcaatt	tttaaaagtc	catagctcat	taaagtctca	ctggagacat	tgccccacct	12000
gtctaactgc	aggagggact	aaaacttttt	atcaaattcc	tcaaaaatct	aaagatttcc	12060
aagctttatt	taaaaacaaa	agttattttg	actatgaggt	tttaggggta	ggaggtggga	12120
tgttgtttct	gtttccatgg	tggtagctgc	aggaaagatt	ttaataaaac	cagggtagaa	12180
cttttggcaa	tgcacttcag	catgtttctt	ctccaaaatg	tgccctcctc	cctccactg	12240
atggccccct	tgacatgtag	gtgacttagc	cactgccaag	tgccctttat	ggttctctca	12300
ttttgtctgc	acatgtaccc	ttcaggaggg	aagaactgga	gtggaaccac	ctcctgcctt	12360
gtagaatgca	gtgccaggga	agggaccaat	cctaacaggt	gccttccttg	gcaggaagta	12420
ccttcccgtg	agttagtgaa	gcagctctgc	ttccggctca	tgggacaggt	tttatacagc	12480
aatagcttgt	ctcacagcca	cgtcacaagg	agtcttgctt	cccattgtgg	ggctgcagaa	12540
ttgggtctct	tgccacctgt	gagcatcctt	ccccacacag	tctccttccc	tccctccttc	12600
cctccctccc	tccctccctc	cctccgtccc	tccctccctc	cctcagcatt	gagcactagg	12660
atcatggctg	ctaccaggac	aggcatgaag	ctgtcctcca	gggattggta	tgtgggagtc	12720
gaagacactg	agctgctgat	gctgggtgtg	ggctcaggat	atcatggttg	ggaaaagaat	12780
tgttcctcag	tgggtctgga	gcctccagga	aagaagaacc	aatgctgagc	agtgtgacaa	12840
ctaaagatga	tatcaaggtt	cagggccacc	ctccatgtgt	gcttgtcaca	ctctagagcc	12900
atcgaaggaa	ctgctccccct	caagtgtctc	tggaaacacc	ctctgccgca	agctgggtgt	12960
aagataatag	gtggcagaga	cctatctgca	gagatttggc	tgcattctag	ggggctcctg	13020
tccaagcctt	gctgctgtat	gccatgggct	tactgggaa	ctaggagggc	tgtgatgggt	13080
gtgccccgga	gcccagccta	gacctggctg	tccatttcca	aaaggaagga	ctgacatgaa	13140
atgtatatatt	aaaattttta	aattgcagat	attgtacagt	tgaattaaag	aagcgattaa	13200
accacctgtt	gttgctgtta	aaaaaaaaaa	aaaaaaa			13237

<210> 3

<211> 13189

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 3

gcactcgccg cgagggttgc cgggacgggc ccaagatggc tgggagcttt ggttccgctt	60
cggtctacct cgtagagccc cattcattac cttgctgcta agtggcgctg cgtagtgcga	120
ataggctcca agccttcagg gtctgtcctg tcgggcagga ggccgtcatg gcaaccctgg	180
aaaaactgat gaaggctttc gagtgcgtca agtcgttcca gcagcaacag cagcagcagc	240
agccgcccgc gcaggcgccc ccaccaccgc cgccgcccgc gcctcaaccc cctcagccgc	300
cgcctcaggg gcagccgccc ccaccaccgc cgctgccagg tccggccgag gagccgctgc	360
accgacaaaa gaaggaaact tcagccacca agaaggaccg tgtgaatcac tgtctaacaa	420
tatgtgaaaa cattgtggca cagtctctca gaaattctcc agaatttcag aaactcttgg	480
gcattgctat ggaactgttt ctgctgtgca gcgacgatgc ggagtcagac gtcagaatgg	540
tggtgatga gtgcctcaac aaagtcatca aagctttgat ggactctaatt cttccaaggc	600
tacagttaga actctataag gaaattaaaa agaattgtgc tcctcgaagt ttgcgtgcag	660
ctctgtggag gtttgcctgag ctggctcacc tggttcgacc tcagaagtgc aggccttctc	720
tggtgaatct tcttccatgt ttgacccgaa caagcaaacg accggaggag tcagttcagg	780
agactttggc tgcagctgtt cctaaaatta tggcctcttt tggcaatttc gcgaatgaca	840
atgaaattaa ggttctattg aaagctttca tagcaaactc gaagtcaagc tctcccactg	900
tgcggcggac agcagctggg tcagcagtga gtatctgcca gcactctagg aggacacagt	960
acttctacaa ctggctcctg aatgtgctcc taggtttgct ggttcccatg gaggaagacc	1020
acccactct cctgatcctt ggtgtgttgc tcacactgag gtgtctagtg cccttgctcc	1080
agcagcaggt caaggacaca agtctaaagg gcagctttgg ggtaacacgg aaagaaatgg	1140
aagtctctcc ttctgcagag cagcttgtcc aggtttatga actgactttg catcacacac	1200
agcaccaaga ccataatgtg gtgacagggg cattggagct cctgcagcag ctcttccgta	1260
cccctccacc tgagctgctg caagcactga ccacaccagg agggctcggg cagctcactc	1320
tggttcgaga ggaagccggg ggccgaggcc gcagcgggag tatcgtggag cttttagctg	1380
gaggggggtt ctcatgcagc cctgttctct caagaaagca aaaaggcaaa gtgctcttag	1440
gagaggaaga agccttgag gatgactcg agtccaggtc agatgtcagc agctcagcct	1500
ttgcagcctc tgtgaagagt gagattggtg gagagctcgc tgcttcttct tcgggtgtct	1560
ccactcccgg ttctgtaggt cacgacatca tcaactgagca gcctcgatcc cagcacacac	1620
ttcaagcaga ctctgtggat ttgtcaggct gtgacttgac cagtgtgct actgatggag	1680
atgaggaaga catcttgagc cacagctcca gccagttcag tgctgttcca tccgaccctg	1740
ccatggacct gaatgatggg acccaggcct cctcaccat cagtgcagct tctcagacca	1800
ccactgaagg acctgattca gctgtgactc cttctgacag ttctgaaatt gtcttagatg	1860
gtgctgacag ccagtattta ggcgtgcaga taggacagcc acaggaggaa gacgaggagg	1920
aagctgcagg tgttctttct ggtgaagtct cagacgtttt cagaaactct tctctggccc	1980
ttcagcaggc acacttggtg gaaagaatgg gtcatagccg gcagccttct gacagcagtg	2040
ttgataagtt tgtttcaaaa gatgaggttg ctgaagctgg ggaccagaa agcaagcctt	2100

gccgaatcaa	aggtgacata	ggacagccta	atgatgatga	ttctgctcct	ctggtacatt	2160
gtgtccgtct	tttatccgct	tcctttttgt	taactggcga	aaagaaagca	ctggttccag	2220
acagagatgt	gagagtcagt	gtgaaggccc	tggccctcag	ctgtattggg	gcagctgtgg	2280
cccttcatcc	agagtcgttc	ttcagcaaac	tctacaaagt	acctctcagt	accatggaaa	2340
gtactgagga	acagtatgtc	tctgacatcc	tgaactacat	cgatcatgga	gaccctcagg	2400
tgcgaggagc	tactgccatt	ctctgtggga	cccttgtcta	ctccatcctc	agcaggtccc	2460
gtctccgtgt	tggtgactgg	ctgggcacca	tcagggccct	gacaggaaat	acattttctc	2520
tggtggaactg	cattccttta	ctgcagaaaa	ctttgaagga	tgaatcttct	gttacttgca	2580
agttggccttg	tacagctgtg	aggcactgtg	tcctgagtct	ttgcagcagc	agctacagtg	2640
acttgggatt	acaactgctt	attgacatgc	tgccctctga	gaacagctcc	tactggctgg	2700
tgaggactga	actgctggaa	actcttgag	agattgattt	caggctgggtg	agtttttttg	2760
aggcaaaagc	agaaaagtta	caccgagggg	ctcatcatta	tacagggttt	ctaaaactac	2820
aagaacgagt	actcaataat	gtggtcattt	atttgcttgg	agatgaagac	cccagggttc	2880
gacatgttgc	tgcgacgaca	ttgacaagac	ttgtcccaaa	gctgttttat	aagtgtgacc	2940
aaggacaggc	tgaccagtc	gtggctgtag	caagagatca	aagtagtggt	tacctgaagc	3000
tcctcatgca	tgagaccag	ccaccatccc	acttctccgt	cagcaccata	accagaatct	3060
atagaggcta	cagcttacta	ccaagtgtaa	cagatgtcac	catggaaaac	aacctctcaa	3120
gagtcgttgc	cgcagtttct	catgaactca	ttacgtcaac	tacacgggca	ctcacatttg	3180
ggtgctgtga	agccttgtgt	gttctttcag	ccgcctttcc	agtttgact	tggagtctag	3240
gatggcactg	tggagtggcc	ccactgagtg	cctctgatga	gtccaggaag	agctgcactg	3300
ttgggatggc	ctccatgatt	ctcaccttgc	tttcatcagc	ttggttccca	ctggatctct	3360
cagcccatca	ggatgccttg	attttggctg	gaaacttgct	agcagcgagt	gcccccaagt	3420
ctctgagaag	ctcatgggcc	tcggaagaag	aaggcagctc	agcagccacc	agacaggagg	3480
agatctggcc	tgccctgggg	gatcggactc	tggtgcccat	ggtggagcag	cttttctccc	3540
acctgctgaa	ggtgatcaat	atctgtgctc	atgtcttgga	tgacgtgact	cctggaccag	3600
caatcaaggc	agctttgcct	tctctcacia	accccccttc	tctaagtcct	attcgacgga	3660
aagggaagga	gaaagagccc	ggagaacaaa	catccactcc	gatgagtccc	aagaaaggtg	3720
gagaggccag	tacagcctct	cgacagtcag	acacctcagg	acctgtcaca	gcgagtaaat	3780
catcttcact	tgggagtttc	taccatctcc	cttctacct	cagactgcat	gatgtcctga	3840
aagccactca	cgccaactat	aaggtcacct	tagatcttca	gaacagcact	gaaaagtttg	3900
gggggttcct	gcgctctgcc	ttggacgtcc	tttctcagat	tctagagctg	gcgacactgc	3960
aggacattgg	aaagtgtgtt	gaagaggtcc	ttggatactt	gaaatcctgc	tttagtcgag	4020
aaccaatgat	ggcgactgtc	tgtgttcagc	agctattgaa	gactctcttt	gggacaaaact	4080
tagcctcaca	gtttgatggc	ttatcttcca	accccagcaa	gtctcagtgc	cgagcacagc	4140
gccttggtct	ttccagtgtg	aggccccgct	tatatcacta	ctgcttcatg	gcaccataca	4200
cgcacttcac	gcaggctttg	gctgatgcca	gcctgaggaa	catggtacag	gcggaccagg	4260
agcacgatgc	ctcagggtgg	tttgatgtac	tccagaaagt	gtctgctcag	ttgaagacga	4320
accttacaag	tgtcacaaaag	aaccgtgcag	ataagaacgc	tattcataac	cacattaggt	4380
tatttgagcc	tcttgttata	aaagcattga	agcagtacac	cacgacaaca	tcagtacaac	4440

tgcagaagca	ggtttttgat	ttgctggcac	agctggttca	gctacgggtc	aattactgtc	4500
tactggattc	agatcagggtg	ttcatcgggt	ttgtgctgaa	gcagtttgag	tacattgaag	4560
tgggccagtt	cagggaatca	gaggcaatta	ttccaaatat	atttttcttc	ctggtactat	4620
tatcttatga	gcgctaccat	tcaaaacaga	tcattggaat	tcctaaaatc	atccagctgt	4680
gtgatggcat	catggccagt	ggaaggaagg	ctgtcacaca	tgctattcct	gcgctgcagc	4740
ccattgtcca	tgacctcttt	gtgttaagag	gaacaaataa	agctgatgca	gggaaagagc	4800
ttgaaaccca	gaaggagggtg	gtggtctcaa	tgctgttacg	actcatccag	taccatcagg	4860
tgctagagat	gttcatcctc	gtcctgcagc	agtgccacaa	agagaatgag	gacaagtgga	4920
aacggctctc	tcggcagggtc	gcagacatca	tctgccccat	gttagccaag	cagcagatgc	4980
atattgactc	tcatgaagcc	cttggagtat	taaatacctt	gtttgagatt	ttggctcctt	5040
cctccctacg	tctgtggac	atgcttttgc	ggagtatgtt	catcactcca	agcacaatgg	5100
catctgtaag	cactgtgcag	ctgtggatat	ctggaatcct	agccattctg	agggttctca	5160
tttcccagtc	aaccgaagac	attgttcttt	ctcgtattca	ggagctctcc	ttctctccat	5220
atttaatttc	ctgtccagta	attaacaggt	taagggatgg	agacagtaat	ccaacactag	5280
gagaacgcag	tgaagggaag	caagtaaaga	atttgccaga	agatacattc	tcaaggtttc	5340
tcttacagct	ggttggtatt	cttctggaag	acattgttac	aaaacagctc	aaagtggaca	5400
tgagtgaaca	gcagcataca	ttctattgcc	aagagctcgg	cacactgctc	atgtgtctga	5460
tccacatatt	caaactctgga	atgttccgga	gaatcacagc	cgctgccact	agactcttca	5520
ccagtgatgg	ctgtgaaggc	agcttctata	ctctagatag	cctgaatgca	cgggtgcgag	5580
ccatggtgcc	cacacacca	gctctggtac	tgctctggtg	tcagatccta	ctgctcatca	5640
accacactga	ccaccgatgg	tgggccgagg	tgcagcagac	gcccagaga	cacagtctgt	5700
cctgcacgaa	gtcactaaac	ccccagatat	ctgctgaaga	ggattctggc	tcagcagctc	5760
agcttggaat	gtgcaataga	gaaatagtac	gaagaggggc	ccttattctc	ttctgtgatt	5820
atgtctgtca	gaatctccat	gactcagaac	acttaacatg	gctcattgtg	aatcacattc	5880
aagatctgat	cagcttgtcc	cacgagcctc	cagttcaaga	ctttattagt	gccattcatc	5940
gtaattctgc	agctagtgggt	ctttttatcc	aggcaattca	gtctcgctgt	gaaaatcttt	6000
caactccaac	cactctgaag	aaaacacttc	agtgttgga	aggcatccat	ctcagccagt	6060
ctggtgctgt	gtcacactg	tatgtggaca	ggctactggg	cacccctttc	cgtgcgctgg	6120
ctcgcaggt	cgacaccctg	gctgtcgcc	gagtagaaat	gcttttggct	gcaaatttac	6180
agagcagcat	ggcccagttg	ccagaggagg	aactgaacag	aatccaggaa	cacctccaga	6240
acactgggct	tgcacaaaaga	caccaaaggc	tctattcact	gctggacaga	ttccgactct	6300
ctactgtgca	ggactcactt	agcccttgc	ccccagtcac	ttcccacct	ctggatgggg	6360
atgggcacac	atccctggaa	acagtgaatc	cggacaaaga	ctggtacctc	cagcttgtca	6420
gatcccagtg	ttggaccagg	tcagattctg	cactgctgga	aggtgcagag	ctggtgaacc	6480
gtatccctgc	tgaagatatg	agtgaattca	tgatgagctc	ggagttcaac	ctaagccttt	6540
tggctccctg	cttaagcctt	ggcatgagcg	agattgctaa	tggccaaaag	agtcctcttt	6600
ttgaagcggc	tcgtaggggtg	actctggacc	gggtgaccaa	tgtggttcag	cagctgcctg	6660
cagtcacatca	agtcttccag	cctttcctgc	ctacagaacc	cacagcctac	tggagcaagc	6720
tgaatgatct	ctttggtgat	accacatcat	accagtctct	gaccacactt	gcccgtgccc	6780

tggcacagta	cctggtggtg	ctctccaaag	tgcttgcctc	tttgcacctt	cctcctgaga	6840
aggaggggca	cacggtgaag	tttgtggtaa	tgacacttga	ggccctgtca	tggcatttga	6900
tccatgagca	gatcccactg	agtctggacc	tccaagccgg	cctagactgc	tgctgcctgg	6960
cactgcaggt	gcctggcctc	tgggggggtg	tgctcctccc	agagtacgtg	actcatactt	7020
gctcccttat	ccactgtgtg	cgattcatcc	tggaagccat	tgcagtacaa	cctggagacc	7080
aacttcttgg	tccgaaaagc	aggtcacata	ctccaagggc	tgtcagaaaag	gaggaagtag	7140
actcagatat	acaaaacctc	agtcacatca	cttcggcctg	cgagatggtg	gcagacatgg	7200
tggaatccct	gcagtcggtg	ctggccctgg	gccacaagag	gaacagcacc	ctaccttcat	7260
ttctcacagc	tgtgctgaag	aacattgttg	tcagtctggc	ccgcctcccc	ctcgtttaaca	7320
gctatactcg	tgtgcctcct	ctggtatgga	aactcgggtg	gtcacccaag	cctggagggg	7380
atttcggcac	agtgtttcct	gagatccctg	tagagtctct	ccaggagaag	gaggtcctca	7440
aggagtccat	ctaccgcctc	aacaccctag	ggtggaccag	tcgtactcaa	ttcgaagaaa	7500
cttgggccac	cctccttggg	gtcctggtga	ctcagccctt	ggtgatggaa	caggaagaga	7560
gcccaccaga	ggaagacacc	gaaaggaccc	agatccacgt	cctggctgta	caggccatca	7620
cctctctagt	gctcagcgca	atggctgtgc	ctgtggctgg	caatccagct	gtaagctgct	7680
tggagcaaca	gccccggaac	aagccactga	aggctctcga	taccagattt	ggaagaaagt	7740
tgagcatgat	cagagggatt	gtagaacaag	aaatccaaga	gatggtttcc	caaagagaga	7800
atactgccac	tcatcattct	caccaggcat	gggatcctgt	cccttctctg	ttaccagcta	7860
ctacaggtgc	tcttatcagc	catgacaagc	tgctgctgca	gatcaactca	gagcgggagc	7920
caggcaacat	gagctacaag	ctgggccagg	tgtccataca	ctccgtgtgg	ctggggaaca	7980
acatcacacc	cctgagagag	gaggaatggg	atgaggagga	ggaggaagaa	gcggatgccc	8040
ctgcgccaac	atcaccacct	gtgtctccag	tcaattccag	aaaacaccgt	gctgggggtg	8100
atattcactc	ctgttcgcag	tttctgcttg	aattatacag	ccgttggatc	ctgccatcca	8160
gtgcagccag	aaggaccctt	gtcatcctga	tcagtgaagt	ggttcgatct	cttcttgtgg	8220
tgtcagactt	attcactgaa	cgtaccctgt	ttgaaatgat	gtatctgacg	ctgacagaac	8280
tacggagagt	gcacccttca	gaagatgaga	tcctcattca	atacctggtg	cctgccacct	8340
gtaaggcagc	tgctgttctt	ggaatggaca	aaactgtggc	agagccggtc	agccgcctac	8400
tggagagcac	actcaggagc	accacactgc	ccagccagat	cggagccctg	catggcatcc	8460
tctatgtgtt	ggagtgtgac	ctcttggatg	acactgtaaa	gcagctcatt	ccagttgtta	8520
gtgactatct	gctgtccaac	ctcaaaggaa	tagccactg	cgtgaacatt	cacagccagc	8580
agcatgtgct	ggtgatgtgt	gccactgcat	tctacctgat	ggaaaactac	cctctggatg	8640
tggggccaga	attctcagca	tctgtgatac	agatgtgtgg	agtaatgctg	tctggaagtg	8700
aggagtccac	cccctccatc	atttaccact	gtgcctcccg	gggtctggaa	cggctcctgc	8760
tgtctgagca	gctctctcgg	ctagacacgg	agtccttggg	caagctaagt	gtggacagag	8820
tgaatgtaca	aagcccacac	agggccatgg	cagccctagg	cctgatgctt	acctgcatgt	8880
acacaggaaa	ggaaaaagcc	agtccaggca	gagcttctga	ccccagccct	gctacccttg	8940
acagcgagtc	tgtgattgta	gctatggagc	gagtgtctgt	gctctttgac	aggatccgca	9000
agggatttcc	ctgtgaagcc	agggtcgtgg	caaggatcct	gcctcagttt	ctagatgact	9060
tctttccacc	tcaagatgtc	atgaacaaaag	tcattggaga	gttcctgtcc	aaccagcagc	9120

catacccaca	gttcatggcc	actgtagtat	acaaggtttt	tcagactctg	cacagtgtctg	9180
ggcagtcac	catgggtccg	gactgggtta	tgctgtctct	gtccaacttc	acacaaagaa	9240
ctccagttgc	catggccatg	tggagcctct	cctgcttctt	tgtcagtgca	tctaccagcc	9300
catgggtttc	tgcaatcctt	ccacacgtca	tcagcaggat	gggcaaactg	gagcaggtgg	9360
atgtgaacct	tttctgcctg	gttgccacag	acttctacag	acaccagata	gaggaggaat	9420
tcgaccgcag	ggctttccag	tctgtgtttg	aggtgggtgg	agcaccagga	agtccatacc	9480
acaggctgct	tgcttgtttg	caaaatgttc	acaaggtcac	cgcctgctga	gtagtacctg	9540
tggaacaaga	ggctgagagg	aggcaactgc	tgtggctaca	gcctccaggg	gcctgcacca	9600
agcttctgct	aaggctgcct	tggacgtgca	ggcttccact	tgtgtcaagt	ggacagccag	9660
gcaatggcag	gagtgtttg	caatgagagc	tatgcaggga	acatgcacta	tgttgggggt	9720
gagcctgagt	cctgggtcct	ggcatcactg	cagctggtgg	cagtgttagg	ttgaccaggt	9780
gtttgtcttt	ttcttagtgt	tgccctggcc	atagttgcca	ggttgacagt	gccttggtat	9840
gtggaacaga	atccgagctc	ttgtaagatg	gttctgagcc	cccctgtccc	actgggctgg	9900
agagctccct	cccacattta	cccagcaggt	gtacctgcca	caccagtgtc	tggacacaaa	9960
gtgaatgggtg	tgggggctgg	gaactgggac	tgccaggtgt	ccagcatcat	tttccctttc	10020
tctgttttct	tctcaggagt	taaaatttaa	ttatatcagt	aaagagatta	attttaatgt	10080
aactcttcct	atgcccgtgt	aaagtgtgtg	acttggaag	gcctgtgctg	catgtgacaa	10140
agtttatgga	agtggatgcg	ccttctggcc	accactctct	ctcctgtagc	tactcagtct	10200
agtcgggcag	gtccctcatg	tagccctccc	aacaccctat	ggcacttgca	cttcacacgg	10260
ctcctttttc	ttatgcattc	catttgacta	gcacagagtg	gtgttggtgt	taactgcctt	10320
atgtgagaat	cctgcttgtg	gcccagctta	tgagactgac	ttccacttag	gattaagaga	10380
ggcttgccct	gcggcagacc	cccacccta	cccaggcat	gactatcaag	ctgtctactc	10440
actagtgttg	atgcactctc	ctagtctctc	agcctgggca	gagacagcat	ctgctggacc	10500
caaagaggct	atttcaataa	tctcatccct	ggctgtggct	gacctgggct	gtagcctgcc	10560
cagacaccgg	ctgaccattg	tggatgctct	ctgtcccttt	gtatcttctg	catggttggg	10620
acctgaggaa	tgctagcccg	atcaccccaa	aggtgtctct	gagctatggc	ttgttggttg	10680
tctccgtttc	tcttggtcaa	gggaaagctc	aatgtcctag	caacaattaa	gaatggaacc	10740
agagcctctt	ttgccccttc	ccatcttgcc	ttctgtcagc	ccttacagta	cagacctatg	10800
cctttcagag	ccaaggagg	actcggcctg	acaagatgag	gcaccaaagg	gaaggttcaa	10860
aatcaggtea	gcctatggcc	tcagacagct	tcccgtgctg	ctggtcagag	ccgcctcttc	10920
ccaaggccca	agcccagagt	agccaggaca	tgttgatgag	aatgagccct	ggacacaggc	10980
tgcttctgtc	ccctggcttg	gtccaggagc	tctgttggtt	gtgtgactga	gcgggctctc	11040
tgctgcccac	tcagtcctgt	ctgtaccaat	cgactgcaga	gtggggagag	gagtaatttg	11100
gagctgtttc	taggctacac	gggaggaaag	agcttgacgc	ctatgactaa	ttaactgtgc	11160
ttcagtctgt	ggactgcttt	cttaagaatt	tccttctgtt	ttcccatcat	gatgattaaa	11220
aggctgccgg	gatgcaaggt	tccttaccaa	acacaggtac	acaggttgtg	gggagcctca	11280
cacttggcct	gattctattc	ctatctgccc	tggcaaaggc	cactgcaagc	cagcccagcc	11340
catcctgggtg	tcatggtaac	aggaacagtg	gacatggatc	aggtctttca	agaggacctt	11400
aaaggaagct	actgaatttt	aatgaaagaa	agtcaccaat	gcccctttgc	tgatttaggg	11460

tttctacttg	ttaccctaga	tatccctcct	agaagtgcct	ggagaccaca	tgaaagttct	11520
cacaatgctg	ctgccacact	ctaaagttgg	tccaacagct	ctgagatgag	catgttgcag	11580
gcctgattac	cgattactcc	tcatggtaga	tgttcataag	aaaacagaat	ataaaatcta	11640
gagccattca	cctgggggtt	atatcagtga	cttccagttt	agttggcttc	ttgttcagtg	11700
tggtcagaaa	taactcttag	tatgggacaa	gaacagcctc	tgctacaaag	ctgttgtctg	11760
ctcatgggtg	ctgcaacctc	gagatgcacc	tgggcacagg	cacacacgca	cacacgcaca	11820
cacacacaca	cacacacaca	cacacacctc	aaagacatat	gcaagacctc	taaaaatgcc	11880
tgtccattct	tcctgaaagc	agacttttct	tgtaactgcc	acatacagtc	agctttgtga	11940
gtctagcatc	tgagaatggg	actcaatttt	taaaagtcca	tagtcattaa	agtccactg	12000
aagacattgc	cccacctgtc	taactgtagg	aagaactaaa	actttttatc	aaattcctca	12060
aaaatctatg	gattttccaaa	ctttatttaa	aaaaaaaaaa	gtaattttga	ctgtgaggtt	12120
ttgggggtag	gagggtgggat	gttgtttctg	ttttctgct	ggtattatca	ggaaagattt	12180
tagtaaaacc	agggtagaac	tatttggaac	tgactttaag	tatgtttctt	ctccaaaatg	12240
tgctccctc	ccactgatgg	ccccttgaca	ttaggtgact	ttgccactgc	caagtgcct	12300
ttactattct	ctcattttgt	ctgcacatgt	acccttcagg	agggaaggac	tagagtggaa	12360
ccacctcctg	ccctgtagac	tgcggtgcca	gggaaggcac	tgaccctaac	gggtgccctc	12420
cctggcagga	agtaccttcc	tgtgagttag	gcagctctgc	tttcagctca	tgggacaggg	12480
tttatacagc	aatagcttgg	ctcacagcca	cctggcaagg	agtcctgcct	cccattgtag	12540
ggctgcagaa	ttagtctcct	cctgcctctc	gtgagcatcc	ttccccactg	cctgcctgcc	12600
tcctccctc	cctccctccc	tcaacggtga	gcactaggat	catggctgct	gccaggacag	12660
gcacgaagct	gtcttccagg	gattggtagt	tgggagtaga	agaccctgag	agctgctgag	12720
gctgggtggg	ggctcaggat	atcacggttt	ggaagagaac	tgttcctcag	tgggtctgga	12780
gcctccagga	aagaagaacc	aatgccgagc	agtgtgacaa	ctgaagatga	catgaaggtt	12840
cagggccacc	tccatgtgtg	cttgtcacac	tttagagcca	tcgaaggaa	tgctccctc	12900
aagtgtccgg	aaacacctc	tgccacaagc	tgggtgtaag	gtgacagaca	cctatctgca	12960
gagatttgcc	tgcatcttag	ggggctcctg	tccaggcctt	gctgctgtat	gccatgggct	13020
tcactgggaa	ctaggagggc	tgtgatgggt	atgccccgga	gccagccta	gacctggccg	13080
tccatttcca	agaggaagga	ctgacatgaa	atgtatat	aaaattttta	aattgcagat	13140
attgtacatt	tgaattaaag	aagcaattaa	actaccggtt	gttgctgtt		13189

<210> 4

<211> 13328

<212> DNA

<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 4

aggcgccgcg	ggggctgccg	ggacgggtcc	aagatggacg	gccgcttcgg	ttccgctttt	60
accgcgggcc	cagagcccca	ttcattgccc	cggtgctgag	cggcgctgcg	agtcggcccc	120
aggcctccgg	ggactgcccc	gccgggcggg	agaccgcat	ggcgaccctg	gaaaagctga	180
tgaaggcctt	cgagtctctc	aagtccttcc	agcagcagca	gcagcagcag	ccaccgccc	240
cggctgtggc	tgaggagccg	ctgcaccgac	caaagaaaga	actttcagct	accaagaaag	300

accgtgtgaa	tcattgtctg	acaatatgtg	aaaacatagt	ggcacagtct	gtcagaaatt	360
ctccagaatt	tcagaaactt	ctgggcatcg	ctatggaact	ttttctgctg	tgcagtgatg	420
acgcagagtc	ggatgtcaga	atggtggctg	atgaatgcct	caacaaagtt	atcaaagctt	480
tgatggattc	taatcttcca	aggttacagc	tcgagctcta	taaagaaatt	aaaaagaatg	540
gtgccccctg	gagtttgcgt	gctgccctgt	ggaggtttgc	cgagctggct	cacctggttc	600
ggcctcagaa	atgcaggcct	tacctggtga	accttctgcc	gtgcctaagt	cgaacaagca	660
agagacccga	ggaatcagtc	caggagacct	tggctgcagc	tgttcccaaa	attatggctt	720
ctttcggcaa	ttttgcaaat	gacaatgaaa	ttaaggtttt	gttaaaggcc	ttcatagcga	780
acctgaagtc	aagctcccc	accattcggc	ggacagctgc	tggatcagca	gtgagcatct	840
gccagcactc	aagaaggaca	cagtatttct	atagctggct	actaaatgtg	ctcttaggct	900
tactggttcc	tgtcgaggag	gagcactcca	ccctgctgat	tcttggcgtg	ctgctcacc	960
tgaggatatt	ggtgcccttg	ctgcagcagc	aggtcaagga	tacaagcctg	aaaggcagct	1020
tcggagtga	acggaaagaa	atggaggtct	gtccttctgc	ggagcagctt	gtccaggttt	1080
atgaactgac	gttacatcat	acacagcacc	aagaccacaa	tgttgtgacc	ggagccctgg	1140
agctgttgca	gcagctcttc	agaacgcctc	cccccgagct	tctgcaagcc	ctgaccacag	1200
tggggggcat	tgggcagctc	accgccgcta	aggaggagtc	tgggtggccga	agccgtagt	1260
ggagtattgt	ggaacttata	gctggagggg	gttcctcatg	cagccctgtc	ctttcaagaa	1320
aacaaaaagg	caaagtgtc	ttaggagaag	aagaagcctt	ggaggatgac	tctgaatcga	1380
gatcggatgt	cagcagctct	gcctttgcag	cctcagtga	ggatgatata	agtggagagc	1440
tggctacttc	ttcaggggtt	tccactccag	ggtcagcagg	tcacgacatc	atcacggagc	1500
agccacggtc	acagcacacg	ctgcaggcgg	actcagtgga	tctggccagc	tgtgacttga	1560
caagctctgc	cacggatggg	gatgaggagg	atatcttgag	ccacagctcc	agccaggcca	1620
gcgccgtccc	atctgaccct	gccatggacc	tgaatgatgg	gaccaggcc	tcctcgccca	1680
tcagcgacag	ctcccagacc	accaccgaag	ggcctgattc	agctgtcacc	ccttcagaca	1740
gttctgaaat	tgtgttagac	ggtaccgaca	accagtattt	gggcctgcag	attggacagc	1800
cccaggatga	agatgaggaa	gccacaggtg	ttcttctga	cgaagcctcg	gaggccttca	1860
ggaactcttc	catggccctt	caacaagcac	atttattgaa	aaacatgagt	cacagcaggc	1920
agccttctga	cagcagtgtt	gataaatttg	tgttgagaga	tgaagctact	gaaccgggtg	1980
atcaagaaaa	caagccttgc	cgcacaaag	gtgacatcgg	acagtccact	gatgatgatt	2040
ctgcacctct	tgtccattgt	gtccgccttt	tatctgcttc	gtttttgcta	acagggggaa	2100
aaaatgtgct	ggttccggac	cgggatgtga	gggtcagcgt	gaaggccctg	gccctcagct	2160
gtgtgggagc	agctgtggct	ctccaccag	aatctttctt	cagcaaactc	tataaagttc	2220
ctcttgacac	cacagaatac	cctgaggga	aatatgtctc	agatatcttg	aactacatcg	2280
atcatggaga	cccacaggtt	cgaggagcca	ctgccattct	ctgtgggacc	ctcatctgct	2340
ccatcctcag	caggtcccg	ttccacgtgg	gagattggat	gggcgccatt	agaaccctga	2400
caggaaacac	attttctttg	gcggattgca	ttcctttgct	gcggaaaaca	ctgaaggacg	2460
agtcttctgt	cacttgcaag	ctggcttgta	cagctgtgag	gcattgtgtc	atgagtctct	2520
gcagcagcag	ctacagtga	ttaggactgc	agctgatcat	cgacgtgctg	actctgagga	2580
acagttccta	ttggctgggtg	aggacagagc	ttctggaaac	ccttgcggag	attgacttca	2640

ggctggtgag	ctttttggag	gcaaaagcag	aaaacttaca	cagaggggct	catcattata	2700
cagggctttt	aaagctgcaa	gaacgagtgc	tcaataatgt	tgatcatccat	ttgcttgggg	2760
atgaagaccc	caggggtcga	catgttgctg	cagcatcatt	aattaggctt	gtcccaaagc	2820
tgttttataa	atgtgaccaa	ggacaagctg	accagtagt	ggccgtggca	agagatcaaa	2880
gcagtgttta	cctgaaactt	ctcatgcatg	agacgcagcc	tccatctcat	ttctccgtca	2940
gcacaataac	cagaatatac	agaggctata	acctactacc	aagcataaca	gatgtcacta	3000
tggaaaataa	cctttcaaga	gttattgcag	cagttttctc	tgaactgatc	acatcaacca	3060
cgagagcact	cacttttggg	tgctgtgaag	ctttgtgtct	tctttccact	gccttcccag	3120
tttgcatttg	gagtttaggt	tggcactgtg	gagtgcctcc	actgagcgcc	tccgatgagt	3180
ctaggaagag	ctgtaccgtt	gggatggcca	cgatgattct	gacctgctc	tcgtcagctt	3240
ggttccccatt	ggatctctca	gccccatcaag	atgctttgat	tttggccgga	aacttgcttg	3300
cagccagtgc	tcctaaatct	ctgagaagtt	catgggcctc	tgaagaagaa	gccaaaccag	3360
cagccacca	gcaagaggag	gtctggccag	ccctagggga	ccgggccttg	gtgcccattg	3420
tggagcagct	cttctcccac	ctgctgaagg	tgatcaacat	ttgtgcacat	gtcctggacg	3480
acgtggctcc	tggaccggca	ataaaggcag	ccttgccctc	tctaacaac	cccccttctc	3540
taagtcccat	ccgacgaaag	gggaaggaga	aagaaccagg	agaacaagca	tctgtaccgt	3600
tgagtcccaa	gaaaggcagt	gaggccagt	cagcttctag	acaatctgat	acctcaggtc	3660
ctgttacaac	aagtaaatcc	tcatcactgg	ggagtttcta	tcattcttct	tcataacctca	3720
aactgcatga	tgtcctgaaa	gctacgcacg	ctaactacaa	ggtcaccttg	gatcttcaga	3780
acagcacgga	aaaatttggg	gggtttcttc	gctcagcctt	ggacgttctc	tctcagattc	3840
tagagctggc	cacactgcag	gacattggga	agtgtgttga	ggagatccta	ggataacctga	3900
aatcctgctt	tagtcgagaa	ccaatgatgg	caactgtttg	tgttcaacaa	ttgttgaaga	3960
ctctcttttg	gacaaacttg	gcctcccagt	ttgacggctt	atcatccaac	cccagcaagt	4020
cacaaggccg	agcacagcgc	cttggctcct	ccagtgtgag	gccaggcttg	taccactact	4080
gcttcatggc	cccgtacacc	cacttcaccc	aggccctcgc	tgacgccagc	ttgaggaaca	4140
tgggtgcaggc	ggagcaggag	cacgacacct	cgggatgggt	tgatgtcctc	cagaaagtgt	4200
ctacccagtt	gaagacgaac	ctcacaagt	tcacaaagaa	ccgtgcagat	aagaatgcta	4260
ttcataatca	cattcgtttg	tttgaacctc	ttgttataaa	agcttttaaa	cagtacacga	4320
caacaacatc	tgtgcagtta	cagaagcagg	ttttagattt	gctggcgcag	ctggttcagt	4380
tacgggttaa	ttactgtctt	ctggattcag	atcaggtgtt	tattggcttt	gtattgaaac	4440
agttcgaata	cattgaagt	ggccagttca	gggaatcaga	ggcaatcatt	ccaaacatct	4500
ttttcttctt	ggtattactg	tcttatgaac	gctatcattc	aaaacagatc	attggaattc	4560
ctaaaatcat	tcagctctgt	gatggcatca	tggccagtgg	aaggaaggct	gtgacacacg	4620
ccataccggc	tctgcagccc	atagtccatg	acctttttgt	attaagagga	acaataaag	4680
ctgatgcagg	aaaagagctt	gaaacccaaa	aagaagtgg	ggtatcaatg	ttactgagac	4740
tcatccagta	ccatcaggtg	ttggagatgt	tcattctcgt	cctgcagcag	tgccacaagg	4800
agaatgaaga	caagtggaag	cgactgtctc	gacagatagc	tgacatcatc	ctcccaatgt	4860
tagccaaaca	gcagatgcac	attgactctc	atgaagccct	tggagtgtta	aatacattat	4920
ttgagatttt	ggcccccttc	tccctccgtc	cgggtggacat	gctttttacg	agtatgttcg	4980

tcactccaaa	cacaatggca	tctgtgagca	ctgttcaact	gtggatatca	ggaattctgg	5040
ccattttgag	ggttctgatt	tcccagtcaa	ctgaagatat	tgttctttct	cgtattcagg	5100
agctctcttt	ctctccatat	ttaatctcct	gtccagtaat	taataggcta	agagatgggg	5160
acagtaattc	agcactagaa	gaacacagtg	aagggaaaca	aataaagaat	ttgccggaag	5220
aaacattttc	aaggtttcta	ttacaactgg	tgggtattct	tttagaagac	attgtttacaa	5280
aacagctgaa	ggtggaaatg	agtgagcagc	aacatacttt	ctattgccaa	gaactaggca	5340
ctctgctaata	gtgtctgata	cacatcttca	agtctggaat	gttccggaga	atcacagcag	5400
ctgccactag	actgttccgc	agtgatggct	gtggcggcag	tttctacacc	ctggacagct	5460
tgaattttgcg	ggctcgttcc	atgatcacca	cccacccggc	cctgggtgctg	ctctgggtgtc	5520
agatcctgct	gcttgtcaac	cacaccgact	accgctgggtg	ggcagaagtg	cagcagaccc	5580
cgaaaagaca	cagtctgtcc	agcacaaagt	tacttagtcc	ccagatgtct	ggagaagagg	5640
aggattctga	cttggcagcc	aaacttggaa	tgtgcaatag	agaaatagta	cgaagagggg	5700
ctctcattct	cttctgtgat	tatgtctgtc	agaacctcca	tgactccgag	cacttaacgt	5760
ggctcattgt	aaatcacatt	caagatctga	tcagccttcc	ccacgagcct	ccagtacagg	5820
acttcatcag	tgctgttcat	cggaaactccg	ctgccagcgg	cctcttccatc	caggcaattc	5880
agtctcgttg	tgaaaacctt	tcaactccaa	ccactctgaa	gaaaactctt	cagtgccttg	5940
aggggatcca	tctcagccag	tcgggagctg	tgctcacgtt	gtatgtggac	aggctgctgt	6000
gcaccccttt	ccgtgtgctg	gctcgcattg	tcgacatcct	tgcttgtcgc	cgggtagaaa	6060
tgcttctggc	tgcaaattta	cagagcagca	tggcccagtt	gccaatggaa	gaactcaaca	6120
gaatccagga	ataccttcag	agcagcgggc	tcgctcagag	acaccagagg	ctctattccc	6180
tgctggacag	gtttcgtctc	tccaccatgc	aagactcact	tagtccctct	ccccagctct	6240
cttcccaccc	gctggacggg	gacgggcacg	tgtcactgga	aacagtgagt	ccggacaaag	6300
actggtacat	tcactttgtc	aaatcccagt	gttggaccag	gtcagattct	gcgctgctgg	6360
aaggtgcaga	gctgggtgaat	cggattcctg	ctgaagatat	gagtgccttc	atgatgaact	6420
cggagttcaa	cctaagcctg	ctagctccat	gcttaagcct	agggatgagt	gaaatttctg	6480
gtggccagag	gagtccgctt	tttgaagcag	cccgtgaggt	gactctggcc	cgcgtgagca	6540
gcaccgtgca	gcagctccct	gctgtccacc	acgtcttcca	gtccgacctg	cctgcagagc	6600
cggcggccta	ctggagcaag	ttgaatgata	tatttgggga	tgctgcgctg	tatcagtccc	6660
tgaccactct	ggcccgggccc	ctggcacagt	acctggtggc	ggtctccaaa	ctgcccagtc	6720
acttgcacct	tcctcctgag	aaagagaagg	acaccatgaa	attcgtgggtg	gcaacccttg	6780
aggccctgtc	ctggcatttg	atccatgagc	agattccgct	gagtctggat	ctccaggcag	6840
ggctggactg	ctgtgcctg	gccctgcagc	tgcttgacct	ctggagcgtg	gtctcctccg	6900
cagagtttgt	gaccacagcc	tgctccctca	tccactgtgt	gcacttccatc	ctggaggccg	6960
ttgcagtgca	gcctggagag	cagcttctta	gtccagaaag	aaggacaaat	accccaaaag	7020
ccatcagaga	ggaggaggag	gaaatagatc	ctaacacaca	gaatccgaag	tatatcaccg	7080
cagcctgtga	gatgggtggca	gaaatgggtg	agtctctgca	gtcgggtgtg	gctttgggtc	7140
ataaaaggaa	tagtggcgtg	ccggcgtttc	tcacgtcagt	gtcagggaac	atcgtcgtca	7200
gcctggcccc	cctgccccct	gtcaacagct	acacacgtgt	gccccactg	gtgtggaagc	7260
ttggatggtc	acccaaaccg	ggaggggatt	ttggcacagc	attccctgag	atccccgtgg	7320

agttcctcca	ggaaaaggaa	gtctttaagg	agttcatcta	ccgcatcaac	acgctaggct	7380
ggaccagtcg	tactcagttt	gaagaaactt	gggccactct	ccttggtgtc	ctggtgacgc	7440
agccccctcg	gatggagcag	gaggagagcc	caccagaaga	agacacagag	aggacgcaga	7500
tcaacgtcct	ggccgtgcag	gccatcacct	cactggtgct	cagtgcattg	accgtgcctg	7560
tggccggcaa	cccagctgtg	agctgcttgg	agcagcagcc	tcggaacaag	cctctgaaag	7620
ctctggacac	caggtttggg	aggaagctga	gcattatcag	agggattgta	gagcaagaga	7680
ttcaagcaat	ggtttcaaaag	agagagaaca	tcgccaccca	tcattttatac	caggcgtggg	7740
atcctgtccc	ttctctgtcc	ccggctacca	caggtgccct	catcagccac	gagaagctgc	7800
tgtctgcagat	caacccccgag	cgggagctgg	ggagcgtgag	ctacaaactc	ggccaggtgt	7860
ccatacactc	tgtgtggctg	gggaacagca	tcacaccctt	aaggaggagg	gaatgggacg	7920
aggaggagga	ggaggaggcc	gacgcccctg	caccttcate	accaccacg	tctccagtca	7980
actccaggaa	acaccgggct	ggagttgaca	tccattcctg	ttcgcagttt	ttactcgagt	8040
tgtacagccg	ctggatcctg	ccatccaact	cagccaggag	gacccccggc	atcctgatca	8100
gtgaggtggt	tcgatccctt	ctggtggtct	cagacttggt	cactgagcgc	aaccagtttg	8160
agctgatgta	tgtgacgctg	acagaactgc	gaagggtgca	tccttcagaa	gacgagatcc	8220
tcgctcagta	cctggtgccc	gccacctgca	aggcagctgc	cgtccttggg	atggacaagg	8280
tcgtggcgga	gcctgtcagc	cgcctgctgg	agagcacact	caggagcagc	cacctgcccc	8340
gcagggtcgg	agccctgcac	ggcatcctct	atgtgctgga	gtgcgacctg	ctggacgata	8400
ctgccaagca	gctcatccca	gtcatcagtg	actatctcct	ctccaacctg	aaagggatcg	8460
cccactgcgt	gaacattcac	agccagcagc	acgtactggt	catgtgtgcc	actgcgtttt	8520
acctgattga	gaactatcct	ctggacgtag	ggccagaatt	ttcagcatca	ataatacaga	8580
tgtgtggggg	gatgctgtcc	ggaagtgagg	agtccacccc	ctctatcatt	taccactgtg	8640
ccctcagagg	cctggagcgc	ctcctgctct	ctgagcagct	ctcccgcttg	gatgcagaat	8700
ccctgggtcaa	gctgagtgtg	gacagagtga	acgtgcacag	cccgcaccgg	gccatggcgg	8760
ctctggggctt	gatgctcacc	tgcattgtaca	caggaaagga	gaaagtcagt	ccgggtagaa	8820
cttcagaccc	taatcctgca	gccccagaca	gcgagtcggt	gattgttgct	atggagcggg	8880
tgtctgttct	ttttgatagg	atcaggaaaag	gctttccttg	tgaagccaga	gtggtggcga	8940
ggatcctgcc	ccagtttcta	gatgacttct	tcccacccca	ggacatcatg	aacaaagtca	9000
tcggagagtt	tctgtccaac	cagcagccat	acccccagtt	catggccacg	gtggtgtata	9060
agggtgtttca	gactctgcac	agcaccgggc	agtcattccat	ggtccgggac	tgggtcatgc	9120
tgtccctctc	caacttcacg	cagaggaccc	cagtcgccat	ggccacatgg	agcctctcct	9180
gcttcttcgt	cagcgcgtcc	accagcccat	gggttgcggc	gatectccca	catgtcatca	9240
gcaggatggg	aaagctggag	caggtggacg	tcaacctttt	ctgcctgggt	gccacagact	9300
tttacagaca	ccagatagag	gaggagctcg	accgcagggc	cttcagctct	gtgtttgagg	9360
tggttgcagc	tccaggaagc	ccatatcacc	ggctgctgac	ttgtttacga	aatgtccaca	9420
aggtcaccac	ctgctgagcg	ccatgggtggg	agagactgtg	aggcggcagc	tggggctgga	9480
gcctccagaa	atctgcgccc	tgtgccctgc	ctccaccgag	ccagcttggt	ccctgtgggc	9540
ttccgcacat	gccgcgggcg	gccaggcaac	gtgcgtgtct	ctgccatatg	gcagaagtgc	9600
tctttgtggt	acagtggcca	ggcaaggagt	atctgcagtc	ccggtggggc	tgagcctgag	9660

gccttccgga	gagcaggagc	agctgtgctg	cacgccatgt	gggtgaccag	gtcctttctc	9720
ctgatgctca	cctgttgggt	gttgccaggc	tgcagctgct	cttgcatctg	ggccggaagt	9780
cctccctcct	gcaggctggc	tgtgggcccc	tctgctgtcc	tgcagtagaa	ggtgccgtga	9840
gcaggctttg	ggaacactgg	cctgtgtctt	cctgggtggg	tgtgcatgcc	acgccctgtg	9900
tctgtatgca	cagatgccat	ggcatgtgct	gggccagtgg	ctgggggtgc	tagacacca	9960
gcaccattct	cccttctctc	ttttcttctc	aggatttaaa	atttaattat	atcagtaaag	10020
agattaattt	taacgtaact	ctttctatgc	ccgtgtaaag	tatgtgaatt	gcaaggcctg	10080
tgctgcatgc	gacagtgttc	ggggaggtgg	gcagggcccc	tggccacgct	ccctctcctg	10140
tagccactgg	catagccttc	ctgagcacc	gctgacattt	ccgttgtaga	tgttctctgt	10200
tatgcattca	caaggtgact	gggatgtaga	gaggcgctag	tgtgcaggtg	gccacagcag	10260
gactaaggac	aggccccac	tgtcctaggg	gcatgctcgc	ctgcagcccc	tccttcttgg	10320
gcacagacaa	ctgttgttct	ccaccacat	tagggacagc	agcctcccta	tcagctgaga	10380
aggccagccc	tccctggctg	tgagcagcct	ccgctgtgtc	cagagacatg	ggcctccac	10440
tcctgttcct	tgctagccct	ggggcggtgt	ctgcccagga	gctggctggc	cggtgttggg	10500
atctgccgtt	ccatggatgc	atgccccaa	ggtgtcactg	agctgtgttt	tgtctgagcc	10560
tctcttggtc	aacagcaaag	cttggcgtct	tggcactgtt	agtacagag	cctggcatcc	10620
cttctgcccc	cgttccagct	gacatcttgc	acggggaccc	cttttagtca	ggagagtga	10680
gatctgtgct	cattggagac	tgccccactg	ccctgtcaga	gccgccactc	ctatccccag	10740
gccaggtccc	tggaccagcc	tcttgtttgc	aggcccagag	gagccaagtc	attaaaatgg	10800
aagtggattc	tggatggccg	gctgctgctg	acataggagc	tggatttggg	agctctgaga	10860
tggggcagga	gctctgcttc	ctcagccctt	gaggcgagcc	aggcgaggtt	ggcgaactgc	10920
atgtggcctg	gtttgctcat	gcctgttgat	gttttgggta	ttgaatatgg	taagtggagg	10980
aaatgctttt	ctggagtctg	tgcaggtgct	gccttgagac	cctcaagctt	ccacctgtcc	11040
ctctcctatg	tggcagctga	ggagcagctg	acatgtggac	ttgtgtgctg	cccacataca	11100
tgagggggcg	ctgaaaggga	gccccgtctc	aaaggagacc	cctcctctga	gcagcctttg	11160
acaggcctgt	atgaggcttt	tcccaccagc	tccaacaga	ggcctcccc	agccaggacc	11220
acctcgtcct	cgtggcaggg	cagcaggagc	gtagaaaagg	ggtctgatgt	ttgaggaggc	11280
ccttaaggga	agctactgaa	ttttaacaag	aaaaccaccg	ttcttccgta	ttggttgggg	11340
gctcctgttt	ctcatcctag	cttcttctctg	gaaagcctgc	tagaagcttt	gggaatgagg	11400
ggaaaagtct	cagaaccgtt	gctgctcccc	accacctcc	cctgcagtaa	gttatgtcaa	11460
cagctcggag	acagaagtat	cacaggccag	atgttgttct	gctagatgtt	tacatttgta	11520
agaaataaca	ctgtgaatgt	aaaacggagc	cattccccct	ggaatgcata	tcgctgggct	11580
caacacagag	tttgtcttcc	ttttgtttac	gacgtgatct	aaaacagtcc	ttagcaaggg	11640
gctcagaaca	ccccgctctg	gcagtgggtg	tccccactc	ccaaaggcct	gcctgtgtgc	11700
tccagagatg	aatatgagct	cattagtaaa	atgactttac	ccatgcgtaa	gtcaagtaca	11760
cgtgcacgtg	catatggaca	catctgtagt	tttatacacg	cacatctcaa	gacagagatg	11820
catggcctcc	aagagtcccc	gtgtcggttc	ttcctggaag	ttgactttcc	tcagacctgc	11880
caggtaaagt	tagctgtgtg	acgggcgtcc	aggcgcgggg	cttggtcaga	gcagggtcca	11940
ttcatggctc	actaggatcc	caccggagaa	aacggtctcc	atatcaactc	tgccgaaggg	12000

```

aggaagactt tgtcgcgttc ctaaaaaacc tatggcaagc accaatcata ttatccaaat 12060
tttgttgaaa atgtgattaa tttggttgtc aagttttggg ggtgagctgt ggggagactg 12120
cttttgtttt gctgctggta atatcaggaa agactttaat gaaaccaggg tagaattgtt 12180
tggcaatgca ctgaagcgcg tttctttccc aaacgtgcc tcccttccgc tgcgggcccc 12240
gctgagctctg tgtaggtgac gtttccggct gccaaagcgt ctttgttact gtccaccccc 12300
atttctgcca gcacacgtgt cttttcagga ggaaaatgtg aagctgaaac ccctccagac 12360
accagaatg tagcatctga gaaggccctg tgccctaaag gacacccccg cccccacctt 12420
catggagggg tcattccaga gccctcggag ccgatgaaca gctcgtcctc ttggagctga 12480
gctgagcccc ccacggagct cgggacggat agtaaacagc aataactcgg tctgtggctg 12540
cctggcaggt ggaagtccct cccctgagg ggaggagtga ggtagttct gtgtgtctgt 12600
ggggtggagt cagcctgtct ctgtacctg tgagcatect gccagcaga catctcacc 12660
cggctttgtc cctccccact tcctccctct gcggggagga cccaggacca cagctgctgg 12720
ccagggtagg cttggagctg tgctccggag gggccacctg agggagcgag aagaaggaag 12780
atcttgagag ctgccgaggc accctggaga gctcaggatg gtccaggcga gaagaggaca 12840
ctcgtcgcgc aggcctgggc ctcttgggaa ggaggagacc gctcagagcg ccgcatgaca 12900
actgaaggca acctggaagg ttcagaggcc actcttcccc cgtgtgcctg tcacgtctctg 12960
gtgcagtcca aggaacgcct tcccctcagt tgtttccaaa agcagagtct cccgtgcaa 13020
tctgggttgt gattgccagc cttggaggat tgtggccaac gtggacctgc ctacggaggg 13080
tgggctctga cccacgtggg gcctccttgt ccaggctctc ttgctttgcg ctgtggctcag 13140
agggactgtc agctgagcct gagctcccct ggagccagca gggctgtgat gggtagtcc 13200
cggagcccca cccagacctg actgcttctg agagcaaagg gaaggactga cgagagatgt 13260
atatttaatt tttttaactg ctgcaaacat tgtacatcca aattaaagga aaaacattga 13320
aaccatca 13328

```

<210> 5

<211> 13447

<212> DNA

<213> 猕猴(Macaca mulatta)

<400> 5

```

gcaaggcgcc gcgggggctg ccgggacggg tccaagatgg acggccgctt cggttccgct 60
tttaccgcgc gccagagcc ccattcattg ccccggtgct gagcggcgct gcgagtcggc 120
ccgaggcctc cggggactgc ctagccgggc gggagaccgc catggcgacc ctggaaaagc 180
tgatgaaggc cttcgagtct ctcaagtcct tccagcagca gcagcagcag cagcagcagc 240
aacagccgcc gccgccgccg ccgccgccgc ctctctctcc tcagcttccct cagccgccgc 300
aggcacagcc gatgctgcct cagccgcagc cgccccgcgc gccgccccgc ccaccaccgc 360
gcccggctgt ggctgaggag ccgctgcacc gaccaaagaa agaactttca gctaccaaga 420
aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat agtggcacag tctgtcagaa 480
attctccaga atttcagaaa cttctgggca tcgctatgga actttttctg ctgtgcagtg 540
atgacgcaga gtcggatgtc agaatggtgg ctgatgaatg cctcaacaaa gttatcaaag 600
ctttgatgga ttctaattct ccaaggttac agctcgagct ctataaagaa attaaaaaga 660

```

atggtgcccc	tcggagtttg	cgtgctgccc	tgtggaggtt	tgccgagctg	gctcacctgg	720
ttcggcctca	gaaatgcagg	ccttacctgg	tgaaccttct	gccgtgccta	agtcgaacaa	780
gcaagagacc	cgaggaatca	gtccaggaga	ccttggtctgc	agctgttccc	aaaattatgg	840
cttcttttcgg	caatttttgca	aatgacaatg	aaattaaggt	tttgttaaag	gccttcatag	900
cgaacctgaa	gtcaagctcc	cccactattc	ggcggacagc	tgctggatca	gcagtgcgca	960
tctgccagca	ctcaagaagg	acacagtatt	tctatagctg	gctactaaat	gtgctcttag	1020
gcttactggg	tcctgtcgag	gaggagcact	ccaccctgct	gattcttggc	gtgctgctca	1080
ccctgaggta	tttggtgccc	ttgctgcagc	agcaggtcaa	ggatacaagc	ctgaaaggca	1140
gcttcggagt	gacacggaaa	gaaatggagg	tctctccttc	tgacagagcag	cttgtccagg	1200
tttatgaact	gacgttacat	catacacagc	accaagacca	caatgtttgtg	accggagccc	1260
tggagctgtt	gcagcagctc	ttcagaacgc	ctccccccga	gcttctgcaa	gccttgacca	1320
cagtgggggg	cattgggcag	cttaccgccg	ctaaggagga	gtctggtggc	cgaagccgta	1380
gtgggagtat	tgtggaactt	atagctggag	ggggttcttc	atgcagccct	gtcctttcaa	1440
gaaaacaaaa	aggcaaagtg	ctcttaggag	aagaagaagc	cttgaggatg	gactctgaat	1500
cgagatcgga	tgtcagcagc	tctgcctttg	cagcctcagt	gaaggatgat	atcagtggag	1560
agctggctac	ttcttcaggg	gtttccactc	cagggtcagc	aggtcacgac	atcatcacgg	1620
agcagccacg	gtcacagcac	acgctgcagg	cggactcagt	ggatctggcc	agctgtgact	1680
tgacaagctc	tgccacggat	ggggatgagg	aggatatctt	gagccacagc	tccagccagg	1740
tcagcgccgt	cccatctgac	cctgccatgg	acctgaatga	tgggaccag	gcctcctcgc	1800
ccatcagcga	cagctcccag	accaccaccg	aagggcctga	ttcagctgtc	acccttcag	1860
acagtcttga	aattgtgtta	gacggtaccg	acaaccagta	tttgggcctg	cagattggac	1920
agccccagga	tgaagatgag	gaagccacag	gtgttcttcc	tgacgaagcc	tcggaggcct	1980
tcaggaactc	ttccatggcc	cttcaacaag	cacatttatt	gaaaaacatg	agtcacagca	2040
ggcagccctc	tgacagcagt	gttgataaat	ttgtgttgag	agatgaagct	actgaaccgg	2100
gtgatcaaga	aaacaagcct	tgccgcatca	aaggtgacat	tggacagtcc	actgatgatg	2160
attctgcacc	tcttgtccat	tgtgtccgcc	ttttatctgc	ttcatttttg	ctaacagggg	2220
gaaaaaatgt	gctggttccg	gaccgggatg	tgagggtcag	cgtgaaggcc	ctggccctca	2280
gctgtgtggg	agcagctgtg	gctctccacc	cagaatcttt	cttcagcaaa	ctctataaag	2340
ttcctcttga	caccacagaa	tacctgagg	aacaatatgt	ctcagatata	ttgaactaca	2400
tcgatcatgg	agaccacag	gttcgaggag	ccactgccat	tctctgtggg	accctcatct	2460
gctccatcct	cagcaggtcc	cgcttccacg	tgggagattg	gatgggcgcc	attagaaccc	2520
tgacaggaaa	cacattttct	ttggcggatt	gcattccttt	gctgcggaaa	acactgaagg	2580
acgagtcttc	tgtcacttgc	aagctggcct	gtacagctgt	gaggcattgt	gtcatgagtc	2640
tctgcagcag	cagctacagt	gagttaggac	tgcagctgat	catcgacgtg	ctgactctga	2700
ggaacagttc	ctattggctg	gtgaggacag	agcttctgga	aacccttgcg	gagattgact	2760
tcaggctggg	gagctttttg	gaggcaaaaag	cagaaaactt	acacagaggg	gtcctatcatt	2820
atacagggct	tttaaagctg	caagaacgag	tgctcaataa	tgttgctcatc	catttgcttg	2880
gggatgaaga	ccccagggtg	cgacatgttg	ctgcagcatc	attaattagg	cttgtcccaa	2940
agctgtttta	taaatgtgac	caaggacaag	ctgaccagct	agtggccgtg	gcaagagatc	3000

aaagcagtgt	ttacctgaaa	cttctcatgc	atgagacgca	gcctccatct	cattttctccg	3060
tcagcacaat	aaccagaata	tacagaggct	ataacctact	gccaagcata	acagatgtca	3120
ctatggaaaa	taacctttca	agagtatttg	cagcagtttc	tcatgaactg	atcacatcaa	3180
ccacgagagc	actcactttt	ggatgctgtg	aagctttgtg	tcttctttcc	actgccttcc	3240
cagtttgcat	ttggagttta	ggttggcact	gtggagtgcc	tccactgagc	gcctccgatg	3300
agtctaggaa	gagctgtacc	gttgggatgg	ccacgatgat	tctgaccctg	ctctcgtcag	3360
cttggttccc	attggatctc	tcagcccata	aagatgcttt	gattttggcc	ggaaacttgc	3420
ttgcagccag	tgctcctaaa	tctctgagaa	gttcatgggc	ctctgaagaa	gaagccaacc	3480
cagcagccac	caagcaagag	gaggtctggc	cagccctggg	ggaccgggcc	ttggtgcccc	3540
tggtggagca	gctcttctcc	cacctgctga	aggtgatcaa	catttgtgca	catgtcctgg	3600
acgacgtggc	tcctggaccg	gcaataaagg	cagccttgcc	ttctctaaca	aacccccctt	3660
ctctaagtcc	catccgacga	aagggaagg	agaaagaacc	aggagaacaa	gcattctgtac	3720
cgttgagtcc	caagaaaggc	agtgaggcca	gtgcagcttc	tagacaatct	gatacctcag	3780
gtcctgttac	aacaagtaaa	tcctcatcac	tggggagtth	ctatcatctt	ccttcatacc	3840
tcaaaactgca	tgatgtcctg	aaagctacgc	acgctaacta	caaggtcacc	ttgcatcttc	3900
agaacagcac	ggaaaaatth	ggagggtthc	ttcgctcagc	cttggaactt	ctctctcaga	3960
ttctagagct	ggccacactg	caggacattg	ggaagtgtgt	tgaggagatc	ctaggatacc	4020
tgaaatcctg	ctttagtcca	gaaccaatga	tggcaactgt	ttgtgttcaa	caattgttga	4080
agactctctt	tgggacaaac	ttggcctccc	agtttgacgg	cttatcatcc	aaccccagca	4140
agtcacaagg	ccgagcacag	cgccttggct	cctccagtgt	gaggccaggc	ttgtaccact	4200
actgcttcat	ggccccgtac	accacttca	cccaggccct	cgctgacgcc	agcctgagga	4260
acatggtgca	ggcggagcag	gagcacgaca	cctcgggatg	gtttgatgtc	ctccagaaag	4320
tgtctaccca	gttgaagacg	aacctacaaa	gtgtcacaaa	gaaccgtgca	gataagaatg	4380
ctattcataa	tcacattcgt	ttgtttgaac	ctcttgttat	aaaagcttta	aaacagtaca	4440
cgacaacaac	atctgtgcag	ttacagaagc	aggttttaga	tttgctggcg	cagctggttc	4500
agttacgggt	taattactgt	cttctggatt	cagatcaggt	gtttattggc	tttgtattga	4560
aacagttcga	atacattgaa	gtgggccagt	tcagggaatc	agaggcaatc	attccaaaca	4620
tctttttctt	cttgggtatta	ctgtcttatg	aacgctatca	ttcaaaacag	atcattggaa	4680
ttcctaaaaat	cattcagctc	tgtgatggca	tcatggccag	tggaaggaag	gctgtgacac	4740
acgccatacc	ggctctgcag	cccatagtcc	atgacctttt	tgtattaaga	ggaacaaata	4800
aagctgatgc	aggaaaagag	cttgaaaccc	aaaaagaagt	ggtggtatca	atgttactga	4860
gactcatcca	gtaccatcag	gtgttggaga	tgttcattct	cgctctgcag	cagtgccaca	4920
aggagaatga	agacaagtgg	aagcgactgt	ctcgacagat	agctgacatc	atcctcccaa	4980
tgttagccaa	acagcagatg	cacattgact	ctcatgaagc	ccttggagtg	ttaaatacat	5040
tatttgagat	tttggccccct	tcctccctcc	gtccggtgga	catgctttta	cggagtatgt	5100
tcgtcactcc	aaacacaatg	gcattctgtga	gcactgttca	actgtggata	tcaggaattc	5160
tggccatttt	gagggttctg	atttcccagt	caactgaaga	tattgttctt	tctcgtattc	5220
aggagctctc	tttctctcca	tatttaattct	cctgtccagt	aattaatagg	ctaagagatg	5280
gggacagtaa	ttcagcacta	gaagaacaca	gtgaagggaa	acaaataaag	aatttgccag	5340

aagaaacatt	ttcaaggttt	ctattacaac	tggtgggtat	tcttttagaa	gacattgtta	5400
caaaacagct	gaaggtggaa	atgagtgagc	agcaacatac	tttctattgc	caagaactag	5460
gcactctgct	aatgtgtctg	atccacatct	tcaagtctgg	aatgttccgg	agaatcacag	5520
cagctgccac	tagactgttc	cgcagtgatg	gctgtggcgg	cagtttctac	accctggaca	5580
gcttgaattt	gcgggctcgt	tccatgatca	ccaccacacc	ggccctgggtg	ctgctctggt	5640
gtcagatcct	gctgcttgtc	aaccacaccg	actaccgctg	gtgggcagaa	gtgcagcaga	5700
ccccgaaaag	acacagtctg	tccagcacaa	agttacttag	tccccagatg	tctggagaag	5760
aggaggattc	tgacttggca	gccaaacttg	gagtgtgcaa	tagagaaata	gtacgaagag	5820
gggctctcat	tctcttctgt	gattatgtct	gtcagaacct	ccatgactcc	gagcacttaa	5880
cgtggctcat	tgtaaatcac	attcaagatc	tgatcagcct	ttcccacgag	cctccagtac	5940
aggacttcat	cagtgtgttt	catcggaact	ccgtgccag	cggcctcttc	atccaggcaa	6000
ttcagtctcg	ttgtgaaaac	ctttcaactc	caaccactct	gaagaaaact	cttcagtgtc	6060
tggaggggat	ccatctcagc	cagtcgggag	ctgtgtctac	gttgatgtg	gacaggctgc	6120
tgtgcacccc	tttccgtgtg	ctggctcgca	tggtcgacat	ccttgcttgt	cgccgggtag	6180
aaatgcttct	ggctgcaaat	ttacagagca	gcatggccca	gttgccaatg	gaagaactca	6240
acagaatcca	ggaatacctt	cagagcagcg	ggctcgtca	gagacaccag	aggctctatt	6300
ccctgctgga	caggtttcgt	ctctccacca	tgcaagactc	acttagtccc	tctccccag	6360
tctcttccca	cccgtggac	ggggatgggc	acgtgtcact	ggaaacagtg	agtccggaca	6420
aagactggta	cattcatctt	gtcaaatccc	agtgttgac	caggtcagat	tctgcactgc	6480
tggaagggtg	agagctgggtg	aatcggattc	ctgctgaaga	tatgagtgcc	ttcatgatga	6540
actcggagtt	caacctaaag	ctgctagctc	catgcttaag	cctagggatg	agtgaatttt	6600
ctgggtggcca	gaagagtccg	ctttttgaag	cagcctgtga	ggtgactctg	gcccgcgtga	6660
gcagcaccgt	gcagcagctc	cctgctgtcc	accacgtctt	ccagtccgac	ctgcctgcag	6720
agccggcggc	ctactggagc	aagttagaatg	atctatttgg	ggatgctgcg	ctgtatcagt	6780
ccctgaccac	tctggcccgg	gccctggcac	agtacctggt	ggcggctctcc	aaactgcccc	6840
gtcacttgca	ccttcctcct	gagaaagaga	aggacaccat	gaaattcgtg	gtggcaaccc	6900
ttgaggccct	gtcctggcat	ttgatccatg	agcagattcc	gctgagtctg	gatctccagg	6960
cagggttgga	ctgctgtgc	ctggccctgc	agctgcctgg	cctctggagc	gtggtctcct	7020
ccgcagagtt	tgtgaccac	gctgctccc	tcattccactg	tgtgcacttc	atcctggagg	7080
ccgttgcatg	gcagcctgga	gagcagcttc	ttagtccaga	aagaaggaca	aataccccaa	7140
aagtcatcag	agaggaggag	gaggaaatag	atcctaacac	acagaatccg	aagtatatca	7200
ccgcagcctg	tgagatgggtg	gcagaaatgg	tggagtctct	gcagtccgtg	ttggcttttg	7260
gtcataaaaag	gaatagtggc	gtgccggcgt	ttctcacgtc	agtgtctcagg	aacatcgctc	7320
tcagcctggc	ccgcctgccc	cttgtcaaca	gtacacacg	tgtgccccca	ctgggtgtgga	7380
agcttggatg	gtcacccaaa	ccgggagggg	atthtggcac	agcattccct	gagatccccg	7440
tggagtccct	ccaggaaaag	gaagtcttta	aggagtccat	ctaccgcac	aacacgctag	7500
gctggaccag	tcgtactcag	tttgaagaaa	cttgggccac	tctccttggt	gtcctggtga	7560
cgcagcccct	cgtgatggag	caggaggaga	gcccaccaga	agaagacaca	gagaggacgc	7620
agatcaacgt	cctggccgtg	caggccatca	cctcactggt	gctcagtgc	atgaccgtgc	7680

ctgtggccgg	caaccagct	gtgagctgct	tggagcagca	gcctcggaac	aagcctctga	7740
aagctctgga	caccaggttt	gggaggaagc	tgagcattat	cagagggtt	gtagagcaag	7800
agattcaagc	aatggtttca	aagagagaga	acatcgccac	ccatcattta	taccaggcgt	7860
gggatcctgt	cccttctctg	tccccggcta	ccacaggtgc	cctcatcagc	cacgagaagc	7920
tgctgctgca	gatcaacccc	gagcgggagc	tggggagcgt	gagctacaaa	ctcggccagg	7980
tgtccataca	ctctgtgtgg	ctggggaaca	gcacacacc	cctaaggag	gaggaatggg	8040
acgaggagga	ggaggaggag	gccgacgccc	ctgcaccttc	atcaccaccc	acgtctccag	8100
tcaactccag	gaaacaccgg	gctggagtgt	acatccattc	ctgttcgcag	tttttactcg	8160
agttgtacag	ccgtctggatc	ctgccatcca	actcagccag	gaggaccccg	gccatcctga	8220
tcagttaggt	ggttcgatcc	cttctgggtg	tctcagactt	gttcactgag	cgcaaccagt	8280
ttgagctgat	gtatgtgacg	ctgacagaac	tgcgaagggt	gcaccttca	gaagacgaga	8340
tcctcgctca	gtacctggtg	cccgccacct	gcaaggcagc	tgccgtcctt	gggatggaca	8400
aggctcgtggc	ggagcctgtc	agccgcctgc	tggagagcac	actcaggagc	agccacctgc	8460
ccagcagggt	cggagccctg	cacggcatcc	tctatgtgct	ggagtgcgac	ctgctggacg	8520
atactgccaa	gcagctcatc	ccagtcatca	gtgactatct	cctctccaac	ctgaaaggga	8580
tcgcccactg	cgtgaacatt	cacagccagc	agcacgtact	ggcatgtgt	gccactgcgt	8640
tttacctgat	tgagaactat	cctctggacg	tagggccaga	attttcagca	tcaataatac	8700
agatgtgtgg	ggtgatgctg	tccggaagtg	aggagtccac	cccctctatc	atttaccact	8760
gtgccctcag	aggcctggag	cgcctcctgc	tctctagaca	gctctcccgc	ctggatgcag	8820
aatccctggg	caagctgagt	gtggacagag	tgaacgtgca	cagcccgcac	cgggccatgg	8880
cggctctggg	cttgatgctc	acctgcatgt	acacaggaag	ggagaaagtc	agtccgggta	8940
gaacttcaga	ccctaatacct	gcagccccag	acagcgagtc	ggtgattgtt	gctatggagc	9000
gggtgtctgt	tctttttgat	aggatcagga	aaggctttcc	ttgtgaagcc	agagtgggtg	9060
cgaggatcct	gccccagttt	ctagacgact	tcttcccacc	ccaggacatc	atgaacaaag	9120
tcacgcgaga	gtttctgtcc	aaccagcagc	cataccccc	gttcatggcc	accgtggtgt	9180
ataaggtgtt	tcagactctg	cacagcaccg	ggcagtcac	catggtccgg	gactgggtca	9240
tgctgtccct	ctccaacttc	acacagagga	ccccagtcgc	catggccaca	tggagcctct	9300
cctgcttctt	cgtcagcgcg	tccaccagcc	catgggttgc	ggcgatcctc	ccacatgtca	9360
tcagcaggat	gggaaaagctg	gagcaggtgg	acgtcaacct	tttctgcctg	gttgccacag	9420
acttttacag	acaccagata	gaggaggagc	tcgaccgcag	ggccttccag	tctgtgtttg	9480
aggtggttgc	agctccagga	agcccatatc	accggtgct	gacttgttta	cgaaatgtcc	9540
acaaggtcac	cacctgctga	gcgccatggt	gggagagact	gtgaggcggc	agctggggct	9600
ggagcctcca	gaaatctgcg	ccctgtgccc	tgcttccacc	gagccagctt	ggtccctgtg	9660
ggcttccgca	catgccgcgg	gcggccaggc	aacgtgcgtg	tctctgccat	atggcagaag	9720
tgctctttgt	ggtacagtgg	ccaggcaagg	agtatctgca	gtcccgggtg	ggctgagcct	9780
gaggccttcc	ggagagcagg	agcagctgtg	ctgcacgcca	tgtgggtgac	caggtccttt	9840
ctcctgatgc	tcacctgttg	ggtgttgcca	ggctgcagct	gctcttgcat	ctgggccgga	9900
agtcctccct	cctgcaggct	ggctgtgggc	ccctctgctg	tcctgcagta	gaaggtgccg	9960
tgagcaggct	ttgggaacac	tggcctgtgt	cttctggtg	gggtgtgcat	gccacgcct	10020

gtgtctgtat	gcacagatgc	catggcatgt	gctgggccag	tggttggggg	tgctagacac	10080
ccagcaccat	tctcccttct	ctcttttctt	ctcaggattt	aaaatttaat	tatatcagta	10140
aagagattaa	ttttaacgta	actctttcta	tgcccgtgta	aagtatgtga	attgcaaggc	10200
ctgtgctgca	tgcgacagt	ttcggggagg	tgggcagggc	ccctggccac	gctccctctc	10260
ctgtagccac	tgccatagcc	ttcctgagca	cccgtgaca	tttccgttgt	acatgttcct	10320
gtttatgcat	tcacaaggtg	actgggatgt	agagaggcgc	tagtgtgcag	gtggccacag	10380
caggactaag	gacaggcccc	cactgtccta	ggggcatgct	cgcctgcagc	ccctccttct	10440
tgggcacaga	caactgttgt	tctccacca	cattagggac	agcagcctcc	ctatcagctg	10500
agaaggccag	ccctccctgg	ctgtgagcag	cctccgctgt	gtccagagac	atgggcctcc	10560
cactcctgtt	ccttgctagc	cctggggcgg	tgtctgcccc	ggagctggct	ggccggtgat	10620
gggatctgcc	gttccatgga	tgcattgccc	aagggtgtca	ctgagctgtg	ttttgtctga	10680
gcctctcttg	gtcaacagca	aagcttggcg	tcttggcact	gttagtgaca	gagcctggca	10740
tcccttctgc	ccccgttcca	gctgacatct	tgcacgggga	cccccttttag	tcaggagagt	10800
gcagatctgt	gctcattgga	gactgcccc	ctgccctgtc	agagccgcca	ctcctatccc	10860
caggccaggt	ccctggacca	gcctcttggt	tgcaggcccc	gaggagccaa	gtcattaaaa	10920
tggaagtgga	ttctggatgg	ccggctgctg	ctgacatagg	agctggattt	gggagctctg	10980
agatggggca	ggagctctgc	ttcctcagcc	cttgaggcga	gccaggcgag	gttggcgact	11040
gtcatgtggc	ttggtttgct	catgcctgtt	gatgttttgg	gtattgaata	tggttaagtgg	11100
aggaaatgct	tttctggagt	ctgtgcaggt	gctgccttga	gaccctcaag	cttccacctg	11160
tccctctcct	atgtggcagc	tgaggagcag	ctgacatgtg	gacttgtgtg	ctgcccacat	11220
acatgagggg	gcgctgaaag	ggagcccctg	ctcaaaggga	gcccctcctc	tgagcagcct	11280
ttgacaggcc	tgtatgaggc	ttttcccacc	agctcccaac	agaggcctcc	cccagccagg	11340
accacctcgt	cctcgtggca	gggcagcagg	agcggtagaa	aggggtctga	tgtttgagga	11400
ggcccttaag	ggaagctact	gaattttaac	aagaaagcca	ccattcttcc	gtattggttg	11460
ggggctcctg	tttctcatcc	tagcttcttc	ctggaaagcc	tgctagaagc	tttgggaatg	11520
aggggaaagt	tctcagaacc	gttgctgctc	cccaccacc	tcccctgcag	taagtatatgt	11580
caacagctcg	gagacagaag	tatcacaggc	cagatgttgt	tctgctagat	gtttacattt	11640
gtaagaaata	acactgtgaa	tgtaaaacgg	agccattccc	cttggaatgc	atatcgctgg	11700
gctcaacaca	gagtttgtct	tccttttggt	tacgacgtga	tctaaaacag	tccttagcaa	11760
ggggctcaga	acaccccgtc	ctggcagtgg	gtgtccccc	ctcccaaagg	cctgcctgtg	11820
tgctccagag	atgaatatga	gctcattagt	aaaatgactt	tacccatgcg	taagtcaagt	11880
acacgtgcac	gtgcatatgg	acacatctgt	agttttatac	acgcacatct	caagacagag	11940
atgcatggcc	tccaagagt	cccgtgtcgg	ttcttctctg	aagttgactt	tcctcagacc	12000
tgccaggtaa	agttagctgt	gtgacgggcg	tccaggcgcg	gggcttggtc	agagcagggc	12060
tcattcatgg	ctcactagga	tcccaccgga	gaaaacggtc	tccatatcaa	ctctgccgaa	12120
gggaggaaga	ctttgtcgcg	ttcctaaaaa	acctatggca	agcaccaatc	atattatcca	12180
aattgtgttg	aaaatgtgat	taatttggtt	gtcaagtttt	gggggtgagc	tgcggggaga	12240
ctgcttttgt	tttgctgctg	gtaatatcag	gaaagacttt	aatgaaacca	gggtagaatt	12300
gtttggcaat	gcactgaagc	gcgtttctgt	cccaaaacgt	gcctcccttc	cgctgcgggc	12360

ccagctgagt	ctgtgtaggt	gacgtttccg	gctgccaagc	gctctttgtt	actgtccacc	12420
cccatttctg	ccagcacacg	tgtcctttca	ggaggaaaat	gtgaagcgga	aacccctcca	12480
gacacccaga	atgtagcatc	tgagaaggcc	ctgtgcccta	aaggacaccc	ccgccccac	12540
cttcatggag	gggtcattcc	agagccctcg	gagccgatga	acagctcgtc	ctcttgagc	12600
tgagctgagc	cccccacgga	gctcgggacg	gatagtaaac	agcaataact	cggtctgtgg	12660
ctgcctggca	ggtggaagtt	cctccccctg	aggggcggag	tgaggttagt	tctgtgtgtc	12720
tgtgggggtg	agtcagcctg	ctcctgctac	ctgtgagcat	cctgcccagc	agacatcctc	12780
acccggcttt	gtccctcccc	acttctctcc	tctgcgggga	ggaccagga	ccacagctgc	12840
tggccagggt	aggcttgag	ctgtgctccg	gaggggccac	ctgagggagc	gagaagaagg	12900
aagatcttga	gagctgccga	ggcacctgg	agagctcagg	atggtccagg	cgagaagagg	12960
acactcgctc	gccaggcctg	ggcctcctgg	gaaggaggga	gccgctcaga	gcgctgcatg	13020
acaactgaag	gcaacctgga	aggttcagag	gccactcttc	ccccgtgtgc	ctgtcacgct	13080
ctgggtgcagt	ccaaggaacg	ccttccctca	gttgtttcca	aaagcagagt	ctcccgtgc	13140
aatctgggtg	gtgattgcca	gccttgagg	attgtggcca	acgtggacct	gcctacggag	13200
ggtgggctct	gaccacgtg	gggcctcctt	gtccaggctc	cattgctttg	cgctgtggtc	13260
agagggactg	tcagctgagc	ctgagctccc	ctggagccag	cagggtgtg	atgggcgagt	13320
cccgagccc	caccagacc	tgactgcttc	tgagagcaaa	gggaaggact	gacgagagat	13380
gtatatTTAA	TTTTTTTAAc	tgctgcaaac	attgtacatc	caaattaaag	gaaaaacatt	13440
gaaacca						13447

<210> 6

<211> 13498

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

TTTTTTTTTT	TTTTTTTTga	tggtttccat	TTTTTtctt	taatttggat	gtacaatgtt	60
tgcagcagtt	aaaaaattaa	atatacatct	ctcgtcagtc	cttccctttg	ctctcagaag	120
cattcaggtc	tgggtggggc	tccgggactc	gcccatacaca	gccctgctgg	ctccagggga	180
gctcaagctc	agctgacagt	ccctctgacc	acggtgcaaa	gcagtgagac	ctggacaagg	240
aggccccact	tgggtcagag	cccacctctc	gtaggcaggt	ccacgttggc	cacgatcctc	300
caaggctggc	agttaccacc	cagattgcag	cgggagactc	tgctcttaga	aacaactgag	360
gggaaggcgt	tcctttgact	gcaccagagc	gtgacaggca	catgggggaa	gagcggcccc	420
tgaaccttcc	aggttgctt	cagttgtcat	gcggcattct	gagcagctcc	ctccttccca	480
ggaggcccag	gcccggcaag	cgagtgtcct	cgtctgagcc	atcctgagct	ctccaaggctc	540
cctcagcagc	tctcaagatc	tctcttcttc	tactctctac	acgtgacccc	tctggaggac	600
agctccaagt	ctaccctggc	cagcagctgt	ggtccccgggt	cctccccgca	gagggaggaa	660
gcggggggagg	gacaaaagccc	gatgaggatg	tctgtctggga	aggatgctca	caggtagcaa	720
gagaagcctg	actccacca	ccagacacac	agaactaacc	tactccacc	ccgcaacggg	780
aggaagttcc	acctgccagg	cggccacaca	ccgagttatt	gctgtctact	atccgtcccc	840
agctccacgt	ggggctcatc	tcagctccaa	gaggaggagc	tgttcattgg	ctccgagggc	900

tctgaaatga	ccccctccat	gaagatgggg	gcgaggggtg	tccttttaggg	cacagggcct	960
tctcagatgc	tacattctgg	gtgtctggag	ggggttcagc	ttcacatttt	ccccttgaaa	1020
ggacacatgc	gctggcagaa	atgaggggtg	acagtaacaa	agagcacttg	gcagctggaa	1080
acatcaccta	catagactca	gctgggcccc	cagcggaagg	gaggcacatt	ttgggaaaga	1140
aacacgcttc	agtgcattgc	caaacaattc	taccctgggt	tcattaaaat	ctttcccgat	1200
attaccagca	ggaaaacaaa	agcaatctcc	ccacagccca	cccccaaac	ttgacaacca	1260
aattaatcac	atttgcaaca	aaatttggat	aatacagatg	gtgcttgcca	cagattttta	1320
ggaacatgat	aaagtcttcc	tcccttctgc	agagagctga	tatggagacc	atcttcgcca	1380
gtgggatcct	agtgggcaat	gaatgagccc	tgccctgacc	acgtcccacg	cctggatgtc	1440
cgtcacgcgg	ctaacttgac	ctggcggtgc	taaggaaagt	caacttccag	gaagaaccga	1500
cacgggcact	cttagaggcc	atgcactctc	gtcttgagag	gtgtgtgtgt	aaaattatag	1560
atgtgtctat	atgcacatgc	atggatactt	tatgtatatg	cgtgggtgaa	gtcattttta	1620
ctaagagct	catattcatc	tccggagcac	acaggcaggt	ctttgggggt	gggggacacc	1680
tactgccaga	gcgggggtgt	ctgagcccc	tgctaaggac	tggtttagat	cacgtcgtaa	1740
acaagaggaa	gacaaaactc	atgttgagcc	cagcgatatg	cattccaagg	gaatggctct	1800
gttttacatt	cacagtgtta	tttcttacia	atgtaaacad	ctagccagga	acaacatctg	1860
gcctgtgata	ctgctgtctc	agagctgtcg	acataacctg	cgggggaggc	gggaggcggg	1920
tggggagcag	ccaacagttc	tgagaacttt	cccctcgttc	ccaaaccttc	tagcgggctt	1980
tccaggaaaa	agctaggatg	agaaacagga	gcccccaacc	aatacggaat	ggtgattttc	2040
ttacgtgtta	taattcagta	gcttccctta	agggcctcct	caaacatcgg	acccctttct	2100
accgctcctg	ctgccccgcc	acgaggacga	ggtggtcctg	gctgggggag	gcctctgttg	2160
ggagctgggtg	ggaaaagcct	catacaggcc	tggcagaggc	tgctcagagg	aggggctccc	2220
tttcagctcc	ccctcacgta	tgtgggcagc	atacaagtcc	acatctcagc	tgctccccag	2280
ctgccacata	ggagagggac	aggtggaagc	ttgggggtct	caaggcagca	cctgcacaga	2340
gttccaacat	ttcttccact	taccacattc	aatacccaaa	acatcgacgg	gcatgaccaa	2400
accaagccac	atgacagtcg	ccaaccttgc	ctggctcgcc	tctagggtg	aggaagcaga	2460
gcccctgcct	cgtctcacag	ccagtcggca	agcagagctc	ccaaatccag	ctcctacatc	2520
agcagcagcc	cggccatcca	gaatccactt	ccattttaat	gacttggtct	ctctgggcct	2580
gcaaacagga	ggctggtcca	gggacctggc	ctggggatag	gagtggcggc	tctgacaggg	2640
ccgtggggca	gtctccgatg	agcacagatc	tgcactctcc	tgactaaaag	gggtcaccgt	2700
gcaagatgtc	agctggaacg	ggggcagaag	ggatgctggg	ctctgtcact	aacagtgcc	2760
agacaccaag	ctttgtgtgt	gaccgagaga	ggctcagaca	aaacacagct	cagtgcact	2820
cttagggcat	gcatccatgg	agcagcaggt	cccaacacct	gccagccagc	tcctaggcag	2880
acgccacccc	agggttagca	aggaacagga	gtgggaggcc	catgtctctg	gacacagtgg	2940
aggctgctca	cagccaggga	gggtggcct	tctcagctga	gtgacaggga	ggctgctgtc	3000
cctgactggg	gggtggagaa	cgacagtcgt	ctgtgcccga	ggaggagggg	ctgcaggtga	3060
gcgcacccct	aggataatgg	gggcctgtcc	tcagtcctgc	tgtggccacc	tgcccactaa	3120
cgctctctta	catcccagtc	accttgtgaa	tgcataaaca	ggaacatgta	caacggaaat	3180
gtcagcgggt	gctcaggagg	gctatgccag	tggctacagg	agagggagcg	tggccggggg	3240

ccctgtccac	caccccggac	gctgtcgc	gcagcacagg	ccttgcgatt	cacatacttt	3300
acacgggcat	agaaagagtt	acgttaaaat	taatctcttt	actgatataa	ttaaatttta	3360
aatcctgaga	agaaaagaga	gaagggagaa	tggtgccggg	tgtctagcac	ccccagccac	3420
tggtccagca	caggccatgg	catctgtgca	tccagacacg	gggcgtggca	tgcacacccc	3480
accagggaga	cccaggccag	tggtcccaaa	gcctgctcac	ggcaccttct	actgcaggac	3540
agcagagggg	ccaacagcca	gcctgcagga	gggaggactt	ctggcccaga	tgcaagagca	3600
gctgcaacct	ggcaacaacc	agcagggtgac	tatcaggaga	aaggacctgg	tcacccacat	3660
ggggtgcagc	acagctgtct	ctgctttctg	gaaggcctca	ggctcagccc	caccaggact	3720
gcagacactc	cctgcctggc	cactgccaca	aagagcactt	ctgccacatg	gcagagacac	3780
gcacgttgcc	tggccgcccg	cggcatgtgc	ggaagcccat	agggaccaag	ctggctcggt	3840
ggaggcaggg	cacaagggcg	cagacttcca	aaggctccgg	ccccagctgc	cgcttcacag	3900
tctctcccac	catggcgctc	agcagggtgg	gaccttgtgg	acatttcgta	aacaagtcag	3960
cagccggtga	tatgggcttc	ctggggtgc	aaccacctca	agcacagact	ggaaggccct	4020
gcggtcgagc	tcctcctcta	tctggtgtct	gtagaagtct	gtggcgacca	ggcagaaaag	4080
gttcacgtcc	acctgtctca	gcttgcccat	cctgctgatg	acatgtggga	ggatcgccgc	4140
gaccacggg	ctggtggacg	cgctgacaaa	gaagcaggag	aggctccacg	tggccatggc	4200
gaccggggcc	ctctgcgtga	agttggagag	ggacagcatg	accagtccc	ggacctgga	4260
cgactgccc	gtgctgtgca	gagtctgaaa	caccttatac	accacggtgg	ccatgaactg	4320
ggggtatggc	tgctggttgg	acagaaactc	tccgatgact	ttgttcatga	tgctctgggg	4380
tgggaagaag	tcgtctagaa	actggggcag	gatcctggcc	accactctgg	cttcacaagg	4440
aaagcctttc	ctgatcctat	caaaaagaac	agataccgc	tccatagcaa	caatcactga	4500
ctcgtgtcg	ggggctgcag	gattagggtc	tgaagttcta	cccggactga	ctttctcctt	4560
tcctgtgtac	atgcagggtga	gcatcaggcc	cagagccgcc	atggcccggg	gcgggctgtg	4620
cacgttcact	ctgtccacac	tcagcttgac	cagcgattct	gcatccaggc	gggagagctg	4680
ctcagagagc	aggaggcgct	ccaggcctct	gagggcacag	tggtaaatga	tggagggggt	4740
ggactcctca	cttccagaca	gcatcacccc	acacatctgt	attattgatg	ctgaaaattc	4800
cggccctacg	tccagaggat	agttctcaat	gaggtaaaac	gcagtggcac	acatgaccag	4860
tacgtgtgc	tggtgtgaa	tggtcacgca	gtgggcgatc	cctttcaggt	tggagaggag	4920
atagtcgctg	atgaccggga	tgagctgctt	ggcagtgtcg	tccagcaggt	cgcactccag	4980
cacatagagg	acgccgtgca	gggctccaac	cctgctgggc	aggtggctgc	tcctgagcgt	5040
gctctccagc	aggcggctga	caggctccgc	cacggccttg	tccatcccaa	ggacggcagc	5100
tgcccttgca	gtggcaggca	ccaggtactg	agcgaggatc	tcgtcttctg	aagggtgcac	5160
ccttcgcagt	tctgtcagcg	tcacatacat	cagctcaaac	tggttgcgct	cggtgaacaa	5220
gtctgagacc	actagaaggg	atctgaccac	ctcactgatc	aggatggccg	gggtcctcct	5280
ggctgagctg	gacggcagga	tccagcggct	gtacaactca	agcaaaaact	gcgaacagga	5340
gtggatgtca	actccagccc	ggtgtttcct	ggagttgact	ggagacgtgg	gtggtgacga	5400
aggtgcaggg	gcgtcggcct	cctcctcctc	ttcctcgtcc	cattcctcct	ccctcagggg	5460
tgtgatgctg	ttccccagcc	acacggagtg	tatggacacc	tggccgagtt	tgtagctcat	5520
gctccccagc	tcccgtcggg	ggttgatctg	tagcagcagc	ttctcgtggc	tgatgagggc	5580

acctgtagta	gccggagaca	gagaagggac	aggatcccat	gcctgatata	aatgatgggt	5640
ggcaatatct	tctctctttg	aaaccattgc	ttgaatctct	tgctccacaa	tcctctgat	5700
aatgctcagc	ttctcccaa	acctggtgtc	gagagctttc	agaggcttgt	tcggggctg	5760
ctgctccaag	cagcttacag	ctgggttgcc	ggccacaggc	acagtcatcg	cactgagcac	5820
cagtgagggtg	atggcctgca	cggccaggac	gttgatctgg	gtcctctctg	tgtcttcttc	5880
tggtgggctc	tcctcctgct	ccatcacgag	gggctgcgtc	accaggacac	caaggagggt	5940
ggcccaagtt	tcttcaaact	gagtacgact	gttccagcct	agtgtgttga	tgcggtagat	6000
gaactcctta	aagacttcct	tttctggag	gaactccacg	gggatctcag	ggaatgctgt	6060
gccaaaatcc	cctcccgtt	tgggtgacca	tccaagcttc	cacaccagtg	ggggcacacg	6120
tgtgtagctg	ttgacaaggg	gcaggcgggc	caggctgatg	atgatgttcc	ttagcaatgg	6180
cgtgagaaac	gccggcacgc	cgtatttct	tttatgacc	aaggccaaca	ccgactgcag	6240
agactccacc	atttctgcca	ccatctcaca	ggctgcagtg	atatacttag	gattctgtgt	6300
gtttggatct	acttcttct	cctctctgct	gatggctttt	ggggtatttg	tccttctttc	6360
tggactaaga	agctgctctc	caggctgcac	tgcaacggcc	tccaggatga	agtgcacaca	6420
gtagatgagg	gagcaggcgt	gggtcacaaa	ctctgtggag	gagaccacgc	tccagaggcc	6480
aggcagctgc	agggccaggc	agcagcagtc	cagccctgcc	tggagatcca	gactcagcgg	6540
gatctgctca	tggatcaaat	gccaggacag	ggcctcaagg	gttgccacca	cgaatttcac	6600
aatgtccttc	tctttctcag	gaggaaggtg	caaatgactg	ggcagtttgg	agaccaccac	6660
caggctactgt	gccaggggcc	gggcccagag	gggcagggac	tgatacagtg	cagcatcccc	6720
aaacagatca	ttcaacttgc	tccagtaggc	cgccggctct	gcaggcagct	cgggctggaa	6780
gacatgatgg	acagcaggga	gctgctgcac	gggtccgctc	acacgggcca	gagtcacctc	6840
acgggctgct	tcaaaaagg	cactcttctg	gccaccagaa	atttactca	tccttaggct	6900
taagcatgga	gctagcaggc	ttaggttgaa	ctccgagttc	atcatgaagg	cattcatatc	6960
ttcagcagga	atccgattca	ccagctctgc	accttccagc	agtgcagaat	ctgacctggt	7020
ccaacactgg	gatttgacaa	gatgaacgta	ccagtctttg	tccggactca	ctgtttccag	7080
tgacacgtgc	ccatccccgt	ccagcgggtg	ggaagagact	ggaggagagg	gactaagtga	7140
gtcttgcatg	gtggagagac	gaaacctgtc	cagcagggaa	tagagccttt	ggtgtctctg	7200
agcgagcccc	ctgctctgaa	ggtattcctg	gattctgttg	agttcttcca	ttggcaactg	7260
ggccatgctg	ctctgtaaat	ttgcagccag	aagcatttct	acccggcgac	aagcaaggat	7320
gtcgaccatg	cgagccagca	cacggaaagg	ggtgcacaga	agcctgtcca	catacagcgt	7380
gagcacagct	cccgactggc	tgagatggat	ccctccaag	cactgaagag	ttttcttcag	7440
catggttgga	gttgaaagg	tttcacaacg	agactgaatt	gcctggatga	acaggccgct	7500
ggcagcagag	ttccgatgaa	cggcactgat	gaagtctgt	actggaggct	cgtgggaaag	7560
gctgatcaga	tcttgaatgt	gatttacaat	gagccacgtt	aagtgtcgg	agtcattggag	7620
gttctgacag	acataatcac	agaagagaat	gagagccct	cttcgtacta	tttctctatt	7680
gcacattcca	agtttggctg	ccaagtccga	atcctctct	tctccagaca	tctggggact	7740
aagtaacttt	gtgctggaca	gactgtgtct	tttcggggtc	tgctgcactt	ctgcccacca	7800
gcggtagtcg	gtgtggttga	caagcagcag	tatctgacac	cagagcagca	ccagggccgg	7860
gtgggtgggtg	atcatggaac	gagcccga	gttcaagctg	tccagggtgt	agaaactgcc	7920

gccacagcca	tcactgcgga	acagcctagt	ggcagctgct	gtgattctcc	ggaacattcc	7980
agacttgaag	atgtggatca	gacacattag	cagtgtgcct	agttcctggc	aatagaaagt	8040
atgttgctgc	tcactcattt	ccaccttcag	ctgttttgta	acaatgtctt	ctaaaagaat	8100
accaaccagt	tgtaatagaa	accttgaaaa	tgtttcttct	ggcaaattct	ttatttgttt	8160
cccttcactg	tgttcttcta	gcgttgaagt	actgtcccca	tctcttaacc	tattaattac	8220
tgtacaggag	attaaatacg	gagagaagga	gagctcctga	atacgagaaa	gaacaatata	8280
ttcagttgac	tgggaaatca	gaaccctcaa	aatggccaga	attcccgaata	tccacagttg	8340
aacagtgctc	acggacgcca	ttgtgttttg	agtgcgaac	atactccgta	aaagcatgtc	8400
taccggacgg	agggaggaag	gggccaaaat	ctcaaataat	gtattttaaca	ctccaagggc	8460
ttcatgagag	tcaatgtgca	tctgctgttt	ggctaacatt	gggaggatga	tgtcagctat	8520
ctgtcgagac	agtcgcttcc	acttgctctc	attctccttg	tggcactgct	gcaggacaag	8580
aatgaacatc	tccaacacct	gatggtactg	gatgagtctc	agtaacattg	acaccaccac	8640
ctcttttttg	gtttcaagct	cttttctctg	atcagcttta	tttgttctct	ttaatacaaa	8700
gaggtcgtgg	actatgggct	gcagagccgg	tatggcatgt	gtcacagcct	tccttccact	8760
ggccatgatg	ccatcacaga	gctgaatgat	tttaggaatt	ccaatgatct	gttttgaatg	8820
atagcggtca	taagatagta	ataccaagaa	gaaaaagatg	tttggaatga	ttgcctctga	8880
ttccctgaac	tggcccactt	caatgtattc	aaactgtttc	aatacaaagc	caataaacac	8940
ctgatctgaa	tccagaagac	agtaattaac	ccgtaactga	accagctgcg	ccagcaaata	9000
taaaacctgc	ttctgttaact	gcacacatgt	tgtagtcgtg	tactgtttta	aagcttttat	9060
aacaagaggt	tcaaacaaac	gaatgtgatt	atgaatagca	ttcttatctg	cacggttctt	9120
tgtgacactc	gtgaggtttg	tcttcaactg	ggtagacact	ttctggagga	catcaaacca	9180
tcccagagtg	tcgttctcct	gctccgcctg	caccatgttc	ctcaggctgg	cgtcagcgag	9240
ggcctgggtg	aagtgggtgt	acggggccat	gaagcagtag	tgggtacaagc	ctggcctcac	9300
actggaggag	ccaaggcgct	gtgctcggcc	ttgtgacttg	ctgggggttg	aagataagcc	9360
atcaaactgg	gaggccaagt	ttgtgccaaa	gagagtcttc	aacaattggt	gaacacaaac	9420
agttgccatc	attggttctc	gactaaagca	ggatttcagg	tatcctagga	tctcttcaac	9480
acacttccca	atgtcctgca	gtgtggccag	ctctagtata	tgagaaagaa	catccaaggc	9540
tgagcggaga	aaccctccaa	acttttccgt	gctgttctga	agatccagcg	tgaccttgta	9600
gttagcgtgt	gtagctttca	ggacatcatg	cagtttgagg	tatgaaggaa	gatgatagaa	9660
actccccagt	gatgaggatt	tacttgttgt	aacaggacct	gaggtatcag	attgtctaga	9720
agctgcactg	gcctcactgc	ctttcttggg	actcaacggt	acagatgctt	gttctcctgg	9780
ttctttctcc	ttcccccttc	gtcggatggg	acttagagaa	gggggggttg	ttagagaagg	9840
caaggctgcc	tttattgcgg	gtccaggagc	cacgtcatcc	aggacgtggg	cacaaatgtt	9900
aatcaccttc	agcaggtgag	agaagagctg	ctccaccatg	ggcaccaggg	cccggtcccc	9960
cagggtggc	cagacctcct	cttgcttggt	ggctgctggg	ttggcttctt	cttcagaggc	10020
ccatgaactt	ctcagagatt	tgggagcact	ggctgcaagc	aagtttccgg	ccaaaatcaa	10080
agcatcttga	tgggctgaga	gatccaatgg	gaaccaagct	gacgagagca	gggtcagaat	10140
cattgtggcc	atcccaacgg	tacagctctt	cctagactca	tctgaggcac	tcagtggagg	10200
cactccacag	tgccaacctt	aactccaaat	gcaaactggg	aaggcagtg	aaagaagaca	10260

caaagcttca	cagcatccaa	atgtgagtgc	tctggtggtt	gatgtgatta	gttcatgaga	10320
aactgctgca	ataactcttg	aaaggttatt	ttccatagtg	acgtctgtta	tgcttggtag	10380
taggttatag	cctctatata	ttctggttat	tgtgctgacg	gagaaatgag	atggaggctg	10440
cgtctcatgc	atgagaagtt	tcaggtaaac	actgctttga	tctcttgcca	cggccactac	10500
tggatcagct	tgtccttggt	cacatttata	aaacagcttt	gggacaagcc	taattagtga	10560
tgtgcggca	acatgtcgca	ccctggggtc	ttcatctcca	agcaaagga	tgacaacatt	10620
attgagcact	cgttcttgca	gttttaaaag	ccctgtataa	tgatgagccc	ctctgtgtaa	10680
gttttctgct	tttgcccca	aaaagctcac	cagcctgaag	tcaatctctg	caagggtttc	10740
cagaagctct	gtcctcacca	gccaatagga	actgttcctc	agagtcagca	catcgatgat	10800
cagctgcagt	cctaactcac	tgtagctgct	gctgcagaga	ctcatgacac	agttcctcac	10860
agctgtacaa	gctaacttgc	aagtaacaga	agactcatcc	ttcagtgttt	tccgcagcaa	10920
aggaatgcaa	tccgccaaag	aaaatgtatt	tctgtgagg	gttctaattg	tgcccatcca	10980
atctcccacg	tgggaagcggg	acctgctgag	gatggagcag	atgagggtcc	cacagagaat	11040
ggcagtggct	cctcgaacct	gtgggtctcc	atgatcgatg	tagttcaaga	tgtctgagac	11100
atactgttcc	tcagggtatt	ccgtgggtgc	aagaggaact	ttatagagtt	tgctgaagaa	11160
agattccggg	tggagggccca	cagctgctcc	cacacagctg	agggccaggg	ccttcacgct	11220
gacctcaca	tccctgtccg	gaaccagcac	atTTTTTccc	cctgttagca	aaaacgaagc	11280
agataaaagg	cggacacaaat	ggacaagagg	tgcagagtca	tcatcagtgg	actgtccaat	11340
gtcacctttg	atgcggaag	gcttgttttc	ttgatcacc	ggttcagtag	cttcatctct	11400
caacacaaat	ttatcaacac	tgctgtcaga	aggctgcctg	cagtgactca	tgTTTTTcaa	11460
taaagtgtcc	tggtgaagg	ccatggaaga	gttctgaag	gcctccgagg	cttcatcagg	11520
aagaatacct	gtggcttcct	catcttcac	ctggggctgt	ccaatctgca	ggcccaaata	11580
ctggttgtcg	gtaccgtcta	acacaatttc	agaactgtct	gaaggggtaa	cagctgaatc	11640
aggcccttcg	gtggtggtct	gggagctgtc	gctgatgggc	gacgaggcct	gggtcccatc	11700
attcaggctc	atggcagggt	cagatgggac	ggcgtgacc	tggctggagc	tgtggctcaa	11760
gatatcctcc	tcatcccat	cagtggcaga	gcttgtcaag	tcacagctgg	ccagatccac	11820
tgagtccgcc	tgcagtgtgt	gctgtgaccg	tggtgtttct	gtgatgatgt	catgacctgc	11880
tgacctgga	gtggaacccc	ctgaagaagc	agccagctct	ccactgatct	catccttcac	11940
tgaggctgtt	aaggcagagc	tgctgacatc	cgatctcgat	tcagagtcac	cctccaaggc	12000
ttcttcttct	cctaagagca	ctttgccttt	ttgttttctt	gaaaggacag	ggctgcatga	12060
ggaacccccct	ccagctataa	gttccacaat	actcccacta	cggcttcggc	caccagactc	12120
ctccttagca	gcggtgagct	gccaatgcc	cccactgcg	gtcagggttt	gcagaagctc	12180
gggtggaggc	gttctgaaga	gctgctgcaa	cagctccagg	gctccggtea	caacattgtg	12240
gtcttggtgc	tgtgtatgat	gtaacgtcag	ttcataaacc	tgacaagct	gctctgcaga	12300
aggagagact	tccatttctt	tccttgteac	tccgaagctg	cctttcaggc	ttgtgtcctt	12360
gacctgctgc	tgcagcaagg	gcaccaaata	cctcagggtg	agcagcacgc	caagaatcag	12420
cagagtggag	tgttcatcct	cgacaggaac	gagtaagcct	aagagcacat	ttagtagcca	12480
actatagaaa	tattgtgtcc	ttcttgagtg	ctggcagatg	ctcactgctg	atccagccgc	12540
tgtccgccga	atgggtggggg	agcttgactt	caggttcgct	atgaaggcct	ttaacaaaac	12600

cttaattttca	ttgtcatttg	caaaattgcc	aaaagaagcc	ataatttttg	gaacagctgc	12660
agccaaggtc	tcctggactg	attcttcggg	tctcttgctt	gttcgagtca	ggcacggcag	12720
aaggttcacc	aggtaaggcc	tgcatctctg	aggccgaacc	aggtgagcca	gctcagcaaa	12780
cctccacagg	gcagcacgca	aactccgagg	ggcaccattc	tttttaattt	ccttatagag	12840
ctcgagctgt	aaccttggaa	gattagaatc	catcaaagct	ttgataactt	tgttgaggca	12900
ttcgtcagcc	accatcctga	catctgactc	tgcgatcatc	ctgcacagca	gaaaaagttc	12960
catagcgatg	cccagaagtt	tctgaaattc	tggagaattt	ctgacagact	gtgccactat	13020
gtttttcacat	attgtcagac	aatgattcac	acggctcttt	ttggtagctg	aaagtctctt	13080
ctttggctcg	tgacgcggct	cctcagccac	agccggggccg	ggtggcggcg	ggggcggcgg	13140
cgggggcggc	tgcggtgag	gcagcagcgg	ctgtgcctgc	ggcggcggct	gaggaagctg	13200
aggaggcggc	ggcggcggcg	gcggcggttg	cggctgttgc	tgctgctgct	gctgctgctg	13260
ctgctgctgc	tgctgctgct	gctgctgctg	ctgctgctgc	tggaaggact	tgagggactc	13320
gaaggccttc	atcagctttt	ccagggtcgc	catggcggtc	tcccggcccg	cacggcagtc	13380
cccggaggcc	tcgggccgac	tcgcggcgcc	gctcagcacc	ggggcaatga	atggggctct	13440
gggccgcagg	taaaagcaga	acctgagcgg	ccgtccatct	tggaccctgc	ccggcagc	13498
<210>	7					
<211>	13237					
<212>	DNA					
<213>	小家鼠 (Mus musculus)					
<400>	7					
tttttttttt	ttttttttta	cagcaacaac	aggtggttta	atcgcttctt	taattcaact	60
gtacaatatc	tgcaatttaa	aaattttaaa	tatacatttc	atgtcagtcc	ttccttttgg	120
aaatggacag	ccaggctctag	gctgggctcc	ggggcacacc	catcacagcc	ctcctagttc	180
ccagtgaagc	ccatggcata	cagcagcaag	gcttggacag	gagcccccta	gaatgcagcc	240
aaatctctgc	agataggtct	ctgccaccta	ttatcttaca	cccagcttgc	ggcagagggt	300
gtttccagag	acacttgagg	ggagcagttc	cttcgatggc	tctagagtgt	gacaagcaca	360
catggagggt	ggccctgaac	cttgatatca	tctttagtgt	tcacactgct	cagcattggt	420
tcttctttcc	tggaggctcc	agaccactg	aggaacaatt	cttttcccaa	ccatgatatc	480
ctgagcccac	accagcctc	agcagctcag	tgtcttcgac	tcccacatac	caatccctgg	540
aggacagctt	catgcctgtc	ctggtagcag	ccatgatcct	agtgtcfaat	gctgagggag	600
ggaggggagg	acggagggag	ggaggggagg	agggagggaa	ggaggggagg	aaggagactg	660
tgtggggaag	gatgctcaca	ggtggcaagg	agaccaattc	tgacagccca	caatgggagg	720
caagactcct	tgtgacgtgg	ctgtgagaca	agctattgct	gtataaaacc	tgtcccatga	780
gccggaagca	gagctgcttc	actcactcac	gggaaggtac	ttcctgccag	ggaaggcacc	840
tgtaggatt	ggcccttcc	ctggcactgc	attctacagg	gcaggagggt	gttccactcc	900
agttcttccc	tcctgaaggg	tacatgtgca	gacaaaatga	gagaaccata	aagggcactt	960
ggcagtggct	aagtcaccta	catgtcaagg	gggccatcag	tgggagggag	ggaggcacat	1020
tttgagaag	aaacatgctg	aagtgcattg	ccaaaagttc	taccctggtt	ttattaaaat	1080
ctttcctgac	agtaccacca	tggaaacaga	aacaacatcc	cacctcctac	ccctaaaacc	1140

tcatagtcaa	aataactttt	gtttttaaat	aaagcttgga	aatctttaga	tttttgagga	1200
atttgataaa	aagtttttagt	ccctcctgca	gttagacagg	tggggcaatg	tctccagtga	1260
gactttaatg	agctatggac	ttttaaaaaat	tgagtcccat	tctcagatgc	tagactcaca	1320
aagctgactg	tatgtggcag	ttgcaagaaa	agtctgcttt	cagaaaaaac	aggcaggcat	1380
tttttagaggc	cttgcatatg	tctttgagga	ttgtgtgtgt	gtttatgtgt	gtacacaaat	1440
acatacctgc	ctgtacccag	gtgcatctct	aggttgtggc	acccatgagc	agacaacaac	1500
tttgtggcag	aggctgtcct	tgccccatac	taagaattgt	ttctgatcac	actaaacaag	1560
aggccaacta	aacttgaggt	tgagctcact	gatataatcc	cctggtgaat	ggctctagat	1620
tttatattga	gtttccttat	gaacatctac	catgaggagt	aatcaggcct	gcaccatgct	1680
catctcagag	cggttggacc	aacctcagag	tgtggcagca	gcactgtaag	aactttcaca	1740
tggtccccga	gcacttctag	gcgggaaatt	gagggtgaca	agaagaagcc	ctaaatcagc	1800
aaaggggcat	tggtgaattt	ctttcattaa	aattcagtag	cttcccttaa	cgctctcttg	1860
aaagacctaa	tccatgtcca	ctgttctgt	taccacgcct	tgggggtggtt	tttgccaggg	1920
cagataggag	gagagtcagg	ccaagtgtga	ggctccccac	aacctgtgtt	tggtagggaa	1980
ccttgcatcc	cagcagcaag	gctacttgtc	atgatggaaa	gatagaggga	aattcaaggg	2040
tctcaagaaa	gcaatccatg	gactgaagca	cagttagtta	atcacaggct	gcaagctctt	2100
tcctcctgtg	tagcctagaa	acatctccaa	actattccac	tcccctactc	tacagctgag	2160
aaatacagat	atgacttagc	ggaacagcag	aaaatctgct	tggtcatata	gtcaaacagc	2220
aaacagagtt	cccaaaccac	gccaggaaat	gaaggtagct	cattttcatt	aacatgacct	2280
ggttactctg	ggcttgggct	ttgggaagag	gtggctctga	ccagcatggg	aagctgtctg	2340
aggccagagg	ctgacctgat	tttgaacctt	ccctttgggtg	cctcatcttg	tcagctgagt	2400
cctccctggg	ctctgacagg	cataggtctg	tactctactg	ggctgacaga	aggcaagatg	2460
ggaaggggca	aaagaggctc	tgggtccatt	cttaactggt	gctaggacac	caagctttcc	2520
cttgactatg	agaaactgag	acaaaccaac	aaaccatagc	tcagagacac	ctttggggta	2580
atcaggctcag	cacttctcag	gtcccaacca	tgcagaagat	acaaagggac	agacagcatc	2640
cacaatggtc	agctgggtgtg	tgggcaggct	acagtgcagg	tcagccacaa	ccagggatga	2700
ggttatttggg	atagccactt	tgggtccagc	agatgctggt	tctaccagg	ctgagagact	2760
aggagagtgc	atcaacacca	gggaggagat	agcttgacag	tcatgcctgg	gaaggggaga	2820
ggagggcagc	tgccacaggg	caagcctctt	ataactetaa	cagtggaggt	cagtttttca	2880
gttcctcagt	taggccacag	gcaggattct	cacacaggca	gtcaatacca	acacctctct	2940
ctgtgctggc	ttaatggaat	gcataagaaa	agggagctgt	atgaagtgca	agtgccacag	3000
ggtgttggga	gggctacagg	agggacctgc	ccgactagac	tgagtagcta	caggagaggg	3060
agtggcggcc	agaaggcccc	tccacttcca	taaactttgt	cacatgcagc	acaggccttg	3120
ccaagtcaca	cactttacac	gggcatagga	aaagttacat	taaaattaat	ctctttactg	3180
atataattaa	atttttaactc	ctgagaagaa	aacacagaaa	ggaaaatggt	gctggacacc	3240
tggcagcccc	agttcccagc	cccacacacc	attcattttg	tgtccagaca	ctgggtgtggc	3300
aggatatgcct	actgggtaaa	tgtgggaggg	agctctccag	cccagtggag	caggcgggct	3360
cagaaccatc	tggcaagagc	taggacttct	gatccacata	ccagggcagc	tgcaacctgg	3420
cgactatggc	caggggaaca	ctaggaaaaa	gacaaacacc	tggtcaacct	agcactgtca	3480

ccagctgcag	cgaggccagg	accaggact	caggctcaac	cccaacatag	tgcatgttcc	3540
ctgcatagcc	ctcattgcaa	agcactcctg	ccattgcctg	gctgtccact	tgacacaagt	3600
ggaagcctgc	acggccaagg	cagccccagc	agaagcttgg	agcaggctcc	tgagggtca	3660
ggccccagca	gctgccttct	ttcagccttt	tgtcccacag	gcactactca	gcaggtggtg	3720
accttgtgaa	cattttgcaa	acaagcaagc	agcctgtggt	atggacttcc	tggtgcagcc	3780
accacctcaa	acacagactg	gaaagccctg	cggtcgaatt	cctcctctat	ctggtgtctg	3840
tagaagtctg	tggcaaccag	gcagaaaagg	ttcacatcca	cctgttccag	tttgcctatc	3900
ctgctgatga	catgtggaag	gatcgagaa	acccatgggc	tggtagatgc	gctaacaagg	3960
aagcaggaga	ggctccacat	ggccatggca	actggagttc	tttgtgtgaa	gttgacagg	4020
gacagcatga	cccagtcccg	gacatggat	gactgccag	cactgtgcag	agtctgaaaa	4080
accttgtaaa	ctacagtggc	catgaactgt	gggtatggct	gctgattgga	caggaactct	4140
ccaatgactt	tgttcatgac	atcttgaggt	ggaaagaagt	catctaggaa	ctgaggcagg	4200
atccttgcca	caaccctggc	ttcacaggga	aatcccttgc	ggatcctatc	aaagagaaca	4260
gacactcgct	ccatagctac	aatcacagac	tcgctgtcag	gtgtagcagg	gctggggtea	4320
gaagctctgc	ctggactggc	tttttccttt	cctgtgtaca	tgcaggtgag	catcaggcct	4380
agggctgcca	tggccctgtg	tgggctttgt	acattcactc	tgtccacact	tagcttgacc	4440
aaggactctg	tgtctagccg	agatagctgc	tcagacagca	ggagccgctc	cagaccccg	4500
agggcacagt	ggtaaagtat	ggaggggggtg	gactcctcac	ttccagacag	cattactcca	4560
cacatctgta	tcacagatgc	tgaaaattct	gttcccacat	ccagagggtg	gttttccatc	4620
aggtagaaa	cagtggcaca	cattaccagc	acatgctgct	ggctgtgaat	gttcacgcag	4680
tgggctattc	ctttgaggtt	ggacagcaga	tagtactaa	caactggaat	gagctgcttt	4740
gcagtgtcat	ccaagaggtc	acactccaac	acatagagga	tgccgtgcag	ggctccgatc	4800
tggctgggca	ggtggctgct	cctcagtgtg	ctctccagta	ggcggtgac	tggctctgcc	4860
acagttttgt	ccattccaag	gacagcagct	gccttacagg	tggcaggcac	caggtactga	4920
atgaggatct	catcttctga	agggtgcact	ctccgtagtt	ctgtcagcgt	cagatacatc	4980
atttcaaact	gggtacgttc	ggtgaataag	tctgacacta	caagaagaga	tcgaaccact	5040
tcactgatca	ggatgacggg	ggtccttctg	gctgcactgg	atggcaggat	ccatcggtg	5100
tacaattcaa	gcagaaactg	cgaacaggag	tgaatatcaa	ccccggcacg	gtgttttctg	5160
gaattgactg	gagacacagg	tggtgacgtt	ggtgcaggga	catcactttc	ttcctcttct	5220
tcctcatccc	attcctcctc	tctcaggggt	gtgatgttat	ttcccagcca	cacggagtgt	5280
atggacacct	ggcccagctt	gtagctcatg	ttgcctggct	cccgtctctg	gttgatctgc	5340
agcagcagct	tgtcatggct	gataagagca	cctgtagtag	ctggtaacag	agaagggaca	5400
ggatcccacg	cctggtgaga	atggtgagtg	gcagtattct	ctctctggga	aaccatctct	5460
tggatttctt	gttctacaat	ccctctgatc	atgtcagct	ttcttccaaa	tctggtatcg	5520
agagccttca	gtggcttggt	ccggggctgt	tgctccaagc	agcttacagc	tggattgcca	5580
gccacaggca	cggtcattgc	actgagcact	agagaggtga	tggcctgcac	agccaggaca	5640
tggatctggg	ttctttctgt	gtcttctct	ggtgggctct	cttctgttct	catcaccagg	5700
ggctgagtca	ccaggacacc	aaggagggtg	gccaagtgtt	cttcgaactg	ggtacgattg	5760
gtccacccta	gggtgttgat	gcggtagatg	aactccttga	ggatctcctt	ctcctggagg	5820

aactctacag	ggatctcagg	aaacactgtg	ccaaaatccc	ctccaggctt	gggtgaccac	5880
ccgagtttcc	ataccagagg	aggcacacga	gtatagctgt	taactagggg	gagtcgggcc	5940
agactgataa	caatgttctt	cagcacagct	gtgagaaatg	aaggcagggt	gctgttcctc	6000
ttgtggccca	aggccagcac	tgactgcagg	gattccacca	tgtctgccac	catctcgag	6060
gccgaagtga	catgactgag	gttttgtata	tctgagtcta	cttcctcctt	tctgacagct	6120
cttggagtat	gtgacctgct	ttcaggaccg	agaagctggt	ctccaggttg	tactgcaatg	6180
gcttccagga	tgaatcgcac	acaatggatg	agggagcagg	catgagtcac	gtactctggg	6240
gaggacagca	ccccccagag	gccaggcacc	tgtagtgcca	ggcagcagca	gtctagcccc	6300
gcttggaggt	ccagactcag	tgggatctgc	tcatggatca	aatgccatga	cagggcctca	6360
actgtcatta	ccacaaactt	caccgtgtcc	ccctccttct	caggaggaag	gtgcaaata	6420
gcaggcactt	tggagagcac	caccaggtac	tgtgccaggg	cacgggcaag	tatggtcaga	6480
gactggatat	atgtggtatc	accaagcaga	tcattcaact	tgttccagta	ggccgtgggc	6540
tctataggca	ggaagggtg	gaagacttga	tggacagcag	gaagctgctg	aacaacactg	6600
gtcaccgggt	tcagaatcac	cccacgggct	gcttcaaaga	ggggactctt	ttggccatta	6660
gcaatctcgc	tcatgccaa	gcttaaacag	ggagccaaaa	ggcttaggtt	gaactccgag	6720
ctcatcatga	agtcattcat	atcttcagca	gggatacgtt	tgaccagctc	tgcaccttcc	6780
agcagtgcag	aatctgatct	ggtccaacac	tgggatctga	caagctggag	gtaccagtct	6840
ttgtctggac	tactgtttc	cagagatgtg	tgcccatccc	catccagtgg	gtgggaagtg	6900
actgggggca	aggggctaag	tgagtcctgc	acagtagaga	gtcggaatct	gtccagcagt	6960
gaatagagcc	tttgggtgtc	ttgtgcaagc	ccactgttct	ggaggtgttc	ttggattctg	7020
tttagttcct	cctctggcaa	ctgggccatg	ctgctctgta	aatttgcagc	caaaagcatt	7080
tctacccggc	gacaggccag	ggtgtcgacc	atgcgagcca	gcgcacggaa	gggggtgccc	7140
aggagcctgt	ccacatatag	tgtgagcaca	gcaccagact	ggctgagatg	gatgccttcc	7200
aagcactgaa	gtgttttctt	cagagtgggt	ggcgttgaaa	gattttcaca	gcgagactga	7260
attgcctgga	taaaaagacc	actagctgca	gaattacgat	gaatggcact	aataaagtct	7320
tgtactggag	gctcatgaga	caagctgata	agatcttgaa	tgtgattcac	aatgagccat	7380
gttaagtgtt	ctgagtcata	gagattctga	cagacataat	cacagaagag	aataagggcc	7440
cctcttcgca	ctatttctct	attgcacatt	cccagctgag	ctgccgagcc	agaatcctcc	7500
tcttcgccag	acttctgggg	gttaagtga	ttcgtgcagg	acagactgtg	tctcttgggt	7560
gtctgctgca	cctctgcccc	ccaccgggtg	tcagtgtggt	tgatgagaag	taggatctga	7620
caccagagca	gtaccagggc	tgggtgcgtg	ggcaccatgg	atcggaccgc	tgcattcagg	7680
ctctctagag	tatagaagct	gccttcacag	ccatcactgg	tgaagagtct	agtggcagct	7740
gctgtgattc	tccggaacat	tccagatttg	aatatgtgga	tcagacacat	gagcagtgtg	7800
cctagctctt	ggcagtagaa	cgtatgtctg	tgttcaactc	tgtccacttt	gagctgtttt	7860
gtaacgatgt	cttctagaag	aataccaacc	agctgtaaaa	gaaaccttga	gaatgtatct	7920
tctggcaaac	tcttttgttt	cccttcgctg	cattctccta	gtgttacatt	accgcctcca	7980
ccccttaacc	tgtaaatcac	tggacaggag	agcaagtgtg	gagagaagga	gagctcctga	8040
atacgacaaa	gaacaatgtc	ctcggttgac	tgggaaatga	gaaccctcag	aatggcgagg	8100
attccagata	tccacagctg	cacagtgtct	acagatgcca	ttgtgcttgg	agtgatgaac	8160

atactccgca	aaagcatgtc	cacaggacgt	agggaggaag	gagccaaaat	ctcaaacaag	8220
gtattttaaca	ctccaagggc	ttcatgagag	tcaatatgca	tctgtctgctt	ggccaacatg	8280
ggcaggatga	tgtctgcgac	ctgccgagag	agccgtttcc	acttgtcctc	attctccttg	8340
tggcactgct	gcaggacaag	gatgaacatc	tccagcacct	gatggtactg	gatgagtcgt	8400
aacagcatgg	agaccaccac	ctccttctgt	gtctcaagct	ctttccctgc	atcagcttta	8460
tttgttcctc	gtaacacaaa	gaggtcatgg	acaatgggct	gcagagcagg	tatagcatgt	8520
gtaacggcct	tccttccact	ggccatgatg	ccatcacaca	gctggatgat	tttaggaatt	8580
ccaatgatct	gttttgaatg	gtagcgtca	taagacagta	ataccaggaa	gaaaaatata	8640
tttggataa	ttgcctctga	ttccctgaac	tggcccaactt	caatgtactc	aaactgcttc	8700
agcacaaaacc	cgatgaacac	ctggtctgaa	tccagtagac	agtaattgac	ccgtagctga	8760
accagctgtg	ccagcaaate	caaaacctgc	ttctgcaatt	gtacagatgt	tgtcgtggtg	8820
tactgcttca	atgcttttat	aacaagaggc	tcaataaacc	taatgtgatt	atgaatagca	8880
ttcttatctg	cacggttctt	tgtgacgctt	gttaggttcg	tcttcaattg	ggcagacact	8940
ttctggagta	catcaaacca	ccccgaggca	tcacgtcctt	gctccgcctg	caccatgttc	9000
ctcaggcttg	cgtcagccaa	ggcctgtgtg	aagtgcgtgt	atggtgccat	gaagcagtag	9060
tgatataagc	cgggcctcac	acttgaagag	ccaaggcgt	gagctcggca	ctgagacttg	9120
ctgggggttg	aagataagcc	atcaaactgt	gaggctaagt	ttgtcccaaa	gagagtcttc	9180
aatagctgct	gcacacagac	agttgccatc	attggttctc	gactaaagca	ggatttcagg	9240
tatccaagga	cctcttcaac	acactttcca	atgtcctgca	gtgtcgccag	ctctagaatc	9300
tgagaaagga	cgtccaaggc	agagcgcagg	aaccccccaa	acttttcagt	gctgtttctga	9360
agatctaagg	tgaccttata	gttggcgtga	gtggctttca	ggacatcatg	cagtttgagg	9420
taggagggga	gatggtagaa	actccccagt	gaggatgatt	tacttgctgt	gacaggtcct	9480
gaggtgtctg	attgtcgaga	ggctgcactg	gcctcaccaa	ctttcttggg	actcattgga	9540
gtagaagctt	gttctccagg	ttctttctcc	ttccctttcc	gtcgaatagg	acttagagaa	9600
gggggggttg	ttagagaagg	caaggctgcc	ttgattgctg	gtccaggagt	cacatcgctc	9660
aagacatgag	cacagatatt	gatcaccttc	agcaggtggg	agaaaagctg	ctccaccaag	9720
ggcactagag	tccgatcccc	cagagcaggc	cagatttcct	cctgtctggt	ggctgctgag	9780
ttggcttctt	cttcagaggt	ccatgaactt	ctcagagact	tgggggcact	cgctgctagc	9840
aagtttccag	ccaaaatcaa	ggcatcctga	tgggctgaga	gatccagtgg	gaaccaagct	9900
gatgaaagca	aggtgagaat	catggaggcc	atcccaacag	tgcagctctt	cctggactca	9960
tcagaggcac	tcagtggggg	cactccacag	tgccatccta	aactccaagt	gcaaactgga	10020
aaggctgctg	agagaagaca	caaggcttca	cagcatccaa	atgtgagtgc	ccgtgttggt	10080
gacgtaatga	gttcatgaga	aactgcggca	acaactcttg	agagattggt	ttccatggtg	10140
acatctgtta	tacttggcag	taagctatag	cctctataga	ttctggtgat	ggtgctgaca	10200
gaaaagtgtg	atggtggctg	ggtctcatgc	atgaggagct	tcaggtagac	actgctctga	10260
tcctctgcta	cagccacaac	tggatcagct	tgtccttggt	cacacttgta	aaacagcttt	10320
gggacaagcc	ttgttaatga	tgttgacgca	acatgtcgaa	ccctggggtc	ttcatctcca	10380
agcaaataaa	tgaccacatt	attgagtact	cgttcttgta	gttttagaaa	ccctgtataa	10440
tgatgagccc	ctcgggtgaa	actttctgct	tttgcttcca	aaaaactcac	gagcctgaag	10500

tcaatctctg	ccagagtgtc	cagcagttcg	gtcctcacca	gccagtagga	gctgtttcttc	10560
agaggcagca	tatcaataag	cagttgtaat	cccaagtcac	tgtagctgct	gctgcaaaga	10620
ctcaggacac	agtgccctcac	agctgtacaa	gccaaacttg	aagtaacaga	agattcatcc	10680
ttcaacgttt	tctgcagtaa	aggaatgcag	tccaccagag	aaaatgtatt	tcctgtcagg	10740
gttctgatgt	tgcccagcca	gtcaccaaca	cggagacggg	acctactgag	gatggagtag	10800
acaaggggtcc	cacagagaat	ggcagtagct	cctcggacct	gtgggtctcc	atgatcgatg	10860
tagttcaaga	tgctagaaac	atactgttcc	tcagtacttt	ccgtgggtatt	aagaggtact	10920
ttgtacagtc	tgctgaagaa	cgactctgga	tgaagggcc	cagccgcacc	aatgcagctg	10980
agggccagg	ccttcacact	gactctcacg	tctctgtctg	gaaccagtgc	tttcttttca	11040
ccagttaaca	aaaaggaagc	agataaaaga	cggacacaat	gtaccagagg	agcagaatca	11100
tcatcattag	gctgtcctat	gtcacctttg	attcggcaag	gcttgctttc	tggtactctg	11160
gcttcagcaa	cctcatctct	tgttacatac	ttatctatac	tgctgtcgga	aggctgcctg	11220
ctatggccca	ttctttccaa	caagtgtgcc	tggtgaagg	ccagagaaga	gtttctgaaa	11280
acatctgaga	cttcaccaga	aagaacacct	gcagctccct	cctcatcgtc	ctcctgtggc	11340
tgtcctatct	gcatgcctaa	atactggcta	tcggcaccat	ctaacacaat	ttcagaactg	11400
tccgaaggag	tcacagctga	atcaggtcct	tcagtggtag	tctgagaact	gtcactgatg	11460
ggtagaggagg	cctgggtccc	atcattcagg	tccatggcag	ggtcggatgg	gacagcactg	11520
aactggctgg	agctgtggct	caagatgtcc	tcctcatccc	catcagtagc	agcactggtc	11580
aggtcacagc	cggacaaaac	cacagagtct	gcttgaagt	tgtgctggga	tctaggctgc	11640
tcagtgatga	tgctgtgacc	aacagaacca	ggagtggaaa	cacctgaaga	agcagcgagc	11700
tctccaccaa	tctcactctt	cacagaggct	gcaaaggctg	agctgctgac	atctgacctg	11760
gactccgagt	catcttccaa	ggcttcttcc	tctcctaaga	gcactttgcc	tttctgcttt	11820
cttgagagga	cagggtcgca	cgaggaaccc	cctccagcta	aaagctccac	gatgctcccc	11880
ctgcggcctc	ggccccgggc	ctcttcttga	accagagtga	gctgccaag	ccctcctggt	11940
gtggtcagtg	cttgaggag	ttcaggtagga	ggggtacgga	agagctgctg	caggagctcc	12000
agtccccctg	tcaccacatt	gtggtcttgg	tgctgagtat	gatgcaaagt	cagttcataa	12060
acctggacaa	gctgctctgt	agaaggagag	acttccattt	ctttccgtgt	caccccaaag	12120
ctgcctttta	gacttgtgtc	cttgacctgc	tgctggagca	agggcactag	acacctcaat	12180
gtgagcaaca	caccgaggat	caggagagt	gagtgtcttt	cttccatggg	aaccagcaga	12240
cctaggagga	cattaaggag	ccagttgtag	aagtactgtg	tcctcctaga	atgttggcag	12300
atgctcacgg	ctgagccggc	tgctgtccgc	cgcacggtgg	gagagcttga	cttcagattt	12360
gctatgaaa	ctttcaacag	aaccttaatt	tcattgtcat	ttgcgaaatt	gccaaaagaa	12420
gccataattt	taggaacagc	tgacagcaag	gtctcctgaa	ctgattcctc	cggctctttg	12480
cttggttcggg	tcaggcatgg	aagaagattc	accaggtaa	gcctgcactt	ctgaggtcga	12540
accaggtgag	ccagctcagc	aaacctccac	agggcagcac	gcaaacttcg	aggagcacca	12600
ttctttttta	tttccctata	gagttctaac	tgtagccttg	gaagattaga	atccatcaaa	12660
gctttgatga	ctttgttgag	gcactcatca	gccaccattc	tgacatctga	ctccgcateg	12720
tcactgcaca	gcagaaaacag	ttccatagcg	atgcccaaga	gtttctgaaa	ttctggagaa	12780
tttctgagag	actgtgccac	aatgttttca	catattgtta	gacaatgatt	cacacggtct	12840

ttcttgggtg	ctgagagttc	cttcttttgg	cggtgcagcg	gttcctctgc	cggacctggc	12900
agcggcgggtg	gtggcggcgg	cggctgcccc	tgaggcggcg	gctgaggggg	ttgaggcgga	12960
ggcggcggcg	gcggtggcgg	cggcgccctgc	ggcggtggct	gctgctgctg	ttgctgctga	13020
aacgacttga	gcgactcgaa	agccttcctc	agcttttcca	gggttgccat	gacggcttcc	13080
tgccccgatgg	gacagaccct	gaagacttgg	agcctactgg	cactacgcgg	cgccacttag	13140
cagcaaggca	atgaatgggg	ctctgcgcgg	caggcagaag	cggaaccaag	gcgctcagcc	13200
atcttggggc	cgccccggca	accctcgcgg	cgagtgc			13237
<210>	8					
<211>	13189					
<212>	DNA					
<213>	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)					
<400>	8					
aacagcaaca	acgggtagtt	taattgcttc	tttaattcaa	atgtacaata	tctgcaattt	60
aaaaatttta	aatatacatt	tcatgtcagt	ccttcctctt	ggaaatggac	ggccaggtct	120
aggctgggct	ccggggcata	cccatcacag	ccctcctagt	tcccagtga	gcccattggca	180
tacagcagca	aggcctggac	aggagcccc	tagaatgcag	gcaaattctt	gcagataggt	240
gtctgtcacc	ttacaccag	cttgtggcag	agggtgtttc	cggacacttg	aggggagcag	300
ttccttcgat	ggctctaaag	tgtgacaagc	acacatggag	gtggccctga	accttcattg	360
catcttcagt	tgtcacactg	ctcggcattg	gttcttcttt	cctggagggt	ccagaccac	420
tgaggaacag	ttctcttcca	aaccgtgata	tcctgagccc	ccaccagcc	tcagcagctc	480
tcagggtctt	ctactccac	ataccaatcc	ctggaagaca	gcttcgtgcc	tgtcctggca	540
gcagccatga	tcctagtgtc	caccgttgag	ggaggaggag	aggaggag	gcaggcaggc	600
agtggggaag	gatgctcacg	agaggcagga	ggagactaat	tctgcagccc	tacaatggga	660
ggcaggactc	cttgccagg	ggctgtgagc	caagctattg	ctgtataaac	cctgtcccat	720
gagctgaaag	cagagctgcc	tcactcacag	gaaggtactt	cctgccagg	agggcacccg	780
ttagggtcag	tgccttccct	ggcaccgcag	tctacagggc	aggaggtggt	tccactctag	840
tccttccctc	ctgaagggtg	catgtgcaga	caaaatgaga	gaatagtaaa	gggcacttgg	900
cagtggcaaa	gtcaccta	gtcaaggggc	catcagtggg	aggaggcac	atcttggaga	960
agaaacatac	ttaagtgc	tgccaaatag	ttctacctg	gttttactaa	aatctttcct	1020
gataatacca	gcaggaaaac	agaaacaaca	tccacctcc	taccccaaa	acctcacagt	1080
caaaattact	ttttttttt	ttaaataaag	ttggaaatcc	atagattttt	gaggaatttg	1140
ataaaaagtt	ttagttcttc	ctacagttag	acagggtggg	caatgtcttc	agtgggactt	1200
taatgactat	ggacttttaa	aaattgagtc	ccattctcag	atgctagact	cacaaagctg	1260
actgtatgtg	gcagttacaa	gaaaagtctg	ctttcaggaa	gaatggacag	gcatttttag	1320
aggctttgca	tatgtctttg	agggtgtgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgcgtgtgt	1380
gcgtgtgtgc	ctgtgccag	gtgcactctc	aggttgacgc	acccatgagc	agacaacagc	1440
tttgtagcag	aggctgttct	tgtcccatac	taagagttat	ttctgaccac	actgaacaag	1500
agaccaacta	aactggaagt	cactgatata	aacccaggt	gaatggctct	agattttata	1560
ttctgttttc	ttatgaacat	ctacatgag	gagtaatcgg	taatcaggcc	tgcaacatgc	1620

tcatctcaga	gctgttggac	caactttaga	gtgtggcagc	agcattgtga	gaactttcat	1680
gtggtctcca	agcacttcta	ggagggatat	ctagggtaac	aagtagaaac	cctaaatcag	1740
caaaggggca	ttggtgactt	tctttcatta	aaattcagta	gcttccttta	aggtcctctt	1800
gaaagacctg	atccatgtcc	actgttcctg	ttaccatgac	accaggatgg	gctgggctgg	1860
cttgacagtgg	cctttgccag	ggcagatagg	aatagaatca	ggccaagtgt	gaggctcccc	1920
acaacctgtg	tacctgtgtt	tggtagggaa	ccttgcatcc	cggcagcctt	ttaatcatca	1980
tgatgggaaa	acagaaggaa	attcttaaga	aagcagtcca	cagactgaag	cacagttaat	2040
tagtcatagg	ctgcaagctc	tttctctccc	tgtagcctag	aaacagctcc	aaattactcc	2100
tctccccact	ctgcagtcga	ttggtacaga	caggactgag	tgggcagcag	agagcccgct	2160
cagtacacaca	gccagcagag	ctcctggacc	aagccagggg	acgaaggcag	cctgtgtcca	2220
gggctcattc	tcatcaacat	gtcctggcta	ctctgggctt	gggccttggg	aagaggcggc	2280
tctgaccagc	agcacgggaa	gctgtctgag	gccataggct	gacctgattt	tgaaccttcc	2340
ctttgggtgcc	tcatcttgtc	aggccgagtc	ctcccttggc	tctgaaaggc	ataggtctgt	2400
actgtaaggg	ctgacagaag	gcaagatggg	aaggggcaaa	agaggctctg	gttccattct	2460
taattgttgc	taggacattg	agctttccct	tgaccaagag	aaacggagac	aaccaacaag	2520
ccatagctca	gagacacctt	tggggtgatc	gggctagcat	tcctcaggtc	ccaacctgac	2580
agaagataca	aagggaacaga	gagcatccac	aatggtcagc	cgggtgtctg	gcaggctaca	2640
gcccagggtca	gccacgacca	gggatgagat	tattgaaata	gcctcttttg	gtccagcaga	2700
tgctgtctct	gcccaggctg	agagactagg	agagtgcac	aacactagt	agtagacagc	2760
ttgatagtca	tgcctggggg	aggggtgggg	gtctgccgca	gggcaagcct	ctcttaattcc	2820
taagtggaag	tcagtctcat	aagctgggcc	acaagcagga	ttctcacata	gggcagttaa	2880
caccaacacc	actctgtgct	agtcaaatgg	aatgcataag	aaaaaggagc	cgtgtgaagt	2940
gcaagtgcc	taggggtgtg	ggagggctac	atgagggacc	tgcccgacta	gactgagtag	3000
ctacaggaga	gagagtgggt	gccagaaggc	gcatccactt	ccataaactt	tgtcacatgc	3060
agcacaggcc	ttgccaagtc	acacacttta	cacgggcata	ggaagagtta	cattaaaatt	3120
aatctcttta	ctgatataat	taaattttta	ctcctgagaa	gaaaacagag	aaagggaata	3180
tgatgctgga	cacctggcag	tcccagttcc	cagccccac	accattcact	ttgtgtccag	3240
acactgggtg	ggcaggtaca	cctgctgggt	aaatgtggga	gggagctctc	cagcccagtg	3300
ggacaggggg	gctcagaacc	atcttacaag	agctcggatt	ctgttccaca	taccagggca	3360
gctgcaacct	ggcaactatg	gccagggcaa	cactaagaaa	aagacaaaca	cctggtcaac	3420
ctagcactgc	caccagctgc	agtgatgcca	ggaccagga	ctcaggctca	accccaacat	3480
agtgcattgt	ccctgcatag	ctctcattgc	aaagcactcc	tgccattgcc	tggtgttcca	3540
cttgacacaa	gtggaagcct	gcacgtccaa	ggcagcctta	gcagaagcct	ggtgcaggcc	3600
cctggaggct	gtagccacag	cagttgcctc	ctctcagcct	cttgttccac	aggtactact	3660
cagcaggcgg	tgaccttgtg	aacattttgc	aaacaagcaa	gcagcctgtg	gtatggactt	3720
cctggtgctg	ccaccacctc	aaacacagac	tggaaagccc	tgcggtcgaa	ttctctctct	3780
atctgggtgc	tgtagaagtc	tgtggcaacc	aggcagaaaa	ggttcacatc	cacctgctcc	3840
agtttgccca	tcctgctgat	gacgtgtgga	aggattgcag	aaacccatgg	gctggtagat	3900
gcactgacaa	ggaagcagga	gaggctccac	atggccatgg	caactggagt	tctttgtgtg	3960

aagttggaca	gagacagcat	aaccaggtcc	cggaccatgg	atgactgccc	agcactgtgc	4020
agagtctgaa	aaaccttgta	tactacagtg	gccatgaact	gtgggtatgg	ctgctggttg	4080
gacaggaact	ctccaatgac	tttgttcatg	acatcttgag	gtggaaagaa	gtcatctaga	4140
aactgaggca	ggatccttgc	cacgaccctg	gcttcacagg	gaaatccctt	gcggatcctg	4200
tcaaagagca	cagacactcg	ctccatagct	acaatcacag	actcgctgtc	aggggtagca	4260
gggctggggg	cagaagctct	gcctggactg	gctttttcct	ttcctgtgta	catgcaggta	4320
agcatcaggc	ctagggctgc	catggccctg	tgtgggcttt	gtacattcac	tctgtccaca	4380
cttagcttga	ccaaggactc	cgtgtctagc	cgagagagct	gctcagacag	caggagccgt	4440
tccagacccc	ggagggcaca	gtggtaaagt	atggaggggg	tggactcctc	acttccagac	4500
agcattactc	cacacatctg	tatcacagat	gctgagaatt	ctggccccac	atccagaggg	4560
tagttttcca	tcaggtagaa	tgcagtggca	cacatcacca	gcacatgctg	ctggctgtga	4620
atgttcacgc	agtgggctat	tcctttgagg	ttggacagca	gatagtcact	aacaactgga	4680
atgagctgct	ttacagtgtc	atccaagagg	tcacactcca	acacatagag	gatgccatgc	4740
agggtccga	tctggctggg	caggtgggtg	ctcctgagtg	tgctctccag	taggcggctg	4800
accggctctg	ccacagtttt	gtccattcca	agaacagcag	ctgccttaca	ggtggcaggc	4860
accaggtatt	gaatgaggat	ctcatcttct	gaagggtgca	ctctccgtag	ttctgtcagc	4920
gtcagataca	tcattttcaaa	ctgggtacgt	tcagtgaata	agtctgacac	cacaagaaga	4980
gatcgaacca	cttcaactgat	caggatgaca	gggttccttc	tggctgcact	ggatggcagg	5040
atccaacggc	tgtataattc	aagcagaaac	tgcgaacagg	agtgaatatc	aacccagca	5100
cgggtgtttc	tggaaattgac	tggagacaca	ggtggtgatg	ttggcgcagg	ggcatccgct	5160
tcttcctcct	cctcctcatc	ccattcctcc	tctctcaggg	gtgtgatgtt	gttccccagc	5220
cacacggagt	gtatggacac	ctggcccagc	ttgtagctca	tgttgccctgg	ctcccgtctt	5280
gagttgatct	gcagcagcag	cttgtcatgg	ctgataagag	cacctgtagt	agctggtaac	5340
agagaaggga	caggatccca	tgcctgggtga	gaatgatgag	tggcagtatt	ctctcttttg	5400
gaaacatctt	cttggatttc	ttgttctaca	atccctctga	tcatgtctaa	ctttcttcca	5460
aatctgggtat	cgagagcctt	cagtggcttg	ttccggggct	gttgctccaa	gcagcttaca	5520
gctggattgc	cagccacagg	cacagccatt	gcgctgagca	ctagagaggt	gatggcctgt	5580
acagccagga	cgtggatctg	ggtcctttcg	gtgtcttctt	ctggtgggct	ctcttcctgt	5640
tccatcacca	agggtctgag	caccaggaca	ccaaggaggg	tggcccaagt	ttcttcgaat	5700
tgagtacgac	tgggtccacc	taggggtgtg	atgcggtaga	tgaactcctt	gaggacctcc	5760
ttctcctgga	ggaactctac	agggatctca	ggaaacactg	tgccgaaatc	ccctccaggc	5820
ttgggtgacc	acccgagttt	ccataaccaga	ggaggcacac	gagtatagct	gttaacgagg	5880
gggaggcggg	ccagactgac	aacaatgttc	ttcagcacag	ctgtgagaaa	tgaaggtagg	5940
gtgctgttcc	tcttgtggcc	cagggccagc	accgactgca	gggattccac	catgtctgcc	6000
accatctcgc	aggccgaagt	gatgtgactg	aggttttgta	tatctgagtc	tacttctctc	6060
ttcttgacag	cccttggagt	atgtgacctg	ctttccggac	caagaagttg	gtctccaggt	6120
tgtactgcaa	tggcttccag	gatgaatcgc	acacagtgga	taaggagca	agtatgagtc	6180
acgtactctg	gggaggacag	cacccccag	aggccaggca	cctgcagtgc	caggcagcag	6240
cagtctaggc	cggcttggag	gtccagactc	agtgggatct	gctcatggat	caaatgccat	6300

gacagggcct	caagtgtcat	taccacaaac	ttcacctgt	gcccctcctt	ctcaggagga	6360
aggtgcaaag	gagcaggcac	tttggagagc	accaccaggt	actgtgccag	ggcacgggca	6420
agtgtgggtca	gagactggta	tgatgtggta	tcaccaaaga	gatcattcag	cttgctccag	6480
taggctgtgg	gttctgtagg	caggaaaggc	tggaagactt	gatggactgc	aggcagctgc	6540
tgaaccacat	tggtcacccg	gtccagagtc	accctacgag	ccgcttcaaa	aaggggactc	6600
ttttggccat	tagcaatctc	gctcatgcca	aggcttaagc	agggagccaa	aaggcttagg	6660
ttgaactccg	agctcatcat	gaagtcactc	atatcttcag	cagggatacg	gttcaccagc	6720
tctgcacctt	ccagcagtgc	agaatctgac	ctgggtccaac	actgggatct	gacaagctgg	6780
aggtaccagt	ctttgtccgg	attcactgtt	tccagggatg	tgtgcccatac	cccatccaga	6840
gggtgggaag	tgactggggg	caaggggcta	agtgagtcct	gcacagtaga	gagtcggaat	6900
ctgtccagca	gtgaatagag	cctttgggtg	ctttgtgcaa	gcccagtgtt	ctggagggtg	6960
tcctggattc	tgttcagttc	ctcctctggc	aactggggcca	tgctgctctg	taaatttgca	7020
gccaaaagca	tttctactcg	gcgacaggcc	agggtgtcga	ccatgcgagc	cagcgacagg	7080
aaaggggtgc	ccagtagcct	gtccacatac	agtgtgagca	cagcaccaga	ctggctgaga	7140
tggatgcctt	ccaagcactg	aagtgttttc	ttcagagtgg	ttggagtga	aagattttca	7200
cagcgagact	gaattgcctg	gataaaaaga	ccactagctg	cagaattacg	atgaatggca	7260
ctaataaagt	cttgaactgg	aggctcgtgg	gacaagctga	tcagatcttg	aatgtgattc	7320
acaatgagcc	atgttaagtg	ttctgagtca	tggagattct	gacagacata	atcacagaag	7380
agaataaggg	ccccctctcg	tactatttct	ctattgcaca	ttccaagctg	agctgctgag	7440
ccagaatcct	cttcagcaga	tatctggggg	tttagtgact	tcgtgcagga	cagactgtgt	7500
ctcttgggcg	tctgctgcac	ctcggcccac	catcggtggt	cagtgtgggt	gatgagcagt	7560
aggatctgac	accagagcag	taccagagct	gggtgtgtgg	gcacatggc	tcgcacccgt	7620
gcattcaggc	tatctagagt	atagaagctg	ccttcacagc	catcactggt	gaagagtcta	7680
gtggcagcgg	ctgtgattct	ccggaacatt	ccagatttga	atatgtggat	cagacacatg	7740
agcagtgtgc	cgagctcttg	gcaatagaat	gtatgctgct	gttcactcat	gtccactttg	7800
agctgttttg	taacaatgtc	ttccagaaga	ataccaacca	gctgtaagag	aaaccttgag	7860
aatgtatctt	ctggcaaatt	ctttacttgt	ttcccttcac	tgcgttctcc	tagtgttgga	7920
ttactgtctc	catcccttaa	cctgttaatt	actggacagg	aaattaaata	tggagagaag	7980
gagagctcct	gaatacgaga	aagaacaatg	tcttcggttg	actgggaaat	gagaaccctc	8040
agaatggcta	ggattccaga	tatccacagc	tgcacagtgc	ttacagatgc	cattgtgctt	8100
ggagtgatga	acatactccg	caaaagcatg	tccacaggac	gtagggagga	aggagccaaa	8160
atctcaaaca	aggtatttta	tactccaagg	gcttcatgag	agtcaatatg	catctgctgc	8220
ttggctaaca	tgggcaggat	gatgtctgcg	acctgccgag	agagccgttt	ccacttgtcc	8280
tcattctctt	tgtggcactg	ctgcaggacg	aggatgaaca	tctctagcac	ctgatggtac	8340
tggatgagtc	gtaacagcat	tgagaccacc	acctccttct	gggtttcaag	ctctttccct	8400
gcacagctt	tatttgttcc	tcttaacaca	aagaggtcat	ggacaatggg	ctgcagcgca	8460
ggaatagcat	gtgtgacagc	cttccttcca	ctggccatga	tgccatcaca	cagctggatg	8520
attttaggaa	ttccaatgat	ctgttttgaa	tggtagcgct	cataagataa	tagtaccagg	8580
aagaaaaata	tatttggaat	aattgcctct	gattccctga	actggcccac	ttcaatgtac	8640

tcaaactgct	tcagcacaaa	cccgatgaac	acctgatctg	aatccagtag	acagtaattg	8700
acccgtagct	gaaccagctg	tgccagcaaa	tccaaaacct	gcttctgcag	ttgtactgat	8760
gttgctcgtg	tgtactgctt	caatgctttt	ataacaagag	gctcaaataa	cctaattgtg	8820
ttatgaatag	cgttcttata	tgacaggttc	tttgtgacac	ttgtaagggt	cgctttcaac	8880
tgagcagaca	ctttctggag	tacatcaaac	cacctgagg	catcgtgctc	ctgggtccgc	8940
tgtacatgt	tcctcaggct	ggcatcagcc	aaagcctgcg	tgaagtgcgt	gtatgggtgc	9000
atgaagcagt	agtatataa	gccgggcctc	acactggaag	agccaaggcg	ctgtgctcgg	9060
cactgagact	tgctgggggt	ggaagataag	ccatcaaact	gtgaggctaa	gtttgtccca	9120
aagagagtct	tcaatagctg	ctgaacacag	acagtcgcca	tcattgggtc	tcgactaaag	9180
caggatttca	agtatccaag	gacctcttca	acacactttc	caatgtcctg	cagtgtcgcc	9240
agctctagaa	tctgagaaa	gacgtccaag	gcagagcgca	ggaaccccc	aaacttttca	9300
gtgctgttct	gaagatctaa	ggtgacctta	tagttggcgt	gagtggcttt	caggacatca	9360
tgacgtctga	ggtagggaag	gagatggtag	aaactcccaa	gtgaagatga	tttactcgct	9420
gtgacaggtc	ctgagggtgc	tgactgtcga	gaggctgtac	tgacctctcc	acctttcttg	9480
ggactcatcg	gagtggatgt	ttgttctccg	ggctctttct	ccttcccttt	ccgtcgaata	9540
ggacttagag	aaggggggtt	tgtgagagaa	ggcaaagctg	ccttgattgc	tggtccagga	9600
gtcacgtcat	ccaagacatg	agcacagata	ttgatcacct	tcagcagggt	ggagaaaagc	9660
tgtccacca	tgggcaccag	agtccgatcc	cccagggcag	gccagatctc	ctcctgtctg	9720
gtggctgctg	agctgccttc	ttcttccgag	gcccattgagc	ttctcagaga	cttgggggca	9780
ctcgtgcta	gcaagtttcc	agccaaaatc	aaggcatcct	gatgggctga	gagatccagt	9840
gggaaccaag	ctgatgaaag	caaggtgaga	atcatggagg	ccatcccaac	agtgcagctc	9900
ttcctggact	catcagaggc	actcagtggg	ggcactccac	agtgccatcc	tagactccaa	9960
gtgcaaaactg	gaaaggcggc	tgaagaaca	cacaaggctt	cacagcacc	aaatgtgagt	10020
gcccgtgtag	ttgacgtaat	gagttcatga	gaaactgcgg	caacgactct	tgagagggtg	10080
ttttccatgg	tgacatctgt	tacacttggt	agtaagctgt	agcctctata	gattctgggt	10140
atgggtgctga	cggagaagtg	ggatgggtggc	tggtgtctcat	gcatgaggag	cttcaggtaa	10200
acactacttt	gatctcttgc	tacagccacg	actgggtcag	cctgtccttg	gtcacactta	10260
taaaacagct	ttgggacaag	tcttgtcaat	gtcgtcgcag	caacatgtcg	aacctgggg	10320
tcttcatctc	caagcaata	aatgaccaca	ttattgagta	ctcgttcttg	tagttttaga	10380
aacctgttat	aatgatgagc	ccctcgggtg	aaactttctg	cttttgctc	caaaaaactc	10440
accagcctga	aatcaatctc	tgcaagagtt	tccagcagtt	cagtcctcac	cagccagtag	10500
gagctgttct	tcagaggcag	catgtcaata	agcagttgta	atcccaagtc	actgtagctg	10560
ctgctgcaaa	gactcaggac	acagtgcctc	acagctgtac	aagccaactt	gcaagtaaca	10620
gaagattcat	ccttcaaagt	tttctgcagt	aaaggaatgc	agtccaccag	agaaaatgta	10680
tttctgtca	gggccctgat	ggtgcccagc	cagtcaccaa	cacggagacg	ggacctgctg	10740
aggatggagt	agacaagggt	cccacagaga	atggcagtag	ctcctcgcac	ctgagggtct	10800
ccatgatcga	tgtagtctag	gatgtcagag	acatactgtt	cctcagtact	ttccatggta	10860
ctgagaggta	ctttgtagag	tttgctgaag	aacgactctg	gatgaagggc	cacagctgca	10920
ccaatacagc	tgagggccag	ggccttcaca	ctgactctca	catctctgtc	tggaaccagt	10980

gctttctttt	cgccagttaa	caaaaaggaa	gcggataaaa	gacggacaca	atgtaccaga	11040
ggagcagaat	catcatcatt	aggctgtcct	atgtcacctt	tgattcggca	aggcttgctt	11100
tctgggtccc	cagcttcagc	aacctcatct	tttgaaacaa	acttatcaac	actgctgtca	11160
gaaggctgcc	ggctatgacc	cattctttcc	aacaagtgtg	cctgctgaag	ggccagagaa	11220
gagtttctga	aaacgtctga	gacttcacca	gaaagaacac	ctgcagcttc	ctcctcgtct	11280
tcctcctgtg	gctgtcctat	ctgcacgcct	aaatactggc	tgtcagcacc	atctaagaca	11340
atttcagaac	tgtcagaagg	agtcacagct	gaatcaggtc	cttcagtggg	ggctctgagaa	11400
ctgtcactga	tgggtgagga	ggcctgggtc	ccatcattca	ggtccatggc	agggtcggat	11460
ggaacagcac	tgaactggct	ggagctgtgg	ctcaagatgt	cttcctcatc	tccatcagta	11520
gcagcactgg	tcaagtcaca	gcttgacaaa	tccacagagt	ctgcttgaag	tgtgtgctgg	11580
gatcgaggct	gctcagtgat	gatgtcgtga	cctacagaac	cgggagtggg	gacacccgaa	11640
gaagaagcag	cgagctctcc	accaatctca	ctcttcacag	aggctgcaaa	ggctgagctg	11700
ctgacatctg	acctggactc	cgagtcatcc	tccaaggctt	cttcctctcc	taagagcact	11760
ttgccttttt	gctttcttga	gagaacaggg	ctgcatgagg	aacccccctc	agctaaaagc	11820
tccacgatac	tcccgtcgcg	gcctcggccc	ccggttctct	ctcgaaccag	agtgaactgc	11880
ccgagccctc	ctgggtgtgg	cagtgtctgc	agcagctcag	gtggaggggt	acggaagagc	11940
tgtgtcagga	gctccaatgc	ccctgtcacc	acattatggg	cttggtgctg	tgtgtgatgc	12000
aaagtcagtt	cataaacctg	gacaagctgc	tctgcagaag	gagagacttc	catttctttc	12060
cgtgttacct	caaagctgcc	ctttagactt	gtgtccttga	cctgctgctg	gagcaagggc	12120
actagacacc	tcagtgtgag	caacacacca	aggatcagga	gagtgggggt	gtcttctctc	12180
atgggaacca	gcaaacctag	gagcacattc	aggagccagt	tgtagaagta	ctgtgtcctc	12240
ctagagtgtc	ggcagatact	cactgtgtgc	ccagctgtct	tccgccgcac	agtgggagag	12300
cttgacttca	gatttgctat	gaaagctttc	aatagaacct	taatttcatt	gtcattcgcg	12360
aaattgccaa	aagaggccat	aatttttagga	acagctgcag	ccaaagtctc	ctgaactgac	12420
tcctccgggt	gtttgcttgt	tcgggtcaaa	catggaagaa	gattcaccag	ataaggcctg	12480
cacttctgag	gtcgaaccag	gtgagccagc	tcagcaaacc	tccacagagc	tgacgcaaaa	12540
cttcgaggag	caccattctt	tttaatttcc	ttatagagtt	ctaactgtag	ccttggaaga	12600
ttagagtcca	tcaaagcttt	gatgactttg	ttgaggcact	catcagccac	cattctgacg	12660
tctgactccg	catcgctcgt	gcacagcaga	aacagttcca	tagcaatgcc	caagagtttc	12720
tgaatttctg	gagaatttct	gagagactgt	gccacaatgt	tttcacatat	tgtttagacag	12780
tgattcacac	ggtccttctt	ggtggctgag	agttccttct	ttggtcgggt	cagcggctcc	12840
tcggccggac	ctggcagcgg	cgggtggtgg	ggcggtctgc	cctgaggcgg	cggctgaggg	12900
ggttgaggcg	gcggcggcgg	cgggtggtgg	ggcgctctgc	gcggcggtct	ctgctgtctgc	12960
tgttgctgct	ggaacgactt	gagcgactcg	aaagcettca	tcagtttttc	cagggttgcc	13020
atgacggcct	cctgcccgcg	aggacagacc	ctgaaggctt	ggagcctatt	cgcactacgc	13080
agcgccactt	agcagcaagg	taatgaatgg	ggctctacga	ggtagaccga	agcggaacca	13140
aagctcccag	ccatcttggg	cccgtcccgg	caaccctcgc	ggcgagtgc		13189

<210> 9

<211> 13328

<212> DNA

<213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<400> 9

tgatggtttc aatgtttttc ctttaatttg gatgtacaat gtttgacagca gttaaaaaaa	60
ttaaatatac atctctcgtc agtccttccc tttgctctca gaagcagtca ggtctgggtg	120
gggctccggg actcacccat cacagccctg ctggctccag gggagctcag gctcagctga	180
cagtccctct gaccacagcg caaagcaatg agacctggac aaggaggccc cacgtgggtc	240
agagcccacc ctccgtaggc aggtccacgt tggccacaat cctccaaggc tggcaatcac	300
cacccagatt gcagcgggag actctgcttt tggaaacaac tgaggggaag gcgttccttg	360
gactgcacca gagcgtgaca ggcacacggg ggaagagtgg cctctgaacc ttccaggttg	420
ccttcagttg tcatgcggcg ctctgagcgg ctccctcctt cccaggaggc ccaggcctgg	480
cgagcgagtg tcctcttctc gcctggacca tctgagctc tccagggtgc ctcggcagct	540
ctcaagatct tccttcttct cgtccctca ggtggccct cggagcaca gctccaagcc	600
taccctggcc agcagctgtg gtctgggtc ctccccgcag agggaggaag tggggagga	660
caaagccggg tgaggatgtc tgctgggcag gatgtcaca ggtagcagga gcaggctgac	720
tccacccac agacacacag aactaacctc actccgccc tcagggggag gaacttcac	780
ctgccaggca gccacagacc gagttattgc tgtttactat ccgtcccgag ctccgtgggg	840
ggctcagctc agctccaaga ggacgagctg ttcctcggt cccagggtc tggaatgacc	900
cctccatgaa ggtgggggcg ggggtgtcct ttagggcaca gggccttctc agatgttaca	960
ttctgggtgt ctggaggggt ttcagcttca cattttctc ctgaaaggac acgtgtgctg	1020
gcagaaatgg ggggtggacag taacaaagag cgcttggcag ccggaacgt cacctacaca	1080
gactcagctg ggcccgagc ggaaggagg cacgttttg gaaagaaacg cgcttcagt	1140
cattgccaaa caattctacc ctggtttcat taaagtctt cctgatatta ccagcagcaa	1200
aacaaaagca gtctccccac agctcacccc caaaactga caaccaaatt aatcacattt	1260
tcaacaaaat ttggataata tgattggtgc ttgccatagg ttttttagga acgcgacaaa	1320
gtcttctctc cttcggcaga gttgatatgg agaccgtttt ctccggtggg atcctagtga	1380
gccatgaatg agccctgctc tgaccaagcc ccgcgcctgg acgcccgtca cacagctaac	1440
tttacctggc aggtctgagg aaagtcaact tccaggaaga accgacacgg gactcttg	1500
aggccatgca tctctgtctt gagatgtgcg tgtataaaac tacagatgtg tccatagca	1560
cgtgcacgtg tacttgactt acgcatgggt aaagtcattt tactaatgag ctcatattca	1620
tctctggagc acacaggcag gcctttggga gtgggggaca cccactgcca gagcgggggtg	1680
ttctgagccc cttgctaagg actgttttag atcacgtcgt aaacaaaagg aagacaaact	1740
ctgtgttgag cccagcgata tgcattccaa ggggaatggc tccgttttac attcacagt	1800
ttatttctta caaatgtaaa catctagcag aacaacatct ggctgtgat acttctgtct	1860
ccgagctgtt gacataactt actgcagggg aggtgggtgg ggagcagcaa cggttctgag	1920
aactttcccc tcattcccaa agcttctagc aggttttcca ggaagaagct aggatgagaa	1980
acaggagccc ccaaccaata cggaagaacg gtggttttct tgttaaaatt cagtagcttc	2040
ccttaagggc ctctcaaac atcagacccc tttctaccgc tcctgctgcc ctgccacgag	2100
gacgaggtgg tcctggctgg gggaggcctc tgttgggagc tgggtggaaa agcctcatac	2160

aggcctgtca	aaggctgctc	agaggagggg	ctccctttga	gcaggggctc	ccttttcagcg	2220
ccccctcatg	tatgtgggca	gcacacaagt	ccacatgtca	gctgtctctc	agctgccaca	2280
taggagaggg	acaggtggaa	gcttgagggt	ctcaaggcag	cacctgcaca	gactccagaa	2340
aagcattttcc	tccacttacc	atattcaata	cccaaaacat	caacaggcat	gagcaaacca	2400
agccacatga	cagtcgccaa	cctcgccctgg	ctcgccctcaa	gggctgagga	agcagagctc	2460
ctgccccatc	tcagagctcc	caaatccagc	tcctatgtca	gcagcagccg	gccatccaga	2520
atccactttcc	attttaatga	cttggtctct	ctgggcctgc	aaacaagagg	ctgggtccagg	2580
gacctggcct	ggggatagga	gtggcggctc	tgacagggca	gtggggcagt	ctccaatgag	2640
cacagatctg	cactctcctg	actaaaaggg	gtccccgtgc	aagatgtcag	ctggaacggg	2700
ggcagaaggg	atgccaggct	ctgtcactaa	cagtgcceaag	acgccaagct	ttgctgttga	2760
ccaagagagg	ctcagacaaa	acacagctca	gtgacacct	tggggcatgc	atccatggaa	2820
cggcagatcc	caacaccggc	cagccagctc	ctgggcagac	accgccccag	ggctagcaag	2880
gaacaggagt	gggaggccca	tgtctctgga	cacagcggag	gctgtctaca	gccagggagg	2940
gctggccttc	tcagctgata	gggaggtgc	tgtccctaata	gtgggtggag	aacaacagtt	3000
gtctgtgccc	aagaaggagg	ggctgcaggc	gagcatgccc	ctaggacagt	gggggcctgt	3060
ccttagtcct	gctgtggcca	cctgcacact	agcgctctc	tacatcccag	tcaccttgtg	3120
aatgcataaa	caggaacatg	tacaacggaa	atgtcagcgg	gtgctcagga	aggctatgcc	3180
agtggctaca	ggagagggag	cgtggccagg	ggccctgccc	acctccccga	acactgtcgc	3240
atgcagcaca	ggccttgcaa	ttcacatact	ttacacgggc	atagaaagag	ttacgttaaa	3300
attaatctct	ttactgatat	aattaaattt	taaatcctga	gaagaaaaga	gagaagggag	3360
aatggtgctg	ggtgtctagc	acccccagcc	actggcccag	cacatgccat	ggcatctgtg	3420
catacagaca	cagggcgtgg	catgcacacc	ccaccaggaa	gacacaggcc	agtgttccca	3480
aagcctgctc	acggcacctt	ctactgcagg	acagcagagg	ggcccacagc	cagcctgcag	3540
gagggaggac	ttccggccca	gatgcaagag	cagctgcagc	ctggcaacac	ccaacaggtg	3600
agcatcagga	gaaaggacct	ggtcacccac	atggcgtgca	gcacagctgc	tcctgtctctc	3660
cggaaggcct	caggctcagc	cccaccggga	ctgcagatac	tccttgccctg	gccactgtac	3720
cacaaagagc	acttctgcca	tatggcagag	acacgcacgt	tgccctggccg	cccgcggcat	3780
gtgcggaagc	ccacagggac	caagctggct	cgggtggaggc	agggcacagg	gcgcagattt	3840
ctggaggctc	cagccccagc	tgccgcctca	cagtctctcc	caccatggcg	ctcagcaggt	3900
ggtgaccttg	tggacatttc	gtaaacaagt	cagcagccgg	tgatatgggc	ttcctggagc	3960
tgcaaccacc	tcaaacacag	actggaaggc	cctgcggctg	agctcctcct	ctatctgggtg	4020
tctgtaaaaag	tctgtggcaa	ccaggcagaa	aaggttgacg	tccacctgct	ccagctttcc	4080
catcctgctg	atgacatgtg	ggaggatcgc	cgcaaccat	gggctgggtg	acgcgctgac	4140
gaagaagcag	gagaggctcc	atgtggccat	ggcgaactgg	gtcctctgcg	tgaagttgga	4200
gagggacagc	atgaccagct	cccggaccat	ggatgactgc	ccggtgctgt	gcagagtctg	4260
aaacacctta	tacaccaccg	tggccatgaa	ctgggggtat	ggctgctggt	tggacagaaa	4320
ctctccgatg	actttgttca	tgatgtcctg	gggtgggaag	aagtcattcta	gaaactgggg	4380
caggatcctc	gccaccactc	tggtttcaca	aggaaagcct	ttcctgatcc	tatcaaaaag	4440
aacagacacc	cgctccatag	caacaatcac	cgactcgctg	tctggggctg	caggattagg	4500

gtctgaagtt	ctacccggac	tgactttctc	ctttcctgtg	tacatgcagg	tgagcatcaa	4560
gccagagcc	gcatggccc	ggtgcgggct	gtgcacgttc	actctgtcca	cactcagctt	4620
gaccagggat	tctgcatcca	ggcgggagag	ctgctcagag	agcaggaggc	gctccaggcc	4680
tctgaggga	cagtggtaaa	tgatagaggg	ggtggactcc	tcacttccgg	acagcatcac	4740
cccacacatc	tgtattattg	atgctgaaaa	ttctggccct	acgtccagag	gatagtcttc	4800
aatcaggtaa	aacgcagtgg	cacacatgac	cagtacgtgc	tgctggctgt	gaatgttcac	4860
gcagtgggcg	atccctttca	ggttggagag	gagatagtca	ctgatgactg	ggatgagctg	4920
cttggcagta	tcgtccagca	ggtcgcactc	cagcacatag	aggatgccgt	gcagggctcc	4980
gacctgtctg	ggcagggtgg	tgctcctgag	tgtgctctcc	agcaggcggc	tgacaggctc	5040
cgccacgacc	ttgtccatcc	caaggacggc	agctgccttg	cagggtggcg	gcaccaggta	5100
ctgagcgagg	atctcgtctt	ctgaaggatg	caccttctgc	agttctgtca	gcgtcacata	5160
catcagctca	aactggttgc	gctcagtga	caagtctgag	accaccagaa	gggatcgaa	5220
cacctcactg	atcaggatgg	ccggggctct	cctggctgag	ttggatggca	ggatccagcg	5280
gctgtacaac	tcgagtaaaa	actgcgaaca	ggaatggatg	tcaactccag	cccgggtgtt	5340
cctggagttg	actggagacg	tgggtggtga	tgaaggtgca	ggggcgctcg	ctcctcctc	5400
ctcctcctcg	tccattcct	cctcccttag	gggtgtgatg	ctgttcccca	gccacacaga	5460
gtgtatggac	acctggccga	gtttgtagct	cacgtcccc	agctcccgt	cggggttgat	5520
ctgcagcagc	agcttctcgt	ggctgatgag	ggcacctgtg	gtagccgggg	acagagaagg	5580
gacaggatcc	cacgcctggt	ataaatgatg	ggtggcgatg	ttctctctct	ttgaaacat	5640
tgcttgaatc	tcttgcctca	caatccctct	gataatgctc	agcttctctc	caaacctggt	5700
gtccagagct	ttcagaggct	tggtccgagg	ctgctgctcc	aagcagctca	cagctgggtt	5760
gccggccaca	ggcacgggtca	ttgactgag	caccagttag	gtgatggcct	gcacggccag	5820
gacgttgatc	tgctcctct	ctgtgtcttc	ttctgggtgg	ctctcctcct	gtccatcac	5880
gaggggctgc	gtcaccagga	caccaaggag	agtggcccaa	gtttcttcaa	actgagtacg	5940
actggtccag	cctagcgtgt	tgatgcggta	gatgaactcc	ttaaagactt	ccttttcctg	6000
gaggaactcc	acggggatct	cagggaatgc	tgtgccaaaa	tcccctcccg	gtttgggtga	6060
ccatccaagc	ttccacacca	gtgggggcac	acgtgtgtag	ctgttgacaa	ggggcaggcg	6120
ggccaggctg	acgacgatgt	tcctgagcac	tgacgtgaga	aacgccggca	cgccactatt	6180
ccttttatga	cccaaagcca	acaccgactg	cagagactcc	accatttctg	ccaccatctc	6240
acaggctgcg	gtgatatact	tcggattctg	tgtgttagga	tctatttctc	ctcctcctc	6300
tctgatggct	tttggggtat	ttgtccttct	ttctggacta	agaagctgct	ctccaggctg	6360
cactgcaacg	gcctccagga	tgaagtgcac	acagtggatg	agggagcagg	cgtgggtcac	6420
aaactctgcg	gaggagacca	cgtccagag	gccaggcagc	tgaggggcca	ggcagcagca	6480
gtccagccct	gcctggagat	ccagactcag	cggaatctgc	tcatggatca	aatgccagga	6540
cagggcctca	agggttgcca	ccacgaattt	catggtgtcc	ttctctttct	caggaggaag	6600
gtgcaagtga	ctgggcagtt	tggagaccgc	caccaggtac	tgtgccaggg	cccgggccag	6660
agtggtcagg	gactgataca	gcgcagcatc	cccaaataga	tcattcaact	tgtccagta	6720
ggccgccggc	tctgcaggca	ggtcggactg	gaagacgtgg	tggacagcag	ggagctgctg	6780
cacggtgctg	ctcacgcggg	ccagagtcac	ctcacgggct	gcttcaaaaa	gcggactcct	6840

ctggccacca	gaaatttcac	tcatccctag	gcttaagcat	ggagctagca	ggcttaggtt	6900
gaactccgag	ttcatcatga	aggcactcat	atcttcagca	ggaatccgat	tcaccagctc	6960
tgcaccttcc	agcagcgcag	aatctgacct	gtccaacac	tgggatttga	caagatgaat	7020
gtaccagtct	ttgtccggac	tactgtttc	cagtgcacg	tgcccgctcc	cgtccagcgg	7080
gtgggaagag	actgggggag	agggactaag	tgagtcttgc	atggtggaga	gacgaaacct	7140
gtccagcagg	gaatagagcc	tctggtgtct	ctgagcgagc	ccgctgctct	gaaggtattc	7200
ctggattctg	ttgagttctt	ccattggcaa	ctgggccatg	ctgctctgta	aatttgcagc	7260
cagaagcatt	tctacccggc	gacaagcaag	gatgtcgacc	atgcgagcca	gcacacggaa	7320
aggggtgcac	agcagcctgt	ccacatacaa	cgtgagcaca	gctcccgact	ggctgagatg	7380
gatccccctc	aagcactgaa	gagttttctt	cagagtgggt	ggagttgaaa	ggttttcaca	7440
acgagactga	attgcctgga	tgaagaggcc	gctggcagcg	gagttccgat	gaacagcact	7500
gatgaagtcc	tgtactggag	gctcgtggga	aaggctgac	agatcttgaa	tgtgatttac	7560
aatgagccac	gttaagtgt	cggagtcag	gaggttctga	cagacataat	cacagaagag	7620
aatgagagcc	cctcttcgta	ctatttctct	attgcacatt	ccaagtttgg	ctgccaagtc	7680
agaatcctcc	tcttctccag	acatctgggg	actaagtaac	tttgtgctgg	acagactgtg	7740
tcttttcggg	gtctgctgca	cttctgcccc	ccagcggtag	tcggtgtggt	tgacaagcag	7800
caggatctga	caccagagca	gcaccagggc	cgggtgggtg	gtgatcatgg	aacgagcccc	7860
caaattcaag	ctgtccaggg	tgtagaaact	gccgccacag	ccatcactgc	ggaacagtct	7920
agtggcagct	gctgtgattc	tccggaacat	tccagacttg	aagatgtgga	tcagacacat	7980
tagcagagtg	cctagtctct	ggcaatagaa	agtatgttgc	tgctcactca	tttccacctt	8040
cagctgtttt	gtaacaatgt	cttctaaaag	aatacccacc	agttgtaata	gaaaccttga	8100
aaatgtttct	tccggcaaat	tctttatttg	tttcccttca	ctgtgttctt	ctagtgtgta	8160
attactgtcc	ccatctctta	gcctattaat	tactggacag	gagattaaat	atggagagaa	8220
agagagctcc	tgaatacag	aaagaacaat	atcttcagtt	gactgggaaa	tcagaacctt	8280
caaaatggcc	agaattcctg	atatccacag	ttgaacagtg	ctcacagatg	ccattgtgtt	8340
tggagtgcag	aacatactcc	gtaaaagcat	gtccaccgga	cggaggagg	aaggggcca	8400
aatctcaaat	aatgtattta	acactccaag	ggcttcagta	gagtcaatgt	gcatctgctg	8460
tttggttaac	attgggagga	tgatgtcagc	tatctgtcga	gacagtcgct	tccacttgct	8520
ttcattctcc	ttgtggcact	gctgcaggac	gagaatgaac	atctccaaca	cctgatggta	8580
ctggatgagt	ctcagtaaca	ttgataccac	cacttctttt	tgggtttcaa	gctcttttcc	8640
tgcacagct	ttatttgttc	ctcttaatac	aaaaaggtca	tggactatgg	gctgcagagc	8700
cggtatggcg	tgtgtcacag	ccttccttcc	actggccatg	atgccatcac	agagctgaat	8760
gatttttagga	attccaatga	tctgttttga	atgatacgct	tcataagaca	gtaataccaa	8820
gaagaaaaag	atgtttggaa	tgattgcctc	tgattccctg	aactggccca	cttcaatgta	8880
ttcgaactgt	ttcaatacaa	agccaataaa	cacctgatct	gaatccagaa	gacagtaatt	8940
aaccgtaac	tgaaccagct	gcgccagcaa	atctaaaacc	tgcttctgta	actgcacaga	9000
tgttggtgtc	gtgtactgtt	ttaaagcttt	tataacaaga	ggttcaaaca	aacgaatgtg	9060
attatgaata	gcattcttat	ctgcacggtt	ctttgtgaca	cttgtgaggt	tcgtcttcaa	9120
ctgggtagac	actttctgga	ggacatcaaa	ccatcccag	gtgtcgtgct	cctgctccgc	9180

ctgcaccatg	ttcctcaagc	tggcgtcagc	gagggcctgg	gtgaagtggg	tgtacggggc	9240
catgaagcag	tagtgggtaca	agcctggcct	cacactggag	gagccaaggc	gctgtgtctg	9300
gccttgtgac	ttgctgggggt	tggatgataa	gccgtcaaac	tgggaggcca	agtttgtccc	9360
aaagagagtc	ttcaacaatt	gttgaacaca	aacagttgcc	atcattgggt	ctcgactaaa	9420
gcaggatttc	aggtatccta	ggatctcctc	aacacacttc	ccaatgtcct	gcagtgtggc	9480
cagctctaga	atctgagaga	gaacgtccaa	ggctgagcga	agaaaccctc	caaatttttc	9540
cgtgtgtgtc	tgaagatcca	aggtgacctt	gtagttagcg	tgcgtagctt	tcaggacatc	9600
atgcagtttg	aggtatgaag	gaagatgata	gaaactcccc	agtgatgagg	atttacttgt	9660
tgtaacagga	cctgaggtat	cagattgtct	agaagctgca	ctggcctcac	tgcttttctt	9720
gggactcaac	ggtacagatg	cttgtttctc	tggttctttc	tccttcccct	ttcgtcggat	9780
gggacttaga	gaaggggggt	ttgttagaga	aggcaaggct	gcctttattg	ccgggtccagg	9840
agccacgtcg	tccaggacat	gtgcacaaat	gttgatcacc	ttcagcaggt	gggagaagag	9900
ctgctccacc	atgggcacca	aggcccgtc	ccctagggtc	ggccagacct	cctcttgctt	9960
ggtggctgct	gggttggctt	cttcttcaga	ggcccatgaa	cttctcagag	atttaggagc	10020
actggctgca	agcaagtttc	cggccaaaat	caaagcatct	tgatgggctg	agagatccaa	10080
tgggaaccaa	gctgacgaga	gcagggtcag	aatcatcgtg	gccatcccaa	cggtacagct	10140
cttcctagac	tcatcggagg	cgctcagtg	aggcactcca	cagtgccaac	ctaaactcca	10200
aatgcaaact	gggaaggcag	tggaaagaag	acacaaagct	tcacagcatc	caaaagttag	10260
tgtctctgtg	gttgatgtga	tcagttcatg	agaaactgct	gcaataactc	ttgaaaggtt	10320
attttccata	gtgacatctg	ttatgcttgg	tagtaggtta	tagcctctgt	atattctggt	10380
tattgtgctg	acggagaaat	gagatggagg	ctgcgtctca	tgcatgagaa	gtttcaggtta	10440
aacactgctt	tgatctcttg	ccacggccac	tactgggtca	gcttgtcctt	ggtcacattt	10500
ataaaacagc	tttgggacaa	gcctaattaa	tgatgctgca	gcaacatgtc	gcaccctggg	10560
gtcttcatcc	ccaagcaa	ggatgacaac	attattgagc	actcgttctt	gcagctttaa	10620
aagccctgta	taatgatgag	cccctctgtg	taagttttct	gcttttgcct	ccaaaaagct	10680
caccagcctg	aagtcaatct	ccgcaagggt	ttccagaagc	tctgtcctca	ccagccaata	10740
ggaactgttc	ctcagagtca	gcacgtcgat	gatcagctgc	agtcctaact	cactgtagct	10800
gctgtgcag	agactcatga	cacaatgcct	cacagctgta	caagccagct	tgcaagtgc	10860
agaagactcg	tccttcagt	ttttccgcag	caaaggaatg	caatccgcca	aagaaaatgt	10920
gtttcctgtc	agggttctaa	tggcgcccat	ccaatctccc	acgtggaagc	gggacctgct	10980
gaggatggag	cagatgagg	tcccacagag	aatggcagtg	gctcctcgaa	cctgtgggtc	11040
tccatgatcg	atgtagttca	agatatctga	gacatattgt	tcctcagggt	attctgtggt	11100
gtcaagagga	actttataga	gtttgctgaa	gaaagattct	gggtggagag	ccacagctgc	11160
tcccacacag	ctgagggcca	gggccttcac	gctgaccctc	acatcccggg	ccggaaccag	11220
cacatttttt	ccccctgtta	gcaaaaacga	agcagataaa	aggcggacac	aatggacaag	11280
aggtgcagaa	tcatcatcag	tggactgtcc	gatgtcacct	ttgatgcggc	aaggcttggt	11340
ttcttgatca	cccggttcag	tagcttcac	tctcaacaca	aatttatcaa	cactgctgtc	11400
agaaggctgc	ctgctgtgac	tcatgttttt	caataaatgt	gcttggtgaa	gggccatgga	11460
agagttcctg	aaggcctccg	aggcttcgtc	aggaagaaca	cctgtggctt	cctcatcttc	11520

atcctggggc	tgtccaatct	gcaggcccaa	atactggttg	tcggtaccgt	ctaacacaat	11580
ttcagaactg	tctgaagggg	tgacagctga	atcaggccct	tcggtggtgg	tctgggagct	11640
gtcgtgatg	ggcgaggagg	cctgggtccc	atcattcagg	tccatggcag	ggtcagatgg	11700
gacggcgctg	acctggctgg	agctgtggct	caagatatcc	tcctcatccc	catccgtggc	11760
agagcttgtc	aagtcacagc	tggccagatc	cactgagtcc	gcctgcagcg	tgtgctgtga	11820
ccgtggctgc	tccgtgatga	tgtcgtgacc	tgctgaccct	ggagtggaaa	cccctgaaga	11880
agtagccagc	tctccactga	tatcatcctt	cactgaggct	gcaaaggcag	agctgctgac	11940
atccgatctc	gattcagagt	catcctccaa	ggctttcttct	tctcctaaga	gcactttgcc	12000
tttttgtttt	cttgaaagga	cagggctgca	tgaggaaccc	cctccagcta	taagttccac	12060
aatactccca	ctacggcttc	ggccaccaga	ctctctctta	gcggcggtga	gctgccccat	12120
gccccccact	gtggtcaggg	cttgccagaag	ctcgggggga	ggcgttctga	agagctgctg	12180
caacagctcc	agggtccgg	tcacaacatt	gtggtcttgg	tgctgtgtat	gatgtaacgt	12240
cagttcataa	acctggacaa	gctgtctcgc	agaaggacag	acctccattt	ctttccgtgt	12300
cactccgaag	ctgcctttca	ggcttgtatc	cttgacctgc	tgctgcagca	agggcaccaa	12360
atacctcagg	gtgagcagca	cgccaagaat	cagcagggtg	gagtgtctct	cctcgacagg	12420
aaccagtaag	cctaagagca	catttagtag	ccagctatag	aaatactgtg	tccttcttga	12480
gtgctggcag	atgctcactg	ctgatccagc	agctgtccgc	cgaatggtgg	gggagcttga	12540
cttcaggttc	gctatgaagg	cctttaacaa	aaccttaatt	tcattgtcat	ttgcaaaatt	12600
gccgaaagaa	gccataattt	tgggaacagc	tgcagccaag	gtctcctgga	ctgattcctc	12660
gggtctcttg	cttgttcgac	ttaggcacgg	cagaaggttc	accaggtaag	gcctgcattt	12720
ctgaggccga	accaggtag	ccagctcggc	aaacctccac	agggcagcac	gcaaaactccg	12780
aggggcacca	ttctttttaa	tttctttata	gagctcgagc	tgtaaccttg	gaagattaga	12840
atccatcaaa	gctttgataa	ctttgttgag	gcattcatca	gccaccattc	tgacatccga	12900
ctctgcgtca	tcactgcaca	gcagaaaaag	ttccatagcg	atgccagaa	gtttctgaaa	12960
ttctggagaa	tttctgacag	actgtgccac	tatgttttca	catattgtca	gacaatgatt	13020
cacacggtct	ttcttggtag	ctgaaagttc	tttctttggt	cgggtgcagcg	gctcctcagc	13080
cacagccggg	ccgggtggct	gctgctgctg	ctgctgctgg	aaggacttga	gagactcgaa	13140
ggccttcac	agcttttcca	gggtcgccat	ggcgggtctcc	cgcccggctg	ggcagtcccc	13200
ggaggcctcg	ggccgactcg	cagcgccgct	cagcaccggg	gcaatgaatg	gggctctggg	13260
ccgcgggtaa	aagcggaacc	gaagcggccg	tccatcttgg	accgtcccg	gcagcccccg	13320
cggcgcct						13328
<210>	10					
<211>	13447					
<212>	DNA					
<213>	猕猴(Macaca mulatta)					
<400>	10					
tggtttcaat	gtttttcctt	taatttggat	gtacaatgtt	tgcagcagtt	aaaaaatta	60
aatatacatc	tctcgtcagt	ccttcccttt	gctctcagaa	gcagtcaggt	ctgggtgggg	120
ctccgggact	cgcccatcac	agccctgctg	gctccagggg	agctcaggct	cagctgacag	180

tccctctgac	cacagcgcaa	agcaatgaga	cctggacaag	gaggccccac	gtgggtcaga	240
gcccaccctc	cgtaggcagg	tccacgttgg	ccacaatcct	ccaaggctgg	caatcaccac	300
ccagattgca	gcgggagact	ctgcttttgg	aaacaactga	gggaaggcgt	tccttggact	360
gcaccagagc	gtgacaggca	cacgggggaa	gagtggcctc	tgaaccttcc	aggttgcctt	420
cagttgtcat	gcagcgctct	gagcggctcc	ctccttccca	ggaggcccag	gcctggcgag	480
cgagtgtcct	cttctcgcct	ggaccatcct	gagctctcca	gggtgcctcg	gcagctctca	540
agatcttcct	tcttctcgct	ccctcaggtg	gccccctcgg	agcacagctc	caagcctacc	600
ctggccagca	gctgtgggtc	tgggtcctcc	ccgcagaggg	aggaagtggg	gagggacaaa	660
gccgggtgag	gatgtctgct	gggcaggatg	ctcacaggta	gcaggagcag	gctgactcca	720
ccccacagac	acacagaact	aacctcactc	cgccccctcag	ggggaggaac	ttccacctgc	780
caggcagcca	cagaccgagt	tattgtctgt	tactatccgt	cccagactcc	gtgggggggt	840
cagctcagct	ccaagaggac	gagctgttca	tcggctccga	gggctctgga	atgacctctc	900
catgaagggt	ggggcggggg	tgtccttttag	ggcacagggc	cttctcagat	gctacattct	960
gggtgtctgg	aggggtttcc	gcttcacatt	ttcctcctga	aaggacacgt	gtgctggcag	1020
aaatgggggt	ggacagtaac	aaagagcgct	tggcagccgg	aaacgtcacc	tacacagact	1080
cagctgggcc	cgcagcggaa	gggaggcacg	ttttgggaca	gaaacgcgct	tcagtgcatt	1140
gccaaacaat	tctaccctgg	tttcattaaa	gtctttcctg	atattaccag	cagcaaaaca	1200
aaagcagtct	ccccgcagct	cacccccaaa	acttgacaac	caaattaatc	acattttcaa	1260
cacaattttg	ataatatgat	tgggtgcttg	cataggtttt	ttaggaacgc	gacaaagtct	1320
tcctcccttc	ggcagagttg	atatggagac	cgttttctcc	ggtgggatcc	tagtgagcca	1380
tgaatgagcc	ctgctctgac	caagccccgc	gcctggacgc	ccgtcacaca	gctaacttta	1440
cctggcaggt	ctgaggaaag	tcaacttcca	ggaagaaccg	acacgggcac	tcttggaggc	1500
catgcatctc	tgtcttgaga	tgtgcgtgta	taaaactaca	gatgtgtcca	tatgcacgtg	1560
cacgtgtact	tgacttacgc	atgggtaaag	tcattttact	aatgagctca	tattcatctc	1620
tggagcacac	aggcaggcct	ttgggagtgg	gggacacca	ctgccagagc	ggggtgttct	1680
gagccccctg	ctaaggactg	ttttagatca	cgtcgtaaac	aaaaggaaga	caaactctgt	1740
gttgagccca	gcgatatgca	ttccaagggg	aatggctccg	ttttacattc	acagtgttat	1800
ttcttacaaa	tgtaaacatc	tagcagaaca	acatctggcc	tgtgatactt	ctgtctccga	1860
gctgttgaca	taacttactg	caggggaggt	gggtggggag	cagcaacggg	tctgagaact	1920
ttccccctcat	tcccaaagct	tctagcaggc	tttccaggaa	gaagctagga	tgagaaacag	1980
gagcccccaa	ccaatacgga	agaatggtgg	ctttcttggt	aaaattcagt	agcttccctt	2040
aagggcctcc	tcaaacatca	gacccctttc	taccgtctct	gctgccctgc	cacgaggacg	2100
aggtggctct	ggctggggga	ggcctctgtt	gggagctggt	gggaaaagcc	tcatacaggc	2160
ctgtcaaagg	ctgctcagag	gaggggtctc	ctttgagcag	gggctccctt	tcagcgcccc	2220
ctcatgtatg	tgggcagcac	acaagtccac	atgtcagctg	ctcctcagct	gccacatagg	2280
agagggacag	gtggaagctt	gaggggtctc	aggcagcacc	tgcacagact	ccagaaaagc	2340
atttcctcca	cttaccatat	tcaataccca	aaacatcaac	aggcatgagc	aaaccaagcc	2400
acatgacagt	cgccaacctc	gcctggctcg	cctcaagggc	tgaggaagca	gagctcctgc	2460
cccatctcag	agctcccaaa	tccagctcct	atgtcagcag	cagccggcca	tccagaatcc	2520

acttccattt	taatgacttg	gctcctctgg	gcctgcaaac	aagaggctgg	tccagggacc	2580
tggcctgggg	ataggagtgg	cggctctgac	agggcagtgg	ggcagtctcc	aatgagcaca	2640
gatctgcact	ctcctgacta	aaaggggtcc	ccgtgcaaga	tgtagctgg	aacgggggca	2700
gaagggatgc	caggctctgt	cactaacagt	gccaaagacg	caagctttgc	tgttgaccaa	2760
gagaggctca	gacaaaacac	agctcagtga	cacccttggg	gcatgcatcc	atggaacggc	2820
agatccccatc	accggccagc	cagctcctgg	gcagacaccg	ccccagggct	agcaaggaac	2880
aggagtggga	ggcccatgtc	tctggacaca	gcggaggctg	ctcacagcca	gggagggtg	2940
gccttctcag	ctgataggga	ggctgctgtc	cctaattgtg	gtggagaaca	acagttgtct	3000
gtgcccaga	aggaggggct	gcaggcgagc	atgcccttag	gacagtgggg	gcctgtcctt	3060
agtcttgctg	tggccacctg	cacactagcg	cctctctaca	tcccagtcac	cttgtgaatg	3120
cataaacagg	aacatgtaca	acggaaatgt	cagcgggtgc	tcaggaaggc	tatgccagtg	3180
gctacaggag	agggagcgtg	gccagggggc	ctgcccacct	ccccgaacac	tgtcgcatgc	3240
agcacaggcc	ttgcaattca	catactttac	acgggcatag	aaagagttac	gttaaaatta	3300
atctctttac	tgatataatt	aaattttaaa	tcctgagaag	aaaagagaga	agggagaatg	3360
gtgctgggtg	tctagcacc	ccagccactg	gccagcaca	tgccatggca	tctgtgcata	3420
cagacacagg	gcgtggcatg	cacacccac	caggaagaca	caggccagtg	ttcccaaagc	3480
ctgctcacgg	caccttctac	tgcaggacag	cagaggggcc	cacagccagc	ctgcaggagg	3540
gaggacttcc	ggcccagatg	caagagcagc	tgcagcctgg	caacacccaa	caggtgagca	3600
tcaggagaaa	ggacctggtc	accacatgg	cgtgcagcac	agctgctcct	gctctccgga	3660
aggcctcagg	ctcagcccca	ccgggactgc	agatactcct	tgccctggcca	ctgtaccaca	3720
aagagcactt	ctgccatatg	gcagagacac	gcacgttgcc	tggccgcccc	cggcatgtgc	3780
ggaagcccac	agggaccaag	ctggctcggt	ggaggcagg	cacagggcgc	agatttctgg	3840
aggctccagc	cccagctgcc	gcctcacagt	ctctcccacc	atggcgctca	gcaggtggtg	3900
accttgtgga	catttcgtaa	acaagtcagc	agccggtgat	atgggcttcc	tggagctgca	3960
accacctcaa	acacagactg	gaaggccctg	cggctcagct	cctcctctat	ctggtgtctg	4020
taaaagtctg	tggcaaccag	gcagaaaagg	ttgacgtcca	cctgctccag	ctttcccatc	4080
ctgctgatga	catgtgggag	gatcgccgca	acctatgggc	tgggtggacgc	gctgacgaag	4140
aagcaggaga	ggctccatgt	ggccatggcg	actgggggtcc	tctgtgtgaa	gttgagagg	4200
gacagcatga	cccagtcctg	gacctgggat	gactgcccgg	tgctgtgcag	agtctgaaac	4260
accttataca	ccacggtggc	catgaactgg	gggtatggct	gctggttgga	cagaaactct	4320
ccgatgactt	tgttcatgat	gtcctgggggt	gggaagaagt	cgtctagaaa	ctggggcagg	4380
atcctcgcca	ccactctggc	ttcacaagga	aagcctttcc	tgatcctatc	aaaaagaaca	4440
gacacccgct	ccatagcaac	aatcaccgac	tcgctgtctg	gggctgcagg	attaggtctt	4500
gaagtctctac	ccggactgac	tttctccttt	cctgtgtaca	tgcaggtgag	catcaagccc	4560
agagccgcca	tggcccgggtg	cgggctgtgc	acgttcactc	tgtccacact	cagcttgacc	4620
agggattctg	catccaggcg	ggagagctgc	tcagagagca	ggaggcgctc	caggcctctg	4680
agggcacagt	ggtaaatgat	agaggggggtg	gactcctcac	ttccggacag	catcacccca	4740
cacatctgta	ttattgatgc	tgaatttct	ggccctacgt	ccagaggata	gttctcaatc	4800
aggtaaaacg	cagtggcaca	catgaccagt	acgtgctgct	ggctgtgaat	gttcacgcag	4860

tgggcgatcc	ctttcaggtt	ggagaggaga	tagtcactga	tgactgggat	gagctgcttg	4920
gcagtatcgt	ccagcaggtc	gcactccagc	acatagagga	tgccgtgcag	ggctccgacc	4980
ctgctgggca	ggtggctgct	cctgagtgtg	ctctccagca	ggcggctgac	aggctccgcc	5040
acgaccttgt	ccatcccaag	gacggcagct	gccttgacag	tggcgggcac	caggtactga	5100
gcgaggatct	cgtcttctga	aggatgcacc	cttcgcagtt	ctgtcagcgt	cacatacatc	5160
agctcaaact	ggttgcgctc	agtgaacaag	tctgagacca	ccagaaggga	tcgaaccacc	5220
tactgatca	ggatggccgg	ggtcctcctg	gctgagttgg	atggcaggat	ccagcggctg	5280
tacaactcga	gtaaaaaactg	cgaacaggaa	tggatgtcaa	ctccagcccc	gtgtttcctg	5340
gagttgactg	gagacgtggg	tggatgatga	ggtgcagggg	cgtcggcctc	ctcctcctcc	5400
tcctcgtccc	attcctcctc	ccttaggggt	gtgatgctgt	tccccagcca	cacagagtgt	5460
atggacacct	ggccgagttt	gtagctcacg	ctccccagct	cccgtcggg	gttgatctgc	5520
agcagcagct	tctcgtggct	gatgagggca	cctgtggtag	ccggggacag	agaagggaca	5580
ggatcccacg	cctgggtataa	atgatgggtg	gcgatgttct	ctctctttga	aaccattgct	5640
tgaatctctt	gctctacaat	ccctctgata	atgctcagct	tcctcccaa	cctggtgtcc	5700
agagctttca	gaggcttggt	ccgaggtgc	tgctccaagc	agctcacagc	tgggttgccg	5760
gccacaggca	cggtcattgc	actgagcacc	agtgaggtga	tggcctgcac	ggccaggacg	5820
ttgatctgcg	tcctctctgt	gtcttcttct	ggtgggctct	cctcctgctc	catcacagg	5880
ggctgcgtca	ccaggacacc	aaggagagt	gccaagtgtt	cttcaaactg	agtacgactg	5940
gtccagccta	gcgtgttgat	gcggtagatg	aactccttaa	agacttcctt	ttcctggagg	6000
aactccacgg	ggatctcagg	gaatgctgtg	ccaaaatccc	ctcccgggtt	gggtgaccat	6060
ccaagcttcc	acaccagtgg	gggcacacgt	gtgtagctgt	tgacaagggg	caggcgggcc	6120
aggctgacga	cgatgttcct	gagcactgac	gtgagaaacg	ccggcacgcc	actattcctt	6180
ttatgaccca	aagccaacac	cgactgcaga	gactccacca	tttctgccac	catctcacag	6240
gctgcgggtga	tatacttcgg	attctgtgtg	ttaggatcta	tttctcctc	ctcctctctg	6300
atgacttttg	gggtatttgt	ccttctttct	ggactaagaa	gctgctctcc	aggctgcaat	6360
gcaacggcct	ccaggatgaa	gtgcacacag	tggatgaggg	agcaggcgtg	ggtcacaac	6420
tctgcggagg	agaccacgct	ccagaggcca	ggcagctgca	gggccaggca	gcagcagtc	6480
agccctgcct	ggagatccag	actcagcgga	atctgctcat	ggatcaaagt	ccaggacagg	6540
gcctcaagg	ttgccaccac	gaatttcagt	gtgtccttct	ctttctcagg	aggaaggtgc	6600
aagtgactgg	gcagtttgga	gaccgccacc	aggtaactgt	ccaggggccc	ggccagagtg	6660
gtcagggact	gatacagcgc	agcatcccca	aatagatcat	tcaacttgct	ccagtaggcc	6720
gccggctctg	caggcaggtc	ggactggaag	acgtgggtga	cagcagggag	ctgctgcacg	6780
gtgctgctca	cgcgggccag	agtcacctca	caggctgctt	caaaaagcgg	actcttctgg	6840
ccaccagaaa	tttcaactcat	ccctaggett	aagcatggag	ctagcaggct	taggttgaac	6900
tccgagttca	tcatgaaggc	actcatatct	tcagcaggaa	tccgattcac	cagctctgca	6960
ccttcagca	gtgcagaatc	tgacctggtc	caacactggg	atttgacaag	atgaatgtac	7020
cagtctttgt	ccggactcac	tgtttccagt	gacacgtgcc	catccccgtc	cagcgggtgg	7080
gaagagactg	ggggagaggg	actaagttag	tcttgcatgg	tggagagacg	aaacctgtcc	7140
agcagggaat	agagcctctg	gtgtctctga	gcgagccgcg	tgctctgaag	gtattcctgg	7200

attctgttga	gttcttccat	tggaactgg	gccatgctgc	tctgtaaatt	tgcagccaga	7260
agcatttcta	cccggcgaca	agcaaggatg	tcgaccatgc	gagccagcac	acggaaaggg	7320
gtgcacagca	gcctgtccac	atacaacgtg	agcacagctc	ccgactggct	gagatggatc	7380
ccctccaagc	actgaagagt	tttcttcaga	gtggttggag	ttgaaagggt	ttcacaacga	7440
gactgaattg	cctggatgaa	gaggccgctg	gcagcggagt	tccgatgaac	agcactgatg	7500
aagtccctgta	ctggaggctc	gtgggaaagg	ctgatcagat	cttgaatgtg	atttacaatg	7560
agccacgtta	agtgtctcga	gtcatggagg	ttctgacaga	cataatcaca	gaagagaatg	7620
agagccccctc	ttcgtactat	ttctctattg	cacactccaa	gtttggctgc	caagtcagaa	7680
tcctcctctt	ctccagacat	ctggggacta	agtaactttg	tgctggacag	actgtgtctt	7740
ttcggggctct	gctgcacttc	tgcccaccag	cggtagtcgg	tgtggttgac	aagcagcagg	7800
atctgacacc	agagcagcac	cagggccggg	tggttggtga	tcatggaacg	agccccgaaa	7860
ttcaagctgt	ccagggtgta	gaaactgccg	ccacagccat	cactgcggaa	cagtctagtg	7920
gcagctgctg	tgattctccg	gaacattcca	gacttgaaga	tgtggatcag	acacattagc	7980
agagtgccta	gttcttggca	atagaaagta	tgttgctgct	cactcatttc	caccttcagc	8040
tgttttgtaa	caatgtcttc	taaaagaata	cccaccagtt	gtaatagaaa	ccttgaaaat	8100
gtttcttctg	gcaaatctt	tatttgtttc	ccttcactgt	gttcttctag	tgctgaatta	8160
ctgtcccat	ctcttagcct	attaattact	ggacaggaga	ttaaatatgg	agagaaagag	8220
agctcctgaa	tacgagaaaag	aacaatatct	tcagttgact	gggaaatcag	aaccctcaaa	8280
atggccagaa	ttcctgatat	ccacagttga	acagtgtca	cagatgccat	tgtgtttgga	8340
gtgacgaaca	tactccgtaa	aagcatgtcc	accggacgga	gggaggaagg	ggccaaaatc	8400
tcaataaatg	tatttaacac	tccaagggt	tcatgagagt	caatgtgcat	ctgctgtttg	8460
gctaacattg	ggaggatgat	gtcagctatc	tgctgagaca	gtcgcttcca	cttgtcttca	8520
ttctccttgt	ggcactgctg	caggacgaga	atgaacatct	ccaacacctg	atggtactgg	8580
atgagtctca	gtaacattga	taccaccact	tctttttggg	tttcaagctc	ttttcctgca	8640
tcagctttat	ttgttcctct	taatacaaaa	aggtcatgga	ctatgggctg	cagagccggt	8700
atggcgtgtg	tcacagcctt	ccttccactg	gccatgatgc	catcacagag	ctgaatgatt	8760
ttaggaattc	caatgatctg	ttttgaatga	tagcgttcat	aagacagtaa	taccaagaag	8820
aaaaagatgt	ttggaatgat	tgctctgat	tcctgaact	ggcccacttc	aatgtattcg	8880
aactgtttca	atacaaagcc	aataaacacc	tgatctgaat	ccagaagaca	gtaattaacc	8940
cgtaactgaa	ccagctgcgc	cagcaaactc	aaaacctgct	tctgtaactg	cacagatgtt	9000
gttgtcgtgt	actgttttaa	agcttttata	acaagagggt	caaacaaacg	aatgtgatta	9060
tgaatagcat	tcttatctgc	acggttcttt	gtgacacttg	tgaggttcgt	cttcaactgg	9120
gtagacactt	tctggaggac	atcaaaccat	cccaggtgt	cgtgctcctg	ctccgcctgc	9180
accatgttcc	tcaggctggc	gtcagcgagg	gcctgggtga	agtgggtgta	cggggccatg	9240
aagcagtagt	ggtacaagcc	tggcctcaca	ctggaggagc	caaggcgctg	tgctcggcct	9300
tgtgacttgc	tggggttgga	tgataagccg	tcaaaactggg	aggccaagtt	tgtcccaaag	9360
agagtcttca	acaattgttg	aacacaaaca	gttgccatca	ttggttctcg	actaaagcag	9420
gatttcaggt	atcctaggat	ctcctcaaca	cacttcccaa	tgtcctgcag	tgtggccagc	9480
tctagaatct	gagagagaac	gtccaaggct	gagcgaagaa	accctccaaa	tttttccgtg	9540

ctgttctgaa	gatccaaggt	gaccttgtag	ttagcgtgcg	tagctttcag	gacatcatgc	9600
agtttgaggt	atgaaggaag	atgatagaaa	ctccccagtg	atgaggattt	acttgttgta	9660
acaggacctg	aggatatcaga	ttgtctagaa	gctgcactgg	cctcactgcc	tttcttgggga	9720
ctcaacggta	cagatgcttg	ttctcctggg	tctttctcct	tcccctttcg	tcggatggga	9780
cttagagaag	gggggtttgt	tagagaaggc	aaggctgcct	ttattgccgg	tccaggagcc	9840
acgtcgtcca	ggacatgtgc	acaaatgttg	atcaccttca	gcaggaggga	gaagagctgc	9900
tccaccatgg	gcaccaaggc	ccgggtcccc	agggtgggcc	agacctctc	ttgcttggtg	9960
gctgctgggt	tggttcttc	ttcagaggcc	catgaacttc	tcagagattt	aggagcactg	10020
gctgcaagca	agtttccggc	caaaatcaaa	gcattctgat	gggctgagag	atccaatggg	10080
aaccaagctg	acgagagcag	ggtcagaatc	atcgtggcca	tcccaacggg	acagctcttc	10140
ctagactcat	cggaggcgct	cagtggaggc	actccacagt	gccaacctaa	actccaaatg	10200
caaactggga	aggcagtggg	aagaagacac	aaagcttcac	agcatccaaa	agtgagtgtc	10260
ctcgtggttg	atgtgatcag	ttcatgagaa	actgctgcaa	taactcttga	aaggttattt	10320
tccatagtga	catctgttat	gcttggcagt	aggttatagc	ctctgtatat	tctggttatt	10380
gtgctgacgg	agaaatgaga	tggaggctgc	gtctcatgca	tgagaagttt	caggtaaaca	10440
ctgctttgat	ctcttgccac	ggccactact	gggtcagctt	gtccttggtc	acatttataa	10500
aacagctttg	ggacaagcct	aattaatgat	gctgcagcaa	catgtcgcac	cctggggctc	10560
tcatcccaa	gcaaattgat	gacaacatta	ttgagcactc	gttcttgagc	ctttaaagc	10620
cctgtataat	gatgagcccc	tctgtgtaag	ttttctgctt	ttgcctcaa	aaagctcacc	10680
agcctgaagt	caatctccgc	aagggtttcc	agaagctctg	tcctcaccag	ccaataggaa	10740
ctgttctca	gagtcagcac	gtcgatgatc	agctgcagtc	ctaactcact	gtagctgctg	10800
ctgcagagac	tcatgacaca	atgcctcaca	gctgtacagg	ccagcttgca	agtgcagaa	10860
gactcgtcct	tcagtgtttt	ccgcagcaaa	ggaatgcaat	ccgccaaaga	aaatgtgttt	10920
cctgtcaggg	ttctaattggc	gcccattcaa	tctcccacgt	ggaagcggga	cctgctgagg	10980
atggagcaga	tgagggtccc	acagagaatg	gcagtggctc	ctcgaacctg	tgggtctcca	11040
tgatcgatgt	agttcaagat	atctgagaca	tattgttctc	cagggtattc	tgtggtgtca	11100
agaggaactt	tatagagttt	gctgaagaaa	gattctgggt	ggagagccac	agctgctccc	11160
acacagctga	gggccagggc	cttcacgctg	accctcacat	cccgggtccg	aaccagcaca	11220
ttttttcccc	ctgttagcaa	aaatgaagca	gataaaaggc	ggacacaatg	gacaagaggt	11280
gcagaatcat	catcagtggg	ctgtccaatg	tcacctttga	tgcggaagg	cttgttttct	11340
tgatcacccg	gttcagtagc	ttcatctctc	aacacaaatt	tatcaacact	gctgtcagaa	11400
ggctgcctgc	tgtgactcat	gtttttcaat	aaatgtgctt	gttgaagggc	catggaagag	11460
ttcctgaagg	cctccgaggc	ttcgtcagga	agaacacctg	tggttctctc	atcttcatcc	11520
tggggctgtc	caatctgcag	gccccaaatac	tggttgctcg	taccgtctaa	cacaatttca	11580
gaactgtctg	aaggggtgac	agctgaatca	ggcccttcgg	tgggtggtctg	ggagctgtcg	11640
ctgatgggcg	aggaggcctg	ggtcccatca	ttcaggtcca	tggcagggtc	agatgggacg	11700
gcgctgacct	ggctggagct	gtggtcaag	atctctctc	catccccatc	cgtggcagag	11760
cttgtcaagt	cacagctggc	cagatccact	gagtcgcct	gcagcgtgtg	ctgtgaccgt	11820
ggctgctccg	tgatgatgtc	gtgacctgct	gacctggag	tggaaacccc	tgaagaagta	11880

```

gccagctctc cactgatatc atccttcact gaggtgcaa aggcagagct gctgacatcc 11940
gatctcgatt cagagtcac cccaaggct tcttcttctc ctaagagcac tttgcctttt 12000
tgttttcttg aaaggacagg gctgcatgag gaacccctc cagctataag ttccacaata 12060
ctcccactac ggcttcggcc accagactcc tccttagcgg cggtaaagctg cccaatgccc 12120
cccactgtgg tcagggttg cagaagctcg gggggaggcg ttctgaagag ctgctgcaac 12180
agctccaggg ctccggtcac aacattgttg tcttggtgct gtgtatgatg taacgtcagt 12240
tcataaacct ggacaagctg ctctgcagaa ggagagacct ccatttcttt ccgtgtcact 12300
ccgaagctgc ctttcaggct tgtatccttg acctgctgct gcagcaaggg caccaaatac 12360
ctcagggtga gcagcacgcc aagaatcagc aggggtggagt gctcctctc gacaggaacc 12420
agtaagccta agagcacatt tagtagccag ctatagaaat actgtgtcct tcttgagtgc 12480
tggcagatgc tcaactgctga tccagcagct gtccgccgaa tagtggggga gcttgacttc 12540
aggttcgcta tgaaggcctt taacaaaacc ttaatttcat tgtcatttgc aaaattgccg 12600
aaagaagcca taattttggg aacagctgca gccaaagttc cctggactga ttctctgggt 12660
ctcttgcttg ttcgacttag gcacggcaga aggttcacca ggtaaggcct gcatttctga 12720
ggccgaacca ggtgagccag ctccgcaaac ctccacaggg cagcacgcaa actccagggg 12780
gcaccattct ttttaatttc tttatagagc tcgagctgta accttggaag attagaatcc 12840
atcaaagctt tgataacttt gttgaggcat tcatcagcca ccattctgac atccgactct 12900
gcgtcatcac tgcacagcag aaaaagttcc atagcgatgc ccagaagttt ctgaaattct 12960
ggagaatttc tgacagactg tgccactatg tttcacata ttgtcagaca atgattcaca 13020
cggctcttct tggtagctga aagttctttc tttggtcggg gcagcggctc ctcagccaca 13080
gccgggccgg gtggtggcgg gggcggcggc gggggcggct gcggctgagg cagcatcggc 13140
tgtgcctgcg gcggctgagg aagctgagga ggaggaggcg gcggcggcgg cggcggcggc 13200
ggctgttgct gctgctgctg ctgctgctgc tgctggaagg acttgagaga ctcgaaggcc 13260
ttcatcagct tttccagggt cgccatggcg gtctcccgcc cggctaggca gtccccggag 13320
gcctcgggcc gactcgcagc gccgctcagc accggggcaa tgaatggggc tctgggccgc 13380
gggtaaaagc ggaaccgaag cggccgtcca tcttggaacc gtcccggcag ccccgcggc 13440
gccttgc 13447

```

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> source

<223> /注释=“未知的描述:RFGF肽序列”

<400> 11

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1

5

10

15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> source
<223> /注释=“未知的描述:RFGF类似物序列”
<400> 12
Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10
<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 人类免疫缺陷病毒1
<400> 13
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10
<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 果蝇(Drosophila sp.)
<400> 14
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15
<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
<400> 15
gcuaaucaua aucacauucg a
<210> 16
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”
<400> 16

21

ucgaauguga uuaugaauag cau	23
<210> 17	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 17	
gcuaaucaua aucacauucg a	21
<210> 18	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 18	
ucgaauguga uuaugaauag cau	23
<210> 19	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 19	
ucauaaucac auucguuugu a	21
<210> 20	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 20	
uacaaacgaa ugugauuauug aa	23
<210> 21	
<211> 21	

<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	21	
	gcuggugaau cggauuccug a	21
<210>	22	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	22	
	ucaggaaucc gauucaccag cuc	23
<210>	23	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	23	
	uggaaaagcu gaugaaggcc a	21
<210>	24	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	24	
	uggccutcau cagcuuuucc agg	23
<210>	25	
<211>	21	

<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	25	
ucauaaucac auucguuugu a		21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	26	
gcuggugaau cggauuccug a		21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	27	
uggaaaagcu gaugaaggcc a		21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	28	
ccauggcgac ccuggaaaag a		21
<210>	29	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	29	
	uacaaacgaa ugugauuaug aa	23
<210>	30	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	30	
	ucaggaaucc gauucaccag cuc	23
<210>	31	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	31	
	uggccutcau cagcuuuucc agg	23
<210>	32	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	32	
	ucuuuuuccag ggucgccaug gcg	23
<210>	33	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	33	
	ccauggcgac ccuggaaaag a	21
<210>	34	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	34	
	ucuuuuccag ggucgccaug gcg	23
<210>	35	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	35	
	cuucgagucc cucaaguca	19
<210>	36	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	36	
	acccuggaaa agcugaugaa a	21
<210>	37	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	37	

ccuggaaaag cugaugaaa	19
<210> 38	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 38	
cugaugaagg ccuucgaguc a	21
<210> 39	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 39	
cugaagaagg ccuucgaguc a	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 40	
gcgacccugg aaaagcugau a	21
<210> 41	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 41	
ucccucaagu ccuuccagca a	21
<210> 42	
<211> 21	

<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	42	
ucccacaagu ccuuccagca a		21
<210>	43	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	43	
ucagguucug cuuuuacca		19
<210>	44	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	44	
cuucgagucc cucaaguccu a		21
<210>	45	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	45	
gccgcucagg uucugcuuuu a		21
<210>	46	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	46	
	ccggucaggu ucugcuuuua a	21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	47	
	ugactugagg gacucgaagg c	21
<210>	48	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	48	
	uuucaucagc uuuccaggg ucg	23
<210>	49	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	49	
	uuucaucagc uuuccaggg u	21
<210>	50	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	50	
	ugacucgaag gccuucauca gcu	23
<210>	51	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	51	
	ugactcgaag gccuucuuca gcu	23
<210>	52	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	52	
	uauacagcuuu uccagggucg cca	23
<210>	53	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	53	
	uauacagcuuu uccagggucg ccg	23
<210>	54	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	54	
	uugcuggaag gacuugaggg acu	23
<210>	55	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	55	
	uugctggaag gacuuguggg acu	23
<210>	56	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	56	
	ugguaaaagc agaaccugag c	21
<210>	57	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	57	
	uaggactuga gggacucgaa ggc	23
<210>	58	
<211>	23	

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 58	
uaaaagcaga accugagcgg ccg	23
<210> 59	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 59	
uuaaaagcag aaccugaccg gcc	23
<210> 60	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 60	
cuucgagucc cucaaguca	19
<210> 61	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 61	
accuggaaa agcugaugaa a	21
<210> 62	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	62	
	ccuggaaaag cugaugaaa	19
<210>	63	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	63	
	cugaugaagg ccuucgaguc a	21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	64	
	cugaagaagg ccuucgaguc a	21
<210>	65	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	65	
	gcgacccugg aaaagcugau a	21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		

<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	66	
	gcgacccugg aaaagcugau a	21
<210>	67	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	67	
	ucccucaagu ccuuccagca a	21
<210>	68	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	68	
	ucccacaagu ccuuccagca a	21
<210>	69	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	69	
	ucagguucug cuuuuacca	19
<210>	70	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	70	

cuucgagucc cucaaguccu a	21
<210> 71	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 71	
gccgcucagg uucugcuuuu a	21
<210> 72	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 72	
ccggucaggu ucugcuuuua a	21
<210> 73	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 73	
ugactugagg gacucgaagg c	21
<210> 74	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	74	
uuucaucagc	uuuuccaggg	ucg
		23
<210>	75	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	75	
uuucaucagc	uuuuccaggg	u
		21
<210>	76	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	76	
ugacucgaag	gccuucuca	gcu
		23
<210>	77	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	77	
ugactcgaag	gccuucuca	gcu
		23
<210>	78	
<211>	23	

<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	78	
uauca <u>gc</u> uuu uccagggucg cca		23
<210>	79	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	79	
uauca <u>gc</u> uuu uccagggucg ccg		23
<210>	80	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	80	
uu <u>gc</u> uggaag gacuuagaggg acu		23
<210>	81	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	81	

uugctggaag gacuuguggg acu	23
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 82	
ugguaaaaagc agaaccugag c	21
<210> 83	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 83	
uaggactuga gggacucgaa ggc	23
<210> 84	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 84	
uaaaagcaga accugagcgg ccg	23
<210> 85	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<220>	
<221> source	
<223> /注释=“组合的DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸”	
<400> 85	
uuaaaaagcag aaccugaccg gcc	23
<210> 86	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 86	
gccuucgagu cccucaaguc c	21
<210> 87	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 87	
cgccauggcg acccuggaaa agc	23
<210> 88	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 88	
cgaccucugga aaagcugaug aag	23
<210> 89	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 89	
accucuggaaa agcugaugaa g	21
<210> 90	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 90	

agcugaugaa ggccuucgag ucc	23
<210> 91	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 91	
uggcgacccu ggaaaagcug aug	23
<210> 92	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 92	
agucccucaa guccuuccag cag	23
<210> 93	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 93	
gcucagguuc ugcuuuuacc u	21
<210> 94	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 94	
gccuucgagu cccucaaguc cuu	23
<210> 95	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 95	
cggccgcuca gguucugcuu uua	23
<210> 96	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 96	
ggccgcucag guucugcuu uac	23
<210> 97	
<211> 21	

<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	97	
	ccagagcccc auucauugcc a	21
<210>	98	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	98	
	uggcaaugaa uggggcucug ggc	23
<210>	99	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	99	
	ccagagcccc auucauugcc a	21
<210>	100	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	source	
<223>	/注释=“人工序列的描述:合成寡核苷酸”	
<400>	100	
	uggcaaugaa uggggcucug ggc	23
<210>	101	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	101	

gccagagcc ccauucuuug ccc

23

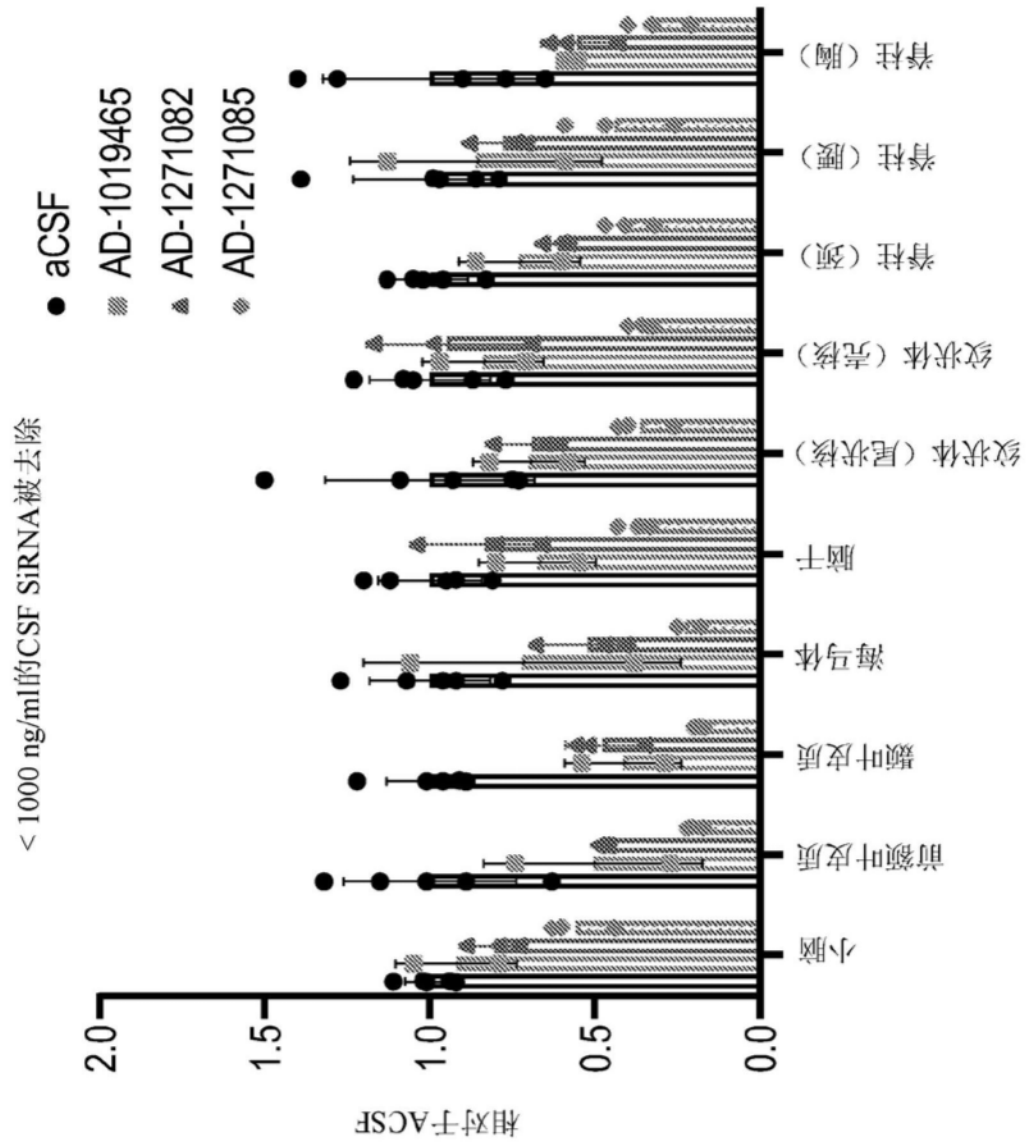


图1

	平均值	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ACSF	SD	0.08	0.26	0.13	0.18	0.16	0.31	0.18	0.11	0.24	0.33								
	平均值	0.86	0.63	0.44	0.77	0.78	0.76	0.80	0.74	0.87	0.57								
AD-1019465	SD	0.16	0.32	0.13	0.35	0.22	0.16	0.15	0.13	0.27	0.02								
	平均值	0.80	0.47	0.48	0.52	0.83	0.69	0.95	0.61	0.78	0.55								
AD-1271082	SD	0.08	0.02	0.11	0.14	0.19	0.10	0.24	0.04	0.09	0.11								
	平均值	0.56	0.20	0.18	0.23	0.38	0.36	0.36	0.40	0.44	0.31								
AD-1271085	SD	0.10	0.02	0.01	0.04	0.05	0.09	0.04	0.07	0.17	0.10								

图2

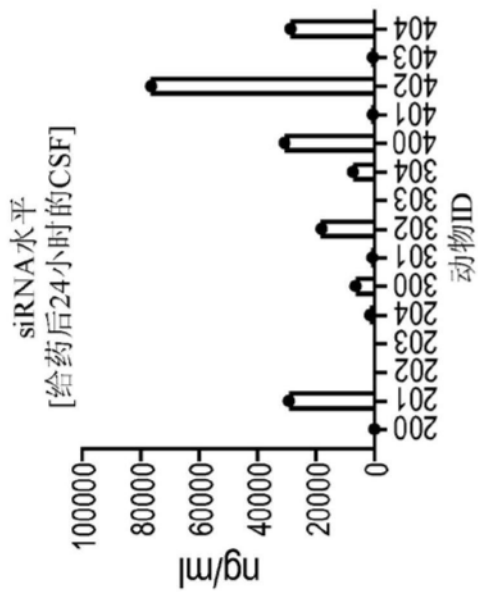


图3A

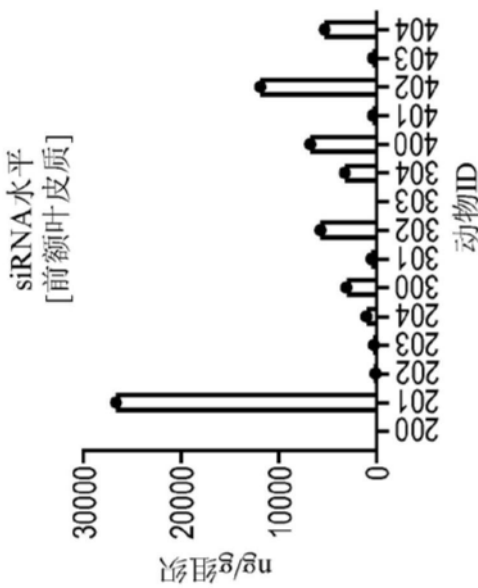


图3B

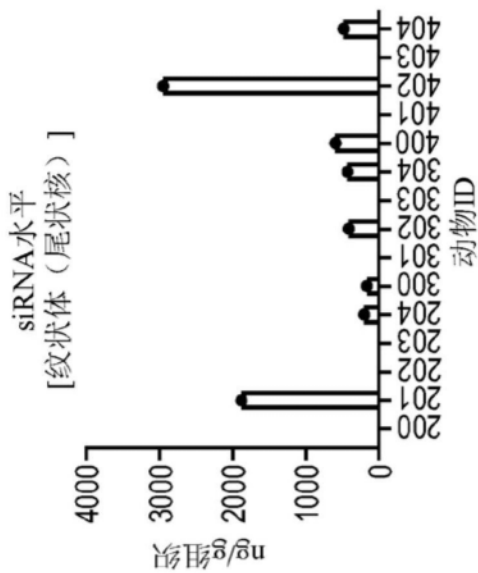


图3C

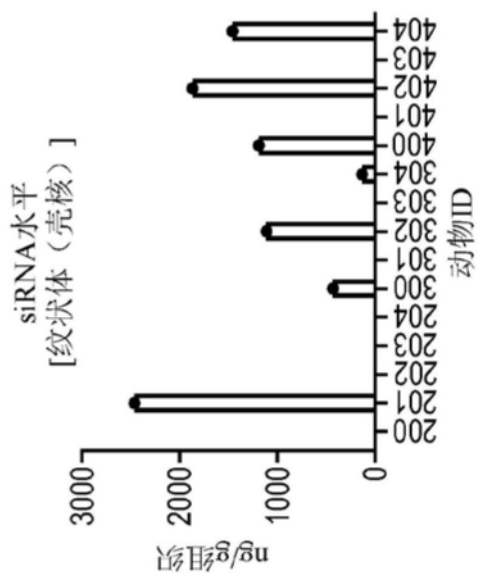


图3D

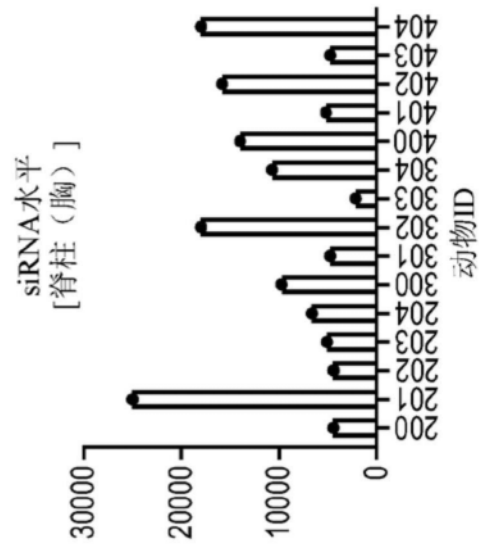


图3E

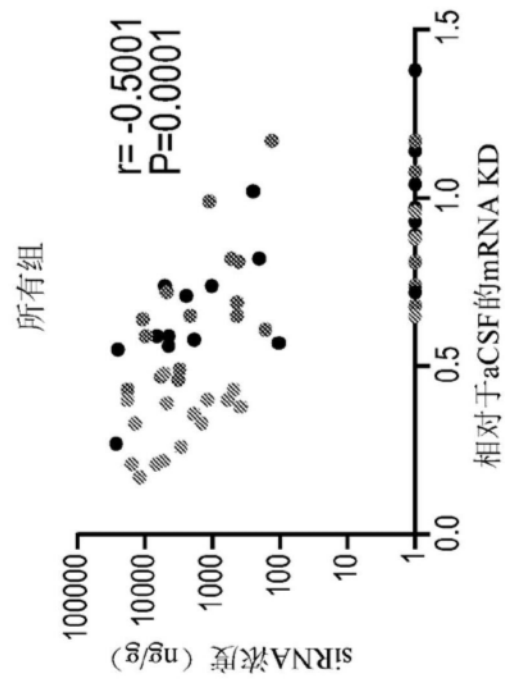


图4A

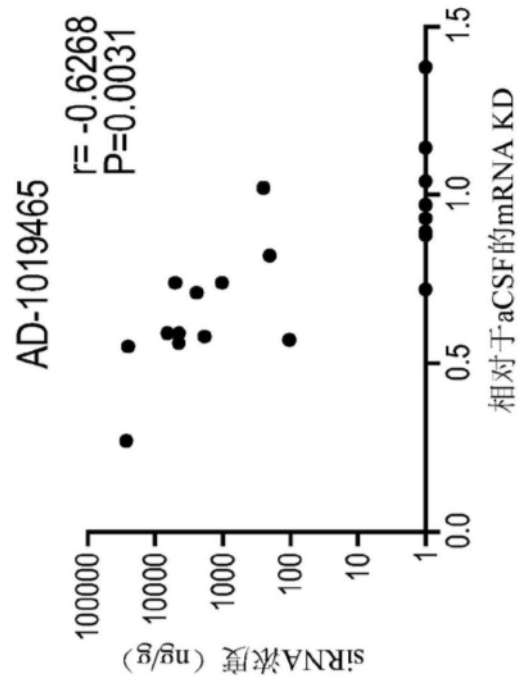


图4B

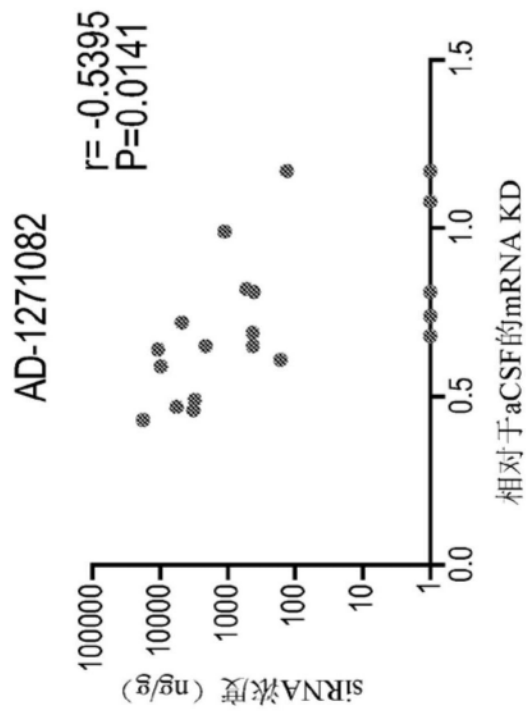


图4C

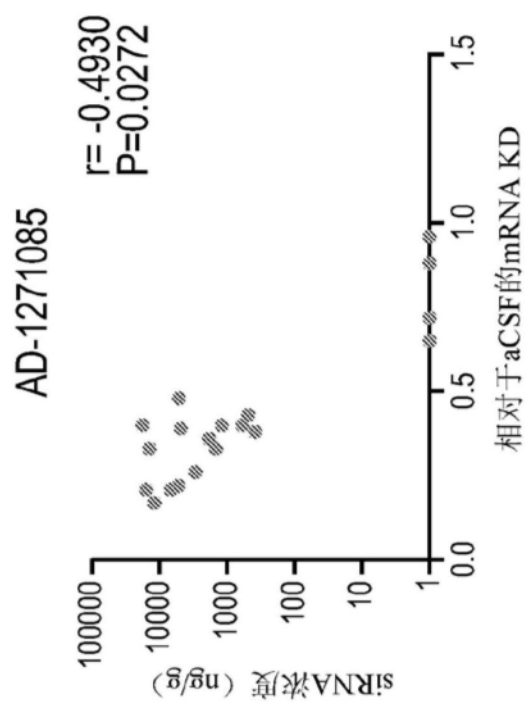


图4D

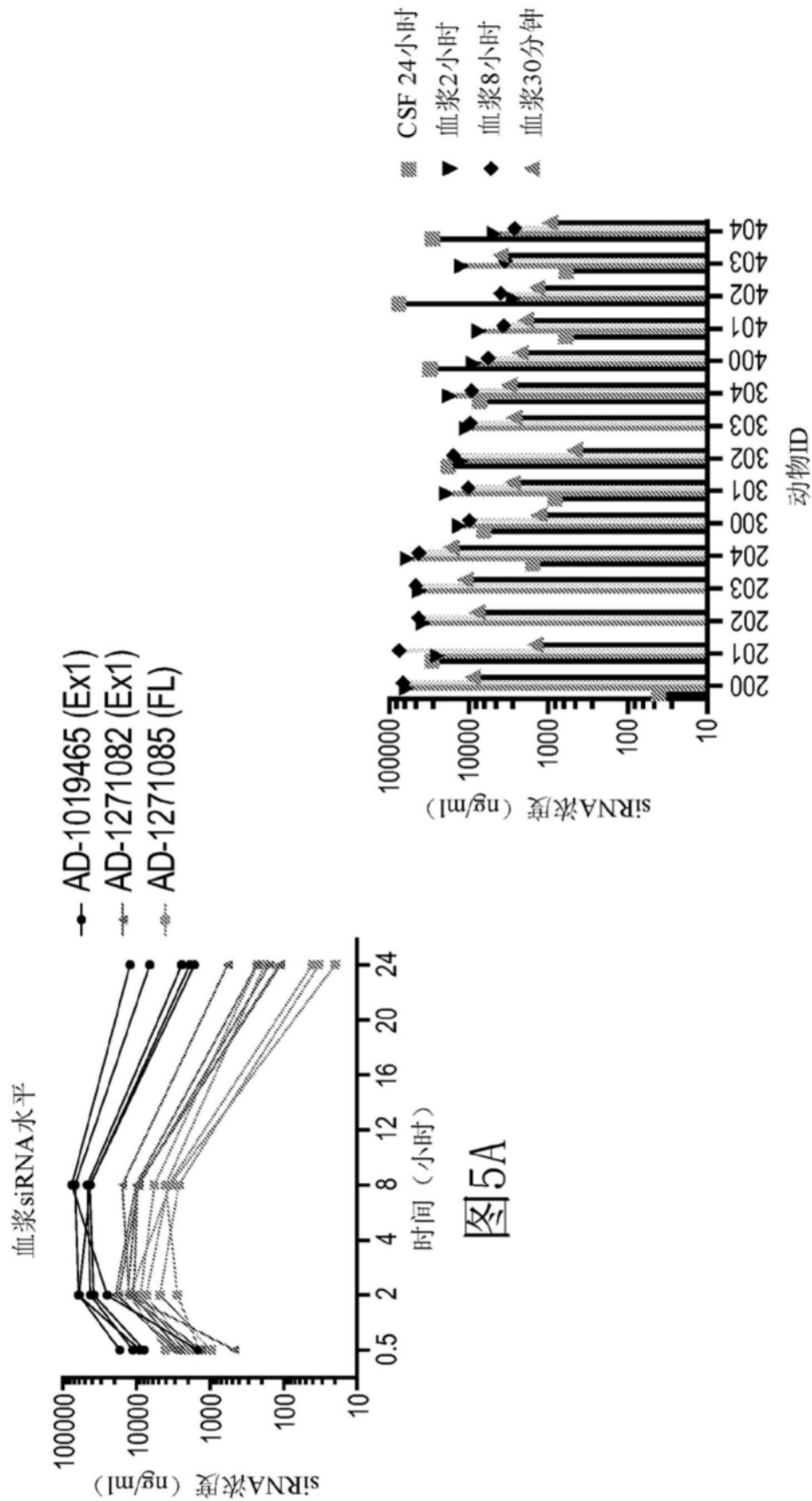


图5A

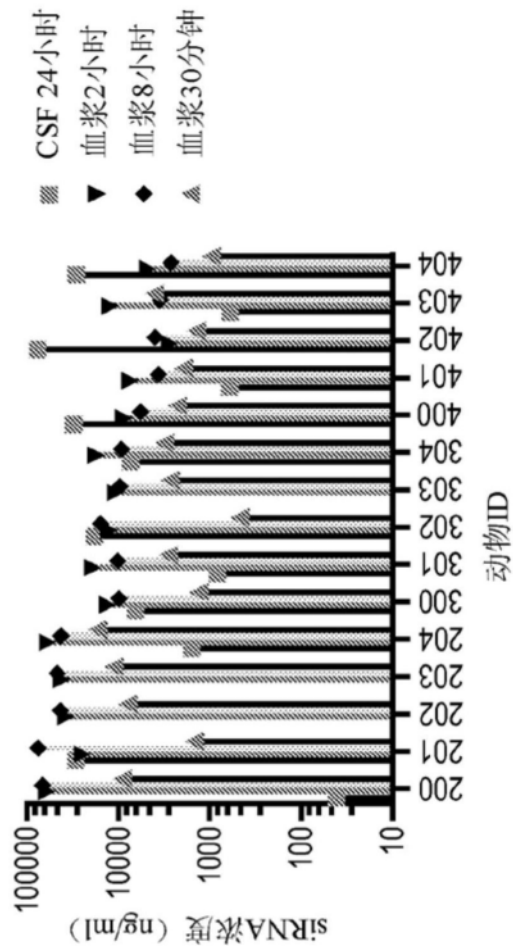


图5B

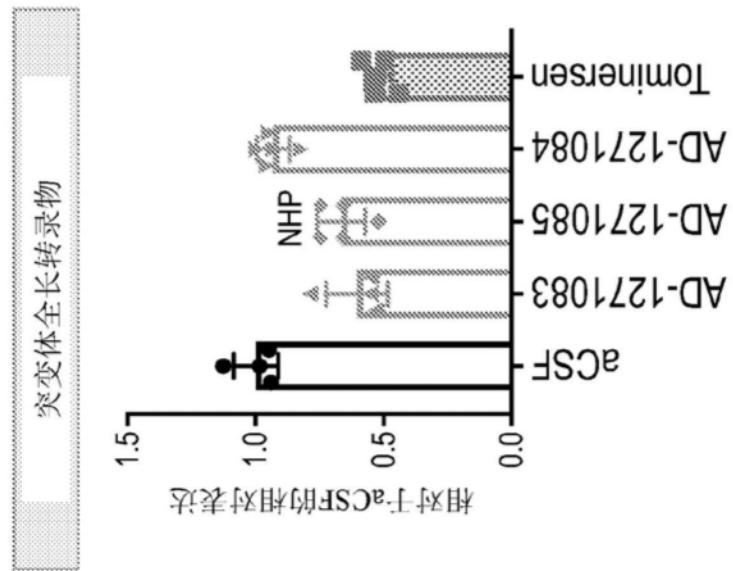


图6A

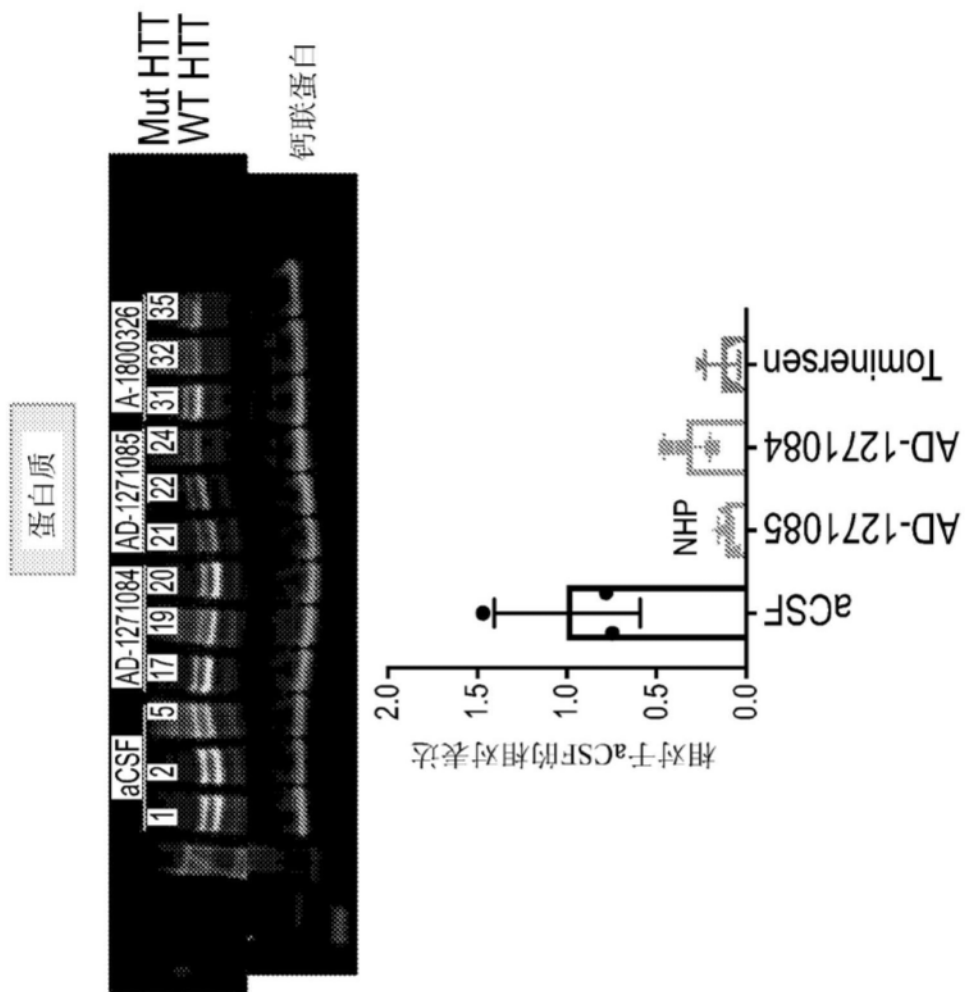


图6B

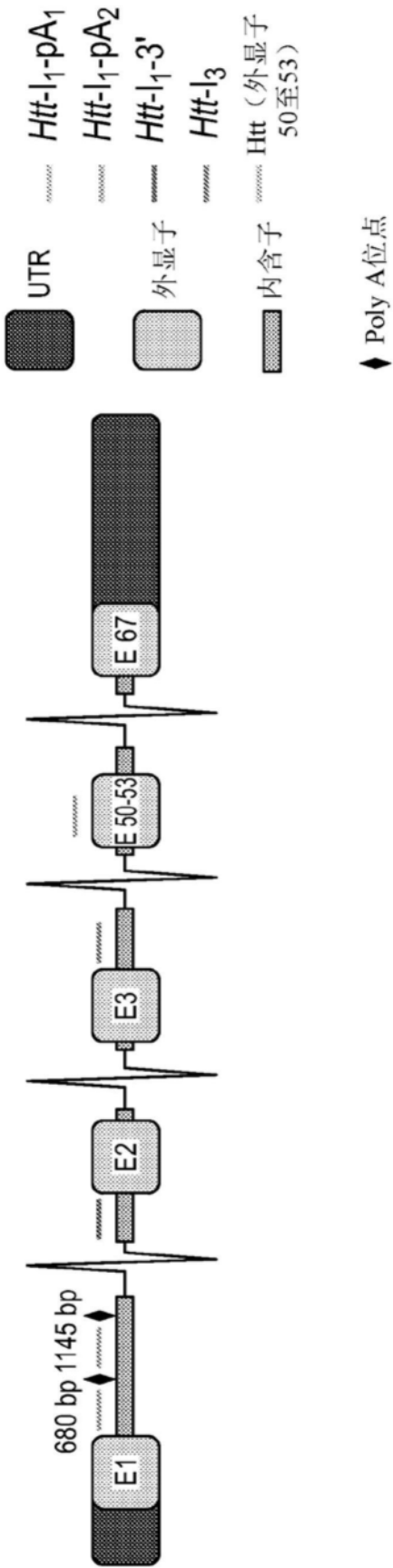


图7

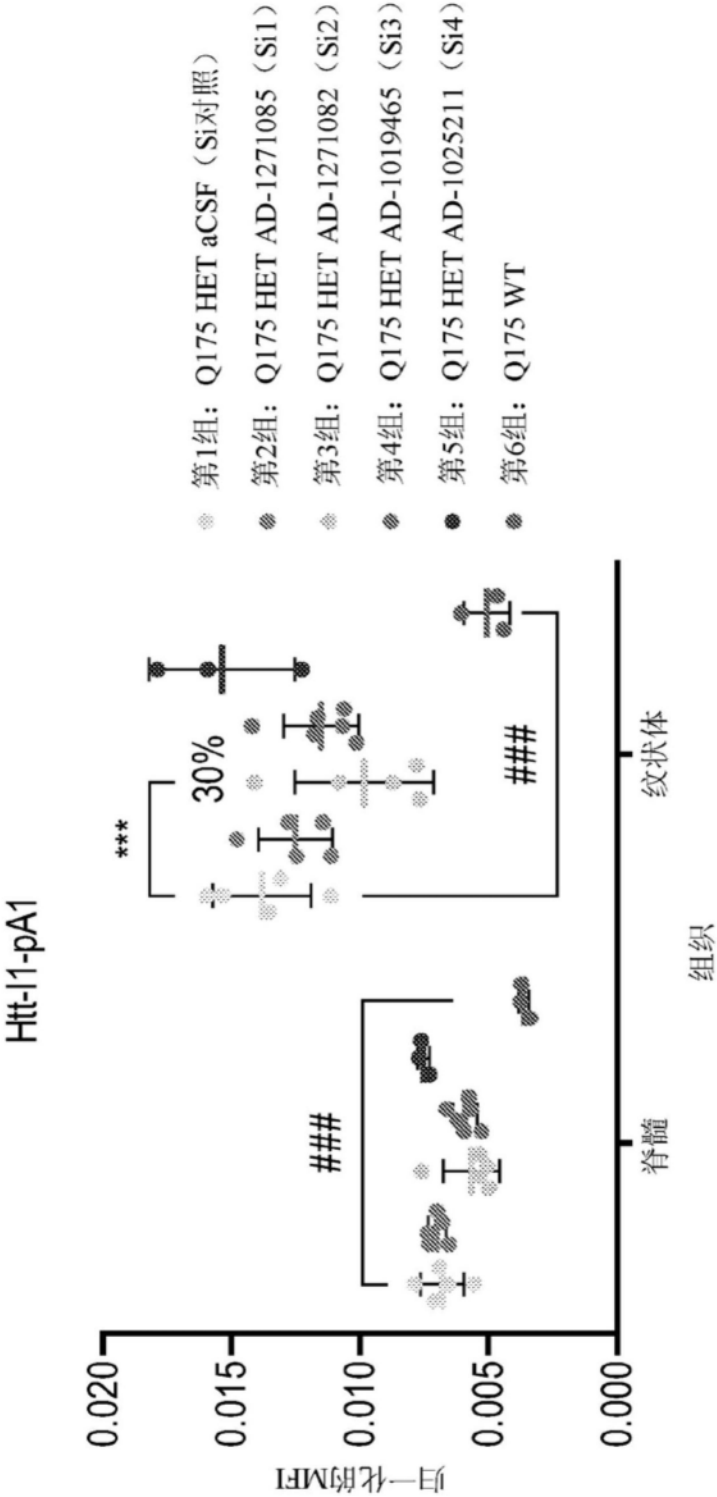


图8A

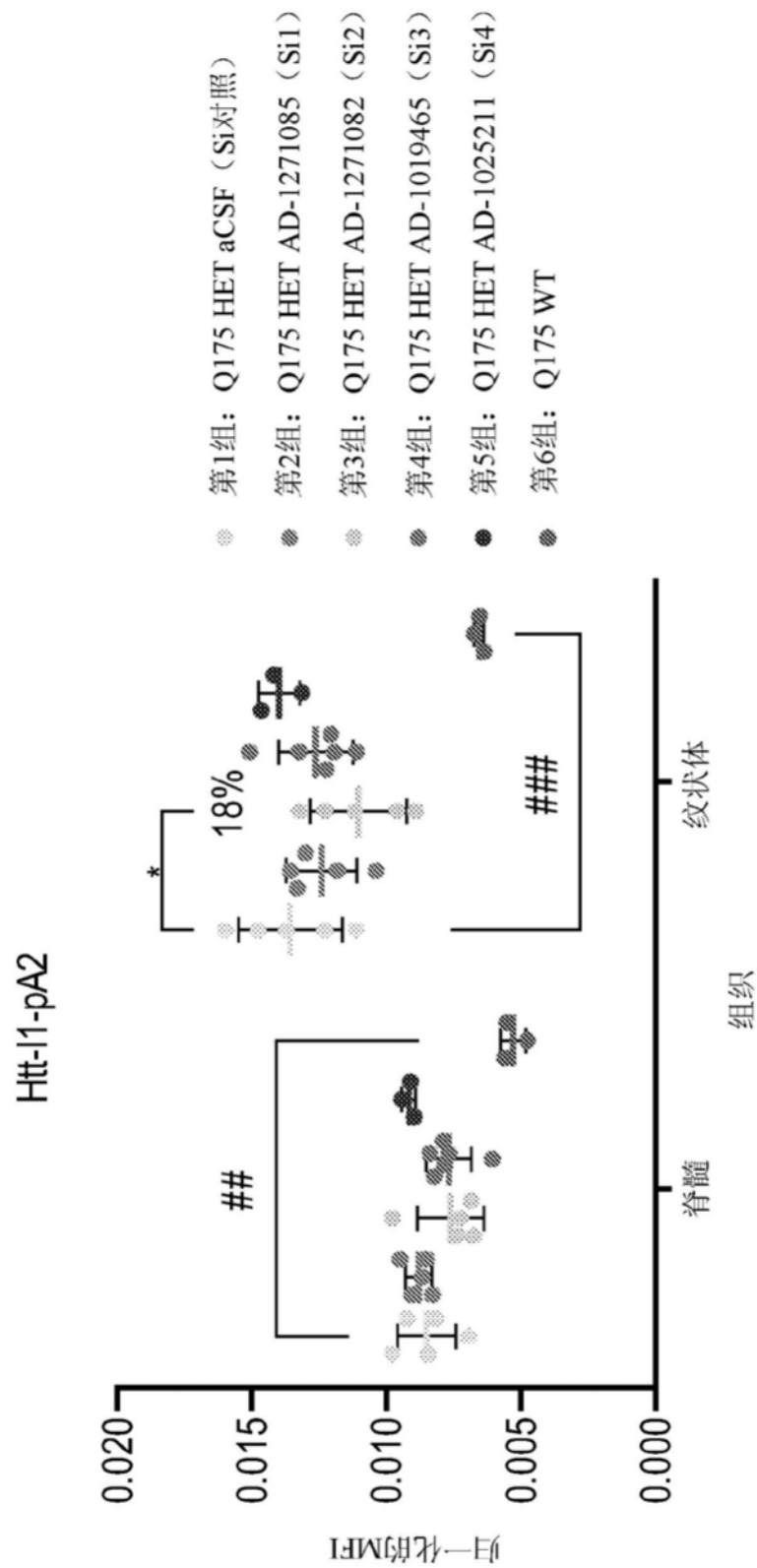


图8B

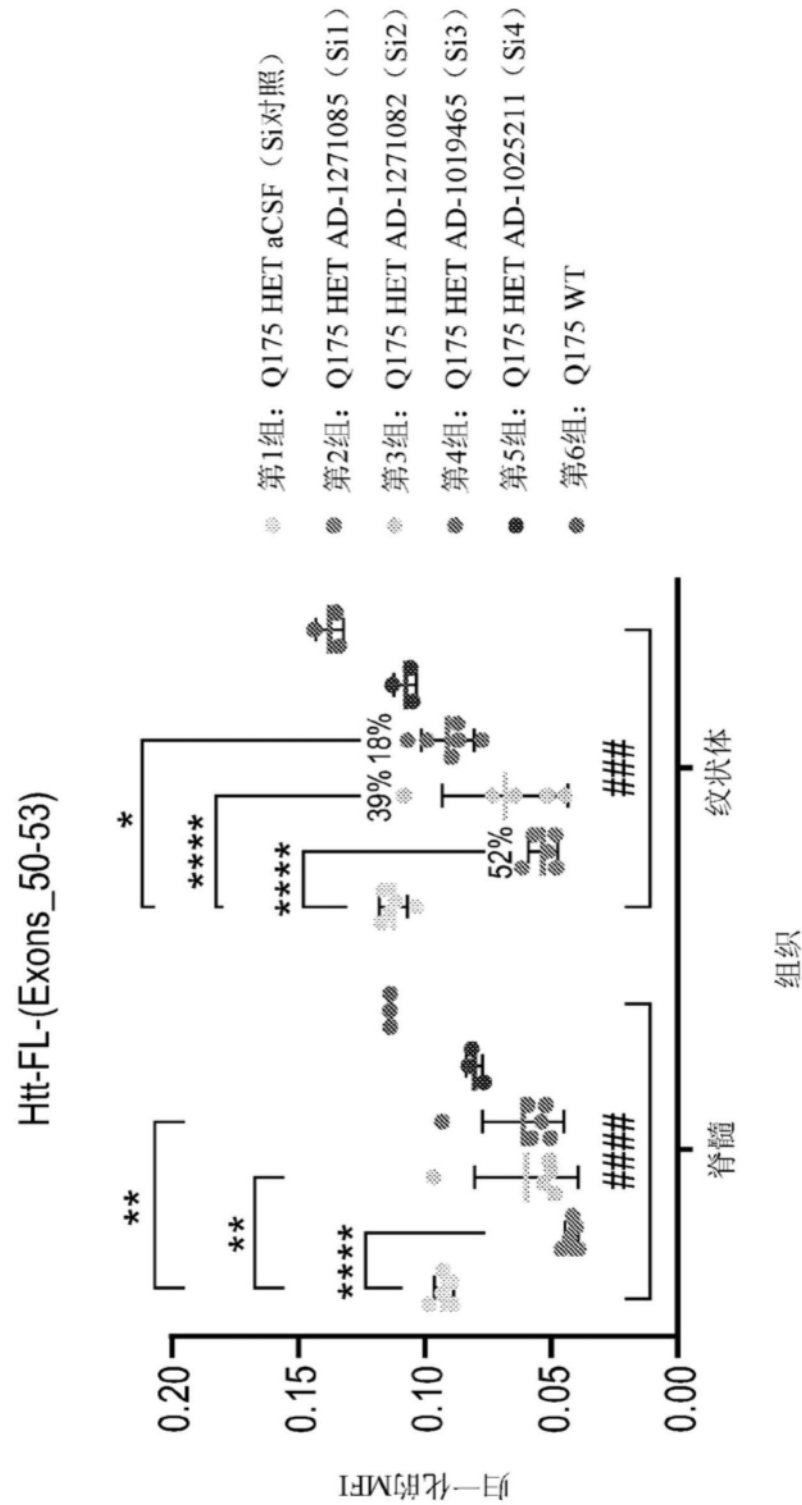


图8C

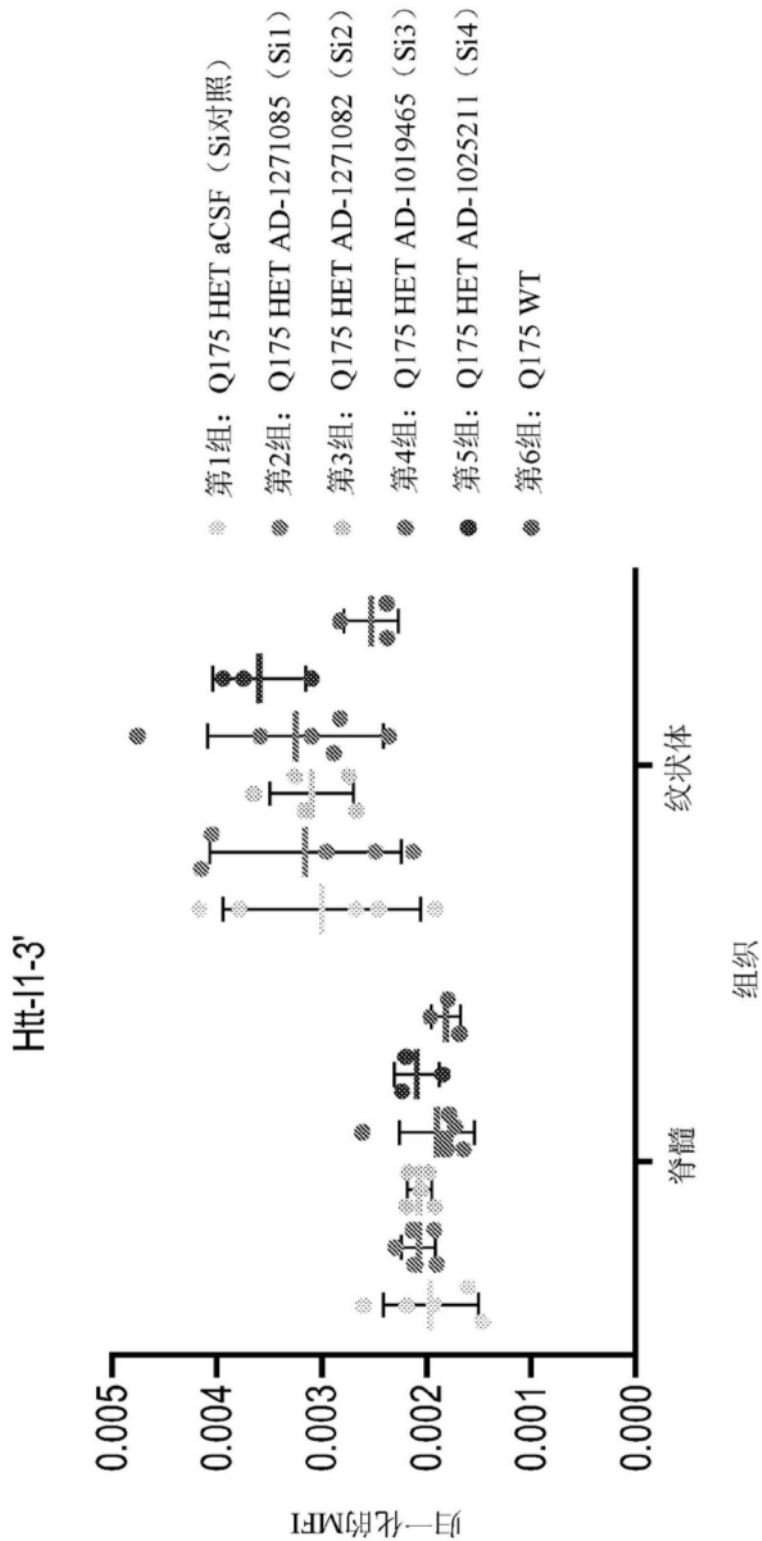


图8D

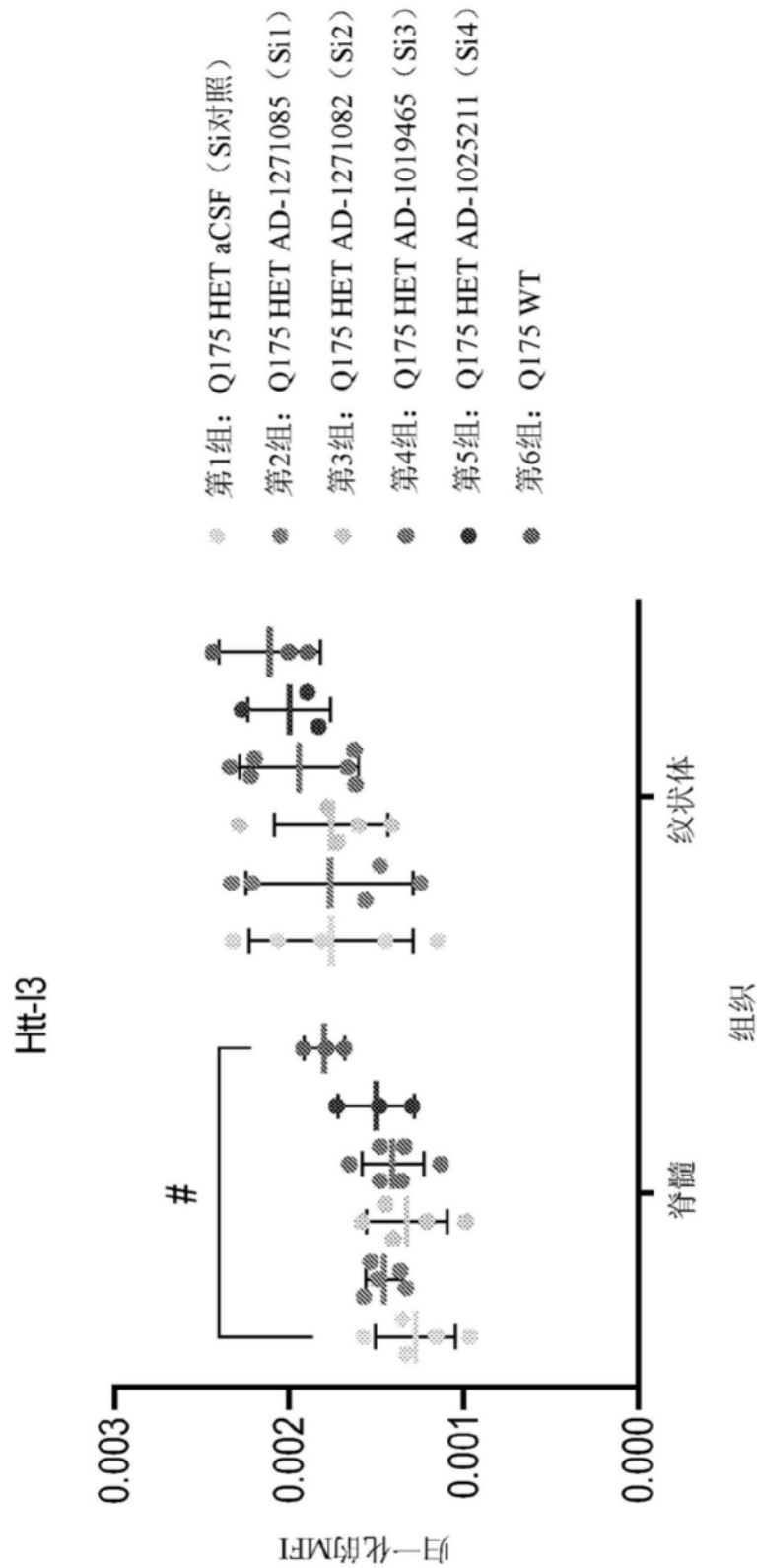


图8E

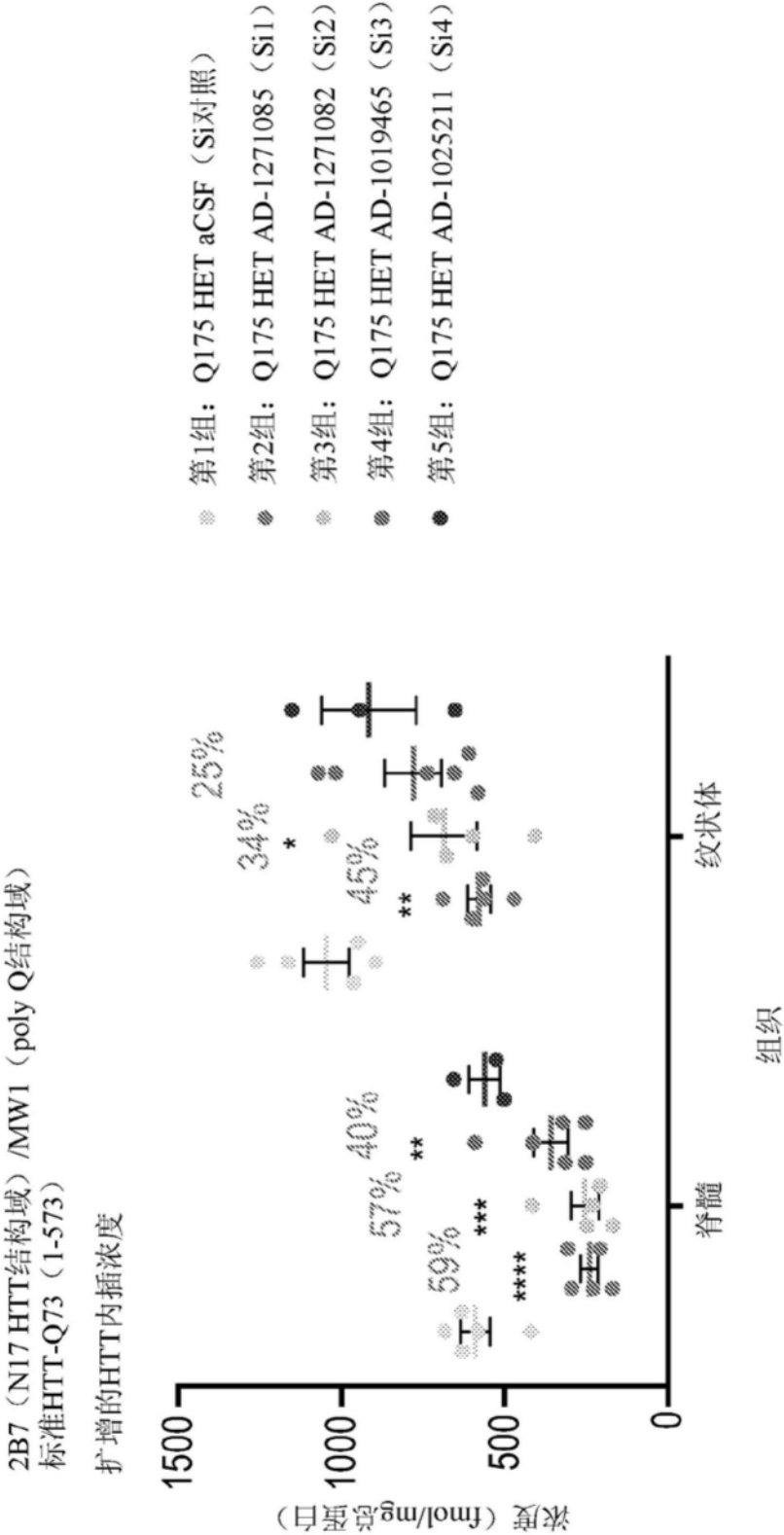


图8F

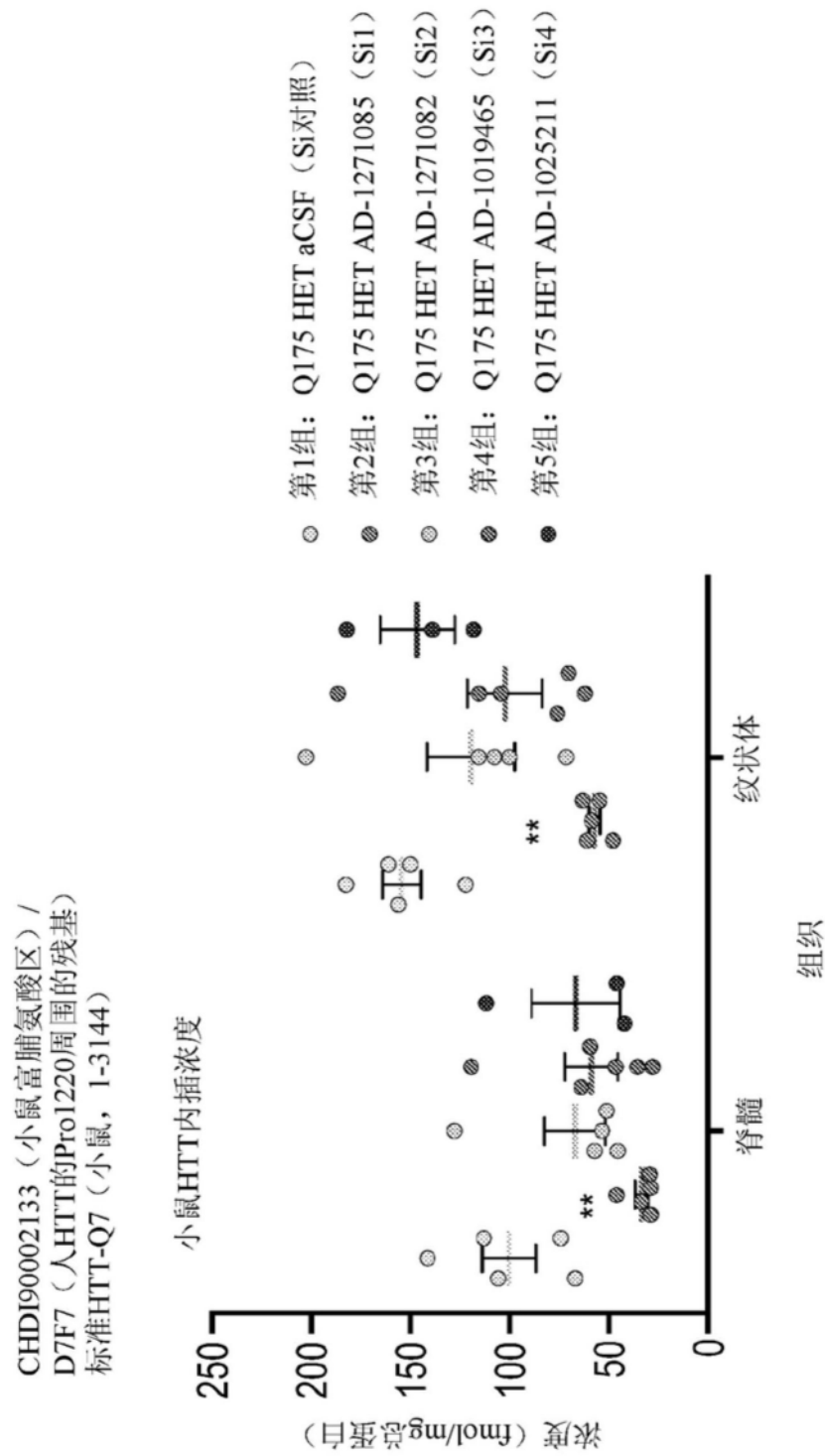
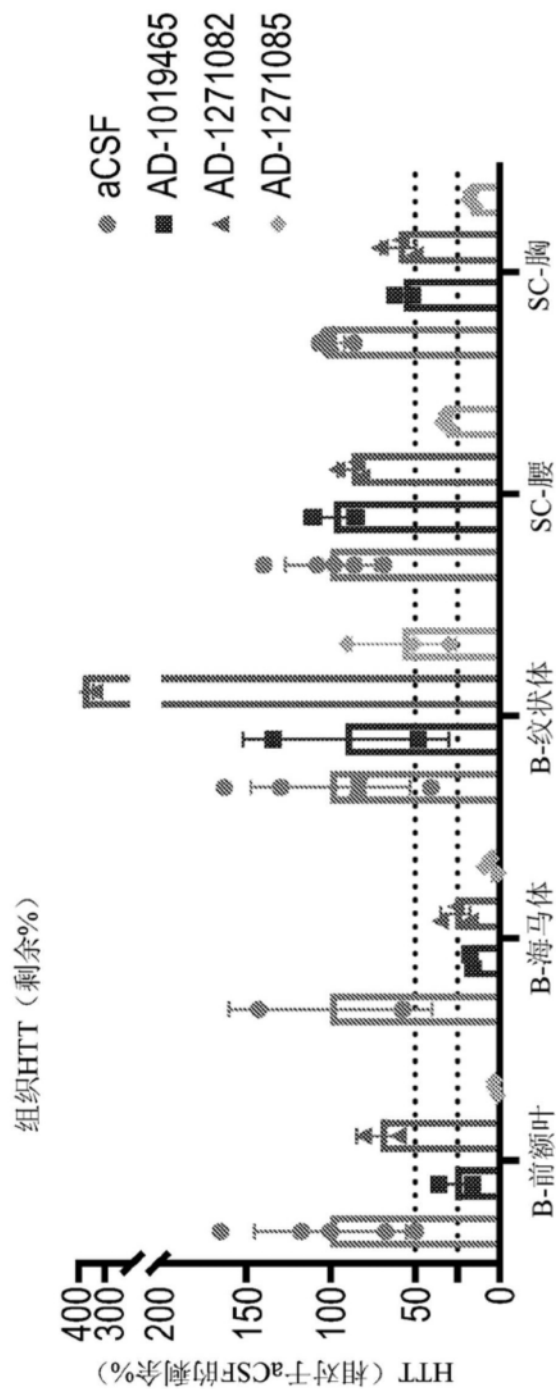


图8G



处理	研究剂量 (mg)	脑-前额叶			脑-海马体			脑-纹状体尾状核			脊柱-腰			脊柱-胸		
		平均 HTT (ng/mg)	% K/D	SD	平均 HTT (ng/mg)	% K/D	SD	平均 HTT (ng/mg)	% K/D	SD	平均 HTT (ng/mg)	% K/D	SD	平均 HTT (ng/mg)	% K/D	SD
aCSF	0	35.91	0.000	44.96	39.13	0.000	60.01	50.85	0.000	47.02	19.61	0.000	26.53	27.85	0.000	8.20
AD-1019465	60	9.36	73.935	14.10	6.56	83.241	1.27	46.35	8.862	60.69	19.17	2.246	17.31	15.81	43.223	7.52
AD-1271082	60	25.25	29.687	14.38	10.25	73.800	8.68	194.83	-283.104	39.25	17.23	12.167	7.59	16.68	40.108	10.50
AD-1271085	60	0.97	97.307	0.93	2.04	94.774	3.99	29.01	42.964	30.91	6.18	68.483	2.40	4.69	83.147	2.04

图9

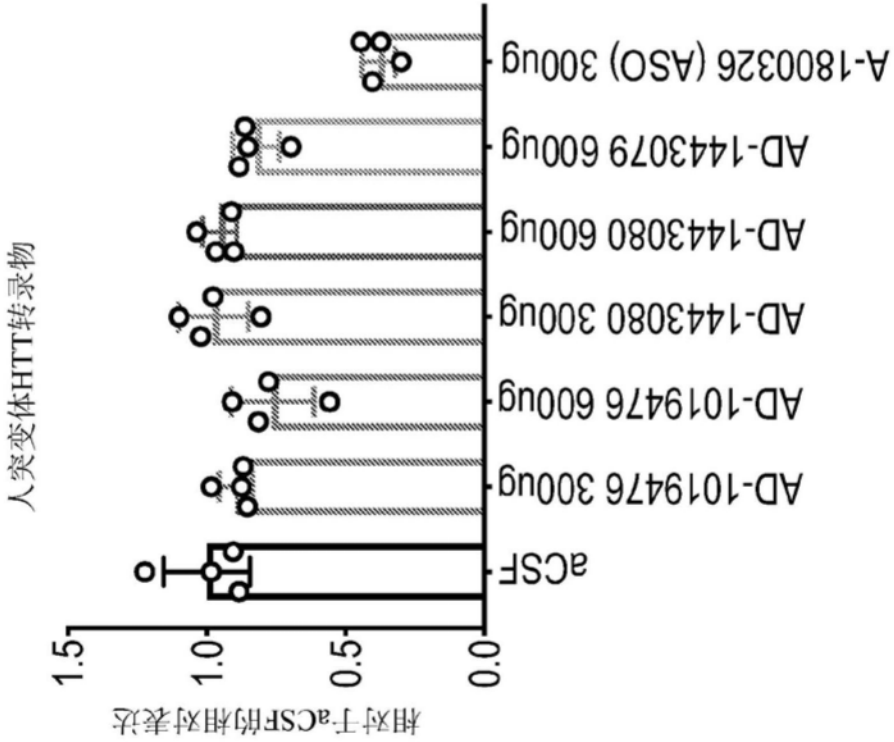


图10A

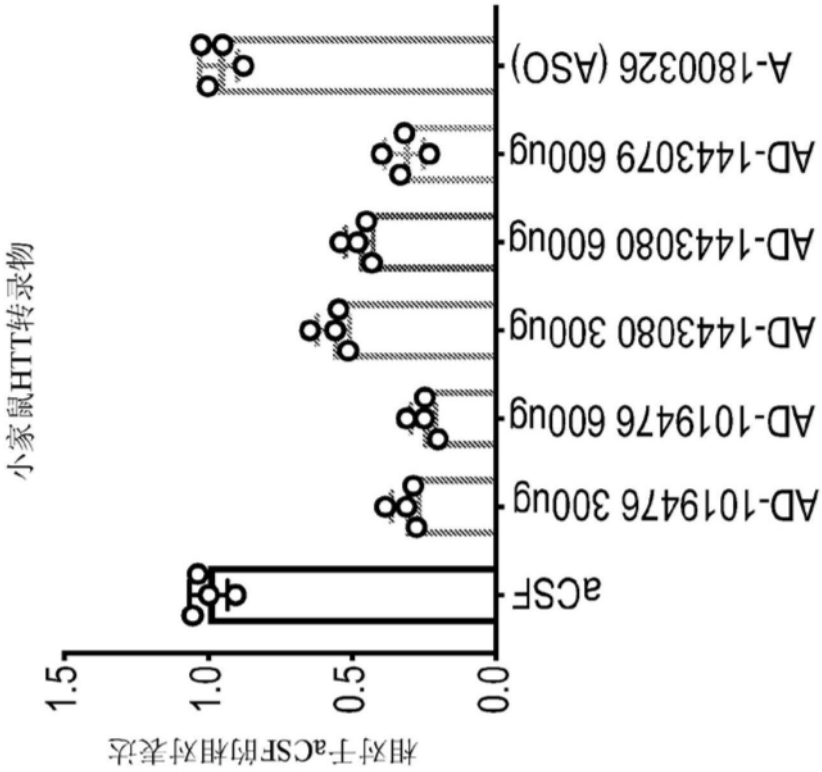


图10B

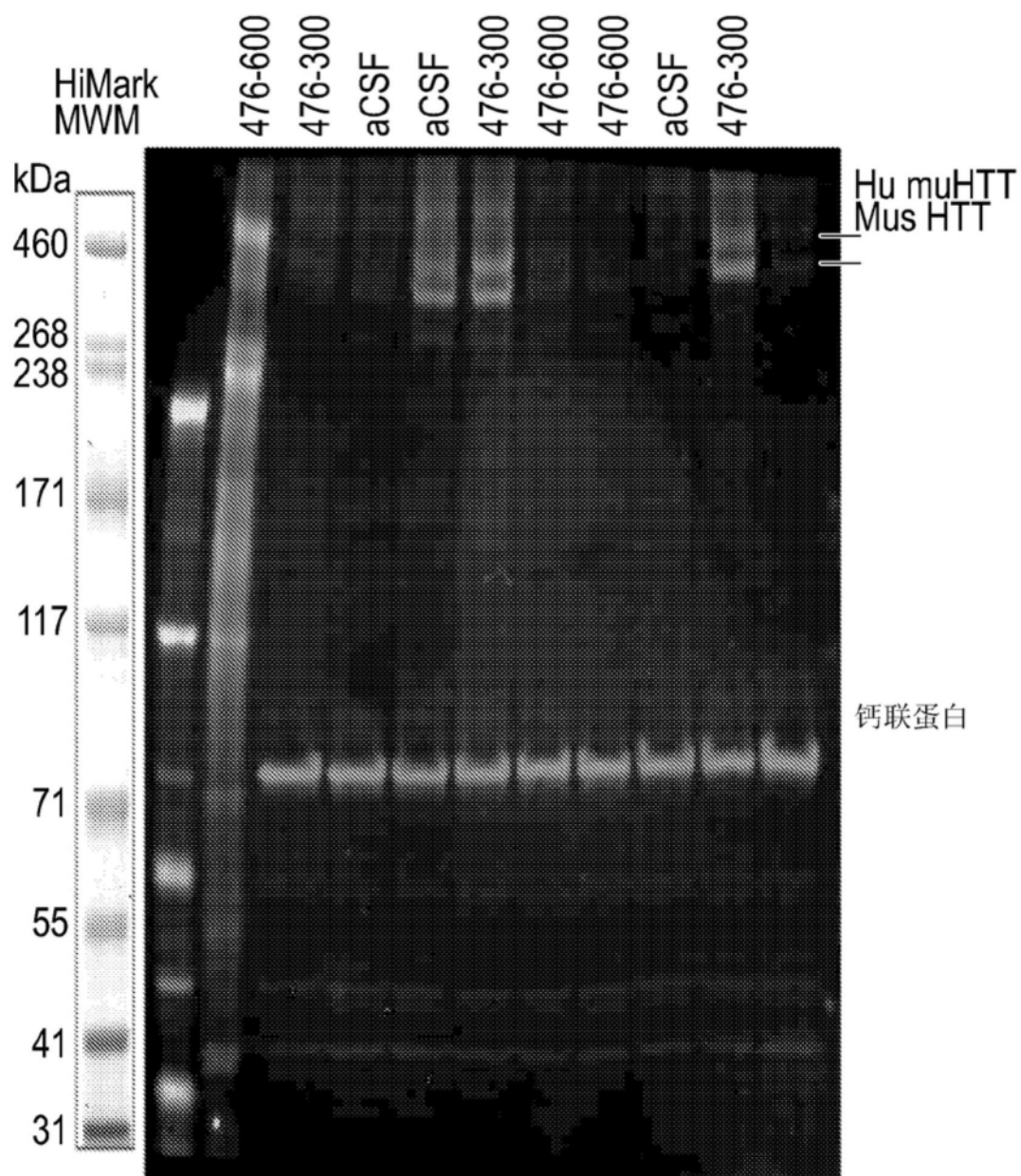


图10C

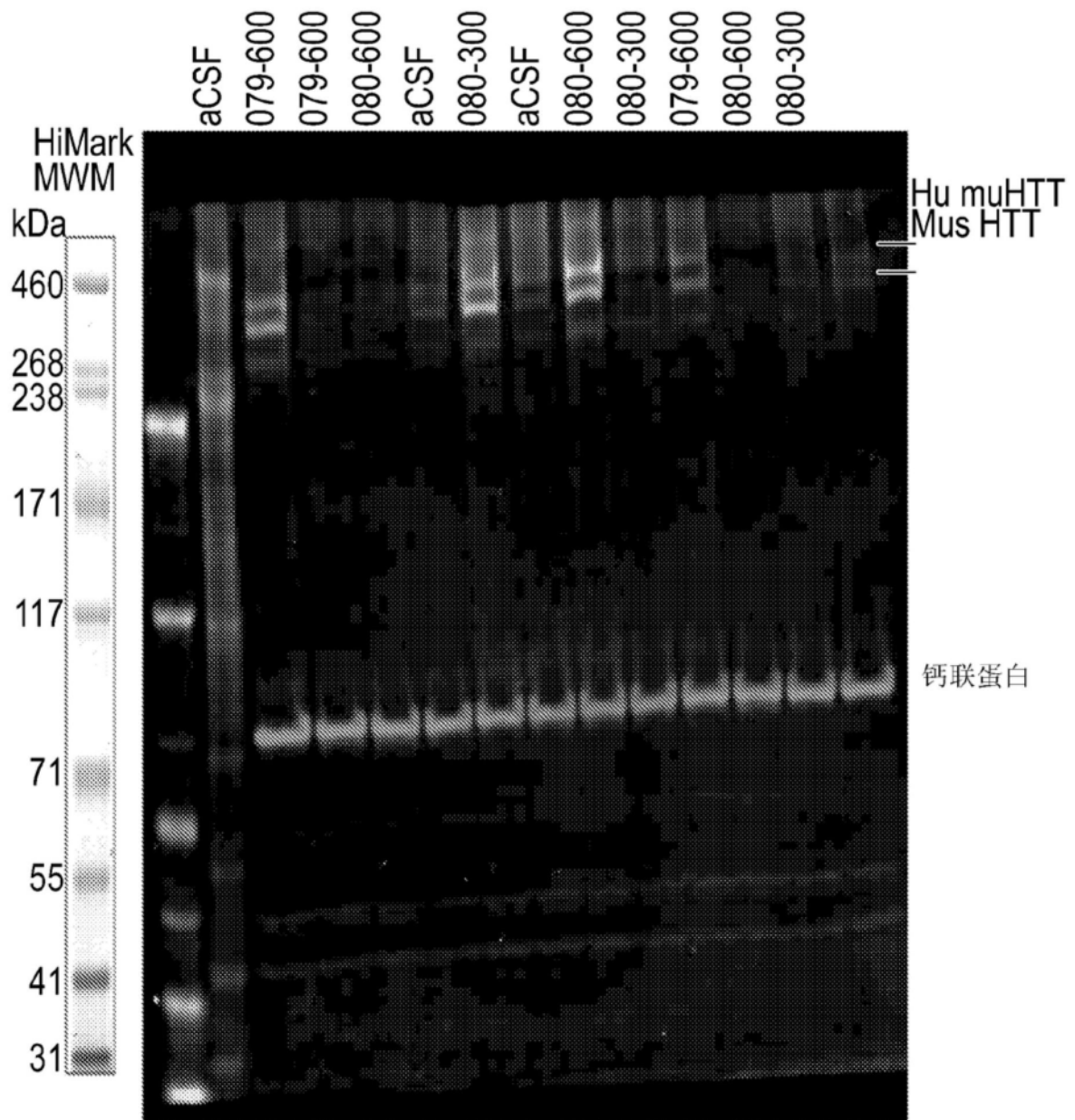


图10D

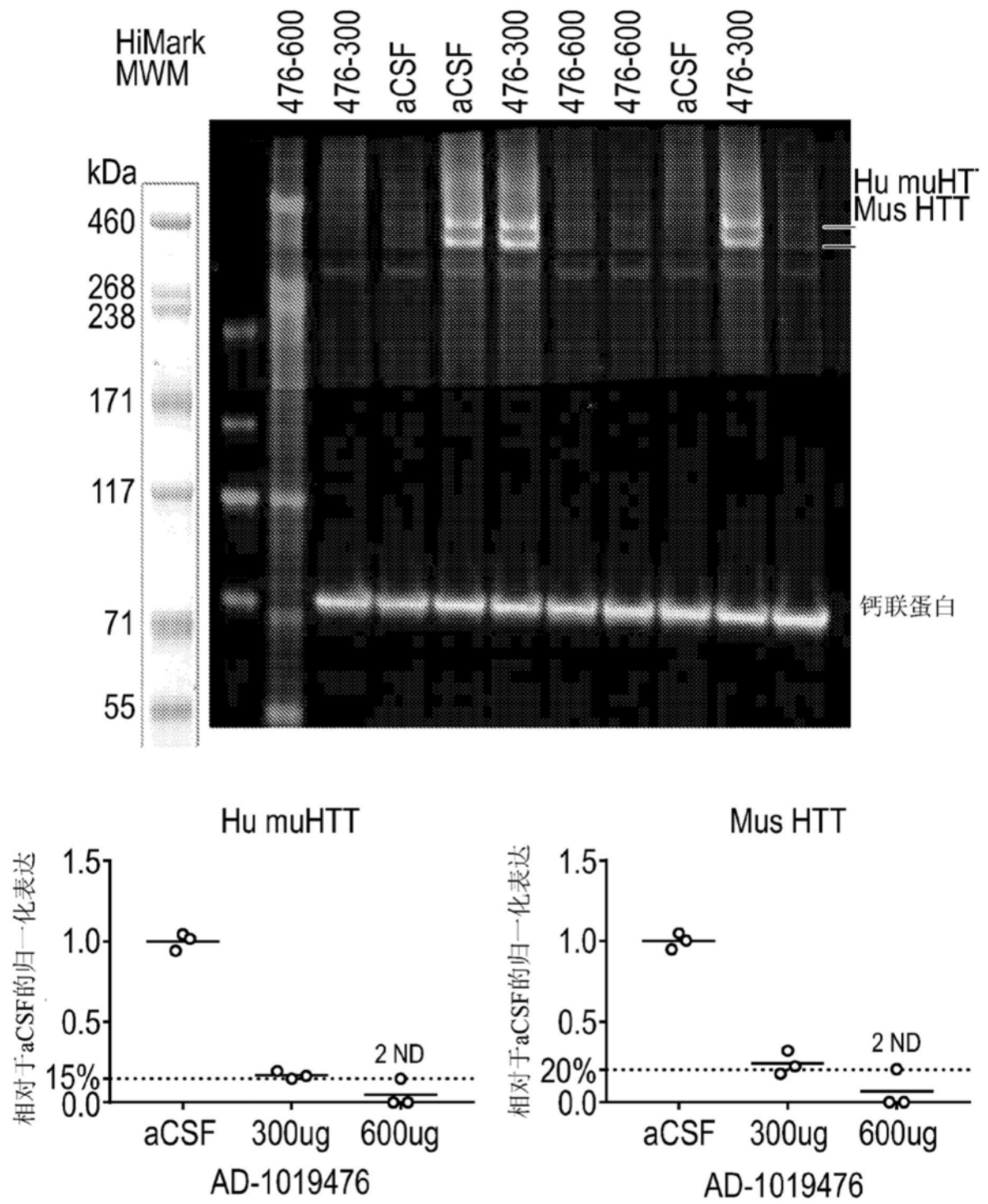


图10E

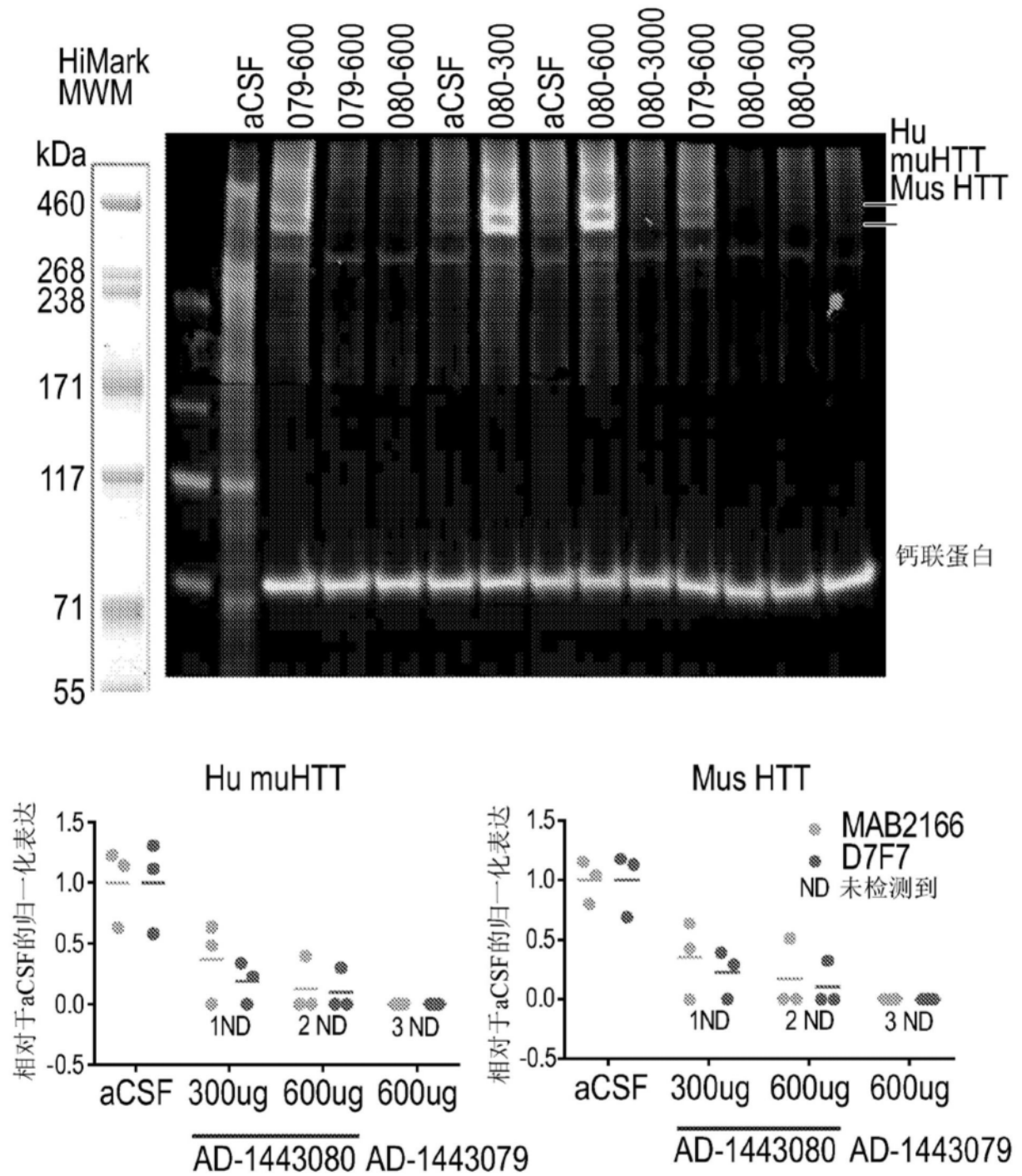


图10F

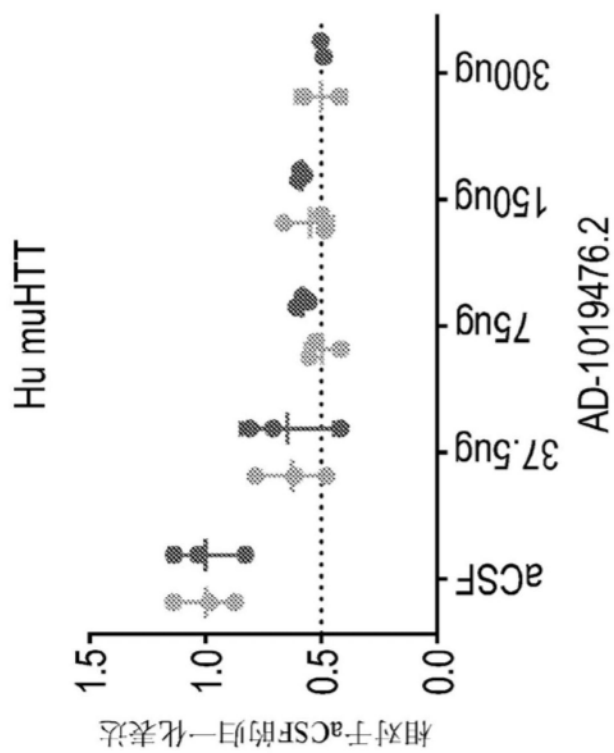


图11A

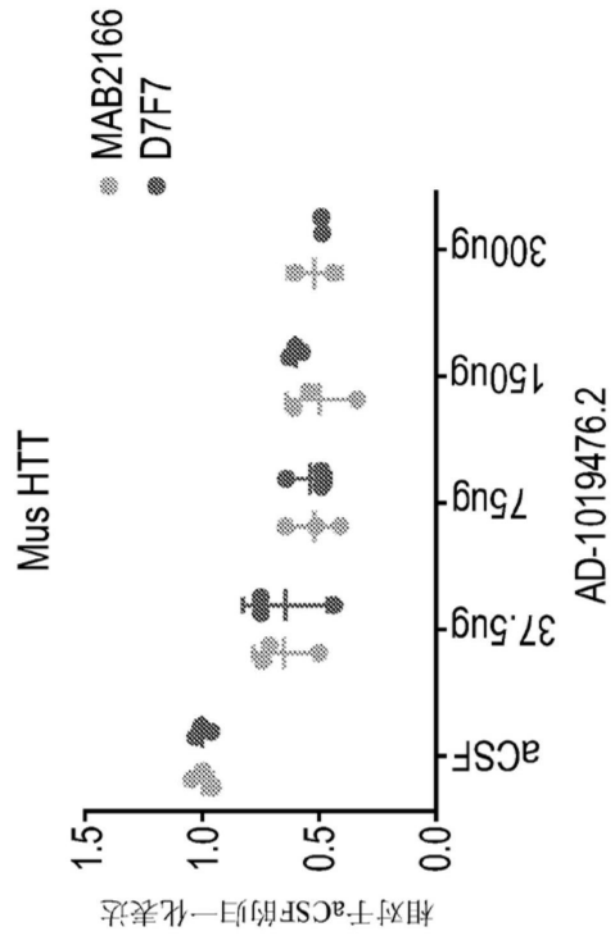


图11B

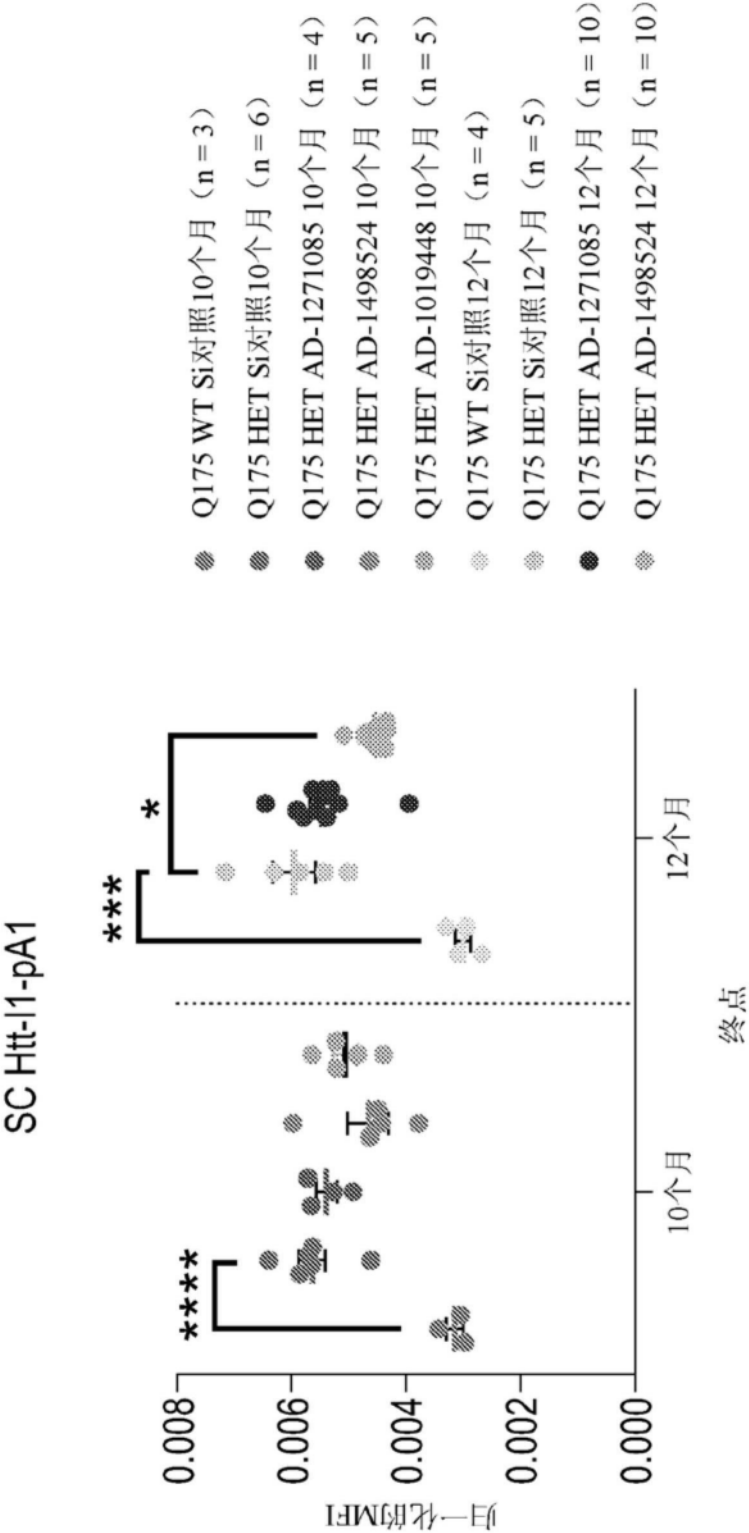


图12A

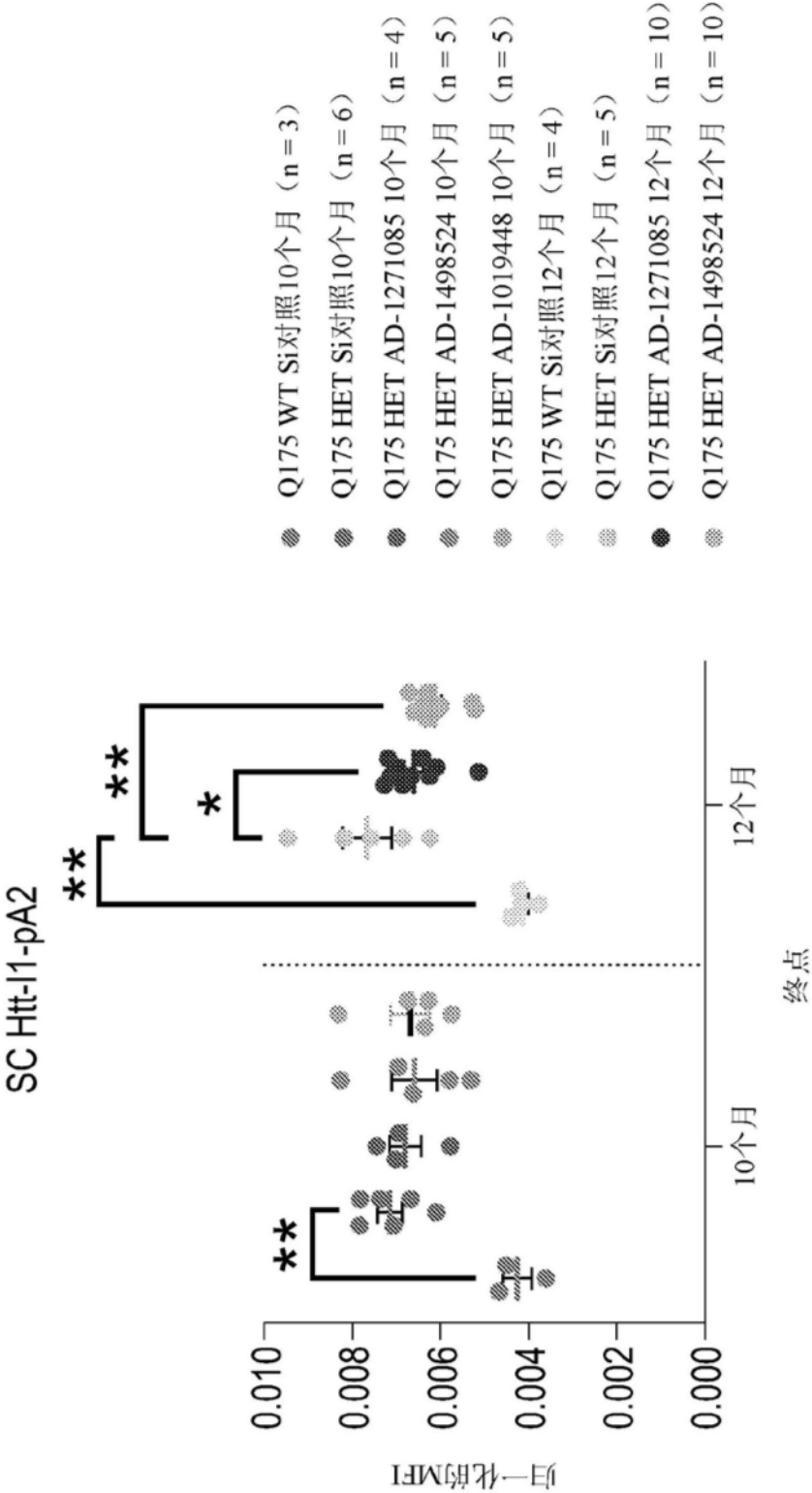


图12B

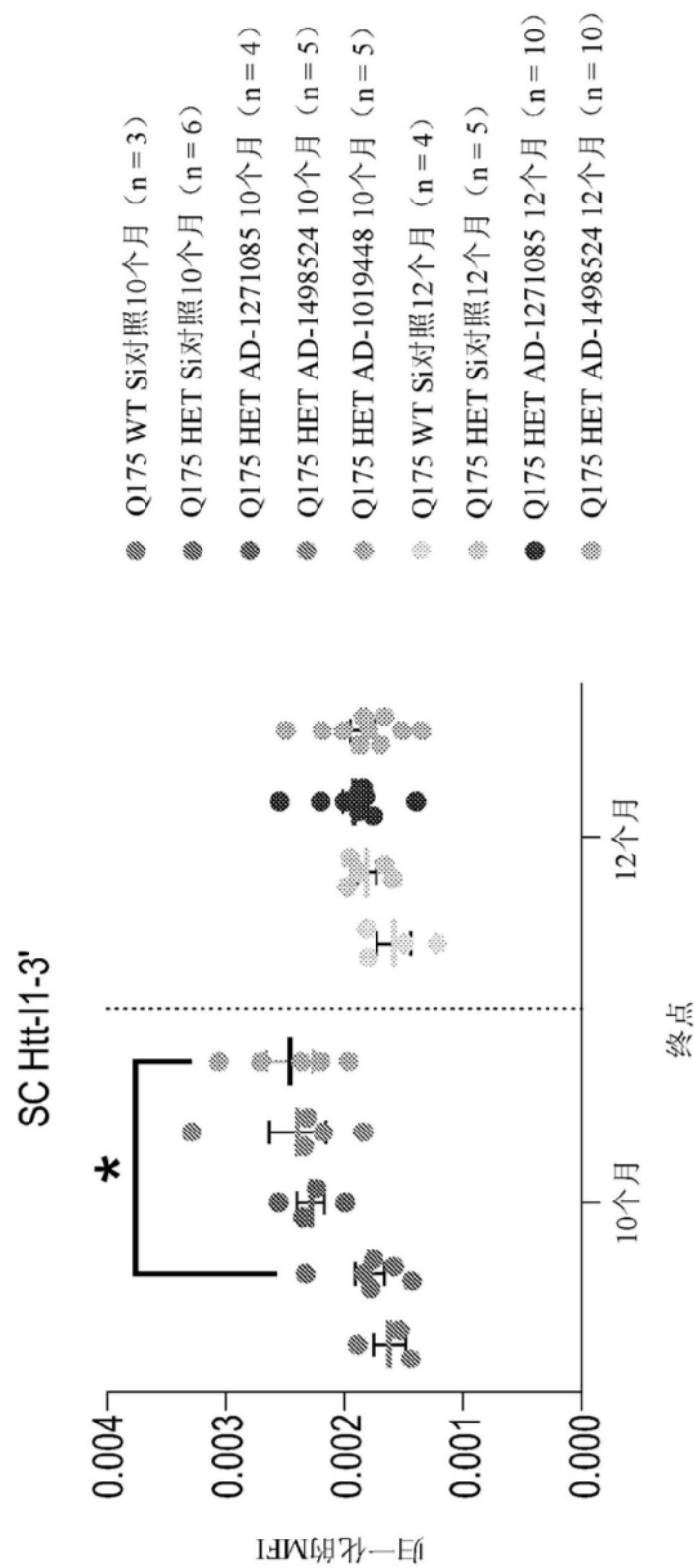


图12C

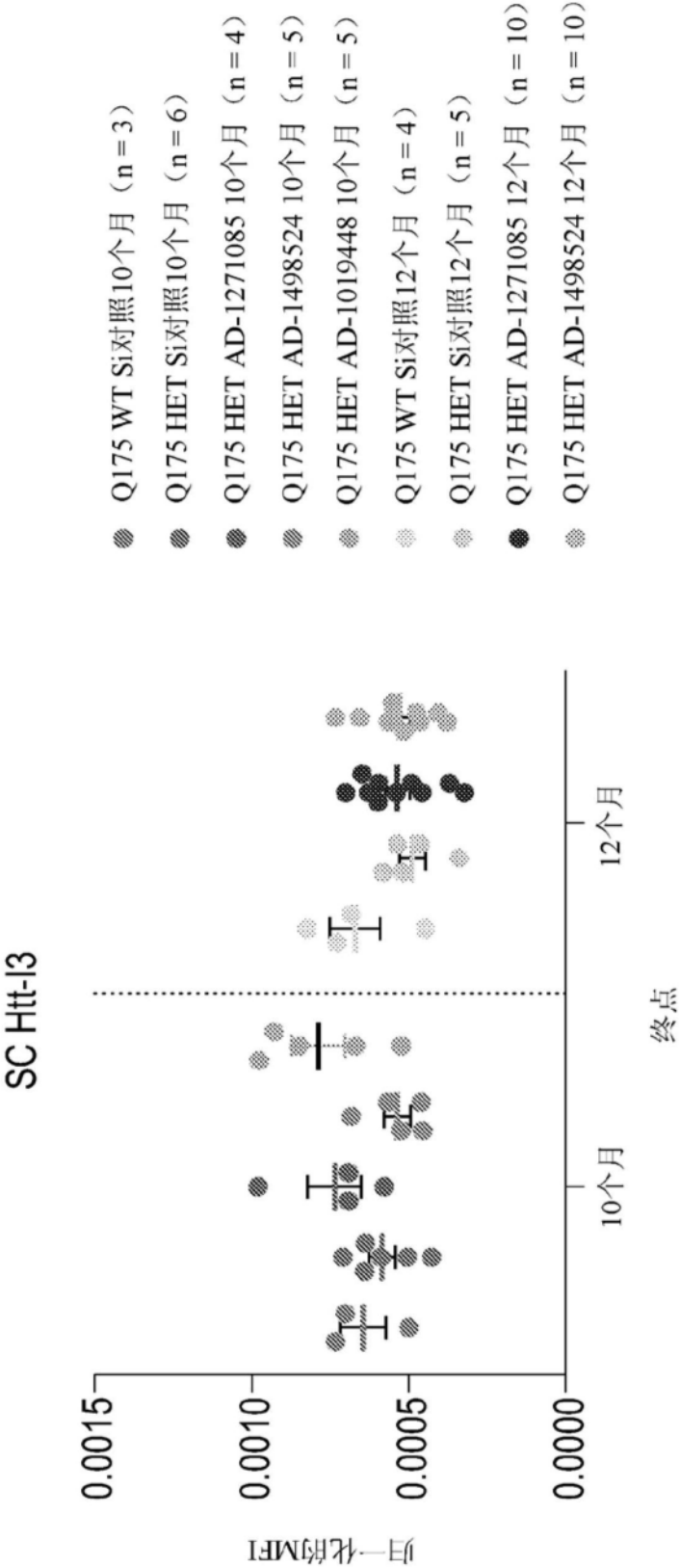


图12D

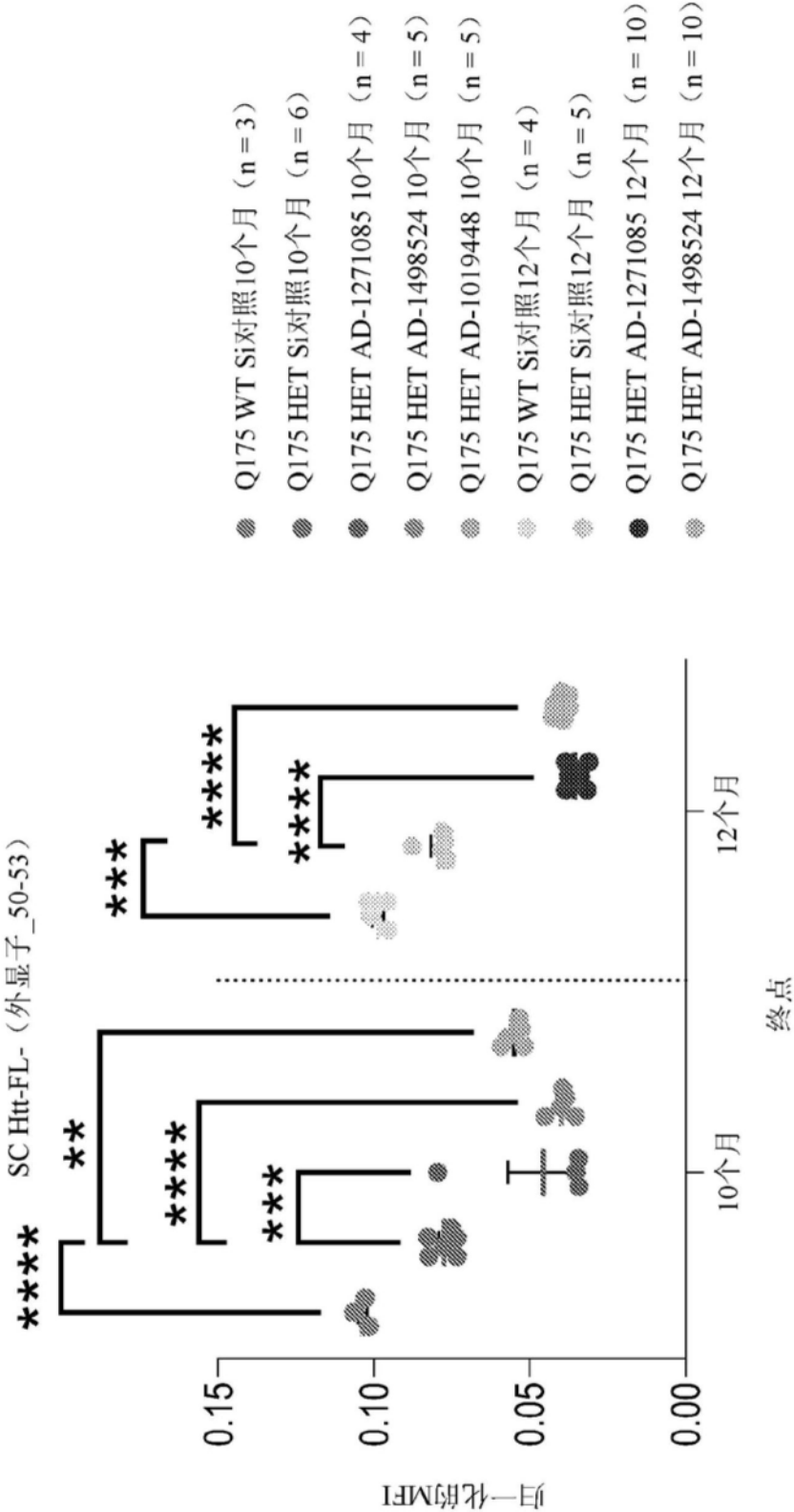


图12E

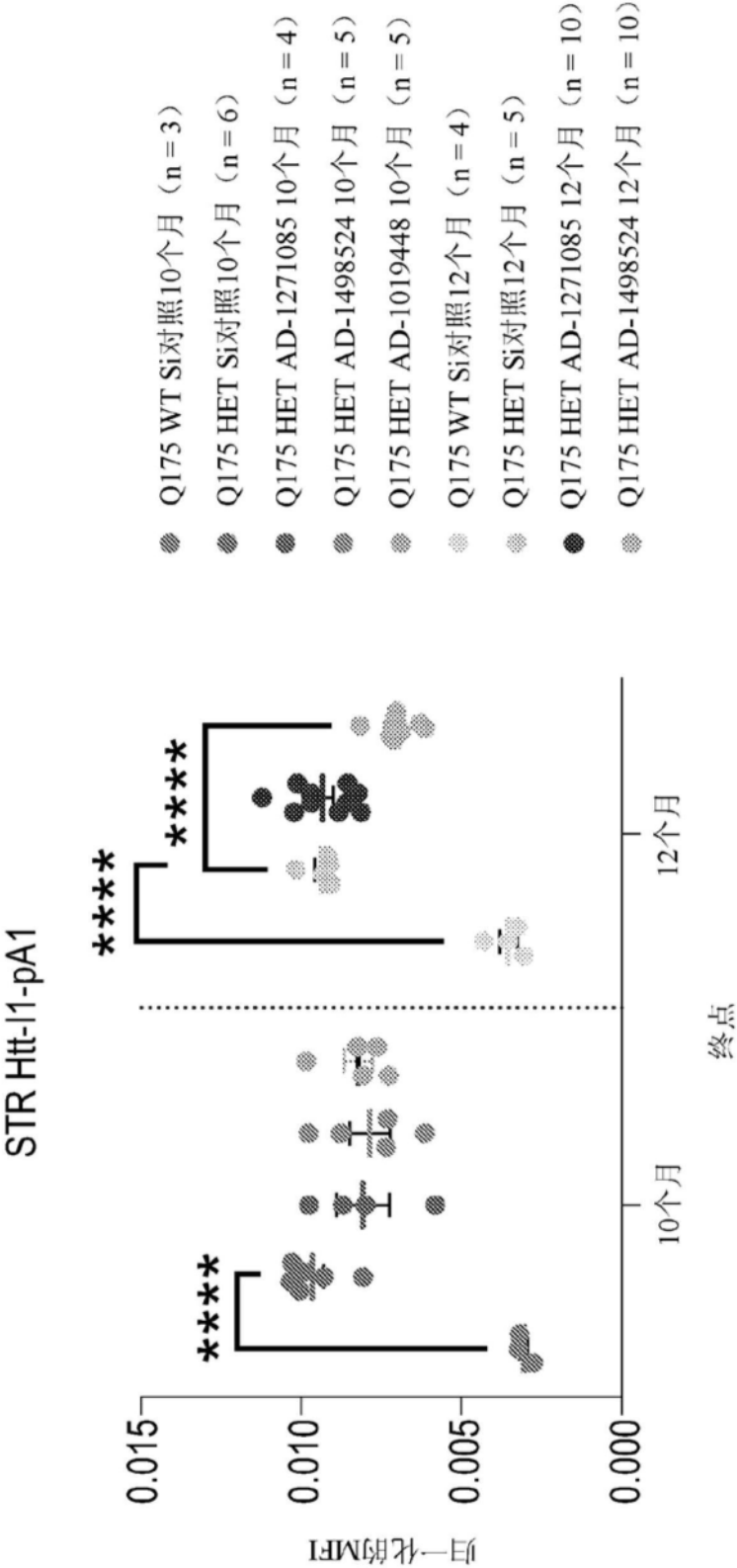


图12F

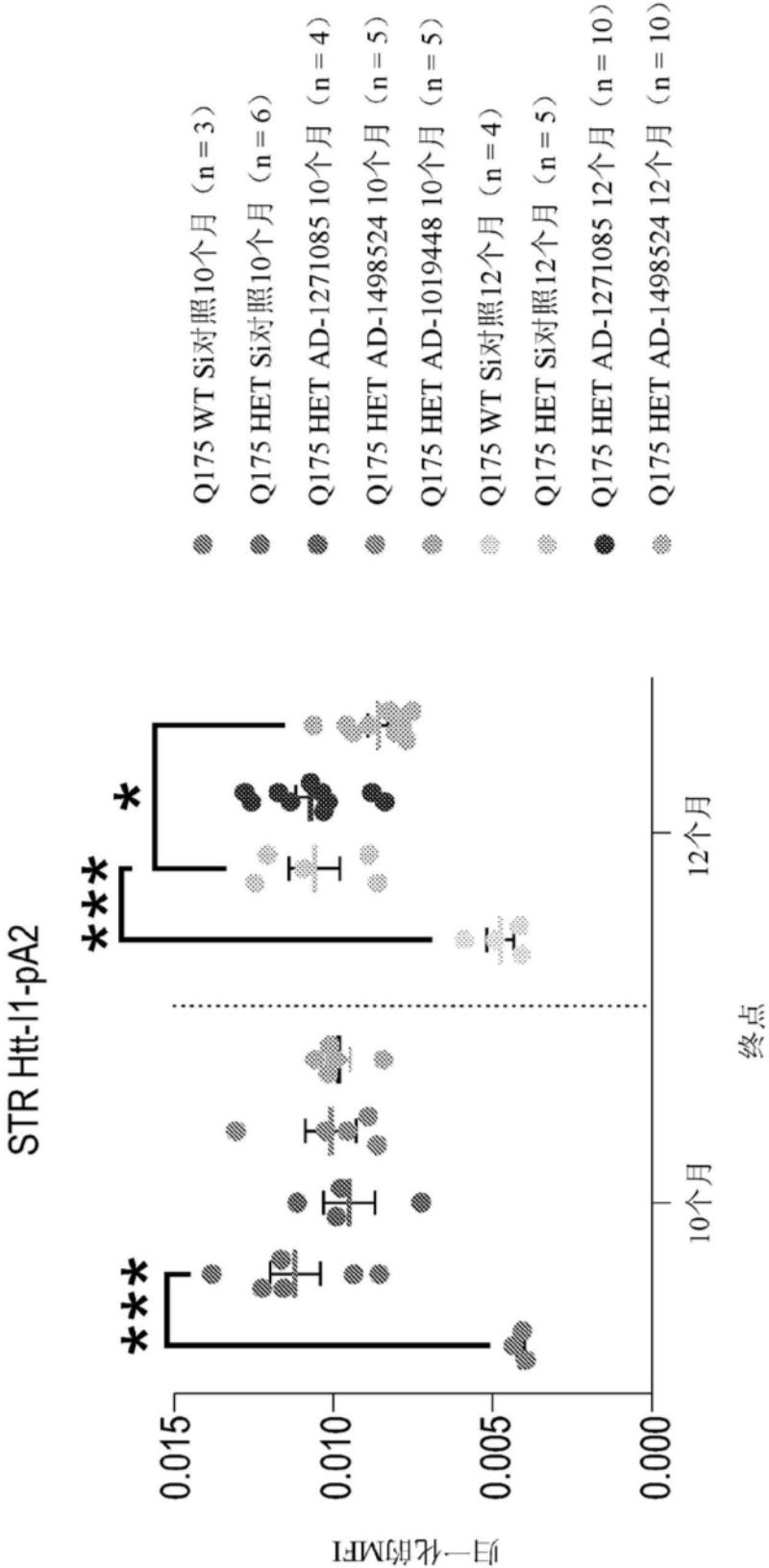


图12G

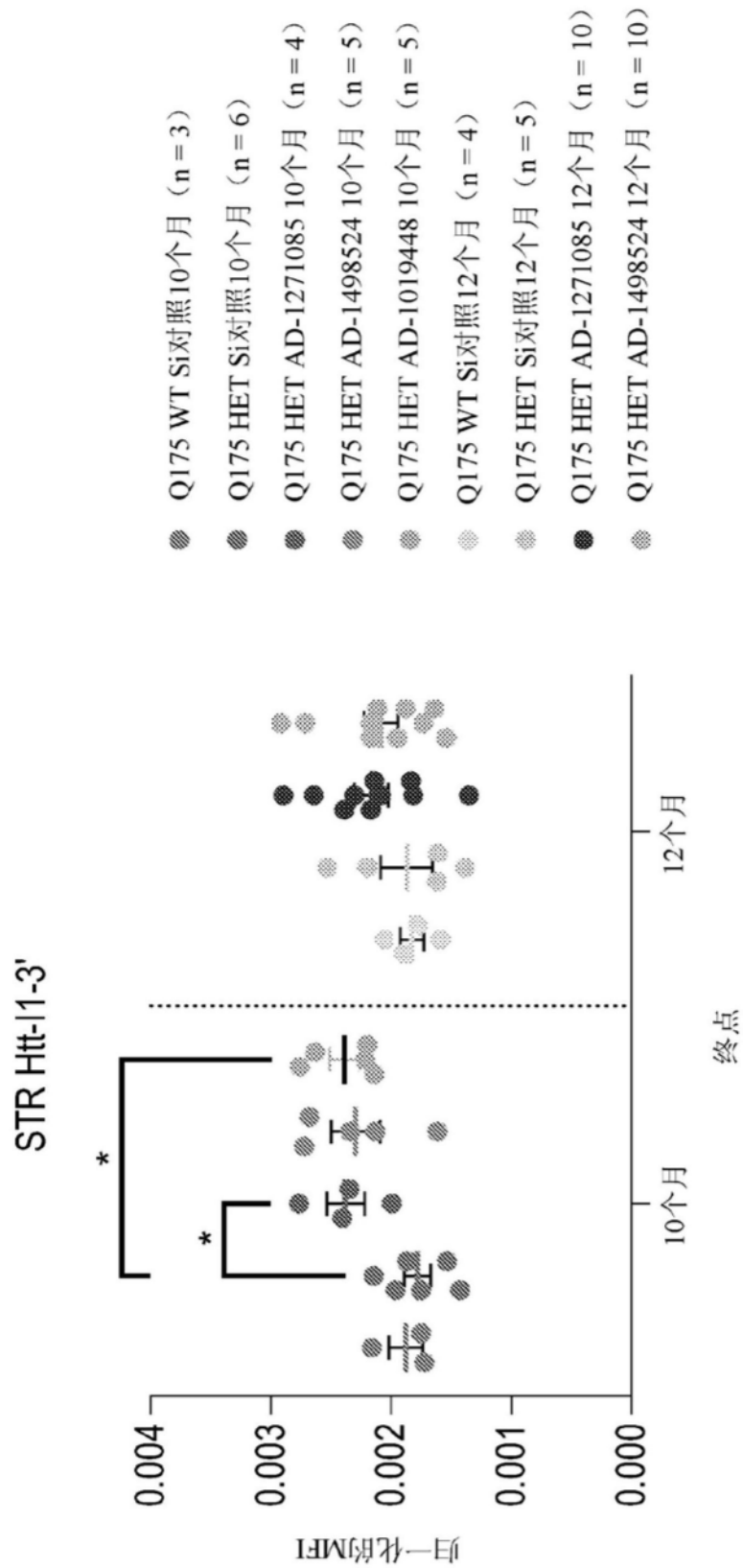


图12H

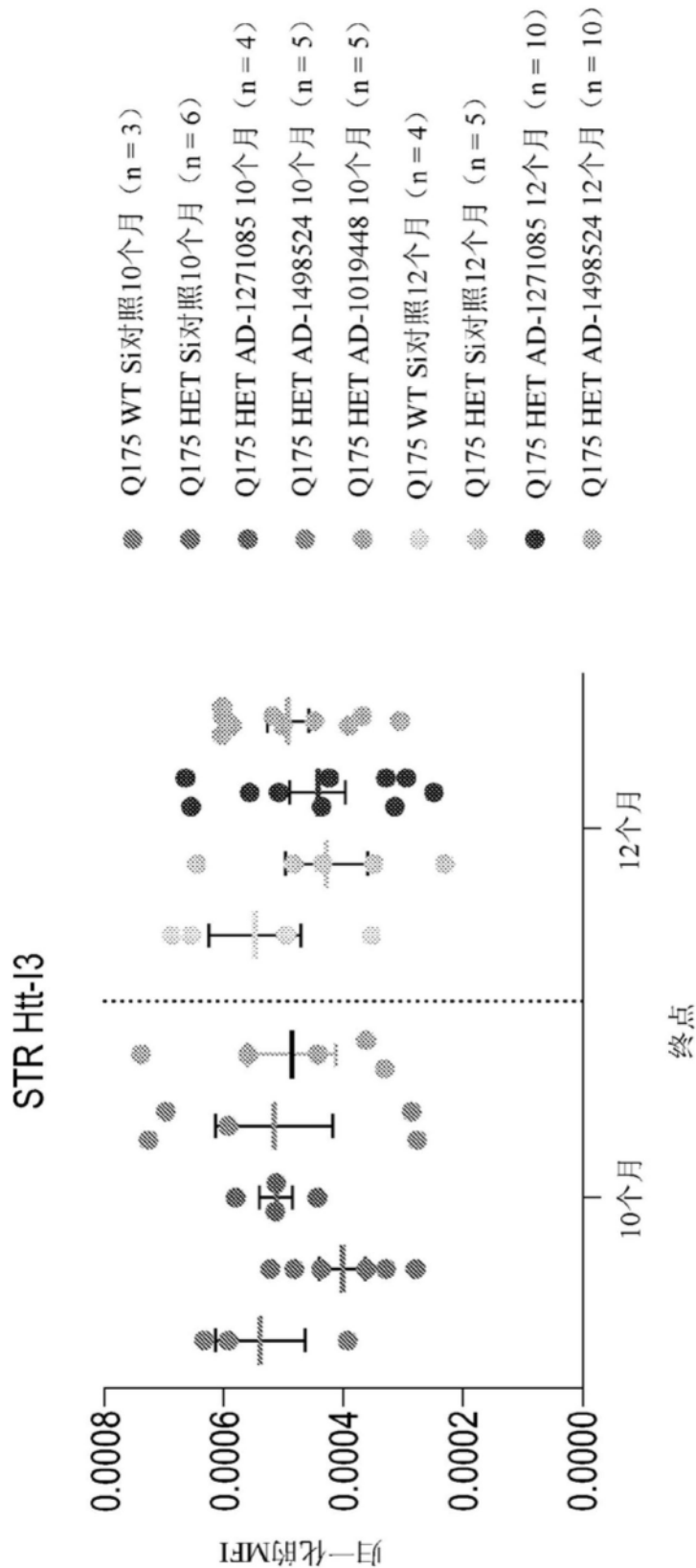


图12I

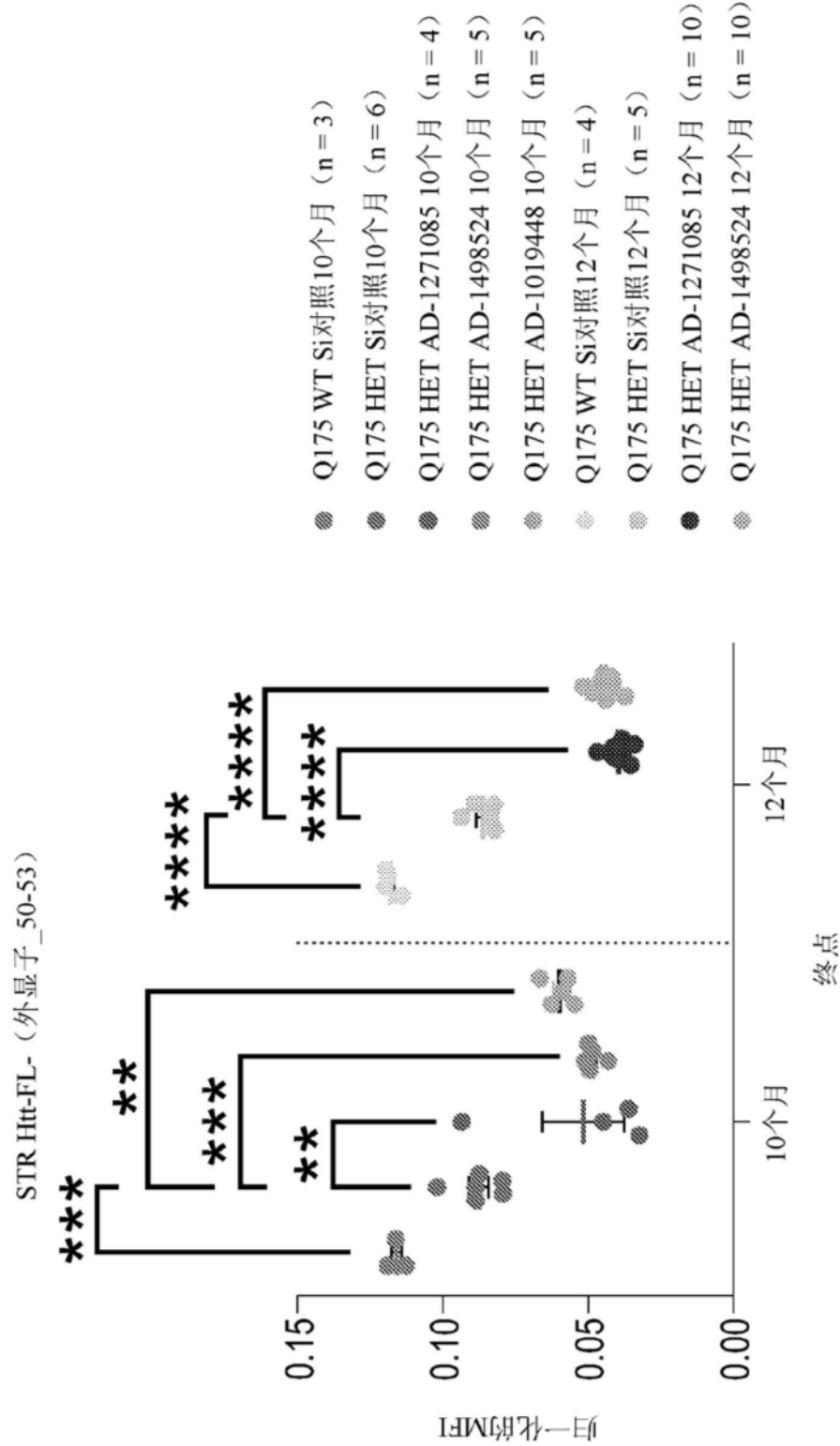
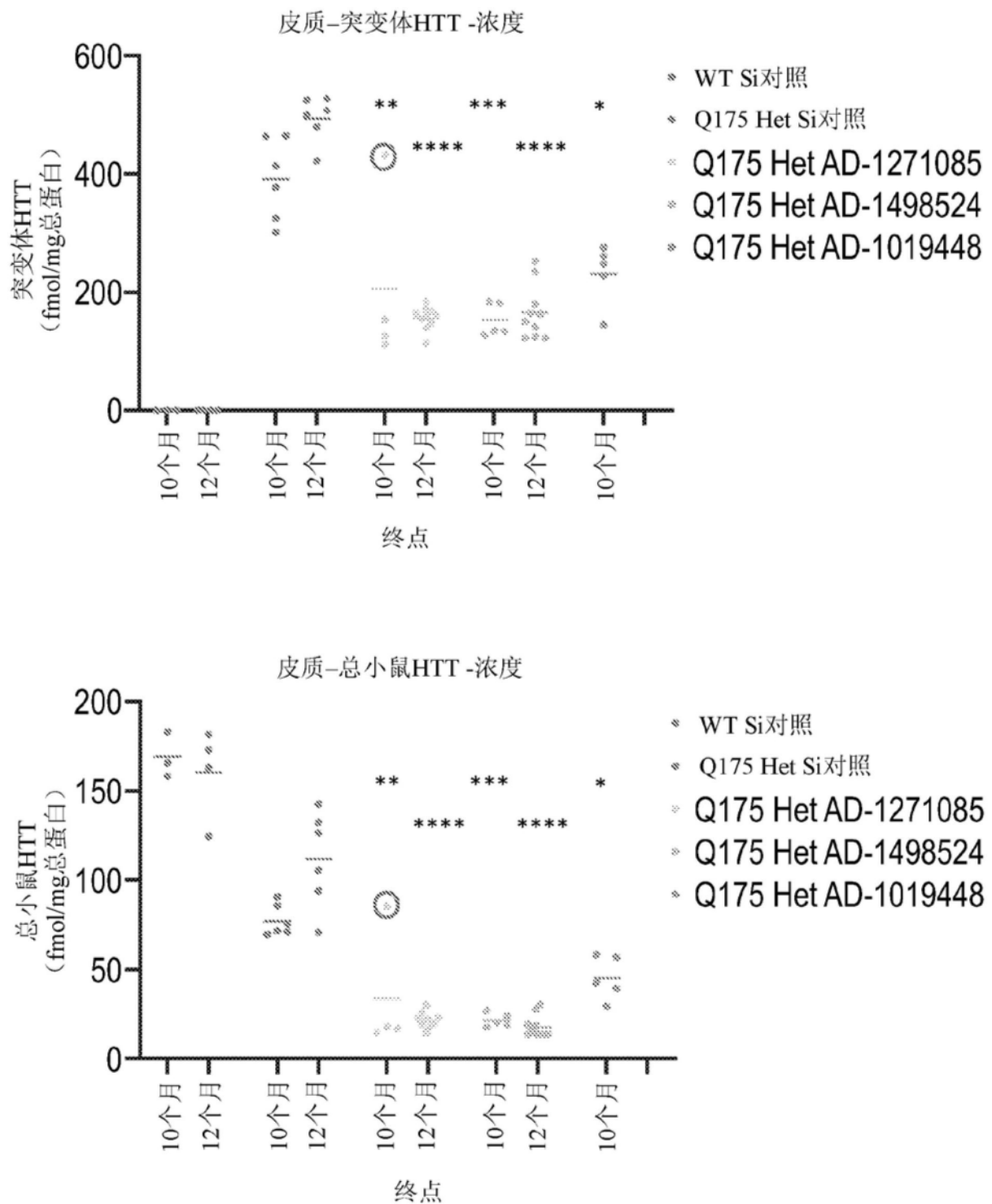


图12J



*Q175 Het Si对照*与治疗：在相应的时间点进行比较的单向ANOVA，随后是邓尼特多重比较测试

* $p \leq 0.05$
** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$
**** $p < 0.0001$

图12K

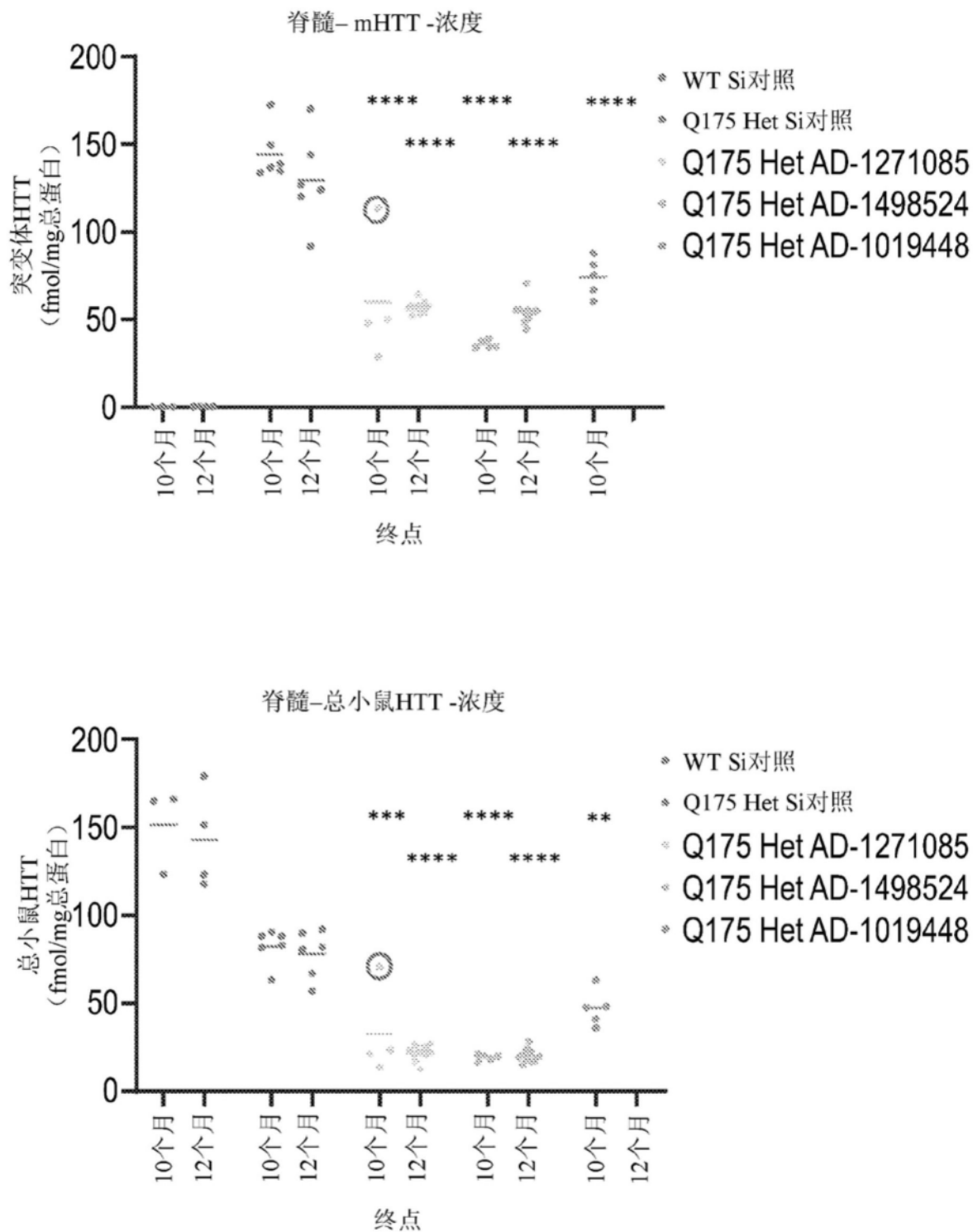


图12L

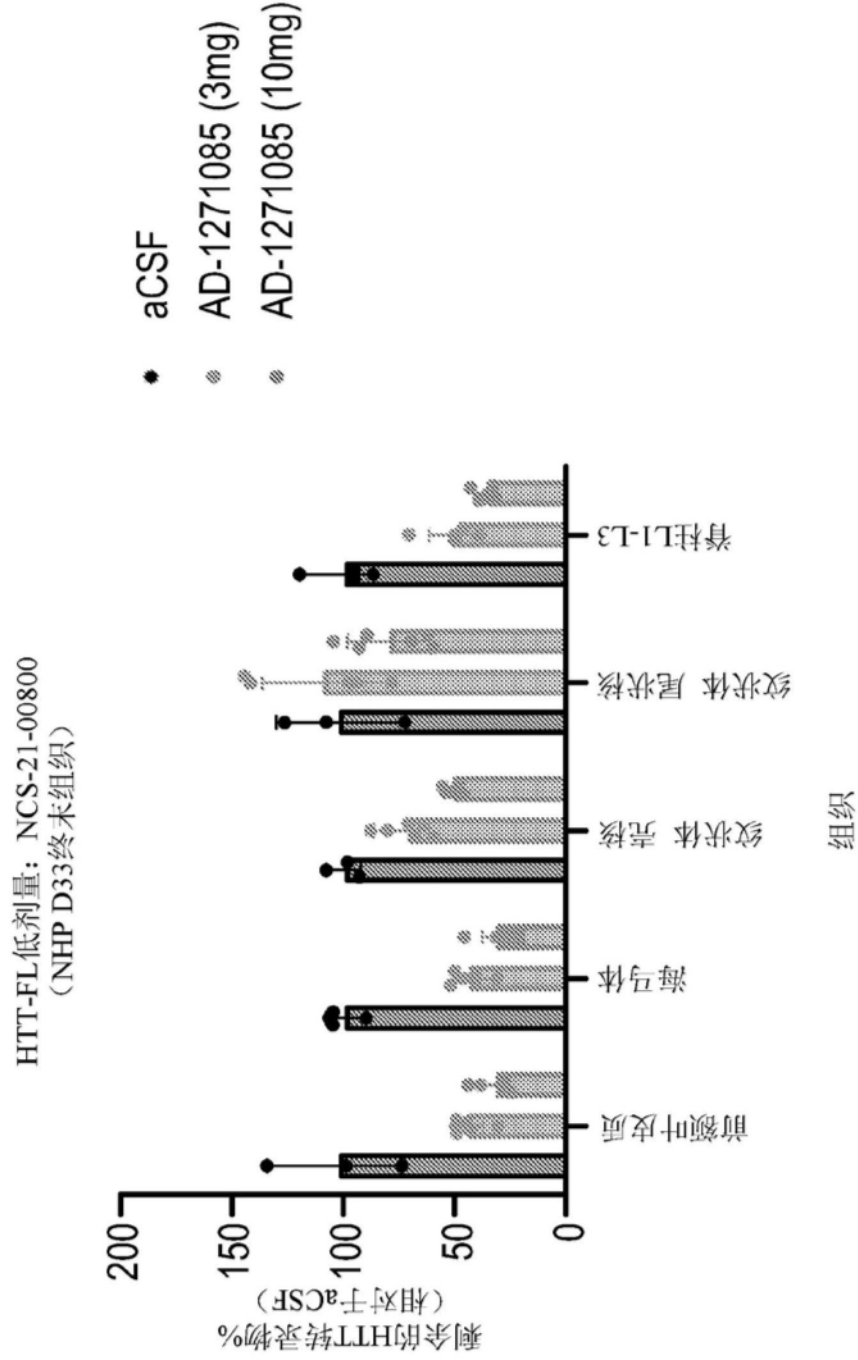


图13A

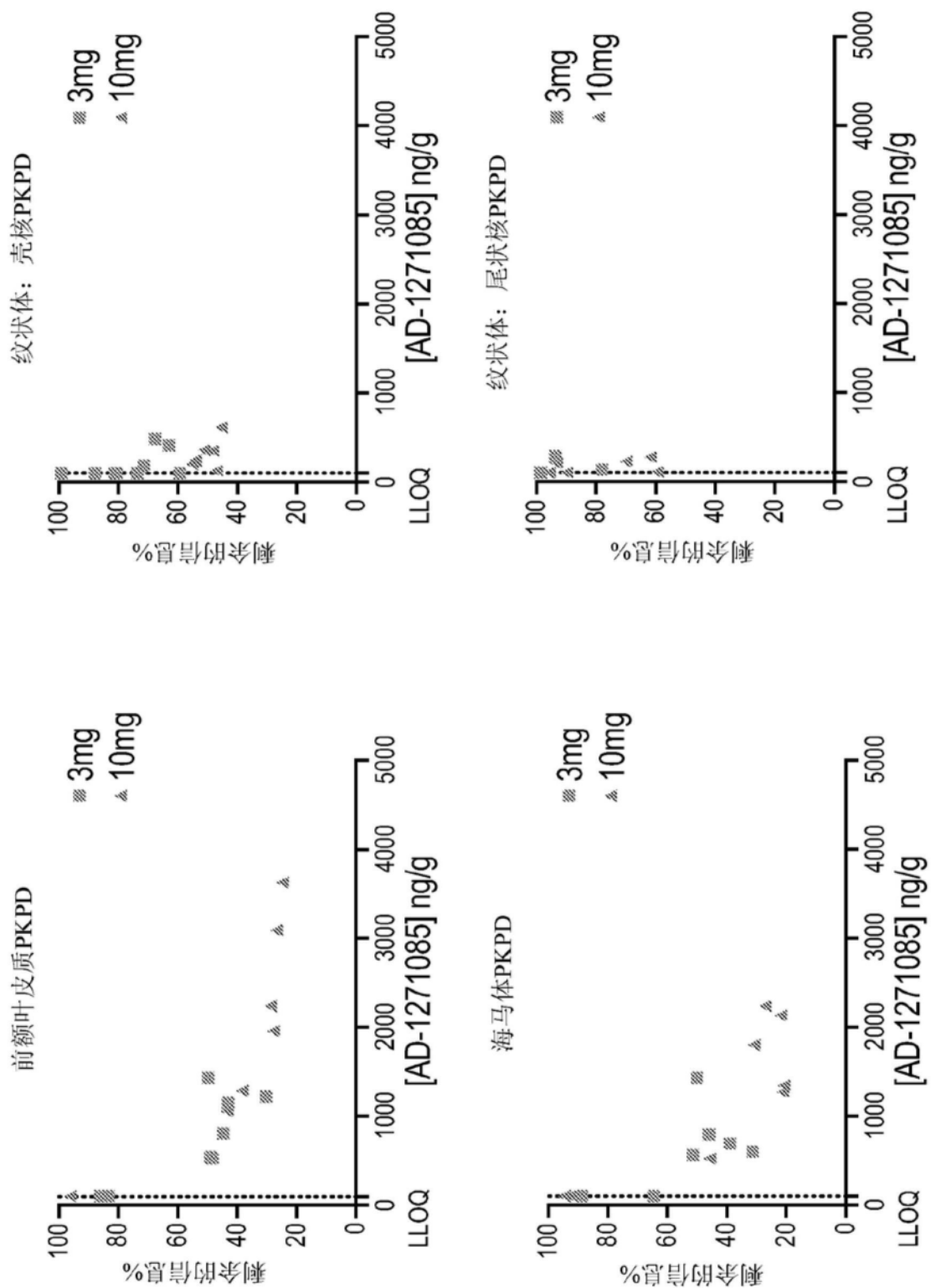


图13B

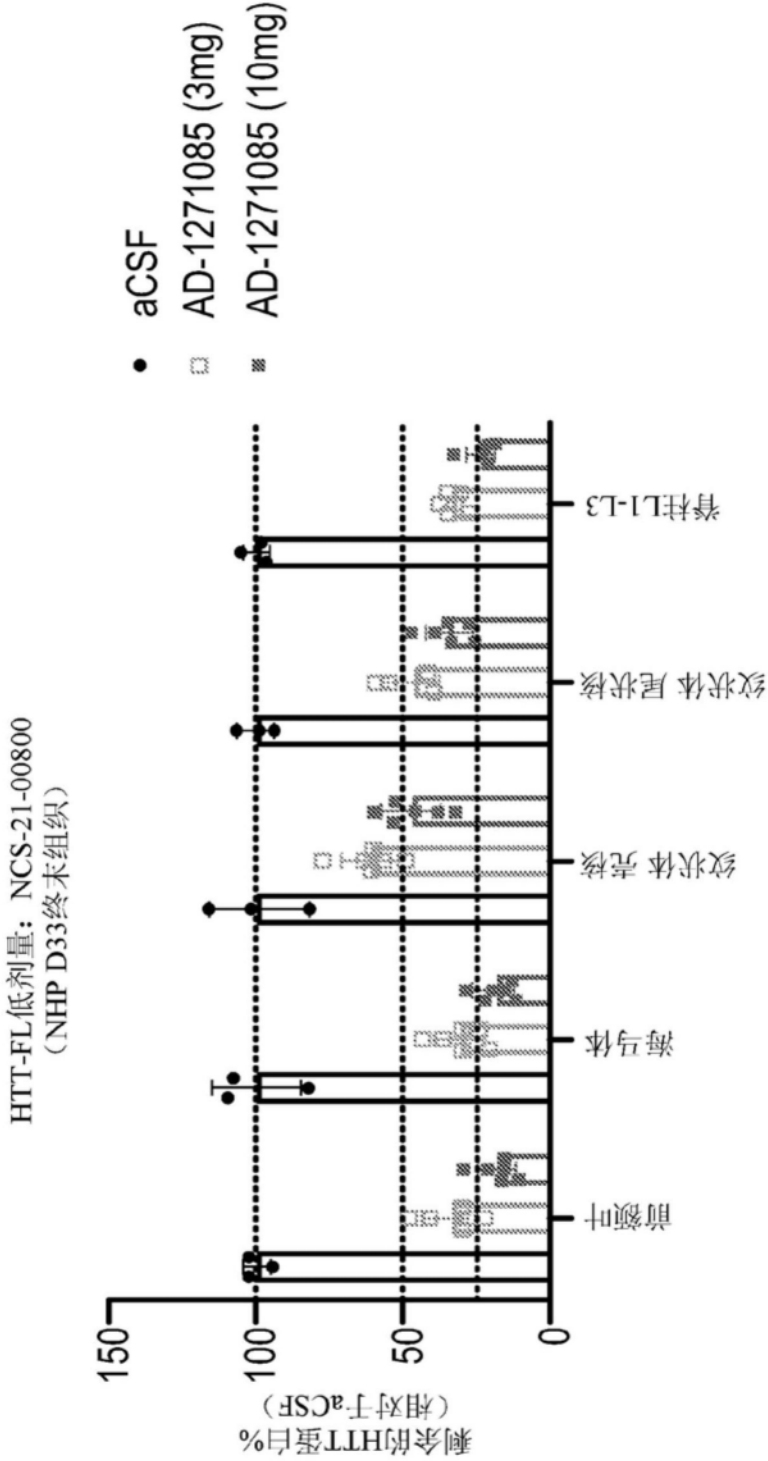


图13C

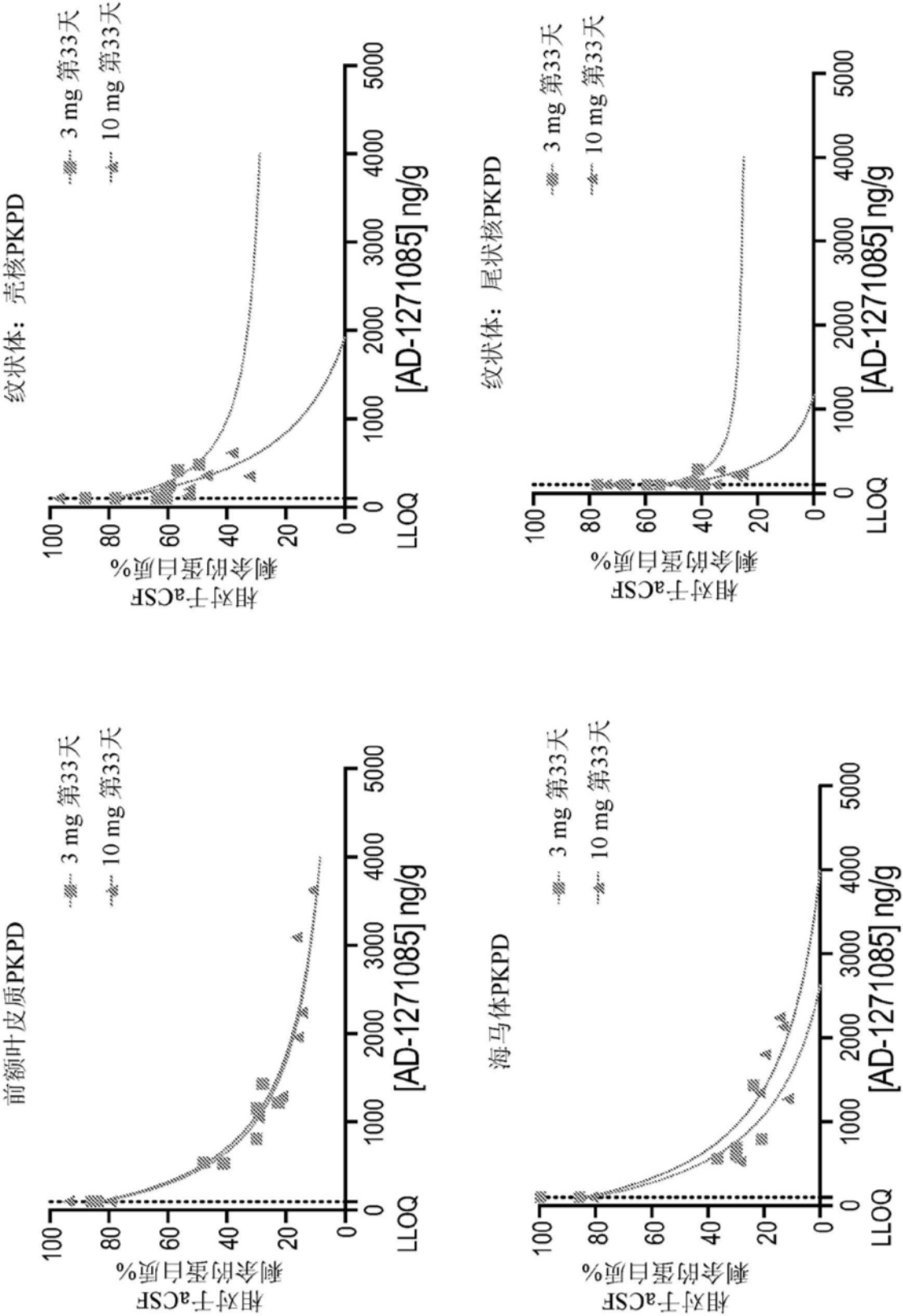


图13D

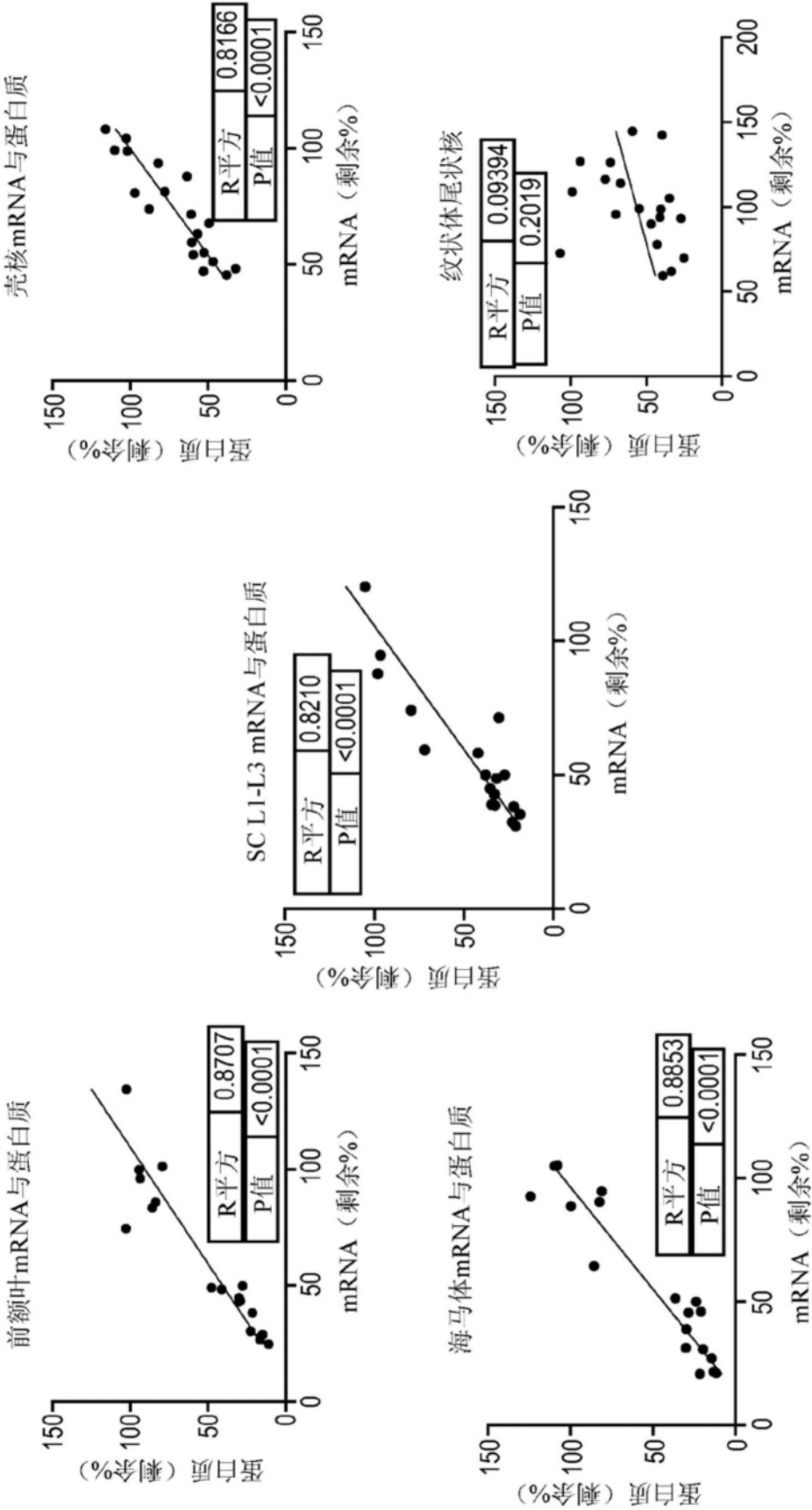


图13E

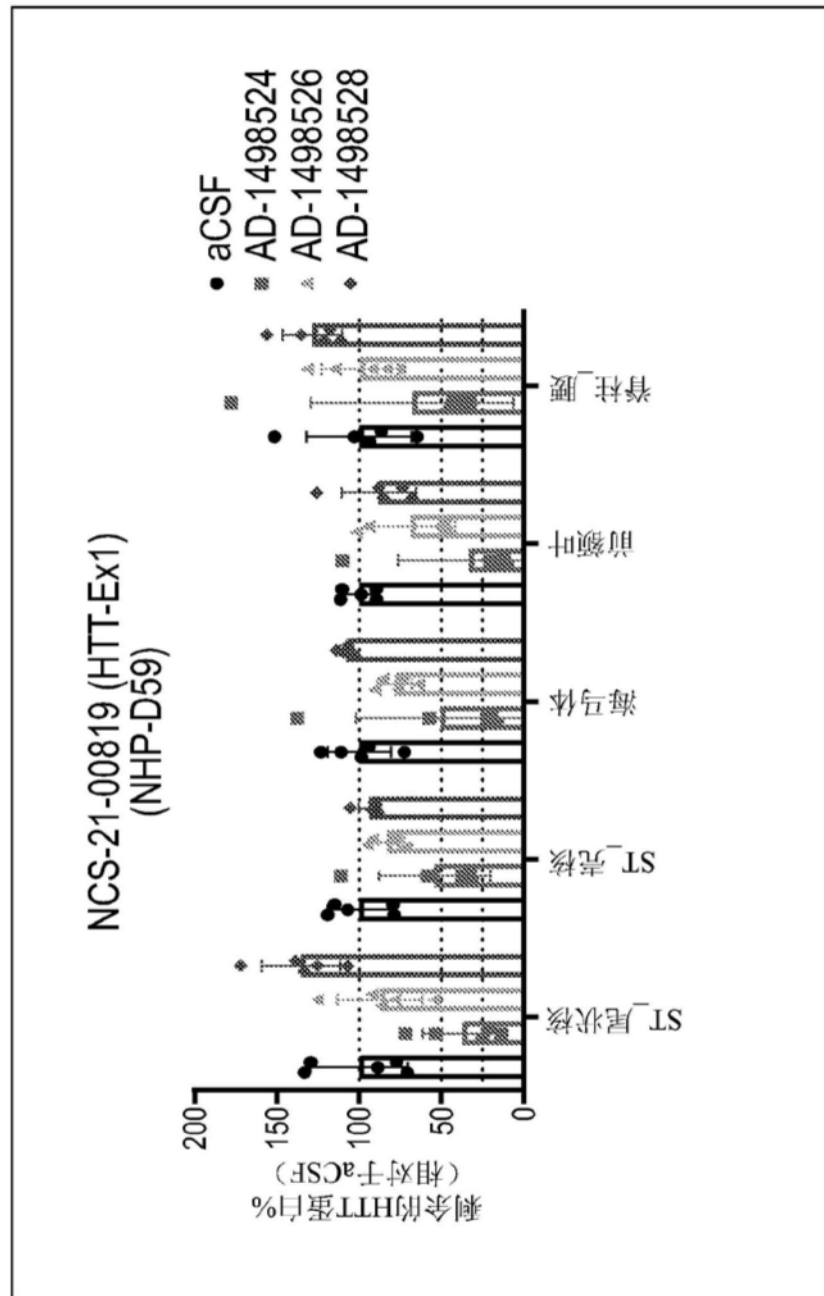


图14A

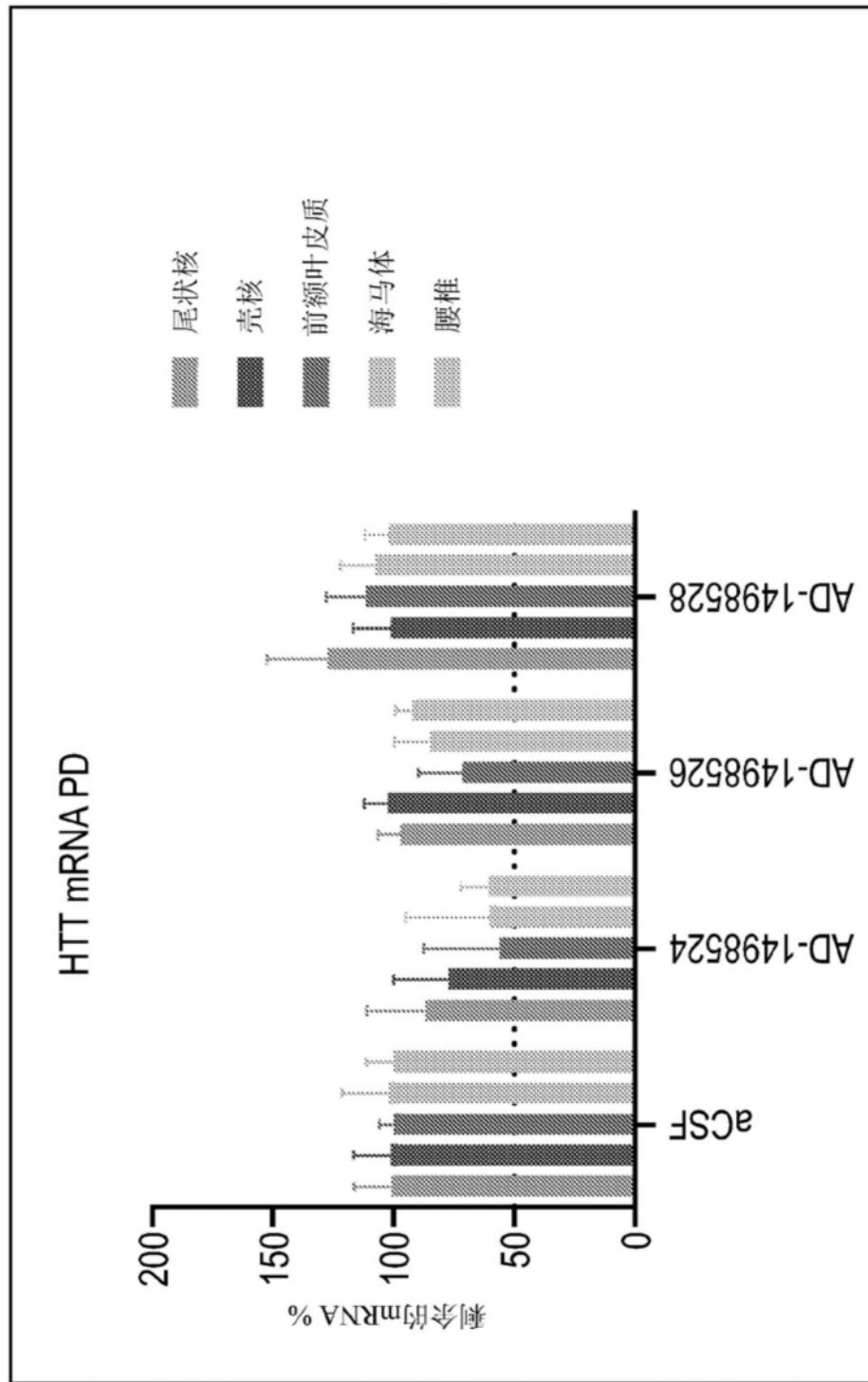


图14B

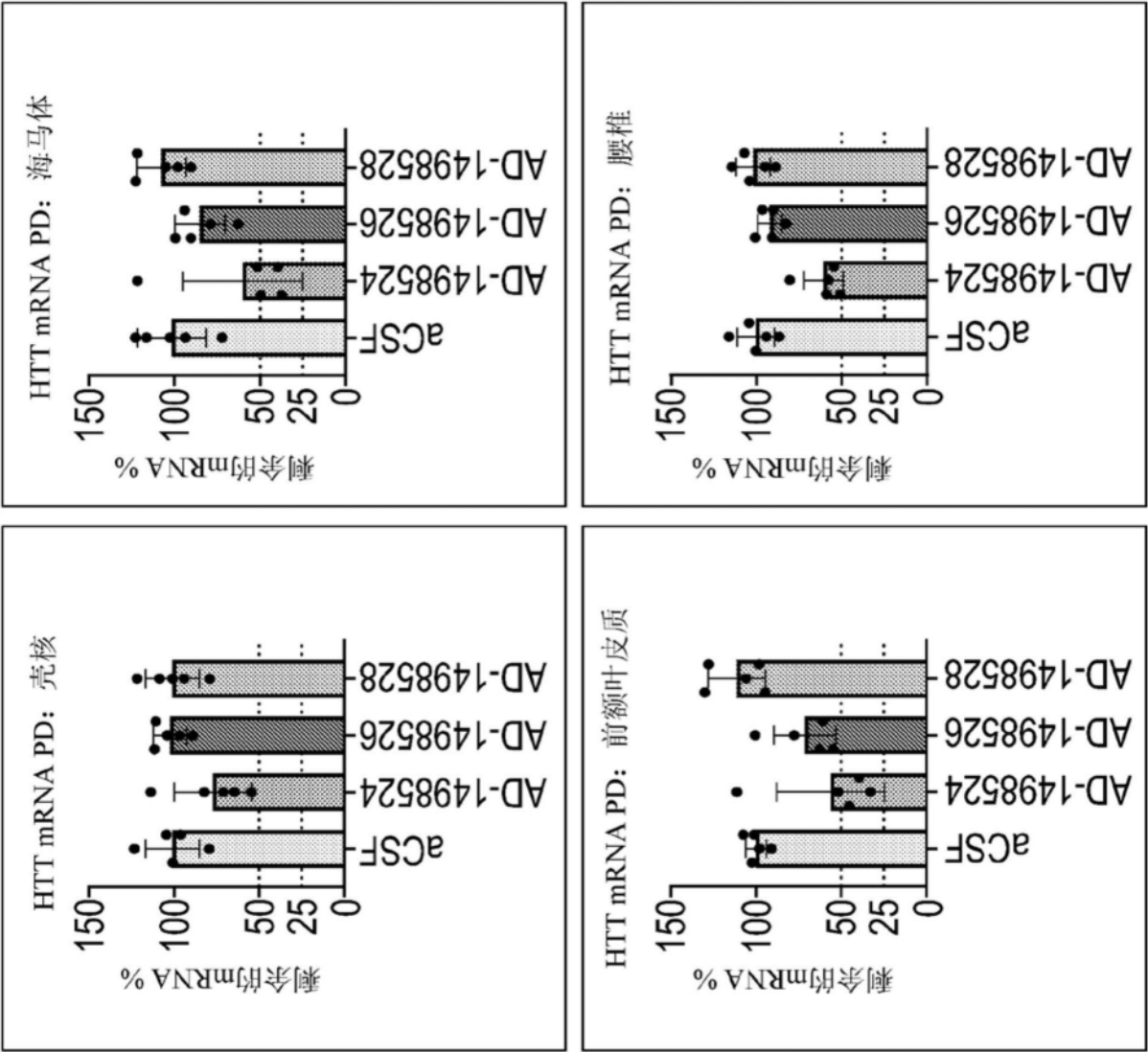


图14C

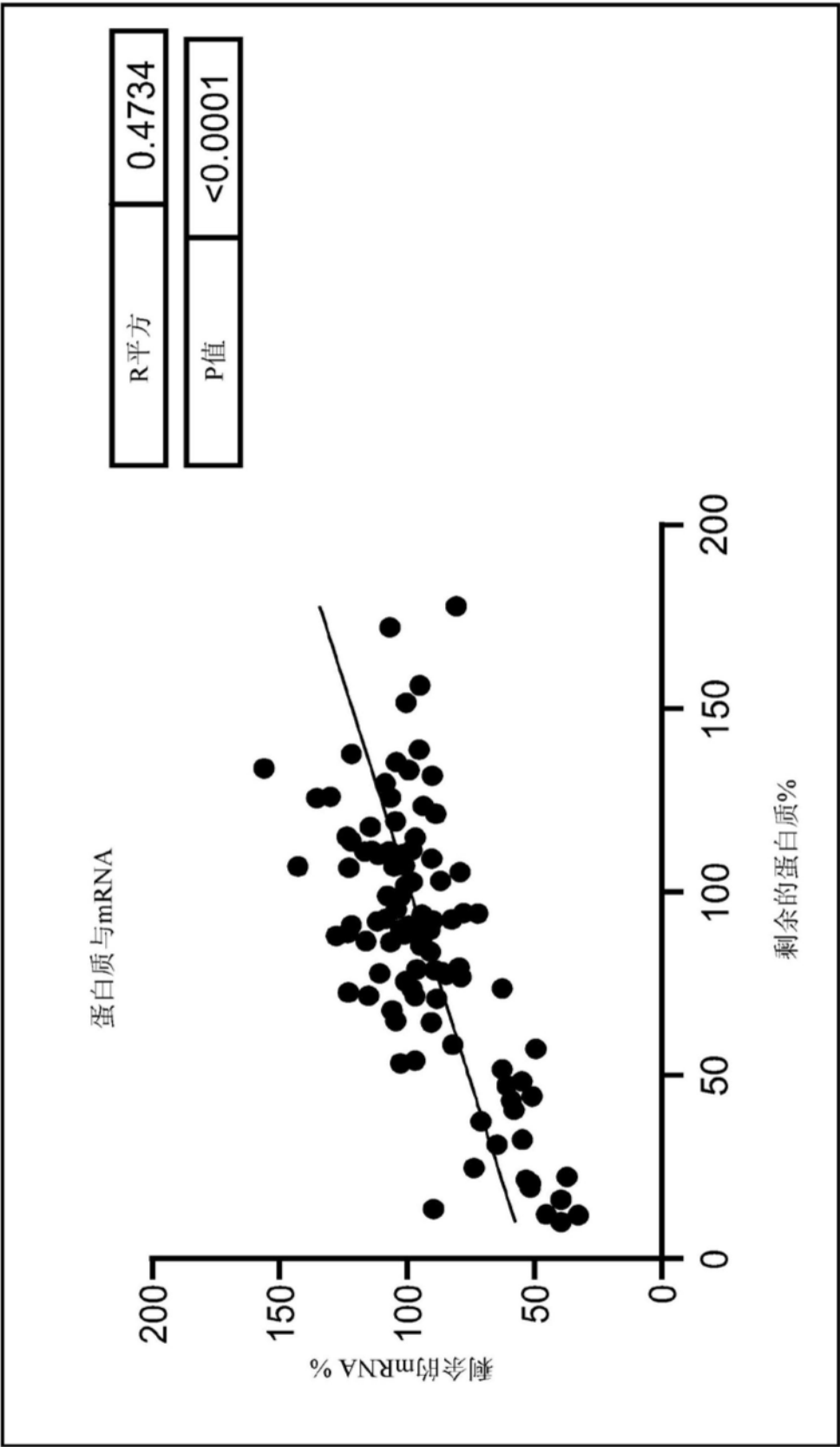


图14D

