



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104540948 B

(45)授权公告日 2018.09.21

(21)申请号 201380029258.8

(22)申请日 2013.04.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104540948 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(30)优先权数据

61/622,288 2012.04.10 US

13/835,613 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/036006 2013.04.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/155204 EN 2013.10.17

(73)专利权人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 西奈山伊坎医学院

(72)发明人 B·贝滕考特 K·菲茨杰拉德

W·奎尔贝斯 M·亚苏达

R·J·德斯尼克

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

(56)对比文件

US 8090542 B2,2012.01.03,

US 8090542 B2,2012.01.03,

W0 2010148013 A2,2010.12.23,

CN 101052717 A,2007.10.10,

审查员 李楠

权利要求书6页 说明书243页 附图13页

(54)发明名称

用于抑制ALAS1基因表达的组合物与方法

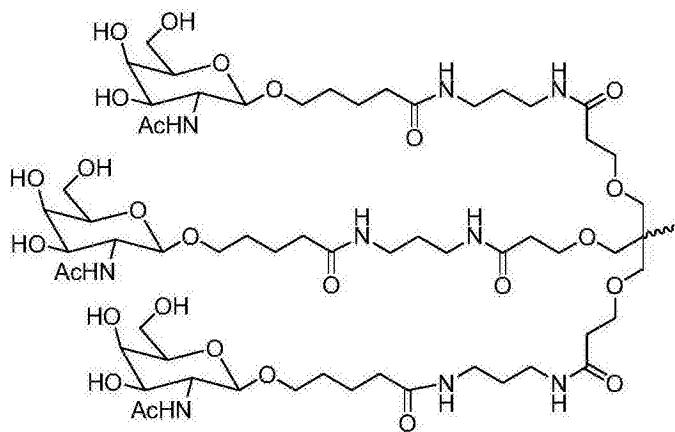
(57)摘要

本发明涉及靶向ALAS1基因的双链核糖核酸

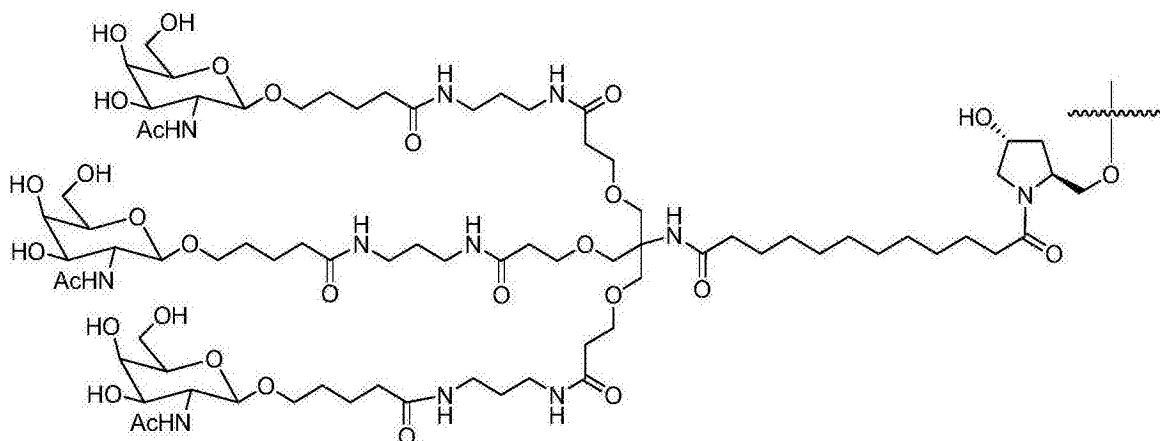
(dsRNA)组合物,和使用这类dsRNA组合物来改变

(例如,抑制)ALAS1的表达的方法。

1. 一种用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),包括:
 - (i) 包含SEQ ID NO:1295的至少15个连续核苷酸的有义链;
 - (ii) 与SEQ ID NO:1的至少核苷酸871-889互补的反义链;和
 - (ii) 包含一个或多个N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物的配体,其中所述有义链和所述反义链各自长度为15-30个核苷酸。
2. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含长度15-30个核苷酸对的双链体区域。
3. 如权利要求2所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是17-23个核苷酸对。
4. 如权利要求2所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是19-21个核苷酸对。
5. 如权利要求2所述的dsRNA,其中该双链体区域长度是21-23个核苷酸对。
6. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一个经修饰的核苷酸。
7. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述有义链和反义链各自长度为19-24个核苷酸。
8. 如权利要求1所述的dsRNA,其中至少一条链包含具有至少1个核苷酸的3' 突出端。
9. 如权利要求8所述的dsRNA,其中所述3' 突出端长度是至少2个核苷酸。
10. 如权利要求9所述的dsRNA,其中所述dsRNA的一端是平端的。
11. 如权利要求10所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含一个或多个硫代磷酸酯键。
12. 如权利要求1所述的dsRNA,其包含20个或更多个选自2'-O-甲基修饰的核苷酸和2'-氟修饰的核苷酸的修饰核苷酸。
13. 如权利要求12所述的dsRNA,其在所述有义链和反义链的整个长度上包含2'-O-甲基修饰的核苷酸和2'-氟修饰的核苷酸。
14. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含核苷酸上的修饰,且所述修饰选自LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基及其组合。
15. 如权利要求14所述的dsRNA,其中所述核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、2'-氟或两者。
16. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一个经修饰的核苷酸,其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个选自2'-O-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基的核苷酸、与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯以及包含非天然碱基的核苷酸。
17. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述配体通过连接物附接。
18. 如权利要求17所述的dsRNA,其中所述连接物是二价或三价分枝的连接物。
19. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述配体是



20. 如权利要求17所述的dsRNA,其中所述配体和所述连接物是如式XXIV所示的:



21. 如权利要求20所述的dsRNA,其中所述配体附接至所述有义链的3'末端。

22. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述有义链包含SEQ ID NO:1295的序列。

23. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述反义链包含SEQ ID NO:1296的序列。

24. 如权利要求23所述的dsRNA,其中所述有义链包含SEQ ID NO:1295的序列。

25. 一种细胞,包含如权利要求1所述的dsRNA。

26. 一种药物组合物,包含如权利要求1所述的dsRNA。

27. 如权利要求26所述的药物组合物,其包含缓冲溶液。

28. 一种体外抑制细胞中ALAS1表达的方法,该方法包括:

(a) 向该细胞中引入权利要求1所述的dsRNA,并且

(b) 维持步骤(a)的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解,由此抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

29. 如权利要求1所述的dsRNA在制备用于治疗需要受试者的与ALAS1表达相关的失调的药物中的用途。

30. 如权利要求1所述的dsRNA在制备用于治疗需要受试者的卟啉症的药物中的用途。

31. 如权利要求29或30所述的用途,其中该受试者处于发展卟啉症的风险中,或被诊断为患有卟啉症。

32. 如权利要求31所述的用途,其中该dsRNA是在卟啉症急性发作之后给予的。

33. 如权利要求30所述的用途,其中所述反义链包含SEQ ID NO:1296的序列。

34. 如权利要求30所述的用途,其中以0.05-50mg/kg的剂量给予该dsRNA。

35. 如权利要求30所述的用途,其中以0.01mg/kg-5mg/kg受试者体重的浓度给予该dsRNA。

36. 如权利要求30所述的用途,其中所述受试者中卟啉或卟啉前体的水平降低。

37. 如权利要求36所述的用途,其中该卟啉前体是 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)或胆色素原(PBG)。

38. 如权利要求30所述的用途,其中该dsRNA具有在0.01-1nM范围内的 IC_{50} 。

39. 如权利要求30所述的用途,其中:

(i) 改善与ALAS1相关的失调相关联的一种症状,

(ii) 抑制该受试者中的ALAS1表达,

(iii) 降低该受试者中卟啉前体或卟啉的水平,

(iv) 减少该受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的频率,或

(v) 当将受试者暴露于诱发因素时减少该受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的发病率。

40. 如权利要求39所述的用途,其中所述ALAS1相关的失调是卟啉症。

41. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA包含核苷酸上的修饰,且这些核苷酸上的修饰选自下组,该组由以下各项组成:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧基、2'-羟基及其组合。

42. 如权利要求41所述的用途,其中这些核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、2'-氟或两者。

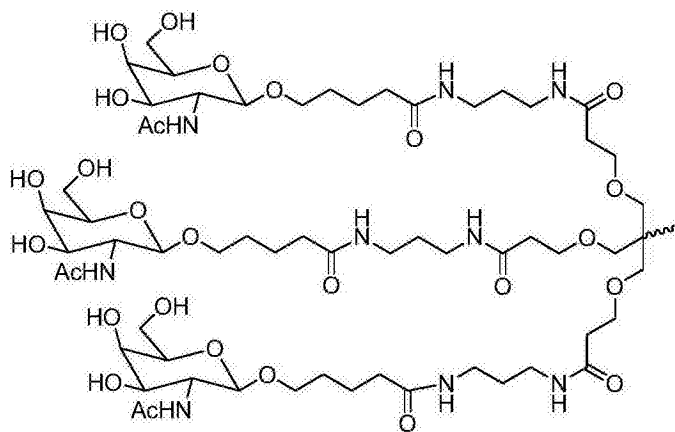
43. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA包含长度15-30个核苷酸对的双链体区域。

44. 如权利要求43所述的用途,其中所述双链体区域长度是19-21个核苷酸对。

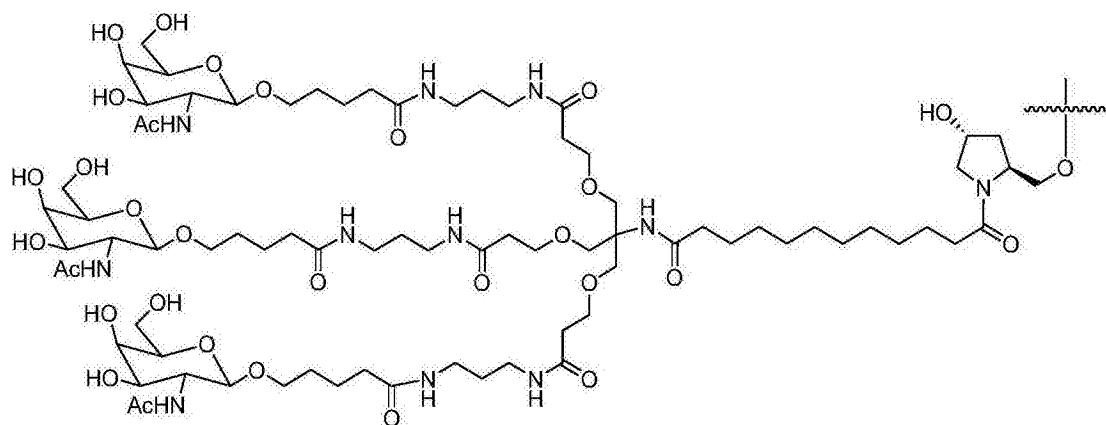
45. 如权利要求44所述的用途,其中该配体是经由一个连接物附接的。

46. 如权利要求45所述的用途,其中该连接物是一种二价或三价分枝的连接物。

47. 如权利要求44所述的用途,其中该配体是



48. 如权利要求45所述的用途,其中该配体和该连接物是如式XXIV所示的:



49. 如权利要求48所述的用途,其中该配体附接至该有义链的3'末端。

50. 如权利要求30所述的用途,其中该卟啉症是选自以下各项的肝性卟啉症:急性间歇性卟啉症(AIP)、遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。

51. 如权利要求30所述的用途,其中该dsRNA是在前驱症状过程中给予的。

52. 如权利要求51所述的用途,其中该受试者具有升高的ALA和/或PBG的水平。

53. 如权利要求52所述的用途,其中该受试者经受慢性疼痛。

54. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA包含一个或多个硫代磷酸酯键。

55. 如权利要求41所述的用途,其中所述dsRNA包含至少20个修饰的核苷酸。

56. 如权利要求55所述的用途,其中所述dsRNA在有义链和反义链的整个长度上包含核苷酸修饰。

57. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA包含至少一个平端。

58. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA在有义链或反义链上包含至少一个核苷酸的3'突出端。

59. 如权利要求58所述的用途,其中所述3'突出端长度是两个核苷酸。

60. 如权利要求58所述的用途,其中所述3'突出端存在于有义链和反义链两者的3'末端上。

61. 如权利要求58所述的用途,其中所述3'突出端存在于反义链上。

62. 如权利要求61所述的用途,其中所述突出端中的一个或多个核苷酸是核苷硫代磷酸酯。

63. 如权利要求30所述的用途,其中所述反义链包含与ALAS RNA的互补区,且其中所述互补区长度是19-24个核苷酸。

64. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA包含长度为17-23个核苷酸对的双链体区域。

65. 如权利要求30所述的用途,其中所述dsRNA的各条链长度是19-24个核苷酸。

66. 如权利要求30所述的用途,其中所述有义链包含SEQ ID NO:1295的序列。

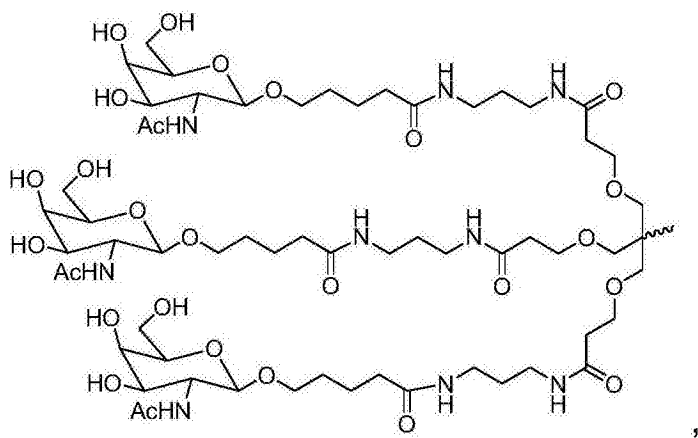
67. 如权利要求1所述的dsRNA在制备用于治疗具有升高的ALA和/或PBG水平的受试者的药物中的用途。

68. 如权利要求67所述的用途,其中ALA和/或PBG的水平有效地降低。

69. 一种双链核糖核酸(dsRNA)在制备用于治疗患有卟啉症的受试者的药物中的用途,

其中所述dsRNA包括各自长度是19-24个核苷酸的有义链和反义链,其中

- (i) 所述反义链与SEQ ID NO:1的至少核苷酸871-889互补,
- (ii) 所述有义链包含SEQ ID NO:1295的至少15个连续核苷酸,
- (iii) 所述dsRNA包含附接于所述有义链的3'末端的配体,其具有以下结构:

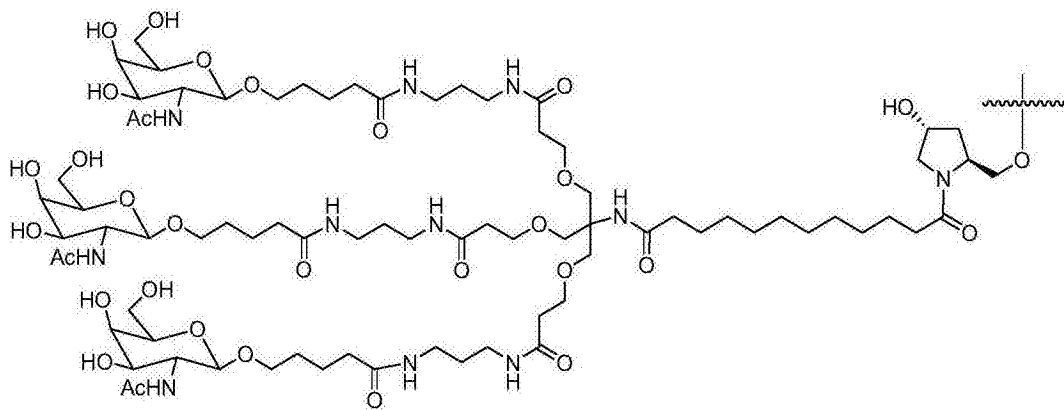


(iv) 所述dsRNA的核苷酸在所述有义链和反义链的整个长度上用2'-O-甲基和2'-氟修饰进行修饰,和

- (v) 所述反义链包含2个核苷酸的3'突出端。

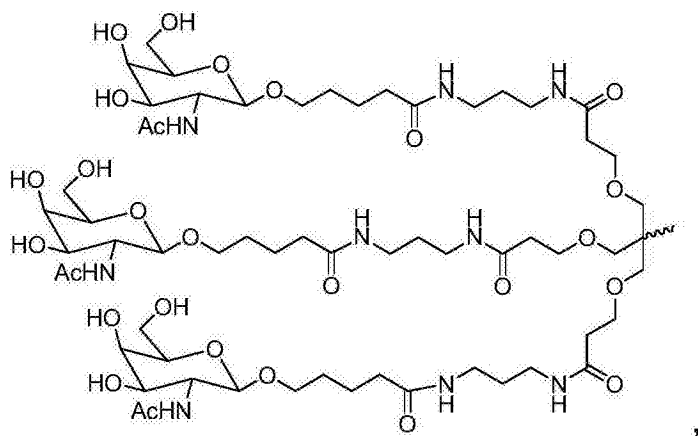
70. 如权利要求69所述的用途,其中所述dsRNA包含一个或多个硫代磷酸酯键。

71. 如权利要求69所述的用途,其中所述配体如式XXIV中所示通过连接物附接:



72. 一种用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包含各自长度是19-24个核苷酸的有义链和反义链,其中

- (i) 所述反义链与SEQ ID NO:1的至少核苷酸871-889互补;
- (ii) 所述有义链包含与SEQ ID NO:1295的至少15个连续核苷酸;
- (iii) 所述dsRNA包含附接于所述有义链的3'末端的配体,其具有以下结构:



(iv) 所述dsRNA的核苷酸在所述有义链和反义链的整个长度上用2'-O-甲基和2'-氟修饰进行修饰,和

(v) 所述反义链包含2个核苷酸的3' 突出端。

用于抑制ALAS1基因表达的组合物与方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是对于2013年3月15日提交的美国申请号13/835,613的部分继续申请,并且还要求了对于2012年4月10日提交的美国临时申请号61/622,288的优先权。上述申请各自的全部内容以其整体结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及特异性抑制ALAS1基因的表达。

[0004] 发明背景

[0005] 遗传性卟啉症是血红素生物合成途径(在此还称作卟啉途径)中特异性酶的活性缺乏导致的一类失调。卟啉途径中酶的缺乏导致血红素的不充分生产并且导致卟啉前体和卟啉的累积,高浓度的卟啉前体和卟啉对组织是有毒的。

[0006] 遗传性卟啉症中,急性间歇性卟啉症(AIP,例如,常染色体显性AIP)、杂斑卟啉症(variegate porphyria,VP,例如,常染色体显性VP)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症或HCP,例如,常染色体显性HCP)、以及5'-氨基乙酰丙酸(还称作 δ -氨基乙酰丙酸或ALA)脱水酶缺乏卟啉症(ADP,例如,常染色体隐性ADP)被分类为急性肝性卟啉症并且表现为可能危及生命的急性神经性发作。这些急性发作特征是自主神经、外周神经和中枢神经症状,包括急性腹痛、高血压、心动过速、便秘、运动无力、瘫痪、以及抽搐。如果治疗不得当,接着可能发生四肢瘫痪、呼吸道受损、以及死亡。多种因素,包括细胞色素P450-诱导药物、饮食、以及激素变化可能通过增加肝5'-氨基乙酰丙酸合酶1(ALAS1,血红素生物合成途径的第一以及限速酶)的活性促成急性发作。在急性卟啉症,例如,AIP、VP、HCP以及ADP中,各自的酶缺乏导致肝产生并累积一种或多种物质(例如,卟啉和/或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG),这种或这些物质可能是神经毒的并且可能导致发生急性发作。参见,例如,巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.),血液(Blood),120:4496-4504,2012。

[0007] 目前用于急性神经性发作的疗法是静脉给药氯化血红素(Panhematin®,灵北公司(Lundbeck)或Normosang®,科懋公司(Orphan Europe)),这为ALAS1的负反馈抑制提供了外源血红素,并且由此降低了ALA和PBG产生。氯化血红素用于在急性发作期间进行治疗或用于预防发作,特别是对于患有急性卟啉症并在她们的月经周期中伴随激素变化经历频繁发作的女性。虽然患者总体上响应良好,但是它的效果缓慢,典型地花费二到四天或更久来使得ALA和PBG浓度朝向正常水平标准化。因为静脉内氯化血红素代谢迅速,通常需要三至四次输注以有效治疗或预防急性发作。此外,重复输注可能导致铁超负荷以及静脉炎,这可能危害外周静脉通路。尽管通过原位肝移植可治愈,这一手术具有显著的发病率和死亡率并且可用的肝供体是受限的。因此,需要更有效、作用快速且安全的替代性治疗方案。如果此类治疗可以通过皮下给药而递送,将是特别有益的,因为这将排除对输注和旷日持久的住院治疗的需求。

[0008] AIP,还称作胆色素原脱氨酶(PBGD)缺乏,或羟甲基胆素合酶(HMBS)缺乏,是最常见的急性肝性卟啉症。这是由HMBS基因突变引起的一种常染色体显性失调,这一突变将导

致该酶的活性降低,例如,正常活性的一半。预先通过同源重组产生具有约30%野生型HMBS活性的AIP小鼠模型。如同人类患者一样,当给予生卟啉药(porphyrinogenic drugs),如苯巴比妥时,这些小鼠增加肝ALAS1活性并且累积大量的血浆和尿ALA与PBG。因此,将它们用作对用于急性肝性卟啉症的新颖疗法的效力进行评估的优异模型。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明描述了用于调节ALAS1基因表达的方法和iRNA组合物。在某些实施例中,使用ALAS1-特异性iRNA降低或抑制ALAS1基因的表达。这样的抑制可以有用于治疗与ALAS1表达相关的失调,如卟啉症。

[0011] 因此,在此描述的是多种组合物和方法,如在细胞或在受试者中(例如,在哺乳动物如人类受试者中),实现ALAS1基因RNA转录本的RNA-诱导的沉默复合体(RISC)-介导的切割。还描述了多种组合物和方法,用于治疗与ALAS1基因的表达相关的失调,像卟啉症,例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症或ADP)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症(CEP)、迟发性皮肤卟啉症(PCT)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症、或HCP)、杂斑卟啉症(VP)、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在一些实施例中,该失调是急性肝性卟啉症,例如,ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、AIP、HCP、或VP。在某些实施例中,该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)或AIP。

[0012] 在实施例中,该卟啉症是肝性卟啉症,例如,是选自以下各项的卟啉症:急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症(dual porphyria)。

[0013] 如在此使用的,术语“iRNA”、“RNAi”、“iRNA剂”、或“RNAi剂”是指包含如在此定义的术语RNA,并且例如,经由RNA-诱导的沉默复合体(RISC)路径介导RNA转录本的靶向切割的一种试剂。在一个实施例中,如在此所述的iRNA实现ALAS1在细胞或哺乳动物中表达的抑制。

[0014] 包含在在此表征的组合物中的iRNA包含具有RNA链(反义链)的dsRNA,该RNA链具有一个区域,例如,该区域是30个或更少个核苷酸,通常是19-24个核苷酸的长度,该区域基本上与ALAS1基因(例如,小鼠或人ALAS1基因)的mRNA转录本(在此还称作“ALAS1-特异性iRNA”)的至少一部分互补。可替代地,或组合地,iRNAs包含具有RNA链(反义链)的dsRNA,该RNA链具有一个区域,该区域是30个或更少个核苷酸,通常是19-24个核苷酸的长度,该区域基本上与ALAS1基因(例如,人ALAS1基因的变体1或2)的mRNA转录本的至少一部分互补(在此还称作“ALAS1-特异性iRNA”)。

[0015] 在实施例中,在此描述的iRNA(例如dsRNA)包括一个反义链,该反义链具有基本上与人ALAS1的一个区域互补的一个区域。在实施例中,人ALAS1具有序列NM_000688.4(SEQ ID NO:1)或NM_000688.5(SEQ ID NO:382)。

[0016] 在其他实施例中,iRNA包含具有RNA链(反义链)的dsRNA,该RNA链具有一个区域,该区域基本上与根据表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中任意一个的ALAS1mRNA的一部分互补。在一个实施例中,iRNA包含具有RNA链(反义链)的dsRNA,该RNA链具有一个区域,该区域基本上与ALAS1mRNA的一部分互补,例如人ALAS1mRNA(例如,如在SEQ ID NO:1或SEQ ID

NO:382中提供的人ALAS1mRNA)。

[0017] 在一个实施例中,用于抑制ALAS1基因表达的iRNA包含至少两个彼此互补的序列。iRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。反义链包含基本上与编码ALAS1转录本的mRNA的至少一部分互补的核苷酸序列,并且该互补区域是30个或更少个核苷酸和至少15个核苷酸长度。总体上,iRNA长度是19个至24个核苷酸。

[0018] 在一些实施例中,iRNA是19个至21个核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA是19-21个核苷酸长度并且使一种脂质配制品,例如,脂质纳米颗粒(LNP)配制品(例如,LNP11制剂)。

[0019] 在一些实施例中,iRNA是21个至23个核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA是21-23个核苷酸长度并且处于共轭物的形式,例如,共轭至如在此描述的一种或多种GalNAc衍生物。

[0020] 在一些实施例中,iRNA是从约15至约25个核苷酸长度,并且在其他实施例中,该iRNA是从约25至约30个核苷酸长度。一旦与表达ALAS1的细胞接触,靶向ALAS1的iRNA抑制ALAS1基因的表达至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多,如通过如本文所述的方法分析时。在一个实施例中,在稳定的核酸脂质颗粒(SNALP)中配制靶向ALAS1的iRNA。

[0021] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包含选自由表2、3、6、7、8、9、14、和15的有义序列组成的组的dsRNA的第一序列以及选自由表2、3、6、7、8、9、14、和15的相应反义序列组成的组的第二序列。

[0022] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包含选自由表2、3、6、7、8、9、14、15、18、和20的有义序列组成的组的dsRNA的第一序列以及选自由表2、3、6、7、8、9、14、15、18、和20的相应反义序列组成的组的第二序列。在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)具有选自以下如在本文实例中披露的那些的有义和/或反义序列:AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、AD-59129、AD-59124、AD-58874、AD-59125、AD-59105、AD-59120、AD-59122、AD-59106、AD-59126、以及AD-59107。在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)具有选自以下那些的有义和/或反义序列:AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、以及AD-59129。

[0023] 在此表征的iRNA分子可以包括天然存在的核苷酸或可以包括至少一个修饰的核苷酸,包括但不限于2'-O-甲基修饰的核苷酸、具有5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸和与胆甾醇基衍生物连接的末端核苷酸。可替代地,修饰的核苷酸可以选自下组:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、以及包含非天然碱基的核苷酸。这种修饰的序列可以基于,例如,所述iRNA的第一序列,所述第一序列选自由表2的有义序列组成的组,和第二序列,所述第二序列选自由表2的相应反义序列组成的组。

[0024] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包括一个有义链,该有义链包括选自下组的一个序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:330、SEQ ID NO:334、SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:356、SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:362、SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:376、以及SEQ ID NO:380。

[0025] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包括一个反义链,该反义链包括

选自下组的一个序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:345、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:357、SEQ ID NO:359、SEQ ID NO:363、SEQ ID NO:367、SEQ ID NO:377、以及SEQ ID NO:381。

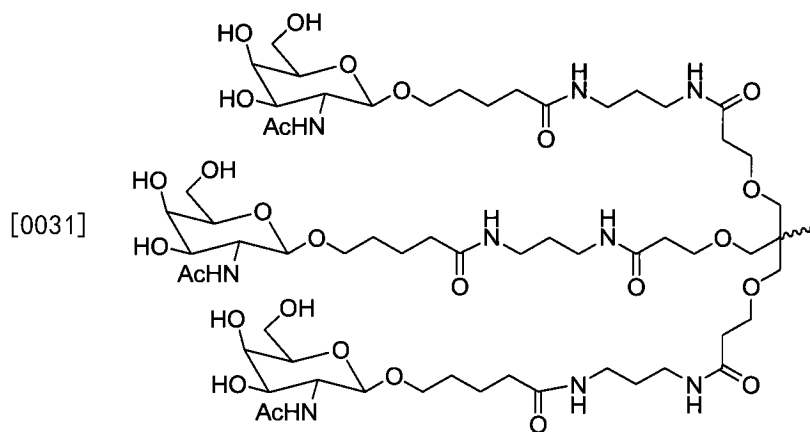
[0026] 在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包括一个有义链,该有义链包括选自下组的一个序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:190。在一个实施例中,在此表征的iRNA(例如,dsRNA)包括一个反义链,该反义链包括选自下组的一个序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:187、以及SEQ ID NO:191。

[0027] 在一个实施例中,在此描述的iRNA靶向野生型ALAS1RNA转录本变体,并且在另一个实施例中,iRNA靶向突变转录本(例如,携带等位变体的ALAS1RNA)。例如,本发明中表征的iRNA可以靶向ALAS1的多态性变体,如单核苷酸多态性(SNP)。在另一个实施例中,iRNA靶向野生型和突变ALAS1转录本两者。在又另一个实施例中,iRNA靶向ALAS1的特定转录本变体(例如,人ALAS1变体1)。在又另一个实施例中,iRNA剂靶向多种转录本变体(例如,人ALAS1的变体1和变体2两者)。

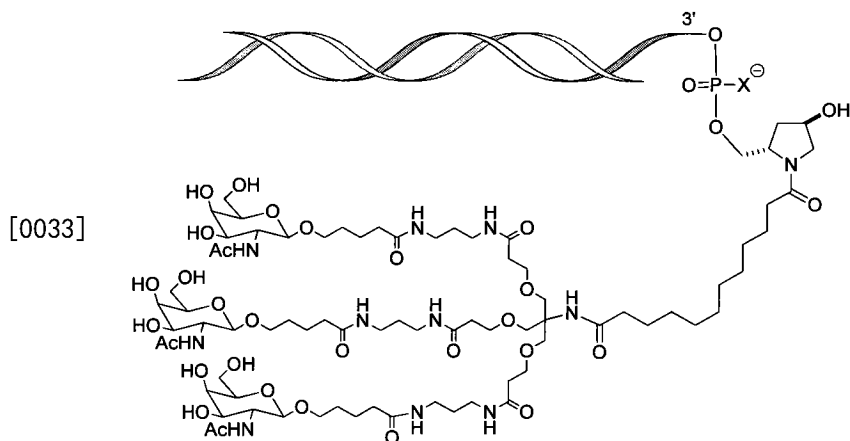
[0028] 在一个实施例中,本发明中表征的iRNA靶向ALAS1RNA转录本的非编码区,如转录本的5'或3'非翻译区。

[0029] 在一些实施例中,在此描述的iRNA处于共轭物(例如,碳水化合物共轭物)形式,该共轭物可以用作靶向部分和/或配体,如在此描述的。在一个实施例中,共轭物附接至dsRNA的有义链的3'末端。在一些实施例中,共轭物经由连接物附接,例如,经由二价或三价分枝的连接物。

[0030] 在一些实施例中,共轭物包括一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物。这样一种共轭物在此还称作GalNAc共轭物。在一些实施例中,共轭物将RNAi剂靶向特定细胞,例如,肝脏细胞(liver cell),像肝上皮实质细胞(hepatocyte)。GalNAc衍生物可以经由连接物附接,例如,二价或三价分枝的连接物。在具体的实施例中,该共轭物是

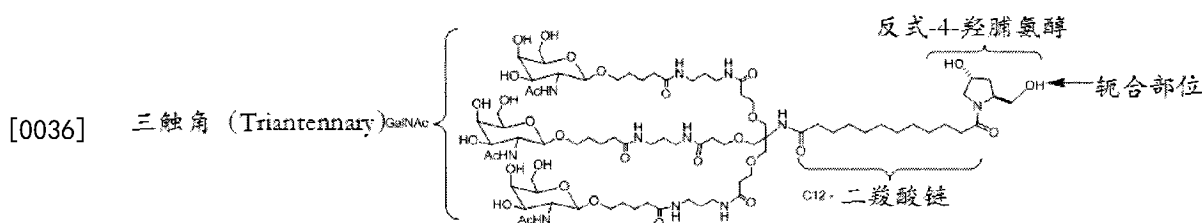


[0032] 在一些实施例中, RNAi 剂经由连接物附接至碳水化合物共轭物,例如,如以下方案中示出的连接物,其中X是O或S



[0034] 在一些实施例中,X是O。在一些实施例中,X是S。

[0035] 在一些实施例中, RNAi 剂共轭至如表1中定义且如下示出的L96



[0037] 在一个方面中,在此提供的是一种药物组合物,用于抑制ALAS1基因在生物体(通常是人类受试者)中的表达。这种组合物一般包含本文所述的一种或多种iRNA和药学上可接受的载体或递送媒介物。在一个实施例中,该组合物用于治疗卟啉症,例如,AIP。

[0038] 在一个方面中,在此提供的iRNA是用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括一个有义链和一个反义链(15-30个碱基对长度),并且该反义链与SEQ ID NO:1或382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0039] 在另一个方面中,在此提供的iRNA是双链RNAi(dsRNA),它包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包括与ALAS1RNA转录本互补的一个区域,其中每条链具有约14至约30个核苷酸,其中所述双链RNAi剂由式(III)表示:

[0040] 有义:5'-N_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-N_q3'

[0041] 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'

[0042] (III)

[0043] 其中:

[0044] i、j、k、以及l各自独立地是0或1;

[0045] p、p'、q、以及q'各自独立地是0-6;

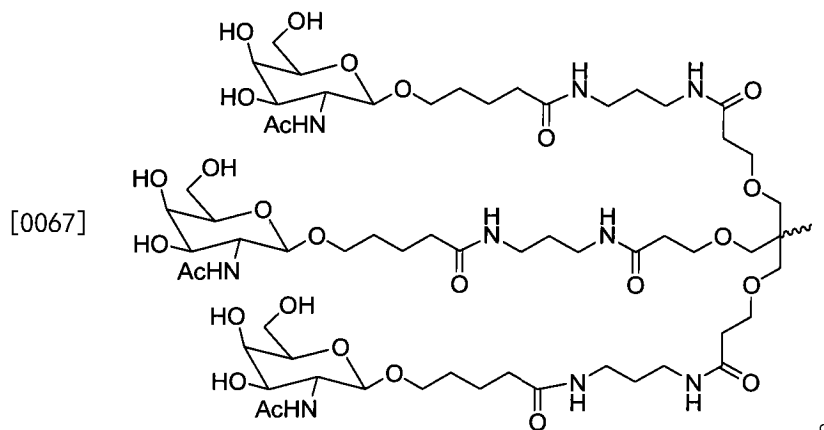
[0046] N_a和N_a'各自独立地表示包括0-25个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0047] N_b和N_b'各自独立地表示包括0-10个修饰的或未修饰的或其组合的核苷酸的寡核苷酸序列;

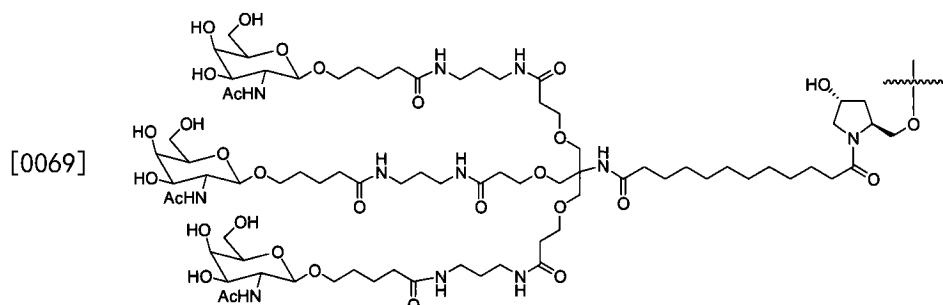
[0048] n_p、n_p'、n_q、以及n_q'各自独立地表示突出核苷酸;

[0049] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序;

- [0050] N_b上的修饰不同于Y上的修饰并且N_b'上的修饰不同于Y'上的修饰。
- [0051] 在实施例中,有义链共轭至至少一个配体。
- [0052] 在实施例中,i是1;j是1;或i和j两者都是1。
- [0053] 在实施例中,k是1;l是1;或k和l两者都是1。
- [0054] 在实施例中,XXX与X'X'X'互补,YYY与Y'Y'Y'互补,并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。
- [0055] 在实施例中,Y'Y'Y'基序发生在该反义链从5'-端开始的位置11、12和13处。
- [0056] 在实施例中,Y'是2'-O-甲基。
- [0057] 在实施例中,双链体区域是15-30个核苷酸对的长度。
- [0058] 在实施例中,双链体区域是17-23个核苷酸对的长度。
- [0059] 在实施例中,双链体区域是19-21个核苷酸对的长度。
- [0060] 在实施例中,双链体区域是21-23个核苷酸对的长度。
- [0061] 在实施例中,核苷酸上的修饰选自下组,该组由以下各项组成:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧基、2'-羟基、及其组合。
- [0062] 在实施例中,核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、2'-氟或两者。
- [0063] 在实施例中,配体包括碳水化合物。
- [0064] 在实施例中,配体经由连接物附接。
- [0065] 在实施例中,连接物是二价或三价分枝的连接物。
- [0066] 在实施例中,配体是



- [0068] 在实施例中,配体和连接物是如式XXIV所示的:



- [0070] 在实施例中,配体附接至有义链的3'末端。
- [0071] 在实施例中,d_sRNA具有(例如,包括)选自下组的核苷酸序列,该组是表2和3中提供的序列。在实施例中,d_sRNA具有选自下组的核苷酸序列,该组是表2、3、6、7、8和9中提供

的序列。在实施例中,dsRNA具有选自下组的核苷酸序列,该组是表2、3、6、7、8、9、14和15中提供的序列。在实施例中,dsRNA具有选自下组的核苷酸序列,该组是表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的序列。在实施例中,dsRNA具有表18中披露的核苷酸序列。在实施例中,dsRNA具有选自下组的核苷酸序列,该组是表14和15中提供的序列。

[0072] 在实施例中,dsRNA具有选自下组的核苷酸序列,该组是表3和8中提供的序列。

[0073] 在又一个方面中,在此提供的iRNA是用于抑制ALAS1的表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括一个有义链和一个反义链,该反义链包含与ALAS1RNA转录本互补的一个区域,该反义链包含与表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中任一个列出的反义序列之一相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。在一些此类实施例中,有义和反义序列选自以下如本文实例中披露的那些双链体:AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、AD-59129、AD-59124、AD-58874、AD-59125、AD-59105、AD-59120、AD-59122、AD-59106、AD-59126、以及AD-59107。在实施例中,有义和反义序列选自以下那些双链体:AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、和AD-59129。在实施例中,有义和反义序列选自以下那些双链体:AD-58632。在实施例中,有义和反义序列选自以下那些双链体:AD-59453、AD-59395、AD-59477、和AD-59492。在实施例中,有义和反义序列是在此披露的那些双链体,它们压制ALAS1mRNA表达至少50%、60%、70%、80%、85%或90%,例如,如使用在此提供的实例中披露的测定进行评估。

[0074] 在一些实施例中,dsRNA包括至少一个修饰核苷酸。

[0075] 在一些实施例中,修饰的核苷酸的至少一个选自下组,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基的核苷酸和与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷酸。

[0076] 在一些实施例中,修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、以及包含非天然碱基的核苷酸。

[0077] 在一些实施例中,互补区域长度是至少17个核苷酸。

[0078] 在一些实施例中,互补区域长度是在19个和21个核苷酸之间。

[0079] 在一些实施例中,互补区域长度是19个核苷酸。

[0080] 在一些实施例中,每一链的长度是不超过30个核苷酸。

[0081] 在一些实施例中,至少一条链包含具有至少1个核苷酸的3'突出端。

[0082] 在一些实施例中,至少一条链包含具有至少2个核苷酸的3'突出端。

[0083] 在一些实施例中,在此描述的dsRNA进一步包括配体。

[0084] 在一些实施例中,配体是GalNAc配体。

[0085] 在一些实施例中,配体将dsRNA靶向肝上皮实质细胞。

[0086] 在一些实施例中,配体共轭至dsRNA的有义链的3'末端。

[0087] 在一些实施例中,互补区域由选自表2或表3的反义序列组成。在实施例中,互补区域由选自表2、3、6、7、8、9、14、或15的反义序列组成。在实施例中,互补区域由选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18、或20的反义序列组成。在一些实施例中,互补区域由选自以下如在本文实例中披露的反义序列组成:AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、AD-59129、AD-59124、AD-58874、AD-59125、AD-59105、AD-59120、AD-59122、AD-59106、AD-

59126、或AD-59107。在一些实施例中，互补区域由双链体AD-58632的反义序列组成。在实施例中，互补区域由选自以下各项的反义序列组成：AD-59453、AD-59395、AD-59477、以及AD-59492。在实施例中，互补区域由选自在此披露的双链体的反义序列组成，它们压制ALAS1mRNA表达至少50%、60%、70%、80%、85%或90%，例如，如使用在此提供的实例中披露的测定进行评估。

[0088] 在一些实施例中，dsRNA包含由选自表2或表3的有义链序列组成的有义链和由选自表2或表3的反义序列组成的反义链。

[0089] 在一些实施例中，dsRNA包含由选自表2、3、6、7、8、9、14、或15的有义链序列组成的有义链和由选自表2、3、6、7、8、9、14、或15的反义序列组成的反义链。在实施例中，dsRNA包括一对对应的有义和反义序列，其选自表2、3、6、7、8、9、14、和15中披露的那些双链体。

[0090] 在一些实施例中，dsRNA包含由选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18、或20的有义链序列组成的有义链和由选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18、或20的反义序列组成的反义链。在实施例中，dsRNA包括一对对应的有义和反义序列，其选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18、和20中披露的那些双链体的。

[0091] 在一个方面中，本发明提供了包含在此表征的iRNA（例如，dsRNA）中至少一个的细胞。所述细胞通常是哺乳动物细胞，如人细胞。在一些实施例中，细胞是类红细胞。在其他实施例中，细胞是肝脏细胞（例如，肝上皮实质细胞）。

[0092] 在一个方面中，在此提供的是一种药物组合物，用于抑制ALAS1基因的表达，该组合物包括在此描述的iRNA（例如，dsRNA）。

[0093] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA（例如，dsRNA）在一种非缓冲溶液中进行给予。在实施例中，非缓冲溶液是盐水或水。

[0094] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA（例如，dsRNA）与缓冲溶液一起给予。在实施例中，缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐，或其任意组合。在实施例中，缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水（PBS）。

[0095] 在本文描述的药物组合物的实施例中，iRNA（例如，dsRNA）靶向肝上皮实质细胞。

[0096] 在本文描述的药物组合物的实施例中，静脉内给予组合物。

[0097] 在本文描述的药物组合物的实施例中，皮下给予组合物。

[0098] 在实施例中，药物组合物包括在此描述的iRNA（例如，dsRNA），该iRNA包括配体（例如，GalNAc配体），该配体将该iRNA（例如，dsRNA）靶向肝上皮实质细胞。

[0099] 在实施例中，药物组合物包括在此描述的iRNA（例如，dsRNA），该iRNA包括配体（例如，GalNAc配体），并且皮下给予该药物组合物。在实施例中，该配体将该iRNA（例如，dsRNA）靶向肝上皮实质细胞。

[0100] 在某些实施例中，药物组合物，例如，在此描述的组合物包括脂质配制品。在一些实施例中，RNAi剂是LNP配制品，例如，MC3配制品。在一些实施例中，LNP配制品将RNAi剂靶向特定细胞，例如，肝脏细胞，例如，肝上皮实质细胞。在实施例中，脂质配制品是LNP11配制品。在实施例中，静脉内给予组合物。

[0101] 在另一个实施例中，配制这种药物组合物以便根据本文所述的剂量方案给药，例如，每4周不多于1次、每3周不多于1次、每2周不多于1次或每周不多于1次。在另一个实施例中，可以维持药物组合物的给药一个月或更长时间，例如，1个、2个、3个或6个月，或1年或更

长时间。

[0102] 在另一个实施例中,将含有在本发明中表征的iRNA(例如,靶向ALAS1的dsRNA)的组合物随一种非iRNA治疗剂,如已知治疗卟啉症(例如,AIP)或卟啉症的症状(例如,疼痛)的药剂一起给予。在另一个实施例中,将含有在本发明中表征的iRNA(例如,靶向AIP的dsRNA)的组合物随一种非iRNA治疗方案,如氯化血红素或葡萄糖(例如,IV葡萄糖)输注一起给予。例如,在本发明中表征的iRNA可以在葡萄糖、右旋糖、或类似的用作恢复能量平衡(例如,全肠外营养)的治疗之前、之后或与其同时给予。在本发明中表征的iRNA还可以在血红素产品(例如,氯化血红素、精氨酸血红素、或白蛋白血红素)、以及任选地还与葡萄糖(例如,IV葡萄糖)或类似物组合给予之前、之后或与其同时给予。

[0103] 典型地,静脉内(IV)给予用于卟啉症治疗而给予的葡萄糖。静脉内给予葡萄糖在此称作“IV葡萄糖”。然而,还包括替代性实施例,其中通过其他手段给予葡萄糖。

[0104] 在一个实施例中,向患者给予ALAS1iRNA,并且然后向该患者给予非iRNA剂或治疗方案(例如,葡萄糖和/或血红素产品)(反之亦然)。在另一个实施例中,同时给予ALAS1iRNA和非iRNA治疗剂或治疗方案。

[0105] 在一个方面中,在此提供的是抑制细胞中ALAS1表达的方法,该方法包括:(a)向该细胞中引入在此描述的iRNA(例如dsRNA)并且(b)维持步骤(a)中产生的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解,由此抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0106] 在一个方面中,在此提供的是用于降低或抑制细胞(例如,类红细胞或肝脏细胞,例如,像肝上皮实质细胞)中ALAS1基因表达的方法。该方法包括:

[0107] (a)向所述细胞引入双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。该dsRNA具有包含第一序列的有义链和包含第二序列的反义链;该反义链具有基本上与编码ALAS1的mRNA的至少一部分互补的互补区域,并且其中该互补区域是30个或更少核苷酸长度,即15-30个核苷酸长度,并且总体上是19-24个核苷酸长度,并且其中一旦与表达ALAS1的细胞接触,则该dsRNA抑制ALAS1基因的表达至少10%、例如至少20%、至少30%、至少40%或更多;并且

[0108] (b)维持步骤(a)中产生的细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解,由此降低或抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0109] 在抑制细胞中ALAS1表达的前述方法的实施例中,将该细胞离体、体外、或体内地进行处理。在实施例中,细胞是肝上皮实质细胞。

[0110] 在实施例中,细胞存在于需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的受试者中。

[0111] 在实施例中,该失调是卟啉症。在实施例中,卟啉症是急性间歇性卟啉症或ALA-脱水酶缺乏卟啉症。

[0112] 在实施例中,该卟啉症是肝性卟啉症,例如,是选自以下各项的卟啉症:急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症。

[0113] 在实施例中,ALAS1表达被抑制至少30%。

[0114] 在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)具有在0.01-1nM范围内的IC₅₀。

[0115] 在某些实施例中,细胞(例如,肝上皮实质细胞)是哺乳动物细胞(例如,人类、非人类灵长动物、或啮齿动物细胞)。

[0116] 在一个实施例中,离体、体外、或体内地处理细胞(例如,存在于受试者(例如,需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的患者)中的细胞)。

[0117] 在一个实施例中,受试者是处于风险或被诊断为患有卟啉症的哺乳动物(例如,人类),卟啉症是例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP或Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症(CEP)、迟发性皮肤卟啉症(PCT)、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症或HCP)、杂斑卟啉症(VP)、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在一些实施例中,该失调是急性肝性卟啉症,例如,ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、AIP、HCP、或VP。在具体实施例中,该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)或AIP。

[0118] 在实施例中,该卟啉症是肝性卟啉症,例如,是选自以下各项的卟啉症:急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症。

[0119] 在一个实施例中,引入的dsRNA降低或抑制细胞中ALAS1基因的表达。

[0120] 在一个实施例中,与参比细胞(例如,未处理的细胞或用非靶向对照dsRNA处理的细胞)相比较,引入的dsRNA降低或抑制ALAS1基因的表达、或一种或多种卟啉或卟啉前体(例如, δ -氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆素(HMB)、尿卟啉原(protoporphyrinogen) I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、以及原卟啉IX)或卟啉产物或代谢物的水平至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更高。不受理论的限制,ALAS1是卟啉途径的第一酶。因此,降低ALAS1基因的表达很可能降低一种或多种卟啉前体、卟啉或卟啉产物或代谢物的水平。

[0121] 在其他方面,本发明提供了用于治疗、预防或管理与ALAS1表达相关的病理过程的方法,(例如,涉及卟啉、卟啉前体或卟啉途径缺陷的病理过程,例如,像卟啉症)。在一个实施例中,该方法包括向受试者,例如需要这种治疗、预防、或管理的患者施用有效(例如,治疗或预防有效)量的在此表征的一种或多种iRNA。

[0122] 在一个方面中,在此提供的是治疗和/或预防与ALAS1表达相关的失调的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的在此描述的iRNA(例如,dsRNA)、或在此描述的包括iRNA(例如,dsRNA)的组合物。

[0123] 在一个方面中,在此提供的是治疗和/或预防卟啉症的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括一个有义链和一个反义链(15-30个碱基对长度),并且该反义链与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0124] 在一个实施例中,受试者(例如,患者)患有卟啉症。在另一个实施例中,受试者(例如,患者)处于发展卟啉症的风险中。在一些实施例中,靶向ALAS1的iRNA的给予减轻或缓解患者中与ALAS1相关的失调的至少一个症状的严重性。

[0125] 在一个实施例中,受试者是处于风险或已经被诊断为患有与ALAS1表达相关的失调的哺乳动物(例如,人类),例如卟啉症,像X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺

乏卟啉症 (Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症 (AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症 (CEP)、迟发性皮肤卟啉症 (PCT)、遗传性粪卟啉症 (粪卟啉症或HCP)、杂斑卟啉症 (VP)、红细胞生成性原卟啉症 (EPP)、或婴儿暂时性红细胞卟啉症。在又一个实施例中,卟啉症是急性肝性卟啉症,例如,ALA脱水酶缺乏卟啉症 (ADP)、AIP、HCP、或VP。在一些此类实施例中,该失调是ALA脱水酶缺乏卟啉症 (ADP) 或AIP。

[0126] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中。在实施例中,该卟啉症是肝性卟啉症,例如,是选自以下各项的卟啉症:急性间歇性卟啉症 (AIP) 遗传性粪卟啉症 (HCP)、杂斑卟啉症 (VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症 (ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症 (例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP) 或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症。

[0127] 在实施例中,卟啉症、卟啉症的症状、前驱症状、或卟啉症的发作通过暴露于如在此描述的诱发因素而诱导。在一些实施例中,诱发因素是化学暴露。在一些实施例中,诱发因素是药物,例如,处方药物或非处方药。在一些实施例中,诱发因素是月经周期,例如,月经周期的一个具体时期,例如,黄体期。

[0128] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 或包括iRNA的组合物是在卟啉症急性发作后给予。

[0129] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 或包括iRNA的组合物是在卟啉症急性发作过程中给予。

[0130] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 或包括iRNA的组合物是预防性给予的以防止卟啉症的急性发作。

[0131] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 被配制为LNP配制品。

[0132] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 处于GalNAc共轭物的形式。

[0133] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 以0.05-50mg/kg的剂量给予。

[0134] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 以0.01mg/kg-5mg/kg受试者体重的浓度给予。

[0135] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 被配制为LNP配制品并且是以0.05-5mg/kg的剂量给予。

[0136] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 是处于GalNAc共轭物的形式并且是以0.5-50mg/kg的剂量给予。

[0137] 在实施例中,该方法降低受试者中卟啉或卟啉前体的水平。

[0138] 在实施例中,该水平被降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。在一个实施例中,该水平被降低至少30%。

[0139] 在实施例中,卟啉前体是 δ -氨基乙酰丙酸 (ALA) 或胆色素原 (PBG)。

[0140] 在实施例中,iRNA (例如,dsRNA) 具有在0.01-1nM范围内的IC₅₀。

[0141] 在实施例中,当将受试者暴露于诱发因素 (例如,经前期或黄体期) 时,在此描述的方法

[0142] (i) 改善与ALAS1相关的失调 (例如,卟啉症) 相关联的症状

[0143] (ii) 抑制受试者中的ALAS1表达,

[0144] (iii) 降低受试者中卟啉前体 (例如,ALA或PBG) 或卟啉的水平,

[0145] (iv) 减少受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的频率,或

[0146] (v) 减少受试者中与卟啉症相关联的症状的急性发作的发病率。

[0147] 在实施例中,该方法改善疼痛和/或渐进性神经病变。

[0148] 在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)或包括iRNA的组合物是根据剂量方案给予的。

[0149] 在一些实施例中,iRNA(例如,dsRNA)或包括iRNA的组合物是在卟啉症的急性发作之前或过程中给予的。在一些实施例中,iRNA是在卟啉症的急性发作之前给予的。

[0150] 在一些实施例中,iRNA(例如,dsRNA)或包括iRNA的组合物是在前驱症状过程中给予的。在实施例中,前驱症状的特征在于腹痛、恶心、心理症状(例如,焦虑)、坐立不安和/或失眠。

[0151] 在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)或包括iRNA的组合物是在月经周期的一个具体时期过程中,例如,在黄体期过程中给予的。

[0152] 在实施例中,例如,通过降低严重性、持续时间、或发作频率,该方法改善或预防卟啉症的循环发作。在实施例中,循环发作与诱发因素相关联。在实施例中,诱发因素是月经周期,例如,月经周期的一个具体时期,例如,黄体期。

[0153] 在实施例中,受试者具有升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,肝性卟啉症。在实施例中,受试者是无症状的。在实施例中,如在此所述的,受试者携带有与卟啉症相关联的遗传变异(例如,基因突变)。

[0154] 在实施例中,受试者具有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中并且经受疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,受试者不经受急性发作但是经受疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。

[0155] 在实施例中,受试者(a)具有升高的ALA和/或PBG的水平并且(b)经受疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。

[0156] 在实施例中,受试者具有ALA和/或PBG的升高的血浆水平和/或尿水平。在实施例中,升高的ALA和/或PBG的水平伴随有其他症状,例如,疼痛(例如,慢性疼痛,例如,慢性神经性疼痛)或神经病变(例如,渐进性神经病变)。在实施例中,疼痛是腹痛。在实施例中,受试者是无症状的。在实施例中,受试者具有与卟啉症相关联的基因突变,例如,如在此描述的突变。

[0157] 在实施例中,受试者具有升高的卟啉前体,例如,ALA和/或PBG水平(例如,血浆水平或尿水平),例如,该水平是大于、或大于或等于参比值。在实施例中,该水平是大于参比值。在实施例中,参比值是超过健康个体样本中平均水平两个标准差。在实施例中,参比值是参比上限。

[0158] 在实施例中,受试者具有ALA和/或PBG的大于、或大于或等于参比上限2倍、3倍、4倍、或5倍的血浆水平和/或尿水平。如在此使用的,“参比上限”是指参比样本的95%置信区间上限的一个水平,该样本是,例如,正常(例如,野生型)或健康个体,例如,不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体和/或不经受卟啉症的个体的样本。在实施例中,受试者具有大于参比上限2至4倍的ALA和/或PBG的尿水平。在实施例中,受试者具有大于参比上限4倍的ALA和/或PBG的尿水平。

[0159] 在实施例中,血浆PBG的参比值是0.12 μ mol/L。在实施例中,受试者是人类并且具

有大于、或大于或等于 $0.12\mu\text{mol/L}$ 、 $0.24\mu\text{mol/L}$ 、 $0.36\mu\text{mol/L}$ 、 $0.48\mu\text{mol/L}$ 、或 $0.60\mu\text{mol/L}$ 的血浆PBG水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 $0.48\mu\text{mol/L}$ 的PBG的血浆水平。

[0160] 在实施例中，尿PBG的参比值是 1.2mmol/mol 肌酸酐。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 1.2mmol/mol 肌酸酐、 2.4mmol/mol 肌酸酐、 3.6mmol/mol 肌酸酐、 4.8mmol/mol 肌酸酐、或 6.0mmol/mol 肌酸酐的尿PBG水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 4.8mmol/mol 肌酸酐的PBG的尿水平。

[0161] 在实施例中，血浆ALA的参比值是 $0.12\mu\text{mol/L}$ 。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 $0.12\mu\text{mol/L}$ 、 $0.24\mu\text{mol/L}$ 、 $0.36\mu\text{mol/L}$ 、 $0.48\mu\text{mol/L}$ 、或 $0.60\mu\text{mol/L}$ 的血浆ALA水平。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 $0.48\mu\text{mol/L}$ 的血浆ALA水平。

[0162] 在实施例中，尿ALA的参比值是 3.1mmol/mol 肌酸酐。在实施例中，受试者是人类并且具有大于、或大于或等于 3.1mmol/mol 肌酸酐、 6.2mmol/mol 肌酸酐、 9.3mmol/mol 肌酸酐、 12.4mmol/mol 肌酸酐、或 15.5mmol/mol 肌酸酐的尿ALA水平。

[0163] 在实施例中，该方法降低升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中，该方法减少疼痛(例如，慢性疼痛，例如，慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如，渐进性神经病变)。在实施例中，疼痛是腹痛。在实施例中，疼痛是神经性疼痛(例如，与急性卟啉症的渐进性神经病变相关联的疼痛)。减少疼痛可以包括，例如，预防疼痛、疼痛发作延迟、疼痛频率下降、和/或疼痛严重性下降。

[0164] 在实施例中，例如，通过降低严重性、持续时间、或发作频率，该方法改善或预防卟啉症的急性发作。

[0165] 在实施例中，该方法减少或预防神经损伤。

[0166] 在实施例中，该方法预防恶化(例如，预防畸形发展)或导致临床测量值，例如，肌肉和/或神经功能临床测量值，例如，EMG和/或神经传导速度的改善。

[0167] 在实施例中，该方法对于降低ALA和/或PBG的水平(例如，ALA和/或PBG的血浆或尿水平)是有效的。在实施例中，该方法对于产生升高的ALA和/或PBG水平的预定下降是有效的。

[0168] 在实施例中，该预定下降是降低至小于或等于参比值的一个值。在一些实施例中，参比值是参比上限。在一些实施例中，参比值是超过参比样本中平均水平两个标准差的一个值。

[0169] 在实施例中，iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物是例如，根据剂量方案重复给予的。

[0170] 在实施例中，将iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物预防性给予受试者，该受试者处于发展卟啉症的风险中。在实施例中，从青春期开始预防性地给予iRNA(例如，dsRNA)或包括iRNA的组合物。在实施例中，受试者携带有与卟啉症相关联的基因突变和/或具有升高的ALA和/或PBG的水平(例如，ALA和/或PBG的升高的血浆或尿水平)。在实施例中，突变使得个体易于急性发作(例如，一旦暴露于诱发因素，例如，药物、饮食或其他诱发因素，例如，如在此披露的诱发因素)。在实施例中，突变是与卟啉或卟啉前体(例如，ALA和/或PBG)的升高的水平相关联的。在实施例中，突变是与慢性疼痛(例如，慢性神经性疼痛)和/

或神经病变(例如,渐进性神经病变)相关联的。

[0171] 在实施例中,突变是ALAS1基因的突变。在实施例中,突变是ALAS1基因启动子的突变,或是ALAS1基因上游或下游区域中的突变。在实施例中,突变是转录因子或与ALAS1相互作用的其他基因的突变。在实施例中,突变是编码血红素生物合成途径中的酶的基因的突变。

[0172] 在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)或包括iRNA的组合物是皮下给予。在实施例中,iRNA是处于GalNAc共轭物的形式。在实施例中,iRNA(例如,dsRNA)以0.5-50mg/kg的剂量给予。

[0173] 在一个方面中,在此提供地是对具有升高的ALA和/或PBG水平的受试者进行治疗的方法,该方法包括向该受试者给予双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括一个有义链和一个长度是15-30个碱基对的反义链,并且该反义链与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:382中的至少15个连续核苷酸互补。

[0174] 在一个方面中,在此提供地是对具有升高的ALA和/或PBG水平的受试者进行治疗的方法,该方法包括向该受试者给予一个治疗有效量的、如在此所述的dsRNA或包含dsRNA的组合物。

[0175] 在一些实施例中,在此描述的方法对于降低ALA和/或PBG的水平是有效的。在一些实施例中,降低ALA和/或PBG的水平以使得它是小于、或小于或等于参比值,例如,参比上限。在另一个方面中,本发明提供了用于降低细胞(例如,类红细胞或肝脏细胞,例如像肝上皮实质细胞)中卟啉或卟啉前体水平的方法。在一个实施例中,离体、体外、或体内地处理细胞(例如,存在于受试者(例如,需要治疗、预防和/或管理与ALAS1表达相关的失调的患者)中的细胞)。该方法包括使该细胞与有效量的一个或多个靶向ALAS1的iRNA相接触,例如,在此披露的一个或多个iRNA,由此相对于接触之前的水平,降低该细胞中卟啉或卟啉前体的水平;或降低该细胞位于其中的受试者体内的其他细胞、组织或流体中卟啉或卟啉前体的水平。可以使用此类方法来治疗与ALAS1表达相关的失调,例如卟啉症,例如,AIP或ALA脱水酶缺乏卟啉症(例如,改善其严重性)。

[0176] 在一个实施例中,离体、体外、或体内地实现接触步骤。例如,该细胞可以存在于受试者中,例如,该受试者是哺乳动物(例如,人类),处于患有卟啉症的风险中或已经被诊断为患有卟啉症。在一个实施例中,卟啉症是急性肝性卟啉症。在实施例中,该卟啉症是肝性卟啉症,例如,是选自以下各项的卟啉症:急性间歇性卟啉症(AIP)、遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)、和肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是纯合的显性肝性卟啉症(例如,纯合的显性AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在实施例中,卟啉症是双卟啉症。

[0177] 在一个方面中,在此提供的是一种用于降低细胞中卟啉或卟啉前体(例如,ALA或PBG)的水平的方法,该方法包括以一个有效降低该细胞中卟啉或卟啉前体的水平的量将该细胞与iRNA(例如,dsRNA)相接触。在实施例中,细胞是肝上皮实质细胞。在实施例中,卟啉或卟啉前体是 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆素(HMB)、尿卟啉原I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、或原卟啉IX。在实施例中,卟啉前体是ALA或PBG。

[0178] 在一个实施例中,细胞是类红细胞。在又一个实施例中,细胞是肝脏细胞(例如,肝上皮实质细胞)。

[0179] 在一个方面中,在此提供的是一种载体,该载体编码如在此描述的iRNA(例如,dsRNA)的至少一条链。

[0180] 在一个方面中,在此提供的是一种编码dsRNA的至少一条链的载体,其中所述dsRNA包含与编码ALAS1的mRNA的至少一部分互补的一个区域,其中所述dsRNA长度是30个或更少碱基对,并且其中所述dsRNA靶向所述mRNA以便切割。

[0181] 在实施例中,该互补区域长度是至少15个核苷酸。

[0182] 在实施例中,该互补区域长度是19至21个核苷酸。在一个方面,本发明提供一种用于抑制细胞中ALAS1基因表达的载体。在一个实施例中,载体包括如在此所述的iRNA。在一个实施例中,该载体包含与核苷酸序列可操作连接的至少一种调节序列,其中所述核苷酸序列编码如本文所述的iRNA的至少一条链。在一个实施例中,载体包括ALAS1iRNA的至少一条链。

[0183] 在一个方面中,在此提供的是一种细胞,该细胞包括如在此所述的载体。在一个方面中,在此提供的是一种细胞,该细胞包括用于抑制细胞中ALAS1基因表达的载体。该载体包含与核苷酸序列可操作连接的调节序列,该核苷酸序列编码如本文所述的iRNA之一的至少一条链。在一个实施例中,细胞是肝脏细胞(例如,肝上皮实质细胞)。在另一个实施例中,细胞是类红细胞。

[0184] 本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用方式以其全文结合。

[0185] 在下文描述中叙述本发明的不同实施方案的详细内容。本发明的其他特征、目的以及优点将通过以下说明和附图以及权利要求书而清楚。

附图说明

[0186] 图1描绘了血红素生物合成途径。

[0187] 图2总结了与血红素新陈代谢中遗传错误相关联的某些卟啉症。

[0188] 图3描绘了人ALAS1mRNA序列转录本变体1(参比序列NM_000688.4(GI:40316942,记录日期2011年11月19日),SEQ ID NO:1)。

[0189] 图4描绘了人ALAS1mRNA序列转录本变体2(参比序列NM_000688.5(GI:362999011,记录日期2012年4月1日),SEQ ID NO:382)。

[0190] 图5显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558在压制小鼠ALAS1(mALAS1)mRNA中的剂量响应。还显示了针对萤虫素酶(LUC)AD-1955对照的结果。

[0191] 图6显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558在压制大鼠ALAS1mRNA中的剂量响应。还显示了针对萤虫素酶(LUC)AD-1955对照的结果。

[0192] 图7显示相对于PBS对照,siRNA AD-53558对小鼠ALAS1(mALAS1)mRNA的压制的持久性。

[0193] 图8显示基线处的、以及苯巴比妥处理后实验组(ALAS1siRNA)和对照组(LUC siRNA)中血浆ALA水平(以 μM 计)的平均值 $\pm$ 标准差。

[0194] 图9显示个体动物在基线处的、以及苯巴比妥处理后接受ALAS1siRNA和对照(LUC siRNA)处理的动物中的血浆ALA水平(以 μM 计)。

[0195] 图10显示在基线处的、以及苯巴比妥处理后在接受ALAS1siRNA和对照(LUC

siRNA) 处理的动物中的血浆PBG水平(以 μM 计)的平均值 $\pm$ 标准差。

[0196] 图11显示个体动物在基线处的、以及苯巴比妥处理后在接受ALAS1siRNA和对照(LUC siRNA)处理的动物中的血浆PBG水平(以 μM 计)。

[0197] 图12显示在基线处,以及苯巴比妥处理后在挑选出的代表性实验(ALAS1siRNA)和对照(PBS)动物中的肝脏中的相对mALAS1mRNA水平。

[0198] 图13显示在小鼠肝脏组织中,三种GalNAc共轭的mALAS1siRNA对mALAS1表达(相对于PBS对照)的影响。

[0199] 图14显示苯巴比妥给予以及用ALAS1siRNA或对照LUC siRNA处理之后,随时间推移的血浆ALA和PBG水平。

[0200] 图15显示小鼠AIP苯巴比妥诱导模型中GalNAc共轭的ALAS1siRNA对血浆ALA和血浆PBG水平的影响。

[0201] 发明详细说明

[0202] iRNA通过已知为RNA干扰(RNAi)的过程指导mRNA的序列特异性降解。本文中描述了iRNA和使用它们抑制细胞或哺乳动物中ALAS1基因表达的方法,其中iRNA靶向ALAS1基因。还提供了用于与ALAS1表达相关的失调的多种组合物和方法,像卟啉症(例如,ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP或Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、以及婴儿暂时性红细胞卟啉症)。

[0203] 卟啉症是遗传性或获得性失调,可能起因于血红素生物合成途径(在此还称作卟啉途径(参见图1))中特异性酶的降低的或增强的活性。卟啉是主要的血红素前体。卟啉和卟啉前体是 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆素(HMB)、尿卟啉原I或III、粪卟啉原I或III、原卟啉原IX、和原卟啉IX。血红素是血红蛋白、肌红蛋白、过氧化氢酶、过氧化物酶、以及细胞色素的基本部分,后者包括呼吸道和P450肝细胞色素。血红素是合成于大多数或全部人类细胞。大约85%的血红素在类红细胞中制成,主要用于血红蛋白。剩余血红素中大部分在肝脏中制成,其中80%用于细胞色素合成。卟啉途径中特异性酶的缺乏导致血红素的不充分生产并且还导致卟啉前体和/或卟啉的累积,高浓度的卟啉前体和/或卟啉对细胞或器官是有毒的。

[0204] 卟啉症表现是神经系统并发症(“急性”)、皮肤问题(“皮肤性”)或两者。卟啉症可以依据卟啉或其前体超量产生和累积的主要部位进行分类。在肝性卟啉症中,卟啉和卟啉前体主要在肝脏中超量产生,而在红细胞生成性卟啉症中,卟啉在骨骼中的类红细胞内超量产生。急性或肝性卟啉症导致神经系统和神经表现异常,可以影响中枢和周围神经系统两者,导致多种症状,例如,疼痛(例如,腹痛和/或慢性神经性疼痛)、呕吐、神经病变(例如,急性神经病变、渐进性神经病变)、肌无力、发作、精神紊乱(例如,幻觉、抑郁焦虑、妄想症)、心律失常、心动过速、便秘、以及腹泻。皮肤或红细胞生成性卟啉症主要影响皮肤,导致多种症状,例如光过敏,光过敏可以在多个区域,例如前额引起疼痛、疱疹、坏死、瘙痒、肿胀、以及增加的毛发生长。皮肤损害的继发感染可能导致骨骼与组织损失,连同瘢痕、毁容、以及手指或足趾损失(例如,手指、足趾)。大多数卟啉症由编码血红素生物合成途径中的酶的突变导致。血红素新陈代谢中与遗传错误相关联的卟啉症概述于图2中。

[0205] 不是所有的卟啉症都是遗传性的。例如,患有肝脏疾病的患者可能发展卟啉症,这

是由于肝脏异常的结果,并且暂时形式的红细胞卟啉症(婴儿暂时性红细胞卟啉症)已经被描述于婴儿中(参见克劳福德(Crawford,R.I.)等人,美国皮肤病学会杂志(J Am Acad Dermatol.)1995年8月;33(2Pt2):333-6。)患有PCT的患者可能获得尿卟啉原脱羧酶的活性缺乏(URO-D),这是由于具有低于正常酶活性的URO-D酶的形成(参见菲利普斯(Phillips)等人,血液(Blood),98:3179-3185,2001。)

[0206] 急性间歇性卟啉症(AIP)(还被称作胆色素原(PBG)脱氨酶缺乏,或羟甲基胆素合酶(HMBS)缺乏),是急性肝性卟啉症的最常见类型。急性肝性卟啉症的其他类型包括遗传性粪卟啉症(HCP),杂斑卟啉症(VP),以及ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)。急性肝性卟啉症描述于,例如,巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.),血液(Blood),120:4496-4504,2012中。

[0207] AIP典型地是一种常染色体显性疾病,特征在于酶:胆色素原脱氨酶(PBG脱氨酶)的缺乏;这种酶还称作羟甲基胆素合酶(HMB合酶或HMBS)。PBG脱氨酶是血红素生物合成途径(参见图1)中的第三酶并且催化四个胆色素原分子头尾缩合成线性四吡咯,羟甲基胆素(HMB)。编码PBG脱氨酶不同同种型的可变剪接的转录本变体已经被描述。PBG脱氨酶基因的突变是与AIP相关联的。此类突变可能导致PBG脱氨酶的减少量和/或PBG脱氨酶的降低的活性(受累个体典型地具有约50%的PBG脱氨酶活性下降)。

[0208] 存在AIP以及其他急性肝性卟啉症病理生理学的至少两种不同模型(参见,例如,林(Lin CS-Y)等人,临床神经生理学(Clinical Neurophysiology),2011;122:2336-44)。根据一个模型,由PBG脱氨酶缺乏引起的降低的血红素导致能量衰竭以及轴突变性。根据另一个当前更受欢迎的模型,卟啉前体(例如,ALA和PBG)的逐渐累积(buildup)导致神经毒性。

[0209] 已经发现AIP在某些群体中具有高达万分之一的患病率(例如,在瑞典北部;参见弗洛德拉斯(Floderus Y),等人临床遗传学(Clin Genet.)2002;62:288-97)。估计美国与欧洲(英国除外)总群体中的患病率是约万分之一至两万分之一。仅在大约10%-15%的携带有已知与AIP相关联的突变的个体中表现临床疾病本身。然而,在具有某些突变(例如,W198X突变)的个体中,外显率高达40%。在青春期之前,AIP典型地是潜伏的。症状在雌性中比在雄性中更加常见。由于其不完全外显以及长潜伏期,该疾病的患病率很可能被低估。在美国,估计有约2000个患者已经经受至少一次发作。在法国、瑞典和英国,估计有约150个活动性、复发性案例;这些患者主要是中位年龄30岁的年轻女性。参见,例如,埃尔德(Elder)等人,遗传代谢杂志(J Inherit Metab Dis.),在线发表,2012年11月1日。

[0210] AIP影响,例如,内脏神经系统、外周神经系统、自主神经系统、和中枢神经系统。AIP症状是可变的并且包括胃肠道症状(例如,严重和较轻的局部腹痛、恶心/呕吐、便秘、腹泻、肠梗阻),泌尿症状(排尿困难、尿潴留/失禁、或小便黄赤),神经性症状(例如,感觉神经病变、运动神经病变(例如,影响脑神经和/或导致上臂或下肢无力),发作,神经性疼痛(例如,与渐进性神经病变相关联的疼痛,例如,慢性神经性疼痛),神经精神症状(例如,精神错乱、焦虑、激动、幻觉、癔病、谵妄、冷漠、抑郁、恐怖症、精神病、失眠、嗜睡、昏迷),自主神经系统牵连(例如导致心血管症状,像心动过速、高血压、和/或心率失常,连同其他症状,例如,升高的循环的儿茶酚胺水平、显汗、坐立不安、和/或震颤),脱水,以及电解质异常。最常见的症状是腹痛和心动过速。此外,患者更加频繁地具有慢性神经性疼痛并发展渐进性神

经病变。具有复发性发作的患者通常具有前驱症状。发生严重发作之后可能导致永久性瘫痪。从未得到迅速治疗的严重发作的恢复可能花费数周或数月。急性发作可能是致命的,例如,归因于呼吸肌瘫痪或电解质失调导致的心血管衰竭。(参见,例如,桑奈尔(Thunell S.) 羟甲基胆素合酶缺乏 (Hydroxymethylbilane Synthase Deficiency). 2005年9月27日 [2011年9月1日更新]. 于:佩金(Pagon RA),波德(Bird TD),多兰(Dolan CR),等人,编著. GeneReviews™[网络版]. 西雅图(Seattle) (WA): 华盛顿大学,西雅图(University of Washington, Seattle); 1993- (在下文中,桑奈尔(1993)), 通过引用以其整体结合在此)。在氯化血红素治疗可得之前,多达20%患有AIP的患者死于该疾病。

[0211] 在携带有AIP基因的个体中,肝细胞癌的风险增加。在具有复发性发作的那些人中,肝细胞癌的风险尤其重大:50岁之后,该风险大于总体群体接近100-倍。

[0212] 急性卟啉症的发作可由内源的或外源的因素促成。此类因素诱导发作的机制可能包括,例如,对肝P450酶的增加的需求和/或肝脏中ALAS1活性的诱导。对肝P450酶的增加的需求导致下降的肝游离血红素,由此诱导肝ALAS1合成。

[0213] 诱发因素包括禁食(或其他形式的减少的或不充分的热量摄入,归因于速成节食、远距离运动等)、代谢应力(例如,感染、手术、国际航空旅行以及心理应激)、内源激素(例如,黄体酮)、吸烟、脂溶性异质化学品(包括,例如,存在于烟草烟雾中的化学品、某些处方药、有机溶剂、杀生物剂、酒精饮料中的组分)、内分泌物因素(例如,生殖激素(女性在经期前可能经历恶化)、合成雌激素类、黄体酮、促排卵药物、以及激素替代疗法)。参见,例如,桑奈尔(Thunell) (1993)。

[0214] 超过1000种药物是急性肝性卟啉症(例如,AIP、HCP、ADP、以及VP)中禁忌的,包括,例如,酒精、巴比妥类、卡马西平、卡立普多、氯硝西洋(高剂量)、达那唑、双氯芬酸和可能的其他NSAID、麦角(Ergot)、雌激素、乙氯戊烯炔醇、格鲁米特、灰黄霉素、美芬妥英、甲丙氨酯(也称作美布氨酯和tybutamate)、甲乙哌酮、甲氧氯普胺(Metopramide)、苯妥英、扑米酮、黄体酮和合成黄体酮、吡嗪酰胺、吡唑啉酮(氨基比林和安替比林)、利福平、琥珀酰亚胺(乙琥胺和甲琥胺(methsuximide))、磺胺类抗生素、和丙戊酸。

[0215] AIP的体征包括急性发作期间的尿变色(尿可能显现为红色或棕红色),以及急性发作期间尿中增加的PBG和ALA浓度。分子基因检测确认PBG脱氨酶(还称作HMBS)基因突变发生于超过98%的受累个体中。桑奈尔(Thunell) (1993)。

[0216] 卟啉症的鉴别诊断可能包括通过测量发作期间尿、粪便、和/或血浆中卟啉或卟啉前体(例如,ALA、PBG)的个体水平(例如,通过层析法以及荧光测定)来确定卟啉症的类型。通过确立红细胞PBG脱氨酶活性是正常水平的50%或更低,可以确认AIP的诊断。可以在患者中或在处于危险中的家族成员中进行突变的DNA检测。AIP的诊断典型地通过DNA检测鉴别特异性致病性基因突变(例如,HMBS突变)来确认。

[0217] 急性发作的治疗典型地需要住院治疗以控制并治疗急性症状,包括,例如,腹痛、发作、脱水/低钠血症、恶心/呕吐、心动过速/高血压、尿潴留/梗阻。例如,像可以使用麻醉性镇痛药治疗腹痛,可以使用发作预防措施以及可能的药物(尽管许多抗-发作药物是禁忌的)治疗发作,例如可以使用酚噻嗪治疗恶心/呕吐,并且例如可以使用β-阻断剂治疗心动过速/高血压。治疗可以包括不安全药物的取消、呼吸功能连同肌肉强度和神经状态监控。轻度发作(例如,无轻瘫或低钠血症的那些)可以用每天至少300g静脉内10%葡萄糖进行治

疗,尽管渐增地氯化血红素是立即提供的。重度发作应该尽快使用静脉内氯化血红素(每天3-4mg/kg,持续4-14天),并且在等待氯化血红素起效的同时使用IV葡萄糖进行治疗。典型地,使用IV氯化血红素持续4天并且在等待给予IV氯化血红素的同时使用IV葡萄糖来对发作进行治疗。

[0218] 氯化血红素(**Panhematin®**或注射用氯化血红素,先前称作羟高铁血红素)是美国批准使用的唯一的血红素产品并且是孤儿药法案(Orphan Drug Act)下第一个批准的药物。**Panhematin®**是衍生自经处理的红细胞(PRBC)的氯化血红素,并且是具有氯化物配体的、含三价铁离子(血红素B)的原卟啉IX。血红素发挥作用以限制卟啉的肝和/或骨髓合成。在患有肝性卟啉症急性发作的患者中,氯化血红素产品症状改善的确切的机制尚未被阐明;然而,其作用可能归因于 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)合酶的(反馈)抑制,该酶限制卟啉/血红素生物合成途径的速率。参见**Panhematin®**产品标签,灵北公司(Lundbeck, Inc.), 2010年10月。ALA合酶的抑制将导致降低的ALA和PBG,连同卟啉和卟啉中间体的产生。

[0219] 氯化血红素的缺点包括其对临床症状的延迟的影响及其不能预防发作复发。与氯化血红素给予相关联的不良反应可能包括血栓性静脉炎、抗凝、血小板减少、肾脏机能停止、或铁超负荷,这在需要多疗程氯化血红素治疗复发性发作的患者体内是尤其可能发生的。为了预防静脉炎,在患有复发性发作的患者体内需要留置静脉导管。不常报道的副作用包括发热、疼痛、不适、溶血、全身型过敏性反应、以及循环衰竭。参见,安德森(Anderson, K.E),人类卟啉症治疗与预防法(*Approaches to Treatment and Prevention of Human Porphyrrias*),于卟啉症手册:卟啉症的医学方面(*The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyrins*)中,卡尔M.凯蒂丝(Karl M. Kadish),凯文M.史密斯(Kevin M. Smith),罗杰古拉德(Roger Guillard) (2003) (在下文中,安德森(Anderson))。

[0220] 难以制备用于静脉给药的稳定态的血红素。它在中性pH下是不溶解的但是可将其在pH 8或更高下制备为血红素氢氧化物。安德森(Anderson)。Panhematin是一种冻干型氯化血红素制剂。当冻干型氯化血红素是针对静脉给药的增溶剂时,降解产物迅速形成;这些降解产物造成瞬时抗凝效应并且在输注部位造成静脉炎。安德森(Anderson)。血红素白蛋白和精氨酸血红素(Normosang, 欧洲版氯血红素)是更稳定的并且可潜在地引起较少的血栓性静脉炎。然而,精氨酸血红素在美国是不被批准使用的。通过将其溶解在30%人血白蛋白而不是在无菌水中用于输注,Panhemin可能是稳定的;然而,白蛋白增加血管内的容积膨胀效应并且增加治疗花费连同病原体风险,因为它分离自人类血液。参见,例如,安德森(Anderson)。

[0221] 急性发作的成功治疗未预防或延迟复发。由于血红素加氧酶的诱导,氯化血红素本身是否可以触发复发性发作是一个问题。尽管如此,在一些地区(尤其是法国),具有多次复发性发作的年轻女性正在每周使用氯化血红素的治疗,其目的是实现预防。

[0222] 使用肝移植进行的有限经验表明如果成功,它是针对AIP的一种有效治疗。在欧洲,在人类患者中已有将近12个移植病例是治愈的或具有不同效果。肝移植可恢复ALA和PBG的正常排泄并预防急性发作。参见,例如,达(Dar, F.S.)等人国际肝胆胰疾病杂志(*Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*), 9(1):93-96(2010)。此外,如果患有AIP患者的肝脏被移植到另一个患者中(“多米诺移植(domino transplant)”),接受该移植的患者可能发展AIP。

[0223] 在急性卟啉症的长期临床效应中,神经性疼痛可能是由归因于神经毒性的渐进性神经病变导致的,例如,升高的卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)。在急性发作之前或过程中,患者可能经受神经性疼痛。年长的患者随年龄增长可能经历增加的神经性疼痛,对于他们而言,不同的麻醉性镇痛药典型地是失效的。已经在患有急性肝性卟啉症的患者中记录了肌电图异常以及降低的传导次数。值得注意的是,未经处理的、未诱导的AIP小鼠(PBG脱氨酶缺乏)发展了进行性运动神经病变,假定归因于组成性升高的卟啉前体(ALA&PBG)水平卟啉和/或血红素缺乏,该进行性运动神经病变已经显示引起进行性股四头肌神经轴突退化及丧失(林德贝格(Lindberg)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.),103(8):1127-1134,1999)。在患有急性卟啉症(例如,ADP、AIP、HCP、或VP)的患者中,在两次发作之间,卟啉前体(ALA&PBG)水平在无症状患者以及在有症状患者中通常升高。因此,预期通过降低ALAS1表达水平和/或活性来减少卟啉前体以及恢复正常血红素生物合成,从而预防和/或最小化慢性和渐进性神经病变的发展。治疗,例如,慢性治疗(例如,使用如在此所述的iRNA的周期性治疗,例如,根据如在此所述的剂量方案的治疗,例如,每周或每两周一次的治疗)可持续降低急性卟啉症患者中的ALAS1表达,这些患者具有升高的卟啉前体、卟啉、卟啉产物或其代谢物水平。如果需要的话,可以提供此类治疗来预防或降低个体患者症状(例如,疼痛和/或神经病变)的频率或严重性和/或降低卟啉前体、卟啉、卟啉产物或代谢物水平。

[0224] 存在对鉴别可用于治疗卟啉症的新颖疗法的需求。如上所讨论的,现有治疗如氯化血红素具有大量缺点。例如,氯化血红素对临床症状的影响是延迟的,它是昂贵的,并且它可能具有副作用(例如,血栓性静脉炎、抗凝、血小板减少、铁超负荷、肾脏机能停止)。如在此所述的新颖的疗法可以解决这些缺点以及患者的未被满足的需求,通过,例如,作用更快,不诱导静脉炎,提供皮下施用的便利,成功预防复发性发作,预防或改善疼痛(例如,慢性神经性疼痛)和/或渐进性神经病变,和/或不产生与氯化血红素相关联的某些不良作用(例如,铁超负荷、增加的肝细胞癌的风险)。

[0225] 本披露提供了用于调节ALAS1基因表达的方法和iRNA组合物。在某些实施例中,使用ALAS1-特异性iRNA减少或抑制ALAS1的表达,由此导致降低的ALAS1基因表达水平。降低的ALAS1基因的表达可以降低一种或多种卟啉前体、卟啉或卟啉产物或代谢物的水平。降低的ALAS1基因的表达,连同一种或多种卟啉前体、和/或卟啉水平的相关降低,可用于治疗与ALAS1表达相关的失调,例如,卟啉症。

[0226] 在此表征的组合物的iRNA包括RNA链(反义链),该RNA链具有一个区域,该区域是30个或更少个核苷酸长度,即,15-30个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的mRNA转录本(在此还称作“ALAS1-特异性iRNA”)的至少一部分互补。这样一种iRNA的使用使得靶向降解基因的mRNA成为可能,这些基因参与哺乳动物中与ALAS1表达相关联的病理,例如,卟啉症像ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)或急性间歇性卟啉症。非常低剂量的ALAS1-特异性iRNA可以特异性且高效地介导RNAi,导致ALAS1基因表达的显著抑制。靶向ALAS1的iRNA可以特异性且高效地介导RNAi,导致ALAS1基因表达的显著抑制,例如,在基于细胞的测定中。因此,包含这些iRNA的方法和组合物用于治疗与ALAS1表达相关的病理过程,像卟啉症(例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、以及婴儿暂时性

红细胞卟啉症)。

[0227] 以下描述披露了怎样制作和使用含有iRNA的组合物以抑制ALAS1基因表达,以及用于治疗由这种基因的表达引起或调制的疾病和失调的组合物和方法。在本发明中表征的药物组合物的实施例包括具有反义链的iRNA,连同一种药学上可接受的载体,该反义链包含一个区域,该区域是30个或更少个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。在本发明中表征的组合物实施例还包括具有反义链的iRNA,该反义链具有一个互补区域,该互补区域是30个或更少个核苷酸长度,通常是19-24个核苷酸长度,该区域基本上与ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。

[0228] 因此,在一些方面,本发明中表征了含有ALAS1iRNA和一种药学上可接受的载体的药物组合物、使用这些组合物抑制ALAS1基因表达的方法、以及使用这些药物组合物来治疗与ALAS1表达相关的失调的方法。

[0229] I. 定义

[0230] 为方便起见,在本说明书、实例以及所附权利要求书中使用的某些术语与短语的意义提供于下。如果在本说明书中的其他部分中的术语使用与在本部分提供的该术语的定义有明显偏差,应该以在本部分中的定义为准。

[0231] “G”、“C”、“A”、“T”以及“U”每一者通常分别代表包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶以及尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,应理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指一种经修饰的核苷酸(如以下进一步详述)或一种替代性的置换部分。技术人员应很好地意识到,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶可以被其他部分置换而基本上不改变一种寡核苷酸(包括一种具有这种置换部分的核苷酸)的碱基配对特性。例如,非限制性地,包括肌苷作为其碱基的核苷酸可以与包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸进行碱基配对。因此,包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本发明表征的dsRNA的核苷酸序列中被一种包含例如肌苷的核苷酸所置换。在另一个实例中,寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别地替换为鸟嘌呤和尿嘧啶,以形成与靶mRNA的G-U摇摆碱基配对。含有这类置换部分的序列适用于本发明表征的组合物和方法。

[0232] 如在此使用的,“ALAS1”(还称作ALAS-1; δ -氨基酮戊酸合酶1; δ -ALA合酶1;5'-氨基乙酰丙酸合酶1;ALAS-H;ALASH;ALAS-N;ALAS3;EC2.3.1.37;5-氨基酮戊酸合酶,非特异性的,线粒体的;ALAS;MIG4;OTTHUMP00000212619;OTTHUMP00000212620;OTTHUMP00000212621;OTTHUMP00000212622;迁移-诱导蛋白4;EC2.3.1)是指一种核编码的线粒体酶,是哺乳动物血红素生物合成途径中的第一酶并且典型地是限速酶。ALAS1催化甘氨酸与琥珀酰-辅酶A缩合以形成 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)。人类ALAS1基因的表达无处不在,发现于染色体3p21.1,并且典型地编码640个氨基酸的一个序列。相比之下,编码一种同工酶的ALAS-2基因仅在红细胞中表达,发现于染色体Xp11.21,并且典型地编码550个氨基酸的一个序列。如在此使用的,“ALAS1蛋白”意指来自任何物种(例如,人类、小鼠、非人灵长类动物)的ALAS1的任何蛋白变体,连同保留ALAS1活性的任何突变体及其片段。类似的,“ALAS1转录本”是指自任何物种(例如,人类、小鼠、非人灵长类动物)的ALAS1的任何转录本变体。人ALAS1变体1mRNA转录本的序列可以在NM_000688.4处找到(图3;SEQ ID NO:1)。另一种形式,人ALAS1变体2mRNA转录本可以在NM_000688.5处找到(图4;SEQ ID NO:382)。成熟的、编码的ALAS1蛋白的水平是由血红素调节的:高水平血红素下调线粒体中成熟的酶而

低血红素水平上调。迄今为止,已经鉴定了多个可变剪接的变体,这些变体编码相同蛋白。

[0233] 如在此使用的,术语“iRNA”、“RNAi”、“iRNA剂”、或“RNAi剂”是指包含如在此定义的术语RNA,并且例如,经由RNA诱导的沉默复合物(RISC)路径介导RNA转录本的靶向切割的一种试剂。在一个实施例中,如在此所述的iRNA实现ALAS1表达的抑制。ALAS1表达的抑制可以基于ALAS1mRNA水平的下降或ALAS1蛋白水平的下降进行评估。如在此所使用的,“靶标序列”指的是在ALAS1基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。序列的靶部分将至少足够地长,以充当iRNA指导在这个部分或其附近切割的底物。例如,靶标序列总体上将是9-36个核苷酸长度,例如,15-30个核苷酸长度,包括其之间的全部子范围。作为一个非限制性实例,该靶标序列可以是15-30个核苷酸、15-26个核苷酸、15-23个核苷酸、15-22个核苷酸、15-21个核苷酸、15-20个核苷酸、15-19个核苷酸、15-18个核苷酸、15-17个核苷酸、18-30个核苷酸、18-26个核苷酸、18-23个核苷酸、18-22个核苷酸、18-21个核苷酸、18-20个核苷酸、19-30个核苷酸、19-26个核苷酸、19-23个核苷酸、19-22个核苷酸、19-21个核苷酸、19-20个核苷酸、20-30个核苷酸、20-26个核苷酸、20-25个核苷酸、20-24个核苷酸、20-23个核苷酸、20-22个核苷酸、20-21个核苷酸、21-30个核苷酸、21-26个核苷酸、21-25个核苷酸、21-24个核苷酸、21-23个核苷酸或21-22个核苷酸。

[0234] 如在此所使用的,术语“含有序列的链”是指含有由相当于使用标准核苷酸命名法描述的序列的核苷酸链的寡核苷酸。

[0235] 如在此所使用的,除非另有陈述,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,是指含有第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一定条件下和含有第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链结构的能力,如本领域技术人员所理解。此类条件可以是,例如,严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl,40mM PIPES pH 6.4,1mM EDTA,50℃或70℃持续12-16小时,随后洗涤。可以应用其他条件,比如可以在有机体中遇到的生理学相关条件。技术人员将能够根据杂交的核苷酸的最终应用来确定两序列互补测试的最适条件集。

[0236] 在iRNA内部(例如,在如本文所述的dsRNA内部)的互补序列包括包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的整个长度范围内的碱基配对。此类序列在此可以称作相对于彼此“完全互补”。然而,在此在一个第一序列被称作相对于一个第二序列“基本上互补”的情况下,这两个序列可以是完全互补的,或者它们可以在针对高达30个碱基对的双链体杂交时形成一个或多个,但是总体上不多于5个、4个、3个或2个错配碱基配对,同时保留了在与它们的最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如,经由RISC路径的基因表达的抑制。然而,在两个寡核苷酸被设计为在杂交时形成一个或多个单链突出的情况下,此类突出不应该被认为是关于互补性确定的错配。例如,出于在此描述的目的,以下这样一种dsRNA也可以称作“完全互补”:该dsRNA包括一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸以及一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸,其中该更长的寡核苷酸包括一个与该更短的寡核苷酸完全互补的21核苷酸序列。

[0237] 如在此使用的,就满足以上相对于它们杂交的能力而言的要求来说,“互补”序列还可以包括或完全形成自非沃森-克里克碱基对和/或从非天然的以及经修饰的核苷酸形成的碱基对。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摇摆碱基配对或Hoogsteen碱基

配对。

[0238] 本文的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可相对于在dsRNA的有义链与反义链之间,或iRNA剂的反义链与靶标序列之间的碱基配对使用,如将从其使用的上下文理解。

[0239] 如在此使用的,与信使RNA (mRNA) 的“基本上至少部分互补”的多核苷酸指与感兴趣的mRNA (例如,编码ALAS1蛋白的mRNA) 的一个连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果一个多核苷酸与编码ALAS1的mRNA的一个非间断部分基本上互补,那么该序列则与ALAS1mRNA的至少一部分互补。作为另一个实例,如果一个多核苷酸与编码ALAS1的mRNA的一个非间断部分基本上互补,那么该序列则与ALAS1mRNA的至少一部分互补。

[0240] 如在此所使用的,术语“双链RNA”或“dsRNA”指的是包括具有杂合的双链体区域的RNA分子或分子的复合体的iRNA,该区域包括两条反向平行的且基本上互补的核酸链,还可将其称之为相对于靶标RNA具有“有义”和“反义”取向。该双链体区可以是允许例如,经RISC路径特异性降解所需靶标的任何长度,但是一般范围是从9至36个碱基对长度,例如,15-30个碱基对长度。就9和36碱基对之间的双链体时,双链体可以具有在这个范围内的任意长度,例如,9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36和其间的任何子范围,包括但不限于15-30碱基对、15-26碱基对、15-23碱基对、15-22碱基对、15-21碱基对、15-20碱基对、15-19碱基对、15-18碱基对、15-17碱基对、18-30碱基对、18-26碱基对、18-23碱基对、18-22碱基对、18-21碱基对、18-20碱基对、19-30碱基对、19-26碱基对、19-23碱基对、19-22碱基对、19-21碱基对、19-20碱基对、20-30碱基对、20-26碱基对、20-25碱基对、20-24碱基对、20-23碱基对、20-22碱基对、20-21碱基对、21-30碱基对、21-26碱基对、21-25碱基对、21-24碱基对、21-23碱基对或21-22碱基对。细胞中通过Dicer和相似酶加工产生的dsRNA通常具有范围19-22的碱基对长度。dsDNA的双链体区的一条链包含与靶RNA的区域基本上互补的序列。形成双链体结构的两个链可以来自具有至少一个自身互补区域的单一RNA分子,或可以由两个或更多个独立RNA分子组成。当该双链体区是形成自单个分子的两条链时,该分子可以在一条链的3'-端与形成该双链体结构的各自的另一条链的5'-端之间具有由核苷酸的一个单链的链分隔开的一个双链体区(在此称为“发夹环”)。发夹环可以包含至少一个非配对的核苷酸;在一些实施例中,发夹环可以包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个非配对的核苷酸。当dsRNA的两个基本上互补的链包含分离的RNA分子时,这些分子不是必须的,但是可以共价地连接。当这两条链通过除发夹环之外的方式共价连接时,该连接结构被称为“连接物”。术语“siRNA”还可以在此用作指代以上所述的dsRNA。

[0241] 在另一个实施例中,该iRNA剂可以是被引入到细胞或组织中以抑制靶标mRNA的一个“单链siRNA”。单链RNAi剂结合到RISC内切核酸酶Argonaute 2,其然后切割靶标mRNA。单链siRNA通常是指15-30核苷酸并且是化学修饰的。单链siRNA的设计和检测描述于美国专利号8,101,348中,以及利马(Lima)等人,(2012)细胞(Cell) 150:883-894中,特此将它们各自的全部内容通过引用结合在此。在此描述的反义核苷酸序列中的任一个(例如,表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的序列)可用作单链siRNA,如在此所述的或如通过利马等人,(2012)细胞150:883-894中描述的进行化学修饰的。

[0242] 在另一个方面中, RNA剂是一种“单链的反义RNA分子”。单链的反义RNA分子是与靶标mRNA之内的一个序列互补的。单链的反义RNA分子能以化学计量的方式通过与该mRNA碱基配对并且物理性地阻碍翻译装置来抑制翻译, 参见蒂斯(Dias, N.) 等人, (2002) 分子癌症治疗学(Mol. Cancer Ther.) 1:347-355。可替代地, 该单链的反义分子通过杂交至靶标并通过RNaseH切割事件切割靶标来抑制靶标mRNA。单链的反义RNA分子可以是大约10至大约30个核苷酸长度并且具有与靶标序列互补的一个序列。例如, 该单链的反义RNA分子可以包括以下这样一个序列: 该序列是来自在此所述的反义核苷酸序列中任一个的至少大约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸, 如表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中的任一个中提供的序列。

[0243] 熟练技术人员将意识到术语“RNA分子”或“核糖核酸分子”不仅包括自然中表达或发现的RNA分子, 而且还包括包含一个或多个核糖核苷酸/核糖核苷类似物或衍生物的RNA的类似物或衍生物, 如在此所述的或如本领域中已知的。严格来说, “核糖核苷”包括核苷碱基和核糖, 并且“核糖核苷酸”是具有一个、两个或三个磷酸部分的一种核糖核苷。然而, 如在此使用的, 术语“核糖核苷”和“核糖核苷酸”可以被认为是相等的。例如, 如下文所述, 可以在核碱基结构或在核糖-磷酸酯主链结构方面修饰RNA。然而, 包含核糖核苷类似物或衍生物的分子必须保留形成双链体的能力。作为非限制性实例, RNA分子也可以包含至少一个修饰的核糖核苷, 其包括但不限于2'-O-甲基修饰的核苷, 包含5'硫代磷酸酯基的核苷、与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷、锁定核苷、非碱基核苷、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷、2'-氨基修饰的核苷, 2'-烷基修饰的核苷, 吗啉代核苷、磷酸酯或包含非天然碱基的核苷, 或其任意组合。可选地, RNA分子可以包含至少两个修饰的核糖核苷、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个或更多个修饰的核糖核苷, 直到dsRNA分子的整个长度。对于RNA分子中这些多个修饰的核糖核苷中的每一个, 修饰不需要是相同的。在一个实施例中, 经构思用本文所述方法和组合物中的修饰RNA是具有形成所需双链体结构的能力并且经, 例如RISC途径允许或介导靶RNA特异性降解的肽核酸(PNA)。

[0244] 在一个方面, 修饰的核糖核苷包括脱氧核糖核苷。在这种情况下, iRNA剂可以包含一个或多个脱氧核苷, 包括例如脱氧核苷突出端或在dsRNA的双链部分内部的一个或多个脱氧核苷。然而, 不论在何种情况下不言自明地是被术语“iRNA”, 包括的双链DNA分子。

[0245] 在一个方面, RNA干扰剂包括与靶RNA序列相互作用以指导靶RNA切割的单链RNA。不希望受理论约束, 引入细胞中的长的双链RNA由称作Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(夏普(Sharp) 等人, 基因和发育(Genes Dev.) 2001, 15:485)。Dicer(核糖核酸酶-III样酶)将dsRNA加工成至具有特征性双碱基3'突出端的19-23碱基对短干扰性RNA(伯恩斯坦(Bernstein) 等人, (2001) 自然(Nature) 409:363)。这些siRNA随后掺入RNA诱导沉默复合物(RISC)中, 在其中一种或多种解旋酶解开siRNA双链体, 这使得互补性反义链指导靶识别成为可能(尼坎宁(Nykanen) 等人, (2001) 细胞(Cell) 107:309)。一旦与适宜的靶mRNA结合, RISC内部的一种或多种核酸内切酶切割靶以诱导沉默(巴希尔(Elbashir) 等人, (2001) 基因与发育(Genes Dev.) 15:188)。因此, 在一个方面, 本发明涉及了促进实现靶基因沉默的RISC复合物形成的单链RNA。

[0246] 如在此所使用的, 术语“核苷酸突出”是指至少一个非配对的核苷酸, 其从iRNA的

双链体结构(例如,dsRNA)突出。例如,当dsRNA的一条链的3'-端延伸超过另一条链的5'-端时或反之亦然,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,该突出端可以包括至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个或更多个核苷酸。核苷酸突出端可以包括核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。一个或多个突出端可以处于有义链、反义链或其任意组合上。另外,突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的反义或有义链的5'末端、3'末端或两个末端上。

[0247] 在一个实施例中,dsRNA的反义链在3'末端和/或5'末端具有一个1-10个核苷酸突出端。在一个实施例中,dsRNA的有义链在3'末端和/或5'末端具有一个1-10个核苷酸突出端。在另一个实施例中,突出中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替代。

[0248] 关于dsRNA,在此使用的“平端”或“平末端的”是指在dsRNA的给定的末端没有非配对的核苷酸或核苷酸类似物,即,没有核苷酸突出。dsRNA的一个或两个末端可以是平端。当dsRNA的两个末端都是平端,该dsRNA被称为平末端的。为了清楚起见,一个“平末端的”dsRNA是一个在其两端齐平的dsRNA,即,在该分子的任何一端都没有核苷酸突出。大多数情况下,这种分子将在其整个长度范围内是双链的。

[0249] 术语“反义链”或“引导链”是指iRNA链,例如,dsRNA,其包括一个区域,该区域基本上与靶标序列互补。如在此所使用的,术语“互补性区域”指的是该反义链上基本上与一个序列互补的区域,例如如在此定义的一个靶标序列。其中互补区域不与靶序列完全互补的情况下,错配可以存在于分子的内部或末端区域内。通常,最耐受的错配存在于末端区域内,例如,在5'和/或3'末端的5、4、3或2个核苷酸内部。

[0250] 如在此所使用的,术语“有义链”或“过客链”指的是含有与在此定义的术语反义链的一个区域基本上互补的一个区域的iRNA链。

[0251] 如在此使用的,术语“SNALP”是指一种稳定的核酸-脂质颗粒。SNALP代表包覆缩减的含水内部的脂质囊泡,该含水内部包含核酸如iRNA或从中转录出iRNA的质粒。SNALP例如在美国专利申请公开号20060240093、20070135372中并且在国际申请号WO 2009082817中描述。这些申请以其全文通过引用结合在此。

[0252] 当提及iRNA时,“引入细胞内”意思是促进或影响摄取或吸收进入该细胞,如本领域内的普通技术人员所理解的。吸收或摄取iRNA可以通过无协助扩散过程或主动细胞过程或借助助剂或装置发生。本术语的意义不限于体外细胞;iRNA还可以被“引入细胞内”,其中该细胞是活有机体的部分。在这种情况下,引入细胞中将包括递送至生物。例如,对于体内递送,可以将iRNA注射至组织部位中或全身施用。体内递送还可以通过 β -葡聚糖递送系统,如美国专利号5,032,401和5,607,677以及美国公开号2005/0281781中所描述的那些,将它们通过引用以其全文结合于此。体外引入细胞内包括本领域内已知的方法,例如电穿孔以及脂质转染法。另外的方法描述下文或在本领域内是已知的。

[0253] 如在此使用的,术语“调制...的表达”是指与ALAS1在对照细胞中的表达相比,至少部分“抑制”或部分“激活”ALAS1基因在用如在此所述的iRNA组合物处理过的细胞中的表达。对照细胞包括未处理的细胞或用非靶标对照iRNA处理的细胞。

[0254] 术语“激活”、“增强”、“上调...的表达”、“增加...的表达”等,只要它们是指ALAS1基因,在此是指至少部分激活ALAS1基因的表达,表示为:可从ALAS1基因在其中转录的一个第一细胞或一组第一细胞(已经经过处理由此ALAS1基因的表达被增加)中分离的

ALAS1mRNA的量增加,这是与一个第二细胞或一组第二细胞(对照细胞)相比,其与该一个第一细胞或一组第一细胞实质上相同,除了未经受如此的处理。

[0255] 在一个实施例中,通过施用如在此描述的iRNA激活ALAS1基因表达至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中,通过施用本发明中表征的iRNA激活ALAS1基因至少约60%、70%或80%。在一些实施例中,通过施用如本文所述的iRNA激活ALAS1基因表达至少约85%、90%或95%或更多。在一些实施例中,与未处理的细胞中的表达相比,ALAS1基因表达在用如本文所述的iRNA处理的细胞中增加至少1倍、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多倍。通过小dsRNA激活表达例如在李(Li)等人,2006美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.) 103: 17337-42中并且在US 20070111963和US 2005226848中描述,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0256] 术语“沉默”、“抑制...的表达”、“下调...的表达”、“压制...的表达”等,只要它们是指ALAS1基因,在此是指至少部分地压制ALAS1基因的表达,这是基于例如,ALAS1mRNA表达、ALAS1蛋白表达、或与ALAS1基因表达功能性相联系的另外的参数(例如,血浆或尿中的ALA或PBG浓度)进行评估的。例如,ALAS1表达的抑制可被表示为:与对照相比,可从ALAS1基因在其中转录的一个第一细胞或一组第一细胞(已经经过处理由此ALAS1基因的表达被抑制)中分离的ALAS1mRNA的量减少。对照可以是一个第二细胞或一组第二细胞,其与该一个第一细胞或一组第一细胞实质上相同,除了该第二细胞或该组第二细胞未经受如此的处理(对照细胞)。抑制程度通常表示为对照水平的百分比,例如,

$$[0257] \quad \frac{(\text{对照细胞中的 mRNA}) - (\text{经处理的细胞中的 mRNA})}{(\text{对照细胞中的 mRNA})} \cdot 100\%$$

[0258] 可替代地,抑制程度能以与ALAS1基因表达功能性相联系的一个参数的减少而给出,例如ALAS1基因编码的蛋白的量,或一种或多种卟啉的水平。与ALAS1基因表达功能性相联系的一个参数的减少可以类似地表示为对照水平的百分比。原则上,ALAS1基因沉默可以在(组成型地或通过基因组工程化)表达ALAS1的任何细胞中通过任何合适的测定来确定。然而,当需要一个参考来确定一个给定的iRNA是否在一定程度上抑制ALAS1基因的表达并且因此被本发明所囊括时,在以下实例中提供的这些测定应该作为此参考。

[0259] 例如,在某些情况下,通过施用本发明中表征的iRNA压制ALAS1基因表达至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中,通过施用本发明中表征的iRNA压制ALAS1基因至少约60%、65%、70%、75%、或80%。在一些实施例中,通过施用如本文所述的iRNA压制ALAS1基因至少约85%、90%、95%、98%、99%、或更多。

[0260] 如在此使用的,如在ALAS1表达的背景下,术语“治疗(treat)”“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”以及类似术语指缓解或减轻与ALAS1表达相关的病理过程(例如,涉及卟啉或卟啉途径缺陷的病理过程,例如,像卟啉症)。在本发明的上下文中,在涉及以下在此所引用的任何其他病状的范围内(除了与ALAS1表达相关的病理过程),术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”以及等等意思是预防、缓解或减轻至少一个与此病状相关联的症状,或意思是减缓或逆转这种病状的进程或预期进程。例如,在此表征的方法,当用于治疗卟啉症时,可以用于减少或预防与卟啉症相关联的一种或多种症状(例如,疼痛),降低与卟啉症相关联发作的严重性或频率,降低一旦暴露于诱发条件将发生的、与卟啉症相关

联的一种或多种症状发作的可能性,缩短与卟啉症相关联的发作,和/或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如,肝细胞癌或神经病变(例如,渐进性神经病变))的风险。因此,除非在上下文中另外明确的指出,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”以及等等意在包含预防,例如,预防与ALAS1表达相关的失调和/或失调的症状。

[0261] 在疾病标记或症状的背景下,“降低”意为此水平的统计学上或临床上的显著减少。下降可以是例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或更多,并且典型地降至作为不患这种病症的个体的正常范围内所接受的水平。

[0262] 如在此所使用的,短语“治疗有效量”以及“预防有效量”指这样一个量,该量在治疗、预防或管理与ALAS1表达相关的病理过程中提供一个治疗上的益处。治疗有效的具体量可以容易地由普通医疗从业者来确定,并且可以根据本领域内已知的因素而变化,比如,例如由病理学过程的类型、患者病史以及年龄、病理学过程的阶段、以及其他试剂的给予。

[0263] 如在此所使用的,“药物组合物”包括药理学有效量的iRNA以及药学上可接受的载体。如在此所使用的,“药理学有效量”、“治疗有效量”或简言之的“有效量”指有效产生预期的药理学、治疗或预防结果的iRNA的量。例如,在治疗与ALAS1表达相关的失调的方法中(例如,在治疗卟啉症的方法中),有效量包括有效地减少与卟啉症相关联的一种或多种症状的一个量,有效地降低发作频率的一个量,有效地降低一旦暴露于诱发因素将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性的一个量,或有效地降低发展与卟啉症相关联的病状(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险的一个量。例如,如果当一个与一种疾病或病症相关联的可测量的参数减少至少10%时,一个给定的临床治疗才被认为是有效的,那么一种用于该疾病或病症的治疗的药物的治疗的有效量是实现该参数至少减少10%所需要的一个量。例如,治疗有效量的靶向ALAS1的iRNA可以减少ALAS1蛋白水平任何可测量的量,例如,至少10%、20%、30%、40%或50%。

[0264] 术语“药学上可接受的载体”指用于一种治疗剂的给予的载体。此类载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇、及其组合。该术语特别地排除细胞培养基。对于口服给予的药物,药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的赋形剂,比如惰性稀释剂、崩解剂、结合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠以及碳酸钙、磷酸钠以及磷酸钙,以及乳糖,而玉米淀粉以及褐藻酸是合适的崩解剂。结合剂可以包括淀粉以及明胶,而润滑剂(如果存在的话)将通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果希望的话,可以将片剂用一种材料进行包衣,比如单硬脂酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯,以延迟在胃肠道中的吸收。下文进一步描述药物制剂所包含的药剂。

[0265] 当提及数字或数值范围时,术语“约”是指所提及的数字或数值范围是在一个实验变异内(或在统计实验误差内)的近似值,并且由此该数字或数值范围可以从,例如,所陈述数字或数值范围的1%与15%之间变化。

[0266] II. 双链核糖核酸(dsRNA)

[0267] 在此描述了抑制ALAS1基因表达的iRNA剂。在一个实施例中,该iRNA剂包括用于在细胞或受试者(例如,哺乳动物,像患有卟啉症的人类)中抑制ALAS1基因的表达式的双链核糖核酸(dsRNA)分子,其中该dsRNA包括一个具有互补性区域(该区域与在ALAS1基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补)的反义链,并且其中该互补性区域的长度小于或等于30个核

苷酸,通常长度是19-24个核苷酸,并且其中该dsRNA在与表达该ALAS1基因的细胞相接触时抑制该ALAS1基因的表达至少10%,如通过例如PCR或基于分支DNA (bdNA) 的方法、或通过基于蛋白的方法(例如通过蛋白质印迹(Western blot))所测定的。在一个实施例中,该iRNA剂激活ALAS1基因在细胞或哺乳动物中的表达。可以通过测量ALAS1mRNA水平,如通过bdNA或TaqMan测定法,或使用例如蛋白质印迹法或流式细胞技术通过测量蛋白质水平,如通过免疫荧光分析,测定细胞培养物中如COS细胞、HeLa细胞、原代肝上皮实质细胞、HepG2细胞、原代培养物细胞中或在来自受试者的生物样本中的ALAS1基因表达。

[0268] dsRNA包括两个RNA链,它们足够地互补以在其中将使用dsRNA的条件下杂交形成一个双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括一个互补区域,该区域基本上是与衍生自ALAS1基因表达过程中形成的mRNA的序列的靶标序列互补的,通常是完全互补的。另一条链(有义链)包括与反义链互补的区域,从而在适合的条件组合时,这两条链杂交并形成双链体结构。通常,该双链体结构具有15和30之间并包括15和30碱基对长度,更通常地具有18和25之间并包括18和25碱基对长度,然而更通常地具有19和24之间并包括19和24个碱基对长度,并且更通常地具有19和21个之间并包括19和21个碱基对长度。同样地,与靶标序列互补的区域具有15和30个之间并包括15和30个核苷酸长度,更通常地具有18和25个之间并包括18和25个核苷酸长度,然而更通常地具有19和24个之间并包括19和24个核苷酸长度,并且最通常地具有19和21个之间并包括19和21个核苷酸长度。在一些实施例中,dsRNA具有15和20个之间并包括15和20个核苷酸长度,并且在其他实施例中,dsRNA具有25和30个之间并包括25和30个核苷酸长度。如普通技术人员将认识,被靶向以便切割的RNA的靶向区域将最经常是较大RNA分子(往往mRNA分子)的部分。在相关的情况下,mRNA靶标的“一部分”是mRNA靶标的连续序列,其长度足够作为RNAi指导的切割的底物(即,经RISC途径的切割)。在一些情况下,具有短至9个碱基对的双链体的dsRNA可以介导RNAi指导的RNA切割。最经常地,靶标将是至少15个核苷酸长度,例如,15-30个核苷酸长度。

[0269] 本领域技术人员将也认识到,双链体区是dsRNA的主要功能性部分,例如,9至36个碱基对(例如,15-30个碱基对)的双链体区。因此,在一个实施例中,为了达到被加工成导引所需RNA切割的(例如,15-30个碱基对)功能性双链体,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,随后,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,用于靶向ALAS1表达的iRNA剂不是在靶标细胞中通过切割较大dsRNA产生的。

[0270] 如本文所述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出。该dsRNA可以通过如进一步在以下所讨论的、本领域内已知的标准方法来进行合成,例如,通过使用自动化的DNA合成仪,比如从例如生物研究公司(Biosearch)、应用生物系统公司(Applied Biosystem公司)可商购的合成仪。在一个实施例中,ALAS1基因是人类ALAS1基因。在另一个实施例中,ALAS1基因是小鼠或大鼠ALAS1基因。在特定的实施例中,第一序列是包含表2或3中的有义序列的dsRNA的有义链,并且第二序列包含表2或3中的反义序列的dsRNA的反义链。在实施例中,第一序列是包含表2、3、6、7、8、9、14、或15中的有义序列的dsRNA有义链,并且第二序列包含表2、3、6、7、8、9、14、或15中的反义序列的dsRNA的反义链。在实施例中,第一序列是包含表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的有义序列的dsRNA的有义链,并且第二序列包含表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的反义序列的dsRNA的反义链。使用靶标序列和侧

翼ALAS1序列,可以轻易确定靶向除在此(例如,表2或表3中)披露的dsRNA的那些序列的替代性dsRNA剂。

[0271] 在一个方面中,dsRNA将至少包括有义和反义核苷酸序列,由此有义链选自表2和3中提供的序列的组,并且该有义链相应的反义链选自表2和3中提供的序列的组。在另外一个方面中,dsRNA将至少包括有义和反义核苷酸序列,由此有义链选自表2、3、6、7、8、9、14、和15提供的序列的组,并且该有义链相应的反义链选自表2、3、6、7、8、9、14、和15提供的序列的组。在另外一个方面中,dsRNA将至少包括有义和反义核苷酸序列,由此有义链选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20提供的序列的组,并且该有义链相应的反义链选自表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20提供的序列的组。在这些方面中,两个序列的一者与两个序列的另一者互补,其中这些序列中的一者与ALAS1基因表达中产生的mRNA的序列基本上互补。就这一点而论,dsRNA将包括两个寡核苷酸,其中将一个寡核苷酸描述为表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的有义链并且将第二寡核苷酸描述为来自表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20的有义链的相应反义链。如本文中他处描述并且如本领域已知,与处在分开的寡核苷酸上相反,dsRNA的互补序列也可以作为单一核酸分子的自我互补区域包括。

[0272] 熟练的技术人员将很好的意识到,具有20与23之间个碱基对(但是特别是21个碱基对)的双链结构的dsRNA被奉为是尤其有效地诱导RNA干扰(厄尔巴瑟等人,EMBO 2001, 20:6877-6888)。然而,其他人已经发现较短或较长的RNA双链体结构物也可以是有效的。在上文描述的实施例中,由于表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的寡核苷酸序列的性质,本文所述的dsRNA可以包括长度最小21个核苷酸的至少一条链。可以合理地预期,具有表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中的序列之一的、在一个末端或两个末端减去仅仅数个核苷酸的更短的双链体与以上描述的dsRNA相比可以类似地有效。因此,根据本发明构思这样的dsRNA,它们具有来自表2、3、6、7、8、9、14、15、18或20中序列之一的至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的部分序列并且在它们抑制ALAS1基因表达的能力方面与包含全序列的dsRNA不同不多于5%、10%、15%、20%、25%或30%抑制。

[0273] 此外,在表2和3中提供的RNA,连同在表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的RNA,识别ALAS1转录本中一个易于经受RISC介导的切割的位点。就这一点而论,本发明进一步表征了靶向这类序列之一内部的iRNA。如本文所用,如果一种iRNA促进在某个特定位置内部任何地方切割RNA转录本,则称这种iRNA靶向该转录本内部的这个特定位置。这种iRNA通常将包括来自表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中提供的序列之一的至少15个连续核苷酸,所述连续核苷酸与从ALAS1基因中的选择序列保持连续的区域所取得的额外核苷酸序列连接。

[0274] 尽管靶序列总体上是15-30个核苷酸长度,但是在这个范围内的特定序列指导任何给定靶RNA切割的适用性方面存在广泛变异。在此陈述的不同软件包和指南提供了用于针对任意给定基因靶标识别最优靶标序列的指南,但是还可以采取一种经验主义的方法,其中给定大小的“窗口”或“掩码”(作为一个非限制性实例,21个核苷酸)被照字面的或象征性地(包括,例如,计算机模拟)放置在靶标RNA序列上以识别可用作靶标序列的大小范围内的序列。通过移动该序列“窗口”渐进初始靶标序列位置的一个核苷酸上游或下游,可以鉴别下一个潜在的靶标序列,直到针对所选择的任何给定的靶标尺寸鉴别可能的序列的全套。这个过程(加上为了鉴定最佳执行的那些序列的所鉴定的序列的系统合成和测试(使用此处所述的或如本领域中已知的测定))可以鉴定当用一种iRNA剂靶向时介导靶基因表达

的最好抑制的那些RNA序列。因此,当例如在表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中识别的序列表示有效靶标序列时,在此考虑了可以通过以下方式实现抑制效力的进一步优化:沿着给定序列的上游或下游的一个核苷酸逐步地“窗口步移”来鉴别具有相同或更好抑制特性的序列。

[0275] 另外,考虑了对于例如在表2、3、6、7、8、9、14、15、18和20中识别的任何序列,可以通过以下方式实现进一步优化:系统地添加或移走核苷酸以产生较长或较短的序列,并且测试通过从该点上游于或下游于靶标RNA步移具有更长或更短尺寸的窗口所产生的那些序列。再次地,使这种方案与产生新候选物靶联系,同时在如本领域已知或如本文所述的抑制测定法中基于这些靶序列测试iRNA的有效性,可以导致效率抑制的进一步改善。再者,可以例如通过引入如本文所述或如本领域已知的修饰核苷酸、添加或改变突出端或如本领域已知和/或本文中讨论的其他修饰,调节这类优化的序列以便进一步优化该分子(例如,增加血清稳定性或循环半寿期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加从内体放中等)作为表达抑制剂。

[0276] 如本文所述的iRNA可以含有一个或多个相对于靶标序列的错配。在一个实施例中,如本文所述的iRNA含有不多于3个错配。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配,则优选错配区域不应当位于互补区域的中心内。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配,则优选错配区域应当局限于距互补区域5'或3'末端的最末5个核苷酸内部。例如,对于与ALAS1基因的某区域互补的23个核苷酸iRNA剂的RNA链而言,RNA链通常在中央13个核苷酸内部不合任何错配。本文所述的方法或本领域已知的方法可以用来确定含有相对于靶序列的错配的iRNA是否有效抑制ALAS1基因表达。考虑具有错配的iRNA在抑制ALAS1基因表达方面的效率是重要的,尤其是如果ALAS1基因中的互补性具体区域已知在群体内具有多态性序列变异。

[0277] 在一个实施例中,dsRNA的至少一个端具有1至4个、总体上1或2个核苷酸的单链核苷酸突出端。具有至少一个核苷酸突出的dsRNA相对于它们的平末端的对应物,具备出乎意料优越的抑制性特性。在又一个实施例中,将iRNA(例如,dsRNA)的RNA化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。本发明中表征的核酸可以通过本领域充分建立的方法合成和/或修饰,如在“核酸化学实验室指南(Current protocols in nucleic acid chemistry)”,毕克奇(Beaucage, S.L.)等人(编著),约翰威利父子出版公司(John Wiley & Sons, Inc.),美国纽约(New York, NY, USA)中描述的那些方法,所述文献因此通过引用方式结合在此。修饰包括例如(a)末端修饰,例如,5'末端修饰(磷酸化、共轭、倒置键等)、3'末端修饰(共轭、DNA核苷酸、倒置键等), (b)碱基修饰,例如,替换为稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩充的配偶物库发生碱基配对的碱基、移除碱基(非碱基核苷酸)、或共轭的碱基, (c)糖修饰(例如,在2'位置或4'位置)或糖的替换,以及(d)主链修饰,包括修饰或替换磷酸二酯键。在本发明中的有用的RNA化合物的具体实例包括但不限于含有修饰主链或无天然核苷间键的RNA。具有修饰骨架的RNA除其他之外包括在骨架中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的和如有时本领域中谈及,也可以将在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰RNA视为寡核苷。在具体的实施例中,修饰的RNA将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0278] 修饰的RNA主链包括例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯、次膦

酸酯、磷酰胺酯,包括3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯、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和具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、这些酯的2'-5'连接的类似物,和具有反转极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位为3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。还可以包括不同盐、混合盐以及游离酸形式。

[0279] 教授制备以上含磷键的代表性美国专利包括但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利RE 39464,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0280] 其中不包含磷原子的修饰的RNA骨架具有由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者一个或多个短链杂原子核苷间键或杂环核苷间键形成的骨架。这些包括具有吗啉代键的那些(部分地从一个核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物,亚砷和砷骨架;甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基(thioformacetyl)骨架;亚甲基甲乙酰基(methylene formacetyl)和硫代甲乙酰基骨架;含烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;和其他具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的骨架。

[0281] 教授制备以上寡核苷的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。

[0282] 在适合用于或构思用于iRNA的其他RNA模拟物中,将核苷酸单位的糖和核苷间键即主链替换为新基团。保持碱基单元以与适当的核酸靶标化合物杂交。一种这类寡聚化合物,已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物,称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架替换为含有酰胺的骨架,尤其氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。教授制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此。对PNA化合物的其他教授内容可以在例如尼尔森(Nielsen)等人,科学(Science),1991,254,1497-1500中找到。

[0283] 本发明中表征的一些实施例包括具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷,并且尤其上文所参考美国专利号5,489,677的--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称作亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--、和--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其中天然磷酸二酯主链表述为--O--P--O--CH₂--],和上文所参考美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施例中,在此表征的RNA具有上文所参考美国专利号5,034,506的吗啉代主链结构。

[0284] 经修饰的RNA还可以含一个或多个经取代的糖部分。在此表征的iRNA,例如dsRNA,

在2'位置包括下述之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中该烷基、烯基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。示例性的适合的修饰包括O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m是从1至约10。在其他实施例中,dsRNA在2'位置包含以下之一:C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环芳基、氨烷基氨基、聚烷氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报道基团、嵌入剂、用于改善iRNA的药物代谢动力学特性的基团、或用于改善iRNA的药效特征的基团、和具有相似特性的其他取代基。在一些实施例中,该修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃,也称作2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(马丁(Martin)等人,瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta),1995,78,486-504),即,一个烷氧基-烷氧基基团。另一个示例修饰是2'-二甲基氨基基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,如在以下实例中所描述的也称作2'-DMAOE,以及2'-二甲基氨基基乙氧基乙氧基(在本领域中也称作2'-O-二甲基氨基基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂,也如在以下实例中所描述的。

[0285] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。也可以在iRNA的RNA上的其他位置处作出相似的修饰,尤其在3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有糖模拟物,如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教授制备这类修饰糖结构的代表性美国专利包括但不限于,美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;和5,700,920,所述专利的某些由本申请共同所有,并且所述专利的每一篇通过引用方式结合在此。

[0286] iRNA还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰物或取代物。如在此所使用的,“非修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰核碱基包括但不限于其他合成以及天然核碱基例如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-甲基以及其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶以及2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶以及胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶以及胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶以及胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤基,8-氨基,8-氢硫基,8-硫烷基,8-羟基以及其他8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤基尤其是5-溴,5-三氟甲基以及其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤,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。其他的核碱基包括在美国专利号3,687,808中披露的那些、在生物化学、生物技术和医药中的修饰的核苷酸(Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine),赫德维珍妮(Herdewijn),P.编著.Wiley-VCH,2008中披露的那些;在聚合物科学与工程简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering),第858-859页,克洛舍维奇(Kroschwitz),J.L编著,约翰威利父子(John Wiley&Sons),1990中披露的那些、由恩利施(Englisch)等人,应用化学(Angewandte Chemie),国际版,1991,30,613披露的那些和由赛格维(Sanghvi),Y.S.,第15章,dsRNA研究

与应用(dsRNA Research and Applications),第289-302页,克鲁克(Crooke),S.T.和拉布列(Lebleu),B.编著,CRC出版社,1993披露的那些。这些核碱基中的某些对提高本发明表征的寡聚化合物的结合亲和力是特别有用的。这些碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮嘧啶以及N-2、N-6以及O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶以及5-丙炔基胞嘧啶。已经表明5-甲基胞嘧啶取代基提高核酸双链体的稳定性0.6°C-1.2°C(桑格威(Sanghvi),Y.S.,克鲁克(Crooke),S.T.以及拉布列(Lebleu),B.编辑,dsRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications),CRC出版社,波卡拉顿(Boca Raton),1993,第276-278页),并是示例性的碱基取代基,甚至更加特别地为当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰物组合时。

[0287] 教授制备某些上述修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基的代表性美国专利包括但不限于上述的美国专利号3,687,808,以及美国专利号4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,681,941;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;和7,495,088,所述文献的每一篇通过引用方式结合在此,和美国专利号5,750,692,其也通过引用方式结合在此。

[0288] 也可以修饰iRNA的RNA以包含一个或多个锁定的核酸(LNA)。锁定的核酸是具有修饰核糖部分的核苷酸,其中所述核糖部分包含连接2'碳和4'碳的额外桥。这个结构有效地将该核糖“锁”在3'-内切结构构象中。向siRNA添加锁定的核酸已经显示增加血清中的siRNA稳定性并且减少脱靶效应(埃尔曼(Elmen,J.)等人,(2005)核酸研究(Nucleic Acids Research)33(1):439-447;莫克(Mook,OR.)等人,(2007)分子癌症治疗(Mol Canc Ther)6(3):833-843;谷万尔(Grunweller,A.)等人,(2003)核酸研究(Nucleic Acids Research)31(12):3185-3193)。

[0289] 传授锁定的核酸核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于以下美国专利号6,268,490;6,670,461;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,084,125;以及7,399,845,其每一者通过引用结合于此。

[0290] 对RNA分子的末端的潜在的稳定化修饰可包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAC)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-NHAC)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二醇基(docosanoyl)-尿苷-3''-磷酸酯、反向碱基dT(idT)及其他。在PCT公开号W0 2011/005861中可以找到这种修饰的披露。

[0291] iRNA基序

[0292] 在一个实施例中,有义链序列可以由式(I)表示:

[0293] $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$ (I)

[0294] 其中:

[0295] i和j彼此独立地是0或1;

[0296] p和q彼此独立地是0-6;

[0297] 每个 N_a 独立地表示包括0-25个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;

[0298] 每个 N_b 独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0299] 每个 n_p 和 n_q 独立地表示一个突出核苷酸;

[0300] 其中 N_b 和 Y 不具有相同的修饰;并且

[0301] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。优选地YYY全是2'-F修饰的核苷酸。

[0302] 在一个实施例中, N_a 和/或 N_b 包括交替模式的修饰。

[0303] 在一个实施例中,YYY基序发生在有义链的切割位点处或其附近处。例如,当该RNAi剂具有17-23个核苷酸长度的双链体区域时,该YYY基序可以发生在有义链的切割位点处或其附近处(例如,可以发生在位置6、7、8;7、8、9;8、9、10;9、10、11;10、11、12或11、12、13处),该计数从5'-末端,从第一个核苷酸开始;或任选地,该计数从5'-末端,从该双链体区域内的第一对核苷酸开始。

[0304] 在一个实施例中, i 是1且 j 是0,或 i 是0且 j 是1,或 i 和 j 两者都是1。该有义链因此可以由以下式表示:

[0305] $5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Ib);

[0306] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ic);或

[0307] $5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (Id)。

[0308] 当该有义链是由式(Ib)表示时, N_b 表示一个寡核苷酸序列,包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a 可独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0309] 当该有义链表示为式(Ic)时, N_b 表示一个寡核苷酸序列,包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a 可独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0310] 当该有义链表示为式(Id)时,每个 N_b 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。优选地, N_b 是0、1、2、3、4、5或6。每个 N_a 可独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0311] X、Y和Z每个可以是彼此相同的或不同的。

[0312] 在其他实施例中, i 是0且 j 是0,并且该有义链可以由下式表示:

[0313] $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$ (Ia)。

[0314] 当该有义链由式(Ia)表示时,每个 N_a 独立地可以表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸。

[0315] 在一个实施例中,该RNAi的反义链序列可以由式(II)表示:

[0316] $5' n_q' - N_a' - (Z' Z' Z')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (X' X' X')_l - N_a' - n_p' 3'$ (II)

[0317] 其中:

[0318] k 和 l 各自独立地是0或1;

[0319] p' 和 q' 各自独立地是0-6;

[0320] 每个 N_a' 独立地表示包括0-25个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;

[0321] 每个 N_b' 独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0322] 每个 n_p' 和 n_q' 独立地表示一个突出核苷酸;

[0323] 其中 N_b' 和 Y' 不具有相同的修饰;

[0324] 并且

[0325] $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 、以及 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。

[0326] 在一个实施例中, N_a' 和/或 N_b' 包括交替模式的修饰。

[0327] $Y'Y'Y'$ 基序发生在反义链的切割位点处或其附近处。例如,当该RNAi剂具有17-23个核苷酸长度的双链体区域时,该 $Y'Y'Y'$ 基序可以发生在该反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15处),该计数从5'-末端,从第一个核苷酸开始;或任选地,该计数从5'-末端,从该双链体区域内的第一对核苷酸开始。优选地,该 $Y'Y'Y'$ 基序发生在位置11、12、13处。

[0328] 在一个实施例中, $Y'Y'Y'$ 基序全是2'-OMe修饰的核苷酸。

[0329] 在一个实施例中,k是1且l是0,或k是0且l是1,或k和l两者都是1。

[0330] 该反义链因此可以由以下式表示:

[0331] $5'n_a'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p'3'$ (IIb);

[0332] $5'n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p'3'$ (IIc);或

[0333] $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p'3'$ (IId)。

[0334] 当该反义链是由式(IIb)表示时, N_b' 表示一个寡核苷酸序列,包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a' 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0335] 当该反义链表示为式(IIc)时, N_b' 表示一个寡核苷酸序列,包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a' 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0336] 当该反义链表示为式(IId)时,每个 N_b' 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a' 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, N_b 是0、1、2、3、4、5或6。

[0337] 在其他实施例中,k是0且l是0,并且该反义链可以由下式表示:

[0338] $5'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'3'$ (Ia)。

[0339] 当该反义链由式(IIa)表示时,每个 N_a' 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸。

[0340] X' 、 Y' 和 Z' 每个可以是彼此相同的或不同的。

[0341] 该有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地由以下各项修饰: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。例如,该有义链和反义链的每个核苷酸独立地由2'-O-甲基或2'-氟修饰。具体地,每个X、Y、Z、 X' 、 Y' 和 Z' 可以表示一个2'-O-甲基修饰或一个2'-氟修饰。

[0342] 在一个实施例中,当该双链体区域是21nt时,该RNAi剂的有义链可以包含发生在该链的位置9、10和11处的YYY基序,该计数从5'-末端,从第一个核苷酸开始;或任选地,该计数从5'-末端,从该双链体区域内的第一对核苷酸开始;并且Y表示2'-F修饰。该有义链可以另外包含XXX基序或ZZZ基序作为在该双链体区域的相反末端处的翼修饰;并且XXX和ZZZ各自独立地表示一个2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0343] 在一个实施例中,该反义链可以包含发生在该链的位置11、12和13处的 $Y'Y'Y'$ 基

序,该计数从5'-末端,从第一个核苷酸开始;或任选地,该计数从5'-末端,从该双链体区域内的第一对核苷酸开始;并且Y'表示2'-O-甲基修饰。该反义链可以另外包含X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为在该双链体区域的相反末端处的翼修饰;并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示一个2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0344] 由上式(Ia)、(Ib)、(Ic)、和(Id)中任一项表示的有义链分别与由式(IIa)、(IIb)、(IIc)、和(IId)中任一项表示的反义链形成了一个双链体。

[0345] 因此,用于在本发明的方法中使用的RNAi剂可以包括一个有义链和一个反义链,每个链具有14至30个核苷酸,该RNAi双链体由式(III)表示:

[0346] 有义:5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q3'

[0347] 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'

[0348] (III)

[0349] 其中:

[0350] i、j、k、以及l各自独立地是0或1;

[0351] p、p'、q、以及q'各自独立地是0-6;

[0352] 每个N_a和N_a'独立地表示包括0-25个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;

[0353] 每个N_b和N_b'独立地表示包括0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0354] 其中

[0355] 每个n_p'、n_p、n_q'、和n_q,其中每个可以是存在的或可以是不存在的,独立地表示一个突出核苷酸;并且

[0356] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、以及Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。

[0357] 在一个实施例中,i是0且j是0;或i是1且j是0;或i是0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且l是0;或k是1且l是0;k是0且l是1;或k和l两者都是0;或k和l两者都是1。

[0358] 形成RNAi双链体的该有义链和反义链的示例组合包括下式:

[0359] 5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q3'

[0360] 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'

[0361] (IIIa)

[0362] 5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'

[0363] 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'5'

[0364] (IIIb)

[0365] 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q3'

[0366] 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'

[0367] (IIIc)

[0368] 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'

[0369] 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'5'

[0370] (IIId)

[0371] 当该RNAi剂是由式(IIIa)表示时,每个N_a独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核

苷酸序列包含2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸。

[0372] 当该RNAi剂是由式(IIIb)表示时,每个 N_b 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含1-10个、1-7个、1-5个或1-4个修饰的核苷酸。每个 N_a 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0373] 当该RNAi剂表示为式(IIIc)时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0374] 当该RNAi剂表示为式(IIId)时,每个 N_b 、 N_b' 独立地表示一个寡核苷酸序列,该寡核苷酸序列包含0-10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个修饰的核苷酸。每个 N_a 、 N_a' 独立地表示包括2-20个、2-15个、或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。 N_a 、 N_a' 、 N_b 和 N_b' 中的每一个独立地包括交替模式的修饰。

[0375] 式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、和(IIId)中的每个X、Y和Z每个可以是彼此相同的或不同的。

[0376] 当该RNAi剂是由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、和(IIId)表示时,Y核苷酸中的至少一个可以与该Y'核苷酸形成一个碱基对。可替代地,至少两个Y核苷酸与相应的Y'核苷酸形成碱基对;或全部三个Y核苷酸与相应的Y'核苷酸都形成碱基对。

[0377] 当该RNAi剂是由式(IIIb)或(IIId)表示时,Z核苷酸中的至少一个可以与该Z'核苷酸形成一个碱基对。可替代地,至少两个Z核苷酸与相应的Z'核苷酸形成碱基对;或全部三个Z核苷酸与相应的Z'核苷酸都形成碱基对。

[0378] 当该RNAi剂表示为式(IIIc)或(IIId)时,X核苷酸中的至少一个可以与该X'核苷酸形成一个碱基对。可替代地,至少两个X核苷酸与相应的X'核苷酸形成碱基对;或全部三个X核苷酸与相应的X'核苷酸都形成碱基对。

[0379] 在一个实施例中,Y核苷酸上的修饰不同于Y'核苷酸上的修饰,Z核苷酸上的修饰不同于Z'核苷酸上的修饰、和/或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0380] 在一个实施例中,当该RNAi剂是由式(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,当该RNAi剂是由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰且 $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 是经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上的。在又一个实施例中,当该RNAi剂是由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 是经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上的,并且有义链共轭到通过一个二价或三价分支连接物附接的一个或多个GalNAc衍生物。在另一个实施例中,当该RNAi剂是由式(IIId)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 是经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上的,有义链包括至少一个硫代磷酸酯键并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支连接物附接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0381] 在一个实施例中,当该RNAi剂是由式(IIIa)表示时, N_a 修饰是2'-O-甲基或2'-氟修饰, $n_p' > 0$ 并且至少一个 n_p' 是经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸上的,有义链包括至少一个硫代磷酸酯键并且该有义链共轭到通过一个二价或三价分支连接物附接的一个或多个GalNAc衍生物。

[0382] 在一个实施例中,该RNAi剂是一种多聚体,包含至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、和(IIId)表示的双链体,其中这些双链体通过连接物连接。该连接物可以

是可剪切的或不可剪切的。任选地,该多聚体进一步包括一种配体。这些双链体中的每一个可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些双链体中的每一个可以靶向在两个不同靶标部位的相同基因。

[0383] 在一个实施例中,该RNAi剂是一种多聚体,包含三个、四个、五个、六个、或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、和(IIId)表示的双链体,其中这些双链体通过连接物连接。该连接物可以是可剪切的或不可剪切的。任选地,该多聚体进一步包括一种配体。这些双链体中的每一个可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些双链体中的每一个可以靶向在两个不同靶标部位的相同基因。

[0384] 在一个实施例中,由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、和(IIId)表示的两个RNAi剂在5'末端彼此连接,并且3'末端中的一个或两个都任选地共轭至一个配体。这些试剂中的每一个可以靶向相同基因或两个不同基因;或这些试剂中的每一个可以靶向在两个不同靶标部位的相同基因。

[0385] iRNA共轭物

[0386] 在此披露的iRNA剂能处于共轭物的形式。该共轭物可以在iRNA分子的任何适合的位置处附接,例如,在该有义或反义链的3'末端或5'末端处。该共轭物可任选地经由连接物附接。

[0387] 在一些实施例中,在此所述的iRNA剂化学地连接至一个或多个配体、部分或共轭物,这可能赋予功能性,例如,通过影响(例如,增强)iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取。此类部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分(乐欣格(Letsinger)等人,美国科学院院刊(Proc.Natl.Acid.Sci.USA),1989,86:6553-6556),胆酸(马诺汗(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学快报(Biorg.Med.Chem.Lett.),1994,4:1053-1060),硫醚如bery1-S-三苯甲基硫醇(马诺汗(Manoharan)等人,纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.),1992,660:306-309;马诺汗(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学快报(Biorg.Med.Chem.Lett.),1993,3:2765-2770),硫代胆固醇(奥博汗瑟(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1992,20:533-538),脂肪链如十二烷基二醇或十一烷基残基(赛森-博和马拉(Saison-Behmoaras)等人,EMBO杂志,1991,10:1111-1118;卡波诺(Kabanov)等人,FEBS通讯,1990,259:327-330;斯伍那区克(Svinarchuk)等人,生物化学(Biochimie),1993,75:49-54),磷脂如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(马诺汗(Manoharan)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654;舍阿(Shea)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1990,18:3777-3783),聚胺或聚乙烯乙二醇链(马诺汗(Manoharan)等人,核苷&核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969-973)或金刚烷乙酸(马诺汗(Manoharan)等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651-3654),十六烷基部分(米莎(Mishra)等人,生物化学与生物物理学学报(Biochim.Biophys.Acta),1995,1264:229-237),或十八胺或己胺-羰基胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923-937)。

[0388] 在一个实施例中,配体改变向其中并入该配体的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在一些实施例中,与例如不存在这样一种配体的种类相比,该配体提供针对所选靶标例如,分子、细胞或细胞类型、区室(例如,细胞或器官区室、身体组织、器官或区域)的增强的亲和

力。典型的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0389] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、茁霉多糖、壳多糖、壳聚糖、菊糖、环糊精或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组或合成分子,如合成聚合物,例如,合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括以下聚氨基酸:聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙酸钠-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、聚胺肽、树枝状聚合物的聚胺、精氨酸、胍、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐、或 α 螺旋肽。

[0390] 配体也可以包括靶向基团,例如,与指定的细胞类型如肾细胞结合的细胞或组织靶向剂,例如,凝集素,糖蛋白,脂质或蛋白质,例如,抗体。靶向基团可以是促甲状腺激素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白质A、黏蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0391] 在一些实施例中,该配体是包括一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物的GalNAc配体。GalNAc配体的另外的描述提供于标题为碳水化合物共轭物的节段。

[0392] 配体的其他例子包括染料、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多环芳烃(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-O(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、鲸蜡基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰)石胆酸、O3-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噻嗪肽共轭物(例如,触角足肽、Tat肽)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]2、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标记物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑聚类、吖啶-咪唑共轭物、四氮杂大环类的Eu³⁺络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0393] 配体可以是蛋白质,例如,糖蛋白,或肽,例如,对辅助配体具有特异亲和力的分子,或抗体,例如,与指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体也可以包括激素和激素受体。它们也可以包括非肽种类,如脂质、凝集素、糖类、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。该配体可以是例如脂多糖,p38MAP激酶的活化剂或NF- κ B的活化剂。

[0394] 配体可以是例如通过破坏细胞骨架(例如,通过破坏细胞微管、微丝和/或中间丝)增加iRNA剂摄入细胞中的物质,例如,药物。药物可以例如是泰素(taxon)、长春新碱、长春碱、松胞菌素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵素A、鬼笔环肽、海洋苔藓素(swinholide)A、茚满诺星(indanocine)或myoservin。

[0395] 在一些实施例中,与如本文所述的iRNA连接的配体充当药物代谢动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维

生素等。示例性PK调节剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬 (ibuprofen)、维生素E、生物素等。包含许多硫代磷酸酯键的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合,因此在骨架中包含多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸,例如约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,也服从于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。此外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适配体也适合用作本文所述的实施例中的PK调节配体。

[0396] 本发明的配体-共轭的寡核苷酸可以通过使用这样一种寡核苷酸合成,该寡核苷酸具有吊坠反应功能性,例如衍生自该寡核苷酸上的连接分子的附接物(如下所述)。该反应性寡核苷酸可以直接与可商购的配体,合成的、具有多种保护基中的任一种的配体,或具有连接部分附接于其上的配体发生反应。

[0397] 在本发明的共轭物中使用的寡核苷酸可以通过固相合成的公知技术方便且常规地制备。用于这类合成的设备由多个供应商(包括例如应用生物系统公司(Applied Biosystems)(福斯特市,加利福尼亚州))销售。可另外地或替代地使用本领域中已知的用于这类合成的任何其他装置。使用相似的技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化衍生物)也是已知的。

[0398] 在本发明的配体-共轭的寡核苷酸以及具有序列特异性连接的核苷的配体-分子中,该寡核苷酸以及寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体,或已经具有连接部分的核苷酸或核苷共轭前体,已经具有配体分子的配体-核苷酸或核苷-共轭物前体,或带有组块的非核苷配体,从而在适合的DNA合成仪中组装。

[0399] 当使用已经具有连接部分的核苷酸-共轭物前体时,典型地完成该序列特异性连接的核苷的合成,并且然后该配体分子与该连接部分反应以形成配体共轭的寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过一种自动合成仪合成,除了可商购以及寡核苷酸合成中常规使用的标准亚磷酰胺以及非标准亚磷酰胺之外,该合成还使用衍生自配体-核苷共轭物的亚磷酰胺。

[0400] 脂质共轭物

[0401] 在一个实施例中,该配体是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子可以典型地结合血清蛋白,例如,人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许共轭物分布至靶组织,例如,身体的非肾靶组织。例如靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普生(neproxin)或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加共轭物对降解的抵抗力,(b)增加靶向或转运至靶标细胞或细胞膜中,和/或(c)可以用来调节与血清蛋白(例如,HSA)的结合。

[0402] 基于脂质的配体可以用来调制,例如,控制(如,抑制)共轭物与靶组织的结合。例如与HSA更强烈结合的脂质或基于脂质的配体将更不可能被靶向肾并且因此较不可能从身体清除。与HSA较不强烈结合的脂质或基于脂质的配体可以用来使共轭物靶向肾。

[0403] 在一个实施例中,基于脂质的配体结合HSA。例如,该配体以足够的亲和力结合HSA,从而共轭物向分布至非肾组织的分布增强。然而,典型地是这种亲和力并不是这样强,从而HSA-配体结合不能逆转。

[0404] 在另一个实施例中,基于脂质的配体微弱或根本不结合HSA,从而共轭物向肾的分布增强。作为基于脂质的配体的替代或除它之外,也可以使用靶向肾细胞的其他部分。

[0405] 在另一个方面,配体是由靶标细胞(例如,正在增殖的细胞)摄取的部分,例如,维生素。这些特别可用于治疗以不希望的细胞(例如,恶性或非恶性型,例如,癌细胞)增殖为特征的病症。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括是B维生素,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或由癌细胞摄取的其他维生素或养分。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0406] 细胞渗透剂

[0407] 在另一个方面,配体是细胞渗透剂,如螺旋形细胞渗透剂。在一个实施例中,该药剂是两亲的。一种示例性剂渗透剂是肽如tat或触角足蛋白。如果该渗透剂是肽,则它可以经修饰的,包括肽酰基模拟物、反演体、非肽键或假肽键和D-氨基酸的使用。该螺旋剂典型地是 α -螺旋剂,并且可以具有亲脂性和疏脂性相。

[0408] 该配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称作寡肽模拟物)是能够折叠成与天然肽相似的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA剂的附接可以影响iRNA的药物代谢动力学分布,如通过增强细胞鉴别与吸收。肽或肽模拟物部分可以是约5-50氨基酸长的,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0409] 肽或肽模拟物可以例如是细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。在另一个替代中,肽部分可以包含疏水性膜转运序列(MTS)。一种含有疏水性MTS的示例性肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:3367)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:3368))也可以是靶向部分。该肽部分可以是一个“递送”肽,其可携带大的极性分子,包括肽、寡核苷酸、和蛋白跨细胞膜。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:3369))和果蝇触角足蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:3370))的序列能够作为递送肽发挥作用。肽或肽模拟物可以由随机DNA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(拉姆(Lam)等人,自然(Nature),354:82-84,1991)。典型地,经由一个合并的单体单元留至dsRNA剂的肽或肽模拟物是细胞靶向肽,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽或RGD模拟物。肽部分可以在长度上范围从约5个氨基酸至约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰,如以便增加稳定性或指导构象特性。可以利用下文描述的任何结构修饰。

[0410] 用于在本发明的组合物和方法中使用的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以是修饰的,例如糖基化或甲基化以促进靶向一个或多个特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD之外,可使用靶向整合素配体的其他部分。该配体的优选共轭物靶向PECAM-1或VEGF。

[0411] RGD肽部分可以用来靶向特定细胞类型,例如,肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳腺癌肿瘤细胞(扎特曼(Zitzmann)等人,癌症研究(Cancer Res.),62:5139-43,2002)。RGD肽可以促进dsRNA剂靶向多种其他组织(包括肺、脾或肝脏)的肿瘤(青木(Aoki)等人,癌症基因疗法(Cancer Gene Therapy)8:783-787,2001)。典型地,RGD肽将促进iRNA剂靶向肾。RGD肽可以是线性或环状的,并且可以是修饰的,例如,糖基化或甲基化以促进靶向特定组织。例如,糖基化的RGD肽可以递送iRNA剂至表达 $\alpha v \beta_3$ 的肿瘤细胞(华博纳(Haubner)等人,核医学(Jour.Nucl.Med.),42:326-336,2001)。

[0412] “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 -螺旋形线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1),含有二硫键的肽(例如, α -防御素、 β -防御素或牛抗菌肽),或仅含一个或两个支配性氨基酸的肽(例如,PR-39或indolicidin)。细胞渗透肽也可以包含核定位信号(NLS)。例如细胞渗透肽可以是二重两亲肽,如MPG,其源自HIV-1gp41的融合物肽结构域和SV40大T抗原的NLS(西梅奥尼(Simeoni)等人,核酸研究(Nucl. Acids Res.) 31:2717-2724, 2003)。

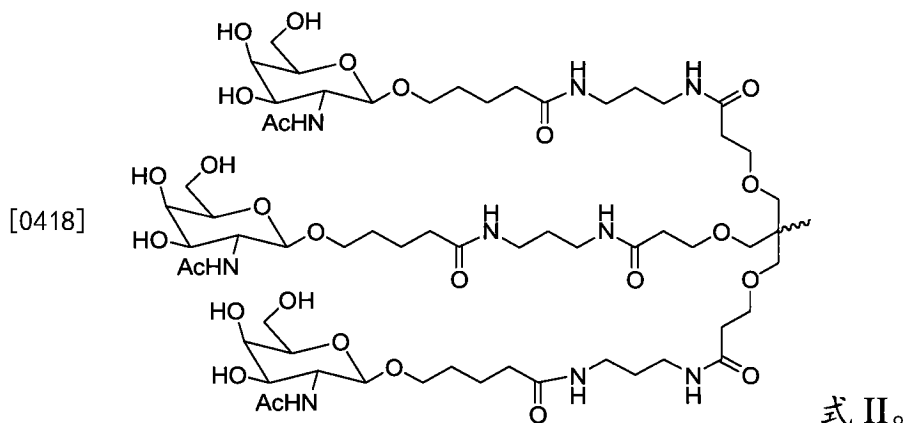
[0413] 碳水化合物共轭物

[0414] 在本发明的组合物与方法的一些实施例中,iRNA寡核苷酸进一步包括一种碳水化合物。碳水化合物共轭的iRNA对于核酸的体内递送以及适合于体内治疗用途的组合物而言是有利的,如在此所描述。如在此所使用的,“碳水化合物”指以下这样一种化合物,它是一种本身由具有至少6个碳原子的一个或多个单糖单位构成的碳水化合物(其可以是线性的、支链的或环状的),其中氧、氮或硫原子结合至每一碳原子;或者它是一种具有以下这样的碳水化合物部分作为其一部分的化合物,该碳水化合物由具有至少六个碳原子的一个或多个单糖单位构成(其可以是线性的、支链的或环状的),其中氧、氮或硫原子结合至每一碳原子。代表性的碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖以及包含从大约4、5、6、7、8或9个单糖单位的低聚糖),以及多糖例如淀粉、糖原、纤维素以及多糖胶。具体的单糖包括C5以及以上的(例如C5、C6、C7或C8)糖;二糖以及三糖包括具有两个或三个单糖单位的糖(例如C5、C6、C7或C8)。

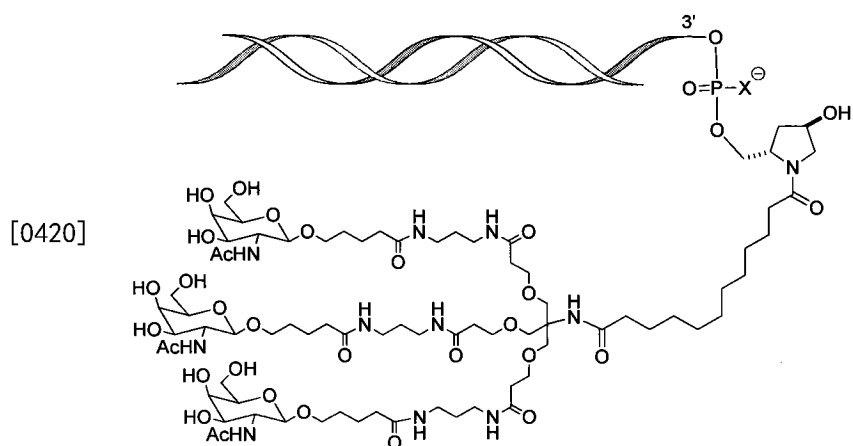
[0415] 在一个实施例中,碳水化合物共轭物包括单糖。在一个实施例中,该单糖是一种N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。GalNAc共轭物描述于,例如,美国专利号8,106,022,通过引用将其全部内容结合在此。在一些实施例中,GalNAc共轭物用作将iRNA靶向特定细胞的配体。在一些实施例中,GalNAc共轭物将iRNA靶向肝脏细胞,例如,通过用作针对肝脏细胞(例如,肝上皮实质细胞)的脱唾液酸糖蛋白受体的一种配体。

[0416] 在一些实施例中,碳水化合物共轭物包括一个或多个GalNAc衍生物。GalNAc衍生物可以经由连接物附接,例如,二价或三价分枝的连接物。在一些实施例中,GalNAc共轭物共轭至有义链的3'末端。在一些实施例中,GalNAc共轭物经由连接物(例如,在此所述的连接物)共轭至iRNA剂(例如,有义链的3'末端)。

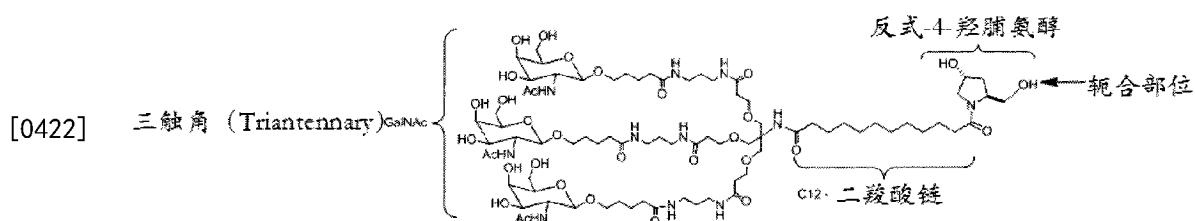
[0417] 在一些实施例中,该GalNAc共轭物是



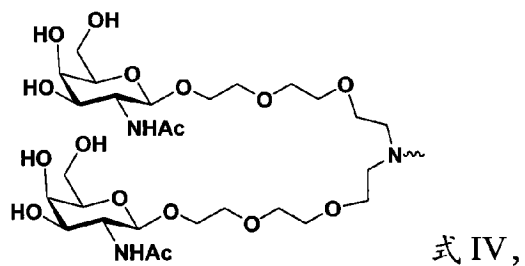
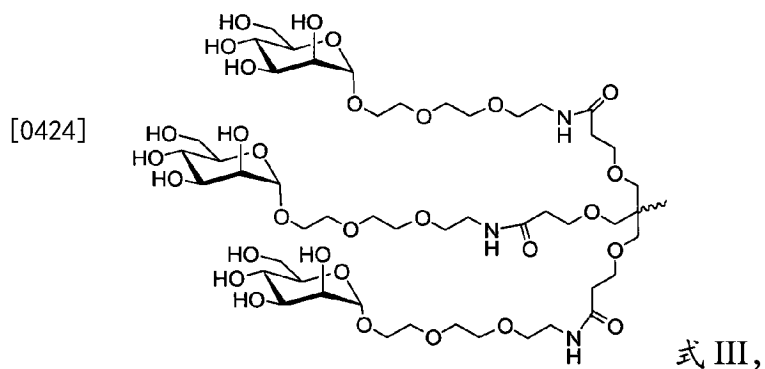
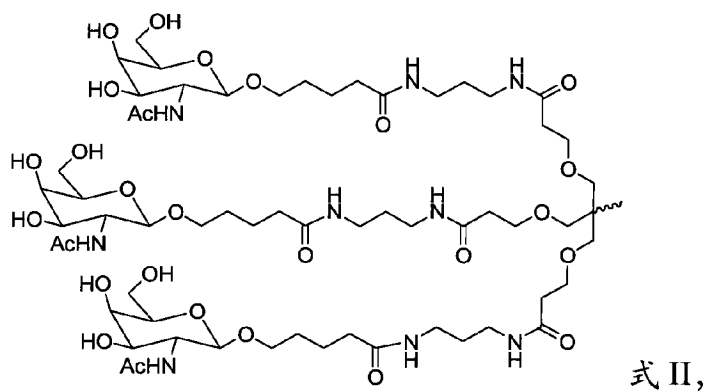
[0419] 在一些实施例中, RNAi 剂经由连接物附接至碳水化合物共轭物,例如,如以下方案中示出的连接物,其中X是O或S

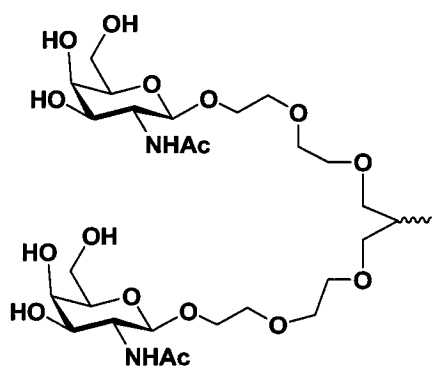


[0421] 在一些实施例中, RNAi 剂共轭至如表 1 中定义且如下示出的 L96

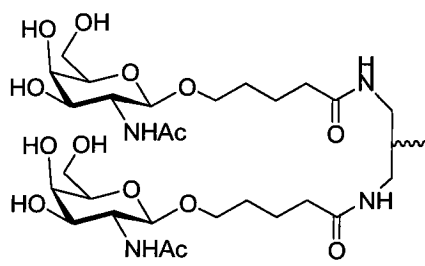


[0423] 在一些实施例中, 用于在本发明的组合物以及方法中使用的碳水化合物共轭物是选自下组, 该组由以下各项组成:

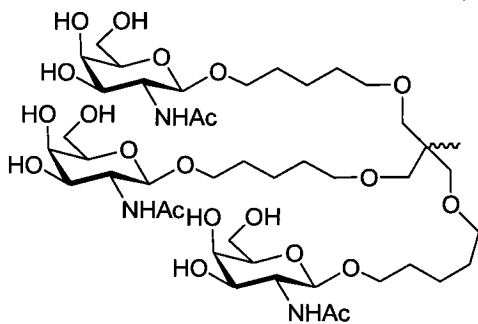




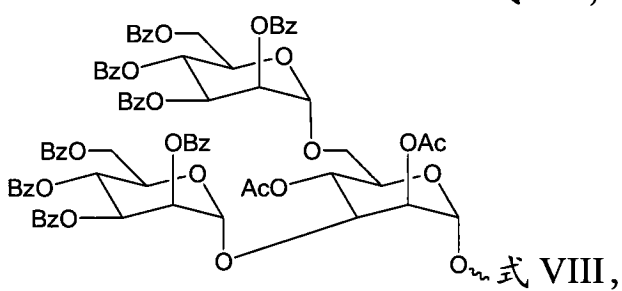
式 V,



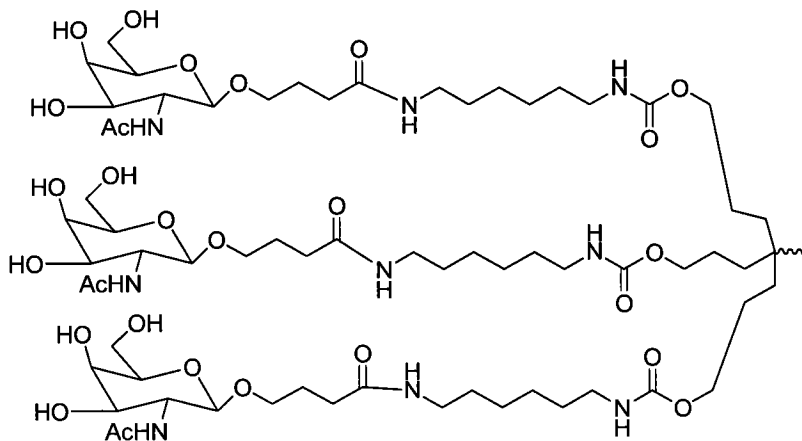
式 VI,



式 VII,

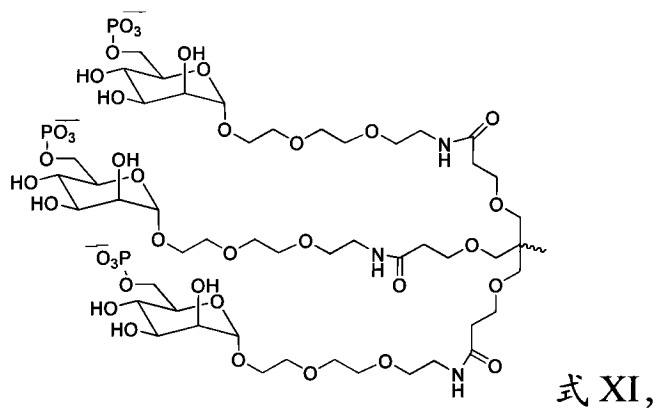
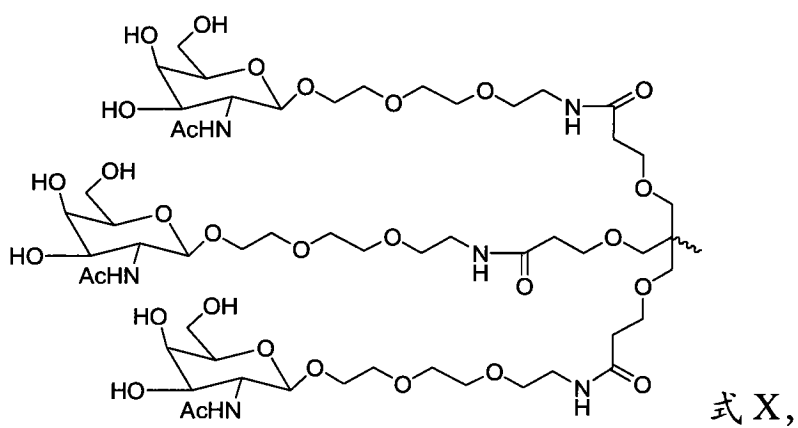


式 VIII,

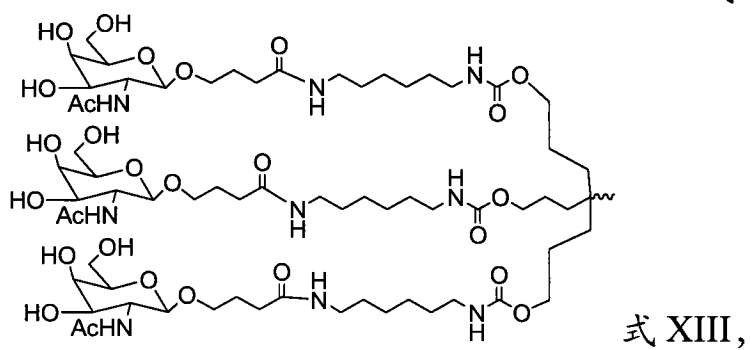
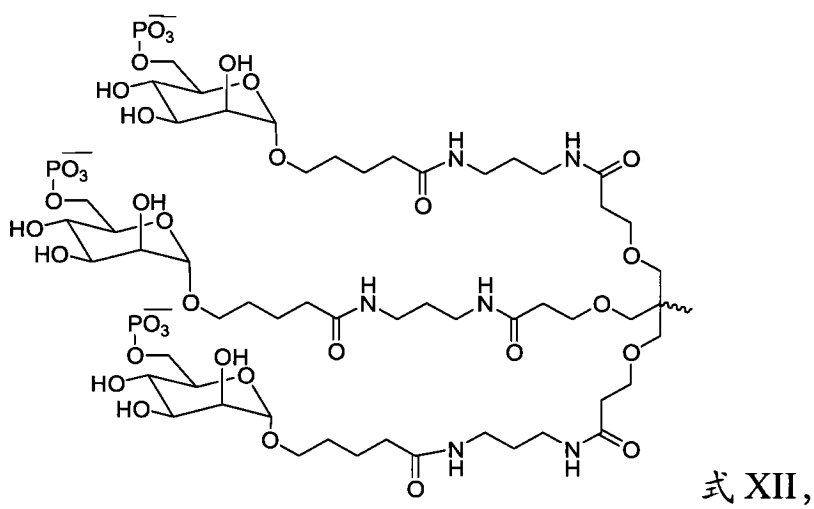


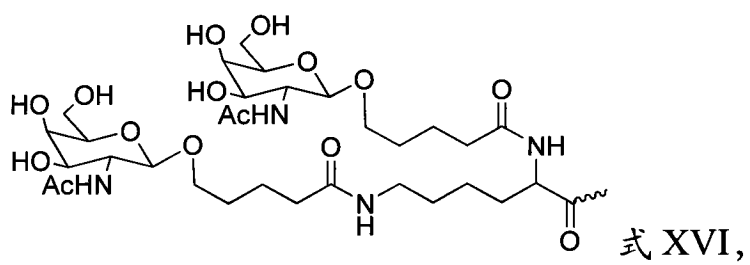
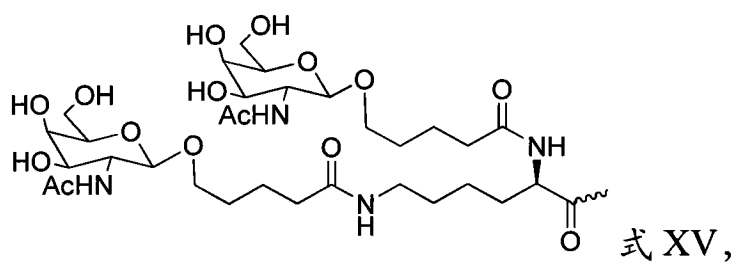
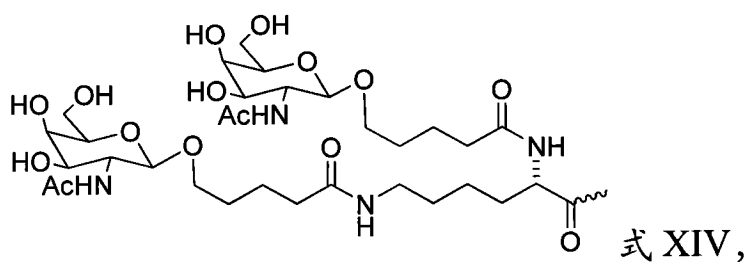
式 IX,

[0425]

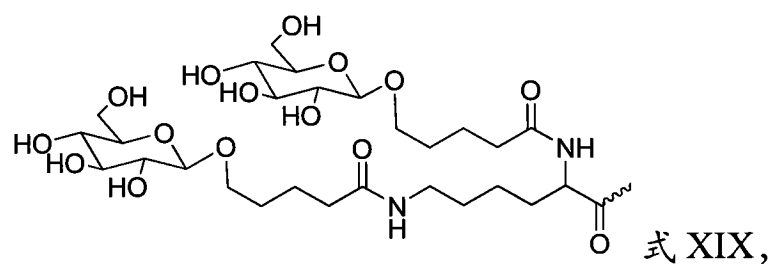
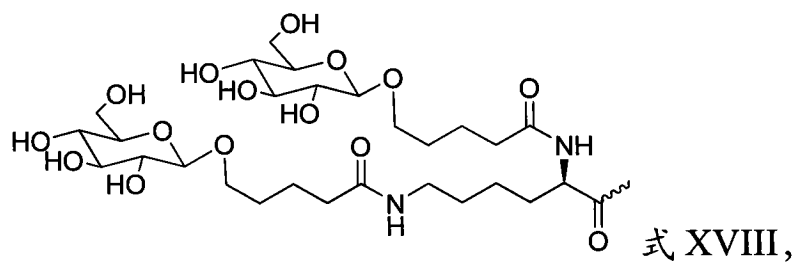
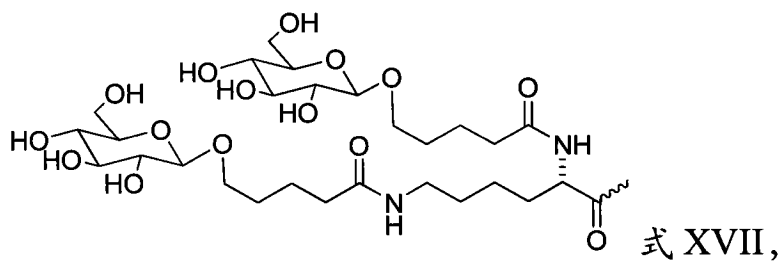


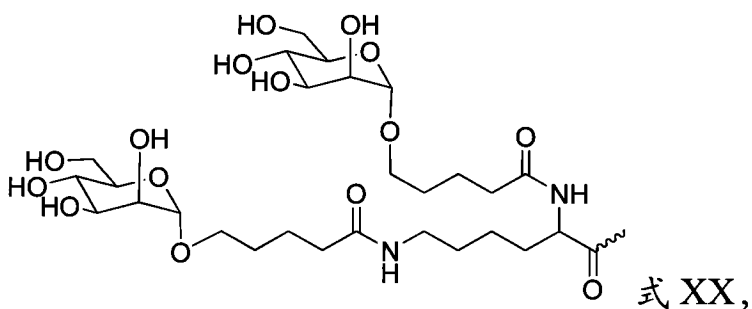
[0426]



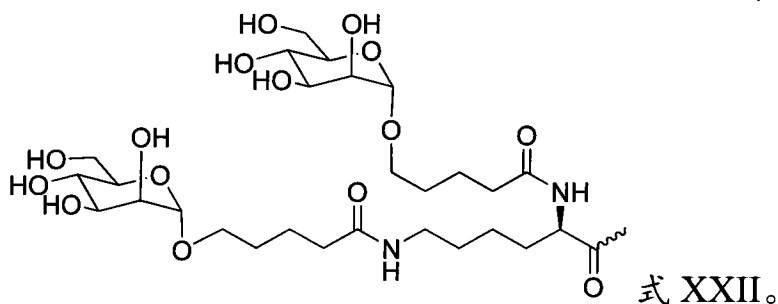
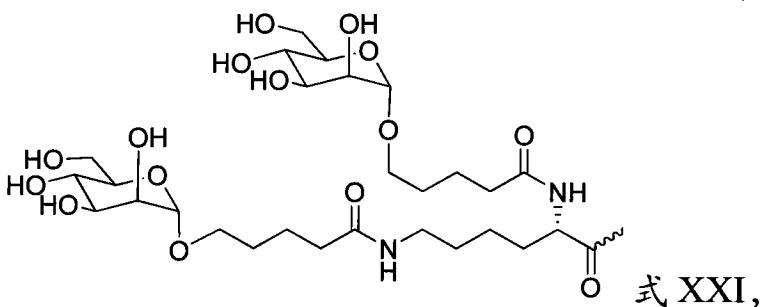


[0427]



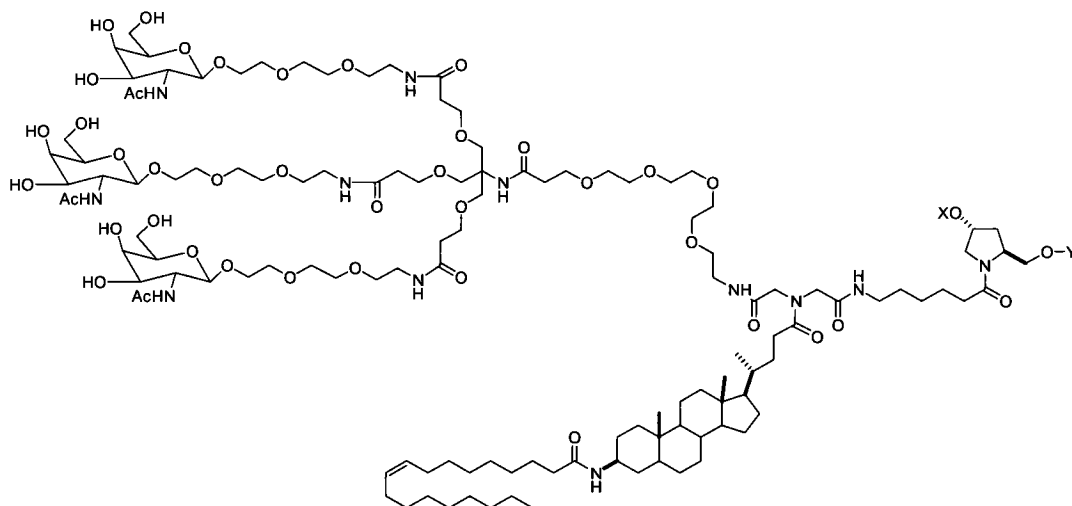


[0428]



[0429] 用于在于此描述的实施例中的另一个代表性碳水化合物共轭物包括但不限于，

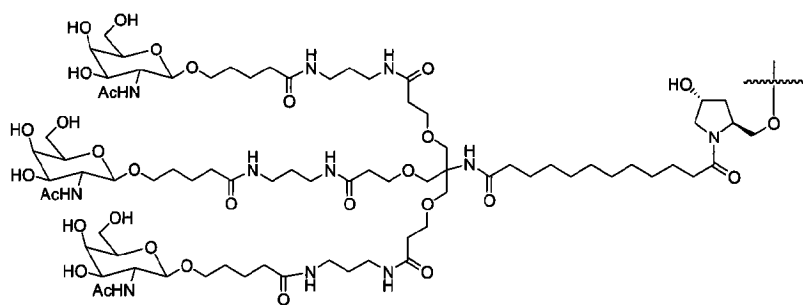
[0430]



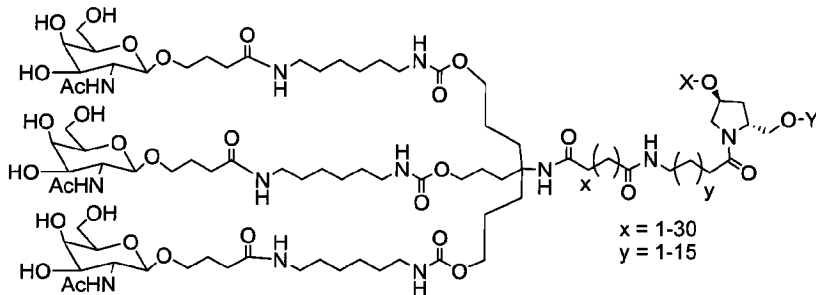
(式XXIII), 当X或Y其中一者是寡核苷酸时, 另一者是氢。

[0431] 在一些实施例中, 该碳水化合物共轭物进一步包括以上描述的一个或多个另外的配体, 例如但不限于一种PK调制子和/或一种细胞渗透肽。

[0432] 在一个实施例中, 本发明的iRNA通过一种连接物被共轭至一种碳水化合物。本发明的组合物与方法的具有连接物的iRNA碳水化合物共轭物的非限制性实例包括但不限于,

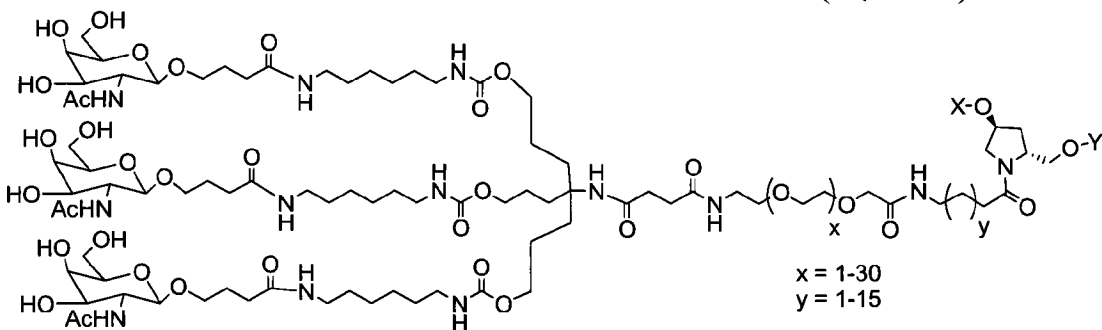


(式 XXIV)、

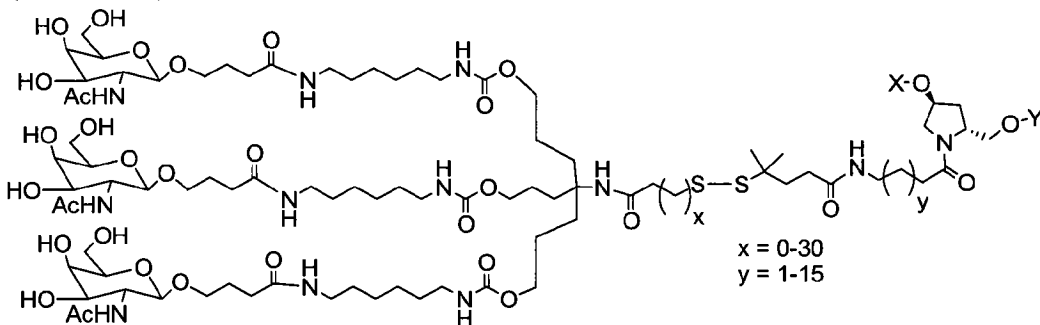


(式 XXV)、

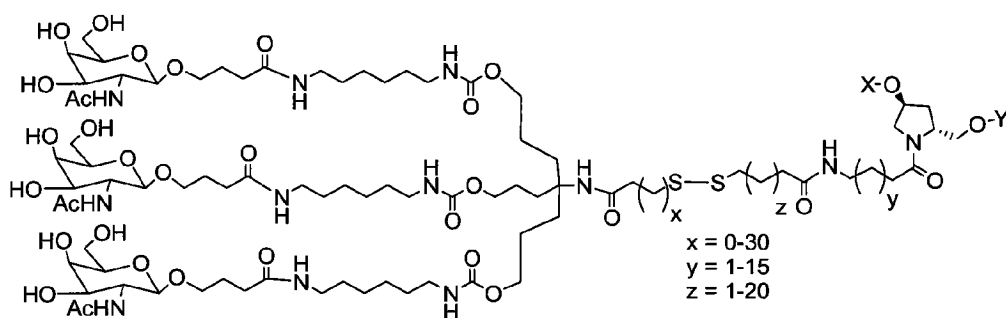
[0433]



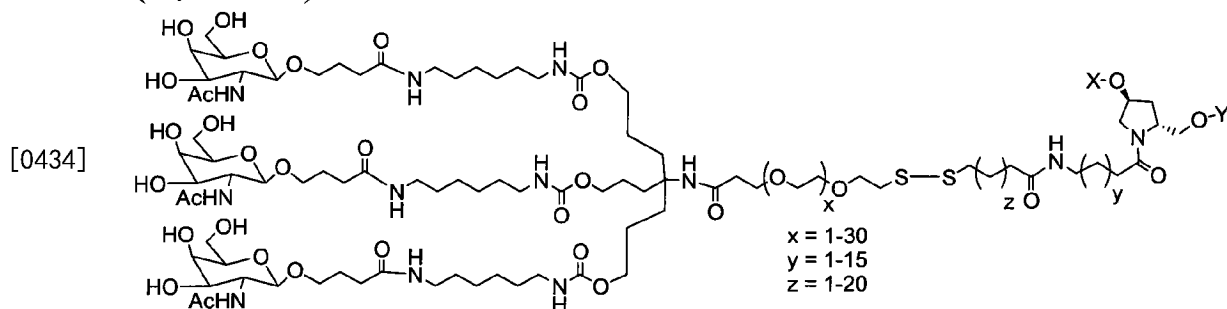
(式 XXVI)、



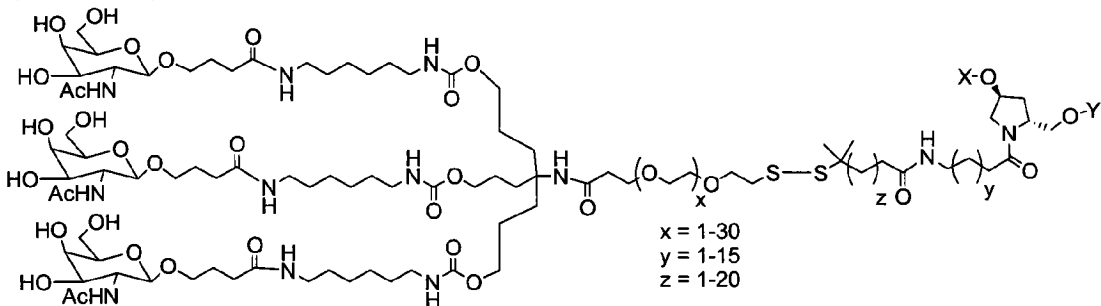
(式 XXVII)、



(式 XXVIII)、



(式 XXIX)、和



[0435] (式XXX), 当X或Y其中一者是寡核苷酸时, 另一者是氢。

[0436] 连接物

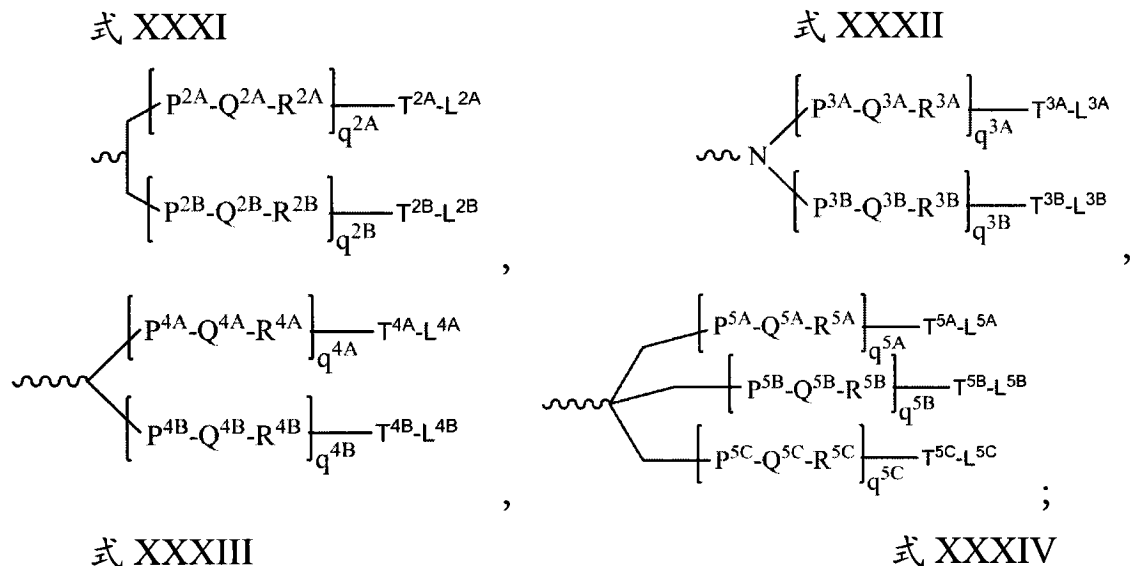
[0437] 在一些实施例中, 此处所述的共轭物或配体可以借助各种连接物与iRNA寡核苷酸附接, 所述连接物可以是可切割或不可切割的。

[0438] 术语“连接物”或“连接基团”意为一种有机部分, 它连接一个化合物的两个部分, 例如共价地附接一个化合物的两个部分。连接物典型地包括一种直接的键或一种原子例如氧或硫, 一种单位例如NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NH或者一种原子链, 例如但不限于经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的烯基、经取代或未经取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、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, 其中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)、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基、经取代或未经取代的杂环基; 其中R₈是氢、

酰基、脂肪族的或经取代的脂肪族的。在一个实施例中,该连接物是在大约1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子,7-17、8-17、6-16、7-16或8-16个原子之间。

[0439] 在一个实施例中,本发明的dsRNA被共轭至一种二价或三价分支连接物,其选自在式(XXXI)-(XXXIV)的任一个中显示的结构组:

[0440]



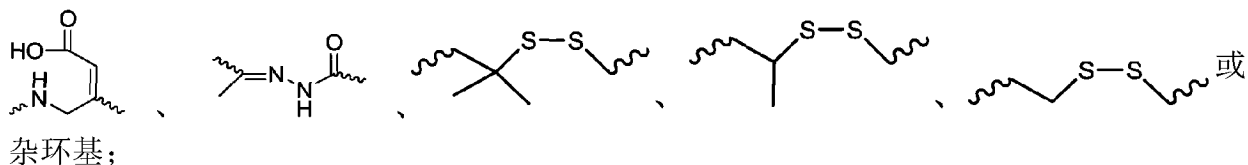
[0441] 其中:

[0442] 各次出现的 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 以及 q^{5C} 独立地代表0-20,并且其中该重复单元可以是相同或不同的;

[0443] 各次出现的 P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{4A} 、 T^{5B} 、 T^{5C} 各自独立地是:不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH或CH₂O;

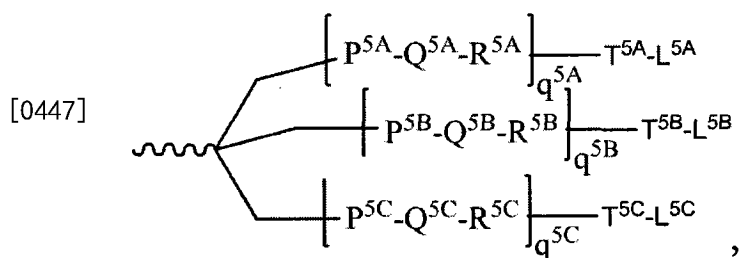
[0444] 各次出现的 Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、 Q^{5C} 各自独立地是:不存在、亚烷基、经取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可以被以下各项中的一个或多个所中断或封端:O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C或C(O);

[0445] 各次出现的 R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{5A} 、 R^{5B} 、 R^{5C} 各自独立地是:不存在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、



[0446] L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 和 L^{5C} 代表配体;即各次出现时各自独立地代表:单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、低聚糖或多糖;并且R^a是H或氨基酸侧链。三价共轭的GalNAc衍生物对于与RNAi剂一起使用以抑制靶标基因的表达是特别有用的,例如具有式(XXXV)的那些:

式 XXXV



[0448] 其中 L^{5A} 、 L^{5B} 与 L^{5C} 代表单糖,例如GalNAc衍生物。

[0449] 合适的二价与三价分支连接物基团共轭GalNAc衍生物的实例包括但不限于在以上引用为式II、VII、XI、X以及XIII的结构。

[0450] 一种可切割的连接基团在细胞外是足够稳定的,但它在进入靶标细胞时被切割以释放该连接物结合在一起的两个部分。在一个优选的实施例中,该可切割的连接基团在靶标细胞中或在一个第一参考条件(其可以例如被选择为模拟或代表细胞内条件)下的切割比在受试者的血液中或在一个第二参考条件下(其可以例如被选择为模拟或代表在该血液或血清中发现的条件)快至少大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少大约100倍。

[0451] 可切割的连接基团易于受到切割因子(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)的影响。一般地,切割因子在细胞内比在血清或血液中更普遍或具有更高水平或活性。此类降解因子的实例包括:氧化还原因子,它们被选择用于具体底物或者无底物特异性,包括例如氧化或还原酶或者在细胞中出现的还原因子例如硫醇(它可以通过还原作用降解一种可氧化还原切割的连接基团);酯酶;核内体或可以创造酸性环境的因子,例如可以导致pH为5或更低的那些;可以通过作为一种广义酸起作用而水解或降解一种酸可切割的连接基团的酶,肽酶(它可以是底物特异性的),以及磷酸酶。

[0452] 一种可切割的键基团,例如二硫键可以对pH敏感。人血清的pH是7.4,而平均的细胞内pH稍低,范围为大约7.1-7.3。核内体具有一个更酸的pH,范围在5.5-6.0,并且溶酶体具有一个甚至更酸的pH,在5.0左右。一些连接物将具有可切割的连接基团,这些基团在一个优选的pH处被切割,由此将阳离子脂质从配体释放在细胞内,或释放进入所希望的细胞区室。

[0453] 连接物可以包括一种可被特定酶切割的可切割连接基团。并入连接物的可切割连接基团的类型可以取决于有待被靶向的细胞。例如肝靶向的配体可以通过一种包括酯基团的连接物而被连接至一种阳离子脂质。肝细胞富含酯酶,并且因此与不富含酯酶的细胞相比,该连接物将在肝细胞中被更有效地切割。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质以及睾丸的细胞。

[0454] 当靶向富含肽酶的细胞类型(例如肝细胞与滑膜细胞)时,可以使用包含肽键的连接物。

[0455] 总体上,一种候选的可切割连接基团的适合性可以通过测试降解因子(或条件)切割该候选的连接基团的能力来进行评估。还希望的是也测试该候选的可切割连接基团在血液中或当与其他非靶标组织接触时抵抗切割的能力。因此,可以确定在一个第一条件与一个第二条件之间进行切割的相对敏感性,其中该第一条件被选择为指示在一个靶标细胞中

的切割并且该第二条件被选择为指示在其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的切割。这些评估可以在无细胞系统中、在细胞中、在细胞培养物中、在器官或组织培养物中或在整个动物中进行。有用的是在无细胞或培养条件下进行初始评估并且通过在整个动物中的进一步评估来进行确证。在优选的实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在选择为模拟细胞内条件的体外条件下)的切割比在血液或血清(或在被选择为模拟细胞外条件的体外条件下)中的切割快至少大约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或大约100倍。

[0456] 氧化还原可切割的连接基团

[0457] 在一个实施例中,可切割的连接基团是一种氧化还原可切割的连接基团,其在还原或氧化时被切割。还原地可切割的连接基团的实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定一个候选的可切割连接基团是否是一种适合的“还原地可切割的连接基团”,或者例如是否适合于与一种特定的iRNA部分以及特定的靶向剂一起使用,可以参考在此描述的方法。例如可以通过与二硫苏糖醇(DTT)或本领域内已知的使用还原剂的试剂进行孵育来对一个候选者进行评估,这模拟了会在细胞(例如靶标细胞)内观察到的切割速率。还可以在被选择为模拟血液或血清条件的条件下对这些候选者进行评估。在一个实施例中,候选化合物在血液中被切割最多大约10%。在其他实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择为模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液(或在选择以模拟细胞外条件的体外条件下)中的降解快至少大约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或大约100倍。可以在被选择为模拟细胞内介质的条件下,使用标准的酶动力学测定来确定候选化合物的切割速率,并且将其与被选择为模拟细胞外介质的条件下的速率相比较。

[0458] 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0459] 在另一个实施例中,可切割连接物包括一种基于磷酸酯的可切割的连接基团。基于磷酸酯的可切割的连接基团通过降解或水解该磷酸酯基团的因子而被切割。一种在细胞中切割磷酸酯基团的因子的实例是酶,例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例是-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。优选的实施例是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、-O-P(S)(H)-S-。一个优选的实施例是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评估这些候选者。

[0460] 酸可切割连接基团

[0461] 在另一个实施例中,可切割连接物包括一种酸可切割的连接基团。酸可切割的连接基团是在酸性条件下被切割的一种连接基团。在优选的实施例中,酸可切割的连接基团在一个具有大约6.5或更低(例如大约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的pH的酸性环境中被切割,或者被多种因子(例如可以作为一种广义酸起作用的酶)切割。在细胞中,具体的低pH细胞器(例如核内体或溶酶体)可以提供针对酸可切割的连接基团的切割环境。酸可切割的连接基团的实例包括但不限于脞、酯以及氨基酸的酯。酸可切割的基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。一个优选的实施例是当附接至酯(烷氧基基团)的氧的碳是芳基基团、经取代的烷基基团或叔烷基基团(例如二甲基戊基或叔丁基)时。可以使用类似于

以上描述的那些方法来评估这些候选者。

[0462] 基于酯的可切割的连接基团

[0463] 在另一个实施例中,可切割连接物包括一种基于酯的可切割的连接基团。基于酯的可切割的连接基团通过酶(例如细胞中的酯酶与酰胺酶)而被切割。基于酯的可切割的连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基以及亚炔基的酯。酯可切割的连接基团具有通式 $-C(O)O-$ 、或 $-OC(O)-$ 。可以使用类似于以上描述的那些方法来评估这些候选者。

[0464] 基于肽的可切割的连接基团

[0465] 在又一个实施例中,可切割连接物包括一种基于肽的可切割的连接基团。基于肽的可切割的连接基团通过酶(例如细胞中的肽酶与蛋白酶)而被切割。基于肽的可切割的连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如二肽、三肽,等等)以及多肽的肽键。基于肽的可切割的基团不包括酰胺基团($-C(O)NH-$)。该酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的特定类型的酰胺键。该基于肽的可切割的基团总体上限于在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的肽键(即,酰胺键),并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割的连接基团具有通式 $-NHCH(RA)C(O)NHCH(RB)C(O)-$ (SEQ ID NO:13),其中RA与RB是这两个邻接氨基酸的R基团。可以使用类似于以上描述的那些方法来评估这些候选者。

[0466] 传授RNA共轭物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928以及5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;8,106,022,每一者的全部内容特此通过引用结合于此。

[0467] 给定化合物中的全部位置不必要一致地经修饰,并且实际上可以在单个化合物中或甚至在iRNA内部的单个核苷处掺入多于一个前述修饰。本发明也包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0468] 在本发明的上下文中,“嵌合的”iRNA化合物或“嵌合体”是以下这样的iRNA化合物,例如,dsRNA,它们包含两个或更多个化学上不同的区域,每者由至少一个单体单元构成,即,在dsRNA化合物的情况下的一种核苷酸。这些iRNA一般含有至少一个区域,其中RNA经修饰,从而赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的靶核酸结合亲和力。iRNA的另外区域可以充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交分子的酶的底物。举例而言,RNase H是一种切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。因此,RNase H的激活导致RNA靶的切割,因而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,可以在使用嵌合dsRNA时,经常用较短的iRNA获得可比较的结果。可以常规地通过凝胶电泳并且如果必要的话联合本领域内已知的核酸杂交技术来检测该RNA靶标的切割。

[0469] 在某些实例中,iRNA的RNA可以通过非配体基团来进行修饰。一些非配体分子已经被共轭至iRNA以增强该iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且用于进行此类共轭的程序在科学文献中是可得。此类非配体部分已经包括脂质部分例如胆固醇(库博(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;乐欣格(Letsinger)等人,美国科学院院刊,1989,86:6553)、胆酸(马诺汗(Manoharan)等人,生物有机化学与医药化学快报(Bioorg.Med.Chem.Lett.),1994,4:1053)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(马诺汗等人,纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.),1992,660:306;马诺汗等人,生物有机化学与医药化学快报,1993,3:2765)、硫代胆固醇(奥博汗瑟(Oberhauser)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),1992,20:533)、脂肪链如十二烷基二醇或十一烷基残基(赛森-博和马拉(Saison-Behmoaras)等人,EMBO J.,1991,10:111;卡波诺(Kabanov)等人,FEBS Lett.,1990,259:327;斯伍那区克(Svinarchuk)等人,生物化学(Biochimie),1993,75:49)、磷脂如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯(马诺汗等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.),1995,36:3651;舍阿(Shea)等人,核酸研究,1990,18:3777)、聚胺或聚乙烯乙二醇链(马诺汗等人,核苷&核苷酸(Nucleosides&Nucleotides),1995,14:969),或金刚烷乙酸(马诺汗等人,四面体通讯,1995,36:3651)、棕榈基部分(米莎(Mishra)等人,生物化学与生物物理学学报(Biochim.Biophys.Acta),1995,1264:229),或十八胺或己胺-羧基-羟胆固醇部分(克鲁克(Crooke)等人,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),1996,277:923)。教授制备这类RNA共轭物的代表性美国专利已经在上文列出。典型的共轭方案涉及在序列的一个或多个位置具有氨基连接物的RNA的合成。然后使用适当的偶联剂或活化剂使该氨基基团与被共轭的分子进行反应。共轭反应可以用仍与固相支持物结合或在切割RNA后处于溶液相的RNA进行。通过HPLC纯化RNA共轭物一般提供纯的共轭物。

[0470] iRNA的递送

[0471] 可以按许多不同方式实现向有需求的受试者递送iRNA。可以通过向受试者施用包含iRNA(例如dsRNA)的组合物,直接进行体内递送。可选地,可以通过施用编码和指导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行递送。这些替代方案在后文进一步论述。

[0472] 直接递送

[0473] 通常,递送核酸分子的任何方法可以适应于随iRNA使用(参见例如,阿赫塔尔(Akhtar S.)和朱利安(Julian RL.) (1992) 细胞生物学趋势(Trends Cell.Biol.) 2(5):139-144和W094/02595,所述文献通过引用的方式完整结合在此)。然而,存在认为对体内成功递送iRNA分子重要的三种因素:(a) 所递送分子的生物学稳定性,(2) 防止非特异性作用,和(3) 所递送分子在靶组织中的积累。可以通过局部施用,例如通过直接注射或植入至组织中(作为非限制性例子,肿瘤)或局部施用该试剂,使siRNA的非特异性作用最小化。局部施用至治疗部位使试剂的局部浓度最大化,限制该试剂向全身组织的暴露,所述全身组织否则可能受试剂损害或可能降解该试剂,并且允许较低总剂量的iRNA分子施用。几项研究已经显示在局部施用iRNA时成功敲减基因产物。例如,在食蟹猴中通过玻璃体内注射眼球内递送VEGF dsRNA(托伦蒂诺(Tolentino,MJ.)等人(2004) 视网膜(Retina) 24:132-138)和在鼠中视网膜下注射(赖希(Reich,SJ.)等人(2003) 分子视觉(Mol.Vis.) 9:210-216)眼球内递送VEGF dsRNA均显示在年龄相关性黄斑变性的实验模型中防止血管新生。此外,在小

鼠中直接肿瘤内注射dsRNA缩减肿瘤体积(派乐(Pille,J.)等人(2005)分子治疗(Mol.Ther.) 11:267-274)并且可以延长带瘤小鼠的存活(金姆(Kim,WJ.)等人(2006)分子治疗14:343-350;李(Li,S.)等人(2007)分子治疗15:515-523)。也已经显示通过直接注射将RNA干扰成功局部递至CNS(多恩(Dorn,G.)等人(2004)核酸(Nucleic Acids) 32:e49;谭(Tan,PH.)等人(2005)基因疗法(Gene Ther.) 12:59-66;牧村(Makimura,H.)等人(2002)BMC神经科学(BMC Neurosci.) 3:18;斯卡拉(Shishkina,GT.)等人(2004)神经科学(Neuroscience) 129:521-528;塔克尔(Thakker,ER.)等人(2004)美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.) 101:17270-17275;阿卡亚(Akaneya,Y.)等人(2005)神经生理学杂志(J.Neurophysiol.) 93:594-602并且通过鼻内施用成功递送至肺(霍华德(Howard,KA.)等人(2006)分子疗法(Mol.Ther.) 14:476-484;张(Zhang,X.)等人(2004)生物化学(J.Biol.Chem.) 279:10677-10684;比托卡(Bitko,V.)等人(2005)自然医学(Nat.Med.) 11:50-55)。对于全身性施用iRNA以便治疗疾病,可以将RNA修饰或可替代地使用药物递送系统递送;两种方法均起到防止dsRNA被体内核酸内切酶和外切酶快速降解的作用。

[0474] RNA或药用载体的修饰也可以允许iRNA组合物靶向至靶标组织并避免不想要的脱靶效应。iRNA分子可以通过化学共轭至其他基团如在此所述的脂质或碳水化合物基团以进行修饰。此类共轭物可用于将iRNA靶向特定细胞,例如,肝脏细胞(liver cell),像肝上皮实质细胞(hepatocyte)。例如,GalNAc共轭物或脂质(例如,LNP)配制品可用于将iRNA靶向特定细胞,例如,肝脏细胞,像肝上皮实质细胞。

[0475] 亲脂性基团如胆固醇以增强细胞摄取并预防降解。例如,将与亲脂性胆固醇部分共轭的针对ApoB的iRNA全身注射至小鼠并且导致肝脏和空肠中apoB mRNA的敲低(索特切克(Soutschek,J.)等人(2004)自然(Nature) 432:173-178)。iRNA与适配体的共轭已经在前列腺癌的小鼠模型中显示抑制肿瘤生长并介导肿瘤消退(麦克纳马拉(McNamara,JO.)等人(2006)自然生物技术(Nat.Biotechnol.) 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iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)iRNA分子的结合并且也在带负电荷的细胞膜增强相互作用以允许iRNA由细胞高效摄取。阳离子脂质、树状物或聚合物可以与iRNA结合或被诱导以形成包装siRNA的囊泡或胶束(见例如,金姆(Kim SH.)等人(2008)缓释杂志(Journal of Controlled Release) 129(2):107-116)。囊泡或胶束的形成进一步防止全身施用时iRNA的降解。用于制造和施用阳离子-iRNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(见例如,索伦森(Sorensen,DR.)等人(2003)分子化学杂志(J.Mol.Biol) 327:761-766;维尔马(Verma,UN.)等人(2003)临床癌症研究(Clin.Cancer Res.) 9:1291-1300;阿诺德(Arnold,AS)等人(2007)高血压杂志(J.Hypertens.) 25:197-205,所述文献通过引用方式完整结合在此)。用于系统递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(索伦森(Sorensen,DR.),等人(2003),同上;维尔马(Verma,UN.),等人(2003),同上)、Oligofectamine,“固态核酸脂质颗粒(solid nucleic acid lipid particles)”(齐默尔曼(Zimmermann,TS.),等人(2006)自然(Nature) 441:111-114)、心磷脂(cardiolipin)(钱(Chien,PY.),等人(2005)癌症基因疗法(Cancer Gene Ther.) 12:321-328;帕尔(Pal,A.),等人(2005)肿瘤学国际杂志(Int J.Oncol.) 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺(邦内特(Bonnet

ME.), 等人 (2008) 药物研究 (Pharm. Res.) 8月16日, Aug 16先于印刷版的电子公开; 艾格纳 (Aigner, A.) (2006) 生物医药与生物技术杂志 (J. Biomed. Biotechnol.) 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) 肽 (刘 (Liu, S.) (2006) 分子药理学 (Mol. Pharm.) 3:472-487)、以及聚酰胺 (托马利亚 (Tomalia, D.A.), 等人 (2007) 生化学会会报 (Biochem. Soc. Trans.) 35:61-67; 姚 (Yoo, H.), 等人 (1999) 药物研究 (Pharm. Res.) 16:1799-1804)。在一些实施例中, iRNA与环糊精形成用于全身性施用的复合物。用于施用iRNA和环糊精的药物组合物的方法可以在美国专利号7,427,605中找到, 所述专利通过引用方式完整地结合在此。

[0476] 载体编码的iRNA

[0477] 在另一个方面, 靶向ALAS1基因的iRNA可以从插入DNA或RNA载体中的转录单位表达 (见, 例如, 卡秋尔 (Couture, A) 等人, TIG. (1996), 12:5-10; 思科勒尔 (Skillern, A.) 等人, 国际PCT公开号WO 00/22113, 卡雷德 (Conrad), 国际PCT公开号WO 00/22114, 和卡雷德 (Conrad), 美国专利号6,054,299)。取决于使用的具体构建体和靶组织或细胞类型, 表达可以是瞬时的 (在小时至周数量级上) 或持续的 (数周至数月或更长时间)。可以将这些转基因作为线性构建体、环状质粒或可以是整合或非整合载体的病毒载体引入。转基因也可以如此构建以允许它作为染色体外质粒遗传 (加斯曼 (Gassmann) 等人, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) (1995) 92:1292)。

[0478] iRNA的单条链或多条链可以从表达载体上的启动子转录。在两条单独的链待表达以产生例如dsRNA的情况下, 可以将两个单独表达载体共引入 (例如, 通过转染或感染) 靶标细胞中。可替代地, dsRNA的每条单独链可以由均位于相同表达质粒上的启动子转录。在一个实施例中, dsRNA表达为被一种连接物多核苷酸序列连接的反向重复, 由此该dsRNA具有茎环结构。

[0479] iRNA表达载体典型地是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞, 例如, 与脊椎动物细胞相容的表达载体, 可以用来产生表达如本文所述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域熟知的并且从许多商业来源可获得。典型地, 此类载体含有用于插入所需核酸区段的便利限制性位点。表达iRNA的载体的递送可以是全身性的, 如通过静脉内或肌肉施用, 通过施用至从患者移植出来、随后重新引入患者的靶细胞或通过允许向所希望的靶细胞引入的任何其他手段。

[0480] 可以将iRNA表达质粒作为与阳离子脂质载体 (例如, Oligofectamine) 或基于非阳离子脂质的载体 (例如, Transit-TKO™) 的复合物转染至靶标细胞中。本发明也构思了在一周或更长时间范围内用于iRNA介导的靶向靶RNA不同区域的敲减的多次脂质转染。成功地将载体引入宿主细胞可以使用多种已知的方法来监测。例如瞬时转染可以使用一种报告物来进行信号化, 例如荧光标记, 例如绿色荧光蛋白 (GFP)。稳定的对离体细胞的转染可以使用以下这样的标记来进行确保: 这些标记为被转染的细胞提供了对特定环境因子 (例如抗生素或药物) 的抗性, 例如潮霉素B抗性。

[0481] 可以随本文所述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不限于 (a) 腺病毒载体; (b) 逆转录病毒载体, 包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病病毒等; (c) 腺联病毒载体; (d) 单纯疱疹病毒载体; (e) SV40载体; (f) 多瘤病毒载体; (g) 乳头瘤病毒载体; (h) 小RNA病毒载体; (i) 痘病毒载体如正痘病毒, 例如, 痘苗病毒载体或禽痘病毒, 例如金丝雀痘病毒或鸡痘病毒; 和 (j) 辅助病毒依赖性或不肠腺病毒。复制缺陷型病毒也可以有利

的。不同的载体将并入或将不并入细胞的基因组中。如果需要,构建体可以包含病毒序列以用于转染。可替代地,构建体可以并入能够发生附加型复制的载体(例如EPV和EBV载体)中。用于重组表达iRNA的构建体通常将需要调节元件,例如,启动子、增强子等,以确保iRNA在靶标细胞中的表达。下文进一步描述针对载体和构建体考虑的其他方面。

[0482] 可用于递送iRNA的载体将包括足以在所需靶细胞或组织中表达iRNA的调节元件(启动子、增强子等)。可以选择调节元件以提供组成型或调节/诱导型表达。

[0483] 可以精确地调节iRNA的表达,例如,通过使用对某些生理调节剂(例如,循环型葡萄糖水平或激素)敏感的诱导型调节序列(多赫替(Docherty)等人,1994,FASEB J.8:20-24)。适合于在细胞中或哺乳动物中控制dsRNA表达的此类可诱导的表达系统包括,例如,由以下项进行的调节:蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚作用的化学诱导物、以及异丙基- β -D1-硫代半乳糖苷(IPTG)。本领域技术人员将能够基于iRNA转基因的预期用途选择适宜的调节/启动子序列。

[0484] 在一个具体实施例中,可以使用含有编码iRNA的核酸序列的病毒载体。例如,可以使用逆转录病毒载体(见米勒(Miller)等人,酶学方法(Meth.Enzymol.) 217:581-599(1993))。这些逆转录病毒载体含有对于病毒基因组正确包装并整合入宿主细胞DNA必需的组件。将编码iRNA的核酸序列克隆至促进该核酸递送入患者的一种或多种载体中。关于逆转录病毒载体的更多细节可以在例如博恩(Boesen)等人,生物疗法(Biotherapy) 6:291-302(1994)找到,所述文献描述使用逆转录病毒载体递送mdr1基因至造血干细胞,以便使得干细胞对化疗更耐受。说明基因治疗中逆转录病毒载体用途的其他参考文献是:克洛斯(Clows)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.) 93:644-651(1994);凯恩(Kiem)等人,血液(Blood) 83:1467-1473(1994);萨尔蒙斯(Salmons)和古兹伯格(Gunzberg),人类基因疗法(Human Gene Therapy) 4:129-141(1993);以及格罗斯曼(Grossman)和威尔逊(Wilson),遗传发育新见(Curr.Opin.in Genetics and Devel.) 3:110-114(1993)。构思使用的慢病毒载体例如包括基于HIV的载体,这些载体在美国专利号6,143,520;5,665,557;和5,981,276中描述,所述专利通过引用方式结合在此。

[0485] 也构思腺病毒用于iRNA的递送。腺病毒是特别有吸引力的媒介物,例如,用于递送基因至呼吸道上皮。腺病毒天然地感染呼吸道上皮,在那里它们引起轻微疾病。基于腺病毒的递送系统的其他靶是肝脏、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感染不分裂细胞的优点。Kozarsky和Wilson,遗传与发育现行观点(Current Opinion in Genetics and Development) 3:499-503(1993)提供了腺病毒基因治疗的综述。布特(Bout)等人,人类基因疗法(Human Gene Therapy) 5:3-10(1994)展示了腺病毒载体转移基因至恒河猴呼吸道上皮的用途。基因治疗中使用腺病毒的其他例子可以在罗森菲尔(Rosenfeld)等人,科学(Science) 252:431-434(1991);罗森菲尔(Rosenfeld)等人,细胞(Cell) 68:143-155(1992);玛莎格力(Mastrangeli)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.) 91:225-234(1993);PCT公开W0 94/12649;和王(Wang)等人,基因疗法(Gene Therapy) 2:775-783(1995)中找到。用于表达本发明中表征的iRNA的合适AV载体、用于构建重组AV载体的方法和用于递送该载体至靶标细胞中的方法在夏(Xia H)等人,(2002),自然生物技术(Nat.Biotech.) 20:1006-1010中描述。

[0486] 也构思使用腺联病毒(AAV)载体(沃尔什(Walsh)等人,美国实验生物学和医学学

会学报 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.) 204:289-300 (1993); 美国专利号5,436,146)。在一个实施例中, iRNA可以从具有例如U6或H1RNA启动子或细胞巨化病毒 (CMV) 启动子的重组AAV载体作为两个单独的互补性单链RNA分子表达。用于表达本发明中表征的dsRNA的合适AAV载体、用于构建重组AV载体的方法和用于递送该载体至靶标细胞中的方法在萨穆尔斯基 (Samulski R) 等人 (1987)、病毒学杂志 (J. Virol.) 61:3096-3101; 费希尔 (Fisher K J) 等人 (1996)、病毒学杂志 (J. Virol.) , 70:520-532; 萨穆尔斯基 (Samulski R) 等人 (1989)、病毒学杂志 (J. Virol.) 63:3822-3826; 美国专利号5,252,479; 美国专利号5,139,941; 国际专利申请号W0 94/13788; 和国际专利申请号W0 93/24641中描述, 所述文献的完整内容通过引用方式并入本文

[0487] 另一种典型的病毒载体是痘病毒如痘苗病毒, 例如减毒痘苗病毒如修饰的安卡拉病毒 (MVA) 或NYVAC、禽痘病毒如鸡痘病毒或金丝雀痘病毒。

[0488] 病毒载体的向性可以通过用包膜蛋白或来自其他病毒的其他表面抗原来对这些载体假型化而进行修饰, 或者适当时通过取代不同的病毒衣壳蛋白而进行修饰。例如慢病毒载体可以是来自水泡性口炎病毒 (VSV)、狂犬病病毒、埃博拉病毒、Mokola等的表面蛋白进行假病毒化。可以通过将载体工程化以表达不同血清型的衣壳蛋白, 使得AAV载体靶向不同的细胞; 见, 例如, 拉比诺维茨 (Rabinowitz J E) 等人, (2002), 病毒学杂志 (J. Virol.) 76:791-801, 所述文献的完整内容通过引用方式结合在此。

[0489] 载体的药物制剂可以包括在一种可接受的稀释剂中的该载体, 或者可以包括一种缓释基质, 该基因递送媒介物被嵌入其中。可替代地, 当该完全的基因递送载体可以从重组细胞 (例如逆转录病毒载体) 完整地产出的情况下, 该药物制剂可以包括产出该基因递送系统的一个或多个细胞。

[0490] III. 含有iRNA的药物组合物

[0491] 在一个实施例中, 本发明提供了包含如在此所描述的iRNA以及一种药学上可接受的载体的药物组合物。包含该iRNA的药物组合物对于治疗与ALAS1基因表达或活性相关的疾病或失调 (例如, 涉及卟啉途径的失调) 而言是有用的。此类药物组合物基于递送模式而进行配制。例如, 可以经配制以便通过肠胃外递送, 例如, 通过静脉内 (IV) 递送来全身性施用的组合物。在一些实施例中, 在此提供的组合物 (例如, LNP配制品) 被配制以用于静脉内递送。在一些实施例中, 在此提供的组合物 (例如, 包含GalNAc共轭物的组合物) 被配制以用于皮下递送。

[0492] 在此表征的药物组合物以足以抑制ALAS1基因表达的剂量给予。通常, iRNA的适合剂量处于每日受体每千克体重0.01毫至200.0毫克范围内, 通常处于每日受体每千克体重1至50mg范围内。例如, dsRNA可以按每单剂量0.05mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg或50mg/kg施用。可以将该药物组合物一日给予一次, 或者可以将该iRNA在一天内以适当的间隔给予两次、三次或更多次亚-剂量, 或者甚至可以通过控释制剂使用连续输注或递送而给予。在这种情况下, 每个亚-剂量中所含的iRNA必须相应地更少, 以便实现每日总剂量。也可以将剂量单位复配用于在几天内递送, 例如使用在几天时间范围内提供持久iRNA释放的常规持续释放配制品。持续释放配制品在本领域内是熟知的并且对于在特定部位递送试剂是特别有用的, 由此可以与本发明的试剂使用。在这一实施例中, 该剂量单位包含相应的多个每日剂量。

[0493] 单一剂量对ALAS1水平的影响可以长久持续,从而后续剂量以不多于3、4或5天的间距或以不多于1、2、3,或4周的间距施用。

[0494] 本领域技术人员将理解,某些因素可以影响有效治疗一个受试者所需的剂量和时间安排,这些因素包括(但不局限于)疾病或病症的严重性、之前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄、以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效剂量的组合物治疗一个受试者可以包括单一治疗或者一系列治疗。如本文中他处描述,使用常规方法或基于使用适宜动物模型的体内测试,可以估计本发明涵盖的各个iRNA的有效剂量和体内半寿期。

[0495] 小鼠遗传学的进展已经产生了用于不同人类疾病研究的大量小鼠模型,例如与ALAS1表达相关的病理过程(例如,涉及卟啉或卟啉途径缺陷的病理过程,例如,像卟啉症)。这类模型可以用于iRNA的体内测试,以及用于确定治疗有效剂量和/或有效剂量方案。

[0496] 适合的小鼠模型例如是含有表达人ALAS1的转基因的小鼠。具有敲入突变(例如,与人类中的急性肝性卟啉症相关联的突变)的小鼠可以用于确定治疗有效剂量和/或ALAS1siRNA给予的持续时间。本发明还包括了包含在本发明中表征的iRNA化合物的药物组合物和配制品。取决于希望局部还是系统性治疗以及取决于有待治疗的区域,可以将本发明的药物组合物按许多方式给予。给予可以是局部的(例如,通过透皮贴剂);肺的;例如通过粉末或气溶剂的吸入或吹入,包括通过喷雾器;气管内的;鼻内的;表皮的以及经皮的、经口的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内的、动脉内的、皮下的、腹膜内的或肌内的注射或输注;真皮下的,例如,经由植入性器械;或颅内的,例如实质内的、鞘内的或心室内的给予。

[0497] iRNA可以按这样的方式递送以靶向特定组织,如产生红细胞的组织。例如,iRNA可以被递送至骨髓、肝脏(例如,肝脏肝细胞)、淋巴结、脾、肺(例如,肺胸膜)或脊椎。在一个实施例中,iRNA被递送至骨髓。

[0498] 用于局部给予的药物组合物以及配制品可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉末。常规的药物载体、水、粉末或油基、增稠剂等等可以是必要的或希望的。包衣的避孕套、手套等等也可以是有用的。适合的局部用配制品包括其中本发明中表征的iRNA与局部用递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。适合的脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子脂质和脂质体(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明中表征的iRNA可以封装于脂质体内部或可以与其、尤其与阳离子脂质体形成复合物。可选地,iRNA可以与脂质、尤其与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸与酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、花生酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、或C₁₋₂₀烷基酯(例如,异丙基肉豆蔻酸酯IPM)、甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部用配制品在美国专利号6,747,014中详细描述,所述专利通过引用方式结合在此。

[0499] 脂质体配制品

[0500] 除了已经被研究过并且用于药物的配制的微乳剂之外,还存在许多有组织的表面活性剂结构。这些包括单分子层、微粒、双分子层以及囊泡。囊泡(比如脂质体)由于其特异性以及它们从药物递送方面所提供的的作用持续时间而引起人们很大兴趣。如在本发明中所

使用的,术语“脂质体”意为一种由以球形双分子层或双分子层排列的两亲性分子脂质构成的囊泡。

[0501] 脂质体是单层的或多层的囊泡,其具有一个形成自亲脂材料的膜以及一个水性内部。该水性部分包含有待递送的组合物。阳离子脂质体具有能够融合至细胞壁的优势。非阳离子脂质体尽管不能够一样有效地与细胞壁融合,但是可以被体内巨噬细胞摄取。

[0502] 为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适合透皮梯度的影响下通过一系列细孔,每个细孔具有小于50nm的直径。因此,希望的是使用高度可变形并且能够穿过这些细孔的脂质体。

[0503] 脂质体的其他优点包括;从天然磷脂获得的脂质体是生物相容和生物可降解的;脂质体可以并入广泛类型的水溶性和脂溶性药物;脂质体可以在其内部区室中保护封装的药物免受代谢和降解(洛索夫(Rosoff),药用剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),利伯曼(Lieberman),里格尔(Rieger)和班克(Banker)(编著)、1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约, N.Y.,第1卷,第245页)。在制备脂质体配制品方面的重要的考虑是脂质表面电荷、囊泡尺寸以及这些脂质体的水性体积。

[0504] 脂质体对于将活性成分转移以及递送至作用位点是有用的。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜,所以当脂质体被应用至一个组织时,这些脂质体开始与这些细胞膜合并,并且随着脂质体的合并和细胞进程,这些脂质体的内容物被排空进入该细胞,在这里活性剂可以起作用。

[0505] 脂质体配制品已经作为许多药品的递送的模型成为广泛研究的焦点。越来越多的证据表明,对于局部给予而言,脂质体呈现超出其他制剂的一些优势。这些优势包括:减少的与所给予药物的高系统性吸收相关的副作用、在希望的靶标处所给予药物的增加的积累、以及将广泛种类的药物(亲水的与疏水的两者)给予进入皮肤的能力。

[0506] 一些报告已经详述了脂质体递送试剂(包括高分子量的DNA)进入皮肤的能力。已经将包括镇痛药、抗体、激素以及高分子量DNA的化合物给予至皮肤。大多数的应用导致靶向上表皮

[0507] 脂质体有两个广泛的类别。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的DNA分子相互作用而形成一种稳定的复合体。该带正电荷的DNA/脂质体复合物结合至带负电荷的细胞表面并且内化在内涵体中。由于内涵体内部的酸性pH,脂质体破裂,释放它们的内容物至细胞胞质中(王(Wang)等人,生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.),1987,147,980-985)。

[0508] pH敏感的或带负电荷的脂质体捕获DNA而不是与其形成复合体。由于该DNA与该脂质是带类似的电荷,所以形成排斥而不是复合。然而,一些DNA包埋于这些脂质体的含水内部。pH-敏感脂质体已经用来递送编码胸苷激酶基因的DNA至培养的细胞单层。在靶标细胞内检测到外源基因的表达(周(Zhou)等人,控释杂志(Journal of Controlled Release),1992,19,269-274)。

[0509] 脂质体组合物的一个主要类型包括磷脂而不是天然衍生的磷脂酰胆碱。例如中性脂质体组合物可以形成自二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)。阴离子脂质体组合物通常可以形成自二肉豆蔻酰磷脂酰甘油,而阴离子融合脂质体主要形成自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。另一类型的脂质体组合物形成自磷脂酰胆碱(PC),例如

像大豆PC,蛋PC。另一个类型形成自磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物。

[0510] 一些研究已经评价了脂质体药物制剂至皮肤的局部递送。将包含干扰素的脂质体应用至天竺鼠皮肤导致皮肤疱疹溃疡的减少,而通过其他手段的干扰素递送(例如,作为溶液或作为乳剂)是无效的(维纳(Weiner)等人,药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting),1992,2,405-410)。此外,另外的研究测试了作为脂质体制剂的一部分而给予的干扰素与使用水性系统而给予的干扰素的疗效,并且总结出该脂质体制剂优于水性给予(杜普利斯(du Plessis)等人,抗病毒研究(Antiviral Research),1992,18,259-265)。

[0511] 非离子型脂质体系统也已经得以检验以确定它们在递送药物至皮肤方面的实用性,特别是包括非离子型表面活性剂以及胆固醇的系统。包括Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)以及Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)的非离子型脂质体制剂用于将环孢霉素A递送入小鼠皮肤的真皮。结果表明此类非离子型脂质体系统在促进环孢霉素A沉积进入皮肤的不同层之内方面是有效的(胡(Hu)等人,S.T.P.药物科学(S.T.P.Pharma.Sci.),1994,4,6,466)。

[0512] 脂质体还包括“立体化学稳定的”脂质体,这个术语如在此使用的指包括一种或多种专门化脂质的脂质体,当并入脂质体中时这些脂质导致相对于缺少此类专门化脂质的脂质体而言的增加的循环寿命。立体化学稳定的脂质体的实例是以下那些:在其中该脂质体的形成囊泡的脂质部分中的一部分(A)包括一种或多种糖脂,例如单唾液酸神经节苷酯GM1,或者(B)是用一种或多种亲水聚合物衍生,例如聚乙二醇(PEG)部分。虽然不希望受任何具体理论束缚,但是本领域认为,至少对于包含神经节苷酯、鞘磷脂或PEG-衍生脂质的立体化学稳定的脂质体而言,这些立体化学稳定的脂质体的增加的循环半寿期是由于进入网状内皮系统(RES)细胞的减少的摄取(阿勒(Allen)等人,FEBS Letters,1987,223,42;吴(Wu)等人,癌症研究(Cancer Research),1993,53,3765)。

[0513] 包括一种或多种糖脂的不同脂质体在本领域内是已知的。帕帕哈都久珀罗斯(Papahadjopoulos)等人(纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.,1987,507,64))报道了单唾液酸神经节苷酯GM1、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半寿期的能力。这些研究结果由加布吉(Gabizon)等人(美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.),1988,85,6949)阐释。均为艾伦(Allen)等人的美国专利号4,837,028和W088/04924披露了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂GM1或硫酸半乳糖脑苷脂的脂质体。美国专利号5,543,152(韦伯(Webb)等人)披露了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻磷脂酰胆碱的脂质体在W0 97/13499(利姆(Lim)等人)中披露。

[0514] 含有由一种或多种亲水性聚合物衍生化的脂质的许多脂质体及其制备方法是本领域已知的。熊本(Sunamoto)等人(日本化学学会公报(Bull.Chem.Soc.Jpn.),1980,53,2778)描述包含非离子去垢剂2C₁₂15G的脂质体,所述脂质体含有PEG部分。伊录姆(Illum)等人(FEBS Lett.,1984,167,79)报道了用聚合物二醇对聚苯乙烯颗粒的亲水包覆导致显著增长的血液半寿期。通过附接聚二醇(例如,PEG)的羧基所修饰的合成磷脂由Sears描述(美国专利号4,426,330和4,534,899)。克利巴诺夫(Klibanov)等人(FEBS Lett.,1990,268,235)描述了展示以下的实验:包含用PEG或PEG硬脂酸酯衍生化的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质体具有显著增加的血液循环半寿期。布鲁姆(Blume)等人(生物化学与生物物理学学报(Biochimica et Biophysica Acta),1990,1029,91)将这类观察结果扩展至其他PEG衍生

化的磷脂,例如,由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)和PEG的组合形成的DSPE-PEG。授予Fisher的欧洲专利号EP 0445131B1和WO 90/04384中描述了在它们的外表面上具有共价结合的PEG部分的脂质体。含有1摩尔%-20摩尔%用PEG衍生化的PE的脂质体组合物及其使用方法由Woodle等人(美国专利号5,013,556和5,356,633)和马丁(Martin)等人(美国专利号5,213,804和欧洲专利号EP0496813B1)描述。包含许多其他脂质聚合共轭物的脂质体在WO 91/05545和美国专利号5,225,212(均授予马丁(Martin)等人)中和在WO 94/20073(Zalipsky等人)中公开包括PEG修饰的神经酰胺脂质的脂质体描述于WO 96/10391(佐伊(Choi)等人)中。美国专利号5,540,935(宫崎(Miyazaki)等人)以及美国专利号5,556,948(田川(Tagawa)等人)描述了包含PEG的脂质体,它们可以进一步被官能部分在其表面进行衍生化。

[0515] 一些包括核酸的脂质体在本领域内是已知的。授予蒂埃里(Thierry)等人的WO 96/40062公开了在脂质体中封装高分子量核酸的方法。授予田川(Tagawa)等人的美国专利号5,264,221公开了结合蛋白质的脂质体并且声称这类脂质体的内容物可以包含dsRNA。授予拉赫曼(Rahman)等人的美国专利号5,665,710描述在脂质体中封装寡脱氧核苷酸的某些方法。授予洛夫(Love)等人的WO 97/04787公开了包含靶向raf基因的dsRNA的脂质体。

[0516] 传递体是又另一种类型的脂质体,并且是高度可变形的脂质聚集物,它们是用于药物递送媒介物的引人注目的候选者。传递体可以描述为脂滴,其是高度可变形从而它们能够容易地穿过比该脂滴更小的孔。传递体能适应在其中使用它们的环境,例如它们是自优化性的(能适应皮肤中孔的形状)、自我修复性的、频繁地到达它们的靶标而不片段化,并且通常是自我负载性的。为了制备传递体,可能的是将表面边缘激活剂(通常是表面活性剂)添加至一种标准的脂质体组合物。传递体已经被用于递送血清白蛋白至皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已经显示与包含血清白蛋白的溶液的皮下注射同样有效。

[0517] 表面活性剂在配制品(例如乳剂(包括微乳剂)以及脂质体)中有广泛应用。对许多不同类型的表面活性剂(天然的与合成的)的特性进行分类与评级的最普通的方法是通过亲水/亲油平衡值(HLB)的使用。亲水基团(也称作“头”)的性质提供了用于对在配制品中使用的不同表面活性剂进行分类的最有用的手段(列赫尔(Rieger),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,1988,285页)。

[0518] 如果该表面活性剂分子没有离子化,它被分类为一种非离子型表面活性剂。发现非离子型表面活性剂在药物与化妆品产品方面有广泛应用并且能够在广泛的pH范围使用。总体上,取决于它们的结构,它们的HLB值范围为从2至大约18。非离子型表面活性剂包括非离子型酯,例如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯以及乙氧基化酯。非离子型烷醇酰胺以及醚(例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇、以及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物)也包括在这一类别中。聚氧乙烯表面活性剂是该非离子型表面活性剂类别中最常用的成员。

[0519] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带负电荷,则该表面活性剂被分类为阴离子型。阴离子型表面活性剂包括羧化物(例如皂)、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯(例如烷基硫酸酯以及乙氧基化的烷基硫酸酯)、磺酸酯(例如烷基苯磺酸酯、酰基羟乙基磺酸酯、酰基牛磺酸酯以及磺基琥珀酸酯)、以及磷酸酯。该阴离子型表面活性剂

类别中最重要的成员是烷基硫酸酯以及皂类。

[0520] 如果该表面活性剂分子在其溶解或分散在水中时携带正电荷,则该表面活性剂被分类为阳离子型。阳离子型表面活性剂包括季铵盐以及乙氧基化胺。这些季铵盐是这一类别的最常用的成员。

[0521] 如果该表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,该表面活性剂被分类为两性型。两性型表面活性剂包括丙烯酸衍生物、经取代的烷基胺、N-烷基甜菜碱以及磷脂。

[0522] 已经综述了表面活性剂在药品、配制品和在乳剂中的用途(列赫尔(Rieger),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,1988,285页)。

[0523] 核酸脂质颗粒

[0524] 在一个实施例中,本发明表征的ALAS1dsRNA被完全包囊在脂质配制品中,从而例如形成一种SPLP、pSPLP、SNALP或其他核酸-脂质颗粒。如在此使用的,术语“SNALP”指一种稳定的核酸-脂质颗粒,包括SPLP。如在此使用的,术语“SPLP”指一种核酸-脂质颗粒,其包括包囊在脂质囊泡中的质粒DNA。SNALP与SPLP典型地包含一种阳离子脂质、一种非阳离子脂质以及一种阻止该颗粒聚集的脂质(例如一种PEG-脂质共轭物)。SNALP与SPLP对于合成应用是极其有用的,因为它们展示出在静脉内(i.v.)注射之后延长的循环寿命并且在远端位点积累(例如在与给予位点物理分开的位点)。SPLP包括“pSPLP”,pSPLP包括一种包囊化的缩合剂-核酸复合体,如在PCT公开号WO 00/03683中所提出的。本发明的颗粒典型地具有大约50nm至大约150nm,更典型地是大约60nm至大约130nm,更典型地是大约70nm至大约110nm,最典型地是大约70nm至大约90nm的平均直径,并且基本上是无毒的。另外,当出现在本发明的核酸-脂质颗粒中时,这些核酸在水溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒和它们制备方法在例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;和PCT公开号WO 96/40964中公开。

[0525] 在一个实施例中,脂质与药物的比率(质量/质量比率)(例如脂质与dsRNA的比率)将处于从大约1:1至大约50:1,从大约1:1至大约25:1,从大约3:1至大约15:1,从大约4:1至大约10:1,从大约5:1至大约9:1,或大约6:1至大约9:1的范围内。

[0526] 阳离子脂质可以是例如,N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂酰-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基(DiLinoleyloxy)-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基(Dilinenyloxy)-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油基酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油基酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油基酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷

(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯)四氢-3aH-环戊[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基月桂基)氨基)乙基)(2-羟基月桂基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基脲二基)二十二烷-2-醇(Tech G1),或其混合物。该阳离子脂质可以占该颗粒中存在的总脂质的从大约20mol%至大约50mol%或大约40mol%。

[0527] 在另一个实施例中,化合物2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可以用来制备脂质-siRNA纳米颗粒。2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环的合成描述于2008年10月23日提交的美国临时专利申请号61/107,998中,将其通过引用结合于此。

[0528] 在一个实施例中,该脂质-siRNA颗粒包括40%2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环:10%DSPC:40%胆固醇:10%PEG-C-DMG(摩尔百分数),颗粒尺寸在 $63.0 \pm 20\text{nm}$,并且具有0.027siRNA/脂质比率。

[0529] 非阳离子脂质可以是一种阴离子脂质或一种中性脂质,包括但不限于:二硬脂酰磷酸卵磷脂(DSPC)、二油酰基磷酸卵磷脂(DOPC)、二棕榈酰磷酸卵磷脂(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷酸卵磷脂(POPC)、棕榈酰油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-一甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇,或其混合物。非阳离子脂质(如果包括胆固醇的话)可以占该颗粒中存在的总脂质的从大约5mol%至大约90mol%,大约10mol%,或大约58mol%。

[0530] 抑制颗粒聚集的共轭脂质可以是例如一种聚乙二醇(PEG)-脂质,其包括但不限于PEG-PEG-(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer),或其混合物。PEG-DAA共轭物可以例如是PEG-二月桂基氧丙基(Ci₂)、PEG-二肉豆蔻基氧丙基(Ci₄)、PEG-二棕榈基氧丙基(Ci₆)或PEG-二硬脂基氧丙基(Ci₈)。防止颗粒聚集的共轭脂质可以占从0mol%至约20mol%或约2mol%在颗粒中存在的总脂质。

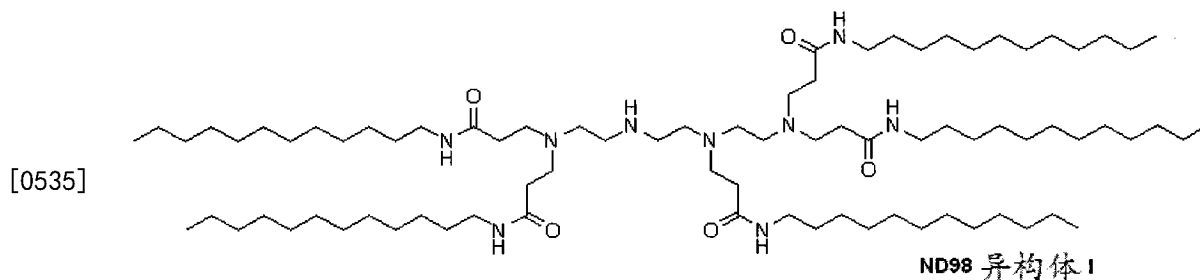
[0531] 在一些实施例中,核酸-脂质颗粒进一步包括胆固醇,该胆固醇例如占该颗粒中存在的总脂质的从大约10mol%到大约60mol%或大约48mol%。

[0532] 在一些实施例中,该iRNA被配制成一种脂质纳米颗粒(LNP)。

[0533] LNP01

[0534] 在一个实施例中,脂质ND98.4HCl(MW 1487)(见2008年3月26日提交的美国专利申请号12/056,230,所述文献通过引用的方式结合在此)、胆固醇(Sigma-Aldrich)和PEG-脑苷脂C16(Avanti极性脂质)可以用来制备脂质-dsRNA纳米颗粒(例如,LNP01颗粒)。可以如下制备每种组分在乙醇中的母液:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml,PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16母液可以随后以例如42:48:10摩尔比合并。合并的脂质溶液可以与(例如pH 5乙酸钠中的)含水dsRNA混合,从而乙醇终浓度是约35%-45%并且乙酸钠终浓度是约100-300mM。一旦混合,脂质-dsRNA纳米颗粒一般自发形成。取决于所需的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,如Lipex挤出机(北部脂质公司(Northern

Lipids, Inc)), 经聚碳酸酯膜 (例如100nm截值) 挤出所产生的纳米颗粒混合物。在一些情况下, 可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切线流过滤实现乙醇移除和同时交换缓冲液。缓冲液可以与例如约pH7, 例如约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 交换。



式 1

[0536] LNP01配制品例如在国际申请公开号W0 2008/042973中描述, 将其通过引用结合在此。

[0537] 另外的示例性脂质-dsRNA制剂提供于下表中。

[0538] 表10: 示例性脂质配制品

[0539]

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质共轭物 脂质：siRNA 比率
SNALP	1,2-二亚麻基氧基-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
S-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
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

[0540]

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[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: siRNA10 : 1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质: siRNA10 : 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)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇 (C12-200)	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质: siRNA10 : 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

[0541]

		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
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质 : siRNA: 10 : 1

[0542] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0543] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱

[0544] PEG-DMG:PEG-双二肉豆蔻酰甘油 (C14-PEG,或PEG-C14) (平均分子量为2000的PEG)

[0545] PEG-DSG:PEG-二苯乙烯基甘油 (C18-PEG,或PEG-C18) (平均分子量为2000的PEG)

[0546] PEG-cDMA:PEG-氨甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧丙胺 (平均分子量为2000的PEG)

[0547] 包含SNALP (1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)) 的制剂描述于2009年4月15日提交的国际公开号WO 2009/127060中,通过引用将其结合于此。

[0548] 包括XTC的配制品描述于例如以下各项中:2009年1月29日提交的美国临时序列号61/148,366;2009年3月2日提交的美国临时序列号61/156,851;2009年6月10日提交的美国临时序列号;2009年7月24日提交的美国临时序列号61/228,373;2009年9月3日提交的美国临时序列号61/239,686,以及2010年1月29日提交的国际申请号PCT/US 2010/022614,将其通过引用特此结合。

[0549] 包括MC3的配制品描述于例如以下各项中:2009年9月22日提交的美国临时序列号61/244,834,2009年6月10日提交的美国临时序列号61/185,800,以及2010年6月10日提交的国际申请号PCT/US 10/28224,将其通过引用特此结合。

[0550] 包括ALNY-100的配制品描述于例如以下中:2009年11月10日提交的国际专利申请号PCT/US 09/63933,将其通过引用特此结合。

[0551] 包括C12-200的配制品描述于例如以下各项中:2009年5月5日提交的美国临时序列号61/175,770以及2010年5月5日提交的国际申请号PCT/US 10/33777,将其通过引用特此结合。

[0552] 阳离子脂质的合成

[0553] 在本发明中表征的核酸颗粒中使用的任何化合物,例如,阳离子脂质等可以通过已知的有机合成技术 (包括在实例中更详细描述的方法) 制备。除非另外指明,否则全部取代基如下文定义。

[0554] “烷基”意味着一种直链或支链的、非环的或环的饱和脂肪族烃,包含从1至24个碳原子。代表性饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等;而饱和支链

烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、等；而不饱和环状烷基包括环丙烯基和环己烯基等。

[0555] “烯基”意味着如上定义的一种烷基，该烷基在相邻碳原子之间包含至少一个双键。烯基包括顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等。

[0556] “炔基”意味着如上定义的任何烷烃或烯基，其另外包含在相邻碳之间的至少一个三键。代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0557] “酰基”是指任何烷基，烯基或炔基，其中，在连接点的碳被氧代基团取代，如下所定义。例如-C(=O) 烷基、-C(=O) 烯基和-C(=O) 炔基是酰基。

[0558] “杂环”意味着一个5-至7-元单环、或7-至10-元二环的杂环，它是饱和的、不饱和的或芳香族的，并且它包含独立地选自氮、氧、和硫的从1或2个杂原子，并且其中该氮和硫杂原子可以是任选地氧化的，并且该氮杂原子可以任选地是季铵化的，包括双环，其中上述杂环的任一个被稠合至一个苯环。该杂环可通过任何杂原子或碳原子而附接。杂环包括如下文定义的杂芳基。杂环包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基(piperizynyl)、乙内酰脲基(hydantoinyl)、戊内酰胺基(valerolactamyl)、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

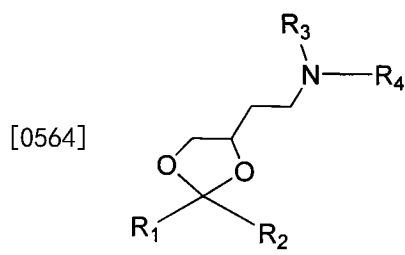
[0559] 术语“任选取代的烷基”，“任选取代的烯基”，“任选取代的炔基”，“任选取代的酰基”和“任选被取代的杂环”是指，当取代时，至少一个氢原子被一个取代基置换。在氧代取代基(=O)的情况下，两个氢原子被置换。就这一点而言，取代基包括氧代、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y，其中n是0、1或2，R^x和R^y是相同或不同的并且独立地是氢、烷基或杂环，并且所述烷基和杂环取代基中的每一个可以进一步地被一个或多个氧代、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^x、杂环、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y取代。

[0560] “卤素”是指氟、氯、溴、以及碘。

[0561] 在一些实施例中，本发明中表征的方法可以需要使用保护基。保护基方法学是本领域技术人员熟知的(见例如，有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)，格林(Green, T.W.)等人，威利国际科学出版社(Wiley-Interscience)，纽约城(New York City)，1999)。简言之，本发明上下文中的保护基是降低或消除不希望的官能团反应性的任何基团。可以将保护基添加到官能团以掩蔽其在某些反应过程中的反应性并且随后将其移除以暴露原始官能团。在一些实施例中，使用“醇保护基”。“醇保护基”是减少或消除不希望的醇官能团反应性的任何基团。保护基团可以使用本领域中公知的技术添加和去除。

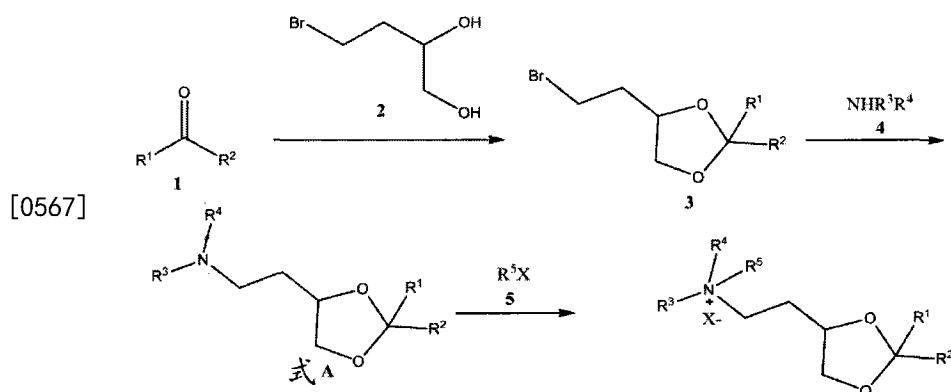
[0562] 式A的合成

[0563] 在一个实施例中，使用式A的阳离子脂质配制本发明中表征的核酸-脂质颗粒：



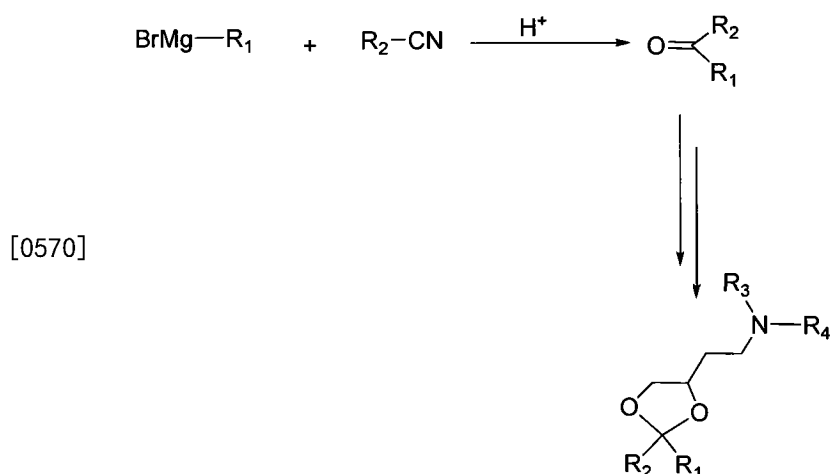
[0565] 其中R₁和R₂独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且R₃和R₄独立地是低级烷基或R₃和R₄可以一起形成任选取代的杂环。在一些实施例中,阳离子脂质是XTC (2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)。通常,可以通过以下反应方案1或2产生以上式A的脂质,其中除非另外指明,否则全部取代基如上文定义。

[0566] 方案1



[0568] 根据方案1制备脂质A,其中R₁和R₂独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且R₃和R₄独立地是低级烷基或R₃和R₄可以一起形成任选取代的杂环。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备酮1和溴化物2。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3产生式A的脂质。式A的脂质可以用式5的有机盐转化成相应的铵盐,其中X是选自卤素、氢氧化物、磷酸根、硫酸根等的阴离子反离子。

[0569] 方案2



[0571] 可选地,可以根据方案2制备酮1原料。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备格氏(Grignard)试剂6和氰化物7。6和7的反应产生酮1。如方案1中所述,酮1转化成式A的相应脂质。

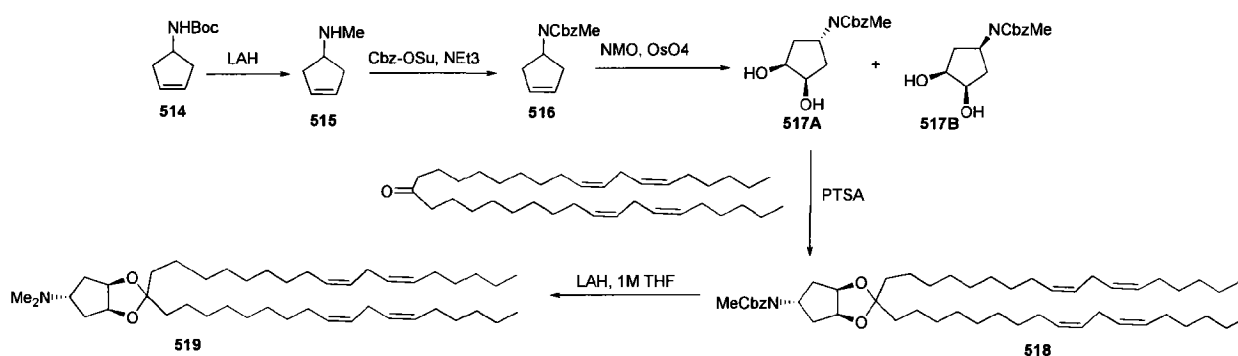
[0572] MC3的合成

[0573] 如下制备DLin-M-C3-DMA (即, (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯)。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g), 4-N,N-二甲基氨基丁酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲氨基吡啶(0.61g)和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.53g)在二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温搅拌过夜。将该溶液用稀盐酸洗涤,随后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机部分在无水硫酸镁上干燥,过滤并且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1%-5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度,使残余物通过硅胶柱(20g)。合并含有纯化产物的级分并且移除溶剂,产生无色油(0.54g)。

[0574] ALNY-100的合成

[0575] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:

[0576]



[0577] 515的合成:

[0578] 在0℃在氮气氛下向双颈RBF (1L) 中的LiAlH₄ (3.74g, 0.09852mol) 在200ml无水THF中的搅拌悬浮液缓慢添加514 (10g, 0.04926mol) 在70mL THF中的溶液。在完成添加后, 将反应混合物加温至室温并且随后加热至回流持续4小时。通过TLC监测反应的进程。在完成反应(借助TLC检测)后, 将混合物冷却至0℃并且通过小心添加饱和Na₂SO₄溶液淬灭。将反应混合物在室温搅拌4小时并滤出。将残余物用THF充分洗涤。将滤液和洗涤液混合并用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并且在室温搅拌20分钟。在真空下剥离挥发物以提供作为白色固体的515盐酸盐。产量: 7.12g 1H-NMR (DMSO, 400MHz): δ=9.34 (宽, 2H), 5.68 (s, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.66-2.60 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 5H)。

[0579] 516的合成:

[0580] 向250mL双颈RBF中化合物515在100mL无水DCM中的搅拌悬液添加NEt₃ (37.2mL, 0.2669mol) 并在氮气氛下冷却至0℃。在缓慢添加在50mL无水DCM中的N-(苄氧羰基)-琥珀酰亚胺(20g, 0.08007mol)后, 允许反应混合物加温到室温。在反应结束(通过TLC检测2-3小时)后, 将混合物用1N HCl溶液(1x100mL)和饱和NaHCO₃溶液(1x50mL)依次洗涤。随后在无水Na₂SO₄上干燥有机层并且蒸发溶剂以产生粗制材料, 所述粗制材料通过硅胶柱层析纯化以获得作为粘性物质的516。产量: 11g (89%)。1H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ=7.36-7.27 (m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (br., 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 2H)。LC-MS [M+H]⁺-232.3 (96.94%)。

[0581] 517A和517B的合成:

[0582] 将环戊烯516 (5g, 0.02164mol) 溶解于单颈500mLRBF中的220mL丙酮和水(10:1)的溶液内, 并且在室温向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g, 0.06492mol), 随后添加叔-丁醇中的4.2mL 7.6% OsO₄溶液(0.275g, 0.00108mol)。在反应结束(约3小时)后, 将混合物通

过添加固体Na₂SO₃淬灭并且将所产生的混合物在室温搅拌1.5小时。将反应混合物用DCM (300mL) 稀释并且用水 (2x100mL) 洗涤,随后用饱和NaHCO₃ (1x50mL) 溶液、水 (1x30mL) 并最终用盐水 (1x50mL) 洗涤。在无水Na₂SO₄上干燥有机相并且在真空中移除溶剂。粗制材料的硅胶柱层析纯化提供了非对映异构体的混合物,所述非对映异构体由制备型HPLC分离。产量:-6g粗制物

[0583] 517A-峰-1 (白色固体), 5.13g (96%)。¹H-NMR (DMSO, 400MHz): δ =7.39-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.48-4.47 (d, 2H), 3.94-3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 4H)。LC-MS- [M+H]⁻-266.3, [M+NH₄]⁺-283.5存在, HPLC-97.86%。通过X射线证实立体化学。

[0584] 518的合成:

[0585] 使用与被描述用于合成化合物505的方法类似的方法, 获得作为无色油的化合物518 (1.2g, 41%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ =7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (br m, 36H), 0.87 (m, 6H) HPLC-98.65%。

[0586] 用于合成化合物519的一般方法:

[0587] 将化合物518 (1eq) 在己烷 (15mL) 中的溶液以逐滴方式添加至LAH在THF (1M, 2当量) 中的冰冷溶液中。在完成添加后, 将混合物在40℃加热0.5小时, 随后在冰浴上再次冷却。将混合物用饱和Na₂SO₄水溶液小心地水解, 随后经塞里滤料 (celite) 过滤并缩减成油。柱层析提供作为无色油获得的纯519 (1.3g, 68%)。¹³C NMR=130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 226, 14.1; Electrospray MS (+ve): 对于C₄₄H₈₀N₂O₂ (M+H)⁺的分子量, 计算值是654.6, 发现值是654.6。

[0588] 通过标准或非挤出方法制备的配制品可以按类似的方式来表征。例如配制品典型地通过视觉检查来进行表征。它们应该是发白的半透明溶液, 无聚集物或沉淀。脂质纳米颗粒的颗粒尺寸与颗粒尺寸分布可以使用例如马尔文 (Malvern) Zetasizer Nano ZS (马尔文公司 (Malvern), USA) 通过光散射来进行测量。颗粒应该是大约20-300nm, 例如40-100nm尺寸。颗粒尺寸分布应该是单峰。配制品中的总dsRNA浓度以及捕获的部分是使用染料排除测定来评估。配制的dsRNA的样品可以与RNA结合染料如Ribogreen (分子探针公司 (Molecular Probes)) 在配制品破坏性表面活性剂 (例如0.5% Triton-X100) 存在或不存在下孵育。配制品中的总dsRNA可以相对于标准曲线, 通过来自含有表面活性剂的样品的信号来确定。该捕获的部分是通过将“游离”dsRNA内含物 (如通过在表面活性剂不存在下的信号所测量的) 从该总dsRNA内含物中减去来确定。封装的dsRNA的百分比典型地大于85%。对于SNALP配制品而言, 颗粒尺寸是至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm、以及至少120nm。合适的范围典型地是大约至少50nm至大约至少110nm、大约至少60nm至大约至少100nm、或大约至少80nm至大约至少90nm。

[0589] 用于口服给予的组合物与配制品包括粉末或颗粒剂、微粒剂、纳米颗粒剂、在水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或迷你片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可以是希望的。在一些实施例中, 口服配制品是以下那些:

在其中本发明所表征的dsRNA与一种或多种增渗剂表面活性剂以及螯合剂结合地给予。合适的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆汁酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)以及乌索脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡萄糖胆酸、甘油胆酸、甘油脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-梭链孢酸钠以及甘油二氢梭链孢酸钠。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、羊脂酸、羊蜡酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、甘油二月桂酸酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、一种酰基肉毒碱、一种酰基胆碱、或一种甘油一酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如钠盐)。在一些实施例中,渗透增强剂的组合(例如脂肪酸/盐)是与胆汁酸/盐组合使用。一个示例性的组合是月桂酸、羊蜡酸以及UDCA的钠盐。另外的渗透增强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基酯、聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚。本发明表征的dsRNA可以口服递送,以包括喷雾干燥颗粒的颗粒剂的形式递送,或者复合形成颗粒或纳米颗粒。dsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸烷基酯;聚氧乙烷(polyoxethane)、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衍生化聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。合适的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如p-氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE-异丁烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白与DEAE-葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻朊酸盐、以及聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服配制品及其制备在美国专利6,887,906、美国公开号20030027780和美国专利号6,747,014中详述,各自通过引用结合在此。

[0590] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内给药的组合物和配制品可以包括无菌水溶液,其也可以包含缓冲液、稀释剂及其他适当的添加剂,例如但不限于:增渗剂、载体化合物及其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0591] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂以及含脂质体配制品。这些组合物可以产生自多种组分,这些组分包括但不限于预成形的液体、自乳化固体以及自乳化半固体。

[0592] 本发明中表征的药物配制品(可以方便地以单位剂型存在)可以根据医药工业内熟知的常规技术来制备。此类技术包括以下这样的步骤:将这些活性成分与该(这些)药物载体或赋形剂进行联合。总体而言,这些配制品是通过以下步骤来制备:使这些活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或它们两者均匀地且精细地联合,并且如果需要,进而将产品成形。

[0593] 本发明中表征的组合物可以被配制为许多可能的剂型中的任一者,这些剂型比如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软胶囊、栓剂以及灌肠剂。这些组合物还可以被配制为在水性或非水性介质或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

[0594] 另外的配制品

[0595] 乳剂

[0596] 本发明的组合物可以被制备或配制为乳剂。乳剂典型地是一种液体以液滴形式(通常直径超过 $0.1\mu\text{m}$)分散在另一种中的非均匀系统(参见,例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页;洛索夫(Rosoff),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,245页;布洛克(Block)于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷2,335页;希古契(Higuchi)等人,于雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)中,麦克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿(Easton, Pa.),1985,301页)。乳剂通常是双相的系统,其包含互不混溶的两个彼此紧密混合并分散的液相。通常,乳剂可以为油包水(w/o)或水包油(o/w)两种。当水相作为微小液滴细碎并分散到本体油相中时,所产生的组合物被称为油包水(w/o)乳剂。可替代地,当油相作为微小液滴细碎并分散到本体水相中时,所产生的组合物被称为水包油(o/w)乳剂。除了分散相和活性药物外,乳剂还可以含其他组分,并且活性药物可以作为在水相、油相中的溶液,或者其自身作为独立相。如果需要,也可以存在药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳剂还可以为包括多于两种相的多重乳剂,比如像油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳剂的情况。此类复合配制品通常提供某些简单的二元乳剂所不具有的优势。当多重乳剂中的o/w乳剂的各油滴还包有小水滴时,该多重乳剂形成w/o/w乳剂。同样地,在油连续相中稳定化的水滴中封装油滴的系统,构成o/w/o乳剂。

[0597] 乳剂具有较小或没有热力学稳定性的特征。通常,乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或配制品的粘性保持这种形式。在乳剂状软膏基料或膏剂的情况下,乳剂的每个相都可以为半固体或固体。其他稳定乳剂的方式需要使用乳化剂,这些乳化剂可以合并进入到乳剂的任意相中。乳化剂可以大致分成4类:合成性的表面活性剂、天然存在的乳化、吸收基质和精细分散的固体(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。

[0598] 合成性的表面活性剂,也称作表面活性试剂,已经广泛应用于乳剂的制备并且已经在文献中综述(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich

NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;列赫尔(Rieger),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,285页;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,1988,卷1,199页)。表面活性剂典型地是两亲性分子,并且包括亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比值定义为亲水/亲油平衡值(HLB),它是配制品制备中分类和选择表面活性剂的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质:非离子、阴离子、阳离子和两性分成不同类别(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen,LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;列赫尔(Rieger),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,285页)。

[0599] 乳剂配制品中使用的自然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯树胶。吸收基料具有亲水特性,所以它们能够吸收水以形成w/o乳剂并仍然保持它们的半固体稠度,如无水羊毛脂和亲水凡士林。精细分散的固体也已经被用做优良的乳化剂,尤其是与表面活性剂组合和在粘性制剂中使用。这些包括极性无机固体,如重金属氢氧化物、非膨胀粘土如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石,高岭土、蒙脱土、胶态硅酸铝和胶态镁硅酸铝、颜料和非极性固体如碳或甘油基三硬脂酸酯。

[0600] 在乳剂配制品中还包括多种非乳化材料,它们对乳剂的特性有帮助。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(布洛克(Block)于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷2,335页;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms),利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。

[0601] 亲水胶体或水状胶体包括天然存在的树胶和合成的聚合物如多糖(如阿拉伯树胶、琼脂、藻酸、角叉菜聚糖、瓜耳胶、刺梧桐树胶和皂荚胶),纤维素衍生物(如羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成的聚合物(如卡波姆胶、纤维素醚和羧基乙烯基聚合物)。这些物质在水中分散或膨胀形成胶状溶液,这些胶状溶液通过在分散相小滴的周围形成强的界面膜并通过增强外相的粘度来稳定乳剂。

[0602] 由于乳剂通常包含一些可以容易地支持微生物生长的成份如碳水化合物、蛋白、固醇和磷脂,所以这些制剂通常含有防腐剂。乳剂配制品中通常使用的防腐剂包括甲基对羟基苯甲酸酯、丙基对羟基苯甲酸酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。通常也将抗氧化剂加入到乳剂配制品中,以预防配制品的变质。所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、丁化羟基茴香醚、丁化羟基甲苯,或还原剂如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,和抗氧化剂增效剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0603] 通过皮肤途径、口途径和肠胃外途径使用乳剂配制品和制造它们的方法已经在文献中综述(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。口服递送的乳剂配制品已经非常广泛地使用,原因在于易于配制以及从吸收和生物利用率的观点看有效(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;洛索夫(Rosoff),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,245页;爱德森(Idson),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,199页)。基于矿物油的缓泻药、油溶性的维生素和高脂肪营养制剂属于经常作为o/w乳剂口服给予的物质。

[0604] 在本发明的一个实施例中,将iRNA和核酸的组合物配制为微乳剂。可以将微乳剂定义为水、油和两亲分子的体系,所述体系是光学各向同性和热动力学稳定的单一液态溶液(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(第8版),纽约,纽约州;洛索夫(Rosoff),于药物剂型(Pharmaceutical Dosage Forms)中,利伯曼(Lieberman),列赫尔(Rieger)与斑克(Banker)(编著),1988,,马塞尔·德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,纽约州,卷1,245页)。典型地,微乳剂是通过如下方法制备的系统:首先将油分散到表面活性剂水溶液中,然后加入足量的通常为中等链长度的醇的第四组分而形成透明系统。因此,微乳剂也被描述成由表面活性分子的界面膜稳定化的两种不能混合的液体的热力学稳定的各向同性的澄清分散系(朗(Leung)与纱(Shah),在:药物的受控释放:聚合物和聚集体系统(Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate Systems),洛索夫(Rosoff),M.编著,1989,VCH出版公司,纽约,第185-215页)。通常微乳剂通过包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解液的三至五种组分的组合来制备。微乳剂是为油包水(w/o)还是水包油(o/w)类型取决于所使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部和羟基尾的结构和几何包装(斯科特(Schott),于雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),麦克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿(Easton),Pa.,1985,第271页)。

[0605] 已经广泛研究了利用相图的现象学方法并且对本领域技术人员,该方法已经产生怎样配制微乳剂的广泛知识(见例如,安塞尔药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems),艾伦(Allen, LV.),波波维奇(Popovich NG.),以及安塞尔(Ansel HC.),2004,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公

司 (Lippincott Williams&Wilkins) (第8版), 纽约, 纽约州; 洛索夫 (Rosoff), 于药物剂型 (Pharmaceutical Dosage Forms) 中, 利伯曼 (Lieberman), 列赫尔 (Rieger) 与斑克 (Banker) (编著), 1988, 马塞尔·德克公司 (Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 纽约州, 卷1, 245 页; 布洛克 (Block) 于药物剂型 (Pharmaceutical Dosage Forms) 中, 利伯曼 (Lieberman), 列赫尔 (Rieger) 与斑克 (Banker) (编著), 1988, 马塞尔·德克公司 (Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 纽约州, 卷2, 335 页)。与常规乳剂相比, 微乳剂提供的优点是能将非水溶性药物溶解到自发形成的热力学稳定的液滴的配制品中。

[0606] 在微乳剂的制备中使用的表面活性剂包括但不限于单独的或与助表面活性剂组合使用的离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚、聚脂肪酸甘油酯、单月桂酸四甘油酯 (ML310)、单油酸四甘油酯 (M0310)、单油酸六甘油酯 (P0310)、五油酸六甘油酯 (P0500)、单癸酸十甘油酯 (MCA750)、单油酸十甘油酯 (M0750)、一又二分之一油酸十甘油酯 (S0750) (decaglycerol sequioleate)、十油酸十甘油酯 (DA0750)。该助表面活性剂通常是短链醇如乙醇、1-丙醇和1-丁醇, 作用是通过渗透到表面活性剂膜中并由此在表面活性剂分子间产生空余空间来产生无序膜从而提高界面流动性。然而, 微乳剂可以不用助表面活性剂进行制备, 并且无醇的自乳化微乳剂系统是本领域已知的。典型地, 水相可以是 (但不限于) 水、药物的水溶液、甘油、PEG 300、PEG 400、聚甘油、丙二醇、和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于如多种材料, 比如 Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯, 中等链 (C8-C12) 的单、二和三甘油三酯, 聚氧乙基化的甘油脂肪酸酯、脂肪醇, 聚乙二醇化的甘油酯 (polyglycolized glyceride), 饱和的聚乙二醇化的 C8-C10 甘油酯、植物油和硅油。

[0607] 从药物溶解和增强的药物吸收方面看, 微乳剂是特别令人感兴趣的。已经提出基于脂质的微乳剂 (o/w 和 w/o) 以增强药物 (包括肽) 的口服生物利用率 (见例如, 美国专利号 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; 康斯坦丁尼德斯 (Constantinides) 等人, 药物研究 (Pharmaceutical Research), 1994, 11, 1385-1390; 里切尔 (Ritschel), 实验与临床药理学的方法与发现 (Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.), 1993, 13, 205)。微乳剂提供以下优点: 改进药物溶解、保护药物免遭酶水解、可能因表面活性剂引起的膜流动性和通透性改变而增强药物吸收、易于制备、比固体剂型易于口服施用、临床效力改善和毒性降低 (见例如, 美国专利号 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; 康斯坦丁尼德斯 (Constantinides) 等人, 药物研究 (Pharmaceutical Research), 1994, 11, 1385; 胡 (Ho) 等人, 药物科学杂志 (J. Pharm. Sci.), 1996, 85, 138-143)。通常, 微乳剂的成份在环境温度下混合在一起时, 它们可以自发形成微乳剂。在配制热不稳定药物、肽或 iRNA 时, 这可以是特别有利的。在化妆品和药物应用领域, 微乳剂在活性组分的经皮递送中也是有效的。预期本发明的微乳剂组合物和配制品将促进 iRNA 和核酸从胃肠道的全身性吸收增加以及改善 iRNA 和核酸的局部细胞摄取。

[0608] 本发明的微乳剂也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 (Gril13)、Labrasol、和改善制剂特性并增强本发明 iRNA 和核酸吸收的增渗剂。可以将本发明的微乳剂中所用的增渗剂划分为属于 5 大类之一——表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂 (李 (Lee) 等人, 治疗性药物载体系统锐评 (Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems), 1991, 第 92 页)。每个类型都已经在以上进行了讨

论。

[0609] 渗透增强剂

[0610] 在一个实施例中,本发明采用各种渗透增强剂来实现向动物皮肤高效递送核酸,尤其是iRNA。大多数药物以离子化和非离子化的形式两者存在于溶液中。然而,通常只有脂溶的或亲脂的药物易于穿过细胞膜。已经发现,如果用增渗剂处理要穿过的膜,甚至连非亲脂药物都可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂药物扩散穿过细胞膜外,渗透增强剂还增强亲脂药物的渗透性。

[0611] 可以将增渗剂划分为属于5大类之一,即,表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(见例如,马姆斯顿(Malmsten,M.)药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92)。在下面对每类以上提及的渗透增强剂都详细进行了阐述。

[0612] 表面活性剂:表面活性剂:在本发明的上下文中,表面活性剂(或“表面活性试剂”)为化学实体,当其溶解在水溶液中时,它能降低该溶液的表面张力或者水溶液和另一种液体之间的界面张力,结果是iRNA通过粘膜的吸收得到增强。除了胆汁盐和脂肪酸之外,这些增渗剂还包括例如月桂醇硫酸钠、聚氧乙烯基-9-月桂基醚和聚氧乙烯基-20-鲸蜡基醚(参见,例如,马姆斯顿(Malmsten,M.)药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92);以及全氟化学乳剂如FC-43(高松(Takahashi)等人,药物药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.),1988,40,252)。

[0613] 脂肪酸:充当增渗剂的各种脂肪酸及其衍生物例如包括油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精(1-单油酰-外消旋-甘油)、二月桂精、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯(例如、甲基酯、异丙基酯和叔丁基酯)及其单和二甘油酯(即、油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(见例如,头头(Touitou,E.)等人,药物递送增强(Enhancement in Drug Delivery),CRC出版社,丹弗斯(Danvers),MA,2006;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92);村西(Muranishi),治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;El海瑞(Hariri)等人,药物药理学(J.Pharm.Pharmacol.),1992,44,651-654)。

[0614] 胆汁盐:胆汁的生理学作用包括促进脂质和脂肪维生素的分散和吸收(见例如,马姆斯顿(Malmsten,M.),药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;布鲁顿(Brunton),第38章,古德曼&吉尔曼,治疗的药理学基础第38章中(Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第9版,哈德曼(Hardman)等人编著,麦格劳希尔(McGraw-Hill),纽约,1996,第934-935页)。各种天然胆汁盐和它们的合成衍生物作为渗透增强剂起作用。因此术语“胆汁盐”包括胆汁中天然存在的任意成分和它们的任意合成衍

生物。适合的胆盐包括,例如,胆酸(或其可药用的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡糖胆酸(葡糖胆酸钠)、甘氨酸(甘氨酸钠)、甘氨酸脱氧胆酸(甘氨酸脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢夫西地酸钠(STDHF)、二氢夫西地酸钠和聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(见例如,马姆斯顿(Malmsten,M.),药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery),英富曼卫生保健(Informa Health Care),纽约,纽约州,2002;李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,92页);斯文亚德(Swinyard),第39章,于雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,真纳罗(Gennaro)编著,马克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿(Easton, Pa.),1990,第782-783页;村西(Muranishi),治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;山本(Yamamoto)等人,药理学和实验治疗学杂志(J.Pharm.Exp.Ther.),1992,263,25;山下(Yamashita)等人,药物科学杂志(J.Pharm.Sci.),1990,79,579-583)。

[0615] 螯合剂:与本发明有关使用的螯合剂可以定义为通过金属离子与其形成复合物将金属离子从溶液中除去的化合物,结果是通过粘膜的iRNA的吸收得到加强。关于它们在本发明中作为增渗剂的应用,因为多数特征化的DNA核酸酶需要二价金属离子用于催化并且因此可以被螯合剂抑制,螯合剂还具有充当DNase抑制剂的附加优势(加热特(Jarrett),层析学杂志(J.Chromatogr.),1993,618,315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐(酯)(如水杨酸钠、5-甲氧水杨酸酯和高香草酸酯)、胶原质的N-酰基衍生物、月桂醇聚醚-9和 β -二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)(李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,p.92;Muranishi(村西),治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33;布尔(Buur)等人,缓释杂志(J.Control Rel.),1990,14,43-51)。

[0616] 非螯合性非表面活性剂:如本文所用,非螯合性非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或作为表面活性剂展示不明显活性但是反而增强iRNA经消化道粘膜吸收的化合物(见例如,村西(Muranishi),治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1990,7,1-33)。这类的增渗剂包括例如不饱和环脲、1-烷基烷酮衍生物和1-烯基氮杂环烷酮衍生物(李(Lee)等人.,治疗性药物载体系统锐评(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems),1991,第92页);以非甾体抗炎剂如双氯芬酸钠、引哚美辛和苯丁唑啉(山下(Yamashita)等人药物药理学(J.Pharm.Pharmacol.),1987,39,621-626)。

[0617] 也可以添加在细胞水平增强摄取iRNA的物质至本发明的药物组合物和其他组合物。例如阳离子脂质,如脂质体(淳一(Junichi)等人,美国专利号5,705,188)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸(洛洛(Lollo)等人,PCT申请WO 97/30731)也已知增强dsRNA的细胞摄取。市售转染试剂的例子包括例如Lipofectamine™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州(Invitrogen;Carlsbad,CA))、Lipofectamine 2000™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、293fectin™(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、Cellfectin™(英

杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、DMRIE-CTM(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、FreeStyleTM MAX(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、LipofectamineTM 2000CD(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、LipofectamineTM(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、RNAiMAX(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、OligofectamineTM(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、OptifectTM(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、X-tremeGENE Q2转染试剂(罗氏公司(Roche); 格兰扎克尔街,瑞士(Grenzacherstrasse, Switzerland))、DOTAP脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)、DOSPER脂质体转染试剂(格兰扎克尔街,瑞士)或Fugene(格兰扎克尔街,瑞士)、**Transfectam®**试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州(Promega; Madison, WI))、TransFastTM转染试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、TfxTM-20试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、TfxTM-50试剂(普洛麦格公司,麦迪逊市,威斯康辛州)、DreamFectTM(OZ生命科学公司; 马赛市,法国(OZ Biosciences; Marseille, France))、EcoTransfect(OZ生命科学公司; 马赛市,法国)、TransPass[®]D1转染试剂(新英格兰生物实验室; 伊普斯威奇市,马萨诸塞州,美国(New England Biolabs; Ipswich, MA, USA))、LyoVecTM/LipoGenTM(英杰公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国(Invivogen; San Diego, CA, USA))、PerFectin转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国(Genlantis; San Diego, CA, USA))、NeuroPORTER转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER2转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、Cytofectin转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、BaculoPORTER转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、TroganPORTERTM转染试剂(Genlantis公司; 圣地亚哥市,加利福尼亚州,美国)、RiboFect(星谱生公司; 陶顿市,马萨诸塞州,美国(Bioline; Taunton, MA, USA))、PlasFect(星谱生公司; 陶顿市,马萨诸塞州,美国)、UniFECTOR(晨桥国际公司; 山景城,加利福尼亚州,美国(B-Bridge International, Mountain View, CA, USA))、SureFECTOR(晨桥国际公司; 山景城,加利福尼亚州,美国)或HiFectTM(晨桥国际公司; 山景城,加利福尼亚州,美国),连同其他。

[0618] 其他物质可以用来增强所施用核酸渗透,包括二醇如乙二醇和丙二醇、吡咯如2-吡咯、氮酮和萜类如苧烯和薄荷酮。

[0619] 载体

[0620] 本发明的某些组合物还向配制品中并入了载体化合物。如在此所使用的,“载体化合物”或“载体”可以指核酸或其类似物,它是惰性的(即本身不具有生物活性),但却在体内过程中被认为是核酸,能例如通过降解生物活性的核酸或促进其从循环中的除去而降低具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载体化合物的共施用(一般后一种物质过量)可以导致肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度缩减,假定归因于该载体化合物和该核酸之间对共同受体的竞争。例如与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸苈-2,2'-二磺酸共施用,肝组织中部分硫代磷酸酯化的dsRNA的回收可以减少(宫尾(Miyao)等人,DsRNA研究与研发(DsRNA Res.Dev.),1995,5,115-121;高仓(Takakura)等人,DsRNA&核酸药物研发(DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.),1996,6,177-183)。

[0621] 赋形剂

[0622] 与载体化合物相比,“药物载体”或“赋形剂”是用于向动物递送一种或多种核酸的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或其他任意药学上惰性的媒介物。该赋形剂可以是液体或固体,当与核酸和特定药物组合物的其他组分组合时,参考意欲的给予方式,对赋形剂进行选择以提供希望的容积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于、粘合剂(例如预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填料(例如乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如淀粉、淀粉羟乙酸钠等);和润湿剂(例如月桂基硫酸钠等)。

[0623] 适合于非肠胃外给予的、不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。适当的药学上可接受载体包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0624] 用于局部给予核酸的配制品可以包括在普通溶剂如醇中的无菌或非无菌的水溶液、非水溶液,或在液体或固体油基质中的核酸溶液。这些溶液还可以包含缓冲液、稀释液和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外给予的、且不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0625] 适当的药学可接受赋形剂包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0626] 其他组分

[0627] 本发明的组合物另外可以包含其他本领域熟知用量的在药物组合物中常用的辅助组分。因此,例如这些组合物可以包含另外的、可相容的药学上有活性的物质如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以包含对本发明的组合物的各种剂型的物理配制有用的其他物质,如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当加入此类物质时,它们不应当过度干扰本发明的组合物的成份的生物活性。可以将这些配制品进行灭菌并且如果希望的话与助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质、芳香物质和/或芬芳物质等进行混合,这些助剂不与该配制品中的一种或多种核酸发生有害的相互作用。

[0628] 水性悬浮液可以包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

[0629] 在一些实施例中,本发明中表征的药物组合物包含(a)一种或多种iRNA化合物和(b)通过非RNAi机制发挥作用的一种或多种生物试剂。此类生物试剂的实例包括干扰ALAS1与至少一个ALAS1结合配偶体的相互作用的试剂。

[0630] 此类化合物的毒性与治疗效果可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如以确定LD50(50%群体的致死剂量)以及ED50(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比为治疗指数,并且它可以被表示为比率LD50/ED50。典型地是那些表现出高的治疗指数的化合物。

[0631] 获得自细胞培养测定与动物研究的数据可以在配制一系列的用于在人类中使用的剂量方面使用。在本发明中表征的组合物的剂量总体上处在一个循环浓度范围内,该范围包括具有很小或没有毒性的ED50。该剂量可以取决于所采用的剂型以及利用的给予途径

而在该范围内变化。对于任何在本发明表征的方法中使用的化合物,该治疗上有效的剂量可以从细胞培养测定来进行初始估计。在动物模型中可以将一个剂量配制为达到该化合物的循环血浆浓度范围,或者当适当时,一个靶标序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如,达到该多肽的一个降低的浓度),该范围包括如在细胞培养中确定的IC₅₀(即,测试化合物实现症状的半最大抑制时的浓度)。这种信息可以用于更准确地确定人类中有用的剂量。可以测量血浆中的水平,例如,通过高效液相层析。

[0632] 除了给予它们之外,如在此所讨论的,还可以将在本发明中表征的iRNA与在治疗与ALAS1表达相关的疾病或失调中有效的其他已知试剂联合给予。在任何情况下,基于使用本领域已知或本文所述的标准功效量值所观察到的结果,施用医师可以调整施用iRNA的量和时间。

[0633] 用于治疗与ALAS1基因表达相关的疾病的方法

[0634] 本发明尤其涉及靶向ALAS1的iRNA的使用,用于抑制ALAS1表达和/或治疗与ALAS1表达相关的疾病、失调、或病理过程。

[0635] 如在此使用的,“与ALAS1表达相关的失调”、“与ALAS1表达相关的疾病”、“与ALAS1表达相关的病理过程”等等包括任何病况、失调、或疾病,其中ALAS1表达是被改变了的(例如,升高的)、一种或多种卟啉的水平是被改变了的(例如,升高的)、血红素生物合成途径(卟啉途径)中的一种或多种酶的水平或活性是被改变了的,或导致血红素生物合成途径病理变化的其他机制。例如,靶向ALAS1基因的iRNA、或其组合,可以用于治疗其中卟啉或卟啉前体(例如,ALA或PBG)水平升高了的病状,(例如,某些卟啉症),或其中存在血红素生物合成途径中的酶的缺乏的病状(例如,某些卟啉症)。与ALAS1表达相关的失调包括,例如,X-连锁的铁粒幼细胞贫血(XLSA)、ALA脱水酶缺乏卟啉症(Doss卟啉症)、急性间歇性卟啉症(AIP)、先天性红细胞生成性卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、遗传性粪卟啉症(粪卟啉症)、杂斑卟啉症、红细胞生成性原卟啉症(EPP)、以及婴儿暂时性红细胞卟啉症。

[0636] 如在此使用的,有待于根据在此所述的方法进行治疗的“受试者”包括人类或非人动物,例如,哺乳动物。该哺乳动物可以是,例如,啮齿类动物(例如,大鼠或小鼠)或灵长类(例如,猴)。在一些实施例中,受试者是人。

[0637] 在一些实施例中,该受试者经受与ALAS1表达相关的失调(例如,已经被诊断为患有卟啉症或已经遭遇一种或多种卟啉症症状,以及是与卟啉症相关联的突变的携带者)或处于发展与ALAS1表达相关的失调(例如,具有卟啉症家族史的受试者,或是与卟啉症相关联的基因突变的携带者)的风险中。

[0638] 卟啉症(包括急性肝性卟啉症)的分类描述于,例如,巴望尼(Balwani,M)和戴斯尼克(Desnick,R.J.),血液(Blood),120(23),作为血液第一版论文在线发布,7月12日,102; DOI 10.1182/blood-2012-05-423186。如在巴望尼和戴斯尼克(Balwain&Desnick)中所述的,急性间歇性卟啉症(AIP)遗传性粪卟啉症(HCP)、杂斑卟啉症(VP)是常染色体显性卟啉症并且ALA脱水酶缺乏卟啉症(ADP)是常染色体隐性的。在罕见情况下,AIP、HCP、以及VP发生为纯合的显性形式。此外,存在迟发性皮肤卟啉症(PCT)的罕见的纯合隐性形式,这是单一的肝性皮肤性卟啉症,并且还称作肝性红细胞生成性卟啉症。这些卟啉症的临床和实验室特征描述于下表11中。

[0639] 表11:人肝性卟啉症:临床和实验室特征

[0640]

卟啉症	缺乏酶	遗传	主要症状， NV 或 CP	酶活性， 正常的%	增加的卟啉前体和/或卟啉* 红细胞 尿 粪便		
急性肝性卟啉症							
ADP	ALA- 脱水酶	AR	NV	约 5	Zn- 原卟啉	ALA， 粪卟啉 III	—
AIP	HMB- 合酶	AD	NV	约 50	—	ALA， PBG， 尿卟啉	—
HCP	COPRO- 氧化酶	AD	NV 和 CP	约 50	—	ALA， PBG， 粪卟啉 III	粪卟啉 III
VP	PROTO- 氧化酶	AD	NV 和 CP	约 50	—	ALA， PBG， 粪卟啉 III	粪卟啉 III， 原卟啉
肝性皮肤性卟啉症							
PCT	URO- 脱羧酶	散发性或 AD	CP	< 20	—	尿卟啉， 7- 羧酸卟啉	尿卟啉， 7- 羧酸卟啉

[0641] AR表示常染色体隐性；AD，常染色体显性；NV，脑脊髓交感神经系统的；CP，皮肤光过敏；并且—，不适用。

[0642] *增加对于诊断可以是非常重要的。

[0643] 在一些实施例中，受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中，例如，肝性卟啉症，例如，AIP、HCP、VP、ADP、或肝性红细胞生成性卟啉症。

[0644] 在一些实施例中，该卟啉症是急性肝性卟啉症，例如，选自急性间歇性卟啉症（AIP）、遗传性粪卟啉症（HCP）、杂斑卟啉症（VP）、以及ALA脱水酶缺乏卟啉症（ADP）的急性肝性卟啉症。

[0645] 在一些实施例中，该卟啉症是双卟啉症，例如，至少两种卟啉症。在一些实施例中，该双卟啉症包括选自急性间歇性卟啉症（AIP）遗传性粪卟啉症（HCP）、杂斑卟啉症（VP）、以及ALA脱水酶缺乏卟啉症（ADP）的两种或更多种卟啉症。

[0646] 在一些实施例中,该卟啉症是纯合显性的肝性卟啉症(例如,纯合显性的AIP、HCP、或VP)或肝性红细胞生成性卟啉症。在一些实施例中,该卟啉症是AIP、HCP、VP、或肝性红细胞生成性卟啉症、或其组合(例如,双卟啉症)。在实施例中,AIP、HCP、或VP是杂合显性的或是纯合显性的。

[0647] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,ADP,并且显示ALA和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,ADP,并且显示红细胞Zn-原卟啉的升高的水平。

[0648] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,AIP,并且显示ALA、PBG、和/或尿卟啉的升高的水平(例如,升高的尿水平)。

[0649] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示ALA、PBG、和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0650] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,VP,并且显示ALA、PBG、和/或粪卟啉III的升高的水平(例如,升高的尿水平)。

[0651] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,HCP,并且显示粪卟啉III和/或原卟啉的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0652] 在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,PCT,(例如,肝性红细胞生成性卟啉症),并且显示尿卟啉和/或7-羧酸卟啉的升高的水平(例如,升高的尿水平)。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,PCT,(例如,肝性红细胞生成性卟啉症),并且显示尿卟啉和/或7-羧酸卟啉的升高的水平(例如,升高的粪便水平)。

[0653] 与卟啉症相关联的突变包括编码血红素生物合成途径(卟啉途径)中的一种酶的基因的或改变血红素生物合成途径中基因的表达的基因的任何突变。在许多实施例中,受试者携带卟啉途径中酶的一个或多个突变(例如,ALA脱水酶或PBG脱氢酶)。在一些实施例中,受试者经受急性卟啉症(例如,AIP、ALA脱水酶缺乏卟啉症)。

[0654] 在一些情况中,与健康个体相比,患有急性肝性卟啉症(例如,AIP)的患者,或携带有与急性肝性卟啉症(例如,AIP)相关联的突变但无症状的患者具有升高的ALA和/或PBG水平。参见,例如,弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006;沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007。在此类情况中,ALA和/或PBG的水平可以是升高的,甚至是在该患者不具有,或从未有过发作的情况下。在一些情况中,该患者否则是完全无症状的。在一些此类情况下,该患者经受疼痛,例如,神经性疼痛,这可以是慢性痛(例如,慢性神经性疼痛)。在一些情况中,该患者具有神经病变。在一些情况中,该患者具有渐进性神经病变。

[0655] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平。可以使用本领域中已知的方法或在此描述的方法对卟啉或卟啉前体的水平进行评估。例如,评估尿和血浆ALA和PBG水平,连同尿和血浆卟啉水平的方法披露于弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,0.06;和沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),

46 (4) :335-349,2007,将其全部内容以其整体通过引用结合在此。

[0656] 在一些实施例中,受试者是卟啉症的动物模型,例如,卟啉症的小鼠模型(例如,如在林德贝格等人自然遗传学(Nature Genetics),12:195-199,1996中描述的突变小鼠)。在一些实施例中,受试者是人类,例如,患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中的人类,如在此所述的。在一些实施例中,受试者是不具有卟啉症的急性发作。在一些实施例中,受试者从未有过发作。在一些实施例中,患者经受慢性痛。在一些实施例中,患者具有神经损伤。在实施例中,受试者具有EMG改变和/或神经传导速度改变。在一些实施例中,受试者是无症状的。在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中(例如,携带有与卟啉症相关联的基因突变)并且是无症状的。在一些实施例中,受试者先前有过急性发作但是在治疗时是无症状的。

[0657] 在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中并且接受预防性治疗以防止卟啉症的发展。。在一些实施例中,受试者具有升高的水平的卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG。在一些实施例中,预防治疗开始于青春期。在一些实施例中,治疗降低卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的水平(例如,血浆水平或尿水平)。在一些实施例中,治疗预防卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平。在一些实施例中,治疗预防与卟啉症相关联的症状,例如,疼痛或神经损伤的发展,或降低其频率或严重性。

[0658] 在一些实施例中,卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平是升高的,例如,在来自该受试者的血浆或尿的样本中。在一些实施例中,基于来自该受试者的样本中的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的绝对水平,评估受试者中卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平。在一些实施例中,基于来自该受试者的样本中的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的相对水平,评估受试者中卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的水平。在一些实施例中,相对水平是相对于来自该受试者的样本中的另一种蛋白或化合物的水平,例如,肌酸酐的水平。在一些实施例中,样本是尿样本。在一些实施例中,样本是血浆样本。在一些实施例中,样本是粪便样本。

[0659] 可以确定卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平,例如,通过显示受试者具有的卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG水平(例如,ALA和/或PBG的血浆或尿水平)是大于、或大于或等于参比值。具有治疗卟啉症经验的医师将能够确定卟啉或卟啉前体,(例如,ALA和/或PBG)的水平是否是升高的,例如,出于诊断卟啉症的目的或用于确定受试者是否是处于发展卟啉症的风险中,例如,受试者可能预先倾向于急性发作或与卟啉症相关联的病变,例如像,慢性痛(例如,神经性疼痛)以及神经病变(例如,渐进性神经病变)。

[0660] 如在此使用的,“参比值”是指来当受试者不处于疾病状态时自该受试者的值,或是来自正常或健康受试者的值,或是来自参比样本或群体的值,例如,一组正常或健康的受试者(例如,不携带与卟啉症相关联的突变的一组受试者和/或不经受与卟啉症相关联的症状的一组受试者)。

[0661] 在一些实施例中,参比值是相同个体的疾病前水平。在一些实施例中,参比值是参比样本或群体的水平。在一些实施例中,参比值是参比样本或群体中的平均值或中位值。在一些实施例中,参比值是超过参比样本或群体中平均值的两个标准差的值。在一些实施例中,参比值是超过参比样本或群体中平均值2.5、3、3.5、4、4.5、或5个标准差的值。

[0662] 在一些实施例中,其中受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的

水平,该受试者具有的ALA和/或PBG的水平高于参比值至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。在一些实施例中,受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平,该水平高于参比值至少2、3、4、5、6、7、8、9、或10倍。

[0663] 在一些实施例中,参比值是参比上限。如在此使用的,“参比上限”是指参比样本或群体的95%置信区间上限的一个水平,该样本或群体是,例如,一组正常(例如,野生型)或健康个体,例如,不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体和/或不经受卟啉症的个体。因此,参比下限是指相同95%置信区间下限的一个水平。

[0664] 在一些实施例中,其中受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的升高的水平,例如,血浆水平或尿水平,该水平大于或等于参比值,例如参比上限2倍、3倍、4倍、或5倍。在一些实施例中,受试者具有大于参比上限4倍的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的尿水平。

[0665] 在一些实施例中,参比值是提供于弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006或沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007中的值。在一些实施例中,参比值是提供于沙赫(Sardh)等人的表1中的值。

[0666] 在一些实施例中,受试者是人类并且具有大于或等于4.8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。在某些实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于约3、4、5、6、7、或8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。

[0667] 在实施例中,血浆PBG的参比值是0.12μmol/L。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.10μmol/L、0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或0.60μmol/L的血浆PBG水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的PBG的血浆水平。

[0668] 在实施例中,尿PBG的参比值是1.2mmol/mol肌酸酐。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于1.0mmol/mol肌酸酐、1.2mmol/mol肌酸酐、2.4mmol/mol肌酸酐、3.6mmol/mol肌酸酐、4.8mmol/mol肌酸酐、或6.0mmol/mol肌酸酐的尿PBG水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于4.8mmol/mol肌酸酐的PBG的尿水平。

[0669] 在实施例中,血浆ALA的参比值是0.12μmol/L。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.10μmol/L、0.12μmol/L、0.24μmol/L、0.36μmol/L、0.48μmol/L、或0.60μmol/L的血浆ALA水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于0.48μmol/L的血浆ALA水平。

[0670] 在实施例中,尿ALA的参比值是3.1mmol/mol肌酸酐。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于2.5mmol/mol肌酸酐、3.1mmol/mol肌酸酐、6.2mmol/mol肌酸酐、9.3mmol/mol肌酸酐、12.4mmol/mol肌酸酐、或15.5mmol/mol肌酸酐的尿ALA水平。

[0671] 在实施例中,血浆卟啉的参比值是10nmol/L。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于10nmol/L的血浆卟啉水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于8、10、15、20、25、30、35、40、45、或50nmol/L的血浆卟啉水平。受试者是人类并且具有大于、或大于或等于40nmol/L的血浆卟啉水平。在实施例中,尿卟啉的参比值是25μmol/mol肌酸酐。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或大于或等于25μmol/mol肌酸酐的尿卟啉水平。在实施例中,受试者是人类并且具有大于、或等于20、25、30、35、40、45、

50、55、60、65、70、75、或80 $\mu\text{mol/mol}$ 肌酸酐的尿卟啉水平。

[0672] 在一些实施例中,受试者具有卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG的这样一个水平,例如,血浆水平或尿水平,该水平大于健康个体样本中99%的个体的水平。

[0673] 在一些实施例中,受试者具有ALA或PBG的这样一个水平,例如,血浆水平或尿水平,该水平大于超过健康个体样本中平均水平两个标准差的水平。

[0674] 在一些实施例中,受试者具有的ALA的尿水平是正常受试者(例如,不携带与卟啉症相关联的突变的受试者)平均水平的1.6或更多倍。在一些实施例中,受试者具有的ALA的血浆水平是正常受试者平均水平的2或3倍。在一些实施例中,受试者具有的PBG的尿水平是正常受试者平均水平的四倍或更多倍。在一些实施例中,受试者具有的PBG的血浆水平是正常受试者平均水平的四倍或更多倍。

[0675] 在一些实施例中,该方法有效降低卟啉或卟啉前体,例如,ALA和/或PBG的水平。在实施例中,该方法对于产生升高的卟啉或卟啉前体,例如,ALA或PBG水平的预定下降是有效的。在一些实施例中,预定下降是降低至少10%、20%、30%、40%、或50%。在一些实施例中,预定下降是有效预防或改善症状,例如,疼痛或复发性发作的一个下降。

[0676] 在一些实施例中,预定下降是至少1、2、3、或更多个标准差的一个下降,其中该标准差是基于来自参比样本,例如,如在此所述的参比样本的值确定的。

[0677] 在一些实施例中,预定下降是这样一个下降,该下降使卟啉或卟啉前体水平达到小于,或达到小于或等于参比值(例如,如在此所述的参比值)的一个水平。

[0678] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者经受疼痛,例如,慢性痛。在实施例中,受试者患有卟啉症或处于发展卟啉症的风险中,例如,急性肝性卟啉症,例如,AIP。在实施例中,例如,通过降低疼痛的严重性或治愈疼痛,该方法有效治疗疼痛。在实施例中,该方法有效降低或预防神经损伤。

[0679] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(a)具有升高的ALA和/或PBG的水平并且(b)疼痛,例如,慢性痛。在实施例中,该方法有效降低升高的ALA和/或PBG的水平和/或治疗疼痛,例如,通过降低疼痛的严重性或治愈疼痛。

[0680] 在一些实施例中,受试者是一种动物,充当用于与ALAS1表达相关的失调的模型。

[0681] 在一些实施例中,受试者是一种动物,充当用于卟啉症的模型(例如,具有一个或多个突变的基因修饰动物。在一些实施例中,卟啉症是AIP并且受试者是AIP的动物模型。在这样一种实施例中,受试者是胆色素原脱氢酶缺乏的遗传修饰的小鼠,例如像,描述于林德贝格等人,自然遗传学(Nature Genetics),12:195-199,1996中的小鼠,或描述于安田町(Yasuda,M.),于(Yu,C.)张(Zhang,J.),克拉维罗(Clavero,S.),德尔曼(Edelmann,W.),甘(Gan,L.),菲利普斯(Phillips,J.D.),&德斯耐克(Desnick,R.J.)中的纯合R167Q小鼠。急性间歇性卟啉症:严重地影响的敲入小鼠,模拟人类纯合显性表型。(摘要,2011年10月14日呈递于美国人类遗传学学会(American Society of Human Genetics);项目编号1308F;2012年4月4日开放在线访问,网址是`ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167`);将所有参考通过引用以其整体结合在此。针对在人类中引起纯合显性AIP的突变,已经生成了若干个敲入模型。所用的突变包括,例如,PBG脱氢酶中的R167Q、R173Q、以及R173W。能存活的纯合子包括R167Q/R176Q或R167Q/R173Q,这两者都展示组成型升高的ALA和PBG水平,该水平类似于人类纯合显性的AIP中的表型;在一些实施例中,这样一种能存活

的纯合AIP小鼠模型是该受试者。

[0682] 在一个实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(例如,人类受试者或患者)处于发展卟啉症的风险中或已经被诊断为患有与ALAS1表达相关的失调,例如,卟啉症。在一些实施例中,受试者是经受一种或多种卟啉性症状的一次或多次急性发作的受试者。在其他实施例中,受试者是长期地经受卟啉症的一种或多种症状(例如,疼痛,例如,神经性疼痛和或神经病变,例如,渐进性神经病变)的受试者。在一些实施例中,受试者携带有在此描述的遗传变异(例如,突变)但是此外是无症状的。在一些实施例中,受试者之前接受过如在此描述的血红素产品(例如,氯血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)的治疗。

[0683] 在一些实施例中,有待于根据在此描述的方法进行治疗的受试者(例如患有卟啉症,例如像,AIP的受试者)近期经历过或正在经历一种前驱症状。在一些此类实施例中,对该受试者给予组合治疗,例如,如在此所述的iRNA,以及已知有效对抗卟啉症或其相关联的症状的一种或多种另外的治疗(例如,葡萄糖和/或血红素产品像氯血红素,如在此所述的)。

[0684] 在一个实施例中,将如在此所述的iRNA与葡萄糖或右旋糖组合给予。例如,可以静脉内地提供10%-20%右旋糖生理盐水。典型地,当给予葡萄糖时,每天静脉内给予至少300g的10%葡萄糖。还可以静脉内给予iRNA(例如,LNP配制品中的iRNA),作为用于给予葡萄糖或右旋糖的相同输注的一部分,或作为葡萄糖或右旋糖给予之前、同时、或之后给予的一个单独的输注。在一些实施例中,iRNA是经由不同给予途径(例如,皮下地)给予的。在又一个实施例中,iRNA是与全肠外营养组合给予。可以在全肠外营养给予之前、同时、或之后给予iRNA。

[0685] 在一个实施例中,iRNA是与血红素产品(例如,氯血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)组合给予。在又一个实施例中,iRNA是与血红素产品和葡萄糖、血红素产品和右旋糖、或血红素产品和全肠外营养组合给予的。

[0686] 如在此使用的,“前驱症状”包括受试者先前发展急性发作之前刚刚经历的任何症状。前驱症状的典型症状包括,例如,腹痛、恶心、头痛、心理症状(例如,焦虑)、坐立不安和/或失眠。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中经历疼痛(例如,腹痛和/或头痛)。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中经历恶心。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中经历心理症状(例如,焦虑)。在一些实施例中,受试者在前驱症状过程中变得坐立不安和/或经受失眠。

[0687] 卟啉症的急性“发作”涉及一种或多种卟啉症症状的发病,典型地是在携带有与卟啉症相关联的突变(例如,编码卟啉途径中酶的基因的突变)的患者中。

[0688] 在某些实施例中,ALAS1 iRNA的给予致使如在此所述的一种或多种卟啉或卟啉前体,(例如,ALA和/或PBG)的水平下降。该下降相对于任何适当的对照或参比值是可以测得的。例如,与治疗前(例如,刚刚在治疗之前)的水平相比,在一个个体受试者中可以确定一种或多种卟啉或卟啉前体的水平的下降,例如,下降至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。卟啉前体、卟啉、或卟啉代谢物水平的降低可以使用本领域中已知的任何方法测得。例如,使用瓦-施二氏试验(Watson-Schwartz test)、离子交换层析法、或高效液相层析-质谱法,可以对尿或血浆中的PBG和/或ALA的水平进行评估。参见,

例如,桑奈尔(Thunell)(1993)。

[0689] 在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效降低受试者中ALA和/或PBG的水平。可以在受试者中对来自该受试者的样本中的ALA或PBG的水平进行评估,例如,基于ALA或PBG的绝对水平,或基于ALA或PBG的相对水平(例如,相对于另一种蛋白或化合物的水平,例如,肌酸酐的水平)。在一些实施例中,样本是尿样本。在一些实施例中,样本是血浆样本。

[0690] 在某些实施例中,靶向ALAS1的iRNA是与一种或多种另外的治疗组合给予的,例如,已知在卟啉症或卟啉症症状的治疗中有效的另一种治疗。例如,其他治疗可以是葡萄糖(例如,IV葡萄糖)或血红素产品(例如,氯血红素、精氨酸血红素、或血红素白蛋白)。这种或这些另外的治疗可以是iRNA给予之前、之后或与之一一起给予的。

[0691] iRNA以及另外的治疗剂可以在相同的组合物中,例如,静脉内,组合地给予,或该另外的治疗剂可以作为一个单独的组合物的一部分或通过在此描述的另一种方法给予。

[0692] 在一些实施例中,iRNA的给予,或iRNA与一种或多种另外的治疗(例如,葡萄糖、右旋糖等)的組合的给予降低急性发作的频率(例如,通过预防急性发作以使得它们不再发生,或通过减少某一时间段内发生的发作的数目,例如,每一年发生较少的发作)。在一些此类实施例中,根据常规剂量方案给予iRNA,例如,每天、每周、每两周、或每月一次。

[0693] 在一些实施例中,iRNA是在卟啉症的急性发作之后给予的。在一些此类实施例中,iRNA处于一种组合物中,例如,包括一种脂质配制品,像LNP配制品的一种组合物。

[0694] 在一些实施例中,iRNA是在卟啉症的急性发作过程中给予的。在一些此类实施例中,iRNA处于一种组合物中,例如,包括一种脂质配制品,像LNP配制品的一种组合物或包括GalNAc共轭物的一种组合物。

[0695] 在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效减轻发作的严重性(例如,通过改善与该发作相关联的一种或多种病征或症状)。在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效缩短发作的持续时间。在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效终止发作。在一些实施例中,预防性地给予的iRNA以防止卟啉症的急性发作。在一些此类实施例中,iRNA是处于GalNAc共轭物的形式,例如,处于包括GalNAc共轭物的一种组合物。在一些实施例中,预防性给予是在暴露于或出现诱发因素之前、过程中、或之后给予的。在一些实施例中,受试者处于发展卟啉症的风险中。

[0696] 在一些实施例中,siRNA是在前驱症状过程中给予的。在一些实施例中,前驱症状特征在于疼痛(例如,头痛和/或腹痛)、恶心、心理症状(例如,焦虑)、坐立不安和/或失眠。

[0697] 在一些实施例中,siRNA是在月经周期的一个具体时期过程中,例如,在黄体期过程中给予的。

[0698] 在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效预防发作(例如,与前驱症状和/或诱发因素相关联的复发性发作,例如,与月经周期的一个具体时期,例如,黄体期相关联)。在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效降低发作的频率。在实施例中,ALAS1siRNA的给予有效减轻发作的严重性(例如,通过改善与该发作相关联的一种或多种病征或症状)。在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效缩短发作的持续时间。在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效终止发作。

[0699] 在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效预防或减少疼痛,例如,神经性疼痛的频率或严重性。

[0700] 在一些实施例中,ALAS1siRNA的给予有效预防或减少神经病变的频率或严重性

[0701] 例如,通过与适当的对照相比较,可以确定ALAS1siRNA给予的效果。例如,可以确定急性发作频率的下降,连同一种或多种卟啉或卟啉前体水平的降低,例如,在患有AIP的一组患者中,如与适当的对照相比较的频率下降。对照组(例如,一组类似的个体或处于交叉设计的同一组个体)可以包括,例如,未处理的群体,已经接受针对卟啉症的传统治疗处理的群体(例如,针对AIP的传统治疗可以包括葡萄糖、氯血红素、或两者);已经接受安慰剂、或非靶向性iRNA处理的群体,任选地与一种或多种针对卟啉症的传统治疗(例如,葡萄糖,例如,IV葡萄糖)组合,等。

[0702] 如在此使用的,处于发展卟啉症的“风险中”的受试者包括具有卟啉症家族史和/或一种或多种复发性或慢性卟啉性症状史的受试者,和/或携带有编码血红素生物合成途径中酶的基因的遗传变异(例如,基因突变)的受试者,以及携带有遗传变异(例如,已知与卟啉症相关联的突变)的受试者。

[0703] 在实施例中,变异,例如突变使得个体易于急性发作(例如,一旦暴露于诱发因素,例如,药物、饮食或其他诱发因素,例如,如在此披露的诱发因素)。在实施例中,变异,例如突变是与卟啉或卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)的升高的水平相关联的。在实施例中,变异,例如突变是与慢性疼痛(例如,慢性神经性疼痛)和/或神经病变(例如,渐进性神经病变)相关联的。在实施例中,变异,例如突变是与EMG改变和/或神经传导速度改变相关联的。

[0704] 在实施例中,变异是ALAS1基因中的突变。在实施例中,变异是ALAS1基因启动子的突变,或是ALAS1基因上游或下游区域中的突变。在实施例中,变异是转录因子或与ALAS1相互作用的其他基因的突变。在实施例中,变异是一种变化,例如编码血红素生物合成途径中的酶的基因的突变。

[0705] 在一些实施例中,受试者具有如在此所述的遗传变异(例如,已知与卟啉症相关联的基因突变)。在一些此类实施例中,受试者具有升高的ALA和/或PBG水平(例如,尿或血浆水平)。在一些此类实施例中,受试者不具有升高的ALA和/或PBG的水平。在实施例中,受试者具有如在此所述的遗传变异并且具有其他症状,例如,慢性痛、EMG改变、神经传导速度改变、和/或与卟啉症相关联的其他症状。在实施例中,受试者具有遗传变异但不经受急性发作。

[0706] 在实施例中,受试者具有与AIP、HCP、VP、或ADP相关联的突变。

[0707] 在一些实施例中,卟啉症是AIP。在一些此类实施例中,在PBG脱氨酶基因中,受试者具有变异,例如,至少一个突变。许多PBG脱氨酶突变是本领域中已知的,例如,如报道于赫德卡(Hrdinka,M.)等人生理研究(Physiological Research),55(增刊2):S119-136(2006)中。在一些实施例中,受试者针对PBG脱氨酶突变是杂合的。在其他实施例中,受试者针对PBG脱氨酶突变是纯合的。纯合的受试者在PBG脱氨酶基因中可以携带两个相同突变或两个不同突变。

[0708] 在一些实施例中,卟啉症是HCP。在一些此类实施例中,受试者在编码粪卟啉原III氧化酶的基因中具有变异,例如,至少一个突变。

[0709] 在一些实施例中,卟啉症是VP。在一些此类实施例中,受试者在编码原卟啉原氧化酶的基因中具有变异,例如,至少一个突变。

[0710] 在实施例中,卟啉症是ADP,例如,常染色体隐性ADP。在一些此类实施例中,受试者

在编码ALA脱水酶的基因中具有变异,例如,至少一个突变。

[0711] 在此提供的治疗方法可以用于改善与卟啉症相关联的一种或多种症状,降低与卟啉症相关联发作的频率,降低一旦暴露于诱发因子将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性,或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险。此外,在此提供的方法可以用于降低一种或多种卟啉前体、卟啉和/或相关卟啉产物或代谢物的水平。卟啉前体或卟啉的水平可以在任何生物样本中测得,例如像,尿、血液、粪便、脑脊髓液、或组织样品。该样本可以存在于受试者体内或可以从该受试者获得或提取。在一些实施例中,卟啉症是AIP,并且PBG和/或ALA的水平是下降了的。在一些实施例中,卟啉产物或代谢物是卟吩胆色素、胆色素原、或尿卟啉。卟啉产物或代谢物水平的降低可以使用本领域中已知的任何方法进行测量。例如,使用瓦-施二氏试验(Watson-Schwartz test)、离子交换层析法、或高效液相层析-质谱法,可以对尿或血浆中的PBG和/或ALA的水平进行评估。参见,例如,桑奈尔(Thunell) (1993)。

[0712] 在此描述的方法还可以用于降低经受卟啉症(例如,急性肝性卟啉症,例如,AIP)或处于发展卟啉症的风险中的受试者中的长期升高的卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)水平。用于评估卟啉前体的血浆和尿水平(例如,长期升高的水平)的方法包括,例如,HPLC-质谱法以及离子交换层析术。卟啉前体的水平可以表示为相对于另一种蛋白或化合物(例如,肌酸酐)的水平。参见,例如,弗洛德拉斯(Floderus,Y.)等人,临床化学(Clinical Chemistry),52(4):701-707,2006;沙赫(Sardh)等人,临床药代动力学(Clinical Pharmacokinetics),46(4):335-349,2007

[0713] 如在此使用的,“诱发因素”指的是可以诱导与卟啉症相关联的一种或多种症状的急性发作的一种内源或外源因素。诱发因素包括禁食(或其他形式的减少的或不充分的热量摄入,归因于速成节食、远距离运动等)、代谢应力(例如,感染、手术、国际航空旅行以及心理应激)、内源激素(例如,黄体酮)、吸烟、脂溶性异质化学品(包括,例如,存在于烟草烟雾中的化学品、某些处方药、有机溶剂、杀生物剂、酒精饮料中的组分)、内分泌物因素(例如,生殖激素(女性在经期前可能经历恶化)、合成雌激素类、黄体酮、促排卵药物、以及激素替代疗法)。参见,例如,桑奈尔(Thunell) (1993)。常见诱发因素包括细胞色素P450,包括药物和苯巴比妥。

[0714] 与卟啉症相关联的症状可以包括腹痛或冷烫、头痛、由神经系统异常引起的后果、以及导致皮肤发疹、发疱和瘢痕(光照性皮炎)的光过敏。在某些实施例中,卟啉症是AIP。AIP症状包括胃肠道症状(例如,严重和较轻的局部腹痛、恶心/呕吐、便秘、腹泻、肠梗阻),泌尿症状(排尿困难、尿潴留/失禁、或小便黄赤),神经性症状(例如,感觉神经病变、运动神经病变(例如,影响脑神经和/或导致上臂或下肢无力),发作,神经性疼痛,渐进性神经病变,头痛,神经精神症状(例如,精神错乱、焦虑、激动、幻觉、癔病、谵妄、冷漠、抑郁、恐怖症、精神病、失眠、嗜睡、昏迷),自主神经系统牵连(例如导致心血管症状,像心动过速、高血压、和/或心率失常,连同其他症状,例如,升高的循环的儿茶酚胺水平、显汗、坐立不安、和/或震颤),脱水,以及电解质异常。

[0715] 在一些实施例中,靶向ALAS1的iRNA是与可以用于减轻上述症状中的一种或多种的另一种治疗一起给予的(例如,之前、之后、或同时)。例如,像可以使用麻醉性镇痛药治疗腹痛,像可以使用抗-发作药物治疗发作,像可以使用酚噻嗪治疗恶心/呕吐,并且像可以使

用β-阻断剂治疗心动过速/高血压。

[0716] 术语“降低”(或“增加”)意思是指一个可测量的变化,例如,统计学显著的变化。该变化可以是,例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%或更高变化(例如,降低(或增加),这相对于参比值,例如,未提供iRNA情况下的参比)。

[0717] 本发明进一步涉及iRNA或其药物组合物的用途例如,用于与其他药物和/或其他治疗方法组合治疗与ALAS1表达相关的失调,例如,与已知的药物和/或已知的治疗方法组合,例如像当前使用以用于治疗失调的那些。在一个实施例中,iRNA或其药物组合物可以连同血红蛋白产品(例如,如在此所述的氯血红蛋白、精氨酸血红蛋白、或血红蛋白白蛋白)和/或连同静脉内葡萄糖输注一起给予。在一些实施例中,预防性地使用iRNA或其药物组合物,例如,以预防或改善急性卟啉症的预期发作的症状。该预防性使用的时间可以根据受试者暴露或预期暴露于诱发因素的情况进行确定。如在此描述的,诱发因素可以是已知促成急性发作的任何内源或外源因素。例如,经前期是内源诱发因素,而细胞色素P450诱导药物是外源诱发因素。

[0718] 用于治疗与ALAS1表达相关的失调(例如,卟啉症像AIP)的有效量取决于待治疗的失调的类型、症状的严重性、接受治疗的受试者、该受试者的性别、年龄和总体健康状况、给予模式等。对于任意给定情况,使用常规实验,本领域的普通技术人员可以确定一个适当的“有效量”。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测治疗或预防效果,这在本领域内的普通技术人员的能力范围之内。结合靶向ALAS1的iRNA或其药物组合物的给予,“有效对抗”与ALAS1表达相关的失调是指以临床适当的方式给予以导致有益效果,例如,针对个体患者或针对至少一部分患者,例如,统计学上显著部分的患者。有益效果包括,例如,症状的预防或减少或其他效果。例如,有益效果包括,例如,改进症状(例如,降低严重性或频率),降低发作的严重性或频率,降低发展相关疾病的风险(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)、肝细胞癌),改进的诱发因素耐受能力,改进的生命质量,降低ALAS1表达,降低卟啉或卟啉前体(例如,ALA和/或PBG)的水平(例如,血浆或尿水平)或其他通常被熟悉具体失调类型的治疗的医师认为是积极的效果。

[0719] 当存在改进时,例如,一种或多种疾病状态参数的统计学上显著的改进,或症状不能恶化或发展(否则这些症状将是所预期的),则治疗或预防效果是明显的。作为一个实例,疾病可测量参数中的至少10%的有利改变,例如,至少20%、30%、40%、50%或更多可以表示有效的治疗。也可以使用如本领域已知的给定疾病的实验动物模型,判定给定diRNA剂或这种药物的制剂的功效。当使用实验动物模型时,当观察到标记(例如血浆或尿ALA或PBG)或症状的统计学上显著的降低时,证实了治疗效力。

[0720] 患者可以被给予治疗量的iRNA。该治疗量可以是,例如,0.05–50mg/kg。例如,该治疗量可以是0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、或2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50mg/kg dsRNA。

[0721] 在一些实施例中,iRNA被配制为一种脂质配制品,例如,如在此所述的LNP配制品。在一些此类实施例中,该治疗量是0.05–5mg/kg,例如,0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、或5.0mg/kg dsRNA。在一些实施例中,静脉内给予脂质配制品,例如,LNP配制品。

[0722] 在一些实施例中,通过经一段时间的静脉内输注来给予iRNA,例如,经5分钟、10分

钟、15分钟、20分钟、或25分钟的时间。

[0723] 在一些实施例中，iRNA处于如在此所述的GalNAc共轭物的形式。在一些此类实施例中，治疗量是0.5-50mg，例如，0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50mg/kg dsRNA。在一些实施例中，GalNAc共轭物是皮下给予的。

[0724] 在一些实施例中，重复进行该给予，例如，定期地，像每天、两周（即，每两周）一次持续一个月、两个月、三个月、四个月或更久。在初始治疗方案之后，可以将这些治疗以一个频繁度更低的基础来进行给予。例如，两周一次持续三个月的给予之后，可以每个月一次进行重复给予，持续六个月或一年或更久。

[0725] 在一些实施例中，iRNA剂是以两个或更多个剂量给予的。在一些实施例中后续剂量的数或量取决于所希望的效果的实现，例如，ALAS基因的压制，卟啉或卟啉前体（例如，ALA和/或PBG）水平的降低，或治疗性或预防性效果的实现，例如，与卟啉症相关联的一种或多种症状（例如，疼痛，例如，神经性疼痛）的减少或预防，和/或预防发作或降低与卟啉症相关联的发作的频率和/或严重性。

[0726] 在一些实施例中，iRNA剂是根据一个时间表给予的。例如，可以每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、或每周五次给予该iRNA剂。在一些实施例中，该时间表涉及定期间隔的给予，例如，每小时、每四小时、每六小时、每八小时、每十二小时、每天、每2天、每3天、每4天、每5天、每周、每两周、或每月一次。在实施例中，iRNA剂是每周或每两周一次给予的，以实现所希望的效果，例如，降低ALA和/或PBG的水平，减少疼痛、和/或预防急性发作。

[0727] 在实施例中，该时间表涉及密集的给予，随后是一个较长的时期，在该时期过程中，不给予该试剂。例如，该时间表可以涉及在相对短时期内给予的初始剂量设置（例如，约每6小时、约每12小时、约每24小时、约每48小时、或约每72小时），随后是一个较长的时期，（例如，约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、或约8周），在该时期过程中，不给予iRNA剂。在一个实施例中，iRNA剂初始地按小时给予，并且随后以一个较长的时间间隔给予（例如，每天、每周、每两周、或每月一次）。在另一个实施例中，iRNA剂初始地按天给予，并且随后以一个较长的时间间隔给予（例如，每周、每两周、或每月一次）。在某些实施例中，该较长的时间间隔随着时间增加或基于所希望的效果的实现来确定。在一个具体的实施例中，iRNA剂在急性发作期间每天一次地给予，随后是每周给予（从给予的第八天开始）。在另一个具体的实施例中，iRNA剂在第一周期间每两天一次地给予，随后是每周给予（从给予的第八天开始）。

[0728] 在一个实施例中，给予iRNA剂以预防或降低复发性发作的严重性或频率，例如，与诱发因素相关联的循环发作。在一些实施例中，诱发因素是月经周期。在一些实施例中，重复给予iRNA，例如，每隔一定间隔地给予以预防或降低复发性发作的严重性或频率，例如，与诱发因素（例如，月经周期，例如，月经周期的一个具体时期，例如，黄体期）相关联的循环发作。在一些实施例中，在月经周期的一个具体时期过程中、或基于接受治疗的患者的激素水平（例如，基于与月经周期的一个具体时期相关联的激素水平）给予iRNA。在一些实施例中，在月经周期的一个或多个具体天内，例如，在第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天、第16天、第17天、第18天、第19天、第20天、第21天、第22天、第23天、第24天、第25天、第26天、第27天或第28天

(或对于具有较长月经周期的受试者而言随后的天内)给予iRNA。在一些实施例中,在黄体期过程中,例如,在月经周期的第14-28天之间的一天或多天内(或在具有超过28天的月经周期的受试者中,随后的天内)给予iRNA。在一些实施例中,对受试者的排卵进行评估(例如,使用血液或尿检,检测与排卵相关联的激素,例如,LH)并且在排卵后以预定的时间间隔给予iRNA。在一些实施例中,在排卵之后立即给予iRNA。在一些实施例中,在排卵1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、或18天之后给予iRNA。可任选地重复这些时间表中的任一个,持续一个或多个迭代次数。迭代数目可以取决于所希望的效果的实现,例如,ALAS1基因的压制和/或治疗性或预防性效果的实现,例如,与卟啉症相关联的一种或多种症状的减少或预防、降低与卟啉症相关联的发作的频率。

[0729] 在一些实施例中,给予iRNA剂的初始剂量并对ALA或PBG水平进行检验,例如,给予初始剂量1-48小时,例如,2、4、8、12、或24小时后。在一些实施例中,如果ALA和/或PBG的水平得以降低(例如,至实现预定的降低,例如,正常),和/或如果与卟啉症相关联的症状(例如,疼痛)得以改进(例如,以使得患者是无症状的),不给予另外的剂量,而如果ALA和/或PBG的水平未降低(例如,未实现预定的降低,例如,未正常化),给予ALA或PBG的另外的剂量。在一些实施例中,初始剂量12、24、36、48、60、或72小时后给予另外的剂量。在一些实施例中,如果初始剂量未有效降低ALA和/或PBG的水平,修改另外的剂量,例如,增加以实现ALA或PBG水平的所希望的降低(例如,预定的降低,例如,常态化)。

[0730] 在一些实施例中,预定下降是降低至少10%、20%、30%、40%、或50%。在一些实施例中,预定下降是有效预防或改善症状,例如,疼痛、前驱症状、或复发性发作的一个下降。

[0731] 在一些实施例中,预定下降是至少1、2、3、或更多个标准差的一个下降,其中该标准差是基于来自参比样本,例如,如在此所述的参比样本的值确定的。

[0732] 在一些实施例中,预定下降是这样下降,该下降使卟啉或卟啉前体水平达到小于,或达到小于或等于参比值(例如,如在此所述的参比值)的一个水平。

[0733] 如在此使用的,ALA或PBG水平的“正常”(或“正常的”或“正常化的”水平)是指ALA、或PBG、或两者的一个水平(例如,尿和/或血浆水平),该水平在针对健康个体的预期范围之内,该个体是无症状的个体(例如,不经历疼痛和/或不经受神经病变的个体),或不具有与卟啉症相关联的突变的个体。例如,在一些实施例中,正常化的水平是在正常平均值的两个标准差内。在一些实施例中,正常化的水平是在正常参比限制内,例如,在针对适当对照样本的95%置信区间内,例如,健康个体或不携带与卟啉症相关联的基因突变的个体的样本。在一些实施例中,每隔一段时间对受试者的ALA和/或PBG水平(例如,尿和/或血浆ALA和/或PBG水平)进行监控,当该水平增加超过参比值时,给予另外剂量的iRNA剂。

[0734] iRNA的施用可以降低例如患者的细胞、组织、血液、尿或其他区室中的ALAS1mRNA或蛋白质水平至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%或更多。iRNA的给予可以降低与ALAS1基因表达相关联的产物的水平,例如,一种或多种卟啉或卟啉前体的水平(例如,ALA和/或PBG的水平)。iRNA剂的给予还可以抑制或预防ALAS1mRNA或蛋白水平在AIP急性发作期间的上调。

[0735] 在给予全剂量iRNA之前,可以对患者给予一个较小剂量,例如5%输注剂量,并监控不良作用,例如,过敏反应、或升高的脂质水平或血压。在另一个实例中,可以针对不希望

的效果对患者进行监控。

[0736] 用于调制ALAS1基因表达的方法

[0737] 在又一个方面,本发明提供了用于调制(例如,抑制或激活)ALAS1基因,例如,在细胞中或受试者中的表达的方法。在一些实施例中,细胞是离体、体外、或体内的。在一些实施例中,细胞是类红细胞或肝上皮实质细胞。在一些实施例中,细胞是在受试者(例如,哺乳动物,例如像人类)中的。在一些实施例中,受试者(例如,人类)处于与ALAS1表达相关的疾病的风险中,或被诊断为患有该疾病,如上所述。

[0738] 在一个实施例中,该方法包括以一个有效降低细胞中ALAS1基因的表达的量将该细胞与如在此所述的iRNA相接触。如在此使用的,“接触”包括直接接触一个细胞,连同间接接触一个细胞。例如,当向受试者给予(例如,静脉内或皮下地)包含iRNA的组合物时,该受试者体内的细胞(例如,类红细胞或肝脏细胞像肝上皮实质细胞)可以是被接触的。

[0739] 基于ALAS1mRNA的表达水平、ALAS1蛋白、或与ALAS1基因表达水平功能性相联系的一个参数的水平(例如,卟啉的水平或与卟啉症相关的症状的发病率或严重性),可以对ALAS1基因的表达进行评估。在一些实施例中,ALAS1的表达被抑制至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。在一些实施例中,iRNA具有以下范围内的 IC_{50} :0.001-0.01nM、0.001-0.10nM、0.001-1.0nM、0.001-10nM、0.01-0.05nM、0.01-0.50nM、0.02-0.60nM、0.01-1.0nM、0.01-1.5nM、0.01-10nM。 IC_{50} 值可以相对于适当的对照值被归一化,例如,非靶向性iRNA的 IC_{50} 。

[0740] 在一些实施例中,该方法包括向该细胞中引入在此描述的iRNA并且维持该细胞一段时间,该时间足以获得ALAS1基因的mRNA转录本的降解,由此抑制该细胞中的ALAS1基因的表达。

[0741] 在一个实施例中,该方法包括向哺乳动物给予在此描述的一种组合物,例如,包括靶向ALAS1的iRNA的组合物,以使得靶标ALAS1基因的表达被降低,如持续一个延长的时间,例如,至少两天、三天、四天或更多天,例如,一周、两周、三周、或四周或更久。在一些实施例中,在第一次给予1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、或24小时内,ALAS1表达下降是可检出的。

[0742] 在另一个实施例中,该方法包括向哺乳动物给予如在此所述的组合物以使得靶标ALAS1基因的表达与未处理的动物相比,增加例如,至少10%。在一些实施例中,超过一个延长的持续时间发生ALAS1的激活,例如,至少两天、三天、四天或更多天,例如,一周、两周、三周、或四周或更久。不希望受理论约束,通过稳定ALAS1mRNA转录本,与基因组中启动子相互作用和/或抑制ALAS1表达抑制剂,iRNA可以激活ALAS1表达。

[0743] 对本发明中表征的方法和组合物有用的iRNA特异性靶向ALAS1基因的RNA(初级或经加工的)。用于使用iRNA抑制ALAS1基因的表达的组合物和方法可以如在本文中其他地方描述的制备和执行。

[0744] 在一个实施例中,该方法包括给予包含iRNA的组合物,其中该iRNA包括一个核苷酸序列,该核苷酸序列与待治疗哺乳动物ALAS1基因的RNA转录本的至少一部分互补。当有待治疗的有机体是哺乳动物(比如人类)时,该组合物可以通过本领域内已知的任何手段进行给予,这些手段包括但不限于经口、腹膜内、或肠胃外途径(包括颅内(例如,心室内、实质

内、鞘内)、静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气溶剂)、经鼻、直肠以及局部(包括口腔与舌下)给予)。

[0745] 在某些实施例中,通过静脉内输注或注射给予这些组合物。在一些此类实施例中,这些组合物包括一种脂质配制的siRNA(例如,LNP配制品,像LNP11制剂),以用于静脉内输注。在具体实施例中,此类组合物可以用于治疗卟啉症的急性发作和/或用于预防(例如,降低发作的严重性或频率)。

[0746] 在其他实施例中,皮下给予这些组合物。在一些此类实施例中,这些组合物包括共轭至GalNAc配体的iRNA。在具体实施例中,此类组合物可以用于治疗卟啉症的急性发作或用于预防(例如,降低发作的严重性或频率)。

[0747] 用于降低卟啉或卟啉前体水平的方法

[0748] 在另一个方面中,本发明提供了一种用于降低卟啉或卟啉前体,例如,在细胞中或受试者中的水平的方法。

[0749] 在一些实施例中,细胞是离体(ex vivo)、体外(in vitro)、或体内(in vivo)的。在一些实施例中,细胞是类红细胞或肝上皮实质细胞。在一些实施例中,细胞是肝上皮实质细胞。在一些实施例中,细胞是在受试者(例如,哺乳动物,例如像人类)中的。

[0750] 在一些实施例中,受试者(例如,人类)处于卟啉症的风险中,或被诊断为患有卟啉症,如在此所述。在一些实施例中,该方法有效治疗如在此所述的卟啉症(例如,通过改善与卟啉症相关联的一种或多种症状,降低与卟啉症相关联发作的频率,降低一旦暴露于诱发因素将发生的、与卟啉症相关联的一种或多种症状发作的可能性,或降低发展与卟啉症相关联的病状(例如,神经病变(例如,渐进性神经病变)、肝细胞癌)的风险。在一个实施例中,该方法包括以一个足以降低该细胞或另一个相关细胞或细胞组或该受试者中卟啉或卟啉前体(例如,ALA或PBG)的量将该细胞与如在此所述的RNAi相接触。如在此使用的,“接触”包括直接接触一个细胞,连同间接接触一个细胞。例如,当向受试者给予(例如,静脉内或皮下地)包含RNAi的组合物时,该受试者体内的细胞(例如,类红细胞或肝脏细胞像肝上皮实质细胞)可以是被接触的。如在此使用的,“另一个相关细胞或细胞组”包括其中卟啉或卟啉前体的水平由于该接触而下降的任何细胞或细胞组。例如,该细胞可以是受试者体内存在的组织的一部分(例如,受试者体内存在的肝脏细胞),并且将该受试者体内的细胞与RNAi相接触(例如,接触受试者体内存在的一个或多个肝脏细胞)可以导致另一个相关细胞或细胞组(例如,受试者的神经细胞)或该受试者的组织或体液中(例如,该受试者的尿、血液、血浆、或脑脊髓液中)卟啉或卟啉前体水平的降低。

[0751] 在一些实施例中,卟啉或卟啉前体是选自下组,该组由以下各项组成: δ -氨基乙酰丙酸(ALA)、胆色素原(PBG)、羟甲基胆素(HMB)、尿卟啉原III、粪卟啉原III、原卟啉原IX、以及原卟啉IX。在一些实施例中,卟啉前体是ALA。在一些实施例中,卟啉前体是PBG。在一些实施例中,该方法降低ALA和PBG的水平。卟啉或卟啉前体的水平可以如在此所述的以及如本领域中已知的进行测量。

[0752] 除非另外限定,否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或测试本发明中表征的iRNA和方法,然而现在描述合适的方法和材料。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用方式以其全文结

合。在矛盾的情况下,本发明说明书,包括定义,将占据主导。此外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0753] 实例

[0754] 实例1.siRNA合成

[0755] 试剂来源

[0756] 当本文没有专门给出试剂来源时,这种试剂可以从分子生物学试剂的任何供应商获得,其质量/纯度标准符合分子生物学应用。

[0757] 寡核苷酸合成。

[0758] 全部寡核苷酸在AKTAoligopilot合成仪上合成。以下各项用于寡核苷酸合成:可商购的可控孔度玻璃固相支持体(dT-CPG, **500^Å**,原初合成公司(Prime Synthesis))以及具有标准保护基的RNA亚磷酰胺,5'-O-二甲氧三苯甲基N6-苯甲酰基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基二甲基甲硅烷基-腺苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、5'-O-二甲氧三苯甲基-N4-乙酰基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-胞苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、5'-O-二甲氧三苯甲基-N2--异丁基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-鸟苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺、以及5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-尿苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰乙基亚磷酰胺(皮尔斯核酸技术公司(Pierce Nucleic Acids Technologies))。2'-F亚磷酰胺、5'-O-二甲氧三苯甲基-N4-乙酰基-2'-氟-胞苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基-亚磷酰胺以及5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-氟-尿苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基-亚磷酰胺购自普洛麦格公司(Promega)。全部亚磷酰胺以乙腈(CH₃CN)中的0.2M浓度使用,除了以10% THF/ANC(v/v)中的0.2M浓度使用的鸟苷之外。使用16分钟偶联/再循环时间。活化剂是5-乙基硫代四唑(0.75M,美国国际化学品公司(American International Chemicals));对于PO-氧化,使用碘/水/吡啶并且对于PS-氧化,使用2,6-卢剔啶/ACN(1:1v/v)中的PADS(2%)。

[0759] 3'-配体共轭的链使用含有相应配体的固相支持物合成。例如,从羟脯氨酸-胆固醇亚磷酰胺实施在序列中引入胆固醇单元。胆固醇经6-氨基己酸酯键系至反式-4-羟脯氨酸,以获得羟脯氨酸-胆固醇部分。5'-末端Cy-3和Cy-5.5(荧光团)标记的iRNA从购自生物研究技术公司(Biosearch Technologies)的相应Quasar-570(Cy-3)合成。通过使用适当保护的配体-亚磷酰胺结构单元实现配体与5'-末端和或内部位置的共轭。在活化剂5-(乙基硫代)-1H-四唑存在下,延长的15分钟使无水CH₃CN中的0.1M亚磷酰胺溶液偶联至固态支持物结合的寡核苷酸。使用标准碘-水如报道(1)那样,实施核苷酸间亚磷酸酯氧化成磷酸酯,或通过用叔-丁基过氧化氢/乙腈/水(10:87:3)以10分钟氧化等待时间共轭寡核苷酸。通过使用硫转移试剂如DDTT(购自AM Chemicals)、PADS和或Beaucage试剂将亚磷酸酯氧化成硫代磷酸酯而引入硫代磷酸酯。自行合成胆固醇亚磷酰胺并且以二氯甲烷中的0.1M浓度使用。胆固醇亚磷酰胺的偶联时间是16分钟。

[0760] 脱保护I(核碱基脱保护)

[0761] 在完成合成后,将支持物转移至100mL玻璃瓶(VWR)。从支持物切下寡核苷酸,同时用80mL乙醇氨的混合物[氨:乙醇(3:1)]在55℃持续6.5小时使得碱基和磷酸酯基团脱保护。将瓶在冰上短暂冷却并且随后将乙醇-氨混合物过滤至一只新250-mL瓶。CPG用2x40mL份的乙醇/水(1:1v/v)洗涤。随后通过旋转蒸发器将混合物的体积缩减至约30mL。随后混合

物在干冰上冷冻并在离心真空浓缩机上在真空下干燥。

[0762] 脱保护II (2'-TBDMS基团的移除)

[0763] 将干燥的残余物重悬于26mL的三乙胺、三乙胺三氟化氢 (TEA • 3HF) 或吡啶-HF和DMSO (3:4:6) 中并且在60℃加热90分钟以除去在2'位置的叔-丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS)。反应随后用50mL的20mM乙酸钠淬灭并且调节pH至6.5。将寡核苷酸贮存在制冷器中直至纯化。

[0764] 分析

[0765] 在纯化之前通过高效液相层析 (HPLC) 分析寡核苷酸, 并且缓冲溶液和柱的选择取决于序列和或共轭的配体的性质。

[0766] HPLC纯化

[0767] 通过反相制备型HPLC纯化配体共轭的寡核苷酸。通过阴离子-交换HPLC在自行装填的TSK凝胶柱上纯化未共轭的寡核苷酸。缓冲液是10%CH₃CN中的20mM磷酸钠 (pH 8.5) (缓冲液A) 和10%CH₃CN, 1M NaBr中的20mM磷酸钠 (pH 8.5) (缓冲液B)。将含有全长寡核苷酸的级分池化、脱盐并冻干。将大约0.150D的脱盐寡核苷酸稀释于水中至150μL, 并随后吸取至CGE和LC/MS分析专用小瓶中。随后通过LC-ESMS和CGE分析化合物。

[0768] siRNA制备

[0769] 对于siRNA的一般制备, 将等摩尔量的有义链和反义链在1xPBS中在95℃加热5分钟并且缓慢冷却至室温。通过HPLC分析证实双链体的完整性。

[0770] 下文使用标准命名并且具体是表1的缩写描述核酸序列。

[0771] 表1:核酸序列描述中使用的核苷酸单体的缩写。应当理解在寡核苷酸中存在时这些单体是由5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

[0772]

缩写	一个或多个核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸
Ab	β-L-腺苷-3'-磷酸
Abs	β-L-腺苷-3'-硫代磷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸
As	腺苷-3'-硫代磷酸
C	胞苷-3'-磷酸
Cb	β-L-胞苷-3'-磷酸

[0773]

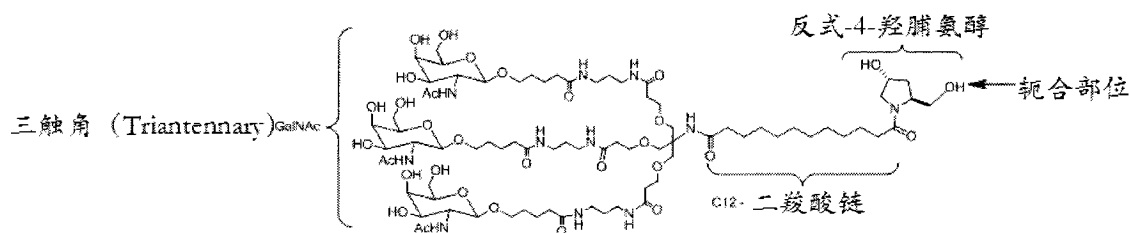
Cbs	β -L-胞苷-3'-硫代磷酸
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸
(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸
G	鸟苷-3'-磷酸
Gb	β -L-鸟苷-3'-磷酸
Gbs	β -L-鸟苷-3'-硫代磷酸
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸
Tb	β -L-胸苷-3'-磷酸
Tbs	β -L-胸苷-3'-硫代磷酸
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
U	尿苷-3'-磷酸
Ub	β -L-尿苷-3'-磷酸
Ubs	β -L-尿苷-3'-硫代磷酸
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸
(Uhds)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸
Us	尿苷-3'-硫代磷酸
N	任何核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸

[0774]

cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
dA	2'-脱氧腺苷-3'-磷酸
dAs	2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸
dCs	2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸
dG	2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸
dGs	2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸
dT	2'-脱氧胸苷
dTs	2'-脱氧胸苷-3'-硫代磷酸
dU	2'-脱氧尿苷
s	硫代磷酸酯键
L96 ¹	N-[三(GalNAc-烷基)-酰氨基癸酰基]-4-羟基脯氨酸 Hyp-(GalNAc-烷基) ₃
(Aeo)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸
(Aeos)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸
(Geo)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-磷酸
(Geos)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-硫代磷酸
(Teo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-磷酸
(Teos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸
(m5Ceo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-磷酸
(m5Ceos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸

[0775] ¹L96的化学结构如下:

[0776]

[0777] 实例2.ALAS1siRNA设计与合成[0778] 实验方法[0779] 生物信息学[0780] 转录本

[0781] 进行siRNA设计以鉴别对NCBI基因库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中注释的人类、恒河猴 (rhesus或Macaca mulatta)、小鼠、与大鼠ALAS1转录本进行靶向的siRNA。设计使用了以下来自NCBI RefSeq集的转录本:人类-NM_000688.4 (参见图3), NM_199166.1; 恒河猴-XM_001090440.2, XM_001090675.2; 小鼠-NM_020559.2; 大鼠-NM_024484.2。由于高等灵长类动物/啮齿动物序列趋异,以若干个单独的批次设计siRNA双链体,包括但不限于包含匹配以下各项的双链体的批次:仅人类和啮齿动物转录本;仅人类、啮齿动物、小鼠和大鼠转录本;以及仅小鼠和大鼠转录本。设计的大多数siRNA双链体与每一设计批次 (见上文) 中所考虑的、列出的人类转录本以及其他物种的转录本具有100%一致性。在一些情况中, (参见表8) 当反义链:靶标mRNA互补碱基对是GC或CG对时,允许在第一反义 (最后有义) 位置处的双链体与mRNA靶标之间的错配。在这些情况下,双链体被设计为在第一反义:最后有义对处具有UA或AU对。因此这些双链体维持互补性但是相对于靶标是错配的 (U:C, U:G, A:C, 或A:G)。这些“UA-交换”双链体中的十八个被设计为人类/恒河猴/小鼠/大鼠集合的一部分 (参见表8中的双链体,其中“C19U”、“G19U”、“C19A”、或“G19A”在位置栏中标注)。

[0782] siRNA设计、特异性以及效果预测

[0783] 从每一序列预测所有可能的19mer的预测特异性。然后对缺少长于7个核苷酸的重复的候选19mer进行选择。使用测试脚本 ‘BruteForce.py’ 中实施的详尽的穷尽蛮力 (“brute-force”) 算法,将该1510个候选人类/恒河猴,114个人类/恒河猴/小鼠/大鼠、以及717个小鼠/大鼠siRNA用于针对适当转录组 (定义为人类、恒河猴、狗、小鼠、或大鼠NCBI Refseq组中NM_和XM_记录的组) 的全面搜索中。该脚本接下来解析该转录本-寡核苷酸比对,以产生基于该siRNA和任何潜在的“脱靶”转录本之间的错配的位置和数目的分数。对脱靶分数进行加权,以强调从该分子的5'末端开始,在位置2-9处,siRNA“种子”区域中的不同。通过求和单个错配得分,来自蛮力搜索 (brute-force search) 的每个寡转录本对被赋予了错配分数;在位置2-9的错配被计数为2.8,在切割位点位置10-11的错配被计数为1.2,并且在区域12-19中的错配被计数为1.0。通过对衍生自每个寡核苷酸的3个不同的种子衍生的六聚物的七聚物和八聚物的频率做比较进行另外的脱靶预测。使用从相对于5'起点开始的位置2-7的六聚物来产生2个七聚物和1个八聚物。我们通过添加3' A到六聚物产生‘七聚物1’;通过添加5' A到六聚物产生七聚物2;通过添加A到该六聚物的5' 和3' 末端产生八聚物。预计算了人类、恒河猴、小鼠或大鼠3' UTRome中八聚物与七聚物的频率 (定义为来自

NCBI Refseq数据库的转录组的子序列,其中编码区域的末端‘CDS’是清楚定义的)。使用来自八聚物频率范围的中值,将八聚物的频率归一化为七聚物的频率。然后通过计算 $((3 \times \text{归一化的八聚物计数}) + (2 \times \text{七聚物2计数}) + (1 \times \text{七聚物1计数}))$ 之和,计算‘mirSeedScore’。

[0784] 两种siRNA链被指定为根据计算分数的特异性分类:得分高于3为高特异性的、等于3为特异性的,并且在2.2与2.8之间为中等特异性的。我们通过该反义链的特异性进行分类。然后我们选择双链体,其反义寡核苷酸在第一位置缺乏GC,在位置13和14两者缺乏G,并且在种子区域具有3个或更多个Us或As(具有高预测效力的双链体的特征)

[0785] 通过在3’方向上延伸反义19mer 4个另外的核苷酸(保留与靶标转录本的完美的互补性),设计在有义链和反义链上分别是21和23个核苷酸长的候选GalNAc-共轭双链体。将该有义链指定为反义23mer的第一个21核苷酸的反向互补体。选择全部23个核苷酸与所有所选物种的转录本维持完美匹配的双链体。

[0786] siRNA序列选择

[0787] 来自人类/恒河猴的90个有义和90个反义,来自人类/恒河猴/小鼠/小鼠/大鼠的40个有义和40个反义,以及来自小鼠/大鼠siRNA 19mer寡核苷酸的40个有义和40个反义全部合成并形成双链体。合成来自人类/恒河猴21/23mer寡核苷酸的总计45个有义和45个反义以获得45GalNAc-共轭双链体。

[0788] 经修饰的双链体的有义链和反义链的序列示于表2中,并且未经修饰的双链体的有义链和反义链的序列示于表3中。

[0789] ALAS1序列的合成

[0790] 在MerMade 192合成仪上以1或0.2umol的规模合成ALAS1序列。单链用2’O-甲基修饰制造,用于使用转染试剂进行体外筛选。用采用21-23mer设计的、在有义链上包含2’F和2’-O-甲基修饰的序列制造3’GalNAc共轭物,以用于在细胞中自由摄取。对于所列出的全部21mer序列,使用如下详述的‘内发光(endolight)’化学。

[0791] • 有义链中的全部嘧啶(胞嘧啶和尿苷)均含有2’-O-甲基碱基(2’O-甲基C和2’-O-甲基U)

[0792] • 在反义链中,与核糖A核苷毗邻(指向5’位置)的嘧啶被它们的相应2-O-甲基核苷替换

[0793] • 在有义序列和反义序列的3’末端均引入一个双碱基dTsdT延长物

[0794] • 序列文件被转换成文本文件,以便使其对在MerMade192合成软件中加载具有相容性

[0795] 对于GalNAc共轭的有义链和互补反义序列,将2’F和其他修饰的核苷与具有2’O-甲基核苷的核糖组合引入。在GalNAc修饰的CPG支持物上进行有义链的合成,并且在通用支持物修饰的CPG上进行反义序列的合成。

[0796] 合成、切割与去保护:

[0797] 使用亚磷酸胺化学,使用固相支持的寡核苷酸合成法合成ALAS1序列。对于21mer内发光(endolight)序列,使用脱氧胸苷CPG作为固相支持物,而对于GalNAc共轭物,对于有义链使用GalNAc固相支持物并且对于反义链使用通用CPG。

[0798] 在96孔板中以1或0.2um的规模进行以上序列的合成。酰亚胺溶液按0.1M浓度制备并且可以乙基硫代四唑(乙腈中的0.6M)作为活化剂。

[0799] 在96孔板中进行合成序列的切割与去保护,在第一步骤中使用甲胺并且在第二步骤使用氟化物试剂。对于含GalNAc和2' F核苷序列,对去保护条件进行修改。使用丙酮:乙醇(80:20)混合物对切割与去保护后序列进行沉淀并且将沉淀物重悬浮在0.2M乙酸钠缓冲液中。将来自每一序列的样品通过LC-MS进行分析以确证一致性、UV用于定量并且通过IEX层析选定样品集以确定纯度。

[0800] 纯化与脱盐:

[0801] 沉淀ALAS1序列并使用葡聚糖凝胶柱在AKTA纯化系统上(AKTA Purifier system)进行纯化。ALAS1ess在环境温度下运行。样品注射与收集在96孔板(孔深1.8mL)中进行。在洗脱液中收集到对应于全长度序列的一个单一峰。将脱盐的ALAS1序列针对浓度(通过在A260处的UV测量)以及纯度(通过离子交换HPLC)进行分析。然后将这些互补单链以1:1化学计量比率进行组合以形成siRNA双链体。

[0802]

表 2：人 ALAS1 修饰的单链和双链体序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	转录本上的位置	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
2	3	522-540	AD-55078.2	cuccGGccAGuGAGAAAGAdTsdT	UCUUUCUcACUGGCCGGAGdTsdT
4	5	669-687	AD-55084.2	uGGcAGcAcAGAuGAaAucAdTsdT	UGAUUcAUCUGUGCUGCcAdTsdT
6	7	790-808	AD-55090.2	cAGuGuGGuuAGuGuGAAAdTsdT	UUUcAcACuAACcAcACUGdTsdT
8	9	853-871	AD-55096.2	cAucAuGcAAAAAGcAAAGAdTsdT	UCUUUGCUUUUGcAUGAUGdTsdT
10	11	876-894	AD-55102.2	AAAGAGuGucucAucucucdTsdT	AGAAGAUGAGAcACUCUUUdTsdT
12	13	877-895	AD-55106.2	AAGAGuGucucAucucucdTsdT	AAGAAGAUGAGAcACUCUUUdTsdT
14	15	914-932	AD-55111.2	ucuGuuuccAcuuuucAGudTsdT	ACUGAAAGUGGAAAcAGAdTsdT

[0803]

16	17	923-941	AD- 55073.2	AcuuuucAGuAuGAucGuudTsdT	AACGAUcAuACUGAAAGUdTsdT
18	19	926-944	AD- 55079.2	uuucAGuAuGAucGuuucudTsdT	AGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT
20	21	927-945	AD- 55085.2	uuucAGuAuGAucGuuucuuudTsdT	AAGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT
22	23	928-946	AD- 55091.2	ucAGuAuGAucGuuucuuudTsdT	AAAGAAACGAUcAuACUGAdTsdT
24	25	932-950	AD- 55097.2	uAuGAucGuuucuuuGAGAdTsdT	UCUcAAAGAAACGAUcAuAdTsdT
26	27	973-991	AD- 55103.2	uGAccAcAccuAucGAGGuudTsdT	AACUCGAuAGGUGUGGUcAdTsdT
28	29	975-993	AD- 55107.2	AccAcAccuAucGAGuuuudTsdT	AAAACUCGAuAGGUGUGGUdTsdT
30	31	1029-1047	AD- 55112.2	uGGcAGAuGAcuAuucAGAdTsdT	UCUGAAuAGUcAUUCUGCcAdTsdT
32	33	1077-1095	AD- 55074.2	ucuGGuGcAGuAAuGAcuAdTsdT	uAGUcAUuACUGcAcAcAGAdTsdT
34	35	1124-1142	AD-	uGuGGGGcAGuuAuGGAcAdTsdT	UGUCcAuAACUGCCCCcAcAdTsdT

[0804]

				55080.2			
36	37	1137-1155		AD- 55086.2	uGGAcAuuuGAAAcAAcAdTsdT	UGUUGUUUcAAAAGUGUCcAdTsdT	
38	39	1182-1200		AD- 55098.2	AuAuuuuGGAACuAGuAAAdTsdT	UuACuAGUUUcCAGAAAuAUdTsdT	
40	41	1184-1202		AD- 55104.2	AuuuGGAACuAGuAAAudTsdT	AUUuACuAGUUUcCAGAAAuUdTsdT	
42	43	1185-1203		AD- 55108.2	uuuGGAACuAGuAAAuudTsdT	AAUUuACuAGUUUcCAGAAAAdTsdT	
44	45	1188-1206		AD- 55113.2	cuGGAACuAGuAAAuuccAdTsdT	UGGAAUUuACuAGUUUcCAGdTsdT	
46	47	1325-1343		AD- 55075.2	uGuGAGAuuuAcucuGAuudTsdT	AAUcAGAGuAAAUcUcAcAdTsdT	
48	49	1364-1382		AD- 55081.2	AuccAAGGGAuucGAAAcAdTsdT	UGUUUCGAAUCCCCUUGGAUdTsd T	
50	51	1382-1400		AD- 55087.2	AGccGAGuGccAAAGuAcAdTsdT	UGuACUUUUGGcACUCGGCUdTsdT	
52	53	1478-1496		AD- 55093.2	uuuGAAAcuGuccAuucAAAdTsdT	UUUGAAUGGAcAGUUUcAAAAdTsdT	

[0805]

54	55	1531-1549	AD- 55099.2	uGAuGuGGccAuGAGuuudTsdT	AAACUcAUGGGCcAcAUcAdTsdT
56	57	1631-1649	AD- 53573.3	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUUGGcAUGACdTsdT
58	59	1637-1655	AD- 55109.2	ccAAAAAuGGAcAucAuuuudTsdT	AAAUcAUGUCcAUUUUUUGGdTsdT
60	61	1706-1724	AD- 55114.2	AcGAGuuucucuGAuuGAcAdTsdT	UGUcAAUcAGAGAACUCGUdTsdT
62	63	1962-1980	AD- 55076.2	AAGucuGuGAuGAACuAAudTsdT	AUuAGUUcAUcAcAGACUUdTsdT
64	65	1967-1985	AD- 55082.2	uGuGAuGAACuAAuGAGcAdTsdT	UGCUcAUuAGUUcAUcAcAdTsdT
66	67	1977-1995	AD- 55088.2	uAAuGAGcAGAcAuAAcAudTsdT	AUGUuAUGUCUGCUcAUuAdTsdT
68	69	2189-2207	AD- 55094.2	uuuGAAGuGAuGAGuGAAAdTsd T	UUUcACUcAUcACUUcAAAAdTsdT
70	71	2227-2245	AD- 55100.2	AGGcuuGAGcAAGuuGGuAdTsdT	uACcAACUUUGCUcAAGCCUdTsdT
72	73	2313-2331	AD-	ucuuCAGAGuuGucuuuAudTsdT	AuAAAAGAcAACUCUGAAGAdTsdT

[0806]

			55105.2			
74	75	2317-2335	AD- 55110.2	cAGAGuuGucuuuAuAuGudTsdT	AcAuAuAAAGAcAACUCUGdTsdT	
76	77	2319-2337	AD- 55115.2	GAGuuGucuuuAuAuGuGAdTsdT	UcAcAuAuAAAGAcAACUCdTsdT	
78	79	2320-2338	AD- 55077.2	AGuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	UUcAcAuAuAAAGAcAACUCdTsdT	
80	81	2344-2362	AD- 55083.2	uuAuAuuuAAAuuuuAAucudTsdT	AGAUuAAAAUuAuAuAAAdTsdT	
82	83	2352-2370	AD- 55089.2	AAuuuuAAucuAuAGuAAAdTsdT	UUuACuAuAGAUuAAAAUdTsdT	
84	85	2353-2371	AD- 55095.2	AuuuuAAucuAuAGuAAAAAdTsdT	UUUuACuAuAGAUuAAAAUdTsdT	
86	87	2376-2394	AD- 55101.2	AGuccuGGAAAuAAAuucudTsdT	AGAAUUuAUUUUCcAGGACUdTsdT	
88	89	358-376	AD- 53511.1	cuGcccAuucuuAucccGAdTsdT	UCGGGAuAAGAAUUGGGcAGdTsdT	
90	91	789-807	AD- 53512.1	ccAGuGuGGuuAGuGuGAAdTsdT	UUcAcACuAACcAcACUGGGdTsdT	

[0807]

92	93	1076-1094	AD- 53513.1	GucuGGuGcAGuAAuGAcu dTsdT	AGUcAUuACUGcACcAGACdTsdT
94	95	1253-1271	AD- 53514.1	GcAcucuGuuuuccucGudTsdT	ACGAGGAAAAcAAAGAGUGCdTsdT
96	97	1544-1562	AD- 53515.1	GAGuuuGGAGcAAucAccudTsdT	AGGUGAUUUGCUCcAAACUCdTsdT
98	99	2228-2246	AD- 53516.1	GGcuuGAGcAAGuuGGuAudTsdT	AuACcAACUUUGCUCcAAAGCCdTsdT
100	101	404-422	AD- 53517.1	GGcAAAUcucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
102	103	404-422	AD- 53517.1	GGcAAAUcucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
104	105	866-884	AD- 53518.1	cAAAGAccAGAAAGAGuGudTsd T	AcACUCUUUCUGGUCUUUGdTsdT
106	107	1080-1098	AD- 53519.1	GGuGcAGuAAuGAcuAccudTsdT	AGGuAGUcAUuACUGcACCCdTsdT
108	109	1258-1276	AD- 53520.1	cuuGuuuuccucGuGcuuudTsdT	AAAGcACGAGGAAAAcAAGdTsdT
110	111	1616-1634	AD-	GGGGAucGGGAuGGAGucAdTsd	UGACUCcAUCCCCGAUCCCCdTsdT

[0808]

			53521.1	T	
112	113	2230-2248	AD- 53522.1	cuuGAGcAAGuuGGuAucudTsdT	AGAuACcAACUUUGCUCaAGdTsdT
114	115	436-454	AD- 53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTsdT
116	117	436-454	AD- 53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGGdTsdT
118	119	885-903	AD- 53524.1	cucAucuuucucAAGAuAAdTsdT	UuAUCUUGAAGAAGAUGAGdTsdT
120	121	1127-1145	AD- 53525.1	GGGGcAGuuAuGGAcAcuudTsdT	AAGUGUCcAuAACUGCCCCCdTsdT
122	123	1315-1333	AD- 53526.1	GAuGccAGGcuGuGAGAuudTsdT	AAUCUcAcAGCCUGGcAUCdTsdT
124	125	1870-1888	AD- 53527.1	GAGAcAGAuGcuAAuGGAudTsdT	AUCcAUuAGcAUCUGUCUCdTsdT
126	127	2286-2304	AD- 53528.1	ccccAGGccAuuAucAuAudTsdT	AuAUGAuAAUGGCCUCUGGGGdTsdT
128	129	489-507	AD- 53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUCUGdTsdT

[0809]

130	131	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGGCUUGdTsdT
132	133	915-933	AD-53530.1	cuGuuuuccAcuuuuuAGuAdTsdT	uACUGAAAAGUGGAAAcAGdTsdT
134	135	1138-1156	AD-53531.1	GGAcAcuuuGAAAcAAcAudTsdT	AUGUUGUUUcAAAGUGUCCdTsdT
136	137	1324-1342	AD-53532.1	cuGuGAGAuuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUCUcAcAGdTsdT
138	139	1927-1945	AD-53533.1	cccuGuGcGGGuuGcAGAudTsdT	AUCUGcAACCCGcAcAGGGdTsdT
140	141	2312-2330	AD-53534.1	GucuuAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdT
142	143	646-664	AD-53535.1	cAcuGcAAGcAAAuGccudTsdT	AGGGcAUUUGCUUGcAGUGdTsdT
144	145	922-940	AD-53536.1	cAcuuuuAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTsdT
146	147	1163-1181	AD-53537.1	GGGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsd T	UUCuAGuAcAcACCUGCCCCdTsdT
148	149	1347-1365	AD-	GGAAccAuGccuccAuGAudTsdT	AUcAUGGAGGcAUGGUUCCdTsdT

[0810]

			53538.1			
150	151	1964-1982	AD- 53539.1	GucuGuGAuGAACuAAuGAdTsdT	UcAUuAGUUcAUcAcAGACdTsdT	
152	153	2321-2339	AD- 53540.1	GuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	AUcAcAuAuAAAGAcAACdTsdT	
154	155	671-689	AD- 53541.1	GcAGcAcAGAuGAaucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT	
156	157	924-942	AD- 53542.1	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAGdTsdT	
158	159	1164-1182	AD- 53543.1	GGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsd T	UUUCuAGuACcACCUGCCCCdTsdT	
160	161	1460-1478	AD- 53544.1	GucucccAAGAuGuGGcAudTsdT	AUGCcAcAAUCUUUGGGGACdTsdT	
162	163	1976-1994	AD- 53545.1	cuAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsdT	UGUuAUGUCUCUcAUuAGdTsdT	
164	165	786-804	AD- 53546.1	GccccAGuGuGGuuAGuGudTsdT	AcACuAAACcAcACUGGGGCdTsdT	
166	167	935-953	AD- 53547.1	GAucGuuucuuuGAGAAAdTsdT	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTsdT	

[0811]

168	169	1165-1183	AD- 53548.1	GGcAGGuGGuAcuAGAAAudTsdT	AUUUCuAGuACcACCUUGCCdTsdT
170	171	1530-1548	AD- 53549.1	GuGAuGuGGcccAuGAGuudTsdT	AACUcAUGGGCcAcAUcACdTsdT
172	173	2003-2021	AD- 53550.1	cAAGcAAucAAuuAcccuAdTsdT	uAGGGuAAUUUGAUUGCUUGdTsdT
174	175	788-806	AD- 53551.1	cccAGuGuGGuuAGuGuGAdTsdT	UcAcACuAACcAcACUGGGdTsdT
176	177	974-992	AD- 53552.1	GAccAcAccuAucGAGuudTsdT	AAACUCGauAGGUGUGGUCdTsdT
178	179	1191-1209	AD- 53553.1	GAAcuAGuAAAuuccAuGudTsdT	AcAUGGAAUuACuAGUUCdTsdT
180	181	1541-1559	AD- 53554.1	cAuGAGuuuGGAGcAAucAdTsdT	UGAUUGCUCcAAACUcAUGdTsdT
182	183	2075-2093	AD- 53555.1	ccccAGAuGAuGAcuAcudTsdT	AGuAGUUCuAUcAUCUGGGGdTsdT
184	185	360-378	AD- 53561.1	GcccAuucuuAucccGAGudTsdT	ACUCGGGAuAAGAAUGGGCdTsdT
186	187	1356-1374	AD-	ccuccAuGAuccAAGGGAudTsdT	AUCCCUUGGAUcAUGGAGGdTsdT

[0812]

			53567.1		
188	189	1631-1649	AD-53573.1	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUUGGcAUGACdTsdT
190	191	1634-1652	AD-53579.1	AuGccAAAAAuGGAcAucAdTsdT	UGAUGUCcAUUUUUUGGcAUdTsdT

表 3: 人 ALAS1 未修饰的单链和双链体序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	转录本上的位置	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
192	193	522-540	AD-55078.2	CUCCGGCCAGUGAGAAAGA	UCUUUUCACUCUGGCCGGAG
194	195	669-687	AD-55084.2	UGGCAGCACAGAUGAAUCA	UGAUUCAUCUGUGCUGCCA
196	197	790-808	AD-55090.2	CAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCCACACUG
198	199	853-871	AD-55096.2	CAUCAUGCAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUUGCAUGAUG
200	201	876-894	AD-55102.2	AAAGAGUGUCUCAUCUUCU	AGAGAUGAGACACUCUUU
202	203	877-895	AD-55106.2	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU
204	205	914-932	AD-55111.2	UCUGUUUCCACUUUUCAGU	ACUGAAAAGUGGAAACAGA
206	207	923-941	AD-55073.2	ACUUUUCAGUAUGAUCGUU	AACGAUCAUACUGAAAAGU
208	209	926-944	AD-55079.2	UUUCAGUAUGAUCGUUUCU	AGAAACGAUCAUACUGAAA

[0813]

210	211	927-945	AD-55085.2	UUCAGUAUGAUCGUUUCUU	AAGAAACGAUCAUACUGAA
212	213	928-946	AD-55091.2	UCAGUAUGAUCGUUUCUU	AAAGAAACGAUCAUACUGA
214	215	932-950	AD-55097.2	UAUGAUCGUUUCUUUGAGA	UCUCAAGAAACGAUCAUA
216	217	973-991	AD-55103.2	UGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGUCA
218	219	975-993	AD-55107.2	ACCACACCUAUCGAGUUUU	AAACUCGAUAGGUGUGGU
220	221	1029-1047	AD-55112.2	UGGCAGAUAGACUAUUCAGA	UCUGAAUAGUCAUCUGCCA
222	223	1077-1095	AD-55074.2	UCUGGUGCAGUAAUGACUA	UAGUCAUUACUGCACCAGA
224	225	1124-1142	AD-55080.2	UGUGGGCAGUUAUGGACA	UGUCCAUAACUGCCCCACA
226	227	1137-1155	AD-55086.2	UGGACACUUUGAAACAACA	UGUUGUUUCAAGUGUCCA
228	229	1182-1200	AD-55098.2	AUAUUUCUGGAACUAGUAA	UUACUAGUUCCAGAAAUAU
230	231	1184-1202	AD-55104.2	AUUUCUGGAACUAGUAAAU	AUUUACUAGUUCCAGAAAU
232	233	1185-1203	AD-55108.2	UUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCCAGAAA
234	235	1188-1206	AD-55113.2	CUGGAACUAGUAAAUCCA	UGGAAUUUACUAGUUCCAG
236	237	1325-1343	AD-55075.2	UGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUUCACACA
238	239	1364-1382	AD-55081.2	AUCCAAGGGAUUCGAAACA	UGUUUCGAAUCCCUUGGAU
240	241	1382-1400	AD-55087.2	AGCCGAGUGCCAAAGUACA	UGUACUUUGGCACUCGGCU
242	243	1478-1496	AD-55093.2	UUUGAAACUGUCCAUAUCAA	UUGAAUGGACACAGUUUCAA
244	245	1531-1549	AD-55099.2	UGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCA
246	247	1631-1649	AD-53573.3	GUCAUGCCCAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC

[0814]

248	249	1637-1655	AD-55109.2	CCAAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUAGUCCAUUUUUGG
250	251	1706-1724	AD-55114.2	ACGAGUUCUCUGAUUGACA	UGUCAUUCAGAGAACUCGU
252	253	1962-1980	AD-55076.2	AAGUCUGUGAUGAACUAAU	AUUAGUUCAUCACAGACUU
254	255	1967-1985	AD-55082.2	UGUGAUGAACUAAUGAGCA	UGCUCAUUAGUUCaucACA
256	257	1977-1995	AD-55088.2	UAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUU AUGUCUGCCUCAUUA
258	259	2189-2207	AD-55094.2	UUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCaucACUUCAAA
260	261	2227-2245	AD-55100.2	AGGCUUGAGCAAGUUGGUA	UACCAACUUGCUCAGCCU
262	263	2313-2331	AD-55105.2	UCUUCAGAGUUGUCUUUAU	AUAAAGACAACUCUGAAGA
264	265	2317-2335	AD-55110.2	CAGAGUUGUCUUUAUAUGU	ACAUUAUAAAGACAACUCUG
266	267	2319-2337	AD-55115.2	GAGUUGUCUUUAUAUGUGA	UCACAUUAUAAAGACAACUC
268	269	2320-2338	AD-55077.2	AGUUGUCUUUAUAUGUGAA	UUCACAUUAUAAAGACAACU
270	271	2344-2362	AD-55083.2	UUUAUAUUAUUUAUUAUCU	AGAUUAAAUUUUAUUAUAA
272	273	2352-2370	AD-55089.2	AAUUUUAUUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUU
274	275	2353-2371	AD-55095.2	AUUUUAUUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAU
276	277	2376-2394	AD-55101.2	AGUCCUGGAAAUAAUUUCU	AGAAUUUAUUUCCAGGACU
278	279	358-376	AD-53511.1	CUGCCCAUUCUUUAUCCCGA	UCGGGAUAAAGAAUGGGCAG
280	281	789-807	AD-53512.1	CCAGUGUGGUUAGUGUGAA	UUCACACUAACCACACUGG
282	283	1076-1094	AD-53513.1	GUCUGGUGCAGUAAUGACU	AGUCAUUACUGCACCAGAC
284	285	1253-1271	AD-53514.1	GCACUCUUGUUUCCUCGU	ACGAGGAAACAAGAGUGC

[0815]

286	287	1544-1562	AD-53515.1	GAGUUUGGAGCAAUCACCU	AGGUGAUUGCUCCAAACUC
288	289	2228-2246	AD-53516.1	GGCUUGAGCAAGUUGUAU	AUACCAACUUGCUCAAGCC
290	291	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAAACAGAGAUUUGCC
292	293	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAAACAGAGAUUUGCC
294	295	866-884	AD-53518.1	CAAAGACCAGAAAGAGUGU	ACACUCUUUCUGGUCUUUG
296	297	1080-1098	AD-53519.1	GGUGCAGUAAUGACUACCU	AGGUAGUCAUUAUCUGCACC
298	299	1258-1276	AD-53520.1	CUUGUUUUCUCUGUCUUU	AAAGCACGAGGAAACAAG
300	301	1616-1634	AD-53521.1	GGGGAUCGGGAUGGAGUCA	UGACUCCAUCCCGAUCCCC
302	303	2230-2248	AD-53522.1	CUUGAGCAAGUUGGUAUCU	AGAUACCAACUUGCUCACAG
304	305	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
306	307	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
308	309	885-903	AD-53524.1	CUCAUCUUCUUCUCAAAGUAA	UUAUCUUUGAAGAAGAUGAG
310	311	1127-1145	AD-53525.1	GGGGCAGUUUAUGGACACUU	AAGUGUCCAUAAACUGCCCC
312	313	1315-1333	AD-53526.1	GAUGCCAGGCUGUGAGAUU	AAUCUCACAGCCUGGCAUC
314	315	1870-1888	AD-53527.1	GAGACAGAUUGCUAUUGGAU	AUCCAUUAGCAUCUGUCUC
316	317	2286-2304	AD-53528.1	CCCCAGGCCAUUAUCAUAU	AUAUGAUAAUUGGCCUGGGG
318	319	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
320	321	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
322	323	915-933	AD-53530.1	CUGUUUCCACUUUUCAGUA	UACUGAAAGUGGAAACAG

[0816]

324	325	1138-1156	AD-53531.1	GGACACUUUGAAACAACAU	AUGUUGUUUCAAAGUGUCC
326	327	1324-1342	AD-53532.1	CUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAG
328	329	1927-1945	AD-53533.1	CCCUGUGCGGUUGCAGAU	AUCUGCAACCCGCACAGGG
330	331	2312-2330	AD-53534.1	GUCUUUCAGAGUUUGUCUUUA	UAAAGACAACUCUCUGAAGAC
332	333	646-664	AD-53535.1	CACUGCAAAGCAA AUGCCCU	AGGGCAUUUUGCUUGCAGUG
334	335	922-940	AD-53536.1	CACUUUUCAGUAUGAUCGU	ACGAUCAUACUGAAAAGUG
336	337	1163-1181	AD-53537.1	GGGGCAGGUGGUACUAGAA	UUCUAGUACCAUCCUGCCCC
338	339	1347-1365	AD-53538.1	GGAAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
340	341	1964-1982	AD-53539.1	GUCUGUGAUGAACUAAUGA	UCAUUAGUUCAUCACAGAC
342	343	2321-2339	AD-53540.1	GUUGUCUUUAU AUGUGAAU	AUUCACAUAAAAGACAAC
344	345	671-689	AD-53541.1	GCAGCACAGAUAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGC
346	347	924-942	AD-53542.1	CUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAG
348	349	1164-1182	AD-53543.1	GGGCAGGUGGUACUAGAAA	UUUCUAGUACCAUCCUGCCC
350	351	1460-1478	AD-53544.1	GUCCCCAAGAUUGUGGCAU	AUGCCACA AU CUUGGGGAC
352	353	1976-1994	AD-53545.1	CUAAUGAGCAGACAUAAACA	UGUUAUGUCUGUCUCAUUAG
354	355	786-804	AD-53546.1	GCCCCAGUGUGGUUAGUGU	ACACUAAACCACACUGGGGC
356	357	935-953	AD-53547.1	GAUCGUUUUCUUUGAGAAA	UUUUCUCAAGAAGAACGAUC
358	359	1165-1183	AD-53548.1	GGCAGGUGGUACUAGAAA	AUUUCUAGUACCAUCCUGCC
360	361	1530-1548	AD-53549.1	GUGAUGUGGCCCAUGAGUU	AACUCAUGGGGCCACAUCAC

[0817]

362	363	2003-2021	AD-53550.1	CAAGCAAUCAAUUACCCUA	UAGGGUAAUUGAUUGCUUG
364	365	788-806	AD-53551.1	CCCAGUGUGGUUAGUGUGA	UCACACUAACCCACACUGGG
366	367	974-992	AD-53552.1	GACCACACCUAUCGAGUUU	AAACUCGAUAGGUGUGGUC
368	369	1191-1209	AD-53553.1	GAACUAGUAAAUUCCAUGU	ACAUUGGAUUUACUAGUUC
370	371	1541-1559	AD-53554.1	CAUGAGUUUGGAGCAAUCA	UGAUUGCUCCAAACUCAUG
372	373	2075-2093	AD-53555.1	CCCCAGAUGAUGAACUACU	AGUAGUUUCAUCAUCUGGGG
374	375	360-378	AD-53561.1	GCCCAUUCUUUUCUCCGAGU	ACUCGGGAUAAAGAAUGGGC
376	377	1356-1374	AD-53567.1	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
378	379	1631-1649	AD-53573.1	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
380	381	1634-1652	AD-53579.1	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU

[0818] 实例3. 针对ALAS1敲低活性,对ALAS1siRNA双链体进行体外筛选。

[0819] 针对体外敲低ALAS1表达的能力对ALAS1siRNA双链体进行筛选。

[0820] 体外筛选

[0821] 细胞培养和转染

[0822] 将Hep3B细胞(ATCC公司,马纳萨斯,弗吉尼亚州(Manassas,VA))在37℃在5%CO₂的气氛中在MEM(ATCC公司)(补充有10%FBS)中生长至接近融合,然后通过胰酶消化从该板释放。转染通过以下进行:将14.8μl的Opti-MEM加每孔0.2μl的Lipofectamine RNAiMax(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州,产品目录号13778-150)与每孔5μl的siRNA双链体添加至96孔板并且在室温孵育15分钟。然后将包含约2x10⁴Hep3B细胞的80μl的完全生长培养基添加至该siRNA混合物。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时或120小时。单剂量实验以10nM和0.1nM双链体终浓度进行并且剂量响应实验以10、1.67、0.27、0.046、0.0077、0.0013、0.00021、0.00004nM双链体终浓度进行。

[0823] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件#:610-12)的总RNA分离

[0824] 收获细胞并且在150μl裂解/结合缓冲液中进行裂解,然后使用Eppendorf Thermomixer在850rpm混合5分钟(混合速度在整个过程中相同)。将十微升磁珠与80μl裂解/结合缓冲液混合物添加至圆底板中并且混合1分钟。使用磁性支座捕获磁珠并且将该上清液除去而不扰动这些珠子。在移出上清液后,将裂解的细胞添加至剩余的珠子并且混合5分钟。在除去上清液后,将磁珠用150μl洗涤缓冲液A(Wash Buffer A)洗涤2次并且混合1分钟。珠子再次被捕获并且去除上清液。然后将珠子用150μl洗涤缓冲液B(Wash Buffer B)进行洗涤,捕获,并且除上清液。然后将珠子用150μl洗脱缓冲液(Elution Buffer)进行洗涤、捕获并且除上清液。允许珠子干燥持续2分钟。在干燥之后,添加50μl的洗脱缓冲液(Elution Buffer)并且在70℃混合5分钟。用磁体捕获珠子持续5分钟。去除40μl的上清液并且添加至另一96孔板中。

[0825] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统公司(Applied Biosystems)),福斯特城(Foster City),加利福尼亚州,Cat#4368813)的cDNA合成

[0826] 将母混合物(每一反应:2μl10×缓冲液、0.8μl 25XdNTP、2μl随机引物、1μl逆转录酶、1μl R Nase抑制剂以及3.2μl H₂O)添加至10μl总RNA中。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(大力神公司,CA)通过以下步骤产生cDNA:25℃ 10min、37℃ 120min、85℃ 5秒、4℃保持。

[0827] 实时PCR

[0828] 将2μl的cDNA添加至母混合物中,该母混合物在一个384孔板(罗氏公司(Roche)产品目录号04887301001)中每一孔包含0.5μl GAPDH TaqMan探针(应用生物系统公司(Applied Biosystems)产品目录号4326317E)、0.5μl ALAS1TaqMan探针(应用生物系统公司,产品目录号Hs00167441_m1)以及5μl Lightcycler 480探针母混合物(罗氏公司,产品目录号#04887301001)。实时PCR在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)上使用ΔΔCt(RQ)测定而完成。将每一双链体在两个独立的转染(各自具有两个生物学重复)中进行测试并且每一转染以一式两份进行测定,除非在总结表中另外指出。

[0829] 为了计算相对倍数变化,使用ΔΔCt方法分析实时数据,并且将这些数据归一化为利用以下这样的细胞而进行的测定:这些细胞是转染了10nM AD-1955的细胞,或是模拟转染的细胞。使用4参数拟合模型使用XLFit计算IC₅₀,并且将IC₅₀归一化为在相同剂量范围内或至其自身最低剂量转染了AD-1955的细胞或原初细胞(naïve cell)。

[0830] 通过ALAS1siRNA双链体体外敲低内源ALAS1表达

[0831] 表4示例了在Hep3B细胞中通过ALAS1修饰的siRNA双链体进行的ALAS1敲低(参见表2)。沉默表示为相对于阴性(萤虫素酶)对照siRNA AD-1955,剩余的RNA信使的分数。每个siRNA的10nM或0.1nM转染之后,如上所述生成数据。使用ALAS1TaqMan探针Hs00167441_m1运行qPCR。

[0832] 表4:ALAS1siRNA转染之后,Hep3B细胞中的ALAS1表达

[0833]

双链体 ID	10 nM Avg	0.1 nM Avg	10 nM STDEV	0.1 nM STDEV
AD-55078.2	0.7	0.87	0.001	0.089
AD-55084.2	0.08	0.3	0	0.04
AD-55090.2	0.06	0.08	0.002	0.003
AD-55096.2	0.61	0.92	0.171	0.34
AD-55102.2	0.63	0.62	0.005	0.069

[0834]

AD-55106.2	0.07	0.08	0.004	0.027
AD-55111.2	0.06	0.23	0.013	0.062
AD-55073.2	0.21	0.4	0.018	0.061
AD-55079.2	0.17	0.43	0.033	0.089
AD-55085.2	0.13	0.21	0.011	0.019
AD-55091.2	0.27	0.55	0.033	0.009
AD-55097.2	0.31	0.38	0.051	0.059
AD-55103.2	0.05	0.11	0.017	0.006
AD-55107.2	0.12	0.24	0.007	0.008
AD-55112.2	0.15	0.2	0.036	0.025
AD-55074.2	0.16	0.45	0.008	0.002
AD-55080.2	0.79	0.99	0.095	0.304
AD-55086.2	0.09	0.22	0.005	0.035
AD-55098.2	0.25	0.51	0.03	0.07
AD-55104.2	0.06	0.1	0.017	0.001
AD-55108.2	0.47	0.65	0.03	0.015
AD-55113.2	0.38	0.62	0.068	0.039
AD-55075.2	0.12	0.28	0.007	0.051
AD-55081.2	0.21	0.51	0.036	0.066
AD-55087.2	0.1	0.19	0.017	0.02
AD-55093.2	0.24	0.56	0.029	0.053
AD-55099.2	0.05	0.18	0.001	0.038
AD-53573.3	0.67	1.07	0.16	0.153
AD-55109.2	0.07	0.23	0.006	0.052
AD-55114.2	0.08	0.16	0.004	0.017
AD-55076.2	0.05	0.14	0.007	0.035
AD-55082.2	0.08	0.3	0.019	0.016
AD-55088.2	0.06	0.12	0.008	0.02
AD-55094.2	0.06	0.18	0.005	0.023
AD-55100.2	0.45	0.83	0.02	0.05
AD-55105.2	0.02	0.05	0.005	0.004
AD-55110.2	0.15	0.19	0.031	0.016
AD-55115.2	0.35	0.58	0.045	0.052
AD-55077.2	0.14	0.14	0.006	0.019
AD-55083.2	0.56	0.98	0.24	0.188
AD-55089.2	0.62	0.79	0.036	0.094
AD-55095.2	0.59	0.92	0.12	0.079
AD-55101.2	0.71	0.97	0.074	0.097
AD-1955	1.00	1.01	0.03	0.04
AD-53511.1	0.84	1.08	0.028	0.0515
AD-53512.1	0.15	0.65	0.062	0.023

[0835]

AD-53513.1	0.34	0.86	0.055	0.011
AD-53514.1	0.12	0.61	0.003	0.008
AD-53515.1	0.25	0.66	0.005	0.004
AD-53516.1	1.05	1.02	0.032	0.011
AD-53517.1	0.145	0.725	0.025	0.0155
AD-53518.1	0.72	0.85	0.045	0.028
AD-53519.1	0.18	0.66	0.061	0.004
AD-53520.1	0.18	0.9	0.041	0.001
AD-53521.1	0.97	1.07	0.01	0.003
AD-53522.1	0.87	1.1	0.065	0.112
AD-53523.1	0.48	0.96	0.0305	0.0255
AD-53524.1	0.11	0.66	0.02	0.006
AD-53525.1	0.71	1.03	0.016	0.01
AD-53526.1	0.23	0.85	0.075	0.01
AD-53527.1	0.25	0.83	0.015	0.017
AD-53528.1	0.44	0.93	0.037	0.006
AD-53529.1	0.185	0.73	0.015	0.014
AD-53530.1	0.1	0.62	0.02	0.003
AD-53531.1	0.48	0.93	0.019	0.045
AD-53532.1	0.06	0.17	0	0.003
AD-53533.1	0.36	0.93	0.025	0.034
AD-53534.1	0.1	0.36	0.014	0.012
AD-53535.1	0.58	1.05	0.036	0.071
AD-53536.1	0.12	0.45	0.009	0.026
AD-53537.1	0.73	0.96	0.101	0.015
AD-53538.1	0.74	1.07	0	0.046
AD-53539.1	0.52	0.97	0.057	0.032
AD-53540.1	0.1	0.47	0.017	0.012
AD-53541.1	0.11	0.29	0.026	0.015
AD-53542.1	0.08	0.23	0.008	0.006
AD-53543.1	0.62	1.01	0.027	0.014
AD-53544.1	0.8	1.04	0.002	0.001
AD-53545.1	0.17	0.73	0.007	0.007
AD-53546.1	0.27	0.93	0.058	0.019
AD-53547.1	0.12	0.28	0.008	0.01
AD-53548.1	0.1	0.34	0.022	0.002
AD-53549.1	0.8	1.04	0.011	0.026
AD-53550.1	0.05	0.54	0.02	0.003
AD-53551.1	0.96	1.16	0.029	0.044
AD-53552.1	0.13	0.5	0.002	0.009
AD-53553.1	0.92	1.1	0.027	0.02

[0836]

AD-53554.1	0.76	0.67	0.005	0.004
AD-53555.1	0.11	0.53	0.009	0.007
AD-53561.1	0.72	0.94	0.014	0.001
AD-53567.1	0.16	0.66	0.019	0.003
AD-53573.1	1.06	1.10	0.019	0.037
AD-53579.1	0.19	0.76	0.036	0.019

[0837] 选择的ALAS1siRNA双链体在体外筛选中的IC₅₀

[0838] 表5示例了选择的ALAS1siRNA双链体的IC₅₀,由内源性表达的ALAS1在Hep3B细胞系中通过ALAS1修饰的siRNA双链体进行的敲低确定(参见表2)。在每个siRNA双链体感染24或120小时后,如上所述生成数据。ALAS1的沉默表示为相对于siRNA AD-1955(用作阴性对照的非靶向性siRNA)的剩余的mRNA信使的分数。使用来自重复进行的转染实验的数据以拟合单线,从而确定IC₅₀。若干个双链体(例如,AD-53541.1、AD-53542.1、以及AD-53547.1)具有在24小时低至大约0.03nM的IC₅₀。大多数双链体具有在24小时低于0.1nM的IC₅₀(例如,AD-53534.1、AD-53536.1、AD-53540.1、AD-53541.1、AD-53542.1、AD-53547.1、AD-53548.1、AD-53550.1、AD-53552.1),并且这些中的一些还具有在120小时低于0.1nM的IC₅₀(例如,AD-53534.1、AD-53540.1、AD-53541.1、AD-53542.1、AD-53547.1、AD-53552.1)。

[0839] 表5:归一化为AD-1955的、选择的ALAS1siRNA双链体的IC₅₀

[0840]

双链体 ID	IC ₅₀ (nM)	
	24 小时	120 小时
AD-53534.1	0.045	0.076
AD-53536.1	0.049	0.105
AD-53540.1	0.054	0.077
AD-53541.1	0.032	0.062
AD-53542.1	0.028	0.093
AD-53547.1	0.03	0.062
AD-53548.1	0.044	0.101
AD-53550.1	0.085	0.152
AD-53552.1	0.077	0.063
AD-53567.1	0.219	0.357
AD-53579.1	0.217	0.566

[0841] 实例4.使用配制为LNP的小鼠/大鼠ALAS1siRNA的体内沉默

[0842] 修饰的双链体AD-53558的序列示于下表6中。

[0843]

表 6: ALAS1 siRNA 双链体 AD-53558.4 的序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	NM_02055 9.2 的转录本上的起始位置	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
383	384	1184	AD-53558	cuGuGAAAnuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUUUcAcAGdTsdT

[0844] 这个双链体被配制为LNP11配制品 (参见上表10)。该LNP-配制的AD-53558siRNA在

小鼠 (N=25只动物;每组5只动物) 和大鼠 (N=20只动物;每组4只动物) 中进行体内检验并进行确认以体内沉默ALAS1mRNA。这些结果显示在图5和图6中。

[0845] 图5显示了siRNA证实了小鼠内的剂量响应效应。当siRNA以1mg/kg给予时,小鼠ALAS1 (mALAS1) mRNA表达被减少约78%;当siRNA以0.3mg/kg给予时,小鼠ALAS1mRNA表达被减少约60%;并且当siRNA以0.1mg/kg给予时,小鼠ALAS1mRNA表达被减少约49%。这些减少是相对于PBS对照表述的。如图5中所示的,还利用了AD-1955LUC对照。

[0846] 同样地,图6显示了siRNA证实了大鼠内的剂量响应效应。当siRNA以1mg/kg给予时,ALAS1RNA表达被减少约70%;当siRNA以0.3mg/kg给予时,ALAS1mRNA表达被减少约62%;并且当siRNA以0.1mg/kg给予时,ALAS1mRNA表达被减少约34%。

[0847] 还在小鼠中检验了沉默持久性 (N=15;每个时间点3只动物)。结果示于图7中,该图显示AD-53558压制mALAS1mRNA约80%,持续至少9天。至少约50%的压制持续至少14天。

[0848] 实例5. ALAS1siRNA在AIP动物模型中的效力

[0849] AD-53558LNP11配制品 (描述于上文实例中的小鼠/大鼠ALAS1siRNA) 的效果在AIP小鼠模型中进行了研究。PBGD敲除是不可行的 (-/-, 0%活性)。杂合的PBGD敲除小鼠 (+/-, 约50%活性) 是可得的但是不具有全生物化学表型并且因此不重现人类疾病表型。因此,所研发的AIP小鼠模型是具有T1/T2等位基因的复合杂合子,包括T1 (+/-) 启动子破坏和T2 (-/-) 剪接位点变更。这些小鼠已经显示具有肝残留的PBGD活性,该活性是约30%的野生型水平,并且具有正常或略微升高的基线血浆ALA和PBG水平。已经发现这些小鼠在生命早期显现正常但是随着年龄增加变得略微变慢和共济失调。在六个月时,这些小鼠已经被记录为发展了病理检查方面的受损的运动协调和肌肉性能以及轴突变性。在年老的小鼠中,小鼠模型病理学研究显示轴突变性、受损的运动协调和肌肉性能。已经发现随着连续i.p.给予苯巴比妥,尿和血浆ALA以及PBG显著增加 (参见林德贝格等人, (1996)、自然遗传学 (Nature Genetics), 12:195-219以及林德贝格等人, (1999) 临床研究杂志 (Journal of Clinical Investigation), 103:1127-34)。通过肝脏中PBGD的AAV-介导的表达拯救小鼠 (安田町 (Yasuda) 等人 (2010), 分子医学 (Molecular Medicine), 1:17-22以及尤组 (Unzu) 等人 (2011), 分子医学, 2:243-50)。

[0850] 在第1天,将小鼠通过i.v.注射给予1mg/kg ALAS1siRNA (n=5) 或LUC AD-1955对照 (n=3)。给予三次苯巴比妥注射 (在第2天、第3天和第4天每天1次注射) 以诱导肝ALAS1以及卟啉前体、ALA和PBG。在第5天收集血浆和过夜尿样本并通过LC-MS测量代谢水平。在血浆中通过LC-MS测量代谢水平并且还在尿中对其进行了测量。在第1天,在第一次处理之前,测量代谢的基线水平。结果示于图8-12以及表12和13中。

[0851] 图8和图9显示了以 μM 计的血浆ALA水平。基线ALA水平低, (n=4), 并且苯巴比妥处理在对照LUC siRNA处理的动物中诱导了显著增加的血浆ALA水平 (n=3)。使用ALAS1siRNA进行的处理抑制血浆ALA的诱导 (n=5), 如在图8中所示的。在所研究的每个个体动物中, ALAS1siRNA持续有效于阻断血浆ALA的诱导 (参见图9)。这些研究表明在这一AIP动物模型中, ALAS1siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的血浆ALA增加。

[0852] 图10和图11显示了以 μM 计的血浆PBG水平。基线PBG水平低 (n=4), 并且苯巴比妥处理在对照LUC siRNA处理的动物中诱导了显著增加的血浆PBG水平 (n=3)。使用ALAS1siRNA进行的处理抑制血浆PBG的诱导 (n=5), 如在图10中所示的。在所研究的每个个

体动物中,ALAS1siRNA持续有效于阻断血浆PBG的诱导(参见图11)。这些研究表明在这一AIP动物模型中,ALAS1siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的血浆PBG增加。

[0853] 表12和13示出了在LUC siRNA (n=2) 对照 (CTR,是指PBS缓冲液处理的动物,n=1) 以及ALAS1siRNA (n=5) 处理的动物中,基线处和苯巴比妥处理后尿ALA和PBG水平。

[0854] 表12:来自显示预防诱导的急性发作的个体小鼠的尿数据

[0855]

小鼠 ID	ALA (微 M/l)	PBG (微 M/L)	肌酸酐 (mg/dl)	ALA (微 M/mg 肌 酸酐)	PBG (微 M/mg 肌 酸酐)	siRNA	PB
-------	----------------	----------------	----------------	-------------------------	-------------------------	-------	----

[0856]

Ha-17-4-6				29.7	7.9	基线	-
Ha-19-5-4/2				15.7	5.1	基线	-
Ha-20-39-4/3				28.6	6.7	基线	-
Ha-20-38-4				21.4	4.7	基线	-
Ha-21-33-4	934.92	483.71	0.4205	222.33	115.03	Luc	+
Ha-21-36-9	944.08	563.53	0.5055	186.76	111.48	Luc	+
Ha-21-18-8	32.88	8.69	0.133	24.72	6.53	ALAS1 ; 1 mg/kg	+
Ha-21-33-7	83.07	23.28	0.426	19.50	5.46	ALAS1 ; 1 mg/kg	+
Ha-21-34-5	59.15	18.41	0.263	22.49	7.00	ALAS1 ; 1 mg/kg	+

[0857] PB代表苯巴比妥。A“+”表明给予苯巴比妥。

[0858] 表13:平均尿数据

[0859]

平均 ALA (微 M/mg 肌酸酐)	平均 PBG (微 M/mg 肌酸酐)
23.8	6.1 AIP 基线
204.55	113.26 Luc-siRNA
22.24	6.33 ALAS1-siRNA

[0860] 在LUC siRNA处理的小鼠(对照)中,苯巴比妥处理诱导强增加(约25-30倍增加)尿中ALA(超过基线水平约9-倍)以及PBG(超过基线水平约19-倍),而这样的增加在ALAS1siRNA处理的小鼠中未观察到。因此,ALAS1siRNA阻断苯巴比妥诱导的尿ALA和PBG的增加。这些结果与血浆测试值一致并且显示在这一AIP动物模型中,ALAS1siRNA处理有效预防与苯巴比妥-诱导的急性发作相关联的尿代谢物(ALA和PBG)的增加。

[0861] 在另外的实验(图12)中,发现苯巴比妥处理诱导小鼠模型肝脏中ALAS1mRNA表达的大的增加(约25倍)。ALAS1siRNA给予完全阻断了ALAS1mRNA诱导。这些结果提供了进一步的证据:ALAS1siRNA在AIP动物模型中是有效的。

[0862] 总之,在该实例中提供的结果显示ALAS1siRNA在急性肝性卟啉症AIP的动物模型中对治疗急性发作是有效的。多个结果测量支持这一结论,包括血浆ALA水平、血浆PBG水平、尿ALA水平、尿PBG水平、以及肝脏ALAS1mRNA表达水平。

[0863] 实例6. 使用GalNAc-共轭的小鼠ALAS1siRNA的体内沉默

[0864] 在该实例中描述的实验研究了三种GalNAc-共轭的siRNA的体内效力(参见表7)。使用如在实例2中描述的那些方法设计并生产这些siRNA。

[0865] 表7:序列AD-57929

[0866]

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	有义序列在转录本上的位置 NM_020559.2	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	反义序列在转录本上的位置 NM_020559.2
385	386	775-795	AD-56211	AfaGfuCfuGfu UfUfCfcAfcUfu UfuCfaAfl96	uUfgAfaAfaGfuGf gaaAfcAfgAfcUfu sUfsg	773-795
387	388	2168-2188	AD-56173	AfcAfuAfgUfa GfCfCfaGfaAfu UfgUfcUfl96	aGfaCfaAfuUfcUf ggcUfaCfuAfuGfu sGfsg	2166-2188
389	390	775-795	AD-57929	AfsasGfuCfuGf uUfUfCfcAfcUf uUfuCfaAfl96	usUfsgAfaAfaGfu GfgaaAfcAfgAfcU fusug	773-795

[0867] 将这些小鼠 (n=40; 对于每一实验条件, n=4) 分成多组: 接受PBS或3mg/kg、10mg/kg、或30mg/kg剂量的siRNA的皮下给予。在给予72小时后, 在肝脏细胞中确定相对于PBS对照的mALAS1/mGAPDH mRNA的水平。这些结果显示于图13中。对于siRNA AD-56211和siRNA AD-56173, 不存在明显的剂量响应效应。相反地, ALAS1siRNA AD-57929在抑制mALAS1表达中显示剂量响应效应。这些结果证明ALAS1GalNAc共轭物有效抑制ALAS1mRNA的体内表达, 并且显示了一个剂量响应效应。

[0868] 实例7. 人siRNAs

[0869] 如在实例2中描述的, 设计并生产另外的人siRNA。基于它们的预测效力, 选择最高的45个siRNA。这45个siRNA的序列提供于表8中。

[0870]

表 8: 人 ALAS1 siRNA 有义和反义序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	转 录 本 上 的 位 置 NM_000688.4	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
391	392	1635-1657	CAUGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCAUGAC
393	394	2352-2374	UAAAUUUUAUUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAUUUAAU
395	396	1324-1346	GGCUGUGAGAUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUUCUCACAGCCUG
397	398	1637-1659	UGCCAAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUAGAUGUCCAUUUUUGGCAUG
399	400	1363-1385	AUGAUCCAAGGGAUUCGAAAC	GUUUCGAAUCCCUUGGGAUCAUGG
401	402	925-947	ACUUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGGAAAAGUGG
403	404	790-812	CCCAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCCACACUGGGGC
405	406	1531-1553	UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUACACACA
407	408	2189-2211	AUUUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAUAUGC
409	410	929-951	UUCAGUAUGAUCGUUUCUUUG	CAAGAAACGAUCAUACUGAAAA
411	412	872-894	GACCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGGUCUU
413	414	706-728	UUCUGCAAAGCCAGUCUUUGAG	CUCAAGACUGGCUUUGCAGAAGA
415	416	1362-1384	CAUGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGGA
417	418	1634-1656	UCAUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAUGACU
419	420	1325-1347	GCUGUGAGAUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACAGCCU

[0871]

421	422	2208-2230	AAGAGAGAAGUCCUAUUUCUC	GAGAAUAGGACUUCUCUCUUUC
423	424	2344-2366	AGUUAUAUAAAUAUUUAUUCU	AGAUUAAAUAUUAAUAUAACUUA
425	426	924-946	CACUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAGUGGA
427	428	873-895	ACCAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUGGUCU
429	430	759-781	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCCUUCUUUCCUCAC
431	432	871-893	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGGUCUUU
433	434	1183-1205	AAUAUUUCUGGAAACUAGUAAA	UUUACUAGUUCAGAAAUUUUC
435	436	2229-2251	AGGCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCAAAGCCUGA
437	438	671-693	UGGCAGCACAGAUAGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCGUGCCAGG
439	440	2187-2209	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUCAAAAGCAG
441	442	913-935	AAUUCUGUUUCCACUUUUCAG	CUGAAAAGUGGAAACAGAUUUUG
443	444	1977-1999	ACUAAUGAGCAGACAUAAACAU	AUGUUAUGUCUGCUCUUAAGUUC
445	446	1174-1196	GGUACUAGAAAUAUUUCUGGA	UCCAGAAAUAUUUCUAGUACCAC
447	448	1810-1832	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC
449	450	892-914	CUUCUUCAAGAUAAAUUGCCA	UGGCAAGUUAUCUUUGAAGAAGAU
451	452	877-899	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUUUCUG
453	454	935-957	AUGAUCGUUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAGAAACGAUCAUAC
455	456	1975-1997	GAACUAAUGAGCAGACAUAAAC	GUUAUGUCUGCUCAUUAGUUCAU
457	458	1478-1500	CAUUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUUGAAUGGACAGUUUCAAAUGCC

[0872]

459	460	2366-2388	UAGUAAAAACAUAAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUACUAUA
461	462	853-875	GACAUCAUGCAAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCCU
463	464	1966-1988	GUCUGUGAUGAACUA AUGAGC	GCUCAUUA GUUCAUCACAGACUU
465	466	928-950	UUUCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGAAAAAG
467	468	1186-1208	AUUUCUGGAACUAAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUUC CAGAAAUAU
469	470	1189-1211	UCUGGAACUAGUAAA AUUCCAU	AUGGAAUUUACUAGUUC CAGAAA
471	472	973-995	AAUGACCACACCCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUC AUUCU
473	474	983-1005	CCUAUCGAGUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAACUCG AUAGGUG
475	476	1185-1207	UAUUUCUGGAAACUAGUAAA AUU	AAUUUACUAGUUC CAGAAAUAU
477	478	2353-2375	AAAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUUACUAUAGAUUAAA AUUUA
479	480	875-897	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAGAUGAGACACUCU UUUCUGGU
481	482	360-378	GCCCAUUCUUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAAGAAUGGGC
483	484	428-446	CAAAACUGCCCCAAGAUGA	UCAUCUUUGGGGCAGUUUUUG
485	486	873-891	CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCU UUUCUG
487	488	874-892	AGAAAGAGUGUCUCAUCU	AAGAUGAGACACUCU UUUCU
489	490	877-895	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUAGAGACACUCUU
491	492	1295-1313	CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG
493	494	1296-1314	UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAAGCCAGGGUGAAGA
495	496	1299-1317	UCACCCUGGCUAAGAUGAU	AUCAUCUUAGCCAGGGUGA

[0873]

497	498	1347-1365	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
499	500	1355-1373	GCCUCCAUGAUCCAAGGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC
501	502	1356-1374	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
503	504	1357-1375	CUCCAUGAUCCAAGGGAUU	AAUCCCUUGGAUCAUGGAG
505	506	1631-1649	GUCAUGCCAAAUAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
507	508	1634-1652	AUGCCAAAUAUGGACAUC	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU
509	510	1635-1653	UGCCAAAUAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCA
511	512	1791-1809	CCUGGAGUCUGUGCGGAU	AUCCGCACAGACUCCAGGG
513	514	1794-1812	UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA
515	516	1921-1939	CAUCAUCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGAUGAUG
517	518	359-377	UGCCCAUUCUUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAAGAAUGGGCA
519	520	362-380	CCAUUCUUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAAGAAUGG
521	522	363-381	CAUUCUUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAAGAAUG
523	524	434-452	UGCCCCAAGAUGAUGGAAU	AUCCAUCUUCUUGGGGCA
525	526	872-890	CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUUCUGG
527	528	875-893	GAAAGAGUGUCUCAUCUUA	UAAGAUGAGACACUCUUUC
529	530	1112-1130	CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCACACACCCGUGGGUG
531	532	1113-1131	ACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCCCACACACCCGUGGGU
533	534	1297-1315	CUUCACCCUGGCCUAAAGAU	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG

[0874]

535	536	1300-1318	CACCCUGGCUAAGAUGAUA	UAUCAUCUUAAGCCAGGGUG
537	538	1301-1319	ACCCUGGCUAAGAUGAUGA	UCAUCAUCUUAAGCCAGGGU
539	540	1348-1366	GAACCAUGCCUCCAUGAUA	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC
541	542	1481-1499	GAAACUGUCCAUAUCAAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC
543	544	1786-1804	UGGAGCCCUGGAGUCUGUA	UACAGACUCCAGGGCUCCA
545	546	1795-1813	GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGACUCC
547	548	1919-1937	CACAUCAUCCUGUGCGGA	UCCGCACAGGGAUGAUGUG
549	550	1922-1940	AUCAUCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU
551	552	1923-1941	UCAUCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA

[0875] 实例8.人siRNA

[0876] 生成了另外的19mer人siRNA。这些siRNA的序列提供于表9中。可以使用在此描述

的方法和/或本领域中已知的方法对这些siRNA的效力进行检验。

[0877] 表9:人ALAS1siRNA有义和反义序列

[0878]

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	转录本上的位置 NM_000688.4	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
553	554	4-22	UAUAUUAAGGCG CCGGCGA	UCGCCGGCGCCUU AAUAUA
555	556	5-23	AUAUUAAGGCGC CGGCGAU	AUCGCCGGCGCCU UAAUAU
557	558	6-24	UAUUAAGGCGCC GGCGAUC	GAUCGCCGGCGCC UUAUAU
559	560	7-25	AUUAAGGCGCCG GCGAUCG	CGAUCGCCGGCGC CUUAAU
561	562	8-26	UUAAGGCGCCGG CGAUCGC	GCGAUCGCCGGCG CCUUAU
563	564	9-27	UAAGGCGCCGGC GAUCGCG	CGCGAUCGCCGGC GCCUUA
565	566	10-28	AAGGCGCCGGCG AUCGCGG	CCGCGAUCGCCGG CGCCUU
567	568	11-29	AGGCGCCGGCGA UCGCGGC	GCCGCGAUCGCCG GCGCCU
569	570	12-30	GGCGCCGGCGAU CGCGGCC	GGCCGCGAUCGCC GGCGCC
571	572	13-31	GCGCCGGCGAUC GCGGCCU	AGGCCGCGAUCGC CGGCGC
573	574	14-32	CGCCGGCGAUCGC GGCCUG	CAGGCCGCGAUCG CCGGCG
575	576	81-99	CUUGAGUGCCCG CCUCCUU	AAGGAGGCGGGC ACUCAAG
577	578	82-100	UUGAGUGCCCGC CUCCUUC	GAAGGAGGCGGG CACUCAA
579	580	83-101	UGAGUGCCCGCC UCCUUCG	CGAAGGAGGCGG GCACUCA
581	582	84-102	GAGUGCCCGCCUC	GCGAAGGAGGCG

[0879]

			CUUCGC	GGCACUC
583	584	85-103	AGUGCCCGCCUCC UUCGCC	GGCGAAGGAGGC GGGCACU
585	586	86-104	GUGCCCGCCUCCU UCGCCG	CGGCGAAGGAGGC GGGCAC
587	588	87-105	UGCCCGCCUCCUU CGCCGC	GCGGCGAAGGAG GCGGGCA
589	590	88-106	GCCCGCCUCCUUC GCCGCC	GGCGGCGAAGGA GGCGGGC
591	592	89-107	CCCGCCUCCUUCG CCGCCG	CGGCGGCGAAGGA GGCGGG
593	594	90-108	CCGCCUCCUUCGC CGCCGC	GCGGCGGCGAAGG AGGCGG
595	596	91-109	CGCCUCCUUCGCC GCCGCC	GGCGGCGGCGAAG GAGGCG
597	598	92-110	GCCUCCUUCGCCG CCGCCU	AGGCGGCGGCGAA GGAGGC
599	600	93-111	CCUCCUUCGCCGC CGCCUC	GAGGCGGCGGCGA AGGAGG
601	602	356-374	CGCUGCCCAUUCU UAUCCC	GGGAUAAGAAUG GGCAGCG
603	604	357-375	GCUGCCCAUUCU UAUCCCG	CGGGAUAAGAAU GGGCAGC
605	606	359-377	UGCCCAUUCUUA UCCCGAG	CUCGGGAUAAGA AUGGGCA
607	608	361-379	CCCAUUCUUAUCC CGAGUC	GACUCGGGAUAA GAAUGGG
609	610	362-380	CCAUUCUUAUCCC GAGUCC	GGACUCGGGAUA AGAAUGG
611	612	363-381	CAUUCUUAUCCC GAGUCCC	GGGACUCGGGAU AAGAAUG
613	614	364-382	AUUCUUAUCCCG AGUCCCC	GGGGACUCGGGA UAAGAAU
615	616	365-383	UUCUUAUCCCGA GUCCCC	GGGGGACUCGGG AUAAGAA
617	618	366-384	UCUUAUCCCGAG UCCCCCA	UGGGGGACUCGG GAUAAGA
619	620	367-385	CUUAUCCCGAGU CCCCCAG	CUGGGGGACUCGG GAUAAG
621	622	368-386	UUAUCCCGAGUC CCCCAGG	CCUGGGGGACUCG GGAUAA
623	624	369-387	UAUCCCGAGUCCC	GCCUGGGGGACUC

[0880]

			CCAGGC	GGGAUA
625	626	370-388	AUCCCGAGUCCCC CAGGCC	GGCCUGGGGGACU CGGGAU
627	628	371-389	UCCCGAGUCCCC AGGCCU	AGGCCUGGGGGAC UCGGGA
629	630	372-390	CCCGAGUCCCCA GGCCUU	AAGGCCUGGGGG ACUCGGG
631	632	373-391	CCGAGUCCCCCAG GCCUUU	AAAGGCCUGGGG GACUCGG
633	634	374-392	CGAGUCCCCCAGG CCUUUC	GAAAGGCCUGGG GGACUCG
635	636	375-393	GAGUCCCCCAGGC CUUUCU	AGAAAGGCCUGG GGGACUC
637	638	376-394	AGUCCCCCAGGCC UUUCUG	CAGAAAGGCCUGG GGGACU
639	640	377-395	GUCCCCCAGGCCU UUCUGC	GCAGAAAGGCCUG GGGGAC
641	642	378-396	UCCCCCAGGCCUU UCUGCA	UGCAGAAAGGCCU GGGGGA
643	644	379-397	CCCCCAGGCCUUU CUGCAG	CUGCAGAAAGGCC UGGGGG
645	646	380-398	CCCCAGGCCUUUC UGCAGA	UCUGCAGAAAGGC CUGGGG
647	648	381-399	CCCAGGCCUUUCU GCAGAA	UUCUGCAGAAAG GCCUGGG
649	650	382-400	CCAGGCCUUUCU GCAGAAA	UUUCUGCAGAAA GGCCUGG
651	652	383-401	CAGGCCUUUCUG CAGAAAG	CUUUCUGCAGAAA GGCCUG
653	654	384-402	AGGCCUUUCUGC AGAAAGC	GCUUUCUGCAGAA AGGCCU
655	656	385-403	GGCCUUUCUGCA GAAAGCA	UGC UUUCUGCAGA AAGGCC
657	658	386-404	GCCUUUCUGCAG AAAGCAG	CUGC UUUCUGCAG AAAGGC
659	660	387-405	CCUUUCUGCAGA AAGCAGG	CCUGC UUUCUGC GAAAGG
661	662	388-406	CUUUCUGCAGAA AGCAGGC	GCCUGC UUUCUGC AGAAAG
663	664	389-407	UUUCUGCAGAAA GCAGGCA	UGCCUGC UUUCUG CAGAAA
665	666	390-408	UUCUGCAGAAAG	UUGCCUGC UUUCU

[0881]

			CAGGCAA	GCAGAA
667	668	391-409	UCUGCAGAAAGC AGGCAAA	UUUGCCUGCUUUC UGCAGA
669	670	392-410	CUGCAGAAAGCA GGCAAU	AUUUGCCUGCUUU CUGCAG
671	672	393-411	UGCAGAAAGCAG GCAAUC	GAUUUGCCUGCUU UCUGCA
673	674	394-412	GCAGAAAGCAGG CAAUCU	AGAUUUGCCUGCU UUCUGC
675	676	395-413	CAGAAAGCAGGC AAUCUC	GAGAUUUGCCUGC UUUCUG
677	678	396-414	AGAAAGCAGGCA AAUCUCU	AGAGAUUUGCCU GCUUUCU
679	680	397-415	GAAAGCAGGCAA AUCUCUG	CAGAGAUUUGCCU GCUUUC
681	682	398-416	AAAGCAGGCAAA UCUCUGU	ACAGAGAUUUGCC UGCUIU
683	684	399-417	AAGCAGGCAAAU CUCUGUU	AACAGAGAUUUG CCUGCUU
685	686	400-418	AGCAGGCAAAUC UCUGUUG	CAACAGAGAUUU GCCUGCU
687	688	401-419	GCAGGCAAAUCU CUGUUGU	ACAACAGAGAUU UGCCUGC
689	690	402-420	CAGGCAAAUCUC UGUUGUU	AACAACAGAGAU UUGCCUG
691	692	403-421	AGGCAAAUCUCU GUUGUUC	GAACAACAGAGA UUUGCCU
693	694	405-423	GCAAAUCUCUGU UGUUCUA	UAGAACAACAGA GAUUUGC
695	696	406-424	CAAUCUCUGUU GUUCUAU	AUAGAACAACAG AGAUUUG
697	698	407-425	AAAUCUCUGUUG UUCUAUG	CAUAGAACAACAG AGAUUU
699	700	408-426	AAUCUCUGUUGU UCUAUGC	GCAUAGAACAACA GAGAUU
701	702	409-427	AUCUCUGUUGUU CUAUGCC	GGCAUAGAACAAC AGAGAU
703	704	410-428	UCUCUGUUGUUC UAUGCCC	GGGCAUAGAACA ACAGAGA
705	706	411-429	CUCUGUUGUUCU AUGCCCA	UGGGCAUAGAAC AACAGAG
707	708	412-430	UCUGUUGUUCUA	UUGGGCAUAGAA

[0882]

			UGCCCAA	CAACAGA
709	710	413-431	CUGUUGUUCUAU GCCCAA	UUUGGGCAUAGA ACAACAG
711	712	414-432	UGUUGUUCUAUG CCCAAAA	UUUUGGGCAUAG ACAACA
713	714	415-433	GUUGUUCUAUGC CCAAAAC	GUUUUGGGCAUA GAACAAC
715	716	416-434	UUGUUCUAUGCC CAAACU	AGUUUUGGGCAU AGAACA
717	718	417-435	UGUUCUAUGCCC AAAACUG	CAGUUUUGGGCA UAGAACA
719	720	418-436	GUUCUAUGCCCA AACUGC	GCAGUUUUGGGC AUAGAAC
721	722	419-437	UUCUAUGCCCAA AACUGCC	GGCAGUUUUGGG CAUAGAA
723	724	420-438	UCUAUGCCCAAA ACUGCCC	GGGCAGUUUUGG GCAUAGA
725	726	421-439	CUAUGCCCAAAA CUGCCCC	GGGGCAGUUUUG GGCAUAG
727	728	422-440	UAUGCCCAAAAC UGCCCCA	UGGGGCAGUUUU GGGCAUA
729	730	423-441	AUGCCCAAAACU GCCCAA	UUGGGGCAGUUU UGGGCAU
731	732	424-442	UGCCCAAAACUG CCCAAG	CUUGGGGCAGUU UUGGGCA
733	734	425-443	GCCCAAAACUGCC CCAAGA	UCUUGGGGCAGU UUUGGGC
735	736	426-444	CCCAAAACUGCCC CAAGAU	AUCUUGGGGCAG UUUUGGG
737	738	427-445	CCAAAACUGCCCC AAGAUG	CAUCUUGGGGCAG UUUUGG
739	740	429-447	AAAACUGCCCCA AGAUGAU	AUCAUCUUGGGGC AGUUUU
741	742	430-448	AAACUGCCCCAA GAUGAUG	CAUCAUCUUGGGG CAGUUU
743	744	431-449	AACUGCCCCAAG AUGAUGG	CCAUCAUCUUGGG GCAGUU
745	746	432-450	ACUGCCCCAAGA UGAUGGA	UCCAUCAUCUUGG GGCAGU
747	748	433-451	CUGCCCCAAGAU GAUGGAA	UCCAUCAUCUUG GGGCAG
749	750	434-452	UGCCCCAAGAUG	CUCCAUCAUCUU

[0883]

			AUGGAAG	GGGGCA
751	752	435-453	GCCCCAAGAUGA UGGAAGU	ACUUCCAUCAUCU UGGGGC
753	754	437-455	CCCAAGAUGAUG GAAGUUG	CAACUCCAUCAU CUUGGG
755	756	438-456	CCAAGAUGAUGG AAGUUGG	CCAACUCCAUCA UCUUGG
757	758	439-457	CAAGAUGAUGGA AGUUGGG	CCCAACUCCAUC AUCUUG
759	760	440-458	AAGAUGAUGGAA GUUGGGG	CCCCAACUCCA CAUCU
761	762	441-459	AGAUGAUGGAAG UUGGGGC	GCCCCAACUCCA UCAUCU
763	764	442-460	GAUGAUGGAAGU UGGGGCC	GGCCCCAACUCC AUCUCC
765	766	443-461	AUGAUGGAAGUU GGGGCCA	UGGGCCCCAACU CAUCAU
767	768	444-462	UGAUGGAAGUUG GGGCCAA	UUGGGCCCCAACU CCAUCA
769	770	445-463	GAUGGAAGUUGG GGCCAAG	CUUGGGCCCCAACU UCCAUC
771	772	446-464	AUGGAAGUUGGG GCCAAGC	GCUUGGGCCCCAAC UCCAUC
773	774	447-465	UGGAAGUUGGGG CCAAGCC	GGCUUGGGCCCCAA CUCCA
775	776	448-466	GGAAGUUGGGGC CAAGCCA	UGGCUUGGGCCCCA ACUCC
777	778	449-467	GAAGUUGGGGCC AAGCCAG	CUGGCUUGGGCCCC AACUUC
779	780	450-468	AAGUUGGGGGCCA AGCCAGC	GCUGGCUUGGGCCC CAACUU
781	782	451-469	AGUUGGGGGCCAA GCCAGCC	GGCUGGCUUGGCC CCAACU
783	784	452-470	GUUGGGGGCCAA CCAGCCC	GGGCUGGCUUGGC CCAAC
785	786	453-471	UUGGGGGCCAAGC CAGCCCC	GGGGCUGGCUUG GCCCCAA
787	788	454-472	UGGGGGCCAAGCC AGCCCCU	AGGGGCUGGCUU GGCCCCA
789	790	455-473	GGGGCCAAGCCA GCCCCUC	GAGGGGCUGGCU UGGCCCC
791	792	456-474	GGGCCAAGCCAG	CGAGGGGCUGGCU

[0884]

			CCCCUCG	UGGCCC
793	794	457-475	GGCCAAGCCAGCC CCUCGG	CCGAGGGGCUGGC UUGGCC
795	796	458-476	GCCAAGCCAGCCC CUCGGG	CCCGAGGGGCUGG CUUGGC
797	798	459-477	CCAAGCCAGCCCC UCGGGC	GCCCGAGGGGCUG GCUUGG
799	800	460-478	CAAGCCAGCCCCU CGGGCA	UGCCCGAGGGGCU GGCUUG
801	802	461-479	AAGCCAGCCCCUC GGGCAU	AUGCCCGAGGGGC UGGCUU
803	804	462-480	AGCCAGCCCCUCG GGCAUU	AAUGCCCGAGGGG CUGGCU
805	806	463-481	GCCAGCCCCUCGG GCAUUG	CAAUGCCCGAGGG GCUGGC
807	808	464-482	CCAGCCCCUCGGG CAUUGU	ACAAUGCCCGAGG GGCUGG
809	810	465-483	CAGCCCCUCGGGC AUUGUC	GACAAUGCCCGAG GGGCUG
811	812	466-484	AGCCCCUCGGGCA UUGUCC	GGACAAUGCCCGA GGGGCU
813	814	467-485	GCCCCUCGGGCAU UGUCCA	UGGACAAUGCCCG AGGGGC
815	816	468-486	CCCCUCGGGCAUU GUCCAC	GUGGACAAUGCCC GAGGGG
817	818	469-487	CCUCGGGCAUU GUCCACU	AGUGGACAAUGCC CGAGGG
819	820	470-488	CCUCGGGCAUUG UCCACUG	CAGUGGACAAUGC CCGAGG
821	822	471-489	CUCGGGCAUUGU CCACUGC	GCAGUGGACAAU GCCCGAG
823	824	472-490	UCGGGCAUUGUC CACUGCA	UGCAGUGGACAA UGCCCGA
825	826	473-491	CGGGCAUUGUCC ACUGCAG	CUGCAGUGGACAA UGCCCG
827	828	474-492	GGGCAUUGUCCA CUGCAGC	GCUGCAGUGGACA AUGCCC
829	830	475-493	GGCAUUGUCCAC UGCAGCA	UGCUGCAGUGGAC AAUGCC
831	832	476-494	GCAUUGUCCACU GCAGCAG	CUGCUGCAGUGGA CAAUGC
833	834	477-495	CAUUGUCCACUG	ACUGCUGCAGUGG

[0885]

			CAGCAGU	ACAAUG
835	836	478-496	AUUGUCCACUGC AGCAGUA	UACUGCUGCAGUG GACAAU
837	838	479-497	UUGUCCACUGCA GCAGUAC	GUACUGCUGCAGU GGACAA
839	840	480-498	UGUCCACUGCAG CAGUACA	UGUACUGCUGCAG UGGACA
841	842	481-499	GUCCACUGCAGC AGUACAC	GUGUACUGCUGCA GUGGAC
843	844	482-500	UCCACUGCAGCA GUACACU	AGUGUACUGCUGC AGUGGA
845	846	483-501	CCACUGCAGCAG UACACUA	UAGUGUACUGCU GCAGUGG
847	848	484-502	CACUGCAGCAGU ACACUAC	GUAGUGUACUGC UGCAGUG
849	850	485-503	ACUGCAGCAGUA CACUACC	GGUAGUGUACUG CUGCAGU
851	852	486-504	CUGCAGCAGUAC ACUACCA	UGGUAGUGUACU GCUGCAG
853	854	487-505	UGCAGCAGUACA CUACCAA	UUGGUAGUGUAC UGCUGCA
855	856	488-506	GCAGCAGUACAC UACCAAC	GUUGGUAGUGUA CUGCUGC
857	858	490-508	AGCAGUACACUA CCAACAG	CUGUUGGUAGUG UACUGCU
859	860	491-509	GCAGUACACUAC CAACAGA	UCUGUUGGUAGU GUACUGC
861	862	492-510	CAGUACACUACC AACAGAU	AUCUGUUGGUAG UGUACUG
863	864	493-511	AGUACACUACCA ACAGAU	GAUCUGUUGGUA GUGUACU
865	866	494-512	GUACACUACCAA CAGAUCA	UGAUCUGUUGGU AGUGUAC
867	868	495-513	UACACUACCAAC AGAUCAA	UUGAUCUGUUGG UAGUGUA
869	870	496-514	ACACUACCAACA GAUCAA	UUUGAUCUGUUG GUAGUGU
871	872	497-515	CACUACCAACAG AUCAAAG	CUUUGAUCUGUU GGUAGUG
873	874	498-516	ACUACCAACAGA UCAAGA	UCUUUGAUCUGU UGGUAGU
875	876	499-517	CUACCAACAGAU	UUCUUUGAUCUG

[0886]

			CAAAGAA	UUGGUAG
877	878	500-518	UACCAACAGAUCA AAAGAAA	UUUCUUUGAUCU GUUGGUA
879	880	501-519	ACCAACAGAUCA AAGAAAC	GUUUCUUUGAUC UGUUGGU
881	882	502-520	CCAACAGAUCAA AGAAACC	GGUUUCUUUGAU CUGUUGG
883	884	523-541	UCCGGCCAGUGA GAAAGAC	GUCUUUCUCACUG GCCGGA
885	886	524-542	CCGGCCAGUGAG AAAGACA	UGUCUUUCUCACU GGCCGG
887	888	525-543	CGGCCAGUGAGA AAGACAA	UUGUCUUUCUCAC UGGCCG
889	890	526-544	GGCCAGUGAGAA AGACAAA	UUUGUCUUUCUCA CUGGCC
891	892	527-545	GCCAGUGAGAAA GACAAA	UUUUGUCUUUCUC ACUGGC
893	894	528-546	CCAGUGAGAAAG ACAAAAC	GUUUUGUCUUUC UCACUGG
895	896	529-547	CAGUGAGAAAGA CAAACU	AGUUUUGUCUUU CUCACUG
897	898	530-548	AGUGAGAAAGAC AAAACUG	CAGUUUUGUCUU UCUCACU
899	900	531-549	GUGAGAAAGACA AAACUGC	GCAGUUUUGUCU UUCUCAC
901	902	570-588	CUCCUGAUGGAU CCCAGCA	UGCUGGGAUCCAU CAGGAG
903	904	571-589	UCCUGAUGGAUC CCAGCAG	CUGCUGGGAUCCA UCAGGA
905	906	572-590	CCUGAUGGAUCC CAGCAGA	UCUGCUGGGAUCC AUCAGG
907	908	573-591	CUGAUGGAUCCC AGCAGAG	CUCUGCUGGGAUC CAUCAG
909	910	574-592	UGAUGGAUCCCA GCAGAGU	ACUCUGCUGGGAU CCAUCA
911	912	575-593	GAUGGAUCCAG CAGAGUC	GACUCUGCUGGGA UCCAUC
913	914	576-594	AUGGAUCCAGC AGAGUCC	GGACUCUGCUGGG AUCCA
915	916	577-595	UGGAUCCAGCA GAGUCCA	UGGACUCUGCUGG GAUCCA
917	918	578-596	GGAUCCAGCAG	CUGGACUCUGCUG

[0887]

			AGUCCAG	GGAUCC
919	920	579-597	GAUCCCAGCAGA GUCCAGA	UCUGGACUCUGCU GGGAUC
921	922	580-598	AUCCCAGCAGAG UCCAGAU	AUCUGGACUCUGC UGGGAU
923	924	581-599	UCCCAGCAGAGU CCAGAU	CAUCUGGACUCUG CUGGGA
925	926	582-600	CCCAGCAGAGUCC AGAUGG	CCAUCUGGACUCU GCUGGG
927	928	583-601	CCAGCAGAGUCC AGAUGGC	GCCAUCUGGACUC UGCUGG
929	930	584-602	CAGCAGAGUCCA GAUGGCA	UGCCAUCUGGACU CUGCUG
931	932	585-603	AGCAGAGUCCAG AUGGCAC	GUGCCAUCUGGAC UCUGCU
933	934	586-604	GCAGAGUCCAGA UGGCACA	UGUGCCAUCUGGA CUCUGC
935	936	587-605	CAGAGUCCAGAU GGCACAC	GUGUGCCAUCUGG ACUCUG
937	938	588-606	AGAGUCCAGAUG GCACACA	UGUGUGCCAUCUG GACUCU
939	940	589-607	GAGUCCAGAUGG CACACAG	CUGUGUGCCAUCU GGACUC
941	942	590-608	AGUCCAGAUGGC ACACAGC	GCUGUGUGCCAUC UGGACU
943	944	591-609	GUCCAGAUGGCA CACAGCU	AGCUGUGUGCCAU CUGGAC
945	946	592-610	UCCAGAUGGCAC ACAGCUU	AAGCUGUGUGCCA UCUGGA
947	948	593-611	CCAGAUGGCACA CAGCUUC	GAAGCUGUGUGCC AUCUGG
949	950	594-612	CAGAUGGCACAC AGCUUCC	GGAAGCUGUGUG CCAUCUG
951	952	595-613	AGAUGGCACACA GCUUCCG	CGGAAGCUGUGU GCCAUCU
953	954	596-614	GAUGGCACACAG CUUCCGU	ACGGAAGCUGUG UGCCAUC
955	956	597-615	AUGGCACACAGC UUCCGUC	GACGGAAGCUGU GUGCCAU
957	958	598-616	UGGCACACAGCU UCCGUCU	AGACGGAAGCUG UGUGCCA
959	960	599-617	GGCACACAGCUU	CAGACGGAAGCUG

[0888]

			CCGUCUG	UGUGCC
961	962	600-618	GCACACAGCUUCC GUCUGG	CCAGACGGAAGCU GUGUGC
963	964	601-619	CACACAGCUUCCG UCUGGA	UCCAGACGGAAGC UGUGUG
965	966	602-620	ACACAGCUUCCG UCUGGAC	GUCCAGACGGAAG CUGUGU
967	968	603-621	CACAGCUUCCGUC UGGACA	UGUCCAGACGGAA GCUGUG
969	970	604-622	ACAGCUUCCGUC UGGACAC	GUGUCCAGACGGA AGCUGU
971	972	605-623	CAGCUUCCGUCU GGACACC	GGUGUCCAGACGG AAGCUG
973	974	606-624	AGCUUCCGUCUG GACACCC	GGGUGUCCAGACG GAAGCU
975	976	607-625	GCUUCCGUCUGG ACACCCC	GGGGUGUCCAGAC GGAAGC
977	978	608-626	CUUCCGUCUGGA CACCCCU	AGGGGUGUCCAG ACGGAAG
979	980	609-627	UCCGUCUGGAC ACCCCUU	AAGGGGUGUCCA GACGGAA
981	982	610-628	UCCGUCUGGACA CCCCUUG	CAAGGGGUGUCCA GACGGA
983	984	611-629	CCGUCUGGACACC CCUUGC	GCAAGGGGUGUCC AGACGG
985	986	612-630	CGUCUGGACACCC CUUGCC	GGCAAGGGGUGU CCAGACG
987	988	613-631	GUCUGGACACCCC UUGCCU	AGGCAAGGGGUG UCCAGAC
989	990	614-632	UCUGGACACCCCU UGCCUG	CAGGCAAGGGGU GUCCAGA
991	992	615-633	CUGGACACCCCUU GCCUGC	GCAGGCAAGGGG UGUCCAG
993	994	616-634	UGGACACCCCUU GCCUGCC	GGCAGGCAAGGG GUGUCCA
995	996	617-635	GGACACCCCUUGC CUGCCA	UGGCAGGCAAGG GGUGUCC
997	998	618-636	GACACCCCUUGCC UGCCAC	GUGGCAGGCAAG GGGUGUC
999	1000	619-637	ACACCCCUUGCCU GCCACA	UGUGGCAGGCAA GGGGUGU
1001	1002	620-638	CACCCCUUGCCUG	UUGUGGCAGGCA

[0889]

			CCACAA	AGGGGUG
1003	1004	621-639	ACCCCUUGCCUGC CACAAG	CUUGUGGCAGGCA AGGGGU
1005	1006	622-640	CCCUUGCCUGCC ACAAGC	GCUUGUGGCAGGC AAGGGG
1007	1008	623-641	CCCUUGCCUGCCA CAAGCC	GGCUUGUGGCAG GCAAGGG
1009	1010	624-642	CCUUGCCUGCCAC AAGCCA	UGGCUUGUGGCA GGCAAGG
1011	1012	625-643	CUUGCCUGCCACA AGCCAG	CUGGCUUGUGGCA GGCAAG
1013	1014	626-644	UUGCCUGCCACA AGCCAGG	CCUGGCUUGUGGC AGGCAA
1015	1016	627-645	UGCCUGCCACAA GCCAGGG	CCCUGGCUUGUGG CAGGCA
1017	1018	628-646	GCCUGCCACAAGC CAGGGC	GCCCUGGCUUGUG GCAGGC
1019	1020	629-647	CCUGCCACAAGCC AGGGCA	UGCCCUGGCUUGU GGCAGG
1021	1022	630-648	CUGCCACAAGCCA GGGCAC	GUGCCCUGGCUUG UGGCAG
1023	1024	631-649	UGCCACAAGCCA GGGCACU	AGUGCCCUGGCUU GUGGCA
1025	1026	632-650	GCCACAAGCCAG GGCACUG	CAGUGCCCUGGCU UGUGGC
1027	1028	633-651	CCACAAGCCAGG GCACUGC	GCAGUGCCCUGGC UUGUGG
1029	1030	634-652	CACAAGCCAGGG CACUGCA	UGCAGUGCCCUGG CUUGUG
1031	1032	635-653	ACAAGCCAGGGC ACUGCAA	UUGCAGUGCCCUG GCUUGU
1033	1034	636-654	CAAGCCAGGGCA CUGCAAG	CUUGCAGUGCCCU GGCUUG
1035	1036	637-655	AAGCCAGGGCAC UGCAAGC	GCUUGCAGUGCCC UGGCUU
1037	1038	638-656	AGCCAGGGCACU GCAAGCA	UGCUUGCAGUGCC CUGGCU
1039	1040	639-657	GCCAGGGCACUG CAAGCAA	UUGCUGCAGUGC CCUGGC
1041	1042	640-658	CCAGGGCACUGC AAGCAA	UUUGCUUGCAGU GCCUGG
1043	1044	641-659	CAGGGCACUGCA	AUUUGCUUGCAG

[0890]

			AGCAA AU	UGCCCUG
1045	1046	642-660	AGGGCACUGCAA GCAA AUG	CAUUUGCUUGCAG UGCCCU
1047	1048	643-661	GGGCACUGCAAG CAA AUGC	GCAUUUGCUUGC GUGCCC
1049	1050	644-662	GGCACUGCAAGC AA AUGCC	GGCAUUUGCUUGC AGUGCC
1051	1052	645-663	GCACUGCAAGCA AAUGCCC	GGGCAUUUGCUU GCAGUGC
1053	1054	647-665	ACUGCAAGCAAA UGCCCUU	AAGGGCAUUUGC UUGCAGU
1055	1056	648-666	CUGCAAGCAAAU GCCCUUU	AAAGGGCAUUUG CUUGCAG
1057	1058	649-667	UGCAAGCAAAUG CCCUUUC	GAAAGGGCAUUU GCUUGC A
1059	1060	650-668	GCAAGCAAAUGC CCUUUCC	GGAAAGGGCAUU UGCUUGC
1061	1062	651-669	CAAGCAAAUGCC CUUUCU	AGGAAAGGGCAU UUGCUUG
1063	1064	652-670	AAGCAAAUGCCC UUUCCUG	CAGGAAAGGGCA UUUGCUU
1065	1066	653-671	AGCAAAUGCCCU UUCUGG	CCAGGAAAGGGCA UUUGCU
1067	1068	654-672	GCAAAUGCCCUU UCCUGGC	GCCAGGAAAGGGC AUUUGC
1069	1070	655-673	CAA AUGCCCUU CCUGGCA	UGCCAGGAAAGG GCAUUUG
1071	1072	656-674	AA AUGCCCUUUC CUGGCAG	CUGCCAGGAAAGG GCAUUU
1073	1074	657-675	AAUGCCCUUUC UGGCAGC	GCUGCCAGGAAAG GGCAUU
1075	1076	658-676	AUGCCCUUUCU GGCAGCA	UGCUGCCAGGAAA GGGCAU
1077	1078	659-677	UGCCCUUUCUG GCAGCAC	GUGCUGCCAGGAA AGGGCA
1079	1080	660-678	GCCCUUUCUGGC AGCACA	UGUGCUGCCAGGA AAGGGC
1081	1082	661-679	CCCUUUCUGGCA GCACAG	CUGUGCUGCCAGG AAAGGG
1083	1084	662-680	CCUUUCUGGCA GCACAGA	UCUGUGCUGCCAG GAAAGG
1085	1086	663-681	CUUUCUGGCAG	AUCUGUGCUGCCA

[0891]

			CACAGAU	GGAAAG
1087	1088	664-682	UUUCCUGGCAGC ACAGAUG	CAUCUGUGCUGCC AGGAAA
1089	1090	665-683	UUCUGGCAGCA CAGAUGA	UCAUCUGUGCUGC CAGGAA
1091	1092	666-684	UCCUGGCAGCAC AGAUGAA	UUCAUCUGUGCUG CCAGGA
1093	1094	667-685	CCUGGCAGCACA GAUGAAU	AUUCAUCUGUGCU GCCAGG
1095	1096	668-686	CUGGCAGCACAG AUGAAUC	GAUUCAUCUGUGC UGCCAG
1097	1098	670-688	GGCAGCACAGAU GAAUCAG	CUGAUUCAUCUGU GCUGCC
1099	1100	672-690	CAGCACAGAUGA AUCAGAG	CUCUGAUUCAUCU GUGCUG
1101	1102	692-710	GGCAGCAGUGUC UUCUGCA	UGCAGAAGACACU GCUGCC
1103	1104	693-711	GCAGCAGUGUCU UCUGCAA	UUGCAGAAGACAC UGCUGC
1105	1106	694-712	CAGCAGUGUCUU CUGCAAA	UUUGCAGAAGAC ACUGCUG
1107	1108	695-713	AGCAGUGUCUUC UGCAAAG	CUUUGCAGAAGAC ACUGCU
1109	1110	696-714	GCAGUGUCUUCU GCAAAGC	GCUUUGCAGAAG ACACUGC
1111	1112	697-715	CAGUGUCUUCUG CAAAGCC	GGCUUUGCAGAA GACACUG
1113	1114	698-716	AGUGUCUUCUGC AAAGCCA	UGGCUUUGCAGA AGACACU
1115	1116	699-717	GUGUCUUCUGCA AAGCCAG	CUGGCUUUGCAGA AGACAC
1117	1118	700-718	UGUCUUCUGCAA AGCCAGU	ACUGGCUUUGCAG AAGACA
1119	1120	701-719	GUCUUCUGCAAA GCCAGUC	GACUGGCUUUGCA GAAGAC
1121	1122	702-720	UCUUCUGCAAAG CCAGUCU	AGACUGGCUUUGC AGAAGA
1123	1124	703-721	CUUCUGCAAAGC CAGUCUU	AAGACUGGCUUU GCAGAAG
1125	1126	704-722	UUCUGCAAAGCC AGUCUUG	CAAGACUGGCUUU GCAGAA
1127	1128	705-723	UCUGCAAAGCCA	UCAAGACUGGCUU

[0892]

			GUCUUGA	UGCAGA
1129	1130	706-724	CUGCAAAGCCAG UCUUGAG	CUCAAGACUGGCU UUGCAG
1131	1132	707-725	UGCAAAGCCAGU CUUGAGC	GCUCAAGACUGGC UUUGCA
1133	1134	708-726	GCAAAGCCAGUC UUGAGCU	AGCUCAAGACUGG CUUUGC
1135	1136	709-727	CAAAGCCAGUCU UGAGCUU	AAGCUCAAGACUG GCUUUG
1137	1138	710-728	AAAGCCAGUCUU GAGCUUC	GAAGCUCAAGACU GGCUUU
1139	1140	711-729	AAGCCAGUCUUG AGCUUCA	UGAAGCUCAAGAC UGGCUU
1141	1142	712-730	AGCCAGUCUUGA GCUUCAG	CUGAAGCUCAAGA CUGGCU
1143	1144	713-731	GCCAGUCUUGAG CUUCAGG	CCUGAAGCUCAAG ACUGGC
1145	1146	714-732	CCAGUCUUGAGC UUCAGGA	UCCUGAAGCUCAA GACUGG
1147	1148	715-733	CAGUCUUGAGCU UCAGGAG	CUCCUGAAGCUCA AGACUG
1149	1150	716-734	AGUCUUGAGCUU CAGGAGG	CCUCCUGAAGCUC AAGACU
1151	1152	717-735	GUCUUGAGCUUC AGGAGGA	UCCUCCUGAAGCU CAAGAC
1153	1154	718-736	UCUUGAGCUUCA GGAGGAU	AUCCUCCUGAAGC UCAAGA
1155	1156	719-737	CUUGAGCUUCAG GAGGAUG	CAUCCUCCUGAAG CUCAAG
1157	1158	720-738	UUGAGCUUCAGG AGGAUGU	ACAUCCUCCUGAA GCUCAA
1159	1160	721-739	UGAGCUUCAGGA GGAUGUG	CACAUCCUCCUGA AGCUCA
1161	1162	722-740	GAGCUUCAGGAG GAUGUGC	GCACAUCCUCCUG AAGCUC
1163	1164	723-741	AGCUUCAGGAGG AUGUGCA	UGCACAUCCUCCU GAAGCU
1165	1166	724-742	GCUUCAGGAGGA UGUGCAG	CUGCACAUCCUCC UGAAGC
1167	1168	725-743	CUUCAGGAGGAU GUGCAGG	CCUGCACAUCCUC CUGAAG
1169	1170	726-744	UUCAGGAGGAUG	UCCUGCACAUCCU

[0893]

			UGCAGGA	CCUGAA
1171	1172	727-745	UCAGGAGGAUGU GCAGGAA	UUCCUGCACAUC UCCUGA
1173	1174	728-746	CAGGAGGAUGUG CAGGAAA	UUUCCUGCACAUC CUCCUG
1175	1176	729-747	AGGAGGAUGUGC AGGAAAU	AUUUCCUGCACA CCUCCU
1177	1178	730-748	GGAGGAUGUGCA GGAAAUG	CAUUUCCUGCACA UCCUCC
1179	1180	731-749	GAGGAUGUGCAG GAAAUGA	UCAUUUCCUGCAC AUCCUC
1181	1182	732-750	AGGAUGUGCAGG AAAUGAA	UUCAUUUCCUGCA CAUCCU
1183	1184	733-751	GGAUGUGCAGGA AAUGAAU	AUUCAUUUCCUGC ACAUCC
1185	1186	734-752	GAUGUGCAGGAA AUGAAUG	CAUUCAUUUCCUG CACAUC
1187	1188	735-753	AUGUGCAGGAAA UGAAUGC	GCAUUCAUUUCCU GCACAU
1189	1190	755-773	GUGAGGAAAGAG GUUGCUG	CAGCAACCUCUUU CCUCAC
1191	1192	756-774	UGAGGAAAGAGG UUGCUGA	UCAGCAACCUCUU UCCUCA
1193	1194	757-775	GAGGAAAGAGGU UGCUGAA	UUCAGCAACCUCU UCCUC
1195	1196	758-776	AGGAAAGAGGUU GCUGAAA	UUUCAGCAACCUC UUUCCU
1197	1198	759-777	GGAAAGAGGUUG CUGAAAC	GUUUCAGCAACCU CUUUCC
1199	1200	760-778	GAAAGAGGUUGC UGAAACC	GGUUUCAGCAACC UCUUUC
1201	1202	761-779	AAAGAGGUUGCU GAAACCU	AGGUUUCAGCAAC CUCUUU
1203	1204	762-780	AAGAGGUUGCUG AAACCUC	GAGGUUUCAGCA ACCUCUU
1205	1206	763-781	AGAGGUUGCUGA AACCUCA	UGAGGUUUCAGC AACCUCU
1207	1208	764-782	GAGGUUGCUGAA ACCUCAG	CUGAGGUUUCAGC AACCUC
1209	1210	765-783	AGGUUGCUGAAA CCUCAGC	GCUGAGGUUUCA GCAACCU
1211	1212	766-784	GGUUGCUGAAAC	UGCUGAGGUUUC

[0894]

			CUCAGCA	AGCAACC
1213	1214	787-805	CCCCAGUGUGGU UAGUGUG	CACACUAACCACA CUGGGG
1215	1216	791-809	AGUGUGGUUAGU GUGAAAA	UUUUCACACUAA CACACU
1217	1218	792-810	GUGUGGUUAGUG UGAAAAC	GUUUUCACACUAA CCACAC
1219	1220	812-830	GAUGGAGGGGAU CCCAGUG	CACUGGGGAUCCCC UCCAUC
1221	1222	813-831	AUGGAGGGGAUC CCAGUGG	CCACUGGGGAUCCC CUCCAUC
1223	1224	833-851	CUGCUGAAGAAC UCCAGG	CCUGGAAGUUCU CAGCAG
1225	1226	834-852	UGCUGAAGAACU UCCAGGA	UCCUGGAAGUUCU UCAGCA
1227	1228	835-853	GCUGAAGAACUU CCAGGAC	GUCCUGGAAGUUC UUCAGC
1229	1230	836-854	CUGAAGAACUUC CAGGACA	UGUCCUGGAAGU UCUUCAG
1231	1232	837-855	UGAAGAACUUC AGGACAU	AUGUCCUGGAAG UUCUUC
1233	1234	838-856	GAAGAACUCCA GGACAUC	GAUGUCCUGGAA GUUCUUC
1235	1236	839-857	AAGAACUCCAG GACAUC	UGAUGUCCUGGA AGUUCU
1237	1238	840-858	AGAACUCCAGG ACAUCAU	AUGAUGUCCUGG AAGUUCU
1239	1240	841-859	GAACUCCAGGA CAUCAUG	CAUGAUGUCCUGG AAGUUC
1241	1242	842-860	AACUCCAGGAC AUCAUGC	GCAUGAUGUCCUG GAAGUU
1243	1244	843-861	ACUCCAGGACA UCAUGCA	UGCAUGAUGUCCU GGAAGU
1245	1246	844-862	CUCCAGGACAU CAUGCAA	UUGCAUGAUGUCC UGGAAG
1247	1248	845-863	UCCAGGACAUC AUGCAA	UUUGCAUGAUGU CCUGGAA
1249	1250	846-864	UCCAGGACAUC UGCAAAA	UUUUGCAUGAUG UCCUGGA
1251	1252	847-865	CCAGGACAUCAU GCAAAAAG	CUUUUGCAUGAU GUCCUGG
1253	1254	848-866	CAGGACAUCAUG	GCUUUUGCAUGA

[0895]

			CAAAAGC	UGUCCUG
1255	1256	849-867	AGGACAUCAUGC AAAAGCA	UGCUIIUUGCAUG AUGUCCU
1257	1258	850-868	GGACAUCAUGCA AAAGCAA	UUGCUUUUGCAU GAUGUCC
1259	1260	851-869	GACAUCAUGCAA AAGCAAA	UUUGCUUUUGCA UGAUGUC
1261	1262	852-870	ACAUCAUGCAAA AGCAAAG	CUUUGCUUUUGCA UGAUGU
1263	1264	854-872	AUCAUGCAAAAG CAAAGAC	GUCUUUGCUUUU GCAUGAU
1265	1266	855-873	UCAUGCAAAAGC AAAGACC	GGUCUUUGCUUU UGCAUGA
1267	1268	856-874	CAUGCAAAAGCA AAGACCA	UGGUCUUUGCUU UUGCAUG
1269	1270	857-875	AUGCAAAAGCAA AGACCAG	CUGGUCUUUGCUU UUGCAU
1271	1272	858-876	UGCAAAAGCAAA GACCAGA	UCUGGUCUUUGCU UUUGCA
1273	1274	859-877	GCAAAAGCAAAG ACCAGAA	UUCUGGUCUUUGC UUUUGC
1275	1276	860-878	CAAAAGCAAAGA CCAGAAA	UUUCUGGUCUUU GCUUUUG
1277	1278	861-879	AAAAGCAAAGAC CAGAAAG	CUUUCUGGUCUUU GCUUUU
1279	1280	862-880	AAAGCAAAGACC AGAAAGA	UCUUUCUGGUCUU UGCUIIU
1281	1282	863-881	AAGCAAAGACCA GAAAGAG	CUCUUUCUGGUCU UUGCUU
1283	1284	864-882	AGCAAAGACCAG AAAGAGU	ACUCUIIUUGGUC UUUGCU
1285	1286	865-883	GCAAAGACCAGA AAGAGUG	CACUCUIIUUGGU CUUUGC
1287	1288	867-885	AAAGACCAGAAA GAGUGUC	GACACUCUIIUUG GUCUIIU
1289	1290	868-886	AAGACCAGAAAG AGUGUCU	AGACACUCUIIU GGUCUU
1291	1292	869-887	AGACCAGAAAGA GUGUCUC	GAGACACUCUIIU UGGUCU
1293	1294	870-888	GACCAGAAAGAG UGUCUCA	UGAGACACUCUIIU CUGGUC
1295	1296	871-889	ACCAGAAAGAGU	AUGAGACACUCUIIU

[0896]

			GUCUCAU	UCUGGU
1297	1298	872-890	CCAGAAAGAGUG UCUCAUC	GAUGAGACACUCU UUCUGG
1299	1300	875-893	GAAAGAGUGUCU CAUCUUC	GAAGAUGAGACA CUCUUUC
1301	1302	878-896	AGAGUGUCUCAU CUUCUUC	GAAGAAGAUGAG ACACUCU
1303	1304	879-897	GAGUGUCUCAUC UUCUUA	UGAAGAAGAUGA GACACUC
1305	1306	880-898	AGUGUCUCAUCU UCUCAA	UUGAAGAAGAUG AGACACU
1307	1308	881-899	GUGUCUCAUCUU CUUCAAG	CUUGAAGAAGAU GAGACAC
1309	1310	882-900	UGUCUCAUCUUC UUAAGA	UCUUGAAGAAGA UGAGACA
1311	1312	883-901	GUCUCAUCUUCU UCAAGAU	AUCUUGAAGAAG AUGAGAC
1313	1314	884-902	UCUCAUCUUCUU CAAGUA	UAUCUUGAAGAA GAUGAGA
1315	1316	886-904	UCAUCUUCUUA AGAUAAC	GUUAUCUUGAAG AAGAUGA
1317	1318	887-905	CAUCUUCUUA GAUAACU	AGUUAUCUUGAA GAAGAUG
1319	1320	888-906	AUCUUCUUAAG AUAACUU	AAGUUAUCUUGA AGAAGAU
1321	1322	889-907	UCUUCUUAAGA UAACUUG	CAAGUUAUCUUG AAGAAGA
1323	1324	890-908	CUUCUUAAGAU AACUUGC	GCAAGUUAUCUU GAAGAAG
1325	1326	891-909	UUCUUAAGAU ACUUGCC	GGCAAGUUAUCU UGAAGAA
1327	1328	892-910	UCUUAAGAUAA CUUGCCA	UGGCAAGUUAUC UUGAAGA
1329	1330	893-911	CUUCAAGAUAA UUGCCAA	UUGGCAAGUUAU CUUGAAG
1331	1332	894-912	UUAAGAUAA UGCCAAA	UUUGGCAAGUUA UCUUGAA
1333	1334	895-913	UCAAGAUAA GCCAAA	UUUUGGCAAGUU AUCUUGA
1335	1336	896-914	CAAGAUAA CCAAAAU	AUUUUGGCAAGU UAUCUUG
1337	1338	897-915	AAGAUAA CUUGC	GAUUUUGGCAAG

[0897]

			CAAAAUC	UUAUCUU
1339	1340	898-916	AGAUAACUUGCC AAAAUCU	AGAUUUUGGCAA GUUAUCU
1341	1342	899-917	GAUAACUUGCCA AAAUCUG	CAGAUUUUGGCA AGUUAUC
1343	1344	900-918	AUAACUUGCCAA AAUCUGU	ACAGAUUUUGGC AAGUUAU
1345	1346	901-919	UAACUUGCCAAA AUCUGUU	AACAGAUUUUGG CAAGUUA
1347	1348	902-920	AACUUGCCAAAA UCUGUUU	AAACAGAUUUUG GCAAGUU
1349	1350	903-921	ACUUGCCAAAAU CUGUUUC	GAAACAGAUUUU GGCAAGU
1351	1352	904-922	CUUGCCAAAAUC UGUUUCC	GGAAACAGAUUU UGGCAAG
1353	1354	905-923	UUGCCAAAAUCU GUUUCCA	UGGAAACAGAUU UUGGCAA
1355	1356	906-924	UGCCAAAAUCUG UUUCCAC	GUGGAAACAGAU UUUGGCA
1357	1358	907-925	GCCAAAAUCUGU UCCACU	AGUGGAAACAGA UUUUGGC
1359	1360	908-926	CCAAAAUCUGUU UCCACUU	AAGUGGAAACAG AUUUUGG
1361	1362	909-927	CAAAAUUCUGUUU CCACUUU	AAAGUGGAAACA GAUUUUG
1363	1364	910-928	AAAUCUGUUUC CACUUUU	AAAAGUGGAAAC AGAUUUU
1365	1366	911-929	AAAUCUGUUUCC ACUUUUC	GAAAAGUGGAAA CAGAUUU
1367	1368	912-930	AAUCUGUUUCCA CUUUUCA	UGAAAAGUGGAA ACAGAUU
1369	1370	913-931	AUCUGUUUCCAC UUUUCAG	CUGAAAAGUGGA AACAGAU
1371	1372	916-934	UGUUUCCACUUU UCAGUAU	AUACUGAAAAGU GGAAACA
1373	1374	917-935	GUUUCCACUUUU CAGUAUG	CAUACUGAAAAG UGGAAAC
1375	1376	918-936	UUUCCACUUUUC AGUAUGA	UCAUACUGAAAA GUGGAAA
1377	1378	919-937	UCCACUUUUUCA GUAUGAU	AUCAUACUGAAA AGUGGAA
1379	1380	920-938	UCCACUUUUUCAG	GAUCAUACUGAA

[0898]

			UAUGAUC	AAGUGGA
1381	1382	921-939	CCACUUUUCAGU AUGAUCG	CGAUCAUACUGAA AAGUGG
1383	1384	925-943	UUUUCAGUAUGA UCGUUUC	GAAACGAUCAUAC UGAAAA
1385	1386	929-947	CAGUAUGAUCGU UUCUUUG	CAAAGAAACGAUC AUACUG
1387	1388	930-948	AGUAUGAUCGUU UCUUUGA	UCAAAGAAACGA UCAUACU
1389	1390	931-949	GUAUGAUCGUUU CUUUGAG	CUCAAAGAAACGA UCAUAC
1391	1392	933-951	AUGAUCGUUUCU UUGAGAA	UUCUCAAGAAAC GAUCAU
1393	1394	934-952	UGAUCGUUUCUU UGAGAAA	UUUCUCAAGAA ACGAUCA
1395	1396	936-954	AUCGUUUCUUUG AGAAAAA	UUUUUCUCAAG AAACGAU
1397	1398	937-955	UCGUUUCUUUGA GAAAAAA	UUUUUUCUCAA GAAACGA
1399	1400	938-956	CGUUUCUUUGAG AAAAAAA	UUUUUUCUCA AGAAACG
1401	1402	939-957	GUUUCUUUGAGA AAAAAAU	AUUUUUUCUCA AAGAAAC
1403	1404	940-958	UUUCUUUGAGAA AAAAAUU	AAUUUUUUCUC AAAGAAA
1405	1406	941-959	UUCUUUGAGAAA AAAAUUG	CAUUUUUUCUC AAAGAA
1407	1408	942-960	UCUUUGAGAAAA AAAUUGA	UCAUUUUUUC UCAAGA
1409	1410	943-961	CUUUGAGAAAAA AAUUGAU	AUCAUUUUUUU CUCAAAG
1411	1412	944-962	UUUGAGAAAAAA AUUGAUG	CAUCAUUUUUU UCUCAA
1413	1414	945-963	UUGAGAAAAAAA UGAUGA	UCAUCAUUUUU UUCUCA
1415	1416	946-964	UGAGAAAAAAAU UGAUGAG	CUCAUCAUUUUU UUCUCA
1417	1418	947-965	GAGAAAAAAAUU GAUGAGA	UCUCAUCAUUUU UUUCUC
1419	1420	948-966	AGAAAAAAAUUG AUGAGAA	UUCUCACAUUUU UUUUCU
1421	1422	949-967	GAAAAAAAUUGA	UUUCUCAUCAUU

[0899]

			UGAGAAA	UUUUUC
1423	1424	950-968	AAAAAAAUUGAU GAGAAAA	UUUUCUCAUCAAU UUUUUU
1425	1426	951-969	AAAAAAUUGAUG AGAAAAA	UUUUUCUCACAA UUUUUU
1427	1428	952-970	AAAAAUUGAUGA GAAAAAG	CUUUUUCUCAUCA AUUUUU
1429	1430	953-971	AAAAUUGAUGAG AAAAAGA	UCUUUUUCUCAUC AAUUUU
1431	1432	954-972	AAAUUGAUGAGA AAAAGAA	UUCUUUUUCUCAU CAAUUU
1433	1434	955-973	AAUUGAUGAGAA AAAGAAU	AUUCUUUUUCUCA UCAAUU
1435	1436	956-974	AUUGAUGAGAAA AAGAAUG	CAUUCUUUUUCUC AUCAAU
1437	1438	957-975	UUGAUGAGAAAA AGAAUGA	UCAUUCUUUUUCU CAUCAA
1439	1440	958-976	UGAUGAGAAAAA GAAUGAC	GUCAUUCUUUUUC UCAUCA
1441	1442	959-977	GAUGAGAAAAAG AAUGACC	GGUCAUUCUUUU UCUCAUC
1443	1444	960-978	AUGAGAAAAAGA AUGACCA	UGGUCAUUCUUU UUCUCAU
1445	1446	961-979	UGAGAAAAAGAA UGACCAC	GUGGUCAUUCUU UUUCUCA
1447	1448	962-980	GAGAAAAAGAAU GACCACA	UGUGGUCAUUCU UUUUCUC
1449	1450	963-981	AGAAAAAGAAUG ACCACAC	GUGUGGUCAUUC UUUUUCU
1451	1452	964-982	GAAAAAGAAUGA CCACACC	GGUGUGGUCAUU CUUUUUC
1453	1454	965-983	AAAAAGAAUGAC CACACCU	AGGUGUGGUCAU UCUUUUU
1455	1456	966-984	AAAAGAAUGACC ACACCUA	UAGGUGUGGUCA UUCUUUU
1457	1458	967-985	AAAGAAUGACCA CACCUAU	AUAGGUGUGGUC AUUCUUU
1459	1460	968-986	AAGAAUGACCAC ACCUAUC	GAUAGGUGUGGU CAUUCUU
1461	1462	969-987	AGAAUGACCACA CCUAUCG	CGAUAGGUGUGG UCAUUCU
1463	1464	970-988	GAAUGACCACAC	UCGAUAGGUGUG

[0900]

			CUAUCGA	GUCAUUC
1465	1466	971-989	AAUGACCACACC UAUCGAG	CUCGAUAGGUGU GGUCAU
1467	1468	972-990	AUGACCACACCU AUCGAGU	ACUCGAUAGGUG UGGUCAU
1469	1470	976-994	CCACACCUAUCGA GUUUUU	AAAAACUCGAUA GGUGUGG
1471	1472	977-995	CACACCUAUCGA GUUUUUA	UAAAAACUCGAU AGGUGUG
1473	1474	978-996	ACACCUAUCGAG UUUUUAA	UUAAAAACUCGA UAGGUGU
1475	1476	979-997	CACCUAUCGAGU UUUUAAA	UUUAAAAACUCG AUAGGUG
1477	1478	980-998	ACCUAUCGAGUU UUUAAAA	UUUUAAAAACUC GAUAGGU
1479	1480	981-999	CCUAUCGAGUUU UAAAAAC	GUUUUAAAAACU CGAUAGG
1481	1482	982-1000	CUAUCGAGUUUU UAAAACU	AGUUUUAAAAAC UCGAUAG
1483	1484	983-1001	UAUCGAGUUUUU AAAACUG	CAGUUUUAAAAA CUCGAUA
1485	1486	984-1002	AUCGAGUUUUUA AAACUGU	ACAGUUUUAAAA ACUCGAU
1487	1488	985-1003	UCGAGUUUUUAA AACUGUG	CACAGUUUUAAA AACUCGA
1489	1490	986-1004	CGAGUUUUUAAA ACUGUGA	UCACAGUUUUAA AAACUCG
1491	1492	987-1005	GAGUUUUUAAAA CUGUGAA	UUCACAGUUUUA AAAACUC
1493	1494	988-1006	AGUUUUUAAAAC UGUGAAC	GUUCACAGUUUU AAAAACU
1495	1496	989-1007	GUUUUUAAAACU GUGAAC	GGUUCACAGUUU UAAAAAC
1497	1498	990-1008	UUUUUAAAACUG UGAACCG	CGGUUCACAGUUU UAAAAA
1499	1500	991-1009	UUUUAAAACUGU GAACCGG	CCGGUUCACAGUU UAAAAA
1501	1502	992-1010	UUUAAAACUGUG AACCGGC	GCCGGUUCACAGU UUUAAA
1503	1504	993-1011	UUAAAACUGUGA ACCGGCG	CGCCGGUUCACAG UUUUAA
1505	1506	994-1012	UAAAACUGUGAA	UCGCCGGUUCACA

[0901]

			CCGGCGA	GUUUUA
1507	1508	995-1013	AAAACUGUGAAC CGGCGAG	CUCGCCGGUUCAC AGUUUU
1509	1510	996-1014	AAACUGUGAACC GGCGAGC	GCUCGCCGGUUC CAGUUU
1511	1512	997-1015	AACUGUGAACCG GCGAGCA	UGCUCGCCGGUUC ACAGUU
1513	1514	998-1016	ACUGUGAACCGG CGAGCAC	GUGCUCGCCGGU CACAGU
1515	1516	999-1017	CUGUGAACCGGC GAGCACA	UGUGCUCGCCGGU UCACAG
1517	1518	1000-1018	UGUGAACCGGCG AGCACAC	GUGUGCUCGCCGG UUCACA
1519	1520	1001-1019	GUGAACCGGCGA GCACACA	UGUGUGCUCGCCG GUUCAC
1521	1522	1002-1020	UGAACCGGCGAG CACACAU	AUGUGUGCUCGCC GGUUCA
1523	1524	1003-1021	GAACCGGCGAGC ACACAUC	GAUGUGUGCUCGC CGGUUC
1525	1526	1004-1022	AACCGGCGAGCA CACAUCU	AGAUGUGUGCUC GCCGGUU
1527	1528	1005-1023	ACCGGCGAGCAC ACAUCUU	AAGAUGUGUGCU CGCCGGU
1529	1530	1006-1024	CCGGCGAGCACAC AUCUUC	GAAGAUGUGUGC UCGCCGG
1531	1532	1007-1025	CGGCGAGCACAC AUCUCC	GGAAGAUGUGUG CUCGCCG
1533	1534	1008-1026	GGCGAGCACACA UCUUCCC	GGGAAGAUGUGU GCUCGCC
1535	1536	1028-1046	AUGGCAGAUGAC UAUUCAG	CUGAAUAGUCAUC UGCCAU
1537	1538	1030-1048	GGCAGAUGACUA UUCAGAC	GUCUGAAUAGUC AUCUGCC
1539	1540	1031-1049	GCAGAUGACUAU UCAGACU	AGUCUGAAUAGU CAUCUGC
1541	1542	1032-1050	CAGAUGACUAUU CAGACUC	GAGUCUGAAUAG UCAUCUG
1543	1544	1033-1051	AGAUGACUAUUC AGACUCC	GGAGUCUGAAUA GUCAUCU
1545	1546	1034-1052	GAUGACUAUUCA GACUCCC	GGGAGUCUGAAU AGUCAUC
1547	1548	1035-1053	AUGACUAUUCAG	AGGGAGUCUGAA

[0902]

			ACUCCCU	UAGUCAU
1549	1550	1036-1054	UGACUAUUCAGA CUCCUC	GAGGGAGUCUGA AUAGUCA
1551	1552	1037-1055	GACUAUUCAGAC UCCUCA	UGAGGGAGUCUG AAUAGUC
1553	1554	1038-1056	ACUAUUCAGACU CCCUCAU	AUGAGGGAGUCU GAAUAGU
1555	1556	1039-1057	CUAUUCAGACUC CCUCAUC	GAUGAGGGAGUC UGAAUAG
1557	1558	1040-1058	UAUUCAGACUCC CUCAUCA	UGAUGAGGGAGU CUGAAUA
1559	1560	1041-1059	AUUCAGACUCCC UCAUCAC	GUGAUGAGGGAG UCUGAAU
1561	1562	1042-1060	UUCAGACUCCCUC AUCACC	GGUGAUGAGGGA GUCUGAA
1563	1564	1043-1061	UCAGACUCCCUC UCACCA	UGGUGAUGAGGG AGUCUGA
1565	1566	1044-1062	CAGACUCCCUCAU CACCAA	UUGGUGAUGAGG GAGUCUG
1567	1568	1045-1063	AGACUCCCUCAUC ACCAA	UUUGGUGAUGAG GGAGUCU
1569	1570	1046-1064	GACUCCCUCAUCA CCAAA	UUUUGGUGAUGA GGGAGUC
1571	1572	1047-1065	ACUCCCUCAUCAC CAAAA	UUUUUGGUGAUG AGGGAGU
1573	1574	1048-1066	CUCCUCAUCACC AAAAAG	CUUUUUGGUGAU GAGGGAG
1575	1576	1049-1067	UCCUCAUCACCA AAAAGC	GCUUUUUGGUGA UGAGGGA
1577	1578	1050-1068	CCCUCAUCACCAA AAAGCA	UGCUIUUUGGUG AUGAGGG
1579	1580	1070-1088	GUGUCAGUCUGG UGCAGUA	UACUGCACCAGAC UGACAC
1581	1582	1071-1089	UGUCAGUCUGGU GCAGUAA	UUACUGCACCAGA CUGACA
1583	1584	1072-1090	GUCAGUCUGGUG CAGUAAU	AUUACUGCACCAG ACUGAC
1585	1586	1073-1091	UCAGUCUGGUGC AGUAAUG	CAUUACUGCACCA GACUGA
1587	1588	1074-1092	CAGUCUGGUGCA GUAAUGA	UCAUUACUGCACC AGACUG
1589	1590	1075-1093	AGUCUGGUGCAG	GUCAUUACUGCAC

[0903]

			UAAUGAC	CAGACU
1591	1592	1078-1096	CUGGUGCAGUAA UGACUAC	GUAGUCAUUACU GCACCAG
1593	1594	1079-1097	UGGUGCAGUAAU GACUACC	GGUAGUCAUUAC UGCACCA
1595	1596	1081-1099	GUGCAGUAAUGA CUACCUA	UAGGUAGUCAUU ACUGCAC
1597	1598	1082-1100	UGCAGUAAUGAC UACCUAG	CUAGGUAGUCAU UACUGCA
1599	1600	1083-1101	GCAGUAAUGACU ACCUAGG	CCUAGGUAGUCAU UACUGC
1601	1602	1084-1102	CAGUAAUGACUA CCUAGGA	UCCUAGGUAGUCA UUACUG
1603	1604	1085-1103	AGUAAUGACUAC CUAGGAA	UUCCUAGGUAGUC AUUACU
1605	1606	1086-1104	GUA AUGACUACC UAGGAAU	AUCCUAGGUAG UCAUUAC
1607	1608	1087-1105	UAAUGACUACCU AGGAAUG	CAUCCUAGGUAG UCAUUA
1609	1610	1088-1106	AAUGACUACCUA GGAAUGA	UCAUCCUAGGUA GUCAUU
1611	1612	1089-1107	AUGACUACCUAG GAAUGAG	CUCAUCCUAGGU AGUCAU
1613	1614	1090-1108	UGACUACCUAGG AAUGAGU	ACUCAUCCUAGG UAGUCA
1615	1616	1091-1109	GACUACCUAGGA AUGAGUC	GACUCAUCCUAG GUAGUC
1617	1618	1092-1110	ACUACCUAGGAA UGAGUCG	CGACUCAUCCUA GGUAGU
1619	1620	1093-1111	CUACCUAGGAAU GAGUCGC	GCGACUCAUCCU AGGUAG
1621	1622	1094-1112	UACCUAGGAAUG AGUCGCC	GGCGACUCAUCC UAGGUA
1623	1624	1095-1113	ACCUAGGAAUGA GUCGCCA	UGGCGACUCAUUC CUAGGU
1625	1626	1096-1114	CCUAGGAAUGAG UCGCCAC	GUGGCGACUCAU CCUAGG
1627	1628	1097-1115	CUAGGAAUGAGU CGCCACC	GGUGGCGACUCAU UCCUAG
1629	1630	1098-1116	UAGGAAUGAGUC GCCACCC	GGUGGCGACUCA UCCUA
1631	1632	1099-1117	AGGAAUGAGUCG	UGGGUGGCGACUC

[0904]

			CCACCCA	AUUCCU
1633	1634	1100-1118	GGAAUGAGUCGC CACCCAC	GUGGGUGGCGAC UCAUUC
1635	1636	1101-1119	GAAUGAGUCGCC ACCCACG	CGUGGGUGGCGAC UCAUUC
1637	1638	1102-1120	AAUGAGUCGCCA CCCACGG	CCGUGGGUGGCGA CUCAU
1639	1640	1103-1121	AUGAGUCGCCAC CCACGGG	CCCGUGGGUGGCG ACUCAU
1641	1642	1104-1122	UGAGUCGCCACCC ACGGGU	ACCCGUGGGUGGC GACUCA
1643	1644	1105-1123	GAGUCGCCACCCA CGGGUG	CACCCGUGGGUGG CGACUC
1645	1646	1106-1124	AGUCGCCACCCAC GGGUGU	ACACCCGUGGGUG GCGACU
1647	1648	1107-1125	GUCGCCACCCACG GGUGUG	CACACCCGUGGGU GGCGAC
1649	1650	1108-1126	UCGCCACCCACGG GUGUGU	ACACACCCGUGGG UGGCGA
1651	1652	1109-1127	CGCCACCCACGGG UGUGUG	CACACACCCGUGG GUGGCG
1653	1654	1110-1128	GCCACCCACGGGU GUGUGG	CCACACACCCGUG GGUGGC
1655	1656	1111-1129	CCACCCACGGGUG UGUGGG	CCCACACACCCGU GGGUGG
1657	1658	1112-1130	CACCCACGGGUG UGUGGGG	CCCACACACCCG UGGGUG
1659	1660	1113-1131	ACCCACGGGUGU GUGGGGC	GCCCCACACACC GUGGGU
1661	1662	1114-1132	CCCACGGGUGUG UGGGGCA	UGCCCCACACACC CGUGGG
1663	1664	1115-1133	CCACGGGUGUGU GGGGCAG	CUGCCCCACACAC CCGUGG
1665	1666	1116-1134	CACGGGUGUGUG GGGCAGU	ACUGCCCCACACA CCCGUG
1667	1668	1117-1135	ACGGGUGUGUGG GGCAGUU	AACUGCCCCACAC ACCCGU
1669	1670	1118-1136	CGGGUGUGUGGG GCAGUUA	UAACUGCCCCACA CACCCG
1671	1672	1119-1137	GGGUGUGUGGGG CAGUUAU	AUAACUGCCCCAC ACACCC
1673	1674	1120-1138	GGUGUGUGGGGC	CAUAACUGCCCCA

[0905]

			AGUUAUG	CACACC
1675	1676	1121-1139	GUGUGUGGGGCA GUUAUGG	CCAUAACUGCCCC ACACAC
1677	1678	1122-1140	UGUGUGGGGCAG UUAUGGA	UCCAUAACUGCCC CACACA
1679	1680	1123-1141	GUGUGGGGCAGU UAUGGAC	GUCCAUAACUGCC CCACAC
1681	1682	1125-1143	GUGGGGCAGUUA UGGACAC	GUGUCCAUAACUG CCCCAC
1683	1684	1126-1144	UGGGGCAGUUAU GGACACU	AGUGUCCAUAACU GCCCCA
1685	1686	1128-1146	GGGCAGUUAUGG ACACUUU	AAAGUGUCCAUA ACUGCCC
1687	1688	1129-1147	GGCAGUUAUGGA CACUUUG	CAAAGUGUCCAUA ACUGCC
1689	1690	1130-1148	GCAGUUAUGGAC ACUUUGA	UCAAAGUGUCCAU AACUGC
1691	1692	1131-1149	CAGUUAUGGACA CUUUGAA	UUCAAAGUGUCCA UAACUG
1693	1694	1132-1150	AGUUAUGGACAC UUUGAAA	UUUCAAAAGUGUC AUAACU
1695	1696	1133-1151	GUUAUGGACACU UUGAAAC	GUUUCAAAAGUGU CCAUAAC
1697	1698	1134-1152	UUAUGGACACUU UGAAACA	UGUUUCAAAAGUG UCCAUA
1699	1700	1135-1153	UAUGGACACUUU GAAACAA	UUGUUUCAAAAGU GUCCAUA
1701	1702	1136-1154	AUGGACACUUUG AAACAAC	GUUGUUUCAAAAG UGUCCA
1703	1704	1139-1157	GACACUUUGAAA CAACAUG	CAUGUUGUUUCA AAGUGUC
1705	1706	1140-1158	ACACUUUGAAAC ACAUGG	CCAUGUUGUUUCA AAGUGU
1707	1708	1141-1159	CACUUUGAAACA ACAUGGU	ACCAUGUUGUUUC AAAGUG
1709	1710	1142-1160	ACUUUGAAACAA CAUGGUG	CACCAUGUUGUUU CAAAGU
1711	1712	1143-1161	CUUUGAAACAAC AUGGUGC	GCACCAUGUUGUU UCAAG
1713	1714	1144-1162	UUUGAAACAACA UGGUGCU	AGCACCAUGUUGU UUCAAA
1715	1716	1145-1163	UUGAAACAACAU	CAGCACCAUGUUG

[0906]

			GGUGCUG	UUUCAA
1717	1718	1146-1164	UGAAACAACAUG GUGCUGG	CCAGCACCAUGUU GUUUCA
1719	1720	1147-1165	GAAACAACAUGG UGCUGGG	CCCAGCACCAUGU UGUUUC
1721	1722	1148-1166	AAACAACAUGGU GCUGGGG	CCCCAGCACCAUG UUGUUU
1723	1724	1149-1167	AACAACAUGGUG CUGGGGC	GCCCCAGCACCAU GUUGUU
1725	1726	1150-1168	ACAACAUGGUGC UGGGGCA	UGCCCCAGCACCA UGUUGU
1727	1728	1151-1169	CAACAUGGUGCU GGGGCAG	CUGCCCCAGCACC AUGUUG
1729	1730	1152-1170	AACAUGGUGCUG GGGCAGG	CCUGCCCCAGCAC CAUGUU
1731	1732	1153-1171	ACAUGGUGCUGG GGCAGGU	ACCUGCCCCAGCA CCAUGU
1733	1734	1154-1172	CAUGGUGCUGGG GCAGGUG	CACCUGCCCCAGC ACCAUG
1735	1736	1155-1173	AUGGUGCUGGGG CAGGUGG	CCACCUGCCCCAG CACCAU
1737	1738	1156-1174	UGGUGCUGGGGC AGGUGGU	ACCACCUGCCCCA GCACCA
1739	1740	1157-1175	GGUGCUGGGGCA GGUGGUA	UACCACCUGCCCC AGCACC
1741	1742	1158-1176	GUGCUGGGGCAG GUGGUAC	GUACCACCUGCCC CAGCAC
1743	1744	1159-1177	UGCUGGGGCAGG UGGUACU	AGUACCACCUGCC CCAGCA
1745	1746	1160-1178	GCUGGGGCAGGU GGUACUA	UAGUACCACCUGC CCCAGC
1747	1748	1161-1179	CUGGGGCAGGUG GUACUAG	CUAGUACCACCUG CCCCAG
1749	1750	1162-1180	UGGGGCAGGUGG UACUAGA	UCUAGUACCACCU GCCCCA
1751	1752	1166-1184	GCAGGUGGUACU AGAAUAU	UAUUUCUAGUACC ACCUGC
1753	1754	1167-1185	CAGGUGGUACUA GAAUAU	AUAUUUCUAGUA CCACCUG
1755	1756	1168-1186	AGGUGGUACUAG AAUAU	AAUAUUUCUAGU ACCACCU
1757	1758	1169-1187	GGUGGUACUAGA	AAUAUUUCUAG

[0907]

			AAUAUUU	UACCACC
1759	1760	1170-1188	GUGGUACUAGAA AUAUUUC	GAAAUUUUCUA GUACCAC
1761	1762	1171-1189	UGGUACUAGAAA UAUUUCU	AGAAAUUUUCU AGUACCA
1763	1764	1172-1190	GGUACUAGAAAU AUUUCUG	CAGAAAUUUUC UAGUACC
1765	1766	1173-1191	GUACUAGAAUA UUUCUGG	CCAGAAAUUUUC UAGUAC
1767	1768	1174-1192	UACUAGAAUAU UUCUGGA	UCCAGAAUAU UCUAGUA
1769	1770	1175-1193	ACUAGAAUAU UCUGGAA	UCCAGAAUAU UUCUAGU
1771	1772	1176-1194	CUAGAAUAUU CUGGAAC	GUCCAGAAUA UUUCUAG
1773	1774	1177-1195	UAGAAUAUUUC UGGAACU	AGUCCAGAAU AUUUCUA
1775	1776	1178-1196	AGAAUAUUUCU GGAACUA	UAGUCCAGAAA UAUUUCU
1777	1778	1179-1197	GAAUAUUUCUG GAACUAG	CUAGUCCAGAAA UAUUUC
1779	1780	1180-1198	AAUAUUUCUGG AACUAGU	ACUAGUCCAGAA AUUUU
1781	1782	1181-1199	AAUAUUUCUGGA ACUAGUA	UACUAGUCCAGA AAUAU
1783	1784	1183-1201	UAUUUCUGGAAC UAGUAAA	UUUACUAGUCCA GAAUA
1785	1786	1186-1204	UUCUGGAACUAG UAAAUUC	GAAUUACUAGU UCCAGAA
1787	1788	1187-1205	UCUGGAACUAGU AAAUUCC	GGAAUUUACUAG UCCAGA
1789	1790	1189-1207	UGGAACUAGUAA AUUCCA	AUGGAAUUUACU AGUCCA
1791	1792	1190-1208	GGAACUAGUAAA UCCAUG	CAUGGAAUUUAC UAGUCC
1793	1794	1192-1210	AACUAGUAAAU CCAUGUG	CACAUGGAAUU ACUAGU
1795	1796	1193-1211	ACUAGUAAAUUC CAUGUGG	CCACAUGGAAUU ACUAGU
1797	1798	1194-1212	CUAGUAAAUUCC AUGUGGA	UCCACAUGGAAU UACUAG
1799	1800	1195-1213	UAGUAAAUCCA	GUCCACAUGGAAU

[0908]

			UGUGGAC	UUACUA
1801	1802	1196-1214	AGUAAAUUCCAU GUGGACU	AGUCCACAUGGAA UUUACU
1803	1804	1197-1215	GUAAAUUCCAUG UGGACUU	AAGUCCACAUGGA AUUUAC
1805	1806	1198-1216	UAAAUUCCAUGU GGACUUA	UAAGUCCACAUGG AAUUUA
1807	1808	1199-1217	AAAUUCCAUGUG GACUAG	CUAAGUCCACAUG GAAUUU
1809	1810	1200-1218	AAUUCCAUGUGG ACUUAGA	UCUAAGUCCACAU GGAAUU
1811	1812	1201-1219	AUUCCAUGUGGA CUUAGAG	CUCUAAGUCCACA UGGAAU
1813	1814	1202-1220	UUCCAUGUGGAC UUAGAGC	GCUCUAAGUCCAC AUGGAA
1815	1816	1222-1240	GGAGCUGGCAGA CCUCCAU	AUGGAGGUCUGCC AGCUCC
1817	1818	1223-1241	GAGCUGGCAGAC CUCCAUG	CAUGGAGGUCUGC CAGCUC
1819	1820	1224-1242	AGCUGGCAGACC UCCAUGG	CCAUGGAGGUCUG CCAGCU
1821	1822	1225-1243	GCUGGCAGACCU CCAUGGG	CCAUGGAGGUCU GCCAGC
1823	1824	1226-1244	CUGGCAGACCUC AUGGGA	UCCCAUGGAGGUC UGCCAG
1825	1826	1227-1245	UGGCAGACCUC AUGGGAA	UUCCCAUGGAGGU CUGCCA
1827	1828	1228-1246	GGCAGACCUC UGGGAAA	UUUCCCAUGGAGG UCUGCC
1829	1830	1229-1247	GCAGACCUC GGGAAAG	CUUUCCCAUGGAG GUCUGC
1831	1832	1230-1248	CAGACCUC GGAAAGA	UCUUUCCCAUGGA GGUCUG
1833	1834	1231-1249	AGACCUC GAAAGAU	AUCUUUCCCAUGG AGGUCU
1835	1836	1232-1250	GACCUC AAAGAUG	CAUCUUUCCCAUG GAGGUC
1837	1838	1233-1251	ACCUC AAGAUGC	GCAUCUUUCCCAU GGAGGU
1839	1840	1254-1272	CACUCUUGUUUU CCUCGUG	CACGAGGAAAACA AGAGUG
1841	1842	1255-1273	ACUCUUGUUUUC	GCACGAGGAAAAC

[0909]

			CUCGUGC	AAGAGU
1843	1844	1256-1274	CUCUUGUUUCC UCGUGCU	AGCACGAGGAAA ACAAGAG
1845	1846	1257-1275	UCUUGUUUCCU CGUGCUU	AAGCACGAGGAA ACAAGA
1847	1848	1259-1277	UUGUUUCCUCG UGC UUUG	CAAAGCACGAGGA AAACAA
1849	1850	1260-1278	UGUUUCCUCGU GCUUUGU	ACAAAGCACGAGG AAAACA
1851	1852	1261-1279	GUUUUCCUCGUG CUUUGUG	CACAAAGCACGAG GAAAAC
1853	1854	1262-1280	UUUCCUCGUGC UUUGUGG	CCACAAAGCACGA GGAAAA
1855	1856	1263-1281	UUCCUCGUGCU UUGUGGC	GCCACAAAGCACG AGGAAA
1857	1858	1264-1282	UCCUCGUGCUU UGUGGCC	GGCCACAAAGCAC GAGGAA
1859	1860	1265-1283	UCCUCGUGCUUU GUGGCCA	UGGCCACAAAGCA CGAGGA
1861	1862	1266-1284	CCUCGUGCUUUG UGGCCAA	UUGGCCACAAAGC ACGAGG
1863	1864	1267-1285	CUCGUGCUUUGU GGCCAAU	AUUGGCCACAAAG CACGAG
1865	1866	1268-1286	UCGUGCUUUGUG GCCAAUG	CAUUGGCCACAAA GCACGA
1867	1868	1269-1287	CGUGCUUUGUGG CCAAUGA	UCAUUGGCCACAA AGCACG
1869	1870	1270-1288	GUGCUUUGUGGC CAAUGAC	GUCAUUGGCCACA AAGCAC
1871	1872	1271-1289	UGC UUUGUGGCC AAUGACU	AGUCAUUGGCCAC AAAGCA
1873	1874	1272-1290	GCUUUGUGGCCA AUGACUC	GAGUCAUUGGCCA CAAAGC
1875	1876	1273-1291	CUUUGUGGCCAA UGACUCA	UGAGUCAUUGGCC ACAAAG
1877	1878	1274-1292	UUUGUGGCCAAU GACUCAA	UUGAGUCAUUGG CCACAAA
1879	1880	1275-1293	UUGUGGCCAAUG ACUCAAC	GUUGAGUCAUUG GCCACAA
1881	1882	1276-1294	UGUGGCCAAUGA CUCAACC	GGUUGAGUCAUU GGCCACA
1883	1884	1277-1295	GUGGCCAAUGAC	GGGUUGAGUCAU

[0910]

			UCAACCC	UGGCCAC
1885	1886	1278-1296	UGGCCAAUGACU CAACCCU	AGGGUUGAGUCA UUGGCCA
1887	1888	1279-1297	GGCCAAUGACUC AACCCUC	GAGGGUUGAGUC AUUGGCC
1889	1890	1280-1298	GCCAAUGACUCA ACCCUCU	AGAGGGUUGAGU CAUUGGC
1891	1892	1281-1299	CCAAUGACUCAA CCCUCUU	AAGAGGGUUGAG UCAUUGG
1893	1894	1282-1300	CAAUGACUCAAC CCUCUUC	GAAGAGGGUUGA GUCAUUG
1895	1896	1283-1301	AAUGACUCAACC CUCUUCA	UGAAGAGGGUUG AGUCAUU
1897	1898	1284-1302	AUGACUCAACCC UCUUCAC	GUGAAGAGGGUU GAGUCAU
1899	1900	1285-1303	UGACUCAACCCUC UUCACC	GGUGAAGAGGGU UGAGUCA
1901	1902	1286-1304	GACUCAACCCUCU UCACCC	GGGUGAAGAGGG UUGAGUC
1903	1904	1287-1305	ACUCAACCCUCUU CACCCU	AGGGUGAAGAGG GUUGAGU
1905	1906	1288-1306	CUCAACCCUCUUC ACCCUG	CAGGGUGAAGAG GGUUGAG
1907	1908	1289-1307	UCAACCCUCUUCA CCCUGG	CCAGGGUGAAGA GGGUUGA
1909	1910	1290-1308	CAACCCUCUUCAC CCUGGC	GCCAGGGUGAAG AGGGUUG
1911	1912	1291-1309	AACCCUCUUCACC CUGGCU	AGCCAGGGUGAA GAGGGUU
1913	1914	1292-1310	ACCCUCUUCACCC UGGCUA	UAGCCAGGGUGA AGAGGGU
1915	1916	1293-1311	CCCUCUUCACCCU GGCUAA	UUAGCCAGGGUG AAGAGGG
1917	1918	1294-1312	CCUCUUCACCCUG GCUAAG	CUUAGCCAGGGUG AAGAGG
1919	1920	1297-1315	CUUCACCCUGGCU AAGAUG	CAUCUUAGCCAGG GUGAAG
1921	1922	1298-1316	UUCACCCUGGCU AAGAUGA	UCAUCUUAGCCAG GGUGAA
1923	1924	1300-1318	CACCCUGGCUAA GAUGAUG	CAUCAUCUUAGCC AGGGUG
1925	1926	1301-1319	ACCCUGGCUAAG	GCAUCAUCUUAGC

[0911]

			AUGAUGC	CAGGGU
1927	1928	1302-1320	CCCUGGCUAAGA UGAUGCC	GGCAUCAUCUUAG CCAGGG
1929	1930	1303-1321	CCUGGCUAAGAU GAUGCCA	UGGCAUCAUCUUA GCCAGG
1931	1932	1304-1322	CUGGCUAAGAUG AUGCCAG	CUGGCAUCAUCUU AGCCAG
1933	1934	1305-1323	UGGCUAAGAUGA UGCCAGG	CCUGGCAUCAUCU UAGCCA
1935	1936	1306-1324	GGCUAAGAUGAU GCCAGGC	GCCUGGCAUCAUC UUAGCC
1937	1938	1307-1325	GCUAAGAUGAUG CCAGGCU	AGCCUGGCAUCAU CUUAGC
1939	1940	1308-1326	CUAAGAUGAUGC CAGGCUG	CAGCCUGGCAUCA UCUUAG
1941	1942	1309-1327	UAAGAUGAUGCC AGGCUGU	ACAGCCUGGCAUC AUCUUA
1943	1944	1310-1328	AGAUGAUGCCA GGCUGUG	CACAGCCUGGCAU CAUCUU
1945	1946	1311-1329	AGAUGAUGCCAG GCUGUGA	UCACAGCCUGGCA UCAUCU
1947	1948	1312-1330	GAUGAUGCCAGG CUGUGAG	CUCACAGCCUGGC AUAUC
1949	1950	1313-1331	AUGAUGCCAGGC UGUGAGA	UCUCACAGCCUGG CAUCAU
1951	1952	1314-1332	UGAUGCCAGGCU GUGAGAU	AUCUCACAGCCUG GCAUCA
1953	1954	1316-1334	AUGCCAGGCUGU GAGAUUU	AAAUCUCACAGCC UGGCAU
1955	1956	1317-1335	UGCCAGGCUGUG AGAUUUA	UAAAUCUCACAGC CUGGCA
1957	1958	1318-1336	GCCAGGCUGUGA GAUUUAC	GUAAAUCUCACAG CCUGGC
1959	1960	1319-1337	CCAGGCUGUGAG AUUUACU	AGUAAAUCUCACA GCCUGG
1961	1962	1320-1338	CAGGCUGUGAGA UUUACUC	GAGUAAAUCUCAC AGCCUG
1963	1964	1321-1339	AGGCUGUGAGAU UUACUCU	AGAGUAAAUCUC ACAGCCU
1965	1966	1322-1340	GGCUGUGAGAUU UACUCUG	CAGAGUAAAUCUC ACAGCC
1967	1968	1323-1341	GCUGUGAGAUUU	UCAGAGUAAAUC

[0912]

			ACUCUGA	UCACAGC
1969	1970	1326-1344	GUGAGAUUUACU CUGAUUC	GAAUCAGAGUAA AUCUCAC
1971	1972	1327-1345	UGAGAUUUACUC UGAUUCU	AGAAUCAGAGUA AAUCUCA
1973	1974	1328-1346	GAGAUUUACUCU GAUUCUG	CAGAAUCAGAGU AAAUCUC
1975	1976	1329-1347	AGAUUUACUCUG AUUCUGG	CCAGAAUCAGAGU AAAUCU
1977	1978	1330-1348	GAUUUACUCUGA UUCUGGG	CCCAGAAUCAGAG UAAAUC
1979	1980	1331-1349	AUUUACUCUGAU UCUGGGA	UCCCAGAAUCAGA GUAAAU
1981	1982	1332-1350	UUUACUCUGAUU CUGGGAA	UUCCCAGAAUCAG AGUAAA
1983	1984	1333-1351	UUACUCUGAUUC UGGGAAC	GUUCCCAGAAUCA GAGUAA
1985	1986	1334-1352	UACUCUGAUUCU GGGAACC	GGUUCCCAGAAUC AGAGUA
1987	1988	1335-1353	ACUCUGAUUCUG GGAACCA	UGGUUCCCAGAAU CAGAGU
1989	1990	1336-1354	CUCUGAUUCUGG GAACCAU	AUGGUUCCCAGAA UCAGAG
1991	1992	1337-1355	UCUGAUUCUGGG AACCAUG	CAUGGUUCCCAGA AUCAGA
1993	1994	1338-1356	CUGAUUCUGGGA ACCAUGC	GCAUGGUUCCCAG AAUCAG
1995	1996	1339-1357	UGAUUCUGGGAA CCAUGCC	GGCAUGGUUCCCA GAAUCA
1997	1998	1340-1358	GAUUCUGGGAAC CAUGCCU	AGGCAUGGUUCCC AGAAUC
1999	2000	1341-1359	AUUCUGGGGAACC AUGCCUC	GAGGCAUGGUUCC CAGAAU
2001	2002	1342-1360	UUCUGGGGAACCA UGCCUCC	GGAGGCAUGGUU CCCAGAA
2003	2004	1343-1361	UCUGGGGAACCAU GCCUCCA	UGGAGGCAUGGU UCCCAGA
2005	2006	1344-1362	CUGGGGAACCAUG CCUCCA	AUGGAGGCAUGG UUCCCAG
2007	2008	1345-1363	UGGGAACCAUGC CUCCAUG	CAUGGAGGCAUG GUUCCCA
2009	2010	1346-1364	GGGAACCAUGCC	UCAUGGAGGCAU

[0913]

			UCCAUGA	GGUUCCC
2011	2012	1348-1366	GAACCAUGCCUCC AUGAUC	GAUCAUGGAGGC AUGGUUC
2013	2014	1349-1367	AACCAUGCCUCCA UGAUCC	GGAUCAUGGAGG CAUGGUU
2015	2016	1350-1368	ACCAUGCCUCCA GAUCCA	UGGAUCAUGGAG GCAUGGU
2017	2018	1351-1369	CCAUGCCUCCAUG AUCCAA	UUGGAUCAUGGA GGCAUGG
2019	2020	1352-1370	CAUGCCUCCAUG AUCCAAG	CUUGGAUCAUGG AGGCAUG
2021	2022	1353-1371	AUGCCUCCAUGA UCCAAGG	CCUUGGAUCAUGG AGGCAU
2023	2024	1354-1372	UGCCUCCAUGAU CCAAGGG	CCCUUGGAUCAUG GAGGCA
2025	2026	1358-1376	UCCAUGAUCCAA GGGAUUC	GAAUCCCUUGGAU CAUGGA
2027	2028	1359-1377	CCAUGAUCCAAG GGAUUCG	CGAAUCCCUUGGA UCAUGG
2029	2030	1360-1378	CAUGAUCCAAGG GAUUCGA	UCGAAUCCCUUGG AUCAUG
2031	2032	1361-1379	AUGAUCCAAGGG AUUCGAA	UUCGAAUCCCUUG GAUCAU
2033	2034	1362-1380	UGAUCCAAGGGA UUCGAAA	UUUCGAAUCCCUU GGAUCA
2035	2036	1363-1381	GAUCCAAGGGAU UCGAAAC	GUUUCGAAUCCCU UGGAUC
2037	2038	1365-1383	UCCAAGGGAUUC GAAACAG	CUGUUUCGAAUCC CUUGGA
2039	2040	1366-1384	CCAAGGGAUUCG AAACAGC	GCUGUUUCGAAUC CCUUGG
2041	2042	1367-1385	CAAGGGAUUCGA AACAGCC	GGCUGUUUCGAA UCCCUUG
2043	2044	1368-1386	AAGGGAUUCGAA ACAGCCG	CGGCUGUUUCGAA UCCCUU
2045	2046	1369-1387	AGGGAUUCGAAA CAGCCGA	UCGGCUGUUUCGA AUCCCU
2047	2048	1370-1388	GGGAUUCGAAAC AGCCGAG	CUCGGCUGUUUCG AAUCCC
2049	2050	1371-1389	GGAUUCGAAACA GCCGAGU	ACUCGGCUGUUUC GAAUCC
2051	2052	1372-1390	GAUUCGAAACAG	CACUCGGCUGUUU

[0914]

			CCGAGUG	CGAAUC
2053	2054	1373-1391	AUUCGAAACAGC CGAGUGC	GCACUCGGCUGUU UCGAAU
2055	2056	1374-1392	UUCGAAACAGCC GAGUGCC	GGCACUCGGCUGU UUCGAA
2057	2058	1375-1393	UCGAAACAGCCG AGUGCCA	UGGCACUCGGCUG UUUCGA
2059	2060	1376-1394	CGAAACAGCCGA GUGCCAA	UUGGCACUCGGCU GUUUCG
2061	2062	1377-1395	GAAACAGCCGAG UGCCAAA	UUUGGCACUCGGC UGUUUC
2063	2064	1378-1396	AAACAGCCGAGU GCCAAAG	CUUUGGCACUCGG CUGUUU
2065	2066	1379-1397	AACAGCCGAGUG CCAAAGU	ACUUUGGCACUCG GCUGUU
2067	2068	1380-1398	ACAGCCGAGUGC CAAAGUA	UACUUUGGCACUC GGCUGU
2069	2070	1381-1399	CAGCCGAGUGCC AAAGUAC	GUACUUUGGCACU CGGCUG
2071	2072	1383-1401	GCCGAGUGCCAA AGUACAU	AUGUACUUUGGC ACUCGGC
2073	2074	1384-1402	CCGAGUGCCAAA GUACAUC	GAUGUACUUUGG CACUCGG
2075	2076	1385-1403	CGAGUGCCAAAG UACAUCU	AGAUGUACUUUG GCACUCG
2077	2078	1386-1404	GAGUGCCAAAGU ACAUCUU	AAGAUGUACUUU GGCACUC
2079	2080	1387-1405	AGUGCCAAAGUA CAUCUUC	GAAGAUGUACUU UGGCACU
2081	2082	1388-1406	GUGCCAAAGUAC AUCUUC	GGAAGAUGUACU UUGGCAC
2083	2084	1389-1407	UGCCAAAGUACA UCUCCG	CGGAAGAUGUAC UUUGGCA
2085	2086	1390-1408	GCCAAAGUACAU CUUCCGC	GCGGAAGAUGUA CUUUGGC
2087	2088	1391-1409	CCAAAGUACAUC UUCCGCC	GGCGGAAGAUGU ACUUUGG
2089	2090	1392-1410	CAAAGUACAUCU UCCGCCA	UGGCGGAAGAUG UACUUUG
2091	2092	1393-1411	AAAGUACAUCUU CCGCCAC	GUGGCGGAAGAU GUACUUU
2093	2094	1394-1412	AAGUACAUCUUC	UGUGGCGGAAGA

[0915]

			CGCCACA	UGUACUU
2095	2096	1395-1413	AGUACAUCUUC GCCACAA	UUGUGGCGGAAG AUGUACU
2097	2098	1396-1414	GUACAUCUUCG CCACAAU	AUUGUGGCGGAA GAUGUAC
2099	2100	1397-1415	UACAUCUUCGCG ACAAUG	CAUUGUGGCGGA AGAUGUA
2101	2102	1398-1416	ACAUCUUCGCCA CAAUGA	UCAUUGUGGCGG AAGAUGU
2103	2104	1399-1417	CAUCUUCGCCAC AAUGAU	AUCAUUGUGGCG GAAGAUG
2105	2106	1400-1418	AUCUUCGCCACA AUGAUG	CAUCAUUGUGGCG GAAGAU
2107	2108	1401-1419	UCUUCGCCACAA UGAUGU	ACAUCAUUGUGGC GGAAGA
2109	2110	1402-1420	CUUCGCCACAAU GAUGUC	GACAUCAUUGUG GCGGAAG
2111	2112	1403-1421	UUCGCCACAAU GAUGUCA	UGACAUCAUUGU GGCGGAA
2113	2114	1404-1422	UCCGCCACAAUG AUGUCAG	CUGACAUCAUUGU GGCGGA
2115	2116	1405-1423	CCGCCACAAUGA UGUCAGC	GCUGACAUCAUUG UGGCGG
2117	2118	1406-1424	CGCCACAAUGAU GUCAGCC	GGCUGACAUCAU GUGGCG
2119	2120	1407-1425	GCCACAAUGAUG UCAGCCA	UGGCUGACAUCAU UGUGGC
2121	2122	1427-1445	CUCAGAGAACUG CUGCAA	UUUGCAGCAGUUC UCUGAG
2123	2124	1428-1446	UCAGAGAACUGC UGCAAAG	CUUUGCAGCAGUU CUCUGA
2125	2126	1429-1447	CAGAGAACUGCU GCAAAGA	UCUUUGCAGCAGU UCUCUG
2127	2128	1430-1448	AGAGAACUGCUG CAAAGAU	AUCUUUGCAGCAG UUCUCU
2129	2130	1431-1449	GAGAACUGCUGC AAAGAUC	GAUCUUUGCAGCA GUUCUC
2131	2132	1432-1450	AGAACUGCUGCA AAGAUCU	AGAUCUUUGCAGC AGUUCU
2133	2134	1433-1451	GAACUGCUGCAA AGAUCUG	CAGAUCUUUGCAG CAGUUC
2135	2136	1434-1452	AACUGCUGCAA	UCAGAUCUUUGCA

[0916]

			GAUCUGA	GCAGUU
2137	2138	1435-1453	ACUGCUGCAAAG AUCUGAC	GUCAGAUCUUUGC AGCAGU
2139	2140	1436-1454	CUGCUGCAAAGA UCUGACC	GGUCAGAUCUUU GCAGCAG
2141	2142	1437-1455	UGCUGCAAAGAU CUGACCC	GGGUCAGAUCUU UGCAGCA
2143	2144	1457-1475	UCAGUCCCCAAG AUUGUGG	CCACAAUCUUGGG GACUGA
2145	2146	1458-1476	CAGUCCCCAAGA UUGUGGC	GCCACAAUCUUGG GGACUG
2147	2148	1459-1477	AGUCCCCAAGAU UGUGGCA	UGCCACAAUCUUG GGGACU
2149	2150	1461-1479	UCCCCAAGAUUG UGGCAUU	AAUGCCACAAUCU UGGGGA
2151	2152	1462-1480	CCCCAAGAUUGU GGCAUUU	AAAUGCCACAAUC UUGGGG
2153	2154	1463-1481	CCCAAGAUUGUG GCAUUUG	CAA AUGCCACAAU CUUGGG
2155	2156	1464-1482	CCAAGAUUGUGG CAUUUGA	UCAA AUGCCACAA UCUUGG
2157	2158	1465-1483	CAAGAUUGUGGC AUUUGAA	UUCAAAUGCCACA AUCUUG
2159	2160	1466-1484	AAGAUUGUGGCA UUUGAAA	UUUCAAAUGCCAC AAUCUU
2161	2162	1467-1485	AGAUUGUGGCAU UUGAAAC	GUUUCAAAUGCCA CAAUCU
2163	2164	1468-1486	GAUUGUGGCAUU UGAAACU	AGUUUCAAAUGCC ACAAUC
2165	2166	1469-1487	AUUGUGGCAUUU GAAACUG	CAGUUUCAAAUGC CACAAU
2167	2168	1470-1488	UUGUGGCAUUUG AAACUGU	ACAGUUUCAAAU GCCACAA
2169	2170	1471-1489	UGUGGCAUUUGA AACUGUC	GACAGUUUCAAA UGCCACA
2171	2172	1472-1490	GUGGCAUUUGAA ACUGUCC	GGACAGUUUCA AUGCCAC
2173	2174	1473-1491	UGGCAUUUGAAA CUGUCCA	UGGACAGUUUCA AAUGCCA
2175	2176	1474-1492	GGCAUUUGAAAC UGUCCA	AUGGACAGUUUC AAAUGCC
2177	2178	1475-1493	GCAUUUGAAACU	AAUGGACAGUUU

[0917]

			GUCCAUU	CAA AUGC
2179	2180	1476-1494	CAUUUGAAACUG UCCA UUC	GAAUGGACAGUU UCAAAUG
2181	2182	1477-1495	AUUUGAAACUGU CCA UUCA	UGAAUGGACAGU UUCAAA U
2183	2184	1479-1497	UUGAAACUGUCC AUUCAAU	AUUGAAUGGACA GUU UCAA
2185	2186	1480-1498	UGAAACUGUCCA UUCA AUG	CAUUGAAUGGAC AGUUUCA
2187	2188	1481-1499	GAAACUGUCCA U UCA AUGG	CCA UUGAAUGGAC AGUUUC
2189	2190	1482-1500	AAACUGUCCA U CAAUGGA	UCCA UUGAAUGG ACAGUUU
2191	2192	1483-1501	AACUGUCCA UUC AAUGGAU	AUCCA UUGAAUG GACAGUU
2193	2194	1484-1502	ACUGUCCA UUCA AUGGAUG	CAUCCA UUGAAUG GACAGU
2195	2196	1485-1503	CUGUCCA UUCA UGGAUGG	CCA UCCA UUGAAU GGACAG
2197	2198	1486-1504	UGUCCA UUCAAU GGAUGGG	CCA UCCA UUGAA UGGACA
2199	2200	1487-1505	GUCCA UUCA AUG GAUGGGG	CCCA UCCA UUGA AUGGAC
2201	2202	1488-1506	UCCA UUCA AUGG AUGGGGC	GCCCA UCCA UUG AAUGGA
2203	2204	1508-1526	GUGUGCCCACUG GAAGAGC	GCUCU UCCAGUGG GCACAC
2205	2206	1509-1527	UGUGCCCACUGG AAGAGCU	AGCUCU UCCAGUG GGCACA
2207	2208	1510-1528	GUGCCCACUGGA AGAGCUG	CAGCUCU UCCAGU GGGCAC
2209	2210	1511-1529	UGCCCACUGGAA GAGCUGU	ACAGCUCU UCCAG UGGGCA
2211	2212	1512-1530	GCCCACUGGAAG AGCUGUG	CACAGCUCU UCCA GUGGGC
2213	2214	1513-1531	CCCACUGGAAGA GCUGUGU	ACACAGCUCU UCC AGUGGG
2215	2216	1514-1532	CCACUGGAAGAG CUGUGUG	CACACAGCUCU UC CAGUGG
2217	2218	1515-1533	CACUGGAAGAGC UGUGUGA	UCACACAGCUCU U CCAGUG
2219	2220	1516-1534	ACUGGAAGAGCU	AUCACACAGCUCU

[0918]

			GUGUGAU	UCCAGU
2221	2222	1517-1535	CUGGAAGAGCUG UGUGAUG	CAUCACACAGCUC UUCCAG
2223	2224	1518-1536	UGGAAGAGCUGU GUGAUGU	ACAUCACACAGCU CUUCCA
2225	2226	1519-1537	GGAAGAGCUGUG UGAUGUG	CACAUCACACAGC UCUUCC
2227	2228	1520-1538	GAAGAGCUGUGU GAUGUGG	CCACAUCACACAG CUCUUC
2229	2230	1521-1539	AAGAGCUGUGUG AUGUGGC	GCCACAUCACACA GCUCUU
2231	2232	1522-1540	AGAGCUGUGUGA UGUGGCC	GGCCACAUCACAC AGCUCU
2233	2234	1523-1541	GAGCUGUGUGAU GUGGCC	GGGCCACAUCACA CAGCUC
2235	2236	1524-1542	AGCUGUGUGAUG UGGCCA	UGGGCCACAUCAC ACAGCU
2237	2238	1525-1543	GCUGUGUGAUGU GGCCAU	AUGGGCCACAUCA CACAGC
2239	2240	1526-1544	CUGUGUGAUGUG GCCCAUG	CAUGGGCCACAUC ACACAG
2241	2242	1527-1545	UGUGUGAUGUGG CCCAUGA	UCAUGGGCCACA CACACA
2243	2244	1528-1546	GUGUGAUGUGGC CCAUGAG	CUCAUGGGCCACA UCACAC
2245	2246	1529-1547	UGUGAUGUGGCC CAUGAGU	ACUCAUGGGCCAC AUCACA
2247	2248	1532-1550	GAUGUGGCCCAU GAGUUUG	CAAACUCAUGGGC CACAUC
2249	2250	1533-1551	AUGUGGCCCAUG AGUUUGG	CCAAACUCAUGGG CCACAU
2251	2252	1534-1552	UGUGGCCCAUGA GUUUGGA	UCCAAACUCAUGG GCCACA
2253	2254	1535-1553	GUGGCCCAUGAG UUUGGAG	CUCCAAACUCAUG GGCCAC
2255	2256	1536-1554	UGGCCCAUGAGU UUGGAGC	GCUCCAAACUCAU GGCCA
2257	2258	1537-1555	GGCCAUGAGUU UGGAGCA	UGCUCCAAACUCA UGGGCC
2259	2260	1538-1556	GCCCAUGAGUUU GGAGCAA	UUGCUCCAAACUC AUGGGC
2261	2262	1539-1557	CCCAUGAGUUUG	AUUGCUCCAAACU

[0919]

			GAGCAAU	CAUGGG
2263	2264	1540-1558	CCAUGAGUUUGG AGCAAUC	GAUUGCUCCAAAC UCAUGG
2265	2266	1542-1560	AUGAGUUUGGAG CAAUCAC	GUGAUUGCUCCAA ACUCAU
2267	2268	1543-1561	UGAGUUUGGAGC AAUCACC	GGUGAUUGCUCCA AACUCA
2269	2270	1545-1563	AGUUUGGAGCAA UCACCUU	AAGGUGAUUGCU CCAAACU
2271	2272	1546-1564	GUUUGGAGCAAU CACCUUC	GAAGGUGAUUGC UCCAAAC
2273	2274	1547-1565	UUUGGAGCAAUC ACCUUCG	CGAAGGUGAUUG CUCCAAA
2275	2276	1548-1566	UUGGAGCAAUCA CCUUCGU	ACGAAGGUGAUU GCUCCAA
2277	2278	1549-1567	UGGAGCAAUCAC CUUCGUG	CACGAAGGUGAU UGCUGCA
2279	2280	1550-1568	GGAGCAAUCACC UUCGUGG	CCACGAAGGUGAU UGCUC
2281	2282	1551-1569	GAGCAAUCACCU UCGUGGA	UCCACGAAGGUGA UUGCUC
2283	2284	1552-1570	AGCAAUCACCUU CGUGGAU	AUCCACGAAGGUG AUUGCUC
2285	2286	1553-1571	GCAAUCACCUUC GUGGAUG	CAUCCACGAAGGU GAUUGC
2287	2288	1554-1572	CAAUCACCUUCG UGGAUGA	UCAUCCACGAAGG UGAUUG
2289	2290	1555-1573	AAUCACCUUCGU GGAUGAG	CUCAUCCACGAAG GUGAUU
2291	2292	1556-1574	AUCACCUUCGUG GAUGAGG	CCUCAUCCACGAA GGUGAU
2293	2294	1557-1575	UCACCUUCGUGG AUGAGGU	ACCUCAUCCACGA AGGUGA
2295	2296	1558-1576	CACCUUCGUGGA UGAGGUC	GACCUCAUCCACG AAGGUG
2297	2298	1559-1577	ACCUUCGUGGAU GAGGUCC	GGACCUCAUCCAC GAAGGU
2299	2300	1560-1578	CCUUCGUGGAUG AGGUCCA	UGGACCUCAUCCA CGAAGG
2301	2302	1561-1579	CUUCGUGGAUGA GGUCCAC	GUGGACCUCAUCC ACGAAG
2303	2304	1562-1580	UUCGUGGAUGAG	CGUGGACCUCAUC

[0920]

			GUCCACG	CACGAA
2305	2306	1563-1581	UCGUGGAUGAGG UCCACGC	GCGUGGACCUCAU CCACGA
2307	2308	1564-1582	CGUGGAUGAGGU CCACGCA	UGCGUGGACCUC UCCACG
2309	2310	1565-1583	GUGGAUGAGGUC CACGCAG	CUGCGUGGACCUC AUCCAC
2311	2312	1566-1584	UGGAUGAGGUCC ACGCAGU	ACUGCGUGGACCU CAUCCA
2313	2314	1567-1585	GGAUGAGGUCCA CGCAGUG	CACUGCGUGGACC UCAUCC
2315	2316	1568-1586	GAUGAGGUCCAC GCAGUGG	CCACUGCGUGGAC CUCAUC
2317	2318	1569-1587	AUGAGGUCCACG CAGUGGG	CCCACUGCGUGGA CCUCAU
2319	2320	1570-1588	UGAGGUCCACGC AGUGGGG	CCCACUGCGUGG ACCUCA
2321	2322	1571-1589	GAGGUCCACGCA GUGGGGC	GCCCCACUGCGUG GACCUC
2323	2324	1572-1590	AGGUCCACGCAG UGGGGCU	AGCCCCACUGCGU GGACCU
2325	2326	1595-1613	GGGGCUCGAGGC GGAGGGA	UCCCUCCGCCUCG AGCCCC
2327	2328	1596-1614	GGGCUCGAGGCG GAGGGAU	AUCCCUCCGCCUC GAGCCC
2329	2330	1597-1615	GGCUCGAGGCGG AGGGAUU	AAUCCCUCCGCCU CGAGCC
2331	2332	1598-1616	GCUCGAGGCGGA GGGAUUG	CAAUCCCUCCGCC UCGAGC
2333	2334	1599-1617	CUCGAGGCGGAG GGAUUGG	CCAAUCCCUCCGC CUCGAG
2335	2336	1600-1618	UCGAGGCGGAGG GAUUGGG	CCCAAUCCCUCCG CCUCGA
2337	2338	1601-1619	CGAGGCGGAGGG AUUGGGG	CCCAAUCCCUCC GCCUCG
2339	2340	1602-1620	GAGGCGGAGGGA UUGGGGA	UCCCCAAUCCCU CGCCUC
2341	2342	1603-1621	AGGCGGAGGGAU UGGGGAU	AUCCCCAAUCCCU CCGCCU
2343	2344	1604-1622	GGCGGAGGGGAU GGGGAUC	GAUCCCCAAUCCC UCCGCC
2345	2346	1605-1623	GCGGAGGGGAUUG	CGAUCCCCAAUCC

[0921]

			GGGAUCG	CUCCGC
2347	2348	1606-1624	CGGAGGGAUUGG GGAUCGG	CCGAUCCCCAAUC CCUCCG
2349	2350	1607-1625	GGAGGGAUUGGG GAUCGGG	CCCGAUCCCCAAU CCCUCC
2351	2352	1608-1626	GAGGGAUUGGGG AUCGGGA	UCCCGAUCCCCAA UCCCUC
2353	2354	1609-1627	AGGGAUUGGGGA UCGGGAU	AUCCCGAUCCCCA AUCCCU
2355	2356	1610-1628	GGGAUUGGGGAU CGGGAUG	CAUCCCGAUCCCC AAUCCC
2357	2358	1611-1629	GGAUUGGGGAUC GGGAUGG	CCAUCCCGAUCCC CAAUCC
2359	2360	1612-1630	GAUUGGGGAUCG GGAUGGA	UCCAUCCCGAUCC CCAAUC
2361	2362	1613-1631	AUUGGGGAUCGG GAUGGAG	CUCCAUCCCGAUC CCCAAU
2363	2364	1614-1632	UUGGGGAUCGGG AUGGAGU	ACUCCAUCCCGAU CCCCAA
2365	2366	1615-1633	UGGGGAUCGGGA UGGAGUC	GACUCCAUCCCGA UCCCCA
2367	2368	1617-1635	GGGAUCGGGAUG GAGUCAU	AUGACUCCAUCCC GAUCCC
2369	2370	1618-1636	GGAUCGGGAUGG AGUCAUG	CAUGACUCCAUCC CGAUCC
2371	2372	1619-1637	GAUCGGGAUGGA GUCAUGC	GCAUGACUCCAUC CCGAUC
2373	2374	1620-1638	AUCGGGAUGGAG UCAUGCC	GGCAUGACUCCA CCCGAU
2375	2376	1621-1639	UCGGGAUGGAGU CAUGCCA	UGGCAUGACUCCA UCCCGA
2377	2378	1622-1640	CGGGAUGGAGUC AUGCCAA	UUGGCAUGACUCC AUCCCG
2379	2380	1623-1641	GGGAUGGAGUCA UGCCAAA	UUUGGCAUGACUC CAUCCC
2381	2382	1624-1642	GGAUGGAGUCAU GCCAAA	UUUUGGCAUGAC UCCAUC
2383	2384	1625-1643	GAUGGAGUCAUG CCAAAA	UUUUUGGCAUGA CUCCAUC
2385	2386	1626-1644	AUGGAGUCAUGC CAAAAAU	AUUUUUGGCAUG ACUCCA
2387	2388	1627-1645	UGGAGUCAUGCC	CAUUUUUGGCAU

[0922]

			AAAAAUG	GACUCCA
2389	2390	1628-1646	GGAGUCAUGCCA AAAAUGG	CCAUUUUUGGCAU GACUCC
2391	2392	1629-1647	GAGUCAUGCCAA AAAUGGA	UCCAUUUUUGGCA UGACUC
2393	2394	1630-1648	AGUCAUGCCAAA AAUGGAC	GUCCAUUUUUGGC AUGACU
2395	2396	1632-1650	UCAUGCCAAAAA UGGACAU	AUGUCCAUUUUU GGCAUGA
2397	2398	1633-1651	CAUGCCAAAAAU GGACAUC	GAUGUCCAUUUU UGGCAUG
2399	2400	1636-1654	GCCAAAAAUGGA CAUCAUU	AAUGAUGUCCA UUUUGGC
2401	2402	1638-1656	CAAAAAUGGACA UCAUUUC	GAAAUGAUGUCC AUUUUUG
2403	2404	1639-1657	AAAAAUGGACAU CAUUUCU	AGAAAUGAUGUC CAUUUUU
2405	2406	1640-1658	AAA AUGGACAUC AUUUCUG	CAGAAAUGAUGU CCAUUUU
2407	2408	1641-1659	AA AUGGACAUCA UUUCUGG	CCAGAAAUGAUG UCCAUUU
2409	2410	1642-1660	AAUGGACAUCAU UUCUGGA	UCCAGAAAU GAU GUCCA UU
2411	2412	1643-1661	AUGGACAUCAUU UCUGGAA	UCCAGAAAU GA UGUCCA U
2413	2414	1644-1662	UGGACAUCAUUU CUGGAAC	GUUCCAGAAAU AUGUCCA
2415	2416	1645-1663	GGACAUCAUUUC UGGAACA	UGUCCAGAAAU GAUGUCC
2417	2418	1646-1664	GACAUCAUUUCU GGAACAC	GUGUCCAGAAA UGAUGUC
2419	2420	1647-1665	ACAUCAUUUCUG GAACACU	AGUGUCCAGAA AUGAUGU
2421	2422	1648-1666	CAUCAUUUCUGG AACACUU	AAGUGUCCAGA AAUGAUG
2423	2424	1649-1667	AUCAUUUCUGGA ACACUUG	CAAGUGUCCAGA AAUGAU
2425	2426	1650-1668	UCAUUUCUGGAA CACUUGG	CCAAGUGUCCAG AAAUGA
2427	2428	1651-1669	CAUUUCUGGAAC ACUUGGC	GCCAAGUGUCCA GAA AUG
2429	2430	1652-1670	AUUUCUGGAACA	UGCCAAGUGUCC

[0923]

			CUUGGCA	AGAAAU
2431	2432	1653-1671	UUUCUGGAACAC UUGGCAA	UUGCCAAGUGUUC CAGAAA
2433	2434	1654-1672	UUCUGGAACACU UGGCAA	UUUGCCAAGUGU UCCAGAA
2435	2436	1655-1673	UCUGGAACACUU GGCAAAG	CUUUGCCAAGUGU UCCAGA
2437	2438	1656-1674	CUGGAACACUUG GCAAAGC	GCUUUGCCAAGUG UCCAG
2439	2440	1657-1675	UGGAACACUUGG CAAAGCC	GGCUUUGCCAAGU GUUCCA
2441	2442	1658-1676	GGAACACUUGGC AAAGCCU	AGGCUUUGCCAAG UGUCC
2443	2444	1659-1677	GAACACUUGGCA AAGCCU	AAGGCUUUGCCAA GUGUUC
2445	2446	1660-1678	AACACUUGGCAA AGCCUUU	AAAGGCUUUGCCA AGUGUU
2447	2448	1661-1679	ACACUUGGCAAA GCCUUUG	CAAAGGCUUUGCC AAGUGU
2449	2450	1662-1680	CACUUGGCAAAG CCUUUGG	CCAAAGGCUUUGC CAAGUG
2451	2452	1682-1700	UGUGUUGGAGGG UACAUCG	CGAUGUACCCUCC AACACA
2453	2454	1683-1701	GUGUUGGAGGGU ACAUCGC	GCGAUGUACCCUC CAACAC
2455	2456	1684-1702	UGUUGGAGGGUA CAUCGCC	GGCGAUGUACCCU CCAACA
2457	2458	1685-1703	GUUGGAGGGUAC AUCGCA	UGGCGAUGUACCC UCCAAC
2459	2460	1686-1704	UUGGAGGGUACA UCGCCAG	CUGGCGAUGUACC CUCCAA
2461	2462	1687-1705	UGGAGGGUACAU CGCCAGC	GCUGGCGAUGUAC CCUCCA
2463	2464	1688-1706	GGAGGGUACAUC GCCAGCA	UGCUGGCGAUGU ACCCUCC
2465	2466	1689-1707	GAGGGUACAUCG CCAGCAC	GUGCUGGCGAUG UACCCUC
2467	2468	1690-1708	AGGGUACAUCGC CAGCACG	CGUGCUGGCGAUG UACCCU
2469	2470	1691-1709	GGGUACAUCGCC AGCACGA	UCGUGCUGGCGAU GUACCC
2471	2472	1692-1710	GGUACAUCGCCA	CUCGUGCUGGCGA

[0924]

			GCACGAG	UGUACC
2473	2474	1693-1711	GUACAUCGCCAG CACGAGU	ACUCGUGCUGGCG AUGUAC
2475	2476	1694-1712	UACAUCGCCAGC ACGAGUU	AACUCGUGCUGGC GAUGUA
2477	2478	1695-1713	ACAUCGCCAGCAC GAGUUC	GAACUCGUGCUGG CGAUGU
2479	2480	1696-1714	CAUCGCCAGCACG AGUUCU	AGAACUCGUGCUG GCGAUG
2481	2482	1697-1715	AUCGCCAGCACG AGUUCUC	GAGAACUCGUGC GGCGAU
2483	2484	1698-1716	UCGCCAGCACGA GUUCUCU	AGAGAACUCGUGC UGGCGA
2485	2486	1699-1717	CGCCAGCACGAG UUCUCUG	CAGAGAACUCGUG CUGGCG
2487	2488	1700-1718	GCCAGCACGAGU UCUCUGA	UCAGAGAACUCGU GCUGGC
2489	2490	1701-1719	CCAGCACGAGUU CUCUGAU	AUCAGAGAACUCG UGCUGG
2491	2492	1702-1720	CAGCACGAGUUC UCUGAUU	AAUCAGAGAACUC GUGCUG
2493	2494	1703-1721	AGCACGAGUUCU CUGAUUG	CAAUCAGAGAACU CGUGCUG
2495	2496	1704-1722	GCACGAGUUCUC UGAUUGA	UCAAUCAGAGAAC UCGUGC
2497	2498	1705-1723	CACGAGUUCUCU GAUUGAC	GUCAAUCAGAGA ACUCGUG
2499	2500	1707-1725	CGAGUUCUCUGA UUGACAC	GUGUCAAUUCAGA GAACUCG
2501	2502	1727-1745	GUACGGUCCUAU GCUGCUG	CAGCAGCAUAGGA CCGUAC
2503	2504	1728-1746	UACGGUCCUAUG CUGCUGG	CCAGCAGCAUAGG ACCGUA
2505	2506	1729-1747	ACGGUCCUAUGC UGCUGGC	GCCAGCAGCAUAG GACCGU
2507	2508	1730-1748	CGGUCCUAUGCU GCUGGCU	AGCCAGCAGCAUA GGACCG
2509	2510	1731-1749	GGUCCUAUGCUG CUGGCUU	AAGCCAGCAGCAU AGGACC
2511	2512	1732-1750	GUCCUAUGCUGC UGGCUUC	GAAGCCAGCAGCA UAGGAC
2513	2514	1733-1751	UCCUAUGCUGCU	UGAAGCCAGCAGC

[0925]

			GGCUUCA	AUAGGA
2515	2516	1734-1752	CCUAUGCUGCUG GCUUCAU	AUGAAGCCAGCAG CAUAGG
2517	2518	1735-1753	CUAUGCUGCUGG CUUCAUC	GAUGAAGCCAGCA GCAUAG
2519	2520	1736-1754	UAUGCUGCUGGC UUCAUCU	AGAUGAAGCCAGC AGCAUA
2521	2522	1737-1755	AUGCUGCUGGCU UCAUCUU	AAGAUGAAGCCA GCAGCAU
2523	2524	1738-1756	UGCUGCUGGCUU CAUCUUC	GAAGAUGAAGCC AGCAGCA
2525	2526	1739-1757	GCUGCUGGCUUC AUCUUCA	UGAAGAUGAAGC CAGCAGC
2527	2528	1740-1758	CUGCUGGCUUCA UCUUCAC	GUGAAGAUGAAG CCAGCAG
2529	2530	1741-1759	UGCUGGCUUCAU CUUCACC	GGUGAAGAUGAA GCCAGCA
2531	2532	1742-1760	GCUGGCUUCAUC UUCACCA	UGGUGAAGAUGA AGCCAGC
2533	2534	1743-1761	CUGGCUUCAUCU UCACCAC	GUGGUGAAGAUG AAGCCAG
2535	2536	1744-1762	UGGCUUCAUCUU CACCACC	GGUGGUGAAGAU GAAGCCA
2537	2538	1745-1763	GGCUUCAUCUUC ACCACCU	AGGUGGUGAAGA UGAAGCC
2539	2540	1746-1764	GCUUCAUCUUCA CCACCUC	GAGGUGGUGAAG AUGAAGC
2541	2542	1747-1765	CUUCAUCUUCACC ACCUCU	AGAGGUGGUGAA GAUGAAG
2543	2544	1748-1766	UUCAUCUUCACC ACCUCUC	GAGAGGUGGUGA AGAUGAA
2545	2546	1749-1767	UCAUCUUCACCAC CUCUCU	AGAGAGGUGGUG AAGAUGA
2547	2548	1750-1768	CAUCUUCACCACC UCUCUG	CAGAGAGGUGGU GAAGAUG
2549	2550	1751-1769	AUCUUCACCACCU CUCUGC	GCAGAGAGGUGG UGAAGAU
2551	2552	1752-1770	UCUUCACCACCUC UCUGCC	GGCAGAGAGGUG GUGAAGA
2553	2554	1753-1771	CUUCACCACCUCU CUGCCA	UGGCAGAGAGGU GGUGAAG
2555	2556	1754-1772	UUCACCACCUCUC	GUGGCAGAGAGG

[0926]

			UGCCAC	UGGUGAA
2557	2558	1755-1773	UCACCACCUCUCU GCCACC	GGUGGCAGAGAG GUGGUGA
2559	2560	1756-1774	CACCACCUCUCUG CCACCC	GGGUGGCAGAGA GGUGGUG
2561	2562	1757-1775	ACCACCUCUCUGC CACCCA	UGGGUGGCAGAG AGGUGGU
2563	2564	1758-1776	CCACCUCUCUGCC ACCCA	AUGGGUGGCAGA GAGGUGG
2565	2566	1759-1777	CACCUCUCUGCCA CCCAUG	CAUGGGUGGCAG AGAGGUG
2567	2568	1760-1778	ACCUCUCUGCCAC CCAUGC	GCAUGGGUGGCA GAGAGGU
2569	2570	1761-1779	CCUCUCUGCCACC CAUGCU	AGCAUGGGUGGC AGAGAGG
2571	2572	1762-1780	CUCUCUGCCACCC AUGCUG	CAGCAUGGGUGGC AGAGAG
2573	2574	1763-1781	UCUCUGCCACCCA UGCUGC	GCAGCAUGGGUG GCAGAGA
2575	2576	1764-1782	CUCUGCCACCCA GCUGCU	AGCAGCAUGGGU GGCAGAG
2577	2578	1765-1783	UCUGCCACCCAUG CUGCUG	CAGCAGCAUGGGU GGCAGA
2579	2580	1766-1784	CUGCCACCCAUGC UGCUGG	CCAGCAGCAUGGG UGGCAG
2581	2582	1767-1785	UGCCACCCAUGC GCUGGC	GCCAGCAGCAUGG GUGGCA
2583	2584	1768-1786	GCCACCCAUGCUG CUGGCU	AGCCAGCAGCAUG GGUGGC
2585	2586	1769-1787	CCACCCAUGCUGC UGGCUG	CAGCCAGCAGCAU GGGUGG
2587	2588	1770-1788	CACCCAUGCUGCU GGCUGG	CCAGCCAGCAGCA UGGGUG
2589	2590	1771-1789	ACCCAUGCUGCU GGCUGGA	UCCAGCCAGCAGC AUGGGU
2591	2592	1772-1790	CCCAUGCUGCUG GCUGGAG	CUCCAGCCAGCAG CAUGGG
2593	2594	1773-1791	CCAUGCUGCUGG CUGGAGC	GCUCCAGCCAGCA GCAUGG
2595	2596	1774-1792	CAUGCUGCUGGC UGGAGCC	GGCUCCAGCCAGC AGCAUG
2597	2598	1775-1793	AUGCUGCUGGCU	GGGCUCCAGCCAG

[0927]

			GGAGCCC	CAGCAU
2599	2600	1776-1794	UGCUGCUGGCUG GAGCCCU	AGGGCUCCAGCCA GCAGCA
2601	2602	1777-1795	GCUGCUGGCUGG AGCCUG	CAGGGCUCCAGCC AGCAGC
2603	2604	1778-1796	CUGCUGGCUGGA GCCUGG	CCAGGGCUCCAGC CAGCAG
2605	2606	1779-1797	UGCUGGCUGGAG CCCUGGA	UCCAGGGCUCCAG CCAGCA
2607	2608	1780-1798	GCUGGCUGGAGC CCUGGAG	CUCCAGGGCUCCA GCCAGC
2609	2610	1781-1799	CUGGCUGGAGCC CUGGAGU	ACUCCAGGGCUCC AGCCAG
2611	2612	1782-1800	UGGCUGGAGCCC UGGAGUC	GACUCCAGGGCUC CAGCCA
2613	2614	1783-1801	GGCUGGAGCCCU GGAGUCU	AGACUCCAGGGCU CCAGCC
2615	2616	1784-1802	GCUGGAGCCCUG GAGUCUG	CAGACUCCAGGGC UCCAGC
2617	2618	1785-1803	CUGGAGCCCUGG AGUCUGU	ACAGACUCCAGGG CUCCAG
2619	2620	1786-1804	UGGAGCCCUGGA GUCUGUG	CACAGACUCCAGG GCUCCA
2621	2622	1787-1805	GGAGCCCUGGAG UCUGUGC	GCACAGACUCCAG GGCUCC
2623	2624	1788-1806	GAGCCCUGGAGU CUGUGCG	CGCACAGACUCCA GGGCUC
2625	2626	1789-1807	AGCCUGGAGUC UGUGCGG	CCGCACAGACUCC AGGGCU
2627	2628	1790-1808	GCCUGGAGUCU GUGCGGA	UCCGCACAGACUC CAGGGC
2629	2630	1792-1810	CCUGGAGUCUGU GCGGAUC	GAUCCGCACAGAC UCCAGG
2631	2632	1793-1811	CUGGAGUCUGUG CGGAUCC	GGAUCCGCACAGA CUCCAG
2633	2634	1795-1813	GGAGUCUGUGCG GAUCCUG	CAGGAUCCGCACA GACUCC
2635	2636	1796-1814	GAGUCUGUGCGG AUCCUGA	UCAGGAUCCGCAC AGACUC
2637	2638	1797-1815	AGUCUGUGCGGA UCCUGAA	UUCAGGAUCCGCA CAGACU
2639	2640	1798-1816	GUCUGUGCGGAU	CUUCAGGAUCCGC

[0928]

			CCUGAAG	ACAGAC
2641	2642	1799-1817	UCUGUGCGGAUC CUGAAGA	UCUUCAGGAUCCG CACAGA
2643	2644	1800-1818	CUGUGCGGAUCC UGAAGAG	CUCUUCAGGAUCC GCACAG
2645	2646	1801-1819	UGUGCGGAUCCU GAAGAGC	GCUCUUCAGGAUC CGCACA
2647	2648	1802-1820	GUGCGGAUCCUG AAGAGCG	CGCUCUUCAGGAU CCGCAC
2649	2650	1803-1821	UGC GGAUCCUGA AGAGCGC	GCGCUCUUCAGGA UCCGCA
2651	2652	1804-1822	GCGGAUCCUGAA GAGCGCU	AGCGCUCUUCAGG AUCCGC
2653	2654	1805-1823	CGGAUCCUGAAG AGCGCUG	CAGCGCUCUUCAG GAUCCG
2655	2656	1806-1824	GGAUCCUGAAGA GCGCUGA	UCAGCGCUCUUC GGAUCC
2657	2658	1807-1825	GAUCCUGAAGAG CGCUGAG	CUCAGCGCUCUUC AGGAUC
2659	2660	1808-1826	AUCCUGAAGAGC GCUGAGG	CCUCAGCGCUCUU CAGGAU
2661	2662	1809-1827	UCCUGAAGAGCG CUGAGGG	CCCUCAGCGCUCU UCAGGA
2663	2664	1810-1828	CCUGAAGAGCGC UGAGGGA	UCCCUCAGCGCUC UUCAGG
2665	2666	1811-1829	CUGAAGAGCGCU GAGGGAC	GUCCCUCAGCGCU CUUCAG
2667	2668	1812-1830	UGAAGAGCGCUG AGGGACG	CGUCCCUCAGCGC UCUUCA
2669	2670	1813-1831	GAAGAGCGCUGA GGGACGG	CCGUCCCUCAGCG CUCUUC
2671	2672	1814-1832	AAGAGCGCUGAG GGACGGG	CCCGUCCCUCAGC GCUCUU
2673	2674	1815-1833	AGAGCGCUGAGG GACGGGU	ACCCGUCCCUCAG CGCUCU
2675	2676	1816-1834	GAGCGCUGAGGG ACGGGUG	CACCCGUCCCUC GCGCUC
2677	2678	1817-1835	AGCGCUGAGGGA CGGGUGC	GCACCCGUCCCUC AGCGCU
2679	2680	1818-1836	GCGCUGAGGGAC GGGUGCU	AGCACCCGUCCCU CAGCGC
2681	2682	1819-1837	CGCUGAGGGACG	AAGCACCCGUCCC

[0929]

			GGUGCUU	UCAGCG
2683	2684	1820-1838	GCUGAGGGACGG GUGCUUC	GAAGCACCCGUCC CUCAGC
2685	2686	1821-1839	CUGAGGGACGGG UGCUCG	CGAAGCACCCGUC CCUCAG
2687	2688	1822-1840	UGAGGGACGGGU GCUUCGC	GCGAAGCACCCGU CCCUCA
2689	2690	1823-1841	GAGGGACGGGUG CUUCGCC	GGCGAAGCACCCG UCCCUC
2691	2692	1824-1842	AGGGACGGGUGC UUCGCCG	CGGCGAAGCACCC GUCCCU
2693	2694	1825-1843	GGGACGGGUGCU UCGCCGC	GCGGCGAAGCACC CGUCCC
2695	2696	1826-1844	GGACGGGUGCUU CGCCGCC	GGCGGCGAAGCAC CCGUCC
2697	2698	1827-1845	GACGGGUGCUUC GCCGCCA	UGGCGGCGAAGCA CCCGUC
2699	2700	1828-1846	ACGGGUGCUUCG CCGCCAG	CUGGCGGCGAAGC ACCCGU
2701	2702	1829-1847	CGGGUGCUUCGC CGCCAGC	GCUGGCGGCGAAG CACCCG
2703	2704	1830-1848	GGGUGCUUCGCC GCCAGCA	UGCUGGCGGCGAA GCACCC
2705	2706	1831-1849	GGUGCUUCGCCG CCAGCAC	GUGCUGGCGGCGA AGCACC
2707	2708	1832-1850	GUGCUUCGCCGCC AGCACC	GGUGCUGGCGGGC AAGCAC
2709	2710	1833-1851	UGCUCGCCGCCA GCACCA	UGGUGCUGGCGGC GAAGCA
2711	2712	1834-1852	GCUUCGCCGCCAG CACCAG	CUGGUGCUGGCGG CGAAGC
2713	2714	1835-1853	CUUCGCCGCCAGC ACCAGC	GCUGGUGCUGGCG GCGAAG
2715	2716	1836-1854	UUCGCCGCCAGCA CCAGCG	CGCUGGUGCUGGC GGCGAA
2717	2718	1837-1855	UCGCCGCCAGCAC CAGCGC	GCGCUGGUGCUGG CGGCGA
2719	2720	1838-1856	CGCCGCCAGCACC AGCGCA	UGCUGGUGCUGG GCGGCG
2721	2722	1839-1857	GCCGCCAGCACCA GCGCAA	UUGCGCUGGUGCU GGCGGC
2723	2724	1840-1858	CCGCCAGCACCAG	GUUGCGCUGGUGC

[0930]

			CGCAAC	UGGCGG
2725	2726	1841-1859	CGCCAGCACCAGC GCAACG	CGUUGCGCUGGUG CUGGCG
2727	2728	1842-1860	GCCAGCACCAGCG CAACGU	ACGUUGCGCUGGU GCUGGC
2729	2730	1865-1883	CUCAUGAGACAG AUGC UAA	UUAGCAUCUGUCU CAUGAG
2731	2732	1866-1884	UCAUGAGACAGA UGC UAAU	AUUAGCAUCUGUC UCAUGA
2733	2734	1867-1885	CAUGAGACAGAU GC UAAUG	CAUUAGCAUCUGU CUCAUG
2735	2736	1868-1886	AUGAGACAGAUG CUAAUGG	CCAUUAGCAUCUG UCUCAU
2737	2738	1869-1887	UGAGACAGAUGC UAAUGGA	UCCA UUAGCAUCU GUCUCA
2739	2740	1871-1889	AGACAGAUGC UA AUGGAUG	CAUCCA UUAGCAU CUGUCU
2741	2742	1872-1890	GACAGAUGC UAA UGGAUGC	GCAUCCA UUAGCA UCUGUC
2743	2744	1873-1891	ACAGAUGC UAAU GGAUGCC	GGCAUCCA UUAGC AUCUGU
2745	2746	1874-1892	CAGAUGC UAAUG GAUGCCG	CGGCAUCCA UUAG CAUCUG
2747	2748	1875-1893	AGAUGC UAAUGG AUGCCGG	CCGGCAUCCA UUA GCAUCU
2749	2750	1876-1894	GAUGC UAAUGGA UGCCGGC	GCCGGCAUCCA U AGCAUC
2751	2752	1877-1895	AUGC UAAUGGAU GCCGGCC	GGCCGGCAUCCA UAGCAU
2753	2754	1878-1896	UGC UAAUGGAUG CCGGCCU	AGGCCGGCAUCCA UUAGCA
2755	2756	1879-1897	GC UAAUGGAUGC CGGCCUC	GAGGCCGGCAUCC AUUAGC
2757	2758	1880-1898	CUAAUGGAUGCC GGCCUCC	GGAGGCCGGCAUC CAUUAG
2759	2760	1881-1899	UAAUGGAUGCCG GCCUCCC	GGGAGGCCGGCAU CCA UUA
2761	2762	1882-1900	AAUGGAUGCCGG CCUCCCU	AGGGAGGCCGGCA UCCA U
2763	2764	1883-1901	AUGGAUGCCGGC CUCCUG	CAGGGAGGCCGGC AUCCA U
2765	2766	1884-1902	UGGAUGCCGGCC	ACAGGGAGGCCGG

[0931]

			UCCCUGU	CAUCCA
2767	2768	1885-1903	GGAUGCCGGCCU CCCUGUU	AACAGGGAGGCCG GCAUCC
2769	2770	1886-1904	GAUGCCGGCCUCC CUGUUG	CAACAGGGAGGCC GGCAUC
2771	2772	1887-1905	AUGCCGGCCUCCC UGUUGU	ACAACAGGGAGGC CGGCAU
2773	2774	1888-1906	UGCCGGCCUCCCU GUUGUC	GACAACAGGGAG GCCGGCA
2775	2776	1889-1907	GCCGGCCUCCUG UUGUCC	GGACAACAGGGA GGCCGGC
2777	2778	1890-1908	CCGGCCUCCUGU UGUCCA	UGGACAACAGGG AGGCCGG
2779	2780	1891-1909	CGGCCUCCUGUU GUCCAC	GUGGACAACAGG GAGGCCG
2781	2782	1892-1910	GGCCUCCUGUU GUCCACU	AGUGGACAACAG GGAGGCC
2783	2784	1893-1911	GCCUCCUGUUG UCCACUG	CAGUGGACAACAG GGAGGC
2785	2786	1894-1912	CCUCCUGUUGUC CACUGC	GCAGUGGACAACA GGGAGG
2787	2788	1895-1913	CUCCUGUUGUCC ACUGCC	GGCAGUGGACAAC AGGGAG
2789	2790	1896-1914	UCCUGUUGUCC ACUGCCC	GGGCAGUGGACA ACAGGGA
2791	2792	1897-1915	CCCUGUUGUCCAC UGCCCC	GGGGCAGUGGAC AACAGGG
2793	2794	1898-1916	CCUGUUGUCCAC UGCCCCA	UGGGGCAGUGGA CAACAGG
2795	2796	1899-1917	CUGUUGUCCACU GCCCCAG	CUGGGGCAGUGG ACAACAG
2797	2798	1900-1918	UGUUGUCCACUG CCCCAGC	GCUGGGGCAGUG GACAACA
2799	2800	1901-1919	GUUGUCCACUGC CCCAGCC	GGCUGGGGCAGU GGACAAC
2801	2802	1902-1920	UUGUCCACUGCCC CAGCCA	UGGCUGGGGCAG UGGACAA
2803	2804	1903-1921	UGUCCACUGCCCC AGCCAC	GUGGCUGGGGCA GUGGACA
2805	2806	1904-1922	GUCCACUGCCCCA GCCACA	UGUGGCUGGGGC AGUGGAC
2807	2808	1905-1923	UCCACUGCCCCAG	AUGUGGCUGGGG

[0932]

			CCACAU	CAGUGGA
2809	2810	1906-1924	CCACUGCCCCAGC CACAUC	GAUGUGGCUGGG GCAGUGG
2811	2812	1907-1925	CACUGCCCCAGCC ACAUCA	UGAUGUGGCUGG GGCAGUG
2813	2814	1908-1926	ACUGCCCCAGCCA CAUCAU	AUGAUGUGGCUG GGGCAGU
2815	2816	1909-1927	CUGCCCCAGCCAC AUCAUC	GAUGAUGUGGCU GGGGCAG
2817	2818	1910-1928	UGCCCCAGCCACA UCAUCC	GGAUGAUGUGGC UGGGGCA
2819	2820	1911-1929	GCCCCAGCCACAU CAUCCC	GGGAUGAUGUGG CUGGGGC
2821	2822	1912-1930	CCCCAGCCACAUC AUCCCU	AGGGAUGAUGUG GCUGGGG
2823	2824	1913-1931	CCCAGCCACAUCA UCCUG	CAGGGAUGAUGU GGCUGGG
2825	2826	1914-1932	CCAGCCACAUCAU CCCUGU	ACAGGGAUGAUG UGGCUGG
2827	2828	1915-1933	CAGCCACAUCAUC CCUGUG	CACAGGGAUGAU GUGGCUG
2829	2830	1916-1934	AGCCACAUCAUCC CUGUGC	GCACAGGGAUGA UGUGGCU
2831	2832	1917-1935	GCCACAUCAUCCC UGUGCG	CGCACAGGGAUGA UGUGGC
2833	2834	1918-1936	CCACAUCAUCCCU GUGCGG	CCGCACAGGGAUG AUGUGG
2835	2836	1919-1937	CACAUCAUCCUG UGCGGG	CCCGCACAGGGAU GAUGUG
2837	2838	1920-1938	ACAUCAUCCUG UGCGGGU	ACCCGCACAGGGA UGAUGU
2839	2840	1922-1940	AUCAUCCUGUG CGGGUUG	CAACCCGCACAGG GAUGAU
2841	2842	1923-1941	UCAUCCUGUGC GGGUUGC	GCAACCCGCACAG GGAUGA
2843	2844	1924-1942	CAUCCUGUGCG GGUUGCA	UGCAACCCGCACA GGGAUG
2845	2846	1925-1943	AUCCUGUGCGG GUUGCAG	CUGCAACCCGCAC AGGGAU
2847	2848	1926-1944	UCCUGUGCGGG UUGCAGA	UCUGCAACCCGCA CAGGGA
2849	2850	1928-1946	CCUGUGCGGGUU	CAUCUGCAACCCG

[0933]

			GCAGAUG	CACAGG
2851	2852	1929-1947	CUGUGCGGGUUG CAGAUGC	GCAUCUGCAACCC GCACAG
2853	2854	1930-1948	UGUGCGGGUUGC AGAUCU	AGCAUCUGCAACC CGCACA
2855	2856	1931-1949	GUGCGGGUUGCA GAUGCUG	CAGCAUCUGCAAC CCGCAC
2857	2858	1932-1950	UGC GGGUUGCAG AUGCUGC	GCAGCAUCUGCAA CCCGCA
2859	2860	1933-1951	GCGGGUUGCAGA UGCUGCU	AGCAGCAUCUGCA ACCCGC
2861	2862	1934-1952	CGGGUUGCAGAU GCUGCUA	UAGCAGCAUCUGC AACCCG
2863	2864	1935-1953	GGGUUGCAGAUG CUGC UAA	UUAGCAGCAUCUG CAACCC
2865	2866	1936-1954	GGUUGCAGAUGC UGC UAAA	UUUAGCAGCAUCU GCAACC
2867	2868	1937-1955	GUUGCAGAUGC GCUAAAA	UUUUAGCAGCAUC UGCAAC
2869	2870	1938-1956	UUGCAGAUGCUG CUAAAAA	UUUUUAGCAGCA UCUGCAA
2871	2872	1939-1957	UGCAGAUGCUGC UAAAAAC	GUUUUUAGCAGC AUCUGCA
2873	2874	1940-1958	GCAGAUGCUGCU AAAAACA	UGUUUUUAGCAG CAUCUGC
2875	2876	1941-1959	CAGAUGCUGCUA AAAACAC	GUGUUUUUAGCA GCAUCUG
2877	2878	1961-1979	GAAGUCUGUGAU GAACUAA	UUAGUUCAUCACA GACUUC
2879	2880	1963-1981	AGUCUGUGAUGA ACUAAUG	CAUUAGUUCAUCA CAGACU
2881	2882	1965-1983	UCUGUGAUGAAC UAAUGAG	CUCAUUAGUUCAU CACAGA
2883	2884	1966-1984	CUGUGAUGAACU AAUGAGC	GCUCAUUAGUUCA UCACAG
2885	2886	1968-1986	GUGAUGAACUAA UGAGCAG	CUGCUCAUUAGUU CAUCAC
2887	2888	1969-1987	UGAUGAACUAAU GAGCAGA	UCUGCUCAUUAGU UCAUCA
2889	2890	1970-1988	GAUGAACUAAUG AGCAGAC	GUCUGCUCAUUAG UUCAUC
2891	2892	1971-1989	AUGAACUAAUGA	UGUCUGCUCAUUA

[0934]

			GCAGACA	GUUCAU
2893	2894	1972-1990	UGAACUAAUGAG CAGACAU	AUGUCUGCUCU AGUUCA
2895	2896	1973-1991	GAACUAAUGAGC AGACAU	UAUGUCUGCUC UAGUUC
2897	2898	1974-1992	AACUAAUGAGCA GACAUAA	UUAUGUCUGCUC UUAGUU
2899	2900	1975-1993	ACUAAUGAGCAG ACAUAAC	GUUAUGUCUGC AUUAGU
2901	2902	1978-1996	AAUGAGCAGACA UAACAUC	GAUGUUAUGUC GCUCAU
2903	2904	1979-1997	AUGAGCAGACAU ACAUCU	AGAUGUUAUGUC UGCUCU
2905	2906	1980-1998	UGAGCAGACAU ACAUCU	UAGAUGUUAUG CUGCUC
2907	2908	2000-2018	GUGCAAGCAAUC AAUUACC	GGUAAUUGAUUG CUUGCAC
2909	2910	2001-2019	UGCAAGCAAUCA AUUACCC	GGGUAAUUGAU GCUUGCA
2911	2912	2002-2020	GCAAGCAAUCAA UUACCCU	AGGGUAAUUGAU UGCUUGC
2913	2914	2004-2022	AAGCAAUCAAUU ACCCUAC	GUAGGGUAAUUG AUUGCUCU
2915	2916	2024-2042	GUGCCCCGGGGA GAAGAGC	GCUCUUCUCCCC GGGCAC
2917	2918	2025-2043	UGCCCCGGGGAG AAGAGCU	AGCUCUUCUCCCC GGGGCA
2919	2920	2026-2044	GCCCCGGGGAGA AGAGCUC	GAGCUCUUCUCCC CGGGGC
2921	2922	2027-2045	CCCCGGGGAGAA GAGCUCC	GGAGCUCUUCUCC CCGGGG
2923	2924	2028-2046	CCCGGGGAGAAG AGCUCCU	AGGAGCUCUUCUC CCCGGG
2925	2926	2029-2047	CCGGGGAGAAGA GCUCCUA	UAGGAGCUCUUCU CCCCGG
2927	2928	2030-2048	CGGGGAGAAGAG CUCCUAC	GUAGGAGCUCUUC UCCCCG
2929	2930	2031-2049	GGGGAGAAGAGC UCCUACG	CGUAGGAGCUCUU CUCCCC
2931	2932	2032-2050	GGGAGAAGAGCU CCUACGG	CCGUAGGAGCUCU UCUCCC
2933	2934	2033-2051	GGAGAAGAGCUC	UCCGUAGGAGCUC

[0935]

			CUACGGA	UUCUCC
2935	2936	2034-2052	GAGAAGAGCUCC UACGGAU	AUCCGUAGGAGCU CUUCUC
2937	2938	2060-2078	ACCCUCACCACA CACCCC	GGGGUGUGUGGU GAGGGGU
2939	2940	2061-2079	CCCCUACCACAC ACCCCA	UGGGGUGUGUGG UGAGGGG
2941	2942	2062-2080	CCCUCACCACACA CCCCAG	CUGGGGUGUGUG GUGAGGG
2943	2944	2063-2081	CCUCACCACACAC CCCAGA	UCUGGGGUGUGU GGUGAGG
2945	2946	2064-2082	CUCACCACACACC CCAGAU	AUCUGGGGUGUG UGGUGAG
2947	2948	2065-2083	UCACCACACACCC CAGAUG	CAUCUGGGGUGU GUGGUGA
2949	2950	2066-2084	CACCACACACCCC AGAUGA	UCAUCUGGGGUG UGUGGUG
2951	2952	2067-2085	ACCACACACCCCA GAUGAU	AUCAUCUGGGGU GUGUGGU
2953	2954	2068-2086	CCACACACCCCAG AUGAUG	CAUCAUCUGGGGU GUGUGG
2955	2956	2069-2087	CACACACCCCAGA UGAUGA	UCAUCAUCUGGGG UGUGUG
2957	2958	2070-2088	ACACACCCCAGAU GAUGAA	UUCAUCAUCUGGG GUGUGU
2959	2960	2071-2089	CACACCCCAGAU AUGAAC	GUUCAUCAUCUGG GGUGUG
2961	2962	2072-2090	ACACCCCAGAU AUGAAU	AGUUCAUCAUCUG GGGUGU
2963	2964	2073-2091	CACCCCAGAU UGAACUA	UAGUUCAUCAUCU GGGGUG
2965	2966	2074-2092	ACCCCAGAU GAACUAC	GUAGUUCAUCAUC UGGGGU
2967	2968	2076-2094	CCCAGAU ACUACUU	AAGUAGUUCAUC AUCUGGG
2969	2970	2077-2095	CCAGAU CUACUUC	GAAGUAGUUCAUC CAUCUGG
2971	2972	2078-2096	CAGAU UACUCC	GGAAGUAGUUCA UCAUCUG
2973	2974	2079-2097	AGAUGAU ACUCCU	AGGAAGUAGUUC AUCUUCU
2975	2976	2080-2098	GAUGAU GAACUA	AAGGAAGUAGUU

[0936]

			CUUCCUU	CAUCAUC
2977	2978	2081-2099	AUGAUGAACUAC UUCCUUG	CAAGGAAGUAGU UCAUCAU
2979	2980	2082-2100	UGAUGAACUACU UCCUUGA	UCAAGGAAGUAG UUCAUCA
2981	2982	2083-2101	GAUGAACUACUU CCUUGAG	CUCAAGGAAGUA GUUCAUC
2983	2984	2084-2102	AUGAACUACUUC CUUGAGA	UCUCAAGGAAGU AGUUCAU
2985	2986	2085-2103	UGAACUACUCC UUGAGAA	UUCUCAAGGAAG UAGUUCA
2987	2988	2086-2104	GAACUACUCCU UGAGAAU	AUUCUCAAGGAA GUAGUUC
2989	2990	2087-2105	AACUACUCCUU GAGAAUC	GAUUCUCAAGGA AGUAGUU
2991	2992	2088-2106	ACUACUCCUUG AGAAUCU	AGAUUCUCAAGG AAGUAGU
2993	2994	2089-2107	CUACUCCUUGA GAAUCUG	CAGAUUCUCAAGG AAGUAG
2995	2996	2090-2108	UACUCCUUGAG AAUCUGC	GCAGAUUCUCAAG GAAGUA
2997	2998	2091-2109	ACUCCUUGAGA AUCUGCU	AGCAGAUUCUCA GGAAGU
2999	3000	2117-2135	UGGAAGCAAGUG GGGCUGG	CCAGCCCCACUUG CUUCCA
3001	3002	2118-2136	GGAAGCAAGUGG GGCUGGA	UCCAGCCCCACU GCUUCC
3003	3004	2119-2137	GAAGCAAGUGGG GCUGGAA	UCCAGCCCCACU UGCUC
3005	3006	2120-2138	AAGCAAGUGGGG CUGGAAC	GUUCCAGCCCCAC UUGCUU
3007	3008	2121-2139	AGCAAGUGGGGC UGGAACU	AGUUCCAGCCCCA CUUGCU
3009	3010	2122-2140	GCAAGUGGGGCU GGAACUG	CAGUUCCAGCCCC ACUUGC
3011	3012	2123-2141	CAAGUGGGGCUG GAACUGA	UCAGUUCCAGCCC CACUUG
3013	3014	2124-2142	AAGUGGGGCUGG AACUGAA	UUCAGUUCCAGCC CCACUU
3015	3016	2125-2143	AGUGGGGCUGGA ACUGAAG	CUUCAGUUCCAGC CCCACU
3017	3018	2126-2144	GUGGGGCUGGAA	GCUUCAGUUCCAG

[0937]

			CUGAAGC	CCCCAC
3019	3020	2127-2145	UGGGGCUGGAAC UGAAGCC	GGCUUCAGUCCA GCCCCA
3021	3022	2147-2165	CAUUCCUCAGCU GAGUGCA	UGCACUCAGCUGA GGAAUG
3023	3024	2148-2166	AUUCCUCAGCUG AGUGCAA	UUGCACUCAGCUG AGGAAU
3025	3026	2149-2167	UUCCUCAGCUGA GUGCAAC	GUUGCACUCAGCU GAGGAA
3027	3028	2150-2168	UCCUCAGCUGAG UGCAACU	AGUUGCACUCAGC UGAGGA
3029	3030	2151-2169	CCUCAGCUGAGU GCAACUU	AAGUUGCACUCAG CUGAGG
3031	3032	2152-2170	CUCAGCUGAGUG CAACUUC	GAAGUUGCACUCA GCUGAG
3033	3034	2153-2171	UCAGCUGAGUGC AACUUCU	AGAAGUUGCACUC AGCUGA
3035	3036	2154-2172	CAGCUGAGUGCA ACUUCUG	CAGAAGUUGCACU CAGCUG
3037	3038	2155-2173	AGCUGAGUGCAA CUUCUGC	GCAGAAGUUGCAC UCAGCU
3039	3040	2156-2174	GCUGAGUGCAAC UUCUGCA	UGCAGAAGUUGC ACUCAGC
3041	3042	2157-2175	CUGAGUGCAACU UCUGCAG	CUGCAGAAGUUGC ACUCAG
3043	3044	2158-2176	UGAGUGCAACUU CUGCAGG	CCUGCAGAAGUUG CACUCA
3045	3046	2159-2177	GAGUGCAACUUC UGCAGGA	UCCUGCAGAAGUU GCACUC
3047	3048	2160-2178	AGUGCAACUUCU GCAGGAG	CUCCUGCAGAAGU UGCACU
3049	3050	2161-2179	GUGCAACUUCUG CAGGAGG	CCUCCUGCAGAAG UUGCAC
3051	3052	2162-2180	UGCAACUUCUGC AGGAGGC	GCCUCCUGCAGAA GUUGCA
3053	3054	2163-2181	GCAACUUCUGCA GGAGGCC	GGCCUCCUGCAGA AGUUGC
3055	3056	2164-2182	CAACUUCUGCAG GAGGCCA	UGGCCUCCUGCAG AAGUUG
3057	3058	2165-2183	AACUUCUGCAGG AGGCCAC	GUGGCCUCCUGCA GAAGUU
3059	3060	2166-2184	ACUUCUGCAGGA	AGUGGCCUCCUGC

[0938]

			GGCCACU	AGAAGU
3061	3062	2167-2185	CUUCUGCAGGAG GCCACUG	CAGUGGCCUCCUG CAGAAG
3063	3064	2168-2186	UUCUGCAGGAGG CCACUGC	GCAGUGGCCUCCU GCAGAA
3065	3066	2169-2187	UCUGCAGGAGGC CACUGCA	UGCAGUGGCCUCC UGCAGA
3067	3068	2170-2188	CUGCAGGAGGCC ACUGCAU	AUGCAGUGGCCUC CUGCAG
3069	3070	2171-2189	UGCAGGAGGCCA CUGCAUU	AAUGCAGUGGCCU CCUGCA
3071	3072	2172-2190	GCAGGAGGCCAC UGCAUUU	AAAUGCAGUGGCC UCCUGC
3073	3074	2173-2191	CAGGAGGCCACU GCAUUUU	AAAAUGCAGUGG CCUCCUG
3075	3076	2174-2192	AGGAGGCCACUG CAUUUUG	CAAAAUGCAGUG GCCUCCU
3077	3078	2175-2193	GGAGGCCACUGC AUUUUGA	UCAAAAUGCAGU GGCCUCC
3079	3080	2176-2194	GAGGCCACUGCA UUUUGAA	UUCAAAAUGCAG UGGCCUC
3081	3082	2177-2195	AGGCCACUGCAU UUUGAAG	CUUCAAAAUGCAG UGGCCU
3083	3084	2178-2196	GGCCACUGCAUU UGAAGU	ACUUCAAAAUGCA GUGGCC
3085	3086	2179-2197	GCCACUGCAUUU UGAAGUG	CACUUCAAAAUGC AGUGGC
3087	3088	2180-2198	CCACUGCAUUUU GAAGUGA	UCACUUCAAAAUG CAGUGG
3089	3090	2181-2199	CACUGCAUUUUG AAGUGAU	AUCACUUCAAAAU GCAGUG
3091	3092	2182-2200	ACUGCAUUUUGA AGUGAUG	CAUCACUUCAAAA UGCAGU
3093	3094	2183-2201	CUGCAUUUUGAA GUGAUGA	UCAUCACUUCAAA AUGCAG
3095	3096	2184-2202	UGCAUUUUGAAG UGAUGAG	CUCAUCACUUCAA AAUGCA
3097	3098	2185-2203	GCAUUUUGAAGU GAUGAGU	ACUCAUCACUUCA AAAUGC
3099	3100	2186-2204	CAUUUUGAAGUG AUGAGUG	CACUCAUCACUUC AAAUG
3101	3102	2187-2205	AUUUUGAAGUGA	UCACUCAUCACUU

[0939]

			UGAGUGA	CAAAAU
3103	3104	2188-2206	UUUUGAAGUGAU GAGUGAA	UUCACUCAUCACU UCAAAA
3105	3106	2190-2208	UUGAAGUGAUGA GUGAAAG	CUUUCACUCAUCA CUUCAA
3107	3108	2191-2209	UGAAGUGAUGAG UGAAAGA	UCUUUCACUCAUC ACUUCA
3109	3110	2192-2210	GAAGUGAUGAGU GAAAGAG	CUCUUUCACUCAU CACUUC
3111	3112	2193-2211	AAGUGAUGAGUG AAAGAGA	UCUCUUUCACUCA UCACUU
3113	3114	2194-2212	AGUGAUGAGUGA AAGAGAG	CUCUCUUUCACUC AUCACU
3115	3116	2195-2213	GUGAUGAGUGAA AGAGAGA	UCUCUCUUUCACU CAUCAC
3117	3118	2196-2214	UGAUGAGUGAAA GAGAGAA	UUCUCUCUUUCAC UCAUCA
3119	3120	2197-2215	GAUGAGUGAAAG AGAGAAG	CUUCUCUCUUUCA CUCAUC
3121	3122	2198-2216	AUGAGUGAAAGA GAGAAGU	ACUUCUCUCUUUC ACUCAU
3123	3124	2199-2217	UGAGUGAAAGAG AGAAGUC	GACUUCUCUCUUU CACUCA
3125	3126	2200-2218	GAGUGAAAGAGA GAAGUCC	GGACUUCUCUCUU UCACUC
3127	3128	2201-2219	AGUGAAAGAGAG AAGUCCU	AGGACUUCUCUCU UUCACU
3129	3130	2202-2220	GUGAAAGAGAGA AGUCCUA	UAGGACUUCUCUC UUUCAC
3131	3132	2203-2221	UGAAAGAGAGAA GUCCUAU	AUAGGACUUCUCU CUUUCA
3133	3134	2204-2222	GAAAGAGAGAAG UCCUAUU	AAUAGGACUUCUC UCUUUC
3135	3136	2205-2223	AAAGAGAGAAGU CCUAUUU	AAAUAGGACUUC UCUCUUU
3137	3138	2206-2224	AAGAGAGAAGUC CUAUUUC	GAAAUAGGACUU CUCUCUU
3139	3140	2207-2225	AGAGAGAAGUCC UAUUUCU	AGAAAUAGGACU UCUCUCU
3141	3142	2208-2226	GAGAGAAGUCCU AUUUCUC	GAGAAAUAGGAC UUCUCUC
3143	3144	2209-2227	AGAGAAGUCCUA	UGAGAAAUAGGA

[0940]

			UUUCUCA	CUUCUCU
3145	3146	2210-2228	GAGAAGUCCUAU UUCUCAG	CUGAGAAAUAGG ACUUCUC
3147	3148	2211-2229	AGAAGUCCUAUU UCUCAGG	CCUGAGAAAUAG GACUUCU
3149	3150	2212-2230	GAAGUCCUAUUU CUCAGGC	GCCUGAGAAUA GGACUUC
3151	3152	2213-2231	AAGUCCUAUUUC UCAGGCU	AGCCUGAGAAU AGGACUU
3153	3154	2214-2232	AGUCCUAUUUCU CAGGCUU	AAGCCUGAGAAA UAGGACU
3155	3156	2215-2233	GUCCUAUUUCUC AGGCUUG	CAAGCCUGAGAAA UAGGAC
3157	3158	2216-2234	UCCUAUUUCUCA GGCUUGA	UCAAGCCUGAGAA AUAGGA
3159	3160	2217-2235	CCUAUUUCUCAG GCUUGAG	CUCAAGCCUGAGA AAUAGG
3161	3162	2218-2236	CUAUUUCUCAGG CUUGAGC	GCUCAAGCCUGAG AAAUAG
3163	3164	2219-2237	UAUUUCUCAGGC UUGAGCA	UGCUCAGCCUGA GAAUA
3165	3166	2220-2238	AUUUCUCAGGCU UGAGCAA	UUGCUCAGCCUG AGAAAU
3167	3168	2221-2239	UUUCUCAGGCUU GAGCAAG	CUUGCUCAGCCU GAGAAA
3169	3170	2222-2240	UUCUCAGGCUUG AGCAAGU	ACUUGCUCAGCC UGAGAA
3171	3172	2223-2241	UCUCAGGCUUGA GCAAGUU	AACUUGCUCAGC CUGAGA
3173	3174	2224-2242	CUCAGGCUUGAG CAAGUUG	CAACUUGCUCAG CCUGAG
3175	3176	2225-2243	UCAGGCUUGAGC AAGUUGG	CCAACUUGCUCAA GCCUGA
3177	3178	2226-2244	CAGGCUUGAGCA AGUUGGU	ACCAACUUGCUC AGCCUG
3179	3180	2229-2247	GCUUGAGCAAGU UGGUAUC	GAUACCAACUUGC UCAAGC
3181	3182	2231-2249	UUGAGCAAGUUG GUAUCUG	CAGAUACCAACU GCUCAA
3183	3184	2232-2250	UGAGCAAGUUGG UAUCUGC	GCAGAUACCAACU UGCUC
3185	3186	2233-2251	GAGCAAGUUGGU	AGCAGAUACCAAC

[0941]

			AUCUGCU	UUGCUC
3187	3188	2234-2252	AGCAAGUUGGUA UCUGCUC	GAGCAGAUACCAA CUUGCUC
3189	3190	2235-2253	GCAAGUUGGUAU CUGCUC	UGAGCAGAUACCA ACUUGC
3191	3192	2236-2254	CAAGUUGGUAUC UGCUCAG	CUGAGCAGAUACC AACUUG
3193	3194	2237-2255	AAGUUGGUAUCU GCUCAGG	CCUGAGCAGAUAC CAACUU
3195	3196	2238-2256	AGUUGGUAUCUG CUCAGGC	GCCUGAGCAGAU CCAACU
3197	3198	2239-2257	GUUGGUAUCUGC UCAGGCC	GGCCUGAGCAGAU ACCAAC
3199	3200	2240-2258	UUGGUAUCUGC CAGGCCU	AGGCCUGAGCAGA UACCAA
3201	3202	2241-2259	UGGUAUCUGCUC AGGCCUG	CAGGCCUGAGCAG AUACCA
3203	3204	2242-2260	GGUAUCUGCUC GGCCUGA	UCAGGCCUGAGCA GAUACC
3205	3206	2243-2261	GUAUCUGCUCAG GCCUGAG	CUCAGGCCUGAGC AGAUAC
3207	3208	2244-2262	UAUCUGCUCAGG CCUGAGC	GCUCAGGCCUGAG CAGAU
3209	3210	2245-2263	AUCUGCUCAGGC CUGAGCA	UGCUCAGGCCUGA GCAGAU
3211	3212	2246-2264	UCUGCUCAGGCC UGAGCAU	AUGCUCAGGCCUG AGCAGA
3213	3214	2247-2265	CUGCUCAGGCCU GAGCAUG	CAUGCUCAGGCCU GAGCAG
3215	3216	2248-2266	UGCUCAGGCCUG AGCAUGA	UCAUGCUCAGGCC UGAGCA
3217	3218	2249-2267	GCUCAGGCCUGA GCAUGAC	GUCAUGCUCAGGC CUGAGC
3219	3220	2250-2268	CUCAGGCCUGAG CAUGACC	GGUCAUGCUCAGG CCUGAG
3221	3222	2251-2269	UCAGGCCUGAGC AUGACCU	AGGUCAUGCUCAG GCCUGA
3223	3224	2252-2270	CAGGCCUGAGCA UGACCUC	GAGGUCAUGCUC GGCCUG
3225	3226	2253-2271	AGGCCUGAGCAU GACCUCA	UGAGGUCAUGCUC AGGCCU
3227	3228	2279-2297	CACUUAACCCAG	AAUGGCCUGGGG

[0942]

			GCCAUU	UUAAGUG
3229	3230	2280-2298	ACUUAACCCCAG GCCAUUA	UAAUGGCCUGGG GUUAAGU
3231	3232	2281-2299	CUUAACCCCAGGC CAUUAU	AUAAUGGCCUGG GGUUAAG
3233	3234	2282-2300	UUAACCCCAGGCC AUUAUC	GAUAAUGGCCUG GGGUUAA
3235	3236	2283-2301	UAACCCCAGGCCA UUAUCA	UGAUAAUGGCCU GGGGUUA
3237	3238	2284-2302	AACCCCAGGCCAU UAUCAU	AUGAUAAUGGCC UGGGGUU
3239	3240	2285-2303	ACCCCAGGCCAUU AUCUA	UAUGAUAAUGGC CUGGGGU
3241	3242	2287-2305	CCCAGGCCAUUA UCAUAUC	GAUAUGAUAAUG GCCUGGG
3243	3244	2288-2306	CCAGGCCAUUAU CAUAUCC	GGAUAUGAUAAU GGCCUGG
3245	3246	2289-2307	CAGGCCAUUAUC AUAUCCA	UGGAUAUGAUAA UGGCCUG
3247	3248	2290-2308	AGGCCAUUAUCA UAUCCAG	CUGGAUAUGAU AUGGCCU
3249	3250	2291-2309	GGCCAUUAUCAU AUCCAGA	UCUGGAUAUGAU AAUGGCC
3251	3252	2292-2310	GCCAUUAUCAUA UCCAGAU	AUCUGGAUAUGA UAAUGGC
3253	3254	2314-2332	CUUCAGAGUUGU CUUUAUA	UAUAAAGACAAC UCUGAAG
3255	3256	2315-2333	UUCAGAGUUGUC UUUAUAU	AUAUAAAGACAA CUCUGAA
3257	3258	2316-2334	UCAGAGUUGUCU UUAUAUG	CAUAUAAAGACA ACUCUGA
3259	3260	2318-2336	AGAGUUGUCUUU AUAUGUG	CACAUUAAAGAC AACUCU
3261	3262	2322-2340	UUGUCUUUAUAU GUGAAUU	AAUUCACAUUA AAGACAA
3263	3264	2323-2341	UGUCUUUAUAUG UGAAUUA	UAAUUCACAUUA AAAGACA
3265	3266	2324-2342	GUCUUUAUAUGU GAAUUA	UUAUUCACAUUA UAAAGAC
3267	3268	2325-2343	UCUUUAUAUGUG AAUUAAG	CUUAAUUCACAU UAAAGA
3269	3270	2326-2344	CUUUAUAUGUGA	ACUUAUUCACAU

[0943]

			AUUAAGU	AUAAAG
3271	3272	2327-2345	UUUAUAUGUGAA UUAAGUU	AACUUAUUCACA UAUAAA
3273	3274	2328-2346	UUAUAUGUGAAU UAAGUUA	UAACUUAUUCAC AUUAUA
3275	3276	2329-2347	UAUAUGUGAAUU AAGUUUAU	AUAACUUAUUC ACAUUA
3277	3278	2330-2348	AUAUGUGAAUUA AGUUUAU	UAUAACUUAU CACAUUA
3279	3280	2331-2349	UAUGUGAAUUAA GUUAUAU	AUAUAACUUAU UCACUA
3281	3282	2332-2350	AUGUGAAUUAAG UUAUAUU	AAUAUAACUUA UUCACAU
3283	3284	2333-2351	UGUGAAUUAAGU UAUAUUA	UAAUAUAACUUA AUUCACA
3285	3286	2334-2352	GUGAAUUAAGUU AUUAUUA	UUAUAUAACUU AAUUCAC
3287	3288	2335-2353	UGAAUUAAGUUA UAUUAAA	UUUAAUAUAACU UAAUUA
3289	3290	2336-2354	GAAUUAAGUUUA AUUAAA	AUUUAAUAUAAC UUAAUUC
3291	3292	2337-2355	AAUUAAGUUUA UUAUUU	AAUUUAAUAUA CUUAAU
3293	3294	2338-2356	AUUAAGUUUAU UAAUUU	AAUUUAAUAUA ACUUAU
3295	3296	2339-2357	UUAAGUUUAUU AAUUUU	AAAUUUUAUAU AACUUA
3297	3298	2340-2358	UAAGUUUAUUA AAUUUA	UAAAAUUUAUA UAACUUA
3299	3300	2341-2359	AAGUUUAUUA AUUUUA	UUAAAAUUUAU AUAACU
3301	3302	2342-2360	AGUUUAUUA UUUUAAU	AUUAAAAUUUA UAUAACU
3303	3304	2343-2361	GUUAUAUUA UUUAUUC	GAUUAAAAUUUA AUUAAC
3305	3306	2345-2363	UAUAUUAAA UUAUCUA	UAGAUUAAAAU UUAUAU
3307	3308	2346-2364	AUAUUAAA AAUCUAU	AUAGAUUAAAA UUAAUAU
3309	3310	2347-2365	UAUUAAA AUCUAU	UAUAGAUUAAA UUUAAUA
3311	3312	2348-2366	AUUAAA CUUAUAGAUUAAA	CUUAUAGAUUAAA

[0944]

			UCUAUAG	AUUUAAU
3313	3314	2349-2367	UAAAAUUUAAU CUAUAGU	ACUAUAGAUUAA AAUUUAA
3315	3316	2350-2368	UAAAUUUUAAUC UAUAGUA	UACUAUAGAUUA AAAUUUA
3317	3318	2351-2369	AAAUUUUAAUCU AUAGUAA	UUACUAUAGAUU AAAAUUU
3319	3320	2354-2372	UUUUAAUCUAUA GUAAAAA	UUUUUACUAUAG AUUAAAA
3321	3322	2355-2373	UUUAAUCUAUAG UAAAAAC	GUUUUUACUAUA GAUUAAA
3323	3324	2356-2374	UUAUCUAUAGU AAAAACA	UGUUUUUACUAU AGAUUAA
3325	3326	2357-2375	UAAUCUAUAGUA AAAACAU	AUGUUUUUACUA UAGAUUA
3327	3328	2358-2376	AAUCUAUAGUAA AAACAU	UAUGUUUUUACU AUAGAUU
3329	3330	2359-2377	AUCUAUAGUAAA AACAUAG	CUAUGUUUUUAC UAUAGAU
3331	3332	2360-2378	UCUAUAGUAAAA ACAUAGU	ACUAUGUUUUUA CUAUAGA
3333	3334	2361-2379	CUAUAGUAAAAA CAUAGUC	GACUAUGUUUUU ACUAUAG
3335	3336	2362-2380	UAUAGUAAAAAC AUAGUCC	GGACUAUGUUUU UACUAUA
3337	3338	2363-2381	AUAGUAAAAACA UAGUCCU	AGGACUAUGUUU UUACUAU
3339	3340	2364-2382	UAGUAAAAACAU AGUCCUG	CAGGACUAUGUU UUUACUA
3341	3342	2365-2383	AGUAAAAACAUA GUCCUGG	CCAGGACUAUGUU UUUACU
3343	3344	2366-2384	GUAAAAACAUAUAG UCCUGGA	UCCAGGACUAUGU UUUUAC
3345	3346	2367-2385	UAAAAACAUAUAGU CCUGGAA	UCCAGGACUAUG UUUUUA
3347	3348	2368-2386	AAAAACAUAUAGUC CUGGAAA	UUUCCAGGACUAU GUUUUU
3349	3350	2369-2387	AAAACAUAUAGUCC UGGAAAU	AUUUCCAGGACUA UGUUUU
3351	3352	2370-2388	AAACAUAUAGUCCU GGAAUA	UAUUUCCAGGACU AUGUUU
3353	3354	2371-2389	AACAUAUAGUCCUG	UUAUUUCCAGGAC

[0945]

			GAAAUAA	UAUGUU
3355	3356	2372-2390	ACAUAGUCCUGG AAAUAAA	UUUAUUUCCAGG ACUAUGU
3357	3358	2373-2391	CAUAGUCCUGGA AAUAAAU	AUUUAUUUCCAG GACUAUG
3359	3360	2374-2392	AUAGUCCUGGAA AUAAAUU	AAUUUAUUUCCA GGACUAU
3361	3362	2375-2393	UAGUCCUGGAAA UAAAUUC	GAAUUUAUUUCC AGGACUA
3363	3364	2377-2395	GUCCUGGAAUA AAUUCUU	AAGAAUUUAUUU CCAGGAC
3365	3366	2378-2396	UCCUGGAAAUAA AUUCUUG	CAAGAAUUUAUU UCCAGGA

[0946] 实例9.在急性治疗范例中使用ALAS1siRNA进行卟啉前体的压制

[0947] 使用AIP小鼠模型(参见实例5)研究ALAS1siRNA在急性治疗范例中是否起作用以降低已经升高了的ALA和PBG水平,该升高的水平可能是存在的,例如,当人类卟啉症患者经受急性发作时。距最后给予苯巴比妥12小时后以1mg/kg的剂量给予AD-53558LNP11配制品siRNA迅速降低小鼠血浆中ALA和PBG两者的水平,而Luc对照处理的小鼠中,这些水平继续上升(图14)。这些结果表明ALAS1siRNA对于治疗急性发作是有效的。ALAS1siRNA有效降低并预防ALA和PBG水平的进一步增加。

[0948] 实例10.靶向ALAS1的siRNA

[0949] 如在实例2中描述的,设计并生产靶向ALAS1siRNA的、另外的未修饰的或修饰的siRNA序列。如下所述对这些修饰的双链体的体外活性进行检验。

[0950] 方法

[0951] 脂质介导的转染

[0952] 对于Hep3B、PMH、以及初代猕猴肝上皮实质细胞,转染通过以下进行:将14.8μl的Opti-MEM加每孔0.2μl的Lipofectamine RNAiMax per well(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州,产品目录号13778-150)与每孔5μl的各自的siRNA双链体添加至96孔板中的每一个孔中。随后将该混合物在室温下孵育20分钟。然后将80μl不含抗生素的但包含适当细胞数目的完全培养基添加至该siRNA混合物。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。

[0953] 对于GalNAc修饰的,单剂量实验以1μM、500nM、20nM、10nM和0.2nM的双链体终浓度进行。

[0954] 自由摄取转染

[0955] 在使用之前,立刻将低温保存的初代猕猴肝上皮实质细胞(赛西斯体外技术公司(Celsis In Vitro Technologies),M003055-P)在37℃水浴上解冻,并且以 0.26×10^6 细胞/ml重悬于InVitroGRO CP(接种)培养基(赛西斯体外技术公司,产品目录号Z99029)中。在转染过程中,以每孔25,000个细胞将细胞涂布在BD BioCoat 96孔胶原板(BD,356407)上并且在37℃下在5%CO₂气氛中进行孵育。通过每孔添加PBS中的10μl的siRNA双链体到96孔(96w)板,进行游离摄取实验。然后将包含该细胞类型的适当细胞数目的90μl完全培养基添

加至该siRNA。在RNA纯化之前将细胞孵育24小时。单剂量实验以1 μ M、500nM、20nM、和10nM的最终双链体进行。

[0956] 使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒(英杰公司,部件#:610-12)的总RNA分离

[0957] 收获细胞并且在150 μ l裂解/结合缓冲液中进行裂解,然后使用Eppendorf Thermomixer在850rpm混合5分钟,混合速度在整个过程中相同。将十微升磁珠与80 μ l裂解/结合缓冲液混合物添加至圆底板中并且混合1分钟。使用磁力支座捕获磁珠并且在不扰动磁珠的情况下移出上清液。在移出上清液后,将裂解的细胞添加至剩余的珠子并且混合5分钟。在除去上清液后,将磁珠用150 μ l洗涤缓冲液A(Wash Buffer A)洗涤2次并且混合1分钟。珠子再一次被捕获,并且除去上清液。然后将珠子用150 μ l洗涤缓冲液B(Wash Buffer B)进行洗涤并且除上清液。然后将珠子用150 μ l洗脱缓冲液(Elution Buffer)进行洗涤、捕获并且除去上清液。最终,允许珠子干燥2分钟。在干燥之后,添加50 μ l的洗脱缓冲液(Elution Buffer)并且在70 $^{\circ}$ C混合5分钟。用磁体捕获珠子持续5分钟。去除45 μ l的上清液并且添加至另一96孔板中。

[0958] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(应用生物系统公司,福斯特城,加利福尼亚州(Applied Biosystems,Foster City,CA)),产品目录号4368813)的cDNA合成

[0959] 母混合物如所制备的:每一反应:2 μ l 10X缓冲液、0.8 μ l 25X dNTP、2 μ l随机引物、1 μ l逆转录酶、1 μ l RNase抑制剂以及3.2 μ l的H₂O。将相同体积的母混合物和RNA混合为用于体外筛选的样本的12 μ l终体积或用于体内筛选的样本的20 μ l终体积。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(大力神公司(Hercules),CA)通过以下步骤产生cDNA:25 $^{\circ}$ C 10min、37 $^{\circ}$ C 120min、85 $^{\circ}$ C 5秒、4 $^{\circ}$ C保持。

[0960] 实时PCR

[0961] 在384孔(384w)板(罗氏公司(Roche)产品目录号04887301001)的每个孔中,将2 μ l的cDNA添加到母混合物中,该母混合物包含:2 μ l的H₂O、0.5 μ l GAPDH TaqMan探针(生命技术公司(Life Technologies)产品目录号4326317E(对于Hep3B细胞),产品目录号352339E(对于原初小鼠肝上皮实质细胞),或定制探针(对于猕猴原初肝上皮实质细胞))、0.5 μ l C5TaqMan探针(生命技术公司产品目录号Hs00167441_m1(对于Hep3B细胞)或Mm00457879_m1(对于原初小鼠肝上皮实质细胞)或定制探针(对于猕猴原初肝上皮实质细胞))以及5 μ l Lightcycler 480探针母混合物(罗氏公司产品目录号04887301001)。实时PCR在罗氏LC480实时PCR系统(罗氏公司)上使用 $\Delta\Delta$ Ct(RQ)测定而进行。除非另外指出,对于体外筛选,使用两个生物重复对每个双链体进行检验并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。对于体内筛选,在一个或多个实验(每组3只小鼠)中对每个双链体进行检验并且每个实时PCR以一式二份技术重复而进行。

[0962] 为了计算ALAS1mRNA水平变化的相对倍数,使用 $\Delta\Delta$ Ct方法分析实时数据,并且将这些数据归一化为利用以下这样的细胞而进行的测定:这些细胞是转染了10nM AD-1955的细胞,或是模拟转染的细胞。以利用XLFit的4参数拟合模型计算IC₅₀并且针对在相同的剂量范围用AD-1955转染的细胞归一化或针对自身最低剂量归一化。

[0963] AD-1955的有义链和反义链序列是:

[0964] 有义:cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:3682)

[0965] 反义:UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:3683)。

[0966] 修饰的和未修饰的siRNA的单链和双链体序列分别提供于下表14和表15中。

[0967] 表14:人ALAS1修饰的单链和双链体序列

[0968]

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标部位,
3371	3372	AD-58848	CfsasUfgCfcAfaAfAfAfuGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgCfaUfgsAfsc	1635-1657
3373	3374	AD-58849	AfsusUfuUfgAfaGfUfGfaUfgAfgUfgAfaAfL96	usUfsuCfaCfuCfaUfcacUfuCfaAfaAfusGfsc	2189-2211
3375	3376	AD-58850	AfsgsUfuAfuAfuUfAfAfaUfuUfuAfaUfcUfL96	asGfsaUfuAfaAfaUfuuaAfuAfaAfaCfusUfsa	2344-2366
3377	3378	AD-58851	GfscsAfuUfuUfgAfaAfGfuGfaUfgAfgUfgAfL96	usCfsaCfuCfaUfcAfcuuCfaAfaAfuGfcsAfsg	2187-2209
3379	3380	AD-58852	GfsasAfcUfaAfuGfAfGfcAfgAfcAfuAfaCfL96	gsUfsuAfuGfuCfuGfcucAfuUfaGfuUfcsAfsu	1975-1997
3381	3382	AD-58853	AfsasUfgAfcCfaCfAfCfcUfaUfcGfaGfuUfL96	asAfscUfcGfaUfaGfgugUfgGfuCfaUfusCfsu	973-995
3383	3384	AD-58854	UfsasAfaUfuUfuAfaUfcUfaUfaGfuAfaAfL96	usUfsuAfcUfaUfaGfauuAfaAfaUfuUfasAfsu	2352-2374
3385	3386	AD-58855	UfsusCfaGfuAfuGfAfUfcGfuUfuCfuUfuGfL96	csAfsaAfgAfaAfcGfaucAfuAfcUfgAfasAfsa	929-951
3387	3388	AD-58856	CfsasCfuUfuUfcAfGfUfaUfgAfuCfgUfuUfL96	asAfsaCfgAfuCfaUfacuGfaAfaAfgUfgsGfsa	924-946
3389	3390	AD-58857	AfsasAfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaGfL96	csUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfuUfusUfsg	913-935
3391	3392	AD-58858	CfsasUfuUfgAfaAfCfuUfgUfcCfaUfuCfaA	usUfsgAfaUfgGfaCfaguUfuCfaAfaUfgs	1478-1500

[0969]

			fL96	Cfsc	
3393	3394	AD-58859	CfscsUfaUfcGfaGfUfUfuUfuAfaAfaCfuGfL96	csAfsgUfuUfuAfaAfaacUfcGfaUfaGfgsUfsg	983-1005
3395	3396	AD-58861	GfsasCfcAfgAfaAfGfAfgUfgUfcUfcAfuCfL96	gsAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfuGfgUfcsUfsu	872-894
3397	3398	AD-58862	AfscsCfaGfaAfaGfAfGfuGfuCfuCfaUfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcUfgGfusCfsu	873-895
3399	3400	AD-58863	AfscsUfaAfuGfaGfCfAfgAfcAfuAfaCfaUfL96	asUfsgUfuAfuGfuCfugcUfcAfuUfaGfusUfsc	1977-1999
3401	3402	AD-58864	UfsasGfuAfaAfaAfCfAfuAfgUfcCfuGfgAfL96	usCfscAfgGfaCfuAfuuguUfuUfuAfcUfasUfsa	2366-2388
3403	3404	AD-58865	UfsasUfuUfcUfgGfAfAfcUfaGfuAfaAfuUfL96	asAfsuUfuAfcUfaGfuucCfaGfaAfaUfasUfsu	1185-1207
3405	3406	AD-58867	UfsusCfuGfcAfaAfGfCfcAfgUfcUfuGfaGfL96	csUfscAfaGfaCfuGfgcuUfuGfcAfgAfasGfsa	706-728
3407	3408	AD-58868	GfsasGfgAfaAfgAfGfGfuUfgCfuGfaAfaCfL96	gsUfsuUfcAfgCfaAfccuCfuUfuCfcUfcsAfsc	759-781
3409	3410	AD-58869	GfsgsUfaCfuAfgAfAfAfuAfuUfuCfuGfgAfL96	usCfscAfgAfaAfuAfuuuCfuAfgUfaCfcsAfsc	1174-1196
3411	3412	AD-58870	GfsasCfaUfcAfuGfCfAfaAfaGfcAfaAfgAfL96	usCfsuUfuGfcUfuUfugcAfuGfaUfgUfcsCfsu	853-875
3413	3414	AD-58871	AfsasAfuUfuUfaAfUfCfuAfuAfgUfaAfaAfL96	usUfsuUfaCfuAfuAfgauUfaAfaAfuUfusAfsa	2353-2375
3415	3416	AD-58873	CfsasUfgAfuCfcAfAfGfgGfaUfuCfgAfaAfL96	usUfsuCfgAfaUfcCfcuuGfgAfuCfaUfgsGfsa	1362-1384
3417	3418	AD-58874	AfsgsAfcCfaGfaAfAfGfaGfuGfuCfuCfaUfL96	asUfsgAfgAfcAfcUfcuuUfcUfgGfuCfusUfsu	871-893
3419	3420	AD-58875	AfsusCfcUfgAfaGfAfGfcGfcUfgAfgGfgAfL96	usCfscCfuCfaGfcGfcucUfuCfaGfgAfus	1810-1832

[0970]

			fL96	Cfsc	
3421	3422	AD-58876	GfsusCfuGfuGfaUfGfAfaCfuAfaUfgAfgCfL96	gsCfsuCfaUfuAfgUfucaUfcAfcAfgAfcUfsu	1966-1988
3423	3424	AD-58877	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuCfL96	gsAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsGfsu	875-897
3425	3426	AD-58878	AfscsUfuUfuCfaGfUfAfuGfaUfcGfuUfuCfL96	gsAfsaAfcGfaUfcAfuacUfgAfaAfaGfusGfsg	925-947
3427	3428	AD-58879	UfscsAfuGfcCfaAfAfAfaUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcAfuGfasCfsu	1634-1656
3429	3430	AD-58880	AfsasUfaUfuUfcUfGfGfaAfcUfaGfuAfaAfL96	usUfsuAfcUfaGfuUfccAfaAfaUfaUfusUfsc	1183-1205
3431	3432	AD-58881	CfsusUfcUfuCfaAfGfAfuAfaCfuUfgCfcAfL96	usGfsgCfaAfgUfuAfuUfgAfaGfaAfgsAfsu	892-914
3433	3434	AD-58882	UfsusUfcAfgUfaUfGfAfuCfuUfuUfcUfuUfL96	asAfsaGfaAfaCfgAfucaUfaCfuGfaAfasAfg	928-950
3435	3436	AD-58883	CfscsCfaGfuGfuGfGfUfuAfgUfgUfgAfaAfL96	usUfsuCfaCfaCfuAfacAfcAfcUfgGfgsGfsc	790-812
3437	3438	AD-58884	GfscsUfgUfgAfgAfUfUfuAfcUfcUfgAfuUfL96	asAfsuCfaGfaGfuAfaaUcfuCfaCfaGfcsCfsu	1325-1347
3439	3440	AD-58885	AfsgsGfcUfuGfaGfCfAfaGfuUfgGfuAfuCfL96	gsAfsuAfcCfaAfcUfugcUfcAfaGfcCfusGfsa	2229-2251
3441	3442	AD-58886	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsUfsg	877-899
3443	3444	AD-58887	AfsusUfuCfuGfgAfAfCfuAfgUfaAfaUfuCfL96	gsAfsaUfuUfaCfuAfguuCfcAfgAfaAfusAfsu	1186-1208
3445	3446	AD-58888	UfsgsUfgAfuGfuGfGfCfcCfaUfgAfgUfuUfL96	asAfsaCfuCfaUfgGfgccAfcAfuCfaCfasCfsa	1531-1553
3447	3448	AD-58889	AfsasGfaGfaGfaAfGfUfcCfuAfuUfuCfuCfL96	gsAfgAfaAfuAfgGfacuUfcUfcUfcUfus	2208-2230

[0971]

			fL96	Ufsc	
3449	3450	AD-58890	UfsgsGfcAfgCfaCfA fGfaUfgAfaUfcAfgA fL96	usCfsuGfaUfuCfaUf cugUfgCfuGfcCfas Gfsg	671-693
3451	3452	AD-58891	AfsusGfaUfcGfuUfU fCfuUfuGfaGfaAfaA fL96	usUfsuUfcUfcAfaA fgaaAfcGfaUfcAfus Afsc	935-957
3453	3454	AD-58892	UfscsUfgGfaAfcUfA fGfuAfaAfuUfcCfaU fL96	asUfsgGfaAfuUfuA fcuaGfuUfcCfaGfas Afsa	1189-1211
3455	3456	AD-59095	GfscsCfcAfuUfcUfU fAfuCfcCfgAfgUfL9 6	asCfsuCfcGfgAfuA fagaAfuGfgsgsc	360-382
3457	3458	AD-59096	GfsgsAfaCfcAfuGfC fCfuCfcAfuGfaUfL9 6	asUfscAfuGfgAfgG fcauGfgUfscsc	1347-1369
3459	3460	AD-59097	UfsgsGfaGfuCfuGfU fGfcGfgAfuCfcUfL9 6	asGfsgAfuCfcGfcAf cagAfcUfscsa	1794-1816
3461	3462	AD-59098	CfsasCfcCfaCfgGfGf UfgUfgUfgGfgAfL9 6	usCfscCfaCfaCfaCf ccgUfgGfgsusg	1112-1134
3463	3464	AD-59099	GfsgsAfgUfcUfgUfG fCfgGfaUfcCfuAfL9 6	usAfgGfaUfcCfcGfCf acaGfaCfscsc	1795-1817
3465	3466	AD-59100	CfsasAfaAfcUfgCfCf CfcAfaGfaUfgAfL96	usCfsaUfcUfuGfgG fgcaGfuUfusug	428-450
3467	3468	AD-59101	GfscsCfuCfcAfuGfA fUfcCfaAfgGfgAfL9 6	usCfscCfuUfgGfaUf cauGfgAfgsgsc	1355-1377
3469	3470	AD-59102	CfsasUfcAfuCfcCfUf GfuGfcGfgGfuUfL96	asAfscCfcGfcAfcAf gggAfuGfasug	1921-1943
3471	3472	AD-59103	AfscsCfcAfcGfgGfU fGfuGfuGfgGfgAfL9 6	usCfscCfcAfcAfcAf cccGfuGfgsgsu	1113-1135
3473	3474	AD-59104	CfsasCfaUfcAfuCfCf CfuGfuGfcGfgAfL96	usCfscGfcAfcAfgGf gauGfaUfgsusg	1919-1941
3475	3476	AD-59105	CfsasGfaAfaGfaGfUf GfuCfuCfaUfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcA fcucUfuUfcsug	873-895
3477	3478	AD-59106	CfscsUfcCfaUfgAfUf CfcAfaGfgGfaUfL96	asUfscCfcUfuGfgAf ucaUfgGfasgsg	1356-1378
3479	3480	AD-	UfsgsCfcCfaUfuCfUf	usUfscGfgGfaUfaA	359-381

[0972]

		59107	UfaUfcCfcGfaAfL96	fgaaUfgGfgscsa	
3481	3482	AD-59108	CfsusUfcAfcCfcUfGfGfcUfaAfgAfuAfL96	usAfsuCfuUfaGfcCfaggGfuGfasasg	1297-1319
3483	3484	AD-59109	AfsusCfaUfcCfcUfGfUfgCfgGfgUfuAfL96	usAfsaCfcCfcGfaCfaggGfaUfgsasus	1922-1944
3485	3486	AD-59110	AfsgsAfaAfgAfgUfGfUfcUfcAfuCfuUfL96	asAfsgAfuGfaGfaCfacuCfuUfscsu	874-896
3487	3488	AD-59111	CfsusCfcAfuGfaUfCfCfaAfgGfgAfuUfL96	asAfsuCfcCfuUfgGfaucAfuGfgsasg	1357-1379
3489	3490	AD-59112	CfscsAfuUfcUfuAfUfCfcCfcAfgUfcAfL96	usGfsaCfuCfcGfgAfuuaGfaAfusgsg	362-384
3491	3492	AD-59113	CfsasCfcCfuGfgCfUfAfaGfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfcUfuAfgccAfgGfgsusg	1300-1322
3493	3494	AD-59114	UfscsAfuCfcCfuGfUfGfcGfgGfuUfgAfL96	usCfsaAfcCfcGfcAfcagGfgAfusgsa	1923-1945
3495	3496	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu	877-899
3497	3498	AD-59116	GfsusCfaUfgCfcAfAfAfaAfuGfgAfcAfL96	usGfsuCfcAfuUfuUfuggCfaUfgsasc	1631-1653
3499	3500	AD-59117	CfsasUfuCfuUfaUfCfCfcGfaGfuCfcAfL96	usGfsgAfcUfcGfgGfauaAfgAfasusg	363-385
3501	3502	AD-59118	AfscsCfcUfgGfcUfAfAfgAfuGfaUfgAfL96	usCfsaUfcAfuCfuUfagcCfaGfgsgsu	1301-1323
3503	3504	AD-59119	CfsusCfuUfcAfcCfCfUfgGfcUfaAfgAfL96	usCfsuUfaGfcCfaGfgguGfaAfgsasg	1295-1317
3505	3506	AD-59120	AfsusGfcCfaAfaAfAfUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcsasu	1634-1656
3507	3508	AD-59121	UfsgsCfcCfcAfaGfAfUfgAfuGfgAfaUfL96	asUfsuCfcAfuCfaUfcuuGfgGfgscsa	434-456
3509	3510	AD-59122	GfsasAfcCfaUfgCfCfUfcCfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfgGfaGfgcaUfgGfususc	1348-1370
3511	3512	AD-59123	UfscsUfuCfaCfcCfUfGfgCfuAfaGfaUfL96	asUfscUfuAfgCfcAfgggUfgAfasgsa	1296-1318
3513	3514	AD-59124	UfsgsCfcAfaAfaAfUfGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgscsa	1635-1657

			6		
3515	3516	AD-59125	CfscsAfgAfaAfgAfGfUfgUfcUfcAfuAfL96	usAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfusgsg	872-894
3517	3518	AD-59126	GfsasAfaCfuGfuCfCfAfuUfcAfaUfgAfL96	usCfsaUfuGfaAfuGfgacAfgUfususc	1481-1503
3519	3520	AD-59127	UfscsAfcCfcUfgGfCfUfaAfgAfuGfaUfL96	asUfscAfuCfuUfaGfccaGfgGfusgsa	1299-1321
3521	3522	AD-59128	CfscsCfuGfgAfgUfCfUfgUfgCfgGfaUfL96	asUfscCfgCfaCfaGfacuCfcAfgsgsg	1791-1813
3523	3524	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc	875-897
3525	3526	AD-59130	UfsgsGfaGfcCfcUfGfGfaGfuCfuGfuAfL96	usAfscAfgAfcUfcCfaggGfcUfcscsa	1786-1808

[0973] 表15:人ALAS1未修饰的单链和双链体序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	反义序列在 NM_000688.4 上的 靶标部位
3684	3527	AD-58848	CAUGCCAAAAAUG GACAUCAU	AUGAUGUCCA UUUUUGGCAU GAC	1635-1657
3528	3529	AD-58849	AUUUUGAAGUGA UGAGUGAAA	UUUCACUCAUC ACUUCAAAAU GC	2189-2211
3530	3531	AD-58850	AGUUAUAUUAAA UUUUAACUCU	AGAUAUAAA UUAUAUAAC UUA	2344-2366
3532	3533	AD-58851	GCAUUUUGAAGUG AUGAGUGA	UCACUCAUCAC UUCAAAAUGC AG	2187-2209
3534	3535	AD-58852	GAACUAAUGAGCA GACAUAAC	GUUAUGUCUG CUCAUUAGUUC AU	1975-1997
3536	3537	AD-	AAUGACCACACCU	AACUCGAUAG	973-995

[0974]

		58853	AUCGAGUU	GUGUGGUCAU UCU	
3538	3539	AD- 58854	UAAAUUUUAAUCU AUAGUAAA	UUUACUUAUAG AUUAAAAUUU AAU	2352-2374
3540	3541	AD- 58855	UUCAGUAUGAUCG UUUCUUUG	CAAAGAAACG AUCAUACUGA AAA	929-951
3542	3543	AD- 58856	CACUUUUCAGUAU GAUCGUUU	AAACGAUCAU ACUGAAAAGU GGA	924-946
3544	3545	AD- 58857	AAAUCUGUUUCCA CUUUUCAG	CUGAAAAGUG GAAACAGAUU UUG	913-935
3546	3547	AD- 58858	CAUUUGAAACUGU CCAUUCAA	UUGAAUGGAC AGUUUCAAAU GCC	1478-1500
3548	3549	AD- 58859	CCUAUCGAGUUUU UAAAACUG	CAGUUUUAAA AACUCGAUAG GUG	983-1005
3550	3551	AD- 58861	GACCAGAAAGAGU GUCUCAUC	GAUGAGACAC UCUUUCUGGUC UU	872-894
3552	3553	AD- 58862	ACCAGAAAGAGUG UCUCAUCU	AGAUGAGACA CUCUUUCUGGU CU	873-895
3554	3555	AD- 58863	ACUAAUGAGCAGA CAUAACAU	AUGUUAUGUC UGCUCAUUAG UUC	1977-1999
3556	3557	AD- 58864	UAGUAAAAACAUA GUCCUGGA	UCCAGGACUAU GUUUUUACUA UA	2366-2388
3558	3559	AD- 58865	UAUUUCUGGAACU AGUAAAUU	AAUUUACUAG UCCAGAAAU AUU	1185-1207
3560	3561	AD- 58867	UUCUGCAAAGCCA GUCUUGAG	CUCAAGACUGG CUUUGCAGAA GA	706-728
3562	3563	AD- 58868	GAGGAAAGAGGU UGCUGAAAC	GUUUCAGCAAC CUCUUUCCUCA C	759-781
3564	3565	AD-	GGUACUAGAAAUA	UCCAGAAAUA	1174-1196

[0975]

		58869	UUUCUGGA	UUUCUAGUACC AC	
3566	3567	AD- 58870	GACAUCAUGCAAA AGCAAAGA	UCUUUGCUUU UGCAUGAUGU CCU	853-875
3568	3569	AD- 58871	AAAUUUUAAUCUA UAGUAAAA	UUUUACUAUA GAUUAAAAUU UAA	2353-2375
3570	3571	AD- 58873	CAUGAUCCAAGGG AUUCGAAA	UUUCGAAUCCC UUGGAUCAUG GA	1362-1384
3572	3573	AD- 58874	AGACCAGAAAGAG UGUCUCAU	AUGAGACACUC UUUCUGGUCU UU	871-893
3574	3575	AD- 58875	AUCCUGAAGAGCG CUGAGGGA	UCCCUCAGCGC UCUUCAGGAUC C	1810-1832
3576	3577	AD- 58876	GUCUGUGAUGAAC UAAUGAGC	GCUCAUUAGU UCAUCACAGAC UU	1966-1988
3578	3579	AD- 58877	CAGAAAGAGUGUC UCAUCUUC	GAAGAUGAGA CACUCUUUCUG GU	875-897
3580	3581	AD- 58878	ACUUUUCAGUAUG AUCGUUUC	GAAACGAUCA UACUGAAAAG UGG	925-947
3582	3583	AD- 58879	UCAUGCCAAAAAU GGACAUCA	UGAUGUCCAU UUUUGGCAUG ACU	1634-1656
3584	3585	AD- 58880	AAUAUUUCUGGAA CUAGUAAA	UUUACUAGUU CCAGAAAUAU UUC	1183-1205
3586	3587	AD- 58881	CUUCUUCAAGAU ACUUGCCA	UGGCAAGUUA UCUUGAAGAA GAU	892-914
3588	3589	AD- 58882	UUUCAGUAUGAUC GUUUCUUU	AAAGAAACGA UCAUACUGAA AAG	928-950
3590	3591	AD- 58883	CCCAGUGUGGUUA GUGUGAAA	UUUCACACUAA CCACACUGGGG C	790-812
3592	3593	AD-	GCUGUGAGAUUUA	AAUCAGAGUA	1325-1347

[0976]

		58884	CUCUGAUU	AAUCUCACAGC CU	
3594	3595	AD- 58885	AGGCUUGAGCAAG UUGGUAUC	GAUACCAACUU GCUCAAGCCUG A	2229-2251
3596	3597	AD- 58886	GAAAGAGUGUCUC AUCUUCUU	AAGAAGAUGA GACACUCUUUC UG	877-899
3598	3599	AD- 58887	AUUUCUGGAACUA GUAAAUUC	GAAUUUACUA GUUCCAGAAA UAU	1186-1208
3600	3601	AD- 58888	UGUGAUGUGGCCC AUGAGUUU	AAACUCAUGG GCCACAUCACA CA	1531-1553
3602	3603	AD- 58889	AAGAGAGAAGUCC UAUUUCUC	GAGAAAUAGG ACUUCUCUCUU UC	2208-2230
3604	3605	AD- 58890	UGGCAGCACAGAU GAAUCAGA	UCUGAUUCAUC UGUGCUGCCAG G	671-693
3606	3607	AD- 58891	AUGAUCGUUUCUU UGAGAAAA	UUUUCUCAA GAAACGAUCA UAC	935-957
3608	3609	AD- 58892	UCUGGAACUAGUA AAUUCCA	AUGGAAUUUA CUAGUCCAGAA AA	1189-1211
3610	3611	AD- 59095	GCCCAUUCUUAUC CCGAGU	ACUCGGGAUA AGAAUGGGC	360-382
3612	3613	AD- 59096	GGAACCAUGCCUC CAUGAU	AUCAUGGAGG CAUGGUUCC	1347-1369
3614	3615	AD- 59097	UGGAGUCUGUGCG GAUCCU	AGGAUCCGCAC AGACUCCA	1794-1816
3616	3617	AD- 59098	CACCCACGGGUGU GUGGGA	UCCACACACC CGUGGGUG	1112-1134
3618	3619	AD- 59099	GGAGUCUGUGCGG AUCCUA	UAGGAUCCGCA CAGACUCC	1795-1817
3620	3621	AD- 59100	CAAAACUGCCCCA AGAUGA	UCAUCUUGGG GCAGUUUUG	428-450
3622	3623	AD- 59101	GCCUCCAUGAUCC AAGGGA	UCCCUUGGAUC AUGGAGGC	1355-1377
3624	3625	AD- 59102	CAUCAUCCCUGUG CGGGUU	AACCCGCACAG GGAUGAUG	1921-1943

[0977]

3626	3627	AD-59103	ACCCACGGGUGUG UGGGGA	UCCCCACACAC CCGUGGGU	1113-1135
3628	3629	AD-59104	CACAUCAUCCCUG UGCGGA	UCCGCACAGGG AUGAUGUG	1919-1941
3630	3631	AD-59105	CAGAAAGAGUGUC UCAUCU	AGAUGAGACA CUCUUUCUG	873-895
3632	3633	AD-59106	CCUCCAUGAUCCA AGGGAU	AUCCCUUGGAU CAUGGAGG	1356-1378
3634	3635	AD-59107	UGCCCAUUCUUAU CCCGAA	UUCGGGAUAA GAAUGGGCA	359-381
3636	3637	AD-59108	CUUCACCCUGGCU AAGAU	UAUCUUAGCCA GGGUGAAG	1297-1319
3638	3639	AD-59109	AUCAUCCCUGUGC GGGUUA	UAACCCGCACA GGGAUGAU	1922-1944
3640	3641	AD-59110	AGAAAGAGUGUCU CAUCUU	AAGAUGAGAC ACUCUUUCU	874-896
3642	3643	AD-59111	CUCCAUGAUCCAA GGGAUU	AAUCCCUUGGA UCAUGGAG	1357-1379
3644	3645	AD-59112	CCAUUCUUAUCCC GAGUCA	UGACUCGGGA UAAGAAUGG	362-384
3646	3647	AD-59113	CACCCUGGCUAAG AUGAU	UAUCAUCUUA GCCAGGGUG	1300-1322
3648	3649	AD-59114	UCAUCCCUGUGCG GGUUGA	UCAACCCGCAC AGGGAUGA	1923-1945
3650	3651	AD-59115	AAGAGUGUCUCAU CUUCUU	AAGAAGAUGA GACACUCUU	877-899
3652	3653	AD-59116	GUCAUGCCAAAAA UGGACA	UGUCCAUUUU UGGCAUGAC	1631-1653
3654	3655	AD-59117	CAUUCUUAUCCCG AGUCCA	UGGACUCGGG AUAAGAAUG	363-385
3656	3657	AD-59118	ACCCUGGCUAAGA UGAUGA	UCAUCAUCUUA GCCAGGGU	1301-1323
3658	3659	AD-59119	CUCUUCACCCUGG CUAAGA	UCUUAGCCAGG GUGAAGAG	1295-1317
3660	3661	AD-59120	AUGCCAAAAAUGG ACAUCA	UGAUGUCCA UUUUGGCAU	1634-1656
3662	3663	AD-59121	UGCCCCAAGAUGA UGGAAU	AUUCCAUCAUC UUGGGGCA	434-456
3664	3665	AD-59122	GAACCAUGCCUCC AUGAU	UAUCAUGGAG GCAUGGUUC	1348-1370
3666	3667	AD-59123	UCUUCACCCUGGC UAAGAU	AUCUUAGCCAG GGUGAAGA	1296-1318

[0978]

3668	3669	AD-59124	UGCCAAAAAUGGA CAUCAU	AUGAUGUCCA UUUUUGGCA	1635-1657
3670	3671	AD-59125	CCAGAAAGAGUGU CUCAUA	UAUGAGACAC UCUUUCUGG	872-894
3672	3673	AD-59126	GAAACUGUCCA CAAUGA	UCAUUGAAUG GACAGUUUC	1481-1503
3674	3675	AD-59127	UCACCCUGGC GAUGAU	AUCAUCUUAGC CAGGGUGA	1299-1321
3676	3677	AD-59128	CCCUGGAGUCUGU GCGGAU	AUCCGCACAGA CUCCAGGG	1791-1813
3678	3679	AD-59129	GAAAGAGUGUCUC AUCUUA	UAAGAUGAGA CACUCUUUC	875-897
3680	3681	AD-59130	UGGAGCCCUGGAG UCUGUA	UACAGACUCCA GGGCUCCA	1786-1808

[0979] 体外测定的结果提供于表16中。表16还注释了每个siRNA的靶标物种。

[0980] 表16: 功能测定的结果

[0981]

双链 体 ID	靶标 物种	类型	猕猴 (Cyno) 游离摄取				猕猴转染		Hep3b 转染	
			1 uM Avg	500 nM	20 nM Avg	10 nM	20 nM Avg	0.2 nM Avg	10 nM Avg	0.1 nM Avg
AD-58848	M/R/ Rh/H	21/ 23	131.6	176.0	104.4	128.0	43.5	44.8	25.3	76.8
AD-58849	H/Rh	21/ 23	91.9	88.1	92.2	105.0	29.4	35.4	11.5	47.1
AD-58850	H/Rh	21/ 23	79.4	103.4	80.0	111.2	NA	62.2	31.3	72.0
AD-58851	H/Rh	21/ 23	99.7	74.7	94.8	104.7	NA	40.7	8.6	81.3
AD-58852	H/Rh	21/ 23	108.1	91.8	103.3	111.9	101.1	128.8	43.4	129.0
AD-58853	H/Rh	21/ 23	74.8	67.7	84.2	93.5	24.7	52.9	14.1	61.2
AD-58854	H/Rh	21/ 23	145.9	124.1	106.6	115.3	119.0	83.9	85.0	84.0
AD-58855	H/Rh	21/ 23	81.5	97.9	92.7	101.8	39.5	40.3	15.3	67.6
AD-58856	H/Rh	21/ 23	74.1	90.6	84.6	82.6	22.4	30.7	8.7	33.3

[0982]

AD-58857	H/Rh	21/ 23	64.7	91.4	62.3	87.1	22.0	31.6	9.8	106.3
AD-58858	H/Rh	21/ 23	67.4	91.7	68.6	98.3	27.9	40.3	17.4	44.8
AD-58859	H/Rh	21/ 23	71.2	77.2	92.4	90.1	19.1	34.3	13.1	39.7
AD-58861	H/Rh	21/ 23	104.6	107.2	102.0	100.6	25.9	35.1	18.0	69.8
AD-58862	H/Rh	21/ 23	66.8	77.0	68.7	88.5	20.3	31.1	24.2	49.9
AD-58863	H/Rh	21/ 23	70.8	66.8	76.8	98.5	21.5	29.7	8.7	54.9
AD-58864	H/Rh	21/ 23	76.2	85.6	83.7	100.8	60.4	61.0	56.4	87.3
AD-58865	H/Rh	21/ 23	67.9	77.9	95.9	98.4	21.3	38.6	15.5	81.4
AD-58867	H/Rh	21/ 23	95.9	93.3	107.0	97.5	32.3	42.7	16.6	79.8
AD-58868	H/Rh	21/ 23	95.2	92.1	116.2	94.7	54.6	69.2	61.5	105.9
AD-58869	H/Rh	21/ 23	65.0	78.2	75.8	88.2	17.4	25.0	13.0	63.9
AD-58870	H/Rh	21/ 23	69.4	92.3	81.0	88.1	29.2	43.8	33.7	79.1
AD-58871	H/Rh	21/ 23	61.2	77.3	88.2	77.0	71.2	73.2	36.7	110.3
AD-58873	H/Rh	21/ 23	95.2	100.9	83.3	94.6	54.2	52.8	36.6	73.3
AD-58874	H/Rh	21/ 23	75.8	76.8	63.8	85.3	22.3	31.2	15.0	38.2
AD-58875	H/Rh	21/ 23	80.7	88.7	78.6	97.9	48.6	73.6	61.2	90.6
AD-58876	H/Rh	21/ 23	90.8	93.1	82.5	100.2	41.1	56.9	21.2	58.7
AD-58877	H/Rh	21/ 23	68.3	85.1	51.2	78.7	18.5	46.6	11.9	27.4
AD-58878	H/Rh	21/ 23	78.3	68.3	81.2	91.2	24.1	23.4	6.2	37.1
AD-58879	H/Rh	21/ 23	87.9	94.1	79.7	95.4	32.0	47.8	15.7	82.5
AD-58880	H/Rh	21/ 23	74.9	72.2	88.9	88.1	20.1	27.5	14.0	60.7

[0983]

AD-58881	H/Rh	21/ 23	85.9	76.8	78.8	118.0	22.2	36.7	27.6	71.6
AD-58882	H/Rh	21/ 23	54.1	53.4	60.3	85.8	14.6	27.2	8.2	23.8
AD-58883	H/Rh	21/ 23	80.4	69.9	75.7	80.3	31.8	25.8	12.3	63.0
AD-58884	H/Rh	21/ 23	57.7	55.3	64.8	78.2	20.0	30.0	11.8	68.9
AD-58885	H/Rh	21/ 23	101.8	91.8	104.1	101.5	85.9	71.9	61.8	71.2
AD-58886	M/R/ Rh/H	21/ 23	47.1	58.0	36.3	93.3	16.0	26.6	9.2	32.0
AD-58887	H/Rh	21/ 23	73.6	98.7	82.6	95.2	28.5	33.5	12.8	65.2
AD-58888	H/Rh	21/ 23	90.2	69.9	69.4	85.6	46.9	45.0	16.6	72.0
AD-58889	H/Rh	21/ 23	83.6	98.6	82.4	92.2	36.5	40.3	31.6	99.4
AD-58890	H/Rh	21/ 23	69.5	95.4	84.2	88.2	50.8	45.6	21.7	92.9
AD-58891	H/Rh	21/ 23	62.8	75.7	75.4	109.2	23.6	34.3	15.6	55.8
AD-58892	H/Rh	21/ 23	60.2	92.9	89.8	92.9	22.8	43.3	20.2	75.6
AD-59095	M/R/ Rh/H	19 mer	88.9	NA	132.8	NA	48.3	97.4	54.3	99.0
AD-59096	M/R/ Rh/H	19 mer	95.5	NA	90.5	NA	105.7	138.6	131.4	120.7
AD-59097	M/R/ Rh/H	19 mer	92.5	NA	84.2	NA	75.0	NA	94.7	108.5
AD-59098	M/R/ Rh/H	19 mer	84.0	NA	87.7	NA	109.3	NA	130.0	87.3
AD-59099	M/R/ Rh/H	19 mer	89.7	NA	90.0	NA	77.8	85.4	46.8	74.9
AD-59100	M/R/ Rh/H	19 mer	84.8	NA	144.3	NA	70.6	108.1	91.5	117.6
AD-59101	M/R/ Rh/H	19 mer	79.0	NA	103.8	NA	89.8	102.9	124.2	107.0
AD-59102	M/R/ Rh/H	19 mer	85.9	NA	100.6	NA	72.2	68.5	87.9	95.1
AD-59103	M/R/ Rh/H	19 mer	86.0	NA	91.1	NA	93.0	81.3	130.0	96.0

[0984]

AD-59104	M/R/Rh/H	19mer	92.6	NA	96.9	NA	94.9	91.4	124.4	83.1
AD-59105	M/R/Rh/H	19mer	48.9	NA	101.7	NA	18.4	48.9	17.0	34.7
AD-59106	M/R/Rh/H	19mer	63.2	NA	76.7	NA	28.5	40.7	28.6	46.4
AD-59107	M/R/Rh/H	19mer	71.4	NA	68.7	NA	37.1	45.3	26.8	63.6
AD-59108	M/R/Rh/H	19mer	70.7	NA	85.1	NA	89.9	84.8	139.2	101.7
AD-59109	M/R/Rh/H	19mer	86.1	NA	83.4	NA	84.9	96.2	131.7	86.7
AD-59110	M/R/Rh/H	19mer	70.8	NA	119.7	NA	38.5	60.4	67.4	80.3
AD-59111	M/R/Rh/H	19mer	66.1	NA	76.5	NA	52.2	61.0	69.7	87.6
AD-59112	M/R/Rh/H	19mer	71.2	NA	80.2	NA	91.2	83.4	127.4	89.0
AD-59113	M/R/Rh/H	19mer	67.0	NA	77.8	NA	49.1	59.0	66.8	91.4
AD-59114	M/R/Rh/H	19mer	81.7	NA	79.3	NA	96.3	88.0	129.6	72.4
AD-59115	M/R/Rh/H	19mer	40.4	NA	69.6	NA	19.6	35.7	9.3	16.9
AD-59116	M/R/Rh/H	19mer	72.2	NA	78.3	NA	53.5	77.8	70.1	107.8
AD-59117	M/R/Rh/H	19mer	70.7	NA	75.6	NA	75.8	74.9	129.0	103.5
AD-59118	M/R/Rh/H	19mer	68.8	NA	75.9	NA	81.4	82.1	114.1	89.7
AD-59119	M/R/Rh/H	19mer	64.9	NA	86.5	NA	85.1	125.1	122.8	124.8
AD-59120	M/R/Rh/H	19mer	63.5	NA	75.1	NA	29.9	52.0	16.1	54.1
AD-59121	M/R/Rh/H	19mer	67.6	NA	72.0	NA	88.8	77.4	108.0	103.1
AD-59122	M/R/Rh/H	19mer	60.2	NA	62.3	NA	25.1	45.3	16.2	54.8
AD-59123	M/R/Rh/H	19mer	68.6	NA	108.2	NA	59.2	84.6	80.0	97.7
AD-59124	M/R/Rh/H	19mer	47.5	NA	56.5	NA	23.9	40.0	9.8	18.9

[0985]

AD-59125	M/R/Rh/H	19mer	45.4	NA	47.2	NA	15.2	40.7	14.7	15.1
AD-59126	M/R/Rh/H	19mer	64.3	NA	74.6	NA	51.6	57.1	35.5	54.4
AD-59127	M/R/Rh/H	19mer	103.4	NA	105.8	NA	94.0	156.4	135.9	113.7
AD-59128	M/R/Rh/H	19mer	102.4	NA	81.4	NA	66.3	89.3	60.2	74.9
AD-59129	M/R/Rh/H	19mer	41.3	NA	38.8	NA	17.9	41.4	8.6	12.6
AD-59130	M/R/Rh/H	19mer	58.3	NA	80.8	NA	94.9	78.3	106.7	88.0

[0986] 表17示例了所选择的ALAS1siRNA双链体的IC₅₀。在每个ALAS1修饰的siRNA双链体的转染24小时后,从Hep3B细胞系中的内源性表达的ALAS1的敲低来确定IC₅₀(参见表14)。至少七个双链体(包括AD-58882、AD-58878、AD-58886、AD-58877、AD-59115、AD-58856、和AD-59129)一致地证明IC₅₀低于0.1nM,表明这些双链体在抑制ALAS1表达中是特别有效的。

[0987] 表17:所选择的ALAS1siRNA双链体的IC₅₀

[0988]

双链体ID	384w IC ₅₀ (nM)	96w IC ₅₀ (nM)
AD-58882	0.008	0.014
AD-58878	0.040	0.031
AD-58886	0.037	0.033
AD-58877	0.031	0.034
AD-59115	0.093	0.052
AD-58856	0.061	0.066
AD-59129	0.085	0.071
AD-59124	0.572	0.078
AD-58874	0.140	0.102
AD-59125	0.118	0.115
AD-59105	0.511	0.144
AD-59120	180.592	0.498
AD-59122	36.646	0.646
AD-59106	7.906	0.847
AD-59126	n/a	1.014
AD-59107	n/a	1.971

[0989] 实例11.AIP苯巴比妥诱导小鼠模型中的ALAS1-GaINAc活性

[0990] 使用AIP小鼠模型来研究为ALAS1-GaINAc共轭物的siRNA的效果。该siRNA具有双链体AD-58632的序列(参见表20)。

[0991]

表 20: ALAS1 siRNA 双链体 AD-58632 的序列						
SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	反义序列的靶标部位	双链体名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	
4149	4150	877-899	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGafaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	

[0992] AIP小鼠是未处理的(基线)、或在第1天皮下注射盐水或ALAS1-Ga1NAc共轭物(以20mg/kg的剂量)的。在第2天、第3天、和第4天,不对它们进行处理(基线)或用苯巴比妥的IP注射对其进行处理。在第5天,采集血浆并使用LC-MS测定法测量ALA和PBG水平。如在图15中所示的,ALAS1-Ga1NAc共轭物钝化血浆ALA和PBG生产分别约84%和80%。这些结果表明在这个AIP动物模型中,ALAS1-Ga1NAc共轭物处理有效预防与苯巴比妥诱导的急性发作相关

联的血浆ALA和PBG两者的增加。

[0993] 实例12. 靶向ALAS1并抑制ALAS1表达的另外的siRNA

[0994] 如在实例2中描述的,设计并生产靶向ALAS1siRNA的、修饰的siRNA序列。这些序列提供于表18中。如下所述对这些修饰的双链体的体外活性进行检验。

[0995]

表 18: 人 ALAS1 修饰的单链和双链体序列

SEQ ID NO: (有义)	SEQ ID NO: (反义)	双链名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')	反义序列在 NM_000688.4 上的靶标部位,
3685	3686	AD-59453	CAGGCAAAUCUCUGUUGUUTdT	AACAACAGAGAUUUGCCUGdTdT	402-420
3687	3688	AD-59395	GAAAAAAUUGAUGAGAAAdTdT	UUUCUCAUCAAUUUUUUCpTdT	949-967
3689	3690	AD-59477	GGAAAGAUGCCGCACUCUUTdT	AAGAGUGCGGCAUCUUUCCpTdT	1242-1260
3691	3692	AD-59492	UGUCUCAUCUUCUCAAAGAdTdT	UCUUGAAGAAGAUAGAGACAdTdT	882-900
3693	3694	AD-59361	ACAUCUACGUGGCAAGCAAUTdT	AUUGCUUGCACGUAGAUGUTdT	1992-2010
3695	3696	AD-59462	UUCUCUGAUUGACACCCGUAdTdT	UACGGUGUCAAUUCAGAGAAAdTdT	1711-1729
3697	3698	AD-59433	GCUGCUGGCUUCAUCUUCAdTdT	UGAAGAUGAAGCCAGCAGCpTdT	1739-1757
3699	3700	AD-59424	AGCGCAACGUCAAACUCAUTdT	AUGAGUUUGACGUUGCGCUpTdT	1851-1869
3701	3702	AD-59414	UAUUUCUGGGAACUAGUAAAdTdT	UUUACUAGUUCCAGAAAUAdTdT	1183-1201
3703	3704	AD-59539	GGUUGUGUUGGAGGGUACAdTdT	UGUACCCUCCAACACAACCpTdT	1679-1697

[0996]

3705	AD- 59400	3706	GUGUCAGUCUGGUGCAGUAdTdT	UACUGCACCGAGACUGACACdTdT	1070-1088
3707	AD- 59551	3708	CUUUGUGGCCAAUGACUCAdTdT	UGAGUCAUUGGCCACAAAGdTdT	1273-1291
3709	AD- 59482	3710	AGAUGCUGCUAAAACACAdTdT	UGUGUUUUUAGCAGCAUCUdTdT	1942-1960
3711	AD- 59448	3712	GAGUCAUGCCAAA AUGGAdTdT	UCCAUUUUUGGCAUGACUCdTdT	1629-1647
3713	AD- 59392	3714	CUGUGCGGAUCCUGAAGAGdTdT	CUCUUCAGGAUCCGCACAGdTdT	1800-1818
3715	AD- 59469	3716	CACUUUGAAACAACAUGGUdTdT	ACCAUGUUGUUUCAAGUGdTdT	1141-1159
3717	AD- 59431	3718	AAGUGAUGAGUGAAAGAGAdTdT	UCUCUUUCACUCAUCACUUdTdT	2193-2211
3719	AD- 59423	3720	AUCUGCUAGUCACAUGGAAdTdT	UUCCAUGUGACUAGCAGAUdTdT	2103-2121
3721	AD- 59517	3722	UGGGGCAGGUGGUACUAGAdTdT	UCUAGUACCACCUGCCCCAdTdT	1162-1180
3723	AD- 59578	3724	GCAGAUGACUAUUCAGACUdTdT	AGUCUGAAUAGUCAUCUGCdTdT	1031-1049
3725	AD- 59495	3726	GCCUCAUCCUCAGCUGAGdTdT	CUCAGCUGAGGAAUGAGGCdTdT	2143-2161
3727	AD- 59432	3728	GU AUGAUCGUUUUCUUUGAGdTdT	CUCAAAAGAAACGAUCAUACdTdT	931-949
3729	AD- 59382	3730	UAUCCAGAUGGUCUUCAGAdTdT	UCUGAAGACCAUCUCUGGAUAdTdT	2302-2320
3731	AD-	3732	UAGUGUGAAAACCGAUGGAdTdT	UCCAUCGGUUUUUCACACUAdTdT	799-817

[0997]

	59472	UCCCCAUGGCAGAGACUAAdTdT	UAGUCAUCUGCCAUAGGGGAdTdT	1023-1041
3733	AD- 3734 59459			
3735	AD- 3736 59413	CCACUGCAGCAGUACACUAAdTdT	UAGUGUACUGCUGCAGUGGdTdT	483-501
3737	AD- 3738 59478	CUGUGAACCGCGGAGCACAdTdT	UGUGCUCGCCGGUUCACAGdTdT	999-1017
3739	AD- 3740 59376	GGUCCUAUGCUGCUGGCUUdTdT	AAGCCAGCAGCAUAGGACCdTdT	1731-1749
3741	AD- 3742 59556	AGCCUUUGGUUGUGUUGGAdTdT	UCCAAACACAACCAAGGCUdTdT	1672-1690
3743	AD- 3744 59399	AAUUCCAUGUGGACUUAGAdTdT	UCUAAGUCCACAUGGAUUdTdT	1200-1218
3745	AD- 3746 59474	CCAGGGCACUGCAAGCAAAdTdT	UUUGCUUGCAGUGCCCCUGGdTdT	640-658
3747	AD- 3748 53542	cuuuucAGuAuGAucGuuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsdt	924-942
3749	AD- 3750 59480	GAAUCAGAGAGGCAGAGUdTdT	ACUGCUGCCUCUCUGAUUCdTdT	682-700
3751	AD- 3752 59549	GCAAAGAUCUGACCCCUCAAdTdT	UGAGGGGUCAGAUUUUUGCdTdT	1441-1459
3753	AD- 3754 59515	GGAGAAGAGCUCUACGGAdTdT	UCCGUAGGAGCUCUUCUCCdTdT	2033-2051
3755	AD- 3756 59427	CCAUGAGUUUGGAGCAUUCdTdT	GAUUGCUCCAAACUCAUGGdTdT	1540-1558
3757	AD- 3758 59390	CUUUGAGAAAAAAAUUGAUdTdT	AUCAAUUUUUUUUCUCAAAGdTdT	943-961

[0998]

3759	3760	AD- 59511	UGAGCAGACAUAACAUCUAdTdT	UAGAUGUUAUGUCUGCUCAdTdT	1980-1998
3761	3762	AD- 59532	CGUGCAAAGCAAUCAAUACdTdT	GUAAUUGAUUGCUUGCACGdTdT	1999-2017
3763	3764	AD- 59562	AAAGCAAAGACCAGAAAGAdTdT	UCUUUCUGGUCUUUUGCUUUdTdT	862-880
3765	3766	AD- 59513	GGAUUGGCAGGAAAUAGAAUdTdT	AUUCAUUCCUGCACAUCCdTdT	733-751
3767	3768	AD- 59362	CAGCAUACUUCUCUGAACAUdTdT	AUGUUCAGGAAGUAUGCUGdTdT	321-339
3769	3770	AD- 53541	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT	671-689
3771	3772	AD- 59490	UCUGUUGUUCUAUGCCCCAAdTdT	UUGGGCAUAGAAACAACAGAdTdT	412-430
3773	3774	AD- 59422	UGAGACAGAUGCUA AUGGAdTdT	UCCAUAAGCAUCUGUCUCAdTdT	1869-1887
3775	3776	AD- 59467	GCCAAUGACUCAACCCUCUdTdT	AGAGGGUUGAGUCAUUGGCCdTdT	1280-1298
3777	3778	AD- 59579	GAGUGCAACUUCUCGACGGAdTdT	UCCUGCAGAAAGUUGCACUCdTdT	2159-2177
3779	3780	AD- 59426	GUGAAAGAGAGAAAGUCCUAdTdT	UAGGACUUCUCUCUUUUCACdTdT	2202-2220
3781	3782	AD- 59363	UAACUUUGCCAAAUAUCUGUUDdTdT	AACAGAUUUUUGGCAAGUUAAdTdT	901-919
3783	3784	AD- 59436	AAGCCAGUCUUGAGCUUCAdTdT	UGAAGCUCAAAGACUGGCCUUdTdT	711-729
3785	3786	AD-	cAcuuuucAGuAuGAnGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAGUGdTsdT	922-940

[0999]

		53536		GCAGCAGUGUCUUCUGCAAdTdT	UUGCAGAAAGACACUGCUGCdTdT	693-711
3787	3788	AD- 59491				
3789	3790	AD- 59500		UCCUGAACAUUGGAGAGUGUdTdT	ACACUCUCCAUGUUCAGGAdTdT	330-348
3791	3792	AD- 59394		AUUUCUGGGAACACUUGGCAdTdT	UGCCAAAGUGUUCCAGAAAUdTdT	1652-1670
3793	3794	AD- 59441		CAGUACACUACCAACAGAUdTdT	AUCUGUUGGUAGUGUACUGdTdT	492-510
3795	3796	AD- 59365		GCAUGACCUCAAUUAUUUCdTdT	GAAAUAAUUGAGGUCAUGCdTdT	2261-2279
3797	3798	AD- 59411		AGAACUGCUGCAAGAUcUdTdT	AGAUcUUUGCAGCAGUUCUdTdT	1432-1450
3799	3800	AD- 59544		CACCCCAGAUGAUAUAdTdT	UAGUUCAUCAUCUGGGUGdTdT	2073-2091
3801	3802	AD- 59428		GAUCCAAGGGAUUUCGAAACpTdT	GUUUCGAAUCCCUUGGAUCpTdT	1363-1381
3803	3804	AD- 59471		CUCAUCACCAAAAAGCAAGdTdT	CUUGCUUUUUGGUGAUGAGdTdT	1052-1070
3805	3806	AD- 59518		ACAACAUGGUGCUGGGGCAdTdT	UGCCCCAGCACCAUGUUGUpTdT	1150-1168
3807	3808	AD- 53547		GAucGuuucuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUCUcAAAAGAAACGAUCdTsdT	935-953
3809	3810	AD- 59573		CAGCACGAGUUCUCUGAUUdTdT	AAUCAGAGAAACUCGUGCUGdTTdT	1702-1720
3811	3812	AD- 59473		AAUGAUGUCAGCCACCUCAdTdT	UGAGGUGGCUGACAUCAUUpdTdT	1412-1430

[1000]

3813	3814	AD- 59412	AGUUAUGGACACUUAUUGAAAdTdT	UUUCAAAGUGUCCAUAACUdTdT	1132-1150
3815	3816	AD- 59522	GAUGAUGAACUACUUCUUAUdTdT	AAGGAAGUAGUUCAUCAUCdTdT	2080-2098
3817	3818	AD- 59502	GCAGGAAAUAGAAUGCCGUGdTdT	CACGGCAUUCAUUUCCUGCdTdT	739-757
3819	3820	AD- 59499	UCUUCAGAUAAACUUGCCAAdTdT	UGGCAAGUUACUUAUGAAGAdTdT	892-910
3821	3822	AD- 59520	CGAUGGAGGGGAUCCCAGUdTdT	ACUGGGAUCCCCUCCAUCGdTdT	811-829
3823	3824	AD- 59581	CCAAAAGCAAGUGUCAGUdTdT	ACUGACACUUGCUUUUUUGGdTdT	1059-1077
3825	3826	AD- 59461	GAUUGGGGAUCCGGAUGGAdTdT	UCCAUCCCCGAUCCCCCAUCdTdT	1612-1630
3827	3828	AD- 59370	CCCUGGAGUCUGUGCGGAUdTdT	AUCCGCACAGACUCCACGGGdTdT	1791-1809
3829	3830	AD- 53540	GuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	AUUcAcAuAuAAAAGAcAACdTsdt	2321-2339
3831	3832	AD- 59574	CGGGCAUUGUCCACUGCAGdTdT	CUGCAGUGGACAAUGCCCCGdTdT	473-491
3833	3834	AD- 59375	UAUUCAGACUCCCCUCAUCAdTdT	UGAUGAGGGAGUCUGAAUAdTdT	1040-1058
3835	3836	AD- 59387	CACUGCAUUUUGAAGUGAUdTdT	AUCACUUCAAAUAGCAGUGdTdT	2181-2199
3837	3838	AD- 59397	CCAGAAAGAGUGUCUCAUCdTdT	GAUGAGACACUCUUUCUGGdTdT	872-890
3839	3840	AD-	AGGCGGAGGGAUUGGGGAUdTdT	AUCCCCAAUCCCCUCCGCCUdTdT	1603-1621

[1001]

		59396		AGACCUCCAUGGGAAGAAdTdT	AUCUUUCCCAUGGAGGUCUdTdT	1231-1249
3841	3842	AD- 59393				
3843	3844	AD- 59483		GCAGAGGCCACUGCAUUUdTdT	AAAUGCAGUGGCCUCCUGCdTdT	2172-2190
3845	3846	AD- 59430		AUCUGUUUCCACUUUCAGdTdT	CUGAAAAGUGGAAACAGAUdTdT	913-931
3847	3848	AD- 59463		AGAGAAGUCCUAUUUCUCAdTdT	UGAGAAAUAGGACUUCUCUdTdT	2209-2227
3849	3850	AD- 53534		GucuuAGAGuuGucuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdt	2312-2330
3851	3852	AD- 59514		GGCUGGAACUGAAGCCUCAdTdT	UGAGGCUUCAGUUCCAGCCdTdT	2130-2148
3853	3854	AD- 59575		GCCAUUAUCAUAUCCAGAUdTdT	AUCUGGAUAUGAUAAUGGCdTdT	2292-2310
3855	3856	AD- 59364		AGCAGGCCCCAGUGUGGUUdTdT	AACCACACUGGGGCCUdTdT	781-799
3857	3858	AD- 59402		UCAGCUGAGUGCAACUUCUdTdT	AGAAGUUGCACUCAGCUGAdTdT	2153-2171
3859	3860	AD- 59479		GAGCACACAUCUUCCCCAUdTdT	AUGGGGAAGAUUGUGUCUCdTdT	1011-1029
3861	3862	AD- 59481		ACUUCCAGGACAUCAUGCAdTdT	UGCAUGAUGUCCUGGAAAGUdTdT	843-861
3863	3864	AD- 59530		CCUAUCGAGUUUUUAAAACdTdT	GUUUUAAAAACUCGUAAGGdTdT	981-999
3865	3866	AD- 59582		CUUCCUUGAGAAUCUGCUAdTdT	UAGCAGAUUCUCAAGGAAGdTdT	2092-2110

[1002]

3867	3868	AD- 59506	ACCAACAGAUCAAAGAAACdTdT	GUUUCUUUGAUCUGUUGGUdTdT	501-519
3869	3870	AD- 59567	UAACCCAGGCCAUUAUCAdTdT	UGAUAAUGGCCUCGGGUUAAdTdT	2283-2301
3871	3872	AD- 59485	CCAUGCCUCCAUGAUCCAAdTdT	UUGGAUCAUGGAGGCAUGGdTdT	1351-1369
3873	3874	AD- 59525	UGAUGAACUA AUGAGCAGAdTdT	UCUGCUAUUA GUUCAUCAdTdT	1969-1987
3875	3876	AD- 59566	CCUGAAGAGCGCUGAGGGAdTdT	UCCUCAGCGCUCUUCAGGdTdT	1810-1828
3877	3878	AD- 59580	AACACUUGGCAAAAGCCUUdTdT	AAAGGCUUUGCCAAAGUGUUDdTdT	1660-1678
3879	3880	AD- 59512	UCUGCAGAAAGCAGGCAAdTdT	UUUGCCUCCUUUCUGCAGAdTdT	391-409
3881	3882	AD- 59475	CCGGCCUCCCUUGUUGUCCAdTdT	UGGACAAACAGGGAGGCCGGdTdT	1890-1908
3883	3884	AD- 59438	CAUCAUCCCUUGUGCGGGUdTdT	AACCCGCACAGGGAUGAUGdTdT	1921-1939
3885	3886	AD- 59442	UGUGCGGGUUGCAGAUUGCdTdT	AGCAUCUGCAACCCGCACAdTdT	1930-1948
3887	3888	AD- 59516	GGAAAGAGGUUGCUGAAACdTdT	GUUUCAGCAACCUCUUUCCdTdT	759-777
3889	3890	AD- 59429	AGGUCCACGCAGUGGGGCUdTdT	AGCCCCACUGCGUGGACCUdTdT	1572-1590
3891	3892	AD- 59510	UGCCGUGAGGAAAGAGGUdTdT	AACCUCUUUCCUCACGGCAdTdT	751-769
3893	3894	AD-	GCUAAUGGAUGCCGGCCUCdTdT	GAGGCCGGCAUCCAUAUAGCdTdT	1879-1897

[1003]

	59457	GAAGCAAGUGGGGCUGGAAdTdT	UCCAGCCCCACUUGCUUCdTdT	2119-2137
3895	AD- 3896 59434			
3897	AD- 3898 59454	CAUCUCCGCCACAAUGAUdTdT	AUCAUUGUGGCGGAAGAUGdTdT	1399-1417
3899	AD- 3900 59468	AUUUCUCAGGCUUUGAGCAAdTdT	UUGCUCAAAGCCUGAGAAAUdTdT	2220-2238
3901	AD- 3902 59565	CCCGAGUCCCCCAGGCCUUpdTdT	AAGCCUGGGGGACUCGGGdTdT	372-390
3903	AD- 3904 59416	CAAGCAAAUGCCCCUUCUdTdT	AGGAAAGGGCAUUUGCUUGdTdT	651-669
3905	AD- 3906 59420	CCCCUCAGUCCCCCAAGAUUpdTdT	AAUCUUGGGGACUGAGGGGdTdT	1453-1471
3907	AD- 3908 59552	CUACGGUGCCCCCGGGGAGAdTdT	UCUCCCCGGGGCACCCGUAGdTdT	2019-2037
3909	AD- 3910 59558	AAAACUGCCCCCAAGAUAdTdT	AUCAUCUUGGGGCAGUUUdTdT	429-447
3911	AD- 3912 59404	ACAAAACUGCUAAGGCCAAAdTdT	UUGGCCUUAGCAGUUUUGUdTdT	540-558
3913	AD- 3914 59455	GAUUCUGGGGAACCAUGCCUdTdT	AGGCAUGGUUCCCCAGAAUCdTdT	1340-1358
3915	AD- 3916 59496	CCAGAUGGCACACAGCUUCdTdT	GAAGCUGUGUGCCCAUCUGGdTdT	593-611
3917	AD- 3918 59446	AGGGAUUCGAAACAGCCGAdTdT	UCGGCUGUUUCGAAUCCCCUdTdT	1369-1387
3919	AD- 3920 59435	CUCUGCAGUCCUCAGCGCAdTdT	UGCGCUGAGGACUCGACAGAdTdT	109-127

[1004]

3921	3922	AD- 59419	CCGCCGCCUCUCAGUCCUdTdT	AGGACUGCAGAGCGCGGdTdT	102-120
3923	3924	AD- 59533	CUGGCUGGAGCCCUUGAGUdTdT	ACUCCAGGCUCCAGCCAGdTdT	1781-1799
3925	3926	AD- 59366	GACAUCAUGCAAAGCAAAdTdT	UUUGCUUUUGCAUGAUGUCdTdT	851-869
3927	3928	AD- 59521	GCUUGAGCAAGUUGGUAUCdTdT	GAUACCAACUUUGCUCAAAGCdTdT	2229-2247
3929	3930	AD- 59563	CAGGCUGUGAGAUUACUCdTdT	GAGUAAAUUCUCACAGCCUGdTdT	1320-1338
3931	3932	AD- 59534	AGAGCUGUGUGAUGUGGCCdTdT	GGCCACAUCACACAGCUCUCdTdT	1522-1540
3933	3934	AD- 59407	GGAGCUGGCAGACCUCCAUdTdT	AUGGAGGUCUGCCAGCUCUCCdTdT	1222-1240
3935	3936	AD- 59445	AUCCCAGUGGACUCUGCAAAdTdT	UUCAGCAGUCCACUCUGGGAUdTdT	822-840
3937	3938	AD- 59546	GUCAAACUCAUGAGACAGAdTdT	UCUGUCUCAUGAGUUUGACdTdT	1859-1877
3939	3940	AD- 59456	CUUUCCUGGCAGCACAGAUdTdT	AUCUGUGCUGCCAGGAAAGdTdT	663-681
3941	3942	AD- 59503	CCCUCGGCCAGUGAGAAAdTdT	UUUCUCACUGGCCGAGGGdTdT	520-538
3943	3944	AD- 59536	CUACCUAGGAAUGAGUCGCdTdT	GCGACUCAUUCUAGGUAGdTdT	1093-1111
3945	3946	AD- 59385	CCCAAGAUUGUGGCAUUUGdTdT	CAAAUGCCACAUCUUGGGdTdT	1463-1481
3947	3948	AD- 59419	GAGCAAUACACCUUCUGGAdTdT	UCCACGAAGGUGAUUGCUCdTdT	1551-1569

[1005]

		59367		UGCCCAUUCUUAUCCCCGAGdTdT	CUCGGGAUAAGAAUGGGCAdTdT	359-377
3949	3950	AD- 59458				
3951	3952	AD- 59381		AAGGCCAAGGUCCAACAGAdTdT	UCUGUUGGACCUUUGGCCUdUdTdT	551-569
3953	3954	AD- 59538		CACACAGCUUCCGUCUGGAdTdT	UCCAGACGGAAGCUGUGUGdTdT	601-619
3955	3956	AD- 59421		UUAUGGGGCUCCGAGCGGAdTdT	UCCGCCUCGAGCCCCAUAdTdT	1591-1609
3957	3958	AD- 59388		UGUCUUCUGCAAAGCCAGUdTdT	ACUGGCUUUGCAGAGAAGACAdTdT	700-718
3959	3960	AD- 59444		AGGCCUGAGCAUGACCUCAdTdT	UGAGGUCAUGCUCAGGCCUdTdT	2253-2271
3961	3962	AD- 59528		AUGUGAAUUAAGUUAUAUdTdT	AAUAUAACUUAUAUUCACAUTdTdT	2332-2350
3963	3964	AD- 59498		ACUGCUGAAGAACUUCACGdTdT	CUGGAAGUUCUUCAGCAGUdTdT	832-850
3965	3966	AD- 59497		UGAGAAAGACAAACUGCUdTdT	AGCAGUUUUGUCUUUCUCAdTdT	532-550
3967	3968	AD- 59384		UCAGCCACCUCAGAGAACUdTdT	AGUUCUCUGAGGUGGCUGAdTdT	1419-1437
3969	3970	AD- 59452		GGCAACGAGCGUUUCGUUUdTdT	AAACGAAACGCUCUGUUGCCdTdT	51-69
3971	3972	AD- 59379		CCUGAUGGAUCCCAGCAGAdTdT	UCUGCUGGGAUCCAUCAGGGdTdT	572-590
3973	3974	AD- 59529		UGUGCCCACUGGAAGAGCUdTdT	AGCUCUCCAGUGGGCACAdTdT	1509-1527

[1006]

3975	3976	AD- 59389	CCACAGGAGCCAGCAUACUdTdT	AGUAUGCUGGCUCUCCUGUGGdTdT	311-329
3977	3978	AD- 59585	GUGGUACUAGAAUUAUUUCpTdT	GAAAUUUUCUAGUACCACdTdT	1170-1188
3979	3980	AD- 59570	UUCGCCGUCGCCCAUUCUdTdT	AAGAAUGGGCAGCGGCGAAdTdT	351-369
3981	3982	AD- 59415	CCGCCAGCACCCAGCGCAACpTdT	GUUGCGCUGGUGCUGGCGGdTdT	1840-1858
3983	3984	AD- 59505	CGCUGAGGGACGGGUGCUUdTdT	AAGCACCCGUCUCCUCAGCGdTdT	1819-1837
3985	3986	AD- 59557	UGGACUUCUCGACUUGAGUdTdT	ACUCAAGUCGAGAGUCCAdTdT	69-87
3987	3988	AD- 59548	AAAGAAACCCUCCCGGCCAdTdT	UGGCCGGAGGGUUUCUUUdTdT	512-530
3989	3990	AD- 59487	UUGACACCGUACGGUCCUAdTdT	UAGGACCGUACGGUGUCAAdTdT	1719-1737
3991	3992	AD- 59550	CCCUUCUACCCUUGGCUAAdTdT	UUAGCCAGGGUGAAGAGGGdTdT	1293-1311
3993	3994	AD- 59572	CCCCCAGGCCUUUCUGCAGdTdT	CUGCAGAAAGGCCUUGGGGGdTdT	379-397
3995	3996	AD- 59554	AUGCCCAAAACUGCCCCAAdTdT	UUUGGGCAGUUUUUGGGCAUdTdT	423-441
3997	3998	AD- 59437	CUUGAGUGCCCCGCCUCCUdTdT	AAGGAGCGGGCACUCAAGdTdT	81-99
3999	4000	AD- 59584	GGGUACAUCGCCCAGCACGAdTdT	UCGUGCUGGCGAUGUACCCdTdT	1691-1709
4001	4002	AD- 59584	GUGUGGGGCAGUUAUGGACpTdT	GUCCAUAACUGCCCCACACdTdT	1123-1141

[1007]

		59373	ACAUAGUCCUGGAAUAAAdTdT	UUUAUUUCCAGGACUUAUGUdTdT	2372-2390
4003	4004	AD- 59545			
4005	4006	AD- 59547	AUCCAGCAGAGUCCAGAUdTdT	AUCUGGACUCUCUGGGGAUdTdT	580-598
4007	4008	AD- 59470	CUAGAUUCUUUCCACAGGAdTdT	UCCUGUGGAAAGAAUUCUAGdTdT	300-318
4009	4010	AD- 59417	UUUUUUUCCUCGUGCUUUGdTdT	CAAAGCACGAGGAAAACAAAdTdT	1259-1277
4011	4012	AD- 59535	CCUCCUUCGCCGCCGCCUCdTdT	GAGGCGGGCGGAAGGAGGdTdT	93-111
4013	4014	AD- 59507	UGAGGCUCUCCCCGGACAAAdTdT	UUUCCCGGGAGCAGCCUCAdTdT	31-49
4015	4016	AD- 59519	CCAAACAGACUCCUGAUGGAdTdT	UCCAUACAGGAGUCUGUUGGdTdT	562-580
4017	4018	AD- 59391	UCACAUGGAAGCAAGUGGGdTdT	CCCACUUUCUCCAUUGUGAdTdT	2112-2130
4019	4020	AD- 59537	CAUUCAAUGGAUGGGGCGGdTdT	CCGCCCCAUCCAUUGAAUGdTdT	1490-1508
4021	4022	AD- 59450	AGGAAUGAGUCGCCACCCAdTdT	UGGUGGGCGACUCAUUCUdTdT	1099-1117
4023	4024	AD- 59449	UGGACUUAGAGCGGGAGCUdTdT	AGCUCCCGCUCUAAGUCCAdTdT	1209-1227
4025	4026	AD- 59418	CUAAAAACACAGAAAGUCUGdTdT	CAGACUUCUGUGUUUUUAGdTdT	1950-1968
4027	4028	AD- 59561	CCCUCACACACACCCAGdTdT	CUGGGGUGUGUGGUGAGGGdTdT	2062-2080

[1008]

4029	4030	AD- 59460	AAUCCUUGCUUCAGGGACUdTdT	AGUCCCUGAAGCAAGGAUUdTdT	171-189
4031	4032	AD- 59409	UUGUGGCAUUUGAAACUGUdTdT	ACAGUUUCAAAUGCCACAAdTdT	1470-1488
4033	4034	AD- 59476	UCAAUUACCCUACGGUGCCdTdT	GGCACCGUAGGGUAAUUGAdTdT	2010-2028
4035	4036	AD- 59406	CAAGCCAGCCCCUCGGGCAdTdT	UGCCCAGGGGCGUUGCUUGdTdT	460-478
4037	4038	AD- 59569	GAGUCUCCCUGCCUGGAUdTdT	AUCCAGGCAGGGAAGACUCdTdT	259-277
4039	4040	AD- 59451	UGGAGAGUGUUGUUCGCCGdTdT	CGGCGAACAAACACUCUCCAdTdT	339-357
4041	4042	AD- 59553	ACCCCUUGCCUGCCACAAAGdTdT	CUUGUGGCAGGCAAGGGGUdTdT	621-639
4043	4044	AD- 59372	CUGGAUGGAUGAGUGGCUUdTdT	AAGCCACUCAUCCAUCCAGdTdT	272-290
4045	4046	AD- 59377	CAAGAUGAUGGAAGUUGGGdTdT	CCCAACUCCAUCAUCUUGdTdT	439-457
4047	4048	AD- 59531	UUUCGUUUGGACUUCUCGAdTdT	UCGAGAAGUCCAAACGAAAdTdT	62-80
4049	4050	AD- 59560	UCAUCUUCACCAACCUCUCUdTdT	AGAGAGGUGGUGAAGAUGAdTdT	1749-1767
4051	4052	AD- 59489	UGCCCCAGUUCUUCGCCGUGdTdT	CAGCGGGAAGAACUGGGCAdTdT	132-150
4053	4054	AD- 59540	AAAAUGGACAUCAUUUCUdTdT	AGAAUUGAUGUCCAUUUUUdTdT	1639-1657
4055	4056	AD-	CUUGAGCUUUCAGGAGGAUGdTdT	CAUCCUCCUGAAGCUCAAAGdTdT	719-737

[1009]

		59378	CCUCUCUGCCACCCAUAGCUdTdT	AGCAUGGGUGGCAGAGAGGdTdT	1761-1779
4057	4058	AD- 59403			
4059	4060	AD- 59493	AAAGUCAGGAUCCCUAAGAdTdT	UCUAGGGAUCCUGACUUUdTdT	242-260
4061	4062	AD- 59374	CGACCACGGAGGAUCCCUdTdT	AAGGAUUCCUCCGUGGUCGdTdT	159-177
4063	4064	AD- 59380	UUCCGUCUGGACACCCCUdTdT	AAGGGGUGUCCAGACGGAAdTdT	609-627
4065	4066	AD- 59576	CCACCCAUUGCUGGCUGdTdT	CAGCCAGCAGCAUGGGUGGdTdT	1769-1787
4067	4068	AD- 59425	UGAGAAAAGAAUGACCACdTdT	GUGGUCAUUCUUUUUCUCAdTdT	961-979
4069	4070	AD- 59509	UAAGAUGAUGCCAGGCUGUdTdT	ACAGCCUGGCAUCAUCUUAdTdT	1309-1327
4071	4072	AD- 59488	AGUUAUAUUAUUUUAAUdTdT	AUUAAAUUUUAUAUAACUdTdT	2342-2360
4073	4074	AD- 59486	UCUCCCCGCUUGGGGACAdTdT	UGUCCCCACAGCGGGAAGAdTdT	140-158
4075	4076	AD- 59465	UGCCACAAGCCAGGCACUdTdT	AGUGCCCUGGCUUUGUGGCAdTdT	631-649
4077	4078	AD- 59484	AGCGCAGUUAUGCCCCAGUdTdT	AACUGGGCAUAACUGCGCUdTdT	122-140
4079	4080	AD- 59368	GGACCAGGAGAAAAGUCAGGGdTdT	CCUGACUUUCUCCUGGUCCTdTdT	232-250
4081	4082	AD- 59464	UGUCCACUGCCCCAGCCACdTdT	GUGGCUGGGGCAGUGGACAdTdT	1903-1921

[1010]

4083	4084	AD- 59386	AUCGCGGCCUGAGGCUGCUTdT	AGCAGCCUCAGGCGCGGAUdT	22-40
4085	4086	AD- 59439	GGGAUGUGGGGACCAGGAdT	UCCUGGUCCCCACAUCCCCdT	222-240
4087	4088	AD- 59440	CUGGAAUAAAUUCUUGCUdT	AGCAAGAAUUUAUUUCCAGdT	2380-2398
4089	4090	AD- 59542	UUGAAACUGUCCAUAUdT	AUUGAAUGGACAGUUUCAAdT	1479-1497
4091	4092	AD- 59559	GUGGGACACGACCACGGAdT	UCCGUGGUGUGUCCCCACdT	150-168
4093	4094	AD- 59586	CGCAGUGGGGUUAUGGGdT	CCCAUAAAGCCCCACUGCGdT	1579-1597
4095	4096	AD- 59408	UUGUCUUUAUAUGUGAAUdT	AAUUCACAUAUAAAGACAAdT	2322-2340
4097	4098	AD- 59568	UCACCCUGGCUAAGAUAUdT	AUCAUCUUAAGCCAGGGUGAdT	1299-1317
4099	4100	AD- 59398	GUUUCUGCUCAGGCCUGAGdT	CUCAGGCCUGAGCAGAUACdT	2243-2261
4101	4102	AD- 59508	AUGAGUGGCUUCUUCUCCAdT	UGGAGAGAAAGCCACUCAUdT	280-298
4103	4104	AD- 59523	GAAGUUGGGGCCAAGCCAGdT	CUGGCUUGGCCCCAACUUCdT	449-467
4105	4106	AD- 59410	UCAGGGACUCGGGACCCUGdT	CAGGUCCCCGAGUCCCUAGAdT	181-199
4107	4108	AD- 59541	UCCUACGGAUUGCCCCCACdT	GUGGGGCAAUCCGUAGGAdT	2043-2061
4109	4110	AD- 59541	UUACUCUGAUUCUGGGAACdT	GUUCCAGAAUCAGAGUAAdT	1333-1351

[1011]

		59524		AUCCCCUAAAGAGUCUCCCCUdTdT	AGGGAAGACUCUUAGGGAUdTdT	251-269
4111	4112	AD- 59501		UGCCAAAAGUACAUCUUCCGdTdT	CGGAAGAUGUACUUGGCAdTdT	1389-1407
4113	4114	AD- 59383		UCCUCGGGUUUAGGGGAUGdTdT	CAUCCCCUAAACCCGAGGAdTdT	210-228
4115	4116	AD- 59577		UGCUGAAACCUCAGCAGGCdTdT	GCCUGCUGAGGUUUCAGCAdTdT	769-787
4117	4118	AD- 59447		CCACCCACGGGUGUGUGGGdTdT	CCCACACACCCGUGGGUGGdTdT	1111-1129
4119	4120	AD- 59555		UGGUGCAGUAAUGACUACCCdTdT	GGUAGUCAUUAUCUGCACCAAdTdT	1079-1097
4121	4122	AD- 59405		UUCUCCACCUAGAUAUUCUUdTdT	AAAGAAUCUAGGUGGAGAAAdTdT	292-310
4123	4124	AD- 59371		UAAGGCGCCGCGAUCGCGdTdT	CGCGAUCGCCGCGGCCUUAdTdT	9-27
4125	4126	AD- 59443		UGGAACUAGUAAAUAUCCAUpdTdT	AUGGAAUUUACUAGUCCAdTdT	1189-1207
4127	4128	AD- 59401		GGACCCUGCUGGACCCCUUpdTdT	AAGGGUCCAGCAGGGUCCdTdT	192-210
4129	4130	AD- 59494		UCAAUUAUUUCACUUAACCCdTdT	GGUUAAGUGAAAUAAUUGAdTdT	2269-2287
4131	4132	AD- 59504		CCCGACAAGGGCAACGAGdTdT	CUCGUUGCCCUUGUCCGGGdTdT	41-59
4133	4134	AD- 59369		UUUUAAAACUGUGAACCGGdTdT	CCGGUUCACAGUUUUAACAdTdT	991-1009
4135	4136	AD- 59571				

[1012]

4137	4138	AD- 59527	GUGCUUCGCCGCCAGCACCCpTdT	GGUGCUGGCGGCGAAGCACdTdT	1832-1850
4139	4140	AD- 59466	UGGACCCCUUCCUCGGGUUpTdT	AACCCGAGGAAGGGUCCAdTdT	201-219
4141	4142	AD- 59526	CUGUAUAUUAAGGCGCCGpTdT	CCGGCGCCUUAUAUACAGdTdT	1-19
4143	4144	AD- 59543	UUGCCCCACCCUCACCApTdT	UGGUGAGGGGUGGGGGCAAdTdT	2052-2070
4145	4146	AD- 59564	AUGGGCGGUGUGCCCAcUpTdT	AGUGGCACACCGCCCCAUdTdT	1500-1518
4147	4148	AD- 59583	CUAUAUAUAAAAUAGUCpTdT	GACUAUGUUUUUACUUAUAGdTdT	2361-2379

[1013] 在用Lipofectamine2000作为转染剂进行转染的Hep3B细胞中,以单剂量筛选,对siRNA在压制ALAS1mRNA中的体外活性进行了检验。单剂量实验以10nM双链体浓度进行并且

通过分支DNA (bdNA) 测定法进行分析。结果示于表19中并且表示为剩余mRNA百分数。

[1014] 表19:通过bdNA测定法评估的ALAS1mRNA的压制

[1015]

双链体	% 剩余mRNA	SD
AD-59453	11.2	1.5
AD-59395	12.7	1.1
AD-59477	14.5	2.0
AD-59492	14.8	2.1
AD-59361	15.1	4.9
AD-59462	15.4	2.6
AD-59433	15.8	2.7
AD-59424	16.0	1.7
AD-59414	16.1	1.3
AD-59539	16.2	2.6
AD-59400	16.2	1.8
AD-59551	16.3	2.3
AD-59482	16.6	2.1
AD-59448	16.6	3.7
AD-59392	16.9	3.5
AD-59469	16.9	2.2
AD-59431	17.0	2.0
AD-59423	17.1	3.8
AD-59517	17.2	1.5
AD-59578	17.3	3.1
AD-59495	17.7	3.7
AD-59432	17.7	2.8
AD-59382	17.9	3.2
AD-59472	18.6	3.5
AD-59459	18.7	3.8
AD-59413	18.8	2.4
AD-59478	18.9	3.0
AD-59376	18.9	3.2
AD-59556	18.9	2.4
AD-59399	19.0	4.1
AD-59474	19.4	1.6
AD-53542	19.4	1.7
AD-59480	19.6	1.6

[1016]

AD-59549	19.7	2.1
----------	------	-----

AD-59515	19.8	4.4
AD-59427	19.9	3.2
AD-59390	19.9	3.4
AD-59511	19.9	2.2
AD-59532	20.0	2.4
AD-59562	20.2	2.6
AD-59513	20.3	3.9
AD-59362	20.6	2.5
AD-53541	20.6	2.2
AD-59490	20.7	2.3
AD-59422	20.8	4.5
AD-59467	21.2	2.3
AD-59579	21.2	3.3
AD-59426	21.7	2.3
AD-59363	21.7	2.7
AD-59436	21.7	2.7
AD-53536	21.9	1.5
AD-59491	21.9	2.6
AD-59500	22.2	2.8
AD-59394	22.3	10.1
AD-59441	22.3	2.6
AD-59365	22.4	4.2
AD-59411	22.5	2.9
AD-59544	22.5	2.1
AD-59428	22.7	4.7
AD-59471	22.9	5.0
AD-59518	22.9	2.3
AD-53547	22.9	1.5
AD-59573	23.0	4.2
AD-59473	23.2	1.8
AD-59412	23.4	2.5
AD-59522	23.4	3.3
AD-59502	23.6	2.7
AD-59499	23.6	1.6
AD-59520	23.8	3.8
AD-59581	23.9	6.0
AD-59461	24.3	4.2
AD-59370	24.3	5.6
AD-53540	24.4	2.1

AD-59574	24.5	2.0
[1017]		
AD-59375	24.6	2.3
AD-59387	24.8	7.2
AD-59397	24.9	9.6
AD-59396	25.0	10.2
AD-59393	25.3	11.6
AD-59483	25.4	3.8
AD-59430	25.5	1.8
AD-59463	25.6	4.8
AD-53534	25.9	3.1
AD-59514	26.2	5.7
AD-59575	26.2	3.2
AD-59364	26.2	4.5
AD-59402	26.3	3.1
AD-59479	26.3	2.5
AD-59481	26.4	2.2
AD-59530	26.4	4.4
AD-59582	26.6	3.9
AD-59506	27.0	4.1
AD-59567	27.3	1.1
AD-59485	27.7	4.7
AD-59525	28.3	3.1
AD-59566	28.5	0.6
AD-59580	28.7	7.1
AD-59512	29.5	2.5
AD-59475	29.6	4.2
AD-59438	29.6	3.3
AD-59442	29.9	2.8
AD-59516	30.4	3.8
AD-59429	30.8	4.3
AD-59510	31.3	1.9
AD-59457	31.4	1.2
AD-59434	31.6	3.5
AD-59454	32.0	1.9
AD-59468	32.2	3.2
AD-59565	32.4	1.5
AD-59416	32.7	1.7
AD-59420	33.2	3.1

AD-59552	33.2	2.2
AD-59558	33.8	3.8
AD-59404	34.0	5.4
AD-59455	34.8	1.3

[1018]

AD-59496	34.9	5.2
AD-59446	35.5	1.7
AD-59435	35.9	1.2
AD-59419	36.0	1.4
AD-59533	36.7	3.7
AD-59366	36.7	6.0
AD-59521	36.9	4.3
AD-59563	36.9	4.1
AD-59534	36.9	3.3
AD-59407	37.1	4.7
AD-59445	37.2	3.2
AD-59546	37.9	4.9
AD-59456	38.3	4.0
AD-59503	38.8	5.0
AD-59536	39.8	4.2
AD-59385	39.9	13.7
AD-59367	40.0	3.6
AD-59458	40.0	3.4
AD-59381	40.3	9.9
AD-59538	40.8	4.9
AD-59421	40.9	6.4
AD-59388	41.0	9.1
AD-59444	41.1	2.7
AD-59528	41.9	3.3
AD-59498	42.2	3.3
AD-59497	42.4	4.9
AD-59384	42.7	17.6
AD-59452	42.7	3.1
AD-59379	43.6	2.6
AD-59529	43.8	4.8
AD-59389	44.1	6.4
AD-59585	44.3	3.2
AD-59570	45.1	4.0
AD-59415	46.6	2.3

AD-59505	47.5	6.2
AD-59557	48.1	4.4
AD-59548	49.9	4.0
AD-59487	50.7	3.2
AD-59550	50.8	5.8
AD-59572	51.1	4.0
AD-59554	51.3	6.0

[1019]

AD-59437	52.2	4.8
AD-59584	54.9	2.7
AD-59373	55.3	20.1
AD-59545	55.4	3.4
AD-59547	55.9	4.7
AD-59470	56.0	2.7
AD-59417	56.4	7.7
AD-59535	57.6	5.1
AD-59507	58.8	4.7
AD-59519	59.1	5.6
AD-59391	60.1	12.5
AD-59537	60.6	9.1
AD-59450	60.7	7.2
AD-59449	61.6	6.8
AD-59418	61.8	8.4
AD-59561	62.2	7.2
AD-59460	62.8	4.7
AD-59409	64.4	9.0
AD-59476	65.2	5.6
AD-59406	65.6	3.5
AD-59569	66.7	7.6
AD-59451	66.9	2.9
AD-59553	67.2	8.8
AD-59372	67.3	25.6
AD-59377	68.7	5.1
AD-59531	68.7	9.0
AD-59560	68.7	12.7
AD-59489	69.6	8.9
AD-59540	70.1	10.1
AD-59378	70.6	14.1
AD-59403	71.4	3.3

AD-59493	72.3	3.5
AD-59374	75.9	5.1
AD-59380	76.4	11.1
AD-59576	77.5	16.2
AD-59425	77.9	10.6
AD-59509	78.0	3.2
AD-59488	78.6	7.1
AD-59486	79.4	5.0
AD-59465	79.5	5.1
AD-59484	79.8	3.2

[1020]

AD-59368	80.0	11.9
AD-59464	80.2	9.3
AD-59386	80.6	33.2
AD-59439	80.9	4.0
AD-59440	82.2	1.9
AD-59542	83.3	10.6
AD-59559	83.7	9.1
AD-59586	83.8	11.5
AD-59408	86.3	2.8
AD-59568	86.8	4.2
AD-59398	87.4	24.9
AD-59508	87.5	2.5
AD-59523	87.6	11.8
AD-59410	88.8	8.3
AD-59541	88.9	10.8
AD-59524	89.5	12.1
AD-59501	89.9	5.1
AD-59383	90.8	27.4
AD-59577	91.1	2.3
AD-59447	91.3	12.9
AD-59555	91.7	3.4
AD-59405	92.5	5.7
AD-59371	93.5	31.7
AD-59443	93.8	9.0
AD-59401	94.5	7.1
AD-59494	95.1	9.1
AD-59504	96.8	11.7
AD-59369	96.8	4.8

AD-59571	97.4	7.0
AD-59527	98.6	7.8
AD-59466	99.7	14.0
AD-59526	102.9	4.6
AD-59543	103.7	3.0
AD-59564	103.7	12.1
AD-59583	112.4	13.2

[1021] 在该单剂量测定中,所检验的232个双链体在不同程度上压制ALAS1mRNA。根据这一测定,至少这些双链体中的四个(AD-59453、AD-59395、AD-59477、和AD-59492)压制ALAS1mRNA 85%或更高,这些双链体中的39个压制ALAS1mRNA 80%或更高,这些双链体中的101个压制ALAS1mRNA 70%或更高,并且这些双链体中的152个压制ALAS1mRNA 50%或更高。相反,在这个测定中,一些双链体不显示可感知的压制。

[1022] 等同物

[1023] 利用不超出常规的实验,本领域技术人员将认识到,或将能够确定在此所描述的本发明具体实施例的许多等同物。此类等同物意在由以下权利要求书涵盖。

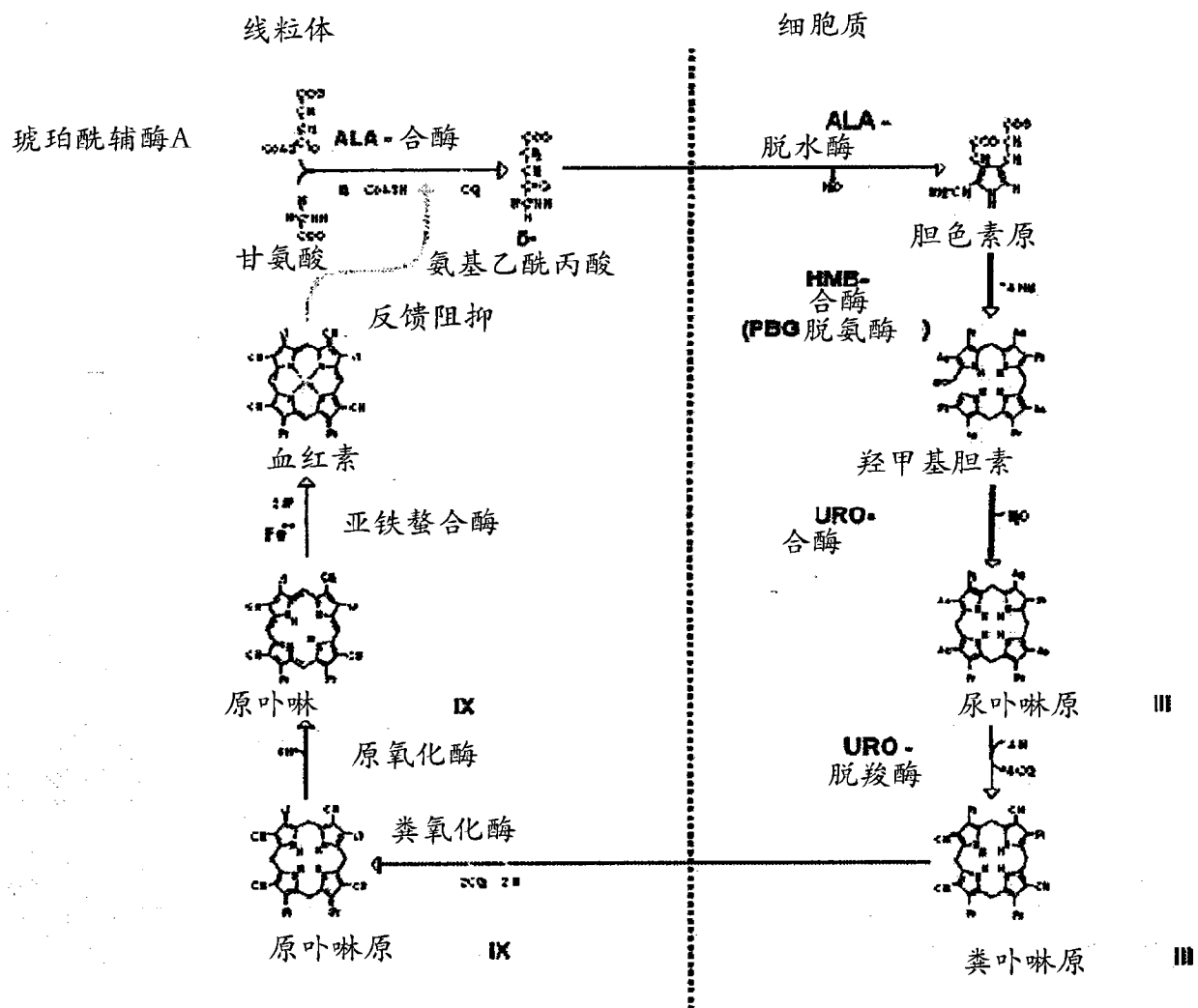


图1

酶 染色体位置	催化的反应	相关联的卟啉症	卟啉症的类型	典型遗传模式	典型症状
δ-氨基乙酰丙酸 (ALA) 合酶 1 3p21	甘氨酸 + 琥珀酰辅酶 A ↓ δ-氨基乙酰丙酸 (ALA)				
δ-氨基乙酰丙酸 (ALA) synthase 2 (ALAS2) (类红细胞特异性) Xp11.21	甘氨酸 + 琥珀酰辅酶 A ↓ δ-氨基乙酰丙酸 (ALA)	X-连锁的铁粒幼细胞贫血 (XLSA) X-连锁的原卟啉症 (XLP)	红细胞生成性	X-连锁的	
δ-氨基乙酰丙酸 脱水酶 (ALAD) 9q34	δ-氨基乙酰丙酸 (ALA) ↓ 胆色素原 (PBG)	ALA脱水酶缺乏卟啉症 (ADP或Doss卟啉症)	肝性	常染色体隐性	腹痛 神经病变
PBG脱氨酶 (PBGD) 或 羟甲基胆素合酶 (HMBS) 11q23	胆色素原 (PBG) ↓ 羟甲基胆素 (HMB)	急性间歇性卟啉症 (AIP)	肝性	常染色体显性	周期性腹痛 周围神经病变 精神障碍 心动过速

图2A

尿卟啉原III 合酶 (UROS) 10q26	羟甲基胆素 ↓ 尿卟啉原III (URO)	先天性红细胞 生成性卟啉症 (CEP)	红细胞生 成性	常染色 体隐性	具有红 斑、肿胀 和发疱的 严重光过 敏 溶血性贫 血 脾肿大
尿卟啉原脱 羧酶 (UROD) 1q34	尿卟啉原III (URO) ↓ 粪卟啉原III	迟发性皮肤卟 啉症 (PCT)	肝性	常染色体 显性或散 发性	具有囊泡 和大疱的 光过敏
粪卟啉原III 氧化酶 (CPOX)3q12	粪卟啉原III (COPRO) ↓ 原卟啉原IX	遗传性粪卟啉 症 (HCP)	肝性	常染色体 显性	光过敏 神经性症 状 腹绞痛
原卟啉原氧 化酶 (PPOX) 1q14	原卟啉原IX (PROTO) ↓ 原卟啉IX	杂斑卟啉症 (VP)	混合性	常染色体 显性	光过敏 神经性症 状 发育延迟
亚铁螯合酶 18q21.3	原卟啉IX ↓ 血红素	红细胞生成性 原卟啉症 (EPP)	红细胞生 成性	常染色体 隐性	具有皮肤 损害、胆 结石、轻 度肝功能 障碍的光 过敏

图2B

1 ctgtatatatta aggcgcgcgc gatcgcgccg tgaggctgct cccggacaag ggcaacgagc
61 gtttcgtttg gacttctcga cttgagtgcc cgctccttc gcgcgcgcct ctgcagtcct
121 cagcgcagtt atgcccagtt cttcccgcgtg tggggacacg accacggagg aatccttgct
181 tcagggactc gggaccctgc tggaccctt cctcgggttt aggggatgtg gggaccagga
241 gaaagtcagg atccctaaga gtcttcctg cctggatgga tgagtggctt cttctccacc
301 tagattcttt ccacaggagc cagcatactt cctgaacatg gagagtgttg ttcgcgctg
361 cccattctta tcccaggtcc cccaggcctt tctgcagaaa gcaggcaa atctgttgtt
421 ctatgcccaa aactgcccc aagatgatgga agttggggcc aagccagccc ctcgggcatt
481 gtccactgca gcagtacact accaacagat caaagaaacc cctccggcca gtgagaaaga
541 caaaactgct aaggccaagg tccaacagac tcctgatgga tcccagcaga gtccagatgg
601 cacacagctt ccgtctggac accccttgcc tgccacaagc cagggcactg caagcaa atg
661 ccccttctctg gcagcacaga tgaatcagag aggcagcagt gtcttctgca aagccagtct
721 tgagcttcag gaggatgtgc aggaatgaa tgccgtgagg aaagaggttg ctgaaacctc
781 agcaggcccc agtgtgtgta gtgtgaaaac cgatggaggg gatccagtg gactgctgaa
841 gaacttcag gacatcatgc aaaagcaaag accagaaaga gtgtctcctc ttcttcaaga
901 taacttgcca aaatctgttt ccacttttca gtatgatcgt ttctttgaga aaaaaattga
961 tgagaaaaag aatgaccaca cctatcgagt ttttaaaact gtgaaccggc gagcacacat
1021 cttcccatg gcagatgact attcagactc cctcatcacc aaaaagcaag tgtcagtctg
1081 gtgcagtaat gactacctag gaatgagtcg ccacccacgg gtgtgtgggg cagttatgga
1141 cactttgaaa caacatggtg ctggggcagg tggtagtaga aatatttctg gaactagtaa
1201 attccatgtg gacttagagc gggagctggc agacctccat gggaaagatg ccgcactctt
1261 gttttcctcg tgctttgtgg ccaatgactc aacctcttc acctggcta agatgatgcc
1321 aggctgtgag atttactctg attctgggaa ccatgcctcc atgatccaag ggattcgaaa
1381 cagccgagtg ccaaagtaca tcttcgcca caatgatgtc agccacctca gagaactgct
1441 gcaaagatct gacctctag tcccaagat tgtggcattt gaaactgtcc attcaatgga
1501 tggggcggtg tgcccactgg aagagctgtg tgatgtggcc catgagtttg gagcaatcac
1561 cttcgtggat gaggtccacg cagtggggct ttatggggct cgaggcggag ggattgggga
1621 tcgggatgga gtcatgcaa aaatggacat catttctgga acacttgga aagcctttgg
1681 ttgtgttgga gggtagatcg ccagcacgag ttctctgatt gacaccgtac ggtcctatgc
1741 tgctggcttc atcttcacca cctctctgcc acccatgctg ctggctggag ccctggagtc
1801 tgtgcggatc ctgaagagcg ctgagggacg ggtgcttcgc cgccagcacc agcgcaacgt
1861 caaactcatg agacagatgc taatggatgc cggcctccct gttgtccact gccccagcca
1921 catcatccct gtgcgggttg cagatgctgc taaaaacaca gaagtctgtg atgaactaat
1981 gagcagacat aacatctacg tgcaagcaat caattaccct acggtgcccc ggggagaaga
2041 gctcctacgg attgccccca cccctcacca cacacccag atgatgaact acttcttga
2101 gaatctgcta gtcacatgga agcaagtggg gctggaactg aagcctcatt cctcagctga
2161 gtgcaacttc tgcaggaggc cactgcattt tgaagtgatg agtgaaagag agaagtccta
2221 tttctcaggc ttgagcaagt tggtagctgc tcaggcctga gcatgacctc aattatttca

图3A

2281 cttaacccca ggccattatc atatccagat ggtcttcaga gttgtcttta tatgtgaatt
2341 aagttatatt aaattttaat ctatagtaaa aacatagtcc tggaaataaa ttcttgctta
2401 aatggtg
(SEQ ID NO:1)

图3B

1 cagaagaagg cagcgcccaa ggcgcacgcg cagcgggtcac tcccgcctgta tattaaggcg
61 cccgcatcg cggcctgagg ctgctcccgg acaagggcaa cgagcgtttc gtttgactt
121 ctgcacttga gtgcccgcct ccttcgccgc cgctctgca gtccctcagcg cagttatgcc
181 cagttcttcc cgctgtgggg acacgaccac ggaggaatcc ttgcttcagg gactcgggac
241 cctgctggac cccttctcgc ggtttagggg atgtggggac caggagaaag tcaggatccc
301 taagagtctt ccctgcctgg atggatgagt ggcttcttct ccacctagat tctttccaca
361 ggagccagca tacttctga acatggagag tgttgctcgc cgctgcccat tcttatcccg
421 agtccccag gcctttctgc agaaagcagg caaatctctg ttgttctatg cccaaaactg
481 ccccaagatg atggaagtg gggccaagcc agcccctcgg gcattgtcca ctgcagcagt
541 aactaccaa cagatcaaag aaaccctcc ggccagttag aaagacaaaa ctgctaaggc
601 caaggtccaa cagactcctg atggatccca gcagagtcca gatggcacac agcttccgctc
661 tggacacccc ttgcctgcca caagccaggg cactgcaagc aaatgccctt tcttggcagc
721 acagatgaat cagagaggca gcagtgtctt ctgcaaagcc agtcttgagc ttcaggagga
781 tgtgcaggaa atgaatgccg tgaggaaaga ggttgcctga acctcagcag gccccagtg
841 ggttagtggtg aaaaccgatg gaggggatcc cagtggactg ctgaagaact tccaggacat
901 catgcaaaag caaagaccag aaagagtgtc tcatcttctt caagataact tgccaaaatc
961 tgtttccact tttcagtatg atcgtttctt tgagaaaaaa attgatgaga aaaagaatga
1021 ccacacctat cgagttttta aaactgtgaa cccgagcagca cacatcttcc ccatggcaga
1081 tgactattca gactcctca tcaccaaaaa gcaagtgtca gtctggtgca gtaatgacta
1141 cctaggaatg agtcgccacc cacgggtgtg tggggcagtt atggacactt tgaacaaca
1201 tgggtgctggg gcaggtggta ctgaaatat ttctggaact agtaaattcc atgtggactt
1261 agagcgggag ctggcagacc tccatgggaa agatgccgca ctcttgtttt cctcgtgctt
1321 tgtggccaat gactcaaccc tcttcaccct ggctaagatg atgccaggct gtgagattta
1381 ctctgattct gggaaccatg cctccatgat ccaagggtatt cgaaacagcc gagtgccaaa
1441 gtacatcttc cgcacaatg atgtcagcca cctcagagaa ctgctgcaaa gatctgaccc
1501 ctcaagctccc aagattgtgg catttgaaac tgtccattca atggatgggg cgggtgcccc
1561 actggaagag ctgtgtgatg tggcccatga gtgtggagca atcacctcgc tggatgaggt
1621 ccaocgagtg gggctttatg gggctcaggg cggagggatt ggggatcggg atggagtcac
1681 gccaaaaatg gacatcattt ctggaacact tggcaaagcc tttggttggtg ttggagggtg
1741 catcgccagc acgagttctc tgattgacac cgtacggctc tatgctgctg gcttcactct
1801 caccacctct ctgccacca tgctgctggc tggagccctg gactctgtgc ggtacctgaa
1861 gagcgtgag ggacgggtgc ttcgccgcca gcaccagcgc aacgtcaaac tcatgagaca
1921 gatgctaata gatgccggcc tccctgttgt ccaactgccc agccacatca tccctgtgcg
1981 ggttgagatg gctgctaaaa acacagaagt ctgtgatgaa ctaatgagca gacataacat
2041 ctacgtgcaa gcaatcaatt accctacggt gccccgggga gaagagctcc tacggattgc
2101 cccaccccct caccacacac ccagatgat gaactacttc cttgagaatc tgctagtccac
2161 atggaagcaa gtggggctgg aactgaagcc tcattcctca gctgagtga acttctgcag
2221 gaggccactg cattttgaag tgatgagtga aagagagaag tctatttct caggcttgag

图4A

2281 caagttggta tctgctcagg cctgagcatg acctcaatta ttctacttaa cccaggcca
2341 ttatcatatc cagatggtct tcagagttgt ctttatatgt gaattaagtt atattaaatt
2401 ttaatctata gtaaaaacat agtcctggaa ataaattctt gcttaaatgg tgaaaaaa
(SEQ ID NO:382)

图4B

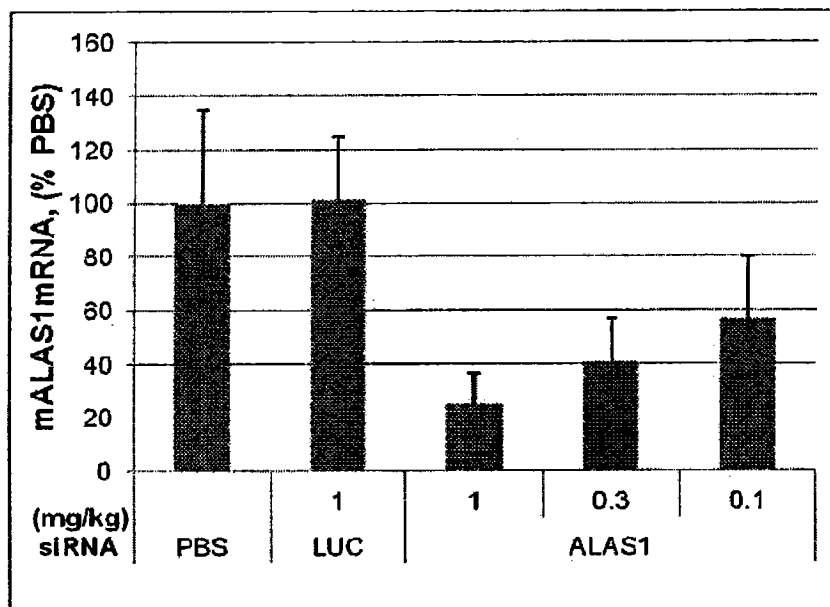


图5

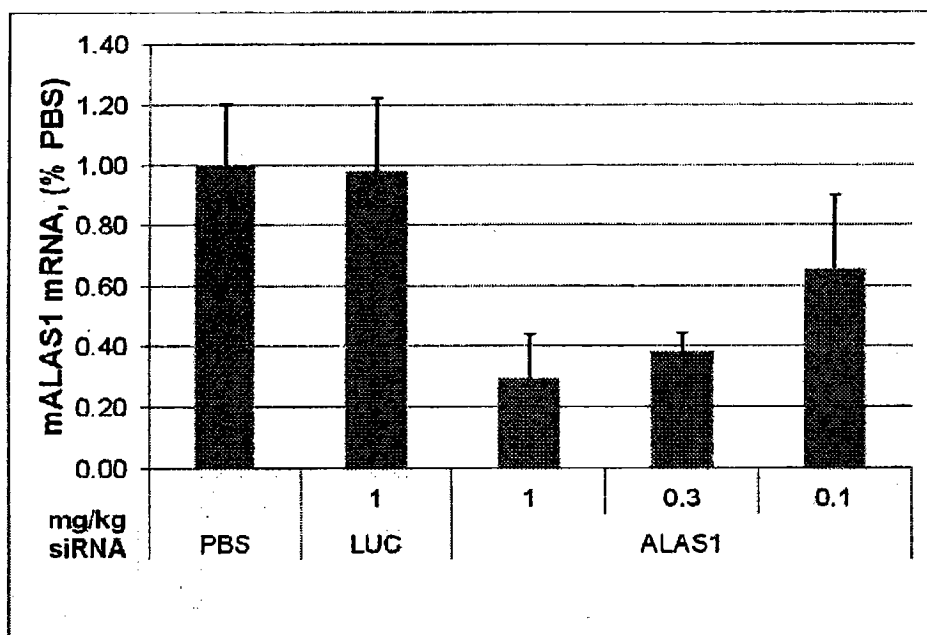


图6

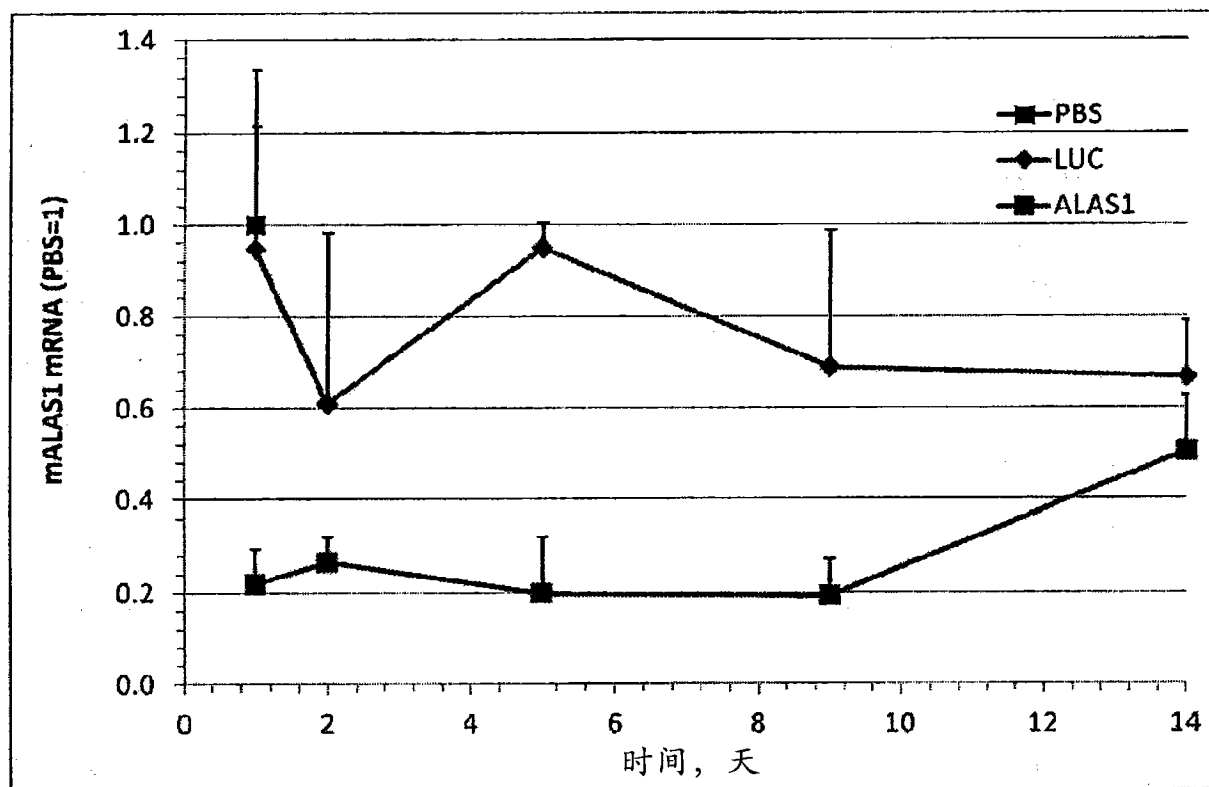


图7

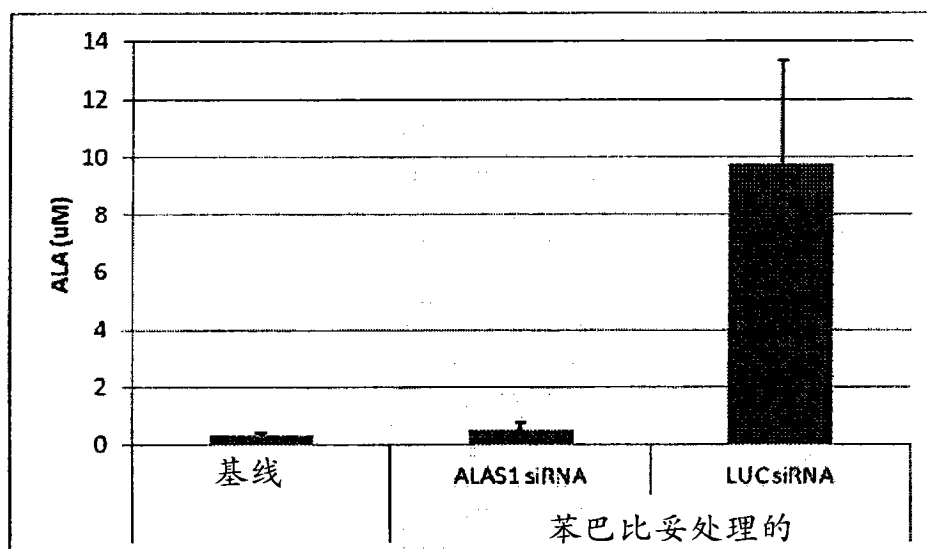


图8

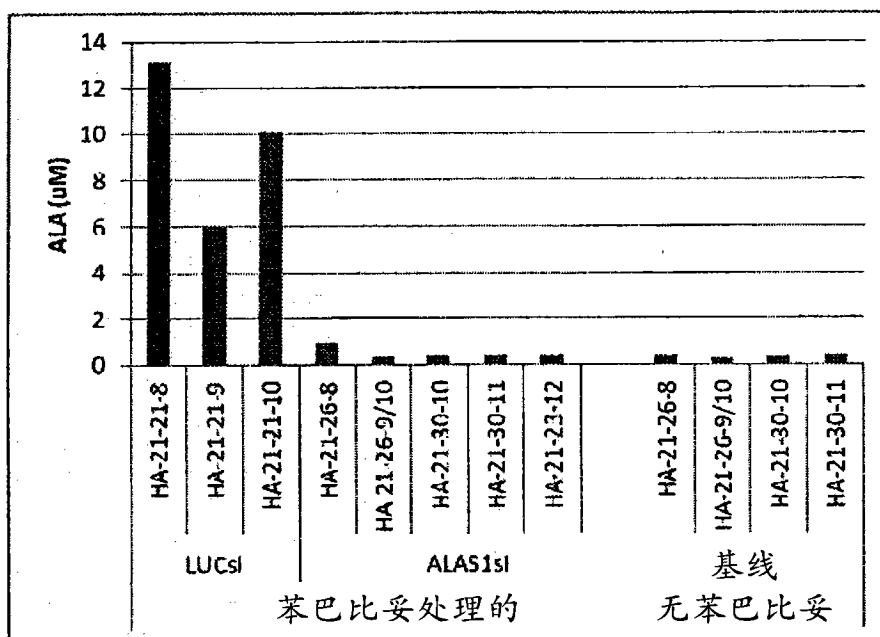


图9

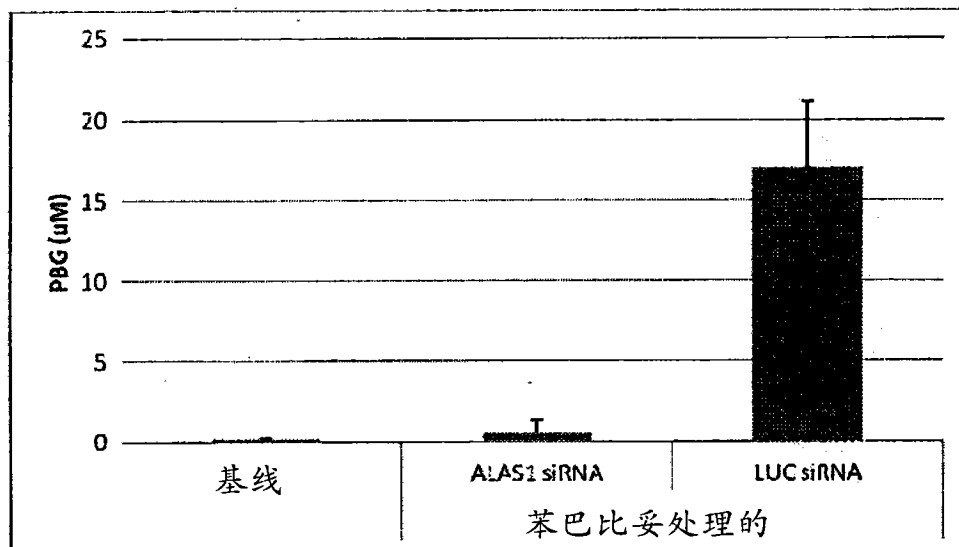


图10

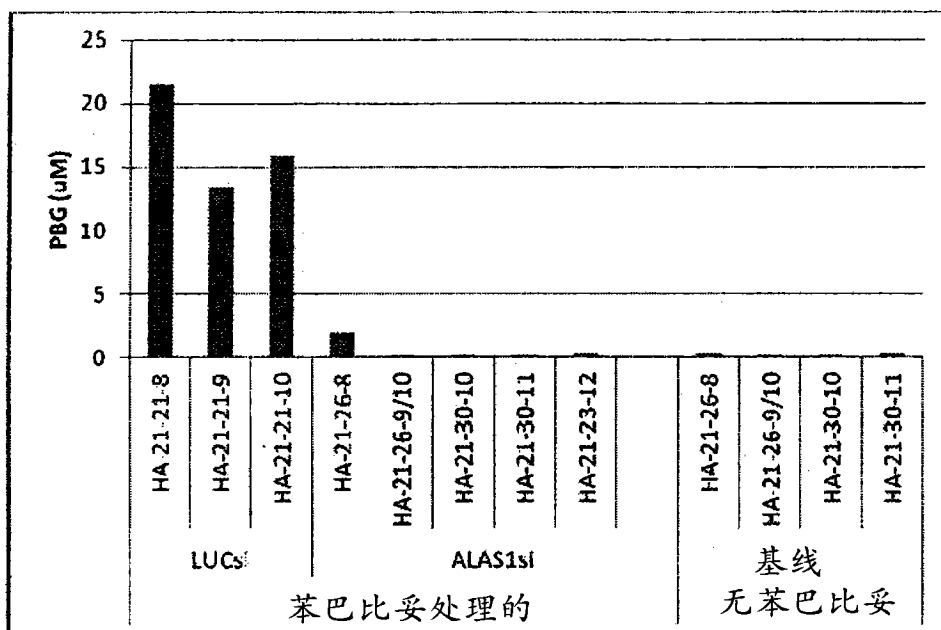


图11

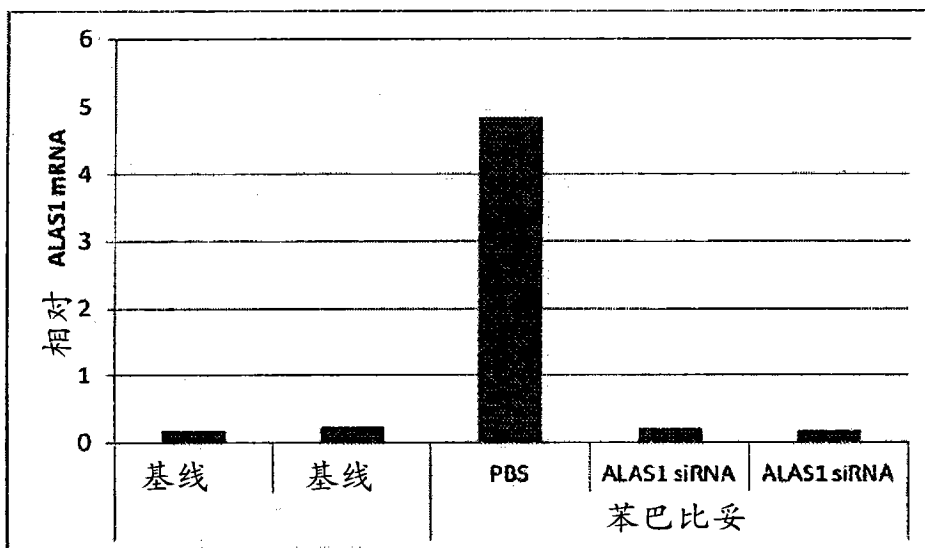


图12

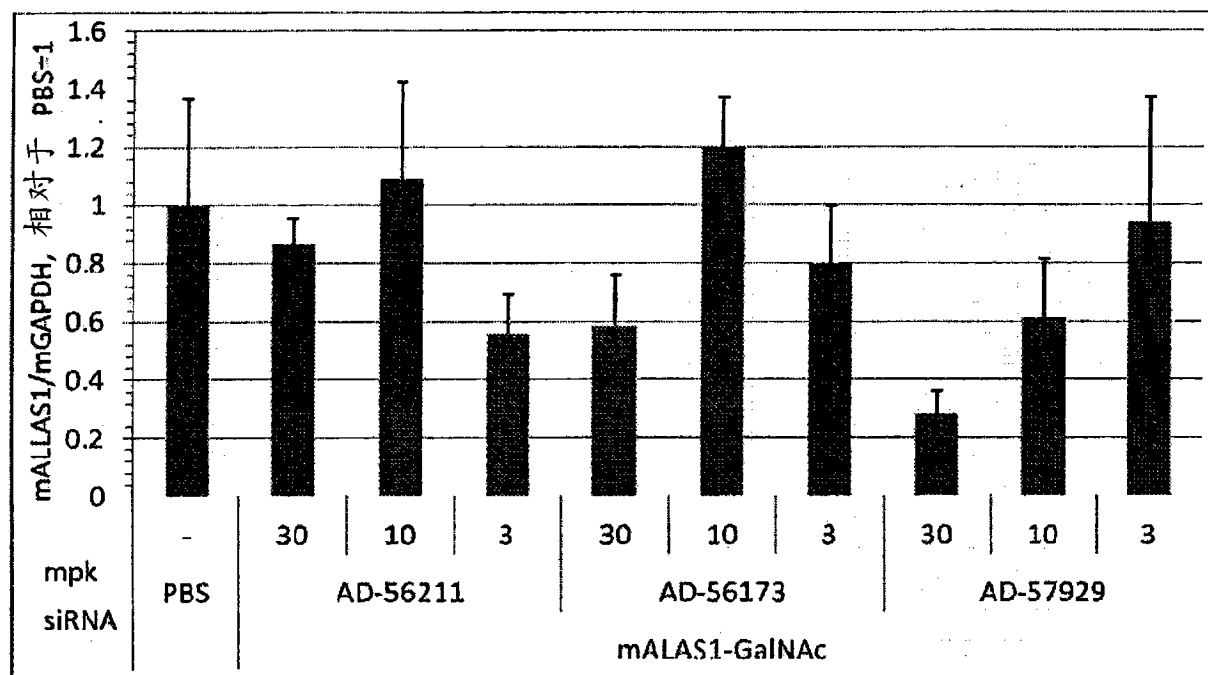


图13

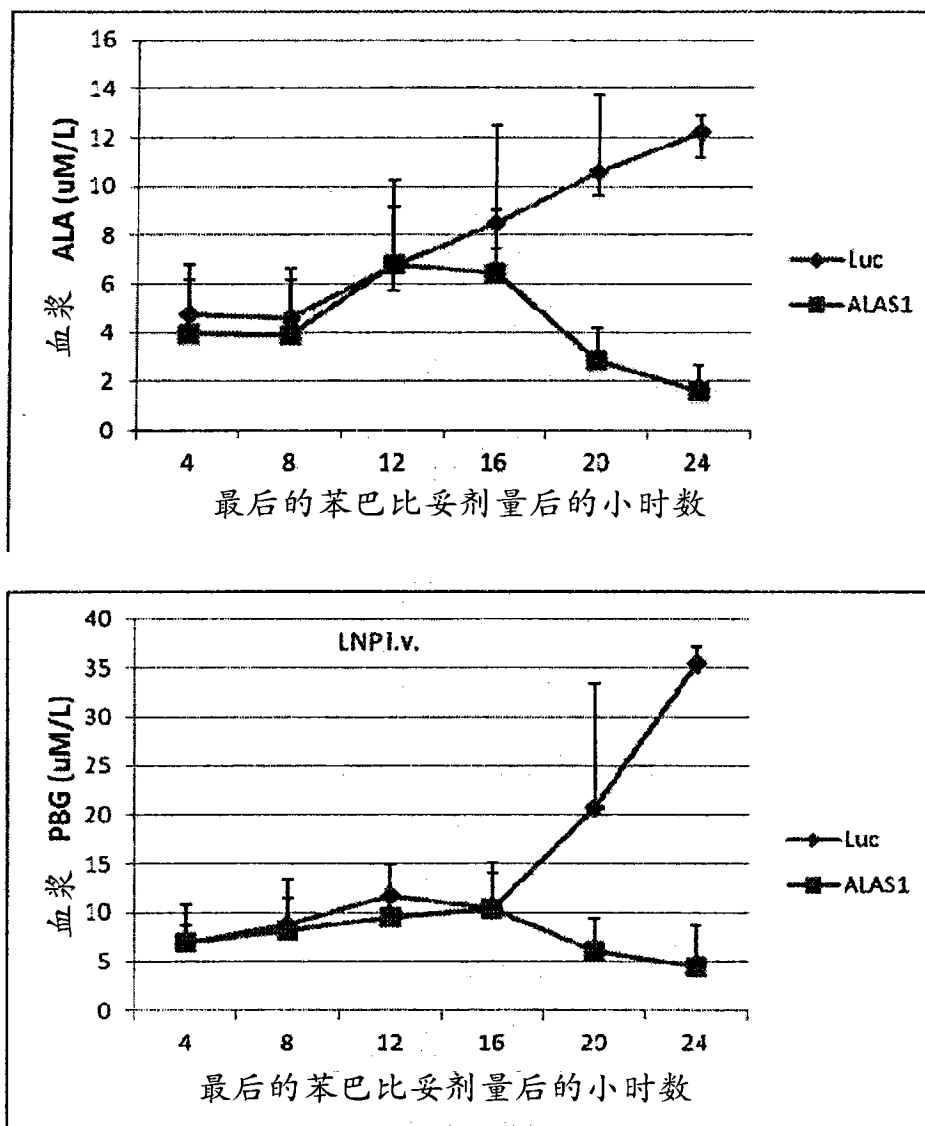


图14

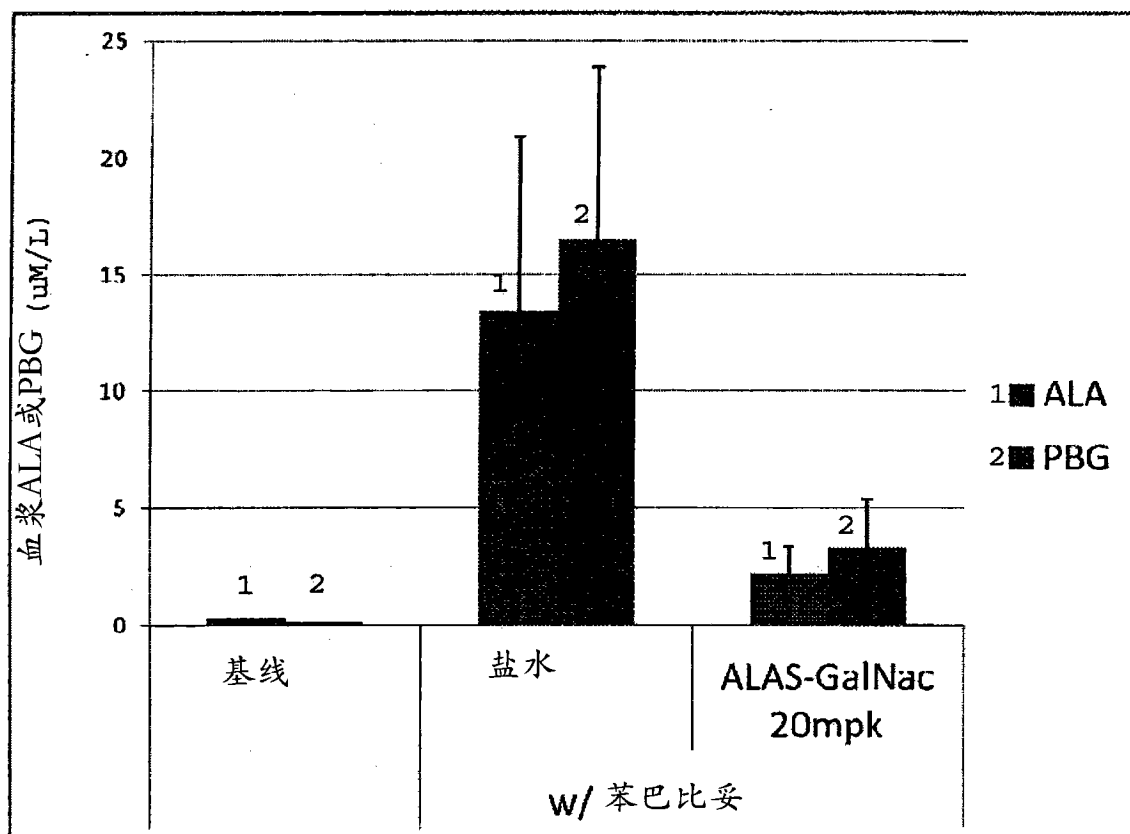


图15