(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106232125 B
(45)授权公告日 2020.10.16

(21)申请号 201580020831.8
(22)申请日 2015.05.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106232125 A
(43)申请公布日 2016.12.14
(30)优先权数据
61/987,478 2014.05.01 US
62/058,629 2014.10.01 US
62/088,459 2014.12.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/028765 2015.05.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/168532 EN 2015.11.05
(73)专利权人 IONIS制药公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 撒扎·P·普拉卡什
普内特·P·塞思
埃里克·E·斯威兹
苏珊·M·弗赖尔 H·布维
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 赵昊 顾云峰
(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/7125(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
(56)对比文件
WO 2013/003808 A1,2013.01.03
WO 2013/033230 A1,2013.03.07
Nathalie Dias, et al..Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms.《Molecular Cancer Therapeutics》.2002,第1卷347-355.
Gourab Bhattacharjee, et al..Inhibition of Vascular Permeability by Antisense-Mediated Inhibition of Plasma Kallikrein and Coagulation Factor 12.《NUCLEIC ACID THERAPEUTICS》.2013,第23卷(第3期),175-187.
审查员 葛瀚麟

权利要求书6页 说明书438页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

用于调节PKK表达的组合物和方法

(57)摘要

本文公开用于减少PKK mRNA和蛋白质表达的反义化合物和方法。此类方法、化合物以及组合物适用于治疗、预防或减轻PKK相关疾病、病症以及病状。

CN 106232125 B

1.一种化合物,其包含修饰寡核苷酸和缀合物基团,其中所述修饰寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有SEQ ID NO:570的核碱基序列,其中所述缀合物基团在所述修饰寡核苷酸的5'末端处连接至所述修饰寡核苷酸。

2.如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物由所述修饰寡核苷酸和所述缀合物基团组成,且其中所述修饰寡核苷酸是单链的。

3.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸的至少一个核苷间键是修饰的核苷间键。

4.如权利要求3所述的化合物,其中所述至少一个修饰的核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联。

5.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含至少1个磷酸二酯核苷间键联。

6.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含至少2个磷酸二酯核苷间键联。

7.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含至少3个磷酸二酯核苷间键联。

8.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含至少4个磷酸二酯核苷间键联。

9.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯核苷间键联和硫代磷酸酯核苷间键联。

10.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中至少一个核苷包含修饰的核碱基。

11.如权利要求10所述的化合物,其中所述修饰的核碱基为5-甲基胞嘧啶。

12.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含至少一个修饰的糖。

13.如权利要求12所述的化合物,其中所述修饰的糖为2'-O-甲氧基乙基修饰的糖、2'-O-甲基修饰的糖、限制性乙基、LNA或3'-氟代-HNA中的任一个。

14.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述修饰寡核苷酸包含:

由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;

由5个连接的核苷组成的5'翼区段;以及

由5个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中所述缺口区段定位在所述5'翼区段与所述3'翼区段之间并且其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的糖。

15.如权利要求1所述的化合物,其中所述缀合物基团包含恰好一个配体。

16.如权利要求1所述的化合物,其中所述缀合物基团包含恰好两个配体。

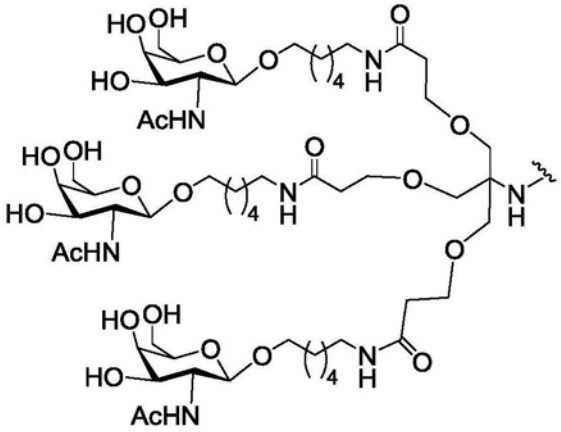
17.如权利要求1所述的化合物,其中所述缀合物基团包含三个或更多个配体。

18.如权利要求1所述的化合物,其中所述缀合物基团包含恰好三个配体。

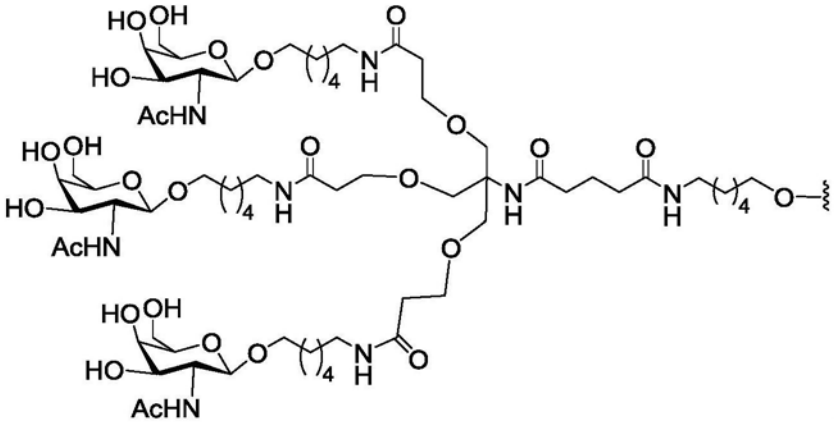
19.如权利要求15-18中任一项所述的化合物,其中每个配体为N-乙酰基半乳糖胺。

20.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述缀合物基团包含细胞靶向部分。

21.如权利要求20所述的化合物,其中所述细胞靶向部分具有以下结构:

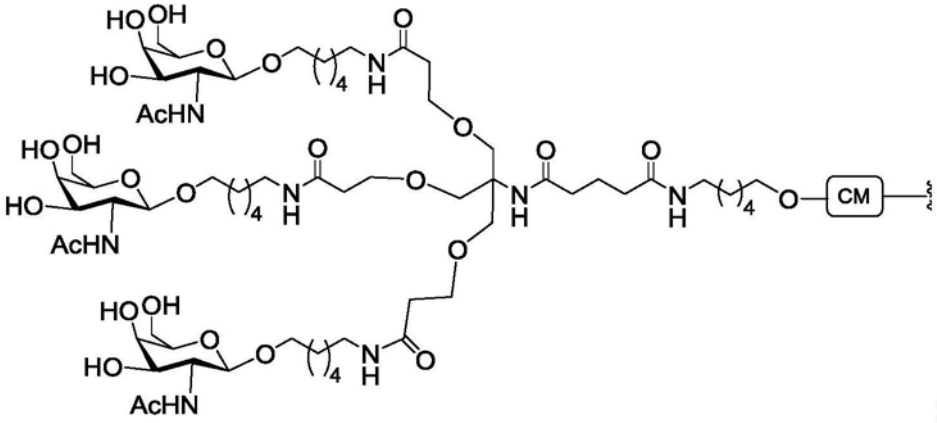


22.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述缀合物基团包含:



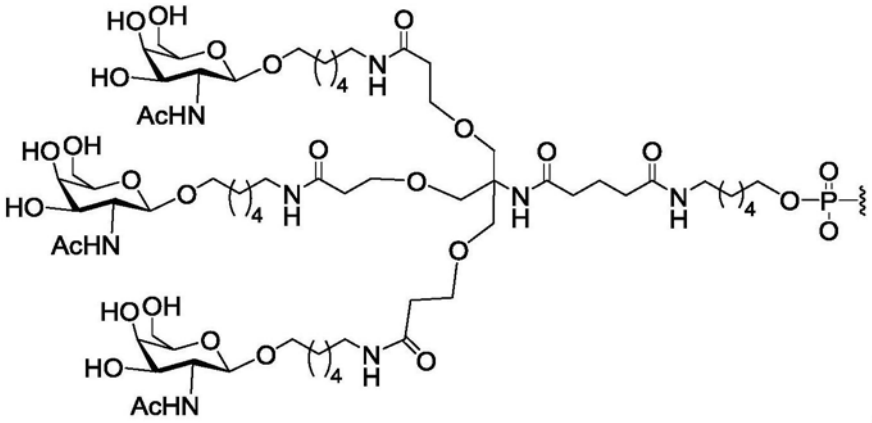
23.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述缀合物基团包含可裂解部分。

24.如权利要求23所述的化合物,其中所述缀合物基团包含:



其中CM是所述可裂解部分。

25.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中所述缀合物基团包含:



26.一种化合物，其包含修饰寡核苷酸和缀合物基团，其中所述修饰寡核苷酸是由5’翼区段、中心缺口区段、和3’翼区段组成的缺口聚物，其中：

所述5’翼区段由5个2’-O-甲氧基乙基核苷组成，

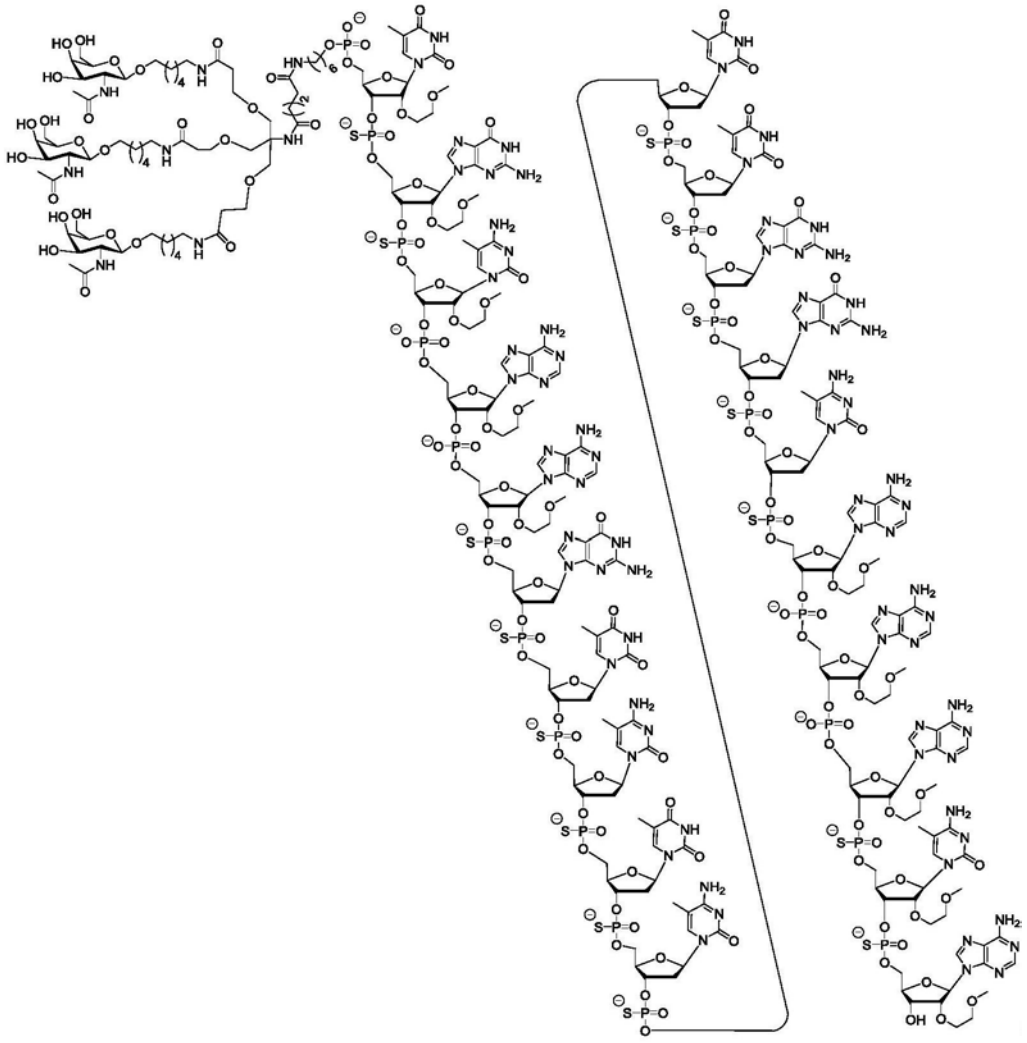
所述中心缺口区段由10个β-D-2’-脱氧核糖核苷组成；以及

所述3’翼区段由5个2’-O-甲氧基乙基核苷组成，

其中所述缀合物基团在所述修饰寡核苷酸的5’末端处连接至所述修饰寡核苷酸，其中所述修饰寡核苷酸具有5’-TGCAAGTCTCTTGGCAAACA-3’(SEQ ID NO:570)的核碱基序列，其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶，且其中所述修饰寡核苷酸的所述核苷间键联从5’到3’为ssoosssssssssssooss，其中每个s为硫代磷酸酯键和每个o为磷酸二酯键。

27.如权利要求26所述的化合物，其中所述修饰寡核苷酸与所述缀合物基团共价连接。

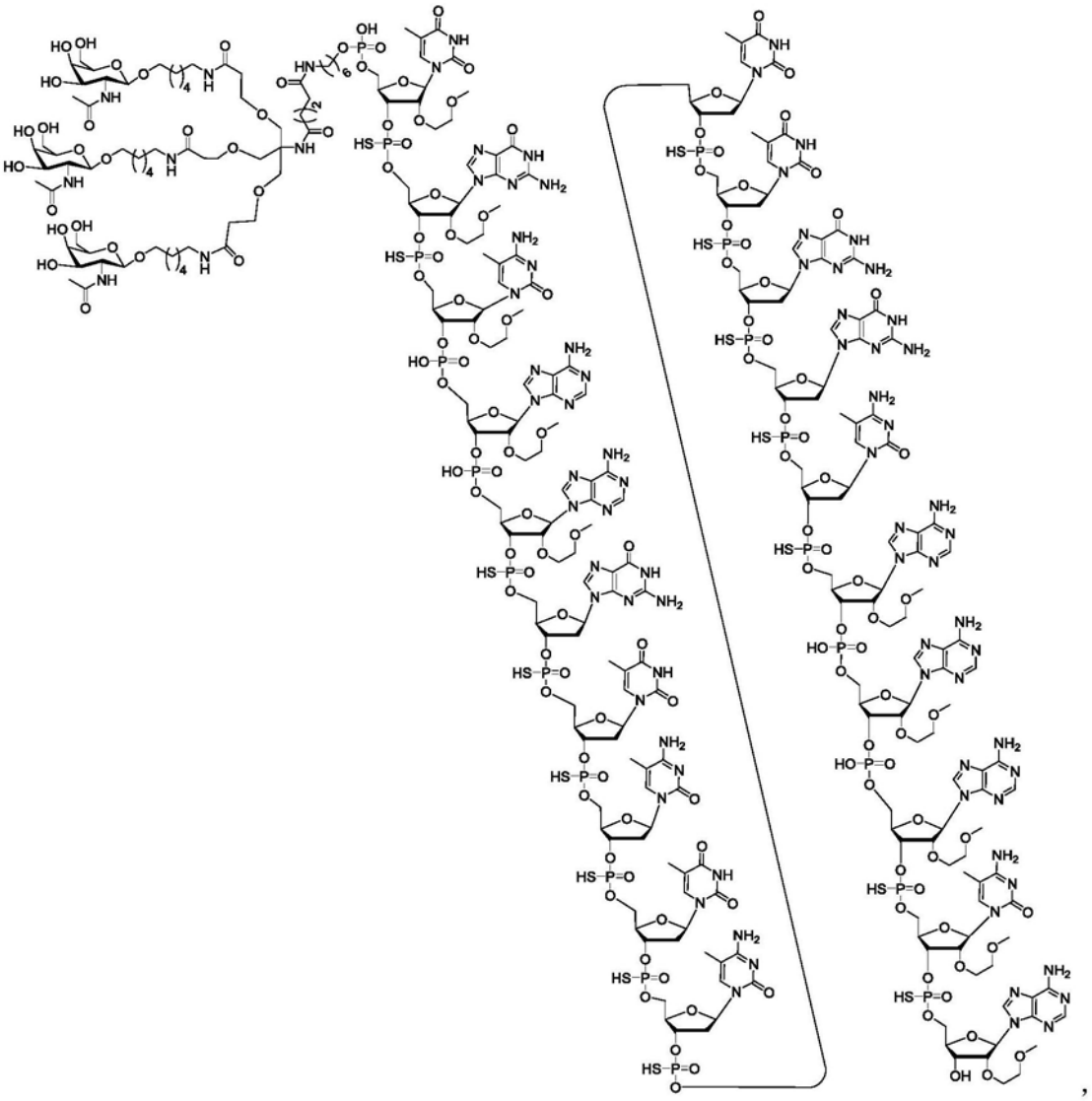
28.一种化合物，其中所述化合物的阴离子形式具有以下化学结构：



(SEQ ID NO:570)。

29.如权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是盐,且其中所述盐的阳离子是钠。

30.一种如以下化学结构的化合物:



(SEQ ID NO:570),或其盐。

31.如权利要求30所述的化合物,其是钠盐或钾盐。

32.一种药物组合物,其包含如权利要求1-31中任一项所述的化合物,和药学上可接受的载体或稀释剂中的至少一种。

33.如权利要求32所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的稀释剂是磷酸盐缓冲的生理盐水(PBS)。

34.如权利要求32所述的药物组合物,其中所述药物组合物主要由所述修饰寡核苷酸和PBS组成。

35.如权利要求1-31中任一项所述的化合物,或如权利要求32-34中任一项所述的药物组合物在制备用于预防或治疗PKK相关疾病、病症或病状的药物中的用途。

36.如权利要求1-31中任一项所述的化合物,或如权利要求32-34中任一项所述的药物组合物在制备用于减轻PKK相关疾病、病症或病状的药物中的用途。

37.如权利要求35或权利要求36所述的用途,其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含水肿。

38.如权利要求37所述的用途,其中所述水肿是血管性水肿。

39.如权利要求38所述的用途，其中所述水肿是遗传性血管性水肿(HAE)或眼睑的血管性水肿。

40.如权利要求37所述的用途，其中所述水肿是眼水肿或脑水肿。

41.如权利要求37所述的用途，其中所述水肿是黄斑水肿。

42.如权利要求35或权利要求36所述的用途，其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含肿胀。

43.如权利要求35或权利要求36所述的用途，其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含血栓。

44.如权利要求43所述的用途，其中所述血栓是深静脉血栓。

45.如权利要求35或权利要求36所述的用途，其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含栓。

46.如权利要求45所述的用途，其中所述栓是肺栓塞。

47.如权利要求35或权利要求36所述的用途，其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含血栓栓塞。

48.如权利要求35或权利要求36所述的用途，其中所述PKK相关疾病、病症或病状包含梗塞。

49.如权利要求48所述的用途，其中所述梗塞是心肌梗塞或中风。

50.如权利要求1-31中任一项所述的化合物，或如权利要求32-34中任一项所述的药物组合物在制备用于预防或治疗炎性疾病或血栓栓塞疾病的药物中的用途。

51.如权利要求1-31中任一项所述的化合物，或如权利要求32-34中任一项所述的药物组合物在制备用于减轻炎性疾病或血栓栓塞疾病的药物中的用途。

用于调节PKK表达的组合物和方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请连同序列表一起以电子格式提交。序列表是提供为2015年4月27日建立的大小为约636KB的题为BIOL0252WOSEQ_ST25.txt的文档。电子格式的序列表中的信息以引用的方式整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本文提供用于减少动物中的人血浆前激肽释放酶(PKK)mRNA和蛋白质的表达的化合物、组合物和方法。此类组合物和方法可用于治疗、预防或改善炎性和血栓栓塞病状。

背景技术

[0005] 血浆前激肽释放酶(PKK)为由KLKB1基因编码的血浆激肽释放酶(PK)的前体。PKK为参与血液凝聚、纤维蛋白溶解、激肽形成以及炎症的表面依赖性激活的糖蛋白。PKK通过因子XIIa通过内部的Arg-Ile肽键的裂解转化成PK。PK从激肽原释放出激肽并且还自纤溶酶原形成纤溶酶。PK为由在炎症、血压控制、凝聚以及疼痛中起作用的若干蛋白质组成的激肽-激肽释放酶途径的成员。

发明内容

[0006] 本文提供用于调节PKK mRNA和蛋白质表达的化合物和方法。在某些实施方案中，适用于调节PKK mRNA和蛋白质的表达的化合物为反义化合物。在某些实施方案中，反义化合物为反义寡核苷酸。

[0007] 在某些实施方案中，可在细胞或组织中进行调节。在某些实施方案中，细胞或组织处于动物体内。在某些实施方案中，动物为人。在某些实施方案中，PKK mRNA水平降低。在某些实施方案中，PKK蛋白水平降低。所述降低可以时间依赖性方式或以剂量依赖性方式出现。

[0008] 还提供适用于预防、治疗和改善与PKK相关的疾病、病症和病状的化合物、组合物和方法。在某些实施方案中，所述PKK相关疾病、病症和病状为炎性疾病。在某些实施方案中，所述炎性疾病可以为急性或慢性炎性疾病。在某些实施方案中，所述炎性疾病可以包括遗传性血管性水肿(HAE)、水肿、血管性水肿、肿胀、眼睑的血管性水肿、眼水肿、黄斑水肿以及脑水肿。在某些实施方案中，所述PKK相关疾病、病症和病状为血栓栓塞疾病。在某些实施方案中，所述血栓栓塞疾病可以包括血栓、栓、血栓栓塞、深静脉血栓、肺栓塞、心肌梗塞、中风以及梗塞。

[0009] 所述疾病、病症和病状可共同具有一个或多个风险因素、成因或结果。

[0010] 发展炎性疾病的某些风险因素和成因包括对炎性疾病的遗传素质和环境因素。在某些实施方案中，受试者具有突变的补体1酯酶抑制剂(C1-INH)基因或突变的因子12基因。在某些实施方案中，受试者携带或具有紧张素-转换酶抑制剂(ACE抑制剂)或紧张素II受体阻滞剂(ARB)。在某些实施方案中，受试者已具有过敏反应，导致血管性水肿。在某些实施方案中，受试者具有I型HAE。在某些实施方案中，受试者具有II型HAE。在某些实施方案中，受

试者具有III型HAE。

[0011] 某些与炎性疾病的发展相关的结果包括各种身体部分的水肿/肿胀，所述各种身体部分包括肢端(即手、脚、手臂、腿)、肠(腹腔)、面、生殖器、喉(即喉头)；血管渗透性；血管泄漏；全身炎症；腹痛；气胀；呕吐；腹泻；瘙痒的皮肤；呼吸(哮喘性)反应；鼻炎；过敏反应；支气管收缩；低血压；昏迷以及死亡。

[0012] 发展血栓栓塞疾病的某些风险因素和成因包括对血栓栓塞的遗传素质、外科手术(具体地讲矫形手术)、恶性肿瘤、妊娠、年纪大、口服避孕药的使用、心房颤动、先前的血栓栓塞病状、慢性炎性疾病以及遗传性或获得性预防血栓剂凝血病症。某些与血栓栓塞病状的发展相关的结果包括通过受影响的血管的血液流降低、组织死亡和死亡。

[0013] 在某些实施方案中，治疗方法包括向有需要的个体施用PKK反义化合物。在某些实施方案中，治疗方法包括向有需要的个体施用PKK反义寡核苷酸。

[0014] 附图列表

[0015] 图1为来自如实施例124中所述的血液样本的HMWK的蛋白质印记量化。

[0016] 图2为来自如实施例127中所述的血液样本的HMWK的蛋白质印记量化。

[0017] 详述

[0018] 要理解，以上概述和以下详述都仅是示例性和解释性的，并且不限制要求保护的本发明。在本文中，除非另外确切说明，否则单数的使用包括复数。如本文所使用，除非另外说明，否则“或”的使用意指“和/或”。此外，术语“包括(including)”以及其他形式诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。另外，除非另外确切说明，否则术语诸如“元件”或“组分”既涵盖包含一个单元的元件和组分，又涵盖包含多于一个子单元的元件和组分。

[0019] 除非提供确切的定义，否则结合本文所描述的分析化学、合成有机化学和医药化学所使用的命名法和这些化学领域的工序和技术为本领域熟知和常用的那些。标准技术可用于化学合成和化学分析。某些此类技术和工序可见于“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”，Sangvi和Cook编，美国化学学会，Washington D.C.，1994；“Remington's Pharmaceutical Sciences”，Mack Publishing Co.，Easton，Pa.，第21版，2005；和“Antisense Drug Technology，Principles，Strategies，and Applications”，Stanley T.Crooke编，CRC Press，Boca Raton，Florida；和Sambrook等，“Molecular Cloning，A laboratory Manual，”第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989，所述文献出于任何目的而以引用方式并入本文。如果允许，本公开通篇提及的所有专利、申请、已公布的申请和其他出版物以及其他数据以引用的方式整体并入本文。

[0020] 本文所用的章节标题仅出于组织目的，并且不应解释为限制所述主题。本申请中引用的所有文献或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍及论文)关于本文所论述的文献部分明确地以引用方式特此并入以及以引用方式特此整体并入。

[0021] 定义

[0022] 除非提供具体定义，否则关于本文所述的分析化学、合成有机化学及医学和药物化学所用的命名及本文所述的分析化学、合成有机化学及医学和药物化学的工序及技术为本领域中熟知且常用的。标准技术可用于化学合成和化学分析。在允许的情况下，贯穿本公开中所提及的所有专利、申请、公布的申请及其他公布、可经由数据库(如美国国家生物技

术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI))获得的GENBANK登录号及相关序列信息及其他数据关于本文所论述的文献部分以引用方式并入本文以及以引用方式整体并入本文。

[0023] 除非另外指出,否则以下术语具有以下含义:

[0024] "2'-O-甲氧基乙基"(又为2'-MOE和2'-OCH_2CH_2-OCH_3以及MOE)是指呋喃糖环的2'位上的O-甲氧基乙基修饰。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是修饰的糖。

[0025] "2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷"(又为"2'-MOE核苷")意谓包含2'-MOE修饰的糖部分的核苷。

[0026] "2'-取代的核苷"意谓在呋喃糖环的2'位上包含除H或OH以外的取代基的核苷。在某些实施方案中,2'-取代的核苷包括具有双环糖修饰的核苷。

[0027] "2'-脱氧核苷"意谓在核苷的糖部分的2'位上包含氢的核苷。

[0028] "3'靶位点"是指与特定反义化合物的最3'核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0029] "5'靶位点"是指与特定反义化合物的最5'核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0030] "5-甲基胞嘧啶"意谓用连接至5位的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是修饰的核碱基。

[0031] "约"意指在值的±7%以内。例如,如果指出"化合物影响PKK至少约70%的抑制",那么表示63%至77%范围内的PKK水平被抑制。

[0032] "伴随施用"是指在相同时间以任何方式对两种药剂同时施用,其中两种药剂的药理作用均在患者中显现。伴随施用不需要在单一药物组合物中、以相同剂型或通过相同施用途经对两种药剂进行施用。两种药剂的作用不需要在相同时间显现。所述作用仅需要重叠一段时间但不需要同延。

[0033] "施用"意谓向动物提供药剂,且包括但不限于由医学专业人员施用和自行施用。

[0034] 如本文所使用的"烷基"意指含有最多至二十四个碳原子的饱和直链或支链烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基通常包括1至约24个碳原子,更通常地1至约12个碳原子(C_1-C_{12}烷基),其中1至约6个碳原子更优选。

[0035] 如本文所使用,"烯基"意指含有最多至二十四个碳原子并且具有至少一个碳-碳双键的直链或支链链烃基。烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、二烯如1,3-丁二烯等。烯基通常包括2至约24个碳原子,更通常地2至约12个碳原子,其中2至约6个碳原子更优选。如本文所使用的烯基可任选地包括一个或多个另外的取代基。

[0036] 如本文所使用,"炔基"意指含有最多至二十四个碳原子并且具有至少一个碳-碳三键的直链或支链烃基。炔基的实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、1-丁炔基等。炔基通常包括2至约24个碳原子,更通常地2至约12个碳原子,其中2至约6个碳原子更优选。如本文所使用的炔基可任选地包括一个或多个另外的取代基。

[0037] 如本文所使用,"酰基"意指通过从有机酸中去除羟基形成的基团并且具有通式-C(O)-X,其中X通常为脂肪族、脂环族或芳香族。实例包括脂肪族羰基、芳香族羰基、脂肪族磺酰基、芳香族亚硫酰基、脂肪族亚硫酰基、芳香族磷酸酯、脂肪族磷酸酯等。如本文所使用的酰基可任选地包括另外的取代基。

[0038] 如本文所使用，“脂环族”意指其中环为脂肪族的环系统。环系统可包含一个或多个环，其中至少一个环为脂肪族。优选的脂环族包括其中具有约5至约9个碳原子的环。如本文所使用的脂环族可任选地包括另外的取代基。

[0039] 如本文所使用，“脂肪族”意指含有最多至二十四个碳原子的直链或支链烃基，其中任何两个碳原子之间的饱和度为单键、双键或三键。脂肪族基团优选含有1至约24个碳原子，更通常地1至约12个碳原子，其中1至约6个碳原子更优选。脂肪族基团的直链或支链可被一个或多个杂原子中断，所述杂原子包括氮、氧、硫和磷。被杂原子中断的所述脂肪族基团包括但不限于聚烷氧基，如聚亚烷基二醇、聚胺和聚亚胺。如本文所使用的脂肪族基团可任选地包括另外的取代基。

[0040] 如本文所使用，“烷氧基”意指在烷基与氧原子之间形成的基团，其中氧原子用来将烷氧基连接至母体分子。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、新戊氧基、正己氧基等。如本文所使用的烷氧基可任选地包括另外的取代基。

[0041] 如本文所使用，“氨基烷基”意指氨基取代的C_1-C_{12}烷基。基团的烷基部分与母体分子形成共价键。氨基可位于任何位置并且氨基烷基可在烷基和/或氨基部分上被另外的取代基取代。

[0042] 如本文所使用，“芳烷基”和“芳基烷基”意指共价连接至C_1-C_{12}烷基的芳香族基团。所得到的芳烷基(或芳基烷基)的烷基部分与母体分子形成共价键。实例包括但不限于苯甲基、苯乙基等。如本文所使用的芳烷基可任选地包括连接至烷基、芳基或形成基团的这两个基团的另外的取代基。

[0043] 如本文所使用，“芳基”和“芳香族”意指具有一个或多个芳环的单环或多环碳环系统基团。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。优选的芳环系统在一个或多个环中具有约5至约20个碳原子。如本文所使用的芳基可任选地包括另外的取代基。

[0044] “改善”是指减轻、减缓、终止或逆转病状或疾病严重性的至少一个指标。指标的严重性可通过本领域的技术人员已知的主观或客观度量来确定。

[0045] “动物”是指人类或非人类动物，包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、狗、猫、猪，以及非人灵长类，包括但不限于猴子和猩猩。

[0046] “反义活性”意指可归因于反义化合物与其靶核酸的杂交的任何可检测或可测量的活性。在某些实施方案中，反义活性为靶核酸或由这种靶核酸所编码的蛋白质的量或表达的减少。“反义化合物”意指能够与靶核酸经由氢键进行杂交的低聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物，诸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、ssRNA及占位型化合物。

[0047] “反义化合物”意指能够经历通过氢键合与靶核酸进行杂交的低聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物，诸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、ssRNA及占位型化合物。

[0048] “反义抑制”意指在与靶核酸互补的反义化合物存在下靶核酸水平相较于或在不存在反义化合物下的靶核酸水平有所减少。“反义机制”为所有涉及化合物与靶核酸的杂交的机制，其中杂交的结果或效果为靶降解或靶占位，伴随阻碍涉及例如转录或剪接的细胞机构。

[0049] “反义机制”为所有涉及化合物与靶核酸的杂交的机制,其中杂交的结果或效果为靶降解或靶占位,伴随阻碍涉及例如转录或剪接的细胞机构。

[0050] “反义寡核苷酸”意指具有允许与靶核酸的对应区段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。“碱基互补性”是指反义寡核苷酸的核酸碱基与靶核酸中的相应核酸碱基进行准确碱基配对(即杂交)的能力,且由相应核酸碱基之间的沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏氢键结合介导。

[0051] “碱基互补性”是指反义寡核苷酸的核酸碱基与靶核酸中的相应核酸碱基进行准确碱基配对(即杂交)的能力,且由相应核酸碱基之间的沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏氢键结合介导。

[0052] “双环糖”意指由两个原子桥连修饰的呋喃糖环。双环糖是修饰的糖。

[0053] “双环核酸”(也称为BNA)意指具有如下的核苷,所述核苷具有包含连接糖环的两个碳原子,从而形成双环系统的桥的糖部分。在某些实施方案中,所述桥连接糖环的4’碳与2’碳。

[0054] “帽结构”或“端帽部分”意指已在反义化合物的任一末端并入的化学修饰。

[0055] “碳水化合物”意指天然存在的碳水化合物、修饰的碳水化合物或碳水化合物衍生物。

[0056] “碳水化合物聚簇”意指具有连接至支架或接头基团的一个或多个碳水化合物残基的化合物。(参见针对碳水化合物聚簇的实例,例如Maier等,“Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting,”Bioconjug ate Chemistry,2003,(14):18-29),所述文献以引用方式全部并入本文,或Rensen等“Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the He patic Asiaglycoprotein Receptor,”J.Med.Chem.2004,(47):5798-5808)。

[0057] “碳水化合物衍生物”意指可使用碳水化合物作为起始材料或中间体合成的任何化合物。

[0058] “cEt”或“限制性乙基”意指具有包含连接4’-碳与2’-碳的桥的糖部分的双环核苷,其中所述桥具有下式:4’-CH(CH_3)-O-2’。

[0059] “cEt修饰的核苷”(又称为“限制性乙基核苷”)意指包含含有4’-CH(CH_3)-O-2’桥的双环糖部分的核苷。

[0060] “化学上不同的区域”是指以某种方式化学上不同于同一反义化合物的另一区域的反义化合物的区域。例如,具有2’-O-甲氧基乙基核苷的区化学上不同于具有无2’-O-甲氧基乙基修饰的核苷的区。

[0061] “化学修饰”意指当与天然存在的对应物相比时化合物的化学差异。寡核苷酸的化学修饰包括核苷修饰(包括糖部分修饰和核碱基修饰)和核苷间键联修饰。就寡核苷酸而言,化学修饰不包括仅在核碱基序列上的差异。

[0062] “嵌合反义化合物”意指具有至少两个化学相异区的反义化合物,每一位置具有多个亚单位。

[0063] “可裂解键”意指能够被分裂的任何化学键。在某些实施方案中,可裂解键选自以下:酰胺、聚酰胺、酯、醚、磷酸二酯的一个或两个酯、磷酸酯、氨基甲酸酯、二硫化物或肽。

[0064] “可裂解部分”意指能够在生理条件下分裂的键或基团。在某些实施方案中，可裂解部分在细胞或亚细胞区室(诸如溶酶体)内部裂解。在某些实施方案中，可裂解部分通过内源性酶如核酸酶裂解。在某些实施方案中，可裂解部分包含具有一个、两个、三个、四个或多于四个可裂解键的原子基团。

[0065] “共同施用”意指向个体施用两种或更多种药剂。两种或更多种药剂可在单个药物组合物中，或可在单独的药物组合物中。所述两种或更多种药剂可各自经由相同或不同的施用途径来施用。共同施用包括平行或相继施用。

[0066] “互补性”意指第一核酸与第二核酸的核碱基之间配对的能力。

[0067] “包含(comprise)”、“包含(comprises)”以及“包含(comprising)”应理解为意指包括所述步骤或要素或步骤或要素的群组，但不排除任何其他步骤或要素或步骤或要素的群组。

[0068] “缀合物”或“缀合物基团”意指结合至寡核苷酸或低聚化合物的原子或原子基团。通常，缀合物基团改变它们所连接至的化合物的一种或多种性质，包括但不限于药效学、药物代谢动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和/或清除性质。

[0069] 在缀合物基团背景下的“缀合物接头”或“接头”意指包含任何原子或原子基团的缀合物基团的一部分并且其(1)将寡核苷酸共价连接至缀合物基团的另一个部分或(2)共价连接缀合物基团的两个或更多个部分。

[0070] 缀合物基团在本文中示为基团，提供用于形成至低聚化合物如反义寡核苷酸的共价连接的键。在某些实施方案中，低聚化合物上的连接点为低聚化合物的3’末端核苷的3’-羟基的3’-氧原子。在某些实施方案中，低聚化合物上的连接点为低聚化合物的5’末端核苷的5’-羟基的5’-氧原子。在某些实施方案中，用于形成至低聚化合物的连接的键为可裂解键。在某些所述实施方案中，所述可裂解键构成可裂解部分的全部或部分。

[0071] 在某些实施方案中，缀合物基团包含可裂解部分(例如，可裂解键或可裂解核苷)和碳水化合物聚簇部分，如GalNAc聚簇部分。此碳水化合物聚簇部分包含：靶向部分和任选地缀合物接头。在某些实施方案中，通过配体的数目和身份来鉴定碳水化合物聚簇部分。例如，在某些实施方案中，碳水化合物聚簇部分包含3个GalNAc基团并且命名为“$GalNAc_3$”。在某些实施方案中，碳水化合物聚簇部分包含4个GalNAc基团并且命名为“$GalNAc_4$”。本文描述了具体的碳水化合物聚簇部分(具有具体系链、支链基团和缀合物接头基团)并且由后面跟着下标“a”的罗马数字命名。因此“$GalNac3\text{-}1_a$”是指具有3个GalNac基团和明确鉴定的系链、支链基团和连接基团的缀合物基团的具体碳水化合物聚簇部分。所述碳水化合物聚簇片段通过可裂解部分(如可裂解键或可裂解核苷)连接至低聚化合物。

[0072] “缀合物化合物”意指适合用作缀合物基团的任何原子、原子基团或连接的原子基团。在某些实施方案中，缀合物化合物可具有或赋予一种或多种性质，包括但不限于药效学、药物代谢动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和/或清除性质。

[0073] “连续核碱基”意指彼此紧邻的核碱基。

[0074] “设计”或“被设计来”是指形成与所选核酸分子特异性杂交的低聚化合物的方法。

[0075] “稀释剂”是指组合物中缺乏药理活性但在药学上是必需的或期望的成分。举例来说，在注射的药物中，稀释剂可为液体，例如生理盐水溶液。

[0076] “剂量”意指在单个施用中或在指定时间内提供的指定量的药剂。在某些实施方案

中，剂量可以在一个、两个或更多个大丸剂、片剂或注射剂中施用。例如，在某些实施方案中，当需要皮下施用时，所需剂量需要不易由单次注射调节的体积，因此，两个或更多个注射可用于实现所需剂量。在某些实施方案中，药剂通过在延长的时段内或连续地输注来施用。剂量可被规定为每小时、每天、每周或每个月的药剂的量。

[0077] “下游”是指朝3'端的相对方向或核酸的C末端。

[0078] “有效量”在调节活性或治疗或预防病状的情况下意指向需要所述调节、治疗或防治的受试者以单次剂量或一系列剂量的一部分形式施用有效调节所述效应，或治疗或防治或改善所述病状的药剂的量。有效量可在个体间变化，取决于待治疗个体的健康和身体条件、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、个体的医疗条件的评价以及其他相关因素。

[0079] “功效”意指产生所需效果的能力。

[0080] “表达”包括基因密码信息借以转化成细胞中存在且起作用的结构的所有功能。所述结构包括但不限于转录及转译的产物。

[0081] “完全互补”或“100％互补”意指第一核酸的各核酸碱基在第二核酸中皆具有互补核酸碱基。在某些实施方案中，第一核酸是反义化合物且靶核酸是第二核酸。

[0082] “缺口聚物(Gapmer)”意指其中具有多个支持RNA酶H裂解的核苷的内部区域位于具有一个或多个核苷的外部区域之间的嵌合反义化合物，其中包含内部区域的核苷化学上不同于包含外部区域的核苷。内部区域可称为“缺口”且外部区域可称为“翼”。

[0083] “卤基”和“卤素”意指选自氟、氯、溴以及碘的原子。

[0084] “杂芳基”和“杂芳香族”意指包含单环或多环芳环、环系统或稠环系统的基团，其中至少一个环为芳香族的并且包括一个或多个杂原子。杂芳基还意图包括稠环系统，所述稠环系统包括其中一个或多个稠环不含有杂原子的系统。杂芳基通常包括一个选自硫、氮或氧的环原子。杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹喔啉基等。杂芳基可直接或通过连接部分如脂肪族基团或杂原子连接至母体分子。如本文所使用的杂芳基可任选地包括另外的取代基。

[0085] “杂交”意指互补核酸分子的退火。在某些实施方案中，互补核酸分子包括但不限于反义化合物和靶核酸。在某些实施方案中，互补核酸分子包括但不限于反义寡核苷酸与核酸靶。

[0086] “鉴定具有炎性疾病的动物”意指鉴定已被诊断为炎性疾病或易发展炎性疾病的动物。易发展炎性疾病的个体包括具有发展炎性疾病的包括环境因素、对一种或多种炎性疾病具有个人或家族史或遗传素质的一种或多种风险因素的那些。此鉴定可通过包括评估个体的医疗史和标准临床测试或评估的任何方法(诸如遗传测试)来实现。

[0087] “鉴定具有PKK相关疾病的动物”意指鉴定已被诊断为PKK相关疾病或易发展PKK相关疾病的动物。易发展PKK相关疾病的个体包括具有发展PKK相关疾病的包括具有一种或多种PKK相关疾病的个人或家族史或遗传素质的一种或多种风险因素的那些。此鉴定可通过包括评估个体的医疗史和标准临床测试或评估的任何方法(诸如遗传测试)来实现。

[0088] “鉴定具有血栓栓塞疾病的动物”意指鉴定已被诊断为血栓栓塞疾病或易发展血栓栓塞疾病的动物。易发展血栓栓塞疾病的个体包括具有发展血栓栓塞疾病的包括具有一种或多种血栓栓塞疾病的个人或家族史或遗传素质、不活动性、外科手术(具体地讲矫形手

术)、恶性肿瘤、妊娠、年纪大、口服避孕药的使用、心房颤动、先前的血栓栓塞病状、慢性炎性疾病以及遗传性或获得性预防血栓剂凝血病症的一种或多种风险因素的那些。此鉴定可通过包括评估个体的医疗史和标准临床测试或评估的任何方法(诸如遗传测试)来实现。

[0089] “紧邻”意指在紧邻的要素之间没有插入要素。“个体”意指选用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0090] “个体”意指选用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0091] “抑制PKK”意指降低PKK mRNA和/或蛋白质的水平或表达。在某些实施方案中,相较于在不存在PKK反义化合物(诸如反义寡核苷酸)下PKK mRNA和/或蛋白质的表达水平,PKK mRNA和/或蛋白质水平在靶向PKK的反义化合物(包括靶向PKK的反义寡核苷酸)存在下得到抑制。

[0092] “抑制表达或活性”是指降低或阻断表达或活性且不一定指示完全消除表达或活性。

[0093] “核苷间键联”是指核苷之间的化学键。

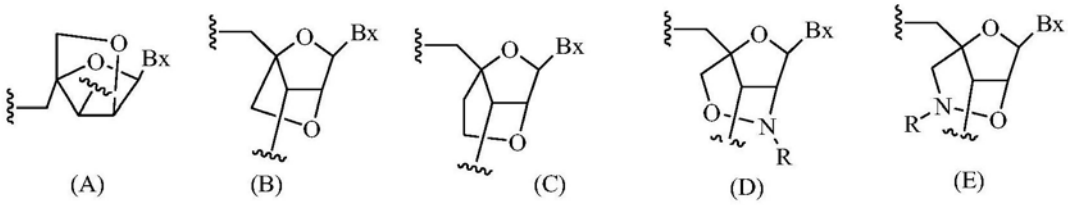
[0094] “核苷间中性连接基团”意指直接连接两个核苷的中性连接基团。

[0095] “核苷间磷连接基团”意指直接连接两个核苷的磷连接基团。

[0096] “键联基序”意指寡核苷酸或其区中的键联修饰的模式。这样的寡核苷酸的核苷可为修饰或未修饰的。除非另外指出,否则本文中仅描述键联的基序意图为键联基序。因此,在所述情况下,核苷不受限制。

[0097] “连接的核苷”意指由核苷间键联连接在一起的相邻核苷。

[0098] “锁核酸”或“LNA”或“LNA核苷”意指在核苷糖单位的4'位与2'位之间具有连接两个碳原子,从而形成双环糖的桥的核酸单体。此类双环糖的实例包括但不限于A)α-L-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')LNA;(B)β-D-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')LNA;(C)亚乙氧基(4'-$(CH_2)_2$-O-2')LNA;(D)氨氧基(4'-CH_2-O-N(R)-2')LNA;及(E)氧氨基(4'-CH_2-N(R)-O-2')LNA,如下文所示。

[0099] 

[0100] 如本文所使用,LNA化合物包括但不限于在糖的4'位与2'位之间具有至少一个桥的化合物,其中所述桥中的每一个独立地包含1个或2至4个独立地选自以下的连接基团:-[C(R_1)(R_2)]$_n$-、-C(R_1)=C(R_2)-、-C(R_1)=N-、-C(=NR$_1$)-、-C(=O)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R_1)$_2$-、-S(=O)$_x$-以及-N(R_1)-;其中:x为0、1或2;n为1、2、3或4;R_1和R_2各自独立地为H、保护基、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C_5-C_7脂环基、取代的C_5-C_7脂环基、卤素、OJ$_1$、NJ$_1$J$_2$、SJ$_1$、N$_3$、COOJ$_1$、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J$_1$)或磺酸氧基(S(=O)-J$_1$);并且J$_1$和J$_2$各自独立地为H、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C_1-C_{12}氨基

烷基、取代的C_1-C_{12}氨基烷基或保护基。

[0101] LNA的定义内所涵盖的4'-2'桥连基团的实例包括但不限于下式中的一种:-[C(R_1)(R_2)]$_n$-、-[C(R_1)(R_2)]$_n$-O-、-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-或-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-。此外,LNA定义中所涵盖的其他桥连基团为4'-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_2$-2'、4'-$(CH_2)_3$-2'、4'-CH_2-O-2'、4'-$(CH_2)_2$-O-2'、4'-CH_2-O-N(R_1)-2'以及4'-CH_2-N(R_1)-O-2'-桥,其中R_1和R_2各自独立地为H、保护基或C_1-C_{12}烷基。

[0102] 根据本发明的LNA的定义内还包括如下LNA,其中核糖基糖环的2'-羟基连接至糖环的4'碳原子,从而形成亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')桥而形成双环糖部分。桥还可为连接2'氧原子与4'碳原子的亚甲基(-CH_2-),对于其使用术语亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')LNA。此外,在于这个位置上具有亚乙基桥连基团的双环糖部分的情况下,使用术语亚乙氧基(4'-CH_2CH_2-O-2')LNA。在本文所用的LNA的定义内还涵盖α-L-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2'),其为亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')LNA的异构体。

[0103] "错配"或"非互补核碱基"是指当第一核酸的核碱基不能与第二或靶核酸的对应核碱基配对的情况。

[0104] "修饰的核苷间键联"是指来自天然存在核苷间键(即,磷酸二酯核苷间键)的取代或任何变化。

[0105] "修饰的核碱基"意指任何除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶(也称为5-甲基尿嘧啶)或尿嘧啶以外的核碱基。"未修饰的核碱基"意指嘌呤碱基腺嘌呤(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)。

[0106] "修饰的核苷"意指独立地具有修饰的糖部分和/或修饰的核酸碱基的核苷。

[0107] "修饰的核苷酸"意指单独地具有修饰的糖部分、修饰的核苷间键联和/或修饰的核碱基的核苷酸。

[0108] "修饰的寡核苷酸"意指包含至少一个修饰的核苷间键联、修饰的糖和/或修饰的核酸碱基的寡核苷酸。

[0109] "修饰的糖"意指与天然糖部分相比存在取代和/或任何变化。

[0110] "单环系统或多环系统"意指包括选自单一或多环基团环系统的所有环系统,其中环稠合或连接并且意图包括单独地选自以下的单环系统和混合环系统:脂肪族、脂环族、芳基、杂芳基、芳烷基、芳基烷基、杂环、杂芳基、杂芳香族以及杂芳基烷基。所述单环结构和多环结构可含有环,所述环各自具有相同水平的饱和或各自独立地具有不同程度的饱和,包括完全饱和、部分饱和或完全不饱和。每个环可包含选自C、N、O和S的环原子以产生杂环以及仅包含C环原子的环,所述环可存在于混合基序中,例如像苯并咪唑,其中一个环仅具有碳环原子并且稠环具有两个氮原子。单环系统或多环系统可进一步被取代基取代,例如像具有两个连接至环中的一个的=O基团的邻苯二甲酰亚胺。单环系统或多环系统可使用各种策略连接至母体分子,如直接通过环原子、通过多个环原子稠合、通过取代基或通过双官能连接部分。

[0111] "单体"意指寡聚物的单个单元。单体包括但不限于天然存在或修饰的核苷和核苷酸。

[0112] "基序"意指反义化合物中未修饰的及修饰的核苷的模式。

[0113] "天然糖部分"意指见于DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中的糖部分。

[0114] “天然存在的核苷间键联”意指3’至5’磷酸二酯键联。

[0115] “中性连接基团”意指不带电荷的连接基团。中性连接基团包括但不限于磷酸三酯、甲基膦酸酯、MMI(-CH_2-N(CH_3)-O-)、酰胺-3(-CH_2-C(=O)-N(H)-)、酰胺-4(-CH_2-N(H)-C(=O)-)、甲乙缩醛(-O-CH_2-O-)以及硫代甲乙缩醛(-S-CH_2-O-)。其他的中性连接基团包括包含硅氧烷(二烷基硅氧烷)的非离子键联、羧酸盐酯、羧酰胺、硫醚、磺酸酯以及磺酰胺(参见例如:Carbohydrate Modifications in Antisense Research;Y.S.Sanghvi和P.D.Cook编,ACS Symposium Series 580;第3和4章,(第40-65页))。其他的中性连接基团包括包含混合的N、O、S和CH_2组成部分的非离子键联。

[0116] “非互补核碱基”是指一对彼此不形成氢键或以其他方式支持杂交的核碱基。

[0117] “非核苷间中性连接基团”意指不直接连接两个核苷的中性连接基团。在某些实施方案中,非核苷间中性连接基团将核苷连接至除核苷之外的基团。在某些实施方案中,非核苷间中性连接基团连接两个基团,所述两个基团中没有一个为核苷。

[0118] “非核苷间磷连接基团”意指不直接连接两个核苷的磷连接基团。在某些实施方案中,非核苷间磷连接基团将核苷连接至除核苷之外的基团。在某些实施方案中,非核苷间磷连接基团连接两个基团,所述两个基团中没有一个为核苷。

[0119] “核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括但不限于核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸、双链核酸、小干扰核糖核酸(siRNA)及微小RNA(miRNA)。

[0120] “核碱基”意指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0121] “核碱基互补性”是指能够与另一核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)互补。例如,在RNA中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)互补。在某些实施方案中,互补核碱基是指反义化合物中能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,如果反义化合物的某个位置上的核碱基能够与靶核酸的某个位置上的核碱基氢键合,那么寡核苷酸与靶核酸之间的氢键合的位置被认为在所述核碱基对上是互补的。

[0122] “核碱基修饰基序”意指沿着寡核苷酸的核碱基的修饰的模式。除非另外指出,否则核碱基修饰基序不依赖于核碱基序列。

[0123] “核酸碱基序列”意指连续核碱基的次序,而与任何糖、键联和/或核碱基修饰无关。

[0124] “核苷”意指连接至糖的核碱基。

[0125] “核苷模拟物”包括用于在低聚化合物的一个或多个位置处置换糖或糖和碱基且不一定要置换键联的那些结构:例如像具有吗啉代、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、双环或三环糖模拟物例如非呋喃糖单元的核苷模拟物。核苷酸模拟物包括用于在低聚化合物的一个或多个位置处置换核苷和键联的那些结构,例如像肽核酸或N-吗啉基(由-N(H)-C(=O)-O-或其他非磷酸二酯键联连接的N-吗啉基)。糖替代物与稍微更广泛的术语核苷模拟物重叠,但仅旨在指示置换糖单位(呋喃糖环)。本文提供的四氢吡喃基环说明糖替代物的一个实例,其中呋喃糖糖基已被四氢吡喃基环系统置换。“模拟物”是指替代糖、核碱基和/或核苷间键联的基团。一般而言,使用模拟物替代糖或糖-核苷间键组合,且维持核酸碱基以便与所选靶杂交。

[0126] “核苷基序”意指寡核苷酸或其区中的核苷修饰的模式。这样的寡核苷酸的键联可为修饰或未修饰的。除非另外指出,否则本文中仅描述核苷的基序意图为核苷基序。因此,

在所述情况下，键联不受限制。

[0127] “核苷酸”意指具有共价连接至核苷的糖部分的磷酸酯基团的核苷。

[0128] “脱靶效应”是指与调节除预定靶核酸以外的基因的RNA或蛋白质表达有关的不必要或有害的生物效应。

[0129] “低聚化合物”或“低聚物”意指具有连接的单体亚单位且能够与核酸分子的至少一个区杂交的聚合物。

[0130] “寡核苷酸”意指连接核苷的聚合物，每个核苷可被修饰或未修饰，彼此无关。

[0131] “以胃肠外方式施用”意指经由注射(例如快速注射)或输注施用。以胃肠外方式施用包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、腹膜内施用或颅内施用，例如鞘内或脑室内施用。

[0132] “肽”意指通过由酰胺键连接至少两个氨基酸而形成的分子。在无限制的情况下，本文所用的“肽”是指多肽和蛋白质。

[0133] “药剂”意指当施用给个体时提供治疗益处的物质。例如，在某些实施方案中，靶向PKK的反义寡核苷酸为药剂。

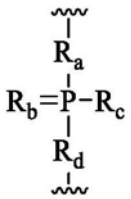
[0134] “药物组合物”意指适于向受试者施用的物质的混合物。例如，药物组合物可包含反义寡核苷酸和无菌水溶液。

[0135] “药学上可接受的衍生物”涵盖本文所述的化合物的药学上可接受的盐、缀合物、前药或异构体。

[0136] “药学上可接受的盐”意指反义化合物的生理上和药学上可接受的盐，即，保留母体化合物的所需生物活性且不会赋予不希望的毒理学效应的盐。

[0137] “硫代磷酸酯键联”意指核苷之间的键联，其中磷酸二酯键通过用硫原子置换非桥联氧原子之一而被修饰。硫代磷酸酯键联为修饰的核苷间键联。

[0138] “磷连接基团”意指包含磷原子的连接基团。磷连接基团包括但不限于具有下式的基团：

[0139] 

[0140] 其中：

[0141] R_a和R_d各自独立地为O、S、CH_2、NH或NJ_1，其中J_1为C_1-C_6烷基或取代的C_1-C_6烷基；

[0142] R_b为O或S；

[0143] R_c为OH、SH、C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_1-C_6烷氧基、取代的C_1-C_6烷氧基、氨基或取代的氨基；并且

[0144] J_1为R_b为O或S。

[0145] 磷连接基团包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、膦酸酯、氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫羰基烷基膦酸酯、磷酸三酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硼烷磷酸酯。

[0146] “PKK”意指哺乳动物血浆前激肽释放酶，包括人血浆前激肽释放酶。血浆前激肽释放酶(PKK)为由KLKB1基因编码的血浆激肽释放酶(PK)的前体。

[0147] “PKK相关的疾病”意指任何与任何PKK核酸或其表达式相关的疾病。此类疾病可以包括炎性疾病或血栓栓塞疾病。此类疾病可以包括遗传性血管性水肿(HAE)。

[0148] “PKK mRNA”意指编码PKK的DNA序列的任何信使RNA表达产物。

[0149] “PKK核酸”意指编码PKK的任何核酸。例如,在某些实施方案中,PKK核酸包括编码PKK的DNA序列、从编码PKK的DNA(包括含有内含子和外显子的基因组DNA)转录的RNA序列以及编码PKK的mRNA序列。“PKK mRNA”意指编码PKK蛋白质的mRNA。

[0150] “PKK蛋白质”意指PKK核酸的多肽表达产物。

[0151] “部分”意指核酸中确定数目的连续(即连接的)核酸碱基。在某些实施方案中,部分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,部分是反义化合物的限定数目的连续核碱基。

[0152] “预防(prevent)”或“预防(preventing)”是指延迟或防止疾病、病症或病状的发作或发展从几分钟到几天、从几周到几个月或无限的一段时间。

[0153] “前药”意指以非活性形式制备且在身体或其细胞内通过内源酶或其他化学物质和/或条件的作用转化成活性形式(即药物)的治疗剂。

[0154] “防治有效量”是指向动物提供防治或预防益处的药剂的量。

[0155] “保护基”意指本领域技术人员已知的任何化合物或保护基。保护基的非限制性实例可见于″Protective Groups in Organic Chemistry″,T.W.Greene、P.G.M.Wuts,ISBN 0-471-62301-6,John Wiley&Sons,Inc,New York,所述参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0156] “区”被定义为靶核酸中具有至少一个可鉴别的结构、功能或特征的部分。

[0157] “核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2’位上具有羟基的核苷酸。核糖核苷酸可被多种取代基中的任一种修饰。

[0158] “基于RISC的反义化合物”意指反义化合物,其中反义化合物的至少一些反义活性可归因于RNA诱导的沉默复合物(RISC)。

[0159] “基于RNA酶H的反义化合物”意指反义化合物,其中反义化合物的至少一些反义活性可归因于反义化合物与靶核酸的杂交和随后的RNA酶H对靶核酸的裂解。

[0160] “盐”意指反义化合物的生理学上及药学上可接受的盐,即保持母体寡核苷酸的所需生物活性且不赋予其不合需要的毒理效应的盐。

[0161] “区段”被定义为靶核酸内的区的较小部分或子部分。

[0162] “单独区”意指寡核苷酸的部分,其中任何相邻部分的化学修饰或化学修饰的基序包括至少一个差异以允许单独的区彼此区分。

[0163] “序列基序”意指沿着寡核苷酸或其部分布置的核碱基的模式。除非另外指出,否则序列基序不依赖于化学修饰并且因此可具有化学修饰的任何组合,包括没有化学修饰。

[0164] “副作用”意指除所需作用以外的可归因于治疗的生理反应。在某些实施方案中,副作用包括不限于注射部位反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝中毒、肾中毒、中枢神经系统异常及肌病。

[0165] “单链寡核苷酸”意指未与互补链杂交的寡核苷酸。

[0166] 本文所用的“位点”被定义为靶核酸内的独特核酸碱基位置。

[0167] “可特异性杂交的”或“特异性杂交”是指在反义寡核苷酸与靶核酸之间具有足够

程度的互补性以诱导所需效应，同时在体内测定和治疗学处理的情况下在需要特异性结合的条件下，即，在生理条件下对非靶核酸表现出极小的作用或无作用的反义化合物。

[0168] “严格杂交条件”或“严格条件”是指低聚化合物与其靶序列杂交，但与极少数目的其他序列杂交的条件。

[0169] “受试者”意指选用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0170] “取代基(substituent)”和“取代基(substituent group)”意指置换指定母体化合物的原子或基团的原子或基团。例如，修饰核苷的取代基为不同于在天然存在的核苷中发现的原子或基团的任何原子或基团(例如，修饰的2'-取代基为在核苷的2'-位上的除H或OH之外的任何原子或基团)。取代基可为保护或未保护的。在某些实施方案中，本公开的化合物在母体化合物的一个位置上或多于一个位置上具有取代基。取代基还可进一步被其他取代基取代并且可直接连接或通过连接基团诸如烷基或烃基连接至母体化合物。

[0171] 同样，如本文所使用，关于化学官能团的“取代基”意指不同于通常存在于指定官能团中的原子或原子基团的原子或原子基团。在某些实施方案中，取代基替代官能团的氢原子(例如，在某些实施方案中，取代的甲基的取代基为替代未取代的甲基的一个氢原子的除氢之外的原子或基团)。除非另外指出，否则适合用作取代基的基团包括但不限于卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基(-C-(O)-R_{aa})、羧基(-C(O)O-R_{aa})、脂族基团、脂环基、烷氧基、取代的氧基(-O-R_{aa})、芳基、芳烷基、杂环基、杂芳基、杂芳基烷基、氨基(-N(R_{bb})(R_{cc}))、亚氨基(=NR_{bb})、酰胺基(-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})或-N(R_{bb})C(O)R_{aa})、叠氮基(-N_3)、硝基(-NO_2)、氰基(-CN)、脲基(carbamido)(-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})或-N(R_{bb})C(O)OR_{aa})、脲基(-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc}))、硫脲基(-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})-(R_{cc}))、胍基(-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}))、脒基(-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})或-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa}))、巯基(-SR_{bb})、亚硫酰基(-S(O)R_{bb})、磺酰基(-S(O)$_2$$R_{bb}$)以及氨磺酰基(-S(O)$_2$N($R_{bb}$)($R_{cc}$)或-N($R_{bb}$)S-(O)$_2$$R_{bb}$)。其中每个$R_{aa}$、$R_{bb}$和$R_{cc}$独立地为H、任选连接的化学官能团或其他的具有优选列表的取代基，所述列表包括但不限于烷基、烯基、炔基、脂肪族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳基、脂环族、杂环和杂芳基烷基。本文描述的化合物内的所选取代基以一定递归度存在。

[0172] “取代的糖部分”意指并非天然存在的糖部分的呋喃糖基。取代的糖部分包括但不限于在2'-位、3'-位、5'-位和/或4'-位上包含取代基的呋喃糖基。某些取代的糖部分为双环糖部分。

[0173] “糖部分”是指核苷的天然存在的糖部分或修饰的糖部分。

[0174] “糖基序”意指寡核苷酸或其区中的糖修饰的模式。

[0175] 术语“糖替代物”意指如下结构：所述结构不包含呋喃糖基并且能够置换核苷的天然存在的糖部分，使得所得到的核苷亚基能够连接在一起和/或与其他核苷连接以形成能够与互补的低聚化合物杂交的低聚化合物。所述结构包括如下环：所述环包含与呋喃糖基(例如，4元环、6元环或7元环)不同的原子数；用非氧原子(例如，碳、硫或氮)替代呋喃糖基的氧；或原子数和氧替代均有所变化。所述结构还可包含对应于对于取代的糖部分所描述的那些取代的取代(例如，任选包含另外取代基的6元碳环双环糖替代物)。糖替代物还包括更复杂的糖代替物(例如，肽核酸的非环系统)。糖替代物包括但不限于吗啉代、环己烯基和环己六醇。

[0176] “靶”是指需要调节的蛋白质。

[0177] “靶基因”是指编码靶的基因。

[0178] “靶向”或“靶向的”意指将与靶核酸特异性杂交并诱导所需效应的反义化合物的设计和选择的过程。

[0179] “靶核酸”、“靶RNA”、“靶RNA转录物”及“核酸靶”都意指能够由反义化合物靶向的核酸。

[0180] “靶区”意指靶核酸中由一种或多种反义化合物所靶向的部分。

[0181] “靶区段”意指反义化合物所靶向的靶核酸的核苷酸的序列。“5’靶位点”是指靶区段的最5’核苷酸。“3’靶位点”是指靶区段的最3’核苷酸。

[0182] “端基”意指连接至寡核苷酸的3’末端或5’末端中的任一或两者的一个或多个原子。在某些实施方案中，端基为缀合物基团。在某些实施方案中，端基包含一个或多个端基核苷。

[0183] “末端核苷间键联”意指寡核苷酸或其限定区的最后两个核苷之间的键联。

[0184] “治疗有效量”意指向个体提供治疗益处的药剂的量。

[0185] “治疗(Treat)”或“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指施用组合物以实现疾病或病状的改善。

[0186] 关于核苷或一种“类型”的核苷的“修饰类型”意指核苷的化学修饰并且包括修饰和未修饰的核苷。因此，除非另外指出，否则“具有第一类型的修饰的核苷”可为未修饰的核苷。

[0187] “未修饰的核碱基”意指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。

[0188] “未修饰的核苷酸”意指由天然存在的核碱基、糖部分及核苷间键构成的核苷酸。在某些实施方案中，未修饰的核苷酸为RNA核苷酸(即，β-D-核糖核苷)或DNA核苷酸(即，β-D-脱氧核糖核苷)。

[0189] “上游”是指朝5’端的相对方向或核酸的N末端。

[0190] “翼区段”意指被修饰来赋予寡核苷酸以如抑制活性增强、对靶核酸的结合亲和力增强或对由体内核酸酶引起的降解具抗性的性质的多个核苷。

[0191] 某些实施方案

[0192] 某些实施方案提供用于抑制血浆前激肽释放酶(PKK)mRNA和蛋白质表达的化合物、组合物和方法。某些实施方案提供用于降低PKK mRNA和蛋白质水平的化合物、组合物和方法。

[0193] 某些实施方案提供靶向血浆前激肽释放酶(PKK)核酸的反义化合物。在某些实施方案中，PKK核酸为以下各项中所列的序列：GENBANK登录号NM_000892.3(以SEQ ID NO:1形式并入本文)、GENBANK登录号DC412984.1(以SEQ ID NO:2形式并入本文)、GENBANK登录号CN265612.1(以SEQ ID NO:3形式并入本文)、GENBANK登录号AK297672.1(以SEQ ID NO:4形式并入本文)、GENBANK登录号DC413312.1(以SEQ ID NO:5形式并入本文)、GENBANK登录号AV688858.2(以SEQ ID NO:6形式并入本文)、GENBANK登录号CD652077.1(以SEQ ID NO:7形式并入本文)、GENBANK登录号BC143911.1(以SEQ ID NO:8形式并入本文)、GENBANK登录号CB162532.1(以SEQ ID NO:9形式并入本文)、从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19(以SEQ ID NO:10形式并入本文)、GENBANK登录号NM_

008455.2(以SEQ ID NO:11形式并入本文)、GENBANK登录号BB598673.1(以SEQ ID NO:12形式并入本文)、从核碱基6114001至6144000截短的GENBANK登录号NT_039460.7(以SEQ ID NO:13形式并入本文)、GENBANK登录号NM_012725.2(以SEQ ID NO:14形式并入本文)、从核碱基10952001至10982000截短的GENBANK登录号NW_047473.1(以SEQ ID NO:15形式并入本文)、GENBANK登录号XM_002804276.1(以SEQ ID NO:17形式并入本文)、以及从核碱基2358000至2391000截短的GENBANK登录号NW_001118167.1(以SEQ ID NO:18形式并入本文)。

[0194] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成,并且具有包含SEQ ID NO:30-2226的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0195] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成,并且具有包含SEQ ID NO:570的核碱基序列的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0196] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成,并且具有包含SEQ ID NO:705的核碱基序列的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0197] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成,并且具有包含SEQ ID NO:1666的核碱基序列的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列。

[0198] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有SEQ ID NO:570的核碱基序列。

[0199] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有SEQ ID NO:705的核碱基序列。

[0200] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由16个连接核苷组成并且具有SEQ ID NO:1666的核碱基序列。

[0201] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物,其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成,并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列:62、72、103、213、312、334-339、344、345、346、348、349、351、369、373、381、382、383、385、387-391、399、411、412、414、416、444、446-449、452、453、454、459、460、462-472、473、476、477、479、480、481、484、489-495、497、500、504、506、522、526、535、558、559、560、564、566、568-571、573、576、577、578、587、595、597-604、607、608、610、613、615、618、619、622、623、624、633、635、636、638、639、640、642、643、645、652、655-658、660、661、670、674-679、684、685、698、704、705、707、708、713、716、717、728、734、736、767、768、776、797、798、800、802、810、815、876、880、882、883、886、891、901-905、908-911、922、923、924、931、942、950-957、972、974、978、979、980、987-991、1005、1017-1021、1025、1026、1029、1030、1032、

1034、1035、1037、1040、1041、1045、1046、1051、1054、1059、1060、1061、1064、1065、1066、1075、1076、1087、1089、1111、1114、1116、1117、1125、1133、1153、1169、1177、1181、1182、1187、1196、1200、1214、1222、1267、1276、1277、1285、1286、1289、1290、1291、1303、1367、1389、1393、1398-1401、1406、1407、1408、1411、1419-1422、1426、1430、1431、1432、1434-1437、1439、1440、1443、1444、1451、1452、1471、1516、1527、1535、1537、1538、1539、1540、1541、1563、1564、1567、1568、1616、1617、1623、1629、1664、1665、1666、1679、1687、1734、1804、1876、1886、1915、2008、2018、2100、2101、2115以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现PKK的至少80％mRNA抑制。

[0202] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：62、72、103、213、334-339、344、346、348、349、351、381、382、383、385、389、390、391、446、448、452、453、454、466-473、476、481、484、491、492、494、495、497、504、526、558、559、566、568-571、576、578、587、595、597、598、600-604、607、610、613、618、619、624、635、638、639、645、652、656、657、658、660、674、675、676、684、698、704、705、707、713、716、768、876、880、901-905、908-911、922、923、924、931、942、951、954-957、972、974、978、979、987、988、990、1005、1019、1020、1021、1025、1032、1037、1040、1041、1045、1054、1059、1060、1061、1064、1065、1066、1075、1111、1116、1117、1125、1133、1153、1169、1177、1200、1222、1267、1285、1290、1291、1303、1367、1398、1399、1401、1406、1408、1411、1419、1420、1421、1426、1430、1431、1432、1434-1437、1440、1443、1444、1451、1537-1540、1563、1616、1679、1687、1804、2008、2101、2115以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现PKK的至少85％mRNA抑制。

[0203] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、346、351、382、390、391、446、448、452、453、468、469、470、471、472、476、481、491、495、504、558、566、568、570、571、578、587、597、598、600、604、613、635、638、645、656、658、660、674、675、684、704、705、880、901-905、909、922、931、951、954、956、990、1005、1020、1032、1037、1040、1041、1045、1054、1075、1111、1125、1133、1153、1200、1267、1291、1303、1398、1399、1401、1406、1420、1426、1430、1431、1434、1435、1436、1440、1443、1451、1537-1540、2115以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现PKK的至少90％mRNA抑制。

[0204] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、391、448、468、469、568、570、598、635、658、674、684、705、901、903、904、922、990、1267、1291、1420、1430、1431、1434、1435、1436、1537、1538以及1540。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现PKK的至少95％mRNA抑制。

[0205] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸

由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、338、346、349、382、383、390、448、452、453、454、495、526、559、570、587、598、635、660、705、901、903、904、908、923、931、955、974、988、990、1020、1039、1040、1111、1117、1267、1291、1349、1352、1367、1389、1393、1399、1401、1408、1411、1426、1499、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1624、1643、1661、1665、1666、1673、1679、1695、1720、1804、1817、1876、1881、1886、1940、1947、2008、2018、2019、2031、2044、2100、2101、2115以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现0.4或更小的IC_{50}(μM)。

[0206] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、346、349、382、453、454、495、526、570、587、598、635、660、901、903、904、931、955、990、1020、1111、1267、1349、1352、1367、1389、1399、1408、1411、1426、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1643、1661、1665、1666、1673、1695、1804、1876、1881、2019、2044、2100、2101、2115以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现0.3或更小的IC_{50}(μM)。

[0207] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、346、382、453、495、526、570、587、598、635、901、904、931、955、1020、1111、1349、1352、1389、1426、1516、1535、1544、1548、1564、1569、1598、1616、1617、1665、1666、1804、1876、1881、2019、2044、2101以及2116。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现0.2或更小的IC_{50}(μM)。

[0208] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含以下各项SEQ ID NO的核碱基序列中的任一个的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个连续核碱基的核碱基序列：334、495、587、598、635、1349、1352、1389、1516、1544、1548、1569、1598、1617、1665、1666、1804、1881以及2019。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸实现小于0.2的IC_{50}(μM)。

[0209] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0210] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0211] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸

由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0212] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0213] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0214] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0215] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基27362-27524的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0216] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0217] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0218] 某些实施方案提供包含修饰寡核苷酸和缀合物基团的化合物，其中修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且包括包含与PKK核酸的外显子9、外显子12或外显子14的等长部分互补的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0219] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:10至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。

[0220] 在某些实施方案中，化合物由单链修饰的寡核苷酸组成。

[0221] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的至少一个核苷间键联为修饰的核苷间键联。

[0222] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的至少一个修饰核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联。

[0223] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸包含至少1个、2个、3个、4个、5个、6个或7个磷酸二酯核苷间键联。

[0224] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯核苷间键联和硫代磷酸酯核苷间键联。

[0225] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的每个核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联。

[0226] 在某些实施方案中，所述修饰寡核苷酸的至少一个核苷包含修饰的核碱基。

[0227] 在某些实施方案中，修饰的核碱基为5-甲基胞嘧啶。

[0228] 在某些实施方案中，修饰寡核苷酸包含至少一个修饰的糖。

[0229] 在某些实施方案中，修饰的糖为2’修饰的糖、BNA或THP。

[0230] 在某些实施方案中，修饰的糖为2’-O-甲氧基乙基、2’-O-甲基、限制性乙基、LNA或3’-氟代-HNA中的任一个。

[0231] 在某些实施方案中，化合物包含至少一个2’-O-甲氧基乙基核苷、2’-O-甲基核苷、限制性乙基核苷、LNA核苷或3’-氟代-HNA核苷。

[0232] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含：

[0233] 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段；

[0234] 由5个连接的核苷组成的5’翼区段；以及

[0235] 由5个连接的核苷组成的3’翼区段；

[0236] 其中所述缺口区段定位在所述5’翼区段与所述3’翼区段之间并且其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的糖。

[0237] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷组成。

[0238] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由19个连接的核苷组成。

[0239] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由18个连接的核苷组成。

[0240] 某些实施方案提供由缀合物基团和根据下列式修饰寡核苷酸组成的化合物：Tes Ges mCes Aes Aes Gds Tds mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds mCds Aes Aes Aes mCes Ae；其中，

[0241] A＝腺嘌呤，

[0242] mC＝5’-甲基胞嘧啶

[0243] G＝鸟嘌呤，

[0244] T＝胸腺嘧啶，

[0245] e＝2’-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0246] d＝2’-脱氧核苷，并且

[0247] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0248] 某些实施方案提供由缀合物基团和根据下列式修饰寡核苷酸组成的化合物：mCes mCes mCes mCes mCes Tds Tds mCds Tds Tds Tds Ads Tds Ads Gds mCes mCes Aes Ges mCe；其中

[0249] A＝腺嘌呤，

[0250] mC＝5’-甲基胞嘧啶；

[0251] G＝鸟嘌呤，

[0252] T＝胸腺嘧啶，

[0253] e＝2’-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0254] d＝2’-脱氧核苷，并且

[0255] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0256] 某些实施方案提供由缀合物基团和根据下列式修饰寡核苷酸组成的化合物：mCes Ges Aks Tds Ads Tds mCds Ads Tds Gds Ads Tds Tds mCks mCks mCe；其中，

[0257] A＝腺嘌呤，

[0258] mC＝5’-甲基胞嘧啶；

[0259] G＝鸟嘌呤，

[0260] T＝胸腺嘧啶，

[0261] e＝2’-O-甲氧基乙基修饰核苷，

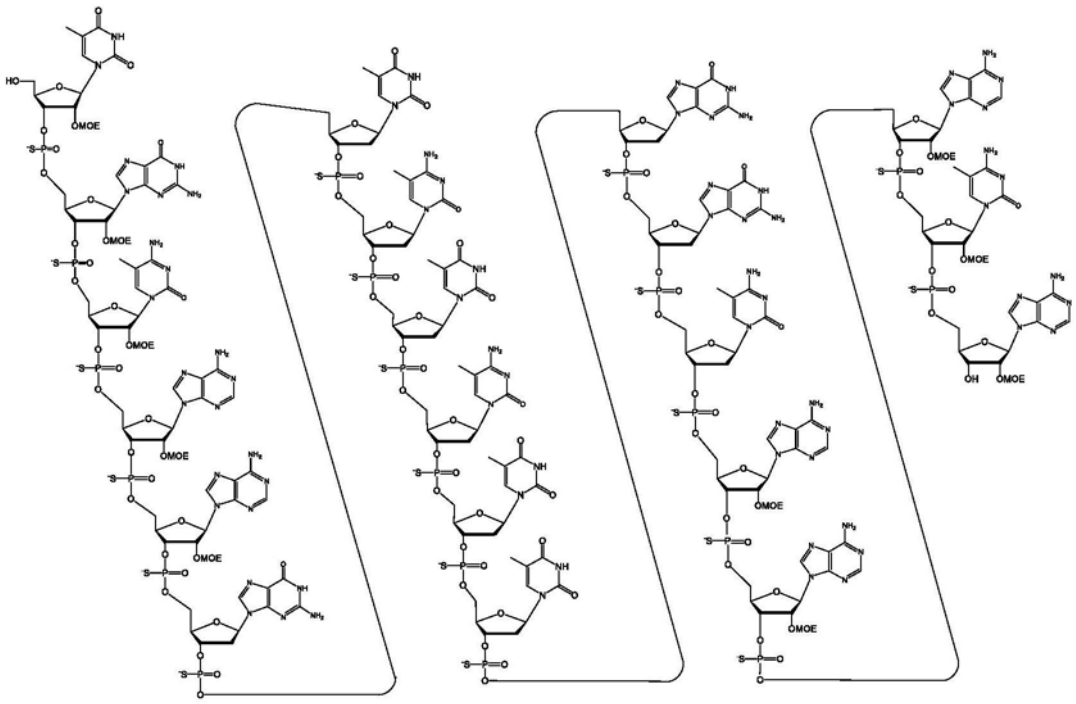
[0262] k＝cEt修饰核苷，

[0263] d＝2’-脱氧核苷，并且

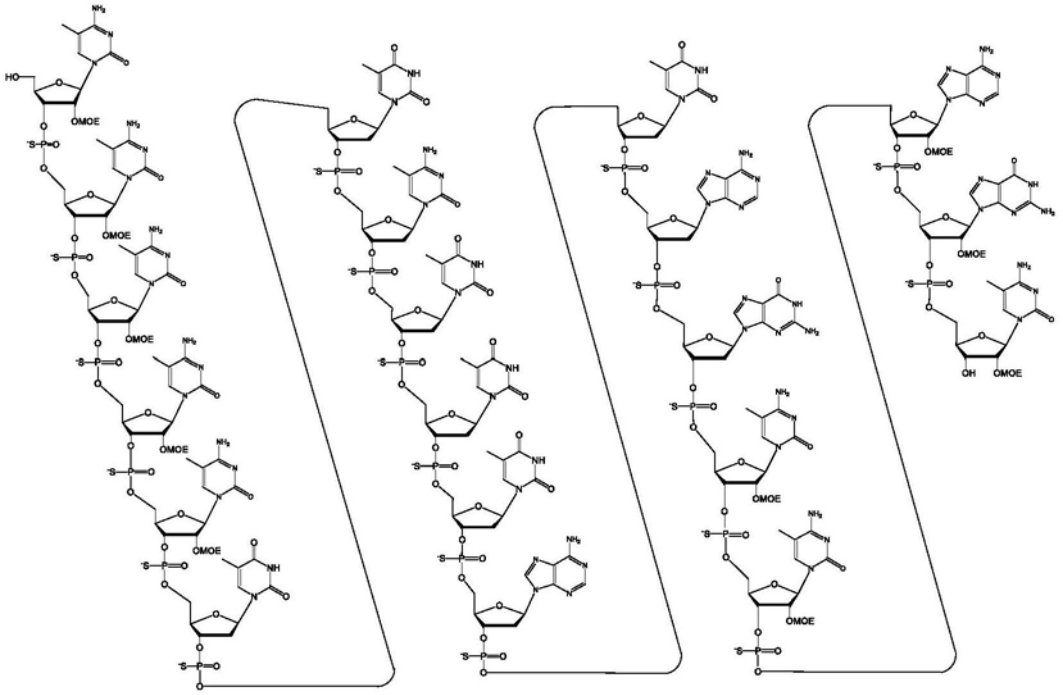
[0264] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0265] 在某些实施方案中，缀合物基团在修饰寡核苷酸的5’端连接至修饰寡核苷酸。在某些实施方案中，缀合物基团在修饰寡核苷酸的3’端连接至修饰寡核苷酸。在某些实施方案中，缀合物基团包含至少一个N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)、至少两个N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)或至少三个N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)。

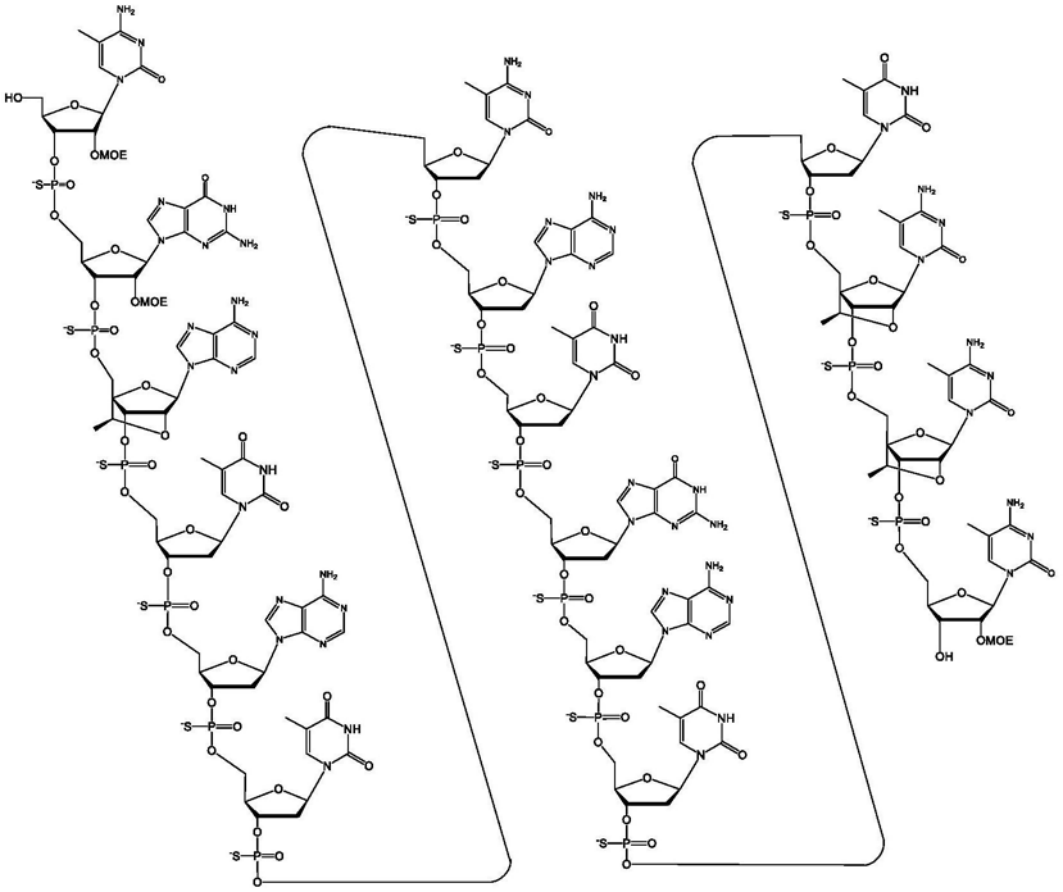
[0266] 某些实施方案提供根据下式的混合物：

[0267] 

[0268] 某些实施方案提供根据下式的混合物：

[0269] 

[0270] 某些实施方案提供根据下式的混合物：

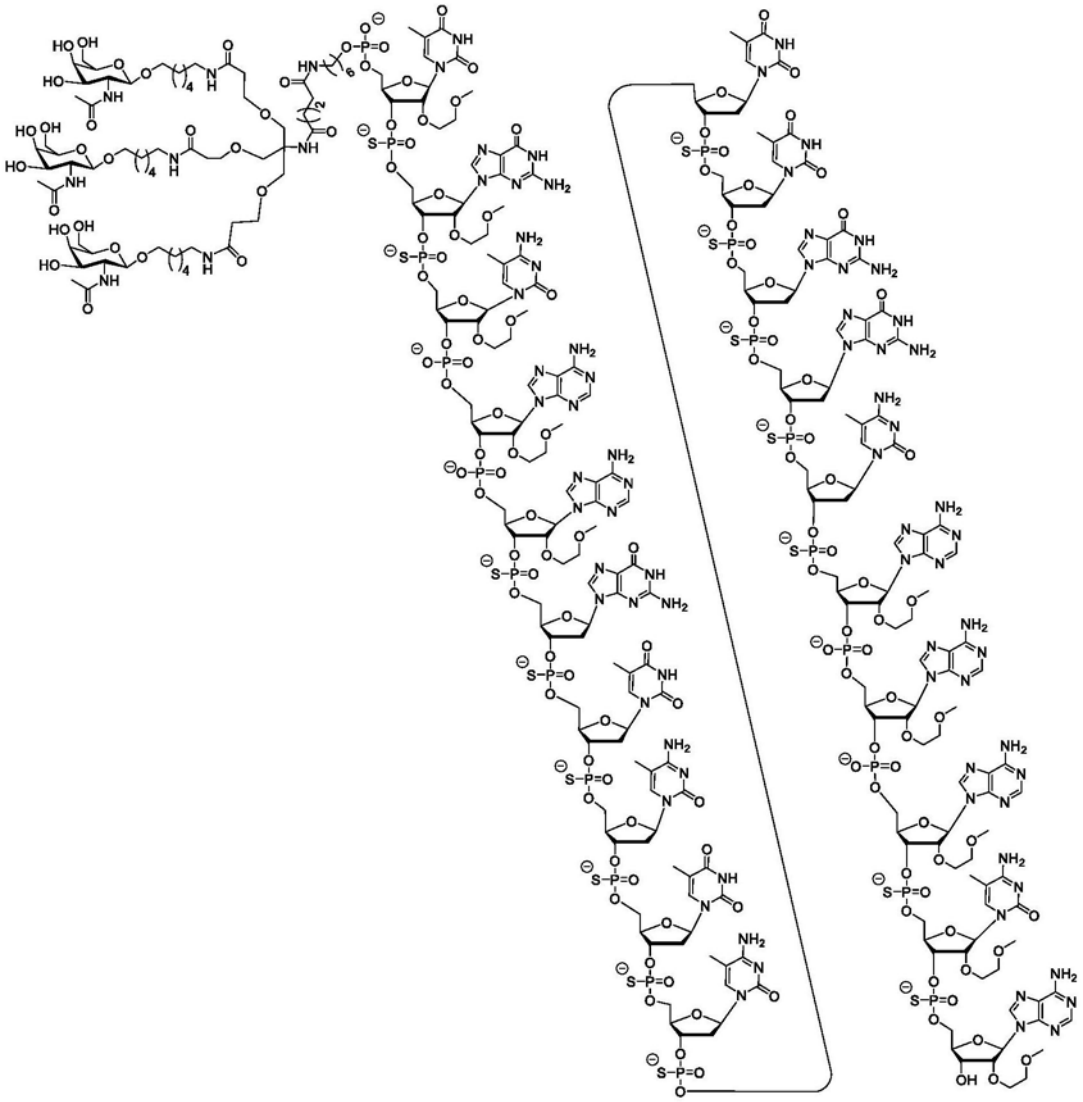
[0271] 

[0272] 在某些实施方案中，化合物可包含本文所述的任何修饰寡核苷酸和缀合物基团或者由本文所述的任何修饰寡核苷酸和缀合物基团组成。在某些实施方案中，化合物可包含修饰寡核苷酸和缀合物基团或者由修饰寡核苷酸和缀合物基团组成，所述修饰寡核苷酸由12至30个连接核苷组成，并且具有包含SEQ ID NO:30-2226的核碱基序列中的任一个的至

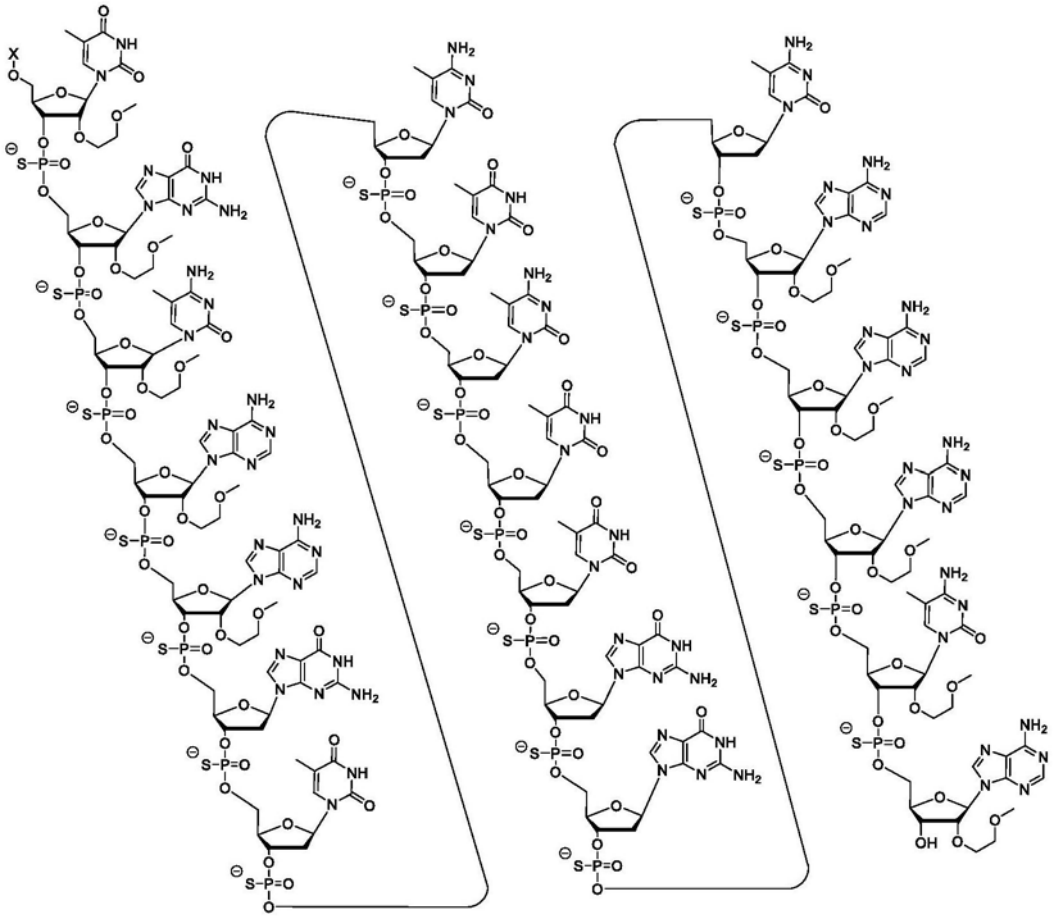
少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19或至少20个连续核碱基的核碱基序列。

[0273] 在某些实施方案中，具有以下化学结构的化合物包含具有5'-X的ISIS 721744或者由具有5'-X的ISIS 721744组成，其中X为包含如本文所述的GalNAc的缀合物基团：

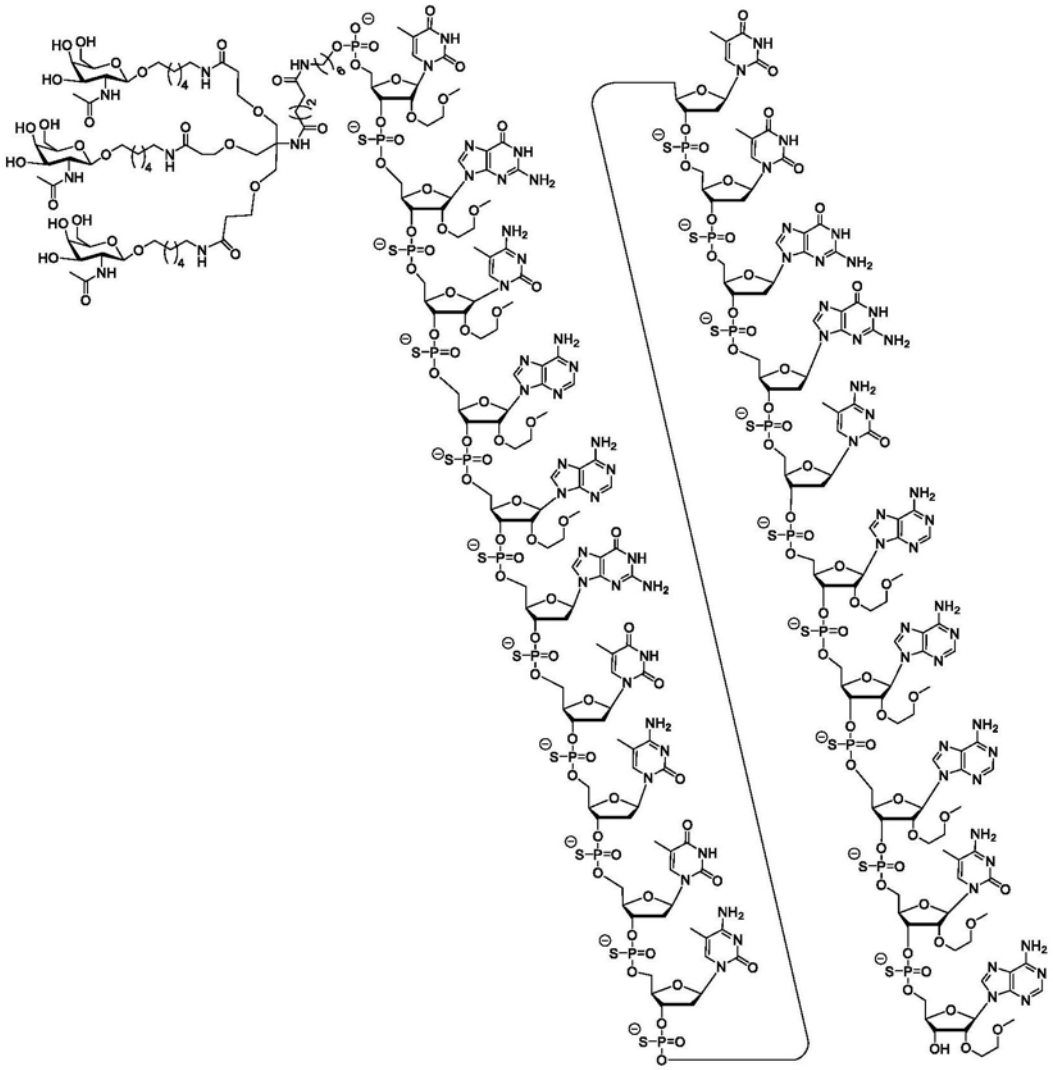
[0274]



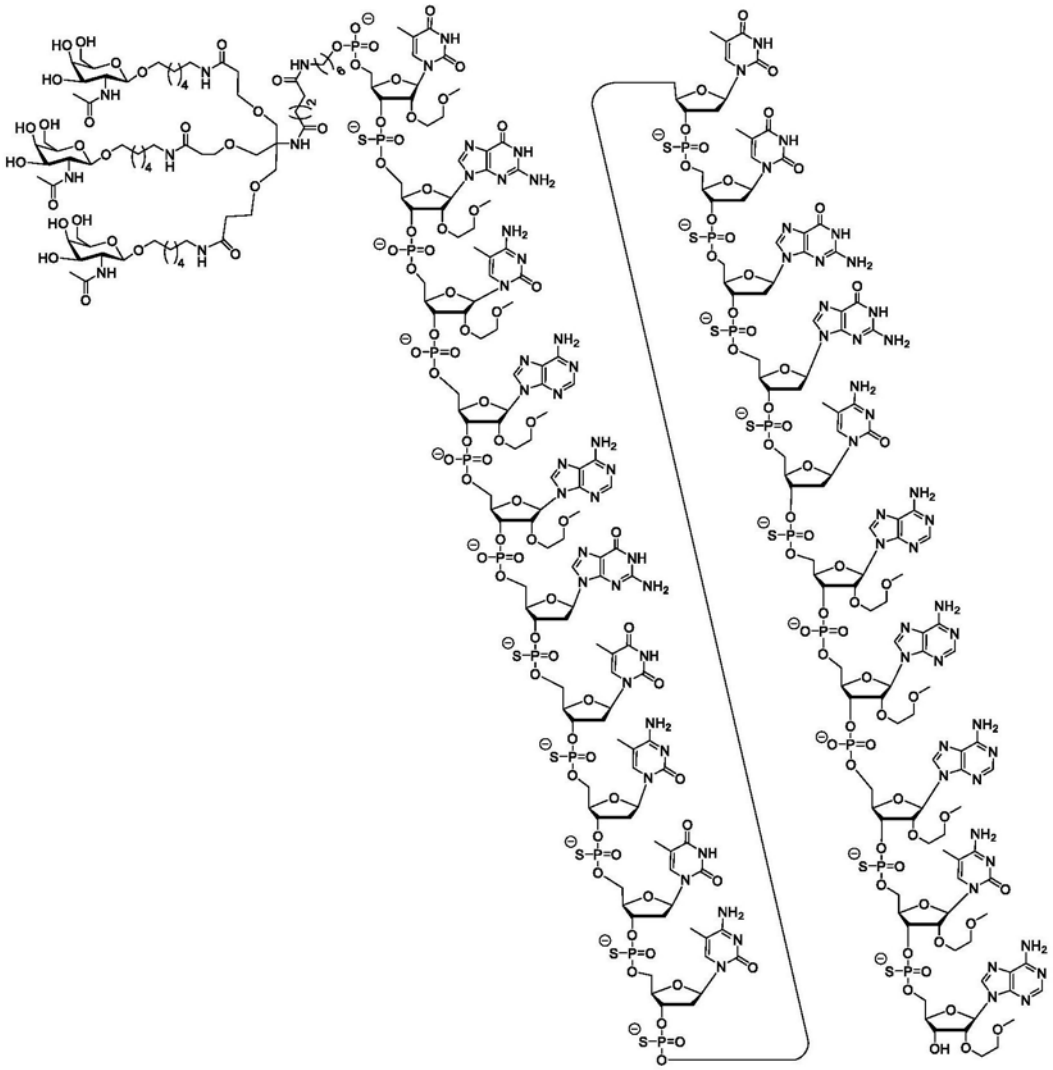
[0275] 在某些实施方案中，具有以下化学结构的化合物包含具有5'-X的ISIS 546254或者由具有5'-X的ISIS 546254组成，其中X为包含如本文所述的GalNAc的缀合物基团：

[0276] 

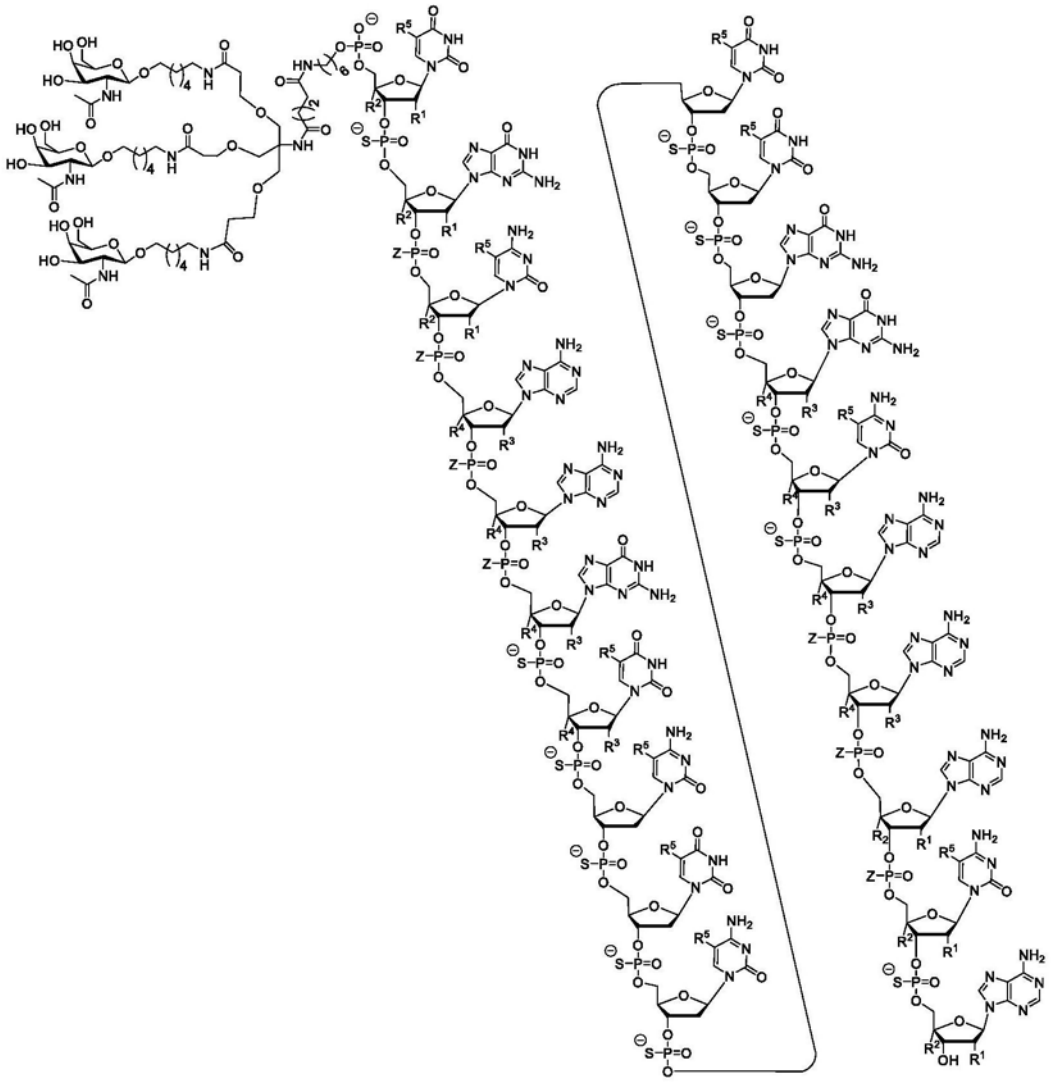
[0277] 某些实施方案提供包含下式的化合物或者由下式的化合物组成：

[0278] 

[0279] 某些实施方案提供包含下式的化合物或者由下式的化合物组成：

[0280] 

[0281] 某些实施方案提供包含下式的化合物或者由下式的化合物组成：

[0282] 

[0283] 其中R^1为-$OCH_2CH_2OCH_3$(MOE)并且R^2为H;或者R^1和R^2一起形成桥,其中R^1为-O-并且R^2为-CH_2-、-CH(CH_3)-或-CH_2CH_2-,并且R^1和R^2直接连接使得所形成的桥选自:-O-CH_2-、-O-CH(CH_3)-以及-O-CH_2CH_2-;

[0284] 并且对于相同环(每个环为独立地)上的R^3和R^4的每一对:R^3选自H和-$OCH_2CH_2OCH_3$并且R^4为H;或者R^3和R^4一起形成桥,其中R^3为-O-并且R^4为-CH_2-、-CH(CH_3)-或-CH_2CH_2-,并且R^3和R^4直接连接使得所形成的桥选自:-O-CH_2-、-O-CH(CH_3)-以及-O-CH_2CH_2-;

[0285] 并且R^5选自H和-CH_3;

[0286] 并且Z选自S^-和O^-。

[0287] 某些实施方案提供包含如任一前述权利要求所述的化合物或其盐、和药学上可接受的载体或稀释剂中的至少一种的组合物。

[0288] 某些实施方案提供包括向动物施用如任一前述权利要求所述的化合物或组合物的方法。

[0289] 在某些实施方案中,动物为人。

[0290] 在某些实施方案中,施用所述化合物预防、治疗或改善PKK相关疾病、病症或病状。

[0291] 在某些实施方案中,PKK相关疾病、病症或病状为遗传性血管性水肿(HAE)、水肿、血管性水肿、肿胀、眼睑的血管性水肿、眼水肿、黄斑水肿、脑水肿、血栓、栓、血栓栓塞、深静

脉血栓、肺栓塞、心肌梗塞、中风或梗塞。

[0292] 某些实施方案提供用于制造用于治疗炎性疾病或血栓栓塞疾病的药物的任一前述权利要求所述的化合物或组合物的用途。

[0293] 反义化合物

[0294] 低聚化合物包括但不限于寡核苷酸、寡核苷、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物、反义化合物、反义寡核苷酸及siRNA。低聚化合物可为靶核酸的“反义序列”，意味着其能够与靶核酸经由氢键键结进行杂交。

[0295] 在某些实施方案中，反义化合物具有在按5’至3’方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。在某些这类实施方案中，反义寡核苷酸具有在按5’至3’方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。

[0296] 在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为12至30个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为12至25个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为12至22个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为14至20个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为15至25个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为18至22个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为19至21个亚单位。在某些实施方案中，反义化合物的长度为8至80个、12至50个、13至30个、13至50个、14至30个、14至50个、15至30个、15至50个、16至30个、16至50个、17至30个、17至50个、18至30个、18至50个、19至30个、19至50个或20至30个连接的亚单位。

[0297] 在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为12个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为13个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为14个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为15个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为16个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为17个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为18个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为19个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为20个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为21个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为22个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为23个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为24个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为25个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为26个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为27个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为28个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为29个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为30个亚单位。在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物的长度为31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个或80个连接的亚单位，或处于由上述任何两个值所界定的范围内。在某些实施方案中，反义化合物为反义寡核苷酸，并且连接

的亚单位为核苷。

[0298] 在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义寡核苷酸可为缩短或截短的反义寡核苷酸。举例来说，单个亚单位可自5'端缺失(5'截短)，或者自3'端缺失(3'截短)。靶向PKK核酸的缩短或截短的反义化合物可有两个亚单位自反义化合物的5'端缺失，或者可有两个亚单位自反义化合物的3'端缺失。或者，缺失的核苷可散布于整个反义化合物中，例如在5'端有一个核苷缺失和3'端有一个核苷缺失的反义化合物中。

[0299] 当单个额外亚单位存在于延长的反义化合物中时，所述额外亚单位可位于反义化合物的5'端或3'端处。当存在两个或更多个额外亚单位时，所添加的亚单位可彼此邻近，例如在反义化合物的5'端上添加有两个亚单位(5'添加)或3'端上添加有两个亚单位(3'添加)的反义化合物中。或者，所添加的亚单位可散布于整个反义化合物中，例如在5'端上添加有一个亚单位和3'端上添加有一个亚单位的反义化合物中。

[0300] 有可能增加或减少反义化合物(如反义寡核苷酸)的长度和/或引入错配碱基而不消除活性。例如，在Woolf等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7305-7309,1992)中，测试长度为13-25个核碱基的一系列反义寡核苷酸在卵母细胞注射模型中诱导靶RNA裂解的能力。长度为25个核碱基且在接近反义寡核苷酸的末端处具有8或11个错配碱基的反义寡核苷酸能够导引靶mRNA进行特异性裂解，但程度低于不含错配的反义寡核苷酸。同样，靶特异性裂解可使用具有13个核碱基的反义寡核苷酸(包括具有1或3个错配者)达成。

[0301] Gautschi等人(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471,March 2001)表明与bcl-2 mRNA具有100％互补性且与bcl-xL mRNA具有3个错配的寡核苷酸在体外及体内减少bcl-2及bcl-xL两者的表达的能力。此外，这个寡核苷酸展现有效的体内抗肿瘤活性。

[0302] Maher和Dolnick(Nuc.Acid.Res.16:3341-3358,1988)分别测试一系列具有14个核酸碱基的串联反义寡核苷酸以及包含所述串联反义寡核苷酸中的两个或三个的序列的具有28个及42个核酸碱基的反义寡核苷酸在家兔网状红血球测定中阻止人DHFR转译的能力。3个具有14个核碱基的反义寡核苷酸各自能够单独抑制转译，但程度相较于具有28个或42个核碱基的反义寡核苷酸而言更适中。

[0303] 反义化合物基元

[0304] 在某些实施方案中，靶向PKK核酸的反义化合物具有排列成一定模式或基序的化学上修饰的亚单位，以赋予反义化合物以如抑制活性增强、对靶核酸的结合亲和力增强或对由体内核酸酶引起的降解具抗性的性质。

[0305] 嵌合反义化合物通常含有至少一个修饰的以赋予增强的核酸酶降解抗性、增加的细胞吸收、增强的对靶核酸的结合亲和力和/或增强的抑制活性的区。嵌合反义化合物的第二区可任选用作细胞核酸内切酶RNA酶H的底物，所述酶裂解RNA:DNA双螺旋体的RNA链。

[0306] 具有缺口聚物基序的反义化合物被认为是嵌合反义化合物。在缺口聚物中，具有多个支持核糖核酸酶H裂解的核苷酸的内部区位于具有多个在化学上与内部区的核苷不同的核苷酸的外部区之间。在具有缺口聚物基序的反义寡核苷酸的状况下，缺口区段一般用作核酸内切酶裂解的底物，而翼区段包含修饰的核苷。在某些实施方案中，缺口聚物的每个区由构成每个相异区的糖部分的类型来区分。用于区分缺口聚物的每个区的糖部分的类型在一些实施方案中可包括β-D-核糖核苷、β-D-脱氧核糖核苷、2'-修饰的核苷(所述2'-修饰的核苷可尤其包括2'-MOE及2'-O-CH_3)，以及双环糖修饰的核苷(所述双环糖修饰的核苷可

包括具有4'-(CH2)n-O-2'桥和4'-CH2-O-CH2-2'的那些核苷,其中n=1或n=2)。在某些实施方案中,翼可包括若干修饰的糖部分,包括例如2'-MOE。在某些实施方案中,翼可包括若干修饰的及未修饰的糖部分。在某些实施方案中,翼可包括2'-MOE核苷和2'-脱氧核苷的各种组合。

[0307] 每个相异区可包含均一糖部分、变化或交替的糖部分。翼-缺口-翼基序常被描述为"X-Y-Z",其中"X"表示5'翼的长度,"Y"表示缺口的长度,并且"Z"表示3'翼的长度。"X"及"Z"可包含均一、变化或交替的糖部分。在某些实施方案中,"X"及"Y"可包含一个或多个2'-脱氧核苷。"Y"可包含2'-脱氧核苷。本文所用的描述为"X-Y-Z"的缺口聚物具有一定构型以使缺口聚物紧邻5'翼及3'翼中的每一个而定位。因此,在5'翼与缺口之间,或缺口与3'翼之间不存在介入的核苷酸。本文所述的任何反义化合物均可具有缺口聚物基序。在某些实施方案中,"X"与"Z"相同;在其他实施方案中,它们不同。

[0308] 在某些实施方案中,本文提供的缺口聚物包括例如具有基序5-10-5的二十聚体。

[0309] 靶核酸、靶区及核苷酸序列

[0310] 编码人血浆前激肽释放酶(PKK)的核苷酸序列包括但不限于以下:GENBANK登录号NM_000892.3(以SEQ ID NO:1形式并入本文)、GENBANK登录号DC412984.1(以SEQ ID NO:2形式并入本文)、GENBANK登录号CN265612.1(以SEQ ID NO:3形式并入本文)、GENBANK登录号AK297672.1(以SEQ ID NO:4形式并入本文)、GENBANK登录号DC413312.1(以SEQ ID NO:5形式并入本文)、GENBANK登录号AV688858.2(以SEQ ID NO:6形式并入本文)、GENBANK登录号CD652077.1(以SEQ ID NO:7形式并入本文)、GENBANK登录号BC143911.1(以SEQ ID NO:8形式并入本文)、GENBANK登录号CB162532.1(以SEQ ID NO:9形式并入本文)、从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19(以SEQ ID NO:10形式并入本文)、GENBANK登录号NM_008455.2(以SEQ ID NO:11形式并入本文)、GENBANK登录号BB598673.1(以SEQ ID NO:12形式并入本文)、从核碱基6114001至6144000截短的GENBANK登录号NT_039460.7(以SEQ ID NO:13形式并入本文)、GENBANK登录号NM_012725.2(以SEQ ID NO:14形式并入本文)、从核碱基10952001至10982000截短的GENBANK登录号NW_047473.1(以SEQ ID NO:15形式并入本文)、GENBANK登录号XM_002804276.1(以SEQ ID NO:17形式并入本文)、以及从核碱基2358000至2391000截短的GENBANK登录号NW_001118167.1(以SEQ ID NO:18形式并入本文)。

[0311] 应了解,本文中所含的实例中的各SEQ ID NO中所列的序列与糖部分、核苷间键或核碱基的任何修饰无关。因而,由SEQ ID NO定义的反义化合物可独立地包含糖部分、核苷间键或核酸碱基的一个或多个修饰。由Isis编号(Isis No)所述的反义化合物指示核酸碱基序列与基元的组合。

[0312] 在某些实施方案中,靶区为靶核酸的结构明确的区。例如,靶区域可包含3'UTR、5'UTR、外显子、内含子、外显子/内含子接合部、编码区、翻译起始区、翻译终止区,或其他所定义的核酸区域。PKK的结构明确的区可由来自序列数据库(诸如NCBI)的登录号获得,且所述信息以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,靶区可涵盖从所述靶区内的一个靶区段的5'靶位点至同一靶区内的另一靶区段的3'靶位点的序列。

[0313] 靶向包括确定至少一个与反义化合物杂交,从而出现所需作用的靶区段。在某些实施方案中,所需作用为mRNA靶核酸水平降低。在某些实施方案中,所需作用为由靶核酸编

码的蛋白质水平的降低或与靶核酸有关的表型改变。

[0314] 靶区可含有一个或多个靶区段。靶区内的多个靶区段可重叠。或者，它们可不相重叠。在某些实施方案中，靶区内的靶区段相隔至多约300个核苷酸。在某些实施方案中，靶区内的靶区段相隔靶核酸上一定数目的核苷酸，所述数目为、为约、为至多、为至多约250个、200个、150个、100个、90个、80个、70个、60个、50个、40个、30个、20个或10个核苷酸，或为由前述任何两个值所界定的范围。在某些实施方案中，靶区内的靶区段相隔靶核酸上的至多或至多约5个核苷酸。在某些实施方案中，靶区段为连续的。涵盖由具有为本文所列的5'靶位点或3'靶位点中的任一个的起始核酸的范围所界定的靶区。

[0315] 适合的靶区段可见于5'UTR、编码区、3'UTR、内含子、外显子或外显子/内含子接合点内。含有起始密码子或终止密码子的靶区段也为适合的靶区段。适合的靶区段可尤其排除某一结构明确的区，诸如起始密码子或终止密码子。

[0316] 确定适合的靶区段可包括将靶核酸的序列与整个基因组中的其他序列相比较。例如，可使用BLAST算法来鉴别不同核酸当中具相似性的区域。这个比较可防止选择可能以非特异性方式与除所选靶核酸以外的序列(即非靶或脱靶序列)杂交的反义化合物序列。

[0317] 反义化合物在活性靶区内的活性(例如如由靶核酸水平的降低百分比所定义)可能不同。在某些实施方案中，PKK mRNA水平的降低指示对PKK表达的抑制。PKK蛋白质水平的降低也指示对靶mRNA表达的抑制。此外，表型改变指示对PKK表达的抑制。例如，降低或预防炎症可以指示对PKK表达的抑制。在另一个实例中，降低或预防水肿/肿胀可以指示对PKK表达的抑制。在另一个实例中，降低或预防血管渗透性可以指示对PKK表达的抑制。在另一个实例中，降低或预防血管泄漏可以指示对PKK表达的抑制。在某些实施方案中，血管渗透性通过染料诸如Evans蓝的量化进行测量。

[0318] 杂交

[0319] 在一些实施方案中，在本文公开的反义化合物与靶核酸之间进行杂交。杂交的最常见机制涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键合(例如沃森-克里克、霍氏或反霍氏氢键合)。

[0320] 杂交可在不同条件下进行。严格条件具序列依赖性且由待杂交的核酸分子的性质和组成决定。

[0321] 确定序列是否可与靶核酸特异性杂交的方法在本领域中为熟知的。在某些实施方案中，本文提供的反义化合物可与靶核酸特异性杂交。

[0322] 互补性

[0323] 当反义化合物中足够数目的核碱基可与靶核酸中的相应核碱基进行氢键合，从而出现所需作用(例如对靶核酸(诸如PKK核酸)的反义抑制)时，反义化合物与靶核酸彼此互补。

[0324] 可容忍反义化合物与PKK核酸之间的非互补性核碱基，前提是所述反义化合物仍能够与靶核酸特异性杂交。此外，反义化合物可在PKK核酸的一个或多个区段上杂交，以使得介入或相邻区段不参与杂交事件(例如环结构、错配或发夹结构)。

[0325] 在某些实施方案中，本文提供的反义化合物或其指定部分与PKK核酸、靶区、靶区段或其指定部分具有或具有至少70％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的互补性。反

义化合物与靶核酸的互补性百分比可使用常规方法测定。

[0326] 例如,反义化合物中反义化合物的20个核碱基中有18个核碱基与靶区互补且因此特异性杂交将表示90%互补性。在这个实例中,其余非互补核酸碱基可与互补核酸碱基丛集或交替并且不需要彼此相邻或与互补核酸碱基相邻。因而,长度为18个核酸碱基并具有4个非互补核酸碱基且所述非互补核酸碱基由与靶核酸完全互补的两个区侧接的反义化合物与靶核酸将具有77.8%的总体互补性且因而处于本发明的范围内。反义化合物与靶核酸的区的互补性百分比可常规地使用本领域中已知的BLAST程序(基本局部比对搜寻工具(basic local alignment search tool))和PowerBLAST程序来测定(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403 410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649 656)。同源性、序列同一性或互补性的百分比可通过例如使用Smith和Waterman(Adv.Appl.Math.,1981,2,482 489)的算法的Gap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison Wis.)使用默认设置来测定。

[0327] 在某些实施方案中,本文提供的反义化合物或其指定部分与靶核酸或其指定部分完全互补(即100%互补)。例如,反义化合物可与血浆前激肽释放酶核酸或其靶区或靶区段或靶序列完全互补。本文所用的“完全互补”意指反义化合物的每个核碱基皆能够与靶核酸的相应核碱基进行准确碱基配对。例如,具有20个核碱基的反义化合物与长度为400个核碱基的靶序列完全互补,只要靶核酸中有具有20个核碱基的相应部分与反义化合物完全互补即可。完全互补还可对于第一和/或第二核酸的指定部分来使用。例如,具有30个核碱基的反义化合物中的20个核碱基的部分可与长度为400个核碱基的靶序列“完全互补”。具有30个核碱基的寡核苷酸中的20个核碱基的部分在靶序列具有含20个核碱基且每个核碱基与反义化合物中的所述20个核碱基的部分互补的相应部分的情况下与靶序列完全互补。同时,整个具有30个核碱基的反义化合物与靶序列可能完全互补或可能不是完全互补,这取决于反义化合物的其余10个核碱基是否也与靶序列互补。

[0328] 非互补核碱基的位置可处于反义化合物的5’端或3’端处。或者,一个或多个非互补核酸碱基可处于反义化合物的内部位置处。当存在两个或更多个非互补核碱基时,它们可为连续(即连接的)或不连续的。在一个实施方案中,非互补核碱基位于缺口聚物反义寡核苷酸的翼区段中。

[0329] 在某些实施方案中,长度为或为多达11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基的反义化合物相对于靶核酸或其指定部分包含至多4个、至多3个、至多2个或至多1个非互补核碱基。

[0330] 在某些实施方案中,长度为或为多达11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核碱基的反义化合物相对于靶核酸或其指定部分包含至多6个、至多5个、至多4个、至多3个、至多2个或至多1个非互补核碱基。

[0331] 所提供的反义化合物还包括与靶核酸的一部分互补的反义化合物。本文所用的“部分”是指靶核酸的区或区段内确定数目的连续(即连接的)核碱基。“部分”还可指反义化合物中确定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少8个核酸碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少9个核碱基的部分

互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少10个核碱基的部分互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少11个核碱基的部分互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少12个核碱基的部分互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少13个核碱基的部分互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少14个核碱基的部分互补。在某些实施方案中，反义化合物与靶区段中具有至少15个核碱基的部分互补。还涵盖与靶区段中具有至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个(或由这些值中的任何两个所界定的范围)核碱基的部分互补的反义化合物。

[0332] 同一性

[0333] 本文提供的反义化合物还可与特定核苷酸序列SEQ ID NO或由特定Isis编号表示的化合物或其部分具有确定的同一性百分比。如本文所用，如果反义化合物具有相同的核碱基配对能力，那么其与本文公开的序列同一。例如，在所公开的DNA序列中含有尿嘧啶代替胸苷的RNA将被视作与DNA序列同一，因为尿嘧啶和胸苷皆与腺嘌呤配对。还涵盖本文所述的反义化合物的缩短及延长型式以及相对于本文提供的反义化合物具有非同一碱基的化合物。非同一碱基可彼此相邻或散布于整个反义化合物中。反义化合物的同一性百分比是根据相对于与其比较的序列具有同一碱基配对的碱基的数目来计算的。

[0334] 在某些实施方案中，反义化合物或其部分与本文公开的一种或多种反义化合物或SEQ ID NO或其部分具有至少70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性。

[0335] 在某些实施方案中，将反义化合物的一部分与靶核酸的等长部分相比较。在某些实施方案中，将具有8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个核酸碱基的部分与靶核酸的等长部分相比较。

[0336] 在某些实施方案中，将反义寡核苷酸的一部分与靶核酸的等长部分相比较。在某些实施方案中，将具有8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个核酸碱基的部分与靶核酸的等长部分相比较。

[0337] 修饰

[0338] 核苷为碱基-糖组合。核苷的核碱基(又称为碱基)部分通常为杂环碱基部分。核苷酸为还包括共价连接至核苷的糖部分的磷酸酯基团的核苷。对于包括呋喃戊糖基糖的那些核苷，磷酸酯基可连接至糖的2’、3’或5’羟基部分。寡核苷酸是经由相邻核苷彼此共价键联形成线性聚合寡核苷酸而形成的。在寡核苷酸结构内，磷酸酯基通常被视作形成寡核苷酸的核苷间键联。

[0339] 反义化合物的修饰涵盖核苷间键联、糖部分或核碱基的取代或改变。修饰的反义化合物常因具有如以下的所需性质而优于原生形式：细胞吸收增强、对核酸靶的亲和力增强、在核酸酶存在下的稳定性增强或抑制活性增强。

[0340] 化学上修饰的核苷还可用于增强缩短或截短型反义寡核苷酸对其靶核酸的结合亲和力。因此，常可以具有所述化学上修饰的核苷的较短反义化合物获得类似结果。

[0341] 修饰的核苷间键联

[0342] RNA和DNA的天然存在的核苷间键联为3’至5’磷酸二酯键联。相较于具有天然存在的核苷间键联的反义化合物，具有一个或多个修饰的(即非天然存在)的核苷间键联的反义

化合物常会因具有所需性质(例如像细胞吸收增强、对靶核酸的亲和力增强及在核酸酶存在下的稳定性增强)而被优先选择。

[0343] 具有修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联以及不具磷原子的核苷间键联。代表性含磷的核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯及硫代磷酸酯。制备含磷键联及不含磷键联的方法为熟知的。

[0344] 在某些实施方案中,靶向血浆前激肽释放酶核酸的反义化合物包含一个或多个修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,修饰的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。在某些实施方案中,反义化合物的每个核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联。

[0345] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含以限定的模式或修饰的核苷间键联基序沿着寡核苷酸或其区域布置的修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,核苷间键联以有缺口的基序布置。在所述实施方案中,两个翼区的每一个中的核苷间键联不同于缺口区中的核苷间键联。在某些实施方案中,翼中的核苷间键联为磷酸二酯并且缺口中的核苷间键联为硫代磷酸酯。核苷基序被独立地选择,使得具有有缺口的核苷间键联基序的所述寡核苷酸可以具有或可不具有有缺口的核苷基序并且如果它具有有缺口的核苷基序,那么翼和缺口长度可以相同或可不同。

[0346] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含具有交替的核苷间键联基序的区域。在某些实施方案中,本发明的寡核苷酸包含具有统一修饰的核苷间键联的区域。在某些所述实施方案中,寡核苷酸包含通过硫代磷酸酯核苷间键联统一连接的区域。在某些实施方案中,寡核苷酸通过硫代磷酸酯统一连接。在某些实施方案中,寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯和硫代磷酸酯。在某些实施方案中,寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯和硫代磷酸酯并且至少一个核苷间键联为硫代磷酸酯。

[0347] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少6个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少8个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少10个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个具有至少6个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个具有至少8个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个具有至少10个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个具有至少12个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些所述实施方案中,至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'末端。在某些所述实施方案中,至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'末端的3个核苷内。

[0348] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个甲基膦酸酯键。在某些实施方案中,具有缺口聚物核苷基序的寡核苷酸包含包括除一个或两个甲基膦酸酯键联之外所有的硫代磷酸酯键联的键联基序。在某些实施方案中,一个甲基膦酸酯键联位于具有缺口聚物核苷基序的寡核苷酸的中心缺口中。

[0349] 在某些实施方案中,布置硫代磷酸酯核苷间键联和磷酸二酯核苷间键联的数量以保持核酸酶抗性是所需的。在某些实施方案中,布置硫代磷酸酯核苷间键联的数量和位置与磷酸二酯核苷间键联的数量和位置以保持核酸酶抗性是所需的。在某些实施方案中,可以减小硫代磷酸酯核苷间键联的数量并且可以增加磷酸二酯核苷间键联的数量。在某些实施方案中,在可以减小硫代磷酸酯核苷间键联的数量并且可以增加磷酸二酯核苷间键联的

数量的同时还能保持核酸酶抗性。在某些实施方案中，在减小硫代磷酸酯核苷间键联的数量的同时保持核酸酶抗性是所需的。在某些实施方案中，在增加磷酸二酯核苷间键联的数量的同时保持核酸酶抗性是所需的。

[0350] 修饰的糖部分

[0351] 反义化合物可任选含有其中糖基已被修饰的一个或多个核苷。所述糖修饰的核苷可赋予反义化合物以增强的核酸酶稳定性、增强的结合亲和力或某种其他有利生物性质。在某些实施方案中，核苷包含化学上修饰的呋喃核糖环部分。化学上修饰的呋喃核糖环的实例包括不限于添加取代基(包括5'及2'取代基)；非偕位环原子桥连形成双环核酸(BNA)；核糖基环氧原子用S、N(R)或C(R_1)(R_2)(R、R_1和R_2各自独立地为H、C_1-C_{12}烷基或保护基团)置换；及其组合。化学上修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代的核苷(关于其他所公开的5',2'-双取代的核苷，参见08年8月21日公开的PCT国际申请WO 2008/101157)或核糖基环氧原子被S置换且2'位上被进一步取代(参见2005年6月16日公开的公开美国专利申请US2005-0130923)；或者BNA的5'-取代(参见07年11月22日公开的PCT国际申请WO 2007/134181，其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代)。

[0352] 具有修饰的糖部分的核苷的实例包括不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH_3、2'-OCH_2CH_3、2'-OCH_2CH_2F和2'-O(CH_2)$_2OCH_3$取代基的核苷。2'位置处的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、巯基、O-烯丙基、O-C_1-C_{10}烷基、OCF_3、OCH_2F、O(CH_2)$_2SCH_3$、O(CH_2)$_2$-O-N(R_m)(R_n)、O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)以及O-CH_2-C(=O)-N(R_1)-(CH_2)$_2$-N(R_m)(R_n)其中R_1、R_m以及R_n各自独立地为H或取代的或未取代的C_1-C_{10}烷基。

[0353] 本文所用的“双环核苷”是指包含双环糖部分的修饰的核苷。双环核苷的实例包括不限于在4'与2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施方案中，本文提供的反义化合物包括一个或多个双环核苷，其中包含4'至2'桥。此类4'至2'桥连的双环核苷的实例包括但不限于下式的一个：4'-(CH_2)-O-2'(LNA)；4'-(CH_2)-S-2'；4'-(CH_2)$_2$-O-2'(ENA)；4'-CH(CH_3)-O-2'(也称为限制性乙基或cEt)以及4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'(以及其类似物，参见2008年7月15日颁发的美国专利7,399,845)；4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2'(以及其类似物，参见2009年1月8日公布的已公布的国际申请WO 2009/006478)；4'-CH_2-N(OCH_3)-2'(以及其类似物，参见2008年12月11日公布的已公布的国际申请WO/2008/150729)；4'-CH_2-O-N(CH_3)-2'(参见2004年9月2日公布的已公布的美国专利申请US2004-0171570)；4'-CH_2-N(R)-O-2'，其中R为H、C_1-C_{12}烷基或保护基团(参见参见2008年9月23日颁发的美国专利7,427,672)；4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'(参见Zhou等，J.Org.Chem.，2009，74，118-134)；以及4'-CH_2-C(=CH_2)-2'(以及其类似物，参见2008年12月8日公布的已公布的国际申请WO 2008/154401)。

[0354] 涉及双环核苷的其他的报告还可以见于已公布的文献(参见例如：Singh等，Chem.Commun.，1998，4，455-456；Koshkin等，Tetrahedron，1998，54，3607-3630；Wahlestedt等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.，2000，97，5633-5638；Kumar等，Bioorg.Med.Chem.Lett.，1998，8，2219-2222；Singh等，J.Org.Chem.，1998，63，10035-10039；Srivastava等，J.Am.Chem.Soc.，2007，129(26)8362-8379；Elayadi等，Curr.Opinion Invest.Drugs，2001，2，558-561；Braasch等，Chem.Biol.，2001，8，1-7；以及Orum等，Curr.Opinion Mol.Ther.，2001，3，239-243；美国专利号6,268,490；6,525,191；6,670,461；6,770,748；6,794,499；7,034,133；7,053,207；7,399,845；7,547,684；以及7，

696,345;美国专利公布号US2008-0039618;US2009-0012281;美国专利序列号61/026,995和61/097,787;已公布的PCT国际申请WO 1999/014226;WO 2004/106356;WO 2005/021570;WO 2007/134181;WO 2008/150729;WO 2008/154401;WO 2009/006478;WO 2010/036698;WO 2011/017521;WO 2009/067647;WO 2009/100320。上述各双环核苷可被制备而具有一种或多种立体化学糖构型,包括例如α-L-呋喃核糖及β-D-呋喃核糖(参见1999年3月25日公开为WO 99/14226的PCT国际申请PCT/DK98/00393)。

[0355] 在某些实施方案中,BNA核苷的双环糖部分包括但不限于在呋喃戊糖基糖部分的4'位与2'位之间具有至少一个桥的化合物,其中所述桥独立地包含1个或2至4个独立地选自以下的连接基团:-[C(R_a)(R_b)]$_n$-、-C(R_a)=C(R_b)-、-C(R_a)=N-、-C(=O)-、-C(=NR_a)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R_a)$_2$-、-S(=O)$_x$-以及-N(R_a)-;

[0356] 其中:

[0357] x为0、1或2;

[0358] n为1、2、3或4;

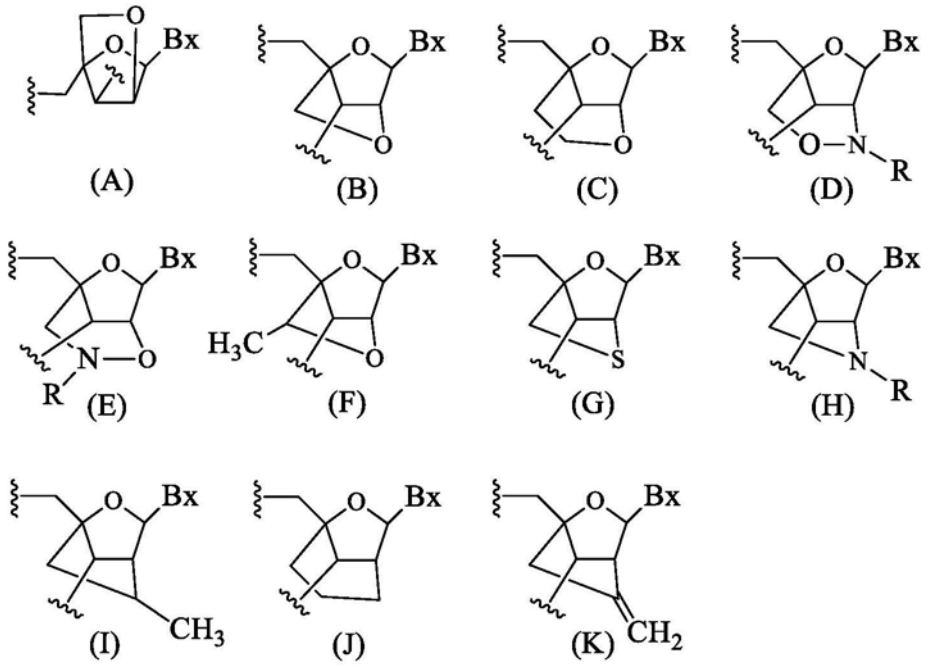
[0359] R_1和R_2各自独立地为H、保护基、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C_5-C_7脂环基、取代的C_5-C_7脂环基、卤素、OJ_1、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、COOJ_1、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J_1)或亚硫酸基(S(=O)-J_1);并且

[0360] J_1和J_2各自独立地为H、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C5-C20芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C_1-C_{12}氨基烷基、取代的C_1-C_{12}氨基烷基或保护基。

[0361] 在某些实施方案中,双环糖部分的桥为-[C(R_a)(R_b)]$_n$-、-[C(R_a)(R_b)]$_n$-O-、-C(R_aR_b)-N(R)-O-或-C(R_aR_b)-O-N(R)-。在某些实施方案中,桥为4'-CH_2-2'、4'-(CH_2)$_2$-2'、4'-(CH_2)$_3$-2'、4'-CH_2-O-2'、4'-(CH_2)$_2$-O-2'、4'-CH_2-O-N(R)-2'以及4'-CH_2-N(R)-O-2'-,其中每个R独立地为H、保护基或C_1-C_{12}烷基。

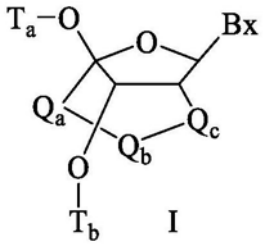
[0362] 在某些实施方案中,双环核苷进一步由异构构型定义。例如,包含4'-2'亚甲基-氧基桥联的核苷可呈α-L构型或呈β-D构型。α-L-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')BNA先前已并入展示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0363] 在某些实施方案中,双环核苷包括但不限于(A)α-L-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')BNA;(B)β-D-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')BNA;(C)亚乙氧基(4'-(CH_2)$_2$-O-2')BNA;(D)氨氧基(4'-CH_2-O-N(R)-2')BNA;(E)氧氨基(4'-CH_2-N(R)-O-2')BNA;和(F)甲基(亚甲氧基)(4'-CH(CH_3)-O-2')BNA;(G)亚甲基-硫基(4'-CH_2-S-2')BNA;(H)亚甲基-氨基(4'-CH_2-N(R)-2')BNA;(I)甲基碳环(4'-CH_2-CH(CH_3)-2')BNA;(J)亚丙基碳环(4'-(CH_2)$_3$-2')BNA;以及(K)乙烯基BNA;如下文所描绘:

[0364] 

[0365] 其中Bx为碱基部分且R独立地为H、保护基、C_1-C_{12}烷基或C_1-C_{12}烷氧基。

[0366] 在某些实施方案中，双环核苷具有式I：

[0367] 

[0368] 其中：

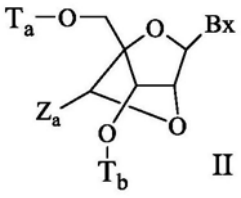
[0369] Bx为杂环碱基部分；

[0370] $-Q_a-Q_b-Q_c-$为$-CH_2-N(R_c)-CH_2-$、$-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$、$-CH_2-O-N(R_c)-$、$-CH_2-N(R_c)-O-$或$-N(R_c)-O-CH_2$；

[0371] R_c为C_1-C_{12}烷基或氨基保护基；并且

[0372] T_a及T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接。

[0373] 在某些实施方案中，双环核苷具有式II：

[0374] 

[0375] 其中：

[0376] Bx为杂环碱基部分；

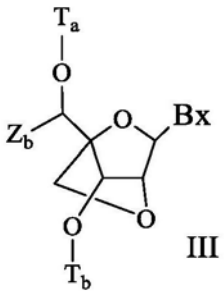
[0377] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0378] Za为C_1-C_6烷基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、取代的C_1-C_6烷基、取代的C_2-C_6烯基、

取代的C_2-C_6炔基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、巯基或取代的巯基。

[0379] 在一个实施方案中，每个取代的基团独立地被独立地选自以下的取代基单取代或多取代：卤素、氧基、羟基、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N_3、$OC(=X)J_c$及$NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$，其中每个J_c、J_d以及J_e独立地为H、C_1-C_6烷基或取代的C_1-C_6烷基且X为O或NJ_c。

[0380] 在某些实施方案中，双环核苷具有式III：

[0381] 

III

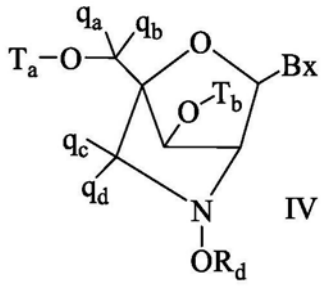
[0382] 其中：

[0383] Bx为杂环碱基部分；

[0384] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0385] Z_b为C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、取代的C_1-C_6烷基、取代的C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6炔基或取代的酰基(C(=O)-)。

[0386] 在某些实施方案中，双环核苷具有式IV：

[0387] 

IV

[0388] 其中：

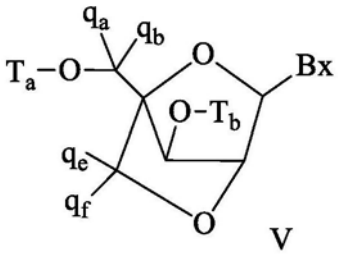
[0389] Bx为杂环碱基部分；

[0390] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0391] R_d为C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基或取代的C_2-C_6炔基；

[0392] q_a、q_b、q_c以及q_d各自独立地为H、卤素、C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基或取代的C_2-C_6炔基、C_1-C_6烷氧基、取代的C_1-C_6烷氧基、酰基、取代的酰基、C_1-C_6氨基烷基或取代的C_1-C_6氨基烷基；

[0393] 在某些实施方案中，双环核苷具有式V：

[0394] 

V

[0395] 其中：

[0396] Bx为杂环碱基部分；

[0397] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0398] q_a、q_b、q_e以及q_f各自独立地为氢、卤素、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_1-C_{12}烷氧基、取代的C_1-C_{12}烷氧基、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO_2J_j、NJ_jJ_k、N_3、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k或N(H)C(=S)NJ_jJ_k；

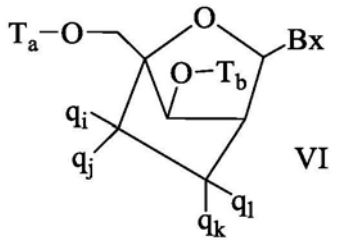
[0399] 或q_e连同q_f一起为=C(q_g)(q_h)；

[0400] q_g和q_h各自独立地为H、卤素、C_1-C_{12}烷基或取代的C_1-C_{12}烷基。

[0401] 亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')BNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶的合成和制备以及它们的寡聚和核酸识别性质已有所描述(Koshkin等人，Tetrahedron,1998,54,3607-3630)。BNA及其制备还描述于WO 98/39352及WO 99/14226中。

[0402] 亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')BNA及2'-硫基-BNA的类似物也已被制备(Kumar等人，Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222)。构成作为核酸聚合酶的底物的寡脱氧核糖核苷酸双螺旋体的锁核苷类似物的制备也已有所描述(Wengel等人,WO 99/14226)。此外，2'-氨基-BNA(一种新颖的构形受限的高亲和力寡核苷酸类似物)的合成在本领域中已有所描述(Singh等人,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039)。另外,2'-氨基-BNA及2'-甲基氨基-BNA已被制备且它们与互补的RNA及DNA链的双螺旋体的热稳定性先前已有所报导。

[0403] 在某些实施方案中,双环核苷具有式VI：

[0404] 

VI

[0405] 其中：

[0406] Bx为杂环碱基部分；

[0407] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基、缀合基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0408] q_i、q_j、q_k以及q_l各自独立地为H、卤素、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_1-C_{12}烷氧基、取代的C_1-C_{12}烷氧基、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO_2J_j、NJ_jJ_k、N_3、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k或N(H)C(=S)NJ_jJ_k；并且

[0409] q_i和q_j或q_l和q_k一起为=C(q_g)(q_h)，其中q_g和q_h各自独立地为H、卤素、C_1-C_{12}烷基或取代的C_1-C_{12}烷基。

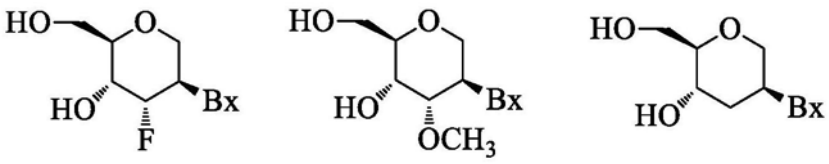
[0410] 一种具有4'-$(CH_2)_3$-2'桥和烯基类似物桥4'-CH=CH-CH_2-2'的碳环双环核苷已有所描述(Freier等人，Nucleic Acids Research,1997,25(22),4429-4443和Albaek等人，J.Org.Chem.,2006,71,7731-7740)。碳环双环核苷的合成和制备以及它们的寡聚及生物化学研究也已有所描述(Srivastava等人，J.Am.Chem.Soc.,2007,129(26),8362-8379)。

[0411] 本文所用的"4'-2'双环核苷"或"4'至2'双环核苷"是指包含含连接2'碳原子与4'碳原子的桥的呋喃糖环的双环核苷。

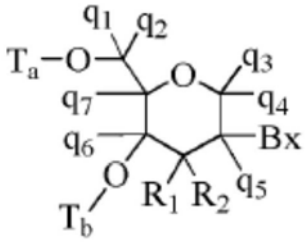
[0412] 本文所用的"单环核苷"是指包含不为双环糖部分的修饰的糖部分的核苷。在某些实施方案中，核苷的糖部分或糖部分类似物可在任何位置上被修饰或取代。

[0413] 本文所用的"2'-修饰的糖"意指在2'位上修饰的呋喃糖基糖。在某些实施方案中，所述修饰包括选自以下的取代基：包括但不限于卤基、取代及未取代的烷氧基、取代及未取代的硫烷基、取代及未取代的氨基烷基、取代及未取代的烷基、取代及未取代的烯丙基以及取代及未取代的炔基。在某些实施方案中，2'修饰选自包括但不限于以下的取代基：O[$(CH_2)_n$O]$_m$$CH_3$、O$(CH_2)_n$$NH_2$、O$(CH_2)_n$$CH_3$、O$(CH_2)_n$F、O$(CH_2)_n$$ONH_2$、$OCH_2$C(=O)N(H)$CH_3$以及O$(CH_2)_n$ON[$(CH_2)_n$$CH_3$]$_2$，其中n和m为1至约10。其他2'取代基还可选自：C_1-C_{12}烷基、取代的烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、F、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷氨基、聚烷氨基、取代的硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、改进药物动力学性质的基团、或改进反义化合物的药效学性质的基团，以及其他具有类似性质的取代基。在某些实施方案中，修饰的核苷包含2'-MOE侧链(Baker等人，J.Biol.Chem.,1997,272,11944-12000)。所述2'-MOE取代已被描述为相较于未修饰的核苷及其他修饰的核苷(如2'-O-甲基、O-丙基及O-氨基丙基)具有改善的结合亲和力。具有2'-MOE取代基的寡核苷酸还被示为在体内使用中具有良好特征的基因表达的反义抑制剂(Martin,Helv.Chim.Acta,1995,78,486-504;Altmann等，Chimia,1996,50,168-176;Altmann等，Biochem.Soc.Trans.,1996,24,630-637以及Altmann等，Nucleosides Nucleotides,1997,16,917-926)。

[0414] 本文所用的"修饰的四氢吡喃核苷"或"修饰的THP核苷"意指具有取代普通核苷中的呋喃戊糖基残基的6元四氢吡喃"糖"(糖替代物)的核苷。修饰的THP核苷包括但不限于在本领域中称为己糖醇核酸(HNA)、anitol核酸(ANA)、甘露醇核酸(MNA)(参见Leumann,Bioorg.Med.Chem.,2002,10,841-1954)或具有如下所示的四氢呋喃环系统的氟HNA(F-HNA)：

[0415] 

[0416] 在某些实施方案中，选择具有式VII的糖替代物：

[0417] 

VII

[0418] 其中独立地对于所述至少一种式VII的四氢吡喃核苷类似物中的每一个：

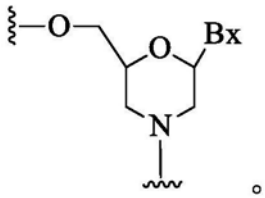
[0419] Bx为杂环碱基部分；

[0420] T_a和T_b各自独立地为将四氢吡喃核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团，或者T_a和T_b中的一个为将四氢吡喃核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团且T_a和T_b中的另一个为H、羟基保护基、连接的缀合基团或5'或3'-端基；

[0421] q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6以及q_7各自独立地为H、C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基或取代的C_2-C_6炔基；并且R_1和R_2各自选自氢、羟基、卤素、取代的或未取代的烷氧基、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、$OC(=X)J_1$、$OC(=X)NJ_1J_2$、$NJ_3C(=X)NJ_1J_2$以及CN，其中X为O、S或NJ_1并且J_1、J_2以及J_3各自独立地为H或C_1-C_6烷基。

[0422] 在某些实施方案中，提供了式VII的修饰THP核苷，其中q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6以及q_7各自为H。在某些实施方案中，q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6以及q_7中的至少一个不为H。在某些实施方案中，q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6以及q_7中的至少一个为甲基。在某些实施方案中，提供了式VII的THP核苷，其中R_1和R_2中的一个是氟。在某些实施方案中，R_1为氟并且R_2为H；R_1为甲氧基并且R_2为H，并且R_1为甲氧基乙氧基并且R_2为H。

[0423] 在某些实施方案中，糖替代物包含具有多于5个原子和多于一个杂原子的环。例如包含吗啉代糖部分的核苷以及它们在低聚化合物中的用途已有所报告(参见例如：Braasch等，Biochemistry，2002，41，4503-4510；和美国专利5，698，685；5，166，315；5，185，444以及5，034，506)。如在此所使用，术语“吗啉代”意指具有以下式的糖替代物：

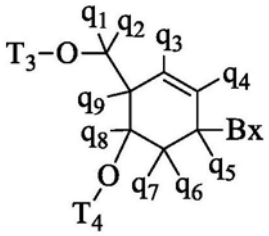
[0424]  。

[0425] 在某些实施方案中，可例如通过添加或改变来自以上吗啉代结构的各种取代基来修饰吗啉代。所述糖替代物在本文中称为“修饰的吗啉代”。

[0426] 还提供了修饰的组合，不限于如2'-F-5'-甲基取代的核苷(对于其他公开的5'，2'-双取代核苷，参见8/21/08公布的PCT国际申请WO 2008/101157)和用S替代核糖基环氧原子以及在2'-位上的进一步取代(参见2005年6月16日公布的已公布的美国专利申请US2005-0130923)或替代地双环核酸的5'-取代(参见11/22/07公布的PCT国际申请WO 2007/134181，其中4'-CH_2-O-2'双环核苷在5'位上被5'-甲基或5'-乙烯基进一步取代)。碳环双环核苷的合成和制备连同其低聚和生物化学研究也已有所描述(参见，例如，Srivastava等，J.Am.Chem.Soc.2007，129(26)，8362-8379)。

[0427] 在某些实施方案中，反义化合物包含一个或多个修饰的环己烯基核苷，其为用六元环己烯基替代天然存在的核苷中的呋喃戊糖基残基的核苷。修饰的环己烯基核苷包括但不限于本领域中描述的那些(参见例如共同拥有的已公布的2010年4月10日公布的PCT申请WO 2010/036696，Robeyns等，J.Am.Chem.Soc.，2008，130(6)，1979-1984；Horváth等，Tetrahedron Letters，2007，48，3621-3623；Nauwelaerts等，J.Am.Chem.Soc.，2007，129(30)，9340-9348；Gu等，，Nucleosides，Nucleotides&Nucleic Acids，2005，24(5-7)，993-998；Nauwelaerts等，Nucleic Acids Research，2005，33(8)，2452-2463；Robeyns等，Acta Crystallographica，Section F:Structural Biology and Crystallization Communications，2005，F61(6)，585-586；Gu等，Tetrahedron，2004，60(9)，2111-2123；Gu等，Oligonucleotides，2003，13(6)，479-489；Wang等，J.Org.Chem.，2003，68，4499-4505；Verbeure等，Nucleic Acids Research，2001，29(24)，4941-4947；Wang等，J.Org.Chem.，2001，66，8478-82；Wang等，Nucleosides，Nucleotides&Nucleic Acids，2001，20(4-7)，785-788；Wang等，J.Am.Chem.，2000，122，8595-8602；已公布的PCT申请WO 06/047842以及已公布的PCT申请WO 01/049687；每项申请的内容以引用的方式整体并入本文)。某些

[0428] 修饰的环己烯基核苷具有式X。

[0429] 

X

[0430] 其中独立地对于所述至少一种式X的环己烯基核苷类似物中的每一个：

[0431] Bx为杂环碱基部分；

[0432] T_3和T_4各自独立地为将环己烯基核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团，或者T_3和T_4中的一个为将四氢吡喃核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团且T_3和T_4中的另一个为H、羟基保护基、连接的缀合基团或5'或3'-端基；并且

[0433] q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6、q_7、q_8以及q_9各自独立地为H、C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、取代的C_2-C_6炔基或其他糖取代基。

[0434] 本文所用的“2'-修饰的核苷”或“2'-取代的核苷”是指包含在2'位上包含除H或OH以外的取代基的糖的核苷。2'-修饰的核苷包括但不限于其中连接糖环的两个碳原子的桥连接糖环的2'碳与另一个碳的双环核苷以及具有如以下的非桥连2'取代基的核苷：烯丙基、氨基、叠氮基、硫基、O-烯丙基、O-C_1-C_{10}烷基、-OCF_3、O-$(CH_2)_2$-O-CH_3、2'-O$(CH_2)_2SCH_3$、O-$(CH_2)_2$-O-N$(R_m)$$(R_n)$或O-$CH_2$-C(=O)-N$(R_m)$$(R_n)$，其中$R_m$和$R_n$各自独立地为H或取代或未取代的$C_1$-$C_{10}$烷基。2'-修饰的核苷可进一步例如在糖的其他位置上和/或在核碱基上包含其他修饰。

[0435] 本文所用的“2'-F”是指包括在糖环的2'位上包含氟基的糖的核苷。

[0436] 本文所用的“2'-OMe”或“2'-OCH_3”或“2'-O-甲基”各自是指包含在糖环的2'位上包含-OCH_3基团的糖的核苷。

[0437] 本文所用的“MOE”或“2'-MOE”或“2'-$OCH_2CH_2OCH_3$”或“2'-O-甲氧基乙基”各自是指

包含在糖环的2'位上包含-$OCH_2CH_2OCH_3$基团的糖的核苷。

[0438] 本文所用的"寡核苷酸"是指包含多个连接的核苷的化合物。在某些实施方案中，多个核苷中的一或多个是修饰的。在某些实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷(RNA)和/或脱氧核糖核苷(DNA)。

[0439] 许多其他双环和三环糖替代物环系统在本领域中也是已知的，其可用于修饰用于并入反义化合物中的核苷(参见例如综述文章:Leumann,Bioorg.Med.Chem.,2002,10,841-1954)。可对所述环系统进行各种其他取代以增强活性。

[0440] 用于制备修饰的糖的方法为本领域技术人员所熟知。教导此类修饰的糖的制备的一些代表性美国专利包括但不限于U.S.: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、5,670,633、5,700,920、5,792,847以及6,600,032以及2005年6月2日提交的国际申请PCT/US-2005/019219和2005年12月22日公布的WO 2005/121371，并且每篇所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0441] 在具有修饰的糖部分的核苷酸中，核碱基部分(天然、修饰的或其组合)被维持以便与适当核酸靶杂交。

[0442] 在某些实施方案中，反义化合物包含一个或多个具有修饰的糖部分的核苷酸。在某些实施方案中，修饰的糖部分为2'-MOE。在某些实施方案中，2'-MOE修饰的核苷酸排列于间隔体基元中。在某些实施方案中，修饰的糖部分是具有(4'-$CH(CH_3)$-O-2')桥接基团的双环核苷。在某些实施方案中，(4'-$CH(CH_3)$-O-2')修饰的核苷布置在整个缺口聚物基序的翼中。

[0443] 缀合的反义化合物

[0444] 在某些实施方案中，本公开提供缀合反义化合物。在某些实施方案中，本公开提供包含与核酸转录物互补的反义寡核苷酸的缀合反义化合物。在某些实施方案中，本公开提供包括使细胞与包含与核酸转录物互补的反义寡核苷酸的缀合反义化合物接触的方法。在某些实施方案中，本公开提供包括使细胞与包含反义寡核苷酸的缀合反义化合物接触并且降低细胞中核酸转录物的量或活性的方法。

[0445] 去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)先前已有描述。参见例如，Park等，PNAS第102卷，第47期，第17125-17129页(2005)。所述受体在肝脏细胞尤其是肝细胞上表达。此外，已显示，包含三个N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)配体的聚簇的化合物能够结合ASGP-R，从而导致化合物被摄取到细胞中。参见例如，Khorev等，Bioorganic and Medicinal Chemistry16,9，第5216-5231页(May 2008)。因此，包含所述GalNAc聚簇的缀合物已用来促进将某些化合物摄取到肝脏细胞(确切地是肝细胞)中。例如，已显示，某些含有GalNAc的缀合物在体内增加双链siRNA化合物在肝脏细胞中的活性。在所述情况下，含有GalNAc的缀合物通常连接至siRNA双链体的有义链。因为在反义链最终与靶核酸杂交之前丢弃有义链，所以存在很少关于缀合物将干扰活性的问题。通常，缀合物连接至siRNA的有义链的3'末端。参见例如，美国专利8,106,022。本文描述的某些缀合物基团比先前描述的缀合物基团更有活性和/或更易于合成。

[0446] 在本发明的某些实施方案中，缀合物连接至单链反义化合物，包括但不限于基于RNA酶H的反义化合物和改变前体mRNA靶核酸的剪接的反义化合物。在所述实施方案中，缀

合物应该保持连接至反义化合物足以提供益处(摄取到细胞中的改进)的时间,但是随后应裂解或以其他方式不干扰对于活性所必需的后续步骤,如与靶核酸杂交以及与RNA酶H或与和剪接或剪接调节相关的酶相互作用。这种性质平衡在单链反义化合物的环境中比在其中缀合物可简单连接至有义链的siRNA化合物中更为重要。本文公开了与缺乏缀合物的相同反义化合物相比在体内在肝脏细胞中具有改进效力的缀合的单链反义化合物。已知这些化合物所需的性质平衡如改进的效力是令人惊奇的。

[0447] 在某些实施方案中,本文的缀合物基团包含可裂解部分。如所指出的,不希望受机制的束缚,合乎逻辑的是,缀合物应在化合物上保持足以提供摄取增强的时间,但其后,希望缀合物的一些部分或理想的是缀合物的全部均裂解,从而释放呈其最具活性形式的母体化合物(例如,反义化合物)。在某些实施方案中,可裂解部分为可裂解核苷。所述实施方案通过经由一个或多个可裂解键(如具有磷酸二酯键联的那些)通过核苷使缀合物的其余部分(聚簇)连接至反义寡核苷酸来利用细胞中的内源性核酸酶。在某些实施方案中,聚簇通过磷酸二酯键联与可裂解核苷结合。在某些实施方案中,可裂解核苷通过磷酸二酯键联连接至反义寡核苷酸(反义化合物)。在某些实施方案中,缀合物基团可包含两个或三个可裂解核苷。在所述实施方案中,所述可裂解核苷通过可裂解键(如具有磷酸二酯键联的那些)彼此连接,连接至反义化合物和/或连接至聚簇。本文的某些缀合物不包含可裂解核苷而是包含可裂解键。显示了通过至少一个在细胞中易受裂解的键(可裂解键)来提供缀合物自寡核苷酸的充分裂解。

[0448] 在某些实施方案中,缀合反义化合物为前药。向动物施用所述前药并且其最终代谢为更具活性的形式。例如,使缀合反义化合物裂解以去除缀合物的全部或部分,从而产生缺乏缀合物的全部或一些的反义化合物的活性(或更具活性)形式。

[0449] 在某些实施方案中,缀合物连接在寡核苷酸的5'末端。某些所述5'-缀合物比具有连接在3'末端的类似缀合物基团的对应物更有效地裂解。在某些实施方案中,改进的活性可与改进的裂解相关。在某些实施方案中,在5'末端包含缀合物的寡核苷酸比在3'末端包含缀合物的寡核苷酸具有更大的效能(参见,例如,实施例56、81、83和84)。此外,5'-连接允许更简单的寡核苷酸合成。通常,在固体载体上在3'至5'方向上合成寡核苷酸。为了制得3'-缀合寡核苷酸,通常将预先缀合的3'核苷连接至固体载体,然后按常规构造寡核苷酸。然而,将所述缀合核苷连接至固体载体增加了合成的复杂性。此外,使用所述方法,缀合物则存在于寡核苷酸的整个合成中并且在后续步骤期间可能发生降解或可能限制可使用的反应和试剂的种类。使用本文针对5'-缀合寡核苷酸所述的结构和技术,可使用标准自动化技术合成寡核苷酸并且与最后(最5')的核苷一起或在寡核苷酸从固体载体上裂解之后引入缀合物。

[0450] 鉴于现有技术和本公开,普通技术人员可简单制得本文的任何缀合物和缀合寡核苷酸。此外,本文公开的某些所述缀合物和缀合寡核苷酸的合成更简单和/或需要更少步骤,并且因此比先前公开的缀合物的合成更低廉,从而在制造上提供优点。例如,某些缀合物基团的合成由较少合成步骤组成,从而导致相对先前所述的缀合物基团产率增加。缀合物基团如实施例46中的GalNAc3-10和实施例48中的GalNAc3-7比先前描述的缀合物简单得更多,所述先前描述的缀合物如需要装配更多化学中间体的U.S.8,106,022或U.S.7,262,177中所述的那些。因此,本文描述的这些和其他缀合物在与任何寡核苷酸一起使用方面优

于先前描述的化合物，所述寡核苷酸包括单链寡核苷酸和双链寡核苷酸(例如，siRNA)的任一链。

[0451] 类似地，本文公开了仅具有一个或两个GalNAc配体的缀合物基团。如所示出的，所述缀合物基团改进了反义化合物的活性。所述化合物比包含三个GalNAc配体的缀合物更易于制备。包含一个或两个GalNAc配体的缀合物基团可连接至任何反义化合物，包括单链寡核苷酸和双链寡核苷酸(例如，siRNA)的任一链。

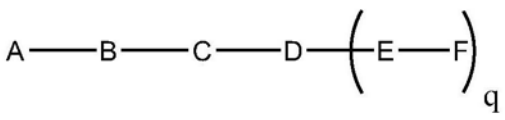
[0452] 在某些实施方案中，本文的缀合物大致上不改变耐受性的某些量度。例如，本文显示缀合反义化合物不比未缀合的母体化合物更具有免疫原性。因为效力得到改进，所以其中耐受性保持相同(或甚至与效力增益相比耐受性实际上仅略微变差)的实施方案对于治疗具有改进的性质。

[0453] 在某些实施方案中，缀合允许人们以在不存在缀合的情况下具有较不吸引人的结果的方式改变反义化合物。例如，在某些实施方案中，用磷酸二酯键联替代完全的硫代磷酸酯反义化合物的一个或多个硫代磷酸酯键联造成耐受性的一些量度的改进。例如，在某些情况下，具有一个或多个磷酸二酯的所述反义化合物比其中每个键联为硫代磷酸酯的相同化合物具有更小的免疫原性。然而，在某些情况下，如实施例26中所示，用磷酸二酯键联同样替代一个或多个硫代磷酸酯键联还造成细胞摄取减少和/或效力损失。在某些实施方案中，本文描述的缀合反义化合物耐受所述键联变化，其中当与缀合的完全硫代磷酸酯对应物相比时摄取和效力损失很少或没有损失。事实上，在某些实施方案中，例如在实施例44、57、59和86中，包含缀合物和至少一个磷酸二酯核苷间键联的寡核苷酸实际上表现出增加的体内效力，即使是相对于也包含相同缀合物的完全硫代磷酸酯对应物来说。此外，因为缀合导致摄取/效力的实质增加，所以为实现改进的耐受性，所述实质增益的些微损失是可接受的。因此，在某些实施方案中，缀合反义化合物包含至少一个磷酸二酯键联。

[0454] 在某些实施方案中，本文的反义化合物的缀合造成肝细胞中递送、摄取和活性的增加。因此，向肝脏组织递送更多的化合物。然而，在某些实施方案中，仅递送增加不能解释活性的整体增加。在某些所述实施方案中，更多化合物进入肝细胞。在某些实施方案中，即使是肝细胞摄取增加也不能解释活性的整体增加。在所述实施方案中，缀合化合物的生产性(productive)摄取增加。例如，如实施例102中所示，相对于非实质细胞，含有GalNAc的缀合物的某些实施方案增加了反义寡核苷酸在肝细胞中的富集。此富集对靶向在肝细胞中表达的基因的寡核苷酸是有益的。

[0455] 在某些实施方案中，本文的缀合反义化合物造成肾暴露减少。例如，如实施例20中所示，包含含有GalNAc的缀合物的某些实施方案的反义寡核苷酸在肾中的浓度低于缺乏含有GalNAc的缀合物的反义寡核苷酸的浓度。这具有若干有益的治疗意义。对于不想要在肾中的活性的治疗适应症(indication)，对肾的暴露具有肾毒性的风险而没有相应的益处。此外，肾中的高浓度通常导致化合物流失至尿液，从而导致更快的清除。因此对于非肾靶标，肾积累是不希望的。

[0456] 在某些实施方案中，本公开提供由下式表示的缀合反义化合物：

[0457] 

[0458] 其中

[0459] A为反义寡核苷酸;

[0460] B为可裂解部分

[0461] C为缀合物接头

[0462] D为支链基团

[0463] 每个E为系链;

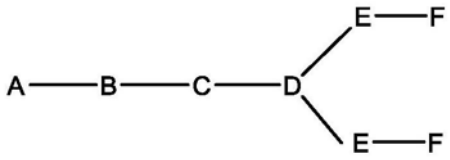
[0464] 每个F为配体;并且

[0465] q为1与5之间的整数。

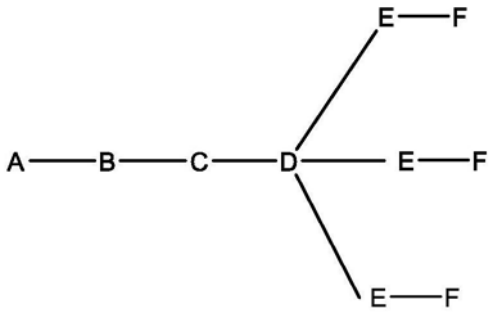
[0466] 在上图和在本文的类似图中,支链基团“D”支化多次,所述次数是适应由“q”指示的(E-F)基团数目所必需的。因此,在q=1时,式为:

[0467] A-B-C-D-E-F

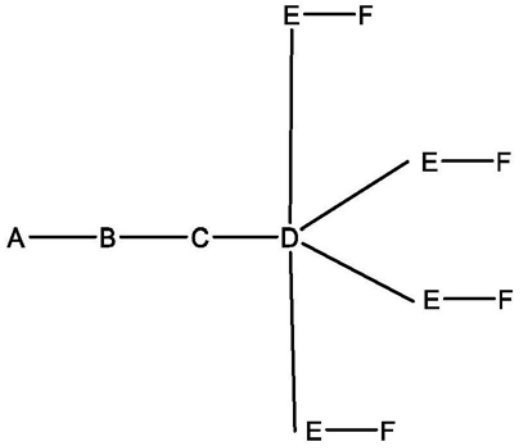
[0468] 在q=2时,式为:

[0469] 

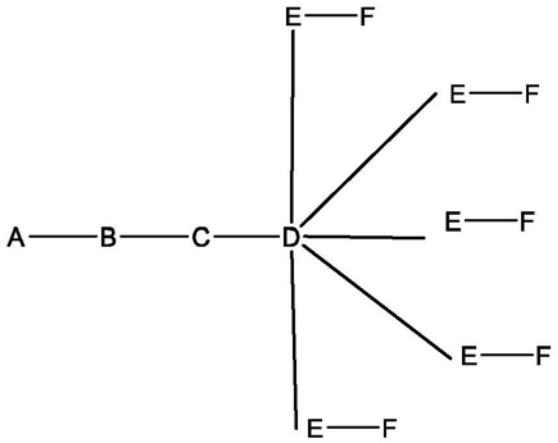
[0470] 在q=3时,式为:

[0471] 

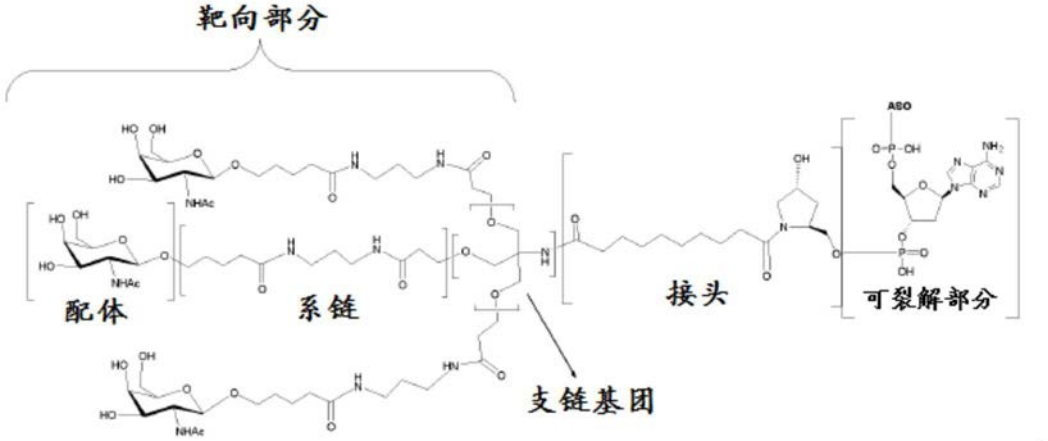
[0472] 在q=4时,式为:

[0473] 

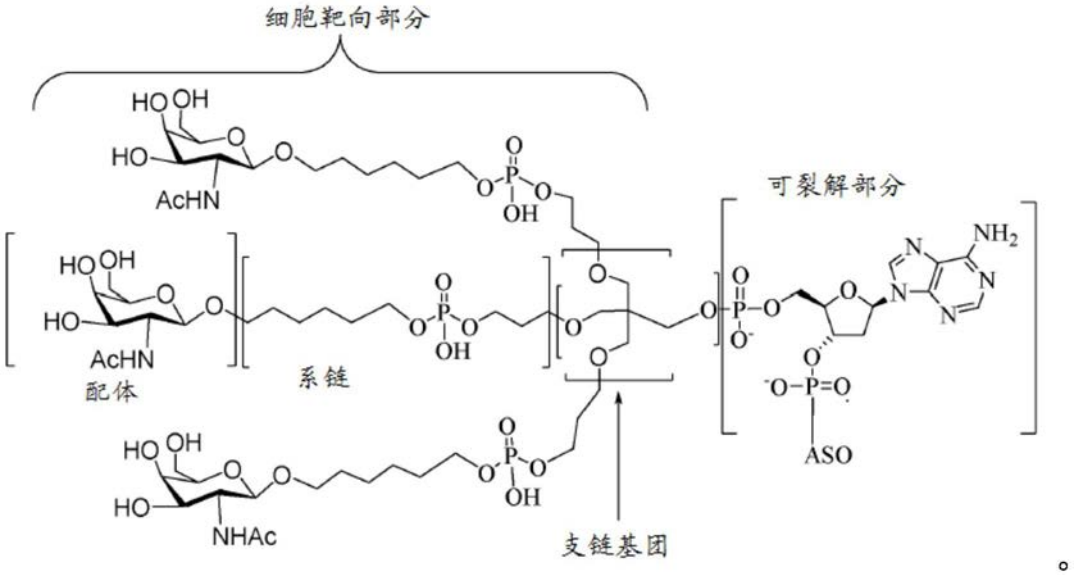
[0474] 在q=5时,式为:

[0475] 

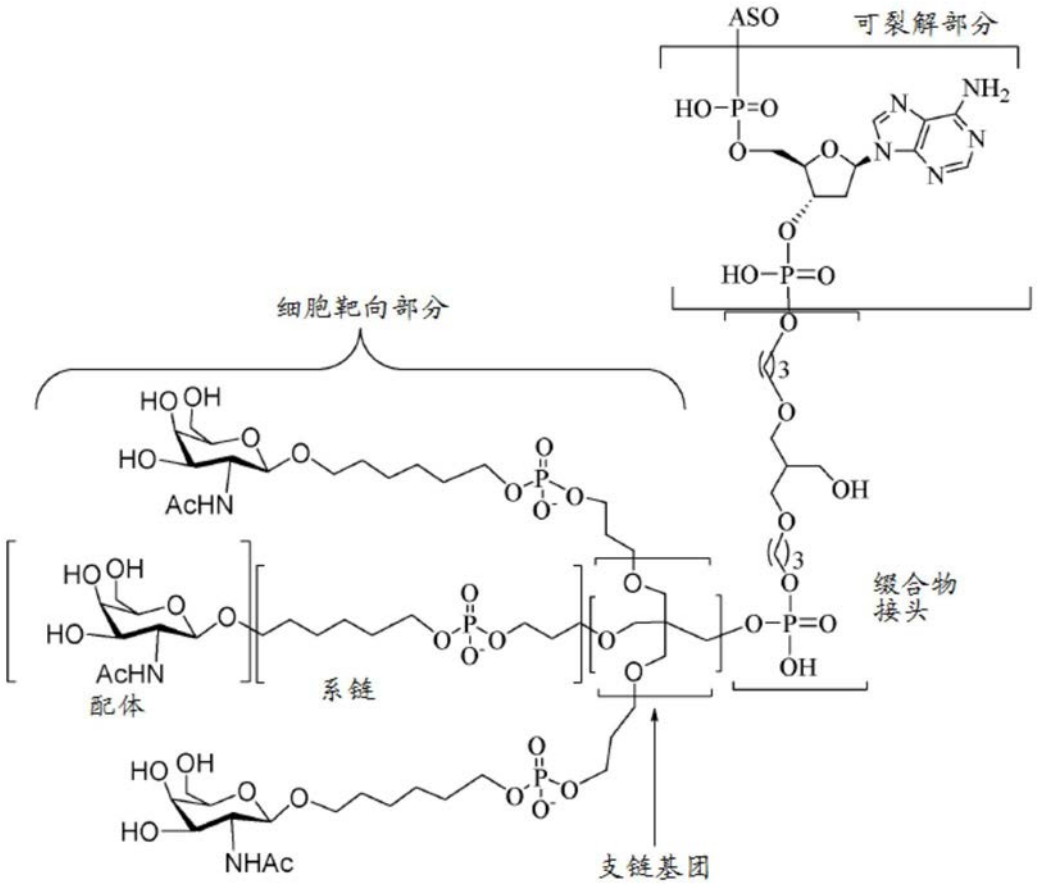
[0476] 在某些实施方案中,提供具有以下结构的缀合反义化合物:

[0477] 

[0478] 在某些实施方案中,提供具有以下结构的缀合反义化合物:

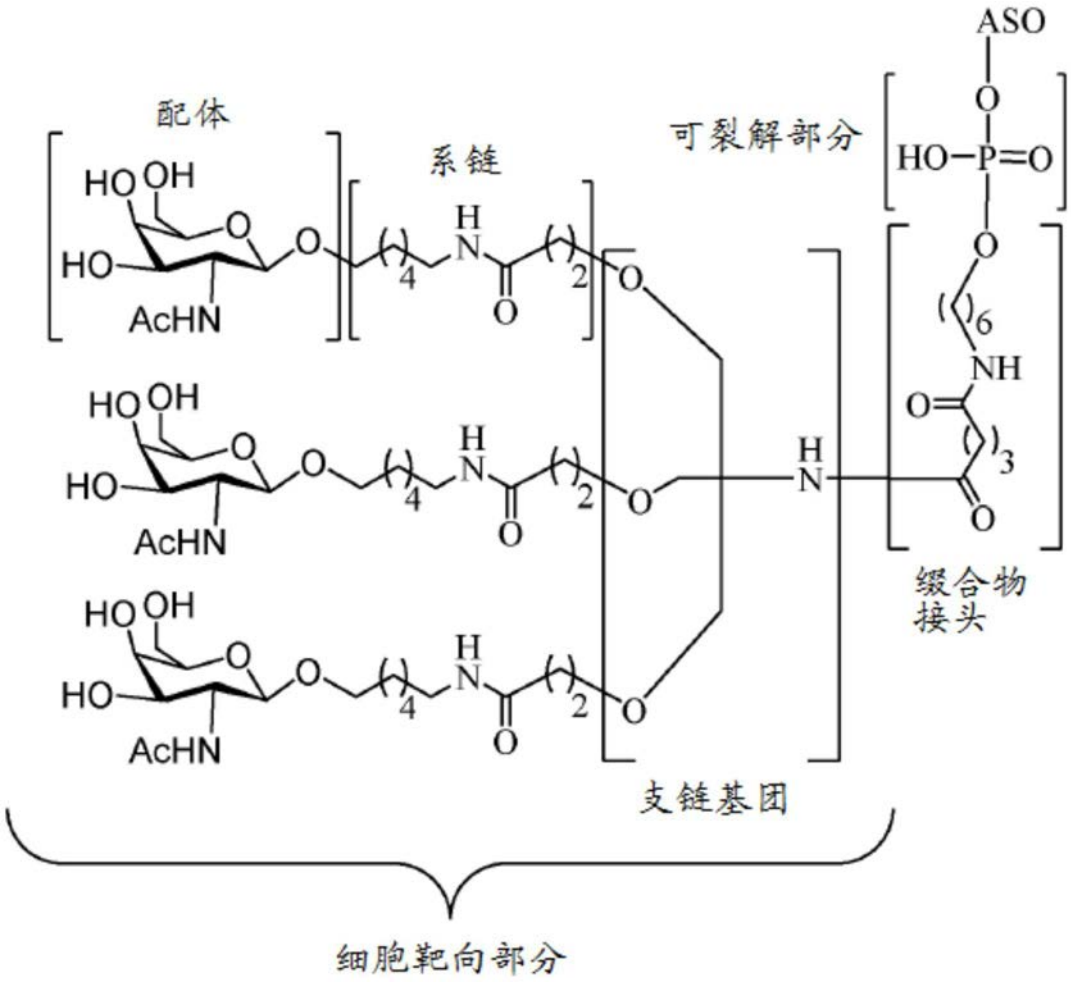
[0479] 

[0480] 在某些实施方案中,提供具有以下结构的缀合反义化合物:

[0481] 

[0482] 在某些实施方案中，提供具有以下结构的缀合反义化合物：

[0483]



[0484] 在具有多于一个具体变量(例如,多于一个“m”或“n”)的实施方案中,除非另外指出,否则独立选择每个所述具体变量。因此,对于具有多于一个n的结构,独立地选择每个n,所以它们可为或可不为彼此相同的。

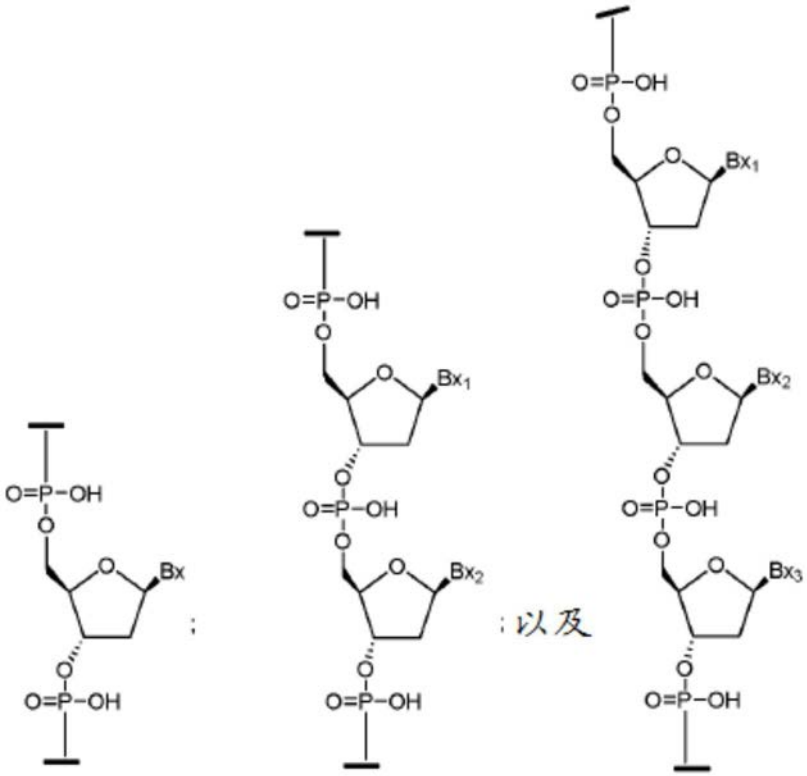
[0485] i.某些可裂解部分

[0486] 在某些实施方案中,可裂解部分为可裂解键。在某些实施方案中,可裂解部分包含可裂解键。在某些实施方案中,缀合物基团包含可裂解部分。在某些所述实施方案中,可裂解部分连接至反义寡核苷酸。在某些所述实施方案中,可裂解部分直接连接至细胞靶向部分。在某些所述实施方案中,可裂解部分连接至缀合物接头。在某些实施方案中,可裂解部分包含磷酸酯或磷酸二酯。在某些实施方案中,可裂解部分为可裂解核苷或核苷类似物。在某些实施方案中,核苷或核苷类似物包含选自以下的任选保护的杂环碱基:嘌呤、取代的嘌呤、嘧啶或取代的嘧啶。在某些实施方案中,可裂解部分为包含选自以下的任何保护的杂环碱基的核苷:尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、4-N-苯甲酰基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基-5-甲基胞嘧啶、腺嘌呤、6-N-苯甲酰基腺嘌呤、鸟嘌呤以及2-N-异丁酰基鸟嘌呤。在某些实施方案中,可裂解部分为2’-脱氧核苷,所述2’-脱氧核苷通过磷酸二酯键联连接至反义寡核苷酸的3’位并且通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联连接至接头。在某些实施方案中,可裂解部分为2’-脱氧腺苷,所述2’-脱氧腺苷通过磷酸二酯键联连接至反义寡核苷酸的3’位并且通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联连接至接头。在某些实施方案中,可裂解部分为2’-脱氧腺苷,所述2’-脱氧腺苷通过磷酸二酯键联连接至反义寡核苷酸的3’位并且通过磷酸二

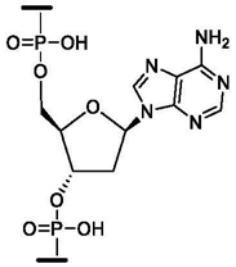
酯键联连接至接头。

[0487] 在某些实施方案中，可裂解部分连接至反义寡核苷酸的3'位。在某些实施方案中，可裂解部分连接至反义寡核苷酸的5'位。在某些实施方案中，可裂解部分连接至反义寡核苷酸的2'位。在某些实施方案中，可裂解部分通过磷酸二酯键联连接至反义寡核苷酸。在某些实施方案中，可裂解部分通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联连接至接头。在某些实施方案中，可裂解部分通过磷酸二酯键联连接至接头。在某些实施方案中，缀合物基团不包括可裂解部分。

[0488] 在某些实施方案中，在将复合物施用至动物之后，仅在被靶细胞内化之后，可裂解部分才被裂解。在细胞内部，可裂解部分裂解，从而释放活性反义寡核苷酸。虽然不希望受理论的束缚，但是据信可裂解部分在细胞内被一种或多种核酸酶裂解。在某些实施方案中，一种或多种核酸酶裂解可裂解部分与接头之间的磷酸二酯键联。在某些实施方案中，可裂解部分具有选自以下的结构：

[0489] 

[0490] 其中Bx、Bx_1、Bx_2以及Bx_3各自独立地为杂环碱基部分。在某些实施方案中，可裂解部分具有选自以下的结构：

[0491] 

[0492] ii.某些接头

[0493] 在某些实施方案中，缀合物基团包含接头。在某些所述实施方案中，接头共价结合

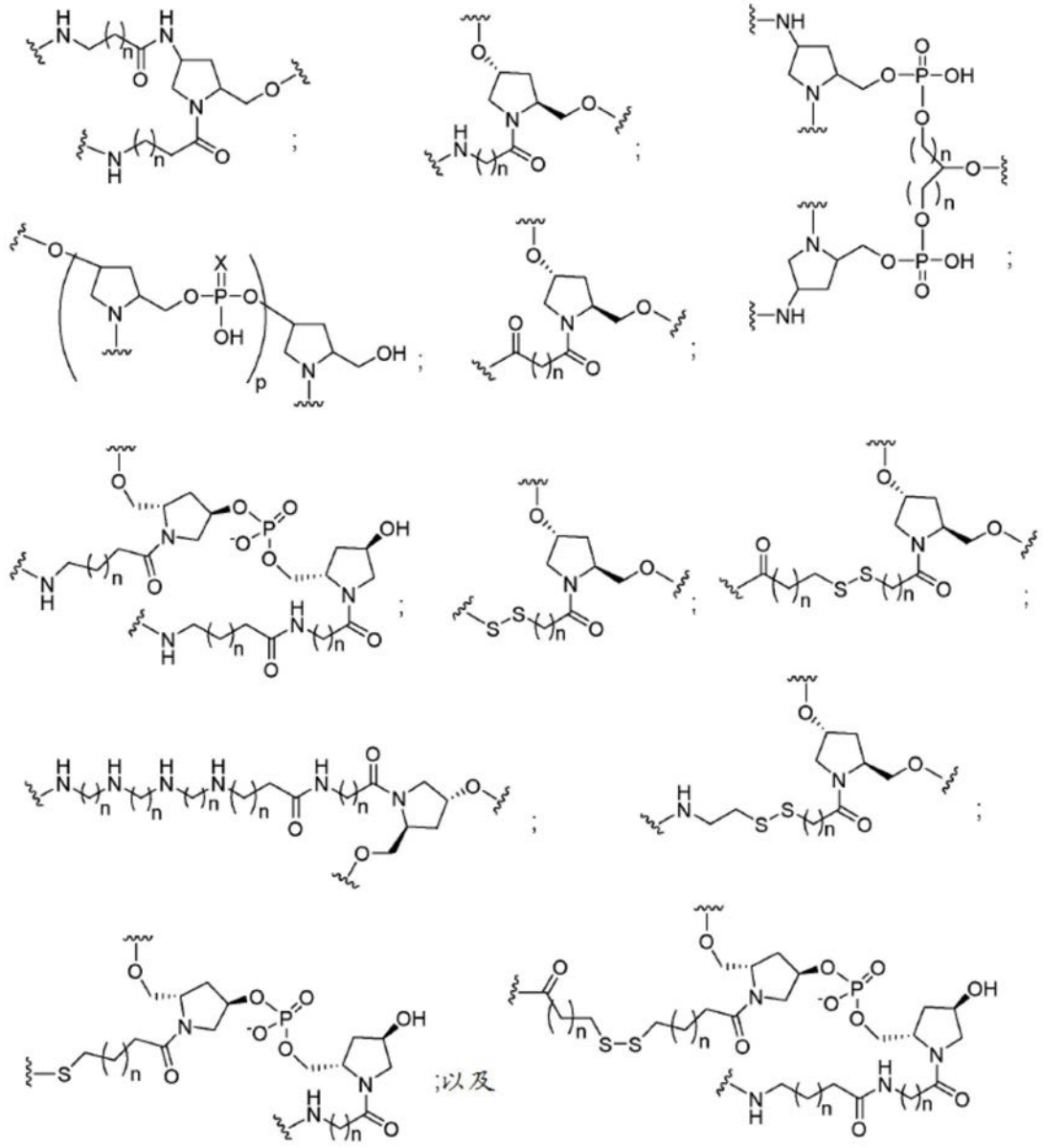
至可裂解部分。在某些所述实施方案中，接头共价结合至反义寡核苷酸。在某些实施方案中，接头共价结合至细胞靶向部分。在某些实施方案中，接头还包含对固体载体的共价连接。在某些实施方案中，接头还包含对蛋白质结合部分的共价连接。在某些实施方案中，接头还包含对固体载体的共价连接并且还包含对蛋白质结合部分的共价连接。在某些实施方案中，接头包括多个用于连接束缚配体(tethered ligand)的位置。在某些实施方案中，接头包括多个用于连接束缚配体的位置并且不连接至支链基团。在某些实施方案中，接头还包含一个或多个可裂解键。在某些实施方案中，缀合物基团不包括接头。

[0494] 在某些实施方案中，接头包括至少线性基团，所述线性基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚(-S-)和羟氨基(-O-N(H)-)。在某些实施方案中，线性基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺和醚基团。在某些实施方案中，线性基团包含选自烷基和醚基团的基团。在某些实施方案中，线性基团包含至少一个磷连接基团。在某些实施方案中，线性基团包含至少一个磷酸二酯基团。在某些实施方案中，线性基团包括至少一个中性连接基团。在某些实施方案中，线性基团共价连接至细胞靶向部分和可裂解部分。在某些实施方案中，线性基团共价连接至细胞靶向部分和反义寡核苷酸。在某些实施方案中，线性基团共价连接至细胞靶向部分、可裂解部分和固体载体。在某些实施方案中，线性基团共价连接至细胞靶向部分、可裂解部分、固体载体和蛋白质结合部分。在某些实施方案中，线性基团包括一个或多个可裂解键。

[0495] 在某些实施方案中，接头包括共价连接至支架基团的线性基团。在某些实施方案中，支架包括支链脂肪族基团，所述支链脂肪族基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟氨基。在某些实施方案中，支架包括支链脂肪族基团，所述支链脂肪族基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺和醚基团。在某些实施方案中，支架包括至少一个单环系统或多环系统。在某些实施方案中，支架包括至少两个单环系统或多环系统。在某些实施方案中，线性基团共价连接至支架基团并且支架基团共价连接至可裂解部分和接头。在某些实施方案中，线性基团共价连接至支架基团并且支架基团共价连接至可裂解部分、接头和固体载体。在某些实施方案中，线性基团共价连接至支架基团并且支架基团共价连接至可裂解部分、接头和蛋白质结合部分。在某些实施方案中，线性基团共价连接至支架基团并且支架基团共价连接至可裂解部分、接头、蛋白质结合部分和固体载体。在某些实施方案中，支架基团包括一个或多个可裂解键。

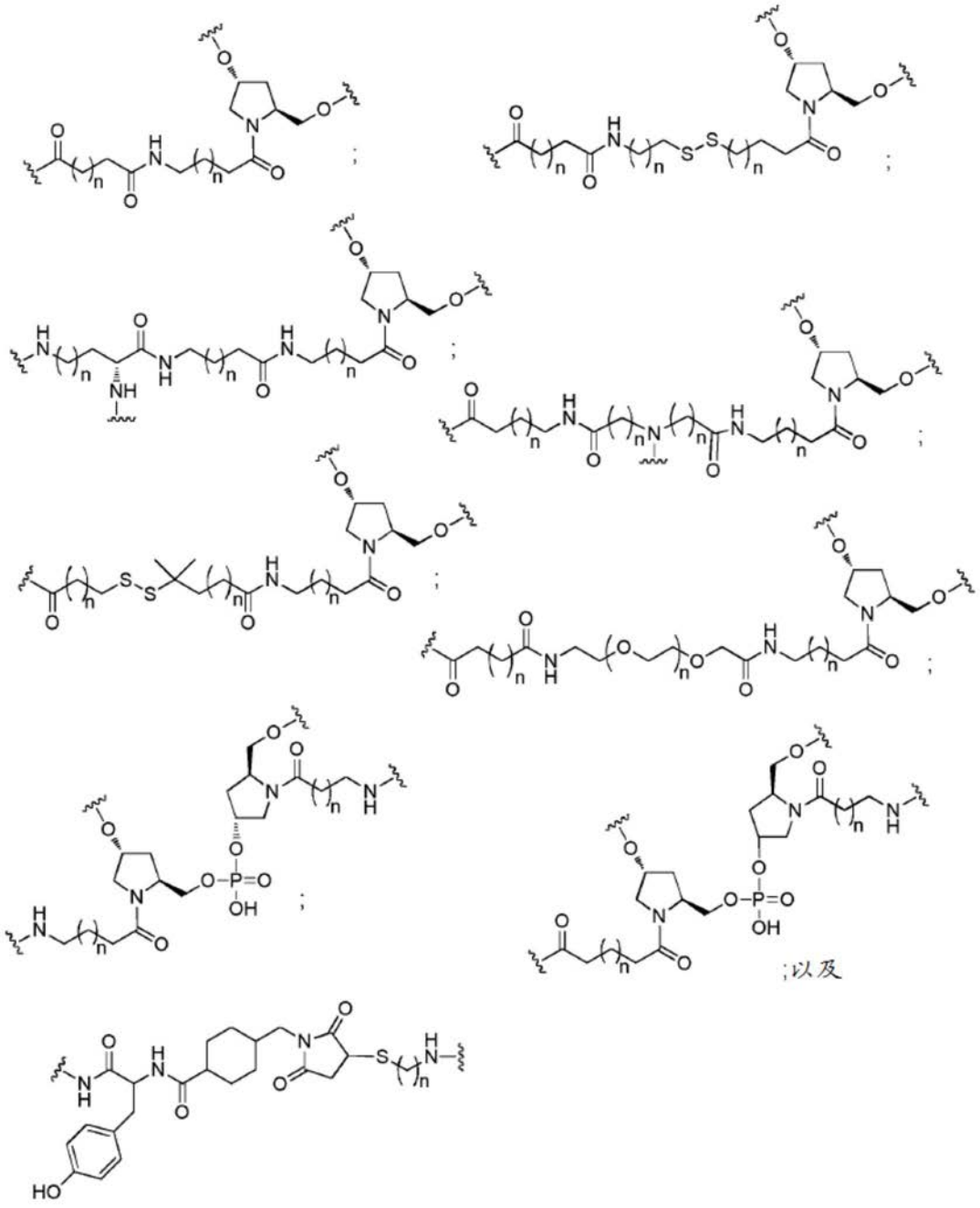
[0496] 在某些实施方案中，接头包括蛋白质结合部分。在某些实施方案中，蛋白质结合部分为脂质，例如像包括但不限于：胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-二-O(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪)、维生素(例如，叶酸、维生素A、维生素E、生物素、吡哆醛)、肽、碳水化合物(例如，单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖、多糖)、溶内体组分、类固醇(例如，熊果醇、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷配基)、萜烯(例如，三萜烯，萨洒皂角苷配基、木栓酮、表木栓醇衍生的石胆酸)或阳离子脂质。在某些实施方案中，蛋白质结合部分为C16至C22长链饱和或不饱和的脂肪酸、胆固醇、胆酸、维生素E、金刚烷或1-五氟丙基。

[0497] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

[0498] 

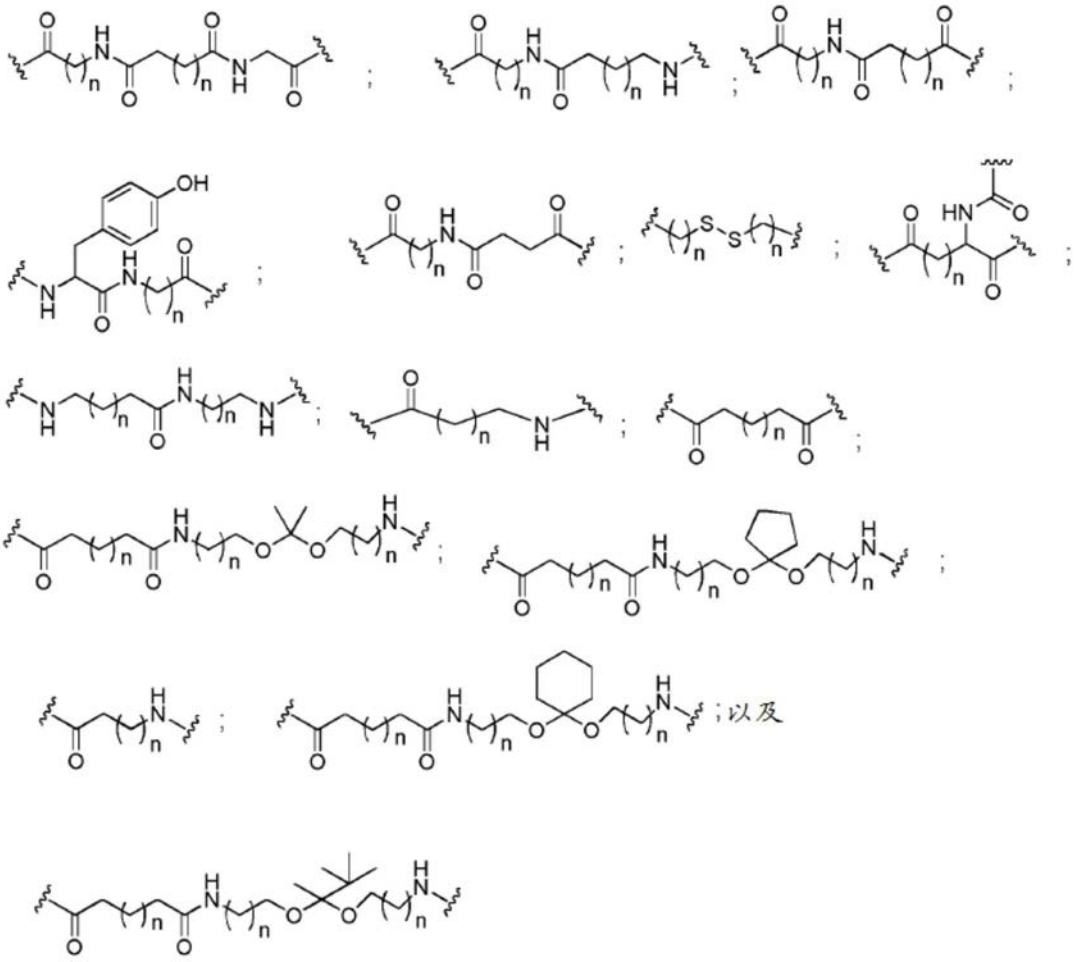
[0499] 其中每个n独立地为1至20;并且p为1至6。

[0500] 在某些实施方案中,接头具有选自以下的结构:

[0501] 

[0502] 其中每个n独立地为1至20。

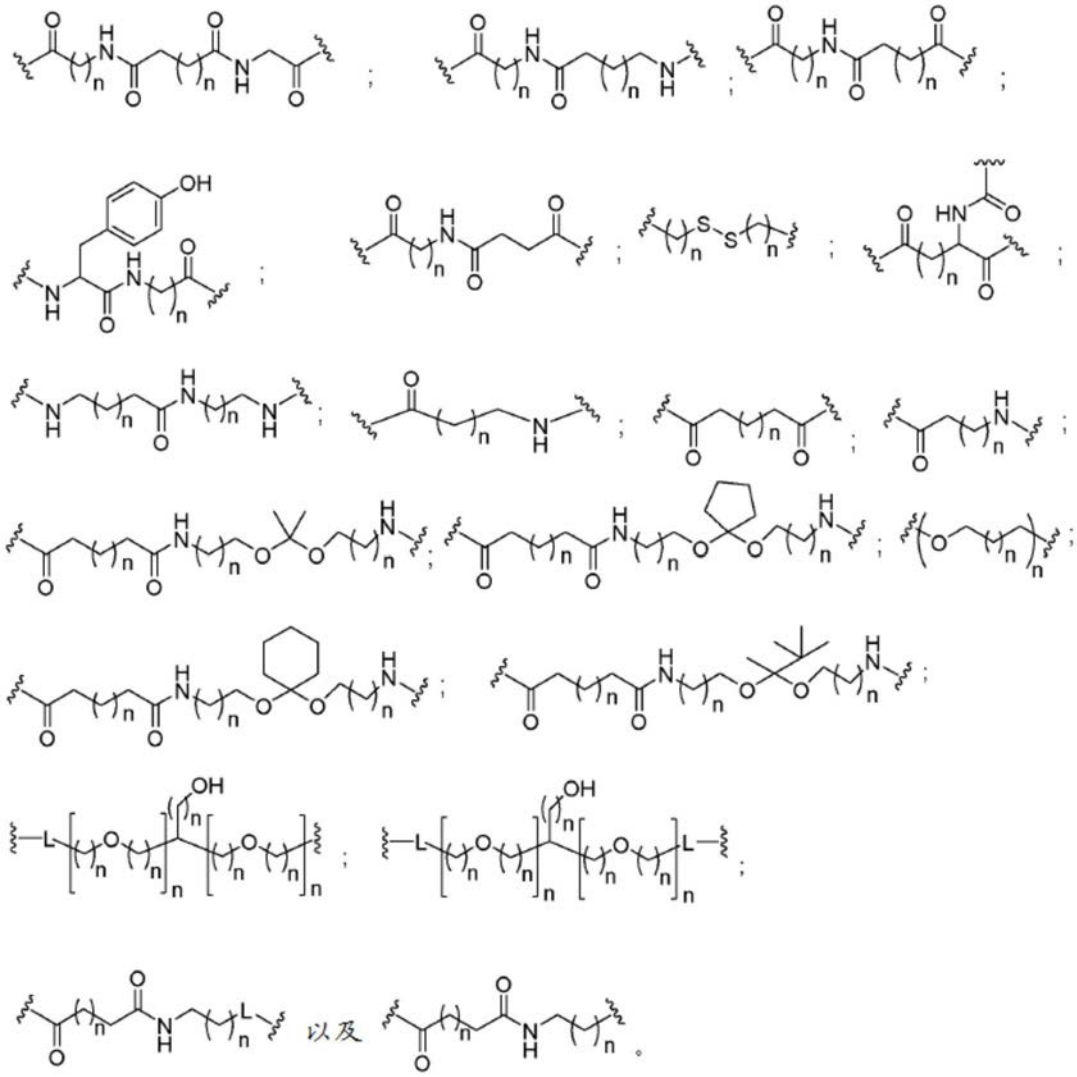
[0503] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：



[0504]

[0505] 其中n为1至20。

[0506] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

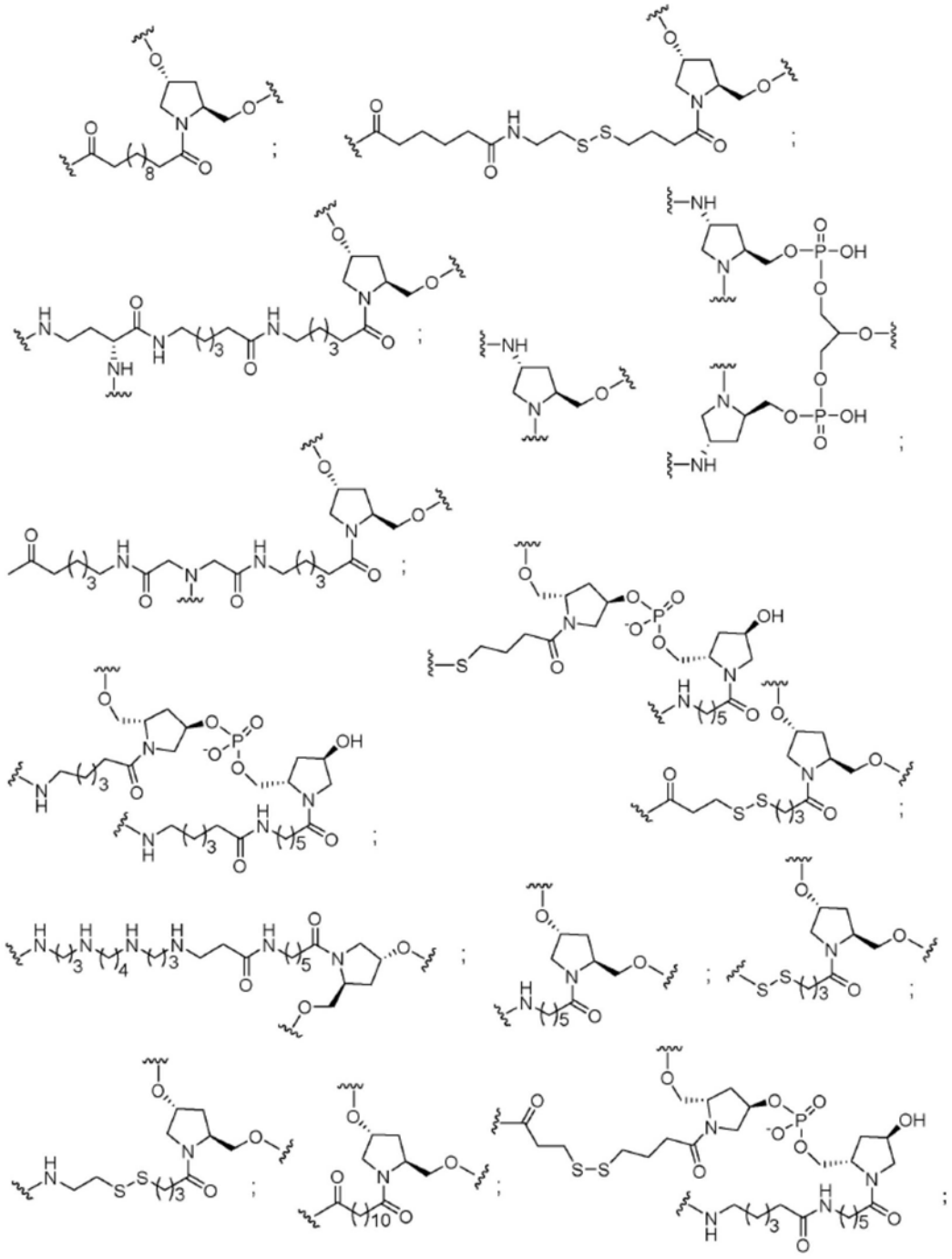


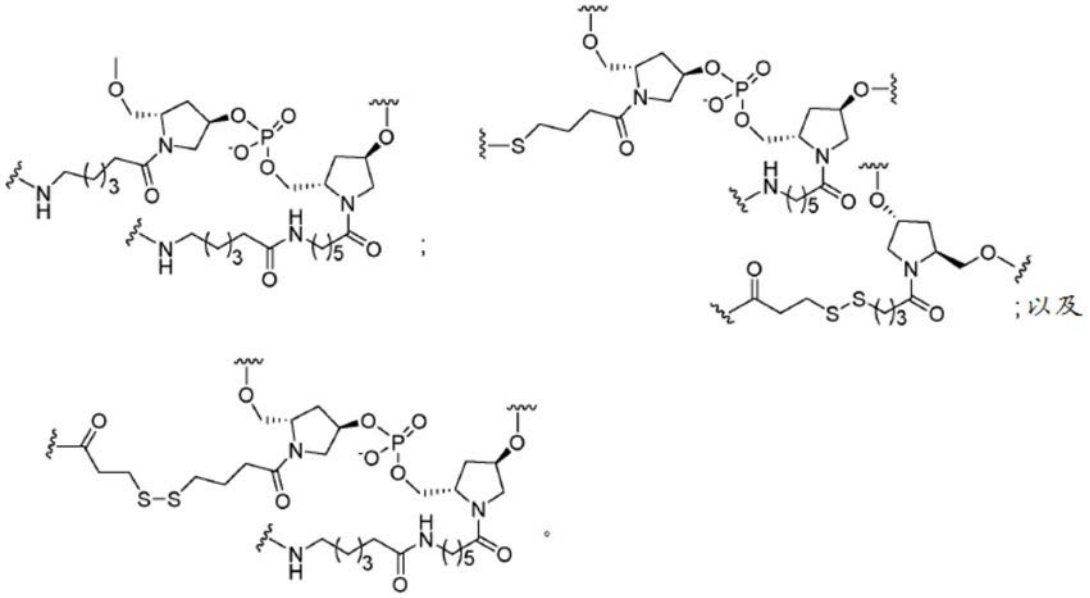
[0507]

[0508] 其中每个L独立地为磷连接基团或中性连接基团;并且

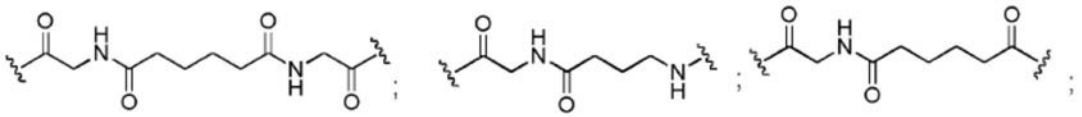
[0509] 每个n独立地为1至20。

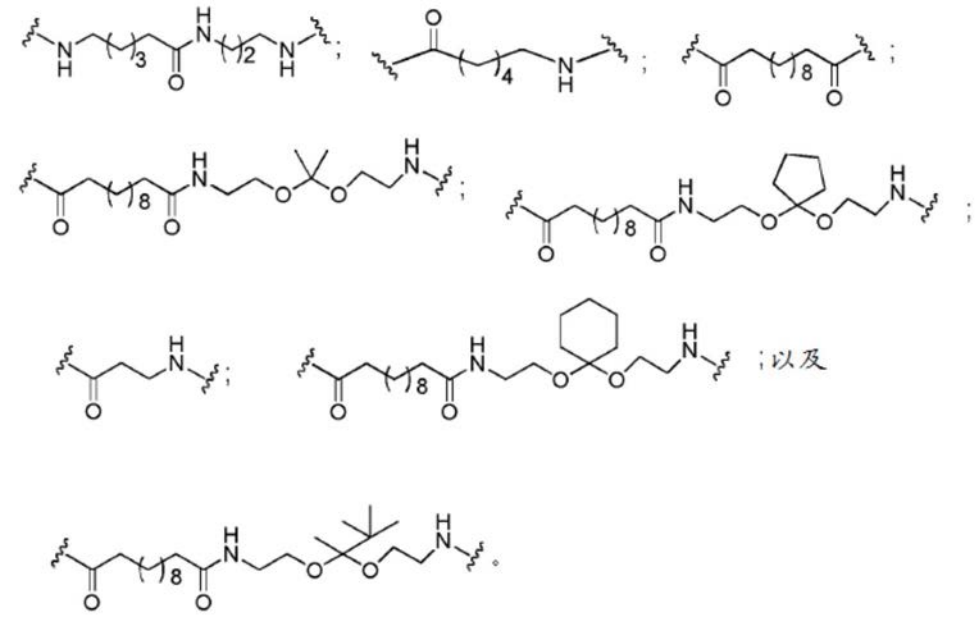
[0510] 在某些实施方案中,接头具有选自以下的结构:

[0511] 

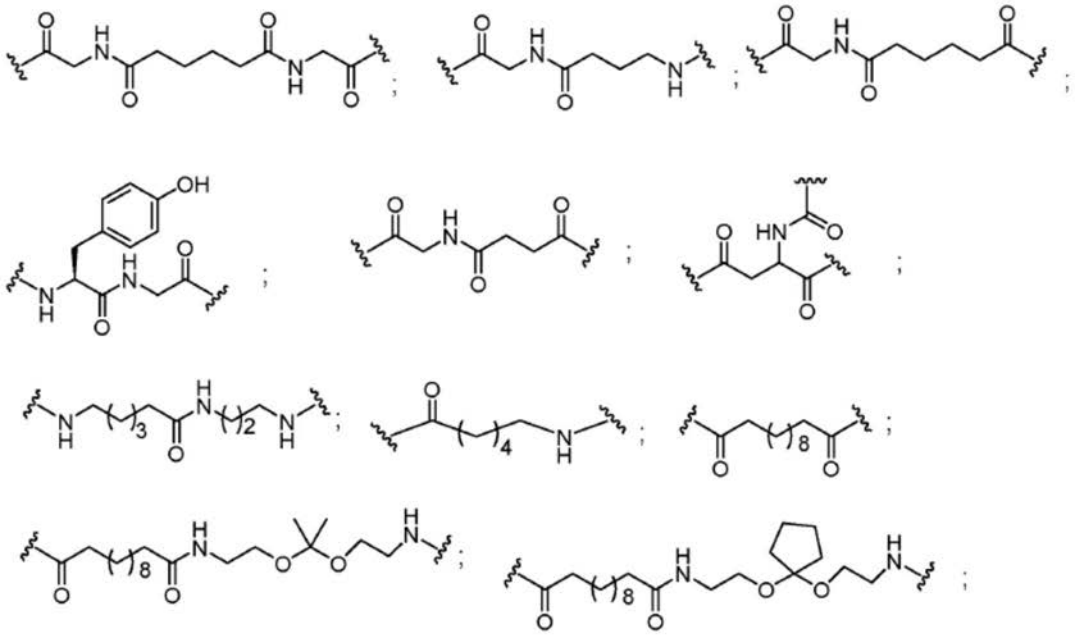
[0512] 

[0513] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

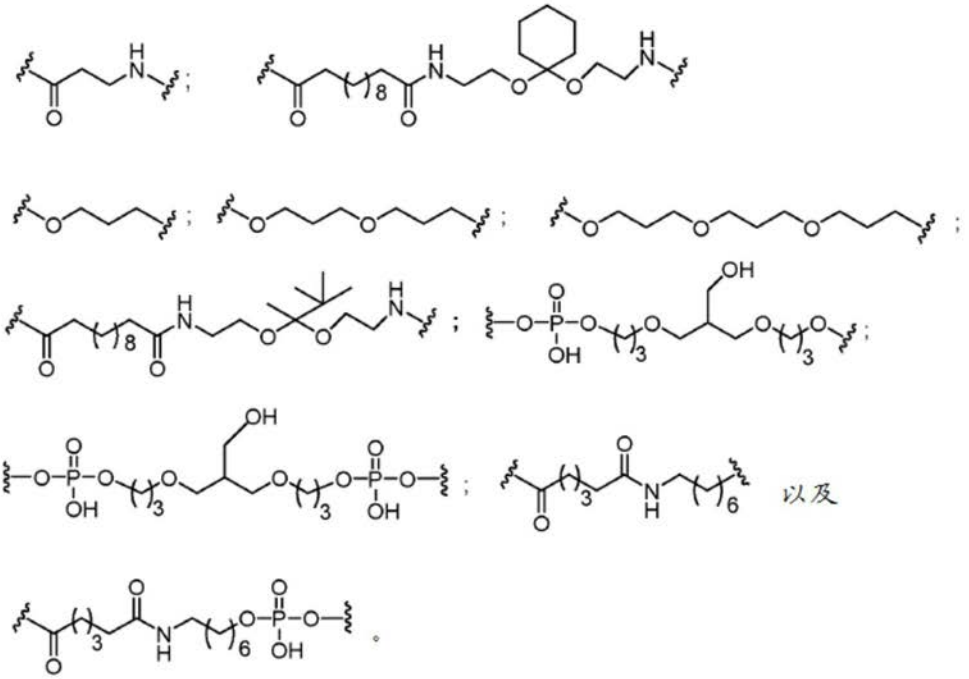


[0514] 

[0515] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

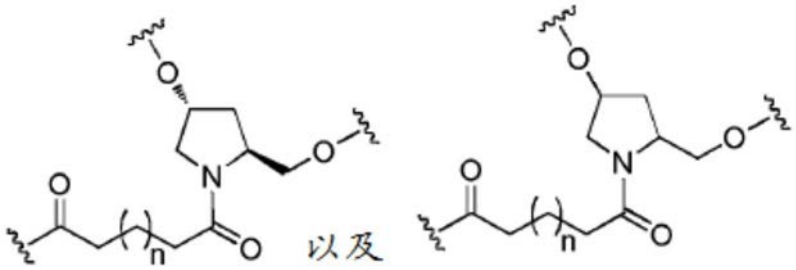


[0516]



[0517] 在某些实施方案中,接头具有选自以下的结构:

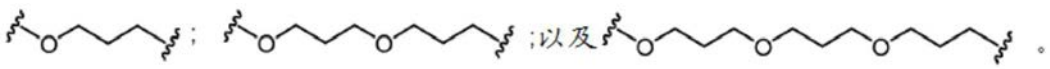
[0518]



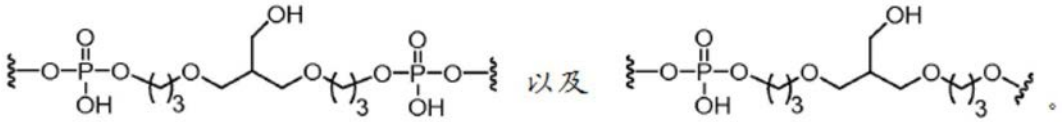
[0519] 其中n为1至20。

[0520] 在某些实施方案中,接头具有选自以下的结构:

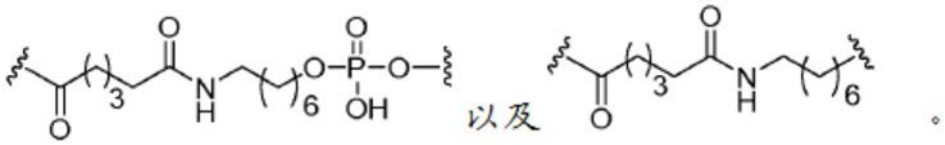
[0521]



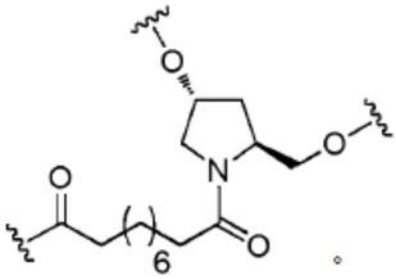
[0522] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

[0523] 

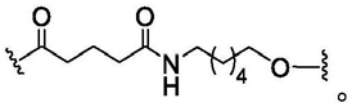
[0524] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

[0525] 

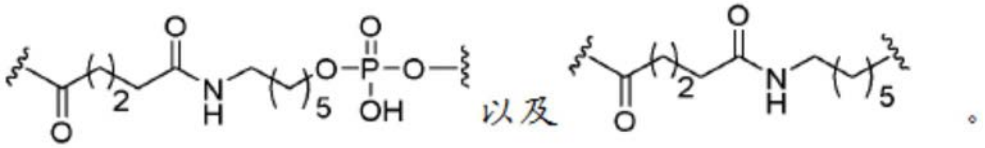
[0526] 在某些实施方案中，缀合物接头具有以下结构：

[0527] 

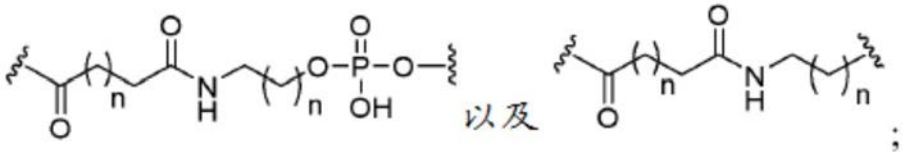
[0528] 在某些实施方案中，缀合物接头具有以下结构：

[0529] 

[0530] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

[0531] 

[0532] 在某些实施方案中，接头具有选自以下的结构：

[0533] 

[0534] 其中每个n独立地为0、1、2、3、4、5、6或7。

[0535] iii.某些细胞靶向部分

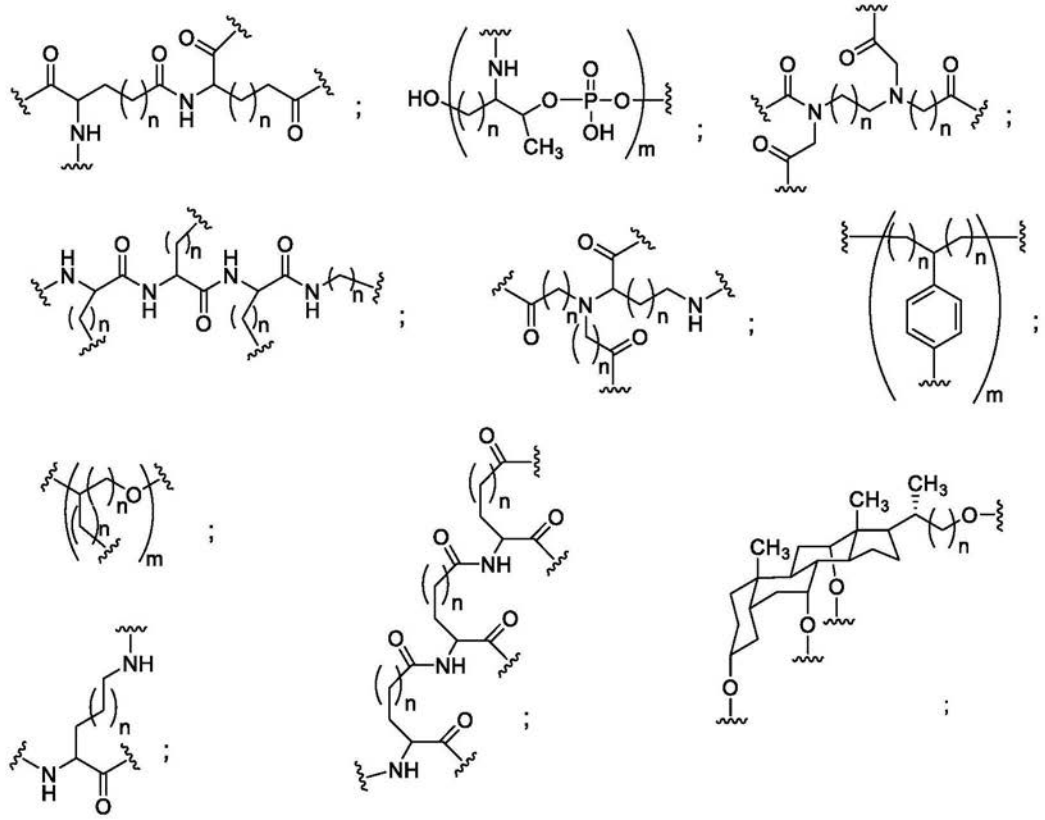
[0536] 在某些实施方案中，缀合物基团包含细胞靶向部分。某些所述细胞-靶向部分使反义化合物的细胞摄取增加。在某些实施方案中，细胞靶向部分包含支链基团、一个或多个系链和一个或多个配体。在某些实施方案中，细胞靶向部分包含支链基团、一个或多个系链、一个或多个配体以及一个或多个可裂解键。

[0537] 1.某些支链基团

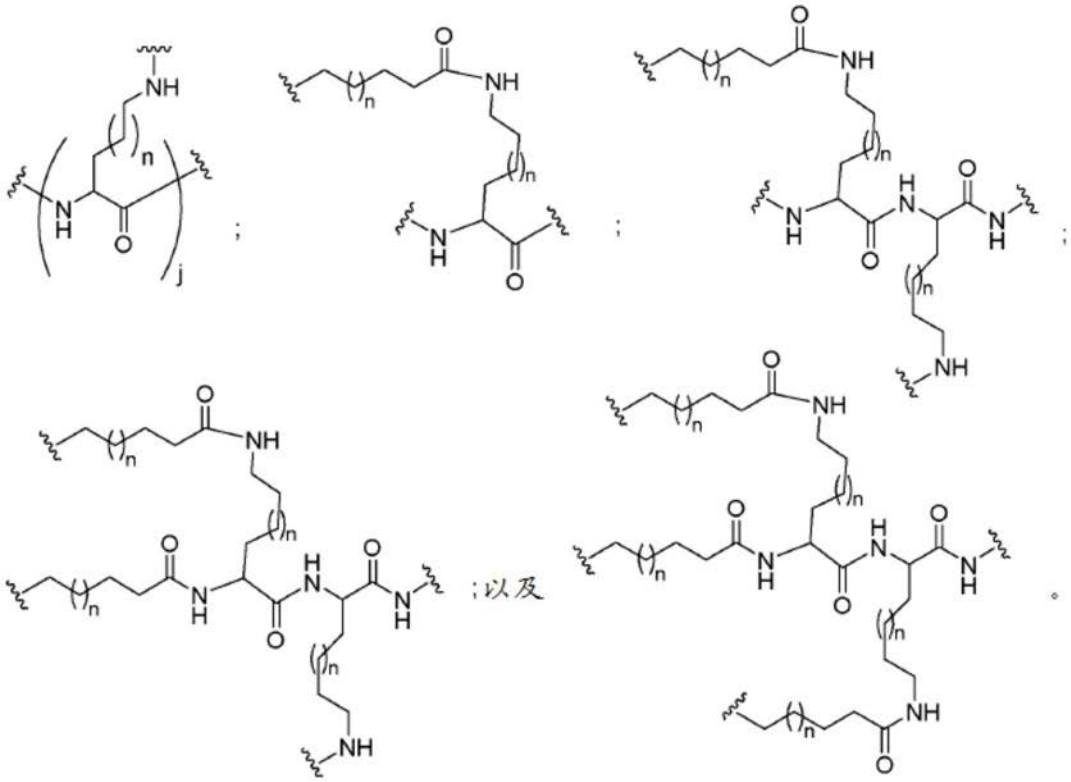
[0538] 在某些实施方案中，缀合物基团包含靶向部分，所述靶向部分包含支链基团和至少两个束缚配体。在某些实施方案中，支链基团连接缀合物接头。在某些实施方案中，支链基团连接可裂解部分。在某些实施方案中，支链基团连接反义寡核苷酸。在某些实施方案中，支链基团共价连接至接头和每个束缚配体。在某些实施方案中，支链基团包含支链脂肪

族基团，所述支链脂肪族基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟氨基。在某些实施方案中，支链基团包含选自以下的基团：烷基、酰胺和醚基团。在某些实施方案中，支链基团包含选自烷基和醚基团的基团。在某些实施方案中，支链基团包含单环系统或多环系统。在某些实施方案中，支链基团包含一个或多个可裂解键。在某些实施方案中，缀合物基团不包括支链基团。

[0539] 在某些实施方案中，支链基团具有选自以下的结构：



[0540]

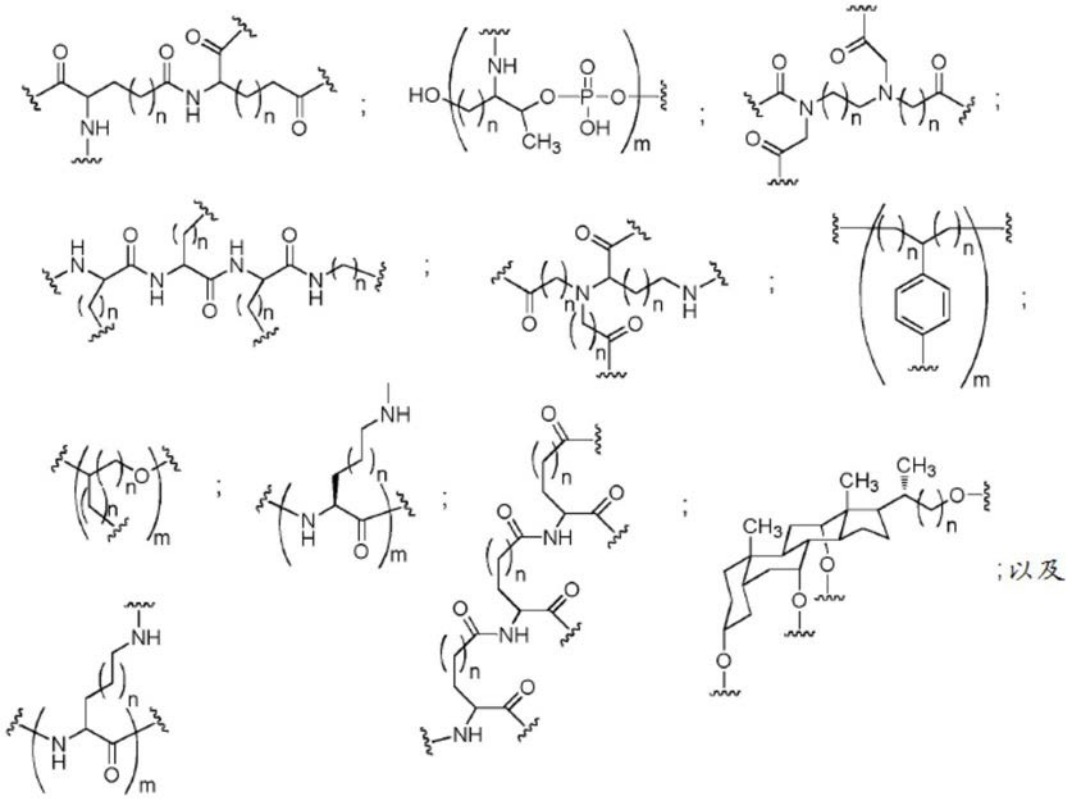


[0541] 其中每个n独立地为1至20；

[0542] j为1至3；并且

[0543] m为2至6。

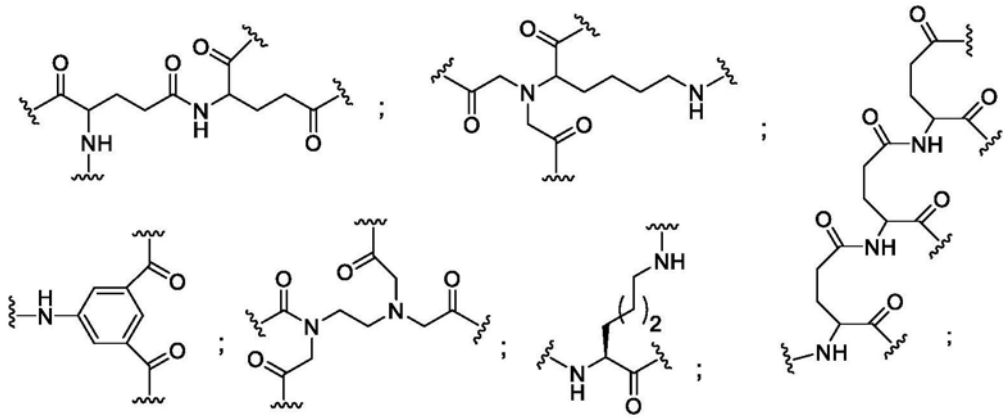
[0544] 在某些实施方案中，支链基团具有选自以下的结构：

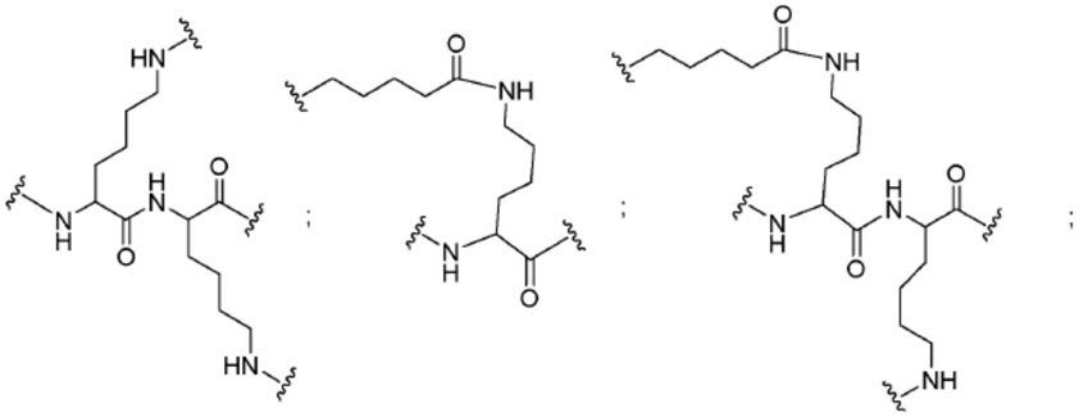
[0545] 

[0546] 其中每个n独立地为1至20;并且

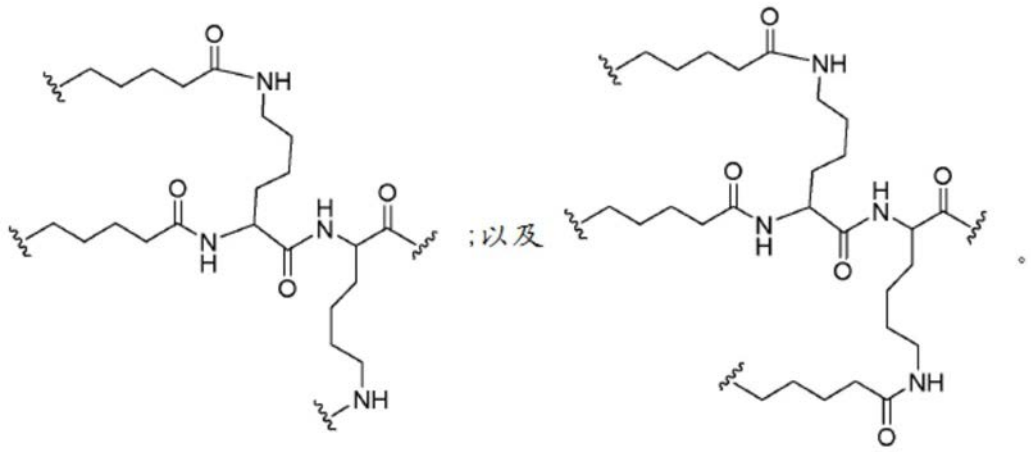
[0547] m为2至6。

[0548] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0549] 

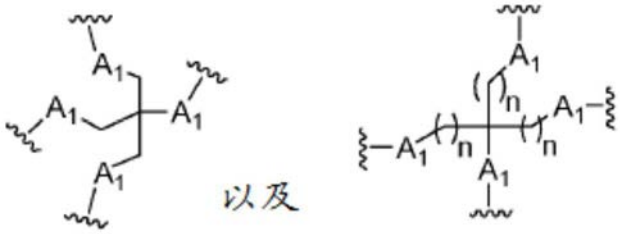


[0550]



[0551] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0552]

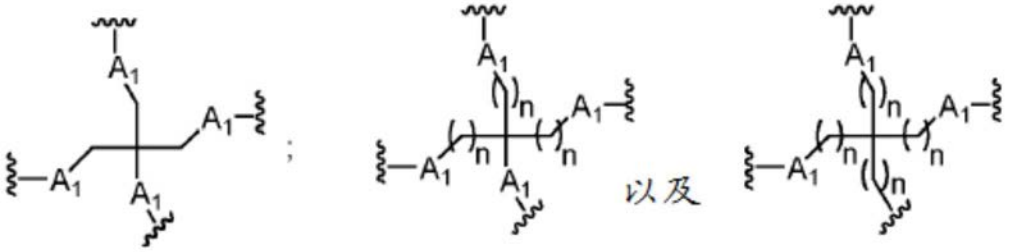


[0553] 其中A_1各自独立地为O、S、C=O或NH;并且

[0554] 每个n独立地为1至20。

[0555] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

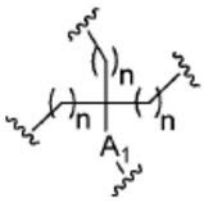
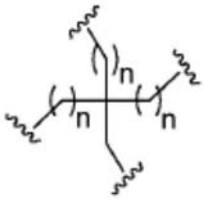
[0556]



[0557] 其中A_1各自独立地为O、S、C=O或NH;并且

[0558] 每个n独立地为1至20。

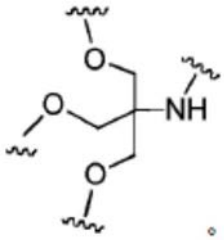
[0559] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0560]  以及 

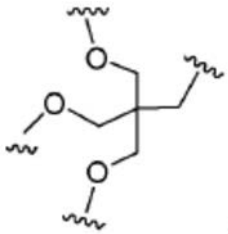
[0561] 其中A_1为O、S、C＝O或NH;并且

[0562] 每个n独立地为1至20。

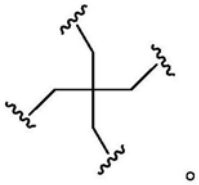
[0563] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0564] 

[0565] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0566] 

[0567] 在某些实施方案中,支链基团具有选自以下的结构:

[0568] 

[0569] 2.某些系链

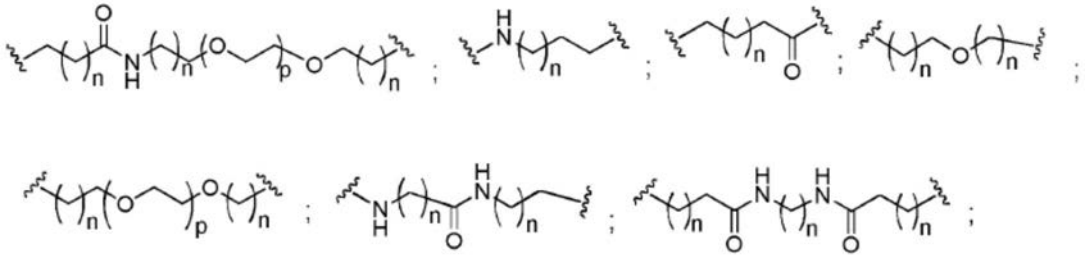
[0570] 在某些实施方案中,缀合物基团包含共价连接至支链基团的一个或多个系链。在某些实施方案中,缀合物基团包含共价连接至连接基团的一个或多个系链。在某些实施方案中,每个系链为包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、醚、硫醚、二硫化物、酰胺和聚乙二醇基团。在某些实施方案中,每个系链为包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、取代的烷基、醚、硫醚、二硫化物、酰胺、磷酸二酯和聚乙二醇基团。在某些实施方案中,每个系链为包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、醚和酰胺基团。在某些实施方案中,每个系链为包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、取代的烷基、磷酸二酯、醚和酰胺基团。在某些实施方案中,每个系链为包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基和磷酸二酯。在某些实施方案中,每个系链包含至少一个磷连接基团或中性连接基团。

[0571] 在某些实施方案中,系链包括一个或多个可裂解键。在某些实施方案中,系链通过酰胺或醚基团连接至支链基团。在某些实施方案中,系链通过磷酸二酯基团连接至支链基

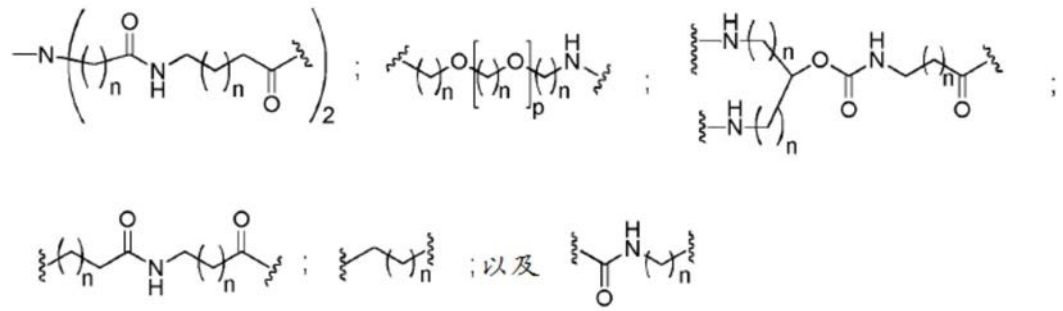
团。在某些实施方案中，系链通过磷连接基团或中性连接基团连接至支链基团。在某些实施方案中，系链通过醚基团连接至支链基团。在某些实施方案中，系链通过酰胺或醚基团连接至配体。在某些实施方案中，系链通过醚基团连接至配体。在某些实施方案中，系链通过酰胺或醚基团连接至配体。在某些实施方案中，系链通过醚基团连接至配体。

[0572] 在某些实施方案中，每个系链在配体与支链基团之间包含约8至约20个原子的链长。在某些实施方案中，每个系链基团在配体与支链基团之间包含约10至约18个原子的链长。在某些实施方案中，每个系链基团包含约13个原子的链长。

[0573] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：



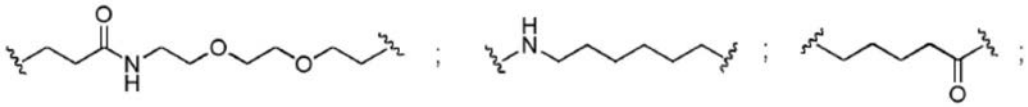
[0574]



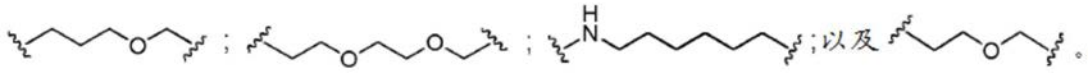
[0575] 其中每个n独立地为1至20；并且

[0576] 每个p为1至约6。

[0577] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

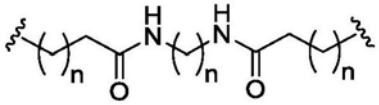


[0578]



[0579] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

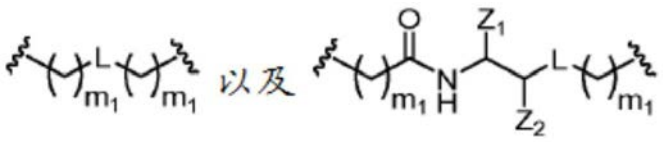
[0580]



[0581] 其中每个n独立地为1至20。

[0582] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

[0583]



[0584] 其中L为磷连接基团或中性连接基团；

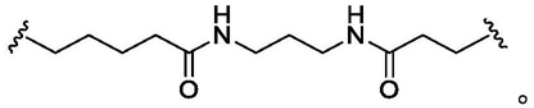
[0585] Z_1为C(=O)O-R_2；

[0586] Z_2为H、C_1-C_6烷基或取代的C_1-C_6烷基；

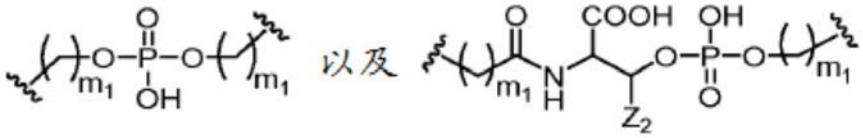
[0587] R_2为H、C1-C6烷基或取代的C_1-C_6烷基；并且

[0588] 每个m_1独立地为0至20，其中对于每个系链，至少一个m_1大于0。

[0589] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

[0590]  。

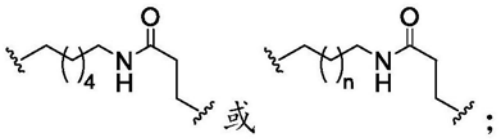
[0591] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

[0592] 

[0593] 其中Z_2为H或CH_3；并且

[0594] 每个m_1独立地为0至20，其中对于每个系链，至少一个m_1大于0。

[0595] 在某些实施方案中，系链具有选自以下的结构：

[0596] 

[0597] 其中每个n独立地为0、1、2、3、4、5、6或7。

[0598] 在某些实施方案中，系链包含磷连接基团。在某些实施方案中，系链不包含任何酰胺键。在某些实施方案中，系链包含磷连接基团并且不包含任何酰胺键。

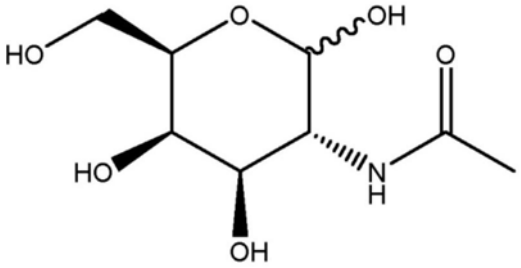
[0599] 3.某些配体

[0600] 在某些实施方案中，本公开提供了配体，其中每个配体共价连接至系链。在某些实施方案中，每个配体经过选择以对靶细胞上的至少一种类型的受体具有亲合力。在某些实施方案中，选择对哺乳动物肝脏细胞表面上的至少一种类型的受体具有亲合力的配体。在某些实施方案中，选择对肝去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)具有亲合力的配体。在某些实施方案中，每个配体为碳水化合物。在某些实施方案中，每个配体独立地选自半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、甘露糖、葡萄糖、葡糖胺以及岩藻糖。在某些实施方案中，每个配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)。在某些实施方案中，靶向部分包含2至6个配体。在某些实施方案中，靶向部分包含3个配体。在某些实施方案中，靶向部分包含3个N-乙酰基半乳糖胺配体。

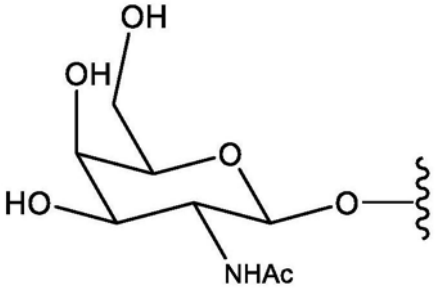
[0601] 在某些实施方案中，配体为碳水化合物、碳水化合物衍生物、改性的碳水化合物、多价碳水化合物聚簇、多糖、修饰的多糖或多糖衍生物。在某些实施方案中，配体为氨基糖或硫代糖。例如，氨基糖可选自任何数目的本领域中已知的化合物，例如葡糖胺、唾液酸、α-D-半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖(GalNAc)、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖(β-胞壁酸)、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰氨基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖和N-磺基-D-葡糖胺以及N-乙醇酰基-α-神经氨酸。例如，硫代糖可选自由以下组成的组：5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖以及3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡

喃葡庚糖苷乙酯。

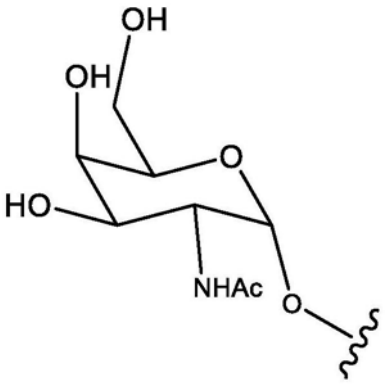
[0602] 在某些实施方案中，“GalNac”或“Gal-NAc”是指2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖，在文献中通常称为N-乙酰基半乳糖胺。在某些实施方案中，“N-乙酰基半乳糖胺”是指2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖。在某些实施方案中，“GalNac”或“Gal-NAc”是指2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖。在某些实施方案中，“GalNac”或“Gal-NAc”是指2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖，其包括两种β形式:2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖和α-形式:2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖。在某些实施方案中，两种β形式:2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖和α-形式:2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖可以互换使用。因此，在其中描绘一种形式的结构中，这些结构也意图包括另一种形式。例如，在针对α形式:2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖示出结构时，该结构也意图包括另一种形式。在某些实施方案中，在某些优选的实施方案中，β形式2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖为优选的实施方案。

[0603] 

[0604] 2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖

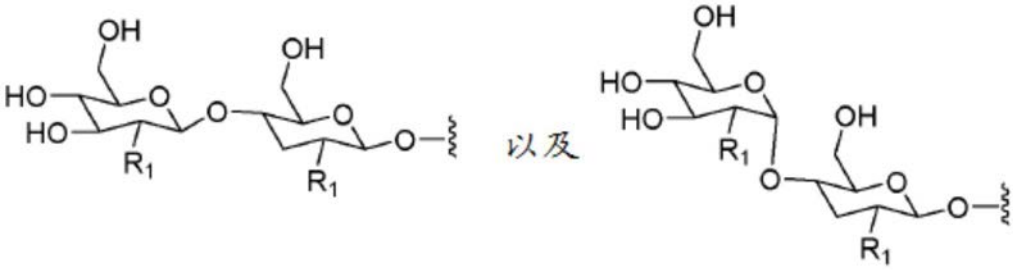
[0605] 

[0606] 2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖

[0607] 

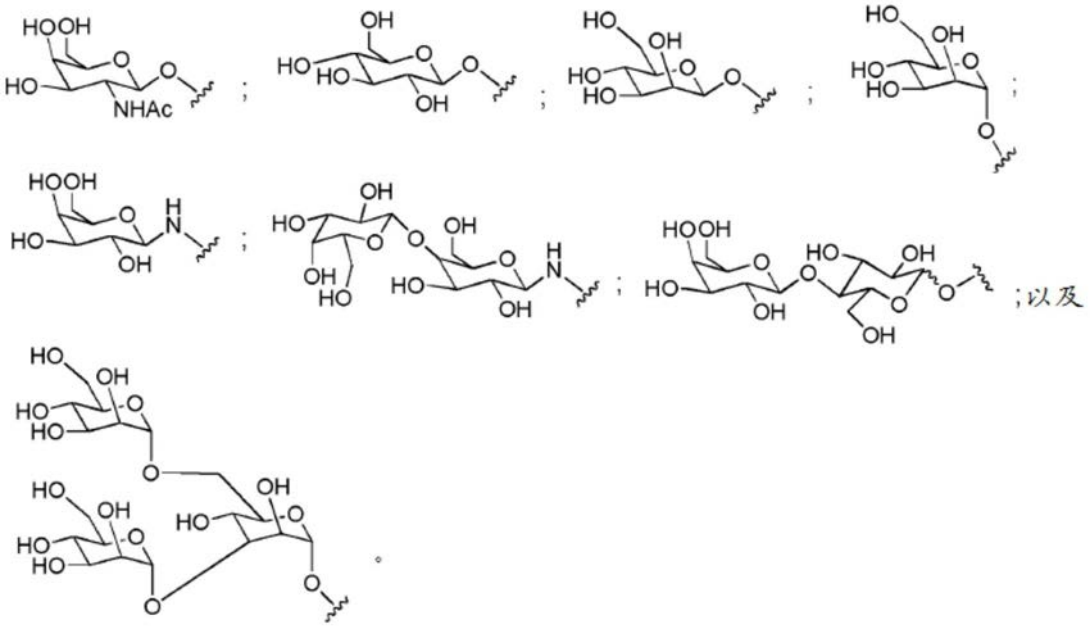
[0608] 2-(乙酰氨基)-2-脱氧-α-D-吡喃半乳糖

[0609] 在某些实施方案中，一个或多个配体具有选自以下的结构：

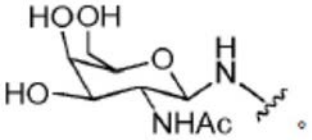
[0610] 

[0611] 其中R_1各自选自OH和NHCOOH。

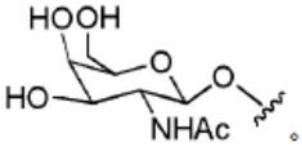
[0612] 在某些实施方案中，一个或多个配体具有选自以下的结构：

[0613] 

[0614] 在某些实施方案中，一个或多个配体具有选自以下的结构：

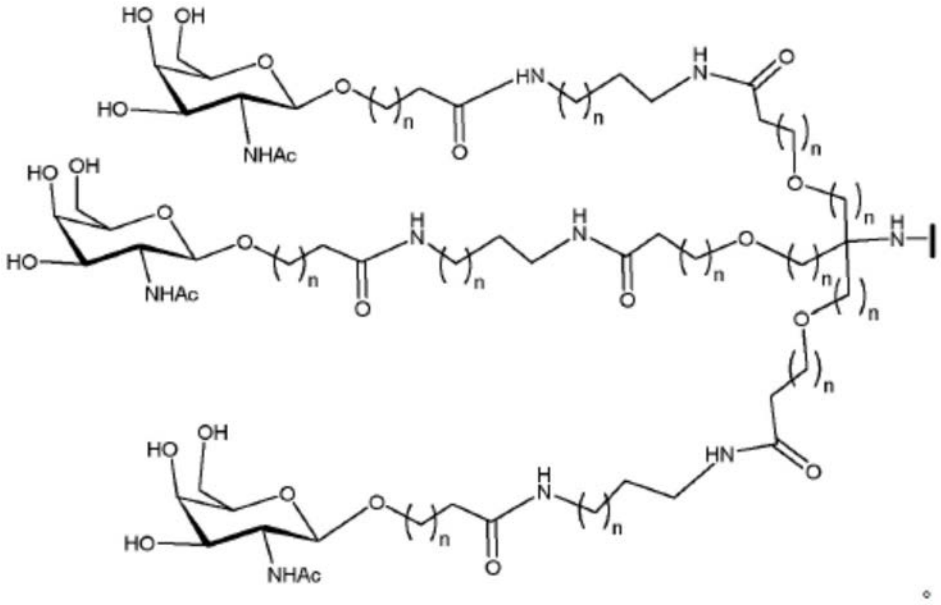
[0615] 

[0616] 在某些实施方案中，一个或多个配体具有选自以下的结构：

[0617] 

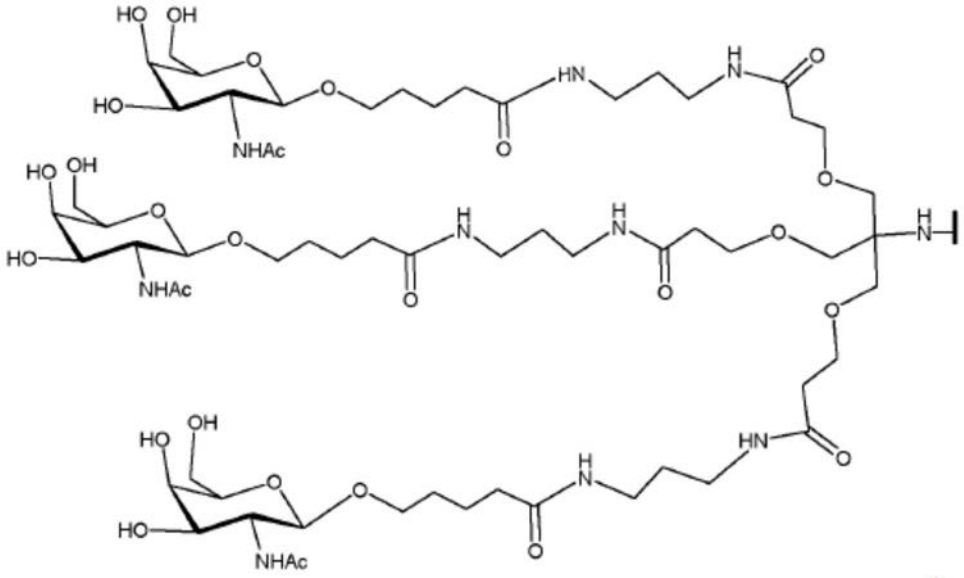
[0618] i.某些缀合物

[0619] 在某些实施方案中，缀合物基团包含以上结构特征。在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

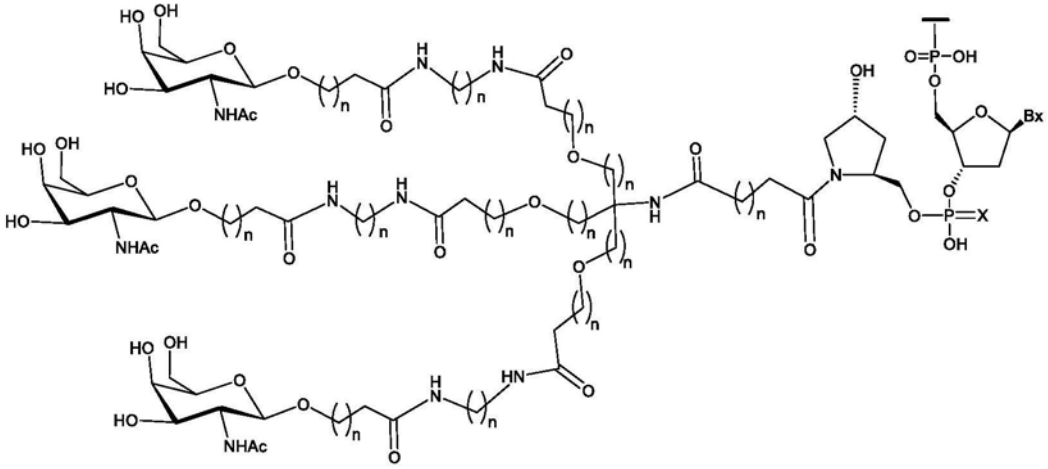
[0620] 

[0621] 其中每个n独立地为1至20。

[0622] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0623] 

[0624] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0625] 

[0626] 其中每个n独立地为1至20；

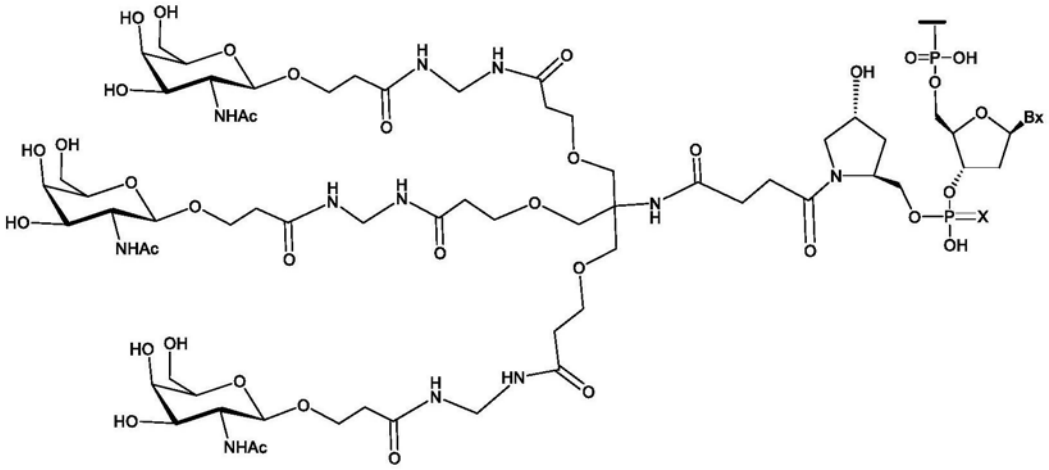
[0627] Z为H或连接的固体载体；

[0628] Q为反义化合物；

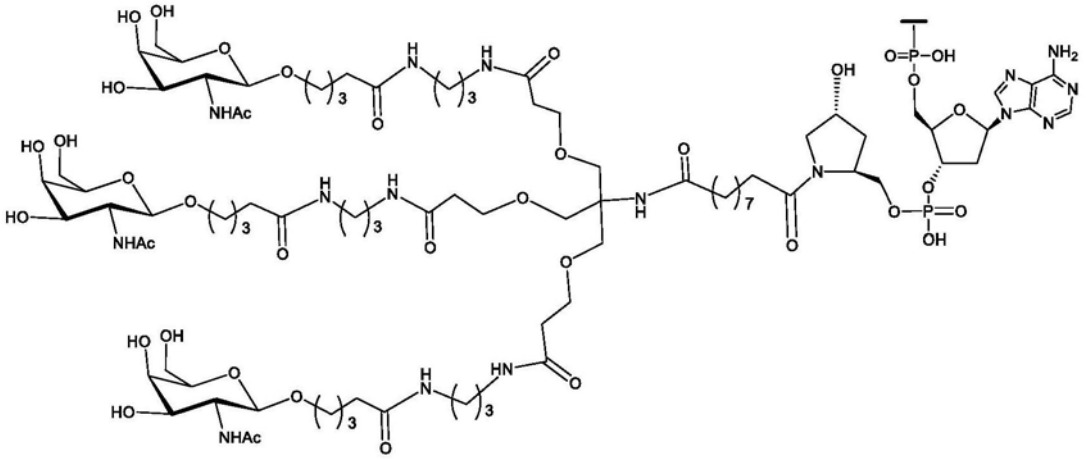
[0629] X为O或S；并且

[0630] Bx为杂环碱基部分。

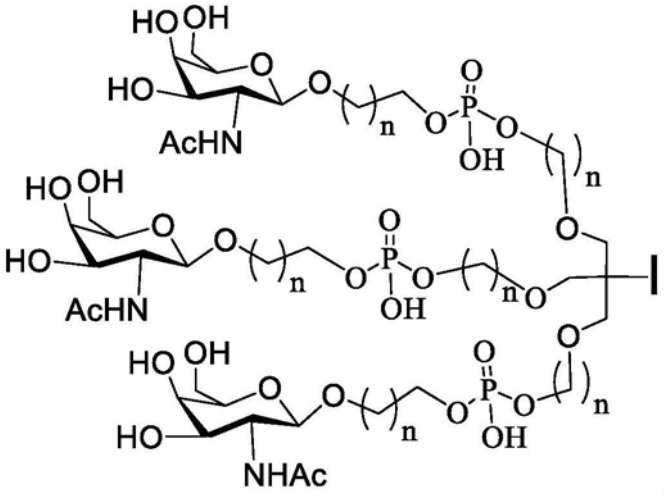
[0631] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0632] 

[0633] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

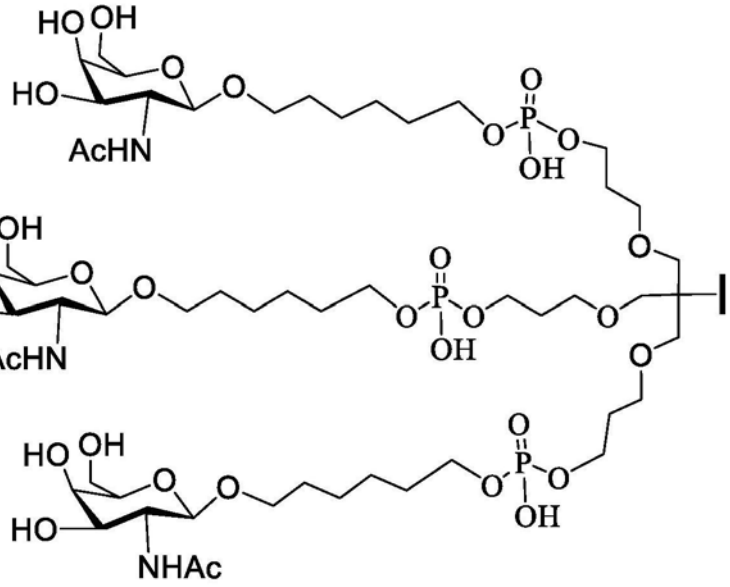
[0634] 

[0635] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0636] 

。

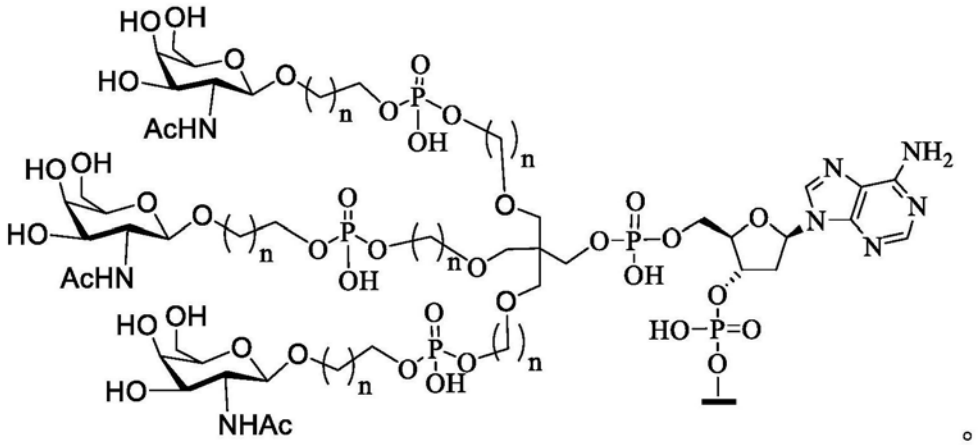
[0637] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：



[0638]

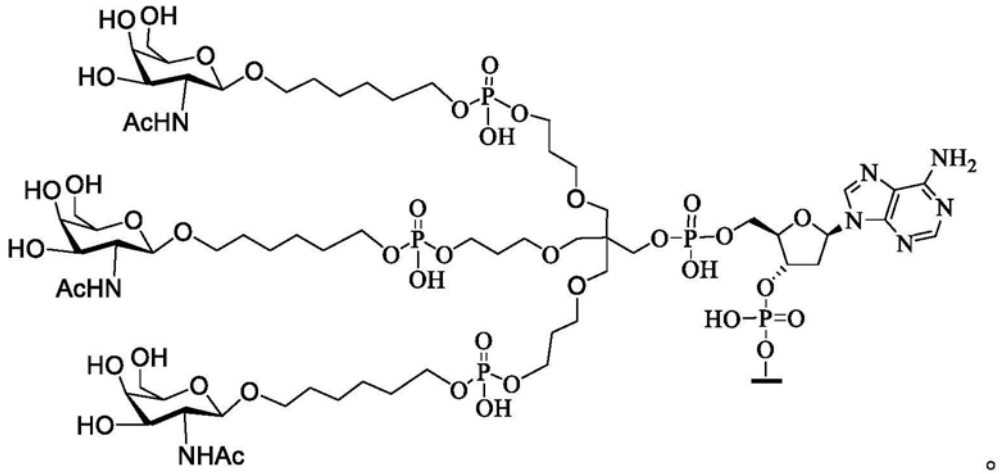
[0639] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0640]

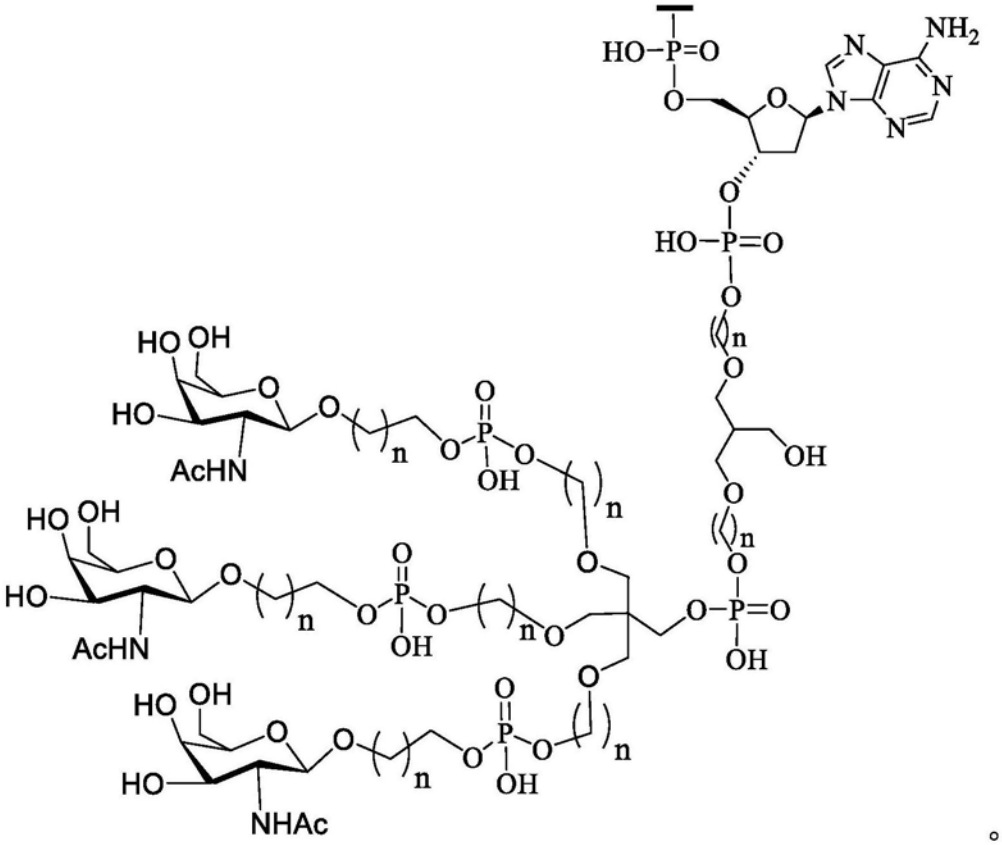


[0641] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

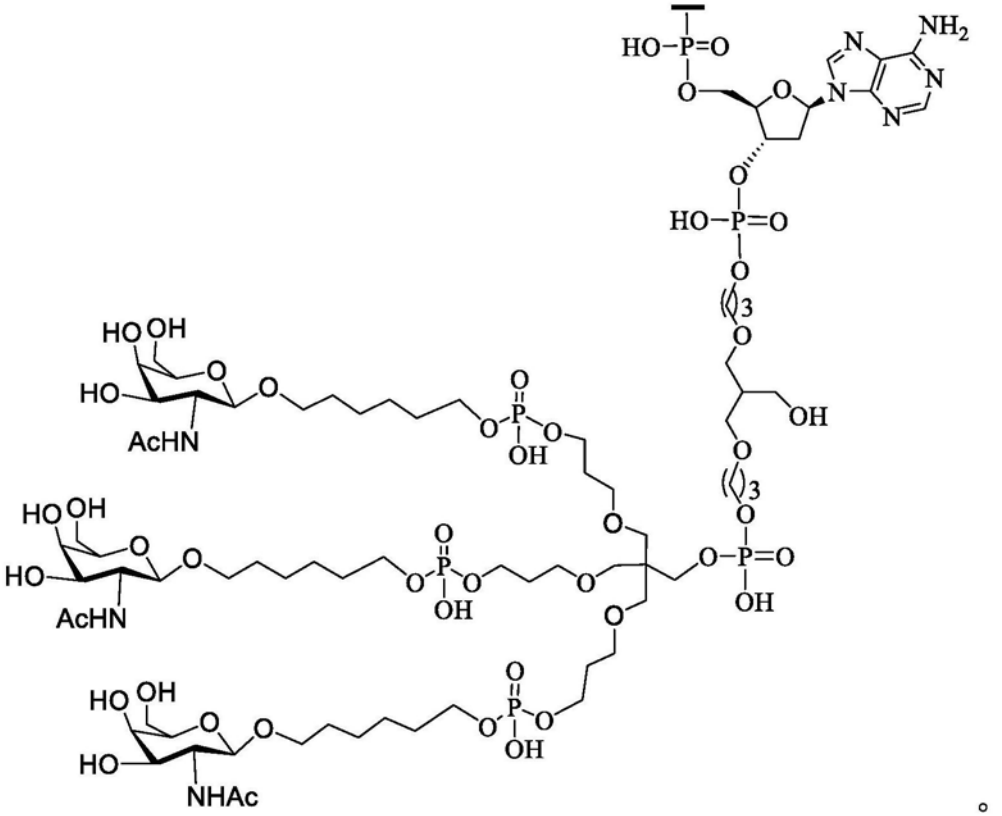
[0642]



[0643] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

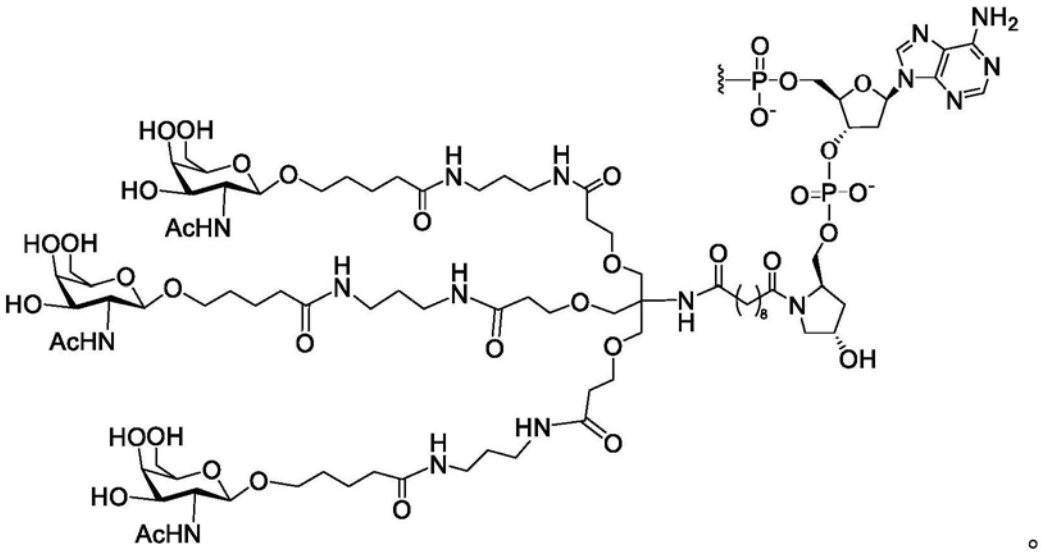
[0644] 

[0645] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

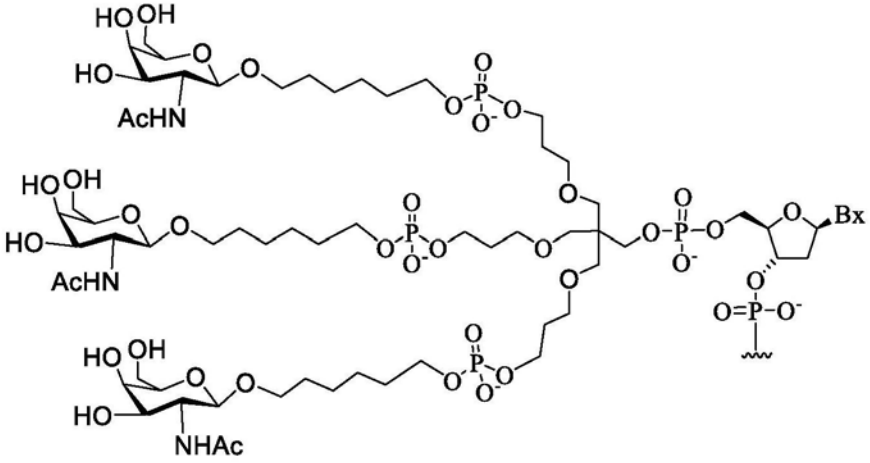
[0646] 

[0647] 在某些实施方案中，缀合物不包含吡咯烷。

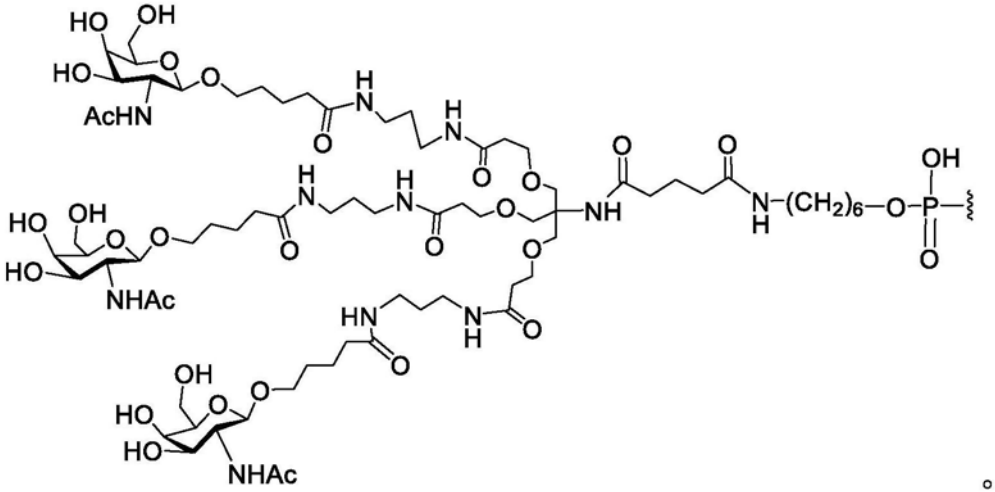
[0648] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0649] 

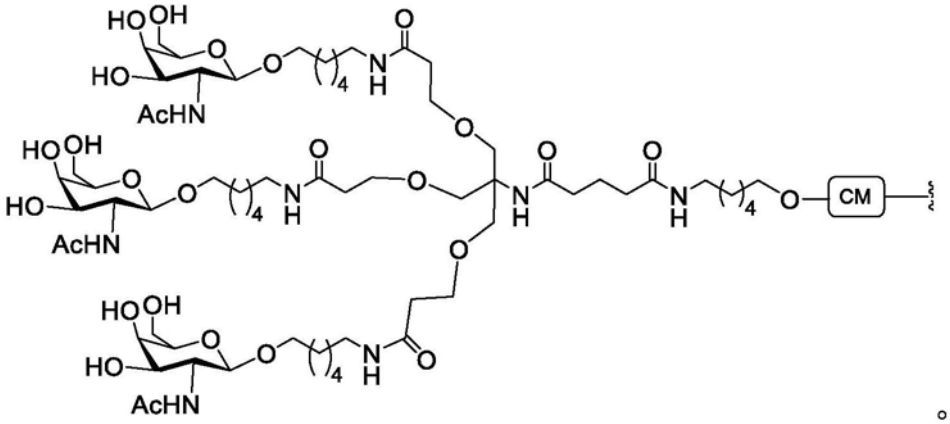
[0650] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0651] 

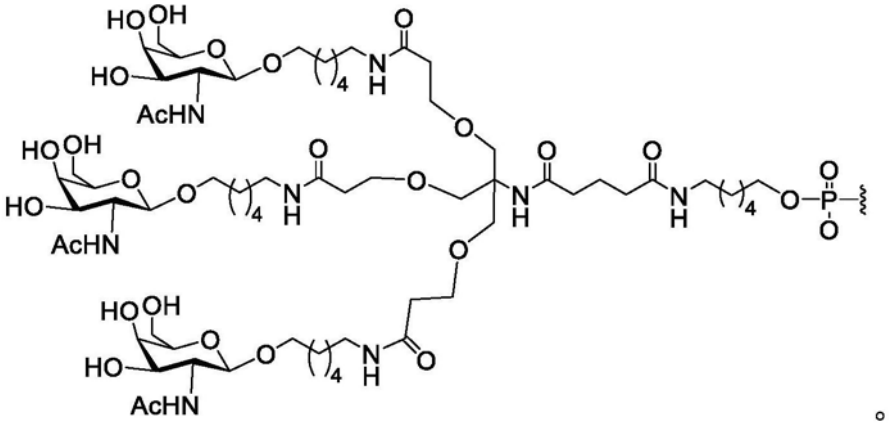
[0652] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0653] 

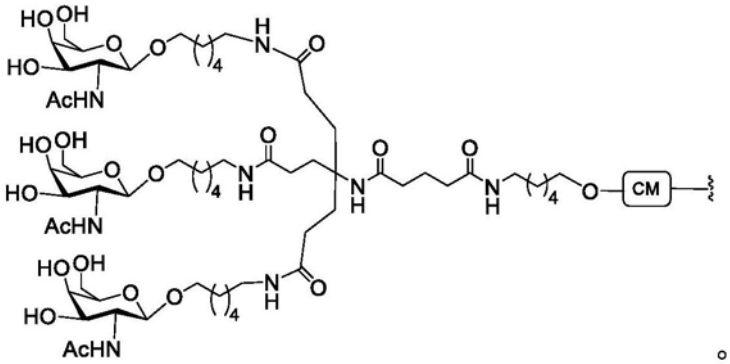
[0654] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0655] 

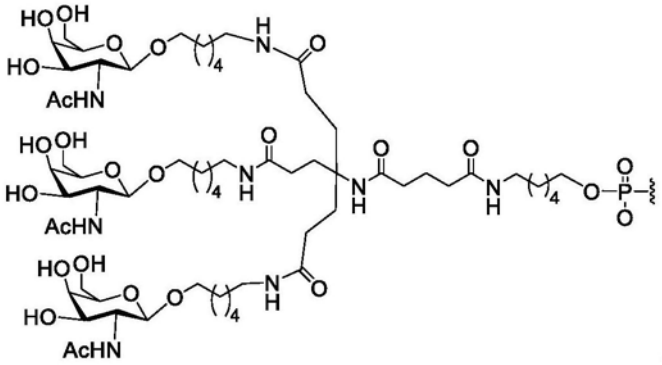
[0656] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0657] 

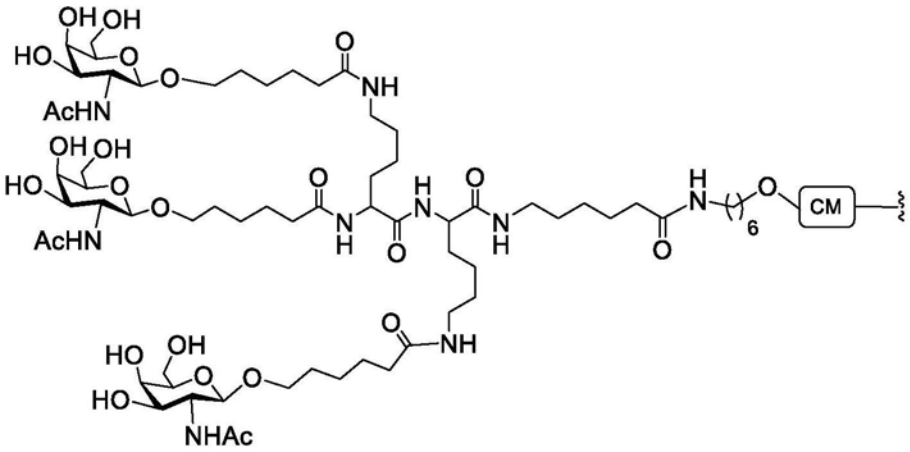
[0658] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0659] 

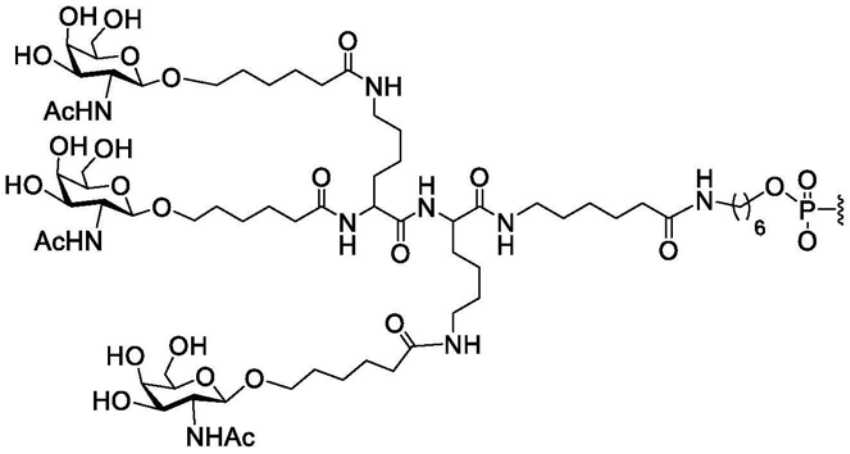
[0660] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0661] 

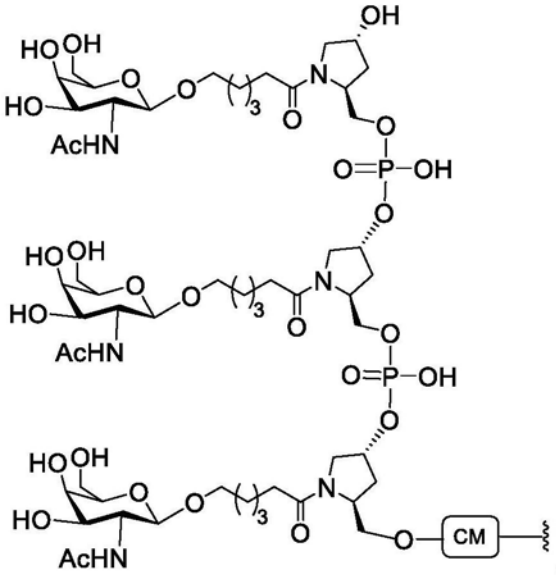
[0662] 在某些所述实施方案中，缀合物基团具有以下结构：

[0663] 

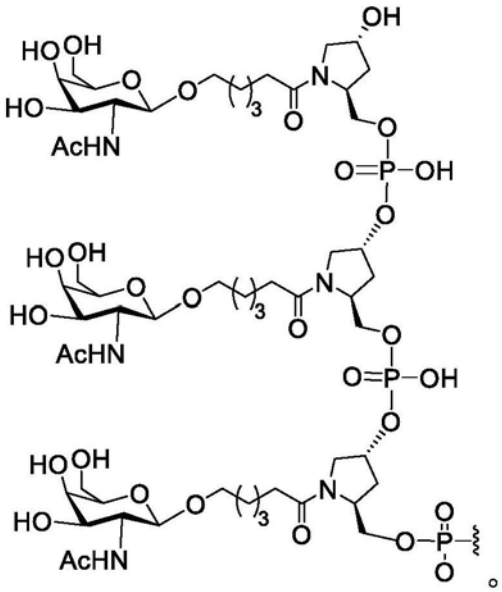
[0664] 在某些所述实施方案中,缀合物基团具有以下结构:

[0665] 

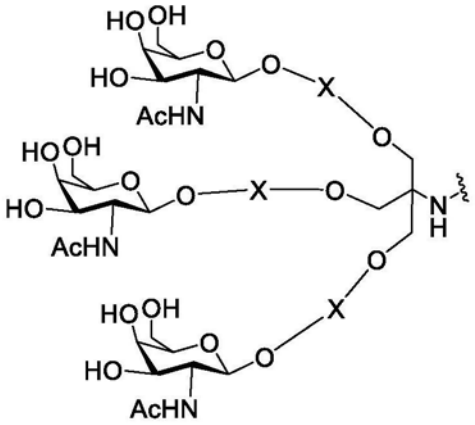
[0666] 在某些所述实施方案中,缀合物基团具有以下结构:

[0667] 

[0668] 在某些所述实施方案中,缀合物基团具有以下结构:

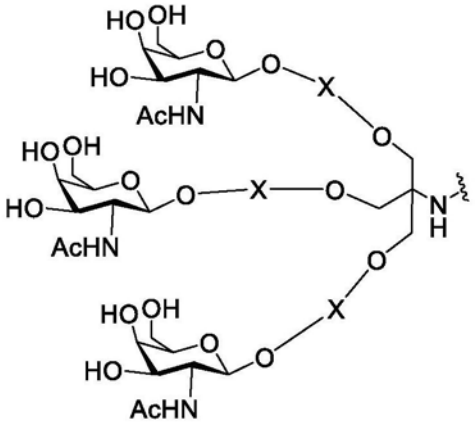
[0669] 

[0670] 在某些实施方案中,缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构:

[0671] 

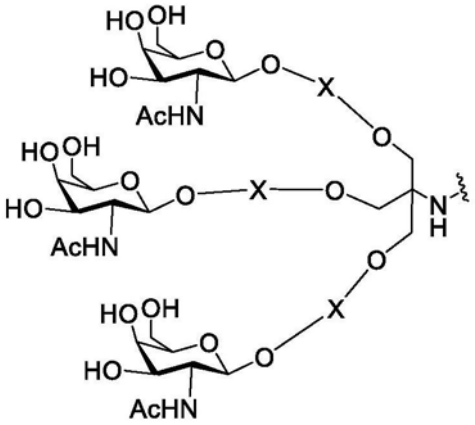
[0672] 其中X为具有六至十一个连续键合的原子的取代或未取代的系链。

[0673] 在某些实施方案中,缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构:

[0674] 

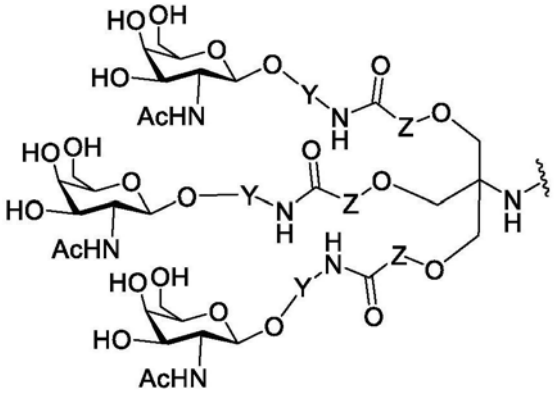
[0675] 其中X为具有十个连续键合的原子的取代或未取代的系链。

[0676] 在某些实施方案中,缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构:

[0677] 

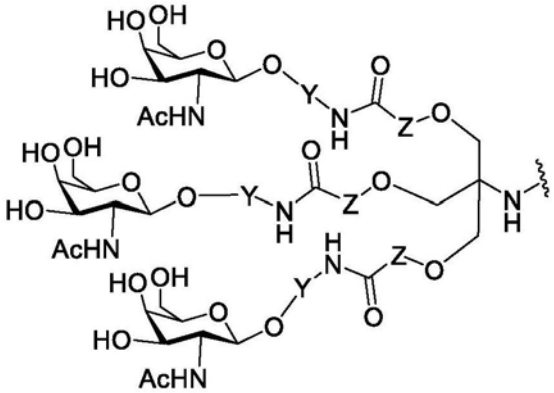
[0678] 其中X为具有四至十一个连续键合的原子的取代或未取代的系链并且其中系链包含恰好一个酰胺键。

[0679] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0680] 

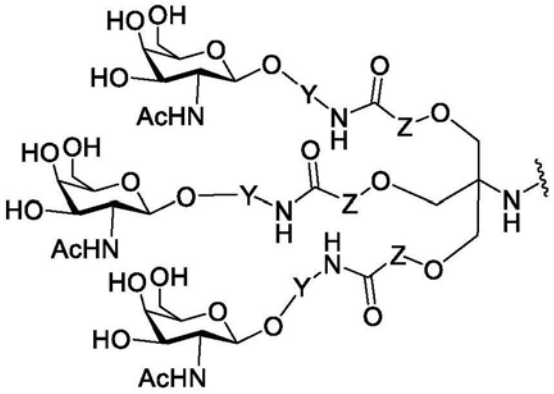
[0681] 其中Y和Z独立地选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基、烯基或炔基，或包含醚、酮、酰胺、酯、氨基甲酸酯、胺、哌啶、磷酸酯、磷酸二酯、硫代磷酸酯、三唑、吡咯烷、二硫化物或硫醚的基团。

[0682] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0683] 

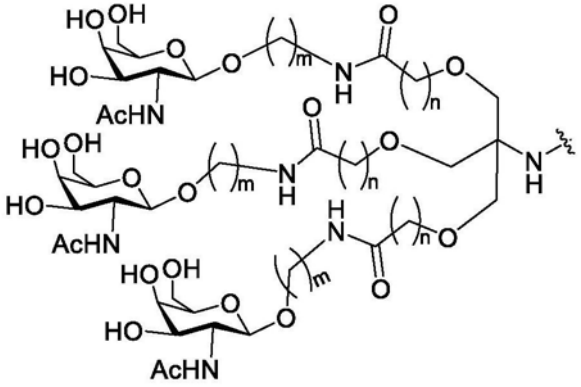
[0684] 其中Y和Z独立地选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基，或包含恰好一个醚或恰好两个醚、酰胺、胺、哌啶、磷酸酯、硫酸二酯或硫代磷酸酯的基团。

[0685] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0686] 

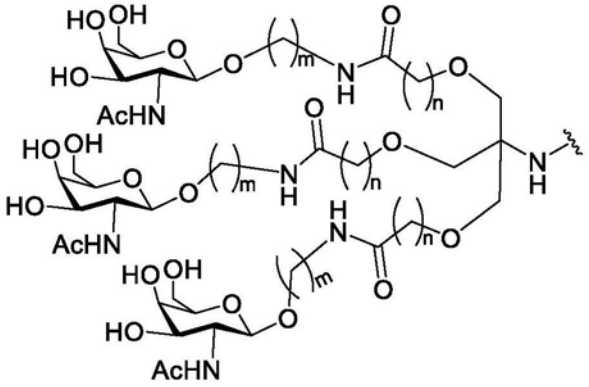
[0687] 其中Y和Z独立地选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基。

[0688] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0689] 

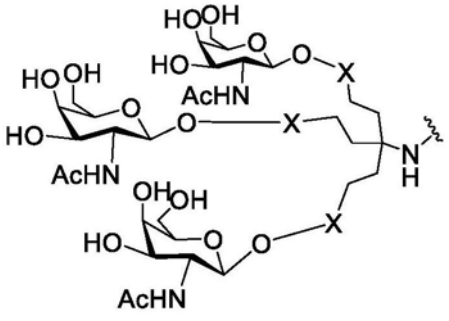
[0690] 其中m和n独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。

[0691] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0692] 

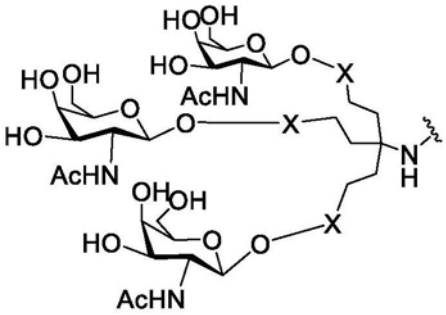
[0693] 其中m为4、5、6、7或8，并且n为1、2、3或4。

[0694] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0695] 

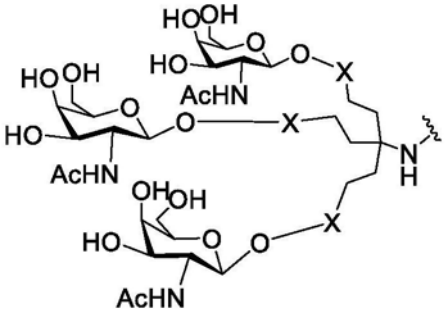
[0696] 其中X为具有四至十三个连续键合的原子的取代或未取代的系链，并且其中X不包含醚基团。

[0697] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0698] 

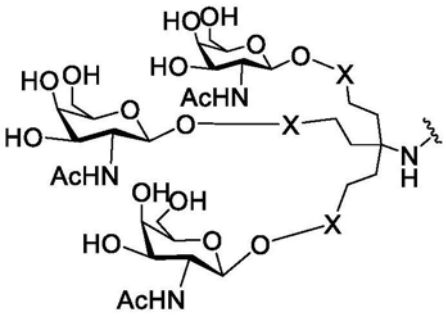
[0699] 其中X为具有八个连续键合的原子的取代或未取代的系链，并且其中X不包含醚基团。

[0700] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0701] 

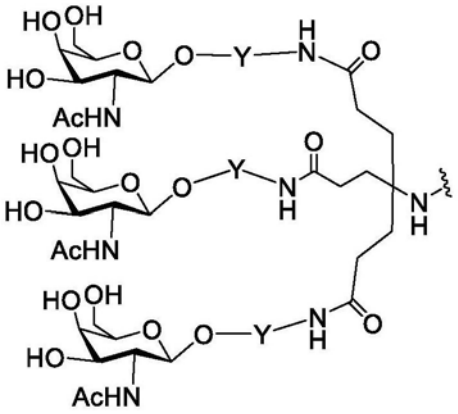
[0702] 其中X为具有四至十三个连续键合的原子的取代或未取代的系链，并且其中系链包含恰好一个酰胺键，并且其中X不包含醚基团。

[0703] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0704] 

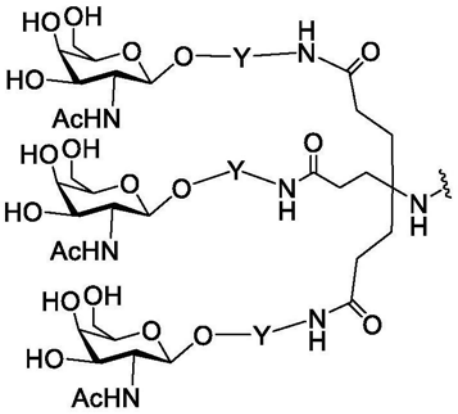
[0705] 其中X为具有四至十三个连续键合的原子的取代或未取代的系链并且其中系链由酰胺键和取代或未取代的C_2-C_{11}烷基组成。

[0706] 在某些实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0707] 

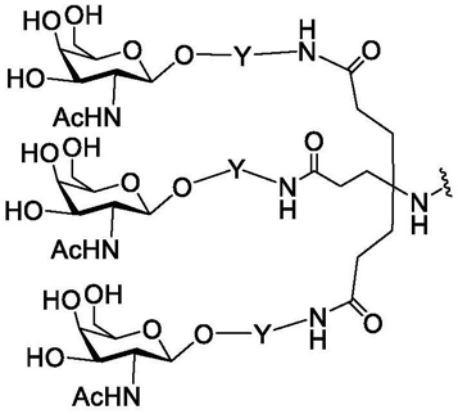
[0708] 其中Y选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基、烯基或炔基，或包含醚、酮、酰胺、酯、氨基甲酸酯、胺、哌啶、磷酸酯、磷酸二酯、硫代磷酸酯、三唑、吡咯烷、二硫化物或硫醚的基团。

[0709] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0710] 

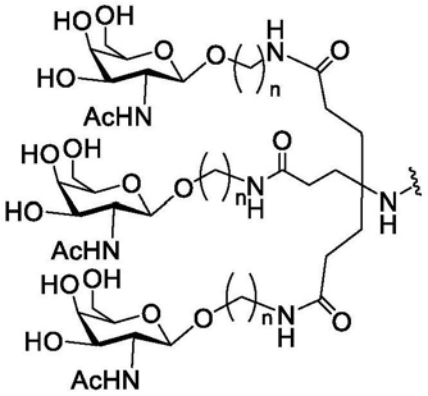
[0711] 其中Y选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基，或包含醚、胺、哌啶、磷酸酯、磷酸二酯或硫代磷酸酯的基团。

[0712] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0713] 

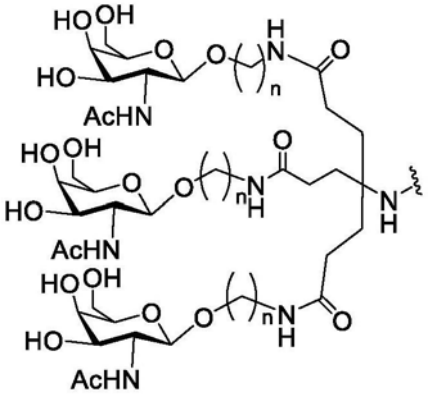
[0714] 其中Y选自C_1-C_{12}取代或未取代的烷基。

[0715] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0716] 

[0717] 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

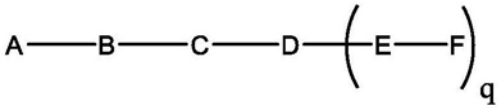
[0718] 在某些所述实施方案中，缀合物基团的细胞靶向部分具有以下结构：

[0719] 

[0720] 其中n为4、5、6、7或8。

[0721] 某些缀合反义化合物

[0722] 在某些实施方案中，缀合物在核苷的2’、3’或5’位上结合至反义寡核苷酸的核苷。在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0723] 

[0724] 其中

[0725] A为反义寡核苷酸；

[0726] B为可裂解部分

[0727] C为缀合物接头

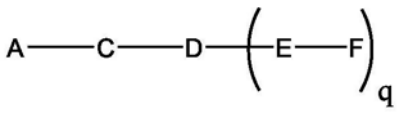
[0728] D为支链基团

[0729] 每个E为系链；

[0730] 每个F为配体；并且

[0731] q为1与5之间的整数。

[0732] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0733] 

[0734] 其中

[0735] A为反义寡核苷酸；

[0736] C为缀合物接头

[0737] D为支链基团

[0738] 每个E为系链；

[0739] 每个F为配体；并且

[0740] q为1与5之间的整数。

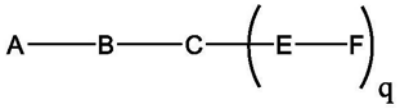
[0741] 在某些所述实施方案中，缀合物接头包含至少一个可裂解键。

[0742] 在某些所述实施方案中，支链基团包含至少一个可裂解键。

[0743] 在某些实施方案中，每个系链包含至少一个可裂解键。

[0744] 在某些实施方案中，缀合物在核苷的2’、3’或5’位上结合至反义寡核苷酸的核苷。

[0745] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0746] 

[0747] 其中

[0748] A为反义寡核苷酸；

[0749] B为可裂解部分

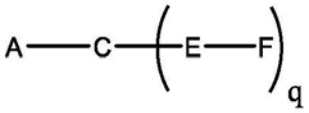
[0750] C为缀合物接头

[0751] 每个E为系链；

[0752] 每个F为配体；并且

[0753] q为1与5之间的整数。

[0754] 在某些实施方案中，缀合物在核苷的2’、3’或5’位上结合至反义寡核苷酸的核苷。在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0755] 

[0756] 其中

[0757] A为反义寡核苷酸；

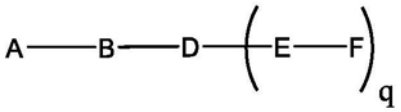
[0758] C为缀合物接头

[0759] 每个E为系链；

[0760] 每个F为配体；并且

[0761] q为1与5之间的整数。

[0762] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0763] 

[0764] 其中

[0765] A为反义寡核苷酸；

[0766] B为可裂解部分

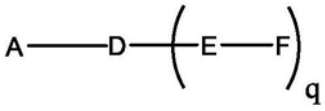
[0767] D为支链基团

[0768] 每个E为系链；

[0769] 每个F为配体；并且

[0770] q为1与5之间的整数。

[0771] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有以下结构：

[0772] 

[0773] 其中

[0774] A为反义寡核苷酸；

[0775] D为支链基团

[0776] 每个E为系链；

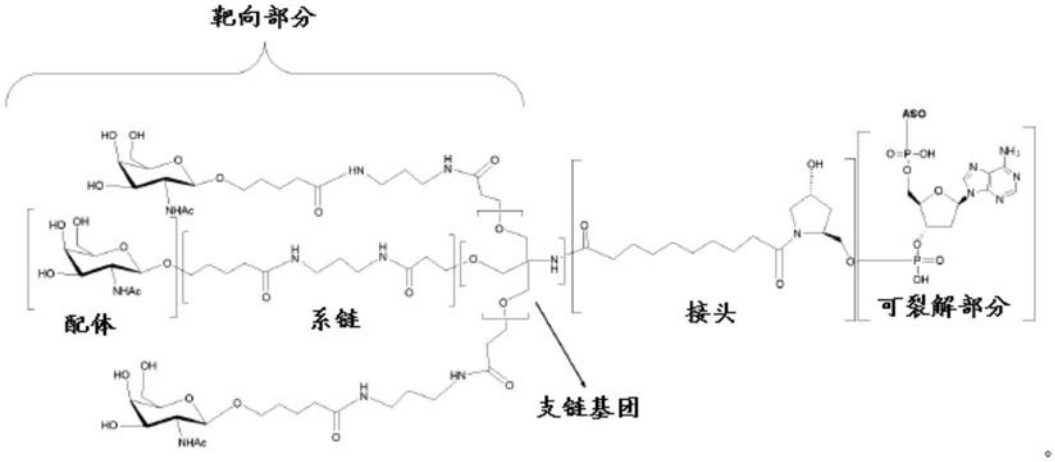
[0777] 每个F为配体；并且

[0778] q为1与5之间的整数。

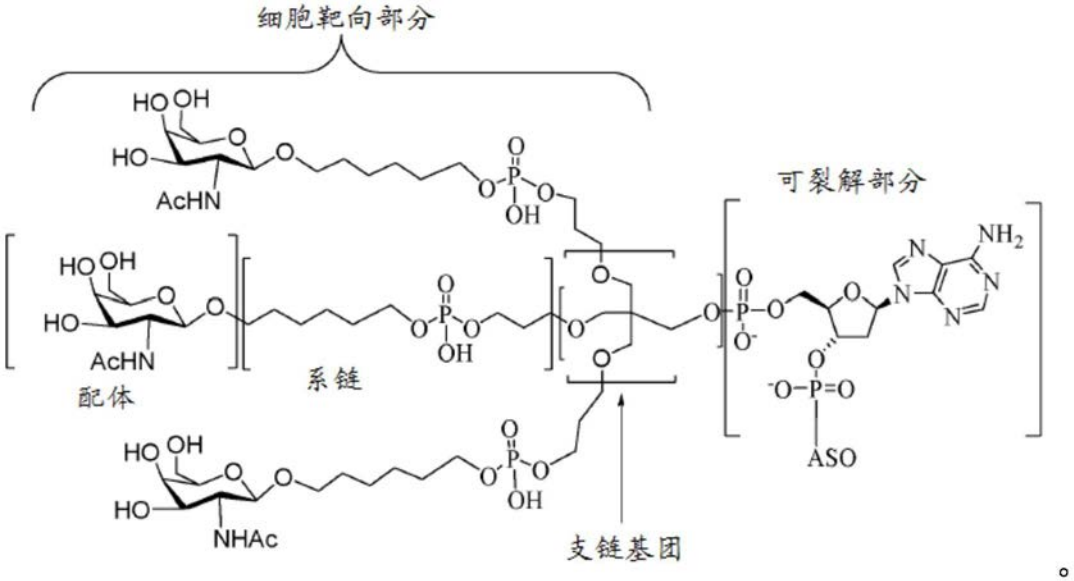
[0779] 在某些所述实施方案中，缀合物接头包含至少一个可裂解键。

[0780] 在某些实施方案中，每个系链包含至少一个可裂解键。

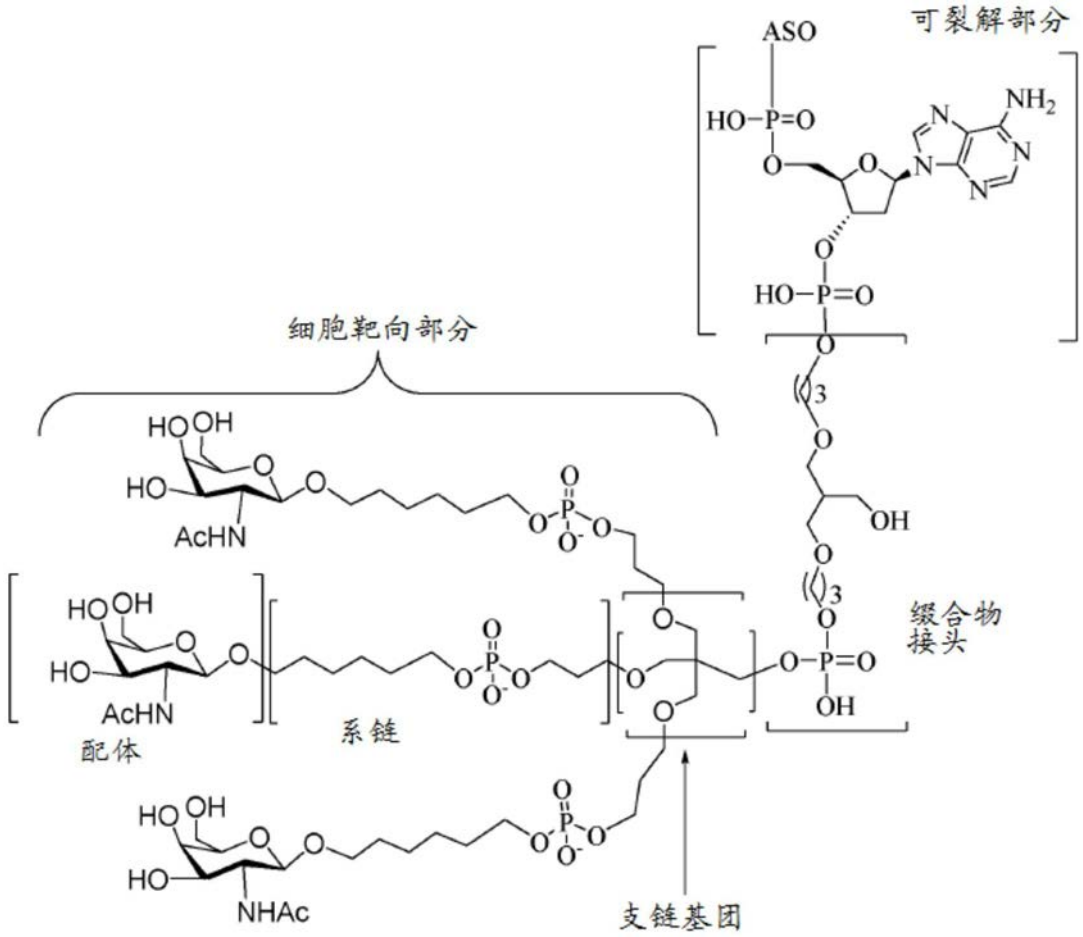
[0781] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有选自以下的结构：

[0782] 

[0783] 在某些实施方案中，缀合反义化合物具有选自以下的结构：

[0784] 

[0785] 在某些实施方案中,缀合反义化合物具有选自以下的结构:

[0786] 

[0787] 教导某些上述缀合物、缀合反义化合物、系链、接头、支链基团、配体、可裂解部分以及其他修饰的制备的代表性美国专利、美国专利申请公布和国际专利申请公布包括但不限于US 5,994,517、US 6,300,319、US 6,660,720、US 6,906,182、US 7,262,177、US 7,491,805、US 8,106,022、US 7,723,509、US 2006/0148740、US 2011/0123520、WO 2013/033230和WO 2012/037254,所述专利中的每一个均以引用的方式整体并入本文。

[0788] 教导某些上述缀合物、缀合反义化合物、系链、接头、支链基团、配体、可裂解部分以及其他修饰的制备的代表性公布包括但不限于BIESSEN等,"The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor:a Potent Cholesterol Lowering Agent"J.Med.Chem.(1995)38:1846-1852、BIESSEN等,"Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor"J.Med.Chem.(1995)38:1538-1546、LEE等,"New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes"Bioorganic&Medicinal Chemistry(2011)19:2494-2500、RENSEN等,"Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo"J.Biol.Chem.(2001)276(40):37577-37584、RENSEN等,"Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein

Receptor"J.Med.Chem.(2004)47:5798-5808、SLIEDREGT等,"Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor"J.Med.Chem.(1999)42:609-618以及Valentijn等,"Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor"Tetrahedron,1997,53(2),759-770,所述专利中的每一项均以引用的方式整体并入本文。

[0789] 在某些实施方案中,缀合反义化合物包含基于RNA酶H的寡核苷酸(如缺口聚物)或剪接调节寡核苷酸(如完全修饰的寡核苷酸)和包含至少一个、两个或三个GalNAc基团的任何缀合物基团。在某些实施方案中,缀合反义化合物包含见于任何以下参考文献中的任何缀合物基团:Lee,Carbohydr Res,1978,67,509-514;Connolly等,J B iol Chem,1982,257,939-945;Pavia等,Int J Pep Protein Res,1983,22,539-548;Lee等,Biochem,1984,23,4255-4261;Lee等,G lycoconjugate J,1987,4,317-328;Toyokuni等,Tetrahedron Lett,1990,31,2673-2676;Biessen等,J Med Chem,1995,38,1538-1546;Valentijn等,Tetrahedron,1997,53,759-770;Kim等,Tetrahedron Lett,1997,38,3487-3490;Lee等,Bioconjug Chem,1997,8,762-765;Kato等,Glycobiol,2001,11,821-829;Rensen等,J Biol Ch em,2001,276,37577-37584;Lee等,Methods Enzymol,2003,362,38-43;Westerlind等,Glycoconj J,2004,21,227-241;Lee等,Bio org Med Chem Lett,2006,16(19),5132-5135;Maierhofer等,Bioor g Med Chem,2007,15,7661-7676;Khorev等,Bioorg Med Chem,2008,16,5216-5231;Lee等,Bioorg Med Chem,2011,19,2494-2500;Kornilova等,Analyt Biochem,2012,425,43-46;Pujol等,A ngew Chemie Int Ed Engl,2012,51,7445-7448;Biessen等,J Me d Chem,1995,38,1846-1852;Sliedregt等,J Med Chem,1999,42,609-618;Rensen等,J Med Chem,2004,47,5798-5808;Rensen等,Arterioscler Thromb Vasc Biol,2006,26,169-175;van Rossenb erg等,Gene Ther,2004,11,457-464;Sato等,J Am Chem Soc,2004,126,14013-14022;Lee等,J Org Chem,2012,77,7564-7571;Biessen等,FASEB J,2000,14,1784-1792;Rajur等,Bioconjug Chem,1997,8,935-940;Duff等,Methods Enzymol,2000,313,297-321;Maier等,Bioconjug Chem,2003,14,18-29;Jayaprakash等,Org Lett,2010,12,5410-5413;Manoharan,Antisense Nucleic Acid Drug Dev,2002,12,103-128;Merwin等,Bioconjug Chem,1994,5,612-620;Tomiya等,Bioorg Med Chem,2013,21,5275-5281;国际申请WO1998/013381;WO2011/038356;WO1997/046098;WO2008/098788;WO2004/101619;WO2012/037254;WO2011/120053;WO2011/100131;WO2011/163121;WO2012/177947;WO2013/033230;WO2013/075035;WO2012/083185;WO2012/083046;WO2009/082607;WO2009/134487;WO2010/144740;WO2010/148013;WO1997/020563;WO2010/088537;WO2002/043771;WO2010/129709;WO2012/068187;WO2009/126933;WO2004/024757;WO2010/054406;WO2012/089352;WO2012/089602;WO2013/166121;WO2013/165816;美国专利4,751,219;8,552,163;6,908,903;7,262,177;5,994,517;6,300,319;8,106,022;7,491,805;7,491,805;7,582,744;8,137,695;6,383,812;6,525,031;6,660,720;7,723,509;8,541,548;8,344,125;8,313,772;8,349,308;8,450,467;8,501,930;8,158,601;7,262,177;6,906,182;6,620,916;8,435,491;8,404,862;7,851,615;已公布的美国专利申请公布US2011/0097264;US2011/0097265;US2013/0004427;

US2005/0164235;US2006/0148740;US2008/0281044;US2010/0240730;US2003/0119724;US2006/0183886;US2008/0206869;US2011/0269814;US2009/0286973;US2011/0207799;US2012/0136042;US2012/0165393;US2008/0281041;US2009/0203135;US2012/0035115;US2012/0095075;US2012/0101148;US2012/0128760;US2012/0157509;US2012/0230938;US2013/0109817;US2013/0121954;US2013/0178512;US2013/0236968;US2011/0123520;US2003/0077829;US2008/0108801以及US2009/0203132;所述参考文献中的每一个均以引用的方式整体并入。

[0790] 细胞培养及反义化合物处理

[0791] 可在多种细胞类型中体外测试反义化合物对PKK核酸的水平、活性或表达的作用。用于所述分析的细胞类型可获自商业供货商(例如American Type Culture Collection,Manassus,VA;Zen-Bio,Inc.,Research Triangle Park,NC;Clonetics Corporation,Walkersville,MD)且根据供货商的说明书使用商购的试剂(例如Life Technologies,Carlsbad,CA)进行培养。例示性细胞类型包括但不限于HepaRG™T细胞和小鼠原代肝细胞。

[0792] 体外测试反义寡核苷酸

[0793] 本文描述用反义寡核苷酸处理细胞的方法,所述方法可被适当修改以用于用其他反义化合物进行的处理。

[0794] 可当细胞在培养中达到约60%至80%汇合度时,用反义寡核苷酸处理细胞。

[0795] 一种常用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括阳离子型脂质转染试剂LIPOFECTIN(Life Technologies,Carlsbad,CA)。可将反义寡核苷酸与LIPOFECTIN在OPTI-MEM 1(Life Technologies,Carlsbad,CA)中混合以达成反义寡核苷酸的所需最终浓度及可在每100nM反义寡核苷酸2至12ug/mL范围内的LIPOFECTIN浓度。

[0796] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括LIPOFECTAMINE(Life Technologies,Carlsbad,CA)。将反义寡核苷酸与LIPOFECTAMINE在OPTI-MEM 1血清减少型培养基(Life Technologies,Carlsbad,CA)中混合以达成反义寡核苷酸的所需浓度及可在每100nM反义寡核苷酸2至12ug/mL范围内的LIPOFECTAMINE浓度。

[0797] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的技术包括电穿孔。

[0798] 又一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的技术包括细胞对寡核苷酸的自由摄取。

[0799] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。可在反义寡核苷酸处理后16至24小时收获细胞,此时通过本领域中已知及本文所述的方法测量靶核酸的RNA或蛋白质水平。一般来说,当在多次重复实验中进行处理时,数据呈现为重复处理的平均值。

[0800] 所用的反义寡核苷酸浓度在细胞系之间有所不同。确定用于特定细胞系的最佳反义寡核苷酸浓度的方法在本领域中为熟知的。当用LIPOFECTAMINE转染时,通常使用浓度在1nM至300nM范围内的反义寡核苷酸。当使用电穿孔进行转染时,使用625nM至20,000nM范围内的较高浓度的反义寡核苷酸。

[0801] RNA分离

[0802] 可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法在本领域中是熟知的。RNA是使用本领域中熟知的方法,例如使用TRIZOL试剂(Life Technologies,Carlsbad,CA),根据制造商推荐的方案来制备。

[0803] 分析对靶水平或表达的抑制

[0804] 对PKK核酸的水平或表达的抑制可以本领域中已知的多种方式来测定。举例来说，靶核酸水平可通过例如RNA印迹分析、竞争性聚合酶链反应(PCR)或定量实时PCR来定量。可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法在本领域中是熟知的。RNA印迹分析在本领域中也是常规的。定量实时PCR宜使用商购的ABI PRISM 7600、7700或7900序列检测系统(可获自PE-Applied Biosystems,Foster City,CA且根据制造商说明书来使用)完成。

[0805] 对靶RNA水平的定量实时PCR分析

[0806] 可通过定量实时PCR，使用ABI PRISM 7600、7700或7900序列检测系统(PE-Applied Biosystems,Foster City,CA)根据制造商说明书来对靶RNA水平进行定量。定量实时PCR的方法在本领域中为熟知的。

[0807] 在实时PCR之前，使分离的RNA经历逆转录酶(RT)反应，产生互补的DNA(cDNA)，其接着用作实时PCR扩增的底物。在同一样品孔中依序进行RT及实时PCR反应。RT和实时PCR试剂可获自Life Technologies(Carlsbad,CA)。RT实时PCR反应通过本领域技术人员熟知的方法进行。

[0808] 通过实时PCR获得的基因(或RNA)目标量是使用表达恒定的基因(诸如亲环素A(cyclophilin A))的表达水平或通过使用RIBOGREEN(Life Technologies,Inc.Carlsbad,CA)定量总RNA来标准化。亲环素A表达是通过实时PCR，通过与靶同时操作、复合操作或分开操作来定量。总RNA是使用RIBOGREEN RNA定量试剂(Invetrogen,Inc.Eugene,OR)来定量。通过RIBOGREEN定量RNA的方法是教导于Jones,L.J.等(Analytical Biochemistry,1998,265,368-374)中。使用CYTOFLUOR 4000仪器(PE Applied Biosystems)来测量RIBOGREEN荧光。

[0809] 探针及引物被设计来与PKK核酸杂交。用于设计实时PCR探针及引物的方法在本领域中为熟知的，且可包括使用软件，如PRIMER EXPRESS软件(Applied Biosystems,Foster City,CA)。

[0810] 分析蛋白质水平

[0811] 对PKK核酸的反义抑制可通过测量PKK蛋白质水平来评估。PKK的蛋白质水平可以本领域中熟知的多种方式来评价或定量，诸如免疫沉淀法、蛋白质印迹分析(免疫印迹法)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、定量蛋白质测定、蛋白质活性测定(例如卡斯蛋白酶活性测定)、免疫组织化学、免疫细胞化学或荧光活化细胞分选法(FACS)。针对靶的抗体可被识别且获自多种来源，诸如MSRS抗体目录(Aerie Corporation,Birmingham,MI)，或可经由本领域中熟知的常规单克隆或多克隆抗体生成方法来制备。

[0812] 体内测试反义化合物

[0813] 在动物体内测试反义化合物(例如反义寡核苷酸)以评估它们抑制PKK表达及引起表型改变的能力。

[0814] 在某些实施方案中，此类表型变化包括与炎性疾病相关的那些，诸如降低的炎症、水肿/肿胀、血管渗透性以及血管泄漏。在某些实施方案中，通过测量水肿、温度、疼痛、组织颜色以及动物腹部功能的增加或降低来测量炎症。

[0815] 在某些实施方案中，此类表型变化包括与血栓栓塞疾病相关的那些，诸如aPTT延长、与正常PT结合的aPTT时间延长、血小板因子4(PF-4)的数量降低以及血栓形成降低或血

栓形成的时间增加。

[0816] 可在正常动物或实验疾病模型中进行测试。为了向动物施用，在药学上可接受的稀释剂(如磷酸盐缓冲的生理盐水)中配制反义寡核苷酸。施用包括胃肠外的施用途径，诸如腹膜内、静脉内以及皮下。计算反义寡核苷酸剂量及给药频率在本领域技术人员的能力范围内，且取决于如施用途径及动物体重的因素。在用反义寡核苷酸处理一段时间后，自肝脏组织分离RNA且测量PKK核酸表达的改变。

[0817] 某些适应症

[0818] 在某些实施方案中，本发明提供治疗个体的方法，所述方法包括施用本文所述的一种或多种药物组合物。

[0819] 在某些实施方案中，个体具有炎性疾病。在某些实施方案中，所述个体处于发展炎性病状的风险中，包括但不限于遗传性血管性水肿(HAE)、水肿、血管性水肿、肿胀、眼睑的血管性水肿、眼水肿、黄斑水肿以及脑水肿。所述个体包括具有导致炎症风险的获得性问题、疾病或病症的个体，例如，对炎性病状的遗传素质、环境因素以及暴露至某些药物，包括例如ACE抑制剂和ARB。在某些实施方案中，个体已被鉴别为需要抗炎治疗。此类个体的实例包括但不限于在针对补体1酯酶抑制剂(即C1-INH)或因子12的基因编码中具有突变的那些。在某些实施方案中，反常编码可以导致C1-INH(即I HAE型)的缺失、现有C1-INH(II HAE型)失去准确行使功能的能力或超官能团因子12(即III HAE型)。

[0820] 在某些实施方案中，个体具有血栓栓塞疾病。在某些实施方案中，个体处于凝血病症的风险中，包括但不限于梗塞、血栓、栓、诸如深静脉血栓的血栓栓塞、肺栓塞、心肌梗塞以及中风。所述个体包括具有导致血栓风险的获得性问题、疾病或病症的个体，例如，外科手术、癌症、不动性、败血病、动脉粥样硬化心房颤动以及遗传倾向性，例如抗磷脂综合征和常染色体显性病状V Leiden因子。在某些实施方案中，个体已被鉴别为需要抗凝作用治疗。此类个体的实例包括但不限于进行大矫形手术(例如，髋部/膝盖更换或髋部)的那些和需要慢性治疗的患者诸如遭受心房颤动以防止中风的那些。

[0821] 在某些实施方案中，本发明提供用于防治性减少个体的PKK表达的方法。某些实施方案包括通过向个体施用治疗有效量的靶向PKK核酸的反义化合物来治疗有需要的个体。

[0822] 在一个实施方案中，施用治疗有效量的靶向PKK核酸的反义化合物同时伴随监测个体血清中的PKK水平以测定个体对施用反义化合物的反应。个体对施用反义化合物的反应可由医师用于确定治疗性干预的量及持续时间。

[0823] 在某些实施方案中，施用靶向PKK核酸的反义化合物导致PKK表达减少至少15、20、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％或处于由这些值中的任何两个值所界定的范围内。在某些实施方案中，包含靶向PKK的反义化合物的药物组合物是用于制备治疗患有或易患炎性疾病或血栓栓塞疾病的患者的药物。

[0824] 某些组合物

[0825] 1.ISIS 546254

[0826] 在某些实施方案中，ISIS 546254的特征在于具有(从5’至3’)TGCAAGTCTCTTGGCAAACA的序列(以SEQ ID NO:570形式并入本文)的5-10-5MOE缺口聚物，其

中每个核苷间键联为硫代磷酸酯键联，每个胞嘧啶为5'-甲基胞嘧啶，核苷1-5和16-20的每个为2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷，并且核苷6-15的每个为2'-脱氧核苷。

[0827] 在某些实施方案中，通过以下化学记号描述ISIS 546254:Tes Ges mCes Aes Aes Gds Tds mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds mCds Aes Aes Aes mCes Ae;其中，

[0828] A＝腺嘌呤，

[0829] mC＝5'-甲基胞嘧啶

[0830] G＝鸟嘌呤，

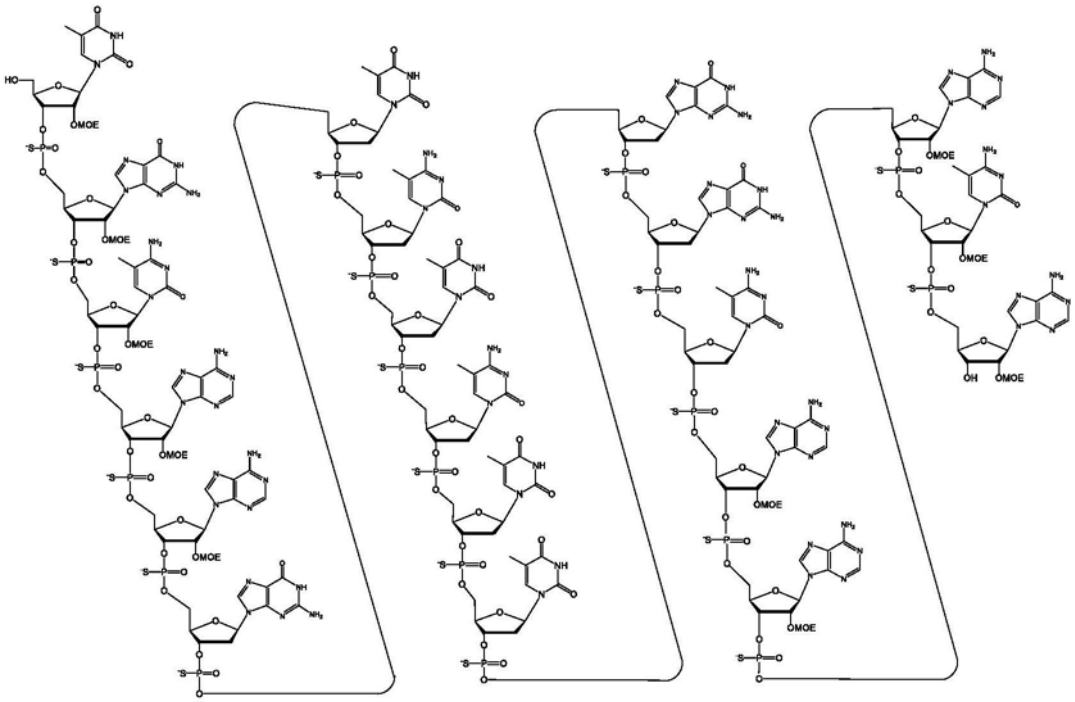
[0831] T＝胸腺嘧啶，

[0832] e＝2'-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0833] d＝2'-脱氧核苷，并且

[0834] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0835] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 546254：

[0836] 

[0837] 结构1.ISIS 546254

[0838] 在某些实施方案中，如实施例2(下文)所提供的ISIS 546254，当在24小时的处理时间段之后，使用具有5,000nM反义寡核苷酸的电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得对培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的人PKK mRNA的95％抑制。

[0839] 在某些实施方案中，如实施例5(参见下文表34和41)所提供的ISIS 546254，当在16小时的处理时间段之后，使用电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得对培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的4个点剂量响应曲线(0.19μM、0.56μM、1.67μM以及5.0μM)中的0.2μM和0.3μM的IC_{50}。

[0840] 在某些实施方案中，如实施例7(下文)所提供的ISIS 546254，每周两次皮下注射2.5mg/kg/周、5.0mg/kg/周、10mg/kg/周或20mg/kg/周的ISIS 546254，保持3周时，取得携带人PKK基因序列的转基因小鼠中的31％、55％、84％以及83％的人PKK mRNA抑制和0％、36％、51％以及76％的人PKK蛋白质抑制。

[0841] 在某些实施方案中，如实施例8(下文)所提供的ISIS 546254有效用于抑制PKK mRNA和蛋白质表达并且在灵长类中是耐受性的。

[0842] 2.ISIS 546343

[0843] 在某些实施方案中，ISIS 546343的特征在于具有(从5’至3’)CCCCCTTCTTTATAGCCAGC的序列(以SEQ ID NO:705形式并入本文)的5-10-5MOE缺口聚物，其中每个核苷间键联为硫代磷酸酯键联，每个胞嘧啶为5’-甲基胞嘧啶，核苷1-5和16-20的每个为2’-O-甲氧基乙基修饰的核苷，并且核苷6-15的每个为2’-脱氧核苷。

[0844] 在某些实施方案中，通过以下化学记号描述ISIS 546343:mCes mCes mCes mCes mCes Tds Tds mCds Tds Tds Tds Ads Tds Ads Gds mCes mCes Aes Ges mCe;其中，

[0845] A＝腺嘌呤，

[0846] mC＝5’-甲基胞嘧啶；

[0847] G＝鸟嘌呤，

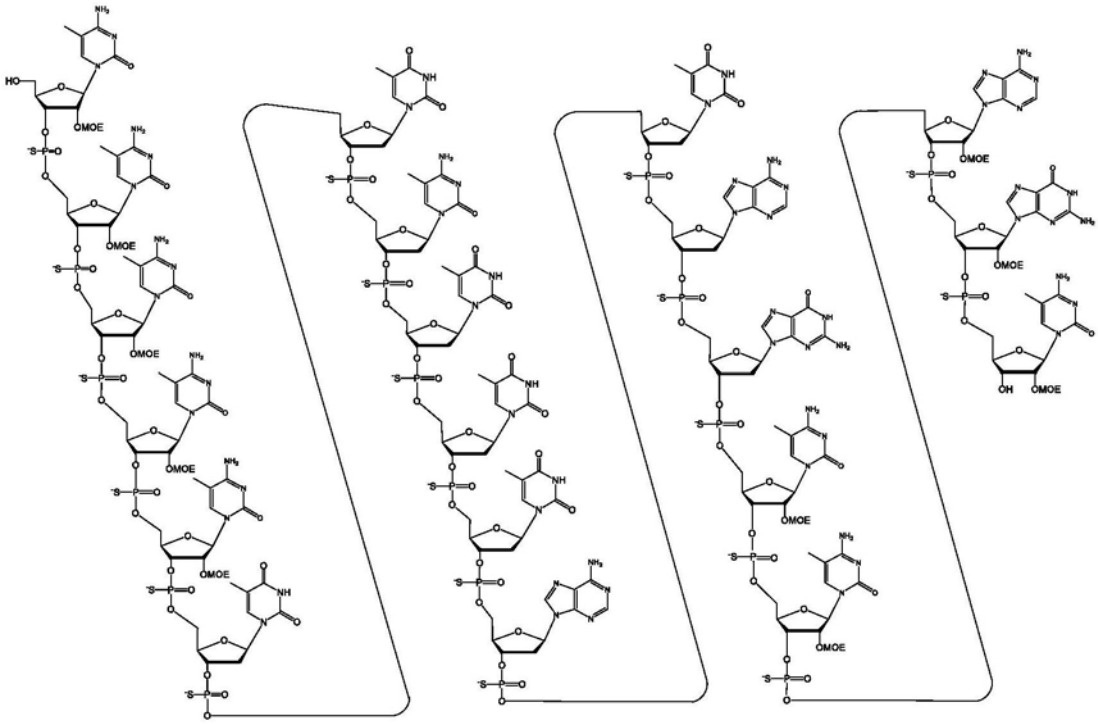
[0848] T＝胸腺嘧啶，

[0849] e＝2’-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0850] d＝2’-脱氧核苷，并且

[0851] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0852] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 546343：

[0853] 

[0854] 结构2.ISIS 546343

[0855] 在某些实施方案中，如实施例2(参见下文表9和表10)所提供的ISIS 546343，当在

24小时的处理时间段之后，使用具有5,000nM反义寡核苷酸的电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的97％和91％的人PKK mRNA抑制。

[0856] 在某些实施方案中，如实施例5(参见下文表34和41)两次所提供的ISIS 546343，当在16小时的处理时间段之后，使用电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得对培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的4个点剂量响应曲线(0.19μM、0.56μM、1.67μM以及5.0μM)中的0.4μM的IC_{50}。

[0857] 在某些实施方案中，如实施例7(下文)所提供的ISIS 546343，每周两次皮下注射2.5mg/kg/周、5.0mg/kg/周、10mg/kg/周或20mg/kg/周的ISIS 546343，保持3周时，取得携带人PKK基因序列的转基因小鼠中的46％、66％以及86％的人PKK mRNA抑制和0％、38％以及79％的人PKK蛋白质抑制。

[0858] 在某些实施方案中，如实施例8(下文)所提供的ISISI 546343有效用于抑制PKK mRNA和蛋白质表达并且在灵长类中是耐受性的。

[0859] 3.ISIS 548048

[0860] 在某些实施方案中，ISIS 548048的特征在于具有核碱基序列(从5’至3’)CGATATCATGATTCCC(以SEQ ID NO:1666形式并入本文)的修饰反义寡核苷酸，其由16个2’-脱氧核苷、2’-O-甲氧基乙基修饰的核苷以及cEt修饰的核苷组成，其中核苷1、2以及16中的每个为2’-O-甲氧基乙基修饰的核苷，其中核苷3、14以及15中的每个为cEt修饰的核苷，其中核苷4-13中的每个为2’-脱氧核苷，其中每个核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联，并且其中每个胞嘧啶为5’-甲基胞嘧啶。

[0861] 在某些实施方案中，通过以下化学记号描述ISIS 548048:mCes Ges Aks Tds Ads Tds mCds Ads Tds Gds Ads Tds Tds mCks mCks mCe;其中，

[0862] A＝腺嘌呤，

[0863] mC＝5’-甲基胞嘧啶；

[0864] G＝鸟嘌呤，

[0865] T＝胸腺嘧啶，

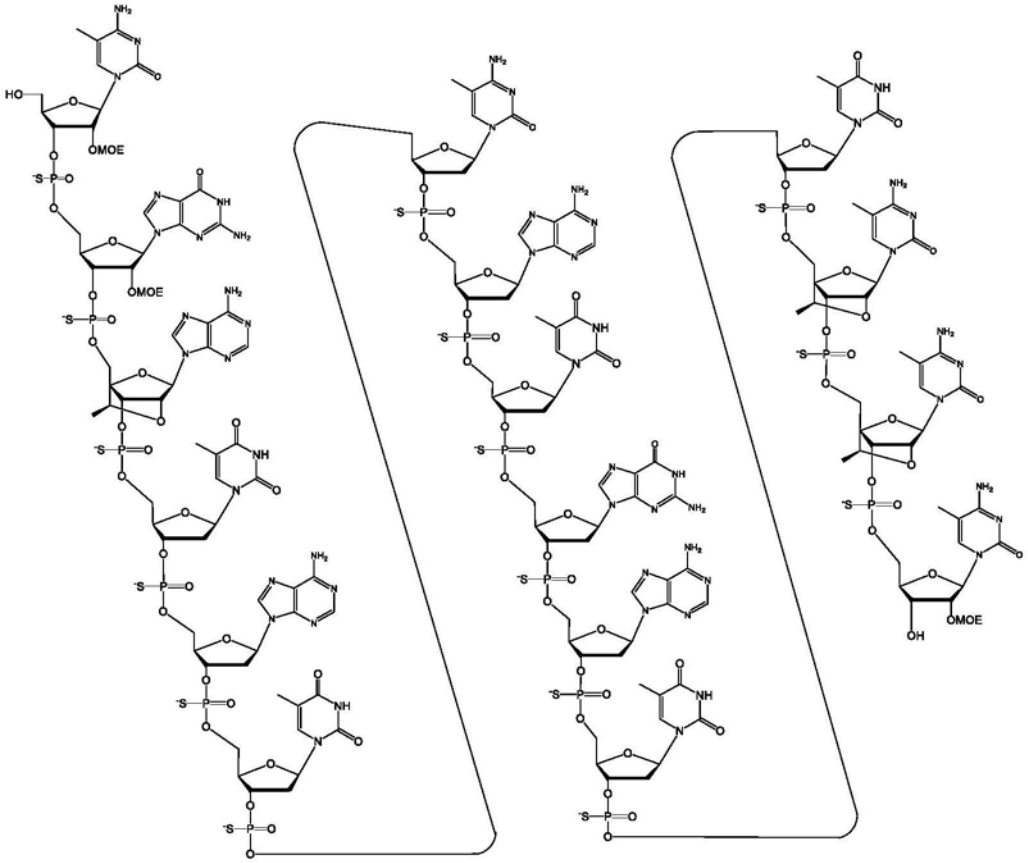
[0866] e＝2’-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0867] k＝cEt修饰核苷，

[0868] d＝2’-脱氧核苷，并且

[0869] s＝硫代磷酸酯核苷间键联。

[0870] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 548048：

[0871] 

[0872] 结构3.ISIS 548048

[0873] 在某些实施方案中，如实施例3(下文)所提供的ISIS 548048，当在24小时的处理时间段之后，使用具有1,000nM反义寡核苷酸的电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得对培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的84％的mRNA抑制。

[0874] 在某些实施方案中，如实施例6(下文)所提供的ISIS 548048，当在16小时的处理时间段之后，使用电穿孔进行转染并且通过定量实时PCR使用人引物探针集RTS3454进行测量并且根据总RNA含量进行调整，如通过RIBOGREEN®进行测量，取得对培养的HepaRG™细胞(每孔20,000个细胞的密度)中的4个点剂量响应曲线(0.11μM、0.33μM、1.00μM以及3.00μM)中的0.1μM的IC_{50}。

[0875] 在某些实施方案中，如实施例7(下文)所提供的ISIS 548048，每周两次皮下注射2.5mg/kg/周、5.0mg/kg/周、10mg/kg/周或20mg/kg/周的ISIS 548048，保持3周时，取得携带人PKK基因序列的转基因小鼠中的7％、77％、72％以及80％的人PKK mRNA抑制和23％、70％、89％以及98％的人PKK蛋白质抑制。

[0876] 在某些实施方案中，如实施例8(下文)所提供的ISISI 548048有效用于抑制PKK mRNA和蛋白质表达并且在灵长类中是耐受性的。

[0877] 4.ISIS 721744

[0878] 在某些实施方案中，ISIS 721744的特征在于具有(从5’至3’)TGCAAGTCTCTTGGCAAACA(以SEQ ID NO:570形式并入本文)的序列的5-10-5MOE缺口聚物，其中核苷3至4、4至5、16至17以及17至18之间的核苷间键联为磷酸二酯键联并且核苷1至2、2

至3、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、14至15、15至16、18至19以及19至20之间的核苷间键联为硫代磷酸酯键联，每个胞嘧啶为5'-甲基胞嘧啶，核苷1-5和16-20中的每个为2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷，并且核苷6-15中的每个为2'-脱氧核苷。

[0879] 在某些实施方案中，通过以下化学记号描述ISIS 721744:GalNAc3-$7_{a-o'}$ Tes Ges mCeo Aeo Aes Gds Tds mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds mCds Aeo Aeo Aes mCes Ae；其中，

[0880] A＝腺嘌呤，

[0881] mC＝5'-甲基胞嘧啶

[0882] G＝鸟嘌呤，

[0883] T＝胸腺嘧啶，

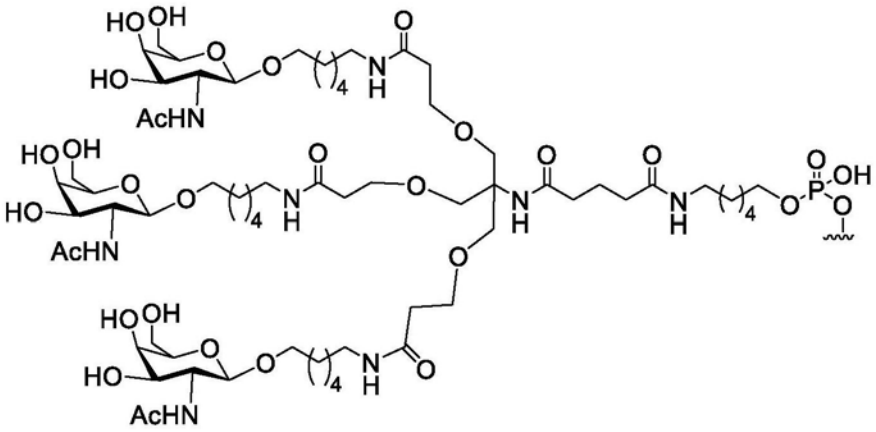
[0884] e＝2'-O-甲氧基乙基修饰核苷，

[0885] d＝2'-脱氧核苷，

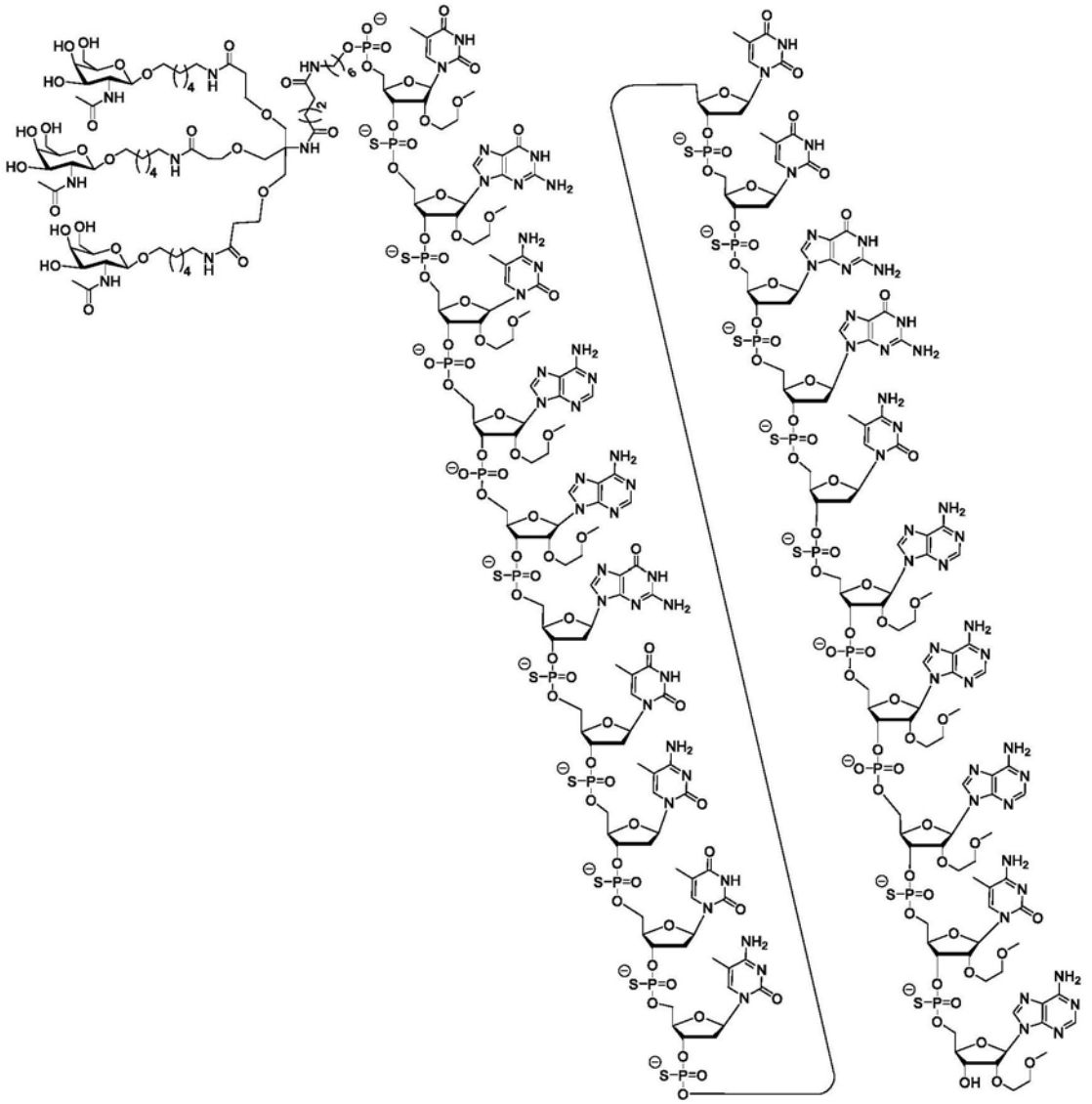
[0886] o＝磷酸二酯核苷间键联，

[0887] s＝硫代磷酸酯核苷间键联，并且

[0888] GalNAc3-$7_{a-o'}$ ＝

[0889] 

[0890] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 721744：

[0891] 

[0892] 某些聚光角区

[0893] 1.SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466

[0894] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基27427-27466。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0895] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466通过以下ISIS号进行靶向：530993、530994、530995、546251、546252、546253、546254、546255、546256、547410、547411、547978、547979、547980以及547981。

[0896] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466通过以下SEQ ID NO进行靶向：94、95、96、566、567、568、569、570、571、572、573、1597、1598、1599以及1600。

[0897] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基27427-27466的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0898] 2.SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242

[0899] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基33183-33242。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0900] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242通过以下ISIS号进行靶向：531052、531053、531054、531055、531056、531057、531158、546343、546345、547480、547481、547482以及547483。

[0901] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242通过以下SEQ ID NO进行靶向：155、156、157、158、159、160、261、702、703、704、705、706以及707。

[0902] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基33183-33242的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK mRNA和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0903] 3.SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610

[0904] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基30570-30610。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0905] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610通过以下ISIS号进行靶向：531026、546309、546310、546311、546313、547453、547454、547455、547456、547457、547458、548046、548047、548048、548049以及548050。

[0906] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610通过以下SEQ ID NO进行靶向：129、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、1664、1665、1666、1667以及1668。

[0907] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基30570-30610的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK mRNA和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0908] 4.SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520

[0909] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基27427-27520。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0910] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520通过以下ISIS号进行靶向：530993-530999、546251-546256、546258-546260、546263、546265-546268、547410-547417以及547978-547992。

[0911] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520通过以下SEQ ID NO进行靶向：94-100、566-587以及1597-1611。

[0912] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基27427-27520的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0913] 5.SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247

[0914] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基33085-33247。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0915] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247通过以下ISIS号进行靶向：531041-531158、546336、546339、546340、546343、546345、547474-547483、547778、548077-548082以及548677-548678。

[0916] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247通过以下SEQ ID NO进行靶向：144-160、261、693-707、1256、1320-1325、2214以及2215。

[0917] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基33085-33247的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0918] 6.SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639

[0919] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基30475-30639。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0920] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639通过以下ISIS号进行靶向：531021-531029、531146、546297、546299-546304、546306-546311、546313、546316-546319、547444-547462、548031、548032以及548034-548056。

[0921] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639通过以下SEQ ID NO进行靶向：124-132、249、633-669以及1650-1674。

[0922] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基30475-30639的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30％、至少31％、至少32％、至少33％、至少34％、至少35％、至少36％、至少37％、至少38％、至少39％、至少40％、至少41％、至少42％、至少43％、至少44％、至少45％、至少46％、至少47％、至少48％、至少49％、至少50％、至少51％、至少52％、至少53％、至少54％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、至少69％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的减少。

[0923] 7.SEQ ID NO:10的核碱基27362-27524

[0924] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基27362-27524。在某些实施方案中，核碱基27362-27524对应于PKK(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的外显子9。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27362-27524为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27362-27524通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0925] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基27361-27524通过以下ISIS号进行靶

向:530985-530999、546244、546247-546256、546258-546260、546263、546265-546268、547403-547417、547723-547970以及547972-547992。

[0926] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:10的核碱基27361-27524通过以下SEQ ID NO进行靶向:86-100、554-587、1217以及1588-1611。

[0927] 在某些实施方案中,靶向SEQ ID NO:10的核碱基27362-27524的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的减少。

[0928] 8.SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240

[0929] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基33101-33240。在某些实施方案中,核碱基33101-33240对应于PKK(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的外显子14。在某些实施方案中,SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240为聚光角区。在某些实施方案中,SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中,反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中,反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中,缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中,缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中,反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0930] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240通过以下ISIS号进行靶向:531041-531158、546336、546339、546340、546343、546345、547474-547483、548077-548082以及548678-548678。

[0931] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240通过以下SEQ ID NO进行靶向:144-160、261、693-707、1320-1325以及2215。

[0932] 在某些实施方案中,靶向SEQ ID NO:10的核碱基33101-33240的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、

至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的减少。

[0933] 9.SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638

[0934] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸被设计来靶向SEQ ID NO:10(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的核碱基30463-30638。在某些实施方案中，核碱基30463-30638对应于PKK(从核碱基111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的外显子12。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638为聚光角区。在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638通过反义寡核苷酸进行靶向。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸为缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。在某些实施方案中，缺口聚物为5-10-5MOE和cEt缺口聚物、4-9-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-4MOE和cEt缺口聚物、4-10-3MOE和cEt缺口聚物、3-10-4MOE和cEt缺口聚物或3-10-3MOE和cEt缺口聚物。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联进行连接。

[0935] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638通过以下ISIS号进行靶向：531021-531029、531146、546297、546299-546304、546306-546311、546313、546316-546319、547444-547462、548031、548032以及548034-548056。

[0936] 在某些实施方案中，SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638通过以下SEQ ID NO进行靶向：124-132、249、633-669以及1650-1674。

[0937] 在某些实施方案中，靶向SEQ ID NO:10的核碱基30463-30638的反义寡核苷酸在体外和/或体内实现PKK和/或蛋白质水平至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的减少。

实施例

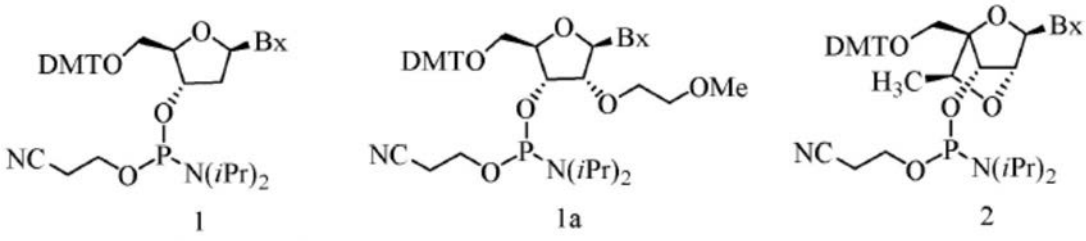
[0938] 非限制性公开且以引用方式并入

[0939] 虽然已根据某些实施方案具体描述了本文所述的某些化合物、组合物和方法，但以下实施例仅用以说明本文所述的化合物并且不意图限制所述化合物。本申请中所述的各参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0940] 以下实施例说明了本公开的某些实施方案并且不是限制性的。此外，在提供具体实施方案时，发明人已预期了那些具体实施方案的一般应用。例如，具有具体基序的寡核苷

酸的公开为具有相同或类似基序的另外的寡核苷酸提供了合理支持。并且，例如，在特别高亲合力的修饰出现在具体位置上时，相同位置上的其他高亲合力修饰也认为是合适的，除非另外指出。

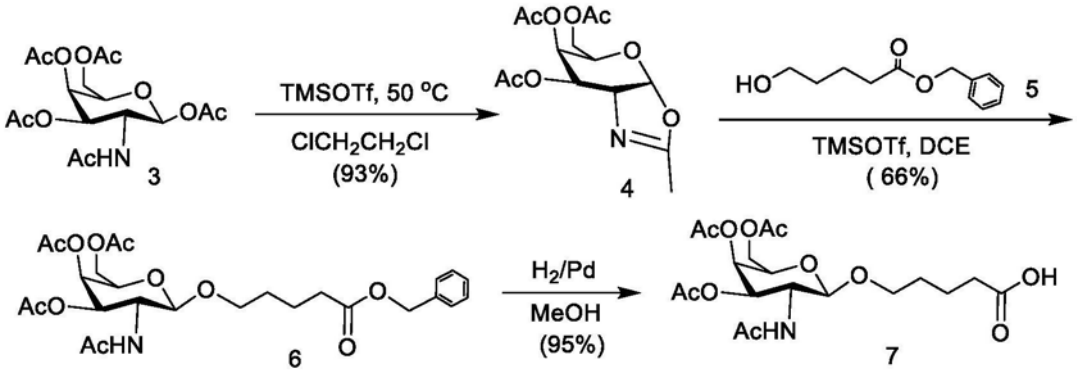
[0941] 实施例1：用于制备亚磷酰胺化合物1、1a和2的一般方法

[0942] 

Bx为杂环碱基；

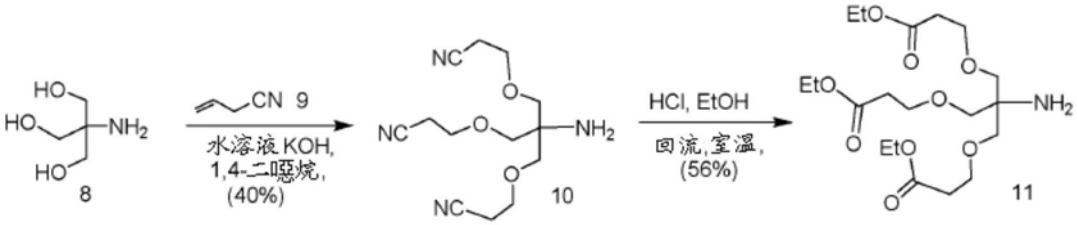
[0943] 根据如本文说明书所述的本领域已知的程序制备化合物1、1a和2(参见Seth等，Bioorg.Med.Chem.,2011,21(4),1122-1125,J.Org.Chem.,2010,75(5),1569-1581,Nucleic Acids Symposium Series,2008,52(1),553-554)；并且还参见已公布的PCT国际申请(WO 2011/115818、WO 2010/077578、WO2010/036698、WO2009/143369、WO 2009/006478以及WO 2007/090071)和美国专利7,569,686)。

[0944] 实施例2：制备化合物7

[0945] 

[0946] 化合物3(2-乙酰氨基-1,3,4,6-四-O-乙酰基-2-脱氧-β-D吡喃半乳糖或半乳糖胺五乙酸酯)为商业上可获得的。根据公布的工序制备化合物5(Weber等，J.Med.Chem.,1991,34,2692)。

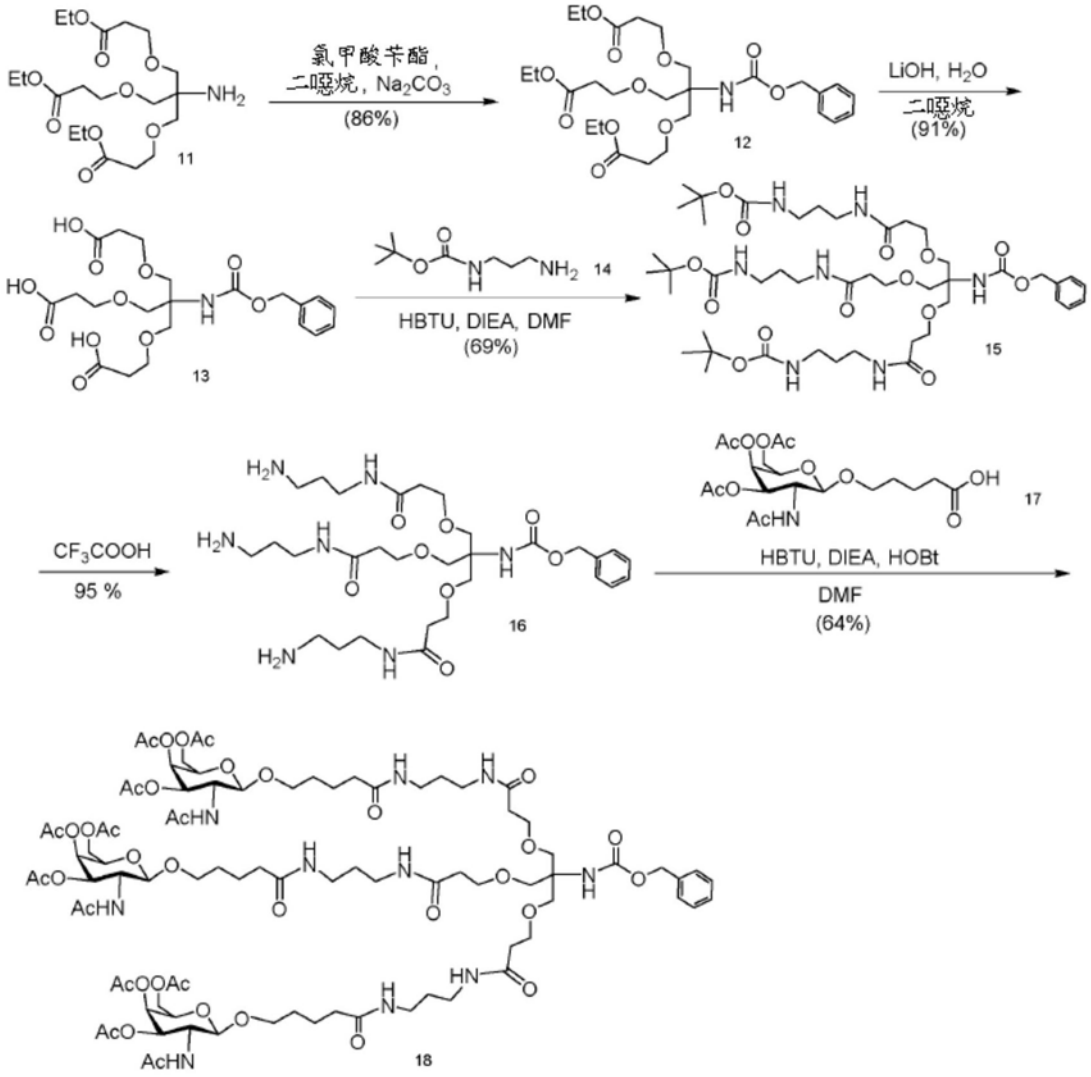
[0947] 实施例3：制备化合物11

[0948] 

[0949] 化合物8和9为商业上可获得的。

[0950] 实施例4：制备化合物18

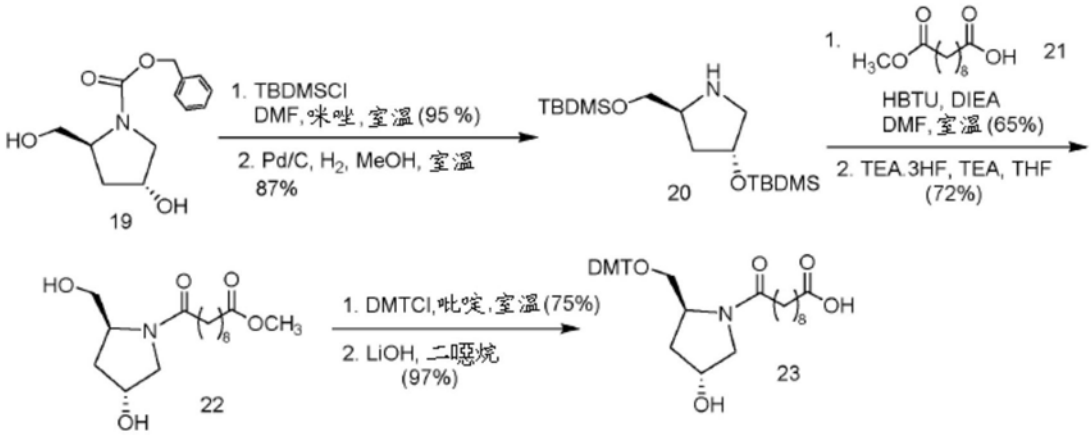
[0951]



[0952] 根据实施例3中说明的工序制备化合物11。化合物14为商业上可获得的。使用由Rensen等,J.Med.Chem.,2004,47,5798-5808所报道的类似工序制备化合物17。

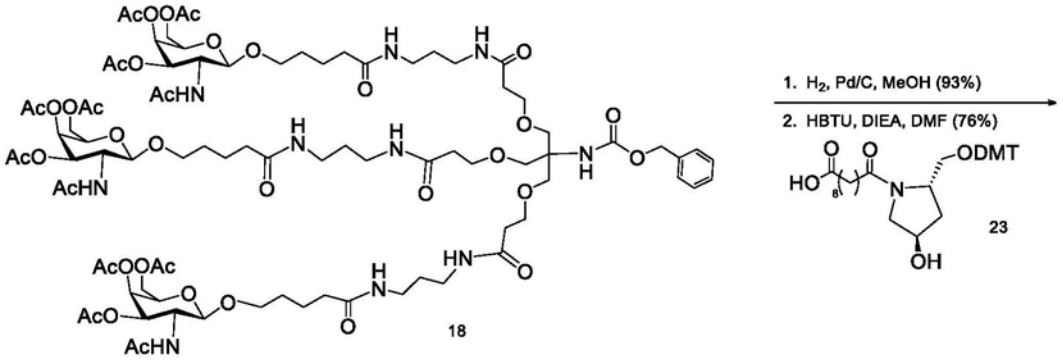
[0953] 实施例5:制备化合物23

[0954]

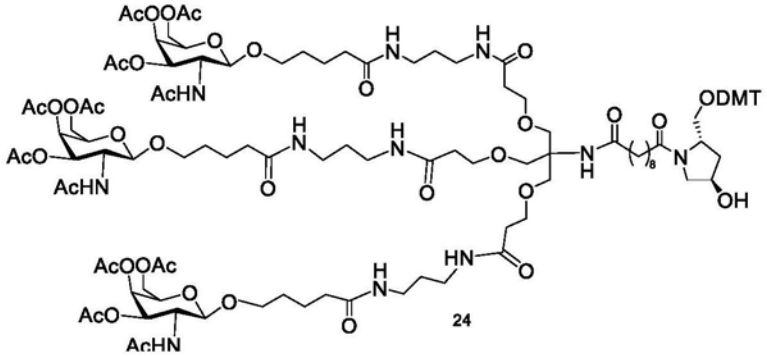


[0955] 化合物19和21为商业上可获得的。

[0956] 实施例6:制备化合物24

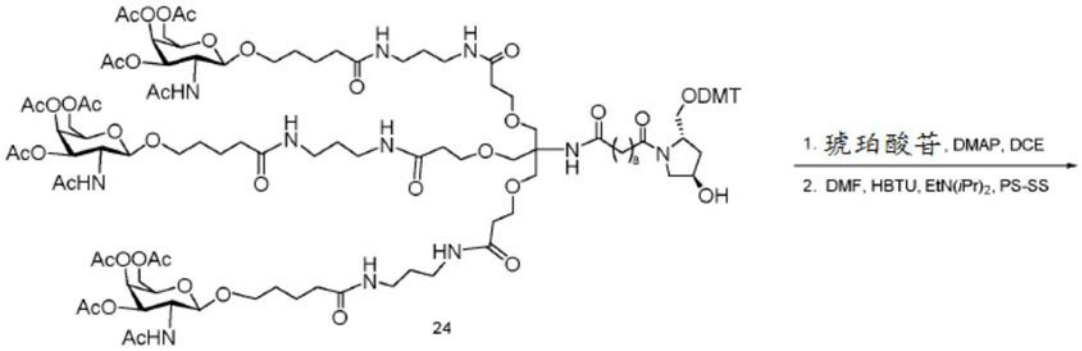


[0957]

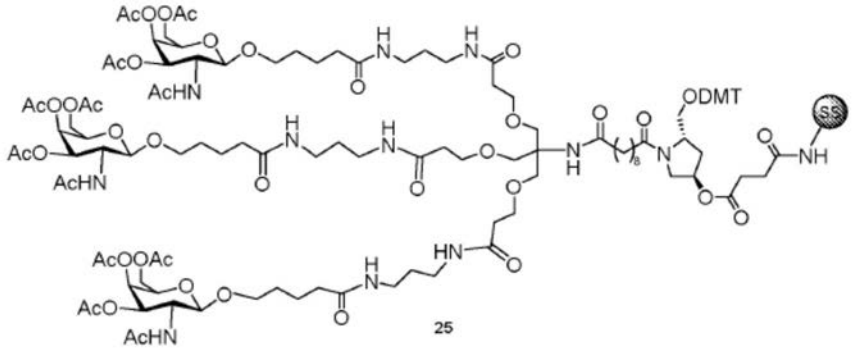


[0958] 根据实施例4和5中说明的工序制备化合物18和23。

[0959] 实施例7:制备化合物25

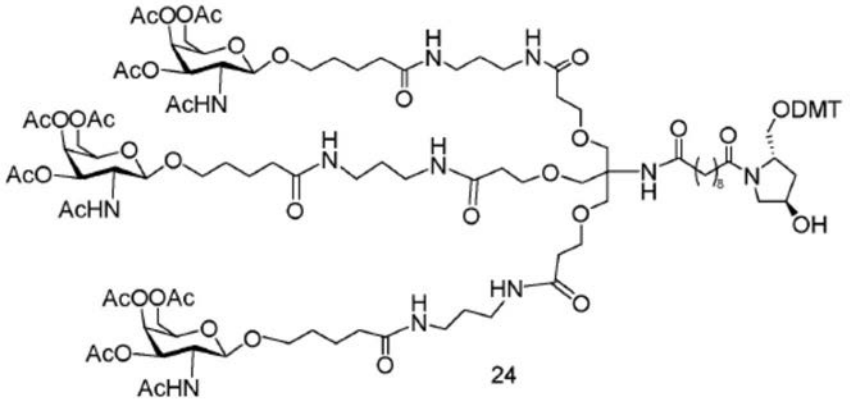


[0960]

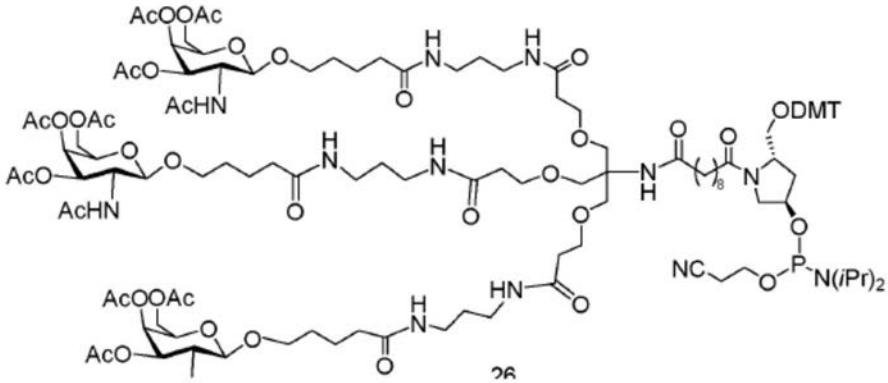


[0961] 根据实施例6中说明的工序制备化合物24。

[0962] 实施例8:制备化合物26



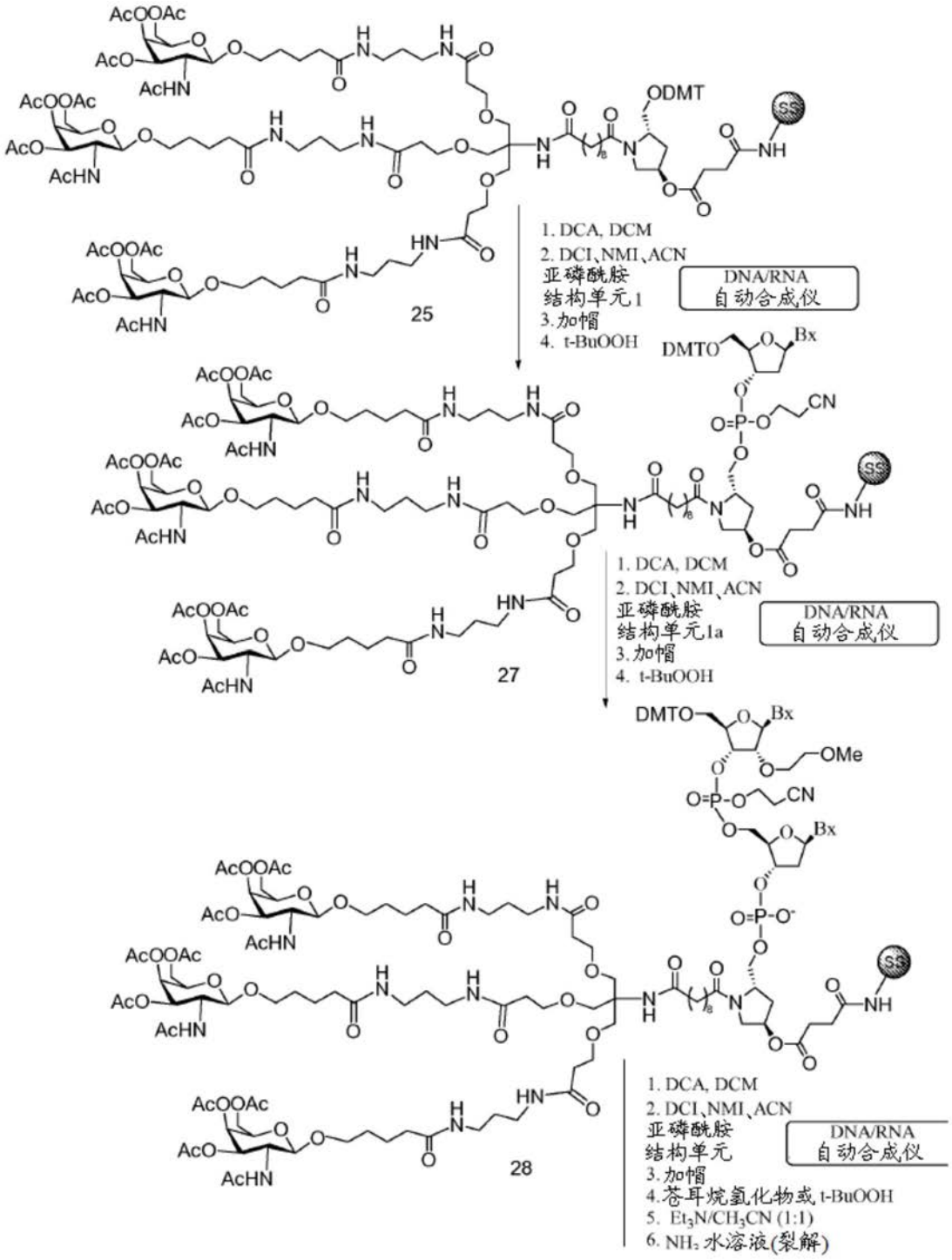
[0963]

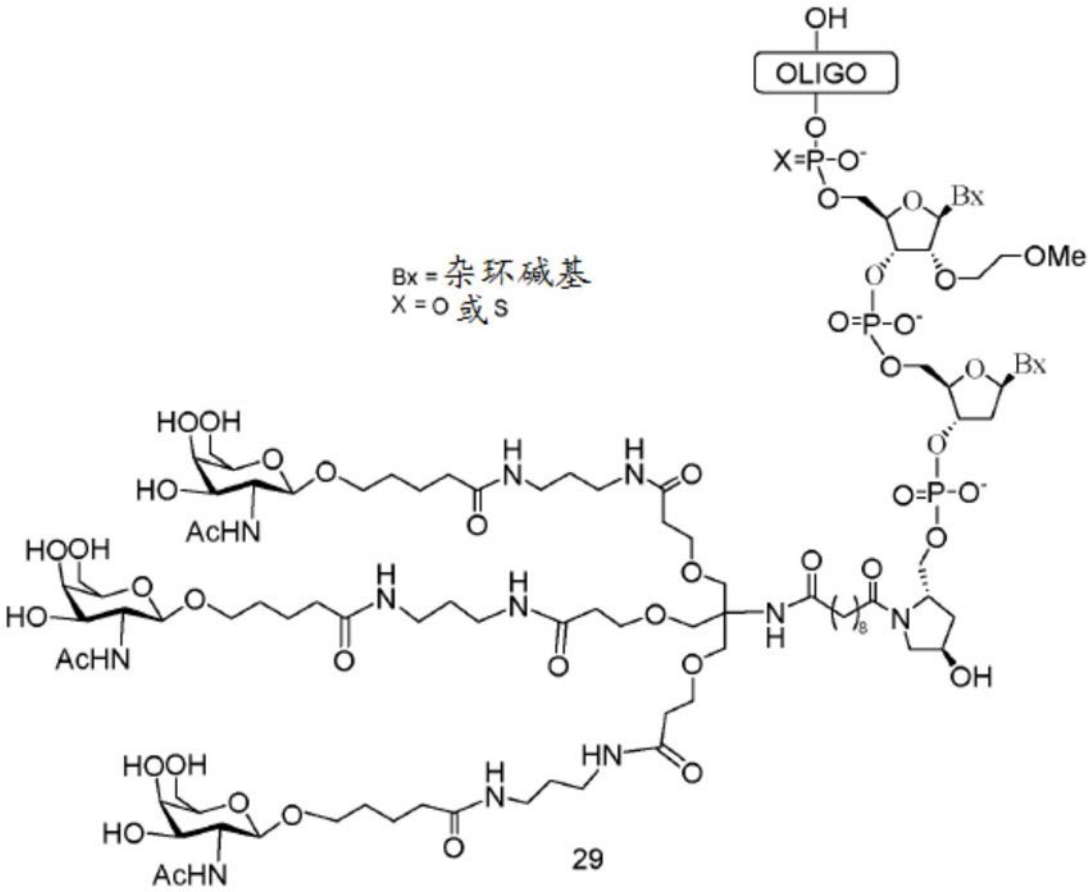


[0964] 根据实施例6中说明的工序制备化合物24。

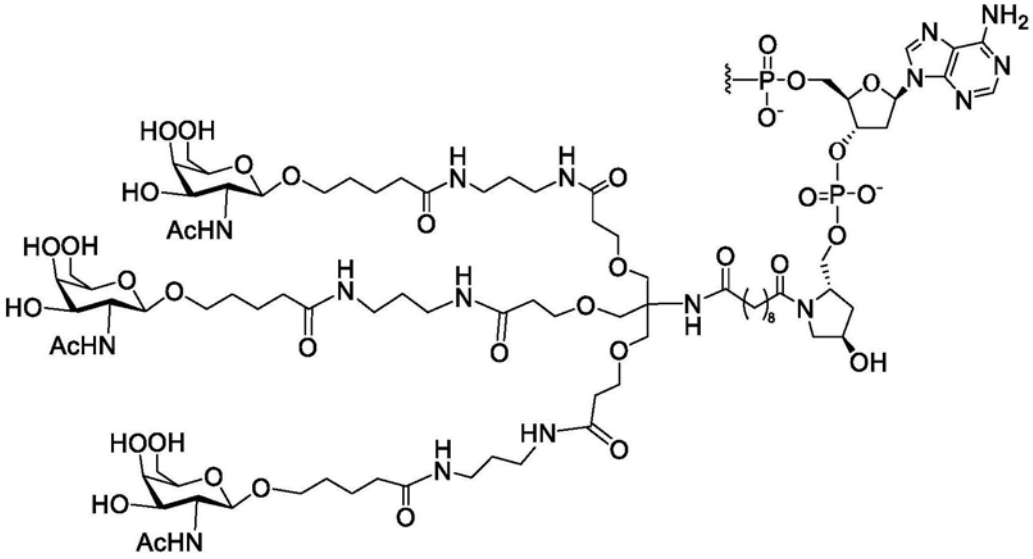
[0965] 实施例9:在3'末端包含$GalNAc_3$-1的缀合ASO化合物29的一般制备

[0966]

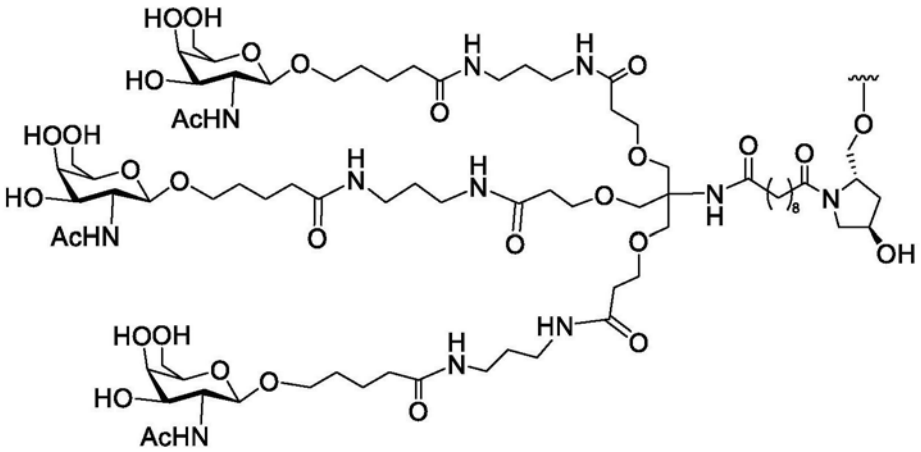

AcOOAc
AcO
AcHN
ODMT
SS
NH
HN
25
1. DCA, DCM
2. DCI、NMI、ACN
亚磷酰胺
结构单元1
3.加帽
4. t-BuOOH
DNA/RNA
自动合成仪
DMTO
Bx
CN
O=P-O
27
结构单元1a
OMe
O=P-O-
28
结构单元
4.苍耳烷氢化物或t-BuOOH
5. Et_3N/CH_3CN (1:1)
6. NH_3 水溶液(裂解)

[0967] 

[0968] 其中受保护的GalNAc$_3$-1具有以下结构：

[0969] 

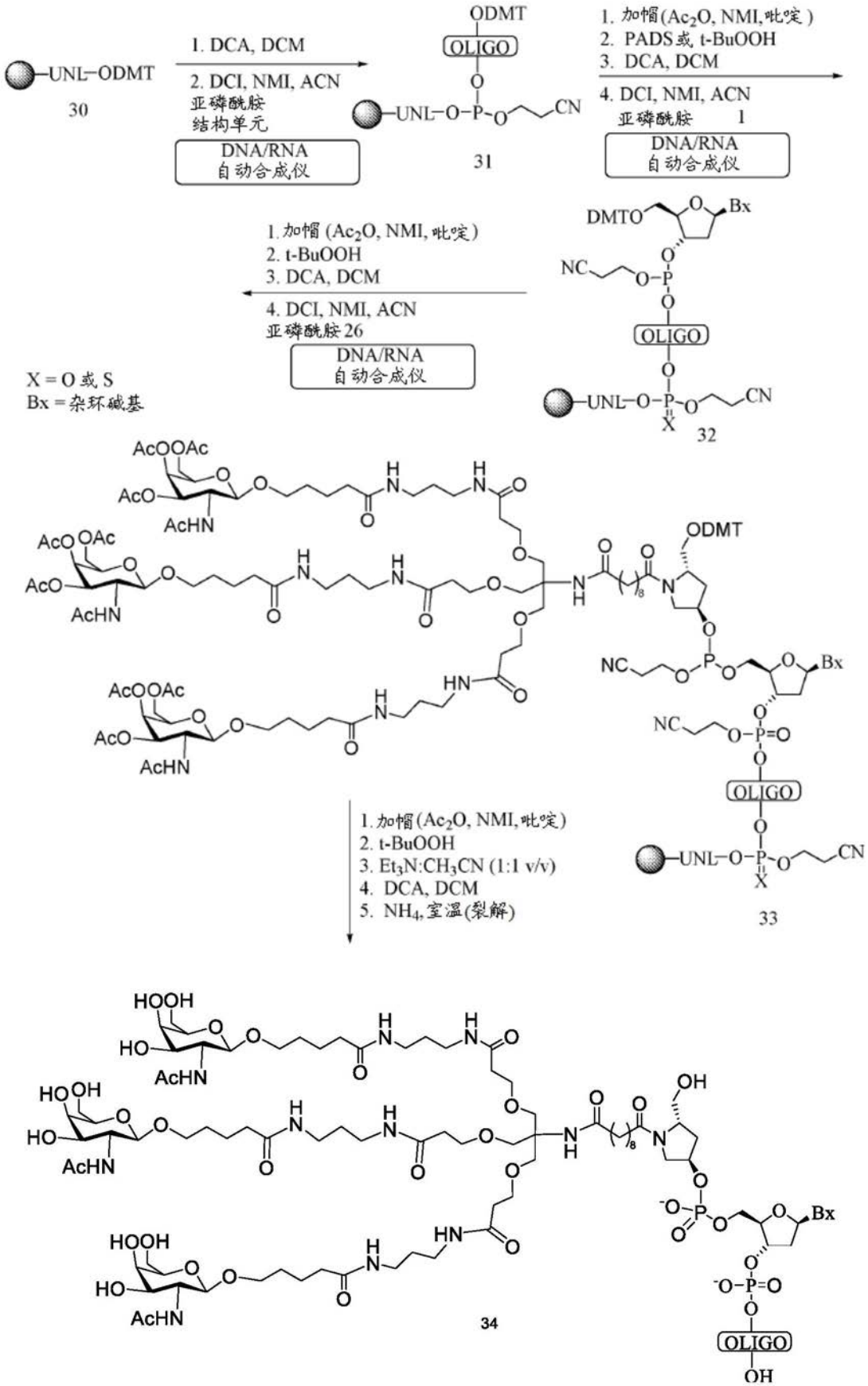
[0970] 缀合物基团GalNAc$_3$-1的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-1$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。其中GalNAc$_3$-1$_a$具有下式：

[0971] 

[0972] 根据实施例7中说明的程序制备固体载体结合的受保护的$GalNAc_3$-1，即化合物25。使用自动化DNA/RNA合成中的标准程序制备在3’末端包含$GalNAc_3$-1的低聚化合物29(参见Dupouy等,Angew.Chem.Int.Ed.,2006,45,3623-3627)。根据实施例1中说明的工序制备亚磷酰胺结构单元，即化合物1和1a。所述的亚磷酰胺意在为代表性的并且不意图为限制性的，因为可使用其他亚磷酰胺结构单元来制备具有预先确定的序列和组成的低聚化合物。可调节添加至固体载体的亚磷酰胺的顺序和量以制备如本文所述的有缺口的低聚化合物。所述有缺口的低聚化合物可具有如任何给定靶标所指示的预先确定的组成和碱基序列。

[0973] 实施例10:在5’末端包含$GalNAc_3$-1的缀合ASO化合物34的一般制备

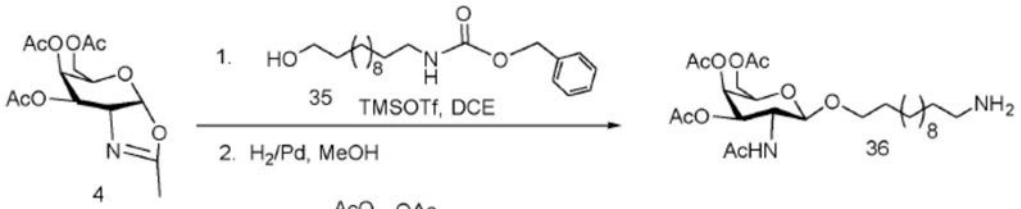
[0974]



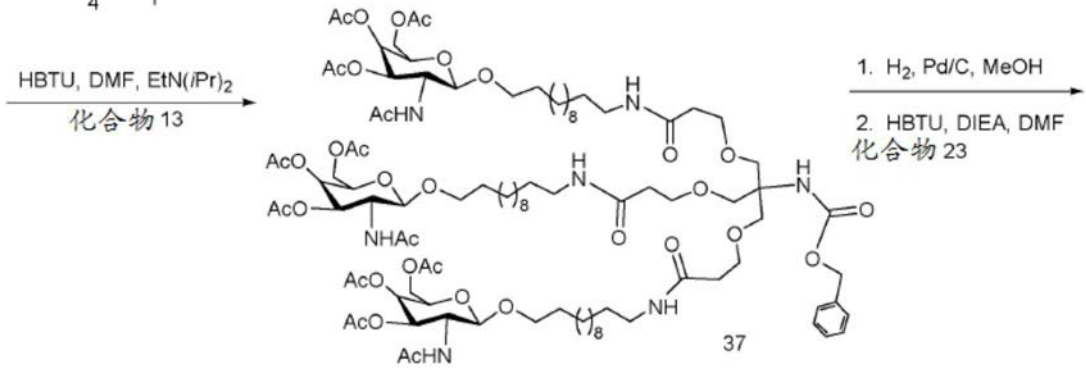
[0975] Unylinker™ 30为商业上可获得的。使用自动化DNA/RNA合成中的标准程序制备在5'末端包含GalNAc3-1聚簇的低聚化合物34(参见Dupouy等,Angew.Chem.Int.Ed.,2006,

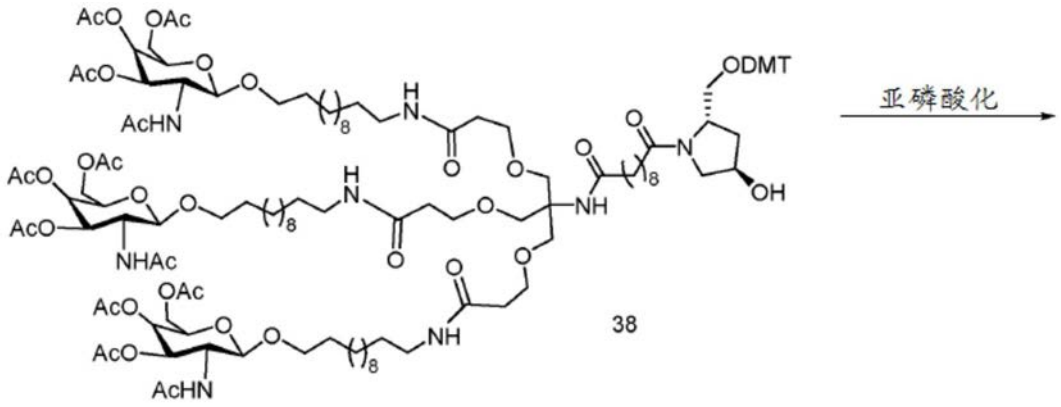
45,3623-3627)。根据实施例1中说明的工序制备亚磷酰胺结构单元,即化合物1和1a。所述的亚磷酰胺意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他亚磷酰胺结构单元来制备具有预先确定的序列和组成的低聚化合物。可调节添加至固体载体的亚磷酰胺的顺序和量以制备如本文所述的有缺口的低聚化合物。所述有缺口的低聚化合物可具有如任何给定靶标所指示的预先确定的组成和碱基序列。

[0976] 实施例11:制备化合物39

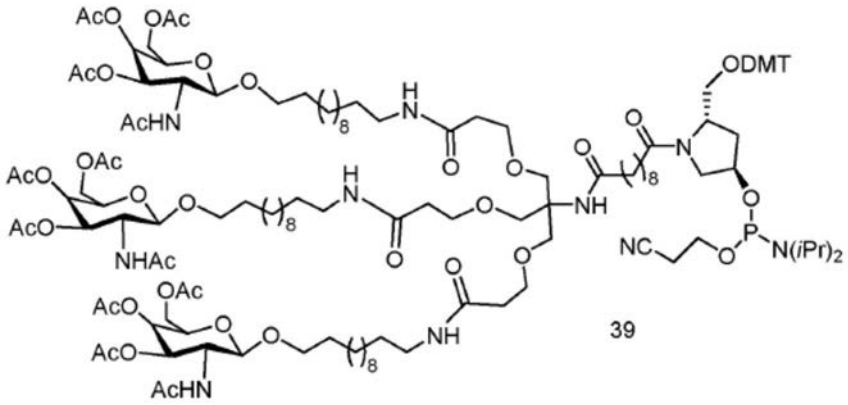


[0977]



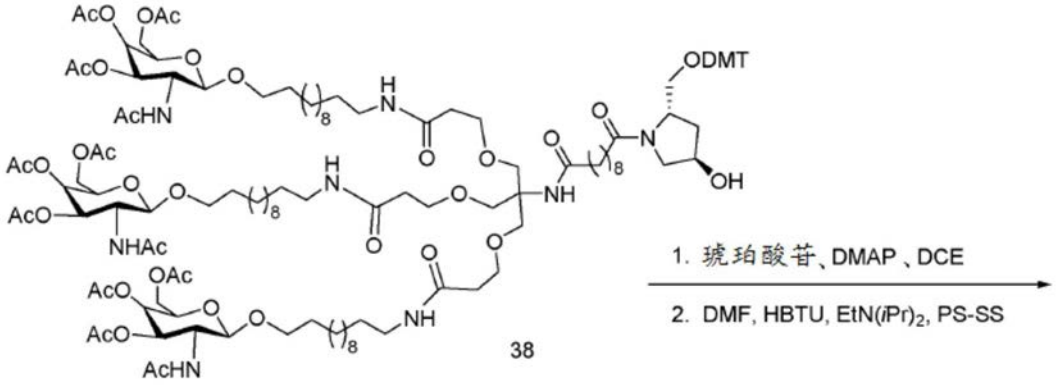


[0978]

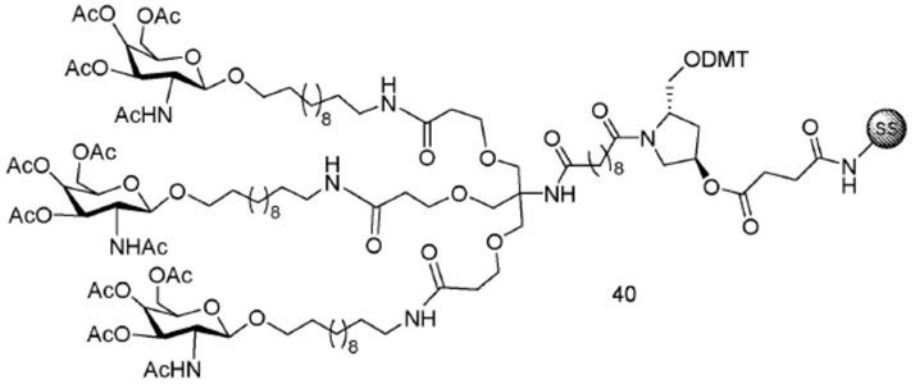


[0979] 根据实施例2、4和5中说明的工序制备化合物4、13和23。使用公布于以下的类似工序制备化合物35:Rouchaud等,Eur.J.Org.Chem.,2011,12,2346-2353。

[0980] 实施例12:制备化合物40



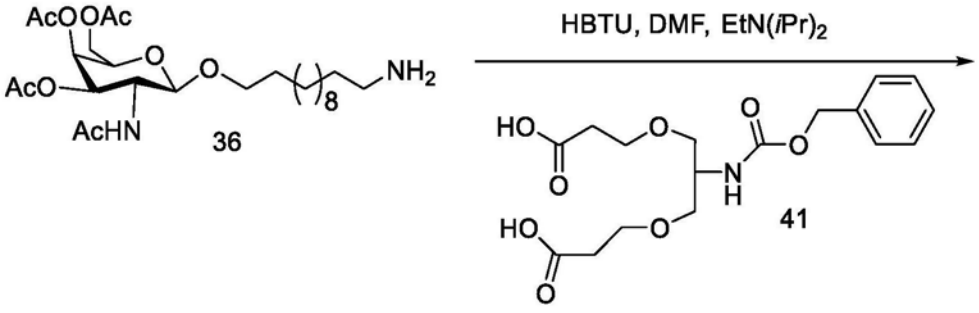
[0981]



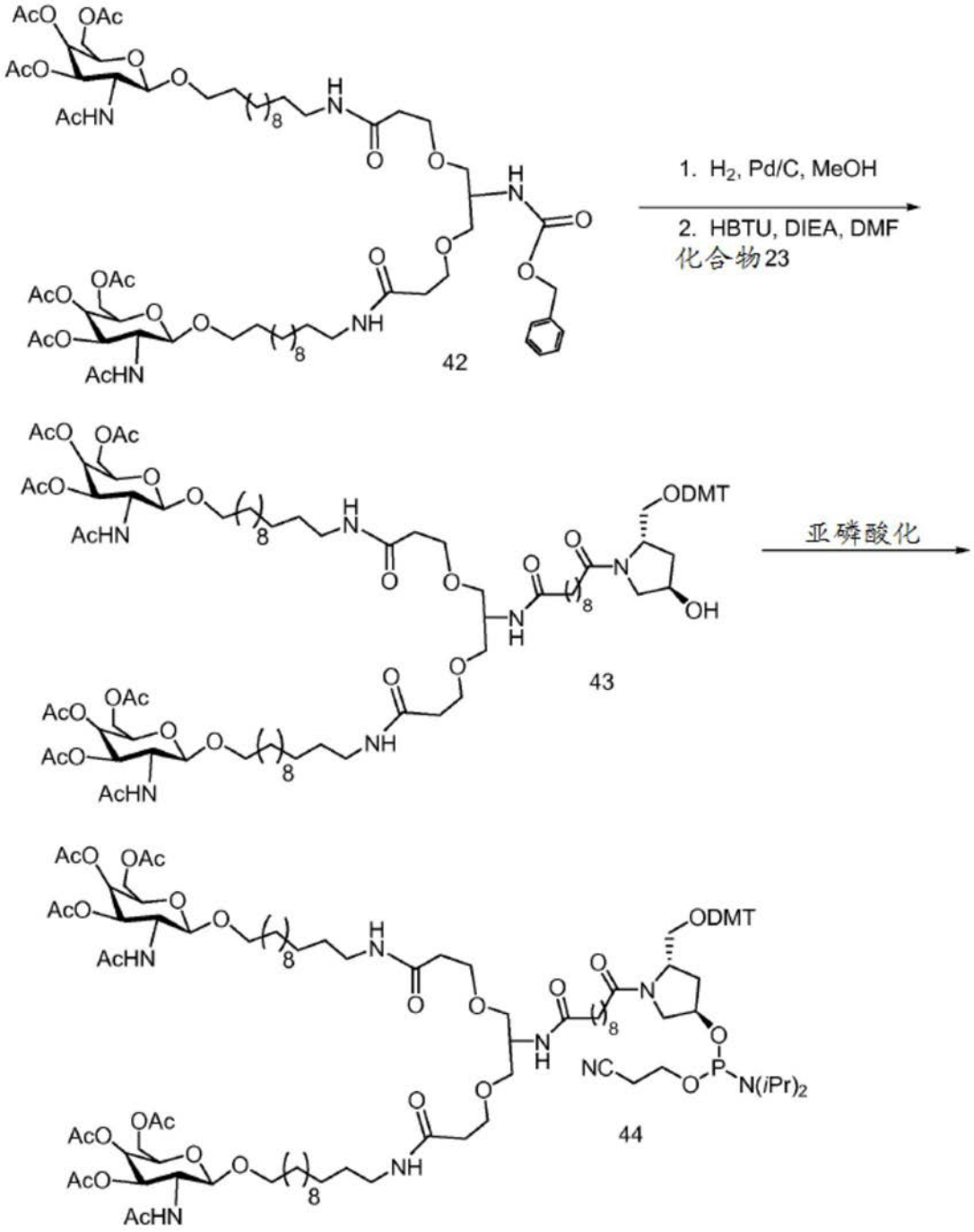
[0982] 根据实施例11中说明的工序制备化合物38。

[0983] 实施例13:制备化合物44

[0984]

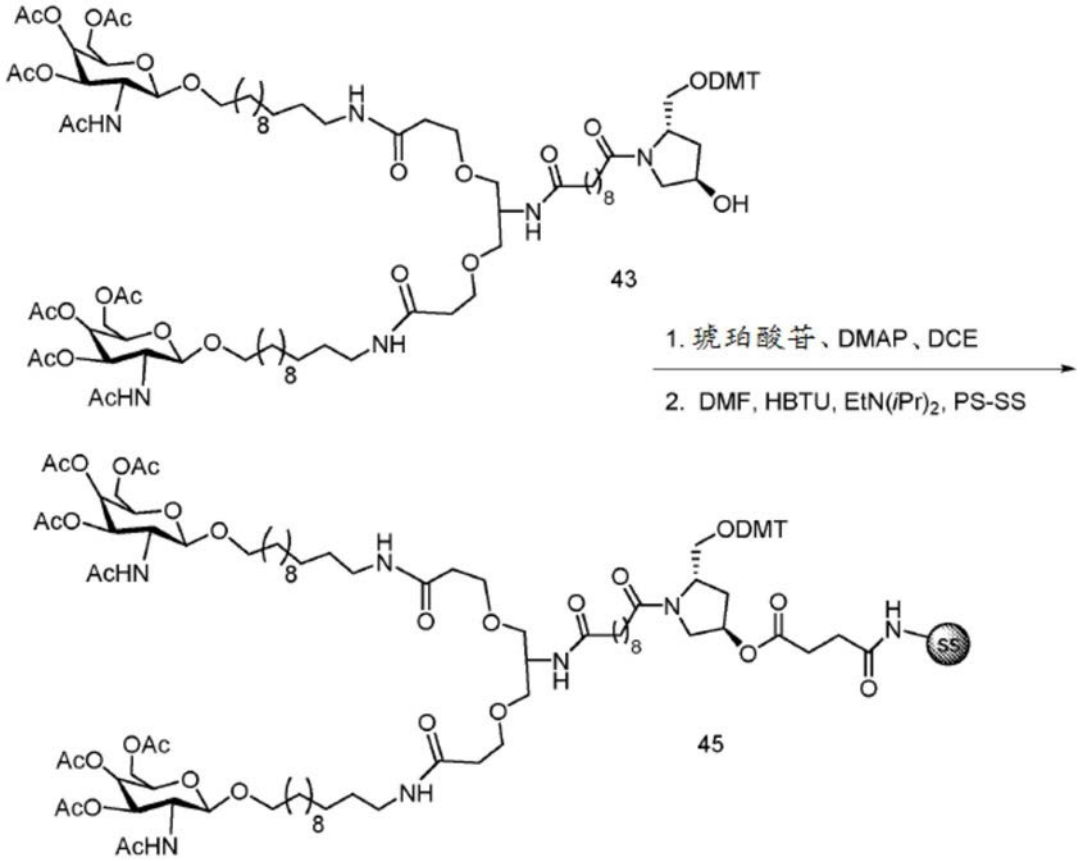


[0985]



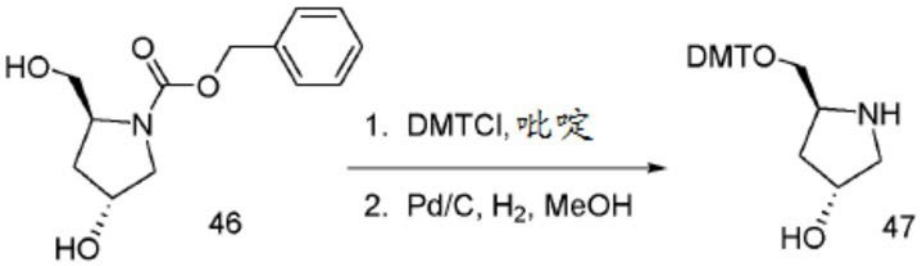
[0986] 根据实施例5和11中说明的工序制备化合物23和36。使用公布于WO 2009082607中的类似工序制备化合物41。

[0987] 实施例14:制备化合物45

[0988] 

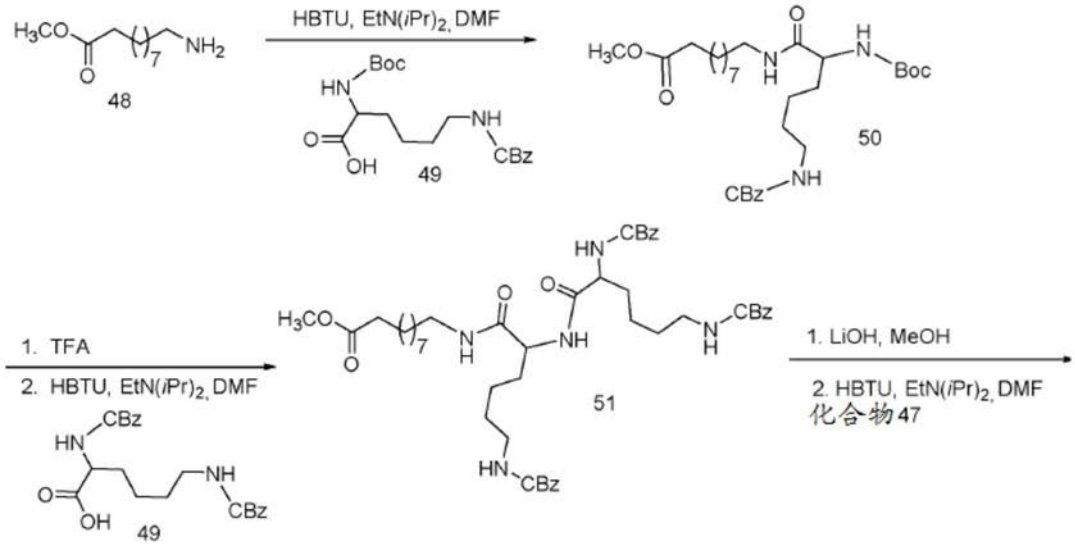
[0989] 根据实施例13中说明的工序制备化合物43。

[0990] 实施例15:制备化合物47

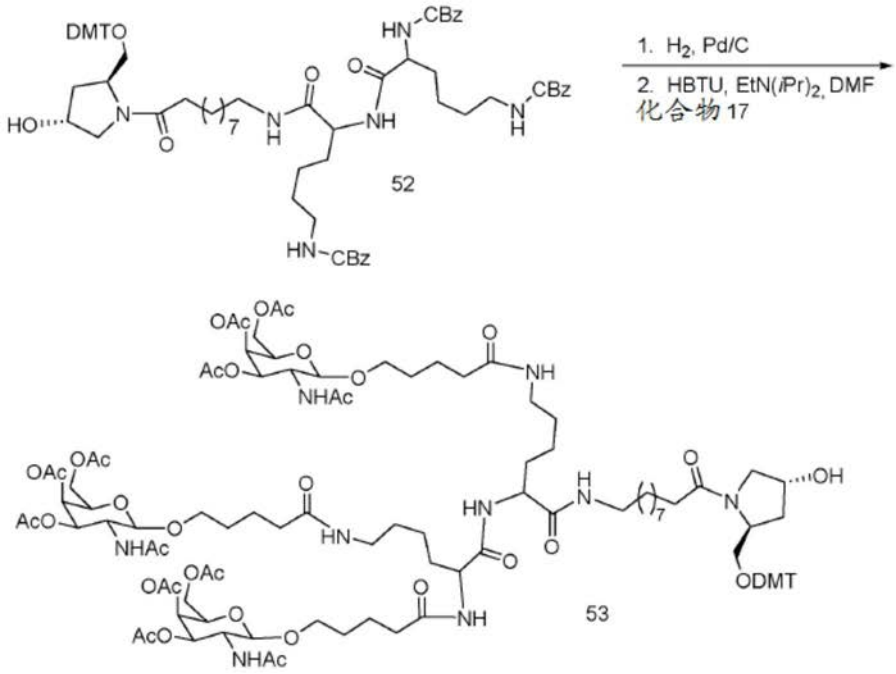
[0991] 

[0992] 化合物46为商业上可获得的。

[0993] 实施例16:制备化合物53



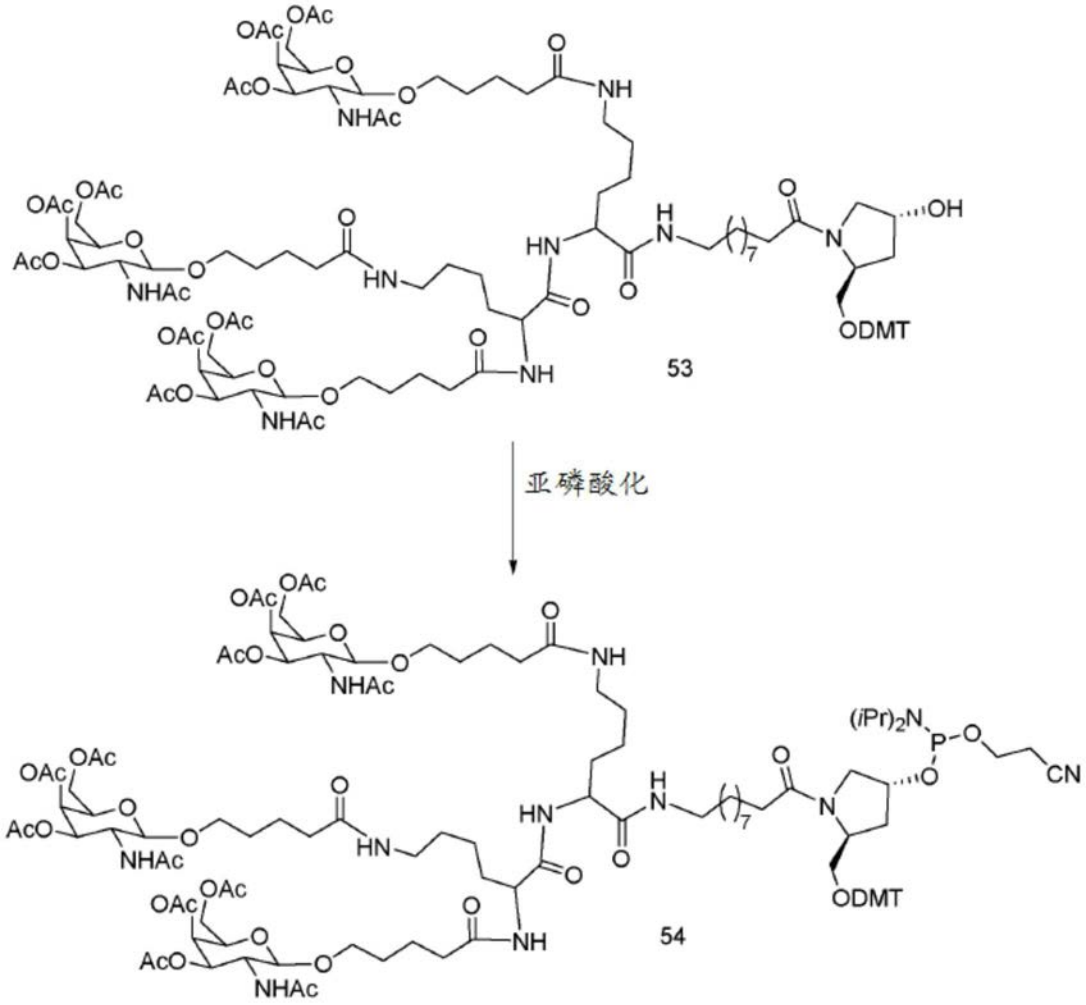
[0994]



[0995] 化合物48和49为商业上可获得的。根据实施例4和15中说明的工序制备化合物17和47。

[0996] 实施例17:制备化合物54

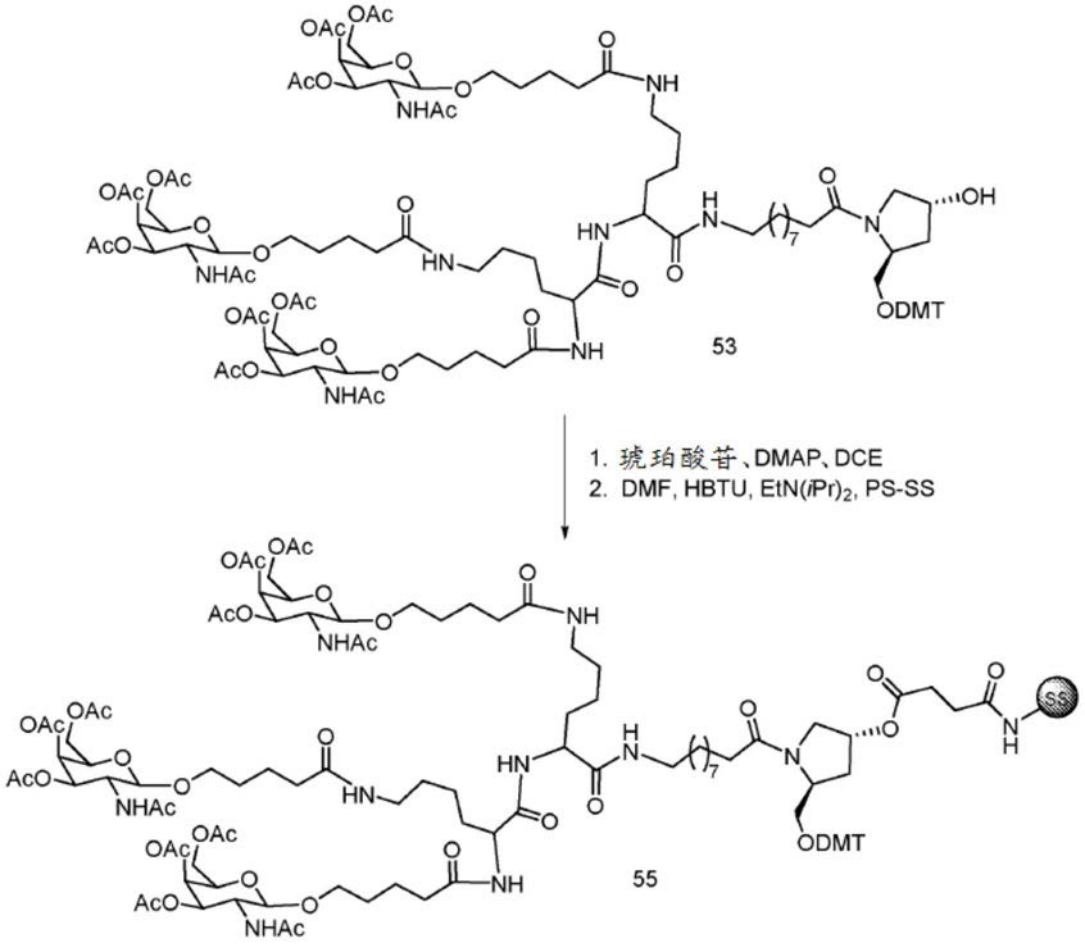
[0997]



[0998] 根据实施例16中说明的工序制备化合物53。

[0999] 实施例18:制备化合物55

[1000]



[1001] 根据实施例16中说明的工序制备化合物53。

[1002] 实施例19:用于通过固相技术制备在3'位包含$GalNAc_3$-1的缀合ASO的一般方法(ISIS 647535、647536以及651900的制备)

[1003] 除非另外说明,否则用于合成低聚化合物的所有试剂和溶液均购自商业来源。使用标准亚磷酰胺结构单元和固体载体来掺入核苷残基,所述核苷残基包括例如T、A、G以及^{m}C残基。0.1M的亚磷酰胺在无水乙腈中的溶液用于β-D-2'-脱氧核糖核苷和2'-MOE。

[1004] 在ABI 394合成器(1-2μmol规模)上或在GE Healthcare Bioscience ÄKTA oligopilot合成器(40-200μmol规模)上通过填充在柱中的负载$GalNAc_3$-1的VIMAD固体载体(110μmol/g,Guzaev等,2003)上的亚磷酰胺偶联方法来进行ASO合成。对于偶联步骤,以超过固体载体上的负载量4倍的量递送亚磷酰胺并且持续10min进行亚磷酰胺缩合。所有其他步骤遵循由生厂商供应的标准协议。使用6%二氯乙酸在甲苯中的溶液来从核苷酸的5'-羟基上去除二甲氧基三苯甲基(DMT)。无水CH_3CN中的4,5-二氰基咪唑(0.7M)用作偶联步骤过程中的活化剂。通过用苍耳烷氢化物在1:1吡啶/CH_3CN中的0.1M溶液硫化3分钟的接触时间来引入硫代磷酸酯键联。使用20%叔丁基过氧化氢在含有6%水的CH_3CN中的溶液作为氧化剂来提供磷酸二酯核苷间键联,其中接触时间为12分钟。

[1005] 在装配希望的序列之后,使用三乙胺和乙腈的1:1(v/v)混合物将磷酸氰基乙酯保护基去保护,其中接触时间为45分钟。将固体载体结合的ASO悬浮在氨水(28-30重量%)中并且在55℃下加热6h。

[1006] 然后过滤未结合的ASO并且将氨煮沸掉。将残余物通过高压液相色谱在强阴离子

交换柱上纯化(GE Healthcare Bioscience,Source 30Q,30μm,2.54x8cm,A＝100mM于30％CH_3CN水溶液中的醋酸铵,B＝1.5M于A中的NaBr,0-40％的B持续60min,流速14mL min-1,λ＝260nm)。残余物通过HPLC在反相柱上脱盐以得到基于固体载体上的初始负载量为15％-30％的分离产率的希望的ASO。使用Agilent 1100MSD系统通过离子对HPLC偶联的MS分析来表征ASO。

[1007] 使用本领域中熟知的标准寡核苷酸合成工序合成不包含缀合物的反义寡核苷酸。

[1008] 使用这些方法,制备了靶向ApoC III的三种单独的反义化合物。如以下表17中所概述,靶向ApoC III的三种反义化合物中的每一种均具有相同的核碱基序列;ISIS 304801为具有所有硫代磷酸酯键联的5-10-5MOE缺口聚物;ISIS 647535与ISIS 304801相同,除了ISIS 647535具有缀合在其3’末端的$GalNAc_3$-1;并且ISIS 647536与ISIS 647535相同,除了所述化合物的某些核苷间键联为磷酸二酯键联。如表17中进一步概述,合成了靶向SRB-1的两种单独的反义化合物。ISIS 440762为具有所有硫代磷酸酯核苷间键联的2-10-2cEt缺口聚物;ISIS 651900与ISIS 440762相同,除了ISIS 651900在其3’-末端包括$GalNAc_3$-1。

[1009] 表17

[1010] 靶向ApoC III和SRB-1的修饰ASO

[1011]

ASO	序列(5’至3’)	靶标	计算质量	观察到的质量	SEQ ID No.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	7165.4	7164.4	2248
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	ApoC III	9239.5	9237.8	2249
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	ApoC III	9142.9	9140.8	2249
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	SRB-1	4647.0	4646.4	2250
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	SRB-1	6721.1	6719.4	2251

[1012] 下标:“e”指示2’-MOE修饰核苷;“d”指示β-D-2’-脱氧核糖核苷;“k”指示6’-(S)-CH_3双环核苷(例如cEt);“s”指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);“o”指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且“o’”指示-O-P(＝O)(OH)-。上标“m”指示5-甲基胞嘧啶。“GalNAc3-1”指示具有先前在实施例9中示出的结构的缀合物基团。应注意,$GalNAc_3$-1包含将ASO连接至缀合物的剩余部分的可裂解腺苷,所述可裂解腺苷命名为“$GalNAc_3\text{-}1_a$”。这种命名法用于上表以显示整个核碱基序列,包括作为缀合物的一部分的腺苷。因此,在上表中,序列还可列为以“$GalNAc_3$-1”结尾,其中省略“A_{do}”。在全部这些实施例中使用了这种惯例:使用下标“a”来指示缺乏可裂解核苷或可裂解部分的缀合物基团的部分。缺乏可裂解部分的缀合物基团的此部分在本文中是指“聚簇”或“缀合物聚簇”或“$GalNAc_3$聚簇”。在某些情况下,通过单独提供其聚簇和其可裂解部分来方便地描述缀合物基团。

[1013] 实施例20:huApoC III转基因小鼠中的人ApoC III的剂量依赖性反义抑制

[1014] 在剂量依赖性研究中,针对其抑制人ApoC III转基因小鼠中的人ApoC III的能

力,对各自靶向人ApoC III并且以上描述的ISIS 304801和ISIS 647535进行单独测试和评价。

[1015] 处理

[1016] 将人ApoCIII转基因小鼠维持在12小时亮/暗循环中并且随意喂食Teklad实验室食物。在开始实验之前,使动物在研究设备中适应至少7天。在PBS中制备ASO并且通过过滤通过0.2微米过滤器进行灭菌。将ASO溶解于0.9%PBS中用于注射。

[1017] 每周一次在0.08、0.25、0.75、2.25或6.75μmol/kg下用ISIS 304801或647535或使用PBS作为对照腹膜内注射人ApoC III转基因小鼠,持续两周。每个处理组由4只动物组成。在施用最后剂量之后的四十八小时,从每只小鼠中抽血并且将小鼠处死并收集组织。

[1018] ApoC III mRNA分析

[1019] 使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案来测定小鼠肝脏中的ApoC III mRNA水平。在归一化为PBS处理的对照之前,测定相对于总RNA的ApoC III mRNA水平(使用Ribogreen)。以下结果以归一化为PBS处理的对照的每个处理组的ApoC III mRNA水平的平均百分比呈现并且表示为“%PBS”。每个ASO的半数最大有效剂量(ED_{50})也呈现于以下表18中。

[1020] 如所说明的,相对于PBS对照,这两种反义化合物使ApoC III RNA减少。此外,缀合至$GalNAc_3$-1的反义化合物(ISIS 647535)大致上比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 304801)更有效。

[1021] 表18

[1022] ASO处理对人ApoC III转基因小鼠中ApoC III mRNA水平的影响

[1023]

ASO	剂量 (μmol/kg)	% PBS	ED_{50} (μmol/kg)	3’缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0.08	95	0.77	无	PS/20	2248
	0.75	42				
	2.25	32				
	6.75	19				
ISIS 647535	0.08	50	0.074	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
	0.75	15				
	2.25	17				
	6.75	8				

[1024] ApoC III蛋白分析(浊度测定)

[1025] 使用在2013年3月29日印刷之前在线公布的Graham等,Circulation Research所报道的工序确定血浆ApoC III蛋白分析。

[1026] 在不稀释的情况下,使用Olympus临床分析仪和可商购获得的浊度ApoC III测定法(Kamiya,Cat#KAI-006,Kamiya Biomedical,Seattle,WA)对从小鼠分离的约100μl血浆进行分析。如供应商所述执行测定方案。

[1027] 如以下表19中所示,相对于PBS对照,这两种反义化合物使ApoC III蛋白减少。此外,缀合至$GalNAc_3$-1的反义化合物(ISIS 647535)大致上比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 304801)更有效。

[1028] 表19

[1029] ASO处理对人ApoC III转基因小鼠中ApoC III血浆蛋白水平的影响

[1030]

ASO	剂量 (μmol/kg)	% PBS	ED_{50} (μmol/kg)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS	0.08	86	0.73	无	PS/20	2248

[1031]

304801	0.75	51				
	2.25	23				
	6.75	13				
ISIS 647535	0.08	72	0.19	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
	0.75	14				
	2.25	12				
	6.75	11				

[1032] 通过Bligh和Dyer(Bligh,E.G.和Dyer,W.J.Can.J.Biochem.Physiol.37:911-917,1959)(Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959)(Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959)的方法提取血浆甘油三酯和胆固醇并且通过使用Beckmann Coulter临床分析仪和商业上可获得的试剂来测量。

[1033] 相对于PBS注射的小鼠测量甘油三酯水平并且表示为"%PBS"。结果呈现于表20中。如所说明的,这两种反义化合物使甘油三酯水平降低。此外,缀合至$GalNAc_3$-1的反义化合物(ISIS 647535)大致上比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 304801)更有效。

[1034] 表20

[1035] ASO处理对转基因小鼠中甘油三酯水平的影响

[1036]

ASO	剂量 (μmol/kg)	% PBS	ED_{50} (μmol/kg)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	87	0.63	无	PS/20	2248
	0.75	46				
	2.25	21				
	6.75	12				
ISIS 647535	0.08	65	0.13	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
	0.75	9				
	2.25	8				
	6.75	9				

[1037] 通过HPLC分析血浆样品来测定总胆固醇和不同级分的胆固醇(HDL和LDL)的量。结果呈现于表21和22中。如所说明的,这两种反义化合物使总胆固醇水平降低;均使LDL降低;并且均使HDL升高。此外,缀合至$GalNAc_3$-1的反义化合物(ISIS 647535)大致上比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 304801)更有效。HDL水平增加和LDL水平降低为反义抑制ApoC III的心血管有益作用。

[1038] 表21

[1039] ASO处理对转基因小鼠中总胆固醇水平的影响

[1040]

ASO	剂量 (μmol/kg)	总胆固醇 (mg/dL)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0.08	226	无	PS/20	2248
	0.75	164			
	2.25	110			
	6.75	82			
ISIS 647535	0.08	230	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	2249
	0.75	82			
	2.25	86			
	6.75	99			

[1041] 表22

[1042] ASO处理对转基因小鼠中HDL和LDL胆固醇水平的影响

[1043]

ASO	剂量 (μmol/kg)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0.08	17	23	无	PS/20	2248
	0.75	27	12			
	2.25	50	4			
	6.75	45	2			
ISIS 647535	0.08	21	21	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	2249
	0.75	44	2			
	2.25	50	2			
	6.75	58	2			

[1044] 药物代谢动力学分析(PK)

[1045] 还评价了ASO的PK。使用标准方案切碎并且提取肝脏和肾样品。在MSD1上利用IP-HPLC-MS分析样品。测量全长ISIS 304801和647535的组织水平(μg/g)并且结果提供于表23中。如所说明的,对于两种反义化合物,总全长反义化合物的肝脏浓度类似。因此,即使GalNAc$_3$-1-缀合的反义化合物在肝脏中更具活性(如通过以上RNA和蛋白质数据所展示),但它在肝脏中不以大致上更高的浓度存在。事实上,所计算的EC_{50}(提供于表23中)证实了所观察到的缀合化合物的效力增加不能完全归因于积累增加。此结果表明缀合物不仅仅通过肝脏积累的机制,还可能通过改进细胞对反义化合物的产生性摄取来改进效力。

[1046] 结果还显示GalNAc$_3$-1缀合反义化合物在肾中的浓度低于缺乏GalNAc缀合物的反义化合物的浓度。这具有若干有益的治疗意义。对于不想要在肾中的活性的治疗适应症(indication),对肾的暴露具有肾毒性的风险而没有相应的益处。此外,肾中的高浓度通常导致化合物流失至尿液,从而导致更快的清除。因此,对于非肾靶标,肾积累为不希望的。这些数据表明GalNAc$_3$-1缀合使肾积累减少。

[1047] 表23

[1048] 转基因小鼠中ASO处理的PK分析

[1049]

ASO	剂量 (μmol/kg)	肝 (μg/g)	肾 (μg/g)	肝脏 EC_{50} (μg/g)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
ISIS 304801	0.1	5.2	2.1	53	无	PS/20	2248
	0.8	62.8	119.6				
	2.3	142.3	191.5				
	6.8	202.3	337.7				
ISIS 647535	0.1	3.8	0.7	3.8	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	2249
	0.8	72.7	34.3				
	2.3	106.8	111.4				
	6.8	237.2	179.3				

[1050] 还鉴定了ISIS 647535的代谢物并且通过高分辨率质谱分析证实了其质量。以下示出所观察到的代谢物的裂解位点和结构。使用标准工序计算全长ASO的相对%并且结果呈现于表23a中。ISIS 647535的主要代谢物为缺乏整个缀合物的全长ASO(即ISIS 304801),其由在以下示出的裂解位点A处裂解产生。此外,还观察到由其他裂解位点产生的另外代谢物。这些结果表明在GalNAc$_3$-1糖与ASO之间引入其他可裂解键如酯、肽、二硫化物、氨基磷酸酯或酰基脲也可以是有用的,所述可裂解键可被细胞内部的酶裂解或所述可裂解键可在细胞液的还原性环境中裂解或所述可裂解键对内体和溶酶体内部的酸性pH不稳定。

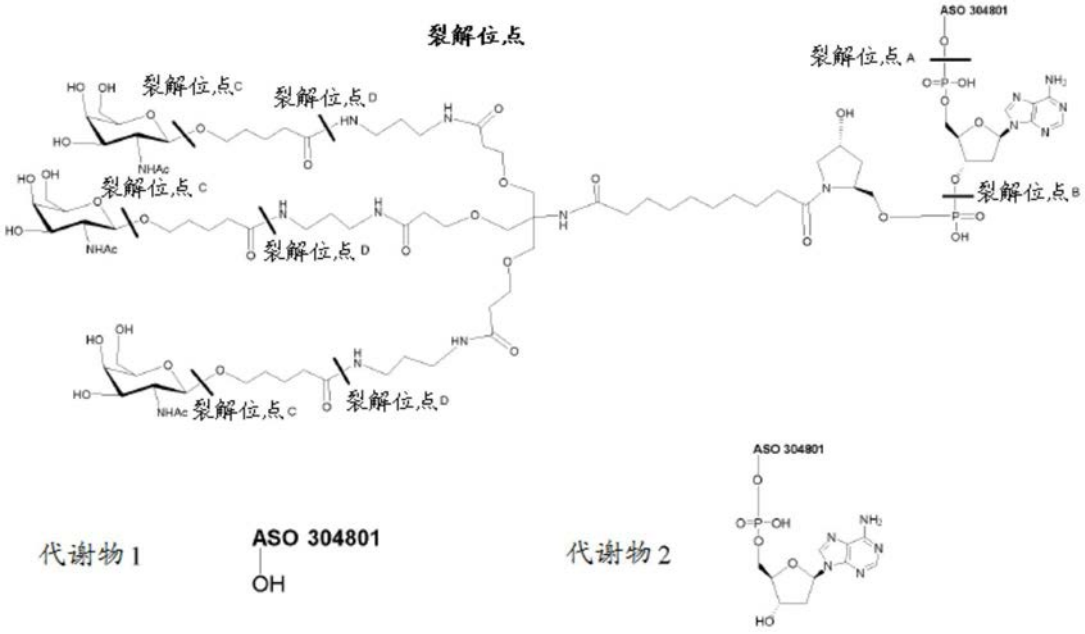
[1051] 表23a

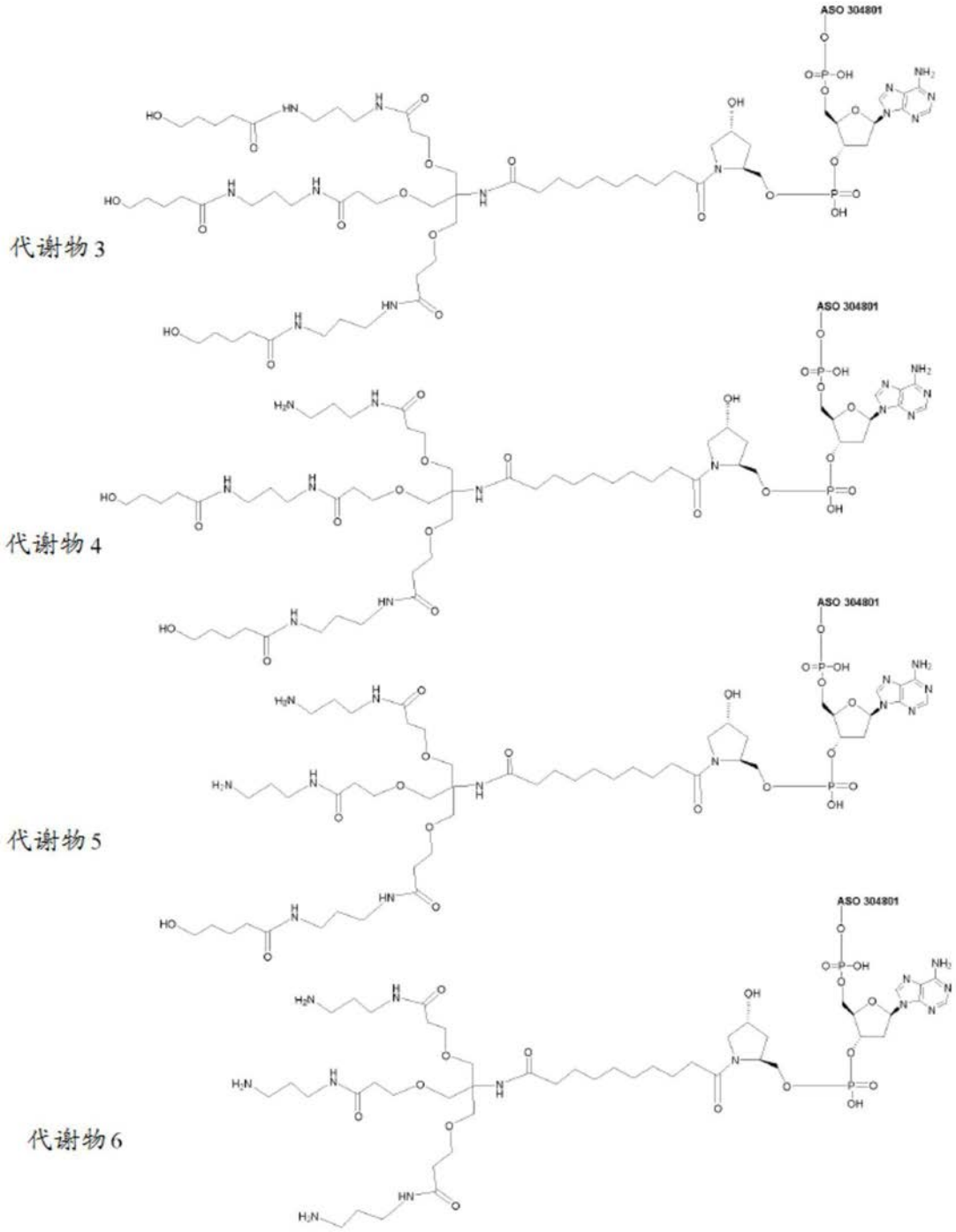
[1052] 所观察到的ISIS 647535的全长代谢物

[1053]

代谢物	ASO	裂解位点	相对%
1	ISIS 304801	A	36.1
2	ISIS 304801 + dA	B	10.5
3	ISIS 647535 减[3 GalNAc]	C	16.1
4	ISIS 647535 减 [3 GalNAc + 1 5-羟基-戊酸系链]	D	17.6
5	ISIS 647535 减 [2 GalNAc + 2 5-羟基-戊酸系链]	D	9.9
6	ISIS 647535 减 [3 GalNAc + 3 5-羟基-戊酸系链]	D	9.8

[1054]


裂解位点
ASO 304801
裂解位点A
裂解位点B
裂解位点C
裂解位点D
裂解位点C
裂解位点D
裂解位点C
裂解位点D
代谢物1
ASO 304801
OH
代谢物2
ASO 304801



[1055]

[1056] 实施例21:单一施用研究中人ApoC III转基因小鼠中的人ApoC III的反义抑制

[1057] 在单一施用研究中,针对其抑制人ApoC III转基因小鼠中的人ApoC III的能力,对各自靶向人ApoC III并且描述于表17中的ISIS 304801、647535和647536进行进一步评价。

[1058] 处理

[1059] 将人ApoCIII转基因小鼠维持在12小时亮/暗循环中并且随意喂食Teklad实验室食物。在开始实验之前,使动物在研究设备中适应至少7天。在PBS中制备ASO并且通过过滤通过0.2微米过滤器进行灭菌。将ASO溶解于0.9%PBS中用于注射。

[1060] 在以下示出的剂量下,用ISIS 304801、647535或647536(以上所述)或用PBS处理

的对照腹膜内注射人ApoC III转基因小鼠一次。处理组由3只动物组成并且对照组由4只动物组成。在处理之前以及在最后一次剂量之后，从每只小鼠中抽血并且分析血浆样品。在最后施用之后72小时将小鼠处死。

[1061] 收集样品并且分析以测定肝脏中的ApoC III mRNA和蛋白质水平；血浆甘油三酯；以及胆固醇，包括如上所述(实施例20)评估的HDL和LDL级分。来自那些分析的数据呈现于以下表24-28中。使用标准方案，相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。ALT和AST水平显示反义化合物在所有施用的剂量下为耐受良好的。

[1062] 这些结果显示了与缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 304801)相比，在3'末端包含$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 647535和647536)的效力的改进。此外，包含$GalNAc_3$-1缀合物和一些磷酸二酯键联的ISIS 647536与ISIS 647535一样有效，所述ISIS 647535包含相同的缀合物并且ASO内的所有核苷间键联为硫代磷酸酯。

[1063] 表24

[1064] ASO处理对人ApoC III转基因小鼠中ApoC III mRNA水平的影响

[1065]

ASO	剂量 (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13.2	无	PS/20	2248
	3	92				
	10	71				
	30	40				

[1066]

ISIS 647535	0.3	98	1.9	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.7	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	2249
	1	60				
	3	31				
	10	21				

[1067] 表25

[1068] ASO处理对人ApoC III转基因小鼠中ApoC III血浆蛋白水平的影响

[1069]

ASO	剂量 (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23.2	无	PS/20	2248
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	2.1	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.8	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	2249
	1	60				
	3	31				
	10	21				

[1070] 表26

[1071] ASO处理对转基因小鼠中甘油三酯水平的影响

[1072]

ASO	剂量 (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29.1	无	PS/20	2248
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS	0.3	100	2.2	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249

[1073]

647535	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0.3	95	1.9	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	2249
	1	66				
	3	31				
	10	23				

[1074] 表27

[1075] ASO处理对转基因小鼠中总胆固醇水平的影响

[1076]

ASO	剂量 (mg/kg)	% PBS	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	无	PS/20	2248
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0.3	93	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	2249
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0.3	115	**GalNAc$_3$-1**	PS/PO/20	2249
	1	79			
	3	51			
	10	54			

[1077] 表28

[1078] ASO处理对转基因小鼠中HDL和LDL胆固醇水平的影响

[1079]

ASO	剂量 (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	无	PS/20	2248
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0.3	98	86	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	2249
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			

[1080]

ISIS 647536	0.3	143	89	**GalNAc$_3$-1**	PS/PO/20	2249
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

[1081] 这些结果证实GalNAc$_3$-1缀合物改进了反义化合物的效力。结果还显示了其中反义寡核苷酸具有混合的键联的GalNAc$_3$-1缀合反义化合物(具有六个磷酸二酯键联的ISIS 647536)和相同反义化合物的全部硫代磷酸酯型式(ISIS 647535)的相等效力。

[1082] 硫代磷酸酯键联为反义化合物提供若干性质。例如,它们抗核酸酶消化并且它们结合导致化合物在肝脏中积累而不是在肾/尿液中积累的蛋白质。这些为希望的性质,特别是当治疗肝脏中的适应症时。然而,硫代磷酸酯键联还与炎症性应答相关。因此,减少化合物中硫代磷酸酯键联的数目预期会减小炎症的风险,但是也降低化合物在肝脏中的浓度,增加在肾和尿液中的浓度,减小在核酸酶存在下的稳定性并且降低总体效力。本结果显示其中某些硫代磷酸酯键联已被磷酸二酯键联替代的GalNAc$_3$-1缀合反义化合物与具有全部

硫代磷酸酯键联的对应物在对抗肝脏中的靶标方面一样有效。所述化合物预期为促炎性较少的(参见实施例24,其描述了显示PS的减少导致炎症性作用减小的实验)。

[1083] 实施例22:靶向SRB-1的$GalNAc_3$-1缀合的修饰ASO在体内的作用

[1084] 在剂量依赖性研究中,针对其抑制Balb/c小鼠中的SRB-1的能力,对各自靶向SRB-1并且描述于表17中的ISIS 440762和651900进行评价。

[1085] 处理

[1086] 在以下示出的剂量下,用ISIS 440762、651900或用PBS处理的对照皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后48小时将小鼠处死以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。在归一化为PBS处理的对照之前,测定相对于总RNA的SRB-1 mRNA水平(使用Ribogreen)。以下结果以归一化为PBS处理的对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现并且表示为"% PBS"。

[1087] 如表29中所说明的,这两种反义化合物使SRB-1 mRNA水平降低。此外,包含$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 651900)大致上比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物(ISIS 440762)更有效。这些结果展示使用与不同靶标互补并且具有不同化学修饰核苷的反义寡核苷酸观察到$GalNAc_3$-1缀合物的效力益处,在这种情况下,修饰核苷包含约束乙基糖部分(双环糖部分)。

[1088] 表29

[1089] ASO处理对Balb/c小鼠中SRB-1 mRNA水平的影响

[1090]

ASO	剂量 (mg/kg)	肝 % PBS	ED_{50} (mg/kg)	3'缀合物		核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0.7	85	2.2	无		PS/14	2250
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0.07	98	0.3	**$GalNAc_3$-1**		PS/14	2251
	0.2	63					
	0.7	20					
	2	6					
	7	5					

[1091] 实施例23:人外周血单核细胞(hPBMC)测定方案

[1092] 使用BD Vautainer CPT管法进行hPBMC测定。从在美国健康工作诊所(Faraday&El Camino Real,Carlsbad)具有知情同意书的志愿供体中获得全血样品并且收集在4-15个BD Vacutainer CPT 8ml管中(VWR Cat.#BD362753)。使用PBMC测定数据表记录每个供体的CPT管中的大约起始总全血体积。

[1093] 通过将管轻轻倒置8-10次在离心之前立即重新混合血液样品。将CPT管在具有制动的1500-1800RCF(2700RPM Beckman Allegra 6R)下、在水平(摆动)转子中在室温(18-25℃)下离心30min。从血沉棕黄层界面(在Ficoll与聚合物凝胶层之间)取回细胞;转移至无

菌50ml圆锥管并且汇集至5个CPT管/50ml圆锥管/供体。然后用PBS(无Ca^{++}、Mg^{++};GIBCO)洗涤细胞两次。将管加满至50ml并且通过倒置若干次来混合。然后将样品在室温下在330x g下(在Beckman Allegra 6R中的1215RPM)离心15分钟并且在不干扰沉淀物的情况下尽可能多的抽吸上清液。通过轻轻旋转管使细胞沉淀物脱落并且将细胞重新悬浮在RPMI+10%FBS+青霉素/链霉素(大约1ml/10ml起始全血体积)中。将60μl样品用移液管移入到具有600μl VersaLyse试剂(Beckman Coulter Cat#A09777)的样品小瓶(Beckman Coulter)中并且轻轻涡旋10-15秒。将样品在室温下孵育10min并且在计数之前再次混合。使用PBMC细胞类型(1:11的稀释因子与其他参数一起存储)在Vicell XR细胞活力分析仪(Beckman Coulter)上计数细胞悬浮液。记录活细胞/ml和活力。在RPMI+10%FBS+青霉素/链霉素中将细胞悬浮液稀释至$1x10^7$活PBMC/ml。

[1094] 将细胞以$5x10^5$涂布在50μl/孔的96孔组织培养平板(Falcon Microtest)中。根据实验模板(总共100μl/孔)添加50μl/孔的稀释在RPMI+10%FBS+青霉素/链霉素中的2x浓度寡核苷酸/对照。将平板放置在振荡器上并且允许混合约1min。在37℃、5%CO_2下孵育24小时之后,将平板在400x g下离心10分钟,之后去除上清液用于MSD细胞因子测定(即人IL-6、IL-10、IL-8以及MCP-1)。

[1095] 实施例24:在hPBMC测定中评价$GalNAc_3$-1缀合ASO的促炎性作用

[1096] 使用实施例23中描述的方案,在hPBMC测定中评价列于表30中的反义寡核苷酸(ASO)的促炎性作用。ISIS 353512为已知为测定中的IL-6释放的高响应者的内标物。从新鲜志愿供体中分离hPBMC并且用0μM、0.0128μM、0.064μM、0.32μM、1.6μM、8μM、40μM和200μM浓度下的ASO处理。在24小时处理之后,测量细胞因子水平。

[1097] IL-6的水平用作原始读出。使用标准工序计算EC_{50}和E_{max}。结果表达为来自两个供体的E_{max}/EC_{50}的平均比率并且表示为"E_{max}/EC_{50}"。较低的比率表明促炎性反应相对减小并且较高的比率表明促炎性反应相对增加。

[1098] 对于测试化合物,促炎性最小的化合物为PS/PO连接的ASO(ISIS 616468)。$GalNAc_3$-1缀合ASO(ISIS 647535)比其未缀合的对应物ISIS 304801的促炎性稍小。这些结果表明掺入一些PO键联使促炎性反应减小并且添加$GalNAc_3$-1缀合物并不使化合物更具有促炎性并且可能减小促炎性反应。因此,人们将预期包含混合的PS/PO键联和$GalNAc_3$-1缀合物的反义化合物将相对于具有或不具有$GalNAc_3$-1缀合物的全部PS连接的反义化合物产生较低的促炎性反应。这些结果表明$GalNAc_3$-1缀合反义化合物(尤其是具有减小的PS含量的那些)为促炎性较小的。

[1099] 总之,这些结果表明$GalNAc_3$-1缀合化合物(尤其是具有减小的PS含量的缀合化合物)可在比缺乏$GalNAc_3$-1缀合物的对应全部PS反义化合物更高的剂量下施用。因为不预期这些化合物的半衰期是大致上不同的,所以所述较高施用将导致较不频繁的给药。事实上,所述施用可为甚至更不频繁的,因为$GalNAc_3$-1缀合化合物为更有效的(参见实施例20-22)并且一旦化合物的浓度下降到低于所需要的水平,重新给药是必要的,其中所述需要的水平基于效力。

[1100] 表30

[1101] 修饰ASO

[1102]

ASO	序列(5'至3')	靶标	SEQ ID No.
ISIS 104838	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	TNFα	2252
ISIS 353512	$T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}G_{es}G_{e}$	CRP	2253
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	2248
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	ApoC III	2249
ISIS 616468	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	2248

[1103] 下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"k"指示6'-(S)-CH_3双环核苷(例如cEt);"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。上标"m"指示5-甲基胞嘧啶。"$A_{do'}$-$GalNAc_3$-1_a"指示所指的具有连接至反义寡核苷酸的3'-末端的在实施例9中示出的结构$GalNAc_3$-1的缀合物。

[1104] 表31

[1105] 靶向ApoC III的ASO在hPBMC测定中的促炎性作用

[1106]

ASO	EC_{50} (μM)	E_{max} (μM)	E_{max}/EC_{50}	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
ISIS 353512 (高响应者)	0.01	265.9	26,590	无	PS/20	2253
ISIS 304801	0.07	106.55	1,522	无	PS/20	2248
ISIS 647535	0.12	138	1,150	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249
ISIS 616468	0.32	71.52	224	无	PS/PO/20	2248

[1107] 实施例25:靶向人ApoC III的$GalNAc_3$-1缀合的修饰ASO在体外的作用

[1108] 在体外测试以上所述的ISIS 304801和647535。用0.03μM、0.08μM、0.24μM、0.74μM、2.22μM、6.67μM和20μM浓度的修饰寡核苷酸处理密度为25,000个细胞/孔的来自转基因小鼠的原代肝细胞。在大约16小时的处理期后,从细胞中分离RNA并且通过定量实时PCR测量mRNA水平并且如通过RIBOGREEN所测量,根据总RNA含量调节hApoC III mRNA水平。

[1109] 使用标准方法计算IC_{50}并且结果呈现于表32中。如所说明的,与对照ISIS 304801相比,在用ISIS 647535处理的细胞中观察到可比的效力。

[1110] 表32

[1111] 靶向原代肝细胞中的人ApoC III的修饰ASO

[1112]

ASO	IC_{50} (μM)	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
ISIS 304801	0.44	无	PS/20	2248
ISIS 647535	0.31	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	2249

[1113] 在本实验中,在体外没有观察到在体内所观察到的$GalNAc_3$-1缀合的极大效力益

处。随后体外的在原代肝细胞中的自由摄取实验确实显示了包含各种GalNAc缀合物的寡核苷酸相对于缺乏GalNAc缀合物的寡核苷酸的效力增加。(参见实施例60、82以及92)

[1114] 实施例26:PO/PS键联对ApoC III ASO活性的影响

[1115] 每周一次以25mg/kg的ISIS 304801或ISIS 616468(上述两者)或用PBS处理的对照腹膜内注射人ApoC III转基因小鼠,持续两周。处理组由3只动物组成并且对照组由4只动物组成。在处理之前以及在最后一次剂量之后,从每只小鼠中抽血并且分析血浆样品。在最后施用之后72小时将小鼠处死。

[1116] 如上所述收集样品并且分析以测定肝脏中的ApoC III蛋白水平(实施例20)。来自那些分析的数据呈现于以下表33中。

[1117] 这些结果表明相对于全部PS(ISIS 304801),在翼中具有PO/PS的反义化合物(ISIS 616468)效力减小。

[1118] 表33

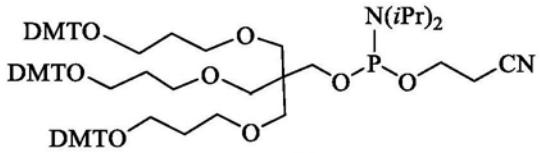
[1119] ASO处理对人ApoC III转基因小鼠中ApoC III蛋白水平的影响

[1120]

ASO	剂量 (mg/kg)	% PBS	3'缀合物	核苷间键联/长度	SEQ ID No.
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 mg/kg/周保持2周	24	无	全部 PS	2248
ISIS 616468	25 mg/kg/周保持2周	40	无	14 PS/6 PO	2248

[1121] 实施例27:化合物56

[1122]

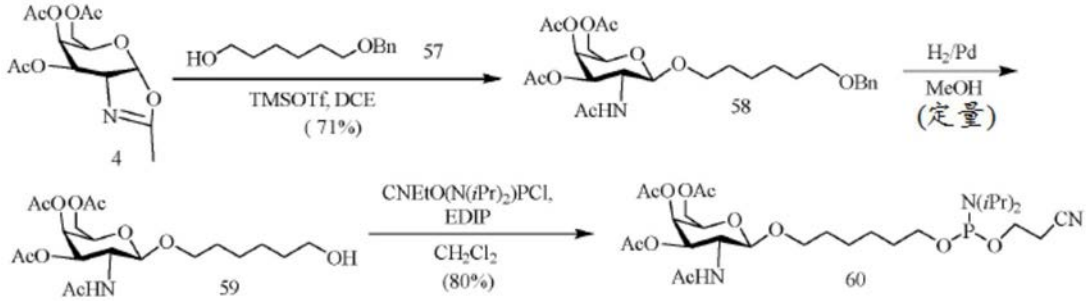


56

[1123] 化合物56可从Glen Research商业上获得或可根据由Shchepinov等,Nucleic Acids Research,1997,25(22),4447-4454所报道的已公布工序制备。

[1124] 实施例28:制备化合物60

[1125]

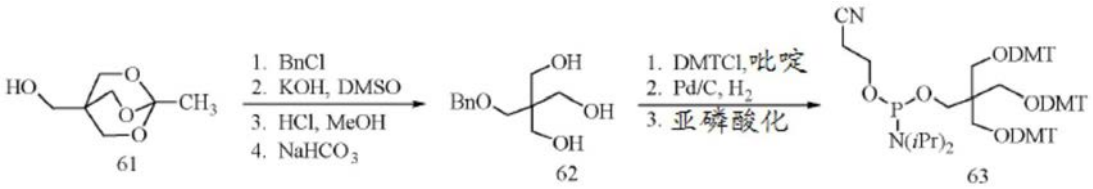


[1126] 根据实施例2中说明的工序制备化合物4。化合物57为商业上可获得的。通过结构分析来证实化合物60。

[1127] 化合物57意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他单保护的取代或未取代的烷基二醇包括但不限于在本文的说明书中呈现的那些来制备具有预先确定的

组成的亚磷酰胺。

[1128] 实施例29:制备化合物63

[1129] 

[1130] 使用类似于由Tober等,Eur.J.Org.Chem.,2013,3,566-577和Jiang等,Tetrahedron,2007,63(19),3982-3988所报道的那些的工序制备化合物61和62。

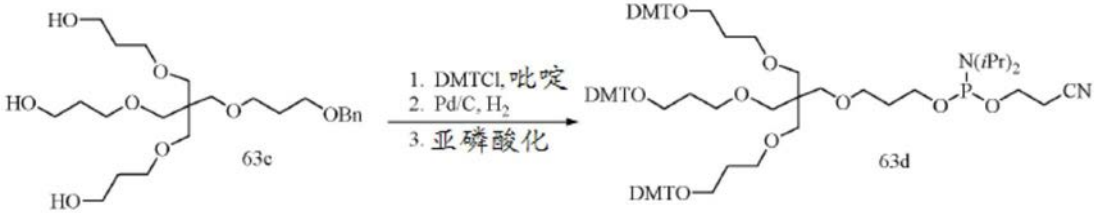
[1131] 或者,使用类似于由Kim等,Synlett,2003,12,1838-1840;和Kim等,已公布的PCT国际申请WO 2004063208的科学和专利文献中所报道的那些的工序制备化合物63。

[1132] 实施例30:制备化合物63b

[1133] 

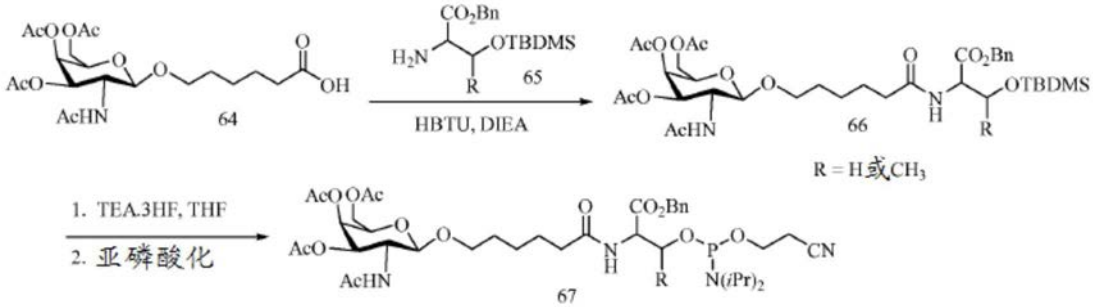
[1134] 使用类似于由Hanessian等,Canadian Journal of Chemistry,1996,74(9),1731-1737所报道的那些的工序制备化合物63a。

[1135] 实施例31:制备化合物63d

[1136] 

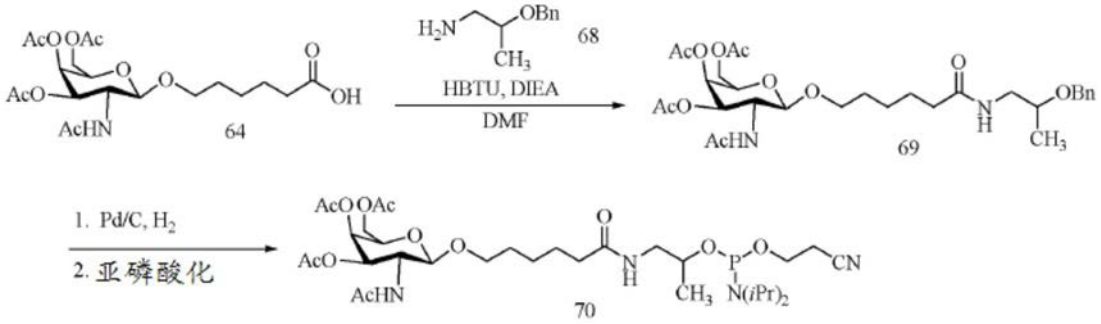
[1137] 使用类似于由Chen等,Chinese Chemical Letters,1998,9(5),451-453所报道的那些的工序制备化合物63c。

[1138] 实施例32:制备化合物67

[1139] 

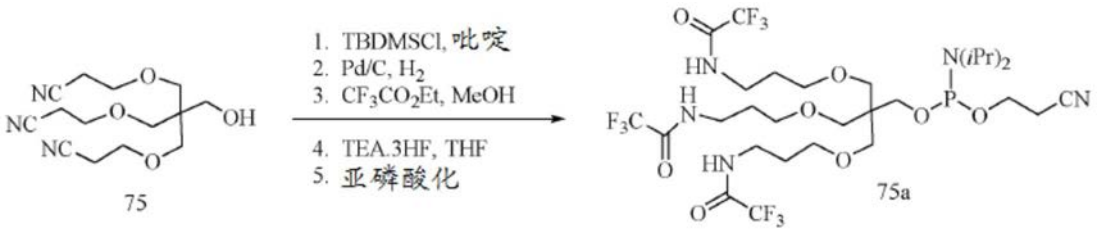
[1140] 根据实施例2中说明的工序制备化合物64。使用类似于由Or等,已公布的PCT国际申请WO 2009003009所报道的那些的工序制备化合物65。用于化合物65的保护基意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他保护基包括但不限于在本文的说明书中呈现的那些。

[1141] 实施例33:制备化合物70

[1142] 

[1143] 根据实施例2中说明的工序制备化合物64。化合物68为商业上可获得的。用于化合物68的保护基意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他保护基包括但不限于在本文的说明书中呈现的那些。

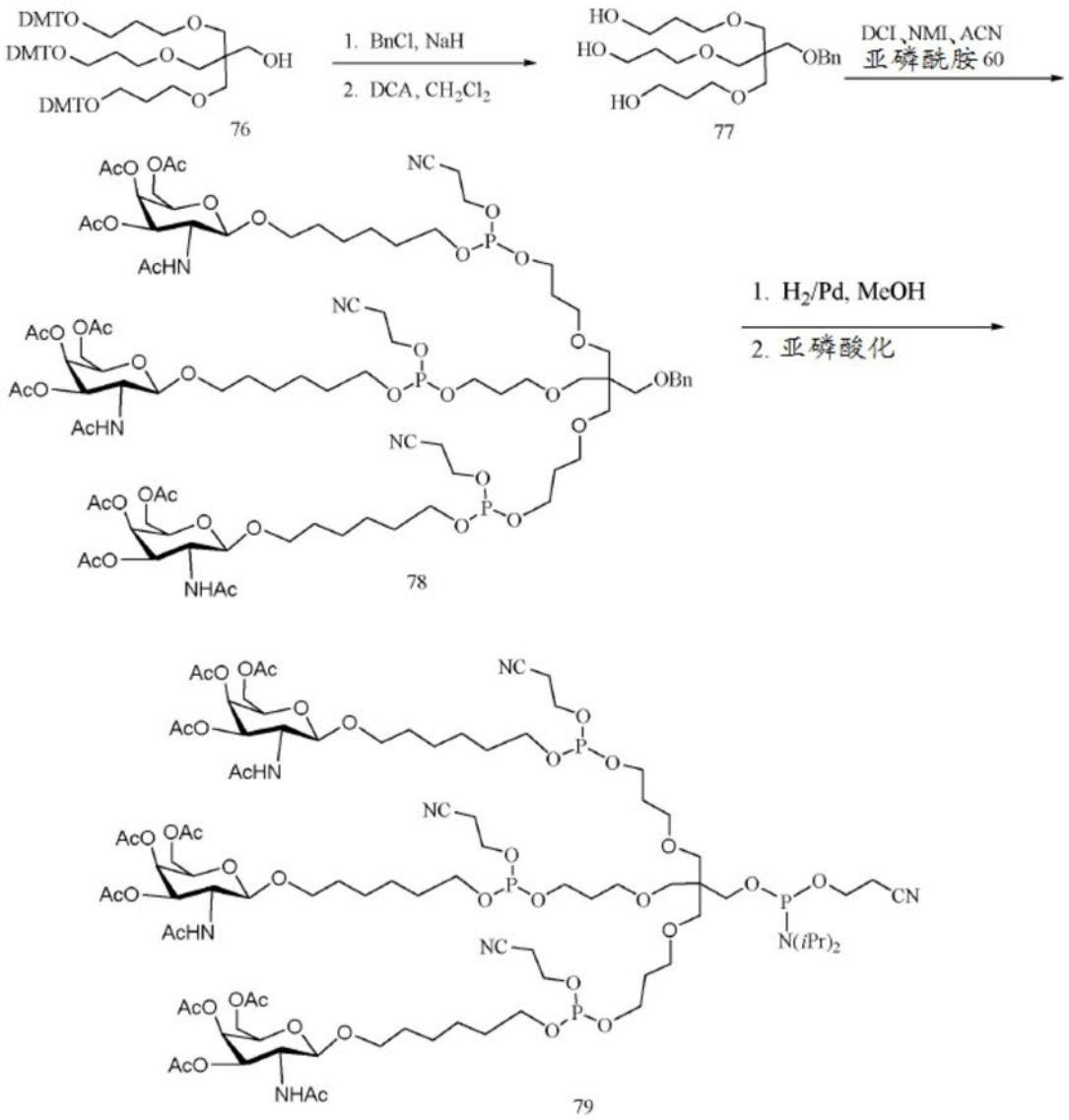
[1144] 实施例34:制备化合物75a

[1145] 

[1146] 根据由Shchepinov等,Nucleic Acids Research,1997,25(22),4447-4454所报道的公布的工序制备化合物75。

[1147] 实施例35:制备化合物79

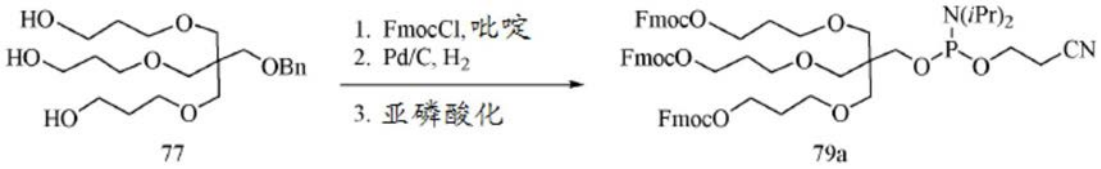
[1148]



[1149] 根据由Shchepinov等,Nucleic Acids Research,1997,25(22),4447-4454所报道的公布的工序制备化合物76。

[1150] 实施例36:制备化合物79a

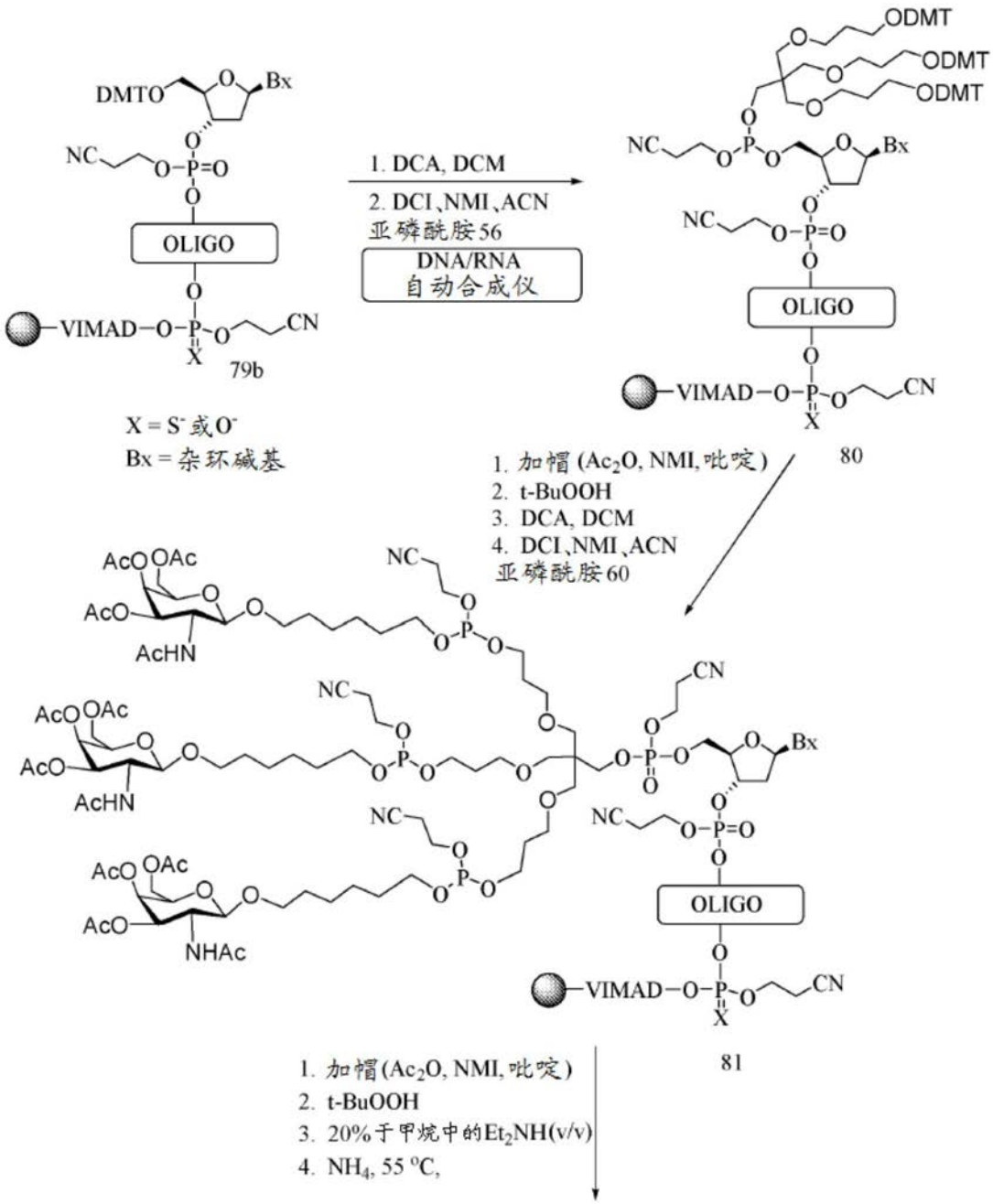
[1151]

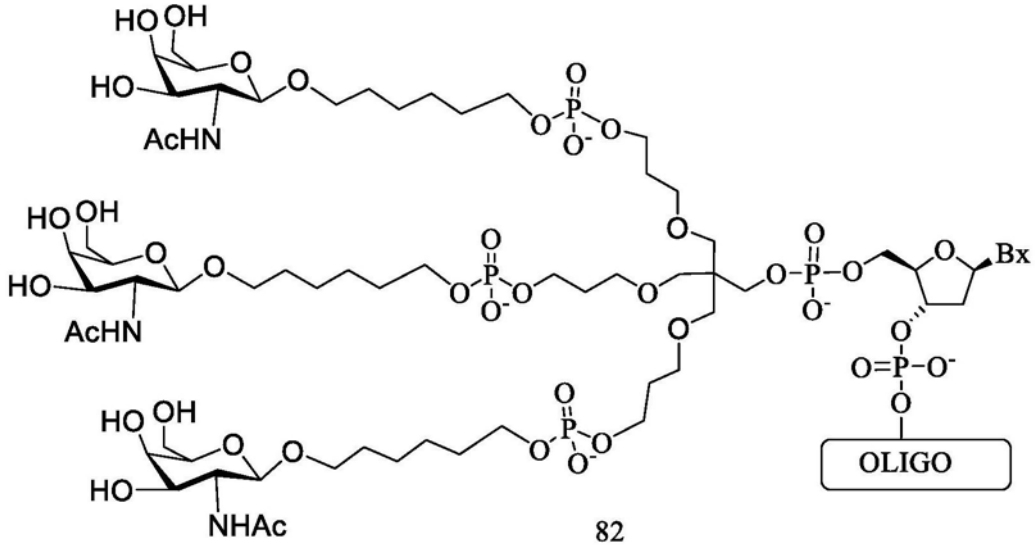


[1152] 根据实施例35中说明的工序制备化合物77。

[1153] 实施例37:用于通过固体载体制备在5'末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的缀合低聚化合物82的一般方法(方法I)

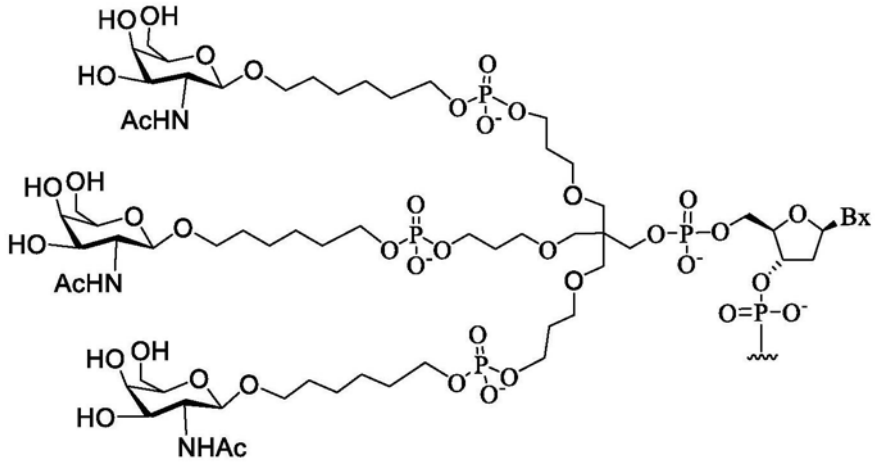
[1154]


DMTO
Bx
NC
O-P=O
OLIGO
VIMAD-O-P-O-CN
X
79b
X = S⁻ 或 O⁻
Bx = 杂环碱基
1. DCA, DCM
2. DCI、NMI、ACN
亚磷酰胺56
DNA/RNA
自动合成仪
ODMT
ODMT
ODMT
80
1. 加帽 (Ac2O, NMI, 吡啶)
2. t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI、NMI、ACN
亚磷酰胺60
AcO
OAc
AcHN
NHAc
81
1. 加帽(Ac2O, NMI, 吡啶)
2. t-BuOOH
3. 20%于甲烷中的Et2NH(v/v)
4. NH4, 55 °C,

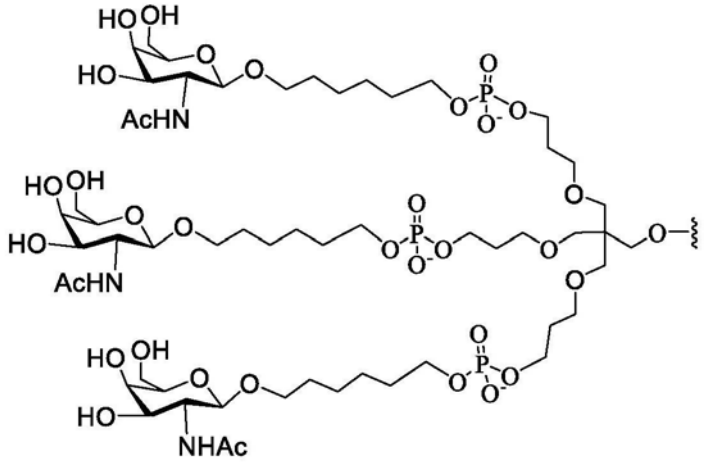
[1155] 

82

[1156] 其中GalNAc$_3$-2具有以下结构：

[1157] 

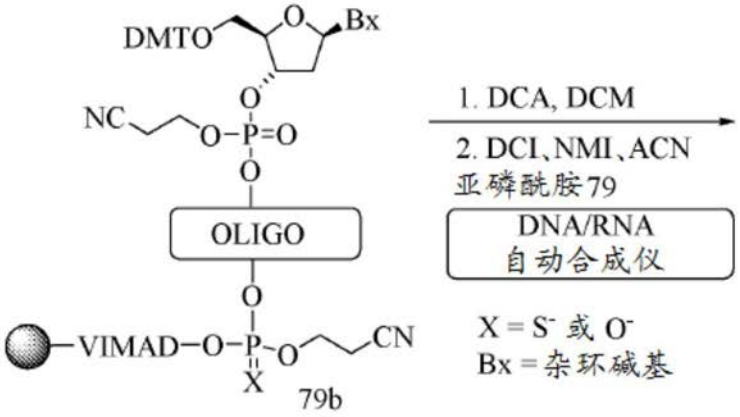
[1158] 缀合物基团GalNAc$_3$-2的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-2$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。其中GalNAc$_3$-2$_a$具有下式：

[1159] 

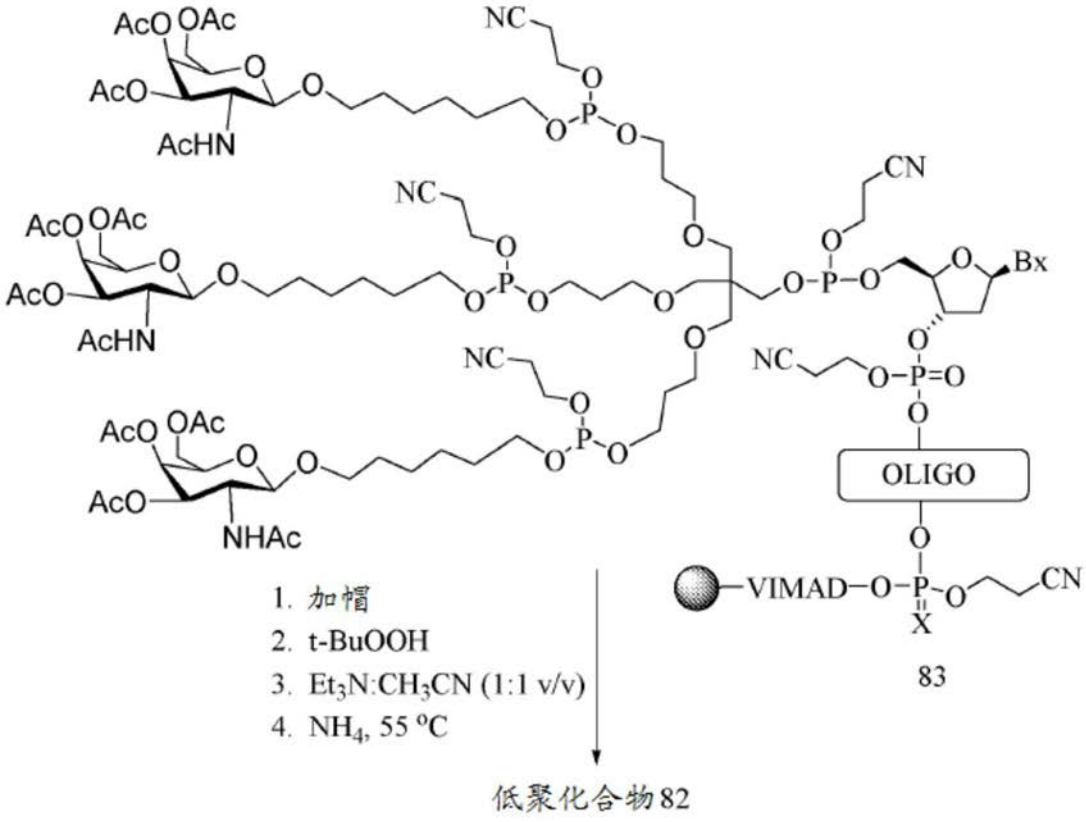
[1160] 使用用于自动化DNA/RNA合成的标准工序制备VIMAD结合的低聚化合物79b(参见Dupouy等,Angew.Chem.Int.Ed.,2006,45,3623-3627)。分别根据实施例27和28中说明的工序制备亚磷酰胺化合物56和60。所说明的亚磷酰胺意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他亚磷酰胺结构单元包括但不限于在本文的说明书中呈现的那些来制备

在5’末端具有磷酸二酯连接的缀合物基团的低聚化合物。可调节添加至固体载体的亚磷酰胺的顺序和量来制备具有任何预先确定的序列和组成的如本文所述的低聚化合物。

[1161] 实施例38：用于制备在5’末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的低聚化合物82的替代方法(方法II)



[1162]

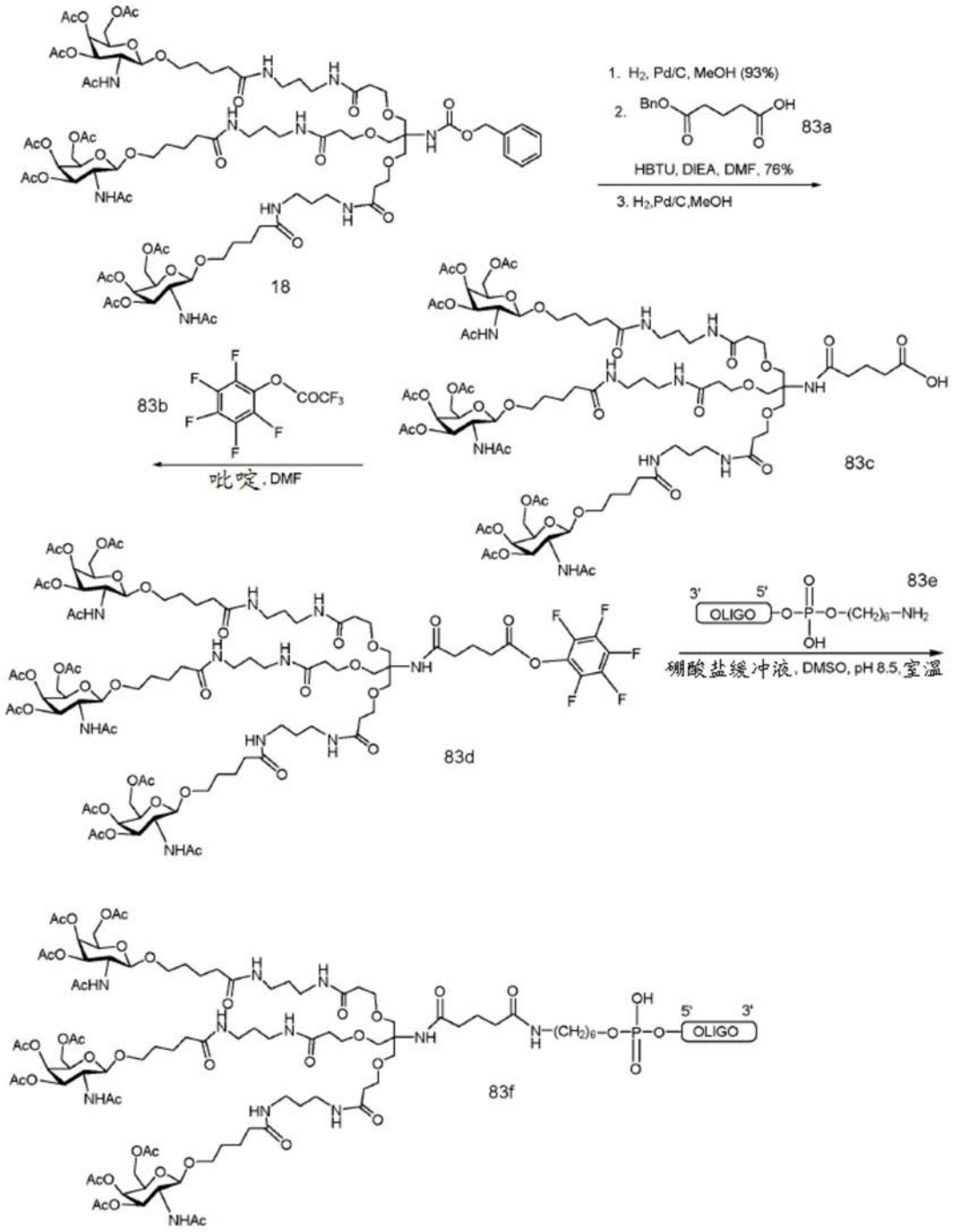


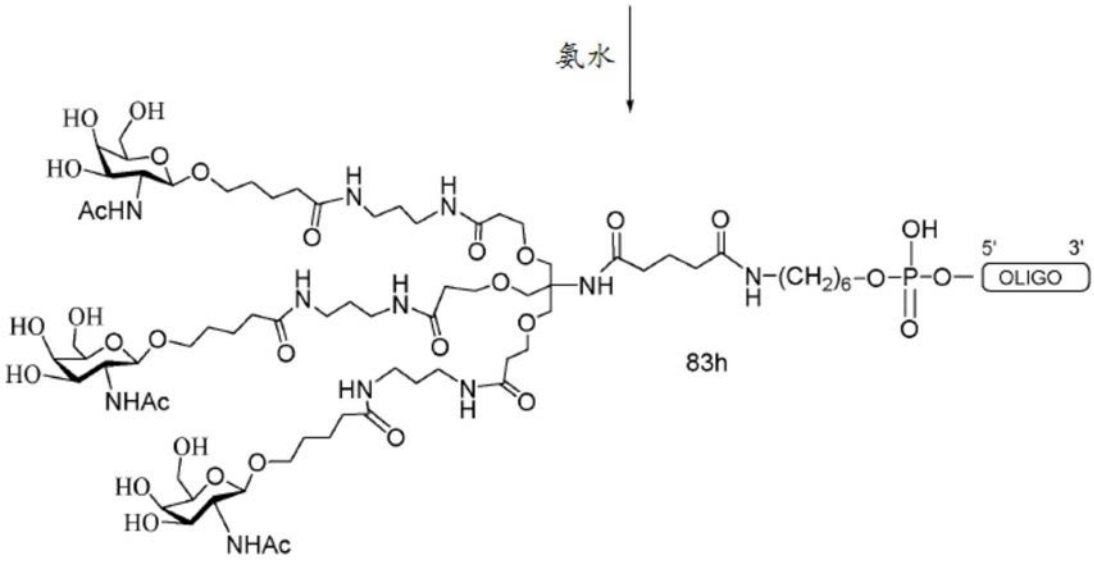
[1163] 使用用于自动化DNA/RNA合成的标准工序制备VIMAD结合的低聚化合物79b(参见Dupouy等，Angew.Chem.Int.Ed.，2006，45，3623-3627)。根据实施例35中说明的工序制备$GalNAc_3$-2聚簇亚磷酰胺，即化合物79。此替代方法允许在合成的最后一步将磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物一步装至低聚化合物。所说明的亚磷酰胺意在为代表性的并且不意图为限制性的，因为可使用其他亚磷酰胺结构单元包括但不限于在本文的说明书中呈现的那些来制备在5’末端具有磷酸二酯缀合物的低聚化合物。可调节添加至固体载体的亚磷酰胺的顺序和量来制备具有任何预先确定的序列和组成的如本文所述的低聚化合物。

[1164] 实施例39：用于通过固体载体制备在5’末端包含$GalNAc_3$-3缀合物的低聚化合物

83h(针对5'末端连接修饰的GalNAc3-1)的一般方法

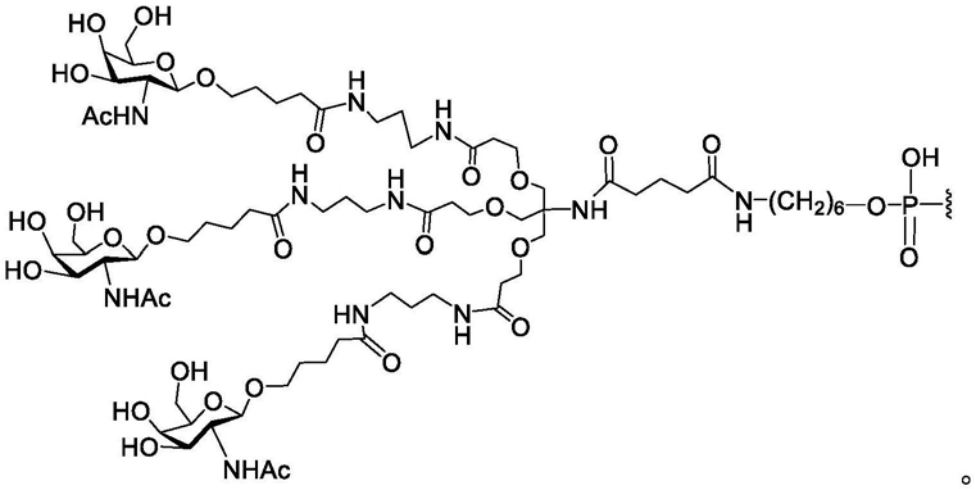
[1165]



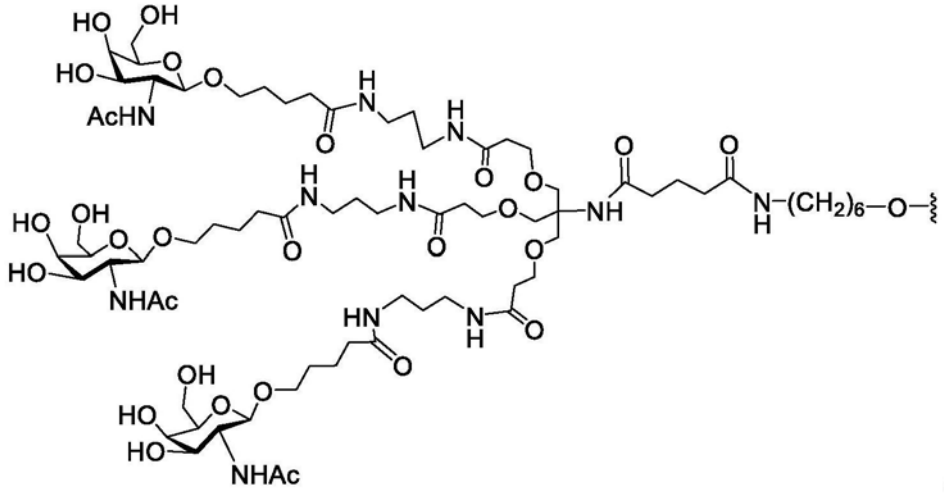
[1166] 

[1167] 根据实施例4中说明的工序制备化合物18。化合物83a和83b为商业上可获得的。使用标准寡核苷酸合成工序制备包含磷酸二酯连接的己胺的低聚化合物83e。用氨水处理受保护的低聚化合物提供5'-GalNAc$_3$-3缀合的低聚化合物(83h)。

[1168] 其中GalNAc$_3$-3具有以下结构：

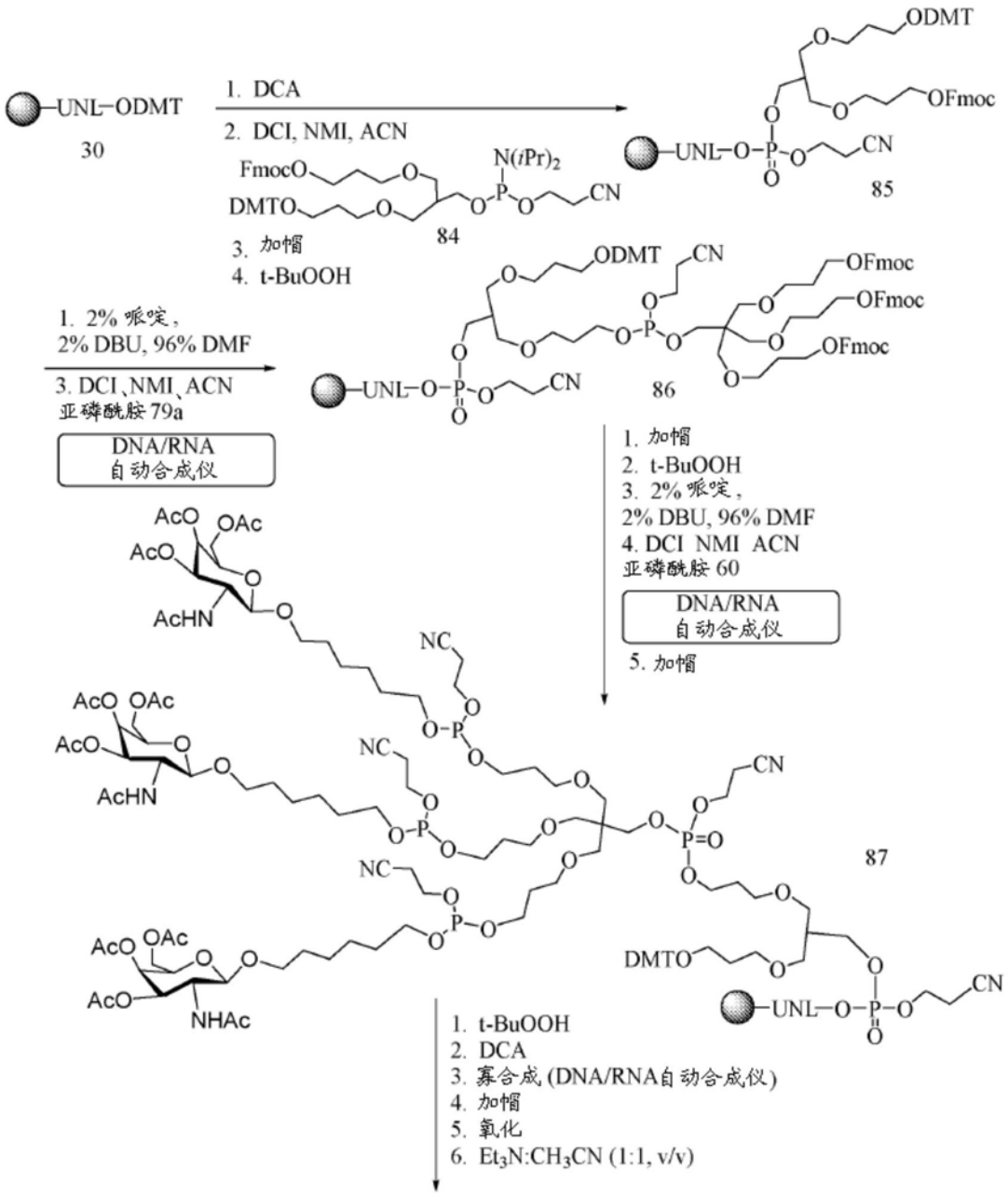
[1169] 

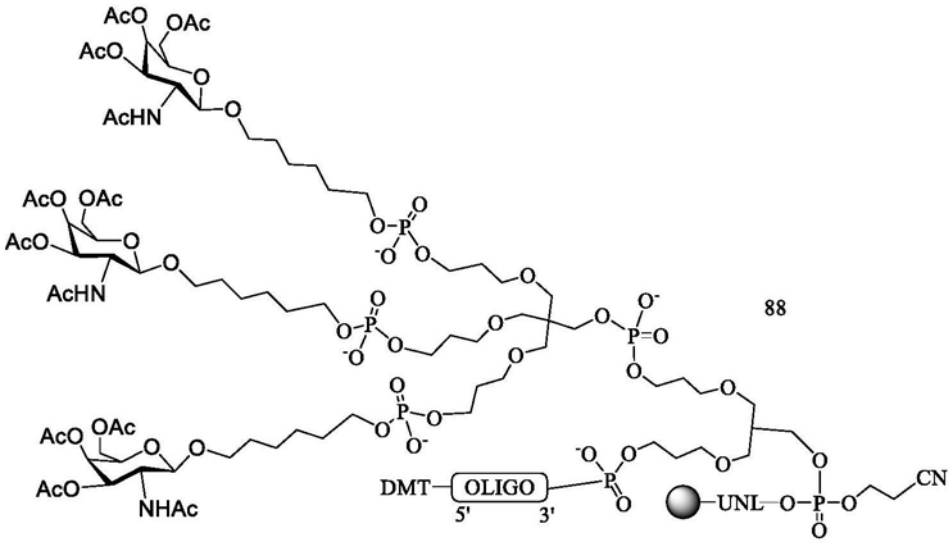
[1170] 缀合物基团GalNAc$_3$-3的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-3$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。其中GalNAc$_3$-3$_a$具有下式：

[1171] 

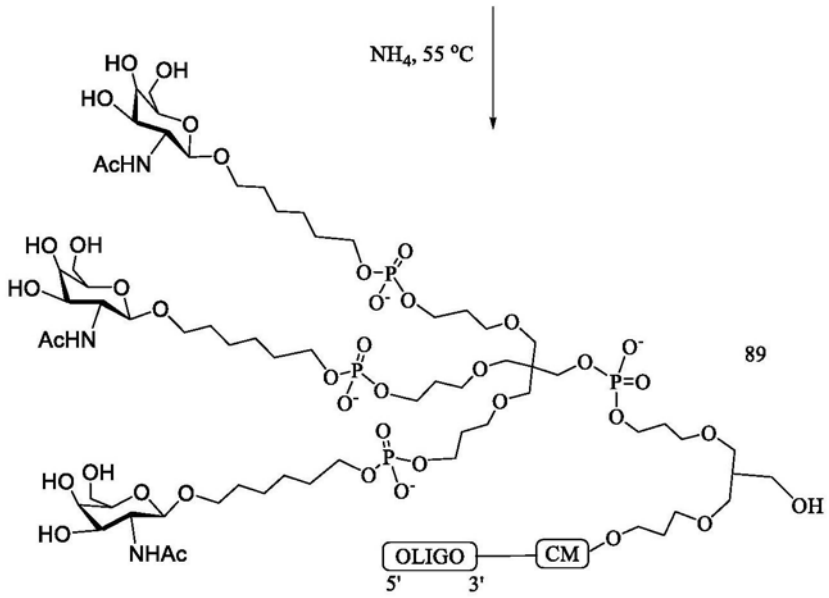
[1172] 实施例40:用于通过固体载体制备在3'末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-4缀合物的低聚化合物89的一般方法

[1173]

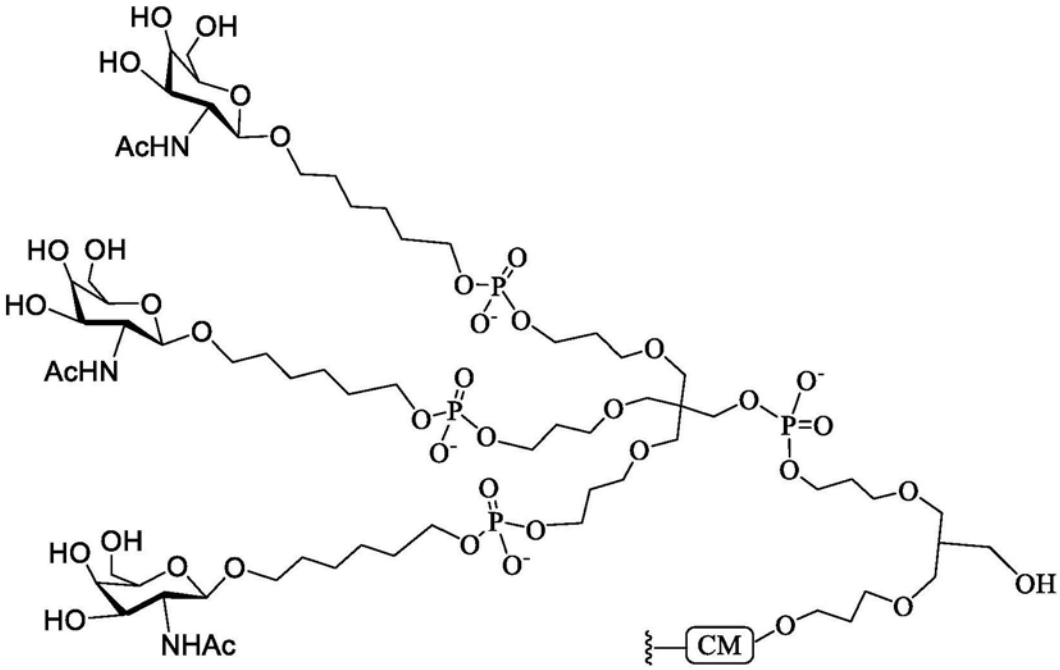

UNL–ODMT
30
1. DCA
2. DCI, NMI, ACN
FmocO
DMTO
N(iPr)2
CN
84
3. 加帽
4. t-BuOOH
ODMT
OFmoc
UNL–O–P–O–CN
85
1. 2% 哌啶,
2% DBU, 96% DMF
3. DCI、NMI、ACN
亚磷酰胺 79a
DNA/RNA
自动合成仪
86
1. 加帽
2. t-BuOOH
3. 2% 哌啶,
2% DBU, 96% DMF
4. DCI NMI ACN
亚磷酰胺 60
DNA/RNA
自动合成仪
5. 加帽
AcO
OAc
AcHN
NC
P=O
87
DMTO
NHAc
1. t-BuOOH
2. DCA
3. 寡合成 (DNA/RNA自动合成仪)
4. 加帽
5. 氧化
6. Et3N:CH3CN (1:1, v/v)



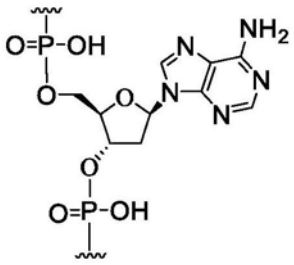
[1174]



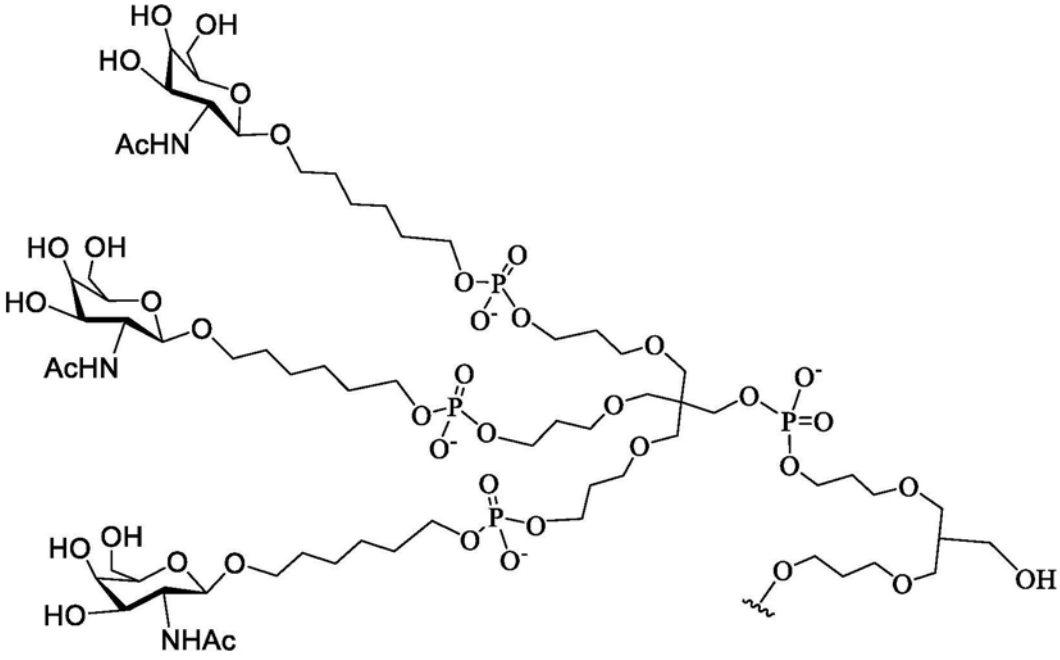
[1175] 其中GalNAc3-4具有以下结构：

[1176] 

[1177] 其中CM为可裂解部分。在某些实施方案中,可裂解部分为:

[1178] 

[1179] 缀合物基团GalNAc$_3$-4的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-4$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。其中GalNAc$_3$-4$_a$具有下式:

[1180] 

[1181] 受保护的Unylinker官能团化的固体载体化合物30为商业上可获得的。使用类似于文献中所报道的那些的工序制备化合物84(参见Shchepinov等,Nucleic Acids

Research,1997,25(22),4447-4454;Shchepinov等,Nucleic Acids Research,1999,27,3035-3041;以及Hornet等,Nucleic Acids Research,1997,25,4842-4849)。

[1182] 根据实施例28和36中说明的工序制备亚磷酰胺结构单元,即化合物60和79a。所说明的亚磷酰胺意在为代表性的并且不意图为限制性的,因为可使用其他亚磷酰胺结构单元来制备具有预先确定的序列和组成的在3'末端具有磷酸二酯连接的缀合物的低聚化合物。可调节添加至固体载体的亚磷酰胺的顺序和量来制备具有任何预先确定的序列和组成的如本文所述的低聚化合物。

[1183] 实施例41:用于通过固相技术制备在5'位上包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2(参见实施例37,Bx为腺嘌呤)缀合物的ASO的一般方法(ISIS 661134的制备)

[1184] 除非另外说明,否则用于合成低聚化合物的所有试剂和溶液均购自商业来源。使用标准亚磷酰胺结构单元和固体载体来掺入核苷残基,所述核苷残基包括例如T、A、G以及^{m}C残基。使用亚磷酰胺化合物56和60来合成5'末端处的磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物。0.1M的亚磷酰胺在无水乙腈中的溶液用于β-D-2'-脱氧核糖核苷和2'-MOE。

[1185] 在ABI 394合成器(1-2μmol规模)上或在GE Healthcare Bioscience ÄKTA oligopilot合成器(40-200μmol规模)上通过填充在柱中的VIMAD固体载体(110μmol/g,Guzaev等,2003)上的亚磷酰胺偶联方法来进行ASO合成。对于偶联步骤,以超过固体载体的初始负载量4倍的量递送亚磷酰胺并且持续10min进行亚磷酰胺偶联。所有其他步骤遵循由生厂商供应的标准协议。使用6%二氯乙酸在甲苯中的溶液来从核苷酸的5'-羟基上去除二甲氧基三苯甲基(DMT)。无水CH_3CN中的4,5-二氰基咪唑(0.7M)用作偶联步骤过程中的活化剂。通过用苍耳烷氢化物在1:1吡啶/CH_3CN中的0.1M溶液硫化3分钟的接触时间来引入硫代磷酸酯键联。使用20%叔丁基过氧化氢在含有6%水的CH_3CN中的溶液作为氧化剂来提供磷酸二酯核苷间键联,其中接触时间为12分钟。

[1186] 在装配希望的序列之后,使用20%甲苯中的二乙胺(v/v)将磷酸氰基乙酯保护基去保护,其中接触时间为45分钟。将固体载体结合的ASO悬浮在氨水(28-30重量%)中并且在55℃下加热6h。

[1187] 然后过滤未结合的ASO并且将氨煮沸掉。将残余物通过高压液相色谱在强阴离子交换柱上纯化(GE Healthcare Bioscience,Source 30Q,30μm,2.54x8cm,A=100mM于30%CH_3CN水溶液中的醋酸铵,B=1.5M于A中的NaBr,0-40%的B持续60min,流速14mL min-1,λ=260nm)。残余物通过HPLC在反相柱上脱盐以得到基于固体载体上的初始负载量为15%-30%的分离产率的希望的ASO。使用Agilent 1100MSD系统通过离子对HPLC偶联的MS分析来表征ASO。

[1188] 表34

[1189] 靶向SRB-1的在5'位上包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的ASO

[1190]

ISIS No.	序列(5'至3')	计算质量	观察到的质量	SEQ ID No.
661134	**$GalNAc_3$-$2_{a-o'}$$A_{do}$**$T_{ks}$$^{m}C_{ks}$$A_{ds}$$G_{ds}$$T_{ds}$$^{m}C_{ds}$$A_{ds}$$T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}$$^{m}C_{ds}$$T_{ds}$$T_{ks}$$^{m}C_{k}$	6482.2	6481.6	2254

[1191] 下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"k"指示6'-(S)-

CH_3双环核苷(例如cEt);“s”指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);“o”指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且“o’”指示-O-P(=O)(OH)-。上标“m”指示5-甲基胞嘧啶。“$GalNAc_3$-2_a”的结构在实施例37中示出。

[1192] 实施例42:用于通过固相技术制备在5’位上包含$GalNAc_3$-3缀合物的ASO的一般方法(ISIS 661166的制备)

[1193] 使用如实施例39和41中所说明的类似工序进行ISIS 661166的合成。

[1194] ISIS 661166为5-10-5MOE缺口聚物,其中5’位包含$GalNAc_3$-3缀合物。使用Agilent 1100MSD系统通过离子对HPLC偶联的MS分析来表征ASO。

[1195] 表34a

[1196] 靶向Malat-1的通过己基氨基磷酸二酯键联在5’位上包含$GalNAc_3$-3缀合物的ASO

[1197]

ISIS No.	序列(5’至3’)	缀合物	计算质量	观察到的质量	SEQ ID No.
661166	**5’-GalNAc$_3$-3$_{a-o}$-**^{m}C$_{es}$G$_{es}$G$_{es}$T$_{es}$G$_{es}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$ G$_{es}$A$_{es}$A$_{es}$ T$_{es}$T$_e$	**5’-GalNAc$_3$-3**	8992.16	8990.51	2255

[1198] 下标:“e”指示2’-MOE修饰核苷;“d”指示β-D-2’-脱氧核糖核苷;“s”指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);“o”指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且“o’”指示-O-P(=O)(OH)-。上标“m”指示5-甲基胞嘧啶。“5’-$GalNAc_3$-3a”的结构在实施例39中示出。

[1199] 实施例43:靶向SRB-1的5’末端处的磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2(参见实施例37和41,Bx为腺嘌呤)的体内剂量依赖性研究

[1200] 在剂量依赖性研究中,测试在5’末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的ISIS 661134(参见实施例41)对小鼠中SRB-1的反义抑制。未缀合的ISIS 440762和651900(3’末端处的$GalNAc_3$-1缀合物,参见实施例9)包括在研究中用于比较并且先前描述于表17中。

[1201] 处理

[1202] 在以下示出的剂量下,用ISIS 440762、651900、661134或用PBS处理的对照皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。在归一化为PBS处理的对照之前,测定相对于总RNA的SRB-1 mRNA水平(使用Ribogreen)。以下结果以归一化为PBS处理的对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现并且表示为“%PBS”。使用如先前所述的类似方法测量ED_{50}并且在以下呈现。

[1203] 如表35中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。事实上,在5’末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 661134)或包含连接在3’末端的$GalNAc_3$-1缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 651900)与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 440762)相比显示出效力的大致改进。此外,在5’末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-2缀合物的ISIS 661134与在3’末端包含$GalNAc_3$-1缀合物的ISIS 651900相比效力相等。

[1204] 表35

[1205] 靶向SRB-1的含有GalNAc$_3$-1或GalNAc$_3$-2的ASO

[1206]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 水平(% PBS)	ED_{50} (mg/kg)	缀合物	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	
440762	0.2	116	2.58	无缀合物	2250
	0.7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0.07	95	0.26	**3' GalNAc$_3$-1**	2251
	0.2	77			
	0.7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0.07	107	0.25	**5' GalNAc$_3$-2**	2254
	0.2	86			
	0.7	28			
	2	10			
	7	6			

[1207] 先前在实施例9和37中描述了3' GalNAc$_3$-1和5' GalNAc$_3$-2的结构。

[1208] 药物代谢动力学分析(PK)

[1209] 如实施例20中所说明,以相同方式检验和评价来自高剂量组(7mg/kg)的ASO的PK。使用标准方案切碎并且提取肝脏样品。鉴定了661134(5' GalNAc$_3$-2)和ISIS 651900(3' GalNAc$_3$-1)的全长代谢物并且通过高分辨率质谱分析证实了其质量。结果显示针对在5'末端包含磷酸二酯连接的GalNAc$_3$-2缀合物的ASO(ISIS 661134)所检测到的主要代谢物为ISIS 440762(数据未示出)。在可检测水平下没有观察到另外的代谢物。不像其对应物,针对在3'末端具有GalNAc$_3$-1缀合物的ASO(ISIS 651900)观察到类似于先前在表23a中报道的那些的另外的代谢物。这些结果表明具有磷酸二酯连接的GalNAc$_3$-1或GalNAc$_3$-2缀合物可在不损害其效力的情况下改进ASO的PK特征。

[1210] 实施例44:PO/PS键联对靶向SRB-1的在3'末端包含GalNAc$_3$-1缀合物(参见实施例9)的ASO的反义抑制的影响

[1211] 在单一施用研究中,针对其抑制小鼠中SRB-1的能力,对各自靶向SRB-1的在3'末端包含GalNAc$_3$-1缀合物的ISIS 655861和655862进行测试。在研究中包括母体未缀合化合物ISIS 353382用于比较。

[1212] ASO为5-10-5MOE缺口聚物,其中缺口区包含十个2'-脱氧核糖核苷并且每个翼区包含五个2'-MOE修饰核苷。使用如先前在实施例19中所说明的类似方法制备ASO并且在以下表36中描述。

[1213] 表36

[1214] 靶向SRB-1的在3'末端包含GalNAc$_3$-1缀合物的修饰ASO

[1215]

ISIS No.	序列(5'至3')	化学	SEQ ID No.
353382 (母体)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	全部PS无缀合物	2256
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	全部PS具有**GalNAc3-1**缀合物	2257
655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	混合的PS/PO具有**GalNAc3-1**缀合物	2257

[1216] 下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。上标"m"指示5-甲基胞嘧啶。"$GalNAc_3$-1"的结构在实施例9中示出。

[1217] 处理

[1218] 在以下示出的剂量下,用ISIS 353382、655861、655862或用PBS处理的对照皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在处理之前以及在最后一次剂量之后,从每只小鼠中抽血并且分析血浆样品。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。在归一化为PBS处理的对照之前,测定相对于总RNA的SRB-1 mRNA水平(使用Ribogreen)。以下结果以归一化为PBS处理的对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现并且表示为"%PBS"。使用如先前所述的类似方法测量ED_{50}并且在以下报告。

[1219] 如表37中所说明,与PBS处理的对照相比,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。事实上,在3'末端包含$GalNAc_3$-1缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 655861和655862)与未缀合反义寡核苷酸(ISIS 353382)相比显示出效力的大致改进。此外,相对于全部PS(ISIS 655861),具有混合的PS/PO键联的ISIS 655862显示出效力的改进。

[1220] 表37

[1221] PO/PS键联对靶向SRB-1的在3'末端包含$GalNAc_3$-1缀合物的ASO的反义抑制的影响

[1222]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA 水平(% PBS)	ED_{50} (mg/kg)	化学	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	
353382 (母体)	3	76.65	10.4	全部 PS 无缀合物	2256
	10	52.40			
	30	24.95			
655861	0.5	81.22	2.2	全部 PS 具有 $GalNAc_3$-1 缀合物	2257
	1.5	63.51			
	5	24.61			
	15	14.80			
655862	0.5	69.57	1.3	混合的 PS/PO 具有	2257
	1.5	45.78			

[1223]

	5	19.70		$GalNAc_3$-1 缀合物	
	15	12.90			

[1224] 使用标准方案，相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了器官重量。结果展示相比于PBS对照，在用ASO处理的小鼠中没有观察到转氨酶水平(表38)或器官重量(数据未示出)上升。此外，与全部PS(ISIS 655861)相比，具有混合的PS/PO键联的ASO(ISIS 655862)显示出类似的转氨酶水平。

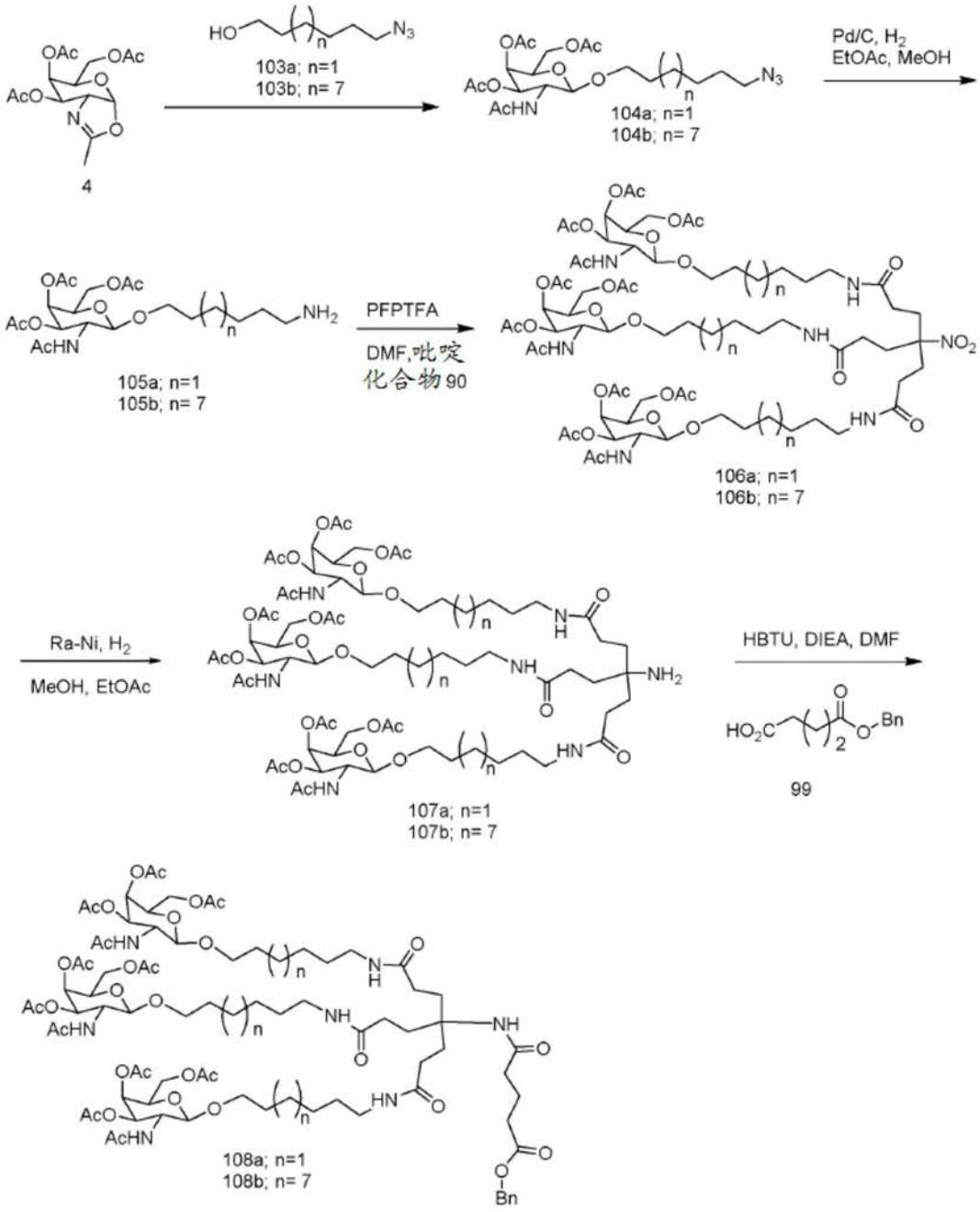
[1225] 表38

[1226] PO/PS键联对靶向SRB-1的在3'末端包含$GalNAc_3$-1缀合物的ASO的转氨酶水平的影响

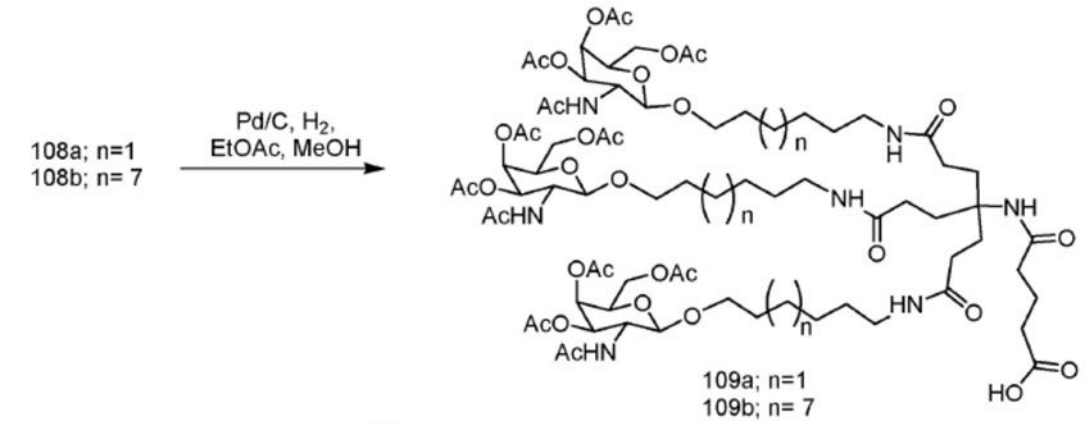
[1227]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	化学	SEQ ID No.
PBS	0	28.5	65	--	
353382 (母体)	3	50.25	89	全部 PS 无缀合物	2256
	10	27.5	79.3		
	30	27.3	97		
655861	0.5	28	55.7	全部 PS 具有 **$GalNAc_3$-1**	2257
	1.5	30	78		
	5	29	63.5		
	15	28.8	67.8		
655862	0.5	50	75.5	混合的 PS/PO 具有 **$GalNAc_3$-1**	2257
	1.5	21.7	58.5		
	5	29.3	69		
	15	22	61		

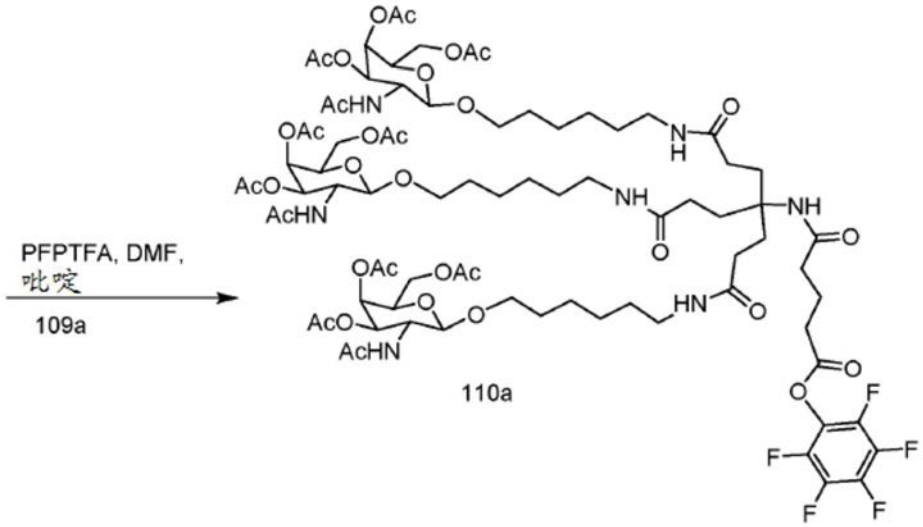
[1228] 实施例45:PFP酯化合物110a的制备


HO
n
N3
103a; n=1
103b; n= 7
OAc
AcO
AcHN
O
N
4
104a; n=1
104b; n= 7
Pd/C, H2
EtOAc, MeOH
NH2
105a; n=1
105b; n= 7
PFPTFA
DMF,吡啶
化合物90
NO2
NH
HN
106a; n=1
106b; n= 7
Ra-Ni, H2
MeOH, EtOAc
107a; n=1
107b; n= 7
HBTU, DIEA, DMF
HO2C
Bn
99
108a; n=1
108b; n= 7

[1229]



[1230]



[1231] 单独用化合物103a或103b(38毫摩尔)和TMSOTf(0.5当量)以及二氯甲烷(200mL)中的分子筛处理化合物4(9.5g,28.8毫摩尔),并且在室温下搅拌16小时。这时使有机层过滤通过硅藻土,然后用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减。通过硅胶色谱法(2%-->10%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到>80%产率的化合物104a和104b。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1232] 将化合物104a和104b处理至与对于化合物100a-d(实施例47)相同的条件,得到>90%产率的化合物105a和105b。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1233] 在与对于化合物901a-d相同的条件下单独用化合物90处理化合物105a和105b,得到化合物106a(80%)和106b(20%)。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1234] 将化合物106a和106b处理至与对于化合物96a-d(实施例47)相同的条件,得到107a(60%)和107b(20%)。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1235] 将化合物107a和107b处理至与对于化合物97a-d(实施例47)相同的条件,得到40%-60%产率的化合物108a和108b。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1236] 将化合物108a(60%)和108b(40%)处理至与对于化合物100a-d(实施例47)相同的条件,得到>80%产率的化合物109a和109b。LCMS和质子NMR与结构一致。

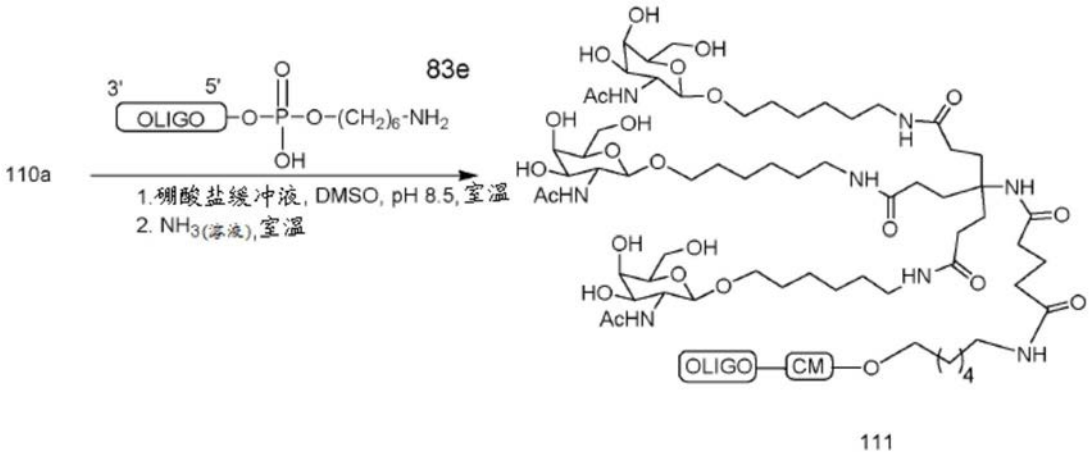
[1237] 将化合物109a处理至与对于化合物101a-d(实施例47)相同的条件,得到30%-60%产率的化合物110a。LCMS和质子NMR与结构一致。或者,可以类似方式用化合物109b起始制备化合物110b。

[1238] 实施例46:用于与PFP酯(寡核苷酸111)缀合的一般工序;ISIS 666881(GalNAc$_3$-

10)的制备

[1239] 使用标准固相寡核苷酸工序合成并纯化5'-己基氨基修饰的寡核苷酸。将5'-己基氨基修饰的寡核苷酸溶解于pH 8.5的0.1M四硼酸钠(200μL)中,并且添加3当量的溶解于DMSO(50μL)中的所选的PFP酯化$GalNAc_3$聚簇。如果在添加至ASO溶液时PFP酯沉淀,那么添加DMSO直到所有PFP酯溶解。在室温下混合约16h之后反应完全。用水将所得到的溶液稀释至12mL,然后在具有3000Da的质量截留的旋转过滤器中在3000rpm下离心沉降。将此过程重复两次以去除小分子杂质。然后将溶液冻干至干燥并且重新溶解于浓氨水中,并且在室温下混合2.5h,接着在真空中浓缩以去除大部分氨。通过RP-HPLC将缀合寡核苷酸纯化和脱盐并且将其冻干以提供$GalNAc_3$缀合的寡核苷酸。

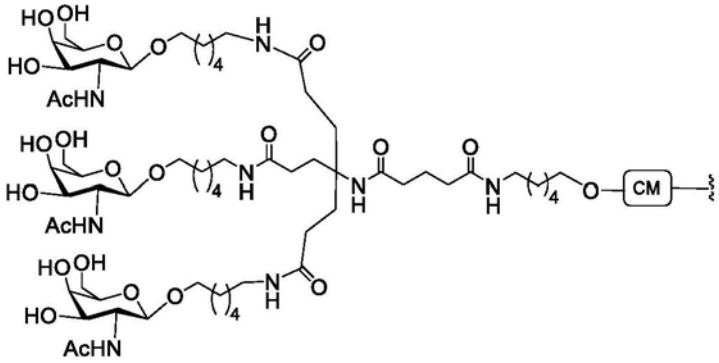
[1240]



111

[1241] 将寡核苷酸111与$GalNAc_3$-10缀合。缀合物基团$GalNAc_3$-10的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-10_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-,如用以下$GalNAc_3$-10合成的寡核苷酸(ISIS 666881)中所示。$GalNAc_3$-10($GalNAc_3$-10_a-CM-)的结构在以下示出:

[1242]



[1243] 根据此一般工序制备ISIS 666881。使用标准固相寡核苷酸工序合成并且纯化5'-己基氨基修饰的寡核苷酸ISIS 660254。将ISIS 660254(40mg,5.2μmol)溶解于pH 8.5的0.1M四硼酸钠(200μL)中,并且添加3当量溶解于DMSO(50μL)中的PFP酯(化合物110a)。在添加至ASO溶液时PFP酯沉淀,则需要另外的DMSO(600μL)来完全溶解PFP酯。在室温下混合16h之后反应完全。用水将溶液稀释至12mL总体积,并且在具有3000Da的质量截留的旋转过滤器中在3000rpm下离心沉降。将此过程重复两次以去除小分子杂质。将溶液冻干至干燥并且重新溶解于浓氨水中,同时在室温下混合2.5h,接着在真空中浓缩以去除大部分氨。通过RP-HPLC将缀合的寡核苷酸纯化和脱盐并且将其冻干,得到90重量%产率的ISIS 666881

(42mg,4.7μmol)。

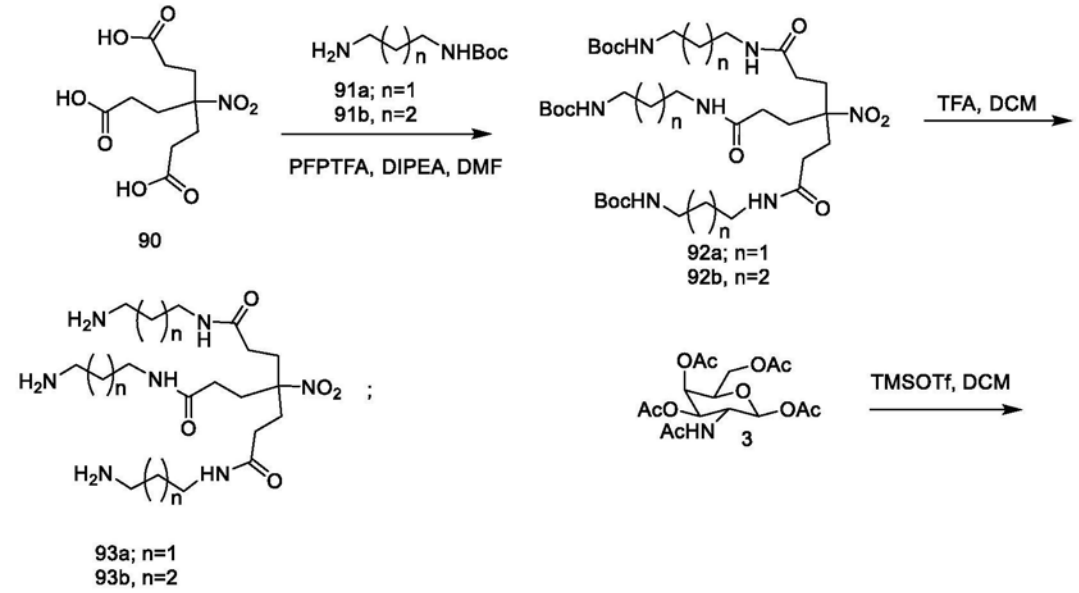
[1244] $GalNAc_3$-10缀合的寡核苷酸

[1245]

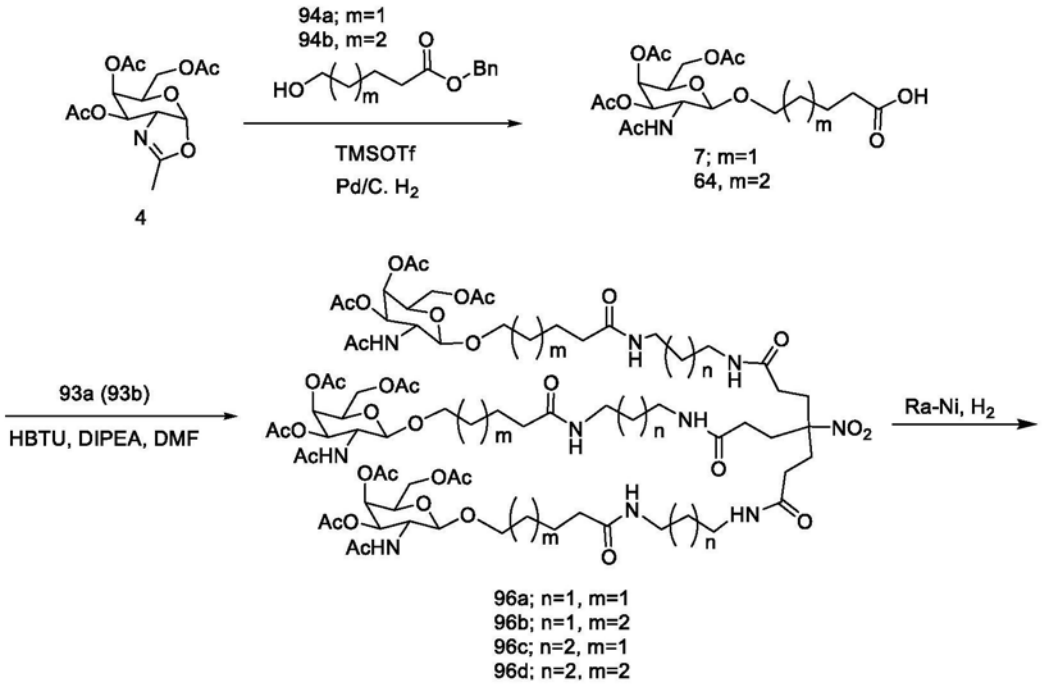
ASO	序列(5'至3')	5'基团	SEQ ID No.
ISIS 660254	$NH_2(CH_2)_6$-$_o$A$_{do}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	己胺	2258
ISIS 666881	**GalNAc$_3$-10$_{a-o}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	**GalNAc$_3$-10**	2258

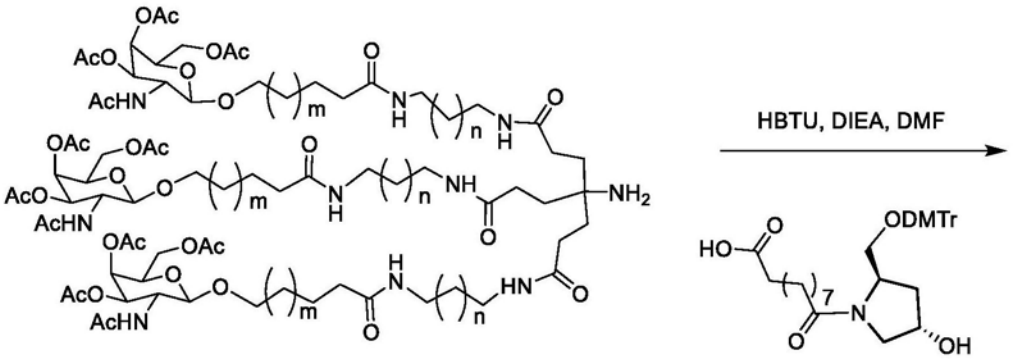
[1246] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:“e”指示2'-MOE修饰核苷;“d”指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;“s”指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);“o”指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且“o'”指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1247] 实施例47:制备包含$GalNAc_3$-8的寡核苷酸102



[1248]

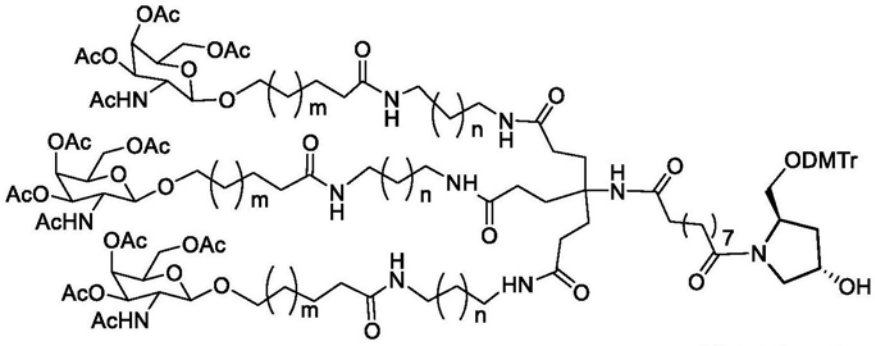




97a; n=1, m=1
97b; n=1, m=2
97c; n=2, m=1
97d; n=2, m=2

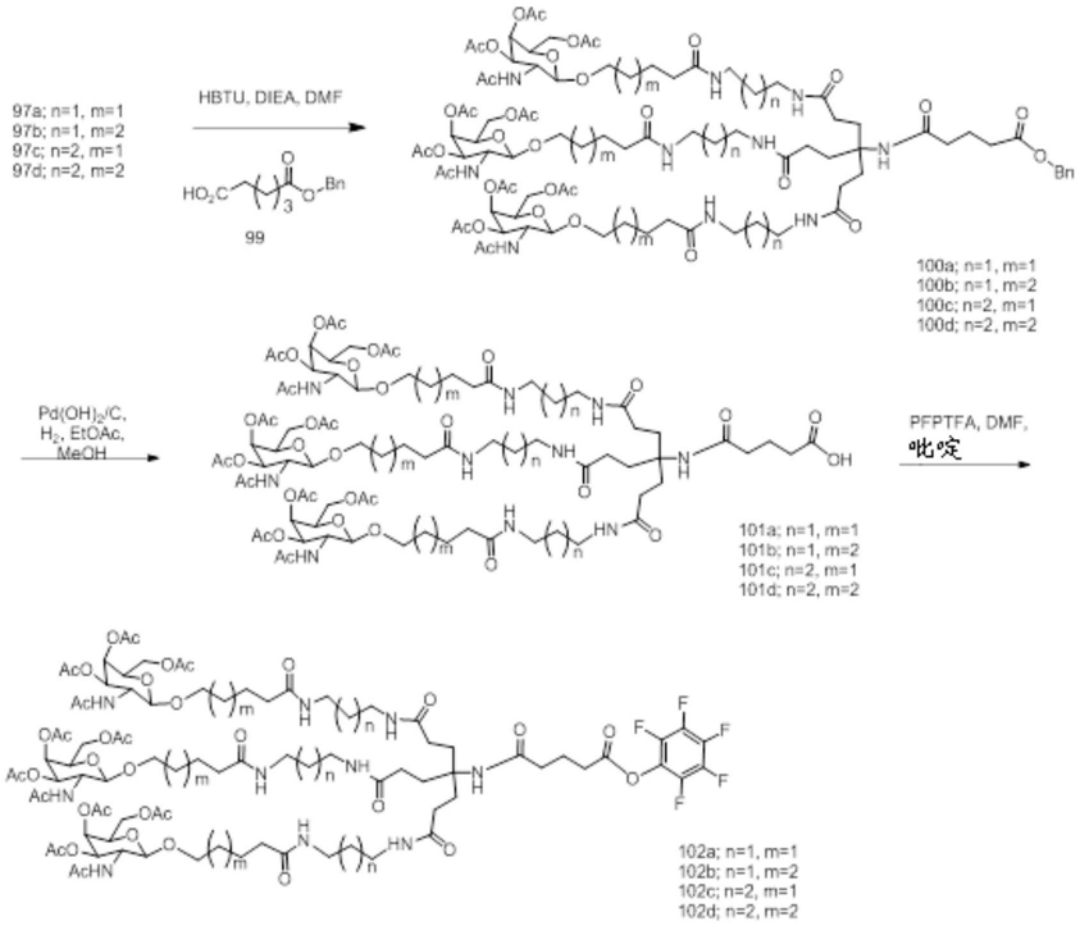
23

[1249]



98a; n=1, m=1
98b; n=1, m=2
98c; n=2, m=1
98d; n=2, m=2

[1250]



[1251] 将三元酸90(4g,14.43mmol)溶解于DMF(120mL)和N,N-二异丙基乙胺(12.35mL,72毫摩尔)中。在氩气下逐滴添加三氟乙酸五氟苯基酯(8.9mL,52毫摩尔),并且使反应物在室温下搅拌30分钟。连同N,N-二异丙基乙胺(12.35mL,72毫摩尔)一起添加Boc-二胺91a或91b(68.87mmol),并且使反应物在室温下搅拌16小时。这时在减压下使DMF缩减>75%,然后将混合物溶解于二氯甲烷中。将有机层用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减至油状物。通过硅胶色谱法(2%-->10%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到大约80%产率的化合物92a和92b。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1252] 在室温下用20mL二氯甲烷和20mL三氟乙酸将化合物92a或92b(6.7毫摩尔)处理16小时。蒸发所得到的溶液,然后溶解于甲醇中,并且用DOWEX-OH树脂处理30分钟。过滤所得到的溶液并且在减压下缩减至油状物,得到85%-90%产率的化合物93a和93b。

[1253] 将化合物7或64(9.6毫摩尔)在DMF(20mL)中用HBTU(3.7g,9.6毫摩尔)和N,N-二异丙基乙胺(5mL)处理15分钟。向其中添加化合物93a或93b(3毫摩尔),并且使其在室温下搅拌16小时。这时在减压下使DMF缩减>75%,然后将混合物溶解于二氯甲烷中。将有机层用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减至油状物。通过硅胶色谱法(5%-->20%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到20%-40%产率的化合物96a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1254] 在乙醇(75mL)中通过雷尼镍单独地将化合物96a-d(0.75毫摩尔)氢化3小时。这时通过过滤通过硅藻土来去除催化剂并且在减压下去除乙醇,得到80%-90%产率的化合物

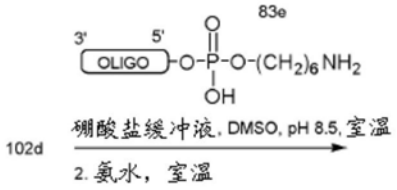
97a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1255] 将化合物23(0.32g,0.53毫摩尔)在DMF(30mL)中用HBTU(0.2g,0.53毫摩尔)和N,N-二异丙基乙胺(0.19mL,1.14毫摩尔)处理15分钟。单独地向其中添加化合物97a-d(0.38毫摩尔),并且使其在室温下搅拌16小时。这时在减压下使DMF缩减>75%,然后将混合物溶解于二氯甲烷中。将有机层用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减至油状物。通过硅胶色谱法(2%-->20%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到30%-40%产率的化合物98a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

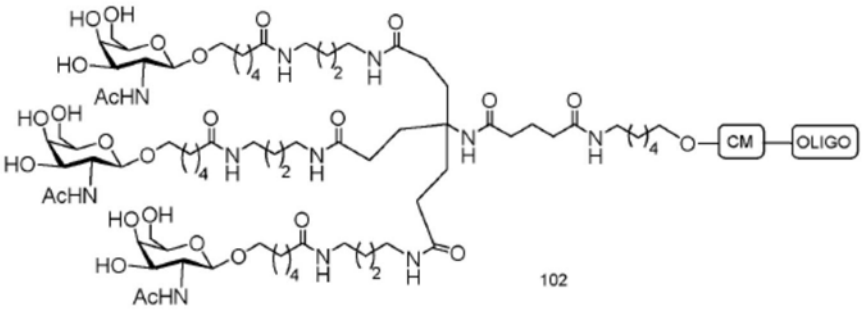
[1256] 将化合物99(0.17g,0.76毫摩尔)在DMF(50mL)中用HBTU(0.29g,0.76毫摩尔)和N,N-二异丙基乙胺(0.35mL,2.0毫摩尔)处理15分钟。单独地向其中添加化合物97a-d(0.51毫摩尔),并且使其在室温下搅拌16小时。这时在减压下使DMF缩减>75%,然后将混合物溶解于二氯甲烷中。将有机层用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减至油状物。通过硅胶色谱法(5%-->20%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到40%-60%产率的化合物100a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1257] 单独地在甲醇/乙酸乙酯(1:1,50mL)中通过10%$Pd(OH)_2$/C将化合物100a-d(0.16毫摩尔)氢化3小时。这时通过过滤通过硅藻土来去除催化剂并且在减压下去除有机物,得到80%-90%产率的化合物101a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

[1258] 单独地将化合物101a-d(0.15毫摩尔)溶解于DMF(15mL)和吡啶(0.016mL,0.2毫摩尔)中。在氩气下逐滴添加三氟乙酸五氟苯基酯(0.034mL,0.2毫摩尔),并且使反应物在室温下搅拌30分钟。这时在减压下使DMF缩减>75%,然后将混合物溶解于二氯甲烷中。将有机层用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。然后将有机层分离并且通过硫酸钠干燥,过滤并且在减压下缩减至油状物。通过硅胶色谱法(2%-->5%甲醇/二氯甲烷)纯化所得到的油状物,得到大约80%产率的化合物102a-d。LCMS和质子NMR与结构一致。

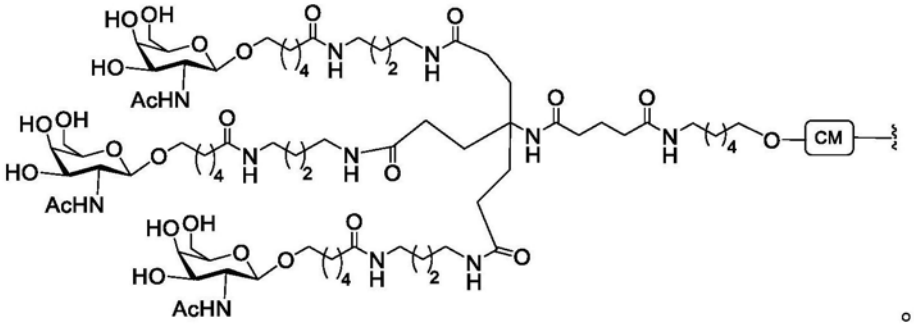


[1259]

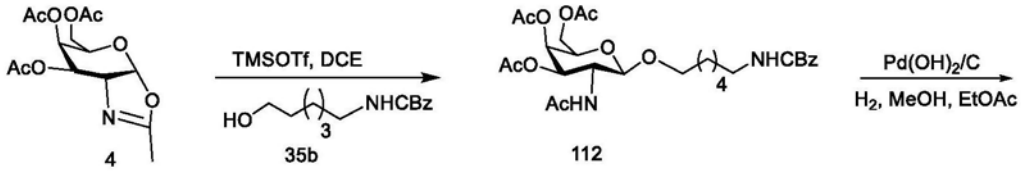


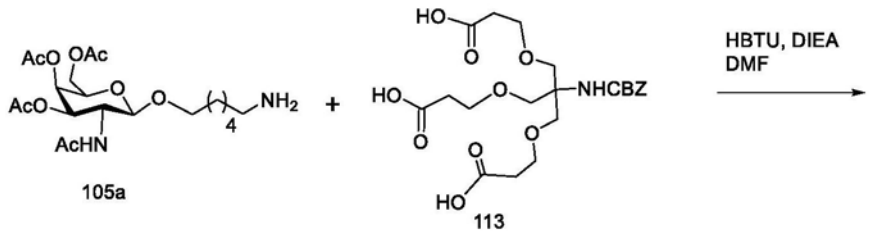
[1260] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-8缀合物基团的低聚化合物102。缀合物基团$GalNAc_3$-8的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-8_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在优选的实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。

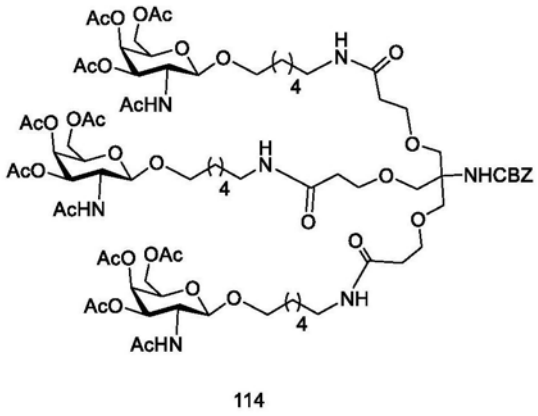
[1261] $GalNAc_3$-8($GalNAc_3$-8_a-CM-)的结构在以下示出:

[1262] 

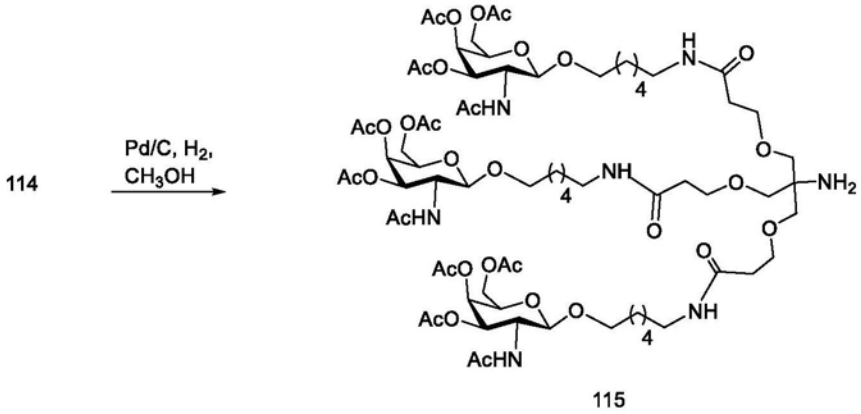
[1263] 实施例48:制备包含GalNAc3-7的寡核苷酸119



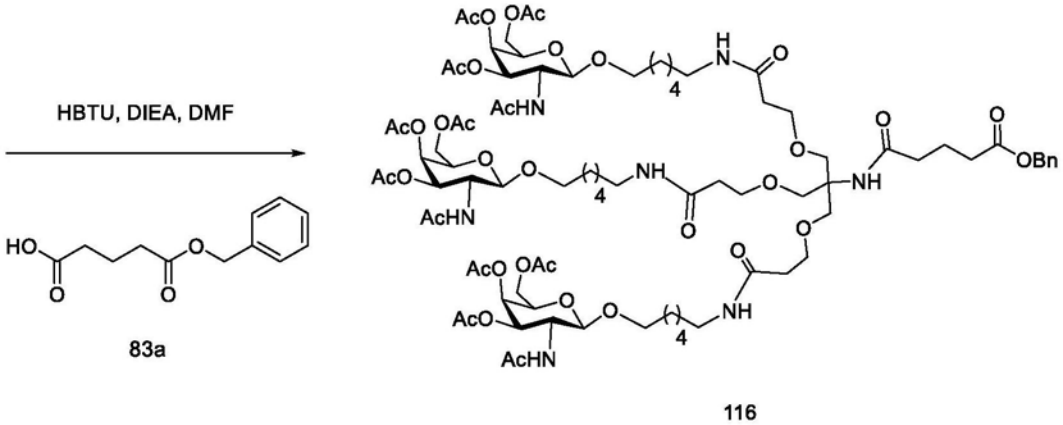


[1264] 

114



[1265]



[1266] 根据文献中描述的工序合成化合物112(J.Med.Chem.2004,47,5798-5808)。

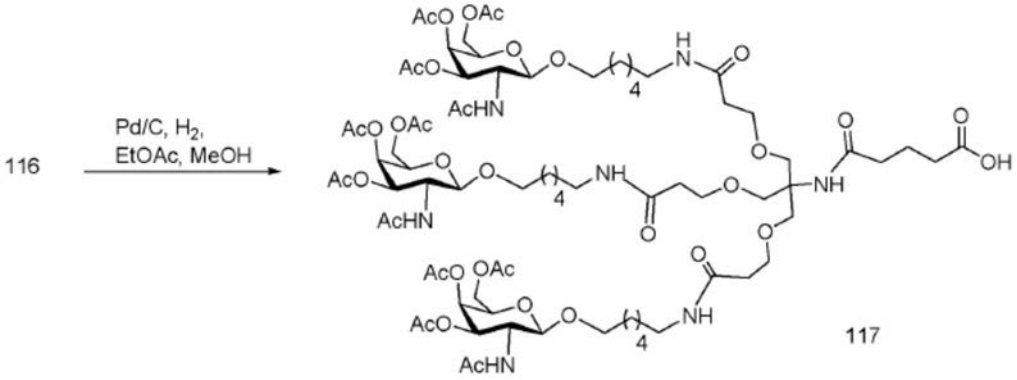
[1267] 将化合物112(5g,8.6mmol)溶解于1:1甲醇/乙酸乙酯(22mL/22mL)中。添加碳上氢氧化钯(0.5g)。将此反应混合物在室温下在氢气下搅拌12h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并且用1:1甲醇/乙酸乙酯洗涤所述垫。合并滤液和洗涤物并且浓缩至干燥,得到化合物105a(定量的)。通过LCMS证实结构。

[1268] 将化合物113(1.25g,2.7mmol)、HBTU(3.2g,8.4mmol)和DIEA(2.8mL,16.2mmol)溶解于无水DMF(17mL)中并且将反应混合物在室温下搅拌5min。添加该化合物105a(3.77g,8.4mmol)在无水DMF(20mL)中的溶液。将反应在室温下搅拌6h。在减压下去除溶剂以得到油。将残余物溶解于CH_2Cl_2(100mL)中并且用饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)和盐水(100mL)洗涤。将有机相分离、干燥(Na_2SO_4)、过滤并且蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化残余物并且用10%至20%的二氯甲烷中的MeOH洗脱,得到化合物114(1.45g,30%)。通过LCMS和^1H NMR分析来证实结构。

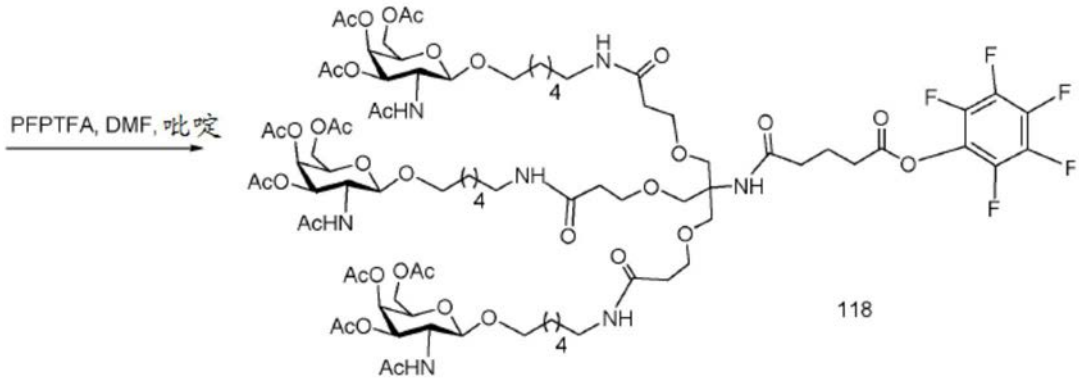
[1269] 将化合物114(1.43g,0.8mmol)溶解于1:1甲醇/乙酸乙酯(4mL/4mL)中。添加钯碳(湿润,0.14g)。用氢气冲洗反应混合物并且在氢气下在室温下搅拌12h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤。用甲醇/乙酸乙酯(1:1)洗涤硅藻土垫。将滤液和洗涤物合并在一起并且在减压下蒸发,得到化合物115(定量的)。通过LCMS和^1H NMR分析来证实结构。

[1270] 将化合物83a(0.17g,0.75mmol)、HBTU(0.31g,0.83mmol)和DIEA(0.26mL,1.5mmol)溶解于无水DMF(5mL)中并且将反应混合物在室温下搅拌5min。添加该化合物115(1.22g,0.75mmol)在无水DMF中的溶液,并且将反应在室温下搅拌6h。在减压下去除溶剂并且将残余物溶解于CH_2Cl_2中。将有机层用饱和$NaHCO_3$水溶液和盐水洗涤并且通过无水Na_2SO_4

干燥并且过滤。将有机层浓缩至干燥，并且通过硅胶柱色谱法纯化所获得的残余物并且用3％至15％的二氯甲烷中的MeOH洗脱，得到化合物116(0.84g，61％)。通过LC MS和^{1}H NMR分析来证实结构。



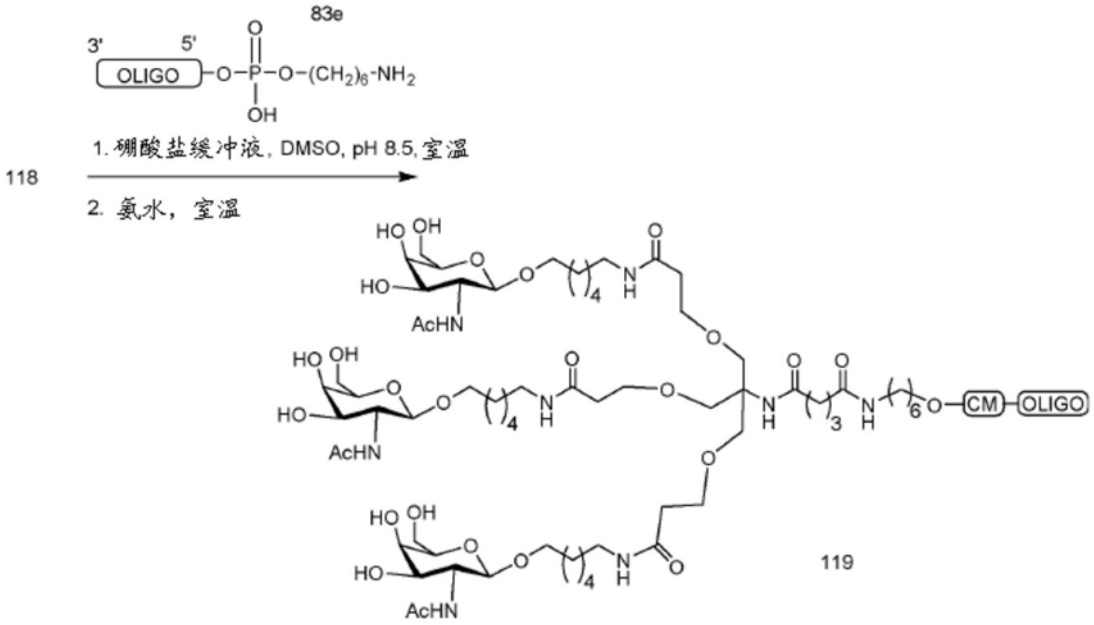
[1271]



[1272] 将化合物116(0.74g，0.4mmol)溶解于1:1甲醇/乙酸乙酯(5mL/5mL)中。添加钯碳(湿润，0.074g)。用氢气冲洗反应混合物并且在氢气下在室温下搅拌12h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤。用甲醇/乙酸乙酯(1:1)洗涤硅藻土垫。将滤液和洗涤物合并在一起并且在减压下蒸发，得到化合物117(0.73g，98％)。通过LCMS和^{1}H NMR分析来证实结构。

[1273] 将化合物117(0.63g，0.36mmol)溶解于无水DMF(3mL)中。向此溶液中添加N,N-二异丙基乙胺(70μL，0.4mmol)和三氟乙酸五氟苯基酯(72μL，0.42mmol)。将反应混合物在室温下搅拌12h并且倾入到饱和$NaHCO_3$水溶液中。将混合物用二氯甲烷萃取，用盐水洗涤并且通过无水Na_2SO_4干燥。将二氯甲烷溶液浓缩至干燥并且用硅胶柱色谱法纯化并且用5％至10％的二氯甲烷中的MeOH洗脱，得到化合物118(0.51g，79％)。通过LCMS以及^{1}H与^{1}H和^{19}F NMR证实结构。

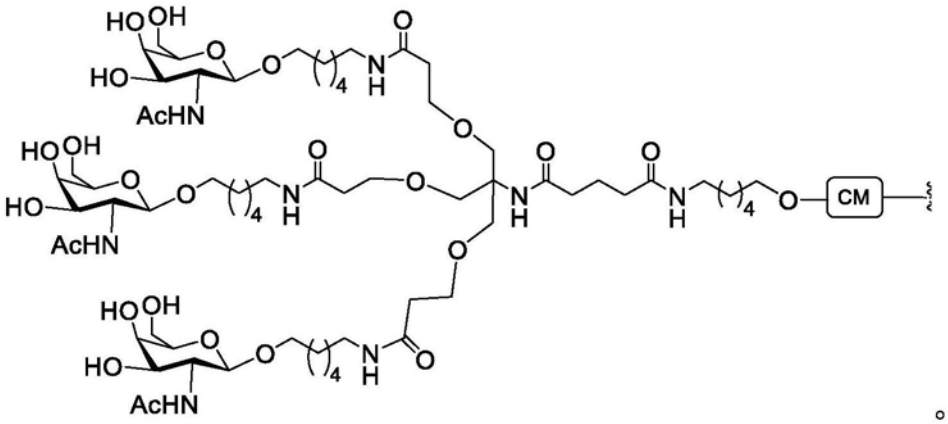
[1274]



[1275] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含GalNAc$_3$-7缀合物基团的低聚化合物119。缀合物基团GalNAc$_3$-7的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-7$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。

[1276] GalNAc$_3$-7(GalNAc$_3$-7$_a$-CM-)的结构在以下示出:

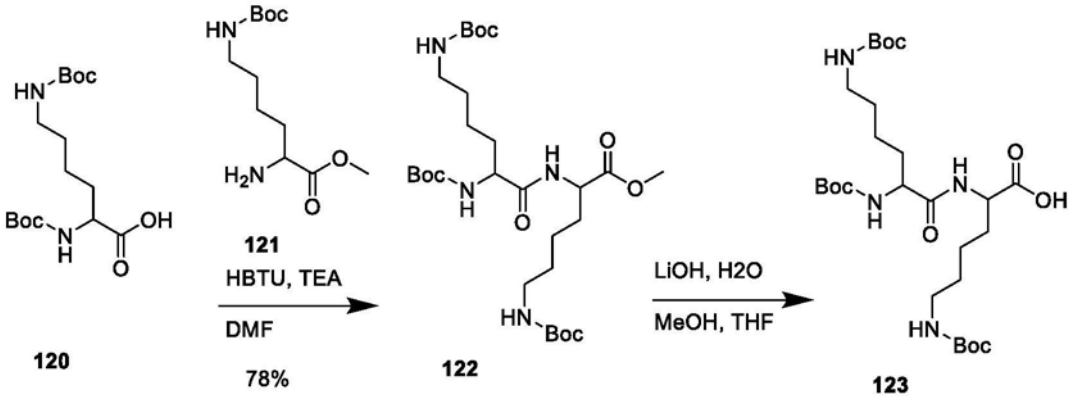
[1277]



。

[1278] 实施例49:制备包含GalNAc$_3$-5的寡核苷酸132

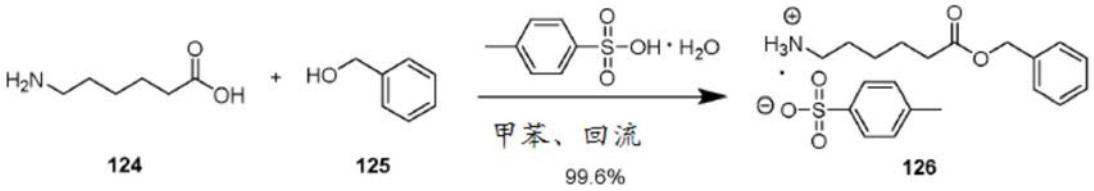
[1279]



[1280] 将化合物120(14.01g,40mmol)和HBTU(14.06g,37mmol)溶解于无水DMF(80mL)中。添加三乙胺(11.2mL,80.35mmol)并且搅拌5min。在冰浴中冷却反应混合物并且添加化合物

121(10g,mmol)在无水DMF(20mL)中的溶液。添加另外的三乙胺(4.5mL,32.28mmol)并且将反应混合物在氩气气氛下搅拌18h。通过TLC(乙酸乙酯:己烷;1:1;Rf＝0.47)监测反应。在减压下移除溶剂。将残余物吸收于EtOAc(300mL)中并且用1M $NaHSO_4$(3x150mL)、饱和$NaHCO_3$水溶液(3x150mL)和盐水(2x100mL)洗涤。用Na_2SO_4干燥有机层。通过过滤去除干燥剂并且通过旋转蒸发浓缩有机层。通过硅胶柱色谱法纯化粗混合物并且通过使用35%-50%的己烷中的EtOAc洗脱,得到化合物122(15.50g,78.13%)。通过LCMS和^1H NMR分析来证实结构。质量m/z 589.3$[M+H]^+$。

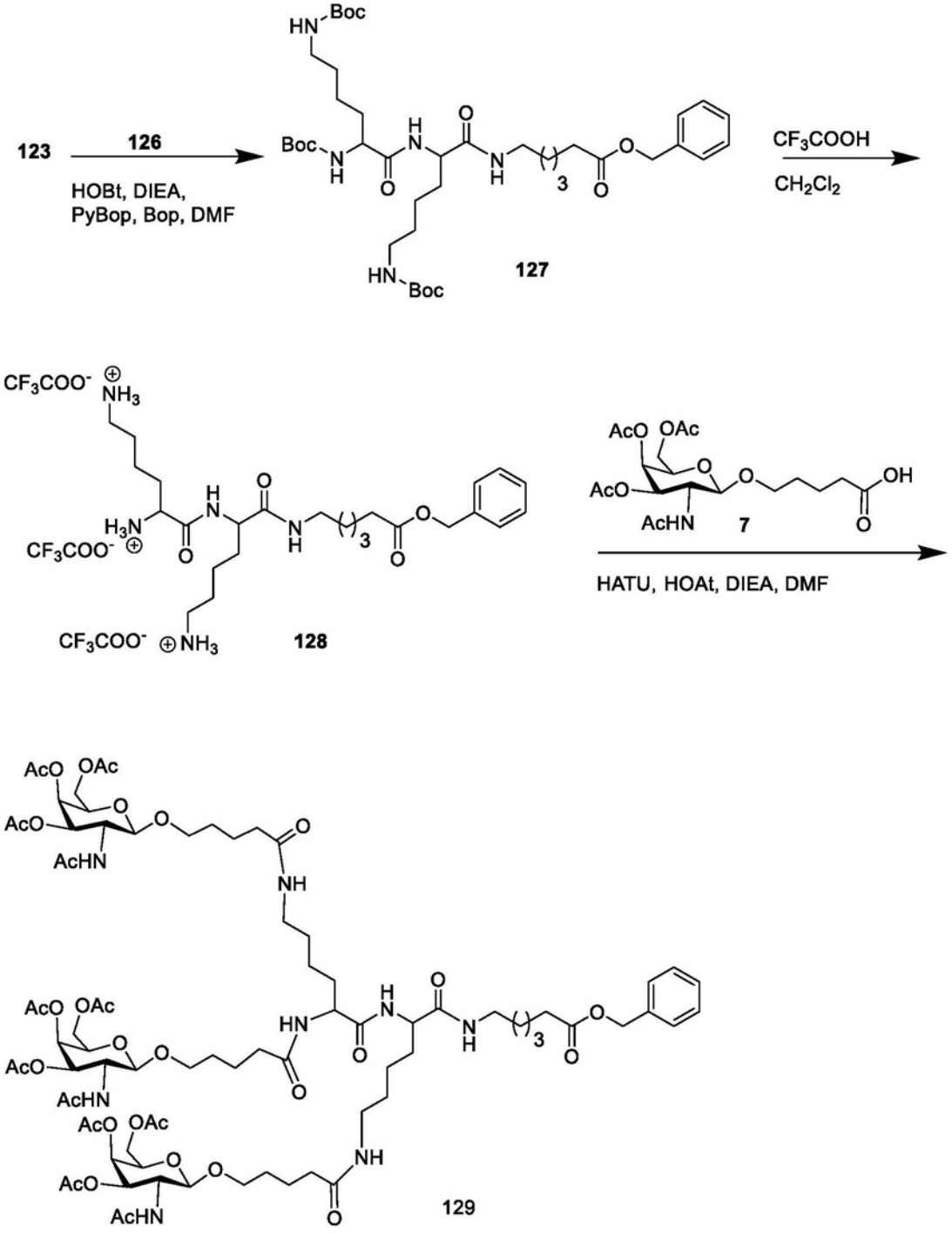
[1281] 将LiOH(92.15mmol)在水(20mL)和THF(10mL)中的溶液添加至溶解于甲醇(15mL)中的化合物122(7.75g,13.16mmol)的冷却溶液中。将反应混合物在室温下搅拌45min并且通过TLC(EtOAc:己烷;1:1)监测。在减压下将反应混合物浓缩至一半体积。在冰浴中冷却剩余的溶液并且通过添加浓HCl来中和。将反应混合物稀释,用EtOAc(120mL)萃取并且用盐水洗涤(100mL)。当静置过夜时形成乳液并且澄清。将有机层分离、干燥(Na_2SO_4)、过滤并且蒸发,得到化合物123(8.42g)。残余的盐可能为质量过量的原因。LCMS与结构一致。产物无需任何进一步纯化即使用。计算的分子量:574.36;实测的分子量:575.3$[M+H]^+$。

[1282] 

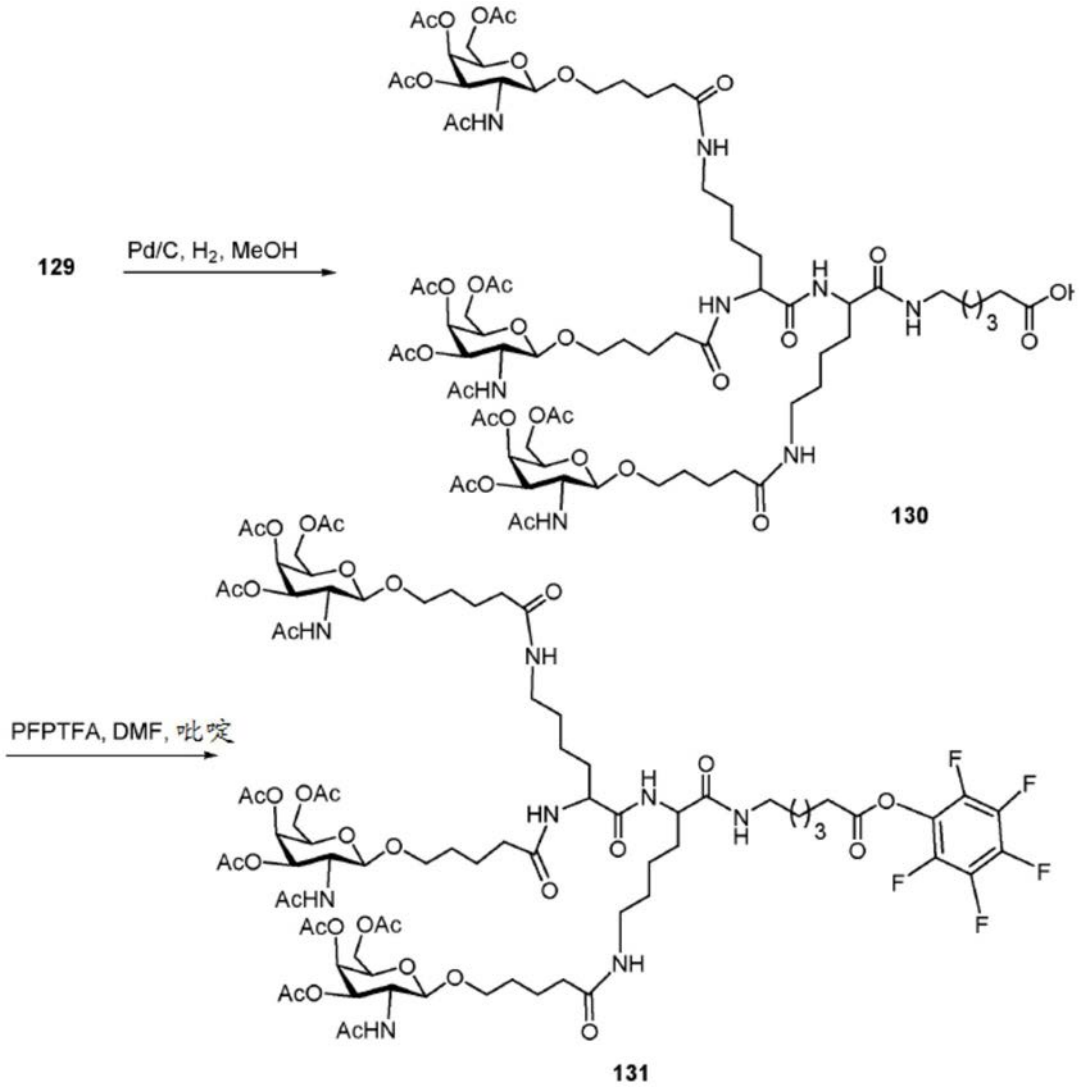
124 125 126

[1283] 根据文献中描述的工序合成化合物126(J.Am.Chem.Soc.2011,133,958-963)。

[1284]


123
126
HOBt, DIEA,
PyBop, Bop, DMF
127
CF3COOH
CH2Cl2
128
7
HATU, HOAt, DIEA, DMF
129

[1285]



[1286] 将化合物123(7.419g,12.91mmol)、HOBt(3.49g,25.82mmol)和化合物126(6.33g,16.14mmol)溶解于DMF(40mL)中,并且在冰浴中冷却所得到的反应混合物。在氩气气氛下,向其中添加N,N-二异丙基乙胺(4.42mL,25.82mmol)、PyBop(8.7g,16.7mmol),接着添加Bop偶联试剂(1.17g,2.66mmol)。去除冰浴并且使溶液升温至室温。在1h后反应完成,如通过TLC(DCM:MeOH:AA;89:10:1)所测定的。在减压下浓缩反应混合物。将残余物溶解于EtOAc(200mL)中并且用1M $NaHSO_4$(3x100mL)、饱和$NaHCO_3$水溶液(3x100mL)和盐水(2x100mL)洗涤。将有机相分离、干燥(Na_2SO_4)、过滤并且浓缩。通过硅胶柱色谱法用50%己烷/EtOAC至100%EtOAc梯度纯化残余物,得到呈白色泡沫的化合物127(9.4g)。LCMS和^1H NMR与结构一致。质量m/z 778.4$[M+H]^+$。

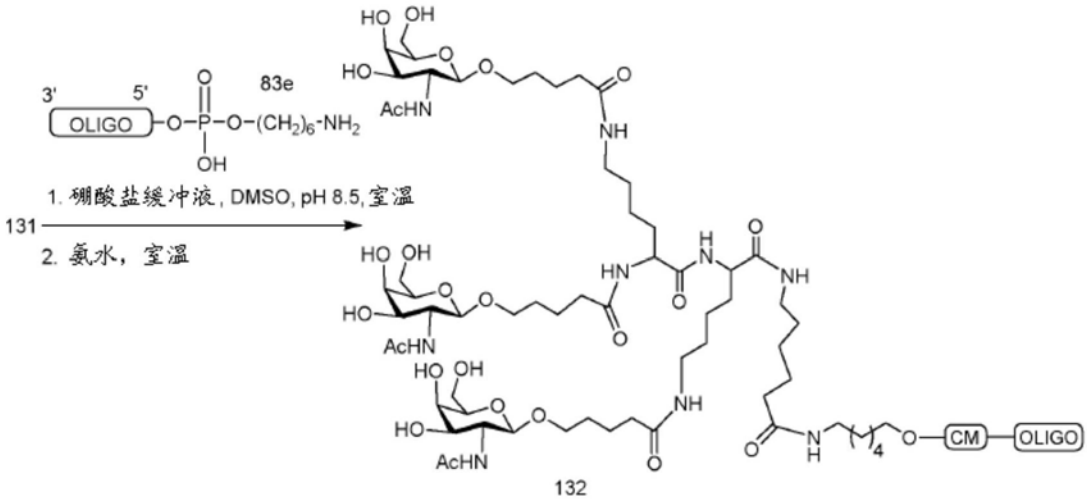
[1287] 将三氟乙酸(12mL)添加至化合物127(1.57g,2.02mmol)在二氯甲烷(12mL)中的溶液中,并且在室温下搅拌1h。将反应混合物与甲苯(30mL)在减压条件下共蒸发至干燥。使所获得的残余物与乙腈(30mL)和甲苯(40mL)共蒸发两次,得到呈三氟乙酸盐的化合物128(1.67g)并且无需进一步纯化即用于下一步。LCMS和^1H NMR与结构一致。质量m/z 478.2$[M+H]^+$。

[1288] 将化合物7(0.43g,0.963mmol)、HATU(0.35g,0.91mmol)和HOAt(0.035g,0.26mmol)合并在一起并且在圆底烧瓶中在减压下通过P_2O_5干燥4h,然后溶解于无水DMF

(1mL)中并且搅拌5min。添加该化合物128(0.20g,0.26mmol)在无水DMF(0.2mL)和N,N-二异丙基乙胺(0.2mL)中的溶液。在氩气气氛下在室温下搅拌反应混合物。在30min之后反应完全,如通过LCMS和TLC(7%MeOH/DCM)所测定的。在减压下浓缩反应混合物。将残余物溶解于DCM(30mL)中并且用1M $NaHSO_4$(3x20mL)、饱和$NaHCO_3$水溶液(3x20mL)和盐水(3x20mL)洗涤。将有机相分离、用Na_2SO_4干燥、过滤并且浓缩。通过硅胶柱色谱法使用5%-15%的二氯甲烷中的MeOH来纯化残余物,得到化合物129(96.6mg)。LC MS和^1H NMR与结构一致。质量m/z 883.4$[M+2H]^+$。

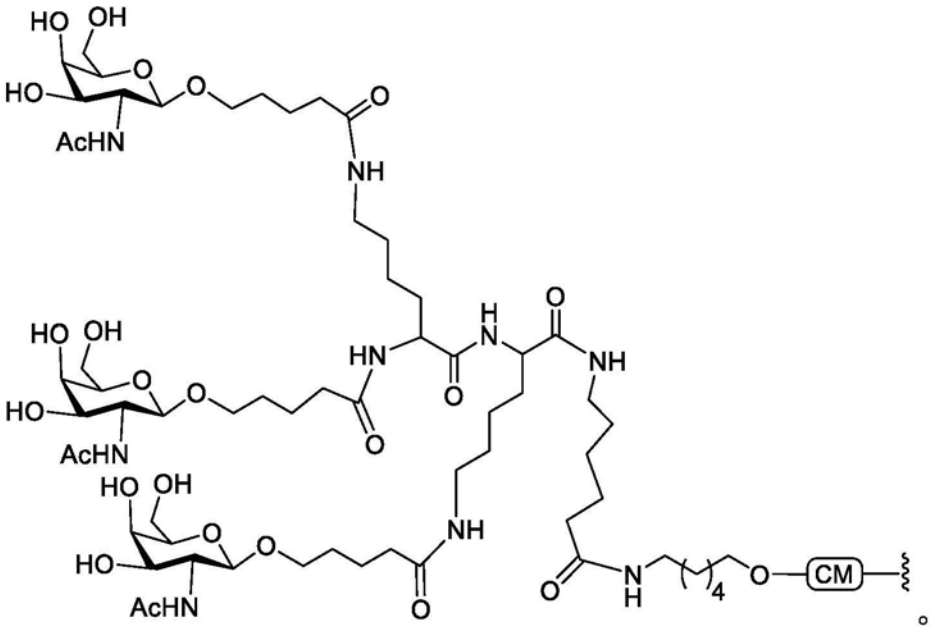
[1289] 在20mL闪烁瓶中将化合物129(0.09g,0.051mmol)溶解于甲醇(5mL)中。向其中添加少量的10%Pd/C(0.015mg)并且用H_2气体冲洗反应容器。将此反应混合物在室温下在H_2气氛下搅拌18h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并且用甲醇洗涤硅藻土垫。将滤液洗涤物汇集在一起并且在减压下浓缩,得到化合物130(0.08g)。LCMS和^1H NMR与结构一致。产物未进行进一步纯化即使用。质量m/z 838.3$[M+2H]^+$。

[1290] 向10mL刻度的圆底烧瓶中添加化合物130(75.8mg,0.046mmol)、0.37M吡啶/DMF(200μL)和搅拌棒。在搅拌的情况下向此溶液中逐滴添加0.7M三氟乙酸五氟苯基酯/DMF(100μL)。在1h后反应完成,如通过LC MS所测定的。在减压下去除溶剂并且将残余物溶解于$CHCl_3$(大约10mL)中。将有机层用$NaHSO_4$(1M,10mL)、饱和$NaHCO_3$水溶液(10mL)和盐水(10mL)各分配三次。将有机相分离并且通过Na_2SO_4干燥、过滤并且浓缩,得到化合物131(77.7mg)。LCMS与结构一致。无需进一步纯化即使用。质量m/z 921.3$[M+2H]^+$。

[1291] 

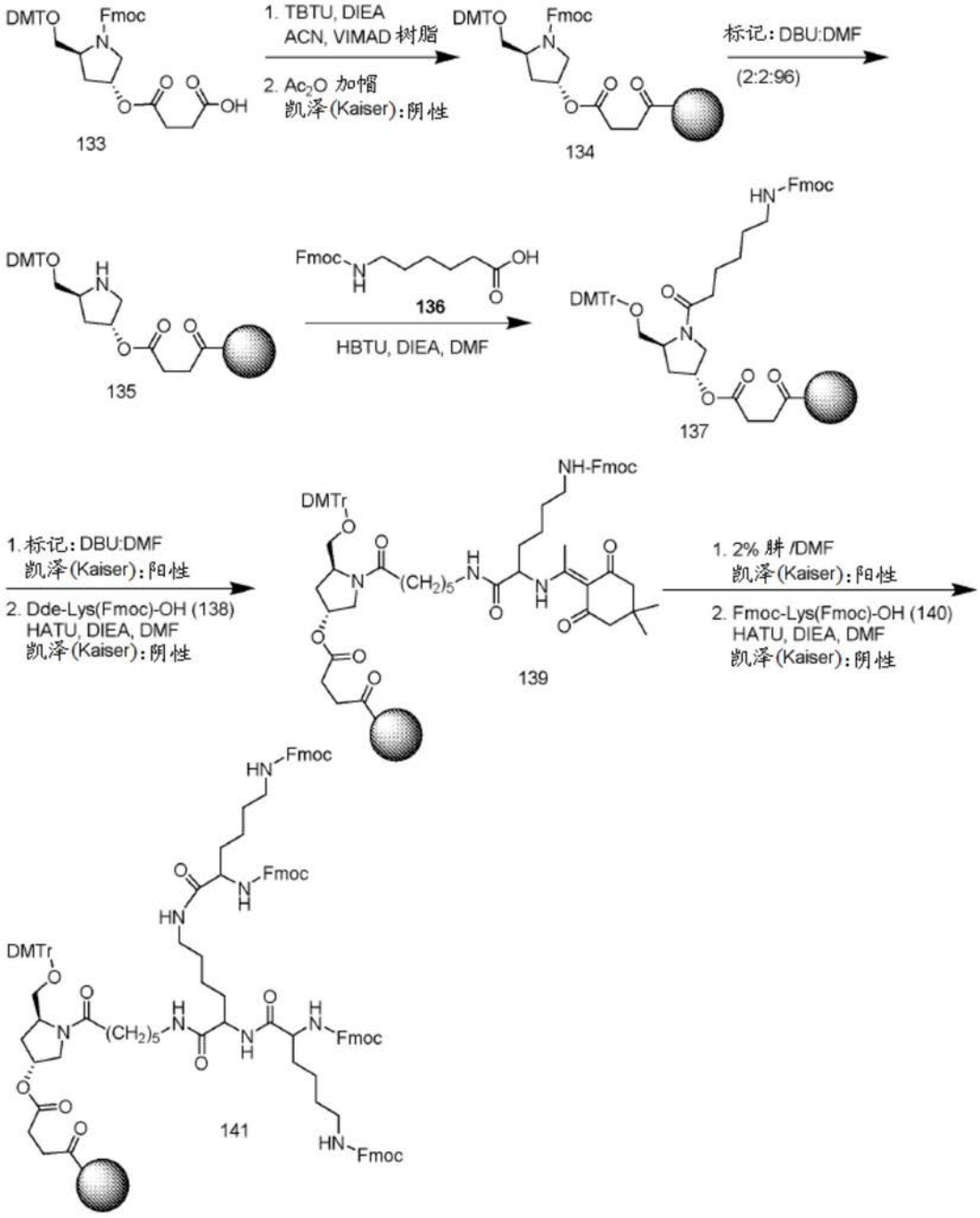
[1292] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-5缀合物基团的低聚化合物132。缀合物基团$GalNAc_3$-5的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-5_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。

[1293] $GalNAc_3$-5($GalNAc_3$-5_a-CM-)的结构在以下示出:

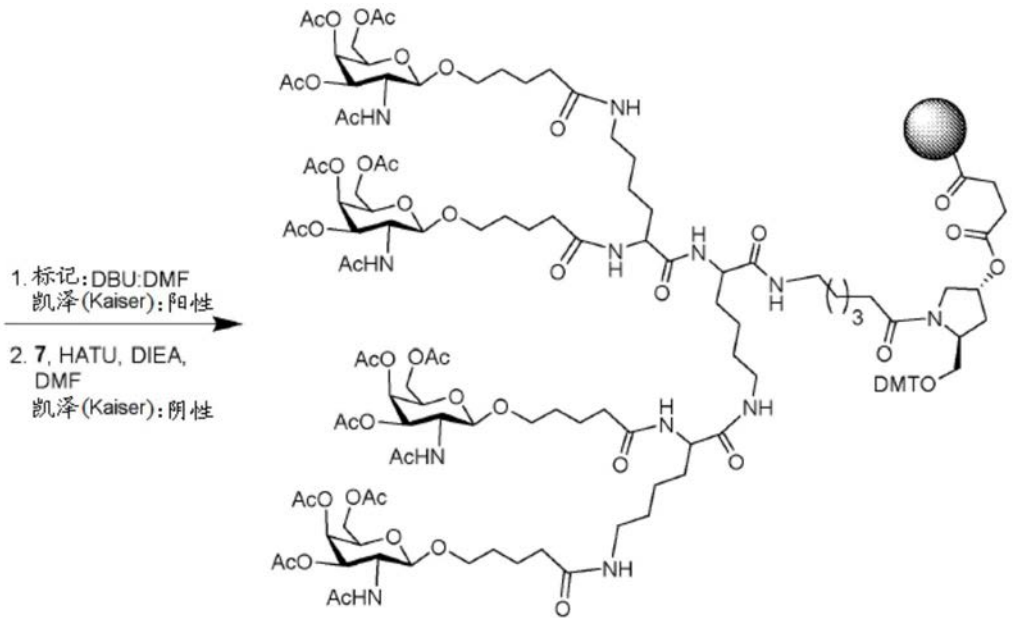
[1294] 

[1295] 实施例50:制备包含GalNAc$_4$-11的寡核苷酸144

[1296]


DMTO
Fmoc
OH
133
1. TBTU, DIEA
ACN, VIMAD 树脂
2. Ac2O 加帽
凯泽(Kaiser):阴性
134
标记:DBU:DMF
(2:2:96)
135
136
HBTU, DIEA, DMF
137
1. 标记:DBU:DMF
凯泽(Kaiser):阳性
2. Dde-Lys(Fmoc)-OH (138)
HATU, DIEA, DMF
凯泽(Kaiser):阴性
NH-Fmoc
139
1. 2% 肼/DMF
凯泽(Kaiser):阳性
2. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (140)
HATU, DIEA, DMF
凯泽(Kaiser):阴性
141

[1297]

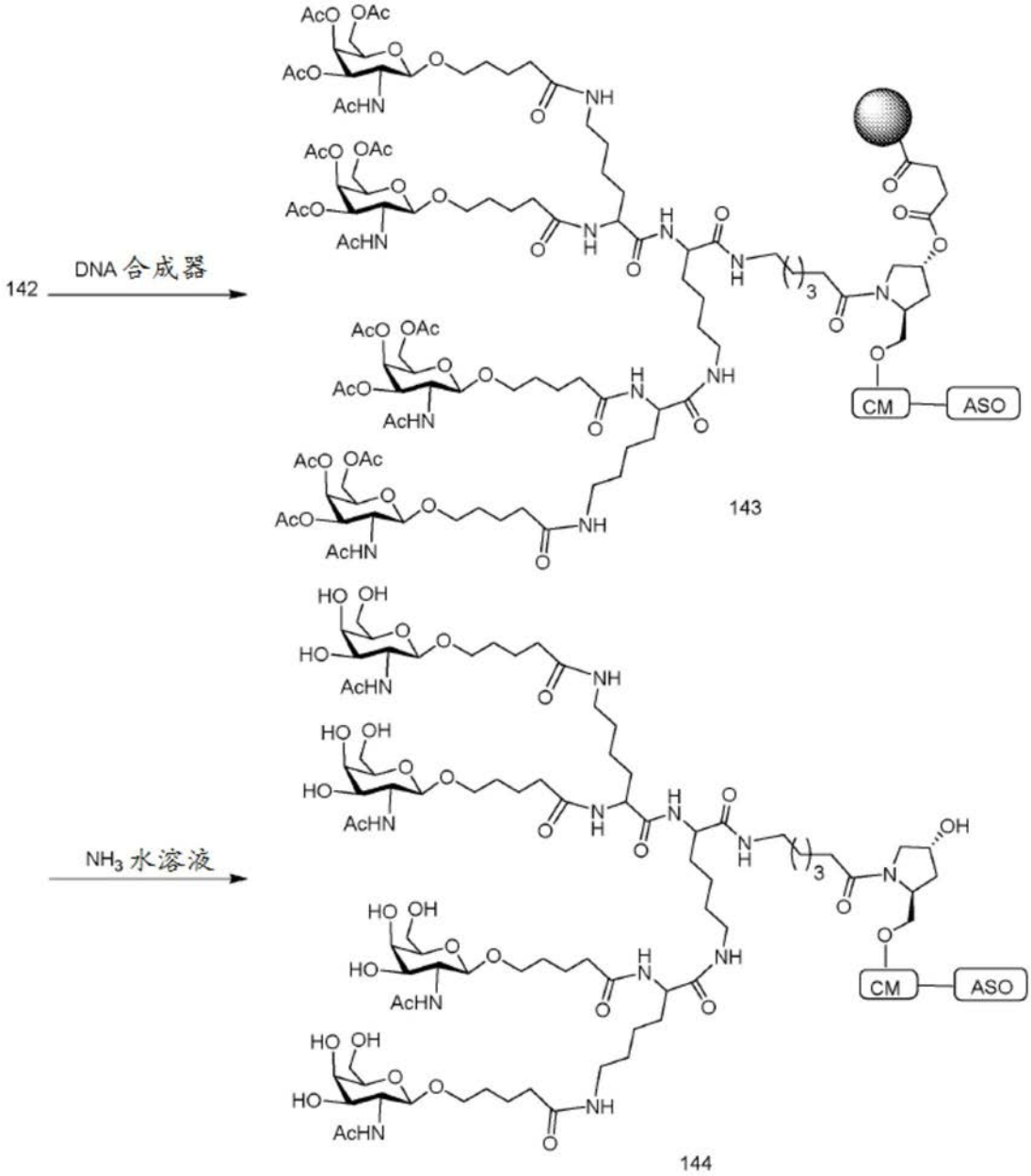


142

[1298] 化合物134的合成。向Merrifield烧瓶中添加用乙腈、二甲基甲酰胺、二氯甲烷和乙腈洗涤的氨甲基VIMAD树脂(2.5g，450μmol/g)。树脂在乙腈(4mL)中溶胀。通过添加20(1.0mmol，0.747g)、TBTU(1.0mmol，0.321g)、乙腈(5mL)和DIEA(3.0mmol，0.5mL)将化合物133在100mL圆底烧瓶中预先活化。使此溶液搅拌5min，然后在振荡的情况下添加至Merrifield烧瓶。使悬浮液震荡3h。排出反应混合物并且用乙腈、DMF和DCM洗涤树脂。通过测量DCM中的DMT阳离子在500nm(消光系数＝76000)处的吸光度来定量新树脂负载量并且测定为238μmol/g。通过悬浮于乙酸酐溶液中持续十分钟，进行三次，来将树脂加帽。

[1299] 使用反复基于Fmoc(iterative Fmoc-based)的固相肽合成方法来合成固体载体结合的化合物141。拆下少量的固体载体并且将其悬浮于氨水(28-30重量％)中6h。通过LC-MS分析裂解的化合物并且所观察到的质量与结构一致。质量m/z 1063.8$[M+2H]^+$。

[1300] 使用固相肽合成方法来合成固体载体结合的化合物142。



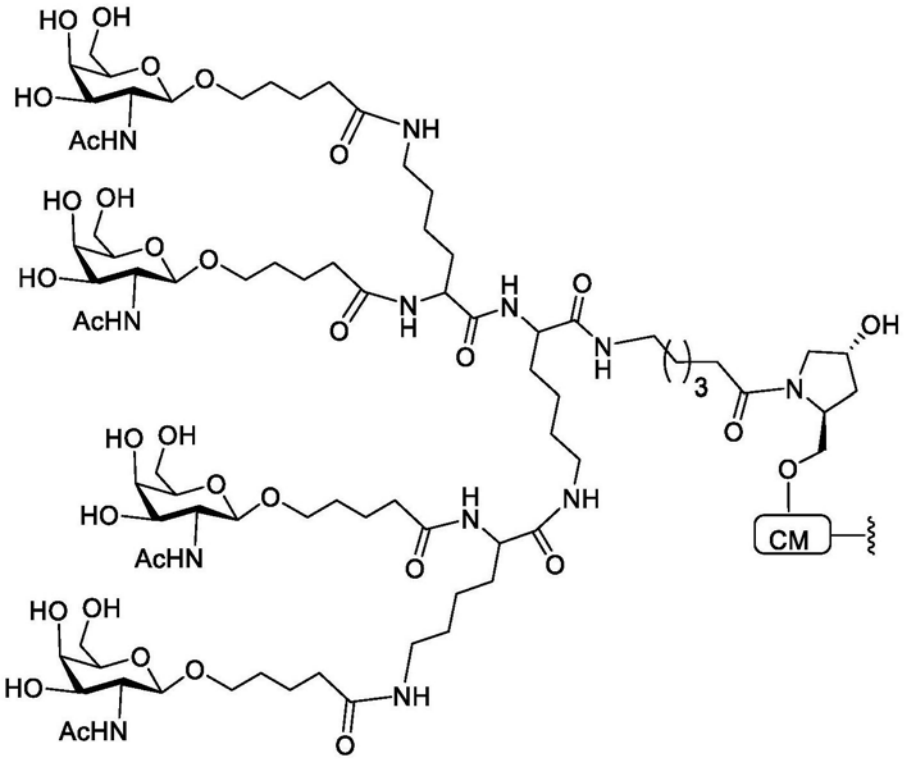
[1301]

[1302] 在DNA合成器上使用标准固相合成来合成固体载体结合的化合物143。

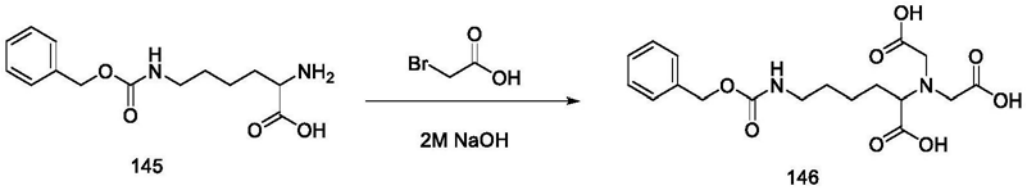
[1303] 将固体载体结合的化合物143悬浮于氨水(28-30重量%)中并且在55℃下加热16h。将溶液冷却并且过滤固体载体。浓缩滤液,将残余物溶解于水中并且通过HPLC在强阴离子交换柱上纯化。将含有全长化合物144的级分汇集在一起并且脱盐。通过LC-MS分析所得到的$GalNAc_4$-11缀合的低聚化合物并且所观察到的质量与结构一致。

[1304] 缀合物基团$GalNAc_4$-11的$GalNAc_4$聚簇部分($GalNAc_4$-11_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。

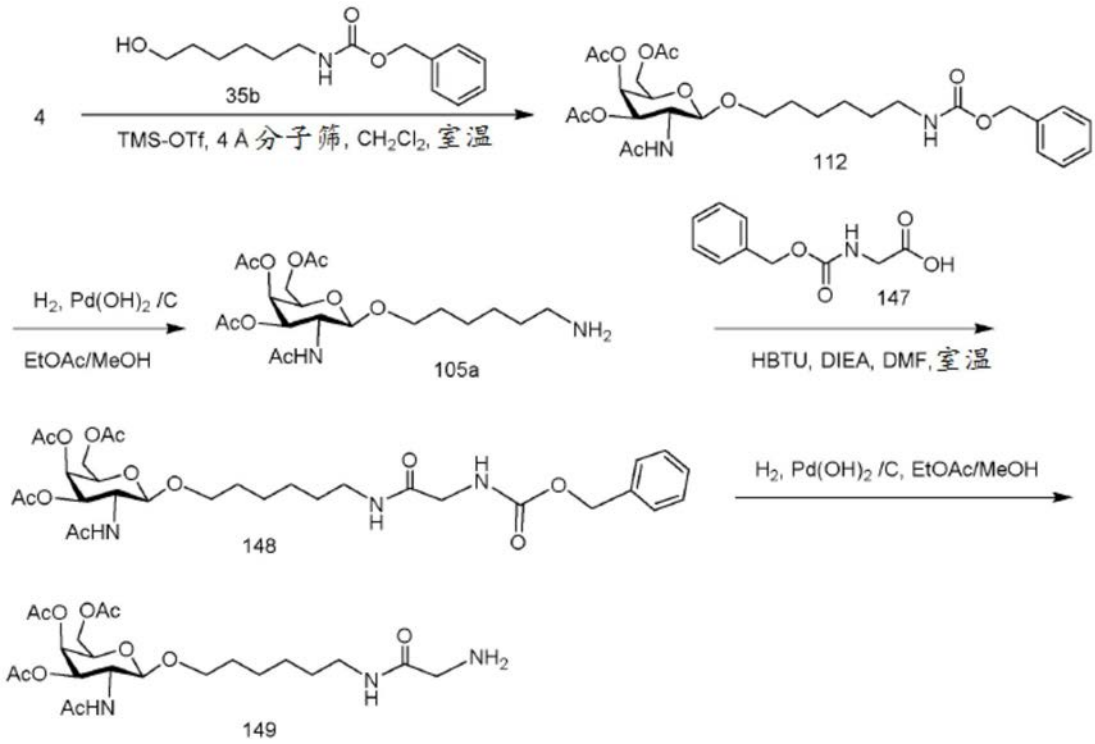
[1305] $GalNAc_4$-11($GalNAc_4$-11_a-CM)的结构在以下示出:

[1306] 

[1307] 实施例51:制备包含GalNAc3-6的寡核苷酸155

[1308] 

[1309] 如文献中所描述来合成化合物146(Analytical Biochemistry 1995,229,54-60)。

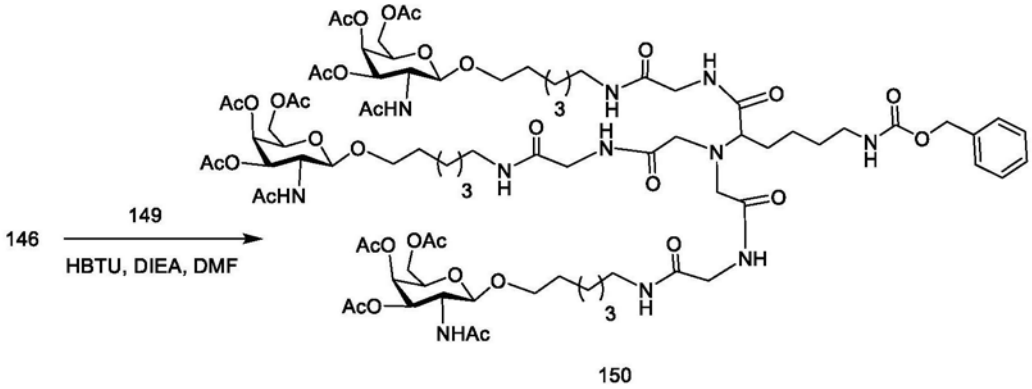
[1310] 

[1311] 将化合物4(15g,45.55mmol)和化合物35b(14.3克,57mmol)溶解于CH_2Cl_2(200ml)中。添加活化的分子筛(4 Å.2g,粉末状),并且使反应物在氮气气氛下搅拌30分钟。添加TMS-OTf(4.1ml,22.77mmol)并且使反应物在室温下搅拌过夜。当完成时,通过倾入到饱和$NaHCO_3$水溶液(500ml)和碎冰(大约150g)的溶液中来猝灭反应。将有机层分离、用盐水洗涤、通过$MgSO_4$干燥、过滤并且在减压下浓缩至橙色油状物。通过硅胶柱色谱法纯化粗材料并且用2%-10%的CH_2Cl_2中的MeOH洗脱,得到化合物112(16.53g,63%)。LCMS和^{1}H NMR与预期的化合物一致。

[1312] 将化合物112(4.27g,7.35mmol)溶解于1:1MeOH/EtOAc(40ml)中。通过使氩气流鼓泡穿过溶液15分钟来吹扫反应混合物。添加Pearlman氏催化剂(碳上氢氧化钯,400mg),并且使氢气鼓泡穿过溶液30分钟。在完成时(TLC 10%的CH_2Cl_2中的MeOH和LCMS),通过过滤通过硅藻土垫来去除催化剂。通过旋转蒸发来浓缩滤液,并且在高真空下简单干燥以得到化合物105a(3.28g)。LCMS和1H NMR与希望的产物一致。

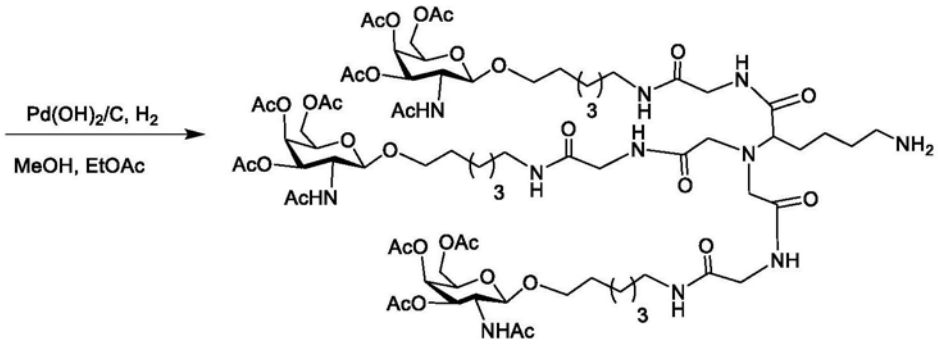
[1313] 将化合物147(2.31g,11mmol)溶解于无水DMF(100mL)中。添加N,N-二异丙基乙胺(DIEA,3.9mL,22mmol),接着添加HBTU(4g,10.5mmol)。使反应混合物在氮气下搅拌大约15分钟。向其中添加化合物105a(3.3g,7.4mmol)在干燥DMF中的溶液并且在氮气气氛下搅拌2h。将反应物用EtOAc稀释并且用饱和$NaHCO_3$水溶液和盐水洗涤。将有机相分离、干燥($MgSO_4$)、过滤并且浓缩至橙色浆状物。通过柱色谱法2%-5%的CH_2Cl_2中的MeOH来纯化粗材料,得到化合物148(3.44g,73%)。LCMS和^{1}H NMR与预期的产物一致。

[1314] 将化合物148(3.3g,5.2mmol)溶解于1:1MeOH/EtOAc(75ml)中。通过使氩气流鼓泡穿过溶液15分钟来吹扫反应混合物。添加Pearlman氏催化剂(碳上氢氧化钯)(350mg)。使氢气鼓泡穿过溶液30分钟。在完成时(TLC 10%的DCM中的MeOH和LCMS),通过过滤通过硅藻土垫来去除催化剂。通过旋转蒸发浓缩滤液并且将其在高真空下简单干燥,得到化合物149(2.6g)。LCMS与希望的产物一致。将残余物溶解于干燥DMF(10ml)中,其立即用于下一步。



150

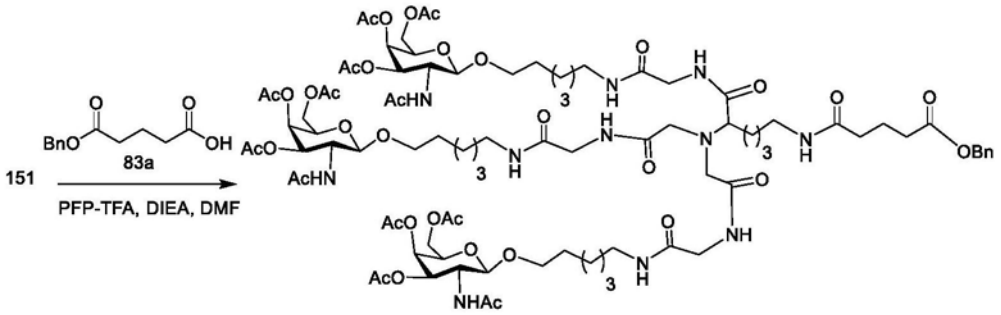
[1315]



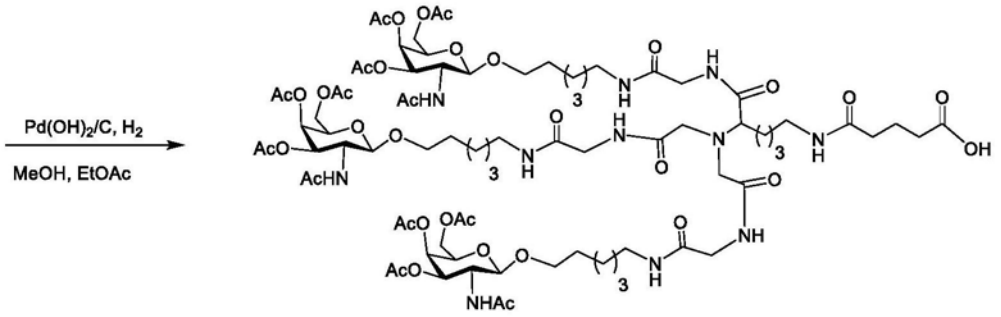
151

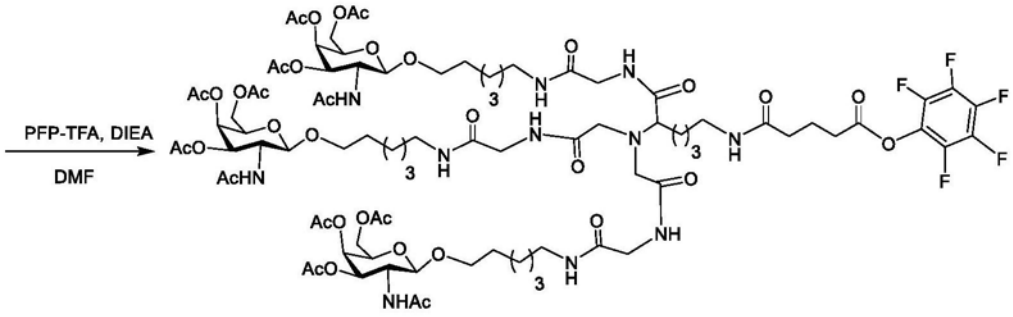
[1316] 将化合物146(0.68g,1.73mmol)溶解于干燥DMF(20ml)中。向其中添加DIEA(450μL,2.6mmol,1.5当量)和HBTU(1.96g,0.5.2mmol)。使反应混合物在氮气下在室温下搅拌15分钟。添加化合物149(2.6g)在无水DMF(10mL)中的溶液。通过添加DIEA(如果必要的话)将反应物的pH调节至pH＝9-10。使反应在室温下在氮气下搅拌2h。在完成时,将反应物用EtOAc(100mL)稀释,并且用饱和$NaHCO_3$水溶液洗涤、接着用盐水洗涤。将有机相分离、用$MgSO_4$干燥、过滤并且浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物并且用2%-10%的CH_2Cl_2中的MeOH洗脱,得到化合物150(0.62g,20%)。LCMS和^1H NMR与所需的产物一致。

[1317] 将化合物150(0.62g)溶解于1:1MeOH/EtOAc(5L)中。通过使氩气流鼓泡穿过溶液15分钟来吹扫反应混合物。添加Pearlman氏催化剂(碳上氢氧化钯)(60mg)。使氢气鼓泡穿过溶液30分钟。在完成时(TLC 10%的DCM中的MeOH和LCMS),通过过滤(注射器针头式特氟龙过滤器,0.45μm)来去除催化剂。通过旋转蒸发浓缩滤液并且将其在高真空下简单干燥,得到化合物151(0.57g)。LCMS与希望的产物一致。将产物溶解于4mL干燥DMF中并且立即用于下一步。



[1318]



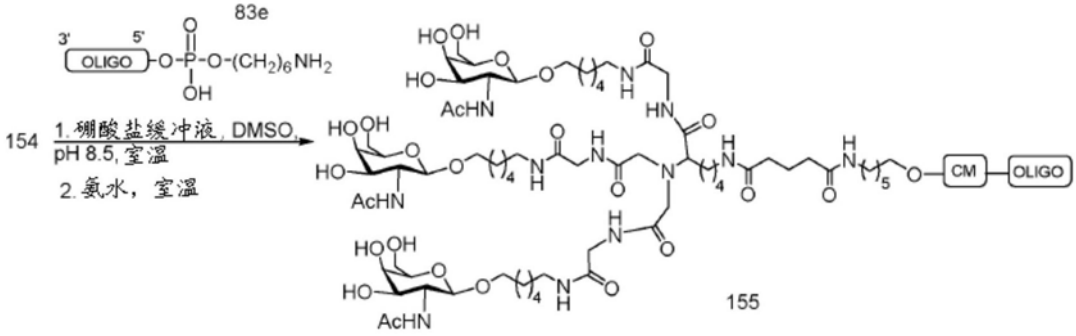


[1319] 将化合物83a(0.11g,0.33mmol)溶解于无水DMF(5mL)中并且添加N,N-二异丙基乙胺(75μL,1mmol)和PFP-TFA(90μL,0.76mmol)。当接触时反应混合物变为洋红色,并且在接下来的30分钟里逐渐变为橙色。通过TLC和LCMS监测反应的进展。当完成时(形成PFP酯),添加化合物151(0.57g,0.33mmol)在DMF中的溶液。通过添加N,N-二异丙基乙胺(如果必要的话)将反应物的pH调节至pH=9-10。将反应混合物在氮气下搅拌大约30min。当完成时,在减压下去除大部分溶剂。用CH_2Cl_2稀释残余物并且用饱和$NaHCO_3$水溶液洗涤,接着用盐水洗涤。将有机相分离、通过$MgSO_4$干燥、过滤并且浓缩至橙色浆状物。通过硅胶柱色谱法(2%-10%的CH_2Cl_2中的MeOH)纯化残余物,得到化合物152(0.35g,55%)。LCMS和^1H NMR与所需的产物一致。

[1320] 将化合物152(0.35g,0.182mmol)溶解于1:1MeOH/EtOAc(10mL)中。通过使氩气流鼓泡穿过溶液15分钟来吹扫反应混合物。添加Pearlman氏催化剂(碳上氢氧化钯)(35mg)。使氢气鼓泡穿过溶液30分钟。在完成时(TLC 10%的DCM中的MeOH和LCMS),通过过滤(注射器针头式特氟龙过滤器,0.45μm)来去除催化剂。通过旋转蒸发来浓缩滤液并且将其在高真空下简单干燥,得到化合物153(0.33g,定量的)。LCMS与希望的产物一致。

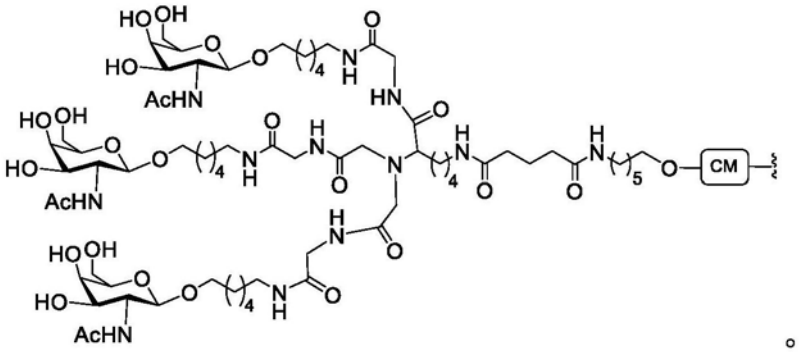
[1321] 在氮气下搅拌的情况下,将化合物153(0.33g,0.18mmol)溶解于无水DMF(5mL)中。

向其中添加N,N-二异丙基乙胺(65μL,0.37mmol)和PFP-TFA(35μL,0.28mmol)。将反应混合物在氮气下搅拌大约30min。当接触时反应混合物变为洋红色,并且逐渐变为橙色。通过添加更多的N,-二异丙基乙胺将反应混合物的pH维持在pH=9-10。通过TLC和LCMS监测反应的进展。当完成时,在减压下去除大部分溶剂。用CH_2Cl_2(50mL)稀释残余物并且用饱和$NaHCO_3$水溶液洗涤,接着用盐水洗涤。将有机层分离、通过$MgSO_4$干燥、过滤并且浓缩至橙色浆状物。通过柱色谱法纯化残余物并且用2%-10%的CH_2Cl_2中的MeOH洗脱,得到化合物154(0.29g,79%)。LCMS和^{1}H NMR与所需的产物一致。

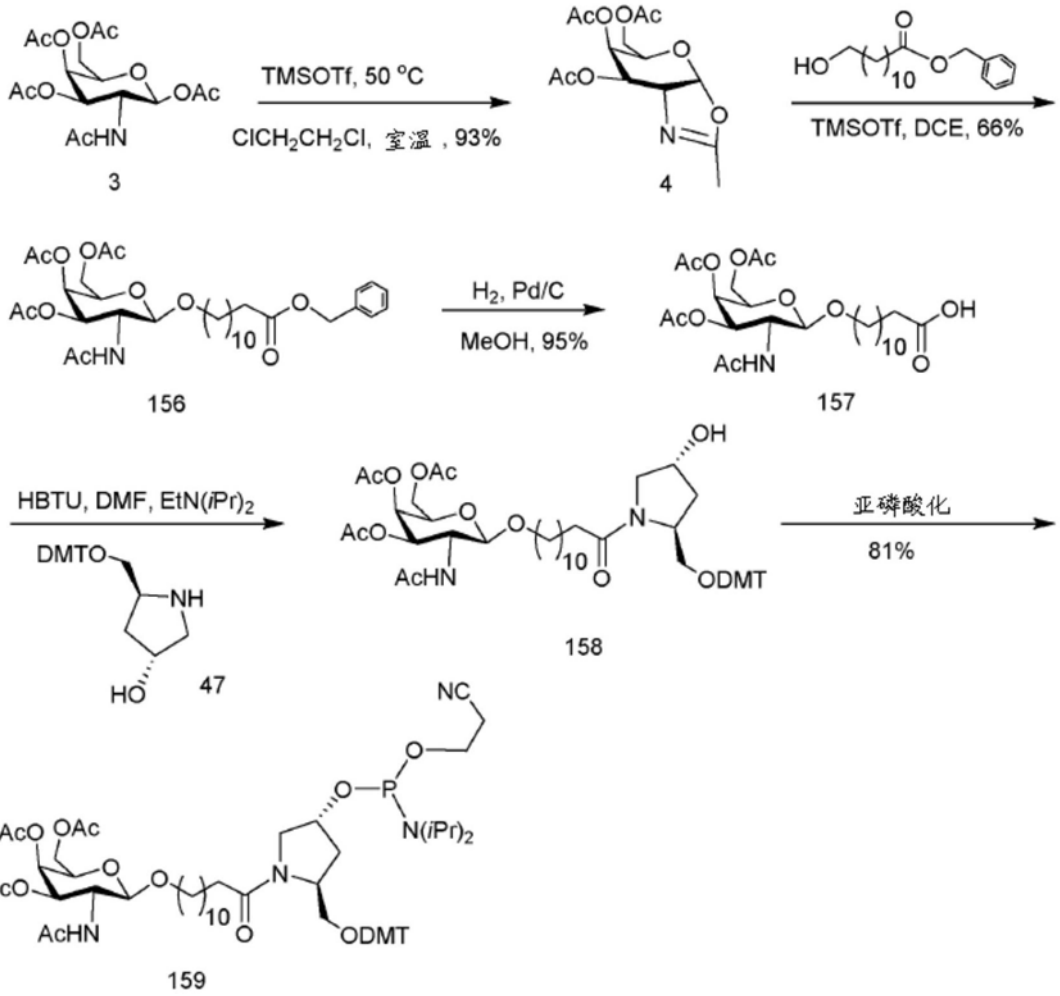
[1322] 

[1323] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-6缀合物基团的低聚化合物155。缀合物基团$GalNAc_3$-6的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-6_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。

[1324] $GalNAc_3$-6($GalNAc_3$-6_a-CM-)的结构在以下示出:

[1325] 

[1326] 实施例52:制备包含$GalNAc_3$-9的寡核苷酸160



[1327]

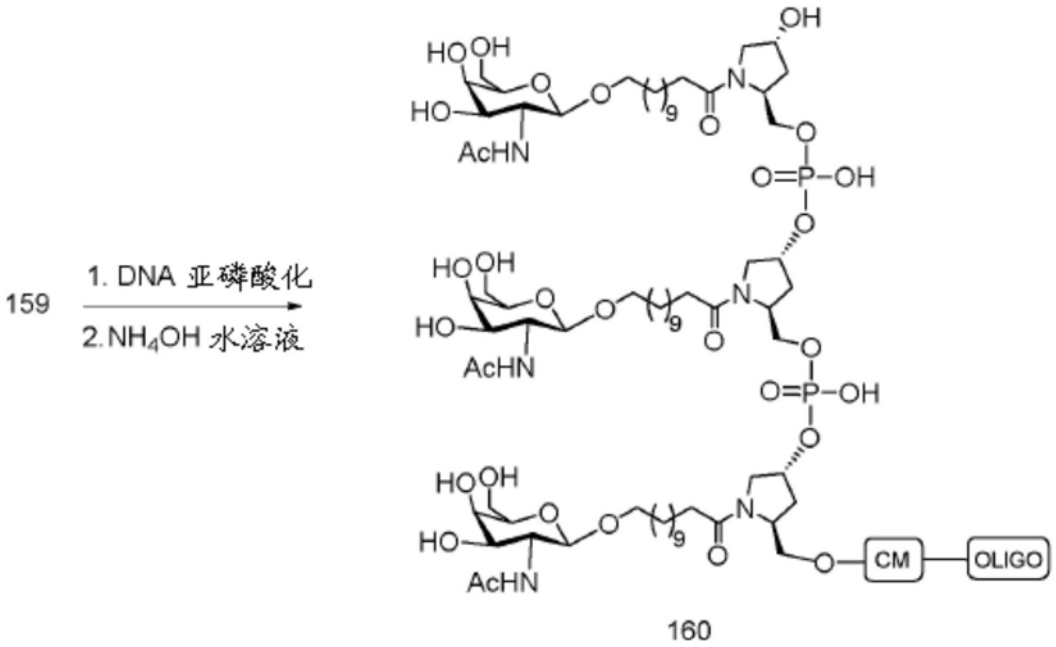
[1328] 根据文献中描述的工序合成化合物156(J.Med.Chem.2004,47,5798-5808)。

[1329] 将化合物156(18.60g,29.28mmol)溶解于甲醇(200mL)中。添加钯碳(6.15g,10重量%,负载量(干基),基质碳粉,湿润)。将此反应混合物在室温下在氢气下搅拌18h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并且用甲醇彻底洗涤硅藻土垫。洗涤合并的滤液并且浓缩至干燥。通过硅胶柱色谱法纯化残余物并且用5%-10%的二氯甲烷中的甲醇洗脱,得到化合物157(14.26g,89%)。质量m/z 544.1[M-H]$^-$。

[1330] 将化合物157(5g,9.17mmol)溶解于无水DMF(30mL)中。添加HBTU(3.65g,9.61mmol)和N,N-二异丙基乙胺(13.73mL,78.81mmol)并且将反应混合物在室温下搅拌5分钟。向其中添加化合物47(2.96g,7.04mmol)的溶液。将反应在室温下搅拌8h。将反应混合物倾入到饱和$NaHCO_3$水溶液中。用乙酸乙酯萃取混合物,并且将有机层用盐水洗涤并干燥(Na_2SO_4)、过滤和蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化所获得的残余物并且用50%的己烷中的乙酸乙酯洗脱,得到化合物158(8.25g,73.3%)。通过MS和^{1}H NMR分析来证实结构。

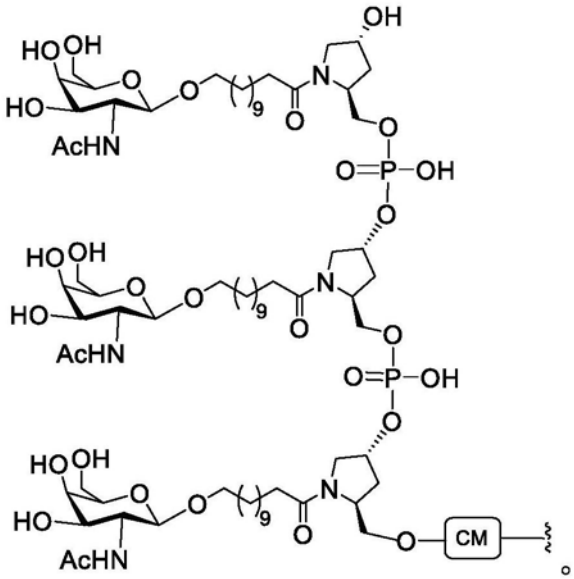
[1331] 在减压下通过P_2O_5干燥化合物158(7.2g,7.61mmol)。将干燥的化合物溶解于无水DMF(50mL)中。向其中添加1H-四唑(0.43g,6.09mmol)和N-甲基咪唑(0.3mL,3.81mmol)以及2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基二氨基磷酸酯(3.65mL,11.50mmol)。将反应混合物在氩气气氛下搅拌4h。将反应混合物用乙酸乙酯(200mL)稀释。用饱和$NaHCO_3$和盐水洗涤反应混合物。将有机相分离、干燥(Na_2SO_4)、过滤并且蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化残余物并且用50%-90%的己烷中的乙酸乙酯洗脱,得到化合物159(7.82g,80.5%)。通过LCMS和^{31}P NMR

分析来证实结构。

[1332] 

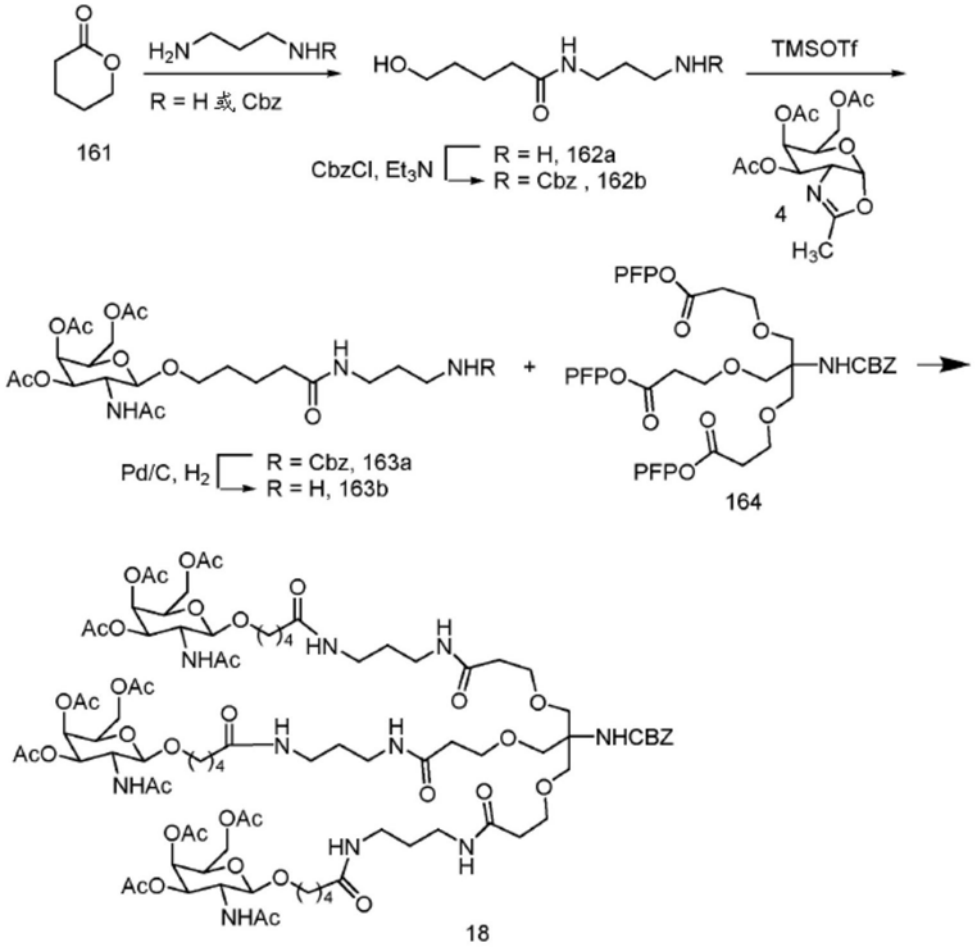
160

[1333] 使用标准寡核苷酸合成工序制备包含GalNAc$_3$-9缀合物基团的低聚化合物160。将化合物159的三个单元偶联至固体载体，接着偶联核苷酸亚磷酰胺。用氨水处理受保护的低聚化合物得到化合物160。缀合物基团GalNAc$_3$-9的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-9$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-9(GalNAc$_3$-9$_a$-CM)的结构在以下示出：

[1334] 

[1335] 实施例53：用于制备化合物18(GalNAc$_3$-1a和GalNAc$_3$-3a)的替代工序

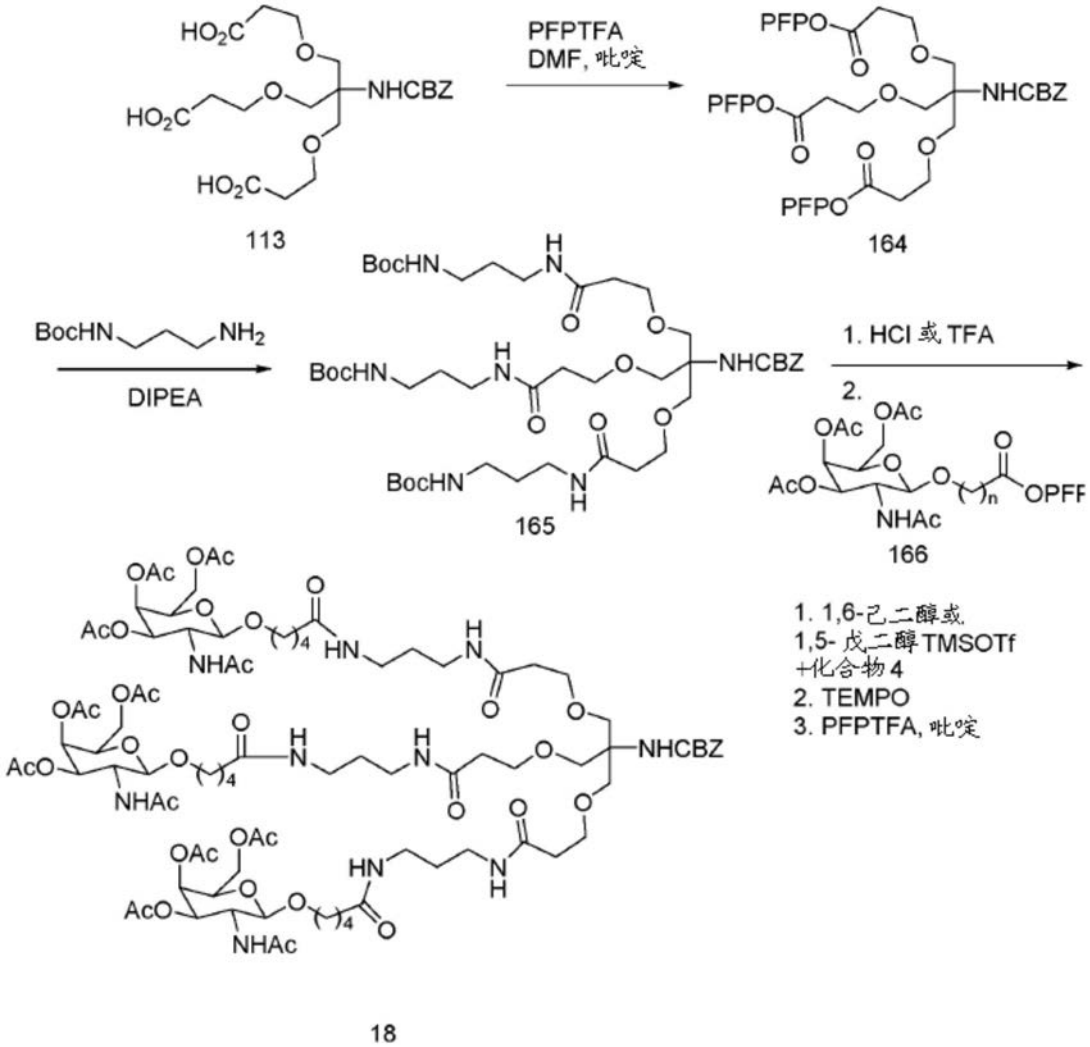
[1336]



[1337] 使内酯161与二氨基丙烷(3-5当量)或单-Boc保护的二氨基丙烷(1当量)反应,以提供醇162a或162b。当未受保护的丙二胺用于上述反应时,通过在高真空下蒸发来去除过量的二胺并且使用CbzCl保护162a中的游离氨基,以在通过柱色谱法纯化之后提供呈白色固体的162b。在TMSOTf的存在下,使醇162b与化合物4进一步反应,以提供163a,所述163a通过使用催化氢化去除Cbz基团而转化为163b。通过使三元酸113(参见实施例48)与DMF(0.1M至0.5M)中的PFPTFA(3.5当量)和吡啶(3.5当量)反应来制备五氟苯基(PFP)酯164。使三酯164与胺163b(3-4当量)和DIPEA(3-4当量)直接反应,以提供化合物18。以上方法极大地促进中间体的纯化并且使副产物的形成最小化,所述副产物使用实施例4中描述的工序形成。

[1338] 实施例54:用于制备化合物18(GalNAc$_3$-1a和GalNAc$_3$-3a)的替代工序

[1339]



18

[1340] 使用实施例53中概述的工序由酸113制备三PFP酯164并且使其与单-Boc保护的二胺反应,以提供基本上定量产率的165。用盐酸或三氟乙酸去除Boc基团以提供三胺,所述三胺在合适的碱如DIPEA的存在下与PFP活化的酸166反应,以提供化合物18。

[1341] 通过用DMF中的PFPTFA(1-1.2当量)和吡啶(1-1.2当量)处理来由对应的酸制备PFP保护的Gal-NAc酸166。继而通过使用乙腈和水中的TEMPO(0.2当量)和BAIB的氧化来由对应的醇制备前体酸。使用先前在实施例47中描述的条件,通过与1,6-己二醇(或1,5-戊二醇或对于其他n值的其他二元醇)(2-4当量)和TMSOTf反应来由糖中间体4制备前体醇。

[1342] 实施例55:靶向SRB-1的包含3'-缀合物基团或5'-缀合物基团的寡核苷酸(比较$GalNAc_3$-1、3、8以及9)的体内剂量依赖性研究

[1343] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。包括未缀合的ISIS 353382作为标准物。各种$GalNAc_3$缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷(可裂解部分)连接在相应寡核苷酸的3'或5'末端处。

[1344] 表39

[1345] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1346]

ASO	序列(5'至3')	基序	缀合物	SEQ ID No.
ISIS 353382 (母体)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	无	2256
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	2257
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-9_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-9**	2257
ISIS 661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	2258
ISIS 665001	**GalNAc$_3$-8$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-8**	2258

[1347] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1348] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出。GalNAc$_3$-9的结构先前在实施例52中示出。GalNAc$_3$-3的结构先前在实施例39中示出。GalNAc$_3$-8的结构先前在实施例47中示出。

[1349] 处理

[1350] 在以下示出的剂量下用ISIS 353382、655861、664078、661161、665001或用盐水皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1 mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1351] 如表40中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。事实上,在3'末端包含磷酸二酯连接的GalNAc$_3$-1和GalNAc$_3$-9缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 655861和ISIS 664078)和包含连接在5'末端的GalNAc$_3$-3和GalNAc$_3$-8缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 661161和ISIS 665001)与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 353382)相比显示出效力的大致改进。此外,在3'末端包含GalNAc$_3$-9缀合物的ISIS 664078与在3'末端包含GalNAc$_3$-1缀合物的ISIS 655861相比基本上效力相等。分别包含GalNAc$_3$-3或GalNAc$_3$-9的5'缀合的反义寡核苷酸ISIS 661161和ISIS 665001与3'缀合的反义寡核苷酸(ISIS 655861和ISIS 664078)相比具有增加的效力。

[1352] 表40

[1353] 靶向SRB-1的含有GalNAc$_3$-1、3、8或9的ASO

[1354]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	缀合物
盐水	n/a	100	
353382	3	88	无
	10	68	
	30	36	
655861	0.5	98	**GalNac$_3$ -1** (3')
	1.5	76	
	5	31	
	15	20	

[1355]

664078	0.5	88	**GalNac$_3$-9** (3')
	1.5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0.5	92	**GalNac$_3$-3** (5')
	1.5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0.5	100	**GalNac$_3$-8** (5')
	1.5	73	
	5	29	
	15	13	

[1356] 使用标准方案，相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化，其中与盐水组相比没有显著变化。ALT、AST、总胆红素和BUN值在下表中示出。

[1357] 表41

[1358]

ISIS No.	剂量 mg/kg	ALT	AST	总胆红素	BUN	缀合物
盐水		24	59	0.1	37.52	
353382	3	21	66	0.2	34.65	无
	10	22	54	0.2	34.2	
	30	22	49	0.2	33.72	
655861	0.5	25	62	0.2	30.65	**GalNac$_3$-1** (3')
	1.5	23	48	0.2	30.97	
	5	28	49	0.1	32.92	
	15	40	97	0.1	31.62	
664078	0.5	40	74	0.1	35.3	**GalNac$_3$-9** (3')
	1.5	47	104	0.1	32.75	
	5	20	43	0.1	30.62	
	15	38	92	0.1	26.2	
661161	0.5	101	162	0.1	34.17	**GalNac$_3$-3** (5')
	1.5 g	42	100	0.1	33.37	
	5 g	23	99	0.1	34.97	
	15	53	83	0.1	34.8	
665001	0.5	28	54	0.1	31.32	**GalNac$_3$-8** (5')
	1.5	42	75	0.1	32.32	
	5	24	42	0.1	31.85	
	15	32	67	0.1	31.	

[1359] 实施例56:靶向SRB-1的包含3'-缀合物基团或5'-缀合物基团的寡核苷酸(比较GalNAc$_3$-1、2、3、5、6、7以及10)的体内剂量依赖性研究

[1360] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。包括未缀合的ISIS 353382作为标准物。各种GalNAc$_3$缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷(可裂解部分)连接在相应寡核苷酸的5'末端处,具有连接在3'末端处的GalNAc$_3$缀合物基团的ISIS 655861除外。

[1361] 表42

[1362] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1363]

ASO	序列(5'至3')	基序	**缀合物**	SEQ ID No.
ISIS 353382 (母体)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	无缀合物	2256
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	2257
ISIS 664507	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}2_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-2**	2258
ISIS 661161	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	2258
ISIS 666224	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}5_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-5**	2258
ISIS 666961	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}6_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-6**	2258
ISIS 666981	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-7**	2258
ISIS 666881	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-10**	2258

[1364] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1365] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出。GalNAc$_3$-2$_a$的结构先前在实施例37中示出。GalNAc$_3$-3$_a$的结构先前在实施例39中示出。GalNAc$_3$-5$_a$的结构先前在实施例49中示出。GalNAc$_3$-6$_a$的结构先前在实施例51中示出。GalNAc$_3$-7$_a$的结构先前在实施例48中示出。GalNAc$_3$-10$_a$的结构先前在实施例46中示出。

[1366] 处理

[1367] 在以下示出的剂量下用ISIS 353382、655861、664507、661161、666224、666961、666981、666881或用盐水皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1368] 如表43中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。事实上,缀合反义寡核苷酸与未缀合反义寡核苷酸(ISIS 353382)相比显示出效力的大致改进。5'缀合的反义寡核苷酸与3'缀合的反义寡核苷酸相比显示出效力稍微增加。

[1369] 表43

[1370]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	缀合物
盐水	n/a	100.0	
353382	3	96.0	无
	10	73.1	
	30	36.1	
655861	0.5	99.4	**GalNac$_3$-1** (3')
	1.5	81.2	
	5	33.9	
	15	15.2	
664507	0.5	102.0	**GalNac$_3$-2** (5')
	1.5	73.2	
	5	31.3	
	15	10.8	
661161	0.5	90.7	**GalNac$_3$-3** (5')
	1.5	67.6	

[1371]

	5	24.3	
	15	11.5	
666224	0.5	96.1	**GalNac$_3$-5** (5')
	1.5	61.6	
	5	25.6	
	15	11.7	
666961	0.5	85.5	**GalNAc$_3$-6** (5')
	1.5	56.3	
	5	34.2	
	15	13.1	
666981	0.5	84.7	**GalNAc$_3$-7** (5')
	1.5	59.9	
	5	24.9	
	15	8.5	
666881	0.5	100.0	**GalNAc$_3$-10** (5')
	1.5	65.8	
	5	26.0	
	15	13.0	

[1372] 使用标准方案,相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平,即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化,其中与盐水组相比没有显著变化。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表44中示出。

[1373] 表44

[1374]

ISIS No.	剂量 mg/kg	ALT	AST	总胆红素	BUN	缀合物
盐水		26	57	0.2	27	
353382	3	25	92	0.2	27	无
	10	23	40	0.2	25	
	30	29	54	0.1	28	
655861	0.5	25	71	0.2	34	**GalNac$_3$-1** (3')
	1.5	28	60	0.2	26	
	5	26	63	0.2	28	
	15	25	61	0.2	28	
664507	0.5	25	62	0.2	25	**GalNac$_3$-2** (5')
	1.5	24	49	0.2	26	
	5	21	50	0.2	26	
	15	59	84	0.1	22	
661161	0.5	20	42	0.2	29	**GalNac$_3$-3** (5')
	1.5 g	37	74	0.2	25	
	5 g	28	61	0.2	29	
	15	21	41	0.2	25	
666224	0.5	34	48	0.2	21	**GalNac$_3$-5** (5')
	1.5	23	46	0.2	26	

[1375]

	5	24	47	0.2	23	
	15	32	49	0.1	26	
666961	0.5	17	63	0.2	26	**GalNAc$_3$-6** (5')
	1.5	23	68	0.2	26	
	5	25	66	0.2	26	
	15	29	107	0.2	28	
666981	0.5	24	48	0.2	26	**GalNAc$_3$-7** (5')
	1.5	30	55	0.2	24	
	5	46	74	0.1	24	
	15	29	58	0.1	26	
666881	0.5	20	65	0.2	27	**GalNAc$_3$-10** (5')
	1.5	23	59	0.2	24	
	5	45	70	0.2	26	
	15	21	57	0.2	24	

[1376] 实施例57:靶向ApoC III的包含3'-缀合物基团的寡核苷酸的体内作用持续时间研究

[1377] 用以下指示的剂量注射小鼠一次并且经过42天的过程监测ApoC-III和血浆甘油三酯(血浆TG)水平。在每个组中使用3只表达人APOC-III的转基因小鼠进行研究。

[1378] 表45

[1379] 靶向ApoC III的修饰ASO

[1380]

ASO	序列(5'至3')	键联	SEQ ID No.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	PS	2248
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	PS	2249
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	PO/PS	2249

[1381] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1382] $GalNAc_3\text{-}1_a$的结构先前在实施例9中示出。

[1383] 表46

[1384] ApoC III mRNA(第1天时的%盐水)和血浆TG水平(第1天时的%盐水)

[1385]

ASO	剂量	靶标	第3天	第7天	第14天	第35天	第42天
盐水	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
盐水	0 mg/kg	血浆 TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 mg/kg	血浆 TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	血浆 TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	血浆 TG	21	19	15	32	35

[1386] 如上表中可看出,与未缀合寡核苷酸相比,作用持续时间随着3'-缀合物基团的添加而增加。与缀合的全部PS寡核苷酸647535相比,对于缀合的混合PO/PS寡核苷酸647536存在作用持续时间的进一步增加。

[1387] 实施例58:靶向SRB-1的包含3'-缀合物基团的寡核苷酸(比较$GalNAc_3\text{-}1$和$GalNAc_4\text{-}11$)的体内剂量依赖性研究

[1388] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。包括未缀合的ISIS 440762作为未缀合标准物。缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷可裂解部分连接在相应寡核苷酸的3'末端处。

[1389] $GalNAc_3\text{-}1_a$的结构先前在实施例9中示出。$GalNAc_3\text{-}11_a$的结构先前在实施例50中示出。

[1390] 处理

[1391] 在以下示出的剂量下用ISIS 440762、651900、663748或用盐水皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在

最后施用之后72小时将小鼠处死，以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1392] 如表47中所说明，用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。在3'末端包含磷酸二酯连接的$GalNAc_3$-1和$GalNAc_4$-11缀合物的反义寡核苷酸(ISIS 651900和ISIS 663748)与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 440762)相比显示出效力的大致改进。两种缀合寡核苷酸$GalNAc_3$-1和$GalNAc_4$-11效力相等。

[1393] 表47

[1394] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1395]

ASO	序列(5'至3')	剂量 mg/kg	%盐水对照	SEQ ID No.
盐水			100	
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	0.6	73.45	2250
		2	59.66	
		6	23.50	
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	0.2	62.75	2251
		0.6	29.14	
		2	8.61	
		6	5.62	
ISIS 663748	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_4\text{-}11_a}$	0.2	63.99	2251
		0.6	33.53	
		2	7.58	
		6	5.52	

[1396] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标："e"指示2'-MOE修饰核苷；"k"指示6'-(S)-CH_3双环核苷；"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷；"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS)；"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO)；并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1397] 使用标准方案，相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化，其中与盐水组相比没有显著变化。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表48中示出。

[1398] 表48

[1399]

ISIS No.	剂量 mg/kg	ALT	AST	总胆红素	BUN	缀合物
盐水		30	76	0.2	40	
440762	0.60	32	70	0.1	35	无
	2	26	57	0.1	35	
	6	31	48	0.1	39	
651900	0.2	32	115	0.2	39	**GalNac$_3$-1** (3')
	0.6	33	61	0.1	35	
	2	30	50	0.1	37	
	6	34	52	0.1	36	
663748	0.2	28	56	0.2	36	**GalNac$_4$-11** (3')
	0.6	34	60	0.1	35	
	2	44	62	0.1	36	
	6	38	71	0.1	33	

[1400] 实施例59:靶向FXI的GalNAc$_3$-1缀合的ASO的体内作用

[1401] 在多剂量研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的FXI的反义抑制。包括ISIS 404071作为未缀合标准物。缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷可裂解部分连接在相应寡核苷酸的3'末端处。

[1402] 表49

[1403] 靶向FXI的修饰ASO

[1404]

ASO	序列(5'至3')	键联	SEQ ID No.
ISIS 404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{e}$	PS	2259
ISIS 656172	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-1_a$**	PS	2260

[1405]

ISIS 656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-1_a$**	PO/PS	2260

[1406] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1407] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出。

[1408] 处理

[1409] 在以下示出的剂量下用ISIS 404071、656172、656173或用PBS处理的对照皮下注射六周龄雄性Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME),一周两次,持续3周。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏FXI mRNA水平。还使用ELISA测量了血浆FXI蛋白水平。在归一化为PBS处理的对照之前,确定相对于总RNA的FXI mRNA水平(使用RIBOGREEN®)。以下结果以每个处理组的FXI mRNA水平的平均百分比呈现。将数据归一化为PBS处理的对照并且表示为"%PBS"。使用如先前所述的类似方法测量ED$_{50}$并且在以下呈现。

[1410] 表50

[1411] 因子XI mRNA(%盐水)

[1412]

ASO	剂 量 mg/kg	%对照	缀合物	键联
盐水		100	无	
ISIS 404071	3	92	无	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0.7	74	**GalNAc$_3$-1**	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS	0.7	49	**GalNAc$_3$-1**	PO/PS

[1413]

656173	2	22		
	6	1		

[1414] 如表50中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低FXI mRNA水平。包含3'-GalNAc$_3$-1缀合物基团的寡核苷酸与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 404071)相比显示出效力的大致改进。在两种缀合寡核苷酸之间,通过用PO取代一些PS键联(ISIS 656173)来进一步提供效力改进。

[1415] 如表50a中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低FXI蛋白水平。包含3'-GalNAc$_3$-1缀合物基团的寡核苷酸与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 404071)相比显示出效力的大致改进。在两种缀合寡核苷酸之间,通过用PO取代一些PS键联(ISIS 656173)来进一步提供效力改进。

[1416] 表50a

[1417] 因子XI蛋白(%盐水)

[1418]

ASO	剂 量 mg/kg	蛋白质(%对照)	缀合物	键联
盐水		100	无	
ISIS 404071	3	127	无	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0.7	70	**GalNAc$_3$-1**	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0.7	45	**GalNAc$_3$-1**	PO/PS
	2	6		
	6	0		

[1419] 使用标准方案,相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平,即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素、总白蛋白、CRE和BUN。评价了体重变化,其中与盐水组相比没有显著变化。ALT、AST、总胆红素和BUN值在下表中示出。

[1420] 表51

[1421]

ISIS No.	剂 量 mg/kg	ALT	AST	总 白 蛋白	总胆 红素	CRE	BUN	缀合物
盐水		71.8	84.0	3.1	0.2	0.2	22.9	
404071	3	152.8	176.0	3.1	0.3	0.2	23.0	无
	10	73.3	121.5	3.0	0.2	0.2	21.4	
	30	82.5	92.3	3.0	0.2	0.2	23.0	
656172	0.7	62.5	111.5	3.1	0.2	0.2	23.8	**GalNac$_3$-1** (3')
	2	33.0	51.8	2.9	0.2	0.2	22.0	
	6	65.0	71.5	3.2	0.2	0.2	23.9	
656173	0.7	54.8	90.5	3.0	0.2	0.2	24.9	**GalNac$_3$-1** (3')
	2	85.8	71.5	3.2	0.2	0.2	21.0	
	6	114.0	101.8	3.3	0.2	0.2	22.7	

[1422] 实施例60:靶向SRB-1的缀合ASO的体外作用

[1423] 在多剂量研究中测试以下列出的寡核苷酸对原代小鼠肝细胞中的SRB-1的反义抑制。包括ISIS 353382作为未缀合标准物。缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷可裂解部分连接在相应寡核苷酸的3'或5'末端处。

[1424] 表52

[1425] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1426]

ASO	序列(5'至 3')	基序	缀合物	SEQ ID No.
ISIS 353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	无	2256
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	2257
ISIS 655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	2257
ISIS 661161	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	2258
ISIS 665001	**GalNAc$_3$-8$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-8**	2258
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-9_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-9**	2257
ISIS 666961	**GalNAc$_3$-6$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-6**	2258

[1427]

ISIS 664507	**GalNAc$_3$-2$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-2**	2258
ISIS 666881	**GalNAc$_3$-10$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-10**	2258
ISIS 666224	**GalNAc$_3$-5$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-5**	2258
ISIS 666981	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$,A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-7**	2258

[1428] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE

修饰核苷；“d”指示β-D-2’-脱氧核糖核苷；“s”指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS)；“o”指示磷酸二酯核苷间键联(PO)；并且“o’”指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1429] $GalNAc_3$-1_a的结构先前在实施例9中示出。$GalNAc_3$-3a的结构先前在实施例39中示出。$GalNAc_3$-8a的结构先前在实施例47中示出。$GalNAc_3$-9a的结构先前在实施例52中示出。$GalNAc_3$-6a的结构先前在实施例51中示出。$GalNAc_3$-2a的结构先前在实施例37中示出。$GalNAc_3$-10a的结构先前在实施例46中示出。$GalNAc_3$-5a的结构先前在实施例49中示出。$GalNAc_3$-7a的结构先前在实施例48中示出。

[1430] 处理

[1431] 在体外在小鼠原代肝细胞中测试以上列出的寡核苷酸，所述小鼠原代肝细胞以25,000个细胞/孔的密度涂布并且用0.03、0.08、0.24、0.74、2.22、6.67或20nM修饰寡核苷酸处理。在大约16小时的处理期之后，从细胞中分离RNA并且通过定量实时PCR测量mRNA水平并且如通过RIBOGREEN®所测量，根据总RNA含量调节SRB-1 mRNA水平。

[1432] 使用标准方法计算IC_{50}并且结果呈现于表53中。结果显示，在其中没有使用试剂或电穿孔技术来人工促进寡核苷酸进入到细胞中的自由摄取条件下，包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比不包含GalNAc缀合物的母体寡核苷酸(ISIS 353382)在肝细胞中显著更有效。

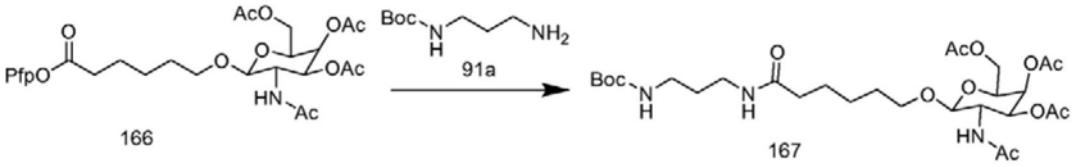
[1433] 表53

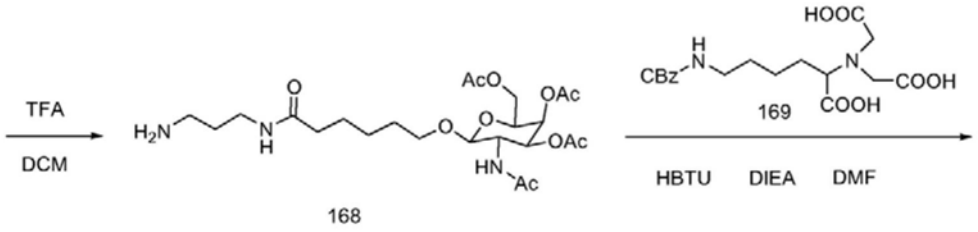
[1434]

ASO	IC_{50}(nM)	核苷间键联	缀合物	SEQ ID No.
ISIS 353382	190[a]	PS	无	2256
ISIS 655861	11[a]	PS	$GalNAc_3$-1	2257
ISIS 655862	3	PO/PS	$GalNAc_3$-1	2257
ISIS 661161	15[a]	PS	$GalNAc_3$-3	2258
ISIS 665001	20	PS	$GalNAc_3$-8	2258
ISIS 664078	55	PS	$GalNAc_3$-9	2257
ISIS 666961	22[a]	PS	$GalNAc_3$-6	2258
ISIS 664507	30	PS	$GalNAc_3$-2	2258
ISIS 666881	30	PS	$GalNAc_3$-10	2258
ISIS 666224	30[a]	PS	$GalNAc_3$-5	2258
ISIS 666981	40	PS	$GalNAc_3$-7	2258

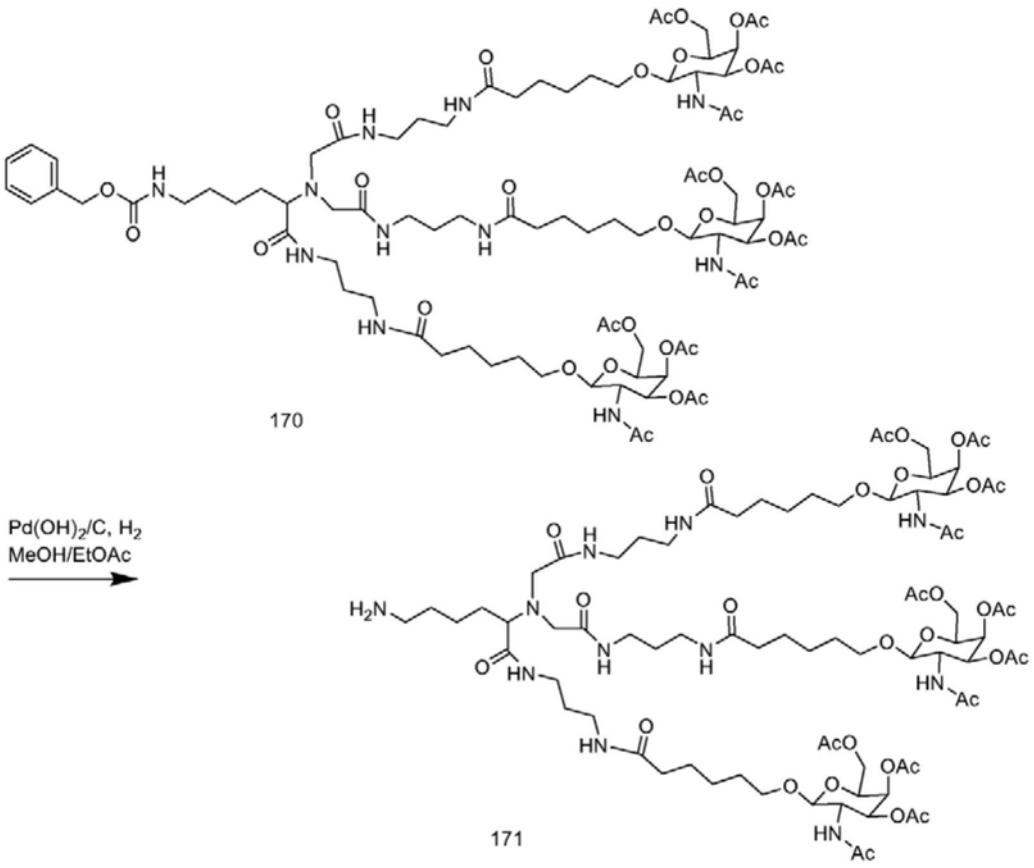
[1435] [a]多次运行的平均值。

[1436] 实施例61：制备包含$GalNAc_3$-12的低聚化合物175


AcO
OAc
Boc
NH2
91a
PfpO
HN
Ac
166
167

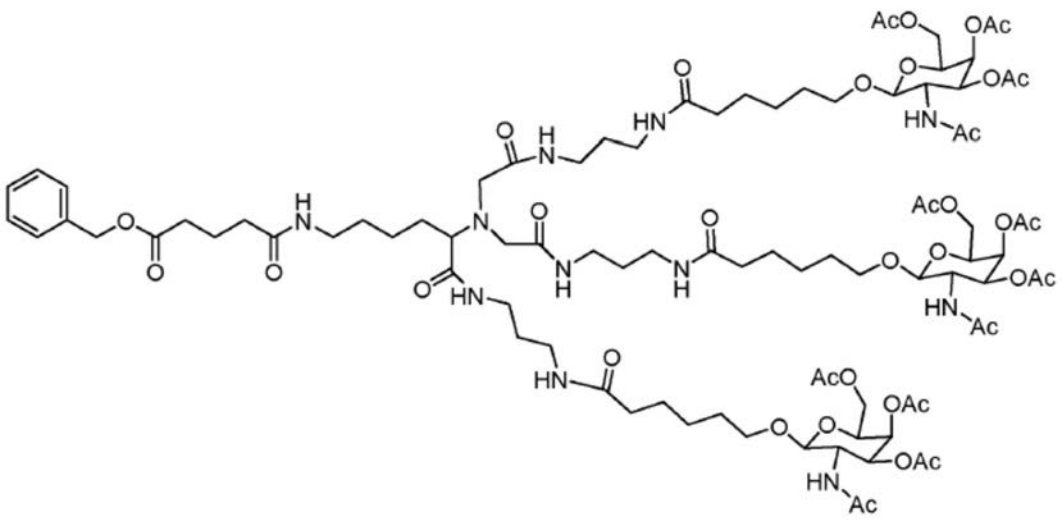

HOOC
CBz
COOH
169
TFA
DCM
HBTU
DIEA
DMF
168

[1437]

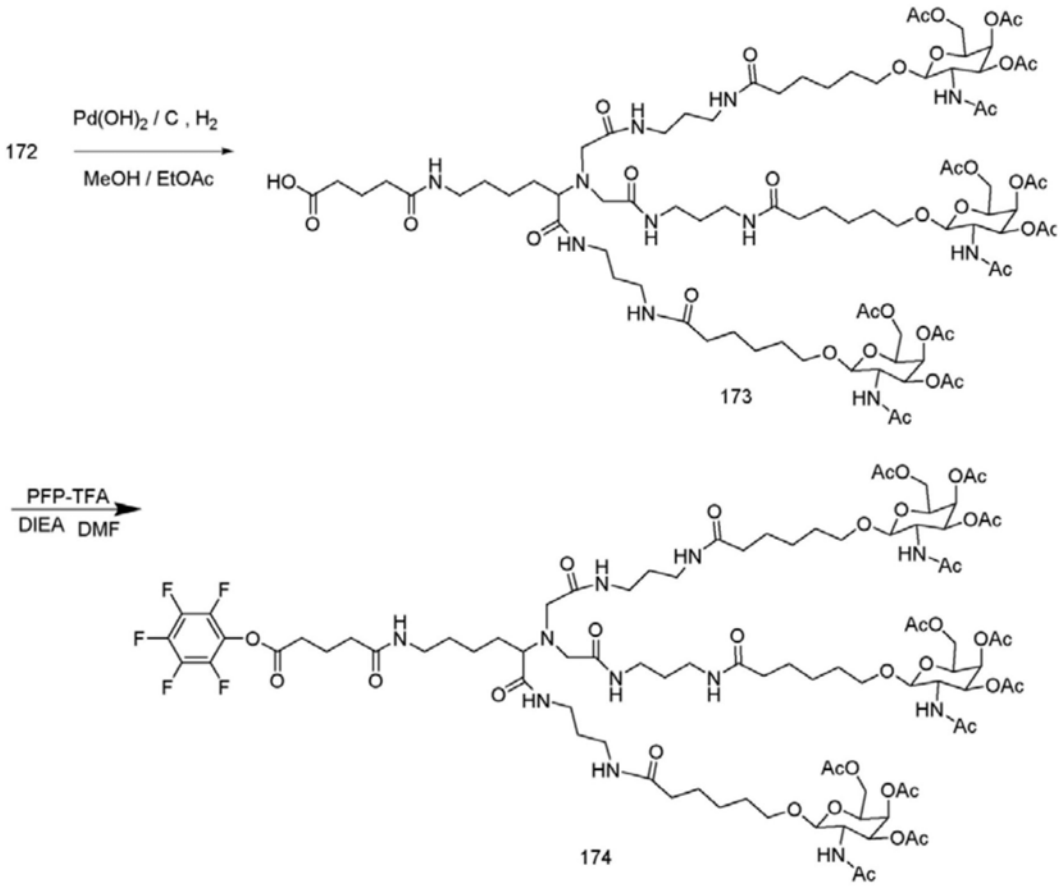

170
Pd(OH)2/C, H2
MeOH/EtOAc
171



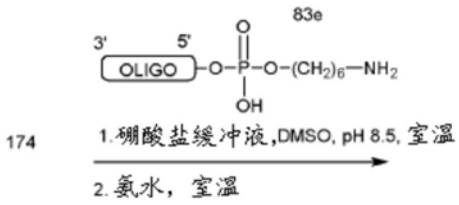
[1438]

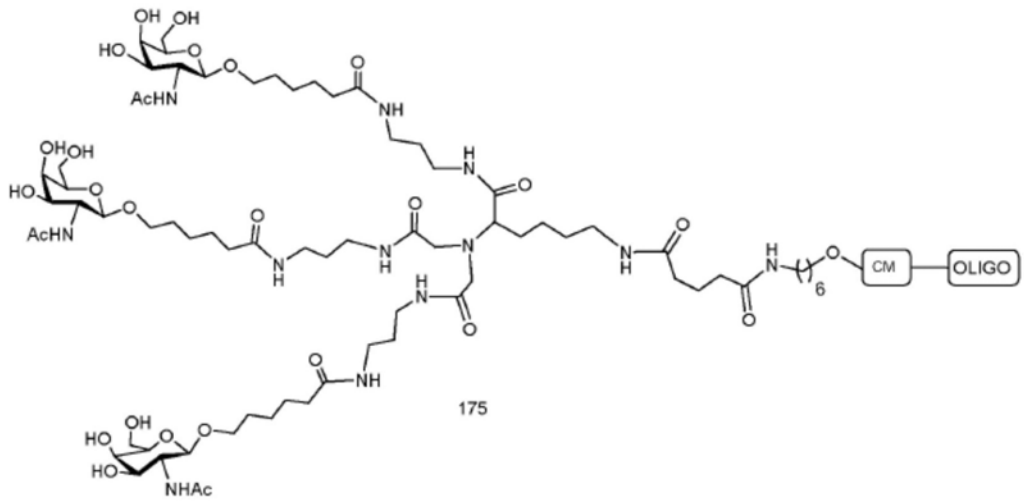


172



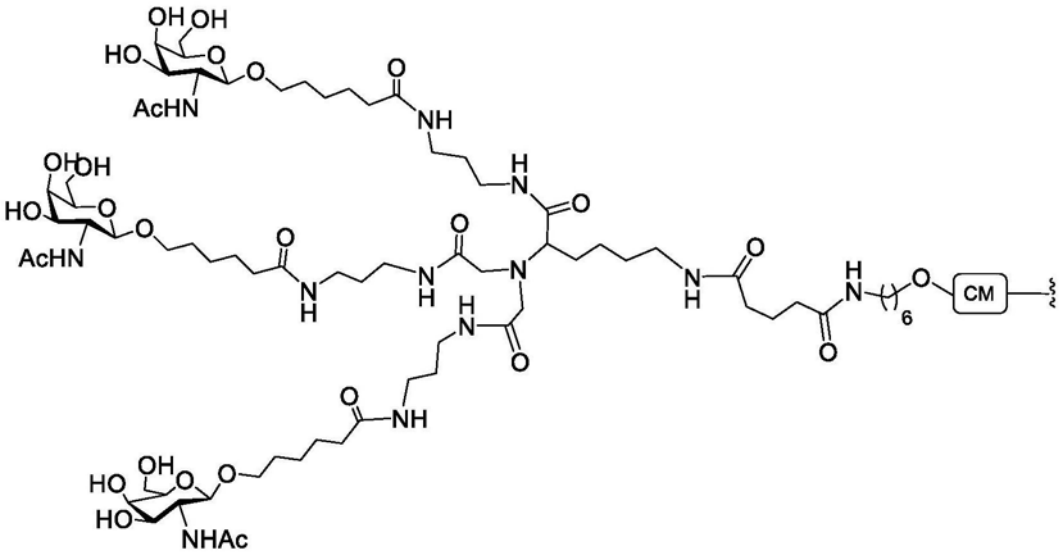
[1439]





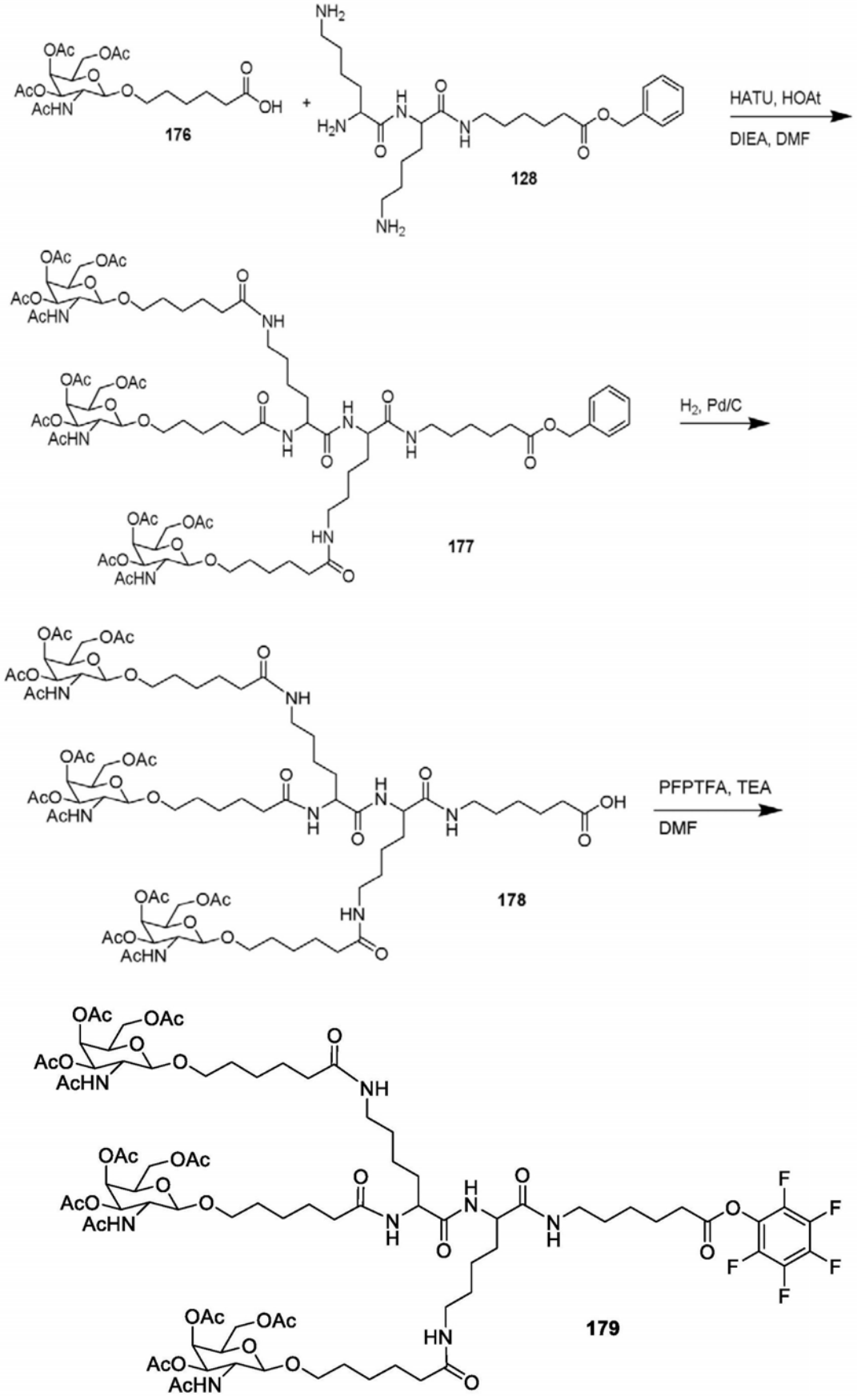
[1440] 化合物169为商业上可获得的。通过向化合物171添加苯甲基(全氟苯基)戊二酸酯来制备化合物172。通过向DMF中的5-(苯甲氧基)-5-氧戊酸添加PFP-TFA和DIEA来制备苯甲

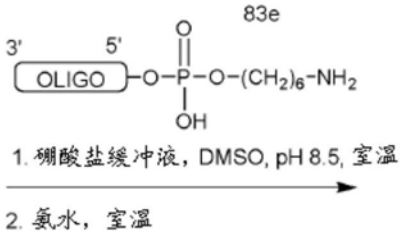
基(全氟苯基)戊二酸酯。使用实施例46中说明的一般工序从化合物174制备包含$GalNAc_3$-12缀合物基团的低聚化合物175。缀合物基团$GalNAc_3$-12的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-12_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某一实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。$GalNAc_3$-12($GalNAc_3$-12_a-CM-)的结构在以下示出:

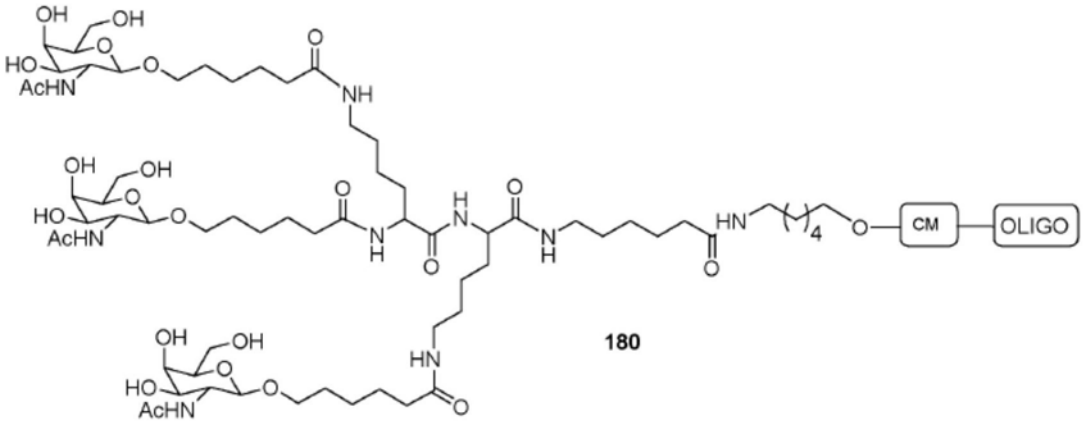
[1441] 

[1442] 实施例62:制备包含$GalNAc_3$-13的低聚化合物180

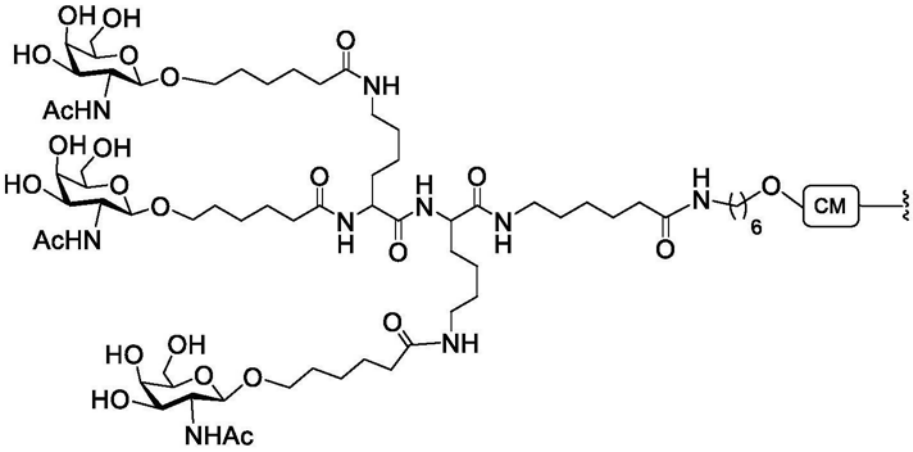
[1443]





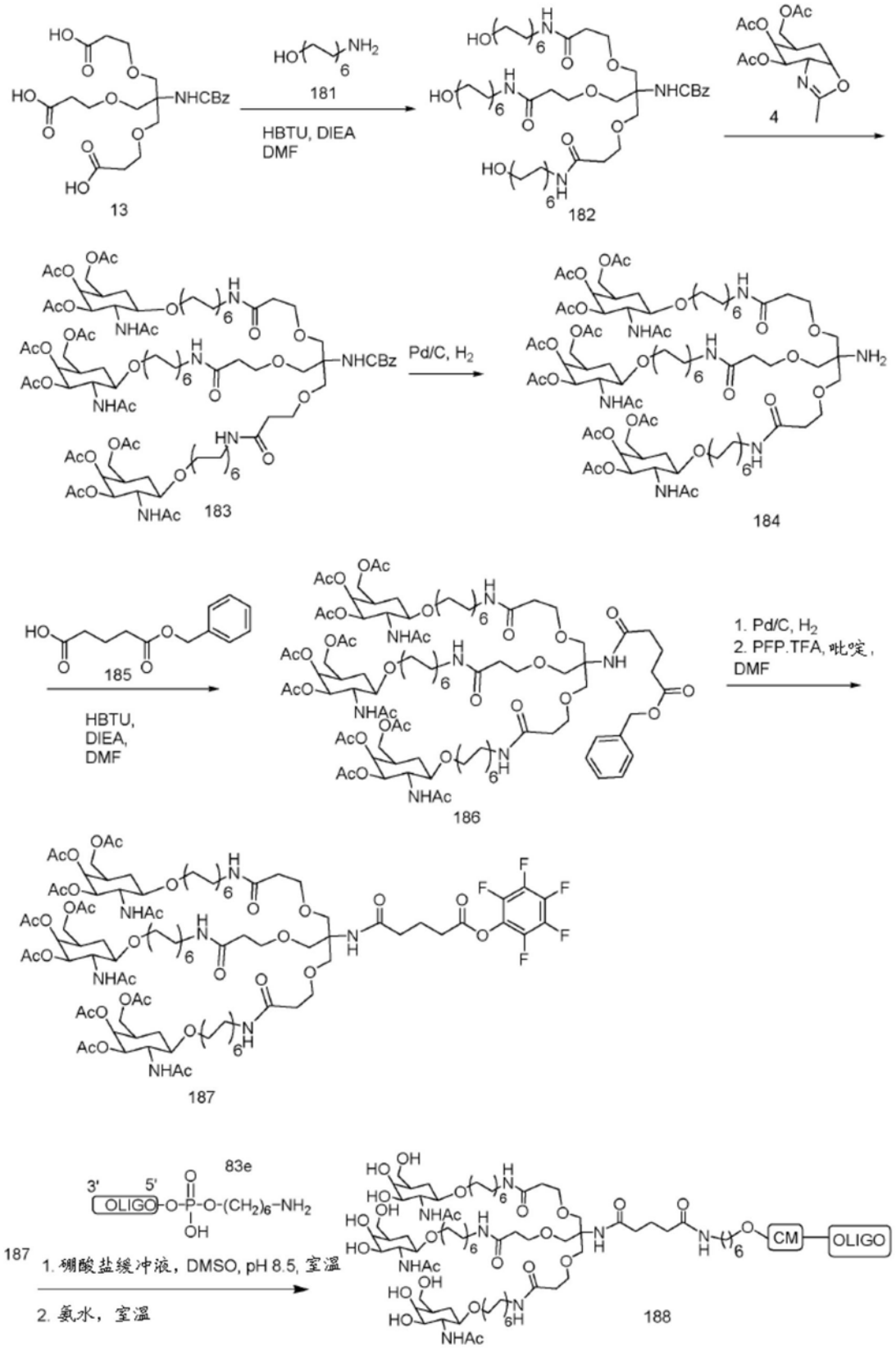
[1444] 

[1445] 使用实施例2中示出的一般工序制备化合物176。使用实施例49中说明的一般工序从化合物177制备包含GalNAc$_3$-13缀合物基团的低聚化合物180。缀合物基团GalNAc$_3$-13的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-13$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某一实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-13(GalNAc$_3$-13$_a$-CM-)的结构在以下示出:

[1446] 

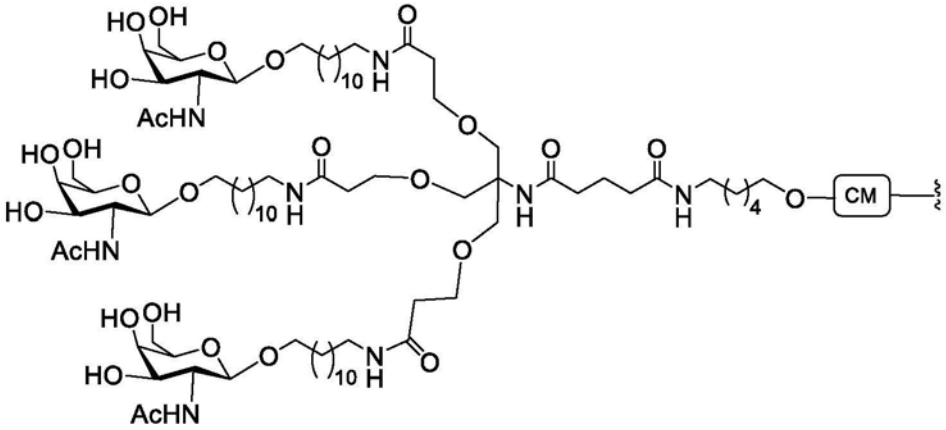
[1447] 实施例63:制备包含GalNAc$_3$-14的低聚化合物188

[1448]

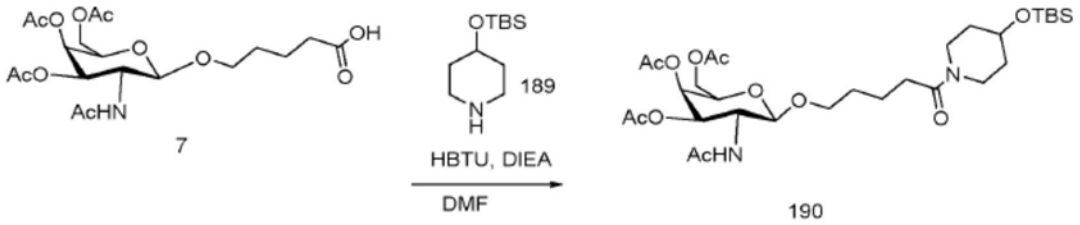


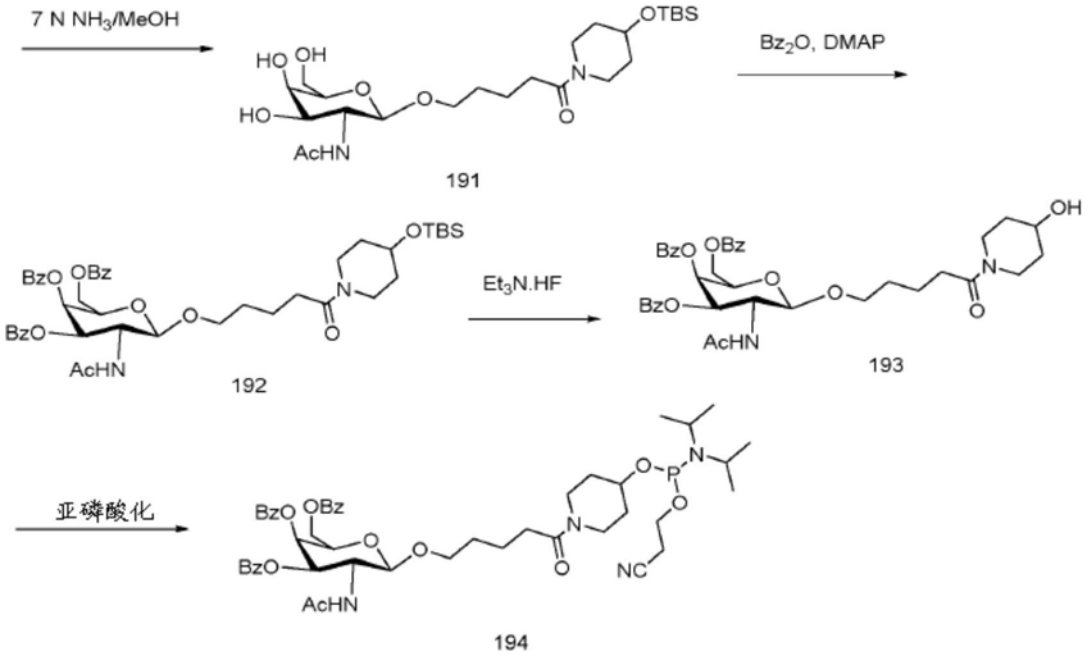
[1449] 化合物181和185为商业上可获得的。使用实施例46中说明的一般工序从化合物187制备包含$GalNAc_3$-14缀合物基团的低聚化合物188。缀合物基团$GalNAc_3$-14的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-14_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。$GalNAc_3$-14($GalNAc_3$-14_a-CM-)的结构在

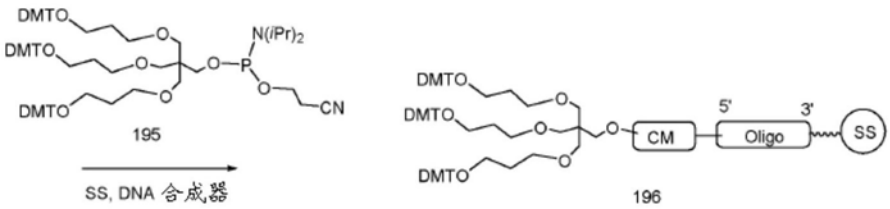
以下示出：

[1450] 

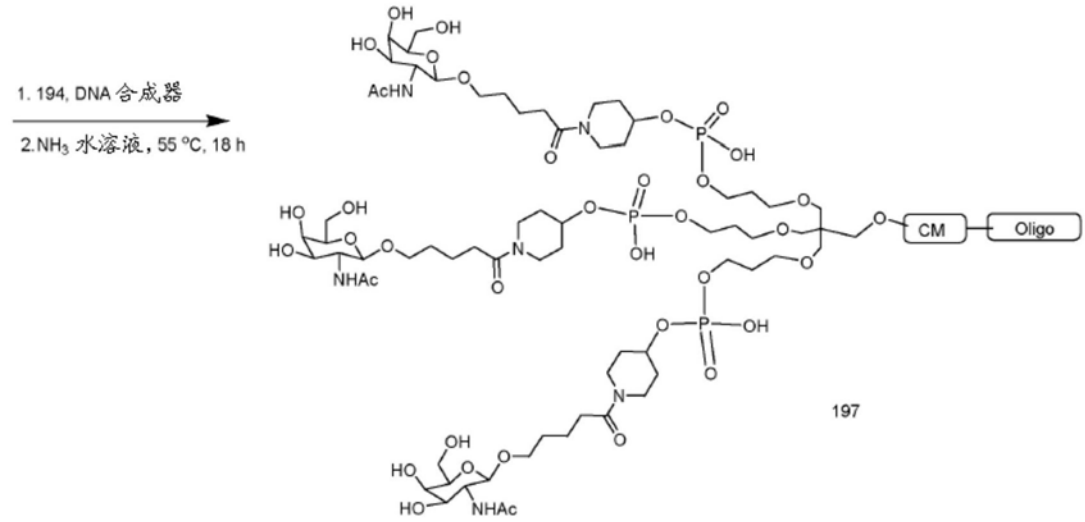
[1451] 实施例64:制备包含GalNAc$_3$-15的低聚化合物197



[1452] 

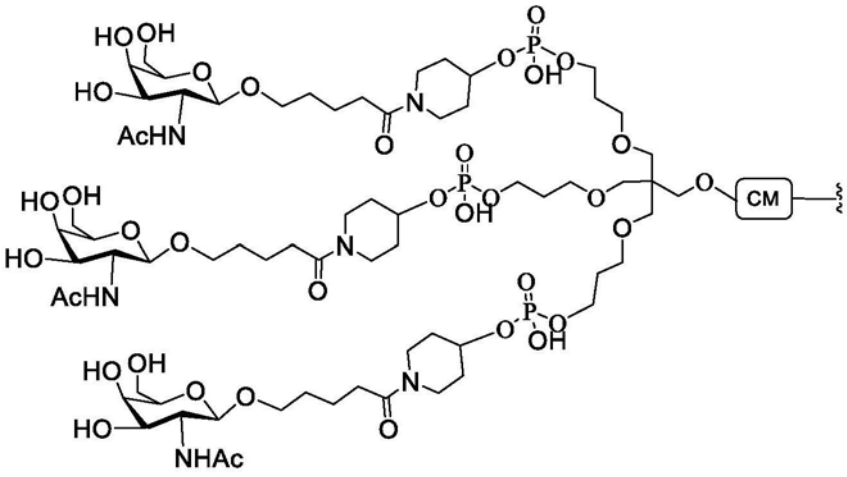


[1453]



[1454] 化合物189为商业上可获得的。使用实施例31中示出的一般工序制备化合物195。使用标准寡核苷酸合成工序由化合物194和195制备包含GalNAc$_3$-15缀合物基团的低聚化合物197。缀合物基团GalNAc$_3$-15的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-15$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-15(GalNAc$_3$-15$_a$-CM-)的结构在以下示出：

[1455]



[1456] 实施例65：靶向SRB-1的包含5'-缀合物基团的寡核苷酸(比较GalNAc$_3$-3、12、13、14以及15)的体内剂量依赖性研究

[1457] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。包括未缀合的ISIS 353382作为标准物。将GalNAc$_3$缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的2'-脱氧腺苷核苷(可裂解部分)连接在相应寡核苷酸的5'末端处。

[1458] 表54

[1459] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1460]

ISIS No.	序列(5'至3')	缀合物	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	无	2256
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3	2258
671144	**GalNAc$_3$-12$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-12	2258
670061	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-13	2258
671261	**GalNAc$_3$-14$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-14	2258
671262	**GalNAc$_3$-15$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-15	2258

[1461] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1462] GalNAc$_3$-3$_a$的结构先前在实施例39中示出。GalNAc$_3$-12a的结构先前在实施例61中示出。GalNAc$_3$-13a的结构先前在实施例62中示出。GalNAc$_3$-14a的结构先前在实施例63中示出。GalNAc$_3$-15a的结构先前在实施例64中示出。

[1463] 处理

[1464] 在以下示出的剂量下用ISIS 353382、661161、671144、670061、671261、671262或用盐水皮下注射六至八周龄C57bl6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次或两次。给药两次的小鼠在第一次剂量之后三天接受第二次剂量。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1465] 如表55中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。在接受单一剂量的动物与接受两次剂量的动物之间没有观察到靶敲除的显著差异(参见ISIS 353382剂量30mg/kg和2x15mg/kg;以及ISIS 661161剂量5mg/kg和2x2.5mg/kg)。包含磷酸二酯连接的GalNAc$_3$-3、12、13、14以及15缀合物的反义寡核苷酸与未缀合的反义寡核苷酸(ISIS 335382)相比显示出效力的大致改进。

[1466] 表55

[1467] SRB-1 mRNA(%盐水)

[1468]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	ED_{50} (mg/kg)	缀合物
盐水	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	85.0	22.4	无
	10	69.2		
	30	34.2		
	2 x 15	36.0		
661161	0.5	87.4	2.2	$GalNAc_3$-3
	1.5	59.0		
	5	25.6		
	2 x 2.5	27.5		
	15	17.4		
671144	0.5	101.2	3.4	$GalNAc_3$-12
	1.5	76.1		
	5	32.0		
	15	17.6		
670061	0.5	94.8	2.1	$GalNAc_3$-13
	1.5	57.8		

[1469]

	5	20.7		
	15	13.3		
671261	0.5	110.7	4.1	$GalNAc_3$-14
	1.5	81.9		
	5	39.8		
	15	14.1		
671262	0.5	109.4	9.8	$GalNAc_3$-15
	1.5	99.5		
	5	69.2		
	15	36.1		

[1470] 使用标准方案,相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平,即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化,其中与盐水组相比没有显著差异(数据未示出)。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表56中示出。

[1471] 表56

[1472]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	总胆红素 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	缀合物
盐水	n/a	28	60	0.1	39	n/a
353382	3	30	77	0.2	36	无
	10	25	78	0.2	36	
	30	28	62	0.2	35	
	2 x 15	22	59	0.2	33	
661161	0.5	39	72	0.2	34	$GalNAc_3$-3
	1.5	26	50	0.2	33	
	5	41	80	0.2	32	
	2 x 2.5	24	72	0.2	28	
	15	32	69	0.2	36	
671144	0.5	25	39	0.2	34	$GalNAc_3$-12
	1.5	26	55	0.2	28	
	5	48	82	0.2	34	
	15	23	46	0.2	32	
670061	0.5	27	53	0.2	33	$GalNAc_3$-13
	1.5	24	45	0.2	35	
	5	23	58	0.1	34	
	15	24	72	0.1	31	
671261	0.5	69	99	0.1	33	$GalNAc_3$-14
	1.5	34	62	0.1	33	
	5	43	73	0.1	32	
	15	32	53	0.2	30	
671262	0.5	24	51	0.2	29	$GalNAc_3$-15

[1473]

	1.5	32	62	0.1	31	
	5	30	76	0.2	32	
	15	31	64	0.1	32	

[1474] 实施例66:各种可裂解部分对通过包含5'-$GalNAc_3$聚簇的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制的影响

[1475] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。$GalNAc_3$缀合物基团中的每一个均通过磷酸二酯连接的核苷(可裂解部分(CM))连接在相应寡核苷酸的5'末端处。

[1476] 表57

[1477] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1478]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$ T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	2258
670699	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$,T$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	T$_d$	2261
670700	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$,A$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A$_e$	2258
670701	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$,T$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	T$_e$	2261
671165	**GalNAc$_3$-13$_{a-o}$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-13a	A$_d$	2258

[1479] 大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗体表示。

[1480] GalNAc$_3$-3$_a$的结构先前在实施例39中示出。GalNAc$_3$-13a的结构先前在实施例62中示出。

[1481] 处理

[1482] 在以下示出的剂量下用ISIS 661161、670699、670700、670701、671165或用盐水皮下注射六至八周龄C57bl6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死,以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定肝脏SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1483] 如表58中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。包含各种可裂解部分的反义寡核苷酸均显示出类似的效力。

[1484] 表58

[1485] SRB-1 mRNA(%盐水)

[1486]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	87.8	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1.5	61.3		
	5	33.8		
	15	14.0		
670699	0.5	89.4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1.5	59.4		
	5	31.3		
	15	17.1		
670700	0.5	79.0	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1.5	63.3		
	5	32.8		
	15	17.9		
670701	0.5	79.1	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1.5	59.2		
	5	35.8		
	15	17.7		
671165	0.5	76.4	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1.5	43.2		
	5	22.6		
	15	10.0		

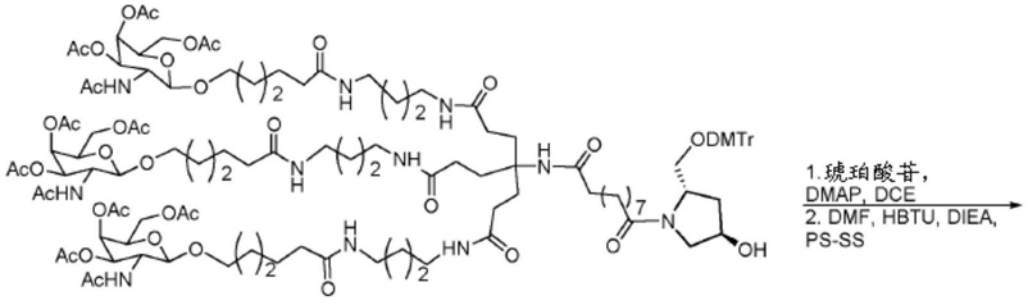
[1487] 使用标准方案,相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平,即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化,其中与盐水组相比没有显著差异(数据未示出)。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表56中示出。

[1488] 表59

[1489]

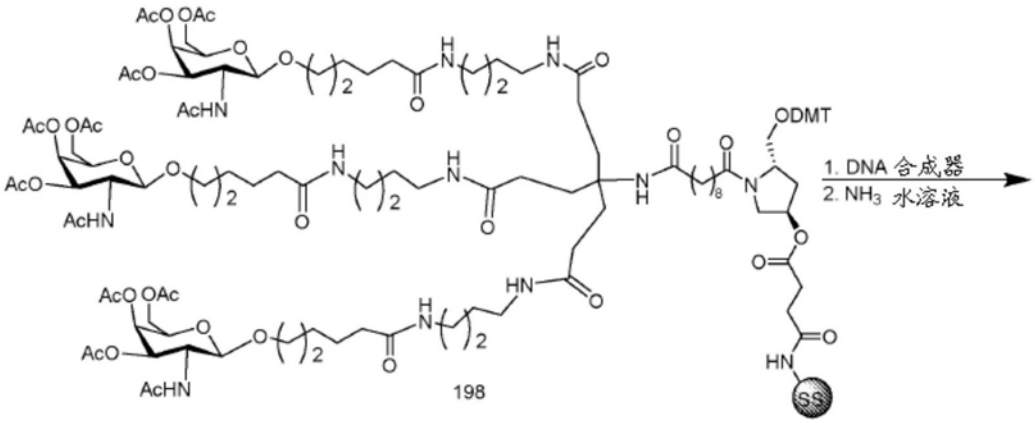
ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	总胆红素 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	24	64	0.2	31	n/a	n/a
661161	0.5	25	64	0.2	31	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1.5	24	50	0.2	32		
	5	26	55	0.2	28		
	15	27	52	0.2	31		
670699	0.5	42	83	0.2	31	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1.5	33	58	0.2	32		
	5	26	70	0.2	29		
	15	25	67	0.2	29		
670700	0.5	40	74	0.2	27	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1.5	23	62	0.2	27		
	5	24	49	0.2	29		
	15	25	87	0.1	25		
670701	0.5	30	77	0.2	27	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1.5	22	55	0.2	30		
	5	81	101	0.2	25		
	15	31	82	0.2	24		
671165	0.5	44	84	0.2	26	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1.5	47	71	0.1	24		
	5	33	91	0.2	26		
	15	33	56	0.2	29		

[1490] 实施例67:制备包含$GalNAc_3$-16的低聚化合物199

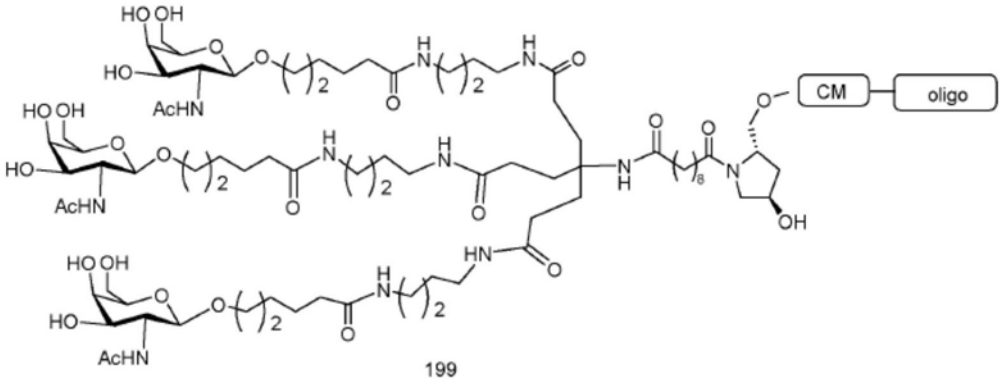


98d

[1491]



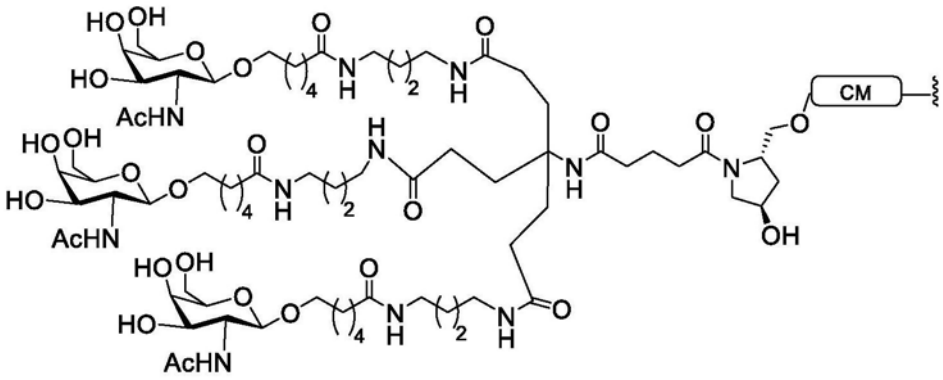
198



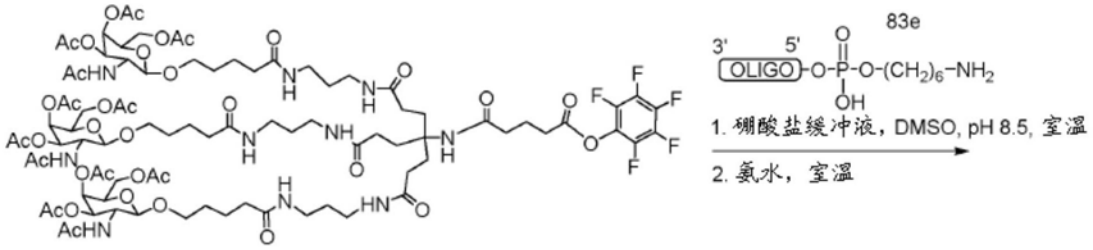
199

[1492] 使用实施例7和9中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-16缀合物基团的低聚化合物199。缀合物基团$GalNAc_3$-16的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-16_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。$GalNAc_3$-16($GalNAc_3$-16_a-CM-)的结构在以下示出：

[1493]

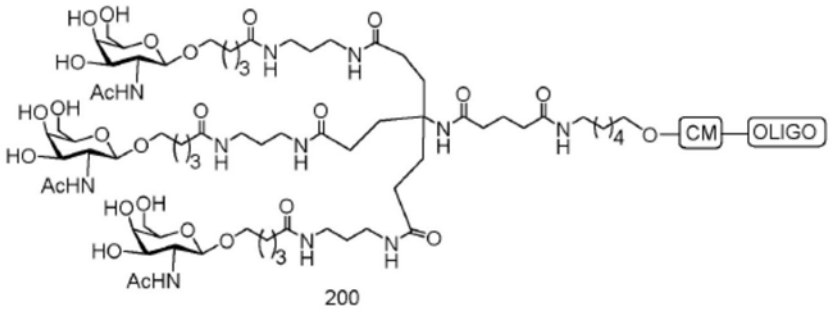


[1494] 实施例68:制备包含$GalNAc_3$-17的低聚化合物200



102a

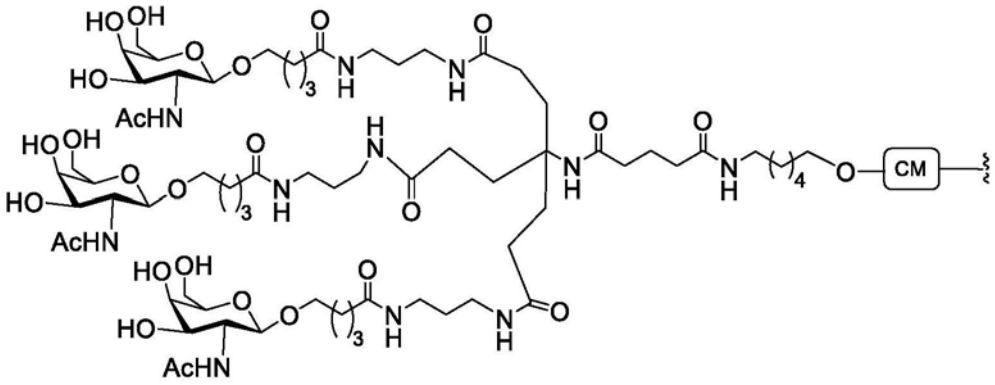
[1495]



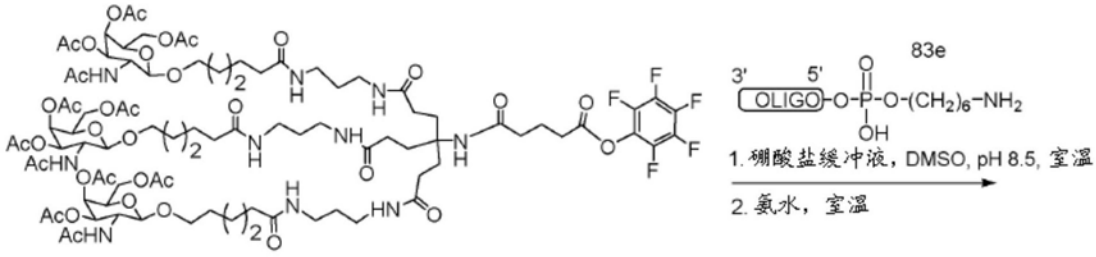
200

[1496] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-17缀合物基团的低聚化合物200。缀合物基团$GalNAc_3$-17的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-17_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。$GalNAc_3$-17($GalNAc_3$-17_a-CM-)的结构在以下示出:

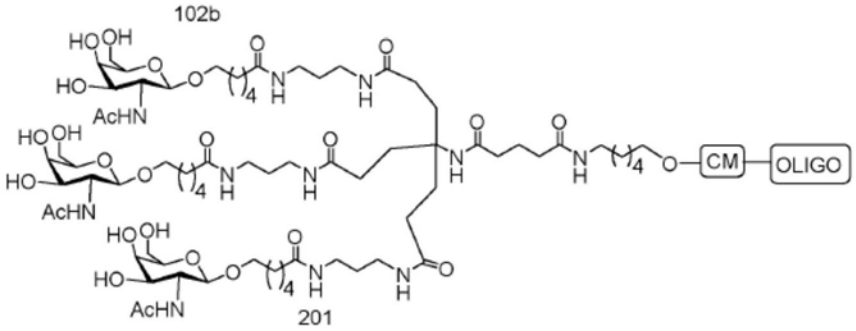
[1497]



[1498] 实施例69:制备包含$GalNAc_3$-18的低聚化合物201

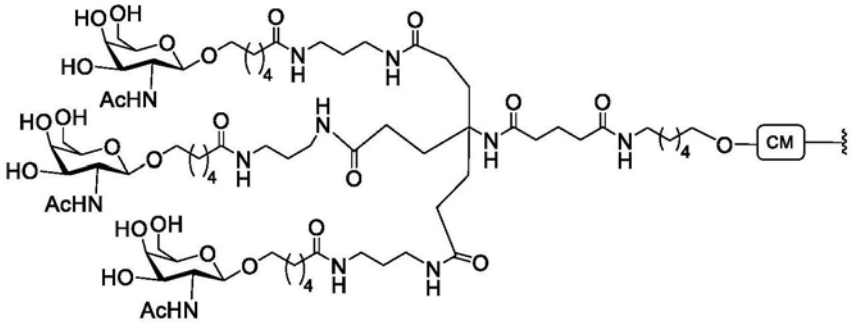


[1499]

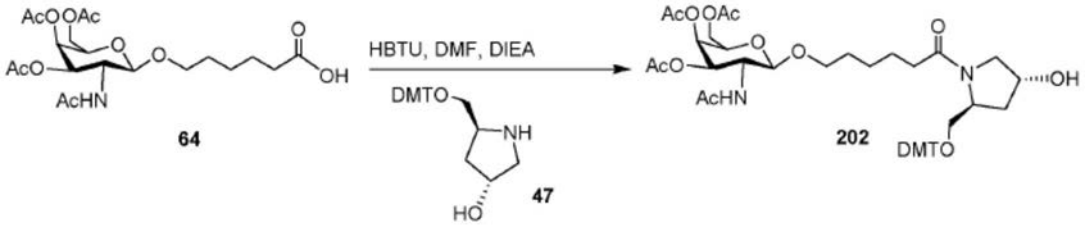


[1500] 使用实施例46中说明的一般工序制备包含$GalNAc_3$-18缀合物基团的低聚化合物201。缀合物基团$GalNAc_3$-18的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-18_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，可裂解部分为-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-。$GalNAc_3$-18($GalNAc_3$-18_a-CM-)的结构在以下示出：

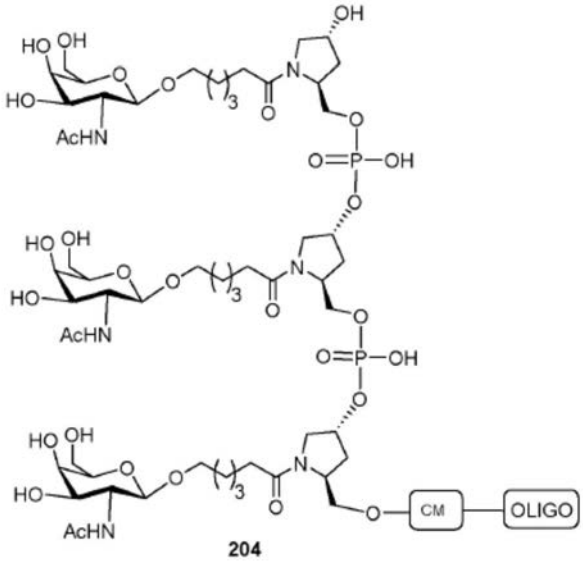
[1501]



[1502] 实施例70：制备包含$GalNAc_3$-19的低聚化合物204

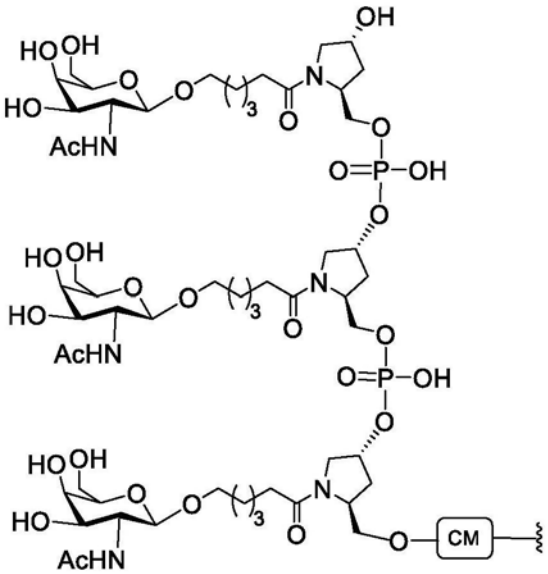


[1503]

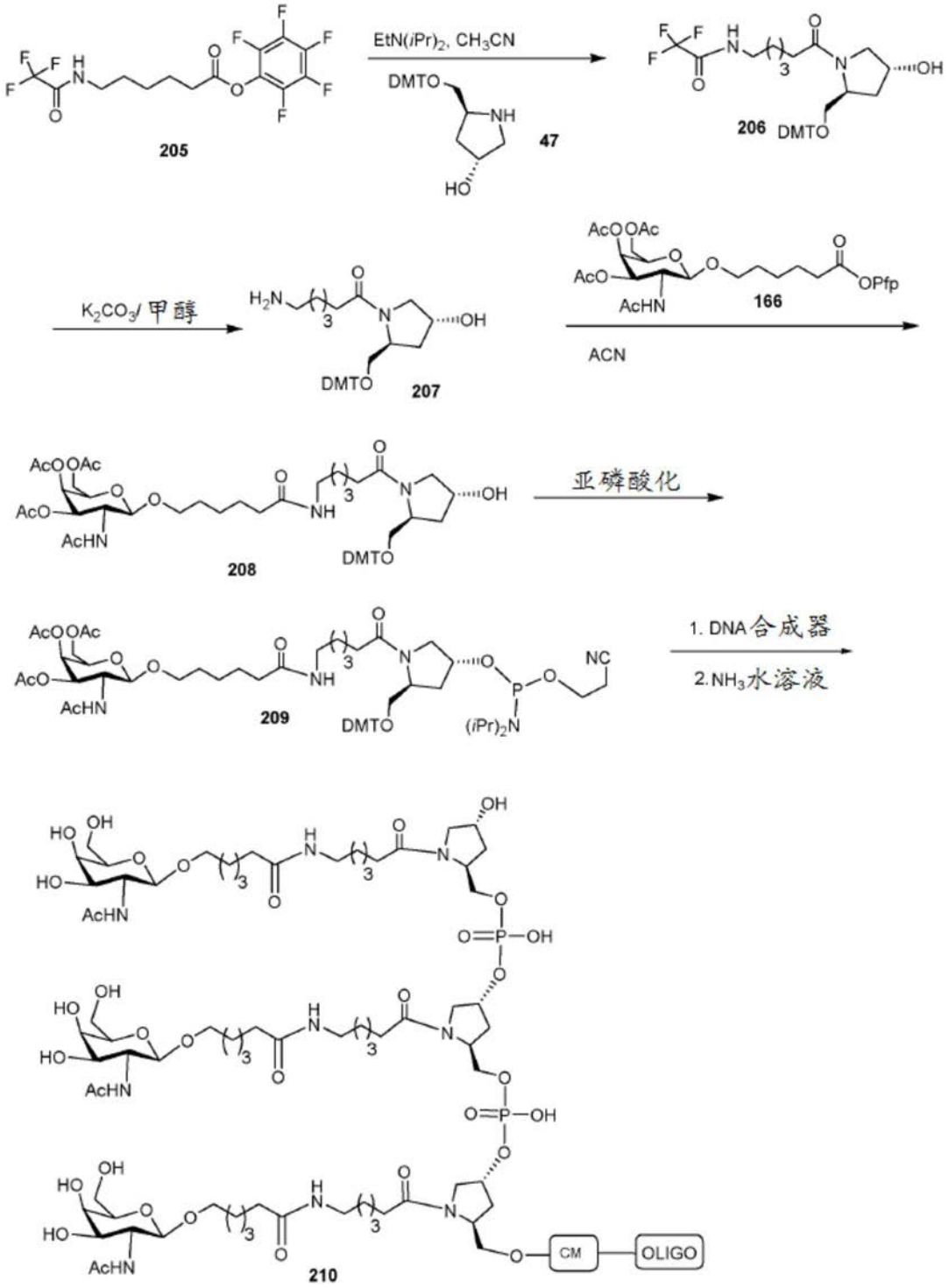


[1504] 使用实施例52中说明的一般工序从化合物64制备包含GalNAc$_3$-19缀合物基团的低聚化合物204。缀合物基团GalNAc$_3$-19的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-19$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-19(GalNAc$_3$-19$_a$-CM-)的结构在以下示出:

[1505]

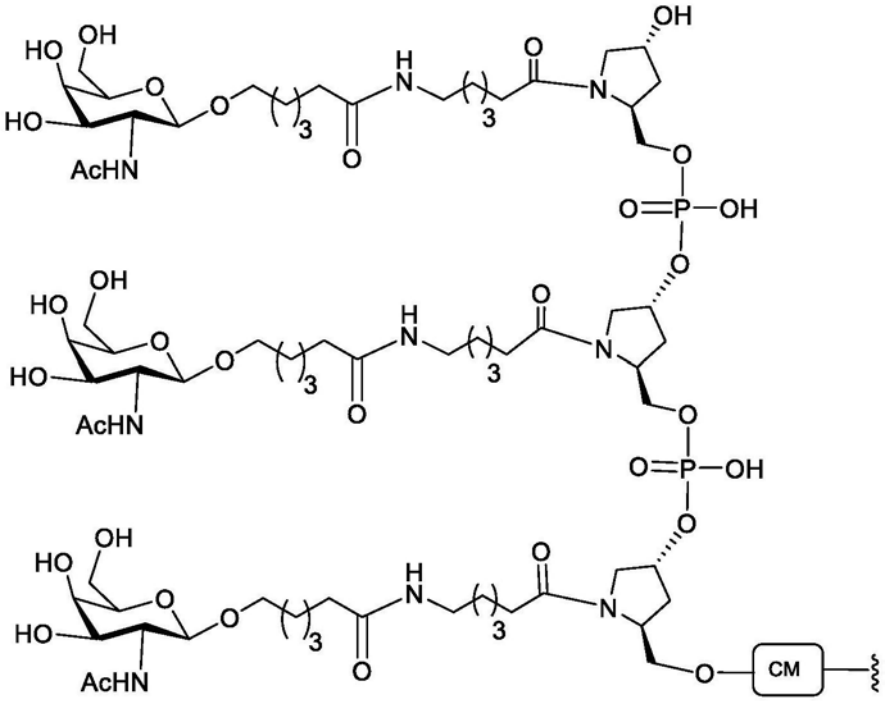


[1506] 实施例71:制备包含GalNAc$_3$-20的低聚化合物210

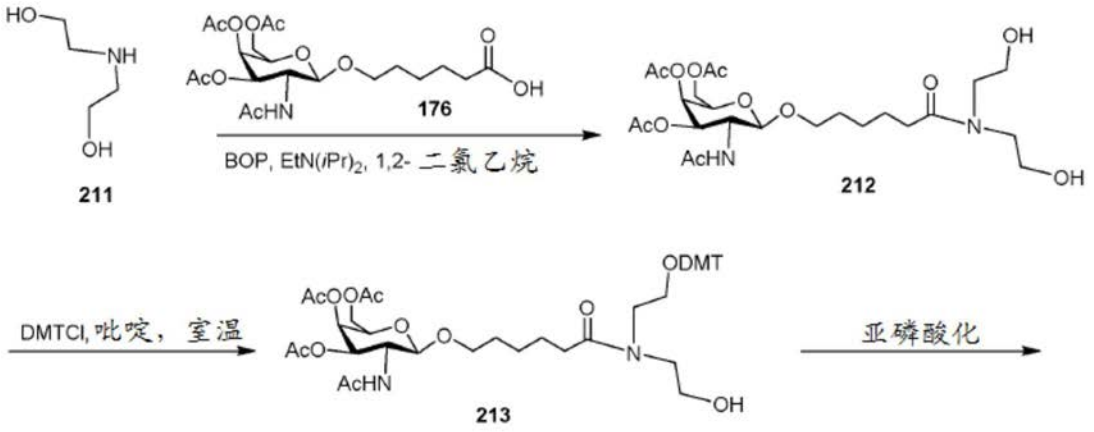


[1507]

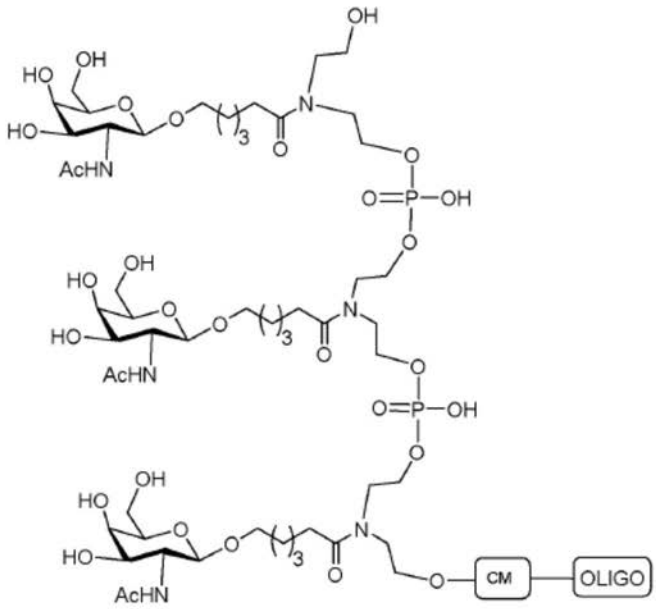
[1508] 通过将PFP-TFA和DIEA添加至乙腈中的6-(2,2,2-三氟乙酰氨基)己酸来制备化合物205,所述乙腈中的6-(2,2,2-三氟乙酰氨基)己酸通过将三氟甲磺酸酐添加至6-氨基己酸来制备。将反应混合物加热至80℃,然后降低至室温。使用实施例52中说明的一般工序从化合物208制备包含GalNAc$_3$-20缀合物基团的低聚化合物210。缀合物基团GalNAc$_3$-20的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-20$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-20(GalNAc$_3$-20$_a$-CM-)的结构在以下示出:

[1509] 

[1510] 实施例72:制备包含GalNAc$_3$-21的低聚化合物215

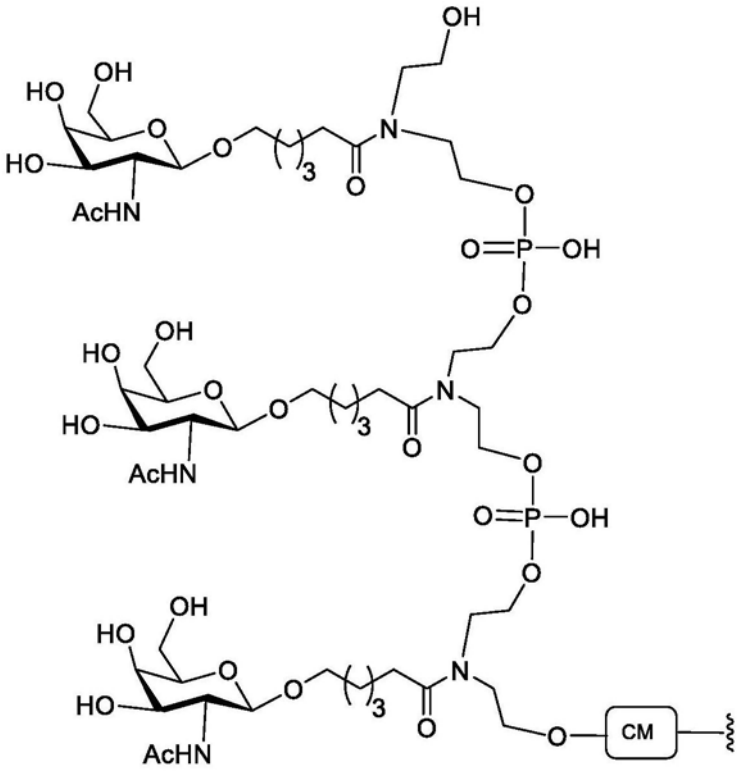


[1511]

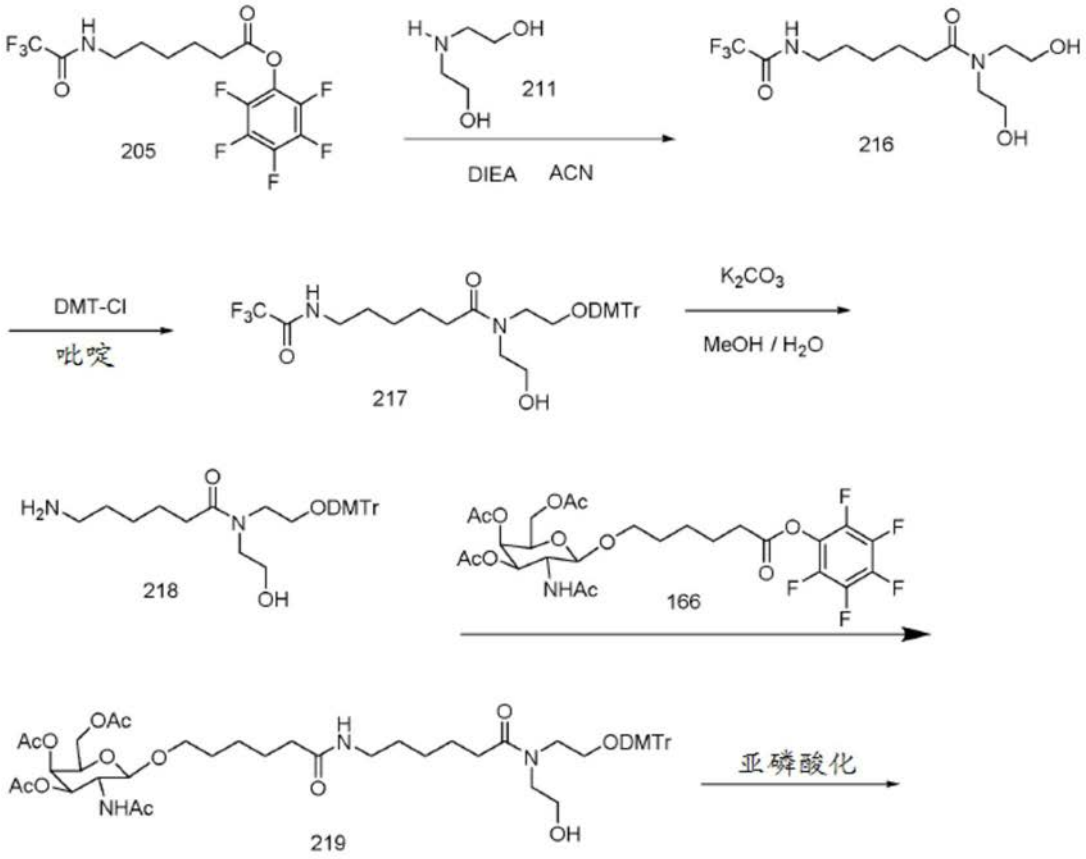


[1512] 化合物211为商业上可获得的。使用实施例52中说明的一般工序从化合物213制备包含GalNAc$_3$-21缀合物基团的低聚化合物215。缀合物基团GalNAc$_3$-21的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-21$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-21(GalNAc$_3$-21$_a$-CM-)的结构在以下示出:

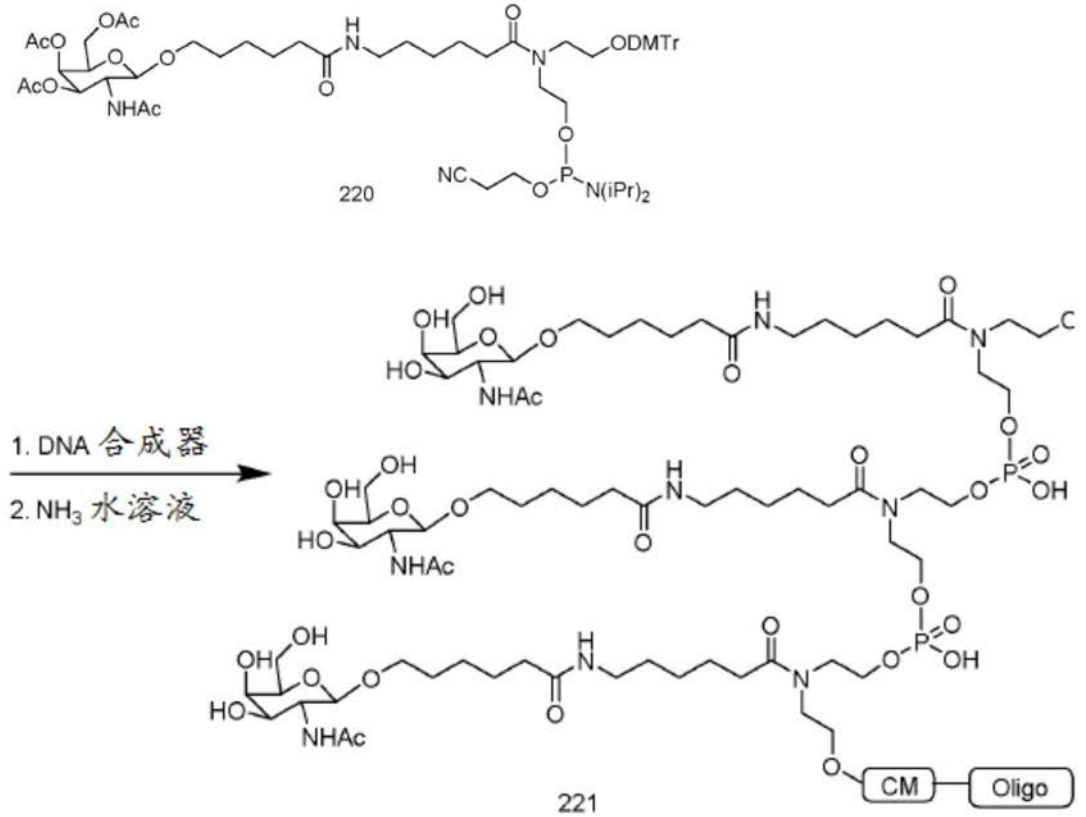
[1513]



[1514] 实施例73:制备包含GalNAc$_3$-22的低聚化合物221



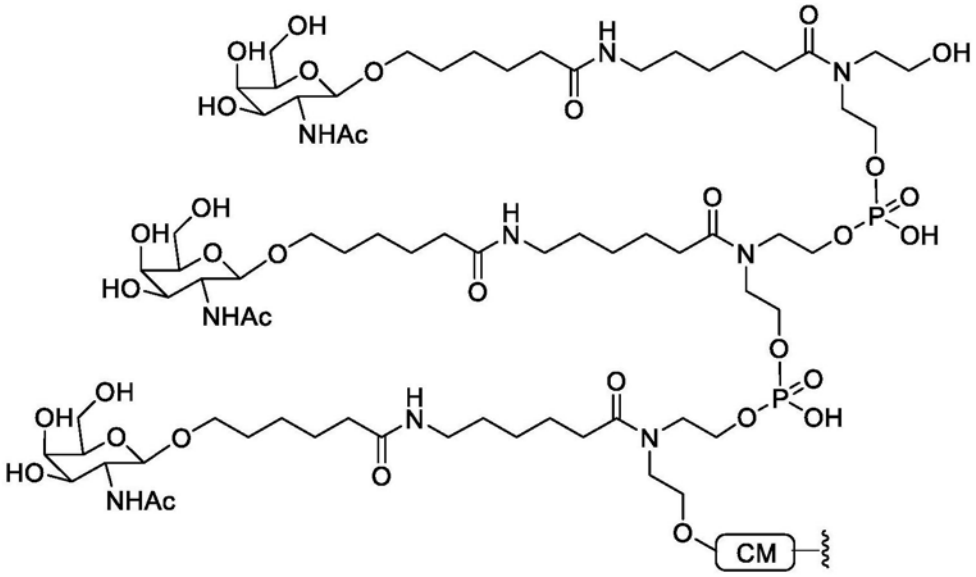
[1515]



[1516] 使用二异丙基铵四唑由化合物219制备化合物220。使用实施例52中说明的一般工序从化合物220制备包含$GalNAc_3$-21缀合物基团的低聚化合物221。缀合物基团$GalNAc_3$-22

的GalNAc$_3$聚簇部分(GalNAc$_3$-22$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中,可裂解部分为-P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-。GalNAc$_3$-22(GalNAc$_3$-22$_a$-CM-)的结构在以下示出:

[1517]



[1518] 实施例74:各种可裂解部分对通过包含5'-GalNAc$_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制的影响

[1519] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。GalNAc$_3$缀合物基团中的每一个均连接在相应寡核苷酸的5'末端处。

[1520] 表60

[1521] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1522]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	n/a	n/a	2256
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	2258

[1523]

666904	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	GalNAc$_3$-3a	PO	2256
675441	**GalNAc$_3$-17$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	GalNAc$_3$-17a	A$_d$	2258
675442	**GalNAc$_3$-18$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	GalNAc$_3$-18a	A$_d$	2258

[1524] 在所有表格中,大写字母指示每个核苷的核碱基并且^{m}C指示5-甲基胞嘧啶。下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o'"指示-O-P(=O)(OH)-。缀合物基团以粗

体表示。

[1525] $GalNAc_3$-3_a的结构先前在实施例39中示出。$GalNAc_3$-17a的结构先前在实施例68中示出，并且$GalNAc_3$-18a的结构在实施例69中示出。

[1526] 处理

[1527] 在以下示出的剂量下用列于表60中的寡核苷酸或用盐水皮下注射六至八周龄C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定SRB-1 mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1528] 如表61中所说明，用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。包含GalNAc缀合物的反义寡核苷酸显示出类似的效力并且比缺乏GalNAc缀合物的母体寡核苷酸显著更有效。

[1529] 表61

[1530] SRB-1 mRNA(%盐水)

[1531]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	79.38	n/a	n/a
	10	68.67		
	30	40.70		
661161	0.5	79.18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1.5	75.96		
	5	30.53		
	15	12.52		
666904	0.5	91.30	$GalNAc_3$-3a	PO
	1.5	57.88		
	5	21.22		
	15	16.49		
675441	0.5	76.71	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1.5	63.63		
	5	29.57		
	15	13.49		
675442	0.5	95.03	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1.5	60.06		
	5	31.04		
	15	19.40		

[1532] 使用标准方案，相对于盐水注射的小鼠测量血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化，其中与盐水组相比没有显著变化(数据未示出)。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表62中示出。

[1533] 表62

[1534]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	总胆红素 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	26	59	0.16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0.18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0.16	43		
	30	20	48	0.12	34		
661161	0.5	30	47	0.13	35	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1.5	23	53	0.14	37		
	5	26	48	0.15	39		
	15	32	57	0.15	42		
666904	0.5	24	73	0.13	36	$GalNAc_3$-3a	PO
	1.5	21	48	0.12	32		
	5	19	49	0.14	33		
	15	20	52	0.15	26		

[1535]

675441	0.5	42	148	0.21	36	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1.5	60	95	0.16	34		
	5	27	75	0.14	37		
	15	24	61	0.14	36		
675442	0.5	26	65	0.15	37	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1.5	25	64	0.15	43		
	5	27	69	0.15	37		
	15	30	84	0.14	37		

[1536] 实施例75:包含5'-缀合物基团的寡核苷酸的药物代谢动力学分析

[1537] 使用根据实施例65、66和74中描述的处理工序所获得的肝脏样品来评价以上表54、57和60中的ASO的PK。使用标准方案切碎并提取肝脏样品并且与内标物一起通过IP-HPLC-MS进行分析。通过对适当的UV峰进行积分,测量组合组织水平(μg/g)并且使用适当的提取离子色谱图(EIC)测量全长ASO缺失缀合物("母体",在该情况下的Isis No.为353382)的组织水平。

[1538] 表63

[1539] 肝脏中的PK分析

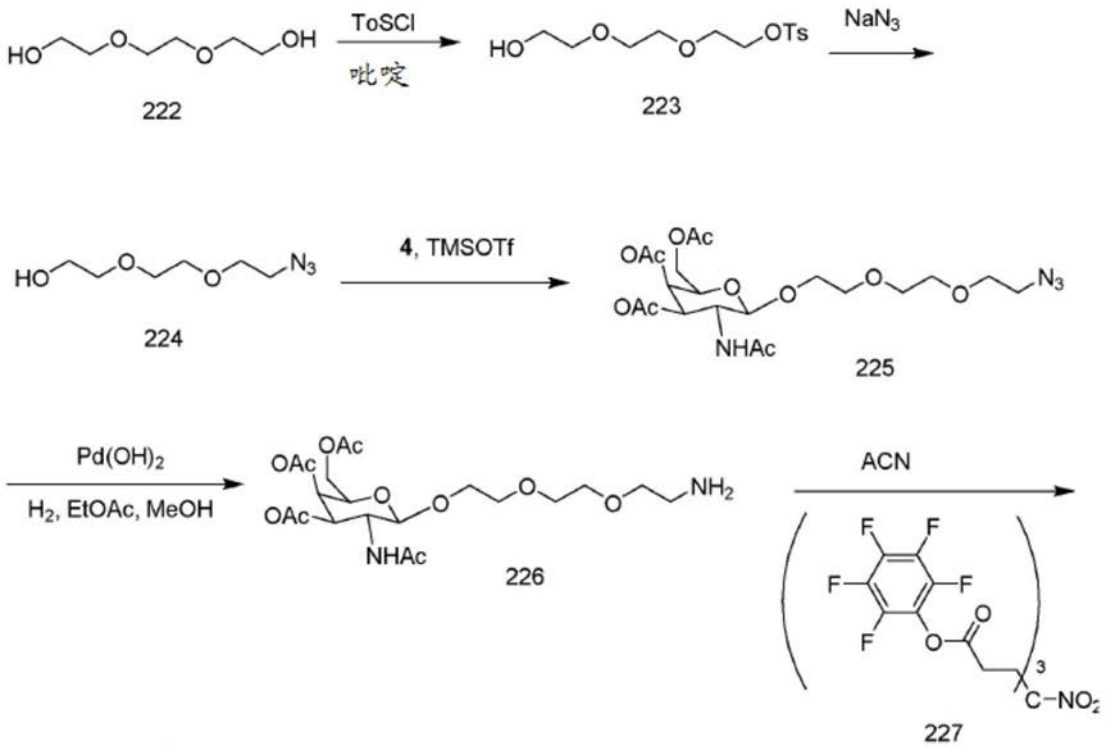
[1540]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	通过UV测得的总组织水平 (μg/g)	通过EIC测得的母体ASO组织水平 (μg/g)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
353382	3	8.9	8.6	n/a	n/a
	10	22.4	21.0		
	30	54.2	44.2		
661161	5	32.4	20.7	$GalNAc_3$-3a	A_d
	15	63.2	44.1		
671144	5	20.5	19.2	$GalNAc_3$-12a	A_d
	15	48.6	41.5		
670061	5	31.6	28.0	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	67.6	55.5		
671261	5	19.8	16.8	$GalNAc_3$-14a	A_d
	15	64.7	49.1		
671262	5	18.5	7.4	$GalNAc_3$-15a	A_d
	15	52.3	24.2		
670699	5	16.4	10.4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	15	31.5	22.5		
670700	5	19.3	10.9	$GalNAc_3$-3a	A_e
	15	38.1	20.0		
670701	5	21.8	8.8	$GalNAc_3$-3a	T_e
	15	35.2	16.1		
671165	5	27.1	26.5	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	48.3	44.3		
666904	5	30.8	24.0	$GalNAc_3$-3a	PO
	15	52.6	37.6		
675441	5	25.4	19.0	$GalNAc_3$-17a	A_d
	15	54.2	42.1		
675442	5	22.2	20.7	$GalNAc_3$-18a	A_d
	15	39.6	29.0		

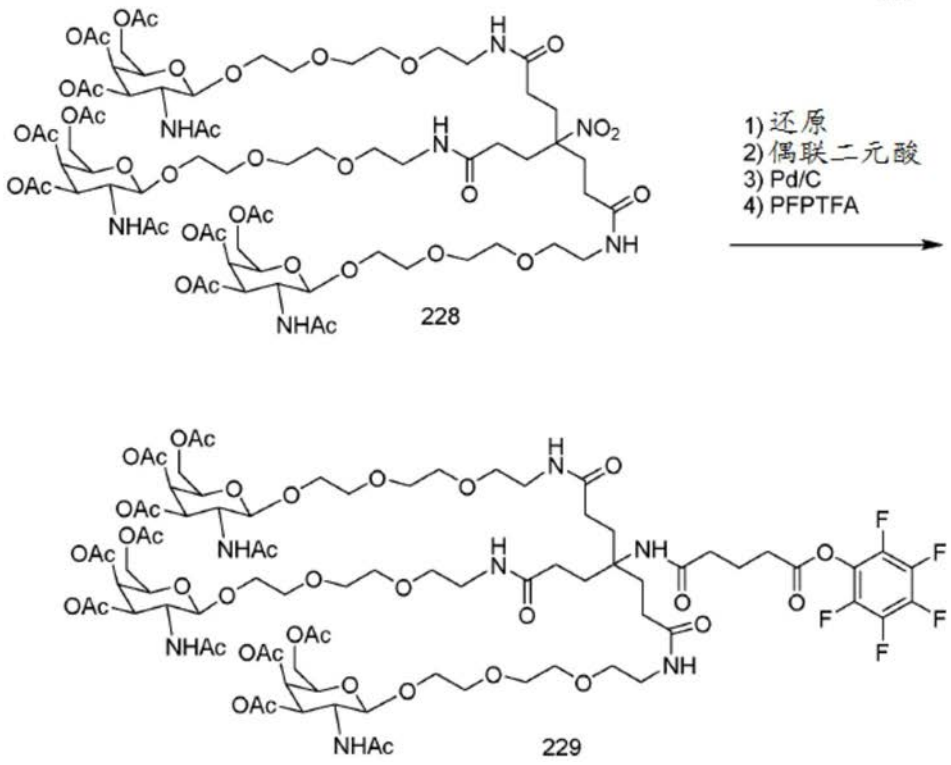
[1541]

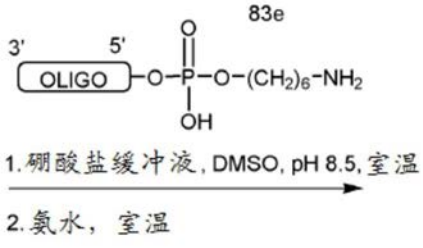
[1542] 以上表63中的结果显示，在寡核苷酸施用之后72小时，尤其当考虑到具有与不具有$GalNAc_3$缀合物基团的寡核苷酸之间的给药差异时，包含$GalNAc_3$缀合物基团的寡核苷酸的肝脏组织水平比不包含$GalNAc_3$缀合物基团的母体寡核苷酸(ISIS 353382)更高。此外，至72小时，40％-98％的包含$GalNAc_3$缀合物基团的每个寡核苷酸代谢为母体化合物，表明$GalNAc_3$缀合物基团从寡核苷酸上裂解。

[1543] 实施例76:制备包含$GalNAc_3$-23的低聚化合物230

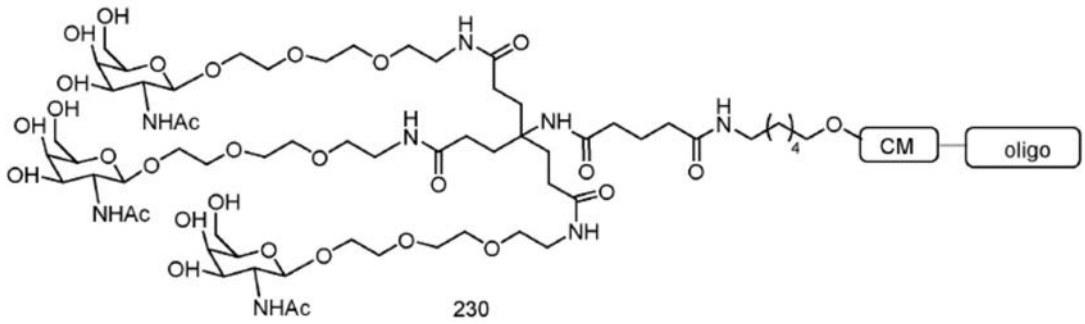

ToSCl
吡啶
NaN3
222
223
4, TMSOTf
224
225
Pd(OH)2
H2, EtOAc, MeOH
226
ACN
227

[1544]


1) 还原
2) 偶联二元酸
3) Pd/C
4) PFPTFA
228
229



[1545]

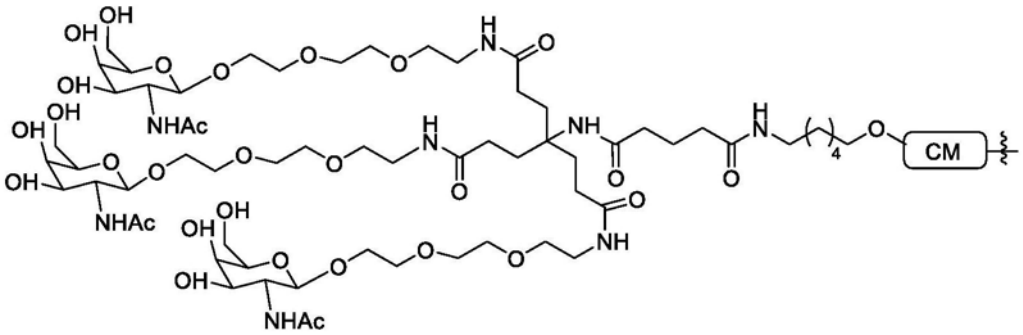


[1546] 化合物222为商业上可获得的。将44.48ml(0.33mol)的化合物222用吡啶(500mL)中的甲苯磺酰氯(25.39g,0.13mol)处理16小时。然后将反应物蒸发至油状物,溶解于EtOAc中并且用水、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤,并且通过Na_2SO_4干燥。将乙酸乙酯浓缩至干燥并且通过柱色谱法纯化,用EtOAc/己烷(1:1)洗脱,接着用10%的CH_2Cl_2中的甲醇洗脱,得到呈无色油状物的化合物223。LCMS和NMR与结构一致。在室温下将10g(32.86mmol)的1-甲苯磺酰基三甘醇(化合物223)用DMSO(100mL)中的叠氮化钠(10.68g,164.28mmol)处理17小时。然后将反应混合物倾倒在水上,并且用EtOAc萃取。将有机层用水洗涤三次并且通过Na_2SO_4干燥。将有机层浓缩至干燥,得到5.3g的化合物224(92%)。LCMS和NMR与结构一致。在惰性气氛下用4A分子筛(5g)和二氯甲烷(100mL)中的TMSOTf(1.65ml,9.11mmol)处理1-叠氮基三甘醇(化合物224,5.53g,23.69mmol)和化合物4(6g,18.22mmol)。在14小时之后,过滤反应物以去除分子筛,并且将有机层用饱和$NaHCO_3$、水、盐水洗涤,并且通过Na_2SO_4干燥。将有机层浓缩至干燥并且通过柱色谱法纯化,用2%至4%梯度的二氯甲烷中的甲醇洗脱,得到化合物225。LCMS和NMR与结构一致。通过Pearlman氏催化剂在EtOAc/甲醇(4:1,250mL)中氢化化合物225(11.9g,23.59mmol)。在8小时之后,通过过滤去除催化剂并且去除溶剂至干燥,得到化合物226。LCMS和NMR与结构一致。

[1547] 为了生成化合物227,用五氟三氟乙酸酯(9.05ml,52.65mmol)逐滴处理硝基甲烷三丙酸(4.17g,15.04mmol)和Hunig氏碱(10.3ml,60.17mmol)在DMF(100mL)中的溶液。在30分钟之后,将反应物倾倒在冰水上并且用EtOAc萃取。将有机层用水、盐水洗涤并且通过Na_2SO_4干燥。将有机层浓缩至干燥并且然后从庚烷中重结晶,得到呈白色固体的化合物227。LCMS和NMR与结构一致。将化合物227(1.5g,1.93mmol)和化合物226(3.7g,7.74mmol)在室温下在乙腈(15mL)中搅拌2小时。然后将反应物蒸发至干燥并且通过柱色谱法纯化,用2%至10%梯度的二氯甲烷中的甲醇洗脱,得到化合物228。LCMS和NMR与结构一致。在氢气气氛中,用乙醇(100mL)中的雷尼镍(约2g湿润)处理化合物228(1.7g,1.02mmol)。在12小时之后,通过过滤去除催化剂并且将有机层蒸发至固体,所述固体直接用于下一步。LCMS和NMR与结构一致。用DMF(5mL)中的苯甲基戊二酸(0.18g,0.8mmol)、HBTU(0.3g,0.8mmol)和DIEA

(273.7μl,1.6mmol)处理此固体(0.87g,0.53mmol)。在16小时之后,在减压下在65℃下去除DMF至油状物,并且将油状物溶解于二氯甲烷。将有机层用饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤并且通过Na_2SO_4干燥。在有机层蒸发之后,通过柱色谱法纯化化合物并且用2%至20%梯度的二氯甲烷中的甲醇洗脱,得到偶联的产物。LCMS和NMR与结构一致。将苯甲酯在氢气气氛下用Pearlman氏催化剂去保护,持续1小时。然后通过过滤去除催化剂并且去除溶剂至干燥,得到酸。LCMS和NMR与结构一致。将酸(486mg,0.27mmol)溶解于干燥DMF(3mL)中。添加吡啶(53.61μl,0.66mmol)并且用氩气吹扫反应物。将五氟三氟乙酸酯(46.39μl,0.4mmol)缓慢添加至反应混合物中。反应物的颜色从浅黄色变为酒红色,并且放出轻烟,所述轻烟用氩气流吹走。使反应物在室温下搅拌一小时(通过LCMS证实反应完全)。在减压(旋转蒸发仪)下在70℃下去除溶剂。将残余物用DCM稀释并且用1N $NaHSO_4$、盐水洗涤,再次用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。将有机物通过Na_2SO_4干燥、过滤并且浓缩至干燥,得到225mg的呈易碎黄色泡沫的化合物229。LCMS和NMR与结构一致。

[1548] 使用实施例46中说明的一般工序由化合物229制备包含$GalNAc_3$-23缀合物基团的低聚化合物230。$GalNAc_3$-23缀合物基团的$GalNAc_3$聚簇部分($GalNAc_3$-23_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。$GalNAc_3$-23($GalNAc_3$-23_a-CM)的结构在以下示出:

[1549] 

[1550] 实施例77:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1551] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1552] 表64

[1553] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1554]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
661161	**$GalNAc_3$-3_{a-o},$A_{do}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{d}{}_{s}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**	$GalNAc_3$-3a	A_d	2258
666904	**$GalNAc_3$-3_{a-o},$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**	$GalNAc_3$-3a	PO	2256
673502	**$GalNAc_3$-10_{a-o},$A_{do}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**	$GalNAc_3$-10a	A_d	2258

[1555]

677844	**GalNAc$_3$-9$_{a-o}$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{d}$ $_{s}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-9a	A$_d$	2258
677843	**GalNAc$_3$-23$_{a-o}$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A $_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-23a	A$_d$	2258
655861	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	GalNAc$_3$-1a	A$_d$	2257
677841	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$-GalNAc$_3$-19$_a$**	GalNAc$_3$-19a	A$_d$	2257
677842	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$-GalNAc$_3$-20$_a$**	GalNAc$_3$-20a	A$_d$	2257

[1556] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出，GalNAc$_3$-3$_a$在实施例39中示出，GalNAc$_3$-9a在实施例52中示出，GalNAc$_3$-10a在实施例46中示出，GalNAc$_3$-19$_a$在实施例70中示出，GalNAc$_3$-20$_a$在实施例71中示出，并且GalNAc$_3$-23$_a$在实施例76中示出。

[1557] 处理

[1558] 在以下示出的剂量下用列于表64中的寡核苷酸或用盐水各自皮下注射六至八周龄C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1559] 如表65中所说明，用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。

[1560] 表65

[1561] SRB-1 mRNA(%盐水)

[1562]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	GalNAc$_3$ 聚簇	CM

[1563]

盐水	n/a	100.0	n/a	n/a
661161	0.5	89.18	GalNAc$_3$-3a	A_d
	1.5	77.02		
	5	29.10		
	15	12.64		
666904	0.5	93.11	GalNAc$_3$-3a	PO
	1.5	55.85		
	5	21.29		
	15	13.43		
673502	0.5	77.75	GalNAc$_3$-10a	A_d
	1.5	41.05		
	5	19.27		
	15	14.41		
677844	0.5	87.65	GalNAc$_3$-9a	A_d
	1.5	93.04		
	5	40.77		
	15	16.95		
677843	0.5	102.28	GalNAc$_3$-23a	A_d
	1.5	70.51		
	5	30.68		
	15	13.26		
655861	0.5	79.72	GalNAc$_3$-1a	A_d
	1.5	55.48		
	5	26.99		
	15	17.58		
677841	0.5	67.43	GalNAc$_3$-19a	A_d
	1.5	45.13		
	5	27.02		
	15	12.41		
677842	0.5	64.13	GalNAc$_3$-20a	A_d
	1.5	53.56		
	5	20.47		
	15	10.23		

[1564] 使用标准方案，还测量了血清中的肝脏转氨酶水平，即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。还评价了总胆红素和BUN。评价了体重变化，其中与盐水组相比没有显著变化(数据未示出)。ALT、AST、总胆红素和BUN值在以下表66中示出。

[1565] 表66

[1566]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	总胆红素 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc$_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	21	45	0.13	34	n/a	n/a

[1567]

661161	0.5	28	51	0.14	39	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1.5	23	42	0.13	39		
	5	22	59	0.13	37		
	15	21	56	0.15	35		
666904	0.5	24	56	0.14	37	$GalNAc_3$-3a	PO
	1.5	26	68	0.15	35		
	5	23	77	0.14	34		
	15	24	60	0.13	35		
673502	0.5	24	59	0.16	34	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1.5	20	46	0.17	32		
	5	24	45	0.12	31		
	15	24	47	0.13	34		
677844	0.5	25	61	0.14	37	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1.5	23	64	0.17	33		
	5	25	58	0.13	35		
	15	22	65	0.14	34		
677843	0.5	53	53	0.13	35	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1.5	25	54	0.13	34		
	5	21	60	0.15	34		
	15	22	43	0.12	38		
655861	0.5	21	48	0.15	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1.5	28	54	0.12	35		
	5	22	60	0.13	36		
	15	21	55	0.17	30		
677841	0.5	32	54	0.13	34	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1.5	24	56	0.14	34		
	5	23	92	0.18	31		
	15	24	58	0.15	31		
677842	0.5	23	61	0.15	35	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1.5	24	57	0.14	34		
	5	41	62	0.15	35		
	15	24	37	0.14	32		

[1568] 实施例78:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向血管紧张素原的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1569] 在剂量依赖性研究中测试以下列出的寡核苷酸对血压正常的斯普拉道来大鼠中的血管紧张素原(AGT)的反义抑制。

[1570] 表67

[1571] 靶向AGT的修饰ASO

[1572]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$ 聚	CM	SEQ ID

[1573]

		簇		No.
552668	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}\ G_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	2262
669509	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}\ G_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	$GalNAc_3\text{-}1_a$	A_d	2263

[1574] $GalNAc_3\text{-}1_a$的结构先前在实施例9中示出。

[1575] 处理

[1576] 在以下示出的剂量(总共三次剂量)下,每周一次用列于表67中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射六周龄雄性斯普拉道来大鼠。每个处理组由4只动物组成。在最后剂量之后72小时将大鼠处死。使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测量AGT肝脏mRNA水平。用1:20,000稀释的血浆使用总血管紧张素原ELISA(目录号JP27412,IBL International,Toronto,ON)来测量AGT血浆蛋白水平。以下结果以归一化为PBS对照的每个处理组的肝脏中AGT mRNA水平或血浆中AGT蛋白水平的平均百分比呈现。

[1577] 如表68中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低AGT肝脏mRNA和血浆蛋白水平,并且包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体寡核苷酸显著更有效。

[1578] 表68

[1579] AGT肝脏mRNA和血浆蛋白水平

[1580]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	AGT 肝脏 mRNA (% PBS)	AGT 血浆蛋白(% PBS)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0.3	95	70	$GalNAc_3\text{-}1a$	A_d
	1	95	129		

[1581]

	3	62	97		
	10	9	23		

[1582] 使用标准方案,在处死时还测量了血浆中的肝脏转氨酶水平(即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST))和体重。结果在以下表69中示出。

[1583] 表69

[1584] 肝脏转氨酶水平和大鼠体重

[1585]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	体重(基线的%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0.3	53	90	190	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

[1586] 实施例79:包含$GalNAc_3$缀合物的靶向APOC-III的寡核苷酸的体内作用持续时间

[1587] 在单一剂量研究中测试列于以下表70中的寡核苷酸在小鼠中的作用持续时间。

[1588] 表70

[1589] 靶向APOC-III的修饰ASO

[1590]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	2248
647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	$GalNAc_3$-1a	A_d	2249
663083	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o}}$,$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	2264
674449	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}}$,$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	2264
674450	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o}}$,$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	2264
674451	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o}}$,$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	2264

[1591]

[1592] $GalNAc_3$-1_a的结构先前在实施例9中示出,$GalNAc_3$-3_a在实施例39中示出,$GalNAc_3$-7_a在实施例48中示出,$GalNAc_3$-10_a在实施例46中示出,并且$GalNAc_3$-13_a在实施例62中示出。

[1593] 处理

[1594] 用列于表70中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射表达人APOC-III的六至八周龄转基因小鼠一次。每个处理组由3只动物组成。在给药之前抽血以确定基线并且在剂量之后72小时、1周、2周、3周、4周、5周和6周时抽血。如实施例20中所描述来测量血浆甘油三酯和APOC-III蛋白水平。以下结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆甘油三酯和APOC-III水平的平均百分比呈现,表明包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸表现出比不具有缀合物基团的母体寡核苷酸(ISIS 304801)更长的作用持续时间,即使母体剂量为包含GalNAc

缀合物基团的寡核苷酸剂量的三倍也是如此。

[1595] 表71

[1596] 转基因小鼠中的血浆甘油三酯和APOC-III蛋白水平

[1597]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	时间点(给药后的天数)	甘油三酯(基线%)	APOC-III 蛋白(基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		

[1598]

		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	$GalNAc_3$-1a	A_d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	$GalNAc_3$-7a	A_d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	$GalNAc_3$-10a	A_d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	$GalNAc_3$-13a	A_d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

[1599] 实施例80:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向α-1抗胰蛋白酶(A1AT)的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1600] 在研究中测试列于以下表72中的寡核苷酸对小鼠中的A1AT的剂量依赖性抑制。

[1601] 表72

[1602] 靶向A1AT的修饰ASO

[1603]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
476366	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	n/a	n/a	2265
656326	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	GalNAc$_3$-1a	A_d	2266
678381	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}$ $A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A_d	2267
678382	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}$ $A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	GalNAc$_3$-7a	A_d	2267
678383	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A$ $_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	GalNAc$_3$-10a	A_d	2267
678384	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A$ $_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	GalNAc$_3$-13a	A_d	2267

[1604] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出,GalNAc$_3$-3$_a$在实施例39中示出,GalNAc$_3$-7$_a$在实施例48中示出,GalNAc$_3$-10$_a$在实施例46中示出,并且GalNAc$_3$-13$_a$在实施例62中示出。

[1605] 处理

[1606] 在以下示出的剂量(总共三次剂量)下,每周一次用列于表72中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射六周龄雄性C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死。使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定A1AT肝脏mRNA水平。使用小鼠α1-抗胰蛋白酶ELISA(目录号41-A1AMS-E01,Alpco,Salem,NH)测定A1AT血浆蛋白水平。以下结果以归一化为PBS对照的每个处理组的A1AT肝脏mRNA和血浆蛋白水平的平均百分比呈现。

[1607] 如表73中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低A1AT肝脏mRNA和A1AT血浆蛋白水平。包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比母体(ISIS 476366)显著更有效。

[1608] 表73

[1609] A1AT肝脏mRNA和血浆蛋白水平

[1610]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	A1AT 肝脏 mRNA (% PBS)	A1AT 血浆蛋白(% PBS)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0.6	99	90	$GalNAc_3$-1a	A_d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0.6	105	90	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0.6	90	79	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0.6	94	84	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0.6	106	91	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

[1611] 使用标准方案在处死时测量血浆中的肝脏转氨酶和BUN水平。还测量了体重和器官重量。结果在以下表74中示出。体重以相对于基线的%示出。器官重量以相对于PBS对照组的体重的%示出。

[1612] 表74

[1613]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	体重(基线%)	肝脏重量 (相对体重%)	肾脏重量 (相对体重%)	脾脏重量 (相对体重%)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0.6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0.6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0.6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0.6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0.6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

[1614] 实施例81:包含$GalNAc_3$聚簇的靶向A1AT的寡核苷酸的体内作用持续时间

[1615] 在单一剂量研究中测试列于表72中的寡核苷酸在小鼠中的作用持续时间。

[1616] 处理

[1617] 用列于表72中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射六周龄雄性C57BL/6小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。在给药前一天抽血以确定基线并且在剂量之后5天、12天、19天和25天时抽血。通过ELISA测量血浆A1AT蛋白水平(参见实施例80)。以下结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆A1AT蛋白水平的平均百分比呈现。结果显示,包含GalNAc缀合物的寡核苷酸更有效并且比缺乏GalNAc缀合物的母体(ISIS 476366)具有更长的作用持续时间。此外,包含5'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 678381、678382、678383和678384)通常比包含3'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 656326)甚至更有效并且作用持续时间甚至更长。

[1618] 表75

[1619] 小鼠中的血浆A1AT蛋白水平

[1620]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	时间点(给药后的天数)	A1AT(基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	$GalNAc_3$-3a	A_d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	$GalNAc_3$-7a	A_d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	$GalNAc_3$-10a	A_d
		12	21		
		19	45		

[1621]

		25	73		
678384	18	5	29	$GalNAc_3$-13a	A_d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

[1622] 实施例82:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体外反义抑制

[1623] 在处理之前2小时,以15,000个细胞/孔将小鼠原代肝脏肝细胞接种于96孔平板中。以2、10、50或250nM在Williams E培养基中添加列于表76中的寡核苷酸,并且将细胞在37℃下在5%CO_2中孵育过夜。在寡核苷酸添加之后16小时使细胞裂解,并且使用RNease 3000BioRobot(Qiagen)纯化总RNA。使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定SRB-1mRNA水平。使用Prism 4软件(GraphPad)确定IC_{50}值。结果显示,包含各种不同GalNAc缀合物基团和各种不同可裂解部分的寡核苷酸在体外自由摄取实验中比缺乏GalNAc缀合物基团的母体寡核苷酸(ISIS 353382和666841)显著更有效。

[1624] 表76

[1625] SRB-1表达的体外抑制

[1626]

ISIS No.	序列(5'至 3')	键联	GalNAc 聚簇	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	n/a	n/a	250	2256
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	PS	GalNAc$_3$-1$_a$	A_d	40	2257
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	40	2258
661162	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	8	2258

[1627]

664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}9_a}$	PS	$GalNAc_3\text{-}9_a$	A_d	20	2257
665001	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}8_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\text{----}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}8_a$	A_d	70	2258
666224	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}5_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}5_a$	A_d	80	2258
666841	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PO/PS	n/a	n/a	>250	2256
666881	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}10_a$	A_d	30	2258
666904	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}3_a$	PO	9	2256
666924	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}T_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}3_a$	T_d	15	2261
666961	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}6_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}6_a$	A_d	150	2258
666981	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}7_a$	A_d	20	2258
670061	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}13_a$	A_d	30	2258
670699	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}T_{do}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PO/PS	$GalNAc_3\text{-}3_a$	T_d	15	2261
670700	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}A_{eo}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T$	PO/PS	$GalNAc_3\text{-}3_a$	A_e	30	2258
670701	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}T_{eo}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PO/PS	$GalNAc_3\text{-}3_a$	T_e	25	2261
671144	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}12_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_e$	PS	$GalNAc_3\text{-}12_a$	A_d	40	2258

[1628]

671165	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T	PO/PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A$_d$	8	2258
671261	**GalNAc$_3$-14$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-14$_a$	A$_d$	>250	2258
671262	**GalNAc$_3$-15$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-15$_a$	A$_d$	>250	2258
673501	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PO/PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A$_d$	30	2258
673502	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PO/PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A$_d$	8	2258
675441	**GalNAc$_3$-17$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-17$_a$	A$_d$	30	2258
675442	**GalNAc$_3$-18$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-18$_a$	A$_d$	20	2258
677841	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$ T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$'-GalNAc$_3$-19$_a$**	PS	GalNAc$_3$-19$_a$	A$_d$	40	2257
677842	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$ T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$'-GalNAc$_3$-20$_a$**	PS	GalNAc$_3$-20$_a$	A$_d$	30	2257
677843	**GalNAc$_3$-23$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-23$_a$	A$_d$	40	2258

[1629] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出，GalNAc$_3$-3$_a$在实施例39中示出，GalNAc$_3$-5$_a$在实施例49中示出，GalNAc$_3$-6$_a$在实施例51中示出，GalNAc$_3$-7$_a$在实施例48中示出，GalNAc$_3$-8$_a$在实施例47中示出，GalNAc$_3$-9$_a$在实施例52中示出，GalNAc$_3$-10$_a$在实施例46中示出，GalNAc$_3$-12$_a$在实施例61中示出，GalNAc$_3$-13$_a$在实施例62中示出，GalNAc$_3$-14$_a$在实施例63中示出，GalNAc$_3$-15$_a$在实施例64中示出，GalNAc$_3$-17$_a$在实施例68中示出，GalNAc$_3$-18$_a$在实施例69中示出，GalNAc$_3$-19$_a$在实施例70中示出，GalNAc$_3$-20$_a$在实施例71中示出，并且GalNAc$_3$-23$_a$在实施例76中示出。

[1630] 实施例83:通过包含GalNAc$_3$聚簇的靶向因子XI的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1631] 在研究中测试列于以下表77中的寡核苷酸对小鼠中的因子XI的剂量依赖性抑制。

[1632] 表77

[1633] 靶向因子XI的修饰寡核苷酸

[1634]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}\ A_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	2259
656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}\ A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do}'\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	$GalNAc_3\text{-}1_a$	A_d	2260
663086	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o}'A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}\ T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3\text{-}3_a$	A_d	2268
678347	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}'A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}\ T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3\text{-}7_a$	A_d	2268
678348	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o}'A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3\text{-}10_a$	A_d	2268
678349	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o}'A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3\text{-}13_a$	A_d	2268

[1635] $GalNAc_3\text{-}1_a$的结构先前在实施例9中示出，$GalNAc_3\text{-}3_a$在实施例39中示出，$GalNAc_3\text{-}7_a$在实施例48中示出，$GalNAc_3\text{-}10_a$在实施例46中示出，并且$GalNAc_3\text{-}13_a$在实施例62中示出。

[1636] 处理

[1637] 在以下示出的剂量(总共三次剂量)下，每周一次用以下列出的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射六至八周龄小鼠。每个处理组由4只动物组成。在最后剂量之后72小时将小鼠处死。根据标准方案使用实时PCR测量因子XI肝脏mRNA水平并且归一化为亲环蛋白。还测量了肝脏转氨酶、BUN和胆红素。以下结果以归一化为PBS对照的每个处理组的平均百分比呈现。

[1638] 如表78中所说明，用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低因子XI肝脏mRNA。结果显示包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体(ISIS 404071)更有效。此外，包含5'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 663086、678347、678348和678349)甚至比包含3'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 656173)更有效。

[1639] 表78

[1640] 因子XI肝脏mRNA、肝脏转氨酶、BUN和胆红素水平

[1641]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	因子 XI mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	胆红素 (mg/dL)	$GalNAc_3$ 聚簇	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	63	70	21	0.18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0.15	n/a	2259
	10	33	49	53	23	0.15		
	30	17	43	57	22	0.14		
656173	0.7	43	90	89	21	0.16	$GalNAc_3$-1a	2260
	2	9	36	58	26	0.17		
	6	3	50	63	25	0.15		
663086	0.7	33	91	169	25	0.16	$GalNAc_3$-3a	2268
	2	7	38	55	21	0.16		
	6	1	34	40	23	0.14		
678347	0.7	35	28	49	20	0.14	$GalNAc_3$-7a	2268
	2	10	180	149	21	0.18		
	6	1	44	76	19	0.15		
678348	0.7	39	43	54	21	0.16	$GalNAc_3$-10a	2268
	2	5	38	55	22	0.17		
	6	2	25	38	20	0.14		
678349	0.7	34	39	46	20	0.16	$GalNAc_3$-13a	2268
	2	8	43	63	21	0.14		
	6	2	28	41	20	0.14		

[1642] 实施例84:包含$GalNAc_3$缀合物的靶向因子XI的寡核苷酸的体内作用持续时间

[1643] 在单一剂量研究中测试列于表77中的寡核苷酸在小鼠中的作用持续时间。

[1644] 处理

[1645] 用列于表77中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射六至八周龄小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。在给药前一天通过尾部放血抽血以确定基线并且在剂量之后3天、10天和17天时抽血。使用来自R&D Systems,Minneapolis,MN的因子XI捕获和生物素化的检测抗体(分别为目录号AF2460和BAF2460)和OptEIA Reagent Set B(目录号550534,BD Biosciences,San Jose,CA)通过ELISA测量血浆因子XI蛋白水平。以下结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆因子XI蛋白水平的平均百分比呈现。结果显示包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体(ISIS 404071)更有效且作用持续时间更长。此外,包含5'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 663086、678347、678348和678349)甚至比包含3'-GalNAc缀合物的寡核苷酸(ISIS 656173)更有效并且作用持续时间甚至更长。

[1646] 表79

[1647] 小鼠中的血浆因子XI蛋白水平

[1648]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	时间点(给药后的天数)	XI 因子 (基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	n/a	n/a	2259
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	$GalNAc_3$-1a	A_d	2260
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	$GalNAc_3$-3a	A_d	2268
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	$GalNAc_3$-7a	A_d	2268
		10	1			
		17	8			

[1649]

678348	6	3	1	$GalNAc_3$-10a	A_d	2268
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	$GalNAc_3$-13a	A_d	2268
		10	1			
		17	5			

[1650] 实施例85:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1651] 在剂量依赖性研究中测试列于表76中的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1652] 处理

[1653] 在以下示出的剂量(总共三次剂量)下,每周一次用列于表76中的寡核苷酸或用盐水各自皮下注射六至八周龄C57BL/6小鼠。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后48小时将小鼠处死以使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定SRB-1mRNA水平。以下结果以归一化为盐水对照的每个处理组的肝脏SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。

[1654] 如表80和81中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平。

[1655] 表80

[1656] 肝脏中的SRB-1 mRNA

[1657]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	100	n/a	n/a
655861	0.1	94	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0.3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0.1	120	$GalNAc_3$-3a	A_d

[1658]

	0.3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0.1	107	GalNAc$_3$-10a	A$_d$
	0.3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0.1	120	GalNAc$_3$-7a	A$_d$
	0.3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0.1	118	GalNAc$_3$-13a	A$_d$
	0.3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0.1	119	GalNAc$_3$-20a	A$_d$
	0.3	96		
	1	65		
	3	23		

[1659] 表81

[1660] 肝脏中的SRB-1 mRNA

[1661]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (%盐水)	GalNAc$_3$ 聚簇	CM
661161	0.1	107	GalNAc$_3$-3a	A$_d$
	0.3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0.1	110	GalNAc$_3$-19a	A$_d$
	0.3	88		
	1	52		
	3	25		

[1662] 还使用标准方案测量了肝脏转氨酶水平、总胆红素、BUN和体重。每个处理组的平均值在以下表82中示出。

[1663] 表82

[1664]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	胆红素 (mg/dL)	BUN (mg/dL)	体重(基线%)	GalNAc$_3$ 聚簇	CM
盐水	n/a	19	39	0.17	26	118	n/a	n/a
655861	0.1	25	47	0.17	27	114	GalNAc$_3$-1a	A$_d$
	0.3	29	56	0.15	27	118		
	1	20	32	0.14	24	112		

[1665]

	3	27	54	0.14	24	115		
661161	0.1	35	83	0.13	24	113	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0.3	42	61	0.15	23	117		
	1	34	60	0.18	22	116		
	3	29	52	0.13	25	117		
666881	0.1	30	51	0.15	23	118	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0.3	49	82	0.16	25	119		
	1	23	45	0.14	24	117		
	3	20	38	0.15	21	112		
666981	0.1	21	41	0.14	22	113	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0.3	29	49	0.16	24	112		
	1	19	34	0.15	22	111		
	3	77	78	0.18	25	115		
670061	0.1	20	63	0.18	24	111	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0.3	20	57	0.15	21	115		
	1	20	35	0.14	20	115		
	3	27	42	0.12	20	116		
677842	0.1	20	38	0.17	24	114	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0.3	31	46	0.17	21	117		
	1	22	34	0.15	21	119		
	3	41	57	0.14	23	118		

[1666] 实施例86:通过包含$GalNAc_3$聚簇的靶向TTR的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1667] 在剂量依赖性研究中测试列于以下表83中的寡核苷酸对表达人TTR基因的转基因小鼠中的人甲状腺素运载蛋白(TTR)的反义抑制。

[1668] 处理

[1669] 每周一次用列于下表中的寡核苷酸和剂量或用PBS各自皮下注射八周龄TTR转基因小鼠,持续三周,总共三次剂量。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死。在整个实验的各个时间点进行尾部放血,测量血浆TTR蛋白、ALT和AST水平并且报道于表85-87中。在将动物处死之后,测量血浆ALT、AST和人TTR水平以及体重、器官重量和肝脏人TTR mRNA水平。使用临床分析仪(AU480,Beckman Coulter,CA)测量TTR蛋白水平。根据标准方案使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)来测定肝脏人TTR mRNA水平。呈现于表84-87中的结果为每个处理组的平均值。mRNA水平为相对于PBS组的平均值的平均值。血浆蛋白水平为相对于基线处的PBS组的平均值的平均值。体重为每个单独处理组的直到处死时从基线的重量变化的平均百分比。将示出的器官重量归一化为动物的体重,然后相对于PBS组的平均归一化器官重量呈现每个处理组的平均归一化器官重量。

[1670] 在表84-87中,"BL"指示基线,即刚好在第一次剂量之前取得的测量结果。如表84和85中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低TTR表达水平。包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体(ISIS 420915)更有效。此外,包含GalNAc缀合物和混合的PS/PO核苷间键联的寡核苷酸甚至比包含GalNAc缀合物和全部PS键联的寡核苷酸更有效。

[1671] 表83

[1672] 靶向人TTR的寡核苷酸

[1673]

Isis No.	序列 5'至 3'	键联	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	2269
660261	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	PS	$GalNAc_3$-1a	A_d	2270
682883	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}}T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T$ $_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-3a	PO	2269
682884	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o'}}T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T$ $_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-7a	PO	2269
682885	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}}T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-10a	PO	2269
682886	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o'}}T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-13a	PO	2269
684057	$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{d}$ $_{s}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_d}$	PS/PO	$GalNAc_3$-19a	A_d	2270

[1674]

	$\mathbf{_{o'}\text{-}GalNAc_3\text{-}19_a}$				

[1675] 表85的图例可见于实施例74。$GalNAc_3$-1的结构在实施例9中示出。$GalNAc_3$-3_a的结构在实施例39中示出。$GalNAc_3$-7_a的结构在实施例48中示出。$GalNAc_3$-10_a的结构在实施例46中示出。$GalNAc_3$-13_a的结构在实施例62中示出。$GalNAc_3$-19_a的结构在实施例70中示出。

[1676] 表84

[1677] 人TTR的体内反义抑制

[1678]

Isis No.	剂量 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	血浆 TTR 蛋白(% PBS)	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	2269
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	$GalNAc_3$-1a	A_d	2270
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

[1679] 表85

[1680] 人TTR的体内反义抑制

[1681]

Isis No.	剂量 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	血浆 TTR 蛋白(在基线处的% PBS)				GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
			基线	第 3 天	第 10 天	第 17 天 (处死之后)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	2269
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0.6	60	88	73	63	68	$GalNAc_3$-3a	PO	2269
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0.6	56	88	78	63	67	$GalNAc_3$-7a	PO	2269
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			

[1682]

682885	0.6	60	92	77	68	76	$GalNAc_3$-10a	PO	2269
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0.6	57	91	70	64	69	$GalNAc_3$-13a	PO	2269
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0.6	53	80	69	56	62	$GalNAc_3$-19a	A_d	2270
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

[1683] 表86

[1684] 转氨酶水平、体重变化和相对器官重量

[1685]

Isis No.	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				身体 (基线%)	肝脏 (% PBS)	脾脏 (% PBS)	肾脏 (% PBS)	SEQ ID No.
		基线	第 3 天	第 10 天	第 17 天	基线	第 3 天	第 10 天	第 17 天					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	2269
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	2270
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

[1686] 表87

[1687] 转氨酶水平、体重变化和相对器官重量

[1688]

Isis No.	剂量(mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				身体(基线%)	肝脏(% PBS)	脾脏(% PBS)	肾脏(% PBS)	SEQ ID No.
		基线	第3天	第10天	第17天	基线	第3天	第10天	第17天					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	2269
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0.6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	2269
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0.6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	2269
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	

[1689]

682885	0.6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	2269
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0.6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	2269
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0.6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	2270
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

[1690] 实施例87:单一剂量的包含$GalNAc_3$聚簇的靶向TTR的寡核苷酸的体内作用持续时间

[1691] 在单一剂量研究中测试ISIS号420915和660261(参见表83)在小鼠中的作用持续时间。在单一剂量研究中还测试ISIS号420915、682883和682885(参见表83)在小鼠中的作用持续时间。

[1692] 处理

[1693] 用100mg/kg ISIS No.420915或13.5mg/kg ISIS No.660261各自皮下注射表达人TTR的八周龄雄性转基因小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。在给药之前进行尾部放血以确定基线并且在剂量之后第3天、第7天、第10天、第17天、第24天和第39天时进行尾部放血。如实施例86中所描述来测量血浆TTR蛋白水平。以下结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆TTR水平的平均百分比呈现。

[1694] 表88

[1695] 血浆TTR蛋白水平

[1696]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	时间点(给药后的天数)	TTR (基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	30	n/a	n/a	2269
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13.5	3	27	$GalNAc_3$-1a	A_d	2270

[1697]

		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

[1698] 处理

[1699] 用100mg/kg ISIS No.420915、10.0mg/kg ISIS No.682883或10.0mg/kg 682885各自皮下注射表达人TTR的雌性转基因小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。在给药之前进行尾部放血以确定基线并且在剂量之后第3天、第7天、第10天、第17天、第24天和第39天时进行尾部放血。如实施例86中所描述来测量血浆TTR蛋白水平。以下结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆TTR水平的平均百分比呈现。

[1700] 表89

[1701] 血浆TTR蛋白水平

[1702]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	时间点(给药后的天数)	TTR (基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	48	n/a	n/a	2269
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10.0	3	45	$GalNAc_3$-3a	PO	2269
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10.0	3	40	$GalNAc_3$-10a	PO	2269
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

[1703] 表88和89中的结果显示包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏缀合物的母体寡核苷酸(ISIS 420915)更有效并且作用持续时间更长。

[1704] 实施例88:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向SMN的寡核苷酸进行的体内剪接调节

[1705] 测试列于表90中的寡核苷酸对小鼠中的人存活运动神经元(SMN)的剪接调节。

[1706] 表90

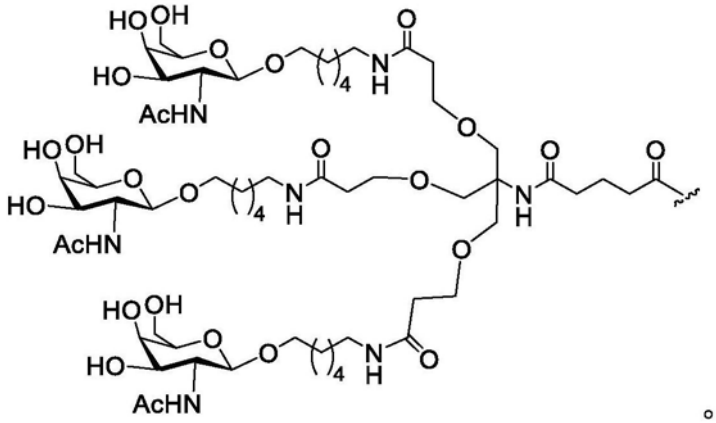
[1707] 靶向SMN的修饰ASO

[1708]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
387954	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}\ G_{e}$	n/a	n/a	2271
699819	**$GalNAc_3$-7_{a}-o'**-$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}\ T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	2271
699821	**$GalNAc_3$-7_{a}-o'**-$A_{es}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}T_{eo}A_{eo}\ A_{eo}T_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	2271
700000	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}\ G_{eo}$**$A_{do}$'-$GalNAc_3$-$1_{a}$**	$GalNAc_3$-1a	A_d	2272
703421	X-$ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG$	n/a	n/a	2271
703422	**$GalNAc_3$-7_{b}-**X-$ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG$	$GalNAc_3$-7b	n/a	2271

[1709] $GalNAc_3$-7_a的结构先前在实施例48中示出。"X"指示通过Gene Tools(Philomath,OR)产生的5'伯胺,并且$GalNAc_3$-7_b指示缺乏如下所示的接头的-NH-C_6-O部分的$GalNAc_3$-7_a的结构:

[1710]



[1711] ISIS号703421和703422为吗啉代寡核苷酸,其中两个寡核苷酸中的每个核苷酸为吗啉代核苷酸。

[1712] 处理

[1713] 用列于表91中的寡核苷酸或用盐水皮下注射表达人SMN的六周龄转基因小鼠一次。每个处理组由2只雄性和2只雌性组成。在剂量之后3天将小鼠处死,以根据标准方案使用实时PCR测定具有和不具有外显子7的肝脏人SMN mRNA水平。使用Ribogreen试剂测量总RNA。将SMN mRNA水平归一化为总mRNA,并且进一步归一化为盐水处理组的平均值。包括外显子7的SMN mRNA与缺失外显子7的SMN mRNA的所得平均比率在表91中示出。结果显示,调节剪接并包含GalNAc缀合物的完全修饰的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体寡核苷酸在改变肝脏中的剪接上显著更有效。此外,对于多种修饰化学包括2'-MOE和吗啉代修饰的寡核苷酸,将维持这个趋势。

[1714] 表91

[1715] 靶向人SMN的寡核苷酸的体内作用

[1716]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	+外显子7/-外显子7	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
盐水	n/a	1.00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1.65	n/a	n/a	2271
387954	288	5.00	n/a	n/a	2271
699819	32	7.84	GalNAc$_3$-7a	PO	2271
699821	32	7.22	GalNAc$_3$-7a	PO	2271
700000	32	6.91	GalNAc$_3$-1a	A$_d$	2272
703421	32	1.27	n/a	n/a	2271
703422	32	4.12	GalNAc$_3$-7b	n/a	2271

[1717] 实施例89:通过包含GalNAc$_3$缀合物的靶向载脂蛋白A(Apo(a))的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1718] 在研究中测试列于以下表92中的寡核苷酸对转基因小鼠中的Apo(a)的剂量依赖性抑制。

[1719] 表92

[1720] 靶向Apo(a)的修饰ASO

[1721]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	2281
681257	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2281

[1722] GalNAc$_3$-7$_a$的结构在实施例48中示出。

[1723] 处理

[1724] 在以下示出的剂量(总共六次剂量)下,每周一次用列于表92中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射八周龄雌性C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)。每个处理组由3-4只动物组成。在第一次剂量前一天进行尾部放血并且每周在每次剂量之后进行尾部放血以测定血浆Apo(a)蛋白水平。在最后施用之后两天将小鼠处死。使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)根据标准方案测定Apo(a)肝脏mRNA水平。使用ELISA测定Apo(a)血浆蛋白水平,并且测定肝脏转氨酶水平。表93中的mRNA和血浆蛋白结果以相对于PBS处理组的处理组平均百分比呈现。将血浆蛋白水平进一步归一化为PBS组的基线(BL)值。平均绝对转氨酶水平和体重(相对于基线平均值的%)报道于表94中。

[1725] 如表93中所说明,用寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低Apo(a)肝脏mRNA和血浆蛋白水平。此外,包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体寡核苷酸显著更有效并且作用持续时间更长。如表94中所说明,转氨酶水平和体重不受寡核苷酸的影响,表明寡核苷酸为耐受良好的。

[1726] 表93

[1727] Apo(a)肝脏mRNA和血浆蛋白水平

[1728]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	Apo(a) mRNA (% PBS)	Apo(a)血浆蛋白水平(% PBS)						
			基线	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0.3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

[1729] 表94

[1730]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	体重(基线%)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0.3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

[1731] 实施例90:通过包含$GalNAc_3$聚簇的靶向TTR的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1732] 在剂量依赖性研究中测试列于以下表95中的寡核苷酸对表达人TTR基因的转基因小鼠中的人甲状腺素运载蛋白(TTR)的反义抑制。

[1733] 处理

[1734] 每周一次用列于表96中的寡核苷酸和剂量或用PBS各自皮下注射TTR转基因小鼠,持续三周,总共三次剂量。每个处理组由4只动物组成。在第一次剂量之前,进行尾部放血以测定基线(BL)处的血浆TTR蛋白水平。在最后施用之后72小时将小鼠处死。使用临床分析仪(AU480,Beckman Coulter,CA)测量TTR蛋白水平。根据标准方案使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR)来测定肝脏人TTR mRNA水平。呈现于表96中的结果为每个处理组的平均值。mRNA水平为相对于PBS组的平均值的平均值。血浆蛋白水平为相对于基线处的PBS组的平均值的平均值。“BL”指示基线,即刚好在第一次剂量之前取得的测量结果。如表96中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低TTR表达水平。包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比缺乏GalNAc缀合物的母体(ISIS 420915)更有效,并且包含磷酸二酯或脱氧腺苷可裂解部分的寡核苷酸与缺乏缀合物的母体相比显示出效力的显著改进(参见ISIS号682883和666943相对于420915并且参见实施例86和87)。

[1735] 表95

[1736] 靶向人TTR的寡核苷酸

[1737]

Isis No.	序列 5'至 3'	键联	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	2269
682883	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	PO	2269
666943	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	A_d	2273
682887	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-7a	A_d	2273
682888	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	A_d	2273
682889	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	A_d	2273

[1738] 表95的图例可见于实施例74。$GalNAc_3$-3_a的结构在实施例39中示出。$GalNAc_3$-7_a的结构在实施例48中示出。$GalNAc_3$-10_a的结构在实施例46中示出。$GalNAc_3$-13_a的结构在实施例62中示出。

[1739] 表96

[1740] 人TTR的体内反义抑制

[1741]

Isis No.	剂量 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	TTR 蛋白(基线%)	GalNAc 聚簇	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0.6	61	73	$GalNAc_3$-3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0.6	74	93	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0.6	60	97	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0.6	65	92	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0.6	72	74	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	38	45		
	6	16	18		

[1742] 实施例91:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向因子VII的寡核苷酸在非人灵长类动物中进行的体内反义抑制

[1743] 在非终止的剂量递增研究(non-terminal,dose escalation study)中测试列于以下表97中的寡核苷酸对猴子中的因子VII的反义抑制。

[1744] 处理

[1745] 用递增剂量的列于表97中的寡核苷酸或用PBS在第0天、第15天和第29天时各自皮下注射非首次用于实验的猴子。每个处理组由4只雄性和1只雌性组成。在第一次剂量之前并且在此后的各个时间点进行抽血以测定血浆因子VII蛋白水平。通过ELISA测量因子VII蛋白水平。呈现于表98中的结果为相对于基线(BL)处的PBS组的平均值(刚好在第一次剂量之前取得的测量结果)的每个处理组的平均值。如表98中所说明,用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低因子VII表达水平,并且包含GalNAc缀合物的寡核苷酸与缺乏GalNAc缀合物的寡核苷酸相比在猴子中显著更有效。

[1746] 表97

[1747] 靶向因子VII的寡核苷酸

[1748]

Isis No.	序列 5'至 3'	键联	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID No.
407935	$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	n/a	n/a	2274
686892	**$GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o}$**,$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	$GalNAc_3$-10a	PO	2274

[1749] 表97的图例可见于实施例74。$GalNAc_3$-10_a的结构在实施例46中示出。

[1750] 表98

[1751] 因子VII血浆蛋白水平

[1752]

ISIS No.	天数	剂量(mg/kg)	因子 VII (基线%)
407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

[1753] 实施例92:通过包含$GalNAc_3$缀合物的靶向Apo-CIII的反义寡核苷酸在原代肝细胞中进行的反义抑制

[1754] 以15,000个细胞/孔将小鼠原代肝细胞接种于96孔平板中,并且以0.46nM、1.37nM、4.12nM或12.35nM、37.04nM、111.11nM或333.33nM或1.00μM添加靶向小鼠ApoC-III的列于表99中的寡核苷酸。在用寡核苷酸孵育24小时之后,使细胞裂解并且使用RNeasy(Qiagen)纯化总RNA。使用实时PCR和RIBOGREEN® RNA定量试剂(Molecular Probes,Inc.)根据标准方案测定ApoC-III mRNA水平。使用Prism 4软件(GraphPad)确定IC_{50}值。结果显示无论可裂解部分是否为磷酸二酯或磷酸二酯连接的脱氧腺苷,包含GalNAc缀合物的寡核苷酸均比缺乏缀合物的母体寡核苷酸显著更有效。

[1755] 表99

[1756] 小鼠原代肝细胞中小鼠APOC-III表达的抑制

[1757]

ISIS No.	序列(5'至3')	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{d}{}_{s}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	13.20	2275
661180	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{d}{}_{s}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}$ **A_{do}'-GalNAc$_3$-1$_a$**	A_d	1.40	2276
680771	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'**$,^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0.70	2275
680772	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**$,^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1.70	2275
680773	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$'**$,^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	2.00	2275
680774	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$'**$,^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1.50	2275
681272	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'**$,^{m}C_{es}A_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{eo}$ $A_{eo}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	< 0.46	2275
681273	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'$,A_{do}$**$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	A_d	1.10	2277
683733	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{d}{}_{s}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}$**$A_{do}$'-GalNAc$_3-19_a$**	A_d	2.50	2276

[1758] GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出，GalNAc$_3$-3$_a$在实施例39中示出，GalNAc$_3$-7$_a$在实施例48中示出，GalNAc$_3$-10$_a$在实施例46中示出，GalNAc$_3$-13$_a$在实施例62中示出，并且GalNAc$_3$-19$_a$在实施例70中示出。

[1759] 实施例93：通过包含混合翼和5'-GalNAc$_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1760] 在剂量依赖性研究中测试列于表100中的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1761] 表100

[1762] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1763]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
449093	$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	2278
699806	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'**$,T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-3a	PO	2278
699807	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**$,T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2278
699809	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**, $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2278
699811	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**$,T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2278
699813	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**$,T_{ks}T_{ds}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2278
699815	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**$,T_{es}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2278

[1764] $GalNAc_3$-3_a的结构先前在实施例39中示出，并且$GalNAc_3$-7a的结构先前在实施例48中示出。下标："e"指示2'-MOE修饰核苷；"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷；"k"指示6'-(S)-CH_3双环核苷(cEt)；"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS)；"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO)。上标"m"指示5-甲基胞嘧啶。

[1765] 处理

[1766] 在以下示出的剂量下用列于表100中的寡核苷酸或用盐水皮下注射六至八周龄C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死。使用实时PCR测量肝脏SRB-1 mRNA水平。根据标准方案将SRB-1 mRNA水平归一化为亲环蛋白mRNA水平。结果以相对于盐水对照组的每个处理组的SRB-1 mRNA水平的平均百分比呈现。如表101中所说明，用反义寡核苷酸处理以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平，并且包含GalNAc缀合物并具有为全部cEt或混合糖修饰的翼的缺口聚物寡核苷酸比缺乏缀合物并包含全部cEt修饰的翼的母体寡核苷酸显著更有效。

[1767] 还测量了体重、肝脏转氨酶、总胆红素和BUN，并且每个处理组的平均值在表101中示出。体重以相对于刚好在寡核苷酸剂量之前测量的基线体重的体重平均百分比(%BL)示出。

[1768] 表101

[1769] SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN和总胆红素水平以及体重

[1770]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	体重(基线%)
PBS	n/a	100	31	84	0.15	28	102
449093	1	111	18	48	0.17	31	104
	3	94	20	43	0.15	26	103
	10	36	19	50	0.12	29	104
699806	0.1	114	23	58	0.13	26	107
	0.3	59	21	45	0.12	27	108
	1	25	30	61	0.12	30	104
699807	0.1	121	19	41	0.14	25	100
	0.3	73	23	56	0.13	26	105
	1	24	22	69	0.14	25	102
699809	0.1	125	23	57	0.14	26	104
	0.3	70	20	49	0.10	25	105
	1	33	34	62	0.17	25	107
699811	0.1	123	48	77	0.14	24	106
	0.3	94	20	45	0.13	25	101
	1	66	57	104	0.14	24	107
699813	0.1	95	20	58	0.13	28	104
	0.3	98	22	61	0.17	28	105

[1771]

	1	49	19	47	0.11	27	106
699815	0.1	93	30	79	0.17	25	105
	0.3	64	30	61	0.12	26	105
	1	24	18	41	0.14	25	106

[1772] 实施例94：通过包含2'-糖修饰和5'-$GalNAc_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行

的体内反义抑制

[1773] 在剂量依赖性研究中测试列于表102中的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1774] 表102

[1775] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1776]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	2256
700989	$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	n/a	n/a	2279
666904	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$**,$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	2256
700991	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2279

[1777] 下标"m"指示2'-O-甲基修饰的核苷。对于完整的表格图例参见实施例74。GalNAc$_3$-3$_a$的结构先前在实施例39中示出,并且GalNAc$_3$-7a的结构先前在实施例48中示出。

[1778] 处理

[1779] 使用实施例93中描述的方案完成研究。结果在以下表103中示出并且显示包含GalNAc缀合物的2'-MOE和2'-OMe修饰的寡核苷酸比缺乏缀合物的相应母体寡核苷酸显著更有效。体重、肝脏转氨酶、总胆红素和BUN测量的结果表明化合物均为耐受良好的。

[1780] 表103

[1781] SRB-1 mRNA

[1782]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

[1783] 实施例95:通过包含双环核苷和5'-GalNAc$_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[1784] 在剂量依赖性研究中测试列于表104中的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1785] 表104

[1786] 靶向SRB-1的修饰ASO

[1787]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	2250
666905	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-3$_a$	PO	2250
699782	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7$_a$	PO	2250
699783	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{l}$	GalNAc$_3$-3$_a$	PO	2250
653621	$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{lo}$**A$_{do}$-GalNAc$_3-1_a$**	GalNAc$_3$-1$_a$	A$_d$	2251
439879	$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	n/a	n/a	2250
699789	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	GalNAc$_3$-3$_a$	PO	2250

[1788] 下标"g"指示氟-HNA核苷,下标"1"指示包含2'-O-CH_2-4'桥联的锁核苷。对于其他缩写参见实施例74表格图例。GalNAc$_3$-1$_a$的结构先前在实施例9中示出,GalNAc$_3$-3$_a$的结构先前在实施例39中示出,并且GalNAc$_3$-7a的结构先前在实施例48中示出。

[1789] 处理

[1790] 使用实施例93中描述的方案完成研究。结果在以下表105中示出并且显示包含GalNAc缀合物和各种双环核苷修饰的寡核苷酸比缺乏缀合物并包含双环核苷修饰的母体寡核苷酸显著更有效。此外,包含GalNAc缀合物和氟-HNA修饰的寡核苷酸比缺乏缀合物并包含氟-HNA修饰的母体显著更有效。体重、肝脏转氨酶、总胆红素和BUN测量的结果表明化合物均为耐受良好的。

[1791] 表105

[1792] SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN和总胆红素水平以及体重

[1793]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	SRB-1 mRNA (% PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0.1	105
	0.3	56
	1	18
699782	0.1	93
	0.3	63
	1	15
699783	0.1	105
	0.3	53
	1	12
653621	0.1	109
	0.3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0.1	82
	0.3	69

[1794]

	1	26

[1795] 实施例96:包含$GalNAc_3$缀合物基团的反义寡核苷酸的血浆蛋白结合

[1796] 在超滤测定中测试靶向ApoC-III的列于表70中的寡核苷酸和靶向Apo(a)的列于表106中的寡核苷酸以便评估血浆蛋白结合。

[1797] 表106

[1798] 靶向Apo(a)的修饰寡核苷酸

[1799]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$聚簇	CM	SEQ ID No
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	2281
693401	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	2281
681251	**$GalNAc_3$-7_{a-o}**,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	2281
681257	**$GalNAc_3$-7_{a-o}**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	2281

[1800] 对于表格图例参见实施例74。$GalNAc_3$-7a的结构先前在实施例48中示出。

[1801] 将Ultrafree-MC超滤单元(30,000NMWL,低结合再生的纤维素膜,Millipore,Bedford,MA)用300μL的0.5%Tween 80预调节并且在2000g下离心10分钟,然后用300μL的对照寡核苷酸在H_2O中的300μg/mL溶液预调节并且在2000g下离心16分钟。为了评估待用于研究中的来自表70和106的每个测试寡核苷酸对过滤器的非特异性结合,将300μL的pH 7.4的寡核苷酸在H_2O中的250ng/mL溶液放置于预调节的过滤器中并且在2000g下离心16分钟。

通过ELISA测定分析未过滤和过滤的样品以测定寡核苷酸浓度。对于每个样品，使用三次重复以获得平均浓度。相对于未过滤样品的过滤样品的平均浓度用来确定在不存在血浆的情况下通过过滤器回收的寡核苷酸的百分比(%回收)。

[1802] 收集于K3-EDTA中的来自正常的无药物人志愿者、食蟹猴和CD-1小鼠的冷冻全血浆样品购自Bioreclamation LLC(Westbury,NY)。在两种浓度(5μg/mL和150μg/mL)下将测试寡核苷酸添加至1.2mL血浆等分试样中。将每个掺加的血浆样品的等分试样(300μL)放置于预调节的过滤器单元中并且在37℃下孵育30分钟，接着立即在2000g下离心16分钟。通过ELISA分析过滤和未过滤的掺加的血浆样品的等分试样，以测定每个样品中的寡核苷酸浓度。每个浓度使用三次重复，以确定每个样品中结合和未结合的寡核苷酸的平均百分数。使用相对于未过滤样品的浓度的过滤样品的平均浓度来确定血浆中未结合至血浆蛋白的寡核苷酸的百分比(%未结合)。通过将每个寡核苷酸的%未结合除以%回收来校正非特异性结合的最终未结合寡核苷酸值。通过从100中扣除最终%未结合值来确定最终%结合寡核苷酸值。对于在每种血浆中测试的两种浓度的寡核苷酸(5μg/mL和150μg/mL)，结果在表107中示出。结果显示GalNAc缀合物基团对血浆蛋白结合不具有显著影响。此外，具有全部PS核苷间键联的寡核苷酸和具有混合PO/PS键联的寡核苷酸均结合血浆蛋白，并且具有全部PS键联的那些寡核苷酸比具有混合PO/PS键联的那些寡核苷酸结合血浆蛋白的程度略微更大。

[1803] 表107

[1804] 结合至血浆蛋白的修饰寡核苷酸的百分比

[1805]

ISIS No.	人血浆		猴子血浆		小鼠血浆	
	5 μg/mL	150 μg/mL	5 μg/mL	150 μg/mL	5 μg/mL	150 μg/mL
304801	99.2	98.0	99.8	99.5	98.1	97.2
663083	97.8	90.9	99.3	99.3	96.5	93.0
674450	96.2	97.0	98.6	94.4	94.6	89.3
494372	94.1	89.3	98.9	97.5	97.2	93.6
693401	93.6	89.9	96.7	92.0	94.6	90.2
681251	95.4	93.9	99.1	98.2	97.8	96.1
681257	93.4	90.5	97.6	93.7	95.6	92.7

[1806] 实施例97:包含$GalNAc_3$缀合物基团的靶向TTR的修饰寡核苷酸

[1807] 将包含GalNAc缀合物的示于表108中的寡核苷酸设计成靶向TTR。

[1808] 表108

[1809] 靶向TTR的修饰寡核苷酸

[1810]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No
666941	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-3	A$_d$	2273
666942	T_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ $^mC_{eo}$ **A$_{do}$'-GalNAc$_3$-3$_a$**	GalNAc$_3$-1	A$_d$	2270
682876	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-3	PO	2269
682877	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-7	PO	2269
682878	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-10	PO	2269
682879	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-13	PO	2269
682880	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-7	A$_d$	2273
682881	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-10	A$_d$	2273
682882	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	GalNAc$_3$-13	A$_d$	2273
684056	T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ $^mC_{eo}$ **A$_{do}$'-GalNAc$_3$-19$_a$**	GalNAc$_3$-19	A$_d$	2270

[1811] 表108的图例可见于实施例74。GalNAc$_3$-1的结构在实施例9中示出。GalNAc$_3$-3$_a$的结构在实施例39中示出。GalNAc$_3$-7$_a$的结构在实施例48中示出。GalNAc$_3$-10$_a$的结构在实施例46中示出。GalNAc$_3$-13$_a$的结构在实施例62中示出。GalNAc$_3$-19$_a$的结构在实施例70中示出。

[1812] 实施例98:在hPMBC测定中评价包含GalNAc缀合物的寡核苷酸的促炎性作用

[1813] 在如实施例23和24中所描述的hPMBC测定中测试列于表109中的寡核苷酸的促炎性作用。(对于寡核苷酸的描述参见表30、83、95和108。)ISIS 353512为用作阳性对照的高响应者,并且其他寡核苷酸描述于表83、95和108中。使用来自一位志愿者供体的血液获得示于表109中的结果。结果显示,与具有全部PS键联的相同寡核苷酸相比,包含混合PO/PS核苷间键联的寡核苷酸产生显著较低的促炎性反应。此外,GalNAc缀合物基团在此测定中不具有显著作用。

[1814] 表109

[1815]

ISIS No.	E_{max}/EC_{50}	GalNAc$_3$聚簇	键联	CM

353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	$GalNAc_3$-10	PS	A_d
682888	0.26	$GalNAc_3$-10	PO/PS	A_d
684057	1.03	$GalNAc_3$-19	PO/PS	A_d

[1816] 实施例99:包含GalNAc缀合物的寡核苷酸对去唾液酸糖蛋白受体的结合亲和力

[1817] 在竞争性受体结合测定中测试列于表110中的寡核苷酸对去唾液酸糖蛋白受体的结合亲和力(对于寡核苷酸的描述,参见表76)。将竞争配体α1-酸糖蛋白(AGP)在50mM乙酸钠缓冲液(pH 5)中用1U神经氨酸酶-琼脂糖在37℃下孵育16小时,并且通过唾液酸测定或尺寸排阻色谱法(SEC)来证实>90%的去唾液酸化。根据Atsma等的工序使用一氯化碘来碘化AGP(参见J Lipid Res.1991年1月;32(1):173-81)。在此方法中,将去唾液酸化的α1-酸糖蛋白(de-AGP)添加至0.25M NaOH中的10mM氯化碘、$Na^{125}I$和1M甘氨酸中。在室温下孵育10分钟之后,通过利用3KDMWCO自旋柱将混合物浓缩两次来从游离的^{125}I中分离出^{125}I-标记的de-AGP。在配备有Agilent SEC-3柱(7.8x300mm)和β-RAM计数器的HPLC系统上测试蛋白质的标记效率和纯度。如下进行利用^{125}I-标记的de-AGP和含有ASO的各种GalNAc-聚簇的竞争实验。将人HepG2细胞(10^6个细胞/毫升)涂布在6孔平板上处于2ml适当的生长培养基中。使用了用10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和10mM HEPES补充的MEM培养基。将细胞分别在5%和10%CO_2下在37℃下孵育16-20小时。在实验之前用不具有FBS的培养基洗涤细胞。将细胞在37℃下用1ml含有适当生长培养基的竞争混合物孵育30min,所述培养基具有2% FBS、10^{-8}M ^{125}I-标记的de-AGP和浓度在10^{-11}至10^{-5}M范围内的含有GalNAc-聚簇的ASO。在10^{-2}M GalNAc糖存在下测定非特异性结合。将细胞用不具有FBS的培养基洗涤两次,以去除未结合的^{125}I-标记的de-AGP和竞争者GalNAc ASO。使用含有1%β-巯基乙醇的Qiagen的RLT缓冲液使细胞裂解。在简短的10min冻/融循环之后将裂解液转移至圆底测定管中并且在γ-计数器上测定。在将^{125}I蛋白计数除以最低GalNAc-ASO浓度计数的值之前扣除非特异性结合。使用非线性回归算法根据单一位点竞争结合方程式拟合抑制曲线以计算结合亲和力(K_D's)。

[1818] 从在五个不同日子进行的实验中获得表110中的结果。用上标"a"标志的寡核苷酸的结果为在两个不同日子进行的实验的平均值。结果显示,在5'-末端包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸以比在3'-末端包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸大1.5倍至16倍的亲和力结合人HepG2细胞上的去唾液酸糖蛋白受体。

[1819] 表110

[1820] 去唾液酸糖蛋白受体结合测定结果

[1821]

ISIS No.	GalNAc 缀合物	GalNAc 缀合物连接到的寡核苷酸末端	K_D (nM)
661161[a]	$GalNAc_3$-3	5'	3.7

[1822]

666881[a]	GalNAc$_3$-10	5’	7.6
666981	GalNAc$_3$-7	5’	6.0
670061	GalNAc$_3$-13	5’	7.4
655861[a]	GalNAc$_3$-1	3’	11.6
677841[a]	GalNAc$_3$-19	3’	60.8

[1823] 实施例100:靶向Apo(a)的包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸的体内反义抑制

[1824] 在单一剂量研究中测试列于以下表111a中的寡核苷酸在小鼠中的作用持续时间。

[1825] 表111a

[1826] 靶向APO(a)的修饰ASO

[1827]

ISIS No.	序列(5’至3’)	GalNAc$_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
681251	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2281
681257	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2281

[1828] GalNAc$_3$-7$_a$的结构在实施例48中示出。

[1829] 处理

[1830] 每周一次用列于表111b中的寡核苷酸和剂量或用PBS各自皮下注射表达人Apo(a)的雌性转基因小鼠,总共6次剂量。每个处理组由3只动物组成。在给药前一天抽血以测定血浆中Apo(a)蛋白的基线水平并且在第一次剂量之后72小时、1周和2周时抽血。在第一次剂量之后3周、4周、5周和6周时将发生另外的抽血。使用ELISA测量血浆Apo(a)蛋白水平。表111b中的结果以归一化为基线水平(基线%)的每个处理组的血浆Apo(a)蛋白水平的平均百分比呈现,所述结果表明包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸在Apo(a)表达中表现出蛋白质减少。对于包含全部PS核苷间键联的寡核苷酸和包含混合PO和PS键联的寡核苷酸观察到这种有效作用。

[1831] 表111b

[1832] Apo(a)血浆蛋白水平

[1833]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	72小时时的Apo(a)(基线%)	在1周时的Apo(a)(基线%)	在3周时的Apo(a)(基线%)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0.3	97	108	93
	1.0	85	77	57
	3.0	54	49	11
	10.0	23	15	4
681257	0.3	114	138	104
	1.0	91	98	54
	3.0	69	40	6
	10.0	30	21	4

[1834] 实施例101:通过包含经由稳定部分连接的GalNAc聚簇的寡核苷酸进行的反义抑

制

[1835] 测试列于表112中的寡核苷酸对小鼠APOC-III表达的体内抑制。用列于表112中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射C57Bl/6小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。用ISIS 440670处理的每只小鼠接受2mg/kg、6mg/kg、20mg/kg或60mg/kg的剂量。用ISIS 680772或696847处理的每只小鼠接受0.6mg/kg、2mg/kg、6mg/kg或20mg/kg。ISIS 696847的GalNAc缀合物基团经由稳定部分连接，所述稳定部分为硫代磷酸酯键联而不是能够易于裂解的含磷酸二酯的键联。在剂量之后72小时将动物处死。使用实时PCR测量肝脏APOC-III mRNA水平。根据标准方案将APOC-III mRNA水平归一化为亲环蛋白mRNA水平。结果以相对于盐水对照组的每个处理组的APOC-III mRNA水平的平均百分比呈现于表112中。结果显示包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸比缺乏缀合物基团的寡核苷酸显著更有效。此外，包含经由可裂解部分连接至寡核苷酸的GalNAc缀合物基团的寡核苷酸(ISIS 680772)甚至比包含经由稳定部分连接至寡核苷酸的GalNAc缀合物基团的寡核苷酸(ISIS 696847)更有效。

[1836] 表112

[1837] 靶向小鼠APOC-III的修饰寡核苷酸

[1838]

ISIS No.	序列(5'至3')	CM	剂量(mg/kg)	APOC-III mRNA (% PBS)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	2	92	2275
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0.6	79	2275
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	**GalNAc$_3$-7$_{a-s}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a (PS)	0.6	83	2275
			2	73	
			6	40	
			20	28	

[1839] GalNAc$_3$-7$_a$的结构在实施例48中示出。

[1840] 实施例102:包含GalNAc缀合物的反义寡核苷酸在肝脏中的分布

[1841] 评价了不包含GalNAc缀合物的ISIS 353382(参见表36)和包含GalNAc缀合物的ISIS 655861(参见表36)的肝脏分布。以列于表113中的剂量用ISIS 353382或655861皮下注射雄性balb/c小鼠一次。每个处理组由3只动物组成，除了ISIS 655861的18mg/kg组，所述组由2只动物组成。在剂量之后48小时将动物处死以确定寡核苷酸的肝脏分布。为了测量每个细胞的反义寡核苷酸分子的数量，将钌(II)三-联吡啶标签(MSD TAG，Meso Scale Discovery)缀合至用来检测反义寡核苷酸的寡核苷酸探针。呈现于表113中的结果为以百万个寡核苷酸分子/细胞单位计的每个处理组的寡核苷酸的平均浓度。结果显示，在等效剂量下，包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比不包含GalNAc缀合物的寡核苷酸以更高的浓度存在于总肝脏和肝细胞中。此外，包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比不包含GalNAc缀合物的寡核苷酸以更低的浓度存在于非实质肝脏细胞中。虽然ISIS 655861在肝细胞和非实质肝脏细

胞中的浓度为每个细胞类似的，但是肝脏大约为80体积％肝细胞。因此，存在于肝脏中的大多数ISIS 655861寡核苷酸见于肝细胞中，而存在于肝脏中的大多数ISIS 353382寡核苷酸见于非实质肝脏细胞中。

[1842] 表113

[1843]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	整个肝脏中的浓度(分子*10^6/个细胞)	肝细胞中的浓度(分子*10^6/个细胞)	非实质肝脏细胞中的浓度(分子*10^6/个细胞)
353382	3	9.7	1.2	37.2
	10	17.3	4.5	34.0
	20	23.6	6.6	65.6
	30	29.1	11.7	80.0
	60	73.4	14.8	98.0
	90	89.6	18.5	119.9
655861	0.5	2.6	2.9	3.2
	1	6.2	7.0	8.8
	3	19.1	25.1	28.5
	6	44.1	48.7	55.0
	18	76.6	82.3	77.1

[1844] 实施例103：包含$GalNAc_3$缀合物的靶向APOC-III的寡核苷酸的体内作用持续时间

[1845] 在单一剂量研究中测试列于以下表114中的寡核苷酸在小鼠中的作用持续时间。

[1846] 表114

[1847] 靶向APOC-III的修饰ASO

[1848]

ISIS No.	序列(5'至3')	$GalNAc_3$ 聚簇	CM	SEQ ID No.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	2248
663084	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o}A_{do}}A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	2264

[1849]

	$^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$			
679241	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}19_a}$	$GalNAc_3$-19a	A_d	2249

[1850] $GalNAc_3$-3_a的结构在实施例39中示出，并且$GalNAc_3$-19_a的结构在实施例70中示出。

[1851] 处理

[1852] 用列于表114中的寡核苷酸或用PBS各自皮下注射表达人APOC-III的雌性转基因小鼠一次。每个处理组由3只动物组成。在给药之前抽血以确定基线并且在剂量之后3天、7天、14天、21天、28天、35天和42天时抽血。如实施例20中所描述来测量血浆甘油三酯和APOC-III蛋白水平。表115中的结果以归一化为基线水平的每个处理组的血浆甘油三酯和APOC-III水平的平均百分比呈现。实施例79的表71中的结果与以下表115中的结果的比较显示，包含磷酸二酯和硫代磷酸酯核苷间键联的混合物的寡核苷酸表现出比仅包含硫代磷酸酯核苷间键联的相当(equivalent)寡核苷酸增加的作用持续时间。

[1853] 表115

[1854] 转基因小鼠中的血浆甘油三酯和APOC-III蛋白水平

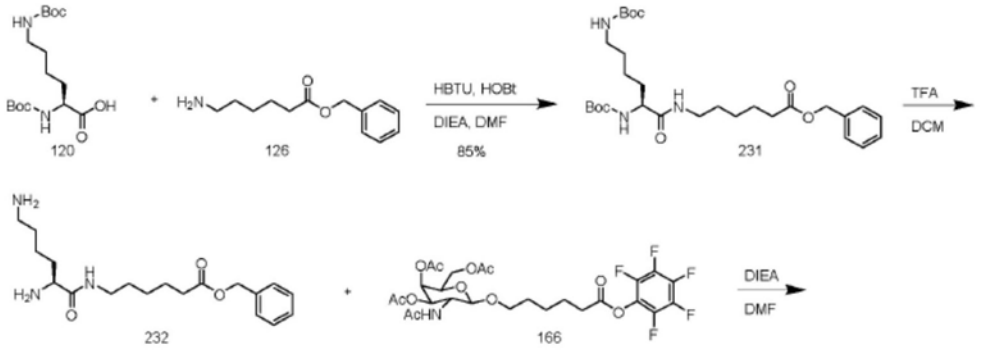
[1855]

ISIS No.	剂量 (mg/kg)	时间点 (给药后的天数)	甘油三酯(基线%)	APOC-III 蛋白(基线%)	$GalNAc_3$ 聚簇	CM
PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		

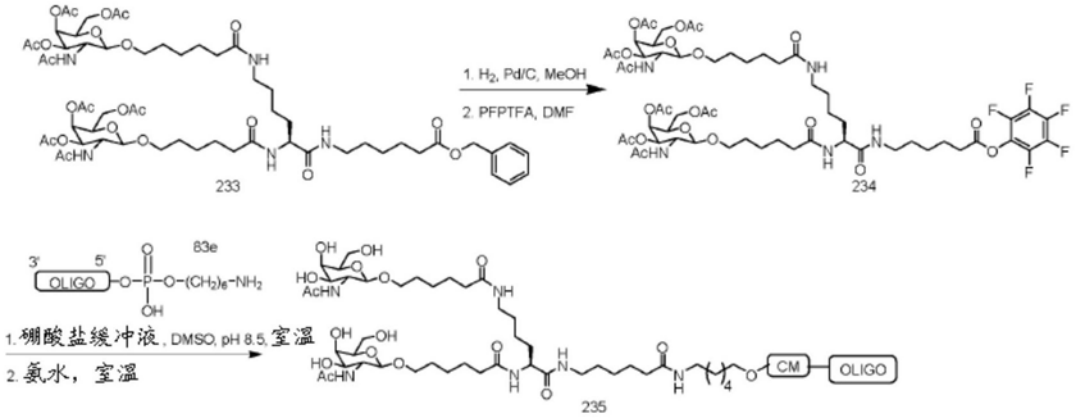
[1856]

		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	$GalNAc_3$-19a	A_d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

[1857] 实施例104:包含5'-$GalNAc_2$缀合物的寡核苷酸的合成

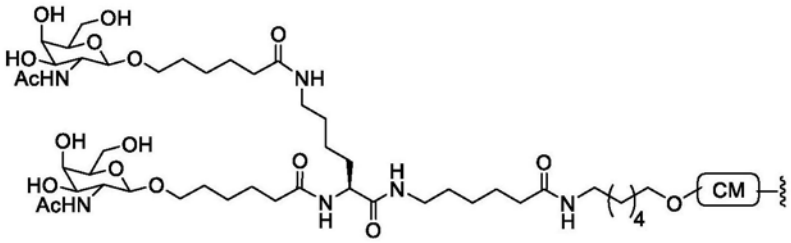


[1858]

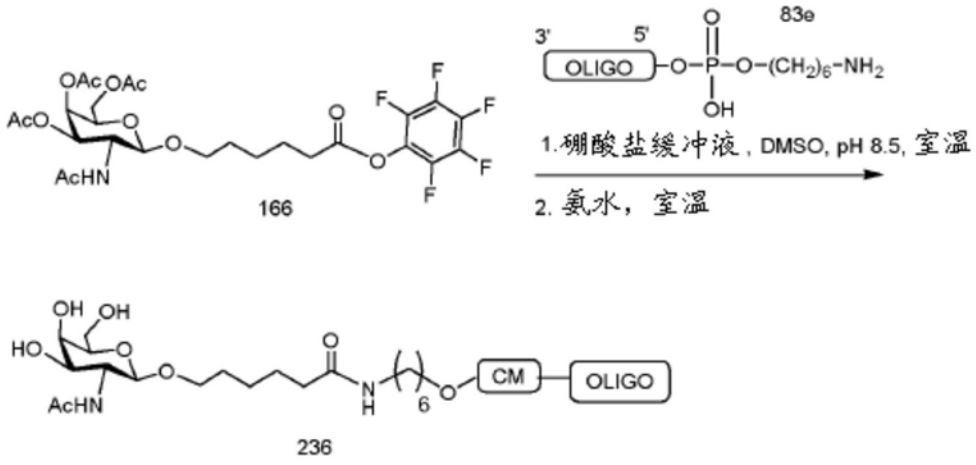


[1859] 化合物120为商业上可获得的,并且化合物126的合成描述于实施例49中。将化合物120(1g,2.89mmol)、HBTU(0.39g,2.89mmol)以及HOBt(1.64g,4.33mmol)溶解于DMF(10mL中。并且添加N,N-二异丙基乙胺(1.75mL,10.1mmol)。在约5min之后,将氨基己酸苄基酯(1.36g,3.46mmol)添加至反应物中。在3h之后,将反应混合物倾入100mL的1M NaHSO4中并且用2x50mL乙酸乙酯萃取。合并有机层并且用3x40mL饱和$NaHCO_3$和2x盐水洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤并且浓缩。通过硅胶柱色谱法(DCM:EA:Hex,1:1:1)纯化产物,得到化合物231。LCMS和NMR与结构一致。将化合物231(1.34g,2.438mmol)溶解于二氯甲烷(10mL)中并且添加三氟乙酸(10mL)。在室温下搅拌2h之后,将反应混合物在减压下浓缩并且与甲苯共蒸发(3x10mL)。在减压下干燥残余物,得到呈三氟乙酸盐的化合物232。化合物166的合成描述于实施例54中。将化合物166(3.39g,5.40mmol)溶解于DMF(3mL)中。将化合物232(1.3g,2.25mmol)的溶液溶解于DMF(3mL)中并且添加N,N-二异丙基乙胺(1.55mL)。将反应物在室温下搅拌30分钟,然后倾入水(80mL)并且用EtOAc(2x100mL)萃取水层。将有机相分离并且用饱和$NaHCO_3$水溶液(3x80mL)、1M $NaHSO_4$(3x80mL)和盐水(2x80mL)洗涤,然后干燥(Na_2SO_4)、过滤并且浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化残余物,得到化合物233。LCMS和NMR与结构一致。将化合物233(0.59g,0.48mmol)溶解于甲醇(2.2mL)和乙酸乙酯(2.2mL)中。添加钯/碳(10重量%Pd/C,湿,0.07g)并且将反应混合物在氢气气氛下搅拌3h。将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并且浓缩以得到羧酸。将羧酸(1.32g,1.15mmol,不含聚簇的酸)溶解于DMF(3.2mL)中。向其中添加N,N-二异丙基乙胺(0.3mL,1.73mmol)和PFPTFA(0.30mL,1.73mmol)。在室温下搅拌30min之后,将反应混合物倾入水(40mL)中并且用EtOAc(2x50mL)萃取。如上所述完成标准的后处理,得到化合物234。LCMS和NMR与结构一致。使用实施例46中描述的一般工序制备寡核苷酸235。缀合物基团$GalNAc_2$-24的$GalNAc_2$聚簇部分($GalNAc_2$-24_a)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。$GalNAc_2$-24

(GalNAc$_2$-24$_a$-CM)的结构在以下示出：

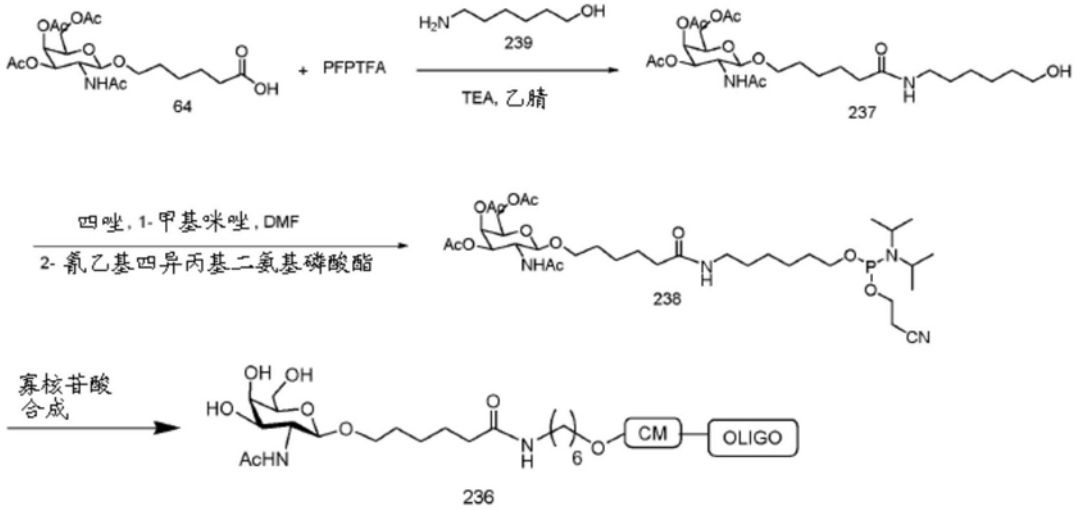
[1860] 

[1861] 实施例105：包含GalNAc$_1$-25缀合物的寡核苷酸的合成

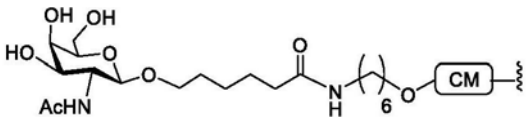
[1862] 

[1863] 化合物166的合成描述于实施例54中。使用实施例46中描述的一般工序制备寡核苷酸236。

[1864] 或者，使用以下示出的方案合成寡核苷酸236，并且使用实施例10中描述的工序使用化合物238来形成寡核苷酸236。

[1865] 

[1866] 缀合物基团GalNAc$_1$-25的GalNAc$_1$聚簇部分(GalNAc$_1$-25$_a$)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。GalNAc$_1$-25(GalNAc$_1$-25$_a$-CM)的结构在以下示出：

[1867] 

[1868] 实施例106：通过包含5'-GalNAc$_2$或5'-GalNAc$_3$缀合物的靶向SRB-1的寡核苷酸进

行的体内反义抑制

[1869] 在剂量依赖性研究中测试列于表116和117中的寡核苷酸对小鼠中的SRB-1的反义抑制。

[1870] 处理

[1871] 用2mg/kg、7mg/kg或20mg/kg的ISIS No.440762，或用0.2mg/kg、0.6mg/kg、2mg/kg、6mg/kg或20mg/kg的ISIS No.686221、686222或708561，或用盐水皮下注射六周龄雄性C57BL/6小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)一次。每个处理组由4只动物组成。在最后施用之后72小时将小鼠处死。使用实时PCR测量肝脏SRB-1 mRNA水平。根据标准方案将SRB-1 mRNA水平归一化为亲环蛋白mRNA水平。反义寡核苷酸以剂量依赖性方式降低SRB-1 mRNA水平，并且ED_{50}结果呈现于表116和117中。尽管先前的研究示出三价的GalNAc缀合的寡核苷酸比二价的GalNAc缀合的寡核苷酸显著更有效，所述二价的GalNAc缀合的寡核苷酸继而比一价的GalNAc缀合的寡核苷酸显著更有效(参见例如Khorev等,Bioorg.&Med.Chem.,第16卷,5216-5231(2008))，用包含一价、二价以及三价的GalNAc聚簇的反义寡核苷酸处理以如表116和117中所示的相似效力降低SRB-1 mRNA水平。

[1872] 表116

[1873] 靶向SRB-1的修饰寡核苷酸

[1874]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc 聚簇	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	4.7	2250
686221	**$GalNAc_2$-$24_{a\text{-}o}$,A_{do}**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_2$-24_a	0.39	2254
686222	**$GalNAc_3$-$13_{a\text{-}o}$,A_{do}**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-13_a	0.41	2254

[1875] 对于表格图例，参见实施例93。$GalNAc_3$-13a的结构在实施例62中示出，并且$GalNAc_2$-24a的结构在实施例104中示出。

[1876] 表117

[1877] 靶向SRB-1的修饰寡核苷酸

[1878]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc 聚簇	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	5	2250
708561	**$GalNAc_1$-$25_{a\text{-}o}$,**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_1$-25_a	0.4	2250

[1879] 对于表格图例，参见实施例93。$GalNAc_1$-25a的结构在实施例105中示出。

[1880] 使用实施例75中描述的工序，还评价了表116和117中的寡核苷酸在肝脏中的浓度。如通过UV以μg寡核苷酸/克肝脏组织的单位所测量，示于以下表117a和117b中的结果为每个处理组的平均总反义寡核苷酸组织水平。结果显示，包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸以显著高于相同剂量的缺乏GalNAc缀合物基团的寡核苷酸的水平在肝脏中积累。此外，在其相应缀合物基团中包含一个、两个或三个GalNAc配体的反义寡核苷酸均以类似水平在

肝脏中积累。由以上引用的Khorev等参考文献来看此结果为令人惊奇的并且与示于以上表116和117中的活性数据一致。

[1881] 表117a

[1882] 包含$GalNAc_2$或$GalNAc_3$缀合物基团的寡核苷酸的肝脏浓度

[1883]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	[反义寡核苷酸] (μg/g)	GalNAc 聚簇	CM
440762	2	2.1	n/a	n/a
	7	13.1		
	20	31.1		
686221	0.2	0.9	$GalNAc_2$-24_a	A_d
	0.6	2.7		
	2	12.0		
	6	26.5		
686222	0.2	0.5	$GalNAc_3$-13_a	A_d
	0.6	1.6		
	2	11.6		
	6	19.8		

[1884] 表117b

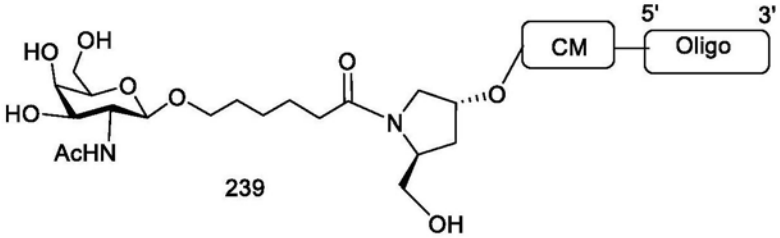
[1885] 包含$GalNAc_1$缀合物基团的寡核苷酸的肝脏浓度

[1886]

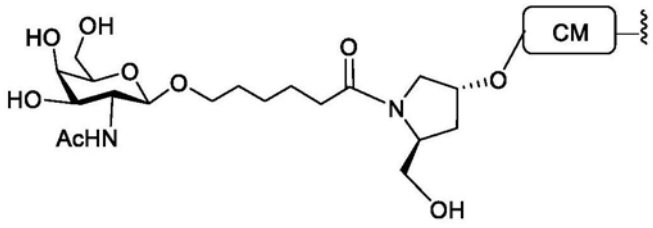
ISIS No.	剂量(mg/kg)	[反义寡核苷酸] (μg/g)	GalNAc 聚簇	CM
440762	2	2.3	n/a	n/a
	7	8.9		
	20	23.7		
708561	0.2	0.4	$GalNAc_1$-25_a	PO
	0.6	1.1		
	2	5.9		
	6	23.7		
	20	53.9		

[1887] 实施例107:包含$GalNAc_1$-26或$GalNAc_1$-27缀合物的寡核苷酸的合成

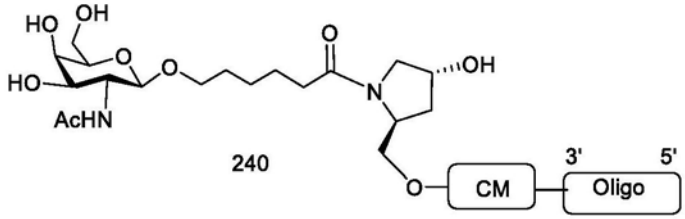
[1888]



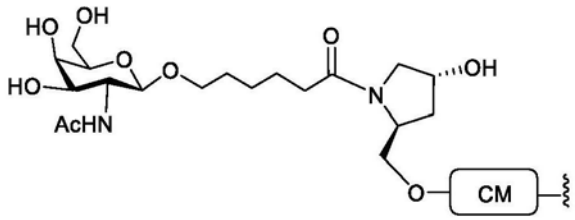
[1889] 通过使用DMF中的HBTU和DIEA将化合物47(参见实施例15)偶联至酸64(参见实施例32)来合成寡核苷酸239。将所得到的含酰胺化合物亚磷酸酯化,然后使用实施例10中描述的工序添加至寡核苷酸的5'-末端。缀合物基团$GalNAc_1$-26的$GalNAc_1$聚簇部分($GalNAc_1$-26_a)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。$GalNAc_1$-26($GalNAc_1$-26_a-CM)的结构在以下示出:

[1890] 

[1891] 为了将GalNAc1缀合物基团添加至寡核苷酸的3'-末端,使用实施例7中描述的工序将由化合物47和64反应所形成的酰胺添加至固体载体上。然后使用实施例9中描述的工序完成寡核苷酸合成以便形成寡核苷酸240。

[1892] 

[1893] 缀合物基团GalNAc1-27的GalNAc1聚簇部分(GalNAc1-27a)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。GalNAc1-27(GalNAc1-27a-CM)的结构在以下示出:

[1894] 

[1895] 实施例108:靶向Apo(a)的包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸的体内反义抑制

[1896] 在单一剂量研究中在小鼠中测试列于以下表118中的寡核苷酸。

[1897] 表118

[1898] 靶向APO(a)的修饰ASO

[1899]

ISIS No.	序列(5'至3')	GalNAc$_3$聚簇	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	2281
681251	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2281
681255	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	2281
681256	**GalNAc$_3$-10$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-10a	PO	2281
681257	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	2281
681258	**GalNAc$_3$-13$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-13a	PO	2281
681260	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do}}$**-GalNAc$_3$-19**	GalNAc$_3$-19a	A_d	2280

[1900] GalNAc$_3$-7$_a$的结构在实施例48中示出。

[1901] 处理

[1902] 用列于表119中的寡核苷酸和剂量或用PBS各自皮下注射表达人Apo(a)的雄性转基因小鼠一次。每个处理组由4只动物组成。在给药前一天抽血以确定血浆中Apo(a)蛋白的基线水平并且在第一次剂量之后1周时抽血。另外的抽血将每周发生,持续大约8周。使用ELISA测量血浆Apo(a)蛋白水平。表119中的结果以归一化为基线水平(基线%)的每个处理组的血浆Apo(a)蛋白水平的平均百分比呈现,所述结果表明反义寡核苷酸减少了Apo(a)蛋白表达。此外,包含GalNAc缀合物基团的寡核苷酸表现出甚至比不包含缀合物基团的寡核苷酸更有效的Apo(a)表达减少。

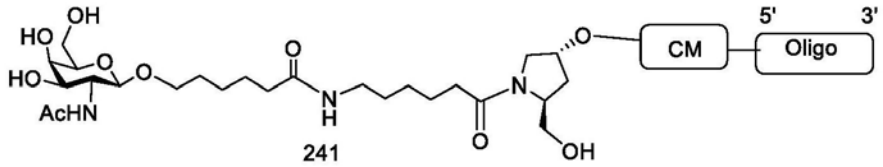
[1903] 表119

[1904] Apo(a)血浆蛋白水平

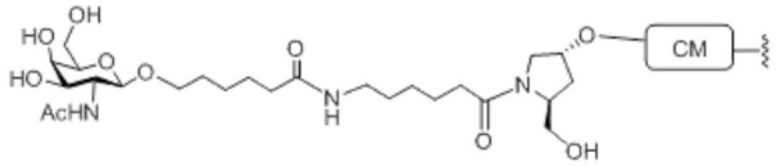
[1905]

ISIS No.	剂量(mg/kg)	在1周时的Apo(a)(基线%)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

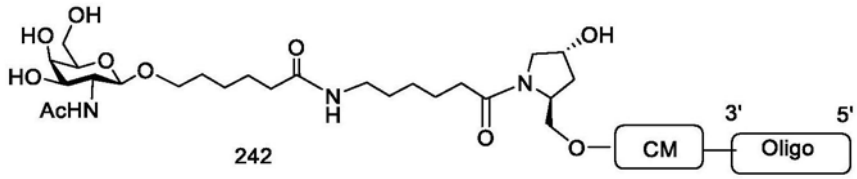
[1906] 实施例109:包含GalNAc$_1$-28或GalNAc$_1$-29缀合物的寡核苷酸的合成

[1907] 

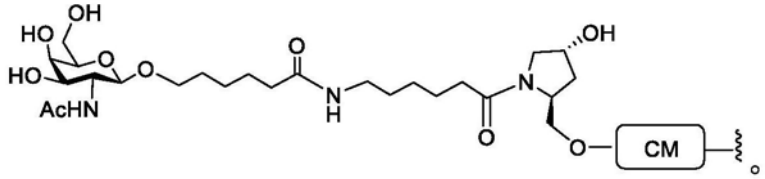
[1908] 使用类似于实施例71中描述的那些的工序形成亚磷酰胺中间体，接着使用实施例10中描述的工序合成寡核苷酸来合成寡核苷酸241。缀合物基团GalNAc$_1$-28的GalNAc$_1$聚簇部分(GalNAc$_1$-28$_a$)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。GalNAc$_1$-28(GalNAc$_1$-28$_a$-CM)的结构在以下示出：

[1909] 

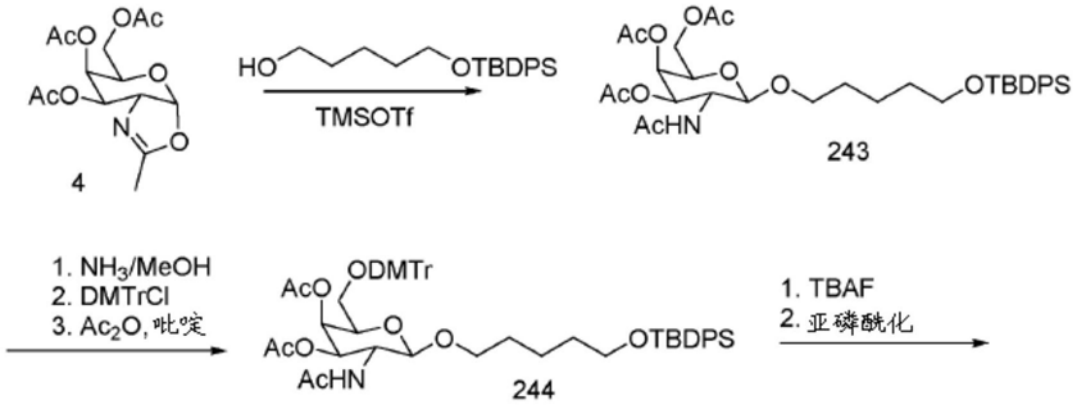
[1910] 为了将GalNAc$_1$缀合物基团添加至寡核苷酸的3'-末端，使用类似于实施例71中描述的那些的工序形成羟基中间体，然后使用实施例7中描述的工序将所述羟基中间体添加至固体载体。然后使用实施例9中描述的工序完成寡核苷酸合成以便形成寡核苷酸242。

[1911] 

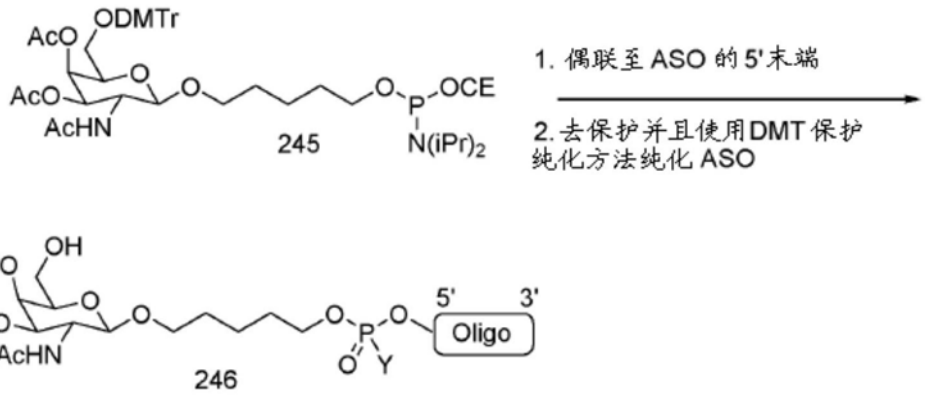
[1912] 缀合物基团GalNAc$_1$-29的GalNAc$_1$聚簇部分(GalNAc$_1$-29$_a$)可与寡核苷酸上存在的任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。GalNAc$_1$-29(GalNAc$_1$-29$_a$-CM)的结构在以下示出：

[1913] 

[1914] 实施例110：包含GalNAc$_1$-30缀合物的寡核苷酸的合成

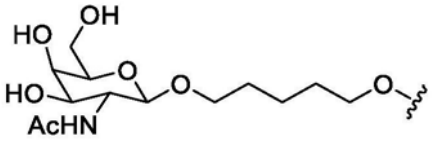


[1915]

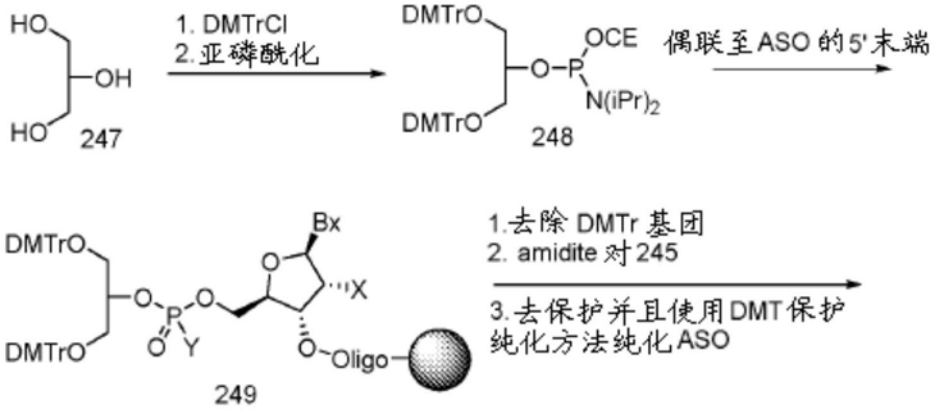


[1916] 如上所示，合成包含$GalNAc_1$-30缀合物基团的寡核苷酸246，其中Y选自O、S、取代或未取代的C_1-C_{10}烷基、氨基、取代的氨基、叠氮基、烯基或炔基。缀合物基团$GalNAc_1$-30的$GalNAc_1$聚簇部分($GalNAc_1$-30_a)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，Y为可裂解部分的一部分。在某些实施方案中，Y为稳定部分的一部分，并且可裂解部分存在于寡核苷酸上。$GalNAc_1$-30_a的结构如下所示：

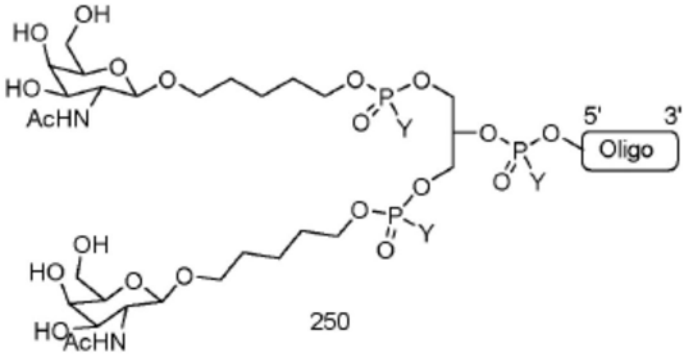
[1917]



[1918] 实施例111：包含$GalNAc_2$-31或$GalNAc_2$-32缀合物的寡核苷酸的合成

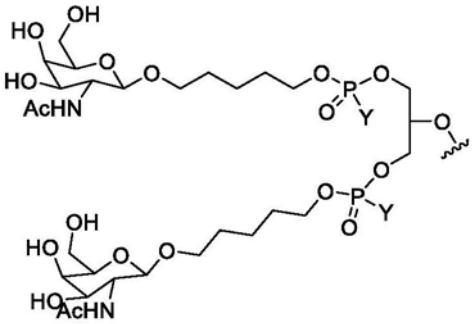


[1919]

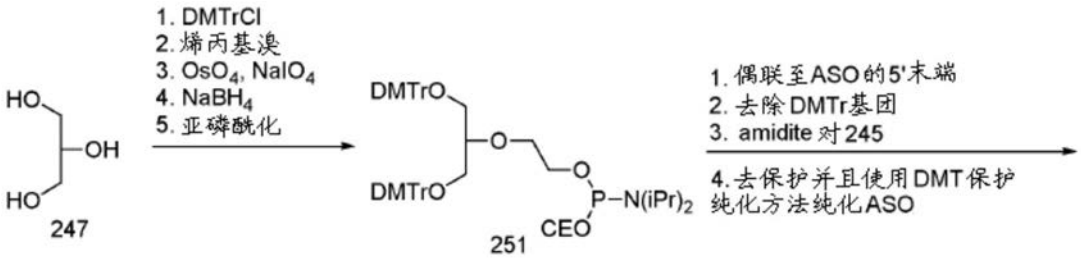


[1920] 如上所示，合成包含GalNAc$_2$-31缀合物基团的寡核苷酸250，其中Y选自O、S、取代或未取代的C_1-C_{10}烷基、氨基、取代的氨基、叠氮基、烯基或炔基。缀合物基团GalNAc$_2$-31的GalNAc$_2$聚簇部分(GalNAc$_2$-31$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，直接与寡核苷酸的5'-末端相邻的含Y基团为可裂解部分的一部分。在某些实施方案中，直接与寡核苷酸的5'-末端相邻的含Y基团为稳定部分的一部分，并且可裂解部分存在于寡核苷酸上。GalNAc$_2$-31$_a$的结构如下所示：

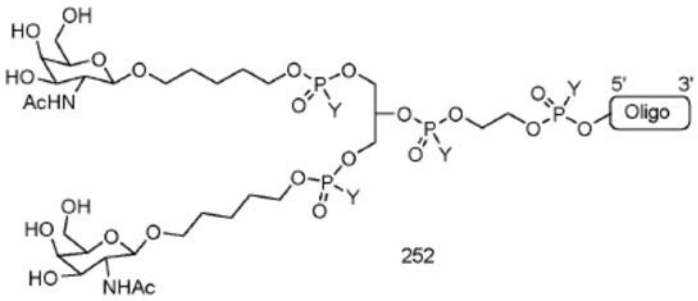
[1921]



[1922] 以下示出包含GalNAc$_2$-32缀合物的寡核苷酸的合成。

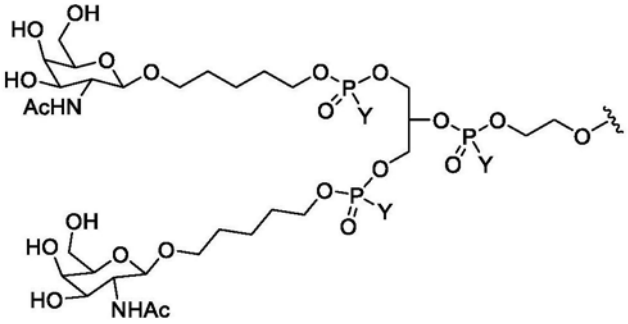


[1923]



[1924] 如上所示，合成包含GalNAc$_2$-32缀合物基团的寡核苷酸252，其中Y选自O、S、取代或未取代的C_1-C_{10}烷基、氨基、取代的氨基、叠氮基、烯基或炔基。缀合物基团GalNAc$_2$-32的GalNAc$_2$聚簇部分(GalNAc$_2$-32$_a$)可与任何可裂解部分组合以提供各种缀合物基团。在某些实施方案中，直接与寡核苷酸的5'-末端相邻的含Y基团为可裂解部分的一部分。在某些实施方案中，直接与寡核苷酸的5'-末端相邻的含Y基团为稳定部分的一部分，并且可裂解部分存在于寡核苷酸上。GalNAc$_2$-32$_a$的结构如下所示：

[1925]



[1926] 实施例112：包含GalNAc$_1$缀合物的修饰寡核苷酸

[1927] 用GalNAc$_1$缀合物基团合成靶向SRB-1的表120中的寡核苷酸，以便进一步测试包含含有一个GalNAc配体的缀合物基团的寡核苷酸的效力。

[1928] 表120

[1929]

ISIS No.	序列(5'至 3')	GalNAc 聚簇	CM	SEQ ID NO.
711461	**GalNAc$_1$-25$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$** G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-25$_a$	A$_d$	2258
711462	**GalNAc$_1$-25$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-25$_a$	PO	2256
711463	**GalNAc$_1$-25$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$ T$_{eo}$ T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-25$_a$	PO	2256
711465	**GalNAc$_1$-26$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$** G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-26$_a$	A$_d$	2258
711466	**GalNAc$_1$-26$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-26$_a$	PO	2256
711467	**GalNAc$_1$-26$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$ T$_{eo}$ T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-26$_a$	PO	2256
711468	**GalNAc$_1$-28$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$** G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-28$_a$	A$_d$	2258
711469	**GalNAc$_1$-28$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ T$_{es}$ T$_{e}$	GalNAc$_1$-28$_a$	PO	2256
711470	**GalNAc$_1$-28$_{a\text{-}o}$,**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$ T$_{eo}$ T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ A$_{ds}$ G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$ T$_{ds}$ G$_{ds}$ A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$ T$_{ds}$ T$_{eo}$	GalNAc$_1$-28$_a$	PO	2256

[1930]

	$^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{e}			
713844	G_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}-**GalNAc$_1$-27$_a$**	GalNAc$_1$-27$_a$	PO	2256
713845	G_{es} $^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}-**GalNAc$_1$-27$_a$**	GalNAc$_1$-27$_a$	PO	2256
713846	G_{es} $^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo} A_{do}-**GalNAc$_1$-27$_a$**	GalNAc$_1$-27$_a$	A$_d$	2257
713847	G_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}-**GalNAc$_1$-29$_a$**	GalNAc$_1$-29$_a$	PO	2256
713848	G_{es} $^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}-**GalNAc$_1$-29$_a$**	GalNAc$_1$-29$_a$	PO	2256
713849	G_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo} A_{do}-**GalNAc$_1$-29$_a$**	GalNAc$_1$-29$_a$	A$_d$	2257
713850	G_{es} $^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo} A_{do}-**GalNAc$_1$-29$_a$**	GalNAc$_1$-29$_a$	A$_d$	2257

[1931] 实施例113:包含GalNAc聚簇的靶向激肽释放酶B、血浆(Fletcher因子)1的反义寡核苷酸

[1932] 表121中的寡核苷酸被设计来靶向人激肽释放酶B、血浆(Fletcher因子)1或激肽释放酶(PKK)。

[1933] 表121

[1934]

序列(5'至3')	SEQ ID No.
GalNAc$_3$-3-$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-3-$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{eo}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-7-$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-7-$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{eo}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-10-$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-10-$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{eo}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
GalNAc$_3$-13-$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}$	570

[1935]

$A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	
GalNAc$_3$-13-$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{eo}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570
$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$**-GalNAc$_3$-19**	570
$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{eo}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$**-GalNAc$_3$-19**	570
GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{es}$ G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	570

[1936] 实施例114:通过具有2'-MOE糖修饰的反义寡核苷酸进行的对HepaRG™细胞中的人PKK的反义抑制

[1937] 反义寡核苷酸被设计成靶向PKK核酸并且测试其在体外对PKK mRNA的作用。筛子中使用HepaRG™细胞,其为末端分化的衍生自人肝祖细胞系的肝脏细胞并且保持原代人肝细胞的许多特性(Lubberstedt M.等,J.Pharmacol.Toxicol.Methods 2011 63:59-68)。

[1938] 以下表中的嵌合反义寡核苷酸被设计为5-10-5MOE缺口聚物。缺口聚物长为20个核苷,其中,中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含五个核苷的翼区段。5'翼区段中的每个核苷和3'翼区段中的每个核苷具有2'-O-甲氧基乙基修饰。每个缺口聚物整个的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。每个缺口聚物整个的所有胞嘧啶残基为5-甲基胞嘧啶。"起始位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。"终止位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最3'核苷酸。将列于以下表中的每个缺口聚物靶向在本文中指定为SEQ ID NO:1(GENBANK登录号NM_000892.3)的人PKK mRNA或在本文中指定为SEQ ID NO:10(从核苷酸111693001至111730000截短的GENBANK登录号NT_016354.19)的人PKK基因组序列。'n/a'表示反义寡核苷酸不靶向那个特定基因序列。

[1939] 使用电穿孔以3,000nM反义寡核苷酸转染密度为每孔20,000个细胞的培养的HepaRG™细胞。在大约24小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人类引物探针集RTS3454(正向序列CCAAAAAAGGTGCACCAGTAACA,在本文中命名为SEQ ID NO:20;反向序列CCTCCGGGACTGTACTTTAATAGG,在本文中命名为SEQ ID NO:21;探针序列CACGCAAACATTTCACAAGGCAGAGTACC,在本文中命名为SEQ ID NO:22)测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。

[1940] 表122

[1941]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
530929	1	20	AACGGTCTTCAAGCTGTTCT	59	3393	3412	30
530930	6	25	AAATGAACGGTCTTCAAGCT	17	3398	3417	31
530931	11	30	CTTAAAAATGAACGGTCTTC	29	3403	3422	32
530932	16	35	TGTCACTTAAAAATGAACGG	52	3408	3427	33
530933	31	50	TGGAGGTGAGTCTCTTGTCA	76	3423	3442	34
530934	36	55	CTTCTTGGAGGTGAGTCTCT	54	3428	3447	35
530935	68	87	GCTTGAATAAAATCATTCTG	0	n/a	n/a	36
530936	73	92	TGCTTGCTTGAATAAAATCA	27	4072	4091	37
530937	78	97	TAAGTTGCTTGCTTGAATAA	0	4077	4096	38
530938	88	107	GGAAATGAAATAAGTTGCTT	11	4087	4106	39
530939	93	112	AACAAGGAAATGAAATAAGT	0	4092	4111	40
530940	98	117	TAGCAAACAAGGAAATGAAA	7	4097	4116	41
530941	103	122	AACTGTAGCAAACAAGGAAA	22	4102	4121	42
530942	108	127	CAGGAAACTGTAGCAAACAA	22	4107	4126	43
530943	113	132	ATCCACAGGAAACTGTAGCA	56	n/a	n/a	44
530944	118	137	CAGACATCCACAGGAAACTG	0	n/a	n/a	45
530945	157	176	ATCCCCACCTCTGAAGAAGG	0	8029	8048	46
530946	160	179	TACATCCCCACCTCTGAAGA	0	8032	8051	47
530947	165	184	GAAGCTACATCCCCACCTCT	27	8037	8056	48
530948	170	189	ACATGGAAGCTACATCCCCA	35	8042	8061	49
530949	175	194	GGTGTACATGGAAGCTACAT	31	8047	8066	50
530950	221	240	ACCTTGGGTGGAATGTGCAC	47	8093	8112	51
530951	226	245	CAAACACCTTGGGTGGAATG	49	8098	8117	52
530952	234	253	CTGAATAGCAAACACCTTGG	38	8106	8125	53
530953	239	258	GAAAACTGAATAGCAAACAC	7	8111	8130	54

[1942]

530954	244	263	TGGAAGAAAACTGAATAGCA	47	8116	8135	55
530955	278	297	CAAACCTTTTCTCCATGTCA	55	n/a	n/a	56
530956	300	319	ACACTATCTTTCAAGAAGCA	57	9834	9853	57
530957	386	405	GGCAAGCACTTATTTGATGA	56	n/a	n/a	58
530958	432	451	TTAAAATTGACTCCTCTCAT	60	12688	12707	59
530959	456	475	TCAACACTGCTAACCTTAGA	60	12712	12731	60
530960	461	480	ATTCTTCAACACTGCTAACC	58	12717	12736	61
530961	466	485	TTGGCATTCTTCAACACTGC	88	12722	12741	62
530962	472	491	CCTTTTTTGGCATTCTTCAA	64	12728	12747	63
530963	479	498	TGGTGCACCTTTTTTGGCAT	78	12735	12754	64
530964	628	647	CTTCAGTGAGAATCCAGATT	44	14199	14218	65
530965	637	656	GGCACAGGGCTTCAGTGAGA	73	14208	14227	66
530966	649	668	AATTTCTGAAAGGGCACAGG	58	14220	14239	67
530967	654	673	CAACCAATTTCTGAAAGGGC	69	n/a	n/a	68
530968	680	699	CAAGATGCTGGAAGATGTTC	18	26128	26147	69
530969	846	865	GTGCCACTTTCAGATGTTTT	0	27110	27129	70
530970	851	870	TTGGTGTGCCACTTTCAGAT	74	27115	27134	71
530971	856	875	GGAACTTGGTGTGCCACTTT	85	27120	27139	72
530972	861	880	GTAGAGGAACTTGGTGTGCC	42	27125	27144	73
530973	866	885	GAGGAGTAGAGGAACTTGGT	52	27130	27149	74
530974	871	890	TTCTTGAGGAGTAGAGGAAC	18	27135	27154	75
530975	876	895	GTGTTTTCTTGAGGAGTAGA	41	27140	27159	76
530976	881	900	ATATGGTGTTTTCTTGAGGA	26	27145	27164	77
530977	886	905	TCCAGATATGGTGTTTTCTT	55	27150	27169	78
530978	891	910	CTATATCCAGATATGGTGTT	0	27155	27174	79
530979	901	920	GGTTAAAAGGCTATATCCAG	35	27165	27184	80
530980	906	925	TTGCAGGTTAAAAGGCTATA	29	27170	27189	81
530981	911	930	TTCTTTTGCAGGTTAAAAGG	0	27175	27194	82
530982	916	935	TAAAGTTCTTTTGCAGGTTA	0	27180	27199	83
530983	931	950	ATGGCAGGGTTCAGGTAAAG	9	n/a	n/a	84
530984	936	955	TTAGAATGGCAGGGTTCAGG	25	n/a	n/a	85
530985	941	960	AAATTTTAGAATGGCAGGGT	32	27363	27382	86
530986	946	965	CGGGTAAATTTTAGAATGGC	62	27368	27387	87
530987	951	970	ACTCCCGGGTAAATTTTAGA	0	27373	27392	88
530988	961	980	TCCAAAGTCAACTCCCGGGT	76	27383	27402	89
530989	966	985	TCTCCTCCAAAGTCAACTCC	28	27388	27407	90
530990	971	990	ATTCTTCTCCTCCAAAGTCA	32	27393	27412	91
530991	976	995	ATTCAATTCTTCTCCTCCAA	43	27398	27417	92
530992	981	1000	GTCACATTCAATTCTTCTCC	70	27403	27422	93
530993	1005	1024	CAAACATTCACTCCTTTAAC	30	27427	27446	94
530994	1010	1029	CTTGGCAAACATTCACTCCT	50	27432	27451	95
530995	1015	1034	AGTCTCTTGGCAAACATTCA	49	27437	27456	96
530996	1038	1057	TGACAGCGAATCATCTTTGT	51	27460	27479	97
530997	1043	1062	AAAACTGACAGCGAATCATC	39	27465	27484	98

[1943]

530998	1048	1067	AGTGAAAAACTGACAGCGAA	0	27470	27489	99
530999	1071	1090	CAGTCTTCTGGGAGTAAAGA	31	27493	27512	100
531000	1098	1117	AAGAAACACTTACACTTCTC	1	n/a	n/a	101
531001	1108	1127	AGATAATCTTAAGAAACACT	44	27629	27648	102
531002	1155	1174	GAGCTCCCTTGTGTCCCATA	85	27676	27695	103
531003	1160	1179	AACCAGAGCTCCCTTGTGTC	49	27681	27700	104
531004	1165	1184	AGAGTAACCAGAGCTCCCTT	76	27686	27705	105
531005	1170	1189	CTCAAAGAGTAACCAGAGCT	76	27691	27710	106
531006	1216	1235	GCTTGTTTTTGTTGTGCAGA	49	27892	27911	107

[1944] 表123

[1945]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
482586	1608	1627	ACCCAACAGTTGGTATAAAT	0	31914	31933	108
486847	1563	1582	AGGCATATTGGTTTTTGGAA	78	31869	31888	109
531007	46	65	AACACAATTGCTTCTTGGAG	51	3438	3457	110
531008	675	694	TGCTGGAAGATGTTCATGTG	51	26123	26142	111
531009	1239	1258	TTTGTTCCTCCAACAATGCG	65	27915	27934	112
531010	1244	1263	AAGAGTTTGTTCCTCCAACA	52	27920	27939	113
531011	1249	1268	CCAAGAAGAGTTTGTTCCTC	0	27925	27944	114
531012	1254	1273	TCTCCCCAAGAAGAGTTTGT	48	27930	27949	115
531013	1264	1283	CCAGGGCCACTCTCCCCAAG	56	27940	27959	116
531014	1287	1306	AGCTTCACCTGCAGGCTCAC	0	27963	27982	117
531015	1324	1343	TATGAGTGACCCTCCACACA	52	28000	28019	118
531016	1329	1348	TGTCCTATGAGTGACCCTCC	39	28005	28024	119
531017	1334	1353	ACTGGTGTCCTATGAGTGAC	31	28010	28029	120
531018	1339	1358	GACCCACTGGTGTCCTATGA	54	28015	28034	121
531019	1344	1363	GTGAGGACCCACTGGTGTCC	28	28020	28039	122
531020	1369	1388	AAGCCCATCAAAGCAGTGGG	0	n/a	n/a	123
531021	1420	1439	GTCTGACAGATTTAAAATGC	50	30498	30517	124
531022	1425	1444	GTAATGTCTGACAGATTTAA	74	30503	30522	125
531023	1430	1449	CTTTTGTAATGTCTGACAGA	71	30508	30527	126
531024	1452	1471	TTTATTTGTGAGAAAGGTGT	69	30530	30549	127
531025	1457	1476	TCTCTTTTATTTGTGAGAAA	34	30535	30554	128
531026	1501	1520	ATCATGATTCCCTTCTGAGA	73	30579	30598	129
531027	1530	1549	AAAGGAGCCTGGAGTTTTAT	0	30608	30627	130
531028	1535	1554	AATTCAAAGGAGCCTGGAGT	56	30613	30632	131
531029	1540	1559	AGTGTAATTCAAAGGAGCCT	59	30618	30637	132
531030	1545	1564	AATTCAGTGTAATTCAAAGG	24	n/a	n/a	133
531031	1550	1569	TTTGGAATTCAGTGTAATTC	59	n/a	n/a	134

[1946]

531032	1555	1574	TGGTTTTTGGAATTCAGTGT	67	n/a	n/a	135
531033	1557	1576	ATTGGTTTTTGGAATTCAGT	53	n/a	n/a	136
531034	1560	1579	CATATTGGTTTTTGGAATTC	36	31866	31885	137
531035	1565	1584	GTAGGCATATTGGTTTTTGG	46	31871	31890	138
531036	1581	1600	GTGTCACCTTTGGAAGGTAG	71	31887	31906	139
531037	1604	1623	AACAGTTGGTATAAATTGTG	35	31910	31929	140
531038	1605	1624	CAACAGTTGGTATAAATTGT	22	31911	31930	141
531039	1609	1628	TACCCAACAGTTGGTATAAA	36	31915	31934	142
531040	1632	1651	TCCTTCGAGAAGCCCCATCC	27	31938	31957	143
531041	1677	1696	AAAGGAATATTTACCTTTTG	68	33121	33140	144
531042	1682	1701	TTACCAAAGGAATATTTACC	11	33126	33145	145
531043	1687	1706	ATTTGTTACCAAAGGAATAT	27	33131	33150	146
531044	1697	1716	GGCATTCTTCATTTGTTACC	68	33141	33160	147
531045	1702	1721	TTTCTGGCATTCTTCATTTG	37	33146	33165	148
531046	1709	1728	GATATCTTTTCTGGCATTCT	54	33153	33172	149
531047	1714	1733	ATCTTGATATCTTTTCTGGC	68	33158	33177	150
531048	1719	1738	TTATAATCTTGATATCTTTT	42	33163	33182	151
531049	1724	1743	TTATTTTATAATCTTGATAT	2	33168	33187	152
531050	1729	1748	TTGGGTTATTTTATAATCTT	18	33173	33192	153
531051	1734	1753	ATCCGTTGGGTTATTTTATA	51	33178	33197	154
531052	1739	1758	AGACCATCCGTTGGGTTATT	60	33183	33202	155
531053	1744	1763	AGCACAGACCATCCGTTGGG	49	33188	33207	156
531054	1754	1773	CTTTATAGCCAGCACAGACC	48	33198	33217	157
531055	1759	1778	CCCTTCTTTATAGCCAGCAC	68	33203	33222	158
531056	1764	1783	TTTCCCCCTTCTTTATAGCC	45	33208	33227	159
531057	1769	1788	CATCTTTTCCCCCTTCTTTA	48	33213	33232	160
531058	1779	1798	CCCTTACAAGCATCTTTTCC	60	n/a	n/a	161
531059	1820	1839	ACATTCCATTGTGTTTGCAA	55	33919	33938	162
531060	1841	1860	TGGTGATGCCCACCAAACGC	35	33940	33959	163
531061	1872	1891	TGCTCCCTGCGGGCACAGCC	52	33971	33990	164
531062	1877	1896	CAGGTTGCTCCCTGCGGGCA	39	33976	33995	165
531063	1882	1901	GACACCAGGTTGCTCCCTGC	51	33981	34000	166
531064	1887	1906	GTGTAGACACCAGGTTGCTC	56	33986	34005	167
531065	1892	1911	CTTTGGTGTAGACACCAGGT	57	33991	34010	168
531066	1897	1916	AGCGACTTTGGTGTAGACAC	67	33996	34015	169
531067	1902	1921	TACTCAGCGACTTTGGTGTA	31	34001	34020	170
531068	1907	1926	CCATGTACTCAGCGACTTTG	59	34006	34025	171
531069	1912	1931	CCAGTCCATGTACTCAGCGA	56	34011	34030	172
531070	1930	1949	CTGTGTTTTCTCTAAAATCC	68	34029	34048	173
531071	1935	1954	CTGCTCTGTGTTTTCTCTAA	73	34034	34053	174
531072	2026	2045	GCTCAGAATTTGACTTGAAC	64	34125	34144	175
531073	2031	2050	CCCAGGCTCAGAATTTGACT	51	34130	34149	176
531074	2049	2068	CTTTGCAGATGAGGACCCCC	67	34148	34167	177
531075	2054	2073	CCATGCTTTGCAGATGAGGA	64	34153	34172	178

[1947]

531076	2059	2078	ACTCTCCATGCTTTGCAGAT	68	34158	34177	179
531077	2064	2083	ATGCCACTCTCCATGCTTTG	51	34163	34182	180
531078	2111	2130	AGCAGCTCTGAGTGCACTGT	77	34210	34229	181
531079	2116	2135	TCCTCAGCAGCTCTGAGTGC	58	34215	34234	182
531080	2121	2140	CATTGTCCTCAGCAGCTCTG	55	34220	34239	183
531081	n/a	n/a	TGGTTTTTGGAATTCTGAAA	14	31861	31880	184
531082	n/a	n/a	ATATTGGTTTTTGGAATTCT	31	31865	31884	185

[1948] 表124

[1949]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531083	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATAACT	60	14738	14757	186
					14809	14828	
					14880	14899	
					14939	14958	
					15071	15090	
					15214	15233	
					15286	15305	
					15345	15364	
					15477	15496	
					15549	15568	
					15607	15626	
					15679	15698	
					15809	15828	
					15881	15900	
					15939	15958	
531084	n/a	n/a	ATAGGGACACAACCAAGGAA	25	16296	16315	187
531085	n/a	n/a	AGGCACAGAGCCAGCACCCA	9	16495	16514	188
531086	n/a	n/a	CCTGCCTCCTGGCAGCCTTC	48	16696	16715	189
531087	n/a	n/a	CCAGGTGTGGACAGCAGCTG	52	16821	16840	190
531088	n/a	n/a	GGTTTTGTTTGTAAAATTAG	27	17159	17178	191
531089	n/a	n/a	AAAACACCATTAAATCCATT	45	17306	17325	192
531090	n/a	n/a	ACAGAAACCATGATGTTGCT	59	17644	17663	193
531091	n/a	n/a	TCAGCCCAATGTCCTAACCT	35	17793	17812	194
531092	n/a	n/a	CCTTCACTGACTCTCTTTTC	24	17922	17941	195
531093	n/a	n/a	TTCTCCTGGCTCAGAAGCTC	60	18053	18072	196
					23315	23334	
531094	n/a	n/a	GAATGTCAGGCCTCTGGGCC	48	18181	18200	197
531095	n/a	n/a	CTAACAACCCCACAATATCA	20	18390	18409	198
531096	n/a	n/a	CCCAATTCTTAGTCCTTTAA	45	18523	18542	199

[1950]

531097	n/a	n/a	ACCAAGCTCAGCCTCCAACT	41	18648	18667	200
531098	n/a	n/a	TTATTAGTCAAATCACCCAA	19	18773	18792	201
531099	n/a	n/a	TGGATGGGTAGAGGCCTTTC	64	18898	18917	202
531100	n/a	n/a	CCCCCTCCCTTCCCTACACA	0	19023	19042	203
531101	n/a	n/a	ATGTAAGTTACAAGCCACTA	37	19153	19172	204
531102	n/a	n/a	TGCCTCTTTAATAAAAACTC	42	19484	19503	205
531103	n/a	n/a	ACTCATTGCCTTAACTCAGG	40	19636	19655	206
531104	n/a	n/a	ACTTGACCTTACTGTTTTAG	20	19886	19905	207
531105	n/a	n/a	CTCCTCCCCAGGCTGCTCCT	16	22092	22111	208
531106	n/a	n/a	AAGATCTAGATAATTCTTGT	31	22332	22351	209
531107	n/a	n/a	TCAACTCACACCTGACCTAA	30	22457	22476	210
531108	n/a	n/a	TGAACCCAAAACTCTGGCAC	50	22771	22790	211
531109	n/a	n/a	AGCCCAAGGAACATCTCACC	52	22959	22978	212
531110	n/a	n/a	GCCTGTTTGGTGGTCTCTTC	86	23110	23129	213
531111	n/a	n/a	CTTCTCCTGGCTCAGAAGCT	68	18054 23316	18073 23335	214
531112	n/a	n/a	ATGTATGATTCTAAGAACTT	14	23479	23498	215
531113	n/a	n/a	AACAGACACATTATTTATAT	0	23604	23623	216
531114	n/a	n/a	AGAGTCAAGTCCACAGACAT	40	24246	24265	217
531115	n/a	n/a	TCCTAAATAGGAACAAAGTA	0	24372	24391	218
531116	n/a	n/a	TTGTTAAGGTTGTAGAGAGA	23	24688	24707	219
531117	n/a	n/a	ACCCAATTATTTTTAATGGC	62	24876	24895	220
531118	n/a	n/a	GCCTAAATGTAAGAGCTAAA	26	25157	25176	221
531119	n/a	n/a	TAAACTCTTACATTTATAGA	0	25293	25312	222
531120	n/a	n/a	AAATAAAAGCACTCAGACTG	0	25418	25437	223
531121	n/a	n/a	TTGGTCTACAGATTCAATGC	72	25550	25569	224
531122	n/a	n/a	TAACAAAAATGCCTTGTGCC	33	25710	25729	225
531123	n/a	n/a	TCCCAGCTCCAGTCACCACC	74	25866	25885	226
531124	n/a	n/a	GTACTAAACATCCTAAGTGA	2	25992	26011	227
531125	n/a	n/a	ACTCGCCTTTGTGACTCGAT	23	26264	26283	228
531126	n/a	n/a	TTTTGAATCTTCATTCAAAG	0	26551	26570	229
531127	n/a	n/a	CAGAGCCTTGATCAGAATAA	12	26676	26695	230
531128	n/a	n/a	AAGTTCCACCTTCTAACTGG	18	26831	26850	231
531129	n/a	n/a	AGCAGCTCACACCCAAAAAG	0	27005	27024	232
531130	n/a	n/a	TTCTGTGTCAATTATAAACA	0	27344	27363	233
531131	n/a	n/a	TAGAAAGAGTAAGCCTTCAC	0	27587	27606	234
531132	n/a	n/a	AGTGAGGTTACTCACCAGAG	0	27732	27751	235
531133	n/a	n/a	TTTTGTTGTGCAGACTGAAA	19	27886	27905	236
531134	n/a	n/a	TTACCCATCAAAGCAGTGGG	6	28045	28064	237
531135	n/a	n/a	AATGTTGTGAATACCATCCC	16	28174	28193	238
531136	n/a	n/a	TAACATTTCTATGGGCCTGA	6	28670	28689	239
531137	n/a	n/a	TGTCTACTATTTGACCAATA	19	28795	28814	240
531138	n/a	n/a	TTTAAATGTGTCACTTAATC	0	28987	29006	241
531139	n/a	n/a	TCACTAAAACAAAAATACTT	0	29156	29175	242

531140	n/a	n/a	TCTTCCAGGCCAACCACCTT	22	29321	29340	243
531141	n/a	n/a	TGCAAGGCATGTGTGCACAA	47	29532	29551	244
531142	n/a	n/a	TGTTTAAAATATCTCTATAC	8	30008	30027	245
531143	n/a	n/a	CATGGAAAAATTAAGCTCAT	0	30133	30152	246
531144	n/a	n/a	TGAAGATTCTATTTAACAAA	0	30266	30285	247
531145	n/a	n/a	GCCTAGGAGAGAAAAATAAA	0	30445	30464	248
531146	n/a	n/a	CCAGTGTAATTCAAAGGAGC	40	30620	30639	249
531147	n/a	n/a	CCATTATTTCCATCACCTGC	18	30871	30890	250
531148	n/a	n/a	TACCCAAATTATACCTGGAA	8	31015	31034	251
531149	n/a	n/a	AGAGGTAAAGCAACTTGCCC	45	31429	31448	252
531150	n/a	n/a	TCCTTAATAGTCATAGCAGG	48	31558	31577	253
531151	n/a	n/a	TCACCACCATTTTTCACATG	44	31683	31702	254
531152	n/a	n/a	GTTATGGATATAGACTTTAA	0	31808	31827	255
531153	n/a	n/a	CTAGAAGCAATATTTAAAGC	0	31974	31993	256
531154	n/a	n/a	ATGAAGTAAGATGCTTAAAA	16	32162	32181	257
531155	n/a	n/a	CTTCTTGTCTCAGATTACCA	79	32464	32483	258
531156	n/a	n/a	TCTGAAAAGCCCTCCGAGCT	0	32589	32608	259
531157	n/a	n/a	AAGTGAATCAGAGCAGTGTA	46	32961	32980	260
531158	n/a	n/a	ACCTTACAAGCATCTTTTCC	41	33223	33242	261
531159	n/a	n/a	ATTTGTTAAAAGTTGCTTAT	0	33368	33387	262
531160	n/a	n/a	TGATATCATCATCCCAATGA	13	33510	33529	263

[1951]

[1952] 表125

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531083	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATAACT	68	14738	14757	264
					14809	14828	
					14880	14899	
					14939	14958	
					15071	15090	
					15214	15233	
					15286	15305	
					15345	15364	
					15477	15496	
					15549	15568	
					15607	15626	
					15679	15698	
					15809	15828	
					15881	15900	
					15939	15958	

[1953]

[1954]

531161	n/a	n/a	CAGACACCTTCTTCACAAGG	40	898	917	264
531162	n/a	n/a	AATTTCCCAGATGTATTAGT	43	1054	1073	265
531163	n/a	n/a	TCAGCAGAAATCATGTAGGC	60	1181	1200	266
531164	n/a	n/a	TTAAATATAAAGAGATCCTC	38	1609	1628	267
531165	n/a	n/a	GTAATAAAAGGAATGATAAA	0	1825	1844	268
531166	n/a	n/a	AGACAGTAAACAAAATCAGG	12	2046	2065	269
531167	n/a	n/a	CAAGAAACCACCAAAGGAAG	37	2176	2195	270
531168	n/a	n/a	ACCCCAACAGACAGCCCACC	55	2314	2333	271
531169	n/a	n/a	TGGGCTCACCCCAGTGGACC	54	2580	2599	272
531170	n/a	n/a	GCCTGGCCCCCAAGACTCTA	54	2743	2762	273
531171	n/a	n/a	AGGCCTGCCACAGGCCAGAC	40	2873	2892	274
531172	n/a	n/a	TTCAAGCCTGGGCAGCACAG	71	3004	3023	275
531173	n/a	n/a	AAAATAACTTCACTAGAGCT	22	3131	3150	276
531174	n/a	n/a	TGTTAAGTATATTAACTATT	10	3256	3275	277
531175	n/a	n/a	TACTCAGGAAATTAGAATAT	25	3550	3569	278
531176	n/a	n/a	TTATGAAACCTCTTGATTTG	0	3753	3772	279
531177	n/a	n/a	TTCTTGTAAATGTCTGAATT	61	3971	3990	280
531178	n/a	n/a	ACCACAGGAAACTGTAGCAA	72	4111	4130	281
531179	n/a	n/a	GATTGGACCCAGACACTATA	57	4506	4525	282
531180	n/a	n/a	CCTCTTAAGTCACCATAGAC	45	4785	4804	283
531181	n/a	n/a	GGTTGAGGGACAGACACAGG	36	4940	4959	284
531182	n/a	n/a	ATAATCATGATTTATTTTGC	34	5099	5118	285
531183	n/a	n/a	CATAAGAATGTGCACACAAA	39	5382	5401	286
531184	n/a	n/a	ACTCTTATTAGCTGGTAGAA	74	5538	5557	287
531185	n/a	n/a	GGACCAAAACTGAGAGGCAG	63	5663	5682	288
531186	n/a	n/a	CCATTACTCTCAAGCTCCAC	75	5890	5909	289
531187	n/a	n/a	ATCTATTGGTTCAGGAGCCA	72	6015	6034	290
531188	n/a	n/a	GTTAAAACAACTAGAAGCCA	67	6146	6165	291
531189	n/a	n/a	AGGTGTTCTTGCTTATCCTC	63	6484	6503	292
531190	n/a	n/a	GCAGTCACTCCTCTTCCAGC	59	6659	6678	293
531191	n/a	n/a	AAGTGTATTGCCTAGATTTC	37	6784	6803	294
531192	n/a	n/a	GAGTGCCATCTTCTCTGCAC	61	6968	6987	295
531193	n/a	n/a	TTATTCCCAGCTCTAAAATA	23	7274	7293	296
531194	n/a	n/a	CTCACAATTCTGTAAGGGAA	64	7596	7615	297
531195	n/a	n/a	ATAAAATATATTAAGGCAAC	61	7846	7865	298
531196	n/a	n/a	TTGAGTCAGACATCCTGTGA	38	7996	8015	299
531197	n/a	n/a	TACCTTTTCTCCATGTCATT	42	8148	8167	300
531198	n/a	n/a	GGGATTTTGCTGAAGCTGGT	73	8273	8292	301
531199	n/a	n/a	CTTTGAATAGAAAATGACTA	1	8415	8434	302
531200	n/a	n/a	CAAAATCACAAGTTCTAGAT	51	8617	8636	303
531201	n/a	n/a	TTTCCAATACTTTTACAAAT	52	8760	8779	304
531202	n/a	n/a	ATTAATAAGCATCTCTCTGA	31	9109	9128	305
531203	n/a	n/a	TGACTATCCAATTTCTAGTT	67	9253	9272	306
531204	n/a	n/a	CTTGTAGTCTGCACTTAATG	60	9418	9437	307

[1955]

531205	n/a	n/a	ACATTTTTTAAGTACAGGAA	0	9602	9621	308
531206	n/a	n/a	GAAATGTCTAGCATTTTCTA	28	9755	9774	309
531207	n/a	n/a	CCACTTATTTGATGACCACA	64	9915	9934	310
531208	n/a	n/a	TCCAGAATACTGCCCCATCT	23	10050	10069	311
531209	n/a	n/a	TGGATTCATTTTCTGCAAAT	81	10175	10194	312
531210	n/a	n/a	AGACATTGTCAAATGTCCCC	60	10322	10341	313
531211	n/a	n/a	TTGATGTCAGCACTGTTGAC	77	10480	10499	314
531212	n/a	n/a	ACATCAGTAGCTTCAGATGT	56	10618	10637	315
531213	n/a	n/a	CAAAATTAATTGTGCATAAT	13	10820	10839	316
531214	n/a	n/a	TTTTTCTTTAAATTTTGCTA	37	11120	11139	317
531215	n/a	n/a	TAGAGATTTTATGTACTTGG	63	11245	11264	318
531216	n/a	n/a	AAACACAGGAATTTGCAGAC	33	11408	11427	319
531217	n/a	n/a	GTGGAATAAACCATAATCTA	47	11579	11598	320
531218	n/a	n/a	GATAATTCTTTTCACAGACA	72	12028	12047	321
531219	n/a	n/a	CTTCTCTATCTCCCAGTGTT	61	12227	12246	322
531220	n/a	n/a	CAATACAGGTAAATTTCACG	56	12374	12393	323
531221	n/a	n/a	AAGGGATTTAAAATTTTTAT	0	12507	12526	324
531222	n/a	n/a	GGCAAGCTGTACAAGAAAAA	19	12642	12661	325
531223	n/a	n/a	TGTACTCACCGGTACTCTGC	58	12805	12824	326
531224	n/a	n/a	AAGAGAATGCTCAGAAATGG	25	13435	13454	327
531225	n/a	n/a	ACACTTGTACCCCATACATC	45	13560	13579	328
531226	n/a	n/a	GACAGTAGAGACTGGGAAGG	12	13708	13727	329
531227	n/a	n/a	TACCAATTTCTGAAAGGGCA	72	14224	14243	330
531228	n/a	n/a	CAGAGTAAACTCCCCATCTC	33	14387	14406	331
531229	n/a	n/a	CTTCAAAGCCAGCAGTGTAA	69	14514	14533	332
531230	n/a	n/a	CTTACTGGGCTAAAATCAAG	46	14639	14658	333
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	94	14744	14763	334
					14815	14834	
					14886	14905	
					14945	14964	
					15005	15024	
					15077	15096	
					15220	15239	
					15292	15311	
					15351	15370	
					15411	15430	
					15483	15502	
					15555	15574	
					15613	15632	
					15685	15704	
					15815	15834	
					15887	15906	
					15945	15964	
531232	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTATAAC	85	14739	14758	335

[1956]

					14810	14829	
					14881	14900	
					14940	14959	
					15000	15019	
					15072	15091	
					15215	15234	
					15287	15306	
					15346	15365	
					15406	15425	
					15478	15497	
					15550	15569	
					15608	15627	
					15680	15699	
					15810	15829	
					15882	15901	
					15940	15959	
531233	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCTATAA	86	14740	14759	336
					14811	14830	
					14882	14901	
					14941	14960	
					15001	15020	
					15073	15092	
					15216	15235	
					15288	15307	
					15347	15366	
					15407	15426	
					15479	15498	
					15551	15570	
					15609	15628	
					15681	15700	
					15811	15830	
					15883	15902	
					15941	15960	
531234	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCCTATA	86	14741	14760	337
					14812	14831	
					14883	14902	
					14942	14961	
					15002	15021	
					15074	15093	
					15217	15236	
					15289	15308	
					15348	15367	
					15408	15427	
					15480	15499	

[1957]

					15552	15571	
					15610	15629	
					15682	15701	
					15812	15831	
					15884	15903	
					15942	15961	
531235	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTCCTAT	86	14742	14761	338
					14813	14832	
					14884	14903	
					14943	14962	
					15003	15022	
					15075	15094	
					15218	15237	
					15290	15309	
					15349	15368	
					15409	15428	
					15481	15500	
					15553	15572	
					15611	15630	
					15683	15702	
					15813	15832	
					15885	15904	
					15943	15962	
531236	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTCCTA	87	14743	14762	339
					14814	14833	
					14885	14904	
					14944	14963	
					15004	15023	
					15076	15095	
					15219	15238	
					15291	15310	
					15350	15369	
					15410	15429	
					15482	15501	
					15554	15573	
					15612	15631	
					15684	15703	
					15814	15833	
					15886	15905	
					15944	15963	
531237	n/a	n/a	GTGGAATGTCATGGCAATTT	56	16399	16418	340

[1958] 实施例115:通过具有2'-MOE糖修饰的反义寡核苷酸进行的对HepaRG™细胞中的人PKK的反义抑制

[1959] 设计其他靶向PKK核酸的反义寡核苷酸且测试其在体外对PKK mRNA的作用。

[1960] 以下表中的嵌合反义寡核苷酸被设计为5-10-5MOE缺口聚物、4-9-4MOE缺口聚物、

4-10-4MOE缺口聚物、4-10-3MOE缺口聚物、3-10-4MOE缺口聚物或3-10-3MOE缺口聚物。5-10-5MOE缺口聚物的长度为20个核苷，其中，中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含五个核苷的翼区段。4-9-4MOE缺口聚物的长度为17个核苷，其中，中心缺口区段包含九个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含四个核苷的翼区段。4-10-4MOE缺口聚物的长度为18个核苷，其中，中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含四个核苷的翼区段。4-10-3MOE缺口聚物的长度为17个核苷，其中，中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上分别侧接包含四个和三个核苷的翼区段。3-10-4MOE缺口聚物的长度为17个核苷，其中，中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上分别侧接包含三和四个核苷的翼区段。3-10-3MOE缺口聚物长为16个核苷，其中，中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含三个核苷的翼区段。5'翼区段中的每个核苷和3'翼区段中的每个核苷具有2'-O-甲氧基乙基修饰。每个缺口聚物整个的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。每个缺口聚物整个的所有胞嘧啶残基为5-甲基胞嘧啶。“起始位点”表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。“终止位点”表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最3'核苷酸。将列于以下表中的每个缺口聚物靶向SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:10。'n/a'表示反义寡核苷酸不靶向那个特定基因序列。

[1961] 使用电穿孔以5,000nM反义寡核苷酸转染密度为每孔20,000个细胞的培养的HepaRG™细胞。在大约24小时的处理期后，自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人引物探针集RTS3454测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。

[1962] 表126

[1963]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	98	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546131	4	23	ATGAACGGTCTTCAAGCTGT	5-10-5	75	3396	3415	341
547269	5	24	AATGAACGGTCTTCAAGCTG	5-10-5	56	3397	3416	342
547270	7	26	AAAATGAACGGTCTTCAAGC	5-10-5	68	3399	3418	343
547271	10	29	TTAAAAATGAACGGTCTTCA	5-10-5	60	3402	3421	344
547272	13	32	CACTTAAAAATGAACGGTCT	5-10-5	82	3405	3424	345
547273	25	44	TGAGTCTCTTGTCACTTAAA	5-10-5	93	3417	3436	346
547274	29	48	GAGGTGAGTCTCTTGTCACT	5-10-5	70	3421	3440	347
546136	30	49	GGAGGTGAGTCTCTTGTCAC	5-10-5	86	3422	3441	348
547275	32	51	TTGGAGGTGAGTCTCTTGTC	5-10-5	87	3424	3443	349
546137	40	59	ATTGCTTCTTGGAGGTGAGT	5-10-5	76	3432	3451	350
547276	42	61	CAATTGCTTCTTGGAGGTGA	5-10-5	93	3434	3453	351
547277	44	63	CACAATTGCTTCTTGGAGGT	5-10-5	75	3436	3455	352
547278	45	64	ACACAATTGCTTCTTGGAGG	5-10-5	70	3437	3456	353
546138	47	66	AAACACAATTGCTTCTTGGA	5-10-5	69	3439	3458	354
547279	48	67	AAAACACAATTGCTTCTTGG	5-10-5	69	3440	3459	355
547280	49	68	GAAAACACAATTGCTTCTTG	5-10-5	47	3441	3460	356
547281	70	89	TTGCTTGAATAAAATCATTC	5-10-5	41	4069	4088	357

[1964]

546140	72	91	GCTTGCTTGAATAAAATCAT	5-10-5	60	4071	4090	358
547282	74	93	TTGCTTGCTTGAATAAAATC	5-10-5	53	4073	4092	359
547283	76	95	AGTTGCTTGCTTGAATAAAA	5-10-5	67	4075	4094	360
546141	82	101	GAAATAAGTTGCTTGCTTGA	5-10-5	56	4081	4100	361
547284	86	105	AAATGAAATAAGTTGCTTGC	5-10-5	26	4085	4104	362
547285	102	121	ACTGTAGCAAACAAGGAAAT	5-10-5	51	4101	4120	363
546143	106	125	GGAAACTGTAGCAAACAAGG	5-10-5	46	4105	4124	364
546144	110	129	CACAGGAAACTGTAGCAAAC	5-10-5	75	4109	4128	365
547286	117	136	AGACATCCACAGGAAACTGT	5-10-5	68	n/a	n/a	366
547287	120	139	GTCAGACATCCACAGGAAAC	5-10-5	69	n/a	n/a	367
546146	123	142	TGAGTCAGACATCCACAGGA	5-10-5	72	n/a	n/a	368
547288	131	150	CATAGAGTTGAGTCAGACAT	5-10-5	80	8003	8022	369
546147	132	151	TCATAGAGTTGAGTCAGACA	5-10-5	76	8004	8023	370
547289	133	152	TTCATAGAGTTGAGTCAGAC	5-10-5	74	8005	8024	371
546148	137	156	CGTTTTCATAGAGTTGAGTC	5-10-5	68	8009	8028	372
546149	155	174	CCCCACCTCTGAAGAAGGCG	5-10-5	83	8027	8046	373
546150	158	177	CATCCCCACCTCTGAAGAAG	5-10-5	58	8030	8049	374
547290	163	182	AGCTACATCCCCACCTCTGA	5-10-5	76	8035	8054	375
546151	166	185	GGAAGCTACATCCCCACCTC	5-10-5	76	8038	8057	376
547291	168	187	ATGGAAGCTACATCCCCACC	5-10-5	74	8040	8059	377
547292	171	190	TACATGGAAGCTACATCCCC	5-10-5	60	8043	8062	378
546152	172	191	GTACATGGAAGCTACATCCC	5-10-5	73	8044	8063	379
546153	176	195	GGGTGTACATGGAAGCTACA	5-10-5	76	8048	8067	380
546154	195	214	TGGCAGTATTGGGCATTTGG	5-10-5	85	8067	8086	381
547293	199	218	CATCTGGCAGTATTGGGCAT	5-10-5	92	8071	8090	382
547294	201	220	CTCATCTGGCAGTATTGGGC	5-10-5	85	8073	8092	383
546155	202	221	CCTCATCTGGCAGTATTGGG	5-10-5	47	8074	8093	384
547295	203	222	ACCTCATCTGGCAGTATTGG	5-10-5	88	8075	8094	385
547296	206	225	TGCACCTCATCTGGCAGTAT	5-10-5	72	8078	8097	386
546156	211	230	GAATGTGCACCTCATCTGGC	5-10-5	81	8083	8102	387
547297	213	232	TGGAATGTGCACCTCATCTG	5-10-5	84	8085	8104	388
546157	216	235	GGGTGGAATGTGCACCTCAT	5-10-5	85	8088	8107	389
547298	218	237	TTGGGTGGAATGTGCACCTC	5-10-5	90	8090	8109	390
546158	219	238	CTTGGGTGGAATGTGCACCT	5-10-5	95	8091	8110	391
546159	229	248	TAGCAAACACCTTGGGTGGA	5-10-5	76	8101	8120	392
546160	235	254	ACTGAATAGCAAACACCTTG	5-10-5	78	8107	8126	393
547299	237	256	AAACTGAATAGCAAACACCT	5-10-5	76	8109	8128	394
546163	250	269	ACTTGCTGGAAGAAAACTGA	5-10-5	42	8122	8141	395
547300	252	271	GAACTTGCTGGAAGAAAACT	5-10-5	37	8124	8143	396
546164	257	276	TGATTGAACTTGCTGGAAGA	5-10-5	33	8129	8148	397
546165	260	279	CATTGATTGAACTTGCTGGA	5-10-5	71	8132	8151	398
547301	261	280	TCATTGATTGAACTTGCTGG	5-10-5	80	8133	8152	399
546166	263	282	TGTCATTGATTGAACTTGCT	5-10-5	70	8135	8154	400
547302	266	285	CCATGTCATTGATTGAACTT	5-10-5	58	8138	8157	401

[1965]

546167	268	287	CTCCATGTCATTGATTGAAC	5-10-5	73	8140	8159	402
547303	270	289	TTCTCCATGTCATTGATTGA	5-10-5	72	8142	8161	403
547304	273	292	CTTTTCTCCATGTCATTGAT	5-10-5	71	8145	8164	404
547305	280	299	ACCAAACCTTTTCTCCATGT	5-10-5	47	n/a	n/a	405
546170	283	302	GCAACCAAACCTTTTCTCCA	5-10-5	54	n/a	n/a	406
547306	284	303	AGCAACCAAACCTTTTCTCC	5-10-5	62	n/a	n/a	407
547307	286	305	GAAGCAACCAAACCTTTTCT	5-10-5	58	n/a	n/a	408
547308	290	309	TCAAGAAGCAACCAAACCTT	5-10-5	66	n/a	n/a	409
547309	293	312	CTTTCAAGAAGCAACCAAAC	5-10-5	71	9827	9846	410
547310	295	314	ATCTTTCAAGAAGCAACCAA	5-10-5	81	9829	9848	411
546171	297	316	CTATCTTTCAAGAAGCAACC	5-10-5	81	9831	9850	412
547311	299	318	CACTATCTTTCAAGAAGCAA	5-10-5	71	9833	9852	413
546172	301	320	AACACTATCTTTCAAGAAGC	5-10-5	81	9835	9854	414
547312	325	344	ATGTACTTTTGGCAGGGTTC	5-10-5	46	9859	9878	415
546173	327	346	CGATGTACTTTTGGCAGGGT	5-10-5	84	9861	9880	416
547313	330	349	GTTCGATGTACTTTTGGCAG	5-10-5	73	9864	9883	417

[1966] 表127

[1967]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	86	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546174	333	352	CCTGTTCGATGTACTTTTGG	5-10-5	74	9867	9886	418
547314	336	355	GCACCTGTTCGATGTACTTT	5-10-5	73	9870	9889	419
546175	338	357	CTGCACCTGTTCGATGTACT	5-10-5	78	9872	9891	420

[1968]

547315	340	359	AACTGCACCTGTTCGATGTA	5-10-5	50	9874	9893	421
547316	342	361	GAAACTGCACCTGTTCGATG	5-10-5	75	9876	9895	422
547317	344	363	CAGAAACTGCACCTGTTCGA	5-10-5	75	9878	9897	423
547318	345	364	CCAGAAACTGCACCTGTTCG	5-10-5	74	9879	9898	424
546177	348	367	TGTCCAGAAACTGCACCTGT	5-10-5	75	9882	9901	425
547319	351	370	GAATGTCCAGAAACTGCACC	5-10-5	62	9885	9904	426
547320	353	372	AGGAATGTCCAGAAACTGCA	5-10-5	73	9887	9906	427
547321	356	375	TCAAGGAATGTCCAGAAACT	5-10-5	53	9890	9909	428
547322	358	377	CTTCAAGGAATGTCCAGAAA	5-10-5	65	9892	9911	429
547323	361	380	TTGCTTCAAGGAATGTCCAG	5-10-5	56	9895	9914	430
547324	363	382	CATTGCTTCAAGGAATGTCC	5-10-5	76	9897	9916	431
547325	368	387	GACCACATTGCTTCAAGGAA	5-10-5	67	9902	9921	432
546181	369	388	TGACCACATTGCTTCAAGGA	5-10-5	75	9903	9922	433
547326	370	389	ATGACCACATTGCTTCAAGG	5-10-5	48	9904	9923	434
547327	373	392	TTGATGACCACATTGCTTCA	5-10-5	45	9907	9926	435
547328	375	394	ATTTGATGACCACATTGCTT	5-10-5	40	9909	9928	436
547329	377	396	TTATTTGATGACCACATTGC	5-10-5	24	9911	9930	437
547330	378	397	CTTATTTGATGACCACATTG	5-10-5	60	9912	9931	438
546183	380	399	CACTTATTTGATGACCACAT	5-10-5	69	9914	9933	439
547331	382	401	AGCACTTATTTGATGACCAC	5-10-5	47	n/a	n/a	440
546184	384	403	CAAGCACTTATTTGATGACC	5-10-5	65	n/a	n/a	441
547332	390	409	CGATGGCAAGCACTTATTTG	5-10-5	44	n/a	n/a	442
547333	395	414	TGTCTCGATGGCAAGCACTT	5-10-5	76	n/a	n/a	443
546186	396	415	ATGTCTCGATGGCAAGCACT	5-10-5	84	n/a	n/a	444
547334	397	416	AATGTCTCGATGGCAAGCAC	5-10-5	74	n/a	n/a	445
547335	402	421	TTATAAATGTCTCGATGGCA	5-10-5	93	12658	12677	446
547336	403	422	TTTATAAATGTCTCGATGGC	5-10-5	81	12659	12678	447
546188	407	426	CTCCTTTATAAATGTCTCGA	5-10-5	95	12663	12682	448
547337	409	428	AACTCCTTTATAAATGTCTC	5-10-5	84	12665	12684	449
547338	411	430	TCAACTCCTTTATAAATGTC	5-10-5	71	12667	12686	450
547339	413	432	TATCAACTCCTTTATAAATG	5-10-5	42	12669	12688	451
546190	419	438	CTCTCATATCAACTCCTTTA	5-10-5	92	12675	12694	452
547340	422	441	CTCCTCTCATATCAACTCCT	5-10-5	93	12678	12697	453
547341	424	443	GACTCCTCTCATATCAACTC	5-10-5	87	12680	12699	454
546192	428	447	AATTGACTCCTCTCATATCA	5-10-5	51	12684	12703	455
547342	433	452	ATTAAAATTGACTCCTCTCA	5-10-5	66	12689	12708	456
546193	434	453	CATTAAAATTGACTCCTCTC	5-10-5	57	12690	12709	457
547343	436	455	CACATTAAAATTGACTCCTC	5-10-5	78	12692	12711	458
547344	438	457	GACACATTAAAATTGACTCC	5-10-5	80	12694	12713	459
547345	439	458	AGACACATTAAAATTGACTC	5-10-5	80	12695	12714	460
547346	444	463	ACCTTAGACACATTAAAATT	5-10-5	57	12700	12719	461
546195	448	467	GCTAACCTTAGACACATTAA	5-10-5	83	12704	12723	462
547347	451	470	ACTGCTAACCTTAGACACAT	5-10-5	82	12707	12726	463
546196	452	471	CACTGCTAACCTTAGACACA	5-10-5	83	12708	12727	464

[1969]

547348	453	472	ACACTGCTAACCTTAGACAC	5-10-5	83	12709	12728	465
547349	458	477	CTTCAACACTGCTAACCTTA	5-10-5	88	12714	12733	466
546198	459	478	TCTTCAACACTGCTAACCTT	5-10-5	85	12715	12734	467
547350	464	483	GGCATTCTTCAACACTGCTA	5-10-5	96	12720	12739	468
546199	465	484	TGGCATTCTTCAACACTGCT	5-10-5	97	12721	12740	469
547351	467	486	TTTGGCATTCTTCAACACTG	5-10-5	92	12723	12742	470
546200	500	519	AAAACTGGCAGCGAATGTTA	5-10-5	91	12756	12775	471
547352	541	560	CCGGTACTCTGCCTTGTGAA	5-10-5	94	12797	12816	472
547354	547	566	ATTGTTCCGGTACTCTGCCT	5-10-5	89	n/a	n/a	473
546203	548	567	AATTGTTCCGGTACTCTGCC	5-10-5	76	n/a	n/a	474
547355	549	568	CAATTGTTCCGGTACTCTGC	5-10-5	77	n/a	n/a	475
546204	555	574	AATAGGCAATTGTTCCGGTA	5-10-5	91	n/a	n/a	476
547356	556	575	TAATAGGCAATTGTTCCGGT	5-10-5	83	n/a	n/a	477
547357	559	578	CTTTAATAGGCAATTGTTCC	5-10-5	78	14130	14149	478
546205	562	581	GTACTTTAATAGGCAATTGT	5-10-5	83	14133	14152	479
547359	569	588	CGGGACTGTACTTTAATAGG	5-10-5	81	14140	14159	480
546208	605	624	CGTTACTCAGCACCTTTATA	5-10-5	92	14176	14195	481
546209	629	648	GCTTCAGTGAGAATCCAGAT	5-10-5	73	14200	14219	482
546210	651	670	CCAATTTCTGAAAGGGCACA	5-10-5	79	14222	14241	483
547360	653	672	AACCAATTTCTGAAAGGGCA	5-10-5	88	n/a	n/a	484
547361	655	674	GCAACCAATTTCTGAAAGGG	5-10-5	46	n/a	n/a	485
546211	656	675	GGCAACCAATTTCTGAAAGG	5-10-5	42	n/a	n/a	486
546212	678	697	AGATGCTGGAAGATGTTCAT	5-10-5	48	26126	26145	487
547362	701	720	CAACATCCACATCTGAGAAC	5-10-5	47	26149	26168	488
547363	703	722	GGCAACATCCACATCTGAGA	5-10-5	84	26151	26170	489
546213	707	726	CCCTGGCAACATCCACATCT	5-10-5	82	26155	26174	490

[1970] 表128

[1971]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	88	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	

[1972]

						15483 15555 15613 15685 15815 15887 15945	15502 15574 15632 15704 15834 15906 15964	
547364	710	729	GAACCCTGGCAACATCCACA	5-10-5	92	26158	26177	491
546214	712	731	GAGAACCCTGGCAACATCCA	5-10-5	88	26160	26179	492
547365	713	732	TGAGAACCCTGGCAACATCC	5-10-5	81	26161	26180	493
547366	717	736	GGAGTGAGAACCCTGGCAAC	5-10-5	86	26165	26184	494
546216	719	738	CTGGAGTGAGAACCCTGGCA	5-10-5	93	26167	26186	495
547367	721	740	ATCTGGAGTGAGAACCCTGG	5-10-5	76	26169	26188	496
547368	723	742	GCATCTGGAGTGAGAACCCT	5-10-5	89	26171	26190	497
547369	725	744	AAGCATCTGGAGTGAGAACC	5-10-5	76	26173	26192	498
547370	728	747	CAAAAGCATCTGGAGTGAGA	5-10-5	73	26176	26195	499
546217	730	749	CACAAAAGCATCTGGAGTGA	5-10-5	83	26178	26197	500
546218	740	759	TGGTCCGACACACAAAAGCA	5-10-5	71	26188	26207	501
547371	741	760	ATGGTCCGACACACAAAAGC	5-10-5	66	26189	26208	502
547372	742	761	GATGGTCCGACACACAAAAG	5-10-5	32	26190	26209	503
547373	745	764	GCAGATGGTCCGACACACAA	5-10-5	90	26193	26212	504
546220	750	769	TAGGTGCAGATGGTCCGACA	5-10-5	71	26198	26217	505
547374	752	771	GATAGGTGCAGATGGTCCGA	5-10-5	81	26200	26219	506
547375	754	773	GTGATAGGTGCAGATGGTCC	5-10-5	72	26202	26221	507
546222	756	775	GGGTGATAGGTGCAGATGGT	5-10-5	12	26204	26223	508
547376	778	797	GAATGTAAAGAAGAGGCAGT	5-10-5	43	26226	26245	509
546224	780	799	TAGAATGTAAAGAAGAGGCA	5-10-5	65	26228	26247	510
547377	788	807	CATTTGTATAGAATGTAAAG	5-10-5	6	26236	26255	511
547378	790	809	TACATTTGTATAGAATGTAA	5-10-5	0	26238	26257	512
546226	793	812	CCATACATTTGTATAGAATG	5-10-5	37	26241	26260	513
547379	802	821	CTCGATTTTCCATACATTTG	5-10-5	37	26250	26269	514
547380	805	824	TGACTCGATTTTCCATACAT	5-10-5	42	26253	26272	515
546228	806	825	GTGACTCGATTTTCCATACA	5-10-5	60	26254	26273	516
547381	807	826	TGTGACTCGATTTTCCATAC	5-10-5	49	26255	26274	517
547382	810	829	CTTTGTGACTCGATTTTCCA	5-10-5	62	26258	26277	518
547383	812	831	TTCTTTGTGACTCGATTTTC	5-10-5	37	n/a	n/a	519
546229	816	835	ACATTTCTTTGTGACTCGAT	5-10-5	19	n/a	n/a	520
547384	818	837	AAACATTTCTTTGTGACTCG	5-10-5	50	n/a	n/a	521
547385	847	866	TGTGCCACTTTCAGATGTTT	5-10-5	80	27111	27130	522
546230	848	867	GTGTGCCACTTTCAGATGTT	5-10-5	70	27112	27131	523
546231	852	871	CTTGGTGTGCCACTTTCAGA	5-10-5	79	27116	27135	524
547386	853	872	ACTTGGTGTGCCACTTTCAG	5-10-5	78	27117	27136	525
546232	857	876	AGGAACTTGGTGTGCCACTT	5-10-5	86	27121	27140	526
547387	878	897	TGGTGTTTTCTTGAGGAGTA	5-10-5	73	27142	27161	527

546233	879	898	ATGGTGTTTTCTTGAGGAGT	5-10-5	69	27143	27162	528
547388	880	899	TATGGTGTTTTCTTGAGGAG	5-10-5	55	27144	27163	529
547389	884	903	CAGATATGGTGTTTTCTTGA	5-10-5	61	27148	27167	530
546234	885	904	CCAGATATGGTGTTTTCTTG	5-10-5	69	27149	27168	531
547390	887	906	ATCCAGATATGGTGTTTTCT	5-10-5	63	27151	27170	532
547391	889	908	ATATCCAGATATGGTGTTTT	5-10-5	32	27153	27172	533
546235	893	912	GGCTATATCCAGATATGGTG	5-10-5	77	27157	27176	534
547392	895	914	AAGGCTATATCCAGATATGG	5-10-5	81	27159	27178	535
546236	900	919	GTTAAAAGGCTATATCCAGA	5-10-5	50	27164	27183	536
546237	903	922	CAGGTTAAAAGGCTATATCC	5-10-5	64	27167	27186	537
547393	905	924	TGCAGGTTAAAAGGCTATAT	5-10-5	73	27169	27188	538
547394	907	926	TTTGCAGGTTAAAAGGCTAT	5-10-5	29	27171	27190	539
546238	909	928	CTTTTGCAGGTTAAAAGGCT	5-10-5	63	27173	27192	540
546239	912	931	GTTCTTTTGCAGGTTAAAAG	5-10-5	47	27176	27195	541
547395	914	933	AAGTTCTTTTGCAGGTTAAA	5-10-5	15	27178	27197	542
546240	917	936	GTAAAGTTCTTTTGCAGGTT	5-10-5	23	27181	27200	543
546241	920	939	CAGGTAAAGTTCTTTTGCAG	5-10-5	69	27184	27203	544
547396	921	940	TCAGGTAAAGTTCTTTTGCA	5-10-5	49	n/a	n/a	545
547397	923	942	GTTCAGGTAAAGTTCTTTTG	5-10-5	27	n/a	n/a	546
546242	925	944	GGGTTCAGGTAAAGTTCTTT	5-10-5	8	n/a	n/a	547
547398	927	946	CAGGGTTCAGGTAAAGTTCT	5-10-5	16	n/a	n/a	548
547399	928	947	GCAGGGTTCAGGTAAAGTTC	5-10-5	10	n/a	n/a	549
547400	930	949	TGGCAGGGTTCAGGTAAAGT	5-10-5	0	n/a	n/a	550
547401	933	952	GAATGGCAGGGTTCAGGTAA	5-10-5	22	n/a	n/a	551
546243	934	953	AGAATGGCAGGGTTCAGGTA	5-10-5	16	n/a	n/a	552
547402	937	956	TTTAGAATGGCAGGGTTCAG	5-10-5	59	n/a	n/a	553
547403	939	958	ATTTTAGAATGGCAGGGTTC	5-10-5	10	27361	27380	554
546244	942	961	TAAATTTTAGAATGGCAGGG	5-10-5	27	27364	27383	555
547404	956	975	AGTCAACTCCCGGGTAAATT	5-10-5	64	27378	27397	556
547405	959	978	CAAAGTCAACTCCCGGGTAA	5-10-5	47	27381	27400	557
546247	960	979	CCAAAGTCAACTCCCGGGTA	5-10-5	90	27382	27401	558
546248	963	982	CCTCCAAAGTCAACTCCCGG	5-10-5	86	27385	27404	559
547406	965	984	CTCCTCCAAAGTCAACTCCC	5-10-5	81	27387	27406	560
546249	968	987	CTTCTCCTCCAAAGTCAACT	5-10-5	68	27390	27409	561
547407	975	994	TTCAATTCTTCTCCTCCAAA	5-10-5	59	27397	27416	562
546250	977	996	CATTCAATTCTTCTCCTCCA	5-10-5	65	27399	27418	563
547408	980	999	TCACATTCAATTCTTCTCCT	5-10-5	84	27402	27421	564
547409	982	1001	AGTCACATTCAATTCTTCTC	5-10-5	67	27404	27423	565
546251	1007	1026	GGCAAACATTCACTCCTTTA	5-10-5	92	27429	27448	566

[1973]

[1974] 表129

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	95	14744	14763	344
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	

[1975]

546252	1011	1030	TCTTGGCAAACATTCACTCC	5-10-5	73	27433	27452	567
546253	1014	1033	GTCTCTTGGCAAACATTCAC	5-10-5	98	27436	27455	568
547410	1017	1036	CAAGTCTCTTGGCAAACATT	5-10-5	88	27439	27458	569
546254	1019	1038	TGCAAGTCTCTTGGCAAACA	5-10-5	95	27441	27460	570
546255	1024	1043	CTTTGTGCAAGTCTCTTGGC	5-10-5	92	27446	27465	571
547411	1027	1046	CATCTTTGTGCAAGTCTCTT	5-10-5	79	27449	27468	572
546256	1028	1047	TCATCTTTGTGCAAGTCTCT	5-10-5	83	27450	27469	573
547412	1029	1048	ATCATCTTTGTGCAAGTCTC	5-10-5	73	27451	27470	574
546258	1036	1055	ACAGCGAATCATCTTTGTGC	5-10-5	74	27458	27477	575
546259	1040	1059	ACTGACAGCGAATCATCTTT	5-10-5	86	27462	27481	576
546260	1045	1064	GAAAAACTGACAGCGAATCA	5-10-5	84	27467	27486	577
547413	1047	1066	GTGAAAAACTGACAGCGAAT	5-10-5	94	27469	27488	578
546263	1061	1080	GGAGTAAAGAATAAGTGAAA	5-10-5	0	27483	27502	579
547414	1063	1082	TGGGAGTAAAGAATAAGTGA	5-10-5	76	27485	27504	580
547415	1065	1084	TCTGGGAGTAAAGAATAAGT	5-10-5	71	27487	27506	581
546265	1069	1088	GTCTTCTGGGAGTAAAGAAT	5-10-5	65	27491	27510	582
546266	1072	1091	ACAGTCTTCTGGGAGTAAAG	5-10-5	63	27494	27513	583
547416	1075	1094	CTTACAGTCTTCTGGGAGTA	5-10-5	79	27497	27516	584
546267	1076	1095	CCTTACAGTCTTCTGGGAGT	5-10-5	72	27498	27517	585
547417	1077	1096	TCCTTACAGTCTTCTGGGAG	5-10-5	68	27499	27518	586
546268	1079	1098	CTTCCTTACAGTCTTCTGGG	5-10-5	93	27501	27520	587
547418	1092	1111	CACTTACACTTCTCTTCCTT	5-10-5	0	n/a	n/a	588
546270	1093	1112	ACACTTACACTTCTCTTCCT	5-10-5	32	n/a	n/a	589

[1976]

546271	1097	1116	AGAAACACTTACACTTCTCT	5-10-5	60	n/a	n/a	590
547419	1101	1120	CTTAAGAAACACTTACACTT	5-10-5	51	n/a	n/a	591
547420	1112	1131	CCATAGATAATCTTAAGAAA	5-10-5	8	27633	27652	592
547421	1115	1134	CATCCATAGATAATCTTAAG	5-10-5	69	27636	27655	593
547422	1117	1136	ACCATCCATAGATAATCTTA	5-10-5	70	27638	27657	594
546275	1119	1138	GAACCATCCATAGATAATCT	5-10-5	87	27640	27659	595
546276	1123	1142	TGGAGAACCATCCATAGATA	5-10-5	74	27644	27663	596
546277	1146	1165	TGTGTCCCATACGCAATCCT	5-10-5	90	27667	27686	597
547423	1150	1169	CCCTTGTGTCCCATACGCAA	5-10-5	95	27671	27690	598
546279	1153	1172	GCTCCCTTGTGTCCCATACG	5-10-5	82	27674	27693	599
547424	1156	1175	AGAGCTCCCTTGTGTCCCAT	5-10-5	90	27677	27696	600
546280	1158	1177	CCAGAGCTCCCTTGTGTCCC	5-10-5	86	27679	27698	601
547425	1161	1180	TAACCAGAGCTCCCTTGTGT	5-10-5	85	27682	27701	602
546281	1162	1181	GTAACCAGAGCTCCCTTGTG	5-10-5	85	27683	27702	603
547426	1164	1183	GAGTAACCAGAGCTCCCTTG	5-10-5	92	27685	27704	604
547427	1166	1185	AAGAGTAACCAGAGCTCCCT	5-10-5	79	27687	27706	605
547428	1169	1188	TCAAAGAGTAACCAGAGCTC	5-10-5	78	27690	27709	606
546283	1171	1190	TCTCAAAGAGTAACCAGAGC	5-10-5	88	27692	27711	607
547429	1173	1192	AATCTCAAAGAGTAACCAGA	5-10-5	81	27694	27713	608
547430	1174	1193	CAATCTCAAAGAGTAACCAG	5-10-5	70	27695	27714	609
546284	1176	1195	CACAATCTCAAAGAGTAACC	5-10-5	89	27697	27716	610
546285	1180	1199	GTTACACAATCTCAAAGAGT	5-10-5	76	27701	27720	611
547431	1184	1203	CAGTGTTACACAATCTCAAA	5-10-5	67	27705	27724	612
547432	1186	1205	CCCAGTGTTACACAATCTCA	5-10-5	90	27707	27726	613
547433	1189	1208	GTCCCCAGTGTTACACAATC	5-10-5	63	27710	27729	614
546287	1192	1211	GTTGTCCCCAGTGTTACACA	5-10-5	82	27713	27732	615
546288	1240	1259	GTTTGTTCCTCCAACAATGC	5-10-5	78	27916	27935	616
547434	1243	1262	AGAGTTTGTTCCTCCAACAA	5-10-5	54	27919	27938	617
547435	1248	1267	CAAGAAGAGTTTGTTCCTCC	5-10-5	85	27924	27943	618
546290	1251	1270	CCCCAAGAAGAGTTTGTTCC	5-10-5	86	27927	27946	619
547436	1253	1272	CTCCCCAAGAAGAGTTTGTT	5-10-5	0	27929	27948	620
547437	1255	1274	CTCTCCCCAAGAAGAGTTTG	5-10-5	50	27931	27950	621
547438	1261	1280	GGGCCACTCTCCCCAAGAAG	5-10-5	82	27937	27956	622
546291	1263	1282	CAGGGCCACTCTCCCCAAGA	5-10-5	81	27939	27958	623
547439	1298	1317	TCTGAGCTGTCAGCTTCACC	5-10-5	85	27974	27993	624
546293	1301	1320	GCCTCTGAGCTGTCAGCTTC	5-10-5	64	27977	27996	625
547440	1327	1346	TCCTATGAGTGACCCTCCAC	5-10-5	67	28003	28022	626
546294	1328	1347	GTCCTATGAGTGACCCTCCA	5-10-5	72	28004	28023	627
547441	1331	1350	GGTGTCCTATGAGTGACCCT	5-10-5	62	28007	28026	628
547442	1332	1351	TGGTGTCCTATGAGTGACCC	5-10-5	42	28008	28027	629
547443	1336	1355	CCACTGGTGTCCTATGAGTG	5-10-5	70	28012	28031	630
546295	1337	1356	CCCACTGGTGTCCTATGAGT	5-10-5	67	28013	28032	631
546296	1370	1389	GAAGCCCATCAAAGCAGTGG	5-10-5	27	n/a	n/a	632
546297	1397	1416	TATAGATGCGCCAAACATCC	5-10-5	82	30475	30494	633

547444	1398	1417	CTATAGATGCGCCAAACATC	5-10-5	71	30476	30495	634
547445	1402	1421	GCCACTATAGATGCGCCAAA	5-10-5	97	30480	30499	635
546299	1404	1423	ATGCCACTATAGATGCGCCA	5-10-5	84	30482	30501	636
546300	1424	1443	TAATGTCTGACAGATTTAAA	5-10-5	58	30502	30521	637
546301	1427	1446	TTGTAATGTCTGACAGATTT	5-10-5	93	30505	30524	638
546302	1444	1463	TGAGAAAGGTGTATCTTTTG	5-10-5	87	30522	30541	639
547446	1447	1466	TTGTGAGAAAGGTGTATCTT	5-10-5	84	30525	30544	640
546303	1448	1467	TTTGTGAGAAAGGTGTATCT	5-10-5	77	30526	30545	641
547447	1449	1468	ATTTGTGAGAAAGGTGTATC	5-10-5	80	30527	30546	642

[1977]

[1978] 表130

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	96	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547448	1451	1470	TTATTTGTGAGAAAGGTGTA	5-10-5	75	30529	30548	643
547449	1453	1472	TTTTATTTGTGAGAAAGGTG	5-10-5	71	30531	30550	644
546304	1454	1473	CTTTTATTTGTGAGAAAGGT	5-10-5	94	30532	30551	645
547450	1456	1475	CTCTTTTATTTGTGAGAAAG	5-10-5	71	30534	30553	646
547451	1471	1490	TTGGTGAATAATAATCTCTT	5-10-5	75	30549	30568	647
546306	1472	1491	TTTGGTGAATAATAATCTCT	5-10-5	65	30550	30569	648
547452	1474	1493	GTTTTGGTGAATAATAATCT	5-10-5	47	30552	30571	649
546307	1478	1497	TATAGTTTTGGTGAATAATA	5-10-5	12	30556	30575	650
546308	1482	1501	ACTTTATAGTTTTGGTGAAT	5-10-5	57	30560	30579	651
546309	1492	1511	CCCTTCTGAGACTTTATAGT	5-10-5	88	30570	30589	652

[1979]

[1980]

546310	1496	1515	GATTCCCTTCTGAGACTTTA	5-10-5	78	30574	30593	653
546311	1499	1518	CATGATTCCCTTCTGAGACT	5-10-5	79	30577	30596	654
547453	1500	1519	TCATGATTCCCTTCTGAGAC	5-10-5	81	30578	30597	655
547454	1502	1521	TATCATGATTCCCTTCTGAG	5-10-5	92	30580	30599	656
547455	1503	1522	ATATCATGATTCCCTTCTGA	5-10-5	88	30581	30600	657
547456	1506	1525	GCGATATCATGATTCCCTTC	5-10-5	89	30584	30603	658
546313	1507	1526	GGCGATATCATGATTCCCTT	5-10-5	60	30585	30604	659
547457	1509	1528	AAGGCGATATCATGATTCCC	5-10-5	89	30587	30606	660
547458	1513	1532	TATCAAGGCGATATCATGAT	5-10-5	84	30591	30610	661
547459	1519	1538	GAGTTTTATCAAGGCGATAT	5-10-5	28	30597	30616	662
547460	1522	1541	CTGGAGTTTTATCAAGGCGA	5-10-5	72	30600	30619	663
546316	1524	1543	GCCTGGAGTTTTATCAAGGC	5-10-5	51	30602	30621	664
546317	1528	1547	AGGAGCCTGGAGTTTTATCA	5-10-5	12	30606	30625	665
546318	1534	1553	ATTCAAAGGAGCCTGGAGTT	5-10-5	47	30612	30631	666
547461	1537	1556	GTAATTCAAAGGAGCCTGGA	5-10-5	49	30615	30634	667
547462	1539	1558	GTGTAATTCAAAGGAGCCTG	5-10-5	59	30617	30636	668
546319	1541	1560	CAGTGTAATTCAAAGGAGCC	5-10-5	50	30619	30638	669
547463	1564	1583	TAGGCATATTGGTTTTTGGA	5-10-5	74	31870	31889	670
546320	1566	1585	GGTAGGCATATTGGTTTTTG	5-10-5	72	31872	31891	671
546321	1569	1588	GAAGGTAGGCATATTGGTTT	5-10-5	53	31875	31894	672
546322	1584	1603	CTTGTGTCACCTTTGGAAGG	5-10-5	74	31890	31909	673
547464	1585	1604	GCTTGTGTCACCTTTGGAAG	5-10-5	95	31891	31910	674
546323	1587	1606	GTGCTTGTGTCACCTTTGGA	5-10-5	94	31893	31912	675
547465	1592	1611	AAATTGTGCTTGTGTCACCT	5-10-5	88	31898	31917	676
547466	1596	1615	GTATAAATTGTGCTTGTGTC	5-10-5	82	31902	31921	677
546324	1597	1616	GGTATAAATTGTGCTTGTGT	5-10-5	73	31903	31922	678
547467	1598	1617	TGGTATAAATTGTGCTTGTG	5-10-5	80	31904	31923	679
547468	1600	1619	GTTGGTATAAATTGTGCTTG	5-10-5	61	31906	31925	680
546325	1602	1621	CAGTTGGTATAAATTGTGCT	5-10-5	74	31908	31927	681
546326	1607	1626	CCCAACAGTTGGTATAAATT	5-10-5	62	31913	31932	682
547469	1610	1629	TTACCCAACAGTTGGTATAA	5-10-5	67	31916	31935	683
546327	1612	1631	GGTTACCCAACAGTTGGTAT	5-10-5	95	31918	31937	684
546328	1624	1643	GAAGCCCCATCCGGTTACCC	5-10-5	84	31930	31949	685
547470	1628	1647	TCGAGAAGCCCCATCCGGTT	5-10-5	70	31934	31953	686
546329	1631	1650	CCTTCGAGAAGCCCCATCCG	5-10-5	18	31937	31956	687
546330	1636	1655	TTTCTCCTTCGAGAAGCCCC	5-10-5	55	31942	31961	688
547471	1638	1657	CCTTTCTCCTTCGAGAAGCC	5-10-5	58	31944	31963	689
547472	1641	1660	TCACCTTTCTCCTTCGAGAA	5-10-5	44	n/a	n/a	690
546331	1642	1661	TTCACCTTTCTCCTTCGAGA	5-10-5	59	n/a	n/a	691
547473	1649	1668	TTTGGATTTCACCTTTCTCC	5-10-5	5	n/a	n/a	692
547474	1659	1678	TGTAGAATATTTTGGATTTC	5-10-5	51	33103	33122	693
547475	1686	1705	TTTGTTACCAAAGGAATATT	5-10-5	44	33130	33149	694
547476	1688	1707	CATTTGTTACCAAAGGAATA	5-10-5	75	33132	33151	695
546336	1689	1708	TCATTTGTTACCAAAGGAAT	5-10-5	66	33133	33152	696

547477	1692	1711	TCTTCATTTGTTACCAAAGG	5-10-5	74	33136	33155	697
547478	1695	1714	CATTCTTCATTTGTTACCAA	5-10-5	85	33139	33158	698
546339	1712	1731	CTTGATATCTTTTCTGGCAT	5-10-5	65	33156	33175	699
546340	1716	1735	TAATCTTGATATCTTTTCTG	5-10-5	30	33160	33179	700
547479	1718	1737	TATAATCTTGATATCTTTTC	5-10-5	48	33162	33181	701
547480	1756	1775	TTCTTTATAGCCAGCACAGA	5-10-5	60	33200	33219	702
547481	1758	1777	CCTTCTTTATAGCCAGCACA	5-10-5	71	33202	33221	703
547482	1760	1779	CCCCTTCTTTATAGCCAGCA	5-10-5	90	33204	33223	704
546343	1761	1780	CCCCCTTCTTTATAGCCAGC	5-10-5	97	33205	33224	705
547483	1762	1781	TCCCCCTTCTTTATAGCCAG	5-10-5	71	33206	33225	706
546345	1773	1792	CAAGCATCTTTTCCCCCTTC	5-10-5	86	33217	33236	707
546346	1796	1815	AGGGACCACCTGAATCTCCC	5-10-5	83	33895	33914	708
547484	1799	1818	CTAAGGGACCACCTGAATCT	5-10-5	69	33898	33917	709
546347	1800	1819	ACTAAGGGACCACCTGAATC	5-10-5	28	33899	33918	710
547485	1803	1822	CAAACTAAGGGACCACCTGA	5-10-5	49	33902	33921	711
546348	1804	1823	GCAAACTAAGGGACCACCTG	5-10-5	79	33903	33922	712
547486	1805	1824	TGCAAACTAAGGGACCACCT	5-10-5	89	33904	33923	713
546349	1810	1829	GTGTTTGCAAACTAAGGGAC	5-10-5	48	33909	33928	714
547487	1811	1830	TGTGTTTGCAAACTAAGGGA	5-10-5	72	33910	33929	715
546350	1868	1887	CCCTGCGGGCACAGCCTTCA	5-10-5	88	33967	33986	716
546351	1873	1892	TTGCTCCCTGCGGGCACAGC	5-10-5	82	33972	33991	717
546352	1880	1899	CACCAGGTTGCTCCCTGCGG	5-10-5	75	33979	33998	718
547488	1881	1900	ACACCAGGTTGCTCCCTGCG	5-10-5	71	33980	33999	719

[1981]

[1982] 表131

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	72	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	

[1983]

[1984]

						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547448	1451	1470	TTATTTGTGAGAAAGGTGTA	5-10-5	83	30529	30548	643
547449	1453	1472	TTTTATTTGTGAGAAAGGTG	5-10-5	73	30531	30550	644
546304	1454	1473	CTTTTATTTGTGAGAAAGGT	5-10-5	86	30532	30551	645
547450	1456	1475	CTCTTTTATTTGTGAGAAAG	5-10-5	67	30534	30553	646
547451	1471	1490	TTGGTGAATAATAATCTCTT	5-10-5	64	30549	30568	647
546306	1472	1491	TTTGGTGAATAATAATCTCT	5-10-5	71	30550	30569	648
547452	1474	1493	GTTTTGGTGAATAATAATCT	5-10-5	62	30552	30571	649
546307	1478	1497	TATAGTTTTGGTGAATAATA	5-10-5	0	30556	30575	650
546308	1482	1501	ACTTTATAGTTTTGGTGAAT	5-10-5	43	30560	30579	651
546309	1492	1511	CCCTTCTGAGACTTTATAGT	5-10-5	81	30570	30589	652
546310	1496	1515	GATTCCCTTCTGAGACTTTA	5-10-5	67	30574	30593	653
546311	1499	1518	CATGATTCCCTTCTGAGACT	5-10-5	76	30577	30596	654
547453	1500	1519	TCATGATTCCCTTCTGAGAC	5-10-5	81	30578	30597	655
547454	1502	1521	TATCATGATTCCCTTCTGAG	5-10-5	78	30580	30599	656
547455	1503	1522	ATATCATGATTCCCTTCTGA	5-10-5	66	30581	30600	657
547456	1506	1525	GCGATATCATGATTCCCTTC	5-10-5	96	30584	30603	658
546313	1507	1526	GGCGATATCATGATTCCCTT	5-10-5	75	30585	30604	659
547457	1509	1528	AAGGCGATATCATGATTCCC	5-10-5	92	30587	30606	660
547458	1513	1532	TATCAAGGCGATATCATGAT	5-10-5	64	30591	30610	661
547459	1519	1538	GAGTTTTATCAAGGCGATAT	5-10-5	51	30597	30616	662
547460	1522	1541	CTGGAGTTTTATCAAGGCGA	5-10-5	75	30600	30619	663
546316	1524	1543	GCCTGGAGTTTTATCAAGGC	5-10-5	60	30602	30621	664
546317	1528	1547	AGGAGCCTGGAGTTTTATCA	5-10-5	31	30606	30625	665
546318	1534	1553	ATTCAAAGGAGCCTGGAGTT	5-10-5	46	30612	30631	666
547461	1537	1556	GTAATTCAAAGGAGCCTGGA	5-10-5	55	30615	30634	667
547462	1539	1558	GTGTAATTCAAAGGAGCCTG	5-10-5	54	30617	30636	668
546319	1541	1560	CAGTGTAATTCAAAGGAGCC	5-10-5	61	30619	30638	669
547463	1564	1583	TAGGCATATTGGTTTTTGGA	5-10-5	84	31870	31889	670
546320	1566	1585	GGTAGGCATATTGGTTTTTG	5-10-5	69	31872	31891	671
546321	1569	1588	GAAGGTAGGCATATTGGTTT	5-10-5	56	31875	31894	672
546322	1584	1603	CTTGTGTCACCTTTGGAAGG	5-10-5	68	31890	31909	673
547464	1585	1604	GCTTGTGTCACCTTTGGAAG	5-10-5	84	31891	31910	674
546323	1587	1606	GTGCTTGTGTCACCTTTGGA	5-10-5	80	31893	31912	675
547465	1592	1611	AAATTGTGCTTGTGTCACCT	5-10-5	85	31898	31917	676
547466	1596	1615	GTATAAATTGTGCTTGTGTC	5-10-5	43	31902	31921	677
546324	1597	1616	GGTATAAATTGTGCTTGTGT	5-10-5	82	31903	31922	678
547467	1598	1617	TGGTATAAATTGTGCTTGTG	5-10-5	65	31904	31923	679
547468	1600	1619	GTTGGTATAAATTGTGCTTG	5-10-5	46	31906	31925	680
546325	1602	1621	CAGTTGGTATAAATTGTGCT	5-10-5	79	31908	31927	681
546326	1607	1626	CCCAACAGTTGGTATAAATT	5-10-5	64	31913	31932	682

547469	1610	1629	TTACCCAACAGTTGGTATAA	5-10-5	50	31916	31935	683
546327	1612	1631	GGTTACCCAACAGTTGGTAT	5-10-5	84	31918	31937	684
546328	1624	1643	GAAGCCCCATCCGGTTACCC	5-10-5	81	31930	31949	685
547470	1628	1647	TCGAGAAGCCCCATCCGGTT	5-10-5	68	31934	31953	686
546329	1631	1650	CCTTCGAGAAGCCCCATCCG	5-10-5	8	31937	31956	687
546330	1636	1655	TTTCTCCTTCGAGAAGCCCC	5-10-5	67	31942	31961	688
547471	1638	1657	CCTTTCTCCTTCGAGAAGCC	5-10-5	43	31944	31963	689
547472	1641	1660	TCACCTTTCTCCTTCGAGAA	5-10-5	42	n/a	n/a	690
546331	1642	1661	TTCACCTTTCTCCTTCGAGA	5-10-5	44	n/a	n/a	691
547473	1649	1668	TTTGGATTTCACCTTTCTCC	5-10-5	26	n/a	n/a	692
547474	1659	1678	TGTAGAATATTTTGGATTTC	5-10-5	34	33103	33122	693
547475	1686	1705	TTTGTTACCAAAGGAATATT	5-10-5	42	33130	33149	694
547476	1688	1707	CATTTGTTACCAAAGGAATA	5-10-5	71	33132	33151	695
546336	1689	1708	TCATTTGTTACCAAAGGAAT	5-10-5	73	33133	33152	696
547477	1692	1711	TCTTCATTTGTTACCAAAGG	5-10-5	68	33136	33155	697
547478	1695	1714	CATTCTTCATTTGTTACCAA	5-10-5	55	33139	33158	698
546339	1712	1731	CTTGATATCTTTTCTGGCAT	5-10-5	64	33156	33175	699
546340	1716	1735	TAATCTTGATATCTTTTCTG	5-10-5	56	33160	33179	700
547479	1718	1737	TATAATCTTGATATCTTTTC	5-10-5	9	33162	33181	701
547480	1756	1775	TTCTTTATAGCCAGCACAGA	5-10-5	49	33200	33219	702
547481	1758	1777	CCTTCTTTATAGCCAGCACA	5-10-5	77	33202	33221	703
547482	1760	1779	CCCCTTCTTTATAGCCAGCA	5-10-5	65	33204	33223	704
546343	1761	1780	CCCCCTTCTTTATAGCCAGC	5-10-5	91	33205	33224	705
547483	1762	1781	TCCCCCTTCTTTATAGCCAG	5-10-5	77	33206	33225	706
546345	1773	1792	CAAGCATCTTTTCCCCCTTC	5-10-5	80	33217	33236	707
546346	1796	1815	AGGGACCACCTGAATCTCCC	5-10-5	70	33895	33914	708
547484	1799	1818	CTAAGGGACCACCTGAATCT	5-10-5	64	33898	33917	709
546347	1800	1819	ACTAAGGGACCACCTGAATC	5-10-5	22	33899	33918	710
547485	1803	1822	CAAACTAAGGGACCACCTGA	5-10-5	66	33902	33921	711
546348	1804	1823	GCAAACTAAGGGACCACCTG	5-10-5	76	33903	33922	712
547486	1805	1824	TGCAAACTAAGGGACCACCT	5-10-5	78	33904	33923	713
546349	1810	1829	GTGTTTGCAAACTAAGGGAC	5-10-5	35	33909	33928	714
547487	1811	1830	TGTGTTTGCAAACTAAGGGA	5-10-5	61	33910	33929	715
546350	1868	1887	CCCTGCGGGCACAGCCTTCA	5-10-5	74	33967	33986	716
546351	1873	1892	TTGCTCCCTGCGGGCACAGC	5-10-5	60	33972	33991	717
546352	1880	1899	CACCAGGTTGCTCCCTGCGG	5-10-5	74	33979	33998	718
547488	1881	1900	ACACCAGGTTGCTCCCTGCG	5-10-5	72	33980	33999	719

[1985]

[1986] 表132

[1987]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始	SEQ ID NO:1 终止	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始	SEQ ID NO:10 终止	SEQ ID NO

	位点	位点				位点	位点	
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744 14815 14886 14945 15005 15077 15220 15292 15351 15411 15483 15555 15613 15685 15815 15887 15945	14763 14834 14905 14964 15024 15096 15239 15311 15370 15430 15502 15574 15632 15704 15834 15906 15964	334
547489	1883	1902	AGACACCAGGTTGCTCCCTG	5-10-5	34	33982	34001	720
547490	1885	1904	GTAGACACCAGGTTGCTCCC	5-10-5	55	33984	34003	721
546353	1900	1919	CTCAGCGACTTTGGTGTAGA	5-10-5	55	33999	34018	722
546354	1903	1922	GTACTCAGCGACTTTGGTGT	5-10-5	47	34002	34021	723
547491	1906	1925	CATGTACTCAGCGACTTTGG	5-10-5	47	34005	34024	724
547492	1911	1930	CAGTCCATGTACTCAGCGAC	5-10-5	62	34010	34029	725
546356	1913	1932	TCCAGTCCATGTACTCAGCG	5-10-5	60	34012	34031	726
546357	1947	1966	GCTTTTCCATCACTGCTCTG	5-10-5	79	34046	34065	727
546358	1951	1970	CTGAGCTTTTCCATCACTGC	5-10-5	83	34050	34069	728
547493	1952	1971	TCTGAGCTTTTCCATCACTG	5-10-5	72	34051	34070	729
546359	1955	1974	GCATCTGAGCTTTTCCATCA	5-10-5	79	34054	34073	730
546360	1958	1977	ACTGCATCTGAGCTTTTCCA	5-10-5	13	34057	34076	731
547494	1963	1982	TGGTGACTGCATCTGAGCTT	5-10-5	70	34062	34081	732
547495	1965	1984	GCTGGTGACTGCATCTGAGC	5-10-5	61	34064	34083	733
547496	1967	1986	ATGCTGGTGACTGCATCTGA	5-10-5	80	34066	34085	734
546362	1969	1988	TCATGCTGGTGACTGCATCT	5-10-5	71	34068	34087	735
546363	1973	1992	CTTCTCATGCTGGTGACTGC	5-10-5	81	34072	34091	736
547497	1977	1996	ACTGCTTCTCATGCTGGTGA	5-10-5	68	34076	34095	737
546364	1979	1998	GGACTGCTTCTCATGCTGGT	5-10-5	61	34078	34097	738
547498	1981	2000	CTGGACTGCTTCTCATGCTG	5-10-5	44	34080	34099	739
547499	1983	2002	CTCTGGACTGCTTCTCATGC	5-10-5	65	34082	34101	740
546365	1986	2005	AGACTCTGGACTGCTTCTCA	5-10-5	64	34085	34104	741
547500	1989	2008	CCTAGACTCTGGACTGCTTC	5-10-5	65	34088	34107	742
546366	1991	2010	TGCCTAGACTCTGGACTGCT	5-10-5	79	34090	34109	743
547501	1993	2012	ATTGCCTAGACTCTGGACTG	5-10-5	55	34092	34111	744

[1988]

[1989]

546367	1997	2016	AAAAATTGCCTAGACTCTGG	5-10-5	61	34096	34115	745
546368	2003	2022	GGTTGTAAAAATTGCCTAGA	5-10-5	44	34102	34121	746
547502	2006	2025	TCAGGTTGTAAAAATTGCCT	5-10-5	64	34105	34124	747
546369	2007	2026	CTCAGGTTGTAAAAATTGCC	5-10-5	51	34106	34125	748
547503	2008	2027	ACTCAGGTTGTAAAAATTGC	5-10-5	66	34107	34126	749
547504	2010	2029	GAACTCAGGTTGTAAAAATT	5-10-5	37	34109	34128	750
546370	2014	2033	ACTTGAACTCAGGTTGTAAA	5-10-5	34	34113	34132	751
547505	2015	2034	GACTTGAACTCAGGTTGTAA	5-10-5	69	34114	34133	752
546372	2021	2040	GAATTTGACTTGAACTCAGG	5-10-5	49	34120	34139	753
546373	2025	2044	CTCAGAATTTGACTTGAACT	5-10-5	59	34124	34143	754
547506	2028	2047	AGGCTCAGAATTTGACTTGA	5-10-5	78	34127	34146	755
547507	2029	2048	CAGGCTCAGAATTTGACTTG	5-10-5	56	34128	34147	756
546374	2030	2049	CCAGGCTCAGAATTTGACTT	5-10-5	50	34129	34148	757
547508	2032	2051	CCCCAGGCTCAGAATTTGAC	5-10-5	69	34131	34150	758
547509	2034	2053	CCCCCCAGGCTCAGAATTTG	5-10-5	58	34133	34152	759
546375	2036	2055	GACCCCCCAGGCTCAGAATT	5-10-5	48	34135	34154	760
547510	2041	2060	ATGAGGACCCCCCAGGCTCA	5-10-5	40	34140	34159	761
547511	2042	2061	GATGAGGACCCCCCAGGCTC	5-10-5	53	34141	34160	762
547512	2045	2064	GCAGATGAGGACCCCCCAGG	5-10-5	74	34144	34163	763
547513	2046	2065	TGCAGATGAGGACCCCCCAG	5-10-5	72	34145	34164	764
546378	2048	2067	TTTGCAGATGAGGACCCCCC	5-10-5	79	34147	34166	765
546379	2056	2075	CTCCATGCTTTGCAGATGAG	5-10-5	69	34155	34174	766
546380	2062	2081	GCCACTCTCCATGCTTTGCA	5-10-5	81	34161	34180	767
547514	2066	2085	AGATGCCACTCTCCATGCTT	5-10-5	85	34165	34184	768
546381	2068	2087	GAAGATGCCACTCTCCATGC	5-10-5	73	34167	34186	769
547515	2069	2088	AGAAGATGCCACTCTCCATG	5-10-5	58	34168	34187	770
546382	2072	2091	CAAAGAAGATGCCACTCTCC	5-10-5	58	34171	34190	771
547516	2076	2095	GATGCAAAGAAGATGCCACT	5-10-5	48	34175	34194	772
546383	2077	2096	GGATGCAAAGAAGATGCCAC	5-10-5	57	34176	34195	773
547517	2079	2098	TAGGATGCAAAGAAGATGCC	5-10-5	57	34178	34197	774
547518	2083	2102	TCCTTAGGATGCAAAGAAGA	5-10-5	51	34182	34201	775
546384	2085	2104	CGTCCTTAGGATGCAAAGAA	5-10-5	81	34184	34203	776
546385	2120	2139	ATTGTCCTCAGCAGCTCTGA	5-10-5	67	34219	34238	777
547519	2126	2145	CCAGACATTGTCCTCAGCAG	5-10-5	76	34225	34244	778
546386	2128	2147	AGCCAGACATTGTCCTCAGC	5-10-5	78	34227	34246	779
547520	2130	2149	TCAGCCAGACATTGTCCTCA	5-10-5	76	34229	34248	780
547521	2132	2151	CTTCAGCCAGACATTGTCCT	5-10-5	58	34231	34250	781
546387	2138	2157	AGCGGGCTTCAGCCAGACAT	5-10-5	77	34237	34256	782
547522	2141	2160	GAAAGCGGGCTTCAGCCAGA	5-10-5	73	34240	34259	783
546388	2143	2162	CTGAAAGCGGGCTTCAGCCA	5-10-5	71	34242	34261	784
546389	2147	2166	CGTGCTGAAAGCGGGCTTCA	5-10-5	71	34246	34265	785
546390	2165	2184	GTCAGCCCCTGGTTACGGCG	5-10-5	70	34264	34283	786
547523	2167	2186	TTGTCAGCCCCTGGTTACGG	5-10-5	69	34266	34285	787
547524	2169	2188	CATTGTCAGCCCCTGGTTAC	5-10-5	58	34268	34287	788

[1990]

546391	2170	2189	GCATTGTCAGCCCCTGGTTA	5-10-5	54	34269	34288	789
547525	2174	2193	CCTCGCATTGTCAGCCCCTG	5-10-5	78	34273	34292	790
546392	2176	2195	GACCTCGCATTGTCAGCCCC	5-10-5	72	34275	34294	791
547526	2178	2197	GCGACCTCGCATTGTCAGCC	5-10-5	59	34277	34296	792
547527	2185	2204	CTCAGTTGCGACCTCGCATT	5-10-5	58	34284	34303	793
546393	2186	2205	TCTCAGTTGCGACCTCGCAT	5-10-5	77	34285	34304	794
546394	2196	2215	GTCATGGAGATCTCAGTTGC	5-10-5	71	34295	34314	795
547528	2200	2219	CACAGTCATGGAGATCTCAG	5-10-5	78	34299	34318	796

[1991] 表133

[1992]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546403	n/a	n/a	CCATGAACATCCTATCCGTG	5-10-5	83	3282	3301	797
546406	n/a	n/a	TGTCCTGTCAACATATTCCA	5-10-5	80	3299	3318	798
546409	n/a	n/a	GGGTTTCTGCCAACAGTTTC	5-10-5	77	3326	3345	799
546410	n/a	n/a	GACTTTGGGTTTCTGCCAAC	5-10-5	83	3332	3351	800
546411	n/a	n/a	ATATTGACTTTGGGTTTCTG	5-10-5	56	3337	3356	801
546412	n/a	n/a	GGCTTCAATATTGACTTTGG	5-10-5	84	3344	3363	802
546416	n/a	n/a	CTGCAGGCAATATTTTGCTT	5-10-5	62	3364	3383	803
546418	n/a	n/a	ATGTGGCACTGCAGGCAATA	5-10-5	72	3372	3391	804
546419	n/a	n/a	TTCTAATGTGGCACTGCAGG	5-10-5	65	3377	3396	805
546421	n/a	n/a	TCAAGCTGTTCTAATGTGGC	5-10-5	71	3385	3404	806
546422	n/a	n/a	ACGGTCTTCAAGCTGTTCTA	5-10-5	72	3392	3411	807

[1993]

546425	n/a	n/a	GGTCAATCTGACTAGTGAAT	5-10-5	69	2284	2303	808
546426	n/a	n/a	TCTCTGGTCAATCTGACTAG	5-10-5	49	2289	2308	809
546429	n/a	n/a	GCCCACCAACAATCTCTGGT	5-10-5	84	2301	2320	810
546432	n/a	n/a	GACCCCAACAGACAGCCCAC	5-10-5	62	2315	2334	811
546444	n/a	n/a	CCAGAATCATGCCTTGTGGG	5-10-5	61	4765	4784	812
546447	n/a	n/a	GTCACCATAGACCCAGAATC	5-10-5	68	4777	4796	813
546450	n/a	n/a	GTGGCCCTCTTAAGTCACCA	5-10-5	73	4790	4809	814
546453	n/a	n/a	CTCATTGTTGTGTGGCCCTC	5-10-5	82	4801	4820	815
546459	n/a	n/a	GTAGCCATACATCTGAGGAA	5-10-5	46	4830	4849	816
546461	n/a	n/a	ATGTTTATTGTAGCCATACA	5-10-5	53	4839	4858	817
546492	n/a	n/a	CTCGCCTTTGTGACTCGATT	5-10-5	61	26263	26282	818
546493	n/a	n/a	CATACTCGCCTTTGTGACTC	5-10-5	35	26267	26286	819
546494	n/a	n/a	GCATACTCGCCTTTGTGACT	5-10-5	67	26268	26287	820
546495	n/a	n/a	TGCATACTCGCCTTTGTGAC	5-10-5	65	26269	26288	821
546395	2209	2228	TTCACAACACACAGTCATGG	5-10-5	72	34308	34327	822
546397	2233	2252	TTTTTTGATCTTTCACCATT	5-10-5	55	n/a	n/a	823
546496	n/a	n/a	ATGCATACTCGCCTTTGTGA	5-10-5	54	26270	26289	824
						26301	26320	
546497	n/a	n/a	CATGCATACTCGCCTTTGTG	5-10-5	56	26271	26290	825
						26302	26321	
546498	n/a	n/a	CCATGCATACTCGCCTTTGT	5-10-5	65	26272	26291	826
						26303	26322	
547529	2203	2222	ACACACAGTCATGGAGATCT	5-10-5	49	34302	34321	827
547530	2206	2225	ACAACACACAGTCATGGAGA	5-10-5	63	34305	34324	828
547531	2213	2232	TTATTTCACAACACACAGTC	5-10-5	69	34312	34331	829
546499	n/a	n/a	TCCATGCATACTCGCCTTTG	5-10-5	20	26273	26292	830
546500	n/a	n/a	TTCCATGCATACTCGCCTTT	5-10-5	46	26274	26293	831
546501	n/a	n/a	TTTCCATGCATACTCGCCTT	5-10-5	53	26275	26294	832
546502	n/a	n/a	GATTTTCCATGCATACTCGC	5-10-5	37	26278	26297	833
546503	n/a	n/a	GTGATGCGATTTTCCATGCA	5-10-5	53	26285	26304	834
546508	n/a	n/a	GCAGCAAGTGCTCCCCATGC	5-10-5	43	26317	26336	835
546511	n/a	n/a	GTGATGAAAGTACAGCAGCA	5-10-5	50	26331	26350	836
546683	n/a	n/a	TCCTATCCGTGTTCAGCTGT	5-10-5	69	3273	3292	837
546684	n/a	n/a	TACTCTCTACATACTCAGGA	5-10-5	71	3561	3580	838
546687	n/a	n/a	TGAGACCTCCAGACTACTGT	5-10-5	76	3847	3866	839
546690	n/a	n/a	CTCTGCTGGTTTTAGACCAC	5-10-5	44	4027	4046	840
546695	n/a	n/a	GGGACAATCTCCACCCCCGA	5-10-5	36	4225	4244	841
546698	n/a	n/a	TGCAGAGTGTCATCTGCGAA	5-10-5	59	4387	4406	842
546700	n/a	n/a	TGGTTCCCTAGCGGTCCAGA	5-10-5	78	4561	4580	843
546705	n/a	n/a	CCCCTGTAGTTGGCTGTGGT	5-10-5	66	5046	5065	844
546707	n/a	n/a	GCAAGTCAAAGAGTGTCCAC	5-10-5	73	5283	5302	845
546710	n/a	n/a	GAAGCCTGTTAGAGTTGGCC	5-10-5	73	5576	5595	846
546719	n/a	n/a	CCCCCATGTCCATGGACTTT	5-10-5	55	6329	6348	847
547532	n/a	n/a	CTGCCAACAGTTTCAACTTT	5-10-5	65	3320	3339	848

547533	n/a	n/a	TTTTGCTTGGCTTCAATATT	5-10-5	23	3352	3371	849
547534	n/a	n/a	ATCTGACTAGTGAATGGCTT	5-10-5	72	2279	2298	850
547535	n/a	n/a	AGACAGCCCACCAACAATCT	5-10-5	28	2306	2325	851
547536	n/a	n/a	TGCATAGACCCCAACAGACA	5-10-5	48	2321	2340	852
547537	n/a	n/a	CCTGTGCATAGACCCCAACA	5-10-5	65	2325	2344	853
547538	n/a	n/a	CCAGCAGAAATCCTGTGCAT	5-10-5	77	2336	2355	854
547539	n/a	n/a	AGAACTCCAGCAGAAATCCT	5-10-5	43	2342	2361	855
547540	n/a	n/a	TTGTGTGGCCCTCTTAAGTC	5-10-5	44	4794	4813	856
547541	n/a	n/a	TATAGATGTTTATTGTAGCC	5-10-5	36	4844	4863	857
547542	n/a	n/a	ATACTCGCCTTTGTGACTCG	5-10-5	35	26266	26285	858
547543	n/a	n/a	TTTTCCATGCATACTCGCCT	5-10-5	54	26276	26295	859
547544	n/a	n/a	TCGCCTTTGTGATGCGATTT	5-10-5	15	26293	26312	860
547545	n/a	n/a	ATACTCGCCTTTGTGATGCG	5-10-5	43	26297	26316	861
547546	n/a	n/a	CATACTCGCCTTTGTGATGC	5-10-5	11	26298	26317	862
547547	n/a	n/a	GCATACTCGCCTTTGTGATG	5-10-5	42	26299	26318	863
547548	n/a	n/a	TGCATACTCGCCTTTGTGAT	5-10-5	61	26300	26319	864
547549	n/a	n/a	CCCATGCATACTCGCCTTTG	5-10-5	36	26304	26323	865
547550	n/a	n/a	CCCCATGCATACTCGCCTTT	5-10-5	53	26305	26324	866
547551	n/a	n/a	TCCCCATGCATACTCGCCTT	5-10-5	38	26306	26325	867
547552	n/a	n/a	CTCCCCATGCATACTCGCCT	5-10-5	53	26307	26326	868
547553	n/a	n/a	TGCTCCCCATGCATACTCGC	5-10-5	64	26309	26328	869
547554	n/a	n/a	GCTCTGATTGGGTCACCACA	5-10-5	50	5743	5762	870
547555	n/a	n/a	TGTCTCCTTCCACTTGCTCC	5-10-5	58	5923	5942	871
547556	n/a	n/a	GCCATTTTATCCCTGAGATT	5-10-5	55	6130	6149	872
547557	n/a	n/a	CTGTGCTGTATTTTGGAGCC	5-10-5	59	6413	6432	873

[1994]

[1995] 表134

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	85	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	

[1996]

[1997]

						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546732	n/a	n/a	GGATTTGGCCCTGAGCCCCA	5-10-5	14	6933	6952	874
546735	n/a	n/a	CAACCTGTCCATTCCCTGGG	5-10-5	46	7082	7101	875
546739	n/a	n/a	ATTCGGTGTCTTTACTGGCT	5-10-5	89	7228	7247	876
546746	n/a	n/a	TCCTGTTGCCTGACATGCTA	5-10-5	65	7694	7713	877
546747	n/a	n/a	CTCCCACTGACTGACTACTC	5-10-5	64	7904	7923	878
546749	n/a	n/a	GCTGGTCCTTGAACCCCGTG	5-10-5	53	8259	8278	879
546753	n/a	n/a	CTGGCTCACTATAGGCCCCA	5-10-5	91	8655	8674	880
546756	n/a	n/a	ATAAGCATCTCTCTGACCTA	5-10-5	47	9105	9124	881
546763	n/a	n/a	GCTTCCCCAATACTTGCTGG	5-10-5	84	9695	9714	882
546765	n/a	n/a	GTGTCCAGAATACTGCCCCA	5-10-5	82	10053	10072	883
546770	n/a	n/a	GTGGACGACTGCCCTGTGCC	5-10-5	74	10435	10454	884
546773	n/a	n/a	TCTCTAGCATCCTAGTCCTC	5-10-5	67	10586	10605	885
546780	n/a	n/a	ATACTGGCTAAGTCAGGCCC	5-10-5	83	10982	11001	886
546784	n/a	n/a	GGCAGGGAGGTGGATTATTC	5-10-5	58	11440	11459	887
546789	n/a	n/a	GCTTCTCTATCTCCCAGTGT	5-10-5	79	12228	12247	888
546791	n/a	n/a	GATGCATGCAGCAATACAGG	5-10-5	52	12385	12404	889
546795	n/a	n/a	GTCTCGATGGCAAGCTGTAC	5-10-5	72	12650	12669	890
546796	n/a	n/a	GTACTCACCGGTACTCTGCC	5-10-5	82	12804	12823	891
546799	n/a	n/a	ATGAAGGGCGAGGCGCAGTG	5-10-5	5	13258	13277	892
546803	n/a	n/a	CCCCATACATCTATGCAAAT	5-10-5	40	13551	13570	893
546804	n/a	n/a	ACATGACTCCAGTGATGGAT	5-10-5	57	13632	13651	894
546808	n/a	n/a	AAAATGACACCAAAATTCGC	5-10-5	0	13841	13860	895
546811	n/a	n/a	TGGACATCCTTCCCCTCGCA	5-10-5	49	13967	13986	896
546817	n/a	n/a	GCTCTGAGCCTTCCGCCTCT	5-10-5	77	14472	14491	897
546822	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACTGCT	5-10-5	32	14735	14754	898
546823	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAACTGC	5-10-5	44	14736	14755	899
546824	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATAACTG	5-10-5	79	14737	14756	900
						14745	14764	
						14816	14835	
						14887	14906	
						14946	14965	
						15006	15025	
546825	n/a	n/a	GTATCACTGTACTAGTTTCC	5-10-5	96	15078	15097	901
						15221	15240	
						15293	15312	
						15352	15371	
						15412	15431	
						15484	15503	

[1998]

						15556	15575	
						15614	15633	
						15686	15705	
						15816	15835	
						15888	15907	
						15946	15965	
546826	n/a	n/a	AGTATCACTGTACTAGTTTC	5-10-5	90	14746	14765	902
						14817	14836	
						14888	14907	
						14947	14966	
						15007	15026	
						15079	15098	
						15222	15241	
						15294	15313	
						15353	15372	
						15413	15432	
						15485	15504	
						15557	15576	
						15615	15634	
						15687	15706	
						15817	15836	
						15889	15908	
						15947	15966	
546827	n/a	n/a	CAGTATCACTGTACTAGTTT	5-10-5	98	14747	14766	903
						14818	14837	
						14889	14908	
						14948	14967	
						15008	15027	
						15080	15099	
						15152	15171	
						15223	15242	
						15295	15314	
						15354	15373	
						15414	15433	
						15486	15505	
						15558	15577	
						15616	15635	
						15688	15707	
						15818	15837	
						15890	15909	
						15948	15967	
546828	n/a	n/a	ACAGTATCACTGTACTAGTT	5-10-5	95	14748	14767	904
						14819	14838	
						14890	14909	

[1999]

						14949	14968	
						15009	15028	
						15081	15100	
						15153	15172	
						15224	15243	
						15296	15315	
						15355	15374	
						15415	15434	
						15487	15506	
						15559	15578	
						15617	15636	
						15689	15708	
						15819	15838	
						15891	15910	
						15949	15968	
	546829	n/a	n/a	AACAGTATCACTGTACTAGT	5-10-5	94	14749	14768	905
							14820	14839	
							14891	14910	
							14950	14969	
							15010	15029	
							15082	15101	
							15154	15173	
							15225	15244	
							15297	15316	
							15356	15375	
							15416	15435	
							15488	15507	
							15560	15579	
							15618	15637	
							15690	15709	
							15820	15839	
							15892	15911	
							15950	15969	
	546830	n/a	n/a	TAACAGTATCACTGTACTAG	5-10-5	78	14750	14769	906
							14821	14840	
							14892	14911	
							14951	14970	
							15011	15030	
							15083	15102	
							15155	15174	
							15226	15245	
							15298	15317	
							15357	15376	
							15417	15436	

[2000]

						15489	15508	
						15561	15580	
						15619	15638	
						15691	15710	
						15821	15840	
						15893	15912	
						15951	15970	
546831	n/a	n/a	TCTAACAGTATCACTGTACT	5-10-5	79	14752	14771	907
						14823	14842	
						14894	14913	
						15013	15032	
						15085	15104	
						15228	15247	
						15300	15319	
						15419	15438	
						15491	15510	
						15621	15640	
						15823	15842	
						15953	15972	
546832	n/a	n/a	CTCTAACAGTATCACTGTAC	5-10-5	88	14753	14772	908
						14824	14843	
						14895	14914	
						15014	15033	
						15086	15105	
						15229	15248	
						15301	15320	
						15420	15439	
						15492	15511	
						15622	15641	
						15824	15843	
						15954	15973	
546833	n/a	n/a	ACTCTAACAGTATCACTGTA	5-10-5	90	14754	14773	909
						14825	14844	
						14896	14915	
						15015	15034	
						15087	15106	
						15230	15249	
						15302	15321	
						15421	15440	
						15493	15512	
						15623	15642	
						15825	15844	
						15955	15974	
546834	n/a	n/a	AACTCTAACAGTATCACTGT	5-10-5	86	14755	14774	910

[2001]

						14826	14845	
						14897	14916	
						15016	15035	
						15088	15107	
						15231	15250	
						15303	15322	
						15422	15441	
						15494	15513	
						15624	15643	
						15826	15845	
						15956	15975	
	546835	n/a	n/a	TAACTCTAACAGTATCACTG	5-10-5	86	14756	14775	911
							14827	14846	
							14898	14917	
							15017	15036	
							15089	15108	
							15232	15251	
							15304	15323	
							15423	15442	
							15495	15514	
							15625	15644	
							15827	15846	
							15957	15976	
	546836	n/a	n/a	ATAACTCTAACAGTATCACT	5-10-5	30	14757	14776	912
							14828	14847	
							14899	14918	
							15018	15037	
							15090	15109	
							15233	15252	
							15305	15324	
							15424	15443	
							15496	15515	
							15626	15645	
							15828	15847	
							15958	15977	
	546837	n/a	n/a	TATAACTCTAACAGTATCAC	5-10-5	0	14758	14777	913
							14829	14848	
							14900	14919	
							15019	15038	
							15091	15110	
							15234	15253	
							15306	15325	
							15425	15444	
							15497	15516	

[2002]

						15627	15646	
						15829	15848	
						15959	15978	
546838	n/a	n/a	CTATAACTCTAACAGTATCA	5-10-5	43	14759	14778	914
						14830	14849	
						14901	14920	
						15020	15039	
						15092	15111	
						15235	15254	
						15307	15326	
						15426	15445	
						15498	15517	
						15628	15647	
						15830	15849	
						15960	15979	
546839	n/a	n/a	CCTATAACTCTAACAGTATC	5-10-5	47	14760	14779	915
						14831	14850	
						14902	14921	
						15021	15040	
						15093	15112	
						15236	15255	
						15308	15327	
						15427	15446	
						15499	15518	
						15629	15648	
						15831	15850	
						15961	15980	
546840	n/a	n/a	CTGTCCTATAACTCTAACAG	5-10-5	53	14764	14783	916
						14835	14854	
546841	n/a	n/a	CACTGTCCTATAACTCTAAC	5-10-5	38	14766	14785	917
						14837	14856	
546842	n/a	n/a	TCACTGTCCTATAACTCTAA	5-10-5	54	14767	14786	918
						14838	14857	
546843	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATAACTCT	5-10-5	52	14769	14788	919
						14840	14859	
546844	n/a	n/a	GTCCTATATCACTGTCCTAT	5-10-5	75	14775	14794	920
						14846	14865	
						15180	15199	
						15716	15735	
546845	n/a	n/a	TGTCCTATATCACTGTCCTA	5-10-5	75	14776	14795	921
						14847	14866	
						15181	15200	
						15717	15736	
546846	n/a	n/a	CTGTCCTATATCACTGTCCT	5-10-5	95	14777	14796	922

[2003]

						14848	14867	
						15182	15201	
						15718	15737	
546847	n/a	n/a	ACTGTCCTATATCACTGTCC	5-10-5	88	14778	14797	923
						14849	14868	
						15183	15202	
						15719	15738	
546848	n/a	n/a	TCACTGTCCTATATCACTGT	5-10-5	86	14780	14799	924
						14851	14870	
						14976	14995	
						15185	15204	
						15257	15276	
						15382	15401	
						15520	15539	
						15650	15669	
						15721	15740	
						15852	15871	
						15982	16001	
547558	n/a	n/a	CCCCCAGTTCCCATGCAAGG	5-10-5	52	6640	6659	925
547559	n/a	n/a	GAGCACAGATCTCTTCAAGT	5-10-5	69	6822	6841	926
547560	n/a	n/a	GACGGTCACCCAGCCCTGAC	5-10-5	42	7459	7478	927
547561	n/a	n/a	AAGGGAAATTAGAGGCAGGC	5-10-5	57	7583	7602	928
547562	n/a	n/a	CTTTCTTGAGACAATCCCTT	5-10-5	59	8463	8482	929
547563	n/a	n/a	GTGGGATCAGAGAATGACTA	5-10-5	48	9267	9286	930
547564	n/a	n/a	CCCTCTGTCTTAGATGTCCA	5-10-5	94	9390	9409	931
547565	n/a	n/a	CTTATCAGTCCCAGTCATGT	5-10-5	63	10698	10717	932
547566	n/a	n/a	AAGAGTTGGGATGCGACTCT	5-10-5	76	11335	11354	933
547567	n/a	n/a	TCCACTCCTAAGAAGTATGG	5-10-5	60	11546	11565	934
547568	n/a	n/a	GCACCCTTTTCATTGAGATT	5-10-5	70	12070	12089	935
547569	n/a	n/a	ACTACCATTTGGGTTGGTAG	5-10-5	9	12571	12590	936
547570	n/a	n/a	AAGCCCTGTTTGGTTTTTAG	5-10-5	18	12900	12919	937
547571	n/a	n/a	AAATGACACCAAAATTGAGT	5-10-5	14	13744	13763	938
547572	n/a	n/a	AAATGACACCAAAATTCGCT	5-10-5	40	13840	13859	939
547573	n/a	n/a	TAAGCAAGGCCTATGTGTGG	5-10-5	2	13880	13899	940
547574	n/a	n/a	ACACGCACAGGTCCCAGGGC	5-10-5	51	14314	14333	941
547575	n/a	n/a	GGGAAACTCTTTCCTCGCCC	5-10-5	89	14583	14602	942
547576	n/a	n/a	CTAGTTTCCTATAACTGCTG	5-10-5	29	14734	14753	943
547577	n/a	n/a	CTAACAGTATCACTGTACTA	5-10-5	79	14751	14770	944
						14822	14841	
						14893	14912	
						15012	15031	
						15084	15103	
						15227	15246	
						15299	15318	

[2004]

						15418	15437	
						15490	15509	
						15620	15639	
						15822	15841	
						15952	15971	
547578	n/a	n/a	GTCCTATAACTCTAACAGTA	5-10-5	30	14762	14781	945
						14833	14852	
547579	n/a	n/a	TGTCCTATAACTCTAACAGT	5-10-5	0	14763	14782	946
						14834	14853	
547580	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATAACTCTA	5-10-5	61	14768	14787	947
						14839	14858	
547581	n/a	n/a	ATATCACTGTCCTATAACTC	5-10-5	60	14770	14789	948
						14841	14860	
547582	n/a	n/a	TATATCACTGTCCTATAACT	5-10-5	22	14771	14790	949
						14842	14861	
						15176	15195	
						15712	15731	
						16160	16179	
547583	n/a	n/a	CACTGTCCTATATCACTGTC	5-10-5	80	14779	14798	950
						14850	14869	
						15184	15203	
						15720	15739	

[2005] 表135

[2006]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	85	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	

[2007]

						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546849	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATATCACTG	5-10-5	93	14781	14800	951
						14852	14871	
						14977	14996	
						15186	15205	
						15258	15277	
						15383	15402	
						15521	15540	
						15651	15670	
						15722	15741	
						15853	15872	
						15983	16002	
546850	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATATCACT	5-10-5	80	14782	14801	952
						14853	14872	
						14978	14997	
						15116	15135	
						15187	15206	
						15259	15278	
						15384	15403	
						15522	15541	
						15652	15671	
						15723	15742	
						15854	15873	
						15984	16003	
546851	n/a	n/a	AGTATCACTGTCCTATATCA	5-10-5	81	14784	14803	953
						14980	14999	
						15118	15137	
						15386	15405	
						15524	15543	
						15986	16005	
546852	n/a	n/a	CAGTATCACTGTCCTATATC	5-10-5	94	14785	14804	954
						14981	15000	
						15119	15138	
						15387	15406	
						15525	15544	
						15987	16006	
546853	n/a	n/a	ACAGTATCACTGTCCTATAT	5-10-5	86	14786	14805	955
						14982	15001	
						15120	15139	
						15388	15407	
						15526	15545	
						15988	16007	

[2008]

546854	n/a	n/a	TAACAGTATCACTGTCCTAT	5-10-5	90	14788	14807	956
						14984	15003	
						15050	15069	
						15122	15141	
						15390	15409	
						15456	15475	
						15528	15547	
						15990	16009	
546855	n/a	n/a	ATAACAGTATCACTGTCCTA	5-10-5	87	14789	14808	957
						14985	15004	
						15051	15070	
						15123	15142	
						15391	15410	
						15457	15476	
						15529	15548	
						15991	16010	
546856	n/a	n/a	AACTATAACAGTATCACTGT	5-10-5	54	14793	14812	958
						15055	15074	
						15127	15146	
						15160	15179	
						15461	15480	
						15533	15552	
						15566	15585	
						15696	15715	
						15898	15917	
						15995	16014	
546857	n/a	n/a	TATAACTATAACAGTATCAC	5-10-5	7	14796	14815	959
						15058	15077	
						15130	15149	
						15163	15182	
						15464	15483	
						15536	15555	
						15569	15588	
						15699	15718	
						15770	15789	
						15998	16017	
546858	n/a	n/a	CTATAACTATAACAGTATCA	5-10-5	21	14797	14816	960
						15059	15078	
						15131	15150	
						15164	15183	
						15465	15484	
						15537	15556	
						15570	15589	
						15700	15719	

[2009]

						15771	15790	
						15999	16018	
546859	n/a	n/a	TTTCCTATAACTATAACAGT	5-10-5	7	14801	14820	961
						15063	15082	
						15469	15488	
						15541	15560	
546860	n/a	n/a	CTAGTTTCCTATAACTATAA	5-10-5	36	14805	14824	962
						14876	14895	
						14935	14954	
						15067	15086	
						15210	15229	
						15282	15301	
						15341	15360	
						15473	15492	
						15545	15564	
						15603	15622	
						15675	15694	
						15746	15765	
						15805	15824	
						15877	15896	
						15935	15954	
546861	n/a	n/a	TAACAATATCACTGTCCTAT	5-10-5	68	14859	14878	963
						15193	15212	
						15265	15284	
						15586	15605	
						15658	15677	
						15729	15748	
						15860	15879	
						16086	16105	
						16183	16202	
						16234	16253	
546862	n/a	n/a	AACTATAACAATATCACTGT	5-10-5	0	14864	14883	964
						14923	14942	
						15198	15217	
						15270	15289	
						15329	15348	
						15591	15610	
						15663	15682	
						15734	15753	
						15793	15812	
						15865	15884	
						15923	15942	
						16066	16085	
						16091	16110	

[2010]

						16144	16163	
						16239	16258	
546863	n/a	n/a	TAACTATAACAATATCACTG	5-10-5	21	14865	14884	965
						14924	14943	
						15199	15218	
						15271	15290	
						15330	15349	
						15592	15611	
						15664	15683	
						15735	15754	
						15794	15813	
						15866	15885	
						15924	15943	
						16067	16086	
						16092	16111	
						16145	16164	
						16240	16259	
546864	n/a	n/a	ATAACTATAACAATATCACT	5-10-5	0	14866	14885	966
						14925	14944	
						15200	15219	
						15272	15291	
						15331	15350	
						15593	15612	
						15665	15684	
						15736	15755	
						15795	15814	
						15867	15886	
						15925	15944	
						16068	16087	
						16093	16112	
						16146	16165	
						16241	16260	
546865	n/a	n/a	TATAACTATAACAATATCAC	5-10-5	0	14867	14886	967
						14926	14945	
						15201	15220	
						15273	15292	
						15332	15351	
						15594	15613	
						15666	15685	
						15737	15756	
						15796	15815	
						15868	15887	
						15926	15945	
						16069	16088	

[2011]

						16094	16113	
						16147	16166	
						16242	16261	
546866	n/a	n/a	GTTTCCTATAACTATAACAA	5-10-5	35	14873	14892	968
						14932	14951	
						15207	15226	
						15279	15298	
						15338	15357	
						15600	15619	
						15672	15691	
						15743	15762	
						15802	15821	
						15874	15893	
						15932	15951	
546867	n/a	n/a	ACCTATAACTCTAACAGTAT	5-10-5	40	14903	14922	969
						15022	15041	
						15094	15113	
						15237	15256	
						15309	15328	
						15428	15447	
						15500	15519	
						15630	15649	
						15832	15851	
						15962	15981	
546868	n/a	n/a	TACCTATAACTCTAACAGTA	5-10-5	51	14904	14923	970
						15023	15042	
						15095	15114	
						15238	15257	
						15310	15329	
						15429	15448	
						15501	15520	
						15631	15650	
						15833	15852	
						15963	15982	
546869	n/a	n/a	TGTACCTATAACTCTAACAG	5-10-5	53	14906	14925	971
						15025	15044	
						15240	15259	
						15312	15331	
						15431	15450	
						15503	15522	
						15633	15652	
						15835	15854	
						15965	15984	
546870	n/a	n/a	CTGTACCTATAACTCTAACA	5-10-5	87	14907	14926	972

[2012]

						15026	15045	
						15241	15260	
						15313	15332	
						15432	15451	
						15504	15523	
						15634	15653	
						15836	15855	
						15966	15985	
546871	n/a	n/a	ACTGTACCTATAACTCTAAC	5-10-5	73	14908	14927	973
						15027	15046	
						15242	15261	
						15314	15333	
						15433	15452	
						15505	15524	
						15635	15654	
						15837	15856	
						15967	15986	
546872	n/a	n/a	CACTGTACCTATAACTCTAA	5-10-5	87	14909	14928	974
						15028	15047	
						15243	15262	
						15315	15334	
						15434	15453	
						15506	15525	
						15636	15655	
						15838	15857	
						15968	15987	
546873	n/a	n/a	CAATATCACTGTACCTATAA	5-10-5	34	14915	14934	975
						15321	15340	
						15785	15804	
546874	n/a	n/a	ATAACAATATCACTGTACCT	5-10-5	68	14919	14938	976
						15325	15344	
						15789	15808	
						16062	16081	
						16140	16159	
546875	n/a	n/a	ACTATAACAATATCACTGTA	5-10-5	33	14922	14941	977
						15328	15347	
						15792	15811	
						16065	16084	
						16143	16162	
546876	n/a	n/a	GTCCTATATCACTGTACCTG	5-10-5	87	14971	14990	978
546877	n/a	n/a	CACTGTCCTATATCACTGTA	5-10-5	88	14975	14994	979
						15256	15275	
						15381	15400	
						15519	15538	

[2013]

						15649	15668	
						15851	15870	
						15981	16000	
546878	n/a	n/a	CCTATAACAGTATCACTGTC	5-10-5	81	14988	15007	980
						15394	15413	
546879	n/a	n/a	TTTCCTATAACAGTATCACT	5-10-5	42	14991	15010	981
						15397	15416	
546880	n/a	n/a	GTTTCCTATAACAGTATCAC	5-10-5	41	14992	15011	982
						15398	15417	
546881	n/a	n/a	AGTTTCCTATAACAGTATCA	5-10-5	49	14993	15012	983
						15399	15418	
546882	n/a	n/a	TAGTTTCCTATAACAGTATC	5-10-5	24	14994	15013	984
						15400	15419	
546883	n/a	n/a	CTAGTTTCCTATAACAGTAT	5-10-5	19	14995	15014	985
						15401	15420	
546884	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACAGTA	5-10-5	6	14996	15015	986
						15402	15421	
547584	n/a	n/a	GTATCACTGTCCTATATCAC	5-10-5	85	14783	14802	987
						14979	14998	
						15117	15136	
						15385	15404	
						15523	15542	
						15985	16004	
547585	n/a	n/a	AACAGTATCACTGTCCTATA	5-10-5	85	14787	14806	988
						14983	15002	
						15121	15140	
						15389	15408	
						15527	15546	
						15989	16008	
547586	n/a	n/a	TATAACAGTATCACTGTCCT	5-10-5	82	14790	14809	989
						14986	15005	
						15052	15071	
						15124	15143	
						15392	15411	
						15458	15477	
						15530	15549	
						15992	16011	
547587	n/a	n/a	CTATAACAGTATCACTGTCC	5-10-5	96	14791	14810	990
						14987	15006	
						15053	15072	
						15125	15144	
						15393	15412	
						15459	15478	
						15531	15550	

[2014]

						15993	16012	
547588	n/a	n/a	ACTATAACAGTATCACTGTC	5-10-5	83	14792 15054 15126 15460 15532 15994	14811 15073 15145 15479 15551 16013	991
547589	n/a	n/a	TAACTATAACAGTATCACTG	5-10-5	36	14794 15056 15128 15161 15462 15534 15567 15697 15996	14813 15075 15147 15180 15481 15553 15586 15716 16015	992
547590	n/a	n/a	ATAACTATAACAGTATCACT	5-10-5	0	14795 15057 15129 15162 15463 15535 15568 15698 15997	14814 15076 15148 15181 15482 15554 15587 15717 16016	993
547591	n/a	n/a	CCTATAACTATAACAGTATC	5-10-5	23	14798 15060 15165 15466 15538 15571 15701 15772 16000	14817 15079 15184 15485 15557 15590 15720 15791 16019	994
547592	n/a	n/a	TCCTATAACTATAACAGTAT	5-10-5	27	14799 15061 15166 15467 15539 15572 15702 16001	14818 15080 15185 15486 15558 15591 15721 16020	995
547593	n/a	n/a	TTCCTATAACTATAACAGTA	5-10-5	29	14800 15062	14819 15081	996

[2015]

						15468	15487	
						15540	15559	
547594	n/a	n/a	GTTTCCTATAACTATAACAG	5-10-5	19	14802	14821	997
						15064	15083	
						15470	15489	
						15542	15561	
547595	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACTATA	5-10-5	21	14806	14825	998
						14877	14896	
						14936	14955	
						15068	15087	
						15211	15230	
						15283	15302	
						15342	15361	
						15474	15493	
						15546	15565	
						15604	15623	
						15676	15695	
						15747	15766	
						15806	15825	
						15878	15897	
						15936	15955	
547596	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAACTAT	5-10-5	14	14807	14826	999
						14878	14897	
						14937	14956	
						15069	15088	
						15212	15231	
						15284	15303	
						15343	15362	
						15475	15494	
						15547	15566	
						15605	15624	
						15677	15696	
						15748	15767	
						15807	15826	
						15879	15898	
						15937	15956	
547597	n/a	n/a	CAATATCACTGTCCTATATC	5-10-5	29	14856	14875	1000
						15190	15209	
						15262	15281	
						15655	15674	
						15726	15745	
						15857	15876	
547598	n/a	n/a	ACTATAACAATATCACTGTC	5-10-5	59	14863	14882	1001
						15197	15216	

[2016]

						15269	15288	
						15590	15609	
						15662	15681	
						15733	15752	
						15864	15883	
						15922	15941	
						16090	16109	
						16238	16257	
547599	n/a	n/a	TTCCTATAACTATAACAATA	5-10-5	4	14871	14890	1002
						14930	14949	
						15205	15224	
						15277	15296	
						15336	15355	
						15598	15617	
						15670	15689	
						15741	15760	
						15800	15819	
						15872	15891	
						15930	15949	
547600	n/a	n/a	TTTCCTATAACTATAACAAT	5-10-5	26	14872	14891	1003
						14931	14950	
						15206	15225	
						15278	15297	
						15337	15356	
						15599	15618	
						15671	15690	
						15742	15761	
						15801	15820	
						15873	15892	
						15931	15950	
547601	n/a	n/a	GTACCTATAACTCTAACAGT	5-10-5	75	14905	14924	1004
						15024	15043	
						15239	15258	
						15311	15330	
						15430	15449	
						15502	15521	
						15632	15651	
						15834	15853	
						15964	15983	
547602	n/a	n/a	TCACTGTACCTATAACTCTA	5-10-5	93	14910	14929	1005
						15029	15048	
						15244	15263	
						15316	15335	
						15435	15454	

[2017]

						15507	15526	
						15637	15656	
						15839	15858	
						15969	15988	
547603	n/a	n/a	TATCACTGTACCTATAACTC	5-10-5	41	14912	14931	1006
						15246	15265	
						15318	15337	
						15509	15528	
						15639	15658	
						15841	15860	
						15971	15990	
547604	n/a	n/a	ATATCACTGTACCTATAACT	5-10-5	0	14913	14932	1007
						15247	15266	
						15319	15338	
						15510	15529	
						15640	15659	
						15783	15802	
						15842	15861	
						15972	15991	
547605	n/a	n/a	ACAATATCACTGTACCTATA	5-10-5	43	14916	14935	1008
						15322	15341	
						15786	15805	
						16137	16156	
547606	n/a	n/a	AACAATATCACTGTACCTAT	5-10-5	43	14917	14936	1009
						15323	15342	
						15787	15806	
						16138	16157	
547607	n/a	n/a	TAACAATATCACTGTACCTA	5-10-5	49	14918	14937	1010
						15324	15343	
						15788	15807	
						16139	16158	
547608	n/a	n/a	TATAACAATATCACTGTACC	5-10-5	35	14920	14939	1011
						15326	15345	
						15790	15809	
						16063	16082	
						16141	16160	
547609	n/a	n/a	CTATAACAATATCACTGTAC	5-10-5	23	14921	14940	1012
						15327	15346	
						15791	15810	
						16064	16083	
						16142	16161	
547610	n/a	n/a	TGTAACAGTATCACTGTACT	5-10-5	45	14953	14972	1013
547611	n/a	n/a	CTGTAACAGTATCACTGTAC	5-10-5	71	14954	14973	1014
547612	n/a	n/a	CCTGTAACAGTATCACTGTA	5-10-5	68	14955	14974	1015

[2018]

547613	n/a	n/a	CTATATCACTGTACCTGTAA	5-10-5	39	14968	14987	1016
547614	n/a	n/a	CCTATATCACTGTACCTGTA	5-10-5	81	14969	14988	1017
547615	n/a	n/a	TCCTATATCACTGTACCTGT	5-10-5	84	14970	14989	1018
547616	n/a	n/a	TGTCCTATATCACTGTACCT	5-10-5	86	14972	14991	1019
						15253	15272	
						15378	15397	
						15516	15535	
						15646	15665	
						15848	15867	
						15978	15997	
547617	n/a	n/a	CTGTCCTATATCACTGTACC	5-10-5	91	14973	14992	1020
						15254	15273	
						15379	15398	
						15517	15536	
						15647	15666	
						15849	15868	
						15979	15998	
547618	n/a	n/a	ACTGTCCTATATCACTGTAC	5-10-5	87	14974	14993	1021
						15255	15274	
						15380	15399	
						15518	15537	
						15648	15667	
						15850	15869	
						15980	15999	
547619	n/a	n/a	TCCTATAACAGTATCACTGT	5-10-5	70	14989	15008	1022
						15395	15414	
547620	n/a	n/a	TTCCTATAACAGTATCACTG	5-10-5	65	14990	15009	1023
						15396	15415	
547621	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAACAGT	5-10-5	12	14997	15016	1024
						15403	15422	
547622	n/a	n/a	GTCACTGTACCTATAACTCT	5-10-5	88	15030	15049	1025
						15436	15455	
547623	n/a	n/a	TGTCACTGTACCTATAACTC	5-10-5	81	15031	15050	1026
						15437	15456	
547624	n/a	n/a	ATGTCACTGTACCTATAACT	5-10-5	64	15032	15051	1027
						15438	15457	

[2019] 表136

[2020]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	% 抑制	基序	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO

[2021]

531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	93	5-10-5	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546885	n/a	n/a	TATGTCACTGTACCTATAAC	46	5-10-5	15033	15052	1028
						15439	15458	
546886	n/a	n/a	CTATGTCACTGTACCTATAA	80	5-10-5	15034	15053	1029
						15440	15459	
546887	n/a	n/a	CCTATGTCACTGTACCTATA	82	5-10-5	15035	15054	1030
						15441	15460	
546888	n/a	n/a	TCCTATGTCACTGTACCTAT	78	5-10-5	15036	15055	1031
						15442	15461	
546889	n/a	n/a	GTCCTATGTCACTGTACCTA	93	5-10-5	15037	15056	1032
						15443	15462	
546890	n/a	n/a	TGTCCTATGTCACTGTACCT	78	5-10-5	15038	15057	1033
						15444	15463	
546891	n/a	n/a	CTGTCCTATGTCACTGTACC	81	5-10-5	15039	15058	1034
						15445	15464	
546892	n/a	n/a	ACTGTCCTATGTCACTGTAC	82	5-10-5	15040	15059	1035
						15446	15465	
546893	n/a	n/a	CACTGTCCTATGTCACTGTA	70	5-10-5	15041	15060	1036
						15447	15466	
546894	n/a	n/a	TCACTGTCCTATGTCACTGT	91	5-10-5	15042	15061	1037
						15448	15467	
546895	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATGTCACT	77	5-10-5	15044	15063	1038
						15450	15469	
546896	n/a	n/a	GTATCACTGTCCTATGTCAC	75	5-10-5	15045	15064	1039
						15451	15470	
546897	n/a	n/a	AGTATCACTGTCCTATGTCA	90	5-10-5	15046	15065	1040
						15452	15471	
546898	n/a	n/a	AACAGTATCACTGTCCTATG	91	5-10-5	15049	15068	1041

[2022]

						15455	15474	
546899	n/a	n/a	CTACCTATAACTCTAACAGT	27	5-10-5	15096	15115	1042
546901	n/a	n/a	ACTGTCCTATAACTATAACA	56	5-10-5	15170	15189	1043
						15576	15595	
						15706	15725	
						16005	16024	
						16076	16095	
						16101	16120	
						16154	16173	
546902	n/a	n/a	CACTGTCCTATAACTATAAC	71	5-10-5	15171	15190	1044
						15577	15596	
						15707	15726	
						16006	16025	
						16077	16096	
						16102	16121	
						16155	16174	
546903	n/a	n/a	CCTATATCACTGTACCTATA	91	5-10-5	15250	15269	1045
						15375	15394	
						15513	15532	
						15643	15662	
						15845	15864	
						15975	15994	
546904	n/a	n/a	TCCTATATCACTGTACCTAT	80	5-10-5	15251	15270	1046
						15376	15395	
						15514	15533	
						15644	15663	
						15846	15865	
						15976	15995	
546905	n/a	n/a	TACCTATAACAGTATCACTG	65	5-10-5	15363	15382	1047
546907	n/a	n/a	ATAACTATAACAGTATCACC	37	5-10-5	15769	15788	1048
546908	n/a	n/a	TCACTGTACCTATAACTATA	77	5-10-5	15780	15799	1049
						16252	16271	
546909	n/a	n/a	AACAATATCACTGTACCTTT	44	5-10-5	16060	16079	1050
546910	n/a	n/a	TAACAATATCACTGTACCTT	82	5-10-5	16061	16080	1051
546911	n/a	n/a	GTCCTATAACTATAACAATA	52	5-10-5	16073	16092	1052
						16098	16117	
						16151	16170	
547625	n/a	n/a	CAGTATCACTGTCCTATGTC	79	5-10-5	15047	15066	1053
						15453	15472	
547626	n/a	n/a	ACAGTATCACTGTCCTATGT	91	5-10-5	15048	15067	1054
						15454	15473	
547627	n/a	n/a	TCTACCTATAACTCTAACAG	71	5-10-5	15097	15116	1055
547628	n/a	n/a	CTCTACCTATAACTCTAACA	34	5-10-5	15098	15117	1056
547629	n/a	n/a	ACTCTACCTATAACTCTAAC	0	5-10-5	15099	15118	1057

[2023]

547630	n/a	n/a	ACTGTCCTATATCACTCTAC	76	5-10-5	15112	15131	1058
547631	n/a	n/a	CACTGTCCTATATCACTCTA	85	5-10-5	15113	15132	1059
547632	n/a	n/a	TCACTGTCCTATATCACTCT	87	5-10-5	15114	15133	1060
547633	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATATCACTC	87	5-10-5	15115	15134	1061
547634	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTTCTA	72	5-10-5	15148	15167	1062
547635	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTTCT	53	5-10-5	15149	15168	1063
547636	n/a	n/a	GTATCACTGTACTAGTTTTC	86	5-10-5	15150	15169	1064
547637	n/a	n/a	AGTATCACTGTACTAGTTTT	88	5-10-5	15151	15170	1065
547638	n/a	n/a	ATAACAGTATCACTGTACTA	87	5-10-5	15156	15175	1066
						15358	15377	
						15562	15581	
						15692	15711	
						15894	15913	
547639	n/a	n/a	GTCCTATAACTATAACAGTA	72	5-10-5	15167	15186	1067
						15573	15592	
						15703	15722	
						16002	16021	
547640	n/a	n/a	TGTCCTATAACTATAACAGT	13	5-10-5	15168	15187	1068
						15574	15593	
						15704	15723	
						16003	16022	
547641	n/a	n/a	CTGTCCTATAACTATAACAG	43	5-10-5	15169	15188	1069
						15575	15594	
						15705	15724	
						16004	16023	
547642	n/a	n/a	TCACTGTCCTATAACTATAA	72	5-10-5	15172	15191	1070
						15578	15597	
						15708	15727	
						16007	16026	
						16078	16097	
						16103	16122	
						16156	16175	
547643	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATAACTATA	72	5-10-5	15173	15192	1071
						15579	15598	
						15709	15728	
						16008	16027	
						16079	16098	
						16104	16123	
						16157	16176	
						16176	16195	
547644	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATAACTAT	51	5-10-5	15174	15193	1072
						15580	15599	
						15710	15729	
						16009	16028	

[2024]

						16080	16099	
						16158	16177	
						16177	16196	
						16228	16247	
547645	n/a	n/a	ATATCACTGTCCTATAACTA	60	5-10-5	15175	15194	1073
						15581	15600	
						15711	15730	
						16010	16029	
						16081	16100	
						16159	16178	
						16178	16197	
						16229	16248	
547646	n/a	n/a	CTATATCACTGTACCTATAA	23	5-10-5	15249	15268	1074
						15374	15393	
						15512	15531	
						15642	15661	
						15844	15863	
						15974	15993	
547647	n/a	n/a	GTCCTATATCACTGTACCTA	92	5-10-5	15252	15271	1075
						15377	15396	
						15515	15534	
						15645	15664	
						15847	15866	
						15977	15996	
547648	n/a	n/a	CCTATAACAGTATCACTGTA	83	5-10-5	15361	15380	1076
547649	n/a	n/a	ACCTATAACAGTATCACTGT	73	5-10-5	15362	15381	1077
547650	n/a	n/a	GTACCTATAACAGTATCACT	32	5-10-5	15364	15383	1078
547651	n/a	n/a	TGTACCTATAACAGTATCAC	48	5-10-5	15365	15384	1079
547652	n/a	n/a	TCACTGTACCTATAACAGTA	59	5-10-5	15369	15388	1080
547653	n/a	n/a	ATCACTGTACCTATAACAGT	57	5-10-5	15370	15389	1081
547654	n/a	n/a	TATCACTGTACCTATAACAG	53	5-10-5	15371	15390	1082
547655	n/a	n/a	AATATCACTGTCCTATAACT	37	5-10-5	15582	15601	1083
						16011	16030	
						16082	16101	
						16179	16198	
						16230	16249	
547656	n/a	n/a	CAATATCACTGTCCTATAAC	42	5-10-5	15583	15602	1084
						16083	16102	
						16180	16199	
						16231	16250	
547657	n/a	n/a	ACAATATCACTGTCCTATAA	43	5-10-5	15584	15603	1085
						16084	16103	
						16181	16200	
						16232	16251	

[2025]

547658	n/a	n/a	CGTACTAGTTTCCTATAACT	68	5-10-5	15750	15769	1086
547659	n/a	n/a	ACTATAACAGTATCACCGTA	80	5-10-5	15766	15785	1087
547660	n/a	n/a	AACTATAACAGTATCACCGT	68	5-10-5	15767	15786	1088
547661	n/a	n/a	TAACTATAACAGTATCACCG	80	5-10-5	15768	15787	1089
547662	n/a	n/a	ACCTATAACTATAACAGTAT	0	5-10-5	15773	15792	1090
547663	n/a	n/a	TACCTATAACTATAACAGTA	10	5-10-5	15774	15793	1091
547664	n/a	n/a	GTACCTATAACTATAACAGT	2	5-10-5	15775	15794	1092
547665	n/a	n/a	TGTACCTATAACTATAACAG	10	5-10-5	15776	15795	1093
547666	n/a	n/a	ATCACTGTACCTATAACTAT	71	5-10-5	15781	15800	1094
						16253	16272	
547667	n/a	n/a	TATCACTGTACCTATAACTA	55	5-10-5	15782	15801	1095
547668	n/a	n/a	CAACTATAACAGTATCACTG	44	5-10-5	15899	15918	1096
547669	n/a	n/a	ACAACTATAACAGTATCACT	0	5-10-5	15900	15919	1097
547670	n/a	n/a	TACAACTATAACAGTATCAC	0	5-10-5	15901	15920	1098
547671	n/a	n/a	CTACAACTATAACAGTATCA	0	5-10-5	15902	15921	1099
547672	n/a	n/a	CAATATCACTGTCCTACAAC	36	5-10-5	15915	15934	1100
547673	n/a	n/a	GAATATCACTGTCCTATAAC	21	5-10-5	16012	16031	1101
547674	n/a	n/a	ACAATATCACTGTACCTTTA	53	5-10-5	16059	16078	1102
547675	n/a	n/a	TGTCCTATAACTATAACAAT	10	5-10-5	16074	16093	1103
						16099	16118	
						16152	16171	
547676	n/a	n/a	CTGTCCTATAACTATAACAA	41	5-10-5	16075	16094	1104
						16100	16119	
						16153	16172	

[2026] 表137

[2027]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	93	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	

[2028]

						15613 15685 15815 15887 15945	15632 15704 15834 15906 15964	
546529	n/a	n/a	GCACCTGGCAGAACAGTACC	5-10-5	65	26419	26438	1105
546578	n/a	n/a	GACAGTGGGCCAGAGCCTTG	5-10-5	73	26686	26705	1106
546912	n/a	n/a	ACATCACTGTCCTATAACTA	5-10-5	26	16106	16125	1107
546913	n/a	n/a	GTACCTATATCACTGTAACT	5-10-5	38	16126	16145	1108
546914	n/a	n/a	ATATCACTGTACCTATATCA	5-10-5	52	16134	16153	1109
546915	n/a	n/a	TCACTGTCCTATAACTATAT	5-10-5	39	16175	16194	1110
546916	n/a	n/a	CGTCACTGTACCTATAACTG	5-10-5	92	16203	16222	1111
546917	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATAACTATT	5-10-5	63	16227	16246	1112
546918	n/a	n/a	AACATCACTGTACCTATAAC	5-10-5	14	16256	16275	1113
546926	n/a	n/a	GCCATCCAGGGTGCTCTCCC	5-10-5	81	16839	16858	1114
546931	n/a	n/a	GCCCCCGGAGCACCTTCACT	5-10-5	58	17205	17224	1115
546935	n/a	n/a	CGTGGTTAGCCTGACATCTC	5-10-5	86	17412	17431	1116
546939	n/a	n/a	GCCATCTGGTTAGCCTCCGA	5-10-5	89	17664	17683	1117
546942	n/a	n/a	TACACTGAACCCCCTTAGGC	5-10-5	56	18570	18589	1118
546943	n/a	n/a	CAGTTTGGCCTTTCCATCTC	5-10-5	54	18819	18838	1119
546944	n/a	n/a	GCCACTAACCCACCTCTTAA	5-10-5	42	19140	19159	1120
546946	n/a	n/a	ACTCCCATCTACTCCCCCAT	5-10-5	41	19291	19310	1121
546954	n/a	n/a	CTGCTGATTGTGTCTGGCTC	5-10-5	71	20235	20254	1122
546955	n/a	n/a	ACAAGGCTTCGAGGACAGCC	5-10-5	49	20339	20358	1123
546964	n/a	n/a	GCGATTCCTTGCCTCTGCTG	5-10-5	53	21550	21569	1124
546967	n/a	n/a	CACCGCGCGAATGCCTGCCT	5-10-5	93	22657	22676	1125
546969	n/a	n/a	ATCCAACCTCTCTCCCTATC	5-10-5	53	22901	22920	1126
546970	n/a	n/a	GCCCAAGCCTACATGCATAC	5-10-5	61	23426	23445	1127
546975	n/a	n/a	GGCCTGGATACAGCCTTTCT	5-10-5	70	23825	23844	1128
546977	n/a	n/a	GTCCCGAAGAGTCAAGTCCA	5-10-5	76	24253	24272	1129
546979	n/a	n/a	ACTGTTGTCCATAGCAGCAT	5-10-5	71	24504	24523	1130
546980	n/a	n/a	AGCCCTCAATTGTTGCTGGT	5-10-5	79	24664	24683	1131
546983	n/a	n/a	GATGACCTGCAGATGCACAG	5-10-5	74	24978	24997	1132
546986	n/a	n/a	CAGGATAGAACTGATGGTCC	5-10-5	91	25318	25337	1133
546990	n/a	n/a	AGAACAGGAGACAATCCACT	5-10-5	49	25680	25699	1134
546994	n/a	n/a	GTTCATGTGGCAACCTGTGA	5-10-5	58	26112	26131	1135
547677	n/a	n/a	CATCACTGTCCTATAACTAT	5-10-5	62	16105	16124	1136
547678	n/a	n/a	TACCTATATCACTGTAACTA	5-10-5	21	16125	16144	1137
547679	n/a	n/a	TGTACCTATATCACTGTAAC	5-10-5	28	16127	16146	1138
547680	n/a	n/a	TATCACTGTACCTATATCAC	5-10-5	41	16133	16152	1139
547681	n/a	n/a	AATATCACTGTACCTATATC	5-10-5	6	16135	16154	1140
547682	n/a	n/a	CAATATCACTGTACCTATAT	5-10-5	20	16136	16155	1141
547683	n/a	n/a	ACTATATCACTGTCCTATAA	5-10-5	33	16162	16181	1142
547684	n/a	n/a	TAACTATATCACTGTCCTAT	5-10-5	43	16164	16183	1143

[2029]

547685	n/a	n/a	ATAACTATATCACTGTCCTA	5-10-5	35	16165	16184	1144
547686	n/a	n/a	CTGTCCTATAACTATATCAC	5-10-5	36	16172	16191	1145
547687	n/a	n/a	ACTGTCCTATAACTATATCA	5-10-5	41	16173	16192	1146
547688	n/a	n/a	CACTGTCCTATAACTATATC	5-10-5	47	16174	16193	1147
547689	n/a	n/a	GTAACAATATCACTGTCCTA	5-10-5	73	16184	16203	1148
547690	n/a	n/a	CTGTAACAATATCACTGTCC	5-10-5	76	16186	16205	1149
547691	n/a	n/a	ACTGTAACAATATCACTGTC	5-10-5	36	16187	16206	1150
547692	n/a	n/a	CACTGTACCTATAACTGTAA	5-10-5	47	16200	16219	1151
547693	n/a	n/a	TCACTGTACCTATAACTGTA	5-10-5	61	16201	16220	1152
547694	n/a	n/a	GTCACTGTACCTATAACTGT	5-10-5	92	16202	16221	1153
547695	n/a	n/a	ACTGTCCTATAACTATTACA	5-10-5	31	16224	16243	1154
547696	n/a	n/a	CACTGTCCTATAACTATTAC	5-10-5	26	16225	16244	1155
547697	n/a	n/a	TCACTGTCCTATAACTATTA	5-10-5	63	16226	16245	1156
547698	n/a	n/a	ACCTATAACTATAACAATAT	5-10-5	0	16245	16264	1157
547699	n/a	n/a	TACCTATAACTATAACAATA	5-10-5	10	16246	16265	1158
547700	n/a	n/a	GTACCTATAACTATAACAAT	5-10-5	0	16247	16266	1159
547701	n/a	n/a	CATCACTGTACCTATAACTA	5-10-5	49	16254	16273	1160
547702	n/a	n/a	ACATCACTGTACCTATAACT	5-10-5	44	16255	16274	1161
547703	n/a	n/a	CAACATCACTGTACCTATAA	5-10-5	25	16257	16276	1162
547704	n/a	n/a	ACATCTTGTCATTAACATCC	5-10-5	61	16435	16454	1163
547705	n/a	n/a	GCACCCAATACAGGGCCAGG	5-10-5	69	16512	16531	1164
547706	n/a	n/a	TGCCTCCTGGCAGCCTTCAA	5-10-5	73	16694	16713	1165
547707	n/a	n/a	TGAAAAGCCACGCCCTTAGC	5-10-5	32	16975	16994	1166
547708	n/a	n/a	GCCAGGAGACAGCCCTACTC	5-10-5	67	17055	17074	1167
547709	n/a	n/a	AGCCCAATGTCCTAACCTGT	5-10-5	76	17791	17810	1168
547710	n/a	n/a	TGCGGTTATATGGGCTGAAG	5-10-5	85	19540	19559	1169
547711	n/a	n/a	CCTTTAGCCACTCCTCTTGC	5-10-5	45	20061	20080	1170
547712	n/a	n/a	CCCCATGGTACCAAAGCCAT	5-10-5	79	20528	20547	1171
547713	n/a	n/a	CTCAATGCCACCCTTTCCCC	5-10-5	37	20880	20899	1172
547714	n/a	n/a	CTGTCTAACTGGCCTGGCTG	5-10-5	19	21326	21345	1173
547715	n/a	n/a	GGTCAGAAGGCCTCTTATTC	5-10-5	21	21750	21769	1174
547716	n/a	n/a	CCATCTGTCCCCTCAATCCC	5-10-5	9	22197	22216	1175
547717	n/a	n/a	ACTCTGGCACTGGTCATGGA	5-10-5	54	22761	22780	1176
547718	n/a	n/a	ATAAAGTGCGATTAAGCCCC	5-10-5	86	23515	23534	1177
547719	n/a	n/a	TACCAAGCTTGTAGAAGGGA	5-10-5	69	23633	23652	1178
547720	n/a	n/a	GAAAGACGGCCAATGGGAAA	5-10-5	8	24177	24196	1179
547721	n/a	n/a	CTCTATCAAAATCCTGCTGC	5-10-5	68	25527	25546	1180
547722	n/a	n/a	CTCCAGTCACCACCATTGCC	5-10-5	80	25860	25879	1181

[2030] 表138

[2031]

ISIS NO	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO

[2032]

	起始位点	终止位点				起始位点	终止位点	
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	91	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546599	n/a	n/a	AAGAGTAAGCCTTCACAGGG	5-10-5	82	27583	27602	1182
546606	n/a	n/a	CTCACCAGAGTTGTCCCCAG	5-10-5	0	27722	27741	1183
546999	n/a	n/a	GCAGCTCACACCCAAAAAGC	5-10-5	29	27004	27023	1184
547000	n/a	n/a	TCTGTTACCTTGAGGATTGT	5-10-5	63	27276	27295	1185
547006	n/a	n/a	CGCCATCTGCCCTGTACAGA	5-10-5	39	28248	28267	1186
547008	n/a	n/a	TTGGTGGTGGGATTGGTGGT	5-10-5	81	28333	28352	1187
						28388	28407	
						28443	28462	
						28608	28627	
						28620	28639	
547009	n/a	n/a	AATTGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	73	28335	28354	1188
547010	n/a	n/a	GAATTGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	39	28336	28355	1189
547011	n/a	n/a	GGCAGGATTGGTGGTGGAAT	5-10-5	22	28352	28371	1190
547013	n/a	n/a	TGAGATTGGTGGTGGGTGGC	5-10-5	0	28369	28388	1191
547015	n/a	n/a	GGTGGTGGGATTGGTGCTGA	5-10-5	55	28429	28448	1192
547016	n/a	n/a	GTAGGTGGTGGGATTGGTGG	5-10-5	62	28456	28475	1193
						28535	28554	
547017	n/a	n/a	GGTAGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	61	28457	28476	1194
						28536	28555	
547018	n/a	n/a	GGTGGCGGGATTGGTGGTGG	5-10-5	58	28477	28496	1195
						28556	28575	
547019	n/a	n/a	GATCGGTGGTGGGATTGGTC	5-10-5	83	28500	28519	1196
						28579	28598	
547020	n/a	n/a	GGATCGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	47	28501	28520	1197
						28580	28599	

[2033]

547021	n/a	n/a	TTGGTGGCGGGATCGGTGGT	5-10-5	57	28510	28529	1198
						28589	28608	
547022	n/a	n/a	ATTGGTGGCGGGATCGGTGG	5-10-5	69	28511	28530	1199
547023	n/a	n/a	GATTGGTGGCGGGATCGGTG	5-10-5	91	28512	28531	1200
547024	n/a	n/a	GGATTGGTGGCGGGATCGGT	5-10-5	56	28513	28532	1201
547025	n/a	n/a	TGGTGGTGGGATTGGTGGTT	5-10-5	72	28607	28626	1202
547029	n/a	n/a	TCTTCTAGGGCCACACCTCT	5-10-5	50	28891	28910	1203
547035	n/a	n/a	TGGTCCCAAATTGGAGTGCA	5-10-5	40	29383	29402	1204
547039	n/a	n/a	TCTCTATACAGCTGGGCACA	5-10-5	0	29997	30016	1205
547049	n/a	n/a	CACTTCCCAGCAACCCTCAC	5-10-5	20	30765	30784	1206
547055	n/a	n/a	GCTCCTGGCAGCAATGACCC	5-10-5	70	31104	31123	1207
547059	n/a	n/a	GGGTATCTTCACTGTTCCAG	5-10-5	12	31540	31559	1208
547063	n/a	n/a	CGTCATGCTTACCTTTCTCC	5-10-5	23	31955	31974	1209
547069	n/a	n/a	GCCCTCCGAGCTTTGGCAAC	5-10-5	35	32581	32600	1210
547071	n/a	n/a	GCAGCCCCCCAGAAATCCCA	5-10-5	27	32708	32727	1211
547076	n/a	n/a	TCTCAAGCAGCCTATTGTGT	5-10-5	14	33263	33282	1212
547080	n/a	n/a	GTGCAAGACCTTGCTTGCCA	5-10-5	54	33657	33676	1213
547081	n/a	n/a	CTGTAGTCCACTACACAGCA	5-10-5	83	33801	33820	1214
547082	n/a	n/a	TCTCCCTGAGTCACAGTGGA	5-10-5	64	33881	33900	1215
547085	n/a	n/a	CCAGGTGCAGCACGGAGAGG	5-10-5	44	34479	34498	1216
547723	n/a	n/a	TAGAATGGCAGGGTTCTGTG	5-10-5	53	27357	27376	1217
547724	n/a	n/a	GATGCATCCAACACTTACCC	5-10-5	16	28059	28078	1218
547725	n/a	n/a	ATTGGTGGTGGGATTGGTGG	5-10-5	26	28334	28353	1219
						28389	28408	
						28444	28463	
						28523	28542	
						28609	28628	
						28621	28640	
547726	n/a	n/a	GCAGGATTGGTGGTGGAATT	5-10-5	0	28351	28370	1220
547727	n/a	n/a	TGGCAGGATTGGTGGTGGAA	5-10-5	0	28353	28372	1221
547728	n/a	n/a	GAGATTGGTGGTGGGTGGCA	5-10-5	88	28368	28387	1222
547729	n/a	n/a	GTGAGATTGGTGGTGGGTGG	5-10-5	45	28370	28389	1223
547730	n/a	n/a	GATTGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	60	28390	28409	1224
						28433	28452	
						28445	28464	
						28524	28543	
						28610	28629	
						28622	28641	
547731	n/a	n/a	GGATTGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	49	28391	28410	1225
						28434	28453	
						28446	28465	
						28525	28544	
						28611	28630	
						28623	28642	

[2034]

547732	n/a	n/a	AGGATTGGTGGTGGGATTGG	5-10-5	0	28392	28411	1226
547733	n/a	n/a	TAGGATTGGTGGTGGGATTG	5-10-5	0	28393	28412	1227
547734	n/a	n/a	GTAGGATTGGTGGTGGGATT	5-10-5	14	28394	28413	1228
547735	n/a	n/a	GGTAGGATTGGTGGTGGGAT	5-10-5	39	28395	28414	1229
547736	n/a	n/a	TGGTAGGATTGGTGGTGGGA	5-10-5	54	28396	28415	1230
547737	n/a	n/a	TGGTGGTGGGATTGGTGCTG	5-10-5	59	28430	28449	1231
547738	n/a	n/a	TTGGTGGTGGGATTGGTGCT	5-10-5	41	28431	28450	1232
547739	n/a	n/a	ATTGGTGGTGGGATTGGTGC	5-10-5	12	28432	28451	1233
547740	n/a	n/a	AGGTGGTGGGATTGGTGGTG	5-10-5	30	28454	28473	1234
						28533	28552	
547741	n/a	n/a	TAGGTGGTGGGATTGGTGGT	5-10-5	47	28455	28474	1235
						28534	28553	
547742	n/a	n/a	ATCGGTGGTGGGATTGGTCG	5-10-5	57	28499	28518	1236
						28578	28597	
547743	n/a	n/a	GGTGGTGGGATTGGTGGCGG	5-10-5	61	28520	28539	1237
547744	n/a	n/a	TGGTGGTGGGATTGGTGGCG	5-10-5	65	28521	28540	1238
547745	n/a	n/a	TTGGTGGTGGGATTGGTGGC	5-10-5	55	28522	28541	1239
547746	n/a	n/a	GTTGGTGGCGGGATCGGTGG	5-10-5	0	28590	28609	1240
547748	n/a	n/a	GGTTGGTGGCGGGATCGGTG	5-10-5	78	28591	28610	1241
547750	n/a	n/a	TGGTTGGTGGCGGGATCGGT	5-10-5	41	28592	28611	1242
547752	n/a	n/a	GTGGTTGGTGGCGGGATCGG	5-10-5	41	28593	28612	1243
547754	n/a	n/a	GGGATTGGTGGTTGGTGGCG	5-10-5	47	28600	28619	1244
547756	n/a	n/a	GGGTCTTGCTCCACCCACAT	5-10-5	49	29244	29263	1245
547758	n/a	n/a	CCAAGTAGTGCAAGGCATGT	5-10-5	24	29540	29559	1246
547760	n/a	n/a	ATCATGCTTACTGCAAGTGA	5-10-5	19	30219	30238	1247
547762	n/a	n/a	TGAAACTGGGCAGTCCTTCC	5-10-5	0	30417	30436	1248
547764	n/a	n/a	CCACCTTCTTACATATGCTA	5-10-5	24	30644	30663	1249
547766	n/a	n/a	GCCTCTCAGACGGCACAGAC	5-10-5	0	30902	30921	1250
547768	n/a	n/a	TTGCCCTCACACATTCGAAT	5-10-5	0	30977	30996	1251
547770	n/a	n/a	TGCTTTCTGCCCAACCTCTA	5-10-5	48	31727	31746	1252
547772	n/a	n/a	CTGTGCTCCCGGCCATTAGC	5-10-5	0	32312	32331	1253
547774	n/a	n/a	GAGACAGTTTGGCAAGCTAC	5-10-5	46	32389	32408	1254
547776	n/a	n/a	GGAGAGAGACGGCACCCTGT	5-10-5	48	32828	32847	1255
547778	n/a	n/a	TCACCTGTGAGTAACCAATA	5-10-5	53	33085	33104	1256
547780	n/a	n/a	CCCCTCTTAAATAGCACATG	5-10-5	67	33441	33460	1257
547782	n/a	n/a	CCAAGTATCTCATGTGCCTG	5-10-5	67	33580	33599	1258

[2035] 表139

[2036]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	基序	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO

[2037]

531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
548706	n/a	n/a	CTAGTTTCCTATAACT	3-10-3	0	14738	14753	1259
						14809	14824	
						14880	14895	
						14939	14954	
						15071	15086	
						15214	15229	
						15286	15301	
						15345	15360	
						15477	15492	
						15549	15564	
						15607	15622	
						15679	15694	
						15750	15765	
						15809	15824	
						15881	15896	
						15939	15954	
548707	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAAC	3-10-3	10	14739	14754	1260
						14810	14825	
						14881	14896	
						14940	14955	
						15000	15015	
						15072	15087	
						15215	15230	
						15287	15302	
						15346	15361	
						15406	15421	
						15478	15493	

[2038]

						15550	15565	
						15608	15623	
						15680	15695	
						15751	15766	
						15810	15825	
						15882	15897	
						15940	15955	
548708	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAA	3-10-3	0	14740	14755	1261
						14811	14826	
						14882	14897	
						14941	14956	
						15001	15016	
						15073	15088	
						15216	15231	
						15288	15303	
						15347	15362	
						15407	15422	
						15479	15494	
						15551	15566	
						15609	15624	
						15681	15696	
						15752	15767	
						15811	15826	
						15883	15898	
						15941	15956	
548709	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATA	3-10-3	0	14741	14756	1262
						14812	14827	
						14883	14898	
						14942	14957	
						15002	15017	
						15074	15089	
						15217	15232	
						15289	15304	
						15348	15363	
						15408	15423	
						15480	15495	
						15552	15567	
						15610	15625	
						15682	15697	
						15753	15768	
						15812	15827	
						15884	15899	
						15942	15957	
548710	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTAT	3-10-3	0	14742	14757	1263

[2039]

						14813	14828	
						14884	14899	
						14943	14958	
						15003	15018	
						15075	15090	
						15218	15233	
						15290	15305	
						15349	15364	
						15409	15424	
						15481	15496	
						15553	15568	
						15611	15626	
						15683	15698	
						15813	15828	
						15885	15900	
						15943	15958	
548711	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTA	3-10-3	21	14743	14758	1264
						14814	14829	
						14885	14900	
						14944	14959	
						15004	15019	
						15076	15091	
						15219	15234	
						15291	15306	
						15350	15365	
						15410	15425	
						15482	15497	
						15554	15569	
						15612	15627	
						15684	15699	
						15814	15829	
						15886	15901	
						15944	15959	
548712	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCT	3-10-3	9	14744	14759	1265
						14815	14830	
						14886	14901	
						14945	14960	
						15005	15020	
						15077	15092	
						15220	15235	
						15292	15307	
						15351	15366	
						15411	15426	
						15483	15498	

[2040]

						15555	15570	
						15613	15628	
						15685	15700	
						15815	15830	
						15887	15902	
						15945	15960	
548713	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCC	3-10-3	33	14745	14760	1266
						14816	14831	
						14887	14902	
						14946	14961	
						15006	15021	
						15078	15093	
						15221	15236	
						15293	15308	
						15352	15367	
						15412	15427	
						15484	15499	
						15556	15571	
						15614	15629	
						15686	15701	
						15816	15831	
						15888	15903	
						15946	15961	
548714	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	3-10-3	15	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548715	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTT	3-10-3	0	14747	14762	1268
						14818	14833	
						14889	14904	
						14948	14963	

[2041]

						15008	15023	
						15080	15095	
						15152	15167	
						15223	15238	
						15295	15310	
						15354	15369	
						15414	15429	
						15486	15501	
						15558	15573	
						15616	15631	
						15688	15703	
						15818	15833	
						15890	15905	
						15948	15963	
	548716	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTT	3-10-3	10	14748	14763	1269
							14819	14834	
							14890	14905	
							14949	14964	
							15009	15024	
							15081	15096	
							15153	15168	
							15224	15239	
							15296	15311	
							15355	15370	
							15415	15430	
							15487	15502	
							15559	15574	
							15617	15632	
							15689	15704	
							15819	15834	
							15891	15906	
							15949	15964	
	548717	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACT	3-10-4	0	14738	14754	1270
							14809	14825	
							14880	14896	
							14939	14955	
							15071	15087	
							15214	15230	
							15286	15302	
							15345	15361	
							15477	15493	
							15549	15565	
							15607	15623	
							15679	15695	

[2042]

						15750	15766	
						15809	15825	
						15881	15897	
						15939	15955	
548718	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAAC	3-10-4	0	14739	14755	1271
						14810	14826	
						14881	14897	
						14940	14956	
						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
548719	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATAA	3-10-4	0	14740	14756	1272
						14811	14827	
						14882	14898	
						14941	14957	
						15001	15017	
						15073	15089	
						15216	15232	
						15288	15304	
						15347	15363	
						15407	15423	
						15479	15495	
						15551	15567	
						15609	15625	
						15681	15697	
						15752	15768	
						15811	15827	
						15883	15899	
						15941	15957	
548720	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATA	3-10-4	0	14741	14757	1273
						14812	14828	
						14883	14899	
						14942	14958	

[2043]

						15002	15018	
						15074	15090	
						15217	15233	
						15289	15305	
						15348	15364	
						15408	15424	
						15480	15496	
						15552	15568	
						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
	548721	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTAT	3-10-4	27	14742	14758	1274
							14813	14829	
							14884	14900	
							14943	14959	
							15003	15019	
							15075	15091	
							15218	15234	
							15290	15306	
							15349	15365	
							15409	15425	
							15481	15497	
							15553	15569	
							15611	15627	
							15683	15699	
							15813	15829	
							15885	15901	
							15943	15959	
	548722	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCTA	3-10-4	26	14743	14759	1275
							14814	14830	
							14885	14901	
							14944	14960	
							15004	15020	
							15076	15092	
							15219	15235	
							15291	15307	
							15350	15366	
							15410	15426	
							15482	15498	
							15554	15570	
							15612	15628	
							15684	15700	

[2044]

						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	
548723	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCCT	3-10-4	62	14744	14760	1276
						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	
						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
548724	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTCC	3-10-4	61	14745	14761	1277
						14816	14832	
						14887	14903	
						14946	14962	
						15006	15022	
						15078	15094	
						15221	15237	
						15293	15309	
						15352	15368	
						15412	15428	
						15484	15500	
						15556	15572	
						15614	15630	
						15686	15702	
						15816	15832	
						15888	15904	
						15946	15962	
548725	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTC	3-10-4	32	14746	14762	1278
						14817	14833	
						14888	14904	
						14947	14963	
						15007	15023	
						15079	15095	
						15222	15238	

[2045]

						15294	15310	
						15353	15369	
						15413	15429	
						15485	15501	
						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	
						15889	15905	
						15947	15963	
	548726	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTT	3-10-4	21	14747	14763	1279
							14818	14834	
							14889	14905	
							14948	14964	
							15008	15024	
							15080	15096	
							15152	15168	
							15223	15239	
							15295	15311	
							15354	15370	
							15414	15430	
							15486	15502	
							15558	15574	
							15616	15632	
							15688	15704	
							15818	15834	
							15890	15906	
							15948	15964	
	548727	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACT	4-10-3	0	14738	14754	1270
							14809	14825	
							14880	14896	
							14939	14955	
							15071	15087	
							15214	15230	
							15286	15302	
							15345	15361	
							15477	15493	
							15549	15565	
							15607	15623	
							15679	15695	
							15750	15766	
							15809	15825	
							15881	15897	
							15939	15955	

[2046]

548728	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAAC	4-10-3	0	14739	14755	1271
						14810	14826	
						14881	14897	
						14940	14956	
						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
548729	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATAA	4-10-3	13	14740	14756	1272
						14811	14827	
						14882	14898	
						14941	14957	
						15001	15017	
						15073	15089	
						15216	15232	
						15288	15304	
						15347	15363	
						15407	15423	
						15479	15495	
						15551	15567	
						15609	15625	
						15681	15697	
						15752	15768	
						15811	15827	
						15883	15899	
						15941	15957	
548730	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATA	4-10-3	0	14741	14757	1273
						14812	14828	
						14883	14899	
						14942	14958	
						15002	15018	
						15074	15090	
						15217	15233	
						15289	15305	

[2047]

						15348	15364	
						15408	15424	
						15480	15496	
						15552	15568	
						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
548731	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTAT	4-10-3	49	14742	14758	1274
						14813	14829	
						14884	14900	
						14943	14959	
						15003	15019	
						15075	15091	
						15218	15234	
						15290	15306	
						15349	15365	
						15409	15425	
						15481	15497	
						15553	15569	
						15611	15627	
						15683	15699	
						15813	15829	
						15885	15901	
						15943	15959	
548732	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCTA	4-10-3	36	14743	14759	1275
						14814	14830	
						14885	14901	
						14944	14960	
						15004	15020	
						15076	15092	
						15219	15235	
						15291	15307	
						15350	15366	
						15410	15426	
						15482	15498	
						15554	15570	
						15612	15628	
						15684	15700	
						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	
548733	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCCT	4-10-3	84	14744	14760	1276

[2048]

						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	
						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
	548734	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTCC	4-10-3	51	14745	14761	1277
							14816	14832	
							14887	14903	
							14946	14962	
							15006	15022	
							15078	15094	
							15221	15237	
							15293	15309	
							15352	15368	
							15412	15428	
							15484	15500	
							15556	15572	
							15614	15630	
							15686	15702	
							15816	15832	
							15888	15904	
							15946	15962	
	548735	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTC	4-10-3	48	14746	14762	1278
							14817	14833	
							14888	14904	
							14947	14963	
							15007	15023	
							15079	15095	
							15222	15238	
							15294	15310	
							15353	15369	
							15413	15429	
							15485	15501	

[2049]

						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	
						15889	15905	
						15947	15963	
548736	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTT	4-10-3	21	14747	14763	1279
						14818	14834	
						14889	14905	
						14948	14964	
						15008	15024	
						15080	15096	
						15152	15168	
						15223	15239	
						15295	15311	
						15354	15370	
						15414	15430	
						15486	15502	
						15558	15574	
						15616	15632	
						15688	15704	
						15818	15834	
						15890	15906	
						15948	15964	
548737	n/a	n/a	ACTAGTTTCCTATAACT	4-9-4	11	14738	14754	1270
						14809	14825	
						14880	14896	
						14939	14955	
						15071	15087	
						15214	15230	
						15286	15302	
						15345	15361	
						15477	15493	
						15549	15565	
						15607	15623	
						15679	15695	
						15750	15766	
						15809	15825	
						15881	15897	
						15939	15955	
548738	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAAC	4-9-4	0	14739	14755	1271
						14810	14826	
						14881	14897	
						14940	14956	

[2050]

						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
	548739	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATAA	4-9-4	0	14740	14756	1272
							14811	14827	
							14882	14898	
							14941	14957	
							15001	15017	
							15073	15089	
							15216	15232	
							15288	15304	
							15347	15363	
							15407	15423	
							15479	15495	
							15551	15567	
							15609	15625	
							15681	15697	
							15752	15768	
							15811	15827	
							15883	15899	
							15941	15957	
	548740	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATA	4-9-4	0	14741	14757	1273
							14812	14828	
							14883	14899	
							14942	14958	
							15002	15018	
							15074	15090	
							15217	15233	
							15289	15305	
							15348	15364	
							15408	15424	
							15480	15496	
							15552	15568	

[2051]

						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
548741	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTAT	4-9-4	69	14742	14758	1274
						14813	14829	
						14884	14900	
						14943	14959	
						15003	15019	
						15075	15091	
						15218	15234	
						15290	15306	
						15349	15365	
						15409	15425	
						15481	15497	
						15553	15569	
						15611	15627	
						15683	15699	
						15813	15829	
						15885	15901	
						15943	15959	
548742	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCTA	4-9-4	50	14743	14759	1275
						14814	14830	
						14885	14901	
						14944	14960	
						15004	15020	
						15076	15092	
						15219	15235	
						15291	15307	
						15350	15366	
						15410	15426	
						15482	15498	
						15554	15570	
						15612	15628	
						15684	15700	
						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	
548743	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCCT	4-9-4	80	14744	14760	1276
						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	

[2052]

						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
548744	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTCC	4-9-4	83	14745	14761	1277
						14816	14832	
						14887	14903	
						14946	14962	
						15006	15022	
						15078	15094	
						15221	15237	
						15293	15309	
						15352	15368	
						15412	15428	
						15484	15500	
						15556	15572	
						15614	15630	
						15686	15702	
						15816	15832	
						15888	15904	
						15946	15962	
548745	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTC	4-9-4	71	14746	14762	1278
						14817	14833	
						14888	14904	
						14947	14963	
						15007	15023	
						15079	15095	
						15222	15238	
						15294	15310	
						15353	15369	
						15413	15429	
						15485	15501	
						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	

[2053]

						15889	15905	
						15947	15963	
548746	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTT	4-9-4	40	14747	14763	1279
						14818	14834	
						14889	14905	
						14948	14964	
						15008	15024	
						15080	15096	
						15152	15168	
						15223	15239	
						15295	15311	
						15354	15370	
						15414	15430	
						15486	15502	
						15558	15574	
						15616	15632	
						15688	15704	
						15818	15834	
						15890	15906	
						15948	15964	
548747	n/a	n/a	TACTAGTTTCCTATAACT	4-10-4	2	14738	14755	1280
						14809	14826	
						14880	14897	
						14939	14956	
						15071	15088	
						15214	15231	
						15286	15303	
						15345	15362	
						15477	15494	
						15549	15566	
						15607	15624	
						15679	15696	
						15750	15767	
						15809	15826	
						15881	15898	
						15939	15956	
548748	n/a	n/a	GTACTAGTTTCCTATAAC	4-10-4	0	14739	14756	1281
						14810	14827	
						14881	14898	
						14940	14957	
						15000	15017	
						15072	15089	
						15215	15232	
						15287	15304	

[2054]

						15346	15363	
						15406	15423	
						15478	15495	
						15550	15567	
						15608	15625	
						15680	15697	
						15751	15768	
						15810	15827	
						15882	15899	
						15940	15957	
548749	n/a	n/a	TGTACTAGTTTCCTATAA	4-10-4	0	14740	14757	1282
						14811	14828	
						14882	14899	
						14941	14958	
						15001	15018	
						15073	15090	
						15216	15233	
						15288	15305	
						15347	15364	
						15407	15424	
						15479	15496	
						15551	15568	
						15609	15626	
						15681	15698	
						15811	15828	
						15883	15900	
						15941	15958	
548750	n/a	n/a	CTGTACTAGTTTCCTATA	4-10-4	62	14741	14758	1283
						14812	14829	
						14883	14900	
						14942	14959	
						15002	15019	
						15074	15091	
						15217	15234	
						15289	15306	
						15348	15365	
						15408	15425	
						15480	15497	
						15552	15569	
						15610	15627	
						15682	15699	
						15812	15829	
						15884	15901	
						15942	15959	

[2055]

548751	n/a	n/a	ACTGTACTAGTTTCCTAT	4-10-4	53	14742	14759	1284
						14813	14830	
						14884	14901	
						14943	14960	
						15003	15020	
						15075	15092	
						15218	15235	
						15290	15307	
						15349	15366	
						15409	15426	
						15481	15498	
						15553	15570	
						15611	15628	
						15683	15700	
						15813	15830	
						15885	15902	
						15943	15960	
548752	n/a	n/a	CACTGTACTAGTTTCCTA	4-10-4	89	14743	14760	1285
						14814	14831	
						14885	14902	
						14944	14961	
						15004	15021	
						15076	15093	
						15219	15236	
						15291	15308	
						15350	15367	
						15410	15427	
						15482	15499	
						15554	15571	
						15612	15629	
						15684	15701	
						15814	15831	
						15886	15903	
						15944	15961	
548753	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTCCT	4-10-4	82	14744	14761	1286
						14815	14832	
						14886	14903	
						14945	14962	
						15005	15022	
						15077	15094	
						15220	15237	
						15292	15309	
						15351	15368	
						15411	15428	

[2056]

						15483	15500	
						15555	15572	
						15613	15630	
						15685	15702	
						15815	15832	
						15887	15904	
						15945	15962	
548754	n/a	n/a	ATCACTGTACTAGTTTCC	4-10-4	77	14745	14762	1287
						14816	14833	
						14887	14904	
						14946	14963	
						15006	15023	
						15078	15095	
						15221	15238	
						15293	15310	
						15352	15369	
						15412	15429	
						15484	15501	
						15556	15573	
						15614	15631	
						15686	15703	
						15816	15833	
						15888	15905	
						15946	15963	
548755	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTC	4-10-4	20	14746	14763	1288
						14817	14834	
						14888	14905	
						14947	14964	
						15007	15024	
						15079	15096	
						15222	15239	
						15294	15311	
						15353	15370	
						15413	15430	
						15485	15502	
						15557	15574	
						15615	15632	
						15687	15704	
						15817	15834	
						15889	15906	
						15947	15964	
548756	n/a	n/a	GTATCACTGTACTAGTT	4-9-4	81	14748	14764	1289
						14819	14835	
						14890	14906	

[2057]

						14949	14965	
						15009	15025	
						15081	15097	
						15153	15169	
						15224	15240	
						15296	15312	
						15355	15371	
						15415	15431	
						15487	15503	
						15559	15575	
						15617	15633	
						15689	15705	
						15819	15835	
						15891	15907	
						15949	15965	
	548757	n/a	n/a	AGTATCACTGTACTAGT	4-9-4	87	14749	14765	1290
							14820	14836	
							14891	14907	
							14950	14966	
							15010	15026	
							15082	15098	
							15154	15170	
							15225	15241	
							15297	15313	
							15356	15372	
							15416	15432	
							15488	15504	
							15560	15576	
							15618	15634	
							15690	15706	
							15820	15836	
							15892	15908	
							15950	15966	
	548758	n/a	n/a	CAGTATCACTGTACTAG	4-9-4	97	14750	14766	1291
							14821	14837	
							14892	14908	
							14951	14967	
							15011	15027	
							15083	15099	
							15155	15171	
							15226	15242	
							15298	15314	
							15357	15373	
							15417	15433	

[2058]

						15489	15505	
						15561	15577	
						15619	15635	
						15691	15707	
						15821	15837	
						15893	15909	
						15951	15967	
548759	n/a	n/a	AACAGTATCACTGTACT	4-9-4	68	14752	14768	1292
						14823	14839	
						14894	14910	
						14953	14969	
						15013	15029	
						15085	15101	
						15157	15173	
						15228	15244	
						15300	15316	
						15359	15375	
						15419	15435	
						15491	15507	
						15563	15579	
						15621	15637	
						15693	15709	
						15823	15839	
						15895	15911	
						15953	15969	
548760	n/a	n/a	TAACAGTATCACTGTAC	4-9-4	53	14753	14769	1293
						14824	14840	
						14895	14911	
						14954	14970	
						15014	15030	
						15086	15102	
						15158	15174	
						15229	15245	
						15301	15317	
						15360	15376	
						15420	15436	
						15492	15508	
						15564	15580	
						15622	15638	
						15694	15710	
						15824	15840	
						15896	15912	
						15954	15970	
548761	n/a	n/a	CTAACAGTATCACTGTA	4-9-4	49	14754	14770	1294

[2059]

						14825	14841	
						14896	14912	
						15015	15031	
						15087	15103	
						15230	15246	
						15302	15318	
						15421	15437	
						15493	15509	
						15623	15639	
						15825	15841	
						15955	15971	
548762	n/a	n/a	TCTAACAGTATCACTGT	4-9-4	16	14755	14771	1295
						14826	14842	
						14897	14913	
						15016	15032	
						15088	15104	
						15231	15247	
						15303	15319	
						15422	15438	
						15494	15510	
						15624	15640	
						15826	15842	
						15956	15972	
548763	n/a	n/a	CTCTAACAGTATCACTG	4-9-4	44	14756	14772	1296
						14827	14843	
						14898	14914	
						15017	15033	
						15089	15105	
						15232	15248	
						15304	15320	
						15423	15439	
						15495	15511	
						15625	15641	
						15827	15843	
						15957	15973	
548764	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATAAC	4-9-4	31	14772	14788	1297
						14843	14859	
						15177	15193	
						15583	15599	
						15713	15729	
						16012	16028	
						16083	16099	
						16161	16177	
						16180	16196	

[2060]

						16231	16247	
548765	n/a	n/a	ATATCACTGTCCTATAA	4-9-4	0	14773	14789	1298
						14844	14860	
						15178	15194	
						15584	15600	
						15714	15730	
						16013	16029	
						16084	16100	
						16162	16178	
						16181	16197	
						16232	16248	
548766	n/a	n/a	TATATCACTGTCCTATA	4-9-4	36	14774	14790	1299
						14845	14861	
						15179	15195	
						15715	15731	
						16163	16179	
548767	n/a	n/a	TATCACTGTCCTATATC	4-9-4	59	14785	14801	1300
						14856	14872	
						14981	14997	
						15119	15135	
						15190	15206	
						15262	15278	
						15387	15403	
						15525	15541	
						15655	15671	
						15726	15742	
						15857	15873	
						15987	16003	
548768	n/a	n/a	GTATCACTGTCCTATAT	4-9-4	56	14786	14802	1301
						14982	14998	
						15120	15136	
						15388	15404	
						15526	15542	
						15988	16004	
548769	n/a	n/a	AGTATCACTGTCCTATA	4-9-4	64	14787	14803	1302
						14983	14999	
						15121	15137	
						15389	15405	
						15527	15543	
						15989	16005	
548770	n/a	n/a	TAACAGTATCACTGTCC	4-9-4	92	14791	14807	1303
						14987	15003	
						15053	15069	
						15125	15141	

[2061]

						15393	15409	
						15459	15475	
						15531	15547	
						15993	16009	
548771	n/a	n/a	ATAACAGTATCACTGTC	4-9-4	62	14792	14808	1304
						14988	15004	
						15054	15070	
						15126	15142	
						15394	15410	
						15460	15476	
						15532	15548	
						15994	16010	
548772	n/a	n/a	TATAACAGTATCACTGT	4-9-4	0	14793	14809	1305
						14989	15005	
						15055	15071	
						15127	15143	
						15160	15176	
						15362	15378	
						15395	15411	
						15461	15477	
						15533	15549	
						15566	15582	
						15696	15712	
						15898	15914	
						15995	16011	
548773	n/a	n/a	CTATAACAGTATCACTG	4-9-4	0	14794	14810	1306
						14990	15006	
						15056	15072	
						15128	15144	
						15161	15177	
						15363	15379	
						15396	15412	
						15462	15478	
						15534	15550	
						15567	15583	
						15697	15713	
						15899	15915	
						15996	16012	
548774	n/a	n/a	CCTATAACTATAACAGT	4-9-4	0	14801	14817	1307
						15063	15079	
						15168	15184	
						15469	15485	
						15541	15557	
						15574	15590	

[2062]

						15704	15720	
						15775	15791	
						16003	16019	
548775	n/a	n/a	TCCTATAACTATAACAG	4-9-4	0	14802	14818	1308
						15064	15080	
						15169	15185	
						15470	15486	
						15542	15558	
						15575	15591	
						15705	15721	
						16004	16020	
548776	n/a	n/a	CCTATAACTATAACAAT	4-9-4	0	14872	14888	1309
						14931	14947	
						15206	15222	
						15278	15294	
						15337	15353	
						15599	15615	
						15671	15687	
						15742	15758	
						15801	15817	
						15873	15889	
						15931	15947	
						16074	16090	
						16099	16115	
						16152	16168	
						16247	16263	
548777	n/a	n/a	GTAACAGTATCACTGTA	4-9-4	41	14955	14971	1310
548778	n/a	n/a	ATAACAGTATCACTGTA	4-9-4	20	15159	15175	1311
						15361	15377	
						15565	15581	
						15695	15711	
						15897	15913	
548779	n/a	n/a	GTCCTATAACTATAACA	4-9-4	0	15170	15186	1312
						15576	15592	
						15706	15722	
						16005	16021	
						16076	16092	
						16101	16117	
						16154	16170	
548780	n/a	n/a	TGTCCTATAACTATAAC	4-9-4	22	15171	15187	1313
						15577	15593	
						15707	15723	
						16006	16022	
						16077	16093	

[2063]

						16102 16155	16118 16171	
548781	n/a	n/a	ACCTATAACTATAACAG	4-9-4	0	15776	15792	1314
548782	n/a	n/a	TACCTATAACTATAACA	4-9-4	0	15777 16249	15793 16265	1315
548783	n/a	n/a	ACCTATAACTATAACAA	4-9-4	0	16248	16264	1316

[2064] 实施例116:通过具有MOE、脱氧以及cEt糖修饰的反义寡核苷酸进行的对HepaRG™细胞中的人PKK的反义抑制

[2065] 设计其他靶向PKK核酸的反义寡核苷酸且测试其在体外对PKK mRNA的作用。

[2066] 下表中的嵌合反义寡核苷酸被设计为脱氧、MOE以及cEt缺口聚物。缺口聚物的长度为16个核苷,其中核苷具有MOE糖修饰、cEt糖修饰或脱氧修饰。'化学'列描述各寡核苷酸的糖修饰。'k'指示cEt糖修饰;数字指示脱氧核苷的数目;另外,'d'指示脱氧核苷;且'e'指示2'-O-甲氧基乙基修饰。每个缺口聚物整个的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。整个各寡核苷酸当中的所有胞嘧啶残基为5-甲基胞嘧啶。"起始位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。"终止位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最3'核苷酸。将列于以下表中的每个缺口聚物靶向在本文中指定为SEQ ID NO:1的人PKK mRNA或在本文中指定为SEQ ID NO:10的人PKK基因组序列。'n/a'表示反义寡核苷酸不靶向那个特定基因序列。

[2067] 使用电穿孔以1,000nM反义寡核苷酸转染密度为每孔20,000个细胞的培养的HepaRG™细胞。在大约24小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人引物探针集RTS3454测量mRNA水平。ISIS 531231包括在测定中。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。

[2068] 表140

[2069]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	95	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548074	1642	1657	CCTTTCTCCTTCGAGA	eekd$_{10}$kke	0	31948	31963	1317
548075	1643	1658	ACCTTTCTCCTTCGAG	eekd$_{10}$kke	0	31949	31964	1318
548076	1644	1659	CACCTTTCTCCTTCGA	eekd$_{10}$kke	26	n/a	n/a	1319
548077	1691	1706	ATTTGTTACCAAAGGA	eekd$_{10}$kke	51	33135	33150	1320
548078	1696	1711	TCTTCATTTGTTACCA	eekd$_{10}$kke	36	33140	33155	1321
548079	1762	1777	CCTTCTTTATAGCCAG	eekd$_{10}$kke	39	33206	33221	1322
548080	1763	1778	CCCTTCTTTATAGCCA	eekd$_{10}$kke	0	33207	33222	1323
548081	1764	1779	CCCCTTCTTTATAGCC	eekd$_{10}$kke	64	33208	33223	1324
548082	1776	1791	AAGCATCTTTTCCCCC	eekd$_{10}$kke	42	33220	33235	1325
548083	1800	1815	AGGGACCACCTGAATC	eekd$_{10}$kke	0	33899	33914	1326
548084	1801	1816	AAGGGACCACCTGAAT	eekd$_{10}$kke	0	33900	33915	1327
548085	1802	1817	TAAGGGACCACCTGAA	eekd$_{10}$kke	8	33901	33916	1328
548086	1803	1818	CTAAGGGACCACCTGA	eekd$_{10}$kke	36	33902	33917	1329
548087	1804	1819	ACTAAGGGACCACCTG	eekd$_{10}$kke	24	33903	33918	1330
548088	1805	1820	AACTAAGGGACCACCT	eekd$_{10}$kke	27	33904	33919	1331
548089	1806	1821	AAACTAAGGGACCACC	eekd$_{10}$kke	34	33905	33920	1332
548090	1807	1822	CAAACTAAGGGACCAC	eekd$_{10}$kke	46	33906	33921	1333
548091	1809	1824	TGCAAACTAAGGGACC	eekd$_{10}$kke	62	33908	33923	1334
548092	1810	1825	TTGCAAACTAAGGGAC	eekd$_{10}$kke	30	33909	33924	1335
548093	1811	1826	TTTGCAAACTAAGGGA	eekd$_{10}$kke	0	33910	33925	1336

[2070]

548094	1812	1827	GTTTGCAAACTAAGGG	eekd$_{10}$kke	74	33911	33926	1337
548095	1813	1828	TGTTTGCAAACTAAGG	eekd$_{10}$kke	35	33912	33927	1338
548096	1814	1829	GTGTTTGCAAACTAAG	eekd$_{10}$kke	23	33913	33928	1339
548097	1876	1891	TGCTCCCTGCGGGCAC	eekd$_{10}$kke	2	33975	33990	1340
548098	1887	1902	AGACACCAGGTTGCTC	eekd$_{10}$kke	0	33986	34001	1341
548099	1904	1919	CTCAGCGACTTTGGTG	eekd$_{10}$kke	55	34003	34018	1342
548100	1905	1920	ACTCAGCGACTTTGGT	eekd$_{10}$kke	25	34004	34019	1343
548101	1906	1921	TACTCAGCGACTTTGG	eekd$_{10}$kke	47	34005	34020	1344
548102	1907	1922	GTACTCAGCGACTTTG	eekd$_{10}$kke	58	34006	34021	1345
548103	1908	1923	TGTACTCAGCGACTTT	eekd$_{10}$kke	66	34007	34022	1346
548104	1909	1924	ATGTACTCAGCGACTT	eekd$_{10}$kke	59	34008	34023	1347
548105	1910	1925	CATGTACTCAGCGACT	eekd$_{10}$kke	49	34009	34024	1348
548106	1911	1926	CCATGTACTCAGCGAC	eekd$_{10}$kke	79	34010	34025	1349
548107	1912	1927	TCCATGTACTCAGCGA	eekd$_{10}$kke	76	34011	34026	1350
548108	1953	1968	GAGCTTTTCCATCACT	eekd$_{10}$kke	61	34052	34067	1351
548109	1959	1974	GCATCTGAGCTTTTCC	eekd$_{10}$kke	77	34058	34073	1352
548110	1960	1975	TGCATCTGAGCTTTTC	eekd$_{10}$kke	62	34059	34074	1353
548111	1963	1978	GACTGCATCTGAGCTT	eekd$_{10}$kke	53	34062	34077	1354
548112	1965	1980	GTGACTGCATCTGAGC	eekd$_{10}$kke	23	34064	34079	1355
548113	1966	1981	GGTGACTGCATCTGAG	eekd$_{10}$kke	56	34065	34080	1356
548114	1967	1982	TGGTGACTGCATCTGA	eekd$_{10}$kke	70	34066	34081	1357
548115	1972	1987	CATGCTGGTGACTGCA	eekd$_{10}$kke	76	34071	34086	1358
548116	1973	1988	TCATGCTGGTGACTGC	eekd$_{10}$kke	3	34072	34087	1359
548117	1974	1989	CTCATGCTGGTGACTG	eekd$_{10}$kke	73	34073	34088	1360
548118	1975	1990	TCTCATGCTGGTGACT	eekd$_{10}$kke	47	34074	34089	1361
548119	1984	1999	TGGACTGCTTCTCATG	eekd$_{10}$kke	25	34083	34098	1362
548121	1986	2001	TCTGGACTGCTTCTCA	eekd$_{10}$kke	64	34085	34100	1363
548122	1987	2002	CTCTGGACTGCTTCTC	eekd$_{10}$kke	55	34086	34101	1364
548123	1990	2005	AGACTCTGGACTGCTT	eekd$_{10}$kke	49	34089	34104	1365
548124	1991	2006	TAGACTCTGGACTGCT	eekd$_{10}$kke	51	34090	34105	1366
548125	1992	2007	CTAGACTCTGGACTGC	eekd$_{10}$kke	89	34091	34106	1367
548126	1995	2010	TGCCTAGACTCTGGAC	eekd$_{10}$kke	19	34094	34109	1368
548127	1996	2011	TTGCCTAGACTCTGGA	eekd$_{10}$kke	60	34095	34110	1369
548128	1997	2012	ATTGCCTAGACTCTGG	eekd$_{10}$kke	55	34096	34111	1370
548129	2022	2037	TTTGACTTGAACTCAG	eekd$_{10}$kke	35	34121	34136	1371
548130	2023	2038	ATTTGACTTGAACTCA	eekd$_{10}$kke	27	34122	34137	1372
548131	2024	2039	AATTTGACTTGAACTC	eekd$_{10}$kke	45	34123	34138	1373
548132	2025	2040	GAATTTGACTTGAACT	eekd$_{10}$kke	0	34124	34139	1374
548133	2026	2041	AGAATTTGACTTGAAC	eekd$_{10}$kke	23	34125	34140	1375
548134	2027	2042	CAGAATTTGACTTGAA	eekd$_{10}$kke	17	34126	34141	1376
548135	2028	2043	TCAGAATTTGACTTGA	eekd$_{10}$kke	46	34127	34142	1377
548136	2031	2046	GGCTCAGAATTTGACT	eekd$_{10}$kke	39	34130	34145	1378
548137	2032	2047	AGGCTCAGAATTTGAC	eekd$_{10}$kke	62	34131	34146	1379
548138	2036	2051	CCCCAGGCTCAGAATT	eekd$_{10}$kke	52	34135	34150	1380

[2071]

548139	2047	2062	AGATGAGGACCCCCCA	eekd$_{10}$kke	56	34146	34161	1381
548140	2048	2063	CAGATGAGGACCCCCC	eekd$_{10}$kke	74	34147	34162	1382
548141	2049	2064	GCAGATGAGGACCCCC	eekd$_{10}$kke	66	34148	34163	1383
548142	2063	2078	ACTCTCCATGCTTTGC	eekd$_{10}$kke	44	34162	34177	1384
548143	2064	2079	CACTCTCCATGCTTTG	eekd$_{10}$kke	39	34163	34178	1385
548144	2068	2083	ATGCCACTCTCCATGC	eekd$_{10}$kke	52	34167	34182	1386
548145	2079	2094	ATGCAAAGAAGATGCC	eekd$_{10}$kke	63	34178	34193	1387
548146	2088	2103	GTCCTTAGGATGCAAA	eekd$_{10}$kke	68	34187	34202	1388
548147	2089	2104	CGTCCTTAGGATGCAA	eekd$_{10}$kke	81	34188	34203	1389
548148	2114	2129	GCAGCTCTGAGTGCAC	eekd$_{10}$kke	66	34213	34228	1390
548149	2127	2142	GACATTGTCCTCAGCA	eekd$_{10}$kke	39	34226	34241	1391
548150	2129	2144	CAGACATTGTCCTCAG	eekd$_{10}$kke	60	34228	34243	1392

[2072] 表141

[2073]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	84	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
547843	384	399	CACTTATTTGATGACC	eekd$_{10}$kke	83	9918	9933	1393
547844	385	400	GCACTTATTTGATGAC	eekd$_{10}$kke	13	n/a	n/a	1394
547845	394	409	CGATGGCAAGCACTTA	eekd$_{10}$kke	0	n/a	n/a	1395
547846	395	410	TCGATGGCAAGCACTT	eekd$_{10}$kke	0	n/a	n/a	1396
547847	396	411	CTCGATGGCAAGCACT	eekd$_{10}$kke	46	n/a	n/a	1397
547848	400	415	ATGTCTCGATGGCAAG	eekd$_{10}$kke	93	12656	12671	1398
547849	401	416	AATGTCTCGATGGCAA	eekd$_{10}$kke	79	12657	12672	1399

[2074]

547850	402	417	AAATGTCTCGATGGCA	eekd$_{10}$kke	51	12658	12673	1400
547851	403	418	TAAATGTCTCGATGGC	eekd$_{10}$kke	93	12659	12674	1401
547852	404	419	ATAAATGTCTCGATGG	eekd$_{10}$kke	67	12660	12675	1402
547853	405	420	TATAAATGTCTCGATG	eekd$_{10}$kke	0	12661	12676	1403
547854	416	431	ATCAACTCCTTTATAA	eekd$_{10}$kke	10	12672	12687	1404
547855	417	432	TATCAACTCCTTTATA	eekd$_{10}$kke	59	12673	12688	1405
547856	419	434	CATATCAACTCCTTTA	eekd$_{10}$kke	93	12675	12690	1406
547858	423	438	CTCTCATATCAACTCC	eekd$_{10}$kke	82	12679	12694	1407
547859	424	439	CCTCTCATATCAACTC	eekd$_{10}$kke	77	12680	12695	1408
547860	425	440	TCCTCTCATATCAACT	eekd$_{10}$kke	71	12681	12696	1409
547861	427	442	ACTCCTCTCATATCAA	eekd$_{10}$kke	0	12683	12698	1410
547862	428	443	GACTCCTCTCATATCA	eekd$_{10}$kke	22	12684	12699	1411
547863	429	444	TGACTCCTCTCATATC	eekd$_{10}$kke	73	12685	12700	1412
547864	430	445	TTGACTCCTCTCATAT	eekd$_{10}$kke	53	12686	12701	1413
547865	434	449	AAAATTGACTCCTCTC	eekd$_{10}$kke	3	12690	12705	1414
547866	436	451	TTAAAATTGACTCCTC	eekd$_{10}$kke	46	12692	12707	1415
547867	447	462	CCTTAGACACATTAAA	eekd$_{10}$kke	34	12703	12718	1416
547868	448	463	ACCTTAGACACATTAA	eekd$_{10}$kke	47	12704	12719	1417
547869	449	464	AACCTTAGACACATTA	eekd$_{10}$kke	45	12705	12720	1418
547870	451	466	CTAACCTTAGACACAT	eekd$_{10}$kke	89	12707	12722	1419
547871	452	467	GCTAACCTTAGACACA	eekd$_{10}$kke	96	12708	12723	1420
547872	453	468	TGCTAACCTTAGACAC	eekd$_{10}$kke	85	12709	12724	1421
547873	454	469	CTGCTAACCTTAGACA	eekd$_{10}$kke	77	12710	12725	1422
547874	455	470	ACTGCTAACCTTAGAC	eekd$_{10}$kke	70	12711	12726	1423
547875	456	471	CACTGCTAACCTTAGA	eekd$_{10}$kke	73	12712	12727	1424
547876	457	472	ACACTGCTAACCTTAG	eekd$_{10}$kke	78	12713	12728	1425
547877	458	473	AACACTGCTAACCTTA	eekd$_{10}$kke	81	12714	12729	1426
547879	460	475	TCAACACTGCTAACCT	eekd$_{10}$kke	69	12716	12731	1427
547880	461	476	TTCAACACTGCTAACC	eekd$_{10}$kke	69	12717	12732	1428
547881	465	480	ATTCTTCAACACTGCT	eekd$_{10}$kke	0	12721	12736	1429
547882	500	515	CTGGCAGCGAATGTTA	eekd$_{10}$kke	91	12756	12771	1430
547883	501	516	ACTGGCAGCGAATGTT	eekd$_{10}$kke	99	12757	12772	1431
547884	518	533	CGTGGCATATGAAAAA	eekd$_{10}$kke	87	12774	12789	1432
547885	539	554	CTCTGCCTTGTGAAAT	eekd$_{10}$kke	45	12795	12810	1433
547886	544	559	CGGTACTCTGCCTTGT	eekd$_{10}$kke	97	12800	12815	1434
547889	547	562	TTCCGGTACTCTGCCT	eekd$_{10}$kke	91	n/a	n/a	1435
547890	550	565	TTGTTCCGGTACTCTG	eekd$_{10}$kke	97	n/a	n/a	1436
547891	551	566	ATTGTTCCGGTACTCT	eekd$_{10}$kke	84	n/a	n/a	1437
547892	553	568	CAATTGTTCCGGTACT	eekd$_{10}$kke	29	n/a	n/a	1438
547893	554	569	GCAATTGTTCCGGTAC	eekd$_{10}$kke	81	n/a	n/a	1439
547894	555	570	GGCAATTGTTCCGGTA	eekd$_{10}$kke	92	n/a	n/a	1440

[2075]

547898	563	578	CTTTAATAGGCAATTG	eekd$_{10}$kke	0	14134	14149	1441
547899	566	581	GTACTTTAATAGGCAA	eekd$_{10}$kke	49	14137	14152	1442
547900	567	582	TGTACTTTAATAGGCA	eekd$_{10}$kke	93	14138	14153	1443
547901	568	583	CTGTACTTTAATAGGC	eekd$_{10}$kke	77	14139	14154	1444
547902	569	584	ACTGTACTTTAATAGG	eekd$_{10}$kke	20	14140	14155	1445
547903	604	619	CTCAGCACCTTTATAG	eekd$_{10}$kke	62	14175	14190	1446
547904	605	620	ACTCAGCACCTTTATA	eekd$_{10}$kke	56	14176	14191	1447
547905	606	621	TACTCAGCACCTTTAT	eekd$_{10}$kke	20	14177	14192	1448
547906	607	622	TTACTCAGCACCTTTA	eekd$_{10}$kke	59	14178	14193	1449
547907	652	667	ATTTCTGAAAGGGCAC	eekd$_{10}$kke	27	14223	14238	1450
547908	654	669	CAATTTCTGAAAGGGC	eekd$_{10}$kke	94	14225	14240	1451
547909	655	670	CCAATTTCTGAAAGGG	eekd$_{10}$kke	82	14226	14241	1452
547910	656	671	ACCAATTTCTGAAAGG	eekd$_{10}$kke	26	14227	14242	1453
547911	661	676	TGGCAACCAATTTCTG	eekd$_{10}$kke	0	n/a	n/a	1454
547912	701	716	ATCCACATCTGAGAAC	eekd$_{10}$kke	23	26149	26164	1455
547913	706	721	GCAACATCCACATCTG	eekd$_{10}$kke	71	26154	26169	1456
547914	707	722	GGCAACATCCACATCT	eekd$_{10}$kke	74	26155	26170	1457
547915	708	723	TGGCAACATCCACATC	eekd$_{10}$kke	0	26156	26171	1458
547916	710	725	CCTGGCAACATCCACA	eekd$_{10}$kke	70	26158	26173	1459
547917	712	727	ACCCTGGCAACATCCA	eekd$_{10}$kke	33	26160	26175	1460
547918	713	728	AACCCTGGCAACATCC	eekd$_{10}$kke	1	26161	26176	1461
547919	714	729	GAACCCTGGCAACATC	eekd$_{10}$kke	41	26162	26177	1462

[2076] 表142

[2077]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	62	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	

[2078]

						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	88	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
547751	7	22	TGAACGGTCTTCAAGC	eekd$_{10}$kke	0	3399	3414	1463
547753	8	23	ATGAACGGTCTTCAAG	eekd$_{10}$kke	3	3400	3415	1464
547755	13	28	TAAAAATGAACGGTCT	eekd$_{10}$kke	0	3405	3420	1465
547757	28	43	GAGTCTCTTGTCACTT	eekd$_{10}$kke	69	3420	3435	1466
547759	29	44	TGAGTCTCTTGTCACT	eekd$_{10}$kke	73	3421	3436	1467
547763	31	46	GGTGAGTCTCTTGTCA	eekd$_{10}$kke	66	3423	3438	1468
547765	32	47	AGGTGAGTCTCTTGTC	eekd$_{10}$kke	20	3424	3439	1469
547767	35	50	TGGAGGTGAGTCTCTT	eekd$_{10}$kke	74	3427	3442	1470
547769	36	51	TTGGAGGTGAGTCTCT	eekd$_{10}$kke	81	3428	3443	1471
547771	37	52	CTTGGAGGTGAGTCTC	eekd$_{10}$kke	60	3429	3444	1472
547773	38	53	TCTTGGAGGTGAGTCT	eekd$_{10}$kke	47	3430	3445	1473
547777	43	58	TTGCTTCTTGGAGGTG	eekd$_{10}$kke	69	3435	3450	1474
547779	44	59	ATTGCTTCTTGGAGGT	eekd$_{10}$kke	41	3436	3451	1475
547781	46	61	CAATTGCTTCTTGGAG	eekd$_{10}$kke	49	3438	3453	1476
547783	48	63	CACAATTGCTTCTTGG	eekd$_{10}$kke	48	3440	3455	1477
547784	72	87	GCTTGAATAAAATCAT	eekd$_{10}$kke	46	4071	4086	1478
547785	79	94	GTTGCTTGCTTGAATA	eekd$_{10}$kke	48	4078	4093	1479
547786	80	95	AGTTGCTTGCTTGAAT	eekd$_{10}$kke	44	4079	4094	1480
547787	81	96	AAGTTGCTTGCTTGAA	eekd$_{10}$kke	22	4080	4095	1481

[2079]

547788	82	97	TAAGTTGCTTGCTTGA	eekd$_{10}$kke	49	4081	4096	1482
547789	86	101	GAAATAAGTTGCTTGC	eekd$_{10}$kke	20	4085	4100	1483
547790	87	102	TGAAATAAGTTGCTTG	eekd$_{10}$kke	23	4086	4101	1484
547791	106	121	ACTGTAGCAAACAAGG	eekd$_{10}$kke	49	4105	4120	1485
547792	116	131	TCCACAGGAAACTGTA	eekd$_{10}$kke	31	n/a	n/a	1486
547793	117	132	ATCCACAGGAAACTGT	eekd$_{10}$kke	16	n/a	n/a	1487
547794	136	151	TCATAGAGTTGAGTCA	eekd$_{10}$kke	49	8008	8023	1488
547795	155	170	ACCTCTGAAGAAGGCG	eekd$_{10}$kke	66	8027	8042	1489
547796	161	176	ATCCCCACCTCTGAAG	eekd$_{10}$kke	35	8033	8048	1490
547797	167	182	AGCTACATCCCCACCT	eekd$_{10}$kke	33	8039	8054	1491
547799	169	184	GAAGCTACATCCCCAC	eekd$_{10}$kke	41	8041	8056	1492
547800	174	189	ACATGGAAGCTACATC	eekd$_{10}$kke	20	8046	8061	1493
547801	175	190	TACATGGAAGCTACAT	eekd$_{10}$kke	11	8047	8062	1494
547802	176	191	GTACATGGAAGCTACA	eekd$_{10}$kke	41	8048	8063	1495
547803	177	192	TGTACATGGAAGCTAC	eekd$_{10}$kke	0	8049	8064	1496
547804	178	193	GTGTACATGGAAGCTA	eekd$_{10}$kke	22	8050	8065	1497
547805	180	195	GGGTGTACATGGAAGC	eekd$_{10}$kke	54	8052	8067	1498
547807	197	212	GCAGTATTGGGCATTT	eekd$_{10}$kke	75	8069	8084	1499
547808	203	218	CATCTGGCAGTATTGG	eekd$_{10}$kke	56	8075	8090	1500
547809	204	219	TCATCTGGCAGTATTG	eekd$_{10}$kke	33	8076	8091	1501
547810	206	221	CCTCATCTGGCAGTAT	eekd$_{10}$kke	60	8078	8093	1502
547811	207	222	ACCTCATCTGGCAGTA	eekd$_{10}$kke	49	8079	8094	1503
547812	211	226	GTGCACCTCATCTGGC	eekd$_{10}$kke	51	8083	8098	1504
547813	219	234	GGTGGAATGTGCACCT	eekd$_{10}$kke	34	8091	8106	1505
547814	220	235	GGGTGGAATGTGCACC	eekd$_{10}$kke	60	8092	8107	1506
547815	255	270	AACTTGCTGGAAGAAA	eekd$_{10}$kke	3	8127	8142	1507
547816	256	271	GAACTTGCTGGAAGAA	eekd$_{10}$kke	45	8128	8143	1508
547817	257	272	TGAACTTGCTGGAAGA	eekd$_{10}$kke	18	8129	8144	1509
547818	260	275	GATTGAACTTGCTGGA	eekd$_{10}$kke	4	8132	8147	1510
547819	264	279	CATTGATTGAACTTGC	eekd$_{10}$kke	11	8136	8151	1511
547820	265	280	TCATTGATTGAACTTG	eekd$_{10}$kke	0	8137	8152	1512
547821	282	297	CAAACCTTTTCTCCAT	eekd$_{10}$kke	44	n/a	n/a	1513
547822	287	302	GCAACCAAACCTTTTC	eekd$_{10}$kke	71	n/a	n/a	1514
547823	288	303	AGCAACCAAACCTTTT	eekd$_{10}$kke	51	n/a	n/a	1515
547824	331	346	CGATGTACTTTTGGCA	eekd$_{10}$kke	82	9865	9880	1516
547825	332	347	TCGATGTACTTTTGGC	eekd$_{10}$kke	59	9866	9881	1517
547826	333	348	TTCGATGTACTTTTGG	eekd$_{10}$kke	31	9867	9882	1518
547827	334	349	GTTCGATGTACTTTTG	eekd$_{10}$kke	47	9868	9883	1519
547828	337	352	CCTGTTCGATGTACTT	eekd$_{10}$kke	63	9871	9886	1520
547829	338	353	ACCTGTTCGATGTACT	eekd$_{10}$kke	59	9872	9887	1521
547830	340	355	GCACCTGTTCGATGTA	eekd$_{10}$kke	74	9874	9889	1522
547831	342	357	CTGCACCTGTTCGATG	eekd$_{10}$kke	49	9876	9891	1523
547832	343	358	ACTGCACCTGTTCGAT	eekd$_{10}$kke	59	9877	9892	1524
547833	344	359	AACTGCACCTGTTCGA	eekd$_{10}$kke	40	9878	9893	1525

[2080]

547834	345	360	AAACTGCACCTGTTCG	eekd$_{10}$kke	63	9879	9894	1526
547835	349	364	CCAGAAACTGCACCTG	eekd$_{10}$kke	81	9883	9898	1527
547836	350	365	TCCAGAAACTGCACCT	eekd$_{10}$kke	50	9884	9899	1528
547837	352	367	TGTCCAGAAACTGCAC	eekd$_{10}$kke	51	9886	9901	1529
547838	362	377	CTTCAAGGAATGTCCA	eekd$_{10}$kke	45	9896	9911	1530
547839	363	378	GCTTCAAGGAATGTCC	eekd$_{10}$kke	35	9897	9912	1531
547840	365	380	TTGCTTCAAGGAATGT	eekd$_{10}$kke	36	9899	9914	1532
547841	369	384	CACATTGCTTCAAGGA	eekd$_{10}$kke	42	9903	9918	1533
547842	375	390	GATGACCACATTGCTT	eekd$_{10}$kke	10	9909	9924	1534

[2081] 表143

[2082]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	75	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	91	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	

[2083]

						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
547843	384	399	CACTTATTTGATGACC	eekd$_{10}$kke	83	9918	9933	1393
547844	385	400	GCACTTATTTGATGAC	eekd$_{10}$kke	76	n/a	n/a	1394
547845	394	409	CGATGGCAAGCACTTA	eekd$_{10}$kke	64	n/a	n/a	1395
547846	395	410	TCGATGGCAAGCACTT	eekd$_{10}$kke	42	n/a	n/a	1396
547847	396	411	CTCGATGGCAAGCACT	eekd$_{10}$kke	72	n/a	n/a	1397
547848	400	415	ATGTCTCGATGGCAAG	eekd$_{10}$kke	79	12656	12671	1398
547849	401	416	AATGTCTCGATGGCAA	eekd$_{10}$kke	90	12657	12672	1399
547850	402	417	AAATGTCTCGATGGCA	eekd$_{10}$kke	80	12658	12673	1400
547851	403	418	TAAATGTCTCGATGGC	eekd$_{10}$kke	84	12659	12674	1401
547852	404	419	ATAAATGTCTCGATGG	eekd$_{10}$kke	66	12660	12675	1402
547853	405	420	TATAAATGTCTCGATG	eekd$_{10}$kke	30	12661	12676	1403
547854	416	431	ATCAACTCCTTTATAA	eekd$_{10}$kke	9	12672	12687	1404
547855	417	432	TATCAACTCCTTTATA	eekd$_{10}$kke	38	12673	12688	1405
547856	419	434	CATATCAACTCCTTTA	eekd$_{10}$kke	51	12675	12690	1406
547857	421	436	CTCATATCAACTCCTT	eekd$_{10}$kke	84	12677	12692	1535
547858	423	438	CTCTCATATCAACTCC	eekd$_{10}$kke	76	12679	12694	1407
547859	424	439	CCTCTCATATCAACTC	eekd$_{10}$kke	88	12680	12695	1408
547860	425	440	TCCTCTCATATCAACT	eekd$_{10}$kke	70	12681	12696	1409
547861	427	442	ACTCCTCTCATATCAA	eekd$_{10}$kke	57	12683	12698	1410
547862	428	443	GACTCCTCTCATATCA	eekd$_{10}$kke	88	12684	12699	1411
547863	429	444	TGACTCCTCTCATATC	eekd$_{10}$kke	77	12685	12700	1412
547864	430	445	TTGACTCCTCTCATAT	eekd$_{10}$kke	73	12686	12701	1413
547865	434	449	AAAATTGACTCCTCTC	eekd$_{10}$kke	61	12690	12705	1414
547866	436	451	TTAAAATTGACTCCTC	eekd$_{10}$kke	40	12692	12707	1415
547867	447	462	CCTTAGACACATTAAA	eekd$_{10}$kke	53	12703	12718	1416
547868	448	463	ACCTTAGACACATTAA	eekd$_{10}$kke	71	12704	12719	1417
547869	449	464	AACCTTAGACACATTA	eekd$_{10}$kke	77	12705	12720	1418
547870	451	466	CTAACCTTAGACACAT	eekd$_{10}$kke	83	12707	12722	1419
547871	452	467	GCTAACCTTAGACACA	eekd$_{10}$kke	77	12708	12723	1420
547872	453	468	TGCTAACCTTAGACAC	eekd$_{10}$kke	73	12709	12724	1421
547873	454	469	CTGCTAACCTTAGACA	eekd$_{10}$kke	82	12710	12725	1422
547874	455	470	ACTGCTAACCTTAGAC	eekd$_{10}$kke	60	12711	12726	1423
547875	456	471	CACTGCTAACCTTAGA	eekd$_{10}$kke	57	12712	12727	1424
547876	457	472	ACACTGCTAACCTTAG	eekd$_{10}$kke	59	12713	12728	1425

[2084]

547877	458	473	AACACTGCTAACCTTA	eekd$_{10}$kke	93	12714	12729	1426
547878	459	474	CAACACTGCTAACCTT	eekd$_{10}$kke	62	12715	12730	1536
547879	460	475	TCAACACTGCTAACCT	eekd$_{10}$kke	65	12716	12731	1427
547880	461	476	TTCAACACTGCTAACC	eekd$_{10}$kke	59	12717	12732	1428
547881	465	480	ATTCTTCAACACTGCT	eekd$_{10}$kke	50	12721	12736	1429
547882	500	515	CTGGCAGCGAATGTTA	eekd$_{10}$kke	96	12756	12771	1430
547883	501	516	ACTGGCAGCGAATGTT	eekd$_{10}$kke	0	12757	12772	1431
547884	518	533	CGTGGCATATGAAAAA	eekd$_{10}$kke	49	12774	12789	1432
547885	539	554	CTCTGCCTTGTGAAAT	eekd$_{10}$kke	57	12795	12810	1433
547886	544	559	CGGTACTCTGCCTTGT	eekd$_{10}$kke	89	12800	12815	1434
547887	545	560	CCGGTACTCTGCCTTG	eekd$_{10}$kke	99	12801	12816	1537
547888	546	561	TCCGGTACTCTGCCTT	eekd$_{10}$kke	99	n/a	n/a	1538
547889	547	562	TTCCGGTACTCTGCCT	eekd$_{10}$kke	97	n/a	n/a	1435
547890	550	565	TTGTTCCGGTACTCTG	eekd$_{10}$kke	90	n/a	n/a	1436
547891	551	566	ATTGTTCCGGTACTCT	eekd$_{10}$kke	88	n/a	n/a	1437
547892	553	568	CAATTGTTCCGGTACT	eekd$_{10}$kke	28	n/a	n/a	1438
547893	554	569	GCAATTGTTCCGGTAC	eekd$_{10}$kke	80	n/a	n/a	1439
547894	555	570	GGCAATTGTTCCGGTA	eekd$_{10}$kke	91	n/a	n/a	1440
547895	556	571	AGGCAATTGTTCCGGT	eekd$_{10}$kke	94	n/a	n/a	1539
547896	557	572	TAGGCAATTGTTCCGG	eekd$_{10}$kke	95	n/a	n/a	1540
547897	558	573	ATAGGCAATTGTTCCG	eekd$_{10}$kke	82	n/a	n/a	1541
547898	563	578	CTTTAATAGGCAATTG	eekd$_{10}$kke	28	14134	14149	1441
547899	566	581	GTACTTTAATAGGCAA	eekd$_{10}$kke	68	14137	14152	1442
547900	567	582	TGTACTTTAATAGGCA	eekd$_{10}$kke	68	14138	14153	1443
547901	568	583	CTGTACTTTAATAGGC	eekd$_{10}$kke	85	14139	14154	1444
547902	569	584	ACTGTACTTTAATAGG	eekd$_{10}$kke	33	14140	14155	1445
547903	604	619	CTCAGCACCTTTATAG	eekd$_{10}$kke	6	14175	14190	1446
547904	605	620	ACTCAGCACCTTTATA	eekd$_{10}$kke	41	14176	14191	1447
547905	606	621	TACTCAGCACCTTTAT	eekd$_{10}$kke	59	14177	14192	1448
547906	607	622	TTACTCAGCACCTTTA	eekd$_{10}$kke	70	14178	14193	1449
547907	652	667	ATTTCTGAAAGGGCAC	eekd$_{10}$kke	27	14223	14238	1450
547908	654	669	CAATTTCTGAAAGGGC	eekd$_{10}$kke	71	14225	14240	1451
547909	655	670	CCAATTTCTGAAAGGG	eekd$_{10}$kke	51	14226	14241	1452
547910	656	671	ACCAATTTCTGAAAGG	eekd$_{10}$kke	34	14227	14242	1453
547911	661	676	TGGCAACCAATTTCTG	eekd$_{10}$kke	15	n/a	n/a	1454
547912	701	716	ATCCACATCTGAGAAC	eekd$_{10}$kke	53	26149	26164	1455
547913	706	721	GCAACATCCACATCTG	eekd$_{10}$kke	61	26154	26169	1456
547914	707	722	GGCAACATCCACATCT	eekd$_{10}$kke	63	26155	26170	1457
547915	708	723	TGGCAACATCCACATC	eekd$_{10}$kke	62	26156	26171	1458
547916	710	725	CCTGGCAACATCCACA	eekd$_{10}$kke	56	26158	26173	1459
547917	712	727	ACCCTGGCAACATCCA	eekd$_{10}$kke	54	26160	26175	1460

[2085]

547918	713	728	AACCCTGGCAACATCC	eekd$_{10}$kke	65	26161	26176	1461
547919	714	729	GAACCCTGGCAACATC	eekd$_{10}$kke	73	26162	26177	1462

[2086] 表144

[2087]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	16	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	83	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

	547920	716	731	GAGAACCCTGGCAACA	eekd$_{10}$kke	52	26164	26179	1542
	547921	717	732	TGAGAACCCTGGCAAC	eekd$_{10}$kke	43	26165	26180	1543
	547922	722	737	TGGAGTGAGAACCCTG	eekd$_{10}$kke	79	26170	26185	1544
	547923	725	740	ATCTGGAGTGAGAACC	eekd$_{10}$kke	68	26173	26188	1545
	547924	742	757	GTCCGACACACAAAAG	eekd$_{10}$kke	53	26190	26205	1546
	547925	743	758	GGTCCGACACACAAAA	eekd$_{10}$kke	16	26191	26206	1547
	547927	745	760	ATGGTCCGACACACAA	eekd$_{10}$kke	79	26193	26208	1548
	547928	746	761	GATGGTCCGACACACA	eekd$_{10}$kke	70	26194	26209	1549
	547929	747	762	AGATGGTCCGACACAC	eekd$_{10}$kke	65	26195	26210	1550
	547930	757	772	TGATAGGTGCAGATGG	eekd$_{10}$kke	48	26205	26220	1551
	547931	758	773	GTGATAGGTGCAGATG	eekd$_{10}$kke	58	26206	26221	1552
	547932	804	819	CGATTTTCCATACATT	eekd$_{10}$kke	33	26252	26267	1553
	547933	805	820	TCGATTTTCCATACAT	eekd$_{10}$kke	44	26253	26268	1554
	547934	806	821	CTCGATTTTCCATACA	eekd$_{10}$kke	38	26254	26269	1555
	547935	807	822	ACTCGATTTTCCATAC	eekd$_{10}$kke	27	26255	26270	1556
	547936	808	823	GACTCGATTTTCCATA	eekd$_{10}$kke	44	26256	26271	1557
	547937	811	826	TGTGACTCGATTTTCC	eekd$_{10}$kke	56	26259	26274	1558
	547938	812	827	TTGTGACTCGATTTTC	eekd$_{10}$kke	56	26260	26275	1559
	547939	813	828	TTTGTGACTCGATTTT	eekd$_{10}$kke	70	26261	26276	1560
	547940	817	832	TTTCTTTGTGACTCGA	eekd$_{10}$kke	71	n/a	n/a	1561
[2088]	547941	852	867	GTGTGCCACTTTCAGA	eekd$_{10}$kke	66	27116	27131	1562
	547942	853	868	GGTGTGCCACTTTCAG	eekd$_{10}$kke	85	27117	27132	1563
	547943	854	869	TGGTGTGCCACTTTCA	eekd$_{10}$kke	83	27118	27133	1564
	547944	857	872	ACTTGGTGTGCCACTT	eekd$_{10}$kke	54	27121	27136	1565
	547945	858	873	AACTTGGTGTGCCACT	eekd$_{10}$kke	62	27122	27137	1566
	547946	859	874	GAACTTGGTGTGCCAC	eekd$_{10}$kke	81	27123	27138	1567
	547947	860	875	GGAACTTGGTGTGCCA	eekd$_{10}$kke	80	27124	27139	1568
	547948	861	876	AGGAACTTGGTGTGCC	eekd$_{10}$kke	77	27125	27140	1569
	547949	880	895	GTGTTTTCTTGAGGAG	eekd$_{10}$kke	6	27144	27159	1570
	547950	881	896	GGTGTTTTCTTGAGGA	eekd$_{10}$kke	49	27145	27160	1571
	547951	887	902	AGATATGGTGTTTTCT	eekd$_{10}$kke	25	27151	27166	1572
	547952	888	903	CAGATATGGTGTTTTC	eekd$_{10}$kke	46	27152	27167	1573
	547953	895	910	CTATATCCAGATATGG	eekd$_{10}$kke	16	27159	27174	1574
	547954	902	917	TAAAAGGCTATATCCA	eekd$_{10}$kke	36	27166	27181	1575
	547956	904	919	GTTAAAAGGCTATATC	eekd$_{10}$kke	13	27168	27183	1576
	547957	905	920	GGTTAAAAGGCTATAT	eekd$_{10}$kke	6	27169	27184	1577
	547958	907	922	CAGGTTAAAAGGCTAT	eekd$_{10}$kke	57	27171	27186	1578
	547959	908	923	GCAGGTTAAAAGGCTA	eekd$_{10}$kke	60	27172	27187	1579
	547960	909	924	TGCAGGTTAAAAGGCT	eekd$_{10}$kke	40	27173	27188	1580
	547961	910	925	TTGCAGGTTAAAAGGC	eekd$_{10}$kke	5	27174	27189	1581
	547962	911	926	TTTGCAGGTTAAAAGG	eekd$_{10}$kke	16	27175	27190	1582

	547963	927	942	GTTCAGGTAAAGTTCT	eekd$_{10}$kke	22	n/a	n/a	1583
	547964	928	943	GGTTCAGGTAAAGTTC	eekd$_{10}$kke	0	n/a	n/a	1584
	547965	929	944	GGGTTCAGGTAAAGTT	eekd$_{10}$kke	29	n/a	n/a	1585
	547966	930	945	AGGGTTCAGGTAAAGT	eekd$_{10}$kke	13	n/a	n/a	1586
	547967	933	948	GGCAGGGTTCAGGTAA	eekd$_{10}$kke	25	n/a	n/a	1587
	547968	940	955	TTAGAATGGCAGGGTT	eekd$_{10}$kke	37	27362	27377	1588
	547969	953	968	TCCCGGGTAAATTTTA	eekd$_{10}$kke	0	27375	27390	1589
	547970	954	969	CTCCCGGGTAAATTTT	eekd$_{10}$kke	42	27376	27391	1590
	547972	958	973	TCAACTCCCGGGTAAA	eekd$_{10}$kke	49	27380	27395	1591
	547973	961	976	AAGTCAACTCCCGGGT	eekd$_{10}$kke	62	27383	27398	1592
	547974	962	977	AAAGTCAACTCCCGGG	eekd$_{10}$kke	52	27384	27399	1593
	547975	963	978	CAAAGTCAACTCCCGG	eekd$_{10}$kke	44	27385	27400	1594
	547976	964	979	CCAAAGTCAACTCCCG	eekd$_{10}$kke	49	27386	27401	1595
	547977	967	982	CCTCCAAAGTCAACTC	eekd$_{10}$kke	57	27389	27404	1596
	547978	1014	1029	CTTGGCAAACATTCAC	eekd$_{10}$kke	71	27436	27451	1597
	547979	1018	1033	GTCTCTTGGCAAACAT	eekd$_{10}$kke	77	27440	27455	1598
[2089]	547980	1020	1035	AAGTCTCTTGGCAAAC	eekd$_{10}$kke	54	27442	27457	1599
	547981	1029	1044	TCTTTGTGCAAGTCTC	eekd$_{10}$kke	76	27451	27466	1600
	547982	1034	1049	AATCATCTTTGTGCAA	eekd$_{10}$kke	54	27456	27471	1601
	547983	1035	1050	GAATCATCTTTGTGCA	eekd$_{10}$kke	56	27457	27472	1602
	547984	1036	1051	CGAATCATCTTTGTGC	eekd$_{10}$kke	55	27458	27473	1603
	547985	1037	1052	GCGAATCATCTTTGTG	eekd$_{10}$kke	63	27459	27474	1604
	547986	1039	1054	CAGCGAATCATCTTTG	eekd$_{10}$kke	63	27461	27476	1605
	547987	1040	1055	ACAGCGAATCATCTTT	eekd$_{10}$kke	64	27462	27477	1606
	547988	1042	1057	TGACAGCGAATCATCT	eekd$_{10}$kke	56	27464	27479	1607
	547989	1043	1058	CTGACAGCGAATCATC	eekd$_{10}$kke	66	27465	27480	1608
	547990	1044	1059	ACTGACAGCGAATCAT	eekd$_{10}$kke	58	27466	27481	1609
	547991	1077	1092	TACAGTCTTCTGGGAG	eekd$_{10}$kke	0	27499	27514	1610
	547992	1080	1095	CCTTACAGTCTTCTGG	eekd$_{10}$kke	17	27502	27517	1611
	547993	1113	1128	TAGATAATCTTAAGAA	eekd$_{10}$kke	26	27634	27649	1612
	547994	1120	1135	CCATCCATAGATAATC	eekd$_{10}$kke	53	27641	27656	1613
	547995	1149	1164	GTGTCCCATACGCAAT	eekd$_{10}$kke	64	27670	27685	1614
	547996	1150	1165	TGTGTCCCATACGCAA	eekd$_{10}$kke	65	27671	27686	1615

[2090] 表145

[2091]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位	SEQ ID NO

[2092]

							点	
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	0	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	80	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
547997	1151	1166	TTGTGTCCCATACGCA	eekd$_{10}$kke	89	27672	27687	1616
547998	1152	1167	CTTGTGTCCCATACGC	eekd$_{10}$kke	82	27673	27688	1617
547999	1153	1168	CCTTGTGTCCCATACG	eekd$_{10}$kke	50	27674	27689	1618
548000	1154	1169	CCCTTGTGTCCCATAC	eekd$_{10}$kke	54	27675	27690	1619
548001	1163	1178	ACCAGAGCTCCCTTGT	eekd$_{10}$kke	64	27684	27699	1620
548002	1164	1179	AACCAGAGCTCCCTTG	eekd$_{10}$kke	56	27685	27700	1621
548003	1165	1180	TAACCAGAGCTCCCTT	eekd$_{10}$kke	66	27686	27701	1622

	548004	1167	1182	AGTAACCAGAGCTCCC	eekd$_{10}$kke	80	27688	27703	1623
	548005	1169	1184	AGAGTAACCAGAGCTC	eekd$_{10}$kke	77	27690	27705	1624
	548006	1172	1187	CAAAGAGTAACCAGAG	eekd$_{10}$kke	54	27693	27708	1625
	548007	1174	1189	CTCAAAGAGTAACCAG	eekd$_{10}$kke	70	27695	27710	1626
	548008	1175	1190	TCTCAAAGAGTAACCA	eekd$_{10}$kke	71	27696	27711	1627
	548009	1184	1199	GTTACACAATCTCAAA	eekd$_{10}$kke	47	27705	27720	1628
	548010	1187	1202	AGTGTTACACAATCTC	eekd$_{10}$kke	80	27708	27723	1629
	548011	1189	1204	CCAGTGTTACACAATC	eekd$_{10}$kke	14	27710	27725	1630
	548012	1192	1207	TCCCCAGTGTTACACA	eekd$_{10}$kke	3	27713	27728	1631
	548013	1193	1208	GTCCCCAGTGTTACAC	eekd$_{10}$kke	37	27714	27729	1632
	548014	1194	1209	TGTCCCCAGTGTTACA	eekd$_{10}$kke	31	27715	27730	1633
	548015	1195	1210	TTGTCCCCAGTGTTAC	eekd$_{10}$kke	50	27716	27731	1634
	548016	1248	1263	AAGAGTTTGTTCCTCC	eekd$_{10}$kke	55	27924	27939	1635
	548017	1252	1267	CAAGAAGAGTTTGTTC	eekd$_{10}$kke	3	27928	27943	1636
	548018	1253	1268	CCAAGAAGAGTTTGTT	eekd$_{10}$kke	22	27929	27944	1637
	548019	1255	1270	CCCCAAGAAGAGTTTG	eekd$_{10}$kke	24	27931	27946	1638
	548020	1256	1271	TCCCCAAGAAGAGTTT	eekd$_{10}$kke	76	27932	27947	1639
	548021	1261	1276	CACTCTCCCCAAGAAG	eekd$_{10}$kke	0	27937	27952	1640
	548022	1262	1277	CCACTCTCCCCAAGAA	eekd$_{10}$kke	69	27938	27953	1641
	548023	1290	1305	GCTTCACCTGCAGGCT	eekd$_{10}$kke	58	27966	27981	1642
[2093]	548024	1297	1312	GCTGTCAGCTTCACCT	eekd$_{10}$kke	79	27973	27988	1643
	548025	1300	1315	TGAGCTGTCAGCTTCA	eekd$_{10}$kke	66	27976	27991	1644
	548026	1332	1347	GTCCTATGAGTGACCC	eekd$_{10}$kke	52	28008	28023	1645
	548027	1334	1349	GTGTCCTATGAGTGAC	eekd$_{10}$kke	18	28010	28025	1646
	548028	1335	1350	GGTGTCCTATGAGTGA	eekd$_{10}$kke	38	28011	28026	1647
	548029	1336	1351	TGGTGTCCTATGAGTG	eekd$_{10}$kke	12	28012	28027	1648
	548030	1337	1352	CTGGTGTCCTATGAGT	eekd$_{10}$kke	52	28013	28028	1649
	548031	1397	1412	GATGCGCCAAACATCC	eekd$_{10}$kke	73	30475	30490	1650
	548032	1398	1413	AGATGCGCCAAACATC	eekd$_{10}$kke	51	30476	30491	1651
	548034	1400	1415	ATAGATGCGCCAAACA	eekd$_{10}$kke	31	30478	30493	1652
	548035	1404	1419	CACTATAGATGCGCCA	eekd$_{10}$kke	44	30482	30497	1653
	548036	1405	1420	CCACTATAGATGCGCC	eekd$_{10}$kke	74	30483	30498	1654
	548037	1427	1442	AATGTCTGACAGATTT	eekd$_{10}$kke	70	30505	30520	1655
	548038	1428	1443	TAATGTCTGACAGATT	eekd$_{10}$kke	67	30506	30521	1656
	548039	1445	1460	GAAAGGTGTATCTTTT	eekd$_{10}$kke	29	30523	30538	1657
	548040	1449	1464	GTGAGAAAGGTGTATC	eekd$_{10}$kke	62	30527	30542	1658
	548041	1450	1465	TGTGAGAAAGGTGTAT	eekd$_{10}$kke	64	30528	30543	1659
	548042	1452	1467	TTTGTGAGAAAGGTGT	eekd$_{10}$kke	63	30530	30545	1660
	548043	1453	1468	ATTTGTGAGAAAGGTG	eekd$_{10}$kke	76	30531	30546	1661
	548044	1474	1489	TGGTGAATAATAATCT	eekd$_{10}$kke	12	30552	30567	1662
	548045	1483	1498	TTATAGTTTTGGTGAA	eekd$_{10}$kke	0	30561	30576	1663

	548046	1506	1521	TATCATGATTCCCTTC	eekd$_{10}$kke	84	30584	30599	1664
	548047	1508	1523	GATATCATGATTCCCT	eekd$_{10}$kke	83	30586	30601	1665
	548048	1509	1524	CGATATCATGATTCCC	eekd$_{10}$kke	84	30587	30602	1666
	548049	1510	1525	GCGATATCATGATTCC	eekd$_{10}$kke	62	30588	30603	1667
	548050	1512	1527	AGGCGATATCATGATT	eekd$_{10}$kke	37	30590	30605	1668
	548051	1513	1528	AAGGCGATATCATGAT	eekd$_{10}$kke	61	30591	30606	1669
	548052	1535	1550	CAAAGGAGCCTGGAGT	eekd$_{10}$kke	43	30613	30628	1670
	548053	1538	1553	ATTCAAAGGAGCCTGG	eekd$_{10}$kke	36	30616	30631	1671
	548054	1539	1554	AATTCAAAGGAGCCTG	eekd$_{10}$kke	45	30617	30632	1672
	548055	1541	1556	GTAATTCAAAGGAGCC	eekd$_{10}$kke	78	30619	30634	1673
	548056	1543	1558	GTGTAATTCAAAGGAG	eekd$_{10}$kke	40	30621	30636	1674
	548057	1564	1579	CATATTGGTTTTTGGA	eekd$_{10}$kke	49	31870	31885	1675
	548058	1565	1580	GCATATTGGTTTTTGG	eekd$_{10}$kke	71	31871	31886	1676
[2094]	548059	1568	1583	TAGGCATATTGGTTTT	eekd$_{10}$kke	50	31874	31889	1677
	548060	1588	1603	CTTGTGTCACCTTTGG	eekd$_{10}$kke	76	31894	31909	1678
	548061	1589	1604	GCTTGTGTCACCTTTG	eekd$_{10}$kke	86	31895	31910	1679
	548062	1598	1613	ATAAATTGTGCTTGTG	eekd$_{10}$kke	19	31904	31919	1680
	548063	1600	1615	GTATAAATTGTGCTTG	eekd$_{10}$kke	35	31906	31921	1681
	548064	1602	1617	TGGTATAAATTGTGCT	eekd$_{10}$kke	54	31908	31923	1682
	548065	1603	1618	TTGGTATAAATTGTGC	eekd$_{10}$kke	22	31909	31924	1683
	548067	1606	1621	CAGTTGGTATAAATTG	eekd$_{10}$kke	18	31912	31927	1684
	548068	1609	1624	CAACAGTTGGTATAAA	eekd$_{10}$kke	0	31915	31930	1685
	548069	1610	1625	CCAACAGTTGGTATAA	eekd$_{10}$kke	57	31916	31931	1686
	548070	1611	1626	CCCAACAGTTGGTATA	eekd$_{10}$kke	85	31917	31932	1687
	548071	1629	1644	AGAAGCCCCATCCGGT	eekd$_{10}$kke	55	31935	31950	1688
	548072	1640	1655	TTTCTCCTTCGAGAAG	eekd$_{10}$kke	33	31946	31961	1689
	548073	1641	1656	CTTTCTCCTTCGAGAA	eekd$_{10}$kke	24	31947	31962	1690

[2095] 表146

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
[2096] 531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	19	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	

[2097]

						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	66	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548151	2139	2154	GGGCTTCAGCCAGACA	eekd$_{10}$kke	35	34238	34253	1691
548152	2140	2155	CGGGCTTCAGCCAGAC	eekd$_{10}$kke	32	34239	34254	1692
548153	2149	2164	TGCTGAAAGCGGGCTT	eekd$_{10}$kke	44	34248	34263	1693
548154	2150	2165	GTGCTGAAAGCGGGCT	eekd$_{10}$kke	7	34249	34264	1694
548155	2151	2166	CGTGCTGAAAGCGGGC	eekd$_{10}$kke	76	34250	34265	1695
548156	2168	2183	TCAGCCCCTGGTTACG	eekd$_{10}$kke	0	34267	34282	1696
548157	2172	2187	ATTGTCAGCCCCTGGT	eekd$_{10}$kke	7	34271	34286	1697
548158	2174	2189	GCATTGTCAGCCCCTG	eekd$_{10}$kke	18	34273	34288	1698
548159	2175	2190	CGCATTGTCAGCCCCT	eekd$_{10}$kke	59	34274	34289	1699
548160	2176	2191	TCGCATTGTCAGCCCC	eekd$_{10}$kke	60	34275	34290	1700
548161	2177	2192	CTCGCATTGTCAGCCC	eekd$_{10}$kke	59	34276	34291	1701
548162	2178	2193	CCTCGCATTGTCAGCC	eekd$_{10}$kke	25	34277	34292	1702
548163	2179	2194	ACCTCGCATTGTCAGC	eekd$_{10}$kke	46	34278	34293	1703
548164	2180	2195	GACCTCGCATTGTCAG	eekd$_{10}$kke	40	34279	34294	1704
548165	2181	2196	CGACCTCGCATTGTCA	eekd$_{10}$kke	53	34280	34295	1705

	548166	2182	2197	GCGACCTCGCATTGTC	eekd$_{10}$kke	0	34281	34296	1706
	548167	2183	2198	TGCGACCTCGCATTGT	eekd$_{10}$kke	36	34282	34297	1707
	548168	2184	2199	TTGCGACCTCGCATTG	eekd$_{10}$kke	61	34283	34298	1708
	548169	2185	2200	GTTGCGACCTCGCATT	eekd$_{10}$kke	7	34284	34299	1709
	548170	2186	2201	AGTTGCGACCTCGCAT	eekd$_{10}$kke	68	34285	34300	1710
	548171	2187	2202	CAGTTGCGACCTCGCA	eekd$_{10}$kke	47	34286	34301	1711
	548172	2188	2203	TCAGTTGCGACCTCGC	eekd$_{10}$kke	0	34287	34302	1712
	548173	2189	2204	CTCAGTTGCGACCTCG	eekd$_{10}$kke	51	34288	34303	1713
	548174	2190	2205	TCTCAGTTGCGACCTC	eekd$_{10}$kke	68	34289	34304	1714
	548175	2191	2206	ATCTCAGTTGCGACCT	eekd$_{10}$kke	0	34290	34305	1715
	548176	2192	2207	GATCTCAGTTGCGACC	eekd$_{10}$kke	38	34291	34306	1716
	548177	2193	2208	AGATCTCAGTTGCGAC	eekd$_{10}$kke	45	34292	34307	1717
	548178	2194	2209	GAGATCTCAGTTGCGA	eekd$_{10}$kke	54	34293	34308	1718
	548179	2195	2210	GGAGATCTCAGTTGCG	eekd$_{10}$kke	52	34294	34309	1719
	548180	2199	2214	TCATGGAGATCTCAGT	eekd$_{10}$kke	79	34298	34313	1720
	548181	2200	2215	GTCATGGAGATCTCAG	eekd$_{10}$kke	55	34299	34314	1721
	548182	2201	2216	AGTCATGGAGATCTCA	eekd$_{10}$kke	55	34300	34315	1722
	548183	2202	2217	CAGTCATGGAGATCTC	eekd$_{10}$kke	43	34301	34316	1723
	548184	2203	2218	ACAGTCATGGAGATCT	eekd$_{10}$kke	73	34302	34317	1724
	548185	2208	2223	AACACACAGTCATGGA	eekd$_{10}$kke	23	34307	34322	1725
[2098]	548186	2209	2224	CAACACACAGTCATGG	eekd$_{10}$kke	0	34308	34323	1726
	548187	n/a	n/a	CATCCTATCCGTGTTC	eekd$_{10}$kke	33	3279	3294	1727
	548189	n/a	n/a	CATGAACATCCTATCC	eekd$_{10}$kke	24	3285	3300	1728
	548190	n/a	n/a	TATTCCATGAACATCC	eekd$_{10}$kke	43	3290	3305	1729
	548191	n/a	n/a	GTCAACATATTCCATG	eekd$_{10}$kke	0	3297	3312	1730
	548192	n/a	n/a	CCTGTCAACATATTCC	eekd$_{10}$kke	65	3300	3315	1731
	548193	n/a	n/a	TGTCCTGTCAACATAT	eekd$_{10}$kke	58	3303	3318	1732
	548194	n/a	n/a	GCCAACAGTTTCAACT	eekd$_{10}$kke	61	3322	3337	1733
	548195	n/a	n/a	TTCTGCCAACAGTTTC	eekd$_{10}$kke	84	3326	3341	1734
	548196	n/a	n/a	CAATATTGACTTTGGG	eekd$_{10}$kke	6	3343	3358	1735
	548197	n/a	n/a	TGCTTGGCTTCAATAT	eekd$_{10}$kke	68	3353	3368	1736
	548198	n/a	n/a	ACTGCAGGCAATATTT	eekd$_{10}$kke	49	3369	3384	1737
	548199	n/a	n/a	GCACTGCAGGCAATAT	eekd$_{10}$kke	24	3371	3386	1738
	548200	n/a	n/a	CTAATGTGGCACTGCA	eekd$_{10}$kke	19	3379	3394	1739
	548201	n/a	n/a	TGTTCTAATGTGGCAC	eekd$_{10}$kke	67	3383	3398	1740
	548202	n/a	n/a	GCTGTTCTAATGTGGC	eekd$_{10}$kke	9	3385	3400	1741
	548203	n/a	n/a	TGACTAGTGAATGGCT	eekd$_{10}$kke	73	2280	2295	1742
	548204	n/a	n/a	TCTGACTAGTGAATGG	eekd$_{10}$kke	25	2282	2297	1743
	548205	n/a	n/a	TCAATCTGACTAGTGA	eekd$_{10}$kke	14	2286	2301	1744
	548206	n/a	n/a	GGTCAATCTGACTAGT	eekd$_{10}$kke	45	2288	2303	1745
	548207	n/a	n/a	CTGGTCAATCTGACTA	eekd$_{10}$kke	60	2290	2305	1746

[2099]

548208	n/a	n/a	CTCTGGTCAATCTGAC	eekd$_{10}$kke	19	2292	2307	1747
548209	n/a	n/a	CAATCTCTGGTCAATC	eekd$_{10}$kke	57	2296	2311	1748
548210	n/a	n/a	CAACAATCTCTGGTCA	eekd$_{10}$kke	55	2299	2314	1749
548211	n/a	n/a	ACCAACAATCTCTGGT	eekd$_{10}$kke	51	2301	2316	1750
548212	n/a	n/a	AGCCCACCAACAATCT	eekd$_{10}$kke	44	2306	2321	1751
548213	n/a	n/a	GACAGCCCACCAACAA	eekd$_{10}$kke	70	2309	2324	1752
548214	n/a	n/a	CAGACAGCCCACCAAC	eekd$_{10}$kke	55	2311	2326	1753
548215	n/a	n/a	GCATAGACCCCAACAG	eekd$_{10}$kke	61	2324	2339	1754
548216	n/a	n/a	GTGCATAGACCCCAAC	eekd$_{10}$kke	45	2326	2341	1755
548217	n/a	n/a	CTGTGCATAGACCCCA	eekd$_{10}$kke	69	2328	2343	1756
548218	n/a	n/a	TCCTGTGCATAGACCC	eekd$_{10}$kke	59	2330	2345	1757
548219	n/a	n/a	GAAATCCTGTGCATAG	eekd$_{10}$kke	8	2334	2349	1758
548220	n/a	n/a	GCAGAAATCCTGTGCA	eekd$_{10}$kke	69	2337	2352	1759
548221	n/a	n/a	ACTCCAGCAGAAATCC	eekd$_{10}$kke	49	2343	2358	1760
548222	n/a	n/a	AATCATGCCTTGTGGG	eekd$_{10}$kke	32	4765	4780	1761
548223	n/a	n/a	TAGACCCAGAATCATG	eekd$_{10}$kke	50	4774	4789	1762
548224	n/a	n/a	CCATAGACCCAGAATC	eekd$_{10}$kke	20	4777	4792	1763
548225	n/a	n/a	AGTCACCATAGACCCA	eekd$_{10}$kke	48	4782	4797	1764
548226	n/a	n/a	TAAGTCACCATAGACC	eekd$_{10}$kke	39	4784	4799	1765
548227	n/a	n/a	GTGGCCCTCTTAAGTC	eekd$_{10}$kke	0	4794	4809	1766

[2100] 表147

[2101]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	42	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	

[2102]

						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	80	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548228	n/a	n/a	GTTGTGTGGCCCTCTT	eekd$_{10}$kke	37	4799	4814	1767
548229	n/a	n/a	CATTGTTGTGTGGCCC	eekd$_{10}$kke	31	4803	4818	1768
548230	n/a	n/a	TACTCATTGTTGTGTG	eekd$_{10}$kke	10	4807	4822	1769
548231	n/a	n/a	AATACTCATTGTTGTG	eekd$_{10}$kke	11	4809	4824	1770
548232	n/a	n/a	GCCATACATCTGAGGA	eekd$_{10}$kke	3	4831	4846	1771
548233	n/a	n/a	ATTGTAGCCATACATC	eekd$_{10}$kke	38	4837	4852	1772
548234	n/a	n/a	TTATTGTAGCCATACA	eekd$_{10}$kke	17	4839	4854	1773
548235	n/a	n/a	TCTAGATGACCTGAAG	eekd$_{10}$kke	0	18147	18162	1774
548236	n/a	n/a	TACATCTAGATGACCT	eekd$_{10}$kke	37	18151	18166	1775
548237	n/a	n/a	GTATACATCTAGATGA	eekd$_{10}$kke	22	18154	18169	1776
548238	n/a	n/a	ACTCGCCTTTGTGACT	eekd$_{10}$kke	31	26268	26283	1777
548239	n/a	n/a	TACTCGCCTTTGTGAC	eekd$_{10}$kke	18	26269	26284	1778
548240	n/a	n/a	ATACTCGCCTTTGTGA	eekd$_{10}$kke	3	26270	26285	1779
						26301	26316	
548241	n/a	n/a	CATACTCGCCTTTGTG	eekd$_{10}$kke	1	26271	26286	1780
						26302	26317	
548242	n/a	n/a	GCATACTCGCCTTTGT	eekd$_{10}$kke	25	26272	26287	1781
						26303	26318	
548243	n/a	n/a	ATGCATACTCGCCTTT	eekd$_{10}$kke	0	26274	26289	1782
						26305	26320	

[2103]

548244	n/a	n/a	CATGCATACTCGCCTT	eekd$_{10}$kke	51	26275 26306	26290 26321	1783
548245	n/a	n/a	CCATGCATACTCGCCT	eekd$_{10}$kke	31	26276 26307	26291 26322	1784
548246	n/a	n/a	TTCCATGCATACTCGC	eekd$_{10}$kke	46	26278	26293	1785
548247	n/a	n/a	CGATTTTCCATGCATA	eekd$_{10}$kke	56	26283	26298	1786
548248	n/a	n/a	TGCGATTTTCCATGCA	eekd$_{10}$kke	13	26285	26300	1787
548249	n/a	n/a	TGTGATGCGATTTTCC	eekd$_{10}$kke	22	26290	26305	1788
548250	n/a	n/a	CTTTGTGATGCGATTT	eekd$_{10}$kke	0	26293	26308	1789
548251	n/a	n/a	GCCTTTGTGATGCGAT	eekd$_{10}$kke	13	26295	26310	1790
548252	n/a	n/a	ACTCGCCTTTGTGATG	eekd$_{10}$kke	33	26299	26314	1791
548253	n/a	n/a	TACTCGCCTTTGTGAT	eekd$_{10}$kke	8	26300	26315	1792
548254	n/a	n/a	CCCATGCATACTCGCC	eekd$_{10}$kke	39	26308	26323	1793
548255	n/a	n/a	CCCCATGCATACTCGC	eekd$_{10}$kke	38	26309	26324	1794
548256	n/a	n/a	GCTCCCCATGCATACT	eekd$_{10}$kke	25	26312	26327	1795
548257	n/a	n/a	AGTGCTCCCCATGCAT	eekd$_{10}$kke	2	26315	26330	1796
548258	n/a	n/a	CAAGTGCTCCCCATGC	eekd$_{10}$kke	0	26317	26332	1797
548259	n/a	n/a	GTGATGAAAGTACAGC	eekd$_{10}$kke	45	26335	26350	1798
548260	n/a	n/a	AGGAGTTTGTCAGAAC	eekd$_{10}$kke	28	3210	3225	1799
548261	n/a	n/a	TTCAGGGAGTGATGTC	eekd$_{10}$kke	36	3241	3256	1800
548262	n/a	n/a	CCTATCCGTGTTCAGC	eekd$_{10}$kke	73	3276	3291	1801
548263	n/a	n/a	CTCTACATACTCAGGA	eekd$_{10}$kke	62	3561	3576	1802
548264	n/a	n/a	CAGTCCAAAAATCCCT	eekd$_{10}$kke	60	3701	3716	1803
548265	n/a	n/a	CCTCTTGATTTGGGCA	eekd$_{10}$kke	85	3749	3764	1804
548266	n/a	n/a	TTGGCCAACTCTGTGG	eekd$_{10}$kke	44	3816	3831	1805
548267	n/a	n/a	GACCTCCAGACTACTG	eekd$_{10}$kke	34	3848	3863	1806
548268	n/a	n/a	TGTGTCTAGGGAGTTG	eekd$_{10}$kke	52	3898	3913	1807
548269	n/a	n/a	AGCACACAATTACTGG	eekd$_{10}$kke	62	3946	3961	1808
548270	n/a	n/a	CTGCTGGTTTTAGACC	eekd$_{10}$kke	28	4029	4044	1809
548271	n/a	n/a	TTCACTTACCACAGGA	eekd$_{10}$kke	56	4122	4137	1810
548272	n/a	n/a	GGTGCCACTTGCTTGG	eekd$_{10}$kke	54	4178	4193	1811
548273	n/a	n/a	AATCTCCACCCCCGAA	eekd$_{10}$kke	5	4224	4239	1812
548274	n/a	n/a	TACCTGACAAGTGGTC	eekd$_{10}$kke	0	4287	4302	1813
548275	n/a	n/a	GTCCCAAGACATTCCT	eekd$_{10}$kke	40	4350	4365	1814
548276	n/a	n/a	CAGAGTGTCATCTGCG	eekd$_{10}$kke	49	4389	4404	1815
548277	n/a	n/a	GGATTGGACCCAGACA	eekd$_{10}$kke	57	4511	4526	1816
548278	n/a	n/a	GGTTCCCTAGCGGTCC	eekd$_{10}$kke	74	4564	4579	1817
548279	n/a	n/a	CACCTAGAACTATCCA	eekd$_{10}$kke	39	4632	4647	1818
548280	n/a	n/a	CTCCCTCTGTAATGAT	eekd$_{10}$kke	43	4736	4751	1819
548281	n/a	n/a	GGTTGAGGGACAGACA	eekd$_{10}$kke	0	4944	4959	1820
548282	n/a	n/a	GTGGGTTTGCACATGG	eekd$_{10}$kke	73	4992	5007	1821

548283	n/a	n/a	GGCTTATGCTCCTTCT	eekd$_{10}$kke	56	5017	5032	1822
548284	n/a	n/a	CCCCCTGTAGTTGGCT	eekd$_{10}$kke	35	5051	5066	1823
548285	n/a	n/a	GCTTACTTACATCCCT	eekd$_{10}$kke	52	5132	5147	1824
548286	n/a	n/a	GGGACTACATGCAATA	eekd$_{10}$kke	47	5166	5181	1825
548287	n/a	n/a	GTCAAAGAGTGTCCAC	eekd$_{10}$kke	38	5283	5298	1826
548288	n/a	n/a	GAATAGCAAGCTCCAA	eekd$_{10}$kke	64	5348	5363	1827
548289	n/a	n/a	CATGATACCACACCAC	eekd$_{10}$kke	28	5484	5499	1828
548290	n/a	n/a	GAGCACTCTTATTAGC	eekd$_{10}$kke	31	5546	5561	1829
548291	n/a	n/a	CCTGTTAGAGTTGGCC	eekd$_{10}$kke	35	5576	5591	1830
548292	n/a	n/a	AGGACACTGTTTCCAG	eekd$_{10}$kke	38	5627	5642	1831
548293	n/a	n/a	GTCACCAGAACCACAT	eekd$_{10}$kke	44	5683	5698	1832
548294	n/a	n/a	GTGTGCACTTTCTGGT	eekd$_{10}$kke	33	5716	5731	1833
548295	n/a	n/a	CTCTGATTGGGTCACC	eekd$_{10}$kke	26	5746	5761	1834
548296	n/a	n/a	ACCAACAACTCAGGCC	eekd$_{10}$kke	34	5858	5873	1835
548297	n/a	n/a	ACTCTCAAGCTCCACG	eekd$_{10}$kke	32	5889	5904	1836
548298	n/a	n/a	GGACAATATGTCTCCT	eekd$_{10}$kke	0	5935	5950	1837
548299	n/a	n/a	CATTGTGCTCAACTGA	eekd$_{10}$kke	35	5961	5976	1838
548300	n/a	n/a	GCCCATGGTGAATCTG	eekd$_{10}$kke	53	5995	6010	1839
548301	n/a	n/a	CCTAGTACAAAGTGGC	eekd$_{10}$kke	65	6050	6065	1840
548302	n/a	n/a	GCCATTTTATCCCTGA	eekd$_{10}$kke	71	6134	6149	1841
548303	n/a	n/a	GGGCCCCCATGTCCAT	eekd$_{10}$kke	0	6336	6351	1842

[2104]

[2105] 表148

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	72	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	

[2106]

[2107]

						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	67	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548305	n/a	n/a	GTTCTTGCTTATCCTC	eekd$_{10}$kke	55	6484	6499	1843
548306	n/a	n/a	ATGTGACAGTCAGGGA	eekd$_{10}$kke	8	6559	6574	1844
548307	n/a	n/a	TTCTGCAACTGAGCCT	eekd$_{10}$kke	6	6587	6602	1845
548308	n/a	n/a	AATGGCAGGTCCTGGC	eekd$_{10}$kke	9	6616	6631	1846
548309	n/a	n/a	AGACAGTTGGTGGTTT	eekd$_{10}$kke	41	6700	6715	1847
548310	n/a	n/a	GAGGAGTTGGTTTAGT	eekd$_{10}$kke	0	6750	6765	1848
548311	n/a	n/a	TGACCACCTCTCGGGT	eekd$_{10}$kke	10	6860	6875	1849
548312	n/a	n/a	ATTTGGCCCTGAGCCC	eekd$_{10}$kke	0	6935	6950	1850
548313	n/a	n/a	GCCTTTGAGGGAGTGG	eekd$_{10}$kke	35	7024	7039	1851
548314	n/a	n/a	ACAACCTGTCCATTCC	eekd$_{10}$kke	43	7087	7102	1852
548315	n/a	n/a	GTTGTCAACTGGGACC	eekd$_{10}$kke	14	7125	7140	1853
548316	n/a	n/a	CTGTTCAGGTAGCACA	eekd$_{10}$kke	64	7150	7165	1854
548317	n/a	n/a	CCGGGAAAGACTGTCT	eekd$_{10}$kke	42	7190	7205	1855
548318	n/a	n/a	ACTGCACCCCACATAT	eekd$_{10}$kke	18	7257	7272	1856
548319	n/a	n/a	CCTCATCTCAGTATGA	eekd$_{10}$kke	26	7398	7413	1857
548320	n/a	n/a	GCACACAGACTTGCCC	eekd$_{10}$kke	0	7508	7523	1858
548321	n/a	n/a	CTGCATCTGGACTATG	eekd$_{10}$kke	38	7559	7574	1859
548322	n/a	n/a	AGGGAAATTAGAGGCA	eekd$_{10}$kke	38	7586	7601	1860
548323	n/a	n/a	CTGTTGCCTGACATGC	eekd$_{10}$kke	43	7696	7711	1861
548324	n/a	n/a	ACATAAATTCCCCACA	eekd$_{10}$kke	29	7741	7756	1862
548325	n/a	n/a	CCCACTGACTGACTAC	eekd$_{10}$kke	27	7906	7921	1863

	548326	n/a	n/a	TCCTGTGACAGAACCA	eekd$_{10}$kke	27	7988	8003	1864
	548327	n/a	n/a	CTACACCTTTCTGCAC	eekd$_{10}$kke	6	8221	8236	1865
	548328	n/a	n/a	GGTCCTTGAACCCCGT	eekd$_{10}$kke	68	8260	8275	1866
	548329	n/a	n/a	AGCAGATCTGGGTTGT	eekd$_{10}$kke	59	8328	8343	1867
	548330	n/a	n/a	GACTAGCTTCTACTAC	eekd$_{10}$kke	34	8404	8419	1868
	548331	n/a	n/a	ACAATCCCTTAGCCCA	eekd$_{10}$kke	73	8457	8472	1869
	548332	n/a	n/a	GATGAAATGTGCACCT	eekd$_{10}$kke	46	8491	8506	1870
	548333	n/a	n/a	GACTGTGCTATCCGCT	eekd$_{10}$kke	58	8550	8565	1871
	548334	n/a	n/a	GCTCACTATAGGCCCC	eekd$_{10}$kke	69	8656	8671	1872
	548335	n/a	n/a	TAGCATCATGCCACAG	eekd$_{10}$kke	51	8684	8699	1873
	548336	n/a	n/a	GCACATTAGGAGGTAG	eekd$_{10}$kke	1	9039	9054	1874
	548337	n/a	n/a	TACCGCTGGGTGCGGT	eekd$_{10}$kke	10	9075	9090	1875
	548338	n/a	n/a	ATGAAACTGTGGCTCG	eekd$_{10}$kke	80	9131	9146	1876
	548339	n/a	n/a	ACATGTGGGATCAGAG	eekd$_{10}$kke	37	9275	9290	1877
	548340	n/a	n/a	GATGATCCTCACATAC	eekd$_{10}$kke	35	9316	9331	1878
	548341	n/a	n/a	TAGAACCTTCCTCCAC	eekd$_{10}$kke	30	9341	9356	1879
	548342	n/a	n/a	GGAAGACTTCCCTCTG	eekd$_{10}$kke	0	9403	9418	1880
	548343	n/a	n/a	TAGTGATAAGAGCTGG	eekd$_{10}$kke	78	9472	9487	1881
	548344	n/a	n/a	GGCAACTATGTTCTCA	eekd$_{10}$kke	76	9536	9551	1882
	548345	n/a	n/a	CTAACTCCATCACTGC	eekd$_{10}$kke	55	9637	9652	1883
[2108]	548346	n/a	n/a	TCCCCAATACTTGCTG	eekd$_{10}$kke	35	9696	9711	1884
	548347	n/a	n/a	GCTGTTCTAAGCGAGA	eekd$_{10}$kke	31	9976	9991	1885
	548348	n/a	n/a	TGAGTGATGCCTTCCA	eekd$_{10}$kke	82	10024	10039	1886
	548349	n/a	n/a	TCCAGAATACTGCCCC	eekd$_{10}$kke	61	10054	10069	1887
	548350	n/a	n/a	GCGCTAACCTCATAAA	eekd$_{10}$kke	29	10148	10163	1888
	548351	n/a	n/a	CTGGAAACGAGACACA	eekd$_{10}$kke	33	10201	10216	1889
	548352	n/a	n/a	GAGAGAGATGTTCCCT	eekd$_{10}$kke	47	10240	10255	1890
	548353	n/a	n/a	CTGCTGGTTGAGAATC	eekd$_{10}$kke	48	10287	10302	1891
	548354	n/a	n/a	ATGTCCCCAGTGGAAG	eekd$_{10}$kke	41	10314	10329	1892
	548355	n/a	n/a	GCATCCTCCCTAGTTG	eekd$_{10}$kke	47	10362	10377	1893
	548356	n/a	n/a	TGTTGGTCAGCATTCA	eekd$_{10}$kke	63	10411	10426	1894
	548357	n/a	n/a	GACGACTGCCCTGTGC	eekd$_{10}$kke	69	10436	10451	1895
	548358	n/a	n/a	ATTTGGGCCTAGTGGT	eekd$_{10}$kke	0	10515	10530	1896
	548359	n/a	n/a	CCTAGTCCTCAAGTTT	eekd$_{10}$kke	0	10580	10595	1897
	548360	n/a	n/a	CAAGACATCAGTAGCT	eekd$_{10}$kke	45	10626	10641	1898
	548361	n/a	n/a	CTTATCAGTCCCAGTC	eekd$_{10}$kke	52	10702	10717	1899
	548362	n/a	n/a	GACAACCCATCAGTTG	eekd$_{10}$kke	33	10742	10757	1900
	548363	n/a	n/a	CAGCAGGCTCAAAGTG	eekd$_{10}$kke	37	10915	10930	1901
	548364	n/a	n/a	TGGCTAAGTCAGGCCC	eekd$_{10}$kke	30	10982	10997	1902
	548365	n/a	n/a	TGTACTCCACCTCACG	eekd$_{10}$kke	55	11017	11032	1903
	548366	n/a	n/a	AGCAAGCTAAGTGAGT	eekd$_{10}$kke	5	11199	11214	1904

[2109]

548367	n/a	n/a	GTTCTTGAGTGTAGAG	eekd$_{10}$kke	52	11260	11275	1905
548368	n/a	n/a	GTGTTCATACGGAAGC	eekd$_{10}$kke	59	11299	11314	1906
548369	n/a	n/a	GTTGGGATGCGACTCT	eekd$_{10}$kke	50	11335	11350	1907
548370	n/a	n/a	ACGAAGTCTCTTTCCT	eekd$_{10}$kke	53	11385	11400	1908
548371	n/a	n/a	CGATGAGTTGGGCAGG	eekd$_{10}$kke	57	11454	11469	1909
548372	n/a	n/a	GATACCTTTCCACTCC	eekd$_{10}$kke	61	11558	11573	1910
548373	n/a	n/a	TCCCCAAGATTATGTG	eekd$_{10}$kke	16	11596	11611	1911
548374	n/a	n/a	GCACCCTTTTCATTGA	eekd$_{10}$kke	41	12074	12089	1912
548375	n/a	n/a	TCGACTTCTCCTGTCT	eekd$_{10}$kke	27	12199	12214	1913
548376	n/a	n/a	GCCTTTGACCTTTCGC	eekd$_{10}$kke	65	12261	12276	1914
548377	n/a	n/a	GTGTGCTGAGGTTTGC	eekd$_{10}$kke	80	12297	12312	1915
548378	n/a	n/a	GCAAGATGCATGCAGC	eekd$_{10}$kke	49	12393	12408	1916
548379	n/a	n/a	ATCGAACTCTGCTTGA	eekd$_{10}$kke	44	12477	12492	1917
548380	n/a	n/a	GCCCAGTTTTGGCAAC	eekd$_{10}$kke	7	12540	12555	1918
548381	n/a	n/a	CCCACTACCATTTGGG	eekd$_{10}$kke	0	12578	12593	1919

[2110] 表149

[2111]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	64	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	

[2112]

						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548459	n/a	n/a	CAACTATAACAGTATC	eekd$_{10}$kke	26	15903	15918	1920
548460	n/a	n/a	CTATACCACGGTAACT	eekd$_{10}$kke	0	16036	16051	1921
548461	n/a	n/a	CCTATATCACTGTAAC	eekd$_{10}$kke	0	16127	16142	1922
548462	n/a	n/a	ACCTATATCACTGTAA	eekd$_{10}$kke	0	16128	16143	1923
548463	n/a	n/a	TCACTGTACCTATATC	eekd$_{10}$kke	0	16135	16150	1924
548464	n/a	n/a	GTCCTATAACTATATC	eekd$_{10}$kke	0	16174	16189	1925
548465	n/a	n/a	CTGTACCTATAACTGT	eekd$_{10}$kke	0	16202	16217	1926
548466	n/a	n/a	CGTCACTGTACCTATA	eekd$_{10}$kke	71	16207	16222	1927
548467	n/a	n/a	CATCACTGTACCTATA	eekd$_{10}$kke	20	16258	16273	1928
548468	n/a	n/a	CAACATCACTGTACCT	eekd$_{10}$kke	6	16261	16276	1929
548469	n/a	n/a	TTCCCTACCCCTGGTA	eekd$_{10}$kke	0	16331	16346	1930
548470	n/a	n/a	GGTGGAATGTCATGGC	eekd$_{10}$kke	56	16404	16419	1931
548471	n/a	n/a	GCGGAAAACTGGCCGT	eekd$_{10}$kke	17	16474	16489	1932
548472	n/a	n/a	CCCAATACAGGGCCAG	eekd$_{10}$kke	0	16513	16528	1933
548473	n/a	n/a	CCAACCTTCCCAATCT	eekd$_{10}$kke	0	16554	16569	1934
548474	n/a	n/a	GAAGGTGTGCTGTCGC	eekd$_{10}$kke	33	16602	16617	1935
548475	n/a	n/a	ATCGAGTCCTGCCTCC	eekd$_{10}$kke	17	16707	16722	1936
548476	n/a	n/a	GCAAATCCTTCCAGCA	eekd$_{10}$kke	27	16755	16770	1937
548477	n/a	n/a	GCACGAGCTTGCCTGT	eekd$_{10}$kke	26	16787	16802	1938
548478	n/a	n/a	GAGCCATCCAGGGTGC	eekd$_{10}$kke	53	16845	16860	1939
548479	n/a	n/a	AGGCCATTTGATCCGA	eekd$_{10}$kke	68	16913	16928	1940
548480	n/a	n/a	GCCACGCCCTTAGCAG	eekd$_{10}$kke	20	16973	16988	1941
548481	n/a	n/a	GTTCCCTGAGGAACGG	eekd$_{10}$kke	2	17010	17025	1942
548482	n/a	n/a	GGCAGTTAGGCCAGGA	eekd$_{10}$kke	53	17068	17083	1943
548483	n/a	n/a	CTACAGATCATCCCTA	eekd$_{10}$kke	5	17102	17117	1944
548484	n/a	n/a	CCCCGGAGCACCTTCA	eekd$_{10}$kke	41	17207	17222	1945
548485	n/a	n/a	GTGACCCAAGGGTCGA	eekd$_{10}$kke	17	17252	17267	1946
548486	n/a	n/a	CGTGGTTAGCCTGACA	eekd$_{10}$kke	68	17416	17431	1947

	548487	n/a	n/a	TCCATGTCAGAGTTGC	eekd$_{10}$kke	71	17461	17476	1948
	548488	n/a	n/a	CCTCCTTTTGGCTTGA	eekd$_{10}$kke	63	17530	17545	1949
	548489	n/a	n/a	TTCCCCAGAGGTGATA	eekd$_{10}$kke	16	17582	17597	1950
	548490	n/a	n/a	TCTGGTTAGCCTCCGA	eekd$_{10}$kke	58	17664	17679	1951
	548491	n/a	n/a	TGGCCAAGCAACCAGT	eekd$_{10}$kke	57	17715	17730	1952
	548492	n/a	n/a	GCCCAATGTCCTAACC	eekd$_{10}$kke	51	17794	17809	1953
	548493	n/a	n/a	CCACCGCTGCCCGCCA	eekd$_{10}$kke	37	18013	18028	1954
	548494	n/a	n/a	TGTGACCCCCCACCGC	eekd$_{10}$kke	39	18022	18037	1955
	548495	n/a	n/a	TTGTGACCCCCCACCG	eekd$_{10}$kke	55	18023	18038	1956
	548496	n/a	n/a	ACTGAACCCCCTTAGG	eekd$_{10}$kke	0	18571	18586	1957
	548497	n/a	n/a	CCTTCATACCCCTCAC	eekd$_{10}$kke	26	18725	18740	1958
	548498	n/a	n/a	CCGATAACAGACCGGC	eekd$_{10}$kke	71	18795	18810	1959
	548499	n/a	n/a	ATACCCGGAGTCAGGA	eekd$_{10}$kke	56	18955	18970	1960
	548500	n/a	n/a	ATTGCTCAGGCCCCCT	eekd$_{10}$kke	29	19037	19052	1961
	548501	n/a	n/a	CAAGCCACTAACCCAC	eekd$_{10}$kke	33	19147	19162	1962
	548502	n/a	n/a	AATTCTTGGACCAAGG	eekd$_{10}$kke	25	19234	19249	1963
	548503	n/a	n/a	CCATCTACTCCCCCAT	eekd$_{10}$kke	9	19291	19306	1964
	548504	n/a	n/a	GCAGCGAGCATTCCAA	eekd$_{10}$kke	28	19352	19367	1965
	548505	n/a	n/a	GGACAATGCCTATGCT	eekd$_{10}$kke	21	19386	19401	1966
	548506	n/a	n/a	GAAGCCATTCACTGCA	eekd$_{10}$kke	32	19436	19451	1967
[2113]	548507	n/a	n/a	AAACTCCTCTCAAGGC	eekd$_{10}$kke	53	19474	19489	1968
	548508	n/a	n/a	GCACCACCATGCGGTT	eekd$_{10}$kke	43	19553	19568	1969
	548509	n/a	n/a	TGCAGGGCTGCGCAGT	eekd$_{10}$kke	41	19960	19975	1970
	548510	n/a	n/a	TTAGCCACTCCTCTTG	eekd$_{10}$kke	30	20062	20077	1971
	548511	n/a	n/a	AGCTAGCTGACCCCAA	eekd$_{10}$kke	16	20092	20107	1972
	548512	n/a	n/a	TCCGCCTTTGGATACT	eekd$_{10}$kke	49	20155	20170	1973
	548513	n/a	n/a	CCTGCTGATTGTGTCT	eekd$_{10}$kke	16	20240	20255	1974
	548514	n/a	n/a	TCGAGGACAGCCCCCA	eekd$_{10}$kke	40	20335	20350	1975
	548515	n/a	n/a	ACCCGTCAGCCTCAGC	eekd$_{10}$kke	59	20381	20396	1976
	548516	n/a	n/a	CTTGCCTATTCACCCC	eekd$_{10}$kke	49	20544	20559	1977
	548517	n/a	n/a	CGGACAAGCCTTACAG	eekd$_{10}$kke	43	20596	20611	1978
	548518	n/a	n/a	CACACTTACCCCGCTC	eekd$_{10}$kke	12	20741	20756	1979
	548519	n/a	n/a	CCTCCCCTTGTGTGTC	eekd$_{10}$kke	31	20843	20858	1980
	548520	n/a	n/a	CCGCTTCCCTGACTGT	eekd$_{10}$kke	43	20919	20934	1981
	548521	n/a	n/a	CAGCTCCCTTACTAGG	eekd$_{10}$kke	61	20958	20973	1982
	548522	n/a	n/a	AGGTATTGACCGCCAG	eekd$_{10}$kke	55	21062	21077	1983
	548523	n/a	n/a	GGTAAATCCATCCCCT	eekd$_{10}$kke	44	21157	21172	1984
	548524	n/a	n/a	GCCCGATCACCTTAGA	eekd$_{10}$kke	45	21220	21235	1985
	548525	n/a	n/a	GTCTAACTGGCCTGGC	eekd$_{10}$kke	2	21328	21343	1986
	548526	n/a	n/a	CTAAGCTGTGTCTCAT	eekd$_{10}$kke	26	21373	21388	1987
	548527	n/a	n/a	TGTTTCAAGTGCCAGA	eekd$_{10}$kke	50	21434	21449	1988

[2114]

548528	n/a	n/a	TGCAGTGGTCAAGCAT	eekd$_{10}$kke	32	21478	21493	1989
548529	n/a	n/a	GCGATTCCTTGCCTCT	eekd$_{10}$kke	56	21554	21569	1990
548530	n/a	n/a	ATAATAGAGGCAGCCA	eekd$_{10}$kke	50	21592	21607	1991
548531	n/a	n/a	GTCAGAAGGCCTCTTA	eekd$_{10}$kke	21	21753	21768	1992
548532	n/a	n/a	TATTTATCCGACCTCT	eekd$_{10}$kke	34	21881	21896	1993
548533	n/a	n/a	GAGGTGGTTGGAGCTA	eekd$_{10}$kke	9	21926	21941	1994
548534	n/a	n/a	CAGATCCCAATTCTTC	eekd$_{10}$kke	22	22063	22078	1995
548535	n/a	n/a	GAGTCTTTCCAATCCT	eekd$_{10}$kke	13	22142	22157	1996

[2115] 表150

[2116]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	64	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	

[2117]

						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548536	n/a	n/a	TCTCAATCCCAACCCC	eekd$_{10}$kke	0	22168	22183	1997
548537	n/a	n/a	CCTCAATCCCAACCCA	eekd$_{10}$kke	0	22191	22206	1998
548538	n/a	n/a	TAGTGGCAAGAACCAC	eekd$_{10}$kke	0	22627	22642	1999
548539	n/a	n/a	CGCGCGAATGCCTGCC	eekd$_{10}$kke	41	22658	22673	2000
548540	n/a	n/a	GACACCTGCTTGATTA	eekd$_{10}$kke	7	22704	22719	2001
548541	n/a	n/a	GGCACTGGTCATGGAC	eekd$_{10}$kke	39	22760	22775	2002
548542	n/a	n/a	GCGCCATCCTTCAATC	eekd$_{10}$kke	7	22857	22872	2003
548543	n/a	n/a	GATCCACCCATGACCT	eekd$_{10}$kke	32	22997	23012	2004
548544	n/a	n/a	GCTGTGACTCAGATCA	eekd$_{10}$kke	62	23070	23085	2005
548545	n/a	n/a	CTCTTCGCATGGACAC	eekd$_{10}$kke	46	23100	23115	2006
548546	n/a	n/a	GCCCAAGCCTACATGC	eekd$_{10}$kke	35	23430	23445	2007
548547	n/a	n/a	GTGCGATTAAGCCCCA	eekd$_{10}$kke	86	23514	23529	2008
548548	n/a	n/a	GCTTGTAGAAGGGATT	eekd$_{10}$kke	54	23631	23646	2009
548549	n/a	n/a	TGTGCAATCAGGTGGA	eekd$_{10}$kke	56	23765	23780	2010
548550	n/a	n/a	CCGGCCTGGATACAGC	eekd$_{10}$kke	0	23831	23846	2011
548551	n/a	n/a	CGGCCAATGGGAAAGG	eekd$_{10}$kke	25	24175	24190	2012
548552	n/a	n/a	TGGAGGAGTAGGGAAT	eekd$_{10}$kke	10	24200	24215	2013
548553	n/a	n/a	CCCGAAGAGTCAAGTC	eekd$_{10}$kke	46	24255	24270	2014
548554	n/a	n/a	GTGCTGCATTGCATGA	eekd$_{10}$kke	42	24290	24305	2015
548555	n/a	n/a	ACACGCCAGGTGAAAA	eekd$_{10}$kke	2	24322	24337	2016
548556	n/a	n/a	ATGCATGCCTACCCAA	eekd$_{10}$kke	43	24526	24541	2017
548557	n/a	n/a	GTTACTCTGTGATCCA	eekd$_{10}$kke	81	24581	24596	2018
548558	n/a	n/a	AACATTGTGTAGCTGC	eekd$_{10}$kke	75	24640	24655	2019
548559	n/a	n/a	GAGACTGAAGCCCTCA	eekd$_{10}$kke	44	24676	24691	2020
548560	n/a	n/a	CACTGCCTAGAAAGGC	eekd$_{10}$kke	16	24734	24749	2021
548561	n/a	n/a	TGTAGTATCCAGAGTA	eekd$_{10}$kke	46	24930	24945	2022
548562	n/a	n/a	AGATGACCTGCAGATG	eekd$_{10}$kke	50	24983	24998	2023
548563	n/a	n/a	AAACCATGAATTAGGT	eekd$_{10}$kke	20	25100	25115	2024
548564	n/a	n/a	TTGCTACTTTACACCA	eekd$_{10}$kke	69	25208	25223	2025
548565	n/a	n/a	GGCATTAGGATAGGCA	eekd$_{10}$kke	63	25350	25365	2026
548566	n/a	n/a	CACTCAGACTGTCTGA	eekd$_{10}$kke	0	25413	25428	2027
548567	n/a	n/a	AGATCCGGAATAACCA	eekd$_{10}$kke	67	25459	25474	2028
548568	n/a	n/a	ATTGACAACCATCCTA	eekd$_{10}$kke	27	25496	25511	2029
548569	n/a	n/a	ACTCATTGGTCTACAG	eekd$_{10}$kke	41	25559	25574	2030
548570	n/a	n/a	ATGCCTTGTGCCTATT	eekd$_{10}$kke	74	25706	25721	2031

[2118]

548571	n/a	n/a	ACTCTGAGGCCTTAGG	eekd$_{10}$kke	59	25794	25809	2032
548572	n/a	n/a	GCATTACTCAGCATGT	eekd$_{10}$kke	63	25836	25851	2033
548573	n/a	n/a	CCAGTCACCACCATTG	eekd$_{10}$kke	65	25862	25877	2034
548574	n/a	n/a	GGTCTAACTCTAAGGG	eekd$_{10}$kke	0	25920	25935	2035
548575	n/a	n/a	TGTCCTTTAAAGTATC	eekd$_{10}$kke	18	25971	25986	2036
548576	n/a	n/a	TCATGTGGCAACCTGT	eekd$_{10}$kke	41	26114	26129	2037
548577	n/a	n/a	AATCTGCACCTGGCAG	eekd$_{10}$kke	42	26428	26443	2038
548578	n/a	n/a	CATGGCTATTGCTTCC	eekd$_{10}$kke	73	26513	26528	2039
548579	n/a	n/a	GGGCTATATTGCCAGC	eekd$_{10}$kke	46	26614	26629	2040
548580	n/a	n/a	CCAGAGCCTTGATCAG	eekd$_{10}$kke	36	26681	26696	2041
548581	n/a	n/a	GGTGGGTTATCTGAGA	eekd$_{10}$kke	13	26710	26725	2042
548582	n/a	n/a	TAGCTCCATGCTGTGT	eekd$_{10}$kke	59	26735	26750	2043
548583	n/a	n/a	GGGAATTTATGCTGCC	eekd$_{10}$kke	79	26782	26797	2044
548584	n/a	n/a	TGATGAAGTTCCACCT	eekd$_{10}$kke	47	26840	26855	2045
548585	n/a	n/a	TAGGCACAGACAACCT	eekd$_{10}$kke	33	26869	26884	2046
548586	n/a	n/a	TCCAACTACAGGACTC	eekd$_{10}$kke	39	26943	26958	2047
548587	n/a	n/a	TTCTGGGAAACTCTCT	eekd$_{10}$kke	45	26969	26984	2048
548588	n/a	n/a	AGCTCACACCCAAAAA	eekd$_{10}$kke	10	27006	27021	2049
548589	n/a	n/a	TCTGTTACCTTGAGGA	eekd$_{10}$kke	40	27280	27295	2050
548590	n/a	n/a	TGGTCATGTCAACTGT	eekd$_{10}$kke	35	27550	27565	2051
548591	n/a	n/a	GTAAGCCTTCACAGGG	eekd$_{10}$kke	3	27583	27598	2052
548592	n/a	n/a	CTCACCAGAGTTGTCC	eekd$_{10}$kke	7	27726	27741	2053
548593	n/a	n/a	CATCCCTGACAGGTCC	eekd$_{10}$kke	61	27759	27774	2054
548594	n/a	n/a	CCCTTCTAACCAAGGA	eekd$_{10}$kke	30	27825	27840	2055
548595	n/a	n/a	GGATGAGATGCATCCA	eekd$_{10}$kke	8	28069	28084	2056
548596	n/a	n/a	ATGGCGGTGAAGCAGC	eekd$_{10}$kke	20	28127	28142	2057
548597	n/a	n/a	TGAATACCATCCCCGC	eekd$_{10}$kke	50	28171	28186	2058
548598	n/a	n/a	GCGCCATCTGCCCTGT	eekd$_{10}$kke	50	28253	28268	2059
548599	n/a	n/a	TGGGTTGGAGGAGTGG	eekd$_{10}$kke	19	28311	28326	2060
548600	n/a	n/a	TGGTGGTGGGATTGGT	eekd$_{10}$kke	53	28336	28351	2061
						28391	28406	
						28434	28449	
						28446	28461	
						28525	28540	
						28611	28626	
						28623	28638	
548601	n/a	n/a	TTGGTGGTGGGATTGG	eekd$_{10}$kke	18	28337	28352	2062
						28392	28407	
						28435	28450	
						28447	28462	
						28526	28541	
						28612	28627	

[2119]

						28624	28639	
548602	n/a	n/a	GGTGGTGGAATTGGTG	eekd$_{10}$kke	20	28347	28362	2063
548603	n/a	n/a	GAGATTGGTGGTGGGT	eekd$_{10}$kke	35	28372	28387	2064
548604	n/a	n/a	GTGGTGGGATTGGTGC	eekd$_{10}$kke	22	28432	28447	2065
548605	n/a	n/a	TGGCGGGATTGGTGGT	eekd$_{10}$kke	12	28479	28494	2066
						28558	28573	
548606	n/a	n/a	CGGTGGTGGGATTGGT	eekd$_{10}$kke	41	28501	28516	2067
						28580	28595	
548607	n/a	n/a	TCGGTGGTGGGATTGG	eekd$_{10}$kke	34	28502	28517	2068
						28581	28596	
548608	n/a	n/a	ATCGGTGGTGGGATTG	eekd$_{10}$kke	25	28503	28518	2069
						28582	28597	
548609	n/a	n/a	GATCGGTGGTGGGATT	eekd$_{10}$kke	30	28504	28519	2070
						28583	28598	
548610	n/a	n/a	GGATCGGTGGTGGGAT	eekd$_{10}$kke	2	28505	28520	2071
						28584	28599	
548611	n/a	n/a	GCGGGATCGGTGGTGG	eekd$_{10}$kke	7	28508	28523	2072
						28587	28602	
548612	n/a	n/a	GGCGGGATCGGTGGTG	eekd$_{10}$kke	20	28509	28524	2073
						28588	28603	

[2120] 表151

[2121]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	%抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	

[2122]

						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	64	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548382	n/a	n/a	GAGCAAATACAGTCCA	eekd$_{10}$kke	19	12620	12635	2074
548383	n/a	n/a	GTCTCGATGGCAAGCT	eekd$_{10}$kke	49	12654	12669	2075
548384	n/a	n/a	CTCACCGGTACTCTGC	eekd$_{10}$kke	49	12805	12820	2076
548385	n/a	n/a	TCCTGGAGGCACCAAT	eekd$_{10}$kke	0	12847	12862	2077
548386	n/a	n/a	AGCCCTGTTTGGTTTT	eekd$_{10}$kke	0	12903	12918	2078
548387	n/a	n/a	TGAAGGGCGAGGCGCA	eekd$_{10}$kke	22	13261	13276	2079
548388	n/a	n/a	AAGAGGATGTCAGGCT	eekd$_{10}$kke	4	13357	13372	2080
548389	n/a	n/a	TTGAGGAAAGACCTGC	eekd$_{10}$kke	11	13399	13414	2081
548390	n/a	n/a	GCTGAGTGTGACTTAA	eekd$_{10}$kke	43	13455	13470	2082
548391	n/a	n/a	GTACATGACTCCAGTG	eekd$_{10}$kke	34	13638	13653	2083
548392	n/a	n/a	GTAGAGCATGGAGCGA	eekd$_{10}$kke	31	13730	13745	2084
548393	n/a	n/a	CGCTTCAGGAAAGCGA	eekd$_{10}$kke	26	13828	13843	2085
548394	n/a	n/a	GGCAGGAGACTCCGTG	eekd$_{10}$kke	25	13919	13934	2086
548395	n/a	n/a	ATCCTTCCCCTCGCAA	eekd$_{10}$kke	0	13966	13981	2087
548396	n/a	n/a	TAATGAGTGGGTTAGG	eekd$_{10}$kke	0	14007	14022	2088
548397	n/a	n/a	GGAGCAGTGCAGGTAA	eekd$_{10}$kke	1	14065	14080	2089
548398	n/a	n/a	ATAGGCAATTGTTCCT	eekd$_{10}$kke	55	14129	14144	2090
548399	n/a	n/a	AGTCCTACAATTACCA	eekd$_{10}$kke	11	14239	14254	2091
548400	n/a	n/a	GGGCTCCTATTCCACC	eekd$_{10}$kke	13	14277	14292	2092
548401	n/a	n/a	GCCAGCTATGGGAACA	eekd$_{10}$kke	71	14333	14348	2093
548402	n/a	n/a	CCCCATCTCGAAGCCC	eekd$_{10}$kke	45	14380	14395	2094
548403	n/a	n/a	GAGTACATTGGGCCCA	eekd$_{10}$kke	25	14418	14433	2095
548404	n/a	n/a	GAGCCTTCCGCCTCTC	eekd$_{10}$kke	37	14471	14486	2096

[2123]

548405	n/a	n/a	CGGACCTTCATCTTCA	eekd$_{10}$kke	35	14529	14544	2097
548406	n/a	n/a	TCTAGAGGCCGCCTGC	eekd$_{10}$kke	0	14558	14573	2098
548407	n/a	n/a	CCTATAACTGCTGCTC	eekd$_{10}$kke	24	14731	14746	2099
548408	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTT	eekd$_{10}$kke	47	14748	14763	1269
						14819	14834	
						14890	14905	
						14949	14964	
						15009	15024	
						15081	15096	
						15153	15168	
						15224	15239	
						15296	15311	
						15355	15370	
						15415	15430	
						15487	15502	
						15559	15574	
						15617	15632	
						15689	15704	
						15819	15834	
						15891	15906	
						15949	15964	
548409	n/a	n/a	GTATCACTGTACTAGT	eekd$_{10}$kke	81	14749	14764	2100
						14820	14835	
						14891	14906	
						14950	14965	
						15010	15025	
						15082	15097	
						15154	15169	
						15225	15240	
						15297	15312	
						15356	15371	
						15416	15431	
						15488	15503	
						15560	15575	
						15618	15633	
						15690	15705	
						15820	15835	
						15892	15907	
						15950	15965	
548410	n/a	n/a	AGTATCACTGTACTAG	eekd$_{10}$kke	85	14750	14765	2101
						14821	14836	
						14892	14907	
						14951	14966	
						15011	15026	

[2124]

						15083	15098	
						15155	15170	
						15226	15241	
						15298	15313	
						15357	15372	
						15417	15432	
						15489	15504	
						15561	15576	
						15619	15634	
						15691	15706	
						15821	15836	
						15893	15908	
						15951	15966	
	548411	n/a	n/a	CAGTATCACTGTACTA	eekd$_{10}$kke	72	14751	14766	2102
							14822	14837	
							14893	14908	
							14952	14967	
							15012	15027	
							15084	15099	
							15156	15171	
							15227	15242	
							15299	15314	
							15358	15373	
							15418	15433	
							15490	15505	
							15562	15577	
							15620	15635	
							15692	15707	
							15822	15837	
							15894	15909	
							15952	15967	
	548412	n/a	n/a	TAACAGTATCACTGTA	eekd$_{10}$kke	17	14754	14769	2103
							14825	14840	
							14896	14911	
							14955	14970	
							15015	15030	
							15087	15102	
							15159	15174	
							15230	15245	
							15302	15317	
							15361	15376	
							15421	15436	
							15493	15508	
							15565	15580	

[2125]

						15623	15638	
						15695	15710	
						15825	15840	
						15897	15912	
						15955	15970	
548413	n/a	n/a	CTAACAGTATCACTGT	eekd$_{10}$kke	55	14755	14770	2104
						14826	14841	
						14897	14912	
						15016	15031	
						15088	15103	
						15231	15246	
						15303	15318	
						15422	15437	
						15494	15509	
						15624	15639	
						15826	15841	
						15956	15971	
548414	n/a	n/a	TCTAACAGTATCACTG	eekd$_{10}$kke	20	14756	14771	2105
						14827	14842	
						14898	14913	
						15017	15032	
						15089	15104	
						15232	15247	
						15304	15319	
						15423	15438	
						15495	15510	
						15625	15640	
						15827	15842	
						15957	15972	
548415	n/a	n/a	ATAACTCTAACAGTAT	eekd$_{10}$kke	0	14761	14776	2106
						14832	14847	
						14903	14918	
						15022	15037	
						15094	15109	
						15237	15252	
						15309	15324	
						15428	15443	
						15500	15515	
						15630	15645	
						15832	15847	
						15962	15977	
548416	n/a	n/a	CTATAACTCTAACAGT	eekd$_{10}$kke	9	14763	14778	2107
						14834	14849	
						14905	14920	

[2126]

						15024	15039	
						15096	15111	
						15239	15254	
						15311	15326	
						15430	15445	
						15502	15517	
						15632	15647	
						15834	15849	
						15964	15979	
	548417	n/a	n/a	ACTGTCCTATAACTCT	eekd$_{10}$kke	24	14769	14784	2108
							14840	14855	
	548418	n/a	n/a	TATATCACTGTCCTAT	eekd$_{10}$kke	39	14775	14790	2109
							14846	14861	
							15180	15195	
							15716	15731	
							16164	16179	
	548419	n/a	n/a	CCTATATCACTGTCCT	eekd$_{10}$kke	52	14777	14792	2110
							14848	14863	
							15182	15197	
							15718	15733	
	548420	n/a	n/a	TCCTATATCACTGTCC	eekd$_{10}$kke	58	14778	14793	2111
							14849	14864	
							15183	15198	
							15719	15734	
	548421	n/a	n/a	CACTGTCCTATATCAC	eekd$_{10}$kke	56	14783	14798	2112
							14854	14869	
							14979	14994	
							15117	15132	
							15188	15203	
							15260	15275	
							15385	15400	
							15523	15538	
							15653	15668	
							15724	15739	
							15855	15870	
							15985	16000	
	548422	n/a	n/a	GTATCACTGTCCTATA	eekd$_{10}$kke	69	14787	14802	2113
							14983	14998	
							15121	15136	
							15389	15404	
							15527	15542	
							15989	16004	
	548423	n/a	n/a	AGTATCACTGTCCTAT	eekd$_{10}$kke	72	14788	14803	2114
							14984	14999	

[2127]

						15050	15065	
						15122	15137	
						15390	15405	
						15456	15471	
						15528	15543	
						15990	16005	
548424	n/a	n/a	CAGTATCACTGTCCTA	eekd$_{10}$kke	90	14789	14804	2115
						14985	15000	
						15051	15066	
						15123	15138	
						15391	15406	
						15457	15472	
						15529	15544	
						15991	16006	
548425	n/a	n/a	AACAGTATCACTGTCC	eekd$_{10}$kke	90	14791	14806	2116
						14987	15002	
						15053	15068	
						15125	15140	
						15393	15408	
						15459	15474	
						15531	15546	
						15993	16008	
548426	n/a	n/a	TATAACAGTATCACTG	eekd$_{10}$kke	14	14794	14809	2117
						14990	15005	
						15056	15071	
						15128	15143	
						15161	15176	
						15363	15378	
						15396	15411	
						15462	15477	
						15534	15549	
						15567	15582	
						15697	15712	
						15899	15914	
						15996	16011	
548427	n/a	n/a	CTATAACAGTATCACT	eekd$_{10}$kke	24	14795	14810	2118
						14991	15006	
						15057	15072	
						15129	15144	
						15162	15177	
						15364	15379	
						15397	15412	
						15463	15478	
						15535	15550	

[2128]

						15568	15583	
						15698	15713	
						15900	15915	
						15997	16012	
548428	n/a	n/a	TAACTATAACAGTATC	eekd$_{10}$kke	0	14798	14813	2119
						15060	15075	
						15132	15147	
						15165	15180	
						15466	15481	
						15538	15553	
						15571	15586	
						15701	15716	
						15772	15787	
						16000	16015	
548429	n/a	n/a	TATAACTATAACAGTA	eekd$_{10}$kke	0	14800	14815	2120
						15062	15077	
						15134	15149	
						15167	15182	
						15468	15483	
						15540	15555	
						15573	15588	
						15703	15718	
						15774	15789	
						16002	16017	
548430	n/a	n/a	CCTATAACTATAACAG	eekd$_{10}$kke	21	14802	14817	2121
						15064	15079	
						15169	15184	
						15470	15485	
						15542	15557	
						15575	15590	
						15705	15720	
						15776	15791	
						16004	16019	
548431	n/a	n/a	TACCTATAACTCTAAC	eekd$_{10}$kke	9	14908	14923	2122
						15027	15042	
						15099	15114	
						15242	15257	
						15314	15329	
						15433	15448	
						15505	15520	
						15635	15650	
						15837	15852	
						15967	15982	
548432	n/a	n/a	ACTGTACCTATAACTC	eekd$_{10}$kke	43	14912	14927	2123

[2129]

						15031	15046	
						15246	15261	
						15318	15333	
						15437	15452	
						15509	15524	
						15639	15654	
						15841	15856	
						15971	15986	
548433	n/a	n/a	TATCACTGTACCTATA	eekd$_{10}$kke	33	14916	14931	2124
						15250	15265	
						15322	15337	
						15375	15390	
						15513	15528	
						15643	15658	
						15786	15801	
						15845	15860	
						15975	15990	
						16137	16152	
548434	n/a	n/a	ACAATATCACTGTACC	eekd$_{10}$kke	63	14920	14935	2125
						15326	15341	
						15790	15805	
						16063	16078	
						16141	16156	
548435	n/a	n/a	AACAATATCACTGTAC	eekd$_{10}$kke	19	14921	14936	2126
						15327	15342	
						15791	15806	
						16064	16079	
						16142	16157	
548436	n/a	n/a	ATATCACTGTACCTGT	eekd$_{10}$kke	8	14970	14985	2127
548437	n/a	n/a	TATATCACTGTACCTG	eekd$_{10}$kke	74	14971	14986	2128
548438	n/a	n/a	CTATATCACTGTACCT	eekd$_{10}$kke	38	14972	14987	2129
						15253	15268	
						15378	15393	
						15516	15531	
						15646	15661	
						15848	15863	
						15978	15993	
548439	n/a	n/a	CCTATATCACTGTACC	eekd$_{10}$kke	46	14973	14988	2130
						15254	15269	
						15379	15394	
						15517	15532	
						15647	15662	
						15849	15864	
						15979	15994	

[2130]

548440	n/a	n/a	CCTATAACAGTATCAC	eekd$_{10}$kke	32	14992 15365 15398	15007 15380 15413	2131
548441	n/a	n/a	TCCTATAACAGTATCA	eekd$_{10}$kke	42	14993 15399	15008 15414	2132
548442	n/a	n/a	TTCCTATAACAGTATC	eekd$_{10}$kke	17	14994 15400	15009 15415	2133
548443	n/a	n/a	GTTTCCTATAACAGTA	eekd$_{10}$kke	12	14996 15402	15011 15417	2134
548444	n/a	n/a	CTATGTCACTGTACCT	eekd$_{10}$kke	43	15038 15444	15053 15459	2135
548445	n/a	n/a	CCTATGTCACTGTACC	eekd$_{10}$kke	62	15039 15445	15054 15460	2136
548446	n/a	n/a	TCCTATGTCACTGTAC	eekd$_{10}$kke	16	15040 15446	15055 15461	2137
548447	n/a	n/a	CACTGTCCTATGTCAC	eekd$_{10}$kke	59	15045 15451	15060 15466	2138
548448	n/a	n/a	TCACTGTCCTATGTCA	eekd$_{10}$kke	61	15046 15452	15061 15467	2139
548449	n/a	n/a	ATCACTGTCCTATGTC	eekd$_{10}$kke	62	15047 15453	15062 15468	2140
548450	n/a	n/a	CTACCTATAACTCTAA	eekd$_{10}$kke	0	15100	15115	2141
548451	n/a	n/a	GTCCTATAACTATAAC	eekd$_{10}$kke	0	15171 15577 15707 16006 16077 16102 16155	15186 15592 15722 16021 16092 16117 16170	2142
548452	n/a	n/a	TATATCACTGTACCTA	eekd$_{10}$kke	65	15252 15377 15515 15645 15847 15977	15267 15392 15530 15660 15862 15992	2143
548453	n/a	n/a	TACCTATAACAGTATC	eekd$_{10}$kke	12	15367	15382	2144
548454	n/a	n/a	ACTGTACCTATAACAG	eekd$_{10}$kke	17	15371	15386	2145
548455	n/a	n/a	CACCGTACTAGTTTCC	eekd$_{10}$kke	64	15757	15772	2146
548456	n/a	n/a	TATAACAGTATCACCG	eekd$_{10}$kke	52	15768	15783	2147
548457	n/a	n/a	CTATAACAGTATCACC	eekd$_{10}$kke	13	15769	15784	2148
548458	n/a	n/a	ACCTATAACTATAACA	eekd$_{10}$kke	0	15777 16249	15792 16264	2149

[2131] 表152

[2132]

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	序列	化学	% 抑制	SEQ ID NO:10 起始位点	SEQ ID NO:10 终止位点	SEQ ID NO
531231	n/a	n/a	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed$_{10}$eeeee	48	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	n/a	n/a	TCACTGTACTAGTTTC	eekd$_{10}$kke	88	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548613	n/a	n/a	TGGCGGGATCGGTGGT	eekd$_{10}$kke	39	28510	28525	2150
						28589	28604	
548614	n/a	n/a	TGGTGGCGGGATCGGT	eekd$_{10}$kke	0	28513	28528	2151
						28592	28607	
548615	n/a	n/a	TTGGTGGCGGGATCGG	eekd$_{10}$kke	10	28514	28529	2152

[2133]

						28593	28608	
548616	n/a	n/a	ATTGGTGGCGGGATCG	eekd$_{10}$kke	35	28515	28530	2153
548617	n/a	n/a	GATTGGTGGCGGGATC	eekd$_{10}$kke	44	28516	28531	2154
548618	n/a	n/a	GTTGGTGGCGGGATCG	eekd$_{10}$kke	18	28594	28609	2155
548619	n/a	n/a	GGTTGGTGGCGGGATC	eekd$_{10}$kke	19	28595	28610	2156
548620	n/a	n/a	TGGTTGGTGGCGGGAT	eekd$_{10}$kke	24	28596	28611	2157
548621	n/a	n/a	GAACACATCAGGGATT	eekd$_{10}$kke	33	28638	28653	2158
548622	n/a	n/a	TTTCTATGGGCCTGAC	eekd$_{10}$kke	0	28669	28684	2159
548623	n/a	n/a	GCTGTCACTTAAGCCA	eekd$_{10}$kke	16	28862	28877	2160
548624	n/a	n/a	TCTAGGGCCACACCTC	eekd$_{10}$kke	24	28892	28907	2161
548625	n/a	n/a	GTTCTACACACAGTAC	eekd$_{10}$kke	0	29014	29029	2162
548626	n/a	n/a	GCAGTATGTTCAATCC	eekd$_{10}$kke	36	29202	29217	2163
548627	n/a	n/a	CCCACATGTACCACCG	eekd$_{10}$kke	22	29235	29250	2164
548628	n/a	n/a	GTATGGCAGAGCCCCT	eekd$_{10}$kke	9	29285	29300	2165
548629	n/a	n/a	CCCATCTTGGGACTTT	eekd$_{10}$kke	44	29341	29356	2166
548630	n/a	n/a	TGGTCCCAAATTGGAG	eekd$_{10}$kke	33	29387	29402	2167
548631	n/a	n/a	CTCACAATACTGAGCC	eekd$_{10}$kke	55	29421	29436	2168
548632	n/a	n/a	GGAGATATCAGGTGCA	eekd$_{10}$kke	45	29499	29514	2169
548633	n/a	n/a	CAAGGCATGTGTGCAC	eekd$_{10}$kke	41	29534	29549	2170
548634	n/a	n/a	GCCTTATTCTGTGCAA	eekd$_{10}$kke	0	29583	29598	2171
548635	n/a	n/a	AGGTGTGGCGCGCGCC	eekd$_{10}$kke	18	29853	29868	2172
548636	n/a	n/a	CTCTATACAGCTGGGC	eekd$_{10}$kke	5	30000	30015	2173
548637	n/a	n/a	GCTGATCTTCTAATGC	eekd$_{10}$kke	38	30063	30078	2174
548638	n/a	n/a	CCTCATTGCTCCACTA	eekd$_{10}$kke	26	30103	30118	2175
548639	n/a	n/a	TGGGAAGAAACTAGCA	eekd$_{10}$kke	10	30159	30174	2176
548640	n/a	n/a	GAATGTTGCTGTCCCA	eekd$_{10}$kke	32	30194	30209	2177
548641	n/a	n/a	GCATCATGCTTACTGC	eekd$_{10}$kke	23	30225	30240	2178
548642	n/a	n/a	GCGGCAGTAGTGAATC	eekd$_{10}$kke	23	30288	30303	2179
548643	n/a	n/a	CCTACCTAATTCCTCC	eekd$_{10}$kke	0	30329	30344	2180
548644	n/a	n/a	AACTGGGCAGTCCTTC	eekd$_{10}$kke	14	30418	30433	2181
548645	n/a	n/a	CCAGCGCAATTCTGCT	eekd$_{10}$kke	8	30666	30681	2182
548646	n/a	n/a	CGTTTCCCTCAACTCC	eekd$_{10}$kke	24	30750	30765	2183
548647	n/a	n/a	CACGGCAAGTCGCGGG	eekd$_{10}$kke	39	30790	30805	2184
548648	n/a	n/a	CAGTTGTATCCCTCCC	eekd$_{10}$kke	32	30852	30867	2185
548649	n/a	n/a	GCCTCTCAGACGGCAC	eekd$_{10}$kke	0	30906	30921	2186
548650	n/a	n/a	CTGATCCCACTTGCCC	eekd$_{10}$kke	21	30991	31006	2187
548651	n/a	n/a	AGTCTCTTTCCTACCC	eekd$_{10}$kke	61	31030	31045	2188
548652	n/a	n/a	CCACGATGCTCTGGCC	eekd$_{10}$kke	65	31068	31083	2189
548653	n/a	n/a	TCGGCTCCTGGCAGCA	eekd$_{10}$kke	46	31111	31126	2190
548654	n/a	n/a	ACCATTCCTGACCATG	eekd$_{10}$kke	34	31151	31166	2191
548655	n/a	n/a	CCCGAGGTCACATAAT	eekd$_{10}$kke	56	31416	31431	2192
548656	n/a	n/a	TTACAACAGACCCAGG	eekd$_{10}$kke	35	31497	31512	2193
548657	n/a	n/a	AGCAGGGTATCTTCAC	eekd$_{10}$kke	26	31548	31563	2194
548658	n/a	n/a	GAAGTTCCTGTGTCTT	eekd$_{10}$kke	11	31593	31608	2195

548659	n/a	n/a	CCAACCTCTAAGGCTA	eekd$_{10}$kke	17	31721	31736	2196
548660	n/a	n/a	ATGCTTACCTTTCTCC	eekd$_{10}$kke	0	31955	31970	2197
548661	n/a	n/a	ACGACCCACTCCATGT	eekd$_{10}$kke	18	32016	32031	2198
548662	n/a	n/a	TGCTTAAAAGTCTCCC	eekd$_{10}$kke	5	32155	32170	2199
548663	n/a	n/a	GCCCTAGAAGGGCCCA	eekd$_{10}$kke	20	32219	32234	2200
548664	n/a	n/a	GCGGGTGGTCTTGCAC	eekd$_{10}$kke	38	32245	32260	2201
548665	n/a	n/a	GCTCCCGGCCATTAGC	eekd$_{10}$kke	8	32312	32327	2202
548666	n/a	n/a	TCTCCATAGTGAGACG	eekd$_{10}$kke	1	32342	32357	2203
548667	n/a	n/a	TGGCAAGCTACCTTCT	eekd$_{10}$kke	51	32384	32399	2204
548668	n/a	n/a	GGGAGCTTTCATGGCT	eekd$_{10}$kke	68	32506	32521	2205
548669	n/a	n/a	AATGCAGGCCAGCATC	eekd$_{10}$kke	42	32541	32556	2206
548670	n/a	n/a	GAAAAGCCCTCCGAGC	eekd$_{10}$kke	15	32590	32605	2207
548671	n/a	n/a	CAACAATCCAAAGCCT	eekd$_{10}$kke	3	32674	32689	2208
548672	n/a	n/a	CCCCCCAGAAATCCCA	eekd$_{10}$kke	40	32708	32723	2209
548673	n/a	n/a	GACCTTGCTTCCATGT	eekd$_{10}$kke	40	32753	32768	2210
548674	n/a	n/a	GAGAGACGGCACCCTG	eekd$_{10}$kke	4	32829	32844	2211
548675	n/a	n/a	GGGAAGGTAGTGTTAC	eekd$_{10}$kke	8	32898	32913	2212
548676	n/a	n/a	GTGAATCAGAGCAGTG	eekd$_{10}$kke	63	32963	32978	2213
548677	n/a	n/a	TCACCTGTGAGTAACC	eekd$_{10}$kke	40	33089	33104	2214
548678	n/a	n/a	GAGTTACCTTACAAGC	eekd$_{10}$kke	22	33232	33247	2215
548679	n/a	n/a	TCTCAAGCAGCCTATT	eekd$_{10}$kke	0	33267	33282	2216
548680	n/a	n/a	GCCCCTCTTAAATAGC	eekd$_{10}$kke	9	33446	33461	2217
548681	n/a	n/a	GATATCATCATCCCAA	eekd$_{10}$kke	22	33513	33528	2218
548682	n/a	n/a	GTATCCCCTTTTCTAT	eekd$_{10}$kke	0	33556	33571	2219
548683	n/a	n/a	AGTATCTCATGTGCCT	eekd$_{10}$kke	46	33581	33596	2220
548684	n/a	n/a	CAAGACCTTGCTTGCC	eekd$_{10}$kke	24	33658	33673	2221
548685	n/a	n/a	TAGTCCACTACACAGC	eekd$_{10}$kke	24	33802	33817	2222
548686	n/a	n/a	ACGACAATGGGATTCA	eekd$_{10}$kke	0	33844	33859	2223
548687	n/a	n/a	GAATCTCCCTGAGTCA	eekd$_{10}$kke	20	33888	33903	2224
548688	n/a	n/a	TAGAGGGATCCCAGGA	eekd$_{10}$kke	0	34416	34431	2225
548689	n/a	n/a	CCAGGTGCAGCACGGA	eekd$_{10}$kke	12	34483	34498	2226

[2134]

[2135] 实施例117:在HepaRG™细胞中对人PKK的剂量依赖性反义抑制

[2136] 选择来自以上所述的研究且对PKK mRNA展现显著体外抑制的缺口聚物且在HepaRG™细胞中以各种剂量测试。将细胞以每孔20,000个细胞的密度铺板并且使用电穿孔,以0.12μM、0.37μM、1.11μM、3.33μM以及10.00μM浓度的反义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人PKK引物探针集RTS3454测量mRNA水平。根据如由 RIBOGREEN® 所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。

[2137] 也呈现了各寡核苷酸的半数最大抑制浓度(IC_{50})。在反义寡核苷酸处理的细胞中,PKK mRNA水平以剂量依赖性反式显著降低。

[2138] 表153

[2139]

ISIS No	0.12 μM	0.37 μM	1.11 μM	3.33 μM	10.00 μM	IC_{50} (μM)
486847	0	34	48	71	87	1.1
530933	15	13	42	67	66	1.7
530959	12	27	53	80	94	0.9
530965	8	5	63	83	91	0.8
530967	30	36	48	82	91	0.7
530970	1	0	66	76	84	1.0
530971	12	40	52	66	70	1.3
530988	0	25	54	86	78	0.9
530992	0	50	63	83	80	0.7
531002	6	28	58	82	86	0.9
531004	0	14	25	71	84	2.1
531005	14	28	61	73	77	0.9
531022	0	0	32	62	77	2.2
531078	10	27	54	69	92	1.1
531231	23	30	76	89	94	0.6

[2140] 表154

[2141]

ISIS No	0.12 μM	0.37 μM	1.11 μM	3.33 μM	10.00 μM	IC_{50} (μM)
531026	23	26	49	75	85	1.0
531055	3	28	64	76	81	0.9
531069	19	39	48	76	83	0.9
531071	23	37	56	83	83	0.7
531110	14	29	49	76	85	1.1
531121	0	13	47	69	79	1.5
531123	14	43	51	71	64	0.9
531172	0	16	37	60	60	2.1
531198	0	35	62	76	60	0.8
531231	18	0	36	76	84	2.0
531232	15	26	40	62	76	1.7
531233	17	27	50	77	84	1.0

[2142]

531234	24	21	47	72	82	1.4
531235	27	55	62	84	95	0.4
531236	4	28	59	85	93	0.8

[2143] 实施例118:在HepaRG™细胞中对人PKK的剂量依赖性反义抑制

[2144] 选择来自以上所述的研究且对PKK mRNA展现显著体外抑制的缺口聚物且在HepaRG™细胞中以各种剂量测试。将细胞以每孔20,000个细胞的密度铺板并且使用电穿孔,以0.19μM、0.56μM、1.67μM以及5.00μM浓度的反义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人PKK引物探针集RTS3454测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。'n/a'表示未针对那个特定反义寡核苷酸针对那个特定剂量进行测量。

[2145] 也呈现了各寡核苷酸的半数最大抑制浓度(IC_{50})。在反义寡核苷酸处理的细胞中，PKK mRNA水平以剂量依赖性反式显著降低。

[2146] 表155

[2147]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	32	30	73	89	0.5
546158	5	45	79	83	0.7
546188	36	55	81	83	0.4
546253	1	13	46	81	1.7
546254	51	66	80	91	0.2
546343	28	64	87	87	0.4
546825	46	73	86	88	0.2
546827	32	70	84	90	0.3
546828	39	58	87	93	0.3
546829	3	30	73	88	1.0
546846	36	45	71	82	0.5
547413	0	0	41	83	2.2
547423	37	50	92	90	0.4

[2148]

547445	41	75	82	88	0.2
547456	12	67	66	80	1.0
547464	21	52	67	97	0.6
547564	51	48	82	90	0.2
547587	20	62	84	86	0.5
548758	41	47	82	94	0.4

[2149] 表156

[2150]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	25	34	84	92	0.7
546190	33	65	86	n/a	0.4
546208	16	45	79	91	0.7
546216	62	69	88	88	0.1
546255	32	35	78	87	0.5
546268	56	50	82	93	0.1
546301	25	50	53	87	0.8
546849	23	35	83	91	0.7
546852	19	40	78	85	0.8
546889	23	54	78	91	0.6
546916	43	71	79	89	0.2
546967	20	39	76	71	0.7
547273	44	69	87	87	0.2
547276	35	44	71	77	0.6
547335	8	52	85	92	0.7
547340	46	79	88	n/a	0.2
547602	18	53	92	87	0.5
547647	1	70	72	n/a	0.8
547694	0	29	67	90	1.2

[2151] 表157

[2152]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	58	64	77	98	0.1
546247	0	29	71	88	1.1
546251	31	60	99	89	0.5
546753	28	47	83	96	0.5
546826	17	40	87	97	0.7
546833	8	33	74	94	0.9
546854	23	39	83	94	0.6
546894	15	47	50	93	0.9
546897	40	56	71	95	0.4
546903	15	37	74	98	0.8

[2153]

546986	31	49	77	89	0.5
547293	53	57	80	86	0.2
547298	32	61	74	90	0.4
547364	38	47	54	89	0.6
547373	20	7	49	86	1.1
547426	19	50	84	93	0.6
547454	19	40	58	92	0.9
547617	52	66	77	93	0.2
548770	26	54	77	91	0.5

[2154] 表158

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	34	47	72	n/a	0.5
546214	0	0	68	85	1.3
546304	0	6	51	71	2.1
546739	35	55	57	79	0.6
546832	19	38	70	95	0.8
546847	39	57	75	89	0.4
546855	18	7	30	82	2.2
546877	0	19	75	80	1.3
546939	1	66	86	90	0.6
547349	0	8	66	76	1.6
547360	8	27	76	76	0.8
547368	0	0	31	80	2.5
547483	0	9	49	71	2.1
547575	0	34	82	93	1.1
547618	0	0	73	98	1.3
547622	0	47	79	90	0.9
547637	10	21	36	82	1.8
547731	0	0	17	56	5.0
548752	0	0	51	90	1.9

[2155]

[2156] 表159

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	21	45	67	96	0.7
546195	34	51	79	92	0.5
546198	7	3	45	92	1.3
546287	0	15	39	89	1.7
546358	0	19	71	80	1.3
546403	0	20	37	41	>5.0
546410	13	43	52	75	1.2
546412	0	1	61	62	2.3
546429	6	10	44	69	2.3
546834	1	0	30	83	2.3
547006	0	0	54	77	1.5
547294	28	59	87	86	0.4
547337	23	41	55	79	1.0
547514	18	8	51	80	1.9
547584	26	34	76	86	0.7
547585	42	57	70	95	0.4
547615	20	26	41	84	1.4
547636	0	24	79	94	1.1
548744	14	35	63	83	1.0

[2157]

[2158]

[2159] 表160

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	21	39	90	97	0.6
546232	49	50	94	97	0.2
546248	25	66	87	93	0.4
546835	9	35	68	93	0.9
546848	0	18	91	97	1.0
546853	47	64	84	n/a	0.2
546870	35	42	80	95	0.5
546872	32	33	82	94	0.4
546876	0	50	85	95	0.8
547275	34	66	82	95	0.3
547341	36	58	91	95	0.3
547366	0	45	68	91	1.2
547453	25	40	54	92	0.8
547457	41	65	80	85	0.3
547616	26	50	72	89	0.6
547632	44	47	81	97	0.6
547633	12	46	78	n/a	0.7
547718	36	12	69	74	1.6
548757	18	49	82	93	0.6

[2160]

[2161] 表161

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	6	38	74	95	0.8
546291	22	32	34	72	2.0
546310	0	36	56	80	1.3
546896	0	45	82	97	0.8
546980	0	18	29	80	2.2
547009	0	9	21	63	3.6
547019	0	6	54	86	1.6
547277	2	32	34	62	2.8
547288	0	0	0	38	>5.0
547374	0	15	24	44	>5.0
547493	0	26	64	77	1.3
547520	0	25	66	64	1.1
547712	0	5	21	62	3.8
547722	0	15	32	73	2.4
547728	0	2	16	61	4.4
547780	0	10	36	55	3.9
548743	25	57	73	88	0.5
548753	0	23	49	84	1.5
548756	0	4	16	86	>5.0

[2162]

[2163]

[2164] 表162

[2165]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	25	55	89	97	0.5
546188	27	69	88	97	0.4
546216	23	78	95	98	<0.2
546254	40	63	84	95	0.3
546268	0	71	92	92	0.5
546343	37	32	83	95	0.4
546825	38	82	n/a	99	0.2
546827	23	74	98	96	0.4
546828	0	64	89	97	0.2
546846	26	49	85	n/a	0.5
546967	22	45	74	92	0.7
547273	0	60	82	83	0.6
547340	34	84	96	n/a	0.3
547423	78	92	n/a	n/a	<0.2
547445	80	87	98	91	<0.2
547564	46	66	90	97	0.2
547587	38	64	91	97	0.3
547602	1	9	52	93	1.4
548758	0	72	79	n/a	0.6

[2166] 表163

[2167]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	7	39	56	97	1.0
546190	21	34	76	98	0.7
546208	5	33	70	97	0.9
546251	19	45	91	97	0.6
546255	5	39	82	96	0.8

[2168]

546739	4	62	84	86	0.6
546753	17	31	70	91	0.9
546849	13	45	84	98	0.7
546889	25	9	73	92	1.4
546897	16	17	69	97	0.8
546916	0	27	73	97	1.0
546986	7	28	69	86	1.1
547276	6	3	53	68	2.2
547293	0	45	65	70	1.3
547298	0	12	67	87	1.7
547335	0	13	73	95	1.3
547426	18	35	80	95	0.7
547617	17	37	79	98	0.7
548770	9	0	61	92	1.7

[2169] 表164

[2170]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC_{50} (μM)
531231	6	56	68	97	0.8
546195	0	27	91	94	0.9
546232	0	74	95	96	0.2
546248	0	59	73	89	0.8
546832	36	49	85	97	0.4
546847	14	44	83	95	0.7
546853	4	49	74	92	0.8
546870	36	34	61	91	1.0
546872	42	13	59	99	1.4
546896	35	60	83	n/a	0.4
546939	16	71	96	95	0.4
547275	56	16	80	86	1.2
547294	4	70	84	91	0.6
547341	45	44	81	95	0.6
547457	33	42	70	83	0.6
547584	0	21	64	92	1.3
547585	0	46	89	93	0.8
547632	0	0	63	91	1.6
548743	22	47	74	96	0.6

[2171] 实施例119:在HepaRG™细胞中对人PKK的剂量依赖性反义抑制

[2172] 选择来自以上所述的研究且对PKK mRNA展现显著体外抑制的缺口聚物且在HepaRG™细胞中以各种剂量测试。将细胞以每孔20,000个细胞的密度铺板并且使用电穿孔,以0.11μM、0.33μM、1.00μM以及3.00μM浓度的反义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平。使用人PKK引物探针集RTS3454测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。在具有类似培养条件的一系列实验中测试反义寡核苷酸。每个实验的结果呈现在以下所示的单独表格中。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的PKK的抑制百分比。'n/a'表示未针对那个特定反义寡核苷酸针对那个特定剂量进行测量。

[2173] 也呈现了各寡核苷酸的半数最大抑制浓度(IC_{50})。在反义寡核苷酸处理的细胞中,PKK mRNA水平以剂量依赖性反式显著降低。

[2174] 表165

[2175]

ISIS No	0.11 μM	0.33 μM	1.00 μM	3.00 μM	IC_{50} (μM)
547747	24	29	81	89	0.4
547769	12	17	80	96	0.6
547824	45	73	78	n/a	0.1
547835	44	27	53	79	0.9
547843	0	52	80	91	0.4
547857	36	66	77	93	0.2
547870	0	44	80	97	0.6
547943	33	70	87	90	0.2
547946	0	47	74	n/a	0.5
547947	24	58	81	93	0.3
547998	55	73	91	91	0.1
548004	24	47	80	92	0.3
548010	0	11	49	64	1.4
548047	50	62	76	95	0.1
548147	59	94	80	n/a	0.0
548338	41	58	79	95	0.2
548348	19	46	67	91	0.4
548409	21	60	90	93	0.3
548557	5	47	82	95	0.4

[2176] 表166

[2177]

ISIS No	0.11 μM	0.33 μM	1.00 μM	3.00 μM	IC_{50} (μM)
547747	8	61	90	92	0.3

[2178]

547807	26	71	61	94	0.4
547922	67	75	81	92	0.0
547927	56	64	92	88	0.1
547948	60	80	88	97	0.0
547979	56	58	94	97	0.1
548005	53	49	71	95	0.4
548024	28	57	84	82	0.3
548043	14	60	90	92	0.3
548055	43	57	50	88	0.3
548106	53	54	82	94	0.1
548109	50	92	79	85	0.1
548155	49	50	70	81	0.3
548180	11	59	71	88	0.4
548278	3	59	78	93	0.4
548343	61	67	88	92	0.0
548558	53	61	78	95	0.1
548570	20	40	70	94	0.4
548583	43	46	93	88	0.2

[2179] 表167

ISIS No	0.11 μM	0.33 μM	1.00 μM	3.00 μM	IC_{50} (μM)
547747	3	44	72	90	0.5
547849	36	52	67	n/a	0.3
547851	16	46	83	n/a	0.4
547859	29	56	83	78	0.3
547862	26	71	69	n/a	0.3
547877	29	66	83	n/a	0.2
547942	25	51	91	n/a	0.3
547997	39	68	n/a	82	0.2
548046	7	35	64	77	0.7
548048	49	66	86	92	0.1
548061	26	61	59	n/a	0.4
548070	26	35	48	63	1.1
548125	33	50	81	73	0.3
548195	5	23	61	76	0.8
548265	47	69	78	67	0.1
548410	31	58	85	82	0.2
548424	17	67	86	72	0.3
548425	41	57	68	80	0.2
548547	30	41	76	90	0.4

[2180]

[2181] 表168

[2182]

ISIS No	0.11 μM	0.33 μM	1.00 μM	3.00 μM	IC_{50} (μM)
547747	16	59	85	96	0.3
547808	19	22	48	71	1.1
547861	7	40	75	84	0.5
548069	6	0	27	66	1.9
548128	14	29	49	66	1.1
548170	0	8	26	65	2.0
548174	20	18	29	62	2.0
548197	33	37	51	75	0.8
548201	0	7	70	85	0.8
548217	22	24	54	71	0.9
548220	0	0	0	6	>3
548247	16	50	62	82	0.5
548422	0	32	71	93	0.7
548479	2	52	82	97	0.4
548486	20	48	77	92	0.4
548521	21	0	3	1	>3
548655	0	0	8	33	>3
548667	0	37	73	86	0.7
548668	10	30	61	84	0.7

[2183]

[2184] 实施例120:靶向人PKK的反义寡核苷酸在转基因小鼠中的功效

[2185] 用选自以上所述研究的ISIS反义寡核苷酸处理含有人KLKB1基因序列(染色体4:

187148672-187179625位，登录号:NC_000004.11)的37,390个碱基对片段，所述转基因小鼠用于评估该模型的功效。

[2186] 处理

[2187] 每周两次向转基因小鼠的组皮下注射2.5mg/kg/周、5.0mg/kg/周、10mg/kg/周或20mg/kg/周的ISIS 546232、ISIS 546251、ISIS 546254、ISIS 546343、ISIS 546828、ISIS 547455、ISIS 547457、ISIS 547927以及ISIS 548048，持续3周。每周两次向一组转基因小鼠皮下注射PBS，持续3周。最后一次剂量48小时后使小鼠安乐死，并且收获器官和血浆用于进一步分析。

[2188] RNA分析

[2189] 为评估ISIS寡核苷酸对靶减少的效应，自肝脏组织提取RNA用于人PKK的实时PCR分析。结果呈现为相对于PBS对照的PKK mRNA的抑制百分比。如在表169中示出，用ISIS反义寡核苷酸处理导致相比于PBS对照的PKK mRNA显著减少。

[2190] 表169

[2191] 相对于PBS对照的转基因小鼠肝脏中PKK mRNA的抑制百分比

[2192]

ISIS No	剂量	%抑制
547927	20	71
	10	93
	5	52
	2.5	35
547455	20	62
	10	45
	5	69
	2.5	0
546232	20	84
	10	30
	5	53
	2.5	57
546254	20	83
	10	84
	5	55
	2.5	31
546343	20	86
	10	66
	5	n/a
	2.5	46
548048	20	80
	10	72
	5	77
	2.5	7
546828	20	83
	10	32
	5	62
	2.5	77
546251	20	79
	10	66
	5	51
	2.5	13
547457	20	62
	10	45
	5	69
	2.5	0

[2193] 蛋白质分析

[2194] 评估所有组中的血浆PKK蛋白质水平。结果呈现为相对于PBS对照的PKK蛋白质的抑制百分比。如在表170中示出，用ISIS反义寡核苷酸处理导致相比于PBS对照的PKK蛋白质水平显著减少。

[2195] 表170

[2196] 相对于PBS对照的转基因小鼠中PKK蛋白质水平的抑制百分比

[2197]

ISIS No	剂量	%抑制
547927	20	80
	10	n/a
	5	21
	2.5	25
547455	20	78
	10	32
	5	0
	2.5	0
546232	20	79
	10	33
	5	6
	2.5	0
546254	20	76
	10	51
	5	36
	2.5	0
546343	20	79
	10	38
	5	n/a
	2.5	0
548048	20	98
	10	89
	5	70
	2.5	23
546828	20	93
	10	36
	5	25
	2.5	0
546251	20	69
	10	52
	5	30
	2.5	22
547457	20	60
	10	31

[2198]

	5	4
	2.5	0

[2199] 实施例121:食蟹猴中靶向人PKK的ISIS反义寡核苷酸的作用

[2200] 将食蟹猴用选自以上研究的ISIS反义寡核苷酸处理。评估反义寡核苷酸功效和耐受性。所测试的人反义寡核苷酸与恒河猴基因组序列(从核苷酸2358000至2391000截短的GENBANK登录号NW_001118167.1,在本文中命名为SEQ ID NO:18)交叉反应。相对于SEQ ID NO:18的每一寡核苷酸的靶起始位点在表171中呈现。'错配'指示寡核苷酸序列与恒河猴序列之间错配的核苷酸的数目。人寡核苷酸与恒河猴序列之间的互补性越高,人寡核苷酸与恒河猴序列交叉反应的可能性越大。'n/a'表示寡核苷酸与恒河猴基因序列具有3个以上的错配。

[2201] 表171

[2202] 与SEQ ID NO:18互补的反义寡核苷酸

[2203]

ISIS No	靶起始位点	错配	序列	化学	SEQ ID NO.
547927	22059	1	ATGGTCCGACACACAA	脱氧、MOE 以及 cEt	1548
546232	n/a	n/a	AGGAACTTGGTGTGCCACTT	5-10-5 MOE	526
547455	27391	0	ATATCATGATTCCCTTCTGA	5-10-5 MOE	657
546254	23858	1	TGCAAGTCTCTTGGCAAACA	5-10-5 MOE	570
546343	30532	0	CCCCCTTCTTTATAGCCAGC	5-10-5 MOE	705
548048	27397	0	CGATATCATGATTCCC	脱氧、MOE 以及 cEt	1666
546828	13632	1	ACAGTATCACTGTACTAGTT	5-10-5 MOE	904
546251	23846	0	GGCAAACATTCACTCCTTTA	5-10-5 MOE	566
547457	27397	0	AAGGCGATATCATGATTCCC	5-10-5 MOE	660

[2204] 处理

[2205] 在研究之前,将猴子保持隔离30天的时间,在此期间,每天观察动物的一般健康状况。猴子是2-4岁并且重量在2至4kg之间。向四只随即指派的雄性食蟹猴的十个组皮下注射ISIS寡核苷酸或PBS。在研究的第一周(第1、3、5以及7天)时,首先用由四个剂量组成的负载方案施用剂量为40mg/kg的PBS溶液或ISIS寡核苷酸,接着为由在第14天(第2至13周)时开始每周一次施用组成的维持方案。以顺时针旋转在背部上的4个位点进行皮下注射;每剂量一个位点。注射位点由刺纹绘出,同时使用氯胺酮使其镇静,并且被最小3cm分开。

[2206] 在研究期期间,每天最少一次观察猴子的生病或不适的迹象。将经历因治疗、损伤或生病所引起的超过瞬时或轻微的疼痛或不适的任何动物迅速地报告至负责兽医和实验负责人。鉴定出任何处于不良健康状况或处于可能的濒死状况的动物以供进一步监测以及可能的安乐死。例如,由于减弱的行为、侧卧位、缺乏对刺激的应答以及降低的呼吸,使用ISIS 547445处理的两只猴子安乐死。实施例中所述的实验方案得到了Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)的批准。

[2207] 靶减少

[2208] RNA分析

[2209] 在第87或88天时,在最后剂量48小时后,自肝脏组织提取RNA,以使用引物探针集RTS3455(正向序列CCTGTGTGGAGGGTCACTCA,在本文中称为SEQ ID NO:23,反向序列CCACTATAGATGCGCCAAACATC,在本文中称为SEQ ID NO:24;探针序列CCCACTGCTTTGATGGGCTTCCC,在本文中称为SEQ ID NO:25),进行PKK的实时PCR分析。将结果归一化为管家基因、亲环蛋白。结果呈现为相对于PBS对照的PKK mRNA的抑制百分比。如在表172中示出,用ISIS反义寡核苷酸处理导致相比于PBS对照的PKK mRNA显著减少。

[2210] 表172

[2211] 相对于PBS对照的食蟹猴肝中PKK mRNA的抑制百分比

[2212]

ISIS No	%抑制

546232	88
546251	90
546254	88
546343	74
546828	45
547455	90
547457	89
547927	54
548048	95

[2213] 蛋白质分析

[2214] 在第17天、第31天、第45天、第59天以及第73天，在给药前每次自所有可获得的动物收集大约0.9mL血液，并且放入含有3.2％的柠檬酸钠的试管中。将试管离心(在室温下以3000rpm保持10min)以获得血浆。通过ELISA测量血浆中的PKK蛋白质水平。结果呈现于表173中，其表示为相比于PBS对照水平的抑制百分比。结果显示ISIS寡核苷酸显著减小了PKK蛋白质水平。

[2215] 表173

[2216] 相对于对照水平的食蟹猴血浆中的PKK蛋白质水平减小(％)

[2217]

	第17天	第31天	第45天	第59天	第73天
ISIS 546232	53	58	72	75	70
ISIS 546251	71	75	75	81	77
ISIS 546254	38	51	63	74	73
ISIS 546343	56	74	69	70	70
ISIS 546828	0	8	23	39	39
ISIS 547455	26	33	43	58	58
ISIS 547457	68	75	79	76	80
ISIS 547927	8	0	15	10	18
ISIS 548048	90	93	95	95	95

[2218] 耐受性研究

[2219] 肝功能

[2220] 为了评估ISIS寡核苷酸对肝功能的效应，使猴子禁食过夜。自所有研究组收集大约1.5mL血液样品。在无用于血清分离的抗凝剂情况下，将血液收集于试管中。将试管在室温下保持最少90分钟，并且然后在3,000rpm下离心10分钟。使用Toshiba 120FR NEO化学分析仪(Toshiba Co.,Japan)来测量各种肝功能标志物的水平。所述结果呈现于表174中并且显示反义寡核苷酸对超出反义寡核苷酸预期范围之外的肝功能没有作用。

[2221] 表174

[2222] 食蟹猴血浆中的肝功能标记物

[2223]

	白蛋白(g/dL)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)
PBS	4.2	48	60
ISIS 546232	4.1	63	140

ISIS 546251	3.7	51	58
ISIS 546254	3.8	68	54
ISIS 546343	4.3	49	76
ISIS 546828	3.7	75	67
ISIS 547455	3.8	56	61
ISIS 547457	4.0	54	52
ISIS 547927	4.2	59	61
ISIS 548048	4.2	44	47

[2224] 血液学

[2225] 为了评价食蟹猴中的ISIS寡核苷酸对血液学参数的任何效应，在给药前和在第87天或第88天时从每个可用的研究动物收集大约1.2mL的血液的血液样品置于含有K_2-EDTA的试管中。使用ADVIA2120i血细胞分析仪(SIEMENS,USA)分析样品的红细胞(RBC)计数、白细胞(WBC)计数、血小板计数、血红蛋白含量以及红细胞压积。数据列于表175中。

[2226] 所述数据示出用大多数寡核苷酸的处理不会引起超出在该剂量下的反义寡核苷酸的预期范围之外的血液学参数的任何改变。

[2227] 表175

[2228] 食蟹猴中的血液学参数

[2229]

	RBC ($x 10^6/\mu L$)	血小板 ($x 10^3/\mu L$)	WBC ($x 10^3/\mu L$)	血红蛋白(g/dL)	HCT (%)
PBS	5.4	458	13	13.1	43
ISIS 546232	5.4	391	11	12.9	42
ISIS 546251	5.7	419	8	12.9	43
ISIS 546254	5.3	436	11	12.4	41
ISIS 546343	5.5	373	14	12.6	42
ISIS 546828	6.0	408	11	12.9	43
ISIS 547455	4.5	448	13	10.2	34
ISIS 547457	6.4	367	10	13.8	45
ISIS 547927	5.2	461	45	12.5	41
ISIS 548048	5.9	393	11	13.4	44

[2230] 肾功能

[2231] 为了评估ISIS寡核苷酸对肾功能的效应，使猴子禁食过夜。自所有研究组收集大约1.5mL血液样品。在无用于血清分离的抗凝剂情况下，将血液收集于试管中。将试管在室温下保持最少90分钟，并且然后在3,000rpm下离心10分钟。使用Toshiba 120FR NEO化学分析仪(Toshiba Co.,Japan)来测量BUN和肌酸酐的水平。结果呈现于表176中，以mg/dL表示。血浆化学数据表示大部分ISIS寡核苷酸对超出反义寡核苷酸预期范围之外的肾功能没有任何作用。具体地，用ISIS 546254处理在猴子肾功能方面是良好耐受的。

[2232] 肾功能还通过验尿进行评估。使用干净的保持盘自所有的动物，将新鲜的尿液收集于湿冰上。在新鲜的尿液收集前一天，禁食一整夜，但是供应水。使用Toshiba 120FR NEO自动化学分析仪(Toshiba Co.,Japan)来测量总蛋白质和肌酸酐水平并且计算蛋白质与肌酸酐的比。结果呈现于表177中。

[2233] 表176

[2234] 食蟹猴中的血浆BUN和肌酸酐水平(mg/dL)

[2235]

	BUN	肌酸酐
PBS	22.8	0.9
ISIS 546232	22.7	1.0
ISIS 546251	25.4	1.1
ISIS 546254	25.7	0.9
ISIS 546343	26.2	1.0
ISIS 546828	24.7	0.9
ISIS 547455	29.4	0.9
ISIS 547457	24.3	1.0
ISIS 547927	22.3	1.0
ISIS 548048	21.9	0.9

[2236] 表177

[2237] 食蟹猴中的尿液蛋白质/肌酸酐的比

[2238]

	比
ISIS 546232	0.03
ISIS 546251	0.12
ISIS 546254	0.04
ISIS 546343	0.01
ISIS 546828	0.03
ISIS 547455	0.70
ISIS 547457	0.03
ISIS 547927	0.04
ISIS 548048	0.03
PBS	0.06

[2239] C-反应蛋白水平分析

[2240] 为了评估ISIS寡核苷酸在食蟹猴中的任何炎性效应,使猴子禁食过夜。自所有研究组收集大约1.5mL血液样品。在无用于血清分离的抗凝剂情况下,将血液收集于试管中。将试管在室温下保持最少90分钟,并且然后在3,000rpm下离心10分钟。使用Toshiba 120FR NEO化学分析仪(Toshiba Co.,Japan)测量在肝脏中合成并且用作炎症的标志物的C反应蛋白(CRP)。补体C3也被类似地测量,并且数据呈现为基线值的百分比。结果呈现于表178中并且表示用ISIS寡核苷酸治的处理未导致猕猴任何炎症。

[2241] 表178

[2242] 食蟹猴血浆中的C-反应蛋白和C3水平

[2243]

	CRP(mg/dL)	C3(基线的%)
PBS	0.2	73
ISIS 546232	0.5	50

ISIS 546251	0.7	62
ISIS 546254	0.8	61
ISIS 546343	0.2	60
ISIS 546828	0.6	56
ISIS 547455	1.9	64
ISIS 547457	0.3	53
ISIS 547927	0.2	73
ISIS 548048	0.2	69

[2244] 实施例122:小鼠原代肝细胞中的鼠PKK mRNA的反义抑制

[2245] 设计靶向鼠PKK核酸的反义寡核苷酸且测试其在体外对PKKmRNA的作用。使用细胞转染剂以12.5nM、25.0nM、50.0nM、100.0nM以及200.0nM的反义寡核苷酸转染密度为每孔10,000个细胞的培养的小鼠原代肝细胞。在大约24小时的处理期间后,自细胞分离RNA并且使用小鼠引物探针集RTS3313(正向序列TGCCTGCTGTTCAGCTTTCTC,在本文中称为SEQ ID NO:2228,反向序列TGGCAAAGTCCCTGTAATGCT,在本文中称为SEQ ID NO:2229;探针序列CGTGACTCCACCCAAAGAGACAAATAAACG,在本文中称为SEQ ID NO:2230),通过定量实时PCR测量鼠PKK mRNA水平。根据如由RIBOGREEN所测量的总RNA含量调整PKK mRNA水平。

[2246] 嵌合反义寡核苷酸被设计为5-10-5MOE缺口聚物。所述缺口聚物的长度为20个核苷,其中中心缺口区段包含10个2'-脱氧核苷且在两侧上(在5'及3'方向上)由各自包含5个核苷的翼侧接。5'翼区段中的每个核苷和3'翼区段中的每个核苷具有2'-O-甲氧基乙基修饰。每个缺口聚物整个的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。每个缺口聚物整个的所有胞嘧啶残基为5-甲基胞嘧啶。结果表明PKK mRNA水平以剂量依赖性反式显著降低。

[2247] 在一个具体实施例中,ISIS 482584(GGCATATTGGTTTTTGGAAT;SEQ ID NO:2244)以剂量依赖性反式降低了PKK mRNA,得到84nM的半数最大抑制浓度(IC_{50})(参见表179)。ISIS 482584靶向SEQ ID NO:11(GENBANK登录号NM_008455.2)并且具有1586的靶起始位点和1605的靶终止位点。"靶起始位点"表示缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。"靶终止位点"表示缺口聚物所靶向的最3'核苷酸。

[2248] 表179

[2249] 通过ISIS 482584的鼠PKK mRNA水平的剂量依赖性抑制

[2250]

剂量	%抑制
12.5nM	0
25.0nM	47
50.0nM	27
100.0nM	60
200.0nM	82

[2251] 实施例123:BALB/c小鼠中的PKK mRNA的反义抑制

[2252] 在体内测试ISIS 482584对鼠PKK mRNA的作用。

[2253] 处理

[2254] 用2.5mg/kg、5.0mg/kg、10.0mg/kg、20.0mg/kg、40.0mg/kg或80.0mg/kg的ISIS 482584各自处理雄性BALB/c小鼠的六个组,每周两次皮下施用保持3周(5.0mg/kg、10.0mg/

kg、20.0mg/kg、40.0mg/kg、80.0mg/kg或160.0mg/kg的周剂量)。用PBS处理BALB/c小鼠的对照组,每周两次皮下施用保持3周。在反义寡核苷酸或PBS的最后剂量之后两天,用混合有10mg/kg赛拉嗪的150mg/kg氯胺酮麻醉来自所有组的小鼠,通过腹膜内注射施用。收集肝脏用于RNA分析。

[2255] RNA分析

[2256] 自肝脏组织提取RNA用于PKK的实时PCR分析。使用小鼠引物探针集(正向序列ACAAGTGCATTTTACAGACCAGAGTAC,在本文中命名为SEQ ID NO:2231;反向序列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT,在本文中命名为SEQ ID NO:2232;探针序列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC,在本文中命名为SEQ ID NO:2233)测量PKK mRNA水平。结果呈现为相对于PBS对照的PKK的抑制百分比。如表180所示,用ISIS 482584处理导致相比于PBS对照的PKK mRNA的剂量依赖性显著减少。

[2257] 表180

[2258] BALB/c小鼠肝脏中的PKK mRNA的剂量依赖性减少

[2259]

剂量(mg/kg/周)	%抑制
5	3
10	42
20	68
40	85
80	91
160	94

[2260] 蛋白质分析

[2261] 将血浆收集于含有柠檬酸钠作为抗凝剂的试管中。将样品在4-12%梯度SDS聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)上运行,接着通过用鼠PKK抗体(R&D系统)进行免疫印迹。用次级荧光团标记抗体(LI-COR)温育印迹并且在Odyssey成像器(LI-COR)中成像。结果呈现为相对于PBS对照的PKK的抑制百分比。如表181所示,用ISIS 482584处理导致相比于PBS对照的PKK血浆蛋白的剂量依赖性显著减少。

[2262] 表181

[2263] BALB/c小鼠血浆中的PKK蛋白的剂量依赖性减少

[2264]

剂量(mg/kg/周)	%抑制
5	5
10	24
20	47
40	76
80	81
160	n.d.

[2265] n.d.=无数据

[2266] 实施例124:血管性水肿小鼠模型中的鼠PKK反义抑制的体内作用

[2267] 遗传性血管性水肿(HAE)的特征在于局部肿胀和皮下组织中的血管渗透性增加(Morgan,B.P.N.Engl.J.Med.363:581-83,2010)。它由C1抑制剂、补体系统的蛋白质的缺陷所引起。在这个研究中使用两个小鼠模型,包括建立的C1-INH缺陷小鼠模型和卡托普利诱导的水肿模型,所述模型均引起血管渗透性、HAE的标志。血管渗透性的逆转伴有增加的高分子量激肽原(HMWK)的血浆水平。

[2268] 在第一个模型中,通过用已知的抗高血压剂卡托普利处理诱导血管性水肿,所述抗高血压剂增加了小鼠的血管渗透性并且复制遗传性血管性水肿的病理。

[2269] 在第二个模型中,通过用靶向小鼠C1抑制剂mRNA的反义寡核苷酸ISIS 461756处理诱导血管性水肿,所述抗高血压剂增加了小鼠的血管渗透性并且复制遗传性血管性水肿的病理。ISIS 461756(SEQ ID NO:2245;AAAGTGGTTGATACCCTGGG)为靶向NM_009776.3(SEQ ID NO:2243)的核苷1730-1749的5-10-5MOE缺口聚物。

[2270] 在血管渗透性的卡托普利和ISIS 461756诱导的小鼠模型中评估PKK的反义寡核苷酸抑制剂HOE-140和ISIS 482584的作用。用缓激肽B2受体的选择性拮抗剂HOE-140处理一些小鼠组,所述选择性拮抗剂阻碍血管舒张和血管渗透性(Cruden和Newby,Expert Opin.Pharmacol.9:2383-90,2008)。其他小鼠用抑制PKK mRNA表达的ISIS 482584处理。将用HOE-140处理的效应与用ISIS 482584处理的效应做比较。

[2271] 处理

[2272] 用于此分析的各种处理组呈现于表182中。

[2273] 组1由用每周两次皮下施用保持4周的PBS处理的4只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2274] 组2由用每周两次皮下施用保持4周的PBS处理的8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成。在处理结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组2用作用于卡托普利诱导的血管渗透性的PBS对照组。

[2275] 组3由用每周两次皮下施用保持4周的PBS处理的8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成。在第14天时,将小鼠用50mg/kg靶向C1抑制剂的反义寡核苷酸ISIS 461756进行处理,每周两次皮下施用保持2周。在处理期间结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组3用作用于卡托普利和ISIS 461756诱导的血管渗透性的PBS对照。

[2276] 组4由用每周两次皮下施用保持4周的PBS处理的8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成。在第14天时,将小鼠用50mg/kg靶向C1抑制剂的反义寡核苷酸ISIS 461756进行处理,每周两次皮下施用保持2周。在处理期间结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。然后,小鼠还被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组4用作用于抑制具有HOE-140的血管渗透性的阳性对照。

[2277] 组5由8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成,所述小鼠用40mg/kg的带有未知鼠靶的5-10-5MOE缺口聚物的对照寡核苷酸ISIS 141923(CCTTCCCTGAAGGTTCCTCC;SEQ ID NO:2246)进行处理,每周两次皮下施用保持4周。在第14天时,将小鼠用50mg/kg靶向C1抑制剂的反义寡核苷酸ISIS 461756进行处理,每周两次皮下施用保持2周。在处理期间结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组5用作用于卡托普利和ISIS 461756诱导的血管渗透性的对照组。

[2278] 组6由8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成并且用40mg/kg的ISIS 482584进行处理，每周两次皮下施用保持4周。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组6用作用于测试PKK ASO对卡托普利诱导的血管渗透性的效应的实验处理组。

[2279] 组7由8只C57BL/6J-Tyrc-2J小鼠组成，所述小鼠用40mg/kg的ISIS 482584进行处理，每周两次皮下施用保持4周。在第14天时，将小鼠用50mg/kg靶向C1抑制剂的反义寡核苷酸ISIS 461756进行处理，每周两次皮下施用保持2周。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组7用作用于测试PKK ASO对卡托普利和ISIS 461756诱导的血管渗透性的效应的实验处理组。

[2280] 然后，将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液至尾静脉。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。通过心脏穿刺采集血液样品。

[2281] 表182

[2282] 处理组

[2283]

组号	处理	卡托普利(Captopril)	ISIS 461756	HOE-140

[2284]

1.(N=4)	PBS	否	否	否
2.(N=8)	PBS	是	否	否
3.(N=8)	PBS	是	是	否
4.(N=8)	PBS	是	是	是
5.(N=8)	ISIS 141923	是	是	否
6.(N=8)	ISIS 482584	是	否	否
7.(N=8)	ISIS 482584	是	是	否

[2285] 血管渗透性的量化

[2286] 将从脚、结肠、耳朵以及肠收获的组织单独放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有耳朵和脚组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表183中。显示血管性水肿的任何表现的小鼠吸收更多的染料并且因此表明高的OD值。

[2287] 如表183所呈现的，与相应的PBS对照(组2和3)相比，用ISIS 482584处理阻止用卡托普利处理的小鼠(组6)和用卡托普利和ISIS 461756处理的小鼠(组7)的血管渗透性。与用对照寡核苷酸ISIS 141923处理的小鼠(组5)相比，大多数组织中的组6和7的小鼠中的血管渗透性的测量值也有所降低，其中血管渗透性由卡托普利和ISIS 461756进行诱导。将两个处理组(组6和7)的结肠和脚组织中的血管渗透性的测量值与基础水平做比较，如在仅用PBS处理的小鼠(组1)中所观察到的。将用ISIS 482584处理的小鼠中的血管渗透性的减少与用缓激肽2受体拮抗剂HOE140处理的用作此分析的阳性对照的小鼠中所见的做比较。

[2288] 因此，PKK mRNA的反义抑制可能有利于治疗和预防血管渗透性，所述血管渗透性为HAE的症状。

[2289] 表183

[2290] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2291]

组号	处理	卡托普利(Captopril)	ISIS 461756	HOE-140	结肠	肠	脚	耳朵
1	PBS	否	否	否	0.26	0.16	0.11	0.02
2	PBS	是	否	否	0.49	0.29	0.12	0.07
3	PBS	是	是	否	0.49	0.34	0.11	0.12
4	PBS	是	是	是	0.14	0.18	0.07	0.09
5	ISIS 141923	是	是	否	0.44	0.29	0.14	0.08
6	ISIS 482584	是	否	否	0.27	0.30	0.07	0.14
7	ISIS 482584	是	是	否	0.21	0.34	0.07	0.06

[2292] 高分子量激肽原(HMWK)的量化

[2293] 来自血液样本的HMWK的蛋白质印记量化呈现于图1。

[2294] 如图1所示，与组6和7相比，来自组1和2的样品具有低水平的HMWK，表示组6和7中的血管渗透性是反向的。还如图1所示，如与组6和7相比，来自组1和2的样品具有增加的HMWK分解产物。因此，HMWK缺乏是由HMWK PKK分解成分解产物(包括缓激肽和HKa)所引起的。

[2295] 实施例125：鼠PKK对小鼠的基础渗透性和卡托普利诱导的渗透性的反义抑制的体内效应

[2296] 基础渗透性为首次未处理的小鼠的组织中出现的血管渗透性的水平。评估阻止血管渗透性(基础的或卡托普利诱导的)中的ISIS 482584的效应。

[2297] 处理

[2298] 用于此分析的各种处理组呈现于表184中。

[2299] 组1由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2300] 组2由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的PBS进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组2用作用于卡托普利诱导的血管渗透性的阴性对照组。

[2301] 组3由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的PBS进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组3用作用于抑制基础血管渗透性的阳性对照。

[2302] 组4由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的PBS进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。小鼠还被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组4用作用于抑制卡托普利诱导的血管渗透性的阳性对照。

[2303] 组5由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的40mg/kg ISIS 482584进行处理。组5用作用于测试ISIS 482584对基础血管渗透性的效应的实验处理组。

[2304] 组6由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持4周的40mg/kg ISIS 482584进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组6用作用于测试ISIS 482584对卡托普利诱导的血管渗透性的效应的实验处理组。

[2305] 然后，将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。

[2306] 表184

[2307] 处理组

[2308]

组号	处理	卡托普利	HOE-140
1.(N=8)	PBS	否	否
2.(N=8)	PBS	是	否
3.(N=8)	PBS	否	是
4.(N=8)	PBS	是	是
5.(N=8)	ISIS 482584	否	否

[2309]

6.(N=8)	ISIS 482584	是	否

[2310] 血管渗透性的量化

[2311] 将从脚、结肠、肠以及耳朵收获的组织单独放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有脚和耳朵组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表185中。显示血管性水肿的任何表现的小鼠吸收更多的染料并且因此表明高的OD值。

[2312] 如表185中所呈现的，与PBS对照(组5与组1)相比，用ISIS 482584处理的小鼠表明减小的基础血管渗透性。将通过用ISIS 482584处理所引起的基础血管渗透性的减小与用HOE-140处理(组3，其用作阳性对照)所引起的基础血管渗透性的减小做比较。与PBS对照(组6与组2)相比，用ISIS 482584处理的小鼠还展示减小的卡托普利诱导的血管渗透性。将通过用ISIS 482584处理所引起的卡托普利诱导的基础血管渗透性的减小与用HOE-140处理(组4，其用作阳性对照)所引起的基础血管渗透性的减小做比较。

[2313] 表185

[2314] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2315]

组号	处理	卡托普利	HOE-140	结肠	脚	肠	耳朵
1	PBS	否	否	0.27	0.08	0.23	0.06
2	PBS	是	否	0.61	0.08	0.24	0.01
3	PBS	否	是	0.18	0.06	0.21	0.03
4	PBS	是	是	0.29	0.03	0.14	0.00
5	ISIS 482584	否	否	0.19	0.07	0.22	0.04
6	ISIS 482584	是	否	0.37	0.05	0.22	0.00

[2316] 实施例126：鼠PKK对卡托普利诱导的血管渗透性的反义抑制的剂量依赖性效应

[2317] 评估ISIS 482584对卡托普利诱导的血管渗透性的变化剂量的效应。

[2318] 处理

[2319] 用于此分析的各种处理组呈现于表186中。

[2320] 组1由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2321] 组2由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间

结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组2用作用于卡托普利诱导的血管渗透性的对照组。

[2322] 组3由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。小鼠还被腹膜内注射施用30μg的Icatibant(HOE-140)。组4用作用于抑制卡托普利诱导的血管渗透性的阳性对照。

[2323] 组4、5、6、7、8以及9各自由8只小鼠组成并且分别用2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg(对应于每周5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg、80mg/kg或160mg/kg)的ISIS 482584处理，每周两次皮下施用保持3周。在处理期间结束时，所有组的小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组4-9用作用于测试ISIS 482584对卡托普利诱导的血管渗透性的变化剂量的效应的实验处理组。

[2324] 然后，将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液于尾静脉中。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。通过心脏穿刺采集血液样品。

[2325] 表186

[2326] 处理组

[2327]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	卡托普利	HOE-140
1.(N=4)	PBS	-	否	否
2.(N=8)	PBS	-	是	否
3.(N=4)	PBS	-	是	是
4.(N=8)	ISIS 482584	160	是	否
5.(N=8)	ISIS 482584	80	是	否
6.(N=8)	ISIS 482584	40	是	否
7.(N=8)	ISIS 482584	20	是	否
8.(N=8)	ISIS 482584	10	是	否
9.(N=8)	ISIS 482584	5	是	否

[2328] 血管渗透性的量化

[2329] 将收获的组织放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有脚和耳朵组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表187中。显示血管性水肿的任何表现的小鼠吸收更多的染料并且因此表明高的OD值。

[2330] 如表187中所呈现的，与对应的PBS对照(组2)相比，用较高剂量的ISIS 482584处理的小鼠(组4、5以及6)具有减小水平的卡托普利诱导的血管渗透性。将这些处理组(组4和5)的小鼠的血管渗透性的减小与基础血管渗透性(如组1所示)以及用HOE-140(组3)处理的小鼠的水平做比较。

[2331] 表187

[2332] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2333]

组号	处理	剂量(mg/kg)	卡托普利	HOE-140	结肠	脚	肠	耳朵
1	PBS	-	否	否	0.16	0.07	0.13	0.01
2	PBS	-	是	否	0.39	0.12	0.18	0.07
3	PBS	-	是	是	0.15	0.03	0.10	0.04

[2334]

4	ISIS 482584	160	是	否	0.26	0.10	0.15	0.05
5	ISIS 482584	80	是	否	0.21	0.04	0.17	0.03
6	ISIS 482584	40	是	否	0.36	0.10	0.20	0.05
7	ISIS 482584	20	是	否	0.40	0.11	0.20	0.07
8	ISIS 482584	10	是	否	0.41	0.10	0.19	0.05
9	ISIS 482584	5	是	否	0.41	0.10	0.17	0.05

[2335] 血管泄漏的量化

[2336] 将通过心脏穿刺抽出的血液立刻与3倍体积的冰冷乙醇混合。将溶液在15,000g下在4℃下离心20分钟以去除细胞碎片和沉淀的血浆蛋白质。进一步通过超滤通过10kDa MWCO过滤器对乙醇提取物进行纯化。然后,在OD_{620nm}下测量乙醇提取血浆溶液的颜色强度。将结果以组1PBS对照的OD值的增加或减小百分比呈现于表188中。预期来自显示血管性水肿表现的小鼠的组织可从血浆泄露更多的染料并且因此,展示低的OD值,然而由于减小的血管泄露,处理组可以显示较高的OD值。与用卡托普利处理的PBS阴性对照(组2),用160mg/kg/周和80mg/kg/周的ISIS 482584处理的小鼠(组4和5)展示较少的血管泄露。将来自组4和5的结果与用HOE-140处理的阳性对照(组3)做比较。

[2337] 表188

[2338] 相比于测量血管泄露的PBS基础对照的Evans蓝染料的OD_{620nm}的百分比

[2339]

组号	处理	剂量(mg/kg)	卡托普利	HOE-140	血浆
2	PBS	-	是	否	-43
3	PBS	-	是	是	5
4	ISIS 482584	160	是	否	91
5	ISIS 482584	80	是	否	40
6	ISIS 482584	40	是	否	-31
7	ISIS 482584	20	是	否	-26
8	ISIS 482584	10	是	否	-20
9	ISIS 482584	5	是	否	-23

[2340] 实施例127:鼠PKK对小鼠的基础渗透性的反义抑制的剂量依赖性效应

[2341] 评估ISIS 482584对基础血管渗透性的变化剂量的效应。

[2342] 处理

[2343] 用于此分析的各种处理组呈现于表189中。

[2344] 组1由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2345] 组2由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间

结束时，小鼠被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组2用作用于抑制基础血管渗透性的阳性对照。

[2346] 组3、4、5、6、7以及8各自由8只小鼠组成并且分别用2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg(对应于每周5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg、80mg/kg或160mg/kg)的ISIS 482584处理，每周两次皮下施用保持3周。组4-9用作用于测试ISIS 482584对基础血管渗透性的变化剂量的效应的实验处理组。

[2347] 然后，将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液于尾静脉中。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚和耳朵并且检测渗透性缺陷。通过心脏穿刺采集血液样品。

[2348] 表189

[2349] 处理组

[2350]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	HOE-140
1.(N=8)	PBS	-	否
2.(N=4)	PBS	-	是
3.(N=8)	ISIS 482584	160	否

[2351]

4.(N=8)	ISIS 482584	80	否
5.(N=8)	ISIS 482584	40	否
6.(N=8)	ISIS 482584	20	否
7.(N=8)	ISIS 482584	10	否
8.(N=8)	ISIS 482584	5	否

[2352] 血管渗透性的量化

[2353] 将从脚、结肠以及耳朵收获的组织放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有脚和耳朵组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表190中。较高的OD值与较高水平的渗透性相关。

[2354] 如表190中所呈现的，与PBS对照(组1)相比，用ISIS 482584以所有剂量处理的小鼠(组3-8)的大多数组织表明减小的基础血管渗透性。将ISIS寡核苷酸处理的组的基础血管渗透性的减少与用HOE-140处理的阳性对照组(组2)中所显示的相同。

[2355] 表190

[2356] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2357]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	HOE-140	结肠	脚	耳朵
1	PBS	-	否	0.27	0.17	0.013
2	PBS	-	是	0.24	0.09	0.047
3	ISIS 482584	160	否	0.25	0.11	0.019
4	ISIS 482584	80	否	0.24	0.09	0.014
5	ISIS 482584	40	否	0.27	0.11	0.011
6	ISIS 482584	20	否	0.26	0.11	0.009
7	ISIS 482584	10	否	0.31	0.10	0.015
8	ISIS 482584	5	否	0.32	0.11	0.009

[2358] 血管泄漏的量化

[2359] 将通过心脏穿刺抽出的血液立刻与3倍体积的冰冷乙醇混合。将溶液在15,000g下在4℃下离心20分钟以去除细胞碎片和沉淀的血浆蛋白质。进一步通过超滤通过10kDa MWCO过滤器对乙醇提取物进行纯化。然后,在OD_{620nm}下测量乙醇提取血浆溶液的颜色强度。将结果以组1PBS对照的OD值的增加或减小百分比呈现于表191中。预期由于减小的血管泄露,处理组可以显示较高的OD值。与PBS阴性对照相比,ISIS寡核苷酸处理的组中的所有小鼠展示血管泄露显著减小。

[2360] 表191

[2361] 相比于测量血管泄露的PBS基础对照的Evans蓝染料的OD_{620nm}的百分比

[2362]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	HOE-140	血浆
2.(N=8)	ISIS 482584	160	否	95
3.(N=8)	ISIS 482584	80	否	93
4.(N=8)	ISIS 482584	40	否	83
5.(N=8)	ISIS 482584	20	否	56
6.(N=8)	ISIS 482584	10	否	36

[2363] 高分子量激肽原(HMWK)的量化

[2364] 来自血液样本的HMWK的蛋白质印记量化呈现于图2和表192和193中。

[2365] 如表192所示,与PBS对照相比,用482584处理的组具有较高水平的HMWK,以剂量依赖性方式增加。用PKK反义寡核苷酸处理导致HMWK的稳定性。因此,血管渗透性在ISIS 482584处理的组中以剂量依赖性方式减小。如表193所示,与PBS对照相比,用ISIS 482584处理的组具有较少的HMWK分解产物,以剂量依赖性方式减小。因此,减小的HMWK是由HMWK PKK分解成分解产物(包括缓激肽和HKa)所引起的。数据如通过密度计量学所测量的呈现于强度单位中。

[2366] 表192

[2367] 通过密度计量学的HMWK的量化

[2368]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	强度单位
1	PBS	-	89
3	ISIS 482584	160	21358
4	ISIS 482584	80	7279
5	ISIS 482584	40	873
6	ISIS 482584	20	608
7	ISIS 482584	10	507

[2369] 表193

[2370] 通过密度计量学的HMWK分解产物的量化

[2371]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	强度单位
1	PBS	-	401738
3	ISIS 482584	160	19936
4	ISIS 482584	80	204482

5	ISIS 482584	40	388135
6	ISIS 482584	20	403360
7	ISIS 482584	10	414774

[2372] 实施例128:靶向PKK和因子12的反义寡核苷酸对卡托普利诱导的小鼠的血管渗透性的组合治疗

[2373] 在卡托普利诱导的血管渗透性模型中,将小鼠用变化剂量的靶向因子12的5-10-5MOE缺口聚物ISIS 410944(GCATGGGACAGAGATGGTGC;SEQ ID NO:2247)和ISIS 482584处理。

[2374] 处理

[2375] 用于此分析的各种处理组呈现于表194中。

[2376] 组1由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2377] 组2由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组2用作用于卡托普利诱导的血管渗透性的对照组。

[2378] 组3由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间结束时,小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。小鼠还被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组3用作用于抑制卡托普利诱导的血管渗透性的阳性对照。

[2379] 组4、5、6、7以及8各自由8只小鼠组成并且分别用2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg(对应于每周5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg)的ISIS 482584和ISIS 410944处理,每种每周两次皮下施用保持3周。在处理期间结束时,所有组的小鼠被腹膜内注射施用20μg的卡托普利。组4-8用作用于测试ISIS 410944和ISIS 482584对卡托普利诱导的血管渗透性的效应的实验处理组。

[2380] 然后,将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液于尾静脉中。在Evans蓝溶液施用之后30min,处死小鼠,并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。

[2381] 表194

[2382] 处理组

[2383]

组号	处理	每个 ASO 的剂量(mg/kg/周)	卡托普利 (Captopril)	HOE-140
1.(N=4)	PBS	-	否	否
2.(N=8)	PBS	-	是	否
3.(N=4)	PBS	-	是	是
4.(N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	80	是	否
5.(N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	40	是	否
6.(N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	20	是	否
7.(N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	10	是	否
8.(N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	5	是	否

[2384] 血管渗透性的量化

[2385] 将从脚、结肠以及耳朵收获的组织放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将

含有脚和耳朵组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表195中。较高的OD值与较高水平的渗透性相关。

[2386] 如表195中所呈现的，与PBS对照(组1)相比，用ISIS 482584和ISIS 410944的组合以所有剂量处理的小鼠(组3-8)的大多数组织表明减小的基础血管渗透性。将ISIS寡核苷酸处理的组的血管渗透性的减少与基础PBS对照(组1)以及用HOE-140处理的阳性对照组(组2)中所显示的相同。PKK和因子12反义寡核苷酸的组合导致渗透性的协同减少。可以预知，还观察到血管泄露的对应的协同减少。

[2387] 表195

[2388] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2389]

组号	处理	每个 ASO 的剂量(mg/kg/周)	卡托普利(Captopril)	HOE-140	结肠	脚	肠	耳朵
1	PBS	-	否	否	0.24	0.11	0.13	0.01
2	PBS	-	是	否	0.38	0.15	0.11	0.05
3	PBS	-	是	是	0.23	0.06	0.15	0.04
4	ISIS 482584+ISIS 410944	80	是	否	0.19	0.07	0.11	0.04
5	ISIS 482584+ISIS 410944	40	是	否	0.19	0.07	0.12	0.03
6	ISIS 482584+ISIS 410944	20	是	否	0.22	0.08	0.12	0.04
7	ISIS 482584+ISIS 410944	10	是	否	0.38	0.13	0.13	0.05
8	ISIS 482584+ISIS 410944	5	是	否	0.53	0.12	0.13	0.03

[2390] 实施例129：靶向PKK和因子12的反义寡核苷酸对小鼠的基础血管渗透性的组合治疗

[2391] 在基础血管渗透性模型中，将小鼠用靶向因子12的反义寡核苷酸ISIS 410944和ISIS 482584的变化剂量处理。

[2392] 处理

[2393] 用于此分析的各种处理组呈现于表196中。

[2394] 组1由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量血管渗透性的基础水平。

[2395] 组2由4只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。在处理期间结束时，小鼠被腹膜内注射施用30μg的HOE-140。组2用作用于抑制基础血管渗透性的阳性对照。

[2396] 组3、4、5、6以及7各自由8只小鼠组成并且分别用2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg(对应于每周5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg)的ISIS 482584和ISIS 410944处理，每种每周两次皮下施用保持3周。组3-7用作用于测试ISIS 410944和ISIS 482584对基础血管渗透性的效应的实验处理组。

[2397] 然后，将所有的组注射30mg/kg的Evans蓝溶液于尾静脉中。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。

[2398] 表196

[2399] 处理组

[2400]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	HOE-140
1.(N＝8)	PBS	-	否
2.(N＝4)	PBS	-	是
3.(N＝8)	ISIS 482584+ISIS 410944	80	否
4.(N＝8)	ISIS 482584+ISIS 410944	40	否
5.(N＝8)	ISIS 482584+ISIS 410944	20	否
6.(N＝8)	ISIS 482584+ISIS 410944	10	否
7.(N＝8)	ISIS 482584+ISIS 410944	5	否

[2401] 血管渗透性的量化

[2402] 将从脚、肠、结肠以及耳朵收获的组织放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有脚和耳朵组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度并且呈现于表197中。较高的OD值与较高水平的渗透性相关。

[2403] 如表197中所呈现的，与PBS对照(组1)相比，用ISIS 482584和ISIS 410944的组合以所有剂量处理的小鼠(组2-7)的大多数组织表明减小的基础血管渗透性。将ISIS寡核苷酸处理的组的血管渗透性的减少与用HOE140处理的阳性对照组(组2)中所显示的相同。PKK和因子12反义寡核苷酸的组合导致渗透性的协同减少。可以预知，还观察到血管泄露的对应的协同减少。

[2404] 表197

[2405] 测量血管渗透性的Evans蓝染料的OD_{600nm}

[2406]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)	HOE-140	结肠	脚	肠	耳朵
1	PBS	-	否	0.19	0.08	0.10	0.004
2	PBS	-	是	0.14	0.04	0.08	0.008
3	ISIS 482584+ISIS 410944	80	否	0.14	0.04	0.09	0.01
4	ISIS 482584+ISIS 410944	40	否	0.15	0.05	0.10	0.006
5	ISIS 482584+ISIS 410944	20	否	0.15	0.04	0.10	0.007
6	ISIS 482584+ISIS 410944	10	否	0.15	0.06	0.10	0.004
7	ISIS 482584+ISIS 410944	5	否	0.14	0.05	0.13	0.002

[2407] 实施例130:通过ISIS 482584对因子12蛋白活化的抑制

[2408] 评估PKK mRNA对因子12蛋白活化的反义抑制的效应。

[2409] 处理

[2410] 用于此分析的各种处理组呈现于表198中。

[2411] 组1由8只小鼠组成并且用每周两次皮下施用保持3周的PBS进行处理。未对用作对照组的组1施用其他处理以测量因子12活化。

[2412] 组2、3、4、5以及6各自由8只小鼠组成并且分别用2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg(对应于每周5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg)的ISIS 482584处理,每周两次皮下施用保持3周。组2-6用作用于测量ISIS 482584对因子12活化的效应的处理组。

[2413] 在处理期间结束时,基于血浆中的因子12的酰胺分解测定,从小鼠收获血浆用于Spectrozyme®因子12a。

[2414] 表198

[2415] 处理组

[2416]

组号	处理	剂量(mg/kg/周)
1.(N=8)	PBS	-
2.(N=8)	ISIS 482584	80
3.(N=8)	ISIS 482584	40
4.(N=8)	ISIS 482584	20
5.(N=8)	ISIS 482584	10
6.(N=8)	ISIS 482584	5

[2417] 用于血浆中的因子12活化的测定

[2418] 将血浆(5μL)添加至85μL带有1ug/ml硫酸葡聚糖(500kDa)的PBS的96孔聚丙烯微板中并且将溶液在室温下温育5分钟。添加Spectrozyme® FXIIa(10μL的2mM溶液)和0.2mM KALLISTOP™溶液并且在405nm下测量动力学吸光度。在吸光度累积的线性脉冲相位中,测量因子12活化。结果以PBS对照样品中所测量的因子12活化的百分比呈现于表199中。如表199中所观察的,通过ISIS 482584对PKK的抑制导致通过其底物减小因子12的活化,意味着PKK为适当的因子12活化所需的。

[2419] 表199

[2420] 相比于PBS对照的因子12活化的百分比

[2421]

剂量(mg/kg/周)	%F12活化
80	14
40	24
20	47
10	63
5	82

[2422] 实施例131:鼠PKK对C1-INH反义寡核苷酸诱导的血管渗透性的反义抑制的体内效应

[2423] 通过用靶向小鼠C1抑制剂mRNA的反义寡核苷酸ISIS 461756诱导的血管渗透性,增加了小鼠的血管渗透性并且复制遗传性血管性水肿的病理。评估ISIS 482584对这个模型的效应。

[2424] 处理

[2425] 用每周两次皮下施用保持3周(80mg/kg的周剂量)的40mg/kg ISIS 482584处理8只小鼠的组。用每周两次皮下施用保持3周(80mg/kg的周剂量)的40mg/kg对照寡核苷酸ISIS 141923处理8只小鼠的第二个组。用PBS处理8只小鼠的第三个组，每周两次皮下施用保持3周。在第14天时，用每周两次皮下施用保持3周(25mg/kg的周剂量)的12.5mg/kg ISIS 461756处理所有的组。用PBS处理小鼠的对照组，每周两次皮下施用保持3周，但是不施用ISIS 461756。

[2426] 在处理期间结束时，所有的组被注射30mg/kg的Evans蓝溶液于尾静脉中。在Evans蓝溶液施用之后30min，处死小鼠，并且收获结肠、脚、耳朵以及肠。还收获肝脏用于RNA分析。

[2427] RNA分析

[2428] 从肝脏分离RNA用于C1-INH和PKK mRNA的RT-PCR分析。C1-INH的引物探针集为RTS3218(正向序列GAGTCCCCCAGAGCCTACAGT，在本文中命名为SEQ ID NO:2234；反向序列TGTCATTTGTTATTGTGATGGCTACA，在本文中命名为SEQ ID NO:2235；探针序列CTGCCCTCTACCTGGCCAACAACCA，在本文中命名为SEQ ID NO:2236)。PKK的引物探针集为RTS3287(正向序列ACAAGTGCATTTTACAGACCAGAGTAC，在本文中命名为SEQ ID NO:2237；反向序列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT，在本文中命名为SEQ ID NO:2238；探针序列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC，在本文中命名为SEQ ID NO:2239)。数据以相比于未用ISIS 461756处理的PBS对照的抑制百分比呈现于表200中。数据表示ISIS 461756显著减小了C1-INH mRNA表达并且用ISIS 482584的处理显著减小了PKK表达。

[2429] 表200

[2430] 相比于未处理的PBS对照，用ISIS 461756处理的小鼠的mRNA表达的抑制百分比

[2431]

处理	C1-INH mRNA	PKK mRNA
PBS	76	0
ISIS 141923	79	0
ISIS 482584	77	78

[2432] 血管渗透性的量化

[2433] 将从脚、结肠以及肠收获的组织放入甲酰胺溶液中过夜以渗出Evans蓝染料。将含有脚组织的甲酰胺溶液加热至55℃并且放置过夜。然后，在OD_{600nm}下测量染料输注的甲酰胺溶液的颜色强度。数据以相比于未用ISIS 461756处理的PBS对照的增加或减小百分比呈现于表201中。数据表示用ISIS 482584处理阻止由ISIS 461756诱导的血管渗透性。

[2434] 表201

[2435] 相比于未处理的PBS对照，用ISIS 461756处理的小鼠的血管渗透性的变化百分比

[2436]

处理	结肠	脚	肠
PBS	13	70	27
ISIS 141923	2	80	14
ISIS 482584	-23	2	-25

[2437] 实施例132：在$FeCl_3$诱导的下腔静脉血栓模型中，鼠PKK的反义抑制的体内效应

[2438] 在$FeCl_3$诱导的下腔静脉血栓小鼠模型中，评估在体外和体内展示显著PKK抑制的

ISIS 482584。

[2439] 处理

[2440] 用10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg的ISIS 482584处理8只雄性BALB/c小鼠的三个组，每周两次皮下施用保持3周(20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg的周剂量)。用PBS各自处理12只BALB/c小鼠的两个对照组，每周两次皮下施用保持3周。在反义寡核苷酸或PBS的最后剂量之后两天，用混合有10mg/kg赛拉嗪的150mg/kg氯胺酮麻醉来自所有组的小鼠，通过腹膜内注射施用。在除第一对照组之外的所有组的麻醉小鼠中，用$FeCl_3$诱导血栓形成。

[2441] 在进行$FeCl_3$处理的小鼠中，通过在腔静脉上直接施加用10％$FeCl_3$溶液预饱和的一片滤纸(2x4mm)诱导血栓形成。暴露3分钟之后，去除滤纸。施加滤纸三十分钟之后，将含有血栓的固定长度的静脉切割下来用于血小板分析。收集肝脏用于RNA分析。

[2442] 血小板组合物的量化

[2443] 使用血小板因子-4(PF-4)的实时PCR量化来定量腔静脉中的血小板，作为血栓形成的量度。使用小鼠引物探针集mPF4_LTS_00086(正向序列AGACCCATTTCCTCAAGGTAGAACT，在本文中命名为SEQ ID NO:2240；反向序列CGCAGCGACGCTCATG，在本文中命名为SEQ ID NO:2241；探针序列TCTTTGGGTCCAGTGGCACCCTCTT，在本文中命名为SEQ ID NO:2242)测量PF-4mRNA水平。结果以相比于两个PBS处理的对照组的ISIS寡核苷酸处理的小鼠中的PF-4的百分比呈现。如表202所示，用ISIS 482584处理导致相比于PBS对照显著减小的PF-4。因此，由本文提供的化合物引起的PKK减小可用于抑制血栓形成。

[2444] 表202

[2445] 通过实时PCR量化$FeCl_3$诱导的静脉血栓模型中的PF-4的血栓形成的分析

[2446]

	剂量 mg/kg/周	PF-4
PBS-$FeCl_3$	-	0
PBS+$FeCl_3$	-	100
ISIS 482584	20	62
	40	34
	80	25

[2447] 实施例133：尾部出血测定的鼠PKK反义抑制的体内作用

[2448] 测量尾部出血以观察用ISIS 482584处理是否会引起小鼠的过量出血或流血。

[2449] 处理

[2450] 用10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg的ISIS 482584处理10只雄性BALB/c小鼠的组，每周两次皮下施用保持3周(20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg的周剂量)。用PBS处理8只BALB/c小鼠的对照组，每周两次皮下施用保持3周。

[2451] 尾部出血测定

[2452] 在最后处理ISIS寡核苷酸或PBS之后两天，将小鼠放入尾部出血室中。将小鼠在具有异氟烷的室中麻醉。然后，用无菌剪子把尾部(距顶端大约4mm)剪切成小片。将剪切的尾部立刻放入填充有升温至37℃的大约10mL的0.9％NaCl缓冲溶液的15mL Falcon管中。经过40分钟后，收集血液。在出血之前和之后，均称量盐水填充的管。结果在表203中提供。

[2453] 用ISIS 482584处理不会显著影响出血。这些数据表明本文提供的化合物的出血性潜能低。这些数据连同实施例19中提供的结果一起表明本文所述的化合物对PKK的抑制

可用于提供无相关出血风险的抗血栓形成活性。

[2454] 表203

[2455] 用ISIS 482584处理之后的尾部出血测定

[2456]

	剂量(mg/kg/周)	出血(mL)
PBS	-	0.03
ISIS 482584	20	0.03
	40	0.14
	80	0.07

[2457] 实施例134:在$FeCl_3$诱导的肠系膜血栓模型中,鼠PKK的反义抑制的体内效应

[2458] 在$FeCl_3$诱导的肠系膜血栓小鼠模型中评估ISIS 482584。

[2459] 处理

[2460] 用每周两次皮下施用保持3周(80mg/kg的周剂量)的40mg/kg ISIS 482584处理6-8只Swiss-Webster小鼠的组。用PBS处理6只Swiss-Webster小鼠的对照组,每周两次皮下施用保持3周。在最后剂量的反义寡核苷酸或PBS之后两天,用混合有25mg/kg赛拉嗪的75mg/kg氯胺酮通过腹膜内注射施用,麻醉来自所有组的小鼠。

[2461] 以5mg/kg的剂量皮下注射Rhodamine 6G染料以使血小板着色。通过尾部静脉注射,以1mg/kg的剂量注射Alexa-647标记的抗纤维蛋白原抗体以使血纤维蛋白着色。通过中间切口打开腹部。将内脏肠系膜分散于玻璃盖片上并且在显微镜下通过观察定位肠系膜小动脉(70-120μm)。通过在靶血管上直接施加用6%$FeCl_3$溶液预饱和的棉线(2x0.3mm)诱导血栓形成。暴露三分钟之后,去除线并且通过具有适当滤波器的荧光显微镜(Olympus FluoView 1000激光扫描共焦显微镜)记录染料的颜色强度70min。

[2462] 对照和处理组中的血小板聚集的结果呈现于表204中,其以任意单位(a.u.)表示。与用PBS处理的小鼠相比,用ISIS 482584处理的小鼠中的血小板聚集以80mg/kg/周的剂量减小。对照和处理组中的血纤维蛋白形成的结果呈现于表205中,其也以任意单位(a.u.)表示。与用PBS处理的小鼠相比,用ISIS 482584处理的小鼠中的血纤维蛋白形成以80mg/kg/周的剂量减小。因此,这些结果表明ISIS 482584抑制血栓形成。

[2463] 表204

[2464] 通过实时测量$FeCl_3$诱导的肠系膜血栓模型中的荧光强度(a.u.)的血小板聚集的分析

[2465]

时间(秒)	PBS	80mg/kg/周
752	54	74
1018	315	11
1284	485	7
1550	654	0
1815	1079	0
2081	1164	0
2347	1452	0
2613	1440	38
2879	1689	148

3144	1716	129
3410	1845	169
3676	1865	131
3944	2055	87

[2466] 表205

[2467] 通过实时测量$FeCl_3$诱导的肠系膜血栓模型中的荧光强度(a.u.)的血纤维蛋白形成的分析

[2468]

时间(秒)	PBS	80mg/kg/周
752	9	54
1018	86	7
1284	203	1
1550	319	10
1815	521	16
2081	598	15
2347	831	61
2613	959	88
2879	1157	141
3144	1236	150
3410	1374	173
3676	1629	160
3944	1822	128

[2469] 实施例135:在狭窄诱导的下腔静脉血栓模型中,鼠PKK的反义抑制的体内效应

[2470] 在狭窄诱导的下腔静脉(IVC)血栓模型中评估ISIS 482584。减小的血液流和内皮损害为这个模型(也称为St.Tomas模型)的标志。

[2471] 处理

[2472] 用5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或40mg/kg的ISIS 482584处理6-8只BALB/c小鼠的四个组,每周两次皮下施用保持3周(10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg或80mg/kg的周剂量)。用PBS处理8只BALB/c小鼠的对照组,每周两次皮下施用保持3周。在施用最后剂量的反义寡核苷酸或PBS之后两天,用2.5%的吸入剂异氟烷麻醉来自所有组的小鼠。通过低于左肾静脉的中线腹部切口暴露小鼠的IVC并且通过钝性分离自腹部主动脉分开。将6-0丝质带(Ethicon,UK)放置于血管后面仅低于左肾静脉并且将金属4-0缝合线(Ethicon,UK)纵向放在IVC上方以把丝质带拴在底部。然后,去除金属缝合线。将两个神经血管手术夹(Braun Medical Inc,PA)在其被去除之后各自放在低于连接的两个单独的位置20秒。然后,替换腹腔内容物并且关闭腹部。24小时后,暴露并且针对血栓形成检查IVC。收集所有形成的血栓并且在10%的福尔马林中固定24小时。

[2473] 称量血栓并且结果呈现于表206中,其以毫克表示。如所述结果所表明的,用增加剂量的ISIS 482584处理导致血栓重量相应的减小。结果显示PKK的反义抑制可用于抑制血栓形成。

[2474] 表206

[2475] 狭窄诱导的IVC血栓模型中的血栓重量

[2476]

	剂量 mg/kg/周	重量(mg)
PBS	-	10
ISIS 482584	10	8
	20	6
	40	5
	80	3

[2477] 实施例136:用包含$GalNAc_3$缀合物基团的反义寡核苷酸对鼠PKK的抑制

[2478] 测试以下表中所示的ISIS 482584和ISIS 722059对鼠PKK mRNA的体内效应。

[2479] 表207

[2480] 包含$GalNAc_3$缀合物基团的ISIS 722059和其母体ISIS 482584

[2481]

Isis No.	序列(5'至3')	化学	SEQ ID NO.
482584	$G_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{es}G_{es}A_{es}A_{es}T_{e}$	无缀合物基团和全部PS	2244
722059	$GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}G_{es}G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}T_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{eo}G_{eo}A_{es}A_{es}T_{e}$	5'-$GalNAc_3$-7和混合的PS/PO	2244

[2482] 下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO);并且"o"指示-O-P(=O)(OH)-。上标"m"指示5-甲基胞嘧啶。"$GalNAc_3$-7"的结构在实施例48中示出。

[2483] 处理

[2484] 将四只C57Bl/6J-Tyr^{c-2J}小鼠的四个组各自用5.0mg/kg、10.0mg/kg、20.0mg/kg或40.0mg/kg的ISIS 482584处理,每周两次皮下施用保持3周(10.0mg/kg、20.0mg/kg、40.0mg/kg或80.0mg/kg的周剂量)。用1.0mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或8.0mg/kg的ISIS 722059处理四只BALB/c小鼠的四个组,每周两次皮下施用保持3周(2.0mg/kg、4.0mg/kg、8.0mg/kg或16.0mg/kg的周剂量)。用PBS处理四只BALB/c小鼠的对照组,每周两次皮下施用保持3周。在最后剂量的反义寡核苷酸或PBS之后三天,将来自所有组的小鼠用在空气中占2.5%的汽化了的异氟烷麻醉用于诱导,接着通过头锥通过1-2%的异氟烷用于维护。这之后进行颈椎脱位法。安乐死之后,收集肝脏用于RNA分析。

[2485] RNA分析

[2486] 自肝脏组织提取RNA用于PKK的实时PCR分析。使用小鼠引物探针集(正向序列ACAAGTGCATTTTACAGACCAGAGTAC,在本文中命名为SEQ ID NO:2231;反向序列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT,在本文中命名为SEQ ID NO:2232;探针序列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC,在本文中命名为SEQ ID NO:2233)测量PKK mRNA水平。结果呈现为相对于PBS对照的PKK的抑制百分比。如以下表208所示,包含$GalNAc_3$缀合物基团的Isis 722059在减小PKK mRNA方面比母体反义寡核苷酸Isis 482584显著更有效。对于小鼠和人两者中的许多靶基因而言,这个结果与以上实施例中的结果一致,其中包含$GalNAc_3$缀合物基团的反义寡核苷酸比其母体反义寡核苷酸显著更有效。因此,预期包含$GalNAc_3$缀合物基团的人PKK反义寡核苷酸同样在减小人PKK mRNA方面比不包含缀合物基团的其母体反

义寡核苷酸显著更有效。

[2487] 表208

[2488] 相对于PBS对照的肝中PKK mRNA的抑制百分比

[2489]

ISIS No.	剂量(mg/kg/周)	%抑制	ED_{50} (mg/kg/周)
482584	10	42.6	17.2
	20	53.3	
	40	71.4	
	80	90.8	
722059	2	50.1	2.09
	4	76.7	
	8	80.8	
	16	86.1	

[2490] 实施例137:用包含$GalNAc_3$缀合物基团的反义寡核苷酸对人PKK的抑制

[2491] 测试以下表中所示的ISIS 546254和ISIS 721744对人PKK mRNA的体内效应。

[2492] 表209

[2493] 包含$GalNAc_3$缀合物基团的SIS 721744和其母体ISIS 546254

[2494]

Isis No.	序列(5'至3')	化学	SEQ ID NO.
546254	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}A_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	无缀合物基团和全部PS	570
721744	$GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}A_{es}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}A_{eo}A_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	5'-$GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}$,和混合的PS/PO	570

[2495] 下标:"e"指示2'-MOE修饰核苷;"d"指示β-D-2'-脱氧核糖核苷;"s"指示硫代磷酸酯核苷间键联(PS);并且"o"指示磷酸二酯核苷间键联(PO)。"$GalNAc_3$-7"的结构在实施例48中示出并且"$GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o}$"指示其中分解部分为-O-P(=O)(OH)-的$GalNAc_3$-7缀合物基团。

[2496] 根据制造商说明书,使用包括基质细胞的原代人肝细胞共培养物以在体外模拟肝脏的生理微环境(HepatoPac试剂盒HPHU-TX-96S,Hepregen,Medford,MA)。在不存在任何转染试剂的情况下,将一定浓度列于下表中的Isis寡核苷酸或PBS添加至每个孔中。96小时后,细胞被裂解并且RNA从细胞分离。使用引物探针集RTS3454通过定量实时PCR测量PKK mRNA水平并且归一化为RNA含量,如通过RIBOGREEN®所测量的。结果以相对于PBS处理的细胞的PKK mRNA水平的抑制百分比呈现于下表中,并且使用4参数逻辑模型(JMP软件,Cary,NC)计算IC_{50}值。结果显示,在其中没有使用试剂或电穿孔技术来人工促进寡核苷酸进入到细胞中的自由摄取条件下,包含GalNAc缀合物的寡核苷酸比不包含GalNAc缀合物的母体寡核苷酸显著更有效。

[2497] 表210

[2498] 相对于PBS对照的PKK mRNA的抑制百分比

[2499]

ISIS No.	浓度(μM)	抑制(%)	IC_{50} (μM)
546254	0.1	30	2.12
	0.3	25	
	1.0	24	
	3.0	63	
	10.0	85	
721744	0.03	34	0.07
	0.1	52	
	0.3	81	
	1.0	92	
	3.0	98	