(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115298312 A
(43)申请公布日 2022.11.04

(21)申请号 202180021227.2

(22)申请日 2021.01.22

(30)优先权数据
62/965,452 2020.01.24 US
63/138,717 2021.01.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/014729 2021.01.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/150969 EN 2021.07.29

(71)申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 J·D·麦金因克 J·吉尔伯特
A·卡斯托雷诺 L·T·H·党
S·勒布朗克 彭海燕
C·凯塔尼斯
M·M·桑达拉潘迪安

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61K 31/7125(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

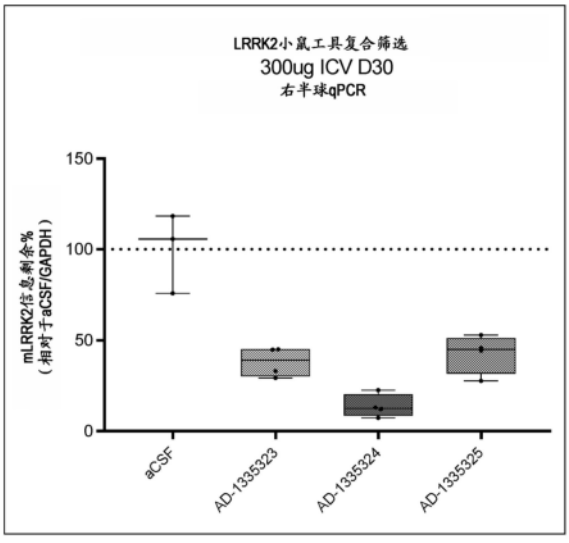
权利要求书8页 说明书144页
序列表134页 附图4页

(54)发明名称

富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)iRNA剂组合物及其使用方法

(57)摘要

本公开涉及靶向富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)基因的双链核糖核酸(dsRNAi)剂和组合物,以及使用此类dsRNAi剂和组合物抑制LRRK2基因的表达和治疗患有LRRK2相关疾病或病症(例如,帕金森氏病)的受试者的方法。



CN 115298312 A

1.一种用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链,

其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸和所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

2.一种用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链,

其中所述反义链包含与编码LRRK2的mRNA的互补区,和其中所述互补区包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

3.一种用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂,其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链,

其中所述反义链包含与编码LRRK2的mRNA的互补区,和其中所述互补区包含与表3、4、6或7中任一个的任一反义核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的dsRNA剂,其中所述有义链包含与以下任一核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸3383-3403、2105-2125、2356-2376、5413-5433、2603-2623、3563-3583、2192-2212、3088-3108、3105-3125、2203-2223、7348-7368、7097-7117、6319-6339、3886-3906、5190-5210、3964-3984、5138-5158、1254-1274、7098-7118、7048-7068、7050-7070、2764-2784、3087-3107、7526-7546、4849-4869、5272-5292、468-488、7520-7540、3720-3740、4016-4036、7792-7812、2515-2535、2286-2306、4014-4034、3721-3741、2284-2304、1896-1916、3876-3896、7788-7808、4013-4033、1275-1295、7527-7547、3606-3626、7525-7545、468-488、1254-1274、2105-2125、2192-2212、2203-2223、2603-2623、2764-2784、3087-3107、3088-3108、3383-3403、3563-3583、3876-3896、3886-3906、3964-3984、4849-4869、5138-5158、5190-5210、5272-5292、6319-6339、7097-7117、7098-7118和7348-7368,和所述反义链包含SEQ ID NO:2的相应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的dsRNA剂,其中所述反义链包含与选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-601140.1、AD-599927.1、AD-612673.1、AD-615420.1、AD-600406.1、AD-601294.1、AD-600013.1、AD-600853.1、AD-613382.1、AD-600024.1、AD-604701.1、AD-604452.1、AD-603747.1、AD-601616.1、AD-602766.1、AD-601694.1、AD-602734.1、AD-599139.1、AD-604453.1、AD-616783.1、AD-616785.1、AD-600566.1、AD-600852.1、AD-617239.1、AD-602466.1、AD-602848.1、AD-598424.1、AD-617233.1、AD-613965.1、AD-614239.1、AD-617466.1、AD-612820.1、AD-612611.1、AD-614237.1、AD-613966.1、AD-612609.1、AD-612246.1、AD-601606.1、AD-617462.1、AD-614236.1、AD-611650.1、AD-617240.1、AD-613851.1、AD-617238.1、AD-1335323.1、AD-1335325.1、AD-1335324.1、AD-1508169、AD-1508884、AD-1509672、AD-1509758、AD-1509769、AD-1510151、AD-1510311、AD-1510597、AD-1510598、AD-1510885、AD-1511039、AD-1511351、AD-1511361、AD-1511439、AD-1512211、AD-1512479、AD-1512511、AD-1512593、AD-1513492、AD-1514197、AD-1514198和AD-1514446。

6.根据权利要求1或权利要求2所述的dsRNA剂,其中所述有义链和反义链的所述核苷

酸序列包含表3、4、6或7中任一个的任一有义链和反义链核苷酸序列。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的dsRNA剂，其中所述有义链、所述反义链或者所述有义链和所述反义链两者与一个或多个亲脂性部分缀合。

8.根据权利要求7所述的dsRNA剂，其中所述亲脂性部分缀合于所述dsRNA剂的所述双链区中的一个或多个内部位置。

9.根据权利要求7或权利要求8所述的dsRNA剂，其中所述亲脂性部分通过接头或载体缀合。

10.根据权利要求7-9中任一项所述的dsRNA剂，其中通过$\log K_{ow}$测量的所述亲脂性部分的亲脂性超过0。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的dsRNA剂，其中通过所述双链RNA剂的血浆蛋白结合测定中的未结合部分测量的所述双链RNA剂的疏水性超过0.2。

12.根据权利要求11所述的dsRNA剂，其中所述血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率变动测定。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的dsRNA剂，其中所述dsRNA剂包含至少一个修饰的核苷酸。

14.根据权利要求13所述的dsRNA剂，其中不超过5个所述有义链核苷酸和不超过5个所述反义链核苷酸是未修饰的核苷酸。

15.根据权利要求13所述的dsRNA剂，其中所述有义链的全部核苷酸和所述反义链的全部核苷酸是修饰的核苷酸。

16.根据权利要求13-15中任一项所述的dsRNA剂，其中所述修饰的核苷酸的至少一个选自以下：脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸苷(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、非锁定核苷酸、构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉基核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包含乙烯膦酸酯的核苷酸、包含腺苷-二醇核酸(GNA)的核苷酸、包含胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体的核苷酸、包含2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧胸苷-3'磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧鸟苷-3'磷酸酯的核苷酸以及与胆固醇基衍生物和十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸；及其组合。

17.根据权利要求16所述的dsRNA剂，其中所述修饰的核苷酸选自以下：2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、3'-末端脱氧胸苷核苷酸(dT)、锁定核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉基核苷酸、氨基磷酸酯和包含非天然碱基的核苷酸。

18.根据权利要求16所述的dsRNA剂，其中所述修饰的核苷酸包含3'-末端脱氧胸苷核苷酸(dT)的短序列。

19.根据权利要求16所述的dsRNA剂，其中在所述核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、GNA和2'氟修饰。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的dsRNA剂,其还包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。

21.根据权利要求1-20所述的dsRNA剂,其中所述dsRNA剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的dsRNA剂,其中每条链的长度不超过30个核苷酸。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的dsRNA剂,其中至少一条链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为15-30个核苷酸对。

26.根据权利要求25所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为17-23个核苷酸对。

27.根据权利要求25所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为17-25个核苷酸对。

28.根据权利要求25所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为23-27个核苷酸对。

29.根据权利要求25所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为19-21个核苷酸对。

30.根据权利要求25所述的dsRNA剂,其中所述双链区的长度为21-23个核苷酸对。

31.根据权利要求1-30中任一项所述的dsRNA剂,其中每条链具有19-30个核苷酸。

32.根据权利要求1-30中任一项所述的dsRNA剂,其中每条链具有19-23个核苷酸。

33.根据权利要求1-30中任一项所述的dsRNA剂,其中每条链具有21-23个核苷酸。

34.根据权利要求8-33中任一项所述的dsRNA剂,其中一个或多个亲脂性部分缀合于至少一条链上的一个或多个内部位置。

35.根据权利要求34所述的dsRNA剂,其中所述一个或多个亲脂性部分通过接头或载体缀合于至少一条链上的一个或多个内部位置。

36.根据权利要求35所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了在所述至少一条链的每一端的末端两个位置以外的所有位置。

37.根据权利要求35所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了在所述至少一条链的每一端的末端三个位置以外的所有位置。

38.根据权利要求35-37所述的dsRNA剂,其中所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区。

39.根据权利要求38所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了从所述有义链的5'末端数的位置9-12以外的所有位置。

40.根据权利要求38所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了从所述有义链的3'末端数的位置11-13以外的所有位置。

41.根据权利要求35-37所述的dsRNA剂,其中所述内部位置不包括所述反义链的切割位点区。

42.根据权利要求41所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了从所述反义链的5'末端数的位置12-14以外的所有位置。

43.根据权利要求35-37所述的dsRNA剂,其中所述内部位置包括除了从所述3'末端数

在所述有义链上的位置11-13,和从所述5'末端数在所述反义链上的位置12-14以外的所有位置。

44.根据权利要求8-43中任一项所述的dsRNA剂,其中所述一个或多个亲脂性部分缀合于选自以下的一个或多个所述内部位置:从每条链的所述5'末端数在所述有义链上的位置4-8和13-18,以及在所述反义链上的位置6-10和15-18。

45.根据权利要求44所述的dsRNA剂,其中所述一个或多个亲脂性部分缀合于选自以下的一个或多个所述内部位置:从每条链的所述5'末端数在所述有义链上的位置5、6、7、15和17,以及在所述反义链上的位置15和17。

46.根据权利要求8所述的dsRNA剂,其中在所述双链区中的所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区。

47.根据权利要求7-46中任一项所述的dsRNA剂,其中所述有义链的长度为21个核苷酸,所述反义链的长度为23个核苷酸,以及所述亲脂性部分缀合于所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或者所述反义链的位置16。

48.根据权利要求47所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分缀合于所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1或位置7。

49.根据权利要求47所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分缀合于所述有义链的位置21、位置20或位置15。

50.根据权利要求47所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分缀合于所述有义链的位置20或位置15。

51.根据权利要求47所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分缀合于所述反义链的位置16。

52.根据权利要求7-51中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分是脂肪族、脂环族或多脂环族化合物。

53.根据权利要求52所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分选自以下:脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或酚噁嗪。

54.根据权利要求52所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C4-C30烃链,以及选自以下的任选的官能团:羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、巯基、叠氮基和炔烃。

55.根据权利要求54所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C6-C18烃链。

56.根据权利要求54所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C16烃链。

57.根据权利要求56所述的dsRNA剂,其中所述饱和或不饱和C16烃链缀合于从所述链的所述5'末端数的位置6。

58.根据权利要求7-57中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分通过载体缀合,所述载体替代在所述一个或多个内部位置或所述双链区中的一个或多个核苷酸。

59.根据权利要求58所述的dsRNA剂,其中所述载体是选自以下的环状基团:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基;或

者是基于丝氨醇骨架或二乙醇胺骨架的非环状部分。

60.根据权利要求7-57中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分通过接头与所述双链iRNA剂缀合,所述接头包含醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫键、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物或氨基甲酸酯。

61.根据权利要求7-60中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分与核碱基、糖部分或核苷间键缀合。

62.根据权利要求7-61中任一项所述的dsRNA剂,其中所述亲脂性部分或靶向配体通过可生物切割的接头缀合,所述接头选自以下:DNA,RNA,二硫化物,酰胺,半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖的官能化单糖或寡糖,及其组合。

63.根据权利要求7-62中任一项所述的dsRNA剂,其中所述有义链的3'末端通过封端保护,所述封端是具有胺的环状基团,所述环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。

64.根据权利要求7-61中任一项所述的dsRNA剂,其还包含靶向肝脏组织的靶向配体。

65.根据权利要求7-61中任一项所述的dsRNA剂,其还包含靶向神经元细胞的靶向配体。

66.根据权利要求7-61中任一项所述的dsRNA剂,其还包含靶向任何眼细胞的靶向配体。

67.根据权利要求64所述dsRNA剂,其中所述靶向配体是GalNAc缀合物。

68.根据权利要求1-67中任一项所述的dsRNA剂,其还包含

在所述反义链的3'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Sp构型的连接磷原子,

在所述反义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,和

在所述有义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型或Sp构型的连接磷原子。

69.根据权利要求1-67中任一项所述的dsRNA剂,其还包含

在所述反义链的3'末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Sp构型的连接磷原子,

在所述反义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,和

在所述有义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型或Sp构型的连接磷原子。

70.根据权利要求1-67中任一项所述的dsRNA剂,其还包含

在所述反义链的3'末端的第一个、第二个和第三个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Sp构型的连接磷原子,

在所述反义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,和

在所述有义链的5'末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型或

Sp构型的连接磷原子。

71.根据权利要求1-67中任一项所述的dsRNA剂,其还包含

在所述反义链的3’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Sp构型的连接磷原子,

在所述反义链的3’末端的第三个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,

在所述反义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,和

在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp或Sp构型的连接磷原子。

72.根据权利要求1-67中任一项所述的dsRNA剂,其还包含

在所述反义链的3’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Sp构型的连接磷原子,

在所述反义链的5’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp构型的连接磷原子,和

在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰,其具有Rp或Sp构型的连接磷原子。

73.根据权利要求1-72中任一项所述的dsRNA剂,其还包含在所述反义链的所述5’末端处的磷酸酯或磷酸酯模拟物。

74.根据权利要求73所述的dsRNA剂,其中所述磷酸酯模拟物是5’-乙烯膦酸酯(VP)。

75.根据权利要求1-72中任一项所述的dsRNA剂,其中在所述双链体的所述反义链的所述5’末端1位处的碱基对是AU碱基对。

76.根据权利要求1-72中任一项所述的dsRNA剂,其中所述有义链具有共计21个核苷酸和所述反义链具有共计23个核苷酸。

77.一种包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂的细胞。

78.一种用于抑制编码LRRK2的基因表达的药物组合物,其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂。

79.一种药物组合物,其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂和脂质制剂。

80.根据权利要求78或权利要求79所述的药物组合物,其中dsRNA剂是在非缓冲溶液中。

81.根据权利要求80所述的药物组合物,其中所述非缓冲溶液是盐水或水。

82.根据权利要求78或权利要求79所述的药物组合物,其中所述dsRNA剂是在缓冲溶液中。

83.根据权利要求82所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包含醋酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐、磷酸盐或其任何组合。

84.根据权利要求82所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

85.一种抑制细胞中LRRK2基因表达的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂,或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物接触,从而抑制所述细胞中所述LRRK2基因的表达。

86.根据权利要求85所述的方法，其中所述细胞是在受试者内。

87.根据权利要求86所述的方法，其中所述受试者是人。

88.根据权利要求87所述的方法，其中所述受试者具有LRRK2相关病症。

89.根据权利要求88所述的方法，其中所述LRRK2相关病症是神经退行性病症。

90.根据权利要求89所述的方法，其中所述神经退行性病症是家族性病症。

91.根据权利要求89所述的方法，其中所述神经退行性病症是散发性病症。

92.根据权利要求90或权利要求91所述的方法，其中所述神经退行性病症是帕金森氏病。

93.根据权利要求88所述的方法，其中所述LRRK2相关病症是眼部病症。

94.根据权利要求85-93中任一项所述的方法，其中使所述细胞与所述dsRNA剂接触将LRRK2的表达抑制至少约25％。

95.根据权利要求85-94中任一项所述的方法，其中抑制LRRK2的表达使所述受试者血清中的LRRK2蛋白水平降低至少约25％。

96.一种治疗患有将从LRRK2表达降低中获益的病症的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂，或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物，从而治疗患有将从LRRK2表达降低中获益的所述病症的所述受试者。

97.一种在患有将从LRRK2表达降低中获益的病症的受试者中预防至少一种症状的方法，其包括向所述受试者施用预防有效量的权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂，或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物，从而在患有将从LRRK2表达降低中获益的所述病症的所述受试者中预防至少一种症状。

98.根据权利要求96或权利要求97所述的方法，其中所述病症是LRRK2相关病症。

99.根据权利要求98所述的方法，其中所述LRRK2相关病症选自以下：帕金森氏病和眼部病症。

100.根据权利要求97-99中任一项所述的方法，其中所述受试者是人。

101.根据权利要求100所述的方法，其中向所述受试者施用所述剂使得LRRK2蛋白累积减少。

102.根据权利要求96-101中任一项所述的方法，其中以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量向所述受试者施用所述dsRNA剂。

103.根据权利要求96-102中任一项所述的方法，其中向所述受试者鞘内施用所述dsRNA剂。

104.根据权利要求96-103中任一项所述的方法，其还包括测定来自受试者的样品中的LRRK2的水平。

105.根据权利要求104所述的方法，其中在所述受试者的样品中的LRRK2的所述水平是在血液、血浆或脑脊液样品中的Lrrk2蛋白水平。

106.根据权利要求96-105中任一项所述的方法，其还包括向所述受试者施用其他治疗剂。

107.一种试剂盒，其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物。

108.一种药瓶，其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂或权利要求78-84中任一

项所述的药物组合物。

109.一种注射器,其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物。

110.一种鞘内泵,其包含权利要求1-76中任一项所述的dsRNA剂或权利要求78-84中任一项所述的药物组合物。

富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)iRNA剂组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年01月24日提交的美国临时申请号62/965,452的优先权,以及要求于2021年01月18日提交的美国临时申请号63/138,717的权益。前述申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并且在此通过引用整体并入。ASCII副本创建于2021年01月20日,名称为A108868_1010WO_SL.txt,大小为170,470字节。

背景技术

[0005] 编码蛋白Lrrk2的富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)基因位于染色体区域12q11.2-q13.1。Lrrk2属于Ras/GTPase超家族的Roco蛋白。高度保守的Lrrk2蛋白由51个外显子组成,共计有2527个氨基酸,其包含酶结构域,所述酶结构域含有ROC(Ras复合物)GTPase结构与和丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。在Lrrk2蛋白中的其他蛋白相互作用结构域包括富亮氨酸重复结构域、C-末端WD40重复结构域以及犰狳和锚蛋白重复结构域。

[0006] LRRK2基因的突变被认为是导致帕金森氏病(PD)的显性遗传形式的原因,帕金森氏病是一种逐渐使人衰弱的神经退行性综合征。LRRK2突变已与患者中的以下表型表现相关:额颞叶变性、皮质基底节变性、黑质致密部(SNpc)中的多巴胺能神经元变性、路易体(Lewy body)的存在(聚集的α-突触核蛋白和其他泛素化蛋白的神经元包涵体)以及相关的运动神经元疾病。在具有单核苷酸多态性(SNP)的散发性PD病例中也发现了LRRK2突变,该突变导致LRRK2表达增加(增加约2倍),由于确定的激酶活性增加,这可能有助于疾病病因。鉴于LRRK2相关的家族性和散发性PD临床表现的相似性,LRRK2中的错义和/或缺失突变可能在家族性和散发性PD的疾病病因学中起关键作用。

[0007] 帕金森氏病目前尚无治愈方法,治疗仅旨在随着疾病的进展减轻症状并提高患者的生活质量。因此,需要能够选择性和有效抑制LRRK2基因表达的剂,从而可以有效治疗患有LRRK2相关病症(例如,帕金森氏病)的受试者。

发明内容

[0008] 本公开提供了RNAi组合物,其影响RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的LRRK2基因的RNA转录物的切割。LRRK2基因可以在细胞内,例如,在受试者(如人)的细胞内。使用这些iRNA可以在哺乳动物中靶向降解相应基因(LRRK2基因)的mRNA。

[0009] 本发明的iRNA已被设计成靶向LRRK2基因,例如,在该基因的外显子中具有错义和/或缺失突变并且具有核苷酸修饰的组合的LRRK2基因。相对于对照水平,本发明的iRNA抑制LRRK2基因的表达至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%,并且降低有义链和反义链基因座的水平。不希望受到理论的限制,据信前述性质和特定靶位点的组合或亚组合,或者这些iRNA中

的特定修饰赋予本发明的iRNA改善的有效性、稳定性、效力、持久性和安全性。在一个方面中，本发明提供了用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂，其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链，其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸和所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0010] 在另一个方面中，本发明提供了一种用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂，其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链，其中所述反义链包含与编码LRRK2的mRNA的互补区，和其中所述互补区包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0011] 在又一个方面中，本发明提供了一种用于抑制LRRK2表达的双链核糖核酸(dsRNA)剂，其中所述dsRNA剂包含形成双链区的有义链和反义链，其中所述反义链包含与编码LRRK2的mRNA的互补区，和其中所述互补区包含与表3-4和表6-7中任一个的任一反义核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0012] 在一个实施方式中，所述有义链包含与以下任一核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的核苷酸3383-3403、2105-2125、2356-2376、5413-5433、2603-2623、3563-3583、2192-2212、3088-3108、3105-3125、2203-2223、7348-7368、7097-7117、6319-6339、3886-3906、5190-5210、3964-3984、5138-5158、1254-1274、7098-7118、7048-7068、7050-7070、2764-2784、3087-3107、7526-7546、4849-4869、5272-5292、468-488、7520-7540、3720-3740、4016-4036、7792-7812、2515-2535、2286-2306、4014-4034、3721-3741、2284-2304、1896-1916、3876-3896、7788-7808、4013-4033、1275-1295、7527-7547、3606-3626、7525-7545、2356-2376、3105-3125和5413-5433，和所述反义链包含SEQ ID NO:2的相应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0013] 在一个实施方式中，所述有义链包含与以下任一核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:SEQ ID NO:1的468-488、1254-1274、2105-2125、2192-2212、2203-2223、2603-2623、2764-2784、3087-3107、3088-3108、3383-3403、3563-3583、3876-3896、3886-3906、3964-3984、4849-4869、5138-5158、5190-5210、5272-5292、6319-6339、7097-7117、7098-7118和7348-7368of SEQ ID NO:1，和所述反义链包含SEQ ID NO:2的相应核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0014] 在一个实施方式中，所述反义链包含与选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-601140.1、AD-599927.1、AD-612673.1、AD-615420.1、AD-600406.1、AD-601294.1、AD-600013.1、AD-600853.1、AD-613382.1、AD-600024.1、AD-604701.1、AD-604452.1、AD-603747.1、AD-601616.1、AD-602766.1、AD-601694.1、AD-602734.1、AD-599139.1、AD-604453.1、AD-616783.1、AD-616785.1、AD-600566.1、AD-600852.1、AD-617239.1、AD-602466.1、AD-602848.1、AD-598424.1、AD-617233.1、AD-613965.1、AD-614239.1、AD-617466.1、AD-612820.1、AD-612611.1、AD-614237.1、AD-613966.1、AD-612609.1、AD-612246.1、AD-601606.1、AD-617462.1、AD-614236.1、AD-611650.1、AD-617240.1、AD-613851.1、AD-617238.1、AD-1335323.1、AD-1335325.1和AD-1335324.1。

[0015] 在一个实施方式中，所述反义链包含与选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序

列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:AD-1508169、AD-1508884、AD-1509672、AD-1509758、AD-1509769、AD-1510151、AD-1510311、AD-1510597、AD-1510598、AD-1510885、AD-1511039、AD-1511351、AD-1511361、AD-1511439、AD-1512211、AD-1512479、AD-1512511、AD-1512593、AD-1513492、AD-1514197、AD-1514198和AD-1514446。

[0016] 在一些实施方式中,所述有义链和反义链的所述核苷酸序列包含表3或4中任一个的任一有义链核苷酸序列。

[0017] 在一些实施方式中,所述有义链和反义链的所述核苷酸序列包含表6或7中任一个的任一有义链核苷酸序列。

[0018] 在一个实施方式中,所述有义链、所述反义链或者所述有义链和所述反义链两者与一个或多个亲脂性部分缀合。

[0019] 在一个实施方式中,所述亲脂性部分缀合于所述dsRNA剂的所述双链区中的一个或多个内部位置。

[0020] 在一个实施方式中,所述亲脂性部分通过接头或载体缀合。

[0021] 在一个实施方式中,通过$\log K_{ow}$测量的所述亲脂性部分的亲脂性超过0。

[0022] 在一个实施方式中,通过所述双链RNAi剂的血浆蛋白结合测定中的未结合部分测量的所述双链RNAi剂的疏水性超过0.2。

[0023] 在一个实施方式中,所述血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率变动测定。

[0024] 在一些实施方式中,所述dsRNA剂包含至少一个修饰的核苷酸。

[0025] 在一个实施方式中,不超过5个所述有义链核苷酸和不超过5个所述反义链核苷酸是未修饰的核苷酸。

[0026] 在一个实施方式中,所述有义链的全部核苷酸和所述反义链的全部核苷酸是修饰的核苷酸。

[0027] 在一个实施方式中,所述修饰的核苷酸的至少一个选自以下:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸苷(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、非锁定核苷酸、构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉基核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-甲基膦酸酯基团的核苷酸、包含5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物的核苷酸、包含乙烯膦酸酯的核苷酸、包含腺苷-二醇核酸(GNA)的核苷酸、包含胸苷-二醇核酸(GNA)S-异构体的核苷酸、包含2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧胸苷-3'磷酸酯的核苷酸、包含2'-脱氧鸟苷-3'磷酸酯的核苷酸以及与胆固醇基衍生物和十二烷酸双乙酰胺基团连接的末端核苷酸;及其组合。

[0028] 在一个实施方式中,所述修饰的核苷酸选自以下:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、3'-末端脱氧胸苷核苷酸(dT)、锁定核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉基核苷酸、氨基磷酸酯和包含非天然碱基的核苷酸。

[0029] 在一个实施方式中,所述修饰的核苷酸包含3'-末端脱氧胸苷核苷酸(dT)的短序

列。

[0030] 在一个实施方式中,在所述核苷酸上的修饰是2'-O-甲基、GNA和2'氟修饰。

[0031] 在一些实施方式中,所述dsRNA剂还包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0032] 在一个实施方式中,所述dsRNA剂包含6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0033] 在一个实施方式中,每条链的长度不超过30个核苷酸。

[0034] 在一个实施方式中,至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。在另一个实施方式中,至少一条链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

[0035] 所述双链区可以是长度为15-30个核苷酸对;长度为17-23个核苷酸对;长度为17-25个核苷酸对;长度为23-27个核苷酸对;长度为19-21个核苷酸对;或长度为21-23个核苷酸对。

[0036] 每条链可以具有19-30个核苷酸;19-23个核苷酸;或21-23个核苷酸。

[0037] 在一个实施方式中,一个或多个亲脂性部分通过接头或载体缀合于至少一条链上的一个或多个内部位置。

[0038] 在一个实施方式中,所述内部位置包括除了在所述至少一条链的每一端的末端两个位置以外的所有位置。

[0039] 在另一个实施方式中,所述内部位置包括除了在所述至少一条链的每一端的末端三个位置以外的所有位置。

[0040] 在一个实施方式中,所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区。

[0041] 在一个实施方式中,所述内部位置包括除了从所述有义链的5'末端数的位置9-12以外的所有位置。

[0042] 在另一个实施方式中,所述内部位置包括除了从所述有义链的3'末端数的位置11-13以外的所有位置。

[0043] 在一个实施方式中,所述内部位置不包括所述反义链的切割位点区。

[0044] 在一个实施方式中,所述内部位置包括除了从所述反义链的5'末端数的位置12-14以外的所有位置。

[0045] 在一个实施方式中,所述内部位置包括除了从所述3'末端数在所述有义链上的位置11-13,和从所述5'末端数在所述反义链上的位置12-14以外的所有位置。

[0046] 在一个实施方式中,所述一个或多个亲脂性部分缀合于选自以下的一个或多个所述所述内部位置:从每条链的所述5'末端数在所述有义链上的位置4-8和13-18,以及在所述反义链上的位置6-10和15-18。

[0047] 在另一个实施方式中,所述一个或多个亲脂性部分缀合于选自以下的一个或多个所述所述内部位置:从每条链的所述5'末端数在所述有义链上的位置5、6、7、15和17,以及在所述反义链上的位置15和17。

[0048] 在一个实施方式中,在所述双链区的所述内部位置不包括所述有义链的切割位点区。

[0049] 在一个实施方式中,所述有义链的长度为21个核苷酸,所述反义链的长度为23个核苷酸,以及所述亲脂性部分与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位置1、位置7、位置6或位置2或者所述反义链的位置16缀合。

[0050] 在一个实施方式中,所述亲脂性部分与所述有义链的位置21、位置20、位置15、位

置1或位置7缀合。

[0051] 在另一个实施方式中，所述亲脂性部分与所述有义链的位置21、位置20或位置15缀合。

[0052] 在又一个实施方式中，所述亲脂性部分与所述有义链的位置20或位置15缀合。

[0053] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分与所述反义链的位置16缀合。

[0054] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分是脂肪族、脂环族或多脂环族化合物。

[0055] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分选自以下：脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-茋丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或酚噁嗪。

[0056] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C4-C30烃链，以及选自以下的任选的官能团：羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、巯基、叠氮基和炔烃。

[0057] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C6-C18烃链。

[0058] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分含有饱和或不饱和C16烃链。

[0059] 在一个实施方式中，所述饱和或不饱和C16烃链与从所述链的所述5’末端数的位置6缀合。

[0060] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分通过载体缀合，所述载体替代在所述一个或多个内部位置或所述双链区中的一个或多个核苷酸。

[0061] 在一个实施方式中，所述载体是选自以下的环状基团：吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基；或者是基于丝氨醇骨架或二乙醇胺骨架的非环状部分。

[0062] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分通过接头与所述双链iRNA剂缀合，所述接头包含醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫键、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物或氨基甲酸酯。

[0063] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分与核碱基、糖部分或核苷间键缀合。

[0064] 在一个实施方式中，所述亲脂性部分或靶向配体通过可生物切割的接头缀合，所述接头选自以下：DNA，RNA，二硫化物，酰胺，半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖的官能化单糖或寡糖，及其组合。

[0065] 在一个实施方式中，所述有义链的3’末端通过封端保护，所述封端是具有胺的环状基团，所述环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。

[0066] 在一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含其还包含靶向肝脏组织的靶向配体。

[0067] 在一个实施方式中，所述靶向配体是GalNAc缀合物。

[0068] 在一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含在所述反义链的3’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Sp构型的连接磷原子，在所述反义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，和在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型或Sp构型的连接磷原子。

[0069] 在另一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含在所述反义链的3’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Sp构型的连接磷原子，在所述反义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，和在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型或Sp构型的连接磷原子。

[0070] 在又一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含在所述反义链的3’末端的第一个、第二个和第三个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Sp构型的连接磷原子，在所述反义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，和在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型或Sp构型的连接磷原子。

[0071] 在另一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含在所述反义链的3’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Sp构型的连接磷原子，在所述反义链的3’末端的第三个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，在所述反义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，和在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp或Sp构型的连接磷原子。

[0072] 在另一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含在所述反义链的3’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Sp构型的连接磷原子，在所述反义链的5’末端的第一个和第二个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp构型的连接磷原子，和在所述有义链的5’末端的第一个核苷酸间键处发生的末端手性修饰，其具有Rp或Sp构型的连接磷原子。

[0073] 在一个实施方式中，所述dsRNA剂还包含所述反义链的所述5’末端处的磷酸酯或磷酸酯模拟物。

[0074] 在一个实施方式中，所述磷酸酯模拟物是5’-乙烯膦酸酯(VP)。

[0075] 在一个实施方式中，在所述双链体的所述反义链的所述5’末端1位处的碱基对是AU碱基对。

[0076] 在一个实施方式中，所述有义链具有共计21个核苷酸和所述反义链具有共计23个核苷酸。

[0077] 本发明还提供了包含本发明的此类dsRNA剂的用于抑制编码LRRK2基因的表达的细胞和药物组合物。

[0078] 在一个实施方式中，所述dsRNA剂是在非缓冲溶液中，如盐水或水。

[0079] 在另一个实施方式中，所述dsRNA剂是在缓冲溶液中，如缓冲溶液包含醋酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐、磷酸盐或其任何组合；或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0080] 在一个方面中，本发明提供了一种抑制细胞中LRRK2基因表达的方法，所述方法包括使所述细胞与本发明的dsRNA剂或本发明的药物组合物接触，从而抑制所述细胞中所述LRRK2基因的表达。

[0081] 在一个实施方式中，所述细胞是在受试者内。

[0082] 在一个实施方式中，所述受试者是人。

[0083] 在一个实施方式中，所述受试者具有LRRK2相关病症。

[0084] 在一个实施方式中，在所述受试者中的所述LRRK2相关病症是神经退行性病症。在另一个实施方式中，在所述受试者中的所述LRRK2相关病症是眼部病症。

[0085] 在一个实施方式中，所述LRRK2相关病症选自以下：帕金森氏病或相关病症，和眼部病症。

[0086] 在一些实施方式中，与对照水平相比，使所述细胞与所述dsRNA剂接触使LRRK2的表达抑制至少约25％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或至少约95％。

[0087] 在一些实施方式中，与对照水平相比，抑制LRRK2的表达使在所述受试者血清中的LRRK2蛋白水平降低至少约25％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或至少约95％。

[0088] 在一个方面中，本发明提供了治疗患有将从LRRK2表达降低中获益的病症的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物，从而治疗患有将从LRRK2表达降低中获益的所述病症的所述受试者。

[0089] 在另一个方面中，本发明提供了一种在患有将从LRRK2表达降低中获益的病症的受试者中预防至少一种症状的方法，其包括向所述受试者施用预防有效量的本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物，从而在患有将从LRRK2表达降低中获益的所述病症的所述受试者中预防至少一种症状。

[0090] 在一个实施方式中，所述病症是LRRK2相关病症。

[0091] 在一些实施方式中，所述LRRK2相关病症选自以下：帕金森氏病、克隆氏病和眼部病症。

[0092] 在一个实施方式中，所述受试者是人。

[0093] 在一个实施方式中，向所述受试者施用所述剂使得LRRK2蛋白累积减少。

[0094] 在一个实施方式中，以约0.01mg/kg至约50mg/kg的剂量向所述受试者施用所述dsRNA剂。

[0095] 在一个实施方式中，向所述受试者皮下施用所述dsRNA剂。

[0096] 在另一个实施方式中，向所述受试者鞘内施用所述dsRNA剂。

[0097] 在又一个实施方式中，向所述受试者脑池内施用所述dsRNA剂。非限制性示例性脑池内施用包括通过枕下穿刺注射到大池(小脑延髓池)中。

[0098] 在一个实施方式中，本发明的方法还包括测定来自受试者的样品中的LRRK2的水平。

[0099] 在一个实施方式中，在所述受试者的样品中的LRRK2的所述水平是在血液、血浆或脑脊液样品中的LRRK2蛋白水平。

[0100] 在一个实施方式中，本发明的方法还包括向所述受试者施用其他治疗剂。

[0101] 在一个方面中，本发明提供了一种试剂盒，其包含本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物。

[0102] 在另一个方面中，本发明提供了一种药瓶，其包含本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物。

[0103] 在又一个方面中，本发明提供了一种注射器，其包含本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物。

[0104] 在另一个方面中，本发明提供了一种鞘内泵，其包含本发明的dsRNA剂，或本发明的药物组合物。

附图说明

[0105] 图1显示了描述在向表达小鼠LRRK2的小鼠施用代表性RNAi剂AD-1335323.1、AD-1335324.1或AD-1335325.1后脑(右半球)中LRRK2 mRNA减少的图。结果表明，相对于对照动物，施用RNAi剂的动物中LRRK2 mRNA水平降低。

[0106] 图2显示了描述在向表达小鼠LRRK2的小鼠施用代表性RNAi剂AD-1335323.1、AD-1335324.1或AD-1335325.1后脑(右半球)、肺(左叶)和肾(右)中LRRK2 mRNA相对减少的图。结果表明，肺(左叶)和肾(右)中LRRK2 mRNA水平降低与在脑(右半球)中观察到的KD趋势相同，但程度更小，变化更大。通过组织学在肺和肾中未观察到毒理学迹象。

[0107] 图3A-3B显示了在表达LRRK2的小鼠的脑中施用AD-1335324观察到LRRK2 mRNA表达的剂量反应性降低。图3A显示了描述在向表达小鼠LRRK2的小鼠中施用代表性RNAi剂AD-1335324.1后在脑(右半球)中LRRK2 mRNA减少的图。结果表明，相对于对照动物，在施用RNAi剂的动物中LRRK2 mRNA水平的剂量反应性降低。图3B显示了描述在CNS中AD-1335324.1的IC50的图。绝对IC50值经测定为108.5μg。

[0108] 图4显示了描述在向表达小鼠LRRK2的小鼠施用代表性RNAi剂AD-1335324后脑(右半球)、肺(左叶)和肾(右)中LRRK2 mRNA相对减少的图。结果表明，在未观察到LRRK2 mRNA剂量反应性降低的剂量下，肺(左叶)的KD存在显着变化。在肾(右)中，通过施用从10-300μg的AD-1335324的不同剂量，没有观察到LRRK2mRNA的减少。

具体实施方式

[0109] 本公开提供了RNAi组合物，其影响RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的LRRK2基因RNA转录物的切割。LRRK2基因可以在细胞内，例如，在受试者(如人)的细胞内。使用这些iRNA可以在哺乳动物中靶向降解相应基因(LRRK2基因)的mRNA。

[0110] 本发明的iRNA已被设计成靶向LRRK2基因，例如，具有或不具有核苷酸修饰的LRRK2基因。与对照水平相比，本发明的iRNA抑制LRRK2基因的表达至少约25％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或至少约95％，，并且降低有义链和反义链基因座的水平。不希望受到理论的限制，据信前述性质和特定靶位点的组合或亚组合，或者这些iRNA中的特定修饰赋予本发明的iRNA改善的有效性、稳定性、效力、持久性和安全性。

[0111] 因此，本公开还提供了使用本发明的RNAi组合物抑制LRRK2基因表达或治疗患有将从抑制或降低LRRK2基因表达中获益的病症的受试者的方法，所述病症例如LRRK2相关疾病，例如，神经退行性疾病，如帕金森氏病或眼部病症。

[0112] 本公开的RNAi剂包含具有长度为30个核苷酸或更短，例如，长度为15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、

21-24、21-23或21-22个核苷酸的区域的RNA链(反义链),该区域与LRRK2基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补,例如,LRRK2外显子。在某些实施方式中,本公开的RNAi剂包含具有长度为约21-23个核苷酸的区域的RNA链(反义链),该区域与LRRK2基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。

[0113] 在某些实施方式中,本公开的RNAi剂包含RNA链(反义链),其可以包含更长的长度,例如多达66个核苷酸,例如长度为36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸,具有至少19个连续核苷酸的区域,该区域与LRRK2基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。这些具有较长反义链的RNAi剂优选包含长度为20-60个核苷酸的第二RNA链(有义链),其中有义链和反义链形成18-30个连续核苷酸的双链体。

[0114] 使用这些RNAi剂能够在哺乳动物中靶向LRRK2基因的mRNA的降解和/或抑制。因此,包含这些RNAi剂的方法和组合物可用于治疗将受益于LRRK2蛋白水平或活性降低的受试者,如患有LRRK2相关疾病的受试者,如帕金森氏病或眼部病症。

[0115] 以下详细描述公开内容了如何制备和使用包含RNAi剂的组合物以抑制LRRK2基因的表达,以及用于治疗患有将受益于抑制或减少基因表达的疾病和病症的受试者的组合物和方法。

[0116] I.定义

[0117] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。此外,应当注意每当列举参数的值或值的范围时,在所列举的值中间的值和范围也旨在成为本公开的一部分。

[0118] 冠词“一”和“一个”在本文中用于指代冠词的语法对象中的一个或多于一个(即,至少一个)。例如,“一种元素”指一种元素或多种元素,例如,多种元素。

[0119] 术语“包括”在本文中用于表示短语“包括但不限于”,并且可以与短语“包括但不限于”互换使用。术语“或”在本文中用于表示术语“和/或”,并且可以与术语“和/或”互换使用,除非上下文另有明确说明。

[0120] 术语“约”在本文中用于表示在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以理解为与平均值相差约2个标准差。在某些实施方式中,约指±10%。在某些实施方式中,约指±5%。当大约出现在一系列数字或范围之前时,可以理解“约”可以修改系列或范围中的每个数字。

[0121] 在一个数字或一系列数字之前的术语“至少”被理解为包括与术语“至少”相邻的数字,以及逻辑上可以包括的所有后续数字或整数,从上下文中可以清楚地看出。例如,核酸分子中的核苷酸数必须是整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子的至少18个核苷酸”指18、19、20或21个核苷酸具有指定的性质。当至少出现在一系列数字或范围之前时,可以理解“至少”可以修改系列或范围中的每个数字。

[0122] 如在本文中所使用的,“不超过”或“小于”被理解为与短语相邻的值和逻辑较低的值或整数,从上下文逻辑到零。例如,具有“不超过2个核苷酸”的突出端的双链体具有2、1或0个核苷酸突出端。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,可以理解“不超过”可以修改系列或范围中的每个数字。

[0123] 如在本文中所使用的,术语“至少约”,当提及诸如参数、量等的可测量值时,旨在包括从指定值+/-20%,优选+/-10%,更优选+/-5%和甚至更优选+/-1%的变化,只要这样的变化适合在所公开的发明中执行即可。例如,LRRK2基因的表达抑制“至少约25%”是指

LRRK2基因的表达抑制可以测量为指定25％的+/-20％的任何值，即，20％、30％或20-30％之间的任何中间值。

[0124] 如在本文中所使用的，“对照水平”指在未调节的细胞、组织或与该细胞、组织相同的系统或者其中表达本文所述的RNAi剂的系统中基因的表达水平、或RNA分子的表达水平或一个或多个蛋白或蛋白亚基的表达水平。与在RNAi剂不存在的条件下所观察到的相比，其中表达RNAi剂的细胞、组织或系统具有至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、2倍、3倍、4倍、5倍或更多的上文所述的基因、RNA和/或蛋白的表达量。可以相对于对照水平计算差异％和/或倍数差异，例如，

[0125] 差异％＝[使用RNAi剂的表达-未使用RNAi剂的表达]/未使用RNAi剂的表达X 100

[0126] 如在本文中所使用的，检测方法可以包括确定存在的分析物的量低于所述方法的检出水平。

[0127] 如果指定的靶位点与有义链或反义链的核苷酸序列发生冲突，则指定的序列优先。

[0128] 如果化学结构和化学名称之间发生冲突，则化学结构优先。

[0129] 术语“LRRK2”基因，也称为“DRDN”、“RIPK7”、“PARK8”、“AURA17”、“ROCO2”和“富亮氨酸重复激酶2”指编码称为dardarin的蛋白的基因。LRRK2基因在脑和全身其他组织中都很活跃。LRRK2在脑中的很多区域都有表达，包括小胶质细胞、少突胶质细胞、神经元和星形胶质细胞。还报道了先天性和适应性免疫系统的细胞中的表达。

[0130] LRRK2编码称为Dardarin的蛋白，该蛋白包含多个功能性结构域，包括富亮氨酸重复(LRR)结构域、GTPase结构域、激酶结构域和WD40结构域。Dardarin可能同时作为活性GTPase和激酶发挥作用。作为具有多个不同功能和蛋白相互作用的结构域的大型蛋白，LRRK2在不同细胞类型中可能具有不同的结合伴侣。由于多个蛋白相互作用结构域支持多种功能，LRRK2已在体外显示影响自噬、巨自噬、神经酰胺代谢、神经突生长、囊泡运输、细胞骨架成分和涉及活化的T细胞核因子(NFAT)、Wnt和核因子-κB的细胞信号转导通路。Dardarin蛋白的结构域之一是富亮氨酸区域，其似乎在需要与其他蛋白相互作用的活动中发挥作用，如传递信号或帮助组装细胞的结构框架(细胞骨架)。Dardarin蛋白的其他部分也被认为与蛋白-蛋白相互作用有关。Dardarin具有激酶和GTPase活性。具有激酶活性的蛋白有助于将磷酸基团(一组氧和磷原子)从能量分子ATP转移到某些蛋白中的氨基酸。这种磷酸化是开启和关闭很多细胞活动的重要步骤。LRRK2的激酶底物是包括Rab10在内的Rab GTPase(鸟苷三磷酸酶)的子集，其与内质网的维持、囊胚运输和自噬有关。LRRK2诱导的Rab10磷酸化可能通过阻止与膜传递和回收所必需的Rab GDP(鸟苷二磷酸)解离抑制因子结合来抑制其功能。异常增强的LRRK2激酶活性与Rab10及其效应物的活性降低有关(Maio等，Science Translational Medicine 25Jul 2018:Vol.10,Issue451,eaar5429.)。Dardarin的GTPase活性与称为ROC结构域的蛋白区域相关。ROC结构域可能有助于控制dardarin蛋白的整体性状。LRRK2基因中至少有20种不同的突变被认为是遗传性和散发性帕金森病的原因。LRRK2的错义突变导致家族性帕金森病。此外，全基因组关联研究涉及扫描很多帕金森氏病患者基因组的标记，以将特定的基因变异与帕金森氏病相关联，研究指出LRRK2基因座是帕金森氏病的危险因素。用于鉴定影响一个或多个基因表达的遗传变异的表达数量性状基因座(eQTL)分析表明，LRRK2的表达在散发性帕金森氏病中增加了约2

倍。

[0131] LRRK2多态性与克隆氏病和麻风病有关,显示了与免疫功能的联系。最近,据报道,在IFN-γ刺激后LRRK2在单核细胞中的表达增加,这可能是LRRK2介导的PD病理生理学机制,其中LRRK2可能作为炎症和免疫反应的调节剂发挥作用,从而调节神经退行性变的风险。尽管LRRK2介导的病理学机制仍在研究中,但PD患者细胞中WT和/或突变的LRRK2表达增加可能会导致先天性和适应性免疫系统细胞的功能和激活失调,从而在PD中导致不利的炎症反应和随后的神经变性。

[0132] LRRK2基因的突变也与大鼠和小鼠的更多外周过程相关,如肾功能。已知斑马鱼中的LRRK2敲低会导致发育扰动,如轴曲缺陷、眼部异常以及眼、晶状体和耳囊中的水肿(Prabhudesai等,(2016)Neuroscience Research Vol.94,Issue 8:717-735)。

[0133] LRRK2的示例性核苷酸和氨基酸序列可以见于,例如,GenBank登录号NM_198578.4(智人LRRK2,SEQ ID NO:1,反向互补,SEQ ID NO:2);GenBank登录号:XM_015151449.2(食蟹猴LRRK2,SEQ ID NO:3,反向互补,SEQ ID NO:4);GenBank登录号NM_025730.3(小家鼠LRRK2,SEQ ID NO:5;反向互补,SEQ ID NO:6);和GenBank登录号:NM_001191789.1(褐家鼠LRRK2,SEQ ID NO:7,反向互补,SEQ ID NO:8)。

[0134] 具有LRRK2基因的人染色体基因组区域的核苷酸序列可以见于,例如,在GenBank中获得的基因组参考联合会(Genome Reference Consortium)人类构建体38(也称为人类基因组构建体38或GRCh38)。具有LRRK2基因的人染色体12的基因组区域的核苷酸序列亦可以见于,例如,GenBank登录号NC_000012.12,对应于人染色体12的核苷酸40196744-40369285。人LRRK2基因的核苷酸序列可以见于,例如,GenBank登录号NG_011709.1。

[0135] LRRK2序列的其他实例可以见于公众可获得的数据库,例如,GenBank、OMIM和UniProt。

[0136] LRRK2上的其他信息可以见于,例如,在NCBI网站上提及的基因120892。如在本文中所使用的,术语LRRK2也指包括在临床变体数据库中提供的变态的LRRK2基因的变异,例如,在NCBI临床变体网站中提及的术语NM_198578.4。

[0137] 自提交本申请之日起,前述GenBank登记号和基因数据库号中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0138] 如在本文中所使用的,“靶序列”指在LRRK2基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,其包括初级转录产物和作为初级转录产物的RNA加工产物的mRNA。在一个实施方式中,序列的靶部分将至少足够长以用作在LRRK2基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列部分处或附近的RNAi定向切割的底物。

[0139] 靶序列长度为约15-30个核苷酸。例如,靶序列长度可以是从约15-30个核苷酸、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸。在某些实施方式中,靶序列长度为19-23个核苷酸,任选地长度为21-23个核苷酸。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开内容的一部分。

[0140] 如在本文中所使用的，术语“包含序列的链”指包含核苷酸链的寡核苷酸，所述核苷酸链由使用标准核苷酸命名法提及的序列描述。“G”、“C”、“A”、“T”和“U”通常代表包含鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘧啶、胸腺和尿嘧啶作为碱基的核苷酸，分别在修饰或未修饰核苷酸的情况下。然而，应当理解，术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指修饰的核苷酸，如下文进一步详述，或替代替代部分(参见，例如，表2)。本领域技术人员非常清楚，鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘧啶、胸腺和尿嘧啶可以被其他部分替代，而不会显著改变包含带有这种替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对性质。例如但不限于，包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与包含腺嘧啶、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此，包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本公开中的特征的dsRNA的核苷酸序列中被包含例如肌苷的核苷酸替代。在另一个实例中，寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别用鸟嘌呤和尿嘧啶替代，以与靶mRNA形成G-U摆动碱基配对。包含此类替代部分的序列适用于本公开中的组合物和方法。

[0141] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi剂”、“iRNA剂”、“RNA干扰剂”指包含如本文所定义的术语的RNA的剂，并且其通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)途径介导RNA转录物的靶向切割。RNA干扰(RNAi)是指导mRNA序列特异性降解的过程。RNAi调节，例如，抑制LRRK2在细胞中的表达，例如受试者例如哺乳动物受试者内的细胞。

[0142] 在一个实施方式中，本公开的RNAi剂包括与靶RNA序列(例如，LRRK2靶mRNA序列)相互作用以指导靶RNA的切割的单链RNAi。不希望受理论束缚，据信引入细胞的长双链RNA被称为Dicer的III型核酸内切酶分解成包含有义链和反义链的双链短干扰RNA(siRNA)(Sharp等(2001)Genes Dev.15:485)。Dicer，核糖核酸酶III样酶，可将这些dsRNA加工成19-23个碱基对短干扰RNA，其具有特征性的两个碱基3’突出端(Bernstein等，(2001)Nature 409:363)。然后将这些siRNA整合到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中，其中一个或多个解旋酶解开siRNA双链体，使互补的反义链能够引导靶标识别(Nykanen等，(2001)Cell 107:309)。在与适当的靶mRNA结合后，RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶标以诱导沉默(Elbashir等，(2001)Genes Dev.15:188)。因此，在一个方面，本公开涉及在细胞内产生并促进RISC复合物的形成以实现靶基因(即，LRRK2基因)的沉默的单链RNA(ssRNA)(siRNA双链体的反义链)。因此，术语“siRNA”在本文中也用于指代如上所述的RNAi。

[0143] 在另一个实施方式中，RNAi剂可以是被引入细胞或生物体以抑制靶mRNA的单链RNA。单链RNAi剂与RISC内切核酸酶Argonaute2结合，然后切割靶mRNA。单链siRNA通常为15-30个核苷酸并且经过化学修饰。单链RNA的设计和测试描述于美国专利号8,101,348和Lima等(2012)Cell 150:883-894中，其每一个的全部内容在此通过引用并入本文。本文所述的任何反义核苷酸序列可用作本文所述的单链siRNA或通过描述于Lima等(2012)Cell150:883-894中的方法进行化学修饰。

[0144] 在另一个实施方式中，用于本公开的组合物和方法的“RNAi剂”是双链RNA并且在本文中称为“双链RNAi剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”指核糖核酸分子的复合物，具有包含两条反平行且基本互补的核酸链的双链体结构，称为相对于靶RNA(即，LRRK2基因)具有“有义”和“反义”方向。在本公开的一些实施方式中，双链RNA(dsRNA)通过本文称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制触发靶RNA例如mRNA的降解。

[0145] 通常，dsRNA分子可以包括核糖核苷酸，但如本文详细描述的，每条或两条链还可

以包含一种或多种非核糖核苷酸，例如脱氧核糖核苷酸、修饰的核苷酸。此外，如本说明书中所用，“RNAi剂”可以包含经过化学修饰的核糖核苷酸;RNAi剂可以包含在多个核苷酸上的实质性修饰。如在本文中所使用的，术语“修饰的核苷酸”指独立地具有修饰的糖部分、修饰的核苷酸间键或修饰的核碱基的核苷酸。因此，术语修饰的核苷酸包括对核苷间键、糖部分或核碱基的取代、添加或去除，例如官能团或原子。适用于本公开的剂的修饰包括本文公开内容的或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书和权利要求的目的，如在siRNA类型分子中使用的任何此类修饰都包含在“RNAi剂”中。

[0146] 在本公开的某些实施方式中，如果存在于RNAi剂中，则包含脱氧核苷酸可被认为构造成修饰的核苷酸。

[0147] 双链体区域可以是允许通过RISC途径特异性降解所需靶RNA的任何长度，并且长度可以约为15-36和碱基对，例如长度约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个碱基对，例如长度约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-24、21-23或21-22个碱基对。在某些实施方式中，双链体区域长度为19-21个碱基对，例如长度为21个碱基对。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0148] 形成双链体结构的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分，或其可以是单独的RNA分子。如果两条链是一个较大分子的一部分，因此在一条链的3’端和另一条链的5’端之间通过核苷酸之间的不间断链连接，形成双链体结构，连接RNA链被称为“发夹环”。发夹环可以包含至少一个未配对的核苷酸。在一些实施方式中，发夹环可以包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多未配对的核苷酸或不指向dsRNA靶位点的核苷酸。在一些实施方式中，发夹环可以是10个或更少的核苷酸。在一些实施方式中，发夹环可以是8个或更少的未配对核苷酸。在一些实施方式中，发夹环可以是4-10个未配对核苷酸。在一些实施方式中，发夹环可以是4-8个核苷酸。

[0149] 当dsRNA的两条基本上互补的链由单独的RNA分子组成时，这些分子不需要但可以共价连接。在某些实施方式中，当两条链通过一条链的3’端和另一条链的5’端之间的不间断核苷酸链以外的方式共价连接，形成双链体结构，连接结构称为“接头”(尽管注意到本文其他地方定义的某些其他结构也可以称为“接头”)。RNA链可以具有相同或不同数量的核苷酸。碱基对的最大数量是dsRNA最短链中的核苷酸数量减去双链体中存在的任何突出端。除了双链体结构之外，RNAi还包含一个或多个核苷酸突出端。在RNAi剂的一个实施方式中，至少一条链包含至少1个核苷酸的3’突出端。在另一个实施方式中，至少一条链包含至少2个核苷酸的3’突出端，例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在其他实施方式中，RNAi剂的至少一条链包含至少1个核苷酸的5’突出端。在某些实施方式中，至少一条链包含至少2个核苷酸的5’突出端，例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在其他实施方式中，RNAi剂的一条链的3’和5’端均包含至少1个核苷酸的突出端。

[0150] 在一个实施方式中，本公开的RNAi剂是dsRNA，其每条链独立地包含19-23个核苷酸，其与靶RNA序列例如LRRK2靶mRNA序列相互作用以指导靶RNA的切割。

[0151] 在一些实施方式中，本发明的iRNA是24-30个核苷酸的dsRNA，其与靶RNA序列(例如，LRRK2靶mRNA序列)相互左右，以指导靶RNA的切割。

[0152] 如在本文中所使用的，术语“核苷酸突出端”指从RNAi剂例如dsRNA的双链体结构的突出的未配对核苷酸。例如，当dsRNA的一条链的3’端延伸超出另一条链的5’端时，或反之亦然，则存在核苷酸突出端。dsRNA可以包含至少一个核苷酸的突出端；或者和，突出端可以包含至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包含或由核苷酸/核苷酸类似组成，其包括脱氧核苷酸/核苷。突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外，突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的有义链或反义链的5’端、3’端或两端。

[0153] 在一个实施方式中，dsRNA的反义链在3’端或5’端具有1-10个核苷酸突出端，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在一个实施方式中，dsRNA的有义链在3’端或5’端具有1-10个核苷酸突出端，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在另一个实施方式中，突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸取代。

[0154] 在某些实施方式中，dsRNA的反义链在3’端或5’端具有1-10个核苷酸突出端，例如0-3、1-3、2-4、2-5、4-10、5-10个，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在一个实施方式中，dsRNA的有义链在3’端或5’端具有1-10个核苷酸突出端，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在另一个实施方式中，突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸取代。

[0155] 在某些实施方式中，有义链或反义链的突出端可包含长于10个核苷酸的延伸长度，例如长度为1-30个核苷酸、2-30个核苷酸、10-30个核苷酸或10-15个核苷酸。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体的有义链上。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体有义链的3’端上。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体有义链的5’端上。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体的反义链上。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体反义链的3’端上。在某些实施方式中，延伸的突出端位于双链体反义链的5’端上。在某些实施方式中，突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸取代。在某些实施方式中，突出端包含自互补部分使得突出端能够形成在生理条件下稳定的发夹结构。

[0156] 如在本文中所使用的关于dsRNA的术语“平端”是指在dsRNA的给定末端没有未配对的核苷酸或核苷酸类似物，即没有核苷酸突出端。dsRNA的一个或两个末端可以是平端。如果dsRNA的两个末端都是平端的，则称dsRNA是平端。需要明确的是，“平端”dsRNA是两端均平端的dsRNA，即分子的任何一端都没有核苷酸突出端。大多数情况下，这种分子在其整个长度上都是双链的。

[0157] 术语“反义链”或“引导链”指RNAi剂的链，例如dsRNA，其包含与靶序列例如LRRK2 mRNA基本上互补的区域。

[0158] 如在本文中所使用的，术语“互补区域”指反义链上与本文定义的序列，例如靶序列，例如LRRK2核苷酸序列基本上互补的区域。在互补区域与靶序列不完全互补的情况下，错配可以在分子的内部或末端区域。通常，最耐受的错配是在末端区域，例如RNAi剂的5’或3’端的5、4、3或2个核苷酸范围内。在一些实施方式中，本发明的双链RNA剂包含反义链中的核苷酸错配。在一些实施方式中，本发明的双链RNA剂的反义链包含不超过4个与靶mRNA的错配，即反义链包含与靶mRNA的4、3、2、1或0个错配。在一些实施方式中，本发明的双链RNA剂的反义链包含不超过4个有义链的错配，即反义链包含与有义链的4、3、2、1或0个错配。在

一些实施方式中，本发明的双链RNA剂包含有义链中的核苷酸错配。在一些实施方式中，本发明的双链RNA剂的有义链包含不超过4个与反义链的错配，及有义链包含与反义链的4、3、2、1或0个错配。在一些实施方式中，核苷酸错配例如在iRNA的3’端的5、4、3个核苷酸内。在另一个实施方式中，核苷酸错配例如在iRNA剂的3’末端核苷酸中。在一些实施方式中，错配不在种子区。

[0159] 因此，如本文所述的RNAi剂可以包含与靶序列的一个或多个错配。在一个实施方式中，如本文所述的RNAi剂包含不超过3个错配(即3、2、1或0个错配)。在一个实施方式中，如本文所述的RNAi剂包含不超过2个错配。在一个实施方式中，如本文所述的RNAi剂包含不超过1个错配。在一个实施方式中，如本文所述的RNAi剂包含不超过0个错配。在某些实施方式中，如果RNAi剂的反义链包含与靶序列的错配，则错配可任选地限制在互补区域的5’或3’端的最后5个核苷酸内。例如，在这样的实施方式中，对于23个核苷酸的RNAi剂，与LRRK2基因区域互补的链通常在中央13个核苷酸内不包含任何错配。如本文所述的方法或本领域已知的方法可用于确定包含与靶序列错配的RNAi剂是否有效抑制LRRK2基因的表达。例如，Jackson等(Nat.Biotechnol.2003;21:635-637)描述了一项表达谱研究，其中与MAPK14 siRNA具有序列同一性的一小组基因的表达仅在有义链的12-18nt处以与MAPK14相似的动力学被下调。类似地，Lin等(Nucleic Acids Res.2005;33(14):4527-4535)使用qPCR和报告基因测定，表明siRNA和靶点之间的7nt互补足以导致靶点的mRNA降解。考虑具有错配的RNAi剂在抑制LRRK2基因表达中的效力是重要的，特别是如果已知LRRK2基因中的特定互补区域在群体中具有多态性序列变异。

[0160] 如在本文中所使用的，“基本上所有的核苷酸都被修饰”在很大程度上但不是完全修饰，并且可以包含不超过5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0161] 如在本文中所使用的术语“有义链”或“随从链”指RNAi剂的链，其包含与本文定义的反义链区域互补的区域。

[0162] 如在本文中所使用的，术语“切割区”指紧邻切割位点的区域。切割位点是靶上发生切割的位点。在一些实施方式中，切割区在切割位点的任一端且紧邻切割位点上包含三个碱基。在一些实施方式中，切割区在切割位点的任一端且紧邻切割位点上包含两个碱基。在一些实施方式中，切割位点特异性地出现在由反义链的核苷酸10和11结合的位点处，并且切割位点包含核苷酸11、12和13。

[0163] 如在本文中所使用的，除非另有说明，术语“互补”在用于描述于第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时，如技术人员将理解的，是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构的能力。此类条件可以是，例如，“严格条件”，包括但不限于，400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50℃或70℃持续12至16小时，随后洗涤(参见，例如，“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等，(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。如在本文中所使用的，“严格条件”或“严格杂交条件”指反义化合物将与其靶序列杂交但与最少数量的其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下会有所不同，且反义化合物与靶序列杂交的“严格条件”由反义化合物的性质和组成以及研究其的测定法决定。可以应用其他条件，如可以在生物体内遇到的生理相关条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合测试两个序列的互补性的一组条件。

[0164] RNAi剂中的互补序列，例如如本文所述的dsRNA内，包含在一个或两个核苷酸序列的全长上，包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸的碱基配对。这样的序列在本文中可以被称为彼此“完全互补”。然而，当第一序列在本文中被称为相对于第二序列“基本上互补”时，这两个序列可以是完全互补的，或者它们可以形成一个或多个，但通常不超过5、4、3或2个错配的碱基对，在杂交后形成多达30个碱基对的双链体。在一些实施方式中，本文公开的“基本上互补”序列包含在其全长上与靶LRRK2序列的等效区域至少约80％互补的连续的核苷酸序列，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％互补。然而，当两个寡核苷酸被设计成在杂交时形成一个或多个单链突出端时，就互补性的确定而言，此类突出端不应被视为错配。例如，包含一个长度为21个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度为23个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA，其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列，处于本文所述的目的仍可称为“完全互补”。

[0165] 如在本文中所使用的，“互补”序列还可以包括或完全由非沃森-克里克碱基配对或由非天然和修饰的核苷酸形成的碱基对，只要满足上述关于它们杂交能力的要求。此类非沃森-克里克碱基配对包括但不限于G:U摆动或Hoogstein碱基配对。

[0166] 本文中的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可用于关于两个寡核苷酸或多核苷酸之间的碱基匹配，如dsRNA的有义链和反义链，或RNAi试剂的反义链和靶序列之间，如从它们使用的上下文中理解的那样。

[0167] 如在本文中所使用的，与信使RNA(mRNA)的“至少部分基本上互补”的多核苷酸是指与所关注的mRNA(例如，编码LRRK2的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如，如果该序列与编码LRRK2的mRNA的非间断部分基本上互补，则该多核苷酸与LRRK2 mRNA的至少一部分互补。

[0168] 因此，在一些实施方式中，本文公开的反义多核苷酸与靶LRRK2序列完全互补。在其他实施方式中，本文公开的反义多核苷酸与靶LRRK2序列基本上互补并且包含在其全长上与SEQ ID NO:1、3、5和7中任一核苷酸序列的等效区域、或SEQ ID NO:1、3、5或7中任一片段至少80％互补的连续核苷酸序列，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％互补。

[0169] 在一些实施方式中，本文公开的反义寡核苷酸与靶LRRK2序列的片段基本上互补并且包含在其全长上与选自以下的SEQ ID NO:1的片段至少80％互补的连续核苷酸序列：SEQ ID NO:1的核苷酸3383-3403、2105-2125、2356-2376、5413-5433、2603-2623、3563-3583、2192-2212、3088-3108、3105-3125、2203-2223、7348-7368、7097-7117、6319-6339、3886-3906、5190-5210、3964-3984、5138-5158、1254-1274、7098-7118、7048-7068、7050-7070、2764-2784、3087-3107、7526-7546、4849-4869、5272-5292、468-488、7520-7540、3720-3740、4016-4036、7792-7812、2515-2535、2286-2306、4014-4034、3721-3741、2284-2304、1896-1916、3876-3896、7788-7808、4013-4033、1275-1295、7527-7547、3606-3626、7525-7545、2356-2376、3105-3125和5413-5433，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％互补。上述范围的中间范围也被认为是本公开的一部分。

[0170] 在一些实施方式中，本文公开的反义寡核苷酸与靶LRRK2序列的片段基本上互补

并且包含在其全长上与选自以下的SEQ ID NO:1的片段至少80％互补的连续核苷酸序列：SEQ ID NO:1的核苷酸468-488、1254-1274、2105-2125、2192-2212、2203-2223、2603-2623、2764-2784、3087-3107、3088-3108、3383-3403、3563-3583、3876-3896、3886-3906、3964-3984、4849-4869、5138-5158、5190-5210、5272-5292、6319-6339、7097-7117、7098-7118和7348-7368，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％互补。上述范围的中间范围也被认为是本公开的一部分。

[0171] 在其他实施方式中，本文公开的反义寡核苷酸与靶LRRK2序列的片段基本上互补并且包含在其全长上与表3-4和6-7任一个中的任一有义链核苷酸序列，或与表3-4和6-7任一个中的任一有义链核苷酸序列的片段至少80％互补的连续核苷酸序列，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或100％互补。

[0172] 在一个实施方式中，本文公开的RNAi剂包含与反义多核苷酸基本上互补的有义链，反义多核苷酸又与靶LRRK2序列相同，并且其中有义链多核苷酸包含在其全长上与SEQ ID NO:1、3、5和7中核苷酸序列的等效区域、或SEQ ID NO:1、3、5或7中任一片段至少80％互补的连续核苷酸序列，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或100％互补。

[0173] 在一些实施方式中，本发明的iRNA包含与反义多核苷酸基本上互补的有义链，反义多核苷酸又与靶LRRK2序列相同，并且其中有义链多核苷酸包含在其全长上与表3-4和6-7任一个中的任一反义链核苷酸序列，或与表3-4和6-7任一个中的任一反义链核苷酸序列的片段至少80％互补的连续核苷酸序列，如约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或100％互补。

[0174] 在某些实施方式中，有义链和反义链选自以下任一双链体：AD-601140.1、AD-599927.1、AD-612673.1、AD-615420.1、AD-600406.1、AD-601294.1、AD-600013.1、AD-600853.1、AD-613382.1、AD-600024.1、AD-604701.1、AD-604452.1、AD-603747.1、AD-601616.1、AD-602766.1、AD-601694.1、AD-602734.1、AD-599139.1、AD-604453.1、AD-616783.1、AD-616785.1、AD-600566.1、AD-600852.1、AD-617239.1、AD-602466.1、AD-602848.1、AD-598424.1、AD-617233.1、AD-613965.1、AD-614239.1、AD-617466.1、AD-612820.1、AD-612611.1、AD-614237.1、AD-613966.1、AD-612609.1、AD-612246.1、AD-601606.1、AD-617462.1、AD-614236.1、AD-611650.1、AD-617240.1、AD-613851.1、AD-617238.1、AD-1335323.1、AD-1335325.1和AD-1335324.1。

[0175] 在一个实施方式中，反义链包含至少15个连续核苷酸，其与选自以下的双链体的任一反义链核苷酸序列相差不超过3个核苷酸：AD-1508169、AD-1508884、AD-1509672、AD-1509758、AD-1509769、AD-1510151、AD-1510311、AD-1510597、AD-1510598、AD-1510885、AD-1511039、AD-1511351、AD-1511361、AD-1511439、AD-1512211、AD-1512479、AD-1512511、AD-1512593、AD-1513492、AD-1514197、AD-1514198和AD-1514446。

[0176] 在一个实施方式中，LRRK2基因表达的至少部分抑制是通过LRRK2 mRNA的量的减少来评估的，例如，有义mRNA、反义mRNA、总LRRK2 mRNA，LRRK2 mRNA的量可以从其中转录LRRK2基因并且已经或已经被处理使得LRRK2基因的表达被抑制的第一细胞或细胞组中分离或检测到，与第二细胞或细胞组相比，第二细胞或细胞组与第一细胞或细胞组基本相同，

但已经或未进行过如此处理(对照细胞)。抑制程度(例如,剩余mRNA表达的百分比)可以表示为:

[0177] $$\frac{(对照细胞中的mRNA)-(处理细胞中的mRNA)}{(对照细胞中的mRNA)}\cdot 100\%$$

[0178] 如在本文中所使用的,短语"使细胞与RNAi剂接触"包括通过任何可能的方式接触细胞。使细胞与RNAi剂接触包括使细胞在体外与RNAi剂接触或使细胞在体内与RNAi剂接触。接触可以直接或间接进行。因此,例如,可以通过实施所述方法的个体使RNAi剂与细胞物理接触,或者,可以将RNAi剂置于允许或导致其随后与细胞接触的环境中。

[0179] 例如,可以通过将细胞与RNAi剂一起孵育来进行体外接触细胞。例如,可以通过将RNAi剂注射到细胞所在的组织或附近,或通过将RNAi剂注射到另一个区域(例如,中枢神经系统(CNS)),任选地通过鞘内注射、玻璃体内注射或其他注射、或注射到血流(即,静脉内)或皮下空间,使得剂随后到达待接触细胞所在的组织。例如,RNAi剂可以包含或偶联至配体,例如亲脂部分或如下所述和进一步详述的部分,例如PCT/US2019/031170中,其通过引用并入本文,其指导或以其他方式将RNAi剂稳定在感兴趣的位点,例如CNS。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如,细胞也可以在体外与RNAi剂接触并随后移植到受试者体内。

[0180] 在一个实施方式中,使细胞与RNAi剂接触包括通过促进或影响细胞的摄取或吸收来"引入"或"将RNAi剂递送至细胞"。RNAi剂的吸收或摄取可以通过独立扩散或活性细胞过程,或通过辅助剂或装置发生。将RNAi剂引入细胞可以在体外后体内进行。例如,对于体内引入,可以将RNAi剂注射到组织部位或全身施用。体外引入细胞包括本领域已知的方法,例如电穿孔和脂质体转染。进一步的方法在下文中描述或在本领域中是已知的。

[0181] 术语"亲脂性"或"亲脂性部分"泛指对脂质具有亲和性的任何化合物或化学部分。表征亲脂部分的亲脂性的一种方法是通过辛醇-水分配稀疏$\log K_{ow}$,其中K_{ow}是化学物质在辛醇相中的浓度与其在平衡时两相体系的水相中的浓度之比。辛醇-水分配系数是一种物质的实验室测量特性。然而,它也可以通过使用归因于化学结构成分的系数来预测,这些系数是使用第一原理或经验方法计算的(参见例如Tetko等,J.Chem.Inf.Comput.Sci.41:1407-21(2001),其通过引用全部并入本文)。它提供了物质倾向于非水或油性环境而不是水的趋势的热力学测量(即其亲水/亲油平衡)。原则上,当$\log K_{ow}$超过0时,化学物质具有亲脂性。通常,亲脂部分具有超过1、超过1.5、超过2、超过3、超过4、超过5或超过10的$\log K_{ow}$。例如,预测6-氨基己醇的$\log K_{ow}$约为0.7。使用相同的方法,预测N-(己-6-醇)氨基甲酸胆固醇酯的$\log K_{ow}$为10.7。

[0182] 分子的亲脂性可以根据其携带的寡能团而改变。例如,在亲脂部分的末端添加羟基或胺基可以增加或降低亲脂部分的分配系数(例如,$\log K_{ow}$)值。

[0183] 或者,与一个或多个亲脂部分缀合的双链RNAi剂的疏水性可以通过其蛋白结合特性来测量。例如,在某些实施方式中,双链RNAi剂的血浆蛋白结合测定中的未结合部分可被确定为与双链RNAi剂的相对疏水性正相关,然后其可能与双链RNAi剂的沉默活性正相关。

[0184] 在一个实施方式中,测定的血浆蛋白结合测定是使用人血清白蛋白的电泳迁移率变动分析(EMSA)。这种结合测定的示例性方案在例如PCT/US2019/031170中有详细说明。简言之,将双链体与人血清白蛋白一起孵育并测定未结合的部分。示例性测定方案包括将储

备浓度为10μM的双链体稀释至最终浓度为0.5μM(总体积20μL)，其在1xPBS中，含有0、20或90％血清。可以混合样品，离心30秒，然后在室温下孵育10分钟。孵育步骤完成后，可以将4μL的6x EMSA凝胶上样溶液添加到每个样品中，离心30秒，然后将每个样品的12μL上样到26孔BioRad 10％PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)上。凝胶可以在100伏电压下运行1小时。运行完成后，从外壳中取出凝胶并在50mL的10％TBE(Tris碱、硼酸和EDTA)中洗涤。洗涤完成后，可将5μL SYBR Gold添加到凝胶中，然后在室温下孵育10分钟，之后在50mL 10％TBE中再次进行凝胶清洗。在该示例性测定中，Gel Doc XR+凝胶文档系统可用于使用以下参数读取凝胶：成像应用设置为SYBR Gold，尺寸设置为Bio-Rad标准凝胶，曝光设置为自动强条带，可以将高亮饱和像素变成一且颜色设定为灰度。检测、分子量分析、输出均可禁用。获得凝胶的干净照片之后，可以使用Image Lab 5.2处理图像。可以手动设置通道和条带以测量条带强度。可以将每个样品的条带强度归一化为PBS，以获得未结合siRNA的分数。通过该测量可以确定相对疏水性。双链RNAi剂的疏水性，通过结合测定中的未结合siRNA的分数测量，对于增强的siRNA体内递送超过0.15、超过0.2、超过0.25、超过0.3、超过0.35、超过0.4、超过0.45或超过0.5。

[0185] 因此，将亲脂性部分缀合于双链RNAi剂的内部位置提供了改善的疏水性，以增强siRNA的体内递送。

[0186] 术语“脂质纳米粒”或“LNP”是包含脂质层的囊泡，该脂质层包封药物活性分子，如核酸分子，例如，RNAi剂或从中转录RNAi剂的质粒。LNP描述于例如美国专利号6,858,225、6,815,432、8,158,601和8,058,069中，其全部内容通过引用并入本文。

[0187] 如在本文中所使用的，“受试者”是动物，例如哺乳动物，包括灵长类(例如，人、非人灵长类，例如猴和黑猩猩)、或非灵长类(例如大鼠或小鼠)。在一个优选的实施方式中，受试者是人，例如正在治疗或评估将受益于LRRK2表达降低的疾病、病症或病情的人；有可能因LRRK2表达减少而受益的疾病、病症或病情的人；患有将从LRRK2表达减少受益的疾病、病症或病情的人；或正在治疗将受益于如本文所述的LRRK2表达减少的疾病、病症或病情的人。在一些实施方式中，受试者是女性人类。在其他实施方式中，受试者是男性人类。在一个实施方式中，受试者是成人受试者。在一个实施方式中，受试者是儿科受试者。在另一个实施方式中，受试者是少年受试者，例如20岁以下的受试者。

[0188] 如在本文中所使用的，术语“治疗”或“治疗”指有益或期望的结果，包括但不限于减轻或改善与LRRK2基因表达或LRRK2蛋白产生相关的一种或多种体征或症状，例如，LRRK2相关的疾病，如LRRK2相关的疾病。治疗”也可指与没有治疗的情况下的预期存活相比延长存活。

[0189] 就受试者或疾病标志物或症状的LRRK2水平而言，术语“较低”指该水平在统计学上显著降低。降低可以是例如至少10％、15％、20％、25％、30％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更多。在某些实施方式中，降低至少为20％。在某些实施方式中，疾病标志物的降低是至少50％，例如，含有基因座的有义链或反义链的的水平和/或异常二肽重复蛋白的水平，例如，降低50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更多。在一些实施方式中，疾病标志物的降低是至少25％，例如，LRRK2蛋白和/或基因表达水平降低，例如，至少约25％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或至少约95％。在受试者中

LRRK2水平的背景下，“较低”优选地下降至对于没有这种病症的个体而言在正常范围内被接受的水平。在某些实施方式中，“较低”是患有疾病的受试者的标志物或症状的水平与个体在正常范围内可接受的水平之间的差异的减少，例如肥胖个体与体重在正常范围内可接受的个体之间的体重下降水平。

[0190] 如在本文中所使用的，“预防”或“预防”当用于提及将受益于LRRK2基因或LRRK2蛋白产生的减少的疾病、病症或病情时，指受试者出现与此类疾病、病症或病情相关的症状的可能性降低，例如，LRRK2相关疾病的症状。未形成疾病、病症或病情，或与此类疾病、病症或病情相关的症状的发展减少(例如，在该疾病或病症的临床可接受的量表上减少至少约10％)，或延迟病状的表现(例如，数天、数周、数月或数年)被认为是有效的预防。

[0191] 如在本文中所使用的，术语“LRRK2相关疾病”或“LRRK2相关病症”被理解为将受益于LRRK2的表达和/或活性降低的任何疾病或病症。示例性LRRK2相关疾病包括受试者在LRRK2基因中携带错义突变和/或缺失的那些疾病，例如，神经退行性疾病，如帕金森氏病(PD)、克隆氏病和眼部病症。神经退行性疾病包括但不限于帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、亨廷顿氏病、精神分裂症、进行性肌阵挛性癫痫(Unver-Richt-Lundberg Lafora病)、Hallervorden-Spatz病、色素性视网膜炎、色素性干皮病和黑色素相关疾病。如在本申请中所使用的，“眼部病症”或“眼部系统病症”指眼睛及其视觉系统(例如，角膜、晶状体和流体)的任何病症系统。眼部病症的非限制性实例包括眼、晶状体和耳囊中的水肿。

[0192] LRRK2错义突变，例如，G2019S、A2016T，可能见于患有家族性或散发性帕金森氏病的受试者中。这些突变可能导致激酶活性增加两倍或三倍，这可能导致神经元死亡信号通路的激活。

[0193] 在LRRK2基因中具有错义突变和/或缺失的受试者可以表现为常染色体显性遗传病，并且是最常见的家族性PD形式，占所有PD病例的1-2％。LRRK2中与PD相关的常见致病突变位于GTPase和激酶结构域，其中最普遍的突变是G2019S突变，位于激酶结构域。

[0194] 如在本文中所使用的，“治疗有效量”旨在包括当给予患有LRRK2相关疾病的受试者时足以实现疾病治疗(例如，通过减少、改善或维持现有疾病或一种或多种疾病病状)。“治疗有效量”可能因RNAi剂、给药方式、疾病及其严重程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因构成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)和待治疗受试者的其他个体特征而异。

[0195] 如在本文中所使用的“预防有效量”旨在包括当给予患有LRRK2相关疾病的受试者时足以预防或改善疾病或一种或多种疾病症状的RNAi剂的量。改善疾病包括减缓疾病的进程或降低后期发展疾病的严重程度。“预防有效量”可能因RNAi剂、给药方式、疾病的风险程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因构成、先前或伴随治疗的类型(如果有的话)和待治疗的患者的其他个体特征而异。

[0196] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括以适用于任何治疗的合理收益/风险比产生一些期望的局部或全身效应的RNAi剂的量。本公开的方法中使用的RNAi剂可以以足够的量施用以产生适用于这种治疗的合理的收益/风险比。

[0197] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适用于与人类受试者和动物受试者的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物或剂型，与合理的收益/风险比相称。

[0198] 如在本文中所使用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如，润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂包封材料、涉及从一个器官或身体的部分携带或运输受试者化合物至另一个器官、或身体的部分。每种载体必须是“可接受的”，即与制剂的其他成分相容并且对待治疗的受试者无害。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些例子包括：(1)糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4)西黄蓍胶粉；(5)麦芽；(6)明胶；(7)润滑剂，如镁盐、十二烷基硫酸钠、滑石粉等；(8)赋形剂，如可可脂、栓剂蜡；(9)油类，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10)二醇类，如丙二醇；(11)多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇、聚乙二醇等；(12)酯类，如油酸乙酯、月桂酸乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，如氢氧化镁、氢氧化铝；(15)海藻酸；(16)无热原水；(17)等渗盐水；(18)林格溶液；(19)乙醇；(20)pH缓冲溶液；(21)聚酯、聚碳酸酯或聚酐；(22)填充剂，如多肽和氨基酸；(23)血清成分，如血清白蛋白、HDL和LDL；和(22)药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0199] 如在本文中所使用的，术语“样品”包括从受试者分离的类似流体、细胞或组织的集合，以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。生物流体的例子包括血液、血清和浆液、血浆、脑脊液、眼液、淋巴液、尿液、唾液等。组织样品可以包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如，样品可以来自特定器官、器官的部分、或这些器官内的流体或细胞。在某些实施方式中，样品可以来自大脑(例如，全脑或脑的某些片段，例如纹状体、或脑中某些类型的细胞，例如神经元和神经胶质细胞(星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞))。在一些实施方式中，“来源于受试者的样品”指取自受试者的血液或来源于其的血浆或血清。在进一步的实施方式中，“来源于受试者的样品”指取自受试者的脑组织(或其亚组分)或视网膜组织(或其亚组分)。

[0200] 术语“取代的”指给定结构中的一个或多个氢基团被指定取代基的基团取代，包括但不限于：烷基、烯基、炔基、芳基、杂环基、卤素、巯基、烷硫基、芳硫基、烷硫基烷基、芳硫基烷基、烷基磺酰基、烷基磺酰基烷基、芳基磺酰基烷基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、氨基羰基、烷基氨基羰基、芳氨基羰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、卤代烷基、氨基、三氟甲基、氰基、硝基、烷基氨基、芳基氨基、烷基氨基烷基、芳基氨基烷基、氨基烷基氨基、羟基、烷氧基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基烷基、酰基、芳烷氧基羰基、羧酸、磺酸、磺酰基、膦酸、芳基、杂芳基、杂环基和脂肪族。应当理解的是，取代基可以被进一步取代。

[0201] 术语“烷基”指可以是直链或支链的饱和和不饱和非芳香烃链，其包含指定数量的碳原子(这些包括但不限于丙基、烯丙基或炔丙基)，其可以任选地插入有N、O或S。例如，“(C1-C6)烷基”指具有1-6个碳原子的直链或支链排列的基团。“(C1-C6)烷基”包括，例如，甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、戊基和己基。在某些实施方式中，本公开的亲脂性部分可以包括C6-C18烷烃链。

[0202] 术语“亚烷基”指具有特定碳原子数的任选取代的饱和脂肪族支链或直链二价烃基。例如，“(C1-C6)亚烷基”指具有1-6个线性排列的碳原子的二价饱和脂肪族基团，例如，$[(CH_2)_n]$，其中n是从1至6的整数。“(C1-C6)亚烷基”包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基和亚己基。或者，“(C1-C6)亚烷基”指在支链排列中具有1-6个碳原子的二价饱和基团，例如：$[(CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)]$、$[(CH_2CH_2CH_2CH_2C(CH_3)_2]$、$[(CH_2C(CH_3)_2CH(CH_3))]$等。术语“亚

烷基二氧代”指结构—O—R—O—的二价物质，其中R代表亚烷基。

[0203] 术语“巯基”指-SH基团。术语“硫代烷氧基”指-S-烷基基团。

[0204] 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘的任何基团。“卤素”和“卤代”在本文中可互换使用。

[0205] 如在本文中所使用的，除非另有说明，否则术语“环烷基”指具有3至14个碳原子的饱和或不饱和非芳香族烃环基团。例如，“(C3-C10)环烷基”指(3-10)元饱和脂肪族环状烃环的烃基。环烷基的实例包括但不限于环丙基、甲基-环丙基、2,2-二甲基-环丁基、2-乙基-环戊基、环己基等。环烷基可以包含多个螺环或稠环。环烷基任选地在正常化合价允许的任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0206] 如在本文中所使用的，除非另有说明，否则术语“烯基”指非芳香族烃基，直链或支链，含有至少一个碳-碳双键，并且具有2至10个碳原子。此类基团中可存在多达五个碳-碳双键。例如，“C2-C6”烯基定义为具有2至6个碳原子的烯基。烯基基团的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。烯基的直链、支链或环状部分可以包含双键，并且在正常化合价允许的位置上任选地被单-、二-、三-、四-或五-取代。术语“环烯基”指具有特定碳原子数和至少一个碳-碳双键的单环烃基。

[0207] 如在本文中所使用的，除非另有说明，否则术语“炔基”指直链或支链烃基，其含有2至10个碳原子，并且含有至少一个碳-碳三键。最多可以存在5个碳-碳三键。因此，“C2-C6炔基”指具有2至6个碳原子的炔基。炔基基团的实例包括但不限于乙炔基、2-丙炔基和2-丁炔基。炔基的直链或支链部分可以包含正常化合价允许的三键，并且可以在正常化合价允许的任何位置上任选地被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0208] 如在本文中所使用的，“烷氧基(alkoxyl)”或“烷氧基(alkoxy)”指如上文定义的烷基，其具有通过氧桥连接的指定数目的碳原子。例如，“(C1-C3)烷氧基”包括甲氧基、乙氧基和丙氧基。例如，“(C1-C6)烷氧基”旨在包括C1、C2、C3、C4、C5和C6烷氧基基团。例如，“(C1-C8)烷氧基”旨在包括C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7和C8烷氧基基团。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、仲戊氧基、正庚氧基和正辛氧基。“烷硫基”指通过硫连接原子连接的烷基。术语“烷基氨基”或“氨基烷基”指通过NH键连接的烷基。“二烷基氨基”指通过氮连接原子连接的两个烷基。氨基基团可以是未取代的、单取代的或二取代的。在一些实施方式中，两个烷基是相同的(例如，N,N-二甲基氨基)。在一些实施方式中，两个烷基基团是不同的(例如，N-乙基-N-甲氨基)。

[0209] 如在本文中所使用的，“芳基”或“芳香族的”指每个环中最多7个原子的任何稳定的单环或多环碳环，其中至少一个环是芳香族的。芳基基团的实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基、四氢萘基、茚满基和联苯基。在芳基取代基为双环且一个环为非芳香族的情况下，应理解连接是通过芳环的。芳基基团任选地在正常化合价允许的任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。术语“芳烷基(arylalkyl)”或术语“芳烷基(aralkyl)”指被芳基取代的烷基。术语“芳基烷氧基”指被芳基取代的烷氧基。

[0210] “杂”指环系中的至少一个碳原子被至少一个选自N、S和O的杂原子取代。“杂”还指在无环系统中至少一个碳原子的取代。杂环系统或杂无环系统可以具有，例如，1、2或3个被杂原子取代的碳原子。

[0211] 如在本文中所使用的，术语“杂芳基”表示每个环中最多7个原子的稳定的单环或

多环，其中至少一个环是芳香族的，并且含有1至4个选自O、N和S的杂原子。杂芳基基团的实例包括但不限于吖啶基、咔唑基、肉桂基、喹喔啉基、吡唑基、吲哚基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹啉基、异喹啉基、二氢异吲哚啉基、咪唑并吡啶基、异吲哚基、吲唑基、噁唑基、噁二唑基、异噁唑基、吲哚基、吡嗪基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、四氢喹啉。还将“杂芳基”理解为包括任何含氮杂芳基的N-氧化物衍生物。在杂芳基取代基为双环且一个环为非芳香族或不含杂原子的情况下，应理解连接是通过芳环或通过含杂原子的环。杂芳基任选地在正常化合价允许的任何位置上被单-、二-、三-、四-、或五-取代。

[0212] 如在本文中所使用的，术语“杂环”、“杂环的”或“杂环基”是指含有1至4个选自O、N和S的杂原子的3至14元芳香族或非芳香族杂环，包括多环基团。如在本文中所使用的，术语“杂环的”也被认为与术语“杂环”和“杂环基”同义，并被理解为也具有本文所述的相同定义。“杂环基”包括上述杂芳基，及其二氢和四氢类似物。杂芳基基团的实例包括但不限于氮杂环丁烷基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋喃唑啉基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、咔唑基、咔啉基、肉桂基、呋喃基、咪唑基、吲哚啉基、吲哚基、吲哚嗪基、吲唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、异喹啉基、异噻唑基、异噁唑基、萘吡啶基、噁二唑基、氧代噁唑烷基、噁唑基、噁唑啉、氧代哌嗪基、氧代吡咯烷基、氧代吗啉基、异噁唑啉、氧杂环丁烷基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并吡啶基、哒嗪基、吡啶基、吡啶酮基、嘧啶基、嘧啶酮基、吡咯基、喹唑啉基、喹啉基、喹喔啉基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、四氢噻喃基、四氢异喹啉基、四唑基、四唑并吡啶基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基、1,4-二噁烷基、六氢吖啶基、哌嗪基、哌啶基、吡啶-2-壬基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃、二氢苯并噻吩基、二氢苯并噁唑基、二氢呋喃基、二氢咪唑基、二氢吲哚基、二氢异噁唑基、二氢异噻唑基、二氢噁二唑基、二氢噁唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢喹啉基、二氢四唑基、二氢噻二唑基、二氢噻唑基、二氢噻吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、二氧化硫代吗啉基、亚甲二氧基苯甲酰基、四氢呋喃基和四氢噻吩基及其N-氧化物。杂环基取代基的附接可以通过碳原子或通过杂原子发生。杂环基任选地在正常化合价允许的任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0213] “杂环烷基”指其中1-4个碳被杂原子如氧、氮或硫取代的环烷基残基。基团为杂环基的杂环的实例包括四氢吡喃、吗啉、吡咯烷、哌啶、噻唑烷、噁唑、噁唑啉、异噁唑、二噁烷、四氢呋喃等。

[0214] 术语“杂芳基”指芳香族5-8元单环、8-12元双环或11-14元三环系统，如果是单环具有1-3个杂原子，如果是双环具有1-6个杂原子，或者如果是三环具有1-9个杂原子，所述杂原子选自O、N或S(例如，碳原子和N、O或S的1-3、1-6或1-9个杂原子，如果分别为单环、双环或三环)，其中每个环的0、1、2、3或4个原子可以被取代基取代。

[0215] 杂芳基基团的实例包括吡啶基、呋喃基(furyl)或呋喃基(furanyl)、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、噻吩基(thiophenyl)或噻吩基(thienyl)、喹啉基、吲哚基、噻唑基等。术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”指被杂芳基取代的烷氧基。

[0216] 如本文所用的术语“环烷基”包括具有3至12个碳的饱和和部分不饱和的环状烃基，例如，3至8个碳，和例如，3至6个碳，其中环烷基还可以任选地被取代。环烷基包括但不

限于环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基和环辛基。

[0217] 术语“酰基”指烷基羰基、环烷基羰基、芳基羰基、杂环基羰基或杂芳基羰基取代，其中任一个都可以进一步被取代基取代。

[0218] 如在本文中所使用的，“酮”指通过羰基桥连接的本文定义的任何烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基或芳基。

[0219] 酮基团的实例包括但不限于烷酰基(例如，乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基)、烯酰基(例如，丙烯酰基)、炔酰基(例如，乙炔酰基、丙炔酰基、丁炔酰基、戊炔酰基、己炔酰基)、芳酰基(例如，苯甲酰基)、杂芳酰基(例如，吡咯酰基、咪唑酰基、喹啉酰基、吡啶酰基)。

[0220] 如在本文中所使用的，“烷氧基羰基”指通过羰基桥连接的任何如上定义的烷氧基(即，—C(O)O-烷基)。烷氧基羰基基团的实例包括但不限于甲氧羰基、乙氧羰基、异丙氧羰基、正丙氧羰基、叔丁氧羰基、苄氧羰基或正戊氧羰基。

[0221] 如在本文中所使用的，“芳氧羰基”指通过氧羰基桥连接的如本文所定义的任何芳基(即，—C(O)O-芳基)。芳氧基羰基的实例包括但不限于苯氧基羰基和萘氧基羰基。

[0222] 如在本文中所使用的，“杂芳氧基羰基”指通过氧羰基桥连接的如本文所定义的任何杂芳基(即，—C(O)O-杂芳基)。杂芳氧基羰基基团的实例包括但不限于2-吡啶基氧羰基、2-噁唑基氧羰基、4-噻唑基氧羰基或嘧啶基氧羰基。

[0223] 术语“氧代”指氧原子，当连接到碳时形成羰基，当连接到氮时形成N-氧化物，当连接到硫时形成亚砜或砜。

[0224] 本领域普通技术人员将容易理解和领会本文公开的化合物和组合物可以具有质子化或去质子化状态的某些原子(例如，N、O或S原子)，这取决于放置化合物或组合物的环境。因此，如在本文中所使用的，本文公开的结构设想某些官能团，例如，OH、SH或NH，可以被质子化或去质子化。如本领域普通技术人员将容易理解的，本文的公开旨在涵盖所公开的化合物和组合物，而不管其基于环境pH的质子化状态。

[0225] II.本公开的RNAi剂

[0226] 本文描述的是抑制LRRK2基因表达的RNAi剂。在一个实施方式中，RNAi剂包含用于抑制细胞中LRRK2基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子，所述细胞如受试者内的细胞，例如，哺乳动物，如患有LRRK2相关病症的人。dsRNA包括具有互补性区域的反义链，该互补性区域与在LRRK2基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补。互补性区域的长度约为15-30个核苷酸或更短。在与表达LRRK2基因的细胞接触后，与未与RNAi剂接触或与LRRK2基因不互补的RNAi剂接触的类似细胞相比时，如本文所述，RNAi剂抑制LRRK2基因(例如，人基因、灵长类动物基因、非灵长类动物基因)的表达至少25％或更高。LRRK2基因的表达可通过例如基于PCR或支链DNA(bDNA)的方法或基于蛋白的方法，诸如通过免疫荧光分析，使用例如western印记或流式细胞测量技术来分析。在一个实施方式中，使用在下述实施例1中提供的测定方法在人A549中测定敲低水平。在一些实施方式中，在原代小鼠肝细胞中测定敲低水平。在另一个实施方式中，在Cos-7中测定敲低水平。在又一个实施方式中，在BE(2)-C细胞中测定敲低水平。在一些实施方式中，在Neuro-2a细胞中测定敲低水平。

[0227] dsRNA包含两条互补的RNA链，其在使用dsRNA的条件下杂交形成双链体结构。dsRNA的一条链(反义链)包括与靶序列基本上互补或完全互补的互补区域。靶序列可以来

源于LRRK2基因表达过程中形成的mRNA序列。另一条链(有义链)包括与反义链互补的区域，以使得两条链在适宜条件下结合时杂交并形成双链体结构。如本文别处所述和本领域公知的，dsRNA的互补序列也可以作为单个核酸分子的自身互补区包含，而不是在单独的寡核苷酸上。

[0228] 通常，双链体结构的长度是15至30个碱基对，例如，长度是15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对。在某些实施方式中，双链体结构的长度是18至25个碱基对，例如，长度是18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-25、20-24,20-23、20-22、20-21、21-25、21-24、21-23、21-22、22-25、22-24、22-23、23-25、23-24或24-25个碱基对，例如，长度是19-21个碱基对。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0229] 类似地，靶序列互补区的长度是15至30个核苷酸，例如，长度是15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸，例如，长度是19-23个核苷酸或长度是21-23个核苷酸。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本公开的一部分。

[0230] 在一些实施方式中，双链体结构的长度是19至30个碱基对。类似地，靶序列互补区的长度是19至30个核苷酸。

[0231] 在一些实施方式中，dsRNA的长度是15至23个核苷酸、19至23个核苷酸或25至30个核苷酸。在通常情况下，dsRNA足够长，以作为Dicer酶的底物。例如，本领域众所周知的是，长于约21-23个核苷酸的dsRNA可用作Dicer的底物。正如普通技术人员也将认识到的，靶向切割的RNA区域通常是较大RNA分子的一部分，通常是mRNA分子。在相关情况下，mRNA靶点的“部分”是mRNA靶点的连续序列，其长度足以使其成为RNAi指导的切割(即，通过RISC途径的切割)的底物。

[0232] 本领域技术人员还将意识到的是双链体区是dsRNA的主要功能部分，例如，双链体区约15至36个碱基对，例如，15-36、15-35、15-34、15-33、15-32、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对，例如，19-21个碱基对。因此，在一个实施方式中，就其被加工成例如15-30个碱基对的功能性双链体而言，其靶向所需RNA进行切割，具有大于30个碱基对的双链体区域的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此，本领域普通技术人员将意识到的是，在一个实施方式中，miRNA是dsRNA。在另一个实施方式中，dsRNA不是天然存在的miRNA。

在另一个实施方式中，用于靶向LRRK2表达的RNAi剂不是通过切割较大的dsRNA在靶细胞中产生的。

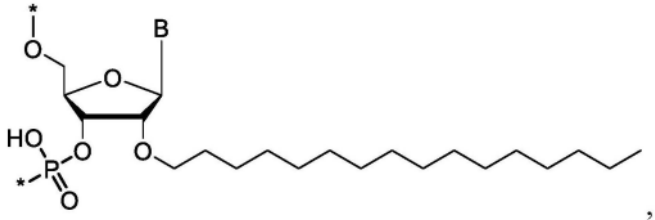
[0233] 如本文所述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端，例如，1、2、3或4个核苷酸。核苷酸突出端可以包含或由核苷酸/核苷类似物组成，包括脱氧核苷酸/核苷。一个或多个突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外，突出端的一个或多个核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5’末端、3’末端或者这两端。

[0234] 可以通过本领域公知的标准方法合成dsRNA。本发明的双链RNAi化合物可以使用两步程序制备。首先，单独制备双链RNA分子的各条链。然后，将组件链退火。dsRNA化合物的单个链可以使用溶液相或固相有机合成或者这两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包含非天然或修饰核苷酸的寡核苷酸链。类似地，本发明的单链寡核苷酸可以使用溶液相或固相有机合成或者这两者来制备。

[0235] 在一个方面中，本公开的dsRNA包含至少两个核苷酸序列，有义序列和反义序列。LRRK2的有义链序列可以选自表3-4和6-7中任一个提供的序列组，并且有义链和反义链的相应核苷酸序列可以选自表3-4和6-7中任一个的序列组。在这一方面中，两条序列之一是与两条序列中的另一个序列互补的，其中一个序列与LRRK2基因表达中产生的mRNA序列基本上互补。这样，在这个方面中，dsRNA将包含两个寡核苷酸，其中将一个寡核苷酸描述为在表2-4的任一个中的有义链(随从链)，并将另一个寡核苷酸描述为在表3-4和6-7的任一个中的反义链(引导链)。

[0236] 在一个实施方式中，dsRNA的基本互补序列包含在不同寡核苷酸上。在另一个实施方式中，dsRNA的基本互补序列包含在单一寡核苷酸上。

[0237] 应当理解的是，虽然将表3-4和6-7中的序列描述为修饰的或缀合的序列，但是本公开的RNAi剂的RNA(例如，本公开的dsRNA)可以包含表3-4和6-7的任一项中列出的任一序列，其是不同于本文所述的未修饰的、未缀合的或者修饰的或缀合的。例如，尽管本发明剂的有义链可以与GalNAc配体缀合，但是这些剂可以缀合至指导递送至CNS的部分，例如，C16配体，如本文所述的。在一个实施方式中，所述亲脂性部分包含饱和的或不饱和的C16烃链(例如，线性C16烷基或烯基)。亲脂性配体可以包括在本申请中提供的任何位置。在一些实施方式中，所述亲脂性部分缀合至双链iRNA剂的核碱基、糖部分或核苷间键。例如，C16配体可以通过核糖核苷酸的2’-氧缀合，如下述结构所示：

[0238] 

，

[0239] 其中*表示与相邻核苷酸的键，并且B是核碱基或核碱基类似物，任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷或尿嘧啶。本文提供的配体和单体的设计和合成描述在例如PCT公开号WO2019/217459、WO2020/132227和WO2020/257194中，其内容通过引用整体并入本文。

[0240] 在一些实施方式中，双链iRNA剂在反义链的5’末端还包含磷酸酯或磷酸酯模拟物。在一个实施方式中，磷酸酯模拟物是5’-乙烯膦酸酯(VP)。在一些实施方式中，双链iRNA

剂的反义链的5’末端不包含5’-乙烯膦酸酯(VP)。

[0241] 本领域技术人员熟知具有约20至23个碱基对(例如21个碱基对)的双链体结构的dsRNA在诱导RNA干扰方面特别有效(Elbashir等,(2001)EMBO J.,20:6877-6888)。然而,其他人发现较短或较长RNA双链体结构也可能有效(Chu和Rana(2007)RNA 14:1714-1719;Kim等,(2005)Nat Biotech 23:222-226)。在上述实施方式中,由于本文提供的寡核苷酸序列的性质,本文所述的dsRNA可以包含至少一条长度为最少21个核苷酸的链。可以合理地预期,与上述dsRNA相比,较短的双链体在一段或两端仅减去几个核苷酸可能同样有效。因此,dsRNA具有至少15、16、17、18、19、20或更多个源自本文提供的序列之一的连续核苷酸的序列,且使用利用例如A549细胞和10nM浓度的RNA剂的体外测定和如本文实施例中所提供的PCR分析,与来自包含完整序列的dsRNA的对照水平相比,抑制LRRK2基因的表达至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的抑制能力不同的dsRNA被考虑在本发明的范围内。在一些实施方式中,使用元代小鼠肝细胞的体外测定测量来自包含完整序列的dsRNA的抑制。

[0242] 此外,本文所述的RNA剂识别LRRK2 mRNA转录物中易受RISC介导的切割的位点。因此,本公开进一步描述了靶向该位点内的RNAi剂。如在本文中所使用的,如果RNAi剂促进转录物在特定位点内任何位置的切割,则称RNAi剂靶向于RNA转录物的特定位点内。这种RNAi剂通常包含至少约15个连续核苷酸,优选地至少19个核苷酸,其源自本文提供的序列之一并与取自LRRK2基因中所选序列的邻近区域的额外核苷酸序列偶联。

[0243] III.本公开的修饰的RNAi剂

[0244] 在一个实施方式中,本公开的RNAi剂的RNA例如dsRNA是未修饰的,并且不包含例如本领域已知的和本文所述的化学修饰或缀合。在优选的实施方式中,本公开的RNAi剂的RNA例如dsRNA是化学修饰的以增强稳定性或其他有益特性。在本公开的某些实施方式中,本公开的RNAi剂的基本上所有核苷酸都是修饰的。在本公开的其他实施方式中,本公开的RNAi剂的所有核苷酸都是修饰的。其中“基本上所有的核苷酸都是修饰的”的本公开的RNAi剂大部分但不是全部修饰并且可以不超过5、4、3、2个或未修饰的核苷酸。在本公开的其他实施方式中,本公开的RNAi剂可以包含不超过5、4、3、2或1个修饰的核苷酸。

[0245] 本公开中的核酸可以通过本领域充分确立的方法合成或修饰,例如“核酸化学中的当前方案”中所述的那些,Beaucage,S.L.等(编著)John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA,其通过引用并入本文。修饰包括例如末端修饰,例如5’端修饰(磷酸化、缀合、反向间键)或3’端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向间键等);碱基修饰,例如用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伴侣库配对的碱基、去除碱基(无碱基核苷酸)或共轭碱基进行替换;糖修饰(例如在2’位或4’位)或糖的替换;或主链修饰,包括磷酸二酯键修饰或替换。可用于本文所述实施方式的RNAi剂的具体实施例包括但不限于包含修饰的主链或非天然核苷间键的RNA。具有修饰的主链的RNA尤其包括那些在主链中没有磷原子的RNA。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提到的,在其核苷间主链中不具有磷原子的修饰的RNA也可以被认为是寡核苷。在一些实施方式中,修饰的RNAi剂将在核苷间主链中具有磷原子。

[0246] 修饰的RNA主链包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯,包括3”-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯、亚膦酸酯、氨基磷酸酯包括3’-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷

基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键的硼酸磷酸酯、它们的2'-5'连接的类似物，以及其中相邻的核苷单元对以3'-5'连接到5'-3'或2'-5'到5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。在本发明的一些实施方式中，本发明的dsRNA剂是游离酸形式。在本发明的其他实施方式中，本发明的dsRNA剂是盐形式。在一个实施方式中，本发明的dsRNA剂是钠盐形式。在某些实施方式中，当本发明的dsRNA剂是钠盐形式时，钠离子作为抗衡离子存在于剂中，用于剂中存在的基本上所有的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团。其中基本上所有的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键都具有钠抗衡离子的剂包含不超过5、4、3、2或1个没有钠抗衡离子的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键。在一些实施方式中，当本发明的dsRNA剂是钠盐形式时，钠离子作为存在于剂中的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在。

[0247] 教导制备上述含磷间键的代表性美国专利包括但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利RE39464，其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0248] 其中不包含磷原子的修饰的RNA主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。这些包括具有吗啉间键(部分由核苷的糖部分形成)；硅氧烷主链；硫化物、亚砜和砜主链；甲乙酰和硫甲乙酰主链；亚甲基甲乙酰和硫甲乙酰主链；含烯烃主链；氨基磺酸脂主链；亚甲基亚氨基和亚甲基肼基主链；磺酸酯和磺酰胺主链；酰胺主链；和其他混合了N、O、S和CH_2组分的部分的那些。

[0249] 教导制备上述寡核苷的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439，其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0250] 在其他实施方式中，考虑将合适的RNA模拟物用于RNAi剂中，其中核苷酸单元的糖和核苷间键，即主链，都被新基团取代。保持碱基单元用于与合适的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物，RNA模拟物已被证明具有优异杂交特性，被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，RNAi的糖主链被包含酰胺的主链取代，特别是氨乙基甘氨酸主链。核碱基被保留并直接或间接结合至主链酰胺部分的氮杂氮原子上。教导制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262，其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。适于在本公开的RNAi剂中使用的其他PNA化合物描述在例如Nielsen等，Science,1991,254,1497-1500中。

[0251] 本公开中的一些实施方式包括上述美国专利号5,489,677的具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷，特别是--CH_2--NH--CH_2-、--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--[称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--、--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--

CH_2--和--N(CH_3)--CH_2--CH_2--，和上述美国专利5,602,240的酰胺主链。在一些实施方式中，本文所表征的RNA具有上述US5,034,506的吗啉主链结构。天然磷酸二酯主链可以表示为O-P(O)(OH)-OCH_2-。

[0252] 修饰的RNA也可以包含一个或多个取代的糖部分。本文所表征的RNAi剂例如dsRNA可以在2'位置包含以下之一：OH；F；O-、S-或N-烷基；O-、S-或N-烯基；O-、S-或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基。示例性合适的修饰包括O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$OCH_3$、O($CH_2$)$_n$$NH_2$、O($CH_2$)$_n$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$ONH_2$和O($CH_2$)$_n$ON[($CH_2$)$_n$$CH_3$)]$_2$，其中n和m为1至约10。在其他实施方式中，dsRNA在2'位置包含以下之一：C_1至C_{10}低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善RNAi剂的药代动力学特性的基团、或用于改善RNAi剂的药效学特性的组，以及具有类似特性的其他取代基。在一些实施方式中，修饰包括2'甲氧基乙氧基(2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$，也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等，Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504)，即烷氧基-烷氧基基团。另一个示例性修饰是2'-二甲氨基乙氧基，即O(CH_2)$_2$ON(CH_3)$_2$基团，也称为2'-DMAOE，如下文实施例中所述，和2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(本领域也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE)，即2'-O--CH_2--O--CH_2--N(CH_2)$_2$。进一步的示例性修饰包括：5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(R和S异构体均在这三个家族中)；2'-烷氧基烷基；和2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0253] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-氨基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、2'-O-十六烷基和2'-氟(2'-F)。也可以在RNAi剂的RNA的其他位置进行类似的修饰，特别是3'末端核苷酸上糖的3'位置或2'-5'连接的dsRNA和5'末端核苷酸的5'位置。RNAi剂也可以具有糖模拟物，例如环丁基部分来替代呋喃戊糖。教导这种修饰的糖结构制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633和5,700,920，其中某些是即时申请共同拥有的。前述每一项的全部内容在此通过引用并入本文。

[0254] 本公开的RNAi剂还可以包含核碱基(在本领域中通常简称“碱基”)修饰或取代。如在本文中所使用的，“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基胸苷(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成和天然核碱基，例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基以及腺嘌呤和鸟嘌呤的其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸苷和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸苷、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代，特别是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-达氮杂腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。其他修饰的核碱基包括美国专利号3,687,808中公开的那些，在Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine,Herdewijn,P.编著Wiley-VCH,2008中公开的那些；在The

Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.L编著John Wiley&Sons,1990中公开的那些,由Englisch等,(1991)Angewandte Chemie,国际版30:613公开的那些和由Sanghvi,Y S.第15章,dsRNA Research and Applications,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编著,CRC Press,1993公开的那些。这些核碱基中的某些特别可用于增加本公开中特征的寡聚化合物的结合亲和力。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,其包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示可将核酸双链体稳定性提高0.6-1.2℃(Sanghvi,Y.S.,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编著,dsRNA Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,1993,pp.276-278),并且是示例性碱基取代,甚至更特别是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0255] 教导某些上述修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基制备的代表性美国专利包括但不限于上述美国专利号3,687,808;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672;和7,495,088,其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0256] 本公开的RNAi剂也可以被修饰以包含一个或多个双环糖部分。"双环糖"是由两个原子桥连修饰的呋喃糖基环。"双环核苷酸"("BNA")是具有糖部分的核苷,其包含连接糖环的两个碳原子的桥,从而形成双环系统。在某些实施方式中,桥连接糖环的4'碳和2'碳。因此,在一些实施方式中,本公开的剂可以包含一种或多种锁核酸(LNA)。锁核酸是具有修饰的核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包含连接2'和4'碳的额外桥。换言之,LNA是包含包含4'-CH_2-O-2'桥的双环糖部分的核苷酸。这种结构有效地将核糖"锁"在3'-endo结构构象中。已显示向siRNA添加锁核酸可提高血清中siRNA的稳定性并降低脱靶效应(Elmen,J.等,(2005)Nucleic Acids Research 33(1):439-447;Mook,OR.等,(2007)Mol Canc Ther6(3):833-843;Grunweller,A.等,(2003)Nucleic Acids Research31(12):3185-3193)用于本公开的多核苷酸的双环核苷酸的例子包括但不限于在4'和2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施方式中,本公开的反义多核苷酸包含一种或多种包含4'至2'桥的双环核苷。这种4'至2'桥连双环核苷的例子包括但不限于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")和4'-CH(CH_2OCH_3)—O-2'(及其类似物;参见例如美国专利号7,399,845);4'-C(CH_3)(CH_3)—O-2'(及其类似物;参见例如美国专利号8,278,283);4'-CH_2—N(OCH_3)-2'(及其类似物;参见例如美国专利号8,278,425);4'-CH_2—O—N(CH_3)-2'(参见例如,美国专利公开号2004/0171570);4'-CH_2—N(R)—O-2',其中R是H、C_1-C_{12}烷基或保护基团(参见例如,美国专利号7,427,672);4'-CH_2—C(H)(CH_3)-2'(参见例如,Chattopadhyaya等,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);和4'-CH_2—C(=CH_2)-2'(及其类似物;参见例如,美国专利号8,278,426)。前述每一项的全部内容在此通过引用并入本文。

[0257] 教导锁定核酸核苷酸制备的其他代表性美国专利和美国专利公开包括但不限于以下:美国专利号6,268,490;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,034,133;7,084,125;7,399,845;7,427,672;7,569,686;7,741,457;8,022,

193;8,030,467;8,278,425;8,278,426;8,278,283;US 2008/0039618;和US2009/0012281,其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0258] 可以制备具有一种或多种立体化学糖构型的任何前述双环核苷,其包括例如α-L-呋喃核糖和β-D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0259] 本公开的RNAi剂可以被修饰以包含一种或多种受限的乙基核苷酸。如在本文中所使用的,"受限的乙基核苷酸"或"cEt"是包含包含4'-CH(CH_3)-O-2'桥的双环糖部分的锁定核酸。在一个实施方式中,受限的乙基核苷酸是S构象在本文中称为"S-cEt"。

[0260] 本公开的RNAi剂还可以包含一种或多种"构象受限的核苷酸"("CRN")。CRN是核苷酸类似物,其具有连接核糖的C2'和C4'碳或核糖的C3和C5'碳的接头。CRN将核糖环锁定为稳定构象并增加与mRNA的杂交亲和力。接头的长度足以将氧置于最佳位置以实现稳定性和亲和力,从而减少核糖环折叠。

[0261] 教导某些上述CRN制备的代表性出版物包括但不限于US 2013/0190383;和WO 2013/036868,其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0262] 在一些实施方式中,本公开的RNAi剂包含一种或多种单体,其是UNA(非锁核酸)核苷酸。UNA是非锁核苷酸,其中糖的任何键已被去除,形成非锁"糖"残基。在一个例子中,UNA还包含C1'-C4'之间的键已被去除的单体(即C1'和C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一例子中,糖的C2'-C3'键(即C2'和C3'碳之间的共价碳-碳键)已被去除(参见Nuc.Acids Symp.Series,52,133-134(2008)和Fluiter等,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,通过引用并入本文)。

[0263] 教导UNA制备的代表性美国专利公开包括但不限于US8,314,227;和美国专利公开号2013/0096289;2013/0011922;和2011/0313020,其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0264] 本公开的RNAi剂还可以包含一种或多种"环己烯核酸"或("CeNA")。CeNA是核苷酸类似物,其中DNA的呋喃糖部分被环己烯环取代。在DNA链中加入环己烯基核苷增加了DNA/RNA杂合体的稳定性。CeNA对血清中的降解稳定,CeNA/RNA杂合体能够激活大肠杆菌RNase H,导致RNA链断裂。(参见,Wang等,Am.Chem.Soc.2000,122,36,8595-8602,通过引用并入本文)。

[0265] 对RNA分子末端的潜在稳定修饰可以包括N-(乙酰氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸)(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(乙醚)、N-(氨基己基)-4-羟脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二碳酰尿苷-3'-磷酸酯、倒碱基dT(idT)及其他。这种修饰的公开内容可以在WO 2011/005861中找到。

[0266] 本公开的RNAi剂的其他修饰包括5'磷酸或5'磷酸模拟物,例如RNAi剂反义链上的5'末端磷酸或磷酸模拟物。合适的磷酸模拟物公开于例如US2012/0157511中,其全部内容通过引用并入本文。A.包含本公开的基序的修饰的RNAi剂

[0267] 在本公开的某些方面中,本公开的双链RNAi剂包含具有化学修饰的剂,例如在WO 2013/075035中公开的,其全部内容通过引用并入本文。如本文和WO 2013/075035中所示,通过将三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个或多个基序引入RNAi剂的有义链或反义链,特别是在切割位点上或附近,可以获得更好的结果。在一些实施方式中,RNAi剂的有义

链和反义链可以另外地被完全修饰。这些基序的引入会中断有义链或反义链的修饰模式(如果存在)。RNAi剂可以任选地与亲脂性配体,例如C16配体缀合,例如在有义链上。RNAi剂可以任选地用(S)-二醇核酸(GNA)修饰修饰,例如在反义链的一个或多个残基上。产生的RNAi剂具有优异的基因沉默活性。

[0268] 因此,本公开提供了能够在体内抑制靶基因(例如,LRRK2基因)表达的双链RNAi剂。RNAi剂包含有义链和反义链。RNAi剂的每条链长度为15-30个核苷酸。例如,每条链长度为16-30个核苷酸、长度为17-30个核苷酸、长度为25-30个核苷酸、长度为27-30个核苷酸、长度为17-23个核苷、长度为17-21个核苷酸酸、长度为17-19个核苷酸、长度为19-25个核苷酸、长度为19-23个核苷酸、长度为19-21个核苷酸、长度为21-25个核苷酸、或长度为21-23个核苷酸。在某些实施方式中,每条链长度为19-23个核苷酸。

[0269] 有义链和反义链通常形成双链体双链RNA(“dsRNA”),在本文中也称为“RNAi剂”。RNAi剂的双链体区长度为15-30个核苷酸对。例如,双链体区可以是长度为16-30个核苷酸对、长度为17-30个核苷酸对、长度为27-30个核苷酸对、长度为17-23个核苷酸对、长度为17-21个核苷酸对、长度为17-19个核苷酸对、长度为19-25个核苷酸对、长度为19-23个核苷酸对、长度为19-21个核苷酸对、长度为21-25个核苷酸对、或长度为21-23个核苷酸对。在另一个例子中,双链体区域选自长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27个核苷酸。在优选的实施方式中,双链体区域的长度为19-21个核苷酸。

[0270] 在一个实施方式中,RNAi剂可以在一条或两条链的3’端、5’端或两端包含一个或多个突出端区域或加帽基团。突出端长度为1-6个核苷酸,例如长度2-6个核苷酸,长度1-5个核苷酸、长度2-5个核苷酸、长度1-4个核苷酸、长度2-4个核苷酸、长度1-3个核苷酸、长度2-3个核苷酸或长度1-2个核苷酸。在优选的实施方式中,核苷酸突出端区域长度为2个核苷酸。突出端可能是一条链比另一条链长的结果,或两条相同长度的链交错的结果。突出端可以与靶mRNA形成错配,或者它可以与被靶向的基因序列互补,或者可以是另一个序列。第一和第二条链也可以例如通过额外的碱基连接以形成发夹,或通过其他无碱基接头连接。

[0271] 在一个实施方式中,RNAi剂的突出端区域中的核苷酸可以各自独立地是修饰的或未修饰的核苷酸,其包括但不限于2’-糖修饰,例如2-F、2’-O-甲基、胸苷(T)及其任何组合。

[0272] 例如,TT可以是任一链上的任一末端的突出端序列。突出端可以与靶mRNA形成错配,或者它可以与被靶向的基因序列互补,或者可以是另一个序列。

[0273] RNAi剂的有义链、反义链或两条链上的5’或3’突出端可能被磷酸化。在一些实施方式中,突出端区域包含两个核苷酸,在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中两个核苷酸可以是相同或不同的。在一个实施方式中,突出端存在于有义链、反义链或两条链的3’端。在一个实施方式中,3’突出端存在于反义链上。在一个实施方式中,3’突出端存在于有义链上。

[0274] RNAi剂可能只包含一个突出端,其可以增强RNAi的干扰活性而不影响其整体稳定性。例如,单链突出端可以位于有义链的3’末端,或者反义链的3’末端。RNAi也可以有一个平端,位于反义链的5’端(或有义链的3’端),反之亦然。通常,RNAi的反义链在3’端有核苷酸突出端,并且5’端是平端。尽管不希望受理论束缚,反义链的5’末端的不对称平端和反义链的3’末端突出端有利于指导链加载到RISC过程。

[0275] 在一个实施方式中,RNAi剂是长度为19个核苷酸的双端平聚体,其中有义链在从

5’端起的7、8、9位上的三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-F修饰的基序。反义链在从5’端起的11、12、13位的三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-O-甲基修饰的基序。

[0276] 在另一个实施方式中，RNAi剂是长度为20个核苷酸的双端平聚体，其中有义链在从5’端起的8、9、10位上的三个连续核苷酸包含至少一个三个2’-F修饰的基序。反义链在从5’端起的11、12、13位的三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-O-甲基修饰的基序。

[0277] 在另一个实施方式中，RNAi剂是长度为21个核苷酸的双端平聚体，其中有义链在从5’端起的9、10、11位上的三个连续核苷酸包含至少一个三个2’-F修饰的基序。反义链在从5”端起的11、12、13位的三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-O-甲基修饰的基序。

[0278] 在一个实施方式中，RNAi剂包含21个核苷酸的有义链和23个核苷酸的反义链，其中有义链包含从5’端起的9、10、11位上的三个连续核苷酸包含至少一个三个2’-F修饰的基序；反义链包含从5’端起的11、12、13位上的三个连续核苷酸包含至少一个三个2’-O-甲基修饰的基序，其中RNAi剂的一端是平端，而另一端包含2个核苷酸突出端。优选地，2个核苷酸突出端在反义链的3’端。当2个核苷酸突出端在反义链的3’端时，末端三个核苷酸之间可以由两个硫代磷酸酯核苷间键，其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸，并且第三个核苷酸是与突出端核苷酸相邻的配对核苷酸。在一个实施方式中，RNAi剂在有义链的5’端和反义链的5’端的末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方式中，RNAi剂的有义链和反义链上的每个核苷酸，包括作为基序一部分的核苷酸，都是修饰的核苷酸。在一个实施方式中，每个残基独立地被2’-甲基或2’-氟修饰，例如在交替基序中。任选地，RNAi剂还包含配体(例如亲脂性配体，任选地C16配体)。

[0279] 在一个实施方式中，RNAi剂包含有义链和反义链，其中有义链的长度为25-30个核苷酸残基，其中从5’末端核苷酸(位置1)开始，位置1至23包含至少8个核糖核苷酸；反义链长度为36-66个核苷酸残基，从3’末端核苷酸开始，在与有义链1-23位配对的位置包含至少8个核糖核苷酸以形成双链体；其中反义链的至少3’末端核苷酸与有义链不配对，并且多达6个连续的3’末端核苷酸与有义链不配对，从而形成1-6个核苷酸的3’单链突出端；其中反义链的5’末端包含10-30个不与有义链配对的连续核苷酸，从而形成10-30个核苷酸单链5’突出端；其中当有义链和反义链对齐以获得最大互补性时，至少有义链5’末端和3’末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对，从而在有义链和反义链之间形成基本上双链的区域；并且反义链与反义链的至少19个核糖核苷酸的靶RNA充分互补，以在将双链核酸引入哺乳动物细胞时降低靶基因表达；并且其中有义链在三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-F修饰的基序，其中至少一个基序出现在切割位点处或附近。反义链在切割位点上或附近的三个连续核苷酸上包含至少一个三个2’-O-甲基修饰的基序。

[0280] 在一个实施方式中，RNAi剂包含有义链和反义链，其中RNAi剂包含长度为至少25个且至多29个核苷酸的第一链和长度至多30个核苷酸的第二链以及从5’端起的11、12、13位三个连续核苷酸上的三个2’-O-甲基修饰的至少一个基序；其中第一链的3’端和第二链的5’端形成平端，第二链的3’端比第一链长1-4个核苷酸，其中至少25个核苷酸长度的双链体区域区域和第二链沿第二链长度的至少19个核苷酸与靶mRNA充分互补，以在将RNAi剂引入哺乳动物细胞时降低靶基因表达，并且其中RNAi剂的二聚体切割优先导致包含第二条链的3’末端的siRNA，从而降低哺乳动物中靶基因的表达。任选地，RNAi剂还包含配体。

[0281] 在一个实施方式中，RNAi剂的有义链在三个连续核苷酸上包含至少一个三个相同

修饰的基序,其中一个基序出现在有义链的切割位点处。

[0282] 在一个实施方式中,RNAi剂的反义链还可以在三个连续核苷酸上包含至少一个三个相同修饰的基序,其中一个基序出现在反义链的切割位点处或附近。

[0283] 对于具有17-23个核苷酸的双链体区域的RNAi剂,反义链的切割位点通常在5'端的10、11、12位附近。因此,三个相同修饰的基序可以发生在反义链的9、10、11位;11、12、13位;12、13、14位;或13、14、15位,从反义链的5'端的第一个核苷酸开始计数,或从反义链的5'端的双链体区域内的第一对核苷酸开始计数。反义链的切割位点也可以根据RNAi 5'端的双链体区长度而变化。

[0284] RNAi剂的有义链可以在链的切割位点处的三个连续核苷酸上包含至少一个三个相同修饰的基序;并且反义链可以在链的切割位点处或附近的三个连续核酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当有义链和反义链形成dsRNA双链体时,有义链和反义链可以如此排列,使得有义链上一个三个核苷酸的基序和反义链上一个三个核苷酸的基序具有至少一个核苷酸重叠,即有义链中基序的是哪个核苷酸中的至少一个与反义链中基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。或者,至少两个核苷酸重叠,或所有三个核苷酸都重叠。

[0285] 在一个实施方式中,RNAi剂的有义链可以在三个连续的核苷酸上包含一个或以上三个相同修饰的基序。第一个基序可以出现在链的切割位点处或附近并且另一个基序可以是翼修饰。本文中的术语"翼修饰"指在链的另一部分出现的基序,其余在相同链的切割位点处或附近的基序分离。翼修饰与第一基序相邻或被至少一个或多个核苷酸分开。当基序彼此直接相邻时,基序的化学性质彼此不同,并且当基序被一个或多个核苷酸分隔时,化学形式可以相同或不同。存在两个或更多翼修饰。例如,当存在两个翼修饰时,每个翼修饰可以发生在相对于位于或靠近切割位点的第一基序的一端,或在前导基序的任一侧。

[0286] 与有义链一样,RNAi剂的反义链可以在三个连续核苷酸上包含一个以上三个相同修饰的基序,其中是指一个基序出现在链的切割位点处或附近。该反义链还可以包含一个或多个与可能存在于有义链的翼修饰相似的排列方式的翼修饰。

[0287] 在一个实施方式中,RNAi剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包括链的3'端、5'端或两端的第一个或两个末端核苷酸。

[0288] 在另一个实施方式中,RNAi剂的有义链或反义链的翼修饰通常不包括链的3'端、5'端或两端的第一个或两个配对的核苷酸。

[0289] 当RNAi剂的有义链和反义链各自包含至少一个翼修饰时,翼修饰可以落在双链体区域的同一端,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0290] 当RNAi剂的有义链和反义链各自包含至少两个翼修饰时,有义链和反义链可以如此排列,使得来自一条链的两个修饰落在双链体区域的一端,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;来自一条链的两个修饰落在双链体区域的另一端,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;一条链的两个修饰落在前导基序的每一侧,在双链体区域具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0291] 在一个实施方式中,RNAi剂包含与靶点、双链体内或其组合的错配。错配可能发生在突出端区域或双链体区。碱基对可以根据它们促进解离或熔化的倾向进行排序(例如,根据特定配对的结合或解离自由能,最简单的方法是在单个配对的基础上检查配对,尽管也可以使用下一个相邻或类似的分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C

优于G:C(I＝肌苷)。错配,例如非标准或不同于标准的配对(如本文别处所述)优于标准(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于标准配对。

[0292] 在一个实施方式中,RNAi剂包含独立地选自以下组的反义链5'端的双链体区域内的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个:A:U、G:U、I:C,和错配对,例如非标准或不同于标准的配对或包含通用碱基的配对,以促进反义链在双链体5'端的解离。

[0293] 在一个实施方式中,从反义链5'端开始的双链体区域内的1位核苷酸选自A、dA、dU、U和dT。或者,从反义链的5'端开始的双链体区域内的第1、2或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从反义链的5'端开始的双链体区域内的第一对碱基对是AU碱基对。

[0294] 在另一个实施方式中,有义链的3'端的核苷酸是脱氧胸苷(dT)。在另一个实施方式中,反义链的3'端的核苷酸是脱氧胸苷(dT)。在一个实施方式中,有一个短序列的脱氧胸苷核苷酸,例如在有义链或反义链3'端的两个dT核苷酸。

[0295] 在一个实施方式中,有义链序列可以由式(I)表示:

[0296] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (I)

[0297] 其中:

[0298] i和j各自独立地为0或1;

[0299] p和q各自独立地为0-6;

[0300] 每个N_a独立地代表包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0301] 每个N_b独立地代表包含0-10个修饰核苷酸的寡核苷酸序列;

[0302] 每个n_p和n_q独立地代表突出端核苷酸;

[0303] 其中N_b和Y不具有相同的修饰;并且

[0304] XXX、YYY和ZZZ各自独立地代表三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。优选地YYY是所有2'-F修饰的核苷酸。

[0305] 在一个实施方式中,N_a或N_b包含交替模式的修饰。

[0306] 在一个实施方式中,YYY基序出现在有义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区域时,YYY基序可以发生在有义链的切割位点处或其附近(例如,可以发生在位置6、7、8、7、8、9、8、9、10、9、10、11、10、11、12或11、12、13),从5'端的第一个核苷酸开始计数;或可选地,从双链体区域内的第一个配对的核苷酸开始计数,从5'端开始。

[0307] 在一个实施方式中,i是1并且j是0,或者i是0并且j是1,或和j都是1。因此,有义链可以用以下公式表示:

[0308] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}YYY\text{-}N_b\text{-}ZZZ\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (Ib);

[0309] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}XXX\text{-}N_b\text{-}YYY\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (Ic);或者

[0310] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}XXX\text{-}N_b\text{-}YYY\text{-}N_b\text{-}ZZZ\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (Id)。

[0311] 当有义链由式(Ib)表示时,N_b表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0312] 每个N_a独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0313] 当有义链由式(Ic)表示时,N_b表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a可以独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷

酸的寡核苷酸序列。

[0314] 当有义链由式(Id)表示时,每个N_b独立地表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地,N_b是0、1、2、3、4、5或6。每个N_a可以独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0315] X、Y和Z中的每一个可以彼此相同或不同。

[0316] 在其他的实施方式中,i是0并且j是0,并且有义链可以有下式表示:

[0317] $5'n_p\text{-}N_a\text{-}YYY\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$ (Ia)。

[0318] 当有义链由式(Ia)表示时,每个N_a可以独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0319] 在一个实施方式中,RNAi的反义链可以由式(II)表示:

[0320] $5'n_{q'}\text{-}N_a'\text{-}(Z'Z'Z')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(X'X'X')_l\text{-}N'_a\text{-}n_p'3'$ (II)

[0321] 其中:

[0322] k和l各自独立地为0或1;

[0323] p'和q'各自独立地为0-6;

[0324] 每个Na'独立地表示包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0325] 个Nb'独立地表示包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0326] 每个np'和nq'独立地表示突出端核苷酸;

[0327] 其中Nb'和Y'不具有相同修饰;

[0328] 并且X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。

[0329] 在一个实施方式中,Na'或Nb'包含交替模式的修饰。

[0330] Y'Y'Y'基序出现在反义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi剂具有长度为17-23个核苷酸的双链体区域时,Y'Y'Y'基序可以发生在反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15,从5'端开始的第一个核苷酸开始计数;或可选地,从双链体区域内的5'端第一个配对的核苷酸开始计数。优选地,Y'Y'Y'基序发生在位置11、12、13。

[0331] 在一个实施方式中,Y'Y'Y'基序都是2'-OMe修饰的核苷酸。

[0332] 在一个实施方式中,k是1并且l是0,或k是0并且l是1,或k和l都是1。

[0333] 因此,反义链可以用下式表示:

[0334] $5'n_{q'}\text{-}N_a'\text{-}Z'Z'Z'\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_a'\text{-}n_{p'}3'$ (IIb);

[0335] $5'n_{q'}\text{-}N_a'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}X'X'X'\text{-}n_{p'}3'$ (IIc);或

[0336] $5'n_{q'}\text{-}N_a'\text{-}Z'Z'Z'\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}X'X'X'\text{-}N_a'\text{-}n_{p'}3'$ (IId)。

[0337] 当反义链由式(IIb)表示时,N_b'表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a'独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0338] 当反义链由式(IIc)表示时,N_b'表示包含0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a'独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0339] 当反义链由式(IId)表示时,每个N_b'独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-

4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a'独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地，N_b是0、1、2、3、4、5或6。

[0340] 在其他实施方式中，k是0并且l是0，且反义链可由下式表示：

[0341] 5'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'3' (Ia)。

[0342] 当反义链由式(IIa)表示时，每个N_a'独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0343] X'、Y'和Z'中的每一个可以彼此相同或不同。

[0344] 有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地用LNA、HNA、CeNa、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基，或2'-氟修饰。例如，有义链和反义链的每个核苷酸都独立地用2'-O-甲基或2'-氟修饰。特别是，每个X、Y、Z、X'、Y'和Z'可以代表2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0345] 在一个实施方式中，当双链体区域为21nt时，RNAi剂的有义链可以包含发生在有义链的9、10和11位的YYY基序，从5'端的第一个核苷酸开始计数，或任选地，从双链体区域内的第一个配对的核苷酸开始计数，从5'端开始；并且Y表示2'-F修饰。有义链可以另外包含XXX基序或ZZZ基序作为双链体区域另一端的翼修饰；XXX和ZZZ各自独立地代表2'-OMe修饰或2'-修饰。

[0346] 在一个实施方式中，反义链可以包含出现在链的位置11、12、13的Y'Y'Y'基序，从5'端的第一个核苷酸开始计数，或任选地，从双链体区域内的第一个配对的核苷酸开始计数，从5'端开始；并且Y'表示2'-O-甲基修饰。反义链可以另外包含X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为双链体区域另一端的翼修饰；并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地代表2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0347] 由上述式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中任一式表示的有义链与由式(IIa)、(IIb)、(IIb)、(IIc)和(IId)中任一式表示的反义链形成双链体。

[0348] 因此，用于本公开的方法的RNAi剂可包含有义链和反义链，每条链具有14至30个核苷酸，RNAi双链体由式(III)表示：

[0349] 有义：5'n_p-N_a-(X X X)$_i$-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)$_j$-N_a-n_q 3'

[0350] 反义：3'n_p'-N_a'-(X'X'X')$_k$-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')$_l$-N_a'-n_q'5' (III)

[0351] 其中：

[0352] i、j、k和l各自独立地为0或1；

[0353] p、p'、q和q'各自独立地为0-6；

[0354] 每个N_a和N_a'独立地代表包含0-25个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列，每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸；

[0355] 每个N_b和N_b'独立地代表包含0-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列；

[0356] 其中

[0357] 每个n_p'、n_p、n_q'和n_q，它们中的每一个可能存在或可能不存在，独立地代表突出端核苷酸；和

[0358] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地代表三个连续核苷酸上三个相同修饰的一个基序。

[0359] 在一个实施方式中，i是0和j是0；或i是1和j是0；或i是0和j是1；或i和j都是0；或i

和j都是1。在另一个实施方式中，k是0和l是0；或k是1和l是0；k是0和l是1；或k和l都是0；或k和l都是1。

[0360] 形成RNAi双链体的有义链和反义链的示例性组合包括下式：

[0361] 5’ n_p-N_a-Y Y Y-N_a-n_q 3’

[0362] 3’ n_p’-N_a’-Y’ Y’ Y’-N_a’ n_q’ 5’ (IIIa)

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

[0364] 3’ n_p’-N_a’-Y’ Y’ Y’-N_b’-Z’ Z’ Z’-N_a’ n_q’ 5’ (IIIb)

[0365] 5’ n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_a-n_q 3’

[0366] 3’ n_p’-N_a’-X’ X’ X’-N_b’-Y’ Y’ Y’-N_a’-n_q’ 5’ (IIIc)

[0367] 5’ n_p-N_a-X X X-N_b-Y Y Y-N_b-Z Z Z-N_a-n_q 3’

[0368] 3’ n_p’-N_a’-X’ X’ X’-N_b’-Y’ Y’ Y’-N_b’-Z’ Z’ Z’-N_a-n_q’ 5’ (IIId)

[0369] 当RNAi剂由式(IIIa)表示时，每个N_a独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0370] 当RNAi剂由式(IIIb)表示时，每个N_b独立地表示包含1-10、1-7、1-5或1-4个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0371] 当RNAi剂由式(IIIc)表示时，每个N_b、N_b’独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a独立地表示包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0372] 当RNAi剂由式(IIId)表示时，每个N_b、N_b’独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个N_a、N_a’独立地代表包含2-20、2-15或2-10个修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。N_a、N_a’、N_b和N_b’各自独立地包含交替模式的修饰。

[0373] 在一个实施方式中，当RNAi剂由式(IIId)表示时，N_a修饰是2’-O-甲基或2’-氟修饰。在另一个实施方式中，当RNAi剂由式(IIId)表示时，N_a修饰是2’-O-甲基或2’-氟修饰和n_p’>0并且至少一个n_p’通过硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸。在又一个实施方式中，当RNAi剂由式(IIId)表示时，N_a修饰是2’-O-甲基或2’-氟修饰，n_p’>0且至少一个n_p’通过硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸，以及有义通过二价或三价支链接头与一个或多个C16(或相关)部分缀合(如下所述)。在另一个实施方式中，当RNAi剂由式(IIId)表示时，N_a修饰是2’-O-甲基或2’-氟修饰，n_p’>0且至少一个n_p’通过硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键，并且有义链与一个或多个亲脂性部分(例如，C16(或相关)部分)缀合，任选地通过二价或三价接头连接。

[0374] 在一个实施方式中，当RNAi剂由式(IIIa)表示时，N_a修饰是2’-O-甲基或2’-氟修饰，n_p’>0并且至少一个n_p’通过硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸，有义链包含至少一个硫代磷酸酯键，并且有义链通过二价或三价支链接头与一个或多个亲脂性部分(例如，C16(或相关)部分)缀合。

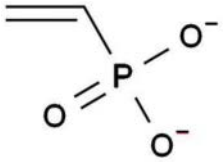
[0375] 在一个实施方式中，RNAi剂是包含至少两个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的双链体的多聚体，其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地，多聚体还包含配体。每个多聚体可以靶向相同基因或两个不同的基因；或每个多聚体可以在两个不同靶点位靶向相同的基因。

[0376] 在一个实施方式中，RNAi剂是包含三个、四个、五个、六个或更多个由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示双链体的多聚体，其中双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地，多聚体还包含配体。每个多聚体可以靶向相同基因或两个不同的基因；或每个多聚体可以在两个不同靶点位靶向相同的基因。

[0377] 在一个实施方式中，由式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)和(IIId)表示的两个RNAi剂在5’端和一个或两个3’端相互连接，并任选地与配体缀合。每种剂可以靶向相同基因或两个不同的基因；或每种剂可以在两个不同靶点位靶向相同的基因。

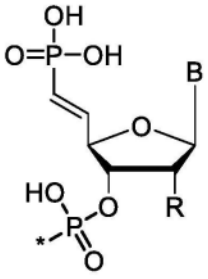
[0378] 各种出版物描述了可用于本公开的方法的多聚体RNAi剂。这样的出版物包括WO2007/091269、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887和WO2011/031520；和US7858769，其中每一个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0379] 在某些实施方式中，本公开的组合物和方法包括如本文所述的RNAi剂的乙烯膦酸酯(VP)修饰。在示例性实施方式中，本公开的乙烯膦酸酯具有以下结构：

[0380] 

[0381] 本公开的乙烯膦酸酯可以连接至本公开的dsRNA的反义链或有义链。在某些实施方式中，本公开的乙烯膦酸酯连接至dsRNA的反义链，任选地在dsRNA反义链的5’端。dsRNA剂可以在有义链或反义链的5’端包含含磷基团。5’端含磷基团可以是5’端磷酸酯(5’-P)、5’端硫代磷酸酯(5’-PS)、5’端二硫代磷酸酯(5’-PS2)、5’端乙烯膦酸酯(5’-VP)、5’端甲基膦酸酯(MePhos)或5’-脱氧-5’-C-丙二酰基。当5’端含磷基团是5’端乙烯膦酸酯(5’-VP)时，5’-VP可以是5’-E-VP异构体(即，反式乙烯膦酸酯)、5’-Z-VP异构体(即，顺式乙烯膦酸酯)或其混合物。

[0382] 例如，当磷酸酯模拟物是5’-乙烯膦酸酯(VP)时，5’端核苷酸可以具有下述结构，

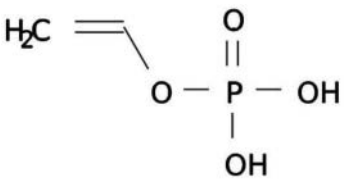
[0383] 

[0384] 其中*表示连接相邻核苷酸的5’位置的键的位置；

[0385] R是氢、羟基、甲氧基或氟(例如，羟基)；和

[0386] B是核碱基或修饰的核碱基，任选地其中B是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷或尿嘧啶。

[0387] 磷酸乙烯酯修饰亦考虑用于本发明的组合物和方法。示例性磷酸乙烯酯结构为：

[0388] 

[0389] i.热不稳定的修饰

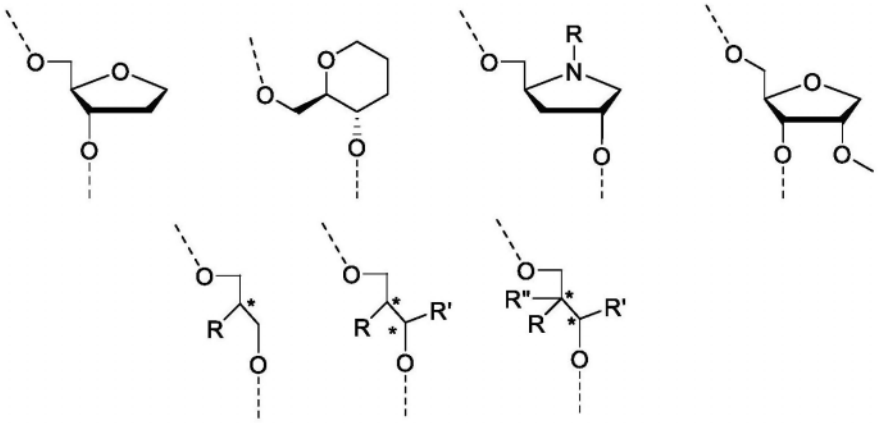
[0390] 在某些实施方式中，dsRNA分子可以通过在反义链的种子区结合热不稳定修饰来优化RNA干扰。如在本文中所使用的，“种子区”是指在参考链的5’末端的位置2-9。例如，可以在反义链的种子区中掺入热不稳定修饰以减少或抑制脱靶基因沉默。

[0391] 术语“热不稳定的修饰”包括这样的修饰，该修饰将导致具有比没有这种修饰的dsRNA的Tm更低的总解链温度(Tm)的dsRNA。例如，热不稳定的修饰可以使dsRNA的Tm降低1-4℃，如1、2、3或4摄氏度。并且，术语“热不稳定的核苷酸”指包含一个或多个热不稳定的修饰的核苷酸。

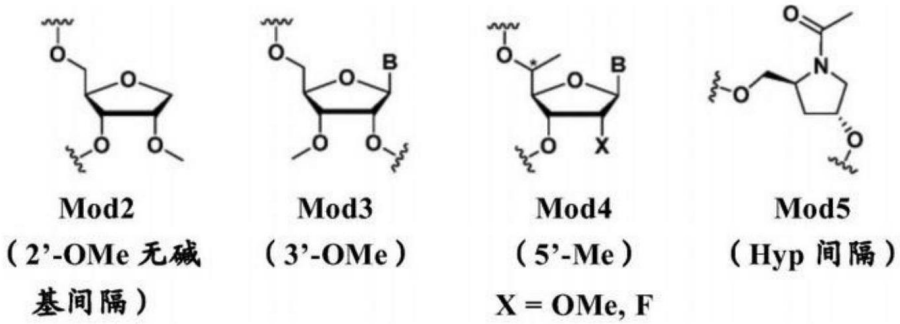
[0392] 已经发现，具有反义链的dsRNA在反义链从5’端开始计数的前9个核苷酸位置内包含至少一个双链体的热不稳定的修饰，具有降低的脱靶基因沉默活性。因此，在一些实施方式中，反义链在反义链的5’区域的前9个核苷酸位置内包含至少一个(例如，一个、两个、三个、四个、五个或更多)热不稳定的修饰的双链体。在一些实施方式中，一个或多个热不稳定的修饰的双链体位于反义链5’端的位置2-9，如位置4-8。在一些进一步的实施方式中，双连体的热不稳定的修饰位于反义链5’端的位置6、7或8。在又一些进一步的实施方式中，双链体的热不稳定的修饰位于反义链5’端的位置7。在一些实施方式中，双链体的热不稳定的修饰位于反义链5’端的位置2、3、4、5或9。

[0393] 热不稳定的修饰可以包括但不限于无碱基修饰;与相反链中的相反核苷酸的错配;和糖修饰，例如2’-脱氧修饰或无环核苷酸，例如，非锁核酸(UNA)或二醇核酸(GNA)。

[0394] 示例性的无碱基修饰包括但不限于以下：

[0395] 

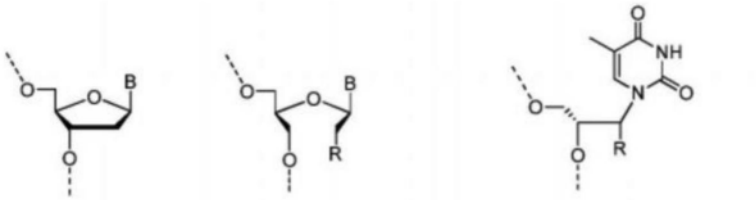
[0396] 其中R＝H、Me、Et或OMe;R’＝H、Me、Et或OMe;R”＝H、Me、Et或OMe

[0397] 

[0398] 其中B是修饰的或未修饰的核碱基。

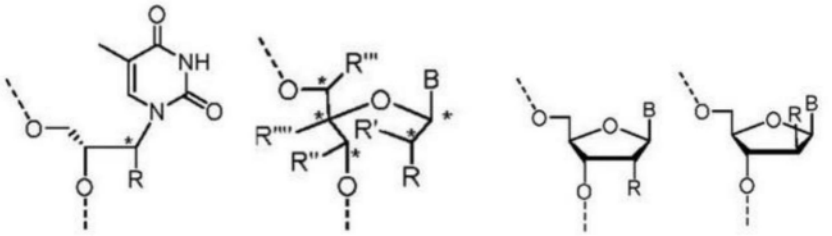
[0399] 示例性的糖修饰包括但不限于以下：

[0400]



2'-脱氧　　非锁核酸　　二醇核酸

R = H，OH，O-烷基　R = H，OH，O-烷基



乙二醇核酸　　非锁核酸　　R = H，甲基，乙基

R = H，OH，O-烷基

[0401]

R = H，OH，CH_3，CH_2CH_3，O-烷基，NH_2，NHMe，NMe_2

R' = H，OH，CH_3，CH_2CH_3，O-烷基，NH_2，NHMe，NMe_2

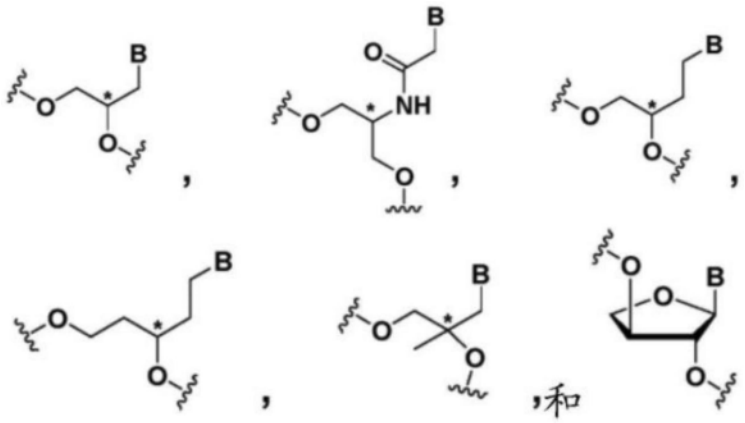
R'' = H，OH，CH_3，CH_2CH_3，O-烷基，NH_2，NHMe，NMe_2

R''' = H，OH，CH_3，CH_2CH_3，O-烷基，NH_2，NHMe，NMe_2

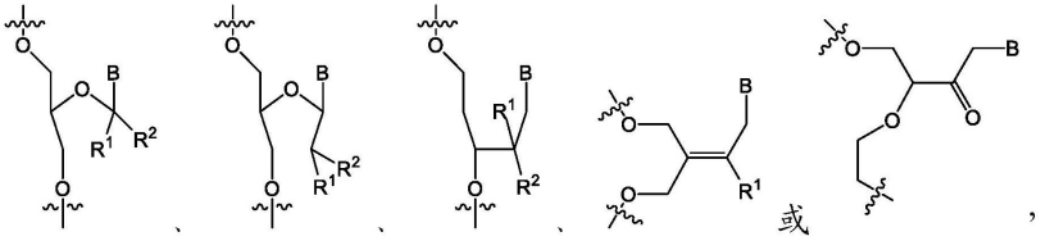
R'''' = H，OH，CH_3，CH_2CH_3，O-烷基，NH_2，NHMe，NMe_2

[0402] 其中B是修饰的或未修饰的核碱基。

[0403] 在一些实施方式中，双链体的热不稳定性修饰选自以下：

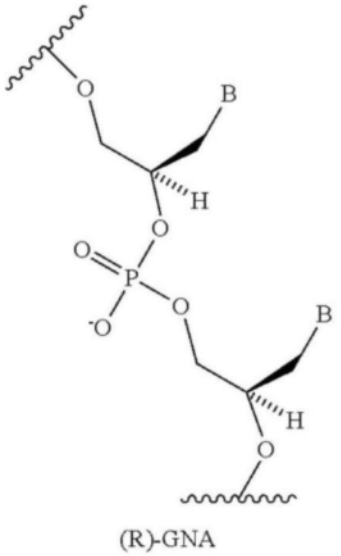
[0404] 

[0405] 其中B是修饰或未修饰的核碱基并且每个结构上的星号代表R、S或外消旋体。

[0406] 术语“无环核苷酸”指具有无环核糖的任何核苷酸，例如，其中核糖碳之间的任何键(例如，C1’-C2’、C2’-C3’、C3’-C4’、C4’-O4’、或C1’-O4’)不存在或至少有一个核糖碳或氧(例如，C1’、C2’、C3’、C4’或O4’)独立地或组合地不存在于核苷酸中。在一些实施方式中，无环核苷酸是 

其中B是修饰或未修饰的核碱基，R^1和R^2独立地是H、卤素、OR_3或烷基；R_3是H、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖)。无环衍生物在不影响Watson-Crick配对的情况下提供了更大的主链柔性。无环核苷酸可以通过2’-5’或3’-5’键连接。

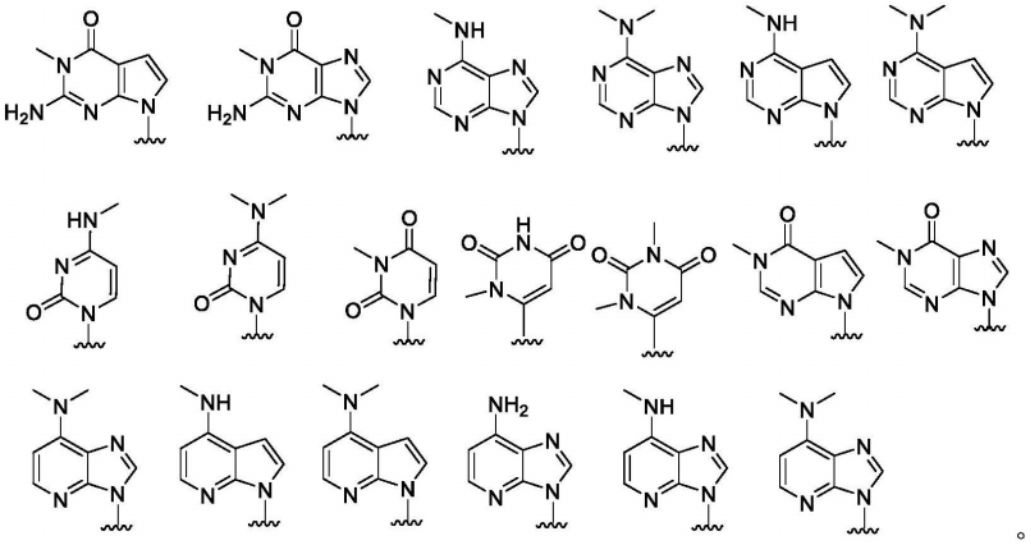
[0407] 术语“GNA”指二醇核酸，其是一种类似于DNA或RNA的聚合物，但其“主链”的组成不同，它由通过磷酸二酯键连接的重复甘油单元组成：

[0408] 

[0409] 双链体的热不稳定的修饰可以是热不稳定的核苷酸与dsRNA双链体中相反链中的相反核苷酸之间的错配(即非互补碱基对)。示例性错配碱基对包括G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T、U:T或其组合。本领域已知的其他错配碱基对也适用于本发明。

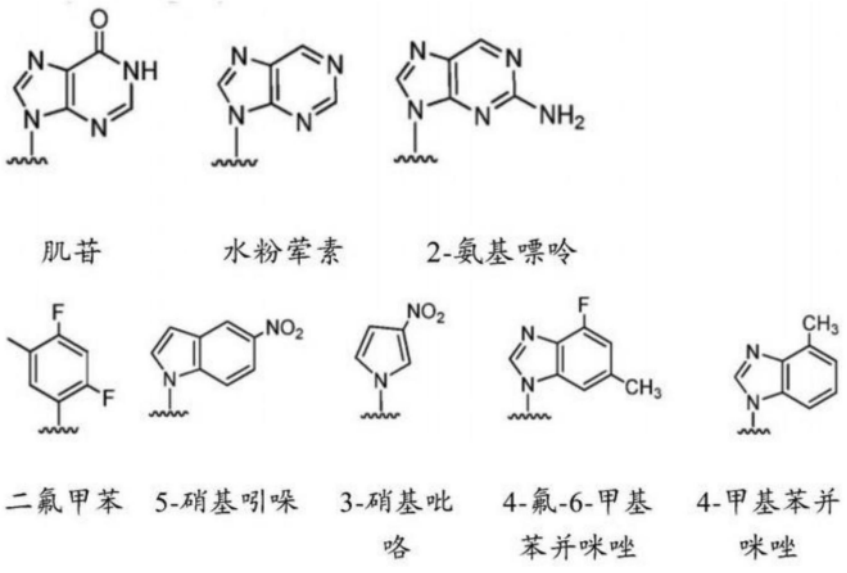
错配可以发生在天然存在的核苷酸或修饰的核苷酸的核苷酸之间，即错配碱基对可以发生在来自各个核苷酸的核碱基之间，而与核苷酸的核糖上的修饰无关。在某些实施方式中，dsRNA分子在错配对中包含至少一个核碱基，即2'-脱氧核碱基；例如2'-脱氧核碱基位于有义链中。

[0410] 在一些实施方式中，反义链的种子区中双链体的热不稳定的修饰包括与靶mRNA上的互补碱基的Watson-Crick氢键合受损的核苷酸，例如：

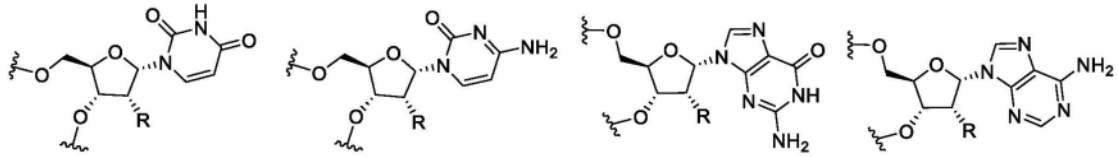
[0411] 

[0412] 无碱基核苷酸、无环核苷酸修饰(包括UNA和GNA)和错配修饰的更多例子已在WO 2011/133876中详细描述，其通过引用整体并入本文。热不稳定的修饰还可以包括通用碱基，其与相对碱基形成氢键的能力降低或消除，以及磷酸修饰。

[0413] 在一些实施方式中，双链体的热不稳定的修饰包括具有非标准碱基的核苷酸，例如但不限于具有受损或完全消除与相反连中碱基形成氢键能力的核碱基修饰。如WO 2010/0011895中所述，已经评估了这些核碱基修饰对dsRNA双链体的中心区域的去稳定化，其通过引用整体并入本文。示例性核碱基修饰是：

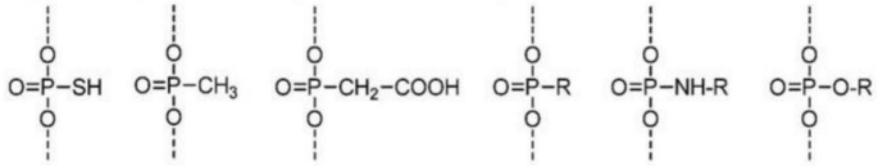
[0414] 

[0415] 在一些实施方式中，反义链的种子区中双链体的热不稳定的修饰包括与靶mRNA上碱基互补的一个或多个α-核苷酸，如：

[0416] 

[0417] 其中R是H、OH、OCH_3、F、NH_2、NHMe、NMe_2或O-烷基。

[0418] 与天然磷酸二酯键相比，已知会降低dsRNA双链体的热稳定性的示例性磷酸修饰是：

[0419] 

R＝烷基

[0420] R基团的烷基可以是C_1-C_6烷基。R基团的具体烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基和己基。

[0421] 如本领域技术人员将认识到的，鉴于核碱基的功能作用是定义本公开的RNAi剂的特异性，虽然核碱基修饰可以如本文所述的各种方法进行，例如以将去稳定化修饰引入本公开的RNAi剂，例如为了相对于脱靶效应增强给靶效应，对于非核碱基修饰，例如对多核糖核苷酸的糖基或磷酸主链的修饰，可用且通常存在于本公开的RNAi剂上的修饰范围往往更大。此类修饰在本公开的其他部分中进行了更详细的描述，并且明确考虑了本公开的RNAi剂，其具有天然核碱基或如上文或本文其他地方所述的修饰的核碱基。

[0422] 除了包含热不稳定的修饰的反义链，dsRNA还可以包含一个或多个稳定修饰。例如，dsRNA可以包含至少两个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)稳定修饰。没有限制，稳定修饰都可以存在于一条链中。在一些实施方式中，有义链和反义链都包含至少两个稳定修饰。稳定修饰可以发生在有义链或反义链的任何核苷酸上。例如，稳定修饰可以发生在有义链或反义链上的每个核苷酸上；每个稳定修饰可以以交替模式发生在有义链或反义链上；或有义链和反义链都包含交替模式的稳定修饰。有义链上的稳定修饰的交替模式可以与反义链上稳定修饰的交替模式相同或不同，并且有义链上的稳定修饰的交替模式可以相对于反义链上的稳定修饰的交替模式有偏移。

[0423] 在一些实施方式中，反义链包含至少两个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)稳定修饰。没有限制，反义链中的稳定修饰可以存在于任何位置。在一些实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、6、8、9、14和16处的稳定修饰。在一些其他实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、6、14和16处的稳定修饰。在又一些其他实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、14和16处的稳定修饰。

[0424] 在一些实施方式中，反义链包含至少一个与去稳定化修饰相邻的稳定修饰。例如，稳定修饰可以是去稳定化修饰的5’端或3’端的核苷酸，即从去稳定化修饰的位置开始-1或+1位的核苷酸。在一些实施方式中，反义链在去稳定化修饰的5’端和3’端中的每一处包含稳定修饰，即从去稳定化修饰的位置开始-1和+1。

[0425] 在一些实施方式中，反义链在去稳定化修饰的3’端包含至少两个稳定修饰，即在去稳定化修饰位置的+1和+2位。

[0426] 在一些实施方式中，有义链包含至少两个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)稳定修饰。没有限制，有义链中的稳定修饰可以存在于任何位置。在一些实施方式中，有义链包含从5’端开始的位置7、10和11处的稳定修饰。在一些其他实施方式中，有义链包含从5’端开始的位置7、9、10和11处的稳定修饰。在一些实施方式中，有义链包含与从反义链的5’端开始计数的反义链的第11、12和15位相反或互补的位置处的稳定修饰。在一些其他实施方式中，有义链包含与反义链上从反义链的5’端开始计数的第11、12、13和15位相反或互补的位置处的稳定修饰。在一些实施方式中，有义链包含一组两个、三个或四个稳定修饰。

[0427] 在一些实施方式中，有义链在与反义链中双链体的热不稳定的修饰相反或互补的位置不包含稳定修饰。

[0428] 示例性的热稳定修饰包括但不限于2’-氟修饰。其他热稳定修饰包括但不限于LNA。

[0429] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA包含至少四个(例如，四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)2’-氟核苷酸。没有限制，2’-氟核苷酸都可以存在于一条链中。在一些实施方式中，有义链和反义链都包含至少两个2’-氟核苷酸。2’-氟修饰可以发生在有义链或反义链的任何核苷酸上。例如，2’-氟修饰可以发生在有义链或反义链上的每个核苷酸;每个2’-氟修饰可以以交替模式发生在有义链或反义链上;或有义链或反义链都包含交替模式的2’-氟修饰。有义链上的2’-氟修饰的交替模式可以与反义链上稳定修饰的交替模式相同或不同，并且有义链上的2’-氟修饰的交替模式可以相对于反义链上的2’-氟修饰的交替模式有偏移。

[0430] 在一些实施方式中，反义链包含至少两个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)2’-氟修饰。没有限制，反义链中的2’-氟修饰可以存在于任何位置。在一些实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、6、8、9、14和16处的2’-氟修饰。在一些实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、6、14和16处的2’-氟修饰。在又一些其他实施方式中，反义包含从5’端开始的位置2、14和16处的2’-氟修饰。

[0431] 在一些实施方式中，反义链包含至少一个与去稳定化修饰相邻的2’-氟修饰。例如，2’-氟修饰核苷酸可以是去稳定化修饰的5’端或3’端的核苷酸，即从去稳定化修饰的位置开始-1或+1位的核苷酸。在一些实施方式中，反义链在去稳定化修饰的5’端和3’端中的每一处包含2’-氟核苷酸，即从去稳定化修饰的位置开始-1和+1。

[0432] 在一些实施方式中，反义链在去稳定化修饰的3’端包含至少两个2’-氟核苷酸，即在去稳定化修饰的+1和+2位。

[0433] 在一些实施方式中，有义链包含至少两个(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多)2’-氟核苷酸。没有限制，有义链中的2’-氟修饰可以存在于任何位置。在一些实施方式中，反义包含从5’端开始的位置7、10和11的2’-氟核苷酸。在其他实施方式中，有义链包含从5’端开始的位置7、9、10和11的2’-氟核苷酸。在一些实施方式中，有义链包含与从反义链的5’端开始计数的反义链的第11、12和15位相反或互补的位置处的2’-氟核苷酸。在一些其他实施方式中，有义链包含与从反义链的5’端开始计数的反义链的第11、12、13和15位相反或互补的位置处的2’-氟核苷酸。在一些实施方式中，有义链包含一组两个、三个或四个2’-氟核苷酸。

[0434] 在一些实施方式中，有义链在与反义链中双链体的热不稳定的修饰相反或互补的位置不包含2'-氟核苷酸。

[0435] 在其他实施方式中，本公开的dsRNA分子包含21个核苷酸(nt)的有义链和23个核苷酸(nt)的反义链，其中反义链包含至少一个热不稳定的核苷酸，其中至少一个热不稳定的核苷酸出现在反义链的种子区(即，反义链的5'端的位置2-9)，其中dsRNA的一端是平端的，而另一端包含2nt突出端，并且其中dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如，一种、两种、三种、四种、五种、六种或所有七种)：(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰；(ii)反义包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(iii)有义链与配体缀合；(iv)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰；(v)有义链包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(vi)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰；和(vii)dsRNA在反义链的5'端包含平端。优选地，2nt突出端在反义的3'端。

[0436] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子包含有义链和反义链，其中：有义链长度为25-30个核苷酸残基，其中从5'端核苷酸(位置1)开始，所述有义链的位置1至23包含至少8个核糖核苷酸；反义链的长度为36-66个核苷酸残基，并且从3'端核苷酸开始，在与有义链的位置1-23配对的位置上至少有8个核糖核苷酸形成双链体；其中反义链的至少3'端核苷酸与有义链不配对，并且多达6个连续的3'端核苷酸与有义链不配对，从而形成1-6个核苷酸的3'单链突出端；其中反义链的5'端包含10-30个不与有义链配对的连续核苷酸，从而形成10-30个核苷酸的单链5'突出端；其中当有义链和反义链对齐以获得最大互补性时，至少有义链5'端和3'端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对，从而在有义链和反义链之间形成基本上双链的区域；并且反义链与反义链的至少19个核糖核苷酸的靶RNA充分互补，以在将双链核酸引入哺乳动物细胞时降低靶基因表达；并且其中反义链包含至少一个热不稳定的核苷酸，其中至少一个热不稳定的核苷酸在反义链的种子区(即在反义链的5'端的位置2-9)。例如，热不稳定的核苷酸出现在与有义链5'端的位置14-17相反或互补的位置之间，并且其中dsRNA任选地还具有一下特征的至少一个(例如，一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个)：(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰；(ii)反义包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(iii)有义链与配体缀合；(iv)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰；(v)有义链包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；和(vi)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰；以及(vii)dsRNA包含长度为12-30个核苷酸对的双链体区域。

[0437] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA包含有义链和反义链，其中所述dsRNA分子包含长度为至少25个且至多29个核苷酸的有义链和长度为至多30个核苷酸的反义链，其中有义链包含在位置11处(从5'端)易受酶降解影响的修饰核苷酸，其中所述有义链的3'端和所述反义链的5'端形成平端，并且所述反义链在其3'端比有义链长1-4个核苷酸，其中长度为至少25个核苷酸的双链体区域，并且所述反义链与沿着所述反义链长度的至少19nt的靶mRNA充分互补，以在将所述dsRNA分子引入哺乳动物细胞时降低靶基因表达，并且其中所述dsRNA的二聚体切割优先产生包含所述反义链的所述3'端的siRNA，从而降低哺乳动物中靶基因的产生，其中反义链包含至少一个热不稳定的核苷酸，其中所述至少一个热不稳定的核苷酸在反义链的种子区(即在反义链的5'端的位置2-9)，并且其中所述dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如，一种、两种、三种、四种、五种、六种或全部七种)：(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰；(ii)反义包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键；(iii)

有义链与配体缀合;(iv)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰;(v)有义链包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;和(vi)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰;并且(vii)dsRNA具有长度为12-29个核苷酸对的双链体区域。

[0438] 在一些实施方式中,dsRNA分子的有义链和反义链上的每个核苷酸都可以被修饰。每个核苷酸可以用相同或不同的修饰进行修饰,该修饰可以包括非连接磷酸氧中的一种或两种或一种或多种链接磷酸氧的一种或多种改变;改变喝汤的成分,例如核糖上的2'羟基;用"去磷酸"接头大量替换磷酸部分;天然碱基的修饰或替换;以及核糖-磷酸主链的替换或修饰。

[0439] 由于核酸是亚基的聚合物,许多修饰发生在核酸内重复的位置,例如碱基或磷酸部分的修饰,或磷酸部分的非连接O。在一些情况下,修饰将发生在核酸中的所有位置,但在许多情况下不会。例如,修饰可能仅发生在3'或5'末端位置,可能仅发生在末端区域,例如一条链的末端核苷酸上的位置或最后2、3、4、5或10个核苷酸。修饰可能发生在双链区,单链区域或两者。修饰可能仅发生在RNA的双链区,也可能发生在RNA的单链区域。例如,在非连接O位置的硫代磷酸酯修饰可能仅发生在一个或两个末端,可能仅发生在末端区域,例如一条链的末端核苷酸位置或最后2、3、4、5或10个核苷酸,或可能发生在双链和单链区域,特别是在末端。5'端或末端可以被磷酸化。

[0440] 例如,可以提高稳定性,在突出端包括特定碱基,或在单链突出端,例如在5'或3'突出端或两者中包含修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,可能需要在突出端包含嘌呤核苷酸。在一些实施方式中,3'或5'突出端中的所有或一些碱基可以被修饰,例如用本文所述的修饰。修饰可以包括例如在核糖的2'位使用本领域已知的修饰,例如使用脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修饰而不是核碱基的核糖,以及磷酸基团的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出端不需要与靶序列同源。

[0441] 在一些实施方式中,有义链和反义链的每个残基独立地被锁定核酸(LNA)、非锁核酸(UNA)、环己烯核酸(CeNA)、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧或2'-氟。该链可以包含一种以上的修饰。在一些实施方式中,有义链和反义链的每个残基独立地被2'-O-甲基或2'-氟修饰。应当理解,这些修饰是对反义链中存在的双链体的至少一种热不稳定的修饰的补充。

[0442] 有义链和反义链上通常存在至少两种不同修饰。这两种修饰可以是2'-脱氧、2'-O-甲基或2'-氟修饰、无环核苷酸或其他。在一些实施方式中,有义链和反义链各自包含选自2'-O-甲基或2'-脱氧的两种不同修饰的核苷酸。在一些实施方式中,有义链和反义链各自独立地被2'-O-甲基核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)核苷酸、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)核苷酸、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)核苷酸或2'-氮杂-F核苷酸。同样,应理解这些修饰是对反义链中存在的双链体的至少一种热不稳定的修饰的补充。

[0443] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA包含交替模式的修饰,特别是在B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'区域。如在本文中所使用的术语"交替基序"或"交替模式"指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰发生在一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可以指每一个其他核苷酸一个或每三个核苷酸一个,或类似的模式。例如,如果A、B和C分别代表对核苷酸的一个修饰,则交替基序可以是"ABABABABABAB…"、"AABBAABBAABB…"、"AABAABAABAAB…"、

“AAABAAABAAAB…”、“AAABBBAAABBB…”或“ABCABCABCABC…”等。

[0444] 交替基序中包含的修饰类型可以是相同的或不同的。例如，如果A、B、C、D各自代表核苷酸上的一个修饰，则交替模式，即每隔一个核苷酸上的修饰可能是相同的，但每个有义链或反义链都可以从交替基序内的几种修饰可能性中选择，例如“ABABAB…”、“ACACAC…”、“BDBDBD…”、或“CDCDCD…”等。

[0445] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子包含相对于反义链上交替基序的修饰模式移位的有义链上交替基序的修饰模式。该移位可以使得有义链的修饰的核苷酸组对应于反义链的不同修饰的核苷酸组，反之亦然。例如，当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时，有义链中的交替基序可以从链的5’-3’开始以“ABABAB”开始并且反义链中的交替基序可以从双链体区域内的3’-5’开始的“BABABA”开始。作为另一个例子，有义链中的交替基序可以从链的5’-3’开始以“AABBAABB”开始并且反义链中的交替基序可以从双链体区域内的3’-5’开始以“BBAABBAA”开始，使得有义链和反义链之间的修饰模式发生了完全或部分移位。

[0446] 本公开的dsRNA还包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰可以发生在有义链或反义链的任何核苷酸上或在链的任何位置上。例如，核苷酸间键修饰可以发生在有义链或反义链的每个核苷酸上；每个核苷酸间键修饰可以发生在有义链或反义链上以交替模式发生；或有义链或反义链包含交替模式的两个核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同，并且有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式相对于反义链上核苷酸间键修饰的交替模式可以有移位。

[0447] 在一些实施方式中，dsRNA分子在突出端区域上包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如，突出端区域包含具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个核苷酸。也可以进行核苷酸间键修饰以将突出端核苷酸与双链体区域内的末端配对核苷酸连接。例如，至少2、3、4或所有突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接，并且任选地，可以存在额外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键将突出端核苷酸与紧邻突出端核苷酸的配对核苷酸连接。例如，末端三个核苷酸之间可能存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键，其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸，并且第三个是紧邻突出端核苷酸的配对核苷酸。优选地，这些末端三个核苷酸可以在反义链的3’端。

[0448] 在一些实施方式中，dsRNA分子的有义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个磷酸核苷酸间键隔开的两个至十个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的1-10个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述有义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0449] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个磷酸核苷酸间键隔开的两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述有义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0450] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15或16个磷酸核苷酸间键隔开的三个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0451] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个磷酸核苷酸间键隔开的四个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0452] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个磷酸核苷酸间键隔开的五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0453] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个磷酸核苷酸间键隔开的五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0454] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5、6、7或8个磷酸核苷酸间键隔开的七个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0455] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3、4、5或6个磷酸核苷酸间键隔开的八个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0456] 在一些实施方式中，dsRNA分子的反义链包含由1、2、3或4个磷酸核苷酸间键隔开的九个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段，其中硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键之一位于寡核苷酸序列中的任何位置，并且所述反义链与包含硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酸酯核苷酸间键的任意组合的反义链或包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯或磷酸酯键的反义链配对。

[0457] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA还包含在有义链或反义链的末端位置的1-10处的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸可以通过有义链或反义链的一端或两端的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键相连。

[0458] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子还包含在每条有义链或反义链的双链体

的内部区域的1-10位内的一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸可以通过双链体区域从有义链的5′端开始计数的位置8-16处的硫代磷酸酯甲基膦酸酯核苷酸间键连接；dsRNA分子可以任选地在末端位置1-10处进一步包含一个或多个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。

[0459] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰和有义链从5’端开始计数的位置18-23内的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的1和2位以及18-23位的一至五个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。

[0460] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和在位置18-23内的一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰以及位置18-23内的两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。

[0461] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0462] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0463] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0464] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0465] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0466] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0467] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰，以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0468] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的

位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0469] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0470] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1-5内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置18-23内的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0471] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置20和21处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0472] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置20和21处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0473] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21和22处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0474] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21和22处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0475] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置22和23处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0476] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子进一步包含在有义链从5’端开始计数的位置1处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置21处的一个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,以及在反义链从5’端开始计数的位置1和2处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰和位置23和23处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0477] 在一些实施方式中,本公开的化合物包含主链手性中心的模式。在一些实施方式中,主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少5个核苷酸间键。在一些实施方式中,主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少6个核苷酸间键。在一些实施方式中,主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少7个核苷酸间键。在一些实施方式中,主链手性中心的

共同模式在Sp构型中包含至少8个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少9个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少10个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少11个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少12个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少13个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少14个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少15个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少16个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少17个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少18个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Sp构型中包含至少19个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过8个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过7个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过6个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过5个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过4个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过3个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过2个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式在Rp构型中包含不超过1个核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过8个非手性的核苷酸间键(作为非限制性实施例，磷酸二酯)。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过3个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过2个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含不超过1个非手性的核苷酸间键.在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少10个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过8个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少11个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过7个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少12个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少13个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过6个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少14个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过5个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，主链手性中心的共同模式包含至少15个Sp构型的核苷酸间键，以及不超过4个非手性的核苷酸间键。在一些实施方式中，Sp构型中的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。在一些实施方式中，Rp构型中的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。在一些实施方式中，非手性的核苷酸间键任选地是连续的或不连续的。

[0478] 在一些实施方式中，本公开的化合物包含嵌段是立体化学嵌段。在一些实施方式中，嵌段是Rp嵌段，因为该嵌段的每个核苷酸间键是Rp。在一些实施方式中，5’嵌段是Rp嵌

段。在一些实施方式中,3’嵌段是Rp嵌段。在一些实施方式中,嵌段是Sp嵌段,因为该嵌段的每个核苷酸间键是Sp。在一些实施方式中,5’嵌段是Sp嵌段。在一些实施方式中,3’嵌段是Sp嵌段。在一些实施方式中,提供的寡核苷酸包含Rp和Sp嵌段。在一些实施方式中,提供的寡核苷酸包含一个或多个Rp但不包含Sp嵌段。在一些实施方式中,提供的寡核苷酸包含一个或多个Sp但不包含Rp嵌段。在一些实施方式中,提供的寡核苷酸包含一个或多个PO嵌段,其中每个核苷酸间键为天然磷酸键。

[0479] 在一些实施方式中,本公开的化合物包含5’嵌段是Sp嵌段,其中每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,5’嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是修饰的核苷酸间键并且每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,5’嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯间键并且每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,5’嵌段包含4个或更多个核苷单元。在一些实施方式中,5’嵌段包含5个或更多个核苷单元。在一些实施方式中,5’嵌段包含6个或更多个核苷单元。在一些实施方式中,5’嵌段包含7个或更多个核苷单元。在一些实施方式中,3’嵌段是Sp嵌段,其中每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,3’嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是修饰的核苷酸并且每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,3’嵌段是Sp嵌段,其中每个核苷酸间键是硫代磷酸酯间键并且每个糖部分包含2’-F修饰。在一些实施方式中,3’嵌段包含4个或更多个核苷单元。在一些实施方式中,3’嵌段包含5个或更多个核苷单元在一些实施方式中,3’嵌段包含6个或更多个核苷单元在一些实施方式中,3’嵌段包含7个或更多个核苷单元。

[0480] 在一些实施方式中,本公开的化合物在区域中包含一种类型的核苷酸或寡核苷酸后接特定类型的核苷酸间键,例如天然磷酸键、修饰的核苷酸间键、Rp手性核苷酸间键、Sp手性核苷酸间键等。在一些实施方式中,A之后是Sp。在一些实施方式中,A之后是Rp。在一些实施方式中,A之后是天然磷酸酯键(PO)。在一些实施方式中,U之后是Sp。在一些实施方式中,U之后是Rp。在一些实施方式中,U之后是天然磷酸酯键(PO)。在一些实施方式中,C之后是Sp。在一些实施方式中,C之后是Rp。在一些实施方式中,C之后是天然磷酸酯键(PO)。在一些实施方式中,G之后是Sp。在一些实施方式中,G之后是Rp。在一些实施方式中,G之后是天然磷酸酯键(PO)。在一些实施方式中,C和U之后是Sp。在一些实施方式中,C和U之后是Rp。在一些实施方式中,C和U之后是天然磷酸酯键(PO)。在一些实施方式中,A和G之后是Sp。在一些实施方式中,A和G之后是Rp。

[0481] 在一些实施方式中,反义链在核苷酸位置21和22之间以及核苷酸位置22和23之间包含硫代磷酸核苷酸间键,其中反义链包含位于反义链的种子区域(即,反义链5’端的位置2-9)的双链体的至少一个热不稳定的修饰,并且其中dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如,一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或所有八种):(i)反义包含2、3、4、5或6个2’-氟修饰;(ii)反义包含3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)有义链与配体缀合;(iv)有义链包含2、3、4或5个2’-氟修饰;(v)有义链包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)dsRNA包含至少四个2’-氟修饰;(vii)dsRNA包含长度为12-40个核苷酸对的双链体区域;以及(viii)dsRNA在反义链的5’端有一个平端。

[0482] 在一些实施方式中,反义链包含核苷酸位置1和2之间、核苷酸位置2和3之间、核苷酸位置21和22之间、和核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链包含位于反义链的种子区域(即,反义链5’端的位置2-9)的双链体的至少一个热不稳定的修饰,

并且其中dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如,一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或所有八种):(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰;(ii)有义链与配体缀合;(iii)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰;(iv)有义链包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(v)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰;(vi)dsRNA包含长度为12-40个核苷酸对的双链体区域;(vii)dsRNA包含长度为12-40个核苷酸对的双链体区域;以及(viii)dsRNA在反义链的5'端有一个平端。

[0483] 在一些实施方式中,有义链在核苷酸位置1和2之间以及核苷酸2和3之间包含硫代磷酸核苷酸间键,其中反义链包含位于反义链的种子区域(即,反义链5'端的位置2-9)的双链体的至少一个热不稳定的修饰,并且其中dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如,一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或所有八种):(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰;(ii)反义包含1、2、3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(iii)有义链与配体缀合;(iv)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰;(v)有义链包含3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(vi)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰;(vii)dsRNA包含长度为12-40个核苷酸对的双链体区域;以及(viii)dsRNA在反义链的5'端有一个平端。

[0484] 在一些实施方式中,有义链包含核苷酸位置1和2之间和核苷酸位置2和3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,反义链包含核苷酸位置1和2之间、核苷酸位置2和3之间、核苷酸位置21和22之间、和核苷酸位置22和23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中反义链包含位于反义链的种子区域(即,反义链5'端的位置2-9)的双链体的至少一个热不稳定的修饰,并且其中dsRNA任选地还具有以下特征中的至少一种(例如,一种、两种、三种、四种、五种、六种或所有七种):(i)反义包含2、3、4、5或6个2'-氟修饰;(ii)有义链与配体缀合;(iii)有义链包含2、3、4或5个2'-氟修饰;(iv)有义链包含3、4或5个硫代磷酸酯核苷酸间键;(v)dsRNA包含至少四个2'-氟修饰;(vi)dsRNA包含长度为12-40个核苷酸对的双链体区域;以及(vii)dsRNA在反义链的5'端有一个平端。

[0485] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子包含与靶点、双链体内或其组合的错配。错配可以发生在突出端区域或双链体区。碱基对可以根据它们促进解离或熔化的倾向进行排序(例如,根据特定配对的结合或解离自由能,最简单的方法是在单个配对的基础上检查配对,尽管也可以使用下一个相邻或类似的分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例如非标准或不同于标准的配对(如本文别处所述)优于标准(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于标准配对。

[0486] 在一些实施方式中,本公开的dsRNA分子包含独立地选自以下组的反义链5'端的双链体区域内的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个:A:U、G:U、I:C,和错配对,例如非标准或不同于标准的配对或包含通用碱基的配对,以促进反义链在双链体5'端的解离。

[0487] 在一些实施方式中,从反义链5'端开始的双链体区域内的1位核苷酸选自A、dA、dU、U和dT。或者,从反义链的5'端开始的双链体区域内的第1、2或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从反义链的5'端开始的双链体区域内的第一对碱基对是AU碱基对。

[0488] 发现在单链或双链寡核苷酸的任意位置的的二核苷酸的磷酸二酯(PO)、硫代磷酸酯(PS)或二硫代磷酸酯(PS2)键的3'端引入4'-修饰或5'-修饰核苷酸,均可以对核苷酸间键产生空间效应,因此保护或稳定它免受核酸酶的影响。在一些实施方式中,将4'-修饰或5'-修饰的核苷酸引入二核苷酸的PO、PS或PS2键的3'-末端会修饰二核苷酸对中的第二个

核苷酸。在其他实施方式中，将4’-修饰或5’-修饰的核苷酸引入二核苷酸的PO、PS或PS2键的3’-末端会修饰二核苷酸对3’-末端的核苷酸。

[0489] 在一些实施方式中，将5’修饰的核苷引入到单链或双链siRNA的任意位置的二核苷酸的3’端。例如，一个5’-烷基化核苷可以被引入到单链或双链siRNA的任意位置的二核苷酸的3’端。核糖5’位置的烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的5’-烷基化核苷是5’-甲基核苷。5’-甲基可以是外消旋体或手性纯R或S异构体。

[0490] 在一些实施方式中，将4’修饰的核苷引入到单链或双链siRNA的任意位置的二核苷酸的3’端。例如，一个4’-烷基化核苷可以被引入到单链或双链siRNA的任意位置的二核苷酸的3’端。核糖4”位置的烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的4’-烷基化核苷是4”-甲基核苷。4’-甲基可以是外消旋体或手性纯R或S异构体。或者，一个4’-O-烷基化核苷可以引入到单链或双链siRNA的任意位置的二核苷酸的3’端。核糖的4’-O-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的4’-O-烷基化核苷是4’-O-甲基核苷。4’-O-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0491] 在一些实施方式中，将5’-烷基化核苷引入到dsRNA的有义链或反义链的任意位置，并且这样的修饰保持或提高了dsRNA的效力。5’-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的5’-烷基化核苷是5’-甲基核苷。5’-甲基可以是外消旋体或手性纯R或S异构体。

[0492] 在一些实施方式中，将4’-烷基化核苷引入到dsRNA的有义链或反义链的任意位置，并且这样的修饰保持或提高了dsRNA的效力。4’-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的4’-烷基化核苷是4’-甲基核苷。4’-甲基可以是外消旋体或手性纯R或S异构体。

[0493] 在一些实施方式中，将4’-O-烷基化核苷引入到dsRNA的有义链或反义链的任意位置，并且这样的修饰保持或提高了dsRNA的效力。5’-烷基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。示例性的4’-O-烷基化核苷是4’-O-甲基核苷。4’-O-甲基可以是外消旋或手性纯R或S异构体。

[0494] 在一些实施方式中，本公开的dsRNA分子可以包含2’-5’间键(具有2’-H、2’-OH和2’-OMe并且具有P＝O或P＝S)。例如，2’-5’键修饰可用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合，或可用于有义链5’端以避免有义链RISC激活。

[0495] 在另一个实施方式中，本公开的dsRNA分子可以包含L糖(例如，具有2’-H、2’-OH和2’-OMe的L核糖、L-阿拉伯糖)。例如，这些L糖修饰可用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合，或可用于有义链5’端以避免有义链RISC激活。

[0496] 各种出版物描述了都可以与本公开的dsRNA一起使用的多聚体siRNA。这样的出版物包括WO2007/091269、US 7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887和WO2011/031520，其在此全部并入。

[0497] 如下文更详细描述的，包含一种或多种碳水化合物部分与RNAi剂的缀合的RNAi剂可以优化RNAi剂的一种或多种性质。在许多情况下，碳水化合物部分将连接到RNAi剂的修饰亚基上。例如，dsRNA剂的一个或多个核糖核苷酸亚基的核糖可以被另一个部分替代，例如连接有碳水化合物配体的非碳水化合物(例如，环状)载体。其中亚基的荷塘已被如此替换的核糖核苷酸亚基在本文中称为核糖置换修饰亚基(RRMS)。环状载体可以是碳环系统，

即所有环原子是碳原子,或杂环系统,即一个或多个环原子可以是杂原子,例如氮、氧、硫。环状载体可以是单环系统、或可以包含两个或更多环,例如稠合环。该环状载体可以是完全饱和的环系统,或者它可以包含一个或多个双键。

[0498] 配体可以通过载体与多核苷酸连接。载体包括(i)至少一个"主链连接点",优选地两个"主链连接点"和(ii)至少一个"束缚连接点"。如在本文中所使用的"主链连接点"指官能团,例如羟基,或通常是可用于并适用于将载体掺入到主链中的键,例如核糖核酸的磷酸酯、或修饰的磷酸酯,例如含硫的主链。"栓系连接点"(TAP)在一些实施方式中指连接选定部分的环状载体的组成还原自,例如碳原子或杂原子(不同于提供主链连接点的原子)。该部分可以是例如碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖和多糖。任选地,选定的部分通过插入系链连接至环状载体。因此,环状载体通常将包括官能团,例如氨基,或通常提供适合于结合或束缚的另一化学实体,例如配体至组成环的键。

[0499] RNAi剂可以通过载体与配体缀合,其中载体可以是环状基团或非环状基团;优选地,环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢萘基。无环基团选自丝氨醇主链或二乙醇胺主链。

[0500] 在某些特定实施方式中,用于本公开的方法的RNAi剂是选自表3-9中任一个所列剂的组的剂。这些剂可以进一步包含配体。

[0501] IV.与配体缀合的iRNA

[0502] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及将一个或多个配体、部分或缀合物与iRNA化学连接,这些配体、部分或缀合物增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,例如进入细胞。此类部分包括但不限于脂质部分,例如胆固醇部分(Letsinger等,Proc.Natl.Acid.Sci.USA,1989,86:6553-6556)、胆酸(Manoharan等,Biorg.Med.Chem.Let.,1994,4:1053-1060)、硫醚,例如,绿柱石-S-三苯基硫醇(Manoharan等,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306-309;Manoharan等,Biorg.Med.Chem.Let.,1993,3:2765-2770)、硫代胆固醇(Oberhauser等,Nucl.Acids Res.,1992,20:533-538)、脂肪链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等,EMBO J,1991,10:1111-1118;Kabanov等,FEBS Lett.,1990,259:327-330;Svinarchuk等,Biochimie,1993,75:49-54)、磷脂,例如,二十六烷基-外消旋甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-膦酸三乙基铵(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654;Shea等,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969-973)、或金刚烷乙酸(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229-237)、或十八胺或己氨基-羰氧基胆固醇部分(Crooke等,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923-937)。

[0503] 在某些实施方式中,配体改变它所掺入的iRNA剂的分布、靶向或寿命。在一些实施方式中,配体提供对选定靶标的增强的亲和力,例如分子、细胞或细胞类型、隔室、例如细胞或器官隔室、组织、器官或身体区域,例如与没有这种配体的物种相比。典型的配体不会参与双链核酸中的双链体配对。

[0504] 配体可以包括天然存在的物质,例如蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉、甲壳质、壳聚糖、菊粉、环糊精或

透明质酸)；或脂质。配体也可以是重组或合成分子，例如合成聚合物，例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的例子包括聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙醇酸)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物,N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物、或聚(L-丙交酯-共-乙醇酸)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的例子包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或α螺旋肽。

[0505] 配体还可以包括结合特定细胞类型例如肾细胞的靶向基团，例如细胞或组织靶向剂，例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白，例如抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、黏蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸脂、聚谷氨酸脂、聚天冬氨酸脂、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素或RGD肽或RGD肽模拟物。在某些实施方式中，配体是多价半乳糖，例如N-乙酰基-半乳糖胺。

[0506] 配体的其他离子包括染料、嵌入剂(例如，吖啶)、交联剂(例如，补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨卟啉、Sapphyrin)、多环芳烃(例如，吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如，EDTA)、亲脂性分子，例如胆固醇、单算、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基十六烷基、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)胆酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪)和肽缀合物(例如，触角肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如，PEG-40K)、mPEG、$[mPEG]_2$、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标记、酶、半抗原(例如，生物素)、转运/吸收促进剂(例如，阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如，咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑偶联物、四氮杂大环的Eu(3+)配合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0507] 配体可以是蛋白，例如糖蛋白、或肽，例如对共配体具有特定亲和力的分子，或抗体例如与特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体还可包括激素或激素受体。它们还可以包括非肽物质，例如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38 MAP激酶的激活剂或NF-κB的激活剂。

[0508] 配体可以是一种物质，例如药物，其可以增加iRNA剂进入细胞的摄取，例如通过破坏细胞的细胞骨架、例如通过破坏细胞的微管、微丝或中间丝。药物可以是例如分类单位、长春新碱、长春碱细胞松弛素、诺可达唑、安非他命、赤霉素A、鬼笔环肽、猪笼素A、吲达诺辛或肌黄蛋白。

[0509] 在一些实施方式中，如本文所述与iRNA连接的配体充当药物代谢动力学调节剂(pK调节剂)。PK调节剂包括亲脂性物质、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、多肽、蛋白结合剂、聚乙二醇(PEG)、维生素等。示例性PK调节剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬、维生素E、生物素等。还已知包含多个硫代磷酸酯间键的寡核苷酸与学清蛋白结合，因此在主链中包含多个硫代磷酸酯间键的短

寡核苷酸，例如约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸也适用于本发明作为配体(例如，PK调节配体)。此外，结合血清部分(例如，血清蛋白)的适配体也适用作本文所述实施方式中的PK调节剂。

[0510] 本发明的配体缀合iRNA可以通过使用具有悬垂反应性官能团的寡核苷酸来合成，例如源自连接分子在寡核苷酸上的连接(如下所述)。这种反应性寡核苷酸可以直接与市售配体、合成的带有多种保护基团的配体或具有与其连接的连接部分的配体反应。

[0511] 用于本发明缀合物的寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术方便地且常规地制备。用于这种合成的设备由多家供应商出售，包括例如Applied Biosystems® (Foster City,Calif.)。可以附加地或替代地使用本领域已知的用于此类合成的任何其他方式。还已知使用类似的技术来制备其他寡核苷酸，例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物。

[0512] 在本发明的配体缀合的寡核苷酸和带有序列特异性连接的配体分子的核苷中，寡核苷酸和寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体，或已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已经带有配体分子的配体-核苷酸或配体-缀合物前体、或带有非核苷配体的结构单元在合适的DNA合成仪上组装。

[0513] 当使用已经带有连接部分的核苷酸-缀合物前体时，同城完成序列特异性核苷的合成，然后配体分子与连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方式中，本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过自动化合成仪使用衍生自配体-核苷缀合物的亚磷酰胺以及可商购且常规用于寡核苷酸合成的标准亚磷酰胺或非标准亚磷酰胺合成。

[0514] A.脂质缀合物

[0515] 在某些实施方式中，配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子通常可以结合血清蛋白，例如人血清白蛋白(HSA)。HSA结合配体允许将缀合物分布到靶组织，例如身体的非肾靶组织。例如，靶组织可以是肝脏，包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可用作配体。例如，可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性，(b)增加靶向或转运至靶细胞或细胞膜中，或(c)可用于调节与学清蛋白的结合例如HSA。

[0516] 基于脂质的配体可用于调节例如控制(例如抑制)缀合物结合至靶组织。例如，与HSA更强结合的脂质或基于脂质的配体将不大可能靶向肾脏，并且因此不太可能从体内清除。与HSA结合较弱的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾脏。

[0517] 在某些实施方式中，基于脂质的配体结合HSA。例如，配体可以以足够的亲和力结合HSA，使得增强缀合物在非肾组织中的分布。然而，亲和力通常不会强到无法逆转HSA配体结合。

[0518] 在某些实施方式中，基于脂质的配体弱结合或根本不结合HSA，使得增强缀合物在肾脏中的分布。靶向肾细胞的其他部分也可用于替代或补充基于脂质的配体。

[0519] 在另一方面，配体是被靶向细胞例如增殖细胞摄取的部分，例如维生素。这些特别适用于治疗以不希望细胞增殖为特征的疾病，例如恶性或非恶性类型的疾病例如癌细胞。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括B族微生物，例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或安溪报吸收的其他维生素或营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0520] B.细胞渗透剂

[0521] 在另一方面中，配体是细胞渗透剂，例如螺旋细胞渗透剂。在某些实施方式中，剂是两亲性的。示例性剂是肽，例如tat或antennopedia。如果剂是肽，它可以被修饰，包括肽模拟物、转化体、非肽或假肽间键，以及D氨基酸的使用。螺旋剂通常是α-螺旋剂并且可以具有亲脂性和疏脂性相。

[0522] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(本文也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的确定的三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA剂的连接可以影响iRNA的药代动力学分布，例如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟物部分可以是约5-50个氨基酸长，例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0523] 肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽、或疏水肽(例如，主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、限制性肽或交联肽。在另一个备选方案中，肽部分可以包括疏水膜转位序列(MTS)。示例性的包含MTS的疏水性肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:9)的RFGF。包含疏水性MTS的RFGF类似物(例如，氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:12))也可以是靶向部分。肽部分可以是"递送"肽，它可以携带包括肽、寡核苷酸和蛋白在内的大极性分子穿过细胞膜。例如，已发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:353))和果蝇触角蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:354))的序列能够用作递送肽。肽或肽模拟物可以由DNA的随机序列编码，例如从噬菌体展示文库或单株一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等，Nature，354:82-84，1991)。通常，通过掺入的单体单元与dsRNA剂连接的肽或肽模拟物是细胞靶向肽，例如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度范围可以从约5个氨基酸到约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰，例如以增加稳定性或直接构象特性。可以使用下面描述的任何结构修饰。

[0524] 用于本发明的组合物和方法的RGD肽可以是线性的或环状的，并且可以被修饰，例如糖基化或甲基化，以促进靶向特定组织。含RGD的肽和肽模拟物可以包括D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD，还可以使用其他靶向整合素配体的部分。该配体的优选缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0525] RGD肽部分可用于靶向特定细胞类型，例如癌细胞，例如内皮肿瘤细胞或乳腺癌肿瘤细胞(Zitzmann等，Cancer Res.，62:5139-43，2002)。RGD肽可以促进dsRNA剂靶向多种其他组织的肿瘤，包括肺、肾、脾或肝(Aoki等，Cancer Gene Therapy 8:783-787，2001)。通常，RGD肽将促进iRNA剂靶向肾脏。RGD肽可以是线性的或环状的，并且可以被修饰，例如糖基化或甲基化，以促进靶向特定组织。例如，糖基化RGD肽可以将iRNA剂递送至表达$\alpha_V\beta_3$的肿瘤细胞(Haubner等，Jour.Nucl.Med.，42:326-336，2001)。

[0526] "细胞渗透肽"能够渗透细胞，例如微生物细胞，例如细菌或真菌细胞，或哺乳动物细胞，例如人细胞。微生物细胞渗透肽可以是例如α-螺旋线性肽(例如，IL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如，α-防御素、β-防御素或细菌素)、或仅包含一个或两个主要氨基酸的肽(例如，PR-39或吲哚西丁)。细胞渗透肽也可以包括核定位信号(NLS)。例如，细胞渗透肽可以是二分两亲肽，例如MPG，其衍生自HIV-1gp41的融合台结构域和SV40大T抗原的NLS(Simeoni等，Nucl.Acids Res.31:2717-2724，2003)。

[0527] C.碳水化合物缀合物

[0528] 在本发明的组合物和方法的一些实施方式中，iRNA还包含碳水化合物。碳水化合

物缀合的iRNA有利于核酸的体内递送，以及适用于体内治疗用途的组合物，如本文所述。如在本文中所使用的，"碳水化合物"指本身为碳水化合物的化合物，其由一个或多个具有至少6个碳原子(可以是直链、直链或环状)的单糖单元组成，每个碳原子上都有一个氧、氮或硫原子；或一种化合物，其碳水化合物部分由一个或多个单糖单元组成，每个单糖单元具有至少六个碳原子(可以是直链、支链或环状)，每个碳原子上都有氧、氮或硫原子。代表性碳水化合物包括糖(包含约4、5、6、7、8或9个单糖单元的单糖、二糖、三糖或寡糖)和多糖，例如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。特定的单糖包括C5及以上(例如，C5、C6、C7或C8)糖；二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单元(例如，C5、C6、C7或C8)。

[0529] 在某些实施方式中，碳水化合物缀合物包含单糖。在某些实施方式中，单糖是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。包含一种或多种N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)衍生物的GalNAc缀合物描述于例如US8,106,022中，其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中，GalNAc缀合物用作将iRNA靶向特定细胞的配体。在一些实施方式中，GalNAc缀合物将iRNA靶向干细胞，例如通过充当肝细胞(例如肝细胞)的去唾液酸糖蛋白受体的配体。

[0530] 在一些实施方式中，碳水化合物缀合物包含一种或多种GalNAc衍生物。GalNAc衍生物可以通过接头连接，例如二价或三价支链接头。在一些实施方式中，GalNAc缀合物与有义链的3'端缀合。在一些实施方式中，GalNAc缀合物通过接头(例如如本文所述的接头)与iRNA剂(例如至有义链的3'端)缀合。在一些实施方式中，GalNAc缀合物与有义链的5'端缀合。在一些实施方式中，GalNAc缀合物通过接头(例如如本文所述的接头)与iRNA剂(例如至有义链的5'端)缀合。

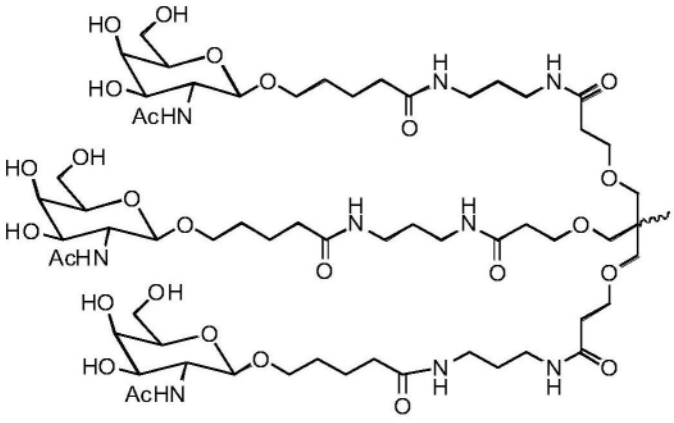
[0531] 在本发明的某些实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA剂连接。在一些实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA剂连接。在本发明的其他实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA剂连接。在本发明的其他实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过四价接头与本发明的iRNA剂连接。

[0532] 在某些实施方式中，本发明的双链RNAi剂包含连接至iRNA剂的一种GalNAc或GalNAc衍生物。在某些实施方式中，本发明的双链RNAi剂包含多个(例如，2、3、4、5或6)个GalNAc或GalNAc衍生物，其各自通过多个单价接头独立地连接到双链RNAi剂的多个核苷酸。

[0533] 在一些实施方式中，例如，当本发明的iRNA剂的两条链是一个较大分子的一部分时，一条链的3'端和相应另一条链的5'端之间通过不间断的核苷酸链连接，形成发夹环，其包含多个未配对的核苷酸，发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包含通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。发夹环也可以由双链的一条链中的延伸突出端形成。

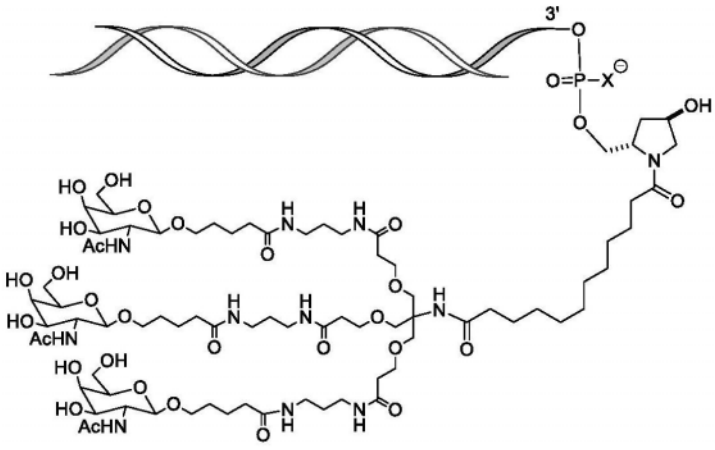
[0534] 在一些实施方式中，例如，当本发明的iRNA剂的两条链是一个较大分子的一部分时，一条链的3'端和相应另一条链的5'端之间通过不间断的核苷酸链连接，形成发夹环，其包含多个未配对的核苷酸，发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包含通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。发夹环也可以由双链的一条链中的延伸突出端形成。

[0535] 在一些实施方式中，GalNAc缀合物是

[0536] 

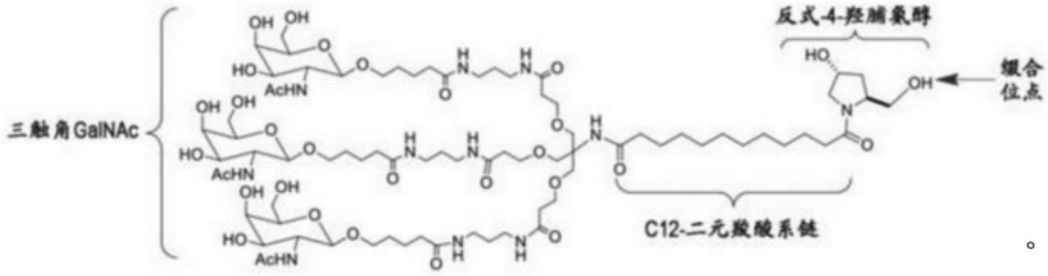
式 II。

[0537] 在一些实施方式中，RNAi剂通过如下示意图所示的接头连接至碳水化合物缀合物，其中X是O或S

[0538] 

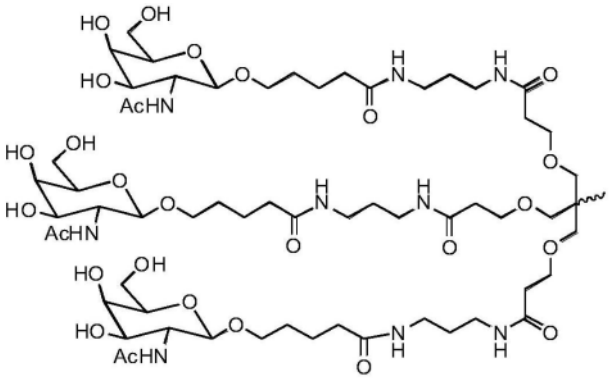
。

[0539] 在一些实施方式中，RNAi剂与L96缀合，如表2中定义的和如下所示：

[0540] 

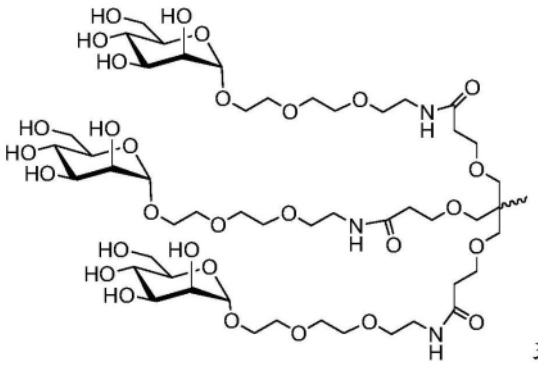
。

[0541] 在某些实施方式中，用于本发明的组合物和方法的碳水化合物缀合物选自以下：

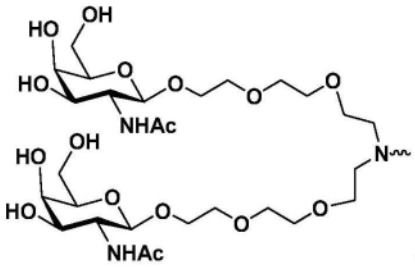


式 II，

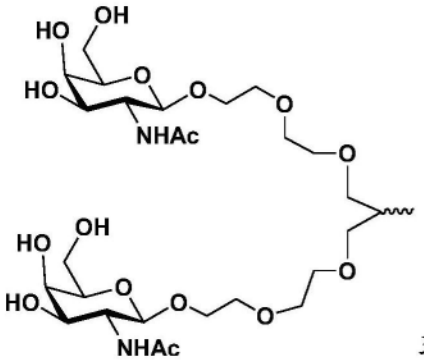
[0542]



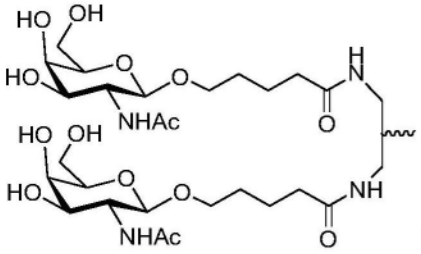
式 III，



式 IV，

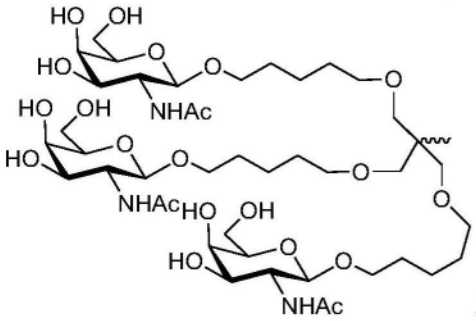


式 V，

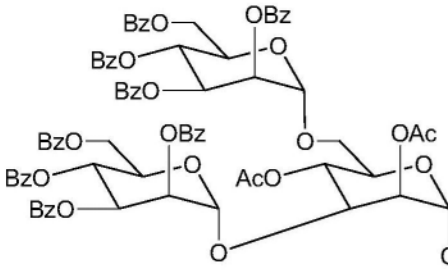


式 VI，

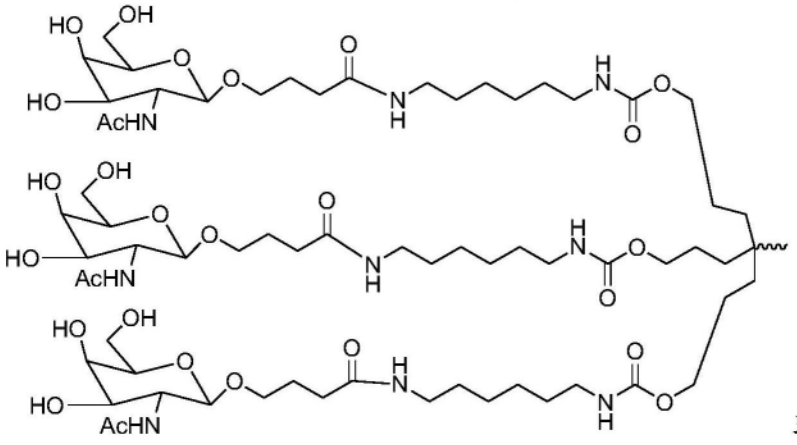
[0543]



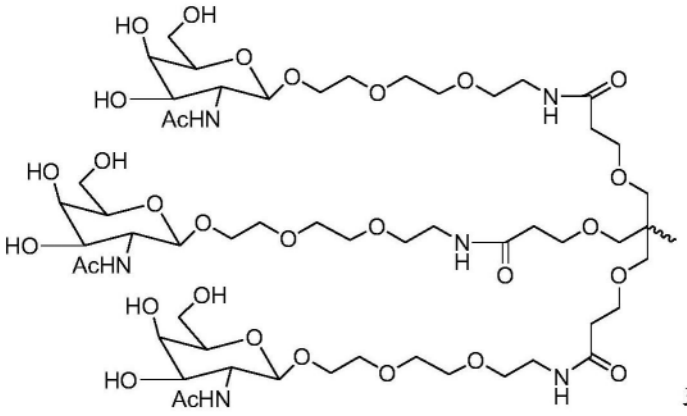
式 VII，



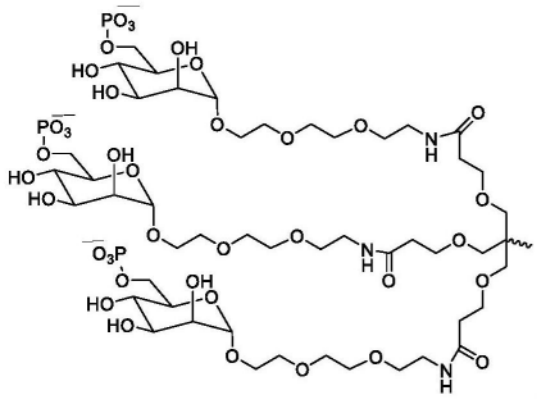
式 VIII，



式 IX，

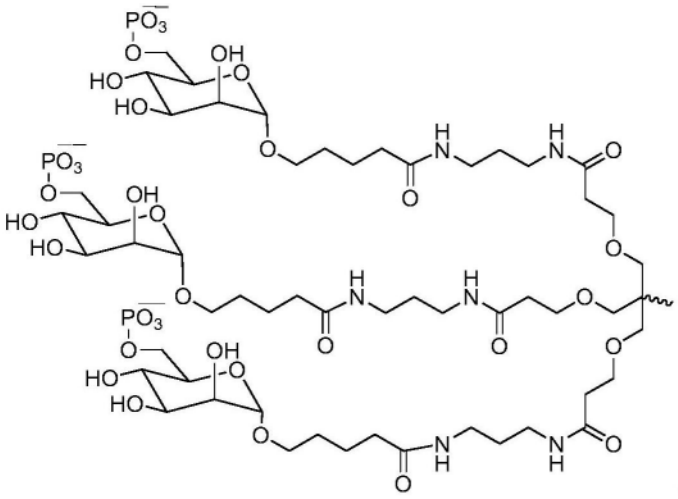


式 X,

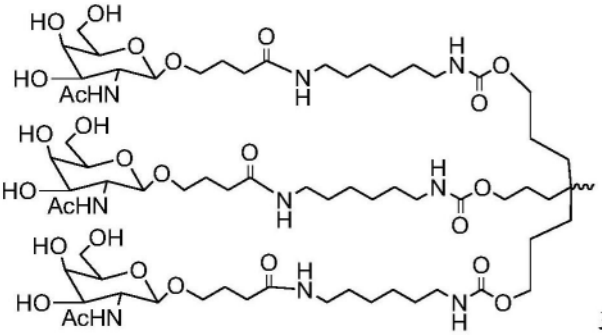


式 XI,

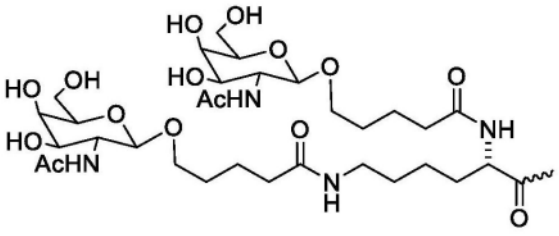
[0544]



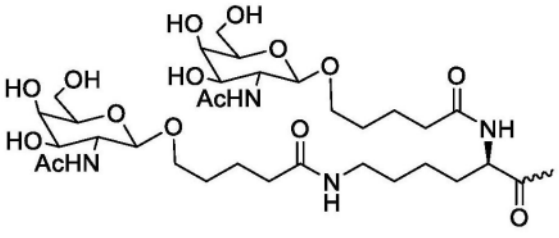
式 XII,



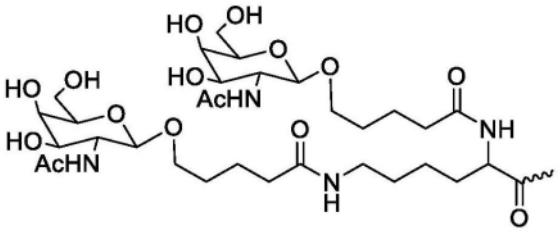
式 XIII,



式 XIV，

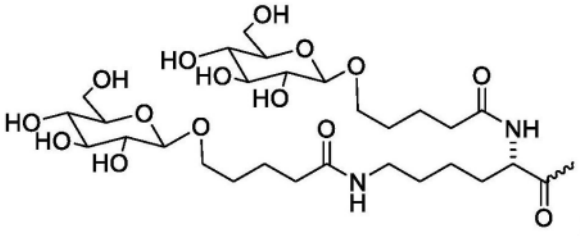


式 XV，

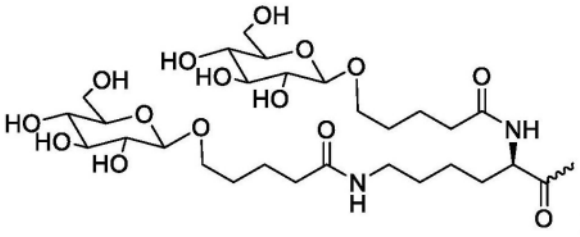


式 XVI，

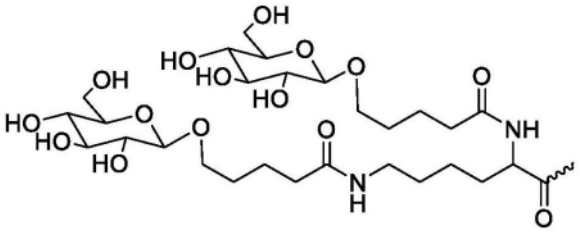
[0545]



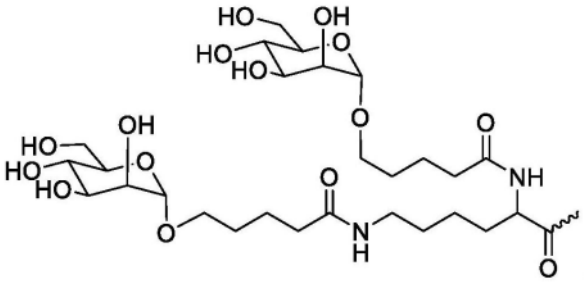
式 XVII，



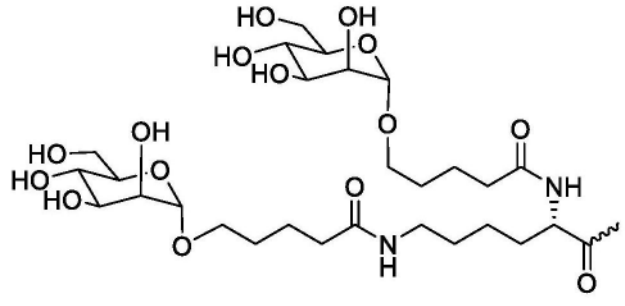
式 XVIII，



式 XIX，

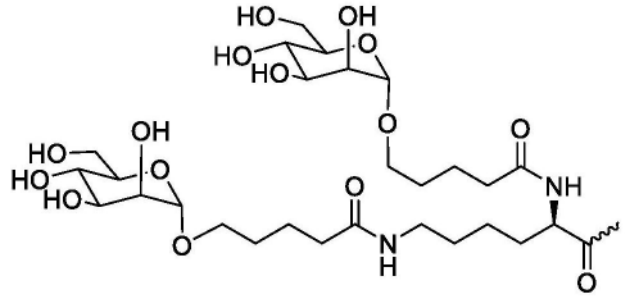


式 XX，

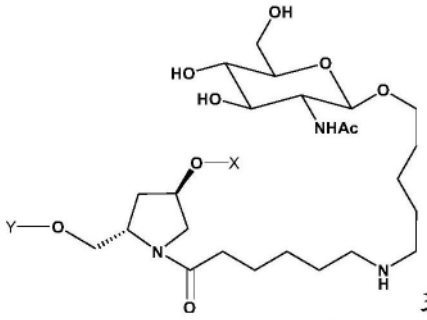


式 XXI,

[0546]

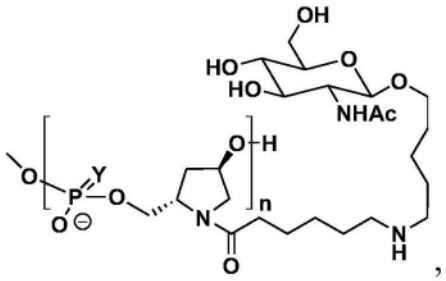


式 XXII,



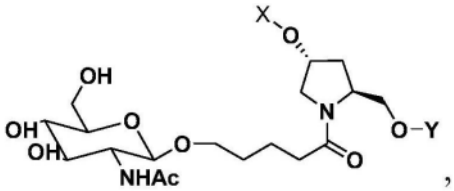
式 XXIII;

[0547]



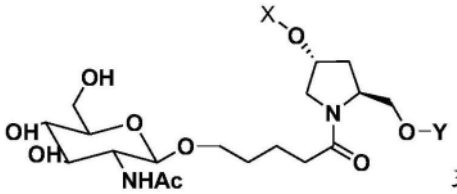
其中Y是O或S和n是3-6(式XXIV);

[0548]

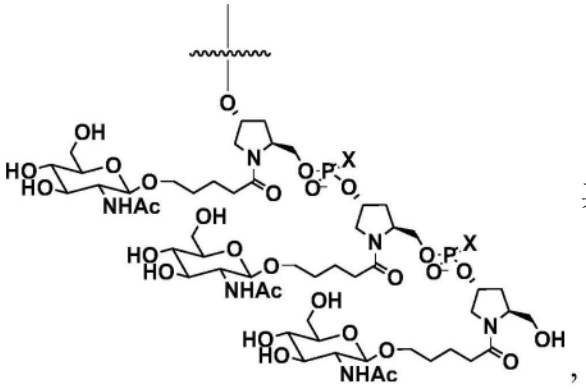


其中Y是O或S和n是3-6(式XXV);

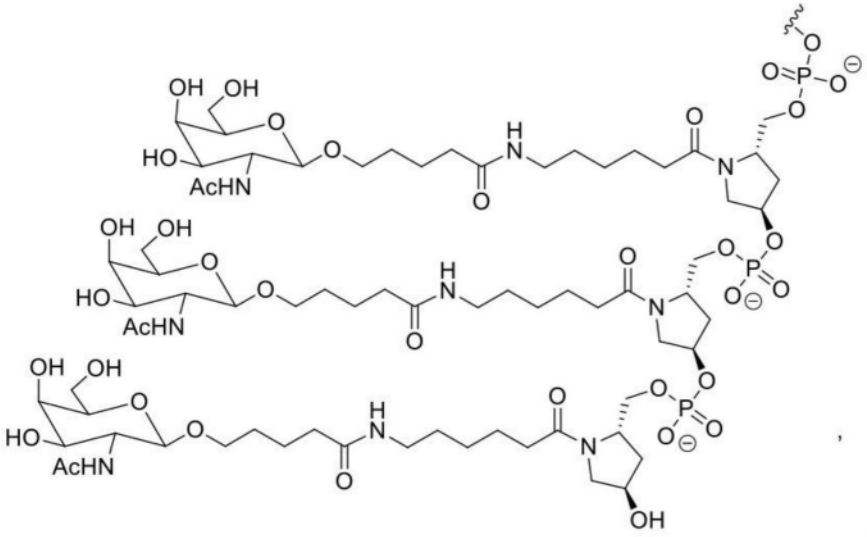
[0549]



式 XXVI;

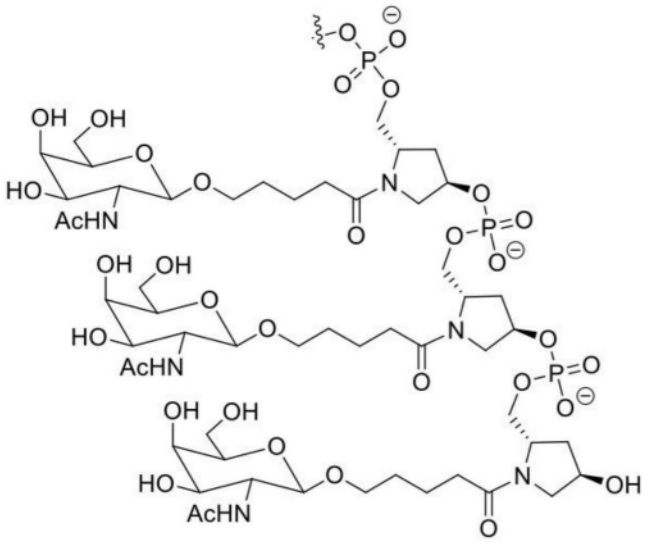
[0550]  其中X是O或S(式XXVII)；

[0551] 式XXVII;式XXIX;

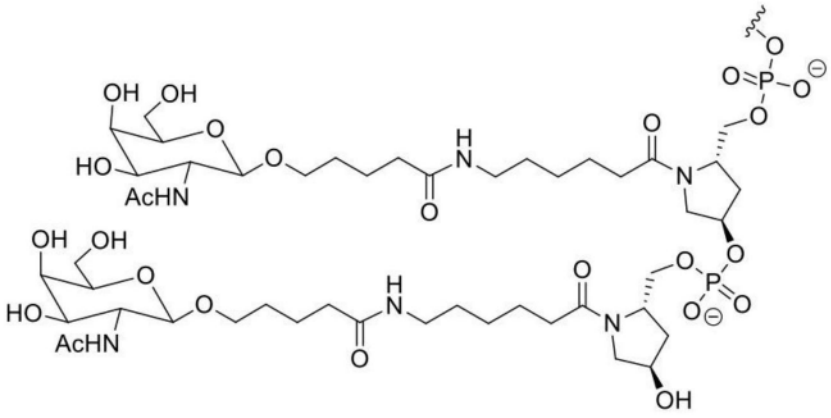


式 XXVII;

[0552]

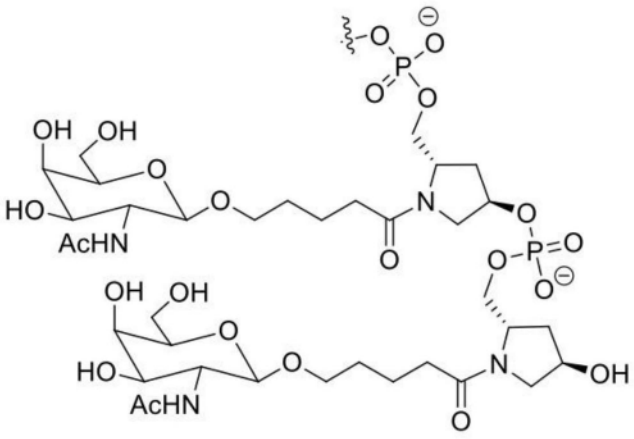


式 XXIX;



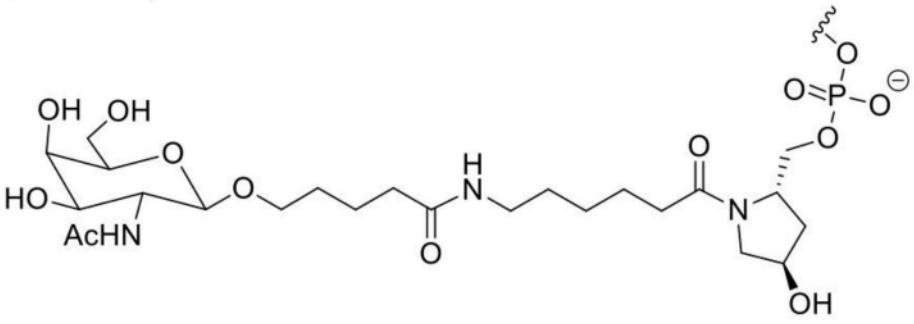
式 XXX;

[0553]

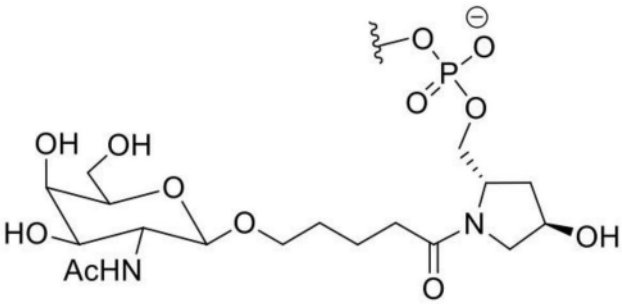


式 XXXI;

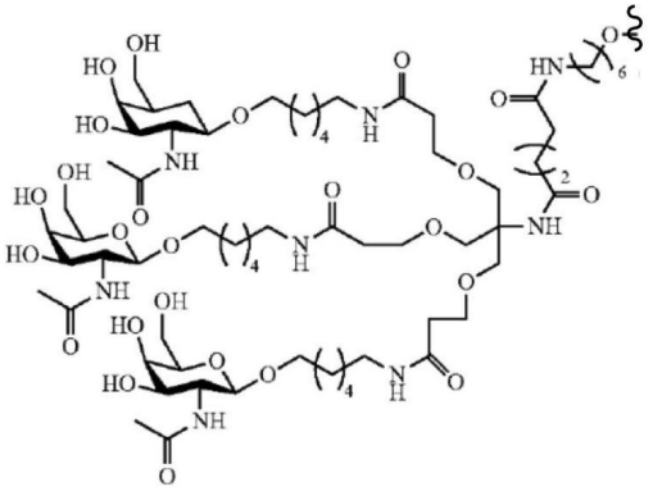
式 XXXII;



，和

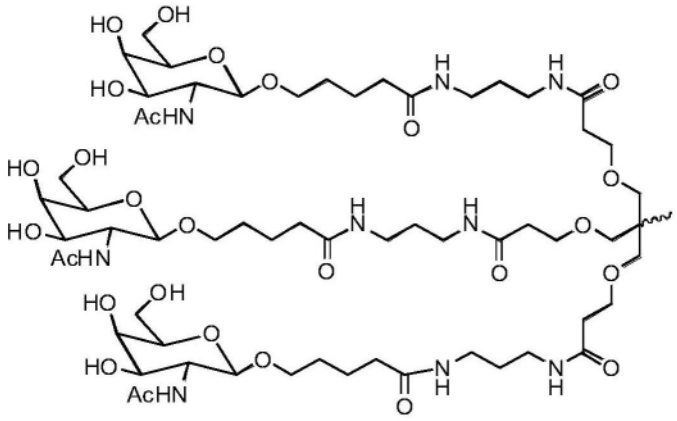


式 XXXIII。

[0554] 

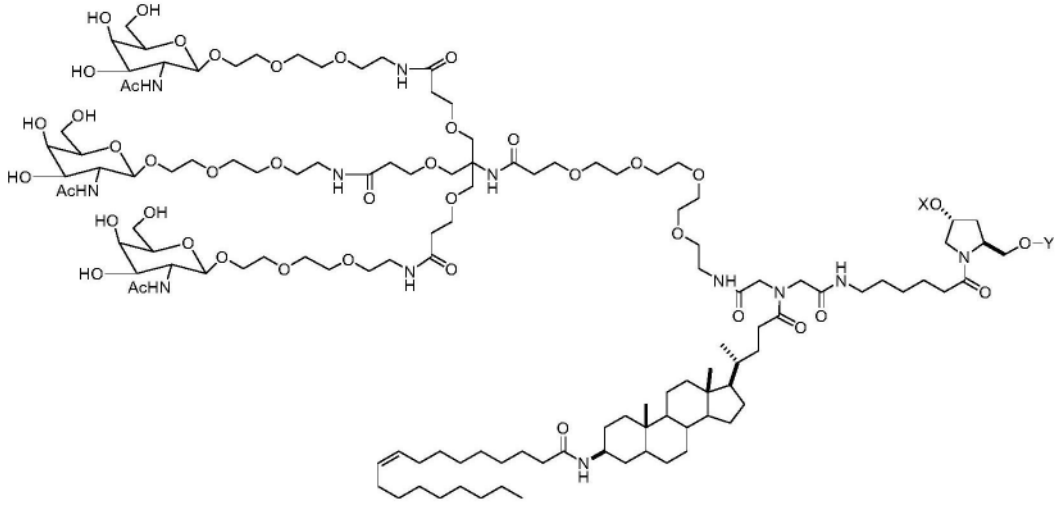
（式 XXXIV）

[0555] 在某些实施方式中，用于本发明的组合物和方法中的碳水化合物缀合物是单糖。在某些实施方式中，单糖是N-乙酰半乳糖胺，如

[0556] 

式 II。

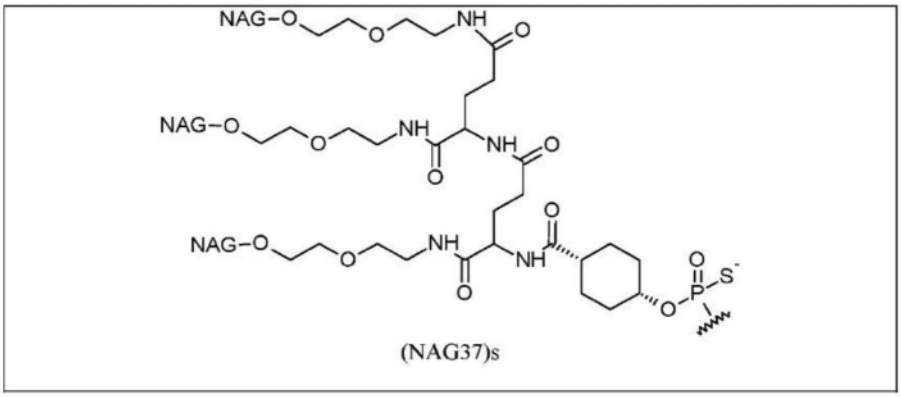
[0557] 用于本文所述实施方式中的另一种代表性碳水化合物缀合物包括但不限于，

[0558] 

（式 XXXVI），

[0559] 当X或Y之一是寡核苷酸时，另一个是氢。

[0560] 在一些实施方式中，合适的配体是WO 2019/055633中公开的配体，其全部内容通过引用并入本文。在一个实施方式中，配体包含以下结构：

[0561] 

[0562] 在某些实施方式中，本公开的RNAi剂可包含GalNAc配体，即使目前预计此类GalNAc配体对于本公开的优选鞘内/CNS递送途径的价值有限。

[0563] 在本发明的某些实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA剂连接。在一些实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA剂连接。在本发明的其他实施方式中，GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA剂连接。

[0564] 在一个实施方式中，本发明的双链RNAi剂包含一种或多种与iRNA剂连接的GalNAc或GalNAc衍生物。GalNAc可以通过有义链或反义链上的接头连接至任何核苷酸。GalNAc可以连接至有义链的5’端、有义链的3’端、反义链的5’端或反义链的3’端。在一个实施方式中，GalNAc例如通过三价接头连接至有义链的3’端。

[0565] 在其他实施方式中，本发明的双链RNAi剂包含多个(例如，2、3、4、5或6)个GalNAc或GalNAc衍生物，其各自通过多个单价接头独立地连接到双链RNAi剂的多个核苷酸。

[0566] 在一些实施方式中，例如，当本发明的iRNA剂的两条链是一个较大分子的一部分时，一条链的3’端和相应另一条链的5’端之间通过不间断的核苷酸链连接，形成发夹环，其包含多个未配对的核苷酸，发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包含通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0567] 在一些实施方式中，碳水化合物缀合物还包含一种或多种如上所述的额外配体，例如但不限于PK调节剂或细胞渗透肽。

[0568] 适用于本发明的其他碳水化合物缀合物和接头包括描述于WO 2014/179620和WO 2014/179627中的那些，其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0569] D.接头

[0570] 在一些实施方式中，本文所述的缀合物或配体可以与具有各种可切割或不可切割的接头的iRNA寡核苷酸连接。

[0571] 术语“接头”或“连接基团”是指连接化合物的两个部分的有机部分，例如共价连接化合物的两个部分。接头通常包含直接键或原子例如氧、硫，单元例如NR8、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH或原子链，例如但不限于，取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烷基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基、烯基芳基炔基、炔基烷基、炔基烯基、炔基炔基、烷基杂芳烷基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳烷基、烯基杂芳基烷

基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳烷基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、烷基杂环烷基、烷基海洛基炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烷基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基，齐总一种或多种亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、N(R8)、C(O)、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环中断或封端；其中R8是氢、酰基、脂肪族或取代的脂肪族。在某些实施方式中，接头约1-24原子之间、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子，7-17、8-17、6-16、7-16或8-16个原子。

[0572] 可切割的连接基团是在细胞外足够稳定的连接基团，但其在进入靶细胞时被切割以释放接头保持在一起的两个部分。在优选的实施方式中，可切割的连接基团被切割至少约10次、20次、30次、40次、50次、60次、70次、80次、90次或更多，或至少约100次，在靶细胞中或在第一参考条件(例如，可以选择模拟或代表细胞内条件)下比在受试者的血液中或第二参考条件(例如，可以选择模拟或代表血液或血清中的条件)下更快。

[0573] 可切割的连接基团易受裂解剂的影响，例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在。通常，裂解剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或以更高的水平或活性存在。这种降解剂的例子包括：针对特定底物选择的或不具有底物特异性的氧化还原剂，包括例如存在于细胞中的氧化或还原酶或还原剂例如硫醇，其可以通过还原降解氧化还原可裂解的连接基团；酯酶；可产生酸性环境的内体或剂，例如导致pH为5或更低的那些；可以通过充当一般酸水解或降解酸可裂解连接基团的酶、肽酶(可以是底物特异性的)和磷酸酶。

[0574] 可切割的连接基团，例如二硫键可能对pH敏感。人血清的pH值为7.4，而细胞内的平均pH略低，范围约为7.1-7.3。内体具有更酸性pH，范围5.5-6.0，并且溶酶体具有甚至更酸pH约5.0。一些接头将具有可切割的连接基团，该连接基团在优选的pH下被切割，从而从细胞内的配体释放阳离子脂质，或释放到所需的细胞隔室中。

[0575] 接头可以包括可被特定酶切割的可切割的接头基团。掺入接头中的可切割的接头基团的类型可能取决于要靶向的细胞。例如，肝脏靶向配体可以通过包括酯基的接头连接至阳离子脂质。肝细胞富含酯酶，并且因此与不富含酯酶的细胞类型相比，干细胞中的接头将被更有效地切割。其他富含酯酶的细胞类型包括肺细胞、肾皮质细胞和睾丸细胞。

[0576] 当靶向富含肽酶的细胞类型(例如肝细胞和滑膜细胞)时，可以使用包含肽键的接头。

[0577] 通常，可通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评估候选可切割接头基团的适用性。还需要测试候选可切割接头基团在血液中或与其他非靶组织接触时抵抗切割的能力。因此，可以确定第一或第二条件之间对切割的相对易感性，其中第一被选择以指示靶细胞中的切割，以及第二被选择以指示在其他组织或盛物流体中的切割，例如血液或血清。评估可以在无细胞系统、细胞中、细胞培养中、器官或组织培养中、或整个动物中进行。在无细胞或培养条件下进行初步评估并通过对整个动物的进一步评估来确认可能很有用。在优选的实施方式中，与血液或血清中相比(或在模拟细胞外条件的体外条件下)，有用的候选化合物在细胞中(或在模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解速度至少快约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。

[0578] i.氧化还原可切割连接基团

[0579] 在某些实施方式中，可切割连接基团是在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连

接基团。可还原切割的连接基团的例子是二硫键连接基团(-S-S-)。为了确定候选可切割接头基团是否是合适的“可还原切割连接基团”或例如是否适合于特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考本文所述的方法。例如,可以通过与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂一起孵育来评估候选物,使用本领域已知的剂模拟在细胞例如靶细胞中观察到的切割速率。还可以在选择模拟血液或血清条件下来评估候选物。一种方法是,候选化合物在血液中最多切割约10%。在其他实施方式中,与血液或血清中相比(或在模拟细胞外条件的体外条件下),有用的候选化合物在细胞中(或在模拟细胞内条件的体外条件下)的降解至少快约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。候选化合物的裂解速率可以在选择模拟细胞内介质的条件下使用标准酶动力学测定来确定,并用选择模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0580] ii.基于磷酸酯的可切割连接基团

[0581] 在其他实施方式中,可切割接头包括基于磷酸酯的可切割连接基团。基于磷酸酯的可切割连接基团通过降解或水解该磷酸酯基团的试剂而被切割。在细胞中切割磷酸酯基团的试剂的实例是酶,如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例是-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。优选的实施方式是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-和-O-P(S)(H)-S-,其中Rk在每次出现时可以独立地是C1-C20烷基、C1-C20卤代烷基、C6-C10芳基或C7-C12芳烷基。在某些实施方式中,基于磷酸酯的连接基团是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评价这些候选物。

[0582] iii.酸可切割连接基团

[0583] 在其他实施方式中,可切割接头包括酸可切割的连接基团。酸可切割的连接基团是在酸性条件下被切割的连接基团。在某些实施方式中,酸可切割的连接基团在具有大约6.5或更低(例如,大约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的pH的酸性环境中被切割,或者被试剂(如可以作为广义酸起作用的酶)切割。在细胞中,具体的低pH细胞器(如核内体或溶酶体)可以提供针对酸可切割连接基团的切割环境。酸可切割连接基团的实例包括但不限于腙、酯以及氨基酸的酯。酸可切割基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。一个优选的实施方式是当附接至酯(烷氧基基团)的氧的碳是芳基基团、经取代的烷基基团或叔烷基基团(如二甲基戊基或叔丁基)时。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评价这些候选物。

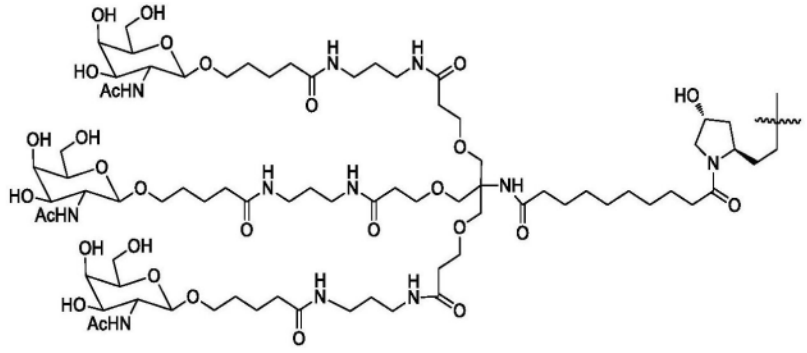
[0584] iv.基于酯的连接基团

[0585] 在其他实施方式中,可切割接头包括基于酯的可切割的连接基团。基于酯的可切割的连接基团通过酶(如细胞中的酯酶与酰胺酶)而被切割。基于酯的可切割连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基以及亚炔基的酯。酯可切割连接基团具有通式-C(O)O-、或-OC(O)-。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评价这些候选物。

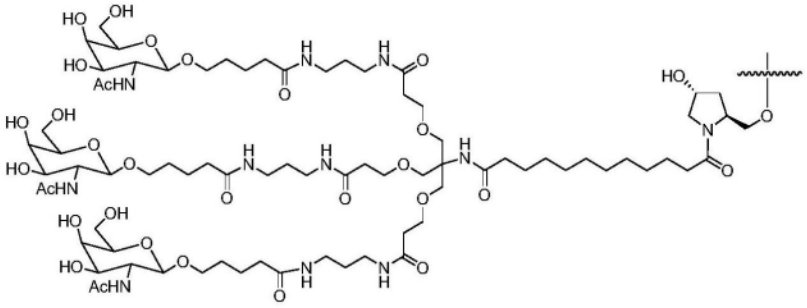
[0586] v.基于肽的可切割基团

[0587] 在再另一个实施方式中，可切割接头包括基于肽的可切割的连接基团。基于肽的可切割连接基团通过酶(如细胞中的肽酶与蛋白酶)而被切割。基于肽的可切割连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如，二肽、三肽，等等)以及多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包括酰胺基团(-C(O)NH-)。酰胺基团可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的特定类型的酰胺键。基于肽的切割基团总体上限于在氨基酸之间形成以产生肽以及蛋白质的肽键(即，酰胺键)，并且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有通式-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-，其中RA与RB是这两个邻接氨基酸的R基团。可以使用类似于以上描述的那些的方法来评价这些候选物。

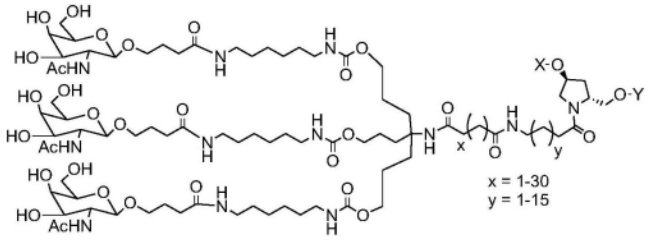
[0588] 在一些实施方式中，本发明的iRNA通过接头被缀合至碳水化合物。本发明的组合物与方法的具有接头的iRNA碳水化合物缀合物的非限制性实例包括但不限于，

[0589] 

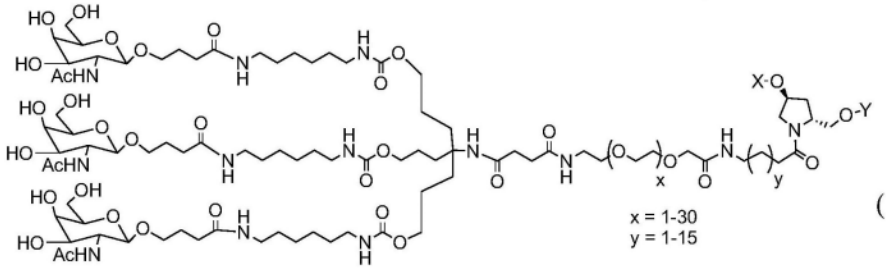
（式 XXXVII），



（式 XXXVIII），

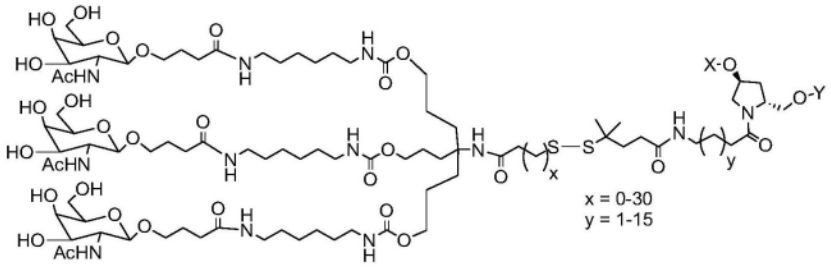


（式 XXXIX），

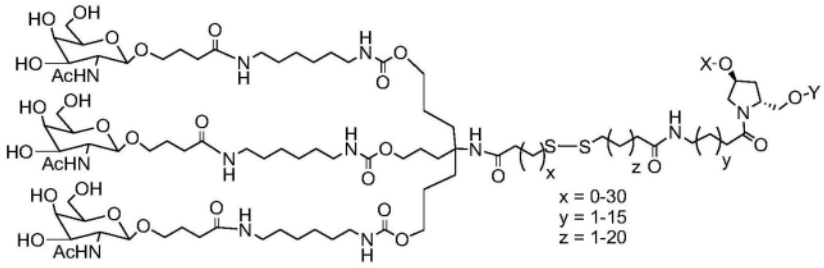


（式 XL），

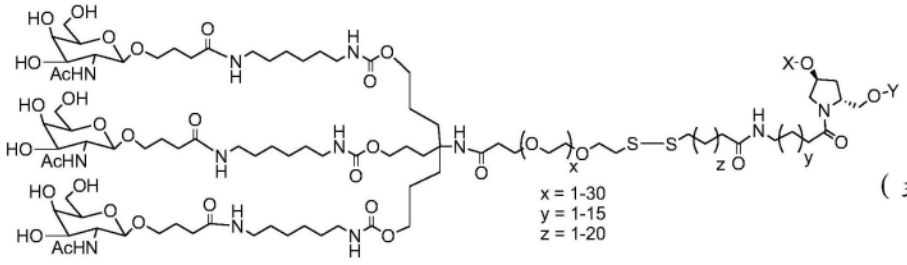
[0590]



（式 XLI），

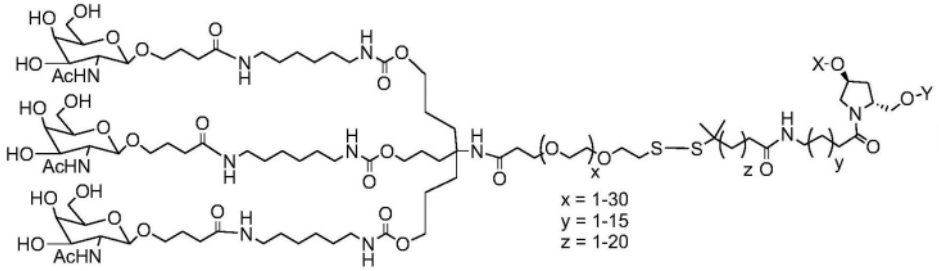


（式 XLII），



（式 XLIII），和

[0591]



（式 XLIV），

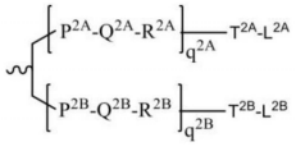
当X或Y之一式寡核苷酸时，另一个是氢。

[0592] 在本发明的组合物和方法的某些实施方式中，配体是通过二价或三价支链接头连

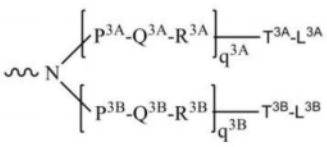
接的一个或多个“GalNAc”(N-乙酰半乳葡糖胺)衍生物。

[0593] 在一个实施方式中,本发明的dsRNA与二价或三价支链接头缀合,所述接头选自式(XLV)-(XLVI)中任一个显示的结构:

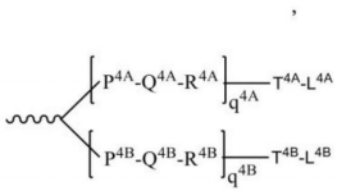
式 XXXXV



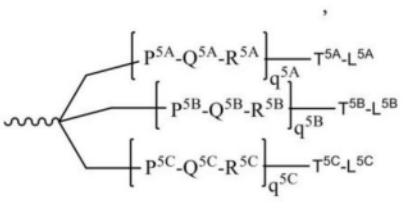
式 XLVI



[0594]



,



;

式 XLVII

式 XLVIII

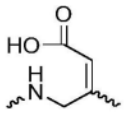
[0595] 其中:

[0596] q2A、q2B、q3A、q3B、q4A、q4B、q5A、q5B和q5C对于每次出现独立地表示0-20和其中重复单元可以相同或不同;

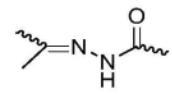
[0597] P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}对于每次出现独立地表示不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH_2、CH_2NH或CH_2O;

[0598] Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}对于每次出现独立地表示不存在、亚烃基、取代的亚烃基,其中一个或多个亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、N(RN)、C(R')=C(R")、C≡C或C(O)中的一个或多个中断或终止;

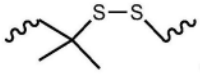
[0599] R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}对于每次出现独立地表示不存在、NH、O、S、CH_2、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、



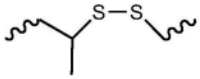
、



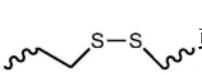
、



、



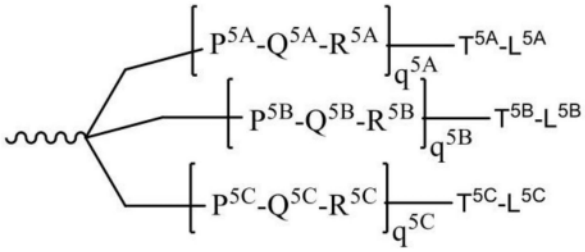
、



或杂环基;

[0600] L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}和L^{5C}表示配体;即,对于每次出现各自独立地为单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;和R^a是H或氨基酸侧链。三价缀合GalNAc衍生物对于与RNAi剂一起使用来抑制靶基因表达特别有用,如式(XLIX)的那些:

[0601]



(式 XLIX),

[0602] 其中L^{5A}、L^{5B}和L^{5C}表示单糖,如GalNAc衍生物。

[0603] 适宜的二价与三价支链接头基团缀合的GalNAc衍生物的实例包括但不限于在以

上引用为化学式II、VII、XI、X以及XIII的结构。

[0604] 教导RNA缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241,5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928;5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;和8,106,022,其每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0605] 给定化合物中的全部位置不必要经统一修饰,并且实际上可以在单个化合物中或甚至在iRNA内部的单个核苷处引入多于一个前述修饰。本发明也包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0606] 在本发明的上下文中,“嵌合的”iRNA化合物或“嵌合体”是以下这样的iRNA化合物,优选是dsRNAi剂,其包含两个或更多个化学上不同的区域,每者由至少一个单体单元构成,即,在dsRNA化合物的情况下的核苷酸。这些iRNA一般含有至少一个区域,其中RNA经修饰,从而赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取或增加的靶核酸结合亲和性。iRNA的其他区域可以充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交分子的酶的底物。举例而言,RNase H是一种切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内核酸酶。因此,RNase H的激活导致RNA靶的切割,因而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,可以在使用嵌合dsRNA时,经常用较短的iRNA获得可比较的结果。可以常规地通过凝胶电泳并且如果必要的话联合本领域内已知的核酸杂交技术来检测该RNA靶点的切割。

[0607] 在某些实例中,iRNA的RNA可以通过非配体基团来进行修饰。一些非配体分子已经被缀合至iRNA以增强该iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且用于进行此类缀合的程序在科学文献中是可得的。这种非配体部分已经包括脂部分如胆固醇(Kubo,T.等,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,365(1):54-61;Letsinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553)、胆酸(Manoharan等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053)、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306;Manoharan等,Bioorg.Med.Chem.Let.,1993,3:2765)、硫代胆固醇(Oberhauser等,Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂肪链,例如,十二烷基二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等,EMBO J.,1991,10:111;Kabanov等,FEBS Lett.,1990,259:327;Svinarchuk等,Biochimie,1993,75:49)、磷脂,例如,二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙铵1,2-二-O-十六烧基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651;Shea等,Nucl.Acids Res.,1990,18:3777)、聚胺或聚乙二醇链(Manoharan等,Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969)或金刚烷乙酸(Manoharan等,Tetrahedron Lett.,1995,36:3651)、棕榈基部分(Mishra等,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229)或十八胺或己胺-羰基-羟胆固醇部分(Crooke等,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923)。

教导制备这类RNA缀合物的代表性美国专利已经在上文列出。典型的缀合方案涉及在序列的一个或多个位置具有氨基接头的RNA的合成。然后使用适当的偶联剂或活化剂使该氨基基团与被缀合的分子进行反应。缀合反应可以用仍与固相支持物结合或在切割RNA后处于溶液相的RNA进行。一般通过HPLC纯化RNA缀合物提供纯的缀合物。

[0608] V.本公开的RNAi剂的递送

[0609] 可以以各种不同的方式来实现本公开的iRNA至细胞的递送，例如，受试者体内的细胞，如人类受试者(例如，需要其的受试者，如患有LRRK2相关病症的受试者，例如，LRRK2相关疾病)。例如，递送可通过将细胞在体外或体内与本发明的iRNA接触来进行。也可以通过向受试者施用包含iRNA(例如，dsRNA)的组合物，直接进行体内递送。或者，可以通过施用编码和指导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行体内递送。这些替代方案在后文进一步论述。

[0610] 在通常情况下，在通常情况下，递送(体外或体内)核酸分子的任何方法可以适应于随本发明的iRNA使用(参见例如，Akhtar S.和Julian RL.(1992)Trends Cell.Biol.2(5):139-144和WO94/02595，其全部内容通过引用并入本文)。对于体内递送，为了递送iRNA分子考虑的因子包括，例如，所递送的分子的生物学稳定性、防止非特异性作用和所递送分子在靶组织中的积累。RNAi剂的非特异性作用可以通过局部给药来最小化，例如通过直接注射或植入组织或局部给药制剂。对治疗部位的局部给药使剂的局部浓度最大化，限制剂暴露于否则会收到剂伤害或可降解剂的全身组织，并允许施用较低总剂量的RNAi剂。几项研究已经表明当局部施用RNAi剂时，基因产物的成功敲低。例如，在与年龄相关的黄斑变性实验模型中，通过玻璃体内注射在食蟹猴(Tolentino,MJ.等，(2004)Retina24:132-138)和小鼠(Reich,SJ.等(2003)Mol.Vis.9:210-216)视网膜下注射眼内递送VEGF dsRNA均显示可防止新血管形成。此外，在小鼠体内直接向肿瘤内注射dsRNA可减少肿瘤体积(Pille,J.等，(2005)Mol.Ther.11:267-274)并延长荷瘤小鼠的存活时间(Kim,WJ.等，(2006)Mol.Ther.14:343-350;Li,S.等，(2007)Mol.Ther.15:515-523)。RNA干扰还显示成功通过直接注射局部递送至CNS(Dorn,G.等，(2004)Nucleic Acids 32:e49;Tan,PH.等，(2005)Gene Ther.12:59-66;Makimura,H.等，(2002)BMC Neurosci.3:18;Shishkina,GT.等，(2004)Neuroscience 129:521-528;Thakker,ER.等，(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17270-17275;Akaneya,Y.等，(2005)J.Neurophysiol.93:594-602)和通过鼻内给药至肺(Howard,KA.等，(2006)Mol.Ther.14:476-484;Zhang,X.等，(2004)J.Biol.Chem.279:10677-10684;Bitko,V.等，(2005)Nat.Med.11:50-55)。为了系统地施用RNAi剂以治疗疾病，可以修饰RNA或施用药物递送系统递送进行递送;这两种方法都可以防止体内核酸内切酶和核酸外切酶对dsRNA的快速降解。RNA或药物载体的修饰还可以允许将RNAi剂靶向靶组织并避免不希望的脱靶效应(例如，不希望受理论束缚，本文所述的GNA的使用已被鉴定为使dsRNA的种子区域不稳定，从而相对于脱靶效应，导致此类dsRNA对靶向有效性的偏好增强，因为这种种子区域的不稳定会显著削弱这种脱靶效应)。RNAi剂可以通过与胆固醇等亲脂性基团的化学缀合进行修饰以增强细胞摄取并防止降解。例如，将与亲脂性胆固醇部分缀合的针对ApoB的RNAi剂全身注射到小鼠内，导致肝脏和空肠中的apoB mRNA被敲低(Soutschek,J.等，(2004)Nature 432:173-178)。在前列腺癌小鼠模型中，RNAi剂与适配体缀合已被证明可抑制肿瘤生长并介导

肿瘤消退(McNamara,JO.等,(2006)Nat.Biotechnol.24:1005-1015)。在一个替代性实施方式中,可以使用药物递送系统例如纳米颗粒、树枝状聚合物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统递送RNAi剂。带正电荷的阳离子递送系统促进分子RNAi剂(带负电荷)的结合,并且还增强带负电荷的细胞膜上的相互作用以允许细胞有效摄取RNAi剂。阳离子脂质、树枝状聚合物或聚合物可以与RNAi剂结合,或诱导形成包裹RNAi剂的囊泡或胶束(参见,例如,Kim SH.等,(2008)Journal of Controlled Release 129(2):107-116)。当全身施用时,囊泡或胶束的形成进一步防止RNAi剂的降解。制备和施用阳离子-RNAi剂复合物的方法在本领域技术人员的能力范围内(参见例如,Sorensen,DR.等,(2003)J.Mol.Biol 327:761-766;Verma,UN.等,(2003)Clin.Cancer Res.9:1291-1300;Arnold,AS等,(2007)J.Hypertens.25:197-205,其全部内容通过引用并入本文)。可用于RNAi剂的全身递送的药物递送系统的一些非限制性实施例包括DOTAP(Sorensen,DR.等,(2003),同上;Verma,UN.等,(2003),同上),Oligofectamine,“固体核酸脂质颗粒”(Zimmermann,TS.等,(2006)Nature 441:111-114),心磷脂(Chien,PY.等,(2005)Cancer Gene Ther.12:321-328;Pal,A.等,(2005)Int J.Oncol.26:1087-1091),聚乙烯亚胺(Bonnet ME.等,(2008)Pharm.Res.Aug 16电子出版;Aigner,A.(2006)J.Biomed.Biotechnol.71659),Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu,S.(2006)Mol.Pharm.3:472-487)和聚酰胺胺(Tomalia,DA.等,(2007)Biochem.Soc.Trans.35:61-67;Yoo,H.等,(1999)Pharm.Res.16:1799-1804)。在一些实施方式中,RNAi剂与环糊精形成复合物用于全身给药。RNAi剂和环糊精的药物组合物及给药方法可以在美国专利号7,427,605中找到,其通过引用整体并入本文。

[0611] 本公开的某些方面涉及降低细胞中LRRK2靶基因表达的方法,其包括使所述细胞与本公开的双链RNAi剂接触。在一个实施方式中,细胞是肝外细胞,任选地CNS细胞,如脑细胞。在其他实施方式中,细胞是肝外细胞,任选地眼细胞。

[0612] 本公开的另一方面涉及降低受试者中LRRK2靶基因表达的方法,其包括向受试者施用本公开的双链RNAi剂。

[0613] 本公开的另一方面涉及治疗患有CNS病症(神经退行性病症)的受试者的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本公开的双链LRRK2靶向RNAi剂,从而治疗受试者。可以通过本公开的方法治疗的示例性CNS病症包括LRRK2相关疾病CNS病症,如帕金森氏病。

[0614] 本公开的另一方面涉及治疗患有眼部系统病症的受试者的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本公开的双链LRRK2靶向RNAi剂,从而治疗受试者。可以通过本公开的方法治疗的示例性眼部病症包括LRRK2相关眼部疾病,如眼、晶状体和耳囊中的水肿。

[0615] 在一个实施方式中,双链RNAi剂是鞘内施用的。通过双链RNAi剂的鞘内施用,所述方法可以降低脑内(例如,纹状体)或脊柱组织例如皮质、小脑、颈椎、腰椎和胸椎、免疫细胞如单核细胞和T细胞中LRRK2靶基因的表达。

[0616] 为了便于说明,本节中的制剂、组合物和方法主要针对修饰的siRNA化合物进行了讨论。然而,可以理解,这些制剂、组合物和方法可以用其他siRNA化合物,例如未修饰的siRNA化合物来实践,并且这种实践在本公开内。可以通过多种途径将包含RNAi剂的组合物递送至受试者。示例性途径包括:鞘内、静脉内、局部、直肠、肛门、阴道、鼻、肺和眼。

[0617] 本公开的RNAi剂可以掺入适合给药的药物组合物中。这种组合物通常包括一种或多种RNAi剂和药学上可接受的载体。如在本文中所使用的语言“药学上可接受的载体”旨在

包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。将此类介质和剂用于药物活性物质在本领域是众所周知的。除非任何常规介质或剂与活性化合物不相容，否则考虑其在组合物中的用途。补充的活性化合物也可以掺入组合物中。

[0618] 本公开的药物组合物可以多种方式施用，这取决于是否需要局部或全身治疗以及取决于待治疗的区域。施用可以是局部的(包括眼用的、阴道的、直肠的、鼻内的、透皮的)、口服或肠胃外的。肠胃外给药包括静脉滴注、皮下、腹膜内或肌肉内注射，或鞘内或心室内给药。

[0619] 可选择给药途径和部位以增强靶向性。例如，为了靶向神经或脊柱组织，鞘内注射将是一个合乎逻辑的选择。通过使用气溶胶形式的RNAi剂可以靶向肺细胞。血管内皮细胞可以通过在球囊导管上涂上RNAi剂并机械地引入RNA来靶向。

[0620] 用于局部给药的制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体或粉末。常规的药物载体、液体、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必要的或合乎需要的。带涂层的避孕套、手套等也可能有用。

[0621] 用于口服给药的组合物包括粉末或颗粒、悬浮液或水溶液、糖浆、酏剂或非水介质、片剂、胶囊、锭剂或锭剂。在片剂的情况下，可以使用的载体包括乳糖、柠檬酸钠和磷酸酯。片剂中常用的崩解剂有淀粉等各种崩解剂，硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠、滑石粉等润滑剂。对于胶囊形式的口服给药，有用的稀释剂是乳糖和高分子量聚乙二醇。当口服使用需要水悬浮液时，核酸组合物可以与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要，可以添加某些甜味剂或调味剂。

[0622] 用于鞘内或心室内给药的组合物可以包括无菌水溶液，其也可以包含缓冲剂、稀释剂或其他合适的添加剂。

[0623] 用于肠胃外给药的制剂可以包括无菌水溶液，其也可以包含缓冲剂、稀释剂或其他合适的添加剂。心室内注射可以通过心室内的导管来易化，例如连接到储存器上。对于静脉内使用，可以控制溶质的总浓度以使制剂等渗。

[0624] 在一个实施方式中，siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物)组合物的施用是肠胃外的，例如静脉内(例如推注或作为可扩散输注)、皮内腹膜内、肌内、鞘内、心室内、颅内、皮下、经粘膜、口腔、舌下、内窥镜、直肠、口腔、阴道、局部、肺部、鼻内、尿道或眼部。施用可以由受试者或其他人(例如医疗保健提供者)提供给药。药物可以按计量剂量或在分配计量剂量呃分配器中提供。下文将更详细地讨论选定的递送模式。

[0625] A.鞘内施用

[0626] 在一个实施方式中，在一个实施方式中，双链RNAi剂通过鞘内注射(即注射到浸没大脑和脊髓组织的脊髓液中)递送。将RNAi剂鞘内注射到脊髓液中可以作为快速推注或通过可植入皮下的微型泵进行，从而将siRNA规则和持续地递送到脊髓液中。脊髓液从产生它的脉络丛循环到脊髓和背根神经节周围，然后向上经过小脑和皮层到达蛛网膜颗粒，在那里液体可以离开中枢神经系统，即，根据注射的化合物的大小、稳定性和溶解度，鞘内递送的分子可以击中整个CNS的目标。

[0627] 在一些实施方式中，鞘内施用是通过泵进行的。泵可以是手术植入的渗透泵。在一个实施方式中，渗透泵被植入椎管的蛛网膜下隙以促进鞘内施用。

[0628] 在一些实施方式中，鞘内施用是通过用于药物的鞘内递送系统，该系统包括包含一定体积的剂的储存器，以及被配置为递送包含在储存器中的剂的一部分的泵。关于这种鞘内递送系统的更多细节可以在WO 2015/116658中找到，其通过引用整体并入。

[0629] 鞘内注射RNAi剂的量可能因一个靶基因而异于另一个靶基因，并且必须应用的适当量可能必须针对每个目标基因单独确定。通常，该量的范围为10μg至2mg，优选50μg至1500μg，更优选100μg至1000μg。

[0630] B.载体编码的本公开的RNAi剂

[0631] 靶向LRRK2基因的RNAi剂可以从插入DNA或RNA载体的转录单位表达(参见，例如，Couture,A等，TIG.(1996),12:5-10;WOOO/22113、WO OO/22114和US 6,054,299)。取决于所使用的特定构建体和靶组织或细胞类型，表达优选地是持续的(数月或更长)。这些转基因可以作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入，其可以是整合或非整合载体。还可以构建转基因以使其作为染色体外质粒遗传(Gassmann等，(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1292)。

[0632] RNAi剂的单个连或多个链可以从表达载体上的启动子转录。在要表达两条单独的链以产生例如dsRNA的情况下，可以将两个单独表达载体共同引入(例如，通过转染或感染)到靶细胞中。或者，dsRNA的每条单独链可以由位于同意表达质粒上的启动子转录。在一个实施方式中，dsRNA表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸，使得dsRNA具有茎和环结构。

[0633] RNAi剂表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体，优选与脊椎动物细胞相容的那些，可用于产生重组构建体，用于表达如本文所述的RNAi剂。RNAi剂表达载体的递送可以是全身性的，例如通过静脉内或肌肉内施用，通过施用至从患者外植的靶细胞，然后再引入患者，或通过允许引入所需靶细胞的任何其他方式。

[0634] 可用于本文所述的方法和组合物的病毒载体系统包括但不限于(a)腺病毒载体；(b)逆转录病毒载体，其包括但不限于慢病毒载体、moloney小鼠白血病病毒等；(c)腺伴随病毒载体；(d)单纯疱疹病毒载体；(e)SV 40载体；(f)多瘤病毒载体；(g)乳头状瘤病毒载体；(h)小RNA病毒载体；(i)痘病毒载体，例如正痘病毒，例如牛痘病毒载体或禽痘病毒例如金丝雀痘或鸡痘；(j)辅助依赖性或无肠腺病毒。复制缺陷的病毒也可能是有利的。不同的载体将会或不会被掺入细胞基因组中。如果需要，构建体可包括用于转染的病毒序列。或者，可以将构建体掺入能够重复复制的载体中，例如EPV和EBV载体。用于RNAi剂的重组表达的构建体通常需要调节元件，例如启动子、增强子等，以确保RNAi剂在靶细胞中的表达。用于考虑载体和构建体的其他方面是本领域已知的。

[0635] VI.本发明的药物组合物

[0636] 本公开也包括药物组合物和制剂，其包含本公开的RNAi剂。在一个实施方式中，本文提供了包含RNAi剂的药物组合物，如本文所述，以及药学上可接受的载体。包含RNAi剂的药物组合物可用于治疗与LRKK2的表达或活性相关的疾病或病症，例如，LRRK2相关疾病。

[0637] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物是无菌的。在另一个实施方式中，本发明的药物组合物是无热原的。

[0638] 这种药物组合物是基于递送方式配制。一个例子是通过肠胃外递送，例如静脉内(IV)、肌肉内(IM)或皮下(subQ)递送的全身递送制备的组合物。另一个例子是用于将其直

接递送至CNS中的组合物，例如通过鞘内或玻璃体内注射途径，任选地输注到脑(例如，纹状体)中，例如通过连续泵输注。

[0639] 本公开的药物组合物可以以足以抑制LRRK2基因表达的剂量施用。通常，本公开的RNAi剂的合适剂量将每天每千克体重约为0.001至约200.0毫克，通常在每天每千克体重约1至50mg的范围内。

[0640] 重复剂量方案可包括定期施用RNAi剂的治疗量，例如每月一次至每六个月一次。在某些实施方式中，RNAi剂每季度施用一次(即，约每三个月一次)至约每年两次。

[0641] 在初治方案(例如，负荷剂量)之后，可以在较少频繁的基础上施用治疗。

[0642] 在其他实施方式中，药物组合物的单剂量可以是持久的，使得随后的剂量以不超过1、2、3或4或更多个月间隔施用。在本公开的一些实施方式中，本公开药物组合物的施用是每月施用一次。在本公开的其他实施方式中，本公开的单剂量药物组合物是每季度一次或每年两次施用。

[0643] 技术人员将理解，某些原因可以影响有效治疗受试者所需的剂量和施加，包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前治疗、受试者的一般健康或年龄以及存在的其他疾病。此外，具有治疗有效量的组合物的受试者的治疗可以包括单治疗或系列治疗。

[0644] 小鼠遗传学的进展为各种人类疾病的研究产生了许多小鼠模型，例如ALS和FTD，其受益于LRRK2表达的减少。这些模型可用于RNAi剂的体内测试，以及确定治疗有效量。合适的啮齿动物模型是本领域已知的，并且包括例如，在例如，Cepeda等，(ASN Neuro(2010)2(2):e00033)和Pouladi等，(Nat Reviews(2013)14:708)中描述的那些。

[0645] 本公开的药物组合物可以根据需要局部或全身治疗和在待处理的区域上以多种方式施用。施用可以是局部的(例如，通过透皮贴剂)、肺部的，例如通过吸入或吹入粉末或气溶胶，包括雾化器；肿瘤内、鼻内、表皮和透皮、口服或胃肠外。胃肠外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注；通过植入装置，例如通过植入装置；或颅内，例如实质内、鞘内或脑室内，施用。

[0646] RNAi剂可以以靶向特定组织的方式递送，如CNS(例如，大脑的神经元、神经胶质或血管组织)。

[0647] 用于局部施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。可以是必要的或期望的常规药物载体、水性、粉末或油性基部、增稠剂等。带涂层的避孕套、手套等也可有用。合适的局部制剂包括本公开中的RNAi剂的那些局部递送剂例如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合。合适的脂质和脂质体包括中性(例如，二油酸磷脂酰DOPE乙醇胺、二嗪磺酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如，二甲基苯乙烯基磷脂酰甘油DMPG)和阳离子(二油基四甲基氨基丙基DOTAP和二己基磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本公开中的RNAi剂可以封装在脂质体内或可以形成与其复合物，特别是阳离子脂质体。或者，RNAi剂可以复合给脂质，特别是阳离子脂质。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生酸、油酸、甘(碳)烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三磷酸、单油酸酯、二月桂酸甘油酯、1-单甲酸甘油酯、1-十二烷基氮环庚烷-2-酮、酰基鸟嘌呤、酰胆碱或C_{1-20}烷基酯(例如，肉豆蔻酸异丙酯IPM)、单甘油酯，氨基甘油酯或其药学上可接受的盐。在US 6,747,014中详细描述了局部制剂，其通过引用并入本文。

[0648] A.包含膜质分子组件的RNAi剂制剂

[0649] 用于本公开的组合物和方法的RNAi剂可以配制用于在膜质组件中递送,例如脂质体或胶束。如在本文中所使用的,术语“脂质体”指由至少一个双层,例如双层或多个双层布置在至少一个双层或多个双层中的两亲性脂质构成的泡囊。脂质体包括单层的和多层的泡囊,其具有由亲脂性材料和含水内部形成的膜。水性部分包含RNAi剂组合物。亲脂性材料将水性内部与水性外部分离,其通常不包含RNAi剂组合物,尽管在一些例子中,其可以。脂质体可用于转移或递送活性成分至作用部位。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜,所以当脂质体施加到组织时,脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体和细胞的合并进展,将包含RNAi剂的内部含水量递送到细胞中,其中RNAi剂可以特异性地结合靶RNA并且可以介导RNAi。在一些实施方式中,脂质体也特别地靶向例如以将RNAi剂指向特定的细胞类型。

[0650] 包含RNAi剂的脂质体可以通过各种方法制备。在一个例子中,将脂质体的脂质组分溶解在洗涤剂中,使得胶束形成有脂质组分。例如,脂质组分可以是两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。洗涤剂可以具有高临界胶束浓度,并且可以是非离子的。示例性洗涤剂包括胆酸脂、CHAPS、辛烷基葡糖苷、脱氧胆酸脂和月桂酰肌氨酸。然后将RNAi剂制剂添加到包含脂质体组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与RNAi剂相互作用并在RNAi剂周围凝聚形成脂质体。凝聚后,例如通过透析出去洗涤剂,以产生RNAi剂的脂质体制剂。

[0651] 如果需要,可以在缩合反应期间加入有助于缩合的载体化合物,例如通过受控添加。例如,载体化合物可以是除核酸之外的聚合物(例如,精胺或亚精胺)。还可以调节pH以促进缩合。

[0652] 用于生产稳定的多核苷酸递送载体的方法,其包含多核苷酸/阳离子脂质复合物作为递送载体的结构成分,描述于例如WO 96/37194中,其全部内容通过引用并入本文。脂质体形成还可以包括描述于Felgner,P.L.等,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8:7413-7417;美国专利号4,897,355;美国专利号5,171,678;Bangham等,(1965)M.Mol.Biol.23:238;Olson等,(1979)Biochim.Biophys.Acta 557:9;Szoka等,(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.75:4194;Mayhew等,(1984)Biochim.Biophys.Acta 775:169;Kim等,(1983)Biochim.Biophys.Acta728:339;和Fukunaga等,(1984)Endocrinol.115:757的示例性方法的一个或多个方面。用于制备用作递送载体的适当大小的脂质聚集体的常用技术包括超声处理和冻融加挤出成型(参见例如,Mayer等,(1986)Biochim.Biophys.Acta 858:161)。当需要始终小的(50至200nm)和相对均匀的聚集体时,可以使用微流化(Mayhew等,(1984)Biochim.Biophys.Acta 775:169)。这些方法很容易地适应将RNAi剂制剂包装到脂质体中。

[0653] 脂质体分为两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的核酸分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电荷的核酸/脂质体复合物与带负电荷的细胞表面结合并被内化。由于内体中的酸性pH值,脂质体破裂,将其内容物释放到细胞质中(Wang等,(1987)Biochem.Biophys.Res.Commun.,147:980-985)。

[0654] 对pH敏感或带负电荷的脂质体包埋核酸而不是与其复合。由于核酸和脂质都带类似电荷,所以会发生排斥而不是复合物形成。然而,一些核酸被截留在这些脂质体的水性内部。pH敏感脂质体已用于将编码胸苷激酶基因的核酸递送至培养中的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou等,(1992)Journal of Controlled Release,19:269-

274)。

[0655] 一种主要类型的脂质体组合物包括除天然衍生的磷脂酰胆碱之外的磷脂。例如，中性脂质体组合物可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成，而阴离子融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一种类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)例如大豆PC和蛋PC形成。另一种类型由磷脂或磷脂酰胆碱或胆固醇的混合物形成。

[0656] 在体外和体内将脂质体引入细胞的其他方法的例子包括美国专利号美国专利号5,283,185;美国专利号5,171,678;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;Felgner,(1994)J.Biol.Chem.269:2550;Nabel,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90:11307;Nabel,(1992)Human Gene Ther.3:649;Gershon,(1993)Biochem.32:7143;和Strauss,(1992)EMBO J.11:417。

[0657] 还检查了非离子脂质体系统已确定它们在将药物递送至皮肤的效用，特别是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包含Novasome™I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)和Novasome™II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)的非离子脂质体制剂将环孢菌素A递送到小鼠皮肤的真皮中。结果表明这种非离子脂质体系统可有效促进环孢菌素A沉积到皮肤的不同层中(Hu等,(1994)S.T.P.Pharma.Sci.,4(6):466)。

[0658] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体，如在本文中所使用的，其包含一种或多种特殊脂质的脂质体，当掺入至脂质体时，相对于缺乏此类特殊脂质的脂质体，其导致循环寿命延长。空间稳定的脂质体的例子是其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的一部分(A)包含一种或多种糖脂，例如单唾液酰神经节苷脂G_{M1}，或(B)用一种或多种亲水性聚合物如聚乙二醇(PEG)部分衍生。尽管不希望受任何特定理论的束缚，但本领域认为，至少对于包含神经节苷脂、鞘磷脂或PEG衍生脂质的空间稳定脂质体而言，这些空间稳定脂质体的循环半衰期延长源于网状内皮系统(RES)细胞的摄取减少(Allen等,(1987)FEBS Letters,223:42;Wu等,(1993)Cancer Research,53:3765)。

[0659] 包含一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos等(Ann.N.Y.Acad.Sci.,(1987),507:64)报道了单唾液酰神经节苷脂G_{M1}、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇提高脂质体血液半衰期的能力。Gabizon等(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,(1988),85:6949)阐述了这些发现。Allen等人的美国专利号4,837,028和WO 88/04924公开了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂G_{M1}或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利号5,543,152(Webb等)公开了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体公开于WO 97/13499(Lim等)。

[0660] 在一个实施方式中，使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优点。非阳离子脂质体虽然不能有效地与质膜融合，但在体内被巨噬细胞吸收，可用于将RNAi剂递送至巨噬细胞。

[0661] 脂质体的其他优点包括：从天然磷脂获得的脂质体具有生物相容性和可生物降解性；脂质体可以掺入多种水溶性和脂溶性药物；之自体可以保护封装在其内部隔室中的RNAi剂免受代谢和降解(Rosoff,"Pharmaceutical Dosage Forms,"Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,第1卷,p.245)。脂质体制剂制备中的重要考虑因素是脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的水体积。

[0662] 一种带正电荷的合成阳离子脂质,N-[1-(2,3-二乙氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可用于形成与核酸自发相互作用形成脂质-核酸复合物的小脂质体,其能够与组织培养细胞的细胞膜的带电荷的脂质融合,导致RNAi剂的递送(参见,例如,P.L.等,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8:7413-7417,和描述DOTMA及其与DNA的使用的美国专利号4,897,355)。

[0663] DOTMA类似物,1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可与磷脂组合使用以形成DNA复合囊泡。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories,Gaithersburg,Md.)是一种将高阴离子核酸递送到或组织培养细胞中的有效剂,该细胞包含带正电荷的DOTMA脂质体,其与带负电荷的多核苷酸自发地相互作用以形成复合物。当使用足够多的带正电荷的脂质体时,所得复合物的净电荷也是正电荷。以这种方式制备的带正电荷的复合物会自发地附着在带负电荷的细胞表面,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送至例如组织培养细胞。另一种市售阳离子脂质,1,2-双(油酰氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷("DOTAP")(Boehringer Mannheim,Indianapolis,Indiana)与DOTMA的不同之处在于油酰部分通过酯而不是醚键连接。

[0664] 其他已报道的阳离子脂质化合物包括已与多种部分缀合的化合物,包括例如已与两种类型的脂质之一缀合的羧基精胺,并包括化合物,例如5-羧基亚磺酰甘氨酸二辛油酰酰胺("DOGS")(Transfectam™,Promega,Madison,Wisconsin)和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基亚精酰胺("DPPES")(参见,例如,美国专利号5,171,678)。

[0665] 另一种阳离子脂质缀合物包括脂质与胆固醇("DC-Chol")的衍生物,其已与DOPE组合成脂质体(参见,Gao,X.和Huang,L.,(1991)Biochim.Biophys.Res.Commun.179:280)。据报道,通过将多聚赖氨酸与DOPE缀合制成的脂多聚赖氨酸在血清存在下对转染有效(Zhou,X.等,(1991)Biochim.Biophys.Acta 1065:8)。对于某些细胞系,据说这些包含缀合阳离子脂质的脂质体表现出比包含DOTMA的组合物更低的毒性并提供更有效的转染。其他市售阳离子脂质产品包括DMRIE和DMRIE-HP(Vical,La Jolla,California)和Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology,Inc.,Gaithersburg,Maryland)。适用于寡核苷酸递送的其他阳离子脂质描述于WO98/39359和WO 96/37194中。

[0666] 脂质体制剂特别适用于局部给药,与其他制剂相比,脂质体具有几个优点。这些优点包括减少与所施用药物的高全身吸收相关的副作用、增加施用药物在所希望靶标处的积累,以及将RNAi剂施用到皮肤中的能力。在一些实施方式中,脂质体用于将RNAi剂递送至表皮细胞并且还用于增强RNAi剂侵入真皮组织例如进入皮肤。例如,脂质体可以局部应用。已记载将配制为脂质体的药物局部递送至皮肤(参见,例如,Weiner等,(1992)Journal of Drug Targeting,vol.2,405-410和du Plessis等,(1992)Antiviral Research,18:259-265;Mannino,R.J.和Fould-Fogerite,S.,(1998)Biotechniques 6:682-690;Itani,T.等,(1987)Gene 56:267-276;Nicolau,C.等,(1987)Meth.Enzymol.149:157-176;Straubinger,R.M.和Papahadjopoulos,D.(1983)Meth.Enzymol.101:512-527;Wang,C.Y.和Huang,L.,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7851-7855)。

[0667] 还检查了非离子脂质体系统已确定它们在将药物递送至皮肤的效用,特别是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包含Novasome I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)和Novasome II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)的非离

子脂质体制剂将药物递送到小鼠皮肤的真皮中。这种具有RNAi剂的制剂可用于治疗皮肤病。

[0668] 可以使包含RNAi剂的脂质体高度变形。这种变形性可以使脂质体能够穿透小于脂质体平均半径的孔。例如,传递体是一种可变形的脂质体。传递体可以通过向标准脂质体组合物中添加表面边缘活化剂,通常是表面活性剂来制备。可以例如通过感染皮下递送包含RNAi剂的传递体以便将RNAi剂递送至皮肤中的角质形成细胞。为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在合适的透皮梯度的影响下通过一系列直径小于50nm的细孔。此外,由于脂质特性,这些传递体可以自我优化(适应例如皮肤中的毛孔的形状)、自我修复,并且可以经常到达其目标而不会碎裂,并且通常可以自我加载。

[0669] 适用于本公开的其他制剂描述于2008年1月2日提交的美国临时申请序列号61/018,616;2008年1月2日提交的61/018,611;2008年3月26日提交的61/039,748;2008年4月22日提交的61/047,087和2008年5月8日提交的61/051,528中。2007年10月3日提交的PCT申请号PCT/US2007/080331也描述了适用于本公开的制剂。

[0670] 传递体是另一种脂质体,是高度可变形的脂质聚集体,是药物递送载体的有吸引力的候选。传递体可以被描述为脂滴,其高度可变形,以至于它们很容易穿过比液滴小的孔。传递体适应使用它们的环境,例如它们是自我优化的(适应皮肤毛孔的形状)、自我修复、经常到达其目标而不会碎裂,并且通常自我加载。为了制造传递体,可以将表面边缘活化剂,通常是表面活性剂添加到标准脂质体组合物中。传递体已被用于将血清白蛋白递送到皮肤。以证明传递体介导的血清白蛋白递送与皮下注射包含血清白蛋白的溶液一样有效。

[0671] 表面活性剂在诸如本文所述的那些制剂中得到广泛应用,特别是在乳液(包括微乳液)和脂质体中。对许多不同类型的表面活性剂(天然和合成的)的特性进行分类和排序的最常用方法是使用亲水/亲油平衡(HLB)。亲水基团(也称为“头部”)的性质为对制剂中使用的不同表面活性剂进行分类提供了最有用的方法(Rieger,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,p.285)。

[0672] 如果表面活性剂分子未电离,则归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆品中得到广泛应用,并可在很宽的pH值范围内使用。通常,它们HLB值范围从2至约18,这取决于它们的结构。非离子表面活性剂包括非离子酯,例如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子烷醇酰胺和醚,例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物也包括在这一类中。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类别中最受欢迎的成员。

[0673] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带负电荷,则表面活性剂被归类为阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂包括羧酸脂例如皂、酰基乳酸脂、氨基酸的酰胺、硫酸酯如烷基硫酸脂和乙氧基化烷基硫酸脂、磺酸脂如烷基苯磺酸脂、酰基羟乙基磺酸脂、酰基牛磺酸脂和磺基琥珀酸脂,以及磷酸酯。阴离子表面活性剂类别中最重要的成员是烷基硫酸脂和皂类。

[0674] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带正电荷,则表面活性剂被归类为阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是此类中最常用的成员。

[0675] 如果表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力，则表面活性剂被归类为两性的。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱和磷脂。

[0676] 已审查表面活性剂在药品、制剂和乳液中的使用(Rieger,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,p.285)。

[0677] 用于本公开的方法中的RNAi剂也可以作为胶束制剂提供。“胶束”在本文中被定义为一种特殊类型的分子组装体，其中两亲分子排列成球形结构，使得分子的所有疏水部分都向内定向，而亲水部分与周围的水相接触。如果环境是疏水的，则存在相反的排列。

[0678] 适合通过透皮膜递送的混合胶束制剂可以通过混合siRNA组合物、碱金属C_8至C_{22}烷基硫酸脂和胶束形成化合物的水溶液来制备。示例性的胶束形成化合物包括卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、单油酸、单油酸酯、单月桂酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧代胆酰甘氨酸及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油精、聚氧乙烯醚及其类似物、聚多卡醇烷基醚及其类似物、鹅去氧胆酸脂、脱氧胆酸脂及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸脂的同时或之后添加。混合胶束将通过基本上任何种类的成分混合形成，但剧烈混合以提供更小尺寸的胶束。

[0679] 在一个方法中，制备包含siRNA组合物和至少碱金属烷基硫酸脂的第一胶束组合物。然后将第一胶束组合物与至少三种胶束形成化合物混合以形成混合胶束组合物。在另一种方法中，通过混合siRNA组合物、碱金属烷基硫酸酯和至少一种胶束形成化合物，然后添加剩余的胶束形成化合物并剧烈混合来制备胶束组合物。

[0680] 可以向混合胶束组合物中添加苯酚或间甲酚，以稳定制剂并防止细菌生长。或者，苯酚或间甲酚可以与胶束形成成分一起添加。在形成混合胶束组合物之后，也可以加入等渗剂如甘油。

[0681] 为了以喷雾剂的形式递送胶束制剂，可以将制剂放入气溶胶散发器中并且在散发器中装入抛射剂。处于压力下的抛射剂在散发器中呈液体形式。调整成分的比例使得水相和抛射剂相合而为一，即存在一相。如果有两个相，则必须在分配一部分内容物之前摇动散发器，例如通过计量阀门。剂的分散剂量从计量阀门以精细的喷雾推进。

[0682] 抛射剂可包括含氢氯氟烃、含氢氟烃、二甲醚和二乙醚。在某些实施方式中，可以使用HFA 134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0683] 基本成分的具体浓度可以通过相对简单的实验来确定。为了通过口腔吸收，通常需要增加例如至少两倍或三倍的通过注射或通过胃肠道给药的剂量。

[0684] B.脂质颗粒

[0685] RNAi剂例如本公开的dsRNA，可以完全包封在脂质制剂中，例如LNP，或其他核酸-脂质颗粒。

[0686] 如在本文中所使用的，术语“LNP”指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常包含阳离子脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的脂质(例如，PEG-脂质缀合物)。LNP对于全身应用非常有用，因为它们在静脉(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命，并在远端部位(例如，与给药部位物理分离的部位)积累。LNP包括“pSPLP”，其包括如WO00/03683中所述包封的缩合剂-核酸复合物。本公开的颗粒通常具有约50nm至约150nm，更通常约60nm至约130nm、更通常约70nm至约110nm，最通常约70nm至约90nm的平均直径，并且基本上无毒。此外，当核酸存在于

本公开的核酸-脂质颗粒中时，核酸在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。核酸-脂质颗粒及其制备方法公开于例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;美国专利公开号2010/0324120和WO 96/40964。

[0687] 在一个实施方式中，脂质与药物的比率(质量/质量比)(例如，脂质与dsRNA比)将在约1:1至约50:1，约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1。上述范围的中间范围也被认为是本公开的一部分。

[0688] 本领域已经描述了用于递送RNAi剂的某些特定LNP制剂，包括例如描述于例如WO 2008/042973中的“LNP01”制剂，其通过引用并入本文。

[0689] 下表中确定了另外的示例性脂质-dsRNA制剂。

[0690] 表1

[0691]

	可电离/阳离子脂质	**阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质缀合物 脂质：siRNA 比率**
SNALP-1	1,2-二亚油烯氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质：siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质：siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质：siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质：siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质：siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质：siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5

[0692]

		脂质： siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA 10:1
LNP11	4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂二基)二十二烷-2-醇 (Tech G1)	Tech G1/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质： siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质： siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质： siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 10:1

[0693]

LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质： siRNA: 10:1

[0694] DSPC:二硬脂酰卵磷脂;DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱;PEG-DMG:PEG-二甲基甘油(C14-PEG或PEG-C14)(平均摩尔重量为2000的PEG);PEG-DSG:PEG-二苯乙烯甘油(C18-PEG或PEG-C18)(平均摩尔重量为2000的PEG);PEG-cDMA:PEG-氨甲酰-1,2-二嗪磺酰丙胺(平均摩尔重量为2000的PEG)和包含SNALP(1,2-二硫烯氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA))的制剂描述于WO 2009/127060中,其通过引用并入本文。

[0695] 包含XTC的制剂描述于WO 2010/088537中,其全部内容通过引用并入本文。

[0696] 包含MC3的制剂描述于例如美国专利公开号2010/0324120中,其全部内容通过引用并入本文。

[0697] 包含ALNY-100的制剂描述于WO 2010/054406中,其全部内容通过引用并入本文。

[0698] 包含C12-200的制剂描述于WO 2010/129709中,其全部内容通过引用并入本文。

[0699] 用于口服给药的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、悬浮液或在水或非水介质中的溶液、胶囊、凝胶胶囊、香囊、片剂或小片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是期望的。在一些实施方式中,口服制剂是其中与一种或多种渗透促进表面活性剂和螯合剂联合施用本公开中特征的dsRNA的那些。合适的表面活性剂包括脂肪酸或其酯或盐、胆汁酸或其盐。合适的胆汁酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊去氧鹅去氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡萄糖胆酸、乙醇酸、甘氨去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺去氧胆酸、牛磺-24,25-二氢钠-夫西地和糖二氢夫西酸钠。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如,钠)。在一些实施方式中,施用渗透促进剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。一个示例性的组合是月桂酸、葵酸和UDCA的钠盐。其他渗透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚。本公开中的特征的dsRNA可以以包括喷雾干燥颗粒、或复合以形成微米或纳米颗粒的颗粒形式口服递送。dsRNA络合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸酯、聚氧乙烯、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生的聚亚胺、花粉、纤维素和淀粉。合适的络合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、多聚赖氨酸、多组氨酸、聚鸟氨酸、多精子、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙氨基甲基乙烯(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如p-氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚氰基丙烯酸乙酯、聚氰基丙烯酸丁酯、聚(氰基丙烯酸异丁酯)、聚(异己基环己基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸脂、DEAE-丙烯酸己酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-右旋糖酐、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸己酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-乙醇酸)(PLGA)、藻酸脂和聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服制剂及其制备详细描述于美国专利6,887,906、U.S.2003/0027780和美国专利号6,747,014中,其每个通过引用并入本文。

[0700] 用于肠胃外、脑实质内(脑内)、鞘内、心室内或肝内给药的组合物和制剂可以包括无菌水溶液,其也可以包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂,例如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0701] 本公开的药物组合物包括但不限于溶液、乳液和包含脂质体的制剂。这些组合物可由多种组分产生,包括但不限于预制液体、自乳化固体和自乳化半固体。特别优选的是在治疗LRRK2相关疾病或病症时靶向大脑的制剂。

[0702] 可由方便地以单位剂型存在的本公开的药物制剂可由根据制药工业中众所周知的常规技术来制备。这种技术包括使活性成分与药物载体后赋形剂结合的步骤。通常，通过将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合，然后，如果有需要，使产品成型，来制备制剂。

[0703] 本公开的组合物可以配制成许多可能的剂型中的任一个，例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本公开的组合物还可以配制成在水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增强悬浮液年度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液也可以包含稳定剂。

[0704] C.其他制剂

[0705] i.乳剂

[0706] 可以将本公开的组合物制备和配制为乳剂。乳剂典型地是一种液体以液滴形式(通常直径超过0.1μm)分散在另一种中的非均匀系统(参见例如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷，第199页;Rosoff,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷，第245页;Block in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.第2卷，第335页;Higuchi等，Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.301)。乳剂通常是双相的系统，其包含互不混溶的两个彼此紧密混合并分散的液相。在通常情况下，乳剂可以为油包水(w/o)或水包油(o/w)两种。当水相作为微小液滴细碎并分散到本体油相中时，所产生的组合物被称为油包水(w/o)乳剂。可替代地，当油相作为微小液滴细碎并分散到本体水相中时，所产生的组合物被称为水包油(o/w)乳剂。除了分散相和活性药物外，乳剂还可以含其他组分，活性药物可以作为在水相、油相中的溶液，或者其自身作为独立相。如果需要，也可以存在药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳剂还可以为包括多于两种相的多重乳剂，例如像油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳剂的情况。此类复合制剂通常提供某些简单的二元乳剂所不具有的优势。当多重乳剂中的o/w乳剂的各油滴还包有小水滴时，该多重乳剂形成w/o/w乳剂。同样地，在油连续相中稳定化的水滴中封装油滴的系统，构成o/w/o乳剂。

[0707] 乳剂具有较小或没有热力学稳定性的特征。通常，乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或制剂的粘性保持这种形式。其他稳定乳剂的方式需要使用乳化剂，这些乳化剂可以合并进入到乳剂的任意相中。乳化剂可以大致分成4类：合成性表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和精细分散的固体(参见例如，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.第1卷，第199页)。

[0708] 合成性表面活性剂，也称作表面活性剂，已经广泛应用于乳剂的制备并且已经在

文献中综述(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rieger,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第285页;Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第1卷,第199页)。表面活性剂典型地是两亲性分子,并且包括亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比值定义为亲水/亲油平衡值(HLB),其是制剂制备中分类和选择表面活性剂的有价值的工具。表面活性物质可以基于亲水基团的性质:非离子、阴离子、阳离子和两亲分成不同类别(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY Rieger,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第285页)。

[0709] 用于乳液制剂的天然乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收基质具有亲水性,因为它们可以吸收水以形成w/o乳液,同时保持其半固体稠度,例如无水羊毛脂和亲水性凡士林。精细地分割的固体也被用作良好的乳化剂,尤其是与表面活性剂结合使用和用于粘性制剂中。这些包括极性无机固体,例如重金属氧化物、非膨胀粘土例如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石、高岭土、蒙蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸镁铝、颜料和非极性固体,例如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0710] 在乳剂制剂中还包括多种非乳化材料,其对乳剂的特性有帮助。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(Block,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第335页;Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第199页)。

[0711] 亲水胶体或亲水胶体包括天然存在的树胶和合成聚合物,例如多糖(例如,阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、角叉菜胶、瓜尔胶、刺梧桐胶和黄蓍胶)、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)、和合成聚合物(例如,羧聚物、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。它们在水中分散或溶胀形成胶体溶液,通过在分散相液滴周围形成强界面膜并增强外相的粘度来稳定乳液。

[0712] 由于乳液通常包含多种成分,例如碳水化合物、蛋白、甾醇和磷脂,它们可以很容易地支持微生物的生长,因此这些制剂通常会加入防腐剂。乳液制剂中常用的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。抗氧化剂通常也添加到乳液制剂中以预防制剂变质。使用的抗氧化剂可以是自由基清除剂例如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基羟基苯甲醚、丁基羟基甲苯、或还原剂例如抗坏血酸和焦亚硫酸钠、和抗氧化剂增效剂例如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0713] 文献综述了通过皮肤病学、口服和非肠道途径应用乳液制剂及其制造方法(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;

Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,p.199)。由于易于配制以及从吸收和生物利用度的角度来看的功效,用于口服递送的乳液制剂已被非常广泛地使用(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,p.245;Idson,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,p.199)。矿物油基质轻泻药、油溶性微生物和高脂肪营养制剂是通常作为o/w乳液口服给药的材料。

[0714] ii.微乳

[0715] 在本公开的一个实施方式中,将iRNA和核酸的组合物配制为微乳液。可以将微乳液定义为水、油和两亲分子的体系,所述体系是光学各向同性和热动力学稳定的单一液态溶液(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.和Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,第245期)。典型地,微乳剂是通过如下方法制备的系统:首先将油分散到表面活性剂水溶液中,然后加入足量的通常为中等链长度的醇的第四组分而形成透明系统。因此,微乳剂也被描述成由表面活性分子的界面膜稳定化的两种不能混合的液体的热力学稳定的各向同性的澄清分散系(Leung和Shah,Controlled Release of Drugs:Polymers and Aggregate Systems,Rosoff,M.编著,1989,VCH Publishers,New York,第185-215页)。微乳通常通过包括油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质类在内的三到五种组分的组合来制备。微乳是油包水(w/o)或水包油(o/w)型,取决于所用油和表面活性剂的性质,以及表面活性剂分子极性头和烃尾的结构和几何堆积(Schott,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.271)。

[0716] 利用相图的现象学方式已经被广泛研究,并且对本领域技术人员来说已经产生了关于如何配制微乳的全面知识(参见,例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Allen,LV.,Popovich NG.,and Ansel HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins(第8版),New York,NY;Rosoff,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,p.245;Block,Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger和Banker(编著),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第1卷,p.335)。与传统的乳液相比,微乳通常具有将水不溶性药物溶解在自发形成的热力学稳定液滴中的优势。

[0717] 用于微乳制备的表面活性剂包括但不限于离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚、聚甘油脂肪酸酯、月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(MO310)、单油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、单癸酸甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(MO750)、亚油酸十甘油酯(SO750)、癸酸十甘油酯(DAO750),单独使用或与助表面活性剂组合使用。助表面活性剂,通常是短链醇例如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,通常渗透到

表面活性剂膜中来增加界面流动性，从而由于表面活性剂分子之间产生空隙空间而产生无序膜。然而，可以在不适用助表面活性剂的情况下制备微乳，并且本领域已知无醇自乳化微乳体系。水相通常可以是但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙醇的衍生物。油相可包括但不限于材料例如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中链(C8-C12)单、二、和三甘油酯、聚氧乙基化甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇化甘油酯、饱和聚乙二醇化C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0718] 从药物溶解和增强药物吸收的角度来看，微乳特别令人感兴趣。已提出基于脂质的微乳(o/w和w/o)来提高药物包括肽的口服生物利用度(参见例如，美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等,Pharmaceutical Research,1994,11,1385-1390;Ritschel,Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.,1993,13,205)。微乳具有以下优点:改善药物溶解性、保护药物免于酶水解、由于表面活性剂引起的膜流动性和渗透性改变而可能增强药物吸收、易于制备、与固体剂型相比易于口服给药、改善临床效力并降低毒性(参见例如美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides等,Pharmaceutical Research,1994,11,1385;Ho等,J.Pharm.Sci.,1996,85,138-143)。当它们的组分在环境温度下混合在一起时，通常会自发形成微乳。这在配制耐热药物、肽或RNAi剂时可能特别有利。在化妆品和药物应用时，微乳在活性组分的透皮递送方面也是有效的。预期本公开的微乳组合物和制剂将促进RNAi剂和核酸从胃肠道的增加的全身吸收，以及改善RNAi剂和核酸的局部细胞摄取。

[0719] 本公开的微乳还可以包含额外的组分和添加剂，例如脱水山梨醇单硬脂酸酯(Grill 3)、Labrasol和渗透促进剂以改善制剂的性质并增强本公开的RNAi剂和核酸的吸收。用于本公开的微乳的渗透促进剂可以分类为属于五个大类之一——表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂(Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92)。上面已经讨论了这些类别中的每一个。

[0720] iii.微粒

[0721] 本公开的RNAi剂可以掺入颗粒，例如微粒中。微粒可以通过喷雾干燥产生，单页可以通过其他方式产生，包括冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合。

[0722] iv.渗透促进剂

[0723] 在一个实施方式中，本公开使用各种渗透促进剂来实现核酸，特别是RNAi剂向动物皮肤的有效递送。大多数药物以离子化和非离子化形式存在于溶液中。然而，通常只有脂溶性或亲脂性药物容易透过细胞膜。已经发现如果要穿过的膜用渗透促进剂处理，即使是非亲脂性药物也可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂性药物扩散穿过细胞膜外，渗透促进剂还增强了亲脂性药物的渗透性。

[0724] 渗透促进剂可分为五类之一，即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂(参见例如，Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92)。下文更详细地描述了上述每一类渗透促进剂。

[0725] 表面活性剂(或“表面活性剂”)是化学实体，当溶解在水溶液中时，会降低溶液的表面张力或水溶液与另一种液体之间的界面张力，从而增强了通过粘膜对RNAi剂的吸收。除了胆汁盐和脂肪酸之外，这些渗透促进剂包括例如十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基

醚和聚氧乙烯-20-十六烷基醚)(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92);和全氟化学乳剂,如FC-43(Takahashi等,J.Pharm.Pharmacol.,1988,40,252)。

[0726] 用作渗透促进剂的各种脂肪酸及其衍生物包括例如油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精(1-单油酰基-外消旋甘油)、双月桂酸、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C1-20烷基酯(例如,甲基、异丙基和叔丁基)、及其单甘酯和双甘酯(即油酸、月桂酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸等)(参见,例如,Touitou,E.等,Enhancement in Drug Delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;El Hariri等,J.Pharm.Pharmacol.,1992,44,651-654)。

[0727] 胆汁的生理作用包括促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Brunton,第38章:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第9版,Hardman等,编著,McGraw-Hill,New York,1996,pp.934-935)。各种天然胆汁盐及其合成衍生物用作渗透促进剂。因此术语"胆汁盐"包括任何天然存在的胆汁成分以及任何它们的合成衍生物。合适的胆汁盐包括例如胆酸(或其药学上可接受的钠盐、胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡萄糖胆酸(葡萄糖胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、甘脱氧胆酸(甘脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅去氧胆酸(鹅去氧胆酸钠)、熊去氧胆酸(UDCA)、牛磺酸-24,25-二氢夫西地酸钠(STDHF)、乙醇二氢熔融酸钠和聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,Malmsten,M.Surfactants and polymers in drug delivery,Informa Health Care,New York,NY,2002;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Swinyard,第39章,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro编著,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990,第782-783页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Yamamoto等,J.Pharm.Exp.Ther.,1992,263,25;Yamashita等,J.Pharm.Sci.,1990,79,579-583)。

[0728] 与本公开组合使用的螯合剂可以定义为通过与其形成复合物从溶液中去除金属离子的化合物,从而增强了通过粘膜对RNAi剂的吸收。关于它们在本公开中用作渗透促进剂,螯合剂具有还用做DNase抑制剂的额外优势,因为大多数表征的DNA核酸酶需要二价金属离子进行催化,因此被螯合剂抑制(Jarrett,J.Chromatogr.,1993,618,315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸和高钒酸脂)、胶原的N-酰基衍生物、月桂醇醚-9和β-二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)(参见例如,Katdare,A.等,Excipient development for pharmaceutical,biotechnology,and drug delivery,CRC Press,Danvers,MA,2006;Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页;Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33;Buur等,J.Control

Rel.,1990,14,43-51)。

[0729] 如在本文中所使用的,非螯合非表面活性剂渗透增强化合物可定义为表现出作为螯合剂或作为表面活性剂的不显著活性但仍增强RNAi剂通过消化道粘膜的吸收的化合物(参见例如,Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1990,7,1-33)。这类渗透增强剂包括例如不饱和环状脲、1-烷基和1-烯基氮杂环烷酮衍生物(Lee等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,第92页);和非甾体抗炎药,例如双氯芬酸钠、消炎痛和保泰松(Yamashita等,J.Pharm.Pharmacol.,1987,39,621-626)。

[0730] 还可以将在细胞水平上增强RNAi剂摄取的剂添加到本公开的药物和其他组合物中。例如,还已知阳离子脂质,如脂质体(Junichi等,美国专利号5,705,188)、阳离子甘油衍生物、和聚阳离子分子,如多聚赖氨酸(WO 97/30731)可增强dsRNA的细胞摄取。

[0731] 其他剂可用于增强所施用核酸的渗透,其包括二醇类例如乙二醇和丙二醇、吡啶类例如2-吡咯、氮酮、和萜烯,如柠檬烯和薄荷酮。

[0732] v.赋形剂

[0733] 与载体化合物相比,“药物载体”或“赋形剂”是用于将一种或多种核酸递送至动物的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或其他药理学惰性载体。赋形剂可以是液体或固体,并且在与核酸和给定药学组合物的其他组分组合时,根据计划的给药方式进行选择,以提供所需的体积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于粘合剂(例如,预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石粉、二氧化硅、胶体二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟基乙酸淀粉钠等);和润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0734] 适用于非肠道给药且不会与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可用于配制本公开的组合物。合适的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0735] 用于局部施用核酸的制剂可以包括无菌或非无菌水溶液、在普通溶剂例如醇中的非水溶液、或核酸在液体或固体油基中的溶液。该溶液还可以包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂。也可以使用适用于非肠道给药且不会与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0736] 合适的药学上可接受的赋形剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0737] vi.其他组分

[0738] 本公开的组合物可以另外包含在药物组合物中常规发现的其他辅助组分,其在本领域确立的使用水平。因此,例如,组合物可以包含另外的、相容的药学活性材料,例如止痒药、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可包含用于物理配制本公开组合物的各种急性的额外材料,例如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,这些材料在添加时不应过度干扰本公开组合物的组分的生物活性。制剂可以灭菌,如果需要,可以与辅助剂混合,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色

剂、调味剂或芳香物质等，它们不会与制剂的核酸发生有害的相互作用。

[0739] 水性悬浮液可包含增强悬浮液粘度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液也可以包含稳定剂。

[0740] 在一些实施方式中，本公开中的药物组合物包含(a)一种或多种RNAi剂和(b)一种或多种通过非RNAi机制起作用并且可用于治疗LRRK2相关病症的剂。这类剂的例子包括但不限于单胺抑制剂、利血平、抗惊厥药、抗精神病药和抗抑郁药。

[0741] 这类化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药学程序来确定，例如用于确定LD_{50}(对50％的群体致死的剂量)和ED_{50}(对50％的群体治疗有效的剂量)。毒性和治疗效应之间的剂量比是治疗指数，并且它可以表示为LD_{50}/ED_{50}的比值。优选表现出高治疗指数的化合物。

[0742] 从细胞培养实验和动物研究中获得的数据可用于制定用于人类的一系列剂量。本公开中本文特征的组合物的剂量通常在循环浓度范围内，包括ED_{50}，毒性很小或没有毒性。根据所用剂型和所用给药途径，剂量可在此范围内变化。对于在本公开的特征的方法中使用的任何化合物，治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定来估计。可以在动物模型中配制剂量以实现化合物的循环血浆浓度范围，或在适当时实现靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如，实现降低的多肽浓度)、包括在细胞培养中测定的IC_{50}(即达到最大症状抑制一半的测试化合物的浓度)。此类信息可用于更准确地确定人体的有用剂量。例如，可以通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0743] 除了它们的施用，如上所述，本公开的RNAi剂可以与其他已知的有效治疗由核苷酸重复表达介导的病理过程的剂组合施用。在任何情况下，施用医师可以基于使用本领域已知的或本文描述的标准功效指标观察到的结果来调整RNAi剂给药的量和时间。

[0744] VII.试剂盒

[0745] 在某些方面，本公开提供了包括合适容器的试剂盒，该容器包含siRNA化合物的药物制剂，例如，双链siRNA化合物，或ssiRNA化合物(例如，前体、例如，更大的siRNA化合物，其可以被加工成ssiRNA化合物，或编码siRNA化合物的DNA，例如，双链siRNA化合物、或ssiRNA化合物或其前体)。

[0746] 此类试剂盒包括一种或多种dsRNA剂和使用说明，例如用于施用预防或治疗有效量dsRNA剂的说明。dsRNA剂可以在小瓶或预填充注射器中。试剂盒可以任选地进一步包括用于施用dsRNA剂的工具(例如，注射装置，如预填充注射器)，或用于测量C3抑制的工具(例如，用于测量LRRK2 mRNA、LRRK2蛋白和/或LRRK2活性的抑制的工具)。用于测量LRRK2抑制的此类工具可包括用于从受试者获得样品(比如，例如，CSF和/或血浆样品)的工具。本发明的试剂盒可任选地进一步包括用于确定治疗有效或预防有效量的工具。

[0747] 在某些实施方式中，药物制剂的各个组分可以在一个容器中提供，例如小瓶或预填充注射器。或者，可以期望在两个或更多个容器中分别提供药物制剂的组分，例如一个容器用于siRNA化合物制剂，且至少另一个用于载体化合物。试剂盒可以以多种不同的装置进行包装，例如一个或多个容器装在一个盒子中。可以组合不同的组分，例如根据试剂盒提供的说明。可以根据本文所述的方法组合组合，例如以制备和施用药物组合物。试剂盒还可以包括递送装置。

[0748] VIII.抑制LRRK2表达的方法

[0749] 本公开还提供了抑制细胞中LRRK2基因表达的方法。所述方法包括使细胞与有效抑制细胞中LRRK2表达的量和/或活性的RNAi剂例如双链RNAi剂接触，从而抑制细胞中LRRK2的表达和/或活性。在本公开的某些实施方式中，LRRK2表达和/或活性优选在CNS(例如，脑)细胞中被抑制至少30％。在特定实施方式中，LRRK2表达和/或活性被抑制至少30％。在本公开的其他实施方式中，LRRK2表达和/或活性优选在眼部(例如，眼)细胞中被抑制至少30％。在本公开的某些其他实施方式中，LRRK2表达和/或活性优选在肝细胞中被抑制至少30％。

[0750] 细胞与RNAi剂例如双链RNAi剂接触可以在体外或体内进行。使体内细胞与RNAi剂接触包括使受试者例如人受试者内的细胞或细胞群与RNAi剂接触。接触细胞的体外或体内方法的组合也是可能的。

[0751] 如上所述，接触细胞可以是直接的或间接的。此外，可以通过靶向配体实现接触细胞，其包本文所述或本领域已知的任何配体。在一些实施方式中，靶向配体是碳水化合物部分，例如GalNAc配体，或将RNAi剂引导至感兴趣位点的任何其他配体。

[0752] 如在本文中所使用的，术语“抑制”与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑制”和其他类似术语可互换使用，并且包括任何水平的抑制。在某些实施方式中，可以在细胞培养条件下评估例如对于本公开的RNAi剂的抑制水平，例如，其中细胞培养物中的细胞通过Lipofectamine™介导的转染以10nM或更低、1nM或更低等的细胞附近浓度进行转染。可以通过比较细胞培养物中的预处理水平与细胞培养物中的后处理水平来确定给定RNAi剂的敲低，任选地还与用乱序或其他形式的对照RNAi剂平行处理的细胞进行比较。细胞培养物中的例如至少约30％的敲低可由此被鉴定为指示已经发生“抑制”或“减少”、“下调”或“抑制”等。明确地考虑，靶mRNA或编码的蛋白水平(以及因此由本公开的RNAi剂引起的“抑制”程度等)的评估也可以在体内系统中评估本公开的RNAi剂，在如本领域所述的适当控制的条件下。

[0753] 如在本文中所使用的短语“抑制LRRK2”、“抑制LRRK2基因的表达”或“抑制LRRK2的表达”包括抑制任何LRRK2基因的表达(比如例如，小鼠LRRK2基因、大鼠LRRK2基因、猴LRRK2基因、或人LRRK2基因)以及编码LRRK2蛋白的LRRK2基因的变体或突变体。因此，在基因操作的细胞、细胞群或生物体的背景下，LRRK2基因可以是野生型LRRK2基因，突变型LRRK2基因或转基因LRRK2基因。

[0754] “抑制LRRK2基因的表达”包括任何水平的LRRK2基因抑制，例如至少部分抑制LRRK2基因的表达，如抑制至少约25％。在某些实施方式中，相对于对照水平，抑制至少约25％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或至少约95％或至少约99％。LRRK2抑制可以使用例如如本文实施例中提供的A549细胞和10nM浓度的RNA剂以及PCR测定的体外测定进行测量，其被认为在本公开的范围内。在一些实施方式中，LRRK2抑制可以使用原代小鼠肝细胞的体外测定来测量。在另一个实施方式中，LRRK2抑制可以使用Cos-7(双荧光素酶psiCHECK2载体)的体外测定来测量。在又一个实施方式中，LRRK2抑制可以使用BE(2)-C细胞的体外测定来测量。在一些实施方式中，LRRK2抑制可以使用Neuro-2a细胞的体外测定来测量。

[0755] LRRK2基因的表达可以基于与LRRK2基因表达相关的任何变量的水平来评估，例如，LRRK2 mRNA水平(例如，有义mRNA、反义mRNA、总LRRKmRNA、有义含有LRRK2重复的mRNA

和/或反义含有LRRK2重复的mRNA)或LRRK2蛋白水平(例如,总LRRK2蛋白、野生型LRRK2蛋白或含扩增重复的蛋白)或者例如含有有意或反义基因座的水平和/或异常二肽重复蛋白的水平。

[0756] 可以通过与对照水平相比这些变量中的一种或多种的绝对或相对水平的降低来评估抑制。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的水平,例如给药前基线水平,或从未经处理或用对照(比如,例如,仅缓冲液对照或非激活剂对照)处理的类似受试者、细胞或样品确定的水平。

[0757] 例如,在本公开的方法的一些实施方式中,与对照水平相比,LRRK2基因的表达(例如,如通过含有有义或反义基因座和/或异常二肽重复蛋白水平所评估的),LRRK2基因的表达抑制至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%,或者低于该测定的检测水平。在本公开的方法的其他实施方式中,与对照水平相比,LRRK2基因的表达(例如,如通过mRNA或蛋白表达水平评估的)抑制至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%。在某些实施方式中,该方法包括LRRK2表达的临床相关抑制,例如,通过用剂治疗受试者以减少LRKK2的表达之后的临床相关结局所表明的。

[0758] LRRK2基因表达的抑制可以通过由其中转录LRRK2基因并且已经或已经被处理(例如,通过将一个或多个细胞与本公开的RNAi剂接触,或通过将本公开的RNAi剂施用于其中存在或曾经存在细胞的受试者)使得LRRK2基因表达被抑制的第一细胞或细胞群(例如,此类细胞可能存在于来自受试者的样品中)例如表达的mRNA量的减少来证明,与第二细胞或细胞群相比,该第二细胞或细胞群与第一细胞或细胞群基本相同,但未经过或未经过如此处理(对照细胞未用RNAi剂处理或未用靶向感兴趣基因的RNAi剂处理)。抑制程度可以表示为:

[0759] $$\frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{处理细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \cdot 100\%$$

[0760] 在其他实施方式中,LRRK2基因表达的抑制可以根据在功能上与LRRK2基因表达相关的参数,例如LRRK2蛋白表达、含有意或反义基因座和/或异常二肽重复蛋白的水平的降低进行评估。LRRK2基因沉默可以在任何表达LRRK2的细胞中确定,无论是内源的还是来自表达构建体的异源的,并且通过本领域已知的任何测定。

[0761] LRRK2蛋白表达的抑制可以通过细胞或细胞组表达的LRRK2蛋白水平(或功能参数,例如,激酶和/或GTP酶活性)的降低(例如,来自受试者的样品中表达的蛋白水平)来体现。如上所述,对于mRNA抑制的评估,处理的细胞或细胞组中蛋白表达水平的抑制可以类似地表示为对照细胞或细胞组中蛋白水平的百分比。在一些实施方式中,短语“抑制LRRK2”也可以指抑制LRRK2的激酶和/或GTPase活性,例如,至少部分抑制LRRK2激酶和/或GTPase活性,如抑制至少约25%。在某些实施方式中,与对照水平相比,LRRK2的激酶和/或GTPase活性抑制至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%或至少约99%。可以使用体外测定测量LRRK2激酶活性,例如,在(Smith等,(2006)Nature Neuroscience 9(10):1231-3)中描述的测定。可以使用体外测定测量LRRK2 GTPase活性,例如,在(Xiong等,(2010)Plos Genet 6(4):e1000902)中描述的测定。

[0762] 可用于评估LRRK2基因表达的抑制的对照细胞或细胞群包括尚未与本公开的RNAi剂接触的细胞或细胞群。例如,对照细胞或细胞群可以在用RNAi剂治疗受试者之前来源于个体受试者(例如,人或动物受试者)。

[0763] 可以使用本领域已知的用于评估mRNA表达的任何方法来确定由细胞或细胞群表达的LRRK2 mRNA水平。在一个实施方式中,样品中LRRK2的表达水平通过检测转录的多核苷酸或其部分,例如LRRK2基因的mRNA来确定。可以使用RNA提取技术从细胞中提取RNA,其包括例如使用酸性苯酚/异硫氰酸胍提取(RNAzol B;Biogenesis)、RNeasy™RNA制备试剂盒(Qiagen®)或PAXgene(PreAnalytix,Switzerland)。用核糖核酸杂交的典型测定形式包括核连续测定、RT-PCR、RNase保护测定、RNA印迹、原位杂交和微阵列分析。可以使用在例如,Jiang等,同上,Lagier-Tourenne,等,同上和Jiang,等,同上中描述的定量RT-PCR和或液滴数字PCR法检测链特异性LRRK2 mRNA。可以使用WO2012/177906中描述的方法检测循环LRRK2 mRNA,其全部内容通过引用并入本文。

[0764] 在一些实施方式中,使用核酸探针确定LRRK2的表达水平。如在本文中所使用的术语“探针”是指能够选择性结合特定LRRK2核酸或蛋白或其片段的任何分子。探针可以由本领域技术人员合成,或衍生自适当的生物制剂。探针可以特异地设计用于标记。可用作探针的分子的例子包括但不限于RNA、DNA、蛋白、抗体或有机分子。

[0765] 分离的mRNA可用于杂交或扩增测定,包括但不限于Southern或Northern分析、聚合酶链式反应(PCR)分析和探针阵列。一种用于确定mRNA的方法包括将分离的mRNA与可以与LRRK2mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。在一个实施方式中,将mRNA固定在固体表面并与探针接触,例如通过在琼脂糖凝胶上运行分离的mRNA并将mRNA从凝胶转移到膜上,例如醋酸纤维素膜。在另一个实施方式中,探针被固定在固体表面上并且mRNA与探针接触,例如在Affymetrix®基因芯片阵列中。熟练的技术人员可以容易地采用已知的mRNA检测方法来确定LRRK2 mRNA的水平。

[0766] 用于确定样品中补体成分LRRK2的表达水平的替代方法包括样品中例如mRNA的核酸扩展或逆转录酶(以制备cDNA)的过程,例如,通过RT-PCR(显示在Mullis,1987,美国专利号4,683,202中的实验实施方式),连接酶链反应(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193),自持续序列复制(Guatelli等,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878),转录扩展系统(Kwoh等,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177),Q-β复制酶(Lizardi等,(1988)Bio/Technology 6:1197),滚环复制(Lizardi等,美国专利号5,854,033)或任何其他核酸扩增方法,随后使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子以非常低的数量存在,则这些检测方案对于检测核酸分子特别有用。在本公开的特定方面中,通过定量荧光RT-PCR(即,TaqMan™系统),通过Dual-Glo®荧光素酶测定或者通过本领域公知的其他用于测量LRRK2表达或mRNA水平的方法确定LRRK2的表达水平。

[0767] LRRK2 mRNA的表达水平可以使用膜印迹(如用于杂交分析,如northern、Southern、dot等)或微孔、样品管、凝胶、珠子或纤维(或者任何包含结合核酸的固体支持物)监测。参见美国专利号5,770,722、5,874,219、5,744,305、5,677,195和5,445,934,其通过引用并入本文。LRRK2表达水平的确定还可以包括使用溶液中的核酸探针。

[0768] 在一些实施方式中,使用支链DNA(bDNA)测定或实时PCR(qPCR)评估mRNA表达的水

平。这些PCR方法的使用在本文呈现的实施例中进行了描述和举例说明。此类方法还可以用于检测LRRK2核酸。

[0769] 可以使用本领域公知的用于测量蛋白水平的任何方法来确定LRRK2蛋白表达水平。此类方法包括,例如,电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层层析(TLC)、高扩散性层析、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱、比色测定、分光广光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单或双)、免疫电泳、蛋白印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、电化学发光测定等。此类测定也可用于检测指示LRRK2蛋白存在或复制的蛋白。

[0770] 可以使用本领域普通技术人员熟知的方法,包括例如荧光原位杂交(FISH)、免疫组织化学和免疫测定来评估含有义或反义基因座的水平和异常二肽重复蛋白的水平(参见,例如,Jiang等,同上)。在一些实施方式中,本公开的方法在治疗LRRK2相关疾病中的功效通过LRRK2 mRNA水平的降低来评估(例如,通过评估CSF样品和/或血浆样品的LRRK2水平、通过脑活检或其他方式)。

[0771] 在本公开方法的一些实施方式中,将RNAi剂施用于受试者使得RNAi剂递送至受试者内的特定位点。LRRK2表达的抑制可以使用来自受试者内特定位点(例如,CNS细胞、眼细胞)的样品中LRRK2mRNA(例如,有义mRNA、反义mRNA、总LRRK2 mRNA)或LRRK2蛋白(例如,总LRRK2蛋白、野生型LRRK2蛋白)、包含有义的基因座、包含反义的基因座、异常二肽重复蛋白的水平或水平变化的测量来评估。在某些实施方式中,所述方法包括临床相关的LRRK2表达抑制,例如用降低LRRK2表达的剂治疗受试者后的临床相关结果所证明的,例如尾状核萎缩的稳定或抑制(例如,通过体积MRI(vMRI))、受试者脑脊液样品中神经丝轻链(Nfl)水平的稳定或降低、突变LRRK2 mRNA或切割的突变LRRK2蛋白减少,例如,全长突变LRRK2 mRNA或蛋白和切割的突变LRRK2 mRNA或蛋白和统一LRRK2相关疾病评定量表(UHDRS)评分稳定或改善。

[0772] 如在本文中所使用的,术语检测或确定分析物的水平应理解为表示执行步骤以确定材料例如蛋白、RNA是否存在。如在本文中所使用的,检测或确定的方法包括检测或确定低于所用方法的检测水平的分析物水平。

[0773] IX.治疗或预防LRRK2相关疾病的方法

[0774] 本公开还提供了使用本公开的RNAi剂或包含本公开的RNAi剂的组合物降低或抑制细胞中LRRK2表达的方法。该方法包括使细胞与本公开的dsRNA接触并将细胞维持足够长的时间以获得LRRK2基因的mRNA转录物的降解,从而抑制细胞中LRRK2基因的表达。

[0775] 此外,本公开还提供了使用本公开的RNAi剂或包含本公开的RNAi剂的组合物降低和/或抑制细胞中包含有义和反义基因座的形成。该方法包括使细胞与本公开的dsRNA接触,从而降低细胞中包含LRRK2有义和反义基因座的水平。

[0776] 本公开还提供了使用本公开的RNAi剂或包含本公开的RNAi剂的组合物降低细胞中异常二肽重复蛋白的水平和/或抑制其形成。该方法包括使细胞与本公开的dsRNA接触,从而降低细胞中异常二肽重复蛋白的水平。

[0777] 可以通过本领域已知的任何方法评估基因表达的降低、含有LRRK2有义和反义基因座的水平和/或异常二肽重复蛋白。例如,LRRK2表达的降低可以通过使用本领域普通技术人员常规的方法确定LRRK2的mRNA表达水平来确定,例如,northern印记,qRT-PCR;通过使用本领域普通技术人员常规的方法测定LRRK2的蛋白水平来确定,例如,western印迹、免

疫学技术。

[0778] 在本公开的方法中,可以在体外或体内接触细胞,即细胞可以在受试者体内。

[0779] 适合使用本公开方法进行治疗的细胞可以是表达LRRK2基因的任何细胞。适用于本公开方法的细胞可以是哺乳动物细胞,例如灵长类细胞(如人细胞或非人灵长类细胞,例如,猴细胞或黑猩猩细胞)、非灵长类细胞(如大鼠细胞或小鼠细胞)。在一个实施方式中,细胞是人细胞,例如,人CNS细胞或人眼细胞。

[0780] 与在对照细胞中的表达相比,在细胞中LRRK2表达(例如,通过有义mRNA、反义mRNA、总LRRK2 mRNA、总LRRK2蛋白)被抑制约20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在某些实施方式中,与对照水平相比,LRRK2表达被抑制至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%。

[0781] 如通过包含有义或反义基因座和/或异常二肽重复蛋白的水平所评估的抑制,在细胞中抑制至少约20%、30%、40%,优选至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%或低于测定的检测水平。

[0782] 本公开的体内方法可以包括向受试者施用包含RNAi剂的组合物,其中RNAi剂包含与待治疗哺乳动物的LRRK2基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。当待治疗的生物体是哺乳动物例如人时,可以通过本领域已知的任何方法施用组合物,其包括但不限于口服、腹膜内或肠胃外途径,包括颅内(例如,心室内、脑实质内和鞘内)、静脉内、肌内、玻璃体内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、鼻腔、直肠和局部(包括口腔和舌下)施用。在某些实施方式中,组合物通过静脉输注或注射施用。在某些实施方式中,组合物通过皮下注射施用。在某些实施方式中,组合物通过鞘内注射施用。

[0783] 在一些实施方式中,施用是通过积存(depot)注射。积存注射可能会在较长时间内以一致的方式释放RNAi剂。因此,积存注射可降低获得所需效果所需的给药频率,例如所需的LRRK2抑制或治疗或预防效果。积存注射也可以提供更一致的血清浓度。积存注射可包括皮下注射或肌内注射。在优选的实施方式中,积存注射是皮下注射。

[0784] 在一些实施方式中,施用通过泵。泵可以是外部泵或手术植入的泵。在某些实施方式中,泵是皮下植入的渗透泵。在其他实施方式中,泵是输液泵。输液泵可用于颅内、静脉内、皮下、动脉或硬膜外输液。在优选的实施方式中,输液泵是皮下输液泵。在其他实施方式中,泵是外科植入的泵,其将递送RNAi剂至CNS。

[0785] 可以基于是否需要局部或全身治疗以及基于待治疗的区域来选择施用方式。可选择施用途径和部位以增强靶向性。

[0786] 在一个方面中,本公开还提供了抑制哺乳动物中LRRK2基因表达的方法。所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物细胞中的LRRK2基因的dsRNA的组合物,从而抑制细胞中LRRK2基因的表达。基因表达的降低可以通过本领域已知的任何方法和通过如本文所述的方法例如qRT-PCR来评估。蛋白产生的降低可以通过本领域已知的任何方法和通过如本文所述的方法例如ELISA来评估。在一个实施方式中,CNS活检样品或脑脊液(CSF)样品用作用于监测LRRK2基因或蛋白表达(或因此的替代物)减少的组织材料。

[0787] 本公开还提供了对其有需要的受试者的治疗方法。本公开的治疗方法包括以治疗有效量的靶向LRRK2基因的RNAi剂或包含靶向LRRK2基因的RNAi剂的药物组合物向受试者(例如,将受益于LRRK2表达抑制的受试者,如在LRRK2基因中具有错义和/或缺失突变的受

试者)施用本公开的RNAi剂。

[0788] 此外,本公开提供了在受试者中预防、治疗或抑制LRRK2相关疾病或病症(例如,LRRK2相关病症)的进展的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的任何RNAi剂,例如dsRNA,或本文提供的药物组合物,从而预防、治疗或抑制受试者中LRRK2相关疾病或病症的进展。

[0789] 本公开的RNAi剂可以作为"游离RNAi剂"施用。游离RNAi剂在不存在药物组合物的情况下施用。裸RNAi剂可以在合适的缓冲溶液中。缓冲溶液可包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐、或其任意组合。在一个实施方式中,缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节包含RNAi剂的缓冲溶液的pH和渗透压,以使其适合施用于受试者。

[0790] 或者,本公开的RNAi剂可以作为药物组合物施用,如dsRNA脂质体制剂。

[0791] 将受益于LRRK2基因表达的减少或抑制的受试者是那些患有LRRK2相关疾病,例如,LRRK2相关疾病,的受试者。示例性LRRK2相关疾病包括但不限于PD、克隆氏病、免疫病症和眼部病症。

[0792] 本公开还提供了使用RNAi剂或其药物组合物的方法,例如用于治疗将受益于LRRK2表达的减少或抑制的受试者,例如患有LRRK2相关病症的受试者,与其他药物或其他治疗方法合用,例如已知药物或已知治疗方法,例如目前用于治疗这些疾病的那些。例如,在某些实施方式中,靶向LRRK2的RNAi剂与例如可用于治疗本文其他地方所述或本领域已知的LRRK2相关病症的剂组合施用。例如,适用于治疗将受益于LRRK2表达减少的受试者(例如,患有LRRK2相关病症的受试者)的其他剂可以包括目前用于治疗LRRK2症状的剂。RNAi剂和另外的治疗剂可以同时或以相同的组合施用,例如鞘内施用、或另外的治疗剂可以作为单独组合物的一部分或在分开的时间或通过本领域已知或本文所述的另一种方法施用。

[0793] 示例性的另外的治疗剂包括例如单胺抑制剂,例如丁苯那嗪(Xenazine)、苯那嗪(Austedo)和利血平、抗惊厥药,例如丙戊酸(Depakote,Depakene,Depacon)和氯硝西泮(Klonopin),抗精神病药,例如利培酮(Risperdal)和氟哌啶醇(Haldol),以及抗抑郁药,例如帕罗西汀(Paxil)。

[0794] 在一个实施方式中,所述方法包括施用本文特征的组合物使得靶LRRK2基因的表达降低至少一个月。在优选的实施方式中,表达降低至少2个月、3个月或6个月。

[0795] 优选地,可用于本文特征的方法和组合物的RNAi剂特异性地靶向靶LRRK2基因的RNA(初级的或加工的)。可以如本文所述制备和实施使用RNAi剂抑制这些基因表达的组合物和方法。

[0796] 根据本公开的方法施用dsRNA可导致患有LRRK2相关病症的患者中此类疾病或病症的严重性、体征、症状或标志物降低。在此上下文中,"降低"是指该水平的统计学显著或临床显著降低。与对照水平相比,降低可以是例如至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0797] 可以评估治疗或预防疾病的功效,例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活质量、维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标志物水平或适用于正在治疗或预防的给定疾病的任何其他可测量参数。通过测量这些参数中的任何一种或参数的任

何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如，可以评估治疗LRRK2相关病症的功效，例如通过定期监测受试者的情况。后期读数与初始读数的比较为医生提供治疗是否有效的指示。通过测量这些参数中的任何一种或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。关于靶向LRRK2的RNAi剂或其药物组合物的施用，“有效对抗”LRRK2相关病症表明以临床上适当的方式给药对至少有统计学意义的部分患者产生有益效果，例如症状改善、治愈、疾病减少、寿命延长、生活质量改善或熟悉治疗LRRK2相关疾病和相关原因的医生普遍认为是积极的其他作用。

[0798] 当疾病状态的一个或多个参数在统计学上有显著改善，或者没有恶化或者出现原本预期的症状时，治疗或预防效果是明显的。例如，疾病的可测量参数中至少10％、优选至少20％、30％、40％、50％或更多的有利变化可以指示有效治疗。还可以使用本领域已知的给定疾病的实验动物模型来判断给定RNAi剂药物或该药物制剂的功效。当使用实验动物模型时，当观察到标志物或症状在统计学上显著降低时，就证明了治疗的功效。

[0799] 或者，可以通过诊断领域的技术人员基于临床接受的疾病严重程度分级量表确定的疾病严重程度的降低来测量功效。导致例如使用适当量表测量的疾病严重程度减轻的任何积极变化代表使用如本文所述的RNAi剂或RNAi剂制剂进行的充分治疗。

[0800] 在某些实施方式中，可以向受试者施用治疗量的dsRNA，如约0.01mg/kg至约200mg/kg。在其他实施方式中，可以向受试者施用治疗量的dsRNA，如约0.01mg/kg至约500mg/kg。在其他实施方式中，可以向受试者施用约500mg/kg或更多的治疗量的dsRNA。

[0801] RNAi剂可以定期通过鞘内、玻璃体注射或在一段时间内通过静脉内输注给药。在某些实施方式中，在初始治疗方案之后，可以以较低频率进行治疗。RNAi剂的施用可以降低LRRK2水平，例如，在患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其他隔室中。在一个实施方式中，相对于对照水平，RNAi剂的施用能够使LRRK2水平(例如，在患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其他隔室中)降低至少约25％，如约25％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或约95％。

[0802] 在施用全剂量的RNAi剂之前，可以施用患者较小的剂量，例如5％输注反应，并监测不良反应，如变态反应。在另一个例子中，可以监测患者的不需要的免疫刺激作用，如增加的细胞因子(例如，TNF-α或INF-α)水平。

[0803] 或者，可以皮下施用RNAi剂，即通过皮下注射。一次或多次注射可用于向受试者递送所需的例如每月剂量的RNAi剂。注射可以在一段时间内重复。可以定期重复给药。在某些实施方式中，在初治方案后，可以以较低频率施用治疗。重复剂量方案可包括定期施用治疗量的RNAi剂，例如每月一次或延长至每一度一次、每年两次、每年一次。在某些实施方式中，约每月一次至约每季度一次(即约每三个月一次)施用RNAi剂。

[0804] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所述的方法和材料相似或等效的方法和材料可用于本发明特征的RNAi剂和方法的实践或测试，但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用整体并入。在冲突的情况下，以本说明书(包括定义)为准。此外，材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。

[0805] 随此提交了一份非正式的序列表，并构成了提交时说明书的一部分。

[0806] 实施例

[0807] 实施例1:RNAi剂的设计、合成、选择和体外评价

[0808] 试剂来源

[0809] 在本文未具体给出试剂来源的情况下,该试剂可以从分子生物学试剂的任何供应商处以用于分子生物学的质量/纯度标准获得。

[0810] 生物信息学

[0811] 靶向人LRRK2转录物(智人富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)mRNA,NCBI refseqID NG_011709.1;NCBI GeneID:120892)的siRNA使用定制R和Rython脚本设计。人NM_198578.4mRNA的长度为9239个碱基。

[0812] 未修饰的LRRK2有义和反义链核苷酸序列的详细列表显示在表3和表6。修饰的LRRK2有义链和反义链核苷酸序列的详细列表显示在表4和表7中。

[0813] 应当理解,在整个申请中,不带小数的双链体名称等同于仅引用双链体的批号的带小数的双链体名称。例如,AD-601140等同于AD-601140.1。

[0814] 体外A549筛选

[0815] i.细胞培养和转染:

[0816] 通过在384孔板中向每孔5μL siRNA双链体添加每孔5μL 1ng/μL稀释于Opti-MEM中的LRRK2 psiCHECK2载体(Blue Heron Biotechnology),4.9μL Opti-MEM加0.1μL Lipofectamine 2000(Invitrogen,Carlsbad CA,目录号#11668-019),其中每个siRNA双链体是4复孔,并在室温下孵育15分钟,转染人肺上皮细胞A549(ATCC)。然后,将含有约$5x10^3$个细胞的35μL的Dulbecco改良的Eagle培养基(ThermoFisher)添加到siRNA混合物中。将细胞培养48小时,然后进行萤火虫(转染对照)和Renilla(融合至靶序列)荧光素酶测量。以10nM、1nM和0.1nM进行三个剂量的实验。

[0817] ii.细胞培养和转染:

[0818] 通过在384孔板中向每孔5μL siRNA双链体添加每孔5μL 1ng/μL稀释于Opti-MEM中的LRRK2 psiCHECK2载体(Blue Heron Biotechnology),4.9μL Opti-MEM加0.1μL Lipofectamine 2000(Invitrogen,Carlsbad CA,目录号#11668-019),其中每个siRNA双链体是4复孔,并在室温下孵育15分钟,转染原代小鼠肝细胞。然后,将含有约$5x10^3$个细胞的35μL的Dulbecco改良的Eagle培养基(ThermoFisher)添加到siRNA混合物中。将细胞培养48小时,然后进行萤火虫(转染对照)和Renilla(融合至靶序列)荧光素酶测量。以10nM、1nM和0.1nM进行三个剂量的实验。

[0819] iii.使用DYNABEADS mRNA分离试剂盒的总RNA分离:

[0820] 在BioTek-EL406平台上使用DYNABEAD(Invitrogen,目录号#61012)使用自动化方案分离RNA。简言之,将含有3μL磁性小珠的70μL裂解/结合缓冲液和10μL裂解缓冲液添加到含有细胞的板中。将板在室温下在电磁振荡器上孵育10分钟,并且随后捕获磁性小珠并除去上清液。结合小珠的RNA随后用150μL洗涤缓冲液A洗涤2次和用洗涤缓冲液B洗涤1次。小珠然后用150μL洗脱缓冲液洗涤,再次捕获和除去上清液。

[0821] iv.使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems,Foster City,CA,目录号#4368813)的cDNA合成:

[0822] 向上述分离的RNA中添加每个反应10μL含有1μL 10X缓冲液、0.4μL 25X dNTP、1μL 10x随机引物、0.5μL逆转录酶、0.5μL RNase抑制剂和6.6μL H_2O的预混合物。将板密封、混

合物并在电磁振荡器上在室温下孵育10分钟,随后在37℃下孵育2h。

[0823] v.实时PCR:

[0824] 在384孔板(Roche目录号#04887301001)中每孔将2μL cDNA和5μL Lightcycler 480探针预混合物(Roche目录号#04887301001)添加到0.5μL人GAPDH TaqMan探针(4326317E)和0.5μL人LRRK2探针(Hs01115057_m1,Thermo)或0.5μL小鼠GAPDH TaqMan探针(4352339E)和0.5μL小鼠LRRK2探针(Mm00481934_m1,Thermo)中。在LightCycler480实时PCR系统(Roche)中进行实时PCR。各双链体测试至少两次,并将数据归一化至使用非靶向对照siRNA转染的细胞。为计算相对倍数变化,使用ΔΔCt法分析数据并归一化至使用利用非靶向对照siRNA转染的细胞进行的测定。

[0825] 表3和表4所列dsRNA剂在A549细胞中的筛选结果见表5。

[0826] 表2:在核酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。应当理解的是,当这些单体存在于寡核苷酸中时,其通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接;并且可以理解,当核苷酸包含2'-氟修饰时,氟取代了母体核苷酸该位置的羟基(即,其是2'-脱氧-2'-氟核苷酸)。

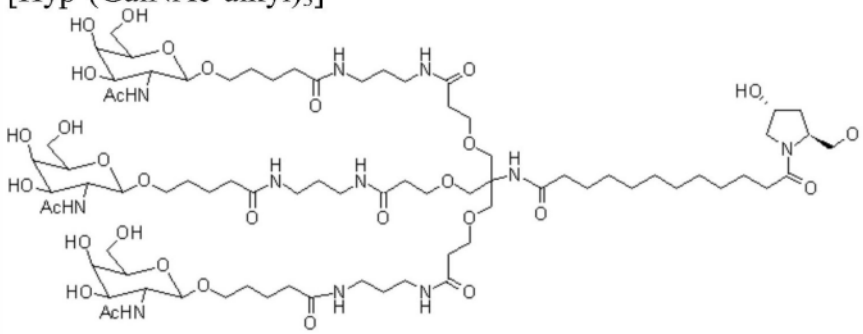
[0827]

缩写	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸酯
Ab	β-L-腺苷-3'-磷酸酯
Abs	β-L-腺苷-3'-硫代磷酸酯

[0828]

缩写	核苷酸
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸酯
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸酯
Cb	β-L-胞苷-3'-磷酸酯
Cbs	β-L-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸酯
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸酯
Gb	β-L-鸟苷-3`-磷酸酯
Gbs	β-L-鸟苷-3`-硫代磷酸酯
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸酯
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸酯
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
N	任何核苷酸，修饰的或未修饰的
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键

[0829]

缩写	核苷酸
L96	N-[三(GalNAc-烷基)-酰胺基-十二酰基)]-4-羟基脯氨醇 [Hyp-(GalNAc-alkyl)$_3$] 
(Agn)	腺苷-二醇核酸(GNA)
(Cgn)	胞苷-二醇核酸(GNA)
(Ggn)	鸟苷-二醇核酸(GNA)
(Tgn)	胸苷-二醇核酸(GNA) S-异构体
P	磷酸酯
VP	乙烯膦酸酯
dA	2`-脱氧腺苷-3`-磷酸酯
dAs	2`-脱氧腺苷-3`-硫代磷酸酯
dC	2`-脱氧胞苷-3`-磷酸酯
dCs	2`-脱氧胞苷-3`-硫代磷酸酯
dG	2`-脱氧鸟苷-3`-磷酸酯
dGs	2`-脱氧鸟苷-3`-硫代磷酸酯
dT	2`-脱氧胸苷-3`-磷酸酯
dTs	2`-脱氧胸苷-3`-硫代磷酸酯
dU	2`-脱氧尿苷
dUs	2`-脱氧尿苷-3`-硫代磷酸酯
(Ahd)	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-磷酸酯
(Ahds)	2'-O-十六烷基-腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯
(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Ghd)	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-磷酸酯
(Ghds)	2'-O-十六烷基-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯
(Uhds)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸酯

[0830] 表3:LRRK2 dsRNA剂的未修饰的有义链和反义链序列

[0831]

双链体名称	有义链序列 5'至3'	SEQ ID NO:	NM_198578.4 中的范围	反义链序列 5'至3'	SEQ ID NO:	NM_198578.4 中的范围
AD-601140.1	CAACUCUGAAA CAGUUUAACA	11	3383-3403	UGUUAAACUGUU UCAGAGUUGGA	55	3381-3403
AD-599927.1	AAUUGUCAGCA UCUUUUUCUA	12	2105-2125	UAGAAAAAGAUG CUGACAAUUUG	56	2103-2125
AD-612673.1	CGUGAACAAGA UGUACGGAAA	13	2356-2376	UUUCCGUACAUC UUGUUCACGAC	57	2354-2376
AD-615420.1	UCACUCAUGGA AGAAUGGUUA	14	5413-5433	UAACCAUUCUUC CAUGAGUGAGU	58	5411-5433
AD-600406.1	CAGAUAAGACU UCUAAUUUAA	15	2603-2623	UUAAAUUAGAAG UCUUAUCUGGA	59	2601-2623
AD-601294.1	CCCUAUCAGAG AACUUUCUUA	16	3563-3583	UAAGAAAGUUCU CUGAUAGGGAU	60	3561-3583
AD-600013.1	AAAAGGAUCAA CAGUUUCUAA	17	2192-2212	UUAGAAACUGUU GAUCCUUUUGU	61	2190-2212
AD-600853.1	ACAUCACUAGA CCUUUCAGCA	18	3088-3108	UGCUGAAAGGUC UAGUGAUGUAA	62	3086-3108
AD-613382.1	GGAACUUCACC AGAAUUCACA	19	3105-3125	UGUGAAUUCUGG UGAAGUUCCAG	63	3103-3125
AD-600024.1	CAGUUUCUAAA CCUCUGUUGA	20	2203-2223	UCAACAGAGGUU UAGAAACUGUU	64	2201-2223
AD-604701.1	AAACACAAAAU GUCUUAUUCA	21	7348-7368	UGAAUAAGACAU UUUGUGUUUUG	65	7346-7368
AD-604452.1	CAAAGAUUUUC UCCUUUUCUA	22	7097-7117	UAGAAAAGGAGA AAAUCUUUGUG	66	7095-7117
AD-603747.1	CUACUCUAUGA CAUUUUGACA	23	6319-6339	UGUCAAAAUGUC AUAGAGUAGUA	67	6317-6339
AD-601616.1	CAUCUUUCUCA CAAUAAACUA	24	3886-3906	UAGUUUAUUGUG AGAAAGAUGCA	68	3884-3906
AD-602766.1	UGAGAACUCUG AAAUUAUCAA	25	5190-5210	UUGAUAAUUUCA GAGUUCUCACA	69	5188-5210
AD-601694.1	UACAACUUGGA ACUAAGAUCA	26	3964-3984	UGAUCUUAGUUC CAAGUUGUAAC	70	3962-3984
AD-602734.1	UGGUUCCAAGC AGUUUGUCUA	27	5138-5158	UAGACAAACUGC UUGGAACCAGC	71	5136-5158
AD-599139.1	ACUAAAUAAUC UCCUUAUGUA	28	1254-1274	UACAUAAGGAGA UUAUUUAGUGC	72	1252-1274
AD-604453.1	AAAGAUUUUCU CCUUUUCUAA	29	7098-7118	UUAGAAAAGGAG AAAAUCUUUGU	73	7096-7118
AD-616783.1	ACCAUUCAGAA ACUCAUCGAA	30	7048-7068	UUCGAUGAGUUU CUGAAUGGUGA	74	7046-7068
AD-616785.1	CAUUCAGAAAC UCAUCGAGAA	31	7050-7070	UUCUCGAUGAGU UUCUGAAUGGU	75	7048-7070
AD-600566.1	UUUAUUCCUGA	32	2764-2784	UAUAGAAGAGUC	76	2762-2784

[0832] 表4:LRRK2 dsRNA剂的修饰的有义链和反义链序列

[0833]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-601140.1	csasacu(Chd)UfgAfAfAfcaguuuaacaL96	99	VPusGfsuuaAfaCfUfguuuCfaGfaguugsgsa	143	UCCAACUCUGAAACAGUUUAACC	187
AD-599927.1	asasuug(Uhd)CfaGfCfAfucuuuucuaL96	100	VPusAfsgaaAfaAfGfaugcUfgAfcaauususg	144	CAAAUUGUCAGCAUCUUUUUCUA	188
AD-612673.1	csgsuga(Ahd)CfaAfGfAfuguacggaaaL96	101	VPusUfsuccGfuAfCfaucuUfgUfucacgsasc	145	GUCGUGAACAAGAUGUACGGAAG	189
AD-615420.1	uscsacu(Chd)AfuGfGfAfagaaugguuaL96	102	VPusAfsaccAfuUfCfuuccAfuGfaguggasgsu	146	ACUCACUCAUGGAAGAAUGGUUU	190
AD-600406.1	csasgau(Ahd)AfgAfCfUfucuaauuuaaL96	103	VPusUfsaaaUfuAfGfaaguCfuUfaucugsgsa	147	UCCAGAUAAGACUUCUAAUUUAA	191
AD-601294.1	cscscua(Uhd)CfaGfAfGfaacuuucuuaL96	104	VPusAfsagaAfaGfUfucucUfgAfuaggsgsasu	148	AUCCCUAUCAGAGAACUUUCUUG	192
AD-600013.1	asasaag(Ghd)AfuCfAfAfcaguuucuaaL96	105	VPusUfsagaAfaCfUfguugAfuCfcuuuusgsu	149	ACAAAAGGAUCAACAGUUUCUAA	193
AD-600853.1	ascsauc(Ahd)CfuAfGfAfccuuucagcaL96	106	VPusGfscugAfaAfGfgucuAfgUfgaugusasa	150	UUACAUCACUAGACCUUUCAGCA	194
AD-613382.1	gsgsaac(Uhd)UfcAfCfCfagaauucacaL96	107	VPusGfsugaAfuUfCfugguGfaAfguuccsasg	151	CUGGAACUUCACCAGAAUUCACU	195
AD-600024.1	csasguu(Uhd)CfuAfAfAfccucguugaL96	108	VPusCfsaacAfgAfGfguuuAfgAfaacugsusu	152	AACAGUUUCUAAACCUCUGUUGC	196
AD-604701.1	asasaca(Chd)AfaAfAfUfgucuuauucaL96	109	VPusGfsaauAfaGfAfcauuUfuGfguguuususg	153	CAAAACACAAAAUGUCUUAUUCU	197
AD-604452.1	csasaag(Ahd)UfuUfUfCfuccuuuucuaL96	110	VPusAfsgaaAfaGfGfagaaAfaUfcuuugsusg	154	CACAAAGAUUUUCUCCUUUUCUA	198
AD-603747.1	csusacu(Chd)UfaUfGfAfcauuuugacaL96	111	VPusGfsucaAfaAfUfgucaUfaGfaguagsusa	155	UACUACUCUAUGACAUUUUGACA	199
AD-601616.1	csasucu(Uhd)UfcUfCfAfcaauaaacuaL96	112	VPusAfsguuUfaUfUfgugaGfaAfagaugscsa	156	UGCAUCUUUCUCACAAUAAACUG	200

[0834]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-602766.1	usgsaga(Ahd)CfuCfUfGfaaauuaucaaL96	113	VPusUfsgauAfaUfUfucagAfgUfucucascsa	157	UGUGAGAACUCUGAAAUUAUCAU	201
AD-601694.1	usascaa(Chd)UfuGfGfAfacuaagaucaL96	114	VPusGfsaucUfuAfGfuuccAfaGfuuguasasc	158	GUUACAACUUGGAACUAAGAUCC	202
AD-602734.1	usgsguu(Chd)CfaAfGfCfaguuugucuaL96	115	VPusAfsgacAfaAfCfugcuUfgGfaaccasgsc	159	GCUGGUUCCAAGCAGUUUGUCUG	203
AD-599139.1	ascsuaa(Ahd)UfaAfUfCfuccuuauguaL96	116	VPusAfscauAfaGfGfagauUfaUfuuagusgsc	160	GCACUAAAUAAUCUCCUUAUGUA	204
AD-604453.1	asasaga(Uhd)UfuUfCfUfccuuuucuaaL96	117	VPusUfsagaAfaAfGfgagaAfaAfucuuusgsu	161	ACAAAGAUUUUCUCCUUUUCUAA	205
AD-616783.1	ascscau(Uhd)CfaGfAfAfacucaucgaaL96	118	VPusUfscgaUfgAfGfuuucUfgAfauggusgsa	162	UCACCAUUCAGAAACUCAUCGAG	206
AD-616785.1	csasuuc(Ahd)GfaAfAfCfucaucgagaaL96	119	VPusUfscucGfaUfGfaguuUfcUfgaaugsgsu	163	ACCAUUCAGAAACUCAUCGAGAC	207
AD-600566.1	ususuau(Uhd)CfcUfGfAfcucuucuauaL96	120	VPusAfsuagAfaGfAfgucaGfgAfauaaasgsg	164	CCUUUAUUCCUGACUCUUCUAUG	208
AD-600852.1	usascau(Chd)AfcUfAfGfaccuuucagaL96	121	VPusCfsugaAfaGfGfucuaGfuGfauguasasu	165	AUUACAUCACUAGACCUUUCAGC	209
AD-617239.1	asasucu(Uhd)GfuUfUfGfucuauuuggaL96	122	VPusCfscaaAfuAfGfacaaAfcAfagauusgsu	166	ACAAUCUUGUUUGUCUAUUUGGG	210
AD-602466.1	gscsagu(Uhd)CfaCfUfUfucuaaaugaaL96	123	VPusUfscauUfuAfGfaaagUfgAfacugcsgsu	167	ACGCAGUUCACUUUCUAAAUGAA	211
AD-602848.1	csusuga(Ghd)AfuUfUfCfaccuuacauaL96	124	VPusAfsuguAfaGfGfugaaAfuCfucaagsusa	168	UACUUGAGAUUUCACCUUACAUG	212
AD-598424.1	cscsuug(Ghd)UfgUfUfCfaccaauugaaL96	125	VPusUfscaaUfuGfGfugaaCfaCfcaaggsasc	169	GUCCUUGGUGUUCACCAAUUGAU	213
AD-617233.1	asgsaua(Chd)AfaUfCfUfuguuugucuaL96	126	VPusAfsgacAfaAfCfaagaUfuGfuaucuscsu	170	AGAGAUACAAUCUUGUUUGUCUA	214
AD-613965.1	csusuaa(Ghd)GfgAfAfCfucauuuuuaaL96	127	VPusUfsaaaAfaUfGfaguuCfcCfuuaagsusu	171	AACUUAAGGGAACUCAUUUUUAG	215

[0835]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-614239.1	gsgsuuu(Chd)UfaCfAfAfcaacgucugaL96	128	VPusCfsagaCfgUfUfguugUfaGfaaaccsusu	172	AAGGUUUCUACAACAACGUCUGA	216
AD-617466.1	asgsuau(Ghd)CfcUfAfUfucuuuacaaaL96	129	VPusUfsuguAfaAfGfaauaGfgCfauacuscsu	173	AGAGUAUGCCUAUUCUUUACAAA	217
AD-612820.1	cscsuuu(Ahd)UfuUfCfCfagauaagucaL96	130	VPusGfsacuUfaUfCfuggaAfaUfaaaggsasc	174	GUCCUUUAUUUCCAGAUAAGUCA	218
AD-612611.1	ususuaa(Uhd)CfuAfUfCfagguaugugaL96	131	VPusCfsacaUfaCfCfugauAfgAfuuaaasgsa	175	UCUUUAAUCUAUCAGGUAUGUGA	219
AD-614237.1	asasggu(Uhd)UfcUfAfCfaacaacgucaL96	132	VPusGfsacgUfuGfUfuguaGfaAfaccuusasu	176	AUAAGGUUUCUACAACAACGUCU	220
AD-613966.1	ususaag(Ghd)GfaAfCfUfcauuuuuagaL96	133	VPusCfsuaaAfaAfUfgaguUfcCfcuuaasgsu	177	ACUUAAGGGAACUCAUUUUUAGC	221
AD-612609.1	uscsuuu(Ahd)AfuCfUfAfucagguaugaL96	134	VPusCfsauaCfcUfGfauagAfuUfaaagasasg	178	CUUCUUUAAUCUAUCAGGUAUGU	222
AD-612246.1	gsasuga(Chd)AfaAfGfAfagaauuucuaL96	135	VPusAfsgaaAfuUfCfuucuUfuGfucaucsasa	179	UUGAUGACAAAGAAGAAUUUCUG	223
AD-601606.1	asgsaga(Ahd)AfcUfGfCfaucuuucucaL96	136	VPusGfsagaAfaGfAfugcaGfuUfucucusasc	180	GUAGAGAAACUGCAUCUUUCUCA	224
AD-617462.1	asasaga(Ghd)UfaUfGfCfcuauucuuuaL96	137	VPusAfsaagAfaUfAfggcaUfaCfucuususc	181	GAAAAGAGUAUGCCUAUUCUUUA	225
AD-614236.1	usasagg(Uhd)UfuCfUfAfcaacacguaL96	138	VPusAfscguUfgUfUfguagAfaAfccuuasusg	182	CAUAAGGUUUCUACAACAACGUC	226
AD-611650.1	usasugc(Uhd)GfaUfGfCfacucucuuaL96	139	VPusAfsagaAfgAfGfugcaUfcAfgcauasgsa	183	UCUAUGCUGAUGCACUCUUCUUC	227
AD-617240.1	asuscuu(Ghd)UfuUfGfUfcuauuugggaL96	140	VPusCfsccaAfaUfAfgacaAfaCfaagaususg	184	CAAUCUUGUUUGUCUAUUUGGGA	228
AD-613851.1	csuscuu(Uhd)CfaCfGfUfgcauuccagaL96	141	VPusCfsuggAfaUfGfcacgUfgAfaagagsusu	185	AACUCUUUCACGUGCAUUCCAGA	229
AD-617238.1	csasauc(Uhd)UfgUfUfUfgucuauuugaL96	142	VPusCfsaaaUfaGfAfcaaaCfaAfgaugsusa	186	UACAAUCUUGUUUGUCUAUUUGG	230

[0836]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-1335323.1	csgsuga(Ahd)CfaAfGfAfuguacggasasa	347	VPusUfsuccGfuAfCfaucuUfgUfucacgsasc	350	GUCGUGAACAAGAUGUACGGAAG	189
AD-1335324.1	gsgsaac(Uhd)UfcAfCfCfagaauucascsa	348	VPusGfsugaAfuUfCfugguGfaAfguuccsasg	351	CUGGAACUUCACCAGAAUUCACU	195
AD-1335325.1	uscsacu(Chd)AfuGfGfAfagaauggususa	349	VPusAfsaccAfuUfCfuuccAfuGfaugasgsu	352	ACUCACUCAUGGAAGAAUGGUUU	190

[0837] 表5:在A549细胞中的LRRK2单剂量筛选

[0838]

	10 nM 剂量		1 nM 剂量		0.1 nM 剂量	
双链体	平均 LRRK2 mRNA 剩余 %	SD	平均 LRRK2 mRNA 剩余%	SD	平均 LRRK2 mRNA 剩余 %	SD
AD-601140.1	17.7	2.8	63.1	14.4	61.0	11.7
AD-599927.1	17.7	1.7	43.0	5.5	41.9	12.9
AD-612673.1	21.2	6.5	42.2	10.1	51.7	8.3
AD-615420.1	21.5	4.1	55.4	32.3	65.3	38.7
AD-600406.1	22.5	7.3	53.5	11.7	54.2	19.6
AD-601294.1	24.5	5.2	62.7	28.6	58.0	24.1
AD-600013.1	25.2	10.9	28.9	17.1	41.8	14.7
AD-600853.1	26.4	6.7	50.4	19.9	69.8	11.5
AD-613382.1	26.4	4.8	66.7	11.1	88.6	30.0
AD-600024.1	26.6	12.3	54.6	9.1	82.6	34.3
AD-604701.1	27.0	7.4	35.2	12.0	68.7	10.2
AD-604452.1	28.7	7.2	51.0	11.0	91.2	18.3
AD-603747.1	29.0	10.9	52.9	19.1	69.5	2.0
AD-601616.1	31.3	7.3	39.8	16.6	89.6	15.9
AD-602766.1	31.8	4.6	43.9	16.8	72.6	18.4
AD-601694.1	34.8	6.8	75.1	35.9	76.9	37.1
AD-602734.1	37.0	9.5	48.8	18.7	85.8	15.3
AD-599139.1	37.2	23.0	104.5	12.0	77.3	16.1
AD-604453.1	40.4	14.3	80.0	44.1	61.2	11.1
AD-616783.1	40.8	2.6	96.7	53.3	128.5	30.3
AD-616785.1	42.6	5.9	71.5	37.8	86.5	47.1
AD-600566.1	45.0	22.3	41.1	39.8	65.8	14.9
AD-600852.1	47.6	13.1	84.2	18.3	106.9	31.2
AD-617239.1	48.2	19.3	83.2	6.3	80.8	38.2
AD-602466.1	49.0	24.5	45.1	26.7	67.8	15.8
AD-602848.1	49.7	9.7	47.4	9.3	98.4	26.4

[0839]

	10 nM 剂量		1 nM 剂量		0.1 nM 剂量	
双链体	平均 LRRK2 mRNA 剩余 %	SD	平均 LRRK2 mRNA 剩余%	SD	平均 LRRK2 mRNA 剩余 %	SD
AD-598424.1	50.4	20.2	27.8	18.3	52.5	13.7
AD-617233.1	52.4	24.9	75.6	20.8	91.0	30.2
AD-613965.1	54.0	12.0	123.3	11.5	80.6	6.4
AD-614239.1	56.5	7.5	103.1	12.9	94.7	26.4
AD-617466.1	56.7	7.5	109.2	7.7	70.1	22.3
AD-612820.1	57.0	9.2	106.7	51.3	74.5	9.2
AD-612611.1	59.4	7.6	154.4	2.8	80.2	9.9
AD-614237.1	60.2	12.0	105.9	24.5	92.2	18.1
AD-613966.1	62.0	11.9	110.0	11.7	65.6	7.0
AD-612609.1	71.8	13.5	76.0	15.4	108.2	49.5
AD-612246.1	74.1	15.8	122.2	48.7	92.5	9.7
AD-601606.1	76.4	17.6	85.9	40.8	154.0	24.3
AD-617462.1	76.4	18.0	93.2	7.5	56.8	9.9
AD-614236.1	76.5	5.7	119.1	49.6	105.4	38.4
AD-611650.1	77.6	28.9	92.0	5.7	91.1	39.9
AD-617240.1	80.2	15.7	95.4	20.1	75.7	27.4
AD-613851.1	81.0	26.3	112.8	20.1	97.2	37.2
AD-617238.1	100.6	26.3	103.9	15.0	91.8	30.4

[0840] 表6:人反应性LRRK2 dsRNA剂的未修饰的有义链和反义链序列

[0841]

双链体名称	有义链序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	有义来源	反义链序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义来源
AD-1508169	CCUUGGUGUUCACCAAUUGAA	231	NM_198578.4_468-488_U21A_s	UUCAAUUGGUGAACACCAAGGAC	253	NM_198578.4_466-488_as
AD-1508884	ACUAAAUAAUCUCCUUAUGUA	232	NM_198578.4_1254-1274_s	UACAUAAGGAGAUUAUUUAGUGC	254	NM_198578.4_1252-1274_U1A_as
AD-1509672	AAUUGUCAGCAUCUUUUUCUA	233	NM_198578.4_2105-2125_s	UAGAAAAAGAUGCUGACAAUUUG	255	NM_198578.4_2103-2125_U1A_as
AD-1509758	AAAAGGAUCAACAGUUUCUAA	234	NM_198578.4_2192-2212_s	UUAGAAACUGUUGAUCCUUUUGU	256	NM_198578.4_2190-2212_U1A_as
AD-1509769	CAGUUUCUAAACCUCUGUUGA	235	NM_198578.4_2203-2223_C21A_s	UCAACAGAGGUUUAGAAACUGUU	257	NM_198578.4_2201-2223_G1A_as
AD-1510151	CAGAUAAGACUUCUAAUUUAA	236	NM_198578.4_2603-2623_s	UUAAAUUAGAAGUCUUAUCUGGA	258	NM_198578.4_2601-2623_U1A_as
AD-1510311	UUUAUUCCUGACUCUUCUAUA	237	NM_198578.4_2764-2784_G21A_s	UAUAGAAGAGUCAGGAAUAAAGG	259	NM_198578.4_2762-2784_C1A_as
AD-1510597	UACAUCACUAGACCUUUCAGA	238	NM_198578.4_3087-3107_C21A_s	UCUGAAAGGUCUAGUGAUGUAAU	260	NM_198578.4_3085-3107_G1A_as
AD-1510598	ACAUCACUAGACCUUUCAGCA	239	NM_198578.4_3088-3108_s	UGCUGAAAGGUCUAGUGAUGUAA	261	NM_198578.4_3086-3108_U1A_as
AD-1510885	CAACUCUGAAACAGUUUAACA	240	NM_198578.4_3383-3403_C21A_s	UGUUAAACUGUUUCAGAGUUGGA	262	NM_198578.4_3381-3403_G1A_as
AD-1511039	CCCUAUCAGAGAACUUUCUUA	241	NM_198578.4_3563-3583_G21A_s	UAAGAAAGUUCUCUGAUAGGGAU	263	NM_198578.4_3561-3583_C1A_as
AD-1511351	AGAGAAACUGCAUCUUUCUCA	242	NM_198578.4_3876-3896_s	UGAGAAAGAUGCAGUUUCUCUAC	264	NM_198578.4_3874-3896_U1A_as
AD-1511361	CAUCUUUCUCACAAUAAACUA	243	NM_198578.4_3886-3906_G21A_s	UAGUUUAUUGUGAGAAAGAUGCA	265	NM_198578.4_3884-3906_C1A_as
AD-1511439	UACAACUUGGAACUAAGAUCA	244	NM_198578.4_3964-3984_C21A_s	UGAUCUUAGUUCCAAGUUGUAAC	266	NM_198578.4_3962-3984_G1A_as
AD-1512211	GCAGUUCACUUUCUAAAUGAA	245	NM_198578.4_4849-4869_s	UUCAUUUAGAAAGUGAACUGCGU	267	NM_198578.4_4847-4869_U1A_as
AD-1512479	UGGUUCCAAGCAGUUUGUCUA	246	NM_198578.4_5138-5158_G21A_s	UAGACAAACUGCUUGGAACCAGC	268	NM_198578.4_5136-5158_C1A_as
AD-1512511	UGAGAACUCUGAAAUUAUCAA	247	NM_198578.4_5190-5210_U21A_s	UUGAUAAUUUCAGAGUUCUCACA	269	NM_198578.4_5188-5210_as
AD-1512593	CUUGAGAUUUCACCUUACAUA	248	NM_198578.4_5272-5292_G21A_s	UAUGUAAGGUGAAAUCUCAAGUA	270	NM_198578.4_5270-5292_C1A_as
AD-15134 92	CUACUCUA UGACAUUU	249	NM_198578. 4_6319-6339	UGUCAAAAU GUCAUAGAG	271	NM_19857 8.4_6317-6

[0842] 表7:人反应性LRRK2 dsRNA剂的修饰的有义链和反义链序列

[0843]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-1508169	cscsuug(Ghd)UfgUfUfCfaccaauugsasa	275	VPusUfscaaUfuGfGfugaaCfaCfcaaggsasc	297	CCUUGGUGUUCACCAAUUGAU	319
AD-1508884	ascsuaa(Ahd)UfaAfUfCfuccuuaugsusa	276	VPusAfscauAfaGfGfagauUfaUfuuagusgsc	298	ACUAAAUAAUCUCCUUAUGUA	320
AD-1509672	asasuug(Uhd)CfaGfCfAfucuuuuucsusa	277	VPusAfsgaaAfaAfGfaugcUfgAfcaauususg	299	AAUUGUCAGCAUCUUUUUCUA	321
AD-1509758	asasaag(Ghd)AfuCfAfAfcaguuucusasa	278	VPusUfsagaAfaCfUfguugAfuCfcuuuusgsu	300	AAAAGGAUCAACAGUUUCUAA	322
AD-1509769	csasguu(Uhd)CfuAfAfAfccucuguusgsa	279	VPusCfsaacAfgAfGfguuuAfgAfaacugsusu	301	CAGUUUCUAAACCUCUGUUGC	323
AD-1510151	csasgau(Ahd)AfgAfCfUfucuaauuusasa	280	VPusUfsaaaUfuAfGfaaguCfuUfaucugsgsa	302	CAGAUAAGACUUCUAAUUUAA	324
AD-1510311	ususuau(Uhd)CfcUfGfAfcucuucuasusa	281	VPusAfsuagAfaGfAfgucaGfgAfauaaasgsg	303	UUUAUUCCUGACUCUUCUAUG	325
AD-1510597	usascau(Chd)AfcUfAfGfaccuuucasgsa	282	VPusCfsugaAfaGfGfucuaGfuGfauguasasu	304	UACAUCACUAGACCUUUCAGC	326
AD-1510598	ascsauc(Ahd)CfuAfGfAfccuuucagscsa	283	VPusGfscugAfaAfGfgucuAfgUfgaugusasa	305	ACAUCACUAGACCUUUCAGCA	327
AD-1510885	csasacu(Chd)UfgAfAfAfcaguuuaascsa	284	VPusGfsuuaAfaCfUfguuuCfaGfaguugsgsa	306	CAACUCUGAAACAGUUUAACC	328
AD-1511039	cscscua(Uhd)CfaGfAfGfaacuuucususa	285	VPusAfsagaAfaGfUfucucUfgAfuagggsasu	307	CCCUAUCAGAGAACUUUCUUG	329
AD-1511351	asgsaga(Ahd)AfcUfGfCfaucuuucuscsa	286	VPusGfsagaAfaGfAfugcaGfuUfucucusasc	308	AGAGAAACUGCAUCUUUCUCA	330
AD-1511361	csasucu(Uhd)UfcUfCfAfcaauaaacsusa	287	VPusAfsguuUfaUfUfgugaGfaAfagaugscsa	309	CAUCUUUCUCACAAUAAACUG	331
AD-1511439	usascaa(Chd)UfuGfGfAfacuaagauscsa	288	VPusGfsaucUfuAfGfuuccAfaGfuuguasasc	310	UACAACUUGGAACUAAGAUCC	332

[0844]

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
AD-1512211	gscsagu(Uhd)CfaCfUfUfucuaaaugsasa	289	VPusUfscauUfuAfGfaaagUfgAfacugcsgsu	311	GCAGUUCACUUUCUAAAUGAA	333
AD-1512479	usgsguu(Chd)CfaAfGfCfaguuugucsusa	290	VPusAfsgacAfaAfCfugcuUfgGfaaccasgsc	312	UGGUUCCAAGCAGUUUGUCUG	334
AD-1512511	usgsaga(Ahd)CfuCfUfGfaaauuaucsasa	291	VPusUfsgauAfaUfUfucagAfgUfucucascsa	313	UGAGAACUCUGAAAUUAUCAU	335
AD-1512593	csusuga(Ghd)AfuUfUfCfaccuuacasusa	292	VPusAfsuguAfaGfGfugaaAfuCfucaagsusa	314	CUUGAGAUUUCACCUUACAUG	336
AD-1513492	csusacu(Chd)UfaUfGfAfcauuuugascsa	293	VPusGfsucaAfaAfUfgucaUfaGfaguagsusa	315	CUACUCUAUGACAUUUUGACA	337
AD-1514197	csasaag(Ahd)UfuUfUfCfuccuuuucsusa	294	VPusAfsgaaAfaGfGfagaaAfaUfcuuugsusg	316	CAAAGAUUUUCUCCUUUUCUA	338
AD-1514198	asasaga(Uhd)UfuUfCfUfccuuuucusasa	295	VPusUfsagaAfaAfGfgagaAfaAfucuuusgsu	317	AAAGAUUUUCUCCUUUUCUAA	339
AD-1514446	asasaca(Chd)AfaAfAfUfgucuuauuscsa	296	VPusGfsaauAfaGfAfcauuUfuGfuguuususg	318	AAACACAAAAUGUCUUAUUCU	340

[0845] 实施例2:在转基因小鼠中的体内评价

[0846] 本实施例描述了用于在表达人LRRK2 RNA的转基因小鼠中体内评价LRRK2 RNAi剂的方法。

[0847] 评估了实施例1中设计和测定的选定dsRNA剂降低表达人LRRK2 RNA的小鼠中包含有义或反义基因座的水平的能力。

[0848] 简言之,向对照同窝仔、人LRRK2 RNA小鼠杂合子和人LRRK2RNA小鼠纯合子鞘内或皮下施用单剂量的目标dsRNA剂,包括双链体AD-601140.1、AD-599927.1、AD-612673.1、AD-615420.1、AD-600406.1、AD-601294.1、AD-600013.1、AD-600853.1、AD-613382.1、AD-600024.1、AD-604701.1、AD-604452.1、AD-603747.1、AD-601616.1、AD-602766.1、AD-601694.1、AD-602734.1、AD-599139.1、AD-604453.1、AD-616783.1、AD-616785.1、AD-600566.1、AD-600852.1、AD-617239.1、AD-602466.1、AD-602848.1、AD-598424.1、AD-617233.1、AD-613965.1、AD-614239.1、AD-617466.1、AD-612820.1、AD-612611.1、AD-614237.1、AD-613966.1、AD-612609.1、AD-612246.1、AD-601606.1、AD-617462.1、AD-614236.1、AD-611650.1、AD-617240.1、AD-613851.1和AD-617238.1或安慰剂。施用两周后,处死动物,收集血液和组织样品,包括大脑皮层、脊髓、肝脏、脾脏和颈部淋巴结。

[0849] 为了确定施用dsRN剂对LRRK2 mRNA水平的影响,通过qRT-PCR确定皮质和脊髓样品中的mRNA水平(参见,例如,上文和Jiang,同上)。

[0850] 结构表明,单剂量dsRNA剂的施用抑制LRRK2 mRNA产生。

[0851] 为了确定dsRNA剂减少包含LRRK2有义链和反义链的基因座的数量和/或形成的作用,在获自施用来自上述的目标双链体的动物的样品中使用在Jiang(同上)中描述的FISH

方法。使用的探针包括那些针对有义和反义RNA的探针(Exiqon,Inc.)。所有杂交步骤均在无RNase条件下进行。将15微米脑和脊髓OCT冷冻切片透化并封闭切片。然后将切片与变性探针杂交。杂交后,洗涤载玻片。淬灭脂褐素的自发荧光,并使用DAPI对细胞核进行染色。小鼠额叶皮层、海马齿状回、膨大后部皮质和小脑分子层中的有义和反义RNA基因座的定量由盲态研究者进行。通过共聚焦显微镜在100倍放大率下拍摄三到六张随机照片,并计数200-400个细胞。

[0852] 结果表明,单剂量的dsRNA剂的施用降低了额叶皮层、海马齿状回、膨大后部皮质和小脑分子层中包含的有义链和反义链的基因座的水平。

[0853] 亦如在(例如,Jiang,同上)中描述的,在施用了上述目标双链体的动物中评估施用剂对异常二肽重复蛋白水平以及聚(GP)和聚(GA)负荷和尺寸的水平的影响。

[0854] 将免疫组织化学用于鉴定和评估小鼠半脑和脊髓中异常的二肽重复蛋白水平。简言之,从福尔马林固定、石蜡包埋的块上切下8到10微米厚的小鼠半脑矢状切片或脊髓冠状切片,并封装在载玻片上。干燥后,将载玻片脱蜡并在洗涤前在二甲苯和酒精中再水化。然后,将载玻片修复并封闭。在使用市售针对聚(GP)、聚(GA)、聚(GR)、聚(PA)、聚(PR)、GFAP、IBA-1、CD3、F4/80和CD45R/B220的抗体染色过夜后,应用HRP偶联的二抗,并底物显示过氧化酶活性。切片用Harris改良的苏木精复染并盖上盖玻片。

[0855] 为量化聚(GP)和聚(GA)包涵体的负荷和尺寸,对聚(GP)或聚(GA)免疫染色的小鼠半脑切片以40倍放大倍率扫描以获得高分辨率数字化图像。使用适宜软件,计算海马或膨大后部皮质中划定区域中的包涵体数量。为测量这些区域中包涵体的尺寸,使用显微镜在63倍放大倍数下拍摄图像。尽管在给定视野中的每个包涵体仅分析了一次,但是可以拍摄该视野中的多个图像以确保分析仅在对焦的包涵体上进行。打开并放大图像,并使用轮廓工具追踪每个包涵体以确定其面积(μm^2)。对于每只小鼠,计算每个测试区域内以μm^{2}为单位的平均包涵体尺寸。

[0856] 该数据用于确定单剂量dsRNA剂的施用是否降低异常二肽重复蛋白水平的水平,特别是聚(GP)和聚(GA)包涵体的负荷和尺寸的水平。

[0857] 实施例3:在小鼠中LRRK2 mRNA抑制的体内评价

[0858] 本实施例描述了用于在表达小鼠LRRK2 RNA的小鼠中体内评价LRRK2 RNAi剂的方法。

[0859] 为评估RNAi剂AD-1335323.1、AD-1335324.1和AD-1335325.1的功效,将这些剂施用于表达小鼠LRRK2的小鼠。将RNAi剂(在缓冲液中,如aCSF)或aCSF对照施用于约6-8周龄的雌性C57BL/6小鼠。对照组有3只动物,并且将三种RNAi剂之一AD-1335323.1、AD-1335324.1和AD-1335325.1施用于每组4只动物。施用是通过单次脑室内注射(徒手ICV注射)以5μL(60mg/mL储备液)中300μg的剂量施用。施用后30天,对小鼠实施安乐死。分离劝学和血浆,并贮存在-80℃,直至进行测定。收集脑(右半球)、肝组织、肺(左叶)和肾脏(左),快速冷冻并贮存在-80℃,直至进行处理。研究设计如表8中所示。

[0860] 表8

[0861]

组别#	动物#	处理	剂量 (ug)	时间点	组织
1	1	aCSF	-	第 30 天	终末 CSF 终末血浆 **灌注后冷冻（qPCR）：** 右脑半球、肺、肾 **灌注后冷冻（蛋白）：** 左脑半球 **灌注后固定（组织学）：** 肺、肾
	2				
	3				
2	4	AD-1335323.1	300		
	5				
	6				
	7				
3	8	AD-1335324.1			
	9				
	10				
	11				
4	12	AD-1335325.1			
	13				
	14				
	15				

[0862] 给药后30天，通过测量脑、肝、肺和肾组织中的LRRK2 mRNA，评价RNAi剂的疗效。使用RT-qPCR测定LRRK2脑mRNA水平。将小鼠脑(右半球)样品研磨并制备组织裂解物。将脑裂解物样品与LRRK2探针(Mm00481934_m1)和作为内源性对照的CSF一起孵育。通过RT-qPCR确定脑样品中的mRNA水平(参见，例如，上述和Jiang，同上)。通过RT-qPCR，使用作为对照探针的小鼠GAPDH探针(Applied Biosystems 4351309)和LRRK2探针(Mm00481934_m1，实验探针)测定在肝脏组织中的mRNA水平。类似地，通过RT-qPCR，使用作为对照探针的小鼠GAPDH探针和LRRK2探针(Mm00481934_m1，实验探针)测定在肾脏组织中的mRNA水平。

[0863] 结果如图1-2中所示。图1显示了向表达小鼠LRRK2的小鼠施用RNAi剂之一AD-1335323.1、AD-1335324.1和AD-1335325.1后在脑(右半球)中的LRRK2 mRNA减少。结果表明，与施用相同剂量aCSF的对照动物相比，在施用300μg剂量RNAi剂的动物中LRRK2 mRNA的水平降低。AD-1335324具有86％KD，优于AD-1335323、AD-1335325，其具有～60％KD(见表9)。图2显示了向表达小鼠LRRK2的小鼠施用300μg剂量RNAi剂之一AD-1335323.1、AD-1335324.1和AD-1335325.1后，在脑(右半球)、肺(左叶)和肾(右)中的LRRK2 mRNA相对减少。结果表明，肺(左叶)和肾(右)等全身组织中LRRK2 mRNA水平的降低与在脑(右半球)中

观察到的KD趋势相同，但程度更小，变化更大(见表9-10)。通过组织学在肺和肾脏中未观察到毒理学体征。

[0864] 表9

[0865]

300 ng D30 qPCR，相对于 aCSF 的剩余信息%						
组织	右半球		肺		肾	
处理	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
aCSF	100.00	21.78	100.00	3.90	100.00	31.83
AD-1335323	38.12	8.11	58.65	39.75	96.50	19.98
AD-1335324	13.79	6.40	23.50	18.20	70.45	13.61
AD-1335325	42.65	10.70	86.71	2.19	104.40	17.01

[0866] 表10:LRRK2小鼠ICV工具复合筛选-aCSF Ct值

[0867]

aCSF Ct 值（归一化 30 ng RNA 输入）			
组织	GAPDH Ct	LRRK2 Ct	δCt

[0868]

脑	20.07	30.35	10.29
肺	24.16	28.54	4.38
肾	19.82	27.27	7.45

[0869] 实施例4:在小鼠体内LRRK2 RNAi剂的剂量确定

[0870] 本实施例描述了确定在CNS中LRRK2 RNAi剂(例如,AD-1335324)在体内的IC_{50}并确定具有最小外周KD的最高有效CNS剂量的方法。

[0871] 为确定RNAi剂AD-1335324.1的疗效，向表达小鼠LRRK2的小鼠施用剂。将RNAi剂AD-1335324.1(在缓冲液中，如aCSF)或aCSF对照施用于约6-8周龄的雌性C57BL/6小鼠。共计6组，对应于一个对照组，另外5组对应于10-300μg的5个不同剂量的AD-1335324.1，如下表11所示。每组有4只动物。施用是通过单次脑室内注射(徒手ICV注射)以5μL(60mg/mL储备液)向脑右半球施用。施用后30天，对小鼠实施安乐死并用盐水灌注，随后收集组织。分离全血和血浆，并贮存在-80℃，直至进行测定。收集脑(右半球)、肝脏组织、肺(左叶)和肾(左)，快速冷冻并贮存在-80℃，直至进行处理。还收集组织样品和终末血液，用于将来的蛋白分析。研究设计显示在表11中。

[0872] 表11

[0873]

组别	处理	剂量 (ug)	给药	注射	时间点	(n)
1	aCSF	-	单剂量 D0	徒手ICV	D30	4
2	AD-1335324.1	10				
3		30				
4		60				
5		100				

[0874]

6		300				

[0875] 在RNAi剂给药后30天时，通过测量脑、肝、肺和肾组织中剩余LRRK2 mRNA的百分比评价RNAi剂AD-1335324.1的疗效和剂量反应。利用RT-qPCR测定LRRK2脑mRNA水平。将小鼠脑(右半球)样品研磨并制备组织裂解物。将脑裂解物样品与LRRK2探针(Mm00481934_m1)和作为内源性对照的CSF一起孵育。通过RT-qPCR确定脑样品中的mRNA水平(参见，例如，上文和Jiang，同上)。使用作为对照探针的小鼠GAPDH探针(Applied Biosystems4351309)和LRRK2探针(Mm00481934_m1，实验探针)通过RT-qPCR测定肝脏组织中的mRNA水平。类似地，使用作为对照探针的小鼠GAPDH探针和LRRK2探针(Mm00481934_m1，实验探针)通过RT-qPCR测定肾脏组织中的mRNA水平。

[0876] 结果如图3-4所示。图3A-B显示了在表达LRRK2表达小鼠的脑中施用AD-1335324观察到LRRK2 mRNA表达的剂量反应性降低。图3A显示了描述在向表达小鼠LRRK2的小鼠施用代表性RNAi剂AD-1335324.1后脑(右半球)中LRRK2 mRNA减少的图。结果表明，相对于对照动物，施用RNAi剂的动物中LRRK2 mRNA水平的剂量反应性降低。与实验相应剂量aCSF的对照动物相比，施用100μg剂量AD-1335324.1的小鼠显示出～40％KD，施用300μg剂量AD-1335324.1的小鼠显示出～80％KD。图3B显示了描述AD-1335324.1在CNS中的IC_{50}的图。绝对IC_{50}值确定为108.5μg。

[0877] 图4显示了在向表达小鼠LRRK2的小鼠施用10-300μg的5个剂量之一的AD-1335324.1后脑(右半球)、肺(左叶)和肾(右)中LRRK2 mRNA的相对减少。结果表明，全身组织如肺(左叶)和肾(右)中LRRK2 mRNA水平的降低不遵循与脑(右半球)中所观察到相同的KD趋势(见表12)。而相反的是，在没有剂量反应性LRRK2 mRNA减少的剂量内，在肺(左叶)中观察到KD的显著变化。在肾(右)中，通过施用10-300μg的不同剂量的AD-1335324，没有观察到LRRK2 mRNA的减少。

[0878] 表12

[0879]

LRRK2小鼠ICV剂量反应AD-1335324 D30 qPCR相对于aCSF的剩余信息%			
组织	处理/剂量	组平均值	标准差
脑-右半球	aCSF	100.00	13.26
	10ug	129.31	23.14
	30ug	91.33	19.66
	60ug	85.66	13.76
	100ug	59.47	16.11
	300ug	19.43	5.59
肺	aCSF	100.00	20.29
	10ug	70.94	28.55
	30ug	74.67	31.82
	60ug	67.78	44.45
	100ug	63.09	26.04
	300ug	66.97	27.01
肾脏	aCSF	100.00	30.52
	10ug	98.79	26.67
	30ug	126.40	20.43
	60ug	116.06	40.17
	100ug	123.84	35.86
	300ug	128.87	26.10

[0880] 等效物

[0881] 本领域技术人员将认识到,或能够仅使用常规的实验确定,本文中所述的特定实施方案和方法的许多等效物。这样的等效物旨在包括在以下权利要求的范围中。

[0882] LRRK2序列

[0883] SEQ ID NO:1

[0884] >NM_198578.4智人富亮氨酸重复激酶2(LRRK2),mRNA

[0885] GGGGCCCGCGGGGAGCGCTGGCTGCGGGCGGTGAGCTGAGCTCGCCCCCGGGGAGCTGTGGCCGGCGCCCCTGCCGGTTCCCTGAGCAGCGGACGTTCATGCTGGGAGGGCGGCGGGTTGGAAGCAGGTGCCACCATGGCTAGTGGCAGCTGTCAGGGGTGCGAAGAGGACGAGGAAACTCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAACAATGTCCAGGAAGGAAAACAGATAGAAACGCTGGTCCAAATCCTGGAGGATCTGCTGGTGTTCACGTACTCCGAGCGCGCCTCCAAGTTATTTCAAGGCAAAAATATCCATGTGCCTCTGTTGATCGTCTTGGACTCCTATATGAGAGTCGCGAGTGTGCAGCAGGTGGGTTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAGTCTGTCCAGGTACAATGCAAAGCTTAATGGGACCCCAGGATGTTGGAAATGATTGGGAAGTCCTTGGTGTTCACCAATTGATTCTTAAAATGCTAACAGTTCATAATGCCAGTGTAAACTTGTCAGTGATTGGACTGAAGACCTTAGATCTCCTCCTAACTTCAGGTAAAATCACCTTGCTGATATTGGATGAAGAAAGTGATATTTTCATGTTAATTTTTGATGCCATGCACTCATTTCCAGCCAATGATGAAGTCCAGAAACTTGGATGCAAAGCTT

TACATGTGCTGTTTGAGAGAGTCTCAGAGGAGCAACTGACTGAATTTGTTGAGAACAAAGATTATATGATATTGTTA
AGTGCGTTAACAAATTTTAAAGATGAAGAGGAAATTGTGCTTCATGTGCTGCATTGTTTACATTCCCTAGCGATTCC
TTGCAATAATGTGGAAGTCCTCATGAGTGGCAATGTCAGGTGTTATAATATTGTGGTGGAAGCTATGAAAGCATTCC
CTATGAGTGAAAGAATTCAAGAAGTGAGTTGCTGTTTGCTCCATAGGCTTACATTAGGTAATTTTTTCAATATCCTG
GTATTAAACGAAGTCCATGAGTTTGTGGTGAAAGCTGTGCAGCAGTACCCAGAGAATGCAGCATTGCAGATCTCAGC
GCTCAGCTGTTTGGCCCTCCTCACTGAGACTATTTTCTTAAATCAAGATTTAGAGGAAAAGAATGAGAATCAAGAGA
ATGATGATGAGGGGGAAGAAGATAAATTGTTTTGGCTGGAAGCCTGTTACAAAGCATTAACGTGGCATAGAAAGAAC
AAGCACGTGCAGGAGGCCGCATGCTGGGCACTAAATAATCTCCTTATGTACCAAAACAGTTTACATGAGAAGATTGG
AGATGAAGATGGCCATTTCCCAGCTCATAGGGAAGTGATGCTCTCCATGCTGATGCATTCTTCATCAAAGGAAGTTT
TCCAGGCATCTGCGAATGCATTGTCAACTCTCTTAGAACAAAATGTTAATTTCAGAAAAATACTGTTATCAAAAGGA
ATACACCTGAATGTTTTGGAGTTAATGCAGAAGCATATACATTCTCCTGAAGTGGCTGAAAGTGGCTGTAAAATGCT
AAATCATCTTTTTGAAGGAAGCAACACTTCCCTGGATATAATGGCAGCAGTGGTCCCCAAAATACTAACAGTTATGA
AACGTCATGAGACATCATTACCAGTGCAGCTGGAGGCGCTTCGAGCTATTTTACATTTTATAGTGCCTGGCATGCCA
GAAGAATCCAGGGAGGATACAGAATTTCATCATAAGCTAAATATGGTTAAAAAACAGTGTTTCAAGAATGATATTCA
CAAACTGGTCCTAGCAGCTTTGAACAGGTTCATTGGAAATCCTGGGATTCAGAAATGTGGATTAAAAGTAATTTCTT
CTATTGTACATTTTCCTGATGCATTAGAGATGTTATCCCTGGAAGGTGCTATGGATTCAGTGCTTCACACACTGCAG
ATGTATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGTTTAAGTCTTATAGGATACTTGATTACAAAGAAGAATGTGTT
CATAGGAACTGGACATCTGCTGGCAAAAATTCTGGTTTCCAGCTTATACCGATTTAAGGATGTTGCTGAAATACAGA
CTAAAGGATTTCAGACAATCTTAGCAATCCTCAAATTGTCAGCATCTTTTTCTAAGCTGCTGGTGCATCATTCATTT
GACTTAGTAATATTCCATCAAATGTCTTCCAATATCATGGAACAAAAGGATCAACAGTTTCTAAACCTCTGTTGCAA
GTGTTTTGCAAAAGTAGCTATGGATGATTACTTAAAAAATGTGATGCTAGAGAGAGCGTGTGATCAGAATAACAGCA
TCATGGTTGAATGCTTGCTTCTATTGGGAGCAGATGCCAATCAAGCAAAGGAGGGATCTTCTTTAATTTGTCAGGTA
TGTGAGAAAGAGAGCAGTCCCAAATTGGTGGAACTCTTACTGAATAGTGGATCTCGTGAACAAGATGTACGAAAAGC
GTTGACGATAAGCATTGGGAAAGGTGACAGCCAGATCATCAGCTTGCTCTTAAGGAGGCTGGCCCTGGATGTGGCCA
ACAATAGCATTTGCCTTGGAGGATTTTGTATAGGAAAAGTTGAACCTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTCCAGATAAG
ACTTCTAATTTAAGGAAACAAACAAATATAGCATCTACACTAGCAAGAATGGTGATCAGATATCAGATGAAAAGTGC
TGTGGAAGAAGGAACAGCCTCAGGCAGCGATGGAAATTTTTCTGAAGATGTGCTGTCTAAATTTGATGAATGGACCT
TTATTCCTGACTCTTCTATGGACAGTGTGTTTGCTCAAAGTGATGACCTGGATAGTGAAGGAAGTGAAGGCTCATTT
CTTGTGAAAAAGAAATCTAATTCAATTAGTGTAGGAGAATTTTACCGAGATGCCGTATTACAGCGTTGCTCACCAAA
TTTGCAAAGACATTCCAATTCCTTGGGGCCCATTTTTGATCATGAAGATTTACTGAAGCGAAAAAGAAAAATATTAT
CTTCAGATGATTCACTCAGGTCATCAAAACTTCAATCCCATATGAGGCATTCAGACAGCATTTCTTCTCTGGCTTCT
GAGAGAGAATATATTACATCACTAGACCTTTCAGCAAATGAACTAAGAGATATTGATGCCCTAAGCCAGAAATGCTG
TATAAGTGTTCATTTGGAGCATCTTGAAAAGCTGGAGCTTCACCAGAATGCACTCACGAGCTTTCCACAACAGCTAT
GTGAAACTCTGAAGAGTTTGACACATTTGGACTTGCACAGTAATAAATTTACATCATTTCCTTCTTATTTGTTGAAA
ATGAGTTGTATTGCTAATCTTGATGTCTCTCGAAATGACATTGGACCCTCAGTGGTTTTAGATCCTACAGTGAAATG
TCCAACTCTGAAACAGTTTAACCTGTCATATAACCAGCTGTCTTTTGTACCTGAGAACCTCACTGATGTGGTAGAGA
AACTGGAGCAGCTCATTTTAGAAGGAAATAAAATATCAGGGATATGCTCCCCCTTGAGACTGAAGGAACTGAAGATT
TTAAACCTTAGTAAGAACCACATTTCATCCCTATCAGAGAACTTTCTTGAGGCTTGTCCTAAAGTGGAGAGTTTCAG
TGCCAGAATGAATTTTCTTGCTGCTATGCCTTTCTTGCCTCCTTCTATGACAATCCTAAAATTATCTCAGAACAAAT

TTTCCTGTATTCCAGAAGCAATTTTAAATCTTCCACACTTGCGGTCTTTAGATATGAGCAGCAATGATATTCAGTAC
CTACCAGGTCCCGCACACTGGAAATCTTTGAACTTAAGGGAACTCTTATTTAGCCATAATCAGATCAGCATCTTGGA
CTTGAGTGAAAAAGCATATTTATGGTCTAGAGTAGAGAAACTGCATCTTTCTCACAATAAACTGAAAGAGATTCCTC
CTGAGATTGGCTGTCTTGAAAATCTGACATCTCTGGATGTCAGTTACAACTTGGAACTAAGATCCTTTCCCAATGAA
ATGGGGAAATTAAGCAAAATATGGGATCTTCCTTTGGATGAACTGCATCTTAACTTTGATTTTAAACATATAGGATG
TAAAGCCAAAGACATCATAAGGTTTCTTCAACAGCGATTAAAAAAGGCTGTGCCTTATAACCGAATGAAACTTATGA
TTGTGGGAAATACTGGGAGTGGTAAAACCACCTTATTGCAGCAATTAATGAAAACCAAGAAATCAGATCTTGGAATG
CAAAGTGCCACAGTTGGCATAGATGTGAAAGACTGGCCTATCCAAATAAGAGACAAAAGAAAGAGAGATCTCGTCCT
AAATGTGTGGGATTTTGCAGGTCGTGAGGAATTCTATAGTACTCATCCCCATTTTATGACGCAGCGAGCATTGTACC
TTGCTGTCTATGACCTCAGCAAGGGACAGGCTGAAGTTGATGCCATGAAGCCTTGGCTCTTCAATATAAAGGCTCGC
GCTTCTTCTTCCCCTGTGATTCTCGTTGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAAGCAACGCAAAGCCTGCATGAG
TAAAATCACCAAGGAACTCCTGAATAAGCGAGGGTTCCCTGCCATACGAGATTACCACTTTGTGAATGCCACCGAGG
AATCTGATGCTTTGGCAAAACTTCGGAAAACCATCATAAACGAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCTTGTT
GTTGGACAGCTGATTCCAGACTGCTATGTAGAACTTGAAAAAATCATTTTATCGGAGCGTAAAAATGTGCCAATTGA
ATTTCCCGTAATTGACCGGAAACGATTATTACAACTAGTGAGAGAAAATCAGCTGCAGTTAGATGAAAATGAGCTTC
CTCACGCAGTTCACTTTCTAAATGAATCAGGAGTCCTTCTTCATTTTCAAGACCCAGCACTGCAGTTAAGTGACTTG
TACTTTGTGGAACCCAAGTGGCTTTGTAAAATCATGGCACAGATTTTGACAGTGAAAGTGGAAGGTTGTCCAAAACA
CCCTAAGGGCATTATTTCGCGTAGAGATGTGGAAAAATTTCTTTCAAAAAAAAGGAAATTTCCAAAGAACTACATGT
CACAGTATTTTAAGCTCCTAGAAAAATTCCAGATTGCTTTGCCAATAGGAGAAGAATATTTGCTGGTTCCAAGCAGT
TTGTCTGACCACAGGCCTGTGATAGAGCTTCCCCATTGTGAGAACTCTGAAATTATCATCCGACTATATGAAATGCC
TTATTTTCCAATGGGATTTTGGTCAAGATTAATCAATCGATTACTTGAGATTTCACCTTACATGCTTTCAGGGAGAG
AACGAGCACTTCGCCCAAACAGAATGTATTGGCGACAAGGCATTTACTTAAATTGGTCTCCTGAAGCTTATTGTCTG
GTAGGATCTGAAGTCTTAGACAATCATCCAGAGAGTTTCTTAAAAATTACAGTTCCTTCTTGTAGAAAAGGCTGTAT
TCTTTTGGGCCAAGTTGTGGACCACATTGATTCTCTCATGGAAGAATGGTTTCCTGGGTTGCTGGAGATTGATATTT
GTGGTGAAGGAGAAACTCTGTTGAAGAAATGGGCATTATATAGTTTTAATGATGGTGAAGAACATCAAAAAATCTTA
CTTGATGACTTGATGAAGAAAGCAGAGGAAGGAGATCTCTTAGTAAATCCAGATCAACCAAGGCTCACCATTCCAAT
ATCTCAGATTGCCCCTGACTTGATTTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATTATGTTGAATAATGATGAGTTGGAATTTG
AACAAGCTCCAGAGTTTCTCCTAGGTGATGGCAGTTTTGGATCAGTTTACCGAGCAGCCTATGAAGGAGAAGAAGTG
GCTGTGAAGATTTTTAATAAACATACATCACTCAGGCTGTTAAGACAAGAGCTTGTGGTGCTTTGCCACCTCCACCA
CCCCAGTTTGATATCTTTGCTGGCAGCTGGGATTCGTCCCCGGATGTTGGTGATGGAGTTAGCCTCCAAGGGTTCCT
TGGATCGCCTGCTTCAGCAGGACAAAGCCAGCCTCACTAGAACCCTACAGCACAGGATTGCACTCCACGTAGCTGAT
GGTTTGAGATACCTCCACTCAGCCATGATTATATACCGAGACCTGAAACCCCACAATGTGCTGCTTTTCACACTGTA
TCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACAT
CAGAGGGCACACCAGGGTTTCGTGCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAACCAACAGGCTGATGTTTAT
TCATTTGGTTTACTACTCTATGACATTTTGACAACTGGAGGTAGAATAGTAGAGGGTTTGAAGTTTCCAAATGAGTT
TGATGAATTAGAAATACAAGGAAAATTACCTGATCCAGTTAAAGAATATGGTTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGA
AATTAATTAAACAGTGTTTGAAAGAAAATCCTCAAGAAAGGCCTACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTCA
GCTGAATTAGTCTGTCTGACGAGACGCATTTTATTACCTAAAAACGTAATTGTTGAATGCATGGTTGCTACACATCA
CAACAGCAGGAATGCAAGCATTTGGCTGGGCTGTGGGCACACCGACAGAGGACAGCTCTCATTTCTTGACTTAAATA

CTGAAGGATACACTTCTGAGGAAGTTGCTGATAGTAGAATATTGTGCTTAGCCTTGGTGCATCTTCCTGTTGAAAAG
GAAAGCTGGATTGTGTCTGGGACACAGTCTGGTACTCTCCTGGTCATCAATACCGAAGATGGGAAAAAGAGACATAC
CCTAGAAAAGATGACTGATTCTGTCACTTGTTTGTATTGCAATTCCTTTTCCAAGCAAAGCAAACAAAAAAATTTTC
TTTTGGTTGGAACCGCTGATGGCAAGTTAGCAATTTTTGAAGATAAGACTGTTAAGCTTAAAGGAGCTGCTCCTTTG
AAGATACTAAATATAGGAAATGTCAGTACTCCATTGATGTGTTTGAGTGAATCCACAAATTCAACGGAAAGAAATGT
AATGTGGGGAGGATGTGGCACAAAGATTTTCTCCTTTTCTAATGATTTCACCATTCAGAAACTCATTGAGACAAGAA
CAAGCCAACTGTTTTCTTATGCAGCTTTCAGTGATTCCAACATCATAACAGTGGTGGTAGACACTGCTCTCTATATT
GCTAAGCAAAATAGCCCTGTTGTGGAAGTGTGGGATAAGAAAACTGAAAAACTCTGTGGACTAATAGACTGCGTGCA
CTTTTTAAGGGAGGTAATGGTAAAAGAAAACAAGGAATCAAAACACAAAATGTCTTATTCTGGGAGAGTGAAAACCC
TCTGCCTTCAGAAGAACACTGCTCTTTGGATAGGAACTGGAGGAGGCCATATTTTACTCCTGGATCTTTCAACTCGT
CGACTTATACGTGTAATTTACAACTTTTGTAATTCGGTCAGAGTCATGATGACAGCACAGCTAGGAAGCCTTAAAAA
TGTCATGCTGGTATTGGGCTACAACCGGAAAAATACTGAAGGTACACAAAAGCAGAAAGAGATACAATCTTGCTTGA
CCGTTTGGGACATCAATCTTCCACATGAAGTGCAAAATTTAGAAAAACACATTGAAGTGAGAAAAGAATTAGCTGAA
AAAATGAGACGAACATCTGTTGAGTAAGAGAGAAATAGGAATTGTCTTTGGATAGGAAAATTATTCTCTCCTCTTGT
AAATATTTATTTTAAAAATGTTCACATGGAAAGGGTACTCACATTTTTTGAAATAGCTCGTGTGTATGAAGGAATGT
TATTATTTTTAATTTAAATATATGTAAAAATACTTACCAGTAAATGTGTATTTTAAAGAACTATTTAAAACACAATG
TTATATTTCTTATAAATACCAGTTACTTTCGTTCATTAATTAATGAAAATAAATCTGTGAAGTACCTAATTTAAGTA
CTCATACTAAAATTTATAAGGCCGATAATTTTTTGTTTTCTTGTCTGTAATGGAGGTAAACTTTATTTTAAATTCTG
TGCTTAAGACAGGACTATTGCTTGTCGATTTTTCTAGAAATCTGCACGGTATAATGAAAATATTAAGACAGTTTCCC
ATGTAATGTATTCCTTCTTAGATTGCATCGAAATGCACTATCATATATGCTTGTAAATATTCAAATGAATTTGCACT
AATAAAGTCCTTTGTTGGTATGTGAATTCTCTTTGTTGCTGTTGCAAACAGTGCATCTTACACAACTTCACTCAATT
CAAAAGAAAACTCCATTAAAAGTACTAATGAAAAAACATGACATACTGTCAAAGTCCTCATATCTAGGAAAGACACA
GAAACTCTCTTTGTCACAGAAACTCTCTGTGTCTTTCCTAGACATAATAGAGTTGTTTTTCAACTCTATGTTTGAAT
GTGGATACCCTGAATTTTGTATAATTAGTGTAAATACAGTGTTCAGTCCTTCAAGTGATATTTTTATTTTTTTATTC
ATACCACTAGCTACTTGTTTTCTAATCTGCTTCATTCTAATGCTTATATTCATCTTTTCCCTAAATTTGTGATGCTG
CAGATCCTACATCATTCAGATAGAAACCTTTTTTTTTTTCAGAATTATAGAATTCCACAGCTCCTACCAAGACCATG
AGGATAAATATCTAACACTTTTCAGTTGCTGAAGGAGAAAGGAGCTTTAGTTATGATGGATAAAAATATCTGCCACC
CTAGGCTTCCAAATTATACTTAAATTGTTTACATAGCTTACCACAATAGGAGTATCAGGGCCAAATACCTATGTAAT
AATTTGAGGTCATTTCTGCTTTAGGAAAAGTACTTTCGGTAAATTCTTTGGCCCTGACCAGTATTCATTATTTCAGA
TAATTCCCTGTGATAGGACAACTAGTACATTTAATATTCTCAGAACTTATGGCATTTTACTATGTGAAAACTTTAAA
TTTATTTATATTAAGGGTAATCAAATTCTTAAAGATGAAAGATTTTCTGTATTTTAAAGGAAGCTATGCTTTAACTT
GTTATGTAATTAACAAAAAAATCATATATAATAGAGCTCTTTGTTCCAGTGTTATCTCTTTCATTGTTACTTTGTAT
TTGCAATTTTTTTTACCAAAGACAAATTAAAAAAATGAATACCATATTTAAATGGAATAATAAAGGTTTTTTAAAAA
CTTTAAA

[0886] SEQ ID NO:2

[0887] >SEQ ID NO:1的反向互补

[0888] TTTAAAGTTTTTAAAAAACCTTTATTATTCCATTTAAATATGGTATTCATTTTTTTAATTTGTCTTTGG
TAAAAAAAATTGCAAATACAAAGTAACAATGAAAGAGATAACACTGGAACAAAGAGCTCTATTATATATGATTTTTT
TGTTAATTACATAACAAGTTAAAGCATAGCTTCCTTTAAAATACAGAAAATCTTTCATCTTTAAGAATTTGATTACC

CTTAATATAAATAAATTTAAAGTTTTCACATAGTAAAATGCCATAAGTTCTGAGAATATTAAATGTACTAGTTGTCC
TATCACAGGGAATTATCTGAAATAATGAATACTGGTCAGGGCCAAAGAATTTACCGAAAGTACTTTTCCTAAAGCAG
AAATGACCTCAAATTATTACATAGGTATTTGGCCCTGATACTCCTATTGTGGTAAGCTATGTAAACAATTTAAGTAT
AATTTGGAAGCCTAGGGTGGCAGATATTTTTATCCATCATAACTAAAGCTCCTTTCTCCTTCAGCAACTGAAAAGTG
TTAGATATTTATCCTCATGGTCTTGGTAGGAGCTGTGGAATTCTATAATTCTGAAAAAAAAAAAAGGTTTCTATCTGA
ATGATGTAGGATCTGCAGCATCACAAATTTAGGGAAAAGATGAATATAAGCATTAGAATGAAGCAGATTAGAAAACA
AGTAGCTAGTGGTATGAATAAAAAAATAAAAATATCACTTGAAGGACTGAACACTGTATTTACACTAATTATACAAA
ATTCAGGGTATCCACATTCAAACATAGAGTTGAAAAACAACTCTATTATGTCTAGGAAAGACACAGAGAGTTTCTGT
GACAAAGAGAGTTTCTGTGTCTTTCCTAGATATGAGGACTTTGACAGTATGTCATGTTTTTTCATTAGTACTTTTAA
TGGAGTTTTCTTTTGAATTGAGTGAAGTTGTGTAAGATGCACTGTTTGCAACAGCAACAAAGAGAATTCACATACCA
ACAAAGGACTTTATTAGTGCAAATTCATTTGAATATTTACAAGCATATATGATAGTGCATTTCGATGCAATCTAAGA
AGGAATACATTACATGGGAAACTGTCTTAATATTTTCATTATACCGTGCAGATTTCTAGAAAAATCGACAAGCAATA
GTCCTGTCTTAAGCACAGAATTTAAAATAAAGTTTACCTCCATTACAGACAAGAAAACAAAAAATTATCGGCCTTAT
AAATTTTAGTATGAGTACTTAAATTAGGTACTTCACAGATTTATTTTCATTAATTAATGAACGAAAGTAACTGGTAT
TTATAAGAAATATAACATTGTGTTTTAAATAGTTCTTTAAAATACACATTTACTGGTAAGTATTTTTACATATATTT
AAATTAAAAATAATAACATTCCTTCATACACACGAGCTATTTCAAAAAATGTGAGTACCCTTTCCATGTGAACATTT
TTAAAATAAATATTTACAAGAGGAGAGAATAATTTTCCTATCCAAAGACAATTCCTATTTCTCTCTTACTCAACAGA
TGTTCGTCTCATTTTTTCAGCTAATTCTTTTCTCACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGCACTTCATGTGGAAGAT
TGATGTCCCAAACGGTCAAGCAAGATTGTATCTCTTTCTGCTTTTGTGTACCTTCAGTATTTTTCCGGTTGTAGCCC
AATACCAGCATGACATTTTTAAGGCTTCCTAGCTGTGCTGTCATCATGACTCTGACCGAATTACAAAAGTTGTAAAT
TACACGTATAAGTCGACGAGTTGAAAGATCCAGGAGTAAAATATGGCCTCCTCCAGTTCCTATCCAAAGAGCAGTGT
TCTTCTGAAGGCAGAGGGTTTTCACTCTCCCAGAATAAGACATTTTGTGTTTTGATTCCTTGTTTTCTTTTACCATT
ACCTCCCTTAAAAAGTGCACGCAGTCTATTAGTCCACAGAGTTTTTCAGTTTTCTTATCCCACACTTCCACAACAGG
GCTATTTTGCTTAGCAATATAGAGAGCAGTGTCTACCACCACTGTTATGATGTTGGAATCACTGAAAGCTGCATAAG
AAAACAGTTGGCTTGTTCTTGTCTCAATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTAGAAAAGGAGAAAATCTTTGTGCCA
CATCCTCCCCACATTACATTTCTTTCCGTTGAATTTGTGGATTCACTCAAACACATCAATGGAGTACTGACATTTCC
TATATTTAGTATCTTCAAAGGAGCAGCTCCTTTAAGCTTAACAGTCTTATCTTCAAAAATTGCTAACTTGCCATCAG
CGGTTCCAACCAAAAGAAAATTTTTTTGTTTGCTTTGCTTGGAAAAGGAATTGCAATACAAACAAGTGACAGAATCA
GTCATCTTTTCTAGGGTATGTCTCTTTTTCCCATCTTCGGTATTGATGACCAGGAGAGTACCAGACTGTGTCCCAGA
CACAATCCAGCTTTCCTTTTCAACAGGAAGATGCACCAAGGCTAAGCACAATATTCTACTATCAGCAACTTCCTCAG
AAGTGTATCCTTCAGTATTTAAGTCAAGAAATGAGAGCTGTCCTCTGTCGGTGTGCCCACAGCCCAGCCAAATGCTT
GCATTCCTGCTGTTGTGATGTGTAGCAACCATGCATTCAACAATTACGTTTTTAGGTAATAAAATGCGTCTCGTCAG
ACAGACTAATTCAGCTGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTAGGCCTTTCTTGAGGATTTTCTTTCAAAC
ACTGTTTAATTAATTTCTCAACCATAGGCCATGGGGCACAACCATATTCTTTAACTGGATCAGGTAATTTTCCTTGT
ATTTCTAATTCATCAAACTCATTTGGAAACTTCAAACCCTCTACTATTCTACCTCCAGTTGTCAAAATGTCATAGAG
TAGTAAACCAAATGAATAAACATCAGCCTGTTGGTTATAAATGACATTTCCTCTGGCAACTTCAGGTGCACGAAACC
CTGGTGTGCCCTCTGATGTTTTTATCCCCATTCTACAGCAGTACTGAGCAATGCCGTAGTCAGCAATCTTTGCAATG
ATGGCAGCATTGGGATACAGTGTGAAAAGCAGCACATTGTGGGGTTTCAGGTCTCGGTATATAATCATGGCTGAGTG
GAGGTATCTCAAACCATCAGCTACGTGGAGTGCAATCCTGTGCTGTAGGGTTCTAGTGAGGCTGGCTTTGTCCTGCT

GAAGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGGAGGCTAACTCCATCACCAACATCCGGGGACGAATCCCAGCTGCCAGCAAA
GATATCAAACTGGGGTGGTGGAGGTGGCAAAGCACCACAAGCTCTTGTCTTAACAGCCTGAGTGATGTATGTTTATT
AAAAATCTTCACAGCCACTTCTTCTCCTTCATAGGCTGCTCGGTAAACTGATCCAAAACTGCCATCACCTAGGAGAA
ACTCTGGAGCTTGTTCAAATTCCAACTCATCATTATTCAACATAATATTTCTAGGCAGGTCAGCCAAAATCAAGTCA
GGGGCAATCTGAGATATTGGAATGGTGAGCCTTGGTTGATCTGGATTTACTAAGAGATCTCCTTCCTCTGCTTTCTT
CATCAAGTCATCAAGTAAGATTTTTTGATGTTCTTCACCATCATTAAAACTATATAATGCCCATTTCTTCAACAGAG
TTTCTCCTTCACCACAAATATCAATCTCCAGCAACCCAGGAAACCATTCTTCCATGAGAGAATCAATGTGGTCCACA
ACTTGGCCCAAAAGAATACAGCCTTTTCTACAAGAAGGAACTGTAATTTTTAAGAAACTCTCTGGATGATTGTCTAA
GACTTCAGATCCTACCAGACAATAAGCTTCAGGAGACCAATTTAAGTAAATGCCTTGTCGCCAATACATTCTGTTTG
GGCGAAGTGCTCGTTCTCTCCCTGAAAGCATGTAAGGTGAAATCTCAAGTAATCGATTGATTAATCTTGACCAAAAT
CCCATTGGAAAATAAGGCATTTCATATAGTCGGATGATAATTTCAGAGTTCTCACAATGGGGAAGCTCTATCACAGG
CCTGTGGTCAGACAAACTGCTTGGAACCAGCAAATATTCTTCTCCTATTGGCAAAGCAATCTGGAATTTTTCTAGGA
GCTTAAAATACTGTGACATGTAGTTCTTTGGAAATTTCCTTTTTTTTGAAAGAAATTTTTCCACATCTCTACGCGAA
ATAATGCCCTTAGGGTGTTTTGGACAACCTTCCACTTTCACTGTCAAAATCTGTGCCATGATTTTACAAAGCCACTT
GGGTTCCACAAAGTACAAGTCACTTAACTGCAGTGCTGGGTCTTGAAAATGAAGAAGGACTCCTGATTCATTTAGAA
AGTGAACTGCGTGAGGAAGCTCATTTTCATCTAACTGCAGCTGATTTTCTCTCACTAGTTGTAATAATCGTTTCCGG
TCAATTACGGGAAATTCAATTGGCACATTTTTACGCTCCGATAAAATGATTTTTTCAAGTTCTACATAGCAGTCTGG
AATCAGCTGTCCAACAACAAGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAAGGCTCTCGTTTATGATGGTTTTCCGAAGTTTTG
CCAAAGCATCAGATTCCTCGGTGGCATTCACAAAGTGGTAATCTCGTATGGCAGGGAACCCTCGCTTATTCAGGAGT
TCCTTGGTGATTTTACTCATGCAGGCTTTGCGTTGCTTCTCATCAGAAACATCCAAATGTGTGCCAACGAGAATCAC
AGGGGAAGAAGAAGCGCGAGCCTTTATATTGAAGAGCCAAGGCTTCATGGCATCAACTTCAGCCTGTCCCTTGCTGA
GGTCATAGACAGCAAGGTACAATGCTCGCTGCGTCATAAAATGGGGATGAGTACTATAGAATTCCTCACGACCTGCA
AAATCCCACACATTTAGGACGAGATCTCTCTTTCTTTTGTCTCTTATTTGGATAGGCCAGTCTTTCACATCTATGCC
AACTGTGGCACTTTGCATTCCAAGATCTGATTTCTTGGTTTTCATTAATTGCTGCAATAAGGTGGTTTTACCACTCC
CAGTATTTCCCACAATCATAAGTTTCATTCGGTTATAAGGCACAGCCTTTTTTAATCGCTGTTGAAGAAACCTTATG
ATGTCTTTGGCTTTACATCCTATATGTTTAAAATCAAAGTTAAGATGCAGTTCATCCAAAGGAAGATCCCATATTTT
GCTTAATTTCCCCATTTCATTGGGAAAGGATCTTAGTTCCAAGTTGTAACTGACATCCAGAGATGTCAGATTTTCAA
GACAGCCAATCTCAGGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTGTGAGAAAGATGCAGTTTCTCTACTCTAGACCATAAATAT
GCTTTTTCACTCAAGTCCAAGATGCTGATCTGATTATGGCTAAATAAGAGTTCCCTTAAGTTCAAAGATTTCCAGTG
TGCGGGACCTGGTAGGTACTGAATATCATTGCTGCTCATATCTAAAGACCGCAAGTGTGGAAGATTTAAAATTGCTT
CTGGAATACAGGAAAATTTGTTCTGAGATAATTTTAGGATTGTCATAGAAGGAGGCAAGAAAGGCATAGCAGCAAGA
AAATTCATTCTGGCACTGAAACTCTCCACTTTAGGACAAGCCTCAAGAAAGTTCTCTGATAGGGATGAAATGTGGTT
CTTACTAAGGTTTAAAATCTTCAGTTCCTTCAGTCTCAAGGGGGAGCATATCCCTGATATTTTATTTCCTTCTAAAA
TGAGCTGCTCCAGTTTCTCTACCACATCAGTGAGGTTCTCAGGTACAAAAGACAGCTGGTTATATGACAGGTTAAAC
TGTTTCAGAGTTGGACATTTCACTGTAGGATCTAAAACCACTGAGGGTCCAATGTCATTTCGAGAGACATCAAGATT
AGCAATACAACTCATTTTCAACAAATAAGAAGGAAATGATGTAAATTTATTACTGTGCAAGTCCAAATGTGTCAAAC
TCTTCAGAGTTTCACATAGCTGTTGTGGAAAGCTCGTGAGTGCATTCTGGTGAAGCTCCAGCTTTTCAAGATGCTCC
AAATGAACACTTATACAGCATTTCTGGCTTAGGGCATCAATATCTCTTAGTTCATTTGCTGAAAGGTCTAGTGATGT
AATATATTCTCTCTCAGAAGCCAGAGAAGAAATGCTGTCTGAATGCCTCATATGGGATTGAAGTTTTGATGACCTGA

GTGAATCATCTGAAGATAATATTTTTCTTTTTCGCTTCAGTAAATCTTCATGATCAAAAATGGGCCCCAAGGAATTG
GAATGTCTTTGCAAATTTGGTGAGCAACGCTGTAATACGGCATCTCGGTAAAATTCTCCTACACTAATTGAATTAGA
TTTCTTTTTCACAAGAAATGAGCCTTCACTTCCTTCACTATCCAGGTCATCACTTTGAGCAAACACACTGTCCATAG
AAGAGTCAGGAATAAAGGTCCATTCATCAAATTTAGACAGCACATCTTCAGAAAAATTTCCATCGCTGCCTGAGGCT
GTTCCTTCTTCCACAGCACTTTTCATCTGATATCTGATCACCATTCTTGCTAGTGTAGATGCTATATTTGTTTGTTT
CCTTAAATTAGAAGTCTTATCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGTTCAACTTTTCCTATACAAAATCCTCCAA
GGCAAATGCTATTGTTGGCCACATCCAGGGCCAGCCTCCTTAAGAGCAAGCTGATGATCTGGCTGTCACCTTTCCCA
ATGCTTATCGTCAACGCTTTTCGTACATCTTGTTCACGAGATCCACTATTCAGTAAGAGTTCCACCAATTTGGGACT
GCTCTCTTTCTCACATACCTGACAAATTAAAGAAGATCCCTCCTTTGCTTGATTGGCATCTGCTCCCAATAGAAGCA
AGCATTCAACCATGATGCTGTTATTCTGATCACACGCTCTCTCTAGCATCACATTTTTTAAGTAATCATCCATAGCT
ACTTTTGCAAAACACTTGCAACAGAGGTTTAGAAACTGTTGATCCTTTTGTTCCATGATATTGGAAGACATTTGATG
GAATATTACTAAGTCAAATGAATGATGCACCAGCAGCTTAGAAAAAGATGCTGACAATTTGAGGATTGCTAAGATTG
TCTGAAATCCTTTAGTCTGTATTTCAGCAACATCCTTAAATCGGTATAAGCTGGAAACCAGAATTTTTGCCAGCAGA
TGTCCAGTTCCTATGAACACATTCTTCTTTGTAATCAAGTATCCTATAAGACTTAAACCCAGACACTGAATTTCTTG
GTCATCTGGATACATCTGCAGTGTGTGAAGCACTGAATCCATAGCACCTTCCAGGGATAACATCTCTAATGCATCAG
GAAAATGTACAATAGAAGAAATTACTTTTAATCCACATTTCTGAATCCCAGGATTTCCAATGAACCTGTTCAAAGCT
GCTAGGACCAGTTTGTGAATATCATTCTTGAAACACTGTTTTTTAACCATATTTAGCTTATGATGAAATTCTGTATC
CTCCCTGGATTCTTCTGGCATGCCAGGCACTATAAAATGTAAAATAGCTCGAAGCGCCTCCAGCTGCACTGGTAATG
ATGTCTCATGACGTTTCATAACTGTTAGTATTTTGGGGACCACTGCTGCCATTATATCCAGGGAAGTGTTGCTTCCT
TCAAAAAGATGATTTAGCATTTTACAGCCACTTTCAGCCACTTCAGGAGAATGTATATGCTTCTGCATTAACTCCAA
AACATTCAGGTGTATTCCTTTTGATAACAGTATTTTTCTGAAATTAACATTTTGTTCTAAGAGAGTTGACAATGCAT
TCGCAGATGCCTGGAAAACTTCCTTTGATGAAGAATGCATCAGCATGGAGAGCATCACTTCCCTATGAGCTGGGAAA
TGGCCATCTTCATCTCCAATCTTCTCATGTAAACTGTTTTGGTACATAAGGAGATTATTTAGTGCCCAGCATGCGGC
CTCCTGCACGTGCTTGTTCTTTCTATGCCACGTTAATGCTTTGTAACAGGCTTCCAGCCAAAACAATTTATCTTCTT
CCCCCTCATCATCATTCTCTTGATTCTCATTCTTTTCCTCTAAATCTTGATTTAAGAAAATAGTCTCAGTGAGGAGG
GCCAAACAGCTGAGCGCTGAGATCTGCAATGCTGCATTCTCTGGGTACTGCTGCACAGCTTTCACCACAAACTCATG
GACTTCGTTTAATACCAGGATATTGAAAAAATTACCTAATGTAAGCCTATGGAGCAAACAGCAACTCACTTCTTGAA
TTCTTTCACTCATAGGGAATGCTTTCATAGCTTCCACCACAATATTATAACACCTGACATTGCCACTCATGAGGACT
TCCACATTATTGCAAGGAATCGCTAGGGAATGTAAACAATGCAGCACATGAAGCACAATTTCCTCTTCATCTTTAAA
ATTTGTTAACGCACTTAACAATATCATATAATCTTTGTTCTCAACAAATTCAGTCAGTTGCTCCTCTGAGACTCTCT
CAAACAGCACATGTAAAGCTTTGCATCCAAGTTTCTGGACTTCATCATTGGCTGGAAATGAGTGCATGGCATCAAAA
ATTAACATGAAAATATCACTTTCTTCATCCAATATCAGCAAGGTGATTTTACCTGAAGTTAGGAGGAGATCTAAGGT
CTTCAGTCCAATCACTGACAAGTTTACACTGGCATTATGAACTGTTAGCATTTTAAGAATCAATTGGTGAACACCAA
GGACTTCCCAATCATTTCCAACATCCTGGGGTCCCATTAAGCTTTGCATTGTACCTGGACAGACTTCTATTAATTTG
CACAGAAGTGACCAACCCACCTGCTGCACACTCGCGACTCTCATATAGGAGTCCAAGACGATCAACAGAGGCACATG
GATATTTTTGCCTTGAAATAACTTGGAGGCGCGCTCGGAGTACGTGAACACCAGCAGATCCTCCAGGATTTGGACCA
GCGTTTCTATCTGTTTTCCTTCCTGGACATTGTTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGTTTCCTCGTCCTCTTCG
CACCCCTGACAGCTGCCACTAGCCATGGTGGCACCTGCTTCCAACCCGCCGCCCTCCCAGCATGAACGTCCGCTGCT
CAGGGAACCGGCAGGGGCGCCGGCCACAGCTCCCCGGGGGCGAGCTCAGCTCACCGCCCGCAGCCAGCGCTCCCCGC

GGGCCCC

[0889] SEQ ID NO:3

[0890] >预测XM_015151449.2:恒河猴富亮氨酸重复激酶2(LRRK2),转录物变体X1,mRNA

[0891] ACGGGCACGGTCATCCCGGCCAGGCCCGGCTCCAGCAGCCCCACGGCCGCCGCCGAAGTTCTGCGCGG
CCCGTCGCCCCGGCGGAGCCTCTGGCAGGCCCCTGAGCTGGTTTTTTGGGGCCTGGCTGGGGGAGGAGGAAGCCGA
GCAGGAGGGCTCTGGAGAGGGAGGGCAACGCGGGGCGGGGAGCCACCGCCTTCCTCATAAACAGGCGGGCGTGGGC
GCCGACGGGGCCCCCGGGGAGCCCTGGCTGAGGGCGGTGAGCTGAGCTAGATCCCGGGGAGCTGTGGCCGGCGCCC
CTGCCGGTTCCCTGAGCAGCGGACGTTCGTGCTGGGAGGGCGGCGGGTTGGAAGCAGGGGCCACCATGGCTAGTGG
CAGCTGTCAGGGGTGCGAGGAGGACGAGGAAACTCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAACAATGTCCAGGAAGGT
AAACAGATAGAAACGCTGGTCCAAATCCTGGAGGATCTGCTGGTGTTCACGTACTCCGAGCACGCCTCCAAGTTAT
TTCAAGGCAAAAATATCCATGTGCCTCTGTTGATCGTCTTGGACTCGTATATGAGAGTCGCGAGTGTGCAGCAGGT
GGGTTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAATCTGCCCGGGTACAATGCAAAGCTTAATGGGACCCCAGGATGTT
GGAAATGATTGGGAAGTCCTTGGTGTTCACCAATTGATTCTTAAAATGCTAACAGTTCATAATGCCAGTGTAAACT
TGTCAATGATTGGACTGAAGACCTTAGATCTCCTCCTAACTTCAGGTAAAATCACCTTACTGATATTGGATGAAGA
AAGTGATATTTTCATGTTAATTTTTGATGCCATGCACTCATTTCCAGCCAATGATGAAATCCAGAAACTTGGATGC
AAAGCTTTACATGTGCTGTTTGAAAGAGTCTCAGAGGAGCAACTAACTGAATTTGTTGAGAACAAAGATTATATGA
TATTGTTAAGTGCGTTAACAAATTTTAAAGATGAAGAGGAAATTGTGCTTCATGTACTGCATTGTTTACATTCCCT
AGCAATTCCTTGCAATAATGTGGAAGTCCTCATGAGTGGCAATGTCAGGTGTTATAATATTGTGGTGGAAGCTATG
AAAGCATTCCCTATCAGTGAAAAAATTCAAGAAGTGAGTTGCTGTTTGCTCCATAGGCTTACATTAGGTAATTTTT
TTAATATCCTGGTATTAAACGAAGTCCATGAATTTGTGGTGAAAGCTGTGCAGCGGTACCCAGAGAACGCAGCATT
ACAGATCTCAGCGCTCAGCTGTTTGGCCCTCCTCACTGAGACCATTTTCTTAAATCAAGATTTAGAGGAAAAGAAT
GAGAATCAAGAGAATGATGATGAGGGGGAAGAAGTTAAATTGTTTTGGCTGGAAGCCTGTTACAAAGCGTTAACGT
GGCATAGAAAGAACAAGCACGTGCAGGAGGCTGCATGCTGGGCACTAAATAATCTCCTTATGTACCAAAACAGTTT
ACATGAGAAGATTGGAGATGAAGATGGCCATTTCCCAGCTCATAGGGAAGTGATGCTGTCCATGCTGATGCATTCA
TCATCAAAGGAAGTTTTCCAGGCATCTGCTAATGCATTGTCAACTCTTTTAGAACAAAATGTTAATTTCAGAAAAA
TCCTGTTATCAAAAGGAATATACCTGAATGTTTTGGAGTTAATGCAGAAGCATATACATTCTCCTGAAGTGGCTGA
AAGTGGCTGTAAAATGCTAAATCATCTTTTTGAAGGAAGCAACACATCCCTGGATACAATGGCAGCAGTGCTCCCC
AAAATAATAACAGTTATGAAAAGTCATGAGACATCATTACCAGTGCAGCTGGAGGCGCTTCGAGCTATTTTACATT
TTATAGTGCCAGGCATGCCAGAAGAATCCAGAGAGGATGCAGAATCTCATCGTAAGCTAAATATGGTTAAAAAACA
GTGTTTCAAGAATGATATTCACAAACTGGTCCTAGCAGCTTTGAACAGGTTCATTGGAAATCCTGGGATTCAGAAA
TGTGGATTAAAAGTAATTTCTTTTATTGCACATTTTACTGATGCATTAGGGGTGTTATCCCTGGAAGGTGCTGTGG
ATTCAGTGCTTCACACACTGCAGATGTATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGTTTAAGTCTTATAGGATG
CTTGATTACAAAGAAGAATTTATGCATAGGAACTGGACATCTGCTGGCAAAAATTCTGGCTTCCAGCTTATACCGA
TTTAAGGATGTTGCTGAAGTACAGACTGAAGGATTTCAGACAATCTTAGCAATCCTCAAATTGTCAGCATCTTTTT
CTAAGCTGCTGGTGCATCATTCGTTTGACTTAGTAATATTCCATCAAATGTCTTCCAGTATCATGGAACAAAAGGA
TCAACAGTTTCTAAACCTCTGTTGCAAGTGTTTTGCAAAAGTAGCTATGGATGATGACTTAAAAAATATGATGCTA
GAGAGAGCGTGTGATCAGAATAACAGCATCATGGTTGAATGCTTGCTTCTATTAGGAGCAGATGCCAATCAAGCAA
AGGAGGGAACTTCTTTAATTTGTCAGGTATGTGAGAAAGAGAGCAGTCCCAAATTGGTGGAACTCTTATTGAATAG
TGGATCTCGTGAACAAGATGTACGAAAAGCGCTGACAATAAGCATTGGGAAAGGCGACAGCCAGATCATCAGCTTG

CTCTTAAGGAGGCTGGCCCTGGACATGGCCAACAATAGCATTTGCCTTGGAGGGTTTTGTATAGGAAAAGTTGAAC
CTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTCCAGATAAGACTTCTAATTTAAGGAAACAAACAAATATAGCATCTACACTAGC
AAGAATGGTGATCAGATATCAGATGAAAAGTGCCATGGAAGAAGGAGCAGCCTCAGGCAGTGATGGAAATTTTTCT
GAAGATGTGCTGTCTAAATTTGATGAATGGACCTTTATTCCTGACTCTTCTATGGACAGTGTCTTTGCTCAAAGTG
ATGATCTAGATAGTGAAGGAAGTGAAGGCTCATTTCTTGTGAAAAAGAAATCAAATTCAATTAGTGTAGGAGAATT
TTACCGAGATGCCGTATTACAACGTTGCTCACCAAATTTGCAAAGGCATTCCAGTTCCTTGGGGCCCATTTTTGAT
CATGAAGATTTACTGAGAAGAAAAAGAAAAATATTATCTTCAGATGATTCACTCAGGTCATCAAAACTTCAATCCC
ATATGAGGCATTCAGACAGCATTTCTTCTCTGGCTTCTGAGAGAGAATATATTACATCACTAGACCTTTCAGCAAA
TGAACTAAGAGATATTGATGCCCTAAGCCAGAAATCCTGTATAAGTGGTCATTTGGAGCATCTTGAAAAGCTGGAG
CTTCACCAGAATGCACTCACGAGCTTTCCACAACAGCTATGTGAAACTCTGAAGAGTTTGACACATTTGGACTTGC
ACAGTAATAAATTTACATCATTTCCTTCTTACTTGTTGAAAATGAGTTGTGTTGCTAACCTTGATGTCTCTCGAAA
TGACATTGGACCCTCAGTGGTTTTAGATCCTGCAGTGAAATGTCCAACTCTGAAACAGTTTAACCTGTCATATAAC
CAGCTGTCTTCTGTTCCTGAGAACCTTGCTGATGGGATAGAGAAACTGGAGCAGCTCATTTTAGAAGGAAATAAAA
TATCAGGGATATGCTCCCCCTTGAGACTGAAGGAACTGAAGATTTTAAACCTTAGTAAAAACCACATTTCATCCCT
ATCAGAGAACTTTCTTGAGGCTTGTCCTAAAGTGGAGAGTTTCAGTGCCAGAATGAATTTTCTTGCTGCTATGCCT
TTCTTGCCTCCTTCCATGACAAGCCTAAAATTATCTCAAAACAAATTTACATGTATTCCAGAAGCAATTTTAAATC
TTCCACACTTGCGGTCTTTAGATATGAGCAGCAATGATATTCAATATCTACCAGGTCCTGCACACTGGAAATCTTT
GAACTTAAGGGAACTCTTATTTAGCCATAATCAGATCAGCATCTTGGACTTGAGTGAAAAAGCGTATTTATGGTCT
AGAGTAGAGAAACTGCATCTTTCTCACAATAAACTGAAAGAGATTCCTCCTGAGATTGGCTGTCTTGAAAATCTGA
CATCTCTGGATGTCAGTTACAACTTGGAACTAAGATCCTTTCCCAATGAAATGGGGAAATTAAGCAAAATATGGGA
TCTTCCTTTGGATGAACTGCGTCTTAACTTTGATTTTAAACATATAGGATGTAAAGCCAAAGACATCATAAGGTTT
CTTCAGCAGCGGTTAAAAAAGGCTGTGCCCTATAACCGAATGAAACTTATGGTTGTTGGAAATACTGGGAGTGGTA
AAACCACCTTGTTGCAGCAATTAATGAAAACCAAGAAATCAGATCTTGGAATGCAAAGTGCCACAGTTGGCATAGA
TGTGAAAGACTGGCCTATCCAAATAAGAGGCAAAAGAAAGAGAGATCTCGTTCTGAATGTGTGGGATTTT GCAGG
TCGTGAGGAATTCTATAGCACTCATCCTCATTTTATGACGCAGCGAGCATTGTACCTTGCTGTCTATGACCTTAGCA
AAGGACAGGCTGAAGTTGATGCCATGAAGCCTTGGCTCTTCAATATAAAGGCTCGCGCTTCTTCTTCCCCTGTGATT
CTCGTTGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAGGCAGCGCAAAGCCTGCATAGGTAAAATCACCAAGGAACTCCT
GAATAAGCGAGGGTTCCCTGCTATACGAGATTACCACTTTGTGAATGCCACCGAGGAATCTGATGCTTTGGCAAAAC
TTCGGAAAACCATCATAAACGAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCCTGTTGTTGGACAGCTGATTCCAGAC
TGCTATGTAGAACTTGAGAAAATCATTTTATCGGAGCGTAAAAATGTGCCAATTGAATTTCCTGTAATTGACCAGAA
ACGATTATTACAACTAGTGAGAGAAAATCAGTTGCAGTTAGATGAAAATGAGCTTCCTCACGCAGTTCACTTTCTAA
ATGAATCAGGAGTCCTTCTTCATTTTCAAGACCCAGCACTGCAGTTAAGTGACTTGTATTTTGTGGAACCCAAGTGG
CTTTGTAAAATCATGGCACAGATTTTGACAGTGAAAGTGGAAGGTTGTCCAAAACACCCTAAGGGAATTATTTCACG
TAGAGATGTGGAAAAATTTCTTTCGAAGAAAAGGAGATTTCCAAAGAACTACATGTCACAGTATTTTAAGCTCCTAG
AAAAATTCCAGATTGCTTTGCCAATAGGAGAAGAATATTTGCTGGTTCCAAGCAGTTTGTCTGACCACAGGCCTGTG
ATAGAGCTTCCCCATTGTGAGAACTCTGAAATTATCATCCGACTATATGAAATGCCTTATTTTCCAATGGGATTTTG
GTCGAGGTTAATCAATCGATTACTTGAGATTTCACCTTACATGCTTTCAGGGAGAGAACGAGCACTTCGCCCAAACA
GAATGTATTGGCGACAAGGCATCTACTTAAATTGGTCTCCTGAAGCTTATTGTCTGGTAGGATCTGAAGTCTTAGAC
AATCACCCAGAGAGTTTCTTAAAAATTACAGTTCCTTCTTGTAGAAAAGGCTGTATTCTTTTGGGCCAAGTTGTGGA

CCACATTGATTCTCTCATGGAGGAATGGTTTCCTGGGTTGCTGGAGATTGATATTTGTGGTGAAGGAGAAACTCTGT
TGAAGAAATGGGCATTATATAGTTTTAATGATGGTGAAGAGCATCAAAAAATCTTACTTGATGACTTGATGAAGAAA
GCAGAGGAAGGAGATCTCTTAGTAAATCCAGATCAACCAAGGCTCACCATTCCAATATCTCAGATTGCCCCTGACTT
GATTTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATTATGTTGAATAATGATGAGCTGGAATTTGAACAAGCTCCAGAGTTTCTCC
TAGGTGATGGCAGTTTTGGATCAGTTTATCGAGCAGCCTATGAAGGAGAAGAAGTGGCTGTGAAGATTTTTAATAAA
CACACATCACTTAGGCTGTTAAGACAAGAGCTGGTGGTGCTTTGCCACCTCCACCACCCCAGTTTGATATCTTTGCT
GGCAGCTGGTATTCGTCCCCGGATGTTGGTGATGGAGTTAGCCTCCAAGGGTTCCTTGGATCGCCTGCTTCAGCAGG
ACAAAGCCAGCCTCACTAGAACCCTACAGCACAGGATTGCACTCCATGTGGCTGATGGTTTGAGATACCTCCATTCA
GCCATGATTATATACCGAGACTTGAAGCCCCACAATGTGCTGCTTTTCACACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGC
AAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACGTCAGAGGGCACACCAGGGTTTC
GTGCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAATCAACAAGCTGATGTTTATTCATTTGGTTTGCTACTCTAT
GACATTTTGACAACTGGAGGTAGAATAGTAGAGGGTTTGAAGTTTCCAAATGAGTTTGATGAATTAGCAATACAAGG
AAAATTACCTGATCCAGTTAAAGAATATGGTTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAAATTAATTACAAAGTGTTTGA
AAGAAAATCCTCAAGAAAGGCCTACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTCAGCTGAATTAGTCTGTCTGACG
AGACACATTTTATTACCTAAAAACGTAATTGTTGACTGCATGGTTGCTACACATCACAACAGCAGGAATGCAAGCAT
TTGGCTGGGCTGTGGGCACACCAACAGAGGACAGCTCTCATTTCTTGACTTAAATACTGAAGGATACACTTCTGAGG
AGGTTGCTGATAGTAGAATATTGTGCTTAGCCTTGGTGCATCTTCCTGTTCAAAAAGAAAGCTGGATTGTGTCCGGG
ACACAGTCTGGTACTCTCCTGGTCATCAATACCGAAGATGGGAAAAAGAGACATACCCTAGAAAAGATGACTGATTC
CATCACTTGTTTGTATTGCAATTCCTTTTCCAAGCAAAGCAAACAAAAAAATTTTCTTTTGGTTGGAACCGCTGATG
GCAATTTAGCAATTTTTGAAGATAAAACTGTTAAGCTTGAAGGAGCTGCTCCTTTGAAGATACTAAATATAGGAAAT
GTCAGTACTCCATTGATGTGTTTGAGTGAATCCACAAATTCAACAGAAAGAAATGTAATGTGGGGAGGATGTGGCAC
AAAGATTTTCTCCTTTTCTAATGATTTCACCATTCAGAAACTCATTGAGACAAGAACAAGCCAACTGTTCTCAAGTG
ATTCTAAAGTATATTCGAGGTTAAGATATACTGCAGACTGCAATGTATTGTTTTCTTACGCAGCTTTCAGTGATTCC
AACATCGTAACAGTGGTGGTAGACACTGTTCTCTATATTGCTAAGAAAAATAGCCCTGTTGTGGAAGTGTGGGATAA
GAAAACTGAAAAACTCTGCGAACTAATAGACTGTGTGCATTTTTTAAGGGAGGTAATGGTAAAAGTAAACAAGGAAT
CAAAACACAAAATGTCTTATTCTGGGAGAGTGAAAGCTCTCTGCCTTCAGAAGAACACTGCTCTTTGGATAGGAACT
GGAGGAGGCCATATTTTACTCCTGGATCTTTCAACTCGTCGAGTTATACGTATAATTTACAACTTTTGTGATTCGGT
CAGAGTCATGATGACAGCACAGCTAGGGAGCCTTAAAAATGTCATGCTGGTATTGGGCTATAACCGGAAAAGTACTG
AAGGTACACAACAGCAGAAAGAGATACAATCTTGCTTGACTGTTTGGGACATCAATCTTCCACATGAAGTGCAAAAT
TTAGAAAAACACATTGAAGTGAGAAAAGAATTAGCTGAAAAAATGAGAGGAACATCTATTGAATAAGAGAGAAACAG
GAATTGTCTTTGGATAGGAAAATTATTCTCTTGTAAATATTTATTTAAAAATGTTCACATGAAAAGGGTACTCACAT
TTTTTGAAATAGCTCATGTGTATATGAAGGAATGTTATATTTTTAATTTAAATATATGTAAAAATACTTACCAGTAA
ACATATATTTTAAAGAACTATTTAAAACACAATGTTGTATTTCTTATGAATACCAGTTACTTTTGTGCATTAATTAA
TGAAAATAAATCTGTGAAATACCTAATTTAAGTACTCATACTAAAATTTATAAGGCCGATAATTTTTTGTTTTCTTG
TCTGTAATGAAGATAAACTTTATTTTAAATTCTATGCTTAAGACAAGACTATTGCTTGTTGATTTTTCTAGAAATCC
GCAAGGTAGAATGAAAATATTAAGACAGTTTCCCGTGTAATGTATTCCCTCTTAGATTGCTTTGAAATGCACTATCA
TATATGCTTGCAAATATTCAAATGAATTTGCACTAATAAATTCCTTTGTTGGTATGTGAATTCTCTTTGTTGCTGTT
GCAGACAGTGCATCTTACACAACTTCACTCAATCCAAAAGAAAACTCCATTAAAAGTACTAA

[0892] SEQ ID NO:4

[0893] >SEQ ID NO:3的反向互补

[0894] TTAGTACTTTTAATGGAGTTTTCTTTTGGATTGAGTGAAGTTGTGTAAGATGCACTGTCTGCAACAGCA
ACAAAGAGAATTCACATACCAACAAAGGAATTTATTAGTGCAAATTCATTTGAATATTTGCAAGCATATATGATAGT
GCATTTCAAAGCAATCTAAGAGGGAATACATTACACGGGAAACTGTCTTAATATTTTCATTCTACCTTGCGGATTTC
TAGAAAAATCAACAAGCAATAGTCTTGTCTTAAGCATAGAATTTAAAATAAAGTTTATCTTCATTACAGACAAGAAA
ACAAAAAATTATCGGCCTTATAAATTTTAGTATGAGTACTTAAATTAGGTATTTCACAGATTTATTTTCATTAATTA
ATGCACAAAAGTAACTGGTATTCATAAGAAATACAACATTGTGTTTTAAATAGTTCTTTAAAATATATGTTTACTGG
TAAGTATTTTTACATATATTTAAATTAAAAATATAACATTCCTTCATATACACATGAGCTATTTCAAAAAATGTGAG
TACCCTTTTCATGTGAACATTTTTAAATAAATATTTACAAGAGAATAATTTTCCTATCCAAAGACAATTCCTGTTTC
TCTCTTATTCAATAGATGTTCCTCTCATTTTTTCAGCTAATTCTTTTCTCACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGC
ACTTCATGTGGAAGATTGATGTCCCAAACAGTCAAGCAAGATTGTATCTCTTTCTGCTGTTGTGTACCTTCAGTACT
TTTCCGGTTATAGCCCAATACCAGCATGACATTTTTAAGGCTCCCTAGCTGTGCTGTCATCATGACTCTGACCGAAT
CACAAAAGTTGTAAATTATACGTATAACTCGACGAGTTGAAAGATCCAGGAGTAAAATATGGCCTCCTCCAGTTCCT
ATCCAAAGAGCAGTGTTCTTCTGAAGGCAGAGAGCTTTCACTCTCCCAGAATAAGACATTTTGTGTTTTGATTCCTT
GTTTACTTTTACCATTACCTCCCTTAAAAAATGCACACAGTCTATTAGTTCGCAGAGTTTTTCAGTTTTCTTATCCC
ACACTTCCACAACAGGGCTATTTTTCTTAGCAATATAGAGAACAGTGTCTACCACCACTGTTACGATGTTGGAATCA
CTGAAAGCTGCGTAAGAAAACAATACATTGCAGTCTGCAGTATATCTTAACCTCGAATATACTTTAGAATCACTTGA
GAACAGTTGGCTTGTTCTTGTCTCAATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTAGAAAAGGAGAAAATCTTTGTGCCAC
ATCCTCCCCACATTACATTTCTTTCTGTTGAATTTGTGGATTCACTCAAACACATCAATGGAGTACTGACATTTCCT
ATATTTAGTATCTTCAAAGGAGCAGCTCCTTCAAGCTTAACAGTTTTATCTTCAAAAATTGCTAAATTGCCATCAGC
GGTTCCAACCAAAAGAAAATTTTTTTGTTTGCTTTGCTTGGAAAAGGAATTGCAATACAAACAAGTGATGGAATCAG
TCATCTTTTCTAGGGTATGTCTCTTTTTCCCATCTTCGGTATTGATGACCAGGAGAGTACCAGACTGTGTCCCGGAC
ACAATCCAGCTTTCTTTTTGAACAGGAAGATGCACCAAGGCTAAGCACAATATTCTACTATCAGCAACCTCCTCAGA
AGTGTATCCTTCAGTATTTAAGTCAAGAAATGAGAGCTGTCCTCTGTTGGTGTGCCCACAGCCCAGCCAAATGCTTG
CATTCCTGCTGTTGTGATGTGTAGCAACCATGCAGTCAACAATTACGTTTTTAGGTAATAAAATGTGTCTCGTCAGA
CAGACTAATTCAGCTGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTAGGCCTTTCTTGAGGATTTTCTTTCAAACA
CTTTGTAATTAATTTCTCAACCATAGGCCATGGGGCACAACCATATTCTTTAACTGGATCAGGTAATTTTCCTTGTA
TTGCTAATTCATCAAACTCATTTGGAAACTTCAAACCCTCTACTATTCTACCTCCAGTTGTCAAAATGTCATAGAGT
AGCAAACCAAATGAATAAACATCAGCTTGTTGATTATAAATGACATTTCCTCTGGCAACTTCAGGTGCACGAAACCC
TGGTGTGCCCTCTGACGTTTTTATCCCCATTCTACAGCAGTACTGAGCAATGCCGTAGTCAGCAATCTTTGCAATGA
TGGCAGCATTGGGATACAGTGTGAAAAGCAGCACATTGTGGGGCTTCAAGTCTCGGTATATAATCATGGCTGAATGG
AGGTATCTCAAACCATCAGCCACATGGAGTGCAATCCTGTGCTGTAGGGTTCTAGTGAGGCTGGCTTTGTCCTGCTG
AAGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGGAGGCTAACTCCATCACCAACATCCGGGGACGAATACCAGCTGCCAGCAAAG
ATATCAAACTGGGGTGGTGGAGGTGGCAAAGCACCACCAGCTCTTGTCTTAACAGCCTAAGTGATGTGTGTTTATTA
AAAATCTTCACAGCCACTTCTTCTCCTTCATAGGCTGCTCGATAAACTGATCCAAAACTGCCATCACCTAGGAGAAA
CTCTGGAGCTTGTTCAAATTCCAGCTCATCATTATTCAACATAATATTTCTAGGCAGGTCAGCCAAAATCAAGTCAG
GGGCAATCTGAGATATTGGAATGGTGAGCCTTGGTTGATCTGGATTTACTAAGAGATCTCCTTCCTCTGCTTTCTTC
ATCAAGTCATCAAGTAAGATTTTTTGATGCTCTTCACCATCATTAAAACTATATAATGCCCATTTCTTCAACAGAGT
TTCTCCTTCACCACAAATATCAATCTCCAGCAACCCAGGAAACCATTCCTCCATGAGAGAATCAATGTGGTCCACAA

CTTGGCCCAAAAGAATACAGCCTTTTCTACAAGAAGGAACTGTAATTTTTAAGAAACTCTCTGGGTGATTGTCTAAG
ACTTCAGATCCTACCAGACAATAAGCTTCAGGAGACCAATTTAAGTAGATGCCTTGTCGCCAATACATTCTGTTTGG
GCGAAGTGCTCGTTCTCTCCCTGAAAGCATGTAAGGTGAAATCTCAAGTAATCGATTGATTAACCTCGACCAAAATC
CCATTGGAAAATAAGGCATTTCATATAGTCGGATGATAATTTCAGAGTTCTCACAATGGGGAAGCTCTATCACAGGC
CTGTGGTCAGACAAACTGCTTGGAACCAGCAAATATTCTTCTCCTATTGGCAAAGCAATCTGGAATTTTTCTAGGAG
CTTAAAATACTGTGACATGTAGTTCTTTGGAAATCTCCTTTTCTTCGAAAGAAATTTTTCCACATCTCTACGTGAAA
TAATTCCCTTAGGGTGTTTTGGACAACCTTCCACTTTCACTGTCAAAATCTGTGCCATGATTTTACAAAGCCACTTG
GGTTCCACAAAATACAAGTCACTTAACTGCAGTGCTGGGTCTTGAAAATGAAGAAGGACTCCTGATTCATTTAGAAA
GTGAACTGCGTGAGGAAGCTCATTTTCATCTAACTGCAACTGATTTTCTCTCACTAGTTGTAATAATCGTTTCTGGT
CAATTACAGGAAATTCAATTGGCACATTTTTACGCTCCGATAAAATGATTTTCTCAAGTTCTACATAGCAGTCTGGA
ATCAGCTGTCCAACAACAGGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAAGGCTCTCGTTTATGATGGTTTTCCGAAGTTTTGC
CAAAGCATCAGATTCCTCGGTGGCATTCACAAAGTGGTAATCTCGTATAGCAGGGAACCCTCGCTTATTCAGGAGTT
CCTTGGTGATTTTACCTATGCAGGCTTTGCGCTGCCTCTCATCAGAAACATCCAAATGTGTGCCAACGAGAATCACA
GGGGAAGAAGAAGCGCGAGCCTTTATATTGAAGAGCCAAGGCTTCATGGCATCAACTTCAGCCTGTCCTTTGCTAAG
GTCATAGACAGCAAGGTACAATGCTCGCTGCGTCATAAAATGAGGATGAGTGCTATAGAATTCCTCACGACCTGCAA
AATCCCACACATTCAGAACGAGATCTCTCTTTCTTTTGCCTCTTATTTGGATAGGCCAGTCTTTCACATCTATGCCA
ACTGTGGCACTTTGCATTCCAAGATCTGATTTCTTGGTTTTCATTAATTGCTGCAACAAGGTGGTTTTACCACTCCC
AGTATTTCCAACAACCATAAGTTTCATTCGGTTATAGGGCACAGCCTTTTTTAACCGCTGCTGAAGAAACCTTATGA
TGTCTTTGGCTTTACATCCTATATGTTTAAAATCAAAGTTAAGACGCAGTTCATCCAAAGGAAGATCCCATATTTTG
CTTAATTTCCCCATTTCATTGGGAAAGGATCTTAGTTCCAAGTTGTAACTGACATCCAGAGATGTCAGATTTTCAAG
ACAGCCAATCTCAGGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTGTGAGAAAGATGCAGTTTCTCTACTCTAGACCATAAATACG
CTTTTTCACTCAAGTCCAAGATGCTGATCTGATTATGGCTAAATAAGAGTTCCCTTAAGTTCAAAGATTTCCAGTGT
GCAGGACCTGGTAGATATTGAATATCATTGCTGCTCATATCTAAAGACCGCAAGTGTGGAAGATTTAAAATTGCTTC
TGGAATACATGTAAATTTGTTTTGAGATAATTTTAGGCTTGTCATGGAAGGAGGCAAGAAAGGCATAGCAGCAAGAA
AATTCATTCTGGCACTGAAACTCTCCACTTTAGGACAAGCCTCAAGAAAGTTCTCTGATAGGGATGAAATGTGGTTT
TTACTAAGGTTTAAAATCTTCAGTTCCTTCAGTCTCAAGGGGGAGCATATCCCTGATATTTTATTTCCTTCTAAAAT
GAGCTGCTCCAGTTTCTCTATCCCATCAGCAAGGTTCTCAGGAACAGAAGACAGCTGGTTATATGACAGGTTAAACT
GTTTCAGAGTTGGACATTTCACTGCAGGATCTAAAACCACTGAGGGTCCAATGTCATTTCGAGAGACATCAAGGTTA
GCAACACAACTCATTTTCAACAAGTAAGAAGGAAATGATGTAAATTTATTACTGTGCAAGTCCAAATGTGTCAAACT
CTTCAGAGTTTCACATAGCTGTTGTGGAAAGCTCGTGAGTGCATTCTGGTGAAGCTCCAGCTTTTCAAGATGCTCCA
AATGACCACTTATACAGGATTTCTGGCTTAGGGCATCAATATCTCTTAGTTCATTTGCTGAAAGGTCTAGTGATGTA
ATATATTCTCTCTCAGAAGCCAGAGAAGAAATGCTGTCTGAATGCCTCATATGGGATTGAAGTTTTGATGACCTGAG
TGAATCATCTGAAGATAATATTTTTCTTTTTCTTCTCAGTAAATCTTCATGATCAAAAATGGGCCCCAAGGAACTGG
AATGCCTTTGCAAATTTGGTGAGCAACGTTGTAATACGGCATCTCGGTAAAATTCTCCTACACTAATTGAATTTGAT
TTCTTTTTCACAAGAAATGAGCCTTCACTTCCTTCACTATCTAGATCATCACTTTGAGCAAAGACACTGTCCATAGA
AGAGTCAGGAATAAAGGTCCATTCATCAAATTTAGACAGCACATCTTCAGAAAAATTTCCATCACTGCCTGAGGCTG
CTCCTTCTTCCATGGCACTTTTCATCTGATATCTGATCACCATTCTTGCTAGTGTAGATGCTATATTTGTTTGTTTC
CTTAAATTAGAAGTCTTATCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGTTCAACTTTTCCTATACAAAACCCTCCAAG
GCAAATGCTATTGTTGGCCATGTCCAGGGCCAGCCTCCTTAAGAGCAAGCTGATGATCTGGCTGTCGCCTTTCCCAA

TGCTTATTGTCAGCGCTTTTCGTACATCTTGTTCACGAGATCCACTATTCAATAAGAGTTCCACCAATTTGGGACTG
CTCTCTTTCTCACATACCTGACAAATTAAAGAAGTTCCCTCCTTTGCTTGATTGGCATCTGCTCCTAATAGAAGCAA
GCATTCAACCATGATGCTGTTATTCTGATCACACGCTCTCTCTAGCATCATATTTTTTAAGTCATCATCCATAGCTA
CTTTTGCAAAACACTTGCAACAGAGGTTTAGAAACTGTTGATCCTTTTGTTCCATGATACTGGAAGACATTTGATGG
AATATTACTAAGTCAAACGAATGATGCACCAGCAGCTTAGAAAAAGATGCTGACAATTTGAGGATTGCTAAGATTGT
CTGAAATCCTTCAGTCTGTACTTCAGCAACATCCTTAAATCGGTATAAGCTGGAAGCCAGAATTTTTGCCAGCAGAT
GTCCAGTTCCTATGCATAAATTCTTCTTTGTAATCAAGCATCCTATAAGACTTAAACCCAGACACTGAATTTCTTGG
TCATCTGGATACATCTGCAGTGTGTGAAGCACTGAATCCACAGCACCTTCCAGGGATAACACCCCTAATGCATCAGT
AAAATGTGCAATAAAAGAAATTACTTTTAATCCACATTTCTGAATCCCAGGATTTCCAATGAACCTGTTCAAAGCTG
CTAGGACCAGTTTGTGAATATCATTCTTGAAACACTGTTTTTTAACCATATTTAGCTTACGATGAGATTCTGCATCC
TCTCTGGATTCTTCTGGCATGCCTGGCACTATAAAATGTAAAATAGCTCGAAGCGCCTCCAGCTGCACTGGTAATGA
TGTCTCATGACTTTTCATAACTGTTATTATTTTGGGGAGCACTGCTGCCATTGTATCCAGGGATGTGTTGCTTCCTT
CAAAAAGATGATTTAGCATTTTACAGCCACTTTCAGCCACTTCAGGAGAATGTATATGCTTCTGCATTAACTCCAAA
ACATTCAGGTATATTCCTTTTGATAACAGGATTTTTCTGAAATTAACATTTTGTTCTAAAAGAGTTGACAATGCATT
AGCAGATGCCTGGAAAACTTCCTTTGATGATGAATGCATCAGCATGGACAGCATCACTTCCCTATGAGCTGGGAAAT
GGCCATCTTCATCTCCAATCTTCTCATGTAAACTGTTTTGGTACATAAGGAGATTATTTAGTGCCCAGCATGCAGCC
TCCTGCACGTGCTTGTTCTTTCTATGCCACGTTAACGCTTTGTAACAGGCTTCCAGCCAAAACAATTTAACTTCTTC
CCCCTCATCATCATTCTCTTGATTCTCATTCTTTTCCTCTAAATCTTGATTTAAGAAAATGGTCTCAGTGAGGAGGG
CCAAACAGCTGAGCGCTGAGATCTGTAATGCTGCGTTCTCTGGGTACCGCTGCACAGCTTTCACCACAAATTCATGG
ACTTCGTTTAATACCAGGATATTAAAAAAATTACCTAATGTAAGCCTATGGAGCAAACAGCAACTCACTTCTTGAAT
TTTTTCACTGATAGGGAATGCTTTCATAGCTTCCACCACAATATTATAACACCTGACATTGCCACTCATGAGGACTT
CCACATTATTGCAAGGAATTGCTAGGGAATGTAAACAATGCAGTACATGAAGCACAATTTCCTCTTCATCTTTAAAA
TTTGTTAACGCACTTAACAATATCATATAATCTTTGTTCTCAACAAATTCAGTTAGTTGCTCCTCTGAGACTCTTTC
AAACAGCACATGTAAAGCTTTGCATCCAAGTTTCTGGATTTCATCATTGGCTGGAAATGAGTGCATGGCATCAAAAA
TTAACATGAAAATATCACTTTCTTCATCCAATATCAGTAAGGTGATTTTACCTGAAGTTAGGAGGAGATCTAAGGTC
TTCAGTCCAATCATTGACAAGTTTACACTGGCATTATGAACTGTTAGCATTTTAAGAATCAATTGGTGAACACCAAG
GACTTCCCAATCATTTCCAACATCCTGGGGTCCCATTAAGCTTTGCATTGTACCCGGGCAGATTTCTATTAATTTGC
ACAGAAGTGACCAACCCACCTGCTGCACACTCGCGACTCTCATATACGAGTCCAAGACGATCAACAGAGGCACATGG
ATATTTTTGCCTTGAAATAACTTGGAGGCGTGCTCGGAGTACGTGAACACCAGCAGATCCTCCAGGATTTGGACCAG
CGTTTCTATCTGTTTACCTTCCTGGACATTGTTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGTTTCCTCGTCCTCCTCGC
ACCCCTGACAGCTGCCACTAGCCATGGTGGCCCCTGCTTCCAACCCGCCGCCCTCCCAGCACGAACGTCCGCTGCTC
AGGGAACCGGCAGGGGCGCCGGCCACAGCTCCCCGGGATCTAGCTCAGCTCACCGCCCTCAGCCAGGGCTCCCCGGG
GGCCCCGTCGGCGCCCACGCCCGCCTGTTTATGAGGAAGGCGGTGGCTCCCCGCCCCGCGTTGCCCTCCCTCTCCAG
AGCCCTCCTGCTCGGCTTCCTCCTCCCCCAGCCAGGCCCCAAAAAACCAGCTCAGGGGCCTGCCAGAGGCTCCGCCG
GGGCGACGGGCCGCGCAGAACTTCGGCGGCGGCCGTGGGGCTGCTGGAGCCGGGCCTGGCCGGGATGACCGTGCCCG
T

[0895] SEQ ID NO:5

[0896] >NM_025730.3小家鼠富亮氨酸重复激酶2(Lrrk2),mRNA

[0897] GAGCAGCTCTGAGAGCAGGAGCCGTCCCAGCTCGCCGCAGTCCCCGCCGGCTGCACCATGGCCAGTGGC

GCCTGTCAGGGCTGCGAAGAGGAAGAGGAGGAGGAGGCTCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAATAATGTCCAGGA
AGGCAAGCAGATCGAGACGTTGCTTCAGCTCCTGGAGGACATGCTGGTGTTCACCTACTCGGACCGCGCCTCCAAGT
TATTTGAAGATAAAAATTTCCACGTGCCTCTGTTGATTGTCCTGGACTCCTACATGAGAGTTGCCAGTGTACAGCAG
GCGGGGTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAGTCTGTCCAGGGACATTGCAAAGCTTAATAGGACCCCAGGATAT
TGGAAATGATTGGGAAGTCCTTGGTATTCACCGGCTGATTCTTAAAATGTTAACTGTTCATCACGCCAATGTAAACC
TGTCAATAGTTGGACTAAAAGCCTTGGATCTCCTCCTAGATTCAGGTAAACTCACCTTGCTGATACTGGATGAAGAA
TGTGATATTTTCTTGTTAATTTTTGATGCCATGCACAGATATTCAGCCAATGATGAAGTCCAAAAACTGGGATGCAA
AGCTTTACACGTGCTTTTTGAGAGAGTTTCCGAGGAACAGCTGACTGAGTTTGTGGAGAACAAAGATTACACGATAC
TGCTGAGTACGTTCGGCAGCTTCAGAAGGGACAAGGAGATTGTGTACCACGTACTTTGCTGCTTGCATTCCCTGGCG
GTTACATGCAGCAATGTAGAGGTCCTCATGAGTGGGAATGTCCGGTGCTACAATCTTGTGGTGGAGGCCATGAAAGC
CTTCCCCACCAATGAAAACATCCAAGAGGTGAGCTGCTCCTTGTTCCAGAAGCTTACATTAGGTAACTTTTTCAACA
TCCTGGTGTTGAACGAAGTGCATGTCTTTGTGGTGAAAGCGGTCCGACAGTATCCTGAGAACGCAGCCTTACAGATC
TCTGCACTCAGCTGTTTAGCACTCCTCACTGAGACTATTTTCTTAAACCAAGACTTGGAGGAAAGAAGTGAGACTCA
AGAGCAGAGCGAAGAGGAAGACAGTGAGAAGCTTTTCTGGCTGGAACCCTGCTATAAAGCCCTGGTGCGCCATCGAA
AGGACAAACACGTGCAGGAGGCTGCCTGCTGGGCACTAAATAACCTCCTTATGTACCAGAACAGTTTGCATGAGAAG
ATCGGAGATGAAGATGGCCAGTTCCCTGCGCACAGGGAAGTGATGCTGTCTATGCTGATGCACTCTTCTTCCAAAGA
TGTCTTCCAAGCAGCTGCACATGCTCTGTCCACTCTCTTGGAACAAAATGTTAATTTCAGGAAAATCCTGCTGGCAA
AAGGAGTATACCTGAATGTCTTGGAATTGATGCAGAAGCATGCCCATGCGCCTGAGGTGGCAGAGAGTGGCTGCAAG
ATGCTGAGTCACCTGTTTGAAGGAAGTAACCCTTCTCTGGATACAATGGCAGCAGTGGTCCCTAAAATACTAACAGT
GATGAAAGCCCACGGAACGTCTCTGTCAGTCCAGCTGGAGGCGCTGCGAGCTATCTTGCATTTCGTTGTGCCAGGAC
TATTGGAAGAATCCAGGGAGGACTCTCAATGCAGACCAAATGTGCTCAGAAAACAGTGTTTCAGGACTGACATCCAC
AAGCTGGTTCTAGTCGCTCTGAACAGGTTCATTGGGAATCCTGGGATTCAGAAATGTGGATTGAAAGTAATCTCTTC
TCTCGCGCACCTTCCTGATGCCACAGAGACATTGTCCCTGCAAGGAGCAGTTGACTCAGTCCTCCACACCTTACAGA
TGTATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGCTTACACCTTATGGGATGCTTGATGACAAAGAAGAATTTCTGC
ATAGGGACAGGGCACCTCCTGGCAAAAATTCTGGCTTCCACTTTGCAGCGCTTTAAAGATGTTGCTGAGGTGCAGAC
TACAGGATTACAGACAACCCTGTCAATACTTGAGCTGTCAGTATCTTTCTCCAAGCTGCTAGTGCACTATTCCTTTG
ATGTGGTGATATTTCATCAGATGTCTTCCAGTGTTGTAGAACAAAAGGATGAGCAGTTCCTCAATCTATGTTGCAAA
TGCTTTGCAAAAGTGGCCGTGGATGATGAGCTGAAAAACACCATGCTAGAGAGAGCCTGCGATCAGAATAACAGCAT
CATGGTTGAATGTTTGCTCCTCTTGGGAGCTGATGCCAACCAAGTGAAGGGGGCAACTTCTTTAATCTATCAGGTAT
GTGAGAAAGAGAGCAGTCCTAAATTGGTGGAACTGTTGCTTAATGGTGGTTGTCGTGAACAAGATGTACGGAAGGCC
CTGACCGTAAGCATCCAAAAGGGCGACAGCCAGGTCATCAGCTTGCTCCTCAGGAAACTTGCCCTGGACCTGGCCAA
CAACAGCATTTGCCTTGGAGGATTTGGCATAGGAAAAATTGATCCTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTCCAGATAAGT
CATCCAATTTAAGGAAGCAAACAAACACAGGATCTGTCCTAGCGAGGAAAGTGCTCCGGTATCAGATGAGAAACACC
CTTCAAGAAGGCGTGGCCTCAGGCAGTGACGGCAAGTTTTCTGAAGACGCGCTGGCGAAATTTGGAGAATGGACCTT
TATTCCCGACTCTTCTATGGACAGTGTGTTTGGCCAGAGCGATGATCTGGATAGCGAAGGCAGCGAGAGCTCATTTC
TCGTGAAGAGGAAGTCCAACTCAATTAGTGTAGGGGAAGTTTACAGAGATCTAGCTCTGCAGCGCTGCTCACCAAAT
GCTCAGAGGCATTCCAATTCGCTGGGTCCTGTTTTTGACCATGAAGACTTACTGAGACGAAAAAGAAAAATACTGTC
TTCAGATGAGTCTCTCAGGTCCTCAAGGCTGCCGTCCCATATGAGGCAATCAGATAGCTCTTCTTCCCTGGCTTCTG
AGAGAGAACACATCACGTCGTTAGACCTATCTGCCAACGAACTCAAAGATATTGATGCTCTGAGCCAGAAGTGTTGC

CTCAGTAGCCACCTGGAACATCTCACCAAACTGGAACTTCACCAGAATTCACTCACGAGCTTCCCACAGCAGCTGTG
TGAGACTCTGAAGTGTTTGATACACTTGGATTTGCACAGTAACAAATTCACCTCATTTCCCTCTTTCGTGTTGAAAA
TGCCACGTATCACCAACCTAGATGCCTCTCGAAATGACATCGGGCCAACAGTAGTTTTAGACCCTGCGATGAAGTGT
CCAAGCCTCAAACAGTTGAATCTGTCCTATAACCAGCTCTCTTCAATCCCAGAGAATCTTGCCCAAGTGGTGGAGAA
ACTTGAGCAGCTCCTACTGGAAGGAAATAAAATATCCGGGATTTGCTCTCCCCTGAGCCTGAAGGAACTGAAGATTT
TAAATCTTAGTAAAAATCACATTCCATCCCTACCTGGAGATTTTCTTGAGGCTTGTTCAAAAGTCGAGAGTTTCAGT
GCTCGCATGAATTTTCTTGCTGCAATGCCTGCCTTACCTTCTTCCATAACGAGCTTAAAATTGTCTCAGAACTCTTT
CACGTGCATTCCAGAAGCGATTTTCAGTCTTCCGCACTTGCGGTCCTTGGATATGAGCCACAACAACATTGAATGTC
TGCCGGGACCTGCACATTGGAAGTCTCTGAACTTAAGGGAACTCATTTTTAGCAAGAATCAGATCAGCACCTTAGAC
TTTAGTGAGAACCCACACGTGTGGTCAAGAGTAGAGAAACTGCATCTCTCTCATAATAAACTGAAAGAGATTCCTCC
AGAAATTGGCTGCCTTGAAAATCTGACGTCTCTCGACGTCAGTTACAACTTGGAACTGAGGTCCTTCCCAAATGAAA
TGGGGAAGTTGAGCAAGATATGGGATCTTCCCTTGGACGGACTGCATCTGAATTTTGACTTTAAGCACGTAGGATGC
AAGGCCAAAGACATCATAAGGTTTCTACAACAACGTCTGAAAAAGGCTGTACCCTACAACCGAATGAAGCTCATGAT
TGTGGGAAATACGGGGAGCGGTAAGACCACTTTACTGCAACAACTCATGAAAATGAAGAAACCAGAACTTGGCATGC
AGGGTGCCACAGTCGGCATAGACGTGCGAGACTGGTCCATCCAAATACGGGGCAAAAGGAGAAAGGACCTGGTTCTA
AACGTGTGGGATTTTGCAGGTCGTGAGGAATTCTACAGCACTCACCCCCACTTCATGACCCAGAGAGCCCTCTACCT
GGCTGTCTATGATCTCAGCAAGGGGCAGGCAGAGGTGGACGCCATGAAGCCCTGGCTCTTCAATATCAAGGCTCGTG
CCTCTTCTTCCCCGGTGATTCTGGTGGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAAGCAGCGGAAAGCGTGCATAAGC
AAAATCACGAAGGAACTCCTAAATAAGCGAGGATTCCCCACCATCCGGGACTACCACTTTGTGAATGCCACCGAGGA
GTCAGATGCGCTGGCAAAGCTTCGGAAAACCATCATAAATGAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCCTGTGG
TTGGGCAGCTAATTCCAGATTGCTACGTAGAACTGGAGAAAATCATTTTATCAGAGCGGAAAGCTGTGCCGACTGAG
TTTCCTGTGATTAACCGGAAACACCTGTTACAGCTCGTGAACGAACATCAGCTGCAGCTGGATGAGAACGAGCTCCC
ACACGCCGTTCACTTCCTAAATGAGTCGGGAGTTCTTCTGCATTTTCAAGACCCTGCCCTGCAGCTAAGTGACCTGT
ACTTTGTGGAACCCAAGTGGCTTTGTAAAGTCATGGCACAGATCTTGACAGTGAAGGTAGACGGCTGTCTGAAACAT
CCTAAGGGCATCATTTCCCGGAGAGATGTGGAAAAATTCCTTTCAAAGAAGAAGCGATTCCCGAAGAACTATATGAT
GCAATACTTTAAACTATTAGAAAAATTTCAGATCGCATTGCCAATAGGGGAAGAATATCTTCTGGTTCCAAGCAGCT
TGTCTGACCACAGGCCAGTGATAGAGCTCCCCCACTGTGAGAACTCTGAGATCATCATCCGGCTGTACGAAATGCCG
TACTTTCCCATGGGATTTTGGTCAAGATTGATTAACCGATTACTTGAAATCTCACCCTTCATGCTTTCTGGCAGAGA
GAGAGCACTACGCCCTAACAGGATGTATTGGCGGCAAGGCATCTACTTGAATTGGTCTCCAGAAGCATACTGTCTGG
TAGGCTCTGAAGTCTTAGACAATCGACCTGAGAGTTTCTTGAAAATCACAGTTCCGTCTTGTAGAAAAGGTTGTATT
CTTCTGGGCCGAGTTGTGGATCATATTGACTCACTCATGGAAGAATGGTTTCCCGGGTTACTGGAGATTGACATTTG
TGGGGAAGGAGAAACTCTGTTGAAGAAATGGGCATTGTACAGTTTTAATGATGGTGAAGAACATCAGAAGATCTTGC
TTGATGAGTTGATGAAGAAGGCTGAAGAAGGAGACCTGTTAATAAATCCAGACCAACCAAGGCTCACTATTCCAATA
TCCCAGATTGCTCCGGACTTGATCTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATCATGTTGAACAATGATGAGTTGGAATTTGA
GGAAGCACCAGAGTTTCTCTTAGGCGATGGAAGTTTTGGATCCGTTTATCGAGCTGCCTACGAAGGAGAGGAAGTGG
CTGTGAAGATTTTTAATAAGCACACATCTCTTAGGCTGTTAAGACAAGAGTTGGTGGTCCTTTGTCACCTTCACCAC
CCCAGCCTGATATCCTTGCTGGCGGCTGGTATTCGTCCTCGGATGTTGGTAATGGAGTTGGCCTCCAAAGGTTCCTT
GGATCGCCTGCTGCAGCAGGACAAAGCCAGCCTCACCAGAACCCTCCAGCACAGGATCGCGTTGCATGTGGCCGACG
GCCTGAGGTATCTCCACTCAGCCATGATTATTTACCGTGACCTGAAGCCCCACAATGTGCTGCTTTTTACCCTGTAT

CCCAATGCTGCCATCATTGCGAAGATTGCGGACTACGGGATCGCACAGTACTGCTGCAGGATGGGAATAAAGACATC
AGAGGGCACCCCAGGGTTCCGGGCACCTGAAGTTGCCAGGGGGAATGTCATTTATAACCAACAGGCCGATGTTTATT
CTTTTGGCTTACTACTTCACGATATTTGGACAACTGGGAGTAGGATTATGGAGGGTTTGAGGTTCCCAAATGAGTTT
GATGAGTTAGCCATACAAGGGAAGTTGCCAGATCCAGTTAAAGAATATGGCTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAA
GTTAATTACAAAGTGTTTGAAAGAAAATCCTCAAGAAAGACCCACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTCGG
CTGAATTAATTTGCCTCATGCGACACATTTTAATACCTAAGAACATCATTGTTGAATGCATGGTTGCCACGAATCTC
AATAGCAAGAGTGCGACTCTCTGGTTGGGATGTGGGAACACAGAAAAAGGACAGCTTTCCTTATTTGACTTAAACAC
GGAAAGATACAGCTATGAGGAAGTTGCTGATAGTAGAATACTGTGCTTGGCTTTGGTGCATCTCGCTGCTGAGAAAG
AGAGCTGGGTTGTGTGCGGGACACAGTCTGGGGCTCTCCTGGTCATCAATGTTGAAGAGGAGACAAAGAGACACACC
CTGGAAAAGATGACTGATTCTGTCACTTGTTTGCATTGCAATTCCCTTGCCAAGCAGAGCAAGCAAAGTAACTTTCT
TTTGGTGGGAACTGCTGATGGTAACTTAATGATATTTGAAGATAAAGCCGTTAAGTGTAAAGGAGCTGCCCCCTTGA
AGACACTACACATAGGCGATGTCAGTACGCCCCTGATGTGCCTGAGCGAGTCCCTGAATTCATCTGAAAGACACATC
ACATGGGGAGGGTGTGGCACAAAGGTCTTCTCCTTTTCCAATGATTTCACCATTCAGAAACTCATCGAGACAAAAAC
CAACCAGCTGTTTTCTTACGCAGCTTTCAGCGATTCTAACATCATAGCGCTGGCAGTAGACACAGCCCTGTATATTG
CCAAGAAAAACAGCCCTGTCGTAGAGGTGTGGGACAAGAAAACAGAAAAGCTCTGTGAATTAATAGACTGTGTGCAC
TTCTTAAAGGAGGTGATGGTAAAACTAAACAAGGAATCGAAACATCAGCTGTCCTACTCTGGGAGGGTGAAGGCCCT
CTGCCTGCAGAAGAACACGGCTCTCTGGATCGGAACTGGAGGAGGCCACATCTTACTCCTGGATCTTTCTACTCGGC
GAGTTATCCGCACCATTCACAATTTCTGTGATTCTGTGAGAGCCATGGCCACAGCACAATTAGGAAGCCTTAAGAAT
GTCATGCTGGTTTTGGGGTACAAGCGGAAGAGTACAGAGGGTATCCAAGAACAAAAAGAGATACAATCTTGTTTGTC
TATTTGGGACCTCAATCTTCCACACGAGGTGCAAAATTTAGAAAAACACATTGAAGTAAGAACAGAATTAGCTGATA
AAATGAGGAAAACATCTGTTGAATAGAAAGACATCAGGCAGTCTCGATGTTATATTGAATAAGACATCAGACATCCT
CGTCACTATATTGAAAAGGACATCAGACATCCTCGCCAATATGTTAGAAAATGTACTCTTCTTTTTAAAATATATTT
TTAAAATGTTTACATTGAAAAGAGTATGCCTATTCTTTACAAAGTTCATATGTATATGAAGGAATGTGTATGTCTTA
TGTTTAATTTAATATATGTAAAAATATTTATCAGTAAATATGTTTTAAAAAACTATTTAATTTAGCATTATATTTTC
TATACTCCTTAACTAATTTGAAGGGATAAACAAAAGAAATCTACAAAGCATTTAATTTCAGTATTTATACTAAAATT
AATAAAAATATCATGTTTGTTTTGCTATGTATTGTGATGATAAAGCCTATTTTAAATTGTTGATTAAGACACAGATG
TTGCTTGATTATCTATGGACTCAGCGGAGTAGAATAAAATATCTGGTCAATTTCCAAGTAAGAGACTCTTTCATATC
TTGTTTTCAAGTGAATTATCATCATTAATGTAAACTGTCATATTTTCACTAATAAAGATTTTTGTTAGCTCAGGAAA

[0898] SEQ ID NO:6

[0899] >SEQ ID NO:5的反向互补

[0900] TTTCCTGAGCTAACAAAAATCTTTATTAGTGAAAATATGACAGTTTACATTAATGATGATAATTCACTT
GAAAACAAGATATGAAAGAGTCTCTTACTTGGAAATTGACCAGATATTTTATTCTACTCCGCTGAGTCCATAGATAA
TCAAGCAACATCTGTGTCTTAATCAACAATTTAAAATAGGCTTTATCATCACAATACATAGCAAAACAAACATGATA
TTTTTATTAATTTTAGTATAAATACTGAAATTAAATGCTTTGTAGATTTCTTTTGTTTATCCCTTCAAATTAGTTAA
GGAGTATAGAAAATATAATGCTAAATTAAATAGTTTTTTAAAACATATTTACTGATAAATATTTTTACATATATTAA
ATTAAACATAAGACATACACATTCCTTCATATACATATGAACTTTGTAAAGAATAGGCATACTCTTTTCAATGTAAA
CATTTTAAAAATATATTTTAAAAAGAAGAGTACATTTTCTAACATATTGGCGAGGATGTCTGATGTCCTTTTCAATA
TAGTGACGAGGATGTCTGATGTCTTATTCAATATAACATCGAGACTGCCTGATGTCTTTCTATTCAACAGATGTTTT
CCTCATTTTATCAGCTAATTCTGTTCTTACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGCACCTCGTGTGGAAGATTGAGGT

CCCAAATAGACAAACAAGATTGTATCTCTTTTTGTTCTTGGATACCCTCTGTACTCTTCCGCTTGTACCCCAAAACC
AGCATGACATTCTTAAGGCTTCCTAATTGTGCTGTGGCCATGGCTCTCACAGAATCACAGAAATTGTGAATGGTGCG
GATAACTCGCCGAGTAGAAAGATCCAGGAGTAAGATGTGGCCTCCTCCAGTTCCGATCCAGAGAGCCGTGTTCTTCT
GCAGGCAGAGGGCCTTCACCCTCCCAGAGTAGGACAGCTGATGTTTCGATTCCTTGTTTAGTTTTACCATCACCTCC
TTTAAGAAGTGCACACAGTCTATTAATTCACAGAGCTTTTCTGTTTTCTTGTCCCACACCTCTACGACAGGGCTGTT
TTTCTTGGCAATATACAGGGCTGTGTCTACTGCCAGCGCTATGATGTTAGAATCGCTGAAAGCTGCGTAAGAAAACA
GCTGGTTGGTTTTTGTCTCGATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTGGAAAAGGAGAAGACCTTTGTGCCACACCCT
CCCCATGTGATGTGTCTTTCAGATGAATTCAGGGACTCGCTCAGGCACATCAGGGGCGTACTGACATCGCCTATGTG
TAGTGTCTTCAAGGGGGCAGCTCCTTTACACTTAACGGCTTTATCTTCAAATATCATTAAGTTACCATCAGCAGTTC
CCACCAAAAGAAAGTTACTTTGCTTGCTCTGCTTGGCAAGGGAATTGCAATGCAAACAAGTGACAGAATCAGTCATC
TTTTCCAGGGTGTGTCTCTTTGTCTCCTCTTCAACATTGATGACCAGGAGAGCCCCAGACTGTGTCCCGCACACAAC
CCAGCTCTCTTTCTCAGCAGCGAGATGCACCAAAGCCAAGCACAGTATTCTACTATCAGCAACTTCCTCATAGCTGT
ATCTTTCCGTGTTTAAGTCAAATAAGGAAAGCTGTCCTTTTTCTGTGTTCCCACATCCCAACCAGAGAGTCGCACTC
TTGCTATTGAGATTCGTGGCAACCATGCATTCAACAATGATGTTCTTAGGTATTAAAATGTGTCGCATGAGGCAAAT
TAATTCAGCCGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTGGGTCTTTCTTGAGGATTTTCTTTCAAACACTTTG
TAATTAACTTCTCAACCATAGGCCATGGGGCACAGCCATATTCTTTAACTGGATCTGGCAACTTCCCTTGTATGGCT
AACTCATCAAACTCATTTGGGAACCTCAAACCCTCCATAATCCTACTCCCAGTTGTCCAAATATCGTGAAGTAGTAA
GCCAAAAGAATAAACATCGGCCTGTTGGTTATAAATGACATTCCCCCTGGCAACTTCAGGTGCCCGGAACCCTGGGG
TGCCCTCTGATGTCTTTATTCCCATCCTGCAGCAGTACTGTGCGATCCCGTAGTCCGCAATCTTCGCAATGATGGCA
GCATTGGGATACAGGGTAAAAAGCAGCACATTGTGGGGCTTCAGGTCACGGTAAATAATCATGGCTGAGTGGAGATA
CCTCAGGCCGTCGGCCACATGCAACGCGATCCTGTGCTGGAGGGTTCTGGTGAGGCTGGCTTTGTCCTGCTGCAGCA
GGCGATCCAAGGAACCTTTGGAGGCCAACTCCATTACCAACATCCGAGGACGAATACCAGCCGCCAGCAAGGATATC
AGGCTGGGGTGGTGAAGGTGACAAAGGACCACCAACTCTTGTCTTAACAGCCTAAGAGATGTGTGCTTATTAAAAAT
CTTCACAGCCACTTCCTCTCCTTCGTAGGCAGCTCGATAAACGGATCCAAAACTTCCATCGCCTAAGAGAAACTCTG
GTGCTTCCTCAAATTCCAACTCATCATTGTTCAACATGATATTTCTAGGCAGGTCAGCCAAGATCAAGTCCGGAGCA
ATCTGGGATATTGGAATAGTGAGCCTTGGTTGGTCTGGATTTATTAACAGGTCTCCTTCTTCAGCCTTCTTCATCAA
CTCATCAAGCAAGATCTTCTGATGTTCTTCACCATCATTAAAACTGTACAATGCCCATTTCTTCAACAGAGTTTCTC
CTTCCCCACAAATGTCAATCTCCAGTAACCCGGGAAACCATTCTTCCATGAGTGAGTCAATATGATCCACAACTCGG
CCCAGAAGAATACAACCTTTTCTACAAGACGGAACTGTGATTTTCAAGAAACTCTCAGGTCGATTGTCTAAGACTTC
AGAGCCTACCAGACAGTATGCTTCTGGAGACCAATTCAAGTAGATGCCTTGCCGCCAATACATCCTGTTAGGGCGTA
GTGCTCTCTCTCTGCCAGAAAGCATGAAGGGTGAGATTTCAAGTAATCGGTTAATCAATCTTGACCAAAATCCCATG
GGAAAGTACGGCATTTCGTACAGCCGGATGATGATCTCAGAGTTCTCACAGTGGGGGAGCTCTATCACTGGCCTGTG
GTCAGACAAGCTGCTTGGAACCAGAAGATATTCTTCCCCTATTGGCAATGCGATCTGAAATTTTTCTAATAGTTTAA
AGTATTGCATCATATAGTTCTTCGGGAATCGCTTCTTCTTTGAAAGGAATTTTTCCACATCTCTCCGGGAAATGATG
CCCTTAGGATGTTTCAGACAGCCGTCTACCTTCACTGTCAAGATCTGTGCCATGACTTTACAAAGCCACTTGGGTTC
CACAAAGTACAGGTCACTTAGCTGCAGGGCAGGGTCTTGAAAATGCAGAAGAACTCCCGACTCATTTAGGAAGTGAA
CGGCGTGTGGGAGCTCGTTCTCATCCAGCTGCAGCTGATGTTCGTTCACGAGCTGTAACAGGTGTTTCCGGTTAATC
ACAGGAAACTCAGTCGGCACAGCTTTCCGCTCTGATAAAATGATTTTCTCCAGTTCTACGTAGCAATCTGGAATTAG
CTGCCCAACCACAGGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAAGGCTCTCATTTATGATGGTTTTCCGAAGCTTTGCCAGCG

CATCTGACTCCTCGGTGGCATTCACAAAGTGGTAGTCCCGGATGGTGGGGAATCCTCGCTTATTTAGGAGTTCCTTC
GTGATTTTGCTTATGCACGCTTTCCGCTGCTTCTCATCAGAAACATCCAAATGTGTGCCCACCAGAATCACCGGGGA
AGAAGAGGCACGAGCCTTGATATTGAAGAGCCAGGGCTTCATGGCGTCCACCTCTGCCTGCCCCTTGCTGAGATCAT
AGACAGCCAGGTAGAGGGCTCTCTGGGTCATGAAGTGGGGGTGAGTGCTGTAGAATTCCTCACGACCTGCAAAATCC
CACACGTTTAGAACCAGGTCCTTTCTCCTTTTGCCCCGTATTTGGATGGACCAGTCTCGCACGTCTATGCCGACTGT
GGCACCCTGCATGCCAAGTTCTGGTTTCTTCATTTTCATGAGTTGTTGCAGTAAAGTGGTCTTACCGCTCCCCGTAT
TTCCCACAATCATGAGCTTCATTCGGTTGTAGGGTACAGCCTTTTTCAGACGTTGTTGTAGAAACCTTATGATGTCT
TTGGCCTTGCATCCTACGTGCTTAAAGTCAAAATTCAGATGCAGTCCGTCCAAGGGAAGATCCCATATCTTGCTCAA
CTTCCCCATTTCATTTGGGAAGGACCTCAGTTCCAAGTTGTAACTGACGTCGAGAGACGTCAGATTTTCAAGGCAGC
CAATTTCTGGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTATGAGAGAGATGCAGTTTCTCTACTCTTGACCACACGTGTGGGTTC
TCACTAAAGTCTAAGGTGCTGATCTGATTCTTGCTAAAAATGAGTTCCCTTAAGTTCAGAGACTTCCAATGTGCAGG
TCCCGGCAGACATTCAATGTTGTTGTGGCTCATATCCAAGGACCGCAAGTGCGGAAGACTGAAAATCGCTTCTGGAA
TGCACGTGAAAGAGTTCTGAGACAATTTTAAGCTCGTTATGGAAGAAGGTAAGGCAGGCATTGCAGCAAGAAAATTC
ATGCGAGCACTGAAACTCTCGACTTTTGAACAAGCCTCAAGAAAATCTCCAGGTAGGGATGGAATGTGATTTTTACT
AAGATTTAAAATCTTCAGTTCCTTCAGGCTCAGGGGAGAGCAAATCCCGGATATTTTATTTCCTTCCAGTAGGAGCT
GCTCAAGTTTCTCCACCACTTGGGCAAGATTCTCTGGGATTGAAGAGAGCTGGTTATAGGACAGATTCAACTGTTTG
AGGCTTGGACACTTCATCGCAGGGTCTAAAACTACTGTTGGCCCGATGTCATTTCGAGAGGCATCTAGGTTGGTGAT
ACGTGGCATTTTCAACACGAAAGAGGGAAATGAGGTGAATTTGTTACTGTGCAAATCCAAGTGTATCAAACACTTCA
GAGTCTCACACAGCTGCTGTGGGAAGCTCGTGAGTGAATTCTGGTGAAGTTCCAGTTTGGTGAGATGTTCCAGGTGG
CTACTGAGGCAACACTTCTGGCTCAGAGCATCAATATCTTTGAGTTCGTTGGCAGATAGGTCTAACGACGTGATGTG
TTCTCTCTCAGAAGCCAGGGAAGAAGAGCTATCTGATTGCCTCATATGGGACGGCAGCCTTGAGGACCTGAGAGACT
CATCTGAAGACAGTATTTTTCTTTTTCGTCTCAGTAAGTCTTCATGGTCAAAAACAGGACCCAGCGAATTGGAATGC
CTCTGAGCATTTGGTGAGCAGCGCTGCAGAGCTAGATCTCTGTAAACTTCCCCTACACTAATTGAGTTGGACTTCCT
CTTCACGAGAAATGAGCTCTCGCTGCCTTCGCTATCCAGATCATCGCTCTGGCCAAACACACTGTCCATAGAAGAGT
CGGGAATAAAGGTCCATTCTCCAAATTTCGCCAGCGCGTCTTCAGAAAACTTGCCGTCACTGCCTGAGGCCACGCCT
TCTTGAAGGGTGTTTCTCATCTGATACCGGAGCACTTTCCTCGCTAGGACAGATCCTGTGTTTGTTTGCTTCCTTAA
ATTGGATGACTTATCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGATCAATTTTTCCTATGCCAAATCCTCCAAGGCAAA
TGCTGTTGTTGGCCAGGTCCAGGGCAAGTTTCCTGAGGAGCAAGCTGATGACCTGGCTGTCGCCCTTTTGGATGCTT
ACGGTCAGGGCCTTCCGTACATCTTGTTCACGACAACCACCATTAAGCAACAGTTCCACCAATTTAGGACTGCTCTC
TTTCTCACATACCTGATAGATTAAAGAAGTTGCCCCCTTCACTTGGTTGGCATCAGCTCCCAAGAGGAGCAAACATT
CAACCATGATGCTGTTATTCTGATCGCAGGCTCTCTCTAGCATGGTGTTTTTCAGCTCATCATCCACGGCCACTTTT
GCAAAGCATTTGCAACATAGATTGAGGAACTGCTCATCCTTTTGTTCTACAACACTGGAAGACATCTGATGAAATAT
CACCACATCAAAGGAATAGTGCACTAGCAGCTTGGAGAAAGATACTGACAGCTCAAGTATTGACAGGGTTGTCTGTA
ATCCTGTAGTCTGCACCTCAGCAACATCTTTAAAGCGCTGCAAAGTGGAAGCCAGAATTTTTGCCAGGAGGTGCCCT
GTCCCTATGCAGAAATTCTTCTTTGTCATCAAGCATCCCATAAGGTGTAAGCCCAGACACTGAATTTCTTGGTCATC
TGGATACATCTGTAAGGTGTGGAGGACTGAGTCAACTGCTCCTTGCAGGGACAATGTCTCTGTGGCATCAGGAAGGT
GCGCGAGAGAAGAGATTACTTTCAATCCACATTTCTGAATCCCAGGATTCCCAATGAACCTGTTCAGAGCGACTAGA
ACCAGCTTGTGGATGTCAGTCCTGAAACACTGTTTTCTGAGCACATTTGGTCTGCATTGAGAGTCCTCCCTGGATTC
TTCCAATAGTCCTGGCACAACGAAATGCAAGATAGCTCGCAGCGCCTCCAGCTGGACTGACAGAGACGTTCCGTGGG

CTTTCATCACTGTTAGTATTTTAGGGACCACTGCTGCCATTGTATCCAGAGAAGGGTTACTTCCTTCAAACAGGTGA
CTCAGCATCTTGCAGCCACTCTCTGCCACCTCAGGCGCATGGGCATGCTTCTGCATCAATTCCAAGACATTCAGGTA
TACTCCTTTTGCCAGCAGGATTTTCCTGAAATTAACATTTTGTTCCAAGAGAGTGGACAGAGCATGTGCAGCTGCTT
GGAAGACATCTTTGGAAGAAGAGTGCATCAGCATAGACAGCATCACTTCCCTGTGCGCAGGGAACTGGCCATCTTCA
TCTCCGATCTTCTCATGCAAACTGTTCTGGTACATAAGGAGGTTATTTAGTGCCCAGCAGGCAGCCTCCTGCACGTG
TTTGTCCTTTCGATGGCGCACCAGGGCTTTATAGCAGGGTTCCAGCCAGAAAAGCTTCTCACTGTCTTCCTCTTCGC
TCTGCTCTTGAGTCTCACTTCTTTCCTCCAAGTCTTGGTTTAAGAAAATAGTCTCAGTGAGGAGTGCTAAACAGCTG
AGTGCAGAGATCTGTAAGGCTGCGTTCTCAGGATACTGTCGGACCGCTTTCACCACAAAGACATGCACTTCGTTCAA
CACCAGGATGTTGAAAAAGTTACCTAATGTAAGCTTCTGGAACAAGGAGCAGCTCACCTCTTGGATGTTTTCATTGG
TGGGGAAGGCTTTCATGGCCTCCACCACAAGATTGTAGCACCGGACATTCCCACTCATGAGGACCTCTACATTGCTG
CATGTAACCGCCAGGGAATGCAAGCAGCAAAGTACGTGGTACACAATCTCCTTGTCCCTTCTGAAGCTGCCGAACGT
ACTCAGCAGTATCGTGTAATCTTTGTTCTCCACAAACTCAGTCAGCTGTTCCTCGGAAACTCTCTCAAAAAGCACGT
GTAAAGCTTTGCATCCCAGTTTTTGGACTTCATCATTGGCTGAATATCTGTGCATGGCATCAAAAATTAACAAGAAA
ATATCACATTCTTCATCCAGTATCAGCAAGGTGAGTTTACCTGAATCTAGGAGGAGATCCAAGGCTTTTAGTCCAAC
TATTGACAGGTTTACATTGGCGTGATGAACAGTTAACATTTTAAGAATCAGCCGGTGAATACCAAGGACTTCCCAAT
CATTTCCAATATCCTGGGGTCCTATTAAGCTTTGCAATGTCCCTGGACAGACTTCTATTAATTTGCACAGAAGTGAC
CACCCCGCCTGCTGTACACTGGCAACTCTCATGTAGGAGTCCAGGACAATCAACAGAGGCACGTGGAAATTTTTATC
TTCAAATAACTTGGAGGCGCGGTCCGAGTAGGTGAACACCAGCATGTCCTCCAGGAGCTGAAGCAACGTCTCGATCT
GCTTGCCTTCCTGGACATTATTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGCCTCCTCCTCCTCTTCCTCTTCGCAGCCC
TGACAGGCGCCACTGGCCATGGTGCAGCCGGCGGGGACTGCGGCGAGCTGGGACGGCTCCTGCTCTCAGAGCTGCTC

[0901] SEQ ID NO:7

[0902] >NM_001191789.1褐家鼠富亮氨酸重复激酶2(Lrrk2),mRNA

[0903] ATGGCCAGTGGCGCCTGTCAGGGCTGCGACGAGGAAGAGGAGGAGGAGGCTCTGAAGAAGTTGATAGTC
AGGCTGAATAATGTCCAGGAAGGCAAGCAGATCGAGACGTTGCTCCAGCTCCTGGAGGACATTCTGGTGTTCACCTA
CTCCGACCGCGCCTCCAAGTTATTTGAAGGCAAAAATGTCCACGTGCCTCTGTTGATAGTCCTGGACTCCTACATGA
GAGTCGCCAGTGTGCAGCAGGTGGGGTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAGTCTGTCCAGGGACATTGCAAAGC
TTAATAGGACCCCAGGATATTGGGAATGATTGGGAAGTCCTTGGTATTCACCGACTGATTCTTAAAATGTTAACTGT
TCATCATGCCAACGTAAACCTGTCAATAGTTGGACTAAAAGCCTTAGATCTCCTCCTAGATTCAGGTAAAATTACTC
TGCTGATACTGGATGAAGAATGTGATGTTTTCCTGTTAATTTTTGATGCCATGCACAGATATTCAGCCAACGAGGAA
GTCCAGAAGCTTGCGTGCAAGGCTTTACATGTGCTGTTCGAGAGAGTGTCCGAGGAGCAACTGACTGAGTTTGTGGA
GAACAAAGATTACATGACCCTGCTGAGTACGTTCCGCAGCTTCAAGAGGGACGAGGAGATTGTGCACCATGTACTCT
GCTGCCTGCATTCTCTGGCCGTCACTTGCAGCAATGTGGAGGTCCTCATGAGTGGGAATGTCAGGTGTTACAATATT
GTGGTGGAAGCCATGAAAACATTCCCCACCAGTGAAAACATTCAAGAGGTGAGCTGCTCCTTGCTCCACAAGCTTAC
ATTAGGTAATTTTTTCAACATCCTGGTGTTGAACGAAGTCCATGTCTTTGTGGTGAAAGCCGTCCAGCGGTATCCCG
AGAACGTAGCCTTACAGATCTCTGCACTCAGCTGCTTAGCCCTCCTCACCGAGACTATTTTCTTAAACCAAGACCTG
GAAGAAAGAAGTGAGACTCAGGAAAACAGCGATGAGGACAGTGAGAAGCCTTTCTGGTTGGAACCCTGCTATAAAGC
CCTGATGCGCCATCGAAAGAACAAACACGTGCAGGAGGCCGCCTGCTGGGCCCTAAATAATCTCCTCATGTACCAGA
GCAGTTTGCACGAGAAGATTGGAGATGAAGATGGCCAGTTCCCGGCGCACAGGGAAGTGATGCTGTCTATGCTGATG
CACTCTTCTTCCAAAGACGTCTTCCAAGCAGCTGCGCATGCTCTGTCCACTCTCTTGGAACAAAACGTTAATTTCAG

GAAAATCCTGCTTGCAAAAGGAGTGTACCTGAATGTCTTGGAGTTGATGCAGCGGCACGCCCAGGTTCCTGAGGTGG
CAGAGAGTGGCTGCAAGATGCTGAGTCATCTGTTTGAAGGAAGCAACCCTTCTTTGGATACAGTGGCGGCAGTGATC
CCCAAAATACTAACAGTGATGAGAACCCATGGAACGTCTCTGTCAGTCCAGCTGGAGGCACTGCGAGCTCTTCTGCA
TTTTGTGGTGCCGGGAGTATCAGAAGATTCCAGGGATGACTCGCGATGCCAACCAAACGTGCTCAGAACACAGTGCT
TCAGGACTGACATCCACAAGCTGGTTCTAGCCGCTCTGAACAGGTTCATTGGGAATCCCGGGATTCAGAAATGTGGA
TTGAAAGTCATCTCTTCTTTCGCACATCTTCCCGATGCCTTAGAGATGTTATCCCTGCATGGAGCAGTTGACTCAGT
CCTCCATACCTTACAGATGTATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGCTTACACCTTATGGGATGCCTGATGA
CAAAGAAGAATTTCTGCATAGGGACAGGGCACCTCCTGGCAAAAATTCTGGCTTCCACCTTGCAGCGATTTAAAGAT
GTTGCTGAAGTACAGACTACAGGATTACAGACGGTCTTGTCAATGCTTGACCTGTCCGTATCTTTCTCCAAGCTGCT
AGTGCACTATTCATTTGATGTGGTGATGTTTCATCAGATGTCTTCCGGTGTCCTGGAACAAAAGGATGAGCAGTTTC
TCAACTTATGCTGCAAATGCTTTGCAAAAGTGGCTGTGGATGATGAGCTGAAAAGCAAGATGCTAGAGAGAGCCTGC
GATCAGAACAACAGCATCATGGTCGAATGTTTGCTCCTCTTGGGAGCCGATGCCAATCAAGCGAAGGGGGCAACTTC
TTTAATCTATCAGGTATGTGAGAAAGAGAGCAGCCCTAAATTGGTGGAACTATTGCTTAACAGTGGGTGCCGTGAAC
AAGATGTACGGAAAGCCCTGACAGTAAGCATCCAAAAGGGCGACAACCAGGTCATCAGCTTACTCCTGAGGAGACTT
GCCCTGGACCTGGCCAACAACAGCATTTGCCTTGGAGGATTTTGCATAGGAAAACTTGATCCTTCTTGGCTAGGCCC
TTTATTTCCAGATAAGTCATCTAATTTGAGGAAACAAACAAATGCGGGGTCTGTCCTAGCGAGGAAAGTGCTCCGGT
ATCAGATGAGAAACACTCTTCAAGAAGGCGTGGCCTCAGGCAGTGAGGGCAACTTCTCTGAGGATGCGCTGGCGAAA
TTTGGCGAATGGACCTTCATTCCCGACTCTTCTATGGACAGTGTGTTTGGCCAGAGTGACGATCTGGATAGCGAAGG
CAGCGAGAGCTCCTTTCTGGTGAAGAAGAAGTCCAACTCAGTTAGTGTAGGAGAAGTTTACAGGGACCTAGCTCTGC
AGCGCTGCTCACCAAATGCTCAGAGGCACTCCAGTTCCTTGGGTCCTGTTTTTGATCACGAAGATCTACTGAGACGA
AAAAGAAAAATACTGTCCTCAGATGAGTCTCTCAGATCCTCAAGGCTGCAGTCCCATACGAGACAATCAGATAGCTC
TTCTTCTCTGGCTTCTGAGAGAGAACACATCACGTCTTTAGACCTTTCTGCCAACGAACTGAAAGATATTGATGCTC
TGGGCCAGAAGTGTTGCCTCAGTAGCCACCTGGAGCATCTCACCAAGCTGGAACTTCACCAGAATTCACTCACGAGC
TTCCCACAACAGCTGTGTGAGACTCTGAAGTGCTTGACACATCTGGATTTGCACAGTAACAAATTCGCCACCTTTCC
CTCCTTCATGTTGAAAATGCCAAGTGTTATCCACCTAGACGCCTCTCGAAATGACATCGGACCAACAGTTGTTTTAG
ACCCTGTGGTGAAGTGTCCAAGCCTCAAACAGTTTAACCTGTCCTACAACCAGCTCTCTTCCATCCCAGAGAACCTG
GACCAAGTGGTGGAGAAACTGGAGCAGCTCCTACTGGAAGGAAACAAAATATCCGGGATTTGTTCTCCCTTGAGCCT
GAAGGAACTGAAGATTTTAAACCTTAGTAAAAACCACATTCCATCCCTACCTGAAGACTTTCTCGAGGCTTGCCCGA
AAGTGGAGAGCTTCAGTGCCCGCATGAATTTTCTCGCTGCAATGCCTGCCTTACCGTCTTCCATAACTAGCTTAAAA
TTGTCTCAAAACTCTTTCACGTGCATTCCAGAAGCGATCTTCAGTCTTCCACACTTGCGGTCCTTGGATATGAGTCA
CAACAACATTGAACACCTGCCGGGACCTGCACATTGGAAGTCTCTGAACTTAAGGGAACTCATTTTTAGCAAGAATC
AGATCAGCACCTTAGACTTGAGCGAAAACCCACACATATGGTCAAGAGTAGAGAAGCTGCATCTCTCTCATAATAAA
CTGAAAGAGATTCCTCCAGAAATTGGCCGTCTTGAAAACCTGACATCTCTTGATGTCAGTTACAACCTGGAACTGAG
GTCCTTTCCAAACGAAATGGGGAAGTTAAGCAAAATATGGGATCTTCCCTTGGATGGACTGCACCTCAACTTTGACT
TTAAGCACATAGGATGCAAAGCCAAAGACATCATAAGGTTTCTACAACAACGTCTGAAAAAGGCCGTGCCCTACAAC
CGAATGAAGCTCATGATTGTGGGCAATACGGGGAGTGGTAAGACCACTCTACTGCAGCAGCTCATGAAAATGAAGAA
ATCAGAACTCGGCATGCAGGGCGCCACGGTTGGCATAGACGTGCGAGACTGGCCCATCCAAATACGAGGCAAAAGGA
AAAAGGACCTTGTTCTAAACGTGTGGGACTTTGCAGGCCGTGAGGAATTCTACAGCACTCACCCCCACTTCATGACC
CAGAGAGCCCTGTACCTGGCTGTCTACGACCTCAGCAAGGGGCAGGCGGAGGTGGATGCCATGAAGCCCTGGCTCTT

CAACATCAAGGCTCGTGCCTCTTCTTCCCCGGTGATTCTGGTGGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAAGCAGC
GCAAAGCCTGCATAGGCAAAATCACGAAGGAACTCCTTAATAAGCGAGGATTCCCCACCATCCGGGACTACCACTTC
GTGAATGCCACTGAGGAGTCGGATGCGCTGGCAAAGCTCCGGAAAACCATCATAAATGAGAGTCTTAATTTCAAGAT
CCGAGATCAGCCCGTGGTTGGGCAGCTAATTCCAGATTGCTACGTAGAACTGGAGAAAATAATCTTATCGGAGCGTA
AAGCTGTACCAACGGAGTTTCCTGTAATTAACCGGAAACACTTACTCCAGCTGGTGAAGGAACACCAGCTGCAGCTG
GATGAGAACGAGCTCCCCCACGCTGTTCACTTCCTGAATGAGTCAGGAGTTCTTCTGCATTTTCAAGACCCCGCATT
GCAGCTGAGTGACCTGTACTTTGTGGAACCCAAGTGGCTTTGTAAAGTCATGGCACAGATTTTGACCGTGAAAGTGG
ACGGCTGCCTGAAGCATCCTAAGGGCATCATTTCACGGAGAGATGTGGAAAAATTCCTTTCCAAGAAAAAGCGATTC
CCTAAGAACTACATGGCGCAGTACTTCAAACTTTTAGAAAAATTTCAGATCGCATTACCAATAGGGGAAGAATATCT
GCTGGTTCCAAGCAGCTTATCTGACCACAGGCCAGTGATAGAGCTCCCCCACTGTGAGAACTCTGAGATCATCATCC
GGCTGTATGAAATGCCATACTTTCCAATGGGATTTTGGTCAAGATTGATTAACCGATTACTTGAAATCTCACCTTTC
ATGCTTTCTGGAAGAGAGAGAGCACTACGCCCAAACCGAATGTACTGGCGCCAAGGCATCTACTTGAATTGGTCTCC
AGAAGCCTACTGTCTGGTGGGCTCTGAAGTCTTAGACAGTCGCCCAGAGAGTTTCTTGAAAATCACAGTTCCATCTT
GTAGAAAAGGTTGTATTCTTTTGGGCCGAGTTGTGGATCATATTGACTCACTCATGGAAGAATGGTTTCCTGGATTG
CTGGAGATTGACATTTGTGGGGAAGGAGAAACTTTGTTGAAAAAATGGGCATTGTATAGTTTTAATGATGGCGAAGA
ACATCAGAAGATCTTGCTTGATGAGTTGATGAAGAAGGCTGAAGAAGGAGACCTGTTAATAAATCCAGATCAACCAA
GGCTCACCATTCCAATATCCCAGATTGCTCCGGACTTGATCTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATTATGTTGAACAAT
GACGAACTGGAATTTGAGGAAGCACCCGAGTTTCTCTTAGGTGATGGAAGTTTCGGATCAGTTTATCGAGCTGCCTA
CGAAGGAGAGGAAGTGGCTGTGAAGATTTTTAATAAGCACACATCGCTTAGGCTGTTAAGACAAGAGTTGGTGGTAC
TCTGTCATCTCCACCATCCCAGCTTGATCTCCCTGTTGGCGGCTGGGATTCGTCCTCGGATGCTGGTAATGGAGTTG
GCCTCCAAGGGTTCCTTGGATCGCCTGCTGCAGCAGGACAAAGCCAGCCTCACCCGGACCCTCCAGCACAGAATCGC
ATTGCATGTGGCCGATGGCCTGAGATATCTGCACTCGGCCATGATTATTTACCGTGATCTGAAGCCCCACAACGTGC
TACTCTTCACCCTGTATCCCAATGCCGCCATCATTGCGAAGATTGCGGACTACGGGATTGCACAGTACTGCTGTAGG
ATGGGAATAAAGACCTCAGAGGGCACCCCAGGGTTCCGAGCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAACCA
ACAGGCTGATGTTTATTCTTTTGGCTTACTACTTCATGATATCTGGACAACTGGGAATAGAATCATGGAGGGTTTGA
GGTTTCCAAATGAGTTTGATGAACTGGCCATACAAGGGAAATTGCCAGACCCAGTTAAAGAATATGGCTGTGCCCCG
TGGCCTATGGTTGAGAAGTTAATTACAAAATGTTTGAAAGAAAATCCTCAAGAAAGACCCACTTCTGCCCAGGTCTT
TGACATTTTGAATTCAGCTGAGTTAATTTGCCTCATGCGACACATTTTCATACCTAAGGACATCACTGTTGAATGCA
TAGCTGCTACAAACCTCAATAGCAAGCGAGCGACTCTCTGGTTGGGCTGTGGGAACACAGAAAAAGGGCAGCTTTCC
TTACTTGACTTGAACACGGAAAGATACAGCTATGAGGAAGTTACTGATAGTAGAATACTGTGCCTGGCTTTGGTGCA
TCTTGCTGCTGAGAAAGAGAGCTGGGTTGTGTGTGGGACACAGTCCGGAGCTCTCCTGGTCATCAATGCTGAAGATG
AGACAAGGAGACACACCCTCGACAAGATGACTGATTCTGTTACTTGCTTGTATTGCAATTCCTTTGCCAAGCAGAGC
AAGCAAAGTCACTTCCTTTTGGTGGGAACTGCTGATGGCAACTTAATGATATTTGAAGATAAGACCATTAAGTGTAA
AGGAGCTGCCCCATTGAAGACACTACACATAGGCGATGTCAGTACGCCCCTGATGTGCCTGAGCGAGTCCATGAATT
CATCTGAAAGACACATCACATGGGGAGGGTGTGGCACAAAGATCTTCTCCTTTTCCAATGATTTCACCATTCAGAAA
CTCATCGAGACAAGAACCAACCAGCTGTTTTCTTACTCAGCGTTCAGCGATTCTAACATCATAGCGGTGGCAGTGGA
CACAGCGCTTTATATTGCCAAGAAAAACAGCCCTGTCGTAGAGGTGTGGGACAAGAAGACAGAAAAACTCTGTGAAC
TAATAGACTGTGTGCACTTCTTAAAGGAGGTGATGGTGAAAATAAACAAGGACTCGAAGCACAAGCTGTCCTACTCT
GGGAGGGTGAAGGCACTCTGCCTGCAGAAGAACACAGCTCTCTGGATCGGAACTGGAGGAGGCCACATCTTACTCCT

GGATCTTTCTACACGGCGAGTCATCCGCACCATCCACAATTTCTGTGATTCCGTGAGAGCCATGGCCACAGCTCAGT
TAGGCAACCTTAAAAATGTCATGCTGGTTTTGGGGTACAAGCGGAAGAGTACAGAAGGAACCCAAGAACAAAAAGAG
ATACAATCTTGTTTGTCTATTTGGGACCTCAATCTTCCACATGAAGTGCAAAACTTAGAAAAACACATTGAAGTAAG
AACAGAACTGGCTGATAAAATGAGGAAAACATCTGTCGAATAG

[0904] SEQ ID NO:8

[0905] >SEQ ID NO:7的反向互补

[0906] CTATTCGACAGATGTTTTCCTCATTTTATCAGCCAGTTCTGTTCTTACTTCAATGTGTTTTTCTAAGTT
TTGCACTTCATGTGGAAGATTGAGGTCCCAAATAGACAAACAAGATTGTATCTCTTTTTGTTCTTGGGTTCCTTCTG
TACTCTTCCGCTTGTACCCCAAAACCAGCATGACATTTTTAAGGTTGCCTAACTGAGCTGTGGCCATGGCTCTCACG
GAATCACAGAAATTGTGGATGGTGCGGATGACTCGCCGTGTAGAAAGATCCAGGAGTAAGATGTGGCCTCCTCCAGT
TCCGATCCAGAGAGCTGTGTTCTTCTGCAGGCAGAGTGCCTTCACCCTCCCAGAGTAGGACAGCTTGTGCTTCGAGT
CCTTGTTTATTTTCACCATCACCTCCTTTAAGAAGTGCACACAGTCTATTAGTTCACAGAGTTTTTCTGTCTTCTTG
TCCCACACCTCTACGACAGGGCTGTTTTTCTTGGCAATATAAAGCGCTGTGTCCACTGCCACCGCTATGATGTTAGA
ATCGCTGAACGCTGAGTAAGAAAACAGCTGGTTGGTTCTTGTCTCGATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTGGAAA
AGGAGAAGATCTTTGTGCCACACCCTCCCCATGTGATGTGTCTTTCAGATGAATTCATGGACTCGCTCAGGCACATC
AGGGGCGTACTGACATCGCCTATGTGTAGTGTCTTCAATGGGGCAGCTCCTTTACACTTAATGGTCTTATCTTCAAA
TATCATTAAGTTGCCATCAGCAGTTCCCACCAAAAGGAAGTGACTTTGCTTGCTCTGCTTGGCAAAGGAATTGCAAT
ACAAGCAAGTAACAGAATCAGTCATCTTGTCGAGGGTGTGTCTCCTTGTCTCATCTTCAGCATTGATGACCAGGAGA
GCTCCGGACTGTGTCCCACACACAACCCAGCTCTCTTTCTCAGCAGCAAGATGCACCAAAGCCAGGCACAGTATTCT
ACTATCAGTAACTTCCTCATAGCTGTATCTTTCCGTGTTCAAGTCAAGTAAGGAAAGCTGCCCTTTTTCTGTGTTCC
CACAGCCCAACCAGAGAGTCGCTCGCTTGCTATTGAGGTTTGTAGCAGCTATGCATTCAACAGTGATGTCCTTAGGT
ATGAAAATGTGTCGCATGAGGCAAATTAACTCAGCTGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTGGGTCTTTC
TTGAGGATTTTCTTTCAAACATTTTGTAATTAACTTCTCAACCATAGGCCACGGGGCACAGCCATATTCTTTAACTG
GGTCTGGCAATTTCCCTTGTATGGCCAGTTCATCAAACTCATTTGGAAACCTCAAACCCTCCATGATTCTATTCCCA
GTTGTCCAGATATCATGAAGTAGTAAGCCAAAAGAATAAACATCAGCCTGTTGGTTATAAATGACATTTCCTCTGGC
AACTTCAGGTGCTCGGAACCCTGGGGTGCCCTCTGAGGTCTTTATTCCCATCCTACAGCAGTACTGTGCAATCCCGT
AGTCCGCAATCTTCGCAATGATGGCGGCATTGGGATACAGGGTGAAGAGTAGCACGTTGTGGGGCTTCAGATCACGG
TAAATAATCATGGCCGAGTGCAGATATCTCAGGCCATCGGCCACATGCAATGCGATTCTGTGCTGGAGGGTCCGGGT
GAGGCTGGCTTTGTCCTGCTGCAGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGGAGGCCAACTCCATTACCAGCATCCGAGGAC
GAATCCCAGCCGCCAACAGGGAGATCAAGCTGGGATGGTGGAGATGACAGAGTACCACCAACTCTTGTCTTAACAGC
CTAAGCGATGTGTGCTTATTAAAAATCTTCACAGCCACTTCCTCTCCTTCGTAGGCAGCTCGATAAACTGATCCGAA
ACTTCCATCACCTAAGAGAAACTCGGGTGCTTCCTCAAATTCCAGTTCGTCATTGTTCAACATAATATTTCTAGGCA
GGTCAGCCAAGATCAAGTCCGGAGCAATCTGGGATATTGGAATGGTGAGCCTTGGTTGATCTGGATTTATTAACAGG
TCTCCTTCTTCAGCCTTCTTCATCAACTCATCAAGCAAGATCTTCTGATGTTCTTCGCCATCATTAAAACTATACAA
TGCCCATTTTTTCAACAAAGTTTCTCCTTCCCCACAAATGTCAATCTCCAGCAATCCAGGAAACCATTCTTCCATGA
GTGAGTCAATATGATCCACAACTCGGCCCAAAAGAATACAACCTTTTCTACAAGATGGAACTGTGATTTTCAAGAAA
CTCTCTGGGCGACTGTCTAAGACTTCAGAGCCCACCAGACAGTAGGCTTCTGGAGACCAATTCAAGTAGATGCCTTG
GCGCCAGTACATTCGGTTTGGGCGTAGTGCTCTCTCTCTTCCAGAAAGCATGAAAGGTGAGATTTCAAGTAATCGGT
TAATCAATCTTGACCAAAATCCCATTGGAAAGTATGGCATTTCATACAGCCGGATGATGATCTCAGAGTTCTCACAG

TGGGGGAGCTCTATCACTGGCCTGTGGTCAGATAAGCTGCTTGGAACCAGCAGATATTCTTCCCCTATTGGTAATGC
GATCTGAAATTTTTCTAAAAGTTTGAAGTACTGCGCCATGTAGTTCTTAGGGAATCGCTTTTTCTTGGAAAGGAATT
TTTCCACATCTCTCCGTGAAATGATGCCCTTAGGATGCTTCAGGCAGCCGTCCACTTTCACGGTCAAAATCTGTGCC
ATGACTTTACAAAGCCACTTGGGTTCCACAAAGTACAGGTCACTCAGCTGCAATGCGGGGTCTTGAAAATGCAGAAG
AACTCCTGACTCATTCAGGAAGTGAACAGCGTGGGGGAGCTCGTTCTCATCCAGCTGCAGCTGGTGTTCCTTCACCA
GCTGGAGTAAGTGTTTCCGGTTAATTACAGGAAACTCCGTTGGTACAGCTTTACGCTCCGATAAGATTATTTTCTCC
AGTTCTACGTAGCAATCTGGAATTAGCTGCCCAACCACGGGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAAGACTCTCATTTAT
GATGGTTTTCCGGAGCTTTGCCAGCGCATCCGACTCCTCAGTGGCATTCACGAAGTGGTAGTCCCGGATGGTGGGGA
ATCCTCGCTTATTAAGGAGTTCCTTCGTGATTTTGCCTATGCAGGCTTTGCGCTGCTTCTCATCAGAAACATCCAAA
TGTGTGCCCACCAGAATCACCGGGGAAGAAGAGGCACGAGCCTTGATGTTGAAGAGCCAGGGCTTCATGGCATCCAC
CTCCGCCTGCCCCTTGCTGAGGTCGTAGACAGCCAGGTACAGGGCTCTCTGGGTCATGAAGTGGGGGTGAGTGCTGT
AGAATTCCTCACGGCCTGCAAAGTCCCACACGTTTAGAACAAGGTCCTTTTTCCTTTTGCCTCGTATTTGGATGGGC
CAGTCTCGCACGTCTATGCCAACCGTGGCGCCCTGCATGCCGAGTTCTGATTTCTTCATTTTCATGAGCTGCTGCAG
TAGAGTGGTCTTACCACTCCCCGTATTGCCCACAATCATGAGCTTCATTCGGTTGTAGGGCACGGCCTTTTTCAGAC
GTTGTTGTAGAAACCTTATGATGTCTTTGGCTTTGCATCCTATGTGCTTAAAGTCAAAGTTGAGGTGCAGTCCATCC
AAGGGAAGATCCCATATTTTGCTTAACTTCCCCATTTCGTTTGGAAAGGACCTCAGTTCCAGGTTGTAACTGACATC
AAGAGATGTCAGGTTTTCAAGACGGCCAATTTCTGGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTATGAGAGAGATGCAGCTTCT
CTACTCTTGACCATATGTGTGGGTTTTCGCTCAAGTCTAAGGTGCTGATCTGATTCTTGCTAAAAATGAGTTCCCTT
AAGTTCAGAGACTTCCAATGTGCAGGTCCCGGCAGGTGTTCAATGTTGTTGTGACTCATATCCAAGGACCGCAAGTG
TGGAAGACTGAAGATCGCTTCTGGAATGCACGTGAAAGAGTTTTGAGACAATTTTAAGCTAGTTATGGAAGACGGTA
AGGCAGGCATTGCAGCGAGAAAATTCATGCGGGCACTGAAGCTCTCCACTTTCGGGCAAGCCTCGAGAAAGTCTTCA
GGTAGGGATGGAATGTGGTTTTTACTAAGGTTTAAAATCTTCAGTTCCTTCAGGCTCAAGGGAGAACAAATCCCGGA
TATTTTGTTTCCTTCCAGTAGGAGCTGCTCCAGTTTCTCCACCACTTGGTCCAGGTTCTCTGGGATGGAAGAGAGCT
GGTTGTAGGACAGGTTAAACTGTTTGAGGCTTGGACACTTCACCACAGGGTCTAAAACAACTGTTGGTCCGATGTCA
TTTCGAGAGGCGTCTAGGTGGATAACACTTGGCATTTTCAACATGAAGGAGGGAAAGGTGGCGAATTTGTTACTGTG
CAAATCCAGATGTGTCAAGCACTTCAGAGTCTCACACAGCTGTTGTGGGAAGCTCGTGAGTGAATTCTGGTGAAGTT
CCAGCTTGGTGAGATGCTCCAGGTGGCTACTGAGGCAACACTTCTGGCCCAGAGCATCAATATCTTTCAGTTCGTTG
GCAGAAAGGTCTAAAGACGTGATGTGTTCTCTCTCAGAAGCCAGAGAAGAAGAGCTATCTGATTGTCTCGTATGGGA
CTGCAGCCTTGAGGATCTGAGAGACTCATCTGAGGACAGTATTTTTCTTTTTCGTCTCAGTAGATCTTCGTGATCAA
AAACAGGACCCAAGGAACTGGAGTGCCTCTGAGCATTTGGTGAGCAGCGCTGCAGAGCTAGGTCCCTGTAAACTTCT
CCTACACTAACTGAGTTGGACTTCTTCTTCACCAGAAAGGAGCTCTCGCTGCCTTCGCTATCCAGATCGTCACTCTG
GCCAAACACACTGTCCATAGAAGAGTCGGGAATGAAGGTCCATTCGCCAAATTTCGCCAGCGCATCCTCAGAGAAGT
TGCCCTCACTGCCTGAGGCCACGCCTTCTTGAAGAGTGTTTCTCATCTGATACCGGAGCACTTTCCTCGCTAGGACA
GACCCCGCATTTGTTTGTTTCCTCAAATTAGATGACTTATCTGGAAATAAAGGGCCTAGCCAAGAAGGATCAAGTTT
TCCTATGCAAAATCCTCCAAGGCAAATGCTGTTGTTGGCCAGGTCCAGGGCAAGTCTCCTCAGGAGTAAGCTGATGA
CCTGGTTGTCGCCCTTTTGGATGCTTACTGTCAGGGCTTTCCGTACATCTTGTTCACGGCACCCACTGTTAAGCAAT
AGTTCCACCAATTTAGGGCTGCTCTCTTTCTCACATACCTGATAGATTAAAGAAGTTGCCCCCTTCGCTTGATTGGC
ATCGGCTCCCAAGAGGAGCAAACATTCGACCATGATGCTGTTGTTCTGATCGCAGGCTCTCTCTAGCATCTTGCTTT
TCAGCTCATCATCCACAGCCACTTTTGCAAAGCATTTGCAGCATAAGTTGAGAAACTGCTCATCCTTTTGTTCCAGG

ACACCGGAAGACATCTGATGAAACATCACCACATCAAATGAATAGTGCACTAGCAGCTTGGAGAAAGATACGGACAG
GTCAAGCATTGACAAGACCGTCTGTAATCCTGTAGTCTGTACTTCAGCAACATCTTTAAATCGCTGCAAGGTGGAAG
CCAGAATTTTTGCCAGGAGGTGCCCTGTCCCTATGCAGAAATTCTTCTTTGTCATCAGGCATCCCATAAGGTGTAAG
CCCAGACACTGAATTTCTTGGTCATCTGGATACATCTGTAAGGTATGGAGGACTGAGTCAACTGCTCCATGCAGGGA
TAACATCTCTAAGGCATCGGGAAGATGTGCGAAAGAAGAGATGACTTTCAATCCACATTTCTGAATCCCGGGATTCC
CAATGAACCTGTTCAGAGCGGCTAGAACCAGCTTGTGGATGTCAGTCCTGAAGCACTGTGTTCTGAGCACGTTTGGT
TGGCATCGCGAGTCATCCCTGGAATCTTCTGATACTCCCGGCACCACAAAATGCAGAAGAGCTCGCAGTGCCTCCAG
CTGGACTGACAGAGACGTTCCATGGGTTCTCATCACTGTTAGTATTTTGGGGATCACTGCCGCCACTGTATCCAAAG
AAGGGTTGCTTCCTTCAAACAGATGACTCAGCATCTTGCAGCCACTCTCTGCCACCTCAGGAACCTGGGCGTGCCGC
TGCATCAACTCCAAGACATTCAGGTACACTCCTTTTGCAAGCAGGATTTTCCTGAAATTAACGTTTTGTTCCAAGAG
AGTGGACAGAGCATGCGCAGCTGCTTGGAAGACGTCTTTGGAAGAAGAGTGCATCAGCATAGACAGCATCACTTCCC
TGTGCGCCGGGAACTGGCCATCTTCATCTCCAATCTTCTCGTGCAAACTGCTCTGGTACATGAGGAGATTATTTAGG
GCCCAGCAGGCGGCCTCCTGCACGTGTTTGTTCTTTCGATGGCGCATCAGGGCTTTATAGCAGGGTTCCAACCAGAA
AGGCTTCTCACTGTCCTCATCGCTGTTTTCCTGAGTCTCACTTCTTTCTTCCAGGTCTTGGTTTAAGAAAATAGTCT
CGGTGAGGAGGGCTAAGCAGCTGAGTGCAGAGATCTGTAAGGCTACGTTCTCGGGATACCGCTGGACGGCTTTCACC
ACAAAGACATGGACTTCGTTCAACACCAGGATGTTGAAAAAATTACCTAATGTAAGCTTGTGGAGCAAGGAGCAGCT
CACCTCTTGAATGTTTTCACTGGTGGGGAATGTTTTCATGGCTTCCACCACAATATTGTAACACCTGACATTCCCAC
TCATGAGGACCTCCACATTGCTGCAAGTGACGGCCAGAGAATGCAGGCAGCAGAGTACATGGTGCACAATCTCCTCG
TCCCTCTTGAAGCTGCGGAACGTACTCAGCAGGGTCATGTAATCTTTGTTCTCCACAAACTCAGTCAGTTGCTCCTC
GGACACTCTCTCGAACAGCACATGTAAAGCCTTGCACGCAAGCTTCTGGACTTCCTCGTTGGCTGAATATCTGTGCA
TGGCATCAAAAATTAACAGGAAAACATCACATTCTTCATCCAGTATCAGCAGAGTAATTTTACCTGAATCTAGGAGG
AGATCTAAGGCTTTTAGTCCAACTATTGACAGGTTTACGTTGGCATGATGAACAGTTAACATTTTAAGAATCAGTCG
GTGAATACCAAGGACTTCCCAATCATTCCCAATATCCTGGGGTCCTATTAAGCTTTGCAATGTCCCTGGACAGACTT
CTATTAATTTGCACAGAAGTGACCACCCCACCTGCTGCACACTGGCGACTCTCATGTAGGAGTCCAGGACTATCAAC
AGAGGCACGTGGACATTTTTGCCTTCAAATAACTTGGAGGCGCGGTCGGAGTAGGTGAACACCAGAATGTCCTCCAG
GAGCTGGAGCAACGTCTCGATCTGCTTGCCTTCCTGGACATTATTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGCCTCCT
CCTCCTCTTCCTCGTCGCAGCCCTGACAGGCGCCACTGGCCAT

序列表

<110> 阿尔尼拉姆医药品有限公司（ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.）

<120> 富亮氨酸重复激酶 2（LRRK2）iRNA 剂组合物及其使用方法

<130> A108868 1010WO

<140>
<141>

<150> 63/138,717
<151> 2021-01-18

<150> 62/965,452
<151> 2020-01-24

<160> 354

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 9239
<212> DNA
<213> 智人

[0001]

<400> 1

ggggcccgcg gggagcgctg gctgcgggcg gtgagctgag ctcgcccccg gggagctgtg 60

gccggcgccc ctgccggttc cctgagcagc ggacgttcat gctgggaggg cggcgggttg 120

gaagcaggtg ccaccatggc tagtggcagc tgtcaggggt gcgaagagga cgaggaaact 180

ctgaagaagt tgatagtcag gctgaacaat gtccaggaag gaaaacagat agaaacgctg 240

gtccaaatcc tggaggatct gctggtgttc acgtactccg agcgcgcctc caagttattt 300

caaggcaaaa atatccatgt gcctctgttg atcgtcttgg actcctatat gagagtcgcg 360

agtgtgcagc aggtgggttg gtcacttctg tgcaaattaa tagaagtctg tccaggtaca 420

atgcaaagct taatgggacc ccaggatgtt ggaaatgatt gggaagtcct tggtgttcac 480

caattgattc ttaaaatgct aacagttcat aatgccagtg taaacttgtc agtgattgga 540

ctgaagacct tagatctcct cctaacttca ggtaaaatca ccttgctgat attggatgaa 600

gaaagtgata ttttcatgtt aatttttgat gccatgcact catttccagc caatgatgaa 660

gtccagaaac ttggatgcaa agctttacat gtgctgtttg agagagtctc agaggagcaa 720

ctgactgaat ttgttgagaa caaagattat atgatattgt taagtgcgtt aacaaatttt 780

aaagatgaag aggaaattgt gcttcatgtg ctgcattgtt tacattccct agcgattcct 840

tgcaataatg tggaagtcct catgagtggc aatgtcaggt gttataatat tgtggtggaa 900

gctatgaaag cattccctat gagtgaaaga attcaagaag tgagttgctg tttgctccat 960

aggcttacat taggtaattt tttcaatatc ctggtattaa acgaagtcca tgagtttgtg 1020

gtgaaagctg tgcagcagta cccagagaat gcagcattgc agatctcagc gctcagctgt 1080

ttggccctcc tcactgagac tattttctta aatcaagatt tagaggaaaa gaatgagaat 1140

caagagaatg atgatgaggg ggaagaagat aaattgtttt ggctggaagc ctgttacaaa 1200

gcattaacgt ggcatagaaa gaacaagcac gtgcaggagg ccgcatgctg ggcactaaat 1260

aatctcctta tgtaccaaaa cagtttacat gagaagattg gagatgaaga tggccatttc 1320

ccagctcata gggaagtgat gctctccatg ctgatgcatt cttcatcaaa ggaagttttc 1380

caggcatctg cgaatgcatt gtcaactctc ttagaacaaa atgttaattt cagaaaaata 1440

ctgttatcaa aaggaataca cctgaatgtt ttggagttaa tgcagaagca tatacattct 1500

[0002]

cctgaagtgg ctgaaagtgg ctgtaaaatg ctaaatcatc tttttgaagg aagcaacact 1560

tccctggata taatggcagc agtggtcccc aaaatactaa cagttatgaa acgtcatgag 1620

acatcattac cagtgcagct ggaggcgctt cgagctattt tacattttat agtgcctggc 1680

atgccagaag aatccaggga ggatacagaa tttcatcata agctaaatat ggttaaaaaa 1740

cagtgtttca agaatgatat tcacaaactg gtcctagcag ctttgaacag gttcattgga 1800

aatcctggga ttcagaaatg tggattaaaa gtaatttctt ctattgtaca ttttcctgat 1860

gcattagaga tgttatccct ggaaggtgct atggattcag tgcttcacac actgcagatg 1920

tatccagatg accaagaaat tcagtgtctg ggtttaagtc ttataggata cttgattaca 1980

aagaagaatg tgttcatagg aactggacat ctgctggcaa aaattctggt ttccagctta 2040

taccgattta aggatgttgc tgaaatacag actaaaggat ttcagacaat cttagcaatc 2100

ctcaaattgt cagcatcttt ttctaagctg ctggtgcatc attcatttga cttagtaata 2160

ttccatcaaa tgtcttccaa tatcatggaa caaaaggatc aacagtttct aaacctctgt 2220

tgcaagtgtt ttgcaaaagt agctatggat gattacttaa aaaatgtgat gctagagaga 2280

gcgtgtgatc agaataacag catcatggtt gaatgcttgc ttctattggg agcagatgcc 2340

aatcaagcaa aggagggatc ttctttaatt tgtcaggtat gtgagaaaga gagcagtccc 2400

aaattggtgg aactcttact gaatagtgga tctcgtgaac aagatgtacg aaaagcgttg 2460

acgataagca ttgggaaagg tgacagccag atcatcagct tgctcttaag gaggctggcc 2520

ctggatgtgg ccaacaatag catttgcctt ggaggatttt gtataggaaa agttgaacct 2580

tcttggcttg gtcctttatt tccagataag acttctaatt taaggaaaca aacaaatata 2640

gcatctacac tagcaagaat ggtgatcaga tatcagatga aaagtgctgt ggaagaagga 2700

acagcctcag gcagcgatgg aaatttttct gaagatgtgc tgtctaaatt tgatgaatgg 2760

acctttattc ctgactcttc tatggacagt gtgtttgctc aaagtgatga cctggatagt 2820

gaaggaagtg aaggctcatt tcttgtgaaa aagaaatcta attcaattag tgtaggagaa 2880

ttttaccgag atgccgtatt acagcgttgc tcaccaaatt tgcaaagaca ttccaattcc 2940

ttggggccca tttttgatca tgaagattta ctgaagcgaa aaagaaaaat attatcttca 3000

[0003] gatgattcac tcaggtcatc aaaacttcaa tcccatatga ggcattcaga cagcatttct 3060

tctctggctt ctgagagaga atatattaca tcactagacc tttcagcaaa tgaactaaga 3120

gatattgatg ccctaagcca gaaatgctgt ataagtgttc atttggagca tcttgaaaag 3180

ctggagcttc accagaatgc actcacgagc tttccacaac agctatgtga aactctgaag 3240

agtttgacac atttggactt gcacagtaat aaatttacat catttccttc ttatttgttg 3300

aaaatgagtt gtattgctaa tcttgatgtc tctcgaaatg acattggacc ctcagtggtt 3360

ttagatccta cagtgaaatg tccaactctg aaacagttta acctgtcata taaccagctg 3420

tcttttgtac ctgagaacct cactgatgtg gtagagaaac tggagcagct cattttagaa 3480

ggaaataaaa tatcagggat atgctccccc ttgagactga aggaactgaa gattttaaac 3540

cttagtaaga accacatttc atccctatca gagaactttc ttgaggcttg tcctaaagtg 3600

gagagtttca gtgccagaat gaattttctt gctgctatgc ctttcttgcc tccttctatg 3660

acaatcctaa aattatctca gaacaaattt tcctgtattc cagaagcaat tttaaatctt 3720

ccacacttgc ggtctttaga tatgagcagc aatgatattc agtacctacc aggtcccgca 3780

cactggaaat ctttgaactt aagggaactc ttatttagcc ataatcagat cagcatcttg 3840

gacttgagtg aaaaagcata tttatggtct agagtagaga aactgcatct ttctcacaat 3900

aaactgaaag agattcctcc tgagattggc tgtcttgaaa atctgacatc tctggatgtc 3960

agttacaact tggaactaag atcctttccc aatgaaatgg ggaaattaag caaaatatgg 4020

gatcttcctt tggatgaact gcatcttaac tttgatttta aacatatagg atgtaaagcc 4080

aaagacatca taaggtttct tcaacagcga ttaaaaaagg ctgtgcctta taaccgaatg 4140

aaacttatga ttgtgggaaa tactgggagt ggtaaaacca ccttattgca gcaattaatg 4200

aaaaccaaga aatcagatct tggaatgcaa agtgccacag ttggcataga tgtgaaagac 4260

tggcctatcc aaataagaga caaaagaaag agagatctcg tcctaaatgt gtgggatttt 4320

gcaggtcgtg aggaattcta tagtactcat ccccatttta tgacgcagcg agcattgtac 4380

cttgctgtct atgacctcag caagggacag gctgaagttg atgccatgaa gccttggctc 4440

ttcaatataa aggctcgcgc ttcttcttcc cctgtgattc tcgttggcac acatttggat 4500

gtttctgatg agaagcaacg caaagcctgc atgagtaaaa tcaccaagga actcctgaat 4560

[0004]

aagcgagggt tccctgccat acgagattac cactttgtga atgccaccga ggaatctgat 4620

gctttggcaa aacttcggaa aaccatcata aacgagagcc ttaatttcaa gatccgagat 4680

cagcttgttg ttggacagct gattccagac tgctatgtag aacttgaaaa aatcatttta 4740

tcggagcgta aaaatgtgcc aattgaattt cccgtaattg accggaaacg attattacaa 4800

ctagtgagag aaaatcagct gcagttagat gaaaatgagc ttcctcacgc agttcacttt 4860

ctaaatgaat caggagtcct tcttcatttt caagacccag cactgcagtt aagtgacttg 4920

tactttgtgg aacccaagtg gctttgtaaa atcatggcac agattttgac agtgaaagtg 4980

gaaggttgtc caaaacaccc taagggcatt atttcgcgta gagatgtgga aaaatttctt 5040

tcaaaaaaaa ggaaatttcc aaagaactac atgtcacagt attttaagct cctagaaaaa 5100

ttccagattg ctttgccaat aggagaagaa tatttgctgg ttccaagcag tttgtctgac 5160

cacaggcctg tgatagagct tccccattgt gagaactctg aaattatcat ccgactatat 5220

gaaatgcctt attttccaat gggattttgg tcaagattaa tcaatcgatt acttgagatt 5280

tcaccttaca tgctttcagg gagagaacga gcacttcgcc caaacagaat gtattggcga 5340

caaggcattt acttaaattg gtctcctgaa gcttattgtc tggtaggatc tgaagtctta 5400

gacaatcatc cagagagttt cttaaaaatt acagttcctt cttgtagaaa aggctgtatt 5460

cttttgggcc aagttgtgga ccacattgat tctctcatgg aagaatggtt tcctgggttg 5520

ctggagattg atatttgtgg tgaaggagaa actctgttga agaaatgggc attatatagt 5580

tttaatgatg gtgaagaaca tcaaaaaatc ttacttgatg acttgatgaa gaaagcagag 5640

gaaggagatc tcttagtaaa tccagatcaa ccaaggctca ccattccaat atctcagatt 5700

gcccctgact tgattttggc tgacctgcct agaaatatta tgttgaataa tgatgagttg 5760

gaatttgaac aagctccaga gtttctccta ggtgatggca gttttggatc agtttaccga 5820

gcagcctatg aaggagaaga agtggctgtg aagatttta ataaacatac atcactcagg 5880

ctgttaagac aagagcttgt ggtgctttgc cacctccacc accccagttt gatatctttg 5940

ctggcagctg ggattcgtcc ccggatgttg gtgatggagt tagcctccaa gggttccttg 6000

gatcgcctgc ttcagcagga caaagccagc ctcactagaa ccctacagca caggattgca 6060

[0005] ctccacgtag ctgatggttt gagatacctc cactcagcca tgattatata ccgagacctg 6120

aaaccccaca atgtgctgct tttcacactg tatcccaatg ctgccatcat tgcaaagatt 6180

gctgactacg gcattgctca gtactgctgt agaatgggga taaaaacatc agagggcaca 6240

ccagggtttc gtgcacctga agttgccaga ggaaatgtca tttataacca acaggctgat 6300

gtttattcat ttggtttact actctatgac attttgacaa ctggaggtag aatagtagag 6360

ggtttgaagt ttccaaatga gtttgatgaa ttagaaatac aaggaaaatt acctgatcca 6420

gttaaagaat atggttgtgc cccatggcct atggttgaga aattaattaa acagtgtttg 6480

aaagaaaatc ctcaagaaag gcctacttct gcccaggtct ttgacatttt gaattcagct 6540

gaattagtct gtctgacgag acgcatttta ttacctaaaa acgtaattgt tgaatgcatg 6600

gttgctacac atcacaacag caggaatgca agcatttggc tgggctgtgg gcacaccgac 6660

agaggacagc tctcatttct tgacttaaat actgaaggat acacttctga ggaagttgct 6720

gatagtagaa tattgtgctt agccttggtg catcttcctg ttgaaaagga aagctggatt 6780

gtgtctggga cacagtctgg tactctcctg gtcatcaata ccgaagatgg gaaaaagaga 6840

[0006]

```
catacctag aaaagatgac tgattctgtc acttgtttgt attgcaattc cttttccaag 6900
caaagcaaac aaaaaaattt tcttttggtt ggaaccgctg atggcaagtt agcaattttt 6960
gaagataaga ctgttaagct taaaggagct gctcctttga agatactaaa tataggaaat 7020
gtcagtactc cattgatgtg tttgagtgaa tccacaaatt caacggaaag aaatgtaatg 7080
tggggaggat gtggcacaaa gattttctcc ttttctaatg atttcaccat tcagaaactc 7140
attgagacaa gaacaagcca actgttttct tatgcagctt tcagtgattc caacatcata 7200
acagtggtgg tagacactgc tctctatatt gctaagcaaa atagccctgt tgtggaagtg 7260
tgggataaga aaactgaaaa actctgtgga ctaatagact gcgtgcactt tttaagggag 7320
gtaatggtaa aagaaaacaa ggaatcaaaa cacaaaatgt cttattctgg gagagtgaaa 7380
accctctgcc ttcagaagaa cactgctctt tggataggaa ctggaggagg ccatatttta 7440
ctcctggatc tttcaactcg tcgacttata cgtgtaattt acaacttttg taattcggtc 7500
agagtcatga tgacagcaca gctaggaagc cttaaaaatg tcatgctggt attgggctac 7560
aaccggaaaa atactgaagg tacacaaaag cagaaagaga tacaatcttg cttgaccgtt 7620
tgggacatca atcttccaca tgaagtgcaa aatttagaaa aacacattga agtgagaaaa 7680
gaattagctg aaaaaatgag acgaacatct gttgagtaag agagaaatag gaattgtctt 7740
tggataggaa aattattctc tcctcttgta aatatttatt ttaaaaatgt tcacatggaa 7800
agggtactca catttttga aatagctcgt gtgtatgaag gaatgttatt atttttaatt 7860
taaatatatg taaaaatact taccagtaaa tgtgtatttt aaagaactat ttaaaacaca 7920
atgttatatt tcttataaat accagttact ttcgttcatt aattaatgaa aataaatctg 7980
tgaagtacct aatttaagta ctcatactaa aatttataag gccgataatt ttttgttttc 8040
ttgtctgtaa tggaggtaaa ctttatttta aattctgtgc ttaagacagg actattgctt 8100
gtcgattttt ctagaaatct gcacggtata atgaaaatat taagacagtt tcccatgtaa 8160
tgtattcctt cttagattgc atcgaaatgc actatcatat atgcttgtaa atattcaaat 8220
gaatttgcac taataaagtc ctttgttggt atgtgaattc tctttgttgc tgttgcaaac 8280
agtgcatctt acacaacttc actcaattca aaagaaaact ccattaaaag tactaatgaa 8340
aaaacatgac atactgtcaa agtcctcata tctaggaaag acacagaaac tctctttgtc 8400
```

acagaaactc tctgtgtctt tcctagacat aatagagttg tttttcaact ctatgtttga 8460

atgtggatac cctgaatttt gtataattag tgtaaataca gtgttcagtc cttcaagtga 8520

tatttttatt tttttattca taccactagc tacttgtttt ctaatctgct tcattctaat 8580

gcttatattc atcttttccc taaatttgtg atgctgcaga tcctacatca ttcagataga 8640

aacctttttt tttttcagaa ttatagaatt ccacagctcc taccaagacc atgaggataa 8700

atatctaaca cttttcagtt gctgaaggag aaaggagctt tagttatgat ggataaaaat 8760

atctgccacc ctaggcttcc aaattatact taaattgttt acatagctta ccacaatagg 8820

agtatcaggg ccaaatacct atgtaataat ttgaggtcat ttctgcttta ggaaaagtac 8880

tttcggtaaa ttctttggcc ctgaccagta ttcattattt cagataattc cctgtgatag 8940

gacaactagt acatttaata ttctcagaac ttatggcatt ttactatgtg aaaactttaa 9000

atttatttat attaagggta atcaaattct taaagatgaa agattttctg tattttaaag 9060

gaagctatgc tttaacttgt tatgtaatta acaaaaaaat catatataat agagctcttt 9120

[0007] gttccagtgt tatctctttc attgttactt tgtatttgca atttttttta ccaaagacaa 9180

attaaaaaaa tgaataccat atttaaatgg aataataaag gttttttaaa aactttaaa 9239

<210> 2
<211> 9239
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
tttaaagttt ttaaaaaacc tttattattc catttaaata tggtattcat ttttttaatt 60

tgtctttggt aaaaaaaatt gcaaatacaa agtaacaatg aaagagataa cactggaaca 120

aagagctcta ttatatatga tttttttgtt aattacataa caagttaaag catagcttcc 180

tttaaaatac agaaaatctt tcatctttaa gaatttgatt acccttaata taaataaatt 240

taaagttttc acatagtaaa atgccataag ttctgagaat attaaatgta ctagttgtcc 300

tatcacaggg aattatctga aataatgaat actggtcagg gccaaagaat ttaccgaaag 360

tacttttcct aaagcagaaa tgacctcaaa ttattacata ggtatttggc cctgatactc 420

ctattgtggt aagctatgta aacaatttaa gtataatttg gaagcctagg gtggcagata 480

ttttatcca tcataactaa agctcctttc tccttcagca actgaaaagt gttagatatt 540

tatcctcatg gtcttggtag gagctgtgga attctataat tctgaaaaaa aaaaaggttt 600

ctatctgaat gatgtaggat ctgcagcatc acaaatttag ggaaaagatg aatataagca 660

ttagaatgaa gcagattaga aaacaagtag ctagtggtat gaataaaaaa ataaaaatat 720

cacttgaagg actgaacact gtatttacac taattataca aaattcaggg tatccacatt 780

caaacataga gttgaaaaac aactctatta tgtctaggaa agacacagag agtttctgtg 840

acaaagagag tttctgtgtc tttcctagat atgaggactt tgacagtatg tcatgttttt 900

tcattagtac ttttaatgga gttttctttt gaattgagtg aagttgtgta agatgcactg 960

tttgcaacag caacaaagag aattcacata ccaacaaagg actttattag tgcaaattca 1020

tttgaatatt tacaagcata tatgatagtg catttcgatg caatctaaga aggaatacat 1080

tacatgggaa actgtcttaa tattttcatt ataccgtgca gatttctaga aaaatcgaca 1140

agcaatagtc ctgtcttaag cacagaattt aaaataaagt ttacctccat tacagacaag 1200

[0008] aaaacaaaaa attatcggcc ttataaattt tagtatgagt acttaaatta ggtacttcac 1260

agatttattt tcattaatta atgaacgaaa gtaactggta tttataagaa atataacatt 1320

gtgttttaaa tagttcttta aaatacacat ttactggtaa gtatttttac atatatttaa 1380

attaaaaata ataacattcc ttcatacaca cgagctattt caaaaaatgt gagtaccctt 1440

tccatgtgaa catttttaaa ataaatattt acaagaggag agaataattt tcctatccaa 1500

agacaattcc tatttctctc ttactcaaca gatgttcgtc tcatttttc agctaattct 1560

tttctcactt caatgtgttt ttctaaattt tgcacttcat gtggaagatt gatgtcccaa 1620

acggtcaagc aagattgtat ctctttctgc ttttgtgtac cttcagtatt tttccggttg 1680

tagcccaata ccagcatgac atttttaagg cttcctagct gtgctgtcat catgactctg 1740

accgaattac aaaagttgta aattacacgt ataagtcgac gagttgaaag atccaggagt 1800

aaaatatggc ctcctccagt tcctatccaa agagcagtgt tcttctgaag gcagagggtt 1860

ttcactctcc cagaataaga cattttgtgt tttgattcct tgttttcttt taccattacc 1920

tcccttaaaa agtgcacgca gtctattagt ccacagagtt tttcagtttt cttatcccac 1980

acttccacaa cagggctatt ttgcttagca atatagagag cagtgtctac caccactgtt 2040

atgatgttgg aatcactgaa agctgcataa gaaaacagtt ggcttgttct tgtctcaatg 2100

agtttctgaa tggtgaaatc attagaaaag gagaaaatct ttgtgccaca tcctccccac 2160

attacatttc tttccgttga atttgtggat tcactcaaac acatcaatgg agtactgaca 2220

tttcctatat ttagtatctt caaaggagca gctcctttaa gcttaacagt cttatcttca 2280

aaaattgcta acttgccatc agcggttcca accaaaagaa aatttttttg tttgctttgc 2340

ttggaaaagg aattgcaata caaacaagtg acagaatcag tcatcttttc tagggtatgt 2400

ctctttttcc catcttcggt attgatgacc aggagagtac cagactgtgt cccagacaca 2460

atccagcttt ccttttcaac aggaagatgc accaaggcta agcacaatat tctactatca 2520

gcaacttcct cagaagtgta tccttcagta tttaagtcaa gaaatgagag ctgtcctctg 2580

tcggtgtgcc cacagcccag ccaaatgctt gcattcctgc tgttgtgatg tgtagcaacc 2640

atgcattcaa caattacgtt tttaggtaat aaaatgcgtc tcgtcagaca gactaattca 2700

gctgaattca aaatgtcaaa gacctgggca gaagtaggcc tttcttgagg attttctttc 2760

[0009]

aaacactgtt taattaattt ctcaaccata ggccatgggg cacaaccata ttctttaact 2820

ggatcaggta attttccttg tatttctaat tcatcaaact catttggaaa cttcaaaccc 2880

tctactattc tacctccagt tgtcaaaatg tcatagagta gtaaaccaaa tgaataaaca 2940

tcagcctgtt ggttataaat gacatttcct ctggcaactt caggtgcacg aaaccctggt 3000

gtgccctctg atgtttttat ccccattcta cagcagtact gagcaatgcc gtagtcagca 3060

atctttgcaa tgatggcagc attgggatac agtgtgaaaa gcagcacatt gtggggtttc 3120

aggtctcggt atataatcat ggctgagtgg aggtatctca aaccatcagc tacgtggagt 3180

gcaatcctgt gctgtagggt tctagtgagg ctggctttgt cctgctgaag caggcgatcc 3240

aaggaaccct tggaggctaa ctccatcacc aacatccggg gacgaatccc agctgccagc 3300

aaagatatca aactggggtg gtggaggtgg caaagcacca caagctcttg tcttaacagc 3360

ctgagtgatg tatgtttatt aaaaatcttc acagccactt cttctccttc ataggctgct 3420

cggtaaactg atccaaaact gccatcacct aggagaaact ctggagcttg ttcaaattcc 3480

aactcatcat tattcaacat aatatttcta ggcaggtcag ccaaaatcaa gtcaggggca 3540

atctgagata ttggaatggt gagccttggt tgatctggat ttactaagag atctccttcc 3600

tctgctttct tcatcaagtc atcaagtaag atttttgat gttcttcacc atcattaaaa 3660

ctatataatg cccatttctt caacagagtt tctccttcac cacaaatatc aatctccagc 3720

aacccaggaa accattcttc catgagagaa tcaatgtggt ccacaacttg gcccaaaaga 3780

atacagcctt ttctacaaga aggaactgta atttttaaga aactctctgg atgattgtct 3840

aagacttcag atcctaccag acaataagct tcaggagacc aatttaagta aatgccttgt 3900

cgccaataca ttctgtttgg gcgaagtgct cgttctctcc ctgaaagcat gtaaggtgaa 3960

atctcaagta atcgattgat taatcttgac caaaatccca ttggaaaata aggcatttca 4020

tatagtcgga tgataatttc agagttctca caatggggaa gctctatcac aggcctgtgg 4080

tcagacaaac tgcttggaac cagcaaatat tcttctccta ttggcaaagc aatctggaat 4140

ttttctagga gcttaaaata ctgtgacatg tagttctttg gaaatttcct ttttttgaa 4200

agaaattttt ccacatctct acgcgaaata atgcccttag ggtgttttgg acaaccttcc 4260

[0010] actttcactg tcaaaatctg tgccatgatt ttacaaagcc acttgggttc cacaaagtac 4320

aagtcactta actgcagtgc tgggtcttga aaatgaagaa ggactcctga ttcatttaga 4380

aagtgaactg cgtgaggaag ctcattttca tctaactgca gctgattttc tctcactagt 4440

tgtaataatc gtttccggtc aattacggga aattcaattg gcacattttt acgctccgat 4500

aaaatgattt tttcaagttc tacatagcag tctggaatca gctgtccaac aacaagctga 4560

tctcggatct tgaaattaag gctctcgttt atgatggttt tccgaagttt tgccaaagca 4620

tcagattcct cggtggcatt cacaaagtgg taatctcgta tggcagggaa ccctcgctta 4680

ttcaggagtt ccttggtgat tttactcatg caggctttgc gttgcttctc atcagaaaca 4740

tccaaatgtg tgccaacgag aatcacaggg gaagaagaag cgcgagcctt tatattgaag 4800

agccaaggct tcatggcatc aacttcagcc tgtcccttgc tgaggtcata gacagcaagg 4860

tacaatgctc gctgcgtcat aaaatgggga tgagtactat agaattcctc acgacctgca 4920

aaatcccaca catttaggac gagatctctc tttcttttgt ctcttatttg gataggccag 4980

tctttcacat ctatgccaac tgtggcactt tgcattccaa gatctgattt cttggttttc 5040

attaattgct gcaataaggt ggttttacca ctcccagtat ttcccacaat cataagtttc 5100

attcggttat aaggcacagc ctttttttaat cgctgttgaa gaaaccttat gatgtctttg 5160

gctttacatc ctatatgttt aaaatcaaag ttaagatgca gttcatccaa aggaagatcc 5220

catattttgc ttaatttccc catttcattg ggaaaggatc ttagttccaa gttgtaactg 5280

acatccagag atgtcagatt ttcaagacag ccaatctcag gaggaatctc tttcagttta 5340

ttgtgagaaa gatgcagttt ctctactcta gaccataaat atgctttttc actcaagtcc 5400

aagatgctga tctgattatg gctaaataag agttccctta agttcaaaga tttccagtgt 5460

gcgggacctg gtaggtactg aatatcattg ctgctcatat ctaaagaccg caagtgtgga 5520

agatttaaaa ttgcttctgg aatacaggaa aatttgttct gagataattt taggattgtc 5580

atagaaggag gcaagaaagg catagcagca agaaaattca ttctggcact gaaactctcc 5640

actttaggac aagcctcaag aaagttctct gatagggatg aaatgtggtt cttactaagg 5700

tttaaaatct tcagttcctt cagtctcaag ggggagcata tccctgatat tttatttcct 5760

tctaaaatga gctgctccag tttctctacc acatcagtga ggttctcagg tacaaaagac 5820

[0011]

agctggttat atgacaggtt aaactgtttc agagttggac atttcactgt aggatctaaa 5880

accactgagg gtccaatgtc atttcgagag acatcaagat tagcaataca actcattttc 5940

aacaaataag aaggaaatga tgtaaattta ttactgtgca agtccaaatg tgtcaaactc 6000

ttcagagttt cacatagctg ttgtggaaag ctcgtgagtg cattctggtg aagctccagc 6060

ttttcaagat gctccaaatg aacacttata cagcatttct ggcttagggc atcaatatct 6120

cttagttcat ttgctgaaag gtctagtgat gtaatatatt ctctctcaga agccagagaa 6180

gaaatgctgt ctgaatgcct catatgggat tgaagttttg atgacctgag tgaatcatct 6240

gaagataata tttttctttt tcgcttcagt aaatcttcat gatcaaaaat gggccccaag 6300

gaattggaat gtctttgcaa atttggtgag caacgctgta atacggcatc tcggtaaaat 6360

tctcctacac taattgaatt agatttcttt ttcacaagaa atgagccttc acttccttca 6420

ctatccaggt catcactttg agcaaacaca ctgtccatag aagagtcagg aataaaggtc 6480

cattcatcaa atttagacag cacatcttca gaaaaatttc catcgctgcc tgaggctgtt 6540

ccttcttcca cagcactttt catctgatat ctgatcacca ttcttgctag tgtagatgct 6600

atatttgttt gtttccttaa attagaagtc ttatctggaa ataaaggacc aagccaagaa 6660

ggttcaactt ttcctataca aaatcctcca aggcaaatgc tattgttggc cacatccagg 6720

gccagcctcc ttaagagcaa gctgatgatc tggctgtcac ctttcccaat gcttatcgtc 6780

aacgcttttc gtacatcttg ttcacgagat ccactattca gtaagagttc caccaatttg 6840

ggactgctct ctttctcaca tacctgacaa attaaagaag atccctcctt tgcttgattg 6900

gcatctgctc ccaatagaag caagcattca accatgatgc tgttattctg atcacacgct 6960

ctctctagca tcacattttt taagtaatca tccatagcta cttttgcaaa acacttgcaa 7020

cagaggttta gaaactgttg atccttttgt tccatgatat tggaagacat ttgatggaat 7080

attactaagt caaatgaatg atgcaccagc agcttagaaa aagatgctga caatttgagg 7140

attgctaaga ttgtctgaaa tcctttagtc tgtatttcag caacatcctt aaatcggtat 7200

aagctggaaa ccagaatttt tgccagcaga tgtccagttc ctatgaacac attcttcttt 7260

gtaatcaagt atcctataag acttaaaccc agacactgaa tttcttggtc atctggatac 7320

[0012] atctgcagtg tgtgaagcac tgaatccata gcaccttcca gggataacat ctctaatgca 7380

tcaggaaaat gtacaataga agaaattact tttaatccac atttctgaat cccaggattt 7440

ccaatgaacc tgttcaaagc tgctaggacc agtttgtgaa tatcattctt gaaacactgt 7500

tttttaacca tatttagctt atgatgaaat tctgtatcct ccctggattc ttctggcatg 7560

ccaggcacta taaaatgtaa aatagctcga agcgcctcca gctgcactgg taatgatgtc 7620

tcatgacgtt tcataactgt tagtattttg gggaccactg ctgccattat atccagggaa 7680

gtgttgcttc cttcaaaaag atgatttagc attttacagc cactttcagc cacttcagga 7740

gaatgtatat gcttctgcat taactccaaa acattcaggt gtattccttt tgataacagt 7800

atttttctga aattaacatt ttgttctaag agagttgaca atgcattcgc agatgcctgg 7860

aaaacttcct ttgatgaaga atgcatcagc atggagagca tcacttccct atgagctggg 7920

aaatggccat cttcatctcc aatcttctca tgtaaactgt tttggtacat aaggagatta 7980

tttagtgccc agcatgcggc ctcctgcacg tgcttgttct ttctatgcca cgttaatgct 8040

ttgtaacagg cttccagcca aaacaattta tcttcttccc cctcatcatc attctcttga 8100

ttctcattct tttcctctaa atcttgattt aagaaaatag tctcagtgag gagggccaaa 8160

cagctgagcg ctgagatctg caatgctgca ttctctgggt actgctgcac agctttcacc 8220

acaaactcat ggacttcgtt taataccagg atattgaaaa aattacctaa tgtaagccta 8280

tggagcaaac agcaactcac ttcttgaatt ctttcactca tagggaatgc tttcatagct 8340

tccaccacaa tattataaca cctgacattg ccactcatga ggacttccac attattgcaa 8400

ggaatcgcta gggaatgtaa acaatgcagc acatgaagca caatttcctc ttcatcttta 8460

aaatttgtta acgcacttaa caatatcata taatctttgt tctcaacaaa ttcagtcagt 8520

tgctcctctg agactctctc aaacagcaca tgtaaagctt tgcatccaag tttctggact 8580

tcatcattgg ctggaaatga gtgcatggca tcaaaaatta acatgaaaat atcactttct 8640

tcatccaata tcagcaaggt gattttacct gaagttagga ggagatctaa ggtcttcagt 8700

ccaatcactg acaagtttac actggcatta tgaactgtta gcattttaag aatcaattgg 8760

tgaacaccaa ggacttccca atcatttcca acatcctggg gtcccattaa gctttgcatt 8820

[0013] gtacctggac agacttctat taatttgcac agaagtgacc aacccacctg ctgcacactc 8880

gcgactctca tataggagtc caagacgatc aacagaggca catggatatt tttgccttga 8940

aataacttgg aggcgcgctc ggagtacgtg aacaccagca gatcctccag gatttggacc 9000

agcgtttcta tctgttttcc ttcctggaca ttgttcagcc tgactatcaa cttcttcaga 9060

gtttcctcgt cctcttcgca cccctgacag ctgccactag ccatggtggc acctgcttcc 9120

aacccgccgc cctcccagca tgaacgtccg ctgctcaggg aaccggcagg ggcgccggcc 9180

acagctcccc gggggcgagc tcagctcacc gcccgcagcc agcgctcccc gcgggcccc 9239

<210> 3
<211> 8617
<212> DNA
<213> 恒河猴

<400> 3
acgggcacgg tcatcccggc caggcccggc tccagcagcc ccacggccgc cgccgaagtt 60

ctgcgcggcc cgtcgccccg gcggagcctc tggcaggccc ctgagctggt tttttggggc 120

ctggctgggg gaggaggaag ccgagcagga gggctctgga gagggagggc aacgcggggc 180

ggggagccac cgccttcctc ataaacaggc gggcgtgggc gccgacgggg cccccgggga 240

gccctggctg agggcggtga gctgagctag atcccgggga gctgtggccg gcgcccctgc 300

cggttccctg agcagcggac gttcgtgctg ggagggcggc gggttggaag caggggccac 360

catggctagt ggcagctgtc aggggtgcga ggaggacgag gaaactctga agaagttgat 420

agtcaggctg aacaatgtcc aggaaggtaa acagatagaa acgctggtcc aaatcctgga 480

ggatctgctg gtgttcacgt actccgagca cgcctccaag ttatttcaag gcaaaaatat 540

ccatgtgcct ctgttgatcg tcttggactc gtatatgaga gtcgcgagtg tgcagcaggt 600

gggttggtca cttctgtgca aattaataga aatctgcccg ggtacaatgc aaagcttaat 660

gggacccccag gatgttggaa atgattggga agtccttggt gttcaccaat tgattcttaa 720

aatgctaaca gttcataatg ccagtgtaaa cttgtcaatg attggactga agaccttaga 780

tctcctccta acttcaggta aaatcacctt actgatattg gatgaagaaa gtgatatttt 840

catgttaatt tttgatgcca tgcactcatt tccagccaat gatgaaatcc agaaacttgg 900

atgcaaagct ttacatgtgc tgtttgaaag agtctcagag gagcaactaa ctgaatttgt 960

[0014]

tgagaacaaa gattatatga tattgttaag tgcgttaaca aattttaaag atgaagagga 1020

aattgtgctt catgtactgc attgtttaca ttccctagca attccttgca ataatgtgga 1080

agtcctcatg agtggcaatg tcaggtgtta taatattgtg gtggaagcta tgaaagcatt 1140

ccctatcagt gaaaaaattc aagaagtgag ttgctgtttg ctccataggc ttacattagg 1200

taatttttttt aatatcctgg tattaaacga agtccatgaa tttgtggtga aagctgtgca 1260

gcggtaccca gagaacgcag cattacagat ctcagcgctc agctgtttgg ccctcctcac 1320

tgagaccatt ttcttaaatc aagatttaga ggaaaagaat gagaatcaag agaatgatga 1380

tgaggggggaa gaagttaaat tgttttggct ggaagcctgt tacaaagcgt taacgtggca 1440

tagaaagaac aagcacgtgc aggaggctgc atgctgggca ctaaataatc tccttatgta 1500

ccaaaacagt ttacatgaga agattggaga tgaagatggc catttcccag ctcataggga 1560

agtgatgctg tccatgctga tgcattcatc atcaaaggaa gttttccagg catctgctaa 1620

tgcattgtca actcttttag aacaaaatgt taatttcaga aaaatcctgt tatcaaaagg 1680

aatatacctg aatgttttgg agttaatgca gaagcatata cattctcctg aagtggctga 1740

aagtggctgt aaaatgctaa atcatctttt tgaaggaagc aacacatccc tggatacaat 1800

ggcagcagtg ctccccaaaa taataacagt tatgaaaagt catgagacat cattaccagt 1860

gcagctggag gcgcttcgag ctattttaca ttttatagtg ccaggcatgc cagaagaatc 1920

cagagaggat gcagaatctc atcgtaagct aaatatggtt aaaaaacagt gtttcaagaa 1980

tgatattcac aaactggtcc tagcagcttt gaacaggttc attggaaatc ctgggattca 2040

gaaatgtgga ttaaaagtaa tttcttttat tgcacatttt actgatgcat taggggtgtt 2100

atccctggaa ggtgctgtgg attcagtgct tcacacactg cagatgtatc cagatgacca 2160

agaaattcag tgtctgggtt taagtcttat aggatgcttg attacaaaga agaatttatg 2220

cataggaact ggacatctgc tggcaaaaat tctggcttcc agcttatacc gatttaagga 2280

tgttgctgaa gtacagactg aaggatttca gacaatctta gcaatcctca aattgtcagc 2340

atctttttct aagctgctgg tgcatcattc gtttgactta gtaatattcc atcaaatgtc 2400

ttccagtatc atggaacaaa aggatcaaca gtttctaaac ctctgttgca agtgttttgc 2460

[0015] aaaagtagct atggatgatg acttaaaaaa tatgatgcta gagagagcgt gtgatcagaa 2520

taacagcatc atggttgaat gcttgcttct attaggagca gatgccaatc aagcaaagga 2580

gggaacttct ttaatttgtc aggtatgtga gaaagagagc agtcccaaat tggtggaact 2640

cttattgaat agtggatctc gtgaacaaga tgtacgaaaa gcgctgacaa taagcattgg 2700

gaaaggcgac agccagatca tcagcttgct cttaaggagg ctggccctgg acatggccaa 2760

caatagcatt tgccttggag ggttttgtat aggaaaagtt gaaccttctt ggcttggtcc 2820

tttatttcca gataagactt ctaatttaag gaaacaaaca aatatagcat ctacactagc 2880

aagaatggtg atcagatatc agatgaaaag tgccatggaa gaaggagcag cctcaggcag 2940

tgatggaaat ttttctgaag atgtgctgtc taaatttgat gaatggacct ttattcctga 3000

ctcttctatg gacagtgtct ttgctcaaag tgatgatcta gatagtgaag gaagtgaagg 3060

ctcatttctt gtgaaaaaga aatcaaattc aattagtgta ggagaatttt accgagatgc 3120

cgtattacaa cgttgctcac caaatttgca aaggcattcc agttccttgg ggcccatttt 3180

tgatcatgaa gatttactga gaagaaaaag aaaaatatta tcttcagatg attcactcag 3240

gtcatcaaaa cttcaatccc atatgaggca ttcagacagc atttcttctc tggcttctga 3300

gagagaatat attacatcac tagacctttc agcaaatgaa ctaagagata ttgatgccct 3360

aagccagaaa tcctgtataa gtggtcattt ggagcatctt gaaaagctgg agcttcacca 3420

gaatgcactc acgagctttc cacaacagct atgtgaaact ctgaagagtt tgacacattt 3480

ggacttgcac agtaataaat ttacatcatt tccttcttac ttgttgaaaa tgagttgtgt 3540

tgctaacctt gatgtctctc gaaatgacat tggaccctca gtggttttag atcctgcagt 3600

gaaatgtcca actctgaaac agtttaacct gtcatataac cagctgtctt ctgttcctga 3660

gaaccttgct gatgggatag agaaactgga gcagctcatt ttagaaggaa ataaaatatc 3720

agggatatgc tccccttga gactgaagga actgaagatt ttaaacctta gtaaaaacca 3780

catttcatcc ctatcagaga actttcttga ggcttgtcct aaagtggaga gtttcagtgc 3840

cagaatgaat tttcttgctg ctatgccttt cttgcctcct tccatgacaa gcctaaaatt 3900

atctcaaaac aaatttacat gtattccaga agcaatttta aatcttccac acttgcggtc 3960

tttagatatg agcagcaatg atattcaata tctaccaggt cctgcacact ggaaatcttt 4020

[0016]

gaacttaagg gaactcttat ttagccataa tcagatcagc atcttggact tgagtgaaaa 4080

agcgtattta tggtctagag tagagaaact gcatctttct cacaataaac tgaaagagat 4140

tcctcctgag attggctgtc ttgaaaatct gacatctctg gatgtcagtt acaacttgga 4200

actaagatcc tttcccaatg aaatggggaa attaagcaaa atatgggatc ttcctttgga 4260

tgaactgcgt cttaactttg attttaaaca tataggatgt aaagccaaag acatcataag 4320

gtttcttcag cagcggttaa aaaaggctgt gccctataac cgaatgaaac ttatggttgt 4380

tggaaatact gggagtggta aaaccacctt gttgcagcaa ttaatgaaaa ccaagaaatc 4440

agatcttgga atgcaaagtg ccacagttgg catagatgtg aaagactggc ctatccaaat 4500

aagaggcaaa agaaagagag atctcgttct gaatgtgtgg gattttgcag gtcgtgagga 4560

attctatagc actcatcctc attttatgac gcagcgagca ttgtaccttg ctgtctatga 4620

ccttagcaaa ggacaggctg aagttgatgc catgaagcct tggctcttca atataaaggc 4680

tcgcgcttct tcttcccctg tgattctcgt tggcacacat ttggatgttt ctgatgagag 4740

gcagcgcaaa gcctgcatag gtaaaatcac caaggaactc ctgaataagc gagggttccc 4800

tgctatacga gattaccact ttgtgaatgc caccgaggaa tctgatgctt tggcaaaact 4860

tcggaaaacc atcataaacg agagccttaa tttcaagatc cgagatcagc ctgttgttgg 4920

acagctgatt ccagactgct atgtagaact tgagaaaatc attttatcgg agcgtaaaaa 4980

tgtgccaatt gaatttcctg taattgacca gaaacgatta ttacaactag tgagagaaaa 5040

tcagttgcag ttagatgaaa atgagcttcc tcacgcagtt cactttctaa atgaatcagg 5100

agtccttctt cattttcaag acccagcact gcagttaagt gacttgtatt ttgtggaacc 5160

caagtggctt tgtaaaatca tggcacagat tttgacagtg aaagtggaag gttgtccaaa 5220

acaccctaag ggaattattt cacgtagaga tgtggaaaaa tttctttcga agaaaaggag 5280

atttccaaag aactacatgt cacagtattt taagctccta gaaaaattcc agattgcttt 5340

gccaatagga gaagaatatt tgctggttcc aagcagtttg tctgaccaca ggcctgtgat 5400

agagcttccc cattgtgaga actctgaaat tatcatccga ctatatgaaa tgccttattt 5460

tccaatggga ttttggtcga ggttaatcaa tcgattactt gagatttcac cttacatgct 5520

[0017] ttcagggaga gaacgagcac ttcgcccaaa cagaatgtat tggcgacaag gcatctactt 5580

aaattggtct cctgaagctt attgtctggt aggatctgaa gtcttagaca atcacccaga 5640

gagtttctta aaaattacag ttccttcttg tagaaaaggc tgtattcttt tgggccaagt 5700

tgtggaccac attgattctc tcatggagga atggtttcct gggttgctgg agattgatat 5760

ttgtggtgaa ggagaaactc tgttgaagaa atgggcatta tatagtttta atgatggtga 5820

agagcatcaa aaaatcttac ttgatgactt gatgaagaaa gcagaggaag gagatctctt 5880

agtaaatcca gatcaaccaa ggctcaccat tccaatatct cagattgccc ctgacttgat 5940

tttggctgac ctgcctagaa atattatgtt gaataatgat gagctggaat ttgaacaagc 6000

tccagagttt ctcctaggtg atggcagttt tggatcagtt tatcgagcag cctatgaagg 6060

agaagaagtg gctgtgaaga tttttaataa acacacatca cttaggctgt taagacaaga 6120

gctggtggtg ctttgccacc tccaccaccc cagtttgata tctttgctgg cagctggtat 6180

tcgtccccgg atgttggtga tggagttagc ctccaagggt tccttggatc gcctgcttca 6240

gcaggacaaa gccagcctca ctagaaccct acagcacagg attgcactcc atgtggctga 6300

tggtttgaga tacctccatt cagccatgat tatataccga gacttgaagc cccacaatgt 6360

gctgcttttc acactgtatc ccaatgctgc catcattgca aagattgctg actacggcat 6420

tgctcagtac tgctgtagaa tggggataaa aacgtcagag ggcacaccag ggtttcgtgc 6480

acctgaagtt gccagaggaa atgtcattta taatcaacaa gctgatgttt attcatttgg 6540

tttgctactc tatgacattt tgacaactgg aggtagaata gtagagggtt tgaagtttcc 6600

aaatgagttt gatgaattag caatacaagg aaaattacct gatccagtta aagaatatgg 6660

ttgtgcccca tggcctatgg ttgagaaatt aattacaaag tgtttgaaag aaaatcctca 6720

agaaaggcct acttctgccc aggtctttga cattttgaat tcagctgaat tagtctgtct 6780

gacgagacac attttattac ctaaaaacgt aattgttgac tgcatggttg ctacacatca 6840

caacagcagg aatgcaagca tttggctggg ctgtgggcac accaacagag gacagctctc 6900

atttcttgac ttaaatactg aaggatacac ttctgaggag gttgctgata gtagaatatt 6960

gtgcttagcc ttggtgcatc ttcctgttca aaaagaaagc tggattgtgt ccgggacaca 7020

gtctggtact ctcctggtca tcaataccga agatgggaaa aagagacata ccctagaaaa 7080

[0018]

gatgactgat tccatcactt gtttgtattg caattccttt tccaagcaaa gcaaacaaaa 7140

aaattttctt ttggttggaa ccgctgatgg caatttagca atttttgaag ataaaactgt 7200

taagcttgaa ggagctgctc ctttgaagat actaaatata ggaaatgtca gtactccatt 7260

gatgtgtttg agtgaatcca caaattcaac agaaagaaat gtaatgtggg gaggatgtgg 7320

cacaaagatt ttctcctttt ctaatgattt caccattcag aaactcattg agacaagaac 7380

aagccaactg ttctcaagtg attctaaagt atattcgagg ttaagatata ctgcagactg 7440

caatgtattg ttttcttacg cagctttcag tgattccaac atcgtaacag tggtggtaga 7500

cactgttctc tatattgcta agaaaaatag ccctgttgtg gaagtgtggg ataagaaaac 7560

tgaaaaactc tgcgaactaa tagactgtgt gcatttttta agggaggtaa tggtaaaagt 7620

aaacaaggaa tcaaaacaca aaatgtctta ttctgggaga gtgaaagctc tctgccttca 7680

gaagaacact gctctttgga taggaactgg aggaggccat attttactcc tggatctttc 7740

aactcgtcga gttatacgta taatttacaa cttttgtgat tcggtcagag tcatgatgac 7800

agcacagcta gggagcctta aaaatgtcat gctggtattg ggctataacc ggaaaagtac 7860

tgaaggtaca caacagcaga aagagataca atcttgcttg actgtttggg acatcaatct 7920

tccacatgaa gtgcaaaatt tagaaaaaca cattgaagtg agaaaagaat tagctgaaaa 7980

aatgagagga acatctattg aataagagag aaacaggaat tgtctttgga taggaaaatt 8040

attctcttgt aaatatttat ttaaaaatgt tcacatgaaa agggtactca catttttga 8100

aatagctcat gtgtatatga aggaatgtta tatttttaat ttaaatatat gtaaaaatac 8160

ttaccagtaa acatatattt taaagaacta tttaaaacac aatgttgtat ttcttatgaa 8220

taccagttac ttttgtgcat taattaatga aaataaatct gtgaaatacc taatttaagt 8280

actcatacta aaatttataa ggccgataat tttttgtttt cttgtctgta atgaagataa 8340

actttatttt aaattctatg cttaagacaa gactattgct tgttgatttt tctagaaatc 8400

cgcaaggtag aatgaaaata ttaagacagt ttcccgtgta atgtattccc tcttagattg 8460

ctttgaaatg cactatcata tatgcttgca aatattcaaa tgaatttgca ctaataaatt 8520

cctttgttgg tatgtgaatt ctctttgttg ctgttgcaga cagtgcatct tacacaactt 8580

[0019] cactcaatcc aaaagaaaac tccattaaaa gtactaa 8617

<210> 4
<211> 8617
<212> DNA
<213> 恒河猴

<400> 4
ttagtacttt taatggagtt ttcttttgga ttgagtgaag ttgtgtaaga tgcactgtct 60

gcaacagcaa caaagagaat tcacatacca acaaaggaat ttattagtgc aaattcattt 120

gaatatttgc aagcatatat gatagtgcat ttcaaagcaa tctaagaggg aatacattac 180

acgggaaact gtcttaatat tttcattcta ccttgcggat ttctagaaaa atcaacaagc 240

aatagtcttg tcttaagcat agaatttaaa ataaagttta tcttcattac agacaagaaa 300

acaaaaaatt atcggcctta taaattttag tatgagtact taaattaggt atttcacaga 360

tttattttca ttaattaatg cacaaaagta actggtattc ataagaaata caacattgtg 420

ttttaaatag ttctttaaaa tatatgttta ctggtaagta tttttacata tatttaaatt 480

aaaaatataa cattccttca tatacacatg agctatttca aaaaatgtga gtacccttt 540

catgtgaaca tttttaaata aatatttaca agagaataat tttcctatcc aaagacaatt 600

cctgtttctc tcttattcaa tagatgttcc tctcattttt tcagctaatt cttttctcac 660

ttcaatgtgt ttttctaaat tttgcacttc atgtggaaga ttgatgtccc aaacagtcaa 720

gcaagattgt atctctttct gctgttgtgt accttcagta cttttccggt tatagcccaa 780

taccagcatg acatttttaa ggctccctag ctgtgctgtc atcatgactc tgaccgaatc 840

acaaaagttg taaattatac gtataactcg acgagttgaa agatccagga gtaaaatatg 900

gcctcctcca gttcctatcc aaagagcagt gttcttctga aggcagagag ctttcactct 960

cccagaataa gacattttgt gttttgattc cttgtttact tttaccatta cctcccttaa 1020

aaaatgcaca cagtctatta gttcgcagag tttttcagtt ttcttatccc acacttccac 1080

aacagggcta tttttcttag caatatagag aacagtgtct accaccactg ttacgatgtt 1140

ggaatcactg aaagctgcgt aagaaaacaa tacattgcag tctgcagtat atcttaacct 1200

cgaatatact ttagaatcac ttgagaacag ttggcttgtt cttgtctcaa tgagtttctg 1260

[0020] aatggtgaaa tcattagaaa aggagaaaat ctttgtgcca catcctcccc acattacatt 1320

tctttctgtt gaatttgtgg attcactcaa acacatcaat ggagtactga catttcctat 1380

atttagtatc ttcaaaggag cagctccttc aagcttaaca gttttatctt caaaaattgc 1440

taaattgcca tcagcggttc caaccaaaag aaaatttttt tgtttgcttt gcttggaaaa 1500

ggaattgcaa tacaaacaag tgatggaatc agtcatcttt tctagggtat gtctcttttt 1560

cccatcttcg gtattgatga ccaggagagt accagactgt gtcccggaca caatccagct 1620

ttctttttga acaggaagat gcaccaaggc taagcacaat attctactat cagcaacctc 1680

ctcagaagtg tatccttcag tatttaagtc aagaaatgag agctgtcctc tgttggtgtg 1740

cccacagccc agccaaatgc ttgcattcct gctgttgtga tgtgtagcaa ccatgcagtc 1800

aacaattacg tttttaggta ataaaatgtg tctcgtcaga cagactaatt cagctgaatt 1860

caaaatgtca aagacctggg cagaagtagg cctttcttga ggattttctt tcaaacactt 1920

tgtaattaat ttctcaacca taggccatgg ggcacaacca tattctttaa ctggatcagg 1980

taattttcct tgtattgcta attcatcaaa ctcatttgga aacttcaaac cctctactat 2040

tctacctcca gttgtcaaaa tgtcatagag tagcaaacca aatgaataaa catcagcttg 2100

ttgattataa atgacatttc ctctggcaac ttcaggtgca cgaaaccctg gtgtgccctc 2160

tgacgttttt atccccattc tacagcagta ctgagcaatg ccgtagtcag caatctttgc 2220

aatgatggca gcattgggat acagtgtgaa aagcagcaca ttgtggggct tcaagtctcg 2280

gtatataatc atggctgaat ggaggtatct caaaccatca gccacatgga gtgcaatcct 2340

gtgctgtagg gttctagtga ggctggcttt gtcctgctga agcaggcgat ccaaggaacc 2400

cttggaggct aactccatca ccaacatccg gggacgaata ccagctgcca gcaaagatat 2460

caaactgggg tggtggaggt ggcaaagcac caccagctct tgtcttaaca gcctaagtga 2520

tgtgtgttta ttaaaaatct tcacagccac ttcttctcct tcataggctg ctcgataaac 2580

tgatccaaaa ctgccatcac ctaggagaaa ctctggagct tgttcaaatt ccagctcatc 2640

attattcaac ataatatttc taggcaggtc agccaaaatc aagtcagggg caatctgaga 2700

tattggaatg gtgagccttg gttgatctgg atttactaag agatctcctt cctctgcttt 2760

cttcatcaag tcatcaagta agatttttg atgctcttca ccatcattaa aactatataa 2820

[0021]

tgcccatttc ttcaacagag tttctccttc accacaaata tcaatctcca gcaacccagg 2880

aaaccattcc tccatgagag aatcaatgtg gtccacaact tggcccaaaa gaatacagcc 2940

ttttctacaa gaaggaactg taatttttaa gaaactctct gggtgattgt ctaagacttc 3000

agatcctacc agacaataag cttcaggaga ccaatttaag tagatgcctt gtcgccaata 3060

cattctgttt gggcgaagtg ctcgttctct ccctgaaagc atgtaaggtg aaatctcaag 3120

taatcgattg attaacctcg accaaaatcc cattggaaaa taaggcattt catatagtcg 3180

gatgataatt tcagagttct cacaatgggg aagctctatc acaggcctgt ggtcagacaa 3240

actgcttgga accagcaaat attcttctcc tattggcaaa gcaatctgga atttttctag 3300

gagcttaaaa tactgtgaca tgtagttctt tggaaatctc cttttcttcg aaagaaattt 3360

ttccacatct ctacgtgaaa taattccctt agggtgtttt ggacaacctt ccactttcac 3420

tgtcaaaatc tgtgccatga ttttacaaag ccacttgggt tccacaaaat acaagtcact 3480

taactgcagt gctgggtctt gaaaatgaag aaggactcct gattcattta gaaagtgaac 3540

tgcgtgagga agctcatttt catctaactg caactgattt tctctcacta gttgtaataa 3600

tcgtttctgg tcaattacag gaaattcaat tggcacattt ttacgctccg ataaaatgat 3660

tttctcaagt tctacatagc agtctggaat cagctgtcca acaacaggct gatctcggat 3720

cttgaaatta aggctctcgt ttatgatggt tttccgaagt tttgccaaag catcagattc 3780

ctcggtggca ttcacaaagt ggtaatctcg tatagcaggg aaccctcgct tattcaggag 3840

ttccttggtg attttaccta tgcaggcttt gcgctgcctc tcatcagaaa catccaaatg 3900

tgtgccaacg agaatcacag gggaagaaga agcgcgagcc tttatattga agagccaagg 3960

cttcatggca tcaacttcag cctgtccttt gctaaggtca tagacagcaa ggtacaatgc 4020

tcgctgcgtc ataaaatgag gatgagtgct atagaattcc tcacgacctg caaaatccca 4080

cacattcaga acgagatctc tctttctttt gcctcttatt tggataggcc agtctttcac 4140

atctatgcca actgtggcac tttgcattcc aagatctgat ttcttggttt tcattaattg 4200

ctgcaacaag gtggttttac cactcccagt atttccaaca accataagtt tcattcggtt 4260

atagggcaca gccttttta accgctgctg aagaaacctt atgatgtctt tggctttaca 4320

[0022] tcctatatgt ttaaaatcaa agttaagacg cagttcatcc aaaggaagat cccatatttt 4380

gcttaatttc cccatttcat tgggaaagga tcttagttcc aagttgtaac tgacatccag 4440

agatgtcaga ttttcaagac agccaatctc aggaggaatc tctttcagtt tattgtgaga 4500

aagatgcagt ttctctactc tagaccataa atacgctttt tcactcaagt ccaagatgct 4560

gatctgatta tggctaaata agagttccct taagttcaaa gatttccagt gtgcaggacc 4620

tggtagatat tgaatatcat tgctgctcat atctaaagac cgcaagtgtg gaagatttaa 4680

aattgcttct ggaatacatg taaatttgtt ttgagataat tttaggcttg tcatggaagg 4740

aggcaagaaa ggcatagcag caagaaaatt cattctggca ctgaaactct ccactttagg 4800

acaagcctca agaaagttct ctgataggga tgaaatgtgg tttttactaa ggtttaaaat 4860

cttcagttcc ttcagtctca agggggagca tatccctgat attttatttc cttctaaaat 4920

gagctgctcc agtttctcta tcccatcagc aaggttctca ggaacagaag acagctggtt 4980

atatgacagg ttaaactgtt tcagagttgg acatttcact gcaggatcta aaaccactga 5040

gggtccaatg tcatttcgag agacatcaag gttagcaaca caactcattt tcaacaagta 5100

agaaggaaat gatgtaaatt tattactgtg caagtccaaa tgtgtcaaac tcttcagagt 5160

ttcacatagc tgttgtggaa agctcgtgag tgcattctgg tgaagctcca gcttttcaag 5220

atgctccaaa tgaccactta tacaggattt ctggcttagg gcatcaatat ctcttagttc 5280

atttgctgaa aggtctagtg atgtaatata ttctctctca gaagccagag aagaaatgct 5340

gtctgaatgc ctcatatggg attgaagttt tgatgacctg agtgaatcat ctgaagataa 5400

tatttttctt tttcttctca gtaaatcttc atgatcaaaa atgggcccca aggaactgga 5460

atgcctttgc aaatttggtg agcaacgttg taatacggca tctcggtaaa attctcctac 5520

actaattgaa tttgatttct ttttcacaag aaatgagcct tcacttcctt cactatctag 5580

atcatcactt tgagcaaaga cactgtccat agaagagtca ggaataaagg tccattcatc 5640

aaatttagac agcacatctt cagaaaaatt tccatcactg cctgaggctg ctccttcttc 5700

catggcactt ttcatctgat atctgatcac cattcttgct agtgtagatg ctatatttgt 5760

ttgtttcctt aaattagaag tcttatctgg aaataaagga ccaagccaag aaggttcaac 5820

ttttcctata caaaaccctc caaggcaaat gctattgttg gccatgtcca gggccagcct 5880

[0023]

ccttaagagc aagctgatga tctggctgtc gcctttccca atgcttattg tcagcgcttt 5940

tcgtacatct tgttcacgag atccactatt caataagagt tccaccaatt tgggactgct 6000

ctctttctca catacctgac aaattaaaga agttccctcc tttgcttgat tggcatctgc 6060

tcctaataga agcaagcatt caaccatgat gctgttattc tgatcacacg ctctctctag 6120

catcatattt tttaagtcat catccatagc tacttttgca aaacacttgc aacagaggtt 6180

tagaaactgt tgatcctttt gttccatgat actggaagac atttgatgga atattactaa 6240

gtcaaacgaa tgatgcacca gcagcttaga aaaagatgct gacaatttga ggattgctaa 6300

gattgtctga aatccttcag tctgtacttc agcaacatcc ttaaatcggt ataagctgga 6360

agccagaatt tttgccagca gatgtccagt tcctatgcat aaattcttct ttgtaatcaa 6420

gcatcctata agacttaaac ccagacactg aatttcttgg tcatctggat acatctgcag 6480

tgtgtgaagc actgaatcca cagcaccttc cagggataac acccctaatg catcagtaaa 6540

atgtgcaata aaagaaatta cttttaatcc acatttctga atcccaggat ttccaatgaa 6600

cctgttcaaa gctgctagga ccagtttgtg aatatcattc ttgaaacact gtttttttaac 6660

catatttagc ttacgatgag attctgcatc ctctctggat tcttctggca tgcctggcac 6720

tataaaatgt aaaatagctc gaagcgcctc cagctgcact ggtaatgatg tctcatgact 6780

tttcataact gttattattt tggggagcac tgctgccatt gtatccaggg atgtgttgct 6840

tccttcaaaa agatgattta gcattttaca gccactttca gccacttcag gagaatgtat 6900

atgcttctgc attaactcca aaacattcag gtatattcct tttgataaca ggatttttct 6960

gaaattaaca ttttgttcta aaagagttga caatgcatta gcagatgcct ggaaaacttc 7020

ctttgatgat gaatgcatca gcatggacag catcacttcc ctatgagctg ggaaatggcc 7080

atcttcatct ccaatcttct catgtaaact gttttggtac ataaggagat tatttagtgc 7140

ccagcatgca gcctcctgca cgtgcttgtt ctttctatgc cacgttaacg ctttgtaaca 7200

ggcttccagc caaaacaatt taacttcttc cccctcatca tcattctctt gattctcatt 7260

cttttcctct aaatcttgat ttaagaaaat ggtctcagtg aggagggcca aacagctgag 7320

cgctgagatc tgtaatgctg cgttctctgg gtaccgctgc acagctttca ccacaaattc 7380

[0024] atggacttcg tttaatacca ggatattaaa aaaattacct aatgtaagcc tatggagcaa 7440

acagcaactc acttcttgaa ttttttcact gatagggaat gctttcatag cttccaccac 7500

aatattataa cacctgacat tgccactcat gaggacttcc acattattgc aaggaattgc 7560

tagggaatgt aaacaatgca gtacatgaag cacaatttcc tcttcatctt taaaatttgt 7620

taacgcactt aacaatatca tataatcttt gttctcaaca aattcagtta gttgctcctc 7680

tgagactctt tcaaacagca catgtaaagc tttgcatcca agtttctgga tttcatcatt 7740

ggctggaaat gagtgcatgg catcaaaaat taacatgaaa atatcacttt cttcatccaa 7800

tatcagtaag gtgattttac ctgaagttag gaggagatct aaggtcttca gtccaatcat 7860

tgacaagttt acactggcat tatgaactgt tagcatttta agaatcaatt ggtgaacacc 7920

aaggacttcc caatcatttc caacatcctg gggtcccatt aagctttgca ttgtacccgg 7980

gcagatttct attaatttgc acagaagtga ccaacccacc tgctgcacac tcgcgactct 8040

catatacgag tccaagacga tcaacagagg cacatggata tttttgcctt gaaataactt 8100

ggaggcgtgc tcggagtacg tgaacaccag cagatcctcc aggatttgga ccagcgtttc 8160

tatctgttta ccttcctgga cattgttcag cctgactatc aacttcttca gagtttcctc 8220

gtcctcctcg cacccctgac agctgccact agccatggtg gcccctgctt ccaacccgcc 8280

gccctcccag cacgaacgtc cgctgctcag ggaaccggca ggggcgccgg ccacagctcc 8340

ccgggatcta gctcagctca ccgccctcag ccagggctcc ccgggggccc cgtcggcgcc 8400

cacgcccgcc tgtttatgag gaaggcggtg gctccccgcc ccgcgttgcc ctccctctcc 8460

agagccctcc tgctcggctt cctcctcccc cagccaggcc ccaaaaaacc agctcagggg 8520

cctgccagag gctccgccgg ggcgacgggc cgcgcagaac ttcggcggcg gccgtggggc 8580

tgctggagcc gggcctggcc gggatgaccg tgcccgt 8617

<210> 5
<211> 8231
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 5
gagcagctct gagagcagga gccgtcccag ctcgccgcag tccccgccgg ctgcaccatg 60

[0025]

gccagtggcg cctgtcaggg ctgcgaagag gaagaggagg aggaggctct gaagaagttg 120

atagtcaggc tgaataatgt ccaggaaggc aagcagatcg agacgttgct tcagctcctg 180

gaggacatgc tggtgttcac ctactcggac cgcgcctcca agttatttga agataaaaat 240

ttccacgtgc ctctgttgat tgtcctggac tcctacatga gagttgccag tgtacagcag 300

gcggggtggt cacttctgtg caaattaata gaagtctgtc cagggacatt gcaaagctta 360

ataggacccc aggatattgg aaatgattgg gaagtccttg gtattcaccg gctgattctt 420

aaaatgttaa ctgttcatca cgccaatgta aacctgtcaa tagttggact aaaagccttg 480

gatctcctcc tagattcagg taaactcacc ttgctgatac tggatgaaga atgtgatatt 540

ttcttgttaa tttttgatgc catgcacaga tattcagcca atgatgaagt ccaaaaactg 600

ggatgcaaag ctttacacgt gctttttgag agagtttccg aggaacagct gactgagttt 660

gtggagaaca aagattacac gatactgctg agtacgttcg gcagcttcag aagggacaag 720

gagattgtgt accacgtact ttgctgcttg cattccctgg cggttacatg cagcaatgta 780

gaggtcctca tgagtgggaa tgtccggtgc tacaatcttg tggtggaggc catgaaagcc 840

ttccccacca atgaaaacat ccaagaggtg agctgctcct tgttccagaa gcttacatta 900

ggtaactttt tcaacatcct ggtgttgaac gaagtgcatg tctttgtggt gaaagcggtc 960

cgacagtatc ctgagaacgc agccttacag atctctgcac tcagctgttt agcactcctc 1020

actgagacta ttttcttaaa ccaagacttg gaggaaagaa gtgagactca agagcagagc 1080

gaagaggaag acagtgagaa gcttttctgg ctggaaccct gctataaagc cctggtgcgc 1140

catcgaaagg acaaacacgt gcaggaggct gcctgctggg cactaaataa cctccttatg 1200

taccagaaca gtttgcatga gaagatcgga gatgaagatg gccagttccc tgcgcacagg 1260

gaagtgatgc tgtctatgct gatgcactct tcttccaaag atgtcttcca agcagctgca 1320

catgctctgt ccactctctt ggaacaaaat gttaatttca ggaaaatcct gctggcaaaa 1380

ggagtatacc tgaatgtctt ggaattgatg cagaagcatg cccatgcgcc tgaggtggca 1440

gagagtggct gcaagatgct gagtcacctg tttgaaggaa gtaacccttc tctggataca 1500

atggcagcag tggtccctaa aatactaaca gtgatgaaag cccacggaac gtctctgtca 1560

gtccagctgg aggcgctgcg agctatcttg catttcgttg tgccaggact attggaagaa 1620

[0026]

tccagggagg actctcaatg cagaccaaat gtgctcagaa aacagtgttt caggactgac 1680

atccacaagc tggttctagt cgctctgaac aggttcattg ggaatcctgg gattcagaaa 1740

tgtggattga aagtaatctc ttctctcgcg caccttcctg atgccacaga gacattgtcc 1800

ctgcaaggag cagttgactc agtcctccac accttacaga tgtatccaga tgaccaagaa 1860

attcagtgtc tgggcttaca ccttatggga tgcttgatga caaagaagaa tttctgcata 1920

gggacagggc acctcctggc aaaaattctg gcttccactt tgcagcgctt taaagatgtt 1980

gctgaggtgc agactacagg attacagaca accctgtcaa tacttgagct gtcagtatct 2040

ttctccaagc tgctagtgca ctattccttt gatgtggtga tatttcatca gatgtcttcc 2100

agtgttgtag aacaaaagga tgagcagttc ctcaatctat gttgcaaatg ctttgcaaaa 2160

gtggccgtgg atgatgagct gaaaaacacc atgctagaga gagcctgcga tcagaataac 2220

agcatcatgg ttgaatgttt gctcctcttg ggagctgatg ccaaccaagt gaaggggcca 2280

acttctttaa tctatcaggt atgtgagaaa gagagcagtc ctaaattggt ggaactgttg 2340

cttaatggtg gttgtcgtga acaagatgta cggaaggccc tgaccgtaag catccaaaag 2400

ggcgacagcc aggtcatcag cttgctcctc aggaaacttg ccctggacct ggccaacaac 2460

agcatttgcc ttggaggatt tggcatagga aaaattgatc cttcttggct tggtccttta 2520

tttccagata agtcatccaa tttaaggaag caaacaaaca caggatctgt cctagcgagg 2580

aaagtgctcc ggtatcagat gagaaacacc cttcaagaag gcgtggcctc aggcagtgac 2640

ggcaagtttt ctgaagacgc gctggcgaaa tttggagaat ggacctttat tcccgactct 2700

tctatggaca gtgtgtttgg ccagagcgat gatctggata gcgaaggcag cgagagctca 2760

tttctcgtga agaggaagtc caactcaatt agtgtagggg aagtttacag agatctagct 2820

ctgcagcgct gctcaccaaa tgctcagagg cattccaatt cgctgggtcc tgtttttgac 2880

catgaagact tactgagacg aaaaagaaaa atactgtctt cagatgagtc tctcaggtcc 2940

tcaaggctgc cgtcccatat gaggcaatca gatagctctt cttccctggc ttctgagaga 3000

gaacacatca cgtcgttaga cctatctgcc aacgaactca aagatattga tgctctgagc 3060

cagaagtgtt gcctcagtag ccacctggaa catctcacca aactggaact tcaccagaat 3120

[0027] tcactcacga gcttcccaca gcagctgtgt gagactctga agtgtttgat acacttggat 3180

ttgcacagta acaaattcac ctcatttccc tctttcgtgt tgaaaatgcc acgtatcacc 3240

aacctagatg cctctcgaaa tgacatcggg ccaacagtag ttttagaccc tgcgatgaag 3300

tgtccaagcc tcaaacagtt gaatctgtcc tataaccagc tctcttcaat cccagagaat 3360

cttgcccaag tggtggagaa acttgagcag ctcctactgg aaggaaataa aatatccggg 3420

atttgctctc ccctgagcct gaaggaactg aagattttaa atcttagtaa aaatcacatt 3480

ccatccctac ctggagattt tcttgaggct tgttcaaaag tcgagagttt cagtgctcgc 3540

atgaattttc ttgctgcaat gcctgcctta ccttcttcca taacgagctt aaaattgtct 3600

cagaactctt tcacgtgcat tccagaagcg attttcagtc ttccgcactt gcggtccttg 3660

gatatgagcc acaacaacat tgaatgtctg ccgggacctg cacattggaa gtctctgaac 3720

ttaagggaac tcatttttag caagaatcag atcagcacct tagactttag tgagaaccca 3780

cacgtgtggt caagagtaga gaaactgcat ctctctcata ataaactgaa agagattcct 3840

ccagaaattg gctgccttga aaatctgacg tctctcgacg tcagttacaa cttggaactg 3900

[0028]

aggtccttcc caaatgaaat ggggaagttg agcaagatat gggatcttcc cttggacgga 3960

ctgcatctga attttgactt taagcacgta ggatgcaagg ccaaagacat cataaggttt 4020

ctacaacaac gtctgaaaaa ggctgtaccc tacaaccgaa tgaagctcat gattgtggga 4080

aatacgggga gcggtaagac cactttactg caacaactca tgaaaatgaa gaaaccagaa 4140

cttggcatgc agggtgccac agtcggcata gacgtgcgag actggtccat ccaaatacgg 4200

ggcaaaagga gaaaggacct ggttctaaac gtgtgggatt ttgcaggtcg tgaggaattc 4260

tacagcactc acccccactt catgacccag agagccctct acctggctgt ctatgatctc 4320

agcaaggggc aggcagaggt ggacgccatg aagccctggc tcttcaatat caaggctcgt 4380

gcctcttctt ccccggtgat tctggtgggc acacatttgg atgtttctga tgagaagcag 4440

cggaaagcgt gcataagcaa aatcacgaag gaactcctaa ataagcgagg attccccacc 4500

atccgggact accactttgt gaatgccacc gaggagtcag atgcgctggc aaagcttcgg 4560

aaaaccatca taaatgagag ccttaatttc aagatccgag atcagcctgt ggttgggcag 4620

ctaattccag attgctacgt agaactggag aaaatcattt tatcagagcg gaaagctgtg 4680

ccgactgagt ttcctgtgat taaccggaaa cacctgttac agctcgtgaa cgaacatcag 4740

ctgcagctgg atgagaacga gctcccacac gccgttcact tcctaaatga gtcgggagtt 4800

cttctgcatt ttcaagaccc tgccctgcag ctaagtgacc tgtactttgt ggaacccaag 4860

tggctttgta aagtcatggc acagatcttg acagtgaagg tagacggctg tctgaaacat 4920

cctaagggca tcatttcccg gagagatgtg gaaaaattcc tttcaaagaa gaagcgattc 4980

ccgaagaact atatgatgca atactttaaa ctattagaaa aatttcagat cgcattgcca 5040

ataggggaag aatatcttct ggttccaagc agcttgtctg accacaggcc agtgatagag 5100

ctcccccact gtgagaactc tgagatcatc atccggctgt acgaaatgcc gtactttccc 5160

atgggatttt ggtcaagatt gattaaccga ttacttgaaa tctcaccctt catgctttct 5220

ggcagagaga gagcactacg ccctaacagg atgtattggc ggcaaggcat ctacttgaat 5280

tggtctccag aagcatactg tctggtaggc tctgaagtct tagacaatcg acctgagagt 5340

ttcttgaaaa tcacagttcc gtcttgtaga aaaggttgta ttcttctggg ccgagttgtg 5400

gatcatattg actcactcat ggaagaatgg tttcccgggt tactggagat tgacatttgt 5460

ggggaaggag aaactctgtt gaagaaatgg gcattgtaca gttttaatga tggtgaagaa 5520

catcagaaga tcttgcttga tgagttgatg aagaaggctg aagaaggaga cctgttaata 5580

aatccagacc aaccaaggct cactattcca atatcccaga ttgctccgga cttgatcttg 5640

gctgacctgc ctagaaatat catgttgaac aatgatgagt tggaatttga ggaagcacca 5700

gagtttctct taggcgatgg aagttttgga tccgtttatc gagctgccta cgaaggagag 5760

gaagtggctg tgaagatttt taataagcac acatctctta ggctgttaag acaagagttg 5820

gtggtccttt gtcaccttca ccaccccagc ctgatatcct tgctggcggc tggtattcgt 5880

cctcggatgt tggtaatgga gttggcctcc aaaggttcct tggatcgcct gctgcagcag 5940

gacaaagcca gcctcaccag aaccctccag cacaggatcg cgttgcatgt ggccgacggc 6000

ctgaggtatc tccactcagc catgattatt taccgtgacc tgaagcccca caatgtgctg 6060

ctttttaccc tgtatcccaa tgctgccatc attgcgaaga ttgcggacta cgggatcgca 6120

cagtactgct gcaggatggg aataaagaca tcagagggca ccccagggtt ccgggcacct 6180

[0029] gaagttgcca gggggaatgt catttataac caacaggccg atgtttattc ttttggctta 6240

ctacttcacg atatttggac aactgggagt aggattatgg agggtttgag gttcccaaat 6300

gagtttgatg agttagccat acaagggaag ttgccagatc cagttaaaga atatggctgt 6360

gccccatggc ctatggttga gaagttaatt acaaagtgtt tgaaagaaaa tcctcaagaa 6420

agacccactt ctgcccaggt ctttgacatt ttgaattcgg ctgaattaat ttgcctcatg 6480

cgacacattt taatacctaa gaacatcatt gttgaatgca tggttgccac gaatctcaat 6540

agcaagagtg cgactctctg gttgggatgt gggaacacag aaaaaggaca gctttcctta 6600

tttgacttaa acacggaaag atacagctat gaggaagttg ctgatagtag aatactgtgc 6660

ttggctttgg tgcatctcgc tgctgagaaa gagagctggg ttgtgtgcgg gacacagtct 6720

ggggctctcc tggtcatcaa tgttgaagag gagacaaaga gacacaccct ggaaaagatg 6780

actgattctg tcacttgttt gcattgcaat tcccttgcca agcagagcaa gcaaagtaac 6840

tttcttttgg tgggaactgc tgatggtaac ttaatgatat ttgaagataa agccgttaag 6900

tgtaaaggag ctgccccctt gaagacacta cacataggcg atgtcagtac gcccctgatg 6960

tgcctgagcg agtccctgaa ttcatctgaa agacacatca catggggagg gtgtggcaca 7020

aaggtcttct ccttttccaa tgatttcacc attcagaaac tcatcgagac aaaaaccaac 7080

cagctgtttt cttacgcagc tttcagcgat tctaacatca tagcgctggc agtagacaca 7140

gccctgtata ttgccaagaa aaacagccct gtcgtagagg tgtgggacaa gaaaacagaa 7200

aagctctgtg aattaataga ctgtgtgcac ttcttaaagg aggtgatggt aaaactaaac 7260

aaggaatcga aacatcagct gtcctactct gggagggtga aggccctctg cctgcagaag 7320

aacacggctc tctggatcgg aactggagga ggccacatct tactcctgga tctttctact 7380

cggcgagtta tccgcaccat tcacaatttc tgtgattctg tgagagccat ggccacagca 7440

caattaggaa gccttaagaa tgtcatgctg gttttggggt acaagcggaa gagtacagag 7500

ggtatccaag aacaaaaaga gatacaatct tgtttgtcta tttgggacct caatcttcca 7560

cacgaggtgc aaaatttaga aaaacacatt gaagtaagaa cagaattagc tgataaaatg 7620

aggaaaacat ctgttgaata gaaagacatc aggcagtctc gatgttatat tgaataagac 7680

atcagacatc ctcgtcacta tattgaaaag gacatcagac atcctcgcca atatgttaga 7740

[0030]

aaatgtactc ttctttttaa aatatatttt taaaatgttt acattgaaaa gagtatgcct 7800

attctttaca aagttcatat gtatatgaag gaatgtgtat gtcttatgtt taatttaata 7860

tatgtaaaaa tatttatcag taaatatgtt ttaaaaaact atttaattta gcattatatt 7920

ttctatactc cttaactaat ttgaagggat aaacaaaaga aatctacaaa gcatttaatt 7980

tcagtattta tactaaaatt aataaaaata tcatgtttgt tttgctatgt attgtgatga 8040

taaagcctat tttaaattgt tgattaagac acagatgttg cttgattatc tatggactca 8100

gcggagtaga ataaaatatc tggtcaattt ccaagtaaga gactctttca tatcttgttt 8160

tcaagtgaat tatcatcatt aatgtaaact gtcatatttt cactaataaa gatttttgtt 8220

agctcaggaa a 8231

<210> 6
<211> 8231
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6

[0031]

```
tttcctgagc taacaaaaat ctttattagt gaaaatatga cagtttacat taatgatgat      60

aattcacttg aaaacaagat atgaaagagt ctcttacttg gaaattgacc agatatttta     120

ttctactccg ctgagtccat agataatcaa gcaacatctg tgtcttaatc aacaatttaa     180

aataggcttt atcatcacaa tacatagcaa aacaaacatg atatttttat taattttagt     240

ataaatactg aaattaaatg ctttgtagat ttcttttgtt tatcccttca aattagttaa     300

ggagtataga aaatataatg ctaaattaaa tagtttttta aaacatattt actgataaat     360

atttttacat atattaaatt aaacataaga catacacatt ccttcatata catatgaact     420

ttgtaaagaa taggcatact cttttcaatg taaacatttt aaaaatatat tttaaaaaga     480

agagtacatt ttctaacata ttggcgagga tgtctgatgt ccttttcaat atagtgacga     540

ggatgtctga tgtcttattc aatataacat cgagactgcc tgatgtcttt ctattcaaca     600

gatgttttcc tcattttatc agctaattct gttcttactt caatgtgttt ttctaaattt     660

tgcacctcgt gtggaagatt gaggtcccaa atagacaaac aagattgtat ctcttttgt      720

tcttggatac cctctgtact cttccgcttg taccccaaaa ccagcatgac attcttaagg     780

cttcctaatt gtgctgtggc catggctctc acagaatcac agaaattgtg aatggtgcgg     840

ataactcgcc gagtagaaag atccaggagt aagatgtggc ctcctccagt tccgatccag     900

agagccgtgt tcttctgcag gcagagggcc ttcaccctcc cagagtagga cagctgatgt     960

ttcgattcct tgtttagttt taccatcacc tcctttaaga agtgcacaca gtctattaat    1020

tcacagagct tttctgtttt cttgtcccac acctctacga cagggctgtt tttcttggca    1080

atatacaggg ctgtgtctac tgccagcgct atgatgttag aatcgctgaa agctgcgtaa    1140

gaaaacagct ggttggtttt tgtctcgatg agtttctgaa tggtgaaatc attggaaaag    1200

gagaagacct ttgtgccaca ccctccccat gtgatgtgtc tttcagatga attcagggac    1260

tcgctcaggc acatcagggg cgtactgaca tcgcctatgt gtagtgtctt caaggggtca    1320

gctcctttac acttaacggc tttatcttca aatatcatta agttaccatc agcagttccc    1380

accaaaagaa agttactttg cttgctctgc ttggcaaggg aattgcaatg caaacaagtg    1440

acagaatcag tcatcttttc cagggtgtgt ctctttgtct cctcttcaac attgatgacc    1500

aggagagccc cagactgtgt cccgcacaca acccagctct ctttctcagc agcgagatgc    1560
```

accaaagcca agcacagtat tctactatca gcaacttcct catagctgta tctttccgtg 1620

tttaagtcaa ataaggaaag ctgtcctttt tctgtgttcc cacatcccaa ccagagagtc 1680

gcactcttgc tattgagatt cgtggcaacc atgcattcaa caatgatgtt cttaggtatt 1740

aaaatgtgtc gcatgaggca aattaattca gccgaattca aaatgtcaaa gacctgggca 1800

gaagtgggtc tttcttgagg attttctttc aaacactttg taattaactt ctcaaccata 1860

ggccatgggg cacagccata ttctttaact ggatctggca acttcccttg tatggctaac 1920

tcatcaaact catttgggaa cctcaaaccc tccataatcc tactcccagt tgtccaaata 1980

tcgtgaagta gtaagccaaa agaataaaca tcggcctgtt ggttataaat gacattcccc 2040

ctggcaactt caggtgcccg gaaccctggg gtgccctctg atgtctttat tcccatcctg 2100

cagcagtact gtgcgatccc gtagtccgca atcttcgcaa tgatggcagc attgggatac 2160

agggtaaaaa gcagcacatt gtggggcttc aggtcacggt aaataatcat ggctgagtgg 2220

agatacctca ggccgtcggc cacatgcaac gcgatcctgt gctggagggt tctggtgagg 2280

[0032] ctggctttgt cctgctgcag caggcgatcc aaggaacctt tggaggccaa ctccattacc 2340

aacatccgag gacgaatacc agccgccagc aaggatatca ggctggggtg gtgaaggtga 2400

caaaggacca ccaactcttg tcttaacagc ctaagagatg tgtgcttatt aaaaatcttc 2460

acagccactt cctctccttc gtaggcagct cgataaacgg atccaaaact tccatcgcct 2520

aagagaaact ctggtgcttc ctcaaattcc aactcatcat tgttcaacat gatatttcta 2580

ggcaggtcag ccaagatcaa gtccggagca atctgggata ttggaatagt gagccttggt 2640

tggtctggat ttattaacag gtctccttct tcagccttct tcatcaactc atcaagcaag 2700

atcttctgat gttcttcacc atcattaaaa ctgtacaatg cccatttctt caacagagtt 2760

tctccttccc cacaaatgtc aatctccagt aacccgggaa accattcttc catgagtgag 2820

tcaatatgat ccacaactcg gcccagaaga atacaacctt ttctacaaga cggaactgtg 2880

attttcaaga aactctcagg tcgattgtct aagacttcag agcctaccag acagtatgct 2940

tctggagacc aattcaagta gatgccttgc cgccaataca tcctgttagg gcgtagtgct 3000

ctctctctgc cagaaagcat gaagggtgag atttcaagta atcggttaat caatcttgac 3060

caaaatccca tgggaaagta cggcatttcg tacagccgga tgatgatctc agagttctca 3120

cagtggggga gctctatcac tggcctgtgg tcagacaagc tgcttggaac cagaagatat 3180

tcttccccta ttggcaatgc gatctgaaat ttttctaata gtttaaagta ttgcatcata 3240

tagttcttcg ggaatcgctt cttctttgaa aggaattttt ccacatctct ccgggaaatg 3300

atgcccttag gatgtttcag acagccgtct accttcactg tcaagatctg tgccatgact 3360

ttacaaagcc acttgggttc cacaaagtac aggtcactta gctgcagggc agggtcttga 3420

aaatgcagaa gaactcccga ctcatttagg aagtgaacgg cgtgtgggag ctcgttctca 3480

tccagctgca gctgatgttc gttcacgagc tgtaacaggt gtttccggtt aatcacagga 3540

aactcagtcg gcacagcttt ccgctctgat aaaatgattt tctccagttc tacgtagcaa 3600

tctggaatta gctgcccaac cacaggctga tctcggatct tgaaattaag gctctcattt 3660

atgatggttt tccgaagctt tgccagcgca tctgactcct cggtggcatt cacaaagtgg 3720

tagtcccgga tggtggggaa tcctcgctta tttaggagtt ccttcgtgat tttgcttatg 3780

cacgctttcc gctgcttctc atcagaaaca tccaaatgtg tgcccaccag aatcaccggg 3840

[0033]

gaagaagagg cacgagcctt gatattgaag agccagggct tcatggcgtc cacctctgcc 3900

tgccccttgc tgagatcata gacagccagg tagagggctc tctgggtcat gaagtggggg 3960

tgagtgctgt agaattcctc acgacctgca aaatcccaca cgtttagaac caggtccttt 4020

ctccttttgc cccgtatttg gatggaccag tctcgcacgt ctatgccgac tgtggcaccc 4080

tgcatgccaa gttctggttt cttcattttc atgagttgtt gcagtaaagt ggtcttaccg 4140

ctccccgtat ttcccacaat catgagcttc attcggttgt agggtacagc ctttttcaga 4200

cgttgttgta gaaaccttat gatgtctttg gccttgcatc ctacgtgctt aaagtcaaaa 4260

ttcagatgca gtccgtccaa gggaagatcc catatcttgc tcaacttccc catttcattt 4320

gggaaggacc tcagttccaa gttgtaactg acgtcgagag acgtcagatt ttcaaggcag 4380

ccaatttctg gaggaatctc tttcagttta ttatgagaga gatgcagttt ctctactctt 4440

gaccacacgt gtgggttctc actaaagtct aaggtgctga tctgattctt gctaaaaatg 4500

agttccctta agttcagaga cttccaatgt gcaggtcccg gcagacattc aatgttgttg 4560

tggctcatat ccaaggaccg caagtgcgga agactgaaaa tcgcttctgg aatgcacgtg 4620

aaagagttct gagacaattt taagctcgtt atggaagaag gtaaggcagg cattgcagca 4680

agaaaattca tgcgagcact gaaactctcg acttttgaac aagcctcaag aaaatctcca 4740

ggtagggatg gaatgtgatt tttactaaga tttaaaatct tcagttcctt caggctcagg 4800

ggagagcaaa tcccggatat tttatttcct tccagtagga gctgctcaag tttctccacc 4860

acttgggcaa gattctctgg gattgaagag agctggttat aggacagatt caactgtttg 4920

aggcttggac acttcatcgc agggtctaaa actactgttg gcccgatgtc atttcgagag 4980

gcatctaggt tggtgatacg tggcattttc aacacgaaag agggaaatga ggtgaatttg 5040

ttactgtgca aatccaagtg tatcaaacac ttcagagtct cacacagctg ctgtgggaag 5100

ctcgtgagtg aattctggtg aagttccagt ttggtgagat gttccaggtg gctactgagg 5160

caacacttct ggctcagagc atcaatatct ttgagttcgt tggcagatag gtctaacgac 5220

gtgatgtgtt ctctctcaga agccagggaa gaagagctat ctgattgcct catatgggac 5280

ggcagccttg aggacctgag agactcatct gaagacagta tttttctttt tcgtctcagt 5340

[0034] aagtcttcat ggtcaaaaac aggacccagc gaattggaat gcctctgagc atttggtgag 5400

cagcgctgca gagctagatc tctgtaaact tcccctacac taattgagtt ggacttcctc 5460

ttcacgagaa atgagctctc gctgccttcg ctatccagat catcgctctg gccaaacaca 5520

ctgtccatag aagagtcggg aataaaggtc cattctccaa atttcgccag cgcgtcttca 5580

gaaaacttgc cgtcactgcc tgaggccacg ccttcttgaa gggtgtttct catctgatac 5640

cggagcactt tcctcgctag gacagatcct gtgtttgttt gcttccttaa attggatgac 5700

ttatctggaa ataaaggacc aagccaagaa ggatcaattt ttcctatgcc aaatcctcca 5760

aggcaaatgc tgttgttggc caggtccagg gcaagtttcc tgaggagcaa gctgatgacc 5820

tggctgtcgc ccttttggat gcttacggtc agggccttcc gtacatcttg ttcacgacaa 5880

ccaccattaa gcaacagttc caccaattta ggactgctct ctttctcaca tacctgatag 5940

attaaagaag ttgccccctt cacttggttg gcatcagctc ccaagaggag caaacattca 6000

accatgatgc tgttattctg atcgcaggct ctctctagca tggtgttttt cagctcatca 6060

tccacggcca cttttgcaaa gcatttgcaa catagattga ggaactgctc atccttttgt 6120

tctacaacac tggaagacat ctgatgaaat atcaccacat caaaggaata gtgcactagc 6180

agcttggaga aagatactga cagctcaagt attgacaggg ttgtctgtaa tcctgtagtc 6240

tgcacctcag caacatcttt aaagcgctgc aaagtggaag ccagaatttt tgccaggagg 6300

tgccctgtcc ctatgcagaa attcttcttt gtcatcaagc atcccataag gtgtaagccc 6360

agacactgaa tttcttggtc atctggatac atctgtaagg tgtggaggac tgagtcaact 6420

gctccttgca gggacaatgt ctctgtggca tcaggaaggt gcgcgagaga agagattact 6480

ttcaatccac atttctgaat cccaggattc ccaatgaacc tgttcagagc gactagaacc 6540

agcttgtgga tgtcagtcct gaaacactgt tttctgagca catttggtct gcattgagag 6600

tcctccctgg attcttccaa tagtcctggc acaacgaaat gcaagatagc tcgcagcgcc 6660

tccagctgga ctgacagaga cgttccgtgg gctttcatca ctgttagtat tttagggacc 6720

actgctgcca ttgtatccag agaagggtta cttccttcaa acaggtgact cagcatcttg 6780

cagccactct ctgccacctc aggcgcatgg gcatgcttct gcatcaattc caagacattc 6840

aggtatactc cttttgccag caggattttc ctgaaattaa cattttgttc caagagagtg 6900

[0035]

gacagagcat gtgcagctgc ttggaagaca tctttggaag aagagtgcat cagcatagac 6960

agcatcactt ccctgtgcgc agggaactgg ccatcttcat ctccgatctt ctcatgcaaa 7020

ctgttctggt acataaggag gttatttagt gcccagcagg cagcctcctg cacgtgtttg 7080

tcctttcgat ggcgcaccag ggctttatag cagggttcca gccagaaaag cttctcactg 7140

tcttcctctt cgctctgctc ttgagtctca cttctttcct ccaagtcttg gtttaagaaa 7200

atagtctcag tgaggagtgc taaacagctg agtgcagaga tctgtaaggc tgcgttctca 7260

ggatactgtc ggaccgcttt caccacaaag acatgcactt cgttcaacac caggatgttg 7320

aaaaagttac ctaatgtaag cttctggaac aaggagcagc tcacctcttg gatgttttca 7380

ttggtgggga aggctttcat ggcctccacc acaagattgt agcaccggac attcccactc 7440

atgaggacct ctacattgct gcatgtaacc gccagggaat gcaagcagca aagtacgtgg 7500

tacacaatct ccttgtccct tctgaagctg ccgaacgtac tcagcagtat cgtgtaatct 7560

ttgttctcca caaactcagt cagctgttcc tcggaaactc tctcaaaaag cacgtgtaaa 7620

gctttgcatc ccagtttttg gacttcatca ttggctgaat atctgtgcat ggcatcaaaa 7680

attaacaaga aaatatcaca ttcttcatcc agtatcagca aggtgagttt acctgaatct 7740

aggaggagat ccaaggcttt tagtccaact attgacaggt ttacattggc gtgatgaaca 7800

gttaacattt taagaatcag ccggtgaata ccaaggactt cccaatcatt tccaatatcc 7860

tggggtccta ttaagctttg caatgtccct ggacagactt ctattaattt gcacagaagt 7920

gaccaccccg cctgctgtac actggcaact ctcatgtagg agtccaggac aatcaacaga 7980

ggcacgtgga aatttttatc ttcaaataac ttggaggcgc ggtccgagta ggtgaacacc 8040

agcatgtcct ccaggagctg aagcaacgtc tcgatctgct tgccttcctg gacattattc 8100

agcctgacta tcaacttctt cagagcctcc tcctcctctt cctcttcgca gccctgacag 8160

gcgccactgg ccatggtgca gccggcgggg actgcggcga gctgggacgg ctcctgctct 8220

cagagctgct c 8231

<210> 7
<211> 7581
<212> DNA
<213> 褐家鼠

[0036]

<400> 7
atggccagtg gcgcctgtca gggctgcgac gaggaagagg aggaggaggc tctgaagaag 60

ttgatagtca ggctgaataa tgtccaggaa ggcaagcaga tcgagacgtt gctccagctc 120

ctggaggaca ttctggtgtt cacctactcc gaccgcgcct ccaagttatt tgaaggcaaa 180

aatgtccacg tgcctctgtt gatagtcctg gactcctaca tgagagtcgc cagtgtgcag 240

caggtggggt ggtcacttct gtgcaaatta atagaagtct gtccagggac attgcaaagc 300

ttaataggac cccaggatat tgggaatgat tgggaagtcc ttggtattca ccgactgatt 360

cttaaaatgt taactgttca tcatgccaac gtaaacctgt caatagttgg actaaaagcc 420

ttagatctcc tcctagattc aggtaaaatt actctgctga tactggatga agaatgtgat 480

gttttcctgt taatttttga tgccatgcac agatattcag ccaacgagga agtccagaag 540

cttgcgtgca aggctttaca tgtgctgttc gagagagtgt ccgaggagca actgactgag 600

tttgtggaga acaaagatta catgaccctg ctgagtacgt tccgcagctt caagagggac 660

gaggagattg tgcaccatgt actctgctgc ctgcattctc tggccgtcac ttgcagcaat 720

gtggaggtcc tcatgagtgg gaatgtcagg tgttacaata ttgtggtgga agccatgaaa 780

acattcccca ccagtgaaaa cattcaagag gtgagctgct ccttgctcca caagcttaca 840

ttaggtaatt ttttcaacat cctggtgttg aacgaagtcc atgtctttgt ggtgaaagcc 900

gtccagcggt atcccgagaa cgtagcctta cagatctctg cactcagctg cttagccctc 960

ctcaccgaga ctattttctt aaaccaagac ctggaagaaa gaagtgagac tcaggaaaac 1020

agcgatgagg acagtgagaa gcctttctgg ttggaaccct gctataaagc cctgatgcgc 1080

catcgaaaga acaaacacgt gcaggaggcc gcctgctggg ccctaaataa tctcctcatg 1140

taccagagca gtttgcacga gaagattgga gatgaagatg gccagttccc ggcgcacagg 1200

gaagtgatgc tgtctatgct gatgcactct tcttccaaag acgtcttcca agcagctgcg 1260

catgctctgt ccactctctt ggaacaaaac gttaatttca ggaaaatcct gcttgcaaaa 1320

ggagtgtacc tgaatgtctt ggagttgatg cagcggcacg cccaggttcc tgaggtggca 1380

gagagtggct gcaagatgct gagtcatctg tttgaaggaa gcaacccttc tttggataca 1440

[0037] gtggcggcag tgatccccaa aatactaaca gtgatgagaa cccatggaac gtctctgtca 1500

gtccagctgg aggcactgcg agctcttctg cattttgtgg tgccgggagt atcagaagat 1560

tccagggatg actcgcgatg ccaaccaaac gtgctcagaa cacagtgctt caggactgac 1620

atccacaagc tggttctagc cgctctgaac aggttcattg ggaatcccgg gattcagaaa 1680

tgtggattga aagtcatctc ttctttcgca catcttcccg atgccttaga gatgttatcc 1740

ctgcatggag cagttgactc agtcctccat accttacaga tgtatccaga tgaccaagaa 1800

attcagtgtc tgggcttaca ccttatggga tgcctgatga caaagaagaa tttctgcata 1860

gggacagggc acctcctggc aaaaattctg gcttccacct tgcagcgatt taaagatgtt 1920

gctgaagtac agactacagg attacagacg gtcttgtcaa tgcttgacct gtccgtatct 1980

ttctccaagc tgctagtgca ctattcattt gatgtggtga tgtttcatca gatgtcttcc 2040

ggtgtcctgg aacaaaagga tgagcagttt ctcaacttat gctgcaaatg ctttgcaaaa 2100

gtggctgtgg atgatgagct gaaaagcaag atgctagaga gagcctgcga tcagaacaac 2160

agcatcatgg tcgaatgttt gctcctcttg ggagccgatg ccaatcaagc gaaggggca 2220

acttctttaa tctatcaggt atgtgagaaa gagagcagcc ctaaattggt ggaactattg 2280

cttaacagtg ggtgccgtga acaagatgta cggaaagccc tgacagtaag catccaaaag 2340

ggcgacaacc aggtcatcag cttactcctg aggagacttg ccctggacct ggccaacaac 2400

agcatttgcc ttggaggatt ttgcatagga aaacttgatc cttcttggct aggcccttta 2460

tttccagata agtcatctaa tttgaggaaa caaacaaatg cggggtctgt cctagcgagg 2520

aaagtgctcc ggtatcagat gagaaacact cttcaagaag gcgtggcctc aggcagtgag 2580

ggcaacttct ctgaggatgc gctggcgaaa tttggcgaat ggaccttcat tcccgactct 2640

tctatggaca gtgtgtttgg ccagagtgac gatctggata gcgaaggcag cgagagctcc 2700

tttctggtga agaagaagtc caactcagtt agtgtaggag aagtttacag ggacctagct 2760

ctgcagcgct gctcaccaaa tgctcagagg cactccagtt ccttgggtcc tgtttttgat 2820

cacgaagatc tactgagacg aaaaagaaaa atactgtcct cagatgagtc tctcagatcc 2880

tcaaggctgc agtcccatac gagacaatca gatagctctt cttctctggc ttctgagaga 2940

gaacacatca cgtctttaga cctttctgcc aacgaactga aagatattga tgctctgggc 3000

[0038]

cagaagtgtt gcctcagtag ccacctggag catctcacca agctggaact tcaccagaat 3060

tcactcacga gcttcccaca acagctgtgt gagactctga agtgcttgac acatctggat 3120

ttgcacagta acaaattcgc cacctttccc tccttcatgt tgaaaatgcc aagtgttatc 3180

cacctagacg cctctcgaaa tgacatcgga ccaacagttg ttttagaccc tgtggtgaag 3240

tgtccaagcc tcaaacagtt taacctgtcc tacaaccagc tctcttccat cccagagaac 3300

ctggaccaag tggtggagaa actggagcag ctcctactgg aaggaaacaa aatatccggg 3360

atttgttctc ccttgagcct gaaggaactg aagattttaa accttagtaa aaaccacatt 3420

ccatccctac ctgaagactt tctcgaggct tgcccgaaag tggagagctt cagtgcccgc 3480

atgaattttc tcgctgcaat gcctgcctta ccgtcttcca taactagctt aaaattgtct 3540

caaaactctt tcacgtgcat tccagaagcg atcttcagtc ttccacactt gcggtccttg 3600

gatatgagtc acaacaacat tgaacacctg ccgggacctg cacattggaa gtctctgaac 3660

ttaagggaac tcatttttag caagaatcag atcagcacct tagacttgag cgaaaaccca 3720

cacatatggt caagagtaga gaagctgcat ctctctcata ataaactgaa agagattcct 3780

ccagaaattg gccgtcttga aaacctgaca tctcttgatg tcagttacaa cctggaactg 3840

aggtcctttc caaacgaaat ggggaagtta agcaaaatat gggatcttcc cttggatgga 3900

ctgcacctca actttgactt taagcacata ggatgcaaag ccaaagacat cataaggttt 3960

ctacaacaac gtctgaaaaa ggccgtgccc tacaaccgaa tgaagctcat gattgtgggc 4020

aatacgggga gtggtaagac cactctactg cagcagctca tgaaaatgaa gaaatcagaa 4080

ctcggcatgc agggcgccac ggttggcata gacgtgcgag actggcccat ccaaatacga 4140

ggcaaaagga aaaaggacct tgttctaaac gtgtgggact ttgcaggccg tgaggaattc 4200

tacagcactc acccccactt catgacccag agagccctgt acctggctgt ctacgacctc 4260

agcaaggggc aggcggaggt ggatgccatg aagccctggc tcttcaacat caaggctcgt 4320

gcctcttctt ccccggtgat tctggtgggc acacatttgg atgtttctga tgagaagcag 4380

cgcaaagcct gcataggcaa aatcacgaag gaactcctta ataagcgagg attccccacc 4440

atccgggact accacttcgt gaatgccact gaggagtcgg atgcgctggc aaagctccgg 4500

[0039] aaaaccatca taaatgagag tcttaatttc aagatccgag atcagcccgt ggttgggcag 4560

ctaattccag attgctacgt agaactggag aaaataatct tatcggagcg taaagctgta 4620

ccaacggagt ttcctgtaat taaccggaaa cacttactcc agctggtgaa ggaacaccag 4680

ctgcagctgg atgagaacga gctcccccac gctgttcact tcctgaatga gtcaggagtt 4740

cttctgcatt ttcaagaccc cgcattgcag ctgagtgacc tgtactttgt ggaacccaag 4800

tggctttgta aagtcatggc acagattttg accgtgaaag tggacggctg cctgaagcat 4860

cctaagggca tcatttcacg gagagatgtg gaaaaattcc tttccaagaa aaagcgattc 4920

cctaagaact acatggcgca gtacttcaaa cttttagaaa aatttcagat cgcattacca 4980

ataggggaag aatatctgct ggttccaagc agcttatctg accacaggcc agtgatagag 5040

ctcccccact gtgagaactc tgagatcatc atccggctgt atgaaatgcc atactttcca 5100

atgggatttt ggtcaagatt gattaaccga ttacttgaaa tctcaccttt catgctttct 5160

ggaagagaga gagcactacg cccaaaccga atgtactggc gccaaggcat ctacttgaat 5220

tggtctccag aagcctactg tctggtgggc tctgaagtct tagacagtcg cccagagagt 5280

ttcttgaaaa tcacagttcc atcttgtaga aaaggttgta ttcttttggg ccgagttgtg 5340

gatcatattg actcactcat ggaagaatgg tttcctggat tgctggagat tgacatttgt 5400

ggggaaggag aaactttgtt gaaaaaatgg gcattgtata gttttaatga tggcgaagaa 5460

catcagaaga tcttgcttga tgagttgatg aagaaggctg aagaaggaga cctgttaata 5520

aatccagatc aaccaaggct caccattcca atatcccaga ttgctccgga cttgatcttg 5580

gctgacctgc ctagaaatat tatgttgaac aatgacgaac tggaatttga ggaagcaccc 5640

gagtttctct taggtgatgg aagtttcgga tcagtttatc gagctgccta cgaaggagag 5700

gaagtggctg tgaagatttt taataagcac acatcgctta ggctgttaag acaagagttg 5760

gtggtactct gtcatctcca ccatcccagc ttgatctccc tgttggcggc tgggattcgt 5820

cctcggatgc tggtaatgga gttggcctcc aagggttcct tggatcgcct gctgcagcag 5880

gacaaagcca gcctcacccg gaccctccag cacagaatcg cattgcatgt ggccgatggc 5940

ctgagatatc tgcactcggc catgattatt taccgtgatc tgaagcccca caacgtgcta 6000

ctcttcaccc tgtatcccaa tgccgccatc attgcgaaga ttgcggacta cgggattgca 6060

[0040]

cagtactgct gtaggatggg aataaagacc tcagagggca ccccagggtt ccgagcacct 6120

gaagttgcca gaggaaatgt catttataac caacaggctg atgtttattc ttttggctta 6180

ctacttcatg atatctggac aactgggaat agaatcatgg agggtttgag gtttccaaat 6240

gagtttgatg aactggccat acaagggaaa ttgccagacc cagttaaaga atatggctgt 6300

gccccgtggc ctatggttga gaagttaatt acaaaatgtt tgaaagaaaa tcctcaagaa 6360

agacccactt ctgcccaggt ctttgacatt ttgaattcag ctgagttaat ttgcctcatg 6420

cgacacattt tcatacctaa ggacatcact gttgaatgca tagctgctac aaacctcaat 6480

agcaagcgag cgactctctg gttgggctgt gggaacacag aaaaagggca gctttcctta 6540

cttgacttga acacggaaag atacagctat gaggaagtta ctgatagtag aatactgtgc 6600

ctggctttgg tgcatcttgc tgctgagaaa gagagctggg ttgtgtgtgg gacacagtcc 6660

ggagctctcc tggtcatcaa tgctgaagat gagacaagga gacacaccct cgacaagatg 6720

actgattctg ttacttgctt gtattgcaat tcctttgcca agcagagcaa gcaaagtcac 6780

ttccttttgg tgggaactgc tgatggcaac ttaatgatat ttgaagataa gaccattaag 6840

tgtaaaggag ctgccccatt gaagacacta cacataggcg atgtcagtac gcccctgatg 6900

tgcctgagcg agtccatgaa ttcatctgaa agacacatca catggggagg gtgtggcaca 6960

aagatcttct ccttttccaa tgatttcacc attcagaaac tcatcgagac aagaaccaac 7020

cagctgtttt cttactcagc gttcagcgat tctaacatca tagcggtggc agtggacaca 7080

gcgctttata ttgccaagaa aaacagccct gtcgtagagg tgtgggacaa gaagacagaa 7140

aaactctgtg aactaataga ctgtgtgcac ttcttaaagg aggtgatggt gaaaataaac 7200

aaggactcga agcacaagct gtcctactct gggagggtga aggcactctg cctgcagaag 7260

aacacagctc tctggatcgg aactggagga ggccacatct tactcctgga tctttctaca 7320

cggcgagtca tccgcaccat ccacaatttc tgtgattccg tgagagccat ggccacagct 7380

cagttaggca accttaaaaa tgtcatgctg gttttggggt acaagcggaa gagtacagaa 7440

ggaacccaag aacaaaaaga gatacaatct tgtttgtcta tttgggacct caatcttcca 7500

catgaagtgc aaaacttaga aaaacacatt gaagtaagaa cagaactggc tgataaaatg 7560

aggaaaacat ctgtcgaata g 7581

[0041]

<210> 8
<211> 7581
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 8
ctattcgaca gatgttttcc tcattttatc agccagttct gttcttactt caatgtgttt 60

ttctaagttt tgcacttcat gtggaagatt gaggtcccaa atagacaaac aagattgtat 120

ctctttttgt tcttgggttc cttctgtact cttccgcttg taccccaaaa ccagcatgac 180

atttttaagg ttgcctaact gagctgtggc catggctctc acggaatcac agaaattgtg 240

gatggtgcgg atgactcgcc gtgtagaaag atccaggagt aagatgtggc ctcctccagt 300

tccgatccag agagctgtgt tcttctgcag gcagagtgcc ttcaccctcc cagagtagga 360

cagcttgtgc ttcgagtcct tgtttatttt caccatcacc tcctttaaga agtgcacaca 420

gtctattagt tcacagagtt tttctgtctt cttgtcccac acctctacga cagggctgtt 480

tttcttggca atataaagcg ctgtgtccac tgccaccgct atgatgttag aatcgctgaa 540

cgctgagtaa gaaaacagct ggttggttct tgtctcgatg agtttctgaa tggtgaaatc 600

attggaaaag gagaagatct ttgtgccaca ccctccccat gtgatgtgtc tttcagatga 660

attcatggac tcgctcaggc acatcagggg cgtactgaca tcgcctatgt gtagtgtctt 720

caatggggca gctcctttac acttaatggt cttatcttca aatatcatta agttgccatc 780

agcagttccc accaaaagga agtgactttg cttgctctgc ttggcaaagg aattgcaata 840

caagcaagta acagaatcag tcatcttgtc gagggtgtgt ctccttgtct catcttcagc 900

attgatgacc aggagagctc cggactgtgt cccacacaca acccagctct ctttctcagc 960

agcaagatgc accaaagcca ggcacagtat tctactatca gtaacttcct catagctgta 1020

tctttccgtg ttcaagtcaa gtaaggaaag ctgccctttt tctgtgttcc cacagcccaa 1080

ccagagagtc gctcgcttgc tattgaggtt tgtagcagct atgcattcaa cagtgatgtc 1140

cttaggtatg aaaatgtgtc gcatgaggca aattaactca gctgaattca aaatgtcaaa 1200

gacctgggca gaagtgggtc tttcttgagg attttctttc aaacattttg taattaactt 1260

[0042] ctcaaccata ggccacgggg cacagccata ttctttaact gggtctggca atttcccttg 1320

tatggccagt tcatcaaact catttggaaa cctcaaaccc tccatgattc tattcccagt 1380

tgtccagata tcatgaagta gtaagccaaa agaataaaca tcagcctgtt ggttataaat 1440

gacatttcct ctggcaactt caggtgctcg gaaccctggg gtgccctctg aggtctttat 1500

tcccatccta cagcagtact gtgcaatccc gtagtccgca atcttcgcaa tgatggcggc 1560

attgggatac agggtgaaga gtagcacgtt gtggggcttc agatcacggt aaataatcat 1620

ggccgagtgc agatatctca ggccatcggc cacatgcaat gcgattctgt gctggagggt 1680

ccgggtgagg ctggctttgt cctgctgcag caggcgatcc aaggaaccct tggaggccaa 1740

ctccattacc agcatccgag gacgaatccc agccgccaac agggagatca agctgggatg 1800

gtggagatga cagagtacca ccaactcttg tcttaacagc ctaagcgatg tgtgcttatt 1860

aaaaatcttc acagccactt cctctccttc gtaggcagct cgataaactg atccgaaact 1920

tccatcacct aagagaaact cgggtgcttc ctcaaattcc agttcgtcat tgttcaacat 1980

aatatttcta ggcaggtcag ccaagatcaa gtccggagca atctgggata ttggaatggt 2040

gagccttggt tgatctggat ttattaacag gtctccttct tcagccttct tcatcaactc 2100

atcaagcaag atcttctgat gttcttcgcc atcattaaaa ctatacaatg cccatttttt 2160

caacaaagtt tctccttccc cacaaatgtc aatctccagc aatccaggaa accattcttc 2220

catgagtgag tcaatatgat ccacaactcg gcccaaaaga atacaacctt ttctacaaga 2280

tggaactgtg attttcaaga aactctctgg gcgactgtct aagacttcag agcccaccag 2340

acagtaggct tctggagacc aattcaagta gatgccttgg cgccagtaca ttcggtttgg 2400

gcgtagtgct ctctctcttc cagaaagcat gaaaggtgag atttcaagta atcggttaat 2460

caatcttgac caaaatccca ttggaaagta tggcatttca tacagccgga tgatgatctc 2520

agagttctca cagtggggga gctctatcac tggcctgtgg tcagataagc tgcttggaac 2580

cagcagatat tcttccccta ttggtaatgc gatctgaaat ttttctaaaa gtttgaagta 2640

ctgcgccatg tagttcttag ggaatcgctt tttcttggaa aggaattttt ccacatctct 2700

ccgtgaaatg atgcccttag gatgcttcag gcagccgtcc actttcacgg tcaaaatctg 2760

tgccatgact ttacaaagcc acttgggttc cacaaagtac aggtcactca gctgcaatgc 2820

[0043]

ggggtcttga aaatgcagaa gaactcctga ctcattcagg aagtgaacag cgtgggggag 2880

ctcgttctca tccagctgca gctggtgttc cttcaccagc tggagtaagt gtttccggtt 2940

aattacagga aactccgttg gtacagcttt acgctccgat aagattattt tctccagttc 3000

tacgtagcaa tctggaatta gctgcccaac cacgggctga tctcggatct tgaaattaag 3060

actctcattt atgatggttt tccggagctt tgccagcgca tccgactcct cagtggcatt 3120

cacgaagtgg tagtcccgga tggtggggaa tcctcgctta ttaaggagtt ccttcgtgat 3180

tttgcctatg caggctttgc gctgcttctc atcagaaaca tccaaatgtg tgcccaccag 3240

aatcaccggg gaagaagagg cacgagcctt gatgttgaag agccagggct tcatggcatc 3300

cacctccgcc tgccccttgc tgaggtcgta gacagccagg tacagggctc tctgggtcat 3360

gaagtggggg tgagtgctgt agaattcctc acggcctgca aagtcccaca cgtttagaac 3420

aaggtccttt ttccttttgc ctcgtatttg gatgggccag tctcgcacgt ctatgccaac 3480

cgtggcgccc tgcatgccga gttctgattt cttcattttc atgagctgct gcagtagagt 3540

ggtcttacca ctccccgtat tgcccacaat catgagcttc attcggttgt agggcacggc 3600

cttttttcaga cgttgttgta gaaaccttat gatgtctttg gctttgcatc ctatgtgctt 3660

aaagtcaaag ttgaggtgca gtccatccaa gggaagatcc catattttgc ttaacttccc 3720

catttcgttt ggaaaggacc tcagttccag gttgtaactg acatcaagag atgtcaggtt 3780

ttcaagacgg ccaatttctg gaggaatctc tttcagttta ttatgagaga gatgcagctt 3840

ctctactctt gaccatatgt gtgggttttc gctcaagtct aaggtgctga tctgattctt 3900

gctaaaaatg agttccctta agttcagaga cttccaatgt gcaggtcccg gcaggtgttc 3960

aatgttgttg tgactcatat ccaaggaccg caagtgtgga agactgaaga tcgcttctgg 4020

aatgcacgtg aaagagtttt gagacaattt taagctagtt atggaagacg gtaaggcagg 4080

cattgcagcg agaaaattca tgcgggcact gaagctctcc actttcgggc aagcctcgag 4140

aaagtcttca ggtagggatg gaatgtggtt tttactaagg tttaaaatct tcagttcctt 4200

caggctcaag ggagaacaaa tcccggatat tttgtttcct tccagtagga gctgctccag 4260

tttctccacc acttggtcca ggttctctgg gatggaagag agctggttgt aggacaggtt 4320

[0044] aaactgtttg aggcttggac acttcaccac agggtctaaa acaactgttg gtccgatgtc 4380

atttcgagag gcgtctaggt ggataacact tggcattttc aacatgaagg agggaaaggt 4440

ggcgaatttg ttactgtgca aatccagatg tgtcaagcac ttcagagtct cacacagctg 4500

ttgtgggaag ctcgtgagtg aattctggtg aagttccagc ttggtgagat gctccaggtg 4560

gctactgagg caacacttct ggcccagagc atcaatatct ttcagttcgt tggcagaaag 4620

gtctaaagac gtgatgtgtt ctctctcaga agccagagaa gaagagctat ctgattgtct 4680

cgtatgggac tgcagccttg aggatctgag agactcatct gaggacagta tttttctttt 4740

tcgtctcagt agatcttcgt gatcaaaaac aggacccaag gaactggagt gcctctgagc 4800

atttggtgag cagcgctgca gagctaggtc cctgtaaact tctcctacac taactgagtt 4860

ggacttcttc ttcaccagaa aggagctctc gctgccttcg ctatccagat cgtcactctg 4920

gccaaacaca ctgtccatag aagagtcggg aatgaaggtc cattcgccaa atttcgccag 4980

cgcatcctca gagaagttgc cctcactgcc tgaggccacg ccttcttgaa gagtgtttct 5040

catctgatac cggagcactt tcctcgctag gacagacccc gcatttgttt gtttcctcaa 5100

attagatgac ttatctggaa ataaagggcc tagccaagaa ggatcaagtt ttcctatgca 5160

aaatcctcca aggcaaatgc tgttgttggc caggtccagg gcaagtctcc tcaggagtaa 5220

gctgatgacc tggttgtcgc ccttttggat gcttactgtc agggctttcc gtacatcttg 5280

ttcacggcac ccactgttaa gcaatagttc caccaattta gggctgctct ctttctcaca 5340

tacctgatag attaaagaag ttgccccctt cgcttgattg gcatcggctc ccaagaggag 5400

caaacattcg accatgatgc tgttgttctg atcgcaggct ctctctagca tcttgctttt 5460

cagctcatca tccacagcca cttttgcaaa gcatttgcag cataagttga gaaactgctc 5520

atccttttgt tccaggacac cggaagacat ctgatgaaac atcaccacat caaatgaata 5580

gtgcactagc agcttggaga aagatacgga caggtcaagc attgacaaga ccgtctgtaa 5640

tcctgtagtc tgtacttcag caacatcttt aaatcgctgc aaggtggaag ccagaatttt 5700

tgccaggagg tgccctgtcc ctatgcagaa attcttcttt gtcatcaggc atcccataag 5760

gtgtaagccc agacactgaa tttcttggtc atctggatac atctgtaagg tatggaggac 5820

tgagtcaact gctccatgca gggataacat ctctaaggca tcgggaagat gtgcgaaaga 5880

[0045]

agagatgact ttcaatccac atttctgaat cccgggattc ccaatgaacc tgttcagagc 5940

ggctagaacc agcttgtgga tgtcagtcct gaagcactgt gttctgagca cgtttggttg 6000

gcatcgcgag tcatccctgg aatcttctga tactcccggc accacaaaat gcagaagagc 6060

tcgcagtgcc tccagctgga ctgacagaga cgttccatgg gttctcatca ctgttagtat 6120

tttggggatc actgccgcca ctgtatccaa agaagggttg cttccttcaa acagatgact 6180

cagcatcttg cagccactct ctgccacctc aggaacctgg gcgtgccgct gcatcaactc 6240

caagacattc aggtacactc cttttgcaag caggattttc ctgaaattaa cgttttgttc 6300

caagagagtg gacagagcat gcgcagctgc ttggaagacg tctttggaag aagagtgcat 6360

cagcatagac agcatcactt ccctgtgcgc cgggaactgg ccatcttcat ctccaatctt 6420

ctcgtgcaaa ctgctctggt acatgaggag attatttagg gcccagcagg cggcctcctg 6480

cacgtgtttg ttctttcgat ggcgcatcag ggctttatag cagggttcca accagaaagg 6540

cttctcactg tcctcatcgc tgttttcctg agtctcactt ctttcttcca ggtcttggtt 6600

taagaaaata gtctcggtga ggagggctaa gcagctgagt gcagagatct gtaaggctac 6660

gttctcggga taccgctgga cggctttcac cacaaagaca tggacttcgt tcaacaccag 6720

gatgttgaaa aaattaccta atgtaagctt gtggagcaag gagcagctca cctcttgaat 6780

gttttcactg gtggggaatg ttttcatggc ttccaccaca atattgtaac acctgacatt 6840

cccactcatg aggacctcca cattgctgca agtgacggcc agagaatgca ggcagcagag 6900

tacatggtgc acaatctcct cgtccctctt gaagctgcgg aacgtactca gcagggtcat 6960

gtaatctttg ttctccacaa actcagtcag ttgctcctcg gacactctct cgaacagcac 7020

atgtaaagcc ttgcacgcaa gcttctggac ttcctcgttg gctgaatatc tgtgcatggc 7080

atcaaaaatt aacaggaaaa catcacattc ttcatccagt atcagcagag taattttacc 7140

tgaatctagg aggagatcta aggcttttag tccaactatt gacaggttta cgttggcatg 7200

atgaacagtt aacattttaa gaatcagtcg gtgaatacca aggacttccc aatcattccc 7260

aatatcctgg ggtcctatta agctttgcaa tgtccctgga cagacttcta ttaatttgca 7320

cagaagtgac caccccacct gctgcacact ggcgactctc atgtaggagt ccaggactat 7380

[0046] caacagaggc acgtggacat ttttgccttc aaataacttg gaggcgcggt cggagtaggt 7440

gaacaccaga atgtcctcca ggagctggag caacgtctcg atctgcttgc cttcctggac 7500

attattcagc ctgactatca acttcttcag agcctcctcc tcctcttcct cgtcgcagcc 7560

ctgacaggcg ccactggcca t 7581

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 未知描述：
RFGF 序列

<400> 9
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 10
<211> 11
<212> PRT

<213> 未知

<220>
<223> 未知描述：
RFGF 类似物序列

<400> 10
Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 11
caacucugaa acaguuuaac a 21

[0047]
<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 12
aauugucagc aucuuuuucu a 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 13
cgugaacaag auguacggaa a 21

<210> 14

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 14
ucacucaugg aagaaugguu a 21

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 15
cagauaagac uucuaauuua a 21

[0048]

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 16
cccuaucaga gaacuuucuu a 21

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 17
aaaaggauca acaguuucua a 21

<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 18
acaucacuag accuuucagc a 21

<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 19
ggaacuucac cagaauucac a 21

[0049]

<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 20
caguuucuaa accucuguug a 21

<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 21
aaacacaaaa ugucuuauuc a 21

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 22
caaagauuuu cuccuuuucu a 21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 23
cuacucuaug acauuuugac a 21

[0050]

<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 24
caucuuucuc acaauaaacu a 21

<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 25
ugagaacucu gaaauuauca a 21

<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 26
uacaacuugg aacuaagauc a 21

<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 27
ugguuccaag caguuugucu a 21

[0051]

<210> 28
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 28
acuaaauaau cuccuuaugu a 21

<210> 29
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 29

aaagauuuuc uccuuuucua a 21

<210> 30
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 30
accauucaga aacucaucga a 21

<210> 31
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0052]

<400> 31
cauucagaaa cucaucgaga a 21

<210> 32
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 32
uuuauuccug acucuucuau a 21

<210> 33
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 33
uacaucacua gaccuuucag a 21

<210> 34
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 34
aaucuuguuu gucuauuugg a 21

<210> 35
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0053]

<400> 35
gcaguucacu uucuaaauga a 21

<210> 36
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 36
cuugagauuu caccuuacau a 21

<210> 37
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 37
ccuugguguu caccaauuga a 21

<210> 38
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 38
agauacaauc uuguuugucu a 21

<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0054]

<400> 39
cuuaagggaa cucauuuuua a 21

<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 40
gguuucuaca acaacgucug a 21

<210> 41
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 41
aguaugccua uucuuuacaa a 21

<210> 42
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 42
ccuuuauuuc cagauaaguc a 21

<210> 43
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0055] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 43
uuuaaucuau cagguaugug a 21

<210> 44
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 44
aagguuucua caacaacguc a 21

<210> 45
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 45
uuaagggaac ucauuuuuag a 21

<210> 46
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 46
ucuuuaaucu aucagguaug a 21

<210> 47
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0056]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 47
gaugacaaag aagaauuucu a 21

<210> 48
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 48
agagaaacug caucuuucuc a 21

<210> 49
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 49
aaagaguaug ccuauucuuu a 21

<210> 50
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 50
uaaggguuucu acaacaacgu a 21

<210> 51
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0057]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 51
uaugcugaug cacucuucuu a 21

<210> 52
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 52
aucuuguuug ucuauuuggg a 21

<210> 53
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 53
cucuuucacg ugcauuccag a 21

<210> 54
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 54
caaucuuguu ugucuauuug a 21

<210> 55
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0058]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 55
uguuaaacug uuucagaguu gga 23

<210> 56
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 56
uagaaaaaga ugcugacaau uug 23

<210> 57
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 57
uuuccguaca ucuuguucac gac 23

<210> 58
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 58
uaaccauucu uccaugagug agu 23

<210> 59
<211> 23
[0059] <212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 59
uuaaauuaga agucuuaucu gga 23

<210> 60
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 60
uaagaaaguu cucugauagg gau 23

<210> 61
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 61
uuagaaacug uugauccuuu ugu 23

<210> 62
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 62
ugcugaaagg ucuagugaug uaa 23

<210> 63
[0060] <211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 63
ugugaauucu ggugaaguuc cag 23

<210> 64
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 64
ucaacagagg uuuagaaacu guu 23

<210> 65

<210> 23
<211> RNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 65
ugaauaagac auuuuguguu uug 23

<210> 66
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 66
uagaaaagga gaaaaucuuu gug 23

[0061]

<210> 67
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 67
ugucaaaaug ucauagagua gua 23

<210> 68
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 68
uaguuuauug ugagaaagau gca 23

<210> 69
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 69
uugauaauuu cagaguucuc aca 23

<210> 70
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 70
ugaucuuagu uccaaguugu aac 23

[0062]

<210> 71
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 71
uagacaaacu gcuuggaacc agc 23

<210> 72
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 72
uacauaagga gauuauuuag ugc 23

<210> 73
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 73
uuagaaaagg agaaaaucuu ugu 23

<210> 74
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 74
uucgaugagu uucugaaugg uga 23

[0063]

<210> 75
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 75
uucucgauga guuucugaau ggu 23

<210> 76
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 76
uauagaagag ucaggaauaa agg 23

<210> 77
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 77
ucugaaaggu cuagugaugu aau 23

<210> 78
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 78
uccaaauaga caaacaagau ugu 23

[0064]

<210> 79
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 79
uucauuuaga aagugaacug cgu 23

<210> 80
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 80

uauguaaggu gaaaucucaa gua 23

<210> 81
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 81
uucaauuggu gaacaccaag gac 23

<210> 82
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0065]

<400> 82
uagacaaaca agauuguauc ucu 23

<210> 83
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 83
uuaaaaauga guucccuuaa guu 23

<210> 84
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 84
ucagacguug uuguagaaac cuu 23

<210> 85
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 85
uuuguaaaga auaggcauac ucu 23

<210> 86
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0066]

<400> 86
ugacuuaucu ggaaauaaag gac 23

<210> 87
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 87
ucacauaccu gauagauuaa aga 23

<210> 88
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 88
ugacguuguu guagaaaccu uau 23

<210> 89
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 89
ucuaaaaaug aguucccuua agu 23

<210> 90
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0067]

<400> 90
ucauaccuga uagauuaaag aag 23

<210> 91
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 91
uagaaauucu ucuuugucau caa 23

<210> 92
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 92
ugagaaagau gcaguuucuc uac 23

<210> 93
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 93
uaaagaauag gcauacucuu uuc 23

<210> 94
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0068] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 94
uacguuguug uagaaaccuu aug 23

<210> 95
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 95
uaagaagagu gcaucagcau aga 23

<210> 96
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 96
ucccaaauag acaaacaaga uug 23

<210> 97
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 97
ucuggaaugc acgugaaaga guu 23

<210> 98
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0069]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 98
ucaaauagac aaacaagauu gua 23

<210> 99
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 99
caacucugaa acaguuuaac a 21

<210> 100
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 100
aauugucagc aucuuuuucu a 21

<210> 101
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 101
cgugaacaag auguacggaa a 21

<210> 102
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0070]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 102
ucacucaugg aagaaugguu a 21

<210> 103
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 103
cagauaagac uucuaauuua a 21

<210> 104
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 104
cccuaucaga gaacuuucuu a 21

<210> 105
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 105
aaaaggauca acaguuucua a 21

<210> 106
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0071]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 106
acaucacuag accuuucagc a 21

<210> 107
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 107
ggaacuucac cagaauucac a 21

<210> 108
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 108
caguuucuaa accucuguug a 21

<210> 109
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 109
aaacacaaaa ugucuuauuc a 21

<210> 110
<211> 21
[0072] <212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 110
caaagauuuu cuccuuuucu a 21

<210> 111
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 111
cuacucuaug acauuuugac a 21

<210> 112
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 112
caucuuucuc acaauaaacu a 21

<210> 113
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 113
ugagaacucu gaaauuauca a 21

[0073]
<210> 114
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 114
uacaacuugg aacuaagauc a 21

<210> 115
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 115
ugguuccaag caguuugucu a 21

<210> 116

<210> 21
<211> RNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 116
acuaaauaau cuccuuaugu a 21

<210> 117
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 117
aaagauuuuc uccuuuucua a 21

[0074]

<210> 118
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 118
accauucaga aacucaucga a 21

<210> 119
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 119
cauucagaaa cucaucgaga a 21

<210> 120
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 120
uuuauuccug acucuucuau a 21

<210> 121
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 121
uacaucacua gaccuuucag a 21

[0075]

<210> 122
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 122
aaucuuguuu gucuauuugg a 21

<210> 123
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 123
gcaguucacu uucuaaauga a 21

<210> 124
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 124
cuugagauuu caccuuacau a 21

<210> 125
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 125
ccuugguguu caccaauuga a 21

[0076]

<210> 126
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 126
agauacaauc uuguuugucu a 21

<210> 127
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 127
cuuaagggaa cucauuuuua a 21

<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 128
gguuucuaca acaacgucug a 21

<210> 129
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 129
aguaugccua uucuuuacaa a 21

[0077]

<210> 130
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 130
ccuuuauuuc cagauaaguc a 21

<210> 131
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 131

uuuaaucuau cagguaugug a 21

<210> 132
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 132
aagguuucua caacaacguc a 21

<210> 133
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

[0078]

<400> 133
uuaagggaac ucauuuuuag a 21

<210> 134
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 134
ucuuuaaucu aucagguaug a 21

<210> 135
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 135
gaugacaaag aagaauuucu a 21

<210> 136
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 136
agagaaacug caucuuucuc a 21

<210> 137
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0079]

<400> 137
aaagaguaug ccuauucuuu a 21

<210> 138
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 138
uaagguuucu acaacaacgu a 21

<210> 139
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 139
uaugcugaug cacucuucuu a 21

<210> 140
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 140
aucuuguuug ucuauuuggg a 21

<210> 141
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0080]

<400> 141
cucuuucacg ugcauuccag a 21

<210> 142
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 142
caaucuuguu ugucuauuug a 21

<210> 143
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 143
uguuaaacug uuucagaguu gga 23

<210> 144
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 144
uagaaaaaga ugcugacaau uug 23

<210> 145
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0081] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 145
uuuccguaca ucuuguucac gac 23

<210> 146
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 146
uaaccauucu uccaugagug agu 23

<210> 147
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 147
uuaaauuaga agucuuaucu gga 23

<210> 148
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 148
uaagaaaguu cucugauagg gau 23

<210> 149
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0082]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 149
uuagaaacug uugauccuuu ugu 23

<210> 150
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 150
ugcugaaagg ucuagugaug uaa 23

<210> 151
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 151
ugugaauucu ggugaaguuc cag 23

<210> 152
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 152
ucaacagagg uuuagaaacu guu 23

<210> 153
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0083]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 153
ugaauaagac auuuuguguu uug 23

<210> 154
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 154
uagaaaagga gaaaaucuuu gug 23

<210> 155
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 155
ugucaaaaug ucauagagua gua 23

<210> 156
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 156
uaguuuauug ugagaaagau gca 23

<210> 157
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0084]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 157
uugauaauuu cagaguucuc aca 23

<210> 158
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 158
ugaucuuagu uccaaguugu aac 23

<210> 159
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 159
uagacaaacu gcuuggaacc agc 23

<210> 160
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 160
uacauaagga gauuauuuag ugc 23

<210> 161
<211> 23
[0085] <212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 161
uuagaaaagg agaaaaucuu ugu 23

<210> 162
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 162
uucgaugagu uucugaaugg uga 23

<210> 163
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 163
uucucgauga guuucugaau ggu 23

<210> 164
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 164
uauagaagag ucaggaauaa agg 23

<210> 165
[0086] <211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 165
ucugaaaggu cuagugaugu aau 23

<210> 166
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 166
uccaaauaga caaacaagau ugu 23

<210> 167

<210> 167
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 167
uucauuuaga aagugaacug cgu 23

<210> 168
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 168
uauguaaggu gaaaucucaa gua 23

[0087]

<210> 169
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 169
uucaauuggu gaacaccaag gac 23

<210> 170
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 170
uagacaaaca agauuguauc ucu 23

<210> 171
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 171
uuaaaaauga guucccuuaa guu 23

<210> 172
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 172
ucagacguug uuguagaaac cuu 23

[0088]

<210> 173
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 173
uuuguaaaga auaggcauac ucu 23

<210> 174
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 174
ugacuuaucu ggaaauaaag gac 23

<210> 175
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 175
ucacauaccu gauagauuaa aga 23

<210> 176
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 176
ugacguuguu guagaaaccu uau 23

[0089]

<210> 177
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 177
ucuaaaaaug aguucccuua agu 23

<210> 178
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 178
ucauaccuga uagauuaaag aag 23

<210> 179
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 179
uagaaauucu ucuuugucau caa 23

<210> 180
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 180
ugagaaagau gcaguuucuc uac 23

[0090]

<210> 181
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 181
uaaagaauag gcauacucuu uuc 23

<210> 182
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 182

uacguuguug uagaaaccuu aug 23

<210> 183
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 183
uaagaagagu gcaucagcau aga 23

<210> 184
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

[0091]

<400> 184
ucccaaauag acaaacaaga uug 23

<210> 185
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 185
ucuggaaugc acgugaaaga guu 23

<210> 186
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 186
ucaaauagac aaacaagauu gua 23

<210> 187
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 187
uccaacucug aaacaguuua acc 23

<210> 188
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0092]

<400> 188
caaauuguca gcaucuuuuu cua 23

<210> 189
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 189
gucgugaaca agauguacgg aag 23

<210> 190
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 190
acucacucau ggaagaaugg uuu 23

<210> 191
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 191
uccagauaag acuucuaauu uaa 23

<210> 192
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0093]

<400> 192
aucccuauca gagaacuuuc uug 23

<210> 193
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 193
acaaaaggau caacaguuuc uaa 23

<210> 194
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 194
uuacaucacu agaccuuuca gca 23

<210> 195
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 195
cuggaacuuc accagaauuc acu 23

<210> 196
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0094] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 196
aacaguuucu aaaccucugu ugc 23

<210> 197
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 197
caaaacacaa aaugucuuau ucu 23

<210> 198
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 198
cacaaagauu uucuccuuuu cua 23

<210> 199
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 199
uacuacucua ugacauuuug aca 23

<210> 200
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0095]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 200
ugcaucuuuc ucacaauaaa cug 23

<210> 201
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 201
ugugagaacu cugaaauuau cau 23

<210> 202
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 202
guuacaacuu ggaacuaaga ucc 23

<210> 203
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 203
gcugguucca agcaguuugu cug 23

<210> 204
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0096]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 204
gcacuaaaua aucuccuuau gua 23

<210> 205
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 205
acaaagauuu ucuccuuuuc uaa 23

<210> 206
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 206
ucaccauuca gaaacucauc gag 23

<210> 207
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 207
accauucaga aacucaucga gac 23

<210> 208
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0097]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 208
ccuuuauucc ugacucuucu aug 23

<210> 209
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 209
auuacaucac uagaccuuuc agc 23

<210> 210
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 210
acaaucuugu uugucuauuu ggg 23

<210> 211
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 211
acgcaguuca cuuucuaaau gaa 23

[0098]

<210> 212
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 212
uacuugagau uucaccuuac aug 23

<210> 213
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 213
guccuuggug uucaccaauu gau 23

<210> 214
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 214
agagauacaa ucuuguuugu cua 23

<210> 215
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 215
aacuuaaggg aacucauuuu uag 23

<210> 216
[0099] <211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 216
aagguuucua caacaacguc uga 23

<210> 217
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 217
agaguaugcc uauucuuuac aaa 23

<210> 218

<210> 23
<211> RNA
<212> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 218
guccuuuauu uccagauaag uca 23

<210> 219
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 219
ucuuuaaucu aucagguaug uga 23

[0100]

<210> 220
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 220
auaagguuuc uacaacaacg ucu 23

<210> 221
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 221
acuuaaggga acucauuuuu agc 23

<210> 222
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 222
cuucuuuaau cuaucaggua ugu 23

<210> 223
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 223
uugaugacaa agaagaauuu cug 23

[0101]

<210> 224
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 224
guagagaaac ugcaucuuuc uca 23

<210> 225
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 225
gaaaagagua ugccuauucu uua 23

<210> 226
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 226
cauaagguuu cuacaacaac guc 23

<210> 227
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 227
ucuaugcuga ugcacucuuc uuc 23

[0102]

<210> 228
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 228
caaucuuguu ugucuauuug gga 23

<210> 229
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 229
aacucuuuca cgugcauucc aga 23

<210> 230
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 230
uacaaucuug uuugucuauu ugg 23

<210> 231
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 231
ccuugguguu caccaauuga a 21

[0103]

<210> 232
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 232
acuaaauaau cuccuuaugu a 21

<210> 233
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 233

aauugucagc aucuuuuucu a 21

<210> 234
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 234
aaaaggauca acaguuucua a 21

<210> 235
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0104]

<400> 235
caguuucuaa accucuguug a 21

<210> 236
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 236
cagauaagac uucuaauuua a 21

<210> 237
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 237
uuuauuccug acucuucuau a 21

<210> 238
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 238
uacaucacua gaccuuucag a 21

<210> 239
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0105]

<400> 239
acaucacuag accuuucagc a 21

<210> 240
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 240
caacucugaa acaguuuaac a 21

<210> 241
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 241
cccuaucaga gaacuuucuu a 21

<210> 242
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 242
agagaaacug caucuuucuc a 21

<210> 243
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0106]

<400> 243
caucuuucuc acaauaaacu a 21

<210> 244
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 244
uacaacuugg aacuaagauc a 21

<210> 245
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 245
gcaguucacu uucuaaauga a 21

<210> 246
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 246
ugguuccaag caguuugucu a 21

<210> 247
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0107] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 247
ugagaacucu gaaauuauca a 21

<210> 248
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 248
cuugagauuu caccuuacau a 21

<210> 249
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 249
cuacucuaug acauuuugac a 21

<210> 250
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 250
caaagauuuu cuccuuuucu a 21

<210> 251
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0108]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 251
aaagauuuuc uccuuuucua a 21

<210> 252
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 252
aaacacaaaa ugucuuauuc a 21

<210> 253
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 253
uucaauuggu gaacaccaag gac 23

<210> 254
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 254
uacauaagga gauuauuuag ugc 23

<210> 255
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0109]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 255
uagaaaaaga ugcugacaau uug 23

<210> 256
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 256
uuagaaacug uugauccuuu ugu 23

<210> 257
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 257
ucaacagagg uuuagaaacu guu 23

<210> 258
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 258
uuaaauuaga agucuuaucu gga 23

<210> 259
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0110]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 259
uauagaagag ucaggaauaa agg 23

<210> 260
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 260
ucugaaaggu cuagugaugu aau 23

<210> 261
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 261
ugcugaaagg ucuagugaug uaa 23

<210> 262
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 262
uguuaaacug uuucagaguu gga 23

<210> 263
<211> 23
[0111] <212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 263
uaagaaaguu cucugauagg gau 23

<210> 264
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 264
ugagaaagau gcaguuucuc uac 23

<210> 265
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 265
uaguuuauug ugagaaagau gca 23

<210> 266
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 266
ugaucuuagu uccaaguugu aac 23

[0112]
<210> 267
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 267
uucauuuaga aagugaacug cgu 23

<210> 268
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 268
uagacaaacu gcuuggaacc agc 23

<210> 269

<210> 269
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 269
uugauaauuu cagaguucuc aca 23

<210> 270
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 270
uauguaaggu gaaaucucaa gua 23

[0113]

<210> 271
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 271
ugucaaaaug ucauagagua gua 23

<210> 272
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 272
uagaaaagga gaaaaucuuu gug 23

<210> 273
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 273
uuagaaaagg agaaaaucuu ugu 23

<210> 274
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 274
ugaauaagac auuuuguguu uug 23

[0114]

<210> 275
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 275
ccuugguguu caccaauuga a 21

<210> 276
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 276
acuaaauaau cuccuuaugu a 21

<210> 277
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 277
aauugucagc aucuuuuucu a 21

<210> 278
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 278
aaaaggauca acaguuucua a 21

[0115]

<210> 279
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 279
caguuucuaa accucuguug a 21

<210> 280
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 280
cagauaagac uucuaauuua a 21

<210> 281
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 281
uuuauuccug acucuucuau a 21

<210> 282
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 282
uacaucacua gaccuuucag a 21

[0116]

<210> 283
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 283
acaucacuag accuuucagc a 21

<210> 284
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 284

caacucugaa acaguuuaac a 21

<210> 285
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 285
cccuaucaga gaacuuucuu a 21

<210> 286
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0117]

<400> 286
agagaaacug caucuuucuc a 21

<210> 287
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 287
caucuuucuc acaauaaacu a 21

<210> 288
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 288
uacaacuugg aacuaagauc a 21

<210> 289
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 289
gcaguucacu uucuaaauga a 21

<210> 290
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0118]

<400> 290
ugguuccaag caguuugucu a 21

<210> 291
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 291
ugagaacucu gaaauuauca a 21

<210> 292
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 292
cuugagauuu caccuuacau a 21

<210> 293
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 293
cuacucuaug acauuuugac a 21

<210> 294
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0119]

<400> 294
caaagauuuu cuccuuuucu a 21

<210> 295
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 295
aaagauuuuc uccuuuucua a 21

<210> 296
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 296
aaacacaaaa ugucuuauuc a 21

<210> 297
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 297
uucaauuggu gaacaccaag gac 23

<210> 298
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0120] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 298
uacauaagga gauuauuuag ugc 23

<210> 299
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 299
uagaaaaaga ugcugacaau uug 23

<210> 300
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 300
uuagaaacug uugauccuuu ugu 23

<210> 301
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 301
ucaacagagg uuuagaaacu guu 23

<210> 302
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0121]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 302
uuaaauuaga agucuuaucu gga 23

<210> 303
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 303
uauagaagag ucaggaauaa agg 23

<210> 304
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 304
ucugaaaggu cuagugaugu aau 23

<210> 305
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 305
ugcugaaagg ucuagugaug uaa 23

<210> 306
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0122]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 306
uguuaaacug uuucagaguu gga 23

<210> 307
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 307
uaagaaaguu cucugauagg gau 23

<210> 308
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 308
ugagaaagau gcaguuucuc uac 23

<210> 309
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 309
uaguuuauug ugagaaagau gca 23

<210> 310
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0123]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 310
ugaucuuagu uccaaguugu aac 23

<210> 311
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 311
uucauuuaga aagugaacug cgu 23

<210> 312
<211> 23
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 312
uagacaaacu gcuuggaacc agc 23

<210> 313
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 313
uugauaauuu cagaguucuc aca 23

<210> 314
<211> 23
[0124] <212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 314
uauguaaggu gaaaucucaa gua 23

<210> 315
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 315
ugucaaaaug ucauagagua gua 23

<210> 316
<211> 23

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 316
uagaaaagga gaaaaucuuu gug 23

<210> 317
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 317
uuagaaaagg agaaaaucuu ugu 23

[0125]
<210> 318
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 318
ugaauaagac auuuuguguu uug 23

<210> 319
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 319
ccuugguguu caccaauuga u 21

<210> 320

<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 320
acuaaauaau cuccuuaugu a 21

<210> 321
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 321
aauugucagc aucuuuuucu a 21

[0126]

<210> 322
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 322
aaaaggauca acaguuucua a 21

<210> 323
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 323
caguuucuaa accucuguug c 21

<210> 324
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 324
cagauaagac uucuaauuua a 21

<210> 325
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 325
uuuauuccug acucuucuau g 21

[0127]

<210> 326
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 326
uacaucacua gaccuuucag c 21

<210> 327
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 327
acaucacuag accuuucagc a 21

<210> 328
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 328
caacucugaa acaguuuaac c 21

<210> 329
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 329
cccuaucaga gaacuuucuu g 21

[0128]

<210> 330
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 330
agagaaacug caucuuucuc a 21

<210> 331
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 331
caucuuucuc acaauaaacu g 21

<210> 332
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 332
uacaacuugg aacuaagauc c 21

<210> 333
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 333
gcaguucacu uucuaaauga a 21

[0129]

<210> 334
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 334
ugguuccaag caguuugucu g 21

<210> 335
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 335

ugagaacucu gaaauuauca u 21

<210> 336
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 336
cuugagauuu caccuuacau g 21

<210> 337
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

[0130]

<400> 337
cuacucuaug acauuuugac a 21

<210> 338
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 338
caaagauuuu cuccuuuucu a 21

<210> 339
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 339
aaagauuuuc uccuuuucua a 21

<210> 340
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 340
aaacacaaaa ugucuuauuc u 21

<210> 341
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0131]

<400> 341
cgugaacaag auguacggaa a 21

<210> 342
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 342
ggaacuucac cagaauucac a 21

<210> 343
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 343
ucacucaugg aagaaugguu a 21

<210> 344
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 344
uuuccguaca ucuuguucac gac 23

<210> 345
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

[0132]

<400> 345
ugugaauucu ggugaaguuc cag 23

<210> 346
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的寡核苷酸

<400> 346
uaaccauucu uccaugagug agu 23

<210> 347
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

寡核苷酸

<400> 347
cgugaacaag auguacggaa a 21

<210> 348
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 348
ggaacuucac cagaauucac a 21

<210> 349
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0133] <223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 349
ucacucaugg aagaaugguu a 21

<210> 350
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 350
uuuccguaca ucuuguucac gac 23

<210> 351
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 351
ugugaauucu ggugaaguuc cag 23

<210> 352
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
寡核苷酸

<400> 352
uaaccauucu uccaugagug agu 23

[0134]

<210> 353
<211> 13
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 353
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 354
<211> 16
<212> PRT
<213> 果蝇

<400> 354
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

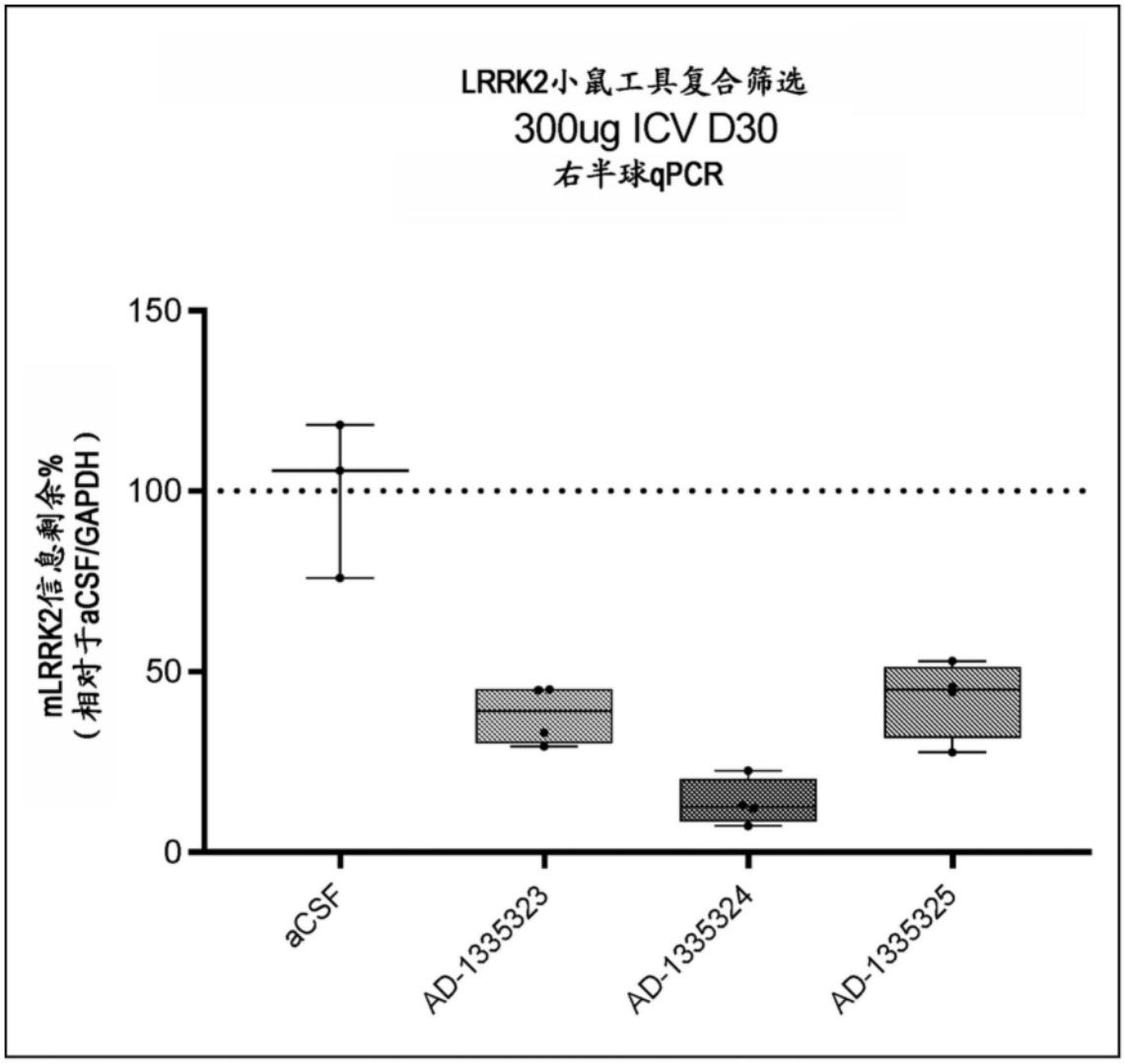

LRRK2小鼠工具复合筛选
300ug ICV D30
右半球qPCR
mLRRK2信息剩余%
（相对于aCSF/GAPDH）
150
100
50
0
aCSF
AD-1335323
AD-1335324
AD-1335325

图1

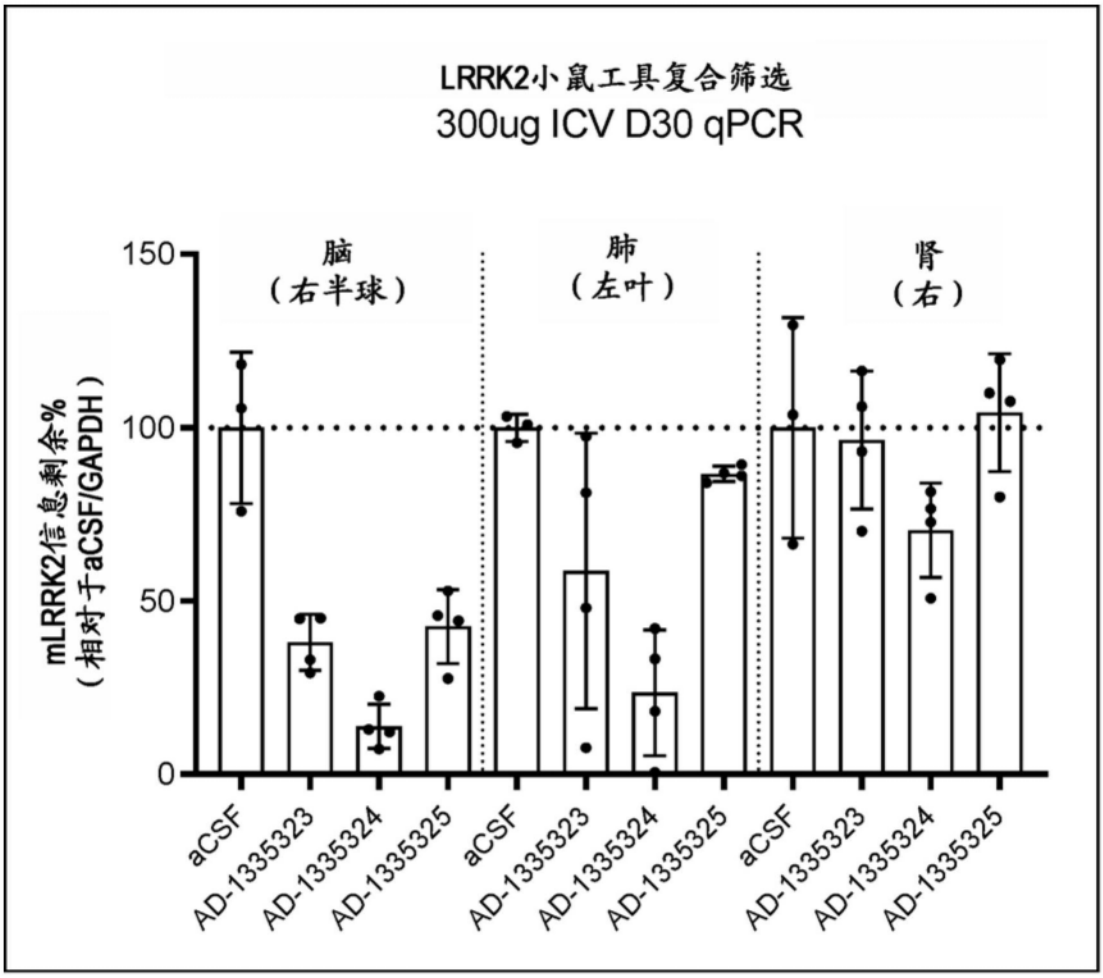

LRRK2小鼠工具复合筛选
300ug ICV D30 qPCR
mLRRK2信息剩余%
（相对于aCSF/GAPDH）
150
100
50
0
脑
（右半球）
肺
（左叶）
肾
（右）
aCSF
AD-1335323
AD-1335324
AD-1335325
aCSF
AD-1335323
AD-1335324
AD-1335325
aCSF
AD-1335323
AD-1335324
AD-1335325

图2

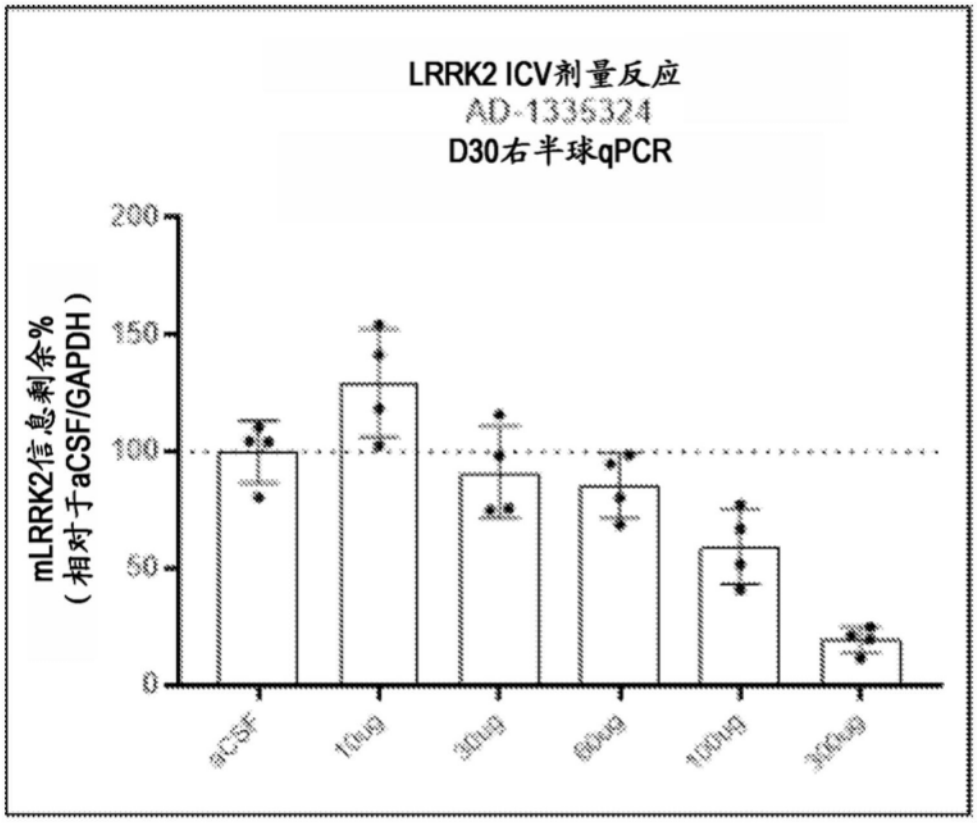

LRRK2 ICV剂量反应
AD-1335324
D30右半球qPCR
mLRRK2信息剩余%
（相对于aCSF/GAPDH）
200
150
100
50
0
aCSF
10ug
30ug
60ug
100ug
300ug

图3A

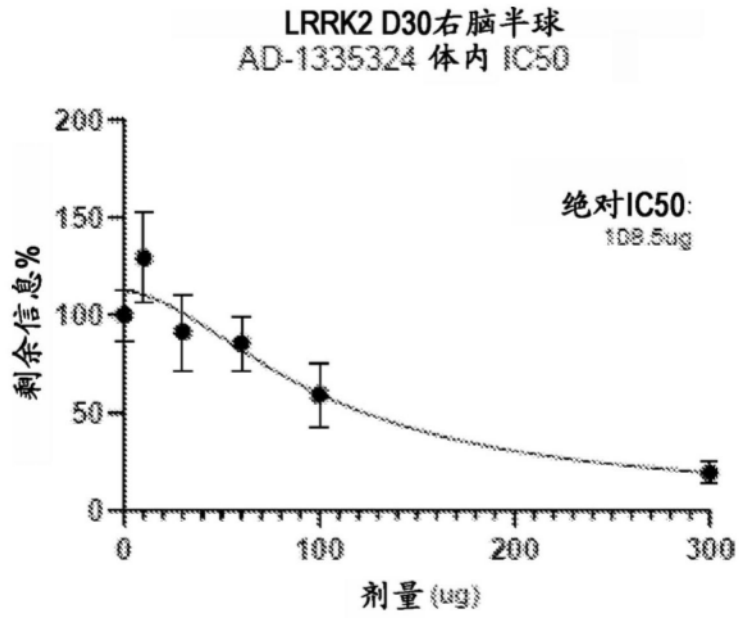

LRRK2 D30右脑半球
AD-1335324 体内 IC50
绝对IC50:
108.5ug
剩余信息%
200
150
100
50
0
0
100
200
300
剂量(ug)

图3B

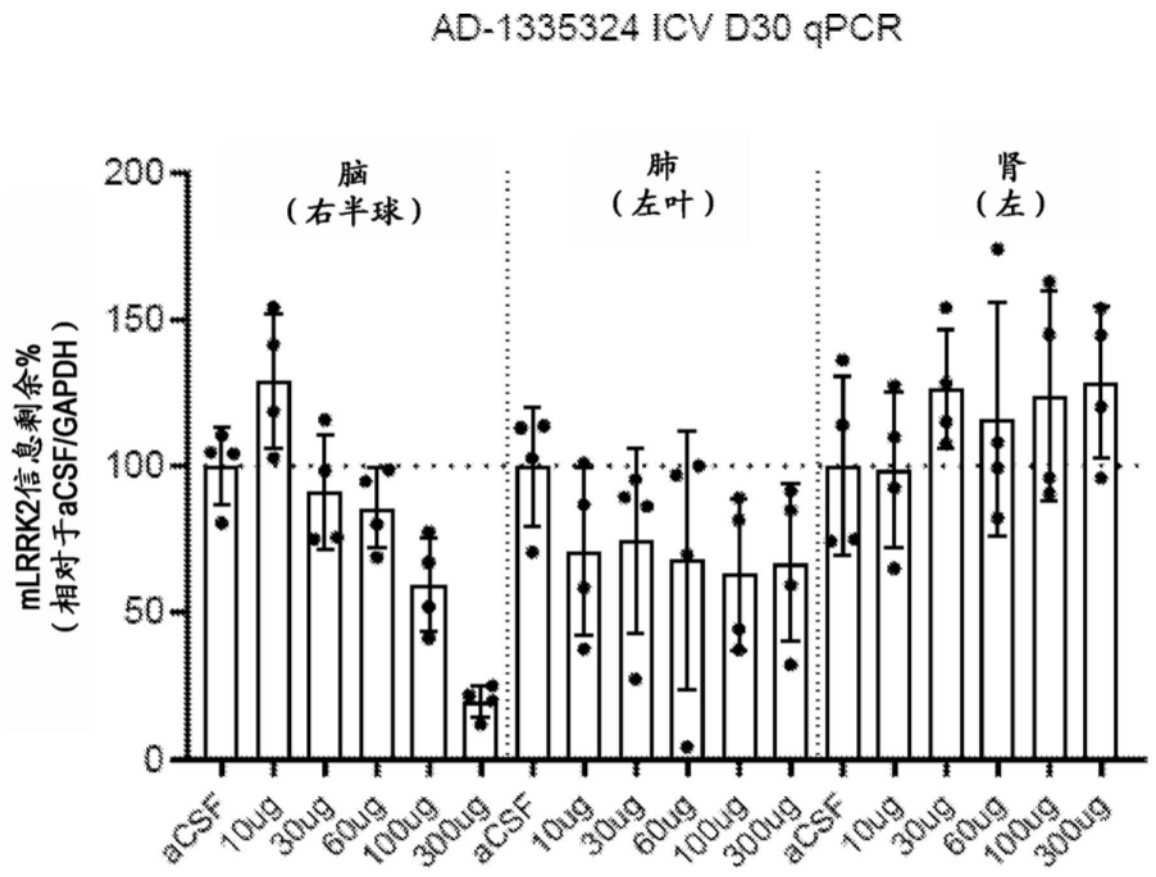

AD-1335324 ICV D30 qPCR
mLRRK2信息剩余%
（相对于aCSF/GAPDH）
200
150
100
50
0
脑
（右半球）
肺
（左叶）
肾
（左）
aCSF
10ug
30ug
60ug
100ug
300ug

图4