(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120035666 A
(43)申请公布日 2025.05.23

(21)申请号 202380056148.4

(22)申请日 2023.07.27

(30)优先权数据
23155105.2 2023.02.06 EP
63/369,631 2022.07.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/070899 2023.07.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/023251 EN 2024.02.01

(71)申请人 e-生物有限公司
地址 英国伦敦

(72)发明人 A·麦卡西 G·克拉格 J·朗登 I·德桑提亚哥 D·布朗 A·A·莫塔扎维 V·马尼拉 M·杰拉曼 A·迪巴克 A·J·莫格

(74)专利代理机构 北京唐颂永信知识产权代理有限公司 11755
专利代理师 刘伟

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)

权利要求书24页 说明书157页
序列表（电子公布） 附图42页

(54)发明名称

抑制ZPI的双链核酸化合物

(57)摘要

本申请提供了适合治疗用途的新型核酸化合物。此外,本申请提供了制备这些化合物的方法,以及使用这些化合物治疗各种疾病和病况的方法。

CN 120035666 A

1.一种用于抑制ZPI表达的核酸,其包含双链体区域,所述双链体区域包含第一链和与所述第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链:

(i)与从所述ZPI基因转录的RNA的一部分至少部分互补,并且

(ii)包含与表2所列的任意一个第一链序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷。

2.一种用于抑制ZPI表达的核酸,其包含双链体区域,所述双链体区域包含第一链和与所述第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链:

(i)与从所述ZPI基因转录的RNA的一部分至少部分互补,并且

(ii)包含与表3所列的任意一个第一链修饰的序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷。

3.根据权利要求1或2所述的核酸,其中所述第一链包含权利要求1或2中定义的任意一个序列的核苷2-18,具体地其中所述第一链包含表2或表3定义的任意一个序列的核苷2-18。

4.根据权利要求1所述的核酸,其中所述第二链包含与表2所列的任意一个第二链序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中所述第二链具有在17个连续核苷上与所述第一链至少85%互补的区域。

5.根据权利要求2所述的核酸,其中所述第二链包含与表4中所列的任意一个第二链修饰的序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中所述第二链具有在17个连续核苷上与所述第一链至少85%互补的区域。

6.根据权利要求1所述的核酸,其中所述第一链包含表2所列的任意一个第一链序列。

7.根据权利要求2所述的核酸,其中所述第一链包含表3所列的任意一个第一链修饰的序列。

8.根据权利要求4所述的核酸,其中所述第二链包含表2所列的任意一个第二链序列。

9.根据权利要求5所述的核酸,其中所述第二链包含表4所列的任意一个第二链修饰的序列。

10.根据权利要求6所述的核酸,其中所述第一链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239。

11.根据权利要求7所述的核酸,其中所述第一链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:385、SEQ ID NO:388、SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:367、SEQ ID NO:368、SEQ ID NO:369、SEQ ID NO:371、SEQ ID NO:372、SEQ ID NO:378、SEQ ID NO:379、SEQ ID NO:384、SEQ ID NO:387、SEQ ID NO:389、SEQ ID NO:466、SEQ ID NO:467、SEQ ID NO:468、SEQ ID NO:469、SEQ ID NO:471、SEQ ID NO:472、SEQ ID NO:478、SEQ ID NO:479、SEQ ID NO:498、SEQ ID NO:518、SEQ ID NO:538、SEQ ID NO:546、SEQ ID NO:547、SEQ ID NO:548、SEQ ID NO:549、SEQ ID NO:551、SEQ ID NO:552、SEQ ID NO:558、SEQ ID NO:559。

12.根据权利要求8所述的核酸,其中所述第二链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:267、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:264、SEQ ID

NO:268、SEQ ID NO:269、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:349、SEQ ID NO:351、SEQ ID NO:352、SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:359。

13.根据权利要求9所述的核酸,其中所述第二链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:585、SEQ ID NO:588、SEQ ID NO:566、SEQ ID NO:567、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:569、SEQ ID NO:571、SEQ ID NO:572、SEQ ID NO:578、SEQ ID NO:579、SEQ ID NO:584、SEQ ID NO:587、SEQ ID NO:589、SEQ ID NO:666、SEQ ID NO:667、SEQ ID NO:668、SEQ ID NO:669、SEQ ID NO:671、SEQ ID NO:672、SEQ ID NO:678、SEQ ID NO:679、SEQ ID NO:698、SEQ ID NO:718、SEQ ID NO:738、SEQ ID NO:746、SEQ ID NO:747、SEQ ID NO:748、SEQ ID NO:749、SEQ ID NO:751、SEQ ID NO:752、SEQ ID NO:758、SEQ ID NO:759。

14.根据权利要求1和4所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:265
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268
SEQ ID NO:126	SEQ ID NO:246
SEQ ID NO:127	SEQ ID NO:247
SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:248
SEQ ID NO:129	SEQ ID NO:249
SEQ ID NO:131	SEQ ID NO:251
SEQ ID NO:132	SEQ ID NO:252
SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:258
SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:259
SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:264
SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:267
SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:269
SEQ ID NO:226	SEQ ID NO:346
SEQ ID NO:227	SEQ ID NO:347
SEQ ID NO:228	SEQ ID NO:348
SEQ ID NO:229	SEQ ID NO:349
SEQ ID NO:231	SEQ ID NO:351
SEQ ID NO:232	SEQ ID NO:352
SEQ ID NO:238	SEQ ID NO:358
SEQ ID NO:239	SEQ ID NO:359

。

15.根据权利要求2和5所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链

SEQ ID NO:385	SEQ ID NO:585
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:366	SEQ ID NO:566
SEQ ID NO:367	SEQ ID NO:567
SEQ ID NO:368	SEQ ID NO:568
SEQ ID NO:369	SEQ ID NO:569
SEQ ID NO:371	SEQ ID NO:571
SEQ ID NO:372	SEQ ID NO:572
SEQ ID NO:378	SEQ ID NO:578
SEQ ID NO:379	SEQ ID NO:579
SEQ ID NO:384	SEQ ID NO:584
SEQ ID NO:387	SEQ ID NO:587
SEQ ID NO:389	SEQ ID NO:589
SEQ ID NO:466	SEQ ID NO:666
SEQ ID NO:467	SEQ ID NO:667
SEQ ID NO:468	SEQ ID NO:668
SEQ ID NO:469	SEQ ID NO:669
SEQ ID NO:471	SEQ ID NO:671
SEQ ID NO:472	SEQ ID NO:672
SEQ ID NO:478	SEQ ID NO:678
SEQ ID NO:479	SEQ ID NO:679
SEQ ID NO:498	SEQ ID NO:698
SEQ ID NO:518	SEQ ID NO:718
SEQ ID NO:538	SEQ ID NO:738
SEQ ID NO:546	SEQ ID NO:746
SEQ ID NO:547	SEQ ID NO:747
SEQ ID NO:548	SEQ ID NO:748
SEQ ID NO:549	SEQ ID NO:749
SEQ ID NO:551	SEQ ID NO:751
SEQ ID NO:552	SEQ ID NO:752
SEQ ID NO:558	SEQ ID NO:758
SEQ ID NO:559	SEQ ID NO:759

。

16.根据权利要求14所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:248
SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:264

SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268
SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:269
SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:258

。

17.根据权利要求15所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:368	SEQ ID NO:568
SEQ ID NO:384	SEQ ID NO:584
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:389	SEQ ID NO:589
SEQ ID NO:538	SEQ ID NO:738

。

18.根据权利要求1和4所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268
SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:265
SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:264
SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:285
SEQ ID NO:202	SEQ ID NO:322

。

19.根据权利要求2和5所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:385	SEQ ID NO:585
SEQ ID NO:384	SEQ ID NO:584
SEQ ID NO:405	SEQ ID NO:605
SEQ ID NO:442	SEQ ID NO:642
SEQ ID NO:762	SEQ ID NO:772
SEQ ID NO:763	SEQ ID NO:773
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:765	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776
SEQ ID NO:767	SEQ ID NO:777

SEQ ID NO:768	SEQ ID NO:778
SEQ ID NO:769	SEQ ID NO:779
SEQ ID NO:770	SEQ ID NO:780
SEQ ID NO:771	SEQ ID NO:781
SEQ ID NO:782	SEQ ID NO:773
SEQ ID NO:783	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:784	SEQ ID NO:777
SEQ ID NO:785	SEQ ID NO:779
SEQ ID NO:786	SEQ ID NO:781

。

20.根据权利要求1和4所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:265
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268

。

21.根据权利要求2和5所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:385	SEQ ID NO:585
SEQ ID NO:765	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:783	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:801	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:802	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:803	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:804	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:805	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:806	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:807	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:808	SEQ ID NO:819
SEQ ID NO:809	SEQ ID NO:819

。

22.根据权利要求2和5所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链

SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:767	SEQ ID NO:777
SEQ ID NO:810	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:811	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:812	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:813	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:814	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:815	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:816	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:817	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:818	SEQ ID NO:820

。

23.根据权利要求2和5所述的核酸,其包含第一链和第二链,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776

。

24.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述第一链的长度为17至30个核苷,优选19至25个核苷,更优选19或23个核苷。

25.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述第二链的长度为17至30个核苷,优选19至25个核苷,更优选19或21个核苷。

26.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述核酸的双链体区域的长度为17至30个核苷,更优选长度为19或21个核苷。

27.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述第一链和从所述ZPI基因转录的RNA的一部分之间的互补区域的长度为17至30个核苷。

28.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含一个或多个单链核苷突出端,任选地其中所述突出端在所述第一链或第二链上,优选在所述第一链或第二链的3'末端,和/或其中所述突出端包含1至4个核苷,更优选2个核苷。

29.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述核酸是siRNA寡核苷。

30.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述第一链和/或第二链上的一个或多个核苷被修饰,以形成修饰的核苷。

31.根据权利要求30所述的核酸,其中所述第一链和/或第二链上的一个或多个核苷包含末端修饰、碱基修饰、糖修饰和/或主链修饰。

32.根据权利要求30所述的核酸,其中所述第一链和/或第二链上的一个或多个核苷包含糖修饰,其中所述修饰是在核糖的2'-OH基团处的修饰。

33.根据权利要求32所述的核酸,其中所述糖修饰包含2'-Me修饰和/或2'-F修饰。

34.根据权利要求30所述的核酸,其中所述第一链从所述第一链的位置1算起,在位置2、位置6、位置14中的任意一个位置处或其任意组合包含2'-F修饰。

35.根据权利要求30所述的核酸,其中所述第二链从所述第二链的位置1算起,在位置7、位置9、位置11中的任意一个位置处或其任意组合包含2'-F修饰。

36.根据权利要求30所述的核酸,其中所述第一链和第二链各自包含2'-Me修饰和2'-F修饰。

37.根据权利要求30所述的核酸,其中所述核酸包含至少一个热去稳定化修饰,所述热去稳定化修饰从所述第一链的位置1算起,适当地在所述第一链的位置1至9中的一个或多个位置处,和/或在所述第二链上与所述第一链的位置1至9对齐的一个或多个位置处,其中所述不稳定化修饰选自:修饰的非锁核酸(UNA)和乙二醇核酸(GNA),优选乙二醇核酸,更优选(S)-乙二醇核酸,其中更优选地,所述核酸从所述第一链的位置1算起,包含至少一个在所述第一链的位置7处的热去稳定化修饰。

38.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述siRNA寡核苷从所述第二链的位置1算起,在所述第二链的位置6至12处包含3个或更多个2'-F修饰,如在所述第二链的位置6至12处包含4、5、6或7个2'-F修饰。

39.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第二链从所述第二链的位置1算起,在所述第二链的位置1至6处包含至少3个,如4、5或6个2'-Me修饰。

40.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链在3'末端区域包含至少5个2'-Me连续修饰,优选包括在3'末端区域的末端核苷,或在3'末端区域从末端核苷开始的至少1或2个核苷内。

41.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链在3'末端区域包含7个2'-Me连续修饰,优选包括在3'末端区域的末端核苷。

42.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链和所述第二链中的每一条链均包含交替修饰模式,优选沿所述第一链和所述第二链中的每一条链的整个长度的完全交替修饰模式,其中所述第一链的核苷通过以下方式进行修饰:(i)从所述第一链的位置1算起,奇数核苷上的2'Me修饰,和(ii)从所述第一链的位置1算起,偶数核苷上的2'F修饰,并且所述第二链的核苷通过以下方式进行修饰:(i)从所述第二链的位置1算起,奇数核苷上的2'F修饰,和(ii)从所述第二链的位置1算起,偶数核苷上的2'Me修饰。

43.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链的核苷包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自:2'Me糖修饰和2'F糖修饰,前提是所述第一链中2'F糖修饰的总数不由四或六个2'F修饰组成。

44.根据权利要求30所述的核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链的核苷包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自:2'Me糖修饰和2'F糖修饰,其中所述第一链中的2'F糖修饰的总数由3、5或7个2'F修饰组成。

45.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其还包含一个或多个无碱基核苷,任选地,其中所述一个或多个无碱基核苷位于所述第二链的末端区域,和/或其中至少一个无碱基核苷通过反向核苷间键连接至相邻的碱基核苷。

46.根据权利要求45所述的核酸,其中所述第二链包含所述第二链的5'末端区域的2个连续无碱基核苷,其中一个这样的无碱基核苷是在所述第二链的5'末端区域处的末端核

苷,而另一个无碱基核苷是在所述第二链的5’末端区域处的倒数第二个核苷,其中:

(a)所述倒数第二个无碱基核苷通过反向核苷间键连接至相邻5’近末端区域中相邻的第一个碱基核苷;并且

(b)反向键是5-5’反向键;并且

(c)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,所述末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键为3’-5’。

47.根据权利要求45所述的核酸,其中所述第二链包含2个连续的无碱基核苷,优选位于所述第二链的3’末端区域的突出端,其中一个这样的无碱基核苷是在所述第二链的3’末端区域处的末端核苷,而另一个无碱基核苷是所述第二链的3’末端区域处的倒数第二个核苷,其中:

(a)所述倒数第二个无碱基核苷通过反向核苷间键连接至相邻3’近末端区域中相邻的第一个碱基核苷;并且

(b)反向键是3-3’反向键;并且

(c)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,所述末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键是5’-3’。

48.根据权利要求46所述的核酸,其中

(i)所述第一链和所述第二链各自的长度为23个核苷;

(ii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第二链的所述5’近末端区域的三个连续位置之间,其中第一硫代磷酸酯核苷间键位于(a)中的所述相邻的第一个碱基核苷与所述第二链的所述5’近末端区域中的相邻的第二个碱基核苷之间,并且第二硫代磷酸酯核苷间键位于所述第二链的所述5’近末端区域的相邻的第二个碱基核苷与相邻的第三个碱基核苷之间;

(iii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第一链的5’和3’末端区域的三个连续位置之间,由此所述第一链的5’和3’末端区域的每个末端核苷分别通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5’和3’相邻的倒数第二个核苷,并且每个5’和3’倒数第二个核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5’和3’相邻的倒数第三个核苷;并且

(iv)所述核酸的第二链直接或间接地与所述第二链的3’末端区域的一个或多个配体部分缀合。

49.根据权利要求47所述的核酸,其中

(i)所述第一链和所述第二链各自的长度为23个核苷;

(ii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第二链的所述3’近末端区域的三个连续位置之间,其中第一硫代磷酸酯核苷间键位于(a)中的所述相邻的第一个碱基核苷与所述第二链的3’近末端区域中的相邻的第二个碱基核苷之间,并且第二硫代磷酸酯核苷间键位于所述第二链的所述3’近末端区域的相邻的第二个碱基核苷与相邻的第三个碱基核苷之间;

(iii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第一链的5’和3’末端区域的三个连续位置之间,由此所述第一链的5’和3’末端区域的每个末端核苷分别通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5’和3’相邻的倒数第二个核苷,并且每个5’和3’倒数第二个核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5’和3’相邻的倒数第三个核苷;并且

(iv)所述核酸的第二链直接或间接地与所述第二链的5’末端区域的一个或多个配体部分缀合。

50.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间键。

51.根据权利要求50所述的核酸,其中所述一个或多个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第二链的5’或3’近末端区域的至少三个连续位置之间,由此所述近末端区域优选与所述末端区域相邻,其中至少根据权利要求45所述第二链的一个或多个无碱基核苷位于所述末端区域。

52.根据权利要求50或51所述的核酸,其中所述一个或多个硫代磷酸酯核苷间键分别位于所述第一链的5’和/或3’末端区域的至少三个连续位置之间,由此优选地所述第一链的5’和/或3’末端区域的末端位置通过硫代磷酸酯核苷间键连接至其相邻位置。

53.根据权利要求33所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me。

54.根据权利要求33所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$。

55.根据权利要求53所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,

其中(s)为硫代磷酸酯核苷间键。

56.根据权利要求54所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

Me(s)Me(s) $(Me)_6$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

57.根据权利要求53所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一

项的修饰模式(5’-3’)：

ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

其中ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在所述第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

58.根据权利要求54所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’)：

ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

其中ia代表反向无碱基核苷。

59.根据权利要求53所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’)：

ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

其中：

(s)是硫代磷酸酯核苷间键,

ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在所述第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

60.根据权利要求54所述的核酸,其中所述第二链的所述修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’)：

ia-ia-Me(s)Me(s)$(Me)_6$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

其中：(s)是硫代磷酸酯核苷间键,

ia代表反向无碱基核苷。

61.根据权利要求33所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一

个：

修饰模式1：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式2：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式3：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式4：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式5：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式6：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me。

62.根据权利要求33所述的核酸，其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个：

修饰模式1：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-Me-Me-X_1-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，其中X_1是热去稳定化修饰；

或修饰模式2：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式3：

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式7:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式8:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me。

63.根据权利要求61所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

64.根据权利要求62所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-

Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式7:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式8:

第二链(5’-3’):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

65.根据权利要求61所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式3：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me，

第一链(5’-3’)：Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me；

或修饰模式4：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me，

第一链(5’-3’)：Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me；

或修饰模式5：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me，

第一链(5’-3’)：Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me；

或修饰模式6：

第二链(5’-3’)：Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me，

第一链(5’-3’)：Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me；

其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

66.根据权利要求61所述的核酸，其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个：

修饰模式1：

第二链(5’-3’)：ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式2：

第二链(5’-3’)：ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式3：

第二链(5’-3’)：ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me，

第一链(5’-3’)：Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me；

或修饰模式4：

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

其中ia代表反向无碱基核苷。

67.根据权利要求62所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-X_1-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-

Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式7:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式8:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me,

其中ia代表反向无碱基核苷。

68.根据权利要求61所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

其中ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在所述第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

69.根据权利要求61所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

其中:

(s)是硫代磷酸酯核苷间键,ia代表反向无碱基核苷。

70.根据权利要求62所述的核酸,其中所述修饰的核苷包含以下修饰模式中的任意一个:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X1是热去稳定化修饰;

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X1是热去稳定化修饰;

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式7:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

或修饰模式8:

第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

其中:

(s)是硫代磷酸酯核苷间键,

ia代表反向无碱基核苷。

71.根据权利要求61的核酸,其中所述修饰的核苷具有以下修饰模式:

修饰模式1:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

或修饰模式2:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

或修饰模式3:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

或修饰模式4:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

或修饰模式5:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

或修饰模式6:

第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

其中:

(s)为硫代磷酸酯间核苷键,

ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

72.根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述核酸直接或间接地与一个或多个配体部分缀合,任选地,其中所述配体部分在所述第二链的末端区域,优选在其3’末端区域。

73.根据权利要求72所述的核酸,其中所述配体部分包含:

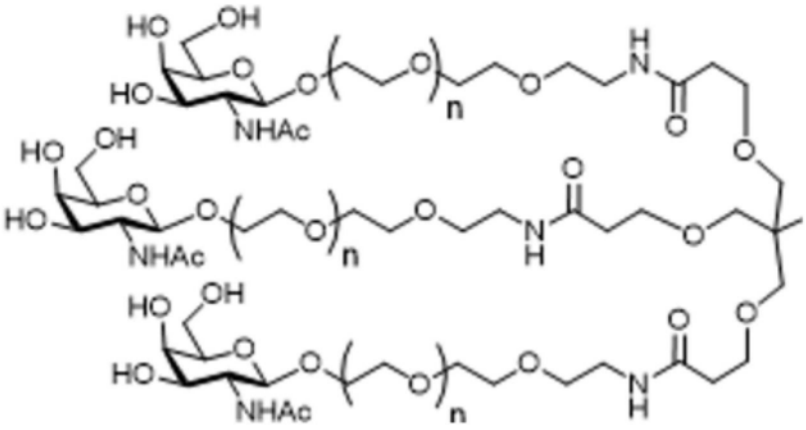
(i)一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)配体,和/或

(ii)一个或多个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)配体衍生物,和/或

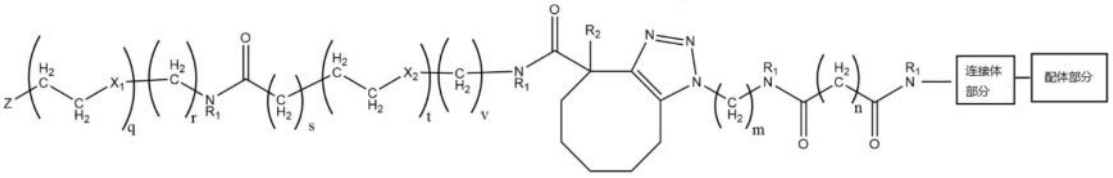
(iii)一个或多个通过连接体与所述核酸缀合的N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)配体和/或其衍生物。

74.根据权利要求73所述的核酸,其中所述一个或多个GalNAc配体和/或GalNAc配体衍生物直接或间接地缀合到所述核酸的第二链的5’或3’末端区域,优选其3’末端区域。

75.根据权利要求72至74中任一项所述的核酸,其中所述配体部分包含以下结构:



76.根据权利要求72至75中任一项所述的核酸,包含以下结构:



其中:

R_1在每次出现时独立地选自下组:氢、甲基和乙基;

R_2选自下组:氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基;

X_1和X_2在每次出现时独立地选自:亚甲基、氧和硫;

m为1至6的整数;

n为1至10的整数;

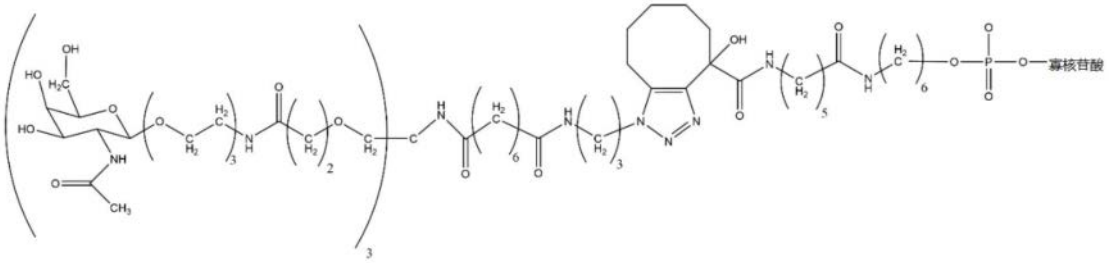
q、r、s、t、v独立地为0至4的整数,前提是:

(i)q和r不能同时为0;并且

(ii)s、t和v不能同时为0;

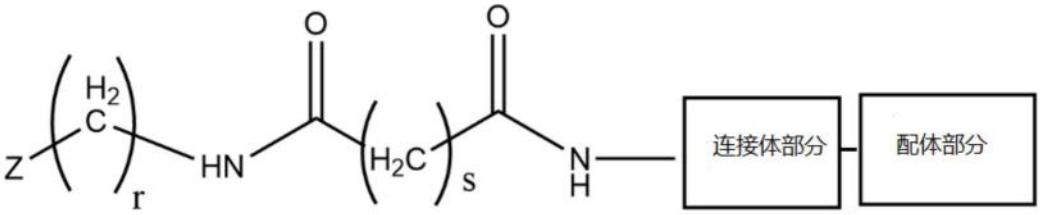
Z是寡核苷部分。

77.根据权利要求76所述的核酸,包含以下结构:



其中[寡核苷酸]代表所述第二链的连续核苷。

78.根据权利要求72至75中任一项所述的核酸,包含以下结构:

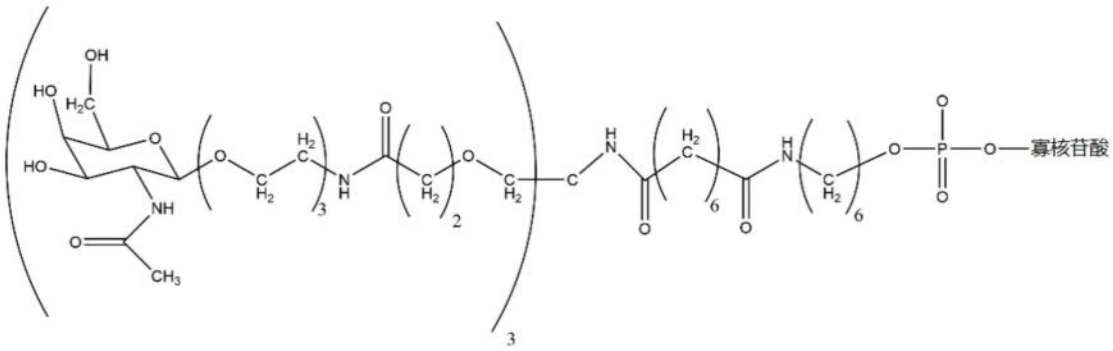


其中:

r和s独立地为选自1至16的整数;并且

Z是寡核苷部分。

79.根据权利要求78所述的核酸,包含以下结构:



其中[寡核苷酸]代表所述第二链的连续核苷。

80.根据权利要求72至79任一项所述的核酸,其中所述核酸包含以下修饰模式:

第二链(5'-3'):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,

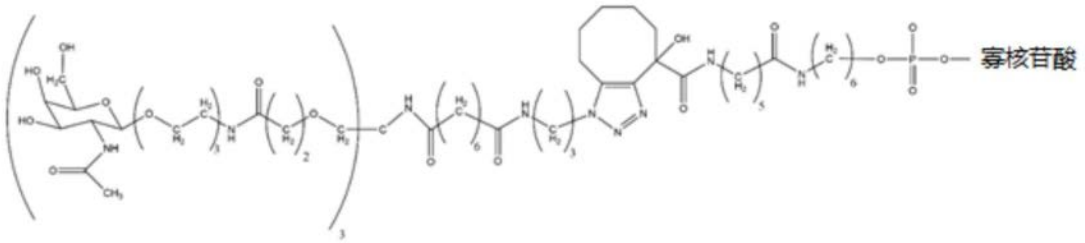
其中：

(s)是硫代磷酸酯核苷间键，

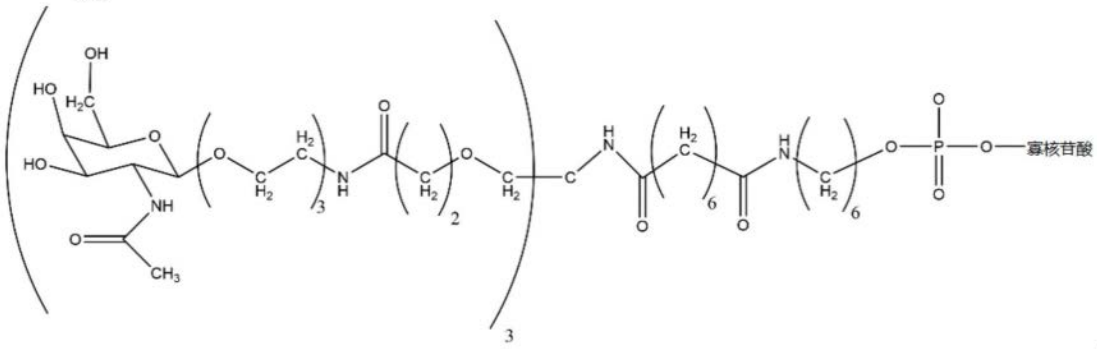
ia代表反向无碱基核苷，

并且其中所述核酸直接或间接地与一个或多个配体部分缀合，任选地其中所述配体部分在所述第二链的末端区域，优选在其3’末端区域。

81.根据权利要求80所述的核酸，其中所述第二链包含以下结构：



或



，

其中[寡核苷酸]代表所述第二链的连续核苷，并且其中所述一个或多个配体部分通过连接体缀合到所述第二链的3’末端区域。

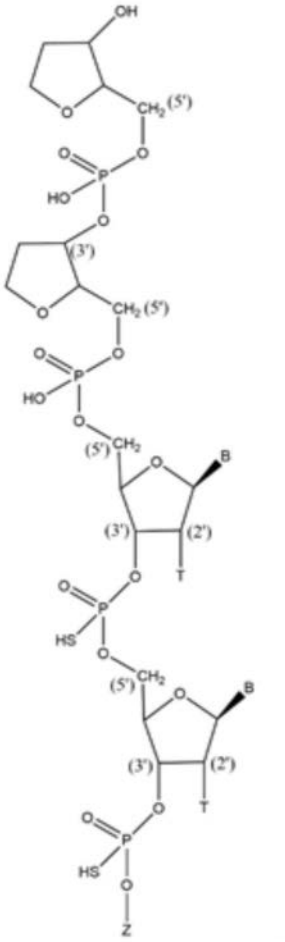
82.根据权利要求80或81所述的核酸，其中所述第一链和所述第二链包含与下列第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本由所述核苷序列组成：

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776

。

83.根据权利要求80至82中任一项所述的核酸，其中所述第二链的5’末端区域的2个连续反向无碱基核苷如以下5’末端基序所示：

5'末端基序



，

其中：

T代表2'Me核糖修饰，

B代表所述第二链的5'末端区域前两个碱基核苷的核苷碱基，并且

Z代表所述第二链的剩余19个连续的碱基核苷。

84.一种药物组合物，其包含前述权利要求中任一项所述的核酸，以及药学上可接受的赋形剂或载体。

85.根据前述权利要求中任一项所述的核酸或药物组合物，用于治疗用途。

86.根据前述权利要求中任一项所述的核酸或药物组合物，用于预防或治疗与止血障碍相关的疾病的用途，所述疾病为例如与止血障碍相关的疾病，如血友病。

抑制ZPI的双链核酸化合物

技术领域

[0001] 本申请提供了适合治疗用途的新型核酸化合物。此外,本申请提供了制备这些化合物的方法,以及使用这些化合物治疗各种疾病和病况的方法。

背景技术

[0002] 核酸化合物在医学上具有重要的治疗应用。核酸可用于沉默导致特定疾病的基因。基因沉默通过抑制翻译来阻止蛋白质的形成。重要的是,基因沉默剂是抑制与疾病相关的蛋白质功能的传统小有机化合物的有前途的替代品。siRNA、反义RNA和微RNA是通过基因沉默来阻止蛋白质形成的寡核苷酸/寡核苷。

[0003] 在过去的二十年里,人们已经开发了大量用于诊断和治疗目的的修饰的siRNA化合物,包括用于治疗各种疾病的siRNA/RNAi治疗剂,这些疾病包括中枢神经系统疾病、炎症性疾病、代谢紊乱、肿瘤、传染病和眼部疾病。

[0004] 本申请涉及用于治疗和/或预防疾病的核酸化合物。

发明内容

[0005] 根据本申请的第一方面,提供了一种用于抑制ZPI表达的核酸,其包含双链体区域,所述双链体区域包含第一链和与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链:(i)与从所述ZPI基因转录的RNA的一部分至少部分互补,并且(ii)包含与表2所列的任意一个第一链序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷。

[0006] 根据本申请的第二方面,提供了一种用于抑制ZPI表达的核酸,其包含双链体区域,所述双链体区域包含第一链和与所述第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链:(i)与从ZPI基因转录的RNA的一部分至少部分互补,并且(ii)包含与表3所列的任意一个第一链修饰的序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷。

[0007] 如本文所述的核酸,其中第一链包含本申请上述第一和第二方面的任意一个序列的核苷2-18。

[0008] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第二链包含与表2所列的任意一个第二链序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中所述第二链具有在17个连续核苷上与所述第一链至少85%互补的区域。

[0009] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第二链包含与表2所列的任意一个第二链序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中双链体区域包含至少14、15、16或17个互补碱基对。

[0010] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第二链包含与表4中所列的任意一个第二链修饰的序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中所述第二链具有在17个连续核苷上与所述第一链至少85%互补的区域。

[0011] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第二链包含与表4中所列的任意一个第二链修饰的序列相差0或1个核苷的至少17个连续核苷的核苷序列,并且其中双链体区域包含

至少14、15、16或17个互补碱基对。

[0012] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第一链包含表2所列的任意一个第一链序列。

[0013] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第一链包含表3所列的任意一个第一链修饰的序列。

[0014] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第二链包含表2所列的任意一个第二链序列。

[0015] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第二链包含表4所列的任意一个第二链修饰的序列。

[0016] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第一链包含以下序列中的任意一个:第一链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239。

[0017] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第一链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:367、SEQ ID NO:368、SEQ ID NO:369、SEQ ID NO:371、SEQ ID NO:372、SEQ ID NO:378、SEQ ID NO:379、SEQ ID NO:384、SEQ ID NO:385、SEQ ID NO:387、SEQ ID NO:388、SEQ ID NO:389、SEQ ID NO:466、SEQ ID NO:467、SEQ ID NO:468、SEQ ID NO:469、SEQ ID NO:471、SEQ ID NO:472、SEQ ID NO:478、SEQ ID NO:479、SEQ ID NO:498、SEQ ID NO:518、SEQ ID NO:538、SEQ ID NO:546、SEQ ID NO:547、SEQ ID NO:548、SEQ ID NO:549、SEQ ID NO:551、SEQ ID NO:552、SEQ ID NO:558、SEQ ID NO:559。

[0018] 根据本申请上述第一方面的核酸,其中第二链包含以下序列中的任意一个:SE SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:264、SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:267、SEQ ID NO:268、SEQ ID NO:269、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:349、SEQ ID NO:351、SEQ ID NO:352,SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:359。

[0019] 根据本申请上述第二方面的核酸,其中第二链包含以下序列中的任意一个:SEQ ID NO:566、SEQ ID NO:567、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:569、SEQ ID NO:571、SEQ ID NO:572、SEQ ID NO:578、SEQ ID NO:579、SEQ ID NO:584、SEQ ID NO:585、SEQ ID NO:587、SEQ ID NO:588、SEQ ID NO:589、SEQ ID NO:666、SEQ ID NO:667、SEQ ID NO:668、SEQ ID NO:669、SEQ ID NO:671、SEQ ID NO:672、SEQ ID NO:678、SEQ ID NO:679、SEQ ID NO:698、SEQ ID NO:718、SEQ ID NO:738、SEQ ID NO:746、SEQ ID NO:747、SEQ ID NO:748、SEQ ID NO:749、SEQ ID NO:751、SEQ ID NO:752、SEQ ID NO:758、SEQ ID NO:759。

[0020] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0021]

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 246
SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 247
SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 248
SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 249
SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 251
SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 252

[0022]

SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 258
SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 259
SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 264
SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 265
SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 267
SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 268
SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 269
SEQ ID NO: 226	SEQ ID NO: 346
SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 347
SEQ ID NO: 228	SEQ ID NO: 348
SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 349
SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 351
SEQ ID NO: 232	SEQ ID NO: 352
SEQ ID NO: 238	SEQ ID NO: 358
SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 359
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 258
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 258
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 258
SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 246
SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 247
SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 248
SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 249
SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 251
SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 252
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 258
SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 259

[0023] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0024]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO: 366	SEQ ID NO: 566
SEQ ID NO: 367	SEQ ID NO: 567
SEQ ID NO: 368	SEQ ID NO: 568
SEQ ID NO: 369	SEQ ID NO: 569
SEQ ID NO: 371	SEQ ID NO: 571
SEQ ID NO: 372	SEQ ID NO: 572

[0025]

SEQ ID NO: 378	SEQ ID NO: 578
SEQ ID NO: 379	SEQ ID NO: 579
SEQ ID NO: 384	SEQ ID NO: 584
SEQ ID NO: 385	SEQ ID NO: 585
SEQ ID NO: 387	SEQ ID NO: 587
SEQ ID NO: 388	SEQ ID NO: 588
SEQ ID NO: 389	SEQ ID NO: 589
SEQ ID NO: 466	SEQ ID NO: 666
SEQ ID NO: 467	SEQ ID NO: 667
SEQ ID NO: 468	SEQ ID NO: 668
SEQ ID NO: 469	SEQ ID NO: 669
SEQ ID NO: 471	SEQ ID NO: 671
SEQ ID NO: 472	SEQ ID NO: 672
SEQ ID NO: 478	SEQ ID NO: 678
SEQ ID NO: 479	SEQ ID NO: 679
SEQ ID NO: 498	SEQ ID NO: 698
SEQ ID NO: 518	SEQ ID NO: 718
SEQ ID NO: 538	SEQ ID NO: 738
SEQ ID NO: 546	SEQ ID NO: 746
SEQ ID NO: 547	SEQ ID NO: 747
SEQ ID NO: 548	SEQ ID NO: 748
SEQ ID NO: 549	SEQ ID NO: 749
SEQ ID NO: 551	SEQ ID NO: 751
SEQ ID NO: 552	SEQ ID NO: 752
SEQ ID NO: 558	SEQ ID NO: 758
SEQ ID NO: 559	SEQ ID NO: 759

[0026] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0027]

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:248

SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:264
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268
SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:269
SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:258

[0028] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0029]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:368	SEQ ID NO:568
SEQ ID NO:384	SEQ ID NO:584
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:389	SEQ ID NO:589
SEQ ID NO:538	SEQ ID NO:738

[0030] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与下列第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0031]

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268
SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:265
SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:264
SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:285
SEQ ID NO:202	SEQ ID NO:322

[0032] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与下列第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由组成或基本上由所述核苷序列组成:

[0033]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:385	SEQ ID NO:585
SEQ ID NO:384	SEQ ID NO:584
SEQ ID NO:405	SEQ ID NO:605
SEQ ID NO:442	SEQ ID NO:642

[0034] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0035]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:762	SEQ ID NO:772
SEQ ID NO:763	SEQ ID NO:773
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:765	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776

[0036]

SEQ ID NO: 767	SEQ ID NO: 777
SEQ ID NO: 768	SEQ ID NO: 778
SEQ ID NO: 769	SEQ ID NO: 779
SEQ ID NO: 770	SEQ ID NO: 780
SEQ ID NO: 771	SEQ ID NO: 781
SEQ ID NO: 782	SEQ ID NO: 773
SEQ ID NO: 783	SEQ ID NO: 775
SEQ ID NO: 784	SEQ ID NO: 777
SEQ ID NO: 785	SEQ ID NO: 779
SEQ ID NO: 786	SEQ ID NO: 781

[0037] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0038]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:385	SEQ ID NO:585
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:765	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776
SEQ ID NO:767	SEQ ID NO:777

[0039] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0040]

未修饰的第一链	未修饰的第二链
SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:265
SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:268

[0041] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与下列第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0042]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO: 385	SEQ ID NO: 585
SEQ ID NO: 764	SEQ ID NO: 774
SEQ ID NO: 765	SEQ ID NO: 775
SEQ ID NO:783	SEQ ID NO:775
SEQ ID NO: 801	SEQ ID NO: 819

[0043]

SEQ ID NO: 802	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 803	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 804	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 805	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 806	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 807	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 808	SEQ ID NO: 819
SEQ ID NO: 809	SEQ ID NO: 819

[0044] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与下列第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0045]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:388	SEQ ID NO:588
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776
SEQ ID NO:767	SEQ ID NO:777
SEQ ID NO:810	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:811	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:812	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:813	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:814	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:815	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:816	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:817	SEQ ID NO:820
SEQ ID NO:818	SEQ ID NO:820

[0046] 包含第一链和第二链的核酸,所述第一链和第二链包含与以下第一序列和第二序列中的任意一个相差0或1个核苷的核苷序列、或者由或基本上由所述核苷序列组成:

[0047]

修饰的第一链	修饰的第二链
SEQ ID NO:764	SEQ ID NO:774
SEQ ID NO:766	SEQ ID NO:776

[0048] 一种用于抑制细胞中ZPI靶基因表达的缀合物,所述缀合物包含本文公开的核酸和一个或多个配体部分。

[0049] 一种药物组合物,其包含本文公开的核酸以及药学上可接受的赋形剂或载体。

[0050] 一种核酸或药物组合物,用于治疗。

[0051] 一种核酸或药物组合物,用于预防或治疗与止血障碍相关的疾病,如与止血障碍相关的疾病,如血友病。

附图说明

[0052] 图1:适用于本申请的构建体的连接体和配体部分,包括系链1a。尽管图1描述了与寡核苷酸缀合的连接体,但应当理解,本申请还涵盖相同连接体与本文公开的寡核苷的缀

合物。

[0053] 还应当理解,尽管图1描绘了基于如图1中具体描绘的连接至寡核苷部分的连接体和配体部分的产物分子,如本文中所述,但该产物可以另外包含连接体和配体部分基本如图1中描绘的连接至寡核苷部分的分子或基本由其组成,但如图1中所示,环辛基环上的F取代基被水解置换而产生的取代基(如OH取代基)取代。以此方式,(a)系链1a构建体可基本上由具有如图1所示连接体和配体部分的分子组成,其中环辛基环上具有F取代基;或(b)系链1a构建体可基本上由具有如图1所示连接体和配体部分的分子组成,但是其中图1所示的环辛基环上的F取代基被水解置换而产生的取代基(例如OH取代基)所取代,或(c)系链1a构建体可包含如(a)和/或(b)中所定义的分子的混合物。

[0054] 图2:适用于本申请的构建体的连接体和配体部分,包括系链1b。尽管图2描述了与寡核苷酸缀合的连接体,但应当理解,本申请还涵盖相同连接体与本文公开的寡核苷的缀合物。

[0055] 针对图1所作的评论以及图1所示的环辛基环上的F取代基可能被水解置换而产生的取代基(例如OH取代基)取代的可能替换同样适用于系链1b构建体。以此方式,(a)系链1b构建体可基本上由具有如图2所示连接体和配体部分的分子组成,其中环辛基环上具有F取代基;或(b)系链1b构建体可基本上由具有如图2所示连接体和配体部分的分子组成,但是其中图2所示的环辛基环上的F取代基被水解置换而产生的取代基(例如OH取代基)所取代,或(c)系链1b构建体可包含如(a)和/或(b)中所定义的分子的混合物。

[0056] 图3:适用于本申请的构建体的连接体和配体部分,包括系链2a。尽管图3描述了与寡核苷酸缀合的连接体,但应当理解,本申请还涵盖相同连接体与本文公开的寡核苷的缀合物。

[0057] 图4:适用于本申请的构建体的连接体和配体部分,包括系链2b。尽管图4描述了与寡核苷酸缀合的连接体,但应当理解,本申请还涵盖相同连接体与本文公开的寡核苷的缀合物。

[0058] 图5:本文公开的项1-101中描述的式。

[0059] 图6:本文公开的款1-56中描述的式。

[0060] 图7a和7b:可与本文所述的本申请的核酸序列一起使用的反向无碱基构建体。对于图7a,galnac连接体连接至正在使用的正义链的5’端区域(图7a中未显示)。对于图7b,galnac连接体连接至正在使用的正义链的3’端区域(图7b中未显示)。

[0061] 图7a中正义链的3’端区域所示的iaia表示:(i)作为正义链的3’端区域的倒数第二个和末端核苷提供的两个无碱基核苷,(ii)其中在正义链的倒数第三个核苷(即正义链的位置21,其中位置1是正义链的末端5’核苷)和相邻的倒数第二个无碱基残基之间提供3’-3’反向键,以及(iii)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的3’端区域读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键为5’-3’。

[0062] 图7b中正义链的5’端区域所示的iaia表示:(i)作为正义链的5’端区域的倒数第二个和末端核苷提供的两个无碱基核苷,(ii)其中正义链的倒数第三个核苷(即正义链的位置1,不包括正义链上核苷位置编号中正义链的5’端区域的iaia基序)与相邻的倒数第二个无碱基残基之间提供5’-5’反向键,(iii)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的5’端区域读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键为3’-5’。

[0063] 图8a和8b:根据表5的双链体构建体。

[0064] 图9:抑制人类Huh7细胞中ZPI mRNA表达的剂量反应实验结果。各点代表用x轴上所示浓度的siRNA构建体处理后,与未处理孔相比,ZPI mRNA的平均相对表达。误差线代表平均值的标准差。虚线曲线代表95%置信区间。虚线和阴影区域代表与同一板上未处理孔的平均相对表达+/-标准偏差。

[0065] 图10:在C57BL/6小鼠中皮下递送GalNAc缀合的siRNA后肝脏ZPI mRNA表达随时间的变化。如实施例11所述,将ETXM1180、1188和1192全部鼠化以进行该测定。数据为平均值+/-标准差,每个时间点n=3只小鼠。

[0066] 图11:在C57BL/6小鼠中皮下递送GalNAc缀合的siRNA后肝脏ZPI mRNA表达随时间的变化。如实施例11所述,将ETXM1181、1189和1193全部鼠化以进行该测定。数据为平均值+/-标准差,每个时间点n=3只小鼠。

[0067] 图12:受伤后3天(图10A)和10天(图10B)三个不同治疗组(野生型对照组、接受溶媒(0.9%盐水)的Haem A小鼠、以及接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的Haem A小鼠)的小鼠的视觉出血评分。出血评分的定义在下文提供。

[0068] 图13:(A)三个不同治疗组的小鼠(野生型对照组、接受溶媒(0.9%盐水)的Haem A小鼠、以及接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的Haem A小鼠)在受伤后第3天和第10天的膝盖直径的比较。(B)相同三个治疗组的小鼠受伤后第10天剥皮的膝盖直径的比较。

[0069] 图14:三个不同治疗组(野生型对照组、接受溶媒(0.9%盐水)的Haem A小鼠和接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的Haem A小鼠)中(A)骨髓增生、(B)骨关节炎、(C)软骨细胞变性/坏死、(D)出血、(E)含铁血黄素沉积、(F)血肿、(G)破骨细胞性骨吸收、(H)骨溶解、(I)骨膜炎、(J)软骨下骨硬化、(K)肌腱变性、(L)肌腱炎和(M)腱鞘炎的严重程度比较(图12M)。

[0070] 图15:关节保护:多个终点记录剂量反应效应。预防性施用ETXM1184在受伤后10天的关键组织读数中显示出剂量依赖性保护。ETXM1184显示出与临床对照物相同范围的疗效:FVIII替代疗法作为紧急治疗的金标准(Advate)和基于siRNA的预防性再平衡剂,在后期临床开发中表现出良好的出血保护作用(fitusiran)。*等级:0=正常;1=轻微;2=中等;3=明显;4=严重。[1]Glasson et al.,Osteoarthritis Cartilage.2010Oct;18Suppl3:S17-23.doi:10.1016/j.joca.2010.05.025.PMID:20864019。

[0071] 图16:综合血肿组织病理学评分量化:肌腱炎、肌腱退化、腱鞘炎、骨膜炎、骨溶解、破骨性骨吸收、出血、血肿、含铁血黄素沉积、软骨细胞坏死、软骨OARSI等级、软骨下骨硬化和骨髓增生。ETX-148显示出显著的剂量反应效应(适合综合评分的贝叶斯线性模型)。与对照组相比,综合评分中位数减少:ETXM1184 10mg/kg组为-1.25(显著性水平相当于$p<0.01$);ETXM1184 3mg/kg组为-0.91(显著性水平相当于$p<0.05$)。比较物fitusiran显示3mg/kg组的中位减少为-1.04(显著性水平相当于$p<0.05$)。

[0072] 图17:预防性施用ETXM1184改善血友病A小鼠的血肿关节病理。施用3mg/kg ETXM1184改善血肿膝关节病理,减少炎症,并减小出血面积。

[0073] 图18:预防性施用ETXM1184减少血友病A小鼠受伤后出血(活体视觉出血评分(VBS))。在施用siRNA 8天后,血友病A小鼠的膝关节发生了出血事件。受伤后10天内监测出血情况并进行终末组织学分析。预防性施用单剂量10mg/kg ETXM1184有效降低视觉出血评

分(VBS),效果与受伤后10天因子VIII替代物(Advate)相当。

[0074] 图19:预防性施用ETXM1184减少血友病A小鼠膝关节受伤后出血(活着的受伤膝盖直径与未受伤膝盖直径的测量比较)。在施用siRNA 8天后,血友病A小鼠的膝关节发生了出血事件。受伤后10天内监测出血情况并进行终末组织学分析。预防性施用单剂量10mg/kg ETXM1184有效减少膝关节血蓄积,效果与受伤后10天因子VIII替代物(Advate)相当。

[0075] 图20:预防性施用ETXM1184减少血友病A小鼠模型中的关节积血(在siRNA给药后18天和受伤后10天进行的终端测量)。预防性施用单剂量10mg/kg ETXM1184有效减少关节出血和血友病性关节病的特征,效果与受伤后10天因子VIII替代物(Advate)相当。

[0076] 图21:ETXM1184(ETXS1036和ETXS1035)、ETXM1199(ETXS2398和ETXS2397)、ETXM1200(ETXS2400和ETXS2397)、ETXM1201(ETXS2402和ETXS2397)、ETXM1202(ETXS2404和ETCS2397)、ETXM1203(ETXS2406和ETXS2397)、ETXM1204(ETXS2408和ETXS2397)、ETXM1205(ETXS2410和ETXS2397)、ETXM1206(ETXS2412和ETXS2397)和ETXM1207(ETXS2414和ETXS2397)对ZPI表达的抑制。

[0077] 定义

[0078] “第一链”在本文中也称为反义链或引导链,在本文中可互换使用,是指核酸链,例如siRNA的链,例如dsiRNA,其包括与靶序列(例如mRNA)基本互补的区域。如本文所用,术语“互补区域”是指反义链上与序列(例如靶序列)基本互补的区域。当互补区域与靶序列不完全互补时,错配通常在分子的内部或末端区域。在一些实施方案中,本申请的双链核酸(例如siRNA剂)包括反义链中的核苷错配。

[0079] “第二链”(本文中也称为正义链或过客链,并且本文中可以互换使用)是指核酸(例如siRNA)的链,其包括与本文定义的术语反义链的区域基本上互补的区域。

[0080] 在包含设有配体部分、任选地还设有连接体部分的核酸的分子背景下,本申请的核酸可以称为寡核苷或寡核苷部分。

[0081] 寡核苷酸是短的核酸聚合物。尽管寡核苷酸在其核苷成分(碱基加糖)之间含有磷酸二酯键,但本申请不限于总是通过相邻核苷之间的这种磷酸二酯键连接的寡核苷酸,还考虑了通过磷酸二酯键以外的键连接的其它核苷寡聚体。例如,核苷之间的键可以是硫代磷酸酯键。因此,本文中使用的术语“寡核苷”涵盖寡核苷酸和其他核苷寡聚体。根据本申请,优选寡核苷,其为具有至少一部分是寡核苷酸的核酸。根据本申请,还优选在核苷之间具有一个或多个或大多数磷酸二酯主链键的寡核苷。根据本申请,还优选在核苷之间具有一个或多个或大多数磷酸二酯主链键,并且在核苷(通常在第一链和/或第二链的末端区域)之间还具有一个或多个硫代磷酸酯主链键的寡核苷。

[0082] 本文优选的是,根据本申请的核酸是在核苷之间包含一个或多个硫代磷酸酯主链键的双链寡核苷。因此,在本申请提及寡核苷酸的所有情况下,具体地在本文公开的化学结构中,寡核苷酸可以同样是本文定义的寡核苷。

[0083] 在一些实施方案中,本申请的双链核酸(例如siRNA剂)包括正义链中的核苷错配。在一些实施方案中,核苷错配位于距核酸(例如siRNA)3’端例如5、4、3、2或1个核苷之内。

[0084] 在另一个实施方案中,核苷错配例如位于核酸(例如siRNA)的3’末端核苷中。

[0085] “靶序列”(也可称为靶RNA或靶mRNA)是指基因转录过程中形成的mRNA分子的核苷序列的连续部分,包括作为初级转录产物的RNA加工的产物的mRNA。

[0086] 靶序列的长度可以为约10-35个核苷,例如长度为约15-30个核苷。例如,靶序列长度可以是约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷。上述范围和长度之间的范围和长度也被认为是本申请的一部分。

[0087] 术语“核糖核苷”或“核苷”也可以指修饰的核苷,如下文进一步详述。

[0088] 核酸可以是DNA或RNA,并且可以包含修饰的核苷。RNA是优选的核酸。

[0089] 术语“iRNA”、“siRNA”、“RNAi剂”和“iRNA剂”、“RNA干扰剂”在本文可互换使用,是指含有RNA的药剂,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。siRNA通过RNA干扰(RNAi)指导mRNA的序列特异性降解。

[0090] 双链RNA在本文中称为“双链siRNA(dsiRNA)剂”、“双链siRNA(dsiRNA)分子”、“双链RNA(dsRNA)剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsiRNA剂”、“dsiRNA分子”或“dsiRNA”,其是指核糖核酸分子复合物,具有包含两条反向平行且基本上互补的核酸链的双链体结构,相对于靶RNA具有“正义”和“反义”方向。

[0091] 核酸(例如dsiRNA分子)每条链的大多数核苷优选为核糖核苷,但在这种情况下,每条链或两条链也可包括一个或多个非核糖核苷,例如脱氧核糖核苷或修饰的核苷。此外,本说明书中使用的“siRNA”可以包括经过化学修饰的核糖核苷。

[0092] 术语“修饰的核苷”是指独立地具有修饰的糖部分、修饰的核苷间键、或修饰的核碱基、或其任意组合的核苷。因此,术语“修饰的核苷”涵盖对核苷间键、糖部分或核碱基进行取代、添加或去除(例如)官能团或原子。就本说明书和权利要求书的目的而言,任何此类修饰(如在siRNA型分子中使用)均涵盖在“iRNA”或“RNAi剂”或“siRNA”或“siRNA剂”中。

[0093] 形成双链体结构的两条链可以是一个较大分子的不同部分,或它们可以是单独的分子,例如RNA分子。

[0094] 术语“核苷突出端”是指从本申请的核酸双链体结构延伸的至少一个未配对的核苷。根据本申请的核酸可包含至少一个核苷的突出端;或,所述突出端可包含至少两个核苷、至少三个核苷、至少四个核苷、至少五个核苷或更多。核苷突出端可包含核苷/核苷类似物(包括脱氧核苷)或由其组成。突出端可位于正义链、反义链或其任意组合上。此外,突出端的核苷可以在反义链或正义链的5’端、3’端或两端上。

[0095] 在某些实施方案中,反义链在3’端或5’端具有1-10个核苷突出端,例如0-3、1-3、2-4、2-5、4-10、5-10、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷突出端。

[0096] “平”或“平端”是指双链核酸该端处没有未配对的核苷,即没有核苷突出端。本申请的核酸包括一端不具有核苷突出端或任意一个端不具有核苷突出端的核酸。

[0097] 除非另有说明,否则术语“互补”在用于描述第一核苷序列相对于第二核苷序列时,是指包含第一核苷序列的寡核苷在某些条件下与包含第二核苷序列的寡核苷杂交并形成双链体结构的能力,正如本领域技术人员所理解的。此类条件可以例如是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50℃或70℃持续12-16小时,随后洗涤(参见例如Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Sambrook,et al.

(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0098] 如本文所述,核酸(例如dsiRNA)内的互补序列包括包含第一核苷序列的寡核苷与包含第二核苷序列的寡核苷在一个或两个核苷序列的整个长度上的碱基配对。此类序列在本文中可称为彼此“完全互补”。然而,当本文中第一序列相对于第二序列被称为“基本互补”或“部分互补”时,两个序列可以完全互补,或它们可以形成一个或多个错配的碱基对,如2、4或5个错配的碱基对,但优选不大于5个,同时保持在与其最终应用(例如,通过RISC途径抑制基因表达)最相关的条件下杂交的能力。在互补性的确定方面,突出端不应被视为错配。例如,包含一个长度为17个核苷的寡核苷和另一个长度为19个核苷的寡核苷的核酸(例如dsiRNA),其中较长的寡核苷包含与较短的寡核苷完全互补的17个核苷的序列,仍然可以称为“完全互补”。

[0099] 本文使用的“互补”序列还可包括非沃森-克里克碱基对或由非天然和修饰的核苷形成的碱基对,或完全由非沃森-克里克碱基对或由非天然和修饰的核苷形成的碱基对形成,只要满足上述关于其杂交能力的要求即可。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U Wobble或Hoogstein碱基配对。

[0100] 本文中的术语“互补”、“完全互补”和“基本上/部分互补”可用于关于核酸(例如dsiRNA)的正义链和反义链之间,或双链核酸(例如siRNA剂)的反义链与靶序列之间的碱基匹配。

[0101] 在本申请中,根据本申请的核酸,特别是用于抑制ZPI的dsiRNA的第二链与所述核酸的第一链至少部分互补。在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度为至少17个碱基对并且包含不大于1、2、3、4或5个错配碱基对的双链体区域,则它们部分互补。

[0102] 在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度为19个碱基对且包含不大于1、2、3、4或5个错配碱基对的双链体区域,则它们部分互补。在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度为21个碱基对且包含不大于1、2、3、4或5个错配碱基对的双链体区域,则它们部分互补。

[0103] 或者如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度至少为17个碱基的双链区,则它们部分互补,其中至少14、15、16或17个所述碱基对是互补碱基对,特别是沃森-克里克碱基对。

[0104] 在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度为19个碱基对的双链体区域,则它们部分互补,其中至少14、15、16、17、18个或所有19个碱基对是互补碱基对,特别是沃森-克里克碱基对。在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链和第二链形成长度为21个碱基对的双链体区域,则它们部分互补,其中至少16、17、18、19、20个或所有21个碱基对是互补碱基对,特别是沃森-克里克碱基对。

[0105] 本文使用的与信使RNA(mRNA)的至少一部分“基本上互补”或“部分互补”的核酸是指与目的mRNA(例如,编码基因的mRNA)的连续部分基本上或部分互补的核酸。在某些实施方案中,mRNA的连续部分是表1所列出的序列,即SEQ ID NO:2-121中的任意一个。例如,如果核酸序列与编码目的基因的mRNA的未中断部分基本上或部分互补,则该核酸与目的基因的mRNA的至少一部分互补。

[0106] 因此,在一些优选的实施方案中,本文公开的反义寡核苷与靶基因序列完全互补。

[0107] 在其他实施方案中,本文公开的反义寡核苷与靶RNA序列基本上或部分互补,并且包含连续的核苷序列,该序列在其整个长度上与靶RNA序列的等效区域至少约80%互补,例如至少约85%、86%、87%、88%、89%、约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补或100%互补。

[0108] 在某些实施方案中,根据本申请的核酸的第一链(反义链)与从ZPI基因转录的RNA的连续部分部分或完全互补。在某些实施方案中,根据本申请的核酸的第一链与ZPI mRNA的至少17个核苷的连续部分部分或完全互补。在某些实施方案中,根据本申请的核酸的第一链与ZPI mRNA的17、18、19、20、21、22或23个核苷的连续部分部分或完全互补。本申请所述核酸的第一链与表1所列任意一个序列(即SEQ ID NO:2-121中的任意一个)的17、18、19、20、21、22或23个核苷的连续部分部分或完全互补。

[0109] 在某些实施方案中,如果本申请的核酸的第一链(反义)包含至少17个核苷的连续核苷序列,则其与ZPI mRNA的连续部分部分互补,其中所述连续核苷序列的至少14、15、16或17个核苷与ZPI mRNA的连续部分互补。在某些实施方案中,本申请的核酸的第一链包含至少17个核苷的连续核苷序列,其中所述连续核苷序列的至少14、15、16或17个核苷与表1中列出的任意一个序列(即SEQ ID NO:2-121中的任意一个)的连续部分互补。在某些实施方案中,本申请的核酸的第一链包含19个核苷的连续核苷序列,其中所述连续核苷序列的至少14、15、16、17、18个或所有19个核苷与表1中所列的任意一个序列(即SEQ ID NO:2-121中的任意一个)的连续部分互补。在某些实施方案中,本申请的核酸的第一链包含23个核苷的连续核苷序列,其中所述连续核苷序列的至少18、19、20、21、22个或所有23个核苷与表1中所列的任意一个序列(即SEQ ID NO:2-101中的任意一个)的连续部分互补。

[0110] 在一些实施方案中,本申请的核酸(例如siRNA)包括与反义寡核苷基本上或部分互补的正义链,而所述反义寡核苷又与靶基因序列互补并包含连续的核苷序列。正义链的核苷序列通常在其整个长度上与反义链的核苷序列的等效区域至少约80%互补,例如约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补,或100%互补。

[0111] 在一些实施方案中,本申请的核酸(例如,siRNA)包括与靶序列基本上或部分互补的反义链,并且包含连续核苷序列,所述连续核苷序列在其整个长度上与靶序列至少80%互补,例如约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补,或100%互补。

[0112] 本文使用的“受试者”是动物,如哺乳动物,包括灵长类动物(如人类、非人类灵长类动物,例如猴子和黑猩猩)或非灵长类动物或鸟类,当靶基因序列与核酸(例如siRNA试剂)具有足够的互补性以促进靶标敲低时,其内源性或异源性地表达靶基因。在某些优选实施方案中,受试者是人类。

[0113] 术语“治疗(treating或treatment)”是指有益的或期望的结果,包括但不限于缓解或改善与基因表达相关的一种或多种症状。“治疗”还可以表示与未治疗时的预期生存期相比延长生存期。治疗可以包括预防合并症的发展,例如减少患有肝脏感染的个体的肝受伤。

[0114] 本文使用的“治疗有效量”旨在包括核酸(例如,siRNA)的量,当将其施用于患者以治疗患有疾病的受试者时,该量足以实现对疾病的治疗(例如,通过减轻、改善或维持现有

疾病,或疾病或其相关合并症的一种或多种症状)。

[0115] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指适合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,并具有合理的效益/风险比的化合物、材料、组合物或剂型。

[0116] 本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂或溶剂包封材料,用于将目标化合物从一个器官或身体部分携带或运输到另一个器官或身体部分。每种载体必须是“可接受的”,即与制剂中的其他成分兼容,并且不会对接受治疗的受试者造成伤害。

[0117] 当列举参数的数值或数值范围时,旨在使列举数值的中间数值或范围也成为本申请的一部分。

[0118] 本文使用冠词“一种”和“一个”来指代该冠词的一个或一个以上(即至少一个)的语法对象。

[0119] 本文使用的术语“包括”意为短语“包括但不限于”,并且可与该短语互换使用。

[0120] 本文使用的术语“或”意为“和/或”,且可与该术语互换使用,除非上下文另有明确说明。例如,“正义链或反义链”应理解为“正义链或反义链或正义链和反义链”。″

[0121] 本文使用的术语“约”是指在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以理解为距平均值约2个标准差。在某些实施方案中,约表示+10%。在某些实施方案中,约表示+5%。当“约”出现在一系列数字或范围之前时,应理解“约”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0122] 数字或一系列数字之前的术语“至少”应理解为包括与术语“至少”相邻的数字,以及所有可以在逻辑上包括的后续数字或整数,这从上下文中可以清楚地看出。例如,核酸分子中核苷的数目必须是整数。例如,“21个核苷核酸分子中至少18个核苷”是指18、19、20或21个核苷具有所示特性。当“至少”出现在一系列数字或范围之前时,应理解为“至少”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0123] 本文使用的“不大于”或“小于”应理解为与该短语相邻的值以及逻辑上较低的值或整数,如从上下文逻辑得出的,为零。例如,具有“不大于2个核苷”的突出端的双链体具有2、1或0个核苷突出端。当“不大于”出现在一系列数字或范围之前时,应理解为“不大于”可以修饰该系列或范围中的每个数字。

[0124] 链的末端区域是距5’或3’端的最后5个核苷。

[0125] 本领域技术人员可以根据需要组合本申请的各种实施方案。

[0126] 无碱基核苷

[0127] 在某些实施方案中,本申请的核酸中存在1个,例如2个,例如3个,例如4个或更多个无碱基核苷。无碱基核苷是修饰的核苷,因为它们缺少通常在糖部分的位置1出现的碱基。通常,在本申请的核酸中存在的无碱基核苷的糖部分的位置1上有氢。

[0128] 无碱基核苷位于第二链的末端区域,优选位于该链端的末端5个核苷内。末端区域可以是末端5个核苷,其包括无碱基核苷。

[0129] 第二链可以包含以下特征,作为优选特征(除非相互排斥,否则均特别考虑组合):

[0130] 第二链的末端区域中有2个或大于2个无碱基核苷;和/或

[0131] 第二链的5’或3’末端区域有2个或大于2个无碱基核苷;和/或

[0132] 第二链的5’或3’末端区域有2个或大于2个无碱基核苷,其中无碱基核苷在如本文

所述的突出端中;和/或

[0133] 第二链的末端区域中有2个或大于2个连续无碱基核苷,其中优选一个这样的无碱基核苷是末端核苷;和/或

[0134] 第二链的5’或3’末端区域中有2个或大于2个连续无碱基核苷,其中优选地一个这样的无碱基核苷是在第二链的5’或3’末端区域的末端核苷;和/或

[0135] 反向核苷间键将至少一个无碱基核苷连接至第二链的末端区域的相邻碱基核苷;和/或

[0136] 反向核苷间键将至少一个无碱基核苷连接至第二链的5’或3’末端区域的相邻碱基核苷;和/或

[0137] 作为倒数第二个核苷的无碱基核苷通过反向键连接至非末端核苷的核苷(本文中称为倒数第三个核苷);和/或

[0138] 当朝包含末端核苷的末端的方向读取链时,无碱基核苷作为通过5’-3’键连接的2个末端核苷;

[0139] 当朝包含末端核苷的末端的方向读取链时,无碱基核苷作为通过3’-5’键连接的2个末端核苷;

[0140] 无碱基核苷作为末端2个位置,其中倒数第二个核苷通过反向键连接至倒数第三个核苷,并且其中反向键是5-5’反向键或3’-3’反向键;

[0141] 无碱基核苷作为末端2个位置,其中倒数第二个核苷通过反向键连接至倒数第三个核苷,并且其中

[0142] (1)反向键为5-5’反向键,并且当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键是3’5’;或

[0143] (2)反向键是3-3’反向键,并且当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键是5’3’。

[0144] 优选地,第二链的末端有无碱基核苷。

[0145] 优选地,第二链的末端区域,优选在末端和倒数第二个位置处有2个或至少2个无碱基核苷。

[0146] 优选地,2个或更多个无碱基核苷是连续的,例如所有无碱基核苷可以是连续的。例如,末端1或末端2或末端3或末端4个核苷可以是无碱基核苷。

[0147] 无碱基核苷也可以通过5’-3’磷酸二酯键或反向键与相邻核苷相连,除非末端只有1个无碱基核苷,在这种情况下它将与相邻核苷具有反向键。

[0148] 反向键(也可称为反向键,在本领域中也是常见的)包含核苷的相邻糖部分之间的5’-5’、3’3’、3’-2’或2’-3’磷酸二酯键。

[0149] 非末端的无碱基核苷将具有2个磷酸二酯键,每个相邻核苷各一个,并且这些键可以是反向键,或可以是5’-3磷酸二酯键,或可以是每种键之一。

[0150] 优选的实施方案包含在第二链的末端和倒数第二个位置处的2个无碱基核苷,并且其中反向核苷间键位于倒数第二个(无碱基)核苷和倒数第三个核苷之间。

[0151] 优选地,第二链的末端和倒数第二个位置处有2个无碱基核苷,并且倒数第二个核苷通过反向核苷间键连接至倒数第三个核苷,并通过5’-3’或3’-5’磷酸二酯键连接至末端核苷(沿分子末端方向读取)。

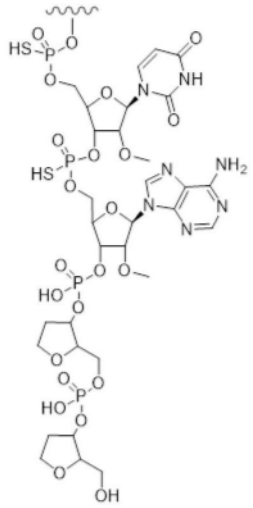
[0152] 优选地,根据本申请的核酸包含一个或多个无碱基核苷,任选地,其中所述一个或多个无碱基核苷位于第二链的末端区域,和/或其中至少一个无碱基核苷通过反向核苷间键连接至相邻的碱基核苷。

[0153] 典型地,第二链在其5'末端区域包含2个连续的无碱基核苷,其中一个这样的无碱基核苷是第二链的5'末端区域的末端核苷,而另一个无碱基核苷是第二链的5'末端区域的倒数第二个核苷,其中:(a)所述倒数第二个无碱基核苷通过反向核苷间键相连至相邻5'近末端区域中相邻的第一个碱基核苷;(b)反向键为5-5'反向键;并且(c)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键为3'5'。更典型地,(i)第一链和第二链各自的长度为23个核苷;(ii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于第二链的所述5'近末端区域的三个连续位置之间,其中第一硫代磷酸酯核苷间键位于第二链的所述5'近末端区域的(a)的所述相邻的第一个碱基核苷与相邻的第二个碱基核苷之间,并且第二硫代磷酸酯核苷间键位于第二链的所述5'近末端区域的相邻的第个二碱基核苷与相邻的第个三碱基核苷之间;(iii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于第一链的5'和3'末端区域的三个连续位置之间,由此所述第一链的5'和3'末端区域的每个末端核苷分别通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5'和3'相邻的倒数第二个核苷,并且每个5'和3'倒数第二个核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5'和3'相邻的倒数第三个核苷;并且(iv)核酸的第二链直接或间接地与第二链的3'末端区域的一个或多个配体部分缀合。

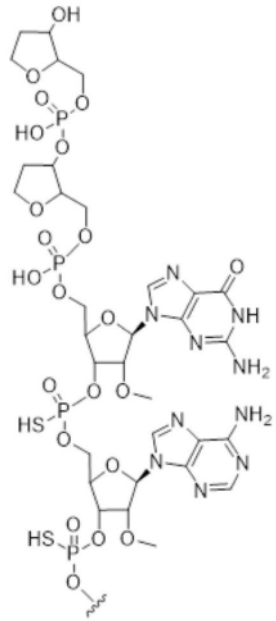
[0154] 或者第二链包含2个连续的无碱基核苷,优选位于第二链的3'末端区域的突出端,其中一个这样的无碱基核苷是第二链的3'末端区域的末端核苷,而另一个无碱基核苷是第二链的3'末端区域的倒数第二个核苷,其中:(a)所述倒数第二个无碱基核苷通过反向核苷间键连接至相邻的3'近末端区域的相邻第一碱基核苷;(b)反向键为3-3'反向键;并且(c)当朝包含末端和倒数第二个无碱基核苷的末端读取时,末端和倒数第二个无碱基核苷之间的键为5'-3'。更典型地,(i)第一链和第二链各自的长度为23个核苷;(ii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于第二链的所述3'近末端区域的三个连续位置之间,其中第一硫代磷酸酯核苷间键位于第二链的所述3'近末端区域的(a)的所述相邻的第一个碱基核苷与相邻的第二个碱基核苷之间,并且第二硫代磷酸酯核苷间键位于第二链的所述3'近末端区域的相邻的第二个碱基核苷与相邻的第三个碱基核苷之间;(iii)两个硫代磷酸酯核苷间键分别位于第一链的5'和3'末端区域的三个连续位置之间,由此所述第一链的5'末端和3'末端区域的每个末端核苷分别通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5'和3'相邻的倒数第二个核苷,并且每个前5'和3'倒数第二个核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接至相应的5'和3'相邻的倒数第三个核苷;并且(iv)核酸的第二链直接或间接地与第二链的5'末端区域的一个或多个配体部分缀合。

[0155] 结构实例如下(其中所示的特定RNA核苷不是限制性的并且可以是任何RNA核苷):

[0156] A3'-3'反向键(也显示朝分子末端读取时,两个无碱基分子之间的最后一个磷酸二酯键的5'-3'方向)

[0157] 

[0158] B说明5’-5’反向键(也显示朝分子末端读取时,两个无碱基分子之间的最后一个磷酸二酯键的3’-5’方向)

[0159] 

[0160] 核酸中存在的一个或多个无碱基核苷是在存在一个或多个反向核苷键,即5’-5’或3’-3’反向核苷间键的情况下提供的。反向键是由于相邻核苷糖的方向发生改变而发生的,使得糖具有3’-5’方向,而不是传统的5’-3’方向(参考核苷糖上环原子的编号)。本申请的核酸中存在的一个或多个无碱基核苷优选包括此类反向核苷糖。

[0161] 在末端核苷具有反转方向的情况下,这将导致整个核酸的“反转”端构型。虽然本文绘制和引用的某些结构是使用常规的5’-3’方向表示的(参考核苷糖上的环原子编号),但可以理解,具有方向变化和近端3’-3’反向键的末端核苷的存在将导致具有整体5’-5’端结构的核酸(即常规的3’端核苷变成5’端核苷)。或者应理解,具有方向改变和近端5’-5’反向键的末端核苷的存在将导致具有整体3’-3’端结构的核酸。

[0162] 如本文所述的近端3’-3’或5’-5’反向键可以包含直接相邻/连接至具有反转方向的末端核苷(如具有反转方向的单个末端核苷)的反向键。或者本文所述的近端3’-3’或5’-5’反向键可包含相邻2个或2个以上具有反转方向的核苷,如2个或大于2个具有反转方向的末端区域核苷,如末端和倒数第二个核苷的反向键。以此方式,反向键可以连接到具有反转

方向的倒数第二个核苷上。虽然熟练的技术人员(addressee)将理解如上所述的反转方向可导致核酸分子具有如本文所述的整体3'-3'或5'-5'端结构,但是还应理解,由于存在一个或多个额外的反向连接和/或具有反转方向的核苷,因此整体核酸可具有与常规定位的5'/3'端相对应的3'-5'端结构。

[0163] 在一个方面,核酸可以具有3'-3'反向键,并且末端糖部分可以该末端糖的5'位置包含5'OH,而不是5'磷酸基团。

[0164] 因此,本领域技术人员将清楚地理解,本文绘制的更常规的5'-3'结构(参考端核苷糖上的环原子编号)的5'-5'、3'-3'和3'-5'(沿该末端方向读取)的端变体包括在本公开的范围内,其中存在一个或多个反向键。

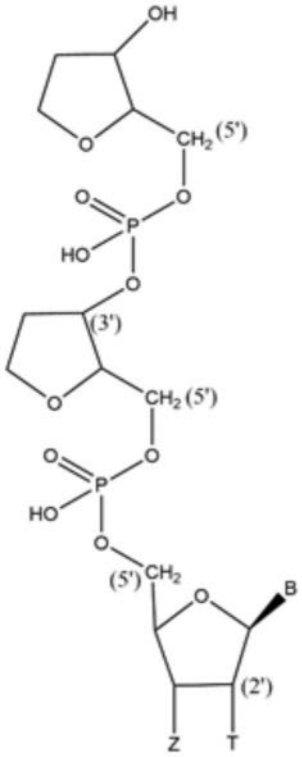
[0165] 在例如反向核苷间键和/或一个或多个核苷具有反转方向而产生反向末端的情况下,并且键的相对位置(例如,与连接体的相对位置)或内部特征(例如,修饰的核苷)的位置是相对于核酸的5'或3'端定义的,则5'或3'端是如果没有反向键就会存在的常规5'或3'端,并且其中常规5'或3'端是通过考虑核酸内大多数内部核苷键的方向性和/或核苷方向来确定的。从这些内部键和/或核苷方向可以判断出,在没有反向键的情况下,核酸的哪些端将构成分子的常规5'和3'端(参考端核苷糖上的环原子编号)。

[0166] 例如,在下面所示的结构中,5'端的前2个位置有无碱基残基。当末端核苷具有反转方向时,下图所示的5'端(其是常规5'端)实际上可以根据末端位置的反转核苷包含3'OH。尽管如此,当沿核酸分子的标准5'[PO4]到3'[OH]方向读取时(参考核苷糖上环原子的编号),大部分分子将包含从糖的3'OH到下一个糖的5'磷酸的常规核苷间键,这可用于确定在没有反向端构型的情况下会发现的常规5'和3'端。

[0167] 5'A-A-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me 3'

[0168] 在一些实施方案中,根据本申请的核酸的第二链(正义链)在5'末端区域包含2个连续的无碱基核苷,如以下5'末端基序所示:

[0169] 5'末端基序



[0170] 其中：

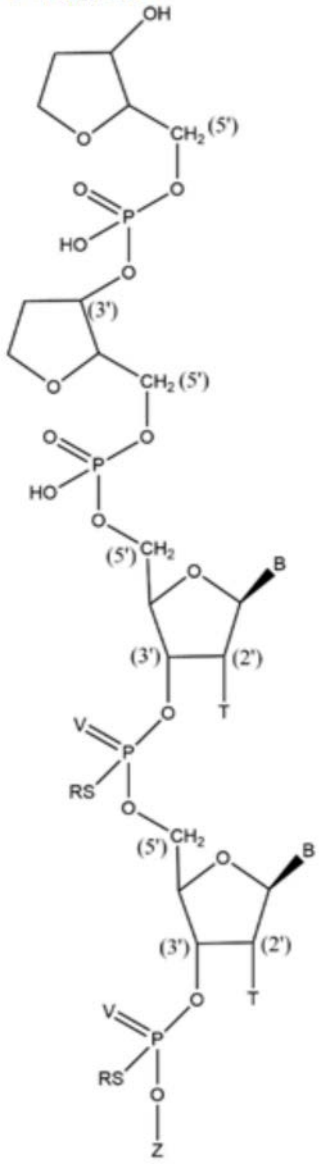
[0171] B代表核苷碱基，

[0172] T代表H、OH或2’核糖修饰，

[0173] Z代表所述第二链的剩余核苷。

[0174] 在一些实施方案中，根据本申请的核酸的第二链(正义链)在5’末端区域包含2个连续的无碱基核苷，如以下5’末端基序所示：

[0175] 5'末端基序



[0176] 其中：

[0177] B代表核苷碱基，

[0178] T代表H、OH或2'核糖修饰(优选2'核糖修饰,更优选2'Me或2'F核糖修饰)，

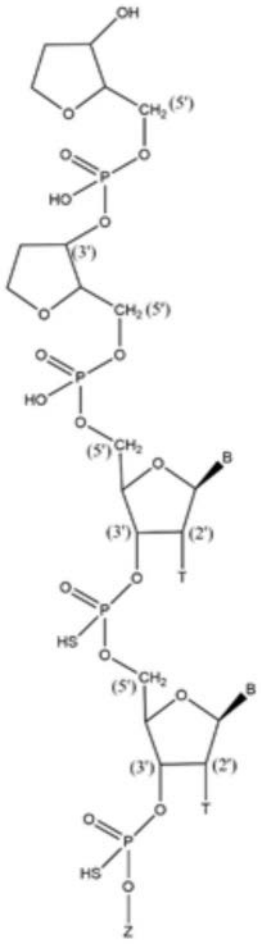
[0179] V代表O或S(优选O)，

[0180] R代表H或C_{1-4}烷基(优选H)，

[0181] Z代表所述第二链的剩余核苷，

[0182] 更优选为以下5'末端基序：

[0183] 5'末端基序



[0184] 其中：

[0185] B代表核苷碱基，

[0186] T代表2'核糖修饰(优选为2'Me或2'F核糖修饰)，

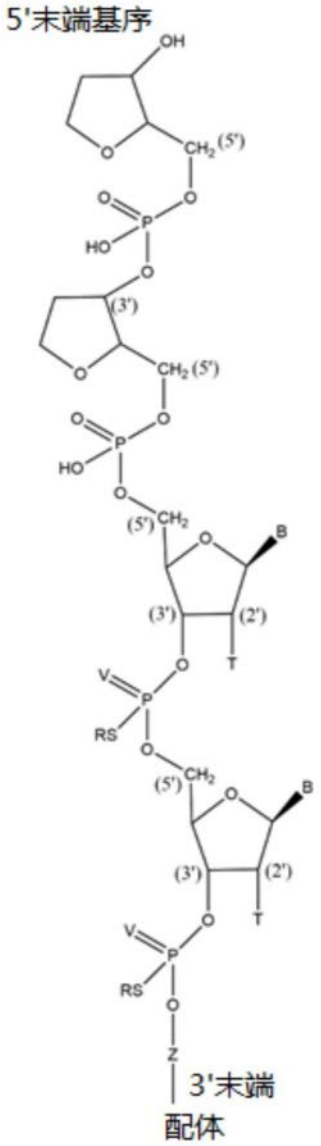
[0187] Z代表所述第二链的剩余核苷。

[0188] 反向键优选位于核酸(例如RNA)的端处,其远离分子的配体部分(如含有GalNAc的部分)。

[0189] 正义链上具有5'-GalNAc的GalNAc-siRNA构建体可以在正义链的另一端具有反向键。

[0190] 正义链上具有3'-GalNAc的GalNAc-siRNA构建体可以在正义链的另一端具有反向键。

[0191] 在优选的实施方案中,根据本申请的核酸的第二链(正义链)在5'末端区域包含2个连续的无碱基核苷,如以下5'末端基序所示，

[0192] 

[0193] 其中：

[0194] B代表核苷碱基，

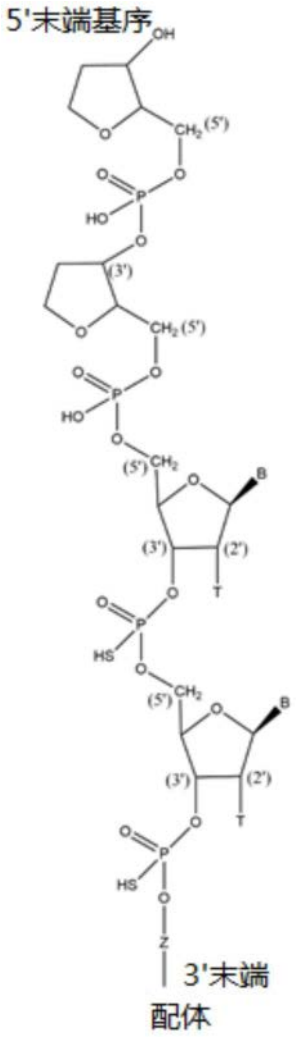
[0195] T代表H、OH或2’核糖修饰(优选2’核糖修饰，更优选2’Me或2’F核糖修饰)，

[0196] V代表O或S(优选O)，

[0197] R代表H或C_{1-4}烷基(优选H)，

[0198] Z包含11至26个连续核苷，优选15至21个连续核苷，更优选19个连续核苷，

[0199] 更优选以下5’末端基序：

[0200] 

[0201] 其中:

[0202] B代表核苷碱基,

[0203] T代表2'核糖修饰(优选2'Me或2'F核糖修饰),

[0204] Z包含19个连续核苷。

[0205] 核酸长度

[0206] 在一个方面,i)核酸的第一链的长度为17至30个核苷,优选为19至25个核苷,更优选为19或23个核苷;和/或ii)核酸的第二链的长度为17至30个核苷,优选为19至25个核苷,更优选为19或21个核苷。

[0207] 通常,核酸的双链体区域的长度为17至30个核苷,更优选长度为19或21个核苷。类似地,第一链和从ZPI基因转录的RNA的一部分之间的互补区域的长度为17至30个核苷。

[0208] 核酸修饰

[0209] 在某些实施方案中,本申请的核酸例如RNA,例如dsiRNA,不包含进一步修饰,例如本领域已知和本文描述的化学修饰或缀合。

[0210] 在其他优选实施方案中,本申请的核酸例如RNA,例如dsiRNA,被进一步化学修饰以增强稳定性或其他有益特性。

[0211] 在本申请的某些实施方案中,基本上所有的核苷都被修饰。

[0212] 本申请中所述的核酸可以通过本领域中已建立的方法合成或修饰,所述方法如描

述于"Current protocols in nucleic acid chemistry,"Beaucage,S.L.et al.(Edrs.),John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA,其通过引用并入本文中。

[0213] 修饰包括例如端修饰,例如5'-端修饰(磷酸化、缀合、反向键)或3'-端修饰(缀合、RNA内的DNA核苷或DNA内的RNA核苷、反向键等);碱基修饰,例如用稳定化碱基、去稳定化碱基或与扩展的配对物库碱基配对的碱基、缀合碱基替换;糖修饰(例如在2'-位置或4'-位置)或糖替换;或主链修饰,包括磷酸二酯键的修饰或替换。

[0214] 在本文所述实施方案中有用的核酸(如siRNA化合物)的具体实例包括但不限于含有修饰的主链或无天然核苷间键的RNA。具有修饰的主链的核酸(如RNA)包括但不限于主链中没有磷原子的核酸。为了本说明书的目的,并且如本领域中有时所引用的,在其核苷间主链中不含磷原子的修饰的核酸(例如RNA)也可被视为寡核苷。在一些实施方案中,修饰的核酸(例如siRNA)在其核苷间主链中具有磷原子。

[0215] 修饰的核酸(例如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、次膦酸酯、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、硫羰基氨基磷酸酯(thionophosphoramidates)、硫羰基烷基膦酸酯(thionoalkylphosphonates)、硫羰基烷基磷酸三酯(thionoalkylphosphotriesters)和具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯(boranophosphates)、这些的2'-5'连接类似物,以及具有反转极性的那些,其中相邻的核苷单元对以5'-3'或5'-2'连接。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0216] 修饰的核酸(例如RNA)还可以含有一个或多个取代的糖部分。本文所述的核酸(例如siRNA,例如dsiRNA)可在2'-位置包括以下之一: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、烯基和炔基可被取代或未被取代。2'O-甲基和2'-F是优选的修饰。

[0217] 在某些优选的实施方案中,核酸包含至少一个修饰的核苷。

[0218] 本申请的核酸可以在第一链和/或第二链上包含一个或多个修饰的核苷。

[0219] 在一些实施方案中,正义链的基本上所有核苷和反义链的所有核苷都包含修饰。

[0220] 在一些实施方案中,正义链的所有核苷和反义链的基本上所有核苷都包含修饰。

[0221] 在一些实施方案中,正义链的所有核苷和反义链的所有核苷都包含修饰。

[0222] 在一个实施方案中,至少一个修饰的核苷选自下组:脱氧核苷、3'-末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷、2'-O-甲基修饰的核苷(本文中也称为2'-Me,其中Me是甲氧基)、2'-氟修饰的核苷、2'-脱氧修饰的核苷、锁定核苷、非锁核苷、构象限制的核苷、受限的乙基核苷、无碱基核苷、2'-氨基修饰的核苷、2'-O-烯丙基修饰的核苷、2'-O-烷基修饰的核苷、2'-羟基修饰的核苷、2'-甲氧基乙基修饰的核苷、2'-O-烷基修饰的核苷、吗啉核苷、氨基磷酸酯、包含核苷的非天然碱基、四氢吡喃修饰的核苷、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷、环己烯基修饰的核苷、包含硫代磷酸酯基团的核苷、包含甲基膦酸酯基团的核苷、包含5'-磷酸的核苷、以及包含5'-磷酸模拟物的核苷。在另一个实施方案中,修饰的核苷包含3'-末端脱氧-胸腺嘧啶核苷(dT)的短序列。

[0223] 核苷上的修饰可以优选地下组:包括但不限于LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-脱氧、2'-羟基及其组合。在另一个实施方案中,核苷上的修饰是2-O-甲基("2'-Me")或2'-氟修饰。

[0224] 一种优选的修饰是在核糖的2'-OH基团处的修饰,任选地选自2'-Me或2'-F修饰。

[0225] 优选的核酸在第一链和/或第二链上包含一个或多个被修饰的核苷,以形成修饰的核苷,如下所示:

[0226] 一种核酸,其中修饰是在核糖的2'-OH基团处的修饰,任选地选自2'-Me或2'-F修饰。

[0227] 一种核酸,其中第一链从所述第一链的位置1算起,在位置2、位置6、位置14中的任意一个位置处或其任意组合包含2'-F修饰。

[0228] 一种核酸,其中第二链从所述第二链的位置1算起,在位置7、位置9、位置11中的任意一个位置处或其任意组合包含2'-F修饰。

[0229] 一种核酸,其中第一链和第二链各自包含2'-Me修饰和2'-F修饰。

[0230] 一种核酸,其包含至少一个热去稳定化修饰,从第一链的位置1算起,适当地在第一链的位置1至9中的一个或多个位置处,和/或在第二链上第一链的位置7处与第一链的位置1至9对齐的一个或多个位置处,其中去稳定化修饰选自:修饰的非锁核酸(UNA)和乙二醇核酸(GNA),优选乙二醇核酸,更优选(S)-乙二醇核酸。

[0231] 一种核酸,其从第一链的位置1算起,包含至少一个在第一链的位置7处的热去稳定化修饰。

[0232] 一种核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述siRNA寡核苷从所述第二链的位置1算起,在第二链的位置6至12处包含3个或更多个2'-F修饰,如在第二链的位置6至12处包含4、5、6或7个2'-F修饰。

[0233] 一种核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第二链从所述第二链的位置1算起,在第二链的位置1至6处包含至少3个,例如4、5或6个2'-Me修饰。

[0234] 一种核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链在3'末端区域包含至少5个2'-Me连续修饰,优选包括3'末端区域的末端核苷,或至少在3'末端区域的末端核苷的1个或2个核苷内。

[0235] 一种核酸,其为siRNA寡核苷,其中所述第一链在3'末端区域包含7个2'-Me连续修饰,优选包括3'末端区域的末端核苷。

[0236] 一种核酸,其为siRNA寡核苷,其中第一链和第二链中的每一条链均包含交替修饰模式,优选地沿第一链和第二链中的每一条链的整个长度的完全交替修饰模式,其中第一链的核苷通过以下方式进行修饰:(i)从第一链的位置1算起,奇数核苷上的2'Me修饰,和(ii)从第一链的位置1算起,偶数核苷上的2'F修饰,并且第二链的核苷通过以下方式进行修饰:(i)从第二链的位置1算起,奇数核苷上的2'F修饰,和(ii)从第二链的位置1算起,偶数核苷上的2'Me修饰。典型地,这种完全交替的修饰模式存在于平端寡核苷中,其中第一链和第二链的长度均为19个核苷。

[0237] 第一链或第二链的位置1是距离核酸端最近的核苷(忽略任何无碱基核苷),并且通过3'到5'内部键与相邻核苷(在位置2)相连,参考主链糖部分之间的键,并沿着远离分子端的方向读取。

[0238] 由此可见,"正义链的位置1"是正义链的常规5'端最5'端的核苷(不包括无碱基核苷)。典型地,正义链的该位置1处的核苷将等同于所选靶核酸序列的5'核苷,且更一般地,正义链将具有与从正义链的该位置1开始的靶核酸序列的核苷等同的核苷,同时也允许序

列之间存在可接受的错配。

[0239] 本文使用的“反义链的位置1”是反义链的常规5’端最5’处的核苷(不包括无碱基核苷)。如前所述,正义链与反义链之间会存在互补区域,这样反义链也具有与上述靶核酸序列互补的区域。

[0240] 在某些实施方案中,核酸(例如siRNA)剂还包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键。例如硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键可以位于一条链(即,正义链或反义链)的3’-末端或末端区域;或位于两条链(即,正义链和反义链)的端处。

[0241] 在某些实施方案中,硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键位于一条链(即,正义链或反义链)的5’末端或末端区域;或位于两条链(即,正义链和反义链)的端处。

[0242] 在某些实施方案中,硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷间键位于一条链(即,正义链或反义链)的5’-和3’-末端或末端区域;或位于两条链(即,正义链和反义链)的端处。

[0243] 任何核酸均可在核酸内包含一个或多个硫代磷酸酯(PS)修饰,如链端的至少两个PS核苷间键。

[0244] 至少一条寡核糖核苷链优选在寡核苷的最后3个核苷中包含至少两个连续的硫代磷酸酯修饰。

[0245] 因此,本申请还涉及:本文公开的核酸,其包含分别在至少两个或三个连续位置之间的硫代磷酸酯核苷间键,如在第二链的5’和/或3’末端区域和/或近末端区域,由此所述近末端区域优选与所述第二链的所述一个或多个无碱基核苷所在的所述末端区域相邻。

[0246] 本文公开的核酸,其在第一链的5’和/或3’末端区域的至少两个或三个连续位置之间包含硫代磷酸酯核苷间键,由此优选地所述第一链的5’和/或3’末端区域的末端位置通过硫代磷酸酯核苷间键连接至其相邻位置。

[0247] 核酸链可以是包含三个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键的RNA,所述三个核苷与两个位于末端的无碱基核苷相邻。

[0248] 优选的核酸是双链RNA,其包含位于第二链的5’末端的2个相邻的无碱基核苷,和位于第二链相反的3’末端的含有一个或多个GalNAc配体部分的配体部分。进一步优选地,同一核酸还可包含从第二链的位置1读取,在第二链的位置3-4和4-5的核苷酸之间的硫代磷酸酯键。进一步优选的,同一核酸还可包含第二链的位置7、9、11处的2’F修饰。

[0249] 优选的修饰如下。

[0250] 一种核酸,其中所述第二链的修饰的核苷包含根据以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

[0251] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

[0252] Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0253] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0254] Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0255] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me。

[0256] 一种核酸,其中所述第二链的修饰的核苷包含根据以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

[0257] Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

[0258] Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0259] Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0260] Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0261] Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0262] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me,或

[0263] Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

[0264] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

[0265] Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,或

[0266] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,

[0267] 其中(s)为硫代磷酸酯核苷间键。

[0268] 一种核酸,其中所述第二链的修饰的核苷包含根据以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

[0269] ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

[0270] ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0271] ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0272] ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0273] ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0274] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-ia-ia,或

[0275] Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

[0276] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

[0277] Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,或

[0278] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,

[0279] 其中,ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在所述第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

[0280] 一种核酸,其中所述第二链的修饰的核苷包含以下任意一项的修饰模式(5’-3’):

[0281] ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,或

[0282] ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0283] ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0284] ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0285] ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,或

[0286] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me-ia-ia,或

[0287] Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

[0288] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

[0289] Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,或

[0290] Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,

[0291] 其中:

[0292] (s)为硫代磷酸酯间核苷键,ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在第二链的3'末端时,所述反向无碱基核苷在2个核苷突出端。

[0293] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0294] 修饰模式1:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0295] 或修饰模式2:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0296] 或修饰模式3:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0297] 或修饰模式4:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0298] 或修饰模式5:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0299] 或修饰模式6:第二链(5'-3'):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me。

[0300] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0301] 修饰模式1:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0302] 或修饰模式2:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0303] 或修饰模式3:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0304] 或修饰模式4:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0305] 或修饰模式5:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5'-3'):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0306] 或修饰模式6:第二链(5'-3'):Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0307] 其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

[0308] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0309] 修饰模式1:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0310] 或修饰模式2:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0311] 或修饰模式3:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0312] 或修饰模式4:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0313] 或修饰模式5:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0314] 或修饰模式6:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0315] 其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键。

[0316] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0317] 修饰模式1:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0318] 或修饰模式2:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0319] 或修饰模式3:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0320] 或修饰模式4:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0321] 或修饰模式5:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0322] 或修饰模式6:第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0323] 其中ia代表反向无碱基核苷。

[0324] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0325] 修饰模式1:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0326] 或修饰模式2:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0327] 或修饰模式3:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0328] 或修饰模式4:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0329] 或修饰模式5:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me

[0330] 或修饰模式6:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0331] 其中ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在所述第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

[0332] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0333] 修饰模式1:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0334] 或修饰模式2:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0335] 或修饰模式3:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0336] 或修饰模式4:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0337] 或修饰模式5:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-

Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0338] 或修饰模式6:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

[0339] 其中:

[0340] (s)是硫代磷酸酯核苷间键,ia代表反向无碱基核苷。

[0341] 一种核酸,其中修饰的核苷包括以下修饰模式中的任意一个:

[0342] 修饰模式1:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0343] 或修饰模式2:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-F-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0344] 或修饰模式3:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0345] 或修饰模式4:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0346] 或修饰模式5:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0347] 或修饰模式6:第二链(5’-3’):Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me-ia-ia,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0348] 其中:(s)为硫代磷酸酯间核苷键,ia代表反向无碱基核苷,并且当ia-ia所代表的反向无碱基核苷在第二链的3’末端时,所述反向无碱基核苷在2核苷突出端。

[0349] 特别优选的是其中修饰的核苷包含以下修饰模式的核酸:

[0350] 修饰模式4:第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-F-Me-F-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me

[0351] 其中:(s)是硫代磷酸酯核苷间键,ia代表反向无碱基核苷。

[0352] 一种核酸,其中第一链包含2’糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2’Me和2’F糖修饰,前提是第一链中2’F糖修饰的总数不由四或六个2’F修饰组成。

[0353] 一种核酸,其中第一链包含2’糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2’Me和2’F糖修饰,其中第一链中的2’F糖修饰的总数由3、5或7个2’F修饰组成。

[0354] 一种核酸,其中第一链包含2’糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2’Me和2’F糖修饰,其中第一链中的2’F糖修饰的总数由3个2’F修饰组成。

[0355] 一种核酸,其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,其中第一链中的2'F糖修饰的总数由5个2'F修饰组成。

[0356] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0357] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0358] 其中X_2、X_3和X_4选自2'Me和2'F糖修饰,前提是对于X_2、X_3和X_4,至少一个是2'F糖修饰,另外两个糖修饰是2'Me糖修饰。

[0359] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0360] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0361] 其中X_2是2'F糖修饰,X_3和X_4是2'Me糖修饰。

[0362] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0363] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0364] 其中X_3是2'F糖修饰,X_2和X_4是2'Me糖修饰。

[0365] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0366] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0367] 其中X_4是2'F糖修饰,X_2和X_3是2'Me糖修饰。

[0368] 一种核酸,其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,其中第一链中的2'F糖修饰的总数由七个2'F修饰组成。

[0369] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0370] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0371] 其中X_2、X_3和X_4选自2'Me和2'F糖修饰,前提是对于X_2、X_3和X_4,至少一个是2'F糖修饰,另外两个糖修饰是2'Me糖修饰。

[0372] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0373] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0374] 其中X_2是2'F糖修饰,X_3和X_4是2'Me糖修饰。

[0375] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0376] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0377] 其中X_3是2'F糖修饰,X_2和X_4是2'Me糖修饰。

[0378] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0379] $Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}X_2\text{-}Me\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}X_3\text{-}Me\text{-}X_4\text{-}(Me)_3$

[0380] 其中X_4是2'F糖修饰,X_2和X_3是2'Me糖修饰。

[0381] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0382] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}X_1\text{-}(Me)_7\text{-}F\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7$

[0383] 其中X_1是热去稳定化修饰。

[0384] 一种核酸,其中第一链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0385] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}X_1\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}F\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7$

[0386] 其中X_1是热去稳定化修饰。

[0387] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0388] $(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$。

[0389] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0390] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0391] 其中第一链包含2'糖修饰模式，其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰，前提是第一链中2'F糖修饰的总数不由四或六个2'F修饰组成。

[0392] 一种核酸，其中第二链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0393] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0394] 其中第一链包含2'糖修饰模式，其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰，其中第一链中的2'F糖修饰的总数由三、五或七个2'F修饰组成。

[0395] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与第一链至少部分互补的第二链，其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域，并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0396] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0397] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0398] Me-F-$(Me)_3$-X_1-$(Me)_7$-F-Me-F-$(Me)_7$，其中X_1是热去稳定化修饰。

[0399] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与第一链至少部分互补的第二链，其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域，并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0400] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0401] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0402] $(Me\text{-}F)_3$-$(Me)_7$-F-Me-F-$(Me)_7$。

[0403] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与第一链至少部分互补的第二链，其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域，并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0404] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0405] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0406] Me-F-$(Me)_3$-F-$(Me)_7$-$(F\text{-}Me)_2$-F-$(Me)_5$。

[0407] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与第一链至少部分互补的第二链，其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域，并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0408] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0409] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0410] Me-F-$(Me)_3$-F-$(Me)_7$-F-Me-F-$(Me)_3$-F-$(Me)_3$。

[0411] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与第一链至少部分互补的第二链，其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域，并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0412] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$，

[0413] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3')：

[0414] Me-F-$(Me)_3$-X_1-Me-$(F)_2$-$(Me)_4$-F-Me-F-$(Me)_7$，

[0415] 其中X_1是热去稳定化修饰。

[0416] 一种核酸，其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链，以及与

第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0417] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

[0418] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0419] $(Me\text{-}F)_3$-Me-$(F)_2$-$(Me)_4$-$(F\text{-}Me)_2$-$(Me)_6$。

[0420] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0421] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

[0422] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0423] Me-F-$(Me)_3$-F-Me-$(F)_2$-$(Me)_4$-$(F\text{-}Me)_2$-F-$(Me)_5$。

[0424] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0425] $(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,

[0426] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0427] Me-F-$(Me)_3$-F-Me-$(F)_2$-$(Me)_4$-$(F\text{-}Me)_2$-$(Me)_2$-F-$(Me)_3$。

[0428] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0429] ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$

[0430] 其中ia代表反向无碱基核苷。

[0431] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0432] ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,前提是第一链中2'F糖修饰的总数不由四或六个2'F修饰组成。

[0433] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0434] ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,其中第一链中的2'F糖修饰总数由三个、五个或七个2'F修饰组成。

[0435] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0436] ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0437] Me-F-(Me)3-X1-(Me)7-F-Me-F-(Me)7,其中X_1是热去稳定化修饰。

[0438] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0439] ia-ia-$(Me)_8$-$(F)_3$-$(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0440] $(Me\text{-}F)_3\text{-}(Me)_7\text{-}F\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7$。

[0441] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0442] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0443] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}F\text{-}(Me)_5$。

[0444] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0445] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0446] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}F\text{-}(Me)_7\text{-}F\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}F\text{-}(Me)_3$。

[0447] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0448] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0449] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}X_1\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}F\text{-}Me\text{-}F\text{-}(Me)_7$,

[0450] 其中X_1是热去稳定化修饰。

[0451] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0452] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0453] $(Me\text{-}F)_3\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}(Me)_6$。

[0454] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0455] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0456] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}F\text{-}(Me)_5$。

[0457] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0458] $ia\text{-}ia\text{-}(Me)_8\text{-}(F)_3\text{-}(Me)_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷;并且其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0459] $Me\text{-}F\text{-}(Me)_3\text{-}F\text{-}Me\text{-}(F)_2\text{-}(Me)_4\text{-}(F\text{-}Me)_2\text{-}(Me)_2\text{-}F\text{-}(Me)_3$。

[0460] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0461] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,

[0462] 其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键。

[0463] 一种核酸,其中第二链包含如下2'糖修饰模式(5'-3'):

[0464] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键;并且

[0465] 其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,前提是第一链中2'F糖修饰的总数不由四或六个2'F修饰组成。

[0466] 一种核酸,其中第二链包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0467] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)e-(F)s-(Me)io,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键;并且

[0468] 其中第一链包含2'糖修饰模式,其中所述修饰至少选自2'Me和2'F糖修饰,其中第一链中的2'F糖修饰的总数由三个、五个或七个2'F修饰组成。

[0469] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0470] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0471] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0472] Me(s)F(s)(Me)$_3$-X_1-(Me)$_7$-F-Me-F-(Me)$_5$(s)Me(s)Me,其中X_1是热去稳定化修饰。

[0473] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0474] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia表示反向无碱基核苷,并且(s)表示硫代磷酸酯键,并且

[0475] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0476] Me(s)F(s)Me-F-Me-F-(Me)$_7$-F-Me-F-(Me)$_5$(s)Me(s)Me。

[0477] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0478] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0479] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0480] Me(s)F(s)(Me)$_3$-F-(Me)$_7$-(F-Me)$_2$-F-(Me)$_3$(s)Me(s)Me。

[0481] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0482] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0483] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0484] Me(s)F(s)(Me)$_3$-F-(Me)$_7$-F-Me-F-(Me)$_3$-F-Me(s)Me(s)Me。

[0485] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0486] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0487] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0488] Me(s)F(s)(Me)$_3$-X$_1$-Me-(F)$_2$-(Me)$_4$-F-Me-F-(Me)$_5$(s)Me(s)Me,其中X$_1$是热去稳定化修饰。

[0489] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0490] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0491] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0492] Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-(F)$_2$-(Me)$_4$-(F-Me)$_2$-(Me)$_4$(s)Me(s)Me。

[0493] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0494] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0495] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0496] Me(s)F(s)(Me)$_3$-F-Me-(F)$_2$-(Me)$_4$-(F-Me)$_2$-F-(Me)$_3$(s)Me(s)Me。

[0497] 一种核酸,其包含与从靶基因转录的RNA的一部分至少部分互补的第一链,以及与第一链至少部分互补的第二链,其中所述第一链和第二链形成长度至少为17个核苷的双链体区域,并且其中所述第二链的核苷包含如下的2'糖和无碱基修饰模式(5'-3'):

[0498] ia-ia-Me(s)Me(s)(Me)$_6$-(F)$_3$-(Me)$_{10}$,其中ia代表反向无碱基核苷,并且(s)代表硫代磷酸酯键,并且

[0499] 其中所述第一链的核苷包含如下的2'糖修饰模式(5'-3'):

[0500] Me(s)F(s)(Me)$_3$-F-Me-(F)$_2$-(Me)$_4$-(F-Me)$_2$-(Me)$_2$-F-Me(s)Me(s)Me。

[0501] 优选的修饰如下:

[0502] 修饰模式1:

[0503] 第二链(5'-3'):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0504] 第一链(5'-3'):Me-F-Me-Me-Me-X$_1$-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,其中X$_1$是热去稳定化修饰;

[0505] 或修饰模式2:

[0506] 第二链(5'-3'):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0507] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

[0508] 或修饰模式3:

[0509] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0510] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me;

[0511] 或修饰模式4:

[0512] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0513] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me;

[0514] 或修饰模式5:

[0515] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0516] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,其中X_1是热去稳定化修饰;

[0517] 或修饰模式6:

[0518] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0519] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me;

[0520] 或修饰模式7:

[0521] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0522] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me;

[0523] 或修饰模式8:

[0524] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0525] 第一链(5’-3’):Me-F-Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me-Me-Me,

[0526] 其中ia代表反向无碱基核苷。

[0527] 进一步优选的修饰如下:

[0528] 修饰模式1:

[0529] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0530] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X1是热去稳定化修饰;

[0531] 或修饰模式2:

[0532] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0533] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

[0534] 或修饰模式3:

[0535] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0536] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

[0537] 或修饰模式4:

[0538] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0539] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

[0540] 或修饰模式5:

[0541] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0542] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-X_1-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me,其中X1是热去稳定化修饰;

[0543] 或修饰模式6:

[0544] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0545] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-F-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

[0546] 或修饰模式7:

[0547] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0548] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-F-Me-Me-Me(s)Me(s)Me;

[0549] 或修饰模式8:

[0550] 第二链(5’-3’):ia-ia-Me(s)Me(s)Me-Me-Me-Me-Me-Me-F-F-F-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me-Me,

[0551] 第一链(5’-3’):Me(s)F(s)Me-Me-Me-F-Me-F-F-Me-Me-Me-Me-F-Me-F-Me-Me-Me-F-Me(s)Me(s)Me;

[0552] 其中(s)是硫代磷酸酯核苷间键,ia代表反向无碱基核苷。

[0553] 缀合

[0554] 本申请的核酸(RNA(例如,siRNA)的另一种修饰,涉及将核酸(例如,siRNA)连接至一个或多个配体部分,例如,以增强核酸(例如,siRNA)例如进入细胞的活性、细胞分布或细

胞摄取。

[0555] 在一些实施方案中,所述配体部分可通过可裂解或不可裂解的连接体连接至核酸,例如siRNA寡核苷。术语“连接体”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。

[0556] 配体可以连接至正义链的3’或5’端。

[0557] 配体优选与核酸(例如siRNA剂)的正义链的3’端缀合。

[0558] 因此,本申请在另一方面涉及用于抑制细胞中靶基因表达的缀合物,所述缀合物包含核酸部分和一个或多个配体部分,所述核酸部分包含如本文所公开的核酸。

[0559] 在一个方面,核酸的第二链直接或间接(例如通过连接体)缀合至一个或多个配体部分,其中所述配体部分通常在第二链的末端区域,优选在其3’末端区域。

[0560] 在某些实施方案中,配体部分包含通过连接体与核酸(例如dsiRNA)连接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0561] 因此本申请涉及一种缀合物,其中配体部分包含:

[0562] i)一个或多个GalNAc配体;和/或

[0563] ii)一个或多个GalNAc配体衍生物;和/或

[0564] iii)一个或多个通过连接体与所述核酸缀合的GalNAc配体。

[0565] 所述GalNAc配体可以直接或间接地与核酸第二链的5’或3’末端区域缀合,优选在其3’末端区域缀合。

[0566] GalNAc配体在本领域中是众所周知的,并且在EP3775207A1等中有描述。

[0567] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图1至4或图5(式XI)中所示的任意一个连接体中,其中“寡核苷酸”可以是本文公开的任何核酸。因此,“寡核苷酸”可以包含除磷酸二酯键之外的其它键,例如一个或多个硫代磷酸酯键。优选地,根据本申请的核酸是如本文所定义的双链寡核苷,并且连接体通过磷酸二酯键缀合到第二链,更优选地缀合到第二链的3’末端区域。

[0568] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中“寡核苷酸”可以是本文公开的任何核酸。因此,“寡核苷酸”可以包含除磷酸二酯键之外的其它键,例如一个或多个硫代磷酸酯键。优选地,根据本申请的核酸是如本文所定义的双链寡核苷,并且连接体通过磷酸二酯键缀合到第二链,更优选地缀合到第二链的3’末端区域。

[0569] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)所示的连接体中,其中“寡核苷酸”可以是本文公开的任何核酸。因此,“寡核苷酸”可以包含除磷酸二酯键之外的其它键,例如一个或多个硫代磷酸酯键。优选地,根据本申请的核酸是如本文所定义的双链寡核苷,并且连接体通过磷酸二酯键缀合到第二链,更优选地缀合到第二链的3’末端区域。

[0570] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图1至4或图5(式XI)中所示的任意一个连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰或未修饰的第二链,所述第二链包含SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3’末端区域(即,与SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268的3’末端区域)缀合。

[0571] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰或未修饰的第二链,所述第二链包含

SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268的3'末端区域)缀合。

[0572] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰或未修饰的第二链,所述第二链包含SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:265或SEQ ID NO:268的3'末端区域)缀合。

[0573] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图1至4或图5(式XI)中所示的任意一个连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第二链,所述第二链包含SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776的3'末端区域)缀合。

[0574] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第二链,所述第二链包含SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776的3'末端区域)缀合。

[0575] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第二链,所述第二链包含SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776或由其组成,优选地其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774或SEQ ID NO:776的3'末端区域)缀合。

[0576] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图1至4或图5(式XI)中所示的任意一个连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:764或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:774或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774的3'末端区域)缀合。

[0577] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:764或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:774或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774的3'末端区域)缀合。

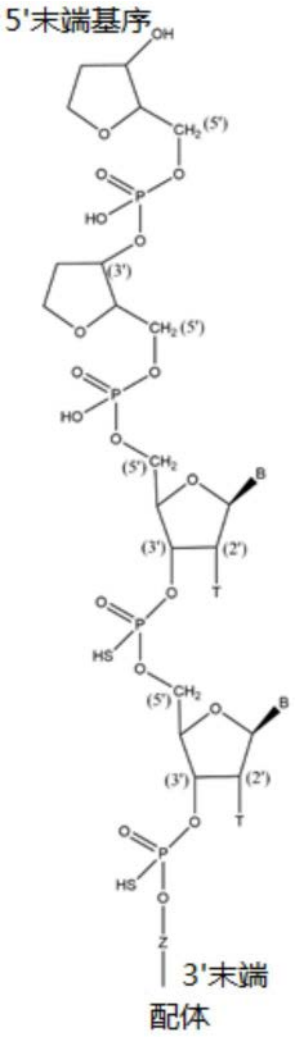
[0578] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:764或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:774或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:774的3'末端区域)缀合。

[0579] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图1至4或图5(式XI)中所示的任意一个连接体中,其中"寡核苷酸"代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:766或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:776或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3'末端区域(即,与SEQ ID NO:776的3'末端区域)缀合。

[0580] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:766或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:776或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3’末端区域(即,与SEQ ID NO:776的3’末端区域)缀合。

[0581] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:766或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:776或由其组成,优选地,其中连接体通过磷酸二酯键与第二链的3’末端区域(即,与SEQ ID NO:776的3’末端区域)缀合。

[0582] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:764或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:774或由其组成,其中所述第二链具有以下结构:

[0583] 

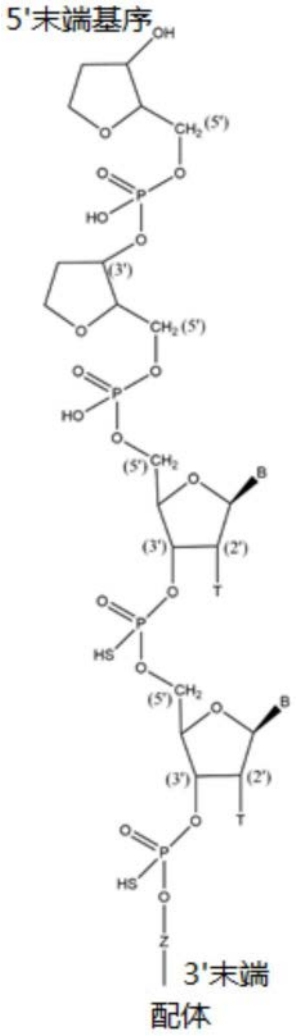
[0584] 其中:

[0585] T代表2’Me核糖修饰,

[0586] B代表SEQ ID NO:774的5’末端区域中前两个碱基核苷的核苷碱基,并且

[0587] Z代表SEQ ID NO:774的剩余19个连续的碱基核苷。

[0588] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:764或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:774或由其组成,其中所述第二链具有以下结构:

[0589] 

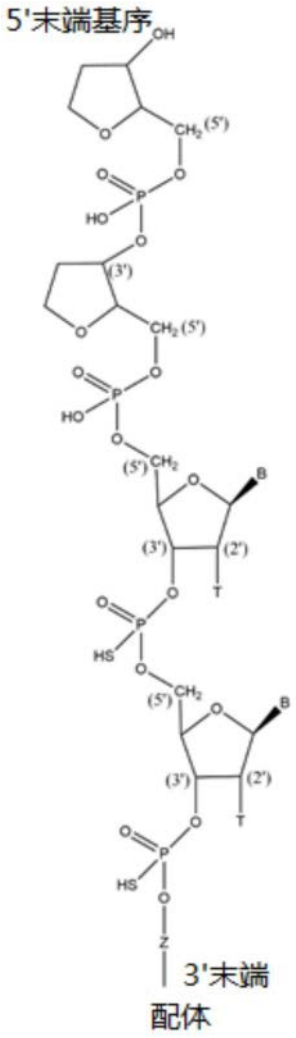
[0590] 其中:

[0591] T代表2’Me核糖修饰,

[0592] B代表SEQ ID NO:774的5’末端区域中前两个碱基核苷的核苷碱基,并且

[0593] Z代表SEQ ID NO:774的剩余19个连续的碱基核苷。

[0594] 在一些实施方案中,GalNAc配体包含在图3所示的连接体中,其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸,其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链,所述第一链包含SEQ ID NO:766或由其组成,所述第二链包含SEQ ID NO:776或由其组成,其中第二链具有以下结构:

[0595] 

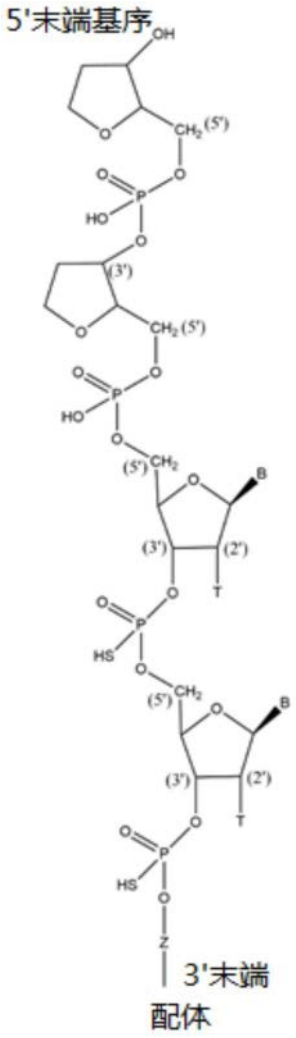
[0596] 其中：

[0597] T代表2'Me核糖修饰，

[0598] B代表SEQ ID NO:776的5'末端区域中前两个碱基核苷的核苷碱基，并且

[0599] Z代表SEQ ID NO:776的剩余19个连续的碱基核苷。

[0600] 在一些实施方案中，GalNAc配体包含在图5(式XI)中所示的连接体中，其中“寡核苷酸”代表根据本申请的核酸，其中根据本申请的核酸包含修饰的第一链和修饰的第二链，所述第一链包含SEQ ID NO:766或由其组成，所述第二链包含SEQ ID NO:776或由其组成，其中第二链具有以下结构：

[0601] 

[0602] 其中:

[0603] T代表2'Me核糖修饰,

[0604] B代表SEQ ID NO:776的5'末端区域中前两个碱基核苷的核苷碱基,并且

[0605] Z代表SEQ ID NO:776的剩余19个连续的碱基核苷。

[0606] 载体与细胞

[0607] 在一个方面,本申请提供了含有核酸,如本文所述的抑制性RNA[RNAi]的细胞。

[0608] 在一个方面,本申请提供了包含本文所述载体的细胞。

[0609] 药学上可接受的组合物

[0610] 在一个方面,本申请提供了用于抑制靶基因表达的药物组合物,所述组合物包含本文所公开的核酸。

[0611] 药学上可接受的组合物可包含赋形剂和/或载体。

[0612] 可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(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)黄蓍胶粉(powdered tragacanth);(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石粉;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,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,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲

剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/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)其他用于药物制剂的无毒相容物质。

[0613] 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、淀粉羟基乙酸钠等);和润湿剂(例如十二烷基硫酸钠等)。

[0614] 适合于非胃肠外施用且不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可用于配制本申请的组合物。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、滑石粉、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0615] 用于局部施用核酸的制剂可以包括无菌和非无菌水溶液、在常见溶剂例如乙醇中的非水溶液、或在液体或固体油基中的核酸溶液。溶液还可以含有缓冲液、稀释剂和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外施用且不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0616] 在一个实施方案中,核酸或组合物在非缓冲溶液中施用。在某些实施方案中,非缓冲溶液是盐水或水。在其他实施方案中,核酸(例如siRNA剂)在缓冲溶液中施用。在此类实施方案中,缓冲溶液可以包含醋酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任意组合。例如,缓冲溶液可以是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0617] 剂量

[0618] 本申请的药物组合物可以以足以抑制基因表达的剂量施用。通常,本申请的核酸(例如,siRNA)的合适剂量为每天每千克接受者体重约0.001至约200.0毫克,通常为每天每千克体重约1至50mg。通常,本申请的核酸(例如,siRNA)的合适剂量为约0.1mg/kg至约5.0mg/kg,例如,约0.3mg/kg和约3.0mg/kg。

[0619] 重复剂量方案可以包括定期(例如每隔一天或每年一次)施用治疗量的核酸,例如siRNA。在某些实施方案中,核酸(例如siRNA)约每月一次至约每季度一次(即,约每三个月一次)施用。

[0620] 在各种实施方案中,核酸(例如,siRNA剂)以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约50mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,核酸(例如siRNA剂)以约10mg/kg至约30mg/kg的剂量施用。在某些实施方案中,核酸(例如siRNA剂)以选自约0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和30mg/kg的剂量施用。在某些实施方案中,核酸(例如siRNA剂)以约0.1mg/kg至约5.0mg/kg的剂量约每周一次、每月一次、每隔两个月一次或每季度一次(即,每三个月一次)施用。在某些实施方案中,每周一次向受试者施用核酸(例如siRNA剂)。在某些实施方案中,每月一次向受试者施用核酸(例如siRNA剂)。在某些实施方案中,核酸(例如siRNA剂)每季度(即,每三个月)施用一次。

[0621] 在初始治疗方案之后,可以以较低的频率进行治疗。例如,每周或每两周施用一次持续三个月后,可以每月重复施用一次,持续六个月或一年;或更长时间。

[0622] 药物组合物可以每日施用一次,或在一天中以适当的间隔以两次、三次或更多次

亚剂量施用,或甚至使用连续输注或通过控释制剂递送。在这种情况下,每个亚剂量中所含的核酸(例如siRNA)必须相应较小,以达到每日总剂量。还可将剂量单位复合以在数天内递送,例如使用常规缓释制剂,其可在数天内提供核酸(例如,siRNA)的缓释。缓释制剂在本领域中是众所周知的,并且特别适用于在特定部位递送药剂,如可与本申请的药剂一起使用。在该实施方案中,剂量单位含有相应倍数的日剂量。

[0623] 在其它实施方案中,药物组合物的单剂量可以持续很长时间,使得后续剂量以不大于3、4或5天的间隔施用,或以不大于1、2、3或4周的间隔施用。在本申请的一些实施方案中,每周施用一次单剂量的本申请的药物组合物。在本申请的其他实施方案中,每两个月施用一次单剂量的本申请的药物组合物。在某些实施方案中,siRNA约每月一次至约每季度一次(即,约每三个月一次),或甚至每6个月或12个月一次施用。

[0624] 可以使用常规方法或基于使用合适动物模型(如本领域所公知的)的体内测试来估计本申请所涵盖的单个核酸(例如siRNA)的有效剂量和体内半衰期。

[0625] 本申请的药物组合物可以以多种方式施用,这取决于需要局部治疗还是全身治疗以及取决于要治疗的区域。施用可以是局部的(例如,通过透皮贴剂)、肺部的(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器)、气管内、鼻内、表皮和透皮、口服或肠胃外的。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉注射或输注;皮下,例如通过植入装置;或颅内,例如通过实质内、鞘内或心室内施用。在某些优选实施方案中,组合物通过静脉输注或注射施用。在某些实施方案中,组合物通过皮下注射施用。

[0626] 在一个实施方案中,将核酸(例如试剂)皮下施用给受试者。

[0627] 核酸(例如siRNA)可以以靶向特定组织(例如特别是肝细胞)的方式递送。

[0628] 抑制ZPI基因表达的方法

[0629] 本申请还提供了抑制细胞中ZPI基因表达的方法。该方法包括使细胞与本申请的核酸(例如,siRNA试剂,如双链siRNA试剂)接触,其量可有效抑制细胞中ZPI基因的表达,从而抑制细胞中ZPI基因的表达。需要注意的是,“用于抑制ZPI表达”的核酸是能够抑制ZPI表达的核酸,优选如下所述。

[0630] 细胞与核酸(例如siRNA,如双链siRNA剂)的接触可以在体外或体内进行。使细胞在体内与核酸接触,例如包括使受试者(例如人类受试者)体内的细胞或一组细胞与核酸(例如siRNA)接触。也可结合与细胞接触的体外和体内方法。如上所述,接触细胞可以是直接的,也可以是间接的。此外,接触细胞可以通过靶向配体部分,包括本文所述或本领域已知的任何配体部分来实现。在优选实施方案中,靶向配体部分是碳水化合物部分,例如GalNAc3配体,或将siRNA剂引导至目标位点的任何其他配体部分。

[0631] 本文使用的术语“抑制”可与“减少”、“沉默”、“下调”、“压制”和其他类似术语互换使用,并且包括任何水平的抑制。

[0632] 在本申请的方法的一些实施方案中,ZPI基因的表达被抑制至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或抑制至低于测定的检测水平,优选当如本文所述通过qPCR测定时和/或当siRNA通过转染引入靶细胞时。在某些实施方案中,该方法包括临床相关的ZPI靶基因表达抑制,例如,如用药剂治疗受试者以降低基因表达后的临床相关结果所证明的。

[0633] 在一些实施方案中,当转染到细胞中时,本申请的核酸抑制ZPI基因的表达,其

IC50值低于2500pM、2400pM、2300pM、2200pM、2100pM、2000pM、1900pM、1800pM、1700pM、1600pM、1500pM、1400pM、1300pM、1200pM、1100pM、1000pM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、200pM或100pM,优选通过qPCR测定,更优选通过逆转录酶(RT)-qPCR测定,如本文所述。

[0634] 在优选的实施方案中,当本申请的核酸转染到细胞中时,其抑制ZPI基因的表达的IC50值低于2500pM。在更优选的实施方案中,当本申请的核酸转染到细胞中时,其抑制ZPI基因的表达的IC50值低于1000pM。在更优选的实施方案中,当本申请的核酸转染到细胞中时,其抑制ZPI基因的表达的IC50值低于500pM。在最优选的实施方案中,当本申请的核酸转染到细胞中时,其抑制ZPI基因的表达的IC50值低于100pM。

[0635] ZPI基因表达的抑制可以通过以下方法量化:

[0636] Huh7细胞(人类肝细胞衍生细胞系,从JCRB细胞库获得)可在37℃和5%CO_2气氛下在补充有10%FBS的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。然后,可以使用靶向ZPI mRNA的siRNA双链体或阴性对照siRNA(siRNA对照;正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(SEQ ID NO:794),反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:790))转染细胞,使用10x3倍连续稀释,最终双链体浓度范围为20nM至1pM。可以通过将9.7μL Opti-MEM(ThermoFisher)和0.3μL Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher)添加到10μL的每个siRNA双链体中进行转染。混合物可在室温下孵育15分钟,然后加入100μL的含有20,000个Huh7细胞的完全生长培养基中。在使用RNeasy 96试剂盒(Qiagen)纯化总RNA之前,可将细胞在37℃/5%CO_2下孵育24小时。可以在单次实验中通过重复孔中的转染来测试每个双链体。

[0637] 可以使用FastQuant RT(含gDNase)试剂盒(Tiangen)进行cDNA合成。可以在ABIPrism 7900HT或ABIQuantStudio 7上使用针对人类ZPI(Hs01547819_m1)和人类GAPDH(Hs02786624_g1)的特异性引物,使用FastStart Universal Probe Master试剂盒(Roche)进行实时定量PCR(qPCR)。

[0638] 可以对来自每个孔的cDNA重复进行qPCR,并计算平均循环阈值(Ct)。可以使用比较Ct(ΔΔCt)方法根据平均Ct值计算相对ZPI表达,标准化为GAPDH并相对于未处理的细胞。可以用四参数(可变斜率)模型使用GraphPad Prism 9计算ZPI表达的最大抑制百分比和IC50值。

[0639] 或者或另外地,ZPI基因表达的抑制可以通过ZPI基因的平均相对表达的降低来表征。

[0640] 在一些实施方案中,当用0.1nM本申请的核酸转染细胞时,ZPI的平均相对表达低于1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5或0.4,优选通过qPCR测定,更优选通过逆转录酶(RT)-qPCR测定,如本文所述。

[0641] 在一些实施方案中,当用5nM本申请的核酸转染细胞时,ZPI的平均相对表达低于1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4或0.3,优选通过qPCR测定,更优选通过逆转录酶(RT)-qPCR测定,如本文所述。

[0642] ZPI基因的平均相对表达可以通过以下方法量化:

[0643] Huh7细胞(人类肝细胞衍生细胞系,从JCRB细胞库获得)可在37℃和5%CO_2的环境下在补充有10%FBS的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。可以用靶向ZPI mRNA的siRNA双链体或阴性对照siRNA(siRNA对照;正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(SEQ ID NO:

794),反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:790))转染细胞,最终双链体浓度为5nM和0.1nM。可以通过将9.7μL Opti-MEM(ThermoFisher)和0.3μL Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher)添加到10μL的每个siRNA双链体中进行转染。混合物可在室温下孵育15分钟,然后加入100μL的含有20,000个Huh7细胞的完全生长培养基中。细胞可在37℃/5%CO_2下孵育24小时,然后使用RNeasy 96试剂盒(Qiagen)纯化总RNA。可以在两个独立实验中通过重复孔中的转染来测试每个双链体。

[0644] 可以使用FastQuant RT(含gDNase)试剂盒(Tiangen)进行cDNA合成。可以在ABIPrism 7900HT或ABIQuantStudio 7上使用针对人类ZPI(Hs01547819_m1)和人类GAPDH(Hs02786624_g1)的特异性引物,使用FastStart Universal Probe Master试剂盒(Roche)进行实时定量PCR(qPCR)。

[0645] 可以对来自每个孔的cDNA重复进行qPCR,并计算平均Ct。可以使用比较Ct(ΔΔCt)方法根据平均Ct值计算相对ZPI表达,标准化为GAPDH并相对于未处理的细胞。

[0646] ZPI基因表达的抑制可以通过与合适的对照相比靶ZPI基因的mRNA数量的减少来表现。

[0647] 在其它实施方案中,ZPI基因表达的抑制可以通过与基因表达功能相关的参数(例如蛋白质表达或信号通路)的减少来评估。

[0648] 治疗或预防与ZPI基因表达相关的疾病的方法

[0649] 本申请还提供了使用本申请的核酸(例如,siRNA)或含有本申请的核酸(例如,siRNA)的组合物来降低或抑制细胞中的ZPI基因表达的方法。该方法包括使细胞与本申请的核酸(例如dsiRNA)接触,并将细胞维持足够的时间以获得ZPI mRNA转录物降解,从而抑制细胞中ZPI基因的表达。基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法来评估。

[0650] 在本申请的方法中,细胞可以在体外或体内接触,即细胞可以在受试者体内。

[0651] 适合使用本申请的方法治疗的细胞可以是表达与止血障碍相关疾病(如与止血障碍相关的疾病,如血友病)相关的目的基因的任何细胞。

[0652] 本申请的体内方法可以包括向受试者施用含有本申请的核酸(例如siRNA)的组合物,其中核酸(例如siRNA)包括与待治疗的哺乳动物的ZPI基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷序列。

[0653] 本申请进一步提供了治疗有需要的受试者的方法。本申请的治疗方法包括以治疗有效量向受试者(例如,受益于降低或抑制ZPI基因表达的受试者)施用本申请的核酸(如siRNA),例如靶向ZPI的核酸(如siRNA)或包含靶向ZPI的核酸的药物组合物。要治疗的疾病与止血障碍有关,如与止血障碍相关的疾病,如血友病。

[0654] 血友病(haemophilia或hemophilia)是一种主要由遗传引起的基因障碍,会损害人体产生血凝块的能力,而血凝块是止血所必需的过程。这会导致受试者受伤后出血时间更长、容易瘀伤,并且关节或大脑内出血的风险增加。该疾病的轻度受试者可能仅在事故后或手术期间才会出现症状。关节出血(也称为关节积血)可导致永久性受伤,而脑出血可导致长期头痛、癫痫或意识水平下降。

[0655] 血友病主要有两种类型:血友病A(因凝血因子VIII含量低而发生)和血友病B(因凝血因子IX含量低而发生)。这两种类型通常通过携带无功能基因的X染色体从父母遗传而来。罕见的是,在早期发育过程中可能会发生新的突变,或在以后的生活中由于形成针对凝

血因子的抗体而可能患上血友病。其他类型包括因XI因子水平低而发生的血友病C、因一种称为血管性血友病因子的物质水平低而发生的血管性血友病,以及因V因子水平低而发生的副血友病。血友病A、B和C阻止内在途径正常运作;当血管内皮受损时,这种凝血途径是必需的。获得性血友病与癌症、自身免疫性疾病和怀孕有关。诊断是通过测试血液的凝血能力和凝血因子水平。

[0656] 在某些实施方案中,本申请的核酸适用于治疗,或用于治疗血友病A、B和/或C。在某些实施方案中,本申请的核酸适用于治疗,或用于治疗血友病A和/或B。在某些实施方案中,本申请的核酸适用于治疗,或用于治疗获得性血友病。在某些实施方案中,本申请的核酸适用于治疗,或用于治疗血管性血友病。在某些实施方案中,本申请的核酸适用于治疗,或用于治疗副血友病。

[0657] 不希望受理论的束缚,用本申请的核酸治疗会导致凝血因子水平的提高,从而可以减少或预防出血,如图12所示。因此,在优选的实施方案中,用本申请的核酸治疗减少或预防患有血友病的受试者的出血发作。在另一个优选的实施方案中,用本申请的核酸治疗减少或预防患有血友病的受试者的关节出血。在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗减少或预防患有血友病的受试者的肌肉或脑部出血。

[0658] 或者或另外地,用本申请的核酸治疗受试者,优选地治疗患有止血障碍如血友病的受试者,可以导致下列一种或多种结果:

[0659] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致骨髓增生减少。如图14A所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的骨髓增生。

[0660] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致骨关节炎减轻。如图14B所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减轻了所述小鼠的骨关节炎。

[0661] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致软骨细胞变性/坏死减少。如图14C所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的软骨细胞变性/坏死。

[0662] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致出血减少。如图14D所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的出血。

[0663] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致含铁血黄素沉积减少。如图14E所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠体内含铁血黄素的沉积。

[0664] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致血肿发生率减少。如图14F所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的血肿。

[0665] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致破骨细胞性骨吸收减少。如图14G所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的破骨细胞性骨吸收。

[0666] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的

受试者,导致骨质溶解减少。如图14H所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的骨质溶解。

[0667] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致骨膜炎减少。如图14I所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的骨膜炎。

[0668] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致软骨下骨硬化减少。如图14J所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的软骨下骨硬化。

[0669] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致肌腱退化减少。如图14K所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少所述小鼠的肌腱退化。

[0670] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致肌腱炎减少。如图14L所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少所述小鼠的肌腱炎。

[0671] 在某些实施方案中,用本申请的核酸治疗受试者,优选患有止血障碍如血友病的受试者,导致腱鞘炎减少。如图14M所示,用本申请的核酸治疗Haem A小鼠显著减少了所述小鼠的腱鞘炎。

[0672] 因此,在特定的实施方案中,本申请涉及适合用于或用于治疗血友病的核酸,其中血友病的治疗特征在于减少出血和以下的一项或多项:减少骨髓增生、减少骨关节炎、减少软骨细胞变性/坏死、减少出血、减少含铁血黄素沉积、减少血肿、减少破骨细胞性骨吸收、减少骨溶解、减少骨膜炎、减少软骨下骨硬化、减少肌腱变性、减少肌腱炎和/或减少腱鞘炎。本申请的核酸(例如,siRNA)可以作为“游离”核酸或“游离”siRNA来施用,在没有药物组合物的情况下施用。裸露的核酸可以在合适的缓冲溶液中。缓冲溶液可以包含醋酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任意组合。在一个实施方案中,缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节缓冲溶液的pH值和渗透压,以使其适合于给受试者施用。

[0673] 或者本申请的核酸(例如,siRNA)可以作为药物组合物(如dsiRNA脂质体制剂)施用。

[0674] 在一个实施方案中,该方法包括施用本文所述的组合物,使得ZPI基因的表达降低,如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32或约36小时。在一个实施方案中,ZPI靶基因的表达降低持续较长时间,例如至少约两天、三天、四天或更长时间,例如约一周、两周、三周或四周或更长时间,例如约1个月、2个月或3个月。

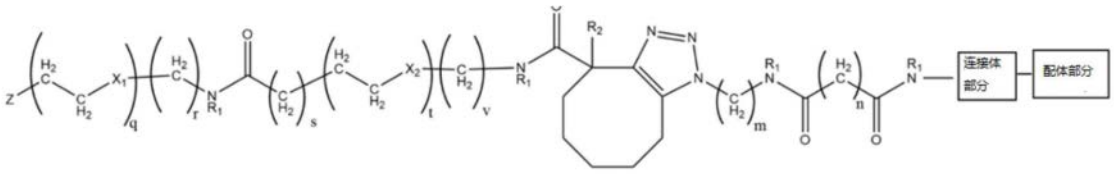
[0675] 可以向受试者施用治疗量的核酸(例如,siRNA),如约0.01mg/kg至约200mg/kg,以便治疗与止血障碍相关的疾病,如与止血障碍相关的疾病,如血友病。

[0676] 核酸(例如siRNA)可以在一段时间内定期通过静脉输注施用。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以以较低频率施用治疗。siRNA的施用可以降低例如患者细胞或组织中ZPI靶基因的基因产物水平至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或低于所用测定方法的检测水平。在某些实施方案中,施用导致临床稳定或优选地临床相关地减少ZPI基因相关障碍的至少一种体征或症状。

[0677] 或者核酸(例如,siRNA)可以皮下施用,即通过皮下注射施用。可以采用一次或多次注射来向受试者递送所需日剂量的核酸(例如,siRNA)。可以在一段时间内重复注射。可以定期重复施用。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以以较低频率施用治疗。重复剂量方案可以包括定期施用治疗量的核酸,例如每隔一天或每年一次。在某些实施方案中,核酸约每月一次至约每季度一次(即,约每三个月一次)施用。

[0678] 在一个方面,本申请可以应用于以下项(Sentences)编号1-101的化合物、方法、组合物或用途,其中对项1-101中的任何式的引用仅指在项1-101内定义的那些式。这些式在图5中重现。具体地,下列任意一项中Z所表示的寡核苷部分可以包含下文任一项权利要求所定义的用于抑制ZPI表达的核酸。

[0679] 1.一种化合物,其包含以下结构:

[0680] 

式(I)

[0681] 其中:

[0682] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基;

[0683] R_2选自氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基;

[0684] X_1和X_2每次出现时独立地选自亚甲基、氧和硫;

[0685] m为1至6的整数;

[0686] n为1至10的整数;

[0687] q、r、s、t、v独立地为0至4的整数,前提是:

[0688] (i)q和r不能同时为0;并且

[0689] (ii)s、t和v不能同时为0;

[0690] Z是寡核苷部分。

[0691] 2.根据项1的化合物,其中R_1在每次出现时均为氢。

[0692] 3.根据项1的化合物,其中R_1是甲基。

[0693] 4.根据项1的化合物,其中R_1是乙基。

[0694] 5.根据项1至4中任一项的化合物,其中R_2是羟基。

[0695] 6.根据项1至4的任一项的化合物,其中R_2是卤素。

[0696] 7.根据项6的化合物,其中R_2是氟。

[0697] 8.根据项6的化合物,其中R_2是氯。

[0698] 9.根据项6的化合物,其中R_2是溴。

[0699] 10.根据项6的化合物,其中R_2是碘。

[0700] 11.根据项6的化合物,其中R_2是硝基。

[0701] 12.根据项1至11中任一项的化合物,其中X_1是亚甲基。

[0702] 13.根据项1至11中任一项的化合物,其中X_1是氧。

[0703] 14.根据项1至11中任一项的化合物,其中X_1是硫。

[0704] 15.根据项1至14中任一项的化合物,其中X_2是亚甲基。

[0705] 16.根据项1至15中任一项的化合物,其中X_2是氧。

[0706] 17.根据项1至16中任一项的化合物,其中X_2是硫。

[0707] 18.根据项1至17中任一项的化合物,其中m=3。

[0708] 19.根据项1至18中任一项的化合物,其中n=6。

[0709] 20.根据项13和15的化合物,其中X_1是氧,并且X_2是亚甲基,并且优选地其中:

[0710] q=1,

[0711] r=2,

[0712] s=1,

[0713] t=1,

[0714] v=1。

[0715] 21.根据项12和15的化合物,其中X_1和X_2均为亚甲基,并且优选地其中:

[0716] q=1,

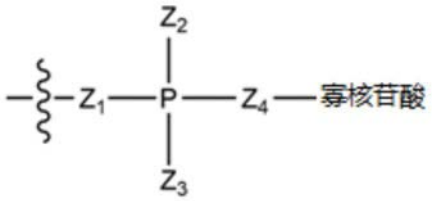
[0717] r=3,

[0718] s=1,

[0719] t=1,

[0720] v=1。

[0721] 22.根据项1至21中任意一项的化合物,其中Z是:

[0722] 

[0723] 其中:

[0724] Z_1、Z_2、Z_3、Z_4在每次出现时独立地为氧或硫;并且P和Z_2之间以及P和Z_3之间的键之一是单键,而另一个键是双键。

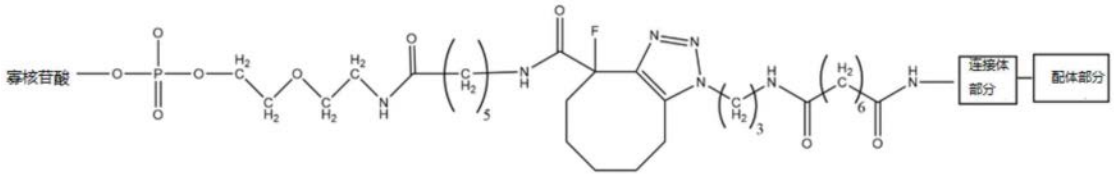
[0725] 23.根据项22的化合物,其中所述寡核苷是能够调节、优选抑制靶基因表达的RNA化合物。

[0726] 24.根据项23的化合物,其中所述RNA化合物包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'端和3'端。

[0727] 25.根据项24的化合物,其中RNA化合物在其第二链的5'端连接到相邻的磷酸基上。

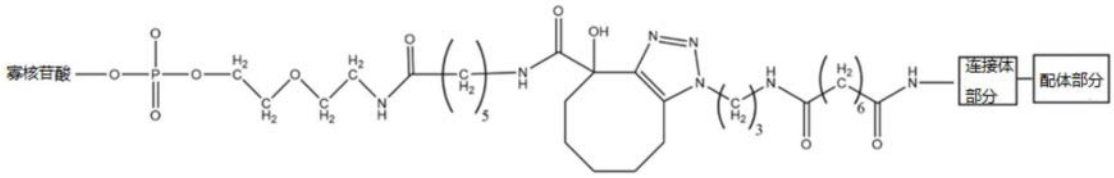
[0728] 26.根据项24的化合物,其中RNA化合物在其第二链的3'端连接到相邻的磷酸基上。

[0729] 27.一种式(II)的化合物:

[0730] 

式(II)

[0731] 28.一种式(III)的化合物

[0732] 

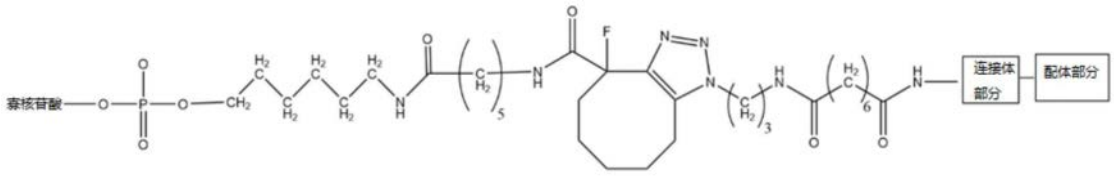
式(III)

[0733] 29.根据项27或28的化合物,其中寡核苷包含RNA双链体,所述RNA双链体包含第一链和第二链,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'端和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的5'端连接到相邻的磷酸基上。

[0734] 30.一种组合物,包含如项27中所定义的式(II)的化合物,和如项28中所定义的式(III)的化合物,任选地从属于项29。

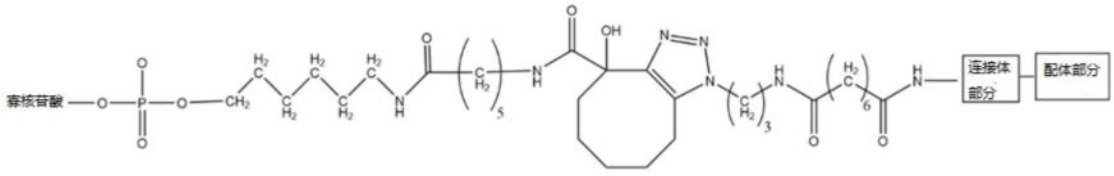
[0735] 31.根据项30的组合物,其中项28中定义的式(III)的所述化合物的含量为所述组合物重量的10至15%。

[0736] 32.一种式(IV)的化合物:

[0737] 

式(IV)

[0738] 33.一种式(V)的化合物

[0739] 

式(V)

[0740] 34.根据项32或33的化合物,其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的3'端连接至相邻的磷酸基上。

[0741] 35.一种组合物,包含如项32中所定义的式(IV)的化合物,和如项33中所定义的式

(V)的化合物,任选地从属于项34。

[0742] 36.根据项35的组合物,其中项33中定义的式(V)的所述化合物的含量为所述组合物重量的10至15%。

[0743] 37.如项1至29或32至34中任一项所定义的化合物,其中寡核苷包含RNA双链体,所述RNA双链体还包含在2'位置修饰的一个或多个核糖,优选在2'位置修饰的多个核糖。

[0744] 38.根据项37的化合物,其中修饰选自2'-O-甲基、2'-脱氧-氟和2'-脱氧。

[0745] 39.根据项1至29、或32至34、或37至38中的任一项的化合物,其中寡核苷还在一个或多个端处包含一个或多个降解保护部分。

[0746] 40.根据项39的化合物,其中所述一个或多个降解保护部分不在携带配体部分的寡核苷链的端处,和/或其中所述一个或多个降解保护部分选自硫代磷酸酯核苷间键、二硫代磷酸酯核苷间键和反向无碱基核苷,其中所述反向无碱基核苷在携带配体部分的链的远端。

[0747] 41.根据项1至29、或32至34、或37至40中任一项的化合物,其中项1中的式(I)所示的所述配体部分包含一个或多个配体。

[0748] 42.根据项41的化合物,其中项1中的式(I)所示的所述配体部分包含一个或多个碳水化合物配体。

[0749] 43.根据项42的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物可以是单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖。

[0750] 44.根据项43的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物包含一个或多个半乳糖部分、一个或多个乳糖部分、一个或多个N-乙酰半乳糖胺部分、和/或一个或多个甘露糖部分。

[0751] 45.根据项44的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物包含一个或多个N-乙酰半乳糖胺部分。

[0752] 46.根据项45的化合物,其包含两个或三个N-乙酰半乳糖胺部分。

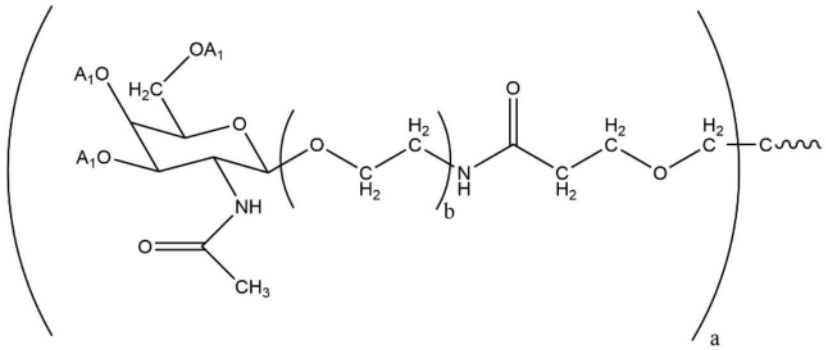
[0753] 47.根据项41至46中任一项的化合物,其中所述一个或多个配体以线性构型或分支构型连接。

[0754] 48.根据项47的化合物,其中所述一个或多个配体以双触角或三触角分支构型连接。

[0755] 49.根据项46至48的化合物,其中项1中式(I)所示的所述部分:

[0756] 

[0757] 是式(VIa)、(VIb)或(VIc)中的任意一个,优选式(VIa):

[0758] 

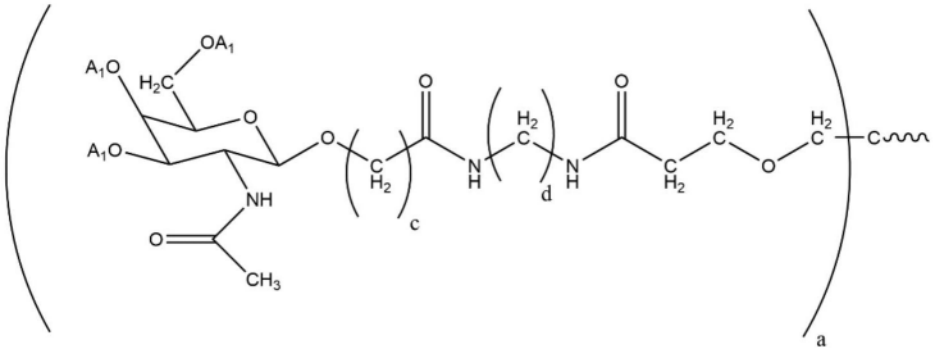
式(VIa)

[0759] 其中：

[0760] A_I是氢,或合适的羟基保护基；

[0761] a是2或3的整数;并且

[0762] b是2至5的整数;或

[0763] 

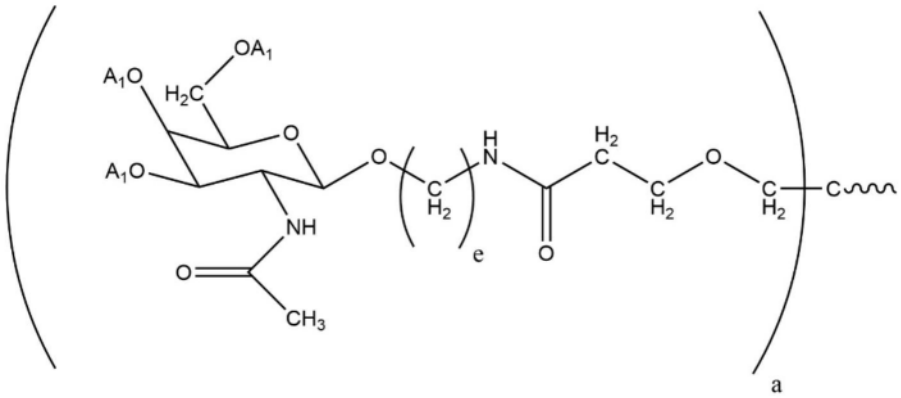
式(VIb)

[0764] 其中：

[0765] A_I为氢,或合适的羟基保护基；

[0766] a为2或3的整数;并且

[0767] c和d独立地为1至6的整数;或

[0768] 

式(VIc)

[0769] 其中：

[0770] A_I是氢,或合适的羟基保护基;

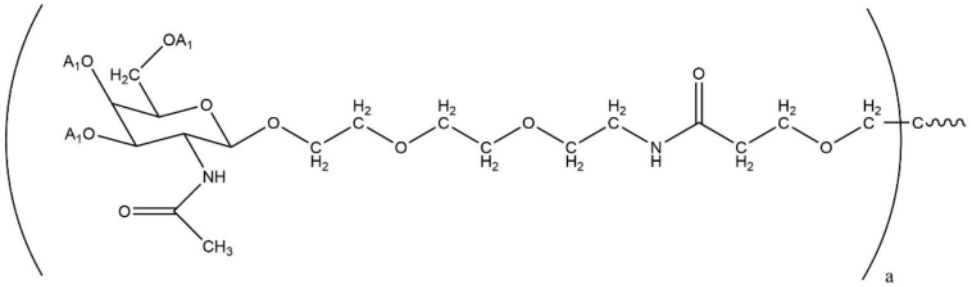
[0771] a是2或3的整数;并且

[0772] e是2至10的整数。

[0773] 50.根据项46至48的化合物,其中项1中式(I)所示的所述部分:

[0774] 

[0775] 为式(VII):

[0776] 

式(VII)

[0777] 其中:

[0778] A_I是氢;

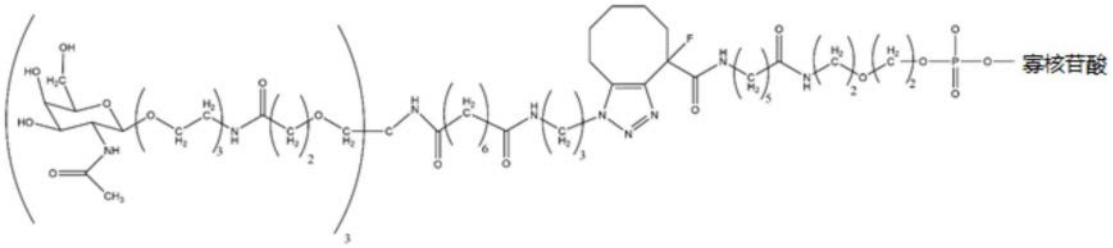
[0779] a是2或3的整数。

[0780] 51.根据项49或50的化合物,其中a=2。

[0781] 52.根据项49或50的化合物,其中a=3。

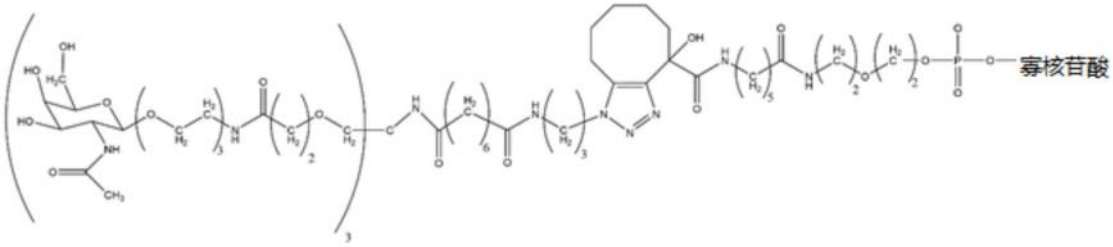
[0782] 53.根据项49的化合物,其中b=3。

[0783] 54.一种式(VIII)的化合物:

[0784] 

式(VIII)

[0785] 55.一种式(IX)的化合物:

[0786] 

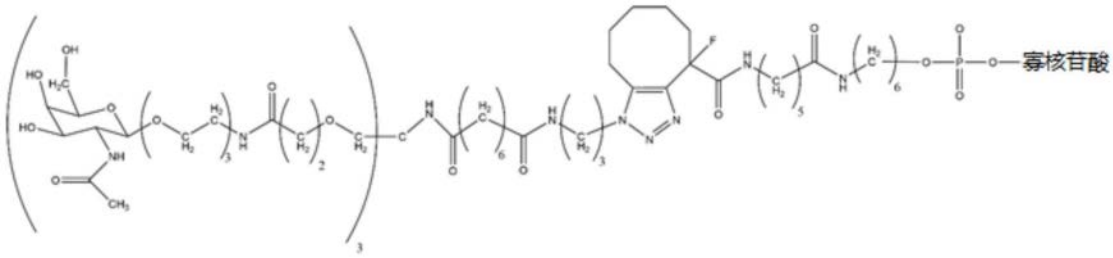
式(IX)

[0787] 56.根据项54或55的化合物,其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的5'端连接至相邻的磷酸基上。

[0788] 57.一种组合物,包含如项54中所定义的式(VIII)的化合物,和如项55中所定义的式(IX)的化合物,任选地从属于项56。

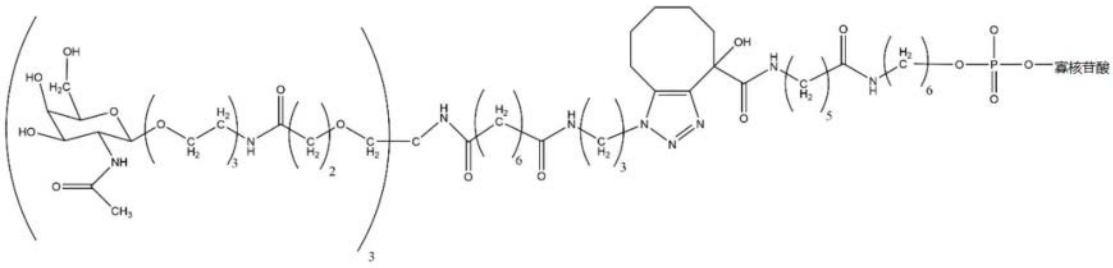
[0789] 58.根据项57的组合物,其中项55中所定义的式(IX)的所述化合物的含量为所述组合物重量的10至15%。

[0790] 59.一种式(X)的化合物:

[0791] 

式(X)

[0792] 60.一种式(XI)的化合物:

[0793] 

式(XI)

[0794] 61.根据项59或60的化合物,其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的3'端连接至相邻的磷酸基上。

[0795] 62.一种组合物,包含如项59中所定义的式(X)的化合物,和如项60中所定义的式(XI)的化合物,任选地从属于项61。

[0796] 63.根据项62的组合物,其中项60中定义的式(XI)的所述化合物的含量为所述组合物重量的10至15%。

[0797] 64.如项54至63中任一项所定义的化合物,其中寡核苷包含RNA双链体,所述RNA双链体还包含在2'位置修饰的一个或多个核糖,优选在2'位置修饰的多个核糖。

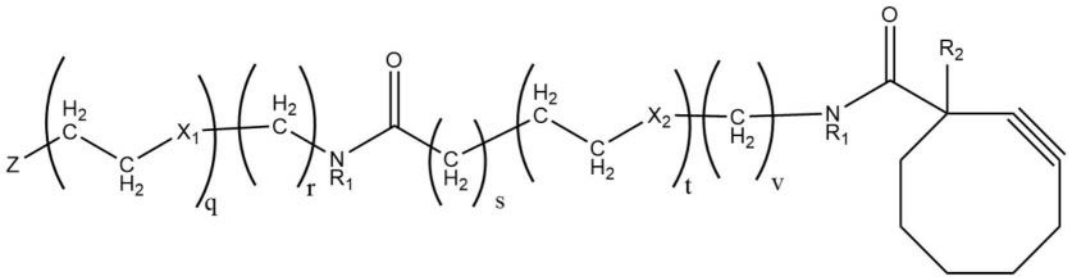
[0798] 65.根据项64的化合物,其中修饰选自2'-O-甲基、2'-脱氧-氟和2'-脱氧。

[0799] 66.根据项54至65中任一项的化合物,其中寡核苷还在一个或多个端处包含一个或多个降解保护部分。

[0800] 67.根据项66的化合物,其中所述一个或多个降解保护部分不在携带配体部分的

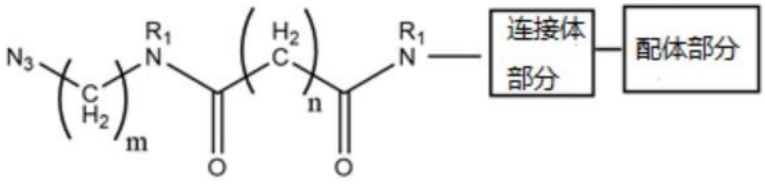
寡核苷链的端处,和/或其中所述一个或多个降解保护部分选自硫代磷酸酯核苷间键、二硫代磷酸酯核苷间键和反向无碱基核苷,其中所述反向无碱基核苷在携带配体部分的链的远端,如项54、55、59或60中任一个式(VIII)、(IX)、(X)或(XI)所示。

[0801] 68.制备项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化合物和/或项30、31、35、36、57、58、62、63中任一项的组合物的方法,其包括使式(XII)和(XIII)的化合物反应:



[0802]

式(XII)



式(XIII)

[0803] 本文中:

[0804] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基;

[0805] R_2选自氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基;

[0806] X_1和X_2在每次出现时独立地选自亚甲基、氧和硫;

[0807] m为1至6的整数;

[0808] n为1至10的整数;

[0809] q、r、s、t、v独立地为0至4的整数,前提是:

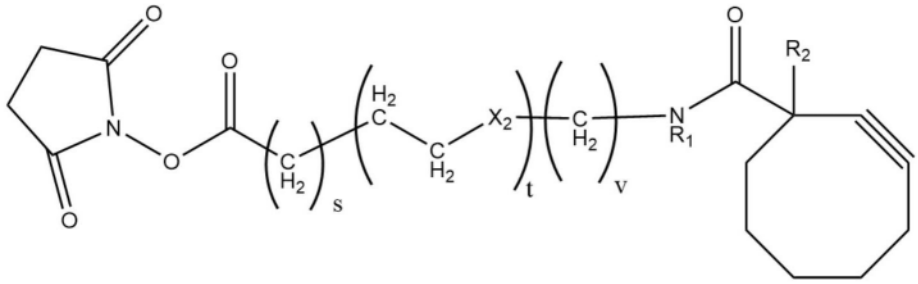
[0810] (i)q和r不能同时为0;并且

[0811] (ii)s、t和v不能同时为0;

[0812] Z是寡核苷部分;

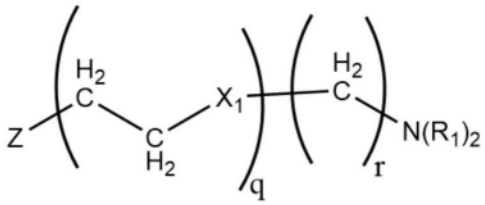
[0813] 并且在适当的情况下,进行配体的脱保护和/或寡核苷部分的第二链的退火。

[0814] 69.根据项68的方法,其中通过使式(XIV)和(XV)的化合物反应来制备式(XII)的化合物:



式(XIV)

[0815]



式(XV)

[0816] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基；

[0817] R_2选自氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基；

[0818] X_1和X_2在每次出现时独立地选自亚甲基、氧和硫；

[0819] q、r、s、t、v独立地为0至4的整数，前提是：

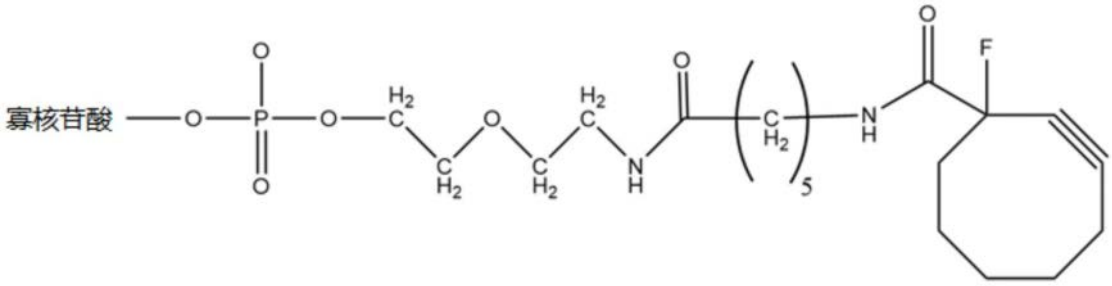
[0820] (i)q和r不能同时为0；并且

[0821] (ii)s、t和v不能同时为0；

[0822] Z是寡核苷部分。

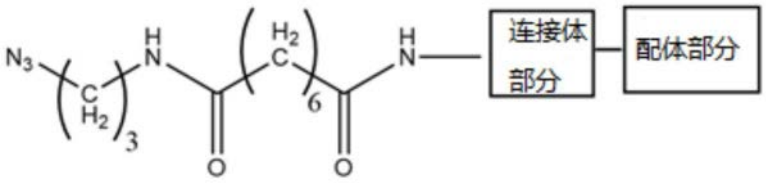
[0823] 70.根据项68的方法，用于制备项20、25、27、29、54、56中任一项的化合物，和/或项30、31、57、58中任一项的组合物，其中：

[0824] 式(XII)的化合物为式(XIIa)：

[0825] 

式(XIIa)

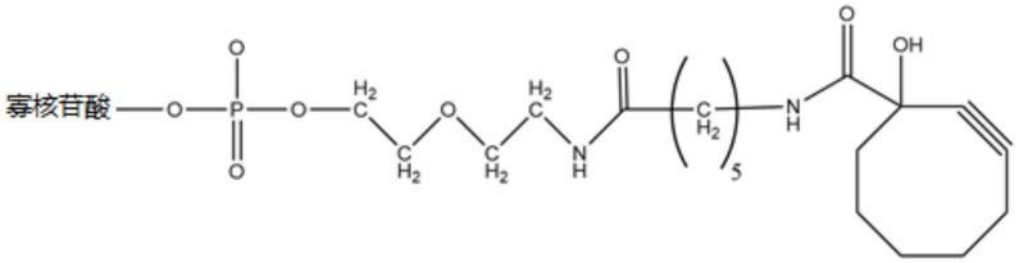
[0826] 式(XIII)的化合物为式(XIIIa)：

[0827] 

式(XIIIa)

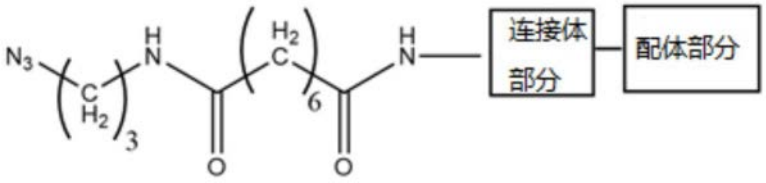
[0828] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的5'端连接至相邻的磷酸基上。

[0829] 71.根据项68的方法,用于制备项20、25、28、29、55、56中任一项的化合物,和/或项30、31、57、58中任一项的组合物,其中:式(XII)的化合物为式(XIIb):

[0830] 

式(XIIb)

[0831] 式(XIII)的化合物为式(XIIIa):

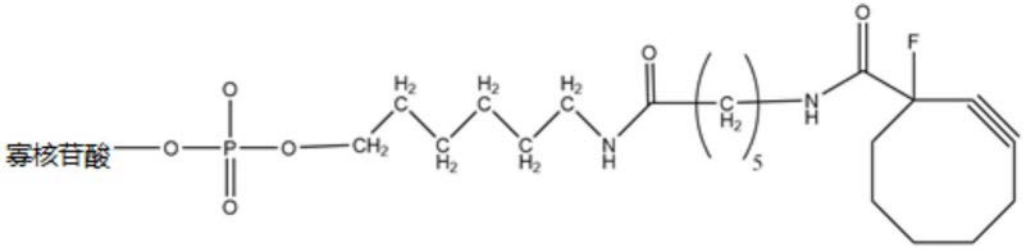
[0832] 

式(XIIIa)

[0833] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'和3'端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的5'端连接至相邻的磷酸基上。

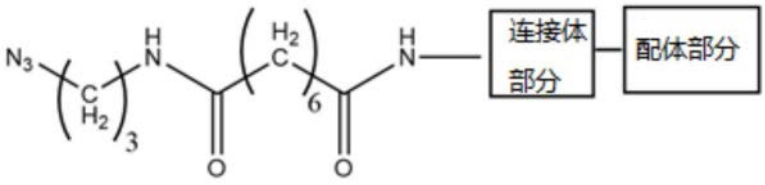
[0834] 72.根据项68的方法,用于制备项21、26、32、34、59、61中任一项的化合物,和/或项35、36、62、63中任一项的组合物,其中:

[0835] 式(XII)的化合物为式(XIIc):

[0836] 

式(XIIc)

[0837] 式(XIII)的化合物为式(XIIIa)：

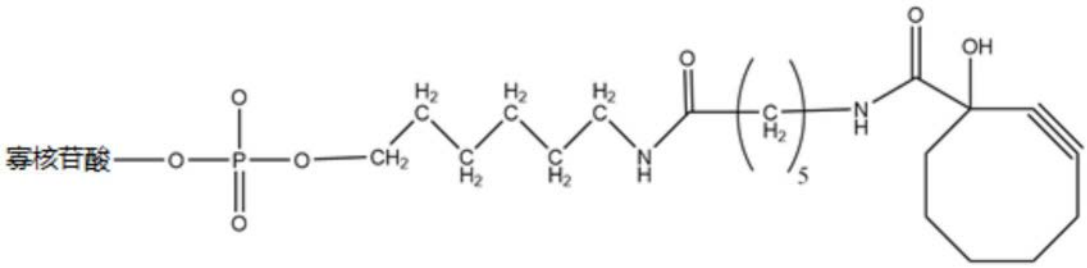
[0838] 

式(XIIIa)

[0839] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5’和3’端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的3’端连接至相邻的磷酸基上。

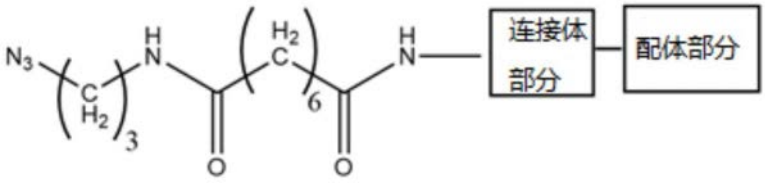
[0840] 73.根据项68的方法,用于制备项21、26、33、34、60、61中任一项的化合物,和/或项35、36、62、63中任一项的组合物,其中：

[0841] 式(XII)的化合物为式(XIId)：

[0842] 

式(XIId)

[0843] 式(XIII)的化合物为式(XIIIa)：

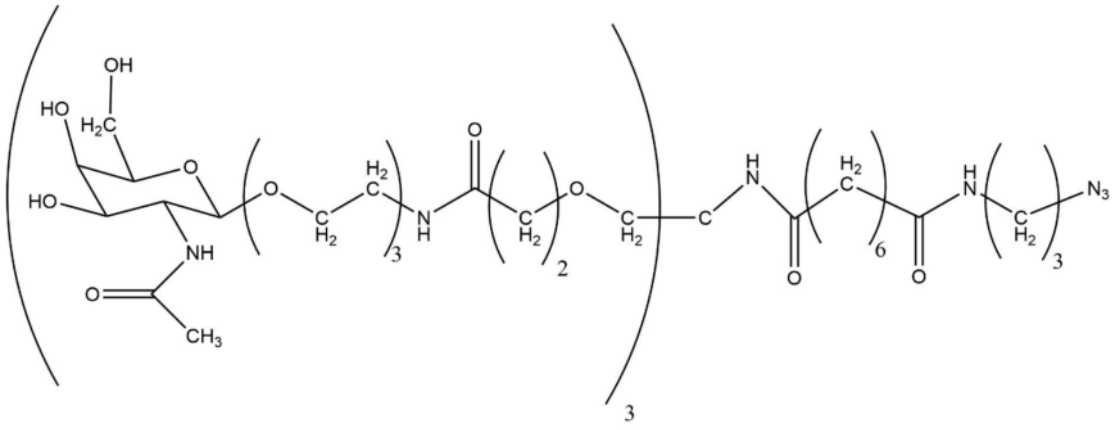
[0844] 

式(XIIIa)

[0845] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5’端和3’端,其中所述RNA双链体在其第二链的3’端连接到相邻的磷酸基上。

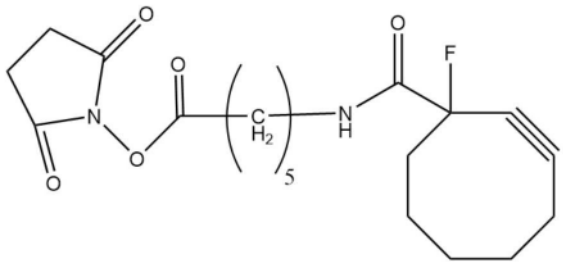
[0846] 74.根据项70至73中任意一项的方法,其中：

[0847] 式(XIIIa)的化合物是式(XIIIb)：

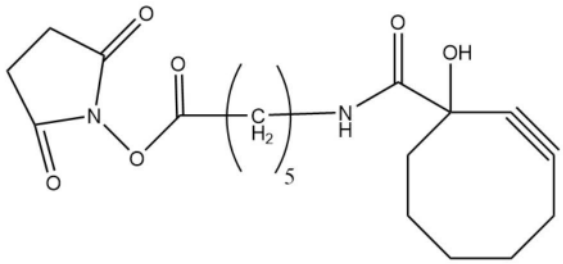
[0848] 

式(XIIIb)

[0849] 75.根据项69的方法,从属于项70至73,其中:式(XIV)的化合物为式(XIVa)或式(XIVb):

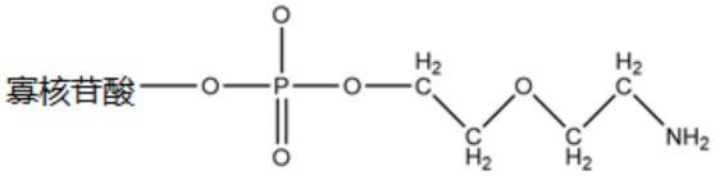


式(XIVa)

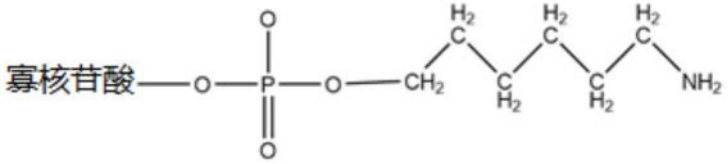
[0850] 

式(XIVb)

[0851] 并且式(XV)的化合物为式(XVa)或式(XIVb):

[0852] 

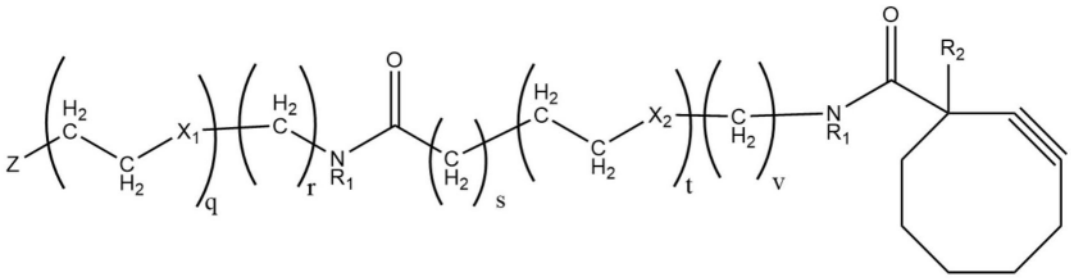
式(XVa)

[0853] 

式(XVb)

[0854] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'端和3'端,并且其中(i)所述RNA双链体在其第二链的5'端连接至式(XVa)中的相邻磷酸基,或(ii)所述RNA双链体在其第二链的3'端连接至式(XVb)中的相邻磷酸基。

[0855] 76.一种式(XII)的化合物:

[0856] 

式(XII)

[0857] 其中:

[0858] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基;

[0859] R_2选自氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基;

[0860] X_1和X_2在每次出现时独立地选自亚甲基、氧和硫;

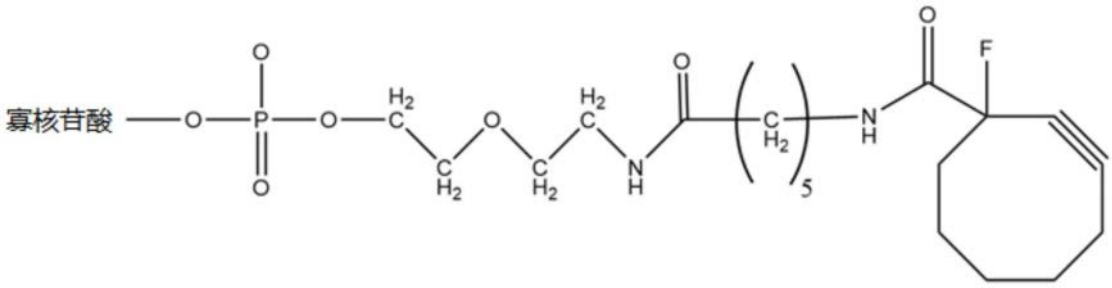
[0861] q、r、s、t、v独立地为0至4的整数,前提是:

[0862] (i)q和r不能同时为0;并且

[0863] (ii)s、t和v不能同时为0;

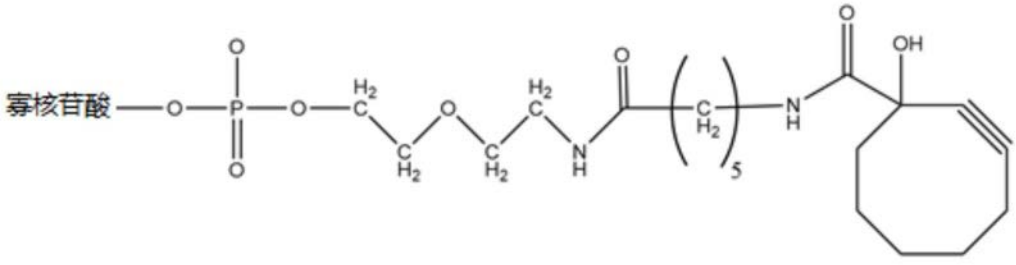
[0864] Z是寡核苷部分。

[0865] 77.一种式(XIIa)的化合物

[0866] 

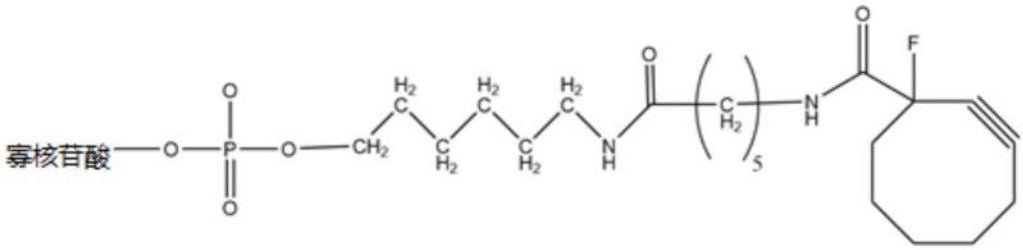
式(XIIa)

[0868] 78.一种式(XIIb)的化合物:

[0869] 

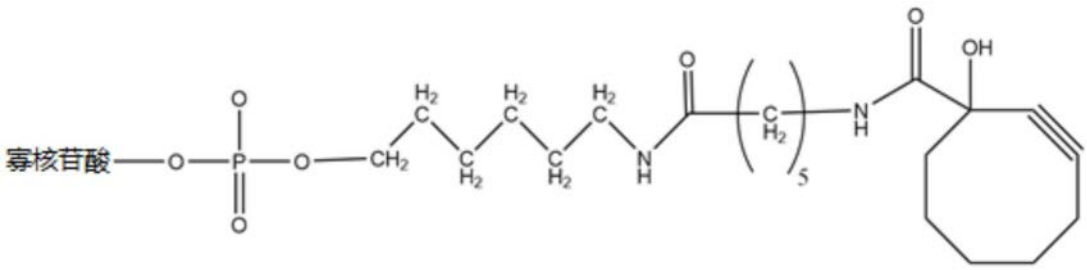
式(XIIb)

[0870] 79.一种式(XIIc)的化合物:

[0871] 

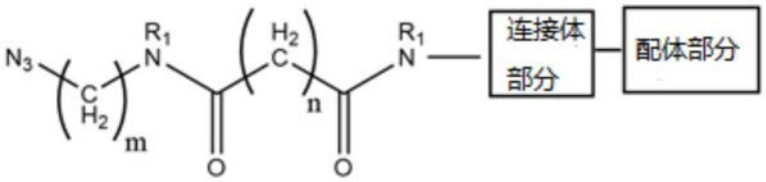
式(XIIc)

[0872] 80.一种式(XIId)的化合物：

[0873] 

式(XIId)

[0874] 81.一种式(XIII)的化合物：

[0875] 

式(XIII)

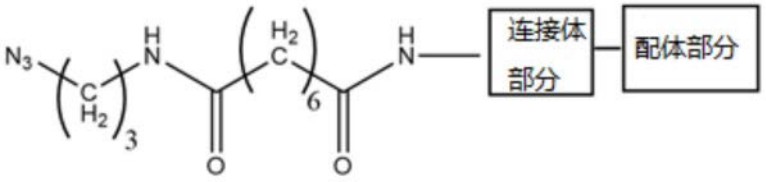
[0876] 其中：

[0877] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基；

[0878] m是1至6的整数；

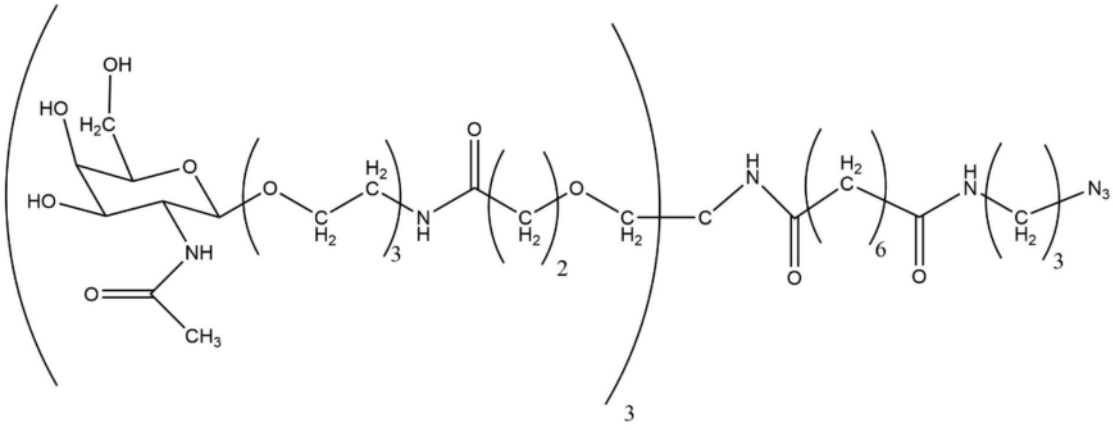
[0879] n是1至10的整数。

[0880] 82.一种式(XIIIa)的化合物：

[0881] 

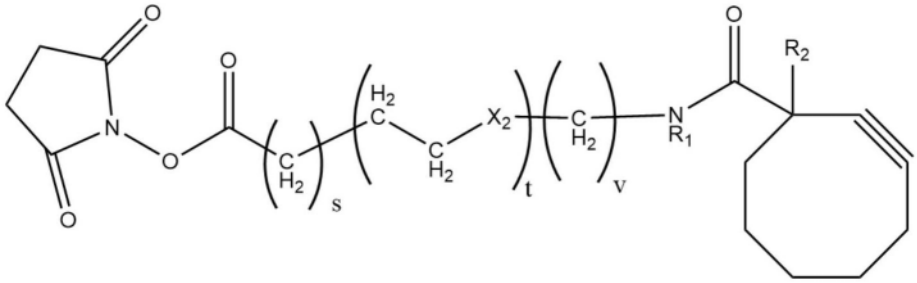
式(XIIIa)

[0882] 83.一种式(XIIIb)的化合物：

[0883] 

式(XIIIb)

[0884] 84.一种式(XIV)的化合物：

[0885] 

式(XIV)

[0886] 其中：

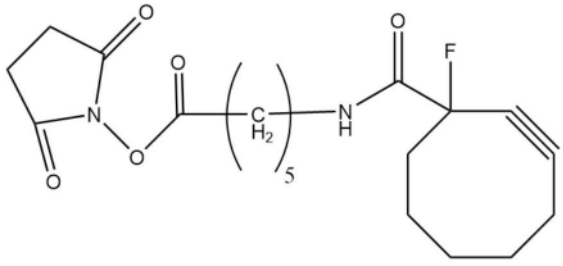
[0887] R_1选自氢、甲基和乙基；

[0888] R_2选自氢、羟基、-OC_{1-3}烷基、-C(=O)OC_{1-3}烷基、卤素和硝基；

[0889] X_2选自亚甲基、氧和硫；

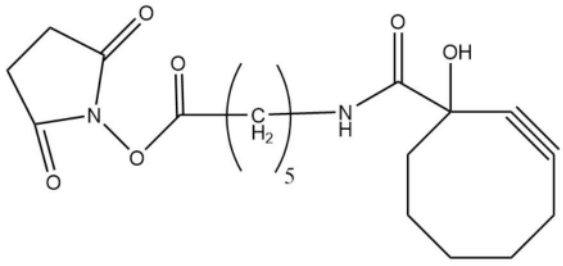
[0890] s、t、v独立地为0至4的整数，前提是s、t和v不能同时为0。

[0891] 85.一种式(XIVa)的化合物：

[0892] 

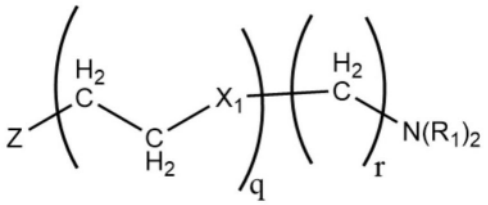
式(XIVa)

[0893] 86.一种式(XIVb)的化合物：

[0894] 

式(XIVb)

[0895] 87.一种式(XV)的化合物：

[0896] 

式(XV)

[0897] 其中：

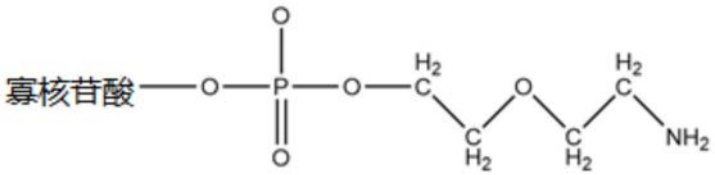
[0898] R_1在每次出现时独立地选自氢、甲基和乙基；

[0899] X_1选自亚甲基、氧和硫；

[0900] q和r独立地为0至4的整数，前提是q和r不能同时为0；

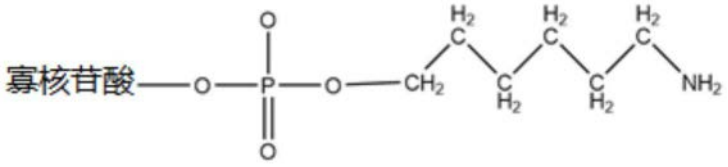
[0901] Z是寡核苷部分。

[0902] 88.一种式(XVa)的化合物

[0903] 

式(XVa)

[0904] 89.一种式(XVb)的化合物：

[0905] 

式(XVb)

[0906] 90.项76、81至84、87中任一项的化合物在制备项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化合物和/或项30、31、35、36、57、58、62和63中任一项的组合物中的用途。

[0907] 91.项85的化合物在制备项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化合物，和/或项30、31、35、36、57、58、62和63中任一项的组合物中的用途，其中R_2＝F。

[0908] 92.项86的化合物在制备项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化

合物,和/或项30、31、35、36、57、58、62和63中任一项的组合物中的用途,其中R_2=OH。

[0909] 93.项77的化合物在制备项20、25、27、29、54、56中任一项的化合物和/或项30、31、57、58中任一项的组合物中的用途。

[0910] 94.项78的化合物在制备项20、25、28、29、55、56中任一项的化合物和/或项30、31、57、58中任意一项的组合物中的用途。

[0911] 95.项79的化合物在制备项21、26、32、34、59、61中任一项的化合物和/或项35、36、62、63中任一项的组合物中的用途。

[0912] 96.项80的化合物在制备项21、26、33、34、60、61中任一项的化合物和/或项35、36、62、63中任一项的组合物中的用途。

[0913] 97.项88的化合物在制备项20、25、27至29、54至56中任一项的化合物和/或项30、31、57、58中任一项的组合物中的用途。

[0914] 98.项89的化合物在制备项21、26、32至34、59至61中任一项的化合物和/或项35、36、62、63中任一项的组合物中的用途。

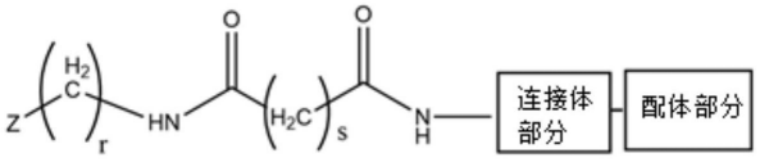
[0915] 99.一种化合物或组合物,其通过项68至75中任一项的方法获得或可获得。

[0916] 100.一种药物组合物,其包含项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化合物,和/或项30、31、35、36、57、58、62和63中任一项的组合物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0917] 101.根据项1至29、32至34、37至56、59至61和64至67中任一项的化合物,和/或项30、31、35、36、57、58、62和63中任一项的组合物,用于治疗中的用途。

[0918] 在另一方面,本申请可以应用于以下款编号1-56的化合物、方法、组合物或用途,其中,对款中的任何式的引用仅指在款1-56内定义的那些式。这些式在图6中重现。具体地,下述任意一款中的Z表示的寡核苷部分可以包含下文任意一项权利要求所定义的用于抑制ZPI表达的核酸。

[0919] 1.一种化合物,其包含以下结构:

[0920] 

式(I)

[0921] 其中:r和s独立地为选自1至16的整数;并且

[0922] Z是寡核苷部分。

[0923] 2.根据款1的化合物,其中s是选自4至12的整数。

[0924] 3.根据款2的化合物,其中s是6。

[0925] 4.根据款1至3中任一款的化合物,其中r是选自4至14的整数。

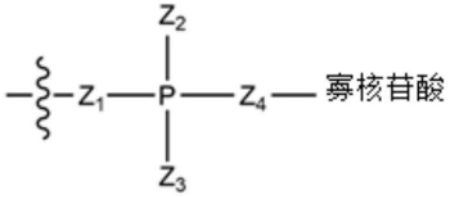
[0926] 5.根据款4的化合物,其中r是6。

[0927] 6.根据款4的化合物,其中r是12。

[0928] 7.根据款5的化合物,其从属于款3。

[0929] 8.根据款6的化合物,其从属于款3。

[0930] 9.根据款1至8中任一款的化合物,其中Z为:

[0931] 

[0932] 其中:

[0933] Z_1、Z_2、Z_3、Z_4在每次出现时独立地为氧或硫;并且

[0934] P和Z_2之间以及P和Z_3之间的键之一是单键,而另一个键是双键。

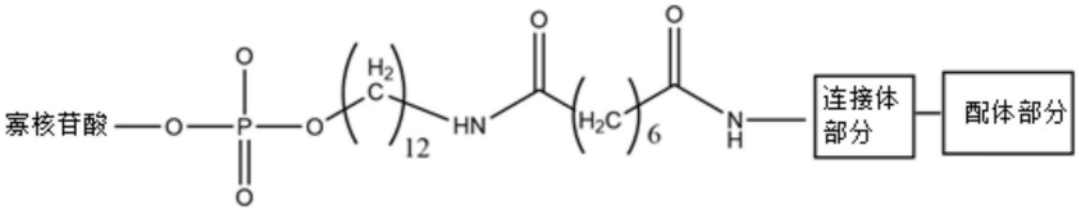
[0935] 10.根据款1至9中任一款的化合物,其中所述寡核苷是能够调节、优选抑制靶基因表达的RNA化合物。

[0936] 11.根据款10的化合物,其中所述RNA化合物包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5'端和3'端。

[0937] 12.根据款11的化合物,优选地还从属于款3和6,其中RNA化合物在其第二链的5'端连接到相邻的磷酸基上。

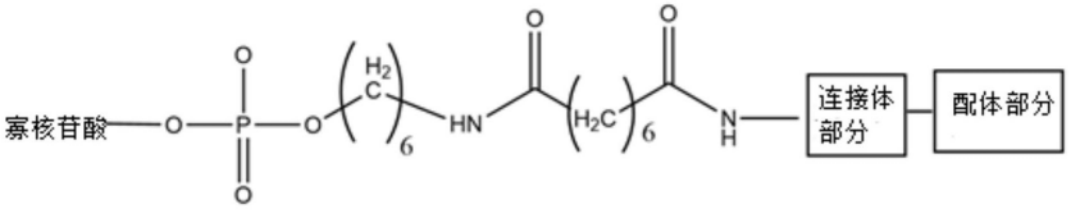
[0938] 13.根据款11的化合物,优选地还从属于款3和5,其中RNA化合物在其第二链的3'端连接到相邻的磷酸基上。

[0939] 14.一种式(II)的化合物,优选从属于款12:

[0940] 

式(II)

[0941] 15.一种式(III)的化合物,优选从属于款13:

[0942] 

式(III)

[0943] 16.如款1至15中任一款所定义的化合物,其中寡核苷包含RNA双链体,所述RNA双链体还包含在2'位置修饰的一个或多个核糖,优选在2'位置修饰的多个核糖。

[0944] 17.根据款16的化合物,其中修饰选自2'-O-甲基、2'-脱氧-氟和2'-脱氧。

[0945] 18.根据款1至17中任一款的化合物,其中寡核苷在一个或多个端处还包含一个或多个降解保护部分。

[0946] 19.根据款18的化合物,其中所述一个或多个降解保护部分不在携带连接体/配体部分的寡核苷链的端处,和/或其中所述一个或多个降解保护部分选自硫代磷酸酯间核苷

键、二硫代磷酸酯间核苷键和反向无碱基核苷,其中所述反向无碱基核苷在与携带连接体/配体部分的端相同的链的远端。

[0947] 20.根据款1至19中任一款的化合物,其中款1中的式(I)所示的所述配体部分包含一个或多个配体。

[0948] 21.根据款20的化合物,其中款1中的式(I)所示的所述配体部分包含一个或多个碳水化合物配体。

[0949] 22.根据款21的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物可以是单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖。

[0950] 23.根据款22的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物包括一个或多个半乳糖部分、一个或多个乳糖部分、一个或多个N-乙酰半乳糖胺部分和/或一个或多个甘露糖部分。

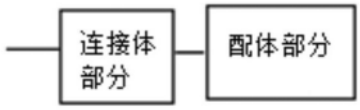
[0951] 24.根据款23的化合物,其中所述一个或多个碳水化合物包含一个或多个N-乙酰半乳糖胺部分。

[0952] 25.根据款24的化合物,其包含两个或三个N-乙酰半乳糖胺部分。

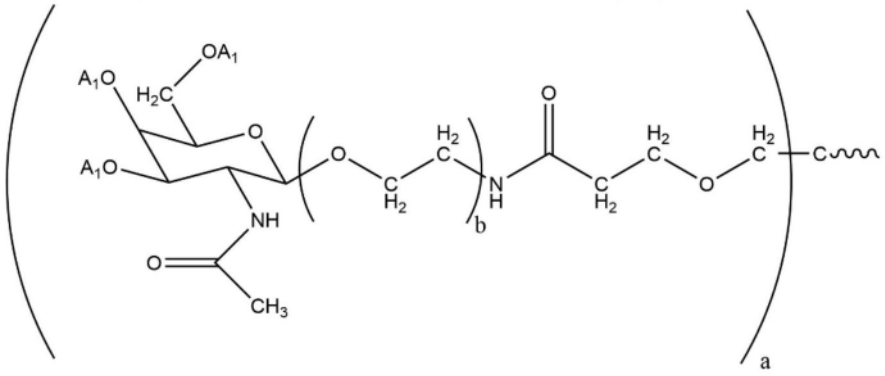
[0953] 26.根据前述任一款的化合物,其中所述一个或多个配体以线性构型或分支构型连接。

[0954] 27.根据款26的化合物,其中所述一个或多个配体以双触角或三触角分支构型连接。

[0955] 28.根据款20至27的化合物,其中款1中式(I)所示的所述部分:

[0956] 

[0957] 为式(IV)、(V)或(VI)中的任意一个,优选为式(IV):

[0958] 

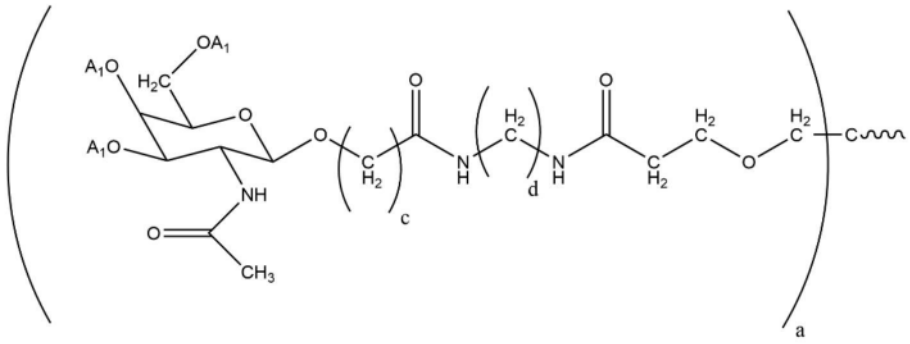
式(IV)

[0959] 其中:

[0960] A_I为氢,或合适的羟基保护基;

[0961] a为2或3的整数;

[0962] b为2至5的整数;或

[0963] 

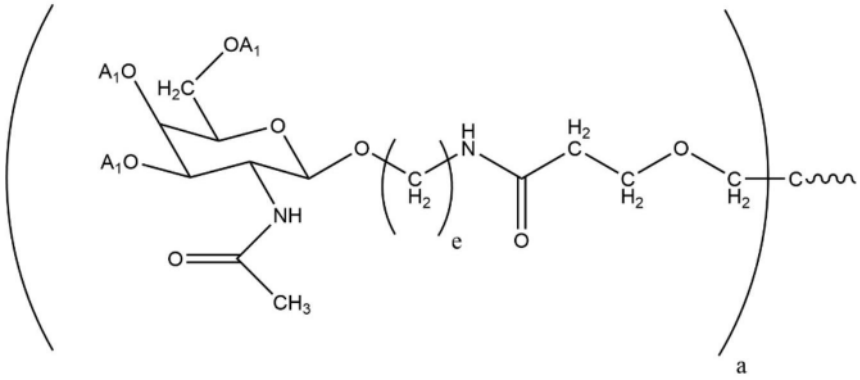
式(V)

[0964] 其中：

[0965] A_I是氢，或合适的羟基保护基；

[0966] a为2或3的整数；并且

[0967] c和d独立地为1至6的整数；或

[0968] 

式(VI)

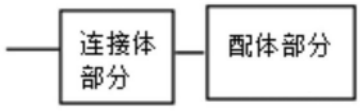
[0969] 其中：

[0970] A_I是氢，或合适的羟基保护基；

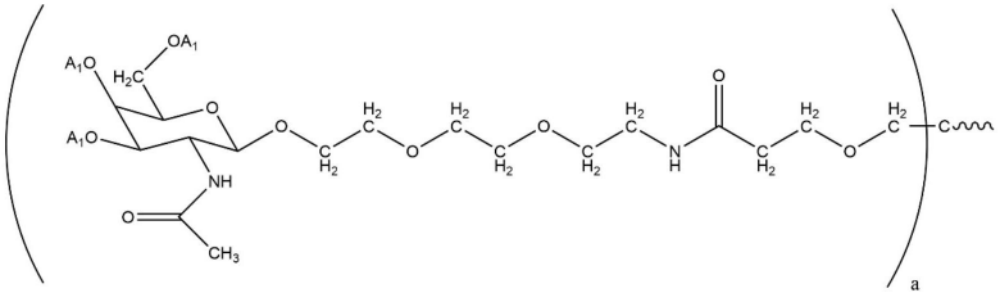
[0971] a是2或3的整数；并且

[0972] e是2至10的整数。

[0973] 29.根据款1至28中任一款的化合物，其中款1中式(I)所示的所述部分：

[0974] 

[0975] 为式(VII)：

[0976] 

[0977] 式(VII)

[0978] 其中：

[0979] A_I是氢；

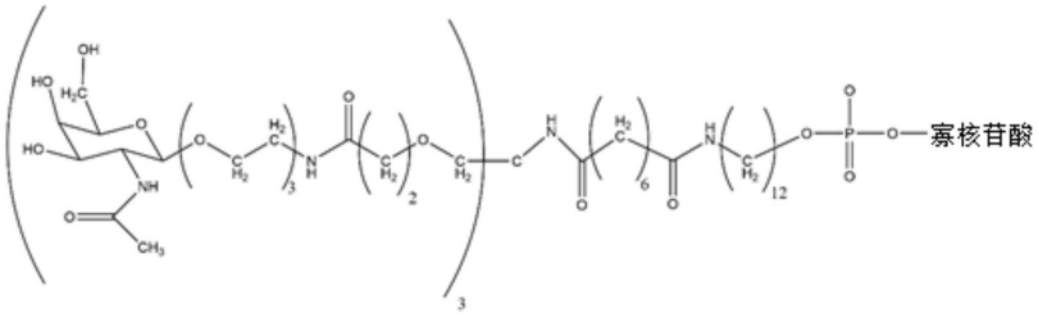
[0980] a是2或3的整数。

[0981] 30.根据款28或29的化合物，其中a＝2。

[0982] 31.根据款28或29的化合物，其中a＝3。

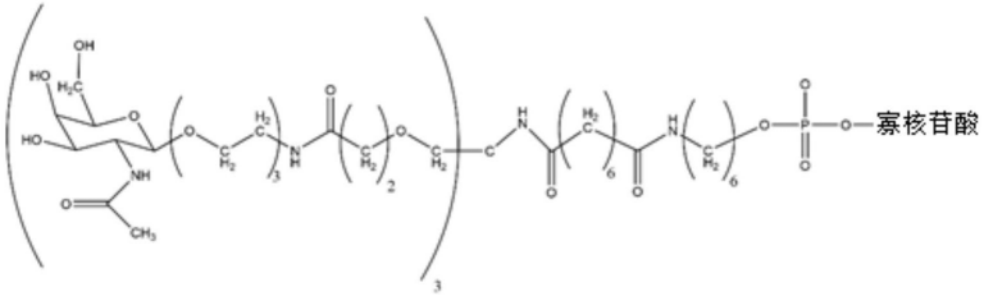
[0983] 32.根据款28的化合物，其中b＝3。

[0984] 33.一种式(VIII)的化合物

[0985] 

式(VIII)

[0986] 34.一种式(IX)的化合物：

[0987] 

式(IX)

[0988] 35.根据款33或34的化合物，其中寡核苷包含RNA双链体，所述RNA双链体还包含在2’位置修饰的一个或多个核糖，优选在2’位置修饰的多个核糖。

[0989] 36.根据款35的化合物，其中修饰选自2’-O-甲基、2’-脱氧-氟和2’-脱氧。

[0990] 37.根据款33至36中任一款的化合物，其中寡核苷在一个或多个端处还包含一个或多个降解保护部分。

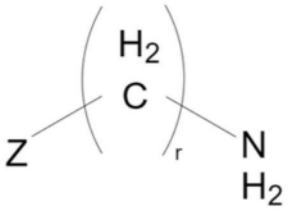
[0991] 38.根据款37的化合物，其中所述一个或多个降解保护部分不在携带连接体/配体部分的寡核苷链的端处，和/或其中所述一个或多个降解保护部分选自硫代磷酸酯核苷间键、二硫代磷酸酯核苷间键和反向无碱基核苷，其中所述反向无碱基核苷在与携带连接体/配体部分的端相同的链的远端。

[0992] 39.根据款33的化合物，其中所述寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体，其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补，并且第二链与所述第一链至少部分互补，并且其中第一链和第二链各自具有5’端和3’端，并且其中所述RNA双链体在其第二链的5’端连接至相邻的磷酸基上。

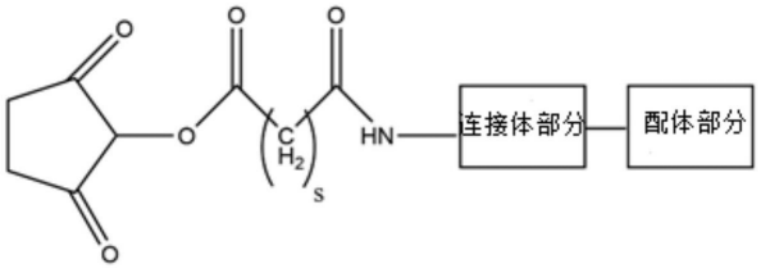
[0993] 40.根据款34的化合物，其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体，其中

第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5’端和3’端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的3’端连接至相邻的磷酸基上。

[0994] 41.制备款1至40中任一款的化合物的方法,其包括使式(X)和(XI)的化合物反应:



式(X)

[0995] 

式(XI)

[0996] 其中:

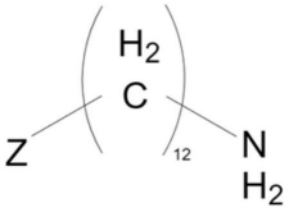
[0997] r和s独立地是选自1至16的整数;并且

[0998] Z是寡核苷部分;并且

[0999] 在适当的情况下,进行配体的脱保护和/或寡核苷的第二链的退火。

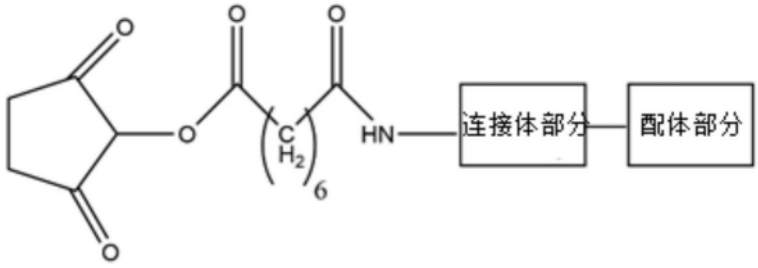
[1000] 42.根据款41的方法以制备款6、8至14、16至33和35至40中任一款的化合物,其中:

[1001] 式(X)的化合物为式(Xa):

[1002] 

[1003] 式(Xa)

[1004] 式(XI)的化合物为式(XIa):

[1005] 

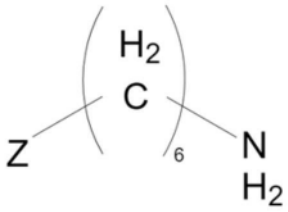
式(XIa)

[1006] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序

列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5’和3’端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的5’端连接至相邻的磷酸基上。

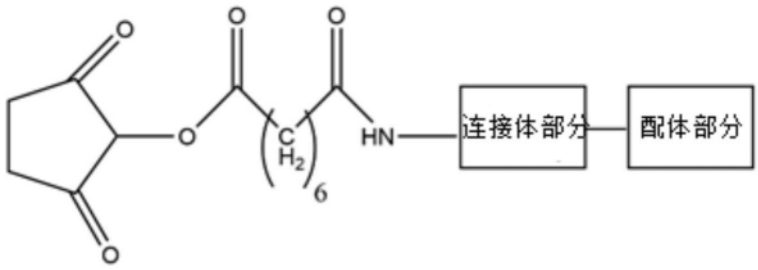
[1007] 43.根据款41的方法以制备款5、7、9至13、15至32和34至40中任一款的化合物,其中:

[1008] 式(X)的化合物为式(Xb):

[1009] 

式(Xb)

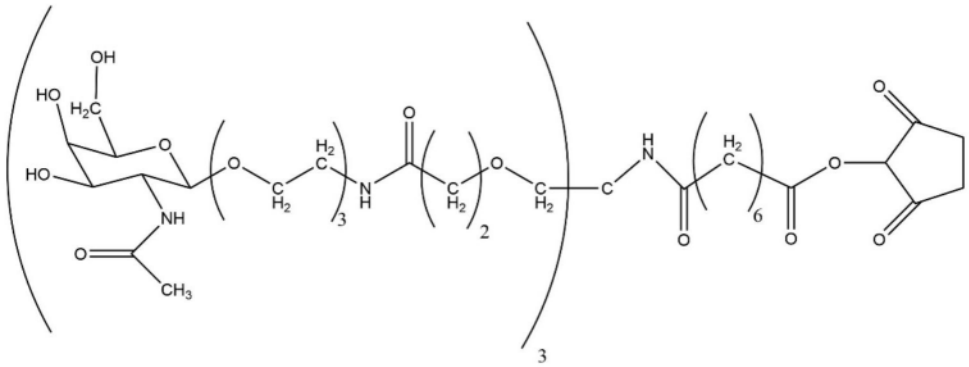
[1010] 式(XI)的化合物为式(XIa):

[1011] 

式(XIa)

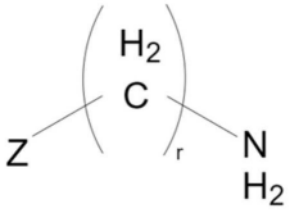
[1012] 其中寡核苷包含含有第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链与靶基因的RNA序列至少部分互补,并且第二链与所述第一链至少部分互补,并且其中第一链和第二链各自具有5’和3’端,并且其中所述RNA双链体在其第二链的3’端连接至相邻的磷酸基上。

[1013] 44.根据款42或43的方法,其中:式(XIa)的化合物为式(XIb):

[1014] 

式(XIb)

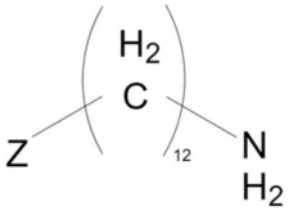
[1015] 45.一种式(X)的化合物:

[1016] 

式(X)

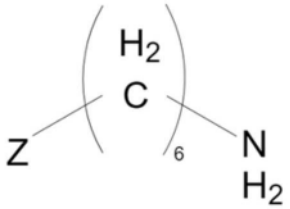
[1017] 其中:r独立地为选自1至16的整数;并且Z是寡核苷部分。

[1018] 46.一种式(Xa)的化合物:

[1019] 

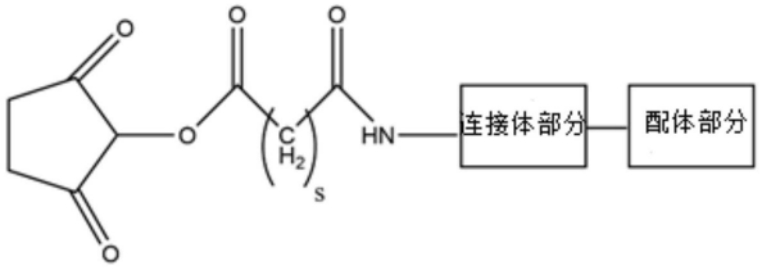
式(Xa)

[1020] 47.一种式(Xb)的化合物:

[1021] 

式(Xb)

[1022] 48.一种式(XI)的化合物:

[1023] 

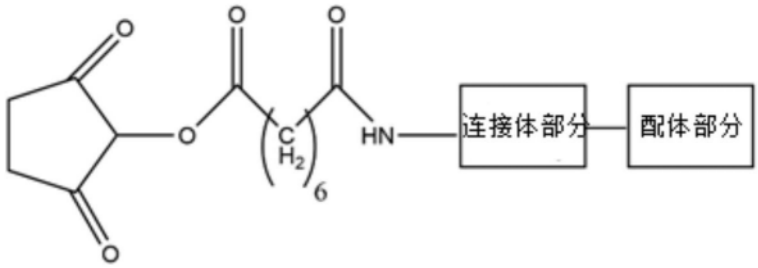
[1024] 式(XI)

[1025] 其中:

[1026] s独立地为选自1至16的整数;并且

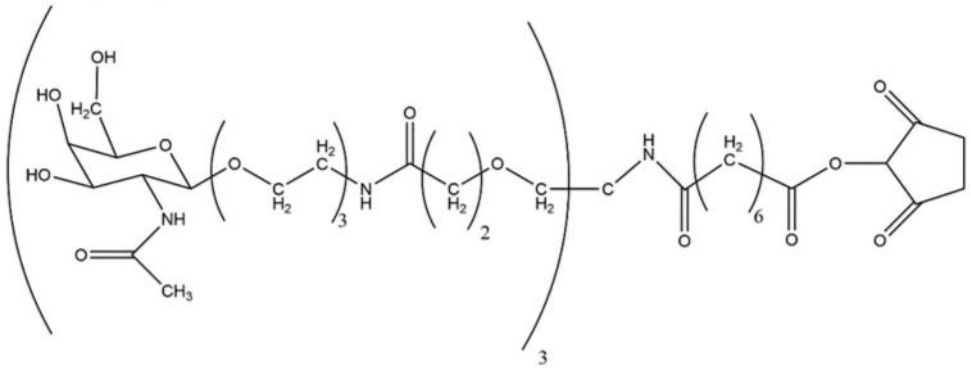
[1027] Z是寡核苷部分。

[1028] 49.一种式(XIa)的化合物:

[1029] 

式(XIa)

[1030] 50.一种式(XIb)的化合物：

[1031] 

式(XIb)

[1032] 51.款45和48至50中任一款的化合物在制备款1至40中任一款的化合物中的用途。

[1033] 52.款46的化合物在制备款6、8至14、16至33和35至40中任一款的化合物中的用途。

[1034] 53.款47的化合物在制备款5、7、9至13、15至32和34至40中任一款的化合物中的用途。

[1035] 54.一种化合物或组合物,其通过款41至44中任一款的方法获得或可获得。

[1036] 55.一种药物组合物,其包含款1至40中任一款的化合物以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[1037] 56.根据款1至40中任一款的化合物,用于治疗。

实施例

[1038] 参考下列实施例将更全面地理解本申请。然而,它们不应被解释为限制本申请的范围。应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明目的,本领域技术人员可以据此做出各种修改或改变,并且这些修改或改变均应包含在本申请的精神和范围以及附加条款的范围内。

[1039] 实施例1:系链1的合成

[1040] 一般实验条件:

[1041] 薄层色谱法(TLC)在涂有二氧化硅的铝板上进行,使用Macherey-Nagel的254nm荧光指示剂。在紫外光(254nm)下,或根据Stahl(来自Sigma-Aldrich),用在甲醇(MeOH)中的5%H_2SO_4或茚三酮试剂喷洒,然后加热,对化合物进行可视化。快速色谱法采用配备有双变量紫外波长检测器(200-400nm)的Biotage Isolera One快速色谱法仪器使用Biotage

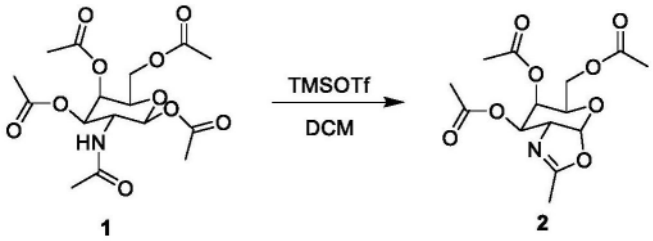
Sfar Silica 10、25、50或100g柱(瑞典乌普萨拉)进行。

[1042] 所有湿敏反应均在无水条件下使用干燥玻璃器皿、无水溶剂和氩气气氛进行。所有市售试剂均从Sigma-Aldrich购买,溶剂从Carl Roth GmbH+Co.KG购买。D-半乳糖胺五乙酸酯从AK scientific购买。

[1043] HPLC/ESI-MS在Dionex UltiMate 3000RS UHPLC系统和Thermo Scientific MSQ Plus质谱仪上使用Waters的Acquity UPLC Protein BEH C4柱(300A,1.7pm,2.1x 100mm)进行,温度为60℃。溶剂系统由具有含有0.1%甲酸的水的溶剂A和具有含有0.1%甲酸的乙腈(ACN)的溶剂B组成。采用0.4mL/min的流速,15分钟内B的梯度从5%增加到100%。检测器和条件:Corona超荷电气溶胶检测器(来自esa)。雾化器温度:25℃。N_2压力:35.1psi。过滤器:Corona。

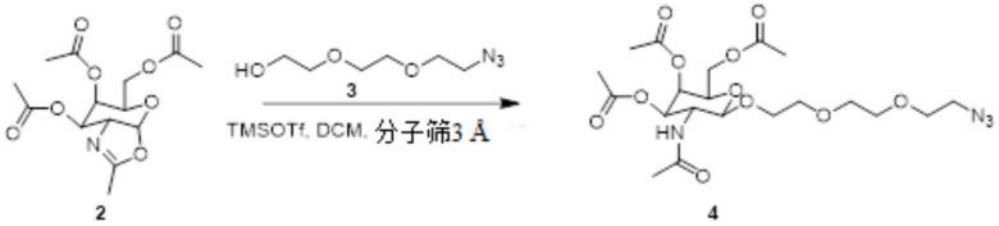
[1044] ^1H和^{13}C NMR光谱在室温下在VaR1an光谱仪上以500MHz(^1H NMR)和125MHz(^{13}C NMR)记录。化学位移以ppm为单位,参考溶剂残留峰($CDCl_3$-^1H NMR:δ在7.26ppm处和^{13}C NMR:δ在77.2ppm处;DMSO-d_6-1H NMR:δ在2.50ppm处和^{13}C NMR:δ在39.5ppm处)。耦合常数以赫兹为单位。信号分裂模式描述为单峰(s)、双峰(d)、三峰(t)或多重峰(m)。

[1045] 缀合结构单元三GalNAc_系链1的合成路线:

[1046] 

1 2

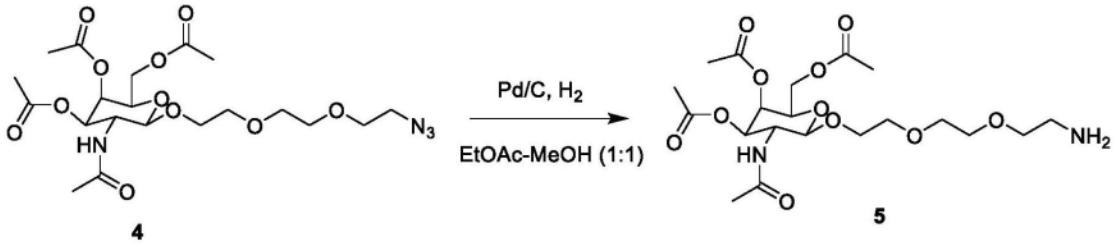
[1047] 化合物2的制备:在氩气下,将D-半乳糖胺五乙酸酯(3.00g,7.71mmol,1.0eq.)溶解于无水二氯甲烷(DCM)(30mL)中,并加入三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf,4.28g,19.27mmol,2.5eq.)。将反应在室温下搅拌3小时。将反应混合物用DCM(50mL)稀释并用冷饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)和水(100mL)洗涤。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并浓缩,得到黄色油状的标题化合物,其经快速色谱法纯化(梯度洗脱:在DCM中0-10%MeOH,10CV)。获得无色油状产物(2.5g,98%,rf=0.45(在DCM中2%MeOH))。

[1048] 

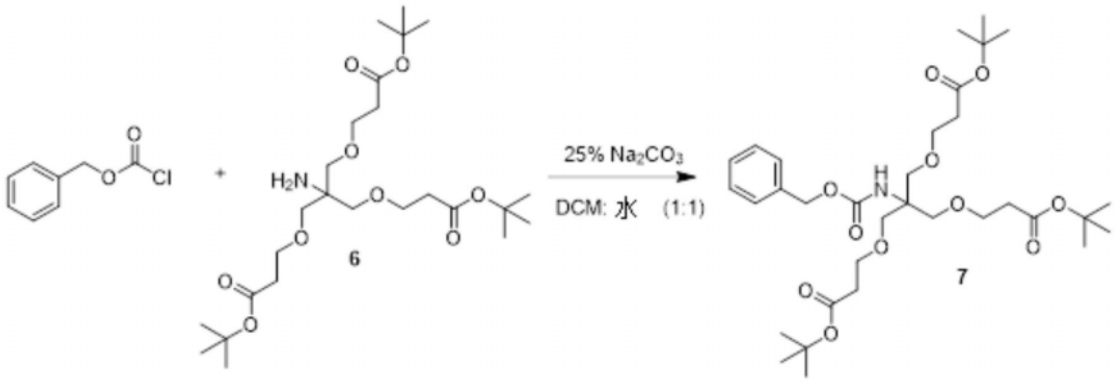
2 4

[1049] 化合物4的制备:在氩气下将化合物2(2.30g,6.98mmol,1.0eq.)和叠氮基-PEG3-OH(1.83g,10.5mmol,1.5eq.)溶解于无水DCM(40mL)中,并将分子筛3 Å(5g)加入到溶液中。将混合物在室温下搅拌1小时。然后将TMSOTf(0.77g,3.49mmol,0.5eq.)添加到混合物中并将反应搅拌过夜。将分子筛过滤,将滤液用DCM(100mL)稀释并用冷饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)和水(100mL)洗涤。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并减压除去溶剂。将粗物质通过快速色谱法纯化(梯度洗脱:在DCM中0-3%MeOH,10CV),得到标题化合物,为浅黄色油状物(3.10g,88%,rf=0.25(在DCM中2%MeOH))。MS:$C_{20}H_{32}N_4O_{11}$的计算值为504.21。测定值

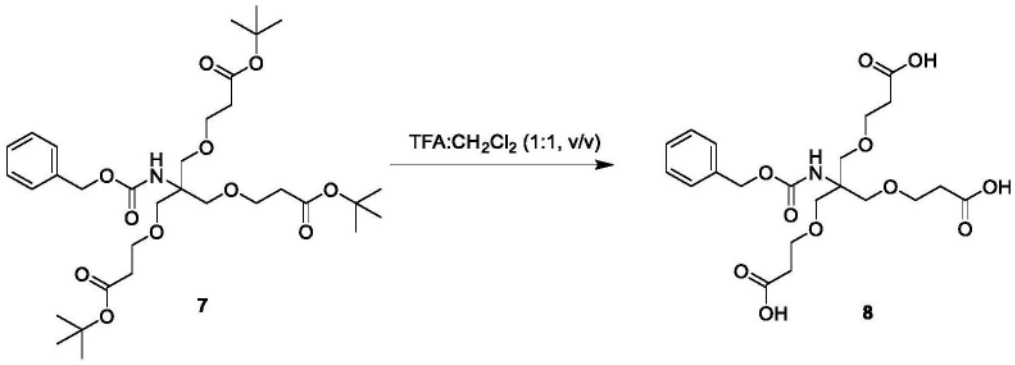
(Found)为505.4。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ6.21-6.14(m,1H),5.30(dd,J=3.4,1.1Hz,1H),5.04(dd,J=11.2,3.4Hz,1H),4.76(d,J=8.6Hz,1H),4.23-4.08(m,3H),3.91-3.80(m,3H),3.74-3.59(m,9H),3.49-3.41(m,2H),2.14(s,3H),2.02(s,3H),1.97(d,J=4.2Hz,6H).^{13}C NMR(125MHz,$CDCl_3$)δ170.6(C),170.5(C),170.4(C),170.3(C),102.1(CH),71.6(CH),70.8(CH),70.6(CH),70.5(CH),70.3(CH_2),69.7(CH_2),68.5(CH_2),66.6(CH_2),61.5(CH_2),23.1(CH_3),20.7(3xCH_3)。

[1050] 

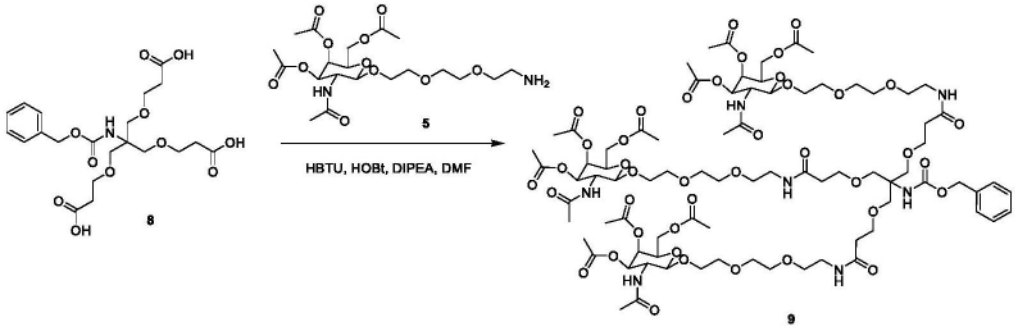
[1051] 化合物5的制备:将化合物4(1.00g,1.98mmol,1.0eq.)溶解在乙酸乙酯(EtOAc)和MeOH的混合物(30mL 1:1v/v)中,并添加Pd/C(100mg)。将反应混合物采用真空/氩气循环(3x)脱气,并在气球压力下氢化过夜。将反应混合物通过硅藻土过滤并用EtOAc(30mL)洗涤。减压除去溶剂,得到标题化合物,为无色油状物(0.95g,定量产率,rf=0.25(在DCM中10%MeOH))。该化合物无需进一步纯化即可使用。MS:$C_{20}H_{34}N_2O_{11}$的计算值为478.2。测定值为479.4。

[1052] 

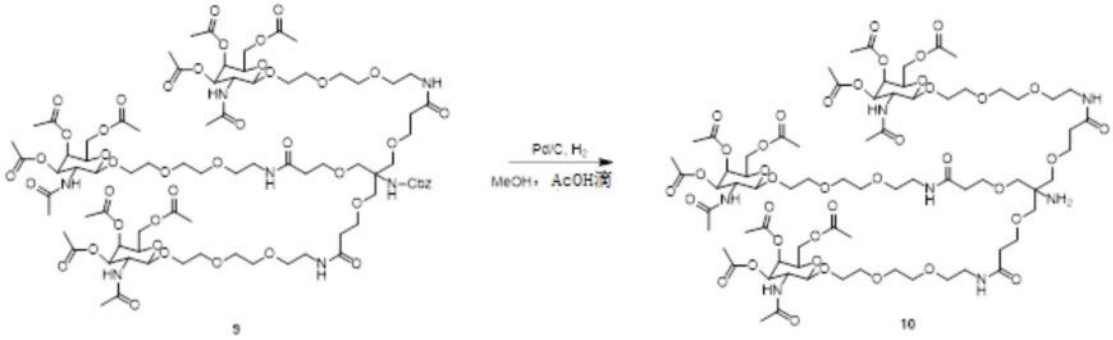
[1053] 化合物7的制备:将三{[2-(叔丁氧羰基)乙氧基]甲基}-甲胺6(3.37g,6.67mmol,1.0eq.)溶解于DCM/水混合物(40mL 1:1v/v)中,并在剧烈搅拌下加入Na_2CO_3(0.18g,1.7mmol,0.25eq.)。将氯甲酸苄酯(2.94mL,20.7mmol,3.10eq.)滴加到先前的混合物中,并在室温下搅拌反应24小时。将反应混合物用CH_2Cl_2(100mL)稀释并用水(100mL)洗涤。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。减压除去溶剂并将所得粗品物质通过快速色谱法纯化(梯度洗脱:环己烷中0-10%EtOAc,12CV),得到标题化合物,为淡黄色油状物(3.9g,91%,rf=0.56(环己烷中10% EtOAc))。MS:$C_{33}H_{53}NO_{11}$的计算值为639.3。测定值为640.9。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.38-7.26(m,5H),4.97(s,2H),3.54(t,6H),3.50(s,6H),2.38(t,6H),1.39(s,27H).^{13}C NMR(125MHz,DMSO-d_6)δ170.3(3xC),154.5(C),137.1(C),128.2(2xCH),127.7(CH),127.6(2xCH),79.7(3xC),68.4(3xCH_2),66.8(3xCH_2),64.9(C),58.7(CH_2),35.8(3xCH_2),27.7(9xCH_3)。

[1054] 

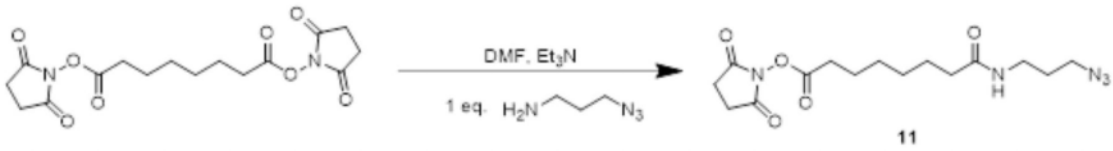
[1055] 化合物8的制备:在氩气下将Cbz-NH-tris-Boc-酯7(0.20g,0.39mmol,1.0eq.)溶解于CH_2Cl_2(1mL)中,加入三氟乙酸(TFA,1mL),并将反应在室温下搅拌1小时。减压除去溶剂,将残余物与甲苯(5mL)共蒸发3次,并在高真空下干燥,得到化合物的TFA盐(0.183g,98%)。该化合物无需进一步纯化即可使用。MS:$C_{21}H_{29}NO_{11}$的计算值为471.6。测定值为472.4。

[1056] 

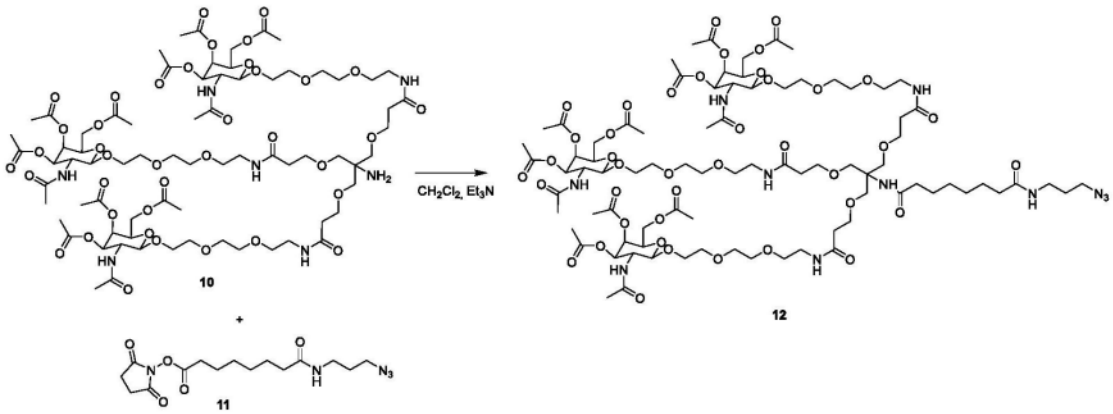
[1057] 化合物9的制备:将CbzNH-tris-COOH 8(0.72g,1.49mmol,1.0eq.)和GalNAc-PEG3-NH_2 5(3.56g,7.44mmol,5.0eq.)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(25mL)中。然后将N,N,N′,N′-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HBTU)(2.78g,7.44mmol,5.0eq.)、1-羟基苯并三唑水合物(HOBt)(1.05g,7.44mmol,5.0eq.)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(2.07mL,11.9mmol,8.0eq.)添加到溶液中,并将反应搅拌72小时。减压除去溶剂,将残余物溶解于DCM(100mL)中并用饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)洗涤。有机层经Na_2SO_4干燥,蒸发溶剂并通过快速色谱法纯化粗品物质(梯度洗脱:在DCM中0-5%MeOH,14CV)。获得淡黄色油状产物(1.2g,43%,rf=0.20(在DCM中5%MeOH))。MS:$C_{81}H_{125}N_7O_{41}$的计算值为1852.9。测定值为1854.7。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.90-7.80(m,10H),7.65-7.62(m,4H),7.47-7.43(m,3H),7.38-7.32(m,8H),5.24-5.22(m,3H),5.02-4.97(m,4H),4.60-4.57(m,3H),4.07-3.90(m 10H),3.67-3.36(m,70H),3.23-3.07(m,25H),2.18(s,10H),2.00(s,13H),1.89(s,11H),1.80-1.78(m,17H).^{13}C NMR(125MHz,DMSO-d_6)δ170.1(C),169.8(C),169.7(C),169.4(C),169.2(C),169.1(C),142.7(C),126.3(CH),123.9(CH),118.7(CH),109.7(CH),100.8(CH),70.5(CH),69.8(CH),69.6(CH),69.5(CH),69.3(CH_2),69.0(CH_2),68.2(CH_2),67.2(CH_2),66.7(CH_2),61.4(CH_2),22.6(CH_2),22.4(3xCH_3),20.7(9xCH_3)。

[1058] 

[1059] 化合物10的制备:将三触角GalNAc化合物9(0.27g,0.14mmol,1.0eq.)溶解于MeOH(15mL)中,加入3滴乙酸(AcOH)和Pd/C(30mg)。将反应混合物采用真空/氩气循环(3x)脱气,并在气球压力下氢化过夜。通过质谱法跟踪反应的完成情况,并将所得混合物通过薄硅藻土垫过滤。蒸发溶剂并将获得的残余物在高真空下干燥并且无需进一步纯化即可用于下一步骤。获得淡黄色油状产物(0.24g,定量产率)。MS:$C_{73}H_{119}N_7O_{39}$的计算值为1718.8。测定值为1719.3。

[1060] 

[1061] 化合物11的制备:将市售的辛二酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(3.67g,9.9mmol,1.0eq.)溶解于DMF(5mL)中,并加入三乙胺(1.2mL)。向该溶液中逐滴添加3-叠氮基-1-丙胺(1.0g,9.9mmol,1.0eq.)在DMF(5mL)中的溶液。将反应在室温下搅拌3小时。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释并用水(50mL)洗涤。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并减压除去溶剂。将粗物质通过快速色谱法纯化(梯度洗脱:在DCM中0-5%MeOH,16CV)。获得白色固体产物(1.54g,43%,rf=0.71(在DCM中5%MeOH))。MS:$C_{15}H_{23}N_5O_5$的计算值为353.4。测定值为354.3。

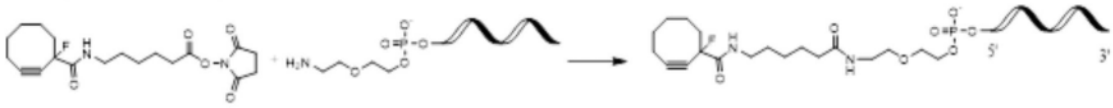
[1062] 

[1063] 三GalNAc(12)的制备:在氩气下将三触角GalNAc化合物10(0.35g,0.24mmol,1.0eq.)和化合物11(0.11g,0.31mmol,1.5eq.)溶解在DCM(5mL)中,并加入三乙胺(0.1mL,0.61mmol,3.0eq.)。将反应在室温下搅拌过夜。减压除去溶剂,将残余物溶解在EtOAc(100mL)中并用水(100mL)洗涤。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。蒸发溶剂并将所得粗物质通过快速色谱法纯化(洗脱梯度:在DCM中0-10%MeOH,20CV),得到标题化合物,为白色蓬松固体(0.27g,67%,rf=0.5(在DCM中10%MeOH))。MS:$C_{84}H_{137}N_{11}O_{41}$的计算值为1957.1。测定值为

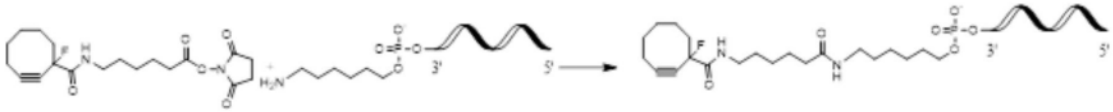
1959.6。

[1064] 系链1与siRNA链的缀合:在5’端或3’端的单氟环辛炔(MFCO)缀合

[1065] 5’端MFCO缀合

[1066] 

[1067] 3’端MFCO缀合

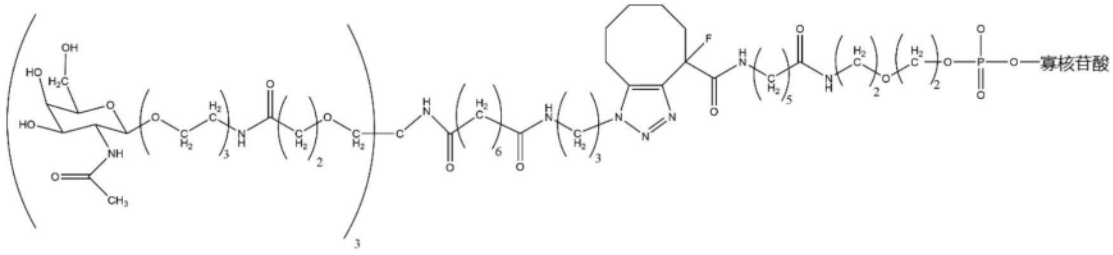
[1068] 

[1069] MFCO缀合的一般条件:将胺修饰的单链以7000D/mL溶解在50mM碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液pH 9.6/二甲基亚砜(DMSO)4:6(v/v)中,并向该溶液中添加一摩尔当量的35mM在DMF中的MFCO-C6-NHS酯溶液(Berry&Associates,Cat.#LK 4300)。反应在室温下进行,1小时后加入另一摩尔当量的MFCO溶液。反应继续进行一小时,并通过LC/MS进行监测。MFCO NHS酯试剂相对于氨基修饰的寡核苷酸至少需要两摩尔当量过量才能实现起始材料的定量消耗。将反应混合物用水稀释15倍,通过Sartorius的1.2μm过滤器过滤,然后在Äkta Pure仪器(GE Healthcare)上通过保留相(RP HPLC)纯化。

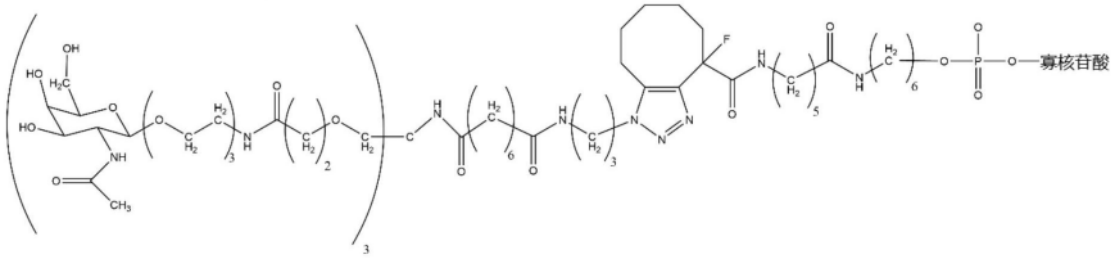
[1070] 使用Waters的Xbridge C18 Prep 19x50mm柱进行纯化。缓冲液A为100mM TEAAc pH 7,缓冲液B含有缓冲液A中的95%乙腈。采用流速为10mL/min,温度为60℃。记录280nm处的紫外线痕迹。采用60个柱体积内0-100% B的梯度。

[1071] 将含有全长缀合的寡核苷酸的级分汇集起来,在冰箱中用3M NaOAc,pH 5.2和85%乙醇沉淀,并将收集的沉淀物溶解在水中。样品通过尺寸排阻色谱法脱盐,并使用真空浓缩器浓缩,得到分离产率为40-80%的缀合的寡核苷酸。

[1072] 5’-GalNAc-T1缀合物

[1073] 

[1074] 3’-GalNAc-T1缀合物

[1075] 

[1076] 三GalNAc缀合的一般程序:将MFCO修饰的单链以2000D/mL溶解在水中,并向该溶液中加入一当量的化合物12(10mM)在DMF中的溶液。反应在室温下进行,3小时后加入0.7摩尔当量的化合物12溶液。反应过夜,通过LCMS监测反应完成情况。将缀合物在水中稀释15

倍,通过Sartorius的1.2μm过滤器过滤,然后在Äkta Pure仪器(GE Healthcare)上通过RP HPLC纯化。

[1077] 使用Waters的Xbridge C18 Prep 19x50mm柱进行纯化。缓冲液A为100mM乙酸三乙基铵pH 7,缓冲液B含有缓冲液A中的95%乙腈。采用流速为10mL/min,温度为60℃。记录280nm处的紫外线痕迹。采用60个柱体积内0-100% B的梯度。

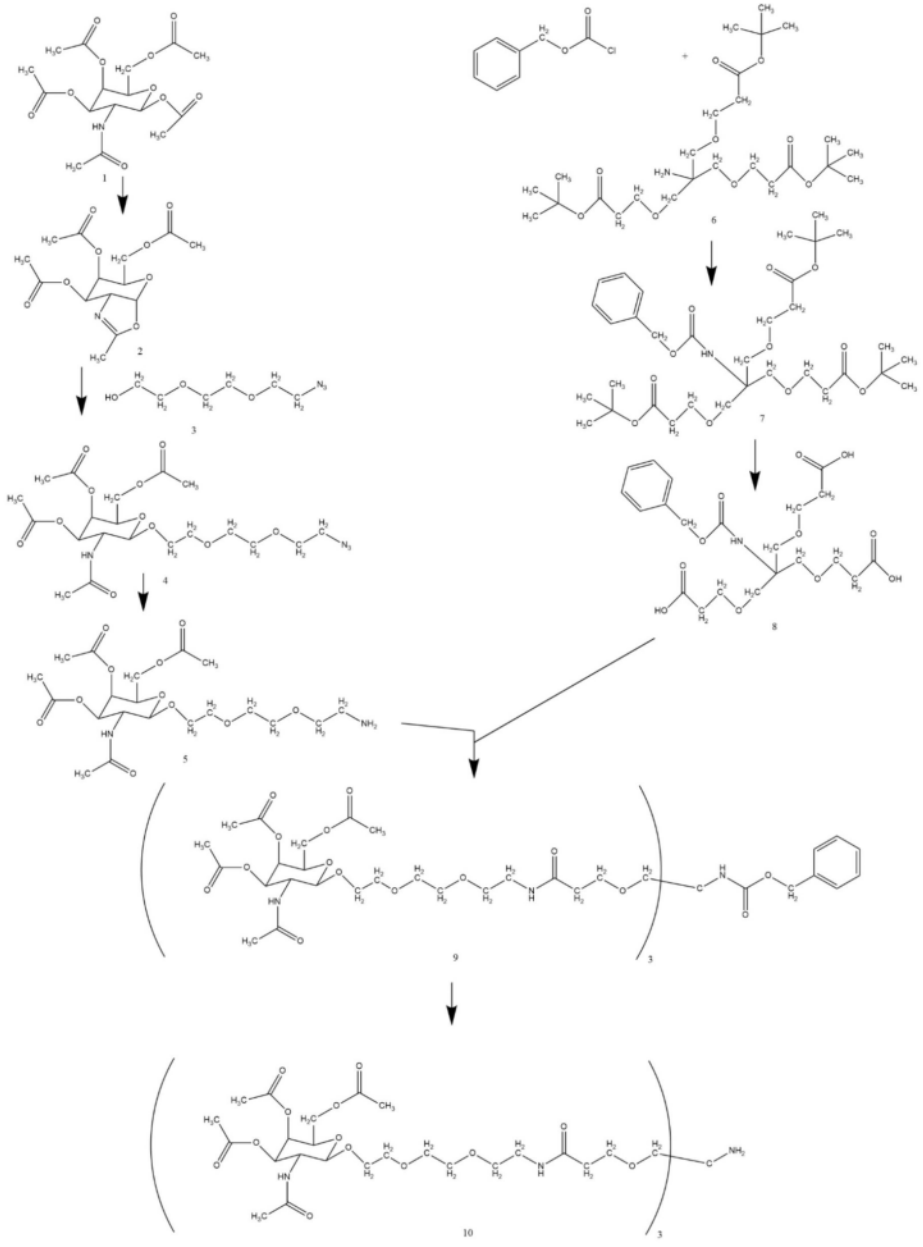
[1078] 将含有全长缀合的寡核苷酸的级分汇集起来,在冰箱中用3M NaOAc,pH 5.2和85%乙醇沉淀,并将收集的沉淀溶解在水中,得到约10000D/mL的寡核苷酸溶液。通过添加20%氨水去除O-乙酸酯。通过LC-MS验证了这些保护基团的定量去除。

[1079] 使用Sephadex G25 Fine树脂(GE Healthcare)在Äkta Pure(GE Healthcare)仪器上通过尺寸排阻色谱法对缀合物进行脱盐,得到分离产率为50-70%的缀合的寡核苷酸。

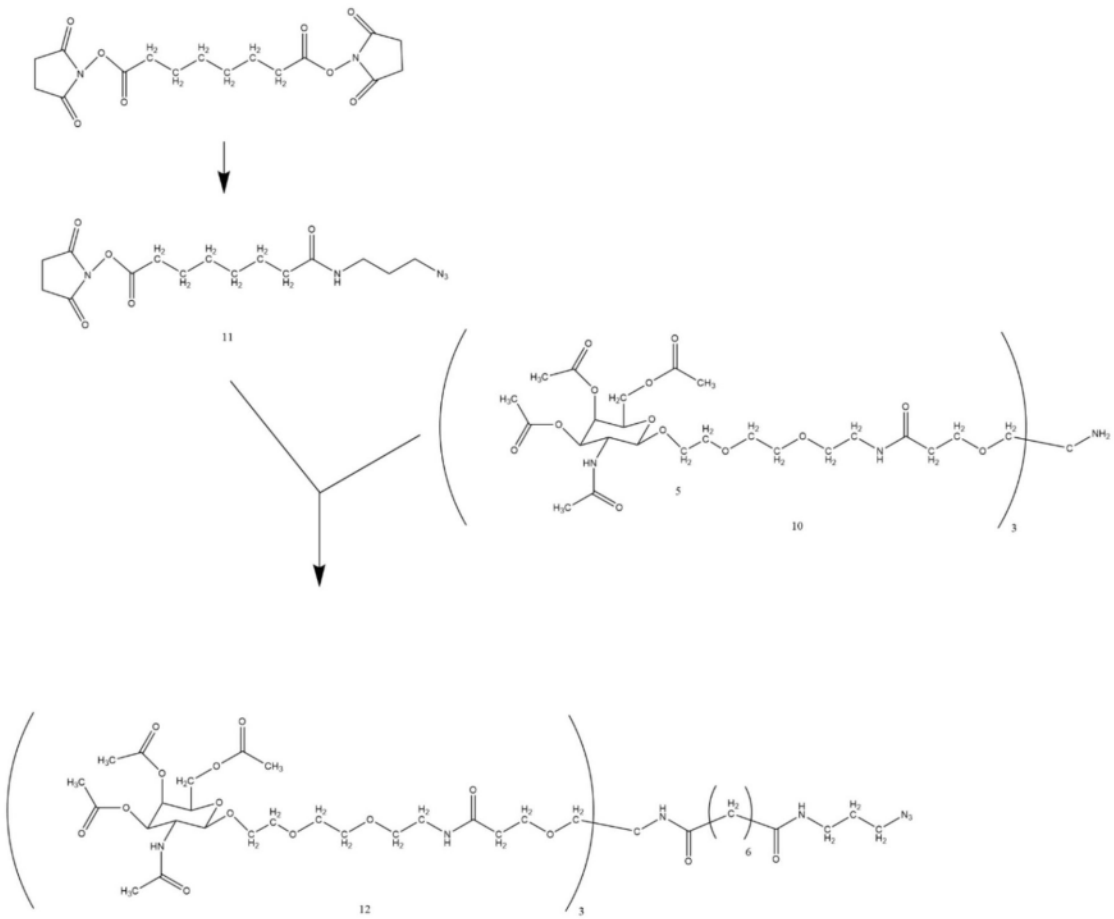
[1080] 以下方案进一步列出了合成路线:

[1081] 方案一:

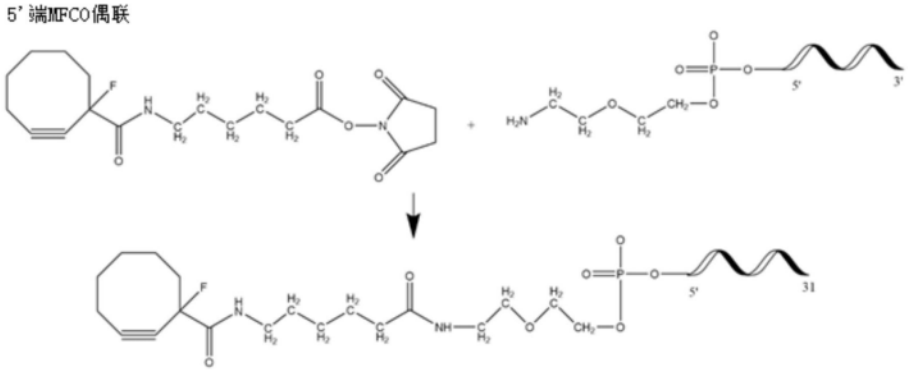
[1082]



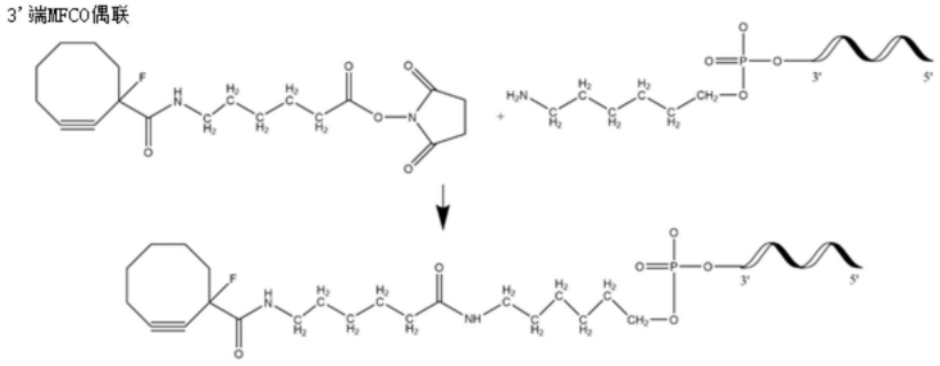
[1083] 方案二：



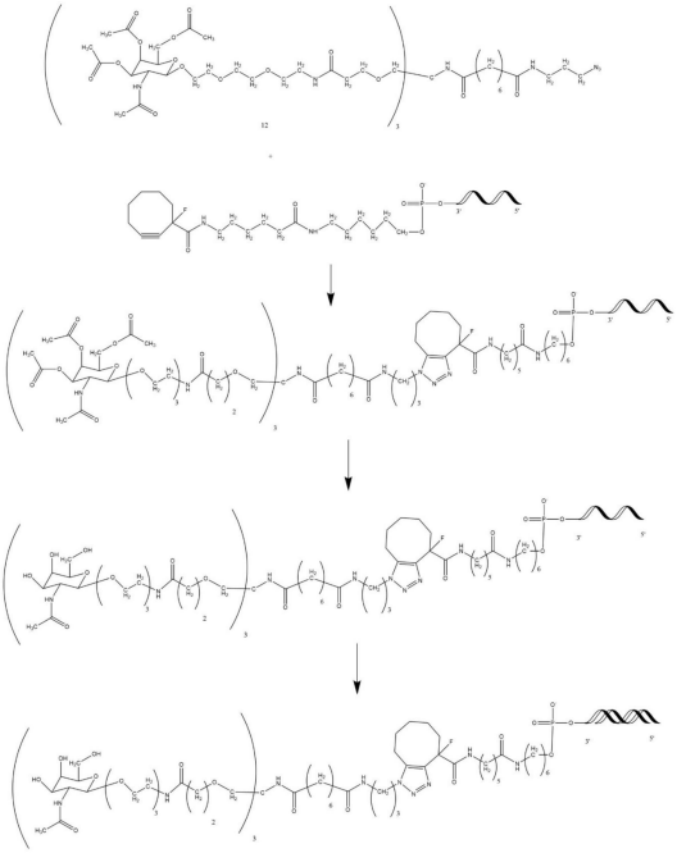
[1084] 方案三：



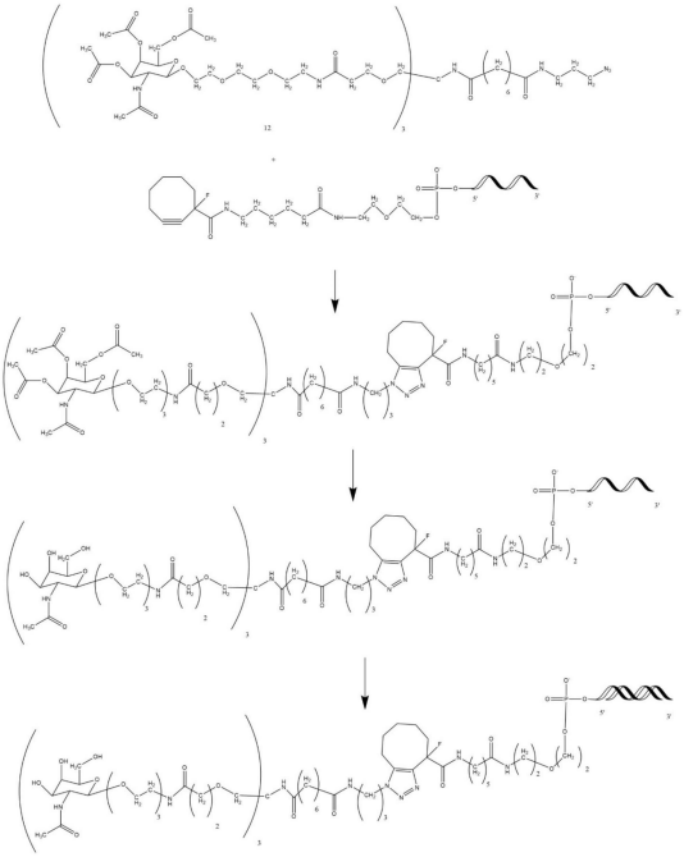
[1085]



[1086] 方案4：



[1087] 方案5：



[1088]

[1089] 实施例2:双重退火

[1090] 为了生成所需的siRNA双链体,通过结合两条链的等摩尔水溶液使两条互补链退火。将混合物放入70℃的水浴中5分钟,然后在2小时内冷却至环境温度。将双链体冻干2天并储存在-20℃下。

[1091] 在Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific)HPLC系统上的Superdex^{TM}75Increase 5/150GL柱5x153-158mm(Cytiva)上,通过分析性SEC HPLC对双链体进行分析。流动相由含有10%乙腈的1x PBS组成。在室温下,以1.5mL/min的流速在10分钟内运行等度梯度。记录260和280nm处的紫外线痕迹。水(LC-MS级)购自Sigma-Aldrich,磷酸盐缓冲盐水(PBS;10x,pH 7.4)购自GIBCO(Thermo Fisher Scientific)。

[1092] 实施例3:系链2的合成

[1093] 一般实验条件:

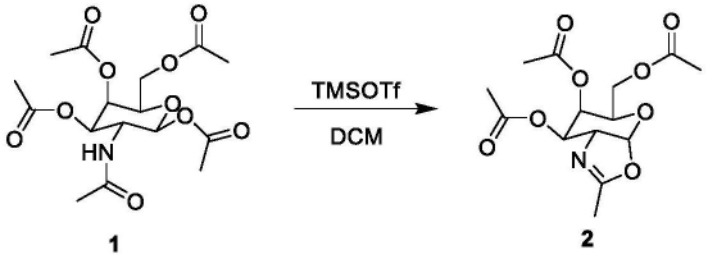
[1094] 薄层色谱法(TLC)在涂有二氧化硅的铝板上进行,使用Macherey-Nagel的254nm荧光指示剂。在紫外光(254nm)下,或根据Stahl(来自Sigma-Aldrich),用在甲醇(MeOH)中的5%H_2SO_4或茚三酮试剂喷洒,然后加热,对化合物进行可视化。快速色谱法采用配备有双变量紫外波长检测器(200-400nm)的Biotage Isolera One快速色谱法仪器,使用Biotage Sfar Silica10、25、50或100g柱(瑞典乌普萨拉)进行。

[1095] 所有湿敏反应均在无水条件下使用干燥玻璃器皿、无水溶剂和氩气气氛进行。所有市售试剂均从Sigma-Aldrich购买,溶剂从Carl Roth GmbH+Co.KG购买。D-半乳糖胺五乙酸酯从AK scientific购买。

[1096] HPLC/ESI-MS在Dionex UltiMate 3000RS UHPLC系统和Thermo Scientific MSQ Plus质谱仪上使用Waters的Acquity UPLC Protein BEH C4柱(300A,1.7pm,2.1x 100mm)进行,温度为60℃。溶剂系统由具有含有0.1%甲酸的水的溶剂A和具有含有0.1%甲酸的乙腈(ACN)的溶剂B组成。采用0.4mL/min的流速,15分钟内B的梯度从5%增加到100%。检测器和条件:Corona超荷电气溶胶检测器(来自esa)。雾化器温度:25℃。N_2压力:35.1psi。过滤器:Corona。

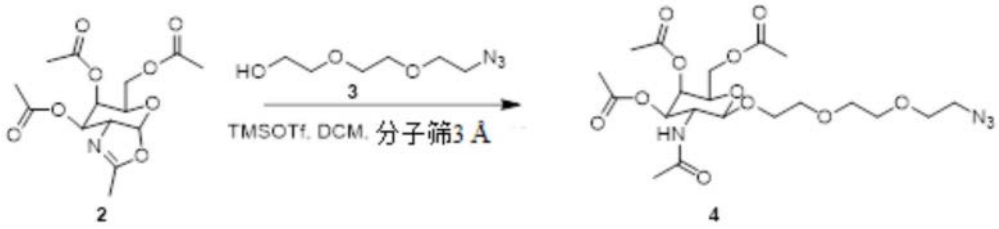
[1097] ^{1}H和^{13}C NMR光谱在室温下在VaR1an光谱仪上以500MHz(^{1}H NMR)和125MHz(^{13}C NMR)记录。化学位移以ppm为单位,参考溶剂残留峰($CDCl_3$-^{1}H NMR:δ在7.26ppm处和^{13}C NMR:δ在77.2ppm处;DMSO-d_6-1H NMR:δ在2.50ppm处和^{13}C NMR:δ在39.5ppm处)。耦合常数以赫兹为单位。信号分裂模式描述为单峰(s)、双峰(d)、三峰(t)或多重峰(m)。

[1098] 缀合结构单元三GalNAc_系链2的合成路线:

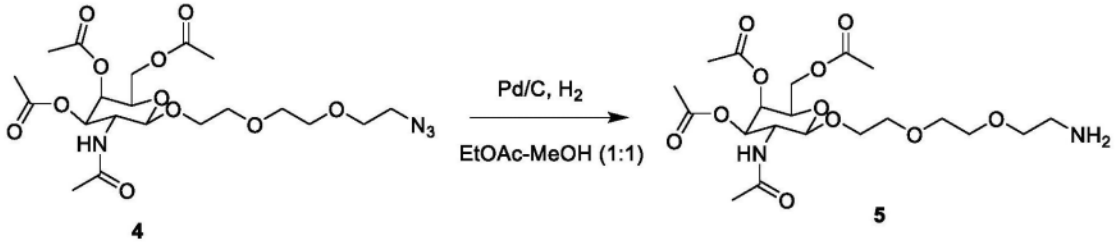
[1099] 

[1100] 化合物2的制备:在氩气下,将D-半乳糖胺五乙酸酯(3.00g,7.71mmol,1.0eq.)溶解于无水二氯甲烷(DCM)(30mL)中,并加入三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf,4.28g,19.27mmol,2.5eq.)。将反应在室温下搅拌3小时。将反应混合物用DCM(50mL)稀释并用冷饱

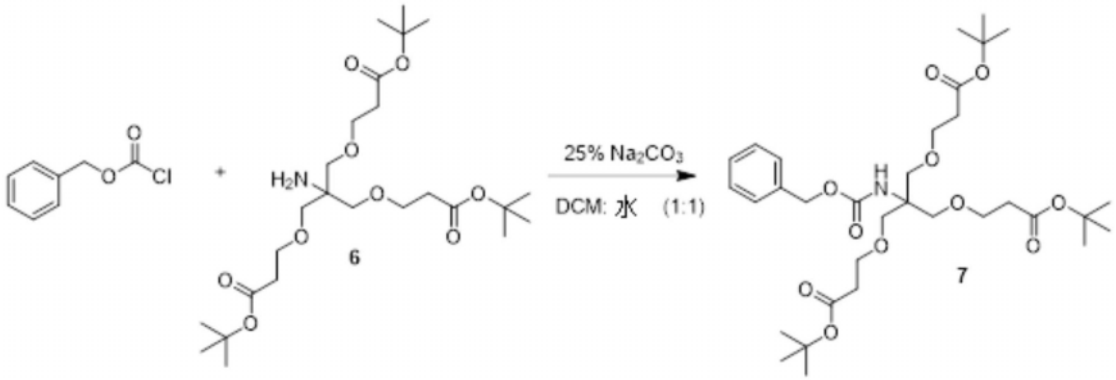
和$NaHCO_3$水溶液(100mL)和水(100mL)洗涤。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并浓缩,得到黄色油状的标题化合物,其经快速色谱法纯化(梯度洗脱:在DCM中0-10%MeOH,10CV)。获得无色油状产物(2.5g,98%,rf=0.45(在DCM中2%MeOH))。

[1101] 

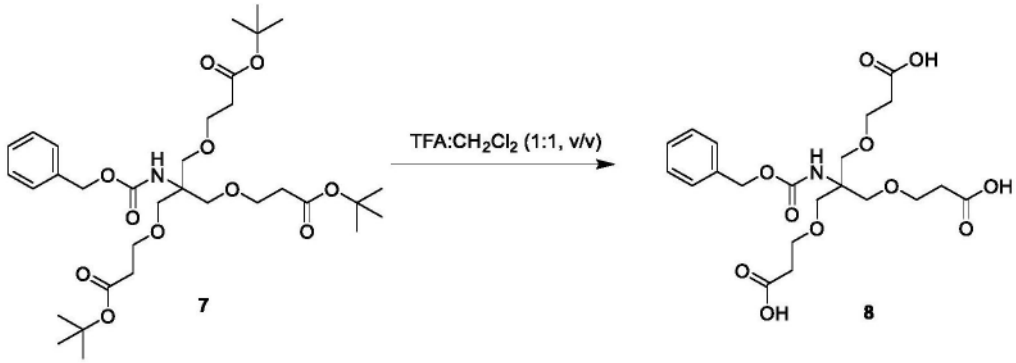
[1102] 化合物4的制备:在氩气下将化合物2(2.30g,6.98mmol,1.0eq.)和叠氮基-PEG3-OH(1.83g,10.5mmol,1.5eq.)溶解于无水DCM(40mL)中,并将分子筛3 Å(5g)加入到溶液中。将混合物在室温下搅拌1小时。然后将TMSOTf(0.77g,3.49mmol,0.5eq.)添加到混合物中并将反应搅拌过夜。将分子筛过滤,将滤液用DCM(100mL)稀释并用冷饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)和水(100mL)洗涤。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并减压除去溶剂。将粗物质通过快速色谱法纯化(梯度洗脱:在DCM中0-3%MeOH,10CV),得到标题化合物,为浅黄色油状物(3.10g,88%,rf=0.25(在DCM中2%MeOH))。MS:$C_{20}H_{32}N_4O_{11}$的计算值为504.21。测定值为505.4。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ6.21-6.14(m,1H),5.30(dd,J=3.4,1.1Hz,1H),5.04(dd,J=11.2,3.4Hz,1H),4.76(d,J=8.6Hz,1H),4.23-4.08(m,3H),3.91-3.80(m,3H),3.74-3.59(m,9H),3.49-3.41(m,2H),2.14(s,3H),2.02(s,3H),1.97(d,J=4.2Hz,6H).^{13}C NMR(125MHz,$CDCl_3$)δ170.6(C),170.5(C),170.4(C),170.3(C),102.1(CH),71.6(CH),70.8(CH),70.6(CH),70.5(CH),70.3(CH_2),69.7(CH_2),68.5(CH_2),66.6(CH_2),61.5(CH_2),23.1(CH_3),20.7(3xCH_3)。

[1103] 

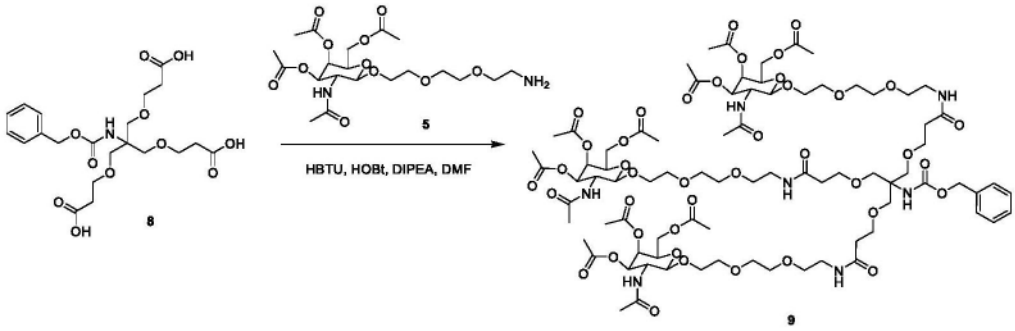
[1104] 化合物5的制备:将化合物4(1.00g,1.98mmol,1.0eq.)溶解在乙酸乙酯(EtOAc)和MeOH的混合物(30mL 1:1v/v)中,并添加Pd/C(100mg)。将反应混合物采用真空/氩气循环(3x)脱气,并在气球压力下氢化过夜。将反应混合物通过硅藻土过滤并用EtOAc(30mL)洗涤。减压除去溶剂,得到标题化合物,为无色油状物(0.95g,定量产率,rf=0.25(在DCM中10%MeOH))。该化合物无需进一步纯化即可使用。MS:$C_{20}H_{34}N_2O_{11}$的计算值为478.2。测定值为479.4。

[1105] 

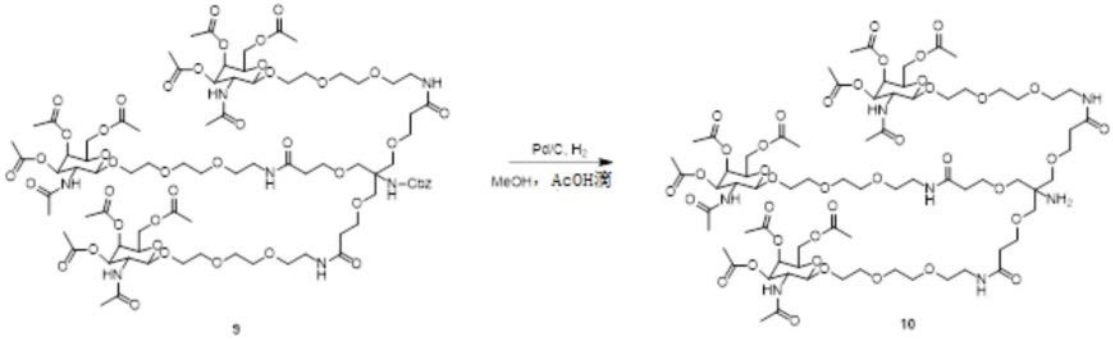
[1106] 化合物7的制备:将三{[2-(叔丁氧羰基)乙氧基]甲基}-甲胺6(3.37g,6.67mmol,1.0eq.)溶解于DCM/水混合物(40mL 1:1v/v)中,并在剧烈搅拌下加入Na_2CO_3(0.18g,1.7mmol,0.25eq.)。将氯甲酸苄酯(2.94mL,20.7mmol,3.10eq.)滴加到先前的混合物中,并在室温下搅拌反应24小时。将反应混合物用CH_2Cl_2(100mL)稀释并用水(100mL)洗涤。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。减压除去溶剂并将所得粗品物质通过快速色谱法纯化(梯度洗脱:环己烷中0-10% EtOAc,12CV),得到标题化合物,为淡黄色油状物(3.9g,91%,rf=0.56(环己烷中10% EtOAc))。MS:$C_{33}H_{53}NO_{11}$的计算值为639.3。测定值为640.9。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.38-7.26(m,5H),4.97(s,2H),3.54(t,6H),3.50(s,6H),2.38(t,6H),1.39(s,27H).^{13}C NMR(125MHz,DMSO-d_6)δ170.3(3xC),154.5(C),137.1(C),128.2(2xCH),127.7(CH),127.6(2xCH),79.7(3xC),68.4(3xCH_2),66.8(3xCH_2),64.9(C),58.7(CH_2),35.8(3xCH_2),27.7(9xCH_3)。

[1107] 

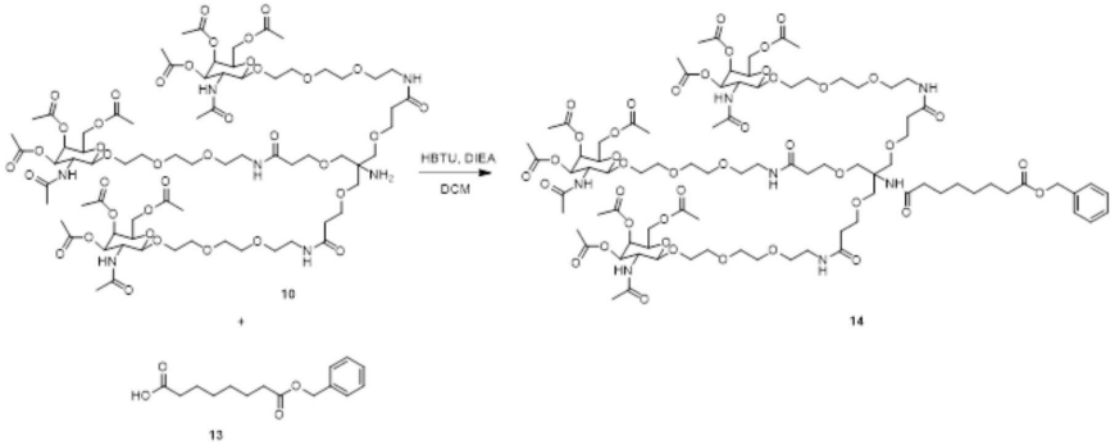
[1108] 化合物8的制备:在氩气下将Cbz-NH-tris-Boc-酯7(0.20g,0.39mmol,1.0eq.)溶解于CH_2Cl_2(1mL)中,加入三氟乙酸(TFA,1mL),并将反应在室温下搅拌1小时。减压除去溶剂,将残余物与甲苯(5mL)共蒸发3次,并在高真空下干燥,得到化合物的TFA盐(0.183g,98%)。该化合物无需进一步纯化即可使用。MS:$C_{21}H_{29}NO_{11}$的计算值为471.6。测定值为472.4。

[1109] 

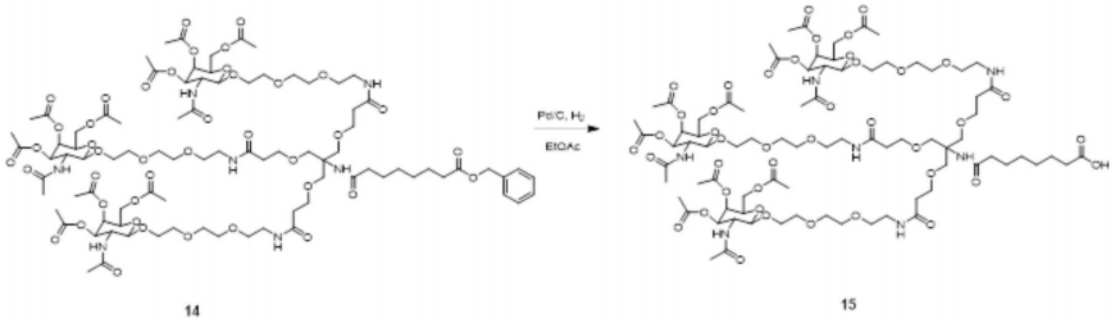
[1110] 化合物9的制备:将CbzNH-tris-COOH 8(0.72g,1.49mmol,1.0eq.)和GalNAc-PEG3-NH_2 5(3.56g,7.44mmol,5.0eq.)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(25mL)中。然后将N,N,N′,N′-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HBTU)(2.78g,7.44mmol,5.0eq.)、1-羟基苯并三唑水合物(HOBt)(1.05g,7.44mmol,5.0eq.)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(2.07mL,11.9mmol,8.0eq.)添加到溶液中,并将反应搅拌72小时。减压除去溶剂,将残余物溶解于DCM(100mL)中并用饱和$NaHCO_3$水溶液(100mL)洗涤。有机层经Na_2SO_4干燥,蒸发溶剂并通过快速色谱法纯化粗品物质(梯度洗脱:在DCM中0-5% MeOH,14CV)。获得淡黄色油状产物(1.2g,43%,rf=0.20(在DCM中5% MeOH))。MS:$C_{81}H_{125}N_7O_{41}$的计算值为1852.9。测定值为1854.7。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.90-7.80(m,10H),7.65-7.62(m,4H),7.47-7.43(m,3H),7.38-7.32(m,8H),5.24-5.22(m,3H),5.02-4.97(m,4H),4.60-4.57(m,3H),4.07-3.90(m 10H),3.67-3.36(m,70H),3.23-3.07(m,25H),2.18(s,10H),2.00(s,13H),1.89(s,11H),1.80-1.78(m,17H).^{13}C NMR(125MHz,DMSO-d_6)δ170.1(C),169.8(C),169.7(C),169.4(C),169.2(C),169.1(C),142.7(C),126.3(CH),123.9(CH),118.7(CH),109.7(CH),100.8(CH),70.5(CH),69.8(CH),69.6(CH),69.5(CH),69.3(CH_2),69.0(CH_2),68.2(CH_2),67.2(CH_2),66.7(CH_2),61.4(CH_2),22.6(CH_2),22.4(3xCH_3),20.7(9xCH_3)。

[1111] 

[1112] 化合物10的制备:将三触角GalNAc化合物9(0.27g,0.14mmol,1.0eq.)溶解于MeOH(15mL)中,加入3滴乙酸(AcOH)和Pd/C(30mg)。将反应混合物采用真空/氩气循环(3x)脱气,并在气球压力下氢化过夜。通过质谱法跟踪反应的完成情况,并将所得混合物通过薄硅藻土垫过滤。蒸发溶剂并将获得的残余物在高真空下干燥并且无需进一步纯化即可用于下一步骤。获得淡黄色油状产物(0.24g,定量产率)。MS:$C_{73}H_{119}N_7O_{39}$的计算值为1718.8。测定值为1719.3。

[1113] 

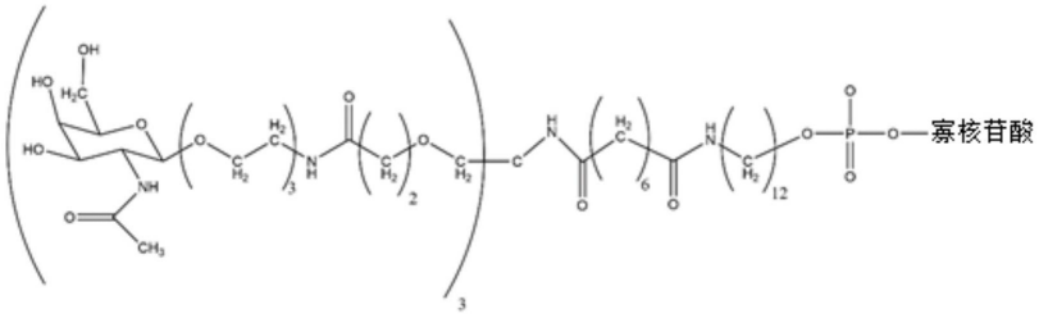
[1114] 化合物14的制备:在氩气下将三触角GalNAc化合物10(0.45g,0.26mmol,1.0eq.)、HBTU(0.19g,0.53mmol,2.0eq.)和DIPEA(0.23mL,1.3mmol,5.0eq.)溶解于DCM(10mL)中。向该混合物中逐滴添加化合物13(0.14g,0.53mmol,2.0eq.)在DCM(5mL)中的溶液。将反应在室温下搅拌过夜。除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc(50mL)中,用水(50mL)洗涤,并用Na_2SO_4干燥。蒸发溶剂,并通过快速色谱法纯化粗物质(梯度洗脱:在DCM中0-5%MeOH,20CV)。获得白色蓬松固体产物(0.25g,48%,rf=0.4(在DCM中10%MeOH))。MS:C88H137N7042的计算值为1965.1。测定值为1965.6。

[1115] 

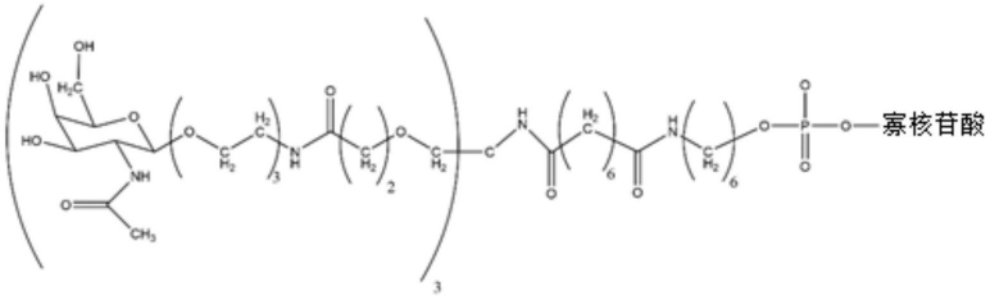
[1116] 三GalNAc(15)的制备:将三触角GalNAc化合物14(0.31g,0.15mmol,1.0eq.)溶解于EtOAc(15mL)中,并添加Pd/C(40mg)。将反应混合物通过真空/氩气循环(3x)脱气,并在气球压力下氢化过夜。通过质谱法监测反应的完成情况,并将所得混合物通过薄硅藻土垫过滤。减压除去溶剂并将所得残余物在高真空下干燥过夜。残留物无需进一步纯化即可用于与寡核苷缀合(0.28g,定量产率)。MS:$C_{81}H_{131}N_7O_{42}$的计算值为1874.9。测定值为1875.3。

[1117] 系链2与siRNA链的缀合:在5'端或3'端的三GalNAc系链2(GalNAc-T2)缀合

[1118] 5'-GalNAc-T2缀合物

[1119] 

[1120] 3'-GalNAc-T2缀合物

[1121] 

[1122] 三GalNAc系链2NHS酯的制备:向羧酸系链2(化合物15,227mg,121μmol)在DMF(2.1mL)中的溶液中,添加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(15.3mg,133μmol)和N,N′-二异丙基碳二酰亚胺(DIC)(19.7μL,127μmol)。该溶液在室温下搅拌18小时,无需纯化即可用于后续的缀合反应。

[1123] 三GalNAc系链2缀合的一般程序:将胺修饰的单链以7000D/mL溶解在50mM碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液pH 9.6/DMSO 4:6(v/v)中,并向该溶液中加入一摩尔当量的系链2NHS酯(57mM)在DMF中的溶液。反应在室温下进行,1小时后加入另一摩尔当量的NHS酯溶液。反应继续进行一小时,并通过LCMS监测反应进程。NHS酯试剂相对于氨基修饰的寡核苷至少需要两摩尔当量过量才能实现起始材料的定量消耗。将反应混合物用水稀释15倍,通过Sartorius的1.2μm过滤器过滤,然后在Äkta Pure仪器(GE Healthcare)上通过保留相(RP HPLC)纯化。

[1124] 使用Waters的Xbridge C18 Prep 19x 50mm柱进行纯化。缓冲液A为100mM TEAApH 7,缓冲液B含有缓冲液A中的95%乙腈。采用流速为10mL/min,温度为60℃。记录280nm处的紫外线痕迹。采用60个柱体积内0-100% B的梯度。

[1125] 将含有全长缀合的寡核苷酸的级分汇集起来,在冰箱中用3M NaOAc,pH 5.2和85%乙醇沉淀,然后以10000D/mL溶解在水中。使用20%氢氧化铵水溶液去除O-乙酸酯直至完成(通过LC-MS监测)。

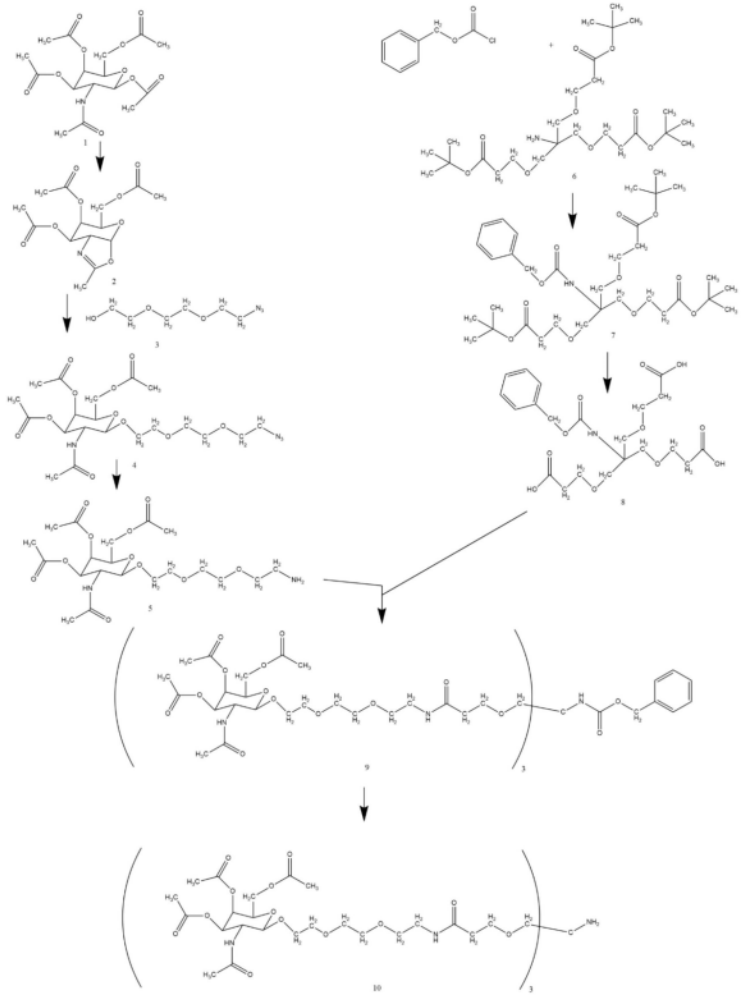
[1126] 使用Sephadex G25 Fine树脂(GE Healthcare)在Äkta Pure(GE Healthcare)仪器上通过尺寸排阻色谱法对缀合物进行脱盐,得到分离产率为60-80%的缀合的寡核苷酸。

[1127] 采用配备有紧凑型ESI-Qq-TOF质谱仪(Bruker Daltonics)的Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific)HPLC系统,使用2.1x50mm Xbridge C18柱(Waters)对缀合物进行HPLC-MS分析。缓冲液A为在1%MeOH水溶液中的16.3mM三乙胺、100mM HFIP,缓冲液B含有缓冲液A中的95%MeOH。采用流速为250μL/min,温度为60℃。记录260和280nm处的紫外线痕迹。采用31分钟内1-100%B的梯度。

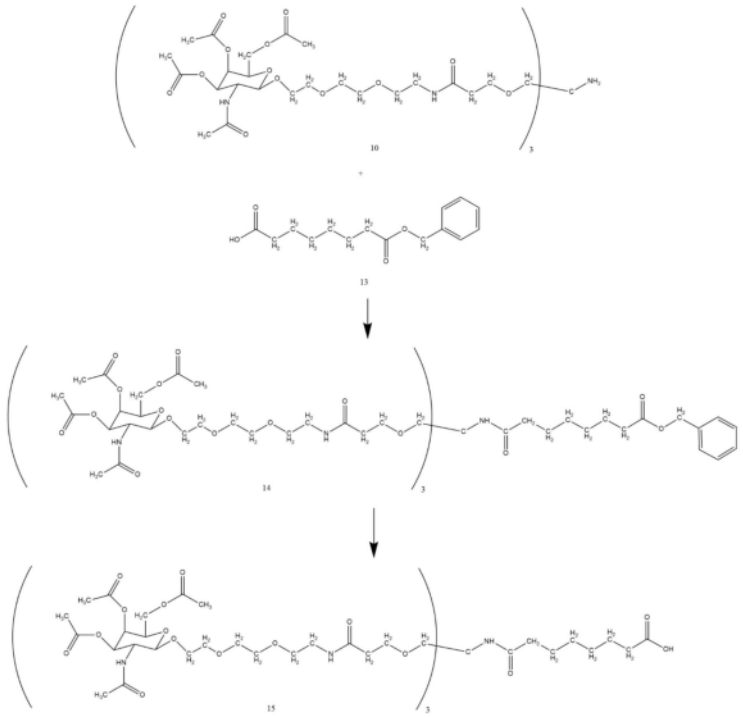
[1128] 以下方案进一步列出了合成路线:

[1129] 方案6:

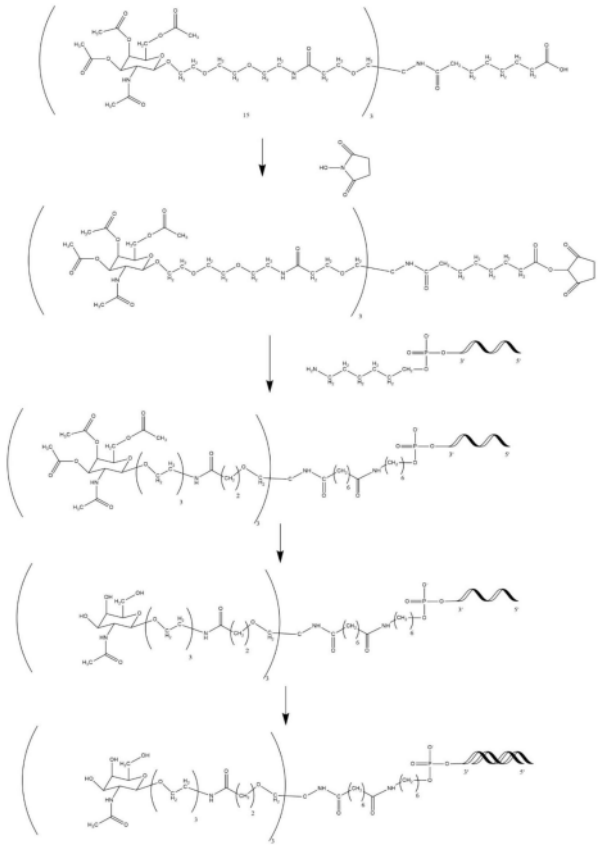
[1130]



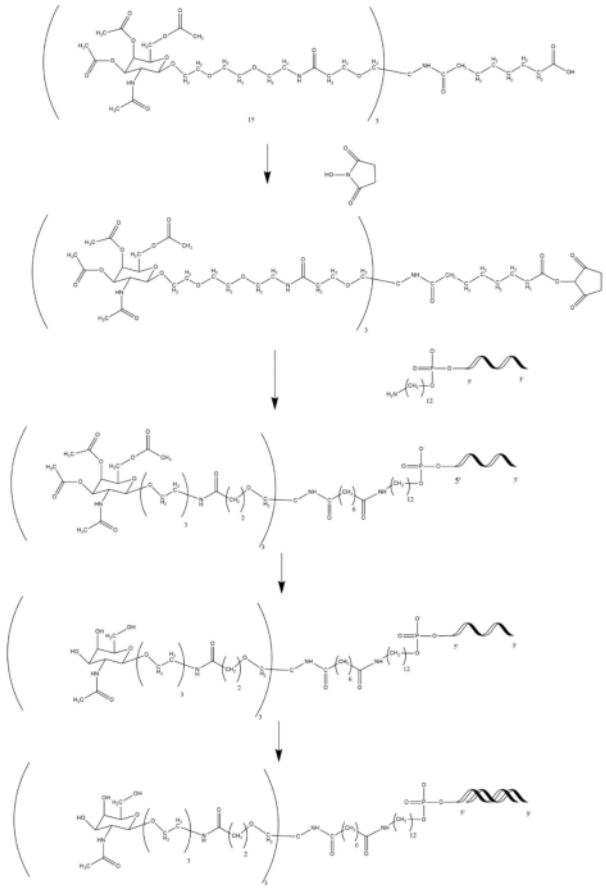
[1131] 方案7：



[1132] 方案8：



[1133] 方案9：



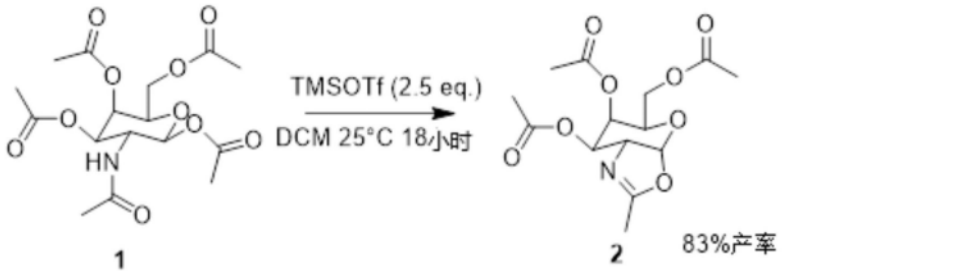
[1134]

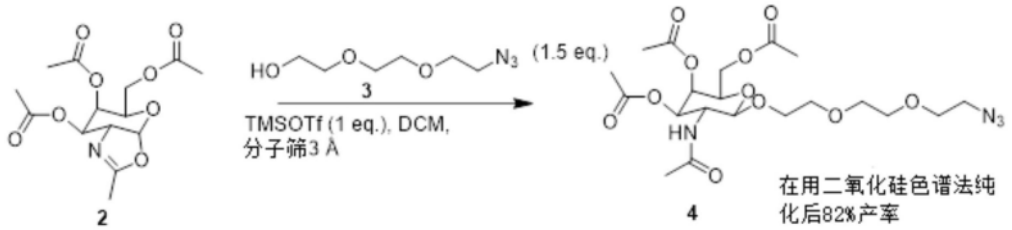
[1135] 实施例4:双重退火

[1136] 为了生成所需的siRNA双链体,通过结合两条链的等摩尔水溶液使两条互补链退火。将混合物放入70℃的水浴中5分钟,然后在2小时内冷却至环境温度。将双链体冻干2天并储存在-20℃下。

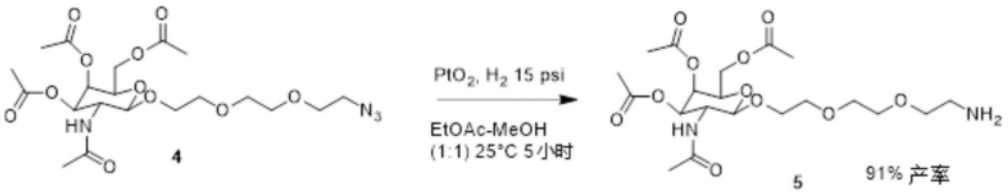
[1137] 在Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific)HPLC系统上的Superdex™75Increase 5/150GL柱5x153-158mm(Cytiva)上,通过分析性SEC HPLC对双链体进行分析。流动相由含有10%乙腈的1x PBS组成。在室温下,以1.5mL/min的流速在10分钟内运行等度梯度。记录260和280nm处的紫外线痕迹。水(LC-MS级)购自Sigma-Aldrich,磷酸盐缓冲盐水(PBS;10x,pH 7.4)购自GIBCO(Thermo Fisher Scientific)。

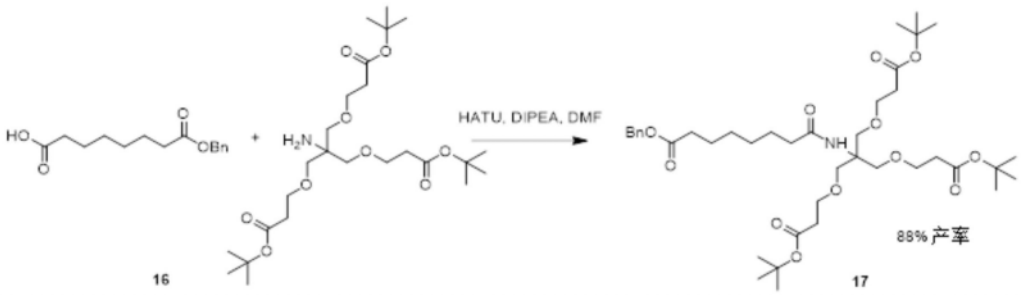
[1138] 实施例5:缀合结构单元三GalNAc_系链2的替代合成路线:

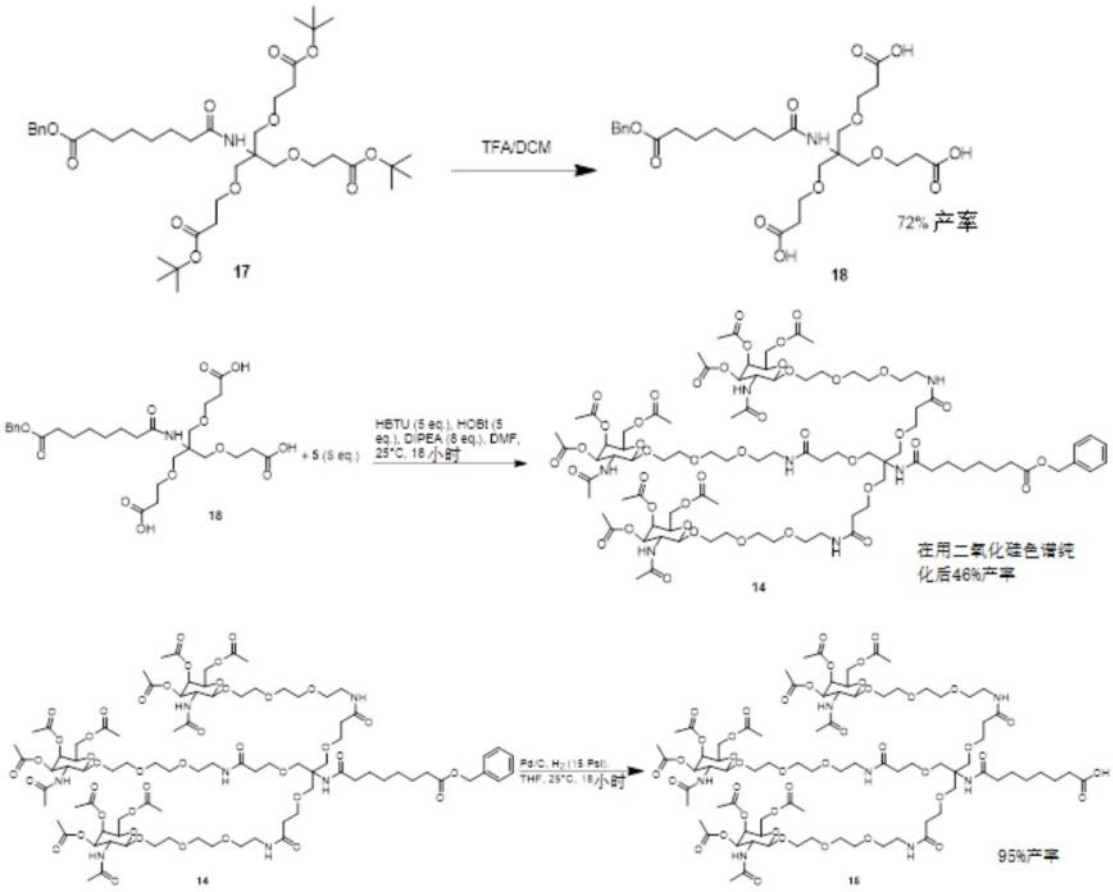




[1139]



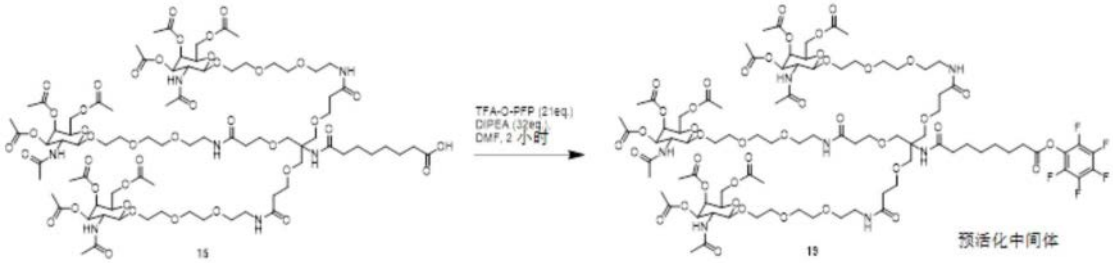




[1140]

[1141] 系链2与siRNA链的缀合:在5’端或3’端的三GalNAc系链2(GalNAc-T2)缀合

[1142] 缀合条件

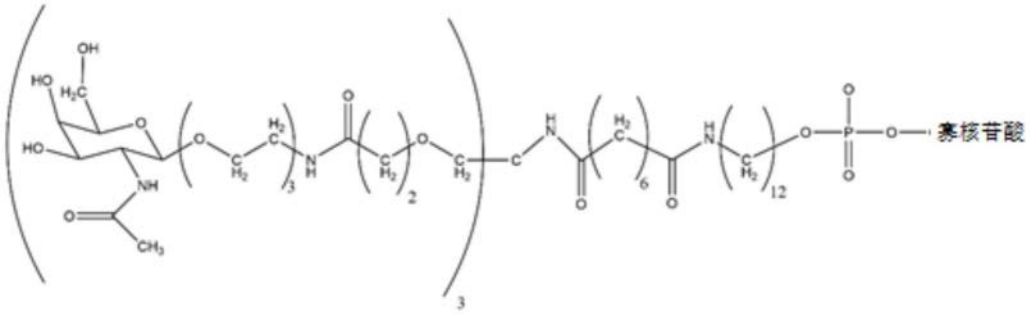


[1143]

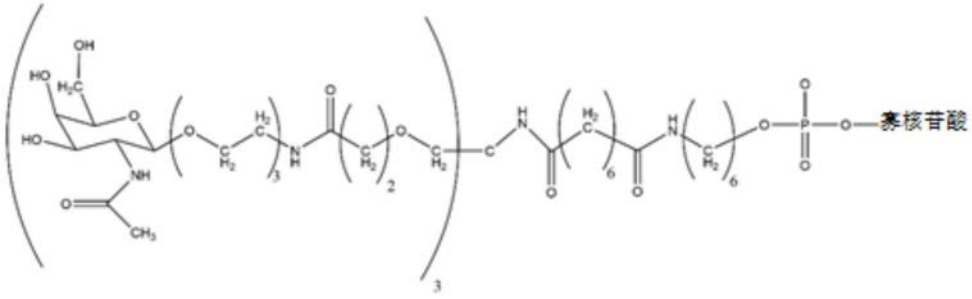
[1144] 预活化:在25℃下,向化合物15(16μmol,4eq.)在DMF(160μL)中的溶液中加入TFA-O-PFP(15μL,21eq.),然后加入DIPEA(23μL,32eq.)。将管在25℃下摇动2小时。用H_2O(10μL)终止反应。

[1145] 缀合:用DMF(400μl)稀释所得混合物,然后添加寡胺溶液(10x PBS中4.0μmol,pH 7.4,500μL;有机和水溶液中的最终寡核苷酸浓度:4μmol/ml＝4mM)。将管在25℃下摇动16小时,并用LCMS分析反应。将所得混合物用28％ NH_4OH(4.5ml)处理,并在25℃下摇动2小时。用LCMS分析混合物,浓缩,并用IP-RP HPLC纯化,以产生与系链2GalNAc缀合的寡核苷酸。

[1146] 5’-GalNAc-T2缀合物

[1147] 

[1148] 3'-GalNAc-T2缀合物

[1149] 

[1150] 实施例6:固相合成法:规模≤1μmol

[1151] siRNA正义链和反义链的合成在MerMade192X合成仪上进行,合成采用市售的固体支持物,该支持物由带有通用连接体的可控孔径玻璃制成(通用CPG,负载为40μmol/g;LGC Biosearch或Glen Research)。

[1152] RNA亚磷酰胺购自ChemGenes或Hongene。

[1153] 所用的2'-O-甲基亚磷酰胺如下:5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-苯甲酰腺苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-乙酰胞苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-异丁酰鸟苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-尿苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。

[1154] 所用的2'-F亚磷酰胺如下:5'-二甲氧基三苯甲基-N-苯甲酰脱氧腺苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-二甲氧基三苯甲基-N-乙酰基脱氧胞苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-二甲氧基三苯甲基-N-异丁酰脱氧鸟苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和5'-二甲氧基三苯甲基脱氧尿苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。

[1155] 除2'-O-甲基-尿苷亚磷酰胺溶解于DMF/MeCN(1:4,v/v)中外,所有亚磷酰胺均溶解于无水乙腈(Honeywell Research Chemicals)中,浓度为0.05M。在乙腈/吡啶/H_2O(DNAchem)中的0.02M的碘作为氧化试剂。使用在1:1v/v的乙腈/吡啶中的0.2M PADS(TCI)进行硫代磷酸酯键的硫醇化。使用在乙腈中的0.25M mM 5-乙基硫四唑(ETT)作为活化剂溶液。

[1156] 反向无碱基亚磷酰胺、3-O-二甲氧基三苯甲基-2-脱氧核糖-5-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺购自Chemgenes(ANP-1422)或Hongene(OP-040)。

[1157] 在每个循环中,使用解封闭溶液(DCM中的3%TCA,DNAchem)去除DMT。

[1158] 缀合时间为180秒。氧化剂接触时间设定为80秒,硫醇化时间为2*100秒。

[1159] 在合成结束时,使用NH_4OH:EtOH溶液4:1(v/v)在45℃(TCI)下反应20小时,将寡核苷酸从固体支持物上裂解下来。然后过滤去除固体支持物,用H_2O彻底清洗过滤器,并通过减压蒸发减少合并溶液的体积。

[1160] 将寡核苷酸用Amicon Ultra-2离心过滤单元、PBS缓冲液(10x,Teknova,pH 7.4,无菌)通过超速离心,或通过从1M乙酸钠中进行EtOH沉淀处理以形成钠盐。

[1161] 通过MS ESI-评估单链同一性,然后在水中退火以形成最终的双链体siRNA,并通过尺寸排阻色谱法评估双链体纯度。

[1162] 实施例7:固相合成法:规模≥5μmol

[1163] siRNA正义链和反义链的合成在MerMade192X合成仪上进行,合成采用市售的固体支持物,该支持物由带有通用连接体的可控孔径玻璃制成(通用CPG,负载为40μmol/g;LGC Biosearch或Glen Research),规模为5μmol。在3'-PT-氨基修饰剂C6 CPG 500 Å固体支持物上合成12μmol的用于3'缀合的正义链,负载量为86μmol/g(LGC)。

[1164] RNA亚磷酰胺购自ChemGenes或Hongene。

[1165] 所用的2'-O-甲基亚磷酰胺如下:5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-苯甲酰腺苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-乙酰胞苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-异丁酰鸟苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-尿苷2'-O-甲基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。

[1166] 所用的2'-F亚磷酰胺如下:5'-二甲氧基三苯甲基-N-苯甲酰脱氧腺苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-二甲氧基三苯甲基-N-乙酰基脱氧胞苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-二甲氧基三苯甲基-N-异丁酰脱氧鸟苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和5'-二甲氧基三苯甲基脱氧尿苷2'-氟-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。

[1167] 反向无碱基亚磷酰胺、3-O-二甲氧基三苯甲基-2-脱氧核糖-5-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺购自Chemgenes(ANP-1422)或Hongene(OP-040)。

[1168] 除2'-O-甲基-尿苷亚磷酰胺溶解于DMF/MeCN(1:4,v/v)中外,所有亚磷酰胺均溶解于无水乙腈(Honeywell Research Chemicals)中,浓度为0.05M。使用在乙腈/吡啶/H_2O(DNAchem)中的0.02M的碘作为氧化试剂。使用在1:1v/v的乙腈/吡啶中的0.2M PADS(TCI)进行硫代磷酸酯键的硫醇化。使用在乙腈中的0.25M mM 5-乙基硫四唑(ETT)作为活化剂溶液。

[1169] 在每个循环中,使用解封闭溶液(DCM中的3%TCA,DNAchem)去除DMT。

[1170] 对于在通用CPG上合成的链,用8eq.的酰胺进行缀合,持续130秒。氧化时间为47秒,硫醇化时间为210秒。

[1171] 对于在3'-PT-氨基修饰剂C6 CPG上合成的链,用8eq.的酰胺进行缀合,持续2*150秒。氧化时间为47秒,硫醇化时间为250秒。

[1172] 在合成结束时,使用NH_4OH:EtOH溶液4:1(v/v)在45℃(TCI)下反应20小时,将寡核苷酸从固体支持物上裂解下来。然后过滤去除固体支持物,用H_2O彻底清洗过滤器,并通过

减压蒸发减少合并溶液的体积。

[1173] 将寡核苷酸从从1M乙酸钠中进行EtOH沉淀处理以形成钠盐。

[1174] 单链寡核苷酸通过IP-RP HPLC在Xbridge BEH C18 5μm,130 Å,19x150 mm (Waters)柱上纯化,其中B在A中梯度增加。流动相A:在水中的240mM HFIP、7mM TEA和5％甲醇;流动相B:在甲醇中的240mM HFIP、7mM TEA。

[1175] 通过UPLC/MS ESI-在Xbridge BEH C18 2.5μm、3x50 mm(Waters)柱上评估单链纯度和同一性,其中B在A中梯度增加。流动相A:在水中的100mM HFIP、5mM TEA;流动相B:20％流动相A:80％乙腈(v/v)。

[1176] 正义链按照实施例1、3或5中提供的方案进行缀合。

[1177] 然后将正链和反义链在水中退火以形成最终的双链体siRNA,并通过尺寸排阻色谱法评估双链体纯度。

[1178] 实施例8:核酸序列

[1179] 本申请的siRNA寡核苷靶向ZPI。ZPI靶标的完整DNA序列如下(SEQ ID NO:1):

[1180] AATGTGGGTTGGAGCCCCCATACAGAATCTCTATGGGGGCACTGCCTAGTGGAGCTGTGAGAAGACGGC
CACCGTCCTCCAGACCCCTGAATGGTAGATCCACCGACAGCTTGCGCCATTTATCCGGAAAAGCCACAGACACTCAA
CGCCAGCCCGTGAAAGCAGCCAGGAGGGAGGCTGTACCCTGCAAAGCCACAGGGGCAGAGCTGCCCAAGACCAAGGG
AAGCTACCTTTTGCATCAACGTGACCTGGACTCAAAGGAGATCATTTTGGAGCTTTAAAATTTGACTGACCTGCTGG
ATTTCAGACTTGCATGGGCCCTGTAACCACTTCGTTTAGGCCAATTTCTCCCATTTGGAACAGCCGTATTTACCCAA
TACCTGTAACCCCATTGTATCTAGGCAGTAACTAGCTTGCTTTTGATTTTACAGGCTCATAGGCAGAAGGGACTTGC
CTTATCTCAGGTGAGACTTTGGATTGTGGACTTTTGGGTTAATGATGAAATGAGTTAAGACTTTGGGGGACTGTTGA
GAAGGCATGATTGGTTTTGAAATGTGAGGACATGAGATTTGGCAGGGCCAGAGGCGGAATGATATGGTTTGGCTCTG
TATCCCCACCCAAATCTCATCTTGAATTGTACTCCCATAATTCCCACATGTTGTGGGAAGGGACCCAGTGGGAGATA
ATTTGAATCATGGGGGTGGTTCCGCCATACTGTTCTTGTGATAGTGAATAAGTCTCACAAGATCTGATGCCTTTATT
GGGGGTTTCTGCTTTTGCGTCTTCCTCATTTTCTCTTGCCGCCACCAGGTAAGCAGTGCCTTTTGCCTCCCACCATG
ATTCTGAGGCCTCCCCAGCCACGTGGAGCTGTAAGTGCATTTAAACCTCTTTCTCTTCCCAGTCTCGGGTATGTCTT
TATCAGCGGCGTGAAAATGGACTAATACACTGTGGTTATGTATTATAGTCATATGATATTTTCATATTTTTGGAAGC
TGGGTGAAGGGTAGATGTGGAGACCATGATTTTTGCAAATTTTTTTAAGTTTAAAGTTATTTCTAAATTAGAAGTTT
AAAAAGAAGAAATCACATAAGCCATAACACAATAGAAAGATGTCTTTAAAGTTCAAGGCAGGAGGGATGTCTGGAAA
TCAGCGAGAAATTTGCACCTGTGTGTGCATGTGCATATGTGTGTGTGTATGTTGCAAGGACTTGGAAAGCCCTTTTT
TTCCTACCTCTGTACTACTGTGGGGGGAGGCTAAACTTGACTTCTTCCCATCTTAGTTCTTTTTTGGGATAGACTCC
TGTAACAAAAGACAGACAAGAGAAAAATCAGCTTACAACATGGGCCATGCACTTCACACAGGAGAAACCTGCATGAA
AAGTAACTCAAAATGGTGCCTTAGAACTCCACTTACCTTTAGTAAAGAGCAATAAATTAGCAGGAAAATCATGGATC
GGGACAAGGGAAGTGGTTTTATGCTTCCAAGGGCAGGAAATCATGGAAGGTAAATATATGGGAGGAAACTAAAGGAA
TAAGGCTTGTTTGCATATTCCTCTGATGCCATCTCTGGGTTGATAAGAGTCTAGAGTCATTTCCAGTAAAGATGAAT
TTTTATCTGTCTTTAGGAAGAAAGGGGGAAAGATAGAGAAAACTATTTCTCCATTTGCTGTTTCTTAATTACCTTCA
GTTCAAAAATAATTTTTATATCAGAAAGGCATATTTAGAGGTATGTTAGTTTATTTTCACACTGCTAATAAAGACAT
ACCCAAGACTGGGTAATTTATAAAGAAAAAGAGGTTTAATGGACTCACCGTTCCACATGGTTGGAGAGGCCTCACAA
TCAAGGCAGGTCTTACATGGCAGCAGGCAAGAGGGAGAATGAGAGCCAAGCGAAAGGAATTTCCCCTTAAAAATCCC
CTTATAAAACCATCAGATCTCGTGAGACTTACTCACTACCACAAGAACAGTATGGGGGAAACCACCTCTATGATTCA

ATGATCTCCCACTGGGTACCCCCCAACAACACGTGGGAATTATGGGAGCTACAATTCAAGATAAGATTTGGGTGGGG
ACACAGACAGACCATATCAAGGGGTAACATAGTCTGGTTTCCTTTACTACCCACCTACCCAAACACCCCCTTCATCT
GATCCACACAAAGTAAACTCTTGCAGTTCTCTCACTGTTTCCTGGAGTCTGCTTTTGGTCTCATAGGACTGCCCTAA
CGCTTGTTTTTCAGACGTTTAACCCTGTAGGTCTCTGGACAAATTTGCTTTAGAAGCCCCTCGATGTCGCCCTGAAG
AGTGGCTTTCAGAAGTTGTGCCTCCTGCCTGAGGGGAGTTCCAGGAAGGGTTCTGCATCGCCTATGAGTTTATCTGG
ATCACCAGAGGCCTTCCCGTCAGAGCTTTCCCAATCGTTTTTGGCCAAGGAGTGTGAGAAGCTAAAGTTCATAACAA
CTGGAAGTCAGACAGCCTGGTCTATTCTGCTTTAACTCTAGCAGGAAAGGCCTTCATGGTGGGGCCTGAATATCTTC
CTTTATAAAATCAAAGCCTGGGGACAGGGTTACTTACTTCTGAGGTTCAATCTGGCTCTAAAATTATGCAACAAATG
CCATTCCTTTAGCACTTCCTTCCTACCGGGCGAGATACTCAACTCCACAGGCACCACCTCAGTTCATCCTCTCAGAA
GTCCTAACAGCTCAGCCTGGGGCACCCCATTTTACAGATTAGTAAACTGAGGCTAAGAGAGGTTAGGTAGCTTGTTC
AGGGTCATGCTGCTGGTAAAAGAGCTCAGGCTACAGTGCTATGCATTGAGTTTTCTCACTTTCCCATCTAACTGGAG
GGCTAAAGGTCAAAGAGTGGGCAGCTCCCTTGTTGGGAGCTGTACAGGAATAATGTCCTCCCTGAAGGAGGGGGACT
TCTGAGCCACACCCTGGGGTCCAGGGCTCACAGCCTTAGGAGCAAAATCGTCCACCCCCTTCCTGGTTCCTCGGTGC
TGCAGAGATATTCATAGGACAGAGTCTGAGTTCTGGCCACTTAACAGAGGAAGAAAGGCTGGCTCGGTGAGGTTAAC
TTACATCCCAGCAGCTAGGAACCGGGAGCAGAGGACCTCAGATTCACACCAGGGCAGGAGGCAATGGCCTGGCTGAA
GCCTTCACAATCTTCCCAATATACTCCGCTGCCTTCCTTTATAAGGATCCATTTCTGAAACCCTGTGCCCTGGCCAG
GCACGGTGGCTCACACCTGTAATTCCAGTACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGAGGACCACGAGGTCAGGAGTTTGAGAC
CAGCCTGGCCAATATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATAGAAAAATTAGCGTGGTGGCAGGCGCCTGTAATCCC
AGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAACTGTTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTCTCAGTGAGCTGAGACAGACAGTG
CCTGGGTGACAGACAGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAACCCTGTGCCCTAAGACCTGCACAC
TCGCTGGCTCCGCTCAGACATTTAGCAAAGCAGACACCTTCCCAGGCCTGGAGGAAACAGCCCCTGCTTTTTGGGAA
TCCACAAGCCCGCAGCTGCAGAGCTCGACCTGGATGGGCAGGCAAAGGCTGACTCCTGTGCGTGGTGTGAGTCCAGC
CTGGCCCCTCTACACCCTCACTTTCACCTCTTAAAGAACTGCCTATTAACAGAGCAGGTACTGCCCAAAAGGAACAC
TCTGGAAACTTGTTGGGACACTTCTGCCTTTCACAAACGTTTGGGGGGAGTACTACTAGCATTTAAGGATTGAGGGT
TAGCAATGCCAGACATACCAGAACACGCAGGGCAGTCTCCCATGATGAAGAGGCCGCCGGGTTCCCCAGGACTCACA
TGTCCACCTCAAGTTCACGTGGGATTATCTGAGCCTAGACTGTCAGTCCTGGGGCTGCTTTATTTCATATAAAAATA
TAATATTTATCCAAGGTTTTACTACACACTGCATTTTCTGTGAAGACAATGACCGTGTAAATCAGGGAAAGATCTAT
ATTTTATTTTGTTTGAAACTTTACCAAGCATTATTTACCATTTCAAAAGCTCTATCCCTGGTAGTACCATTGGTTTT
CTTGTTCACCGGCCAGCAGTGAGCAGCACACAAGCGACCTCCCGTGGGCTCCACATTGGACAGCCTCACTGCACCTG
CCCAGGCCCTTAGGCCACAGCACTGCCATATTCAGGGACACATTATTCTCTTTTATTATGCCTCCATATTATCATTA
CAGCATTATCTTTTTTTTAATTTTGTGGGTAGATTATATTAGCTATACGTTTCACTTCAATGGTAGTAGTAAGGGGC
ACATAACAAAATATTTACTTATATATATTAAAAAAGAGAGTCTGAGAAGTCTGAAAAGTTTTGCCATAAACGGTCTC
CACCAGCCTCAACTCTGAGTGCCCGAGGATTCAGTCTCAAGTCCAGCAACATTGTGAAGCAGGAAATTTACCTTGAA
AGGAGCTATGTACTCTAAGTAGTGATTTACCTGTCTGCCTCCCCCACTGGATTGACCAGTTCCTTGGGGGCTGAGAG
AACAGGTCCTGAACATTTCTGCTGTGCCCCCCAACCCACATCCTCATAGTGTCCAGTACCAGGCTGGGGACTCAGGA
AGCATCCATGGGATCCCCCAGTGCCTTCTTTCTCGAGGTGTTCAGCACCTAGAACAGCTCAAGACAAATTCCCCACA
CCCCACCCAGACAGAGCTGAATCTTACTGGGGCGAAGCCTTGAGTTGCAAGGCAGAAGCTCTCGTGATGGGATTTGG
GTCATATTCCGGGTTATAGGAGGAGCTGGGGAGTATGGGAAGCCTCCCACTTGGTCTTTGGTTTTCCAGAAACTCCA
CCATCACAAGCAGGATGTTAATCAGTAACCGTCCCACAGGGGATCATACTTTGGAATAGCAAATATTTGCTGAAGGT

TCTGGGCTGCAAAGCTGAAGCTTTGGTTTCTGCTCTAAATGAAGGACTTTTCCAGGACCCAAGGCCACACACTGGTA
AGAGGCAGTGGGTTACAGGAGACCTTCAATGAGTCTAATCAGGGAGGGACCGGGAAGGATGGTATCATCCCTGGGCG
GGCTCCAACGTGAGGGCTGTGTGGCTGAGCAGTGCAAAGACCTCCATCCTACACTCCACAGGGACTGTACATACAGA
TTGGGAGCTGGAGTGGGGTAAGAGGCGAATTATAGACACAAGGGGCTCCTCTGCAGGAAGGAGGCCAAGGGAAAGAG
GCTTGAAAGGCTTGATATTTCACCCACCACCACTCACTGCCGGAGTAAGCAGGTCTCCCCTTCCCAGGGCTGAGGGG
AGGCAGGGATGTGTGCTGTCCCAGGGCTGAGAAGTGGCAGGTGAGCTGGTGATTCCTTACTGCCCAGGTTCTGTCTA
GGAAGGTGCGTCCTCACCATGCTGGATGGTGTCCTAGTCCAGGAGCACCCCCTGAGCTCCTGGCCTAGACTCCAAAG
GGTTGGGTAGATGAGCAAAGACTTTACAAAGACCTTAGGCGATATATGTCCAGGAGCACCCAGGAATTACTGGGCTA
CCACTGCAGACTGCAGGACAAGCTCCAAGAACAGGAAGGTAAGACTCAGCATTTGGAGGTGGTGACATCTAGTTGGC
GTGCTGGGCTAATTTCCTGACCATTGTACAGGGAGAAGTAACCTTGAATTCAGGAGTATTCTGTGTGGTCTTAATGT
AGAAAGTAGCACTAAATGATGCCACGTAATCGTTTTAGCTCAGGCTCCTCTAACAAAACACCACAGGCTGGGTGGCT
CCAACAGCCATTGATTTTTCACAGTTTTGGAGGCTGAAAGTCCGAGTCAGGGTGCCAGCGTGGCCGGATTCTGGTAG
GGCTGTCTTCTTGGCTTGCAGATGGCCACCTTCGCACCGTGTCCTCCCATGGAGAGGAGGTGCGGAGGGGGACTCTG
CTCTCTTCTTATGACAGCACTAGTGCTATCACAGGGGCCTTGCCCTCACGACCTCATCTAAACCTAATCACCTCCCA
AGCGCCCCAACTCTATTGCCATCACAATGGTGGTTCGGGCTTCAACTTATTAATTCTCAGGGGACACATTCAGTCCA
TAACAATAAAAGCGTGAAACTGGGCTGCGTTTACACTGAAAGAGCTATTTACCCAACGTTTACAATACTTGGGTGAC
CTGTTGAATGCAGGCTTGCCATTTAGAGTCAAAAAGAGCTTCCTCAACAGTGTCCTTTGGGAAACACAGTGGAAGTA
TTTCACTGCTTCTACAGGGGAGAGGGTAGTGCCGTTCAGACTGCAGAGTGAGGCCCTGAATTCCGGGGTGCCATTCA
GCCCGAGCAAGGGGCAACATGCTGGGCCCTGGCGCTGGAGGCGGTTTTGTCCCAGGCATAGATAAGGACTCAGCCCC
TGCATCAGGAAGAGGCCTGGCAGCACCGCCTGTCAATACATTTTGCCGCAGGTGACCTTGGTCAAGAATAAGGGTCT
CTGCTGATGGGAACTACTGTGAGGCCGGCAGCATCCACCCTGCGCTCACTGGGCTGGGTGGCCTACCCCACCCAGAC
CCTCCCAGGGCAGTGGGCCCAGAGAGAGGATGAGGGAGGGCAGGTGTCCCAGGGGTTCTGCCCAGCCAGCCTCTGGG
ATCAGGCCTGCAGTGTGGCTGAACACCAGAACTGAGTTTGGACACAGCCAGGTGGCCCAGGCCAGTCCCAAGCCATG
TATTTGGATGGAAAACATGGAAGTATTCAGGAGCCAGGCTCTGTGTCCAAGGATGTGGAGGGAGCCTAAAAGGCGAC
AGAGAAGGGGACAGCTAACGGTGAAGAAGTGTAGCTCCCACACTGCAGCCTAGGACAGTGAGAACCGGCATGCAGCC
CAGGTGGCTGAGGGCTCTATGAAGCCACAGTGGAGGGAGCCCAGAAGTGGGTTGTATGAATTGCGGGGCCTCCTGCT
ACCCGGGAGCTGCAGCTATAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGACCTCCAAGGAACTGTGTAGCAGAGGTGCAGTGCAA
AGAGAATTTTGATAAAAAATCCAGGAAAGCTCCAATACTTTCCCCCTTCCTTGCCTAACGGGCATGCAGGCACTCCA
ATCCCCAGCCAAACAGGGCACTGGGCAAGGCCGGCCACCCATCTGGATGGGCAGCCTGACGACCAGATGGTCAGGGC
AGTGAATGAAGCAGATCAAGGAAAGGTGTGTGAGGACCCCTGATTCCACCTGCTTGGACCCCCACCTTCTGTGCTGC
CTCCTGCTCCCAGAGTGGACTCTCTTGCCCTGGCCCTCAGGGAGGAGACGGGATGAATGAAAACGGGGTCAGGACTG
AGAGCTGCCTGCCGGCCTGGCAGGGAATGGGAACTGGAGGAGGTTTTGCTCTGTGAAATAATGTCCCCTCTTTGGGT
GAGCAAATGTCACCCACACTTGCTCTAGGTCTCCCTGGGGCAGGGCTAACCTACTTGAGCCACAGGAAGGAGGCAGG
GTCCCTGAAGAAGCTTTTACTATCCACAAAGACATTTTAGGAGGCATTAAAACCATCTCTATCCTCTCCTCTCCACA
GGAAGTCTTGCAGCTGAAGGGAGGCACTCCTTGGCCTCCGCAGCCGATCACATGAAGGTGGTGCCAAGTCTCCTGCT
CTCCGTCCTCCTGGCACAGGTGTGGCTGGTACCCGGCTTGGCCCCCAGTCCTCAGTCGCCAGAGACCCCAGCCCCTC
AGAACCAGACCAGCAGGGTAGTGCAGGCTCCCAAGGAGGAAGAGGAAGATGAGCAGGAGGCCAGCGAGGAGAAGGCC
AGTGAGGAAGAGAAAGCCTGGCTGATGGCCAGCAGGCAGCAGCTTGCCAAGGAGACTTCAAACTTCGGATTCAGCCT
GCTGCGAAAGATCTCCATGAGGCACGATGGCAACATGGTCTTCTCTCCATTTGGCATGTCCTTGGCCATGACAGGCT

TGATGCTGGGGGCCACAGGGCCGACTGAAACCCAGATCAAGAGAGGGCTCCACTTGCAGGCCCTGAAGCCCACCAAG
CCCGGGCTCCTGCCTTCCCTCTTTAAGGGACTCAGAGAGACCCTCTCCCGCAACCTGGAACTGGGCCTCACACAGGG
GAGTTTTGCCTTCATCCACAAGGATTTTGATGTCAAAGAGACTTTCTTCAATTTATCCAAGAGGTATTTTGATACAG
AGTGCGTGCCTATGAATTTTCGCAATGCCTCACAGGCCAAAAGGCTCATGAATCATTACATTAACAAAGAGACTCGG
GGGAAAATTCCCAAACTGTTTGATGAGATTAATCCTGAAACCAAATTAATTCTTGTGGATTACATCTTGTTCAAAGG
TACTTTGATAATGTTCTGCTCTCCCAAGGCCACAGGGCCCTACGATTGTCTCTCCCTTTCCTTTCGTTAGGCCAGCA
TATGATTAACGCTACGTGATTTTCTATGAATGTGTTTTCACGTTTCAAAAACAGATTGATACACATATTGAACAGTG
CCAGACGCTGTCATTTGAGGCCCTTCCCTGGTATCCTATGTGCTTGTAGTCCTTATTATTTTCAGAGCACTCTACAT
AGCTCCCCTCTGACACTTAGAAGCATAGGGTCTTTCCAAAAAACAGGGGGCTGGGGGATTATCTGGGGGATTTAGGA
TTGCATCATTGCTCCTTCATTTTTACTTTTTGACCAACTCTCTGCCCTTAGATTCCTATTATAGAAAATAGGGACAC
TCCACCTACTACAGTGTTAGAGGCTAAATGAGACAATGAATGTAAAGTGCCCAGATGGGCTTGGCACATAGCAGACA
CTGAGTATCTATTGTTTACTTGTTCTTCCAAACTGCCAATCAGCAGGTAGAGCAGGAGTTGTCTCCTTTCTAAAGAT
GAAACCAGCTCAGAGACGTTAGCTTGATCAAGGTCACACAGTAAGTGGCAGAGGCAAAACCCAAACAAGGGCCTCCT
GACCCCCTGATCCTAGGTTCTGTCCAGCCCTGCCTCCCTAATGGGGCACTGGACGTGGGTTGGATGCCACTTTCGCA
GAGCTGGCACCAGACTTACAAAGCCCCGGCAGGGGAAGCCACTTTACAACCAGCCAGGCCACACCCCCAGGGCAGAC
GTTTATGTAGAGAGTAATGTACCTGCCTGCTAGTAGCCTCTGCATTGTGGGGCCTTCTCTCAGAACCACACTAAACA
GTGGGTGGGTGAGAAGTGTCACTCCTGCCACCTTGGACTCTGCATGTGCTTGTGCCTGGTGTGAATGAGACAAAGTG
GCAGTCAGAGGTGCCAGGCAAAGGCTTTTCTCTAAGCTGGAGCCAACTATGAGGGAACGACTGTGAATTCCGTTCAG
GTCCAGGACAATGAGAGGAGCCAGGGATTGTTAGGAAACATTTCCCTGCTTTCGTGTGCGATTCCCAATAGGGCCTG
CGAGTGGAGCTGCATTTTGCTAGCTGGGCTAGAGGACGGGGAAAATTTTGGGGAAATTTATTTTGCCTGCCTGAGCT
GTGGAAAAGCCAACCCAATTAGGGAACGCCTTTCCTAGTTGGAACGAGAAGACGAGAAGTGAGAGAAGTGAGATAGA
AGGCTCCCTCTCTATTATTTGAGCAAGAACAATGCTTTTCAAAGAGGGAATTTCTGCAATGAGTTCTTCTCTTACTT
GTTCAGGGAAATGGTTGACCCCATTTGACCCTGTCTTCACCGAAGTCGACACTTTCCACCTGGACAAGTACAAGACC
ATTAAGGTGCCCATGATGTACGGTGCAGGCAAGTTTGCCTCCACCTTTGACAAGAATTTTCGTTGTCATGTCCTCAA
ACTGCCCTACCAAGGAAATGCCACCATGCTGGTGGTCCTCATGGAGAAAATGGGTGACCACCTCGCCCTTGAAGACT
ACCTGACCACAGACTTGGTGGAGACATGGCTCAGAAACATGAAAACCAGGTACAACTCTTGCCCACACCCTATACAA
ACTCTACCTTTCTGTACTGGCAAACGCTCAGCACAATTTCATTGAATGCACCGTGATTTAATGTCTCCTCCAGTGAG
CTATAAGTTTCCTGAAGGCAGGGCAGCATTTGTCTTTTTTTCCACTCTATCCCCAGCATCTGTCACAGGGTGCCTGG
CTGATTCATTCATTGAGTCCATCAGTATTTTACGTTCTGCGACTGTGATAAATATATGATGCCAGGGATCCATCAGC
AAACAAAACAGGCAAAATTAGTCTGCCCTCATGCAGCTTACATTCTATTGAAGGAAGACAAAGAGTAAATTAAAAAT
AGGTAATAATGCAGGGAAGGGGACAAGAAGCATCATCAGGATGCAGATGGAGGTTAGACAAGGCCTCTCCAAGAAGG
TAACAGTAAGCAAACATCTGAAGATGAAGGATAAACCATGTGGATATATTCGGGGAGAGAAGTGTTATGTTACAGGC
AGAAGTGTACAAGTTCTGGGATGGGAGTGTACCTGGTGGGTTTGAAGAACATCAAGGAGACAAGTGTGGCTTCAGCA
GTTGGAGATAAAATCAGAGAGGAAACAGGGGCCCAGTCCCCAGAAAAGACTTGGGCTTTCCTGAGAGAGGCAGGAAG
CCACTGGATGGTTCTGAGTAGAGGAGCAACCTGATTTTGACTTCTGTTTTTAAAGGATCACATAAGCTCCTGTGTTG
AGAAAAGACACTAGGGGGTAAGGATGGAAGCAAGGGAGAGTGGTTAGAAAGTTACTAGCAATCCAGGTAGAGATGCT
GCTACCTGGACTGCGGTGGTGGTAGTGGAAGTGGTGAGAAGTGGCTGGATTCTGGATCTATTAGGAAGTGCAGGATC
TGCTAATCGATTGGATGTGGGTGAGAGAGGTGTCAAAGGTGATCACAAAGTTTTTGGCCTTAGCAACTGGAAAGACG
GATTTGCCATTTACTGAAAGGGGGAGGAACAGGTCTGGGGTAAGTGCAGAAGTTCAGTCTTAAACACTTGGATCAGA

AATATCTATTAGACATCCAAGTTGAGATGTCAAGACGACAGGTGGATCTGGAGTCTAGGGTGAGGTCCAGGCCGGAG
ATATAAATTCGGTCATCAACACAGAACTAGAATCTAGACACATGACAGGGTTGGGGTCTGTAAATATAGAGGAGAGG
AAAAGAAAGCACAGAGTGGGCACTGAAATGTCTGCCCAATAAATTAATCCACCTATTGGAGTACAAGGAAAATGGCT
GCAATACGAATTCCATGGCTATGGCTTCTGAATCCTGTGACTCAGATTTTGGCAGACAAGTGCAGCTAAAGGTCCCC
AGGGTTAGTTTTATCTTCATTATTCTTCTTTCATTTTTCTTCATATCTTTAGCACCTAACAATGAACCCCAAACATC
ATAAGCCCTCAAGTAATGTTTGCTGAATGAATAACTTTTTAAATTAATCTTCAAGACACGTCATGTCCTCAATTATT
TTTAAATAAATAAAAAAATTTTATTTTGAGCCACAGAACTCATCTTTTCAAGCAACATATTTTCAAAGGAGGACTCC
AGTATACAAAATAGATGGTATCAGAGCTTCTCTGGCTAAAGACGGGTAGGGGTTGAAAGTTTTCTTTGCTCCCCTCC
CCATCCATCCCCAGACTCCTCGGGTCTGCAGAATCCAGGAGCTGAAAACAGCCATCATCCAGGAGGCTGCAGGACTG
CTGAAAGCAGCTGTTAACTCAGGTTTTTTTTAAAATATAGGGAAATGAACACATAAGTACTTTGCTAAAGAAAACGT
GAGTCACTGGCTGAGGAATAAAACTCATTCACTGAAGCTGAAGTACTATTTGATAAGCTAGAAATATTTTCCCTGAG
TAGACCACTGTAAAAGAATGGCATGAACTACATAGTCAACTGAAAGACTCATTAATGGAAATAATCTTAAAGAACAA
AAATTGTGACCTTTTTGGTGTCCACAGACTAGGGCTTTGTCTACATTTCACCATCATCTGTTCTTGTACCACAGAAA
CATGGAAGTTTTCTTTCCGAAGTTCAAGCTAGATCAGAAGTATGAGATGCATGAGCTGCTTAGGCAGATGGGAATCA
GAAGAATCTTCTCACCCTTTGCTGACCTTAGTGAACTCTCAGCTACTGGAAGAAATCTCCAAGTATCCAGGGTAAGT
CAGGATCTTTCATCAGAGCCCAACCTCAGCATGAAATGTCACCAAAACAAATGCTTTTACAAACCATTTAACTTTGA
TAAAATACCTAATTGTAGTGGAAAATTAGATTTAAGTCCCAAATACTTGAAATAGCACCCAGGTTGGATGTTTTAAG
AATTTCAAGCAACTTCATTAAAATAACTTTTCAACTAATTTATTTTAAGCAGACCTCTCCCCCTCTGCTTAAAGTGC
TCAGGGAGAAATTTGACCCTGAAATAGAACTGGTTTACAGAGGCATCATCATTTATGTTGAATACAACTTGAATAGT
TCATGAAATTACACCACCTTTACAATGAAACAAACCCCTAGACATCATCTAGCCCAACTTCTCCCTCCTTGTGGAAA
TCCCCTCCATAGCCCTACGAAATAGCCCTCCAACTTCTCTTCCTCTTCATGCTTCCAGTGACATCAAACTCACCATT
TCTTTGAAGAGCTGCCCAATCCACAAATAGCTAAAATTGTTATATGTATATATATATATGTGTGTATATATATGTAT
ATATGTATGTGTGTATAAATGTATATGTGTGTATATGTGTGTGTGTATATATATATACACACACATATATATATATA
TGGAGAGAGACATACATATATATATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTCCTGTAACTTCTGATTCATACTTTTTGGTCC
TAGTTCTATCTCTAAAACTTCTAAGAACAAGTTTAGTCACCATCCACATAGAATCCCTTCAGTTACTCAGTGTTTCT
CAGTGGAAGGGTTCTTGGTTTTGAGGGGAACTGCTTGTTGTCCAGAGCAGTTGTGCATGTTGCAGGGAACTGGTTAG
CATTGCTGGCCCATGTTCACTAATGCCAGTAGGAAACTCCAGTCATCACTATAAAAATGCTCCCACACATTTCCAAA
TGGCAGCTACATCTCTCTACATTCTTCCTTAGCTGTGTGGTTTAATATTTTCTTATACAATTGCAATTTTCAATTCC
AAGAGAGACTAAAAATGGCATCCACTTAAGTAGGACACAGTAGGGTAACTGTGGCCTGGAATCAGGTCTTACAACCT
CAAGAGAGGTAAGACAATTAAATAAAACAATCCGTCAGACCAGCACCTGAAAGTGTTTCTGCTATGAACACATGAAA
AACTGAAATGCGCTGCTGCTTTATGAAGGGTCATCATGAAATTTAAACTGTAAATGATTAAATATTCTCCCTCTGTT
TGCTCTGGGGAATTAATTTTCCTCTAGGAAATCAGGGAATTTCCTGGAGTGAAAATCAGTGTAATTACATGTTATGT
TTTCATTATCTCTTATAACACAGTAATTATATAGGTACATCACTCATATCACATCTTGTTTCTGTAAAAAAGGGCCT
CCCAAACATAGCAAGCAGCCACAGTATAGGCAGCCAGAATTCAGGAAGGCTCCAGGGACCCCTGGGCTTGGCCCAGA
AAAATGCCTCAGAGTAGTACCAGGTGCTGGGAAGCTGCTACAGAAGACTAGCCATTCCCTGCCTCCACCTTGCCTGC
CAAAAGGAAAGTCAGAGGACTCAAGGGATCCAGGGATCAAGGGATCCAGGCAGCTTGAAAACCTTTTAGGAGCACCA
GCTCAGCTCAAGAATTAGTAGCATAAATTACATGCTCAATAAAGATTTGATGCATGAGTGCATCCTGAGTCCATGCC
CGGAATGTGTTTCACATATTCCACAATACTTCACATTGGGTTCCTGAGGTCTCCTGGTATTGTTTAAGACTCCTGTG
GCAGTCCCTGGTGCAACCCCAGACCACTCCTCTTAACGTAGATGGGCCTGCTCCACTAAATCCCAGGAGCATGACCC

CATGGGTAGGACCACTGTGAAGAATTTCAAGGGGCTCATTTAATTCCTCCTTTGCACTGCCACACAAATGGTTTTTC
ACATTATTTCCTTTTTCCAGGTTTTACAAAGAACAGTGATTGAAGTTGATGAAAGGGGCACTGAGGCAGTGGCAGGA
ATCTTGTCAGAAATTACTGCTTATTCCATGCCTCCTGTCATCAAAGTGGACCGGCCATTTCATTTCATGATCTATGA
AGAAACCTCTGGAATGCTTCTGTTTCTGGGCAGGGTGGTGAATCCGACTCTCCTATAATTCAGGACACGCATAAGCA
CTTCGTGCTGTAGTAGATGCTGAATCTGAGGTATCAAACACACACAGGATACCAGCAATGGATGGCAGGGGAGAGTG
TTCCTTTTGTTCTTAACTAGTTTAGGGTGTTCTCAAATAAATACAGTAGTCCCCACTTATCTGAGGGGGATACATTC
AAAGACCCCCAGCAGATGCCTGAAACGGTGGACAGTGCTGAACCTTATATATATTTTTTCCTACACATACATACCTA
TGATAAAGTTTAATTTATAAATTAGGCACAGTAAGAGATTAACAATAATAACAACATTAAGTAAAATGAGTTACTTG
AATGCAAGCACTGCAATACCATAACAGTCAAACTGATTATAGAGAAGGCTACTAAGTGACTCATGGGCGAGGAGCAT
AGACAGTGTGGAGACATTGGGCAAGGGGAGAATTCACATCCTGGGTGGGACAGAGCAGGACAATGCAAGATTCCATC
CCACTACTCAGAATGGCATGCTGCTTAAGACTTTTAGATTGTTTATTTCTGGAATTTTTCATTTAATGTTTTTGGAC
CATGGTTGACCATGGTTAACTGAGACTGCAGAAAGCAAAACCATGGATAAGGGAGGACTACTACAAAAGCATTAAAT
TGATACATATTTTTTAAGATGTTTGTGCAATCTGTCTGGTATTTTAAGCTTGTTTCTAAGAACCTTAGTTACTTGGC
TAAAGACTAGCTGGGTAGAATATCTTTTCTCTGTTGCTCACATATTTTCATTTTTAAAAAGTTGCAGATGAGAACAC
TATGTCAAGATAAAGCCTTTGGGAGGAACACATGTAAACATTCTCCTTGAGTCATGTGCTTCTCTCTCTTTCCTTCT
CTCTGGTGCAAAATAAGTGTTTTATTTTAATCTATTACGGAGTCATTTCTTGCTGACTGACATCAGAAGAAAATAGC
TCTAACCAGTCCTGATCACAGCATCTGCTTCCATGGTGCATCAAATCGCTTGGCAGAGGCATTGGCTGAATCACAGA
TCATCTAGTTCAATACCTTCATTTTACAAAGGAAAGAAAGAGGGACCCAGAAACAGGTCCATATTCTTACTTTCATG
GGCCCTAGGCACGTTTAACCTTGTAGACTCCTCCTTCCTTCATGAAGATATATATGTTCTATGGCTGCATTGGTAGA
AAGATGAATATATTCGTCTTTCAAAGTTGCATATCTAGCTTCAAAGTTATATGTCTAGCATATGGCAATAAGCAAAA
CACCTTCATGGGCCCTTACAGTACTGTCAGCCTTGGGCACTGTGTCTTCTGCATCTAGTGGATAAGTCATACCTTAT
ATACCAGTGGGAACAAAATACTTGTCCAAGGTCTTCCAGTGTGGCAATGGCAGAGTCAGAAGCCTACCTTTCCTGAG
TCTAGTCTCCAAGCCCTTTTTACTCTTCCTTCCATCTAAAACATCTGATGGGGACCAGGTAAACAGCATGCACTACA
GCTACCCATGGGGGTTAAACAGAATATAAGCATGAACTTTGTCCCAGGGTGAAAAGGAAAATCGTAAATATCCCTGA
TCTTCCTTAGGCAGTTATTTTCTGTCACAGAAACAGAAAAGACTATATTCAGAGAATCCTGAATAGAGCTGATTTAC
AGTGTGAACTATGTTAACTAAATGCCTAATTGGATTTCTGTCTGTCTGCTATCTAATGTTTAAAAAAACCTAAAATT
CATTTATTGATTAGTTGTTTAATATAATTCAGAGTAATGTGAATAGGTAATAATATTAATATGCAGTCTAAATACTG
ACTTTTCATCATTCCATAACCTGGACTGATGAAAAGTCAGTATTTAGACTGCATATTAATAAAATAAAATTCATTCC
TGTATTCATTCCAAGAGTACTAATTGACACTTATGAAGGGACAGGCAATTCTAGGCCCTAGAGGGCCAAAGACAGAG
GACTAACTCTATCTGACATTCTTAAGTCACCTTGTTTGTGTTCAATTAGTCAGATTTGTTTGTGGAAAAATAGTAGA
AAGAGGAATAAAGTAGCATCCAGTCCAATTTCCCACTTTTAAGAGATGAAATCTGGAAAAATAAGTCTGTGAGAGCA
CAATACTCACTGAAATCAATATGGCCAAACCCAGTAATAAAAAGGTACATTATTATTGAAGGATTCATATAGCATGC
AGATAAAAAACTCCTGCCTTCTTCCCACCACATACACTGCAAAGCAACAACAGCATAATAATTGTATTTAATATACT
ACTCTTTAAGGTAGAAAATGGACCTATTCTATATTTTAAATATACTTTTTAATGTTCCCTCACATTTGCTTTAAGAA
GTTCCTAAGACACTCAGTTTCAGATTTCCCAAGTACACAGGCATGACAGAAAAACGCAGACCAATAAAAAATGTAAC
TTACCTTACACAAATACATACACACAAATTCAGGGTTTCCAACCGAGCGGGGGAAATCTTAACATTGTAGAAGTCTT
CACTATATATGTGTCGAGTTTTTGTTTTTGTTTTTGTTTTTGTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTCACCCAGGCTG
GAGTGCAGTGGTGCGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCGTGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG
AGTAGCTGGGACTACAGGCACCTGCCACCACGACCGGCTAATTTTTTGTATTTTAAGTAGAGATGGGGTTTCACTGT

GTTAGTCAGGATGGTCTTGATCTCCTGACCTTGTGATCTGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCA
TGAGCCACCACGCCCGGCCAAGTGTCGAGTCTTAAAAATTGTTCCTACACAGACACACTCAACCACACGTTCTCACA
TATATATGCTGTAACAACTGAGAACAGGTTACTGACTTAATCTAATTCATTCTATCTTCATTGTAAAACTTCCACTC
CAGCTGAAGAGCCTGTTTCATTTCAATTCAAAGATTTCTCATATATCCACTAATTGTATGGCAAAACTGACTCATCT
CCAGACTAAGATATTCAAGCTCAGGAAGTCAAATAATAGAAATGATTTTTTAAATGTGTAAGAGGTTATAAAGAAAA
ACTTTATGTGCTCCTTATTTAACCTCTATTAAGTAAAATCCTTTATAGACCTATCTCCATTTCTGCAGTAAAAGTGA
GCTCTACAGTTAGCTTGTAAGGCTAACTAGTGAAATTCCTGGACTTGTTCTTAAAAATGCAAGTTTTAGTAATTAAC
AAAATGATGATGAAGATGTCCCTTTTCCCTACAACTACAGATGGAGGGAGATTTTTCTTTGCCATACAACTAGCTTA
AAGGATTAATTTGATAAGTTGTTAAACTGAGAACTTTCACAAAAGTATCCATCTTGTTTTTGATATAAATGGAGATA
CATGTAGTTATTCATAACTGTCAGTAATTTGCTGTTTATCCTGTTTCTATATATCTGTCCTTGAGAGTATAATTTTA
ATAAATATTTCAAAGATTTTAGGAAATGTCATGTTCTGTTAAAAAACTTCCAAAAGTAATTTTGATGAACAGTTTTG
ATAACTTAGTACTAACTAGGACTAAGACTGCAATTGACTGCTCTACATTCCTGAACTTTATAAGCAGTAGTTGTTTC
TCTCTGTCAAATCAGTGTCCCCTTTTCCCATTTGCATCATGGGAAAGTGAAACCTTATAATTCTGCTAAATTTATTA
TAACAAATACATTGAAATTCTCCATTTTATTAAATTAATAGAATGTTATGAATCAAAGCACCAAAAAAACTGATGCA
ATTTTGATGTCTCGTTCTGTACCACATTCTCCAGATCTTAATATATTCAGTTCCACATTATTGGTGCTAGTAGGAGA
CATAATGAAAACAGTTAAATGAAATCCACAGCGAGTATACTGATTAACCAGTACTGTCAAATTTCTCATACCTATTG
AATTTTAACTACTGACAAAATGAGCAGTAACAATTCCATTTACCTGATTGTCCTTTGGCAAAGGATATTATTAAGAA
TCACTAAAAATAGCCATAAAGAAGCCATATGGAAGGAAGAAGGAAAACAAATGGCATGAAAAGGTCTCTCACTGAGT
AACTATGCTCTTATAGTTGACGCTGGTATATTTCTTTTATTCACTACCTAAAAATGAACTATCTTACTCTTTAATTA
TAGAATAAAAACTGCAGGAAAGTATTTAAGACTTTTTTTCACAAACACAGGTATCTCATTAACCTATGTTTTATTTT
GAGTAAATTCATTATTCATTATTTCACATTATAAAAAGTAACCACACATACATATGCATTCACAAATTAGATCATCT
TTATCATACATCAATATATTTTAAAAAACAAATATCTTCTAATATCAATATAGTTATATGCTGATTGCATTTTGAAA
TAGAGAAGCTGACAATAGCTTCACACGGTATATCTCAAGAACTGACAGTTTAAAATTAAGAACTGTATATATTCCAC
AGGCAAATTTTGATGGAAATATTAGCATTAGTACAAATAAATGCTGTTGACATAGCTTAAGCATGATAGCTTGGAAT
AACAGCTGATTCAGACTAGATTCATCATTTTAAATAAAGACAAGTACAATCTAAAATGTAAACAAAGTATTTATAAA
ATAAATTCTCTAGGAAATAAAGAAAATCATCAATCTATTATTTTTAAGGTATTTATAGCTCAAAGTTACCAGAAATC
TTTGTGGAATTTTCACTGCCAAATTTAAATTTGGGAATGTCCGGGTACAACATATTGTCACCACAATCCGGAGGGCC
GCCAAAATCGCAGACGGCTATTTGCATCCTTTCAGTGTGACTTTTCAAGTGGGCTTGGAGACTCATGAGAAAATGCA
GTATCTTTCTCACCTTCCAAGTCCCCCTCCAAGTGCTTATCAAGCTAGGACAATTCAGCTGATGTAGACTTTCATAC
GATTTTTAAATGCTAAAACTCTAGAACAATTAAATGGCTGGTTTCCTGCACAAATAAATGCAGACTTGTCTCTTTTG
CAGCAGTGGTTAAAGCACATTCCTAGAGATGTTTTTCATTACACTTCACTATAACATTGGAATTCCGTAACCACATT
ATTACTCAAGAAATATATATTATACCTCCTAGGGAATCTAATTTGAAATATGAAAAGTTTAACATCAGCTGTCATTA
TGTCTCTCTTTCTGCTCATTAACAACAACAAAAAAAAAAAACCCAAAATTTAAAAACAAAGCCCCAGCCACTGCTTTA
GCTTTTGTGTACCAATCACATTATCTCCTGCTGCCTTTGTTTTGCCTCCTTCATCAAGCAGTTGATTTAAGGATTGG
ATTTTCTGGATTTTCTTTGGGAAGAAAGAAATGAAGGAAGAGAGGGAGGGTGGGGAAGGAGGGAGTGAGAAAGGGAG
AAAAAGAAAAAAATATGAAAAATGTTATTCATATAATGTGTACAAAGTAAATTAAAAATATATAGATACTCTACTTT
GAATAATTCTAATATATGAGAAGT

[1181] 下表1提供了ZPI的寡核苷mRNA靶序列,以及转录本NM_016186.3中的相应位置。应当理解,SEQ ID NO:2至121是指人类(智人)mRNA序列。

[1182] 表1

[1183]

SEQ ID NO	寡核苷 mRNA 靶序列 5′ → 3′	NM_016186.3 上的起始位置
SEQ ID NO: 2	UUUGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	991
SEQ ID NO: 3	GCUGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	756
SEQ ID NO: 4	AUGCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	1390
SEQ ID NO: 5	CUGCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	757
SEQ ID NO: 6	AAGUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	1531
SEQ ID NO: 7	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	1156
SEQ ID NO: 8	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	1162
SEQ ID NO: 9	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	1159
SEQ ID NO: 10	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	1161
SEQ ID NO: 11	UUGAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	1160
SEQ ID NO: 12	AACUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	1154
SEQ ID NO: 13	AGUUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	988
SEQ ID NO: 14	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	758
SEQ ID NO: 15	CAUGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	1389
SEQ ID NO: 16	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	993
SEQ ID NO: 17	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	759
SEQ ID NO: 18	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	995
SEQ ID NO: 19	UGUUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	1157
SEQ ID NO: 20	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	990
SEQ ID NO: 21	AAGAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	763
SEQ ID NO: 22	ACCAUGCUGGUGGUCCUCAUGGA	1387
SEQ ID NO: 23	GUUUUGCCUUCAUCCACAAGGAU	989
SEQ ID NO: 24	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUUUU	992
SEQ ID NO: 25	CCUACCAAGGAAAUGCCACCAUG	1370
SEQ ID NO: 26	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGAAA	1158
SEQ ID NO: 27	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUUGA	994
SEQ ID NO: 28	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	760
SEQ ID NO: 29	ACUGUUUGAUGAGAUUAAUCCUG	1155
SEQ ID NO: 30	CCAUGCUGGUGGUCCUCAUGGAG	1388
SEQ ID NO: 31	GAGUUUUGCCUUCAUCCACAAGG	987

[1184]

SEQ ID NO: 32	UGCCACCAUGCUGGUGGUCCUCA	1383
SEQ ID NO: 33	GCCACCAUGCUGGUGGUCCUCAU	1384
SEQ ID NO: 34	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACGAU	761
SEQ ID NO: 35	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACAAG	986
SEQ ID NO: 36	CCACCAUGCUGGUGGUCCUCAUG	1385
SEQ ID NO: 37	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGAUG	762
SEQ ID NO: 38	CACCAUGCUGGUGGUCCUCAUGG	1386
SEQ ID NO: 39	UUUGCCUCCACCUUUGACAAGAA	1321
SEQ ID NO: 40	UGCCUCCACCUUUGACAAGAAUU	1323
SEQ ID NO: 41	ACCAUUAAGGUGCCCAUGAUGUA	1285
SEQ ID NO: 42	AACUGCCCUACCAAGGAAAUGCC	1364
SEQ ID NO: 43	CUCAAACUGCCCUACCAAGGAAA	1360
SEQ ID NO: 44	CCUCAAACUGCCCUACCAAGGAA	1359
SEQ ID NO: 45	GCCUCCACCUUUGACAAGAAUUU	1324
SEQ ID NO: 46	GUCGACACUUUCCACCUGGACAA	1255
SEQ ID NO: 47	ACACUUUCCACCUGGACAAGUAC	1259
SEQ ID NO: 48	UCAAACUGCCCUACCAAGGAAAU	1361
SEQ ID NO: 49	AAACUGCCCUACCAAGGAAAUGC	1363
SEQ ID NO: 50	GACACUUUCCACCUGGACAAGUA	1258
SEQ ID NO: 51	GACCAUUAAGGUGCCCAUGAUGU	1284
SEQ ID NO: 52	GUUUGCCUCCACCUUUGACAAGA	1320
SEQ ID NO: 53	ACUUUCCACCUGGACAAGUACAA	1261
SEQ ID NO: 54	UGUCCUCAAACUGCCCUACCAAG	1356
SEQ ID NO: 55	CAAACUGCCCUACCAAGGAAAUG	1362
SEQ ID NO: 56	GUCCUCAAACUGCCCUACCAAGG	1357
SEQ ID NO: 57	AUGUCCUCAAACUGCCCUACCAA	1355
SEQ ID NO: 58	UCGACACUUUCCACCUGGACAAG	1256
SEQ ID NO: 59	AGUUUGCCUCCACCUUUGACAAG	1319
SEQ ID NO: 60	CGACACUUUCCACCUGGACAAGU	1257
SEQ ID NO: 61	CUUUCCACCUGGACAAGUACAAG	1262
SEQ ID NO: 62	CACUUUCCACCUGGACAAGUACA	1260
SEQ ID NO: 63	UCCUCAAACUGCCCUACCAAGGA	1358
SEQ ID NO: 64	GAUUACAUCUUGUUCAAAGGGAA	1198
SEQ ID NO: 65	AAUGCCACCAUGCUGGUGGUCCU	1381
SEQ ID NO: 66	UUUAUCCAAGAGGUAUUUUGAUA	1038
SEQ ID NO: 67	GGAAAUGCCACCAUGCUGGUGGU	1378
SEQ ID NO: 68	GGAUUACAUCUUGUUCAAAGGGA	1197
SEQ ID NO: 69	AUCUCCAUGAGGCACGAUGGCAA	766

[1185]

SEQ ID NO: 70	AUUCCAUGCCUCCUGUCAUCAAA	1721
SEQ ID NO: 71	UUAUUCCAUGCCUCCUGUCAUCA	1719
SEQ ID NO: 72	ACCAAGGAAAUGCCACCAUGCUG	1373
SEQ ID NO: 73	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAAAA	1392
SEQ ID NO: 74	ACAUCUUGUUCAAAGGGAAAUGG	1202
SEQ ID NO: 75	CCAAGGAAAUGCCACCAUGCUGG	1374
SEQ ID NO: 76	UUGCCUCCACCUUUGACAAGAAU	1322
SEQ ID NO: 77	GGGAGUUUUGCCUUCAUCCACAA	985
SEQ ID NO: 78	CUGCUGCGAAAGAUCUCCAUGAG	754
SEQ ID NO: 79	CAAGUUUGCCUCCACCUUUGACA	1317
SEQ ID NO: 80	AAGUUUGCCUCCACCUUUGACAA	1318
SEQ ID NO: 81	UACAUCUUGUUCAAAGGGAAAUG	1201
SEQ ID NO: 82	GGGGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	984
SEQ ID NO: 83	UGCUGCGAAAGAUCUCCAUGAGG	755
SEQ ID NO: 84	UUCCAUGCCUCCUGUCAUCAAAG	1722
SEQ ID NO: 85	UCUGUUUCUGGGCAGGGUGGUGA	1794
SEQ ID NO: 86	CAGCCUGCUGCGAAAGAUCUCCA	750
SEQ ID NO: 87	CAAACUGUUUGAUGAGAUUAAUC	1152
SEQ ID NO: 88	CCAUGCCUCCUGUCAUCAAAGUG	1724
SEQ ID NO: 89	GAAGUAUGAGAUGCAUGAGCUGC	1530
SEQ ID NO: 90	AGAAGUAUGAGAUGCAUGAGCUG	1529
SEQ ID NO: 91	CAUGUCCUCAAACUGCCCUACCA	1354
SEQ ID NO: 92	AAACUGUUUGAUGAGAUUAAUCC	1153
SEQ ID NO: 93	AAGACCAUUAAGGUGCCCAUGAU	1282
SEQ ID NO: 94	AGACCAUUAAGGUGCCCAUGAUG	1283
SEQ ID NO: 95	CUGUUUCUGGGCAGGGUGGUGAA	1795
SEQ ID NO: 96	GCUUCUGUUUCUGGGCAGGGUGG	1791
SEQ ID NO: 97	AGUUUUCUUUCCGAAGUUCAAGC	1500
SEQ ID NO: 98	GUUUUCUUUCCGAAGUUCAAGCU	1501
SEQ ID NO: 99	CUUCUGUUUCUGGGCAGGGUGGU	1792
SEQ ID NO: 100	UCAUGUCCUCAAACUGCCCUACC	1353
SEQ ID NO: 101	AGUCGACACUUUCCACCUGGACA	1254
SEQ ID NO: 102	CCUUCAUCCACAAGGAUUU	995
SEQ ID NO: 103	CGAAAGAUCUCCAUGAGGC	760
SEQ ID NO: 104	UGGUGGUCCUCAUGGAGAA	1394
SEQ ID NO: 105	GAAAGAUCUCCAUGAGGCA	761
SEQ ID NO: 106	AUGAGAUGCAUGAGCUGCU	1535
SEQ ID NO: 107	UUGAUGAGAUUAAUCCUGA	1160

[1186]

SEQ ID NO: 108	AGAUUAAUCCUGAAACCAA	1166
SEQ ID NO: 109	AUGAGAUUAAUCCUGAAAC	1163
SEQ ID NO: 110	GAGAUUAAUCCUGAAACCA	1165
SEQ ID NO: 111	UGAGAUUAAUCCUGAAACC	1164
SEQ ID NO: 112	GUUUGAUGAGAUUAAUCCU	1158
SEQ ID NO: 113	UUGCCUUCAUCCACAAGGA	992
SEQ ID NO: 114	AAAGAUCUCCAUGAGGCAC	762
SEQ ID NO: 115	CUGGUGGUCCUCAUGGAGA	1393
SEQ ID NO: 116	UUCAUCCACAAGGAUUUUG	997
SEQ ID NO: 117	AAGAUCUCCAUGAGGCACG	763
SEQ ID NO: 118	CAUCCACAAGGAUUUUGAU	999
SEQ ID NO: 119	UGAUGAGAUUAAUCCUGAA	1161
SEQ ID NO: 120	GCCUUCAUCCACAAGGAUU	994
SEQ ID NO: 121	UCUCCAUGAGGCACGAUGG	767

[1187] 表2提供了本申请的siRNA寡核苷的未修饰的第一链(反义链)和相应的未修饰的第二链(正义链)序列,以及在SEQ ID NO:1的整体基因序列中的相应位置,如下所示。

[1188] 表2

[1189]

SEQ ID NO (AS)	第一链(反义链)碱基序列 5′→3′ (显示为未修饰的核苷序列)	SEQ ID NO (SS)	第二链(正义链)碱基序列 5′→3′ (显示为未修饰的核苷序列)	NM_016186.3 上相应的位置
SEQ ID NO: 145	CAUGGUGGCAUUUCCUUGGUAGG	SEQ ID NO: 265	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG	1370-1391
SEQ ID NO: 148	UCGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCG	SEQ ID NO: 268	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	760-781
SEQ ID NO: 122	AAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAA	SEQ ID NO: 242	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	991-1012
SEQ ID NO: 123	GCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGC	SEQ ID NO: 243	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	756-777
SEQ ID NO: 124	UUCUCCAUGAGGACCACCAGCAU	SEQ ID NO: 244	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	1390-1411
SEQ ID NO: 125	UGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAG	SEQ ID NO: 245	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	757-778
SEQ ID NO: 126	AGCAGCUCAUGCAUCUCAUACUU	SEQ ID NO: 246	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	1531-1552
SEQ ID NO: 127	UCAGGAUUAAUCUCAUCAAACAG	SEQ ID NO: 247	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	1156-1177

[1190]

SEQ ID NO: 128	UUGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUC	SEQ ID NO: 248	UGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	1162-1183
SEQ ID NO: 129	GUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAA	SEQ ID NO: 249	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	1159-1180
SEQ ID NO: 130	UGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 250	AUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	1161-1182
SEQ ID NO: 131	GGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 251	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	1160-1181
SEQ ID NO: 132	AGGAUUAAUCUCAUCAAACAGUU	SEQ ID NO: 252	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	1154-1175
SEQ ID NO: 133	UCCUUGUGGAUGAAGGCAAAACU	SEQ ID NO: 253	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	988-1009
SEQ ID NO: 134	GUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCA	SEQ ID NO: 254	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	758-779
SEQ ID NO: 135	UCUCCAUGAGGACCACCAGCAUG	SEQ ID NO: 255	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	1389-1410
SEQ ID NO: 136	CAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCA	SEQ ID NO: 256	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	993-1014
SEQ ID NO: 137	CGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGC	SEQ ID NO: 257	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	759-780
SEQ ID NO: 138	AUCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 258	UUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	995-1016
SEQ ID NO: 139	UUCAGGAUUAAUCUCAUCAAACA	SEQ ID NO: 259	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	1157-1178
SEQ ID NO: 140	AAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAA	SEQ ID NO: 260	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	990-1011
SEQ ID NO: 141	CCAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 261	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	763-784
SEQ ID NO: 142	UCCAUGAGGACCACCAGCAUGGU	SEQ ID NO: 262	CAUGCUGGUGGUCCUCAUGGA	1387-1408
SEQ ID NO: 143	AUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAAC	SEQ ID NO: 263	UUUGCCUUCAUCCACAAGGAU	989-1010
SEQ ID NO: 144	AAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAA	SEQ ID NO: 264	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUU	992-1013
SEQ ID NO: 146	UUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAAC	SEQ ID NO: 266	UUGAUGAGAUUAAUCCUGAAA	1158-1179
SEQ ID NO: 147	UCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGC	SEQ ID NO: 267	CUUCAUCCACAAGGAUUUUGA	994-1015

[1191]

SEQ ID NO: 149	CAGGAUUAAUCUCAUCAAACAGU	SEQ ID NO: 269	UGUUUGAUGAGAUUAAUCCUG	1155-1176
SEQ ID NO: 150	CUCCAUGAGGACCACCAGCAUGG	SEQ ID NO: 270	AUGCUGGUGGUCCUCAUGGAG	1388-1409
SEQ ID NO: 151	CCUUGUGGAUGAAGGCAAAACUC	SEQ ID NO: 271	GUUUUGCCUUCAUCCACAAGG	987-1008
SEQ ID NO: 152	UGAGGACCACCAGCAUGGUGGCA	SEQ ID NO: 272	CCACCAUGCUGGUGGUCCUCA	1383-1404
SEQ ID NO: 153	AUGAGGACCACCAGCAUGGUGGC	SEQ ID NO: 273	CACCAUGCUGGUGGUCCUCAU	1384-1405
SEQ ID NO: 154	AUCGUGCCUCAUGGAGAUCUUUC	SEQ ID NO: 274	AAGAUCUCCAUGAGGCACGAU	761-782
SEQ ID NO: 155	CUUGUGGAUGAAGGCAAAACUCC	SEQ ID NO: 275	AGUUUUGCCUUCAUCCACAAG	986-1007
SEQ ID NO: 156	CAUGAGGACCACCAGCAUGGUGG	SEQ ID NO: 276	ACCAUGCUGGUGGUCCUCAUG	1385-1406
SEQ ID NO: 157	CAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUUU	SEQ ID NO: 277	AGAUCUCCAUGAGGCACGAUG	762-783
SEQ ID NO: 158	CCAUGAGGACCACCAGCAUGGUG	SEQ ID NO: 278	CCAUGCUGGUGGUCCUCAUGG	1386-1407
SEQ ID NO: 159	UUCUUGUCAAAGGUGGAGGCAAA	SEQ ID NO: 279	UGCCUCCACCUUUGACAAGAA	1321-1342
SEQ ID NO: 160	AAUUCUUGUCAAAGGUGGAGGCA	SEQ ID NO: 280	CCUCCACCUUUGACAAGAAUU	1323-1344
SEQ ID NO: 161	UACAUCAUGGGCACCUUAAUGGU	SEQ ID NO: 281	CAUUAAGGUGCCCAUGAUGUA	1285-1306
SEQ ID NO: 162	GGCAUUUCCUUGGUAGGGCAGUU	SEQ ID NO: 282	CUGCCCUACCAAGGAAAUGCC	1364-1385
SEQ ID NO: 163	UUUCCUUGGUAGGGCAGUUUGAG	SEQ ID NO: 283	CAAACUGCCCUACCAAGGAAA	1360-1381
SEQ ID NO: 164	UUCCUUGGUAGGGCAGUUUGAGG	SEQ ID NO: 284	UCAAACUGCCCUACCAAGGAA	1359-1380
SEQ ID NO: 165	AAAUUCUUGUCAAAGGUGGAGGC	SEQ ID NO: 285	CUCCACCUUUGACAAGAAUUU	1324-1345
SEQ ID NO: 166	UUGUCCAGGUGGAAAGUGUCGAC	SEQ ID NO: 286	CGACACUUUCCACCUGGACAA	1255-1276
SEQ ID NO: 167	GUACUUGUCCAGGUGGAAAGUGU	SEQ ID NO: 287	ACUUUCCACCUGGACAAGUAC	1259-1280

[1192]

SEQ ID NO: 168	AUUUCCUUGGUAGGGCAGUUUGA	SEQ ID NO: 288	AAACUGCCCUACCAAGGAAAU	1361-1382
SEQ ID NO: 169	GCAUUUCCUUGGUAGGGCAGUU	SEQ ID NO: 289	ACUGCCCUACCAAGGAAAUGC	1363-1384
SEQ ID NO: 170	UACUUGUCCAGGUGGAAAGUGUC	SEQ ID NO: 290	CACUUUCCACCUGGACAAGUA	1258-1279
SEQ ID NO: 171	ACAUCAUGGGCACCUUAAUGGUC	SEQ ID NO: 291	CCAUUAAGGUGCCCAUGAUGU	1284-1305
SEQ ID NO: 172	UCUUGUCAAAGGUGGAGGCAAAC	SEQ ID NO: 292	UUGCCUCCACCUUUGACAAGA	1320-1341
SEQ ID NO: 173	UUGUACUUGUCCAGGUGGAAAGU	SEQ ID NO: 293	UUUCCACCUGGACAAGUACAA	1261-1282
SEQ ID NO: 174	CUUGGUAGGGCAGUUUGAGGACA	SEQ ID NO: 294	UCCUCAAACUGCCCUACCAAG	1356-1377
SEQ ID NO: 175	CAUUUCCUUGGUAGGGCAGUUUG	SEQ ID NO: 295	AACUGCCCUACCAAGGAAAUG	1362-1383
SEQ ID NO: 176	CCUUGGUAGGGCAGUUUGAGGAC	SEQ ID NO: 296	CCUCAAACUGCCCUACCAAGG	1357-1378
SEQ ID NO: 177	UUGGUAGGGCAGUUUGAGGACAU	SEQ ID NO: 297	GUCCUCAAACUGCCCUACCAA	1355-1376
SEQ ID NO: 178	CUUGUCCAGGUGGAAAGUGUCGA	SEQ ID NO: 298	GACACUUUCCACCUGGACAAG	1256-1277
SEQ ID NO: 179	CUUGUCAAAGGUGGAGGCAAACU	SEQ ID NO: 299	UUUGCCUCCACCUUUGACAAG	1319-1340
SEQ ID NO: 180	ACUUGUCCAGGUGGAAAGUGUCG	SEQ ID NO: 300	ACACUUUCCACCUGGACAAGU	1257-1278
SEQ ID NO: 181	CUUGUACUUGUCCAGGUGGAAAG	SEQ ID NO: 301	UUCCACCUGGACAAGUACAAG	1262-1283
SEQ ID NO: 182	UGUACUUGUCCAGGUGGAAAGUG	SEQ ID NO: 302	CUUUCCACCUGGACAAGUACA	1260-1281
SEQ ID NO: 183	UCCUUGGUAGGGCAGUUUGAGGA	SEQ ID NO: 303	CUCAAACUGCCCUACCAAGGA	1358-1379
SEQ ID NO: 184	UUCCCUUUGAACAAGAUGUAAUC	SEQ ID NO: 304	UUACAUCUUGUUCAAAGGGAA	1198-1219
SEQ ID NO: 185	AGGACCACCAGCAUGGUGGCAUU	SEQ ID NO: 305	UGCCACCAUGCUGGUGGUCCU	1381-1402
SEQ ID NO: 186	UAUCAAAAUACCUCUUGGAUAAA	SEQ ID NO: 306	UAUCCAAGAGGUAUUUUGAUA	1038-1059

[1193]

SEQ ID NO: 187	ACCACCAGCAUGGUGGCAUUUCC	SEQ ID NO: 307	AAAUGCCACCAUGCUGGUGGU	1378-1399
SEQ ID NO: 188	UCCCUUUGAACAAGAUGUAAUCC	SEQ ID NO: 308	AUUACAUCUUGUUCAAAGGGA	1197-1218
SEQ ID NO: 189	UUGCCAUCGUGCCUCAUGGAGAU	SEQ ID NO: 309	CUCCAUGAGGCACGAUGGCAA	766-787
SEQ ID NO: 190	UUUGAUGACAGGAGGCAUGGAAU	SEQ ID NO: 310	UCCAUGCCUCCUGUCAUCAAA	1721-1742
SEQ ID NO: 191	UGAUGACAGGAGGCAUGGAAUAA	SEQ ID NO: 311	AUUCCAUGCCUCCUGUCAUCA	1719-1740
SEQ ID NO: 192	CAGCAUGGUGGCAUUUCCUUGGU	SEQ ID NO: 312	CAAGGAAAUGCCACCAUGCUG	1373-1394
SEQ ID NO: 193	UUUUCUCCAUGAGGACCACCAGC	SEQ ID NO: 313	UGGUGGUCCUCAUGGAGAAAA	1392-1413
SEQ ID NO: 194	CCAUUUCCCUUUGAACAAGAUGU	SEQ ID NO: 314	AUCUUGUUCAAAGGGAAAUGG	1202-1223
SEQ ID NO: 195	CCAGCAUGGUGGCAUUUCCUUGG	SEQ ID NO: 315	AAGGAAAUGCCACCAUGCUGG	1374-1395
SEQ ID NO: 196	AUUCUUGUCAAAGGUGGAGGCAA	SEQ ID NO: 316	GCCUCCACCUUUGACAAGAAU	1322-1343
SEQ ID NO: 197	UUGUGGAUGAAGGCAAAACUCCC	SEQ ID NO: 317	GAGUUUUGCCUUCAUCCACAA	985-1006
SEQ ID NO: 198	CUCAUGGAGAUCUUUCGCAGCAG	SEQ ID NO: 318	GCUGCGAAAGAUCUCCAUGAG	754-775
SEQ ID NO: 199	UGUCAAAGGUGGAGGCAAACUUG	SEQ ID NO: 319	AGUUUGCCUCCACCUUUGACA	1317-1338
SEQ ID NO: 200	UUGUCAAAGGUGGAGGCAAACUU	SEQ ID NO: 320	GUUUGCCUCCACCUUUGACAA	1318-1339
SEQ ID NO: 201	CAUUUCCCUUUGAACAAGAUGUA	SEQ ID NO: 321	CAUCUUGUUCAAAGGGAAAUG	1201-1222
SEQ ID NO: 202	UGUGGAUGAAGGCAAAACUCCCC	SEQ ID NO: 322	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	984-1005
SEQ ID NO: 203	CCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGCA	SEQ ID NO: 323	CUGCGAAAGAUCUCCAUGAGG	755-776
SEQ ID NO: 204	CUUUGAUGACAGGAGGCAUGGAA	SEQ ID NO: 324	CCAUGCCUCCUGUCAUCAAAG	1722-1743
SEQ ID NO: 205	UCACCACCCUGCCCAGAAACAGA	SEQ ID NO: 325	UGUUUCUGGGCAGGGUGGUGA	1794-1815

[1194]

SEQ ID NO: 206	UGGAGAUCUUUCGCAGCAGGCU G	SEQ ID NO: 326	GCCUGCUGCGAAAGAUCUCCA	750-771
SEQ ID NO: 207	GAUUAAUCUCAUCAAACAGUUUG	SEQ ID NO: 327	AACUGUUUGAUGAGAUUAAU C	1152-1173
SEQ ID NO: 208	CACUUUGAUGACAGGAGGCAUG G	SEQ ID NO: 328	AUGCCUCCUGUCAUCAAAGU G	1724-1745
SEQ ID NO: 209	GCAGCUCAUGCAUCUCAUACUUC	SEQ ID NO: 329	AGUAUGAGAUGCAUGAGCUG C	1530-1551
SEQ ID NO: 210	CAGCUCAUGCAUCUCAUACUUCU	SEQ ID NO: 330	AAGUAUGAGAUGCAUGAGCU G	1529-1550
SEQ ID NO: 211	UGGUAGGGCAGUUUGAGGACAU G	SEQ ID NO: 331	UGUCCUCAAACUGCCCUACCA	1354-1375
SEQ ID NO: 212	GGAUUAAUCUCAUCAAACAGUUU	SEQ ID NO: 332	ACUGUUUGAUGAGAUUAAUC C	1153-1174
SEQ ID NO: 213	AUCAUGGGCACCUUAAUGGUCU U	SEQ ID NO: 333	GACCAUUAAGGUGCCCAUGA U	1282-1303
SEQ ID NO: 214	CAUCAUGGGCACCUUAAUGGUCU	SEQ ID NO: 334	ACCAUUAAGGUGCCCAUGAU G	1283-1304
SEQ ID NO: 215	UUCACCACCCUGCCCAGAAACAG	SEQ ID NO: 335	GUUUCUGGGCAGGGUGGUGA A	1795-1816
SEQ ID NO: 216	CCACCCUGCCCAGAAACAGAAGC	SEQ ID NO: 336	UUCUGUUUCUGGGCAGGGUG G	1791-1812
SEQ ID NO: 217	GCUUGAACUUCGGAAAGAAAACU	SEQ ID NO: 337	UUUUCUUUCCGAAGUUCAAG C	1500-1521
SEQ ID NO: 218	AGCUUGAACUUCGGAAAGAAAAC	SEQ ID NO: 338	UUUCUUUCCGAAGUUCAAGC U	1501-1522
SEQ ID NO: 219	ACCACCCUGCCCAGAAACAGAAG	SEQ ID NO: 339	UCUGUUUCUGGGCAGGGUGG U	1792-1813
SEQ ID NO: 220	GGUAGGGCAGUUUGAGGACAUG A	SEQ ID NO: 340	AUGUCCUCAAACUGCCCUACC	1353-1374
SEQ ID NO: 221	UGUCCAGGUGGAAAGUGUCGAC U	SEQ ID NO: 341	UCGACACUUUCCACCUGGACA	1254-1275
SEQ ID NO: 222	AAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 342	CCUUCAUCCACAAGGAUUU	995-1014
SEQ ID NO: 223	GCCUCAUGGAGAUCUUUCG	SEQ ID NO: 343	CGAAAGAUCUCCAUGAGGC	760-779
SEQ ID NO: 224	UUCUCCAUGAGGACCACCA	SEQ ID NO: 344	UGGUGGUCCUCAUGGAGAA	1394-1413

[1195]

SEQ ID NO: 225	UGCCUCAUGGAGAUCUUUC	SEQ ID NO: 345	GAAAGAUCUCCAUGAGGCA	761-780
SEQ ID NO: 226	AGCAGCUCAUGCAUCUCAU	SEQ ID NO: 346	AUGAGAUGCAUGAGCUGCU	1535-1554
SEQ ID NO: 227	UCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 347	UUGAUGAGAUUAAUCCUGA	1160-1179
SEQ ID NO: 228	UUGGUUUCAGGAUUAAUCU	SEQ ID NO: 348	AGAUUAAUCCUGAAACCAA	1166-1185
SEQ ID NO: 229	GUUUCAGGAUUAAUCUCAU	SEQ ID NO: 349	AUGAGAUUAAUCCUGAAAC	1163-1182
SEQ ID NO: 230	UGGUUUCAGGAUUAAUCUC	SEQ ID NO: 350	GAGAUUAAUCCUGAAACCA	1165-1184
SEQ ID NO: 231	GGUUUCAGGAUUAAUCUCA	SEQ ID NO: 351	UGAGAUUAAUCCUGAAACC	1164-1183
SEQ ID NO: 232	AGGAUUAAUCUCAUCAAAC	SEQ ID NO: 352	GUUUGAUGAGAUUAAUCCU	1158-1177
SEQ ID NO: 233	UCCUUGUGGAUGAAGGCAA	SEQ ID NO: 353	UUGCCUUCAUCCACAAGGA	992-1011
SEQ ID NO: 234	GUGCCUCAUGGAGAUCUUU	SEQ ID NO: 354	AAAGAUCUCCAUGAGGCAC	762-781
SEQ ID NO: 235	UCUCCAUGAGGACCACCAG	SEQ ID NO: 355	CUGGUGGUCCUCAUGGAGA	1393-1412
SEQ ID NO: 236	CAAAAUCCUUGUGGAUGAA	SEQ ID NO: 356	UUCAUCCACAAGGAUUUUG	997-1016
SEQ ID NO: 237	CGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 357	AAGAUCUCCAUGAGGCACG	763-782
SEQ ID NO: 238	AUCAAAAUCCUUGUGGAUG	SEQ ID NO: 358	CAUCCACAAGGAUUUUGAU	999-1018
SEQ ID NO: 239	UUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 359	UGAUGAGAUUAAUCCUGAA	1161-1180
SEQ ID NO: 240	AAUCCUUGUGGAUGAAGGC	SEQ ID NO: 360	GCCUUCAUCCACAAGGAUU	994-1013
SEQ ID NO: 241	CCAUCGUGCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 361	UCUCCAUGAGGCACGAUGG	767-786
SEQ ID NO: 787	AAAGUCCUUGUGGAUGAAGGCAA	SEQ ID NO: 791	GCCUUCAUCCACAAGGACUUU	NA
SEQ ID NO: 788	AACUUCUUGUCAAAGGUGGAGGC	SEQ ID NO: 792	CUCCACCUUUGACAAGAAGUU	NA

[1196]

SEQ ID NO: 789	UGUGGAUGAAGGCAAAGCUACCC	SEQ ID NO: 793	GUAGCUUUGCCUUCAUCCACA	NA

[1197] 表3提供了本申请的siRNA寡核苷的修饰的第一(反义)序列,以及相应的未修饰的

第一(反义)序列,如下所示。

[1198] 表3

[1199]

反义链 ID	修饰的第一链(反义链) 5′→3′	SEQ ID NO (AS - mod)	基础碱基序列 5′→3′ (显示为未修饰的核苷序列)	SEQ ID NO (AS - unmod)
ETXS1036	CmsAfsUmGfGmUfGmGmCmAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 764	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS1040	UmsCfsGmUfGmCfCmUmCmAmUmGmG mAfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 766	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS632	AmsAfsAmUmCmCfUmUfGfUmGmGmAm UfGmAfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 362	AAAUCCUUGUGGAUGAAG GCAAA	SEQ ID NO: 122
ETXS634	GmsCfsCmUmCmAfUmGfGfAmGmAmUm CfUmUfUmCmGmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 363	GCCUCAUGGAGAUCUUUC GCAGC	SEQ ID NO: 123
ETXS636	UmsUfsCmUmCmCfAmUfGfAmGmGmAm CfCmAfCmCmAmGmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 364	UUCUCCAUGAGGACCACC AGCAU	SEQ ID NO: 124
ETXS638	UmsGfsCmCmUmCfAmUfGfGmAmGmAm UfCmUfUmUmCmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 365	UGCCUCAUGGAGAUCUUU CGCAG	SEQ ID NO: 125
ETXS640	AmsGfsCmAmGmCfUmCfAfUmGmCmAm UfCmUfCmAmUmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 366	AGCAGCUCAUGCAUCUCA UACUU	SEQ ID NO: 126
ETXS642	UmsCfsAmGmGmAfUmUfAfAmUmCmUm CfAmUfCmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 367	UCAGGAUUAAUCUCAUCA AACAG	SEQ ID NO: 127
ETXS644	UmsUfsGmGmUmUfUmCfAfGmGmAmUm UfAmAfUmCmUmCmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 368	UUGGUUUCAGGAUUAAU CUCAUC	SEQ ID NO: 128
ETXS646	GmsUfsUmUmCmAfGmGfAfUmUmAmAm UfCmUfCmAmUmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 369	GUUUCAGGAUUAAUCUCA UCAAA	SEQ ID NO: 129
ETXS648	UmsGfsGmUmUmUfCmAfGfGmAmUmUm AfAmUfCmUmCmAmUmsCmsAm	SEQ ID NO: 370	UGGUUUCAGGAUUAAUC UCAUCA	SEQ ID NO: 130
ETXS650	GmsGfsUmUmUmCfAmGfGfAmUmUmAm AfUmCfUmCmAmUmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 371	GGUUUCAGGAUUAAUCUC AUCAA	SEQ ID NO: 131
ETXS652	AmsGfsGmAmUmUfAmAfUfCmUmCmAm UfCmAfAmAmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 372	AGGAUUAAUCUCAUCAAA CAGUU	SEQ ID NO: 132

[1200]

ETXS654	UmsCfsCmUmUmGfUmGfGfAmUmGmAm AfGmGfCmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 373	UCCUUGUGGAUGAAGGCA AAACU	SEQ ID NO: 133
ETXS656	GmsUfsGmCmCmUfCmAfUfGmGmAmGm AfUmCfUmUmUmCmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 374	GUGCCUCAUGGAGAUCUU UCGCA	SEQ ID NO: 134
ETXS658	UmsCfsUmCmCmAfUmGfAfGmGmAmCm CfAmCfCmAmGmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 375	UCUCCAUGAGGACCACCA GCAUG	SEQ ID NO: 135
ETXS660	CmsAfsAmAmAmUfCmCfUfUmGmUmGm GfAmUfGmAmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 376	CAAAAUCCUUGUGGAUGA AGGCA	SEQ ID NO: 136
ETXS662	CmsGfsUmGmCmCfUmCfAfUmGmGmAm GfAmUfCmUmUmUmCmsGmsCm	SEQ ID NO: 377	CGUGCCUCAUGGAGAUCU UUCGC	SEQ ID NO: 137
ETXS664	AmsUfsCmAmAmAfAmUfCfCmUmUmGm UfGmGfAmUmGmAmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 378	AUCAAAAUCCUUGUGGAU GAAGG	SEQ ID NO: 138
ETXS666	UmsUfsCmAmGmGfAmUfUfAmAmUmCm UfCmAfUmCmAmAmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 379	UUCAGGAUUAAUCUCAUC AAACA	SEQ ID NO: 139
ETXS668	AmsAfsUmCmCmUfUmGfUfGmGmAmUm GfAmAfGmGmCmAmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 380	AAUCCUUGUGGAUGAAGG CAAAA	SEQ ID NO: 140
ETXS670	CmsCfsAmUmCmGfUmGfCfCmUmCmAm UfGmGfAmGmAmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 381	CCAUCGUGCCUCAUGGAG AUCUU	SEQ ID NO: 141
ETXS672	UmsCfsCmAmUmGfAmGfGfAmCmCmAm CfCmAfGmCmAmUmGmsGmsUm	SEQ ID NO: 382	UCCAUGAGGACCACCAGC AUGGU	SEQ ID NO: 142
ETXS674	AmsUfsCmCmUmUfGmUfGfGmAmUmGm AfAmGfGmCmAmAmAmsAmsCm	SEQ ID NO: 383	AUCCUUGUGGAUGAAGGC AAAAC	SEQ ID NO: 143
ETXS676	AmsAfsAmAmUmCfCmUfUfGmUmGmGm AfUmGfAmAmGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 384	AAAAUCCUUGUGGAUGAA GGCAA	SEQ ID NO: 144
ETXS678	CmsAfsUmGmGmUfGmGfCfAmUmUmUm CfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 385	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS680	UmsUfsUmCmAmGfGmAfUfUmAmAmUm CfUmCfAmUmCmAmAmsAmsCm	SEQ ID NO: 386	UUUCAGGAUUAAUCUCAU CAAAC	SEQ ID NO: 146
ETXS682	UmsCfsAmAmAmAfUmCfCfUmUmGmUm GfGmAfUmGmAmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 387	UCAAAAUCCUUGUGGAUG AAGGC	SEQ ID NO: 147
ETXS684	UmsCfsGmUmGmCfCmUfCfAmUmGmGm AfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 388	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS686	CmsAfsGmGmAmUfUmAfAfUmCmUmCm AfUmCfAmAmAmCmAmsGmsUm	SEQ ID NO: 389	CAGGAUUAAUCUCAUCAA ACAGU	SEQ ID NO: 149
ETXS688	CmsUfsCmCmAmUfGmAfGfGmAmCmCm AfCmCfAmGmCmAmUmsGmsGm	SEQ ID NO: 390	CUCCAUGAGGACCACCAG CAUGG	SEQ ID NO: 150
ETXS690	CmsCfsUmUmGmUfGmGfAfUmGmAmAm GfGmCfAmAmAmAmCmsUmsCm	SEQ ID NO: 391	CCUUGUGGAUGAAGGCAA AACUC	SEQ ID NO: 151

[1201]

ETXS692	UmsGfsAmGmGmAfCmCfAfCmCmAmGmCfAmUfGmGmUmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 392	UGAGGACCACCAGCAUGGUGGCA	SEQ ID NO: 152
ETXS694	AmsUfsGmAmGmGfAmCfCfAmCmCmAmGfCmAfUmGmGmUmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 393	AUGAGGACCACCAGCAUGGUGGC	SEQ ID NO: 153
ETXS696	AmsUfsCmGmUmGfCmCfUfCmAmUmGmGfAmGfAmUmCmUmUmsUmsCm	SEQ ID NO: 394	AUCGUGCCUCAUGGAGAUCUUUC	SEQ ID NO: 154
ETXS698	CmsUfsUmGmUmGfGmAfUfGmAmAmGmGfCmAfAmAmAmCmUmsCmsCm	SEQ ID NO: 395	CUUGUGGAUGAAGGCAAAACUCC	SEQ ID NO: 155
ETXS700	CmsAfsUmGmAmGfGmAfCfCmAmCmCmAfGmCfAmUmGmGmUmsGmsGm	SEQ ID NO: 396	CAUGAGGACCACCAGCAUGGUGG	SEQ ID NO: 156
ETXS702	CmsAfsUmCmGmUfGmCfCfUmCmAmUmGfGmAfGmAmUmCmUmsUmsUm	SEQ ID NO: 397	CAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUUU	SEQ ID NO: 157
ETXS704	CmsCfsAmUmGmAfGmGfAfCmCmAmCmCfAmGfCmAmUmGmGmsUmsGm	SEQ ID NO: 398	CCAUGAGGACCACCAGCAUGGUG	SEQ ID NO: 158
ETXS706	UmsUfsCmUmUmGfUmCfAfAmAmGmGmUfGmGfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 399	UUCUUGUCAAAGGUGGAGGCAAA	SEQ ID NO: 159
ETXS708	AmsAfsUmUmCmUfUmGfUfCmAmAmAmGfGmUfGmGmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 400	AAUUCUUGUCAAAGGUGGAGGCA	SEQ ID NO: 160
ETXS710	UmsAfsCmAmUmCfAmUfGfGmGmCmAmCfCmUfUmAmAmUmGmsGmsUm	SEQ ID NO: 401	UACAUCAUGGGCACCUUAAUGGU	SEQ ID NO: 161
ETXS712	GmsGfsCmAmUmUfUmCfCfUmUmGmGmUfAmGfGmGmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 402	GGCAUUUCCUUGGUAGGGCAGUU	SEQ ID NO: 162
ETXS714	UmsUfsUmCmCmUfUmGfGfUmAmGmGmGfCmAfGmUmUmUmGmsAmsGm	SEQ ID NO: 403	UUUCCUUGGUAGGGCAGUUUGAG	SEQ ID NO: 163
ETXS716	UmsUfsCmCmUmUfGmGfUfAmGmGmGmCfAmGfUmUmUmGmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 404	UUCCUUGGUAGGGCAGUUUGAGG	SEQ ID NO: 164
ETXS718	AmsAfsAmUmUmCfUmUfGfUmCmAmAmAfGmGfUmGmGmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 405	AAAUUCUUGUCAAAGGUGGAGGC	SEQ ID NO: 165
ETXS720	UmsUfsGmUmCmCfAmGfGfUmGmGmAmAfAmGfUmGmUmCmGmsAmsCm	SEQ ID NO: 406	UUGUCCAGGUGGAAAGUGUCGAC	SEQ ID NO: 166
ETXS722	GmsUfsAmCmUmUfGmUfCfCmAmGmGmUfGmGfAmAmAmGmUmsGmsUm	SEQ ID NO: 407	GUACUUGUCCAGGUGGAAAGUGU	SEQ ID NO: 167
ETXS724	AmsUfsUmUmCmCfUmUfGfGmUmAmGmGfGmCfAmGmUmUmUmsGmsAm	SEQ ID NO: 408	AUUUCCUUGGUAGGGCAGUUUGA	SEQ ID NO: 168
ETXS726	GmsCfsAmUmUmUfCmCfUfUmGmGmUmAfGmGfGmCmAmGmUmsUmsUm	SEQ ID NO: 409	GCAUUUCCUUGGUAGGGCAGUUU	SEQ ID NO: 169
ETXS728	UmsAfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmGmUmGfGmAfAmAmGmUmGmsUmsCm	SEQ ID NO: 410	UACUUGUCCAGGUGGAAAGUGUC	SEQ ID NO: 170

[1202]

ETXS730	AmsCfsAmUmCmAfUmGfGfGmCmAmCm CfUmUfAmAmUmGmGmsUmsCm	SEQ ID NO: 411	ACAUCAUGGGCACCUUAA UGGUC	SEQ ID NO: 171
ETXS732	UmsCfsUmUmGmUfCmAfAfAmGmGmUm GfGmAfGmGmCmAmAmsAmsCm	SEQ ID NO: 412	UCUUGUCAAAGGUGGAG GCAAAC	SEQ ID NO: 172
ETXS734	UmsUfsGmUmAmCfUmUfGfUmCmCmAm GfGmUfGmGmAmAmAmsGmsUm	SEQ ID NO: 413	UUGUACUUGUCCAGGUG GAAAGU	SEQ ID NO: 173
ETXS736	CmsUfsUmGmGmUfAmGfGfGmCmAmGm UfUmUfGmAmGmGmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 414	CUUGGUAGGGCAGUUUG AGGACA	SEQ ID NO: 174
ETXS738	CmsAfsUmUmUmCfCmUfUfGmGmUmAm GfGmGfCmAmGmUmUmsUmsGm	SEQ ID NO: 415	CAUUUCCUUGGUAGGGCA GUUUG	SEQ ID NO: 175
ETXS740	CmsCfsUmUmGmGfUmAfGfGmGmCmAm GfUmUfUmGmAmGmGmsAmsCm	SEQ ID NO: 416	CCUUGGUAGGGCAGUUU GAGGAC	SEQ ID NO: 176
ETXS742	UmsUfsGmGmUmAfGmGfGfCmAmGmUm UfUmGfAmGmGmAmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 417	UUGGUAGGGCAGUUUGA GGACAU	SEQ ID NO: 177
ETXS744	CmsUfsUmGmUmCfCmAfGfGmUmGmGm AfAmAfGmUmGmUmCmsGmsAm	SEQ ID NO: 418	CUUGUCCAGGUGGAAAGU GUCGA	SEQ ID NO: 178
ETXS746	CmsUfsUmGmUmCfAmAfAfGmGmUmGm GfAmGfGmCmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 419	CUUGUCAAAGGUGGAGGC AAACU	SEQ ID NO: 179
ETXS748	AmsCfsUmUmGmUfCmCfAfGmGmUmGm GfAmAfAmGmUmGmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 420	ACUUGUCCAGGUGGAAAG UGUCG	SEQ ID NO: 180
ETXS750	CmsUfsUmGmUmAfCmUfUfGmUmCmCm AfGmGfUmGmGmAmAmsAmsGm	SEQ ID NO: 421	CUUGUACUUGUCCAGGUG GAAAG	SEQ ID NO: 181
ETXS752	UmsGfsUmAmCmUfUmGfUfCmCmAmGm GfUmGfGmAmAmAmGmsUmsGm	SEQ ID NO: 422	UGUACUUGUCCAGGUGG AAAGUG	SEQ ID NO: 182
ETXS754	UmsCfsCmUmUmGfGmUfAfGmGmGmCm AfGmUfUmUmGmAmGmsGmsAm	SEQ ID NO: 423	UCCUUGGUAGGGCAGUU UGAGGA	SEQ ID NO: 183
ETXS756	UmsUfsCmCmCmUfUmUfGfAmAmCmAm AfGmAfUmGmUmAmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 424	UUCCCUUUGAACAAGAUG UAAUC	SEQ ID NO: 184
ETXS758	AmsGfsGmAmCmCfAmCfCfAmGmCmAmU fGmGfUmGmGmCmAmsUmsUm	SEQ ID NO: 425	AGGACCACCAGCAUGGUG GCAUU	SEQ ID NO: 185
ETXS760	UmsAfsUmCmAmAfAmAfUfAmCmCmUm CfUmUfGmGmAmUmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 426	UAUCAAAAUACCUCUUGG AUAAA	SEQ ID NO: 186
ETXS762	AmsCfsCmAmCmCfAmGfCfAmUmGmGm UfGmGfCmAmUmUmUmsCmsCm	SEQ ID NO: 427	ACCACCAGCAUGGUGGCA UUUCC	SEQ ID NO: 187
ETXS764	UmsCfsCmCmUmUfUmGfAfAmCmAmAm GfAmUfGmUmAmAmUmsCmsCm	SEQ ID NO: 428	UCCCUUUGAACAAGAUGU AAUCC	SEQ ID NO: 188
ETXS766	UmsUfsGmCmCmAfUmCfGfUmGmCmCm UfCmAfUmGmGmAmGmsAmsUm	SEQ ID NO: 429	UUGCCAUCGUGCCUCAUG GAGAU	SEQ ID NO: 189

[1203]

ETXS768	UmsUfsUmGmAmUfGmAfCfAmGmGmAmGfGmCfAmUmGmGmAmsAmsUm	SEQ ID NO: 430	UUUGAUGACAGGAGGCAUGGAAU	SEQ ID NO: 190
ETXS770	UmsGfsAmUmGmAfCmAfGfGmAmGmGmCfAmUfGmGmAmAmUmsAmsAm	SEQ ID NO: 431	UGAUGACAGGAGGCAUGGAAUAA	SEQ ID NO: 191
ETXS772	CmsAfsGmCmAmUfGmGfUfGmGmCmAmUfUmUfCmCmUmUmGmsGmsUm	SEQ ID NO: 432	CAGCAUGGUGGCAUUUCCUUGGU	SEQ ID NO: 192
ETXS774	UmsUfsUmUmCmUfCmCfAfUmGmAmGmGfAmCfCmAmCmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 433	UUUUCUCCAUGAGGACCACCAGC	SEQ ID NO: 193
ETXS776	CmsCfsAmUmUmUfCmCfCfUmUmUmGmAfAmCfAmAmGmAmUmsGmsUm	SEQ ID NO: 434	CCAUUUCCCUUUGAACAAGAUGU	SEQ ID NO: 194
ETXS778	CmsCfsAmGmCmAfUmGfGfUmGmGmCmAfUmUfUmCmCmUmUmsGmsGm	SEQ ID NO: 435	CCAGCAUGGUGGCAUUUCCUUGG	SEQ ID NO: 195
ETXS780	AmsUfsUmCmUmUfGmUfCfAmAmAmGmGfUmGfGmAmGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 436	AUUCUUGUCAAAGGUGGAGGCAA	SEQ ID NO: 196
ETXS782	UmsUfsGmUmGmGfAmUfGfAmAmGmGmCfAmAfAmAmCmUmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 437	UUGUGGAUGAAGGCAAAACUCCC	SEQ ID NO: 197
ETXS784	CmsUfsCmAmUmGfGmAfGfAmUmCmUmUfUmCfGmCmAmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 438	CUCAUGGAGAUCUUUCGCAGCAG	SEQ ID NO: 198
ETXS786	UmsGfsUmCmAmAfAmGfGfUmGmGmAmGfGmCfAmAmAmCmUmsUmsGm	SEQ ID NO: 439	UGUCAAAGGUGGAGGCAAACUUG	SEQ ID NO: 199
ETXS788	UmsUfsGmUmCmAfAmAfGfGmUmGmGmAfGmGfCmAmAmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 440	UUGUCAAAGGUGGAGGCAAACUU	SEQ ID NO: 200
ETXS790	CmsAfsUmUmUmCfCmCfUfUmUmGmAmAfCmAfAmGmAmAmUmGmsUmsAm	SEQ ID NO: 441	CAUUUCCCUUUGAACAAGAUGUA	SEQ ID NO: 201
ETXS792	UmsGfsUmGmGmAfUmGfAfAmGmGmCmAfAmAfAmCmUmCmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 442	UGUGGAUGAAGGCAAAACUCCCC	SEQ ID NO: 202
ETXS794	CmsCfsUmCmAmUfGmGfAfGmAmUmCmUfUmUfCmGmCmAmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 443	CCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGCA	SEQ ID NO: 203
ETXS796	CmsUfsUmUmGmAfUmGfAfCmAmGmGmAfGmGfCmAmUmGmGmsAmsAm	SEQ ID NO: 444	CUUUGAUGACAGGAGGCAUGGAA	SEQ ID NO: 204
ETXS798	UmsCfsAmCmCmAfCmCfCfUmGmCmCmCfAmGfAmAmAmCmAmsGmsAm	SEQ ID NO: 445	UCACCACCCUGCCCAGAAACAGA	SEQ ID NO: 205
ETXS800	UmsGfsGmAmGmAfUmCfUfUmUmCmGmCfAmGfCmAmGmGmCmsUmsGm	SEQ ID NO: 446	UGGAGAUCUUUCGCAGCAGGCUG	SEQ ID NO: 206
ETXS802	GmsAfsUmUmAmAfUmCfUfCmAmUmCmAfAmAfCmAmGmUmUmsUmsGm	SEQ ID NO: 447	GAUUAAUCUCAUCAAACAGUUUG	SEQ ID NO: 207
ETXS804	CmsAfsCmUmUmUfGmAfUfGmAmCmAmGfGmAfGmGmCmAmUmsGmsGm	SEQ ID NO: 448	CACUUUGAUGACAGGAGGCAUGG	SEQ ID NO: 208

[1204]

ETXS806	GmsCfsAmGmCmUfCmAfUfGmCmAmUmCfUmCfAmUmAmCmUmsUmsCm	SEQ ID NO: 449	GCAGCUCAUGCAUCUCAUACUUC	SEQ ID NO: 209
ETXS808	CmsAfsGmCmUmCfAmUfGfCmAmUmCmUfCmAfUmAmCmUmUmsCmsUm	SEQ ID NO: 450	CAGCUCAUGCAUCUCAUACUUCU	SEQ ID NO: 210
ETXS810	UmsGfsGmUmAmGfGmGfCfAmGmUmUmUfGmAfGmGmAmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 451	UGGUAGGGCAGUUUGAGGACAUG	SEQ ID NO: 211
ETXS812	GmsGfsAmUmUmAfAmUfCfUmCmAmUmCfAmAfAmCmAmGmUmsUmsUm	SEQ ID NO: 452	GGAUUAAUCUCAUCAAACAGUUU	SEQ ID NO: 212
ETXS814	AmsUfsCmAmUmGfGmGfCfAmCmCmUmUfAmAfUmGmGmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 453	AUCAUGGGCACCUUAAUGGUCUU	SEQ ID NO: 213
ETXS816	CmsAfsUmCmAmUfGmGfGfCmAmCmCmUfUmAfAmUmGmGmUmsCmsUm	SEQ ID NO: 454	CAUCAUGGGCACCUUAAUGGUCU	SEQ ID NO: 214
ETXS818	UmsUfsCmAmCmCfAmCfCfCmUmGmCmCfCmAfGmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 455	UUCACCACCCUGCCCAGAAACAG	SEQ ID NO: 215
ETXS820	CmsCfsAmCmCmCfUmGfCfCmCmAmGmAfAmAfCmAmGmAmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 456	CCACCCUGCCCAGAAACAGAAGC	SEQ ID NO: 216
ETXS822	GmsCfsUmUmGmAfAmCfUfUmCmGmGmAfAmAfGmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 457	GCUUGAACUUCGGAAAGAAAACU	SEQ ID NO: 217
ETXS824	AmsGfsCmUmUmGfAmAfCfUmUmCmGmGfAmAfAmGmAmAmAmsAmsCm	SEQ ID NO: 458	AGCUUGAACUUCGGAAAGAAAAC	SEQ ID NO: 218
ETXS826	AmsCfsCmAmCmCfCmUfGfCmCmCmAmGfAmAfAmCmAmGmAmsAmsGm	SEQ ID NO: 459	ACCACCCUGCCCAGAAACAGAAG	SEQ ID NO: 219
ETXS828	GmsGfsUmAmGmGfGmCfAfGmUmUmUmGfAmGfGmAmCmAmUmsGmsAm	SEQ ID NO: 460	GGUAGGGCAGUUUGAGGACAUGA	SEQ ID NO: 220
ETXS830	UmsGfsUmCmCmAfGmGfUfGmGmAmAmAfGmUfGmUmCmGmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 461	UGUCCAGGUGGAAAGUGUCGACU	SEQ ID NO: 221
ETXS832	AmsAfsAmUfCmCfUmUfGmUfGmGfAmUfGmAfAmsGfsGm	SEQ ID NO: 462	AAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 222
ETXS834	GmsCfsCmUfCmAfUmGfGmAfGmAfUmCfUmUfUmsCfsGm	SEQ ID NO: 463	GCCUCAUGGAGAUCUUUCG	SEQ ID NO: 223
ETXS836	UmsUfsCmUfCmCfAmUfGmAfGmGfAmCfCmAfCmsCfsAm	SEQ ID NO: 464	UUCUCCAUGAGGACCACCA	SEQ ID NO: 224
ETXS838	UmsGfsCmCfUmCfAmUfGmGfAmGfAmUfCmUfUmsUfsCm	SEQ ID NO: 465	UGCCUCAUGGAGAUCUUUC	SEQ ID NO: 225
ETXS840	AmsGfsCmAfGmCfUmCfAmUfGmCfAmUfCmUfCmsAfsUm	SEQ ID NO: 466	AGCAGCUCAUGCAUCUCAU	SEQ ID NO: 226
ETXS842	UmsCfsAmGfGmAfUmUfAmAfUmCfUmCfAmUfCmsAfsAm	SEQ ID NO: 467	UCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 227

[1205]

ETXS844	UmsUfsGmGfUmUfUmCfAmGfGmAfUmUfAmAfUmsCfsUm	SEQ ID NO: 468	UUGGUUUCAGGAUUAAUCU	SEQ ID NO: 228
ETXS846	GmsUfsUmUfCmAfGmGfAmUfUmAfAmUfCmUfCmsAfsUm	SEQ ID NO: 469	GUUUCAGGAUUAAUCUCAU	SEQ ID NO: 229
ETXS848	UmsGfsGmUfUmUfCmAfGmGfAmUfUmAfAmUfCmsUfsCm	SEQ ID NO: 470	UGGUUUCAGGAUUAAUCUC	SEQ ID NO: 230
ETXS850	GmsGfsUmUfUmCfAmGfGmAfUmUfAmAfUmCfUmsCfsAm	SEQ ID NO: 471	GGUUUCAGGAUUAAUCUCA	SEQ ID NO: 231
ETXS852	AmsGfsGmAfUmUfAmAfUmCfUmCfAmUfCmAfAmsAfsCm	SEQ ID NO: 472	AGGAUUAAUCUCAUCAAAC	SEQ ID NO: 232
ETXS854	UmsCfsCmUfUmGfUmGfGmAfUmGfAmAfGmGfCmsAfsAm	SEQ ID NO: 473	UCCUUGUGGAUGAAGGCAA	SEQ ID NO: 233
ETXS856	GmsUfsGmCfCmUfCmAfUmGfGmAfGmAfUmCfUmsUfsUm	SEQ ID NO: 474	GUGCCUCAUGGAGAUCUUU	SEQ ID NO: 234
ETXS858	UmsCfsUmCfCmAfUmGfAmGfGmAfCmCfAmCfCmsAfsGm	SEQ ID NO: 475	UCUCCAUGAGGACCACCAG	SEQ ID NO: 235
ETXS860	CmsAfsAmAfAmUfCmCfUmUfGmUfGmGfAmUfGmsAfsAm	SEQ ID NO: 476	CAAAAUCCUUGUGGAUGAA	SEQ ID NO: 236
ETXS862	CmsGfsUmGfCmCfUmCfAmUfGmGfAmGfAmUfCmsUfsUm	SEQ ID NO: 477	CGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 237
ETXS864	AmsUfsCmAfAmAfAmUfCmCfUmUfGmUfGmGfAmsUfsGm	SEQ ID NO: 478	AUCAAAAUCCUUGUGGAUG	SEQ ID NO: 238
ETXS866	UmsUfsCmAfGmGfAmUfUmAfAmUfCmUfCmAfUmsCfsAm	SEQ ID NO: 479	UUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 239
ETXS868	AmsAfsUmCfCmUfUmGfUmGfGmAfUmGfAmAfGmsGfsCm	SEQ ID NO: 480	AAUCCUUGUGGAUGAAGGC	SEQ ID NO: 240
ETXS870	CmsCfsAmUfCmGfUmGfCmCfUmCfAmUfGmGfAmsGfsAm	SEQ ID NO: 481	CCAUCGUGCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 241
ETXS872	AmsAfsAmUfCmCfUmUfGfUmGmGmAmUfGmAfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 482	AAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAA	SEQ ID NO: 122
ETXS874	GmsCfsCmUfCmAfUmGfGfAmGmAmUmCfUmUfUmCmGmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 483	GCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGC	SEQ ID NO: 123
ETXS876	UmsUfsCmUfCmCfAmUfGfAmGmGmAmCfCmAfCmCmAmGmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 484	UUCUCCAUGAGGACCACCAGCAU	SEQ ID NO: 124
ETXS878	UmsGfsCmCfUmCfAmUfGfGmAmGmAmUfCmUfUmUmCmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 485	UGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAG	SEQ ID NO: 125
ETXS880	AmsGfsCmAfGmCfUmCfAfUmGmCmAmUfCmUfCmAmUmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 486	AGCAGCUCAUGCAUCUCAUACUU	SEQ ID NO: 126

[1206]

ETXS882	UmsCfsAmGfGmAfUmUfAfAmUmCmUmCfAmUfCmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 487	UCAGGAUUAAUCUCAUCAAACAG	SEQ ID NO: 127
ETXS884	UmsUfsGmGfUmUfUmCfAfGmGmAmUmUfAmAfUmCmUmCmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 488	UUGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUC	SEQ ID NO: 128
ETXS886	GmsUfsUmUfCmAfGmGfAfUmUmAmAmUfCmUfCmAmUmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 489	GUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAA	SEQ ID NO: 129
ETXS888	UmsGfsGmUfUmUfCmAfGfGmAmUmUmAfAmUfCmUmCmAmUmsCmsAm	SEQ ID NO: 490	UGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 130
ETXS890	GmsGfsUmUfUmCfAmGfGfAmUmUmAmAfUmCfUmCmAmUmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 491	GGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 131
ETXS892	AmsGfsGmAfUmUfAmAfUfCmUmCmAmUfCmAfAmAmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 492	AGGAUUAAUCUCAUCAAACAGUU	SEQ ID NO: 132
ETXS894	UmsCfsCmUfUmGfUmGfGfAmUmGmAmAfGmGfCmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 493	UCCUUGUGGAUGAAGGCAAAACU	SEQ ID NO: 133
ETXS896	GmsUfsGmCfCmUfCmAfUfGmGmAmGmAfUmCfUmUmUmCmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 494	GUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCA	SEQ ID NO: 134
ETXS898	UmsCfsUmCfCmAfUmGfAfGmGmAmCmCfAmCfCmAmGmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 495	UCUCCAUGAGGACCACCAGCAUG	SEQ ID NO: 135
ETXS900	CmsAfsAmAfAmUfCmCfUfUmGmUmGmGfAmUfGmAmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 496	CAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCA	SEQ ID NO: 136
ETXS902	CmsGfsUmGfCmCfUmCfAfUmGmGmAmGfAmUfCmUmUmUmCmsGmsCm	SEQ ID NO: 497	CGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGC	SEQ ID NO: 137
ETXS904	AmsUfsCmAfAmAfAmUfCfCmUmUmGmUfGmGfAmUmGmAmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 498	AUCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 138
ETXS906	UmsUfsCmAfGmGfAmUfUfAmAmUmCmUfCmAfUmCmAmAmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 499	UUCAGGAUUAAUCUCAUCAAACA	SEQ ID NO: 139
ETXS908	AmsAfsUmCfCmUfUmGfUfGmGmAmUmGfAmAfGmGmCmAmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 500	AAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAA	SEQ ID NO: 140
ETXS910	CmsCfsAmUfCmGfUmGfCfCmUmCmAmUfGmGfAmGmAmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 501	CCAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 141
ETXS912	AmsAfsAmUfCmCfUmUfGfUmGmGmAmUfGmAfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 502	AAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAA	SEQ ID NO: 122
ETXS914	GmsCfsCmUfCmAfUmGfGfAmGmAmUmCfUmUfUmCmGmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 503	GCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGC	SEQ ID NO: 123
ETXS916	UmsUfsCmUfCmCfAmUfGfAmGmGmAmCfCmAfCmCmAmGmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 504	UUCUCCAUGAGGACCACCAGCAU	SEQ ID NO: 124
ETXS918	UmsGfsCmCfUmCfAmUfGfGmAmGmAmUfCmUfUmUmCmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 505	UGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAG	SEQ ID NO: 125

[1207]

ETXS920	AmsGfsCmAfGmCfUmCfAfUmGmCmAmUfCmUfCmAmUmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 506	AGCAGCUCAUGCAUCUCAUACUU	SEQ ID NO: 126
ETXS922	UmsCfsAmGfGmAfUmUfAfAmUmCmUmCfAmUfCmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 507	UCAGGAUUAAUCUCAUCAAACAG	SEQ ID NO: 127
ETXS924	UmsUfsGmGfUmUfUmCfAfGmGmAmUmUfAmAfUmCmUmCmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 508	UUGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUC	SEQ ID NO: 128
ETXS926	GmsUfsUmUfCmAfGmGfAfUmUmAmAmUfCmUfCmAmUmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 509	GUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAA	SEQ ID NO: 129
ETXS928	UmsGfsGmUfUmUfCmAfGfGmAmUmUmAfAmUfCmUmCmAmUmsCmsAm	SEQ ID NO: 510	UGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 130
ETXS930	GmsGfsUmUfUmCfAmGfGfAmUmUmAmAfUmCfUmCmAmUmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 511	GGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 131
ETXS932	AmsGfsGmAfUmUfAmAfUfCmUmCmAmUfCmAfAmAmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 512	AGGAUUAAUCUCAUCAAACAGUU	SEQ ID NO: 132
ETXS934	UmsCfsCmUfUmGfUmGfGfAmUmGmAmAfGmGfCmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 513	UCCUUGUGGAUGAAGGCAAAACU	SEQ ID NO: 133
ETXS936	GmsUfsGmCfCmUfCmAfUfGmGmAmGmAfUmCfUmUmUmCmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 514	GUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCA	SEQ ID NO: 134
ETXS938	UmsCfsUmCfCmAfUmGfAfGmGmAmCmCfAmCfCmAmGmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 515	UCUCCAUGAGGACCACCAGCAUG	SEQ ID NO: 135
ETXS940	CmsAfsAmAfAmUfCmCfUfUmGmUmGmGfAmUfGmAmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 516	CAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCA	SEQ ID NO: 136
ETXS942	CmsGfsUmGfCmCfUmCfAfUmGmGmAmGfAmUfCmUmUmUmCmsGmsCm	SEQ ID NO: 517	CGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGC	SEQ ID NO: 137
ETXS944	AmsUfsCmAfAmAfAmUfCfCmUmUmGmUfGmGfAmUmGmAmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 518	AUCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 138
ETXS946	UmsUfsCmAfGmGfAmUfUfAmAmUmCmUfCmAfUmCmAmAmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 519	UUCAGGAUUAAUCUCAUCAAACA	SEQ ID NO: 139
ETXS948	AmsAfsUmCfCmUfUmGfUfGmGmAmUmGfAmAfGmGmCmAmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 520	AAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAA	SEQ ID NO: 140
ETXS950	CmsCfsAmUfCmGfUmGfCfCmUmCmAmUfGmGfAmGmAmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 521	CCAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 141
ETXS952	AmsAfsAmUfCmCfUmUfGfUmGmGmAmUfGmAfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 522	AAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAA	SEQ ID NO: 122
ETXS954	GmsCfsCmUfCmAfUmGfGfAmGmAmUmCfUmUfUmCmGmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 523	GCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGC	SEQ ID NO: 123
ETXS956	UmsUfsCmUfCmCfAmUfGfAmGmGmAmCfCmAfCmCmAmGmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 524	UUCUCCAUGAGGACCACCAGCAU	SEQ ID NO: 124

[1208]

ETXS958	UmsGfsCmCfUmCfAmUfGfGmAmGmAmUfCmUfUmUmCmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 525	UGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAG	SEQ ID NO: 125
ETXS960	AmsGfsCmAfGmCfUmCfAfUmGmCmAmUfCmUfCmAmUmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 526	AGCAGCUCAUGCAUCUCAUACUU	SEQ ID NO: 126
ETXS962	UmsCfsAmGfGmAfUmUfAfAmUmCmUmCfAmUfCmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 527	UCAGGAUUAAUCUCAUCAAACAG	SEQ ID NO: 127
ETXS964	UmsUfsGmGfUmUfUmCfAfGmGmAmUmUfAmAfUmCmUmCmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 528	UUGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUC	SEQ ID NO: 128
ETXS966	GmsUfsUmUfCmAfGmGfAfUmUmAmAmUfCmUfCmAmUmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 529	GUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAA	SEQ ID NO: 129
ETXS968	UmsGfsGmUfUmUfCmAfGfGmAmUmUmAfAmUfCmUmCmAmUmsCmsAm	SEQ ID NO: 530	UGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 130
ETXS970	GmsGfsUmUfUmCfAmGfGfAmUmUmAmAfUmCfUmCmAmUmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 531	GGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 131
ETXS972	AmsGfsGmAfUmUfAmAfUfCmUmCmAmUfCmAfAmAmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 532	AGGAUUAAUCUCAUCAAACAGUU	SEQ ID NO: 132
ETXS974	UmsCfsCmUfUmGfUmGfGfAmUmGmAmAfGmGfCmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 533	UCCUUGUGGAUGAAGGCAAAACU	SEQ ID NO: 133
ETXS976	GmsUfsGmCfCmUfCmAfUfGmGmAmGmAfUmCfUmUmUmCmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 534	GUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCA	SEQ ID NO: 134
ETXS978	UmsCfsUmCfCmAfUmGfAfGmGmAmCmCfAmCfCmAmGmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 535	UCUCCAUGAGGACCACCAGCAUG	SEQ ID NO: 135
ETXS980	CmsAfsAmAfAmUfCmCfUfUmGmUmGmGfAmUfGmAmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 536	CAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCA	SEQ ID NO: 136
ETXS982	CmsGfsUmGfCmCfUmCfAfUmGmGmAmGfAmUfCmUmUmUmCmsGmsCm	SEQ ID NO: 537	CGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGC	SEQ ID NO: 137
ETXS984	AmsUfsCmAfAmAfAmUfCfCmUmUmGmUfGmGfAmUmGmAmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 538	AUCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 138
ETXS986	UmsUfsCmAfGmGfAmUfUfAmAmUmCmUfCmAfUmCmAmAmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 539	UUCAGGAUUAAUCUCAUCAAACA	SEQ ID NO: 139
ETXS988	AmsAfsUmCfCmUfUmGfUfGmGmAmUmGfAmAfGmGmCmAmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 540	AAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAA	SEQ ID NO: 140
ETXS990	CmsCfsAmUfCmGfUmGfCfCmUmCmAmUfGmGfAmGmAmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 541	CCAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 141
ETXS992	AmsAfsAmUfCmCfUmUmGmUmGmGmAmUfGmAfAmGmGmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 542	AAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAA	SEQ ID NO: 122
ETXS994	GmsCfsCmUfCmAfUmGmGmAmGmAmUmCfUmUfUmCmGmCmAmsGmsCm	SEQ ID NO: 543	GCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAGC	SEQ ID NO: 123

[1209]

ETXS996	UmsUfsCmUfCmCfAmUmGmAmGmGmAmCfCmAfCmCmAmGmCmsAmsUm	SEQ ID NO: 544	UUCUCCAUGAGGACCACCAGCAU	SEQ ID NO: 124
ETXS998	UmsGfsCmCfUmCfAmUmGmGmAmGmAmUfCmUfUmUmCmGmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 545	UGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCAG	SEQ ID NO: 125
ETXS1000	AmsGfsCmAfGmCfUmCmAmUmGmCmAmUfCmUfCmAmUmAmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 546	AGCAGCUCAUGCAUCUCAUACUU	SEQ ID NO: 126
ETXS1002	UmsCfsAmGfGmAfUmUmAmAmUmCmUmCfAmUfCmAmAmAmCmsAmsGm	SEQ ID NO: 547	UCAGGAUUAAUCUCAUCAAACAG	SEQ ID NO: 127
ETXS1004	UmsUfsGmGfUmUfUmCmAmGmGmAmUmUfAmAfUmCmUmCmAmsUmsCm	SEQ ID NO: 548	UUGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUC	SEQ ID NO: 128
ETXS1006	GmsUfsUmUfCmAfGmGmAmUmUmAmAmUfCmUfCmAmUmCmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 549	GUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAAA	SEQ ID NO: 129
ETXS1008	UmsGfsGmUfUmUfCmAmGmGmAmUmUmAfAmUfCmUmCmAmUmsCmsAm	SEQ ID NO: 550	UGGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCA	SEQ ID NO: 130
ETXS1010	GmsGfsUmUfUmCfAmGmGmAmUmUmAmAfUmCfUmCmAmUmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 551	GGUUUCAGGAUUAAUCUCAUCAA	SEQ ID NO: 131
ETXS1012	AmsGfsGmAfUmUfAmAmUmCmUmCmAmUfCmAfAmAmCmAmGmsUmsUm	SEQ ID NO: 552	AGGAUUAAUCUCAUCAAACAGUU	SEQ ID NO: 132
ETXS1014	UmsCfsCmUfUmGfUmGmGmAmUmGmAmAfGmGfCmAmAmAmAmsCmsUm	SEQ ID NO: 553	UCCUUGUGGAUGAAGGCAAAACU	SEQ ID NO: 133
ETXS1016	GmsUfsGmCfCmUfCmAmUmGmGmAmGmAfUmCfUmUmUmCmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 554	GUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGCA	SEQ ID NO: 134
ETXS1018	UmsCfsUmCfCmAfUmGmAmGmGmAmCmCfAmCfCmAmGmCmAmsUmsGm	SEQ ID NO: 555	UCUCCAUGAGGACCACCAGCAUG	SEQ ID NO: 135
ETXS1020	CmsAfsAmAfAmUfCmCmUmUmGmUmGmGfAmUfGmAmAmGmGmsCmsAm	SEQ ID NO: 556	CAAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCA	SEQ ID NO: 136
ETXS1022	CmsGfsUmGfCmCfUmCmAmUmGmGmAmGfAmUfCmUmUmUmCmsGmsCm	SEQ ID NO: 557	CGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCGC	SEQ ID NO: 137
ETXS1024	AmsUfsCmAfAmAfAmUmCmCmUmUmGmUfGmGfAmUmGmAmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 558	AUCAAAAUCCUUGUGGAUGAAGG	SEQ ID NO: 138
ETXS1026	UmsUfsCmAfGmGfAmUmUmAmAmUmCmUfCmAfUmCmAmAmAmsCmsAm	SEQ ID NO: 559	UUCAGGAUUAAUCUCAUCAAACA	SEQ ID NO: 139
ETXS1028	AmsAfsUmCfCmUfUmGmUmGmGmAmUmGfAmAfGmGmCmAmAmsAmsAm	SEQ ID NO: 560	AAUCCUUGUGGAUGAAGGCAAAA	SEQ ID NO: 140
ETXS1030	CmsCfsAmUfCmGfUmGmCmCmUmCmAmUfGmGfAmGmAmUmCmsUmsUm	SEQ ID NO: 561	CCAUCGUGCCUCAUGGAGAUCUU	SEQ ID NO: 141
ETXS1032	AmsAfsAmAfUmCfCmUmUmGmUmGmGmAfUmGfAmAmGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 762	AAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAA	SEQ ID NO: 144

[1210]

ETXS1034	AmsAfsAmAmUmCfCmUmUfGmUmGmG mAfUmGfAmAmGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 763	AAAAUCCUUGUGGAUGAA GGCAA	SEQ ID NO: 144
ETXS1038	CmsAfsUmGmGmUfGmGmCfAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 765	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS1042	UmsCfsGmUmGmCfCmUmCfAmUmGmG mAfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 767	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS1044	AmsAfsAmUfUmCfUmUmGmUmCmAmA mAfGmGfUmGmGmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 768	AAAUUCUUGUCAAAGGUG GAGGC	SEQ ID NO: 165
ETXS1046	AmsAfsAmUmUmCfUmUmGfUmCmAmA mAfGmGfUmGmGmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 769	AAAUUCUUGUCAAAGGUG GAGGC	SEQ ID NO: 165
ETXS1048	UmsGfsUmGfGmAfUmGmAmAmGmGmC mAfAmAfAmCmUmCmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 770	UGUGGAUGAAGGCAAAAC UCCCC	SEQ ID NO: 202
ETXS1050	UmsGfsUmGmGmAfUmGmAfAmGmGmC mAfAmAfAmCmUmCmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 771	UGUGGAUGAAGGCAAAAC UCCCC	SEQ ID NO: 202
ETXS1051	AmsAfsAmAmUmCfCmUmUmGmUmGmG mAfUmGfAmAfGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 782	AAAAUCCUUGUGGAUGAA GGCAA	SEQ ID NO: 144
ETXS1052	CmsAfsUmGmGmUfGmGmCmAmUmUmU mCfCmUfUmGfGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 783	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS1053	UmsCfsGmUmGmCfCmUmCmAmUmGmG mAfGmAfUmCfUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 784	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS1054	AmsAfsAmUmUmCfUmUmGmUmCmAmA mAfGmGfUmGfGmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 785	AAAUUCUUGUCAAAGGUG GAGGC	SEQ ID NO: 165
ETXS1055	UmsGfsUmGmGmAfUmGmAmAmGmGm CmAfAmAfAmCfUmCmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 786	UGUGGAUGAAGGCAAAAC UCCCC	SEQ ID NO: 202
ETXS2128	AmsAfsAmGmUmCfCmUfUfGmUmGmGm AfUmGfAmAmGmGmCmsAmsAm	SEQ ID NO: 795	AAAGUCCUUGUGGAUGAA GGCAA	SEQ ID NO: 787
ETXS2144	AmsAfsCmUmUmCfUmUfGfUmCmAmAm AfGmGfUmGmGmAmGmsGmsCm	SEQ ID NO: 796	AACUUCUUGUCAAAGGUG GAGGC	SEQ ID NO: 788
ETXS2152	UmsGfsUmGmGmAfUmGfAfAmGmGmCm AfAmAfGmCmUmAmCmsCmsCm	SEQ ID NO: 797	UGUGGAUGAAGGCAAAGC UACCC	SEQ ID NO: 789
ETXS2398	CmsAfsUmGmGmUfGmGmCfAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 801	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETSX2400	CmsAfsUmGmGmUfGmGmCmAmUmUmU mCfCmUfUmGfGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 802	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2402	CmsAfsUmGmGmUoGmGmCmAmUmUm UmCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 803	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2404	CmsAfsUmGmGmUoGmGfCfAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 804	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145

[1211]

ETXS2406	CmsAfsUmGmGmUfGmGmCmAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUfAmsGmsGm	SEQ ID NO: 805	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2408	CmsAfsUmGfGmUfGmGmCmAmUmUmU mCfCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 806	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2410	CmsAfsUmGfGmUfGmGfCfAmUmUmUmC fCmUfUmGmGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 807	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2412	CmsAfsUmGmGmUfGmGfCfAmUmUmUm CfCmUfUmGfGmUmAmsGmsGm	SEQ ID NO: 808	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2414	CmsAfsUmGmGmUfGmGfCfAmUmUmUm CfCmUfUmGmGmUfAmsGmsGm	SEQ ID NO: 809	CAUGGUGGCAUUUCCUUG GUAGG	SEQ ID NO: 145
ETXS2416	UmsCfsGmUmGmCfCmUmCfAmUmGmG mAfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 810	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2418	UmsCfsGmUmGmCfCmUmCmAmUmGmG mAfGmAfUmCfUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 811	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2420	UmsCfsGmUmGmCoCmUmCmAmUmGm GmAfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 812	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2422	UmsCfsGmUmGmCoCmUfCfAmUmGmGm AfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 813	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2424	UmsCfsGmUmGmCfCmUmCmAmUmGmG mAfGmAfUmCmUmUfUmsCmsGm	SEQ ID NO: 814	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2426	UmsCfsGmUfGmCfCmUmCmAmUmGmG mAfGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 815	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2428	UmsCfsGmUfGmCfCmUfCfAmUmGmGmA fGmAfUmCmUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 816	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2430	UmsCfsGmUmGmCfCmUfCfAmUmGmGm AfGmAfUmCfUmUmUmsCmsGm	SEQ ID NO: 817	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148
ETXS2432	UmsCfsGmUmGmCfCmUfCfAmUmGmGm AfGmAfUmCmUmUfUmsCmsGm	SEQ ID NO: 818	UCGUGCCUCAUGGAGAUC UUUCG	SEQ ID NO: 148

[1212] 表4提供了本申请的siRNA寡核苷的修饰的第二(正义)序列,以及相应的未修饰的第二(正义)序列,如下所示。

[1213] 表4

[1214]

正义链 ID	修饰的第二链(正义链) 5′ → 3′	SEQ ID NO (SS - mod)	基础碱基序列 5′ → 3′ (显示为未修饰的核苷序列))	SEQ ID NO (SS - unmod)
ETXS1035	iaiaUmsAmsCmCmAmAmGfGmAfAfAfUf GmCmCmAmCmCmAmUmGm	SEQ ID NO: 774	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG	SEQ ID NO: 265

[1215]

ETXS1039	iaiaAmsAmsAmGmAmUmCfUmCfCfAfUf GmAmGmGmCmAmCmGmAm	SEQ ID NO: 776	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	SEQ ID NO: 268
ETXS631	UmsGmsCmCmUmUmCfAmUfCfCfAmC mAmAmGmGmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 562	UGCCUUCAUCCACAAGGAUU U	SEQ ID NO: 242
ETXS633	UmsGmsCmGmAmAmAfGmAfUfCfUmC mCmAmUmGmAmGmGmCm	SEQ ID NO: 563	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGG C	SEQ ID NO: 243
ETXS635	GmsCmsUmGmGmUmGfGmUfCfCfUmC mAmUmGmGmAmGmAmAm	SEQ ID NO: 564	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGA A	SEQ ID NO: 244
ETXS637	GmsCmsGmAmAmAmGfAmUfCfUfCmC mAmUmGmAmGmGmCmAm	SEQ ID NO: 565	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGC A	SEQ ID NO: 245
ETXS639	GmsUmsAmUmGmAmGfAmUfGfCfAmU mGmAmGmCmUmGmCmUm	SEQ ID NO: 566	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGC U	SEQ ID NO: 246
ETXS641	GmsUmsUmUmGmAmUfGmAfGfAfUmU mAmAmUmCmCmUmGmAm	SEQ ID NO: 567	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUG A	SEQ ID NO: 247
ETXS643	UmsGmsAmGmAmUmUfAmAfUfCfCmU mGmAmAmAmCmCmAmAm	SEQ ID NO: 568	UGAGAUUAAUCCUGAAACCA A	SEQ ID NO: 248
ETXS645	UmsGmsAmUmGmAmGfAmUfUfAfAmU mCmCmUmGmAmAmAmCm	SEQ ID NO: 569	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAA C	SEQ ID NO: 249
ETXS647	AmsUmsGmAmGmAmUfUmAfAfUfCmC mUmGmAmAmAmCmCmAm	SEQ ID NO: 570	AUGAGAUUAAUCCUGAAACC A	SEQ ID NO: 250
ETXS649	GmsAmsUmGmAmGmAfUmUfAfAfUmC mCmUmGmAmAmAmCmCm	SEQ ID NO: 571	GAUGAGAUUAAUCCUGAAAC C	SEQ ID NO: 251
ETXS651	CmsUmsGmUmUmUmGfAmUfGfAfGmA mUmUmAmAmUmCmCmUm	SEQ ID NO: 572	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCC U	SEQ ID NO: 252
ETXS653	UmsUmsUmUmGmCmCfUmUfCfAfUmC mCmAmCmAmAmGmGmAm	SEQ ID NO: 573	UUUUGCCUUCAUCCACAAGG A	SEQ ID NO: 253
ETXS655	CmsGmsAmAmAmGmAfUmCfUfCfCmA mUmGmAmGmGmCmAmCm	SEQ ID NO: 574	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 254
ETXS657	UmsGmsCmUmGmGmUfGmGfUfCfCmU mCmAmUmGmGmAmGmAm	SEQ ID NO: 575	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAG A	SEQ ID NO: 255
ETXS659	CmsCmsUmUmCmAmUfCmCfAfCfAmAm GmGmAmUmUmUmUmGm	SEQ ID NO: 576	CCUUCAUCCACAAGGAUUUU G	SEQ ID NO: 256
ETXS661	GmsAmsAmAmGmAmUfCmUfCfCfAmU mGmAmGmGmCmAmCmGm	SEQ ID NO: 577	GAAAGAUCUCCAUGAGGCAC G	SEQ ID NO: 257
ETXS663	UmsUmsCmAmUmCmCfAmCfAfAfGmG mAmUmUmUmUmGmAmUm	SEQ ID NO: 578	UUCAUCCACAAGGAUUUUGA U	SEQ ID NO: 258
ETXS665	UmsUmsUmGmAmUmGfAmGfAfUfUmA mAmUmCmCmUmGmAmAm	SEQ ID NO: 579	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGA A	SEQ ID NO: 259

[1216]

ETXS667	UmsUmsGmCmCmUmUfCmAfUfCfCmAmCmAmAmGmGmAmUmUm	SEQ ID NO: 580	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 260
ETXS669	GmsAmsUmCmUmCmCfAmUfGfAfGmGmCmAmCmGmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 581	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 261
ETXS671	CmsAmsUmGmCmUmGfGmUfGfGfUmCmCmUmCmAmUmGmGmAm	SEQ ID NO: 582	CAUGCUGGUGGUCCUCAUGGA	SEQ ID NO: 262
ETXS673	UmsUmsUmGmCmCmUfUmCfAfUfCmCmAmCmAmAmGmGmAmUm	SEQ ID NO: 583	UUUGCCUUCAUCCACAAGGAU	SEQ ID NO: 263
ETXS675	GmsCmsCmUmUmCmAfUmCfCfAfCmAmAmGmGmAmUmUmUmUm	SEQ ID NO: 584	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUU	SEQ ID NO: 264
ETXS677	UmsAmsCmCmAmAmGfGmAfAfAfUmGmCmCmAmCmCmAmUmGm	SEQ ID NO: 585	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG	SEQ ID NO: 265
ETXS679	UmsUmsGmAmUmGmAfGmAfUfUfAmAmUmCmCmUmGmAmAmAm	SEQ ID NO: 586	UUGAUGAGAUUAAUCCUGAAA	SEQ ID NO: 266
ETXS681	CmsUmsUmCmAmUmCfCmAfCfAfAmGmGmAmUmUmUmUmGmAm	SEQ ID NO: 587	CUUCAUCCACAAGGAUUUUGA	SEQ ID NO: 267
ETXS683	AmsAmsAmGmAmUmCfUmCfCfAfUmGmAmGmGmCmAmCmGmAm	SEQ ID NO: 588	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	SEQ ID NO: 268
ETXS685	UmsGmsUmUmUmGmAfUmGfAfGfAmUmUmAmAmUmCmCmUmGm	SEQ ID NO: 589	UGUUUGAUGAGAUUAAUCCUG	SEQ ID NO: 269
ETXS687	AmsUmsGmCmUmGmGfUmGfGfUfCmCmUmCmAmUmGmGmAmGm	SEQ ID NO: 590	AUGCUGGUGGUCCUCAUGGAG	SEQ ID NO: 270
ETXS689	GmsUmsUmUmUmGmCfCmUfUfCfAmUmCmCmAmCmAmAmGmGm	SEQ ID NO: 591	GUUUUGCCUUCAUCCACAAGG	SEQ ID NO: 271
ETXS691	CmsCmsAmCmCmAmUfGmCfUfGfGmUmGmGmUmCmCmUmCmAm	SEQ ID NO: 592	CCACCAUGCUGGUGGUCCUCA	SEQ ID NO: 272
ETXS693	CmsAmsCmCmAmUmGfCmUfGfGfUmGmGmUmCmCmUmCmAmUm	SEQ ID NO: 593	CACCAUGCUGGUGGUCCUCAU	SEQ ID NO: 273
ETXS695	AmsAmsGmAmUmCmUfCmCfAfUfGmAmGmGmCmAmCmGmAmUm	SEQ ID NO: 594	AAGAUCUCCAUGAGGCACGAU	SEQ ID NO: 274
ETXS697	AmsGmsUmUmUmUmGfCmCfUfUfUfCmAmUmCmCmAmCmAmAmGm	SEQ ID NO: 595	AGUUUUGCCUUCAUCCACAAG	SEQ ID NO: 275
ETXS699	AmsCmsCmAmUmGmCfUmGfGfUfGmGmUmCmCmUmCmAmUmGm	SEQ ID NO: 596	ACCAUGCUGGUGGUCCUCAUG	SEQ ID NO: 276
ETXS701	AmsGmsAmUmCmUmCfCmAfUfGfAmGmGmCmAmCmGmAmUmGm	SEQ ID NO: 597	AGAUCUCCAUGAGGCACGAUG	SEQ ID NO: 277
ETXS703	CmsCmsAmUmGmCmUfGmGfUfGfGmUmCmCmUmCmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 598	CCAUGCUGGUGGUCCUCAUGG	SEQ ID NO: 278

[1217]

ETXS705	UmsGmsCmCmUmCmCfAmCfCfUfUmUmGmAmCmAmAmGmAmAm	SEQ ID NO: 599	UGCCUCCACCUUUGACAAGAA	SEQ ID NO: 279
ETXS707	CmsCmsUmCmCmAmCfCmUfUfUfGmAmCmAmAmGmAmAmUmUm	SEQ ID NO: 600	CCUCCACCUUUGACAAGAAUU	SEQ ID NO: 280
ETXS709	CmsAmsUmUmAmAmGfGmUfGfCfCmCmAmUmGmAmUmGmUmAm	SEQ ID NO: 601	CAUUAAGGUGCCCAUGAUGUA	SEQ ID NO: 281
ETXS711	CmsUmsGmCmCmCmUfAmCfCfAfAmGmGmAmAmAmUmGmCmCm	SEQ ID NO: 602	CUGCCCUACCAAGGAAAUGCC	SEQ ID NO: 282
ETXS713	CmsAmsAmAmCmUmGfCmCfCfUfAmCmCmAmAmGmGmAmAmAm	SEQ ID NO: 603	CAAACUGCCCUACCAAGGAAA	SEQ ID NO: 283
ETXS715	UmsCmsAmAmAmCmUfGmCfCfCfUmAmCmCmAmAmGmGmAmAm	SEQ ID NO: 604	UCAAACUGCCCUACCAAGGAA	SEQ ID NO: 284
ETXS717	CmsUmsCmCmAmCmCfUmUfUfGfAmCmAmAmGmAmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 605	CUCCACCUUUGACAAGAAUUU	SEQ ID NO: 285
ETXS719	CmsGmsAmCmAmCmUfUmUfCfCfAmCmCmUmGmGmAmCmAmAm	SEQ ID NO: 606	CGACACUUUCCACCUGGACAA	SEQ ID NO: 286
ETXS721	AmsCmsUmUmUmCmCfAmCfCfUfGmGmAmCmAmAmGmUmAmCm	SEQ ID NO: 607	ACUUUCCACCUGGACAAGUAC	SEQ ID NO: 287
ETXS723	AmsAmsAmCmUmGmCfCmCfUfAfCmCmAmAmGmGmAmAmAmUm	SEQ ID NO: 608	AAACUGCCCUACCAAGGAAAU	SEQ ID NO: 288
ETXS725	AmsCmsUmGmCmCmCfUmAfCfCfAmAmGmGmAmAmAmUmGmCm	SEQ ID NO: 609	ACUGCCCUACCAAGGAAAUGC	SEQ ID NO: 289
ETXS727	CmsAmsCmUmUmUmCfCmAfCfCfUmGmGmAmCmAmAmGmUmAm	SEQ ID NO: 610	CACUUUCCACCUGGACAAGUA	SEQ ID NO: 290
ETXS729	CmsCmsAmUmUmAmAfGmGfUfGfCmCmCmAmUmGmAmUmGmUm	SEQ ID NO: 611	CCAUUAAGGUGCCCAUGAUGU	SEQ ID NO: 291
ETXS731	UmsUmsGmCmCmUmCfCmAfCfCfUmUmUmGmAmCmAmAmGmAm	SEQ ID NO: 612	UUGCCUCCACCUUUGACAAGA	SEQ ID NO: 292
ETXS733	UmsUmsUmCmCmAmCfCmUfGfGfAmCmAmAmGmUmAmCmAmAm	SEQ ID NO: 613	UUUCCACCUGGACAAGUACAA	SEQ ID NO: 293
ETXS735	UmsCmsCmUmCmAmAfAmCfUfGfCmCmCmUmAmCmCmAmAmGm	SEQ ID NO: 614	UCCUCAAACUGCCCUACCAAG	SEQ ID NO: 294
ETXS737	AmsAmsCmUmGmCmCfCmUfAfCfCmAmAmGmGmAmAmAmUmGm	SEQ ID NO: 615	AACUGCCCUACCAAGGAAAUG	SEQ ID NO: 295
ETXS739	CmsCmsUmCmAmAmAfCmUfGfCfCmCmUmAmCmCmAmAmGmGm	SEQ ID NO: 616	CCUCAAACUGCCCUACCAAGG	SEQ ID NO: 296
ETXS741	GmsUmsCmCmUmCmAfAmAfCfUfGmCmCmCmUmAmCmCmAmAm	SEQ ID NO: 617	GUCCUCAAACUGCCCUACCAA	SEQ ID NO: 297

[1218]

ETXS743	GmsAmsCmAmCmUmUfUmCfCfAfCmCmUmGmGmAmCmAmAmGm	SEQ ID NO: 618	GACACUUUCCACCUGGACAAG	SEQ ID NO: 298
ETXS745	UmsUmsUmGmCmCmUfCmCfAfCfCmUmUmUmGmAmCmAmAmGm	SEQ ID NO: 619	UUUGCCUCCACCUUUGACAAG	SEQ ID NO: 299
ETXS747	AmsCmsAmCmUmUmUfCmCfAfCfCmUmGmGmAmCmAmAmGmUm	SEQ ID NO: 620	ACACUUUCCACCUGGACAAGU	SEQ ID NO: 300
ETXS749	UmsUmsCmCmAmCmCfUmGfGfAfCmAmAmGmUmAmCmAmAmGm	SEQ ID NO: 621	UUCCACCUGGACAAGUACAAG	SEQ ID NO: 301
ETXS751	CmsUmsUmUmCmCmAfCmCfUfGfGmAmCmAmAmGmUmAmCmAm	SEQ ID NO: 622	CUUUCCACCUGGACAAGUACA	SEQ ID NO: 302
ETXS753	CmsUmsCmAmAmAmCfUmGfCfCfCmUmAmCmCmAmAmGmGmAm	SEQ ID NO: 623	CUCAAACUGCCCUACCAAGGA	SEQ ID NO: 303
ETXS755	UmsUmsAmCmAmUmCfUmUfGfUfUmCmAmAmAmGmGmGmAmAm	SEQ ID NO: 624	UUACAUCUUGUUCAAAGGGAA	SEQ ID NO: 304
ETXS757	UmsGmsCmCmAmCmCfAmUfGfCfUmGmGmUmGmGmUmCmCmUm	SEQ ID NO: 625	UGCCACCAUGCUGGUGGUCCU	SEQ ID NO: 305
ETXS759	UmsAmsUmCmCmAmAfGmAfGfGfUmAmUmUmUmUmGmAmUmAm	SEQ ID NO: 626	UAUCCAAGAGGUAUUUUGAUA	SEQ ID NO: 306
ETXS761	AmsAmsAmUmGmCmCfAmCfCfAfUmGmCmUmGmGmUmGmGmUm	SEQ ID NO: 627	AAAUGCCACCAUGCUGGUGGU	SEQ ID NO: 307
ETXS763	AmsUmsUmAmCmAmUfCmUfUfGfUmUmCmAmAmAmGmGmGmAm	SEQ ID NO: 628	AUUACAUCUUGUUCAAAGGGA	SEQ ID NO: 308
ETXS765	CmsUmsCmCmAmUmGfAmGfGfCfAmCmGmAmUmGmGmCmAmAm	SEQ ID NO: 629	CUCCAUGAGGCACGAUGGCAA	SEQ ID NO: 309
ETXS767	UmsCmsCmAmUmGmCfCmUfCfCfUmGmUmCmAmUmCmAmAmAm	SEQ ID NO: 630	UCCAUGCCUCCUGUCAUCAAA	SEQ ID NO: 310
ETXS769	AmsUmsUmCmCmAmUfGmCfCfUfCmCmUmGmUmCmAmUmCmAm	SEQ ID NO: 631	AUUCCAUGCCUCCUGUCAUCA	SEQ ID NO: 311
ETXS771	CmsAmsAmGmGmAmAfAmUfGfCfCmAmCmCmAmUmGmCmUmGm	SEQ ID NO: 632	CAAGGAAAUGCCACCAUGCUG	SEQ ID NO: 312
ETXS773	UmsGmsGmUmGmGmUfCmCfUfCfAmUmGmGmAmGmAmAmAmAm	SEQ ID NO: 633	UGGUGGUCCUCAUGGAGAAAA	SEQ ID NO: 313
ETXS775	AmsUmsCmUmUmGmUfUmCfAfAfAmGmGmGmAmAmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 634	AUCUUGUUCAAAGGGAAAUGG	SEQ ID NO: 314
ETXS777	AmsAmsGmGmAmAmAfUmGfCfCfAmCmCmAmUmGmCmUmGmGm	SEQ ID NO: 635	AAGGAAAUGCCACCAUGCUGG	SEQ ID NO: 315
ETXS779	GmsCmsCmUmCmCmAfCmCfUfUfUmGmAmCmAmAmGmAmAmUm	SEQ ID NO: 636	GCCUCCACCUUUGACAAGAAU	SEQ ID NO: 316

[1219]

ETXS781	GmsAmsGmUmUmUmUfGmCfCfUfUmCmAmUmCmCmAmCmAmAm	SEQ ID NO: 637	GAGUUUUGCCUUCAUCCACAA	SEQ ID NO: 317
ETXS783	GmsCmsUmGmCmGmAfAmAfGfAfUmCmUmCmCmAmUmGmAmGm	SEQ ID NO: 638	GCUGCGAAAGAUCUCCAUGAG	SEQ ID NO: 318
ETXS785	AmsGmsUmUmUmGmCfCmUfCfCfAmCmCmUmUmUmGmAmCmAm	SEQ ID NO: 639	AGUUUGCCUCCACCUUUGACA	SEQ ID NO: 319
ETXS787	GmsUmsUmUmGmCmCfUmCfCfAfCmCmUmUmUmGmAmCmAmAm	SEQ ID NO: 640	GUUUGCCUCCACCUUUGACAA	SEQ ID NO: 320
ETXS789	CmsAmsUmCmUmUmGfUmUfCfAfAmAmGmGmGmAmAmAmUmGm	SEQ ID NO: 641	CAUCUUGUUCAAAGGGAAAUG	SEQ ID NO: 321
ETXS791	GmsGmsAmGmUmUmUfUmGfCfCfUmUmCmAmUmCmCmAmCmAm	SEQ ID NO: 642	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	SEQ ID NO: 322
ETXS793	CmsUmsGmCmGmAmAfAmGfAfUfCmUmCmCmAmUmGmAmGmGm	SEQ ID NO: 643	CUGCGAAAGAUCUCCAUGAGG	SEQ ID NO: 323
ETXS795	CmsCmsAmUmGmCmCfUmCfCfUfGmUmCmAmUmCmAmAmAmGm	SEQ ID NO: 644	CCAUGCCUCCUGUCAUCAAAG	SEQ ID NO: 324
ETXS797	UmsGmsUmUmUmCmUfGmGfGfCfAmGmGmGmUmGmGmUmGmAm	SEQ ID NO: 645	UGUUUCUGGGCAGGGUGGUGA	SEQ ID NO: 325
ETXS799	GmsCmsCmUmGmCmUfGmCfGfAfAmAmGmAmUmCmUmCmCmAm	SEQ ID NO: 646	GCCUGCUGCGAAAGAUCUCCA	SEQ ID NO: 326
ETXS801	AmsAmsCmUmGmUmUfUmGfAfUfGmAmGmAmUmUmAmAmUmCm	SEQ ID NO: 647	AACUGUUUGAUGAGAUUAAUC	SEQ ID NO: 327
ETXS803	AmsUmsGmCmCmUmCfCmUfGfUfCmAmUmCmAmAmAmGmUmGm	SEQ ID NO: 648	AUGCCUCCUGUCAUCAAAGUG	SEQ ID NO: 328
ETXS805	AmsGmsUmAmUmGmAfGmAfUfGfCmAmUmGmAmGmCmUmGmCm	SEQ ID NO: 649	AGUAUGAGAUGCAUGAGCUGC	SEQ ID NO: 329
ETXS807	AmsAmsGmUmAmUmGfAmGfAfUfGmCmAmUmGmAmGmCmUmGm	SEQ ID NO: 650	AAGUAUGAGAUGCAUGAGCUG	SEQ ID NO: 330
ETXS809	UmsGmsUmCmCmUmCfAmAfAfCfUmGmCmCmCmUmAmCmCmAm	SEQ ID NO: 651	UGUCCUCAAACUGCCCUACCA	SEQ ID NO: 331
ETXS811	AmsCmsUmGmUmUmUfGmAfUfGfAmGmAmUmUmAmAmUmCmCm	SEQ ID NO: 652	ACUGUUUGAUGAGAUUAAUCC	SEQ ID NO: 332
ETXS813	GmsAmsCmCmAmUmUfAmAfGfGfUmGmCmCmCmAmUmGmAmUm	SEQ ID NO: 653	GACCAUUAAGGUGCCCAUGAU	SEQ ID NO: 333
ETXS815	AmsCmsCmAmUmUmAfAmGfGfUfGmCmCmCmAmUmGmAmUmGm	SEQ ID NO: 654	ACCAUUAAGGUGCCCAUGAUG	SEQ ID NO: 334
ETXS817	GmsUmsUmUmCmUmGfGmGfCfAfGmGmGmUmGmGmUmGmAmAm	SEQ ID NO: 655	GUUUCUGGGCAGGGUGGUGAA	SEQ ID NO: 335

[1220]

ETXS819	UmsUmsCmUmGmUmUfUmCfUfGfGmG mCmAmGmGmGmUmGmGm	SEQ ID NO: 656	UUCUGUUUCUGGGCAGGGUG G	SEQ ID NO: 336
ETXS821	UmsUmsUmUmCmUmUfUmCfCfGfAmA mGmUmUmCmAmAmGmCm	SEQ ID NO: 657	UUUUCUUUCCGAAGUUCAAG C	SEQ ID NO: 337
ETXS823	UmsUmsUmCmUmUmUfCmCfGfAfAmG mUmUmCmAmAmGmCmUm	SEQ ID NO: 658	UUUCUUUCCGAAGUUCAAGC U	SEQ ID NO: 338
ETXS825	UmsCmsUmGmUmUmUfCmUfGfGfGmC mAmGmGmGmUmGmGmUm	SEQ ID NO: 659	UCUGUUUCUGGGCAGGGUGG U	SEQ ID NO: 339
ETXS827	AmsUmsGmUmCmCmUfCmAfAfAfCmU mGmCmCmCmUmAmCmCm	SEQ ID NO: 660	AUGUCCUCAAACUGCCCUACC	SEQ ID NO: 340
ETXS829	UmsCmsGmAmCmAmCfUmUfUfCfCmA mCmCmUmGmGmAmCmAm	SEQ ID NO: 661	UCGACACUUUCCACCUGGACA	SEQ ID NO: 341
ETXS831	CfsCmsUfUmCfAmUfCmCfAmCfAmAfGm GfAmUfUmUf	SEQ ID NO: 662	CCUUCAUCCACAAGGAUUU	SEQ ID NO: 342
ETXS833	CfsGmsAfAmAfGmAfUmCfUmCfCmAfU mGfAmGfGmCf	SEQ ID NO: 663	CGAAAGAUCUCCAUGAGGC	SEQ ID NO: 343
ETXS835	UfsGmsGfUmGfGmUfCmCfUmCfAmUfG mGfAmGfAmAf	SEQ ID NO: 664	UGGUGGUCCUCAUGGAGAA	SEQ ID NO: 344
ETXS837	GfsAmsAfAmGfAmUfCmUfCmCfAmUfG mAfGmGfCmAf	SEQ ID NO: 665	GAAAGAUCUCCAUGAGGCA	SEQ ID NO: 345
ETXS839	AfsUmsGfAmGfAmUfGmCfAmUfGmAfG mCfUmGfCmUf	SEQ ID NO: 666	AUGAGAUGCAUGAGCUGCU	SEQ ID NO: 346
ETXS841	UfsUmsGfAmUfGmAfGmAfUmUfAmAfU mCfCmUfGmAf	SEQ ID NO: 667	UUGAUGAGAUUAAUCCUGA	SEQ ID NO: 347
ETXS843	AfsGmsAfUmUfAmAfUmCfCmUfGmAfA mAfCmCfAmAf	SEQ ID NO: 668	AGAUUAAUCCUGAAACCAA	SEQ ID NO: 348
ETXS845	AfsUmsGfAmGfAmUfUmAfAmUfCmCfU mGfAmAfAmCf	SEQ ID NO: 669	AUGAGAUUAAUCCUGAAAC	SEQ ID NO: 349
ETXS847	GfsAmsGfAmUfUmAfAmUfCmCfUmGfA mAfAmCfCmAf	SEQ ID NO: 670	GAGAUUAAUCCUGAAACCA	SEQ ID NO: 350
ETXS849	UfsGmsAfGmAfUmUfAmAfUmCfCmUfG mAfAmAfCmCf	SEQ ID NO: 671	UGAGAUUAAUCCUGAAACC	SEQ ID NO: 351
ETXS851	GfsUmsUfUmGfAmUfGmAfGmAfUmUfA mAfUmCfCmUf	SEQ ID NO: 672	GUUUGAUGAGAUUAAUCCU	SEQ ID NO: 352
ETXS853	UfsUmsGfCmCfUmUfCmAfUmCfCmAfC mAfAmGfGmAf	SEQ ID NO: 673	UUGCCUUCAUCCACAAGGA	SEQ ID NO: 353
ETXS855	AfsAmsAfGmAfUmCfUmCfCmAfUmGfA mGfGmCfAmCf	SEQ ID NO: 674	AAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 354

[1221]

ETXS857	CfsUmsGfGmUfGmGfUmCfCmUfCmAfUmGfGmAfGmAf	SEQ ID NO: 675	CUGGUGGUCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 355
ETXS859	UfsUmsCfAmUfCmCfAmCfAmAfGmGfAmUfUmUfUmGf	SEQ ID NO: 676	UUCAUCCACAAGGAUUUUG	SEQ ID NO: 356
ETXS861	AfsAmsGfAmUfCmUfCmCfAmUfGmAfGmGfCmAfCmGf	SEQ ID NO: 677	AAGAUCUCCAUGAGGCACG	SEQ ID NO: 357
ETXS863	CfsAmsUfCmCfAmCfAmAfGmGfAmUfUmUfUmGfAmUf	SEQ ID NO: 678	CAUCCACAAGGAUUUUGAU	SEQ ID NO: 358
ETXS865	UfsGmsAfUmGfAmGfAmUfUmAfAmUfCmCfUmGfAmAf	SEQ ID NO: 679	UGAUGAGAUUAAUCCUGAA	SEQ ID NO: 359
ETXS867	GfsCmsCfUmUfCmAfUmCfCmAfCmAfAmGfGmAfUmUf	SEQ ID NO: 680	GCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 360
ETXS869	UfsCmsUfCmCfAmUfGmAfGmGfCmAfCmGfAmUfGmGf	SEQ ID NO: 681	UCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 361
ETXS871	UmsGmsCmCmUmUmCfAfUfCfCfAmCmAmAmGmGmAmUfUmUm	SEQ ID NO: 682	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	SEQ ID NO: 242
ETXS873	UmsGmsCmGmAmAmAfGfAfUfCfUmCmCmAmUmGmAmGfGmCm	SEQ ID NO: 683	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	SEQ ID NO: 243
ETXS875	GmsCmsUmGmGmUmGfGfUfCfCfUmCmAmUmGmGmAmGfAmAm	SEQ ID NO: 684	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	SEQ ID NO: 244
ETXS877	GmsCmsGmAmAmAmGfAfUfCfUfCmCmAmUmGmAmGmGfCmAm	SEQ ID NO: 685	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	SEQ ID NO: 245
ETXS879	GmsUmsAmUmGmAmGfAfUfGfCfAmUmGmAmGmCmUmGfCmUm	SEQ ID NO: 686	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	SEQ ID NO: 246
ETXS881	GmsUmsUmUmGmAmUfGfAfGfAfUmUmAmAmUmCmCmUfGmAm	SEQ ID NO: 687	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	SEQ ID NO: 247
ETXS883	UmsGmsAmGmAmUmUfAfAfUfCfCmUmGmAmAmAmCmCfAmAm	SEQ ID NO: 688	UGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	SEQ ID NO: 248
ETXS885	UmsGmsAmUmGmAmGfAfUfUfAfAmUmCmCmUmGmAmAfAmCm	SEQ ID NO: 689	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	SEQ ID NO: 249
ETXS887	AmsUmsGmAmGmAmUfUfAfAfUfCmCmUmGmAmAmAmCfCmAm	SEQ ID NO: 690	AUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	SEQ ID NO: 250
ETXS889	GmsAmsUmGmAmGmAfUfUfAfAfUmCmCmUmGmAmAmAfCmCm	SEQ ID NO: 691	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	SEQ ID NO: 251
ETXS891	CmsUmsGmUmUmUmGfAfUfGfAfGmAmUmUmAmAmUmCfCmUm	SEQ ID NO: 692	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	SEQ ID NO: 252
ETXS893	UmsUmsUmUmGmCmCfUfUfCfAfUmCmCmAmCmAmAmGfGmAm	SEQ ID NO: 693	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	SEQ ID NO: 253

[1222]

ETXS895	CmsGmsAmAmAmGmAfUfCfUfCfCmAmUmGmAmGmGmCfAmCm	SEQ ID NO: 694	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 254
ETXS897	UmsGmsCmUmGmGmUfGfGfUfCfCmUmCmAmUmGmGmAfGmAm	SEQ ID NO: 695	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 255
ETXS899	CmsCmsUmUmCmAmUfCfCfAfCfAmAmGmGmAmUmUmUfUmGm	SEQ ID NO: 696	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	SEQ ID NO: 256
ETXS901	GmsAmsAmAmGmAmUfCfUfCfCfAmUmGmAmGmGmCmAfCmGm	SEQ ID NO: 697	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	SEQ ID NO: 257
ETXS903	UmsUmsCmAmUmCmCfAfCfAfAfGmGmAmUmUmUmUmGfAmUm	SEQ ID NO: 698	UUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	SEQ ID NO: 258
ETXS905	UmsUmsUmGmAmUmGfAfGfAfUfUmAmAmUmCmCmUmGfAmAm	SEQ ID NO: 699	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	SEQ ID NO: 259
ETXS907	UmsUmsGmCmCmUmUfCfAfUfCfCmAmCmAmAmGmGmAfUmUm	SEQ ID NO: 700	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 260
ETXS909	GmsAmsUmCmUmCmCfAfUfGfAfGmGmCmAmCmGmAmUfGmGm	SEQ ID NO: 701	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 261
ETXS911	UmsGmsCmCmUmUfCfAmUfCfCfAfCmAmAmGmGmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 702	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	SEQ ID NO: 242
ETXS913	UmsGmsCmGmAmAfAfGmAfUfCfUfCmCmAmUmGmAmGmGmCm	SEQ ID NO: 703	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	SEQ ID NO: 243
ETXS915	GmsCmsUmGmGmUfGfGmUfCfCfUfCmAmUmGmGmAmGmAmAm	SEQ ID NO: 704	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	SEQ ID NO: 244
ETXS917	GmsCmsGmAmAmAfGfAmUfCfUfCfCmAmUmGmAmGmGmCmAm	SEQ ID NO: 705	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	SEQ ID NO: 245
ETXS919	GmsUmsAmUmGmAfGfAmUfGfCfAfUmGmAmGmCmUmGmCmUm	SEQ ID NO: 706	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	SEQ ID NO: 246
ETXS921	GmsUmsUmUmGmAfUfGmAfGfAfUfUmAmAmUmCmCmUmGmAm	SEQ ID NO: 707	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	SEQ ID NO: 247
ETXS923	UmsGmsAmGmAmUfUfAmAfUfCfCfUmGmAmAmAmCmCmAmAm	SEQ ID NO: 708	UGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	SEQ ID NO: 248
ETXS925	UmsGmsAmUmGmAfGfAmUfUfAfAfUmCmCmUmGmAmAmAmCm	SEQ ID NO: 709	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	SEQ ID NO: 249
ETXS927	AmsUmsGmAmGmAfUfUmAfAfUfCfCmUmGmAmAmAmCmCmAm	SEQ ID NO: 710	AUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	SEQ ID NO: 250
ETXS929	GmsAmsUmGmAmGfAfUmUfAfAfUfCmCmUmGmAmAmAmCmCm	SEQ ID NO: 711	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	SEQ ID NO: 251
ETXS931	CmsUmsGmUmUmUfGfAmUfGfAfGfAmUmUmAmAmUmCmCmUm	SEQ ID NO: 712	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	SEQ ID NO: 252

[1223]

ETXS933	UmsUmsUmUmGmCfCfUmUfCfAfUfCmCmAmCmAmAmGmGmAm	SEQ ID NO: 713	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	SEQ ID NO: 253
ETXS935	CmsGmsAmAmAmGfAfUmCfUfCfCfAmUmGmAmGmGmCmAmCm	SEQ ID NO: 714	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 254
ETXS937	UmsGmsCmUmGmGfUfGmGfUfCfCfUmCmAmUmGmGmAmGmAm	SEQ ID NO: 715	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 255
ETXS939	CmsCmsUmUmCmAfUfCmCfAfCfAfAmGmGmAmUmUmUmUmGm	SEQ ID NO: 716	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	SEQ ID NO: 256
ETXS941	GmsAmsAmAmGmAfUfCmUfCfCfAfUmGmAmGmGmCmAmCmGm	SEQ ID NO: 717	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	SEQ ID NO: 257
ETXS943	UmsUmsCmAmUmCfCfAmCfAfAfGfGfmAmUmUmUmUmGmAmUm	SEQ ID NO: 718	UUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	SEQ ID NO: 258
ETXS945	UmsUmsUmGmAmUfGfAmGfAfUfUfAmAmUmCmCmUmGmAmAm	SEQ ID NO: 719	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	SEQ ID NO: 259
ETXS947	UmsUmsGmCmCmUfUfCmAfUfCfCfAmCmAmAmGmGmAmUmUm	SEQ ID NO: 720	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 260
ETXS949	GmsAmsUmCmUmCfCfAmUfGfAfGfGfmCmAmCmGmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 721	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 261
ETXS951	UmsGmsCmCmUmUmCfAmUfCfCfAfCmAmAmGmGmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 722	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	SEQ ID NO: 242
ETXS953	UmsGmsCmGmAmAmAfGmAfUfCfUfCmCmAmUmGmAmGmGmCm	SEQ ID NO: 723	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	SEQ ID NO: 243
ETXS955	GmsCmsUmGmGmUmGfGmUfCfCfUfCmAmUmGmGmAmGmAmAm	SEQ ID NO: 724	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	SEQ ID NO: 244
ETXS957	GmsCmsGmAmAmAmGfAmUfCfUfCfCmAmUmGmAmGmGmCmAm	SEQ ID NO: 725	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	SEQ ID NO: 245
ETXS959	GmsUmsAmUmGmAmGfAmUfGfCfAfUmGmAmGmCmUmGmCmUm	SEQ ID NO: 726	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	SEQ ID NO: 246
ETXS961	GmsUmsUmUmGmAmUfGmAfGfAfUfUmAmAmUmCmCmUmGmAm	SEQ ID NO: 727	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	SEQ ID NO: 247
ETXS963	UmsGmsAmGmAmUmUfAmAfUfCfCfUmGmAmAmAmCmCmAmAm	SEQ ID NO: 728	UGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	SEQ ID NO: 248
ETXS965	UmsGmsAmUmGmAmGfAmUfUfAfAfUmCmCmUmGmAmAmAmCm	SEQ ID NO: 729	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	SEQ ID NO: 249
ETXS967	AmsUmsGmAmGmAmUfUmAfAfUfCfCfmUmGmAmAmAmCmCmAm	SEQ ID NO: 730	AUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	SEQ ID NO: 250
ETXS969	GmsAmsUmGmAmGmAfUmUfAfAfUfCmCmUmGmAmAmAmCmCm	SEQ ID NO: 731	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	SEQ ID NO: 251

[1224]

ETXS971	CmsUmsGmUmUmUmGfAmUfGfAfGfAmUmUmAmAmUmCmCmUm	SEQ ID NO: 732	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	SEQ ID NO: 252
ETXS973	UmsUmsUmUmGmCmCfUmUfCfAfUfCmCmAmCmAmAmGmGmAm	SEQ ID NO: 733	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	SEQ ID NO: 253
ETXS975	CmsGmsAmAmAmGmAfUmCfUfCfCfAmUmGmAmGmGmCmAmCm	SEQ ID NO: 734	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 254
ETXS977	UmsGmsCmUmGmGmUfGmGfUfCfCfUmCmAmUmGmGmAmGmAm	SEQ ID NO: 735	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 255
ETXS979	CmsCmsUmUmCmAmUfCmCfAfCfAfAmGmGmAmUmUmUmUmGm	SEQ ID NO: 736	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	SEQ ID NO: 256
ETXS981	GmsAmsAmAmGmAmUfCmUfCfCfAfUmGmAmGmGmCmAmCmGm	SEQ ID NO: 737	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	SEQ ID NO: 257
ETXS983	UmsUmsCmAmUmCmCfAmCfAfAfGfGmAmUmUmUmUmGmAmUm	SEQ ID NO: 738	UUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	SEQ ID NO: 258
ETXS985	UmsUmsUmGmAmUmGfAmGfAfUfUfAmAmUmCmCmUmGmAmAm	SEQ ID NO: 739	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	SEQ ID NO: 259
ETXS987	UmsUmsGmCmCmUmUfCmAfUfCfCfAmCmAmAmGmGmAmUmUm	SEQ ID NO: 740	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 260
ETXS989	GmsAmsUmCmUmCmCfAmUfGfAfGfGmCmAmCmGmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 741	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 261
ETXS991	UmsGmsCmCmUmUmCfAmUfCfCfAfCmAmAmGmGmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 742	UGCCUUCAUCCACAAGGAUUU	SEQ ID NO: 242
ETXS993	UmsGmsCmGmAmAmAfGmAfUfCfUfCmCmAmUmGmAmGmGmCm	SEQ ID NO: 743	UGCGAAAGAUCUCCAUGAGGC	SEQ ID NO: 243
ETXS995	GmsCmsUmGmGmUmGfGmUfCfCfUfCmAmUmGmGmAmGmAmAm	SEQ ID NO: 744	GCUGGUGGUCCUCAUGGAGAA	SEQ ID NO: 244
ETXS997	GmsCmsGmAmAmAmGfAmUfCfUfCfCmAmUmGmAmGmGmCmAm	SEQ ID NO: 745	GCGAAAGAUCUCCAUGAGGCA	SEQ ID NO: 245
ETXS999	GmsUmsAmUmGmAmGfAmUfGfCfAfUmGmAmGmCmUmGmCmUm	SEQ ID NO: 746	GUAUGAGAUGCAUGAGCUGCU	SEQ ID NO: 246
ETXS1001	GmsUmsUmUmGmAmUfGmAfGfAfUfUmAmAmUmCmCmUmGmAm	SEQ ID NO: 747	GUUUGAUGAGAUUAAUCCUGA	SEQ ID NO: 247
ETXS1003	UmsGmsAmGmAmUmUfAmAfUfCfCfUmGmAmAmAmCmCmAmAm	SEQ ID NO: 748	UGAGAUUAAUCCUGAAACCAA	SEQ ID NO: 248
ETXS1005	UmsGmsAmUmGmAmGfAmUfUfAfAfUmCmCmUmGmAmAmAmCm	SEQ ID NO: 749	UGAUGAGAUUAAUCCUGAAAC	SEQ ID NO: 249
ETXS1007	AmsUmsGmAmGmAmUfUmAfAfUfCfCmUmGmAmAmAmCmCmAm	SEQ ID NO: 750	AUGAGAUUAAUCCUGAAACCA	SEQ ID NO: 250

[1225]

ETXS1009	GmsAmsUmGmAmGmAfUmUfAfAfUfCmCmUmGmAmAmAmCmCm	SEQ ID NO: 751	GAUGAGAUUAAUCCUGAAACC	SEQ ID NO: 251
ETXS1011	CmsUmsGmUmUmUmGfAmUfGfAfGfAmUmUmAmAmUmCmCmUm	SEQ ID NO: 752	CUGUUUGAUGAGAUUAAUCCU	SEQ ID NO: 252
ETXS1013	UmsUmsUmUmGmCmCfUmUfCfAfUfCmCmAmCmAmAmGmGmAm	SEQ ID NO: 753	UUUUGCCUUCAUCCACAAGGA	SEQ ID NO: 253
ETXS1015	CmsGmsAmAmAmGmAfUmCfUfCfCfAmUmGmAmGmGmCmAmCm	SEQ ID NO: 754	CGAAAGAUCUCCAUGAGGCAC	SEQ ID NO: 254
ETXS1017	UmsGmsCmUmGmGmUfGmGfUfCfCfUmCmAmUmGmGmAmGmAm	SEQ ID NO: 755	UGCUGGUGGUCCUCAUGGAGA	SEQ ID NO: 255
ETXS1019	CmsCmsUmUmCmAmUfCmCfAfCfAfAmGmGmAmUmUmUmGm	SEQ ID NO: 756	CCUUCAUCCACAAGGAUUUUG	SEQ ID NO: 256
ETXS1021	GmsAmsAmAmGmAmUfCmUfCfCfAfUmGmAmGmGmCmAmCmGm	SEQ ID NO: 757	GAAAGAUCUCCAUGAGGCACG	SEQ ID NO: 257
ETXS1023	UmsUmsCmAmUmCmCfAmCfAfAfGfGmAmUmUmUmUmGmAmUm	SEQ ID NO: 758	UUCAUCCACAAGGAUUUUGAU	SEQ ID NO: 258
ETXS1025	UmsUmsUmGmAmUmGfAmGfAfUfUfAmAmUmCmCmUmGmAmAm	SEQ ID NO: 759	UUUGAUGAGAUUAAUCCUGAA	SEQ ID NO: 259
ETXS1027	UmsUmsGmCmCmUmUfCmAfUfCfCfAmCmAmAmGmGmAmUmUm	SEQ ID NO: 760	UUGCCUUCAUCCACAAGGAUU	SEQ ID NO: 260
ETXS1029	GmsAmsUmCmUmCmCfAmUfGfAfGfGmCmAmCmGmAmUmGmGm	SEQ ID NO: 761	GAUCUCCAUGAGGCACGAUGG	SEQ ID NO: 261
ETXS1031	iaiaGmsCmsCmUmUmCmAfUmCfCfAfCfAmAmGmGmAmUmUmUmUm	SEQ ID NO: 772	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUU	SEQ ID NO: 264
ETXS1033	iaiaGmsCmsCmUmUmCmAmUmCfCfAfCmAmAmGmGmAmUmUmUmUm	SEQ ID NO: 773	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUU	SEQ ID NO: 264
ETXS1037	iaiaUmsAmsCmCmAmAmGmGmAfAfAfUmGmCmCmAmCmCmAmUmGm	SEQ ID NO: 775	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG	SEQ ID NO: 265
ETXS1041	iaiaAmsAmsAmGmAmUmCmUmCfCfAfUmGmAmGmGmCmAmCmGmAm	SEQ ID NO: 777	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	SEQ ID NO: 268
ETXS1043	iaiaCmsUmsCmCmAmCmCfUmUfUfGfAfCmAmAmGmAmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 778	CUCCACCUUUGACAAGAAUUU	SEQ ID NO: 285
ETXS1045	iaiaCmsUmsCmCmAmCmCmUmUfUfGfAmCmAmAmGmAmAmUmUmUm	SEQ ID NO: 779	CUCCACCUUUGACAAGAAUUU	SEQ ID NO: 285
ETXS1047	iaiaGmsGmsAmGmUmUmUfUmGfCfCfUfUmCmAmUmCmCmAmCmAm	SEQ ID NO: 780	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	SEQ ID NO: 322
ETXS1049	iaiaGmsGmsAmGmUmUmUmUmGfCfCfUmUmCmAmUmCmCmAmCmAm	SEQ ID NO: 781	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	SEQ ID NO: 322

[1226]

ETXS2127	GmsCmsCmUmUmCmAfUmCfCfAfCmA mAmGmGmAmCmUmUmUm	SEQ ID NO: 798	GCCUUCAUCCACAAGGACUUU	SEQ ID NO: 791
ETXS2143	CmsUmsCmCmAmCmCfUmUfUfGfAmC mAmAmGmAmAmGmUmUm	SEQ ID NO: 799	CUCCACCUUUGACAAGAAGU U	SEQ ID NO: 792
ETXS2151	GmsUmsAmGmCmUmUfUmGfCfCfUmU mCmAmUmCmCmAmCmAm	SEQ ID NO: 800	GUAGCUUUGCCUUCAUCCAC A	SEQ ID NO: 793
ETXS2397	iaiaUmsAmsCmCmAmAmGmGmAfAfAfU mGmCmCmAmCmCmAmUmGm	SEQ ID NO: 819	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG	SEQ ID NO: 265
ETXS2399	iaiaAmsAmsAmGmAmUmCmUmCfCfAfU mGmAmGmGmCmAmCmGmAm	SEQ ID NO: 820	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA	SEQ ID NO: 268

[1227] 如上表4所示,一些修饰的第二链序列包括优选的5’iaia基序。然而,还应该理解,这些修饰的第二链序列的范围还包括在没有5’iaia基序的情况下的Me/F修饰的第二链。

[1228] 表5标识了双链体,其双链体ID参考了前面表3和表4中修饰的反义和正义ID。

[1229] 表5

[1230]

双链体 ID	第一链(反义链)ID	第二链(正义链)ID
ETXM1184	ETXS1036	ETXS1035
ETXM1157	ETXS1040	ETXS1039
ETXM316	ETXS632	ETXS631
ETXM317	ETXS634	ETXS633
ETXM318	ETXS636	ETXS635
ETXM319	ETXS638	ETXS637
ETXM320	ETXS640	ETXS639
ETXM321	ETXS642	ETXS641
ETXM322	ETXS644	ETXS643
ETXM323	ETXS646	ETXS645
ETXM324	ETXS648	ETXS647
ETXM325	ETXS650	ETXS649
ETXM326	ETXS652	ETXS651
ETXM327	ETXS654	ETXS653
ETXM328	ETXS656	ETXS655
ETXM329	ETXS658	ETXS657
ETXM330	ETXS660	ETXS659
ETXM331	ETXS662	ETXS661
ETXM332	ETXS664	ETXS663

[1231]

ETXM333	ETXS666	ETXS665
ETXM334	ETXS668	ETXS667
ETXM335	ETXS670	ETXS669
ETXM336	ETXS672	ETXS671
ETXM337	ETXS674	ETXS673
ETXM338	ETXS676	ETXS675
ETXM339	ETXS678	ETXS677
ETXM340	ETXS680	ETXS679
ETXM341	ETXS682	ETXS681
ETXM342	ETXS684	ETXS683
ETXM343	ETXS686	ETXS685
ETXM344	ETXS688	ETXS687
ETXM345	ETXS690	ETXS689
ETXM346	ETXS692	ETXS691
ETXM347	ETXS694	ETXS693
ETXM348	ETXS696	ETXS695
ETXM349	ETXS698	ETXS697
ETXM350	ETXS700	ETXS699
ETXM351	ETXS702	ETXS701
ETXM352	ETXS704	ETXS703
ETXM353	ETXS706	ETXS705
ETXM354	ETXS708	ETXS707
ETXM355	ETXS710	ETXS709
ETXM356	ETXS712	ETXS711
ETXM357	ETXS714	ETXS713
ETXM358	ETXS716	ETXS715
ETXM359	ETXS718	ETXS717
ETXM360	ETXS720	ETXS719
ETXM361	ETXS722	ETXS721
ETXM362	ETXS724	ETXS723
ETXM363	ETXS726	ETXS725
ETXM364	ETXS728	ETXS727
ETXM365	ETXS730	ETXS729
ETXM366	ETXS732	ETXS731
ETXM367	ETXS734	ETXS733
ETXM368	ETXS736	ETXS735
ETXM369	ETXS738	ETXS737
ETXM370	ETXS740	ETXS739

[1232]

ETXM371	ETXS742	ETXS741
ETXM372	ETXS744	ETXS743
ETXM373	ETXS746	ETXS745
ETXM374	ETXS748	ETXS747
ETXM375	ETXS750	ETXS749
ETXM376	ETXS752	ETXS751
ETXM377	ETXS754	ETXS753
ETXM378	ETXS756	ETXS755
ETXM379	ETXS758	ETXS757
ETXM380	ETXS760	ETXS759
ETXM381	ETXS762	ETXS761
ETXM382	ETXS764	ETXS763
ETXM383	ETXS766	ETXS765
ETXM384	ETXS768	ETXS767
ETXM385	ETXS770	ETXS769
ETXM386	ETXS772	ETXS771
ETXM387	ETXS774	ETXS773
ETXM388	ETXS776	ETXS775
ETXM389	ETXS778	ETXS777
ETXM390	ETXS780	ETXS779
ETXM391	ETXS782	ETXS781
ETXM392	ETXS784	ETXS783
ETXM393	ETXS786	ETXS785
ETXM394	ETXS788	ETXS787
ETXM395	ETXS790	ETXS789
ETXM396	ETXS792	ETXS791
ETXM397	ETXS794	ETXS793
ETXM398	ETXS796	ETXS795
ETXM399	ETXS798	ETXS797
ETXM400	ETXS800	ETXS799
ETXM401	ETXS802	ETXS801
ETXM402	ETXS804	ETXS803
ETXM403	ETXS806	ETXS805
ETXM404	ETXS808	ETXS807
ETXM405	ETXS810	ETXS809
ETXM406	ETXS812	ETXS811
ETXM407	ETXS814	ETXS813
ETXM408	ETXS816	ETXS815

[1233]

ETXM409	ETXS818	ETXS817
ETXM410	ETXS820	ETXS819
ETXM411	ETXS822	ETXS821
ETXM412	ETXS824	ETXS823
ETXM413	ETXS826	ETXS825
ETXM414	ETXS828	ETXS827
ETXM415	ETXS830	ETXS829
ETXM416	ETXS832	ETXS831
ETXM417	ETXS834	ETXS833
ETXM418	ETXS836	ETXS835
ETXM419	ETXS838	ETXS837
ETXM420	ETXS840	ETXS839
ETXM421	ETXS842	ETXS841
ETXM422	ETXS844	ETXS843
ETXM423	ETXS846	ETXS845
ETXM424	ETXS848	ETXS847
ETXM425	ETXS850	ETXS849
ETXM426	ETXS852	ETXS851
ETXM427	ETXS854	ETXS853
ETXM428	ETXS856	ETXS855
ETXM429	ETXS858	ETXS857
ETXM430	ETXS860	ETXS859
ETXM431	ETXS862	ETXS861
ETXM432	ETXS864	ETXS863
ETXM433	ETXS866	ETXS865
ETXM434	ETXS868	ETXS867
ETXM435	ETXS870	ETXS869
ETXM436	ETXS872	ETXS871
ETXM437	ETXS874	ETXS873
ETXM438	ETXS876	ETXS875
ETXM439	ETXS878	ETXS877
ETXM440	ETXS880	ETXS879
ETXM441	ETXS882	ETXS881
ETXM442	ETXS884	ETXS883
ETXM443	ETXS886	ETXS885
ETXM444	ETXS888	ETXS887
ETXM445	ETXS890	ETXS889
ETXM446	ETXS892	ETXS891

[1234]

ETXM447	ETXS894	ETXS893
ETXM448	ETXS896	ETXS895
ETXM449	ETXS898	ETXS897
ETXM450	ETXS900	ETXS899
ETXM451	ETXS902	ETXS901
ETXM452	ETXS904	ETXS903
ETXM453	ETXS906	ETXS905
ETXM454	ETXS908	ETXS907
ETXM455	ETXS910	ETXS909
ETXM456	ETXS912	ETXS911
ETXM457	ETXS914	ETXS913
ETXM458	ETXS916	ETXS915
ETXM459	ETXS918	ETXS917
ETXM460	ETXS920	ETXS919
ETXM461	ETXS922	ETXS921
ETXM462	ETXS924	ETXS923
ETXM463	ETXS926	ETXS925
ETXM464	ETXS928	ETXS927
ETXM465	ETXS930	ETXS929
ETXM466	ETXS932	ETXS931
ETXM467	ETXS934	ETXS933
ETXM468	ETXS936	ETXS935
ETXM469	ETXS938	ETXS937
ETXM470	ETXS940	ETXS939
ETXM471	ETXS942	ETXS941
ETXM472	ETXS944	ETXS943
ETXM473	ETXS946	ETXS945
ETXM474	ETXS948	ETXS947
ETXM475	ETXS950	ETXS949
ETXM476	ETXS952	ETXS951
ETXM477	ETXS954	ETXS953
ETXM478	ETXS956	ETXS955
ETXM479	ETXS958	ETXS957
ETXM480	ETXS960	ETXS959
ETXM481	ETXS962	ETXS961
ETXM482	ETXS964	ETXS963
ETXM483	ETXS966	ETXS965
ETXM484	ETXS968	ETXS967

[1235]

ETXM485	ETXS970	ETXS969
ETXM486	ETXS972	ETXS971
ETXM487	ETXS974	ETXS973
ETXM488	ETXS976	ETXS975
ETXM489	ETXS978	ETXS977
ETXM490	ETXS980	ETXS979
ETXM491	ETXS982	ETXS981
ETXM492	ETXS984	ETXS983
ETXM493	ETXS986	ETXS985
ETXM494	ETXS988	ETXS987
ETXM495	ETXS990	ETXS989
ETXM496	ETXS992	ETXS991
ETXM497	ETXS994	ETXS993
ETXM498	ETXS996	ETXS995
ETXM499	ETXS998	ETXS997
ETXM500	ETXS1000	ETXS999
ETXM501	ETXS1002	ETXS1001
ETXM502	ETXS1004	ETXS1003
ETXM503	ETXS1006	ETXS1005
ETXM504	ETXS1008	ETXS1007
ETXM505	ETXS1010	ETXS1009
ETXM506	ETXS1012	ETXS1011
ETXM507	ETXS1014	ETXS1013
ETXM508	ETXS1016	ETXS1015
ETXM509	ETXS1018	ETXS1017
ETXM510	ETXS1020	ETXS1019
ETXM511	ETXS1022	ETXS1021
ETXM512	ETXS1024	ETXS1023
ETXM513	ETXS1026	ETXS1025
ETXM514	ETXS1028	ETXS1027
ETXM515	ETXS1030	ETXS1029
ETXM1064	ETXS2128	ETXS2127
ETXM1072	ETXS2144	ETXS2143
ETXM1076	ETXS2152	ETXS2151
ETXM1180	ETXS1032	ETXS1031
ETXM1181	ETXS1034	ETXS1033
ETXM1185	ETXS1038	ETXS1037
ETXM1162	ETXS1042	ETXS1041

[1236]

ETXM1188	ETXS1044	ETXS1043
ETXM1189	ETXS1046	ETXS1045
ETXM1192	ETXS1048	ETXS1047
ETXM1193	ETXS1050	ETXS1049
ETXM1194	ETXS1051	ETXS1033
ETXM1195	ETXS1052	ETXS1037
ETXM1196	ETXS1053	ETXS1041
ETXM1197	ETXS1054	ETXS1045
ETXM1198	ETXS1055	ETXS1049
ETXM1199	ETXS2398	ETXS2397
ETXM1200	ETSX2400	ETXS2397
ETXM1201	ETXS2402	ETXS2397
ETXM1202	ETXS2404	ETXS2397
ETXM1203	ETXS2406	ETXS2397
ETXM1204	ETXS2408	ETXS2397
ETXM1205	ETXS2410	ETXS2397
ETXM1206	ETXS2412	ETXS2397
ETXM1207	ETXS2414	ETXS2397
ETXM1208	ETXS2416	ETXS2399
ETXM1209	ETXS2418	ETXS2399
ETXM1210	ETXS2420	ETXS2399
ETXM1211	ETXS2422	ETXS2399
ETXM1212	ETXS2424	ETXS2399
ETXM1213	ETXS2426	ETXS2399
ETXM1214	ETXS2428	ETXS2399
ETXM1215	ETXS2430	ETXS2399
ETXM1216	ETXS2432	ETXS2399

[1237] 对于表5中的双链体：

[1238] ETXM316-ETXM415、ETXM436-ETXM515和ETXM1180-ETXM1216具有图8a所示的双链体结构,在反义链的3’端有2核苷突出端；

[1239] ETXM416-ETXM435具有图8b所示的双链体结构,即19mer平端构建体。

[1240] 上表所列定义：

[1241] A—腺苷

[1242] C—胞苷

[1243] G—鸟苷

[1244] T—胸苷

[1245] m—2’-O-甲基

[1246] f—2’氟

[1247] s—硫代磷酸酯键

[1248] o—热去稳定化核苷

[1249] ia—反向无碱基核苷

[1250] 实施例9:人类Huh7细胞中ZPI表达的抑制筛选

[1251] Huh7细胞(人类肝细胞衍生细胞系,从JCRB细胞库获得)在37℃和5%CO_2气氛下在补充有10%FBS的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。使用靶向ZPI mRNA的siRNA双链体或阴性对照siRNA(siRNA对照;正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(SEQ ID NO:794),反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:790))转染细胞,最终双链体浓度为5nM和0.1nM。通过将9.7μL Opti-MEM(ThermoFisher)和0.3μL Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher)添加到10μL的每个siRNA双链体中进行转染。将混合物在室温下孵育15分钟,然后加入100μL的含有20,000个Huh7细胞的完全生长培养基中。将细胞在37℃/5%CO_2下孵育24小时,然后用RNeasy 96试剂盒(Qiagen)纯化总RNA。在两个独立实验中,通过重复孔中的转染对每个双链体进行测试。

[1252] 使用FastQuant RT(含gDNase)试剂盒(Tiangen)进行cDNA合成。在ABI Prism 7900HT或ABIQuantStudio 7上使用针对人类ZPI(Hs01547819_m1)和人类GAPDH(Hs02786624_g1)的特异性引物,使用FastStart Universal Probe Master试剂盒(Roche)进行实时定量PCR(qPCR)。

[1253] 对来自每个孔的cDNA重复进行qPCR,并计算平均Ct。使用比较Ct(ΔΔCt)方法根据平均Ct值计算相对ZPI表达,标准化为GAPDH并相对于未处理的细胞。根据初步筛选的结果,选择表现出良好活性的siRNA双链体进行剂量反应跟踪。结果如图9所示。RNAi分子的序列如表5所示。

[1254] 实施例10:抑制人类Huh7细胞中ZPI表达的剂量反应

[1255] Huh7细胞(人类肝细胞衍生细胞系,从JCRB细胞库获得)在37℃和5%CO_2的气氛下在补充有10%FBS的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。用靶向ZPI mRNA的siRNA双链体或阴性对照siRNA(siRNA对照;正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(SEQ ID NO:794),反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:790))转染细胞,使用10x3倍连续稀释,最终双链体浓度为20nM至1pM。通过将9.7μL Opti-MEM(ThermoFisher)和0.3μL Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher)添加到10μL的每个siRNA双链体中进行转染。将混合物在室温下孵育15分钟,然后加入100μL的含有20,000个Huh7细胞的完全生长培养基中。将细胞在37℃/5%CO_2下孵育24小时,然后使用RNeasy 96试剂盒(Qiagen)纯化总RNA。在一次实验中,通过重复孔中的转染来测试每个双链体。

[1256] 使用FastQuant RT试剂盒(含gDNase)(Tiangen)进行cDNA合成。在ABI Prism 7900HT或ABIQuantStudio 7上使用针对人类ZPI(Hs01547819_m1)和人类GAPDH(Hs02786624_g1)的特异性引物,使用FastStart Universal Probe Master试剂盒(Roche)进行实时定量PCR(qPCR)。

[1257] 对来自每个孔的cDNA重复进行qPCR,并计算平均Ct。使用比较Ct(ΔΔCt)方法根据平均Ct值计算相对ZPI表达,标准化为GAPDH并相对于未处理的细胞。用四参数(可变斜率)模型使用GraphPad Prism 9计算ZPI表达的最大抑制百分比和IC50值。结果如图9所示。RNAi分子的序列在本文的相关表格中描述。

[1258] 表6相对mRNA表达

[1259]

双链体 ID	反义链 ID	SEQ ID NO (AS - mod)	正义链 ID	SEQ ID NO (SS - mod)	平均相对表达/0.1 nM	平均相对表达/5 nM
ETXM316	ETXS632	SEQ ID NO: 362	ETXS631	SEQ ID NO: 562	0.72	0.38
ETXM317	ETXS634	SEQ ID NO: 363	ETXS633	SEQ ID NO: 563	1.01	0.54
ETXM318	ETXS636	SEQ ID NO: 364	ETXS635	SEQ ID NO: 564	0.97	0.56
ETXM319	ETXS638	SEQ ID NO: 365	ETXS637	SEQ ID NO: 565	0.91	0.43
ETXM320	ETXS640	SEQ ID NO: 366	ETXS639	SEQ ID NO: 566	0.84	0.34
ETXM321	ETXS642	SEQ ID NO: 367	ETXS641	SEQ ID NO: 567	0.58	0.27
ETXM322	ETXS644	SEQ ID NO: 368	ETXS643	SEQ ID NO: 568	0.5	0.27
ETXM323	ETXS646	SEQ ID NO: 369	ETXS645	SEQ ID NO: 569	0.69	0.3
ETXM324	ETXS648	SEQ ID NO: 370	ETXS647	SEQ ID NO: 570	0.87	0.46
ETXM325	ETXS650	SEQ ID NO: 371	ETXS649	SEQ ID NO: 571	0.74	0.31
ETXM326	ETXS652	SEQ ID NO: 372	ETXS651	SEQ ID NO: 572	0.99	0.33
ETXM327	ETXS654	SEQ ID NO: 373	ETXS653	SEQ ID NO: 573	0.79	0.37
ETXM328	ETXS656	SEQ ID NO: 374	ETXS655	SEQ ID NO: 574	0.9	0.49
ETXM329	ETXS658	SEQ ID NO: 375	ETXS657	SEQ ID NO: 575	1.11	0.81
ETXM330	ETXS660	SEQ ID NO: 376	ETXS659	SEQ ID NO: 576	1	0.83

[1260]

ETXM331	ETXS662	SEQ ID NO: 377	ETXS661	SEQ ID NO: 577	1.04	0.84
ETXM332	ETXS664	SEQ ID NO: 378	ETXS663	SEQ ID NO: 578	0.42	0.22
ETXM333	ETXS666	SEQ ID NO: 379	ETXS665	SEQ ID NO: 579	0.58	0.28
ETXM334	ETXS668	SEQ ID NO: 380	ETXS667	SEQ ID NO: 580	0.91	0.57
ETXM335	ETXS670	SEQ ID NO: 381	ETXS669	SEQ ID NO: 581	1.04	0.74
ETXM336	ETXS672	SEQ ID NO: 382	ETXS671	SEQ ID NO: 582	1.07	0.85
ETXM337	ETXS674	SEQ ID NO: 383	ETXS673	SEQ ID NO: 583	0.84	0.51
ETXM338	ETXS676	SEQ ID NO: 384	ETXS675	SEQ ID NO: 584	0.38	0.23
ETXM339	ETXS678	SEQ ID NO: 385	ETXS677	SEQ ID NO: 585	0.85	0.4
ETXM340	ETXS680	SEQ ID NO: 386	ETXS679	SEQ ID NO: 586	0.75	0.36
ETXM341	ETXS682	SEQ ID NO: 387	ETXS681	SEQ ID NO: 587	0.55	0.22
ETXM342	ETXS684	SEQ ID NO: 388	ETXS683	SEQ ID NO: 588	0.55	0.42
ETXM343	ETXS686	SEQ ID NO: 389	ETXS685	SEQ ID NO: 589	0.45	0.29
ETXM344	ETXS688	SEQ ID NO: 390	ETXS687	SEQ ID NO: 590	0.98	1.01
ETXM345	ETXS690	SEQ ID NO: 391	ETXS689	SEQ ID NO: 591	0.78	0.57
ETXM346	ETXS692	SEQ ID NO: 392	ETXS691	SEQ ID NO: 592	1.09	1.12
ETXM347	ETXS694	SEQ ID NO: 393	ETXS693	SEQ ID NO: 593	0.93	0.45
ETXM348	ETXS696	SEQ ID NO: 394	ETXS695	SEQ ID NO: 594	0.91	0.65
ETXM349	ETXS698	SEQ ID NO: 395	ETXS697	SEQ ID NO: 595	0.88	0.49
ETXM350	ETXS700	SEQ ID NO: 396	ETXS699	SEQ ID NO: 596	0.87	0.75
ETXM351	ETXS702	SEQ ID NO: 397	ETXS701	SEQ ID NO: 597	0.96	0.96
ETXM352	ETXS704	SEQ ID NO: 398	ETXS703	SEQ ID NO: 598	0.95	1.04
ETXM353	ETXS706	SEQ ID NO: 399	ETXS705	SEQ ID NO: 599	0.71	0.5
ETXM354	ETXS708	SEQ ID NO: 400	ETXS707	SEQ ID NO: 600	0.7	0.43
ETXM355	ETXS710	SEQ ID NO: 401	ETXS709	SEQ ID NO: 601	0.69	0.34
ETXM356	ETXS712	SEQ ID NO: 402	ETXS711	SEQ ID NO: 602	0.92	0.71
ETXM357	ETXS714	SEQ ID NO: 403	ETXS713	SEQ ID NO: 603	0.88	0.49
ETXM358	ETXS716	SEQ ID NO: 404	ETXS715	SEQ ID NO: 604	0.98	0.5
ETXM359	ETXS718	SEQ ID NO: 405	ETXS717	SEQ ID NO: 605	0.66	0.33
ETXM360	ETXS720	SEQ ID NO: 406	ETXS719	SEQ ID NO: 606	0.75	0.54
ETXM361	ETXS722	SEQ ID NO: 407	ETXS721	SEQ ID NO: 607	0.68	0.48
ETXM362	ETXS724	SEQ ID NO: 408	ETXS723	SEQ ID NO: 608	0.95	0.9
ETXM363	ETXS726	SEQ ID NO: 409	ETXS725	SEQ ID NO: 609	0.96	0.75
ETXM364	ETXS728	SEQ ID NO: 410	ETXS727	SEQ ID NO: 610	0.88	0.44
ETXM365	ETXS730	SEQ ID NO: 411	ETXS729	SEQ ID NO: 611	0.82	0.49

[1261]

ETXM366	ETXS732	SEQ ID NO: 412	ETXS731	SEQ ID NO: 612	0.95	0.6
ETXM367	ETXS734	SEQ ID NO: 413	ETXS733	SEQ ID NO: 613	0.92	0.51
ETXM368	ETXS736	SEQ ID NO: 414	ETXS735	SEQ ID NO: 614	1.02	0.84
ETXM369	ETXS738	SEQ ID NO: 415	ETXS737	SEQ ID NO: 615	1.02	1
ETXM370	ETXS740	SEQ ID NO: 416	ETXS739	SEQ ID NO: 616	1.37	0.96
ETXM371	ETXS742	SEQ ID NO: 417	ETXS741	SEQ ID NO: 617	0.94	0.65
ETXM372	ETXS744	SEQ ID NO: 418	ETXS743	SEQ ID NO: 618	0.95	0.67
ETXM373	ETXS746	SEQ ID NO: 419	ETXS745	SEQ ID NO: 619	1.05	0.96
ETXM374	ETXS748	SEQ ID NO: 420	ETXS747	SEQ ID NO: 620	0.97	0.91
ETXM375	ETXS750	SEQ ID NO: 421	ETXS749	SEQ ID NO: 621	0.81	0.39
ETXM376	ETXS752	SEQ ID NO: 422	ETXS751	SEQ ID NO: 622	0.97	0.76
ETXM377	ETXS754	SEQ ID NO: 423	ETXS753	SEQ ID NO: 623	0.93	0.59
ETXM378	ETXS756	SEQ ID NO: 424	ETXS755	SEQ ID NO: 624	0.93	0.52
ETXM379	ETXS758	SEQ ID NO: 425	ETXS757	SEQ ID NO: 625	0.96	0.81
ETXM380	ETXS760	SEQ ID NO: 426	ETXS759	SEQ ID NO: 626	0.61	0.31
ETXM381	ETXS762	SEQ ID NO: 427	ETXS761	SEQ ID NO: 627	0.84	0.82
ETXM382	ETXS764	SEQ ID NO: 428	ETXS763	SEQ ID NO: 628	0.8	0.47
ETXM383	ETXS766	SEQ ID NO: 429	ETXS765	SEQ ID NO: 629	0.82	0.37
ETXM384	ETXS768	SEQ ID NO: 430	ETXS767	SEQ ID NO: 630	0.67	0.38
ETXM385	ETXS770	SEQ ID NO: 431	ETXS769	SEQ ID NO: 631	0.9	0.87
ETXM386	ETXS772	SEQ ID NO: 432	ETXS771	SEQ ID NO: 632	0.91	0.73
ETXM387	ETXS774	SEQ ID NO: 433	ETXS773	SEQ ID NO: 633	0.86	0.97
ETXM388	ETXS776	SEQ ID NO: 434	ETXS775	SEQ ID NO: 634	0.96	0.7
ETXM389	ETXS778	SEQ ID NO: 435	ETXS777	SEQ ID NO: 635	0.95	0.68
ETXM390	ETXS780	SEQ ID NO: 436	ETXS779	SEQ ID NO: 636	0.87	0.51
ETXM391	ETXS782	SEQ ID NO: 437	ETXS781	SEQ ID NO: 637	0.76	0.35
ETXM392	ETXS784	SEQ ID NO: 438	ETXS783	SEQ ID NO: 638	0.99	0.76
ETXM393	ETXS786	SEQ ID NO: 439	ETXS785	SEQ ID NO: 639	0.94	1.06
ETXM394	ETXS788	SEQ ID NO: 440	ETXS787	SEQ ID NO: 640	0.85	0.8
ETXM395	ETXS790	SEQ ID NO: 441	ETXS789	SEQ ID NO: 641	0.95	0.53
ETXM396	ETXS792	SEQ ID NO: 442	ETXS791	SEQ ID NO: 642	0.62	0.27
ETXM397	ETXS794	SEQ ID NO: 443	ETXS793	SEQ ID NO: 643	0.96	0.64
ETXM398	ETXS796	SEQ ID NO: 444	ETXS795	SEQ ID NO: 644	0.93	0.55
ETXM399	ETXS798	SEQ ID NO: 445	ETXS797	SEQ ID NO: 645	0.94	0.66
ETXM400	ETXS800	SEQ ID NO: 446	ETXS799	SEQ ID NO: 646	0.77	0.57

[1262]

ETXM401	ETXS802	SEQ ID NO: 447	ETXS801	SEQ ID NO: 647	0.69	0.25
ETXM402	ETXS804	SEQ ID NO: 448	ETXS803	SEQ ID NO: 648	1.05	0.95
ETXM403	ETXS806	SEQ ID NO: 449	ETXS805	SEQ ID NO: 649	0.86	0.5
ETXM404	ETXS808	SEQ ID NO: 450	ETXS807	SEQ ID NO: 650	0.83	0.35
ETXM405	ETXS810	SEQ ID NO: 451	ETXS809	SEQ ID NO: 651	0.97	0.73
ETXM406	ETXS812	SEQ ID NO: 452	ETXS811	SEQ ID NO: 652	0.84	0.33
ETXM407	ETXS814	SEQ ID NO: 453	ETXS813	SEQ ID NO: 653	0.77	0.51
ETXM408	ETXS816	SEQ ID NO: 454	ETXS815	SEQ ID NO: 654	0.89	0.51
ETXM409	ETXS818	SEQ ID NO: 455	ETXS817	SEQ ID NO: 655	1	0.59
ETXM410	ETXS820	SEQ ID NO: 456	ETXS819	SEQ ID NO: 656	0.98	0.71
ETXM411	ETXS822	SEQ ID NO: 457	ETXS821	SEQ ID NO: 657	0.77	0.36
ETXM412	ETXS824	SEQ ID NO: 458	ETXS823	SEQ ID NO: 658	0.97	0.42
ETXM413	ETXS826	SEQ ID NO: 459	ETXS825	SEQ ID NO: 659	1	0.77
ETXM414	ETXS828	SEQ ID NO: 460	ETXS827	SEQ ID NO: 660	0.98	0.79
ETXM415	ETXS830	SEQ ID NO: 461	ETXS829	SEQ ID NO: 661	0.96	0.62
ETXM416	ETXS832	SEQ ID NO: 462	ETXS831	SEQ ID NO: 662	0.96	0.52
ETXM417	ETXS834	SEQ ID NO: 463	ETXS833	SEQ ID NO: 663	1.03	0.75
ETXM418	ETXS836	SEQ ID NO: 464	ETXS835	SEQ ID NO: 664	1.11	0.74
ETXM419	ETXS838	SEQ ID NO: 465	ETXS837	SEQ ID NO: 665	0.99	0.6
ETXM420	ETXS840	SEQ ID NO: 466	ETXS839	SEQ ID NO: 666	0.91	0.54
ETXM421	ETXS842	SEQ ID NO: 467	ETXS841	SEQ ID NO: 667	0.8	0.27
ETXM422	ETXS844	SEQ ID NO: 468	ETXS843	SEQ ID NO: 668	0.82	0.33
ETXM423	ETXS846	SEQ ID NO: 469	ETXS845	SEQ ID NO: 669	0.91	0.36
ETXM424	ETXS848	SEQ ID NO: 470	ETXS847	SEQ ID NO: 670	0.98	0.62
ETXM425	ETXS850	SEQ ID NO: 471	ETXS849	SEQ ID NO: 671	0.81	0.32
ETXM426	ETXS852	SEQ ID NO: 472	ETXS851	SEQ ID NO: 672	0.91	0.49
ETXM427	ETXS854	SEQ ID NO: 473	ETXS853	SEQ ID NO: 673	1.02	0.46
ETXM428	ETXS856	SEQ ID NO: 474	ETXS855	SEQ ID NO: 674	1.09	0.94
ETXM429	ETXS858	SEQ ID NO: 475	ETXS857	SEQ ID NO: 675	1.14	0.7
ETXM430	ETXS860	SEQ ID NO: 476	ETXS859	SEQ ID NO: 676	0.92	0.71
ETXM431	ETXS862	SEQ ID NO: 477	ETXS861	SEQ ID NO: 677	1.18	0.9
ETXM432	ETXS864	SEQ ID NO: 478	ETXS863	SEQ ID NO: 678	0.7	0.26
ETXM433	ETXS866	SEQ ID NO: 479	ETXS865	SEQ ID NO: 679	1.07	0.31
ETXM434	ETXS868	SEQ ID NO: 480	ETXS867	SEQ ID NO: 680	1.11	0.63
ETXM435	ETXS870	SEQ ID NO: 481	ETXS869	SEQ ID NO: 681	1	0.8

[1263]

ETXM436	ETXS872	SEQ ID NO: 482	ETXS871	SEQ ID NO: 682	0.72	0.44
ETXM437	ETXS874	SEQ ID NO: 483	ETXS873	SEQ ID NO: 683	0.98	0.47
ETXM438	ETXS876	SEQ ID NO: 484	ETXS875	SEQ ID NO: 684	1.05	0.75
ETXM439	ETXS878	SEQ ID NO: 485	ETXS877	SEQ ID NO: 685	0.91	0.49
ETXM440	ETXS880	SEQ ID NO: 486	ETXS879	SEQ ID NO: 686	0.91	0.46
ETXM441	ETXS882	SEQ ID NO: 487	ETXS881	SEQ ID NO: 687	0.74	0.36
ETXM442	ETXS884	SEQ ID NO: 488	ETXS883	SEQ ID NO: 688	0.62	0.36
ETXM443	ETXS886	SEQ ID NO: 489	ETXS885	SEQ ID NO: 689	0.73	0.3
ETXM444	ETXS888	SEQ ID NO: 490	ETXS887	SEQ ID NO: 690	1	0.59
ETXM445	ETXS890	SEQ ID NO: 491	ETXS889	SEQ ID NO: 691	0.71	0.37
ETXM446	ETXS892	SEQ ID NO: 492	ETXS891	SEQ ID NO: 692	0.73	0.27
ETXM447	ETXS894	SEQ ID NO: 493	ETXS893	SEQ ID NO: 693	0.81	0.39
ETXM448	ETXS896	SEQ ID NO: 494	ETXS895	SEQ ID NO: 694	0.81	0.61
ETXM449	ETXS898	SEQ ID NO: 495	ETXS897	SEQ ID NO: 695	0.91	0.8
ETXM450	ETXS900	SEQ ID NO: 496	ETXS899	SEQ ID NO: 696	0.97	0.52
ETXM451	ETXS902	SEQ ID NO: 497	ETXS901	SEQ ID NO: 697	0.96	0.61
ETXM452	ETXS904	SEQ ID NO: 498	ETXS903	SEQ ID NO: 698	0.4	0.24
ETXM453	ETXS906	SEQ ID NO: 499	ETXS905	SEQ ID NO: 699	0.62	0.3
ETXM454	ETXS908	SEQ ID NO: 500	ETXS907	SEQ ID NO: 700	0.81	0.46
ETXM455	ETXS910	SEQ ID NO: 501	ETXS909	SEQ ID NO: 701	0.94	0.68
ETXM456	ETXS912	SEQ ID NO: 502	ETXS911	SEQ ID NO: 702	0.75	0.36
ETXM457	ETXS914	SEQ ID NO: 503	ETXS913	SEQ ID NO: 703	0.98	0.52
ETXM458	ETXS916	SEQ ID NO: 504	ETXS915	SEQ ID NO: 704	1	0.61
ETXM459	ETXS918	SEQ ID NO: 505	ETXS917	SEQ ID NO: 705	0.92	0.44
ETXM460	ETXS920	SEQ ID NO: 506	ETXS919	SEQ ID NO: 706	0.86	0.4
ETXM461	ETXS922	SEQ ID NO: 507	ETXS921	SEQ ID NO: 707	0.84	0.27
ETXM462	ETXS924	SEQ ID NO: 508	ETXS923	SEQ ID NO: 708	0.72	0.33
ETXM463	ETXS926	SEQ ID NO: 509	ETXS925	SEQ ID NO: 709	0.76	0.35
ETXM464	ETXS928	SEQ ID NO: 510	ETXS927	SEQ ID NO: 710	0.95	0.55
ETXM465	ETXS930	SEQ ID NO: 511	ETXS929	SEQ ID NO: 711	0.77	0.36
ETXM466	ETXS932	SEQ ID NO: 512	ETXS931	SEQ ID NO: 712	0.84	0.33
ETXM467	ETXS934	SEQ ID NO: 513	ETXS933	SEQ ID NO: 713	0.91	0.39
ETXM468	ETXS936	SEQ ID NO: 514	ETXS935	SEQ ID NO: 714	1.14	0.8
ETXM469	ETXS938	SEQ ID NO: 515	ETXS937	SEQ ID NO: 715	1.17	0.67
ETXM470	ETXS940	SEQ ID NO: 516	ETXS939	SEQ ID NO: 716	1.12	0.79

[1264]

ETXM471	ETXS942	SEQ ID NO: 517	ETXS941	SEQ ID NO: 717	1.16	0.86
ETXM472	ETXS944	SEQ ID NO: 518	ETXS943	SEQ ID NO: 718	0.49	0.25
ETXM473	ETXS946	SEQ ID NO: 519	ETXS945	SEQ ID NO: 719	0.91	0.34
ETXM474	ETXS948	SEQ ID NO: 520	ETXS947	SEQ ID NO: 720	1.12	0.68
ETXM475	ETXS950	SEQ ID NO: 521	ETXS949	SEQ ID NO: 721	1.25	0.84
ETXM476	ETXS952	SEQ ID NO: 522	ETXS951	SEQ ID NO: 722	0.87	0.42
ETXM477	ETXS954	SEQ ID NO: 523	ETXS953	SEQ ID NO: 723	1.12	0.52
ETXM478	ETXS956	SEQ ID NO: 524	ETXS955	SEQ ID NO: 724	1.03	0.62
ETXM479	ETXS958	SEQ ID NO: 525	ETXS957	SEQ ID NO: 725	1.13	0.51
ETXM480	ETXS960	SEQ ID NO: 526	ETXS959	SEQ ID NO: 726	0.93	0.56
ETXM481	ETXS962	SEQ ID NO: 527	ETXS961	SEQ ID NO: 727	0.89	0.36
ETXM482	ETXS964	SEQ ID NO: 528	ETXS963	SEQ ID NO: 728	0.68	0.46
ETXM483	ETXS966	SEQ ID NO: 529	ETXS965	SEQ ID NO: 729	0.82	0.5
ETXM484	ETXS968	SEQ ID NO: 530	ETXS967	SEQ ID NO: 730	1.06	0.74
ETXM485	ETXS970	SEQ ID NO: 531	ETXS969	SEQ ID NO: 731	0.91	0.41
ETXM486	ETXS972	SEQ ID NO: 532	ETXS971	SEQ ID NO: 732	0.68	0.23
ETXM487	ETXS974	SEQ ID NO: 533	ETXS973	SEQ ID NO: 733	0.8	0.31
ETXM488	ETXS976	SEQ ID NO: 534	ETXS975	SEQ ID NO: 734	0.89	0.64
ETXM489	ETXS978	SEQ ID NO: 535	ETXS977	SEQ ID NO: 735	0.89	0.67
ETXM490	ETXS980	SEQ ID NO: 536	ETXS979	SEQ ID NO: 736	0.91	0.56
ETXM491	ETXS982	SEQ ID NO: 537	ETXS981	SEQ ID NO: 737	1.06	0.75
ETXM492	ETXS984	SEQ ID NO: 538	ETXS983	SEQ ID NO: 738	0.43	0.22
ETXM493	ETXS986	SEQ ID NO: 539	ETXS985	SEQ ID NO: 739	0.59	0.33
ETXM494	ETXS988	SEQ ID NO: 540	ETXS987	SEQ ID NO: 740	0.93	0.59
ETXM495	ETXS990	SEQ ID NO: 541	ETXS989	SEQ ID NO: 741	1.08	0.74
ETXM496	ETXS992	SEQ ID NO: 542	ETXS991	SEQ ID NO: 742	0.73	0.42
ETXM497	ETXS994	SEQ ID NO: 543	ETXS993	SEQ ID NO: 743	1.01	0.59
ETXM498	ETXS996	SEQ ID NO: 544	ETXS995	SEQ ID NO: 744	0.95	0.59
ETXM499	ETXS998	SEQ ID NO: 545	ETXS997	SEQ ID NO: 745	1.08	0.53
ETXM500	ETXS1000	SEQ ID NO: 546	ETXS999	SEQ ID NO: 746	0.87	0.46
ETXM501	ETXS1002	SEQ ID NO: 547	ETXS1001	SEQ ID NO: 747	0.6	0.27
ETXM502	ETXS1004	SEQ ID NO: 548	ETXS1003	SEQ ID NO: 748	0.6	0.28
ETXM503	ETXS1006	SEQ ID NO: 549	ETXS1005	SEQ ID NO: 749	0.73	0.36
ETXM504	ETXS1008	SEQ ID NO: 550	ETXS1007	SEQ ID NO: 750	0.9	0.68
ETXM505	ETXS1010	SEQ ID NO: 551	ETXS1009	SEQ ID NO: 751	0.72	0.36

[1265]

ETXM506	ETXS1012	SEQ ID NO: 552	ETXS1011	SEQ ID NO: 752	0.62	0.25
ETXM507	ETXS1014	SEQ ID NO: 553	ETXS1013	SEQ ID NO: 753	1.21	0.33
ETXM508	ETXS1016	SEQ ID NO: 554	ETXS1015	SEQ ID NO: 754	1.08	0.83
ETXM509	ETXS1018	SEQ ID NO: 555	ETXS1017	SEQ ID NO: 755	1.09	0.85
ETXM510	ETXS1020	SEQ ID NO: 556	ETXS1019	SEQ ID NO: 756	0.98	0.62
ETXM511	ETXS1022	SEQ ID NO: 557	ETXS1021	SEQ ID NO: 757	0.81	0.87
ETXM512	ETXS1024	SEQ ID NO: 558	ETXS1023	SEQ ID NO: 758	0.34	0.17
ETXM513	ETXS1026	SEQ ID NO: 559	ETXS1025	SEQ ID NO: 759	0.49	0.22
ETXM514	ETXS1028	SEQ ID NO: 560	ETXS1027	SEQ ID NO: 760	0.84	0.56
ETXM515	ETXS1030	SEQ ID NO: 561	ETXS1029	SEQ ID NO: 761	0.93	0.74

[1266] 表7剂量反应数据表

[1267]

双链体 ID	反义链 ID	SEQ ID NO (AS - mod)	正义链 ID	SEQ ID NO (SS - mod)	IC_{50} [pM]	%最大抑制
ETXM320	ETXS640	SEQ ID NO: 366	ETXS639	SEQ ID NO: 566	556	77
ETXM321	ETXS642	SEQ ID NO: 367	ETXS641	SEQ ID NO: 567	172	82
ETXM322	ETXS644	SEQ ID NO: 368	ETXS643	SEQ ID NO: 568	101	79
ETXM323	ETXS646	SEQ ID NO: 369	ETXS645	SEQ ID NO: 569	268	79
ETXM325	ETXS650	SEQ ID NO: 371	ETXS649	SEQ ID NO: 571	274	79
ETXM326	ETXS652	SEQ ID NO: 372	ETXS651	SEQ ID NO: 572	607	86
ETXM332	ETXS664	SEQ ID NO: 378	ETXS663	SEQ ID NO: 578	81	85
ETXM333	ETXS666	SEQ ID NO: 379	ETXS665	SEQ ID NO: 579	130	83
ETXM338	ETXS676	SEQ ID NO: 384	ETXS675	SEQ ID NO: 584	33	77
ETXM339	ETXS678	SEQ ID NO: 385	ETXS677	SEQ ID NO: 585	1180	78
ETXM341	ETXS682	SEQ ID NO: 387	ETXS681	SEQ ID NO: 587	186	83
ETXM342	ETXS684	SEQ ID NO: 388	ETXS683	SEQ ID NO: 588	71	63
ETXM343	ETXS686	SEQ ID NO: 389	ETXS685	SEQ ID NO: 589	60	79
ETXM420	ETXS840	SEQ ID NO: 466	ETXS839	SEQ ID NO: 666	2450	77
ETXM421	ETXS842	SEQ ID NO: 467	ETXS841	SEQ ID NO: 667	305	81
ETXM422	ETXS844	SEQ ID NO: 468	ETXS843	SEQ ID NO: 668	502	80
ETXM423	ETXS846	SEQ ID NO: 469	ETXS845	SEQ ID NO: 669	1660	80
ETXM425	ETXS850	SEQ ID NO: 471	ETXS849	SEQ ID NO: 671	1050	89
ETXM426	ETXS852	SEQ ID NO: 472	ETXS851	SEQ ID NO: 672	1570	74

[1268]

ETXM432	ETXS864	SEQ ID NO: 478	ETXS863	SEQ ID NO: 678	239	85
ETXM433	ETXS866	SEQ ID NO: 479	ETXS865	SEQ ID NO: 679	703	86
ETXM452	ETXS904	SEQ ID NO: 498	ETXS903	SEQ ID NO: 698	82	78
ETXM472	ETXS944	SEQ ID NO: 518	ETXS943	SEQ ID NO: 718	130	77
ETXM492	ETXS984	SEQ ID NO: 538	ETXS983	SEQ ID NO: 738	47	84
ETXM500	ETXS1000	SEQ ID NO: 546	ETXS999	SEQ ID NO: 746	607	70
ETXM501	ETXS1002	SEQ ID NO: 547	ETXS1001	SEQ ID NO: 747	190	74
ETXM502	ETXS1004	SEQ ID NO: 548	ETXS1003	SEQ ID NO: 748	132	76
ETXM503	ETXS1006	SEQ ID NO: 549	ETXS1005	SEQ ID NO: 749	322	75
ETXM505	ETXS1010	SEQ ID NO: 551	ETXS1009	SEQ ID NO: 751	199	72
ETXM506	ETXS1012	SEQ ID NO: 552	ETXS1011	SEQ ID NO: 752	162	82
ETXM512	ETXS1024	SEQ ID NO: 558	ETXS1023	SEQ ID NO: 758	76	84
ETXM513	ETXS1026	SEQ ID NO: 559	ETXS1025	SEQ ID NO: 759	146	77

[1269] 本申请不限于特定公开的实施方案的范围,提供这些实施方案例如是为了说明本申请的各个方面。根据本文的描述和教导,对所述组合物和方法的各种修改将变得显而易见。可以在不脱离本公开的真实范围和精神的情况下实践此类变化,并且此类变化旨在落入本公开的范围内。

[1270] 当本说明书中的序列与所附序列表中的序列存在歧义时,本文提供的序列被视为是正确序列。

[1271] 实施例11:ZPI siRNA序列的鼠化

[1272] 表8显示了在Huh7细胞系转染筛选中鉴定为ZPI表达抑制剂的5个siRNA序列。

[1273] 表8

[1274]

序列 ID	正义(5'至 3')	反义(5'至 3')
ETXM342	AAAGAUCUCCAUGAGGCACGA (SEQ ID NO:268)	UCGUGCCUCAUGGAGAUCUUUCG (SEQ ID NO:148)
ETXM339	UACCAAGGAAAUGCCACCAUG (SEQ ID NO:265)	CAUGGUGGCAUUUCCUUGGUAGG (SEQ ID NO:145)
ETXM338	GCCUUCAUCCACAAGGAUUUU (SEQ ID NO:264)	AAAAUCCUUGUGGAUGAAGGCAA (SEQ ID NO:144)
ETXM359	CUCCACCUUUGACAAGAAUUU (SEQ ID NO:285)	AAAUUCUUGUCAAAGGUGGAGGC (SEQ ID NO:165)
ETXM396	GGAGUUUUGCCUUCAUCCACA	UGUGGAUGAAGGCAAAACUCCCC

[1275]

	(SEQ ID NO:322)	(SEQ ID NO:202)

[1276] ETXM338、ETXM359和ETXM396不会与小鼠ZPI序列发生交叉反应,并且不会用于小鼠PoC研究。这些序列被鼠化,以便它们与小鼠ZPI序列同源,以用于小鼠研究。将siRNA序列

与小鼠ZPI转录本NM_144834.4和NM_001301404.1比对,并且与小鼠序列不匹配的核苷酸改变为与小鼠序列匹配。

[1277] ETXM338正义链位置18变为C,反义链位置4变为G,得到ETXM1064。

[1278] ETXM359正义链位置19变为G,反义链位置3变为C,反义链位置23变为C,得到ETXM1072。

[1279] ETXM396的正义链位置2变为U,正义链的位置5变为C,反义链位置17变为G,反义链位置20变为A,得到ETXM1076。

[1280] 通过BLAST搜索检查鼠化序列,以确保它们不与其他小鼠转录本发生交叉反应。

[1281] 鼠化siRNA序列表9所示。变为小鼠序列的位置带有下划线。

[1282] 表9

[1283]

序列 ID	正义(5'至 3')	反义(5'至 3')
ETXM1064	GCCUUCAUCCACAAGGA<u>C</u>UUU (SEQ ID NO:791)	AAA<u>G</u>UCCUUGUGGAUGAAGGCAA (SEQ ID NO:787)
ETXM1072	CUCCACCUUUGACAAGAA<u>G</u>UU (SEQ ID NO:792)	AA<u>C</u>UUCUUGUCAAAGGUGGAGG<u>C</u> (SEQ ID NO:788)
ETXM1076	G<u>U</u>AG<u>C</u>UUUGCCUUCAUCCACA (SEQ ID NO:793)	UGUGGAUGAAGGCAAA<u>G</u>CU<u>A</u>CCC (SEQ ID NO:789)

[1284] 实施例12:血友病小鼠模型中的体内功效数据

[1285] 关节积血被定义为关节腔内出血,其是血友病的常见特征。反复关节积血的长期后果是形成永久性关节疾病,称为血友病性关节病。大约50%的血友病患者会形成严重的关节病,导致慢性关节疼痛、活动范围和功能减少以及生活质量下降。血友病性关节病的特征是滑膜增生、慢性炎症、纤维化和含铁血黄素沉着。

[1286] 所用的关节积血模型是在haem A小鼠和适当的背景野生型(WT)品系中诱发膝盖出血,并在受伤后10天内监测关节出血的进展情况。进行了两次相同的研究以增加用于分析的动物数量。

[1287] 这些重复研究的目的是证明预防性施用ETXM1184可以减少血友病A小鼠关节出血受伤后的关节积血。使用Fitusiran(靶向抗凝血酶(AT)的siRNA)作为参考。Advate(重组FVIII)用作阳性对照。

[1288] 为此,总共20只Haem A小鼠(Bi,L.,Lawler,A.,Antonarakis,S.et al.Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A.Nat Genet 10,119-121(1995).https://doi.org/10.1038/ng0595-119)和10只WT小鼠用于本研究:

[1289]

组	小鼠品系	治疗	给药时间(受伤前；天数)	终止时间(受伤后；天数)	N
1	WT	溶媒	-8	10	10
2	Haem A	溶媒	-8	10	10
3	Haem A	Fitusiran - 3 mg/kg s.c	-8	10	10
4	Haem A	Fitusiran - 10 mg/kg s.c	-8	10	10
5	Haem A	ETXM1184 - 3 mg/kg s.c.	-8	10	10
6	Haem A	ETXM1184 - 10 mg/kg s.c.	-8	10	10
7	Haem A	FVIII (Advate) - 300 IU/kg i.v	15 mins	10	10

[1290] 在诱导膝盖出血前8天,向小鼠皮下(s.c.)注射GalNAc-siRNA构建体ETXM1184、fitusiran或溶媒(0.9％盐水),剂量体积为5ml/kg。在关节出血诱导前15分钟静脉注射Advate。

[1291] 为了诱导膝盖出血,对小鼠进行称重并使用异氟烷吸入麻醉剂进行麻醉。两腿的毛都剃光,露出膝关节。向小鼠皮下注射10ml/kg丁丙诺啡进行镇痛,并用电子卡尺测量双膝直径。随后,用70％乙醇擦拭双膝。

[1292] 将一根30G无菌皮下注射针插入一只膝盖的髌下韧带。将注射的膝盖随机分配到左右两侧,并记录注射的一侧。将小鼠从麻醉中取出并放在温暖的笼子里恢复,然后再放回笼子里。

[1293] 在前6小时内定期监测小鼠,并在受伤后6小时以10ml/kg的剂量皮下注射丁丙诺啡进行镇痛。在受伤后72小时和10天评估受伤膝盖的视觉出血评分(VBS)。

[1294] 每天仔细检查所有小鼠是否有失血过多的临床症状。出于福利原因,表现出过度失血、竖毛、逃避笼内同伴或做怪相的临床症状的小鼠将被杀死。

[1295] 受伤后10天,停止小鼠研究。

[1296] 在异氟烷麻醉下,通过心脏穿刺收集柠檬酸化血样,制备血浆,并在干冰上冷冻等分试样,然后储存在-80℃下。为此,将血液以1:9的比例收集到3.8％柠檬酸钠中,然后在4℃下以7000x g离心10分钟。具体地,执行以下步骤:

[1297] 1.通过心脏穿刺收集血液。

[1298] 2.用柠檬酸钠溶液(3.8％)冲洗注射器和针头,将溶液留在注射器的中心(约30μl)。

[1299] 3.采血后,将样品排入1.5ml微量离心管中,确保加入足量的柠檬酸钠溶液(3.8％),以使柠檬酸钠与血液的比例达到1:9。将柠檬酸钠溶液加至管侧面,而不是直接加至样品中。颠倒4至6次以混合。如果不立即离心样品,则将其放入冰箱(如果可用)中或放在包裹的冰块上,并继续定期颠倒收集管。

[1300] 4.尽快将样品在4℃下以7000x g的旋转速度离心10分钟。

[1301] 5.从样品中取出所有血浆并放入新的微量离心管中。

[1302] 6.将血浆分装到预先标记的管(Thermo Scientific;10775974)中,如下所示:

[1303] o 30μl用于潜在TGA测定

[1304] o 100μl用于潜在APTT测定

[1305] o其余全部用于潜在靶蛋白丰度分析。

[1306] 7.立即将所有等分试样放在湿/干冰上。

[1307] 8.在湿/干冰上运输样品。

[1308] 9.将样品转移到-20℃/-80℃冰箱中保存直至使用。

[1309] 取出肝脏,然后将每个叶的最多3个部分放入RNA中,并在4℃下保存24至72小时。然后将组织吸干、称重并储存在-80℃下。具体地,执行以下步骤:

[1310] 1.心脏穿刺后立即用颈脱位法杀死小鼠。

[1311] 2.在腹壁上切开一个口子并尽快取出肝脏。

[1312] 3.将肝脏放在湿冰上的培养皿中,以尽量减少样品的降解。

[1313] 4.从以下每个叶切下3x～50mg肝片:左侧叶、内侧叶、右侧叶和尾状叶。立即将这些肝片放入含有500μl RNA的预先标记的管(1.5ml微量离心管)中,并将收集管放在湿冰上。

[1314] a.在湿冰上运输并转移至4℃储存。

[1315] b.24-72小时后,吸干肝脏样本并称重。在终端表上记录重量。

[1316] c.转移至-80℃进行长期保存。

[1317] 5.收集多余的肝脏并放入单独的预先标记的收集管(2mL微量离心管)。

[1318] a.将其冷冻在干冰上用于潜在的将来分析。

[1319] b.在干冰上运输样品。

[1320] c.转移至-80℃进行长期保存。

[1321] 6.清洁动物之间的所有解剖工具,以防止任何交叉污染。

[1322] 去除腿部的皮肤并测量膝关节。随后将腿放入10％福尔马林中,然后进行脱钙和载玻片制备。具体地,执行以下步骤:

[1323] 1.去除肝脏后,测量并记录受伤和未受伤膝盖的直径。

[1324] 2.去除两个膝盖的皮肤。进行视觉出血评分并测量膝关节。

[1325] 3.从股骨顶部到踝关节解剖腿部并去除一些多余的肌肉,注意不要对膝盖和相关结构造成任何损伤。将膝盖放入预先标记的管(7mL小试管)中,试管中含有10％中性缓冲福尔马林,以进行组织学分析。

[1326] 在诱导膝盖出血后第3天和第10天,与接受溶媒(0.9％盐水)的Haem A小鼠相比,接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的Haem A小鼠的视觉出血评分显著降低(参见图12A和B)。此外,与接受溶媒治疗的小鼠相比,接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的小鼠的膝盖直径在诱导膝盖出血后恢复得更快(图13A)。通过比较受伤和未受伤的剥皮的膝盖直径的差异证实了这一观察结果(图13B)。

[1327] 对受伤后10天的Haem A小鼠的分析进一步显示,与接受溶媒(0.9％生理盐水)的Haem A小鼠相比,接受GalNAc-siRNA构建体ETXM1184的小鼠骨髓增生较不严重(图14A),骨关节炎较不严重(图14B),软骨细胞变性/坏死较不严重(图14C),出血较不严重(图14D),含铁血黄素沉积较不严重(图14E),血肿较不严重(图14F),破骨细胞性骨吸收较不严重(图14G),骨溶解较不严重(图14H),骨膜炎较不严重(图14I),软骨下骨硬化较不严重(图14J)、肌腱退化较不严重(图14K)、肌腱炎较不严重(图14L),以及腱鞘炎较不严重(图14M)。

[1328] 图15-20提供了ETXM1184和fitusiran之间的比较数据。

[1329] 实施例13:抑制人类Huh7细胞中ZPI表达的剂量反应

[1330] Huh7细胞(人类肝细胞衍生细胞系,从JCRB细胞库获得)在37℃和5%CO_2的气氛下在补充有10%FBS的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。用0.1nM和1nM的针对靶标设计的siRNA双链体或阴性对照siRNA转染细胞。通过将9.7μL Opti-MEM(ThermoFisher)和0.3μL Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher)添加到10μL的每个siRNA双链体中进行转染。将混合物在室温下孵育15分钟,然后加入100μL的含有20,000个Huh7细胞的完全生长培养基中。将细胞在37℃/5%CO_2下孵育24小时,然后使用RNeasy 96试剂盒(Qiagen)纯化总RNA。通过在重复孔中转染来测试每个双链体,并重复实验三次。

[1331] 使用FastKing RT试剂盒(含gDNase)(Tiangen)进行cDNA合成。使用TaqMan基因表达检测试剂盒(ThermoFisher Scientific),在ABIPrism 7900HT或ABI QuantStudio 7上使用针对人类ZPI(Hs01547819_m1)和人类GAPDH(Hs02786624_g1)的特异性引物进行实时定量PCR(qPCR)。

[1332] 对来自每个孔的cDNA进行重复qPCR,并计算平均Ct。使用比较Ct(ΔΔCt)方法根据平均Ct值计算相对靶标表达,标准化为GAPDH并相对于未处理的细胞。

[1333] 为了抑制ZPI,测试了siRNA双链体ETXM1184、ETXM1199、ETXM1200、ETXM1201、ETXM1202、ETXM1203、ETXM1204、ETXM1205、ETXM1206和ETXM1207(图21)。

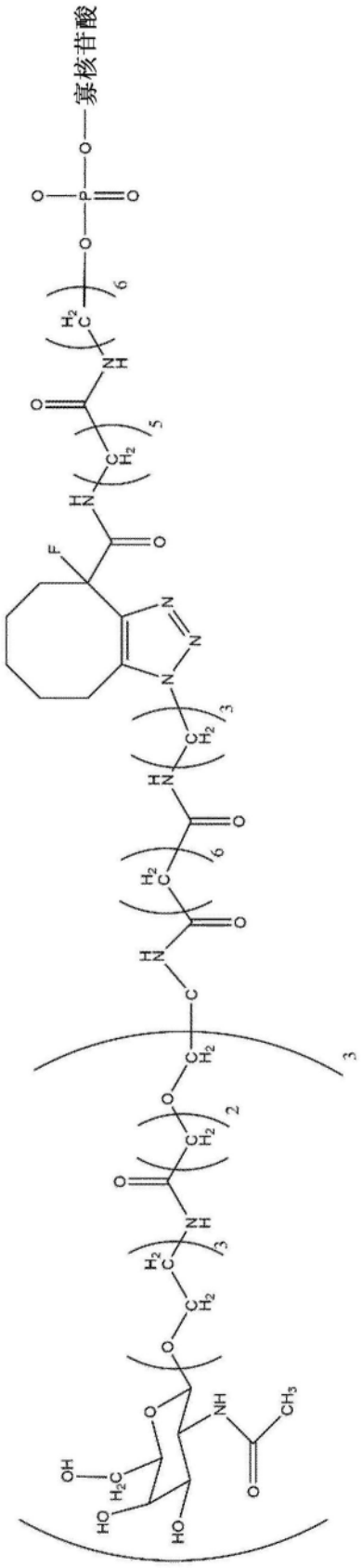


图1

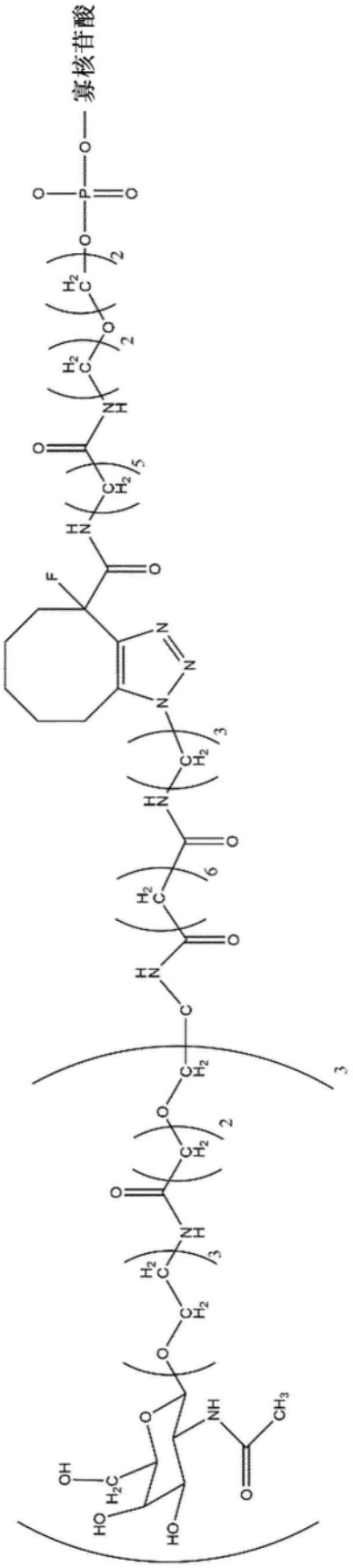


图2

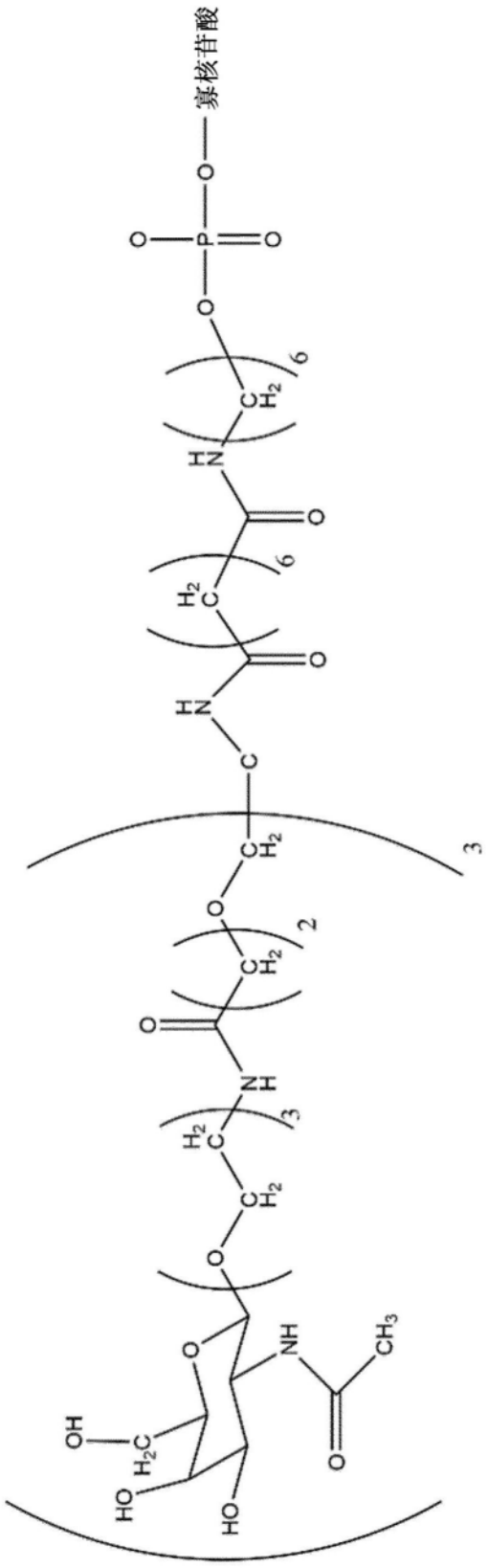


图3

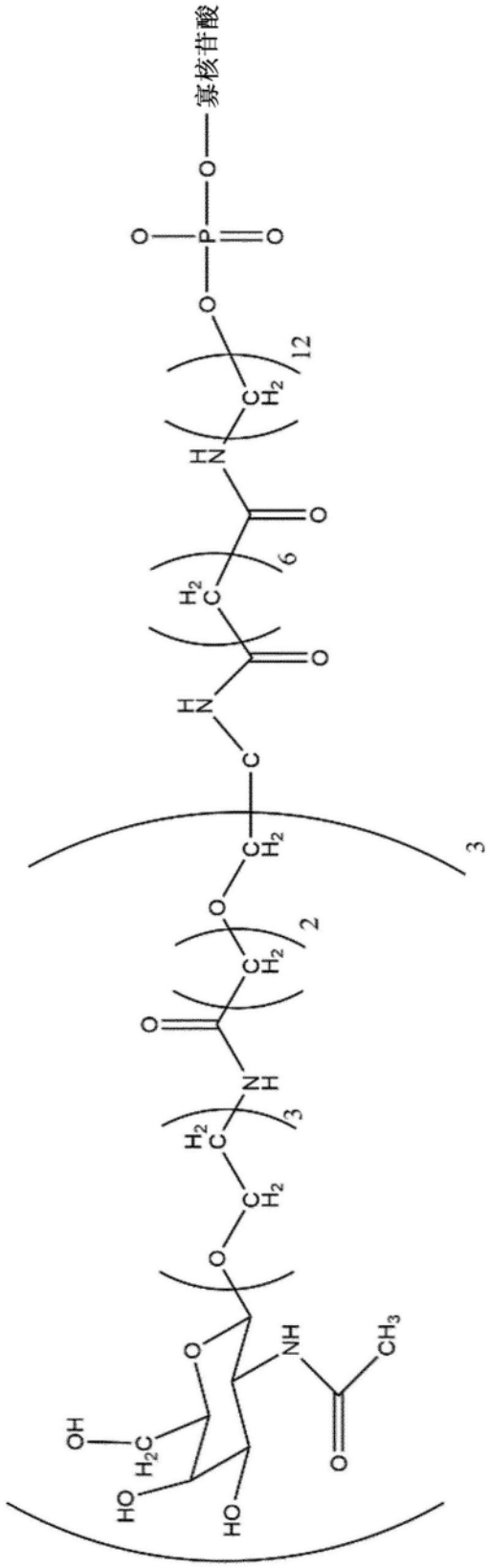
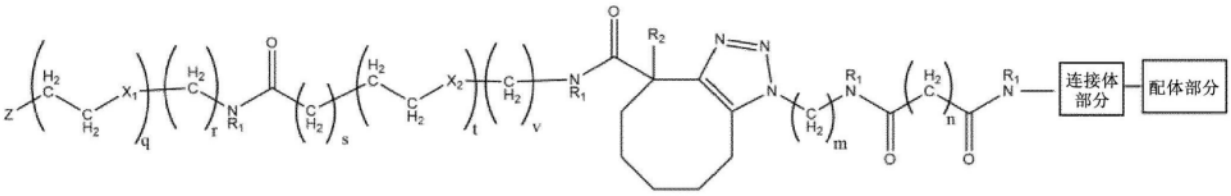
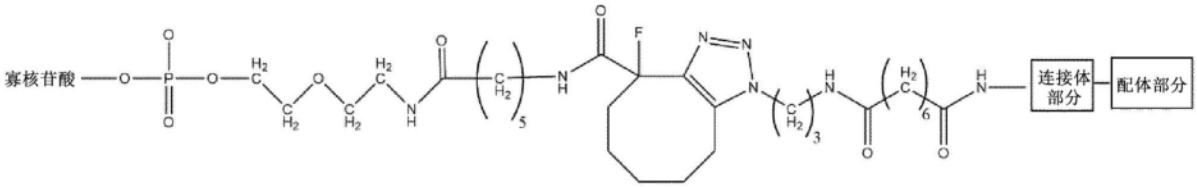


图4

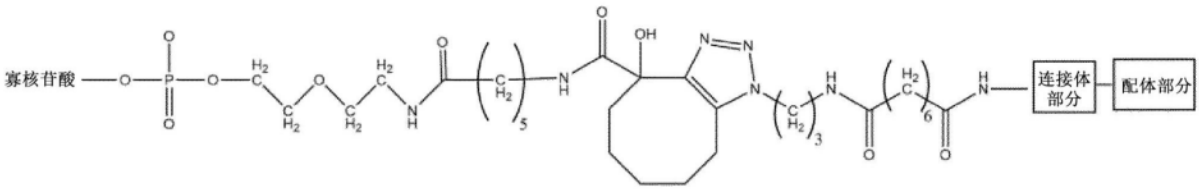
自项1-101



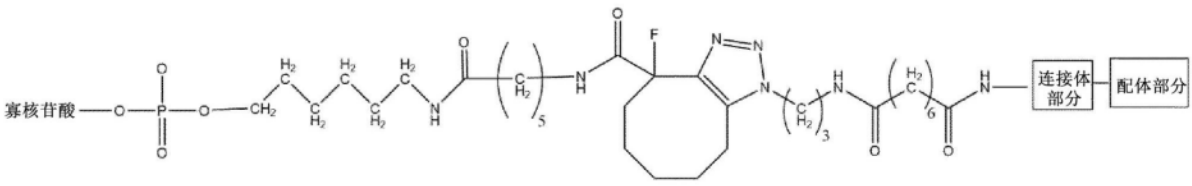
式(Ⅰ)



式(Ⅱ)

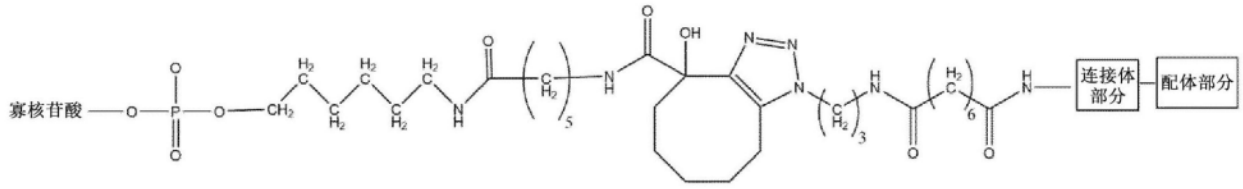


式(Ⅲ)

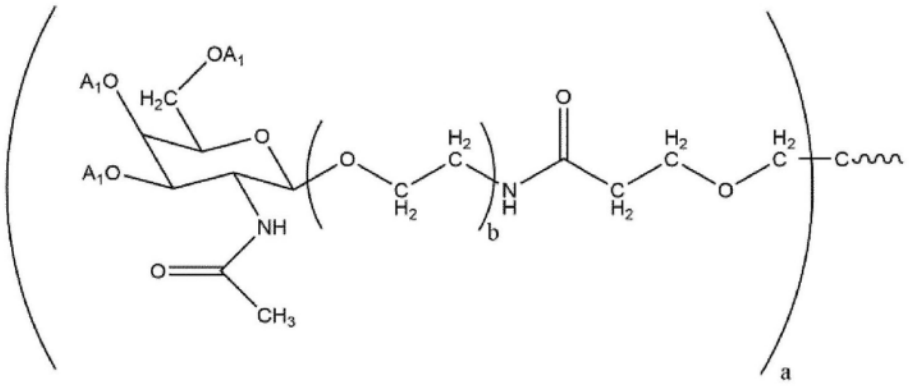


式(Ⅳ)

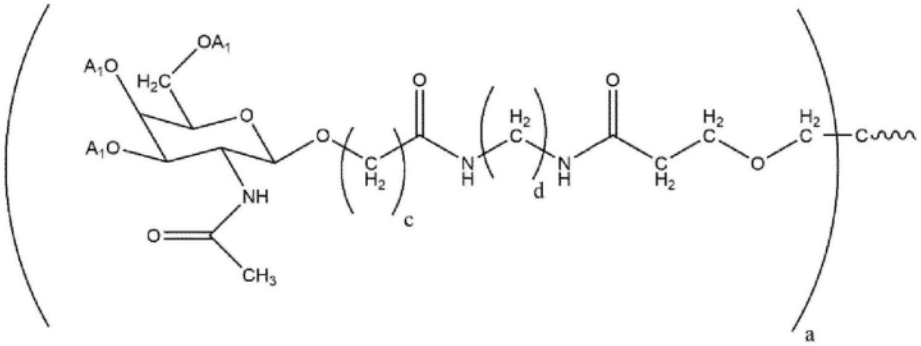
图5



式(V)

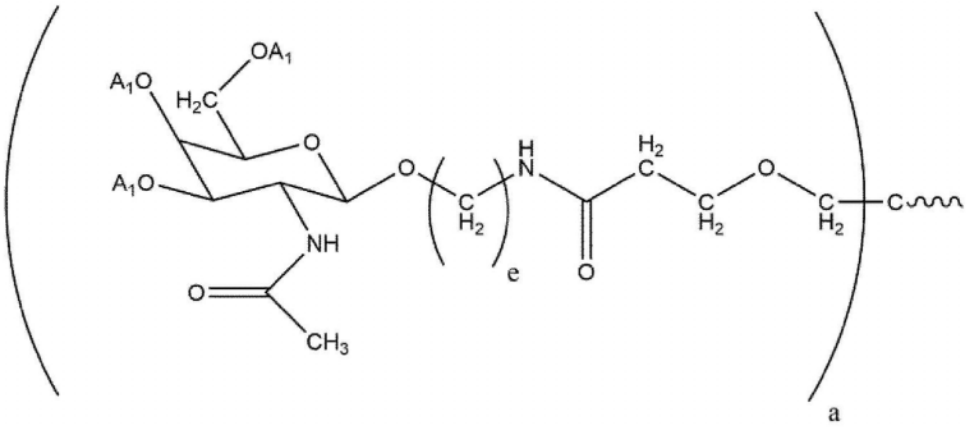


式(VIa)

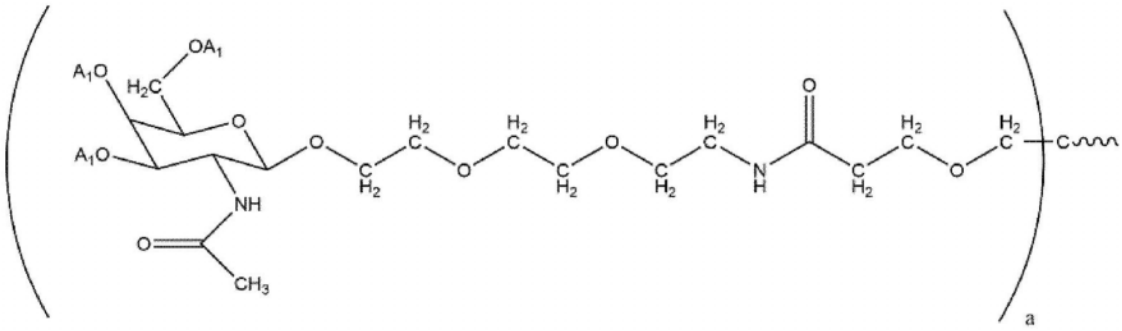


式(VIb)

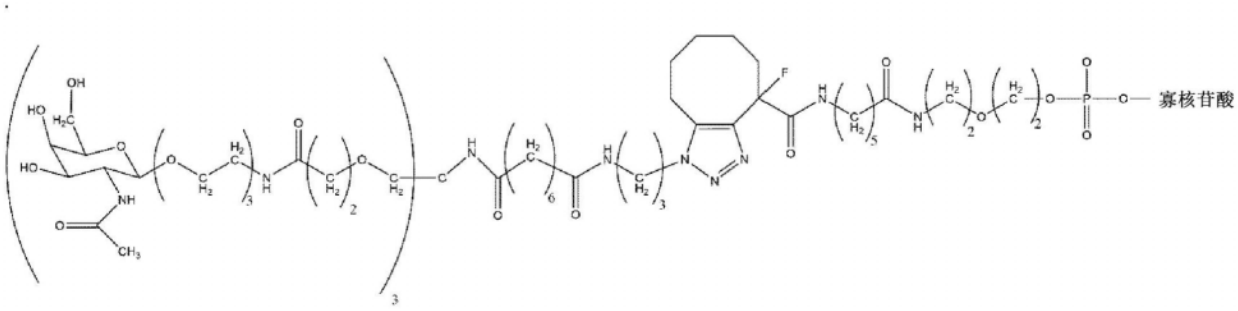
图5(续)



式(VIc)

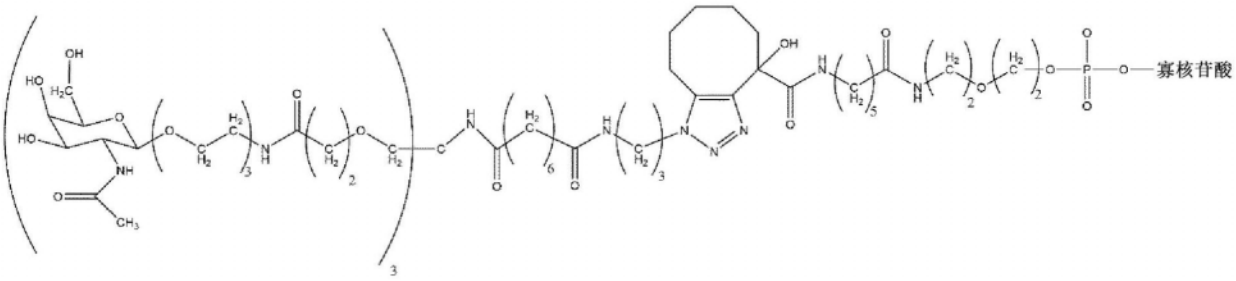


式(VII)

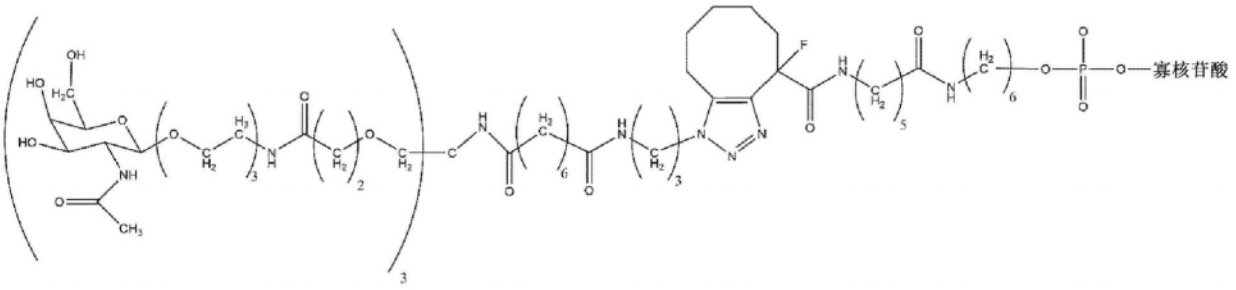


式(VIII)

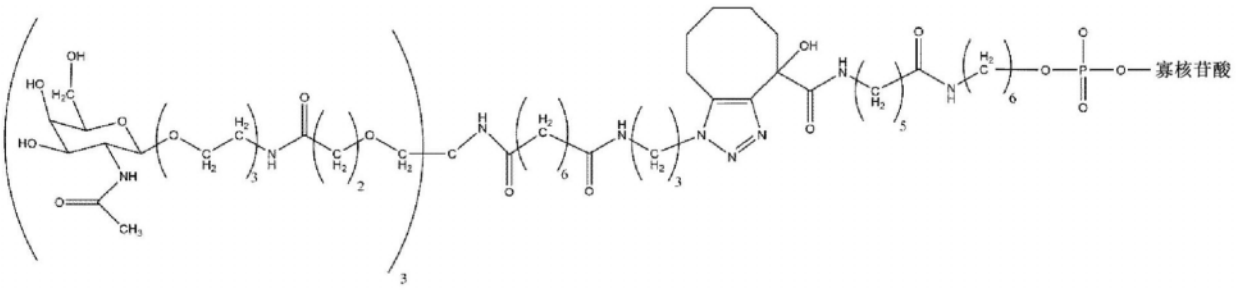
图5(续)



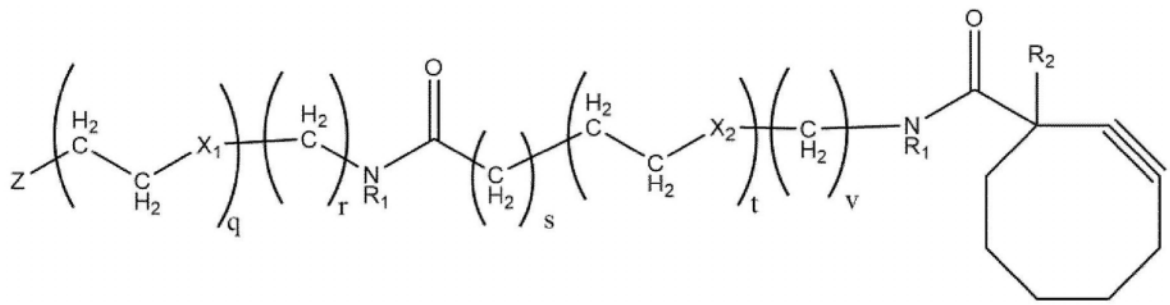
式(IX)



式(X)

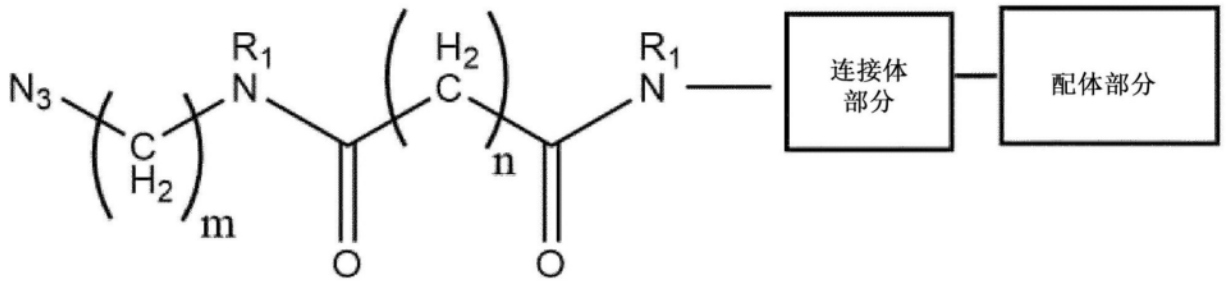


式(XI)

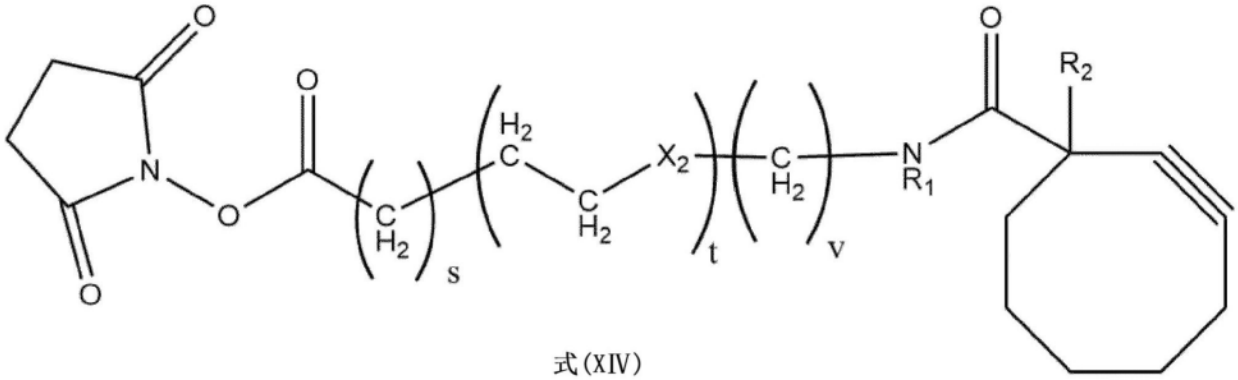


式(XII)

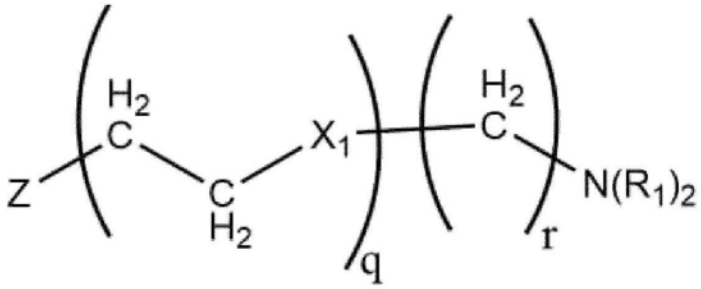
图5(续)



式(XIII)

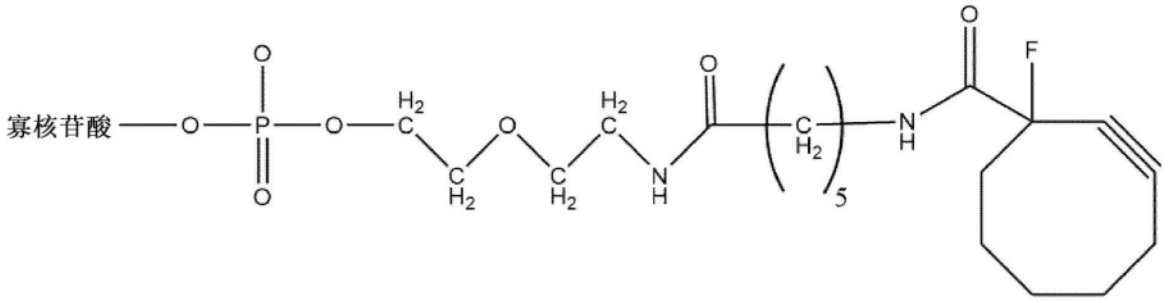


式(XIV)

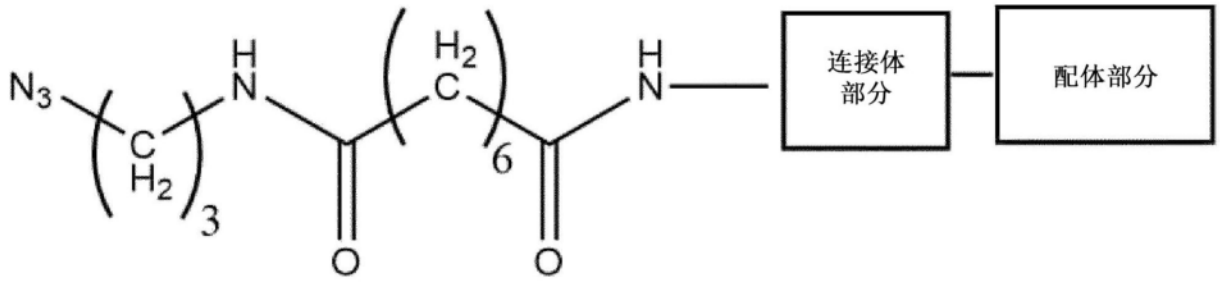


式(XV)

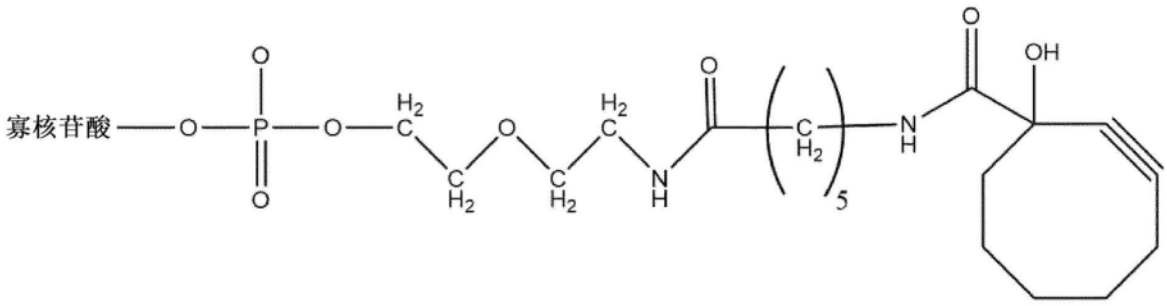
图5(续)



式(XIIa)

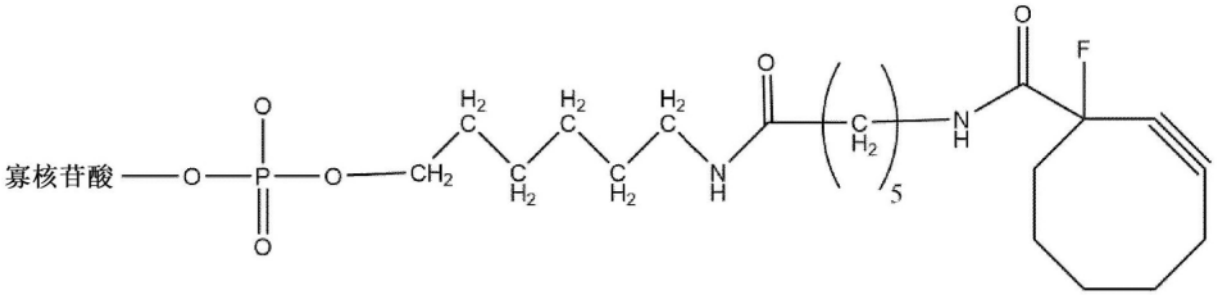


式(XIIIa)

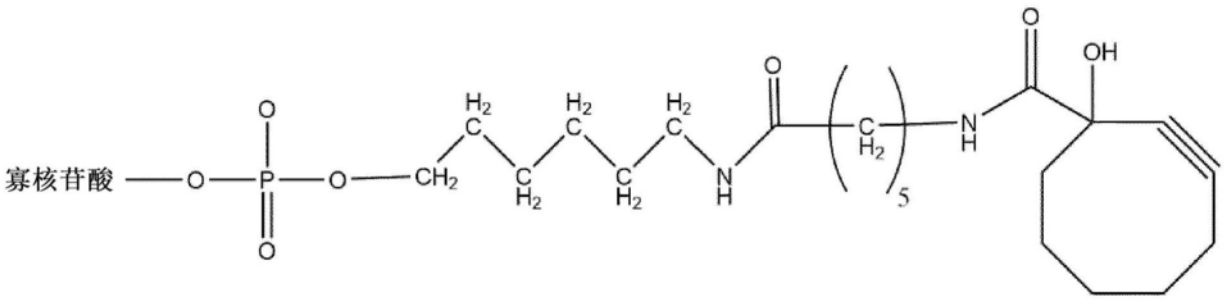


式(XIIb)

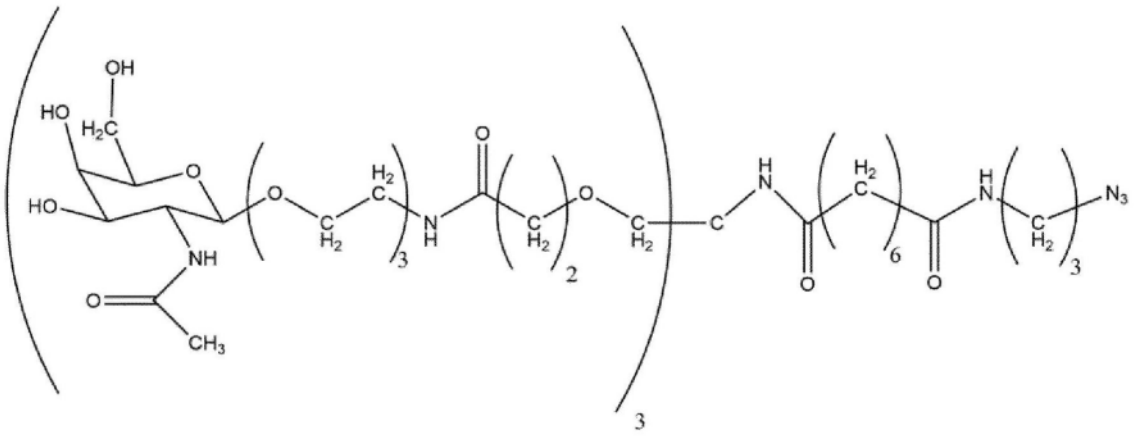
图5(续)



式(XIIIc)

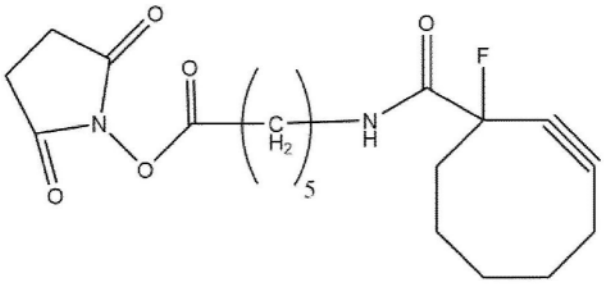


式(XIIId)

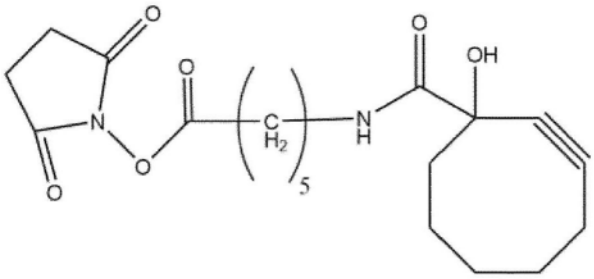


式(XIIIb)

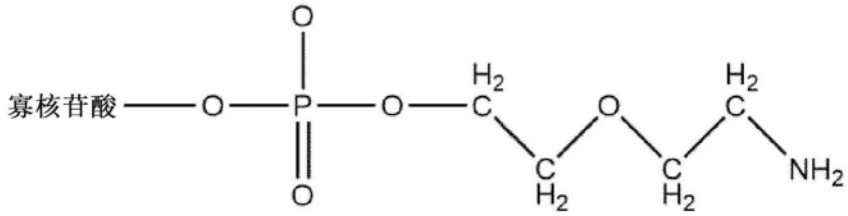
图5(续)



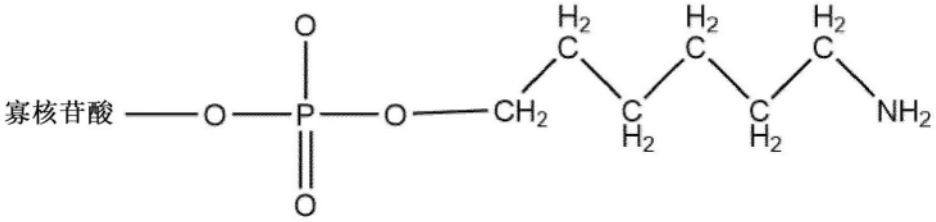
式(XIVa)



式(XIVb)



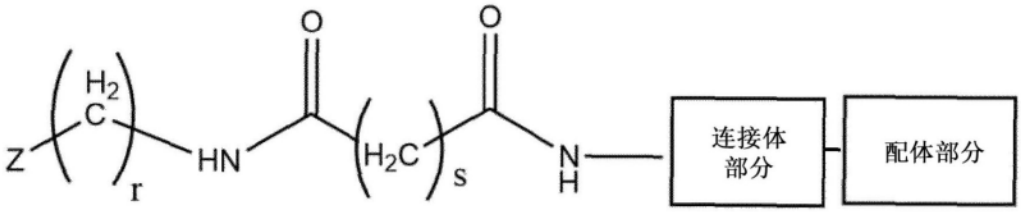
式(XVa)



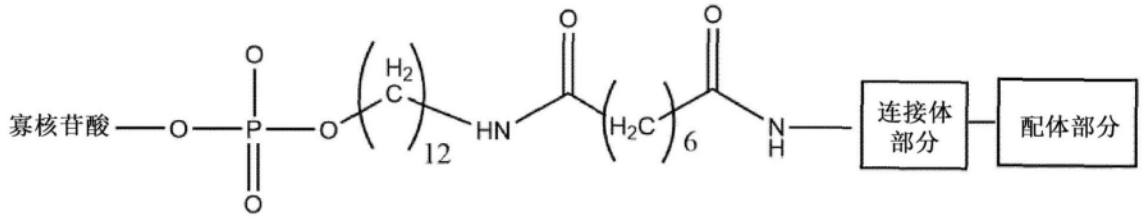
式(XVb)

图5(续)

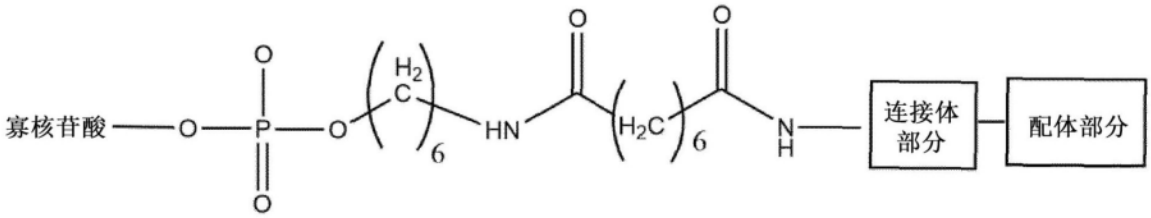
自条款1-56的结构式



式(I)

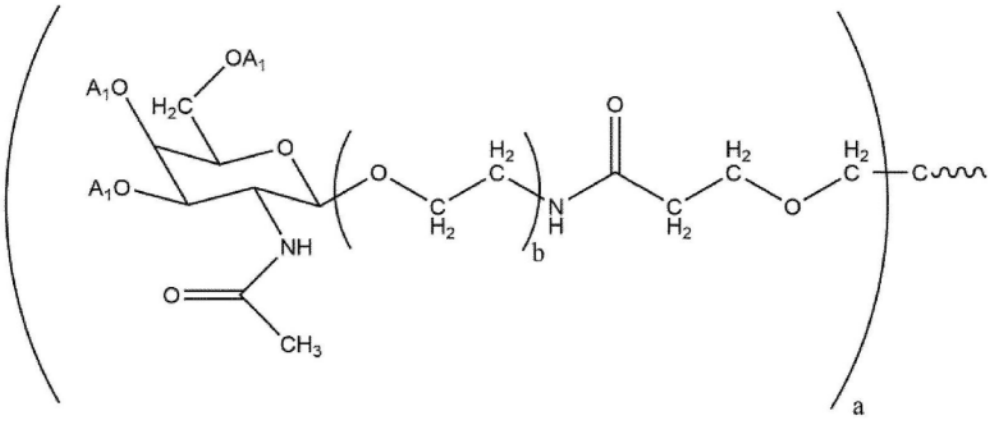


式(II)

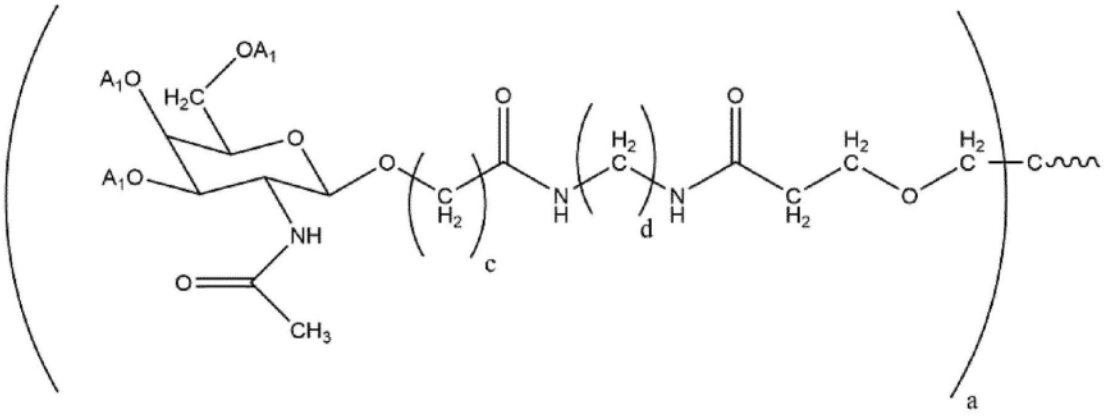


式(III)

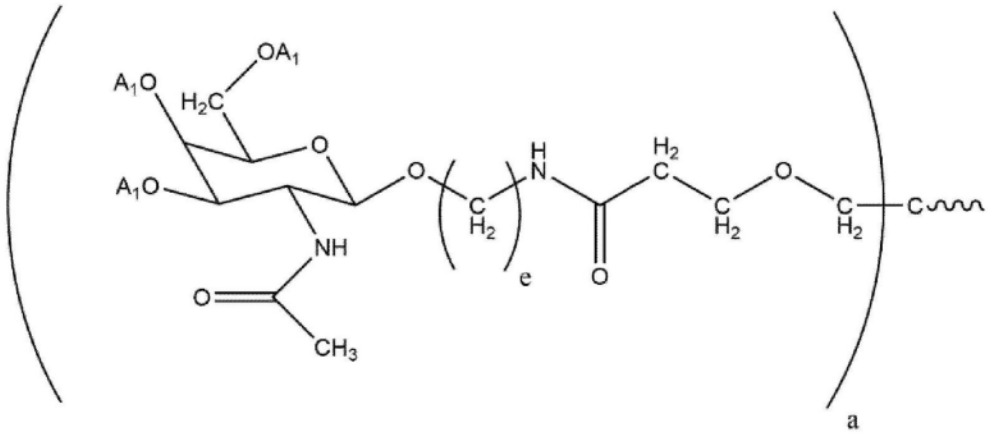
图6



式(Ⅳ)

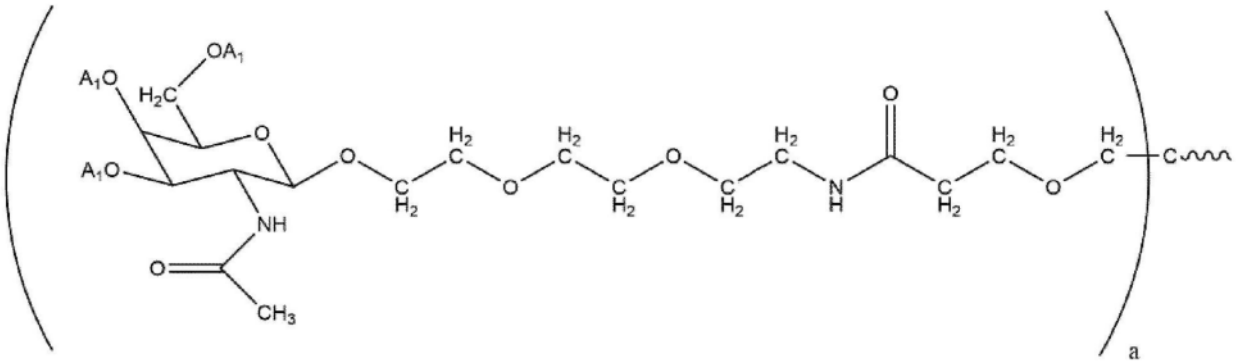


式(Ⅴ)

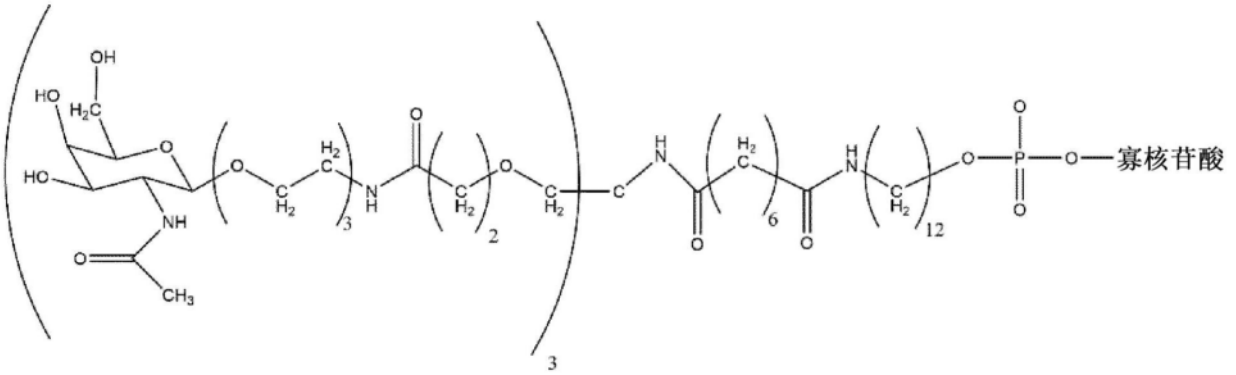


式(Ⅵ)

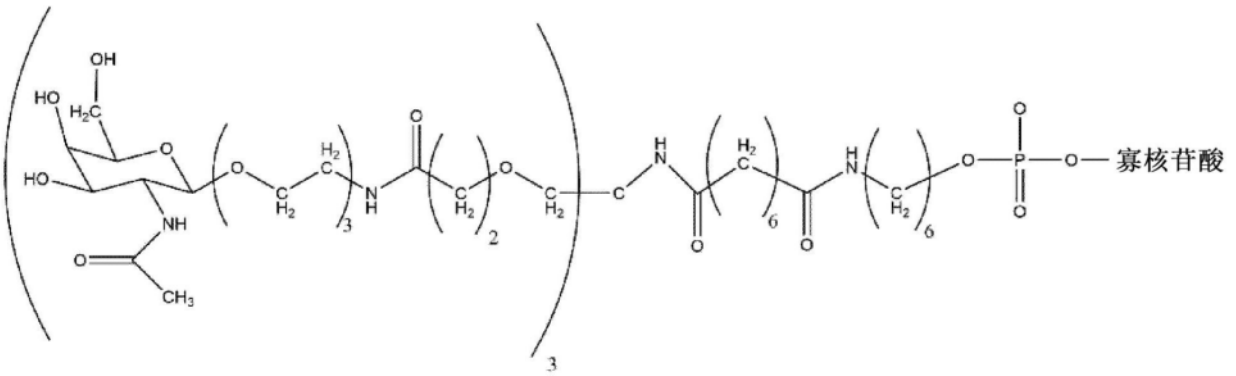
图6(续)



式(Ⅶ)

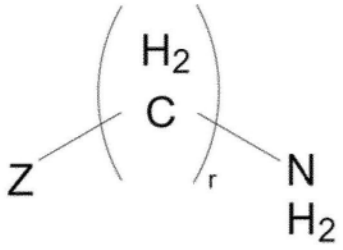


式(Ⅷ)

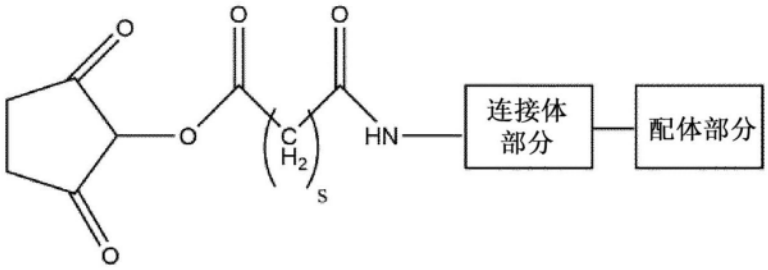


式(Ⅸ)

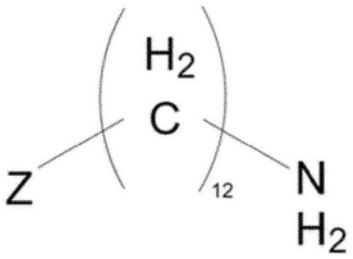
图6(续)



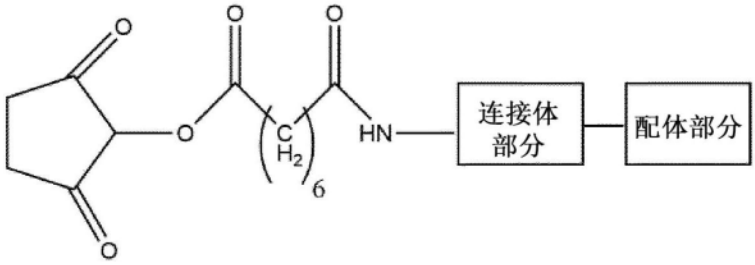
式(X)



式(XI)

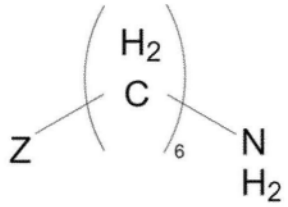


式(Xa)

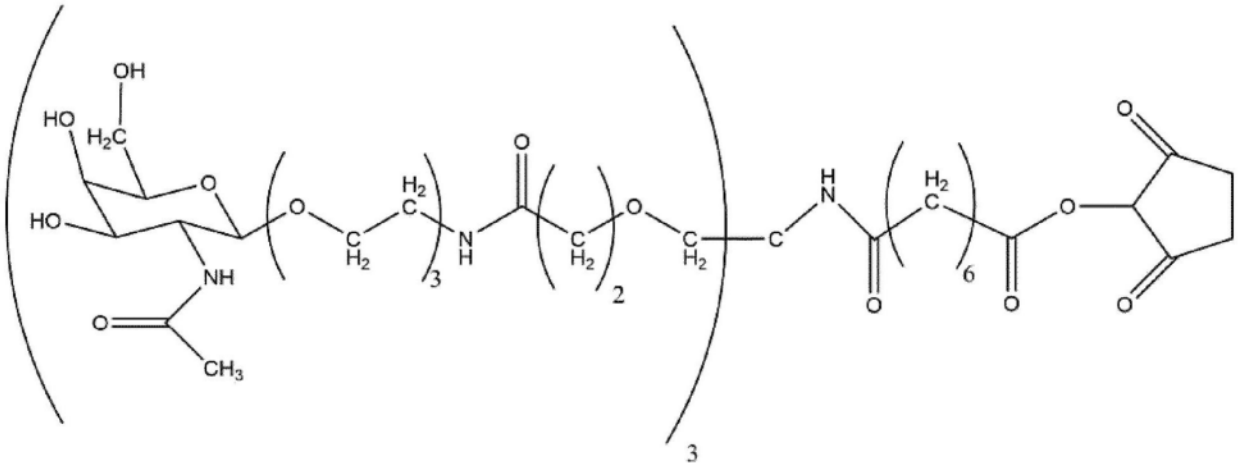


式(XIa)

图6(续)



式(Xb)



式(XIb)

图6(续)

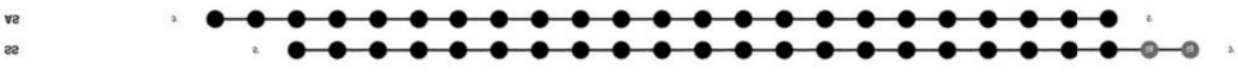


图7a

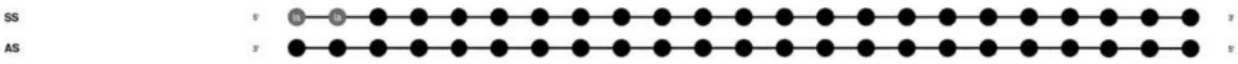


图7b

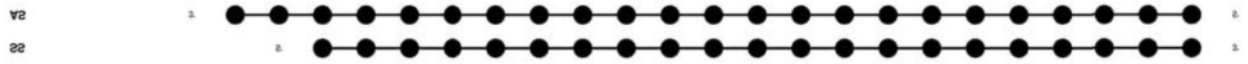


图8a

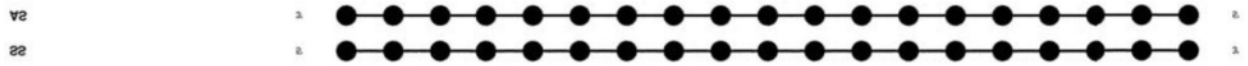


图8b

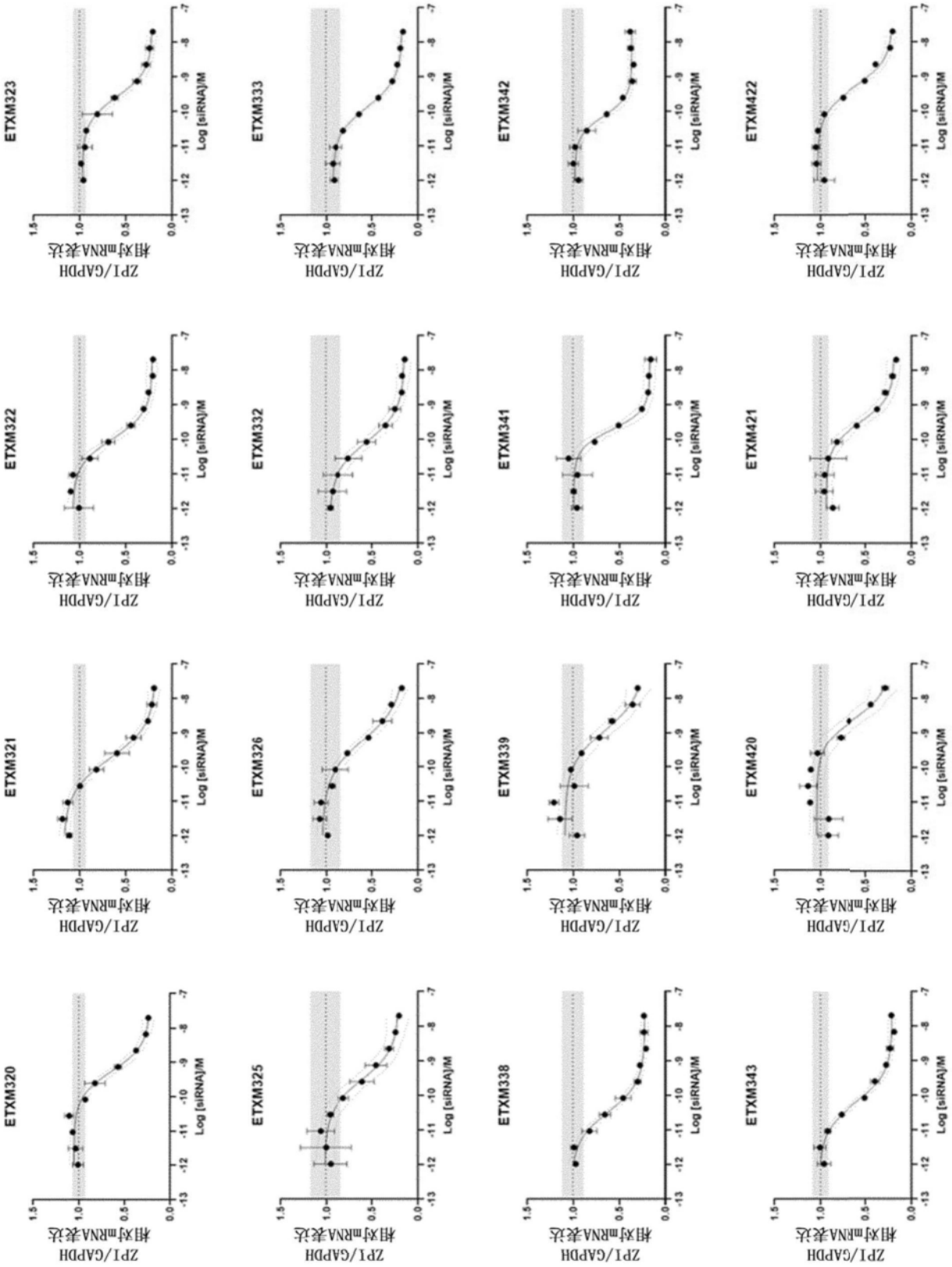

ETXM323
ETXM333
ETXM342
ETXM422
ETXM322
ETXM332
ETXM341
ETXM421
ETXM321
ETXM326
ETXM339
ETXM420
ETXM320
ETXM325
ETXM338
ETXM343
ZPI/GAPDH
相对mRNA表达
Log [siRNA]/M

图9

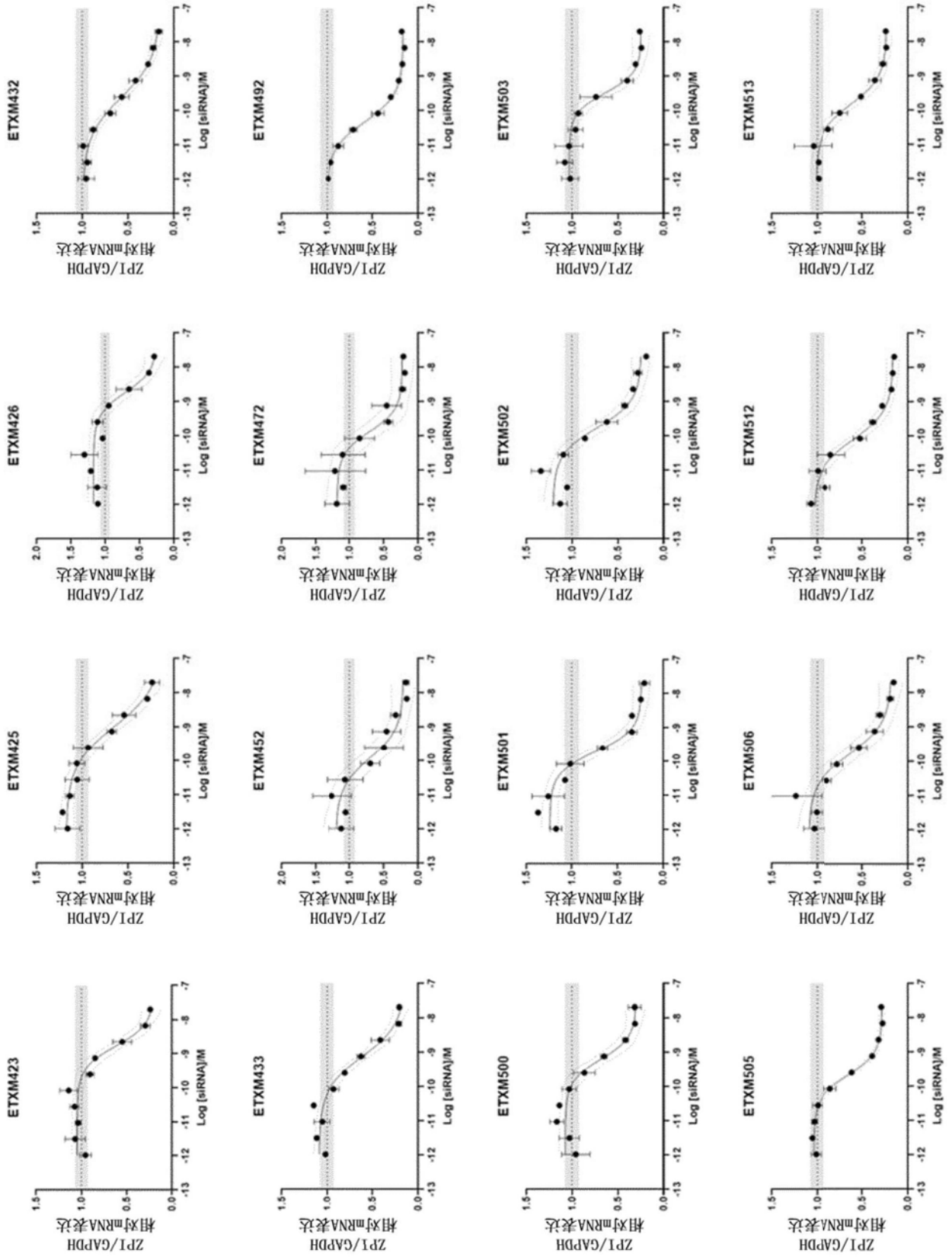

ETXM432
ETXM492
ETXM503
ETXM513
ETXM426
ETXM472
ETXM502
ETXM512
ETXM425
ETXM452
ETXM501
ETXM506
ETXM423
ETXM433
ETXM500
ETXM505
ZP1/GAPDH
相对mRNA表达
Log [siRNA]/M

图9(续)

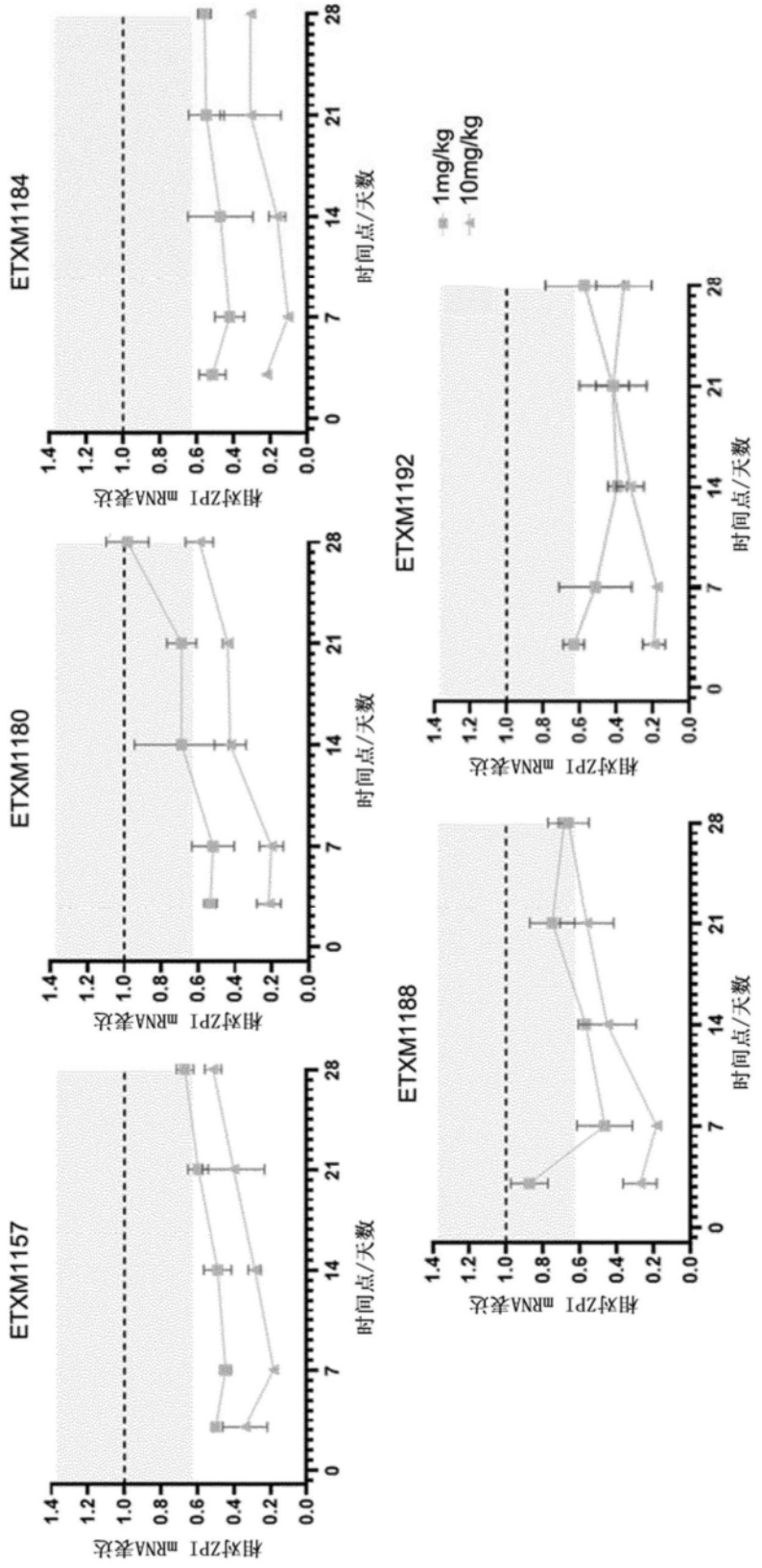

ETXM1184
ETXM1180
ETXM1157
ETXM1192
ETXM1188
1mg/kg
10mg/kg
相对ZPI mRNA表达
时间点/天数
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
0
7
14
21
28

图10

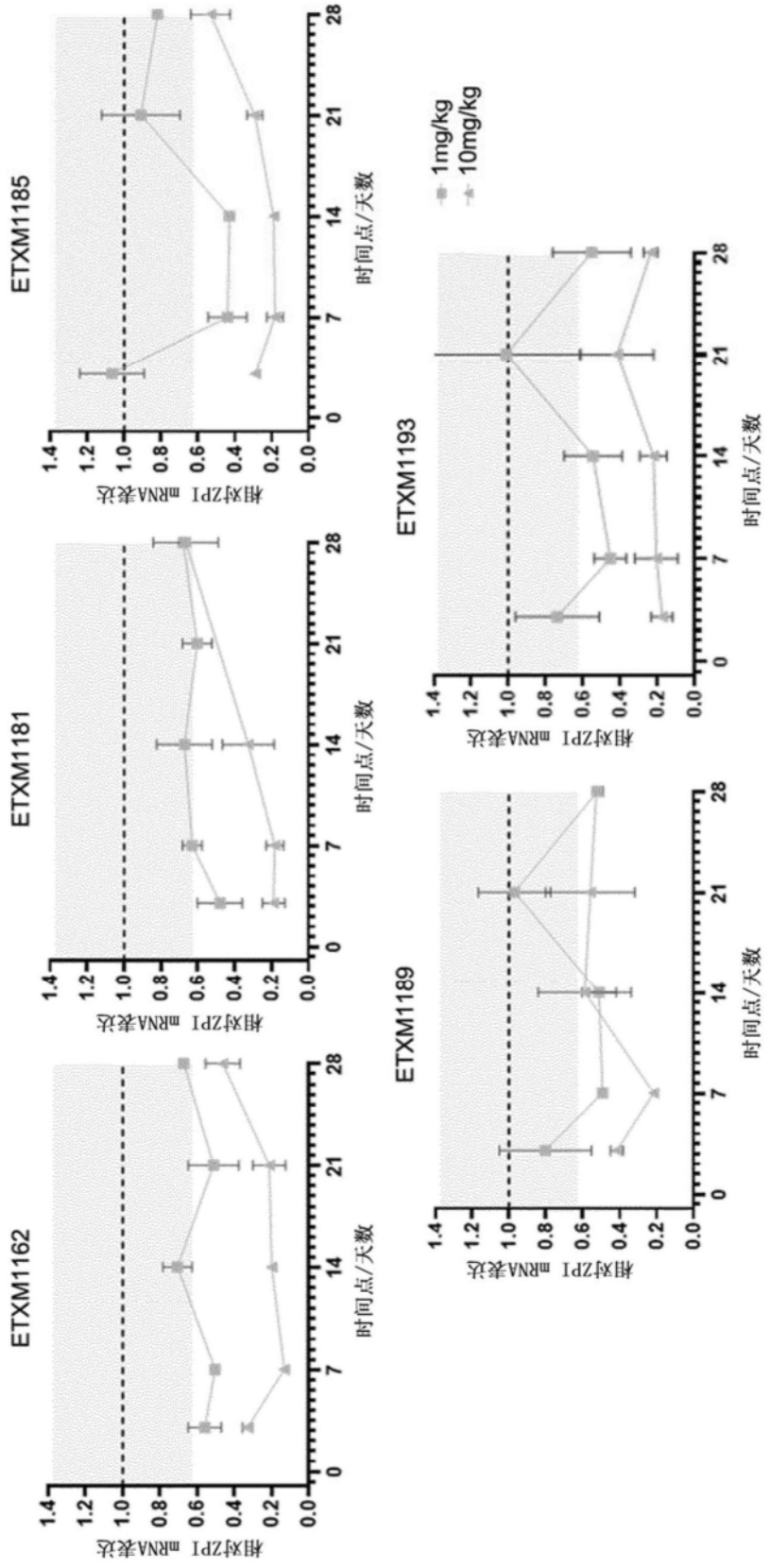
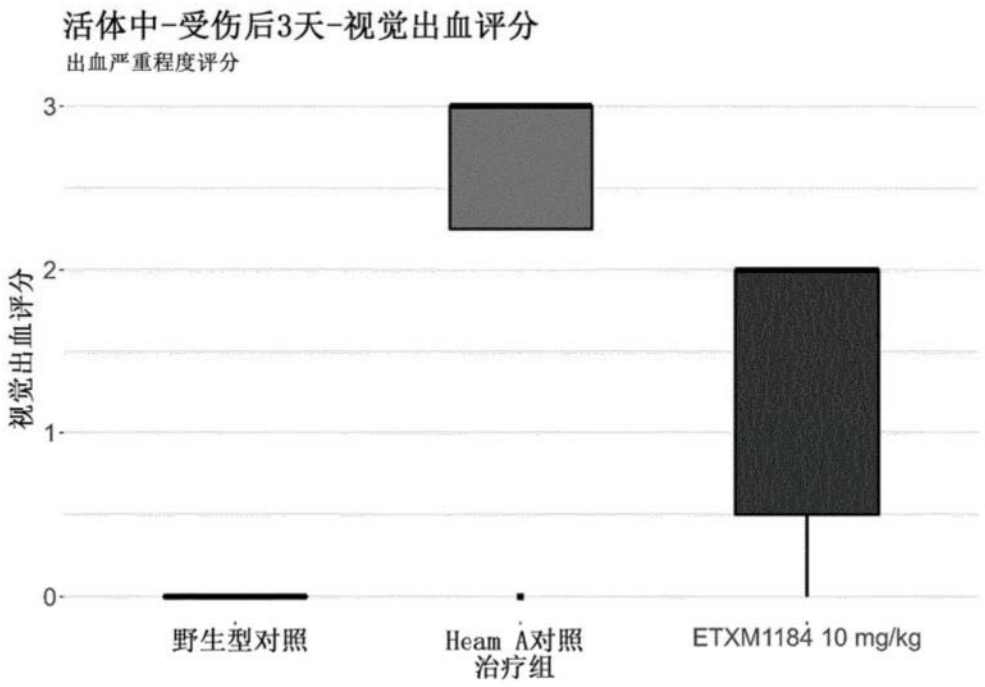

ETXM1185
ETXM1181
ETXM1162
ETXM1193
ETXM1189
1mg/kg
10mg/kg
相对ZPI mRNA表达
时间点/天数
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
0
7
14
21
28

图11



0 - 关节囊无肿胀，关节腔内无血液
1 - 关节囊无肿胀，关节腔内有血液
2 - 关节囊肿胀但不紧张，关节腔内有血液
3 - 关节囊肿胀且紧张，关节腔内有血液

图12A

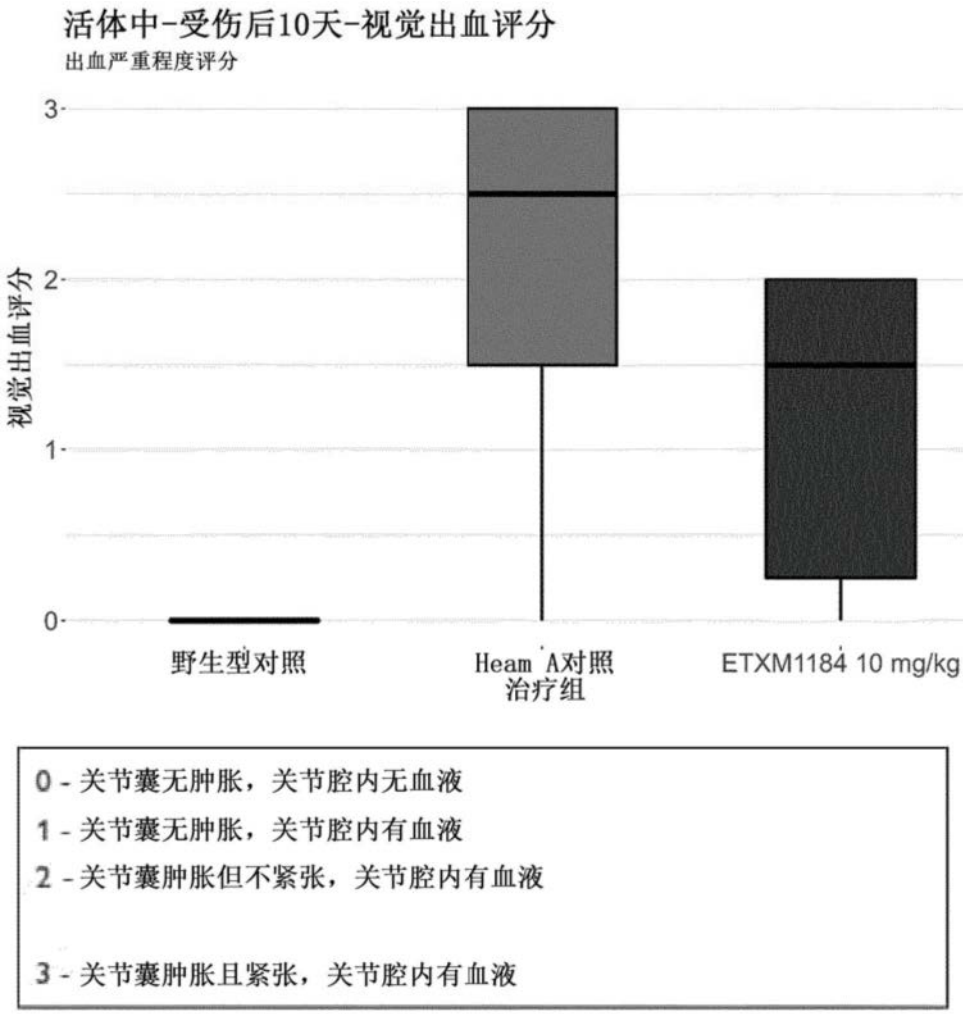

活体中-受伤后10天-视觉出血评分
出血严重程度评分
视觉出血评分
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg
0 - 关节囊无肿胀，关节腔内无血液
1 - 关节囊无肿胀，关节腔内有血液
2 - 关节囊肿胀但不紧张，关节腔内有血液
3 - 关节囊肿胀且紧张，关节腔内有血液

图12B

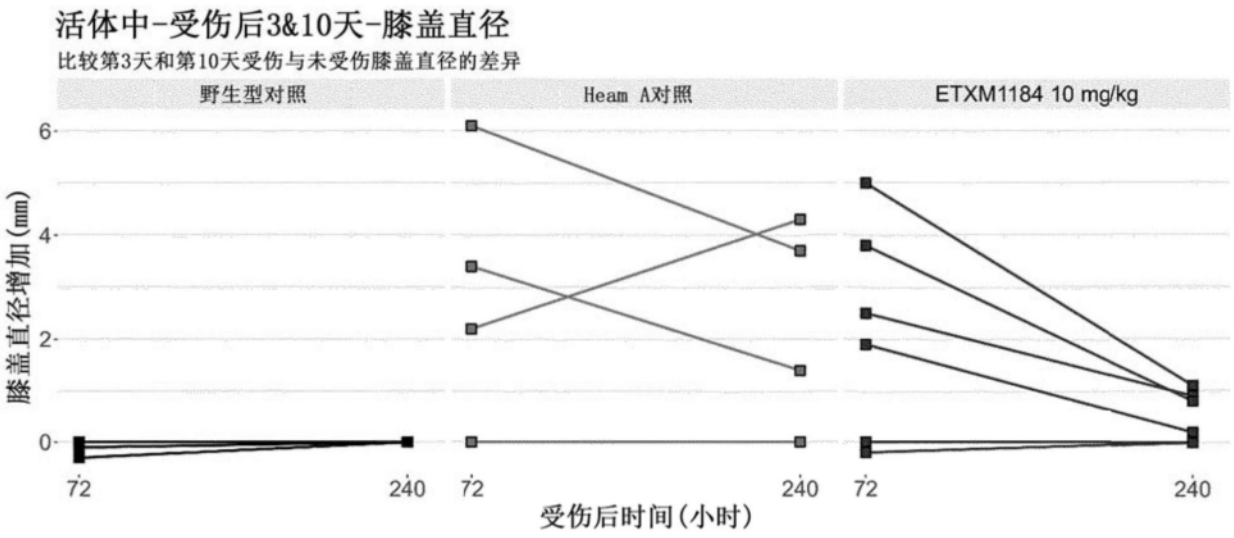

活体中-受伤后3&10天-膝盖直径
比较第3天和第10天受伤与未受伤膝盖直径的差异
野生型对照
Heam A对照
ETXM1184 10 mg/kg
膝盖直径增加(mm)
6
4
2
0
72
240
受伤后时间(小时)

图13A

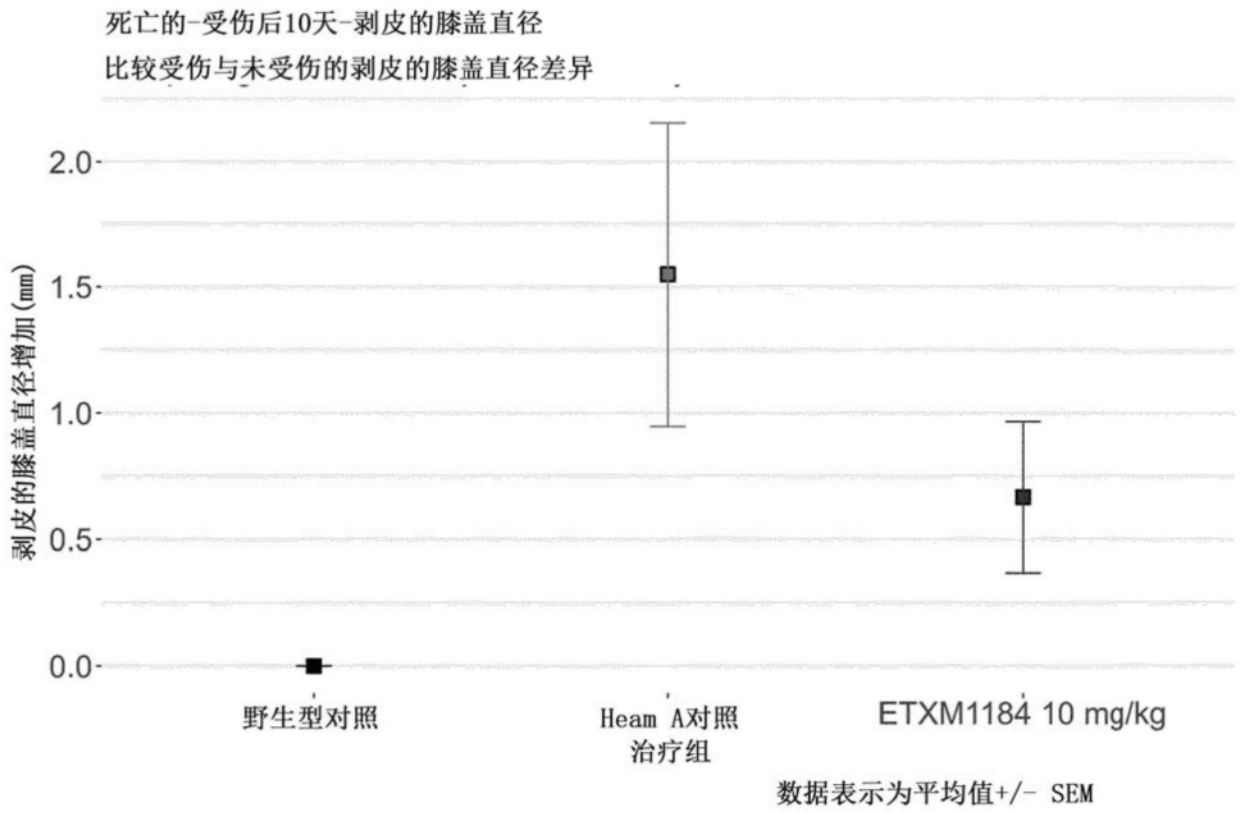

死亡的-受伤后10天-剥皮的膝盖直径
比较受伤与未受伤的剥皮的膝盖直径差异
剥皮的膝盖直径增加(mm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg
数据表示为平均值+/- SEM

图13B

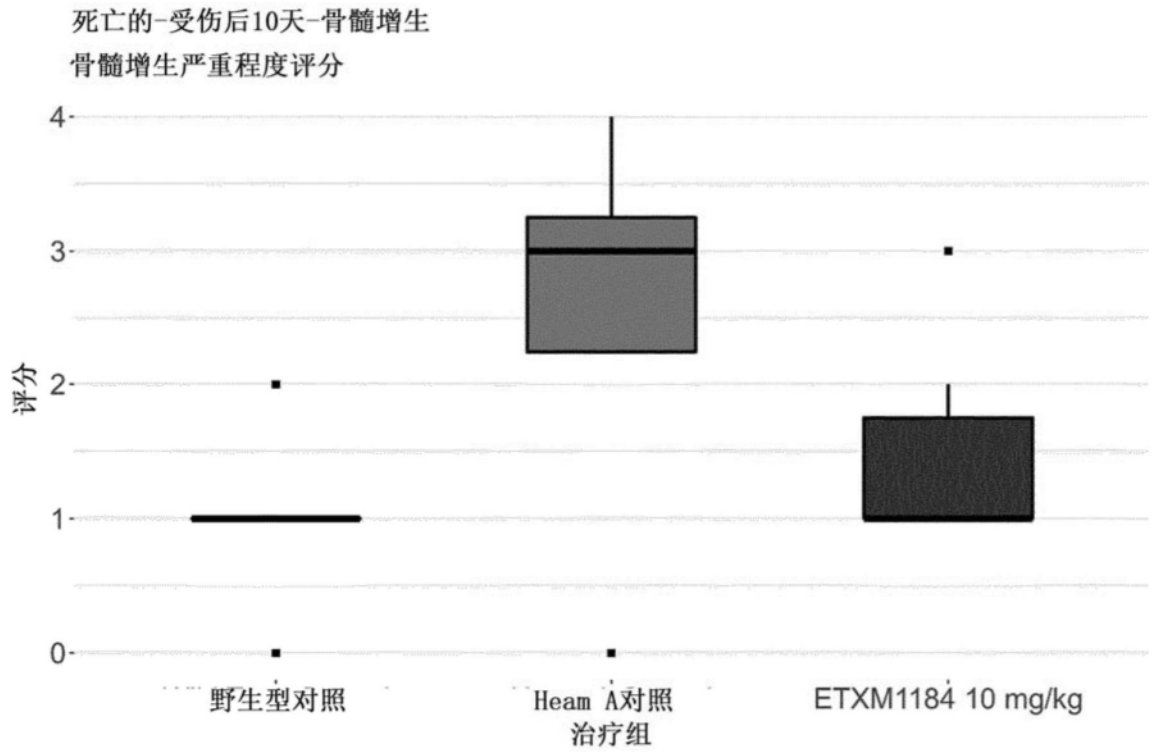

死亡的-受伤后10天-骨髓增生
骨髓增生严重程度评分
评分
4
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14A

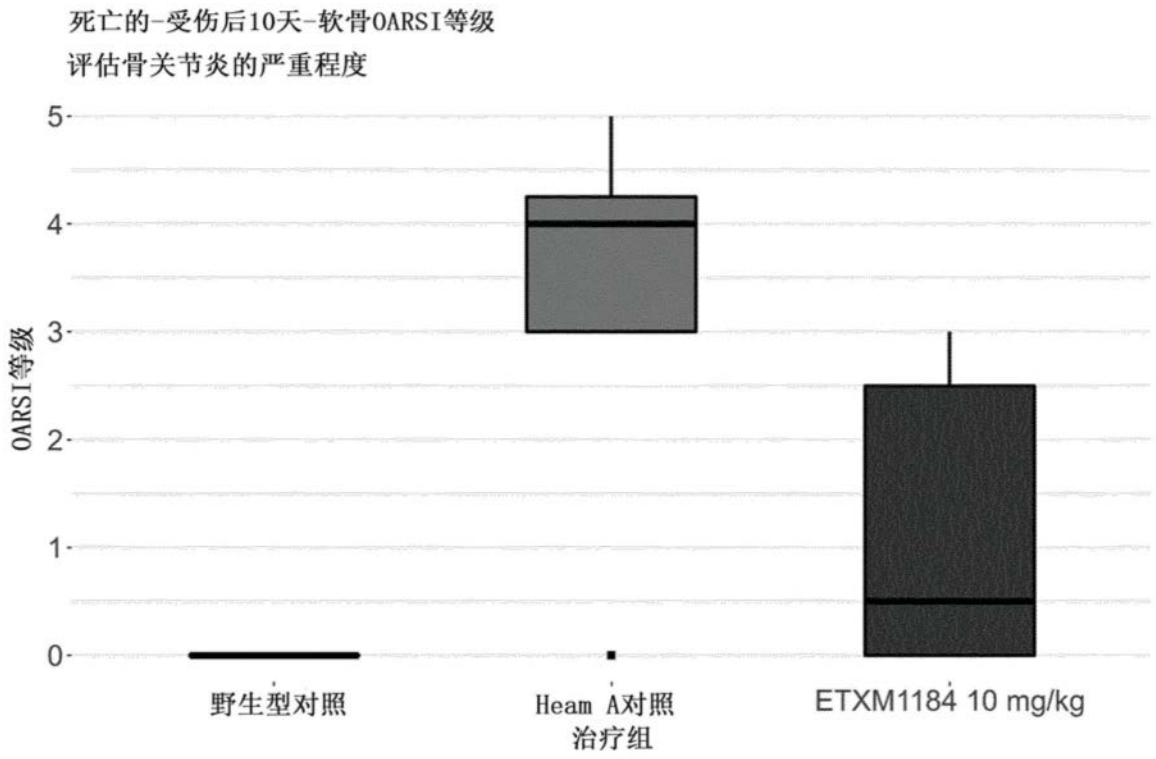

死亡的-受伤后10天-软骨OARSI等级
评估骨关节炎的严重程度
OARSI等级
5
4
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14B

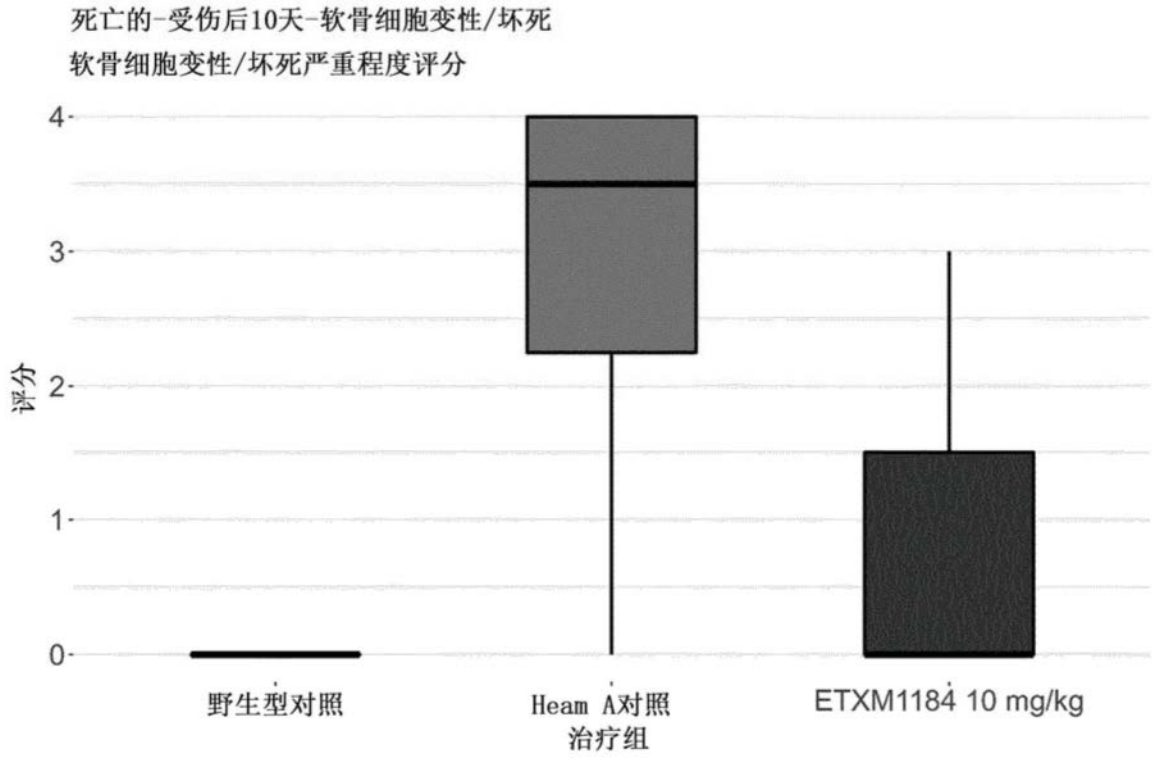

死亡的-受伤后10天-软骨细胞变性/坏死
软骨细胞变性/坏死严重程度评分
评分
4
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14C

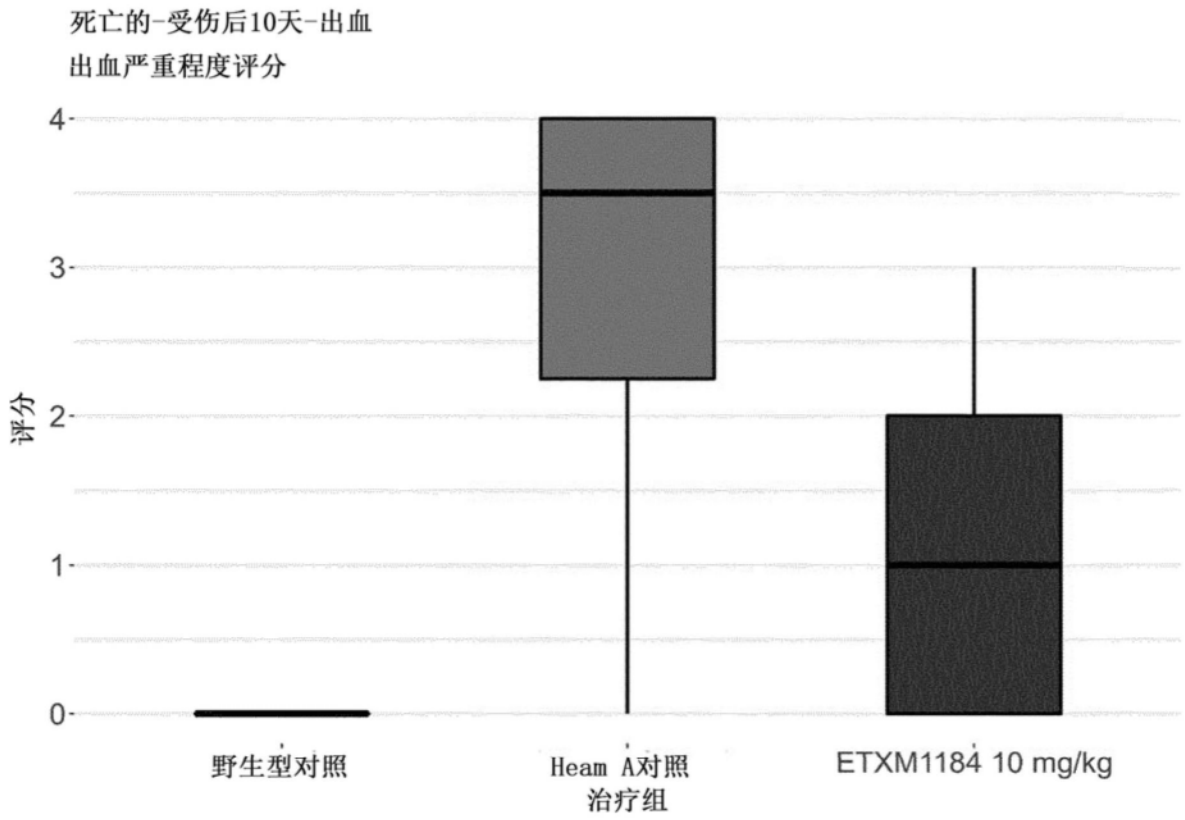

死亡的-受伤后10天-出血
出血严重程度评分
4
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14D

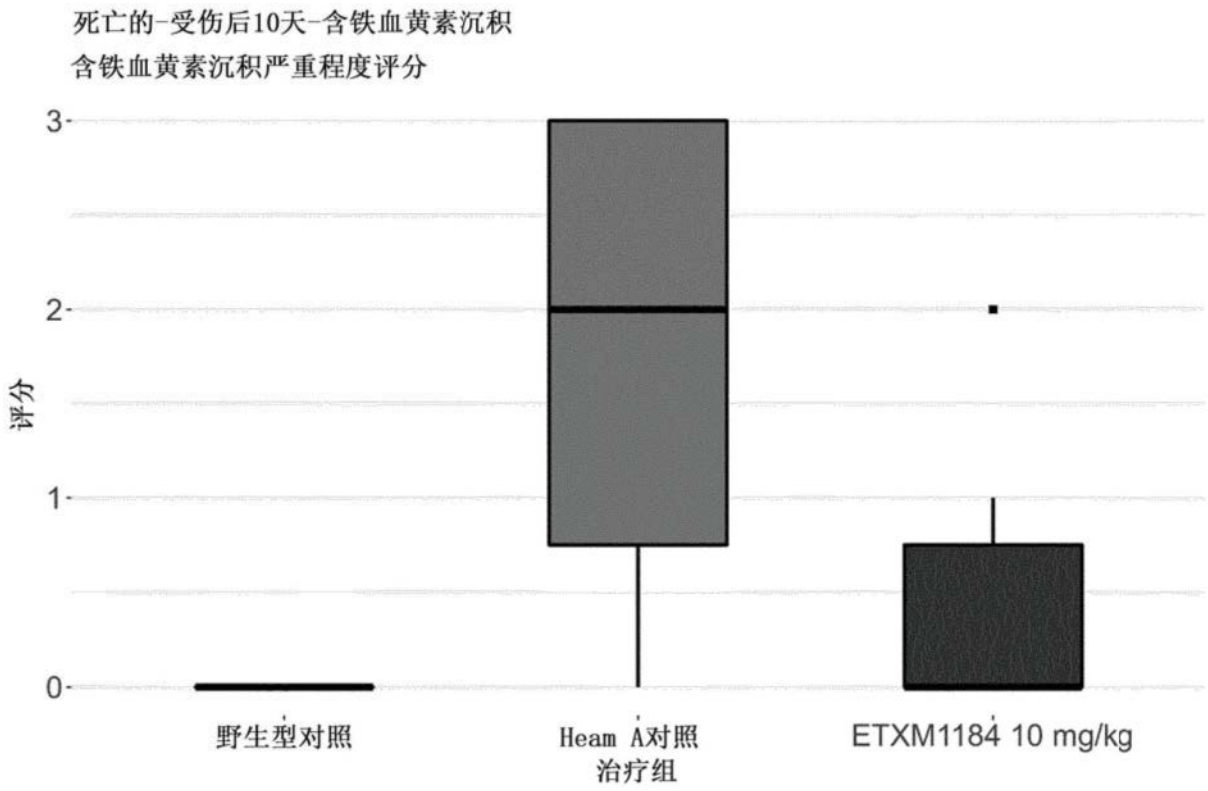

死亡的-受伤后10天-含铁血黄素沉积
含铁血黄素沉积严重程度评分
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14E

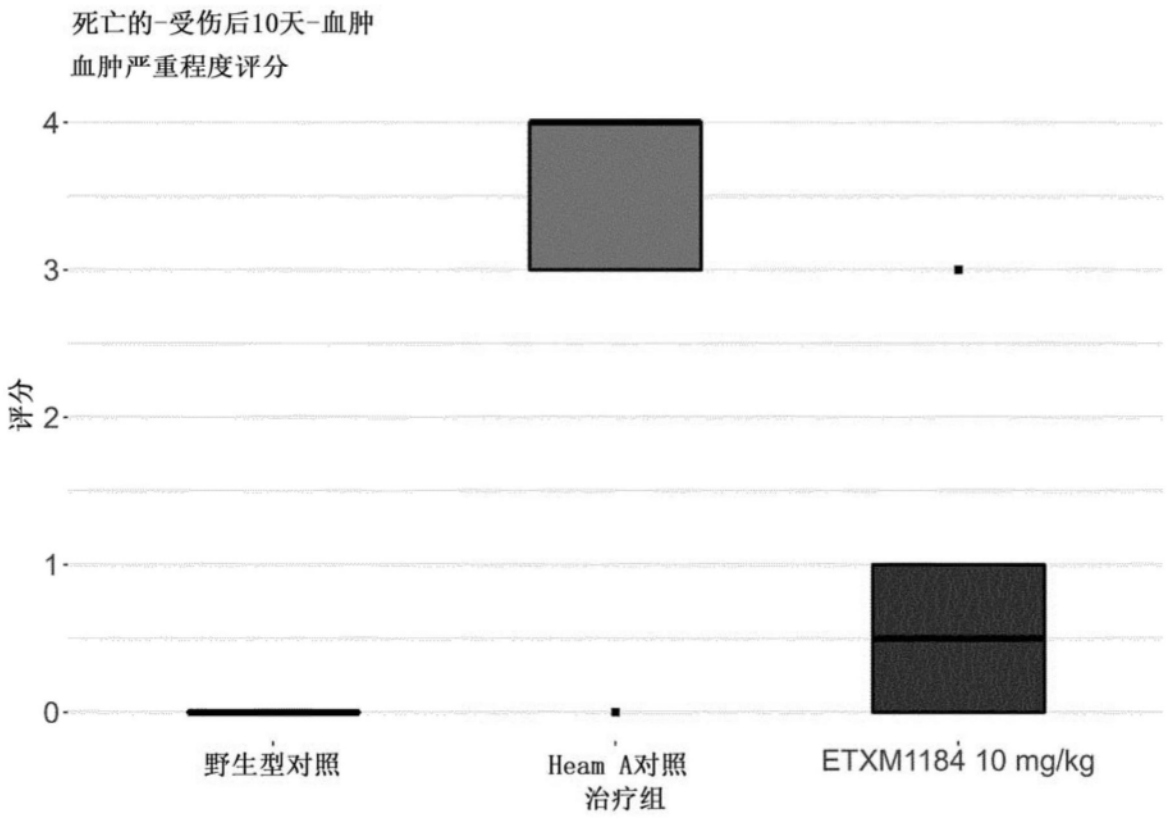

死亡的-受伤后10天-血肿
血肿严重程度评分
4
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14F

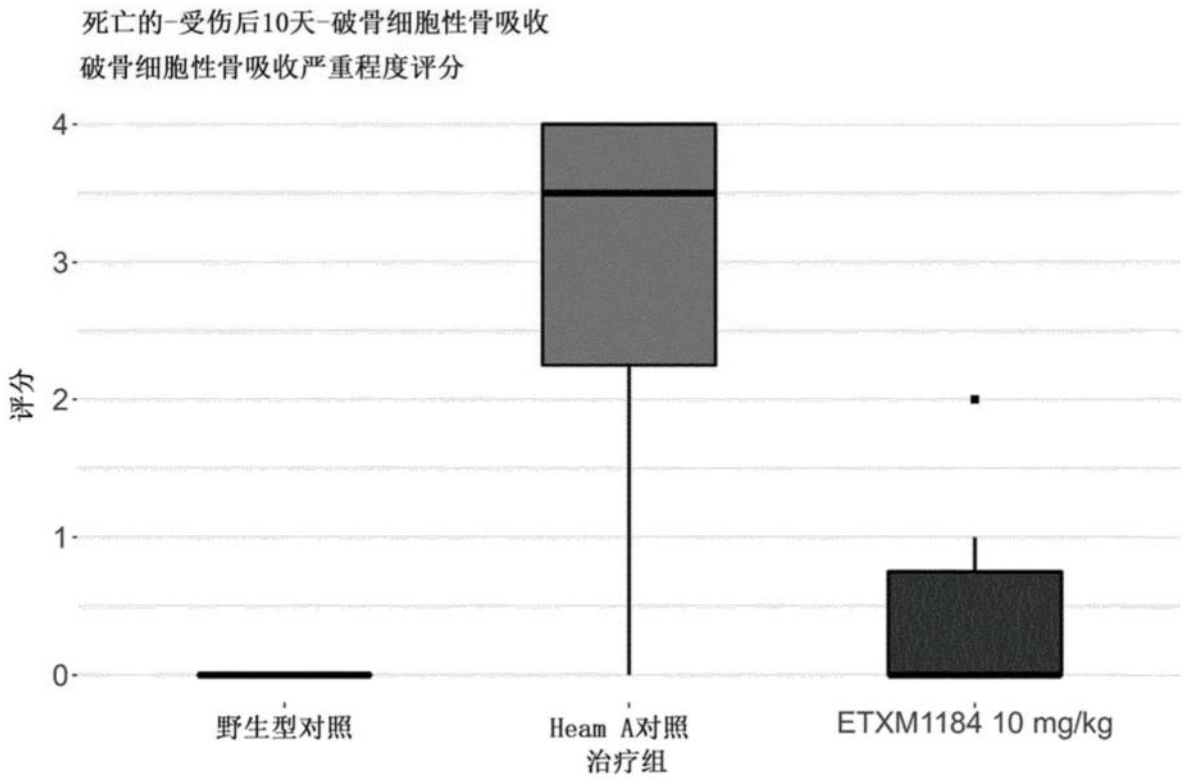

死亡的-受伤后10天-破骨细胞性骨吸收
破骨细胞性骨吸收严重程度评分
评分
4
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14G

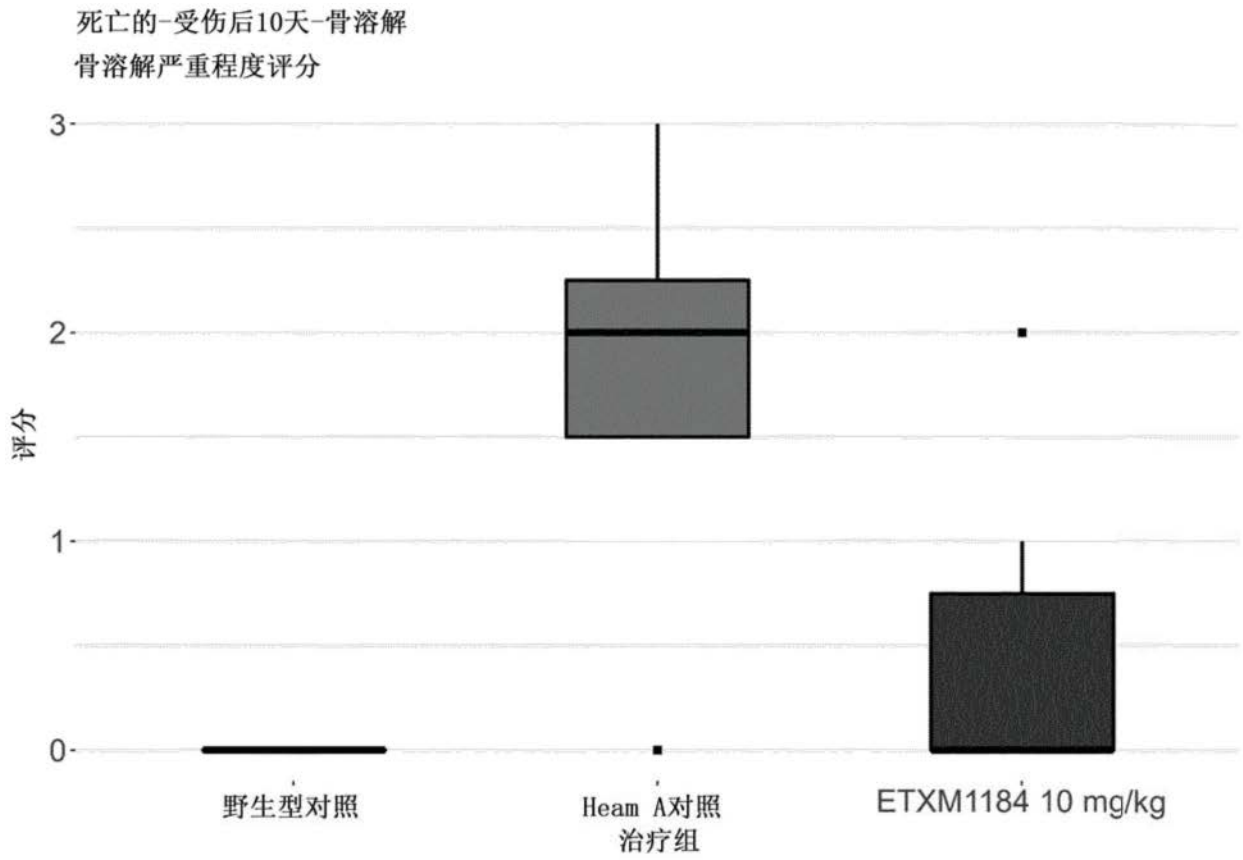

死亡的-受伤后10天-骨溶解
骨溶解严重程度评分
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14H

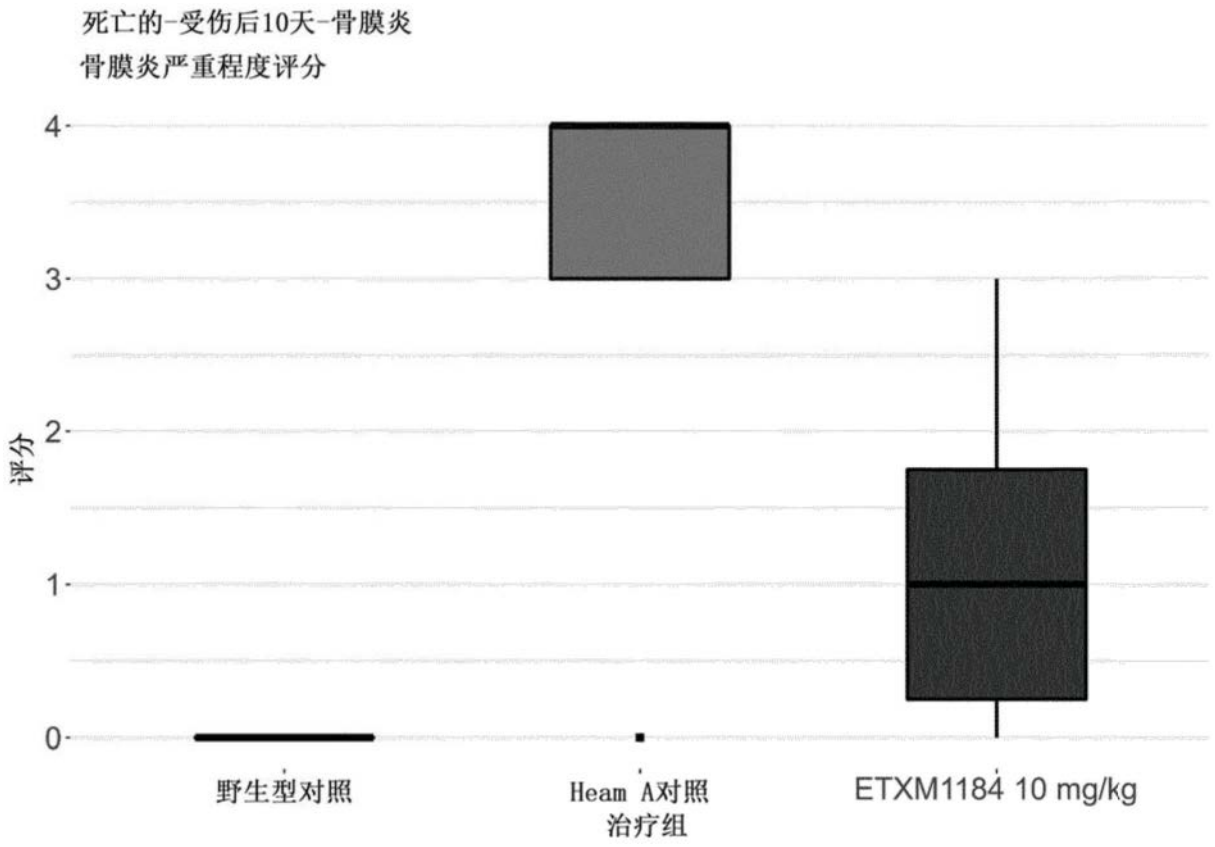

死亡的-受伤后10天-骨膜炎
骨膜炎严重程度评分
评分
4
3
2
1
0
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14I

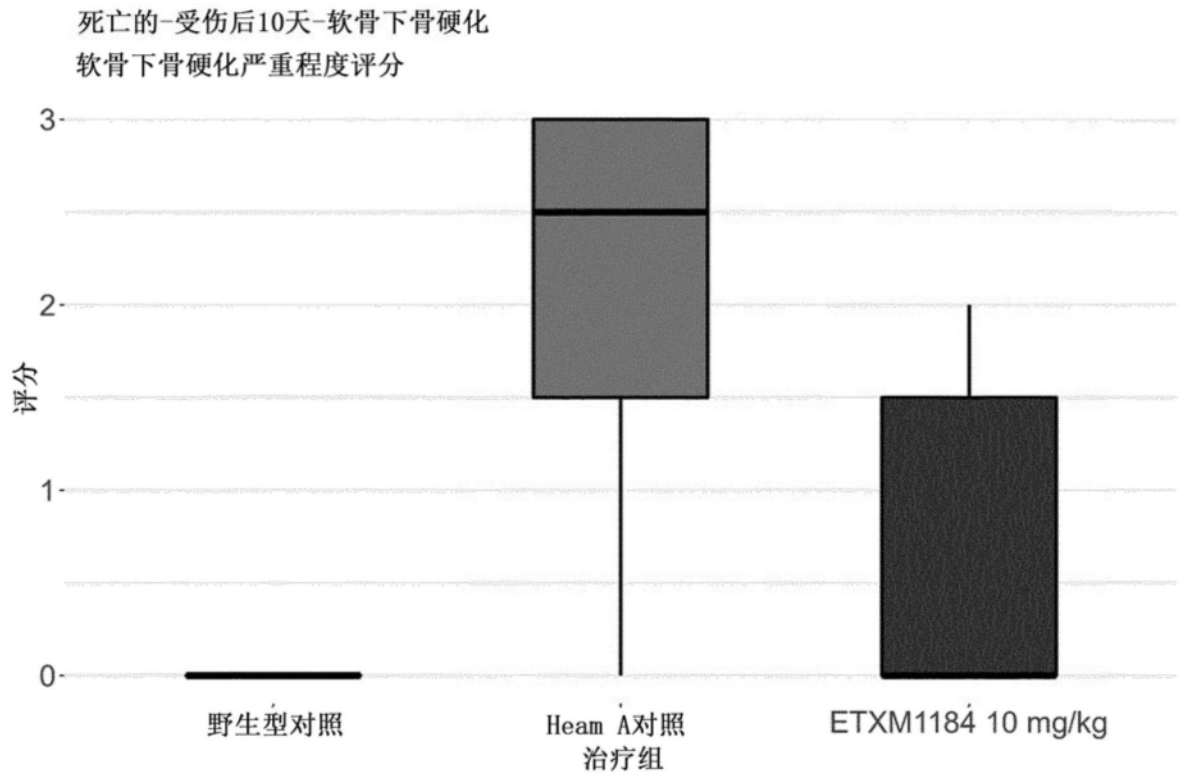

死亡的-受伤后10天-软骨下骨硬化
软骨下骨硬化严重程度评分
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14J

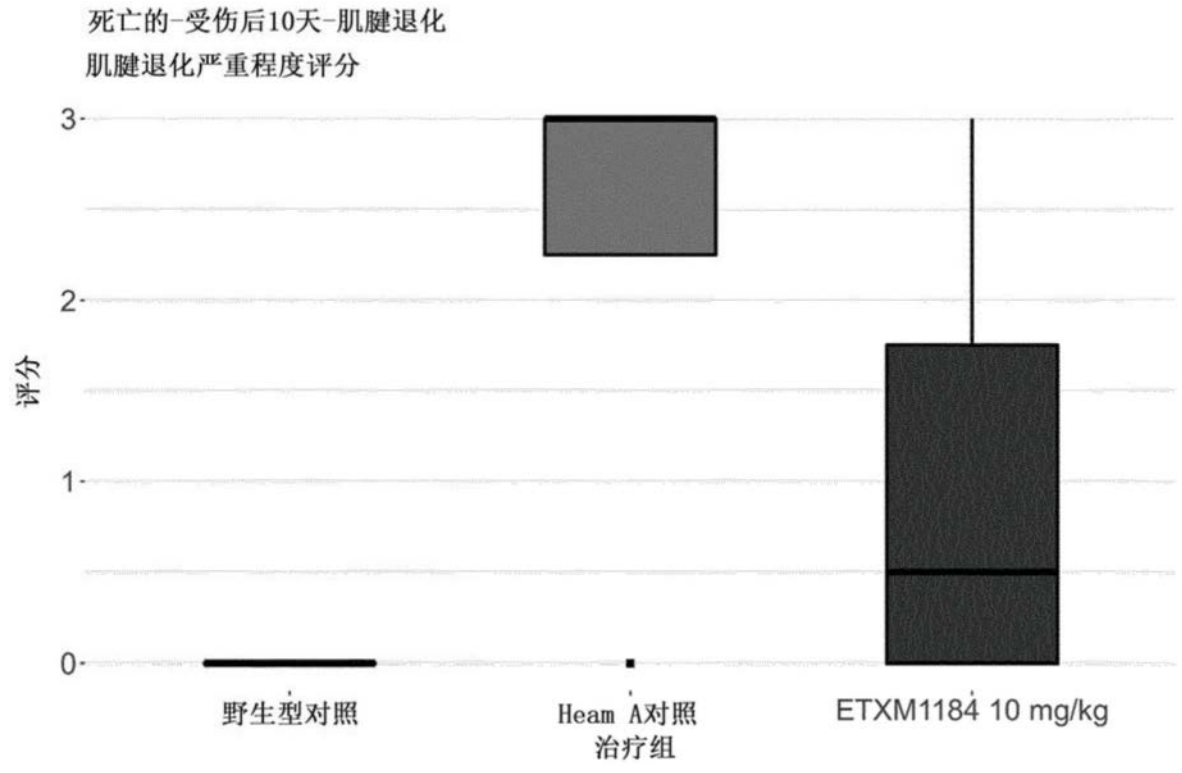

死亡的-受伤后10天-肌腱退化
肌腱退化严重程度评分
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14K

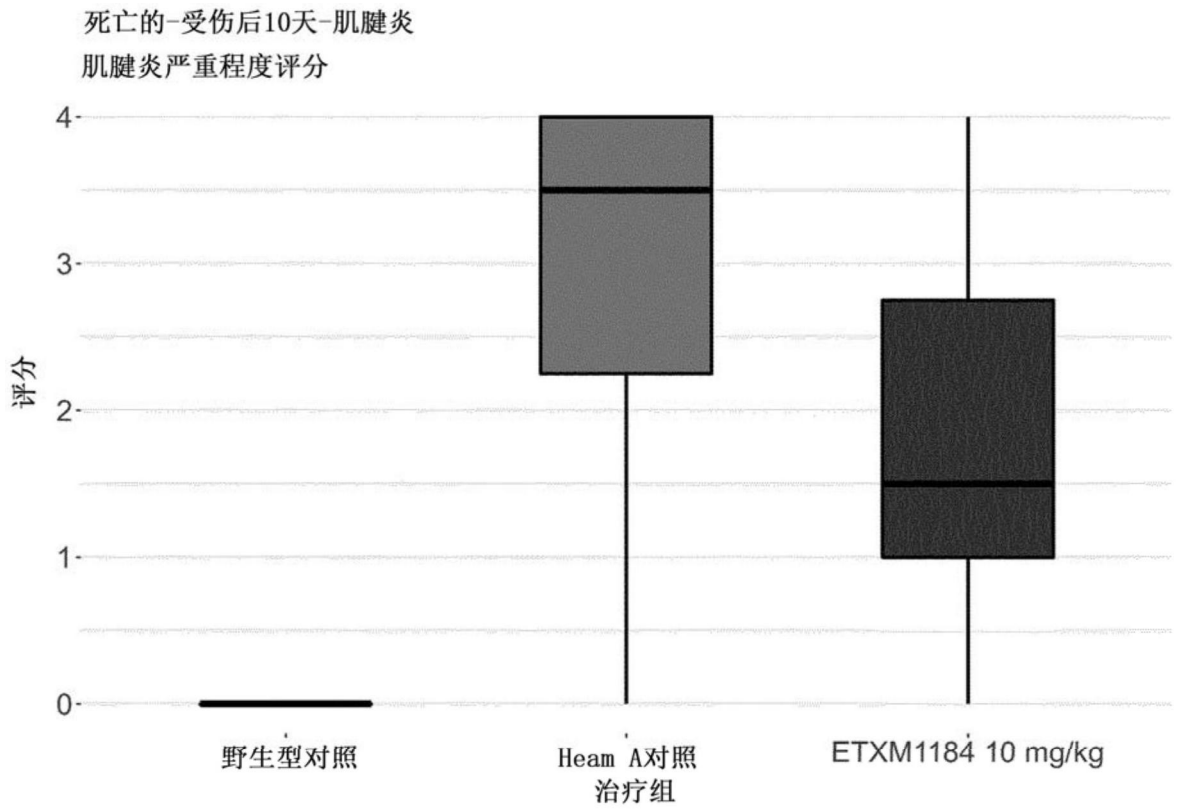

死亡的-受伤后10天-肌腱炎
肌腱炎严重程度评分
4
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14L

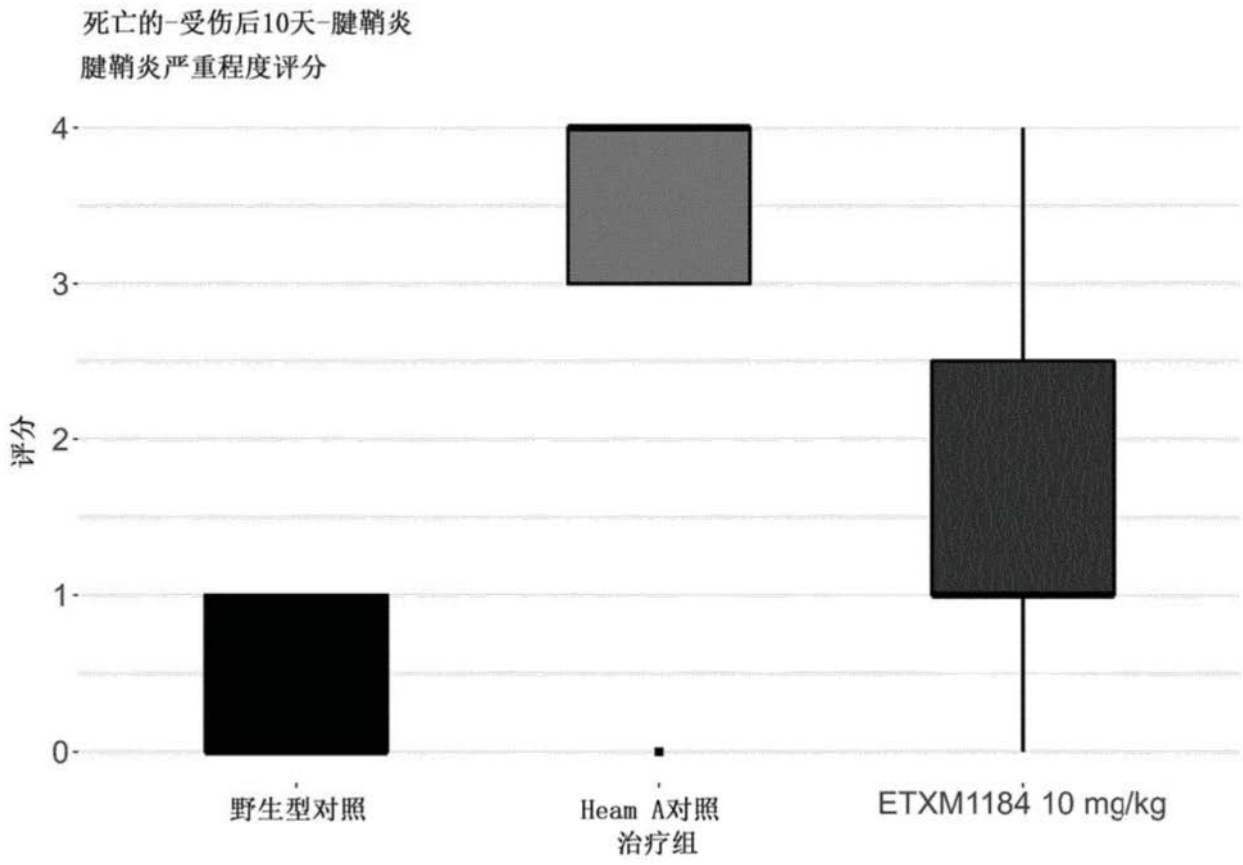

死亡的-受伤后10天-腱鞘炎
腱鞘炎严重程度评分
4
3
2
1
0
评分
野生型对照
Heam A对照
治疗组
ETXM1184 10 mg/kg

图14M

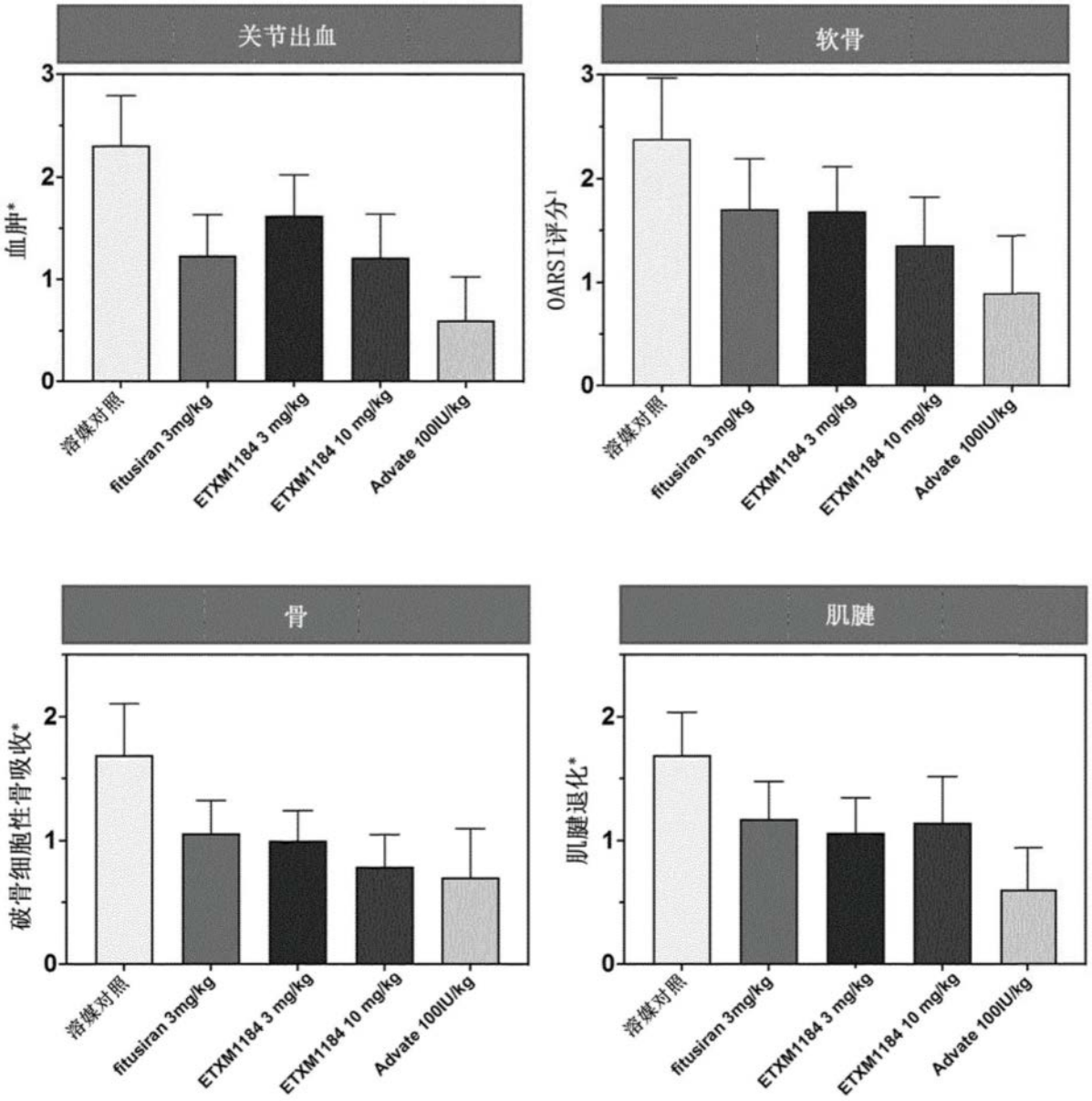

关节出血
血肿*
软骨
OARSI评分
骨
破骨细胞性骨吸收*
肌腱
肌腱退化*
溶媒对照
fitusiran 3mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg
Advate 100IU/kg

图15

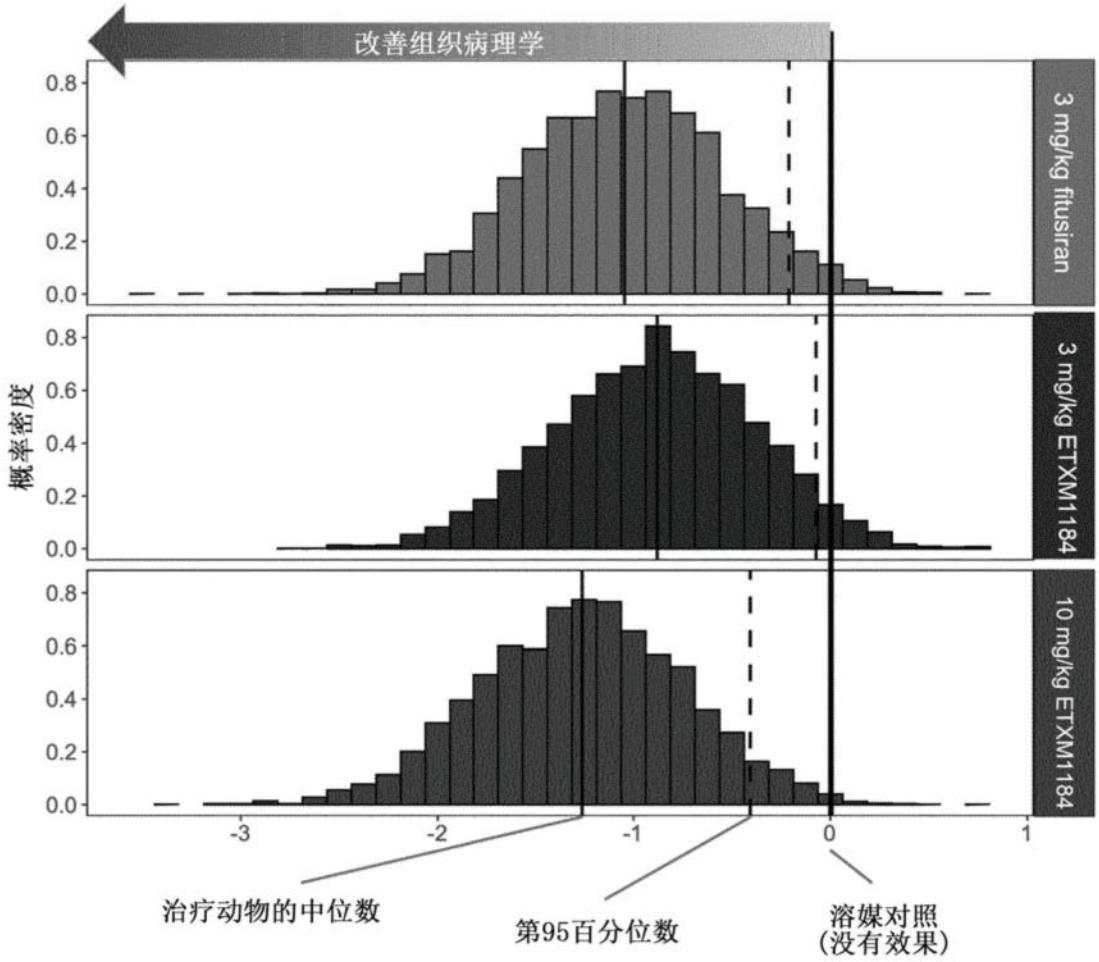

改善组织病理学
概率密度
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
3 mg/kg fitusiran
3 mg/kg ETXM1184
10 mg/kg ETXM1184
-3
-2
-1
0
1
治疗动物的中位数
第95百分位数
溶媒对照
(没有效果)

图16

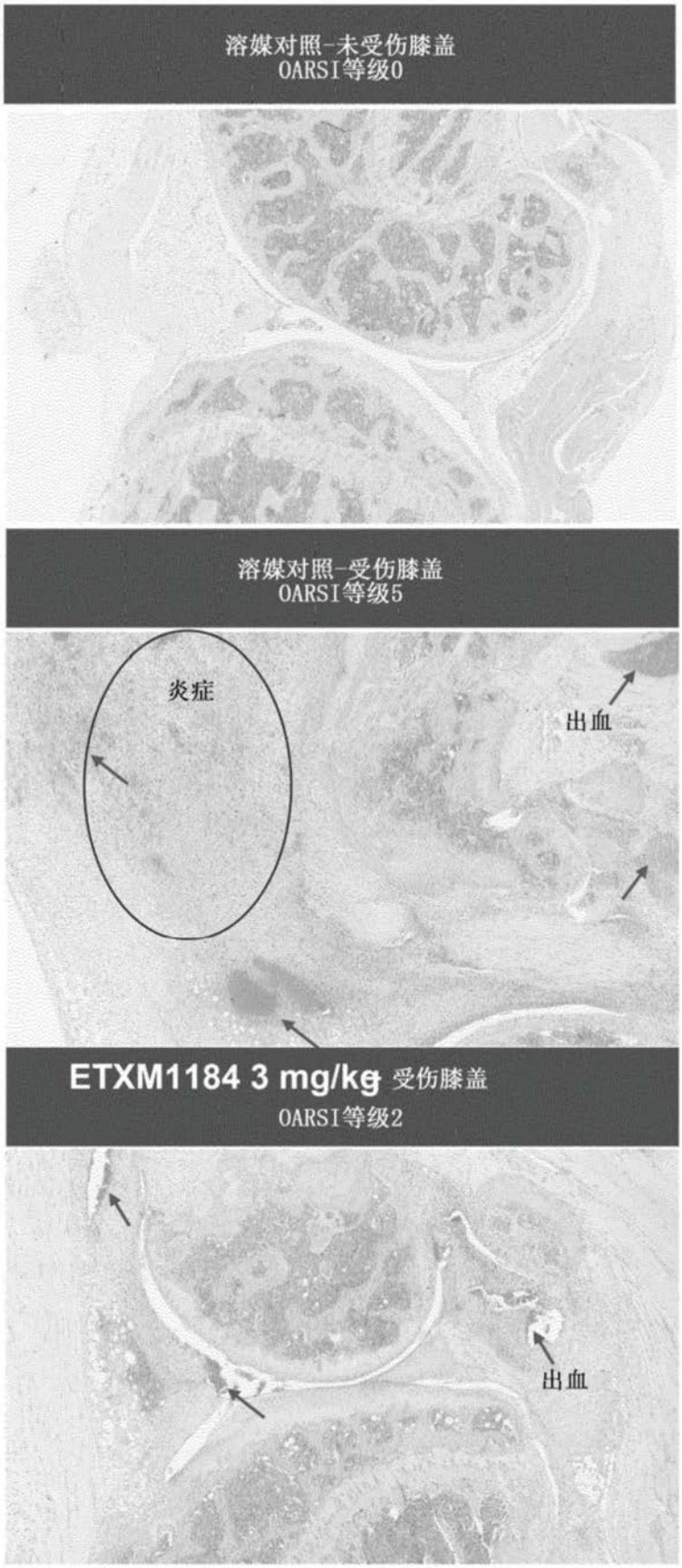

溶媒对照-未受伤膝盖
OARSI等级0
溶媒对照-受伤膝盖
OARSI等级5
炎症
出血
ETXM1184 3 mg/kg 受伤膝盖
OARSI等级2
出血

图17

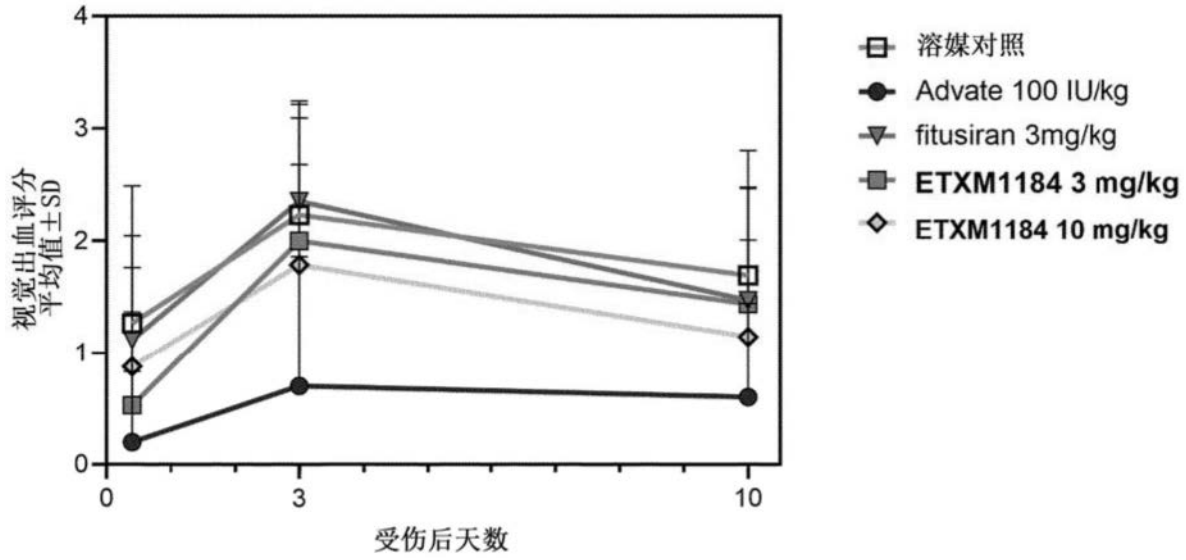

视觉出血评分
平均值±SD
4
3
2
1
0
0
3
10
受伤后天数
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg

图18

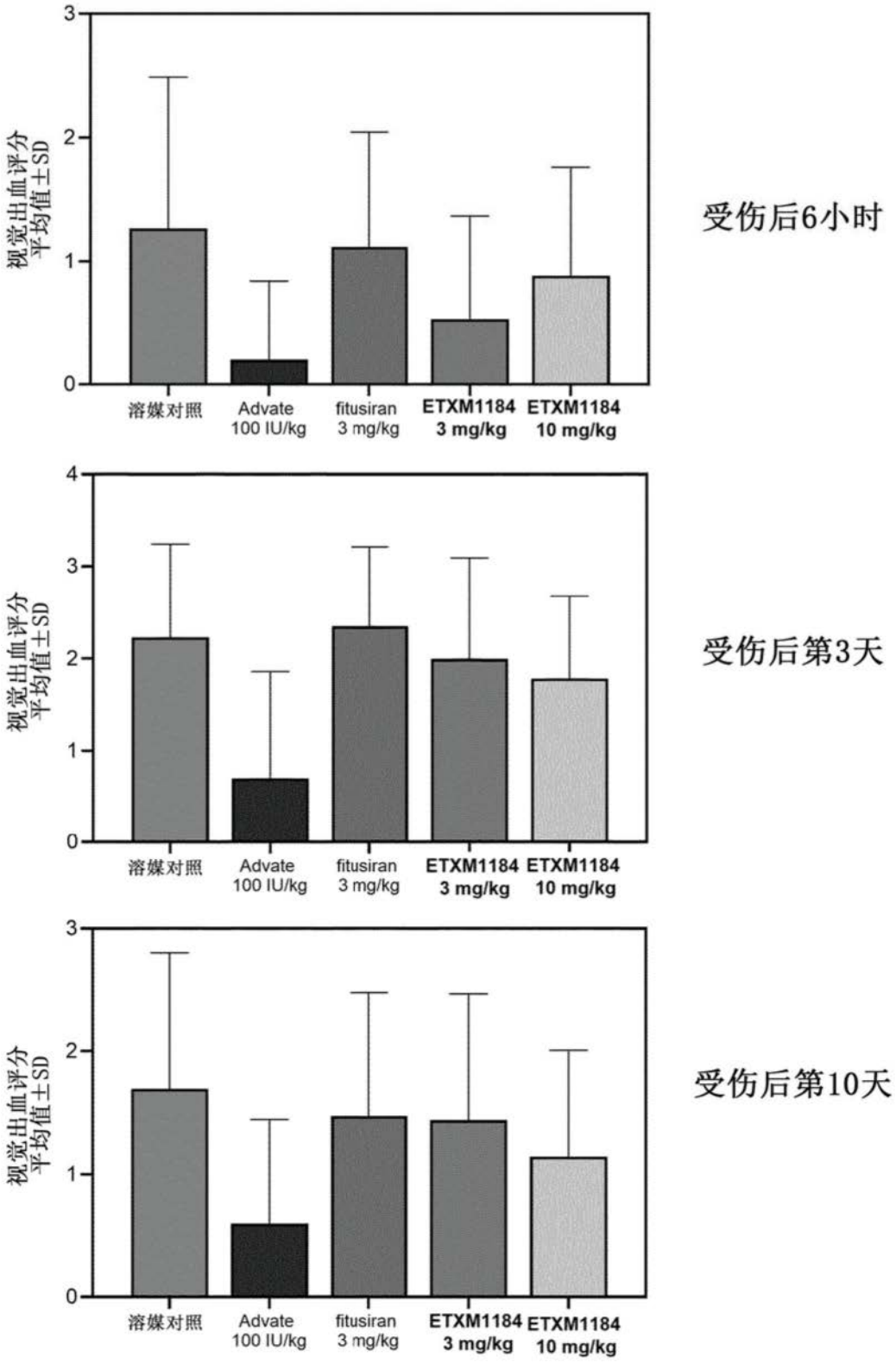

视觉出血评分
平均值±SD
溶媒对照
Advate
100 IU/kg
fitusiran
3 mg/kg
ETXM1184
3 mg/kg
ETXM1184
10 mg/kg
受伤后6小时
受伤后第3天
受伤后第10天

图18(续)

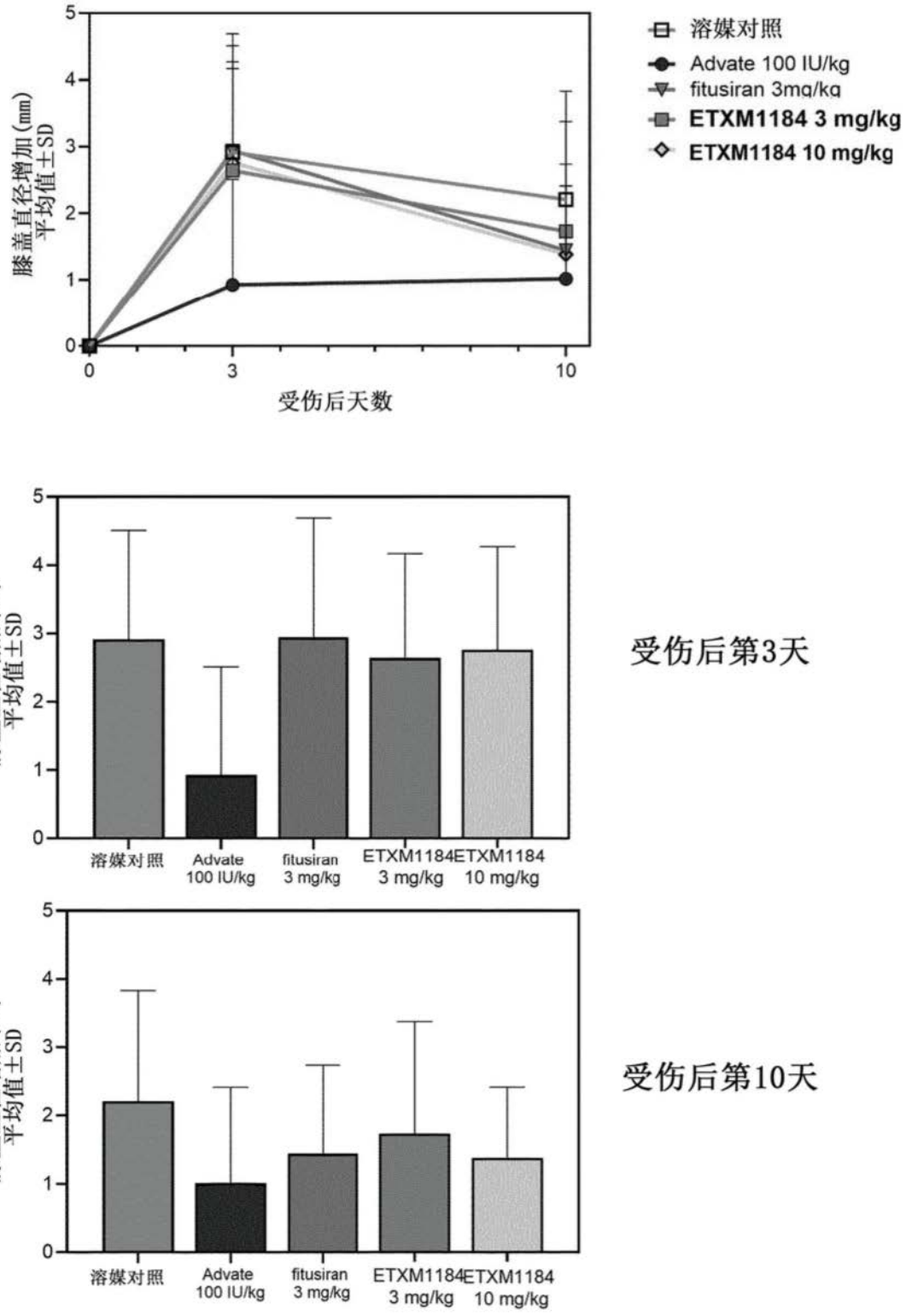

溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg
膝盖直径增加(mm)
平均值±SD
受伤后天数
0
3
10
受伤后第3天
受伤后第10天
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3 mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg

图19

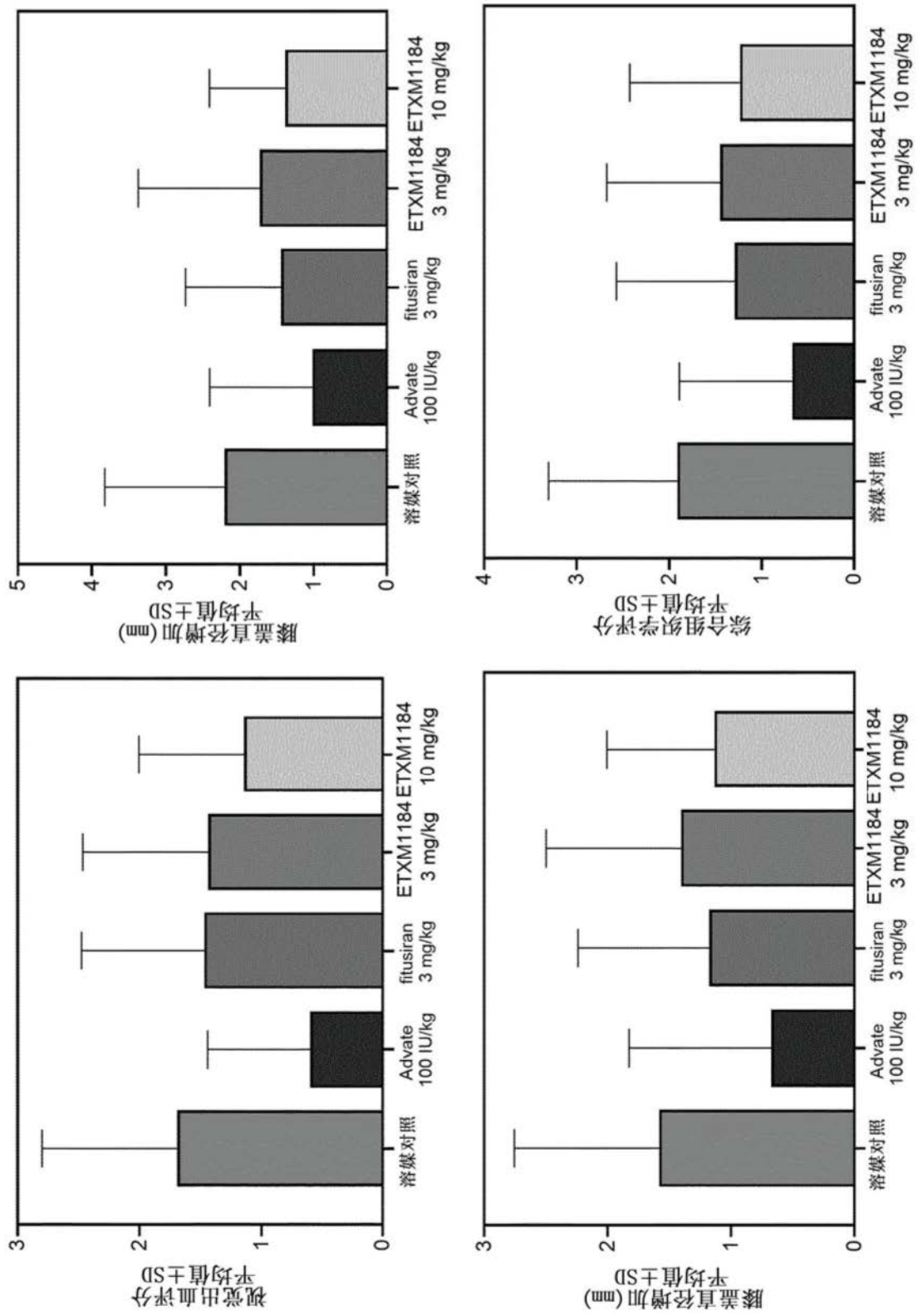

膝盖直径增加(mm)
平均值±SD
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3 mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg
视觉出血评分
平均值±SD
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3 mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg
综合组织学评分
平均值±SD
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3 mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg
膝盖直径增加(mm)
平均值±SD
溶媒对照
Advate 100 IU/kg
fitusiran 3 mg/kg
ETXM1184 3 mg/kg
ETXM1184 10 mg/kg

图20

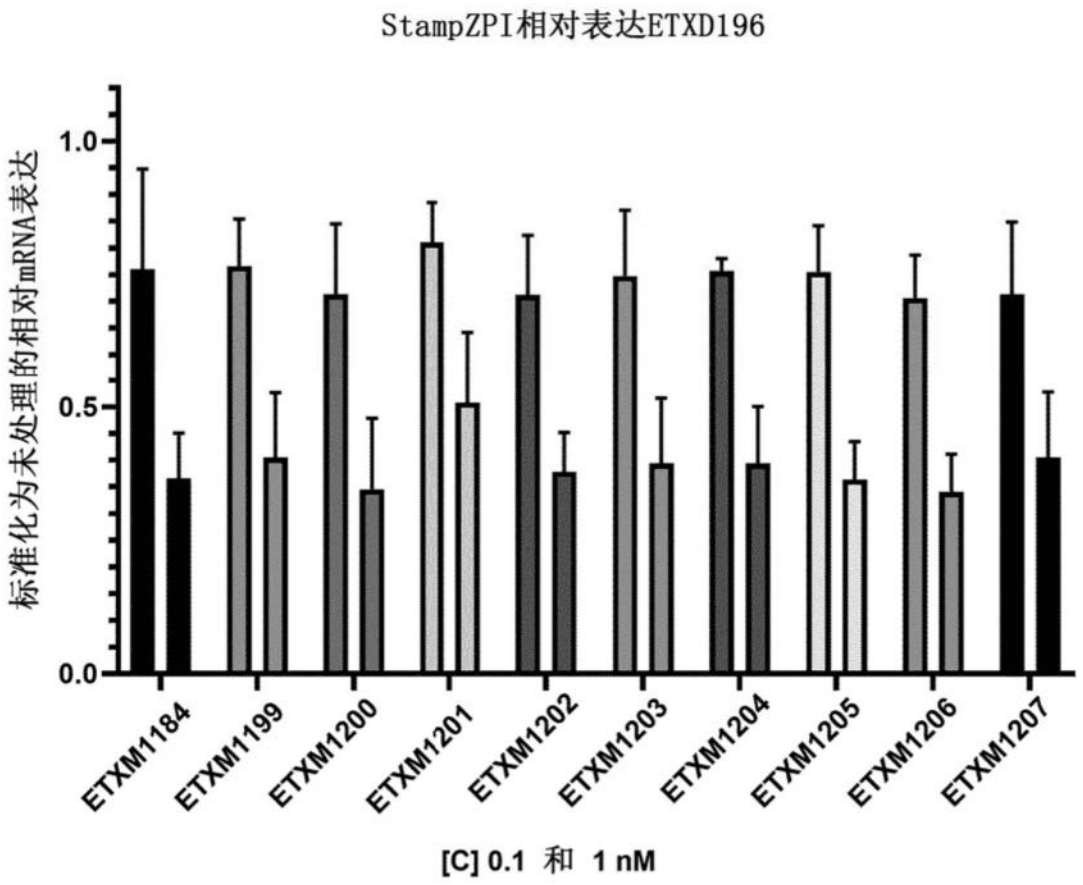

StampZPI相对表达ETXD196
标准化为未处理的相对mRNA表达
1.0
0.5
0.0
ETXM1184
ETXM1199
ETXM1200
ETXM1201
ETXM1202
ETXM1203
ETXM1204
ETXM1205
ETXM1206
ETXM1207
[C] 0.1 和 1 nM

图21