



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111050776 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201880056295.0

(22)申请日 2018.06.29

(30)优先权数据

62/526971 2017.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/040410 2018.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/006375 EN 2019.01.03

(71)申请人 迪克纳制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M.阿布拉姆斯 G.乔达 朴智慧

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 翟建伟 李志强

(51)Int.Cl.

A61K 31/713(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C07H 21/00(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

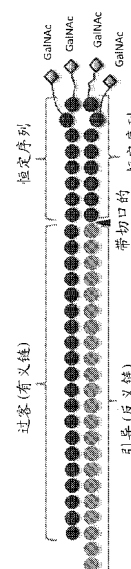
权利要求书4页 说明书43页
序列表87页 附图54页

(54)发明名称

用于抑制HMGB1表达的组合物和方法

(57)摘要

本公开涉及可用于降低HMGB1表达(尤其是在肝细胞中)的寡核苷酸、组合物和方法。公开的用于降低HMGB1表达的寡核苷酸可以是双链或单链的,并且可以被修饰以改善特性,诸如更强的对核酸酶的抗性和更低的免疫原性。公开的用于降低HMGB1表达的寡核苷酸也可以设计成包括靶向配体以靶向特定细胞或器官,诸如肝脏的肝细胞,并且可用于治疗肝纤维化和相关病况。



1. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述反义链具有与HMGB1互补的区域,其与如SEQ ID NO:374-381、193-272和363-365中任一者中所示的序列的至少15个连续核苷酸互补。

2. 权利要求1的寡核苷酸,其中所述反义链长度为19至27个核苷酸。

3. 权利要求1的寡核苷酸,其中所述反义链长度为21至27个核苷酸。

4. 权利要求1至3中任一项的寡核苷酸,其中所述互补的区域与如SEQ ID NO:193-272和363-365中任一者中所示的序列的至少15个连续核苷酸互补。

5. 权利要求1至4中任一项的寡核苷酸,其进一步包含长度为15至50个核苷酸的有义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域。

6. 权利要求5的寡核苷酸,其中所述有义链长度为19至50个核苷酸。

7. 权利要求5或6的寡核苷酸,其中所述双链体区域长度为至少19个核苷酸。

8. 权利要求1至7中任一项的寡核苷酸,其中所述与HMGB1互补的区域与如SEQ ID NO:374-381中所示的序列的至少19个连续核苷酸互补。

9. 权利要求1至8中任一项的寡核苷酸,其中所述与HMGB1互补的区域与如SEQ ID NO:193-272和363-365中任一者中所示的序列的至少19个连续核苷酸互补。

10. 权利要求5至9中任一项的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:193-272或363-365中任一者中所示的序列。

11. 权利要求5至10中任一项的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:204、211、364或365中所示的序列。

12. 权利要求10中任一项的寡核苷酸,其中所述反义链包含如SEQ ID NO:273-362或366-370中任一者中所示的序列。

13. 权利要求11中任一项的寡核苷酸,其中所述反义链包含如SEQ ID NO:286、367、369或370中任一者中所示的序列。

14. 权利要求5至13中任一项的寡核苷酸,其中所述有义链在其3'-末端包含如下所示的茎-环: S_1-L-S_2 ,其中 S_1 与 S_2 互补,且其中L在 S_1 和 S_2 之间形成长度为3至5个核苷酸的环。

15. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含反义链和有义链,

其中所述反义链长度为21至27个核苷酸且具有与HMGB1互补的区域,

其中所述有义链在其3'-末端包含如下所示的茎-环: S_1-L-S_2 ,其中 S_1 与 S_2 互补,且其中L在 S_1 和 S_2 之间形成长度为3至5个核苷酸的环,

且其中所述反义链和所述有义链形成长度为至少19个核苷酸的双链体结构,但不共价连接。

16. 权利要求15的寡核苷酸,其中所述互补的区域与HMGB1 mRNA的至少19个连续核苷酸互补。

17. 权利要求14至16中任一项的寡核苷酸,其中L是四环。

18. 权利要求14至17中任一项的寡核苷酸,其中L长度为4个核苷酸。

19. 权利要求14至18中任一项的寡核苷酸,其中L包含示为GAAA的序列。

20. 权利要求5至13中任一项的寡核苷酸,其中所述反义链长度为27个核苷酸,且所述有义链长度为25个核苷酸。

21. 权利要求20的寡核苷酸,其中所述反义链和有义链形成长度为25个核苷酸的双链

体区域。

22. 权利要求21的寡核苷酸,其在所述反义链上进一步包含长度为两个核苷酸的3'-突出端序列。

23. 权利要求5至13中任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含长度各自在21至23个核苷酸的范围内的反义链和有义链。

24. 权利要求23的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含长度在19至21个核苷酸的范围内的双链体结构。

25. 权利要求23或24的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含长度为一个或多个核苷酸的3'-突出端序列,其中所述3'-突出端序列存在于反义链、有义链或反义链和有义链上。

26. 前述权利要求中任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸。

27. 权利要求26的寡核苷酸,其中所述修饰的核苷酸包含2'-修饰。

28. 权利要求27的寡核苷酸,其中所述2'-修饰是选自以下的修饰:2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖核酸。

29. 权利要求26至28中任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的所有核苷酸都被修饰。

30. 前述权利要求中任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键。

31. 权利要求30的寡核苷酸,其中所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

32. 前述权利要求中任一项的寡核苷酸,其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸酯类似物。

33. 权利要求36的寡核苷酸,其中所述磷酸酯类似物是氧基甲基膦酸酯、乙烯基膦酸酯或丙二酰基膦酸酯。

34. 前述权利要求中任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体。

35. 权利要求34的寡核苷酸,其中各靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质。

36. 权利要求35的寡核苷酸,其中各靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分。

37. 权利要求36的寡核苷酸,其中所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分。

38. 权利要求14至17中任一项的寡核苷酸,其中所述茎-环的L的最多达4个核苷酸各自缀合至单价GalNAc部分。

39. 权利要求34的寡核苷酸,其中所述靶向配体包含适体。

40. 组合物,其包含前述权利要求中任一项的寡核苷酸和赋形剂。

41. 将寡核苷酸递送至受试者的方法,所述方法包括将权利要求40的组合物施用于所述受试者。

42. 权利要求41的方法,其中所述受试者具有肝纤维化或处于具有肝纤维化的风险中。

43. 权利要求41-42中任一项的方法,其中通过向所述受试者施用所述寡核苷酸来降低HMGB1蛋白的表达。

44. 权利要求43的方法,其中所述受试者具有胆汁淤积性或自身免疫性肝病。

45. 治疗具有肝纤维化或处于具有肝纤维化的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用降低HMGB1的表达的寡核苷酸。

46. 权利要求45的方法,其中所述受试者具有胆汁淤积性或自身免疫性肝病。

47. 权利要求45的方法,其中所述受试者具有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

48. 权利要求45的方法,其中在所述受试者暴露于肝毒性剂之前施用所述寡核苷酸。

49. 权利要求45的方法,其中在所述受试者暴露于肝毒性剂之后施用所述寡核苷酸。

50. 权利要求45的方法,其中与所述受试者暴露于肝毒性剂同时施用所述寡核苷酸。

51. 治疗具有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 或处于具有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用降低所述受试者中的HMGB1的表达的RNAi寡核苷酸。

52. 权利要求41-51中任一项的方法,其中所述施用导致肝脏HMGB1水平的降低。

53. 权利要求41-51中任一项的方法,其中所述施用导致血清HMGB1水平的降低。

54. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:97-192的互补序列。

55. 权利要求54的寡核苷酸,其中所述有义链由如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列组成。

56. 权利要求54或55的寡核苷酸,其中所述反义链由选自SEQ ID NO:97-192的互补序列组成。

57. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:193-272或363-365中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:273-362或366-370的互补序列。

58. 权利要求57的寡核苷酸,其中所述有义链由如SEQ ID NO:193-272或363-365中任一者中所示的序列组成。

59. 权利要求57或58的寡核苷酸,其中所述反义链由选自SEQ ID NO:273-362或366-370的互补序列组成。

60. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:204、211、364、365中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:286、367、369、370的互补序列。

61. 权利要求60的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:204中所示的序列,且其中所述反义链包含如SEQ ID NO:286中所示的序列。

62. 权利要求60的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:211中所示的序列,且其中所述反义链包含如SEQ ID NO:367中所示的序列。

63. 权利要求60的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:364中所示的序列,且其中所述反义链包含如SEQ ID NO:369中所示的序列。

64. 权利要求60的寡核苷酸,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:365中所示的序列,且

其中所述反义链包含如SEQ ID NO:370中所示的序列。

65. 权利要求60的寡核苷酸, 其中所述有义链由如SEQ ID NO:204中所示的序列组成, 且其中所述反义链由如SEQ ID NO:286中所示的序列组成。

66. 权利要求60的寡核苷酸, 其中所述有义链由如SEQ ID NO:211中所示的序列组成, 且其中所述反义链由如SEQ ID NO:367中所示的序列组成。

67. 权利要求60的寡核苷酸, 其中所述有义链由如SEQ ID NO:364中所示的序列组成, 且其中所述反义链由如SEQ ID NO:369中所示的序列组成。

68. 权利要求60的寡核苷酸, 其中所述有义链由如SEQ ID NO:365中所示的序列组成, 且其中所述反义链由如SEQ ID NO:370中所示的序列组成。

69. 用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸, 所述寡核苷酸包含选自表7的行的一对有义和反义链。

70. 权利要求54-69中任一项的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸。

71. 权利要求70的寡核苷酸, 其中所述修饰的核苷酸包含2'-修饰。

72. 权利要求71的寡核苷酸, 其中所述2'-修饰是选自以下的修饰: 2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖核酸。

73. 权利要求70-72中任一项的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸中的所有核苷酸都被修饰。

74. 权利要求54-72中任一项的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键。

75. 权利要求74的寡核苷酸, 其中所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

76. 权利要求54-75中任一项的寡核苷酸, 其中所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸酯类似物。

77. 权利要求76的寡核苷酸, 其中所述磷酸酯类似物是氧基甲基膦酸酯、乙烯基膦酸酯或丙二酰基膦酸酯。

78. 权利要求54-77中任一项的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体。

79. 权利要求78的寡核苷酸, 其中各靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质。

80. 权利要求79的寡核苷酸, 其中各靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分。

81. 权利要求80的寡核苷酸, 其中所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分。

82. 权利要求80或权利要求81的寡核苷酸, 其中所述茎-环的L的最多达4个核苷酸各自缀合至单价GalNAc部分。

用于抑制HMGB1表达的组合物和方法

[0001] 相关申请

本申请根据35 U.S.C. §119要求在2017年6月29日提交且题为“COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING HMGB1 EXPRESSION”的美国临时申请序列号62/526,971的申请日的益处,所述申请的完整内容通过引用并入本文。

发明领域

[0002] 本申请涉及寡核苷酸及其用途,尤其是涉及参与纤维化的病况的治疗的用途。

[0003] 序列表的引用

本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表作为在2018年6月28日创建的题为D0800.70002W000-SEQ.txt的文件(其大小为85千字节)提供。序列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入本文。

[0004] 发明背景

组织纤维化是特征在于导致瘢痕形成并促进慢性器官损伤的细胞外基质和炎症因子的异常积累的病况。在肝脏中,纤维化是对肝损伤的多细胞应答,其可以导致肝硬化和肝细胞癌。所述应答经常由与病况相关的肝损伤触发,所述病况诸如酒精滥用、病毒性肝炎、代谢性疾病和肝病、诸如胆汁淤积性肝病、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。研究已暗指高迁移率组蛋白1 (HMGB1) 蛋白在肝脏纤维化中具有促纤维化作用。(参见,例如,Li L-C, 等人, Emerging role of HMGB1 in fibrotic diseases, J. Cell. Mol. Med. Vol 18, No 12, 2014 pp. 2331-2339)。HMGB1是从受损细胞释放的核蛋白,其作为促炎症介质发挥功能,并且已经显示将肝星状细胞和肝脏内皮细胞募集至肝脏损伤的部位。(Seo, YS, 等人, HMGB1 recruits hepatic stellate cells and liver endothelial cells to sites of ethanol-induced parenchymal cell injury, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 305: G838-G848, 2013。)肝星状细胞据信通过其转化为增殖性肌成纤维细胞(其促进肝脏中的纤维发生活性)而在肝脏纤维化的进展中发挥主要作用。(参见,Kao YH, 等人 High-mobility group box 1 protein activates hepatic stellate cells in vitro. Transplant Proc. 2008; 40: 2704-5)。

[0005] 发明简述

本公开的方面涉及用于治疗受试者中的纤维化(例如,肝纤维化)的组合物和方法。在一些实施方案中,已经开发了用于选择性抑制HMGB1表达的有效RNAi寡核苷酸。因此,在一些实施方案中,本文提供的RNAi寡核苷酸可用于降低HMGB1表达,尤其是在肝细胞中,且由此减少或预防纤维化(参见,例如,实施例2-4;图14A-C、17A-D、19和22-27)。在一些实施方案中,将并入带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸与GalNAc部分缀合以促进递送至肝脏肝细胞(通过与主要在肝细胞的表面上表达的脱唾液酸糖蛋白受体的相互作用),以抑制HMGB1表达用于治疗肝纤维化。在一些实施方案中,本文提供了方法,其涉及使用RNAi寡核苷酸用于治疗具有或怀疑具有肝脏病况诸如例如胆汁淤积性肝病、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的受试者。在进一步实施方案中,本公开基于HMGB1 mRNA的关

键区域(被称为热点)的鉴定,所述关键区域尤其适合于使用基于寡核苷酸的方法靶向。因此,在一些实施方案中,已经开发了靶向这些mRNA热点以抑制HMGB1表达以治疗纤维化的寡核苷酸。

[0006] 本公开的一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列。在一些实施方案中,所述反义链由如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述反义链包含如SEQ ID NO:273-362和366-370中任一者中所示的序列,或由其组成。在一些实施方案中,所述反义链包含如SEQ ID NO:286、367、369或370中所示的序列,或由其组成。在一些实施方案中,所述寡核苷酸进一步包含有义链,所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:193-272和363-365中任一者中所示的序列,或由其组成。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:204、211、364、365中所示的序列,或由其组成。

[0007] 本公开的一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含长度为15至30个核苷酸的反义链。在一些实施方案中,所述反义链具有与如SEQ ID NO:374-381中任一者中所示的HMGB1的靶标序列互补的区域。在一些实施方案中,互补区域长度为至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个或至少22个连续核苷酸。在一些实施方案中,所述互补区域与HMGB1的靶标序列完全互补。在一些实施方案中,与HMGB1互补的区域长度为至少19个连续核苷酸。

[0008] 在一些实施方案中,所述反义链长度为19至27个核苷酸。在一些实施方案中,所述反义链长度为21至27个核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸进一步包含长度为15至40个核苷酸的有义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域。在一些实施方案中,所述有义链长度为19至40个核苷酸。在一些实施方案中,所述反义链长度为27个核苷酸,且所述有义链长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,所述双链体区域长度为至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或至少21个核苷酸。在一些实施方案中,所述反义链和有义链形成长度为25个核苷酸的双链体区域。

[0009] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含长度各自在21至23个核苷酸的范围内的反义链和有义链。在一些实施方案中,寡核苷酸包含长度在19至21个核苷酸的范围内的双链体结构。在一些实施方案中,寡核苷酸包含长度为一个或多个核苷酸的3'-突出端序列,其中3'-突出端序列存在于反义链、有义链或反义链和有义链上。在一些实施方案中,寡核苷酸在所述反义链上进一步包含长度为两个核苷酸的3'-突出端序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含长度为两个核苷酸的3'-突出端序列,其中所述3'-突出端序列存在于所述反义链上,且其中所述有义链长度为21个核苷酸且所述反义链为长度为23个核苷酸,使得所述有义链和反义链形成长度为21个核苷酸的双链体。

[0010] 在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列。在一些实施方案中,所述反义链由如SEQ

ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列组成。

[0011] 在一些实施方案中,所述有义链在其3'-末端包含如下所示的茎-环:S1-L-S2,其中S1与S2互补,且其中L在S1和S2之间形成长度为3至5个核苷酸的环。

[0012] 本公开的另一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含反义链和有义链,其中所述反义链长度为21至27个核苷酸且具有与HMGB1互补的区域,其中所述有义链在其3'-末端包含如下所示的茎-环:S1-L-S2,其中S1与S2互补,且其中L在S1和S2之间形成长度为3至5个核苷酸的环,且其中所述反义链和所述有义链形成长度为至少19个核苷酸的双链体结构,但不共价连接(参见,例如,图2)。在一些实施方案中,互补区域与HMGB1 mRNA的至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或至少21个连续核苷酸完全互补。在一些实施方案中,L是四环。在一些实施方案中,L长度为4个核苷酸。在一些实施方案中,L包含示为GAAA的序列。

[0013] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述修饰的核苷酸包含2'-修饰。在一些实施方案中,所述2'-修饰是选自以下的修饰:2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖核酸(arabinonucleic acid)。在一些实施方案中,寡核苷酸的所有核苷酸都被修饰。

[0014] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸酯类似物。在一些实施方案中,所述磷酸酯类似物是氧基甲基磷酸酯、乙烯基磷酸酯或丙二酰基磷酸酯。

[0015] 在一些实施方案中,寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体。在一些实施方案中,各靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质。在一些实施方案中,各靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分。在一些实施方案中,所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分。在一些实施方案中,所述茎-环的L的最多达4个核苷酸各自缀合至单价GalNAc部分。在一些实施方案中,所述靶向配体包含适体。

[0016] 本公开的另一个方面提供了包含本公开的寡核苷酸和赋形剂的组合物。本公开的另一个方面提供了包括将本公开的组合物施用于受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法导致肝纤维化水平降低或肝纤维化的预防。在一些实施方案中,通过向所述受试者施用本文公开的寡核苷酸来降低HMGB1蛋白的表达。在一些实施方案中,受试者具有胆汁淤积性或自身免疫性肝病。

[0017] 本公开的另一个方面提供了治疗具有肝纤维化或处于具有肝纤维化的风险中的受试者的方法。在一些实施方案中,本文提供的方法包括向所述受试者施用降低HMGB1的表达的寡核苷酸。在一些实施方案中,所述受试者具有胆汁淤积性或自身免疫性肝病。在一些实施方案中,所述受试者具有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。在一些实施方案中,向所述受试者施用的寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。

[0018] 在一些实施方案中,在受试者暴露于肝毒性剂之前施用寡核苷酸。在一些实施方案中,在受试者暴露于肝毒性剂之后施用寡核苷酸。在一些实施方案中,与受试者暴露于肝毒性剂同时施用所述寡核苷酸。

[0019] 本公开的另一个方面提供了治疗具有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或处于具有非

酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的风险中的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用降低所述受试者中的HMGB1的表达的寡核苷酸。

[0020] 在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸的施用导致肝脏HMGB1水平的降低。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸的施用导致血清HMGB1水平的降低。

[0021] 本公开的另一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:97-192的互补序列。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述反义链由选自SEQ ID NO:97-192的互补序列组成。

[0022] 本公开的另一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:193-272或363-365中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:273-362或366-370的互补序列。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:193-272或363-365中任一者中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述反义链由选自SEQ ID NO:273-362或366-370的互补序列组成。

[0023] 本公开的另一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含长度为15至50个核苷酸的有义链和长度为15至30个核苷酸的反义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域,其中所述有义链包含如SEQ ID NO:204、211、364、365中任一者中所示的序列,且其中所述反义链包含选自SEQ ID NO:286、367、369、370的互补序列。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:204中所示的序列,且所述反义链包含如SEQ ID NO:286中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:211中所示的序列,且所述反义链包含如SEQ ID NO:367中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:364中所示的序列,且所述反义链包含如SEQ ID NO:369中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链包含如SEQ ID NO:365中所示的序列,且所述反义链包含如SEQ ID NO:370中所示的序列。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:204中所示的序列组成,且所述反义链由如SEQ ID NO:286中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:211中所示的序列组成,且所述反义链由如SEQ ID NO:367中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:364中所示的序列组成,且所述反义链由如SEQ ID NO:369中所示的序列组成。在一些实施方案中,所述有义链由如SEQ ID NO:365中所示的序列组成,且所述反义链由如SEQ ID NO:370中所示的序列组成。

[0024] 本公开的另一个方面提供了用于降低HMGB1的表达的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含选自表7的行的一对有义和反义链。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述修饰的核苷酸包含2'-修饰。在一些实施方案中,所述2'-修饰是选自以下的修饰:2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖核酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸中的所有核苷酸都被修饰。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷酸间键。在一些实

施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间键是硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,所述反义链的5'-核苷酸的糖的4'-碳包含磷酸酯类似物。在一些实施方案中,所述磷酸酯类似物是氧基甲基膦酸酯、乙烯基膦酸酯或丙二酰基膦酸酯。在一些实施方案中,所述寡核苷酸的至少一个核苷酸缀合至一个或多个靶向配体。在一些实施方案中,各靶向配体包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质。在一些实施方案中,各靶向配体包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)部分。在一些实施方案中,所述GalNAc部分是单价GalNAc部分、二价GalNAc部分、三价GalNAc部分或四价GalNAc部分。在一些实施方案中,所述茎-环的L的最多达4个核苷酸各自缀合至单价GalNAc部分。

[0025] 附图简述

并入本说明书并构成本说明书的一部分的附图举例说明某些实施方案,并且与书面描述一起用于提供本文公开的组合物和方法的某些方面的非限制性实例。

[0026] 图1是描绘用于选择化合物用于在细胞和动物模型中测试以及开发双链寡核苷酸用于降低HMGB1的表达的实验设计的流程图。SAR:结构-活性关系。

[0027] 图2是显示已缀合至四个GalNAc部分(分子右侧的菱形)的具有带切口的四环结构的双链寡核苷酸的非限制性实例的示意图。

[0028] 图3A-3D是显示在Hepa1-6细胞中96种HMGB1寡核苷酸的阶段1筛选之后剩余的HMGB1 mRNA的百分比的一系列图。“Mm HMGB1 533-646”指示5' RT-PCR位点的位置,且“Mm HMGB1 1541-1675”指示小鼠mRNA上的3' RT-PCR位点的位置。

[0029] 图4是显示在Hepa1-6细胞(3' 测定)中在三种不同浓度(1 nM、0.1nM和0.01nM)的96种HMGB1寡核苷酸的HMGB1寡核苷酸阶段2筛选之后剩余的mRNA的百分比的图。

[0030] 图5是显示使用呈切口的四环结构的不同碱基序列的HMGB1寡核苷酸(适于不同的修饰模式)和未修饰的对照在Hepa1-6细胞中筛选的结果的图。

[0031] 图6是显示在Hepa1-6细胞中选自剂量应答曲线筛选的六种HMGB1寡核苷酸的IC₅₀结果的图。

[0032] 图7是显示在C57BL/6中皮下施用10 mg/kg (mpk) GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸之后72小时肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的量相对于HPRT mRNA的量的图。

[0033] 图8是显示三种呈带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。将LNP配制的寡核苷酸以三种不同剂量(0.3 mg/kg、1 mg/kg和3 mg/kg)静脉内施用于小鼠。数据显示在施用之后24小时剩余的HMGB1 mRNA的量,其针对PBS对照处理归一化。

[0034] 图9是显示GalNAc-缀合的呈带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。用四种不同的寡核苷酸修饰模式(表示为M49、M54、M55、M56,其含有2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸、硫代磷酸酯键的不同排列,并且包括位于其反义链的5'末端核苷酸处的磷酸酯类似物)测试两种不同的寡核苷酸序列。将寡核苷酸以两种不同剂量(3 mg/kg和10 mg/kg)皮下施用于小鼠。数据显示在施用之后24小时剩余的HMGB1 mRNA的量,其针对PBS对照处理归一化。

[0035] 图10是显示GalNAc-缀合的呈带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。以四种不同的寡核苷酸修饰模式(表示为M49、M51、M53、M57)测试不同的寡核苷酸序列。将寡核苷酸以3 mg/kg皮下施用于小鼠。数据显示在施用之后72小时剩余的HMGB1 mRNA的量,其针对PBS对照处理归一化。

[0036] 图11是显示GalNAc-缀合的呈带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。以不同的修饰模式(表示为M29、M49和M50)测试两种不同的寡核苷酸序列。HMGB1寡核苷酸被设计为结合通过算法在人、猕猴和小鼠序列中鉴定的保守序列(“三重共有”序列)。数据显示在1 mg/kg皮下剂量之后第5天剩余的HMGB1 mRNA的量(其针对PBS对照处理归一化)。

[0037] 图12是显示C57BL/6雄性小鼠(10至11周)的APAP诱导的肝损伤的实验模型的流程图的示意图。在该模型中,小鼠在12小时的禁食时段后接受350或250 mg/kg APAP的腹膜内注射。在6、24和48小时收集血液和/或组织样品。

[0038] 图13A-13B是显示在350 mg/kg APAP注射并用GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸、LNP配制的HMGB1寡核苷酸或PBS对照处理之后小鼠中剩余的HMGB1 mRNA的百分比(其针对Hprt1 mRNA归一化)的一组图。图13A显示肝脏HMGB1表达,且图13B显示血清HMGB1表达。盐水注射的动物用作对照。在图13A-13B中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0039] 图14A-14C是显示在350 mg/kg APAP注射并用GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸、LNP配制的HMGB1寡核苷酸或PBS对照处理之后小鼠中的HMGB1处理之后的AST、ALT和血清miR122表达的一系列图。盐水注射的动物用作对照。在图14A-14C中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0040] 图15是显示APAP诱导的肝损伤的实验模型的流程图的示意图。在该模型中,用五个剂量的5 mg/kg的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸或两个剂量的1.5 mg/kg的LNP配制的HMGB1寡核苷酸治疗动物。在施用所述寡核苷酸的两周时段和12小时的禁食时段后,小鼠接受0.9% NaCl中的350 mg/kg APAP的腹膜内(I.P.)注射。施用APAP注射后一天(24小时),收获组织和/或血液样品。

[0041] 图16A-16B是显示在350 mg/kg APAP注射并用GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸、LNP配制的HMGB1寡核苷酸或PBS对照处理之后小鼠的肝脏或血清中剩余的HMGB1 mRNA的百分比的图。图16A显示肝脏HMGB1表达,且图16B显示血清HMGB1表达。盐水注射的动物用作对照。在图16A-16B中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M56。

[0042] 图17A-17D是显示在用GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸、LNP配制的HMGB1寡核苷酸或PBS对照处理之后350 mg/kg APAP处理的动物中的ALT(图17A)、AST(图17B)、LDH(图17C)和miR122表达(图17D)的一系列图。盐水注射的动物用作对照。在图17A-17D中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M56。

[0043] 图18是显示用GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸给药方案的抗纤维化活性的四氯化碳(CCl₄)模型的流程图的示意图。

[0044] 图19是在用皮下5mg/kg剂量的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(每5或7周)或PBS对照处理之后抗纤维化活性的CCl₄模型中的天狼星红相对平均强度水平的图。在图19中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0045] 图20是在用皮下5mg/kg剂量的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(每5或7周)或PBS对照处理之后抗纤维化活性的CCl₄模型中的 α -平滑肌肌动蛋白相对平均强度水平的图。在图20中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0046] 图21是在用皮下5mg/kg剂量的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(每5或7周)或PBS对照处理之后抗纤维化活性的CCl₄模型中的肝脏重量与体重比率的图。在图21中使用的

HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0047] 图22是在用皮下5mg/kg剂量的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(每5或7周)或PBS对照处理之后抗纤维化活性的CCl₄模型中的F4/80+面积的图。在图22中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0048] 图23是在用5mg/kg皮下剂量的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(呈四环结构)或2.5mg/kg静脉内剂量的LNP配制的寡核苷酸(呈四环结构)处理之后43天抗纤维化活性的CCl₄模型中的天狼星红相对平均强度水平的图。PBS-处理的动物和未用CCl₄处理的动物用作对照。在图23中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0049] 图24是显示小鼠中伴刀豆球蛋白 (Concavalin) A诱导的肝炎模型的流程图连同显示实验设计的基本概述的示意图。

[0050] 图25是表明在小鼠中诱导的肝炎的伴刀豆球蛋白 (Concavalin) A模型中的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸治疗的结果的一系列图。在左侧显示来自用PBS对照处理的小鼠的数据。在右侧显示来自用10 mg/kg GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的皮下剂量治疗的小鼠的数据。在图25中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0051] 图26A-26D是表明在进食胆碱-缺乏的氨基酸限定的高脂饮食 (CDAHFD) 或对照高脂饮食 (HFD) 的小鼠中皮下GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸处理(与PBS对照处理相比)对HMGB1(图26A和26B)、Colla1(图26C)和波形蛋白(图26D) mRNA水平的结果的一系列图。在图26A-26D中使用的HMGB1寡核苷酸是S194-AS274-M30。

[0052] 图27是表明在进食胆碱-缺乏的氨基酸限定的高脂饮食 (CDAHFD) 或对照高脂饮食 (HFD) 的小鼠中皮下GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸处理(与PBS对照处理相比)对ALT和AST水平的结果的一组图。在图27中使用的HMGB1寡核苷酸是S194-AS274-M30。

[0053] 图28是显示在皮下施用1mg/kg后第5天对八种GalNAc缀合的HMGB1寡核苷酸(具有3种不同修饰模式)的体内活性评估的图。显示施用所述寡核苷酸后5天肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的百分比(针对用PBS处理的小鼠中剩余的HMGB1 mRNA的水平归一化)。结果显示,所有测试的HMGB1寡核苷酸(具有不同的化学修饰模式)都在敲低小鼠肝细胞中的HMGB1中是有效的。

[0054] 图29A-29B是显示三种不同剂量(1、0.5或0.25 mg/kg)的八种GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。在5' qPCR反应(图29A)或3' qPCR反应(图29B)中评估施用所述寡核苷酸后5天肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的百分比(针对用PBS处理的小鼠中剩余的HMGB1 mRNA水平归一化)。结果显示,所有测试的HMGB1寡核苷酸的功效都是剂量依赖性的。

[0055] 图30A-30D是显示在4个不同时间点的三种GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。数据显示在施用所述寡核苷酸后第7天、第14天、第21天或第28天剩余的HMGB1 mRNA的量(针对用PBS处理的小鼠中剩余的HMGB1 mRNA水平归一化)。图30A和30B显示5' qPCR反应的结果。图30C和30D显示3' qPCR反应的结果。结果显示,在注射后3周,所有测试的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸在敲低HMGB1中是有效的。

[0056] 图31A-31B是显示三种不同剂量(1、0.5或0.25 mg/kg)的四种GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。在5' qPCR反应(图31A)或3' qPCR反应(图31B)中评估施用所述寡核苷酸后5天肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的百分比(针对用PBS处理的小鼠中剩

余的HMGB1 mRNA水平归一化)。所有测试的HMGB1寡核苷酸抑制剂都显示约0.5至1.0 mg/kg的ED₅₀ (对于接受药物的受体的50%的有效剂量)。

[0057] 图32A-32B是显示皮下施用后21天四种GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的体内活性评估的图。在5' qPCR反应(图32A)或3' qPCR反应(图32B)中评估施用所述寡核苷酸后21天肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的百分比(针对用PBS处理的小鼠中剩余的HMGB1 mRNA水平归一化)。结果显示,在注射后3周,所有测试的GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸在敲低HMGB1中保留功效。

[0058] 图33A-33G是表明原代猴肝细胞中的2种GalNAc-缀合物HMGB1寡核苷酸的摄取和活性的IC₅₀曲线。将IC₅₀曲线针对模拟物处理归一化。RhHMGB1 5' qPCR反应的结果显示于图33A-33C)中,并且3' qPCR反应的结果显示于图33D-33F中。GalNAc-缀合物LDHA寡核苷酸用作测定对照(图33C、33F和33G)。在qPCR测定中通过LDHA特异性引物测量剩余的RhLDHA mRNA的水平(图33G)。

[0059] 图34A-34G是表明原代人肝细胞中的2种GalNAc-缀合物HMGB1寡核苷酸的摄取和活性的IC₅₀曲线。将IC₅₀曲线针对模拟物处理归一化。hsHMGB1 5' qPCR反应的结果显示于图34A-34C)中,并且3' qPCR反应的结果显示于图34D-34F中。GalNAc-缀合物LDHA寡核苷酸用作测定对照(图34C、34F和34G)。在qPCR测定中通过LDHA特异性引物测量剩余的HsLDHA mRNA的水平(图34G)。

[0060] 发明详述

根据一些方面,本公开提供了靶向HMGB1 mRNA的寡核苷酸,其有效降低细胞、尤其是肝脏细胞(例如,肝细胞)中的HMGB1表达,用于治疗肝脏纤维化。因此,在相关方面,本公开提供了治疗纤维化的方法,其涉及选择性降低肝脏中的HMGB1基因表达。在某些实施方案中,本文提供的HMGB1靶向寡核苷酸被设计用于递送至靶标组织的选择细胞(例如,肝脏肝细胞)以治疗那些组织中的纤维化。

[0061] 下面提供本公开的另外的方面,包括定义的术语的描述。

[0062] I. 定义

近似:如本文所用,如应用于一种或多种目标值的术语“近似”或“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中,除非另有说明或另外从上下文显而易见,否则术语“近似”或“约”是指落入所述参考值在任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围(除非这种数字将超过可能值的100%)。

[0063] 施用:如本文所用,术语“施用(administering)”或“施用(administration)”意指以药理学有用的方式将物质(例如,寡核苷酸)提供给受试者(例如,以治疗受试者中的病况)。

[0064] 脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR):如本文所用,术语“脱唾液酸糖蛋白受体”或“ASGPR”是指由主要的48 kDa (ASGPR-1)和次要的40 kDa亚基(ASGPR-2)形成的二分C-型凝集素。ASGPR主要表达在肝细胞的血窦表面上,并且在含有末端半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺残基的循环糖蛋白(脱唾液酸糖蛋白)的结合、内化和随后的清除中具有主要作用。

[0065] 减弱:如本文所用,术语“减弱”意指减少或有效地停止。作为一个非限制性实例,本文提供的治疗中的一种或多种可以减少或有效地停止受试者中的肝脏纤维化或肝脏炎

症的开始或进展。该减弱可以通过例如以下来进行例示：肝脏纤维化或肝脏炎症的一个或多个方面（例如，症状、组织特征以及细胞、炎性或免疫学活性等）的减少，无可检测的肝脏纤维化或肝脏炎症的一个或多个方面的进展（恶化），或者受试者中无可检测到的肝脏纤维化或肝脏炎症的方面（当可能以其他方式预期它们时）。

[0066] 互补：如本文所用，术语“互补”是指两个核苷酸（例如在两个相对的核酸上或在单一核酸链的相对区域上）之间允许两个核苷酸彼此形成碱基对的结构关系。例如，一个核酸的与相对核酸的嘧啶核苷酸互补的嘌呤核苷酸可以通过彼此形成氢键而碱基配对在一起。在一些实施方案中，互补的核苷酸可以以沃森-克里克 (Watson-Crick) 方式或以允许形成稳定双链体的任何其他方式碱基配对。在一些实施方案中，两个核酸可以具有多个核苷酸的区域，其与彼此互补以便形成互补区域，如本文所述。

[0067] 脱氧核糖核苷酸：如本文所用，术语“脱氧核糖核苷酸”是指与核糖核苷酸相比在其戊糖的2' 位置处具有氢代替羟基的核苷酸。修饰的脱氧核糖核苷酸是除了在2' 位置以外具有一个或多个原子的修饰或取代（包括糖、磷酸酯基团或碱基中的修饰或取代或糖、磷酸酯基团或碱基的修饰或取代）的脱氧核糖核苷酸。

[0068] 双链寡核苷酸：如本文所用，术语“双链寡核苷酸”是指基本上呈双链体形式的寡核苷酸。在一些实施方案中，在共价分离的核酸链的核苷酸的反向平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对。在一些实施方案中，在共价连接的核酸链的核苷酸的反向平行序列之间形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对。在一些实施方案中，从单一核酸链形成双链寡核苷酸的一个或多个双链体区域的互补碱基配对，所述单一核酸链被折叠（例如，经由发夹），以提供在一起碱基配对的核苷酸的互补的反向平行序列。在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含彼此完全双链体化的两条共价分离的核酸链。然而，在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含部分双链体化、例如在一个或两个末端具有突出端的两条共价分离的核酸链。在一些实施方案中，双链寡核苷酸包含核苷酸的反向平行序列，其部分互补，且因此，可以具有一个或多个错配，所述错配可以包括内部错配或末端错配。

[0069] 双链体：如本文所用，关于核酸（例如寡核苷酸）的术语“双链体”是指通过核苷酸的两个反向平行序列的互补碱基配对形成的结构。

[0070] 赋形剂：如本文所用，术语“赋形剂”是指可以被包括在组合物中例如以提供或促成期望的稠度或稳定作用的非治疗剂。

[0071] 肝细胞：如本文所用，术语“肝细胞 (hepatocyte或hepatocytes)”是指肝脏的实质组织的细胞。这些细胞占肝脏质量的近似70-85%，并且制造血清白蛋白、纤维蛋白原和凝血因子的凝血酶原组（除了因子3和4）。肝细胞谱系细胞的标志物可以包括，但不限于：运甲状腺素蛋白 (Ttr)、谷氨酰胺合成酶 (Glu1)、肝细胞核因子1a (Hnf1a) 和肝细胞核因子4a (Hnf4a)。成熟肝细胞的标志物可以包括，但不限于：细胞色素P450 (Cyp3a11)、延胡索酰基乙酰乙酸水解酶 (Fah)、葡萄糖6-磷酸 (G6p)、白蛋白 (Alb) 和OC2-2F8。参见，例如，Huch等人，(2013)，Nature，494 (7436)：247-250，其涉及肝细胞标志物的内容通过引用并入本文。

[0072] 肝毒性剂：如本文所用，“肝毒性剂”是本身对肝脏有毒或可以被加工以形成对肝脏有毒的代谢物的化学化合物、病毒或其他物质。肝毒性剂可以包括，但不限于，四氯化碳

(CC14)、对乙酰氨基酚(扑热息痛)、氯乙烯、砷、氯仿、非甾体抗炎药(诸如阿司匹林和苯基丁氮酮)。

[0073] 肝脏炎症:如本文所用,术语“肝脏炎症”或“肝炎”是指其中肝脏变得肿胀、功能障碍和/或疼痛的身体状况,尤其是由于受伤或感染,其可能由暴露于肝毒性剂而引起。症状可以包括黄疸(皮肤或眼睛的发黄)、疲劳、虚弱、恶心、呕吐、食欲下降和体重减轻。如果不进行治疗,肝脏炎症可进展为纤维化、肝硬化、肝脏衰竭或肝脏癌症。

[0074] 肝脏纤维化:如本文所用,术语“肝脏纤维化”或“肝脏的纤维化”是指由炎症和肝脏细胞死亡导致的细胞外基质蛋白在肝脏中的过度积累,所述细胞外基质蛋白可以包括胶原蛋白(I、III和IV)、纤连蛋白、粗纤维调节素(undulin)、弹性蛋白、层粘连蛋白、透明质酸和蛋白聚糖。如果不进行治疗,肝脏纤维化可进展为肝硬化、肝脏衰竭或肝脏癌症。

[0075] 环:如本文所用,术语“环”是指核酸(例如,寡核苷酸)的未配对区域,其侧接核酸的两个反向平行区域,所述核酸的两个反向平行区域彼此充分互补,使得在适当的杂交条件下(例如,在磷酸盐缓冲液中,在细胞中),侧接未配对区域的两个反向平行区域杂交以形成双链体(称为“茎”)。

[0076] 修饰的核苷酸间键:如本文所用,术语“修饰的核苷酸间键”是指与包含磷酸二酯键的参考核苷酸间键相比具有一个或多个化学修饰的核苷酸间键。在一些实施方案中,修饰的核苷酸是非天然存在的键。通常,修饰的核苷酸间键为其中存在修饰的核苷酸间键的核酸赋予一种或多种期望的特性。例如,修饰的核苷酸可以提高热稳定性、对降解的抗性、核酸酶抗性、溶解度、生物利用度、生物活性、降低免疫原性等。

[0077] 修饰的核苷酸:如本文所用,术语“修饰的核苷酸”是指与选自以下的对应参考核苷酸相比具有一个或多个化学修饰的核苷酸:腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸、腺嘌呤脱氧核糖核苷酸、鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸、胞嘧啶脱氧核糖核苷酸和胸苷脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸是非天然存在的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸在其糖、核碱基和/或磷酸酯基团中具有一个或多个化学修饰。在一些实施方案中,修饰的核苷酸具有与对应参考核苷酸缀合的一个或多个化学部分。通常,修饰的核苷酸为其中存在修饰的核苷酸的核酸赋予一种或多种期望的特性。例如,修饰的核苷酸可以提高热稳定性、对降解的抗性、核酸酶抗性、溶解度、生物利用度、生物活性、降低免疫原性等。

[0078] 带切口的四环结构:“带切口的四环结构”是RNAi寡核苷酸的结构,其特征存在于分开的有义(过客)和反义(引导)链,其中所述有义链具有与所述反义链互补的区域,且其中所述链中的至少一条,通常是有义链,具有被配置为稳定在至少一条链内形成的相邻茎区域的四环。

[0079] 寡核苷酸:如本文所用,术语“寡核苷酸”是指短核酸,例如长度小于100个核苷酸的短核酸。寡核苷酸可以是单链或双链的。寡核苷酸可以具有或不具有双链体区域。作为一组非限制性实例,寡核苷酸可以是,但不限于,小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、切丁酶底物干扰RNA(dsiRNA)、反义寡核苷酸、短siRNA或单链siRNA。在一些实施方案中,双链寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。

[0080] 突出端:如本文所用,术语“突出端”是指由延伸超过互补链的末端的一条链或区域产生的末端非碱基配对核苷酸,所述一条链或区域与所述互补链形成双链体。在一些实

施方案中,突出端包含从双链寡核苷酸的5'末端或3'末端的双链体区域延伸的一个或多个未配对的核苷酸。在某些实施方案中,所述突出端是双链寡核苷酸的反义链或有义链上的3'或5'突出端。

[0081] 磷酸酯类似物:如本文所用,术语“磷酸酯类似物”是指模拟磷酸酯基团的静电和/或空间特性的化学部分。在一些实施方案中,磷酸酯类似物代替经常易于酶促除去的5'-磷酸酯位于寡核苷酸的5'末端核苷酸处。在一些实施方案中,5'-磷酸酯类似物含有磷酸酶抗性键。磷酸酯类似物的实例包括5'-磷酸酯,诸如5'-亚甲基磷酸酯(5'-MP)和5'-(E)-乙烯基磷酸酯(5'-VP)。在一些实施方案中,寡核苷酸在5'-末端核苷酸处的糖的4'-碳位置处具有磷酸酯类似物(被称为“4'-磷酸酯类似物”)。4'-磷酸酯类似物的一个实例是其中氧基甲基的氧原子与糖部分(例如在其4'-碳处)结合的氧基甲基磷酸酯或其类似物。参见,例如,在2016年9月2日提交的美国临时申请号62/383,207和2016年9月12日提交的美国临时申请号62/393,401,其各自涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文。已经对于寡核苷酸的5'末端开发其他修饰(参见,例如,WO 2011/133871; 美国专利号8,927,513; 和Prakash等人(2015), *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011,其各自涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文)。

[0082] 降低的表达:如本文所用,术语基因的“降低的表达”是指与适当的参考细胞或受试者相比,由所述基因编码的RNA转录物或蛋白的量减少和/或所述基因在细胞或受试者中的活性量减少。例如,用双链寡核苷酸(例如,具有与HMGB1 mRNA序列互补的反义链的双链寡核苷酸)处理细胞的行为可导致RNA转录物、蛋白和/或活性(例如,由HMGB1基因编码)的量与未用所述双链寡核苷酸处理的细胞相比减少。类似地,如本文所用的“降低表达”是指导致基因(例如,HMGB1)的表达降低的行为。

[0083] 互补区域:如本文所用,术语“互补区域”是指核酸(例如,双链寡核苷酸)的核苷酸的序列,其与核苷酸的反向平行序列充分互补以允许在适当的杂交条件下(例如在磷酸盐缓冲液中,在细胞中等)在核苷酸的两个序列之间的杂交。

[0084] 核糖核苷酸:如本文所用,术语“核糖核苷酸”是指具有核糖作为其戊糖的核苷酸,其在其2'位置处含有羟基基团。修饰的核糖核苷酸是除了在2'位置以外具有一个或多个原子的修饰或取代(包括核糖、磷酸酯基团或碱基中的修饰或取代或核糖、磷酸酯基团或碱基的修饰或取代)的核糖核苷酸。

[0085] RNAi寡核苷酸:如本文所用,术语“RNAi寡核苷酸”是指(a)双链寡核苷酸,其具有有义链(过客)和反义链(引导),其中所述反义链或所述反义链的一部分由Argonaute 2(Ago2)核酸内切酶用于切割靶标mRNA;或(b)单链寡核苷酸,其具有单一反义链,其中该反义链(或该反义链的一部分)由Ago2核酸内切酶用于切割靶标mRNA。

[0086] 链:如本文所用,术语“链”是指通过核苷酸间键(例如,磷酸二酯键、硫代磷酸酯键)连接在一起的核苷酸的单一连续序列。在一些实施方案中,链具有两个游离末端,例如5'-末端和3'-末端。

[0087] 受试者:如本文所用,术语“受试者”意指任何哺乳动物,包括小鼠、兔和人。在一个实施方案中,所述受试者是人或非人灵长类动物。术语“个体”或“患者”可以与“受试者”可互换使用。

[0088] 合成的:如本文所用,术语“合成的”是指这样的核酸或其他分子,其为人工合成的

(例如,使用机器(例如,固态核酸合成仪))或并且不是以其他方式衍生自通常产生该分子的自然来源(例如,细胞或生物)。

[0089] 靶向配体:如本文所用,术语“靶向配体”是指选择性结合目标组织或细胞的同源分子(例如,受体)且为了将其他物质靶向至目标组织或细胞的目的而可与另一物质缀合的分子(例如,碳水化合物、氨基糖、胆固醇、多肽或脂质)。例如,在一些实施方案中,为了将寡核苷酸靶向至特定目标组织或细胞的目的,可以将靶向配体与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,靶向配体选择性结合细胞表面受体。因此,在一些实施方案中,当与寡核苷酸缀合时,靶向配体通过选择性结合细胞的表面上表达的受体和细胞对包含所述寡核苷酸、靶向配体和受体的复合物的内体内化而促进所述寡核苷酸递送至特定细胞中。在一些实施方案中,靶向配体经由接头与寡核苷酸缀合,所述接头在细胞内化之后或期间切割,使得所述寡核苷酸在细胞中从靶向配体释放。

[0090] 四环:如本文所用,术语“四环”是指增加通过核苷酸的侧接序列的杂交形成的相邻双链体的稳定性的环。随着高于从一组由随机选择的核苷酸的序列组成的相当长度的环平均预期的相邻茎双链体的 T_m 的相邻茎双链体的解链温度(T_m)的增加,稳定性的增加是可检测的。例如,四环可以为包含长度为至少2个碱基对的双链体的发夹赋予在10 mM NaHPO_4 中至少50°C、至少55°C、至少56°C、至少58°C、至少60°C、至少65°C或至少75°C的解链温度。在一些实施方案中,四环可以通过堆叠相互作用使相邻的茎双链体中的碱基对稳定。此外,四环中核苷酸间的相互作用包括但不限于非沃森-克里克碱基配对、堆叠相互作用、氢键键合和接触相互作用(Cheong等人, *Nature* 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus和Pardi, *Science* 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4)。在一些实施方案中,四环包含3至6个核苷酸或由其组成,且通常为4至5个核苷酸。在某些实施方案中,四环包含可以被修饰或可以不被修饰(例如,可以与靶向部分缀合或可以不与靶向部分缀合)的3、4、5或6个核苷酸或由其组成。在一个实施方案中,四环由四个核苷酸组成。可以在四环中使用任何核苷酸,并且可以使用用于此类核苷酸的标准IUPAC-IUB符号,如Cornish-Bowden (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:3021-3030中所述。例如,字母“N”可以用于意味着任何碱基都可以在该位置,字母“R”可以用于显示A(腺嘌呤)或G(鸟嘌呤)可以在该位置,且“B”可用于显示C(胞嘧啶)、G(鸟嘌呤)或T(胸腺嘧啶)可以在该位置。四环的实例包括四环的UNCG家族(例如UUCG)、四环的GNRA家族(例如GAAA)和CUUG四环。(Woese等人, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao等人, *Nucleic Acids Res.* 1991 Nov. 11; 19(21):5901-5)。DNA四环的实例包括四环的d(GNNA)家族(例如d(GTTA))、四环的d(GNRA)家族、四环的d(GNAB)家族、四环的d(CNNG)家族和四环的d(TNCG)家族(例如d(TTCG))。参见,例如: Nakano等人. *Biochemistry*, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI等人 *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731* (2000),其对于其相关公开内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,所述四环包含在带切口的四环结构内。

[0091] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指为了就现有病况(例如,疾病、病症)而言改善受试者的健康和/或幸福的目的或为了预防或降低病况的发生的可能性,例如通过将治疗剂(例如,寡核苷酸)施用于受试者来向有此需要的受试者提供护理的行为。在一些实施方案中,治疗涉及降低受试者经历的病况(例如,疾病、病症)的至少一种体征、症状或促成因素的频率或严重程度。

[0092] II. HMGB1表达的基于寡核苷酸的抑制剂

i. HMGB1热点

在一些实施方案中,本文提供了可用于实现治疗益处的HMGB1表达的基于寡核苷酸的抑制剂。通过检查HMGB1 mRNA,包括多种不同物种(人、猕猴和小鼠)的mRNA(参见,例如,实施例1)以及体外和体内测试,已发现HMGB1 mRNA的某些区域是用于靶向的热点,因为它们比其他更适合于基于寡核苷酸的抑制。在一些实施方案中,HMGB1的热点区域包含如SEQ ID NO:374-381中任一者中所示的序列,或由其组成。为了抑制HMGB1 mRNA表达的目的,可以使用如本文所讨论的寡核苷酸靶向HMGB1 mRNA的这些区域。

[0093] 因此,在一些实施方案中,为了靶向细胞中的mRNA和抑制其表达的目的,设计本文提供的寡核苷酸以便具有与HMGB1 mRNA(例如,在HMGB1 mRNA的热点内)互补的区域。为了抑制其表达的目的,所述互补区域通常具有合适的长度和碱基含量,以使得所述寡核苷酸(或其链)能够与HMGB1 mRNA退火。在一些实施方案中,互补区域长度为至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个核苷酸。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸具有与HMGB1互补的区域,其长度在12至30(例如,12至30、12至22、15至25、17至21、18至27、19至27或15至30)个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸具有与HMGB1互补的区域,其长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0094] 在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含互补区域(例如,在双链寡核苷酸的反义链上),其与如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列至少部分互补。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含互补区域(例如,在双链寡核苷酸的反义链上),其与如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列完全互补。在一些实施方案中,寡核苷酸的互补区域(例如,在双链寡核苷酸的反义链上)与如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列的核苷酸的连续序列互补,其长度在10至25个核苷酸(例如,10至25、12至22、15至25、17至21、18至25、19-25或15至30个核苷酸)的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸的互补区域(例如,在双链寡核苷酸的反义链上)与如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列的核苷酸的连续序列互补,其长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸。

[0095] 在一些实施方案中,与如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列的连续核苷酸互补的寡核苷酸的互补区域跨越反义链的整个长度。在一些实施方案中,与如SEQ ID NO:1-96、193-272和363-365中任一者中所示的序列的连续核苷酸互补的寡核苷酸的互补区域跨越反义链的整个长度的一部分。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含互补区域(例如,在双链寡核苷酸的反义链上),其与跨越如SEQ ID NO:193-272、193-272和363-365中任一者中所示的序列的核苷酸1-19的核苷酸的连续延伸段至少部分(例如,完全)互补。

[0096] 在一些实施方案中,与HMGB1互补的区域与HMGB1 mRNA的相应序列相比可以具有一个或多个错配。寡核苷酸上的互补区域可以具有最多达1个、最多达2个、最多达3个、最多达4个、最多达5个等的错配,条件是其维持在适当的杂交条件下与HMGB1 mRNA形成互补碱基对的能力。或者,寡核苷酸上的互补区域可以具有不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个或不超过5个错配,条件是其维持在适当的杂交条件下与HMGB1 mRNA形成互补碱基

对的能力。在一些实施方案中,如果在互补区域中存在多于一个错配,则它们可以连续地定位(例如,连续2、3、4或更多个),或散布在整个互补区域中,条件是所述寡核苷酸维持在适当的杂交条件下与HMGB1 mRNA形成互补碱基对的能力。

[0097] ii. 寡核苷酸的类型

存在可用于本公开的方法中靶向HMGB1的各种寡核苷酸结构,包括RNAi、反义、miRNA等。本文或别处描述的任何结构都可用作框架以并入或靶向本文所述的序列(例如,HMGB1的热点序列,诸如SEQ ID NO:374-381中举例说明的那些)。

[0098] 在一些实施方案中,用于降低HMGB1表达的表达的寡核苷酸参与切丁酶参与的上游或下游的RNA干扰(RNAi)途径。例如,已经开发RNAi寡核苷酸,其中每条链具有19-25个核苷酸的大小,且具有至少一个1至5个核苷酸的3'突出端(参见,例如,美国专利号8,372,968)。还已经开发更长的寡核苷酸,其被切丁酶加工以生成活性RNAi产物(参见,例如,美国专利号8,883,996)。进一步的工作产生延伸的双链寡核苷酸,其中至少一条链的至少一个末端延伸超过双链体靶向区域,包括其中所述链之一包括热力学稳定的四环结构的结构(参见,例如,美国专利号8,513,207和8,927,705,以及W02010033225,其关于其对这些寡核苷酸的公开内容通过引用并入本文)。此类结构可以包括单链延伸(在所述分子的一侧或两侧)以及双链延伸。

[0099] 在一些实施方案中,设计本文提供的寡核苷酸以参与在切丁酶的参与(例如,切丁酶切割)的下游的RNA干扰途径。此类寡核苷酸在有义链的3'末端可以具有突出端(例如,长度为1、2或3个核苷酸)。此类寡核苷酸(例如,siRNA)可以包含与靶标RNA反义的21核苷酸引导链和互补的过客链,其中两条链退火以形成19-bp双链体和在一或两个3'末端的2核苷酸突出端。更长的寡核苷酸设计也可用,包括具有23个核苷酸的引导链和21个核苷酸的过客链的寡核苷酸,其中在所述分子的右侧(过客链的3'-末端/引导链的5'-末端)存在平末端,且在所述分子的左侧(过客链的5'-末端/引导链的3'-末端)存在两个核苷酸的3'-引导链突出端。在此类分子中,存在21个碱基对的双链体区域。参见,例如,US9012138、US9012621和US9193753,其各自对于其相关公开内容并入本文。

[0100] 在一些实施方案中,如本文所公开的寡核苷酸可以包含长度均在17至26(例如,17至26、20至25或21-23)个核苷酸的范围内的有义和反义链。在一些实施方案中,如本文所公开的寡核苷酸包含长度均在19-21个核苷酸的范围内的有义和反义链。在一些实施方案中,所述有义和反义链具有相等的长度。在一些实施方案中,寡核苷酸包含有义链和反义链,使得在有义链或反义链或有义链和反义链两者上存在3'-突出端。在一些实施方案中,对于具有长度均在21-23个核苷酸的范围内的有义和反义链的寡核苷酸,在有义链、反义链或有义和反义链两者上的3'突出端长度为1或2个核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸具有23个核苷酸的引导链和21个核苷酸的过客链,其中在所述分子的右侧(过客链的3'-末端/引导链的5'-末端)存在平末端,且在所述分子的左侧(过客链的5'-末端/引导链的3'-末端)存在两个核苷酸的3'-引导链突出端。在此类分子中,存在21个碱基对的双链体区域。

[0101] 用于与本文公开的组合物和方法一起使用的其他寡核苷酸设计包括:16-聚体siRNAs(参见,例如,Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Blackburn(编), Royal Society of Chemistry, 2006),shRNAs(例如,具有19 bp或更短的茎;参见,例如,Moore等人 Methods Mol. Biol. 2010; 629:141-158),平端siRNAs(例如,长度为19 bp;

参见:例如,Kraynack和Baker, RNA Vol. 12, p163-176 (2006)),不对称siRNAs (aiRNA; 参见,例如,Sun等人, *Nat. Biotechnol.* 26, 1379-1382 (2008)),不对称的较短双链体 siRNA (参见,例如,Chang等人, *Mol Ther.* 2009 Apr; 17(4): 725-32),分叉siRNAs (参见,例如,Hohjoh, *FEBS Letters*, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198),单链 siRNAs (Elsner; *Nature Biotechnology* 30, 1063 (2012)),哑铃形环状siRNAs (参见,例如,Abe等人 *J Am Chem Soc* 129: 15108-15109 (2007))和小的内部分段干扰RNA (sisiRNA; 参见,例如,Bramsen等人, *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(17): 5886-5897)。前述参考文献各自对于其中的相关公开内容以其整体通过引用并入。在一些实施方案中可用于降低或抑制HMGB1的表达的寡核苷酸结构的另外的非限制性实例是微RNA (miRNA)、短发夹RNA (shRNA) 和短siRNA (参见,例如,Hamilton等人, *Embo J.*, 2002, 21(17): 4671-4679;还参见美国申请号20090099115)。

[0102] 仍然,在一些实施方案中,如本文所述的用于降低HMGB1表达的寡核苷酸是单链的。此类结构可以包括但不限于单链RNAi分子。近来的努力已经表明单链RNAi分子的活性(参见,例如,Matsui等人 (May 2016), *Molecular Therapy*, Vol. 24(5), 946-955)。然而,在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。反义寡核苷酸是具有核碱基序列的单链寡核苷酸,当以5'至3'方向书写时,所述核碱基序列包含特定核酸的靶向区段的反向互补物且被合适地修饰(例如,作为间隙体(gapmer))以便诱导RNaseH介导的其靶标RNA在细胞中的切割或(例如,作为混合体(mixmer))以便抑制靶标mRNA在细胞中的翻译。用于本公开中的反义寡核苷酸可以以本领域中已知的任何合适方式进行修饰,包括,如美国专利号9,567,587中所示,其对于其关于反义寡核苷酸的修饰(包括,例如,长度,核碱基(嘧啶、嘌呤)的糖部分,和核碱基的杂环部分的改变)的公开内容通过引用并入本文。进一步,已经持续数十年使用反义分子以降低特定靶标基因的表达(参见,例如,Bennett等人; *Pharmacology of Antisense Drugs*, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 57: 81-105)。

[0103] iii. 双链寡核苷酸

用于靶向HMGB1表达(例如,经由RNAi途径)的双链寡核苷酸通常具有彼此形成双链体的有义链和反义链。在一些实施方案中,所述有义和反义链不是共价连接的。然而,在一些实施方案中,所述有义和反义链是共价连接的。在一些实施方案中,在有义和反义链之间形成的双链体长度为至少15个(例如,至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或至少21个)核苷酸。在一些实施方案中,在有义和反义链之间形成的双链体在长度为15-30个核苷酸(例如长度为15至30、15至27、15至22、18至22、18至25、18至27、18至30或21至30个核苷酸)的范围内。在一些实施方案中,在有义和反义链之间形成的双链体长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在一些实施方案中,在有义和反义链之间形成的双链体不跨越所述有义链和/或反义链的整个长度。在一些实施方案中,在有义和反义链之间的双链体跨越有义或反义链的整个长度。在某些实施方案中,在有义和反义链之间的双链体跨越有义链和反义链两者的整个长度。

[0104] 在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸包含具有如SEQ ID NO:1-96中任一者中所示的序列的有义链和包含选自SEQ ID NO:97-192的互补序列的反义链,如表7中所排列(例如,包含如SEQ ID NO:1中所示的序列的有义链和包含如SEQ ID NO:97中所示的序列的

反义链)。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸含有包含如SEQ ID NO:193-272和363-365中任一者中所示的序列的有义链和包含选自SEQ ID NO:273-362和366-370的互补序列的反义链,也如表7中所排列(例如,包含如SEQ ID NO:193中所示的序列的有义链和包含如SEQ ID NO:273中所示的序列的反义链)。应当理解,在一些实施方案中,在描述寡核苷酸或其他核酸的结构中可以参考序列表中呈现的序列。在此类实施方案中,实际的寡核苷酸或其他核酸与指定序列相比可以具有一个或多个替代核苷酸(例如,DNA核苷酸的RNA对应物或RNA核苷酸的DNA对应物)和/或一个或多个修饰的核苷酸和/或一个或多个修饰的核苷酸间键和/或一个或多个其他修饰,同时保留与指定序列基本上相同或相似的互补特性。

[0105] 在一些实施方案中,双链寡核苷酸包含25个核苷酸的有义链和27个核苷酸的反义链,当由切丁酶作用时,其产生并入成熟RISC中的反义链。在一些实施方案中,寡核苷酸的有义链长于27个核苷酸(例如,28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸)。在一些实施方案中,寡核苷酸的有义链长于25个核苷酸(例如,26、27、28、29或30个核苷酸)。在寡核苷酸的有义和反义链之间形成的双链体的长度可以长度为12至30个核苷酸(例如,12至30、12至27、15至25、18至30或19至30个核苷酸)。在一些实施方案中,在寡核苷酸的有义和反义链之间形成的双链体的长度为至少12个核苷酸长(例如,至少12个、至少15个、至少20个或至少25个核苷酸长)。在一些实施方案中,在寡核苷酸的有义和反义链之间形成的双链体的长度是12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸长度。

[0106] 在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸具有一个5'末端,所述5'末端与另一5'末端相比热力学较不稳定。在一些实施方案中,提供了不对称寡核苷酸,其包括在有义链的3'末端的平末端和在反义链的3'末端的突出端。在一些实施方案中,在反义链上的3'突出端长度为1-8个核苷酸(例如,长度为1、2、3、4、5、6、7或8个核苷酸)。通常,RNAi的寡核苷酸在反义(引导)链的3'末端具有两个核苷酸的突出端。然而,其他突出端是可能的。在一些实施方案中,突出端是3'突出端,其包含1和6个核苷酸之间的长度,任选地1至5个、1至4个、1至3个、1至2个、2至6个、2至5个、2至4个、2至3个、3至6个、3至5个、3至4个、4至6个、4至5个、5至6个核苷酸,或1、2、3、4、5或6个核苷酸。然而,在一些实施方案中,突出端是5'突出端,其包含1和6个核苷酸之间的长度,任选地1至5个、1至4个、1至3个、1至2个、2至6个、2至5个、2至4个、2至3个、3至6个、3至5个、3至4个、4至6个、4至5个、5至6个核苷酸,或1、2、3、4、5或6个核苷酸。

[0107] 在一些实施方案中,在反义链的3'末端的两个末端核苷酸被修饰。在一些实施方案中,在反义链的3'末端的两个末端核苷酸与靶标互补。在一些实施方案中,在反义链的3'末端的两个末端核苷酸不与靶标互补。在一些实施方案中,在带切口的四环结构中的寡核苷酸的每个3'末端的两个末端核苷酸是GG。通常,在寡核苷酸的每个3'末端的两个末端GG核苷酸中的一个或两个不与靶标互补。

[0108] 在一些实施方案中,在有义和反义链之间存在一个或多个(例如1、2、3、4、5个)错配。如果在有义和反义链之间存在多于一个错配,则它们可以被连续地定位(例如,连续2、3或更多个),或者散布在整个互补区域中。在一些实施方案中,所述有义链的3'末端含有一个或多个错配。在一个实施方案中,在所述有义链的3'末端并入两个错配。在一些实施方案中,所述寡核苷酸的有义链的3'-末端的区段的碱基错配或去稳定化提高RNAi中的合成双

链体的功效,可能是通过促进切丁酶的加工。

[0109] a. 反义链

在一些实施方案中,寡核苷酸的反义链可被称为“引导链”。例如,如果反义链可以与RNA-诱导的沉默复合物(RISC)接合并结合Argonaut蛋白,或与一种或多种相似因子接合或结合一种或多种相似因子,并直接沉默靶标基因,则其可以被称为引导链。在一些实施方案中,与引导链互补的有义链可以被称为“过客链”。

[0110] 在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸包含长度为最多达50个核苷酸(例如,长度为最多达30个、最多达27个、最多达25个、最多达21个或最多达19个核苷酸)的反义链。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸包含长度为至少12个核苷酸(例如,长度为至少12个、至少15个、至少19个、至少21个、至少25个或至少27个核苷酸)的反义链。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸的反义链长度在12至50或12至30(例如,12至30、11至27、11至25、15至21、15至27、17至21、17至25、19至27或19至30)个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸中的任一者的反义链长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。

[0111] 在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列的至少12个(例如,至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个或至少23个)连续核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362和366-370中任一者中所示的序列中的任一者的长度在12至30个核苷酸(例如,12至27、12至22、15至25、17至21、18至27、19至27或15至27个核苷酸)的范围内的核苷酸的连续序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含如SEQ ID NO:97-192、273-362或366-370中任一者中所示的序列的核苷酸的连续序列,其长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27个连续核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含反义链,所述反义链由如SEQ ID NO:97-192、273-362或366-370中任一者中所示的序列组成。

[0112] b. 有义链

在一些实施方案中,双链寡核苷酸可以具有长度为最多达40个核苷酸(例如,长度最多达40个、最多达35个、最多达30个、最多达27个、最多达25个、最多达21个、最多达19个、最多达17个或最多达12个核苷酸)的有义链。在一些实施方案中,寡核苷酸可以具有长度为至少12个核苷酸(例如,长度为至少12个、至少15个、至少19个、至少21个、至少25个、至少27个、至少30个、至少35个或至少38个核苷酸)的有义链。在一些实施方案中,寡核苷酸可以具有长度在12至50(例如,12至40、12至36、12至32、12至28、15至40、15至36、15至32、15至28、17至21、17至25、19至27、19至30、20至40、22至40、25至40或32至40)个核苷酸的范围内的有义链。在一些实施方案中,寡核苷酸可以具有长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸的有义链。在一些实施方案中,寡核苷酸的有义链长于27个核苷酸(例如,28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸)。在一些实施方案中,寡核苷酸的有义链长于25个核苷酸(例如,26、

27、28、29或30个核苷酸)。

[0113] 在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含如SEQ ID NO:1-96、193-272或363-365中任一者中所示的有义链序列。在一些实施方案中,寡核苷酸具有有义链,所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96、193-272或363-365中任一者中所示的序列的至少12个(例如,至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个或至少23个)连续核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸具有有义链,所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96、193-272或363-365中任一者中所示的序列中的任一者的长度在7至36个核苷酸(例如,12至30、12至27、12至22、15至25、17至21、18至27、19-27、20-36或15至36个核苷酸)的范围内的核苷酸的连续序列。在一些实施方案中,寡核苷酸具有有义链,所述有义链包含如SEQ ID NO:1-96、193-272或363-365中任一者中所示的序列的核苷酸的连续序列,其长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸具有有义链,所述有义链由如SEQ ID NO:1-96、193-272或363-365中任一者中所示的序列组成。

[0114] 在一些实施方案中,有义链在其3'-末端包含茎-环。在一些实施方案中,有义链在其5'-末端包含茎-环。在一些实施方案中,包含茎环的链长度在2至66个核苷酸(例如,长度为2至66、10至52、14至40、2至30、4至26、8至22、12至18、10至22、14至26或14至30个核苷酸)的范围内。在一些实施方案中,包含茎环的链长度为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在一些实施方案中,茎包含长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个核苷酸的双链体。在一些实施方案中,茎-环为分子提供更好的针对降解(例如,酶促降解)的保护,并促进靶向特征用于递送至靶标细胞。例如,在一些实施方案中,环提供添加的核苷酸,可以对其进行修饰而基本上不影响寡核苷酸的基因表达抑制活性。在某些实施方案中,本文提供了寡核苷酸,其中有义链包含(例如,在其3'-末端)如下所示的茎-环: S_1-L-S_2 ,其中 S_1 与 S_2 互补,且其中L在 S_1 和 S_2 之间形成长度为最长达10个核苷酸(例如,长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸)的环。

[0115] 在一些实施方案中,茎-环的环(L)是四环(例如,在带切口的四环结构内)。四环可以含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、修饰的核苷酸及其组合。通常,四环具有4至5个核苷酸。然而,在一些实施方案中,四环包含3至6个核苷酸或由其组成,且通常由4至5个核苷酸组成。在某些实施方案中,四环包含三个、四个、五个或六个核苷酸或由其组成。

[0116] iv. 寡核苷酸修饰

寡核苷酸可以以各种方式修饰以改进或控制特异性、稳定性、递送、生物利用度、免于核酸酶降解的抗性、免疫原性、碱基-配对特性、RNA分布和细胞摄取以及与治疗或研究用途相关的其他特征。参见,例如,Bramsen等人, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 2867-2881; Bramsen和Kjems (*Frontiers in Genetics*, 3 (2012): 1-22)。因此,在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸可以包括一种或多种合适的修饰。在一些实施方案中,修饰的核苷酸在其碱基(或核碱基)、糖(例如,核糖、脱氧核糖)或磷酸酯基团中具有修饰。

[0117] 寡核苷酸上的修饰的数目和那些核苷酸修饰的位置可以影响寡核苷酸的特性。例如,寡核苷酸可能通过将它们缀合至脂质纳米颗粒(LNP)或类似载体或将它们包封在脂质纳米颗粒(LNP)或类似载体中而在体内递送。然而,当寡核苷酸不被LNP或类似载体保护时,其核苷酸中的至少一些被修饰可以是有利的。因此,在本文提供的任何寡核苷酸的某些实

施方案中,寡核苷酸的所有或基本上所有核苷酸都被修饰。在某些实施方案中,所述核苷酸的多于一半被修饰。在某些实施方案中,所述核苷酸的少于一半被修饰。通常,在裸递送的情况下,每种糖都在2'-位置被修饰。这些修饰可以是可逆的或不可逆的。在一些实施方案中,如本文公开的寡核苷酸具有一定数量和类型的修饰核苷酸,并且足以引起期望的特征(例如,免于酶促降解的保护,在体内施用后靶向期望细胞的能力和/或热力学稳定性)。

[0118] a. 糖修饰

在一些实施方案中,修饰的糖(本文也称为糖类物)包括修饰的脱氧核糖或核糖部分,例如,其中一个或多个修饰发生在所述糖的2'、3'、4'和/或5'碳位置处。在一些实施方案中,修饰的糖还可以包括非天然替代碳结构,诸如存在于以下中的那些:锁定核酸("LNA")(参见,例如,Koshkin等人(1998), Tetrahedron 54, 3607-3630), 未锁定核酸("UNA")(参见,例如,Snead等人(2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2, e103)和桥连的核酸("BNA")(参见,例如,Imanishi和Obika(2002), The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun., 1653-1659)。Koshkin等人,Snead等人以及Imanishi和Obika对于其涉及糖修饰的公开内容通过引用并入本文。

[0119] 在一些实施方案中,糖中的核苷酸修饰包含2'-修饰。2'-修饰可以是2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯核糖核酸。通常,所述修饰是2'-氟、2'-O-甲基或2'-O-甲氧基乙基。在一些实施方案中,糖中的修饰包含糖环的修饰,其可以包含糖环的一个或多个碳的修饰。例如,核苷酸的糖的修饰可以包含糖的2'-氧,其与所述糖的1'-碳或4'-碳连接,或2'-氧经由亚乙基或亚甲基桥与1'-碳或4'-碳连接。在一些实施方案中,修饰的核苷酸具有无环糖,所述无环糖缺乏2'-碳至3'-碳键。在一些实施方案中,修饰的核苷酸具有巯基,例如,在所述糖的4'位置。

[0120] 在一些实施方案中,具有磷酸酯基团或其他基团的末端3'-末端基团(例如,3'-羟基),其可用于例如连接接头、衔接子或标记物,或用于将寡核苷酸直接连接至另一核酸。

[0121] b. 5'末端磷酸酯

在一些实施方案中,寡核苷酸的5'-末端磷酸酯基团增强与Argonaut 2的相互作用。然而,包含5'-磷酸酯基团的寡核苷酸可易于经由磷酸酶或其他酶降解,其可以限制它们在体内的生物利用度。在一些实施方案中,寡核苷酸包括对这种降解有抗性的5'磷酸酯的类似物。在一些实施方案中,磷酸酯类似物可以是氧基甲基磷酸酯、乙烯基磷酸酯或丙二酰基磷酸酯。在某些实施方案中,寡核苷酸链的5'末端连接至模拟天然5'-磷酸酯基团的静电和空间特性的化学部分("磷酸酯模拟物")(参见,例如,Prakash等人(2015), Nucleic Acids Res., Nucleic Acids Res. 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011,其涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文)。已经开发可以连接至5'末端的许多磷酸酯模拟物(参见,例如,美国专利号8,927,513,其涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文)。已经对于寡核苷酸的5'末端开发其他修饰(参见,例如,WO 2011/133871,其涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文)。在某些实施方案中,羟基基团连接至寡核苷酸的5'末端。

[0122] 在一些实施方案中,寡核苷酸在所述糖的4'-碳位置处具有磷酸酯类似物(被称为"4'-磷酸酯类似物")。参见,例如,在2016年9月2日提交的题为4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same的美国临时申请号62/383,207,和在2016年9月12日提交的题为4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same的

美国临时申请号62/393,401,其各自涉及磷酸酯类似物的内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸在5'-末端核苷酸处包含4'-磷酸酯类似物。在一些实施方案中,磷酸酯类似物是其中氧基甲基基团的氧原子与糖部分(例如,在其4'-碳处)结合的氧基甲基磷酸酯或其类似物。在其他实施方案中,4'-磷酸酯类似物是其中硫代甲基基团的硫原子或氨基甲基基团的氮原子与糖部分的4'-碳结合的硫代甲基磷酸酯或氨基甲基磷酸酯或其类似物。在某些实施方案中,4'-磷酸酯类似物是氧基甲基磷酸酯。在一些实施方案中,氧基甲基磷酸酯由式 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 或 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 代表,其中R独立地选自H、CH₃、烷基基团、CH₂CH₂CN、CH₂OCOC(CH₃)₃、CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃或保护基团。在某些实施方案中,所述烷基基团是CH₂CH₃。更通常,R独立地选自H、CH₃或CH₂CH₃。

[0123] c. 修饰的核苷内键

在一些实施方案中,磷酸酯修饰或取代可以导致寡核苷酸包含至少一个(例如,至少1个、至少2个、至少3个或至少5个)修饰的核苷酸内键。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸中的任一种包含1至10个(例如,1至10个、2至8个、4至6个、3至10个、5至10个、1至5个、1至3个或1至2个)修饰的核苷酸内键。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸中的任一种包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个修饰的核苷酸内键。

[0124] 修饰的核苷酸内键可以是二硫代磷酸酯键、硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、硫羰烷基磷酸酯键、硫羰烷基磷酸三酯键、亚磷酰胺键、磷酸酯键或硼酸磷酸酯键。在一些实施方案中,如本文所公开的寡核苷酸中的任一种的至少一个修饰的核苷酸内键是硫代磷酸酯键。

[0125] d. 碱基修饰

在一些实施方案中,本文提供的寡核苷酸具有一个或多个修饰的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基(在本文中也称为碱基类似物)在核苷酸糖部分的1'位置处连接。在某些实施方案中,修饰的核碱基是含氮碱基。在某些实施方案中,修饰的核碱基不含氮原子。参见例如,美国公开专利申请号20080274462。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含通用碱基。然而,在某些实施方案中,修饰的核苷酸不含核碱基(无碱基)。

[0126] 在一些实施方案中,通用碱基是位于修饰的核苷酸中的核苷酸糖部分的1'位置或核苷酸糖部分取代中的等效位置处的杂环部分,当存在于双链体中时,其可以相对多于一种类型的碱基定位,而基本上不改变双链体的结构。在一些实施方案中,相比于与靶标核酸完全互补的参考单链核酸(例如,寡核苷酸),含有通用碱基的单链核酸与靶标核酸形成双链体,其具有比与互补核酸形成的双链体更低的T_m。然而,在一些实施方案中,与其中通用碱基已被碱基替换以生成单个错配的参考单链核酸相比,含有通用碱基的单链核酸与靶标核酸形成双链体,其具有比与包含错配碱基的核酸形成的双链体更高的T_m。

[0127] 通用结合核苷酸的非限制性实例包括肌苷、1-β-D-核糖呋喃糖基-5-硝基吡咯和/或1-β-D-核糖呋喃糖基-3-硝基吡咯(Quay等人的美国专利申请公开号20070254362;Van Aerschot等人, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes等人, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes和Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4039-43。前述各自对于其涉及碱基修饰的公开内容通过引用并入本文)。

[0128] e. 可逆修饰

尽管可以进行某些修饰以保护寡核苷酸在到达靶标细胞之前不受体内环境的影响,但一旦寡核苷酸到达靶标细胞的胞质溶胶,靶标细胞就可以降低寡核苷酸的功效或活性。可以进行可逆修饰,使得所述分子在细胞外部保留期望的特性,其然后在进入细胞的胞质溶胶环境后被除去。可逆修饰可以例如通过细胞内酶的作用或通过细胞内的化学条件(例如通过由细胞内谷胱甘肽还原)除去。

[0129] 在一些实施方案中,可逆修饰的核苷酸包含谷胱甘肽敏感性部分。通常,核酸分子已经用环状二硫醚(disulfide)部分化学修饰以掩蔽由核苷酸间二磷酸酯键产生的负电荷,并改善细胞摄取和核酸酶抗性。参见最初转让给Traversa Therapeutics, Inc. (“Traversa”)的美国公开申请号2011/0294869,转让给Solstice Biologics, Ltd. (“Solstice”)的PCT公开号W0 2015/188197, Meade等人, *Nature Biotechnology*, 2014, 32:1256-1263 (“Meade”), 转让给Merck Sharp & Dohme Corp的PCT公开号W0 2014/088920, 其各自对于其对于此类修饰的公开内容而通过引用并入。这种核苷酸间二磷酸酯键的可逆修饰被设计成通过胞质溶胶的还原环境(例如谷胱甘肽)而在细胞内裂解。较早的实例包括中和磷酸三酯修饰,据报道其可在细胞内切割(Dellinger等人 *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125:940-950)。

[0130] 在一些实施方案中,这种可逆修饰允许在体内施用期间保护(例如,通过血液和/或细胞的溶酶体/内体隔室转运),其中所述寡核苷酸将暴露于核酸酶和其他严酷的环境条件(例如,pH)。当释放至细胞的胞质溶胶(其中谷胱甘肽的水平与细胞外空间相比更高)中时,修饰被逆转,且结果是切割的寡核苷酸。使用可逆的谷胱甘肽敏感性部分,与使用不可逆化学修饰可得的选项相比,可以将空间上更大的化学基团引入目标寡核苷酸中。这是因为这些较大的化学基团将在胞质溶胶中被除去,且因此不应干扰细胞的胞质溶胶内寡核苷酸的生物活性。作为结果,可以将这些较大的化学基团工程改造以为核苷酸或寡核苷酸赋予各种优点,诸如核酸酶抗性、亲脂性、电荷、热稳定性、特异性和降低的免疫原性。在一些实施方案中,可以将谷胱甘肽敏感性部分的结构工程改造以修改其释放的动力学。

[0131] 在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分连接至核苷酸的糖。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分连接至修饰的核苷酸的糖的2' 碳。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于糖的5'-碳,尤其是当修饰的核苷酸是所述寡核苷酸的5'-末端核苷酸时。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于糖的3'-碳,尤其是当修饰的核苷酸是所述寡核苷酸的3'-末端核苷酸时。在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基基团。参见,例如,美国临时申请号62/378,635,题为Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereof,其在2016年8月23日提交,且其内容对于其相关公开内容通过引用并入本文。

[0132] v. 靶向配体

在一些实施方案中,可期望将本公开的寡核苷酸靶向至一个或多个细胞或一个或多个器官。这种策略可以帮助避免在其他器官中的不期望的作用,或者可以避免寡核苷酸过度地损失给对于寡核苷酸不受益的细胞、组织或器官。因此,在一些实施方案中,可以修饰本文公开的寡核苷酸以促进靶向特定组织、细胞或器官,例如,促进寡核苷酸递送至肝脏。在某些实施方案中,可以修饰本文公开的寡核苷酸以促进寡核苷酸递送至肝脏的肝细胞。在

一些实施方案中,寡核苷酸包含与一个或多个靶向配体缀合的核苷酸。

[0133] 靶向配体可以包含碳水化合物、氨基糖、胆固醇、肽、多肽、蛋白或蛋白的部分(例如,抗体或抗体片段)或脂质。在一些实施方案中,靶向配体是适体。例如,靶向配体可以是用于靶向肿瘤脉管系统或神经胶质瘤细胞的RGD肽,用于靶向肿瘤脉管系统或气门(stoma)的CREKA肽,靶向CNS脉管系统上表达的转铁蛋白受体的转铁蛋白(transferring)、乳铁蛋白或适体,或靶向神经胶质瘤细胞上的EGFR的抗EGFR抗体。在某些实施方案中,所述靶向配体是一个或多个GalNAc部分。

[0134] 在一些实施方案中,寡核苷酸的1个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个)核苷酸各自缀合至分开的靶向配体。在一些实施方案中,寡核苷酸的2至4个核苷酸各自缀合至分开的靶向配体。在一些实施方案中,靶向配体缀合至有义或反义链的任一末端的2至4个核苷酸(例如,配体缀合至有义或反义链的5'或3'末端的2至4个核苷酸的突出端或延伸段),使得所述靶向配体类似于牙刷的刷毛,且所述寡核苷酸类似于牙刷。例如,寡核苷酸可以包含有义链的5'或3'末端的茎-环,并且所述茎的环的1、2、3或4个核苷酸可以单独地缀合至靶向配体。

[0135] 在一些实施方案中,期望将降低HMGB1的表达的寡核苷酸靶向至受试者的肝脏的肝细胞。任何合适的肝细胞靶向部分都可用于该目的。

[0136] GalNAc是脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的高亲和力配体,所述脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)主要表达在肝细胞的血窦表面上并且在含有末端半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺残基的循环糖蛋白(脱唾液酸糖蛋白)的结合、内化和随后的清除中具有主要作用。GalNAc部分与本公开的寡核苷酸的缀合(间接或直接)可用于将这些寡核苷酸靶向至在这些肝细胞上表达的ASGPR。

[0137] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸直接或间接缀合至单价GalNAc。在一些实施方案中,所述寡核苷酸直接或间接缀合至多于一个单价GalNAc(即,缀合至2、3或4个单价GalNAc部分,并且通常缀合至3或4个单价GalNAc部分)。在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸缀合至一个或多个二价GalNAc、三价GalNAc或四价GalNAc部分。

[0138] 在一些实施方案中,寡核苷酸的1个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个)核苷酸各自缀合至GalNAc部分。在一些实施方案中,所述茎-环的环(L)的2至4个核苷酸各自缀合至分开的GalNAc。在一些实施方案中,靶向配体缀合至有义或反义链的任一末端的2至4个核苷酸(例如,配体缀合至有义或反义链的5'或3'末端的2至4个核苷酸的突出端或延伸段),使得所述GalNAc部分类似于牙刷的刷毛,且所述寡核苷酸类似于牙刷。例如,寡核苷酸可以包含有义链的5'或3'末端的茎-环,并且所述茎的环的1、2、3或4个核苷酸可以单独地缀合至GalNAc部分。在一些实施方案中,GalNAc部分缀合至有义链的核苷酸。例如,四个GalNAc部分可以缀合至有义链的四环中的核苷酸,其中每个GalNAc部分缀合至一个核苷酸。

[0139] 可以使用任何适当的方法或化学法(例如,点击化学法)来将靶向配体连接至核苷酸。在一些实施方案中,使用点击接头将靶向配体缀合至核苷酸。在一些实施方案中,基于缩醛的接头用于将靶向配体缀合至本文所述的寡核苷酸中的任一种的核苷酸。基于缩醛的接头例如公开于2016年6月23日公开的国际专利申请公开号W02016100401 A1,并且其涉及此类接头的内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,所述接头是不稳定的接头。然而,在其他实施方案中,所述接头是相当稳定的。

[0140] 在一些实施方案中,在靶向配体(例如,GalNAc部分)和双链寡核苷酸之间提供双

链体延伸段(例如,长度最多达3、4、5或6个碱基对)。

[0141] III. 制剂

已经开发了各种制剂以促进寡核苷酸使用。例如,可以使用使降解最小化、促进递送和/或摄取或为制剂中的寡核苷酸提供另一种有益特性的制剂将寡核苷酸递送至受试者或细胞环境。在一些实施方案中,本文提供了包含寡核苷酸(例如,单链或双链寡核苷酸)以降低HMGB1的表达的组合物。可以合适地配制此类组合物,使得当施用于受试者(至靶标细胞的直接环境中或全身性地)时,足够部分的寡核苷酸进入细胞以降低HMGB1表达。各种合适的寡核苷酸制剂中的任一种可用于递送寡核苷酸用于减少HMGB1,如本文所公开。在一些实施方案中,将寡核苷酸配制于缓冲溶液、诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和壳体(capsids)中。

[0142] 具有阳离子脂质的寡核苷酸的制剂可用于促进寡核苷酸转染至细胞中。例如,可以使用阳离子脂质,诸如脂转染试剂(lipofectin),阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子(例如,聚赖氨酸)。合适的脂质包括Oligofectamine、Lipofectamine (Life Technologies)、NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.)或FuGene 6 (Roche),其全部可以根据制造商的说明使用。

[0143] 因此,在一些实施方案中,制剂包含脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,赋形剂包含脂质体、脂质、脂质复合物、微球、微粒、纳米球或纳米颗粒,或者可以以其他方式配制用于向有此需要的受试者的细胞、组织、器官或身体施用(参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第22版, Pharmaceutical Press, 2013)。

[0144] 在一些实施方案中,如本文所公开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂向组合物赋予活性成分的提高了的稳定性、提高了的吸收、提高了的溶解度和/或治疗性增强。在一些实施方案中,赋形剂是缓冲剂(例如,柠檬酸钠、磷酸钠、tris碱或氢氧化钠)或媒介物(例如,缓冲溶液、矿脂、二甲基亚砷或矿物油)。在一些实施方案中,将寡核苷酸冻干用于延长其保质期,且然后在使用(例如,施用于受试者)之前制成溶液。因此,包含本文所述的寡核苷酸中的任一种的组合物中的赋形剂可以是冻干保护剂(例如,甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或塌陷温度改变剂(例如,葡聚糖、ficoll或明胶)。

[0145] 在一些实施方案中,将药物组合物配制为与其意欲的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。

[0146] 适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖,多元醇诸如甘露醇、山梨醇、氯化钠。无菌可注射溶液可以通过如下来制备:将所需量的寡核苷酸与所需的以上列举的成分中的一种或组合并入选择的溶剂中,随后进行过滤灭菌。

[0147] 在一些实施方案中,组合物可以含有至少约0.1%或更多的治疗剂(例如,用于降低HMGB1表达的寡核苷酸),尽管一种或多种活性成分的百分比可以在总组合物的重量或体积

的约1% 80%或更多之间。制备此类药物制剂的领域中的技术人员将考虑因素诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用的途径、产品保质期以及其他药理学考量,并且因此各种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0148] 即使许多实施方案涉及本文公开的任何寡核苷酸的肝脏靶向递送,也考虑靶向其他组织。

[0149] IV. 使用方法

i. 降低细胞中的HMGB1表达

在一些实施方案中,提供了用于降低细胞中的HMGB1的表达而向细胞递送有效量的本文公开的寡核苷酸中的任一种的方法。本文提供的方法可用于任何适当的细胞类型中。在一些实施方案中,细胞是表达HMGB1的任何细胞(例如,肝细胞,巨噬细胞,单核细胞衍生的细胞,前列腺癌细胞,脑、内分泌组织、骨髓、淋巴结、肺、胆囊、肝、十二指肠、小肠、胰腺、肾、胃肠道、膀胱、脂肪以及软组织和皮肤的细胞)。在一些实施方案中,所述细胞是原代细胞,其已经从受试者获得,且可能已经经历有限数目的世代,使得所述细胞基本上维持天然表型特性。在一些实施方案中,向其递送所述寡核苷酸的细胞是离体的或体外的(即,可以递送至培养物中的细胞或所述细胞驻留的生物)。在具体实施方案中,提供了用于降低肝细胞中的HMGB1的表达的目的而向细胞递送有效量的本文公开的寡核苷酸中的任一种的方法。

[0150] 在一些实施方案中,可以使用适当的核酸递送方法引入本文公开的寡核苷酸,所述核酸递送方法包括注射含有所述寡核苷酸的溶液,通过由所述寡核苷酸覆盖的颗粒轰击,将细胞或生物暴露于含有所述寡核苷酸的溶液或在所述寡核苷酸存在的情况下细胞膜的电穿孔。可以使用用于将寡核苷酸递送至细胞的其他适当的方法,诸如脂质介导的载体转运,化学品介导的转运和阳离子脂质体转染诸如磷酸钙和其他。

[0151] 可以通过评估细胞或受试者的一种或多种特性的适当测定法或通过评估指示HMGB1表达(例如, RNA、蛋白)的分子的生物化学技术来证实抑制的后果。在一些实施方案中,通过比较HMGB1的表达水平(例如, mRNA或蛋白水平)与适当对照(例如,未向其递送寡核苷酸或已向其递送阴性对照的细胞或细胞群体中的HMGB1表达的水平)来评估本文提供的寡核苷酸降低HMGB1的表达的水平的程度。在一些实施方案中, HMGB1表达的适当对照水平可以是预定水平或值,使得不需要每次测量对照水平。预定水平或值可以采用各种形式。在一些实施方案中,预定水平或值可以是单一截止值,诸如中值或平均值。

[0152] 在一些实施方案中,如本文所述的寡核苷酸的施用导致细胞中的HMGB1表达的水平降低。在一些实施方案中, HMGB1表达的水平降低可以是与HMGB1的适当对照水平相比降低至1%或更低、5%或更低、10%或更低、15%或更低、20%或更低、25%或更低、30%或更低、35%或更低、40%或更低、45%或更低、50%或更低、55%或更低、60%或更低、70%或更低、80%或更低或90%或更低。适当的对照水平可以是未与如本文所述的寡核苷酸接触的细胞或细胞群体中的HMGB1表达的水平。在一些实施方案中,在有限的时间段之后评价根据本文公开的方法将寡核苷酸递送至细胞的效果。例如,可以在将所述寡核苷酸引入细胞后至少8小时、12小时、18小时、24小时;或至少一、二、三、四、五、六、七或十四天分析细胞中的HMGB1的水平。

[0153] 在一些实施方案中,寡核苷酸以转基因的形式递送,所述转基因被工程改造为在细胞中表达所述寡核苷酸(例如,其有义和反义链)。在一些实施方案中,使用经工程改造以

表达本文公开的任何寡核苷酸的转基因递送寡核苷酸。可以使用病毒载体(例如,腺病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、痘病毒、腺相关病毒或单纯疱疹病毒)或非病毒载体(例如,质粒或合成的mRNA)递送转基因。在一些实施方案中,转基因可以直接注射给受试者。

[0154] ii. 治疗方法

本公开的方面涉及用于降低HMGB1表达用于减轻受试者中的肝纤维化的发作或进展的方法。在一些实施方案中,所述方法可以包括向有此需要的受试者施用有效量的本文公开的寡核苷酸中的任一种。此类治疗可用于例如减缓或停止任何类型的肝纤维化。本公开提供了治疗处于与肝纤维化和/或肝炎症相关的疾病或病症的风险中(或易患与肝纤维化和/或肝炎症相关的疾病或病症)的受试者的预防和治疗的方法。

[0155] 在某些方面,本公开提供了用于通过向受试者施用治疗剂(例如,寡核苷酸或编码其的载体或转基因)来预防受试者中的如本文所述的疾病或病症的方法。在一些实施方案中,待治疗的受试者是将例如肝脏中的HMGB1蛋白的量的减少在治疗上受益的受试者。可以通过例如本领域中已知的诊断或预后测定法中的一种或组合(例如,鉴定肝纤维化和/或肝炎症)来鉴定处于所述疾病或病症的风险中的受试者。预防剂的施用可以在所述疾病或病症特征性的症状的检测或表现之前进行,使得所述疾病或病症被预防或可替代地延迟其进展。

[0156] 本文所述的方法通常涉及向受试者施用有效量(即能够产生期望的治疗结果的量)的寡核苷酸。治疗上可接受的量可以是能够治疗疾病或病症的量。任一受试者的适当剂量将取决于某些因素,包括受试者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定组合物、组合物中的一种或多种活性成分、施用的时间和途径、总体健康和同时施用的其他药物。

[0157] 在一些实施方案中,经肠(例如,经口,通过胃喂食管,通过十二指肠喂食管,经由胃造口术或经直肠),肠胃外(例如,皮下注射,静脉内注射或输注,动脉内注射或输注,骨内输注,肌内注射,脑内注射,脑室内注射,囊内),局部(例如,表皮,吸入,经由滴眼或通过粘膜),或通过直接注射入靶标器官(例如,受试者的肝脏),向受试者施用本文公开的组合物中的任一种。通常,本文公开的寡核苷酸静脉内或皮下施用。

[0158] 作为一组非限制性实例,将通常每季度(每三个月一次)、每两个月(每两个月一次)、每个月或每周施用本公开的寡核苷酸。例如,可以每一、二或三周施用所述寡核苷酸。可以每天施用所述寡核苷酸。

[0159] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是人或非人灵长类动物或其他哺乳动物受试者。其他示例性受试者包括家养动物诸如狗和猫;牲畜诸如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;和动物诸如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

实施例

[0160] 实施例1:使用基于人和小鼠细胞的测定法开发HMGB1 RNAi寡核苷酸

图1显示使用基于人和小鼠的测定法来开发抑制HMGB1表达的候选RNAi寡核苷酸的工作流程。首先,使用基于计算机的算法来生成用于HMGB1抑制的候选寡核苷酸序列(25-27-聚体)。然后,基于细胞的测定法和PCR测定法用于评估候选RNAi寡核苷酸的降低HMGB1表达的能力。

[0161] 计算机算法提供了与人HMGB1 mRNA (SEQ ID NO:371,表1)互补的RNAi寡核苷酸序

列,其中某些序列也与猴HMGB1 mRNA (SEQ ID NO:372,表1)和小鼠HMGB1 mRNA (SEQ ID NO:373,表1)互补。

[0162] 表1. 人、猕猴和小鼠HMGB1 mRNA的序列

物种	GenBank RefSeq #	序列标识符
人	NM_002128.5	SEQ ID NO:371
猴	NM_001283356.1	SEQ ID NO:372
小鼠	NM_010439.4	SEQ ID NO:373

[0163] 所述算法产生数百种RNAi寡核苷酸序列,其中96种寡核苷酸被生物信息学鉴定为用于基于细胞的测定法中的实验评估的最佳候选物。在该测定法中,用所述寡核苷酸转染表达HMGB1的Hepa 1-6 (ATCC® CRL-1830™)肝细胞。转染后将细胞维持一段时间,且然后使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问剩余HMGB1 mRNA的水平。使用两种qPCR测定法,3'测定法和5'测定法。所有96种RNAi寡核苷酸都使用相同的修饰模式(被称为M15)进行评估,所述修饰模式含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸和2'-O-甲基修饰的核苷酸的组合。测试的寡核苷酸的序列提供于表2中。

[0164] 表2. 基于小鼠Hepa 1-6细胞的测定法的候选寡核苷酸序列

Hs	Rh	Mm	有义 SEQ ID NO	对应的反义 SEQ ID NO
X	X	X	1-11; 24-43; 54-69; 96	97-107; 120-139; 150-165; 192
X	X		12-23; 53; 70; 71; 73-75; 89-93; 95	108-119; 149; 166; 167; 169-171; 185-189; 191
X			44-52	140-148

Hs:人,Rh:猕猴,和Mm:小鼠;有义和反义SEQ ID NO列提供杂交以制成每种寡核苷酸的有义链和相应的反义链。例如,具有SEQ ID NO:1的有义链与具有SEQ ID NO:97的反义链杂交;测试的寡核苷酸各自具有相同的修饰模式。

[0165] HMGB1 mRNA中的热点

来自96种候选RNAi寡核苷酸的筛选的数据显示于图3A-3D中。选择在基于细胞的测定法中导致与阴性对照相比剩余小于或等于25% mRNA的表现最佳的寡核苷酸作为命中物用于进一步实验表征。未发现抑制HMGB1表达的寡核苷酸用作阴性对照。管家基因次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 用作HMGB1表达的归一化基因,因为通过抑制HMGB1的表达不改变其表达。

[0166] 通过检查这些寡核苷酸的活性和位置来鉴定人HMGB1 mRNA中的热点。热点被鉴定为与至少两种寡核苷酸相关的人HMGB1 mRNA序列上的延伸段,导致在任一测定法中,mRNA水平与对照相比小于或等于25%。因此,鉴定人HMGB1 mRNA序列内的以下热点:935-965;1100-1130;1160-1215;1230-1270;1470-1500;1680-1710;2190-2220;和2280-2310。

[0167] 热点的序列概述于表3中。

[0168] 表3. 热点的序列

热点位置	序列	SEQ ID NO:
935-965	TAAGATTTGTTTTTAAACTGTACAGTGTCTT	374
1100-1130	TTGGTGACAGCACAAATTAGTTATATATGG	375
1160-1215	TCTGATGCAGCTTATACGAAATAATTGTTGTTCTGTTA ACTGAATACCACTCTGTA	376
1230-1270	AAAAAAGTTGCAGCTGTTTTGTTGACATTCTGAATGCT TCT	377
1470-1500	TGAGATAGTTTTTCATCCATAACTGAACATCC	378
1680-1710	TACCATGTAATGGCAGTTATATTTTGCAGTT	379
2190-2220	TTTACACGCTTTTGTGATGGAGTGCTGTTTT	380
2280-2310	AATACTGAACATCTGAGTCCTGGATGATACT	381

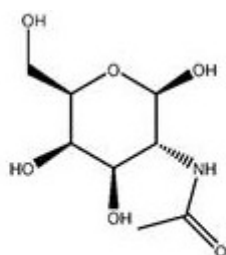
[0169] 剂量应答分析

考虑基因位置和物种之间的序列保守性,选择二十四种表现最佳的RNAi寡核苷酸用于次级筛选中的分析。在该次级筛选中,使用与初级筛选中相同的测定法测试RNAi寡核苷酸,但以三种不同浓度(1 nM、0.1nM和0.01nM)(图4)。然后对在两种更多浓度下显示活性的那些RNAi寡核苷酸进行进一步分析。

[0170] 在来自次级筛选的最佳候选物的该进一步分析中,将所述序列以带切口的四环结构形式(36-聚体过客链与22-聚体引导链)并入RNAi寡核苷酸。最初在1nM测试带切口的四环结构形式的这些RNAi寡核苷酸的降低HMGB1 mRNA表达的能力。图5显示由具有带切口的四环结构(其各自经调整为四种不同的修饰模式,命名为M28、M47、M48和M52)的不同碱基序列制成的RNAi寡核苷酸的数据,所述RNAi寡核苷酸在其有义和反义链中包含呈不同排列的2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸以及硫代磷酸酯和磷酸二酯键,并且在其反义链中包括位于5'末端核苷酸的磷酸酯类似物和未修饰的对照(称为M46)。在Hepa1-6细胞中使用全剂量应答曲线进一步测试最佳RNAi寡核苷酸以测定每种化合物的半数最大抑制浓度(IC₅₀)(参见图6)。

[0171] 体内鼠实验

评价来自上述体外实验的数据,以鉴定将改进递送特性、同时维持用于降低小鼠肝细胞中的HMGB1表达的活性的四环和修饰模式。基于该分析,然后将选择的寡核苷酸缀合至GalNAc部分。将单价GalNAc部分缀合至有义链的四环中的GAAA序列的每个核苷酸,如图2中所举例说明。使用点击接头进行缀合。使用的GalNAc如下所示:



N-乙酰基-β-D-半乳糖胺(CAS#: 14131-60-3)

将GalNAc-缀合的具有不同修饰模式和带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸的组以10 mg/kg皮下施用于C57BL/6小鼠。在72小时测量HMGB1 mRNA与HPRT对照mRNA相比的百分比(图7)。

[0172] 使用基于TAQMAN®的qPCR测定法,再次以三种不同剂量(0.3 mg/kg、1 mg/kg和3 mg/kg)测试三种候选GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的寡核苷酸的寡核苷酸施用后24小时剩余的HMGB1 mRNA的量,其与PBS对照相比(图8)。

[0173] 选择所述RNAi寡核苷酸中的两种用于以3 mg/kg或3 mg/kg和10 mg/kg使用不同修饰模式进一步测试。再次,使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问寡核苷酸施用后72小时剩余的HMGB1 mRNA与PBS对照相比的百分比(分别为图9和图10)。测试呈表示为M49、M54、M55、M56的不同修饰模式的寡核苷酸,所述寡核苷酸在其有义和反义链中包含呈不同排列的2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸和硫代磷酸酯和磷酸二酯键,并且在其反义链中包括位于5'末端核苷酸处的磷酸酯类似物。

[0174] 对于具有不同修饰的相同序列的寡核苷酸(图11)以及保留相同修饰模式的不同序列的寡核苷酸,测定1 mg/kg皮下剂量的GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1 RNAi寡核苷酸后第5天剩余的HMGB1 mRNA(与PBS对照相比)的百分比。

[0175] 还测试三重共有序列连同仅在人HMGB1基因中鉴定的序列(“人独特物”)在用所述RNAi寡核苷酸流体动力注射的小鼠(HDI小鼠)中的活性。简言之,经7秒通过尾静脉向小鼠静脉内注射2 mL含有人HMGB1和新霉素(NEOMYCIN)质粒的溶液。在HDI注射前四天,将1 mg/kg RNAi寡核苷酸皮下注射至每只小鼠中。随后使用基于TAQMAN®的qPCR测定法测定剩余的HMGB1 mRNA的百分比(针对NEO-168归一化)。这些结果表明,与仅结合人独特序列的选择的寡核苷酸相比,与选自先前筛选的三重共有序列互补的RNAi寡核苷酸更强烈地下调HMGB1表达。

[0176] 实施例2:肝毒性剂的模型中的治疗的评估

在APAP-诱导的(对乙酰氨基酚-诱导的)肝损伤的模型中进一步测试实施例1中鉴定的候选RNAi寡核苷酸。已知对乙酰氨基酚被代谢并形成活性代谢物N-乙酰基-对-苯醌亚胺(NAPQI)。NAPQI结合线粒体蛋白以形成NAPQI蛋白加合物,导致肝细胞坏死。

[0177] 模型1 - APAP

将10只C57BL/6雄性小鼠(10-11周龄)的组禁食12小时,然后以0.9 % NaCl腹膜内注射施用250或350 mg/kg APAP。在6、24和48小时收集血液和/或肝组织。该研究的终点测量是定量肝脏损伤(ALT、AST和GLDH-DEXX水平)、分析生物标志物的概况(通过ELISA、Western印迹和RT-qPCR的血清/肝脏HMGB1水平和miR122水平)和肝脏染色(H&E、HMGB1、Ly6-B和F4/800染色)。参见图12中的示意图。

[0178] 图13A和13B显示用350 mg/kg APAP治疗的动物的肝脏(针对Hprt1归一化)和血清(mg/mL)中剩余的HMGB1相比于盐水对照注射的百分比。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问HMGB1 mRNA水平。GalNAc缀合的含有带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸和在脂质纳米颗粒制剂中提供的RNAi寡核苷酸(LNP配制的RNAi寡核苷酸)下调>80% HMGB1 mRNA。然而,仅在HMGB1-LNP治疗的动物中显著降低血清HMGB1。在图13A-13B中描绘的实验中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0179] 还在用350 mg/kg APAP治疗的动物中进行肝功能测试(LFT)。这些实验还表明根

据LNP配制和GalNAc缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸中的血清AST、ALT和miR122水平的肝毒性的降低,其中当使用LNP配制的RNAi寡核苷酸时看到的降低更大(参见图14A-14C)。在图14A-14C中描绘的实验中的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0180] 模型2 - APAP

在使用APAP毒性的模型的第二项研究中,将10只C57BL/6雄性小鼠(10-11周龄)的组禁食12小时,然后以0.9 % NaCl腹膜内注射施用350 mg/kg APAP。在APAP施用之前,将动物用5 mg/kg GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸或1.5 mg/kg LNP配制的RNAi寡核苷酸治疗多次。在APAP施用后24小时收集血液和/或肝脏组织。该研究的终点测量是定量肝脏损伤(ALT、AST和GLDH-*IDEXX*水平)、分析生物标志物的概况(通过ELISA和RT-qPCR的血清/肝脏HMGB1水平和miR122水平)和肝脏染色(H&E和HMGB1免疫组织化学)。参见图15中显示的示意图。

[0181] 图16A-16B显示用350 mg/kg APAP治疗的动物的肝脏(针对Hprt1归一化)和血清(mg/mL)中剩余的HMGB1相比于盐水对照注射的百分比。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问HMGB1 mRNA水平。GalNAc缀合的含有带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸和LNP配制的RNAi寡核苷酸在肝脏中下调>80% *HMGB1* mRNA。使用GalNAc缀合的含有带切口的四环结构的RNAi寡核苷酸和LNP配制的RNAi寡核苷酸两者,也显著降低血清HMGB1。在图16A-16B中描绘的实验中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M56。

[0182] 进一步,在APAP-治疗的小鼠中测量ALT、AST、LDH和血清miR122水平,并表明GalNAc缀合或LNP配制的HMGB1寡核苷酸的施用抑制肝脏损伤(参见图17A-17D)。在图17A-17D中描绘的实验中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M56。

[0183] 总体地,使用APAP毒性模型的研究表明,当与对照动物相比时,HMGB1寡核苷酸治疗的动物具有降低的HMGB1血清水平和肝脏损伤。

[0184] 模型3 -四氯化碳

通过腹膜内施用,向小鼠组施用3 μ l/g体重的与橄榄油混合的四氯化碳(CCl₄:橄榄油,以1:5 v/v比率)或橄榄油对照溶液,每周两次,持续六周。如表4和图18中所示,根据研究设计,将动物随机化至所示组中,并且不治疗或经由皮下(S.C.)或静脉内(I.V.)注射用GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸或PBS治疗,每周一次,持续5或6周。

组	CCl ₄	治疗	剂量(mg/kg)	体积(ml/kg)	开始给药	给药的频率和天数	小鼠数	途径
1	橄榄油	-	-	-	-	-	10	-
2	CCl ₄	PBS	0	10	第-4天	qw x 6周	10	S.C.
3	CCl ₄	GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	5	10	第11天	qw x 5周	10	S.C.
4	CCl ₄	GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	5	10	第-4天	qw x 6周	10	S.C.
5	CCl ₄	LNP HMGB1寡核苷酸	2.5	10	第-4天	qw x 6周	10	I.V.

[0185] 表4:组名称和化合物给药时间表。

[0186] 在研究结束时,在小鼠中检查指示肝脏损伤的几种参数。当与PBS-治疗的动物相比时,在HMGB1 RNAi寡核苷酸-治疗的动物的两组中,在纤维化(使用天狼星红染色)以及巨噬细胞浸润和活化(使用用针对作为小鼠巨噬细胞标志物的F4/80蛋白特异性的抗体的免疫组织化学分析)两者中均看到显著降低。使用图19-22中显示的较长给药方案数据,在星形细胞活化(通过 α -SMA染色测量)和肝肿大(使用肝脏重量与体重比率测量)中也看到显著降低。该研究中使用的HMGB1 RNAi寡核苷酸被鉴定为S212-AS296-M49,并且具有在GAAA环

的四个核苷酸位置各自处缀合的单价GalNAc部分。

[0187] 另外,在注射后43天使用天狼星红染色检查来自如上用四氯化碳治疗的动物的肝脏。这些实验揭示,GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1 RNAi寡核苷酸的施用(以5 mg/kg皮下剂量或2.5 mg/kg静脉内剂量)显著降低肝脏样品中的相对天狼星红-阳性面积,表明这些动物中的肝脏纤维化显著降低(图23)。在图23中描绘的实验中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0188] 实施例3:自身免疫性肝病的模型中的治疗的评估

在皮下施用10 mg/kg GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸或PBS后六天,将五只C57BL/6雄性小鼠(10-11周龄)的两组用20 mg/kg静脉内伴刀豆球蛋白(concavalin) A治疗。伴刀豆球蛋白(concavalin) A施用后一天,检查动物的ALT和AST血清水平以及肝脏的H&E染色(实验示意图显示于图24中)。图25表明,当用GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1 RNAi寡核苷酸治疗时,与PBS相比,动物存活的可能性为三倍。进一步,与PBS对照相比,存活的HMGB1寡核苷酸-治疗的动物在肝脏的H&E染色的样品中具有更少的坏死。在图25中描绘的实验中使用的HMGB1寡核苷酸是S212-AS296-M49。

[0189] 实施例4:在胆碱-缺乏的氨基酸限定的高脂饮食(CDAHFD)的模型中的治疗的评估

向C57BL/6小鼠喂食对照高脂饮食(CDHFD)或胆碱缺乏的氨基酸限定的高脂饮食(CDAHFD)和普通或糖水。CDAHFD具有比CDHFD更低的甲硫氨酸含量。作为甲硫氨酸含量的差异的结果,预期CDHFD生成脂肪变性,但预期其不生成在CDAHFD饮食中所见的NAFLD-样肝脏病理。如表5和6中所示,将动物不治疗,或在将小鼠置于高脂饮食上后六周开始,向动物施用PBS对照或5 mg/kg的GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1 RNAi寡核苷酸6周(皮下施用)。

[0190] 表5:用高脂对照饮食和普通或糖水治疗动物

治疗	饮食	#小鼠	尸检周
-	CDHFD + 普通水	5	6
-	CDHFD + 普通水	5	9
PBS	CDHFD + 普通水	5	12
GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	CDHFD + 普通水	5	12
-	CDHFD + 糖水	5	6
-	CDHFD + 糖水	5	9
PBS	CDHFD + 糖水	5	12
GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	CDHFD + 糖水	5	12

[0191] 表6:用胆碱缺乏的氨基酸限定的高脂肪饮食(CDAHFD)和普通或糖水治疗动物

治疗	饮食	#小鼠	尸检周
-	CDAHFD + 普通水	5	6
-	CDAHFD + 普通水	5	9
PBS	CDAHFD + 普通水	5	12
GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	CDAHFD + 普通水	5	12
-	CDAHFD + 糖水	5	6
-	CDAHFD + 糖水	5	9

PBS	CDAHFD + 糖水	5	12
GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸	CDAHFD + 糖水	5	12

[0192] 与CDHFD对照高脂饮食相比,食用胆碱缺乏的氨基酸限定的高脂饮食(CDAHFD)的小鼠中的HMGB1 mRNA升高(图26A和26B)。进一步,相对于单独的CDHFD,胶原蛋白1a1(Col1a1)和波形蛋白mRNA水平通过CDAHFD升高>100x(分别为图26C和26D)。GalNAc-缀合的含有带切口的四环结构的HMGB1寡核苷酸在治疗6周后表明这些标志物的显著降低。

[0193] 相对于食用对照高脂饮食(CDHFD)的小鼠,在食用CDAHFD的小鼠中的AST和ALT水平也升高(图27)。在治疗6周后,GalNAc-缀合的HMGB1 RNAi寡核苷酸表明这些标志物的中度降低。图26A-26D和27中使用的HMGB1寡核苷酸是S194-AS274-M30,在有义和反义链中包含呈不同排列的2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸和硫代磷酸酯和磷酸二酯键,并且在其反义链中包括位于5'末端核苷酸处的磷酸酯类似物。

[0194] 实施例5. 测试额外HMGB1寡核苷酸的活性

在该实施例中使用的所有额外的HMGB1寡核苷酸被设计为结合通过算法在人、猴(两种猕猴)和小鼠序列中鉴定的保守序列(“三重共有”序列)。如实施例1中所述修饰额外的HMGB1寡核苷酸以含有四环并调整不同的修饰模式。不同的修饰模式(例如,称为M58、M59、M60或M61)在其有义和反义链中包含呈不同排列的2'-氟和2'-O-甲基修饰的核苷酸和硫代磷酸酯和磷酸二酯键,并且在其反义链中包括位于5'末端核苷酸处的磷酸酯类似物。所述寡核苷酸抑制剂也缀合至GalNAc部分。将三个GalNAc部分缀合至有义链的四环中的核苷酸。如实施例1中所述使用点击接头进行缀合。然后测试GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸的降低小鼠中和体外在培养的肝细胞中的HMGB1 mRNA表达的能力。

[0195] 测试八种不同的GalNAc-缀合的具有三种不同的修饰模式(表示为M58、M59和M60)的HMGB1寡核苷酸(S204-AS286、S205-AS287、S210-AS366、S211-AS367、S363-AS368、S364-AS369、S212-AS296和S365-AS370)的敲低HMGB1的功效。将一个单一剂量(1 mg/kg)的具有特定修饰模式的指定HMGB1寡核苷酸皮下注射至CD-1小鼠中。注射后5天将小鼠安乐死,并获得肝脏样品。从肝脏样品提取RNA,以通过qPCR评估HMGB1 mRNA水平(针对HPRT1-F576(管家基因)归一化)。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问剩余的HMGB1 mRNA的水平。所有测试的HMGB1寡核苷酸和修饰模式在敲低HMGB1中都是有效的,其中修饰模式M59和M60表现出更高的功效(图28)。

[0196] 还对6种GalNAc缀合的具有不同修饰模式(M58、M59或M60)的HMGB1寡核苷酸(S204-AS286、S205-AS287、S211-AS367、S364-AS369、S212-AS296和S365-AS370)进行证实性剂量-应答测定。将单一剂量(1、0.5或0.25 mg/kg)的指定GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸皮下施用于CD-1小鼠。在施用后第5天将小鼠安乐死,并获得肝脏样品。提取RNA,以通过qPCR评估HMGB1 mRNA水平(针对HPRT1-F576(管家基因)归一化)。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问剩余的HMGB1 mRNA的水平。在该实验中,PBS用作阴性对照,且S204-AS286-M61用作阳性对照。几乎所有测试的HMGB1寡核苷酸抑制剂都表明剂量依赖性的功效(图29A和29B)。与S204-AS286-M61对照相比,测试的HMGB1寡核苷酸抑制剂中的一些显示提高的功效(图29A和29B)。对于S204-AS286-M59、S211-AS367-M59、S364-AS369-M60和S365-AS370-M59重复证实性剂量-应答测定。获得相似的结果,并且,如果非肝细胞中的HMGB1表达水平被认为是表达基线,则所有测试的HMGB1寡核苷酸抑制剂都显示约0.5至1.0 mg/kg的ED₅₀(图

31A和31B)。

[0197] 在持续时间研究中在体内测试两种GalNAc-缀合的具有不同修饰模式(分别表示为M59和M60)的HMGB1寡核苷酸(S211-AS367-M59、S364-AS369-M60),以评估其抑制小鼠中的HMGB1表达的活性。在该实验中,PBS用作阴性对照,且S204-AS286-M58用作阳性对照。向小鼠皮下注射单一剂量(1 mg/kg)的指定的GalNAc缀合的HMGB1寡核苷酸。注射后第7、14、21和28天将小鼠安乐死,并获得肝脏样品。提取RNA,以通过qPCR评估HMGB1 mRNA水平(针对HPRT1-F576(管家基因)归一化)。使用对HMGB1 mRNA中的不同区域特异性的两种不同引物进行qPCR。使用相对于另一引物的5'末端的引物进行的qPCR被称为“5' qPCR”。类似地,使用相对于另一引物的3'末端的引物进行的qPCR被称为“3' qPCR”。数据显示,注射后3周,所有测试的HMGB1寡核苷酸都在敲低HMGB1中是有效的,如第7、14、21和28天小鼠肝脏中剩余的HMGB1 mRNA的减少量所示(针对PBS对照治疗归一化)(图30A和30B)。

[0198] 选择在图31A和31B中测试的所有HMGB1寡核苷酸抑制剂(S204-AS286-M59、S211-AS367-M59、S364-AS369-M60和S365-AS370-M59)以在3-周持续时间研究中进一步测试。在该研究中,将单一剂量(4 mg/kg)的指定HMGB1寡核苷酸抑制剂皮下注射至CD-1小鼠中。注射后21天将小鼠安乐死,并获得肝脏样品。提取RNA,以通过qPCR评估HMGB1 mRNA水平(针对HPRT1-F576(管家基因)归一化)。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问剩余的HMGB1 mRNA的水平。结果显示,在注射后3周,所有测试的HMGB1寡核苷酸抑制剂都保留敲低HMGB1的效力(图32A和32B)。

[0199] 在猕猴或人肝细胞中使用全剂量应答曲线进一步测试某些GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸以测定每种抑制剂的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。将人原代肝细胞(HPCH10+,批号1410214,Cryopreserved Xenotech)或猴原代肝细胞(P2000.H15,批号1410285,Cryopreserved Xenotech)解冻并以50000个细胞(人)或100000个细胞(猴)/孔铺板于96-孔组织培养板中的OptiPlate肝细胞培养基(K8200)中。使铺板的肝细胞在37℃和5% CO₂下恢复1-6 h,且随后使用OptiCulture肝细胞培养基(K8300)进行维持。将五倍连续稀释的(7-次)GalNAc-缀合的HMGB1寡核苷酸(S204-AS286-M61和S365-AS370-M59)添加至细胞中。所述寡核苷酸至猴或人原代肝细胞中的摄取由ASGPR受体介导。将细胞在37℃和5% CO₂下孵育48h。使用SV 96总RNA分离系统(Promega)从细胞提取RNA,以通过qPCR评估剩余的HMGB1 mRNA水平(针对RhPPIB或HsSFRS9和HsPI08(管家基因)归一化)。使用基于TAQMAN®的qPCR测定法询问剩余的HMGB1 mRNA的水平。将GalNAc-缀合物LDHA寡核苷酸用作测定对照(图33C、33F、33G、34C、34F、34G),并且通过RhLDHA-F887 qPCR测定法测量剩余的LDHA mRNA的水平(图33G和34G)。

[0200] 结果显示,HMGB1寡核苷酸抑制剂在敲低原代小鼠肝细胞中的HMGB1中是有效的(亚nM IC₅₀值),如亚nM至nM IC₅₀值所表明(图33A、33B、33D和33E)。在原代人肝细胞中观察到相似的敲低功效,如亚nM IC₅₀值所表明(图34A、34B、34D和34E)。

[0201] 材料和方法

转染

对于第一次筛选,使用Lipofectamine RNAiMAX™来复合寡核苷酸用于有效转染。将寡核苷酸、RNAiMAX和Opti-MEM添加至板中,并在室温下孵育20分钟,然后转染。从正在活跃传代细胞的烧瓶吸出培养基,并将细胞在37℃下在胰蛋白酶存在的情况下孵育3-5分钟。细胞

不再粘附至烧瓶之后,添加细胞生长培养基(缺乏青霉素和链霉素)以中和胰蛋白酶并悬浮细胞。取出10 μ L等分试样,并用血细胞计数器计数,以基于每毫米定量细胞。对于HeLa细胞,每孔将20,000个细胞接种于100 μ L培养基中。将悬浮液用已知的细胞浓度稀释以获得待转染所述数目的细胞所需的总体积。将稀释的细胞悬浮液添加至96孔转染板中,所述96孔转染板已经在Opti-MEM中含有所述寡核苷酸。然后将转染板在37℃下孵育24小时。孵育24小时之后,从每个孔吸出培养基。使用来自Promega RNA分离试剂盒的裂解缓冲液裂解细胞。将裂解缓冲液添加至每个孔中。然后将裂解的细胞转移至Corbett XtractorGENE (QIAxtractor)用于RNA分离或储存在-80℃。

[0202] 对于随后的筛选和实验,例如二级筛选,使用Lipofectamine RNAiMAX以复合所述寡核苷酸用于反向转染。通过在OptiMEM培养基中混合RNAiMAX和siRNA 15分钟来制备复合物。将转染混合物转移至多孔板,并将细胞悬浮液添加至孔中。在孵育24小时之后,将细胞用PBS洗涤一次,且然后使用来自Promega SV96试剂盒的裂解缓冲液进行裂解。在真空歧管中使用SV96板纯化RNA。然后将四微升纯化的RNA在65℃下加热5分钟并冷却至4℃。然后在10微升反应中使用高容量逆转录试剂盒(Life Technologies)将RNA用于逆转录。然后用无核酸酶的水将cDNA稀释至50 μ l,并用于用多重化5' -核酸内切酶测定和SSoFast qPCR主要混合物(Bio-Rad laboratories)进行定量PCR。

[0203] cDNA合成

使用Corbett X-tractor Gene™ (QIAxtractor)从组织培养物中的哺乳动物细胞分离RNA。修改的SuperScript II方案用于从分离的RNA合成cDNA。将分离的RNA(近似5 ng/ μ L)加热至65℃,持续5分钟,并且与dNP、随机六聚体、寡聚dT和水孵育。将混合物冷却15秒。将由水、5X第一链缓冲液、DTT、SUPERase·In™ (RNA抑制剂)和SuperScript II RTase组成的“酶混合物”添加至混合物中。使用热循环仪,将内容物加热至42℃,持续1小时,然后加热至70℃,持续15分钟,且然后冷却至4℃。然后将所得cDNA进行基于SYBR®的qPCR。qPCR反应是多重化的,每个反应含有两次5' 核酸内切酶测定。

[0204] qPCR测定

最初使用基于SYBR®的qPCR筛选引物组。通过评价解链曲线和“减去RT”对照来验证测定特异性。分别使用来自HeLa和Hepa1-6细胞的cDNA模板的稀释液(每个反应从20 ng且至0.02 ng进行10-倍连续稀释液)来测试人(Hs)和小鼠(Mm)测定。将qPCR测定设置在384-孔板中,用MicroAmp膜覆盖,并在来自Applied Biosystems的7900HT上运行。试剂浓度和循环条件包括以下:2x SYBR混合物、10 μ M正向引物、10 μ M反向引物、DD H₂O和cDNA模板,直至10 μ L的总体积。

[0205] 在一些情况下,如所示,使用基于TAQMAN®的qPCR测定法进行qPCR。靶向靶标mRNA(例如HMGB1)的编码区域内的两个不同位置(在彼此的5' 和3')的TAQMAN®探针通常用于在分析中提供mRNA水平的额外证实。

[0206] 克隆

根据制造商的说明将展现单一解链曲线的PCR扩增子连接至来自Promega的pGEM®-T Easy载体试剂盒中。遵循制造商的方案,用新连接的载体转化JM109高效细胞。然后将细胞铺板在含有氨苄青霉素的LB板上,并在37℃下孵育过夜用于菌落生长。

[0207] PCR筛选和质粒小量制备

将PCR用于鉴定已经用含有连接的目标扩增子的载体转化的大肠杆菌的菌落。在PCR反应中使用侧接插入物的载体特异性引物。然后将所有PCR产物在1%琼脂糖凝胶上运行,并在染色后通过透照仪成像。对凝胶进行定性评价,以确定哪些质粒看起来含有预期大小的连接的扩增子(近似300 bp,包括对于所用引物特异性的扩增子和侧接载体序列)。

[0208] 然后将通过PCR筛选证实为转化体的菌落在由2mL含有氨苄青霉素的LB液体培养基组成的培养物中在37℃下在振荡下孵育过夜。然后裂解大肠杆菌细胞,并使用Promega的小量制备试剂盒分离目标质粒。通过260 nm处的UV吸光度测定质粒浓度。

[0209] 质粒测序和定量

使用BigDye® 终止剂测序试剂盒对纯化的质粒进行测序。使用载体特异性引物T7来得到跨越插入物的阅读长度。在测序反应中使用以下试剂:水、5X测序缓冲液、BigDye终止剂混合物、T7引物和质粒(100 ng/μL),至10 μL的体积。将混合物在96℃下保持1分钟,然后进行15个循环的96℃持续10秒、50℃持续5秒、60℃持续1分钟15秒;5个循环的96℃持续10秒、50℃持续5秒、60℃持续1分钟30秒;和5个循环的96℃持续10秒、50℃持续5秒和60℃持续2分钟。然后使用Applied Biosystems的毛细管电泳测序仪对染料终止反应进行测序。

[0210] 然后定量序列验证的质粒。将它们使用单一切割限制性核酸内切酶线性化。使用琼脂糖凝胶电泳证实线性。在TE缓冲液(pH 7.5)中用100 μg tRNA/mL缓冲液制成所有质粒稀释液,以减少质粒与聚丙烯小瓶的非特异性结合。

[0211] 然后将线性化的质粒从1,000,000拷贝/μL连续稀释至01拷贝/μL,并进行qPCR。计算测定效率,并且如果效率在90-110%的范围内,则该测定被视为可接受。

[0212] 多重化测定

对于每种靶标,通过两种5' 核酸酶测定法定量mRNA水平。通常,针对每种靶标筛选几种测定法。选择的两种测定法展现良好的效率、低检测限值以及目标基因(GOI)的宽5' →3' 覆盖范围的组合。当在相应探针上使用不同的荧光团时,两种针对一种GOI的测定法可以组合在一个反应中。因此,测定验证的最后步骤是确定选择的测定法当它们在相同qPCR中组合或“多重化”时的效率。

[0213] 将10倍稀释液中的两种测定法的线性化质粒组合,并进行qPCR。如上所述测定每种测定法的效率。接受的效率为90-110%。

[0214] 当使用线性化的质粒标准物验证多重化反应时,还使用cDNA作为模板评价目标靶标的C_q值。对于人或小鼠靶标,分别使用HeLa和Hepa1-6 cDNA。在这种情况下,cDNA衍生自Corbett上从未转染细胞分离的RNA(在水中~5 ng/μl)。以该方式,从该样品cDNA观察到的C_q值代表来自96-孔板转染的预期C_q值。在其中C_q值大于30的情况下,寻求表现出目标基因的更高表达水平的其他细胞系。生成在Corbett上经由高通量方法从每种人和小鼠系分离的总RNA的文库,并用于针对靶标表达的可接受水平进行筛选。

[0215] 寡核苷酸命名法的描述

本文所述的所有寡核苷酸都被命名为任一SN₁-ASN₂-MN₃。以下名称适用:

- N₁: 有义链序列的序列标识符编号
- N₂: 反义链序列的序列标识符编号
- N₃: 修饰模式的参考编号,其中每个编号代表寡核苷酸中的修饰核苷酸的模式。

[0216] 例如,S27-AS123-M15代表具有由SEQ ID NO:27所示的有义序列、由SEQ ID NO:

123所示的反义序列且适合于修饰模式编号15的寡核苷酸。

[0217] 表7:HMGB1 RNAi寡核苷酸序列

有义(S)- 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S1-AS97	AGAUUUGUUUUUAAACUG UACAGTG	1	CACUGUACAGUUUA AAAACAAAUCUUA	97
S2-AS98	GUACAGUGUCUUUUUUUG UAUAGTT	2	AACUAUACAAAAAA AGACACUGUACAG	98
S3-AS99	ACAGUGUCUUUUUUUGUA UAGUUA	3	UUAACUAUACAAAA AAAGACACUGUAC	99
S4-AS100	AGUGUCUUUUUUUGUAUA GUUAACA	4	UGUUAACUAUACAA AAAAAGACACUGU	100
S5-AS101	GUGUCUUUUUUUGUAUAG UUAACAC	5	GUGUUAACUAUACA AAAAAGACACUG	101
S6-AS102	GGUGGUAUUUUCAAUAGC CACUAAC	6	GUUAGUGGCUAUU GAAAAUACCACCAG	102
S7-AS103	GUAUUUUCAAUAGCCACU AACCUTG	7	CAAGGUUAGUGGCU AUUGAAAAUACCA	103
S8-AS104	GUGCACAGCACAUAUAG UUAUATA	8	UAUAUAACUAAUU UGUGCUGGCACCA	104
S9-AS105	GUUGUCUCUGAUGCAGCU UAUACGA	9	UCGUUAUAGCUGCA UCAGAGACAACUG	105
S10-AS106	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAUAAT	10	AUUAUUUCGUUAU AGCUGCAUCAGAGA	106
S11-AS107	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAUAATT	11	AAUUAUUUCGUUA AAGCUGCAUCAGAG	107
S12-AS108	GAUGCAGCUUAUACGAAA UAAUUGT	12	ACAAUUAUUUCGUA UAAGCUGCAUCAG	108
S13-AS109	AUGCAGCUUAUACGAAAU AAUUGTT	13	AACAAUUAUUUCGU AUAAGCUGCAUCA	109
S14-AS110	GCAGCUUAUACGAAAUAA UUGUUGT	14	ACAACAUAUUUUUC GUUAUAGCUGCAU	110
S15-AS111	CAGCUUAUACGAAAUAAU UGUUGTT	15	AACAACAUAUUUU CGUAUAAGCUGCA	111
S16-AS112	AGCUUAUACGAAAUAAU GUUGUTC	16	GAACAACAUAUUU UCGUUAUAGCUGC	112
S17-AS113	GCUUAUACGAAAUAAUUG UUGUUCT	17	AGAACAACAUAUU UUCGUUAUAGCUG	113
S18-AS114	UACGAAUAAUUGUUGUU CUGUUA	18	UUAACAGAACAACA AUUAUUUCGUUAU	114
S19-AS115	ACGAAUAAUUGUUGUUC UGUUAAC	19	GUUAACAGAACAAC AAUUAUUUCGUUAU	115
S20-AS116	CGAAUAAUUGUUGUUCU GUUAAC	20	AGUUAACAGAACA CAAUUAUUUCGUA	116
S21-AS117	GAAUAAUUGUUGUUCUG UUAAC	21	CAGUUAACAGAACA ACAUAUUUUUCGU	117
S22-AS118	AAUAAUUGUUGUUCUGU UAACUGA	22	UCAGUUAACAGAAC AACAAUUAUUUCG	118
S23-AS119	AAUAAUUGUUGUUCUGU AACUGAA	23	UUCAGUUAACAGAA CAACAUAUUUUUC	119
S24-AS120	AUAAUUGUUGUUCUGUA ACUGAAT	24	AUUCAGUUAACAGA ACAACAUAUUUU	120

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S25-AS121	UAAUUGUUGUUCUGUAA CUGAATA	25	UAUUCAGUUAACAG AACAACAAUUAUU	121
S26-AS122	AAUUGUUGUUCUGUAAAC UGAAUAC	26	GUUUUCAGUUAACA GAACAACAAUUAU	122
S27-AS123	AUUGUUGUUCUGUAAACU GAAUACC	27	GGUAAUUCAGUUAAC AGAACAACAAUUA	123
S28-AS124	UUGUUGUUCUGUUAACUG AAUACCA	28	UGGUUUUCAGUUA ACAGAACAACAAU	124
S29-AS125	UGUUGUUCUGUUAACUGA AUACCAC	29	GUGGUUUUCAGUU AACAGAACAACAAU	125
S30-AS126	GUUGUUCUGUUAACUGAA UACCACT	30	AGUGGUUUUCAGU UAAACAGAACAACA	126
S31-AS127	UUGUUCUGUUAACUGAAU ACCACTC	31	GAGUGGUUUUCAG UUAACAGAACAACA	127
S32-AS128	GUUCUGUUAACUGAAUAC CACUCTG	32	CAGAGUGGUUUUCA GUUAACAGAACA	128
S33-AS129	UGUUAACUGAAUACCACU CUGUAAT	33	AUUACAGAGUGGU AUUCAGUUAACAGA	129
S34-AS130	GUUAACUGAAUACCACUC UGUAATT	34	AAUUACAGAGUGG UAUUCAGUUAACAG	130
S35-AS131	UUAACUGAAUACCACUCU GUAUTG	35	CAAUUACAGAGUGG UAUUCAGUUAACA	131
S36-AS132	UAACUGAAUACCACUCUG UAAUUGC	36	GCAAUUACAGAGUG GUUUUCAGUUAAC	132
S37-AS133	AACUGAAUACCACUCUGU AAUUGCA	37	UGCAAUUACAGAGU GGUAAUUCAGUUA	133
S38-AS134	ACUGAAUACCACUCUGUA AUUGCAA	38	UUGCAAUUACAGAG UGGUAAUUCAGUUA	134
S39-AS135	CUGAAUACCACUCUGUAA UUGCAA	39	UUUGCAAUUACAGA GUGGUUUUCAGUU	135
S40-AS136	UGAAUACCACUCUGUAAU UGCAAAA	40	UUUUUGCAAUUACAG AGUGGUUUUCAGU	136
S41-AS137	GAAUACCACUCUGUAAUU GCAAAA	41	UUUUUGCAAUUACA GAGUGGUUUUCAG	137
S42-AS138	AAUACCACUCUGUAAUUG CAAAAA	42	UUUUUUGCAAUUAC AGAGUGGUUUUCA	138
S43-AS139	AUACCACUCUGUAAUUGC AAAAAA	43	UUUUUUUGCAAUU ACAGAGUGGUUUUC	139
S44-AS140	AUGCAGCUUAUACGAAGA UAAUUGT	44	ACAAUUAUCUUCGU AUAAGCUGCAUCA	140
S45-AS141	UGCAGCUUAUACGAAGAU AAUUGTT	45	AACAAUUAUCUUCG UAUAAGCUGCAUC	141
S46-AS142	GCAGCUUAUACGAAGAU AUUGUTG	46	CAACAAUUAUCUUC GUUAAGCUGCAU	142
S47-AS143	CAGCUUAUACGAAGAUAA UUGUUGT	47	ACAACAAUUAUCUU CGUAUAAGCUGCA	143
S48-AS144	GCUUAUACGAAGAUAAU GUUGUTC	48	GAACAACAAUUAUC UUCGUUAAGCUG	144
S49-AS145	CUUAUACGAAGAUAAUUG UUGUUCT	49	AGACAACAAUUAU CUUCGUUAAGCU	145
S50-AS146	AUACGAAGAUAAUUGUUG UUCUGTT	50	AACAGAACAACAAU UAUCUUCGUUAUA	146

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S51-AS147	ACGAAGAUAAUUGUUGUU CUGUUA	51	UUAACAGAACACA AUUAUCUUCGUAU	147
S52-AS148	CGAAGAUAAUUGUUGUUC UGUUAAC	52	GUUAACAGAACAC AAUUAUCUUCGUA	148
S53-AS149	GCAGCUGUUUUGUUGACA UUCUGAA	53	UUCAGAAUGUCAAC AAAACAGCUGCAA	149
S54-AS150	GCUGUUUUGUUGACAUUC UGAAUGC	54	GCAUUCAGAAUGUC AACAAAACAGCUG	150
S55-AS151	CUGUUUUGUUGACAUUCU GAAUGCT	55	AGCAUUCAGAAUGU CAACAAAACAGCU	151
S56-AS152	GUUUUGUUGACAUUCUGA AUGCUTC	56	GAAGCAUUCAGAAU GUCAACAAAACAG	152
S57-AS153	GUUGACAUUCUGAAUGCU UCUAAGT	57	ACUUAGAAGCAUUC AGAAUGUCAACAA	153
S58-AS154	GACAUUCUGAAUGCUUCU AAGUAAA	58	UUUACUUAGAAGCA UUCAGAAUGUCA	154
S59-AS155	ACAUUCUGAAUGCUUCUA AGUAAAT	59	AUUUACUUAGAAGC AUUCAGAAUGUCA	155
S60-AS156	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAAAUAC	60	GUUUUACUUAGA AGCAUUCAGAAUGU	156
S61-AS157	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAAUACA	61	UGUAUUUACUUAG AAGCAUUCAGAAUG	157
S62-AS158	UCUGAAUGCUUCUAAGUA AAUACAA	62	UUGUAUUUACUUA GAAGCAUUCAGAAU	158
S63-AS159	CUGAAUGCUUCUAAGUAA AUACAAT	63	AUUGUAUUUACUU AGAAGCAUUCAGAA	159
S64-AS160	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UACAATT	64	AAUUGUAUUUACU UAGAAGCAUUCAGA	160
S65-AS161	GAAUGCUUCUAAGUAAAU ACAAUTT	65	AAAUUGUAUUUAC UUAGAAGCAUUCAG	161
S66-AS162	AAUGCUUCUAAGUAAAUA CAAUUTT	66	AAAAUUGUAUUUA CUUAGAAGCAUUCA	162
S67-AS163	AUGCUUCUAAGUAAAUAC AAUUTT	67	AAAAAUUGUAUUU ACUUAGAAGCAUUC	163
S68-AS164	UGCUCUAAGUAAAUACA AUUUTT	68	AAAAAAUUGUAUU UACUUAGAAGCAUU	164
S69-AS165	GUUGUCCUUUUCAUAGGU CUGAAAT	69	AUUUCAGACCUAUG AAAAGGACAACAA	165
S70-AS166	UGAGAUAGUUUUCAUCCA UACUGA	70	UCAGUUAUGGAUG AAAACUAUCUCAAC	166
S71-AS167	GAGAUAGUUUUCAUCCA AACUGAA	71	UUCAGUUAUGGAU GAAAACUAUCUCA	167
S72-AS168	ACAUUUUCAUCCAUGUU GAAGAAT	72	AUUCUUCACUAUG GAUGAAAUGUUA	168
S73-AS169	CAUUUACAAACUGAAGAG UAAUCAA	73	UUGAUUACUCUUC GUUUGUAAAUGUA	169
S74-AS170	AUUUACAAACUGAAGAGU AAUCAAT	74	AUUGAUUACUCUUC AGUUUGUAAAUGU	170
S75-AS171	ACAAACUGAAGAGUAAUC AAUCUAC	75	GUAGAUUGAUUAC UCUUCAGUUUGUAA	171
S76-AS172	GUAAUGACAGUUAUUAUU UGCAGTT	76	AACUGCAAAUAUA ACUGUCAUUACAC	172

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S77-AS173	AAUGACAGUUAUUAUUUG CAGUUTC	77	GAAACUGCAAAAUA UAACUGUCAUUAC	173
S78-AS174	AAUACAAGACUGCUGUAC UAUUUGT	78	ACAAAUAGUACAGC AGUCUUGUAUUUU	174
S79-AS175	AUACAAGACUGCUGUACU AUUUGTT	79	AACAAAUAGUACAG CAGUCUUGUAUUU	175
S80-AS176	UACAAGACUGCUGUACUA UUUGUTG	80	CAACAAAUAGUACA GCAGUCUUGUAUU	176
S81-AS177	ACAAGACUGCUGUACUAU UUGUUGA	81	UCAACAAAUAGUAC AGCAGUCUUGUAU	177
S82-AS178	CAAGACUGCUGUACUAUU UGUUGAC	82	GUCAACAAAUAGUA CAGCAGUCUUGUA	178
S83-AS179	GACUGCUGUACUAUUUGU UGACCTT	83	AAGGUCAACAAUA GUACAGCAGUCUU	179
S84-AS180	ACUGCUGUACUAUUUGUU GACCUTA	84	UAAGGUCAACAAU AGUACAGCAGUCU	180
S85-AS181	GUGGUUUGUCCCUUAUG AAUCAGA	85	UCUGAUUCAUAAAG GGACAAACCACAG	181
S86-AS182	CAAUACAUUUGCUUUUC UUUAUAA	86	UUUAUAAAGAAAA GCAAAUGUAUUGG A	182
S87-AS183	AUACAUUUGCUUUUUCUU UAUAAAA	87	UUUUUAAAGAAA AAGCAAAUGUAUU G	183
S88-AS184	UGAUGGAGUGCUGUUAUA UAAUUTT	88	AAAAUUAUAUAAAC AGCACUCCAUCACA	184
S89-AS185	GAUGGAGUGCUGUUUUGU UAUAUAA	89	UUUAUAUACAAAAC AGCACUCCAUCAC	185
S90-AS186	AUGGAGUGCUGUUUUGUU AUUAUAT	90	AUUUAUAACAAA ACAGCACUCCAUCA	186
S91-AS187	GGAGUGCUGUUUUGUUAU AUAUUTT	91	AAAUUAUAUAACA AAACAGCACUCCA	187
S92-AS188	GAGUGCUGUUUUGUUAUA UAUUTA	92	UAAAUUAUAUAAAC AAACAGCACUCCA	188
S93-AS189	CUGUUUUGUUAUAAUU UAGACTT	93	AAGUCUAAAUUU AUAACAAACAGCA	189
S94-AS190	CAUUUGCGUUGUAAUGU AAUUUGA	94	UCAAAUUAUUAUAA CAACGCAAAUGUA	190
S95-AS191	AUGUAAUUUCAGGAGGAA UACUGAA	95	UUCAGUAUUCUCC UGAAAUUAUUAUAA	191
S96-AS192	GAGUCCUGGAUGAUACUA AUAACT	96	AGUUUAUUAUUAU CAUCCAGGACUCAG	192
S193-AS273	GUACAGUGUCUUUUUUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	193	UACAAAAAAGACA CUGUACGG	273
S194-AS274	ACAGUGUCUUUUUUUGUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	194	UAUACAAAAAAG ACACUGUGG	274
S195-AS275	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	195	UUCGUUAUAGCUGC AUCAGAGA	275
S195-AS361	UCUGAUGCAGCUUAUACG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	195	UTCUGUAUAGCUGC AUCAGAGA	361
S196-AS276	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUUCGUUAUAGCUG CAUCAGAG	276

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S196-AS277	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUUCGUAAUAGCUG CAUCAGGG	277
S196-AS278	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UUCGUAAUAGCUGC AUCAGGG	278
S196-AS362	CUGAUGCAGCUUAUACGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	196	UTUCGUAAUAGCTG CATCAGAG	362
S197-AS279	AUGCAGCUUAUACGAAAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	197	UUAUUUCGUAAUAA GCUGCAUGG	279
S198-AS280	GCAGCUUAUACGAAAUAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	198	UAUUUUUUCGUAAU AAGCUGCGG	280
S199-AS281	CAGCUUAUACGAAAUAAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	199	UAAUUUUUUCGUA UAAGCUGGG	281
S200-AS282	GCUUAUACGAAAUAAUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	200	UACAAUUAAUUUCGU AUAAGCGG	282
S201-AS283	AAAUAAUUGUUGUUCUGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	201	UAAACAGAACAAACA UUAUUUGG	283
S202-AS284	AAUAAUUGUUGUUCUGUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	202	UUAACAGAACAAACA AUUAUUGG	284
S203-AS285	AUUGUUGUUCUGUUAACU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	203	UCAGUUAACAGAAC AACAAUGG	285
S204-AS286	UUGUUGUUCUGUUAACUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	204	UUCAGUUAACAGAA CAACAAGG	286
S205-AS287	UGUUGUUCUGUUAACUGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	205	UUUCAGUUAACAGAA ACAACAGG	287
S206-AS288	GUUGUUCUGUUAACUGAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	206	UAUUCAGUUAACAG AACAAACGG	288
S207-AS289	AACUGAAUACCACUCUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	207	UUACAGAGUGGUA UUCAGUUGG	289
S208-AS290	CUGAAUACCACUCUGUAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	208	UAUUACAGAGUGG UAUUCAGGG	290
S209-AS291	AAUACCACUCUGUAAUUG CAGCAGCCGAAAGGCUGC	209	UGCAUUUACAGAGU GGUAUUGG	291
S210-AS292	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCAUU CAGAAUGU	292
S210-AS293	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCATU CAGAAUGT	293
S210-AS366	AUUCUGAAUGCUUCUAAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	210	UACUUAGAAGCAUU CAGAAUGG	366
S211-AS294	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UTACUUAGAAGCAU UCAGAAATG	294
S211-AS295	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UUACUUAGAAGCAU UCAGAAUG	295
S211-AS367	UUCUGAAUGCUUCUAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	211	UUACUUAGAAGCAU UCAGAAAGG	367
S212-AS296	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAA GCAUUCAGG	296
S212-AS297	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAA GCAUUCAGA	297
S212-AS298	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	AUUUACUUAGAAGC AUUCAGG	298
S212-AS299	UGAAUGCUUCUAAGUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	212	UAUUUACUUAGAA GCATUCAGA	299

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S213-AS300	GAAUGCUUCUAAGUAAAU ACGCAGCCGAAAGGCUGC	213	GUAUUUACUUAGA AGCAUUCAG	300
S213-AS301	GAAUGCUUCUAAGUAAAU ACGCAGCCGAAAGGCUGC	213	GTAUUUACUUAGAA GCAUTCAG	301
S214-AS302	AAUGCUUCUAAGUAAAU CAGCAGCCGAAAGGCUGC	214	UGUAUUUACUUAG AAGCAUUGG	302
S215-AS303	AUGCUUCUAAGUAAAUAC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	215	UUGUAUUUACUUA GAAGCAUGG	303
S216-AS304	UGAGAUAGUUUUAUCCA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	216	UAUGGAUGAAAAC UAUCUCAGG	304
S217-AS305	GAGAUAGUUUUAUCCA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	217	UUAUGGAUGAAAA CUAUCUCGG	305
S218-AS306	AUUUACAAACUGAAGAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	218	UUACUCUUCAGUUU GUAAAUGG	306
S219-AS307	AAUACAAGACUGCCAUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	219	UAAUAUGGCAGUCU UGUAUUGG	307
S220-AS308	AUACAAGACUGCCAUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	220	UUAUAUGGCAGUC UUGUAUGG	308
S221-AS309	UACAAGACUGCCAUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	221	UUUAAUAUGGCAG UCUUGUAGG	309
S222-AS310	CAAGACUGCCAUUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	222	UAUUUAAUAUGGC AGUCUUGGG	310
S223-AS311	AAGACUGCCAUUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	223	UAAUUUAAUAUGG CAGUCUUGG	311
S224-AS312	AGACUGCCAUUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	224	UAAUUUAAUAUG GCAGUCUGG	312
S225-AS313	GACUGCCAUUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	225	UAAAAUUUAAUAU GGCAGUCGG	313
S226-AS314	ACUGCCAUUUAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	226	UAAAAUUUAAUA UGGCAGUGG	314
S227-AS315	AGUAUGAAUUUUAUUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	227	UAAAUUGAAUAAU UCAUACUGG	315
S228-AS316	GUAUGAAUUUUAUUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	228	UUAAAUUGAAUAA UUCAUACGG	316
S229-AS317	GAUGGAGUGCUGUUUUGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	229	UAACAAAACAGCAC UCCAUCGG	317
S230-AS318	AUGGAGUGCUGUUUUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	230	UUAACAAAACAGCA CUCCAUGG	318
S231-AS319	GGAGUGCUGUUUUGUUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	231	UUUAUACAAAACAG CACUCCGG	319
S232-AS320	GAGUGCUGUUUUGUUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	232	UAUAUAACAAAACA GCACUCGG	320
S233-AS321	CUGUUUUGUUAUUAUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	233	UAAAUUAUAUAA AAAACAGGG	321
S234-AS322	UGCAGAGGUUUUAAAUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	234	UAGUAUUUAAAACC UCUGCAGG	322
S235-AS323	GCAGAGGUUUUAAAUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	235	UUAGUAUUUAAAA CCUCUGCGG	323
S236-AS324	CAGAGGUUUUAAAUA GAGCAGCCGAAAGGCUGC	236	UCUAGUAUUUAAA ACCUCUGGG	324
S237-AS325	GAGGUUUUAAAUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	237	UAACUAGUAUUUA AAACCUCGG	325

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S238-AS326	AGAUUUUGUUACAUAUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	238	UAAAAUAUGUAAC AAAAUCUGG	326
S239-AS327	AUUUUGUUACAUAUUUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	239	UUAAAAUAUGUA ACAAAAUGG	327
S240-AS328	AAAAUACUCACUUUAUGC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	240	UAGCAUAAAGUGA GUAUUUUGG	328
S241-AS329	AAAUACUCACUUUAUGCU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	241	UAAGCAUAAAGUG AGUAUUUGG	329
S242-AS330	AAUACUCACUUUAUGCUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	242	UUAAGCAUAAAGU GAGUAUUGG	330
S243-AS331	AUAAAAGGUUUUGUCAAA CAGCAGCCGAAAGGCUGC	243	UGUUUGACAAAACC UUUAUUGG	331
S244-AS332	AGGUUUUGUCAAAACAUUG CAGCAGCCGAAAGGCUGC	244	UGCAAUGUUUGACA AAACCUGG	332
S245-AS333	GGUUUUGUCAAAACAUUGC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	245	UUGCAAUGUUUGAC AAAACCGG	333
S246-AS334	GCAAGUAUUCGGUGCUAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	246	UUUAAGCACCGAAU ACUUGCGG	334
S247-AS335	AGAUGGAAGUUUCUACUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	247	UACAGUAGAAACUU CCAUCUGG	335
S248-AS336	AUGGAAGUUUCUACUGUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	248	UAUACAGUAGAAAC UCCAUGG	336
S249-AS337	GGAAGUUUCUACUGUAUA GAGCAGCCGAAAGGCUGC	249	UCUAUACAGUAGAA ACUCCGG	337
S250-AS338	GAAGUUUCUACUGUAUAG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	250	UUCUAUACAGUAGA AACUCCGG	338
S251-AS339	AAGUUUCUACUGUAUAGA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	251	UUUCUAUACAGUAG AAACUUGG	339
S252-AS340	AGUUUCUACUGUAUAGAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	252	UUUUCUAUACAGUA GAAACUGG	340
S253-AS341	CUACUGUAUAGAAAUCAC CAGCAGCCGAAAGGCUGC	253	UGGUGAUUUUCUAU ACAGUAGGG	341
S254-AS342	CUGUAUAGAAAUCACCAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	254	UAAUGGUGAUUUC UAUACAGGG	342
S255-AS343	GUCAUGACAACUACCAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	255	UAAAUGGUAGUUG UCAUGACGG	343
S256-AS344	GACAACUACCAUUUUUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	256	UUAAAAAAUUGGU AGUUGUCGG	344
S257-AS345	AGUUGGAUGUCUAAAACU CAGCAGCCGAAAGGCUGC	257	UGAGUUUUAGACA UCCAACUGG	345
S258-AS346	GUUGGAUGUCUAAAACUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	258	UUGAGUUUUAGAC AUCCAACGG	346
S259-AS347	GAUGUCUAAAACUCAAGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	259	UUACUUGAGUUUU AGACAUCGG	347
S260-AS348	GAUAAGUGUAAAGCCUUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	260	UACAAGGCUUUACA CUUAUCGG	348
S261-AS349	AUAAGUGUAAAGCCUUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	261	UUACAAGGCUUUAC ACUUAUGG	349
S262-AS350	GCCUUGUAAACUGAAGAUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	262	UUCAUCUUCAGUUA CAAGGCGG	350
S263-AS351	GUGUAUAGAAACUAUUUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	263	UUAAAAUAGUUUC UAUACACGG	351

有义(S) – 反义(AS)名称	有义序列/mRNA seq	S SEQ ID NO	反义序列	AS SEQ ID NO
S264-AS352	AAAGACUUUGUUGACAUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	264	UUGAUGUCAACAAA GUCUUUGG	352
S265-AS353	GAAGAUGCUUUUUAAAAC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	265	UAGUUUUAAAAAG CAUCUUCGG	353
S266-AS354	AAGAUGCUUUUUAAAACU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	266	UUAGUUUUAAAAA GCAUCUUGG	354
S267-AS355	GAGCUAUUGCUGAUUAGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	267	UAACUAAUCAGCAA UAGCUCGG	355
S268-AS356	GUGUUGUUAUGUUUGCU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	268	UCAGCAAACAUUAA CAACACGG	356
S269-AS357	GUUGUUAUGUUUGCUGU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	269	UUACAGCAAACAUU AACACGG	357
S270-AS358	UGUUAUGUUUGCUGUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	270	UAAUACAGCAAACA UUAACAGG	358
S271-AS359	GUUAAUGUUUGCUGUAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	271	UAAAUACAGCAAAC AUUACGG	359
S272-AS360	UUAUUGUUUGCUGUAUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	272	UUAAAUACAGCAAA CAUUAAGG	360
S363-AS368	UCUGAAUGCUUCUAAGUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	363	UUUACUUAGAAGCA UUCAGAGG	368
S364-AS369	CUGAAUGCUUCUAAGUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	364	UUUUACUUAGAAGC AUUCAGGG	369
S365-AS370	GAAUGCUUCUAAGUAAAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	365	UUAUUUACUUAGA AGCAUUCGG	370

[0218] 本文说明性描述的公开内容可以在本文未具体公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制不存在的情况下合适地实施。因此,例如,在本文每种情况下,术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的任一者可以用其他两个术语中的任一个替换。已经采用的术语和表述用作描述、而非限制的术语,并且此类术语和表述的使用并不意欲排除显示和描述的特征或其部分的任何等效方案,但应认识到,在请求保护的本发明的范围内可能存在各种修改。因此,应当理解,尽管优选实施方案已经具体公开了本发明,但本领域技术人员可以付诸本文公开的概念的任选的特征、修改和变异,并且此类修改和变异被认为在说明书和所附权利要求所限定的本发明的范围内。

[0219] 另外,在马库什组或替代方案的其他分组的方面来描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,还由此在马库什组或其他组的任何个别成员或成员的亚组的方面来描述本发明。

[0220] 在描述本发明的上下文中(尤其是在以下权利要求的上下文中)使用术语“一(a)”和“一(an)”和“该(the)”和类似参考物应被解释为涵盖单数和复数,除非本文以其他方式指明或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”被解释为开放式术语(即,意指“包括,但不限于”),除非另有说明。除非本文另有说明,本文的值的范围的记载仅仅意欲充当单独引用落入该范围内的每个单独值的简写方法,且每个单独值如同其在本文中单独记载地并入本说明书。本文所述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行,除非本文另有指明或另外与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅仅意欲更好地举例说明本发明,并且不构成对本发明的范围的限制,除非另有要求。本说明书中的任何语言都不应解释为指示对实施本发明必不可少的任何未请求保护的要素。

[0221] 本文描述了本发明的实施方案,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。阅读上述描述后,这些实施方案的变异对于本领域普通技术人员可变得显而易见。

[0222] 本发明人期望技术人员适当时采用此类变异,且本发明人意欲本发明以本文中具体描述不同的其他方式实施。因此,如适用法律所允许,本发明包括其随附权利要求中所述的主题的所有修改和等效方案。此外,本发明涵盖其所有可能的变异中的上述要素的任何组合,除非本文另有指明或另外与上下文明显矛盾。仅仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或者能够确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等效方案。此类等效方案意欲由以下权利要求涵盖。

	<110> Dicerna Pharmaceuticals, Inc.	
	<120> 用于抑制HMGB1表达的组合物和方法	
	<130> D0800.70002W000	
	<140> 未指定	
	<141> 与其伴随	
	<150> US 62/526,971	
	<151> 2017-06-29	
	<160> 381	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 1	
	agauuuguuu uuaaacugua cagtg	25
[0001]		
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 2	
	guacaguguc uuuuuuugua uagtt	25
	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 3	
	acagugucuu uuuuuguaua guuaa	25
	<210> 4	
	<211> 25	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 4	
	agugucuuuu uuuguauagu uaaca	25
	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 5	
	gugucuuuuu uuguauaguu aacac	25
	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 6	
	ggugguauuu ucaauagcca cuaac	25
	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 7	
	guauuuucaa uagccacuaa ccutg	25
	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 8	
	gugcacagca caaauuaguu auata	25

	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 9	
	guugucucug augcagcuua uacga	25
	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 10	
	ucugaugcag cuuauacgaa auaat	25
[0003]	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 11	
	cugaugcagc uuauacgaaa uaatt	25
	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 12	
	gaugcagcuu auacgaaaua auugt	25
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 13 augcagcuua uacgaaauaa uugtt	25
	<210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 14 gcagcuuaua cgaaauaaau guugt	25
	<210> 15 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0004]	<400> 15 cagcuuauac gaaauaaauug uugtt	25
	<210> 16 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 16 agcuuauacg aaauaaauugu ugutc	25
	<210> 17 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 17 gcuuauacga aaauaauguu guuct	25
	<210> 18 <211> 25	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 18	
	uacgaaauaa uuguuguucu guuaa	25
	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 19	
	acgaaauaau uguuguucug uuaac	25
	<210> 20	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 20	
	cgaaauaauu guuguucugu uaact	25
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 21	
	gaaauaauug uguucuguu aactg	25
	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 22	
	aaauaauugu uguucuguua acuga	25

	<210>	23	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	23	
		aaauuuuguu guucuguuaa cugaa	25
	<210>	24	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	24	
		auuuuuuguug uucuguuaac ugaat	25
[0006]	<210>	25	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	25	
		uaauuguugu ucuguuaacu gaata	25
	<210>	26	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	26	
		aauguuguu cuguuaacug aauc	25
	<210>	27	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 27 auuguuguuc uguuaacuga auacc	25
	<210> 28 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 28 uuguuguucu guuaacugaa uacca	25
	<210> 29 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0007]	<400> 29 uguuguucug uuaacugaa accac	25
	<210> 30 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 30 guuguucugu uaacugaa cact	25
	<210> 31 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 31 uuguucugu aacugaa cactc	25
	<210> 32 <211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 32	
	guucuguuaa cugaauacca cuctg	25
	<210> 33	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 33	
	uguuaacuga auaccacucu guaat	25
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 34	
	guuaacugaa uaccacucug uaatt	25
	<210> 35	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 35	
	uuaacugaau accacucugu aautg	25
	<210> 36	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 36	
	uaacugaaua ccacucugua auugc	25

	<210> 37	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 37	
	aacugaaauac cacucuguaa uugca	25
	<210> 38	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 38	
	acugaaauacc acucuguaau ugcaa	25
[0009]	<210> 39	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 39	
	cugaauacca cucuguaauu gcaaa	25
	<210> 40	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 40	
	ugaauaccac ucuguaauug caaaa	25
	<210> 41	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 41 gaauaccacu cuguauuugc aaaaa	25
	<210> 42 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 42 aaauaccacuc uguauuugca aaaaa	25
	<210> 43 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0010]	<400> 43 auaccacucu guauuugcaa aaaaa	25
	<210> 44 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 44 augcagcuua uacgaagaua auugt	25
	<210> 45 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 45 ugcagcuuau acgaagauaa uugtt	25
	<210> 46 <211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 46	
	gcagcuuaua cgaagauaau ugutg	25
	<210> 47	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 47	
	cagcuuauac gaagauaau guugt	25
	<210> 48	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 48	
	gcuuauacga agauaaugu ugutc	25
	<210> 49	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 49	
	cuuauacgaa gauaauguu guuct	25
	<210> 50	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 50	
	auacgaagau aauguuguu cugtt	25

	<210> 51	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 51	
	acgaagauaa uuguuguucu guuaa	25
	<210> 52	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 52	
	cgaagauaau uguuguucug uuaac	25
[0012]	<210> 53	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 53	
	gcagcuguuu uguugacauu cugaa	25
	<210> 54	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 54	
	gcuguuuugu ugacauucug aaugc	25
	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 55 cuguuuuguu gacauucuga augct	25
	<210> 56 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 56 guuuuguuga cauucugaau gcutc	25
	<210> 57 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0013]	<400> 57 guugacauuc ugaaugcuuc uaagt	25
	<210> 58 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 58 gacauucuga augcuucuaa guaaa	25
	<210> 59 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 59 acauucugaa ugcuucuaag uaaat	25
	<210> 60 <211> 25	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 60	
	auucugaaug cuucuaagua aauac	25
	<210> 61	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 61	
	uucugaaugc uucuaaguaa auaca	25
	<210> 62	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0014]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 62	
	ucugaaugcu ucuaaguaaa uacaa	25
	<210> 63	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 63	
	cugaaugcuu cuaaguaaau acaat	25
	<210> 64	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 64	
	ugaaugcuuc uaaguaaaau caatt	25

	<210> 65	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 65	
	gaaugcuucu aaguaauac aautt	25
	<210> 66	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 66	
	aaugcuucua aguaauaca auutt	25
[0015]	<210> 67	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 67	
	augcuucuaa guaaauaca uuutt	25
	<210> 68	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 68	
	ugcuucuaag uaaauacaau uuutt	25
	<210> 69	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 69 guuguccuuu ucauaggucu gaaat	25
	<210> 70 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 70 ugagauaguu uucauccaua acuga	25
	<210> 71 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0016]	<400> 71 gagauaguuu ucauccauaa cugaa	25
	<210> 72 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 72 acauuuucau ccuaguuga agaat	25
	<210> 73 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 73 cauuuacaaa cugaagagua aucaa	25
	<210> 74 <211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 74	
	auuuacaaac ugaagaguaa ucaat	25
	<210> 75	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 75	
	acaaacugaa gaguaaucaa ucuac	25
	<210> 76	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0017]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 76	
	guaaugacag uuauuuuug cagtt	25
	<210> 77	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 77	
	aaugacaguu auauuuugca guutc	25
	<210> 78	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 78	
	aauacaagac ugcuguacua uuugt	25

	<210> 79	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 79	
	auacaagacu gcuguacuau uugtt	25
	<210> 80	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 80	
	uacaagacug cuguacuauu ugutg	25
[0018]	<210> 81	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 81	
	acaagacugc uguacuauuu guuga	25
	<210> 82	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 82	
	caagacugcu guacuauuug uugac	25
	<210> 83	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 83 gacugcugua cuauuuguug acctt	25
	<210> 84 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 84 acugcuguac uauuuguuga ccuta	25
	<210> 85 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0019]	<400> 85 gugguuuguc ccuuuugaa ucaga	25
	<210> 86 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 86 caauacauuu gcuuuuucuu uauaa	25
	<210> 87 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 87 auacauuugc uuuuucuuua uaaaa	25
	<210> 88 <211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 88	
	ugauggagug cuguuauaua auutt	25
	<210> 89	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 89	
	gauggagugc uguuuuguua uauaa	25
	<210> 90	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0020]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 90	
	auggagugcu guuuuguuau auaat	25
	<210> 91	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 91	
	ggagugcugu uuuguuauau aautt	25
	<210> 92	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 92	
	gagugcuguu uuguuauaua auuta	25

	<210> 93	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 93	
	cuguuuuguu auauaauua gactt	25
	<210> 94	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 94	
	cauuugcguu guuaauguaa uuuga	25
[0021]	<210> 95	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 95	
	auguaauuuc aggaggaaugaa cugaa	25
	<210> 96	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 96	
	gaguccugga ugauacuaau aaact	25
	<210> 97	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 97 cacuguacag uuuaaaaaca aaucuua	27
	<210> 98 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 98 aacuauacaa aaaaagacac uguacag	27
	<210> 99 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0022]	<400> 99 uuaacuauac aaaaaaagac acuguac	27
	<210> 100 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 100 uguuaacuau acaaaaaaag acacugu	27
	<210> 101 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 101 guguuaacua uacaaaaaaa gacacug	27
	<210> 102 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 102	
	guuaguggcu auugaaaaua ccaccag	27
	<210> 103	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 103	
	caagguuagu ggcuaauugaa aauacca	27
	<210> 104	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0023]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 104	
	uaauaauacua auuugugcug ugcacca	27
	<210> 105	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 105	
	ucguauaagc ugcaucagag acaacug	27
	<210> 106	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 106	
	auuauuucgu auaagcugca ucagaga	27

	<210> 107	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 107	
	aaauauuucg uauaagcugc aucagag	27
	<210> 108	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 108	
	acaauuauuu cguauaagcu gcaucag	27
[0024]	<210> 109	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 109	
	aacaauuauu ucguauaagc ugcauca	27
	<210> 110	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 110	
	acaacaauua uuucguauaa gcugcau	27
	<210> 111	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸 <400> 111 aacaacaauu auuucguaua agcugca	27
	<210> 112 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 112 gaacaacaau uauuucguau aagcugc	27
	<210> 113 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 113 agaacaacaa uuauuucgua uaagcug	27
[0025]	<210> 114 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 114 uuaacagaac aacaauuauu ucguaua	27
	<210> 115 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 115 guuaacagaa caacaauuau uucguau	27
	<210> 116 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 116	
	aguuaacaga acaacaauua uuucgua	27
	<210> 117	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 117	
	caguuaacag aacaacaauu auuucgu	27
	<210> 118	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0026]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 118	
	ucaguuaaca gaacaacaau uauuucg	27
	<210> 119	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 119	
	uucaguuaac agaacaaca uauuuuc	27
	<210> 120	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 120	
	auucaguuaa cagaacaaca auuauuu	27

	<210> 121	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 121	
	uauucaguua acagaacaac aaauuuu	27
	<210> 122	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 122	
	guauucaguu aacagaacaa caauuau	27
[0027]	<210> 123	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 123	
	gguauucagu uaacagaaca acauuua	27
	<210> 124	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 124	
	ugguauucag uuaacagaac aacaauu	27
	<210> 125	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 125 gugguauuca guuaacagaa caacaau	27
	<210> 126 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 126 agugguauuc aguuaacaga acaacaa	27
	<210> 127 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0028]	<400> 127 gagugguauu caguuaacag aacaaca	27
	<210> 128 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 128 cagaguggua uucaguuaac agaacaa	27
	<210> 129 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 129 auuacagagu gguauucagu uaacaga	27
	<210> 130 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 130	
	aauuacagag ugguauucag uuaacag	27
	<210> 131	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 131	
	caauuacaga gugguauuca guuaaca	27
	<210> 132	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0029]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 132	
	gcaauuacag agugguauuc aguuuac	27
	<210> 133	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 133	
	ugcaauuaca gagugguauu caguuaa	27
	<210> 134	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 134	
	uugcauuuac agagugguau ucaguua	27

	<210> 135	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 135	
	uuugcaauua cagaguggua uucaguu	27
	<210> 136	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 136	
	uuuugcaauu acagaguggu auucagu	27
[0030]	<210> 137	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 137	
	uuuuugcaau uacagagugg uauucag	27
	<210> 138	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 138	
	uuuuuugcaa uuacagagug guauuca	27
	<210> 139	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 139 uuuuuuugca auuacagagu gguauuc	27
	<210> 140 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 140 acaauuau cuuguauaagc ugcauca	27
	<210> 141 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0031]	<400> 141 aacaauuau uucguauaag cugcauc	27
	<210> 142 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 142 caacaauuau cuucguauaa gcugcau	27
	<210> 143 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 143 acaacaauua ucuucguaua agcugca	27
	<210> 144 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 144	
	gaacaacaau uaucuucgua uaagcug	27
	<210> 145	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 145	
	agaacaacaa uuauucgu auaagcu	27
	<210> 146	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0032]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 146	
	aacagaacaa caauuauuu cguauaa	27
	<210> 147	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 147	
	uuacagaac acauuuau uucguau	27
	<210> 148	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 148	
	guuacagaa caacaauuau cuucgua	27

	<210> 149	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 149	
	uucagaaugu caacaaaaca gcugcaa	27
	<210> 150	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 150	
	gcauucagaa ugucaacaaa acagcug	27
[0033]	<210> 151	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 151	
	agcauucaga augucaacaa aacagcu	27
	<210> 152	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 152	
	gaagcauuca gaaugucaac aaaacag	27
	<210> 153	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 153 acuuagaagc auucagaaug ucaacaa	27
	<210> 154 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 154 uuuacuuaga agcauucaga augucaa	27
	<210> 155 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0034]	<400> 155 uuuacuuag aagcauucag aauguca	27
	<210> 156 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 156 guauuuacuu agaagcauuc agaau gu	27
	<210> 157 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 157 uguauuuacu uagaagcauu cagaau g	27
	<210> 158 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 158	
	uuguauuuac uuagaagcau ucagaau	27
	<210> 159	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 159	
	auuguauuuu cuuagaagca uucagaa	27
	<210> 160	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0035]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 160	
	aauguauuu acuuagaagc auucaga	27
	<210> 161	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 161	
	aaauguauu uacuuagaag caucag	27
	<210> 162	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 162	
	aaaauuguau uuacuuagaa gcuuuca	27

	<210> 163	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 163	
	aaaaauugua uuua <u>cuuaga</u> agcauuc	27
	<210> 164	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 164	
	aaaaaa <u>uugu</u> auuuacu <u>uag</u> aagcauu	27
[0036]	<210> 165	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 165	
	auuucagacc uau <u>gaaaagg</u> acaacaa	27
	<210> 166	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 166	
	ucaguuaugg au <u>gaaaacua</u> ucucaac	27
	<210> 167	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 167 uucaguuauug gaugaaaacu aucucaa	27
	<210> 168 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 168 auucuuaac uauggaugaa aauguua	27
	<210> 169 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0037]	<400> 169 uugauuacuc uucaguuugu aaaugua	27
	<210> 170 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 170 auugauuacu cuucaguuug uaaaugu	27
	<210> 171 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 171 guagauugau uacucuucag uuuguuaa	27
	<210> 172 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 172	
	aacugcaaaa uauaacuguc auuacac	27
	<210> 173	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 173	
	gaaacugcaa aaauaacug ucauuac	27
	<210> 174	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0038]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 174	
	acaaauagua cagcagucuu guauuuu	27
	<210> 175	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 175	
	aacaaauagu acagcagucu uguauuu	27
	<210> 176	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 176	
	caacaaauag uacagcaguc uuguauu	27

	<210> 177	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 177	
	ucaacaaaua guacagcagu cuuguau	27
	<210> 178	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 178	
	gucaacaaau aguacagcag ucuugua	27
[0039]	<210> 179	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 179	
	aaggucaaca aauguacag cagucuu	27
	<210> 180	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 180	
	uaaggucaac aaauaguaca gcagucu	27
	<210> 181	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 181 ucugauucau aaagggacaa accacag	27
	<210> 182 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 182 uuauaaagaa aaagcaaaug uauugga	27
	<210> 183 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0040]	<400> 183 uuuuauaaag aaaaagcaaa uguauug	27
	<210> 184 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 184 aaaauuauau aacagcacuc caucaca	27
	<210> 185 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 185 uuauauaaca aaacagcacu ccaucac	27
	<210> 186 <211> 27	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 186	
	auuauauaac aaaacagcac uccauca	27
	<210> 187	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 187	
	aaauuauaua acaaaacagc acuccau	27
	<210> 188	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0041]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 188	
	uaauuauau aacaaaacag cacucca	27
	<210> 189	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 189	
	aagucuaau uauuaacaa aacagca	27
	<210> 190	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 190	
	ucaauuaca uuaacaacgc aaaugua	27

	<210> 191	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 191	
	uucaguauuc cuccugaaau uacauaa	27
	<210> 192	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 192	
	aguuuauuag uaucauccag gacucag	27
[0042]	<210> 193	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 193	
	guacaguguc uuuuuuugua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 194	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 194	
	acagugucuu uuuuuguaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 195	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 195 ucugaugcag cuuauacgaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 196 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 196 cugaugcagc uuauacgaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 197 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0043]	<400> 197 augcagcuua uacgaaauaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 198 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 198 gcagcuuaua cgaaauaaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 199 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 199 cagcuuauac gaaauaauua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 200 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 200	
	gcuuauacga aaauauugua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 201	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 201	
	aaauauugu uguucuguua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 202	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0044]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 202	
	aaauauuguu guucuguuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 203	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 203	
	auuguuguuc uguuaacuga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 204	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 204	
	uuguuguucu guuaacugaa gcagccgaaa ggcugc	36

	<210> 205	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 205	
	uguuguucug uuaacugaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 206	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 206	
	guuguucugu uaacugaaua gcagccgaaa ggcugc	36
[0045]	<210> 207	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 207	
	aacugaauac cacucuguaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 208	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 208	
	cugaauacca cucuguaaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 209	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸 <400> 209 aauaccacuc uguaauugca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 210 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 210 auucugaaug cuucuaagua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 211 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 211 uucugaaugc uucuaagua gcagccgaaa ggcugc	36
[0046]	<210> 212 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 212 ugaugcuuc uaaguaaaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 213 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 213 gaaugcuucu aaguaaaauac gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 214 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 214	
	aaugcuucua aguaauaca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 215	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 215	
	augcuucuaa guaaauaca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 216	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0047]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 216	
	ugauaguu uucaucaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 217	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 217	
	gagauaguu ucaucaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 218	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 218	
	auuacaaac ugaagagua gcagccgaaa ggcugc	36

	<210> 219	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 219	
	aauacaagac ugccauauua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 220	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 220	
	auacaagacu gccauauuaa gcagccgaaa ggcugc	36
[0048]	<210> 221	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 221	
	uacaagacug ccuauuuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 222	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 222	
	caagacugcc auauuaaaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 223	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 223 aagacugcca uauuaaaaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 224 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 224 agacugccau auuaaaauua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 225 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0049]	<400> 225 gacugccaua uuaaaauuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 226 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 226 acugccauau uaaauuuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 227 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 227 aguaugaauu auucaauuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 228 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 228	
	guaugaauua uucaauuuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 229	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 229	
	gauggagugc uguuuuguua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 230	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0050]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 230	
	auggagugcu guuuuguuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 231	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 231	
	ggagugcugu uuuguuauaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 232	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 232	
	gagugcuguu uuguuauaia gcagccgaaa ggcugc	36

	<210> 233	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 233	
	cuguuuuguu auauaauuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 234	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 234	
	ugcagagguu uuaaaauacua gcagccgaaa ggcugc	36
[0051]	<210> 235	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 235	
	gcagagguuu uaaauacuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 236	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 236	
	cagagguuuu aaauacuaga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 237	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 237 gagguuuuaa auacuaguua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 238 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 238 agauuuuguu acauauuuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 239 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0052]	<400> 239 auuuuguuac auauuuuuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 240 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 240 aaaauacuca cuuuauugcua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 241 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 241 aaauacucac uuuauugcuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 242 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 242	
	aauacucacu uuaugcuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 243	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 243	
	auaaaagguu uugucaaaca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 244	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0053]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 244	
	agguuuuguc aaacauugca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 245	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 245	
	gguuuuguca aacauugcaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 246	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 246	
	gcaaguauuc ggugcuauaa gcagccgaaa ggcugc	36

	<210> 247	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 247	
	agauggaagu uucucugua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 248	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 248	
	auggaaguuu cuacuguaua gcagccgaaa ggcugc	36
[0054]	<210> 249	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 249	
	ggaaguuucu acuguauaga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 250	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 250	
	gaaguuucua cuguauagaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 251	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 251 aaguuucuaac uguauagaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 252 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 252 aguuuucuaacu guauagaaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 253 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0055]	<400> 253 cuacuguaua gaaauacacca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 254 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 254 cuguauagaa aucaccauua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 255 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 255 gucaugacaa cuaccauuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 256 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 256	
	gacaacuacc auuuuuuuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 257	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 257	
	aguuggaugu cuaaaacuca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 258	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0056]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 258	
	guuggauguc uaaaacucuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 259	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 259	
	gaugucuaaa acucaaguaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 260	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 260	
	gauaagugua aagccuugua gcagccgaaa ggcugc	36

	<210> 261	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 261	
	auaaguguaa agccuuguaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 262	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 262	
	gccuuguaac ugaagaugaa gcagccgaaa ggcugc	36
[0057]	<210> 263	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 263	
	guguauagaa acuauuuuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 264	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 264	
	aaagacuuug uugacaucaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 265	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 265 gaagaugcuu uuuaaaacua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 266 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 266 aagaugcuuu uuaaaacuaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 267 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0058]	<400> 267 gagcuauugc ugauuaguua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 268 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 268 guguuguuaa uguuugcuga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 269 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 269 guuguuaaug uuugcuguua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 270 <211> 36	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 270	
	uguuaauguu ugcuguauua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 271	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 271	
	guuaauguuu gcuguauuuu gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 272	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0059]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 272	
	uuaauguuug cuguauuuua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 273	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 273	
	uacaaaaaaa gacacuguac gg	22
	<210> 274	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 274	
	uauacaaaaa aagacacugu gg	22

	<210> 275	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 275	
	uucguauaag cugcaucaga ga	22
	<210> 276	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 276	
	uuucguauaa gcugcaucag ag	22
[0060]	<210> 277	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 277	
	uuucguauaa gcugcaucag gg	22
	<210> 278	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 278	
	uucguauaag cugcaucagg g	21
	<210> 279	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 279 uuauuucgua uaagcugcau gg	22
	<210> 280 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 280 uauuauuucg uauaagcugc gg	22
	<210> 281 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0061]	<400> 281 uaauuauuuc guauaagcug gg	22
	<210> 282 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 282 uacaauuauu ucguauaagc gg	22
	<210> 283 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 283 uaacagaaca acaauuauuu gg	22
	<210> 284 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 284	
	uuaacagaac aacaauuauu gg	22
	<210> 285	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 285	
	ucaguuaaca gaacaacaau gg	22
	<210> 286	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0062]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 286	
	uucaguuaac agaacaacaa gg	22
	<210> 287	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 287	
	uuucaguuaa cagaacaaca gg	22
	<210> 288	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 288	
	uauucaguua acagaacaac gg	22

	<210> 289	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 289	
	uuacagagug guauucaguu gg	22
	<210> 290	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 290	
	uauuacagag ugguauucag gg	22
[0063]	<210> 291	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 291	
	ugcaauuaca gagugguauu gg	22
	<210> 292	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 292	
	uacuuagaag cauucagaau gu	22
	<210> 293	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 293 uacuuagaag catucagaau gt	22
	<210> 294 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 294 utacuuagaa gcauucagaa tg	22
	<210> 295 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0064]	<400> 295 uuacuuagaa gcauucagaa ug	22
	<210> 296 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 296 uauuuacuua gaagcauua gg	22
	<210> 297 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 297 uauuuacuua gaagcauua ga	22
	<210> 298 <211> 21	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 298	
	auuuacuag aagcauucag g	21
	<210> 299	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 299	
	uauuuacuua gaagcatuca ga	22
	<210> 300	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0065]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 300	
	guauuuacuu agaagcauuc ag	22
	<210> 301	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 301	
	gtauuuacuu agaagcautc ag	22
	<210> 302	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 302	
	uguauuuacu uagaagcauu gg	22

	<210> 303	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 303	
	uuguauuuac uuagaagcau gg	22
	<210> 304	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 304	
	uauggaugaa aacuaucuca gg	22
[0066]	<210> 305	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 305	
	uuauggauga aaacuaucuc gg	22
	<210> 306	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 306	
	uuacucuuca guuuguaau gg	22
	<210> 307	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 307 uaauauggca gucuuguauu gg	22
	<210> 308 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 308 uuaauauggc agucuuguau gg	22
	<210> 309 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0067]	<400> 309 uuuaauaugg cagucuugua gg	22
	<210> 310 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 310 uauuuauau ggcagucuug gg	22
	<210> 311 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 311 uaauuuaua uggcagucuu gg	22
	<210> 312 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 312	
	uaaaauuaau auggcagucu gg	22
	<210> 313	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 313	
	uaaaauuuua uauggcaguc gg	22
	<210> 314	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0068]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 314	
	uaaaaauuua auauggcagu gg	22
	<210> 315	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 315	
	uaaaauugaau aaaucauacu gg	22
	<210> 316	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 316	
	uuaaaauugaa uaauucauac gg	22

	<210> 317	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 317	
	uaacaaaaca gcacuccauc gg	22
	<210> 318	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 318	
	uuaacaaaac agcacuccau gg	22
[0069]	<210> 319	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 319	
	uuauaacaaa acagcacucc gg	22
	<210> 320	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 320	
	uauauaaciaaacagcacuc gg	22
	<210> 321	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 321 uaaaauauau aacaaaacag gg	22
	<210> 322 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 322 uaguauuuua aaccucugca gg	22
	<210> 323 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0070]	<400> 323 uuaguauuuu aaaccucugc gg	22
	<210> 324 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 324 ucuaguauuu aaaaccucug gg	22
	<210> 325 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 325 uaacuaguau uuaaaaccuc gg	22
	<210> 326 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 326	
	uaaaauaugu aacaaaaucu gg	22
	<210> 327	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 327	
	uuaaaaauau guaacaaaau gg	22
	<210> 328	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0071]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 328	
	uagcauaaag ugaguauuuu gg	22
	<210> 329	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 329	
	uaagcauaaa gugaguauuu gg	22
	<210> 330	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 330	
	uuaagcauaa agugaguauu gg	22

	<210> 331	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 331	
	uguuugacaa aaccuuuuau gg	22
	<210> 332	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 332	
	ugcaauguuu gacaaaaccu gg	22
[0072]	<210> 333	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 333	
	uugcaauguu ugacaaaacc gg	22
	<210> 334	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 334	
	uuauagcacc gaauacuugc gg	22
	<210> 335	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 335 uacaguagaa acuuccaucu gg	22
	<210> 336 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 336 uauacaguag aaacuuccau gg	22
	<210> 337 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0073]	<400> 337 ucuauacagu agaaacuucc gg	22
	<210> 338 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 338 uucuauacag uagaaacuuc gg	22
	<210> 339 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 339 uuucuauaca guagaaacuu gg	22
	<210> 340 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 340	
	uuuucuauac aguagaaacu gg	22
	<210> 341	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 341	
	uggugauuuuc uauacaguag gg	22
	<210> 342	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0074]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 342	
	uaauggugau uucuauacag gg	22
	<210> 343	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 343	
	uaaaugguag uugucaugac gg	22
	<210> 344	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 344	
	uuaaaaaaaaau gguaguuguc gg	22

	<210> 345	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 345	
	ugaguuuuag acauccaacu gg	22
	<210> 346	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 346	
	uugaguuuua gacauccaac gg	22
[0075]	<210> 347	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 347	
	uuacuugagu uuuagacauc gg	22
	<210> 348	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 348	
	uacaaggcuu uacacuuauc gg	22
	<210> 349	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 349 uuacaaggcu uuacacuuau gg	22
	<210> 350 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 350 uucaucuuca guuacaaggc gg	22
	<210> 351 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0076]	<400> 351 uuaaaauagu uucuauacac gg	22
	<210> 352 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 352 uugaugucaa caaagucuuu gg	22
	<210> 353 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 353 uaguuuuaaa aagcaucuuc gg	22
	<210> 354 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 354	
	uuaguuuuuaa aaagcaucuu gg	22
	<210> 355	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 355	
	uaacuaauca gcaauagcuc gg	22
	<210> 356	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0077]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 356	
	ucagcaaaca uuaacaacac gg	22
	<210> 357	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 357	
	uuacagcaaa cauuaacaac gg	22
	<210> 358	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 358	
	uaauacagca aacauuaaca gg	22

	<210> 359	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 359	
	uaaaauacagc aaacauuaac gg	22
	<210> 360	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 360	
	uuaaaauacag caaacauuaa gg	22
[0078]	<210> 361	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 361	
	utcguaauaag cugcaucaga ga	22
	<210> 362	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 362	
	utucguauaa gctgcatcag ag	22
	<210> 363	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 363 ucugaaugcu ucuaaguaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 364 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 364 cugaaugcuu cuaaguaaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 365 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0079]	<400> 365 gaaugcuucu aaguaaauaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 366 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 366 uacuuagaag cauucagaau gg	22
	<210> 367 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 367 uuacuuagaa gcauucagaa gg	22
	<210> 368 <211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 368	
	uuuacuuaga agcauucaga gg	22
	<210> 369	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 369	
	uuuuacuuag aagcauucag gg	22
	<210> 370	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0080]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 370	
	uuauuuacuu agaagcauuc gg	22
	<210> 371	
	<211> 4273	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 371	
	gccaatagga gccgcgctgg ctggagagta atgttacaga gcggagagag tgaggaggct	60
	gcgtctggct cccgctctca cagccattgc agtacattga gctccataga gacagcgccg	120
	gggcaagtga gagccggacg ggcactgggc gactctgtgc ctcgctgagg aaaaataact	180
	aaacatgggc aaaggagatc ctaagaagcc gagaggcaaa atgtcatcat atgcattttt	240
	tgtgcaaact tgtcgggagg agcataagaa gaagcaccca gatgcttcag tcaacttctc	300
	agagttttct aagaagtgtc cagagaggtg gaagaccatg tctgctaaag agaaaggaaa	360
	atttgaagat atggcaaaaag cggacaaggc ccgttatgaa agagaaatga aaacctatat	420
	ccctcccaaa ggggagacaa aaaagaagtt caaggatccc aatgcacca agaggcctcc	480

[0081]	ttcggccttc ttcctcttct gctctgagta tcgccccaaa atcaaaggag aacatcctgg	540
	cctgtccatt ggtgatgttg cgaagaaact gggagagatg tggaataaca ctgctgcaga	600
	tgacaagcag ccttatgaaa agaaggctgc gaagctgaag gaaaaatacg aaaaggatat	660
	tgctgcatat cgagctaaag gaaagcctga tgcagcaaaa aaggaggattg tcaaggctga	720
	aaaaagcaag aaaaagaagg aagaggagga agatgaggaa gatgaagagg atgaggagga	780
	ggaggaagat gaagaagatg aagatgaaga agaagatgat gatgatgaat aagttggttc	840
	tagcgcagtt ttttttttct tgtctataaa gcatttaacc cccctgtaca caactcactc	900
	cttttaaaga aaaaaattga aatgtaaggc tgtgtaagat ttgtttttaa actgtacagt	960
	gtcttttttt gtatagttaa cacactaccg aatgtgtctt tagatagccc tgtcctgggtg	1020
	gtattttcaa tagccactaa ccttgctgg tacagtatgg gggttgtaaa ttggcatgga	1080
	aatttaaagc aggttcttgt tgggtgcacag cacaattag ttatatatgg ggatggtagt	1140
	tttttcatct tcagttgtct ctgatgcagc ttatacga aaattgttgt tctgttaact	1200
	gaataccact ctgtaattgc aaaaaaaaaa aaaaagttgc agctgttttg ttgacattct	1260
	gaatgcttct aagtaaatac aatttttttt attagtattg ttgtcctttt cataggctctg	1320
	aaatttttct tcttgagggg aagctagtct tttgcttttg cccattttga atcacatgaa	1380
	ttattacagt gtttatcctt tcatatagtt agctaataaa aagcttttgt ctacacaccc	1440
	tgcatatcat aatgggggta aagttaagtt gagatagttt tcatccataa ctgaacatcc	1500
	aaaatcttga tcagttaaga aatttcacat agcccactta catttacaaa ctgaagagta	1560
	atcaatctac tcaaagcatg ggattattag aatcaaacat ttgaaagtc tgtccttgaa	1620
	ggactaatag aaaagtatgt tctaaccttt acatgaggac tctattcttt aactcccatt	1680
	accatgtaat ggcagttata ttttgagtt cccacattaa agaagacctg agaatgtatc	1740
	cccaaaagcg tgagcttaaa atacaagact gccatattaa attttttggt gacattagtc	1800
	tcagtgaaga ctatgaaaat gctggctata gatgtctttt cccatttatt taaatatgga	1860
	ctgctcagga aacgagactt tccattacaa gtatttttta ttaattgggc cagcttttca	1920
	aacaaagatg ccacattcaa aatagggtat attttcctat attacggttt gcccttttat	1980
	aaatccaagt agataggaag aaagaagaca aactttgcat ctcagtatga attattcaat	2040
	ttatttgaat gatttttctt tacaaaacaa actcattcat tagtcatgtt tatctgetta	2100
	ggagtttagg gaacaatttg gcaattttgt ggttttcgag attatcgttt tcttaaagtg	2160

[0082]	ccagtat tttt aaaatagcgt tcttgtaatt ttacacgctt ttgtgatgga gtgctgtttt	2220
	gttatataat ttagacttgg attctttcca ttgcat ttttatgtaat ttcaggagga	2280
	atactgaaca tctgagtcct ggatgatact aataaactaa taattgcaga ggttttaaat	2340
	actagttaaa tggctttcac ttaagaactt aagat tttgt tacatat ttaaatcttgt	2400
	ttctaataat acctcttagc agtac tttt aaataagtat aagggatggc aaagt ttttc	2460
	cctttaaaaa tactcacttt atgcttataa atagg ttaat gggctgataa aagg ttttgt	2520
	caaacattgc aagtattcgg tgctatataa aaaggaggaa aaactag ttt tactttcaga	2580
	atgatttaaa caagat tttt aaaaacaaga tacatgcaag cgaacagcag ggtagtgat	2640
	aggctgcaat tgtgtcgaa atcagat ttt ttgttaagag gagcaaatga ctcaatctga	2700
	tttagatgga agtttctact gtatagaaat caccattaat caccaacatt aataattctg	2760
	atccatttaa aatgaattct ggctcaagga gaatttgtaa ctttagtagg tacgtcatga	2820
	caactacat ttttttaaga tgttgagaat gggaacagtt ttttaggggt ttattcttga	2880
	ccacagatct taagaaaatg gacaaaacc ctttcaatc tgaagattag tatgg tttgg	2940
	tgttctaaca gtatccccta gaagttggat gtctaaaact caagtaaatg gaagtgggag	3000
	gcaatttaga taagtgtaaa gccttgtaac tgaagatgat ttttttaga aagtgtatag	3060
	aaactat ttt aatgccaaga tagttacagt gctgtgggggt ttaaagactt tgttgacatc	3120
	aagaaaagac taaatctata attaatggg ccaact tta aaatgaagat gctttttaa	3180
	actaatgaac taagatgtat aaatcttagt tttttgtat tttaaagata ggcatatggc	3240
	atattgatta acgagtc aaa tttcctaact ttgctgtgca aagg ttgaga gctattgctg	3300
	attagttacc acagttctga tgatcgtccc atcacagtgt tgtaaatgtt tgctgtat ttt	3360
	attaat tttc ttaaagtgaa atctgaaaaa tgaaat tttgt gtgtcctgtg taccgaggg	3420
	gtaatgatta aatgataaag ataagaaaag cgcccatgta acacaaactg ccattcaaca	3480
	ggat tttccc ttactaccta aggaattgta accattgctc agacattgta ggatttaact	3540
	atgttgaaaa ctacaggaga ggccgggcgc agtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt	3600
	gggaggccaa ggcgggcaga tcacagggtc aggagattga gaccatcctg gctaactgtg	3660
	tgaacccccg cctctactaa aaatacaaaa aattagccaa gcgtgggtgct gggcgctgt	3720
	agtcccagta actcaggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggcggagggt	3780
	gcagtgagcc gagattgtgc cactgcactc cagcctgggt gacagagcaa gactccatct	3840

	caaaaaaaaa aaaaaaacac aggagagaca actggttttt gaatgaaata catgggtact	3900
	gccttgcttg acatcacata gtccttgatg aaagttcaca tttaggcttg cttggtacaa	3960
	tacgcctcct aaaaagggtcc ttgatgaaag ttcacattta ggtctgcttg gtacaacacg	4020
	cctcctgaaa gggctctgata gctttcagta gcagtaagac acttgcatgt gatggttaagg	4080
	tatctgcaaa tttgcacaca ccgtacacag ctttaagtctt agaattaact tgctaaaatg	4140
	tgagcctttg gtaattagge tgttttatta gggagtgtga taatatttga atttcttttc	4200
	atatttgtgc tttgtgtcat tttcaaatga cccttgaaat gtattttaaa agtagataaa	4260
	agccagaaag tga	4273
	<210> 372	
	<211> 2323	
	<212> DNA	
	<213> 食蟹猴	
	<400> 372	
	aatgttacag agcggagaga gtgaggaggc tgcgtctggc tcccgtcttc acagccattg	60
	cagtacattg agctccatag agacagcgcc ggggcaagtg agagccggac gggcactggg	120
[0083]	cgactctgtg cctcgctgag gaaaaataac taaacatggg caaaggagat cctaagaagc	180
	cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag gagcataaga	240
	agaagcacc cagatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc tcagagaggt	300
	ggaagacat gtctgctaaa gagaaaggaa aatttgaaga tatggcaaag gcggacaagg	360
	cccgttacga aagagaaatg aaaacctata tccctcccaa aggggagaca aaaaagaagt	420
	tcaaggatcc caatgcacc cagaggcctc cttcggcctt cttcctgttc tgctctgagt	480
	atcgcccaaa aatcaaagga gaacatcctg gcctgtccat tggatgatgtt gcgaagaaac	540
	tgggagagat gtggaataac actgctgcag atgacaagca gccttatgaa aagaaggctg	600
	cgaagctgaa ggaaaaatac gaaaaggata ttgctgcata tcgagctaaa ggaaagcctg	660
	atgcagcaaa aaaggaggtt gtcaaggctg aaaaaagcaa gaaaaagaag gaagaggagg	720
	aagatgagga agatgaagag gatgaggagg aggaggaaga tgaagaagat gaagatgaag	780
	aagaagatga tgatgatgaa taagttgggt ctagcgcagt tttttttttc ttgtctataa	840
	agcatttaac cccctgtac acaactcact ctttttaag aaaaaaattg aaatgtaagg	900
	ctgtgtaaga tttgttttta aactgtacag tgtctttttt tgtatagtta acacactacc	960
	gaatgtgtct ttacatagcc ctgtcctggg ggtattttca atagccacta accttgccctg	1020

	gtacagtatg ggggttgtaa attggcatgg aaatttaaag caggttcttg ttggtgcaca	1080
	gcacaaatta gttatatatg gggatggtag ttttttcac ttcagttgtc tctgatgcag	1140
	cttatacgaa ataattgttg ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg caaaaaaaaa	1200
	aaaaaaaaagtt gcagctgttt tgttgacatt ctgaatgctt ctaagtaa atacaatttttt	1260
	ttattagtat tgttgtcctt ttcataaggc tgaaattttt cttcttgagg ggaagctagt	1320
	cttttgcttt tgcccatttt gaatcacatg aattattaca gtgtttatcc tttcatatag	1380
	ttagctaata aaaagctttt gtctacacac cctgcatacc ataatggggg taaagttaag	1440
	ttgagatagt tttcatccat aactgaacat cgaaaatctt gatcagttaa gaaatttcac	1500
	atagcccact tacatttaca aactgaagag taatcagtct actcaaagca tgggattatt	1560
	agaatcaaac attttgaaag tctgtccttg aaggactaat agaaaagtat gttctaacct	1620
	ttacatgagg actctattct ttaactccca ttaccatgta atggcagtta tattttgcag	1680
	ttcccacatt aaagaagacc tgagaatgta tccccaaaag cgtgagctta aaatacaaga	1740
	ttgccatatt aaattttttg ttgacattag tctcagtga gactatgaaa atgctggcta	1800
[0084]	tagatgtctt ttcccattta tctcaatatg gactgctcag gaaacgagac tttccattac	1860
	aagtattttt aattaattgg gccagctttt aaaatgaaga tgccacattc aaaatagggt	1920
	gtattttcct atattatggg ttgcccttt ataaatcgaa gtagatagga ggaaagaaga	1980
	cacttaaact ttgcatctca gtatgaatta ttcaattgat ttgaatgatt tttctttaca	2040
	aaacaaactc attagtcatt atctgcttag cagtttaggg aacaatttgg caattttgtg	2100
	gtttttcgag attatcgttt tcttaaagtg ccagtatttt aaaatagcgt tcttgtaatt	2160
	ttacacgctt ttgtgatgga gtgctgtttt gttatataat ttgacttgg attctttcca	2220
	tttgcatctt tttatgtaat ttcaggagga atactgaaca tctgagtcct ggatgatact	2280
	aataaactaa taattgcaga ggttttaaaa aaaaaaaaaa aaa	2323
	<210> 373	
	<211> 2855	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 373	
	cgcgctggct ggagagtaat gttacagagc ggagagagtg aggaggctgc gtctggctcc	60
	cgctctcaca gccattgcag tacattgagc tccatagaga cagcgccggg gcaagcgca	120

	gccggacggg cactgggcga ctctgtgcct cgcggaggaa aatcaactaa acatgggcaa	180
	aggagatcct aaaaagccga gaggcaaaat gtcctcatat gcattctttg tgcaaacttg	240
	ccgggaggag cacaagaaga agcaccgcga tgcttctgtc aacttctcag agttctccaa	300
	gaagtgtca gagaggtgga agaccatgtc tgctaaagaa aaggggaaat ttgaagatat	360
	ggcaaaggct gacaaggctc gttatgaaag agaaatgaaa acctacatcc ccccaaaagg	420
	ggagaccaa aagaagtcca aggaccccaa tgcaccaag aggcctcctt cggccttctt	480
	cttgttctgt tctgagtacc gccccaaaat caaaggcgag catcctggct tatccattgg	540
	tgatgttgca aagaaactag gagagatgtg gaacaacact gcagcagatg acaagcagcc	600
	ctatgagaag aaagctgcc aagctgaagga gaagtatgag aaggatattg ctgcctacag	660
	agctaaagga aaacctgatg cagcgaaaaa ggggggtggtc aaggctgaaa agagcaagaa	720
	aaagaaggaa gaggaagatg atgaggagga tgaagaggat gaggaagagg aggaagaaga	780
	ggaagacgaa gatgaagaag aagatgatga tgatgaataa gttggttcta gcgcagtttt	840
	tttttcttgt ctataaagca ttttaacccc ctgtacacaa ctcactcctt ttaaagaaaa	900
	aaattgaaat gtaaggctgt gtaagatttg tttttaaaact gtacagtgtc ttttttgta	960
[0085]	tagttaacac actaccgaat gtgtctttag atagccctgt cctgggtggta tttcaatag	1020
	ccactaacct tgcttggtac agtctggggg ttgtaaattg gcatggaaat ttaaagcagg	1080
	ttcttgttgg tgcacagcac aaattagtta tataatgggga cagtagtttg gtttttgg	1140
	tttttttttt tttcttttgg ttttcttttt gggttttatt ttttcatct tcagttgtct	1200
	ctgatgcagc ttatacgaag ataattgttg ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg	1260
	caaaaaaaaa attgcggctg ttttgttgac attctgaatg cttctaagta aatacaattt	1320
	tttttattag tattgttgtc cttttcatag gtctgaaagt tttcttctca aggggaagct	1380
	agtcttttgc tttgccatt ttgggtcaca tggattatta gtgtgttatc tttcatctag	1440
	ttagctggaa gagagctttt gtccacatgc cctgccattg tggtagggta acattttcat	1500
	ccatagttag agaatctcct aaatcgtgat agttggataa gagatattat ataacctact	1560
	tggcaaagca aggagtgate aatactgtca caccgtggga ctattaggat caagcaatct	1620
	gaacgtctgt ccttgaagga ctgatagaaa agtaccttct aatccttaca cgaggactct	1680
	cctttaaccg ccattactgt gtaatgacag ttatatatttg cagtttcccc tactaaagaa	1740
	gacctgagaa tgtatcccca aaagtgtgag cttaaaatac aagactgctg tactatttgt	1800

	tgaccttagt cccagcgaag gctatcacia gaacgctggc tgtaaagcct ttgcccttct	1860
	atctagatat ggattgctca ggaaacttga ctgtttaaag gtatitttaa ttacttgagc	1920
	cagcttttaa aattatgcca catttaaaat gaagggtata ttttcctata ctgtggtttg	1980
	tccctttatg aatcagatac aagaggataa actttgcata ttagtaccat ttgtccaata	2040
	catttgcttt ttctttataa aaccctaaact cattcattaa tcaggtttaa tctgcttagt	2100
	ttagggaaca atttggcaat tttgtggatt tttttttgag attatcgttc tcttaaagtg	2160
	ccagtgtttt aaatagcggt cttgtaattt cacgcgcttt tgtgatggag tgctgttata	2220
	taattttgac ttgggttctt tacatttgcg ttgttaatgt aatttgagga ggaatactga	2280
	acatgagtcc tggatgatac taataaacta ataattacag aggtttttaa tattagttaa	2340
	atgactttca cttaagaatt taagcttttg gtcacacttt ataatagtgc cttatagtat	2400
	aaacaactga aaggctcttt cccattaaca acccttgatg ctggggccag tgagatagtg	2460
	ggtaaaaagg cagttggctg ccaaccctga caaccgatgg caaaaggagg gaaccagctt	2520
	ccaaaatgct ttgaccaaatt gctccctcca ttcatgaaca cagtttttaa atgttaaata	2580
	ggctagaggg cagtaaaaac aggttttttt atcgagcatc cctaacttat acatatgagg	2640
[0086]	agccataatc tgaatgttaa gtgaaaagcg aggttggtct taaagattgc acgtgtgttc	2700
	ttaagcctgt agaggacctc cgcaggccgt aatggctctg attaccaact taagaacaag	2760
	tgactggctt ggaaacttgt actgttgctt tagaactacc attgtggaca tctgttgta	2820
	gtaagtgatc catttaaaag tgaactctgc ctcaa	2855
	<210> 374	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 374	
	taagatttgt ttttaaaactg tacagtgtct t	31
	<210> 375	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 375	
	ttggtgcaca gcacaaatta gttatatatg g	31
	<210> 376	

	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 376	
	tctgatgcag cttatacgaa ataattgttg ttctgttaac tgaataccac tctgta	56
	<210> 377	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 377	
	aaaaaagttg cagctgtttt gttgacattc tgaatgcttc t	41
	<210> 378	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 378	
	tgagatagtt ttcattccata actgaacatc c	31
[0087]	<210> 379	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 379	
	taccatgtaa tggcagttat attttgcagt t	31
	<210> 380	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 380	
	tttacacgct tttgtgatgg agtgctgttt t	31
	<210> 381	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 381	
	aatactgaac atctgagtcc tggatgatac t	31

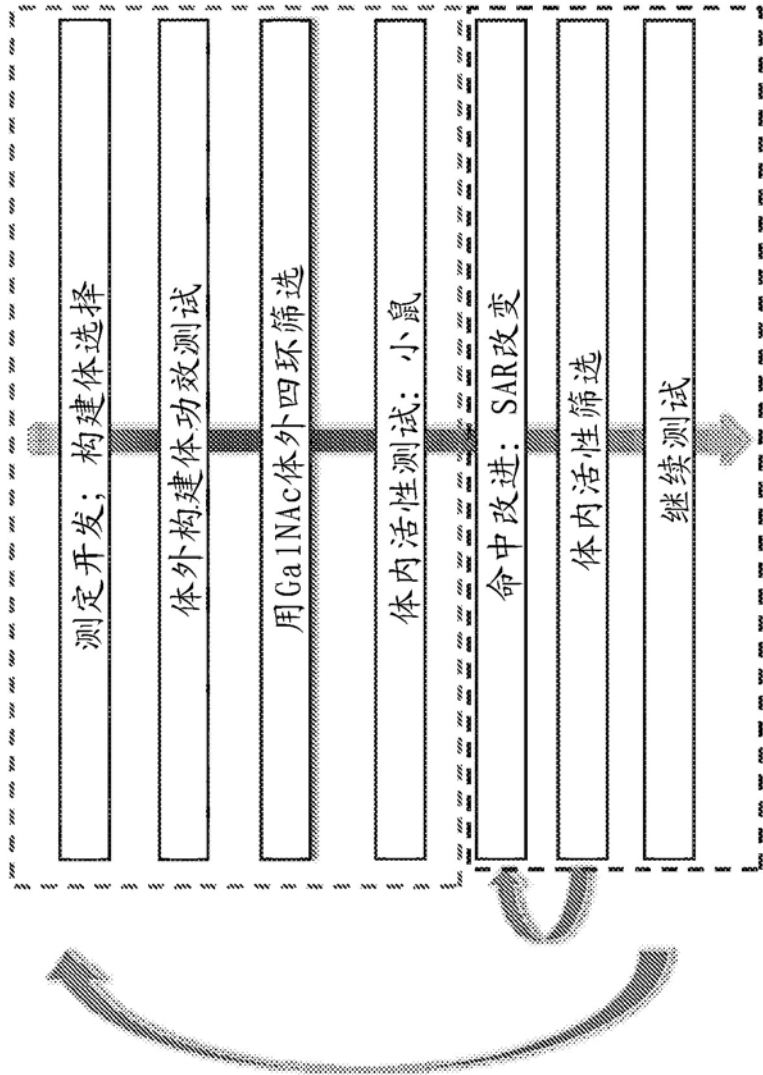


图 1

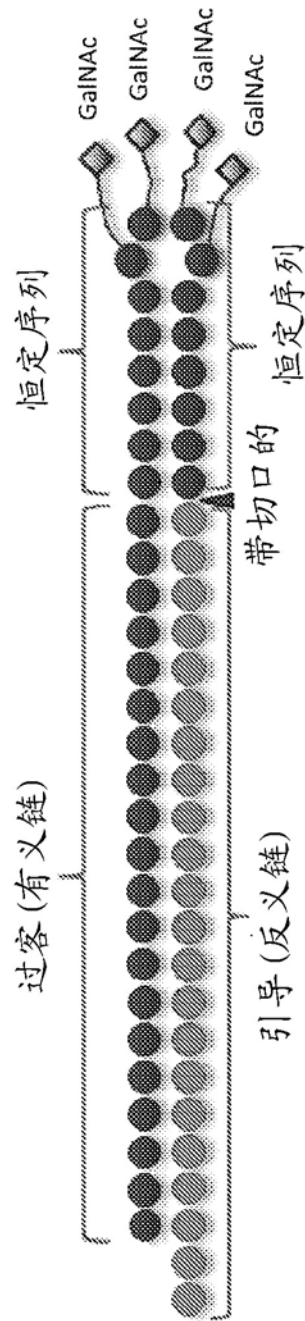


图 2

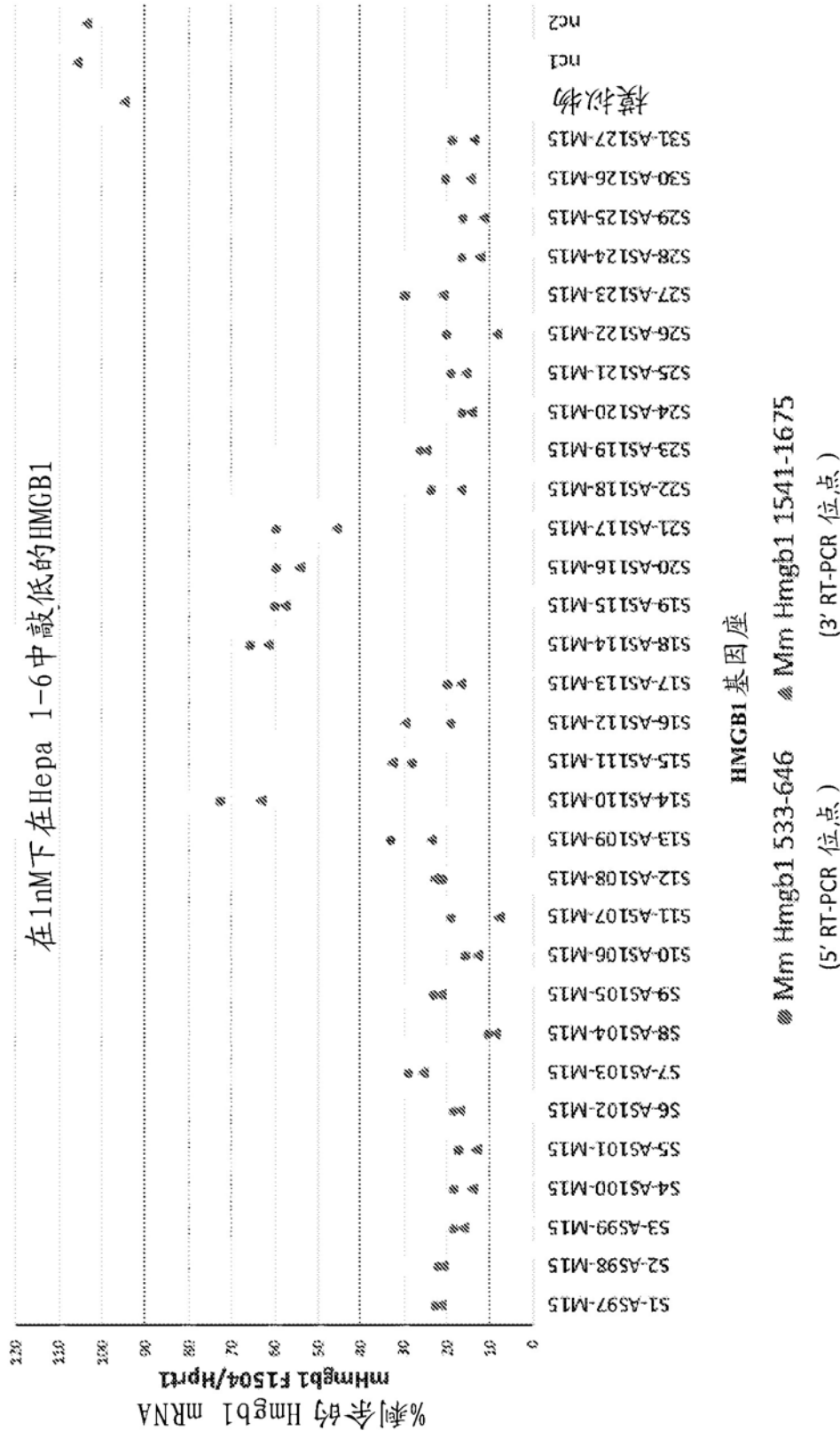


图 3A

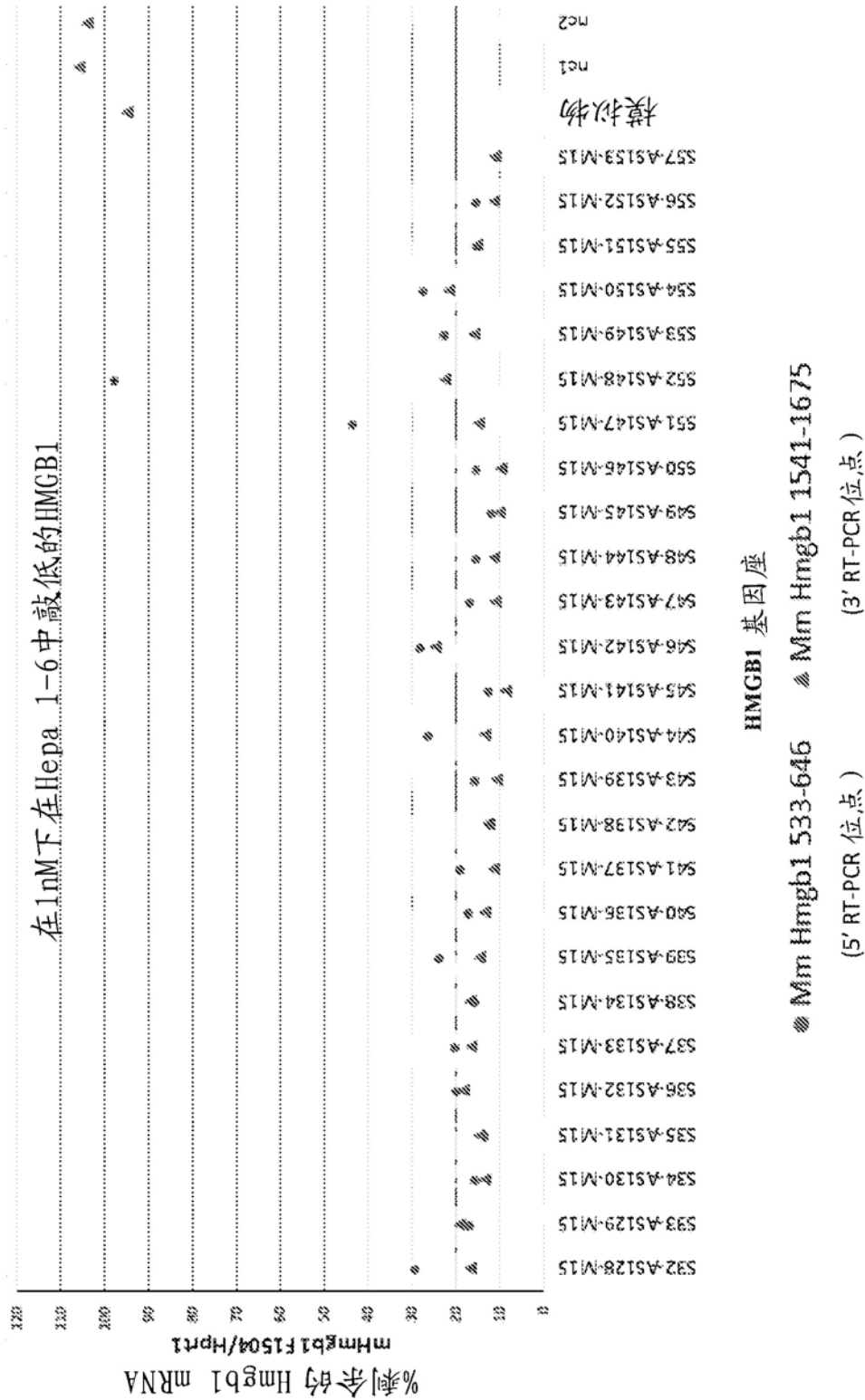


图 3B

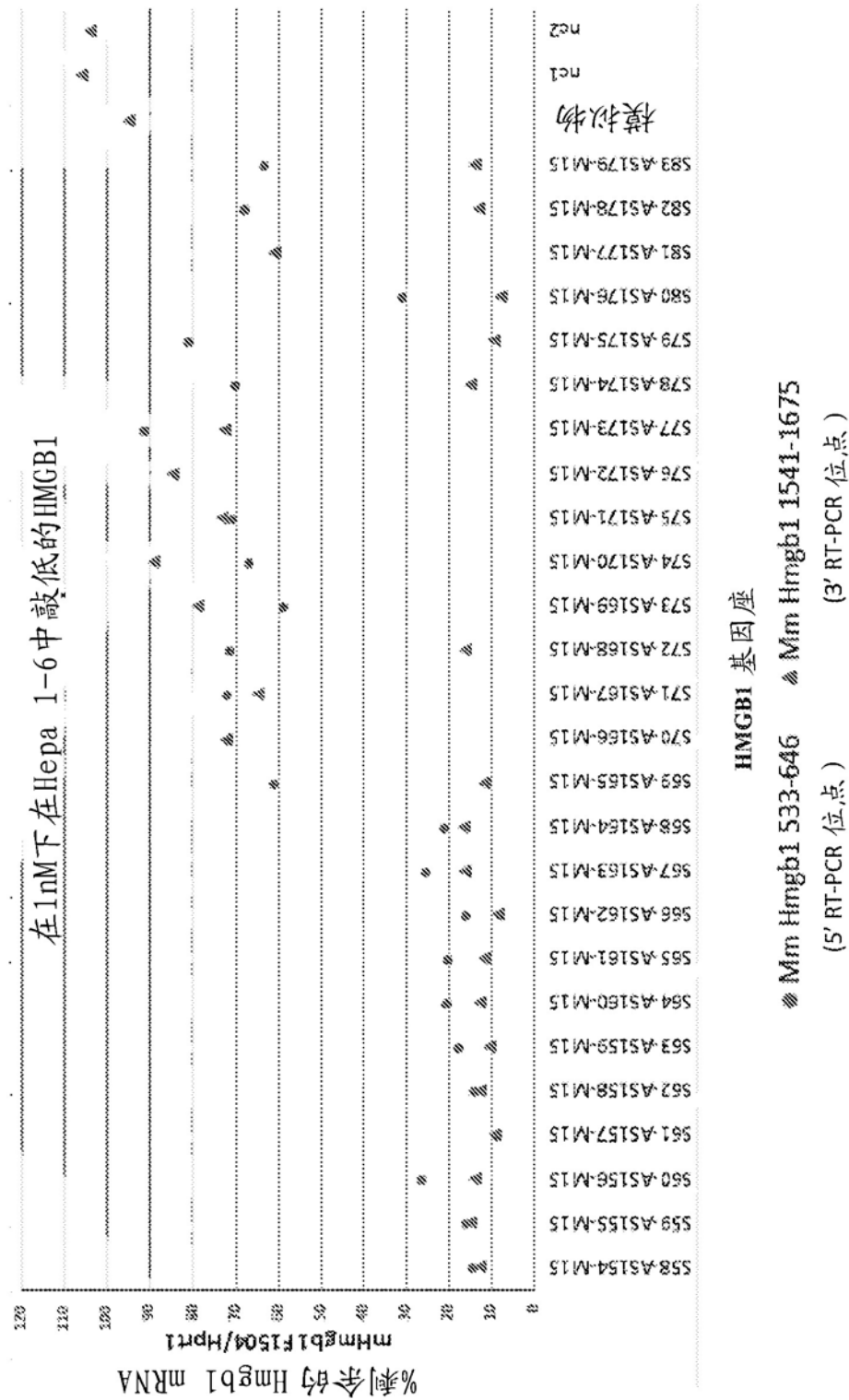


图 3C

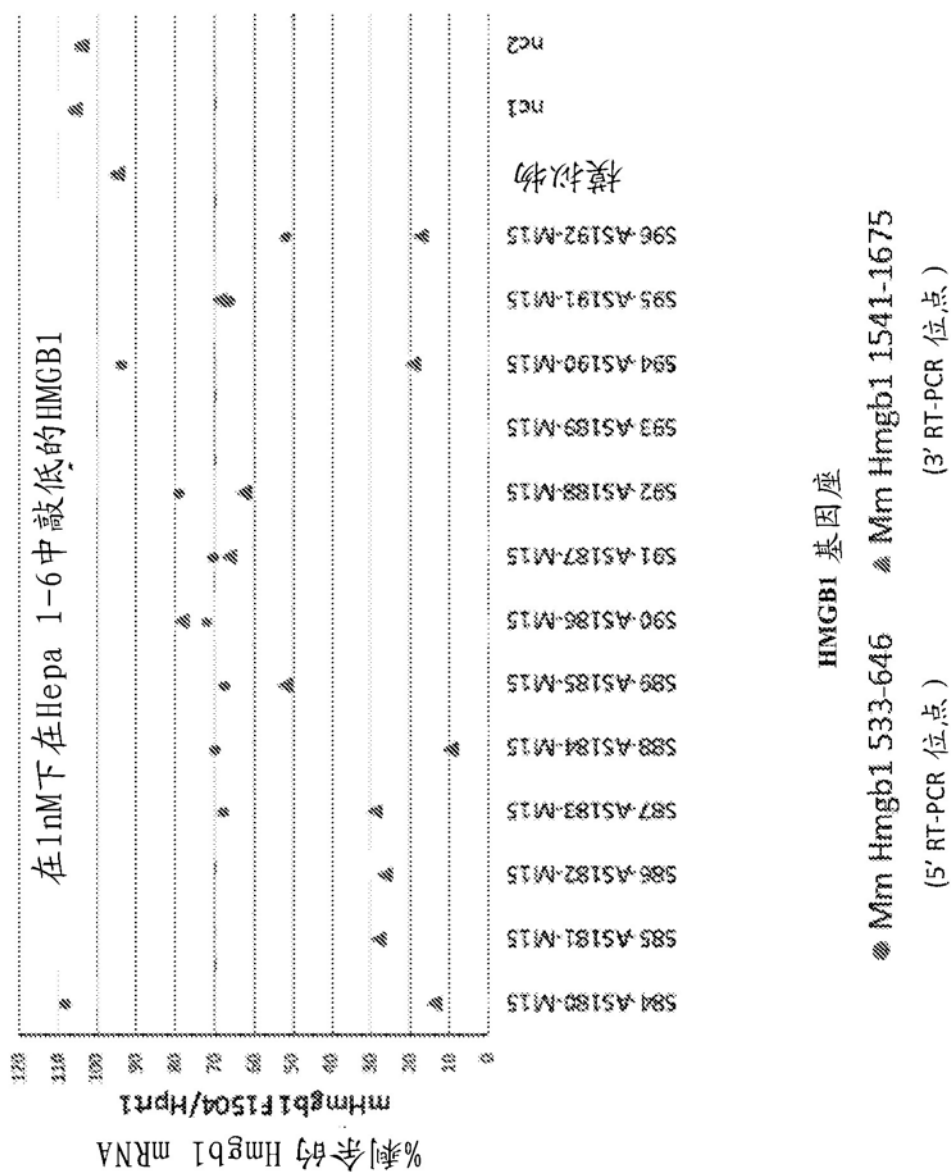


图 3D

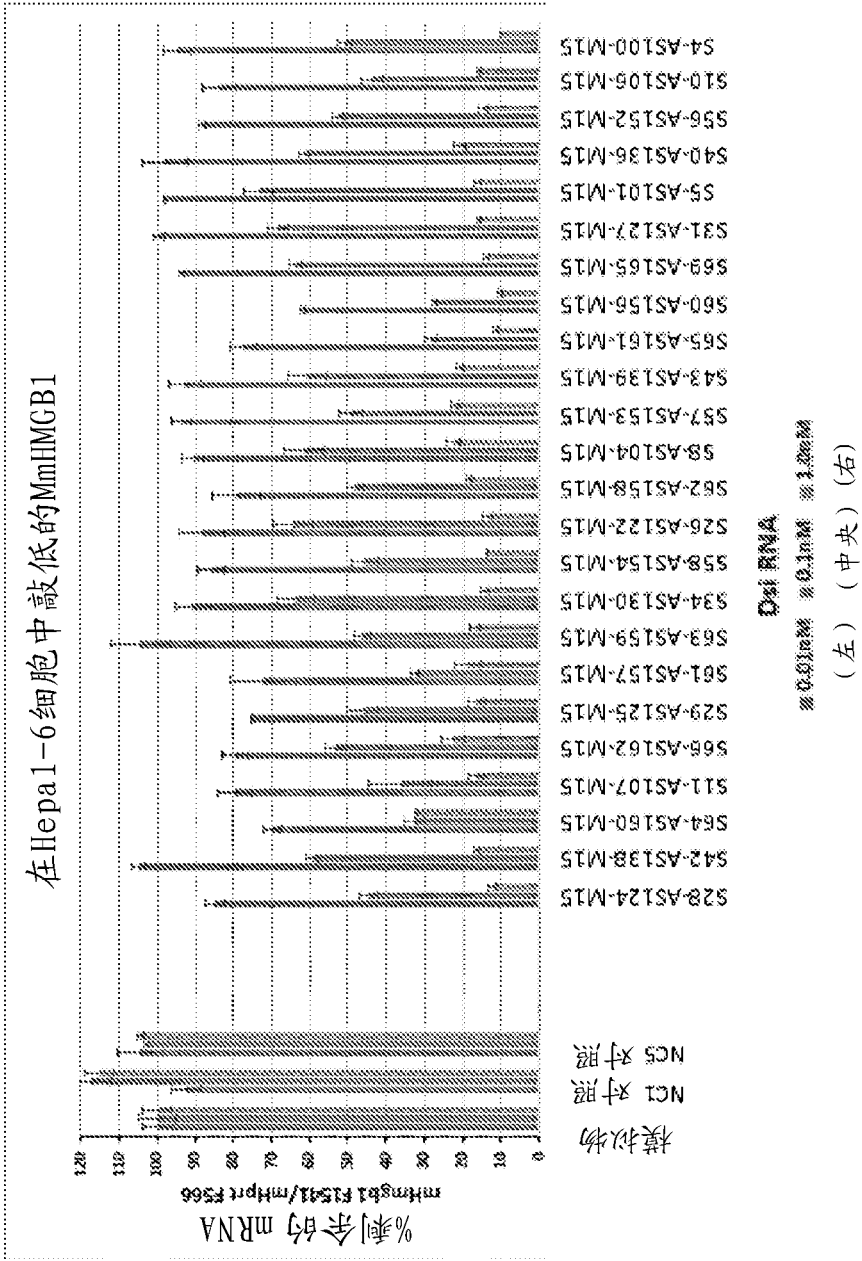


图 4

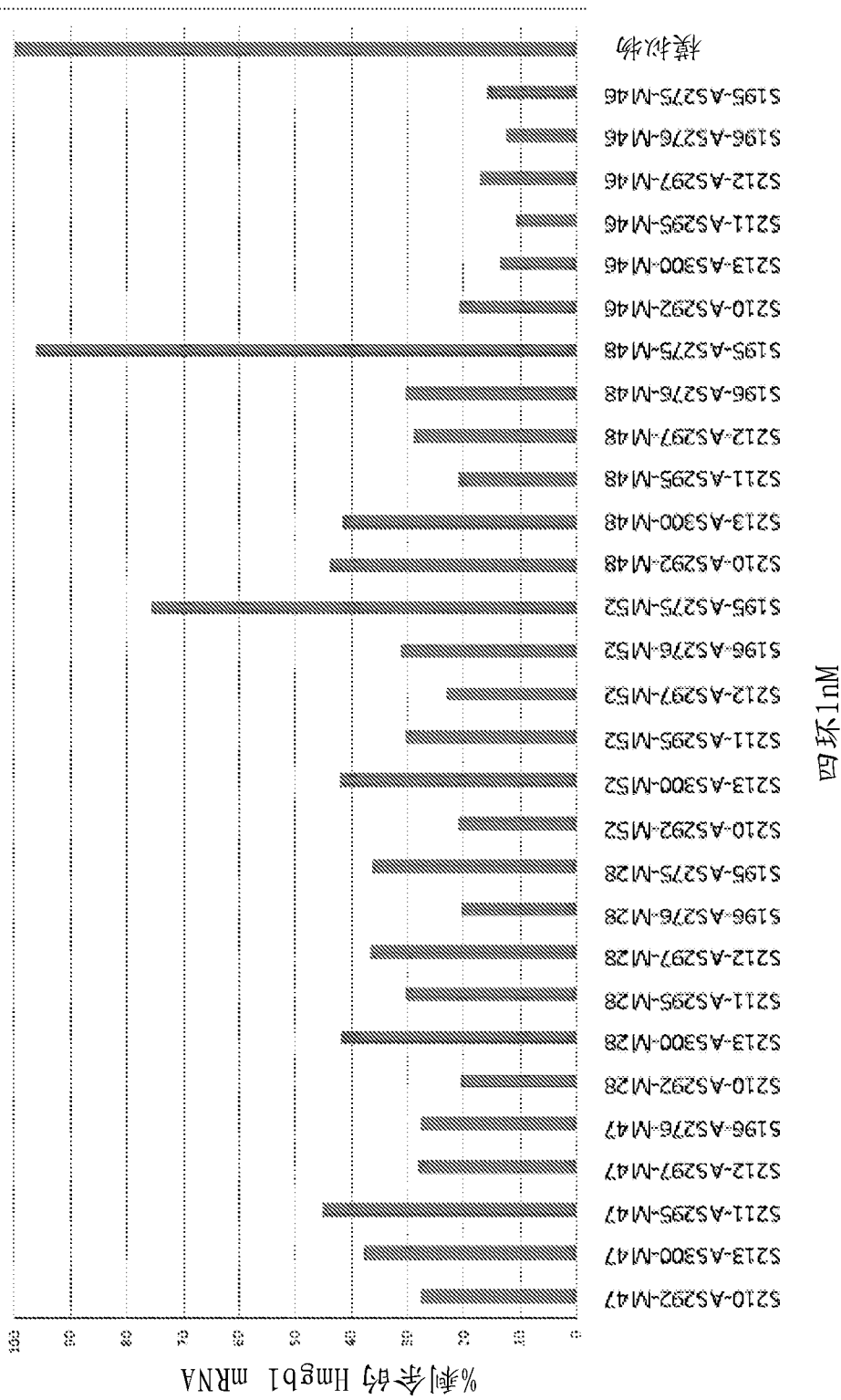


图 5

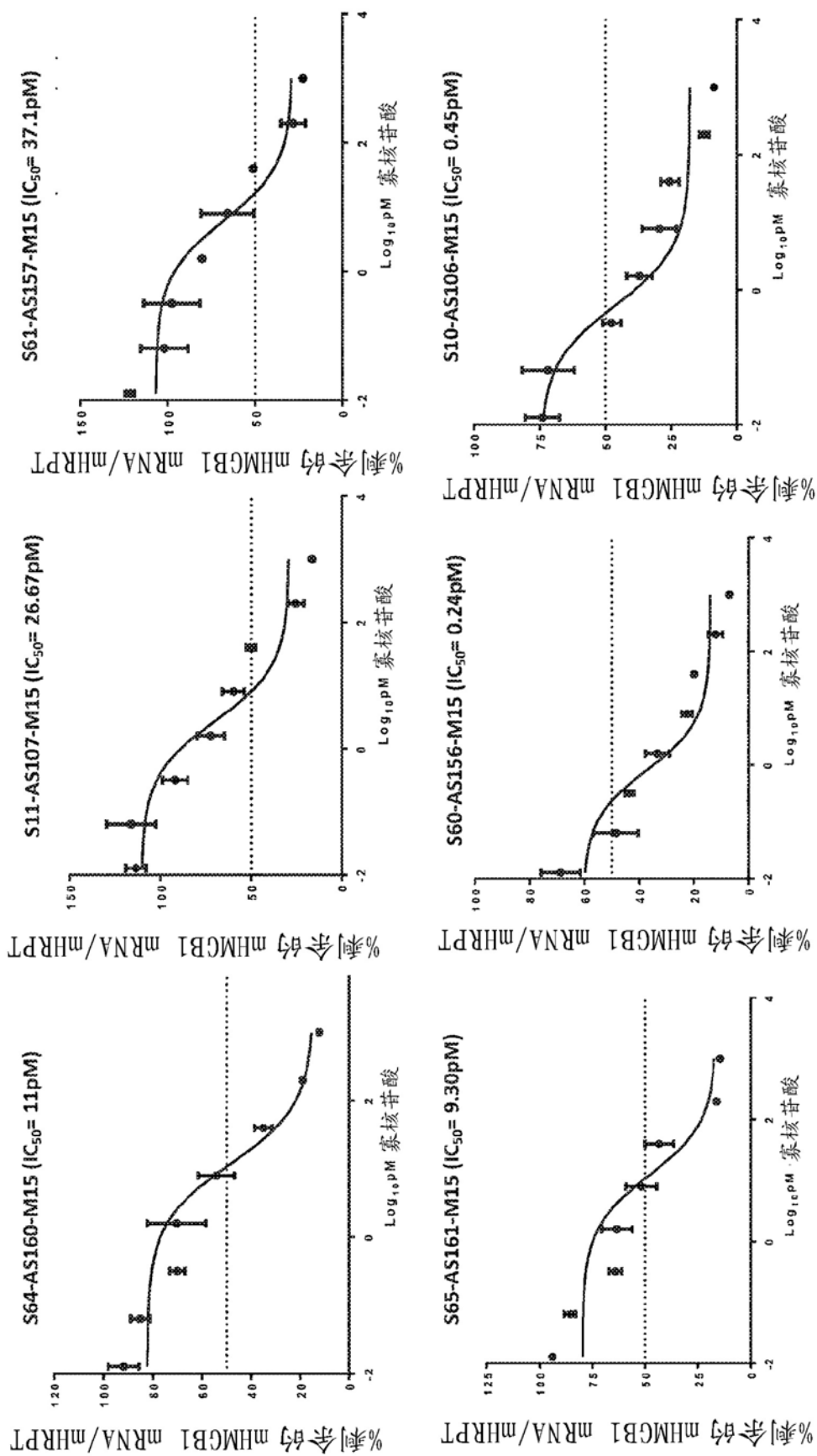


图 6

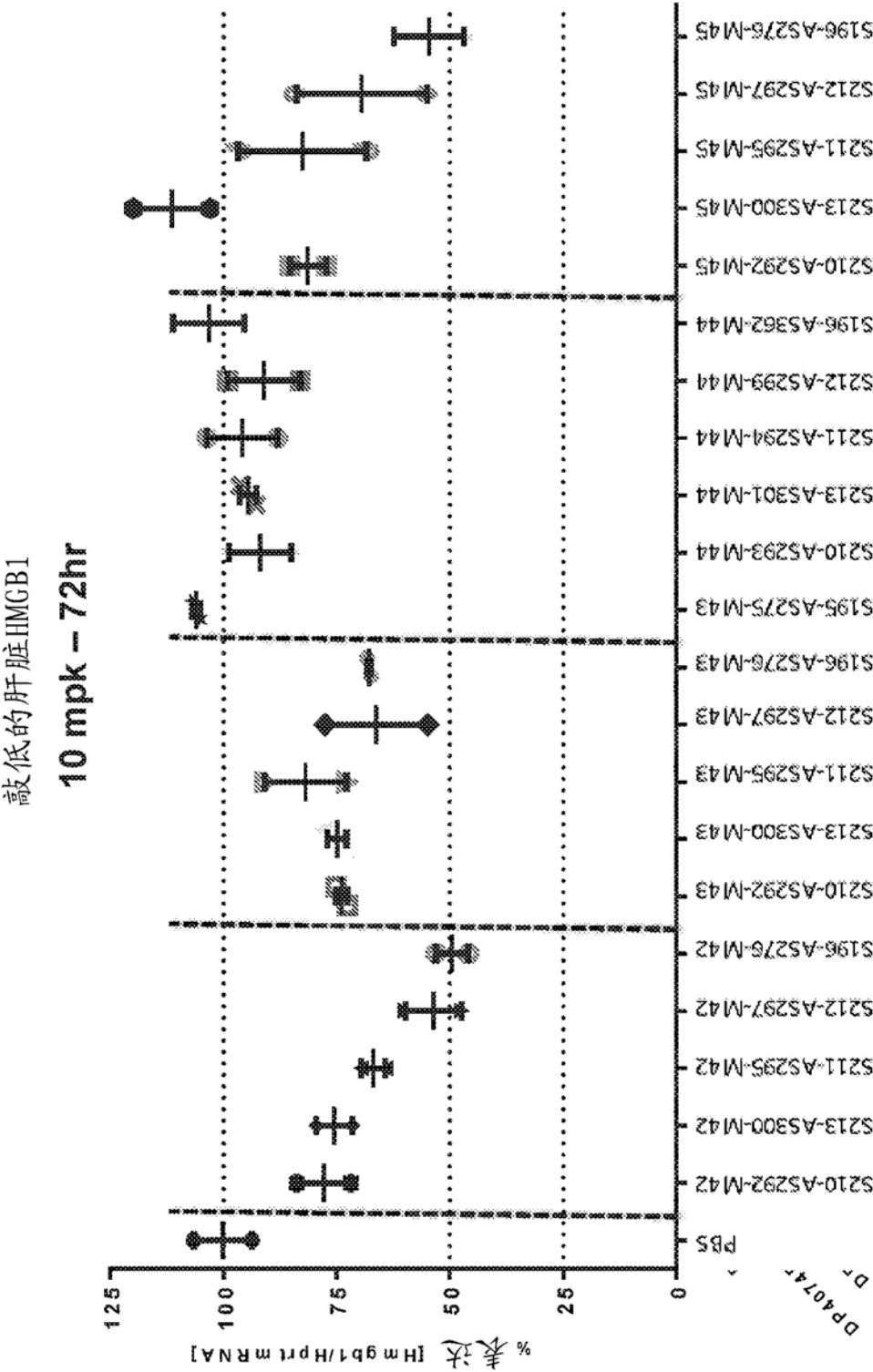


图 7

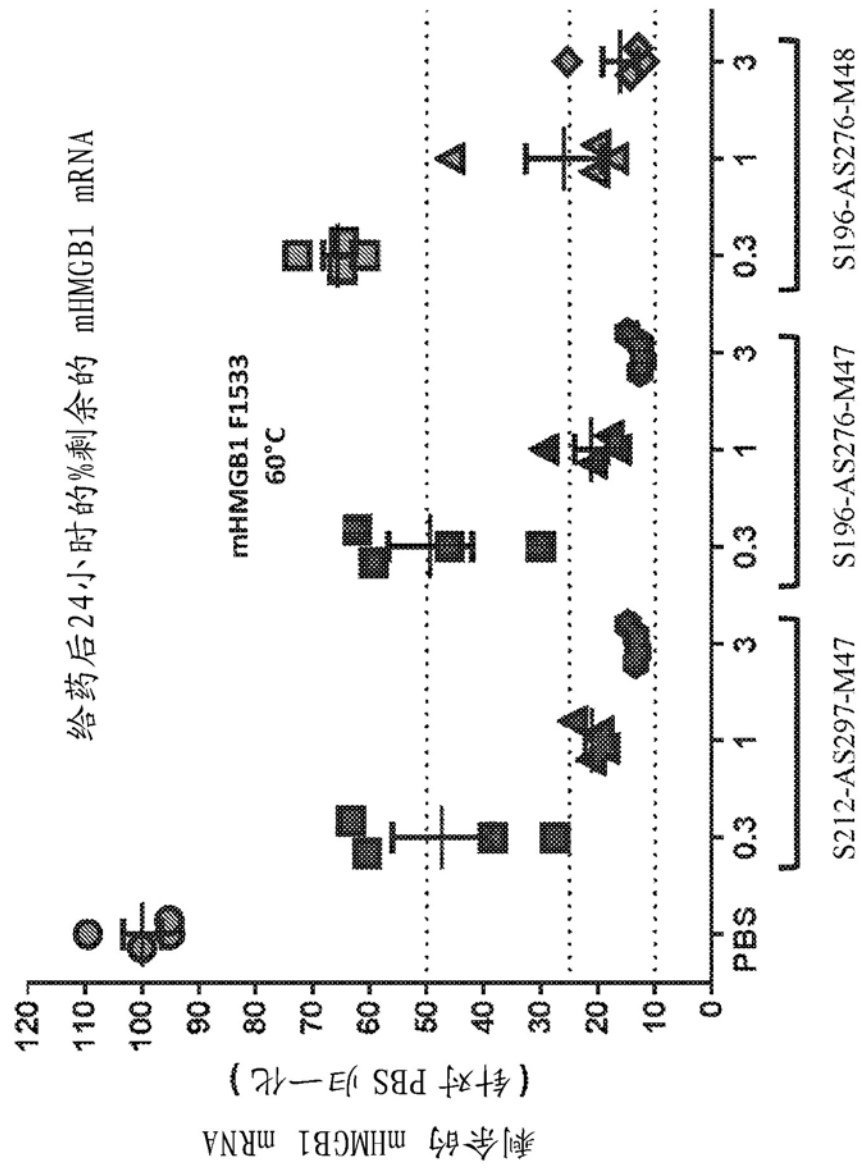


图 8

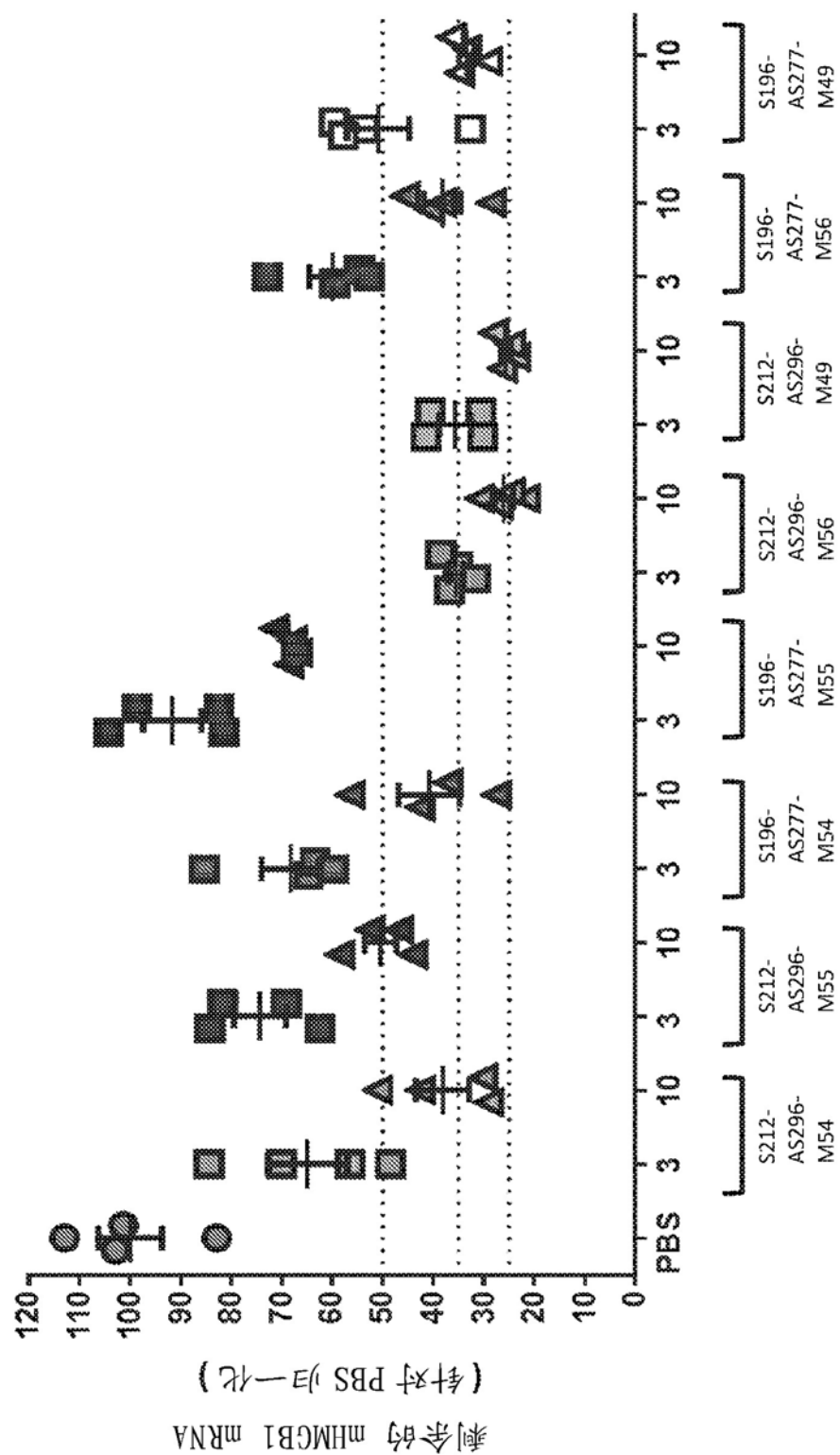


图 9

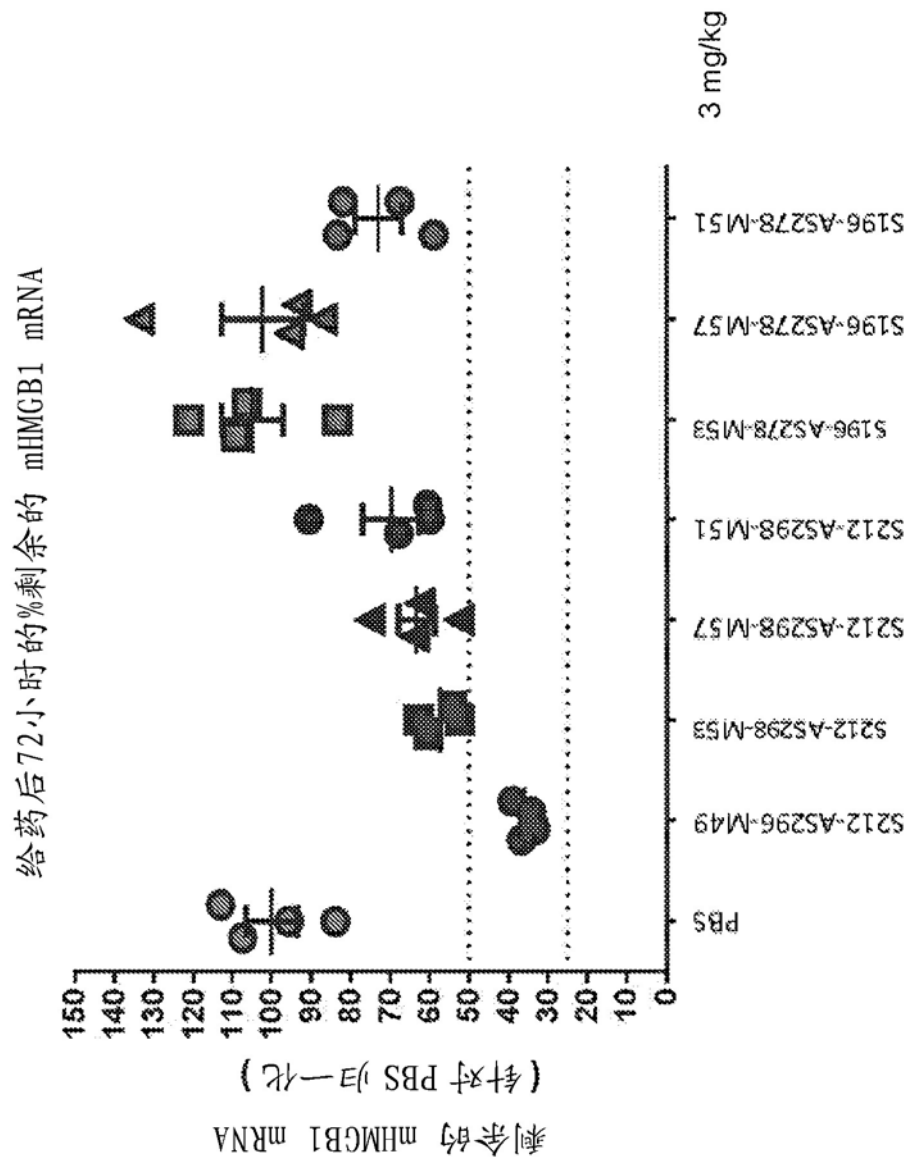


图 10

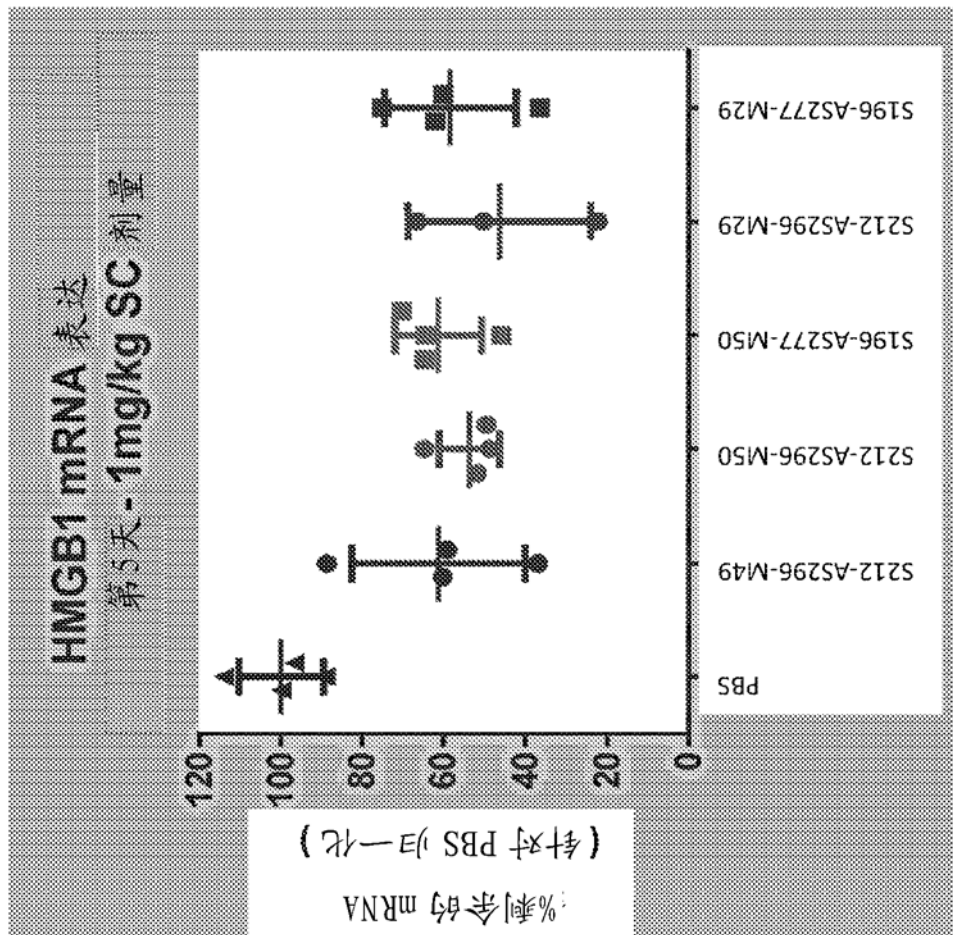


图 11

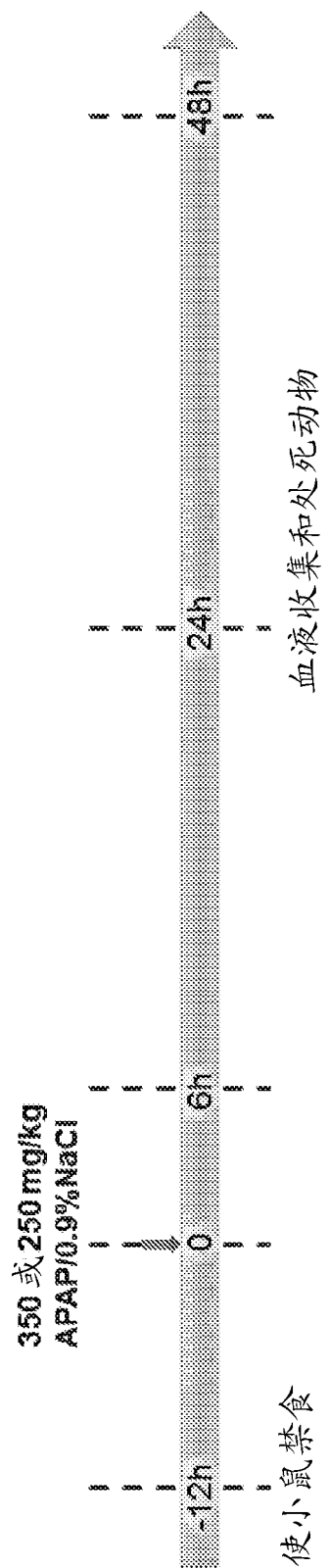


图 12

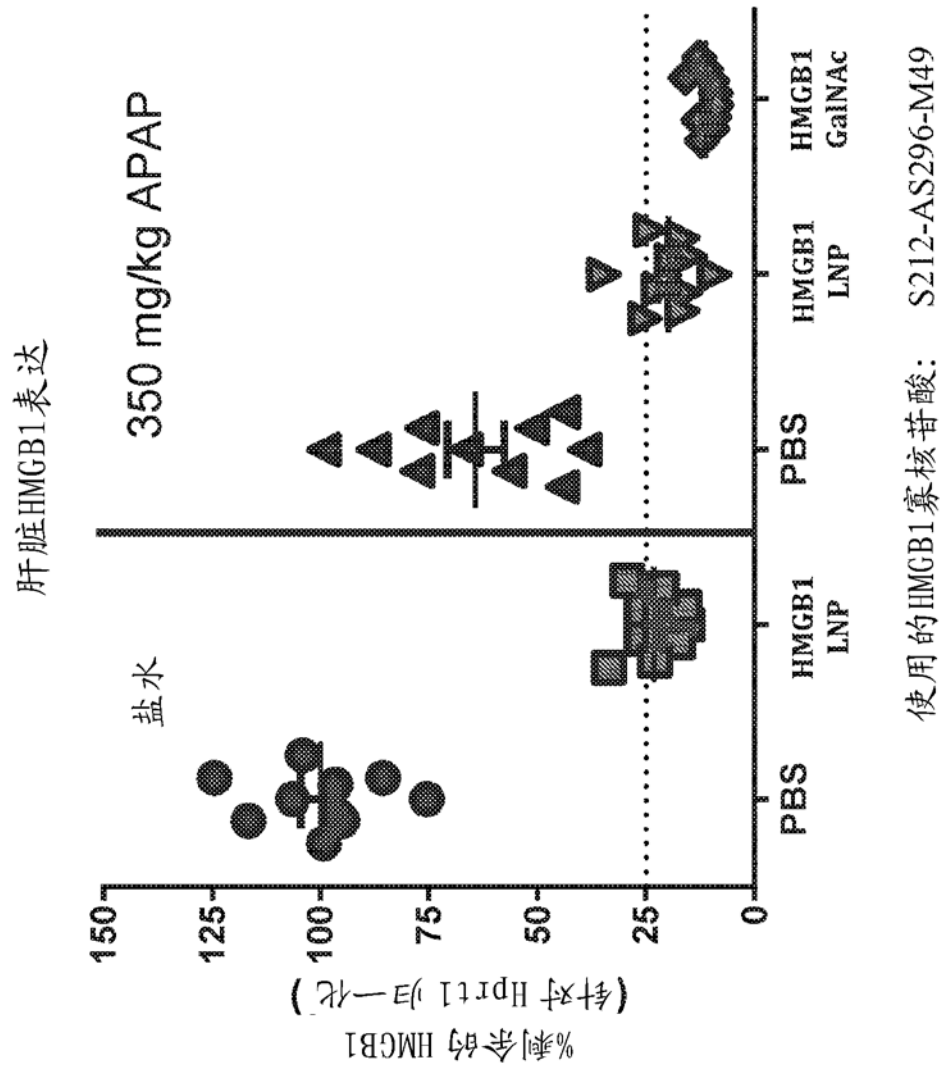


图 13A

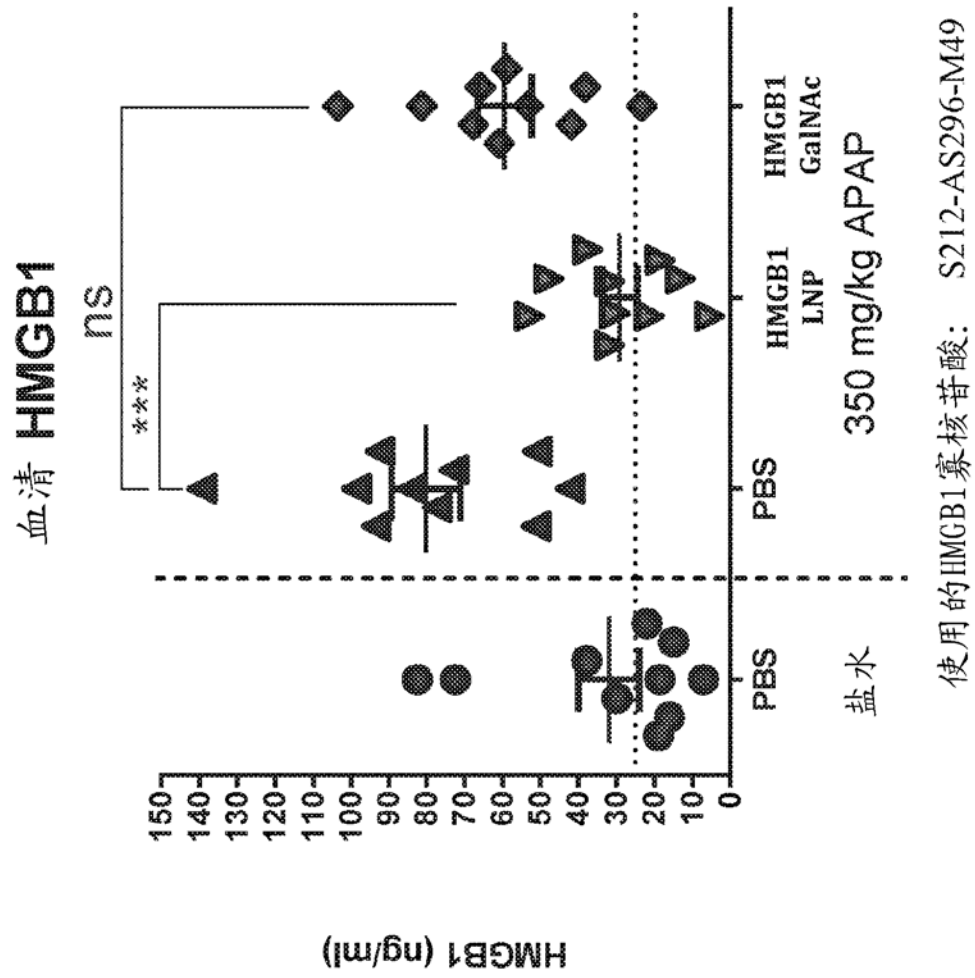
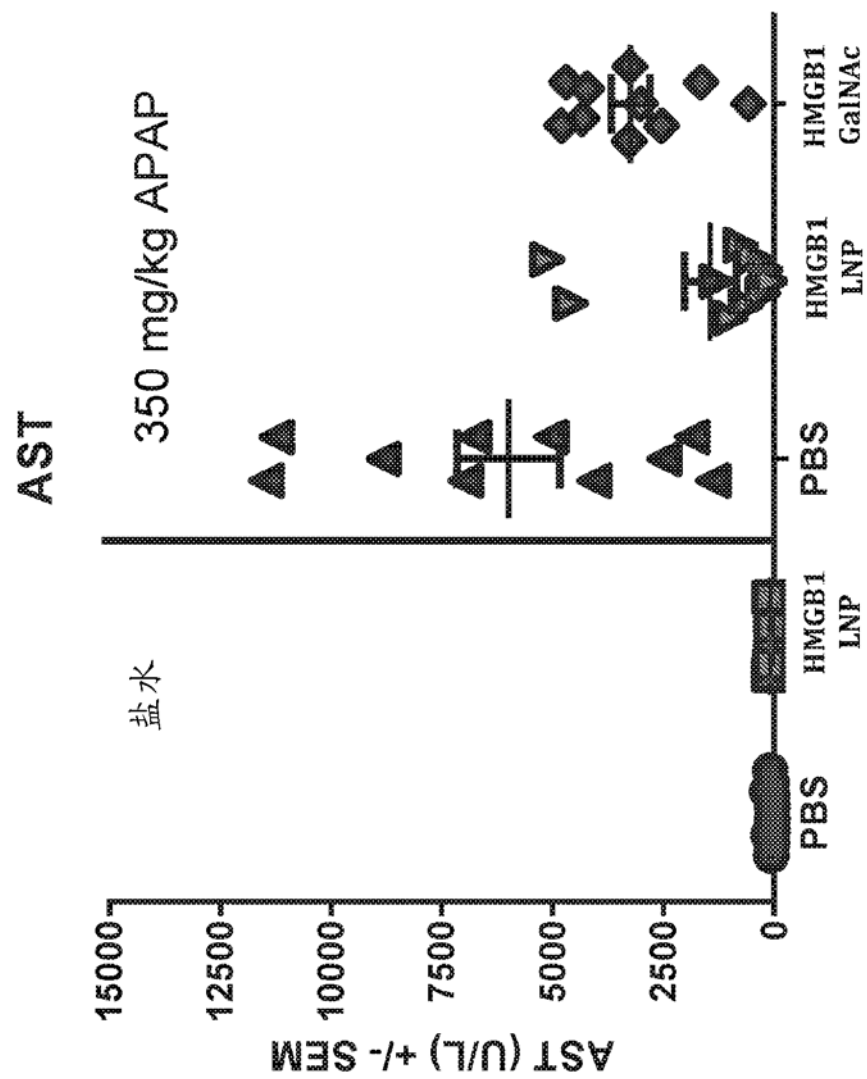
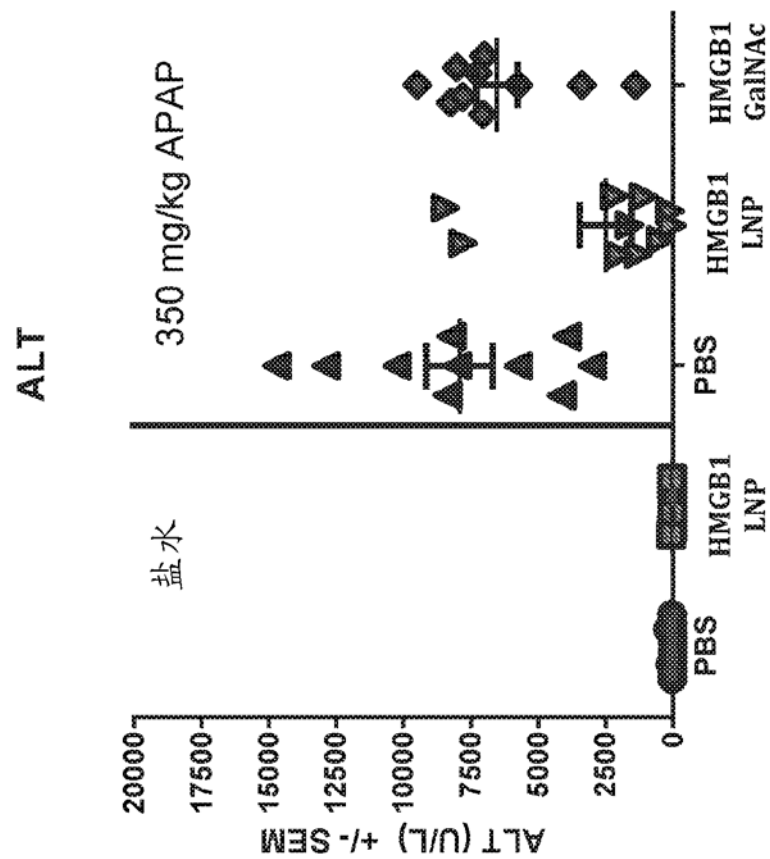


图 13B



使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

图 14A



使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

图 14B

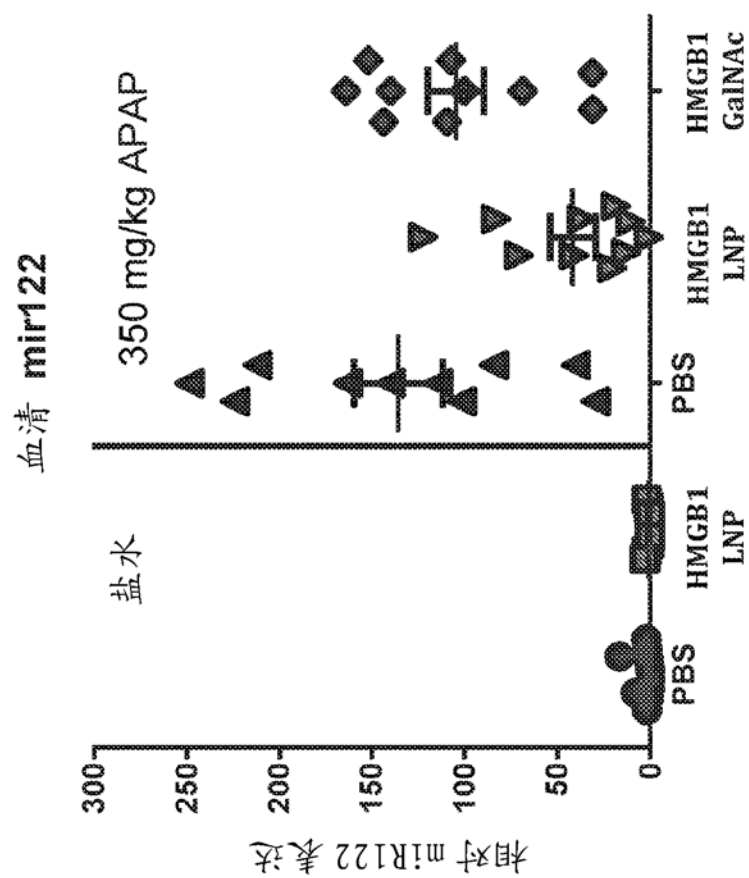


图 14C

使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

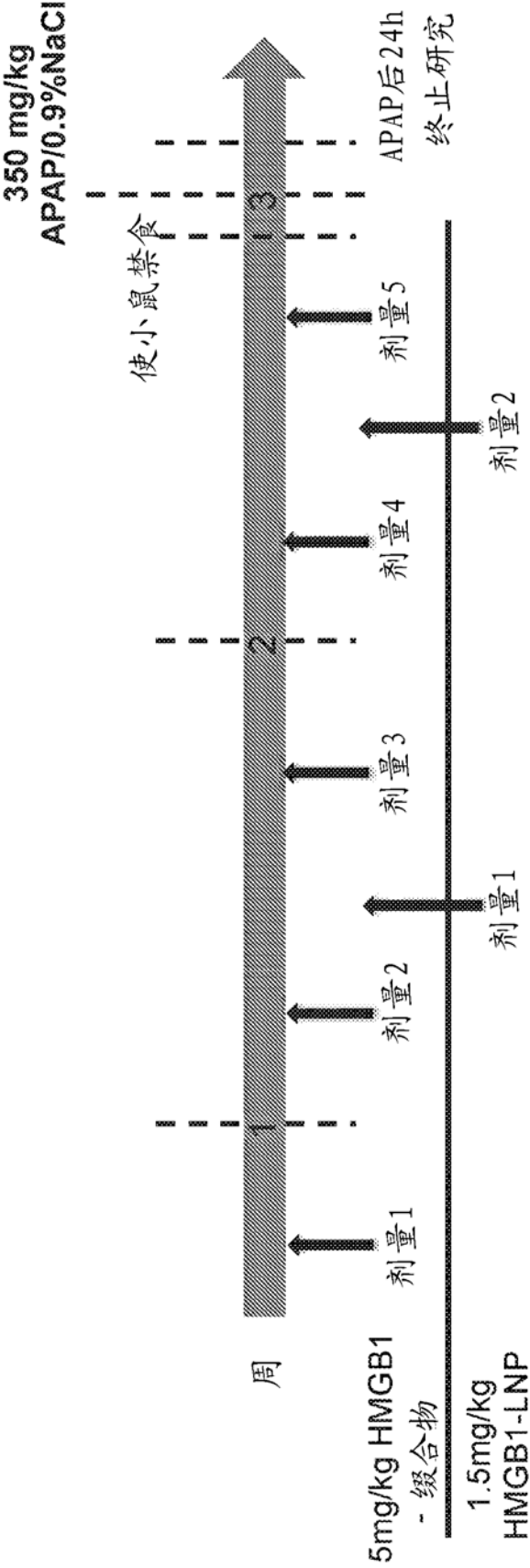
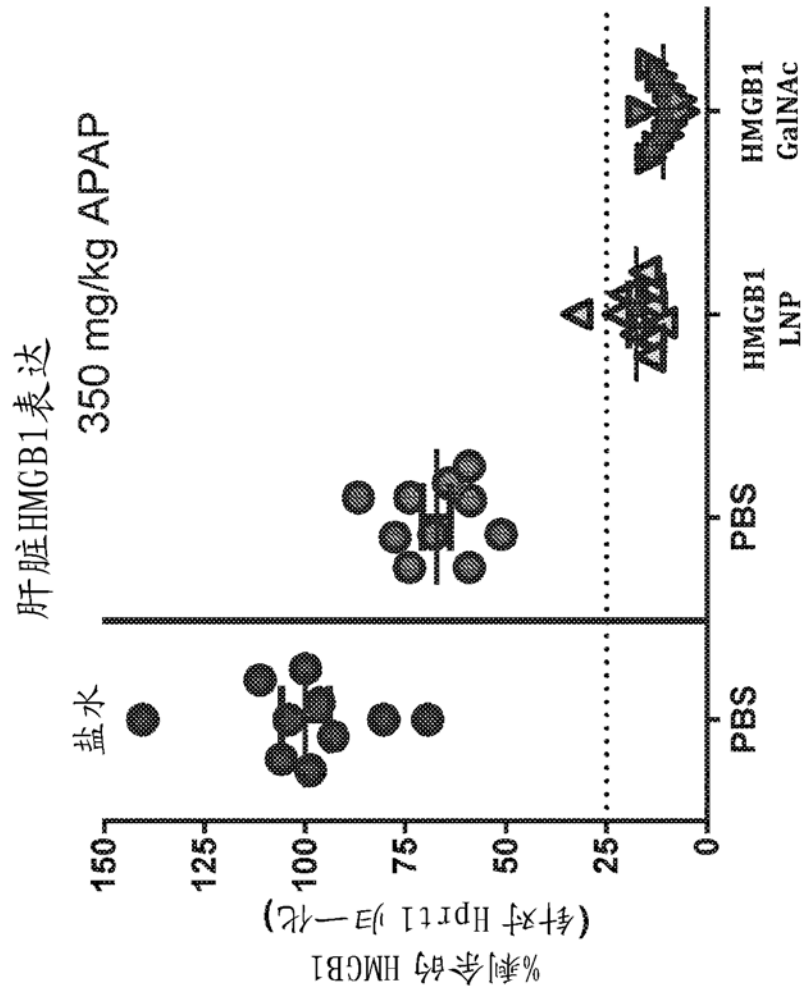
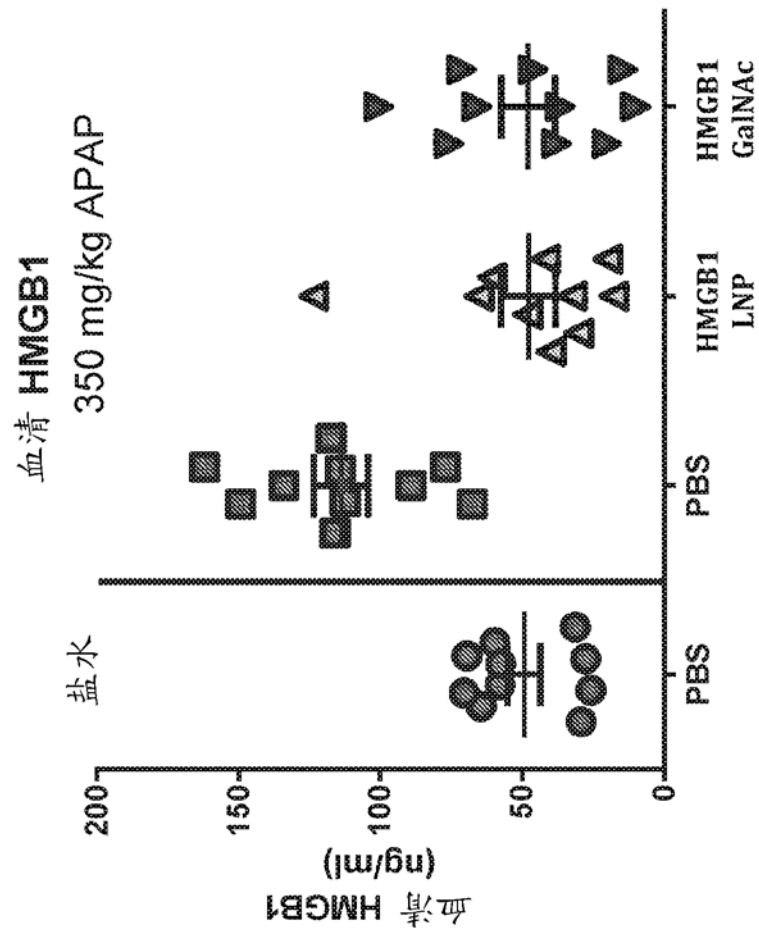


图 15



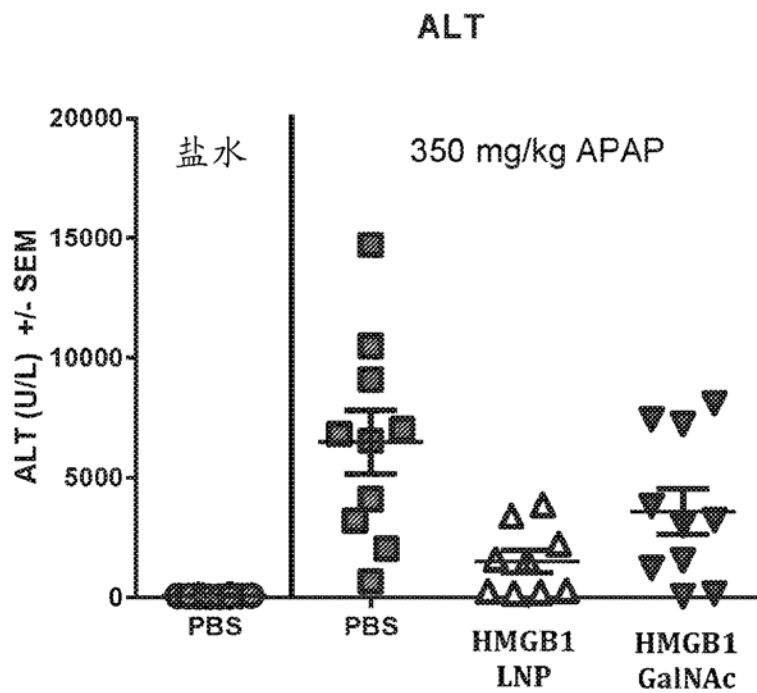
使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M56

图 16A



使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M56

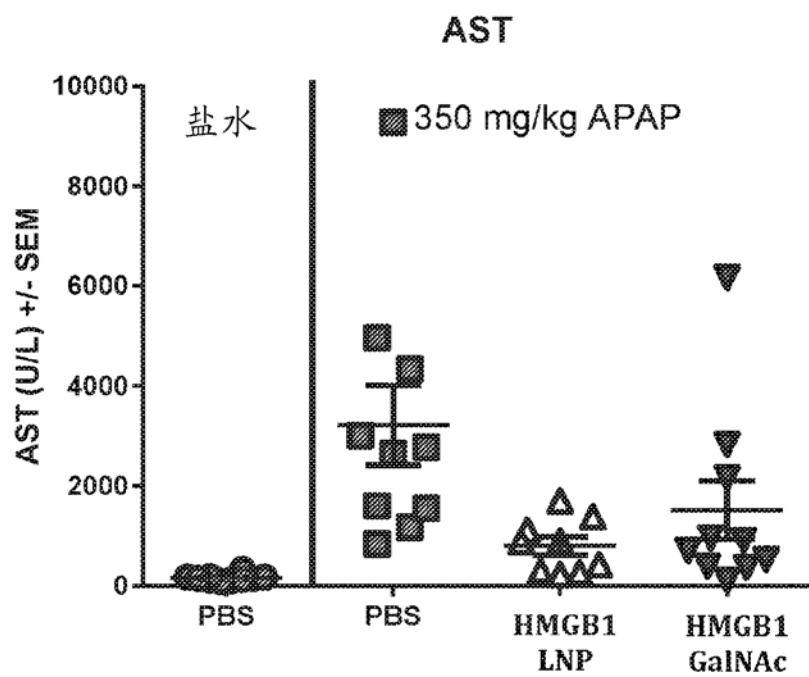
图 16B



使用的HMGB1寡核苷酸:

S212-AS296-M56

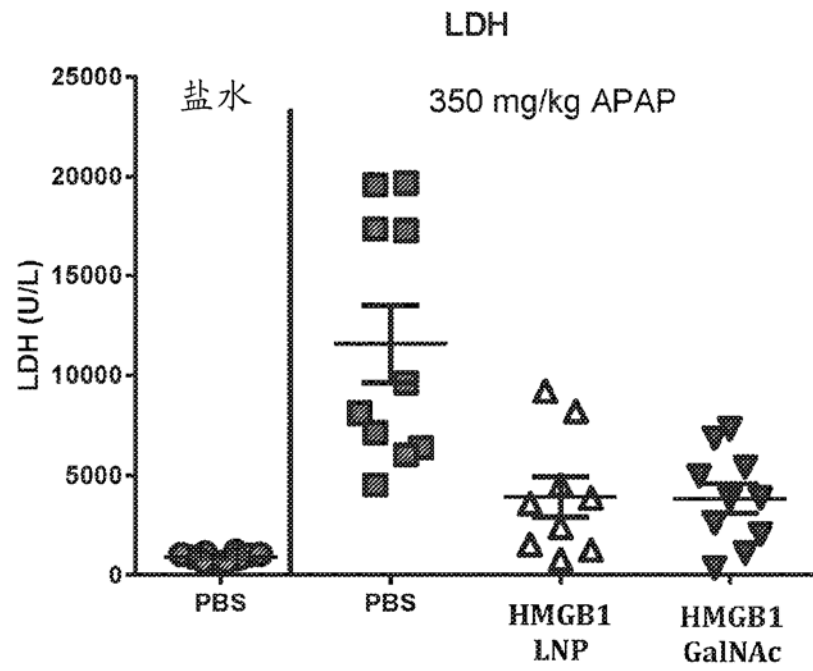
图 17A



使用的HMGB1寡核苷酸:

S212-AS296-M56

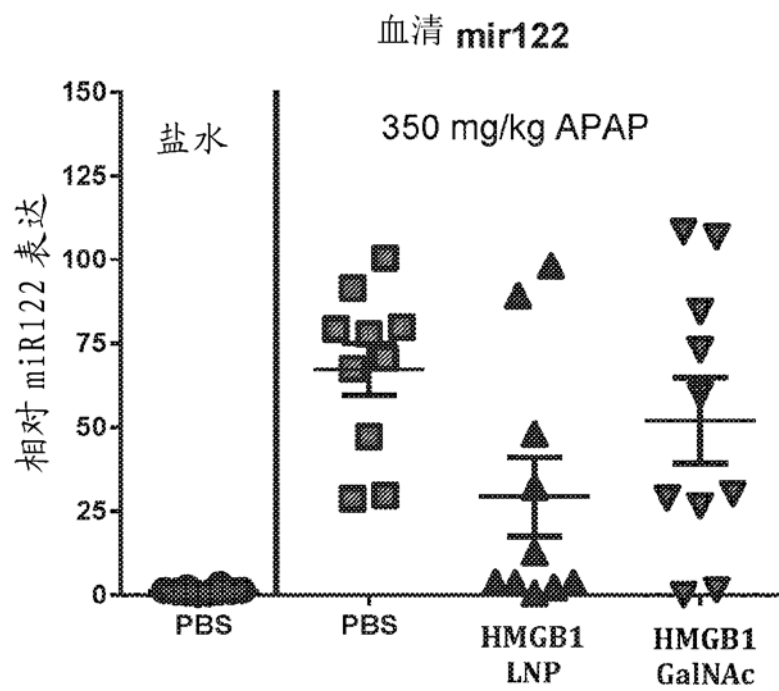
图 17B



使用的HMGB1寡核苷酸:

S212-AS296-M56

图 17C



使用的HMGB1寡核苷酸:

S212-AS296-M56

图 17D

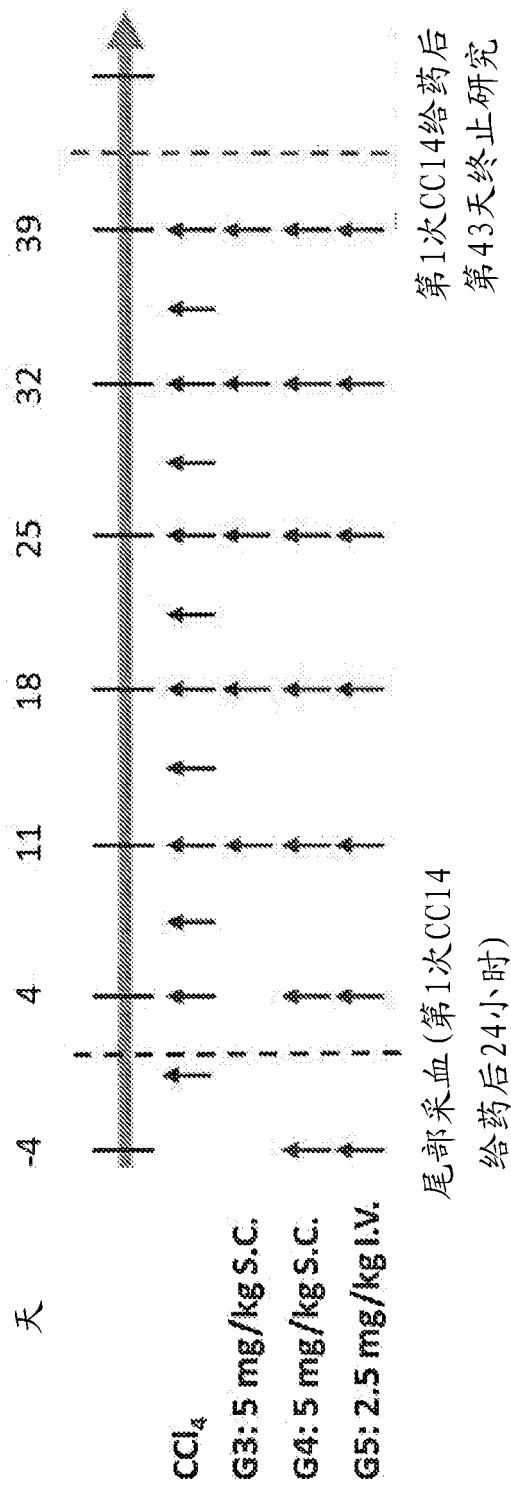


图 18

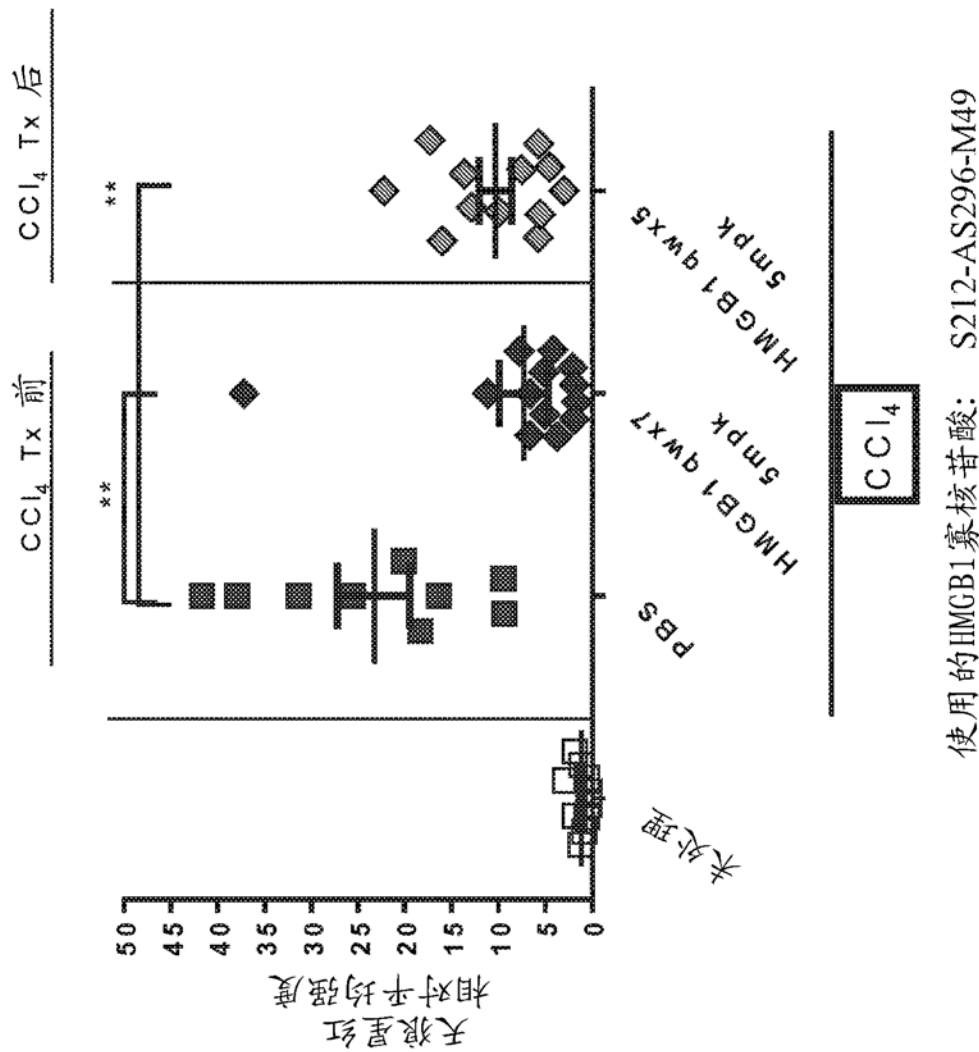
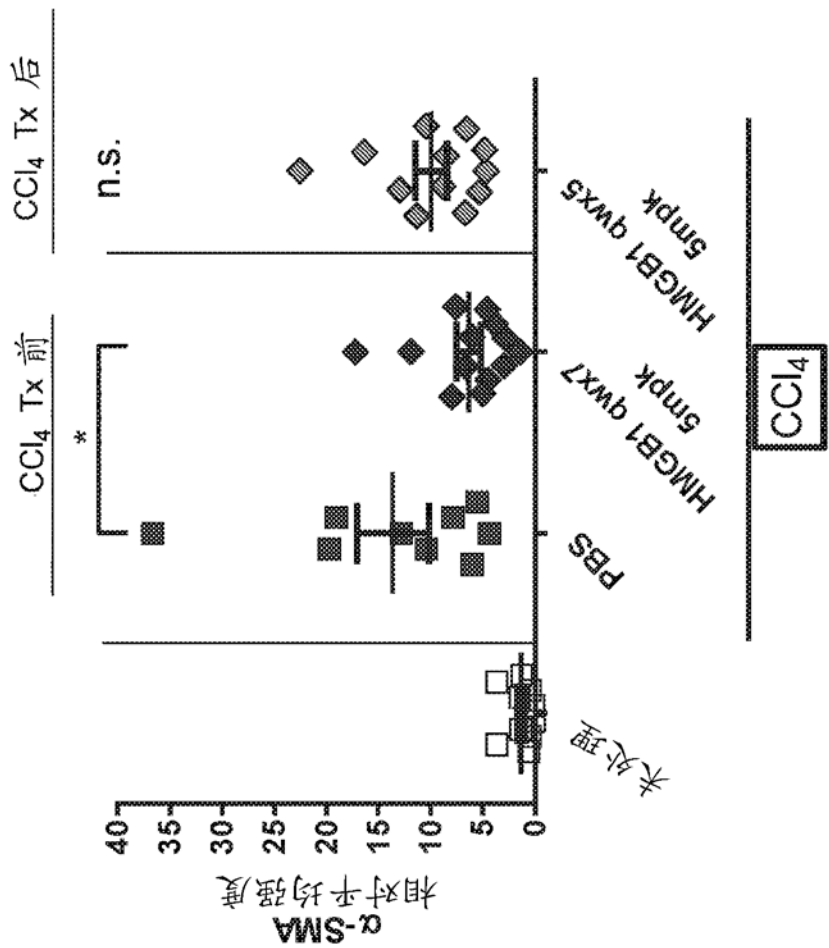


图 19



使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

图 20

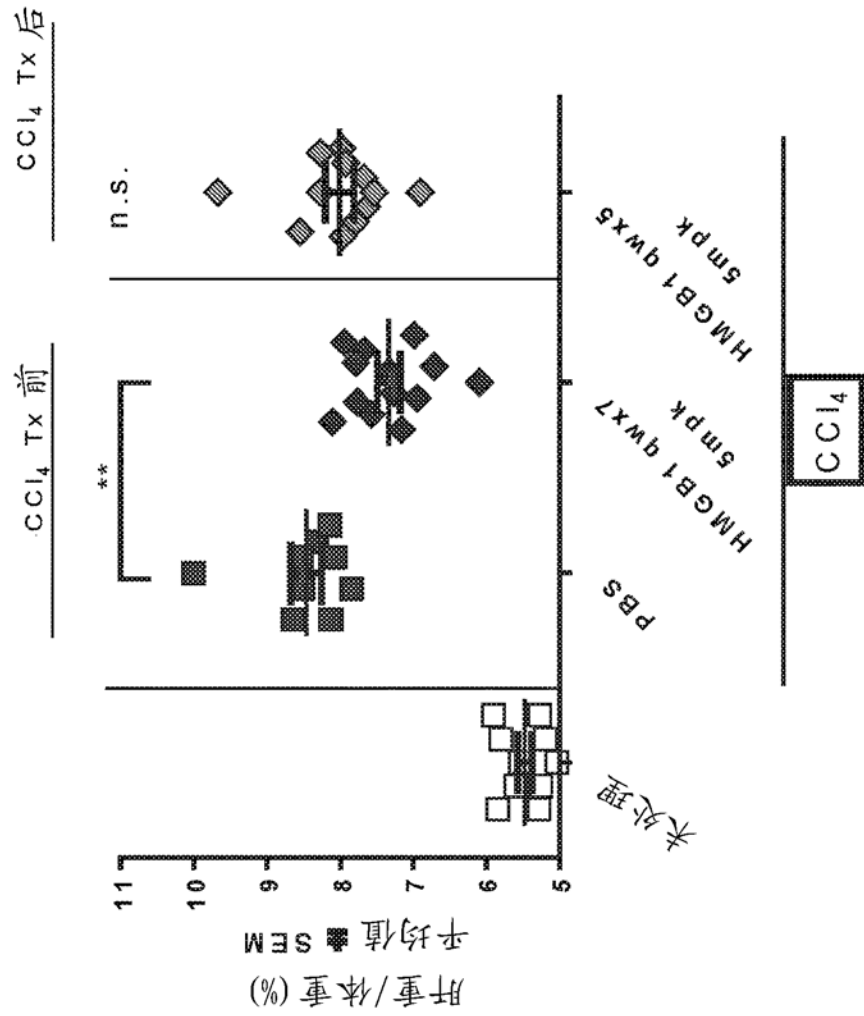


图 21

使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

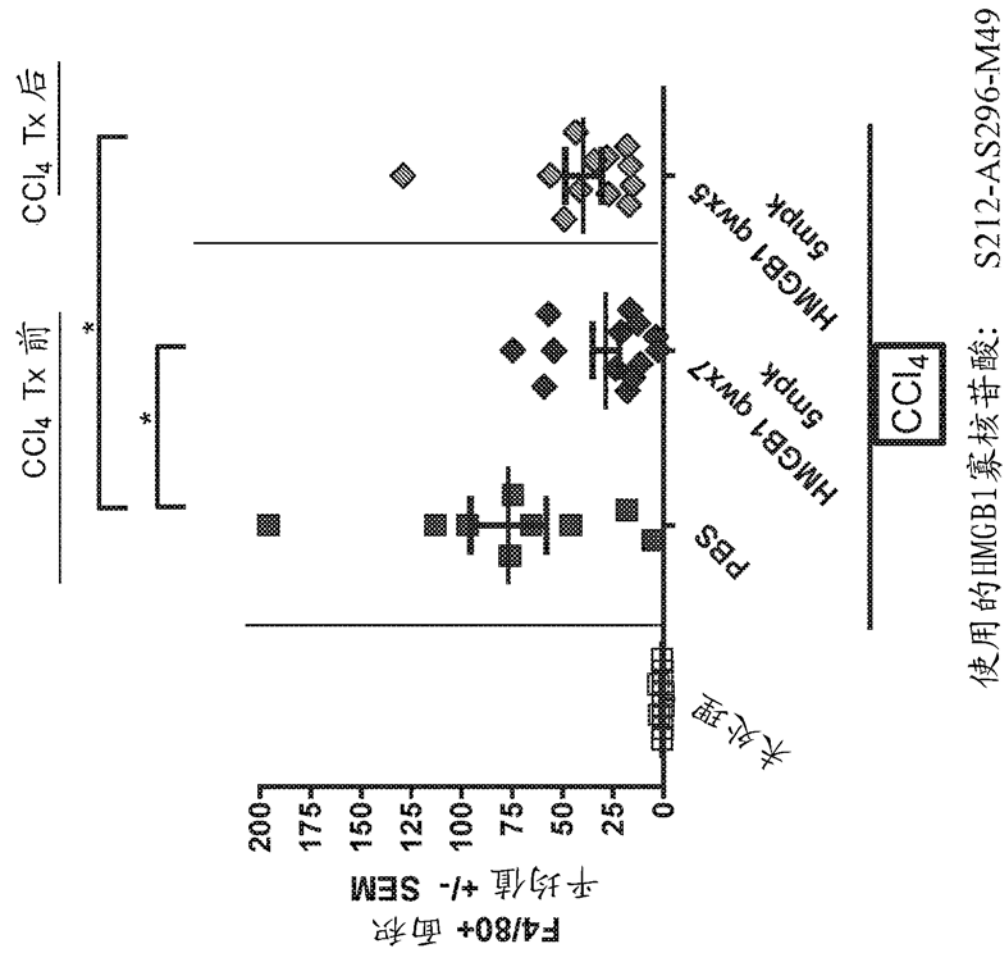


图 22

使用的HMGB1寡核苷酸: S212-AS296-M49

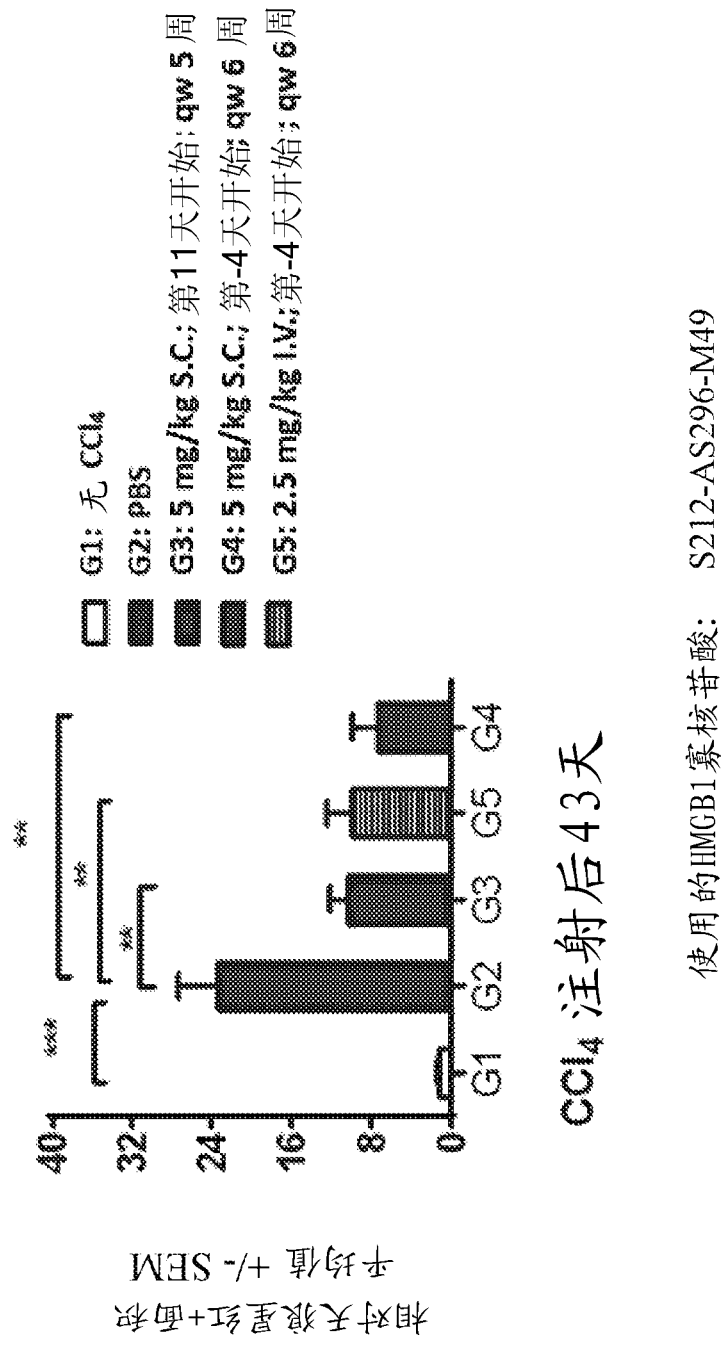


图 23

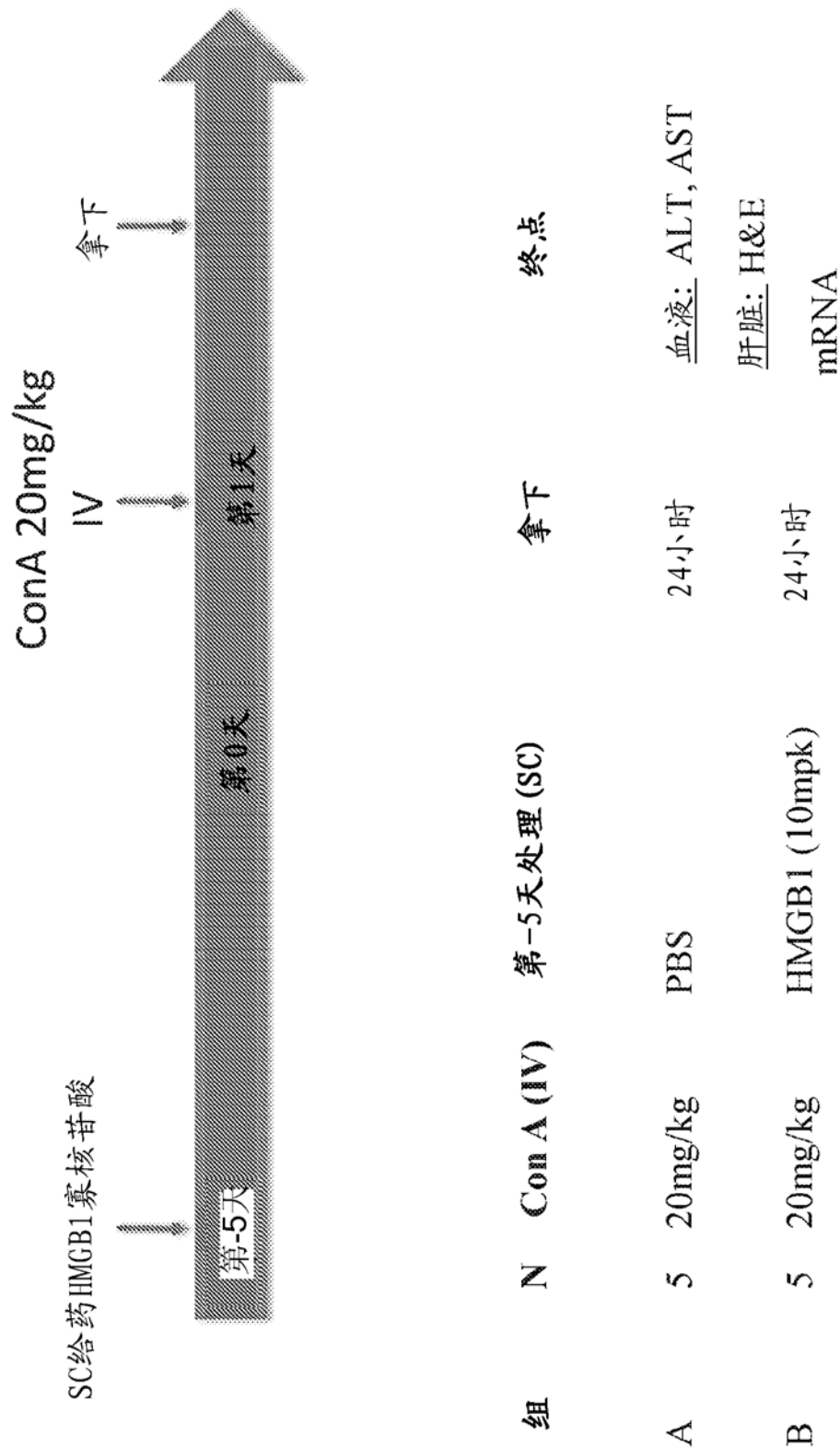


图 24

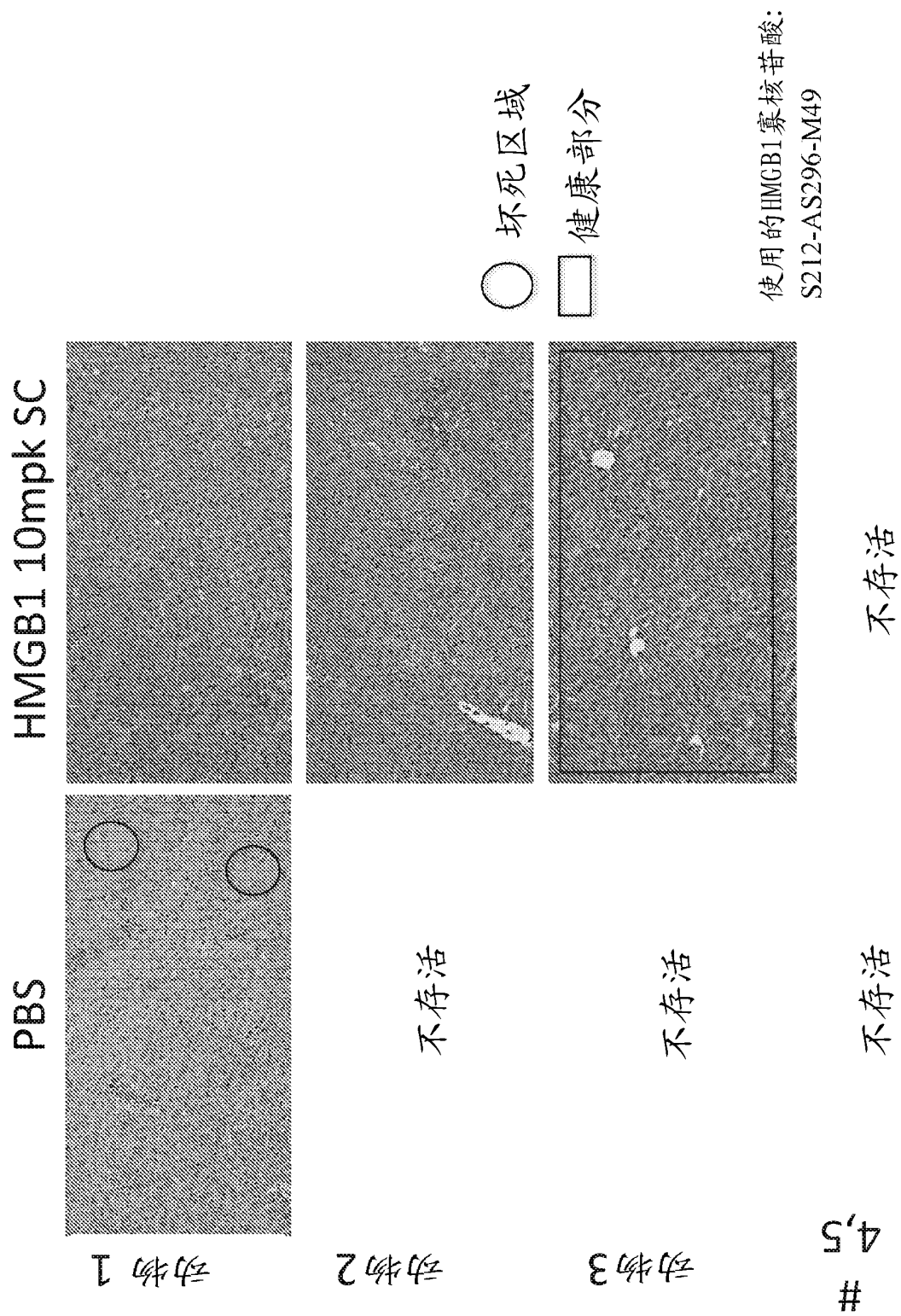
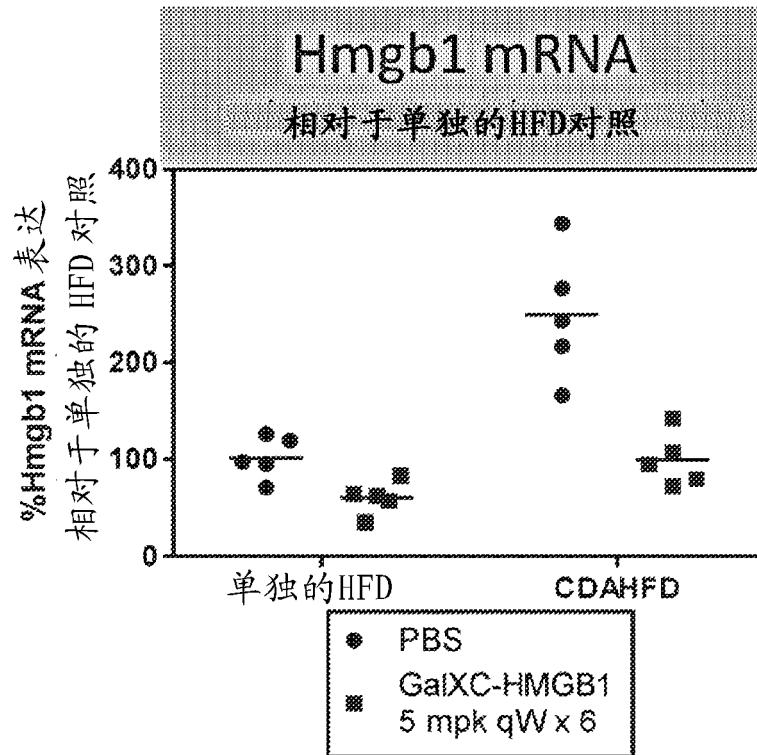
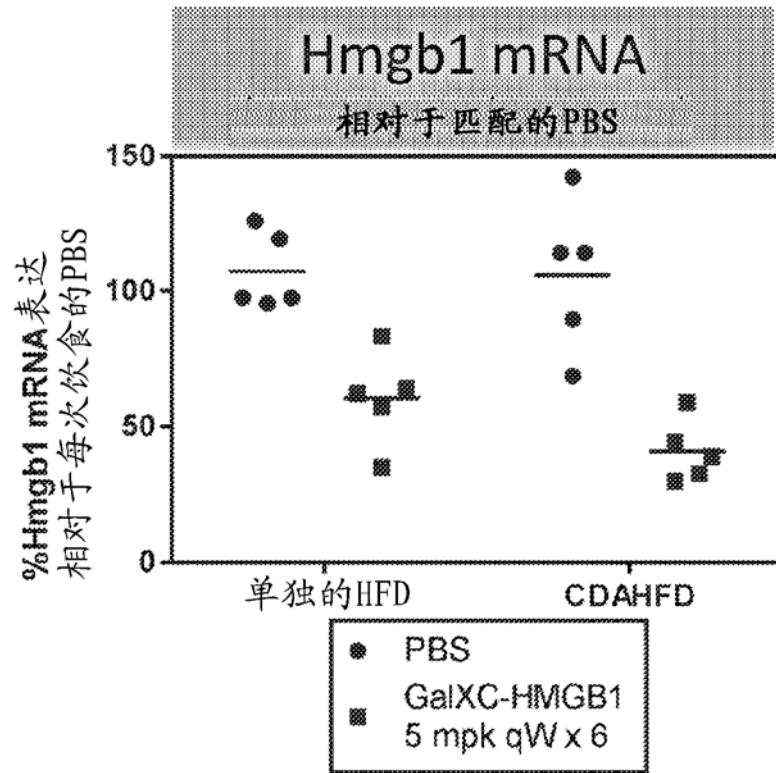


图 25



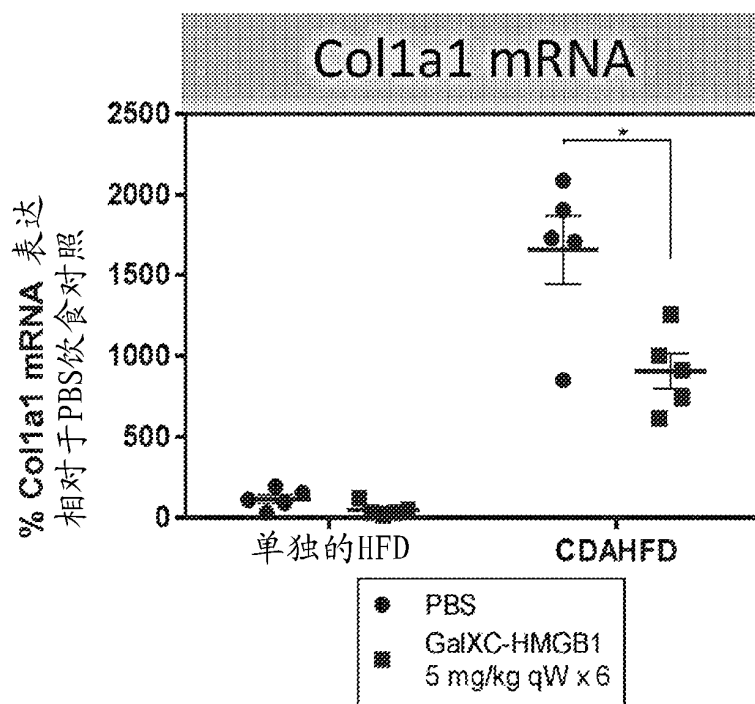
使用的HMGB1寡核苷酸: S194-AS274-M30

图 26A



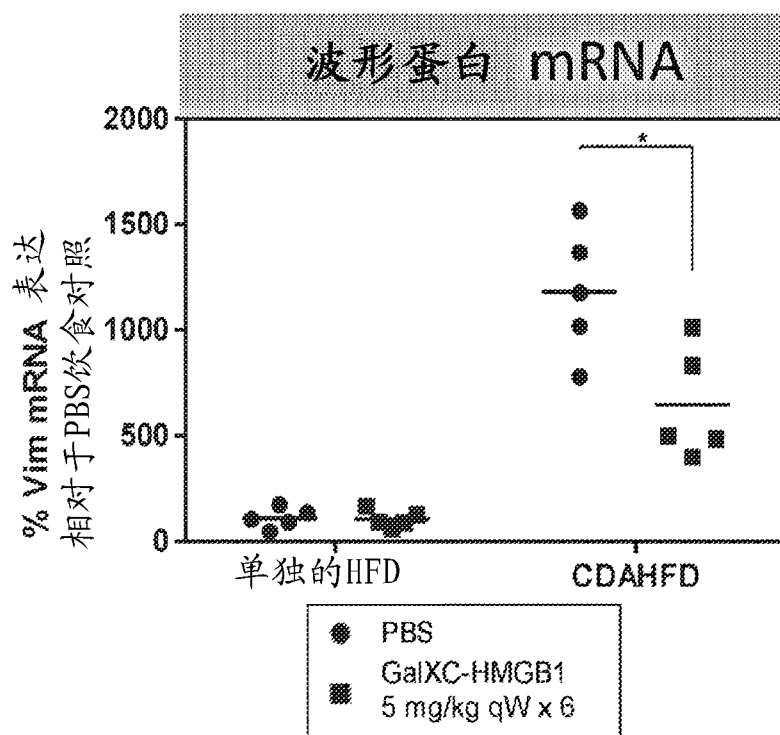
使用的HMGB1寡核苷酸: S194-AS274-M30

图 26B



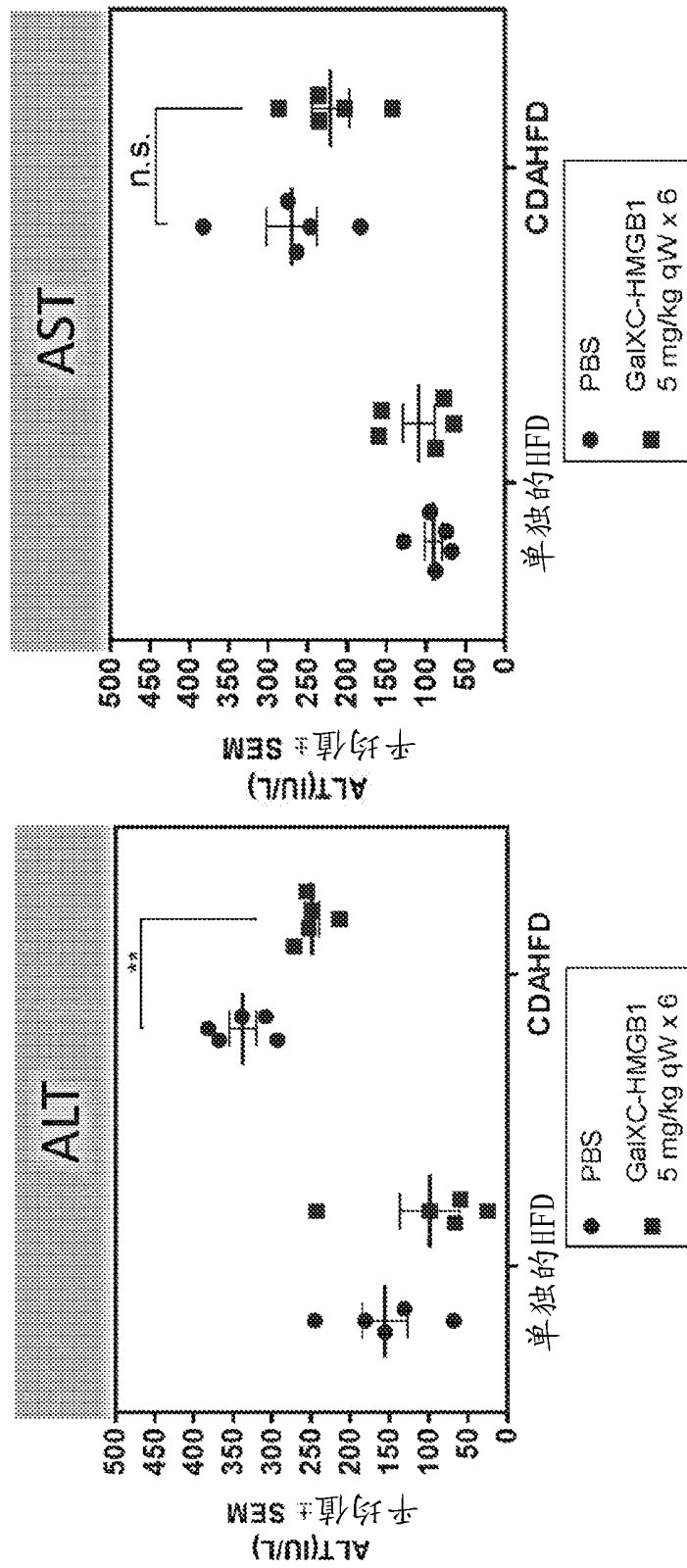
使用的HMGB1寡核苷酸: S194-AS274-M30

图 26C



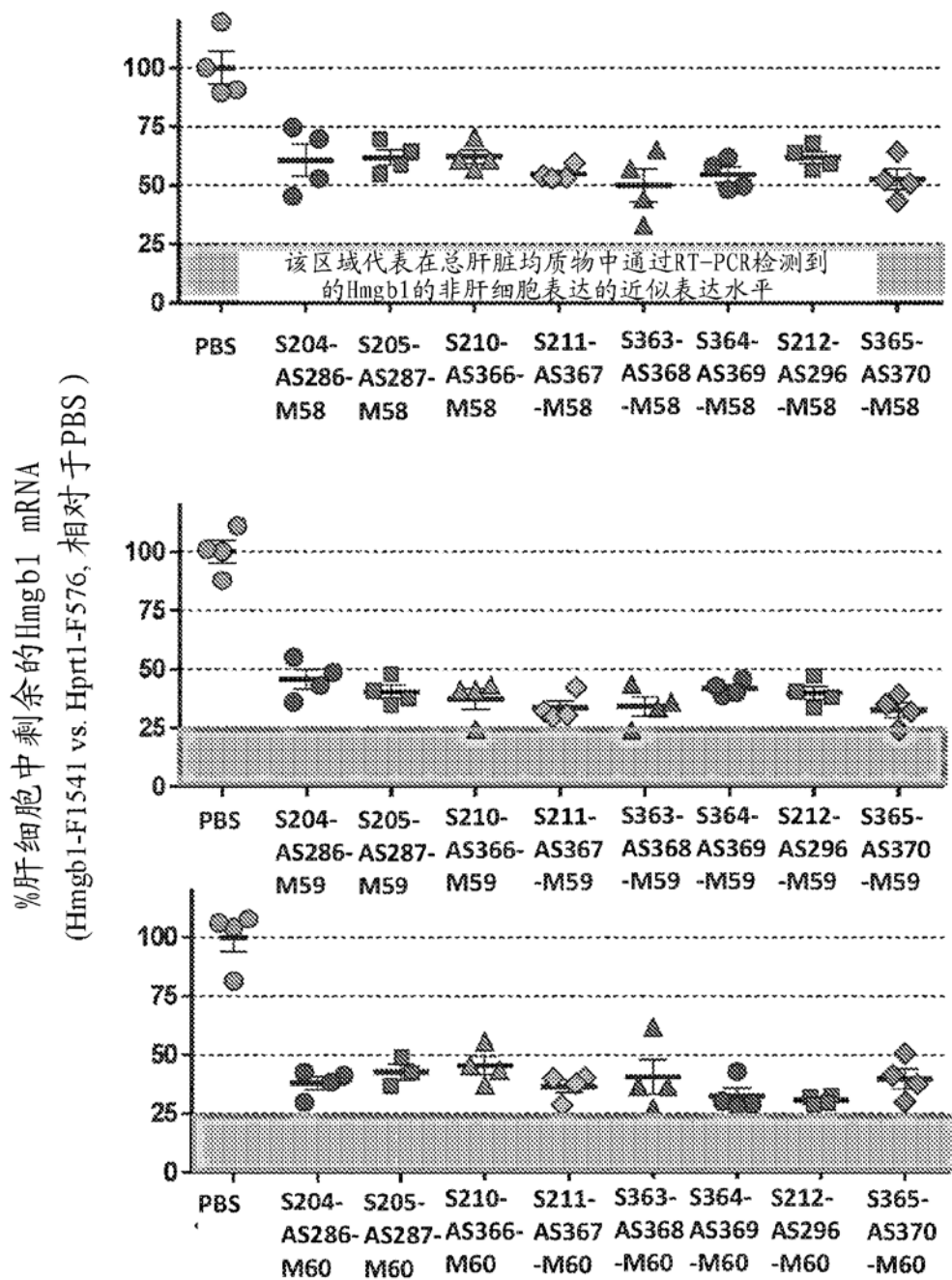
使用的HMGB1寡核苷酸: S194-AS274-M30

图 26D



使用的HMGB1寡核苷酸: S194-AS274-M30

图 27



GalXC-HMGB1 靶标位点

图 28

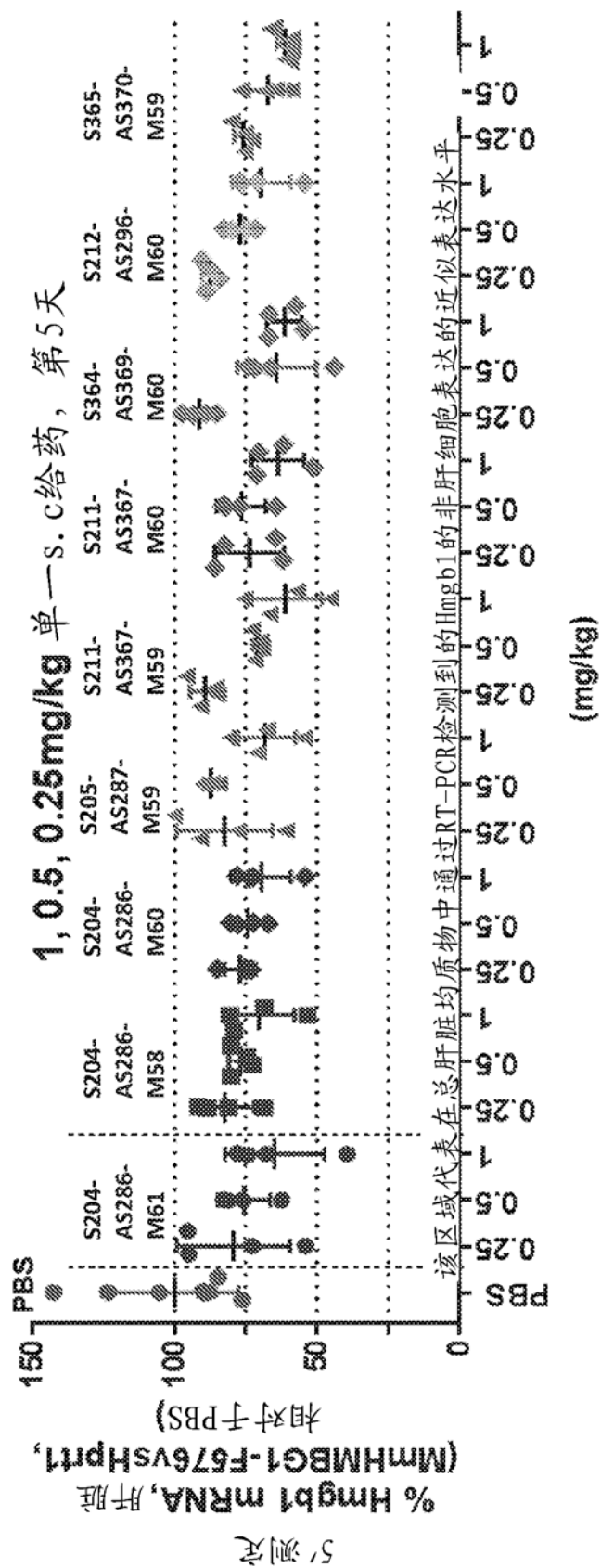


图 29A

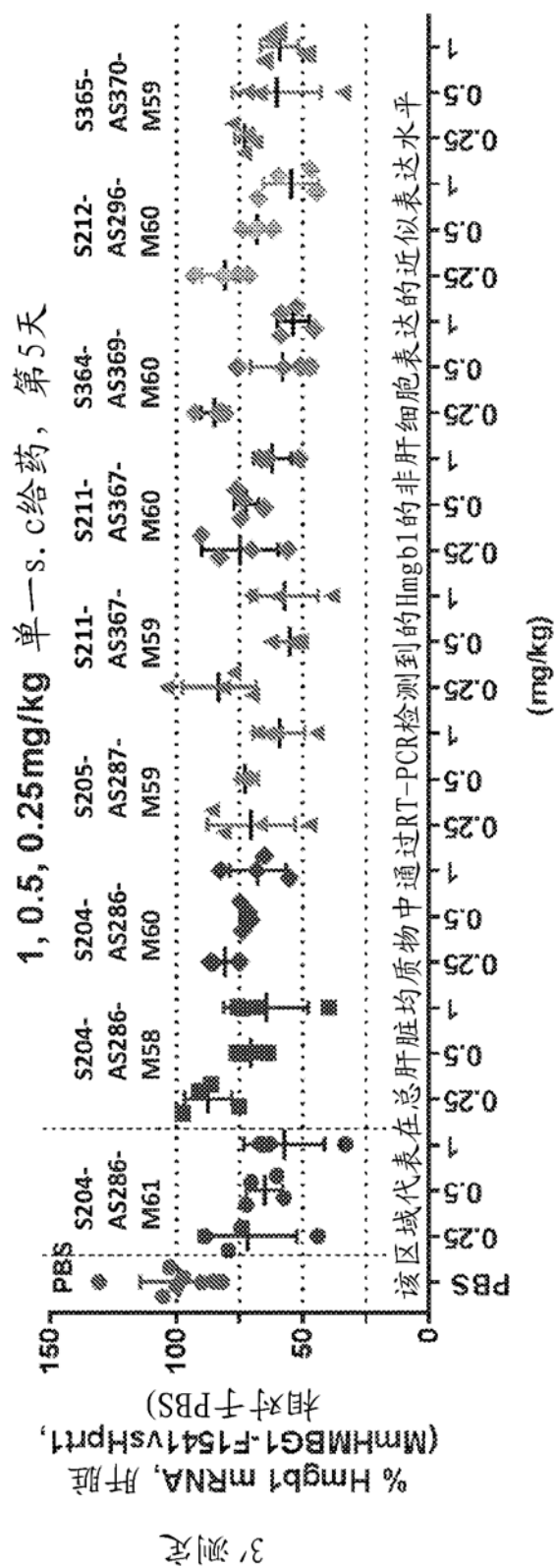


图 29B

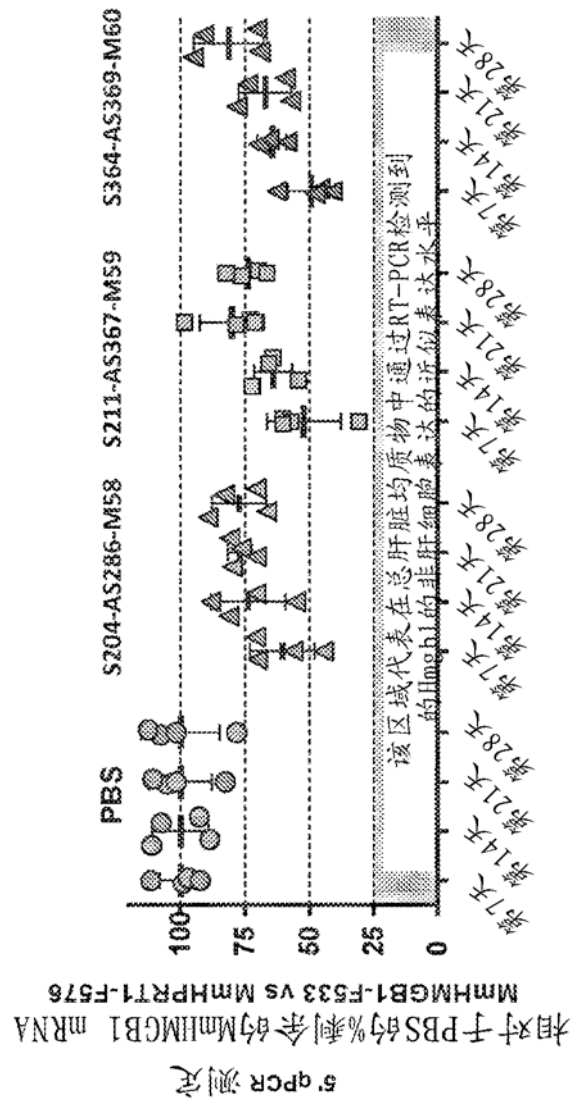


图 30A

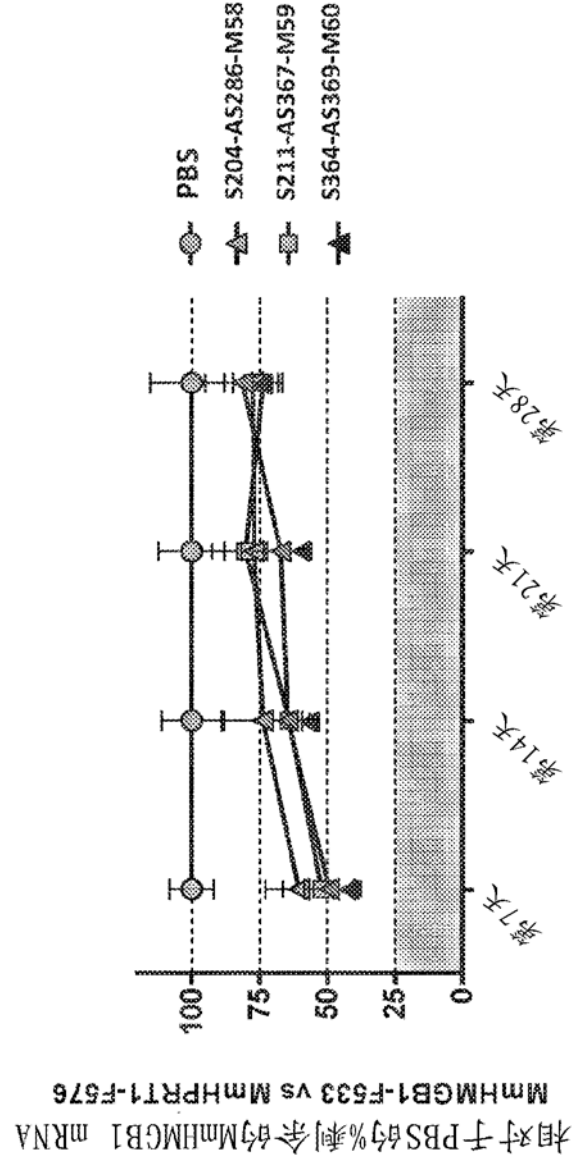


图 30B

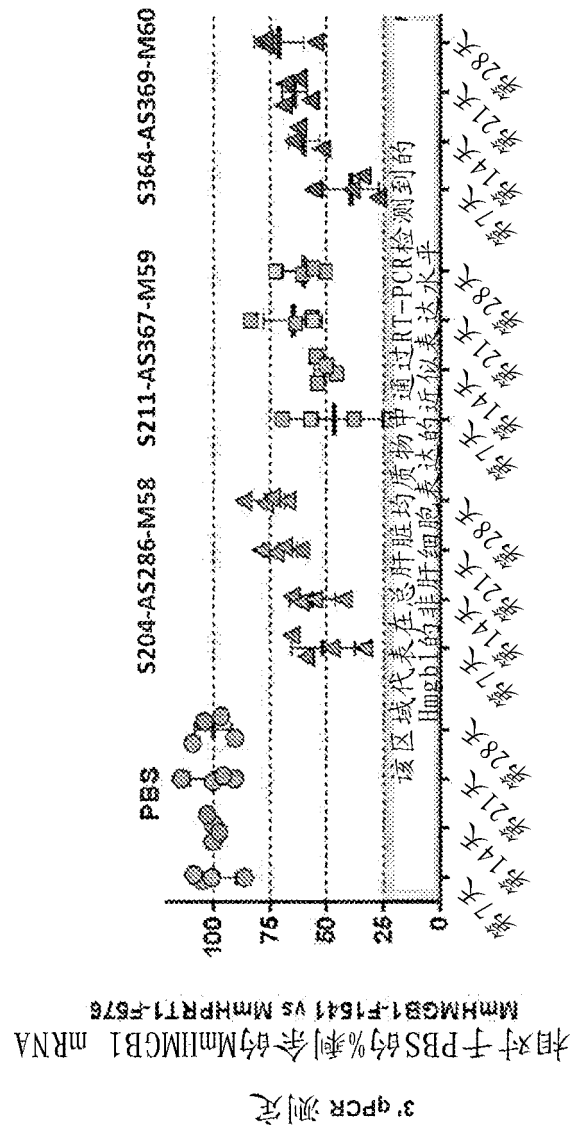


图 30C

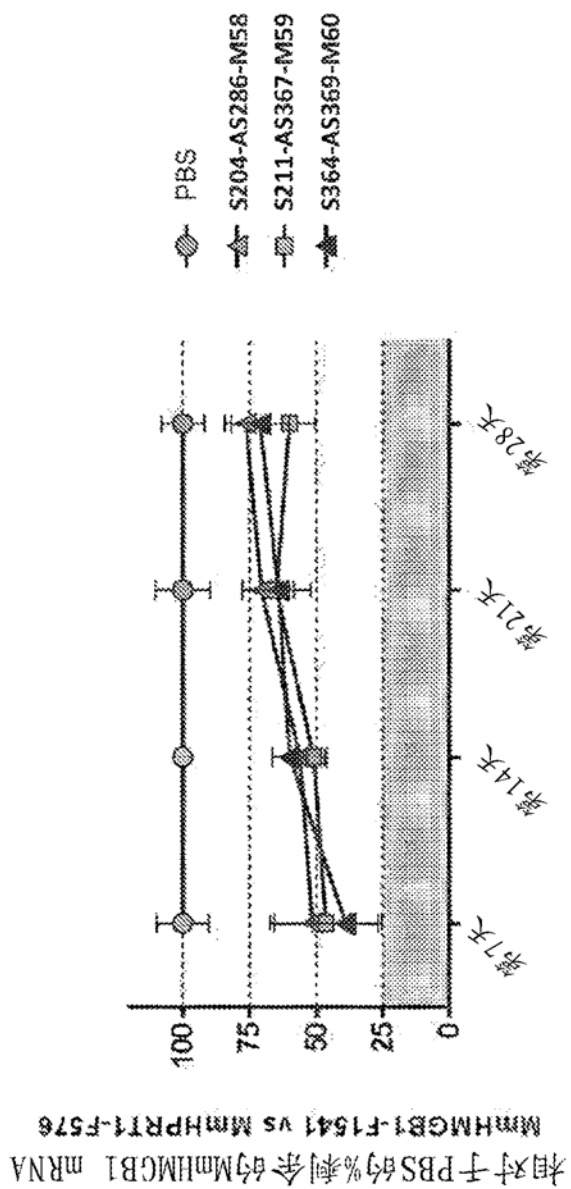


图 30D

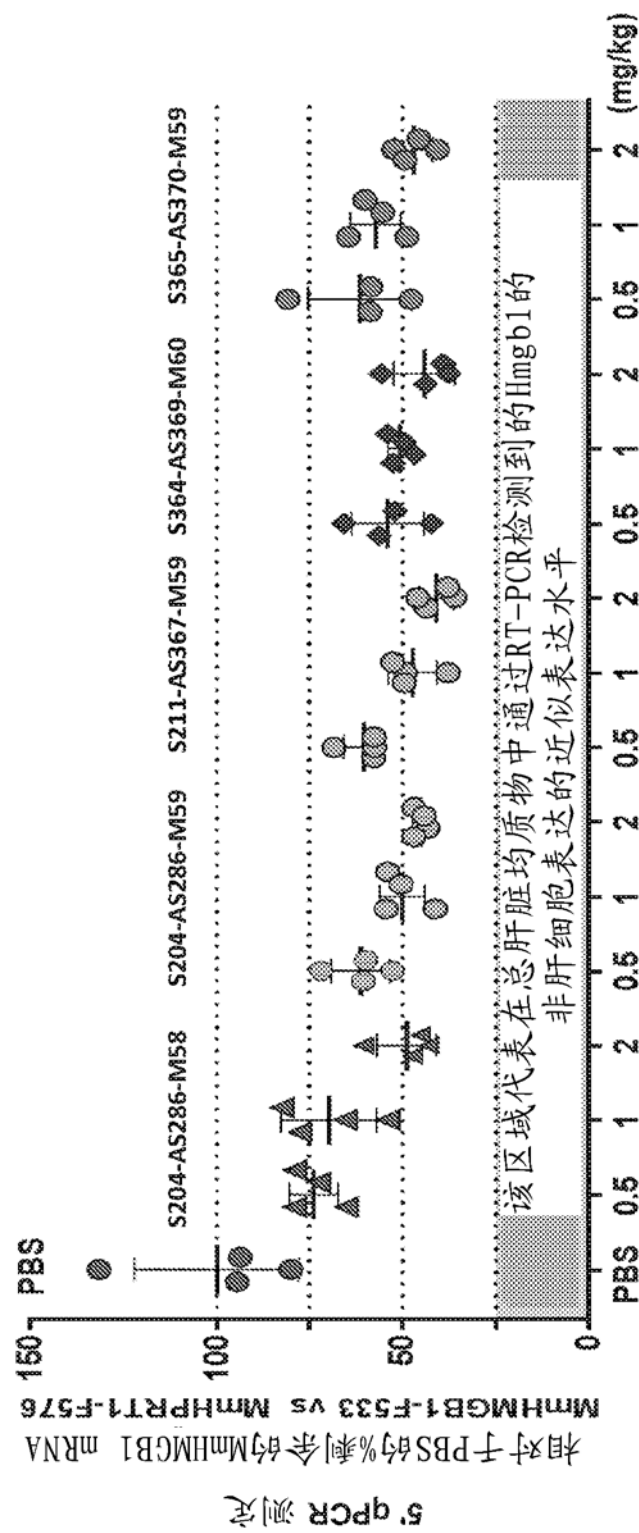


图 31A

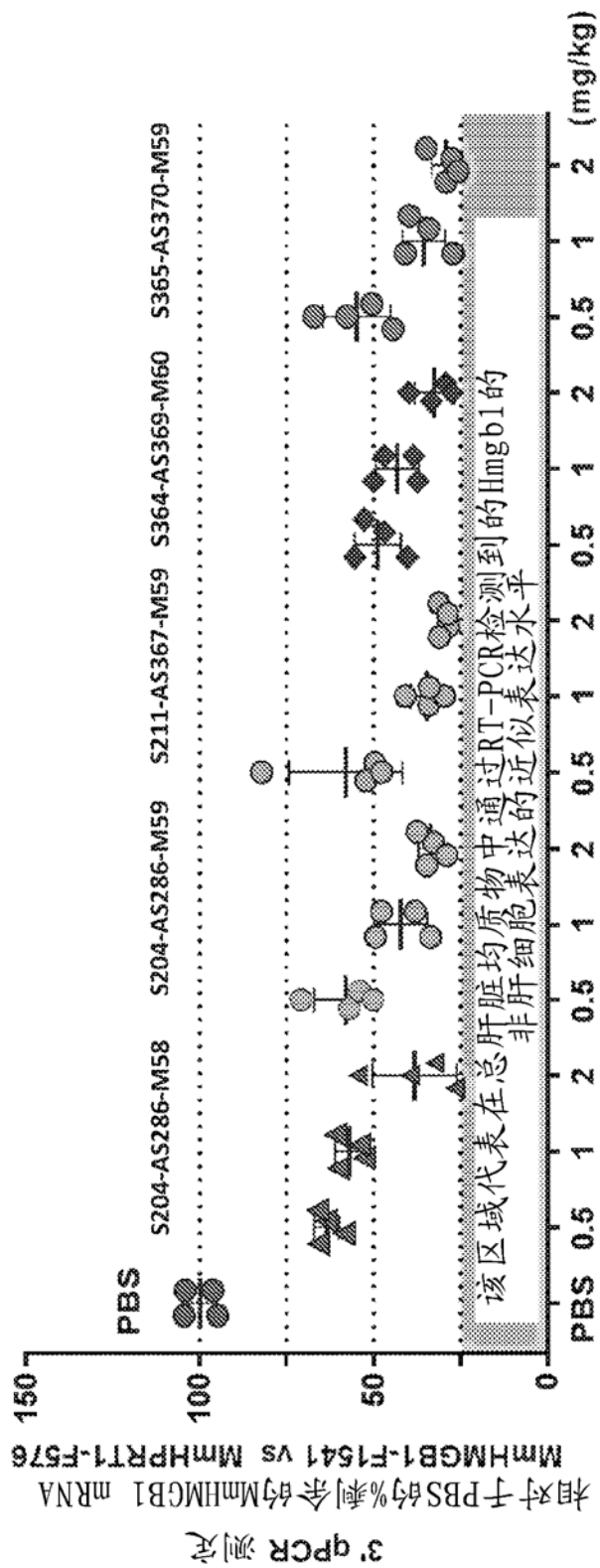


图 31B

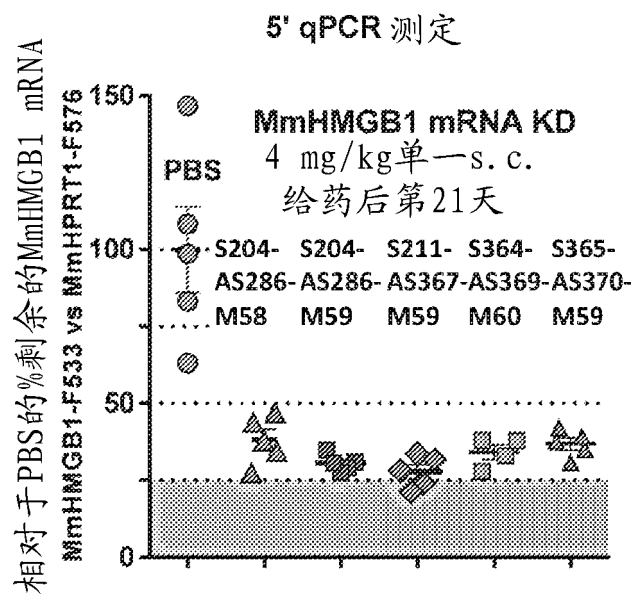


图 32A

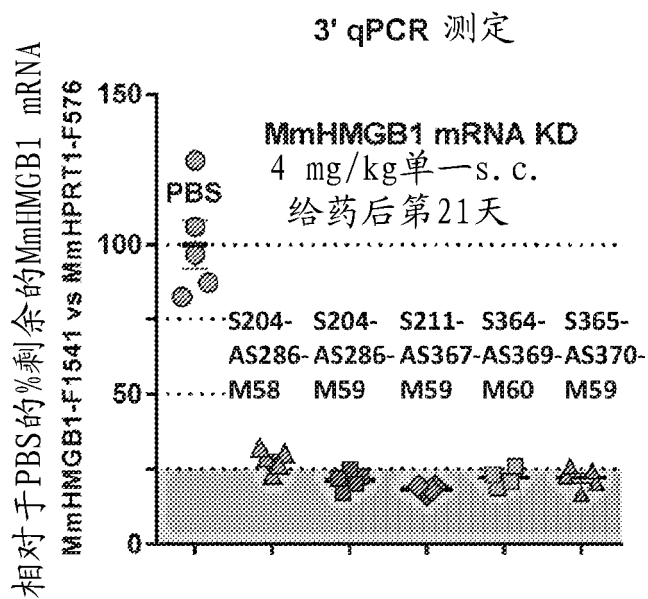


图 32B

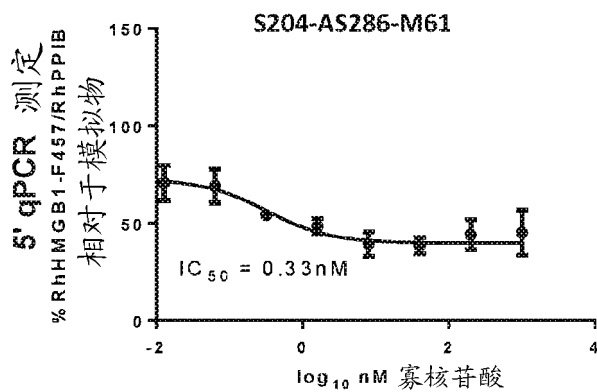


图 33A

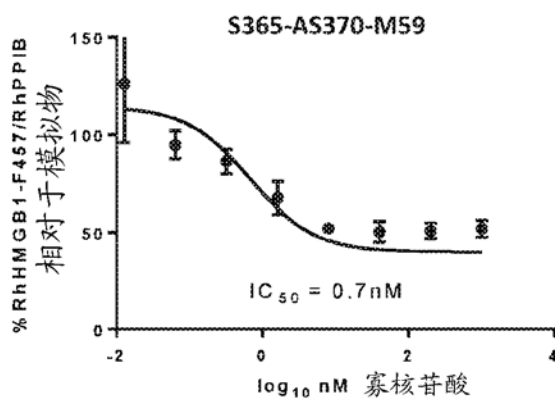


图 33B

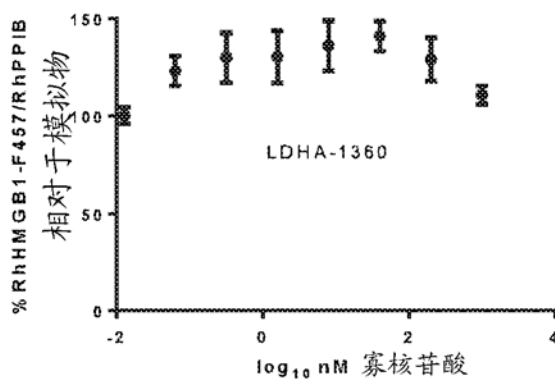


图 33C

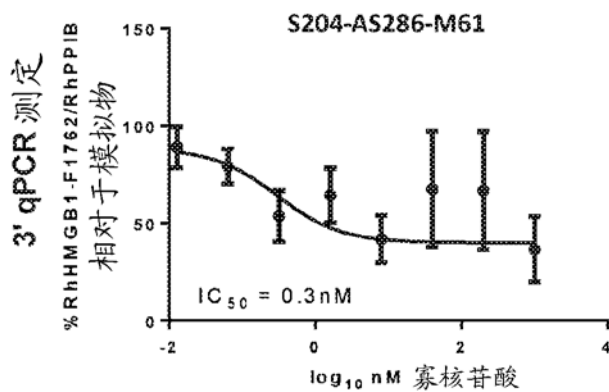


图 33D

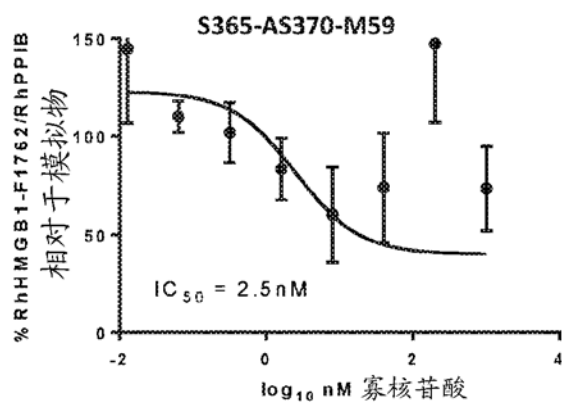


图 33E

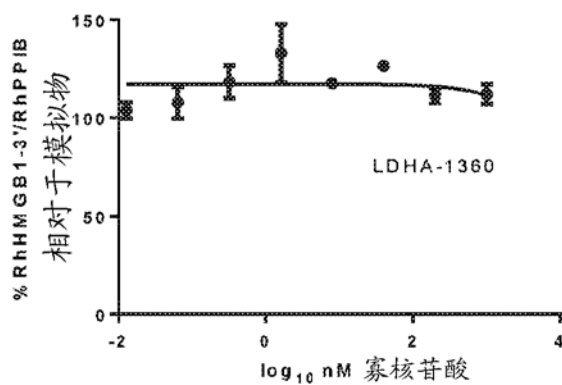


图 33F

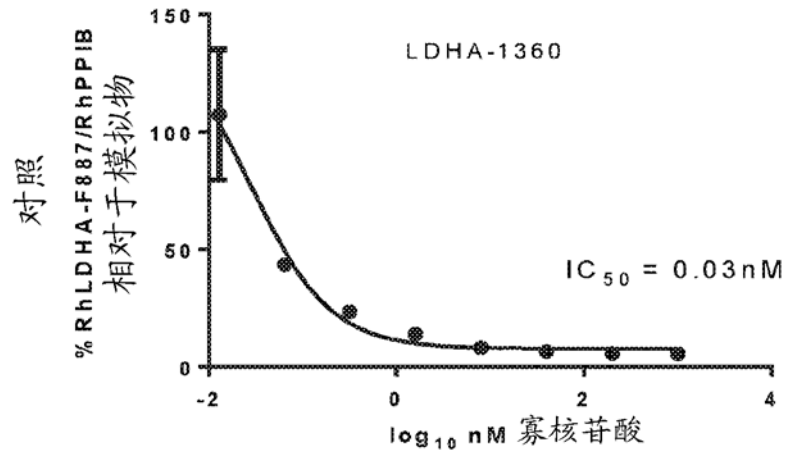


图 33G

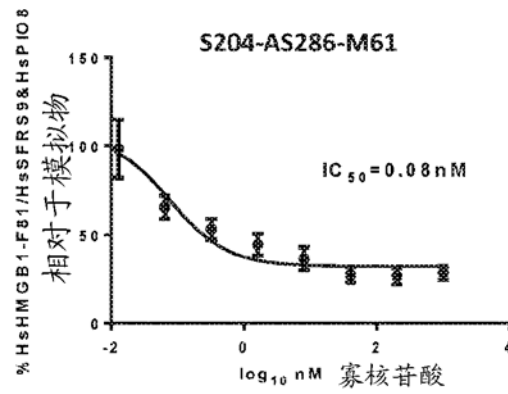


图 34A

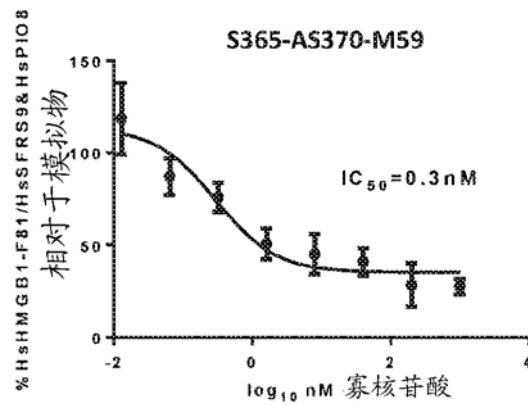


图 34B

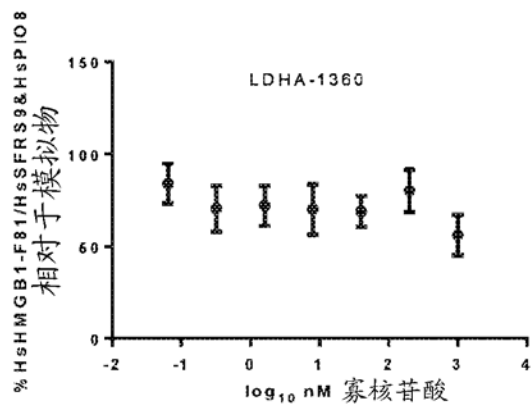


图 34C

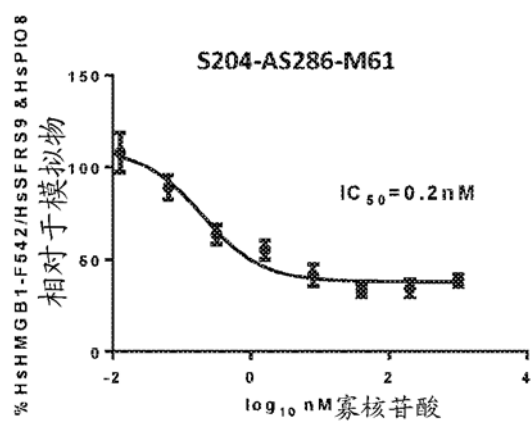


图 34D

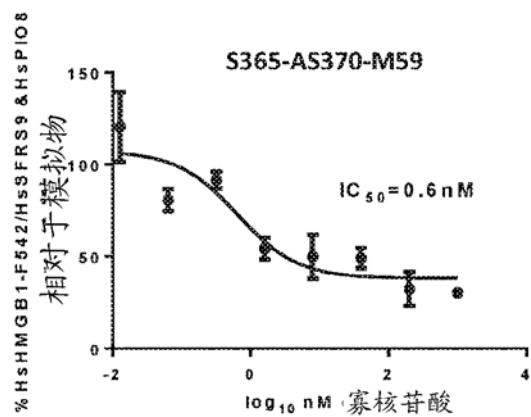


图 34E

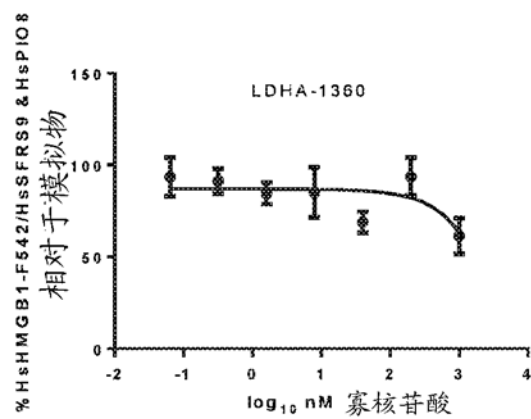


图 34F

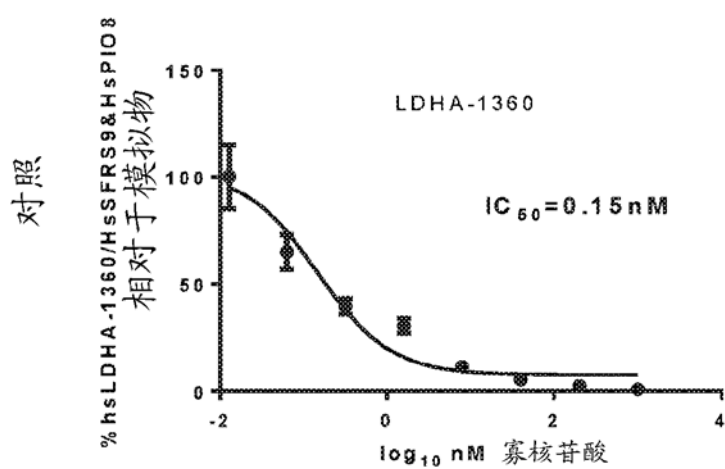


图 34G