



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118076361 A

(43) 申请公布日 2024.05.24

(21) 申请号 202280058994.5

L·邦杜兰特 D·奥扎

(22) 申请日 2022.08.31

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30) 优先权数据

63/239,271 2021.08.31 US

63/341,848 2022.05.13 US

专利代理师 陈文平 徐志明

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.28

(51) Int.Cl.

A61K 31/713 (2006.01)

G12N 15/11 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/075715 2022.08.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/034837 EN 2023.03.09

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·祖贝 J·D·麦金因克

M·K·施莱格尔 A·卡斯托雷诺

权利要求书11页 说明书244页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

细胞死亡诱导DFFA样效应子B(CIDEB) iRNA  
组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向CIDEB基因的双链核糖核酸(dsRNA)组合物,以及抑制CIDEB表达的方法,以及使用此类dsRNA组合物治疗将受益于CIDEB表达降低的受试者,如患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者的方法。

1. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEB) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含有义链和反义链, 其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

2. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEB) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含形成双链区的有义链和反义链, 其中所述反义链包含与编码CIDEB的mRNA互补的区域, 所述区域包含与表3至表6中列出的反义序列中的任一者相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

3. 根据权利要求1或2所述的dsRNA药剂, 其中

(a) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700555的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700555的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(b) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700821的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700821的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(c) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700369的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700369的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(d) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1699976的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1699976的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(e) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700374的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700374的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(f) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700314的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700314的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(g) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700376的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸; 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700376的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;

(h) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1699964的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1699964的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸; 或

(i) 所述反义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700556的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸, 并且所述有义链所含的核苷酸序列包含来自双链体AD-1700556的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述dsRNA药剂包含至少一个经修饰的核苷酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链的基本上所有核苷

酸包含修饰。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。

8. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEb)的双链RNA(dsRNA)药剂,其中所述双链RNA药剂包含形成双链区的有义链和反义链,

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

其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且

其中所述有义链与在3'末端连接的配体缀合。

9. 根据权利要求8所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的所有核苷酸都包含修饰。

10. 根据权利要求8所述的dsRNA药剂,其中所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。

11. 根据权利要求8所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。

12. 根据权利要求4至11中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸选自自由以下组成的群组:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、乙二醇修饰的核苷酸和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,及其组合。

13. 根据权利要求12所述的dsRNA药剂,其中所述核苷酸修饰是2'-O-甲基修饰和/或2'-氟修饰。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是至少17个核苷酸。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是19至30个核苷酸。

16. 根据权利要求15所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是19至25个核苷酸。

17. 根据权利要求16所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是21至23个核苷酸。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度不超过30个核苷酸。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度独立地是19至30个核苷酸。

20. 根据权利要求19所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度独立地是19至25个核苷酸。

21. 根据权利要求19所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度独立地是21至23个核苷酸。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

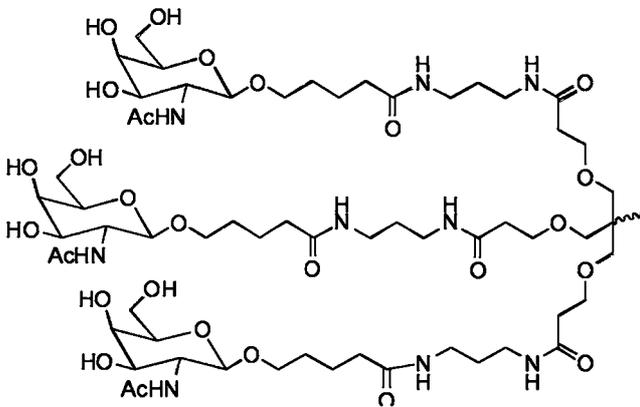
23. 根据权利要求22中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

24. 根据权利要求1至7和12至23中任一项所述的dsRNA药剂,其进一步包含配体。

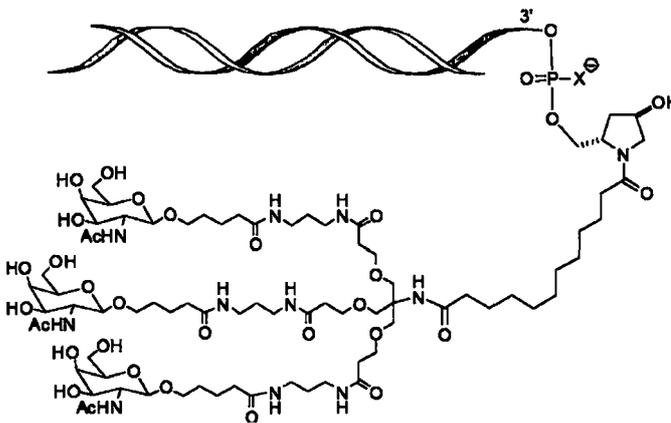
25. 根据权利要求24所述的dsRNA药剂,其中所述配体与所述dsRNA药剂的所述有义链的3'端缀合。

26. 根据权利要求8或25所述的dsRNA药剂,其中所述配体是N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

27. 根据权利要求26所述的dsRNA药剂,其中所述配体是



28. 根据权利要求27所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂与所述配体缀合,如下示意图所示



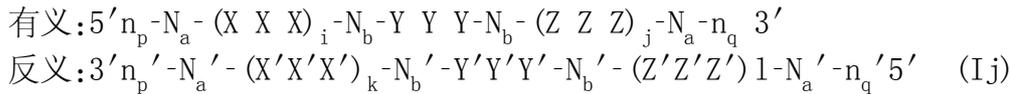
并且其中X是O或S。

29. 根据权利要求28所述的dsRNA药剂,其中所述X是O。

30. 根据权利要求2所述的dsRNA药剂,其中所述互补区包含表3至表6中的反义序列中的任一者。

31. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸(dsRNA) 药剂,其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述

dsRNA药剂由式(Ij)表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地是0或1;

p、p'、q和q'各自独立地是0至6;

每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

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

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合。

32. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中i是0;j是0;i是1;j是1;i和j两者均是0;或者i和j两者均是1。

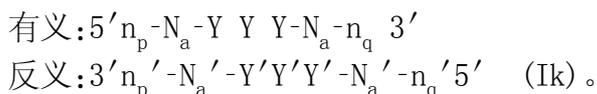
33. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中k是0;l是0;k是1;l是1;k和l两者均是0;或者k和l两者均是1。

34. 据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中XXX与X'X'X'互补,YYY与Y'Y'Y'互补,并且ZZZ与Z'Z'Z'互补。

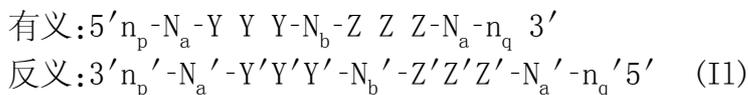
35. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中所述YYY基序存在于所述有义链的切割位点处或附近。

36. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中所述Y'Y'Y'基序存在于所述反义链自5'端的第11、12和13位置处。

37. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中式(Ij)由式(Ik)表示:

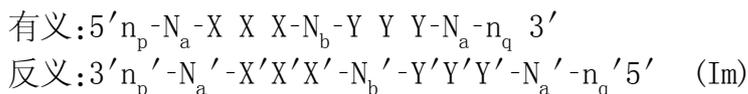


38. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中式(Ij)由式(II)表示:



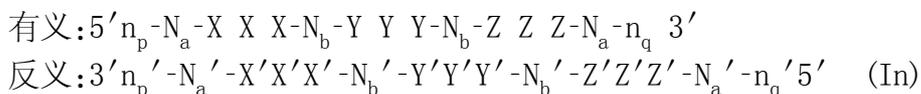
其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

39. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中式(Ij)由式(Im)表示:



其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

40. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中式(Ij)由式(In)表示:



其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,并且每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

41. 根据权利要求31至40中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是至少17个核苷酸。

42. 根据权利要求31至40中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是19至30个核苷酸。

43. 根据权利要求42所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是19至25个核苷酸。

44. 根据权利要求43所述的dsRNA药剂,其中所述互补区的长度是21至23个核苷酸。

45. 根据权利要求31至44中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度不超过30个核苷酸。

46. 根据权利要求31至44中任一项所述的dsRNA药剂,其中每条链的长度独立地为19至30个核苷酸。

47. 根据权利要求31至46中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述核苷酸上的所述修饰选自自由以下组成的群组:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烷基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-脱氧、2'-羟基,及其组合。

48. 根据权利要求47所述的dsRNA药剂,其中所述核苷酸上的所述修饰是2'-O-甲基修饰和/或2'-氟修饰。

49. 根据权利要求31至47中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述Y'是2'-O-甲基或2'-氟修饰的核苷酸。

50. 根据权利要求31至49中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

51. 根据权利要求31至50中任一项所述的dsRNA药剂,其中至少一条链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

52. 根据权利要求31至51中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键。

53. 根据权利要求52所述的dsRNA药剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的3'末端处。

54. 根据权利要求53所述的dsRNA药剂,其中所述链是所述反义链。

55. 根据权利要求53所述的dsRNA药剂,其中所述链是所述有义链。

56. 根据权利要求52所述的dsRNA药剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'末端处。

57. 根据权利要求56所述的dsRNA药剂,其中所述链是所述反义链。

58. 根据权利要求56所述的dsRNA药剂,其中所述链是所述有义链。

59. 根据权利要求52所述的dsRNA药剂,其中所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'末端和3'末端两者处。

60. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中在所述双链体的所述反义链的5'端的第1位置处的碱基对为AU碱基对。

61. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中 $p' > 0$ 。

62. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中 $p' = 2$ 。

63. 根据权利要求62所述的dsRNA药剂,其中 $q'=0$ , $p=0$ , $q=0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与靶mRNA互补。

64. 根据权利要求62所述的dsRNA药剂,其中 $q'=0$ , $p=0$ , $q=0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与靶mRNA不互补。

65. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中所述有义链具有总计21个核苷酸,并且所述反义链具有总计23个核苷酸。

66. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸。

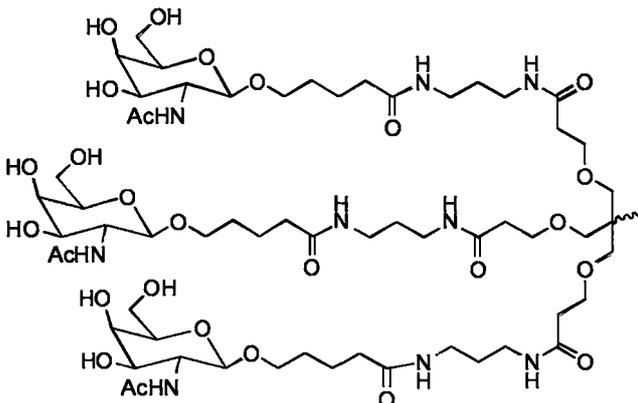
67. 根据权利要求66所述的dsRNA药剂,其中所有 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸。

68. 根据权利要求31所述的dsRNA药剂,其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。

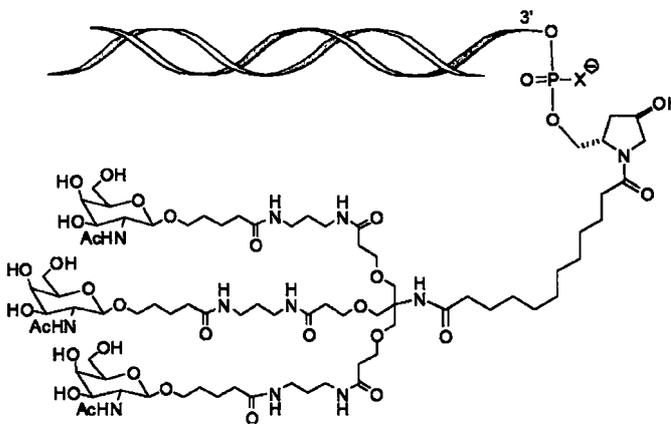
69. 根据权利要求31至68中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述配体与所述dsRNA药剂的所述有义链的3'端缀合。

70. 根据权利要求69所述的dsRNA药剂,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

71. 根据权利要求70所述的dsRNA药剂,其中所述配体是



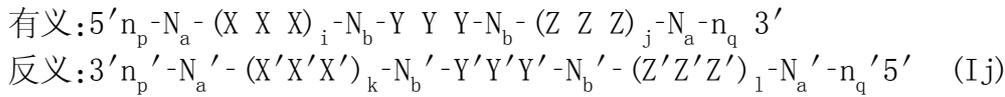
72. 根据权利要求71所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂与所述配体缀合,如以下示意图所示



并且其中X是O或S。

73. 根据权利要求72所述的dsRNA药剂,其中所述X是O。

74. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域, 其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸, 其中所述dsRNA药剂由式 (Ij) 表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地是0或1;

p、p'、q和q'各自独立地是0至6;

每个 $N_a$ 和 $N'_a$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

每个 $N_b$ 和 $N'_b$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

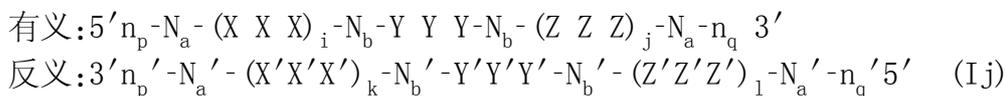
各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n'_p$ 、 $n_q$ 和 $n'_q$ 独立地表示突出端核苷酸;

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序, 并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰, 并且 $N'_b$ 上的修饰不同于Y'上的修饰; 并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合。

75. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域, 其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸, 其中所述dsRNA药剂由式 (Ij) 表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地是0或1;

各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n'_q$ 独立地表示突出端核苷酸;

p、q和q'各自独立地为0至6;

$n'_p > 0$  并且至少一个 $n'_p$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;

每个 $N_a$ 和 $N'_a$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

每个 $N_b$ 和 $N'_b$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

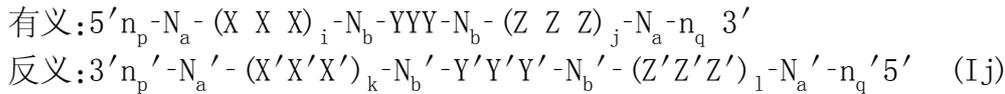
XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序, 并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰, 并且 $N'_b$ 上的修饰不同于Y'上的修饰; 并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合。

76. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包含与编

码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地是0或1;

各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

p、q和q'各自独立地为0至6;

$n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;

每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

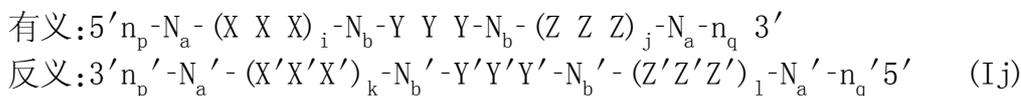
每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。

77. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:



其中:

i、j、k和l各自独立地是0或1;

各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

p、q和q'各自独立地为0至6;

$n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;

每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;

$N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;

其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。

78. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含与反义链互补的有义链, 其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域, 其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸, 其中所述dsRNA药剂由式 (Ij) 表示:

有义:  $5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$

反义:  $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$  (Ik)

其中:

各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

$p$ 、 $q$ 和 $q'$ 各自独立地为0至6;

$n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;

每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列, 每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序, 并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;

其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键; 并且

其中所述有义链与至少一种配体缀合, 其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。

79. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含形成双链区的有义链和反义链,

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

其中所述有义链的基本上所有核苷酸包含选自由2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,

其中所述有义链包含5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,

其中所述反义链的基本上所有核苷酸包含选自由2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,

其中所述反义链包含5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键和3'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键, 并且

其中所述有义链与一种或多种GalNAc衍生物缀合, 所述一种或多种GalNAc衍生物通过3'末端处的单价、二价或三价支链接头连接。

80. 根据权利要求79所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。

81. 根据权利要求3、31和74至80中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述互补区包含表3至表6中列出的反义序列中的任一者。

82. 根据权利要求1至81中任一项所述的dsRNA药剂, 其中所述有义链和所述反义链包含选自由表3至表6中列出的任一种药剂的核苷酸序列组成的群组的核苷酸序列。

83. 一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂, 其中所述dsRNA药剂包含形成双链区的有义链和反义链, 其中所述有义链包

含表3至表6中的任一种药剂的核苷酸序列,并且所述反义链包含表3至表6中的任一种药剂的核苷酸序列,

其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且

其中所述dsRNA药剂与配体缀合。

84. 根据权利要求1至83中任一项所述的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂靶向编码CIDEB的mRNA的热点区。

85. 一种dsRNA药剂,其靶向细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)mRNA的热点区。

86. 一种细胞,其含有根据权利要求1至85中任一项所述的dsRNA药剂。

87. 一种载体,其编码根据权利要求1至85中任一项所述的dsRNA药剂的至少一条链。

88. 一种用于抑制细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)基因表达的药物组合物,其包含根据权利要求1至85中任一项所述的dsRNA药剂。

89. 根据权利要求88所述的药物组合物,其中所述药剂在未缓冲的溶液中调配。

90. 根据权利要求89所述的药物组合物,其中所述未缓冲的溶液是盐水或水。

91. 根据权利要求88所述的药物组合物,其中所述药剂在缓冲溶液中调配。

92. 根据权利要求91所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐,或其任何组合。

93. 根据权利要求91所述的药物组合物,其中所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

94. 一种抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)的方法,所述方法包括使所述细胞与根据权利要求1至84中任一项所述的药剂或根据权利要求88至93中任一项所述的药物组合物接触,从而抑制所述细胞表达CIDEB。

95. 根据权利要求94所述的方法,其中所述细胞在受试者体内。

96. 根据权利要求95所述的方法,其中所述受试者是人。

97. 根据权利要求94至96中任一项所述的方法,其中所述CIDEB表达被抑制至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或被抑制至低于CIDEB表达的检测水平。

98. 根据权利要求97所述的方法,其中所述人受试者患有CIDEB相关疾病、病症或病况。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述CIDEB相关疾病、病症或病况是慢性炎症性疾病。

100. 根据权利要求99所述的方法,其中所述慢性炎症性疾病是慢性炎症性肝病。

101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述慢性炎症性肝病与肝脏中的脂滴的积累和/或扩增相关。

102. 根据权利要求100所述的方法,其中所述慢性炎症性肝病选自自由以下组成的群组:肝脏中脂肪的积累、肝脏的炎症、肝纤维化、脂肪性肝病(脂肪变性)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和肝硬化。

103. 根据权利要求102所述的方法,其中所述慢性炎症性肝病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

104. 一种抑制受试者中CIDEB的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至85中任一项所述的dsRNA药剂或根据权利要求88至93中任一项所述的药物组合物,从而抑制所述受试者中CIDEB的表达。

105. 一种治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至85中任一项所述的药剂或根据权利要求88至93中任一项所述的药物组合物,从而治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的所述受试者。

106. 一种预防患有疾病、病症或病况的受试者的至少一种症状的方法,所述受试者将受益于CIDEB基因表达的降低,所述方法包括向所述受试者施用预防有效量的根据权利要求1至85中任一项所述的药剂或根据权利要求88至93中任一项所述的药物组合物,从而预防患有疾病、病症或病况的受试者的至少一种症状,所述受试者将受益于CIDEB基因表达的降低。

107. 一种降低患有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的受试者发展为慢性肝病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至85中任一项所述的dsRNA药剂或根据权利要求88至93中任一项所述的药物组合物,从而降低患有NASH的所述受试者发展为慢性肝病的风险。

108. 根据权利要求104至107中任一项所述的方法,其中所述CIDEB相关疾病、病症或病况是慢性炎性疾病。

109. 根据权利要求108所述的方法,其中所述慢性炎性疾病是慢性炎性肝病。

110. 根据权利要求109所述的方法,其中所述慢性炎性肝病与肝脏中脂滴的积累和/或扩增有关。

111. 根据权利要求109所述的方法,其中所述慢性炎性肝病选自由以下组成的群组:肝脏中脂肪的积累、肝脏的炎症、肝纤维化、脂肪性肝病(脂肪变性)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和肝硬化。

112. 根据权利要求111所述的方法,其中所述慢性炎性肝病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

113. 根据权利要求95至112中任一项所述的方法,其中所述受试者是肥胖的。

114. 根据权利要求95至113中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另外的治疗剂。

115. 根据权利要求95至114中任一项所述的方法,其中所述dsRNA药剂以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约50mg/kg的剂量施用于所述受试者。

116. 根据权利要求95至115中任一项所述的方法,其中所述药剂被静脉内、肌内或皮下施用于所述受试者。

117. 根据权利要求95至116中任一项所述的方法,其进一步包括测定所述受试者中CIDEB的水平。

## 细胞死亡诱导DFFA样效应子B (CIDEB) iRNA组合物及其使用方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年8月31日提交的美国临时申请第63/239,271号的优先权的权益,并且要求于2022年5月13日提交的美国临时申请第63/341,848号的优先权的权益。前述申请的全部内容据此通过引用并入本文。序列表

[0003] 本申请包含已经以XML格式电子提交的序列表,并且据此通过引用以其整体并入本文。创建于2022年8月30日的XML副本被命名为A108868\_1300W0\_SL.xml并且大小为3,873,182字节。

### 背景技术

[0004] 细胞死亡诱导DFFA样效应子B (CIDEB) ——一种CIDE蛋白家族的成员——主要在肝脏和小肠中表达。CIDEB是内质网 (ER) 和脂滴 (LD) 相关蛋白。CIDEB蛋白的过表达诱导细胞死亡,但是CIDEB的生理功能与各种脂质代谢途径,特别是VLDL途径更密切相关。

[0005] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是世界上所有现代工业化经济体地区 (包括韩国和许多其他亚洲国家) 最常见的肝病形式。患者通常表现为无症状或临床特征无特异性。相反,肝脏异常是通过肝脏成像,特别是超声检查偶然发现的,和/或存在升高的肝脏酶 (丙氨酸氨基转移酶 [ALT] 和  $\gamma$  - 谷氨酰转肽酶)。NAFLD的诊断需要排除其他病症,特别是病毒性肝炎、大量饮酒和暴露于潜在的肝毒性药物。根据如亚太地区NAFLD指南等协议,术语NAFLD现在保留用于与营养过剩的代谢并发症相关的脂肪肝的病例,通常伴有向心性肥胖和超重。

[0006] 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 被认为是非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的进行性形式,并且其特征在于肝脏脂肪变性、炎症、肝细胞损伤和不同程度的纤维化。脂肪组织功能障碍和肝脏炎症响应在NASH发展期间具有重要作用。细胞和分子响应机制还在不存在脂肪肝的情况下通过诱导导致肝细胞损伤的慢性炎症响应来促进肝脏炎症。

[0007] 因此,需要治疗肝脏的慢性炎症性疾病如NASH的改善的方法,包括能够选择性地且有效地抑制CIDEB基因的药剂。

### 发明内容

[0008] 需要治疗肝脏的慢性炎症性疾病如NASH的改善的方法,包括能够选择性地且有效地抑制CIDEB基因的药剂。针对患有慢性炎症性疾病的受试者的当前护理标准包括生活方式改变 (饮食和锻炼、戒烟、戒酒等)、类固醇和/或非类固醇抗炎药物以及相关并存病 (例如高血压、高脂血症、糖尿病) 的管理等。一旦建立,慢性炎症病况就可以维持炎症、组织损伤、从受损细胞中释放促炎症损伤相关分子模式 (DAMP) 以及细胞因子释放的自持续循环,从而导致进一步的炎症。肝脏炎症的消除可以通过利用主动的、生理促分解机制而非促炎介质的经典被动阻断来实现。(Schuster等人,《自然综述-胃肠病学与肝脏病学 (Nature Reviews Gastroenterology&Hepatology) 》,第15卷,第349-364页,2018)。

[0009] 本发明提供了iRNA组合物,其影响细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体(RISC)介导的切割。CIDEB基因可以在细胞内,例如受试者(如人)体内的细胞。本发明还提供了使用本发明的iRNA组合物抑制CIDEB基因的表达和/或治疗将受益于抑制或减少CIDEB基因的表达的受试者的方法,所述受试者为例如患有或易于患有CIDEB相关疾病(例如慢性炎症性疾病)的受试者。

[0010] 因此,在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括有义链和反义链,其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。在一些实施方案中,所述dsRNA药剂包括有义链和反义链,其中所述有义链包含来自SEQ ID NO:1的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0011] 在另一方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述反义链包含与编码CIDEB的mRNA互补的区域,其包含与表3至表6中列出的反义序列中的任一者相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。在一些实施方案中,所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述反义链包含与编码CIDEB的mRNA互补的区域,其包含来自表3至表6中列出的反义序列中的任一者的至少15个连续核苷酸。

[0012] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于抑制细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)表达的双链核糖核酸(dsRNA)药剂,其中所述dsRNA药剂包含:(a)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700555的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700555的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;(b)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700821的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700821的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;(c)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700369的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700369的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;(d)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1699976的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1699976的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;(e)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700374的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700374的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;(f)包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700314的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸;以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700314的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少

15个连续核苷酸；(g) 包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700376的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸；以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700376的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸；(h) 包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1699964的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸；以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1699964的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸；或(i) 包含核苷酸序列的反义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700556的反义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸；以及包含核苷酸序列的有义链,所述核苷酸序列包含来自双链体AD-1700556的有义链核苷酸序列的具有0、1、2或3个错配的至少15个连续核苷酸。

[0013] 在另一个实施方案中,互补区包含与SEQ ID NO:1的以下核苷酸中的任一者相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸:29-51、67-89、154-176、163-185、173-195、184-206、196-218、206-228、257-279、270-292、446-468、459-481、468-490、518-540、530-552、641-663、687-709、702-724、711-733、727-749、758-780、769-791、781-803、790-812、807-829、839-861、850-872、874-896、907-929、917-939、958-980、974-996、983-1005、999-1021、1009-1031、1018-1040、1027-1049、1036-1058、1045-1067、1054-1076、1080-1102、1089-1111、1098-1120、1108-1130、1140-1162、1156-1178、1174-1196、1183-1205、1192-1214、1205-1227、1214-1236、1225-1247、1254-1276、1263-1285、1273-1295、1282-1304、1292-1314、1316-1338、1337-1359、1350-1372、1364-1386、1375-1397、1408-1430、1417-1439、1429-1451、1454-147、1478-1500、1487-1509、1496-1518、1507-1529、1519-1541、1542-1564、1552-1574、1562-1584、1573-1595、1585-1607、1597-1619、1607-1629、1623-1645、1633-1655、1642-1664、1651-1673、1668-1690、1677-1699、1691-1713、1700-1722、1712-1734、1749-1771、1764-1786、1773-1795、1784-1806、1796-1818、1807-1829、1824-1846、1833-1855、1847-1869、1856-1878、1865-1887、1881-1903、1896-1918、1905-1927、1921-1943、1938-1960、1948-1970、1961-1983、1970-1992、1994-2016、2008-2030、2017-2039、2056-2078、2066-2088、2075-2097、2087-2109、2096-2118、2106-2128、2116-2138、2129-2151、2176-2198、2185-2207、2196-2218、2207-2229、2220-2242、2236-2258、2247-2269、2256-2278、2265-2287、2274-2296、2299-2321、2309-2331、2318-2340、2349-2371、2371-2393、2382-2404、2391-2413、2401-2423、1267-1289、1270-1292、1271-1293、1272-1294、1273-1295、1274-1296、1275-1297、1276-1298、1278-1300、1285-1307、1294-1316、1295-1317、1327-1349、1330-1352、1371-1393、1372-1394、1374-1396、1407-1429、1410-1432、1413-1435、1414-1436、1415-1437、1416-1438、1419-1441、1420-1442、1421-1443、1422-1444、1425-1447、1426-1448、1427-1449、1428-1450、1429-1451、1430-1452、1431-1453、1432-1454、1433-1455、1478-1500、1498-1520、1500-1522、1501-1523、1502-1524、1503-1525、1504-1526、1545-1567、1548-1570、1549-1571、1550-1572、1551-1573、1559-1581、1560-1582、1562-1584、1565-1587、1567-1589、1568-1590、1569-1591、1572-1594、1577-1599、1580-1602、1581-1603、1582-1604、1583-1605、1584-1606、1589-1611、1590-1612、1593-1615、1616-1638、1617-1639、1624-1646、1626-1648、1627-1649、1628-1650、1634-1656、1635-1657、1648-1670、1655-1677、1656-1678、1657-1679、1658-1680、1659-

1681、1661-1683、1681-1703、1710-1732、1711-1733、1712-1734、1713-1735、1716-1738、1717-1739、1718-1740、1720-1742、1744-1766、1751-1773、1752-1774、1775-1797、1781-1803、1784-1806、1786-1808、1787-1809、1788-1810、1789-1811、1790-1812、1795-1817、1796-1818、1797-1819、1799-1821、1800-1822、1801-1823、1808-1830、1811-1833、1816-1838、1822-1844、1824-1846、1825-1847、1826-1848、1827-1849、1828-1850、1829-1851、1830-1852、1831-1853、1837-1859、1838-1860、1840-1862、1841-1863、1842-1864、1843-1865、1844-1866、1846-1868、1847-1869、1848-1870、1850-1872、1855-1877、1856-1878、1857-1879、1858-1880、1859-1881、1860-1882、1880-1902、1882-1904、1883-1905、1885-1907、1886-1908、1894-1916、1895-1917、1896-1918、1897-1919、1898-1920、1899-1921、1900-1922、1911-1933、1933-1955、1934-1956、1936-1958、1937-1959、1940-1962、1945-1967、1946-1968、1948-1970、1949-1971、1951-1973、1954-1976、1957-1979、1958-1980、1959-1981、1960-1982、1961-1983、1962-1984、2011-2033、2013-2035、2014-2036、2016-2038、2074-2096、2076-2098、2082-2104、2085-2107、2086-2108、2087-2109、2088-2110、2089-2111、2090-2112、2092-2114、2095-2117、2098-2120、2105-2127、2107-2129、2108-2130、2110-2132、2112-2134、2114-2136、2192-2214、2239-2261、2240-2262、2249-2271、2250-2272、2253-2275、2300-2322、2346-2368、2347-2369、2348-2370、2432-2454、2433-2455、2434-2456、1267-1289、1276-1298、1277-1299、1279-1301、1283-1305、1284-1306、1285-1307、1286-1308、1292-1314、1295-1317、1319-1341、1328-1350、1329-1351、1330-1352、1331-1353、1332-1354、1340-1362、1341-1363、1342-1364、1343-1365、1344-1366、1345-1367、1346-1368、1368-1390、1371-1393、1373-1395、1375-1397、1408-1430、1417-1439、1418-1440、1419-1441、1423-1445、1424-1446、1430-1452、1431-1453、1437-1459、1443-1465、1478-1500、1503-1525、1512-1534、1544-1566、1545-1567、1546-1568、1547-1569、1552-1574、1553-1575、1560-1582、1561-1583、1563-1585、1566-1588、1567-1589、1570-1592、1571-1593、1572-1594、1573-1595、1574-1596、1578-1600、1579-1601、1580-1602、1584-1606、1585-1607、1586-1608、1593-1615、1595-1617、1599-1621、1600-1622、1603-1625、1609-1631、1611-1633、1612-1634、1613-1635、1614-1636、1616-1638、1618-1640、1619-1641、1620-1642、1621-1643、1622-1644、1623-1645、1625-1647、1629-1651、1632-1654、1633-1655、1635-1657、1640-1662、1645-1667、1647-1669、1651-1673、1656-1678、1657-1679、1660-1682、1680-1702、1704-1726、1705-1727、1707-1729、1709-1731、1713-1735、1714-1736、1715-1737、1716-1738、1719-1741、1720-1742、1749-1771、1773-1795、1774-1796、1775-1797、1776-1798、1778-1800、1782-1804、1783-1805、1784-1806、1785-1807、1791-1813、1792-1814、1793-1815、1805-1827、1809-1831、1810-1832、1812-1834、1813-1835、1815-1837、1817-1839、1818-1840、1819-1841、1826-1848、1833-1855、1834-1856、1836-1858、1838-1860、1839-1861、1841-1863、1844-1866、1846-1868、1847-1869、1851-1873、1852-1874、1853-1875、1854-1876、1856-1878、1860-1882、1861-1883、1880-1902、1881-1903、1882-1904、1884-1906、1887-1909、1888-1910、1889-1911、1893-1915、1900-1922、1902-1924、1910-1932、1912-1934、1917-1939、1936-1958、1941-1963、1942-1964、1944-1966、1945-1967、1949-1971、1955-1977、1962-1984、2011-2033、2015-2037、2016-2038、2074-2096、2075-2097、2076-2098、2083-2105、2091-2113、2093-2115、

2094-2116、2095-2117、2096-2118、2102-2124、2103-2125、2106-2128、2109-2131、2111-2133、2112-2134、2113-2135、2115-2137、2117-2139、2241-2263、2250-2272、2253-2275、2300-2322、2301-2323、2343-2365、2347-2369、2349-2371、1796-1818、1270-1292、1624-1646、1795-1817、1822-1844、1847-1869、1582-1604、1582-1604、1582-1604、1570-1592、2110-2132、1954-1976、2013-2035、1840-1862、2114-2136、1565-1587、1808-1830、2249-2271、1614-1636、1655-1677、1581-1603、1717-1739、1717-1739、1717-1739、1883-1905、1894-1916、1957-1979、1957-1979、1957-1979、1786-1808、1681-1703、1589-1611、2098-2120、1327-1349、2432-2454、1374-1396、1911-1933、1372-1394、1816-1838、2240-2262、1577-1599、2105-2127、2092-2114、1951-1973、2346-2368、1781-1803、2014-2036、1410-1432、1940-1962、1718-1740、1859-1881、1744-1766、1787-1809、1787-1809、1787-1809、1855-1877或2082-2104。在一些实施方案中,互补区包含来自SEQ ID NO:1的以下核苷酸中的任一者的至少15个连续核苷酸:29-51、67-89、154-176、163-185、173-195、184-206、196-218、206-228、257-279、270-292、446-468、459-481、468-490、518-540、530-552、641-663、687-709、702-724、711-733、727-749、758-780、769-791、781-803、790-812、807-829、839-861、850-872、874-896、907-929、917-939、958-980、974-996、983-1005、999-1021、1009-1031、1018-1040、1027-1049、1036-1058、1045-1067、1054-1076、1080-1102、1089-1111、1098-1120、1108-1130、1140-1162、1156-1178、1174-1196、1183-1205、1192-1214、1205-1227、1214-1236、1225-1247、1254-1276、1263-1285、1273-1295、1282-1304、1292-1314、1316-1338、1337-1359、1350-1372、1364-1386、1375-1397、1408-1430、1417-1439、1429-1451、1454-147、1478-1500、1487-1509、1496-1518、1507-1529、1519-1541、1542-1564、1552-1574、1562-1584、1573-1595、1585-1607、1597-1619、1607-1629、1623-1645、1633-1655、1642-1664、1651-1673、1668-1690、1677-1699、1691-1713、1700-1722、1712-1734、1749-1771、1764-1786、1773-1795、1784-1806、1796-1818、1807-1829、1824-1846、1833-1855、1847-1869、1856-1878、1865-1887、1881-1903、1896-1918、1905-1927、1921-1943、1938-1960、1948-1970、1961-1983、1970-1992、1994-2016、2008-2030、2017-2039、2056-2078、2066-2088、2075-2097、2087-2109、2096-2118、2106-2128、2116-2138、2129-2151、2176-2198、2185-2207、2196-2218、2207-2229、2220-2242、2236-2258、2247-2269、2256-2278、2265-2287、2274-2296、2299-2321、2309-2331、2318-2340、2349-2371、2371-2393、2382-2404、2391-2413、2401-2423、1267-1289、1270-1292、1271-1293、1272-1294、1273-1295、1274-1296、1275-1297、1276-1298、1278-1300、1285-1307、1294-1316、1295-1317、1327-1349、1330-1352、1371-1393、1372-1394、1374-1396、1407-1429、1410-1432、1413-1435、1414-1436、1415-1437、1416-1438、1419-1441、1420-1442、1421-1443、1422-1444、1425-1447、1426-1448、1427-1449、1428-1450、1429-1451、1430-1452、1431-1453、1432-1454、1433-1455、1478-1500、1498-1520、1500-1522、1501-1523、1502-1524、1503-1525、1504-1526、1545-1567、1548-1570、1549-1571、1550-1572、1551-1573、1559-1581、1560-1582、1562-1584、1565-1587、1567-1589、1568-1590、1569-1591、1572-1594、1577-1599、1580-1602、1581-1603、1582-1604、1583-1605、1584-1606、1589-1611、1590-1612、1593-1615、1616-1638、1617-1639、1624-1646、1626-1648、1627-1649、1628-1650、1634-1656、1635-1657、1648-1670、1655-1677、1656-1678、1657-1679、1658-1680、1659-1681、1661-

1683、1681-1703、1710-1732、1711-1733、1712-1734、1713-1735、1716-1738、1717-1739、1718-1740、1720-1742、1744-1766、1751-1773、1752-1774、1775-1797、1781-1803、1784-1806、1786-1808、1787-1809、1788-1810、1789-1811、1790-1812、1795-1817、1796-1818、1797-1819、1799-1821、1800-1822、1801-1823、1808-1830、1811-1833、1816-1838、1822-1844、1824-1846、1825-1847、1826-1848、1827-1849、1828-1850、1829-1851、1830-1852、1831-1853、1837-1859、1838-1860、1840-1862、1841-1863、1842-1864、1843-1865、1844-1866、1846-1868、1847-1869、1848-1870、1850-1872、1855-1877、1856-1878、1857-1879、1858-1880、1859-1881、1860-1882、1880-1902、1882-1904、1883-1905、1885-1907、1886-1908、1894-1916、1895-1917、1896-1918、1897-1919、1898-1920、1899-1921、1900-1922、1911-1933、1933-1955、1934-1956、1936-1958、1937-1959、1940-1962、1945-1967、1946-1968、1948-1970、1949-1971、1951-1973、1954-1976、1957-1979、1958-1980、1959-1981、1960-1982、1961-1983、1962-1984、2011-2033、2013-2035、2014-2036、2016-2038、2074-2096、2076-2098、2082-2104、2085-2107、2086-2108、2087-2109、2088-2110、2089-2111、2090-2112、2092-2114、2095-2117、2098-2120、2105-2127、2107-2129、2108-2130、2110-2132、2112-2134、2114-2136、2192-2214、2239-2261、2240-2262、2249-2271、2250-2272、2253-2275、2300-2322、2346-2368、2347-2369、2348-2370、2432-2454、2433-2455、2434-2456、1267-1289、1276-1298、1277-1299、1279-1301、1283-1305、1284-1306、1285-1307、1286-1308、1292-1314、1295-1317、1319-1341、1328-1350、1329-1351、1330-1352、1331-1353、1332-1354、1340-1362、1341-1363、1342-1364、1343-1365、1344-1366、1345-1367、1346-1368、1368-1390、1371-1393、1373-1395、1375-1397、1408-1430、1417-1439、1418-1440、1419-1441、1423-1445、1424-1446、1430-1452、1431-1453、1437-1459、1443-1465、1478-1500、1503-1525、1512-1534、1544-1566、1545-1567、1546-1568、1547-1569、1552-1574、1553-1575、1560-1582、1561-1583、1563-1585、1566-1588、1567-1589、1570-1592、1571-1593、1572-1594、1573-1595、1574-1596、1578-1600、1579-1601、1580-1602、1584-1606、1585-1607、1586-1608、1593-1615、1595-1617、1599-1621、1600-1622、1603-1625、1609-1631、1611-1633、1612-1634、1613-1635、1614-1636、1616-1638、1618-1640、1619-1641、1620-1642、1621-1643、1622-1644、1623-1645、1625-1647、1629-1651、1632-1654、1633-1655、1635-1657、1640-1662、1645-1667、1647-1669、1651-1673、1656-1678、1657-1679、1660-1682、1680-1702、1704-1726、1705-1727、1707-1729、1709-1731、1713-1735、1714-1736、1715-1737、1716-1738、1719-1741、1720-1742、1749-1771、1773-1795、1774-1796、1775-1797、1776-1798、1778-1800、1782-1804、1783-1805、1784-1806、1785-1807、1791-1813、1792-1814、1793-1815、1805-1827、1809-1831、1810-1832、1812-1834、1813-1835、1815-1837、1817-1839、1818-1840、1819-1841、1826-1848、1833-1855、1834-1856、1836-1858、1838-1860、1839-1861、1841-1863、1844-1866、1846-1868、1847-1869、1851-1873、1852-1874、1853-1875、1854-1876、1856-1878、1860-1882、1861-1883、1880-1902、1881-1903、1882-1904、1884-1906、1887-1909、1888-1910、1889-1911、1893-1915、1900-1922、1902-1924、1910-1932、1912-1934、1917-1939、1936-1958、1941-1963、1942-1964、1944-1966、1945-1967、1949-1971、1955-1977、1962-1984、2011-2033、2015-2037、2016-2038、2074-2096、2075-2097、2076-2098、2083-2105、2091-2113、2093-2115、2094-2116、

2095-2117、2096-2118、2102-2124、2103-2125、2106-2128、2109-2131、2111-2133、2112-2134、2113-2135、2115-2137、2117-2139、2241-2263、2250-2272、2253-2275、2300-2322、2301-2323、2343-2365、2347-2369、2349-2371、1796-1818、1270-1292、1624-1646、1795-1817、1822-1844、1847-1869、1582-1604、1582-1604、1582-1604、1570-1592、2110-2132、1954-1976、2013-2035、1840-1862、2114-2136、1565-1587、1808-1830、2249-2271、1614-1636、1655-1677、1581-1603、1717-1739、1717-1739、1717-1739、1883-1905、1894-1916、1957-1979、1957-1979、1957-1979、1786-1808、1681-1703、1589-1611、2098-2120、1327-1349、2432-2454、1374-1396、1911-1933、1372-1394、1816-1838、2240-2262、1577-1599、2105-2127、2092-2114、1951-1973、2346-2368、1781-1803、2014-2036、1410-1432、1940-1962、1718-1740、1859-1881、1744-1766、1787-1809、1787-1809、1787-1809、1855-1877或2082-2104。

[0014] 在一个实施方案中,所述dsRNA药剂包含至少一种经修饰的核苷酸。

[0015] 在一个实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸包含修饰。在另一个实施方案中,所述反义链的基本上所有核苷酸包含修饰。在又一个实施方案中,所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都包含修饰。

[0016] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂。所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且其中所述有义链与连接在3'末端的配体缀合。在一些实施方案中,所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包含来自SEQ ID NO:1的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且其中所述有义链与连接在3'末端的配体缀合。

[0017] 在一个实施方案中,所述有义链的所有核苷酸都包含修饰。在另一个实施方案中,所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。在又一个实施方案中,所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸都包含修饰。

[0018] 在一些实施方案中,所述经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸选自以下组成的群组:脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶 (dT) 核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、解锁核苷酸、构象限制性核苷酸、约束乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、包含甲基磷酸酯基团的核苷酸、包含5'-磷酸酯的核苷酸、包含5'-磷酸酯模拟物的核苷酸、乙二醇修饰的核苷酸和2-O-(N-甲基乙酰胺)修饰的核苷酸,及其组合。

[0019] 在一个实施方案中,核苷酸修饰为2'-O-甲基修饰和/或2'-氟修饰。

[0020] 互补区的长度可以为至少17个核苷酸；长度为19至30个核苷酸；长度为19至25个核苷酸；或长度为21至23个核苷酸。

[0021] 每条链的长度可以不超过30个核苷酸，例如，每条链的长度独立地为19至30个核苷酸；每条链的长度独立地为19至25个核苷酸；每条链的长度独立地为21至23个核苷酸。

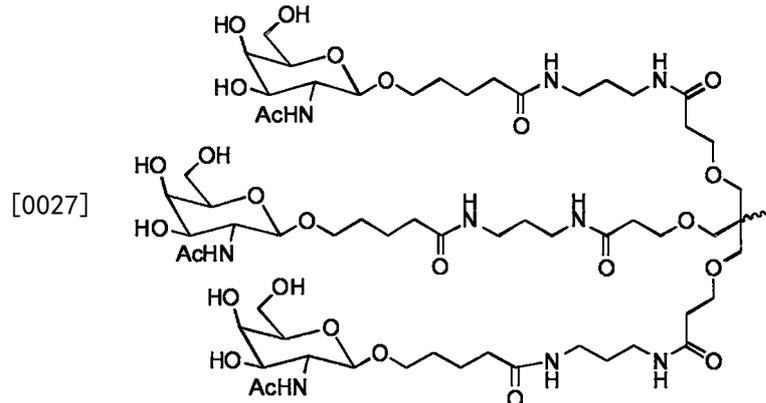
[0022] 所述dsRNA可以包括至少一条包含至少1个核苷酸的3'突出端的链；或至少一条包含至少2个核苷酸的3'突出端的链。

[0023] 在一些实施方案中，所述dsRNA药剂进一步包含配体。

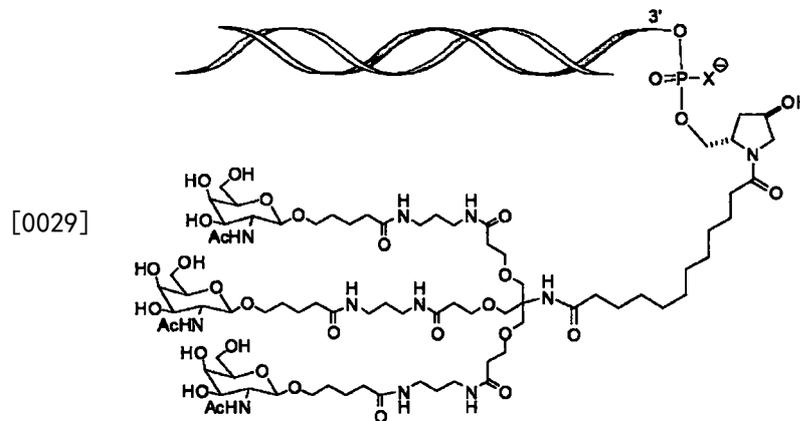
[0024] 在一个实施方案中，所述配体与所述dsRNA药剂的所述有义链的3'端缀合。

[0025] 在一个实施方案中，所述配体是N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 衍生物。

[0026] 在一个实施方案中，所述配体是



[0028] 在一个实施方案中，所述dsRNA药剂与所述配体缀合，如下示意图所示



[0030] 并且其中X是O或S。

[0031] 在一个实施方案中，所述X是O。

[0032] 在一个实施方案中，互补区包含表3至表6中的反义序列中的任一者。

[0033] 在一个方面，本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链，其中反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域，其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸，其中所述dsRNA药剂由式(I<sub>j</sub>)表示：

[0034] 有义：5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-(XXX)<sub>i</sub>-N<sub>b</sub>-YYY-N<sub>b</sub>-(ZZZ)<sub>j</sub>-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub>3'

[0035] 反义：3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>q</sub>'5' (I<sub>j</sub>)，

[0036] 其中

- [0037]  $i$ 、 $j$ 、 $k$ 和 $l$ 各自独立地是0或1;
- [0038]  $p$ 、 $p'$ 、 $q$ 和 $q'$ 各自独立地是0至6;
- [0039] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0040] 每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;
- [0041] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_p'$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;
- [0042]  $XXX$ 、 $YYY$ 、 $ZZZ$ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序;
- [0043]  $N_b$ 上的修饰不同于 $Y$ 上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于 $Y'$ 上的修饰;并且
- [0044] 其中所述有义链与至少一种配体缀合。
- [0045] 在一个实施方案中, $i$ 是0; $j$ 是0; $i$ 是1; $j$ 是1; $i$ 和 $j$ 两者均是0;或者 $i$ 和 $j$ 两者均是1。在另一个实施方案中, $k$ 是0; $l$ 是0; $k$ 是1; $l$ 是1; $k$ 和 $l$ 两者均是0;或者 $k$ 和 $l$ 两者均是1。
- [0046] 在一个实施方案中, $XXX$ 与 $X'X'X'$ 互补, $YYY$ 与 $Y'Y'Y'$ 互补,并且 $ZZZ$ 与 $Z'Z'Z'$ 互补。
- [0047] 在一个实施方案中, $YYY$ 基序存在于有义链的切割位点处或附近,例如 $Y'Y'Y'$ 基序存在于反义链自5'末端的第11、12和13个位置处。
- [0048] 在一个实施方案中,式(Ij)由式(Ik)表示:
- [0049] 有义: $5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q3'$
- [0050] 反义: $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'$ (Ik)。
- [0051] 在另一个实施方案中,式(Ij)由式(I1)表示:
- [0052] 有义: $5'n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'$
- [0053] 反义: $3'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'5'$ (I1)
- [0054] 其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0055] 在又一个实施方案中,式(Ij)由式(Im)表示:
- [0056] 有义: $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q3'$
- [0057] 反义: $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'5'$ (Im)其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0058] 在另一个实施方案中,式(Ij)由式(In)表示:
- [0059] 有义: $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'$
- [0060] 反义: $3'n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q'5'$ (In)
- [0061] 其中每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含1至5个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,并且每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0062] 互补区的长度可以为至少17个核苷酸;长度为19至30个核苷酸;长度为19至25个核苷酸;或长度为21至23个核苷酸。
- [0063] 每条链的长度可以不超过30个核苷酸,例如,每条链的长度独立地为19至30个核苷酸。
- [0064] 在一个实施方案中,核苷酸上的修饰选自以下组成的群组:LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-烷基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-0-甲基、2'-脱氧、2'-羟基,及其组合。

[0065] 在一个实施方案中,核苷酸上的修饰为2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0066] 在一个实施方案中,Y'是2'-O-甲基或2'-氟修饰的核苷酸。

[0067] 在一个实施方案中,所述dsRNA药剂的至少一条链包含至少1个核苷酸的3'突出端或至少2个核苷酸的3'突出端。

[0068] 在一个实施方案中,所述dsRNA药剂进一步包括至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键。

[0069] 在一个实施方案中,所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的3'末端处。在一个实施方案中,所述链是反义链。在另一个实施方案中,所述链是所述有义链。

[0070] 在一个实施方案中,所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'末端处。在一个实施方案中,所述链是反义链。在另一个实施方案中,所述链是所述有义链。

[0071] 在一个实施方案中,所述链是反义链。在另一个实施方案中,所述链是所述有义链。

[0072] 在一个实施方案中,所述硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键位于一条链的5'末端和3'末端两者处。

[0073] 在一个实施方案中,在所述双链体的所述反义链的5'端的第1位置处的碱基对为AU碱基对。

[0074] 在一个实施方案中, $p' > 0$ 。在另一个实施方案中, $p' = 2$ 。

[0075] 在一个实施方案中, $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与靶mRNA互补。在另一个实施方案中, $q' = 0, p = 0, q = 0$ ,并且 $p'$ 突出端核苷酸与靶mRNA不互补。

[0076] 在一个实施方案中,所述有义链具有总计21个核苷酸,并且所述反义链具有总计23个核苷酸。

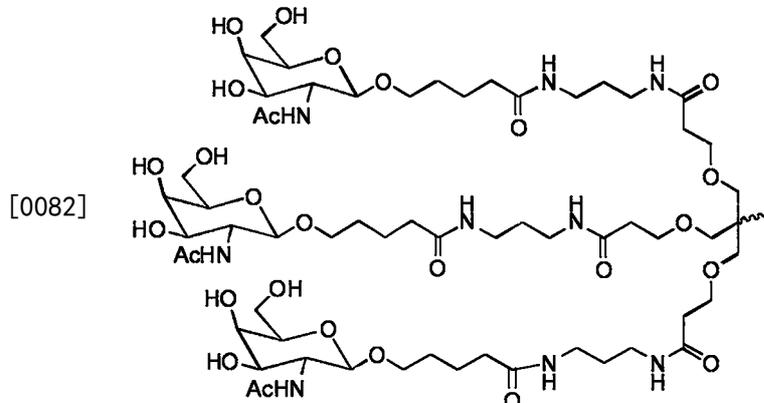
[0077] 在一个实施方案中,至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸。在另一个实施方案中,至少一个 $n_p'$ 通过硫代磷酸酯键连接到相邻的核苷酸。

[0078] 在一个实施方案中,所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸包括修饰。

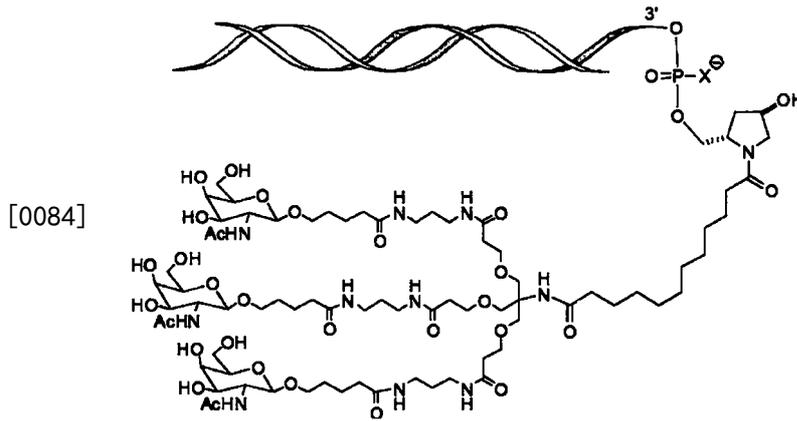
[0079] 在一个实施方案中,所述配体与所述dsRNA药剂的所述有义链的3'端缀合。

[0080] 在一个实施方案中,所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)衍生物。

[0081] 在一个实施方案中,所述配体是



[0083] 在一个实施方案中,所述dsRNA药剂与所述配体缀合,如以下示意图所示



[0085] 并且其中X是O或S。

[0086] 在一个实施方案中,所述X是O。

[0087] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:

[0088] 有义:  $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$

[0089] 反义:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (Ij)

[0090] 其中:

[0091]  $i, j, k$ 和 $l$ 各自独立地是0或1;

[0092]  $p, p', q$ 和 $q'$ 各自独立地是0至6;

[0093] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;

[0094] 每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;

[0095] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p, n_p', n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

[0096]  $XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰; $N_b$ 上的

[0097] 修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且

[0098] 其中所述有义链与至少一种配体缀合。

[0099] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:

[0100] 有义:  $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$

[0101] 反义:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (Ij)

[0102] 其中:

[0103]  $i, j, k$ 和 $l$ 各自独立地是0或1;

[0104] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p, n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;

[0105]  $p, q$ 和 $q'$ 各自独立地为0至6;

- [0106]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;
- [0107] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0108] 每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;
- [0109] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;
- [0110]  $N_b$ 上的修饰与Y上的修饰不同,并且 $N_b'$ 上的修饰与Y'上的修饰不同;并且
- [0111] 其中所述有义链与至少一种配体缀合。
- [0112] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:
- [0113] 有义:  $5'n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q3'$
- [0114] 反义:  $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'5'$  (Ij)
- [0115] 其中:
- [0116] i、j、k和l各自独立地是0或1;
- [0117] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;
- [0118] p、q和q'各自独立地为0至6;
- [0119]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;
- [0120] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0121] 每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;
- [0122] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;
- [0123]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;并且
- [0124] 其中所述有义链与至少一种配体缀合,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。
- [0125] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:
- [0126] 有义:  $5'n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q3'$
- [0127] 反义:  $3'n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q'5'$  (Ij)
- [0128] 其中:
- [0129] i、j、k和l各自独立地是0或1;
- [0130] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;
- [0131] p、q和q'各自独立地为0至6;

- [0132]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;
- [0133] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0134] 每个 $N_b$ 和 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列;
- [0135] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰;
- [0136]  $N_b$ 上的修饰不同于Y上的修饰,并且 $N_b'$ 上的修饰不同于Y'上的修饰;
- [0137] 其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;并且
- [0138] 其中所述有义链与至少一种配体缀合,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。
- [0139] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括与反义链互补的有义链,其中所述反义链包含与编码CIDEb的mRNA的一部分互补的区域,其中每条链的长度为约14至约30个核苷酸,其中所述dsRNA药剂由式(Ij)表示:
- [0140] 有义:5' $n_p$ - $N_a$ -YYY- $N_a$ - $n_q$ 3'
- [0141] 反义:3' $n_p'$ - $N_a'$ -Y'Y'Y'- $N_a'$ - $n_q'$ 5' (Ik)
- [0142] 其中:
- [0143] 各自可能存在或不存在的每个 $n_p$ 、 $n_q$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;
- [0144] p、q和q'各自独立地为0至6;
- [0145]  $n_p' > 0$ 并且至少一个 $n_p'$ 经由硫代磷酸酯键连接到相邻核苷酸;
- [0146] 每个 $N_a$ 和 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的或未经修饰的核苷酸或其组合的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0147] YYY和Y'Y'Y'各自独立地表示三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序,并且其中所述修饰是2'-O-甲基修饰和/或2'-氟修饰;
- [0148] 其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯键;并且
- [0149] 其中所述有义链与至少一种配体缀合,其中所述配体是通过单价、二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物。
- [0150] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb)的双链核糖核酸(dsRNA)药剂。所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸包含选自2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,其中所述有义链包含在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的基本上所有核苷酸包含选自2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,其中所述反义链包含在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且其中所述有义链与一种或多种GalNAc衍生物缀合,所述一种或多种GalNAc衍生物通过在3'末端处的单价、二价或三价支链接头连接。在一些实施方案中,所述dsRNA药剂包括形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包含来

自SEQ ID NO:1的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,其中所述有义链的基本上所有核苷酸包含选自2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,其中所述有义链包含在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述反义链的基本上所有核苷酸包含选自2'-O-甲基修饰和2'-氟修饰组成的群组的修饰,其中所述反义链包含在5'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端处的两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且其中所述有义链与一种或多种GalNAc衍生物缀合,所述一种或多种GalNAc衍生物缀合通过在3'末端处的单价、二价或三价支链接头连接。

[0151] 在一个实施方案中,所述有义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸为经修饰的核苷酸。

[0152] 在一个实施方案中,互补区包含表3至表6中列出的反义序列中的任一者。

[0153] 在一个实施方案中,所述有义链和所述反义链包含选自表3至表6中列出的药剂中的任一者的核苷酸序列组成的群组的核苷酸序列。

[0154] 在上述dsRNA药剂的各种实施方案中,所述dsRNA药剂靶向编码CIDEB的mRNA的热点区。

[0155] 在另一方面,本发明提供了一种靶向细胞死亡诱导DFFA样效应子B(CIDEB)mRNA的热点区的dsRNA药剂。

[0156] 本发明还提供了细胞、载体和药物组合物,其包含本发明的dsRNA药剂中的任一者。dsRNA药剂可以在未缓冲的溶液中调配,例如盐水或水中,或在缓冲的溶液中调配,例如包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合的溶液。在一个实施方案中,缓冲的溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0157] 在一个方面,本发明提供了一种抑制细胞中细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)表达的方法。所述方法包括使所述细胞与本发明的dsRNA药剂或药物组合物接触,从而抑制所述细胞中CIDEB的表达。

[0158] 细胞可以在受试者(如人受试者)体内。

[0159] 在一个实施方案中,CIDEB表达被抑制至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或被抑制至低于CIDEB表达的检测水平。

[0160] 在一个实施方案中,人受试者患有CIDEB相关疾病、病症或病况。在一个实施方案中,CIDEB相关疾病、病症或病况是慢性炎性疾病,如肝脏和其他组织的慢性炎性疾病。在一个实施方案中,慢性炎性疾病是慢性炎性肝病。在一个实施方案中,慢性炎性肝病选自以下组成的群组:肝脏中脂肪的积累、肝脏的炎症、肝纤维化、脂肪性肝病(脂肪变性)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和肝硬化。

[0161] 在一个方面,本发明提供了一种抑制受试者中CIDEB的表达的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,从而抑制所述受试者中CIDEB的表达。

[0162] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,从而治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的所述受试者。

[0163] 在另一个方面,本发明提供了一种预防患有将受益于CIDEB基因的表达的减少的

疾病、病症或病况的受试者中的至少一种症状的方法。所述方法包括向所述受试者施用预防有效量的本发明药剂dsRNA药剂或药物组合物,从而预防患有将受益于CIDEB基因的表达的减少的疾病、病症或病况的所述受试者中的至少一种症状。

[0164] 在另一个方面,本发明提供了一种降低患有脂肪变性的受试者发展为慢性肝病的风险的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,从而降低患有脂肪变性的所述受试者发展为慢性肝病的风险。

[0165] 在一个方面,本发明提供了一种抑制患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者的肝脏中的脂滴积累的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,以及靶向CIDEB基因的dsRNA药剂或包含靶向CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物,从而抑制患有CIDEB相关疾病、病症或病况的所述受试者的肝脏中脂肪的积累。

[0166] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,以及靶向CIDEB基因的dsRNA药剂或包含靶向CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物,从而治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况的所述受试者。

[0167] 在另一个方面,本发明提供了一种预防患有将受益于CIDEB基因的表达的减少的疾病、病症或病况的受试者中的至少一种症状的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,以及靶向CIDEB基因的dsRNA药剂或包含靶向CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物,从而预防患有将受益于CIDEB基因的表达的减少的疾病、病症或病况的所述受试者的至少一种症状。

[0168] 在另一个方面,本发明提供了一种降低患有脂肪变性的受试者发展为慢性肝病的风险的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,以及靶向CIDEB基因的dsRNA药剂或包含靶向CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物,从而降低患有脂肪变性的所述受试者发展为慢性肝病的风险。

[0169] 在另一个方面,本发明提供了一种抑制患有脂肪变性的受试者的脂肪变性进展为脂肪性肝炎的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的dsRNA药剂或药物组合物,以及靶向CIDEB基因的dsRNA药剂或包含靶向CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物,从而抑制所述受试者中脂肪变性进展为脂肪性肝炎。

[0170] 在一个实施方案中,向所述受试者施用dsRNA药剂或药物组合物导致CIDEB蛋白活性降低,例如,CIDEB与ApoB的相互作用降低和/或肝脏中脂质成熟降低;CIDEB蛋白积累降低、CIDEB酶促活性降低、CIDEB蛋白积累降低和/或受试者的肝脏中脂肪积累和/或脂滴扩增降低。

[0171] 在一个实施方案中,CIDEB相关疾病、病症或病况是慢性炎性疾病。

[0172] 在一个实施方案中,慢性炎性疾病是慢性炎性肝病。

[0173] 在一个实施方案中,慢性炎性肝病选自自由以下组成的群组:肝脏中脂肪的积累、肝脏的炎症、肝纤维化、脂肪性肝病(脂肪变性)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和肝硬化。

[0174] 在一个实施方案中,慢性炎性肝病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0175] 在一个实施方案中,受试者是肥胖的。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的方法和用途进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。

[0177] 在一个实施方案中,dsRNA药剂以约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约50mg/kg的剂量施用于受试者。

[0178] 所述药剂可以被静脉内、肌内或皮下施用于受试者。在一个实施方案中,所述药剂被皮下施用于受试者。

[0179] 在一个实施方案中,本发明的方法和用途进一步包括测定受试者中CIDEb的水平。

[0180] 在一个方面,本发明提供了一种用于抑制细胞表达细胞死亡诱导DFFA样效应子b (CIDEb) 的双链核糖核酸 (dsRNA) 药剂,其中所述dsRNA药剂包含形成双链区的有义链和反义链,其中所述有义链包含表3至表6中的药剂的任一者的核苷酸序列,并且所述反义链包含表3至表6中的药剂的任一者的核苷酸序列,其中所述有义链的基本上所有核苷酸和所述反义链的基本上所有核苷酸都是经修饰的核苷酸,并且其中所述dsRNA药剂与配体缀合。

### 附图说明

[0181] 图1描绘了在使用示例性的人CIDEb dsRNA双链体的小鼠体内单剂量(3mg/kg)研究中的CIDEb mRNA的qPCR结果。结果呈现为相对于PBS归一化的剩余的mRNA百分比。

[0182] 图2描绘了使用示例性的人CIDEb dsRNA双链体的小鼠体内多剂量(1.5mg/kg和0.75mg/kg)研究中的CIDEb mRNA的qPCR结果。结果呈现为相对于PBS归一化的剩余的mRNA百分比。

### 具体实施方式

[0183] 本发明提供了iRNA组合物,其影响CIDEb基因的RNA转录物的RNA诱导沉默复合体(RISC)介导的切割。CIDEb基因可以在细胞内,例如受试者(如人)体内的细胞。本发明还提供了使用本发明的iRNA组合物抑制CIDEb基因的表达,以及治疗将受益于抑制或减少CIDEb基因的表达的受试者的方法,所述受试者例如将受益于炎症减轻的受试者,例如患有或易于患有CIDEb相关疾病、病症或病况的受试者,如患有或易于患有肝脏和其他组织的慢性炎性疾病的受试者,例如患有慢性炎性肝病如肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、肝硬化、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝脏损伤、肝细胞坏死、胰岛素不敏感和糖尿病的受试者。

[0184] 靶向CIDEb的本发明的iRNA可以包括RNA链(反义链),所述RNA链(反义链)具有长度为约30个核苷酸或更少的区域,例如,长度为15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个核苷酸,所述区域与CIDEb基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补。

[0185] 在一些实施方案中,本发明的双链RNAi药剂的一条或两条链的长度为至多66个核苷酸,例如长度为36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53个核苷酸,具有与CIDEb基因的mRNA转录物的至少一部分基本上互补的至少19个连续核苷酸的区域。在一些实施方案中,

此类具有较长长度的反义链的iRNA药剂可以包含长度为20至60个核苷酸的第二RNA链(有义链),其中有义链和反义链形成18至30个连续核苷酸的双链体。

[0186] 本文所述的iRNA药剂的使用使得能够在哺乳动物中靶向降解CIDEB基因的mRNA。

[0187] 特别地,极低剂量的iRNA可以特异性且有效地介导RNA干扰(RNAi),导致对CIDEB基因的表达的显著抑制。因此,包括这些iRNA的方法和组合物可用于治疗将受益于抑制或减少CIDEB基因的表达的受试者,例如将受益于炎症减轻的受试者,例如患有或易于患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者,例如患有或易于患有肝脏和其他组织的慢性炎症性疾病的受试者,例如,患有慢性炎症肝病例如肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、肝硬化、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝脏损伤、肝细胞坏死、胰岛素不敏感和糖尿病的受试者。

[0188] 以下详细描述公开了如何制备和使用含有iRNA的组合物以抑制CIDEB基因的表达,以及用于治疗患有将受益于这种基因的表达的抑制和/或减少的疾病和病症的受试者的组合物和方法。

[0189] I. 定义

[0190] 为了更容易理解本发明,首先定义某些术语。另外,应该注意的是,每当引用参数的值或值的范围时,意图是所引用的值中间的值和范围也旨在是本发明的一部分。

[0191] 冠词“一个(a)”和“一种(an)”在本文中用于指代所述冠词的语法宾语中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“要素”是指一个要素或多个要素,例如,多个要素。

[0192] 术语“包含”在本文中用于意指短语“包括但不限于”,并且可与之互换使用。

[0193] 除非上下文另外清楚地指出,否则术语“或”在本文中用于意指术语“和/或”,并且可与之互换使用。

[0194] 术语“约”在本文中用于意指在本领域的典型公差范围内。例如,“约”可以被理解为平均值的约2个标准偏差。在某些实施方案中,约意指 $\pm 10\%$ 。在某些实施方案中,约意指 $\pm 5\%$ 。当“约”存在于一系列数字或范围之前时,应当理解“约”可以修饰所述系列或范围中的数字中的每个数字。

[0195] 除非另有说明,否则术语“CIDEB”,也被称为“细胞死亡诱导DFFA样效应子b”、“细胞死亡激活剂CIDE-B”或“细胞死亡诱导DFF45样效应子B”,是指编码来自任何脊椎动物或哺乳动物来源的CIDEB蛋白的熟知的基因,所述脊椎动物或哺乳动物来源包括但不限于人、牛科动物、鸡、啮齿动物、小鼠、大鼠、猪、羊科动物、灵长类、猴和豚鼠。

[0196] 该术语还指维持天然CIDEB的至少一种体内或体外活性的天然CIDEB的片段和变体。

[0197] CIDEB(一种CIDE蛋白家族的成员)主要在肝脏组织中以及在小肠(例如小肠的空肠和回肠切片)中表达(Zhang等人,《脂质研究(Lipid Res.)》;55(7):1279-87;2014)。CIDEB是内质网(ER)和脂滴(LD)相关蛋白。作为CIDE家族成员,CIDEB蛋白的过表达诱导细胞死亡,但CIDEB的生理功能与各种脂质代谢途径,特别是VLDL途径更密切相关。例如,CIDEB通过与ApoB相互作用来介导VLDL脂质化和成熟;CIDEB也是VLDL转运囊泡的生物发生和小肠中的乳糜微粒脂质化所必需的。CIDEB突变小鼠显示出显著增加的胰岛素敏感性和增强的全身代谢和肝脂肪酸氧化速率(Li等人,《糖尿病(Diabetes)》.56(10):2523-

32.2007)。因此,CIDEB可以表示用于治疗肥胖、糖尿病和肝脂肪变性的新治疗靶标(Li等人,《糖尿病》.56(10):2523-32.2007)。CIDEB由肝细胞核因子4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ )转录调节,所述肝细胞核因子4 $\alpha$ 是肝脏中最丰富的转录因子;HNF4 $\alpha$ 对于VLDL介导的脂质转运至关重要,并且参与HCV组装/释放。作为HNF4 $\alpha$ 的关键转录辅激活因子,过氧化物酶体增殖物-活化的受体- $\gamma$ 辅激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )还调节HCV产生,并且PGC-1 $\alpha$ 以CIDEB依赖性方式刺激VLDL组装(Cai等人,《科学报告(Scientific Reports)》,第6卷,文章编号:27778,2016)。

[0198] HCV进入肝细胞和HCV组装需要CIDEB(Xu等人,《病毒学杂志(J Virology)》,88,8433-8444,2014)。CIDEB与HCV NS5A蛋白相互作用并且调节HCV颗粒与ApoE的缔合。CIDEB还调节登革热病毒(DENV)生命周期的进入后阶段(Cai等人,《科学报告》,第6卷,文章编号:27778,2016)。

[0199] CIDEB的示例性的核苷酸序列和氨基酸序列可以在例如智人的GenBank登录号NM\_001393338.1(SEQ ID NO:1;反向补体SEQ ID NO:2)中找到。

[0200] CIDEB mRNA序列的另外的实例可以使用公开可获得的数据库(例如GenBank、UniProt和OMIM)容易地获得。

[0201] 提供了关于CIDEB的进一步信息,例如在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27141>的NCBI基因数据库中。

[0202] 在一些实施方案中,与小鼠或大鼠CIDEB mRNA的区域基本上互补的iRNA与人CIDEB mRNA交叉反应并且表示用于人靶向的潜在候选物。

[0203] 如本文所使用的,术语“CIDEB”还指通过CIDEB基因的天然存在的DNA序列变异(例如CIDEB基因中的单核苷酸多态性)在细胞中表达的特定多肽。CIDEB基因内的许多单核苷酸多态性(SNP)已经被鉴定,并且可以在例如NCBI dbSNP处找到(参见例如[www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp))。

[0204] 如本文所使用的,“靶序列”是指在CIDEB基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的连续部分,包括作为初级转录产物的RNA加工的产物的mRNA。在一个实施方案中,序列的靶部分将至少足够长,以在CIDEB基因的转录期间形成的mRNA分子的核苷酸序列的该部分处或附近用作iRNA定向切割的底物。

[0205] CIDEB基因的靶序列的长度可以为约9至36个核苷酸,例如,长度为约15至30个核苷酸。例如,靶序列的长度可以为约15至30个核苷酸,15-29,15-28,15-27,15-26,15-25,15-24,15-23,15-22,15-21,15-20,15-19,15-18,15-17,18-30,18-29,18-28,18-27,18-26,18-25,18-24,18-23,18-22,18-21,18-20,19-30,19-29,19-28,19-27,19-26,19-25,19-24,19-23,19-22,19-21,19-20,20-30,20-29,20-28,20-27,20-26,20-25,20-24,20-23,20-22,20-21,21-30,21-29,21-28,21-27,21-26,21-25,21-24,21-23或21-22个核苷酸。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本发明的一部分。

[0206] 如本文所使用的,术语“包括序列的链”是指包括核苷酸链的寡核苷酸,所述核苷酸链通过使用标准核苷酸命名法指代的序列描述。

[0207] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”通常各自分别表示含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,可以理解的是,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指经修饰的核苷酸,如下文进一步详述的,或替代的替代部分(参见例如,表2)。本领域技术人员清楚地知道,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可以被其他部分取代,而不会实质性改变

包括含有此类替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。例如但不限于,包括肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此,在本发明特征的dsRNA的核苷酸序列中,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以被含有例如肌苷的核苷酸取代。在另一个实例中,寡核苷酸中任何位置的腺嘌呤和胞嘧啶都可以分别被鸟嘌呤和尿嘧啶取代,以与靶mRNA形成G-U摆动碱基配对。含有此类取代部分的序列适用于本发明特征的组合物和方法。

[0208] 如本文可互换使用的术语“iRNA”、“RNAi药剂”、“iRNA药剂”和“RNA干扰剂”是指含有如本文所定义的RNA的药剂,并且其通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)通路介导RNA转录物的靶向切割。iRNA通过一种称为RNA干扰(RNAi)的过程指导mRNA的序列特异性降解。iRNA调节(例如抑制)细胞中的CIDEB基因的表达,所述细胞例如受试者(如哺乳动物受试者)体内的细胞。

[0209] 在一个实施方案中,本发明的RNAi药剂包含单链RNA,其与靶RNA序列(例如,CIDEB靶mRNA序列)相互作用以引导靶RNA的切割。不希望受理论束缚,据信引入细胞中的长双链RNA被称为Dicer的III型核酸内切酶分解为siRNA(Sharp等人,(2001)《基因与发育(Genes Dev)》15:485)。Dicer,即核糖核酸酶-III样酶使用特性两个碱基3'突出端将dsRNA加工成19至23个碱基对短干扰RNA(Bernstein等人,(2001)《自然》409:363)。然后将siRNA并入到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,其中一种或多种解旋酶解开siRNA双链体,从而使互补的反义链能够指导靶识别(Nykanen等人,(2001)《细胞》107:309)。在与适当的靶mRNA结合后,RISC内的一种或多种核酸内切酶切割靶以诱导沉默(Elbashir等人,(2001)《基因与发育》15:188)。因此,在一方面,本发明涉及在细胞内产生的单链RNA(sssiRNA),并且其促进RISC复合物的形成以影响靶基因,即CIDEB基因的沉默。因此,术语“siRNA”在本文中用于指如上文所描述的RNAi。

[0210] 在另一个实施方案中,RNAi药剂可以是单链RNAi药剂,其被引入到细胞或生物体中以抑制靶mRNA。单链RNAi药剂(ssRNAi)结合至RISC核酸内切酶Argonaute 2,然后所述核酸内切酶切割靶mRNA。单链siRNA通常为15至30个核苷酸,并且经过化学修饰。单链RNAi药剂的设计和测试在美国专利第8,101,348号和Lima等人,(2012)《细胞》150:883-894中进行了描述,所述文献中每一个的全部内容据此通过引用并入本文。本文所描述的任何反义核苷酸序列可以用作如本文所描述的或如通过Lima等人,(2012)《细胞》150:883-894中所描述的方法进行化学修饰的单链siRNA。

[0211] 在另一个实施方案中,用于本发明的组合物和方法的“iRNA”是双链RNA,并且在本文中被称为“双链RNAi药剂”、“双链RNA(dsRNA)分子”、“dsRNA药剂”或“dsRNA”。术语“dsRNA”是指核糖核酸分子的复合物,具有双链体结构,所述双链体结构包含两条反平行且基本上互补的核酸链,相对于靶RNA,即CIDEB基因具有“有义”和“反义”取向。在本发明的一些实施方案中,双链RNA(dsRNA)通过本文中称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制触发靶RNA(例如,mRNA)的降解。

[0212] 一般而言,dsRNA分子的每条链的大多数核苷酸是核糖核苷酸,但如本文详细描述,每条链或两条链也可以包括一种或多种非核糖核苷酸,例如脱氧核糖核苷酸和/或经修饰的核苷酸。另外,如本说明中所使用的,“RNAi药剂”可以包含具有化学修饰的核糖核苷酸;RNAi药剂可以包含在多个核苷酸处的实质性修饰。如本文所使用的,术语“经修饰的核

苷酸”是指独立地具有经修饰的糖部分、经修饰的核苷酸间键和/或经修饰的核碱基的核苷酸。因此,术语经修饰的核苷酸涵盖对核苷酸间键、糖部分或核碱基的取代、添加或删除,例如官能团或原子。适用于本发明的药剂的修饰包含本文所公开的或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书和权利要求的目的,如在siRNA类型分子中使用的,任何此类修饰都被“RNAi药剂”涵盖。

[0213] 双链体区域可以是允许通过RISC通路特异性降解期望的靶RNA的任何长度,并且长度可以在约9至36个碱基对的范围内,例如,长度为15至30个碱基对,例如长度为约9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个或36个碱基对,例如长度为15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本发明的一部分。

[0214] 形成双链体结构的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分,或其可以是单独的RNA分子。如果这两条链是一个较大分子的一部分,并且因此在一条链的3'端和形成双链体结构的相应的另一条链的5'端之间通过不间断的核苷酸链连接,则连接的RNA链被称为“发夹环”。发夹环可以包括至少一个未配对的核苷酸。在一些实施方案中,发夹环可以包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少23个或更多个未配对核苷酸。

[0215] 在dsRNA的两条基本上互补的链包括单独的RNA分子的情况下,那些分子不必但可以共价连接。在两条链通过除了一条链的3'端与形成双链体结构的相应的另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链以外的其他方式共价连接的情况下,连接结构被称为“接头”。RNA链可以具有相同或不同数量的核苷酸。碱基对的最大数量是dsRNA的最短链中的核苷酸数量减去双链体中存在的任何突出端。除了双链体结构外,RNAi可以包括一个或多个核苷酸突出端。

[0216] 在一个实施方案中,本发明的RNAi药剂是dsRNA,其每条链包含少于30个核苷酸,例如17至27、19至27、17至25、19至25或19至23个核苷酸,这些核苷酸与靶RNA序列(例如,CIDEB靶mRNA序列)相互作用以引导靶RNA的切割。在一个实施方案中,本发明的RNAi药剂是dsRNA,其每条链包含19至23个核苷酸,其与靶RNA序列(例如,CIDEB靶mRNA序列)相互作用以引导靶RNA的切割。在一个实施方案中,有义链的长度为21个核苷酸。在另一个实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸。

[0217] 如本文所使用的,术语“核苷酸突出端”是指从iRNA,例如,dsRNA的双链体结构突出的至少一个未配对的核苷酸。例如,当dsRNA的一条链的3'端延伸超过另一条链的5'端时,反之亦然,则存在核苷酸突出端。dsRNA可以包括至少一个核苷酸的突出端;可替代地,突出端可以包括至少两个核苷酸、至少三个核苷酸、至少四个核苷酸、至少五个核苷酸或更多。核苷酸突出端可以包括以下或由以下组成:核苷酸/核苷类似物,包含脱氧核苷酸/核苷。突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外,突出端的核苷酸可以存在于dsRNA

的反义链或有义链的5'端、3'端或两端上。

[0218] 在一个实施方案中, dsRNA的反义链在3'端和/或5'端处的突出端具有1至10个核苷酸, 例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在一个实施方案中, dsRNA的有义链在3'端和/或5'端处的突出端具有1至10个核苷酸, 例如, 1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在另一个实施方案中, 突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸盐替代。

[0219] 在某些实施方案中, 有义链或反义链或两者上的突出端可以包含长于10个核苷酸的延伸长度, 例如, 长度为10至30个核苷酸, 10至25个核苷酸、10至20个核苷酸或10至15个核苷酸。在某些实施方案中, 延伸的突出端在双链体的有义链上。在某些实施方案中, 在双链体的有义链的3'端上存在延伸的突出端。在某些实施方案中, 在双链体的有义链的5'端上存在延伸的突出端。在某些实施方案中, 延伸的突出端在双链体的反义链上。在某些实施方案中, 在双链体的反义链的3'端上存在延伸的突出端。在某些实施方案中, 在双链体的反义链的5'端上存在延伸的突出端。在某些实施方案中, 延伸的突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸盐替代。

[0220] 如本文所使用的, 关于dsRNA的术语“平端”或“平末端”是指在dsRNA的给定末端处没有未配对的核苷酸或核苷酸类似物, 即, 没有核苷酸突出端。dsRNA的一端或两端可以是平端的。当dsRNA的两端都是平端的时, 所述dsRNA被称为“平末端”。为了清楚起见, “平末端” dsRNA是两端均为平端的dsRNA, 即在分子的任一端处都没有核苷酸突出端。最常见的此类分子将在其整个长度上是双链的。

[0221] 术语“反义链”或“引导链”是指iRNA, 例如dsRNA的链, 其包括与靶序列(例如CIDEB mRNA)基本上互补的区域。

[0222] 如本文所使用的, 术语“互补区”是指反义链上与如本文所定义的序列(例如靶序列, 例如CIDEB核苷酸序列)基本上互补的区域。在互补区与靶序列不完全互补的情况下, 错配可以处于分子的内部或末端区中。通常, 最可容忍的错配在末端区域中, 例如, 在iRNA药剂的5'末端和/或3'末端的5个、4个、3个或2个核苷酸内。

[0223] 如本文所使用的, 术语“有义链”或“随从链”是指包含与如本文所定义的术语的反义链的区域基本上互补的区域的iRNA链。

[0224] 如本文所使用的, 术语“切割区”是指紧邻切割位点的区域。切割位点是靶上发生切割的位点。在一些实施方案中, 切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括三个碱基。在一些实施方案中, 切割区在切割位点的任一端上并紧邻切割位点包括两个碱基。在一些实施方案中, 切割位点特异性地存在于反义链的核苷酸10和11结合的位点处, 并且切割区包括核苷酸11、12和13。

[0225] 如本文所使用的, 并且除非另外指明, 否则术语“互补”当用于相对于第二核苷酸序列描述第一核苷酸序列时是指包括第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包括第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并且形成双链体结构的能力, 如技术人员将理解的。例如, 此类条件可以是严格条件, 其中严格条件可以包含: 400mM NaCl, 40mM PIPES, pH 6.4, 1mM EDTA, 50°C或70°C, 持续12小时至16小时, 然后洗涤(参见例如, 《分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》, Sambrook等人(1989)冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press))。可以应用其他条件, 如生物

体内部可能遇到的生理学上相关的条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合于两个序列的互补性测试的条件集。

[0226] iRNA内(例如,如本文所描述的dsRNA内)的互补序列包含包括第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包括第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长上的碱基配对。此类序列在本文中可以被称为彼此“完全互补”。然而,在第一序列在本文中被称为相对于第二序列“基本上互补”的情况下,这两个序列可以是完全互补的,或者它们可以形成一个或多个,但通常不超过5、4、3或2个杂交后错配的碱基对用于多达30个碱基对的双链体,同时保留在与其最终应用最相关的条件下杂交的能力,例如经由RISC通路抑制基因表达。然而,在两个寡核苷酸被设计以在杂交时形成一个或多个单链突出端的情况下,此类突出端不应视为相对于互补性的确定的错配。例如,包括一个长度是21个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度是23个核苷酸的寡核苷酸的dsRNA,其中较长的寡核苷酸包括与较短的寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列,仍可以被称为出于本文所描述的目的“完全互补”。

[0227] 如本文所使用的,“互补”序列还可以包括非沃森-克里克碱基对(non-Watson-Crick base pair)和/或由非天然和经修饰的核苷酸形成的碱基对,或者完全由其形成,只要满足关于其杂交能力的以上要求即可。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摆动碱基配对或胡斯坦碱基配对(Hoogsteen base pairing)。

[0228] 本文中的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可以相对于dsRNA的有义链和反义链之间或RNAi药剂的反义链与靶序列之间的碱基匹配使用,如将从其使用的上下文所理解的。

[0229] 如本文所使用的,与信使RNA(mRNA)的“至少一部分基本上互补”的多核苷酸是指与所关注的mRNA(例如,编码CIDEB的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果序列与编码CIDEB的mRNA的不间断部分基本上互补,则多核苷酸与CIDEB mRNA的至少一部分互补。

[0230] 因此,在一些实施方案中,本文所公开的反义链多核苷酸与靶CIDEB序列完全互补。在其他实施方案中,本文公开的反义链多核苷酸与靶CIDEB序列基本上互补,并且包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与SEQ ID NO:1的核苷酸序列或SEQ ID NO:1的片段的等效区域至少约80%互补,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0231] 在一个实施方案中,本发明的RNAi药剂包括与反义多核苷酸基本上互补的有义链,所述反义多核苷酸进而与靶CIDEB序列互补,并且其中所述有义链多核苷酸包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与SEQ ID NO:2的核苷酸序列或SEQ ID NO:2中的任一个的片段的等效区域至少约80%互补,如约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%互补。

[0232] 在一些实施方案中,本发明的iRNA包括与靶CIDEB序列基本上互补的反义链,并且包括连续核苷酸序列,所述连续核苷酸序列在其完整长度上与表3至表6中的任一条有义链的核苷酸序列或表3至表6中的任一条有义链的片段的等效区域至少约80%互补,如约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互

补或100%互补。

[0233] 如本文所使用的,术语“抑制(inhibiting)”可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“抑制(suppressing)”和其他类似术语互换使用,并且包含任何水平的抑制。

[0234] 如本文所使用的,短语“抑制CIDEB基因的表达”包括抑制任何CIDEB基因(例如,例如小鼠CIDEB基因、大鼠CIDEB基因、猴CIDEB基因或人CIDEB基因)以及编码CIDEB蛋白的CIDEB基因的变体或突变体的表达。

[0235] “抑制CIDEB基因的表达”包括CIDEB基因的任何水平抑制,例如,CIDEB基因的表达的至少部分抑制,例如抑制至少约20%。在某些实施方案中,抑制为至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%。

[0236] CIDEB基因的表达可以基于与CIDEB基因表达相关的任何变量的水平(例如CIDEB mRNA水平或CIDEB蛋白水平)来评估。还可以基于例如CIDEB蛋白活性的降低,例如CIDEB与ApoB的相互作用的降低和/或组织样品诸如肝脏样品中的脂质成熟的降低间接评估CIDEB基因的表达。可以通过与对照水平相比这些变量中的一个或多个的绝对或相对水平的降低来评估抑制。对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平,例如,给药前基线水平,或从未经治疗或用对照(例如,仅缓冲液对照或无活性药剂对照)治疗的类似受试者、细胞或样品中测定的水平。

[0237] 在一个实施方案中,CIDEB基因的表达的至少部分抑制通过CIDEB mRNA的量的减少来评估,所述CIDEB mRNA可以从转录CIDEB基因的第一细胞或细胞组中分离或检测,并且所述第一细胞或细胞组已经被处理使得CIDEB基因的表达受抑制,如与基本上与第一细胞或细胞组相同但未被如此处理的第二细胞或细胞组(对照细胞)相比较的。

[0238] 抑制程度可以用以下方式表示:

$$[0239] \quad \frac{(\text{对照细胞中的mRNA}) - (\text{经处理的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})} \cdot 100\%$$

[0240] 如本文所使用的,短语“使细胞与RNAi药剂(如dsRNA)接触”包含通过任何可能的方式接触细胞。使细胞与iRNA药剂接触包括使细胞在体外与iRNA接触或使细胞在体内与iRNA接触。可以直接或间接地进行接触。因此,例如可以通过执行所述方法的个体使RNAi药剂与细胞物理接触,或可替代地,可以使RNAi药剂处于允许或使其随后与细胞接触的情况。

[0241] 体外接触细胞可以通过例如将细胞与RNAi药剂一起温育来进行。体内接触细胞可以通过例如将RNAi药剂注射到细胞所在的组织中或其附近,或通过RNAi药剂注射到另一个区域中,例如血流或皮下空间,使得药剂随后将到达待接触的细胞所在的组织来进行。例如,RNAi药剂可以含有配体(例如,Ga1NAc3)或与配体偶联,所述配体将RNAi药剂引导到所关注的位点,例如肝脏。体外和体内接触方法的组合也是可能的。例如,细胞也可以与RNAi药剂体外接触,并且随后移植到受试者体内。

[0242] 在一个实施方案中,使细胞与iRNA接触包括通过促进或影响细胞的摄取或吸收来“引入”或“将iRNA递送到细胞中”。iRNA的吸收或摄取可以通过无辅助的扩散或活性细胞过程发生,或通过辅助剂或装置发生。将iRNA引入到细胞中可以是体外的和/或体内的。例如,

对于体内引入,可以将iRNA注射到组织部位中或全身施用。体内递送也可以通过 $\beta$ -葡聚糖递送系统进行,如在美国专利第5,032,401号和第5,607,677号以及美国公开第2005/0281781号中所描述的那些,所述文献的全部内容据此通过引用并入本文。体外引入细胞包含本领域已知的方法,如电穿孔和脂质转染。另外的方法在下文中描述和/或在本领域中是已知的。

[0243] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是包括脂质层的囊泡,所述脂质层封装药物活性分子,如核酸分子,例如iRNA或从其转录iRNA的质粒。LNP在例如美国专利第6,858,225号、第6,815,432号、第8,158,601号和第8,058,069号中进行了描述,所述美国专利的全部内容据此通过引用并入本文。

[0244] 如本文所使用的,“受试者”是动物,例如哺乳动物,包括灵长类动物(例如人、非人类灵长类动物,例如猴和黑猩猩)、非灵长类动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠、马和鲸)或鸟(例如鸭或鹅)。

[0245] 在一个实施方案中,受试者是人,如正在治疗或评估将受益于CIDEB表达减少的疾病、病症或病况的人;处于将受益于CIDEB表达减少的疾病、病症或病况的风险中的人;患有将受益于CIDEB表达减少的疾病、病症或病况的人;和/或正在治疗将受益于CIDEB表达减少的疾病、病症或病况的人,如本文所描述的。

[0246] 如本文所使用的,术语“治疗/处理(treating)”或“治疗/处理(treatment)”是指有益或期望的结果,包括但不限于减轻或改善与CIDEB基因表达和/或CIDEB蛋白产生相关的一种或多种症状,例如CIDEB相关疾病,例如肝脏和其他组织的慢性炎症性疾病。在一个实施方案中,慢性炎症性疾病是慢性炎症性肝病,例如肝脏的炎症、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素不敏感和/或糖尿病。“治疗”也可以意指与没有治疗的预期存活期相比,延长存活期。

[0247] 在CIDEB相关疾病的上下文中的术语“降低”是指此类水平的统计学显著降低。该降低可以是例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多。在某些实施方案中,降低为至少20%。在受试者的CIDEB水平的上下文中“较低”是优选地降到没有此类病症的个体的正常范围内的被接受的水平。

[0248] 如本文所使用的,“预防/防止(prevention)”或“预防/防止(preventing)”,当用于提及将受益于CIDEB基因的表达的降低的疾病、病症或其病况时,是指受试者将发展出与此类疾病、病症或病况相关的症状的可能性降低,例如,CIDEB基因表达的症状,例如肝脏的炎症、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素不敏感和/或糖尿病。未能发展出疾病、病症或病况,或与此类疾病、病症或病况相关的症状发展减少(例如,在该疾病或病症的临床接受的量表上至少减少约10%),或延迟症状的表现减少(例如炎症的减少,或肝脏中的脂质积累和/或肝脏中的脂滴扩增的减少)延迟(例如,几天、几周、几个月或几年)被认为是有效的预防。

[0249] 如本文所使用,术语“CIDEB相关疾病”是由CIDEB基因表达或CIDEB蛋白产生引起的或与其相关的疾病或病症。术语“CIDEB相关疾病”包括将受益于CIDEB基因表达或蛋白质

活性降低的疾病、病症或病况。

[0250] 在一个实施方案中，“CIDEB相关疾病”是慢性炎性疾病。“慢性炎性疾病”是与慢性炎症相关的任何疾病、病症或病况。慢性炎性疾病的非限制性实例包括例如肝脏和其他组织的炎症。慢性炎性肝病的非限制性实例包括例如纤维化、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎 (ASH)、酒精性肝病 (ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素不敏感和/或糖尿病。

[0251] 如本文所使用的，“治疗有效量”旨在包括当向患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者施用时足以有效治疗疾病 (例如,通过减少、改善或维持现有疾病或疾病的一种或多种症状) 的RNAi 药剂的量。“治疗有效量”可能因RNAi 药剂、药剂如何施用、疾病和其严重程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗的类型 (如果有的话) 以及待治疗受试者的其他个体特征而异。

[0252] 如本文所使用的，“预防有效量”旨在包括当施用于患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者时足以预防或改善疾病或疾病的一种或多种症状的iRNA的量。改善疾病包含减缓疾病的进程或降低后期发展的疾病的严重程度。“预防有效量”可能根据RNAi 药剂、药剂如何施用、疾病的风险程度以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗的类型 (如果有的话) 以及待治疗的患者的其他个体特征而变化。

[0253] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括以适用于任何治疗的合理益处/风险比产生一些期望的局部或全身效应的RNAi 药剂的量。在本发明的方法中使用的iRNA可以以足够的量施用,以产生适用于此类治疗的合理的益处/风险比。

[0254] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在正确医学判断的范围内适合于与人受试者和动物受试者的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物或剂型。

[0255] 如本文所使用的,短语“药学上可接受的载剂”是指药学上可接受的材料、组合物或媒剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂 (例如,润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、或参与将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运送到身体的另一个器官或部分的溶剂封装材料。在与调配物的其他成分相容并且对所治疗受试者无害的意义上讲,每种载剂必须是“可接受的”。可以充当药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括: (1) 糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖; (2) 淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉; (3) 纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素; (4) 粉状黄蓍胶; (5) 麦芽; (6) 明胶; (7) 润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石; (8) 赋形剂,如可可脂和栓剂蜡类; (9) 油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; (10) 二醇,如丙二醇; (11) 多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇; (12) 酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯; (13) 琼脂; (14) 缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝; (15) 海藻酸; (16) 无热原的水; (17) 等渗盐水; (18) 林格氏溶液; (19) 乙醇; (20) pH缓冲溶液; (21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐; (22) 填充剂,如多肽和氨基酸; (23) 血清组分,如血清白蛋白、HDL和LDL; 以及 (22) 在药物调配物中所采用的其他无毒相容性物质。

[0256] 如本文所使用的,术语“样品”包含从受试者分离的类似流体、细胞或组织的集合,以及受试者体内存在的流体、细胞和组织。生物流体的实例包含血液、血清和浆膜流体、血浆、脑脊液、眼流体、淋巴、尿液、唾液等。组织样品可以包含来自组织、器官或局部区域的样

品。例如,样品可以源自特定的器官、器官的一部分或这些器官内的液体或细胞。在某些实施方案中,样品可以源自肝脏(例如,整个肝脏或肝脏的某些部分或肝脏中的某些类型的细胞,例如,肝细胞)。在一些实施方案中,“源自受试者的样品”是指从受试者抽取的血液或血浆。

#### [0257] II. 本发明的iRNA

[0258] 本文描述了抑制靶基因的表达的iRNA。在一个实施方案中,iRNA抑制CIDEB基因的表达。在一个实施方案中,iRNA药剂包括用于抑制细胞例如肝细胞(如,受试者(例如,哺乳动物,如患有慢性炎症性疾病、病症或病况的人)体内的肝细胞)表达CIDEB基因的双链核糖核酸(dsRNA)分子。

[0259] dsRNA包括具有互补区的反义链,所述互补区与在CIDEB基因的表达中形成的mRNA的至少一部分互补。互补区的长度为约30个核苷酸或更少(例如,长度为约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18个核苷酸或更少)。在与表达靶基因的细胞接触时,iRNA抑制靶基因(例如,人、灵长类动物、非灵长类动物或啮齿动物靶基因)的表达至少约10%,如通过例如PCR或基于支链DNA(bDNA)的方法或通过基于蛋白质的方法(如通过免疫荧光分析,使用例如蛋白质印迹或流式细胞术技术)所测定的。

[0260] dsRNA包含两条互补并且在将使用dsRNA的条件下杂交以形成双链体结构的RNA链。dsRNA的一条链(反义链)包含与靶序列基本上互补且通常完全互补的互补区。靶序列可以源自CIDEB基因的表达期间形成的mRNA的序列。另一条链(有义链)包含与反义链互补的区,使得两条链在适当条件下组合时杂交并形成双链体结构。如本文中其他地方所描述且如本领域已知的,dsRNA的互补序列相对于位于单独寡核苷酸上还可以作为单一核酸分子的自身互补区被包含在内。

[0261] 通常,双链体结构的长度为15至30个碱基对,例如,长度为15至29个、15-28,15-27,15-26,15-25,15-24,15-23,15-22,15-21,15-20,15-19,15-18,15-17,18-30,18-29,18-28,18-27,18-26,18-25,18-24,18-23,18-22,18-21,18-20,19-30,19-29,19-28,19-27,19-26,19-25,19-24,19-23,19-22,19-21,19-20,20-30,20-29,20-28,20-27,20-26,20-25,20-24,20-23,20-22,20-21,21-30,21-29,21-28,21-27,21-26,21-25,21-24,21至23个或21至22个碱基对。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本发明的一部分。

[0262] 类似地,与靶序列互补的区域的长度为15至30个核苷酸,例如长度为15至29个、15-28,15-27,15-26,15-25,15-24,15-23,15-22,15-21,15-20,15-19,15-18,15-17,18-30,18-29,18-28,18-27,18-26,18-25,18-24,18-23,18-22,18-21,18-20,19-30,19-29,19-28,19-27,19-26,19-25,19-24,19-23,19-22,19-21,19-20,20-30,20-29,20-28,20-27,20-26,20-25,20-24,20-23,20-22,20-21,21-30,21-29,21-28,21-27,21-26,21-25,21-24,21至23个或21至22个核苷酸。上述范围和长度中间的范围和长度也被认为是本发明的一部分。

[0263] 在一些实施方案中,dsRNA的有义链和反义链的长度各自独立地为约15至约30个核苷酸,或长度为约25至约30个核苷酸,例如,每条链的长度独立地为15至29个、15-28,15-27,15-26,15-25,15-24,15-23,15-22,15-21,15-20,15-19,15-18,15-17,18-30,18-29,18-28,18-27,18-26,18-25,18-24,18-23,18-22,18-21,18-20,19-30,19-29,19-28,19-27,19-26,19-25,19-24,19-23,19-22,19-21,19-20,20-30,20-29,20-28,20-27,20-26,

20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21至23个或21至22个核苷酸。在一些实施方案中, dsRNA的长度是约15至约23个核苷酸, 或长度是约25至约30个核苷酸。一般来说, dsRNA足够长以用作Dicer酶的底物。例如, 本领域众所周知, 长于约21至23个核苷酸的dsRNA可以用作Dicer的底物。如普通技术人员还将认识到的, 靶向切割的RNA的区域通常将是较大RNA分子的部分, 通常是mRNA分子。在相关情况下, mRNA靶的一“部分”是mRNA靶的连续序列, 其长度足以使其成为RNAi定向切割(即通过RISC通路切割)的底物。

[0264] 本领域技术人员还将认识到, 双链体区是dsRNA的主要功能部分, 例如约9至约36个碱基对(例如, 约10至36个、11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21至23个或21至22个碱基对)的双链体区。因此, 在一个实施方案中, 在其被加工成靶向所需RNA进行切割的例如15至30个碱基对的功能性双链体的程度上, 具有大于30个碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此, 普通技术人员将认识到, 在一个实施方案中, 微小RNA(miRNA)是dsRNA。在另一个实施方案中, dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施方案中, 可用于靶向CIDEB表达的iRNA药剂不是通过切割较大的dsRNA在靶细胞中产生的。

[0265] 如本文所描述的dsRNA可以进一步包括一个或多个单链核苷酸突出端, 例如, 1、2、3或4个核苷酸。具有至少一个核苷酸突出端的dsRNA相对于其钝端对应物具有出乎意料优异的抑制特性。核苷酸突出端可以包括以下或由以下组成: 核苷酸/核苷类似物, 包含脱氧核苷酸/核苷。突出端可以在有义链、反义链或其任何组合上。此外, 突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义链或有义链的5'端、3'端或两端上。

[0266] dsRNA可以通过如下文进一步讨论的本领域已知的标准方法合成, 例如, 通过使用自动DNA合成仪, 如可从例如应用生物系统公司的生物搜索(Biosearch, Applied Biosystems, Inc.)商购获得。

[0267] 本发明的iRNA化合物可以使用两步程序制备。首先, 单独制备双链RNA分子的单个链。然后, 对组分链进行退火。siRNA化合物的单个链可以使用溶液相或固相有机合成或两者制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或经修饰的核苷酸的寡核苷酸链。本发明的单链寡核苷酸可以使用溶液相或固相有机合成或两者制备。

[0268] 在一个方面, 本发明的dsRNA包括至少两个核苷酸序列, 有义序列和反义序列。有义链序列选自表3至表6中提供的序列组, 并且有义链的反义链的对应核苷酸序列可以选自表3至表6的序列组。在这方面, 两个序列中的一个序列与两个序列中的另一个序列互补, 其中所述序列中的一个序列与在CIDEB基因的表达中产生的mRNA序列基本上互补。因此, 在这方面, dsRNA将包括两个寡核苷酸, 其中一个寡核苷酸在表3至表6中被描述为有义链(随从链), 并且第二个寡核苷酸被描述为表3至表6中的有义链的对应反义链(引导链)。在一个实

实施方案中, dsRNA的基本上互补的序列包含在分离的寡核苷酸上。在另一个实施方案中, dsRNA的基本上互补的序列包含在单个寡核苷酸上。

[0269] 应当理解, 尽管表3至表6中的序列被描述为经修饰的、未经修饰的、未缀合的和/或缀合的序列, 但本发明的iRNA的RNA (例如本发明的dsRNA) 可以包括表3至表6中所述的未经修饰的、未缀合的和/或与其中所述的不同地经修饰的和/或缀合的序列中的任一者。

[0270] 本领域技术人员充分了解, 具有约20至23个碱基对 (例如, 21个碱基对) 的双链体结构的dsRNA已被誉为在诱导RNA干扰方面特别有效 (Elbashir等人, (2001)《欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO J.)》, 20:6877-6888)。然而, 其他人已经发现, 较短或较长的RNA双链体结构也可以是有效的 (Chu和Rana (2007)《RNA》14:1714-1719; Kim等人, (2005)《自然生物技术》23:222-226)。在上述实施方案中, 由于本文所提供的寡核苷酸序列的性质, 本文所描述的dsRNA可以包含至少一条长度为最少21个核苷酸的链。可以合理地预期, 与上述dsRNA相比, 在一端或两端仅减去很少核苷酸的较短的双链体可以类似地有效。因此, 具有源自本文提供的序列之一的至少15、16、17、18、19、20个或更多个连续核苷酸的序列并且其抑制CIDEB基因表达的能力与包含完整序列的dsRNA相差不超过约5%、10%、15%、20%、25%或30%的抑制的dsRNA被认为在本发明的范围内。

[0271] 另外, 表3至表6中描述的RNA鉴定了CIDEB转录物中对RISC介导的切割敏感的位点。因此, 本发明的进一步特征在于靶向在该位点内的iRNA。如本文所使用的, 如果iRNA促进转录物在所述特定位点内任何位置的切割, 则iRNA被称为靶向RNA转录物的特定位点内。此类iRNA通常将包括来自本文所提供的序列之一的至少约15个连续核苷酸, 所述序列偶联至取自基因中与所选序列相邻的区域的另外的核苷酸序列。

[0272] 虽然靶序列的长度通常为约15-30个核苷酸, 但在此范围内特定序列对引导任何给定靶RNA切割的适用性存在很大差异。本文中所示的各种软件包和指南为任何给定基因靶标的最佳靶序列的鉴定提供了指导, 但也可以采用经验方法, 其中给定大小的“窗口”或“掩码” (作为非限制性实例, 21个核苷酸) 按字面意义或象征意义 (包括例如计算机模拟) 放置在靶RNA序列上, 以鉴定在可以用作靶序列的大小范围内的序列。通过将序列“窗口”逐步移动到位于初始靶序列位置的上游或下游的一个核苷酸, 可以鉴定下一个潜在的靶序列, 直到鉴定到针对所选的任何给定靶标大小的完整的可能序列集。与系统合成和所鉴定的序列的测试 (使用如本文所描述的或如本领域已知的测定) 结合以鉴定那些表现最佳的序列的此过程可以鉴定那些在用iRNA药剂靶向时介导最佳靶基因表达抑制的RNA序列。因此, 尽管本文中鉴定的序列表示有效的靶序列, 但是预期抑制效率的进一步优化可以通过在给定序列的上游或下游逐步“移动窗口”一个核苷酸来实现, 以鉴定具有相同或更好抑制特性的序列。

[0273] 此外, 预期对于所鉴定的任何序列, 可以通过系统地添加或去除核苷酸以产生更长或更短的序列并测试通过从该点开始将靶RNA向上或向下移动更长或更短大小的窗口而产生的序列来实现进一步优化。同样, 将这种产生新候选靶标的方法与如本领域已知和/或如本文所述的抑制测定中基于这些靶标序列测试iRNA的有效性相结合可以导致抑制效率的进一步改善。仍进一步地, 可以通过例如引入如本文所述或本领域已知的经修饰的核苷酸、添加或改变突出端或如本领域已知和/或本文讨论的其他修饰来调整此类优化的序列以进一步优化分子 (例如, 增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶

向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加从核内体的释放)作为表达抑制剂。

[0274] 如本文所描述的iRNA药剂可以包含与靶序列的一个或多个错配。在一个实施方案中,如本文所描述的iRNA包含不超过3个错配。如果iRNA的反义链包含与靶序列的错配,则优选的是错配的区域不位于互补区的中心。如果iRNA的反义链包含与靶序列的错配,则优选的是错配被限制在距互补区的5'端或3'端的最后5个核苷酸内。例如,对于23个核苷酸iRNA药剂,与CIDEB基因的区域互补的链在中心13个核苷酸内通常不包含任何错配。本文所描述的方法或本领域已知的方法可以用于确定含有与靶序列的错配的iRNA是否有效抑制CIDEB基因的表达。考虑具有错配的iRNA在抑制CIDEB基因的表达方面的功效很重要,特别是如果已知CIDEB基因中的特定互补区在群体内具有多态性序列变异。

[0275] RNA靶标可能具有靶RNA核苷酸序列的区域或跨度,这些区域或跨度比RNA靶标的其他区域相对更易感或更容易通过RNAi药剂与所述区域结合诱导的RNA干扰来介导RNA靶标的切割。在此类“热点区”(或简称“热点”)内对RNA干扰的敏感性增加意味着靶向所述区域的iRNA药剂在诱导iRNA干扰方面可能比靶向靶RNA其他区域的iRNA药剂具有更高的功效。例如,在不受理论约束的情况下,靶RNA靶区的可及性可能会影响靶向所述区域的iRNA药剂的功效,其中一些热点区具有更高的可及性。例如,在RNA靶标中形成的二级结构(例如,在热点区内或附近)可能会影响iRNA药剂结合靶区并诱导RNA干扰的能力。

[0276] 根据本发明的某些方面,iRNA药剂可以被设计成靶向本文所描述的任何靶RNA的热点区,包含靶RNA的任何已鉴定部分(例如,特定的外显子)。如本文所使用的,热点区可以指靶RNA序列的大约19-200、19-150、19-100、19-75、19-50、21-200、21-150、21-100、21-75、21-50、50-200、50-150、50-100、50-75、75-200、75-150、75-100、100-200或100-150个核苷酸区,对于所述核苷酸区,使用RNAi药剂靶向提供了有效沉默相对于靶向同一靶RNA的其他区的有效沉默的明显更高的概率。根据本发明的某些方面,热点区可以包括靶RNA的受限区,以及在某些情况下,靶的基本上受限区,包含例如靶RNA的长度的小于一半,如靶RNA的长度的约5%、10%、15%、20%、25%或30%。相反,热点针对其进行比较的其他区可以累积地包括靶RNA的长度的至少大部分。例如,其他区可以累积占靶RNA的长度的至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或至少约95%。

[0277] 可以使用从体外或体内筛选测定中获得的功效数据经验性地评估靶RNA的比较区域以鉴定热点。例如,靶向跨越靶RNA的各个区域的RNAi药剂可以比较结合每个区域的有效iRNA药剂的频率(例如,靶基因表达被抑制的量,例如通过mRNA表达或蛋白质表达测量)。通常,可以通过观察与RNA靶标有限区结合的多个有效RNAi药剂的聚类来识别热点。通过观察iRNA药剂的功效,可以充分表征热点的特征,这些药剂累积覆盖至少约60%的被鉴定为热点的目标区域,如所述区域的长度的约70%、约80%、约90%或约95%或更多,包含所述区域的两端(即,所述区域内至少约60%、70%、80%、90%或95%或更多的核苷酸,包含所述区域的每个末端的核苷酸,被iRNA药剂靶向)。根据本发明的一些方面,表现出对区的至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%抑制(例如,不超过约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5% mRNA剩余)的iRNA药剂可以被鉴定为是有效的。

[0278] 还可以使用对跨限定大小(例如,25nt、30nt、40nt、50nt、60nt、70nt、80nt、90nt或

100nt、110nt、120nt、130nt、140nt、150nt、160nt、170nt、180nt、190nt或200nt)的不同区上的抑制测量结果的定量比较来评估靶向RNA区的便利性。例如,可以测定每个区的平均抑制水平,并且可以比较每个区的平均值。热点区内的平均抑制水平可能显著高于所有评估区域的平均值。根据一些方面,热点区中的平均抑制水平可以比平均区域的平均值高至少约10%、20%、30%、40%或50%。根据一些方面,热点区中的平均抑制水平可以比平均区域的平均值高至少约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0个标准偏差。平均抑制水平可能会高出统计显著(例如, $p < 0.05$ )的量。根据一些方面,热点区内的每个抑制测量值可以高于阈值量(例如,等于或低于剩余mRNA的阈值量)。根据一些方面,所述区域内的每个抑制测量值可以显著高于所有测量区域上的所有抑制测量值的平均值。例如,热点区中的每个抑制测量值可以比所有抑制测量值的平均值高至少约10%、20%、30%、40%或50%。根据一些方面,每个抑制测量值可以比所有抑制测量值的平均值高至少约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0标准偏差。每个抑制测量值可能比所有抑制测量值的平均值高出统计显著(例如, $p < 0.05$ )的量。用于评估热点的标准可以包括上文标准品的相容的各种组合(例如,至少约第一量的平均抑制水平并且没有低于第二量的阈值水平的抑制测量值,第二量小于第一量)。

[0279] 因此,明确设想了可以优选地选择靶向靶RNA的热点区的任何iRNA药剂,包含本文所描述的具体示例性iRNA药剂,用于诱导靶mRNA的RNA干扰,因为靶向此类热点区可能相对于靶向非热点区的区域表现出强烈的抑制应答。靶向基本上重叠(例如,靶序列长度的至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%)或优选地完全位于热点区内的靶序列的RNAi药剂可以被认为靶向热点区。本发明的RNA靶标的热点区可以包含本文所公开的数据证明有效RNAi药剂具有较高靶向频率的任何区域,包含通过本文别处描述的任何标准,无论范围是否此类热点区被明确指定。

[0280] 在各个实施方案中,本发明的dsRNA药剂靶向编码CIDEB的mRNA的热点区。

### [0281] III. 本发明的经修饰的iRNA

[0282] 在一个实施方案中,本发明的iRNA的RNA(例如dsRNA)是未经修饰的,并且不包含例如本领域已知的和本文所描述的化学修饰和/或缀合。在另一个实施方案中,本发明的iRNA的RNA(例如dsRNA)被化学修饰以增强稳定性或其他有益特性。在本发明的某些实施方案中,本发明的iRNA的基本上所有核苷酸都被修饰。在本发明的其他实施方案中,本发明的iRNA的所有核苷酸都被修饰。其中“基本上所有核苷酸都被修饰”的本发明的iRNA在很大程度上但不是完全修饰的,并且可以包括不超过5、4、3、2或1个未经修饰的核苷酸。

[0283] 在本发明的一些方面中,本发明的iRNA的基本上所有核苷酸都被修饰,并且iRNA药剂包含不超过10个核苷酸,所述核苷酸包含2'-氟修饰(例如不超过9个2'-氟修饰、不超过8个2'-氟修饰、不超过7个2'-氟修饰、不超过6个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过3个2'-氟修饰或不超过2个2'-氟修饰)。例如,在一些实施方案中,有义链包含不超过4个核苷酸,所述核苷酸包含2'-氟修饰(例如,不超过3个2'-氟修饰,或不超过2个2'-氟修饰)。在其他实施方案中,反义链包含不超过6个核苷酸,所述核苷酸包含2'-氟修饰(例如,不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰或不超过2个2'-氟修饰)。

[0284] 在本发明的其他方面中,本发明的iRNA的所有核苷酸都被修饰,并且iRNA药剂包

含不超过10个核苷酸,所述核苷酸包含2'-氟修饰(例如不超过9个2'-氟修饰、不超过8个2'-氟修饰、不超过7个2'-氟修饰、不超过6个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过5个2'-氟修饰、不超过4个2'-氟修饰、不超过3个2'-氟修饰或不超过2个2'-氟修饰)。

[0285] 在一个实施方案中,本发明的双链RNAi药剂在反义链的5'核苷酸处进一步包括5'-磷酸酯或5'-磷酸酯模拟物。在另一个实施方案中,双链RNAi药剂在反义链的5'核苷酸处进一步包括5'-磷酸酯模拟物。在具体实施方案中,5'-磷酸酯模拟物是5'-乙烯基磷酸酯(5'-VP)。在一个实施方案中,磷酸酯模拟物是5'-环丙基磷酸酯。在一些实施方案中,双链iRNA药剂的反义链的5'-端不含有5'-乙烯基磷酸酯(VP)。

[0286] 在一个实施方案中,经修饰的核苷酸中的至少一个经修饰的核苷酸选自以下组成的群组:脱氧核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、乙二醇修饰的核苷酸(GNA),例如Ggn、Cgn、Tgn或Agn、具有2'磷酸酯的核苷酸,例如G2p、C2p、A2p或U2p以及磷酸乙烯酯核苷酸;以及其组合。在其他实施方案中,表4和6的双链体中的每一个可以被特别修饰以提供本公开的另一种双链iRNA药剂。在一个实例中,每个有义双链体的3'末端可以通过去除3'末端L96配体并用硫代磷酸酯核苷酸间键交换三个3'末端核苷酸之间的两个磷酸二酯核苷酸间键来修饰。也就是说,下式的有义序列的三个3'末端核苷酸(N):

[0287]  $5'-N_1-\dots-N_{n-2}N_{n-1}N_nL96\ 3'$

[0288] 可以被替换为

[0289]  $5'-N_1-\dots-N_{n-2}\underline{S}N_{n-1}\underline{S}N_n\ 3'$ 。

[0290] 也就是说,例如,AD-1685156,有义序列:

[0291] csusgcagAfaGfGfUfugacugcguuL96 (SEQ ID NO:277)

[0292] 可以被替换为

[0293] csusgcagAfaGfGfUfugacugcgsusu (SEQ ID NO:2922)

[0294] 而反义序列保持不变以提供本公开的另一种双链iRNA药剂。

[0295] 本发明特征的核酸可以通过本领域公认的方法合成和/或修饰,例如“核酸化学中的当前实验方案(Current protocols in nucleic acid chemistry),”Beaucage,S.L等人(编辑),美国纽约州纽约的约翰威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA)中描述的那些方法,所述文献据此通过引用并入本文。修饰包括例如端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、缀合、反向连接等)或3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接etc);碱基修饰,例如,用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的伙伴库碱基配对的碱基替换、去除碱基(无碱基核苷酸)或缀合的碱基;糖修饰(例如,在2'位置或4'位置处)或糖的置换;和/或主链修饰,包括磷酸二酯键的修饰或置换。可用于本文所描述的实施方案的iRNA化合物的具体实例包括但不限于含有经修饰的主链或不含天然核苷间键的RNA。除此之外,具有经修饰的主链的RNA包含在主链中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提及的,在其核苷间主链中不具有磷原子的经修饰的RNA也可以被视为寡核苷。在一些实施方案中,经修饰的iRNA将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0296] 经修饰的RNA主链包含例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包含3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次

磷酸酯、氨基磷酸酯(包含3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酸胺酯)、硫代羰基磷酰胺酯、硫代羰基烷基磷酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯、以及具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、这些酯的2'-5'连接类似物、以及具有反向极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。也包含了各种盐、混合盐和游离酸形式。在本发明的一些实施方案中,本发明的dsRNA药剂是游离酸形式。在本发明的其他实施方案中,本发明的dsRNA药剂是盐形式。在一个实施方案中,本发明的dsRNA药剂是钠盐形式。在某些实施方案中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的基本上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。其中基本上所有的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键都具有钠抗衡离子的药剂包含不超过5个、4个、3个、2个或1个不具有钠抗衡离子的磷酸二酯键和/或硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。

[0297] 教导制备上述含磷键的表示性美国专利包括但不限于美国专利第3,687,808号、第4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029号和美国专利RE39464,所述美国专利中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0298] 其中不包含磷原子的经修饰的RNA主链具有由以下形成的主链:短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键。这些包含具有吗啉代键的那些(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链;和其他具有混合的N、O、S和CH<sub>2</sub>组分部分的主链。

[0299] 教导上述寡核苷酸的制备的表示性美国专利包括但不限于美国专利5,034,506、5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437和5,677,439,所述美国专利中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0300] 在其他实施方案中,合适的RNA模拟物被预期用于iRNA,其中核苷酸单元的糖和核苷间键,即主链用新的基团置换。维持碱基单元以与适当的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物(即已示出具有极佳杂交特性的RNA模拟物)被称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖主链被含酰胺的主链替代,尤其是氨基乙基甘氨酸主链。核碱基被保留并且直接或间接地与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导PNA化合物的制备的表示性美国专利包括但不限于美国专利第5,539,082号;第5,714,331号;以及第5,719,262号,所述美国专利中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。适用于本发明iRNA的另外的PNA化合物在例如Nielsen等人《科学(Science)》,1991,254,1497-1500中进行了描述。

[0301] 本发明特征的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯骨架的RNA和具有杂原子骨架的

寡核苷酸,特别是上文引用的美国专利第5,489,677号的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$  [被称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架],  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  [其中天然磷酸二酯骨架被表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ],以及上文引用的美国专利第5,602,240号的酰胺骨架。在一些实施方案中,本文特征的RNA具有上文引用的美国专利第5,034,506号的吗啉代主链结构。

[0302] 经修饰的RNA还可以包括一个或多个经取代的糖部分。本文特征的iRNA,例如dsRNA可以在2'位置处包含以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代的或未经取代的 $\text{C}_1$ 至 $\text{C}_{10}$ 烷基或 $\text{C}_2$ 至 $\text{C}_{10}$ 烯基和炔基。示例性合适的修饰包含 $0[(\text{CH}_2)_n]_m\text{CH}_3$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $0(\text{CH}_2)_n\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ ,其中n和m为1至约10。在其他实施方案中,dsRNA在2'位置处包含以下之一: $\text{C}_1$ 至 $\text{C}_{10}$ 低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、 $\text{SCH}_3$ 、 $\text{OCN}$ 、Cl、Br、CN、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{OCF}_3$ 、 $\text{SOCH}_3$ 、 $\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{ONO}_2$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{NH}_2$ 、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入子、用于改善iRNA的药代动力学特性的基团、或用于改善iRNA的药效动力学特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。在一些实施方案中,修饰包含2'-甲氧基乙氧基(2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ),也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE(Martin等人,《瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta)》,1995,78:486-504),即,烷氧基-烷氧基基团。另一个示例性修饰是2'-二甲氨基氧基乙氧基,即 $0(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团,也称为2'-DMAOE,如下文实例中描述的,以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O- $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_2$ 。另外的示例性修饰包含:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(这三个家族中的R和S异构体两者);2'-烷氧基烷基;以及2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0303] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH<sub>3</sub>)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)和2'-氟(2'-F)。类似修饰也可以在iRNA的RNA上的其他位置处进行,特别是糖在3'末端核苷酸上的3'位置或在2'-5'连接的dsRNA和5'末端核苷酸的5'位置上。iRNA也可以具有糖模拟物,如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教导此类经修饰的糖结构的制备的表示性美国专利包括但不限于美国专利第4,981,957号、第5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633号和第5,700,920号,所述申请中的某些共同属于本申请。上述各项的全部内容据此通过引用并入本文。

[0304] 本发明的iRNA还可以包含核碱基(在本领域中通常被简称为“碱基”)修饰或取代。如本文所使用的,“未经修饰的”或“天然”核碱基包含嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包含其他合成和天然核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基,具体地5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮

杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的核碱基包含美国专利第3,687,808号中公开的那些,在《生物化学、生物技术和医学中经修饰的核苷(Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine)》, Herdewijn, P. 编辑Wiley-VCH出版社(Wiley-VCH), 2008年中公开的那些;在《聚合物科学与工程化简明百科全书(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering)》,第858-859页, Kroschwitz, J. L. 编辑约翰威利父子公司, 1990中公开的那些, Englisch等人(1991)《化学应用国际版(Angewandte Chemie, International Edition)》, 30:613中公开的那些, 以及Sanghvi, Y. S., 第15章, 《dsRNA研究与应用(dsRNA Research and Applications)》, 第289-302页, Crooke, S. T. 和Lebleu, B. 编辑, CRC出版社(CRC Press), 1993中公开的那些。这些核碱基中的某些核碱基对提高本发明特征的寡聚化合物的结合亲和力特别有用。这些包含5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包含2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经示出5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性提高0.6°C至1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. 和Lebleu, B. 编辑, 《dsRNA研究与应用》, CRC出版社, 波卡拉顿(Boca Raton), 1993, 第276-278页), 并且是示例性碱基取代, 甚至更具体地在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0305] 教导制备某些上述经修饰的核碱基以及其他经修饰的核碱基的表示性美国专利包括但不限于上述美国专利第3,687,808号、第4,845,205;5,130,30;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;6,015,886;6,147,200;6,166,197;6,222,025;6,235,887;6,380,368;6,528,640;6,639,062;6,617,438;7,045,610;7,427,672号和第7,495,088号,所述美国专利中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0306] 本发明的iRNA还可以被修饰以包含一种或多种锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包括连接2'和4'碳的额外桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。向siRNA中添加锁定核酸已被证明可增加血清中的siRNA稳定性,并且减少脱靶效应(Elmen, J.等人(2005)《核酸研究》33(1):439-447;Mook, OR.等人(2007)《分子癌症治疗学》6(3):833-843;Grunweller, A.等人(2003)《核酸研究》31(12):3185-3193)。

[0307] 本发明的iRNA还可以被修饰以包含一个或多个双环糖部分。“双环糖”是由两个原子桥接修饰的呋喃糖基环。“双环核苷”(“BNA”)是一种具有糖部分的核苷,所述糖部分包括连接糖环的两个碳原子的桥,由此形成双环系统。在某些实施方案中,桥连接糖环的4'碳和2'-碳。因此,在一些实施方案中,本发明的药剂可以包含一种或多种锁定核酸(LNA)。锁定核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中核糖部分包括连接2'和4'碳的额外桥。换言之,LNA是包括双环糖部分的核苷酸,所述双环糖部分包括4'-CH<sub>2</sub>-O-2'桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在3'-内结构构象中。向siRNA中添加锁定核酸已被证明可增加血清中的siRNA稳定性,并且减少脱靶效应(Elmen, J.等人, (2005)《核酸研究》33(1):439-447;Mook, OR.等人, (2007)《分子癌症治疗学》6(3):833-843;Grunweller, A.等人, (2003)《核酸研究》31(12):3185-3193)。用于本发明的核苷酸的双环核苷的实例包括但不限于包括4'和2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施方案中,本发明的反义多核苷酸药剂包含一种或多

种包括4'至2'桥的双环核苷。此类4'至2'桥接的双环核苷的实例包括但不限于4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2'(LNA);4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2';4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'(ENA);4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'(也称为“约束乙基”或“cEt”)和4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2'(及其类似物;参见例如美国专利第7,399,845号);4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2'(及其类似物;参见例如,美国专利第8,278,283号);4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2'(及其类似物;参见例如,美国专利第8,278,425号);4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2'(参见例如,美国专利公开第2004/0171570号);4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2',其中R是H、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基或保护基团(参见例如,美国专利第7,427,672号);4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2'(参见,例如,Chattopadhyaya等人《有机化学杂志(J.Org.Chem.)》,2009,74,118-134);以及4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2'(及其类似物;参见,例如,美国专利第8,278,426号)。上述各项的全部内容据此通过引用并入本文。

[0308] 教导制备锁定核酸核苷酸的另外的表示性美国专利和美国专利公开包括但不限于以下:美国专利第6,268,490号;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,034,133;7,084,125;7,399,845;7,427,672;7,569,686;7,741,457;8,022,193;8,030,467;8,278,425;8,278,426;8,278,283;US 2008/0039618;和US 2009/0012281,所述文献中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0309] 可以制备具有一种或多种立体化学糖构型的任何前述双环核苷,包含例如 $\alpha$ -L-呋喃核糖和 $\beta$ -D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0310] 本发明的iRNA也可以被修饰以包含一个或多个约束乙基核苷酸。如本文所使用的,“约束乙基核苷酸”或“cEt”为包括包含4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'桥的双环糖部分的锁核酸。在一个实施方案中,约束乙基核苷酸处于本文中称为“S-cEt”的S构象。

[0311] 本发明的iRNA还可以包含一个或多个“构象限制性核苷酸”(“CRN”)。CRN是具有连接核糖的C2'和C4'碳或核糖的C3和-C5'碳的接头的核苷酸类似物。CRN将核糖环锁定为稳定的构象,并且增加对mRNA的杂交亲和力。接头具有足够的长度以将氧放置在稳定性和亲和力的最佳位置,从而导致较少的核糖环褶皱。

[0312] 教导某些上述CRN的制备的表示性出版物包括但不限于美国专利公开第2013/0190383号;以及PCT公开WO 2013/036868,所述文献中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0313] 在一些实施方案中,本发明的iRNA包括一种或多种为UNA(解锁核酸)核苷酸的单体。UNA是未锁定的无环核酸,其中糖的任何键都已被去除,形成未锁定的“糖”残基。在一个实例中,UNA还涵盖C1'-C4'之间的键已被去除的单体(即C1'与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)。在另一个实例中,糖的C2'-C3'键(即C2'与C3'碳之间的共价碳-碳键)已经被去除(参见《核酸研讨会丛刊(Nuc.Acids Symp.Series)》,52,133-134(2008)和Fluiter等人《分子生物系统(Mol.Biosyst.)》,2009,10,1039,其据此通过引用并入)。

[0314] 教导UNA的制备的表示性美国公开包括但不限于美国专利第8,314,227号;以及美国专利公开第2013/0096289号;第2013/0011922号;和第2011/0313020号,所述文献中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0315] 本公开的RNAi药剂还可以包含一种或多种“环己烯核酸”或(“CeNA”)。CeNA是用环己烯环替代DNA的呋喃糖部分的核苷酸类似物。在DNA链中并入环己基核苷增加了DNA/RNA杂交体的稳定性。CeNA在血清中稳定,不会降解,并且CeNA/RNA杂交体能够激活大肠杆菌RNase H,导致RNA链裂解。(参见Wang等人,《美国化学学会杂志(Am.Chem.Soc.)》2000,122,

36,8595-8602),所述文献据此通过引用并入。

[0316] 对RNA分子末端的潜在稳定修饰可以包含N-(乙酰氨基己酰基)-4-羟脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟脯氨酸)(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟脯氨酸)(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷酰基-尿苷-3''-磷酸酯、反向碱基dT(idT)等。此修饰的公开内容可以在PCT公开第WO 2011/005861号中找到。

[0317] 本发明的RNAi药剂的其他修饰包括5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物,例如, RNAi药剂的反义链上的5'末端磷酸酯或磷酸酯模拟物。合适的磷酸酯模拟物公开于例如美国专利公开第2012/0157511号中,所述美国专利公开的全部内容通过引用并入本文。

[0318] 在某些具体实施方案中,本发明的RNAi药剂是抑制选自表3至表6中列出的药剂组成的群组的CIDEB基因的表达的药剂。这些药剂中的任何一种可以进一步包含配体。

[0319] A. 包括本发明的基序的经修饰的iRNA

[0320] 在本发明的某些方面,本发明的双链RNAi药剂包含具有化学修饰的药剂,如在例如于2012年11月16日提交的WO 2013/075035中公开的,所述文献的全部内容通过引用并入本文。

[0321] 因此,本发明提供了能够在体内抑制靶基因(即CIDEB基因)的表达的双链RNAi药剂。RNAi药剂包括有义链和反义链。RNAi药剂的每条链的长度可以为12至30个核苷酸。例如,每条链可以是长度为14至30个核苷酸、长度为17至30个核苷酸、长度为25至30个核苷酸、长度为27至30个核苷酸、长度为17至23个核苷酸、长度为17至21个核苷酸、长度为17至19个核苷酸、长度为19至25个核苷酸、长度为19至23个核苷酸、长度为19至21个核苷酸、长度为21至25个核苷酸或长度为21至23个核苷酸。在一个实施方案中,有义链的长度为21个核苷酸。在一个实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸。

[0322] 有义链和反义链通常形成双链体双链RNA(“dsRNA”),本文也称为“RNAi药剂”。RNAi药剂的双链体区的长度可以是12至30个核苷酸对。例如,双链体区可以是长度为14至30个核苷酸对、长度为17至30个核苷酸对、长度为27至30个核苷酸对、长度为17至23个核苷酸对、长度为17至21个核苷酸对、长度为17至19个核苷酸对、长度为19个25个核苷酸对、长度为19至23个核苷酸对、长度为19至21个核苷酸对、长度为21至25个核苷酸对或长度为21至23个核苷酸对。在另一个实例中,双链体区的长度选自15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个和27个核苷酸。

[0323] 在一个实施方案中, RNAi药剂可以在一条或两条链的3'端、5'端或两端包含一个或多个突出端区和/或封端基团。突出端的长度可以为1至6个核苷酸,例如长度为2至6个核苷酸、长度为1至5个核苷酸、长度为2至5个核苷酸、长度为1至4个核苷酸、长度为2至4个核苷酸、长度为1至3个核苷酸、长度为2至3个核苷酸或长度为1至2个核苷酸。突出端可以是一条链比另一条链长的结果,或是两条相同长度的链交错的结果。突出端可以与靶mRNA形成错配,或其可以与被靶向的基因序列互补,或可以是另一个序列。第一链和第二链也可以连接,例如通过另外的碱基形成发夹,或通过其他非碱基接头。

[0324] 在一个实施方案中, dsRNAi药剂的突出端区中的核苷酸可以各自独立地是经修饰或未经修饰的核苷酸,包括但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-O-甲基、胸苷(T)、2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'--O-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'--O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷

(m5Ceo) 以及其任何组合。例如, TT 可以是任一条链上任一端的突出端序列。突出端可以与靶 mRNA 形成错配, 或其可以与被靶向的基因序列互补, 或可以是另一个序列。

[0325] RNAi 药剂的有义链、反义链或两条链上的 5' 或 3' 突出端可以被磷酸化。在一些实施方案中, 突出端区含有在两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯的两个核苷酸, 其中两个核苷酸可以是相同的或不同的。在一个实施方案中, 突出端存在于有义链、反义链或两条链的 3' 端处。在一个实施方案中, 这种 3' 突出端存在于反义链中。在一个实施方案中, 这种 3' 突出端存在于有义链中。

[0326] RNAi 药剂可能只含有单个突出端, 这可以增强 RNAi 的干扰活性, 而不会影响其整体稳定性。例如, 单链突出端可以位于有义链的 3' 末端处, 或可替代地, 位于反义链的 3' 末端处。RNAi 也可能具有平端, 位于反义链的 5' 端 (或有义链的 3' 端) 处, 反之亦然。通常, RNAi 的反义链在 3' 端处有核苷酸突出端, 并且 5' 端是平的。虽然不希望受理论的束缚, 但反义链 5' 端的不对称平端和反义链 3' 端突出端有利于引导链装载到 RISC 过程中。

[0327] 在一个实施方案中, RNAi 药剂是长度为 19 个核苷酸的双端钝化剂, 其中所述有义链在从 5' 端开始的位置 7、8、9 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-F 修饰的至少一个基序。反义链在从 5' 端开始的位置 11、12、13 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0328] 在另一个实施方案中, RNAi 药剂是长度为 20 个核苷酸的双端钝化剂, 其中所述有义链在从 5' 端开始的位置 8、9、10 的三个连续核苷酸上含有三个 2'-F 修饰的至少一个基序。反义链在从 5' 端开始的位置 11、12、13 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0329] 在又一个实施方案中, RNAi 药剂是长度为 21 个核苷酸的双端钝化剂, 其中所述有义链在从 5' 端开始的位置 9、10、11 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-F 修饰的至少一个基序。反义链在从 5' 端开始的位置 11、12、13 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0330] 在一个实施方案中, RNAi 药剂包括 21 个核苷酸的有义链和 23 个核苷酸的反义链, 其中所述有义链在从 5' 端开始的位置 9、10、11 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-F 修饰的至少一个基序; 所述反义链在从 5' 端开始的位置 11、12、13 处的三个连续核苷酸上含有三个 2'-O-甲基修饰的至少一个基序, 其中所述 RNAi 药剂的一端是平的, 而另一端包括 2 核苷酸突出端。优选地, 2 核苷酸突出端位于反义链的 3' 端处。

[0331] 当 2 核苷酸突出端位于反义链的 3' 端处时, 在末端三个核苷酸之间可能存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键, 其中所述三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸, 并且第三个核苷酸是紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。在一个实施方案中, RNAi 药剂在有义链的 5' 端和反义链的 5' 端两者的末端三个核苷酸之间另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链和反义链中的每个核苷酸, 包含为基序一部分的核苷酸, 都是经修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 每个残基用 2'-O-甲基或 3'-氟独立地修饰, 例如在交替基序中。任选地, RNAi 药剂进一步包含配体 (优选地 GalNAc<sub>3</sub>)。

[0332] 在一个实施方案中, RNAi 药剂包括有义链和反义链, 其中所述有义链的长度为 25 至 30 个核苷酸残基, 其中从第一链的 5' 末端核苷酸 (位置 1) 位置 1 开始至位置 23, 包括至少 8 个核糖核苷酸; 反义链的长度为 36 至 66 个核苷酸残基, 并且从 3' 末端核苷酸开始, 在与有义

链的位置1至23配对以形成双链体的位置中包括至少8个核糖核苷酸;其中至少反义链的3'末端核苷酸与有义链不配对,并且至多6个连续3'末端核苷酸与有义链不配对,由此形成1至6个核苷酸的3'单链突出端;其中反义链的5'末端包括10至30个与有义链不配对的连续核苷酸,由此形成10至30个核苷酸单链5'突出端;其中当有义链和反义链比对以获得最大互补性时,至少有义链5'末端和3'末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,由此在有义链与反义链之间形成基本上双链的区域;并且反义链沿着反义链长度的至少19个核糖核苷酸与靶RNA充分互补,以在将双链核酸引入哺乳动物细胞时减少靶基因表达;并且其中所述有义链含有在三个连续核苷酸上的三个2'-F修饰的至少一个基序,其中至少一个所述基序存在于切割位点处或附近。反义链在切割位点处或其附近的三个连续核苷酸上含有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0333] 在一个实施方案中, RNAi 药剂包含有义链和反义链, 其中所述 RNAi 药剂包含长度为至少 25 个和至多 29 个核苷酸的第一链和长度为至多 30 个核苷酸的第二链, 在从 5' 端起的位置 11、12 和 13 处的三个连续核苷酸上具有三个 2'-O-甲基修饰的至少一个基序; 其中所述第一链的 3' 端和所述第二链的 5' 端形成平端, 并且所述第二链在其 3' 端处比所述第一链长 1 至 4 个核苷酸, 其中所述双链体区的长度为至少 25 个核苷酸, 并且所述第二链沿着所述第二链长度的至少 19 个核苷酸与靶 mRNA 充分互补, 以在将所述 RNAi 药剂引入到哺乳动物细胞中时减少靶基因表达, 并且其中所述 RNAi 药剂的 dicer 切割优先地产生包含所述第二链的 3' 端的 siRNA, 由此减少所述靶基因在哺乳动物中的表达。任选地, RNAi 药剂进一步包括配体。

[0334] 在一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的至少一个基序, 其中一个基序存在于有义链中的切割位点处。

[0335] 在一个实施方案中, RNAi 药剂的反义链也可以含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的至少一个基序, 其中一个基序存在于反义链中的切割位点处或附近。

[0336] 对于具有长度为 17 至 23 个核苷酸的双链体区的 RNAi 药剂, 反义链的切割位点通常在距离 5' 端的 10、11 和 12 位置附近。因此, 三个相同修饰的基序可以存在于反义链的 9、10、11 位置; 10、11、12 位置; 11、12、13 位置; 12、13、14 位置; 或 13、14、15 位置, 计数从反义链的 5' 端的第 1 个核苷酸开始, 或计数从反义链的 5' 端双链体区内的第 1 个配对核苷酸开始。反义链中的切割位点也可以根据 RNAi 的双链体区从 5' 端开始的长度而改变。

[0337] RNAi 药剂的有义链可以在链的切割位点处的三个连续核苷酸上含有三个相同修饰的至少一个基序; 并且反义链可以在链的切割位点处或附近的三个连续核苷酸上具有三个相同修饰的至少一个基序。当有义链和反义链形成 dsRNA 双链体时, 有义链与反义链可以如此排列, 使得有义链上的三个核苷酸的一个基序与反义链上的三个核苷酸的一个基序具有至少一个核苷酸重叠, 即有义链中的基序的三个核苷酸中的至少一个与反义链中基序的三个核苷酸中的至少一个形成碱基对。可替代地, 至少两个核苷酸可以重叠, 或所有三个核苷酸都可以重叠。

[0338] 在一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链可以含有在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的多于一个的基序。第一个基序可以存在于链的切割位点处或附近, 并且其他基序可以是翼修饰。本文中的术语“翼修饰”是指存在于链的另一部分处的基序, 所述部分在同一链的切割位点处或附近与基序分离。翼修饰要么与第一基序相邻, 或被至少一个或多个核

苷酸分开。当基序彼此紧邻时,则基序的化学性质彼此不同,并且当基序由一个或多个核苷酸分开时,化学性质可以相同或不同。可能存在两个或更多个翼修饰。例如,当存在两个翼修饰时,每个翼修饰可以存在于相对于第一基序的一端,所述第一基序位于切割位点处或附近,或在前导基序的任一侧。

[0339] 与有义链一样, RNAi 药剂的反义链可以包含在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的多于一个基序,其中至少一个基序存在于链的切割位点处或附近。此反义链还可以含有与可能存在于有义链上的翼修饰相似的排列的一个或多个翼修饰。

[0340] 在一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的3'端、5'端或两端处的第一个或前两个末端核苷酸。

[0341] 在另一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链或反义链上的翼修饰通常不包含链的3'端、5'端或两端处双链体区内的第一个或前两个配对核苷酸。

[0342] 当 RNAi 药剂的有义链和反义链各自含有至少一个翼修饰时,翼修饰可以落在双链体区的同一端,并且具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0343] 当 RNAi 药剂的有义链和反义链各自包含至少两个翼修饰时,有义链和反义链可以如此排列,使得各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的一端,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;各自来自一条链的两个修饰落在双链体区的另一端,具有一个、两个或三个核苷酸的重叠;一条链的两个修饰落在前导基序的每一侧,在双链体区中具有一个、两个或三个核苷酸的重叠。

[0344] 在一个实施方案中, RNAi 药剂的有义链和反义链中的每个核苷酸,包括作为基序的一部分的核苷酸,可以是经修饰的。每个核苷酸可以用相同或不同的修饰进行修饰,所述修饰可以包括一个或两个非连接磷酸酯氧或一个或多个连接磷酸酯氧的一种或多种改变;核糖糖的成分的改变,例如,核糖糖上的2'羟基的改变;用“去磷酸”接头大规模替换磷酸酯部分;天然存在的碱基的修饰或替换;以及核糖-磷酸酯主链的替换或修饰。

[0345] 由于核酸是亚基的聚合物,许多修饰发生在核酸内重复的位置,例如碱基或磷酸酯部分的修饰,或磷酸酯部分的非连接O。在一些情况下,修饰将发生在核酸中的所有主体位置,但在许多情况下不会。例如,修饰可以仅发生在3'或5'末端位置处,可以仅发生于末端区域中,例如,在末端核苷酸上的位置处或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中。修饰可以发生在双链区、单链区或两者中。修饰可以仅发生在RNA的双链区中,或可以仅发生在RNA的单链区中。例如,非连接O位置处的硫代磷酸酯修饰可以仅发生在一个或两个末端处,可以仅发生于末端区中,例如,在末端核苷酸上的位置处或在链的最后2个、3个、4个、5个或10个核苷酸中,或可以发生在双链和单链区中,特别是在末端处。一个或多个5'端可以被磷酸化。

[0346] 例如,为增强稳定性,可以在突出端中包含特定的碱基,或在单链突出端中,例如在5'或3'突出端中或在两者中包含经修饰的核苷酸或核苷酸替代物。例如,在突出端中包含嘌呤核苷酸是期望的。在一些实施方案中,3'或5'突出端中的所有或一些碱基可以被修饰,例如,通过本文所描述的修饰。修饰可以包含,例如使用本领域已知的修饰在核糖糖的2'位置处的修饰,例如,用脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基修饰代替核碱基的核糖,以及磷酸酯基团的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出端不需要与靶序列同源。

[0347] 在一个实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地用LNA、CRN、cET、UNA、HNA、

CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧、2'-羟基或2'-氟修饰。链可以含有多于一种修饰。在一个实施方案中,有义链和反义链的每个残基独立地用2'-O-甲基或2'-氟修饰。术语“HNA”是指己糖醇或己糖核酸。

[0348] 在有义链和反义链上通常存在至少两种不同的修饰。这两种修饰可以是2'-O-甲基或2'-氟修饰,或其他修饰。

[0349] 在一个实施方案中, $N_a$ 和/或 $N_b$ 包含交替模式的修饰。如本文所使用的,术语“交替基序”是指具有一个或多个修饰的基序,每个修饰发生在一条链的交替核苷酸上。交替核苷酸可以指每隔一个核苷酸一个或每三个核苷酸一个,或类似的模式。例如,如果A、B和C各自表示核苷酸的一种修饰类型,则交替基序可以是“ABABABABAB...”、“AABBAABBAABB...”、“AABAABAABAAB...”、“AAABAAABAAAB...”、“AAABBBAAABBB...”或“ABCABCABCABC...”等。

[0350] 包含在交替基序中的修饰的类型可以是相同的或不同的。例如,如果A、B、C、D各自表示核苷酸上的一种修饰类型,则交替模式,即每隔一个核苷酸上的修饰可以是相同的,但每个有义链或反义链可以选自交替基序内的若干种修饰可能性,如“ABABAB...”、“ACACAC...”、“BDBDBD...”或“CDCDCD...”等。

[0351] 在一个实施方案中,本发明的RNAi药剂包含有义链上交替基序的修饰模式,相对于反义链上交替基序的修饰模式是移位的。所述偏移可以使得有义链的核苷酸的经修饰的基团对应于反义链的核苷酸的不同经修饰的基团,并且反之亦然。例如,当有义链与dsRNA双链体中的反义链配对时,有义链中的交替基序可以从链的5'到3'以“ABABAB”开始,并且反义链中的交替基序可以在双链体区内从链的5'到3'以“BABABA”开始。作为另一个实例,有义链中的交替基序可以从链的5'到3'以“AABBAABB”开始,并且反义链中的交替基序在双链体区内可以从链的5'到3'以“BBAABBAA”开始,因此在有义链与反义链之间存在修饰模式的完全或部分转移。

[0352] 在一个实施方案中,RNAi药剂包含2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序在有义链上的模式最初相对于反义链上2'-O-甲基修饰和2'-F修饰的交替基序的模式具有偏移,即有义链碱基上的2'-O-甲基修饰的核苷酸与反义链上的2'-F修饰的核苷酸配对,并且反之亦然。有义链的1位置可以从2'-F修饰开始,并且反义链的1位置可以从2'-O-甲基修饰开始。

[0353] 将在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链中断了存在于有义链和/或反义链中的初始修饰模式。这种通过将三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个或多个基序引入到有义链和/或反义链来中断有义链和/或反义链的修饰模式惊人地增强了针对靶基因的基因沉默活性。

[0354] 在一个实施方案中,当三个连续核苷酸上的三个相同修饰的基序被引入到任何链中时,基序旁边的核苷酸的修饰是与基序的修饰不同的修饰。例如,含有基序的序列部分是“... $N_a$ YYN $N_b$ ...”,其中“Y”表示对三个连续核苷酸上的三个相同修饰的基序的修饰,并且“ $N_a$ ”和“ $N_b$ ”表示对基序“YY”旁边的核苷酸的不同于Y的修饰的修饰,并且其中 $N_a$ 和 $N_b$ 可以是相同或不同的修饰。可替代地,当存在翼修饰时, $N_a$ 和/或 $N_b$ 可以存在或不存在。

[0355] RNAi药剂可以进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基磷酸酯核苷酸间键修饰可以发生在链的任何位置中的有义链或反义链或两条链的任何核苷酸上。例如,核苷酸间键修饰可以发生在有义链和/或反义链上的每个核苷酸

上;每个核苷酸间键修饰可以在有义链和/或反义链上以交替模式发生;或者有义链或反义链可以以交替模式包含两种核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上核苷酸间键修饰的交替模式可以相对于反义链上核苷酸间键修饰的交替模式具有偏移。在一个实施方案中,双链RNAi药剂包含6至8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方案中,反义链在5'末端处包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且在3'末端处包含两个硫代磷酸酯核苷酸间键,并且有义链在5'末端或3'末端处包含至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0356] 在一个实施方案中, RNAi 药剂包含在突出端区中的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,突出端区可以含有两个核苷酸,所述两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。还可以进行核苷酸间键修饰,以将突出端核苷酸与双链体区内的末端配对核苷酸连接。例如,至少2个、3个、4个或所有突出端核苷酸可以通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接,并且任选地,可以存在另外的硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间连接,将突出端核苷酸与紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸连接。例如,在末端三个核苷酸之间可能存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个是与突出端核苷酸相邻的配对核苷酸。这些末端三个核苷酸可以位于反义链的3'端、有义链的3'端、反义链5'端和/或反义链的5'端。

[0357] 在一个实施方案中,2-核苷酸突出端位于反义链的3'端,并且在末端三个核苷酸之间存在两个硫代磷酸酯核苷酸间键,其中所述三个核苷酸中的两个是突出端核苷酸,并且第三个核苷酸是紧挨着突出端核苷酸的配对核苷酸。任选地, RNAi 药剂在有义链的5'端和反义链的5'端两者处的末端三个核苷酸之间可以另外具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0358] 在一个实施方案中, RNAi 药剂包括与靶标、在双链体内或其组合的错配。所述错配可能发生在突出端区或双链体区中。碱基对可以基于其促进解离或熔化的倾向进行排序(例如,根据特定配对的缔合或离解的自由能,最简单的方法是在单个配对的基础上检查配对,尽管也可以使用下一个临近点或类似分析)。在促进解离方面:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配,例如非规范或规范外配对(如本文其他地方所述)优于规范(A:T、A:U、G:C)配对;并且包含通用碱基的配对优于规范配对。

[0359] 在一个实施方案中, RNAi 药剂在从反义链的5'端开始的双链体区内包括前1个、2个、3个、4个或5个碱基对中的至少一个,所述双链体区独立地选自以下的组:A:U、G:U、I:C和错配对,例如非规范或规范外配对或包含通用碱基的配对,以促进双链体的5'端处反义链的解离。

[0360] 在一个实施方案中,反义链中从5'端开始的双链体区内1位置处的核苷酸选自以下组成的群组:A、dA、dU、U和dT。可替代地,从反义链的5'端开始的双链体区内的前1个、2个或3个碱基对中的至少一个是AU碱基对。例如,从反义链5'端起的双链体区内的第一个碱基对是AU碱基对。

[0361] 在另一个实施方案中,有义链的3'端处的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶(dT)。在另一个实施方案中,反义链的3'端处的核苷酸是脱氧胸腺嘧啶(dT)。在一个实施方案中,存在脱氧胸腺嘧啶核苷酸的短序列,例如,在有义链和/或反义链的3'端上有两个dT核苷酸。

[0362] 在一个实施方案中,有义链序列可以由式(I)表示:

[0363]  $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3' \quad (I)$

[0364] 其中:

[0365] i和j各自独立地为0或1;

[0366] p和q各自独立地为0至6;

[0367] 每个 $N_a$ 独立地表示包含0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0368] 每个 $N_b$ 独立地表示包含0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0369] 每个 $n_p$ 和 $n_q$ 独立地表示突出端核苷酸;

[0370] 其中 $N_b$ 和 $Y$ 不具有相同的修饰;并且

[0371] XXX、YYY和ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。优选地,YYY全部是2'-F修饰的核苷酸。

[0372] 在一个实施方案中, $N_a$ 和/或 $N_b$ 包含交替模式的修饰。

[0373] 在一个实施方案中,YYY基序存在于有义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi药剂具有长度为17至23个核苷酸的双链体区时,YYY基序可以存在于有义链的切割位点处或附近(例如,可以存在于位置6、7、8;7、8、9;8、9、10;9、10、11;10、11、12或11、12、13处),计数从第1个核苷酸开始,从5'端开始;或任选地,计数从5'端开始,从双链体区内的第1配对核苷酸开始。

[0374] 在一个实施方案中,i是1并且j是0,或者i是0并且j是1,或i和j两者都是1。因此,有义链可以由下式表示:

[0375]  $5'n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q\ 3'$  (Ib);

[0376]  $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q\ 3'$  (Ic);或

[0377]  $5'n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q\ 3'$  (Id)。

[0378] 当有义链由式(Ib)表示时, $N_b$ 表示包含0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 $N_a$ 可以独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0379] 当有义链表示为式(Ic)时, $N_b$ 表示包含0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 $N_a$ 可以独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0380] 当有义链表示为式(Id)时每个 $N_b$ 独立地表示包含0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, $N_b$ 为0、1、2、3、4、5或6。每个 $N_a$ 可以独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0381] X、Y和Z中的每一个可以彼此相同或不同。

[0382] 在其他实施方案中,i是0并且j是0,并且有义链可以由下式表示:

[0383]  $5'n_p-N_a-YYY-N_a-n_q\ 3'$  (Ia)。

[0384] 当有义链由式(Ia)表示时,每个 $N_a$ 可以独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0385] 在一个实施方案中,RNAi的反义链序列可以由式(Ie)表示:

[0386]  $5'n_q'-N_a'-(Z'Z'Z')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(X'X'X')_l-N_a'-n_p'3'$  (Ie)

[0387] 其中:

[0388] k和l各自独立地为0或1;

- [0389]  $p'$ 和 $q'$ 各自独立地为0至6;
- [0390] 每个 $N_a'$ 独立地表示包含0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;
- [0391] 每个 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;
- [0392] 每个 $n_p'$ 和 $n_q'$ 独立地表示突出端核苷酸;
- [0393] 其中 $N_b'$ 和 $Y'$ 不具有相同的修饰;并且
- [0394]  $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 和 $Z'Z'Z'$ 各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。
- [0395] 在一个实施方案中, $N_a'$ 和/或 $N_b'$ 包含交替模式的修饰。
- [0396]  $Y'Y'Y'$ 基序存在于反义链的切割位点处或附近。例如,当RNAi药剂具有长度为17至23个核苷酸的双链体区时, $Y'Y'Y'$ 基序可以存在于反义链的位置9、10、11;10、11、12;11、12、13;12、13、14;或13、14、15处,计数从第1个核苷酸开始,从5'端开始;或任选地,计数从5'端开始,从双链体区内的第1配对核苷酸开始。优选地, $Y'Y'Y'$ 基序存在于位置11、12、13处。
- [0397] 在一个实施方案中, $Y'Y'Y'$ 基序全部是2'-OMe修饰的核苷酸。
- [0398] 在一个实施方案中, $k$ 是1并且 $l$ 是0,或 $k$ 是0并且 $l$ 是1,或 $k$ 和 $l$ 两者都是1。
- [0399] 因此,反义链可以由下式表示:
- [0400]  $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p'3'$  (Ig);
- [0401]  $5'n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p'3'$  (Ih);或
- [0402]  $5'n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p'3'$  (Ii)。
- [0403] 当反义链由式(Ig)表示时, $N_b'$ 表示包含0至10个、0-7个、0至10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 $N_a'$ 独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0404] 当反义链被表示为式(Ih)时, $N_b'$ 表示包含0至10个、0-7个、0至10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 $N_a'$ 独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0405] 当反义链被表示为式(Ii)时,每个 $N_b'$ 独立地表示包含0至10个、0-7个、0至10个、0-7个、0-5个、0-4个、0-2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个 $N_a'$ 独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。优选地, $N_b'$ 为0、1、2、3、4、5或6。
- [0406] 在其他实施方案中, $k$ 是0并且 $l$ 是0,并且反义链可以由下式表示:
- [0407]  $5'n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q'3'$  (If)。
- [0408] 当反义链被表示为式(If)时,每个 $N_a'$ 独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。
- [0409]  $X'$ 、 $Y'$ 和 $Z'$ 中的每一个可以彼此相同或不同。
- [0410] 有义链和反义链的每个核苷酸可以独立地用LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-0-甲基、2'-0-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-羟基或2'-氟修饰。例如,有义链和反义链的每个核苷酸独立地用2'-0-甲基或2'-氟修饰。特别地,每个 $X$ 、 $Y$ 、 $Z$ 、 $X'$ 、 $Y'$ 和 $Z'$ 可以表示2'-0-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0411] 在一个实施方案中,当双链体区为21nt时,RNAi药剂的有义链可以含有存在于链的9、10和11位置处的YYY基序,计数从5'端的第1个核苷酸开始,或任选地,计数从5'端的双链体区内的第1配对核苷酸开始;并且Y表示2'-F修饰。有义链可以另外含有XXX基序或ZZZ基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且XXX和ZZZ各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0412] 在一个实施方案中,反义链可以包含存在于链的位置11、12、13处的Y'Y'Y'基序,计数从5'端的第1个核苷酸开始,或任选地,计数从5'端的双链体区内的第1配对核苷酸开始;并且Y'表示2'-O-甲基修饰。反义链可以另外含有X'X'X'基序或Z'Z'Z'基序作为在双链体区的相对端处的翼修饰;并且X'X'X'和Z'Z'Z'各自独立地表示2'-OMe修饰或2'-F修饰。

[0413] 由上述式(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中的任一个表示的有义链与分别由式(Ie)、(If)、(Ig)、(Ih)和(Ii)中的任一个表示的反义链形成双链体。

[0414] 因此,用于本发明的方法的RNAi药剂可以包含有义链和反义链,每条链具有14至30个核苷酸,RNAi双链体由式(Ij)表示:

[0415] 有义:5'np-Na-(XXX)i-Nb-YYY-Nb-(ZZZ)j-Na-nq 3'

[0416] 反义:3'np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq' 5'

[0417] (Ij)

[0418] 其中:

[0419] i、j、k和l各自独立地为0或1;

[0420] p、p'、q和q'各自独立地为0至6;

[0421] 每个Na和Na'独立地表示包含0至25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包括至少两个不同修饰的核苷酸;

[0422] 每个Nb和Nb'独立地表示包含0至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0423] 各自可能存在或不存在的每个np'、np、nq'和nq独立地表示突出端核苷酸;并且

[0424] XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'和Z'Z'Z'各自独立地表示在三个连续核苷酸上的三个相同修饰的一个基序。

[0425] 在一个实施方案中,i是0并且j是0;或i是1并且j是0;或i是0并且j是1;或i和j两者都是0;或i和j两者都是1。在另一个实施方案中,k是0并且l是0;或k是1并且l是0;k是0并且l是1;或k和l两者都是0;或k和l两者都是1。

[0426] 形成RNAi双链体的有义链和反义链的示例性组合包含下式:

[0427] 5'np-Na-YYY-Na-nq 3'

[0428] 3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Na'nq'5' (Ik)

[0429] 5'np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3'

[0430] 3'np'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'nq'5' (Il)

[0431] 5'np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3'

[0432] 3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq'5' (Im)

[0433] 5'np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3'

[0434] 3'np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na-nq'5' (In)

[0435] 当RNAi药剂由式(Ik)表示时,每个Na独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0436] 当RNAi药剂由式(I1)表示时,每个Nb独立地表示包含1至10个、1至7个、1至5个或1至4个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个Na独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0437] 当RNAi药剂表示为式(Im)时,每个Nb、Nb'独立地表示包含0至10个、0至7个、0至10个、0至7个、0至5个、0至4个、0至2个或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个Na独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。

[0438] 当RNAi药剂表示为式(In)时,每个Nb、Nb'独立地表示包含0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2或0个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。每个Na、Na'独立地表示包含2至20个、2至15个或2至10个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列。Na、Na'、Nb和Nb'中的每一个独立地包括交替模式的修饰。

[0439] 式(Ij)、(Ik)、(I1)、(Im)和(In)中的X、Y和Z中的每一个可以彼此相同或不同。

[0440] 当RNAi药剂由式(Ij)、(Ik)、(I1)、(Im)和(In)表示时,至少一个Y核苷酸可以与其中一个Y'核苷酸形成碱基对。可替代地,至少两个Y核苷酸与对应的Y'核苷酸形成碱基对;或所有三个Y核苷酸都与相应的Y'核苷酸形成碱基对。

[0441] 当RNAi药剂由式(I1)或(In)表示时,至少一个Z核苷酸可以与其中一个Z'核苷酸形成碱基对。可替代地,至少两个Z核苷酸与对应的Z'核苷酸形成碱基对;或所有三个Z核苷酸都与相应的Z'核苷酸形成碱基对。

[0442] 当RNAi药剂被表示为式(Im)或(In)时,至少一个X核苷酸可以与一个X'核苷酸形成碱基对。可替代地,至少两个X核苷酸与对应的X'核苷酸形成碱基对;或所有三个X核苷酸都与相应的X'核苷酸形成碱基对。

[0443] 在一个实施方案中,Y核苷酸上的修饰不同于Y'核苷酸上的修饰,Z核苷酸上的修饰不同于Z'核苷酸上的修饰,和/或X核苷酸上的修饰不同于X'核苷酸上的修饰。

[0444] 在一个实施方案中,当RNAi药剂由式(In)表示时,Na修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。在另一个实施方案中,当RNAi药剂由式(In)表示时,Na修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰,并且 $np' > 0$ ,并且至少一个 $np'$ 经由硫代磷酸酯键与相邻核苷酸a连接。在又其他实施方案中,当RNAi药剂由式(In)表示时,Na修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $np' > 0$ ,并且至少一个 $np'$ 经由硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,并且有义链与通过二价或三价支链接头(下文描述的)连接的一种或多种GalNAc衍生物缀合。在另一个实施方案中,当RNAi药剂由式(In)表示时,Na修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $np' > 0$ ,并且至少一个 $np'$ 经由硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,有义链包含至少一个硫代磷酸键,并且有义链与通过二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物缀合。

[0445] 在一个实施方案中,当RNAi药剂由式(Ik)表示时,Na修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰, $np' > 0$ ,并且至少一个 $np'$ 经由硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,有义链包含至少一个硫代磷酸键,并且有义链与通过二价或三价支链接头连接的一种或多种GalNAc衍生物缀合。

[0446] 在一个实施方案中, RNAi药剂是包含至少两个由式(Ij)、(Ik)、(I1)、(Im)和(In)表示的双链体的多聚体,其中所述双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地,多聚体进一步包括配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因;或每个双链体可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

[0447] 在一个实施方案中, RNAi 药剂是包含三个、四个、五个、六个或更多个由式 (Ij), (Ik), (Il), (Im) 和 (In) 表示的双链体的多聚体, 其中所述双链体通过接头连接。接头可以是可切割的或不可切割的。任选地, 多聚体进一步包括配体。每个双链体可以靶向相同的基因或两个不同的基因; 或每个双链体可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

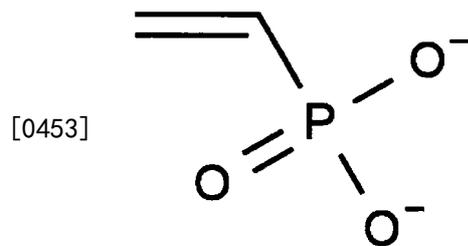
[0448] 在一个实施方案中, 由式 (Ij)、(Ik)、(Il)、(Im) 和 (In) 表示的两种 RNAi 药剂在 5' 端处以及一个或两个 3' 处彼此连接, 并且任选地与配体缀合。每种药剂可以靶向相同的基因或两个不同的基因; 或每种药剂可以靶向两个不同的靶位点处的相同的基因。

[0449] 在某些实施方案中, 本发明的 RNAi 药剂可以含有少量含有 2'-氟修饰的核苷酸, 例如, 10 个或更少个具有 2'-氟修饰的核苷酸。例如, RNAi 药剂可以含有 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个或 0 个具有 2'-氟修饰的核苷酸。在具体实施方案中, 本发明的 RNAi 药剂含有 10 个具有 2'-氟修饰的核苷酸, 例如, 4 个在有义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸和 6 个在反义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸。在另一个具体实施方案中, 本发明的 RNAi 药剂含有 6 个具有 2'-氟修饰的核苷酸, 例如, 4 个在有义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸和 2 个在反义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸。

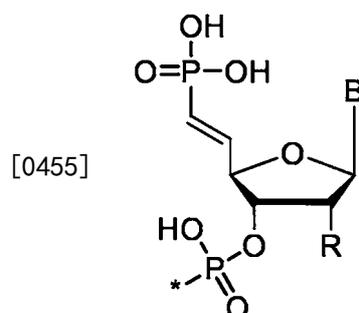
[0450] 在其他实施方案中, 本发明的 RNAi 药剂可以包含超低数量的含有 2'-氟修饰的核苷酸, 例如, 2 个或更少个含有 2'-氟修饰的核苷酸。例如, RNAi 药剂可以含有具有 2'-氟修饰的 0 个核苷酸中的 2 个、1 个。在具体实施方案中, RNAi 药剂可以含有 2 个具有 2'-氟修饰的核苷酸, 例如, 0 个在有义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸和 2 个在反义链中具有 2'-氟修饰的核苷酸。

[0451] 各种出版物描述了可以用于本发明的方法的多聚体 RNAi 药剂。此类出版物包括 W02007/091269、美国专利第 7858769 号、W02010/141511、W02007/117686、W02009/014887 和 W02011/031520, 所述文献中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0452] 在某些实施方案中, 本公开的组合物和方法包括如本文所描述的 RNAi 药剂的乙烯基磷酸酯 (VP) 修饰。在示例性实施方案中, 本公开的乙烯基磷酸酯具有以下结构:



[0454] 例如, 当磷酸酯模拟物是 5'-乙烯基磷酸酯 (VP) 时, 5' 末端核苷酸可以具有以下结构,



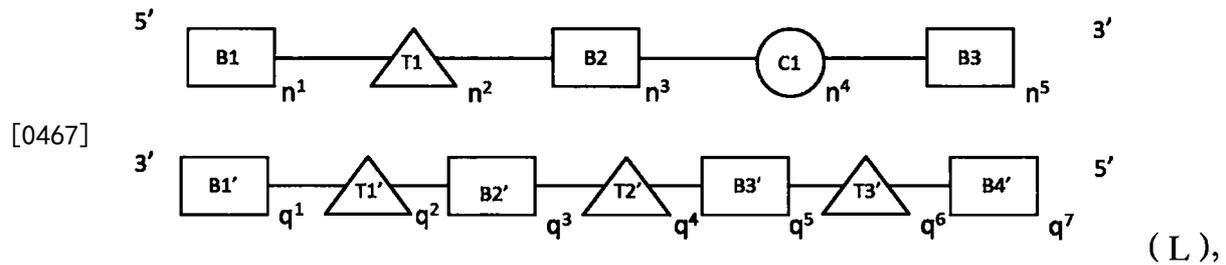
[0456] 其中\*指示键到邻近核苷酸的 5' 位置的位置;



子)。所述部分可以是例如碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡糖和多糖。任选地,所选择的部分通过中间系链与环状载剂连接。因此,环状载剂将通常包括官能团,例如氨基基团,或通常提供适合于另一个化学实体(例如,组成环的配体)的并入或栓系的键。

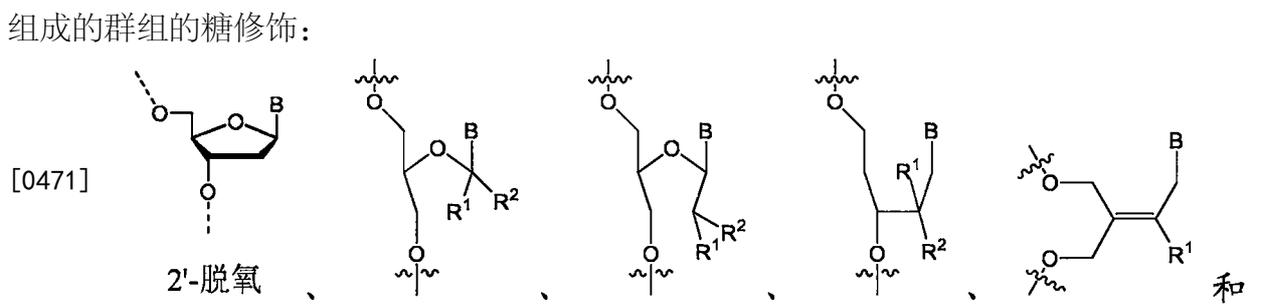
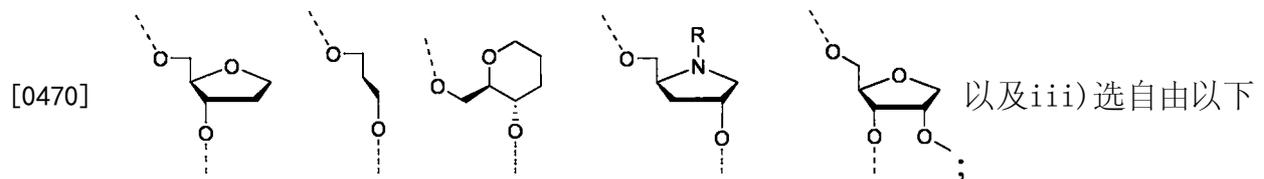
[0465] RNAi 药剂可以经由载剂与配体缀合,其中所述载剂可以是环状基团或无环基团;优选地,所述环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢化萘基;优选地,所述无环基团选自丝氨酸骨架或二乙醇胺骨架。

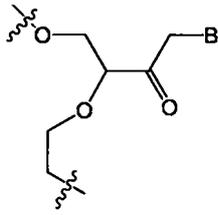
[0466] 在本发明的另一个实施方案中,iRNA 药剂包含有义链和反义链,每条链具有14至40个核苷酸。RNAi 药剂可以由式(L)表示:



[0468] 在式(L)中,B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'和B4'各自独立地是含有选自由以下组成的群组的修饰的核苷酸:2'-O-烷基、2'-取代的烷氧基、2'-取代的烷基、2'-卤基、ENA和BNA/LNA。在某些实施方案中,B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'和B4'各自含有2'-OMe修饰。在某些实施方案中,B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'和B4'各自含有2'-OMe或2'-F修饰。在某些实施方案中,B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'和B4'中的至少一个含有2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰。

[0469] C1是一种热不稳定核苷酸,位于与反义链的种子区相对的位点(即,位于反义链的5'端的位置2至8位处)处。例如,C1位于有义链的一个位置处,所述位置与反义链的5'端的位置2至8处的核苷酸配对。在一个实例中,C1位于从有义链的5'端起的位置15处。C1核苷酸具有热不稳定修饰,所述热不稳定修饰可以包含无碱基修饰;与双链体中的相对核苷酸的错配;以及糖修饰,如2'-脱氧修饰或无环核苷酸,例如解锁核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)。在某些实施方案中,C1具有选自由以下组成的群组的热不稳定修饰:i)与反义链中的相对核苷酸的错配;ii)选自由以下组成的群组的无碱基修饰:

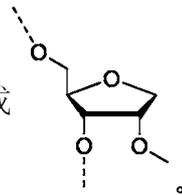




其中B是经修饰或未经修饰的核碱基,  $R^1$ 和 $R^2$ 独立地是H、卤素、 $OR_3$ 或烷基;

并且 $R_3$ 是H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖。在某些实施方案中,C1中的热不稳定修饰是选自自由以下组成的群组的错配:G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T和U:T;并且任选地,错配对中的至少一个核碱基是2'-脱氧核碱基。在一个实例中,C1中的

热不稳定修饰是GNA或



[0472]  $T1$ 、 $T1'$ 、 $T2'$ 和 $T3'$ 各自独立地表示包含修饰的核苷酸,所述修饰为核苷酸提供小于或等于2'-OMe修饰的空间体积的空间体积。空间体积是指修饰的空间效应的总和。用于测定核苷酸修饰的空间效应的方法是本领域技术人员已知的。修饰可以在核苷酸的核糖糖的2'位置处,或对非核糖核苷酸、无环核苷酸的修饰,或与核糖糖的2'位置相似或等效的核苷酸的主链,并且为核苷酸提供小于或等于2'-OMe修饰的空间体积的空间体积。例如, $T1$ 、 $T1'$ 、 $T2'$ 和 $T3'$ 各自独立地选自DNA、RNA、LNA、2'-F和2'-F-5'-甲基。在某些实施方案中, $T1$ 是DNA。在某些实施方案中, $T1'$ 是DNA、RNA或LNA。在某些实施方案中, $T2'$ 是DNA或RNA。在某些实施方案中, $T3'$ 是DNA或RNA。

[0473]  $n^1$ 、 $n^3$ 和 $q^1$ 的长度独立地是4至15个核苷酸。

[0474]  $n^5$ 、 $q^3$ 和 $q^7$ 的长度独立地是1至6个核苷酸。

[0475]  $n^4$ 、 $q^2$ 和 $q^6$ 的长度独立地是1至3个核苷酸;可替代地, $n^4$ 是0。

[0476]  $q^5$ 的长度独立地是0至10个核苷酸。

[0477]  $n^2$ 和 $q^4$ 的长度独立地是0至3个核苷酸。

[0478] 可替代地, $n^4$ 的长度是0至3个核苷酸。

[0479] 在某些实施方案中, $n^4$ 可以是0。在一个实例中, $n^4$ 是0,并且 $q^2$ 和 $q^6$ 是1。在另一个实例中, $n^4$ 是0,并且 $q^2$ 和 $q^6$ 是1,在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0480] 在某些实施方案中, $n^4$ 、 $q^2$ 和 $q^6$ 各自是1。

[0481] 在某些实施方案中, $n^2$ 、 $n^4$ 、 $q^2$ 、 $q^4$ 和 $q^6$ 各自是1。

[0482] 在某些实施方案中,当有义链的长度是19至22个核苷酸,并且 $n^4$ 是1时,C1位于有义链的5'端的位置14至17处。在某些实施方案中,C1位于有义链的5'端的位置15处。

[0483] 在某些实施方案中, $T3'$ 从反义链的5'端的位置2处开始。在一个实例中, $T3'$ 位于从反义链的5'端起的位置2处,并且 $q^6$ 等于1。

[0484] 在某些实施方案中, $T1'$ 从反义链的5'端的位置14处开始。在一个实例中, $T1'$ 位于从反义链的5'端起的位置14处,并且 $q^2$ 等于1。

[0485] 在一个示例性实施方案中, $T3'$ 从反义链的5'端中的位置2开始,并且 $T1'$ 从反义链

的5'端中的位置14开始。在一个实例中,T3'从反义链的5'端中的位置2开始,并且 $q^6$ 等于1,并且T1'从反义链的5'端中的位置14开始,并且 $q^2$ 等于1。

[0486] 在某些实施方案中,T1'和T3'以11个核苷酸的长度分开(即不计数T1'和T3'核苷酸)。

[0487] 在某些实施方案中,T1'位于从反义链的5'端起的位置14处。在一个实例中,T1'位于从反义链的5'端起的位置14处,并且 $q^2$ 等于1,并且修饰位于2'位置处或提供比2'-OMe核糖更少的空间体积的非核糖、无环或主链中的位置处。

[0488] 在某些实施方案中,T3'位于从反义链的5'端起的位置2处。在一个实例中,T3'位于从反义链的5'端起的位置2处,并且 $q^6$ 等于1,并且修饰位于2'位置处或提供比2'-OMe核糖更少或相等的空间体积的非核糖、无环或主链中的位置处。

[0489] 在某些实施方案中,T1位于有义链的切割位点处。在一个实例中,当有义链的长度是19至22个核苷酸,并且 $n^2$ 是1时,T1位于从有义链的5'端起的位置11处。在一个示例性实施方案中,当有义链长度是19至22个核苷酸,并且 $n^2$ 是1时,T1位于从有义链的5'端起的位置11处的有义链切割位点处,

[0490] 在某些实施方案中,T2'从反义链的5'端的位置6处开始。在一个实例中,T2'位于从反义链的5'端起的位置6至10处,并且 $q^4$ 是1。

[0491] 在一个示例性实施方案中,当有义链长度是19至22个核苷酸,并且 $n^2$ 是1时,T1位于有义链的切割位点处,例如,在从有义链的5'端起的位置11处;T1'位于从反义链的5'端起的位置14处,并且 $q^2$ 等于1,并且对T1'的修饰位于核糖糖的2'位置处,或位于提供比2'-OMe核糖更少的空间体积的非核糖、无环或主链中位置处;T2'位于从反义链的5'端起的位置6至10处,并且 $q^4$ 是1;并且T3'位于从反义链的5'端起的位置2处,并且 $q^6$ 等于1,并且对T3'的修饰位于2'位置处或提供比2'-OMe核糖更少或相等的空间体积的非核糖、无环或主链中的位置处。

[0492] 在某些实施方案中,T2'从反义链的5'端的位置8处开始。在一个实例中,T2'从反义链的5'端的位置8开始,并且 $q^4$ 是2。

[0493] 在某些实施方案中,T2'从反义链的5'端的位置9处开始。在一个实例中,T2'位于从反义链的5'端起的位置9处,并且 $q^4$ 是1。

[0494] 在某些实施方案中,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是1,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是6,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0495] 在某些实施方案中, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是1,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是6,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0496] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是

7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是2', B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1。

[0497] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是2, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0498] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是6, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是7, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是2', B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1。

[0499] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是6, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是7, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是2, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0500] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是1, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是6, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1。

[0501] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是1, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是6, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0502] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是5, T2'是2'-F,  $q^4$ 是1, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 任选地在反义链的3'端具有至少2个另外的TT。

[0503] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是5, T2'是2'-F,  $q^4$ 是1, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 任选地在反义链的3'端具有至少2个另外的TT; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内

两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0504] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。

[0505] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

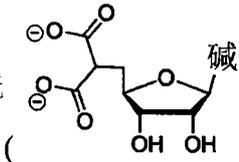
[0506] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。

[0507] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0508] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。

[0509] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'-F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。

[0510] RNAi药剂可以在有义链或反义链的5'端包括含磷基团。5'端含磷基团可以是5'端磷酸酯(5'-P)、5'端硫代磷酸酯(5'-PS)、5'端硫代磷酸二酯(5'-PS<sub>2</sub>)、5'端乙烯基膦酸酯

(5'-VP)、5'端甲基膦酸酯(MePhos)或5'-脱氧-5'-C-丙二酰 (  )。当5'端含

磷基团是5'端乙烯基膦酸酯(5'-VP)时, 5'-VP可以是5'-E-VP异构体(即反式乙烯基膦酸酯



[0511] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在有义链的5'端处的含磷基团。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链的5'端处的含磷基团。

[0512] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括5'-P。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-P。

[0513] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括5'-PS。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-PS。

[0514] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括5'-VP。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-VP。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-E-VP。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-Z-VP。

[0515] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括5'-PS<sub>2</sub>。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-PS<sub>2</sub>。

[0516] 在某些实施方案中, RNAi 药剂包括5'-PS<sub>2</sub>。在某些实施方案中, RNAi 药剂包括在反义链中的5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0517] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-PS。

[0518] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-P。

[0519] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0520] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0521] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0522] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或

2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5 (从有义链的5'端开始计数) 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23 (从反义链的5'端开始计数) 内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi 药剂还包括5'-P。

[0523] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5 (从有义链的5'端开始计数) 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23 (从反义链的5'端开始计数) 内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi 药剂还包括5'-PS。

[0524] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5 (从有义链的5'端开始计数) 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23 (从反义链的5'端开始计数) 内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi 药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0525] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5 (从有义链的5'端开始计数) 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23 (从反义链的5'端开始计数) 内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi 药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0526] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5 (从有义链的5'端开始计数) 内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23 (从反义链的5'端开始计数) 内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi 药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0527] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi 药剂还包括5'-P。

[0528] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或

2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。dsRNA药剂还包括5'-PS。

[0529] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0530] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0531] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0532] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P。

[0533] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS。

[0534] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0535] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0536] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, q<sup>4</sup>是0, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是7, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-OMe, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0537] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-P。

[0538] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-PS。

[0539] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0540] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。dsRNA RNA药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0541] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2', B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0542] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P。

[0543] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F, n<sup>1</sup>是8, T1是2'F, n<sup>2</sup>是3, B2是2'-OMe, n<sup>3</sup>是7, n<sup>4</sup>是0, B3是2'-OMe, n<sup>5</sup>是3, B1'是2'-OMe或2'-F, q<sup>1</sup>是9, T1'是2'-F, q<sup>2</sup>是1, B2'是2'-OMe或2'-F, q<sup>3</sup>是4, T2'是2'-F, q<sup>4</sup>是2, B3'是2'-OMe或2'-F, q<sup>5</sup>是5, T3'是2'-F, q<sup>6</sup>是1, B4'是2'-F, 并且q<sup>7</sup>是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括

5'-PS。

[0544] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0545] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0546] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0547] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1。RNAi药剂还包括5'-P。

[0548] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1。RNAi药剂还包括5'-PS。

[0549] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0550] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0551] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是

7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0552] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P。

[0553] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS。

[0554] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP。5'-VP可以是5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合。

[0555] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>。

[0556] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰。

[0557] 在某些实施方案中, B1是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8, T1是2'F,  $n^2$ 是3, B2是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0, B3是2'-OMe,  $n^5$ 是3, B1'是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9, T1'是2'-F,  $q^2$ 是1, B2'是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4, T2'是2'-F,  $q^4$ 是2, B3'是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5, T3'是2'-F,  $q^6$ 是1, B4'是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯

核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P和靶向配体。在某些实施方案中,5'-P位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0558] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0559] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)以及靶向配体。

[0560] 在某些实施方案中,5'-VP位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0561] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS<sub>2</sub>位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0562] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-OMe,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰和靶向配体。在某些实施方案中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0563] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或

2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P和靶向配体。在某些实施方案中, 5'-P位于反义链的5'端处, 并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0564] 在某些实施方案中,  $B1$ 是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8,  $T1$ 是2'F,  $n^2$ 是3,  $B2$ 是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0,  $B3$ 是2'-OMe,  $n^5$ 是3,  $B1'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9,  $T1'$ 是2'-F,  $q^2$ 是1,  $B2'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS和靶向配体。在某些实施方案中, 5'-PS位于反义链的5'端处, 并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0565] 在某些实施方案中,  $B1$ 是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8,  $T1$ 是2'F,  $n^2$ 是3,  $B2$ 是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0,  $B3$ 是2'-OMe,  $n^5$ 是3,  $B1'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9,  $T1'$ 是2'-F,  $q^2$ 是1,  $B2'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP(例如, 5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)以及靶向配体。在某些实施方案中, 5'-VP位于反义链的5'端处, 并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0566] 在某些实施方案中,  $B1$ 是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8,  $T1$ 是2'F,  $n^2$ 是3,  $B2$ 是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0,  $B3$ 是2'-OMe,  $n^5$ 是3,  $B1'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9,  $T1'$ 是2'-F,  $q^2$ 是1,  $B2'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>和靶向配体。在某些实施方案中, 5'-PS<sub>2</sub>位于反义链的5'端处, 并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0567] 在某些实施方案中,  $B1$ 是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8,  $T1$ 是2'F,  $n^2$ 是3,  $B2$ 是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0,  $B3$ 是2'-OMe,  $n^5$ 是3,  $B1'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9,  $T1'$ 是2'-F,  $q^2$ 是1,  $B2'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $q^4$ 是0,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是7,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-OMe, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰, 并且在反义链的位置18至23(从5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰和靶向配体。在某些实施方案中, 5'-脱氧-5'-C-丙二酰位于反义链的5'端处, 并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0568] 在某些实施方案中,  $B1$ 是2'-OMe或2'-F,  $n^1$ 是8,  $T1$ 是2'F,  $n^2$ 是3,  $B2$ 是2'-OMe,  $n^3$ 是7,  $n^4$ 是0,  $B3$ 是2'-OMe,  $n^5$ 是3,  $B1'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^1$ 是9,  $T1'$ 是2'-F,  $q^2$ 是1,  $B2'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^3$ 是4,  $T2'$ 是2'-F,  $q^4$ 是2,  $B3'$ 是2'-OMe或2'-F,  $q^5$ 是5,  $T3'$ 是2'-F,  $q^6$ 是1,  $B4'$ 是2'-F, 并且 $q^7$ 是1; 在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷

酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P和靶向配体。在某些实施方案中,5'-P位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0569] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0570] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)以及靶向配体。在某些实施方案中,5'-VP位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0571] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS<sub>2</sub>位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0572] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4,T2'是2'-F, $q^4$ 是2,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是5,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰和靶向配体。在某些实施方案中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0573] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在

有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-P和靶向配体。在某些实施方案中,5'-P位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0574] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0575] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-VP(例如,5'-E-VP、5'-Z-VP或其组合)以及靶向配体。在某些实施方案中,5'-VP位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0576] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-PS<sub>2</sub>和靶向配体。在某些实施方案中,5'-PS<sub>2</sub>位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0577] 在某些实施方案中,B1是2'-OMe或2'-F, $n^1$ 是8,T1是2'F, $n^2$ 是3,B2是2'-OMe, $n^3$ 是7, $n^4$ 是0,B3是2'-OMe, $n^5$ 是3,B1'是2'-OMe或2'-F, $q^1$ 是9,T1'是2'-F, $q^2$ 是1,B2'是2'-OMe或2'-F, $q^3$ 是4, $q^4$ 是0,B3'是2'-OMe或2'-F, $q^5$ 是7,T3'是2'-F, $q^6$ 是1,B4'是2'-F,并且 $q^7$ 是1;在有义链的位置1至5(从有义链的5'端开始计数)内具有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在位置1和2处有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰,并且在反义链的位置18至23(从反义链的5'端开始计数)内有两个硫代磷酸酯核苷酸间键修饰。RNAi药剂还包括5'-脱氧-5'-C-丙二酰和靶向配体。在某些实施方案中,5'-脱氧-5'-C-丙二酰位于反义链的5'端处,并且靶向配体位于有义链的3'端处。

[0578] 在一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0579] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0580] (i) 21个核苷酸的长度;

[0581] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的

三种GalNAc衍生物;以及

[0582] (iii) 位置1、3、5、7、9至11、13、17、19和21处的2'-F修饰,以及位置2、4、6、8、12、14至16、18和20处的2'-OMe修饰(从5'端开始计数);

[0583] 以及

[0584] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0585] (i) 23个核苷酸的长度;

[0586] (ii) 位置1、3、5、9、11至13、15、17、19、21和23处的2'-OMe修饰,以及位置2、4、6至8、10、14、16、18、20和22处的2'F修饰(从5'端开始计数);以及

[0587] (iii) 核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0588] 其中dsRNA药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0589] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0590] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0591] (i) 21个核苷酸的长度;

[0592] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0593] (iii) 位置1、3、5、7、9至11、13、15、17、19和21处的2'-F修饰,以及位置2、4、6、8、12、14、16、18和20处的2'-OMe修饰(从5'端开始计数);以及

[0594] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0595] 以及

[0596] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0597] (i) 23个核苷酸的长度;

[0598] (ii) 位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19以及21至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、4、6、8、10、14、16、18和20处的2'F修饰(从5'端开始计数);以及

[0599] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0600] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0601] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0602] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0603] (i) 21个核苷酸的长度;

[0604] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0605] (iii) 位置1至6、8、10以及12至21处的2'-OMe修饰,位置7和9处的2'-F修饰,以及位置11处的脱氧核苷酸(例如dT)(从5'端开始计数);以及

[0606] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0607] 以及

[0608] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0609] (i) 23个核苷酸的长度;

[0610] (ii) 位置1、3、7、9、11、13、15、17以及19至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、4至6、8、10、12、14、16和18处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0611] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0612] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0613] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0614] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0615] (i) 21个核苷酸的长度;

[0616] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0617] (iii) 位置1至6、8、10、12、14以及16至21处的2'-OMe修饰,以及位置7、9、11、13和15处的2'-F修饰;以及

[0618] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0619] 以及

[0620] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0621] (i) 23个核苷酸的长度;

[0622] (ii) 位置1、5、7、9、11、13、15、17、19以及21至23处的2'-OMe修饰,以及位置2至4、6、8、10、12、14、16、18和20处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0623] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0624] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0625] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0626] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0627] (i) 21个核苷酸的长度;

[0628] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0629] (iii) 位置1至9和12至21处的2'-OMe修饰,以及位置10和11处的2'-F修饰;以及

[0630] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0631] 以及

[0632] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0633] (i) 23个核苷酸的长度;

[0634] (ii) 位置1、3、5、7、9、11至13、15、17、19以及21至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、

4、6、8、10、14、16、18和20处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0635] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0636] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0637] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0638] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0639] (i) 21个核苷酸的长度;

[0640] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0641] (iii) 位置1、3、5、7、9至11和13处的2'-F修饰,以及位置2、4、6、8、12以及14至21处的2'-OMe修饰;以及

[0642] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0643] 以及

[0644] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0645] (i) 23个核苷酸的长度;

[0646] (ii) 位置1、3、5至7、9、11至13、15、17至19以及21至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、4、8、10、14、16和20处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0647] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0648] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0649] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0650] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0651] (i) 21个核苷酸的长度;

[0652] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0653] (iii) 位置1、2、4、6、8、12、14、15、17以及19至21处的2'-OMe修饰,以及位置3、5、7、9至11、13、16和18处的2'-F修饰;以及

[0654] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0655] 以及

[0656] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0657] (i) 25个核苷酸的长度;

[0658] (ii) 位置1、4、6、7、9、11至13、15、17以及19至23处的2'-OMe修饰、位置2、3、5、8、10、14、16和18处的2'-F修饰,以及位置24和25处的脱氧核苷酸(例如,dT)(从5'端开始计数);以及

[0659] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核

苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0660] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有四个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0661] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0662] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0663] (i) 21个核苷酸的长度;

[0664] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0665] (iii) 位置1至6、8和12至21处的2'-OMe修饰,以及位置7和9至11处的2'-F修饰;以及

[0666] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0667] 以及

[0668] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0669] (i) 23个核苷酸的长度;

[0670] (ii) 位置1、3至5、7、8、10至13、15以及17至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、6、9、14和16处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0671] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0672] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

[0673] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:

[0674] (a) 有义链,所述有义链具有:

[0675] (i) 21个核苷酸的长度;

[0676] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;

[0677] (iii) 位置1至6、8和12至21处的2'-OMe修饰,以及位置7和9至11处的2'-F修饰;以及

[0678] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0679] 以及

[0680] (b) 反义链,所述反义链具有:

[0681] (i) 23个核苷酸的长度;

[0682] (ii) 位置1、3至5、7、10至13、15以及17至23处的2'-OMe修饰,以及位置2、6、8、9、14和16处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及

[0683] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置21与22之间以及核苷酸位置22与23之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);

[0684] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。

- [0685] 在另一个特定实施方案中,本发明的RNAi药剂包括:
- [0686] (a) 有义链,所述有义链具有:
- [0687] (i) 19个核苷酸的长度;
- [0688] (ii) 与3'端连接的ASGPR配体,其中所述ASGPR配体包括通过三价支链接头连接的三种GalNAc衍生物;
- [0689] (iii) 位置1至4、6和10至19处的2'-OMe修饰,以及位置5和7至9处的2'-F修饰;以及
- [0690] (iv) 核苷酸位置1与2之间以及核苷酸位置2与3之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);
- [0691] 以及
- [0692] (b) 反义链,所述反义链具有:
- [0693] (i) 21个核苷酸的长度;
- [0694] (ii) 位置1、3至5、7、10至13、15以及17至21处的2'-OMe修饰,以及位置2、6、8、9、14和16处的2'-F修饰(从5'端开始计数);以及
- [0695] (iii) 核苷酸位置1与2之间、核苷酸位置2与3之间、核苷酸位置19与20之间以及核苷酸位置20与21之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5'端开始计数);
- [0696] 其中RNAi药剂在反义链的3'端处具有两个核苷酸突出端,并且在反义链的5'端处具有钝端。
- [0697] 在某些实施方案中,用于本发明的方法的iRNA是选自表3至表6中列出的药剂的药剂。这些药剂可以进一步包括配体。

#### [0698] IV. 与配体缀合的iRNA

[0699] 本发明的iRNA的RNA的另一种修饰涉及将一种或多种配体、部分或缀合物化学连接到iRNA,所述一种或多种配体、部分或缀合物增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取。此类部分包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,(1989)《美国国家科学院院刊》,86:6553-6556),胆酸(Manoharan等人,(1994)《生物有机与药物化学快报(Biorg.Med.Chem.Lett.)》4:1053-1060),硫醚,例如,绿柱石-S-三苯基甲硫醇(Manoharan等人,(1992)《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》,660:306-309;Manoharan等人,(1993)《生物有机与药物化学快报》,3:2765-2770),硫代胆固醇(Oberhauser等人,(1992)《核酸研究》,20:533-538),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人.,(1991)《欧洲分子生物学组织杂志》,10:1111-1118;Kabanov等人,(1990)《FEBS快报(FEBS Lett.)》,259:327-330;Svinarchuk等人,(1993)《生物化学(Biochimie)》,75:49-54),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸酯(Manoharan等人,(1995)《四面体快报(Tetrahedron Lett.)》,36:3651-3654;Shea等人,(1990)《核酸研究》,18:3777-3783),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,(1995)《核苷与核苷酸(Nucleosides&Nucleotides)》,14:969-973)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,(1995)《四面体快报》,36:3651-3654),棕榈基部分(Mishra等人,(1995)《生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta,)》,1264:229-237),或十八胺或己基氨基-羰基氧基胆固醇部分(Crooke等人,(1996)《药理和实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.)》,277:923-937)。

[0700] 在一个实施方案中,配体改变其并入的iRNA药剂的分布、靶向或寿命。在优选的实施方案中,例如,与不存在此类配体的物种相比,配体为选定靶标(例如,分子、细胞或细胞类型)、区室(例如,细胞或器官区室、组织、器官或身体区)提供增强的亲和力。优选的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0701] 配体可以包含天然存在的物质,如蛋白质(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊粉、环糊精、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰基半乳糖胺或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组分子或合成分子,如合成聚合物,例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸,即聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包含:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脘、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或 $\alpha$ 螺旋肽。

[0702] 配体还可以包含靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如与特定细胞类型(如肾细胞)结合的抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化多氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双磷酸酯、聚谷氨酸酯、聚天冬氨酸酯、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0703] 配体的其他实例包含染料、嵌入剂(例如,吖啶)、交联剂(例如,补骨脂烯、丝裂霉素C(mitomycin C))、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、扩环卟啉(Sapphyrin))、多环芳香族烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如,EDTA)、亲脂性分子(例如,胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪)、肽缀合物(例如,触角足突变肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如,生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林(aspirin)、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环化合物的Eu<sup>3+</sup>络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0704] 配体可以是蛋白质(例如,糖蛋白)或肽(例如,对共配体具有特异性亲和力的分子)或抗体(例如,与特定细胞类型,如肝细胞结合的抗体)。配体还可以包含激素和激素受体。它们还可以包含非肽物质,如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38MAP激酶的激活剂或NF- $\kappa$ B的激活剂。

[0705] 配体可以是物质,例如药物,其可以例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝来增加iRNA药剂摄取到细胞中。药物可以是例如分类单元(taxon)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、细胞松弛素(cytochalasin)、诺考达唑(nocodazole)、杰斯内酯(japlakinolide)、拉春库林A(latrunculin A)、毒伞素(phalloidin)、斯文赫利A(swinholide A)、印丹诺辛(indanocine)或麦司文(myoservin)。

[0706] 在一些实施方案中,与如本文所描述的iRNA连接的配体充当药代动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包含亲脂性物质、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生(naproxen)、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素。还已知包括许多硫代磷酸酯键的与血清蛋白结合的寡核苷酸,因此在主链中包括多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸(例如,具有约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸)也适于本发明作为配体(例如,作为PK调节配体)。另外,与血清组分(例如,血清蛋白)结合的适体也适于用作本文所描述的实施方案中的PK调节配体。

[0707] 本发明的配体缀合的寡核苷酸可以通过使用带有侧链反应性官能团的寡核苷酸来合成,如源自将连接分子连接到寡核苷酸上的寡核苷酸(如下文所描述的)。这种反应性寡核苷酸可以直接与可商购获得的配体、合成的带有多种保护基团中的任一种的配体、或具有与其连接的连接部分的配体反应。

[0708] 本发明的缀合物中使用的寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术方便且常规地制备。用于此类合成的设备由若干个供应商销售,例如,包含加利福尼亚州福斯特市的应用生物系统公司(Applied Biosystems(Foster City, Calif.))。可以另外或可替代地采用本领域已知的用于此类合成的任何其他方式。使用类似技术来制备其他寡核苷酸(如硫代磷酸酯和烷基化的衍生物)也是已知的。

[0709] 在本发明的配体缀合的寡核苷酸和带有序列特异性连接的核苷的配体分子中,寡核苷酸和寡核苷可以利用标准核苷酸或核苷前体或已经带有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已经带有配体分子的配体-核苷酸或核苷缀合物前体或带有构建块的非核苷配体组装在合适的DNA合成器上。

[0710] 当使用已经带有连接部分的核苷酸缀合物前体时,通常完成序列特异性连接核苷的合成,并且然后配体分子与连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸或连接的核苷通过自动合成器合成,使用源自配体-核苷缀合物的磷脒以及可商购获得的和常规用于寡核苷酸合成的标准磷脒和非标准磷酰胺。

#### [0711] A. 脂质缀合物

[0712] 在一个实施方案中,配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。此类脂质或基于脂质的分子优选地与血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)结合。HSA结合配体允许缀合物分布到靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是肝,包含肝的实质细胞。可以与HSA结合的其他分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普辛(neproxin)或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性,(b)增加靶向或转运到靶细胞或细胞膜中,和/或(c)可以用于调节与血清蛋白,例如HSA的结合HSA。

[0713] 基于脂质的配体可以用于抑制(例如,控制)缀合物与靶组织的结合。例如,更强地与HSA结合的脂质或基于脂质的配体将较不可能被靶向到肾脏,并且因此较不可能从身体清除。较不强烈地与HSA结合的脂质或基于脂质的配体可以用于将缀合物靶向到肾脏。

[0714] 在优选的实施方案中,基于脂质的配体与HSA结合。优选地,它以足够的亲和力与HSA结合,使得缀合物将优选地分布到非肾组织。然而,优选的是亲和力不要强到HSA配体结合不能被逆转。

[0715] 在另一个优选的实施方案中,基于脂质的配体微弱地或根本不与HSA结合,使得缀

合物将优选地分布到肾脏。靶向到肾细胞的其他部分也可以代替基于脂质的配体或除了基于脂质的配体之外使用。

[0716] 另一方面,配体是被靶细胞(例如,增殖细胞)摄取的部分,例如维生素。这些对于治疗以不期望的细胞增殖为特征的疾病特别有用,例如恶性或非恶性类型的疾病,例如癌细胞。示例性维生素包含维生素A、E和K。包含的其他示例性维生素是B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或被靶细胞(如肝细胞)摄取的其他维生素或营养素。还包含HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

#### [0717] B. 细胞渗透剂

[0718] 在另一方面,配体是细胞渗透剂,优选地螺旋细胞渗透剂。优选地,药剂是两亲性的。示例性的药剂为肽,如tat或触角足突变肽。如果药剂为肽,那么其可以被修饰,包含肽基模拟物、反演体、非肽或假肽键和使用D-氨基酸。螺旋药剂优选地是 $\alpha$ 螺旋药剂,其具有亲脂性相和疏脂性相。

[0719] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的所定义三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA药剂的连接可能影响iRNA的药代动力学分布,如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟物部分的长度可以为约5至50个氨基酸,例如约5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸长。

[0720] 肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状体肽、约束肽或交联肽。在另一个替代方案中,肽部分可以包含疏水性膜易位序列(MTS)。示例性疏水性含MTS肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:3)的RFGF。含疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:4))也可以是靶向部分。肽部分可以是“递送”肽,所述肽可以携带包含肽、寡核苷酸和蛋白质在内的大极性分子穿过细胞膜。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:5)和果蝇触角足突变蛋白((RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:6)的序列能够充当递送肽。肽或肽模拟物可以由DNA的随机序列编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等人,《自然》,354:82-84,1991)。为了细胞靶向目的,经由并入的单体单元栓系至dsRNA药剂的肽或肽模拟物的实例是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可以在约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。肽部分可以具有结构修饰,如增加稳定性或直接构象特性。可以使用下面描述的任何结构修饰。

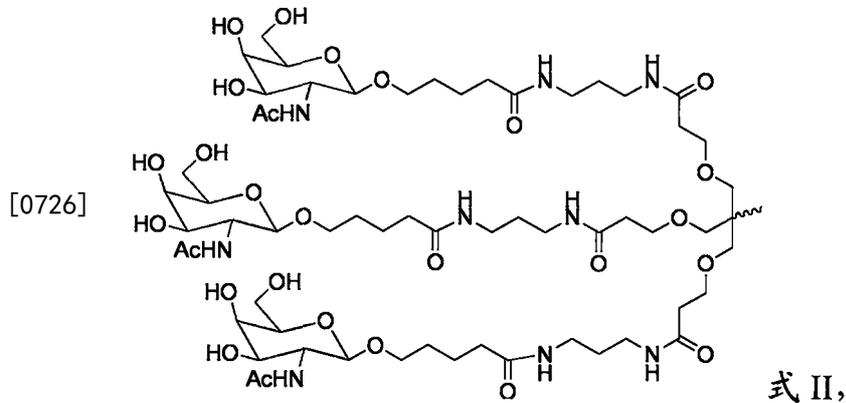
[0721] 用于本发明的组合物和方法的RGD肽可以是线性或环状的,并且可以被修饰,例如被糖基化或甲基化,以促进靶向特定组织。含有RGD的肽和肽二聚体可以包含D-氨基酸以及合成的RGD模拟物。除了RGD,还可以使用靶向整合素配体的其他部分。此配体的优选的缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

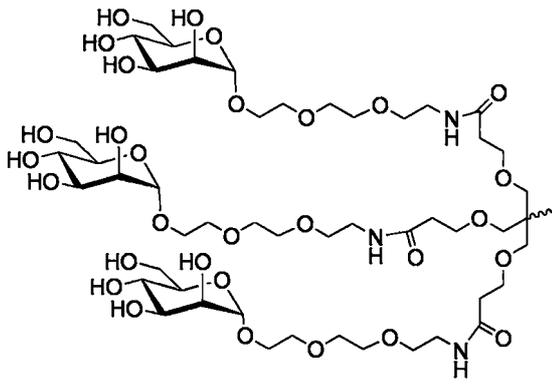
[0722] “细胞渗透肽”能够渗透细胞,例如微生物细胞(如细菌或真菌细胞)或哺乳动物细胞(如人细胞)。微生物细胞渗透肽可以是例如 $\alpha$ -螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如, $\alpha$ -防御素、 $\beta$ -防御素或细菌素)或仅含有一个或两个主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吲哚西丁(indolicidin))。细胞渗透肽还可以包含核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二分两亲性肽,如MPG,其源自HIV-1 gp41的融合肽结构域和SV40大T抗原的NLS(Simeoni等人《核酸研究》,31:2717-2724,2003)。

## [0723] C. 碳水化合物缀合物

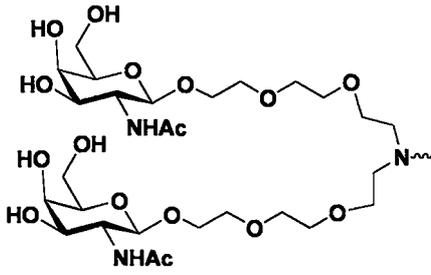
[0724] 在本发明的组合物和方法的一些实施方案中，iRNA寡核苷酸进一步包含碳水化合物。碳水化合物缀合的iRNA对于核酸的体内递送以及适于如本文所描述的体内治疗用途的组合物而言是有利的。如本文所使用的，“碳水化合物”是指化合物，所述化合物是碳水化合物，所述碳水化合物本身由一个或多个单糖单元构成，所述单糖单元具有至少6个碳原子（可以是直链、支链或环状），其中氧、氮或硫原子与每个碳原子结合；或是具有碳水化合物部分作为其部分的化合物，所述碳水化合物部分由一个或多个单糖单元构成，每个单糖单元具有至少六个碳原子（可以是直链、支链或环状），其中氧、氮或硫原子与每个碳原子结合。表示性碳水化合物包含糖（单糖、二糖、三糖和含有约4个、5个、6个、7个、8个或9个单糖单元的寡糖）和多糖如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。特定单糖包含C5及以上（例如，C5、C6、C7或C8）糖；二糖和三糖包含具有两个或三个单糖单元（例如，C5、C6、C7或C8）的糖。

[0725] 在一个实施方案中，用于本发明的组合物和方法的碳水化合物缀合物选自由以下组成的群组：



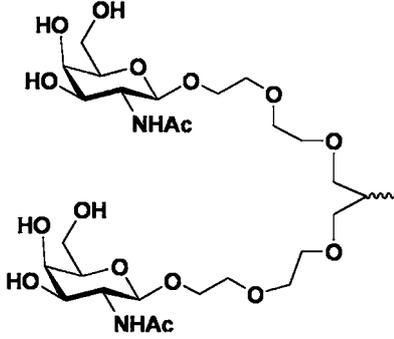


式 III,

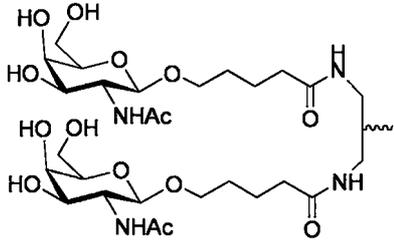


式 IV,

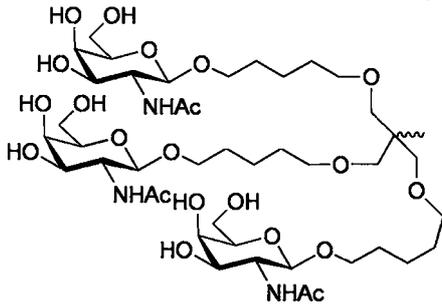
[0727]



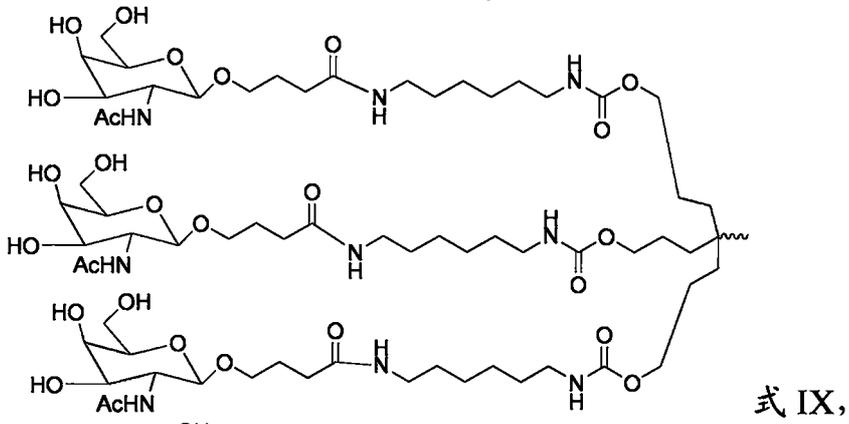
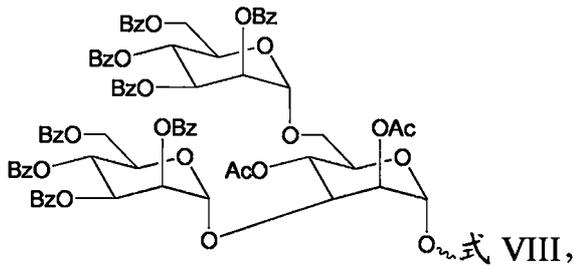
式 V,



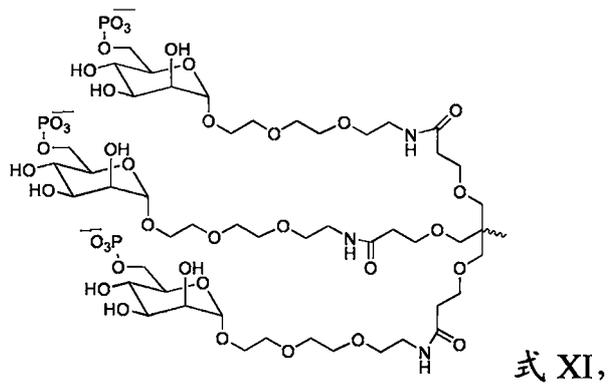
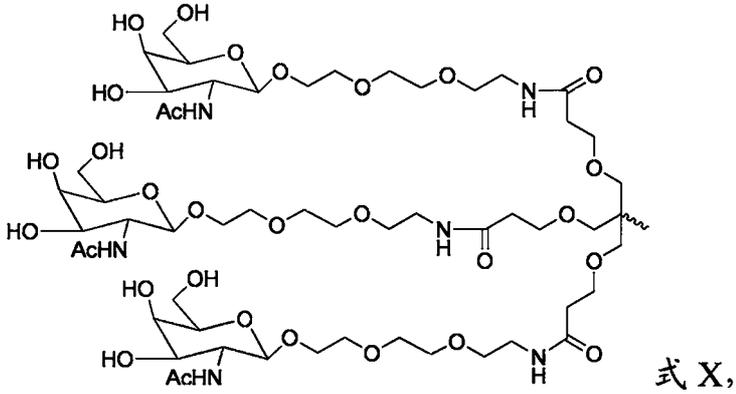
式 VI,

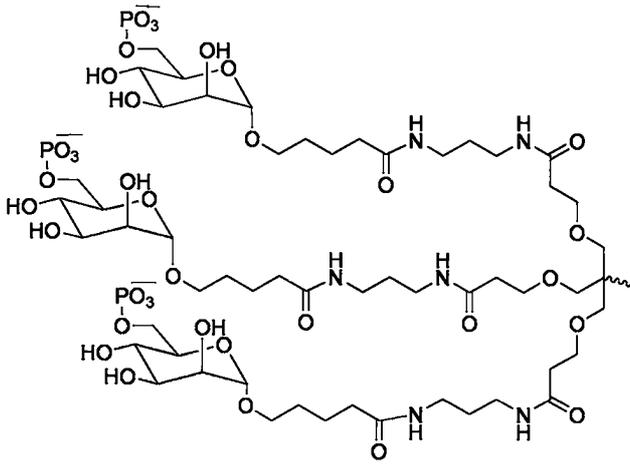


式 VII,

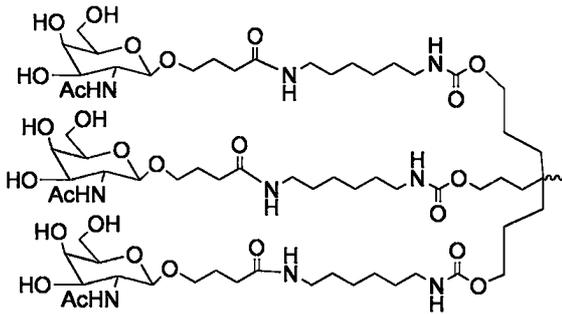


[0728]



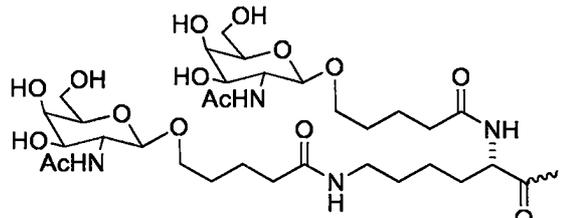


式 XII,

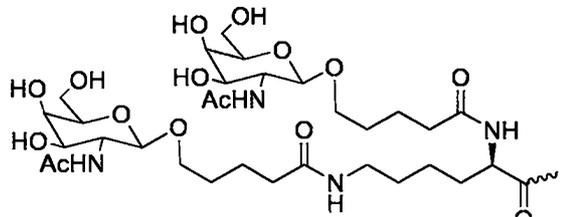


式 XIII,

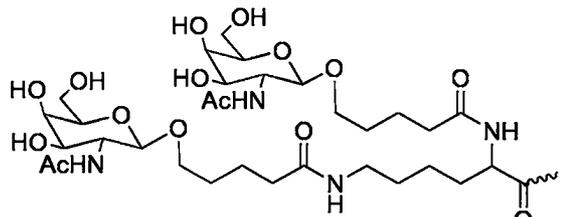
[0729]



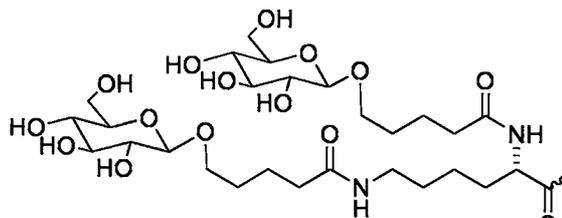
式 XIV,



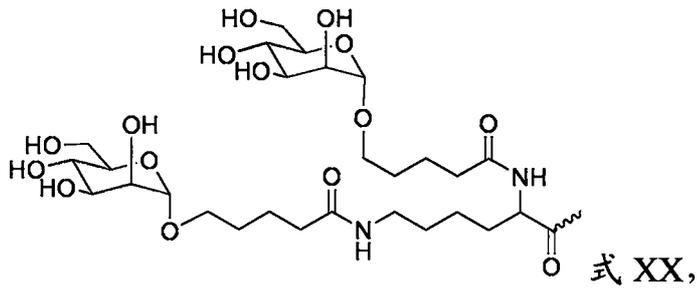
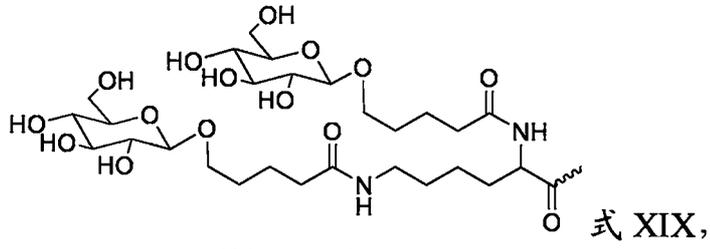
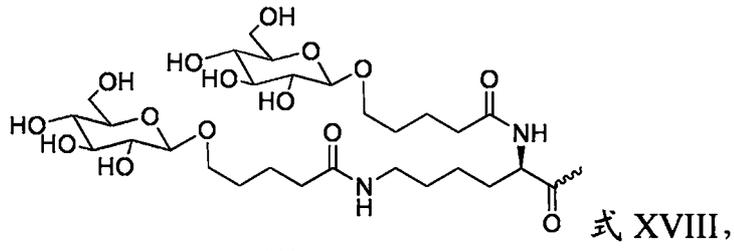
式 XV,



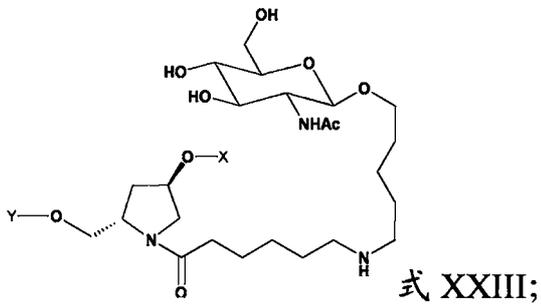
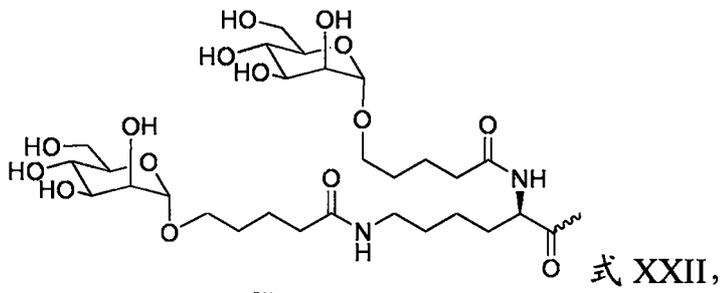
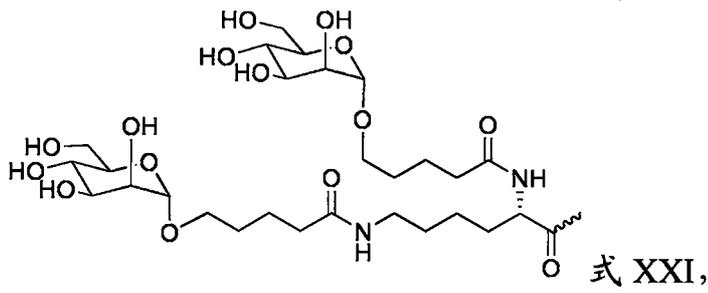
式 XVI,

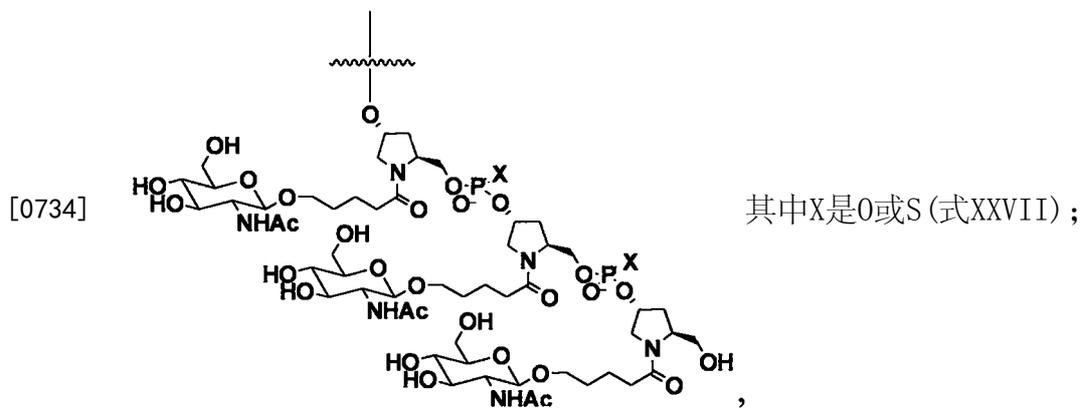
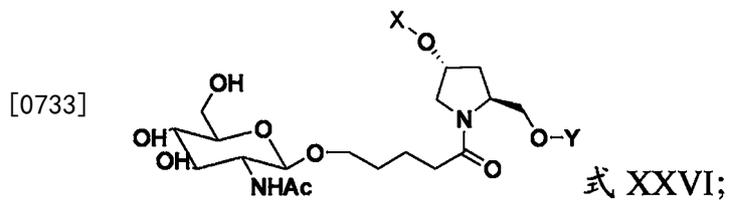
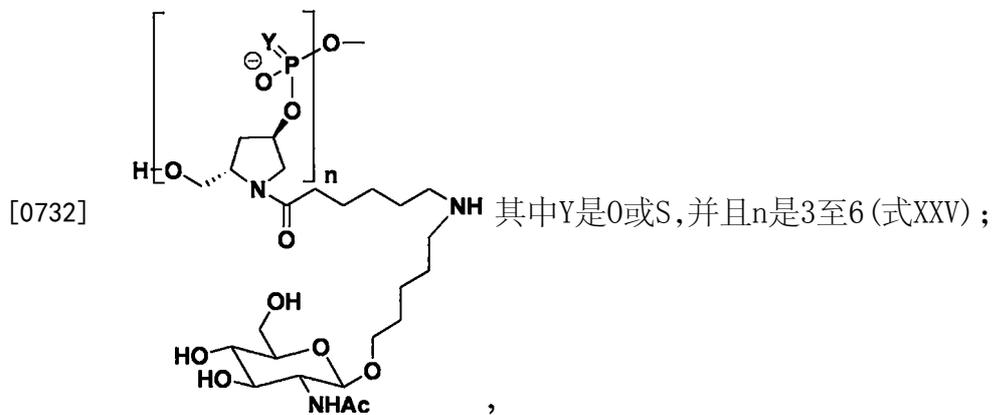
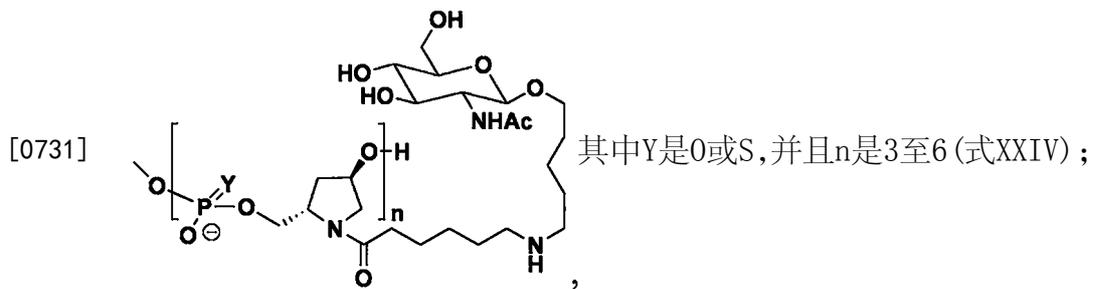


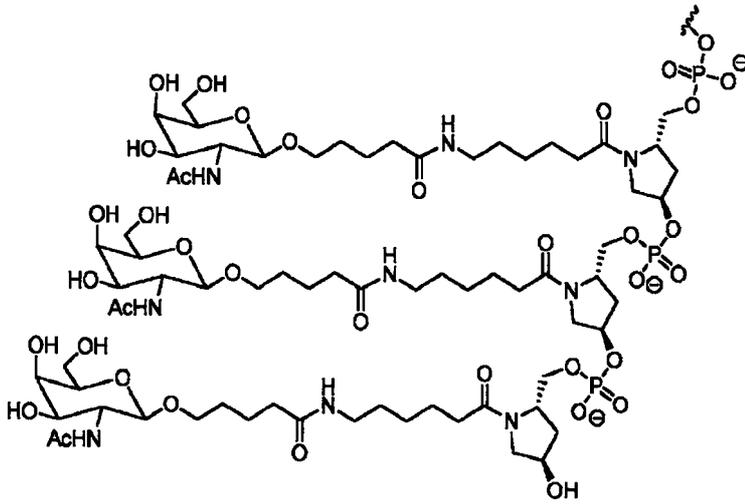
式 XVII,



[0730]

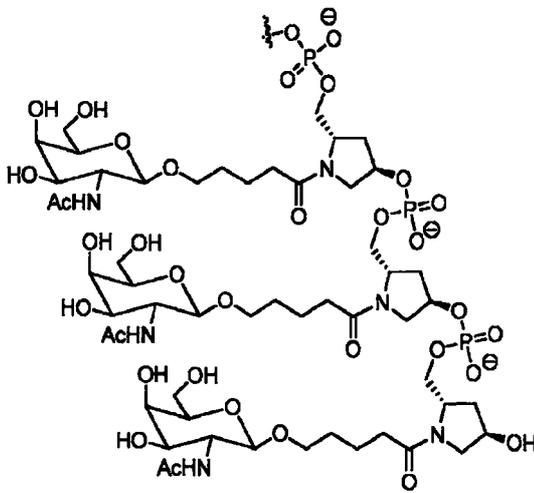




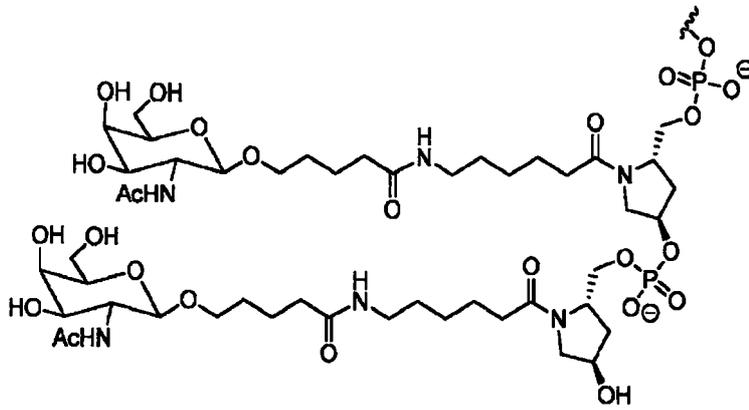


式 XXVIII;

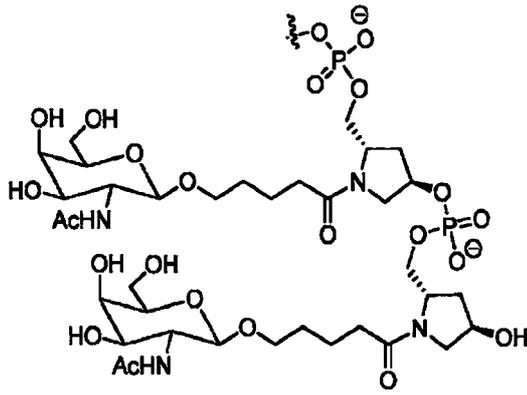
[0735]



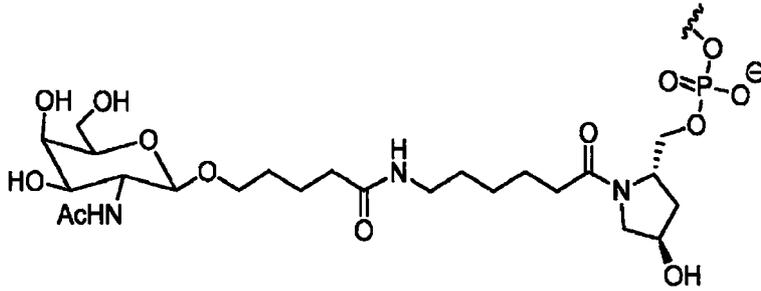
式 XXIX;



式 XXX;

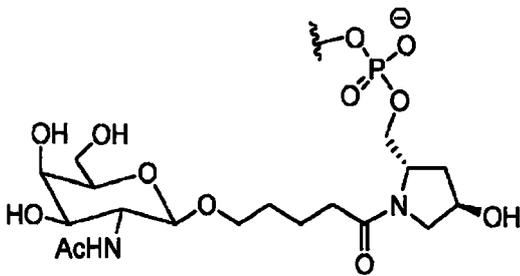


式 XXXI;

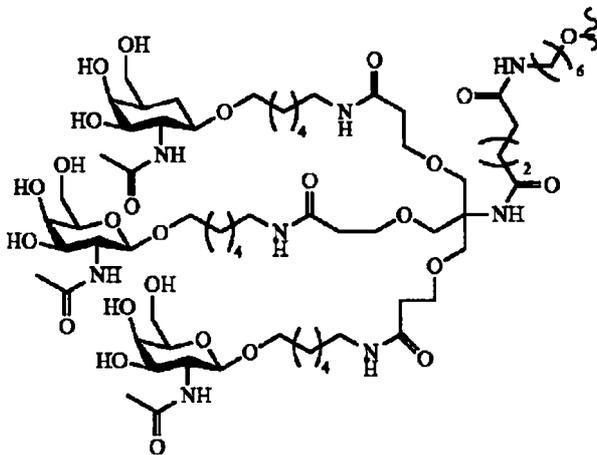


式 XXXII; 和

[0736]

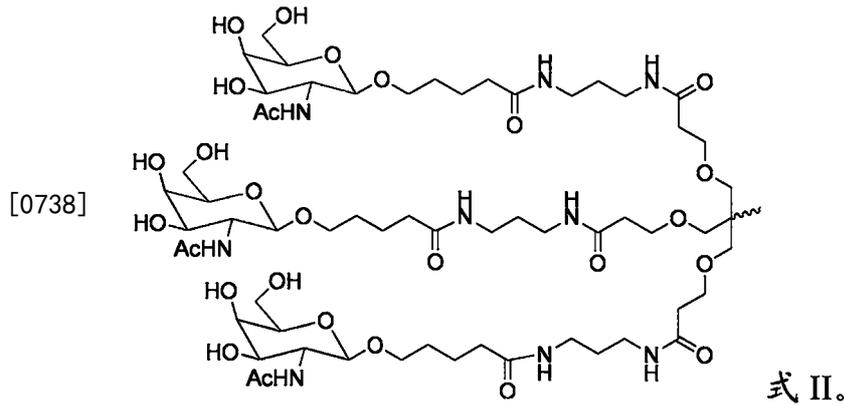


式 XXXIII.

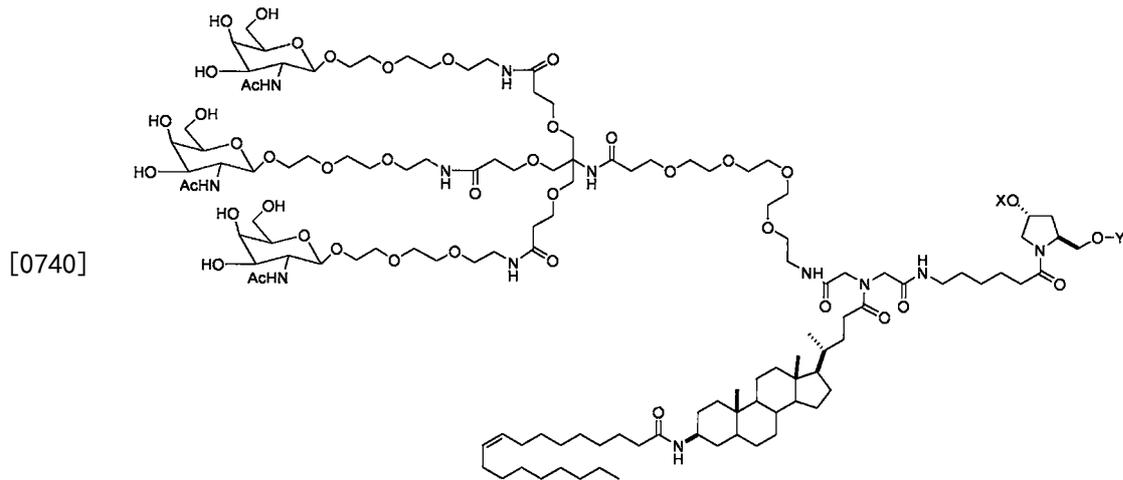


式 XXXIV.

[0737] 在另一个实施方案中,用于本发明的组合物和方法的碳水化合物缀合物是单糖。在一个实施方案中,单糖是N-乙酰基半乳糖胺,如



[0739] 用于本文所描述的实施方案中的另一表示性碳水化合物缀合物包括但不限于：



(式 XXXV),

[0741] 当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

[0742] 在本发明的某些实施方案中,GalNAc或GalNAc衍生物通过单价接头与本发明的iRNA药剂连接。在一些实施方案中,GalNAc或GalNAc衍生物通过二价接头与本发明的iRNA药剂连接。在本发明的又其他实施方案中,GalNAc或GalNAc衍生物通过三价接头与本发明的iRNA药剂连接。

[0743] 在一个实施方案中,本发明的双链RNAi药剂包括与iRNA药剂连接的一种GalNAc或GalNAc衍生物,例如如本文所描述的dsRNA药剂的有义链的3'端或5'端。在另一个实施方案中,本发明的双链RNAi药剂包括多个(例如,2个、3个、4个、5个或6个)GalNAc或GalNAc衍生物,每个所述衍生物通过多个单价接头独立地与双链RNAi药剂的多个核苷酸连接。

[0744] 在一些实施方案中,例如,当本发明的iRNA药剂的两条链是一个较大分子的一部分时,所述较大分子由一条链的3'端和相应的另一条链的5'端之间的不间断核苷酸链连接,形成包括多个未配对核苷酸的发夹环,发夹环内的每个未配对核苷酸可以独立地包括通过单价接头连接的GalNAc或GalNAc衍生物。

[0745] 在一些实施方案中,碳水化合物缀合物进一步包括一个或多个如上文所描述的另外的配体,如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

[0746] 适用于本发明的另外的碳水化合物缀合物(和接头)包含PCT公开第W0 2014/179620号和第W0 2014/179627号中所描述的那些,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

#### [0747] D. 接头

[0748] 在一些实施方案中,本文所描述的缀合物或配体可以通过各种接头与iRNA寡核苷酸连接,所述接头可以是可切割的或不可切割的。

[0749] 术语“接头”或“连接基团”意指连接化合物两部分的有机部分,例如,共价连接化合物的两部分。接头通常包括直接键或原子,如氧或硫;单元,如NR<sub>8</sub>、C(O)、C(O)NH、SO、SO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NH或原子链,如但不限于经取代的或未经取代的烷基、经取代的或未经取代的烯基、经取代的或未经取代的炔基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳烷基、烷基芳烯基、烷基芳炔基、烯基芳烷基、烯基芳烯基、烯基芳炔基、炔基芳烷基、炔基芳烯基、炔基芳炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环烷基、烷基杂环烯基、烷基杂环炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烯基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,所述一个或多个亚甲基可以被以下中断或封端:O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sub>8</sub>)、C(O)、经取代的或未经取代的芳基、经取代的或未经取代的杂芳基、经取代的或未经取代的杂环基;其中R<sub>8</sub>是氢、酰基、脂肪族或经取代的脂肪族。在一个实施方案中,接头为1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子、7-17、8-17、6-16、7-17或8-16个原子。

[0750] 可切割连接基团是在细胞外部充分稳定的连接基团,但其在进入靶细胞之后切割以释放接头保持在一起的两个部分。在优选实施方案中,可切割连接基团在靶细胞中或在第一参考条件下(其可以例如被选择以模拟或表示细胞内条件)的切割是在受试者的血液中或在第二参考条件下(其可以例如被选择以模拟或表示在血液或血清中发现的条件)的切割速度的至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少约100倍。

[0751] 可切割连接基团易受切割剂(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)影响。一般来说,切割剂在细胞内部比在血清或血液中更普遍,或以更高的水平或活性找到。此类降解剂的实例包含:针对特定底物选择的或不具有底物特异性的氧化还原剂,包含例如存在于细胞中的氧化或还原酶或还原剂,如硫醇,所述氧化或还原酶或还原剂可以通过还原降解氧化还原可切割连接基团;酯酶;可以产生酸性环境的核内体或药剂,例如产生pH为五或更低的那些核内体或药剂;可以通过充当广义酸、肽酶(其可以是底物特异性的)和磷酸酶来水解或降解酸可切割连接基团的酶。

[0752] 可切割键基团,如二硫键可能对pH敏感。人血清的pH为7.4,而细胞内pH的平均值略低,范围为约7.1-7.3。核内体具有更酸性的pH,范围为5.5-6.0,并且溶酶体具有甚至更酸性的pH,为约5.0。一些接头将具有可切割连接基团,所述连接基团在优选的pH下切割,由此从细胞内的配体释放阳离子脂质,或释放到细胞的期望的区室中。

[0753] 接头可以包含可由特定酶切割的可切割连接基团。并入到接头中的可切割连接基团的类型可以取决于所靶向的细胞。例如,肝脏靶向配体可以通过包含酯基的接头与阳离子脂质连接。肝细胞富含酯酶,并且因此接头在肝细胞中将比在非富含酯酶的细胞类型中更高效地切割。其他富含酯酶的细胞类型包含肺、肾皮质和睾丸中的细胞。

[0754] 当靶向富含肽酶的细胞类型,如肝细胞和滑膜细胞时,可以使用含有肽键的接头。

[0755] 一般来说,可以通过测试降解剂(或条件)切割候选连接基团的能力来评估候选可切割连接基团的适合性。还将期望测试候选可切割连接基团抵抗在血液或当与其他非靶组织接触时切割的能力。因此,可以确定第一条件与第二条件之间对切割的相对易感性,其中选择第一条件以指示靶细胞中的切割,并且选择第二条件以指示其他组织或生物流体,例如血液或血清中的切割。评估可以在无细胞系统、在细胞、在细胞培养物、在器官或组织培养物或在整只动物中进行。在无细胞或培养条件下进行初始评估并且通过在整只动物中进一步评估来确认可以是有益的。在优选实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的切割是在血液或血清中(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度的至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。

[0756] i. 氧化还原可切割连接基团

[0757] 在一个实施方案中,可切割连接基团是在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连接基团。还原性可切割连接基团的实例是二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定候选可切割连接基团是否是合适的“还原性可切割连接基团”,或例如是否适合与特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以参考本文所描述的方法。例如,可以通过使用本领域已知的试剂与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂一起温育来评估候选物,这模拟将在细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率。候选物还可以在被选择以模拟血液或血清条件的条件下评估。在一个中,候选化合物在血液中被切割至多约10%。在其他实施方案中,有用的候选化合物在细胞中(或在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的降解是在血液(或在被选择以模拟细胞外条件的体外条件下)的切割速度的至少约2倍、4倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或约100倍。候选化合物的切割速率可以使用标准酶动力学测定在被选择以模拟细胞内介质的条件下确定并且与被选择以模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0758] ii. 基于磷酸酯的可切割连接基团

[0759] 在另一个实施方案中,可切割接头包含基于磷酸酯的可切割连接基团。基于磷酸酯的可切割连接基团被降解或水解磷酸酯基团的药剂切割。细胞中使磷酸酯基团切割的药剂的实例为细胞中的酶,如磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-。优选的实施方案是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-。优选实施方案是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评估这些候选物。

[0760] iii. 酸可切割连接基团

[0761] 在另一个实施方案中,可切割接头包括酸可切割连接基团。酸可切割连接基团是在酸性条件下被切割的连接基团。在优选实施方案中,酸可切割连接基团在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的酸性环境中或通过可以充当广义酸的药剂(如酶)被切割。在细胞中,特定低pH细胞器,如核内体和溶酶体可以提供酸可切割连接基团

的切割环境。酸可切割连接基团的实例包括但不限于脞、酯和氨基酸的酯。酸可切割基团可以具有通式  $-C=NN-$ 、 $-C(O)O$  或  $-OC(O)$ 。优选实施方案是与酯的氧连接的碳(烷氧基)为芳基、经取代的烷基或叔烷基,如二甲基戊基或叔丁基。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评估这些候选物。

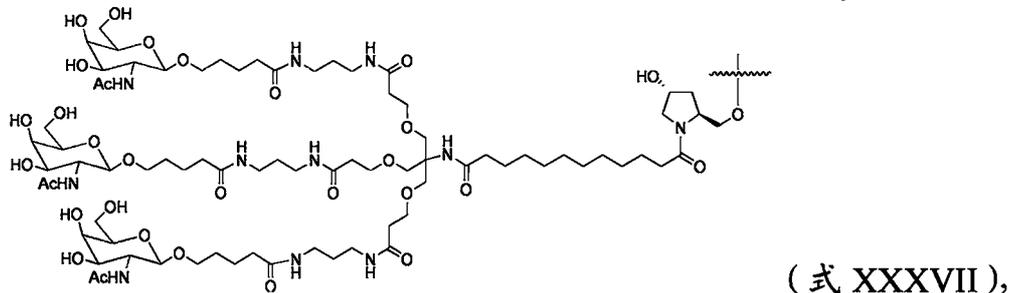
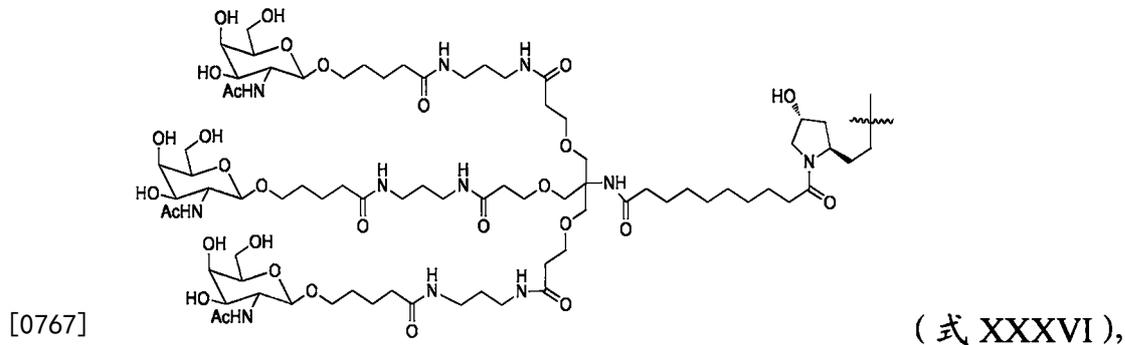
[0762] iv. 基于酯的连接基团

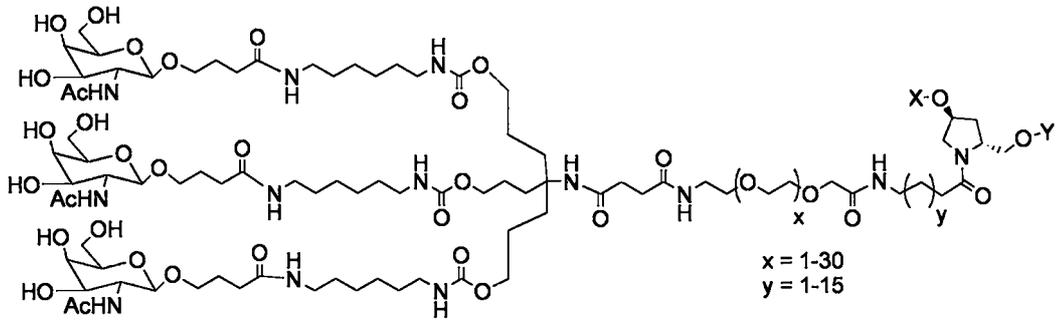
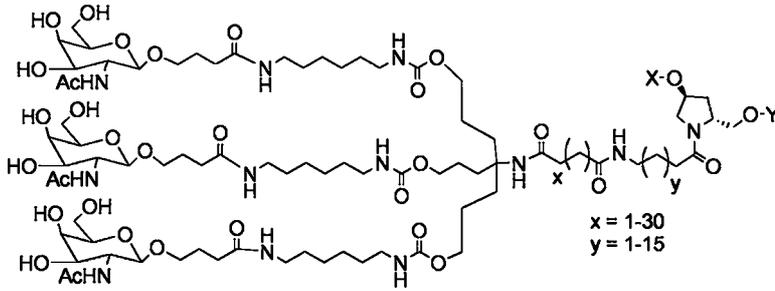
[0763] 在另一个实施方案中,可切割接头包括基于酯的可切割连接基团。基于酯的可切割连接基团通过细胞中的酶,如酯酶和酰胺酶切割。基于酯的可切割连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可切割连接基团具有通式  $-C(O)O-$  或  $-OC(O)-$ 。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评估这些候选物。

[0764] v. 基于肽的切割基团

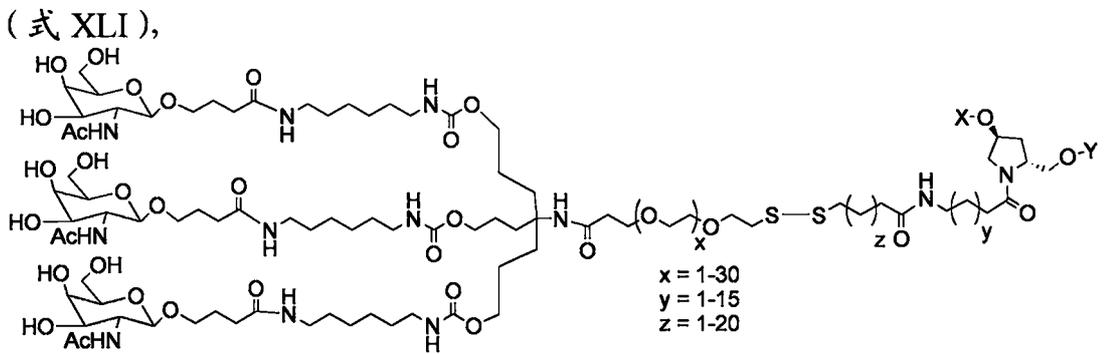
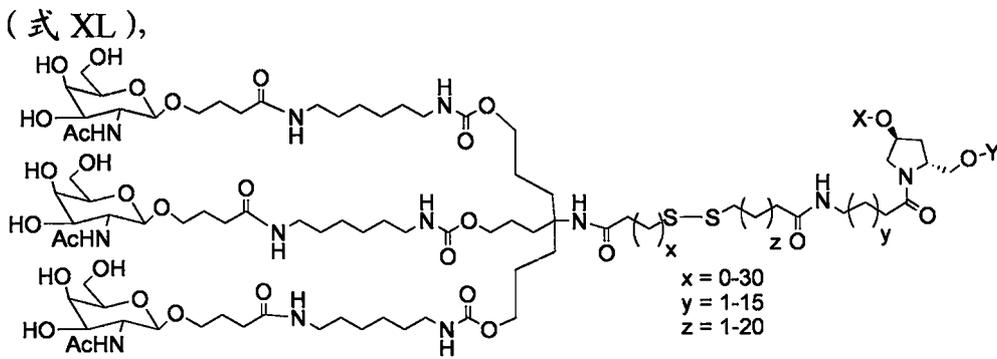
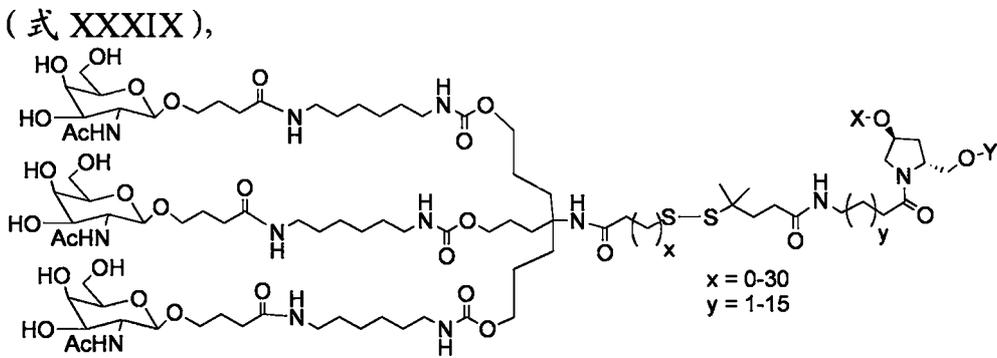
[0765] 在又一个实施方案中,可切割接头包括基于肽的可切割连接基团。基于肽的可切割连接基团通过细胞中的酶,如肽酶和蛋白酶切割。基于肽的可切割连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包含酰胺基  $(-C(O)NH-)$ 。酰胺基可以在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽和蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于在产生肽和蛋白质的氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键)并且不包含整个酰胺官能团。基于肽的可切割连接基团具有通式  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , 其中RA和RB是两个相邻氨基酸的R基团。可以使用与上文所描述的方法类似的方法来评估这些候选物。

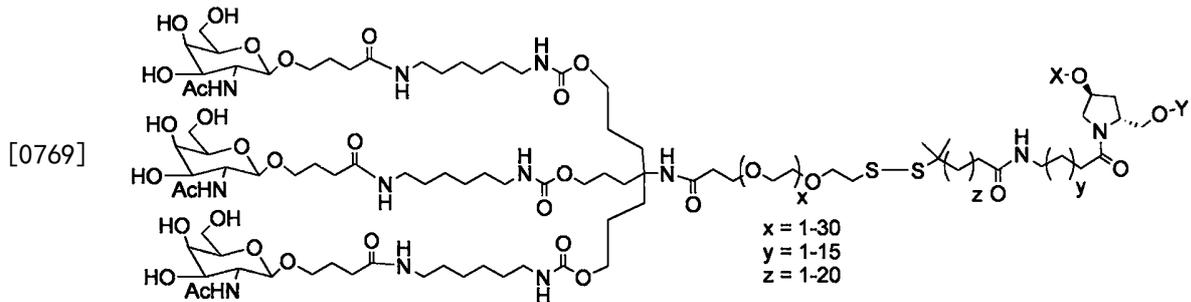
[0766] 在一个实施方案中,本发明的iRNA通过接头与碳水化合物缀合。iRNA碳水化合物缀合物与本发明的组合物和方法的接头的非限制性实例包括但不限于:





[0768]

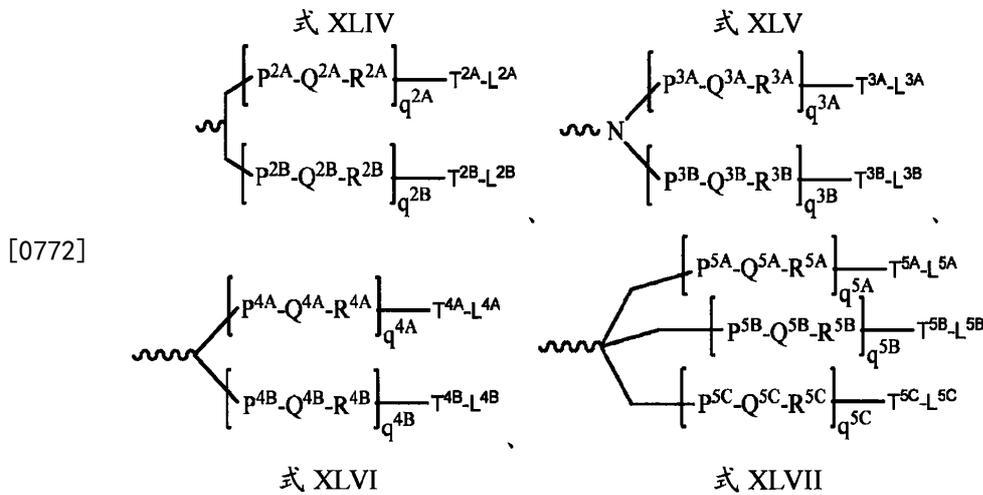




(式 XLIII),当X或Y中的一个为寡核苷酸时,另一个为氢。

[0770] 在本发明的组合物和方法的某些实施方案中,配体为通过二价或三价支链接头连接的一种或多种“GalNAc”(N-乙酰基半乳糖胺)衍生物。

[0771] 在一个实施方案中,本发明的dsRNA与二价或三价支链接头缀合,所述二价或三价支链接头选自自由式XLIV-XLVII中任一者所示的结构组成的群组:



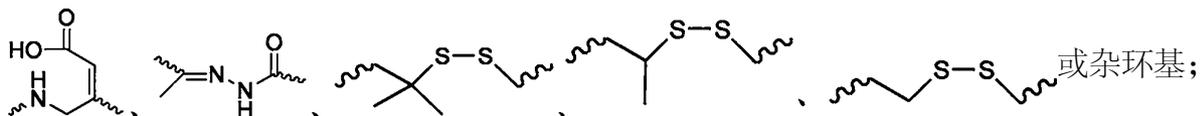
[0773] 其中:

[0774]  $q^{2A}$ 、 $q^{2B}$ 、 $q^{3A}$ 、 $q^{3B}$ 、 $q^{4A}$ 、 $q^{4B}$ 、 $q^{5A}$ 、 $q^{5B}$ 和 $q^{5C}$ 在每次出现时独立地表示0-20,并且其中重复单元可以相同或不同;

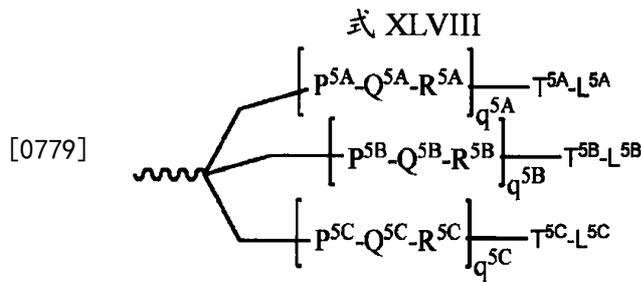
[0775]  $P^{2A}$ 、 $P^{2B}$ 、 $P^{3A}$ 、 $P^{3B}$ 、 $P^{4A}$ 、 $P^{4B}$ 、 $P^{5A}$ 、 $P^{5B}$ 、 $P^{5C}$ 、 $T^{2A}$ 、 $T^{2B}$ 、 $T^{3A}$ 、 $T^{3B}$ 、 $T^{4A}$ 、 $T^{4B}$ 、 $T^{4A}$ 、 $T^{5B}$ 、 $T^{5C}$ 在每次出现时各自独立地是不存在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 $CH_2$ 、 $CH_2NH$ 或 $CH_2O$ ;

[0776]  $Q^{2A}$ 、 $Q^{2B}$ 、 $Q^{3A}$ 、 $Q^{3B}$ 、 $Q^{4A}$ 、 $Q^{4B}$ 、 $Q^{5A}$ 、 $Q^{5B}$ 、 $Q^{5C}$ 在每次出现时独立地是不存在、亚烷基、经取代的亚烷基,其中一个或多个亚甲基可以被以下中的一个或多个中断或封端:O、S、S(O)、 $SO_2$ 、 $N(R^N)$ 、 $C(R')=C(R'')$ 、 $C\equiv C$ 或C(O);

[0777]  $R^{2A}$ 、 $R^{2B}$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{3B}$ 、 $R^{4A}$ 、 $R^{4B}$ 、 $R^{5A}$ 、 $R^{5B}$ 、 $R^{5C}$ 每次出现时各自独立地是不存在、NH、O、S、 $CH_2$ 、C(O)O、C(O)NH、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、CO、 $CH=N-O$ 、



[0778]  $L^{2A}$ 、 $L^{2B}$ 、 $L^{3A}$ 、 $L^{3B}$ 、 $L^{4A}$ 、 $L^{4B}$ 、 $L^{5A}$ 、 $L^{5B}$ 和 $L^{5C}$ 表示配体;即每次出现时各自独立地是单糖(如GalNAc)、二糖、三糖、四糖、寡糖或多糖;并且 $R^a$ 是H或氨基酸侧链。三价缀合的GalNAc衍生物特别适用于与RNAi药剂一起使用以用于抑制靶基因的表达,如式XLVIII的那些:



[0780] 其中L<sup>5A</sup>、L<sup>5B</sup>和L<sup>5C</sup>表示单糖,如GalNAc衍生物。

[0781] 适合的缀合GalNAc衍生物的二价和三价支链接头基团的实例包括但不限于上文所提及的式II、式VII、式XI、式X和式XIII的结构。

[0782] 教导RNA缀合物的制备的表示性美国专利包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717,5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241,5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;8,106,022,这些专利中的每一个的全部内容据此通过引用并入本文。

[0783] 不需要均匀地修饰给定化合物中的所有位置,并且事实上,可以将上述修饰中的多于一个修饰并入单一化合物中或甚至iRNA内的单个核苷处。本发明还包含作为嵌合化合物的iRNA化合物。

[0784] 在本发明的上下文中,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”是iRNA化合物,优选地dsRNA,其含有两个或更多个化学上不同的区域,每个区域由至少一个单体单元构成,即在dsRNA化合物的情况下的核苷酸。这些iRNA通常含有至少一个区,其中RNA被修饰以赋予iRNA增加的对核酸酶降解的抗性、增加的细胞摄取和/或增加的对靶核酸的结合亲和力。iRNA的另外的区可以作为能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。举例来说,RNase H是细胞核酸内切酶,所述细胞核酸内切酶切割RNA:DNA双链体的RNA链。因此,RNase H的激活使RNA靶标切割,由此大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交到同一靶标区的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,当使用嵌合dsRNA时,使用更短的iRNA通常可以获得相当的结果。可以通过凝胶电泳和必要时本领域已知的相关核酸杂交技术常规检测RNA靶标的切割。

[0785] 在某些情况下,iRNA的RNA可以被非配体基团修饰。许多非配体分子已与iRNA缀合以增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且进行此类缀合的程序可在科学文献中获得。此类非配体部分已经包含脂质部分,如胆固醇(Kubo,T.等人,《生物化学和生物物理研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》,2007,365(1):54-61;Letsinger等人,《美国国家科学院院刊》,1989,86:6553),胆酸(Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报》,1994,4:1053),硫醚,例如,己基-S-三苯基甲硫醇(Manoharan等人,《纽约科学院年鉴》,1992,660:306;Manoharan等人,《生物有机与药物化学快报》,1993,3:2765),硫代胆固醇(Oberhauser等人,《核酸研究》,1992,20:533),脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-

Behmoaras等人,《欧洲分子生物学组织杂志》,1991,10:111;Kabanov等人,《FEBS快报》,1990,259:327;Svinarchuk等人,《生物化学》,1993,75:49),磷脂,例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸酯(Marnoharan等人,《四面体快报》,1995,36:3651;Shea等人,《核酸研究》,1990,18:3777),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,《核苷与核苷酸》,1995,14:969)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,《四面体快报》,1995,36:3651),棕榈基部分(Mishra等人,《生物化学与生物物理学报》,1995,1264:229),或十八胺或己基氨基-羰基-羰基氧基胆固醇部分(Crooke等人,《药理和实验治疗学杂志》,1996,277:923)。上面列出了教导制备此类RNA缀合物的表示性美国专利。典型的缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置处具有氨基接头的RNA。随后使用适当偶联试剂或激活试剂使氨基与所缀合的分子反应。缀合反应可以在RNA仍与固相载体结合的情况下或在RNA切割之后在溶液相中进行。通过HPLC纯化RNA缀合物通常产生纯缀合物。

#### [0786] V. 本发明的iRNA的递送

[0787] 将本发明的iRNA递送到细胞,例如受试者(例如人受试者(例如,有此需要的受试者,例如具有脂质代谢紊乱的受试者)体内的细胞可以通过多种不同方式实现。例如,可以通过在体外或体内使细胞与本发明的iRNA接触来进行递送。还可以通过向受试者施用包括iRNA的组合物(例如,dsRNA)直接进行体内递送。可替代地,体内递送可以通过施用一种或多种编码和引导iRNA的表达的载体间接进行。下文将进一步讨论这些替代方案。

[0788] 通常,任何递送核酸分子的方法(体外或体内)都可以适于与本发明的iRNA一起使用(参见例如,Akhtar S.和Julian RL.(1992)《细胞生物学趋势(Trends Cell.Biol.)》2(5):139-144和W094/02595,所述文献通过引用以其整体并入本文)。对于体内递送,为递送iRNA分子需要考虑的因素包含例如,递送的分子的生物稳定性、非特异性效应的预防以及递送的分子在靶组织中的积累。可以通过局部施用,例如通过直接注射或植入到组织中或局部施用制剂来最小化RNAi的非特异性效应。对治疗位点的局部施用使药剂的局部浓度最大化,限制药剂暴露于全身组织(所述全身组织可能被药剂以其他方式伤害或可能降解药剂),并且允许施用较低的总剂量的RNAi分子。若干研究表明,当局部施用iRNA时,基因产物的成功敲低。例如,在食蟹猴中通过玻璃体内注射(Tolentino,MJ.等人(2004)《视网膜(Retina)》24:132-138)和在小鼠中通过视网膜下注射(Reich,SJ.等人(2003)《分子视觉(Mol.Vis.)》9:210-216)眼内递送VEGF dsRNA两者均表明在年龄相关性黄斑变性的实验模型中预防新生血管形成。另外,在小鼠中直接瘤内注射dsRNA减小了肿瘤体积(Pille,J.等人(2005)《分子疗法(Mol.Ther.)》11:267-274),并且可以延长荷瘤小鼠的存活期(Kim,WJ.等人(2006)《分子疗法》14:343-350;Li,S.等人,(2007)《分子疗法》15:515-523)。RNA干扰也显示出通过直接注射局部递送到CNS的成功(Dorn,G.等人,(2004)《核酸(Nucleic Acids)》32:e49;Tan,PH.等人,(2005)《基因疗法》12:59-66;Makimura,H.等人,(2002)《BMC神经科学(BMC Neurosci.)》3:18;Shishkina,GT.等人,(2004)《神经科学(Neuroscience)》129:521-528;Thakker,ER.等人,(2004)《美国国家科学院院刊》101:17270-17275;Akaneya,Y.等人,(2005)《神经生理学杂志(J.Neurophysiol.)》93:594-602),并且通过鼻内施用到达肺部(Howard,KA.等人,(2006)《分子疗法》14:476-484;Zhang,X.等人,(2004)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》279:10677-10684;Bitko,V.等人,(2005)《自然医学(Nat.Med.)》11:50-55)。为了全身地施用iRNA以治疗疾病,可以修饰RNA或可替代地使用药

物递送系统递送;这两种方法都用于防止dsRNA在体内被内切和外切核酸酶快速降解。RNA或药物载剂的修饰也可以允许iRNA组合物靶向靶组织,并且避免不期望的脱靶效应。iRNA分子可以通过与亲脂性基团(如胆固醇)的化学缀合进行修饰,以增强细胞摄取并防止降解。例如,将针对与亲脂性胆固醇部分缀合的ApoB的iRNA被全身注射到小鼠体内,并且导致肝脏和空肠两者中apoB mRNA的敲低(Soutschek, J.等人(2004)《自然》432:173-178)。在前列腺癌的小鼠模型中,iRNA与适体的缀合已经被证明可抑制肿瘤生长并介导肿瘤消退(McNamara, JO.等人], (2006)《自然生物技术(Nat. Biotechnol.)》24:1005-1015)。在替代性实施方案中,可以使用药物递送系统(如纳米颗粒、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统)递送iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)iRNA分子的结合并且还在带负电荷的细胞膜增强相互作用以允许细胞高效地摄取iRNA。阳离子脂质、树状物或聚合物可以结合至iRNA或被诱导以形成包裹iRNA的囊泡或胶束(参见例如, Kim SH.等人(2008)《控释杂志(Journal of Controlled Release)》129(2):107-116)。当全身施用,囊泡或胶束的形成进一步防止iRNA的降解。用于制备和施用阳离子iRNA复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见例如, Sorensen, DR., 等人, (2003)《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》327:761-766; Verma, UN. 等人, (2003)《临床癌症研究(Clin. Cancer Res.)》9:1291-1300; Arnold, AS等人, (2007)《高血压杂志(J. Hypertens.)》25:197-205, 所述文献通过引用以其整体并入本文)。可用于全身递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(Sorensen, DR. 等人(2003), 同上; Verma, UN. 等人, (2003), 同上), Oligofectamine, “固体核酸脂质颗粒(solid nucleic acid lipid particles)”(Zimmermann, TS. 等人, (2006)《自然》441:111-114), 心磷脂(Chien, PY. 等人, (2005)《癌症基因疗法》12:321-328; Pal, A. 等人, (2005)《国际肿瘤学杂志(Int. J. Oncol.)》26:1087-1091)、聚乙烯亚胺(Bonnet ME. 等人(2008)《药学研究(Pharm. Res.)》8月16日电子版先于印刷版; Aigner, A. (2006)《生物医学与生物技术杂志(J. Biomed. Biotechnol.)》71659), Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu, S. (2006)《分子药理学(Mol. Pharm.)》3:472-487)以及聚酰胺型胺(Tomalina, DA. 等人(2007)《生化学会会刊(Biochem. Soc. Trans.)》35:61-67; Yoo, H. 等人(1999)《药学研究》16:1799-1804)。在一些实施方案中,iRNA与环糊精形成用于全身施用的复合物。施用方法以及iRNA和环糊精的药物组合物可以在美国专利第7,427,605号中找到,所述美国专利通过引用以其整体并入本文。

[0789] A. 本发明的载体编码的iRNA

[0790] 靶向CIDEB基因的iRNA可以从插入到DNA或RNA载体中的转录单元表达(参见例如, Couture, A等人,《TIG.》(1996), 12:5-10; Skillern, A. 等人, 国际PCT公开第WO 00/22113号, Conrad, 国际PCT公开第WO 00/22114号, 以及Conrad, 美国专利第6,054,299号)。表达可以是瞬时的(数小时至数周的数量级)或持续的(数周至数月或更长), 这取决于所使用的特定构建体和靶组织或细胞类型。这些转基因可以作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入, 其可以是整合或非整合载体。还可以构建转基因以允许其作为染色体外质粒遗传(Gassmann等人, (1995)《美国国家科学院院刊》92:1292)。

[0791] iRNA的一条或多条单独的链可以从表达载体上的启动子转录。在要表达两条单独的链以产生例如dsRNA的情况下, 可以将两个单独的表达载体共同引入(例如, 通过转染或感染)到靶细胞中。可替代地, dsRNA的每个单独的链都可以通过启动子转录, 这两个启动子

都位于同一表达质粒上。在一个实施方案中,dsRNA被表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸,使得dsRNA具有茎和环结构。

[0792] iRNA表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体,优选地与脊椎动物细胞相容的那些表达载体,可以用于产生用于表达如本文所描述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域众所周知的并且可从许多商业来源获得。通常,提供了此类载体,其含有方便插入所需核酸区段的限制性位点。iRNA表达载体的递送可以是全身的,如通过静脉内或肌内施用,通过施用从患者体内移植的靶细胞,然后重新引入患者体内,或通过允许引入期望的靶细胞的任何其他方式。

[0793] 可以与本文所描述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不限于(a)腺病毒载体;(b)逆转录病毒载体,包括但不限于慢病毒载体、莫罗尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus)等;(c)腺相关病毒载体;(d)单纯性疱疹病毒载体;(e)SV 40载体;(f)多瘤病毒载体;(g)乳头瘤病毒载体;(h)小核糖核酸病毒载体;(i)痘病毒载体,如正痘(例如,牛痘病毒载体)或禽痘(例如,金丝雀痘或禽痘);以及(i)辅助依赖性或非腺病毒。复制缺陷病毒也可能是有利的。不同的载体将或不会被并入到细胞的基因组中。如果期望,构建体可以包含用于转染的病毒序列。可替代地,构建体可以被并入能够附加型复制的载体中,例如EPV和EBV载体。用于重组表达iRNA的构建体将通常需要调节元件,例如启动子、增强子等,以确保iRNA在靶细胞中的表达。对于载体和构建体要考虑的其他方面是本领域已知的。

#### [0794] VI. 本发明的药物组合物

[0795] 本发明还包含药物组合物和调配物,所述药物组合物和调配物包含本发明的iRNA。因此,在一个实施方案中,本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含双链核糖核酸(dsRNA)药剂,所述双链核糖核酸(dsRNA)药剂抑制细胞如肝细胞中细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEB)的表达,其中dsRNA药剂包含有义链和反义链,其中所述有义链包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,dsRNA药剂包含有义链和反义链,其中所述有义链包含来自SEQ ID NO:1的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸,并且所述反义链包含来自SEQ ID NO:2的核苷酸序列的至少15个连续核苷酸。

[0796] 在另一个实施方案中,本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含抑制细胞(例如肝细胞)中CIDEB的表达的dsRNA药剂,其中所述dsRNA药剂包含有义链和反义链,所述反义链包含互补区,所述互补区包含与表3至表6中列出的反义序列中的任一者相差不超过1、2或3个核苷酸的至少15个连续核苷酸;和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,dsRNA药剂包含有义链和反义链,所述反义链包含互补区,所述互补区包含来自表3至表6中列出的反义序列中的任一者的至少15个连续核苷酸。

[0797] 含有本发明的iRNA的药物组合物可用于治疗与CIDEB基因的表达或活性相关的疾病或病症,例如,慢性炎症性疾病。

[0798] 此类药物组合物基于递送模式调配。一个实例是被调配成用于经由肠胃外递送(例如,通过静脉内(IV)、肌内(IM)或用于皮下递送)进行全身施用的组合物。另一个实例是被调配呈用于例如通过输注到肝脏中,例如通过连续泵输注直接递送到肝脏中的组合物。本发明的药物组合物可以以足以抑制CIDEB基因的表达的剂量施用。通常,本发明的iRNA的

合适剂量将在约0.001至约200.0毫克/千克受体体重/天的范围内,通常在约1至50毫克/千克体重/天的范围内。通常,本发明的iRNA的合适剂量将在约0.1mg/kg至约5.0mg/kg,优选地约0.3mg/kg和约3.0mg/kg的范围内。

[0799] 重复剂量方案可以包括在定期基础上施用治疗量的iRNA,如每隔一天一次至每年一次。在某些实施方案中,iRNA约每周一次、每7-10天一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次、每10周一次、每11周一次、每12周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次(每季度一次)、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。

[0800] 在初始治疗方案之后,可以在不太频繁的基础上施用治疗。

[0801] 本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排,这些因素包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的总体健康和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的组合物对受试者进行的治疗可以包含单次治疗或系列治疗。本发明所涵盖的单独的iRNA的有效剂量和体内半衰期的估计可以使用常规方法或基于使用合适的动物模型的体内测试来进行,如本文其他地方描述的。

[0802] 小鼠遗传学的进步已经产生了许多用于研究各种人类疾病的小鼠模型,所述人类疾病例如将受益于CIDEB的表达的减少的CIDEB相关疾病、病症或病况。此类模型可以用于iRNA的体内测试,以及用于确定治疗有效剂量。此类模型可以用于iRNA的体内测试,以及用于确定治疗有效剂量。合适的小鼠模型是本领域已知的,并且包括例如饲喂高脂肪饮食(HFD;也称为西方饮食),甲硫氨酸-胆碱缺乏症(MCD)饮食,或高-脂肪(15%),高-胆固醇(1%)饮食(HFHC)的小鼠和大鼠;肥胖(ob/ob)小鼠,其含有肥胖(ob)基因中的突变(Wiegman等人,(2003)《糖尿病》,52:1081-1089);含有LDL受体的纯合敲除的小鼠(LDLR-/-小鼠;Ishibashi等人,(1993)《临床调查杂志(J Clin Invest)》92(2):883-893);饮食诱导的动脉粥样硬化小鼠模型(Ishida等人,(1991)《脂质研究杂志(J.Lipid.Res.)》,32:559-568);杂合脂蛋白脂肪酶敲除小鼠模型(Weistock等人,(1995)《临床调查杂志》96(6):2555-2568);饲喂胆碱缺乏型L-氨基酸定义的高脂肪饮食(CDAHFD)的小鼠和大鼠(Matsumoto等人,(2013)《国际实验病理学杂志(Int.J.Exp.Path)》94:93-103);饲喂高反式脂肪胆固醇饮食(HTF-C)的小鼠和大鼠(Clapper等人,(2013)《美国生理学杂志-胃肠和肝脏生理学(Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol)》.305:G483-G495);饲喂高脂肪、高胆固醇、胆盐饮食(HF/HC/BS)的小鼠和大鼠(Matsuzawa等人,(2007)《肝脏病学(Hepatology)》46:1392-1403);以及饲喂高脂肪饮食+果糖(30%)水的小鼠和大鼠(Softic等人,(2018)《临床调查杂志》128(1)-85-96)。

[0803] 取决于期望局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域,可以以许多方式施用本发明的药物组合物。施用可以是局部的(例如,通过透皮贴剂)、肺部的(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包含通过雾化器);气管内的、鼻内的、表皮和透皮的、口服的或肠胃外的。肠胃外施用包含静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;皮下(例如,通过植入的装置);或颅内(例如,通过实质内、鞘内或心室内施用)。

[0804] iRNA可以以靶向特定细胞或组织(例如,肝脏(例如,肝脏的肝细胞))的方式递送。

[0805] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物适合于肌内施用于受试者。在其他实施方案中,本发明的药物组合物适合于静脉内施用于受试者。在本发明的一些实施方案中,本

发明的药物组合物适合于例如使用29g或30g针皮下施用于受试者。

[0806] 本发明的药物组合物可以包括在未缓冲的溶液(例如盐水或水)中,或者在缓冲的溶液中的本发明的RNAi药剂,所述缓冲的溶液例如包含乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合的缓冲溶液。

[0807] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物,例如如适合于皮下施用的组合物,包含在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的本发明的RNAi药剂。合适浓度的PBS包括例如1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、6.5mM、7mM、7.5.mM、9mM、8.5mM、9mM、9.5mM或约10mM PBS。在本发明的一个实施方案中,本发明的药物组合物包含溶解于约5mM PBS(例如0.64mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4.36mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 85mM  $\text{NaCl}$ )的溶液中的本发明的RNAi药剂。上述范围和值中间的值也旨在是本发明的一部分。另外,旨在包括使用任何上述值的组合作为上限和/或下限的值的范围。

[0808] 本发明的药物组合物的pH可以为约5.0至约8.0、约5.5至约8.0、约6.0至约8.0、约6.5至约8.0、约7.0至约8.0、约5.0至约7.5、约5.5至约7.5、约6.0至约7.5、约6.5至约7.5、约5.0至约7.2、约5.25至约7.2、约5.5至约7.2、约5.75至约7.2、约6.0至约7.2、约6.5至约7.2或约6.8至约7.2。上述范围和值中间的范围和值也旨在是本发明的一部分。

[0809] 本发明的药物组合物的重量克摩尔浓度(osmolality)可以适合于皮下施用,例如不超过约400mOsm/kg,例如50至400mOsm/kg、75至400mOsm/kg、100至400mOsm/kg、125至400mOsm/kg、150至400mOsm/kg、175至400mOsm/kg、200至400mOsm/kg、250至400mOsm/kg、300至400mOsm/kg、50至375mOsm/kg、75至375mOsm/kg、100至375mOsm/kg、125至375mOsm/kg、150至375mOsm/kg、175至375mOsm/kg、200至375mOsm/kg、250至375mOsm/kg、300至375mOsm/kg、50至350mOsm/kg、75至350mOsm/kg、100至350mOsm/kg、125至350mOsm/kg、150至350mOsm/kg、175至350mOsm/kg、200至350mOsm/kg、250至350mOsm/kg、50至325mOsm/kg、75至325mOsm/kg、100至325mOsm/kg、125至325mOsm/kg、150至325mOsm/kg、175至325mOsm/kg、200至325mOsm/kg、250至325mOsm/kg、300至325mOsm/kg、300至350mOsm/kg、50至300mOsm/kg、75至300mOsm/kg、100至300mOsm/kg、125至300mOsm/kg、150至300mOsm/kg、175至300mOsm/kg、200至300mOsm/kg、250至300、50至250mOsm/kg、75至250mOsm/kg、100至250mOsm/kg、125至250mOsm/kg、150至250mOsm/kg、175至350mOsm/kg、200至250mOsm/kg,例如约50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、295、300、305、310、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395或约400mOsm/kg。上述范围和值中间的范围和值也旨在是本发明的一部分。

[0810] 包含本发明的RNAi药剂的本发明的药物组合物可以存在于包含约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或约2.0mL的药物组合物的小瓶中。本发明的药物组合物中RNAi药剂的浓度可以为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、130、125、130、135、140、145、150、175、180、185、190、195、200、205、210、215、230、225、230、235、240、245、250、275、280、285、290、295、300、305、310、315、330、325、330、335、340、345、350、375、380、385、390、395、400、405、410、415、430、425、430、435、440、445、450、475、480、485、490、495或约500mg/mL。在一个实施方案中,

本发明的药物组合物中RNAi药剂的浓度为约100mg/mL。上述范围和值中间的值也旨在是本发明的一部分。

[0811] 本发明的药物组合物可以包含游离酸形式的本发明的dsRNA药剂。在本发明的其他实施方案中,本发明的药物组合物可以包含盐形式(例如钠盐形式)的本发明的dsRNA药剂。在某些实施方案中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的基本上所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。其中基本上所有的磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键都具有钠抗衡离子的药剂包含不超过5个、4个、3个、2个或1个不具有钠抗衡离子的磷酸二酯键和/或硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,当本发明的dsRNA药剂为钠盐形式时,钠离子作为药剂中存在的所有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯基团的抗衡离子存在于药剂中。

[0812] 用于局部施用的药物组合物和调配物可以包含透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体以及粉末。常规的药物载体、水性基质、粉末或油性基质、增稠剂等可以是必要的或期望的。带涂层的避孕套、手套等也可以是有用的。合适的局部调配物包含其中本发明特征的iRNA与局部递送剂,如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些调配物。合适的脂质和脂质体包括中性的(例如,二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、负性的(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子的(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明特征的iRNA可以被封装在脂质体中或者可以与其形成复合物,具体地与阳离子脂质体形成复合物。可替代地,iRNA可以与脂质复合,具体地与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或C<sub>1-20</sub>烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。局部调配物详细描述于美国专利第6,747,014号中,所述美国专利通过引用并入本文。

[0813] A. 包括膜分子组装体的iRNA调配物

[0814] 用于本发明的组合物和方法的iRNA可以被调配成以膜分子组装体(例如,脂质体或胶束)形式递送。除了微乳液外,还有许多有组织的表面活性剂结构已经被研究并用于药物的调配。这些包含单层、胶束、双层和囊泡。囊泡(如脂质体)由于其特异性和从药物递送的角度提供的的作用持续时间,引起了极大的关注。如本公开中所使用的,术语“脂质体”意指由排列成一个或多个球形双层的两亲性脂质构成的囊泡。

[0815] 脂质体包括具有由亲脂性材料形成的膜和水性内部的单层或多层囊泡。水性部分包含待递送的组合物(例如,iRNA)。亲脂性材料将水性内部与水性外部分离,所述水性外部通常不包含iRNA组合物,尽管在一些实例中其可以。阳离子脂质体具有能够与细胞壁融合的优势。非阳离子脂质体尽管不能够一样有效地与细胞壁融合,但是被体内巨噬细胞摄取。

[0816] 为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适当的透皮梯度的影响下穿过一系列直径小于50nm的细孔。因此,期望使用可高度变形并且能够穿过此类细孔的脂质体。

[0817] 脂质体可用于将活性成分转移和递送到作用位点。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜,因此当脂质体被应用至组织时,脂质体开始与细胞膜合并,并且随着脂质体的合并和细胞进展,脂质体内容物被排空进入细胞,在所述细胞中活性剂可以起作用。

[0818] 脂质体调配物作为许多药物的递送方式一直是广泛研究的焦点。越来越多的证据表明,对于局部施用,脂质体呈现出超过其他调配物的若干个优点。此类优点包含减少了与施用的药物的高全身吸收相关的副作用,增加了施用的药物在期望的靶标处的积聚,以及将多种药物(亲水性和疏水性)施用到皮肤中的能力。

[0819] 若干报道详细介绍了脂质体将包含高分子量DNA的药剂递送到皮肤中的能力。包含镇痛剂、抗体、激素和高分子量DNA的化合物已被施用于皮肤。大多数应用导致靶向上表皮。

[0820] 含有iRNA药剂的脂质体可以通过多种方法制备。在一个实例中,脂质体的脂质组分溶解在洗涤剂中,从而与脂质组分形成胶束。例如,脂质组分可以是两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。洗涤剂可以具有高临界胶束浓度,并且可以是非离子的。示例性洗涤剂包含胆酸盐、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和肌氨酸月桂酰酯。然后将iRNA药剂制剂添加到包含脂质组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与iRNA药剂相互作用,并且在iRNA药剂周围缩合以形成脂质体。在缩合后,例如通过透析去除洗涤剂,以产生iRNA药剂的脂质体制剂。

[0821] 如果需要,可以在缩合反应期间,例如通过控制添加来添加有助于缩合的载剂化合物。例如,载剂化合物可以是除核酸以外的聚合物(例如,精胺或亚精胺)。也可以调节pH以利于缩合。

[0822] 在例如W0 96/37194中进一步描述了用于产生稳定的多核苷酸递送媒剂的方法,所述媒剂合并了多核苷酸/阳离子脂质复合物作为递送媒剂的结构组分,所述文献的全部内容通过引用并入本文。脂质体形成也可以包含以下中描述的示例性方法的一个或多个方面: Felgner, P.L. 等人《美国国家科学院院刊》8:7413-7417, 1987; 美国专利第4,897,355号; 美国专利第5,171,678号; Bangham等人,《分子生物学》,23:238, 1965; Olson等人,《生物化学Biophys. Acta》557:9, 1979; Szoka等人,《美国国家科学院院刊》75:4194, 1978; Mayhew等人,《生物化学与生物物理学报》775:169, 1984; Kim等人《生物化学与生物物理学报Acta》728:339, 1983; 以及Fukunaga等人《内分泌学(Endocrinol.)》115:757, 1984。用于制备用作递送媒剂的合适大小的脂质聚集体的常用技术包含超声处理和冻融加挤压(参见例如, Mayer等人,《生物化学与生物物理学报》858:161, 1986)。当期望持续较小(50nm至200nm)且相对均匀的聚集体时,可以使用微流体化(Mayhew等人,《生物化学与生物物理学报》775:169, 1984)。这些方法很容易适用于将iRNA药剂制剂包装到脂质体中。

[0823] 脂质体分为两个广泛的类别。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的DNA分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电荷的DNA/脂质体复合物结合至带负电荷的细胞表面并且内化于内体中。由于核内体中的酸性pH,脂质体破裂,从而将其内容物释放到细胞质中(Wang等人,《生物化学和生物物理研究通讯》,1987, 147, 980-985)。

[0824] 对pH敏感的或带负电荷的脂质体包埋DNA而不是与其复合。由于DNA和脂质均带有类似的电荷,所以会出现排斥而非复合物形成。然而,一些DNA包埋于这些脂质体的水性内部内。对pH敏感的脂质体已被用于将编码胸苷激酶基因的DNA递送到培养中的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou等人,《控制释放杂志(Journal of Controlled Release)》,1992, 19, 269-274)。

[0825] 一种主要类型的脂质体组合物包含除天然来源的磷脂酰胆碱之外的磷脂。中性脂质体组合物例如可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成,而阴离子融合脂质体主要由二油

酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 形成。另一种类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱 (PC) 形成, 例如大豆 PC 和鸡蛋 PC。另一种类型由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物形成。

[0826] 在体外和体内将脂质体引入到细胞中的其他方法的实例包含美国专利第 5,283,185 号和美国专利第 5,171,678 号; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, 《生物化学杂志》269:2550, 1994; Nabel, 《国家科学院院刊》90:11307, 1993; Nabel, 《人类基因疗法 (Human Gene Ther.)》3:649, 1992; Gershon, 《生物化学杂志 (Biochem.)》32:7143, 1993; 以及 Strauss 《欧洲分子生物学学会杂志 (EMBO J.)》11:417, 1992。

[0827] 还对非离子脂质体系统进行了检查, 以确定其在向皮肤递送药物中的效用, 特别是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包括 Novasome™ I (二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 和 Novasome™ II (二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚) 的非离子脂质体调配物将环孢菌素 A (cyclosporin-A) 递送到小鼠皮肤的真皮中。结果表明, 此类非离子脂质体系统在促进环孢菌素 A 沉积到皮肤的不同层中是有效的 (Hu 等人 《S.T.P. 制药科学 (S.T.P. Pharma. Sci.)》, 1994, 4, 6, 466)。

[0828] 脂质体还包含“空间稳定的”脂质体, 如本文所使用的, 所述术语是指包括一种或多种特殊脂质的脂质体, 当并入脂质体中时, 相对于缺乏此类特殊脂质的脂质体, 所述脂质体导致提高的循环寿命。空间稳定的脂质体的实例是其中脂质体 (A) 的囊泡形成脂质部分的一部分包括一种或多种糖脂, 如单唾液酸神经节苷脂  $G_{M1}$ , 或 (B) 用一种或多种亲水性聚合物衍生的脂质体, 如聚乙二醇 (PEG) 部分。尽管不希望受到任何特定理论的束缚, 但本领域认为, 至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或 PEG 衍生的脂质的空间稳定的脂质体, 这些空间稳定的脂质体的增强的循环半衰期源自减少进入网状内皮系统 (RES) 的细胞的摄取 (Allen 等人, 《FEBS 快报 (FEBS Letters)》, 1987, 223, 42; Wu 等人, 《癌症研究》, 1993, 53, 3765)。

[0829] 包括一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos 等人 (《纽约科学学术年鉴》, 1987, 507, 64) 报道了单唾液酸神经节苷脂  $G_{M1}$ 、硫酸半乳糖脑苷酯和磷脂酰肌醇改善脂质体血液半衰期的能力。这些发现在以下中进行了阐述: Gabizon 等人 (《美国国家科学院院刊》, 1988, 85, 6949)。Allen 等人的美国专利第 4,837,028 号和 WO 88/04924 两者中公开了脂质体, 其包括 (1) 鞘磷脂和 (2) 神经节苷脂  $G_{M1}$  或硫酸半乳糖脑苷酯。美国专利第 5,543,152 号 (Webb 等人) 公开了包括鞘磷脂的脂质体。WO 97/13499 (Lim 等人) 中公开了包括 1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体。

[0830] 在一些实施方案中, 使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够与细胞膜融合的优点。非阳离子脂质体尽管不能与质膜有效融合, 但在体内被巨噬细胞吸收, 并且可以用于向巨噬细胞递送 iRNA 药剂。

[0831] 脂质体的另外的优点包括: 从天然磷脂中获得的脂质体具有生物相容性且可生物降解; 脂质体可以并入多种水溶性和脂溶性药物; 脂质体可以保护其内部区室中封装的 iRNA 免受代谢和降解 (Rosoff, 《药物剂型 (Pharmaceutical Dosage Forms)》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 第 1 卷, 第 245 页)。制备脂质体调配物的重要考虑因素是脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的水性体积。

[0832] 带正电荷的合成阳离子脂质 N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 可以用于形成小脂质体, 所述小脂质体与核酸自发相互作用以形成脂质-核酸复合物, 所述复合物能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电荷的脂质融合, 导致 iRNA 药剂的递

送(参见例如,Felgner,P.L.等人《美国国家科学院院刊》8:7413-7417,1987以及美国专利第4,897,355号关于DOTMA和其与DNA的使用的描述)。

[0833] DOTMA类似物,1,2-双(油酰基氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可以与磷脂组合使用,以形成DNA络合囊泡。Lipofectin™(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)是一种用于将高度阴离子核酸递送到活组织培养细胞中的有效药剂,所述细胞包括带正电荷的DOTMA脂质体,所述脂质体与带负电荷的多核苷酸自发相互作用以形成复合物。当使用足够的带正电荷的脂质体时,所得复合物上的净电荷也是正的。以这种方式制备的带正电荷的复合物自发地与带负电荷的细胞表面连接,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送到例如组织培养细胞中。另一种可商购获得的阳离子脂质,1,2-双(油酰基氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷(“DOTAP”) (印第安纳州印第安纳波利斯的宝灵曼公司(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana))与DOTMA的不同之处在于,油酰基部分通过酯而不是醚键连接。

[0834] 其他报道的阳离子脂质化合物包括与多种部分缀合的那些,包括例如与两种类型的脂质之一缀合的羧精胺,并且包括如5-羧基精胺基甘氨酸二十八烷基酰胺(“DOGS”) (Transfectamine™,威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega, Madison, Wisconsin))和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺5-羧基精酰基-酰胺(“DPPE”)等化合物(参见例如,美国专利第5,171,678号)。

[0835] 另一种阳离子脂质缀合物包含脂质与胆固醇的衍生化(“DC-Chol”),其已经与DOPE组合被调配成脂质体(参见,Gao,X.和Huang,L.,《生物化学与生物物理研究通讯》179:280,1991)。据报道,通过将聚赖氨酸与DOPE缀合制备的脂聚赖氨酸在血清存在下对转染有效(Zhou,X.等人《生物化学与生物物理学报》1065:8,1991)。对于某些细胞系,这些含有缀合的阳离子脂质的脂质体据说表现出比所述含有DOTMA的组合物更低的毒性并提供更有效的转染。其他可商购获得的阳离子脂质产品包含DMRIE和DMRIE-HP(加利福尼亚州拉荷亚市的Vical公司(Vical, La Jolla, California))和Lipofectamine(DOSPA)(马里兰州盖瑟斯堡的生命技术有限公司(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland))。WO 98/39359和WO 96/37194中描述了适用于递送寡核苷酸的其他阳离子脂质。

[0836] 脂质体调配物特别适合于局部施用;脂质体呈现出超过其他调配物的若干个优点。此类优点包括减少的与施用的药物的高全身吸收相关的副作用,施用的药物在期望的靶标的增加的积累,以及将iRNA药剂施用到皮肤中的能力。在一些实施方案中,脂质体用于将iRNA药剂递送到表皮细胞,并且还用于增强iRNA药剂向真皮组织中的渗透,例如向皮肤中的渗透。例如,脂质体可以局部应用。已经记载了将调配成脂质体的药物局部递送到皮肤(参见例如,Weiner等人《药物靶向杂志(Journal of Drug Targeting)》,1992,第2,405-410卷和du Plessis等人《抗病毒研究(Antiviral Research)》,18,1992,259-265; Mannino,R.J.和Fould-Fogerite,S.,《生物技术(Biotechniques)》6:682-690,1988; Itani,T.等人《基因(Gene)》56:267-276,1987; Nicolau,C.等人《酶学方法(Meth.Enz.)》149:157-176,1987; Straubinger,R.M.和Papahadiopoulos,D.《酶学方法》101:512-527,1983; Wang,C.Y.和Huang,L.,《美国国家科学院院刊》84:7851-7855,1987)。

[0837] 还对非离子脂质体系统进行了检查,以确定其在向皮肤递送药物中的效用,特别是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。使用包括Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固

醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)和Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂基醚)的非离子脂质体调配物将药物递送到小鼠皮肤的真皮中。具有iRNA药剂的此类调配物可用于治疗皮肤病学病症。

[0838] 包含iRNA的脂质体可以被制成高度可变形的。此类可变形性可以使脂质体渗透穿过小于脂质体平均半径的孔。例如,传递体是一类可变形的脂质体。传递体可以通过在标准脂质体组合物中添加表面边缘激活剂(通常是表面活性剂)来制备。包含iRNA的传递体可以例如通过感染皮下递送,以便将iRNA递送到皮肤中的角质细胞。为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质囊泡必须在适当的透皮梯度的影响下穿过一系列直径小于50nm的细孔。另外,由于脂质特性,这些传递体可以自我优化(适应孔的形状,例如皮肤中的孔)、自我修复,并且可以经常在不碎裂的情况下达到其靶标,并且经常自我装载。

[0839] 在WO 2008/042973中描述了适用于本发明的其他调配物。

[0840] 传递体是又另一种类型的脂质体,并且是高度可变形的脂质聚集体,该脂质聚集体是药物递送媒介的有吸引力的候选者。传递体可以被描述为脂滴,其可高度可变形,使得其很容易渗透穿过比液滴小的孔。传递体能够适应其使用的环境,例如其是自我优化的(适应皮肤中孔的形状)、自我修复的,经常在不碎裂的情况下达到其靶标,并且经常自我装载。为了制备传递体,可以向标准脂质体组合物添加表面边缘激活剂,通常是表面活性剂。传递体已被用于将血清白蛋白递送到皮肤。传递体介导的血清白蛋白的递送已被证明与皮下注射含有血清白蛋白的溶液一样有效。

[0841] 表面活性剂广泛应用于调配物中,如乳液(包含微乳液)和脂质体。对许多不同类型的表面活性剂(天然和合成两者)的特性进行分类和排序的最常见方式是通过使用亲水/亲脂平衡(HLB)。亲水基团(也称为“头”)的性质为调配物中使用的不同表面活性剂的分类提供了最有用的方法(Rieger,《药物剂型》,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司,1988,第285页)。

[0842] 如果表面活性剂分子未离子化,则将其归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆品中有着广泛的应用,并且可用于多种pH值。通常,根据其结构,其HLB值的范围为2至约18。非离子表面活性剂包含非离子酯,如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、脱水山梨醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子烷醇酰胺和醚,如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物也包含在此类别中。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类别中最受欢迎的成员。

[0843] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有负电荷,则表面活性剂被分类为阴离子。阴离子表面活性剂包含羧酸酯,如皂类、酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯,如烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯,磺酸酯,如烷基苯磺酸酯、酰基异硫辛酸酯、酰基牛磺酸酯和磺基琥珀酸酯,以及磷酸酯。阴离子表面活性剂类别中最重要成员是烷基硫酸酯和皂类。

[0844] 如果表面活性剂分子在溶解或分散在水中时带有正电荷,则表面活性剂被分类为阳离子。阳离子表面活性剂包含季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是此类别化合物中使用至多的成员。

[0845] 如果表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力,则表面活性剂被归类为两性。两性表面活性剂包含丙烯酸衍生物、经取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱和磷脂。

[0846] 对表面活性剂在药物产品、调配物和乳液中的应用进行了综述(Rieger,《药物剂

型》，纽约州纽约的马塞尔德克尔公司，1988，第285页）。

[0847] 用于本发明的方法中的iRNA也可以作为胶束调配物提供。“胶束”在本文中被定义为特定类型的分子组装体，其中两亲性分子以球形结构排列，使得分子的所有疏水部分向内，使亲水部分与周围的水相接触。如果环境是疏水的，则存在相反的排列。

[0848] 适合于通过透皮膜递送的混合胶束调配物可以通过混合iRNA的水溶液、碱金属C<sub>8</sub>至C<sub>22</sub>烷基硫酸酯与胶束形成化合物来制备。示例性胶束形成化合物包含卵磷脂、透明质酸、透明质酸的药学上可接受的盐、乙醇酸、乳酸、洋甘菊提取物、黄瓜提取物、油酸、亚油酸、亚麻酸、单油酸甘油酯、单油酸酯、琉璃苣油、月见草油、薄荷醇、三羟基氧代胆酸基甘氨酸以及其药学上可接受的盐、甘油、聚甘油、赖氨酸、聚赖氨酸、三油酸甘油酯、聚氧乙烯醚以及其类似物、聚多卡醇烷基醚以及其类似物、鹅脱氧胆酸酯、脱氧胆酸酯以及其混合物。胶束形成化合物可以在添加碱金属烷基硫酸酯的同时或之后添加。基本上任何种类的成分混合都会形成混合的胶束，但为了提供更小大小的胶束而剧烈混合。

[0849] 在一种方法中，制备含有RNAi和至少碱金属烷基硫酸酯的第一胶束组合物。然后将第一胶束组合物与至少三种胶束形成化合物混合以形成混合的胶束组合物。在另一种方法中，通过将RNAi、碱金属烷基硫酸酯和至少一种胶束形成化合物混合，然后在剧烈混合的情况下添加剩余的胶束形成化合物来制备胶束组合物。

[0850] 苯酚或间甲酚可以添加到混合的胶束组合物中，以稳定调配物并防止细菌生长。可替代地，苯酚或间甲酚可以与胶束形成成分一起添加。在形成混合的胶束组合物之后，也可以添加等渗剂，如甘油。

[0851] 为了将胶束调配物作为喷雾递送，可以将所述调配物放入气溶胶分配器中，并且在分配器中装入推进剂。处于压力下的推进剂在分配器中呈液体形式。调节成分的比率，使水相和推进剂相成为一个相，即有一个相。如果有两个相，则有必要在分配一部分内容物之前摇动分配器，例如通过计量阀。分配的剂量的药剂以精细喷雾的形式从计量阀推进。

[0852] 推进剂可以包含含氢氯氟烃、含氢氟碳化合物、二甲醚和二乙醚。在某些实施方案中，可以使用HFA 134a(1,1,1,2四氟乙烷)。

[0853] 基本成分的具体浓度可以通过相对简单的实验来测定。为了通过口腔吸收，通常期望通过注射或通过胃肠道施用增加剂量，例如至少两倍或三倍。

[0854] B. 脂质颗粒

[0855] 本发明中的iRNA，例如dsRNA药剂，可以完全包封在脂质调配物，例如LNP，例如其他核酸-脂质颗粒中。

[0856] 如本文所使用的，术语“LNP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的脂质(例如，PEG-脂质缀合物)。LNP对于全身应用非常有用，因为其在静脉内(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命并在远隔位点(例如，与施用位点物理分离的位点)累积。如本文所使用的，术语“SPLP”是指包括封装在脂质囊泡内的质粒DNA的核酸-脂质颗粒。LNP包括“pSPLP”，其包含如PCT公开第WO 00/03683号中所示的封装的缩合剂-核酸复合物。本发明的颗粒的平均直径通常是约50nm至约150nm、更通常地是约60nm至约130nm、更通常地是约70nm至约110nm、最通常地是约70nm至约90nm，并且基本上无毒。另外，核酸当存在于本发明的核酸-脂质颗粒中时在水溶液中抵抗核酸酶的降解。核酸-脂质颗粒以及其制备方法公开于例如美国专利第5,976,567号；第5,981,501号；第6,534,

484号;第6,586,410号;第6,815,432号;以及PCT公开第WO 96/40964号中。

[0857] 在某些实施方案中,脂质与药物的比率(质量/质量比)(例如,脂质与dsRNA的比率)将在约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。上述范围中间的范围也被认为是本发明的一部分。

[0858] 阳离子脂质可以是,例如,N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(I-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(I-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙基胺(DODMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二氢亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二烷基氨基甲酰氨基甲酰氧基-3-二甲氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二烷基氨基甲酰氧基-3-(二甲氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二烷基氨基甲酰氧基-3-吗啉丙烷(DLin-MA)、1,2-二氢油酰基-3-二甲氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二氢油酰基硫代-3-二甲氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油酰基-3-二甲氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二氢油酰氧基-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二氢油酰-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二氢油酰氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二油基氧代-3-(2-N,N-二甲氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊烯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂二基)二十二烷-2-醇(Tech G1)或其混合物。阳离子脂质可以包括颗粒中存在的总脂质的约20mol%至约50mol%或约40mol%。

[0859] 在某些实施方案中,化合物2,2-二氢油酰基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷可以用于制备脂质siRNA纳米颗粒。2,2-二油烯基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环的合成描述于2008年10月23日提交的美国临时专利申请第61/107,998号中,所述美国临时专利申请通过引用并入本文。

[0860] 在某些实施方案中,脂质siRNA颗粒包含40%的2,2-二亚油酰基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷:10%DSPC:40%胆固醇:10%的PEG-C-DOMG(摩尔百分比),其中粒度为 $63.0 \pm 20\text{nm}$ ,并且siRNA/脂质比率为0.027。

[0861] 非阳离子脂质可以是包含阴离子脂质或中性脂质,包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇或其混合物。非阳离子脂质可以占颗粒中存在的总脂质的约5mol%至约90mol%、约10mol%或约58mol%(如果包含胆固醇的话)。

[0862] 抑制颗粒聚集的缀合的脂质可以是例如聚乙二醇(PEG)脂质,包括但不限于PEG-

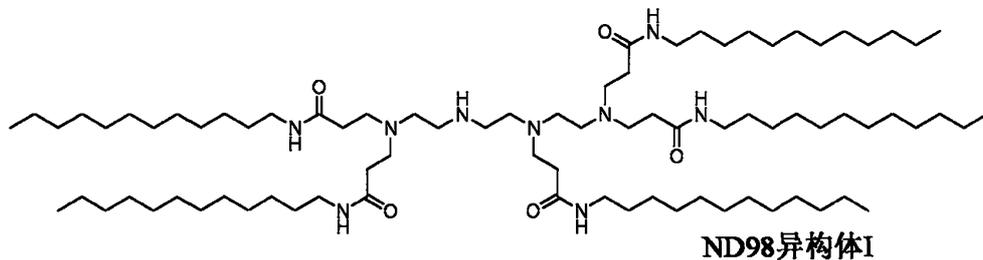
二酰基甘油 (DAG)、PEG-二烷氧基丙基 (DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺 (Cer) 或其混合物。PEG-DAA缀合物可以是例如,PEG-二月桂氧基丙基 (Ci<sub>2</sub>)、PEG-二肉豆蔻氧基丙基 (Ci<sub>4</sub>)、PEG-二棕榈氧基丙基 (Ci<sub>6</sub>) 或PEG-二硬脂氧基丙基 (Ci<sub>8</sub>)。防止颗粒聚集的缀合的脂质可以是颗粒中存在的总脂质的0mol%至约20mol%或约2mol%。

[0863] 在一些实施方案中,核酸脂质颗粒进一步包含胆固醇,其为颗粒中存在的总脂质的例如约10mol%至约60mol%或约48mol%。

[0864] LNP01

[0865] 在某些实施方案中,类脂质ND98·4HCl (MW 1487) (参见于2008年3月26日提交的美国专利申请第12/056,230号,所述美国专利申请通过引用并入本文)、胆固醇(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)) 和PEG-神经酰胺C16(埃文蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids)) 可以用于制备脂质dsRNA纳米颗粒(例如,LNP01颗粒)。每种物质在乙醇中的储备溶液可按如下方式制备:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml,PEG-神经酰胺C16,100mg/ml。然后将ND98、胆固醇和PEG-神经酰胺C16储备溶液以例如42:48:10的摩尔比合并。合并的脂质溶液可以与dsRNA水溶液(例如,在pH 5的乙酸钠中)混合,使得最终乙醇浓度为约35%至45%,并且最终乙酸钠浓度为约100mM至300mM。脂质dsRNA纳米颗粒通常在混合时自发形成。取决于期望的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,如Lipex挤出机(北方脂质公司(Northern Lipids, Inc)),经聚碳酸酯膜(例如,100nm截止值)挤出所得的纳米颗粒混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切向流过滤实现乙醇去除和同时缓冲液交换。缓冲液可以与例如约pH 7,例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)交换。

[0866]



式 I

[0867] LNP01调配物描述,例如,于国际申请公开第W0 2008/042973号中,所述国际申请公开通过引用并入本文。

[0868] 在下表1中提供了另外的示例性脂质-dsRNA调配物。

[0869] 表1:示例性脂质调配物

[0870]

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇 /PEG-脂质缓合物 脂质:siRNA 比率
SNALP	1,2-二氢亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇 /PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA 约 7:1
S-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]- 二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA 约 7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]- 二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG

[0871]

	二氧戊环 (XTC)	57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA 约 11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 6:1
LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA 约 11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊烯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-4-(二甲基氨基)丁酸三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮杂二基)二十二烷-2-醇 (C12-200)	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12:1

[0872]	LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8:1
	LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
	LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
	LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1

[0873] DSPC:二硬脂酰基磷脂酰胆碱

[0874] DPPC:二棕榈酰基磷脂酰胆碱

[0875] PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰基甘油(C14-PEG或PEG-C14)(平均摩尔重量为2000的PEG)

[0876] PEG-DSG:PEG-联苯乙烯基甘油(C18-PEG或PEG-C18)(平均摩尔重量为2000的PEG)

[0877] PEG-cDMA:PEG-氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙胺(平均摩尔重量为2000的PEG)

[0878] 在2009年4月15日提交的国际公开第W02009/127060号中描述了包括SNALP(1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的调配物,所述国际公开据此通过引用并入。

[0879] 包括XTC的调配物在例如以下中进行了描述:于2009年1月29日提交的美国临时序列号61/148,366;于2009年3月2日提交的美国临时序列号61/156,851;于2009年6月10日提交的美国临时序列号61/185,712;于2009年7月24日提交的美国临时序列号61/228,373;于2009年9月3日提交的美国临时序列号61/239,686和于2010年1月29日提交的国际申请第PCT/US2010/022614号,所述文献据此通过引用并入。

[0880] 包括MC3的调配物在例如于2009年9月22日提交的美国临时序列号61/244,834、于2009年6月10日提交的美国临时序列号61/185,800和于2010年6月10日提交的国际申请第PCT/US10/28224号中进行了描述,所述文献据此通过引用并入。

[0881] 描述了包括ALNY-100的调配物,例如于2009年11月10日提交的国际专利申请第PCT/US09/63933号,所述国际专利申请据此通过引用并入。

[0882] 包括C12-200的调配物描述于以下中:于2009年5月5日提交的美国临时序列第61/175,770号以及于2010年5月5日提交的国际申请第PCT/US10/33777号中,所述文献据此通过引用并入。

[0883] 用于口服施用的组合物和调配物包含粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、在水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或微型片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是期望的。在一些实施方案中,口服调配物是其中本发明特征的dsRNA与一种或多种增渗剂表面活性剂和螯合剂一起施用的那些调配物。合适的表面活性剂包含脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆汁酸/盐包含鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊脱氧胆酸(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡胆酸、甘胆酸、甘脱氧胆

酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺基-24,25-二氢-富西酸钠和甘二氢富西酸钠。合适的脂肪酸包含花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐(例如,钠)。在一些实施方案中,使用增渗剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。示例性组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。另外的增渗剂包含聚氧乙烯-9-十二烷基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。本发明特征的dsRNA可以口服、以包含喷雾干燥颗粒的颗粒形式递送,或复合以形成微型或纳米颗粒。dsRNA络合剂包含聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯、聚氧乙烷、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生的聚胺、支链淀粉、纤维素和淀粉。合适的络合剂包含壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精蛋白、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如,对氨基)、聚(甲基氰基丙烯酸酯)、聚(乙基氰基丙烯酸酯)、聚(丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(异己基丙烯酸酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-己基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-右旋糖酐、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚(D,L-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、藻酸酯和聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服调配物以及其制备在美国专利6,887,906、美国公开第20030027780号以及美国专利第6,747,014中进行了详细描述,所述文献中的每一个通过引用并入本文。

[0884] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内施用的组合物和调配物可以包含无菌水溶液,所述无菌水溶液也可以含有缓冲液、稀释剂和其他合适的添加剂,如但不限于增渗剂、载剂化合物和其他药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0885] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳液和含有脂质体的调配物。这些组合物可以由多种组分产生,所述组分包括但不限于预成型液体、自乳化固体和自乳化半固体。特别优选的是在治疗肝脏病症如肝脏的慢性炎症时靶向肝脏的调配物。

[0886] 本发明的药物调配物可以方便地以单位剂型存在,可以根据制药工业中众所周知的常规技术制备。此类技术包含使活性成分与药物载剂或赋形剂缔合的步骤。一般而言,通过使活性成分与液体载剂或精细固体载剂或两者均匀充分地缔合并且然后在必要时使产物成形来制备所述调配物。

[0887] 本发明的组合物可以被调配成许多可能的剂型中的任一种,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物也可以被调配成在水性介质、非水性介质或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步含有增加悬浮液的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0888] 包括用一种或多种亲水性聚合物衍生化的脂质的许多脂质体及其制备方法是本领域已知的。Sunamoto等人(《日本化学会通报(Bull.Chem.Soc.Jpn.)》,1980,53,2778)描述了包括非离子洗涤剂 $2C_{1215G}$ (含有PEG部分)的脂质体。Illum等人(《FEBS快报》,1984,167,79)注意到了聚苯乙烯颗粒与聚合物二醇的亲水性涂层可以显著提高血液半衰期。通过连接聚亚烷基二醇(例如,PEG)的羧基修饰的合成磷脂由Sears(美国专利第4,426,330号和第4,534,899号)进行了描述。Klibanov等人(《FEBS快报》,1990,268,235)描述了实验,证明包括用PEG或PEG硬脂酸酯衍生的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质体在血液循环半衰期中显著增加。

Blume等人(《生物化学与生物物理学学报(Biochimica et Biophysica Acta)》,1990,1029,91)将此类观察扩展到其他PEG衍生化的磷脂,例如由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)和PEG的组合形成的DSPE-PEG。Fisher的欧洲专利第EP 0 445 131 B1号和第WO 90/04384号中描述了在其外表面上具有共价结合的PEG部分的脂质体。以下描述了含有1至20摩尔百分比的用PEG衍生化的PE的脂质体组合物以及其使用方法:Woodle等人(美国专利第5,013,556号和第5,356,633号)以及Martin等人(美国专利第5,213,804号和欧洲专利第EP 0 496 813 B1号)。包括许多其他脂质聚合物缀合物的脂质体公开于WO 91/05545和美国专利第5,225,212号(两者均出自Martin等人)和WO 94/20073(Zalipsky等人)中。包括PEG修饰的神经酰胺脂质的脂质体在WO 96/10391(Choi等人)中进行了描述。美国专利第5,540,935号(Miyazaki等人)和美国专利第5,556,948号(Tagawa等人)描述了含有PEG的脂质体,其可以用其表面上的官能部分进一步衍生化。

[0889] 本领域已知许多包括核酸的脂质体。WO 96/40062(出自Thierry等人)公开了将高分子量核酸封装在脂质体中的方法。美国专利第5,264,221号(出自Tagawa等人)公开了蛋白质结合的脂质体,并且断言此类脂质体的内容物可以包含dsRNA。美国专利第5,665,710号(出自Rahman等人)描述了将寡脱氧核苷酸封装在脂质体中的某些方法。WO 97/04787(出自Love等人)公开了包括靶向raf基因的dsRNA的脂质体。

[0890] C. 另外的调配物

[0891] i. 乳液

[0892] 本发明的组合物可以制备并调配成乳液。乳液通常是一种液体以液滴的形式分散在另一种液体中的非均相系统,通常直径超过0.1 $\mu\text{m}$ (参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》,Allen, LV., Popovich NG.和Ansel HC.,2004,纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins, New York, NY)(第8版);Idson,《药物剂型》,Lieberman, Rieger和Banker(编辑),1988,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.),第1卷,第199页;Rosoff,《药物剂型》,Lieberman, Rieger和Banker(编辑),1988,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司,第1卷,第245页;Block,《药物剂型》,Lieberman, Rieger和Banker(编辑),1988,纽约州纽约的马塞尔德克尔公司,第2卷,第335页;Higuchi等人《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Co., Easton, Pa.),1985,第301页)。乳液通常是两相系统,包括两个相互紧密混合和分散的不混溶液相。通常,乳液可以是油包水(w/w)或水包油(w/w)类型。当水相被精细地分成微小的液滴并分散到本体油相中时,所得到的组合物被称为油包水(w/o)乳液。可替代地,当油相被精细地分成微小的液滴并分散到本体水相中时,所得到的组合物被称为水包油(o/w)乳液。除了分散相和活性药物之外,乳液还可以含有另外的组分,所述活性药物可以以溶液的形式存在于水相、油相中或其本身作为单独的相。药物赋形剂,如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂也可以根据需要存在于乳液中。药物乳液也可以是包含多于两相的多种乳液,例如在油包水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳液的情况下。此类复杂的调配物通常提供简单的二元乳液所没有的某些优点。其中o/w乳液的单个油滴包围小水滴的多重乳液构成w/o/w乳液。类似地,包围在油状连续相中稳定的水滴中的油滴系统提供o/w/o乳液。

[0893] 乳液的特征在于几乎没有或没有热力学稳定性。通常,乳液的分散或不连续相很好地分散到外部或连续相中,并且通过乳化剂或调配物的粘度维持这种形式。乳液的任何一个相都可以是半固体或固体,如同乳液型软膏基质和乳膏的情况一样。稳定乳液的其他方法需要使用可以并入乳液任一相中的乳化剂。乳化剂可以大致分为四类:合成表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收碱和精细分散的固体(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》,Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。

[0894] 已发现合成表面活性剂(也称为表面活性药剂)在乳液调配物中具有广泛的适用性,并且已在文献中进行了综述(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》,Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rieger, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第285页; Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。表面活性剂通常是两亲性的,并且包括亲水性和疏水性部分。表面活性剂的亲水性与疏水性的比率被称为亲水/亲脂平衡(HLB),并且是在调配物的制备中对表面活性剂进行分类和选择的有价值的工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质分为不同的类别:非离子、阴离子、阳离子和两性(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》,Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rieger, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第285页)。

[0895] 乳液调配物中使用的天然存在的乳化剂包含羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。吸收碱具有亲水特性,使得其可以吸收水形成w/o乳液,但仍保持其半固体稠度,如无水羊毛脂和亲水性矿脂。精细分散的固体也被用作良好的乳化剂,特别是与表面活性剂和粘性制剂组合使用。这些包含极性无机固体,如重金属氢氧化物,非溶胀粘土,如膨润土、凹凸棒石、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸镁铝,颜料和非极性固体,如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0896] 乳液调配物中还包含多种非乳化材料,并且有助于乳液的特性。这些包含脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酸酯、保湿剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(Block, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第335页; Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。

[0897] 亲水胶体或水胶体包含天然存在的树胶和合成聚合物,如多糖(例如,阿拉伯胶、琼脂、藻酸、角叉菜胶、瓜尔豆胶、卡拉亚胶和黄芪胶)、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)以及合成聚合物(例如,碳聚合物、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。这些在水中分散或膨胀以形成胶体溶液,所述胶体溶液通过在分散相液滴周围形成强界面膜并通过增加外部相的粘度来稳定乳液。

[0898] 由于乳液通常含有许多成分,如碳水化合物、蛋白质、甾醇和磷脂,所述成分可以很容易地支持微生物的生长,因此这些调配物通常并入防腐剂。乳液调配物中包含的常用

的防腐剂包含尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。抗氧化剂通常也被添加到乳液调配物中,以防止调配物变质。所使用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯,或还原剂,如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,以及抗氧化剂增效剂,如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0899] 乳液调配物通过皮肤、口服和肠胃外途径的应用以及其制造方法已经在文献中进行了综述(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》,Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。用于口服递送的乳液调配物由于易于调配以及从吸收和生物利用度的角度来看的功效而被非常广泛地使用(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rosoff, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页; Idson, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第199页)。矿物油基泻药、油性维生素和高脂肪营养制剂通常是作为o/w乳液口服施用的材料。

#### [0900] ii. 微乳液

[0901] 在本发明的一个实施方案中, iRNA和核酸的组合物被调配为微乳液。微乳液可以定义为水、油和两亲物的系统, 其是单一的光学各向同性和热力学稳定的液体溶液(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rosoff, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页)。通常, 微乳液是通过首先将油分散在表面活性剂水溶液中, 并且然后添加足量的第四组分(通常是中链长醇)以形成透明系统而制备的系统。因此, 微乳液也被描述为两种不混溶液体的热力学稳定、各向同性透明的分散体, 所述两种不混溶液体通过表面活性剂的界面膜来稳定(Leung和Shah, 《药物的控制释放: 聚合物和聚集系统 (Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems)》, Rosoff, M. 编辑, 1989, 纽约的VCH出版社 (VCH Publishers, New York), 第185-215页)。微乳液通常通过三种至五种组分的组合制备, 所述组分包含油、水、表面活性剂、助表面活性剂和电解质。微乳液是油包水(w/o)还是水包油(o/w)类型取决于所用的油和表面活性剂的特性, 以及表面活性剂分子的极性头和烃尾的结构和几何积累(Schott, 《雷明顿药物科学》, 宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司, 1985, 第271页)。

[0902] 利用相图的现象学方法已经得到了广泛的研究, 并且为本领域技术人员提供了关于如何调配微乳液的全面知识(参见例如,《安塞尔的药物剂型和药物递送系统》, Allen, LV., Popovich NG. 和 Ansel HC., 2004, 纽约州纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(第8版); Rieger, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第245页; Block, 《药物剂型》, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, 纽约州纽约的马塞尔德克尔公司, 第1卷, 第335页)。与传统乳液相比, 微乳液提供了将水不溶性药物溶解在自发形成的热力学稳定液滴调配物中的优点。

[0903] 用于制备微乳液的表面活性剂包括但不限于离子表面活性剂、非离子表面活化

剂、Brij 96、聚氧乙烯油醚、聚甘油脂肪酸酯、单月桂酸四甘油酯 (ML310)、单油酸四甘油酯 (MO310)、单油酸六甘油酯 (PO310)、五油酸六甘油酯 (PO500)、单癸酸十甘油酯 (MCA750)、单油酸十甘油酯 (MO750)、连续油酸十甘油酯 (SO750)、十油酸十甘油酯 (DA0750), 单独或与助表面活性剂组合。助表面活性剂, 通常是短链醇, 如乙醇、1-丙醇和1-丁醇, 通过渗透到表面活性剂膜中, 并且由于表面活性剂分子之间产生的空隙空间而产生无序膜, 从而增加界面流动性。然而, 可以在不使用助表面活性剂的情况下制备微乳液, 并且本领域已知无醇自乳化微乳液系统。水相通常可以是但不限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于材料, 如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中链 (C8-C12) 单、二和三甘油酯、聚氧乙烯化甘油脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇化甘油酯、饱和聚乙二醇化C8-C10甘油酯、植物油和硅酮油。

[0904] 从药物增溶和增强药物吸收的角度来看, 微乳液尤其引人关注。已经提出了基于脂质的微乳液 (o/w和w/o两者) 来提高包含肽在内的药物的口服生物利用度 (参见例如, 美国专利第6,191,105号; 第7,063,860号; 第7,070,802号; 第7,157,099号; Constantinides 等人《药物研究 (Pharmaceutical Research)》, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, 《实验和临床药理学的方法和发现 (Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.)》, 1993, 13, 205)。微乳液具有改善药物增溶、保护药物免受酶水解、由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性的改变而可能增强药物吸收、易于制备、相对于固体剂型易于口服施用、提高临床效力以及降低的毒性等优点 (参见例如, 美国专利第6,191,105号; 第7,063,860号; 第7,070,802号; 第7,157,099号; Constantinides 等人《药物研究》, 1994, 11, 1385; Ho 等人《药物科学杂志 (J. Pharm. Sci.)》, 1996, 85, 138-143)。当微乳液的组分在环境温度下聚集在一起时, 通常可以自发形成微乳液。这在调配不耐热药物、肽或iRNA时可能尤其有利。微乳液在化妆品和药物应用两者中对活性组分的透皮递送也很有效。预期本发明的微乳液组合物和调配物将促进iRNA和核酸从胃肠道的增加的全身吸收, 以及改善iRNA和核酸的局部细胞摄取。

[0905] 本发明的微乳液还可以含有另外的组分和添加剂, 如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯 (Grill 3)、Labrasol和增渗剂, 以改善调配物的特性并增强本发明的iRNA和核酸的吸收。本发明的微乳液中使用的增渗剂可以分类为属于五大类之一-表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂 (Lee 等人, 《治疗药物载剂系统的关键综述 (Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems)》, 1991, 第92页)。这些类别中的每一个都已经在上文进行了讨论。

[0906] iii. 微颗粒

[0907] 本发明的RNAi药剂可以并入到颗粒 (例如微颗粒) 中。微颗粒可以通过喷雾干燥生产, 但也可以通过其他方法生产, 包含冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或这些技术的组合。

[0908] iv. 渗透促进剂

[0909] 在一个实施方案中, 本发明使用各种渗透促进剂来实现核酸, 特别是iRNA到动物皮肤的有效递送。大多数药物以电离和非电离两种形式存在于溶液中。然而, 通常只有脂溶性或亲脂性药物容易穿过细胞膜。已经发现, 如果用增渗剂处理待穿过的膜, 即使是非亲脂性药物也可以穿过细胞膜。除了有助于非亲脂性药物穿过细胞膜的扩散外, 增渗剂还可以增强亲脂性药物的渗透性。

[0910] 增渗剂可以分为五大类之一,即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂(参见例如,Malmsten,M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物(Surfactants and polymers in drug delivery)》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司(Informa Health Care,New York,NY),2002;Lee等人《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页)。下面更详细地描述上述每一类增渗剂。

[0911] 表面活性剂(surfactant)(或“表面活性剂(surface-active agent)”)是化学实体,当其溶解在水溶液中时,会降低溶液的表面张力或水溶液与另一种液体之间的界面张力,结果是增强了iRNA通过粘膜的吸收。除了胆汁盐和脂肪酸之外,这些增渗剂还包含例如,十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-十二烷基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚(参见例如,Malmsten,M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司,2002;Lee等人《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页);以及全氟化学乳液,如FC-43.Takahashi等人《药理学和药理学杂志(J.Pharm.Pharmacol.)》,1988,40,252)。

[0912] 作为增渗剂的各种脂肪酸及其衍生物包括例如,油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、单油酸甘油酯(1-单油酰基-rac-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮,酰基肉碱、酰基胆碱、其C<sub>1-20</sub>烷基酯(例如,甲基、异丙基和叔丁基)以及其单甘油酯和二甘油酯(即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(参见例如,Touitou,E.等人,《药物递送的增强(Enhancement in Drug Delivery)》,马萨诸塞州丹弗斯的CRC出版社(CRC Press,Danvers,MA),2006;Lee等人,《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页;Muranishi,《治疗药物载剂系统的关键综述》,1990,7,1-33;El Hariri等人,《药理学和药理学杂志》,1992,44,651-654)。

[0913] 胆汁的生理作用包含促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收(参见例如,Malmsten,M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司,2002;Brunton,第38章:《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第9版,Hardman等人编辑,纽约的麦格劳·希尔出版社(McGraw-Hill,New York),1996,第934-935页)。各种天然胆汁盐及其合成衍生物作为增渗剂。因此,术语“胆汁盐”包含胆汁的任何天然存在的组分以及其任何合成衍生物。合适的胆汁盐包含例如,胆酸(或其药学上可接受的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡胆酸(葡胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、甘脱氧胆酸(甘脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺基-24,25-二氢-富西酸钠(STDHF)、甘二氢富西酸钠和聚氧乙烯-9-十二烷基醚(POE)(参见例如,Malmsten,M.《药物递送中的表面活性剂和聚合物》,纽约州纽约的Informa医疗健康公司,2002;Lee等人《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页;Swinyard,第39章:《雷明顿药物科学》,第18版,Gennaro编辑,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司,1990,第782-783页;Muranishi,《治疗药物载剂系统的关键综述》,1990,7,1-33;Yamamoto等人《药理学和实验治疗学杂志(J.Pharm.Exp.Ther.)》,1992,263,25;Yamashita等人《药物科学杂志》,1990,79,579-583)。

[0914] 如与本发明结合使用的螯合剂可以被定义为通过与溶液形成复合物来从溶液中去除金属离子的化合物,结果是增强了iRNA通过粘膜的吸收。关于其在本发明中作为增渗

剂的用途,螯合剂还具有作为DNase抑制剂的另外的优点,因为大多数表征的DNA核酸酶需要二价金属离子进行催化,并且因此被螯合剂抑制(Jarrett,《色谱杂志(J.Chromatogr.)》,1993,618,315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、柠檬酸、水杨酸酯(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸酯和高香草酸酯)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、 $\beta$ -二酮(烯胺)的月桂醇聚醚-9和N-氨基酰基衍生物(参见例如,Katdare,A.等人《用于药物、生物技术和药物递送的赋形剂开发(Excipient development for pharmaceutical, biotechnology and drug delivery)》,马萨诸塞州丹弗斯的CRC出版社,2006;Lee等人《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页;Muranishi,《治疗药物载剂系统的关键综述》,1990,7,1-33;Buur等人《控制释放杂志》,1990,14,43-51)。

[0915] 如本文所使用的,非螯合非表面活性剂渗透增强化合物可以被定义为作为螯合剂或表面活性剂表现出不显著的活性,但仍然增强iRNA通过消化道粘膜的吸收的化合物(参见例如,Muranishi,《治疗药物载剂系统的关键综述》,1990,7,1-33)。此类增渗剂包含例如,不饱和环脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(Lee等人《治疗药物载剂系统的关键综述》,1991,第92页);和非甾体抗炎剂,如双氯芬酸钠、吲哚美辛和苯基丁氮酮(Yamashita等人《药理学和药理学杂志》,1987,39,621-626)。

[0916] 在细胞水平上增强iRNA的摄取的药剂也可以添加到本发明的药物和其他组合物中。例如,阳离子脂质,如lipofectin(Junichi等人美国专利第5,705,188号)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子,如聚赖氨酸(Lollo等人,PCT申请WO 97/30731)也已知可增强dsRNA的细胞摄取。可商购获得的转染试剂的实例包含例如Lipofectamine<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司(Invitrogen;Carlsbad,CA))、Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、293fectin<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、Cellfectin<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、DMRIE-C<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、FreeStyle<sup>TM</sup> MAX(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 CD(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、Lipofectamine<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、RNAiMAX(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、Oligofectamine<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、Optifect<sup>TM</sup>(加利福尼亚州卡尔斯堡的英杰公司)、X-tremeGENE Q2转染试剂(瑞士格赫斯尔的罗氏公司(Roche;Grenzacherstrasse,Switzerland))、DOTAP脂质体转染试剂(瑞士格赫斯尔)、DOSPER脂质体转染试剂(瑞士格赫斯尔)或Fugene(瑞士格赫斯尔)、**Transfectam®**试剂(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司(Promega;Madison,WI))、TransFast<sup>TM</sup>转染试剂(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司)、Tfx<sup>TM</sup>-20试剂(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司)、Tfx<sup>TM</sup>-50试剂(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司)、DreamFect<sup>TM</sup>(法国马赛的OZ生物科学公司(OZ Biosciences;Marseille,France))、EcoTransfect(法国马赛的OZ生物科学公司)、TransPass<sup>a</sup> D1转染试剂(美国马萨诸塞州伊普斯维奇的新英格兰生物实验室(New England Biolabs;Ipswich,MA,USA)、LyoVec<sup>TM</sup>/LipoGen<sup>TM</sup>(美国加利福尼亚州圣迭戈的Invivogen公司(Invivogen;San Diego,CA,USA))、PerFectin转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司(Genlantis;San Diego,CA,USA))、NeuroPORTER转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司)、GenePORTER转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司)、GenePORTER 2转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司)、Cytofectin转染试剂(美国加利福尼亚州

圣迭戈的Genlantis公司)、BaculoPORTER转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司)、TroganPORTER™转染试剂(美国加利福尼亚州圣迭戈的Genlantis公司)、RiboFect(美国马萨诸塞州陶顿的Bioline公司(Bioline; Taunton, MA, USA))、PlasFect(美国马萨诸塞州陶顿的Bioline公司)、UniFECTOR(美国加利福尼亚州山景城的B桥国际公司(B-Bridge International; Mountain View, CA, USA))、SureFECTOR(美国加利福尼亚州山景城的B桥国际公司)或HiFect™(美国加利福尼亚州山景城的B桥国际公司)等。

[0917] 其他药剂可以用于增强施用的核酸的渗透,包含二醇,如乙二醇和丙二醇,吡咯,如2-吡咯、氮酮和萘烯,如柠檬烯和薄荷酮。

[0918] v. 载剂

[0919] 本发明的某些组合物也在调配物中并入载剂化合物。如本文所使用的,“载剂化合物”或“载剂”可以指核酸或其类似物,其是惰性的(即,本身不具有生物活性),但通过体内过程被识别为核酸,所述体内过程通过例如降解生物活性核酸或促进其从循环中去除来降低具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载剂化合物的共同施用(通常与过量的后一种物质一起施用)可以引起在肝、肾或其他循环外贮存器中回收的核酸量显著减少,这可能是由于载剂化合物与核酸之间对共同受体的竞争。例如,当部分硫代磷酸酯dsRNA与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰氨基-4'异硫氰基-二苯乙烯-2,2'-二磺酸共同施用,可以减少肝组织中部分硫代磷酸酯dsRNA的回收(Miyao等人,《DsRNA研究与开发(DsRNA Res. Dev.)》,1995,5,115-121; Takakura等人,《DsRNA与核酸药物开发(DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.)》,1996,6,177-183)。

[0920] vi. 赋形剂

[0921] 与载剂化合物相比,“药物载剂”或“赋形剂”是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其他用于将一种或多种核酸递送到动物的药理学惰性媒剂。赋形剂可以是液体的或固体的并且在考虑计划的施用方式的情况下被选择,以便在与核酸和给定药物组合物的其他组分组合时提供期望的体积、一致性等。典型的药物载剂包括但不限于结合剂(例如,预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶体二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟乙酸淀粉钠等);以及润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。

[0922] 适于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用于调配本发明的组合物。适合的药学上可接受的载剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0923] 用于局部施用核酸的调配物可以包含无菌和非无菌水溶液、普通溶剂(如醇)中的非水溶液或核酸在液体或固体油基中的溶液。所述溶液还可以含有缓冲液、稀释剂和其他合适的添加剂。可以使用适于非肠胃外施用的不与核酸发生有害反应的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0924] 适合的药学上可接受的赋形剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0925] vii.其他组分

[0926] 本发明的组合物可以另外含有在药物组合物中常规存在的其他附属组分,处于其现有技术确定的使用水平。因此,例如,组合物可以含有另外的相容性药物活性材料,例如,止痒药、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以含有可用于物理调配本发明的组合物的各种剂型的另外的材料,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、不透明剂、增稠剂和稳定剂。然而,此类材料,在添加时,不应该不适当地干扰本发明的组合物的成分的生物活性。调配物可以进行灭菌,并且如果期望的话,可以与不与所述调配物的核酸有害地相互作用的助剂,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、调味剂和/或芳香物质等混合。

[0927] 水性悬浮液可以含有增加悬浮液的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或右旋糖酐。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0928] 在一些实施方案中,本发明特征的药物组合物包含(a)一种或多种iRNA化合物和(b)通过非RNAi机制发挥作用并且可用于治疗CIDEB相关疾病、病症或病况的一种或多种药剂。此类药剂的实例包括但不限于吡哆醇、ACE抑制剂(血管紧张素转化酶抑制剂),例如,贝那普利(Lotensin);血管紧张素II受体拮抗剂(ARB)(例如,氯生钾、例如Merck & Co.的**Cozaar®**)、例如,坎地沙坦(Atacand);HMG-CoA还原酶抑制剂(例如,他汀);钙结合剂,例如磷酸纤维素钠(Calcibind);利尿剂,例如噻嗪利尿剂,如氢氯噻嗪(Microzide);胰岛素敏化剂,例如PPAR  $\gamma$  激动剂吡格列酮、glp-1r激动剂如利拉鲁肽、维生素E、SGLT2抑制剂、DPPIV抑制剂,和肾/肝移植;或前述中任一者的组合。

[0929] 此类化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物中的标准制药程序来测定,例如用于测定LD<sub>50</sub>(对50%群体致死的剂量)和ED<sub>50</sub>(对50%群体治疗有效的剂量)。在毒性作用和治疗作用之间的剂量比为治疗指数,并且其可以表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>。表现出高治疗指数的化合物是优选的。

[0930] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于调配用于在人中使用的剂量范围。本发明中本文特征的组合物的剂量通常在包含ED<sub>50</sub>的循环浓度的范围内,几乎没有或没有毒性。根据所采用的剂型和所利用的施用途径,剂量可以在此范围内变化。对于本发明特征的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以最初由细胞培养测定估计。可以在动物模型中调配剂量,以达到化合物的循环血浆浓度范围,或在适当的情况下,达到靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如,实现多肽浓度的降低),所述范围包含细胞培养中测定的IC<sub>50</sub>(即达到症状的一半最大抑制的测试化合物的浓度)。可以使用此类信息来更精确地确定人体中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0931] 除了其施用之外,如上所述,本发明中特征的iRNA可以与其他已知药剂组合施用,所述其他已知药剂在治疗由CIDEB表达介导的病理过程中有效。在任何情况下,施用医师可以基于使用本领域已知或本文所描述的功​​效的标准测量观察到的结果来调节iRNA施用的量和时间。

[0932] 阳离子脂质的合成:

[0933] 用于本发明特征的核酸脂质颗粒中的任何化合物(例如阳离子脂质等)都可以通过已知的有机合成技术制备。除非另有说明,否则所有取代基均如下文所定义。

[0934] “烷基”意指含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状饱和的脂肪族烃。表

示性的饱和直链烷基包含甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等,而饱和支链烷基包含异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。表示性的饱和环状烷基包含环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和环状烷基包含环戊烯基和环己烯基等。

[0935] “烯基”意指如上文所定义的烷基,在相邻的碳原子之间含有至少一个双键。烯基包含顺式和反式异构体两者。表示性的直链和支链烯基包含乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等。

[0936] “炔基”意指如上文所定义的任何烷基或烯基,其在相邻碳之间另外含有至少一个三键。表示性的直链和支链炔基包含乙炔基、炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基和3-甲基-1-丁炔基等。

[0937] “酰基”意指任何烷基、烯基或炔基,其中连接点处的碳被氧代基取代,如下文所定义的。例如,  $-C(=O)$  烷基、 $-C(=O)$  烯基和  $-C(=O)$  炔基是酰基。

[0938] “杂环”意指饱和、不饱和或芳香族的5元至7元单环或7元至10元双环、杂环,并且其含有1个或2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子,并且其中氮和硫杂原子可任选地氧化,并且氮杂原子可以任选地季铵化,包含双环,其中任何上述杂环与苯环稠合。杂环可以通过任何杂原子或碳原子连接。杂环包含如下文所定义的杂芳基。杂环包含吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪炔基(piperizynyl)、乙内酰脲基(hydantoinyl)、戊内酰胺基(valerolactamyl)、环氧乙烷基(oxiranyl)、氧杂环丁烷基(oxetanyl)、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢苯硫基、四氢硫代吡喃基、四氢嘧啶基、四氢苯硫基、四氢硫代吡喃基等。

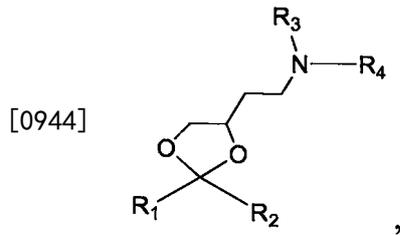
[0939] 术语“任选地经取代的烷基”、“任选地经取代的烯基”、“任选地经取代的炔基”、“任选地经取代的酰基”和“任选地经取代的杂环”意指当被取代时,至少一个氢原子被取代基置换。在氧代取代基( $=O$ )的情况下,两个氢原子被置换。在这方面,取代基包含氧代、卤素、杂环、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$ ,其中 $n$ 是0、1或2, $R^x$ 和 $R^y$ 相同或不同并且独立地为氢、烷基或杂环,并且所述烷基和杂环取代基中的每一个可以进一步被以下中的一个或多个取代:氧代、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR^x$ 、杂环、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$ 。

[0940] “卤素”意指氟、氯、溴或碘。

[0941] 在一些实施方案中,本发明特征的方法可能需要使用保护基团。保护基团方法是本领域技术人员熟知的(参见例如,《有机合成中的保护基团(PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)》,Green, T.W. 等人,纽约市威利国际科学出版社(Wiley-Interscience, New York City), 1999)。简而言之,在本发明的上下文内,保护基团是减少或消除官能团的不期望的反应性的任何基团。保护基团可以添加到官能团中,以掩盖其在某些反应期间的反应性,并且然后去除以显示原始官能团。在一些实施方案中,使用“醇保护基团”。“醇保护基团”是降低或消除醇官能团的不期望的反应性的任何基团。可以使用本领域众所周知的技术来添加和去除保护基团。

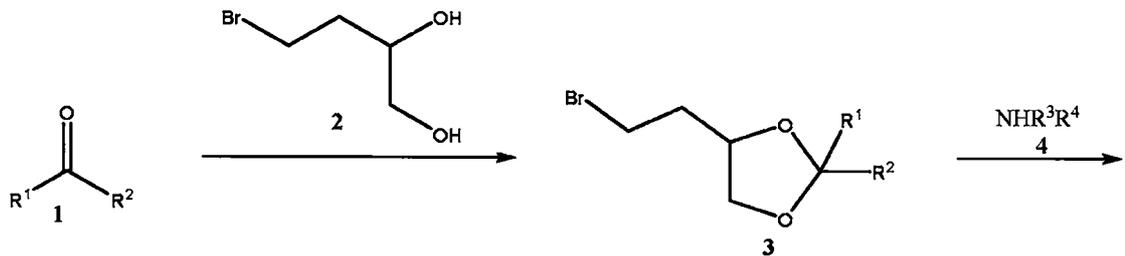
[0942] 式A的合成:

[0943] 在某些实施方案中,使用式A的阳离子脂质调配本发明特征的核酸脂质颗粒:

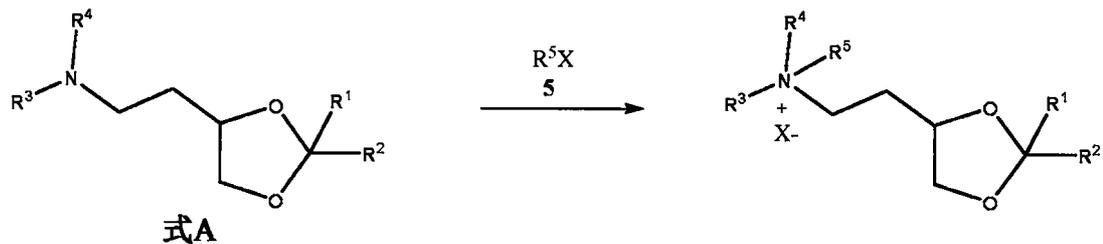


[0945] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地为烷基、烯基或炔基,各自可以任选地被取代,并且R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>独立地为低级烷基,或者R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>可以结合在一起以形成任选地经取代的杂环。在一些实施方案中,阳离子脂质是XTC(2,2-二亚油酰基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊烷)。通常,上述式A的脂质可以通过以下反应方案1或2制备,其中除非另外指明,否则所有取代基均如上文所定义。

[0946] 方案1

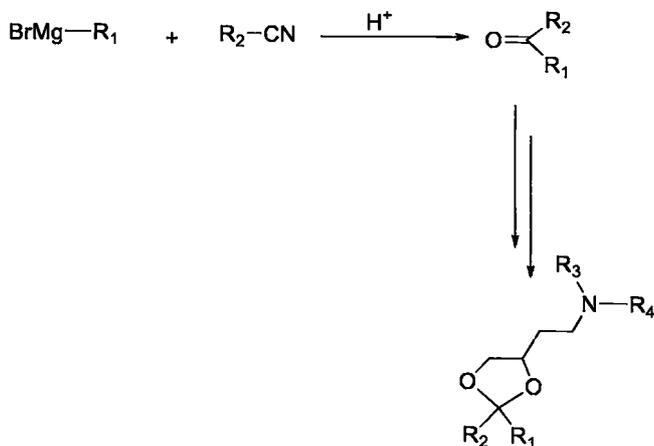


[0947]



[0948] 脂质A,其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地为烷基、烯基或炔基,各自可以任选地被取代,并且R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>独立地为低级烷基,或者R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>可以一起形成任选地经取代的杂环,可以根据方案1制备。酮1和溴化物2可以根据本领域普通技术人员已知的方法购买或制备。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3得到式A的脂质。式A的脂类可以用式5的有机盐转化为对应的铵盐,其中X是选自卤素、氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等的阴离子反离子。

[0949] 方案2



[0950]

[0951] 可替代地,酮1起始材料可以根据方案2制备。格氏试剂(Grignard reagent)6和氰

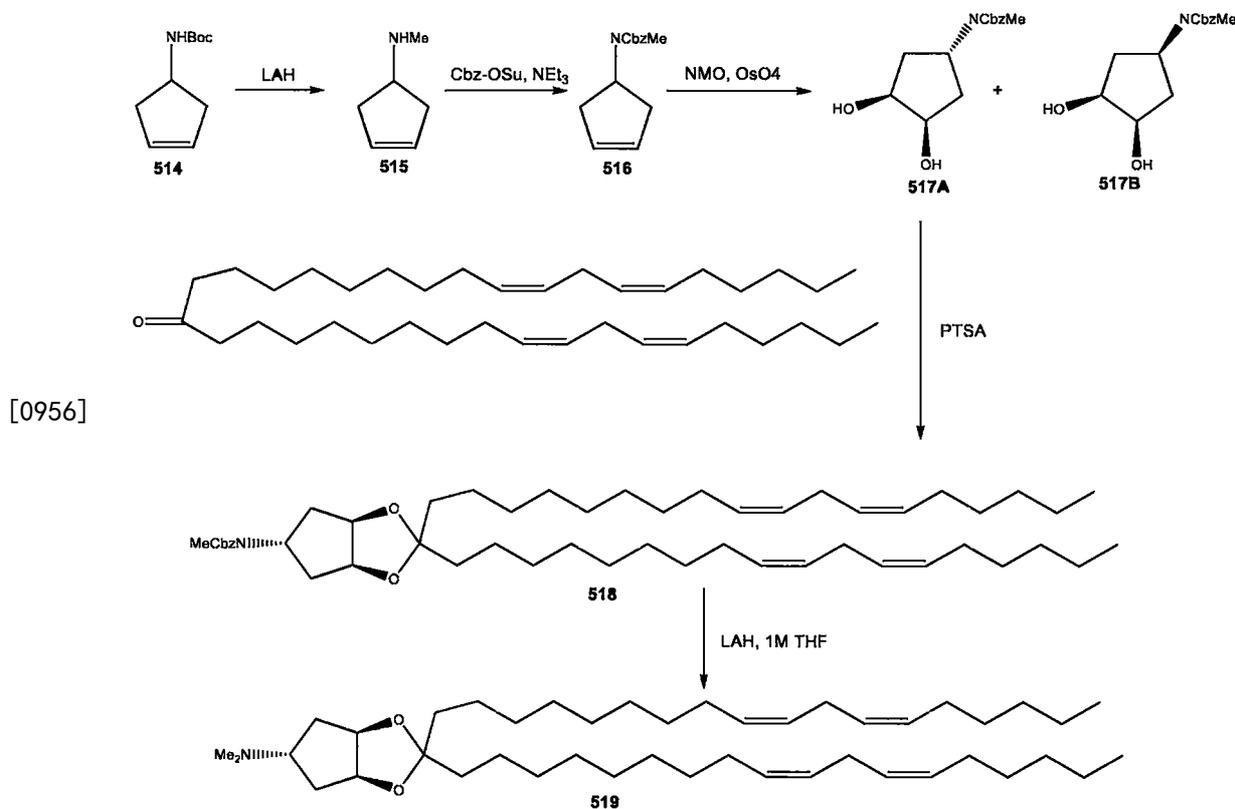
化物7可以根据本领域普通技术人员已知的方法购买或制备。6和7的反应产生酮1。酮1转化为对应的式A的脂质如方案1所述。

[0952] MC3的合成:

[0953] DLin-M-C3-DMA(即, (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯)的制备如下。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g)、4-N,N-二甲基氨基丁酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲基氨基吡啶(0.61g)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.53g)于二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。将溶液用稀盐酸洗涤,然后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机级分经无水硫酸镁干燥,过滤并在旋转蒸发仪上去除溶剂。使用1%至5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度将残留物向下通过硅胶柱(20g)。组合含有纯化产物的级分并除去溶剂,得到无色油状物(0.54g)。

[0954] ALNY-100的合成:

[0955] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:



[0957] 515的合成:

[0958] 在氮气气氛下在0 °C下向LiAlH<sub>4</sub>(3.74g,0.09852mol)于200ml无水THF的双颈RBF(1L)中的搅拌的悬浮液中缓慢添加514(10g,0.04926mol)于70mL的THF中的溶液。完全添加后,将反应混合物温热到室温,并且然后加热回流4小时。通过TLC监测反应的进程。反应完成后(通过TLC测定),将混合物冷却至0°C并小心添加饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液淬灭。将反应混合物在室温下搅拌4小时并过滤掉。将残留物用THF充分洗涤。将滤液和洗涤液混合并用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并在室温下搅拌20分钟。将挥发物在真空下剥离以提供呈白色固体的515盐酸盐。产率:7.12g 1H-NMR(DMSO,400MHz): $\delta$ =9.34(broad,2H),5.68(s,2H),3.74(m,1H),2.66-2.60(m,2H),2.50-2.45(m,5H)。

[0959] 516的合成:

[0960] 向250mL双颈RBF中的化合物515于100mL干燥DCM中的搅拌溶液中添加NEt<sub>3</sub> (37.2mL, 0.2669mol), 并在氮气气氛下冷却至0℃。在50mL干燥DCM中缓慢添加N-(苄氧基-羰基氧基)-琥珀酰亚胺 (20g, 0.08007mol) 后, 使反应混合物温热至室温。反应完成后 (通过TLC 2小时至3小时), 将混合物依次用1N HCl溶液 (1×100mL) 和饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液 (1×50mL) 洗涤。然后将有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并将溶剂蒸发以得到粗材料, 所述粗材料通过硅胶柱色谱法进行纯化以得到呈粘性物质的516。产率: 11g (89%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ = 7.36-7.27 (m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (br., 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 2H)。LC-MS [M+H]<sup>-</sup> -232.3 (96.94%)。

[0961] 517A和517B的合成:

[0962] 将环戊烯516 (5g, 0.02164mol) 溶解于单颈500mL RBF中的220mL丙酮和水 (10:1) 的溶液中, 并且向其中添加N-甲基吗啉-N-氧化物 (7.6g, 0.06492mol), 随后在室温下添加4.2mL 7.6%的OsO<sub>4</sub> (0.275g, 0.00108mol) 于叔丁醇中的溶液。反应完成后 (约3小时), 通过添加固体Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>将混合物淬灭, 并且将所得混合物在室温下搅拌1.5小时。将反应混合物用DCM (300mL) 稀释, 并且用水 (2×100mL) 洗涤, 然后用饱和NaHCO<sub>3</sub> (1×50mL) 溶液、水 (1×30mL), 并且最后用盐水 (1×50mL) 洗涤。将有机相经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 并且在真空中去除溶剂。粗材料的硅胶柱色谱纯化得到非对映异构体的混合物, 其通过制备型HPLC分离。产率: -6g粗产物517A-Peak-1 (白色固体), 5.13g (96%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400MHz): δ = 7.39-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.48-4.47 (d, 2H), 3.94-3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 4H)。LC-MS - [M+H]<sup>-</sup> -266.3, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> -283.5存在, HPLC-97.86%。立体化学通过X射线证实。

[0963] 518的合成:

[0964] 使用类似于化合物505的合成所描述的程序, 获得了呈无色油状物的化合物518 (1.2g, 41%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ = 7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (br m, 36H), 0.87 (m, 6H)。HPLC-98.65%。

[0965] 化合物519的合成的通用程序:

[0966] 将化合物518 (1当量) 于己烷 (15mL) 中的溶液以逐滴方式添加到LAH于THF (1M, 2当量) 中的冰冷溶液中。完全添加后, 将混合物在40℃下加热0.5小时, 然后在冰浴中再次冷却。将混合物用饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液小心水解, 然后通过Celite®过滤并还原成油。柱色谱法提供纯519 (1.3g, 68%), 其获得时呈无色油状物。<sup>13</sup>C NMR = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 226, 14.1; Electrospray MS (+ve): C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> + Calc. 的分子量为654.6, 实测值654.6。

[0967] 通过标准方法或无挤出方法制备的调配物可以以类似的方式表征。例如, 调配物通常通过视觉检查来表征。其应该是发白的半透明溶液, 没有聚集体或沉积物。脂质纳米颗粒的粒度和粒度分布可以通过使用例如Malvern Zetasizer Nano ZS (美国马尔文公司 (Malvern, USA)) 的光散射来测量。颗粒的大小应为约20nm至300nm, 如40nm至100nm。粒度分布应为单峰的。使用染料排除测定估计调配物中的总dsRNA浓度以及包埋的级分。调配的

dsRNA的样品可以在存在或不破坏调配物的表面活性剂(例如,0.5% Triton-X100)的情况下与RNA结合染料(如RiboGreen®(分子探针公司(Molecular Probes)))一起温育。调配物中的总dsRNA可以通过来自含有表面活性剂的样品的信号(相对于标准曲线)来测定。通过从总dsRNA含量中减去“游离”dsRNA含量(如在不存在表面活性剂的情况下通过信号所测量的)来测定包埋的级分。包埋的dsRNA的百分比通常>85%。对于SNALP调配物,粒度为至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm和至少120nm。合适的范围通常为约至少50nm至约至少110nm、约至少60nm至约至少100nm或约至少80nm至约至少90nm。

#### [0968] VII. 本发明的方法

[0969] 本发明还提供了使用本发明的iRNA和/或本发明的组合物来减少和/或抑制细胞(例如受试者的细胞,例如肝细胞)中的CIDEB表达的方法。所述方法包括使细胞与本发明的RNAi药剂或包含iRNA药剂的药物组合物接触。在一些实施方案中,将细胞维持持续足以获得CIDEB基因的mRNA转录物的降解的时间。

[0970] 本发明还提供了使用本发明的iRNA和/或本发明的组合物以及靶向含有3个(PNPLA3)基因的Patatin样磷脂酶结构域的iRNA药剂和/或包含靶向PNPLA3的iRNA药剂的药物组合物来减少和/或抑制细胞(例如受试者的细胞,例如肝细胞)中的PNPLA3表达的方法。

[0971] 另外,本发明提供了抑制脂滴在细胞(例如受试者的细胞,例如肝细胞)中的积累和/或扩增的方法。所述方法包括使细胞与iRNA药剂或包含本发明的iRNA药剂和靶向PNPLA3基因的iRNA药剂的药物组合物和/或包含靶向PNPLA3的iRNA药剂的药物组合物接触。在一些实施方案中,将细胞维持足以获得CIDEB基因和PNPLA3基因的mRNA转录物的降解的时间。

[0972] 基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法进行评估。例如,CIDEB的表达的减少可以通过使用本领域普通技术人员常规的方法(例如Northern印迹、qRT-PCR)测定CIDEB的mRNA表达水平来测定;通过使用本领域普通技术人员常规的方法(如蛋白质印迹、免疫技术)测定CIDEB的蛋白质水平来测定。还可以通过测量CIDEB的生物活性的降低,例如CIDEB与ApoB的相互作用的降低和/或肝脏中脂质成熟的降低来间接评估CIDEB表达的降低。

[0973] 靶向PNPLA3基因的合适的药剂在例如美国专利公开号2017/0340661中描述,所述美国专利公开的全部内容通过引用并入本文。

[0974] 在本发明的方法中,细胞可以在体外或体内接触,即细胞可以在受试者体内。

[0975] 适用于使用本发明的方法进行处理细胞可以是表达CIDEB基因(并且,在一些实施方案中,PNPLA3基因)的任何细胞。适用于本发明的方法中的细胞可以是哺乳动物细胞,例如,灵长类动物细胞(例如人细胞或非人灵长类动物细胞,例如,猴细胞或黑猩猩细胞),非灵长类动物细胞(例如牛细胞、猪细胞、骆驼细胞、美洲驼细胞、马细胞、山羊细胞、兔细胞、绵羊细胞、仓鼠细胞、豚鼠细胞、猫细胞、狗细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、狮子细胞、老虎细胞、熊细胞或水牛细胞),鸟细胞(例如,鸭细胞或鹅细胞),或鲸鱼细胞。在一个实施方案中,细胞是人细胞,例如,人肝细胞。

[0976] CIDEB表达在细胞中被抑制至少约5%、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%或约100%。在优选的实施方案中, CIDEB表达被抑制至少20%。

[0977] 在一些实施方案中, PNPLA3表达在细胞中也被抑制至少约5%、6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%或约100%。在优选的实施方案中, PNPLA3表达被抑制至少20%。

[0978] 在一个实施方案中, 本发明的体内方法可以包括向受试者施用含有iRNA的组合物, 其中所述iRNA包含核苷酸序列, 所述核苷酸序列与待治疗的哺乳动物的CIDEB基因的RNA转录物的至少一部分互补。

[0979] 在另一个实施方案中, 本发明的体内方法可以包括向受试者施用含有第一iRNA药剂和第二iRNA药剂的组合物, 其中第一iRNA包括与待治疗的哺乳动物的CIDEB基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列, 并且第二iRNA包括与待治疗的哺乳动物的PNPLA3基因的RNA转录物的至少一部分互补的核苷酸序列。

[0980] 当待治疗的生物体是例如人的哺乳动物时, 组合物可以通过本领域已知的任何方式施用, 包括但不限于口服、腹膜内或肠胃外途径, 包括颅内(例如, 心室内、脑实质内和鞘内)、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、鼻内、直肠和局部(包含经颊和舌下)施用。在某些实施方案中, 组合物通过静脉输注或注射施用。在某些实施方案中, 组合物通过皮下注射施用。

[0981] 在一些实施方案中, 通过贮库注射进行施用。贮库注射可以在长时段内以一致的方式释放iRNA。因此, 贮库注射可以减少获得期望的效果(例如, CIDEB的期望的抑制, 或治疗或预防效果)所需的给药频率。贮库注射也可以提供更一致的血清浓度。贮库注射可以包含皮下注射或肌内注射。在优选实施方案中, 贮库注射是皮下注射。

[0982] 在一些实施方案中, 通过泵进行施用。泵可以是外部泵或外科植入的泵。在某些实施方案中, 泵是皮下植入的渗透泵。在其他实施方案中, 泵是输注泵。输注泵可以用于静脉、皮下、动脉或硬膜外输注。在优选实施方案中, 输注泵是皮下输注泵。在其他实施方案中, 泵是外科植入的泵, 所述外科植入的泵将iRNA递送到肝脏。

[0983] 本发明的iRNA可以存在于药物组合物中, 例如存在于合适的缓冲溶液中。缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶蛋白、碳酸盐或磷酸盐, 或其任何组合。在一个实施方案中, 缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以调节含有iRNA的缓冲溶液的pH和渗透压, 使其适合向受试者施用。

[0984] 可替代地, 本发明的iRNA可以作为药物组合物, 如dsRNA脂质体调配物施用。

[0985] 可以基于是否期望局部或全身治疗以及基于待治疗的区域来选择施用模式。可以选择施用的通路和位点来增强靶向。

[0986] 在一个方面, 本发明还提供了用于抑制哺乳动物中CIDEB基因的表达的方法。所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物的细胞中CIDEB基因的dsRNA的组合物, 由此抑

制细胞中CIDEB基因的表达。

[0987] 在一些实施方案中,所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物的细胞中CIDEB基因的dsRNA的组合物,由此抑制细胞中CIDEB基因的表达。在另一个实施方案中,所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物的细胞中CIDEB基因的dsRNA药剂的药物组合物。

[0988] 在另一个方面,本发明提供了本发明的iRNA药剂或药物组合物用于抑制哺乳动物中CIDEB基因的表达的用途。

[0989] 在又一方面,本发明提供了靶向CIDEB基因的本发明的iRNA药剂或包含此类药剂的药物组合物在制造用于抑制哺乳动物中CIDEB基因的表达的药物中的用途。

[0990] 在一个方面,本发明还提供了用于抑制哺乳动物中CIDEB基因和PNPLA3基因的表达的方法。所述方法包括向哺乳动物施用包含靶向哺乳动物的细胞中的CIDEB基因的dsRNA的组合物和包含靶向哺乳动物的细胞中的PNPLA3基因的dsRNA的组合物,从而抑制细胞中CIDEB基因和PNPLA3基因的表达。在一个实施方案中,所述方法包括向哺乳动物施用药物组合物,所述药物组合物包含靶向哺乳动物的细胞中CIDEB基因和PNPLA3基因的dsRNA药剂。

[0991] 在一个方面,本发明提供了本发明的iRNA药剂或药物组合物和靶向PNPLA3基因的dsRNA或包含此类药剂的药物组合物用于抑制哺乳动物中CIDEB基因和PNPLA3基因的表达的用途。

[0992] 在又一个方面,本发明提供了本发明的靶向CIDEB基因的iRNA药剂或包含此类药剂的药物组合物,以及靶向PNPLA3基因的dsRNA或包含此类药剂的药物组合物在制造用于抑制哺乳动物中CIDEB基因和PNPLA3基因的表达的药物中的用途。

[0993] 基因表达的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,qRT-PCR)来评估。蛋白质产生的减少可以通过本领域已知的任何方法和通过本文所描述的方法(例如,ELISA)来评估。

[0994] 本发明还提供了治疗和预防方法,其包括向患有或易于发展脂肪肝相关疾病、病症或病况的受试者施用iRNA药剂、包含iRNA药剂的药物组合物或包含本发明的iRNA的载体。

[0995] 在一个方面,本发明提供了治疗患有将受益于CIDEB表达减少的病症(例如CIDEB相关疾病)的受试者的方法。

[0996] 本发明的治疗方法(和用途)包括向受试者(例如人)施用治疗有效量的抑制CIDEB的表达的dsRNA药剂或包含抑制CIDEB的表达的dsRNA的药物组合物,从而治疗受试者。

[0997] 在一个方面,本发明提供了预防患有将受益于CIDEB表达的降低的病症(例如慢性炎症性疾病)的受试者的至少一种症状的方法。所述方法包括向所述受试者施用预防性有效量的dsRNA药剂或包含dsRNA的药物组合物,从而预防所述受试者的至少一种症状。

[0998] 在一个实施方案中,CIDEB相关疾病、病症或病况是慢性炎症性疾病。慢性炎症性疾病的非限制性实例包括肝脏和其他组织的炎症。慢性炎症性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[0999] 本发明还提供了治疗和预防方法,其包括向患有或易于发展脂肪肝相关疾病、病

症或病况的受试者施用iRNA药剂、包含iRNA药剂的药物组合物或包含本发明的iRNA的载体和靶向PNPLA3的iRNA药剂、包含此类iRNA药剂的药物组合物或包含此类iRNA的载体。

[1000] 本发明还提供了治疗有效量的本发明的iRNA药剂或包含抑制CIDEB表达的dsRNA的药物组合物用于治疗受试者(例如将受益于CIDEB表达的降低和/或抑制的受试者)的用途,例如CIDEB相关疾病,例如慢性炎性疾病。慢性炎性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[1001] 在另一个方面,本发明提供了本发明的靶向CIDEB基因的iRNA药剂(例如dsRNA),或包含靶向CIDEB基因的iRNA药剂的药物组合物用于制造用于治疗受试者(例如将受益于CIDEB表达的降低和/或抑制(例如CIDEB相关疾病)的受试者)的药物的用途。

[1002] 本发明还提供了预防有效量的本发明的iRNA药剂或包含抑制CIDEB表达的dsRNA的药物组合物用于预防患有将受益于CIDEB表达的降低的病症(例如慢性炎性疾病)的受试者的至少一种症状的用途。慢性炎性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[1003] 在另一个方面,本发明提供了本发明的靶向CIDEB基因的iRNA药剂(例如dsRNA)或包含靶向CIDEB基因的iRNA药剂的药物组合物在制造用于预防患有将受益于CIDEB表达降低的病症(例如慢性炎性疾病)的受试者的至少一种症状的药物中的用途。慢性炎性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[1004] 在一个方面,本发明还提供了治疗有效量的本发明的iRNA药剂或包含抑制CIDEB表达的dsRNA与靶向PNPLA3基因的dsRNA组合的药物组合物或包含此类药剂的药物组合物用于治疗受试者的用途,所述受试者例如将受益于CIDEB表达的减少和/或抑制的受试者,例如CIDEB相关疾病,例如慢性炎性疾病。慢性炎性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[1005] 在一个方面,本发明还提供了本发明的靶向CIDEB基因的iRNA药剂(例如dsRNA),或包含靶向CIDEB基因的iRNA药剂与靶向PNPLA3基因的dsRNA组合的药物组合物,或包含此类药剂的药物组合物用于预防患有将受益于CIDEB表达降低的病症(例如慢性炎性疾病)的受试者的至少一种症状的用途。慢性炎性肝病的非限制性实例包括肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死、肝细胞癌、胰岛素敏感性和/或糖尿病。

[1006] 用于治疗患有CIDEB相关疾病、病症或病况,例如慢性炎性疾病,例如慢性炎性肝病,例如NASH的受试者(例如人受试者)的组合方法可用于治疗此类受试者,因为PPNPLA3的

沉默减少脂肪变性(即肝脂肪)。

[1007] 因此,在一个方面,本发明提供了治疗患有将受益于CIDEB表达的降低中的病症的受试者的方法,所述病症例如,CIDEB相关疾病,例如慢性炎症性疾病(例如,肝脏和其他组织的炎症)。在一个实施方案中,慢性炎症性疾病是慢性炎性肝病(例如,肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、酒精性肝病(ALD)、HCV相关肝硬化、药物诱导的肝损伤、肝细胞坏死和/或肝细胞癌)。在一个实施方案中,慢性炎性肝病是NASH。

[1008] 本发明的组合治疗方法(和用途)包括向受试者(例如人受试者)施用治疗有效量的抑制CIDEB的表达的dsRNA药剂或包含抑制CIDEB的表达的dsRNA的药物组合物,以及抑制PNPLA3的表达的dsRNA药剂或包含抑制PNPLA3的表达的dsRNA的药物组合物,从而治疗受试者。

[1009] 在一个方面,本发明提供了预防患有将受益于CIDEB表达的降低的病症(例如慢性炎症性疾病)的受试者的至少一种症状的方法。所述方法包括向所述受试者施用预防性有效量的dsRNA药剂或包含抑制CIDEB的表达的dsRNA的药物组合物,和抑制PNPLA3的表达的dsRNA药剂或包含抑制PNPLA3的表达的dsRNA的药物组合物,从而预防所述受试者的至少一种症状。

[1010] 在一个实施方案中,受试者对于编码含有3个(PNPLA3) I148M变异的patatin样磷脂酶结构域的基因是杂合的,也就是说,受试者可以具有编码PNPLA3 I148M变体的基因的等位基因和编码不同变体的另一等位基因。在另一个实施方案中,受试者对于编码PNPLA3 I148M变异的基因是纯合的,也就是说,基因的两个等位基因编码PNPLA3 I148M变体。在一个实施方案中,受试者对于编码含有3个(PNPLA3) I144M变异的patatin样磷脂酶结构域的基因是杂合的,也就是说,受试者可以具有编码PNPLA3 I144M变体的基因的等位基因和编码不同变体的另一等位基因。在另一个实施方案中,受试者对于编码PNPLA3 I144M变异的基因是纯合的,也就是说,基因的两个等位基因编码PNPLA3 I143M变体。

[1011] 在本发明的某些实施方案中,所述方法可以包括鉴定将受益于CIDEB表达的降低的受试者。所述方法通常包括确定来自受试者的样品是否包含编码PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体的核酸。所述方法还可以包括通过抑制CIDEB的表达将受试者分类为用于治疗或抑制肝病的首选者,通过确定来自受试者的样品是否包含编码包含I148M变异的PNPLA3蛋白的第一核酸和编码功能性CIDEB蛋白的第二核酸,和/或包含I144M变异的PNPLA3蛋白和功能性CIDEB蛋白,以及当检测到第一核酸和第二核酸两者时和/或当检测到两种蛋白质时,将受试者分类为通过抑制CIDEB来治疗或抑制肝病的首选者。

[1012] 变体PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体可以是本文所述的PNPLA3 Ile148Met变体和PNPLA3 Ile144Met变体中的任一者。PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体可以通过任何合适的手段(例如ELISA测定、RT-PCR、测序)来检测。

[1013] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定所述受试者对于PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体是纯合的还是杂合的。在一些实施方案中,受试者对于PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体是纯合的。对于PNPLA3 Ile148Met变体纯合的受试者具有编码PNPLA3 Ile148Met变体的基因的两个等位基因;对于PNPLA3 Ile144Met变体纯合的受试者具有编码PNPLA3 Ile144Met变体的基因的两个等位基因。在一些实施方案

中,受试者对于PNPLA3 Ile148Met变体或PNPLA3 Ile144Met变体是杂合的。对于PNPLA3 Ile148Met变体杂合的受试者可以具有编码PNPLA3 Ile148Met变体的基因的等位基因和编码不同PNPLA3变体的另一等位基因;对于PNPLA3 Ile144Met变体杂合的受试者可以具有编码PNPLA3 Ile144Met变体的基因的等位基因和编码不同PNPLA3变体的另一等位基因。在一些实施方案中,受试者对于PNPLA3 Ile148Met变体是纯合的。在一些实施方案中,受试者对于PNPLA3 Ile148Met变体是杂合的。在一些实施方案中,受试者对于PNPLA3 Ile144Met变体是纯合的。在一些实施方案中,受试者对于PNPLA3 Ile144Met变体是杂合的。

[1014] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括确定所述受试者是否肥胖。在一些实施方案中,如果受试者的体重指数(BMI)超过 $30\text{kg}/\text{m}^2$ ,则受试者是肥胖的。肥胖可以是患有肝病或处于发展肝病的风险中的受试者的特征。在一些实施方案中,所述方法进一步包括确定受试者是否患有脂肪肝。脂肪肝可以是患有肝病或处于发展肝病的风险中的受试者的特征。在一些实施方案中,所述方法进一步包括确定受试者是否肥胖并且患有脂肪肝。

[1015] 如本文所使用的,与术语“NAFLD”可互换使用的“非酒精性脂肪性肝病”是指在每天摄入少于20克酒精的情况下由大血管脂肪变性的存在所定义的疾病。NAFLD是美国最常见的肝病,并且通常与胰岛素抗性/2型糖尿病和肥胖相关。NAFLD由脂肪变性、脂肪性肝炎、肝硬化以及有时肝细胞癌表现出。关于NAFLD的综述,参见Tolman和Dalpiaz(2007)《治疗学和临床风险管理(Ther.Clin.Risk.Manag.)》,3(6):1153-1163,其全部内容通过引用并入本文。

[1016] 如本文所使用的,术语“脂肪变性”、“肝脂肪变性”和“脂肪性肝病”是指肝细胞中甘油三酯和其他脂肪的积累。

[1017] 如本文所使用的,术语“NAFLD”是指非酒精性脂肪性肝病。NAFLD是世界上所有现代工业化经济体地区(包括韩国和许多其他亚洲国家)最常见的肝病形式。患者通常表现为无症状或临床特征无特异性。相反,肝脏异常是通过肝脏成像,特别是超声检查偶然发现的,和/或存在升高的肝脏酶(丙氨酸氨基转移酶[ALT]和 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶)。NAFLD的诊断需要排除其他病症,特别是病毒性肝炎、大量饮酒和暴露于潜在的肝毒性药物。根据如亚太地区NAFLD指南等协议,术语NAFLD现在保留用于与营养过剩的代谢并发症相关的脂肪肝的病例,通常伴有向心性肥胖和超重(Farrell等人,《肠道和肝脏(Gut Liver)》6(2):149-171,2012)。

[1018] 如本文所使用的,术语“非酒精性脂肪性肝炎”或“NASH”是指由脂肪在肝脏中积聚引起的肝脏炎症和损害。NASH被认为是非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的进展形式,并且其特征在于肝脂肪变性、炎症、肝细胞损伤和不同程度的纤维化。脂肪组织功能障碍和肝脏炎性响应在NASH发展期间具有重要作用。细胞和分子响应机制还在不存在脂肪肝的情况下通过诱导导致肝细胞损伤的慢性炎性响应来促进肝脏炎症。

[1019] NASH类似于酒精性肝病,但发生在很少饮酒或没有饮酒的人中。NASH的主要特征是肝脏中的脂肪以及炎症和损伤。大多数患有NASH的人感觉良好,并且不知道他们有肝脏问题。然而,NASH可能是严重的,并且可能导致肝硬化,其中肝脏永久受损和疤痕,并且不再能够正常工作。NASH通常首先在被发现在常规血液测试组中包括的肝脏测试(例如丙氨酸氨基转移酶(ALT)或天冬氨酸氨基转移酶(AST))中升高的人中被怀疑。当进一步评估未显示肝脏疾病的明显原因(例如药物、病毒性肝炎或过量使用酒精)时,并且当肝脏的x射线或

成像研究显示脂肪时,怀疑NASH。证明NASH的诊断并将其与简单脂肪肝分离的唯一手段是肝脏活检。

[1020] 如本文所使用的,在组织学上定义的术语“肝硬化”是弥漫性肝脏过程,其特征存在于纤维化和正常肝脏结构转化为结构异常结节。

[1021] 如本文所使用的,术语“血清脂质”是指血液中的任何主要脂质。血清脂质可以以游离形式或作为蛋白质复合物(例如,脂蛋白复合物)的一部分存在于血液中。血清脂质的非限制性实例可以包括甘油三酯、胆固醇,如总胆固醇(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)和中密度脂蛋白胆固醇(IDL-C)。

[1022] 在一个实施方案中,将受益于CIDEB(并且在一些实施方案中,PNPLA3)的表达的降低的受试者是例如患有2型糖尿病和糖尿病前期或肥胖的受试者;在血液中具有高的脂肪水平(如胆固醇)或患有高血压的受试者;患有某些代谢障碍(包括代谢综合征)的受试者;具有快速体重减轻的受试者;患有某些感染(例如丙型肝炎感染)的受试者,或已暴露于一些毒素的受试者。在一个实施方案中,将受益于CIDEB表达(并且在一些实施方案中,PNPLA3)的降低的受试者是例如中年或更大年龄的受试者;西班牙裔、非西班牙裔白人或非裔美国人的受试者;服用某些药物(诸如皮质类固醇和癌症药物)的受试者。

[1023] 在本发明的方法(和用途)中,其包括向受试者施用靶向CIDEB的第一dsRNA药剂和靶向PNPLA3的第二dsRNA药剂,第一dsRNA药剂和第二dsRNA药剂可以调配在相同的组合物或不同的组合物中,并且可以以相同的组合物或单独的组合物施用于受试者。

[1024] 在一个实施方案中,用于本发明的方法中的“iRNA”是“双重靶向RNAi药剂”。术语“双重靶向RNAi药剂”是指包含第一dsRNA药剂的分子,所述第一dsRNA药剂包含核糖核酸分子的复合物,具有双链体结构,所述双链体结构包含两条反平行且基本上互补的核酸链,被称为相对于第一靶RNA(即,CIDEB基因)具有“有义”和“反义”取向,共价连接到包含第二dsRNA药剂的分子,所述第二dsRNA药剂包含核糖核酸分子的复合物,具有双链体结构,所述双链体结构包含两条反平行且基本上互补的核酸链,被称为相对于第二靶RNA(即,PNPLA3基因)具有“有义”和“反义”取向。在本发明的一些实施方案中,双重靶向RNAi药剂通过本文中称为RNA干扰或RNAi的转录后基因沉默机制触发第一和第二靶RNA(例如,mRNA)的降解。

[1025] dsRNA药剂以约0.1mg/kg至约50mg/kg的剂量被施用于受试者。通常,合适的剂量将在约0.1mg/kg至约5.0mg/kg,优选地约0.3mg/kg和约3.0mg/kg的范围内。

[1026] iRNA药剂可以定期通过静脉内输注被施用一段时间。在某些实施方案中,在初始治疗方案之后,可以在不太频繁的基础上施用治疗。

[1027] iRNA的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的CIDEB水平降低至少约5%、6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,39,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98%或至少约99%或更多。在优选的实施方案中,iRNA的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其他区室中的CIDEB水平降低至少20%。

[1028] iRNA的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、尿液或其他区室中的PNPLA3水平

降低至少约5%、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、39、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98%或至少约99%或更多。在优选的实施方案中，iRNA的施用可以将例如患者的细胞、组织、血液、CSF样品或其他区室中的PNPLA3水平降低至少20%。

[1029] 在施用全剂量的iRNA之前，可以向患者施用较小的剂量，如5%的输注反应，并且监测不良反应，如过敏反应。在另一个实例中，可以监测患者不期望的免疫刺激作用，如增加的细胞因子（例如，TNF- $\alpha$ 或INF- $\alpha$ ）水平。

[1030] 可替代地，iRNA可以皮下施用，即通过皮下注射。一次或多次注射可以用于向受试者递送期望的iRNA的日剂量。注射可以在一个时间段内重复进行。可以定期重复施用。在某些实施方案中，在初始治疗方案之后，可以在不太频繁的基础上施用治疗。重复剂量方案可以包括定期施用治疗量的iRNA，如每隔一天一次或一年一次。在某些实施方案中，iRNA约每周一次、每7-10天一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次、每10周一次、每11周一次、每12周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次（每季度一次）、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。

[1031] 在一个实施方案中，所述方法包括施用本文特征的组合，使得靶CIDEB基因的表达降低，如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24小时、28、32或约36小时。在一个实施方案中，靶CIDEB基因的表达降低持续延长的持续时间，例如至少约两、三、四天或更长时间，例如约一周、两周、三周或四周或更长时间。

[1032] 在另一个实施方案中，所述方法包括施用本文特征的组合，使得靶PNPLA3基因的表达降低，如持续约1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24小时、28、32或约36小时。在一个实施方案中，靶PNPLA3基因的表达降低持续延长的持续时间，例如至少约两、三、四天或更长时间，例如约一周、两周、三周或四周或更长时间。

[1033] 优选地，可用于本文特征的方法和组合物的iRNA特异性靶向靶CIDEB基因（并且在一些实施方案中，PNPLA3基因）的RNA（初级或加工的）。使用iRNA抑制这些基因的表达的组合和方法可以如本文所描述的制备和进行。

[1034] 根据本发明的方法施用dsRNA可以导致患有脂质代谢的病症的患者的此类疾病或病症的严重程度、体征、症状或标志物的降低。在此上下文中，“降低”意指此类水平在统计学上显著或临床上显著降低。降低可以是例如至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[1035] 可以例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活质量、维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标志物水平或适用于正在治疗或以预防为目标的给定疾病的任何其他可测量参数来评估疾病的治疗或预防功效。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如，可以例如通过周期性监测一种或多种血清脂质水平（例如甘油三酯水平）来评估治疗脂质代谢的病症的功效。后期读数与初始读数的比较为医师提供了治疗是否有效的指示。通过测量此类参数中的任一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。关于iRNA或其药物组合物的施用，“有效对抗”脂质代谢的病症表明，以临床

上适当的方式施用对患者的至少具有统计学意义的级分产生有益效果,如症状改善、治愈、疾病减轻、寿命延长,生活质量改善或熟悉治疗脂质代谢的病症和相关原因的医生通常认为是积极的其他效果。

[1036] 当疾病状态的一个或多个参数有统计上显著的改善时,或由于没有恶化或出现预期的症状,治疗或预防效果是明显的。作为实例,疾病的可测量参数的至少10%的有利变化,并且优选地至少20%、30%、40%、50%或更多的有利变化可以指示有效的治疗。也可以使用如本领域已知的给定疾病的实验动物模型来判断给定iRNA药物或该药物的调配物的功效。

[1037] 本发明进一步提供了使用本发明的iRNA药剂或药物组合物用于例如治疗将受益于CIDEB表达或CIDEB的减少或抑制的受试者(例如,患有CIDEB相关疾病、病症或病况的受试者)的方法,其与其他药物或其他治疗方法组合,例如,与已知药物和/或已知治疗方法(例如如目前用于治疗这些病症的那些药物和/或治疗方法)组合。在一些实施方案中,本发明提供了使用本发明的iRNA药剂或药物组合物和靶向PNPLA3的iRNA药剂例如用于治疗将受益于CIDEB表达和PNPLA3表达的降低和/或抑制的受试者(例如患有CIDEB相关疾病、病症或病况(例如慢性炎症性疾病)的受试者)的方法,其与其他药物或其他治疗方法组合,例如,与已知药物和/或已知治疗方法(例如如目前用于治疗这些病症的那些药物和/或治疗方法)组合。例如,在某些实施方案中,本发明的iRNA药剂或药物组合物与以下组合施用:例如吡哆醇、降低血压的ACE抑制剂(血管紧张素转化酶抑制剂)例如贝那普利药剂,例如利尿剂、 $\beta$ -阻断剂、ACE抑制剂、血管紧张素II受体阻断剂、钙通道阻断剂、 $\alpha$ -阻断剂、 $\alpha$ -2受体拮抗剂、组合的 $\alpha$ -阻断剂和 $\beta$ -阻断剂、中枢激动剂、外周肾上腺素能抑制剂和血管扩张剂;或降低胆固醇的药剂,例如他汀类药物、选择性胆固醇吸收抑制剂、树脂;降脂疗法;胰岛素增敏剂,如PPAR  $\gamma$  激动剂吡格列酮;glp-1r激动剂,如利拉鲁肽;维生素E;SGLT2抑制剂;或DPPIV抑制剂;或前述中任一者的组合。在一个实施方案中,本发明的iRNA药剂或药物组合物与抑制跨膜6超家族成员2(TM6SF2)基因的表达和/或活性的药剂,例如抑制TM6SF2基因的表达的RNAi药剂组合施用。

[1038] iRNA药剂和另外的治疗剂和/或治疗可以同时和/或以相同的组合施用,例如皮下,或另外的治疗剂可以作为单独的组合物的一部分或在单独的时间施用和/或通过本领域已知或本文所描述的另一种方法施用。

#### [1039] VIII. 药剂盒

[1040] 本发明还提供用于执行本发明的方法中任一者的药剂盒。此类药剂盒包括一种或多种RNAi药剂和使用说明,例如用于通过使细胞与本发明的RNAi药剂或药物组合物接触以有效抑制CIDEB的表达的量来抑制细胞中CIDEB的表达的说明书。药剂盒可以任选地进一步包括用于使细胞与RNAi药剂(例如,注射装置)接触的装置,或用于测量CIDEB的抑制的装置(例如,用于测量CIDEB mRNA和/或CIDEB蛋白的抑制的装置)。用于测量CIDEB的抑制的此类装置可以包括用于从受试者获得样品(例如,如血浆样品)的装置。本发明的药剂盒可以任选地进一步包括向受试者施用RNAi药剂的装置或用于确定治疗有效量或预防有效量的装置。

[1041] 除非另有定义,否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管类似或等效于本文所描述的方法和材料

的方法和材料可以用于实践或测试本发明特征的iRNA和方法,但下文描述了合适的方法和材料。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,将以本说明书(包含定义)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不旨在进行限制。

[1042] 实例

[1043] 实例1:CIDEB iRNA设计、合成和选择

[1044] 本文提供的核酸序列使用标准命名法表示。参见表2的缩略语。应当理解,这些单体当存在于寡核苷酸中时通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接。缩写应被理解为当置于寡核苷酸的3'末端位置时省略3'-磷酸酯(即,它们是3'-OH)。

[1045] 表2:用于核酸序列表示的核苷酸单体的缩略语。

缩略语	核苷酸
A	腺苷-3'-磷酸酯
Ab	$\beta$ -L-腺苷-3'-磷酸酯
Abs	$\beta$ -L-腺苷-3'-硫代磷酸酯
Af	2'-氟腺苷-3'-磷酸酯
Afs	2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
As	腺苷-3'-硫代磷酸酯
(A2p)	腺苷-2'-磷酸酯
(A2ps)	腺苷-2'-硫代磷酸酯
C	胞苷-3'-磷酸酯
Cb	$\beta$ -L-胞苷-3'-磷酸酯
Cbs	$\beta$ -L-胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cf	2'-氟胞苷-3'-磷酸酯
Cfs	2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
Cs	胞苷-3'-硫代磷酸酯
(C2p)	胞苷-2'-磷酸酯

[1046]

[1047]

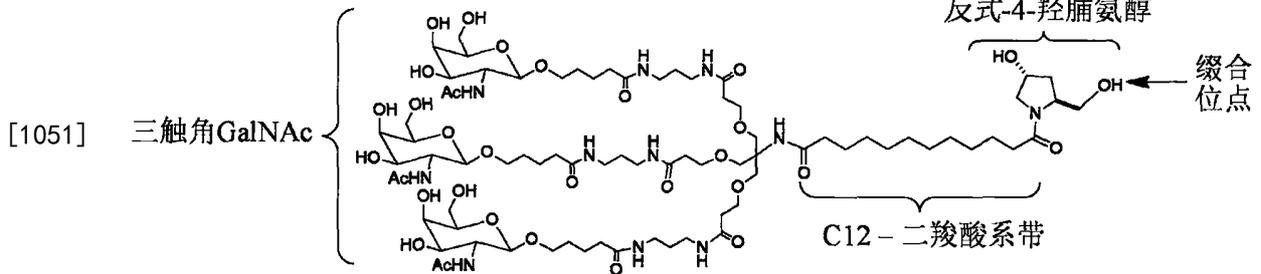
缩略语	核苷酸
(C2ps)	胞苷-2'-硫代磷酸酯
G	鸟苷-3'-磷酸酯
Gb	$\beta$ -L-鸟苷-3'-磷酸酯
Gbs	$\beta$ -L-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gf	2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯
Gfs	2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯
Gs	鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(G2p)	鸟苷-2'-磷酸酯
(G2ps)	鸟苷-2'-硫代磷酸酯
T	5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tf	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
Tfs	2'-氟-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
Ts	5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
U	尿苷-3'-磷酸酯
Uf	2'-氟尿苷-3'-磷酸酯
Ufs	2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
Us	尿苷-3'-硫代磷酸酯
(U2p)	尿苷-2'-磷酸酯
(U2ps)	尿苷-2'-硫代磷酸酯
N	任何核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
as	2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
c	2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
cs	2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
g	2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
gs	2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
t	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
ts	2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
u	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
us	2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
s	硫代磷酸酯键

缩略语	核苷酸
L96 <sup>1</sup>	N-[tris(GalNAc-烷基)-氧癸酰基]-4-羟脯氨酸醇; 或 (2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-氧代戊基]氨基]丙基]氨基]-3-氧代丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四氧代-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-羟基甲基吡咯烷
uL96 <sup>2</sup>	2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯((2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-氧代戊基]氨基]丙基]氨基]-3-氧代丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四氧代-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-吡咯烷基)甲基酯
P	磷酸酯
VP	磷酸乙烯酯
dA	2'-脱氧腺苷-3'-磷酸酯
dAs	2'-脱氧腺苷-3'-硫代磷酸酯
dC	2'-脱氧胞苷-3'-磷酸酯
dCs	2'-脱氧胞苷-3'-硫代磷酸酯
dG	2'-脱氧鸟苷-3'-磷酸酯
dGs	2'-脱氧鸟苷-3'-硫代磷酸酯
dT	2'-脱氧胸腺嘧啶-3'-磷酸酯
dTs	2'-脱氧胸腺嘧啶-3'-硫代磷酸酯
dU	2'-脱氧尿苷
dUs	2'-脱氧尿苷-3'-硫代磷酸酯
Y34	2-羟甲基-四氢呋喃-4-甲氧基-3-磷酸酯(无碱基 2'-OMe 呋喃糖)
Y44	反向无碱基 DNA (2-羟甲基-四氢呋喃-5-磷酸酯)
(Agn)	腺苷-乙二醇核酸(GNA)
(Cgn)	胞苷-乙二醇核酸(GNA)
(Ggn)	鸟苷-乙二醇核酸(GNA)
(Tgn)	胸苷-乙二醇核酸(GNA) S-异构体
(Aam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-磷酸酯
(Aams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Gam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-磷酸酯
(Gams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(Tam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-磷酸酯

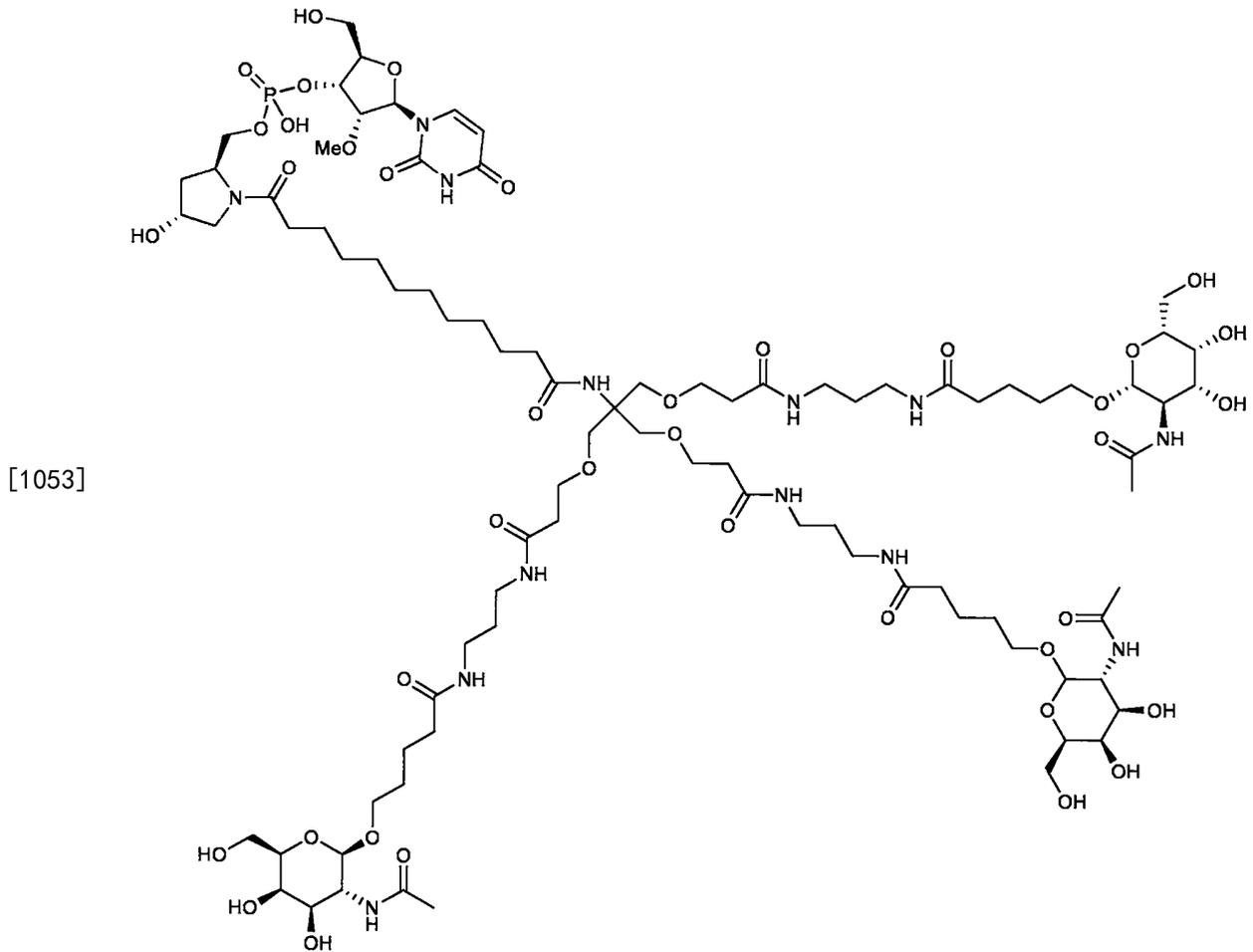
[1048]

缩略语	核苷酸
(Tams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)胸苷-3'-硫代磷酸酯
(Aeo)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-磷酸酯
(Aeos)	2'-O-甲氧基乙基腺苷-3'-硫代磷酸酯
(Geo)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-磷酸酯
(Geos)	2'-O-甲氧基乙基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
(Teo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯
(Teos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
(m5Ceo)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-磷酸酯
(m5Ceos)	2'-O-甲氧基乙基-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
(A3m)	3'-O-甲基腺苷-2'-磷酸酯
(A3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基腺苷-2'-磷酸酯
[1049] (G3m)	3'-O-甲基鸟苷-2'-磷酸酯
(G3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基鸟苷-2'-磷酸酯
(C3m)	3'-O-甲基胞苷-2'-磷酸酯
(C3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基胞苷-2'-磷酸酯
(U3m)	3'-O-甲基尿苷-2'-磷酸酯
(U3mx)	3'-O-甲基-呋喃木糖基尿苷-2'-磷酸酯
(m5Cam)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-磷酸酯
(m5Cams)	2'-O-(N-甲基乙酰胺)-5-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Chd)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-磷酸酯
(Chds)	2'-O-十六烷基-胞苷-3'-硫代磷酸酯
(Uhd)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-磷酸酯
(Uhds)	2'-O-十六烷基-尿苷-3'-硫代磷酸酯
(pshe)	羟乙基硫代磷酸酯

[1050] <sup>1</sup>L96的化学结构如下：



[1052] <sup>2</sup>uL96的化学结构如下：



[1054] 实验方法

[1055] 此实例描述了用于CIDEB siRNA药剂的设计、合成和选择的方法。

[1056] 生物信息学

[1057] 试剂来源

[1058] 在本文没有具体给出试剂来源的情况下,此类试剂可以从任何分子生物学试剂供应商处获得,其质量/纯度标准适用于分子生物学。

[1059] 转录物

[1060] 使用定制R和Python脚本来设计靶向人细胞死亡诱导DFFA样效应子B(CIDEB;人NCBI refseqID NM\_001393338.1;NCBI GeneID:27141)的一组siRNA。人NM\_001393338.1 REFSEQ mRNA具有2482个碱基的长度。

[1061] siRNA合成

[1062] 使用本领域已知的常规方法合成并退火siRNA。

[1063] 简言之,siRNA序列是在Mermade 192合成器(生物自动化公司(BioAutomation))上使用固体支撑物介导的磷酰胺化学以 $1\mu\text{mol}$ 规模合成的。固体支撑物是负载有定制GalNAc配体或通用固体支撑物(AM生物化学)的可控孔玻璃(500A)。辅助合成试剂2'-F和2'-O-甲基RNA和脱氧磷酰胺从赛默飞世尔公司(Thermo-Fisher)(威斯康星州密尔沃基(Milwaukee,WI))和兆维科技发展有限公司(Hongene)(中国(China))获得。使用对应的亚磷酰胺引入2'-F 2'-O-甲基、GNA(乙二醇核酸)、5'磷酸酯和其他修饰。在GalNAc修饰的CPG载体上进行3'GalNAc缀合的单链的合成。使用定制的CPG通用固体支撑物合成反义单链。使

用5-乙基硫基-1H-四唑(ETT)作为活化剂(0.6M在乙腈中),所有亚磷酰胺(100mM在乙腈中)的偶联时间为5分钟。使用3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT,从Chemgenes公司(美国马萨诸塞州威尔明顿)获得)于无水乙腈/吡啶(1:1v/v)中的50mM溶液产生硫代磷酸酯键。氧化时间为3分钟。所有序列都是在最后去除DMT基团的情况下合成的(“DMT off”)。

[1064] 固相合成完成后,将寡核糖核苷酸从固体支撑物上裂解,并在密封的96孔板中使用200 $\mu$ L含水甲胺试剂在60 $^{\circ}$ C下脱保护20分钟。对于含有叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)基团保护的2'核糖残基(2'-OH)的序列,使用TEA.3HF(三乙基胺三氢氟酸盐)试剂进行第二步骤脱保护。向甲胺脱保护溶液中添加200 $\mu$ L的二甲基亚砷(DMSO)和300 $\mu$ L的TEA.3HF试剂,并且将溶液在60 $^{\circ}$ C下再温育20分钟。在切割和脱保护步骤结束时,允许合成板达到室温,并且通过添加1mL的丙酮:乙醇混合物(9:1)沉淀。将板在-80 $^{\circ}$ C下冷却2小时,在多通道移液管的帮助下小心倾析上清液。将寡核苷酸颗粒重新悬浮在20mM NaOAc缓冲液中,并在配备有A905自动进样器和Frac 950级分收集器的AKTA纯化系统上使用5mL HiTrap尺寸排阻柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare))脱盐。在96孔板中收集脱盐样品。通过LC-MS分析每个序列的样品以确认身份,通过UV(260nm)进行定量,并通过IEX色谱法分析选定的一组样品以测定纯度。

[1065] 在Tecan液体处理机器人上进行单链的退火。将有义和反义单链的等摩尔混合物组合并在96孔板中退火。在将互补的单链组合后,将96孔板紧密密封,并在100 $^{\circ}$ C的烘箱中加热10分钟,并在2至3小时时段内缓慢达到室温。在1X PBS中将每个双链体的浓度归一化为10 $\mu$ M,并且然后提交用于体外筛选测定。

[1066] 在一些情况下,双链体(dsRNA)被合成多于一次。不同批次用不同的延伸进行标记。例如,AD-1686813.1和AD-1686813.2是不同批次的相同双链体。具有相同ID但没有延伸或具有不同延伸的双链体具有相同的有义链和反义链的核苷酸序列,例如ADAD-1686813、AD-1686813.1和AD-1686813.2具有相同的有义链和反义链的核苷酸序列。

[1067] 有义链和反义链的未经修饰的核苷酸序列的详细列表在表3和5中示出。

[1068] 有义链和反义链的经修饰的核苷酸序列的详细列表在表4和6中示出。

[1069] 表3.人CIDEB dsRNA药剂的未经修饰的有义链和反义链序列

[1070]

双链体 ID	有义序列 5' 至 3'	SEQ ID NO:	在 NM_0013933 38.1 中的范围	反义序列 5' 至 3'	SEQ ID NO:	在 NM_0013933 38.1 中的范围
AD-16851 56	CUGCAGA AGGUUGA CUGC GUU	7	31-51	AACGCAGU CAACCUUC UGCAGGC	142	29-51
AD-16851 73	AGCCGAA GGCAAGC ACGAUGU	8	69-89	ACAUCGUG CUUGCCUU CGGCUUG	143	67-89
AD-16851 98	CCAGCGU CACGCUG UAGCAGU	9	156-176	ACUGCUAC AGCGUGAC GCUGGCA	144	154-176
AD-16852 07	CGCUGUA GCAGCCG AGCAUCU	10	165-185	AGAUGCUC GGCUGCUA CAGCGUG	145	163-185
AD-16852 17	GCCGAGC AUCAGCC CGAAAGU	11	175-195	ACUUUCGG GCUGAUGC UCGGCUG	146	173-195
AD-16852 28	GCCCGAA AGGAAGC ACGAAAU	12	186-206	AUUUCGUG CUUCCUUU CGGGCUG	147	184-206
AD-16852 40	GCACGAA AGCGGUC AGAGUCU	13	198-218	AGACUCUG ACCGCUUU CGUGCUU	148	196-218
AD-16852 50	GGUCAGA GUCUCCA GGUCUAU	14	208-228	AUGAGCCU GGAGACUC UGACCGC	149	206-228
AD-16852 71	GCACAGC UGGCAUA CGCGGUU	15	259-279	AACCGCGU AUGCCAGC UGUGCCA	150	257-279
AD-16852 84	ACGCGGU CCUCCAC AGGUGU	16	272-292	ACACCGU GGAGGGAC CGGUAU	151	270-292
AD-16853 66	GCUGGCG UACAUGC UGAGCGU	17	448-468	ACGCUCAG CAUGUACG CCAGCGU	152	446-468
AD-16853 79	CUGAGCG CGCACAC GUAGUAU	18	461-481	AUACUACG UGUGCGCG CUCAGCA	153	459-481

[1071]

AD-16853 88	CACACGU AGUACAC CGCCUUU	19	470-490	AAAGGCGG UGUACUAC GUGUGCG	154	468-490
AD-16854 06	CCGGGUC AGGAAGG CCACAAU	20	520-540	AUUGUGGC CUUCCUGA CCC GGCA	155	518-540
AD-16854 18	GGCCACA AAGAGCG GCGUGAU	21	532-552	AUCACGCC GCUCUUUG UGGCCUU	156	530-552
AD-16854 69	CCACACCA CGAAGCC GUUGCU	22	643-663	AGCAACGG CUUCGUGG UGUGGAG	157	641-663
AD-16854 91	AGCAGGA AGGCUGU GCCUGUU	23	689-709	AACAGGCA CAGCCUUC CUGCUGC	158	687-709
AD-16855 03	CCUGUGG CCC GCGA AGUCUUU	24	704-724	AAAGACUU CGCGGGCC ACAGGCA	159	702-724
AD-16855 12	CGCGAAG UCUUCCA GCUCAGU	25	713-733	ACUGAGCU GGAAGACU UCGCGGG	160	711-733
AD-16855 28	UCAGCAG UGUCUCG UUCCCUU	26	729-749	AAGGGAAC GAGACACU GCUGAGC	161	727-749
AD-16855 38	GCAGACC GACAUCC UUCUGGU	27	760-780	ACCAGAAG GAUGUCGG UCUGCUA	162	758-780
AD-16855 49	UCCUUCU GGGCCUA CAGCCUU	28	771-791	AAGGCUGU AGGCCCAG AAGGAUG	163	769-791
AD-16855 61	UACAGCC UGCCUCU UUUCUGU	29	783-803	ACAGAAAA GAGGCAGG CUGUAGG	164	781-803
AD-16855 70	CCUCUUU UCUGCCU GGGAGUU	30	792-812	AACUCCCA GGCAGAAA AGAGGCA	165	790-812
AD-16855 87	AGUCCUG ACUUCCA CGAGGAU	31	809-829	AUCCUCGU GGAAGUCA GGACUCC	166	807-829
AD-16855 99	CUCAAAC ACAACUC CUUCUUU	32	841-861	AAAGAAGG AGUUGUGU UUGAGGU	167	839-861

[1072]

AD-16856 10	CUCCUUC UUGGAAC CCAGAUU	33	852-872	AAUCUGGG UCCAAGA AGGAGUU	168	850-872
AD-16856 14	UGCUC AGUCAGU UGACCUU	34	876-896	AAGGUCAA CUGACUGG GAGCAGG	169	874-896
AD-16856 27	CCUCCUUC CCAGAGC UCAGUU	35	909-929	AACUGAGC UCUGGGAA GGAGGCC	170	907-929
AD-16856 37	AGAGCUC AGUGGAC ACAGAAU	36	919-939	AUUCUGUG UCCACUGA GCUCUGG	171	917-939
AD-16856 48	ACCCUAC AAGGAUC CUUGGCU	37	960-980	AGCCAAGG AUCCUUGU AGGGUCC	172	958-980
AD-16856 64	UGGCAGG AAAGCAG GGAUUGU	38	976-996	ACAAUCCC UGCUIUCC UGCCAAG	173	974-996
AD-16856 73	AGCAGGG AUUGUGU UCAUUUU	39	985-1005	AAAUGAA CACAAUCC CUGCUUU	174	983-1005
AD-16856 89	AUUUGAG GGUUUCA CUGUCAU	40	1001-1021	AUGACAGU GAAACCCU CAAUGA	175	999-1021
AD-16856 99	UUCACUG UCAGUGA GAGUCUU	41	1011-1031	AAGACUCU CACUGACA GUGAAAC	176	1009-1031
AD-16857 08	AGUGAGA GUCUCAG CUUCCAU	42	1020-1040	AUGGAAGC UGAGACUC UCACUGA	177	1018-1040
AD-16857 17	CUCAGCU UCCAUGC AACUGUU	43	1029-1049	AACAGUUG CAUGGAAG CUGAGAC	178	1027-1049
AD-16857 26	CAUGCAA CUGUCCA UCACGGU	44	1038-1058	ACCGUGAU GGACAGUU GCAUGGA	179	1036-1058
AD-16857 35	GUCCAUC ACGGCUG CAACUGU	45	1047-1067	ACAGUUGC AGCCGUGA UGGACAG	180	1045-1067
AD-16857 44	GGCUGCA ACUGAAA UCAGAGU	46	1056-1076	ACUCUGAU UUCAGUUG CAGCCGU	181	1054-1076

[1073]

AD-16857 70	CACAGCG CACCAGA AGCUAAU	47	1082-1102	AUUAGCUU CUGGUGCG CUGUGUC	182	1080-1102
AD-16857 79	CCAGAAG CUAAAGU CUUGAUU	48	1091-1111	AAUCAAGA CUUUAGCU UCUGGUG	183	1089-1111
AD-16857 88	AAAGUCU UGAUGCC AUCAAU	49	1100-1120	AUUUGAUG GCAUCAAG ACUUUAG	184	1098-1120
AD-16857 98	UGCCAUC AAAGGAC AUCCCUU	50	1110-1130	AAGGGAUG UCCUUUGA UGGCAUC	185	1108-1130
AD-16858 10	UCUCUGU CACGUCC ACUAAU	51	1142-1162	AAUUAGUG GACGUGAC AGAGAUG	186	1140-1162
AD-16858 26	UAAUCGG CAAAGG AGAAAAU	52	1158-1178	AUUUUCUC CUUUUGCC GAUUAGU	187	1156-1178
AD-16858 38	AAGUGAG AGAAGAU GACCUAU	53	1176-1196	AUAGGUCA UCUUCUCU CACUUUU	188	1174-1196
AD-16858 47	AAGAUGA CCUAAGU GUGACUU	54	1185-1205	AAGUCACA CUUAGGUC AUCUUCU	189	1183-1205
AD-16858 56	UAAGUGU GACUGCA GCAGGCU	55	1194-1214	AGCCUGCU GCAGUCAC ACUUAGG	190	1192-1214
AD-16858 69	AGCAGGC AGCUCUG GAAAAU	56	1207-1227	AAUUUCC AGAGCUGC CUGCUGC	191	1205-1227
AD-16858 78	CUCUGGA AAAUGAA GCCAGAU	57	1216-1236	AUCUGGCU UCAUUUUC CAGAGCU	192	1214-1236
AD-16858 89	GAAGCCA GAGCAGU GAGCCAU	58	1227-1247	AUGGCUCA CUGCUCUG GCUUCAU	193	1225-1247
AD-16858 98	CCGACCA AGGAGGA AGGAAU	59	1256-1276	AUUUCCUU CCUCCUUG GUCGGAG	194	1254-1276
AD-16859 02	GAGGAAG GAAAGAG CAGAUCU	60	1265-1285	AGAUCUGC UCUUCCU UCCUCCU	195	1263-1285

[1074]

AD-16859 12	AGAGCAG AUCCCAG GUUUGUU	61	1275-1295	AACAAACC UGGGAUCU GCUCUUU	196	1273-1295
AD-16859 21	CCCAGGU UUGUAAC AGAAAAU	62	1284-1304	AUUUUCUG UUACAAAC CUGGGAU	197	1282-1304
AD-16859 31	UAACAGA AAACACC ACUAAAU	63	1294-1314	AUUUAGUG GUGUUUUC UGUUACA	198	1292-1314
AD-16859 35	CAGCACA GGAGAGA ACCACCU	64	1318-1338	AGGUGGUU CUCUCCUG UGCUGGG	199	1316-1338
AD-16859 56	AGCCCAG AAGUCC AGGGAAU	65	1339-1359	AUUCCCUG GAACUUCU GGCUGG	200	1337-1359
AD-16859 69	CAGGGAA GGAACUC UCCGGUU	66	1352-1372	AACCGGAG AGUCCUU CCUGGA	201	1350-1372
AD-16859 83	UCCGGUC CACCAUG GAGUACU	67	1366-1386	AGUACUCC AUGGUGGA CCGGAGA	202	1364-1386
AD-16859 94	AUGGAGU ACCUCUC AGCUCUU	68	1377-1397	AAGAGCUG AGAGGUAC UCCAUGG	203	1375-1397
AD-16860 07	UUACUCA GGUCAGU AUCUAAU	69	1410-1430	AUUAGAUA CUGACCUG AGUAAGU	204	1408-1430
AD-16860 16	UCAGUAU CUAAUAU AAGCUCU	70	1419-1439	AGAGCUUA UAUUAGAU ACUGACC	205	1417-1439
AD-16860 28	AUAAGCU CGGAGUU UGGACGU	71	1431-1451	ACGUCCAA ACUCCGAG CUAAUAU	206	1429-1451
AD-16860 53	UCUGGAC CUCAGCU CCACCAU	72	1456-1476	AUGGUGGA GCUGAGGU CCAGACC	207	1454-1476
AD-16860 57	AGCGACC UUUCCGU GUCUGUU	73	1480-1500	AACAGACA CGGAAAGG UCGCUGG	208	1478-1500
AD-16860 66	UCCGUGU CUGUGAU CACAAGU	74	1489-1509	ACUUGUGA UCACAGAC ACGAAA	209	1487-1509

[1075]

AD-16860 75	GUGAUC CAAGCGG ACCAUCU	75	1498-1518	AGAUGGUC CGCUUGUG AUCACAG	210	1496-1518
AD-16860 86	CGGACCA UCCGGAA AGGCCUU	76	1509-1529	AAGGCCUU UCCGGAUG GUCCGCU	211	1507-1529
AD-16860 98	AAAGGCC UGACAGC UGCCACU	77	1521-1541	AGUGGCAG CUGUCAGG CCUUUCC	212	1519-1541
AD-16861 16	CCAGGAG CUGCUAG CCAAAGU	78	1544-1564	ACUUUGGC UAGCAGCU CCUGGCG	213	1542-1564
AD-16861 26	CUAGCCA AAGCAUU GGAGACU	79	1554-1574	AGUCUCCA AUGCUUUG GCUAGCA	214	1552-1574
AD-16861 36	CAUUGGA GACCCUA CUGCUGU	80	1564-1584	ACAGCAGU AGGGUCUC CAAUGCU	215	1562-1584
AD-16861 47	CUACUGC UGAAUGG AGUGCUU	81	1575-1595	AAGCACUC CAUUCAGC AGUAGGG	216	1573-1595
AD-16861 59	GGAGUGC UAACCCU GGUGCUU	82	1587-1607	AAGCACCA GGGUUAGC ACUCCAU	217	1585-1607
AD-16861 71	CUGGUGC UAGAGGA GGAUGGU	83	1599-1619	ACCAUCCU CCUCUAGC ACCAGGG	218	1597-1619
AD-16861 81	AGGAGGA UGGAACU GCAGUGU	84	1609-1629	ACACUGCA GUUCCAUC CUCCUCU	219	1607-1629
AD-16861 97	AGUGGAC AGUGAGG ACUUCUU	85	1625-1645	AAGAAGUC CUCACUGU CCACUGC	220	1623-1645
AD-16862 07	GAGGACU UCUCCA GCUGCUU	86	1635-1655	AAGCAGCU GGAAGAAG UCCUCAC	221	1633-1655
AD-16862 16	UCCAGC UGCUGGA GGAUGAU	87	1644-1664	AUCAUCCU CCAGCAGC UGGAAGA	222	1642-1664
AD-16862 25	CUGGAGG AUGACAC GUGCCUU	88	1653-1673	AAGGCACG UGUCAUCC UCCAGCA	223	1651-1673

[1076]

AD-16862 42	CCUGAUG GUGUUGC AGUCUGU	89	1670-1690	ACAGACUG CAACACCA UCAGGCA	224	1668-1690
AD-16862 51	GUUGCAG UCUGGUC AGAGCUU	90	1679-1699	AAGCUCUG ACCAGACU GCAACAC	225	1677-1699
AD-16862 65	AGAGCUG GAGCCCU ACAAGGU	91	1693-1713	ACCUUGUA GGGCUCCA GCUCUGA	226	1691-1713
AD-16862 74	GCCCUAC AAGGAGU GGAGUGU	92	1702-1722	ACACUCCA CUCCUUGU AGGGCUC	227	1700-1722
AD-16862 86	GUGGAGU GCUGUCA UAUGGCU	93	1714-1734	AGCCAUAU GACAGCAC UCCACUC	228	1712-1734
AD-16863 19	CAAGCAC AGCAAGG ACAUCGU	94	1751-1771	ACGAUGUC CUUGCUGU GCUUGGG	229	1749-1771
AD-16863 34	CAUCGCC GAUUCAC CUUUGU	95	1766-1786	ACAAAGGU GAAUCGGG CGAUGUC	230	1764-1786
AD-16863 43	AUUCACC UUUGACG UGUACAU	96	1775-1795	AUGUACAC GUCAAAGG UGAAUCG	231	1773-1795
AD-16863 54	ACGUGUA CAAGCAA AACCCUU	97	1786-1806	AAGGGUUU UGCUUGUA CACGUCA	232	1784-1806
AD-16863 66	AAAACCC UCGAGAC CUCUUUU	98	1798-1818	AAAAGAGG UCUCGAGG GUUUUGC	233	1796-1818
AD-16863 77	GACCUCU UUGGCAG CCUGAAU	99	1809-1829	AUUCAGGC UGCCAAAG AGGUCUC	234	1807-1829
AD-16863 94	GAAUGUC AAAGCCA CAUUCUU	100	1826-1846	AAGAAUGU GGCUUUGA CAUUCAG	235	1824-1846
AD-16864 03	AGCCACA UUCUACG GGCUCUU	101	1835-1855	AAGAGCCC GUAGAAUG UGGCUUU	236	1833-1855
AD-16864 17	GGCUCUA CUCUAUG AGUUGUU	102	1849-1869	AACAACUC AUAGAGUA GAGCCCG	237	1847-1869

[1077]

AD-16864 26	CUAUGAG UUGUGAC UUUCAAU	103	1858-1878	AUUGAAAG UCACAACU CAUAGAG	238	1856-1878
AD-16864 35	GUGACUU UCAAGGA CUUGGCU	104	1867-1887	AGCCAAGU CCUUGAAA GUCACAA	239	1865-1887
AD-16864 51	UGGCCCA AAGAAAG UACUCAU	105	1883-1903	AUGAGUAC UUUCUUUG GGCCAAG	240	1881-1903
AD-16864 66	ACUCAGG GAGCUCC UUCGUUU	106	1898-1918	AAACGAAG GAGCUCCC UGAGUAC	241	1896-1918
AD-16864 75	GCUCCUU CGUUGGA CCUCCAU	107	1907-1927	AUGGAGGU CCAACGAA GGAGCUC	242	1905-1927
AD-16864 91	UCCACAC UGCUGCA AGGCCUU	108	1923-1943	AAGGCCUU GCAGCAGU GUGGAGG	243	1921-1943
AD-16865 08	CCUGGGC CAUAUGU UGCUGGU	109	1940-1960	ACCAGCAA CAUAUGGC CCAGGCC	244	1938-1960
AD-16865 18	AUGUUGC UGGGAAU UUCCUCU	110	1950-1970	AGAGGAAA UUCCCAGC AACAUAU	245	1948-1970
AD-16865 31	UUUCCUC CACCCUUC GUCAUU	111	1963-1983	AAUGACGA AGGGUGGA GGAAAUU	246	1961-1983
AD-16865 40	CCUUCG UCAUGCA GUGGAGU	112	1972-1992	ACUCCACU GCAUGACG AAGGGUG	247	1970-1992
AD-16865 43	CUGAGCA GUGGCAG CAGAAGU	113	1996-2016	ACUUCUGC UGCCACUG CUCAGCC	248	1994-2016
AD-16865 56	CAGAAGG GCCGCCUC CAUUCU	114	2010-2030	AGAAUGGA GGCGGCC UUCUGCU	249	2008-2030
AD-16865 65	CGCCUCCA UCCCUAC UAAGGU	115	2019-2039	ACCUUAGU AGGAAUGG AGGCGGC	250	2017-2039
AD-16865 66	CAGAAUC AUUCCAA CCGACCU	116	2058-2078	AGGUCGGU UGGAAUGA UUCUGGG	251	2056-2078

[1078]

AD-16865 76	CCAACCG ACCCACU GCAAAGU	117	2068-2088	ACUUUGCA GUGGGUCG GUUGGAA	252	2066-2088
AD-16865 85	CCACUGC AAAGACU AUGACAU	118	2077-2097	AUGUCAUA GUCUUUGC AGUGGGU	253	2075-2097
AD-16865 97	CUAUGAC AGCAUCA AAUUUCU	119	2089-2109	AGAAAUUU GAUGCUGU CAUAGUC	254	2087-2109
AD-16866 06	CAUCAAA UUUCAGG ACCUGCU	120	2098-2118	AGCAGGUC CUGAAAUU UGAUGCU	255	2096-2118
AD-16866 16	CAGGACC UGCAGAC AGUACAU	121	2108-2128	AUGUACUG UCUGCAGG UCCUGAA	256	2106-2128
AD-16866 26	AGACAGU ACAGGCU AGAUAUU	122	2118-2138	AUUAUCUA GCCUGUAC UGUCUGC	257	2116-2138
AD-16866 39	UAGAUAA CCCACCCA AUUUCU	123	2131-2151	AGAAAUUG GGUGGGUU AUCUAGC	258	2129-2151
AD-16866 49	AGAACCU UUCAGCA UAACGCU	124	2178-2198	AGCGUUUAU GCUGAAAG GUUCUGU	259	2176-2198
AD-16866 58	CAGCAUA ACGCCUC ACAUCCU	125	2187-2207	AGGAUGUG AGGCGUUA UGCUGAA	260	2185-2207
AD-16866 69	CUCACAU CCCAAGU CUAUACU	126	2198-2218	AGUAUAGA CUUGGGAU GUGAGGC	261	2196-2218
AD-16866 80	AGUCUAU ACCCUUA CCUGAAU	127	2209-2229	AUUCAGGU AAGGGUAU AGACUUG	262	2207-2229
AD-16866 93	ACCUGAA GAAUGCU GUUCUUU	128	2222-2242	AAAGAACA GCAUUCUU CAGGUAU	263	2220-2242
AD-16867 09	UCUUUCC UAGCCAC CUUUCUU	129	2238-2258	AAGAAAGG UGGCUAGG AAAGAAC	264	2236-2258
AD-16867 20	CACCUUU CUGGCCU CCCACUU	130	2249-2269	AAGUGGGA GGCCAGAA AGGUGGC	265	2247-2269

[1079]	AD-16867 29	GGCCUCCC ACUUGCC CUGAAU	131	2258-2278	AUUCAGGG CAAGUGGG AGGCCAG	266	2256-2278
	AD-16867 38	CUUGCCC UGAAAGG CCAAGAU	132	2267-2287	AUCUUGGC CUUUCAGG GCAAGUG	267	2265-2287
	AD-16867 47	AAAGGCC AAGAUCA AGAUGUU	133	2276-2296	AACAUCUU GAUCUUGG CCUUUCA	268	2274-2296
	AD-16867 51	AGGCAUC UUGAUCC CAGCCUU	134	2301-2321	AAGGCUGG GAUCAAGA UGCCUGG	269	2299-2321
	AD-16867 61	AUCCCAG CCUGACU GCUGCUU	135	2311-2331	AAGCAGCA GUCAGGCU GGGAUCA	270	2309-2331
	AD-16867 70	UGACUGC UGCUACA UCUAAUU	136	2320-2340	AAUUAGAU GUAGCAGC AGUCAGG	271	2318-2340
	AD-16867 81	GCCUCCU GUCCCUA AACUCCU	137	2351-2371	AGGAGUUU AGGGACAG GAGGCAU	272	2349-2371
	AD-16867 83	AGCAUAC UGAUGAC AGCCCUU	138	2373-2393	AAGGGCUG UCAUCAGU AUGCUGG	273	2371-2393
	AD-16867 94	GACAGCC CUCUCUG ACUUUAU	139	2384-2404	AUAAAGUC AGAGAGGG CUGUCAU	274	2382-2404
	AD-16868 03	CUCUGAC UUUACCU UGAGAUU	140	2393-2413	AAUCUCAA GGUAAAGU CAGAGAG	275	2391-2413
	AD-16868 13	ACCUUGA GAUCUGU CUUCAUU	141	2403-2423	AAUGAAGA CAGAUCUC AAGGUAU	276	2401-2423

[1080] 表4. 人CIDEB dsRNA药剂的经修饰的有义链和反义链序列

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列 5'至 3'	SEQ ID NO:
[1081] AD-16851 56	csusgcagAfaGf GfUfugacugcgu uL96	277	asAfsccgAfgU fCfaaccUfuCf ugcagsgsc	412	GCCUGCAGA AGGUUGACU GCGUG	547
AD-16851 73	asgscggaAfgGf CfAfacgacgaug uL96	278	asCfsaucGfuG fCfuugcCfuUf cggcusug	413	CAAGCCGAA GGCAAGCAC GAUGG	548

[1082]

AD-16851 98	cscsagcgUfcAf CfGfcuguagcag uL96	279	asCfsugcUfaC fAfgcguGfaCf gcuggscsa	414	UGCCAGCGU CACGCUGUA GCAGC	549
AD-16852 07	csgscuguAfgCf AfGfccgagcauc uL96	280	asGfsaugCfuC fGfgcugCfuAf cagcgsusg	415	CACGCUGUA GCAGCCGAG CAUCA	550
AD-16852 17	gscscgagCfaUf CfAfgcccgaag uL96	281	asCfsuuCfG fGfcugaUfgCf ucggcsusg	416	CAGCCGAGC AUCAGCCCG AAAGG	551
AD-16852 28	gscscgaAfaGf GfAfgcagcaaa uL96	282	asUfsuucGfuG fCfuuccUfuUf cgggcsusg	417	CAGCCCGAA AGGAAGCAC GAAAG	552
AD-16852 40	gscsacgaAfaGf CfGfgucagaguc uL96	283	asGfsacuCfuG fAfccgcUfuUf cgugcsusu	418	AAGCACGAA AGCGGUCAG AGUCU	553
AD-16852 50	gsgsucagAfgUf CfUfccaggcuca uL96	284	asUfsgagCfcU fGfgagaCfuCf ugaccsgsc	419	GCGGUCAGA GUCUCCAGG CUCAG	554
AD-16852 71	gscsacagCfuGf GfCfauacgcggu uL96	285	asAfsccgCfG fAfguccAfgCf ugugcscsa	420	UGGCACAGC UGGCAUACG CGGUC	555
AD-16852 84	ascsgcggUfcCf CfUfccacaggug uL96	286	asCfsaccUfgU fGfgaggGfaCf cgcgusasu	421	AUACGCGGU CCCUCCACA GGUGG	556
AD-16853 66	gscsuggcGfuAf CfAfgucugagcg uL96	287	asCfsgcuCfaG fCfauguAfcGf ccagcgsu	422	ACGUGGGCG UACAUGCUG AGCGC	557
AD-16853 79	csusgagcGfcGf CfAfcacguagua uL96	288	asUfsacuAfcG fUfgugcGfcGf cucagscsa	423	UGCUGAGCG CGCACACGU AGUAC	558
AD-16853 88	csascagUfaGf UfAfcaccgcuu uL96	289	asAfsaggCfG fUfguacUfaCf gugugscsg	424	CGCACACGU AGUACACCG CCUUG	559
AD-16854 06	cscsggguCfaGf GfAfggcccacaa uL96	290	asUfsuguGfgC fCfuuccUfgAf cccggscsa	425	UGCCGGGUC AGGAAGGCC ACAAA	560
AD-16854 18	gsgscacAfaAf GfAfgcggcguga uL96	291	asUfscacGfcCf GfcucuUfuGfu ggccsusu	426	AAGGCCACA AAGAGCGGC GUGAG	561
AD-16854 69	cscsacacCfaCfG fAfgccguugcu L96	292	asGfscaaCfG fCfuucUfgGf uguggsasg	427	CUCCACACC ACGAAGCCG UUGCC	562

[1083]

AD-16854 91	asgscaggAfaGf GfCfugugccugu uL96	293	asAfsacgGfcA fCfagccUfuCf cugcugsc	428	GCAGCAGGA AGGCUGUGC CUGUG	563
AD-16855 03	cscsugugGfcCf CfGfcgaagucuu uL96	294	asAfsagaCfuU fCfkgggGfcCf acaggscsa	429	UGCCUGUGG CCCGCGAAG UCUUC	564
AD-16855 12	csgscgaaGfuCf UfUfccagcucag uL96	295	asCfsugaGfcU fGfgaagAfcUf ucgsgsg	430	CCCGCGAAG UCUCCAGC UCAGC	565
AD-16855 28	uscsagcaGfuGf UfCfucguuccu uL96	296	asAfsaggAfaC fGfagacAfcUf gcugasgsc	431	GCUCAGCAG UGUCUCGUU CCUG	566
AD-16855 38	gscsagacCfGfA CfAfuuccucugg uL96	297	asCfscagAfaG fGfauGcGfGf ucugcsusa	432	UAGCAGACC GACAUCUU CUGGG	567
AD-16855 49	uscscuucUfgGf GfCfcuacagccu uL96	298	asAfsaggUfgU fAfggccCfaGf aaggasusg	433	CAUCCUUCU GGCCUACA GCCUG	568
AD-16855 61	usascagcCfuGf CfCfucuuucug uL96	299	asCfsagaAfaA fGfagggAfgGf cuguasgsg	434	CCUACAGCC UGCCUCUUU UCUGC	569
AD-16855 70	cscsucuuUfuCf UfGfccugggagu uL96	300	asAfsucCfcA fGfkgcagAfaA agaggscsa	435	UGCCUCUUU UCUGCCUGG GAGUC	570
AD-16855 87	asgsuccuGfaCf UfUfccacagga uL96	301	asUfscuCfGfU fGfgaagUfcAf ggacuscsc	436	GGAGUCCUG ACUCCACG AGGAC	571
AD-16855 99	csuscaaaCfaCfA fAfcuuccuuuu L96	302	asAfsagaAfgG fAfguugUfgUf uugagsgsu	437	ACCUCAAAC ACAACUCCU UCUUG	572
AD-16856 10	csuscuuCfuUf GfGfaaccagau uL96	303	asAfsucuGfgG fUfuccaAfgAf aggagsusu	438	AACUCCUUC UUGGAACCC AGAUC	573
AD-16856 14	usgscuccCfaGf UfCfaguugaccu uL96	304	asAfsgguCfaA fCfugacUfgGf gagcasgsg	439	CCUGCUCUCC AGUCAGUUG ACCUG	574
AD-16856 27	cscsuccuUfcCf CfAfgagcucagu uL96	305	asAfsucGfgC fUfcuggGfaAf ggaggscsc	440	GGCCUCCUU CCCAGAGCU CAGUG	575
AD-16856 37	asgsagcuCfaGf UfGfgacacagaa uL96	306	asUfsucuGfuG fUfccacUfgAf gcucusgsg	441	CCAGAGCUC AGUGGACAC AGAAA	576

AD-16856 48	ascscuaCfaAf GfGfauccuuggc uL96	307	asGfsccaAfgG fAfuccuUfgUf aggguscsc	442	GGACCCUAC AAGGAUCCU UGGCA	577
AD-16856 64	usgscagGfaAf AfGfcagggauug uL96	308	asCfsaauCfcCf UfgcuUfcCfu gccasag	443	CUUGGCAGG AAAGCAGGG AUUGU	578
AD-16856 73	asgscaggGfaUf UfGfuguucauu uL96	309	asAfsaaGfaA fCfacaUfcCfc ugcususu	444	AAAGCAGGG AUUGUGUUC AUUUG	579
AD-16856 89	asusuugaGfgGf UfUfucacuguca uL96	310	asUfsgacAfgU fGfaaacCfcUfc aaausgsa	445	UCAUUUGAG GGUUUCACU GUCAG	580
AD-16856 99	ususcacuGfuCf AfGfugagagucu uL96	311	asAfsagcUfcU fCfagcUfcAf gugaasasc	446	GUUUCACUG UCAGUGAGA GUCUC	581
AD-16857 08	asgsugagAfgUf CfUfcagcuucca uL96	312	asUfsggaAfgC fUfgagaCfuCf ucacusgsa	447	UCAGUGAGA GUCUCAGCU UCCA	582
AD-16857 17	csuscagcUfuCf CfAfugcaacugu uL96	313	asAfsagcUfuG fCfauggAfaGf cugagsasc	448	GUCUCAGCU UCCAUGCAA CUGUC	583
AD-16857 26	csasugcaAfcUf GfUfccaucacgg uL96	314	asCfscguGfaU fGfgacaGfuUf gcaugsgsa	449	UCCAUGCAA CUGUCCAUC ACGGC	584
AD-16857 35	gsusccauCfaCf GfGfcugcaacug uL96	315	asCfsaguUfgC fAfgccgUfgAf uggacsag	450	CUGUCCAUC ACGGCUGCA ACUGA	585
AD-16857 44	gsgscugcAfaCf UfGfaaaucaag uL96	316	asCfsucuGfaU fUfucagUfuGf cagccsgsu	451	ACGGCUGCA ACUGAAAUC AGAGC	586
AD-16857 70	csascagcGfcAf CfCfagaagcuau L96	317	asUfsuagCfuU fCfugguGfcGf cugugsusc	452	GACACAGCG CACCAGAAG CUAAA	587
AD-16857 79	cscsagaaGfcUf AfAfagucuugau uL96	318	asAfsucaAfgA fCfuuaGfcUf ucuggsusg	453	CACCAGAAG CUAAAGUCU UGAUG	588
AD-16857 88	asasagucUfuGf AfUfgcaucaaaa uL96	319	asUfsuugAfuG fGfcaucAfaGf acuuusag	454	CUAAAGUCU UGAUGCCAU CAAAG	589
AD-16857 98	usgscacuCfaAf AfGfgacaucuu uL96	320	asAfsgggAfuG fUfccuuUfgAf uggcasusc	455	GAUGCCAUC AAAGGACAU CCCUG	590

[1084]

[1085]

AD-16858 10	uscsucugUfcAf CfGfuccacuaau uL96	321	asAfsuuaGfuG fGfacguGfaCf agagasusg	456	CAUCUCUGU CACGUCCAC UAAUC	591
AD-16858 26	usasaucgGfcAf AfA faggagaaaa uL96	322	asUfsuuuCfuC fCfuuuuGfcCf gauuasgsu	457	ACUAAUCGG CAAAGGAG AAAAG	592
AD-16858 38	asasgugaGfaGf AfA fgaugaccua uL96	323	asUfsaggUfcA fUfcuucUfcUf cacuususu	458	AAAAGUGAG AGAAGAUGA CCUAA	593
AD-16858 47	asasgaugAfcCf UfA fagugugacu uL96	324	asAfsugcAfcA fCfuuaGfuCf aucuuscsu	459	AGAAGAUGA CCUAAGUGU GACUG	594
AD-16858 56	usasagugUfgAf CfUfgcagcagc uL96	325	asGfscuGfcU fGfcaguCfaCf acuuasgsg	460	CCUAAGUGU GACUGCAGC AGGCA	595
AD-16858 69	asgscaggCfaGf CfUfcuggaaaa uL96	326	asAfsuuuUfcC fA fgaGcUfgCf cugcusgsc	461	GCAGCAGGC AGCUCUGGA AAAUG	596
AD-16858 78	csuscuggAfaAf AfUfgaagccaga uL96	327	asUfscugGfcU fUfcauuUfuCf cagagscsu	462	AGCUCUGGA AAAUGAAGC CAGAG	597
AD-16858 89	gsasagccAfgAf GfC fagugagcca uL96	328	asUfsggcUfcA fCfugcuCfuGf gcuucsasu	463	AUGAAGCCA GAGCAGUGA GCCAG	598
AD-16858 98	cscsgaccAfaGf GfA fgaagga uL96	329	asUfsuucCfuU fCfcuucUfuGf gucggsasg	464	CUCCGACCA AGGAGGAAG GAAAG	599
AD-16859 02	gsasggaGfgAf AfA fgaGcagauc uL96	330	asGfsaucUfgC fUfcuuuUfcUf uccuucsasu	465	AGGAGGAAG GAAAGAGCA GAUCC	600
AD-16859 12	asgsagcaGfaUf CfCfcagguuugu uL96	331	asAfscaaAfcCf UfgggaUfcUfg cucususu	466	AAAGAGCAG AUCCCAGGU UUGUA	601
AD-16859 21	cscscaggUfuUf GfUfaacagaaaa L96	332	asUfsuuuCfuG fUfuacaAfaCf cugggsasu	467	AUCCCAGGU UUGUAACAG AAAAC	602
AD-16859 31	usasacagAfaAf AfCfaccacuaau L96	333	asUfsuuaGfuG fGfuguuUfuCf uguuascsa	468	UGUAACAGA AAACACCAC UAAAG	603
AD-16859 35	csasgcacAfgGf AfGfagaaccacu L96	334	asGfsgugGfuU fCfucuCfuGf ugcugsgsg	469	CCCAGCACA GGAGAGAAC CACCC	604

[1086]

AD-16859 56	asgscccaGfaAf GfUfuccagggaa uL96	335	asUfsuccCfuG fGfaacuUfcUf gggcusgsg	470	CCAGCCCAG AAGUUCCAG GGAAG	605
AD-16859 69	csasgggaAfgGf AfAfcucuccggu uL96	336	asAfsccgGfaG fAfguucCfuUf cccugsgsa	471	UCCAGGGAA GGAACUCUC CGGUC	606
AD-16859 83	uscscgguCfcAf CfCfauggaguac uL96	337	asGfsuacUfcC fAfugguGfgAf ccggasgsa	472	UCUCCGGUC CACCAUGGA GUACC	607
AD-16859 94	asusggagUfaCf CfUfcucagcucu uL96	338	asAfsagCfuG fAfgaggUfaCf uccausgsg	473	CCAUGGAGU ACCUCUCAG CUCUG	608
AD-16860 07	ususacucAfgGf UfCfaguaucuaa uL96	339	asUfsuagAfuA fCfugacCfuGf aguaasgsu	474	ACUUAUCA GGUCAGUAU CUAAU	609
AD-16860 16	uscsaguaUfcUf AfAfuuaagcuc uL96	340	asGfsagCfuA fUfauuaGfaUf acugascsc	475	GGUCAGUAU CUAAUAUAA GCUCG	610
AD-16860 28	asusaagCfcGf GfAfguuuggacg uL96	341	asCfsgucCfaA fAfcuccGfaGf cuuausasu	476	AUAUAAGCU CGGAGUUUG GACGG	611
AD-16860 53	uscsggagCfcUf CfAfgcuccaccu L96	342	asUfsgguGfgA fGfcugaGfgUf ccagascsc	477	GGUCUGGAC CUCAGCUCC ACCAC	612
AD-16860 57	asgscgacCfuUf UfCfcgugucugu uL96	343	asAfsagCfaA fCfsgaaAfgGf ucgusgsg	478	CCAGCGACC UUUCCGUGU CUGUG	613
AD-16860 66	uscscgugUfcUf GfUfgaucacaag uL96	344	asCfsuugUfgA fUfcacaGfaCfa cggasasa	479	UUUCCGUGU CUGUGAUCA CAAGC	614
AD-16860 75	gsusgaucAfcAf AfGfcggaccauc uL96	345	asGfsaugGfuC fCfgeuuGfuGf aucacsasg	480	CUGUGAUCA CAAGCGGAC CAUCC	615
AD-16860 86	csgsgaccAfuCf CfGfgaaaggccu uL96	346	asAfsaggCfuU fUfccggAfuGf guccgscsu	481	AGCGGACCA UCCGGAAAG GCCUG	616
AD-16860 98	asasaggCfuGf AfCfagcugccac uL96	347	asGfsuggCfaG fCfugucAfgGf ccuuuscsc	482	GGAAAGGCC UGACAGCUG CCACC	617
AD-16861 16	cscsaggaGfcUf GfCfuagccaaag uL96	348	asCfsuuGfgC fUfagcaGfcUf ccuggscsg	483	CGCCAGGAG CUGCUAGCC AAAGC	618

[1087]

AD-16861 26	csusagccAfaAf GfCfauuggagac uL96	349	asGfsucuCfcA fAfugcuUfuGf gcuagscsa	484	UGCUAGCCA AAGCAUUGG AGACC	619
AD-16861 36	csasuuggAfgAf CfCfcuacugcug uL96	350	asCfsagcAfgU fAfggguCfuCf caaugscsu	485	AGCAUUGGA GACCCUACU GCUGA	620
AD-16861 47	csusacugCfuGf AfAfuggagugcu uL96	351	asAfsagcCfuC fCfauucAfgCf aguagsgsg	486	CCCUACUGC UGAAUGGAG UGCUA	621
AD-16861 59	gsgsagugCfuAf AfCfccuggugcu uL96	352	asAfsagcCfcA fGfgguuAfgCf acuccsas	487	AUGGAGUGC UAACCCUGG UGCUA	622
AD-16861 71	csusggugCfuAf GfAfggaggaugg uL96	353	asCfscauCfcUf CfcucuAfgCfa ccagsgsg	488	CCCUAGUGC UAGAGGAGG AUGGA	623
AD-16861 81	asgsgaggAfuGf GfAfacugcagug uL96	354	asCfsacuGfcA fGfuuccAfuCf cuccscsu	489	AGAGGAGGA UGGAACUGC AGUGG	624
AD-16861 97	asgsuggaCfaGf UfGfaggacuucu uL96	355	asAfsгааGfuC fCfucacUfgUf ccacusgsc	490	GCAGUGGAC AGUGAGGAC UUCUU	625
AD-16862 07	gsasggacUfuCf UfUfccagcugcu uL96	356	asAfsagcGfcU fGfgaagAfaGf uccucsasc	491	GUGAGGACU UCUCCAGC UGCUG	626
AD-16862 16	ususccagCfuGf CfUfggaggauga uL96	357	asUfscuCfcU fCfcagcAfgCf uggaasgsa	492	UCUCCAGC UGCUGGAGG AUGAC	627
AD-16862 25	csusggagGfaUf GfAfcagugccu uL96	358	asAfsagcAfcG fUfgucaUfcCf uccagscsa	493	UGCUGGAGG AUGACACGU GCCUG	628
AD-16862 42	cscsugauGfgUf GfUfugcagucug uL96	359	asCfsagaCfuG fCfaacaCfcAfu caggsa	494	UGCCUGAUG GUGUUGCAG UCUGG	629
AD-16862 51	gsusugcaGfuCf UfGfgucagagcu uL96	360	asAfsagcCfuG fAfccagAfcUf gcaacsasc	495	GUGUUGCAG UCUGGUCAG AGCUG	630
AD-16862 65	asgsagcuGfgAf GfCfccuacaagg uL96	361	asCfsacuGfuA fGfggcuCfcAf gcucusgsa	496	UCAGAGCUG GAGCCCUAC AAGGA	631
AD-16862 74	gscscuaCfaAf GfGfaguggagug uL96	362	asCfsacuCfcAf CfuccuUfgUfa gggcsusc	497	GAGCCCUAC AAGGAGUGG AGUGC	632

[1088]

AD-16862 86	gsusggagUfgCf UfGfucauauggc uL96	363	asGfscCaUfaU fGfacagCfaCf uccacsusc	498	GAGUGGAGU GCUGUCAUA UGGCC	633
AD-16863 19	csasagcaCfaGfC fAfgagacaucgu L96	364	asCfsgauGfuC fCfuugcUfgUf gcuugsgsg	499	CCCAAGCAC AGCAAGGAC AUCGC	634
AD-16863 34	csasucgcCfcGf AfUfucaccuuug uL96	365	asCfsaaaGfgU fGfaaucGfgGf cgaugsusc	500	GACAUCGCC CGAUUCACC UUUGA	635
AD-16863 43	asusucacCfuUf UfGfacguguaca uL96	366	asUfsguaCfaC fGfucAAfGfGf ugaauscsg	501	CGAUUCACC UUUGACGUG UACAA	636
AD-16863 54	ascsguguAfcAf AfGfcaaaaccuu L96	367	asAfsaggUfuU fUfgcuUGfuAf cacguscSa	502	UGACGUGUA CAAGCAAAA CCCUC	637
AD-16863 66	asasaaccCfuCfG fAfgaccucuuuu L96	368	asAfsaagAfgG fUfcucgAfgGf guuuusgsc	503	GCAAAACCC UCGAGACCU CUUUG	638
AD-16863 77	gsasccucUfuUf GfGfcagccugaa uL96	369	asUfsucaGfgC fUfgccaAfaGf aggucusc	504	GAGACCUCU UUGGCAGCC UGAAU	639
AD-16863 94	gsasauguCfaAf AfGfccacauucu uL96	370	asAfsгааUfgU fGfgcuUfgAf cauucsasg	505	CUGAAUGUC AAAGCCACA UUCUA	640
AD-16864 03	asgscacAfuUf CfUfacgggcucu uL96	371	asAfsagCfcC fGfuagaAfuGf uggcususu	506	AAAGCCACA UUCUACGGG CUCUA	641
AD-16864 17	gsgscucuAfcUf CfUfaugaguugu uL96	372	asAfscaaCfuCf AfuagaGfuAfg agccscsg	507	CGGGCUCUA CUCUAUGAG UUGUG	642
AD-16864 26	csusaugaGfuUf GfUfgacuuuca uL96	373	asUfsugaAfaG fUfcacaAfcUf cauagsasg	508	CUCUAUGAG UUGUGACUU UCAAG	643
AD-16864 35	gsusgacuUfuCf AfAfggacuuggc uL96	374	asGfscCaAfgU fCfcuugAfaAf gucacsasa	509	UUGUGACUU UCAAGGACU UGGCC	644
AD-16864 51	usgsgcccAfaAf GfAfaaguacuca uL96	375	asUfsgagUfaC fUfuucuUfuGf ggccasasg	510	CUUGGCCCA AAGAAAGUA CUCAG	645
AD-16864 66	ascsucagGfgAf GfCfuccuucguu uL96	376	asAfsagAfaG fGfagcuCfcCf ugagusasc	511	GUACUCAGG GAGCUCCUU CGUUG	646

AD-16864 75	gscsuccuUfcGf UfUfggaccucca uL96	377	asUfsggaGfgU fCfcaacGfaAf ggagesusc	512	GAGCUCCUU CGUUGGACC UCCAC	647
AD-16864 91	uscscacaCfuGf CfUfgcaaggccu uL96	378	asAfsggcCfuU fGfcagcAfgUf guggasgsg	513	CCUCCACAC UGCUGCAAG GCCUG	648
AD-16865 08	cscsugggCfcAf UfAfuguugcugg uL96	379	asCfscagCfaAf CfauauGfgCfc caggscsc	514	GGCCUGGGC CAUAUGUUG CUGGG	649
AD-16865 18	asusguugCfuGf GfGfaauuuccuc uL96	380	asGfsaggAfaA fUfucccAfgCf aacausasu	515	AUAUGUUGC UGGGAAUUU CCUCC	650
AD-16865 31	ususuccuCfcAf CfCfcuucguc <u>au</u> uL96	381	asAfsugaCfgA fAfggguGfgAf ggaaasusu	516	AAUUUCCUC CACCCUUCG UCAUG	651
AD-16865 40	cscscuucGfuCf AfUfgcaguggag uL96	382	asCfsuccAfcU fGfcaugAfcGf aagggusug	517	CACCCUUCG UCAUGCAGU GGAGG	652
AD-16865 43	csusgagcAfgUf GfGfcagcagaag uL96	383	asCfsuucUfgC fUfgccaCfuGf cucagscsc	518	GGCUGAGCA GUGGCAGCA GAAGG	653
AD-16865 56	csasgaagGfgCf CfGfccuccauuc uL96	384	asGfsaaUGfgA fGfgcggCfcCf uucugscsu	519	AGCAGAAGG GCCGCCUCC AUUCC	654
AD-16865 65	csgsc <u>cc</u> CfaUf UfCfcuacuaagg uL96	385	asCfscuuAfgU fAfggaaUfgGf aggcgsgsc	520	GCCGCCUCC AUUCCUACU AAGGG	655
AD-16865 66	csasgaauCfaUf UfCfcaaccgaccu L96	386	asGfsgucGfgU fUfggaaUfgAf uucugsgsg	521	CCCAGAAUC AUUCCAACC GACCC	656
AD-16865 76	cscsaaccGfaCfC fCfacugcaaaguL 96	387	asCfsuuUGfcA fGfugggUfcGf guuggsasa	522	UCCAACCG ACCCACUGC AAAGA	657
AD-16865 85	cscsacugCfaAf AfGfacuaugaca uL96	388	asUfsgucAfuA fGfucuuUfgCf aguggsgsu	523	ACCCACUGC AAAGACUAU GACAG	658
AD-16865 97	csusaugaCfaGf CfAfuc <u>aa</u> uuuc uL96	389	asGfsaaaUfuU fGfaugcUfgUf cauagsusc	524	GACUAUGAC AGCAUCAAA UUUCA	659
AD-16866 06	csasucaaAfuUf UfCfaggaccugc uL96	390	asGfscagGfuC fCfugaaAfuUf ugaugscsu	525	AGCAUCAAA UUUCAGGAC CUGCA	660

[1089]

[1090]

AD-16866 16	csasggacCfuGf CfAfgacaguaca uL96	391	asUfsguaCfuG fUfucgCfAfgGf uccugsasa	526	UUCAGGACC UGCAGACAG UACAG	661
AD-16866 26	asgsacagUfaCf AfGfgcuagauaa uL96	392	asUfsuauCfuA fGfucgUfaCf ugucusgsc	527	GCAGACAGU ACAGGCUAG AUAAC	662
AD-16866 39	usasgauAfcCf CfAfcccauuuc uL96	393	asGfsaaaUfuG fGfguggGfuUf aucuasgsc	528	GCUAGAUAA CCCACCCAA UUUCC	663
AD-16866 49	asgsaaccUfuUf CfAfgcauaacgc uL96	394	asGfscguUfaU fGfcugaAfaGf guucusgsu	529	ACAGAACCU UUCAGCAUA ACGCC	664
AD-16866 58	csasgcauAfaCf GfCfcucacauccu L96	395	asGfsgauGfuG fAfggGgUfuAf ugcugsasa	530	UUCAGCAUA ACGCCUCAC AUCCC	665
AD-16866 69	csuscacaUfcCfC fAfagucuauacu L96	396	asGfsuauAfgA fCfuuggGfaUf gugagsgsc	531	GCCUCACAU CCCAAGUCU AUACC	666
AD-16866 80	asgsucuaUfaCf CfCfuaccugaa uL96	397	asUfsucaGfgU fAfagggUfaUf agacususg	532	CAAGUCUAU ACCCUUACC UGAAG	667
AD-16866 93	ascscugaAfgAf AfUfgcguucuu uL96	398	asAfsgaaAfcA fGfcauUcUfUf caggusasa	533	UUACCUGAA GAAUGCUGU UCUUU	668
AD-16867 09	uscuuucCfuAf GfCfcaccuuucu uL96	399	asAfsгааAfgG fUfggcuAfgGf aaagasasc	534	GUUCUUUCC UAGCCACCU UUCUG	669
AD-16867 20	csasccuuUfcUf GfGfccuccacu uL96	400	asAfsгugGfgA fGfgccaGfaAf aggugsgsc	535	GCCACCUUU CUGGCCUCC CACUU	670
AD-16867 29	gsgsccucCfcAf CfUfugcccugaa uL96	401	asUfsucaGfgG fCfaaguGfgGf aggccsasg	536	CUGGCCUCC CACUUGCCC UGAAA	671
AD-16867 38	csusugccCfuGf AfAfggccaaga uL96	402	asUfscuuGfgC fCfuucAfgGf gcaagsusg	537	CACUUGCCC UGAAAGGCC AAGAU	672
AD-16867 47	asasaggcCfaAf GfAfucaagaugu uL96	403	asAfscauCfuU fGfaucuUfgGf ccuuuscsa	538	UGAAAGGCC AAGAUCAAG AUGUC	673
AD-16867 51	asgsgcauCfuUf GfAfuccagccu uL96	404	asAfsггcUfgG fGfaucaAfgAf ugccusgsg	539	CCAGGCAUC UUGAUCCCA GCCUG	674

[1091]	AD-16867 61	asuscccaGfcCf UfGfacugcugcu uL96	405	asAfsucaGfcA fGfucagGfcUf gggausca	540	UGAUCCCAG CCUGACUGC UGCUA	675
	AD-16867 70	usgsacugCfuGf CfUfacuauuu uL96	406	asAfsuaaGfaU fGfuagCfGfCf agucasgsg	541	CCUGACUGC UGCUACAUC UAAUC	676
	AD-16867 81	gsescuccUfgUf CfCfcuaaacuccu L96	407	asGfsgagUfuU fAfgggaCfaGf gaggsasu	542	AUGCCUCCU GUCCCUAAA CUCC	677
	AD-16867 83	asgscauaCfuGf AfUfgacagcccu uL96	408	asAfsggcCfuG fUfcaucAfgUf augcusgsg	543	CCAGCAUAC UGAUGACAG CCCUC	678
	AD-16867 94	gsascagcCfcUf CfUfcugacuuaa uL96	409	asUfsaaaGfuC fAfgagaGfgGf cugucsasu	544	AUGACAGCC CUCUCUGAC UUUAC	679
	AD-16868 03	csuscugaCfuUf UfAfcuugagau uL96	410	asAfsucuCfaA fGfguaaAfgUf cagagsasg	545	CUCUCUGAC UUUACCUUG AGAUC	680
	AD-16868 13	ascscuugAfgAf UfCfugucuucan uL96	411	asAfsugaAfgA fCfagauCfuCf aaggusasa	546	UUACCUUGA GAUCUGUCU UCAUA	681

[1092] 表5. 人CIDEB dsRNA药剂的未经修饰的有义链和反义链序列

双链体 ID	有义序列 5' 至 3'	SEQ ID NO	在 NM_0013933 38.1 中的范围	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO	在 NM_0013933 8.1 中的范围	
[1093]	AD-169986 4.1	GUCCUGG GCUGAGA UCCCAGU	682	1269-1289	ACUGGGAU CUCAGCCC AGGACAA	1130	1267-1289
	AD-169986 7.1	CUGGGCU GAGAUCCC AGGUUU	683	1272-1292	AAACCUGG GAUCUCAG CCCAGGA	1131	1270-1292
	AD-169986 8.1	UGGGCUG AGAUSCCA GGUUUU	684	1273-1293	AAAACCTG GGATCUCA GCCCAGG	1132	1271-1293
	AD-169986 9.1	GGCUGA GAUSCCAG GUUUGU	685	1274-1294	ACAAACCU GGGAUCUC AGCCCAG	1133	1272-1294
	AD-169987 0.1	GGCUGAG AUSCCAGG UUUGUU	686	1275-1295	AACAAACC UGGGAUCU CAGCCCA	1134	1273-1295

[1094]

AD-169987 1.1	GCUGAGA UCCCAGGU UUGUAU	687	1276-1296	ATACAAACC UGGGAUCU CAGCCC	1135	1274-1296
AD-169987 2.1	CUGAGAU CCCAGGUU UGUAAU	688	1277-1297	ATUACAAA CCUGGGAU CUCAGCC	1136	1275-1297
AD-169987 3.1	UGAGAUC CCAGGUU UGUAACU	689	1278-1298	AGUUACAA ACCTGGGA UCUCAGC	1137	1276-1298
AD-169987 5.1	AGAUCCCA GGUUUGU AACAGU	690	1280-1300	ACUGTUAC AAACCUGG GAUCUCA	1138	1278-1300
AD-169988 2.1	AGGUUUG UAACAGA AACACU	691	1287-1307	AGUGTUTU CUGTUACA AACCUGG	1139	1285-1307
AD-169989 1.1	ACAGAAA ACACCACU AAAGCU	692	1296-1316	AGCUTUAG UGGTGUUU UCUGUUA	1140	1294-1316
AD-169989 2.1	CAGAAAA CACCACUA AAGCCU	693	1297-1317	AGGCTUTA GUGGUGUU UUCUGUU	1141	1295-1317
AD-169990 4.1	AGAACCAC CCAGCCCA GAAGU	694	1329-1349	ACUUCUGG GCUGGGUG GUUCUCU	1142	1327-1349
AD-169990 7.1	ACCACCCA GCCAGAA GUUCU	695	1332-1352	AGAACUTC UGGGCUGG GUGGUUC	1143	1330-1352
AD-169994 8.1	CACCAUGG AGUACCUC UCAGU	696	1373-1393	ACUGAGAG GUACUCCA UGGUGGA	1144	1371-1393
AD-169994 9.1	ACCAUGG AGUACCUC UCAGCU	697	1374-1394	AGCUGAGA GGUACUCC AUGGUGG	1145	1372-1394
AD-169995 1.1	CAUGGAG UACCUCUC AGCUCU	698	1376-1396	AGAGCUGA GAGGUACU CCAUGGU	1146	1374-1396
AD-169996 4.1	CUUACUCA GGUCAGU AUCUAU	699	1409-1429	ATAGAUAC UGACCUGA GUAAGUC	1147	1407-1429
AD-169996 7.1	ACUCAGG UCAGUAU CUAAUAU	700	1412-1432	ATAUTAGAU ACTGACCU GAGUAA	1148	1410-1432

[1095]

AD-169997 0.1	CAGGUCA GUAUCUA AUAUAAU	701	1415-1435	ATUATATUA GATACUGAC CUGAG	1149	1413-1435
AD-169997 1.1	AGGUCAG UAUCUAA UAUAAGU	702	1416-1436	ACUUAUUAU UAGAUACU GACCUGA	1150	1414-1436
AD-169997 2.1	GGUCAGU AUCUAAU AUAAGCU	703	1417-1437	AGCUTATAU UAGAUACU GACCUG	1151	1415-1437
AD-169997 3.1	GUCAGUA UCUAAUA UAAGCUU	704	1418-1438	AAGCTUAU AUUAGUA CUGACCU	1152	1416-1438
AD-169997 6.1	AGUAUCU AAUAUAA GCUCGGU	705	1421-1441	ACCGAGCU UAUAUUAG AUACUGA	1153	1419-1441
AD-169997 7.1	GUAUCUA AUAUAAG CUCGGAU	706	1422-1442	ATCCGAGCU UATAUUAG AUACUG	1154	1420-1442
AD-169997 8.1	UAUCUAA UAUAAGC UCGGAGU	707	1423-1443	ACUCCGAG CUUAUAUU AGAUACU	1155	1421-1443
AD-169997 9.1	AUCUAAU AUAAGCU CGGAGUU	708	1424-1444	AACUCCGA GCUTAUAU UAGAUAC	1156	1422-1444
AD-169998 2.1	UAAUAUA AGCUCGG AGUUUGU	709	1427-1447	ACAAACTC CGAGCUUA UAUUAGA	1157	1425-1447
AD-169998 3.1	AAUAUAA GCUCGGA GUUUGGU	710	1428-1448	ACCAAACU CCGAGCUU AUAUUAG	1158	1426-1448
AD-169998 4.1	AUAUAAG CUCGGAG UUUGGAU	711	1429-1449	ATCCAAACU CCGAGCUU AUAUUA	1159	1427-1449
AD-169998 5.1	UAUAAGC UCGGAGU UUGGACU	712	1430-1450	AGUCCAAA CUCCGAGC UUAUAUU	1160	1428-1450
AD-169998 6.1	AUAAGCU CGGAGUU UGGACGU	713	1431-1451	ACGUCCAA ACUCCGAG CUUAUAU	1161	1429-1451
AD-169998 7.1	UAAGCUC GGAGUUU GGACGGU	714	1432-1452	ACCGTCCA AACTCCGA GCUUAUA	1162	1430-1452

[1096]

AD-169998 8.1	AAGCUCG GAGUUUG GACGGAU	715	1433-1453	ATCCGUCCA AACUCCGA GCUUAU	1163	1431-1453
AD-169998 9.1	AGCUCGG AGUUUGG ACGGAGU	716	1434-1454	ACUCCGTCC AAACUCCG AGCUUA	1164	1432-1454
AD-169999 0.1	GCUCGGA GUUUGGA CGGAGGU	717	1435-1455	ACCUCCGU CCAAACUC CGAGCUU	1165	1433-1455
AD-170001 5.1	AGCGACCU UUCCGUG UCUGUU	718	1480-1500	AACAGACA CGGAAAGG UCGCUGG	1166	1478-1500
AD-170003 5.1	GAUCACA AGCGGACC AUCCGU	719	1500-1520	ACGGAUGG UCCGCUUG UGAUCAC	1167	1498-1520
AD-170003 7.1	UCACAAGC GGACCAUC CGGAU	720	1502-1522	ATCCGGAU GGUCCGCU UGUGAUC	1168	1500-1522
AD-170003 8.1	CACAAGCG GACCAUCC GAAAU	721	1503-1523	ATUCCGGA UGGTCCGC UUGUGAU	1169	1501-1523
AD-170003 9.1	ACAAGCG GACCAUCC GAAAU	722	1504-1524	ATUCCGGA AUGGUCCG CUUGUGA	1170	1502-1524
AD-170004 0.1	CAAGCGG ACCAUCCG GAAAGU	723	1505-1525	ACUUTCCG GAUGGUCC GCUUGUG	1171	1503-1525
AD-170004 1.1	AAGCGGA CCAUCCGG AAAGGU	724	1506-1526	ACCUUCC GGATGGUC CGCUUGU	1172	1504-1526
AD-170007 7.1	GGAGCUG CUAGCCAA AGCAUU	725	1547-1567	AAUGCUTU GGCTAGCA GCUCCUG	1173	1545-1567
AD-170008 0.1	GCUGCUA GCCAAAGC AUUGGU	726	1550-1570	ACCAAUGC UUUGGCUA GCAGCUC	1174	1548-1570
AD-170008 1.1	CUGCUCAGC CAAAGCA UUGGAU	727	1551-1571	ATCCAATGC UUTGGCUA GCAGCU	1175	1549-1571
AD-170008 2.1	UGCUAGCC AAAGCAU UGGAGU	728	1552-1572	ACUCCAAU GCUTUGGC UAGCAGC	1176	1550-1572

[1097]

AD-170008 3.1	GCUAGCCA AAGCAUU GGAGAU	729	1553-1573	ATCUCCAAU GCTUUGGC UAGCAG	1177	1551-1573
AD-170009 1.1	AAGCAUU GGAGACCC UACUGU	730	1561-1581	ACAGTAGG GUCTCCAA UGCUUUG	1178	1559-1581
AD-170009 2.1	AGCAUUG GAGACCCU ACUGCU	731	1562-1582	AGCAGUAG GGUCUCCA AUGCUUU	1179	1560-1582
AD-170009 4.1	CAUUGGA GACCCUAC UGCUGU	732	1564-1584	ACAGCAGU AGGGUCUC CAAUGCU	1180	1562-1584
AD-170009 7.1	UGGAGAC CCUACUGC UGAAUU	733	1567-1587	AAUUCAGC AGUAGGGU CUCCAAU	1181	1565-1587
AD-170009 9.1	GAGACCCU ACUGCUG AAUGGU	734	1569-1589	ACCATUCAG CAGUAGGG UCUCCA	1182	1567-1589
AD-170010 0.1	AGACCCUA CUGCUGA AUGGAU	735	1570-1590	ATCCAUTCA GCAGUAGG GUCUCC	1183	1568-1590
AD-170010 1.1	GACCCUAC UGCUGAA UGGAGU	736	1571-1591	ACUCCATUC AGCAGUAG GGUCUC	1184	1569-1591
AD-170010 4.1	CCUACUGC UGAAUGG AGUGCU	737	1574-1594	AGCACUCC AUUCAGCA GUAGGGU	1185	1572-1594
AD-170010 9.1	UGCUGAA UGGAGUG CUAACCU	738	1579-1599	AGGUTAGC ACUCCAUU CAGCAGU	1186	1577-1599
AD-170011 2.1	UGAAUGG AGUGCUA ACCCUGU	739	1582-1602	ACAGGGTU AGCACUCC AUUCAGC	1187	1580-1602
AD-170011 3.1	GAAUGGA GUGCUIA CCCUGGU	740	1583-1603	ACCAGGGU UAGCACUC CAUUCAG	1188	1581-1603
AD-170011 4.1	AAUGGAG UGCUIAACC CUGGUU	741	1584-1604	AACCAGGG UUAGCACU CCAUUCA	1189	1582-1604
AD-170011 5.1	AUGGAGU GCUAACCC UGGUGU	742	1585-1605	ACACCAGG GUUAGCAC UCCAUUC	1190	1583-1605

[1098]

AD-170011 6.1	UGGAGUG CUAACCCU GGUGCU	743	1586-1606	AGCACCAG GGUTAGCA CUCCAUI	1191	1584-1606
AD-170012 1.1	UGCUAACC CUGGUGC UAGAGU	744	1591-1611	ACUCTAGC ACCAGGGU UAGCACU	1192	1589-1611
AD-170012 2.1	GCUAACCC UGGUGCU AGAGGU	745	1592-1612	ACCUCUAG CACCAGGG UUAGCAC	1193	1590-1612
AD-170012 5.1	AACCCUGG UGCUAGA GGAGGU	746	1595-1615	ACCUCCTCU AGCACCAG GGUUAG	1194	1593-1615
AD-170014 8.1	GAACUGC AGUGGAC AGUGAGU	747	1618-1638	ACUCACTG UCCACUGC AGUUGCA	1195	1616-1638
AD-170014 9.1	AACUGCA GUGGACA GUGAGGU	748	1619-1639	ACCUCACU GUCCACUG CAGUUC	1196	1617-1639
AD-170015 6.1	GUGGACA GUGAGGA CUUCUUU	749	1626-1646	AAAGAAGU CCUCACUG UCCACUG	1197	1624-1646
AD-170015 8.1	GGACAGU GAGGACU UCUUCU	750	1628-1648	AGGAAGAA GUCCUCAC UGUCCAC	1198	1626-1648
AD-170015 9.1	GACAGUG AGGACUU CUUCCAU	751	1629-1649	ATGGAAGA AGUCCUCA CUGUCCA	1199	1627-1649
AD-170016 0.1	ACAGUGA GGACUUC UUCCAGU	752	1630-1650	ACUGGAAG AAGTCCUC ACUGUCC	1200	1628-1650
AD-170016 6.1	AGGACUU CUUCCAGC UGCUGU	753	1636-1656	ACAGCAGC UGGAAGAA GUCCUCA	1201	1634-1656
AD-170016 7.1	GGACUUC UUCCAGCU GCUGGU	754	1637-1657	ACCAGCAG CUGGAAGA AGUCCUC	1202	1635-1657
AD-170018 0.1	CUGCUGG AGGAUGA CACGUGU	755	1650-1670	ACACGUGU CAUCCUCC AGCAGCU	1203	1648-1670
AD-170018 7.1	AGGAUGA CACGUGCC UGAUGU	756	1657-1677	ACAUCAGG CACGUGUC AUCCUCC	1204	1655-1677

AD-170018 8.1	GGAUGAC ACGUGCCU GAUGGU	757	1658-1678	ACCATCAGG CACGUGUC AUCCUC	1205	1656-1678
AD-170018 9.1	GAUGACA CGUGCCUG AUGGUU	758	1659-1679	AACCAUCA GGCACGUG UCAUCCU	1206	1657-1679
AD-170019 0.1	AUGACAC GUGCCUG AUGGUGU	759	1660-1680	ACACCATCA GGCACGUG UCAUCC	1207	1658-1680
AD-170019 1.1	UGACACG UGCCUGA UGGUGUU	760	1661-1681	AACACCAU CAGGCACG UGUCAUC	1208	1659-1681
AD-170019 3.1	ACACGUGC CUGAUGG UGUUGU	761	1663-1683	ACAACACC AUCAGGCA CGUGUCA	1209	1661-1683
AD-170021 3.1	CAGUCUG GUCAGAG CUGGAGU	762	1683-1703	ACUCCAGC UCUGACCA GACUGCA	1210	1681-1703
AD-170024 2.1	GAGUGGA GUGCUGU CAUAUGU	763	1712-1732	ACAUUAUGA CAGCACUC CACUCCU	1211	1710-1732
AD-170024 3.1	AGUGGAG UGCUGUC AUAUGGU	764	1713-1733	ACCATATGA CAGCACUC CACUCC	1212	1711-1733
AD-170024 4.1	GUGGAGU GCUGUCA UAUGGCU	765	1714-1734	AGCCAUAU GACAGCAC UCCACUC	1213	1712-1734
AD-170024 5.1	UGGAGUG CUGUCAU AUGGCCU	766	1715-1735	AGGCCATAU GACAGCAC UCCACU	1214	1713-1735
AD-170024 8.1	AGUGCUG UCAUAUG GCCUGGU	767	1718-1738	ACCAGGCC AUATGACA GCACUCC	1215	1716-1738
AD-170024 9.1	GUGCUGU CAUAUGG CCUGGGU	768	1719-1739	ACCCAGGC CAUAUGAC AGCACUC	1216	1717-1739
AD-170025 0.1	UGCUGUC AUAUGGC CUGGGAU	769	1720-1740	ATCCCAGGC CATAUGACA GCACU	1217	1718-1740
AD-170025 2.1	CUGUCAU AUGGCCU GGGACGU	770	1722-1742	ACGUCCCA GGCCAUAU GACAGCA	1218	1720-1742

[1099]

[1100]

AD-170027 2.1	AGGCCCAA GCACAGCA AGGAU	771	1746-1766	ATCCTUGCU GUGCUUGG GCCUCU	1219	1744-1766
AD-170027 9.1	AGCACAGC AAGGACA UCGCCU	772	1753-1773	AGGCGATG UCCTUGCU GUGCUUG	1220	1751-1773
AD-170028 0.1	GCACAGCA AGGACAU CGCCCU	773	1754-1774	AGGGCGAU GUCCUUGC UGUGCUU	1221	1752-1774
AD-170030 3.1	UCACCUUU GACGUGU ACAAGU	774	1777-1797	ACUUGUAC ACGTCAAA GGUGAAU	1222	1775-1797
AD-170030 9.1	UUGACGU GUACAAG CAAACU	775	1783-1803	AGUUTUGC UUGTACAC GUCAAAG	1223	1781-1803
AD-170031 2.1	ACGUGUA CAAGCAA AACCCU	776	1786-1806	AAGGGUTU UGCTUGUA CACGUCA	1224	1784-1806
AD-170031 4.1	GUGUACA AGCAAAA CCCUCGU	777	1788-1808	ACGAGGGU UUUGCUUG UACACGU	1225	1786-1808
AD-170031 5.1	UGUACAA GCAAACC CUCGAU	778	1789-1809	ATCGAGGG UUUTGCUU GUACACG	1226	1787-1809
AD-170031 6.1	GUACAAG CAAACCC UCGAGU	779	1790-1810	ACUCGAGG GUUTUGCU UGUACAC	1227	1788-1810
AD-170031 7.1	UACAAGC AAAACCCU CGAGAU	780	1791-1811	ATCUCGAG GGUTUUGC UUGUACA	1228	1789-1811
AD-170031 8.1	ACAAGCA AAACCCUC GAGACU	781	1792-1812	AGUCTCGA GGGTUUUG CUUGUAC	1229	1790-1812
AD-170032 3.1	CAAACCC UCGAGACC UCUUU	782	1797-1817	AAAGAGGU CUCGAGGG UUUUGCU	1230	1795-1817
AD-170032 4.1	AAAACCCU CGAGACCU CUUUU	783	1798-1818	AAAAGAGG UCUCGAGG GUUUUGC	1231	1796-1818
AD-170032 5.1	AAACCCUC GAGACCUC UUUGU	784	1799-1819	ACAAAGAG GUUCTCGAG GGUUUUG	1232	1797-1819

[1101]

AD-170032 7.1	ACCCUCGA GACCUCUU UGGCU	785	1801-1821	AGCCAAAG AGGTCUCG AGGGUUU	1233	1799-1821
AD-170032 8.1	CCCUCGAG ACCUCUUU GGCAU	786	1802-1822	ATGCCAAA GAGGUCUC GAGGGUU	1234	1800-1822
AD-170032 9.1	CCUCGAGA CCUCUUUG GCAGU	787	1803-1823	ACUGCCAA AGAGGUCU CGAGGGU	1235	1801-1823
AD-170033 6.1	ACCUCUUU GGCAGCCU GAAUU	788	1810-1830	AAUUCAGG CUGCCAAA GAGGUCU	1236	1808-1830
AD-170033 9.1	UCUUUGG CAGCCUGA AUGUCU	789	1813-1833	AGACAUTC AGGCUGCC AAAGAGG	1237	1811-1833
AD-170034 4.1	GGCAGCCU GAAUGUC AAAGCU	790	1818-1838	AGCUTUGA CAUTCAGG CUGCCAA	1238	1816-1838
AD-170035 0.1	CUGAAUG UCAAGCC ACAUUU	791	1824-1844	AAAUGUGG CUUTGACA UUCAGGC	1239	1822-1844
AD-170035 2.1	GAAUGUC AAAGCCAC AUUCUU	792	1826-1846	AAGAAUGU GGCTUUGA CAUUCAG	1240	1824-1846
AD-170035 3.1	AAUGUCA AAGCCACA UUCUAU	793	1827-1847	ATAGAATGU GGCUUUGA CAUUCA	1241	1825-1847
AD-170035 4.1	AUGUCA AGCCACAU UCUACU	794	1828-1848	AGUAGAAU GUGGCUUU GACAUUC	1242	1826-1848
AD-170035 5.1	UGUCAAA GCCACAUU CUACGU	795	1829-1849	ACGUAGAA UGUGGCUU UGACAUU	1243	1827-1849
AD-170035 6.1	GUCAAAAG CCACAUUC UACGGU	796	1830-1850	ACCGTAGA AUGTGGCU UUGACAU	1244	1828-1850
AD-170035 7.1	UCAAGCC ACAUUCU ACGGGU	797	1831-1851	ACCCGUAG AAUGUGGC UUUGACA	1245	1829-1851
AD-170035 8.1	CAAAGCCA CAUUCUAC GGGCU	798	1832-1852	AGCCCGTA GAATGUGG CUUUGAC	1246	1830-1852

[1102]

AD-170035 9.1	AAAGCCAC AUUCUAC GGGCUU	799	1833-1853	AAGCCCGU AGAAUGUG GCUUUGA	1247	1831-1853
AD-170036 5.1	ACAUUCU ACGGGCUC UACUCU	800	1839-1859	AGAGTAGA GCCCCGUAG AAUGUGG	1248	1837-1859
AD-170036 6.1	CAUUCUAC GGGCUCU ACUCUU	801	1840-1860	AAGAGUAG AGCCCCGUA GAAUGUG	1249	1838-1860
AD-170036 8.1	UUCUACG GGCUCUAC UCUAUU	802	1842-1862	AAUAGAGU AGAGCCCCG UAGAAUG	1250	1840-1862
AD-170036 9.1	UCUACGG GCUCUACU CUAUGU	803	1843-1863	ACAUAGAG UAGAGCCC GUAGAAU	1251	1841-1863
AD-170037 0.1	CUACGGGC UCUACUCU AUGAU	804	1844-1864	ATCATAGAG UAGAGCCC GUAGAA	1252	1842-1864
AD-170037 1.1	UACGGGC UCUACUCU AUGAGU	805	1845-1865	ACUCAUAG AGUAGAGC CCGUAGA	1253	1843-1865
AD-170037 2.1	ACGGGCUC UACUCUA UGAGUU	806	1846-1866	AACUCATAG AGTAGAGC CCGUAG	1254	1844-1866
AD-170037 4.1	GGGCUCU ACUCUAU GAGUUGU	807	1848-1868	ACAACUCA UAGAGUAG AGCCCCG	1255	1846-1868
AD-170037 5.1	GGCUCUAC UCUAUGA GUUGUU	808	1849-1869	AACAACCTC AUAGAGUA GAGCCCCG	1256	1847-1869
AD-170037 6.1	GCUCUACU CUAUGAG UUGUGU	809	1850-1870	ACACAACU CAUAGAGU AGAGCCC	1257	1848-1870
AD-170037 8.1	UCUACUCU AUGAGUU GUGACU	810	1852-1872	AGUCACAA CUCAUAGA GUAGAGC	1258	1850-1872
AD-170038 3.1	UCUAUGA GUUGUGA CUUUCAU	811	1857-1877	ATGAAAGU CACAAACUC AUAGAGU	1259	1855-1877
AD-170038 4.1	CUAUGAG UUGUGAC UUUCAAU	812	1858-1878	ATUGAAAG UCACAACU CAUAGAG	1260	1856-1878

AD-170038 5.1	UAUGAGU UGUGACU UUCAAGU	813	1859-1879	ACUUGAAA GUCACAAC UCAUAGA	1261	1857-1879
AD-170038 6.1	AUGAGUU GUGACUU UCAAGGU	814	1860-1880	ACCUTGAA AGUCACAA CUCAUAG	1262	1858-1880
AD-170038 7.1	UGAGUUG UGACUUU CAAGGAU	815	1861-1881	ATCCTUGAA AGTCACAA CUCAUA	1263	1859-1881
AD-170038 8.1	GAGUUGU GACUUUC AAGGACU	816	1862-1882	AGUCCUTG AAAGUCAC AACUCAU	1264	1860-1882
AD-170040 8.1	UUGGCCCA AAGAAAG UACUCU	817	1882-1902	AGAGTACU UUCTUUGG GCCAAGU	1265	1880-1902
AD-170041 0.1	GGCCCAA GAAAGUA CUCAGU	818	1884-1904	ACUGAGTA CUUTCUUU GGCCAA	1266	1882-1904
AD-170041 1.1	GCCCAAAG AAAGUAC UCAGGU	819	1885-1905	ACCUGAGU ACUTUCUU UGGGCCA	1267	1883-1905
AD-170041 3.1	CAAAGA AAGUACU CAGGGAU	820	1887-1907	ATCCUGAG UACUUUCU UUGGGC	1268	1885-1907
AD-170041 4.1	CAAAGAA AGUACUC AGGGAGU	821	1888-1908	ACUCCCTG AGUACUUU CUUUGGG	1269	1886-1908
AD-170042 2.1	GUACUCA GGGAGCU CCUUCGU	822	1896-1916	ACGAAGGA GCUCCUG AGUACUU	1270	1894-1916
AD-170042 3.1	UACUCAG GGAGCUCC UUCGUU	823	1897-1917	AACGAAGG AGTCCCU GAGUACU	1271	1895-1917
AD-170042 4.1	ACUCAGG GAGCUCCU UCGUUU	824	1898-1918	AAACGAAG GAGCUCCC UGAGUAC	1272	1896-1918
AD-170042 5.1	CUCAGGG AGCUCCUU CGUUGU	825	1899-1919	ACAACGAA GGAGCUCC CUGAGUA	1273	1897-1919
AD-170042 6.1	UCAGGGA GCUCCUUC GUUGGU	826	1900-1920	ACCAACGA AGGAGCUC CCUGAGU	1274	1898-1920

[1103]

[1104]

AD-170042 7.1	CAGGGAG CUCCUUCG UUGGAU	827	1901-1921	ATCCAACGA AGGAGCUC CCUGAG	1275	1899-1921
AD-170042 8.1	AGGGAGC UCCUUCGU UGGACU	828	1902-1922	AGUCCAAC GAAGGAGC UCCCUGA	1276	1900-1922
AD-170043 9.1	UCGUUGG ACCUCCAC ACUGCU	829	1913-1933	AGCAGUGU GGAGGUCC AACGAAG	1277	1911-1933
AD-170046 1.1	CAAGGCCU GGCCAU AUGUUU	830	1935-1955	AAACAUAU GGCCCAGG CCUUGCA	1278	1933-1955
AD-170046 2.1	AAGGCCU GGCCAU AUGUUGU	831	1936-1956	ACAACATAU GGCCCAGG CCUUGC	1279	1934-1956
AD-170046 4.1	GGCCUGG GCCAUU GUUGCUU	832	1938-1958	AAGCAACA UAUGGCC AGGCCU	1280	1936-1958
AD-170046 5.1	GCCUGGGC CAUAUGU UGCUGU	833	1939-1959	ACAGCAAC AUATGGCCC AGGCCU	1281	1937-1959
AD-170046 8.1	UGGGCCA UAUGUUG CUGGGAU	834	1942-1962	ATCCCAGCA ACAUUUGG CCCAGG	1282	1940-1962
AD-170047 3.1	CAUAUGU UGCUGGG AAUUCU	835	1947-1967	AGAAAUTC CCAGCAAC AUAUGGC	1283	1945-1967
AD-170047 4.1	AUAUGUU GCUGGGA AUUCCU	836	1948-1968	AGGAAATU CCCAGCAA CAUAUGG	1284	1946-1968
AD-170047 6.1	AUGUUGC UGGGAAU UCCUCU	837	1950-1970	AGAGGAAA UUCCCAGC AACAUU	1285	1948-1970
AD-170047 7.1	UGUUGCU GGGAAUU UCCUCCU	838	1951-1971	AGGAGGAA AUUCCCAG CAACAU	1286	1949-1971
AD-170047 9.1	UUGCUGG GAAUUC CUCCACU	839	1953-1973	AGUGGAGG AAATUCCCA GCAACA	1287	1951-1973
AD-170048 2.1	CUGGGAA UUCCUCC ACCCUU	840	1956-1976	AAGGGUGG AGGAAUU CCCAGCA	1288	1954-1976

[1105]

AD-170048 5.1	GGAUUU CCUCCACC CUUCGU	841	1959-1979	ACGAAGGG UGGAGGAA AUUCCCA	1289	1957-1979
AD-170048 6.1	GAAUUUC CUCCACCC UUCGUU	842	1960-1980	AACGAAGG GUGGAGGA AAUUCCC	1290	1958-1980
AD-170048 7.1	AAUUUCC UCCACCCU UCGUCU	843	1961-1981	AGACGAAG GGUGGAGG AAAUUCC	1291	1959-1981
AD-170048 8.1	AUUUCCUC CACCCUUC GUCAU	844	1962-1982	ATGACGAA GGGTGGAG GAAAUUC	1292	1960-1982
AD-170048 9.1	UUUCCUCC ACCCUUCG UCAUU	845	1963-1983	AAUGACGA AGGGUGGA GGAAAUU	1293	1961-1983
AD-170049 0.1	UUCUCCA CCCUUCGU CAUGU	846	1964-1984	ACAUGACG AAGGGUGG AGGAAAU	1294	1962-1984
AD-170051 7.1	AAGGGCC GCCUCCAU UCCUAU	847	2013-2033	ATAGGAAU GGAGGCGG CCCUUCU	1295	2011-2033
AD-170051 9.1	GGCCGCC UCCAUUC UACUU	848	2015-2035	AAGUAGGA AUGGAGGC GGCCCUU	1296	2013-2035
AD-170052 0.1	GGCCGCCU CCAUUCCU ACUAU	849	2016-2036	ATAGTAGGA AUGGAGGC GGCCCUU	1297	2014-2036
AD-170052 2.1	CCGCCUCC AUUCCUAC UAAGU	850	2018-2038	ACUUAGTA GGAAUGGA GGCGGCC	1298	2016-2038
AD-170054 2.1	CCCACUGC AAAGACU AUGACU	851	2076-2096	AGUCAUAG UCUTUGCA GUGGGUC	1299	2074-2096
AD-170054 4.1	CACUGCAA AGACUAU GACAGU	852	2078-2098	ACUGTCAU AGUCUUUG CAGUGGG	1300	2076-2098
AD-170055 0.1	AAAGACU AUGACAG CAUCAU	853	2084-2104	ATUGAUGC UGUCAUAG UCUUUGC	1301	2082-2104
AD-170055 3.1	GACUAUG ACAGCAUC AAAUUU	854	2087-2107	AAAUTUGA UGCTGUCA UAGUCUU	1302	2085-2107

[1106]

AD-170055 4.1	ACUAUGA CAGCAUCA AAUUUU	855	2088-2108	AAAATUTG AUGCUGUC AUAGUCU	1303	2086-2108
AD-170055 5.1	CUAUGAC AGCAUCA AAUUUCU	856	2089-2109	AGAAAUTU GAUGCUGU CAUAGUC	1304	2087-2109
AD-170055 6.1	UAUGACA GCAUCAA AUUUCAU	857	2090-2110	ATGAAATUU GATGCUGU CAUAGU	1305	2088-2110
AD-170055 7.1	AUGACAG CAUCAA UUUCAGU	858	2091-2111	ACUGAAAU UUGAUGCU GUCAUAG	1306	2089-2111
AD-170055 8.1	UGACAGC AUCAAU UUCAGGU	859	2092-2112	ACCUGAAA UUUGAUGC UGUCAUA	1307	2090-2112
AD-170056 0.1	ACAGCAUC AAUUUC AGGACU	860	2094-2114	AGUCCUGA AAUTUGAU GCUGUCA	1308	2092-2114
AD-170056 3.1	GCAUCAA AUUCAG GACCUGU	861	2097-2117	ACAGGUCC UGAAAUUU GAUGCUG	1309	2095-2117
AD-170056 6.1	UCAAAUU UCAGGACC UGCAGU	862	2100-2120	ACUGCAGG UCCTGAAA UUUGAUG	1310	2098-2120
AD-170057 3.1	UCAGGACC UGCAGAC AGUACU	863	2107-2127	AGUACUGU CUGCAGGU CCUGAAA	1311	2105-2127
AD-170057 5.1	AGGACCU GCAGACA GUACAGU	864	2109-2129	ACUGTACU GUCTGCAG GUCCUGA	1312	2107-2129
AD-170057 6.1	GGACCUGC AGACAGU ACAGGU	865	2110-2130	ACCUGUAC UGUCUGCA GGUCCUG	1313	2108-2130
AD-170057 8.1	ACCUGCAG ACAGUAC AGGCUU	866	2112-2132	AAGCCUGU ACUGUCUG CAGGUCC	1314	2110-2132
AD-170058 0.1	CUGCAGAC AGUACAG GCUAGU	867	2114-2134	ACUAGCCU GUACUGUC UGCAGGU	1315	2112-2134
AD-170058 2.1	GCAGACA GUACAGG CUAGAUU	868	2116-2136	AAUCTAGC CUGTACUG UCUGCAG	1316	2114-2136

AD-170062 3.1	ACGCCUCA CAUCCCAA GUCUU	869	2194-2214	AAGACUTG GGATGUGA GGCGUUA	1317	2192-2214
AD-170067 0.1	UUCCUAGC CACCUUUC UGGCU	870	2241-2261	AGCCAGAA AGGTGGCU AGGAAAG	1318	2239-2261
AD-170067 1.1	UCCUAGCC ACCUUUCU GGCCU	871	2242-2262	AGGCCAGA AAGGUGGC UAGGAAA	1319	2240-2262
AD-170068 0.1	CCUUUCUG GCCUCCCA CUUGU	872	2251-2271	ACAAGUGG GAGGCCAG AAAGGUG	1320	2249-2271
AD-170068 1.1	CUUUCUG GCCUCCCA CUUGCU	873	2252-2272	AGCAAGTG GGAGGCCA GAAAGGU	1321	2250-2272
AD-170068 4.1	UCUGGCCU CCCACUUG CCCUU	874	2255-2275	AAGGGCAA GUGGGAGG CCAGAAA	1322	2253-2275
AD-170071 0.1	GGCAUCU UGAUCCCA GCCUGU	875	2302-2322	ACAGGCTG GGATCAAG AUGCCUG	1323	2300-2322
AD-170073 6.1	AAUGCCUC CUGUCCCU AAACU	876	2348-2368	AGUUTAGG GACAGGAG GCAUUGG	1324	2346-2368
AD-170073 7.1	AUGCCUCC UGUCCCUA AACUU	877	2349-2369	AAGUTUAG GGACAGGA GGCAUUG	1325	2347-2369
AD-170073 8.1	UGCCUCCU GUCCCUAA ACUCU	878	2350-2370	AGAGTUTA GGGACAGG AGGCAUU	1326	2348-2370
AD-170078 0.1	CAAACUA ACAAAAA CAUUUCU	879	2434-2454	AGAAAUGU UUUTGUUA GUUUGAG	1327	2432-2454
AD-170078 1.1	AAACUAA CAAAAAC AUUCCU	880	2435-2455	AGGAAATG UUUTUGUU AGUUUGA	1328	2433-2455
AD-170078 2.1	AACUAAC AAAAACA UUUCCAU	881	2436-2456	ATGGAAAU GUUTUUGU UAGUUUG	1329	2434-2456
AD-170079 1.1	GUCCUGG GCUGAGA UCCAGU	882	1269-1289	ACUGGGAU CUCAGCCC AGGACAA	1330	1267-1289

[1107]

[1108]

AD-170079 3.1	UGAGAUC CCAGGUU UGUAACU	883	1278-1298	AGUUACAA ACCUGGGA UCUCAGC	1331	1276-1298
AD-170079 4.1	GAGAUCCC AGGUUUG UAACAU	884	1279-1299	AUGUTACA AACCUGGG AUCUCAG	1332	1277-1299
AD-170079 5.1	GAUCCCAG GUUUGUA ACAGAU	885	1281-1301	AUCUGUTA CAAACCUG GGAUCUC	1333	1279-1301
AD-170079 6.1	CCAGGUU UGUAACA GAAAACU	886	1285-1305	AGUUTUCU GUUACAAA CCUGGGA	1334	1283-1305
AD-170079 7.1	CAGGUUU GUAACAG AAAACAU	887	1286-1306	AUGUTUTC UGUUACAA ACCUGGG	1335	1284-1306
AD-170079 8.1	AGGUUUG UACAGA AACACU	888	1287-1307	AGUGTUTU CUGUUACA AACCUGG	1336	1285-1307
AD-170079 9.1	GGUUUGU AACAGAA AACACCU	889	1288-1308	AGGUGUTU UCUGUUAC AAACCUG	1337	1286-1308
AD-170080 0.1	UACAGA AACACCA CUAAAU	890	1294-1314	AUUUAGTG GUGUUUUC UGUUACA	1338	1292-1314
AD-170080 1.1	CAGAAAA CACCACUA AAGCCU	891	1297-1317	AGGCTUTA GUGGUGUU UUCUGUU	1339	1295-1317
AD-170080 2.1	CACAGGA GAGAACC ACCCAGU	892	1321-1341	ACUGGGTG GUUCUCUC CUGUGCU	1340	1319-1341
AD-170080 4.1	GAACCACC CAGCCCAG AAGUU	893	1330-1350	AACUTCTG GGCUGGGU GGUUCUC	1341	1328-1350
AD-170080 5.1	AACCACCC AGCCCAGA AGUUU	894	1331-1351	AAACTUCU GGGCUGGG UGGUUCU	1342	1329-1351
AD-170080 6.1	ACCACCCA GCCCAGAA GUUCU	895	1332-1352	AGAACUTC UGGGCUGG GUGGUUC	1343	1330-1352
AD-170080 7.1	CCACCCAG CCCAGAAG UUCCU	896	1333-1353	AGGAACTU CUGGGCUG GGUGGUU	1344	1331-1353

[1109]

AD-170080 8.1	CACCCAGC CCAGAAG UCCAU	897	1334-1354	AUGGAACU UCUGGGCU GGUGGU	1345	1332-1354
AD-170080 9.1	CCAGAAG UCCAGG GAAGGAU	898	1342-1362	AUCCTUCCC UGGAACUU CUGGGC	1346	1340-1362
AD-170081 0.1	CAGAAGU UCCAGGG AAGGAU	899	1343-1363	AUUCCTC CCUGGAAC UUCUGG	1347	1341-1363
AD-170081 1.1	AGAAGUU CCAGGGA AGGAACU	900	1344-1364	AGUUCCTU CCCUGGAA CUUCUGG	1348	1342-1364
AD-170081 2.1	GAAGUUC CAGGGAA GGAACUU	901	1345-1365	AAGUTCCU UCCUGGA ACUUCUG	1349	1343-1365
AD-170081 3.1	AAGUUC AGGGAAG GAACUCU	902	1346-1366	AGAGTUCC UCCUGG AACUUCU	1350	1344-1366
AD-170081 4.1	AGUCCA GGGAAGG AACUCUU	903	1347-1367	AAGAGUTC CUUCCUG GAACUUC	1351	1345-1367
AD-170081 5.1	GUUCCAG GGAAGGA ACUCUCU	904	1348-1368	AGAGAGTU CCUCCCU GGAACUU	1352	1346-1368
AD-170081 6.1	GUCCACCA UGGAGUA CCUCUU	905	1370-1390	AAGAGGTA CUCCAUGG UGGACCG	1353	1368-1390
AD-170081 7.1	CACCAUGG AGUACCUC UCAGU	906	1373-1393	ACUGAGAG GUACUCCA UGGUGGA	1354	1371-1393
AD-170081 9.1	CCAUGGA GUACCUCU CAGCUU	907	1375-1395	AAGCTGAG AGGUACUC CAUGGUG	1355	1373-1395
AD-170082 1.1	AUGGAGU ACCUCUCA GCUCUU	908	1377-1397	AAGAGCTG AGAGGUAC UCCAUGG	1356	1375-1397
AD-170082 2.1	UUACUCA GGUCAGU AUCUAAU	909	1410-1430	AUUAGATA CUGACCUG AGUAAGU	1357	1408-1430
AD-170082 4.1	UCAGUAU CUAAUUAU AAGCUCU	910	1419-1439	AGAGCUTA UAUUAGAU ACUGACC	1358	1417-1439

[1110]

AD-170082 5.1	CAGUAUC UAAUAUA AGCUCGU	911	1420-1440	ACGAGCTU AUAUUAGA UACUGAC	1359	1418-1440
AD-170082 6.1	AGUAUCU AAUAUAA GCUCGGU	912	1421-1441	ACCGAGCU UAUAUUAG AUACUGA	1360	1419-1441
AD-170082 8.1	UCUAAUA UAAGCUC GGAGUUU	913	1425-1445	AAACTCCG AGCUUAUA UUAGAU	1361	1423-1445
AD-170082 9.1	CUAAUAU AAGCUCG GAGUUUU	914	1426-1446	AAAACUCC GAGCUUAU AUUAGAU	1362	1424-1446
AD-170083 0.1	UAAGCUC GGAGUUU GGACGGU	915	1432-1452	ACCGTCCA AACUCCGA GCUUAUA	1363	1430-1452
AD-170083 1.1	AAGCUCG GAGUUUG GACGGAU	916	1433-1453	AUCCGUCC AAACUCCG AGCUUAU	1364	1431-1453
AD-170083 2.1	GGAGUUU GGACGGA GGUCUUU	917	1439-1459	AAGACCCU CCGUCCAA ACUCCGA	1365	1437-1459
AD-170083 3.1	UGGACGG AGGGUCU GGACCUU	918	1445-1465	AAGGTCCA GACCCUCC GUCCAAA	1366	1443-1465
AD-170083 4.1	AGCGACCU UUCCGUG UCUGUU	919	1480-1500	AACAGACA CGGAAAGG UCGCUGG	1367	1478-1500
AD-170083 7.1	CAAGCGG ACCAUCCG GAAAGU	920	1505-1525	ACUUTCCG GAUGGUCC GCUUGUG	1368	1503-1525
AD-170083 8.1	CAUCCGGA AAGCCU GACAGU	921	1514-1534	ACUGTCAG GCCUUUCC GGAUGGU	1369	1512-1534
AD-170083 9.1	AGGAGCU GCUAGCCA AAGCAU	922	1546-1566	AUGTUTG GCUAGCAG CUCCUGG	1370	1544-1566
AD-170084 0.1	GGAGCUG CUAGCCAA AGCAUU	923	1547-1567	AAUGCUTU GGCUAGCA GCUCCUG	1371	1545-1567
AD-170084 1.1	GAGCUGC UAGCCAA AGCAUUU	924	1548-1568	AAAUGCTU UGGCUAGC AGCUCCU	1372	1546-1568

[1111]

AD-170084 2.1	AGCUGCU AGCCAAA GCAUUGU	925	1549-1569	ACAATGCU UUGGCUAG CAGCUCC	1373	1547-1569
AD-170084 3.1	CUAGCCAA AGCAUUG GAGACU	926	1554-1574	AGUCTCCA AUGCUUUG GCUAGCA	1374	1552-1574
AD-170084 4.1	UAGCCAA AGCAUUG GAGACCU	927	1555-1575	AGGUCUCC AAUGCUUU GGCUAGC	1375	1553-1575
AD-170084 5.1	AGCAUUG GAGACCCU ACUGCU	928	1562-1582	AGCAGUAG GGUCUCCA AUGCUUU	1376	1560-1582
AD-170084 6.1	GCAUUGG AGACCCUA CUGCUU	929	1563-1583	AAGCAGTA GGUCUCC AAUGCUU	1377	1561-1583
AD-170084 8.1	AUUGGAG ACCCUACU GCUGAU	930	1565-1585	AUCAGCAG UAGGGUCU CCAAUGC	1378	1563-1585
AD-170085 0.1	GGAGACCC UACUGCU GAAUGU	931	1568-1588	ACAUTCAG CAGUAGGG UCUCCAA	1379	1566-1588
AD-170085 1.1	GAGACCCU ACUGCUG AAUGGU	932	1569-1589	ACCATUCAG CAGUAGGG UCUCCA	1380	1567-1589
AD-170085 2.1	ACCCUACU GCUGAAU GGAGUU	933	1572-1592	AACUCCA UCAGCAGU AGGGUCU	1381	1570-1592
AD-170085 3.1	CCCUACUG CUGAAUG GAGUGU	934	1573-1593	ACACTCCA UUCAGCAG UAGGGUC	1382	1571-1593
AD-170085 4.1	CCUACUGC UGAAUGG AGUGCU	935	1574-1594	AGCACUCC AUUCAGCA GUAGGGU	1383	1572-1594
AD-170085 5.1	CUACUGCU GAAUGGA GUGCUU	936	1575-1595	AAGCACTC CAUUCAGC AGUAGGG	1384	1573-1595
AD-170085 6.1	UACUGCU GAAUGGA GUGCUAU	937	1576-1596	AUAGCACU CCAUUCAG CAGUAGG	1385	1574-1596
AD-170085 8.1	GCUGAAU GGAGUGC UAACCCU	938	1580-1600	AGGGTUAG CACUCCA UCAGCAG	1386	1578-1600

[1112]

AD-170085 9.1	CUGAAUG GAGUGCU AACCCUU	939	1581-1601	AAGGGUTA GCACUCCA UUCAGCA	1387	1579-1601
AD-170086 0.1	UGAAUGG AGUGCUA ACCCUGU	940	1582-1602	ACAGGGTU AGCACUCC AUUCAGC	1388	1580-1602
AD-170086 3.1	UGGAGUG CUAACCCU GGUGCU	941	1586-1606	AGCACCAG GGUUAGCA CUCCAUI	1389	1584-1606
AD-170086 4.1	GGAGUGC UAACCCUG GUGCUU	942	1587-1607	AAGCACCA GGUUAGC ACUCCAUI	1390	1585-1607
AD-170086 5.1	GAGUGCU AACCCUGG UGCUIU	943	1588-1608	AUAGCACC AGGGUUAG CACUCCA	1391	1586-1608
AD-170086 7.1	AACCCUGG UGCUIAGA GGAGGU	944	1595-1615	ACCUCCTCU AGCACCAG GGUUAG	1392	1593-1615
AD-170086 8.1	CCCUGGUG CUAGAGG AGGAUI	945	1597-1617	AAUCCUCC UCUAGCAC CAGGGUI	1393	1595-1617
AD-170086 9.1	GGUGCUA GAGGAGG AUGGAUI	946	1601-1621	AUCCATCC UCCUCUAG CACCAG	1394	1599-1621
AD-170087 0.1	GUGCUAG AGGAGGA UGGAACU	947	1602-1622	AGUCCAU CCUCCUCU AGCACCA	1395	1600-1622
AD-170087 1.1	CUAGAGG AGGAUGG AACUGCU	948	1605-1625	AGCAGUTC CAUCCUCC UCUAGCA	1396	1603-1625
AD-170087 2.1	GAGGAUG GAACUGC AGUGGAU	949	1611-1631	AUCCACTG CAGUCCA UCCUCCU	1397	1609-1631
AD-170087 3.1	GGAUGGA ACUGCAG UGGACAU	950	1613-1633	AUGUCCAC UGCAGUUC CAUCCUC	1398	1611-1633
AD-170087 4.1	GAUGGAA CUGCAGU GGACAGU	951	1614-1634	ACUGTCCA CUGCAGUU CCAUCCU	1399	1612-1634
AD-170087 5.1	AUGGAAC UGCAGUG GACAGUU	952	1615-1635	AACUGUCC ACUGCAGU UCCAUCC	1400	1613-1635

AD-170087 6.1	UGGAACU GCAGUGG ACAGUGU	953	1616-1636	ACACTGTCC ACUGCAGU UCCAUC	1401	1614-1636
AD-170087 7.1	GAACUGC AGUGGAC AGUGAGU	954	1618-1638	ACUACTG UCCACUGC AGUUGCA	1402	1616-1638
AD-170087 8.1	ACUGCAG UGGACAG UGAGGAU	955	1620-1640	AUCCTCAC UGUCCACU GCAGUUC	1403	1618-1640
AD-170087 9.1	CUGCAGU GGACAGU GAGGACU	956	1621-1641	AGUCCUCA CUGUCCAC UGCAGUU	1404	1619-1641
AD-170088 0.1	UGCAGUG GACAGUG AGGACUU	957	1622-1642	AAGUCCTC ACUGUCCA CUGCAGU	1405	1620-1642
AD-170088 1.1	GCAGUGG ACAGUGA GGACUUU	958	1623-1643	AAAGTCCU CACUGUCC ACUGCAG	1406	1621-1643
AD-170088 2.1	CAGUGGA CAGUGAG GACUUCU	959	1624-1644	AGAAGUCC UCACUGUC CACUGCA	1407	1622-1644
AD-170088 3.1	AGUGGAC AGUGAGG ACUUCUU	960	1625-1645	AAGAAGTC CUCACUGU CCACUGC	1408	1623-1645
AD-170088 5.1	UGGACAG UGAGGAC UUCUUCU	961	1627-1647	AGAAGAAG UCCUCACU GUCCACU	1409	1625-1647
AD-170088 7.1	CAGUGAG GACUUCU UCCAGCU	962	1631-1651	AGCUGGAA GAAGUCCU CACUGUC	1410	1629-1651
AD-170088 8.1	UGAGGAC UUCUUGCA GCUGCU	963	1634-1654	AGCAGCTG GAAGAAGU CCUCACU	1411	1632-1654
AD-170088 9.1	GAGGACU UCUCCAG CUGCUU	964	1635-1655	AAGCAGCU GGAAGAAG UCCUCAC	1412	1633-1655
AD-170089 1.1	GGACUUC UCCAGCU GCUGGU	965	1637-1657	ACCAGCAG CUGGAAGA AGUCCUC	1413	1635-1657
AD-170089 2.1	UCUCCAG CUGCUGG AGGAUU	966	1642-1662	AAUCCUCC AGCAGCUG GAAGAAG	1414	1640-1662

[1113]

[1114]

AD-170089 3.1	CAGCUGCU GGAGGAU GACACU	967	1647-1667	AGUGTCAU CCUCCAGC AGCUGGA	1415	1645-1667
AD-170089 4.1	GCUGCUG GAGGAUG ACACGUU	968	1649-1669	AACGTGTC AUCCUCCA GCAGCUG	1416	1647-1669
AD-170089 5.1	CUGGAGG AUGACAC GUGCCUU	969	1653-1673	AAGGCACG UGUCAUCC UCCAGCA	1417	1651-1673
AD-170089 7.1	GGAUGAC ACGUGCCU GAUGGU	970	1658-1678	ACCATCAGG CACGUGUC AUCCUC	1418	1656-1678
AD-170089 8.1	GAUGACA CGUGCCUG AUGGUU	971	1659-1679	AACCAUCA GGCACGUG UCAUCCU	1419	1657-1679
AD-170089 9.1	GACACGU GCCUGAU GGUGUUU	972	1662-1682	AAACACCA UCAGGCAC GUGUCAU	1420	1660-1682
AD-170090 0.1	GCAGUCU GGUCAGA GCUGGAU	973	1682-1702	AUCCAGCU CUGACCAG ACUGCAA	1421	1680-1702
AD-170090 2.1	UACAAGG AGUGGAG UGCUGUU	974	1706-1726	AACAGCAC UCCACUCC UUGUAGG	1422	1704-1726
AD-170090 3.1	ACAAGGA GUGGAGU GCUGUCU	975	1707-1727	AGACAGCA CUCCACUC CUUGUAG	1423	1705-1727
AD-170090 4.1	AAGGAGU GGAGUGC UGUCAUU	976	1709-1729	AAUGACAG CACUCCAC UCCUUGU	1424	1707-1729
AD-170090 5.1	GGAGUGG AGUGCUG UCAUAUU	977	1711-1731	AAUATGAC AGCACUCC ACUCCUU	1425	1709-1731
AD-170090 6.1	UGGAGUG CUGUCAU AUGGCCU	978	1715-1735	AGGCCATAU GACAGCAC UCCACU	1426	1713-1735
AD-170090 7.1	GGAGUGC UGUCAUA UGGCCUU	979	1716-1736	AAGGCCAU AUGACAGC ACUCCAC	1427	1714-1736
AD-170090 8.1	GAGUGCU GUCAUAU GGCCUGU	980	1717-1737	ACAGGCCA UAUGACAG CACUCCA	1428	1715-1737

AD-170090 9.1	AGUGCUG UCAUAUG GCCUGGU	981	1718-1738	ACCAGGCC AUAUGACA GCACUCC	1429	1716-1738
AD-170091 2.1	GCUGUCA UAUGGCC UGGGACU	982	1721-1741	AGUCCCAG GCCAUAUG ACAGCAC	1430	1719-1741
AD-170091 3.1	CUGUCAU AUGGCCU GGGACGU	983	1722-1742	ACGUCCCA GGCCAUAU GACAGCA	1431	1720-1742
AD-170091 5.1	CAAGCACA GCAAGGA CAUCGU	984	1751-1771	ACGATGTCC UUGCUGUG CUUGGG	1432	1749-1771
AD-170091 6.1	AUUCACCU UUGACGU GUACAU	985	1775-1795	AUGUACAC GUCAAAGG UGAAUCG	1433	1773-1795
AD-170091 7.1	UUCACCUU UGACGUG UACAAU	986	1776-1796	AUUGTACA CGUCAAG GUGAAUC	1434	1774-1796
AD-170091 8.1	UCACCUUU GACGUGU ACAAGU	987	1777-1797	ACUUGUAC ACGUCAAA GGUGAAU	1435	1775-1797
AD-170091 9.1	CACCUUUG ACGUGUA CAAGCU	988	1778-1798	AGCUTGTAC ACGUCAAA GGUGAA	1436	1776-1798
AD-170092 0.1	CCUUUGAC GUGUACA AGCAAU	989	1780-1800	AUUGCUTG UACACGUC AAAGGUG	1437	1778-1800
AD-170092 2.1	UGACGUG UACAAGC AAAACCU	990	1784-1804	AGGUTUTG CUUGUACA CGUCAAA	1438	1782-1804
AD-170092 3.1	GACGUGU ACAAGCA AAACCCU	991	1785-1805	AGGGTUTU GCUUGUAC ACGUCAA	1439	1783-1805
AD-170092 4.1	ACGUGUA CAAGCAA AACCCUU	992	1786-1806	AAGGGUTU UGCUUGUA CACGUCA	1440	1784-1806
AD-170092 5.1	CGUGUAC AAGCAAA ACCCUCU	993	1787-1807	AGAGGGTU UUGCUGU ACACGUC	1441	1785-1807
AD-170092 9.1	CAAGCAA AACCCUCG AGACCU	994	1793-1813	AGGUCUCG AGGGUUUU GCUUGUA	1442	1791-1813

[1115]

[1116]

AD-170093 0.1	AAGCAAA ACCCUCGA GACCUU	995	1794-1814	AAGGTCTC GAGGGUUU UGCUUGU	1443	1792-1814
AD-170093 1.1	AGCAAAA CCCUCGAG ACCUCU	996	1795-1815	AGAGGUCU CGAGGGUU UUGCUUG	1444	1793-1815
AD-170093 4.1	GAGACCUC UUUGGCA GCCUGU	997	1807-1827	ACAGGCTG CCAAAGAG GUCUCGA	1445	1805-1827
AD-170093 6.1	CCUCUUUG GCAGCCUG AAUGU	998	1811-1831	ACAUTCAG GCUGCCAA AGAGGUC	1446	1809-1831
AD-170093 7.1	CUCUUUG GCAGCCUG AAUGUU	999	1812-1832	AACATUCA GGCUGCCA AAGAGGU	1447	1810-1832
AD-170093 8.1	CUUUGGC AGCCUGA AUGUCAU	1000	1814-1834	AUGACATU CAGGCUGC CAAAGAG	1448	1812-1834
AD-170093 9.1	UUUGGCA GCCUGAA UGUCAAU	1001	1815-1835	AUUGACAU UCAGGCUG CCAAAGA	1449	1813-1835
AD-170094 0.1	UGGCAGCC UGAAUGU CAAAGU	1002	1817-1837	ACUUTGAC AUUCAGGC UGCCAAA	1450	1815-1837
AD-170094 2.1	GCAGCCUG AAUGUCA AAGCCU	1003	1819-1839	AGGCTUTG ACAUUCAG GCUGCCA	1451	1817-1839
AD-170094 3.1	CAGCCUGA AUGUCAA AGCCAU	1004	1820-1840	AUGGCUTU GACAUUCA GGCUGCC	1452	1818-1840
AD-170094 4.1	AGCCUGA AUGUCAA AGCCACU	1005	1821-1841	AGUGGCTU UGACAUUC AGGCUGC	1453	1819-1841
AD-170094 7.1	AUGUCAA AGCCACAU UCUACU	1006	1828-1848	AGUAGAAU GUGGCUUU GACAUUC	1454	1826-1848
AD-170094 8.1	AGCCACAU UCUACGG GCUCUU	1007	1835-1855	AAGAGCCC GUAGAAUG UGGCUUU	1455	1833-1855
AD-170094 9.1	GCCACAUU CUACGGGC UCUAU	1008	1836-1856	AUAGAGCC CGUAGAAU GUGGCUU	1456	1834-1856

[1117]

AD-170095 0.1	CACAUUCU ACGGGCUC UACUU	1009	1838-1858	AAGUAGAG CCCGUAGA AUGUGGC	1457	1836-1858
AD-170095 2.1	CAUUCUAC GGGCUCU ACUCUU	1010	1840-1860	AAGAGUAG AGCCCGUA GAAUGUG	1458	1838-1860
AD-170095 3.1	AUUCUAC GGGCUCU ACUCUAU	1011	1841-1861	AUAGAGTA GAGCCCGU AGAAUGU	1459	1839-1861
AD-170095 5.1	UCUACGG GCUCUACU CUAUGU	1012	1843-1863	ACAUAGAG UAGAGCCC GUAGAAU	1460	1841-1863
AD-170095 7.1	ACGGGCUC UACUCUA UGAGUU	1013	1846-1866	AACUCATAG AGUAGAGC CCGUAG	1461	1844-1866
AD-170095 8.1	GGGCUCU ACUCUAU GAGUUGU	1014	1848-1868	ACAACUCA UAGAGUAG AGCCCGU	1462	1846-1868
AD-170095 9.1	GGCUCUAC UCUAUGA GUUGUU	1015	1849-1869	AACAACCTC AUAGAGUA GAGCCCG	1463	1847-1869
AD-170096 0.1	CUACUCUA UGAGUUG UGACUU	1016	1853-1873	AAGUCACA ACUCAUAG AGUAGAG	1464	1851-1873
AD-170096 1.1	UACUCUA UGAGUUG UGACUUU	1017	1854-1874	AAAGTCAC AACUCAUA GAGUAGA	1465	1852-1874
AD-170096 2.1	ACUCUAU GAGUUGU GACUUUU	1018	1855-1875	AAAAGUCA CAACUCAU AGAGUAG	1466	1853-1875
AD-170096 3.1	CUCUAUG AGUUGUG ACUUUCU	1019	1856-1876	AGAAAGTC ACAACUCA UAGAGUA	1467	1854-1876
AD-170096 5.1	CUAUGAG UUGUGAC UUUCAAU	1020	1858-1878	AUUGAAAG UCACAACU CAUAGAG	1468	1856-1878
AD-170096 7.1	GAGUUGU GACUUUC AAGGACU	1021	1862-1882	AGUCCUTG AAAGUCAC AACUCAU	1469	1860-1882
AD-170096 8.1	AGUUGUG ACUUUCA AGGACUU	1022	1863-1883	AAGUCCTU GAAAGUCA CAACUCA	1470	1861-1883

[1118]

AD-170096 9.1	UUGGCCCA AAGAAAG UACUCU	1023	1882-1902	AGAGTACU UUCUUUGG GCCAAGU	1471	1880-1902
AD-170097 0.1	UGGCCCAA AGAAAGU ACUCAU	1024	1883-1903	AUGAGUAC UUUCUUUG GGCCAAG	1472	1881-1903
AD-170097 1.1	GGCCCAAA GAAAGUA CUCAGU	1025	1884-1904	ACUGAGTA CUUUCUUU GGCCAA	1473	1882-1904
AD-170097 3.1	CCCAAAGA AAGUACU CAGGGU	1026	1886-1906	ACCCTGAG UACUUUCU UUGGGCC	1474	1884-1906
AD-170097 5.1	AAAGAAA GUACUCA GGGAGCU	1027	1889-1909	AGCUCCCU GAGUACUU UCUUUGG	1475	1887-1909
AD-170097 6.1	AAGAAAG UACUCAG GGAGCUU	1028	1890-1910	AAGCTCCC UGAGUACU UUCUUUG	1476	1888-1910
AD-170097 7.1	AGAAAGU ACUCAGG GAGCUCU	1029	1891-1911	AGAGCUCC CUGAGUAC UUUCUUU	1477	1889-1911
AD-170097 8.1	AGUACUC AGGGAGC UCCUUCU	1030	1895-1915	AGAAGGAG CUCCUGA GUACUUU	1478	1893-1915
AD-170098 0.1	AGGGAGC UCCUUCGU UGGACU	1031	1902-1922	AGUCCAAC GAAGGAGC UCCUGA	1479	1900-1922
AD-170098 1.1	GGAGCUCC UUCGUUG GACCUU	1032	1904-1924	AAGGTCCA ACGAAGGA GCUCCCU	1480	1902-1924
AD-170098 2.1	UUCGUUG GACCUCCA CACUGU	1033	1912-1932	ACAGTGTG GAGGUCCA ACGAAGG	1481	1910-1932
AD-170098 4.1	CGUUGGA CCUCCACA CUGCUU	1034	1914-1934	AAGCAGTG UGGAGGUC CAACGAA	1482	1912-1934
AD-170098 5.1	GACCUCCA CACUGCUG CAAGU	1035	1919-1939	ACUUGCAG CAGUGUGG AGGUCCA	1483	1917-1939
AD-170098 6.1	GGCCUGG GCCAUAU GUUGCUU	1036	1938-1958	AAGCAACA UAUGGCC AGGCCUU	1484	1936-1958

AD-170098 8.1	GGGCAU AUGUUGC UGGGAAU	1037	1943-1963	AUUCCCAG CAACAUAU GGCCCAG	1485	1941-1963
AD-170098 9.1	GGCCAUA UGUUGCU GGGAAUU	1038	1944-1964	AAUUCCCA GCAACUA UGGCCA	1486	1942-1964
AD-170099 0.1	CCAU AUG UUGCUGG GAAUUUU	1039	1946-1966	AAAATUCCC AGCAACAU AUGGCC	1487	1944-1966
AD-170099 1.1	CAUAUGU UGCUGGG AAUUUCU	1040	1947-1967	AGAAAUTC CCAGCAAC AUAUGGC	1488	1945-1967
AD-170099 2.1	UGUUGCU GGGAAUU UCCUCCU	1041	1951-1971	AGGAGGAA AUUCCCAG CAACUA	1489	1949-1971
AD-170099 5.1	UGGGAAU UCCUCCA CCUUU	1042	1957-1977	AAAGGGTG GAGGAAU UCCAGC	1490	1955-1977
AD-170099 7.1	UCCUCCA CCCUUCGU CAUGU	1043	1964-1984	ACAUGACG AAGGGUGG AGGAAU	1491	1962-1984
AD-170099 8.1	AAGGGCC GCCUCCA UCCUAU	1044	2013-2033	AUAGGAAU GGAGGCGG CCUUUCU	1492	2011-2033
AD-170100 1.1	GCCGCCUC CAUUCUA CUAAU	1045	2017-2037	AUUAGUAG GAAUGGAG GCGGCC	1493	2015-2037
AD-170100 2.1	CCGCCUCC AUUCCUAC UAAGU	1046	2018-2038	ACUUAGTA GGAAUGGA GGCGGCC	1494	2016-2038
AD-170100 3.1	CCCACUGC AAAGACU AUGACU	1047	2076-2096	AGUCAUAG UCUUUGCA GUGGGUC	1495	2074-2096
AD-170100 4.1	CCACUGCA AAGACUA UGACAU	1048	2077-2097	AUGUCATA GUCUUUGC AGUGGGU	1496	2075-2097
AD-170100 5.1	CACUGCAA AGACUAU GACAGU	1049	2078-2098	ACUGTCAU AGUCUUUG CAGUGGG	1497	2076-2098
AD-170100 7.1	AAGACUA UGACAGC AUCAAAU	1050	2085-2105	AUUUGATG CUGUCAUA GUCUUUG	1498	2083-2105

[1119]

[1120]

AD-170100 9.1	GACAGCA UCAAAUU UCAGGAU	1051	2093-2113	AUCCTGAA AUUUGAUG CUGUCAU	1499	2091-2113
AD-170101 1.1	CAGCAUCA AAUUUCA GGACCU	1052	2095-2115	AGGUCCTG AAAUUUGA UGCUGUC	1500	2093-2115
AD-170101 2.1	AGCAUCA AAUUUCA GGACCUU	1053	2096-2116	AAGGTCCU GAAAUUUG AUGCUGU	1501	2094-2116
AD-170101 3.1	GCAUCA AUUCAG GACCUGU	1054	2097-2117	ACAGGUCC UGAAAUUU GAUGCUG	1502	2095-2117
AD-170101 4.1	CAUCAA UUUCAGG ACCUGCU	1055	2098-2118	AGCAGGTC CUGAAAUU UGAUGCU	1503	2096-2118
AD-170101 6.1	AUUUCAG GACCUGCA GACAGU	1056	2104-2124	ACUGTCTGC AGGUCCUG AAAUUU	1504	2102-2124
AD-170101 7.1	UUUCAGG ACCUGCAG ACAGUU	1057	2105-2125	AACUGUCU GCAGGUCC UGAAAUU	1505	2103-2125
AD-170101 9.1	CAGGACCU GCAGACA GUACAU	1058	2108-2128	AUGUACTG UCUGCAGG UCCUGAA	1506	2106-2128
AD-170102 0.1	GACCUGCA GACAGUA CAGGCU	1059	2111-2131	AGCCTGTAC UGUCUGCA GGUCCU	1507	2109-2131
AD-170102 2.1	CCUGCAGA CAGUACA GGCUAU	1060	2113-2133	AUAGCCTG UACUGUCU GCAGGUC	1508	2111-2133
AD-170102 3.1	CUGCAGAC AGUACAG GCUAGU	1061	2114-2134	ACUAGCCU GUACUGUC UGCAGGU	1509	2112-2134
AD-170102 4.1	UGCAGAC AGUACAG GCUAGAU	1062	2115-2135	AUCUAGCC UGUACUGU CUGCAGG	1510	2113-2135
AD-170102 6.1	CAGACAG UACAGGC UAGAUAU	1063	2117-2137	AUAUCUAG CCUGUACU GUCUGCA	1511	2115-2137
AD-170102 7.1	GACAGUA CAGGCUA GAUAACU	1064	2119-2139	AGUUAUCU AGCCUGUA CUGUCUG	1512	2117-2139

[1121]

AD-170102 9.1	CCUAGCCA CCUUUCUG GCCUU	1065	2243-2263	AAGGCCAG AAAGGUGG CUAGGAA	1513	2241-2263
AD-170103 1.1	CUUUCUG GCCUCCCA CUUGCU	1066	2252-2272	AGCAAGTG GGAGGCCA GAAAGGU	1514	2250-2272
AD-170103 2.1	UCUGGCCU CCCACUUG CCCUU	1067	2255-2275	AAGGGCAA GUGGGAGG CCAGAAA	1515	2253-2275
AD-170103 3.1	GGCAUCU UGAUCCCA GCCUGU	1068	2302-2322	ACAGGCTG GGAUCAAG AUGCCUG	1516	2300-2322
AD-170103 4.1	GCAUCUU GAUCCAG CCUGAU	1069	2303-2323	AUCAGGCU GGGAUCAA GAUGCCU	1517	2301-2323
AD-170103 5.1	ACCAAUGC CUCCUGUC CCUAU	1070	2345-2365	AUAGGGAC AGGAGGCA UUGGUAG	1518	2343-2365
AD-170103 7.1	AUGCCUCC UGUCCCUA AACUU	1071	2349-2369	AAGUTUAG GGACAGGA GGCAUUG	1519	2347-2369
AD-170103 8.1	GCCUCCUG UCCCUAAA CUCCU	1072	2351-2371	AGGAGUTU AGGGACAG GAGGCAU	1520	2349-2371
AD-172028 0.1	AAAACCCU CGAGACCU CUUUU	1073	1798-1818	AAAAGAGG UCUCGAGG GUUUUGC	1521	1796-1818
AD-172028 1.1	CUGGGCU GAGAUCCC AGGUUU	1074	1272-1292	AAACCTGG GAUCUCAG CCCAGGA	1522	1270-1292
AD-172028 2.1	GUGGACA GUGAGGA CUUCUUU	1075	1626-1646	AAAGAAGU CCUCACUG UCCACUG	1523	1624-1646
AD-172028 3.1	CAAACCC UCGAGACC UCUUU	1076	1797-1817	AAAGAGGT CUCGAGGG UUUUGCU	1524	1795-1817
AD-172028 4.1	CUGAAUG UCAAGCC ACAUUU	1077	1824-1844	AAATGTGGC UUTGACAU UCAGGC	1525	1822-1844
AD-172028 5.1	GGCUCUAC UCUAUGA GUUGUU	1078	1849-1869	AACAATC AUAGAGUA GAGCCCG	1526	1847-1869

[1122]

AD-172028 6.1	AAUGGAG UGCUAACC CUGGUU	1079	1584-1604	AACCAGGG UUAGCACU CCAUUCA	1527	1582-1604
AD-172028 7.1	AAUGGAG UGCUAACC UUGGUU	1080	1584-1604	AACCAAGG UUAGCACU CCAUUCA	1528	1582-1604
AD-172028 8.1	AAUGGAG UGCUAAC UCUGGUU	1081	1584-1604	AACCAGAG UUAGCACU CCAUUCA	1529	1582-1604
AD-172028 9.1	ACCCUACU GCUGAAU GGAGUU	1082	1572-1592	AACUCCAU UCAGCAGU AGGGUCU	1530	1570-1592
AD-172029 0.1	ACCUGCAG ACAGUAC AGGCUU	1083	2112-2132	AAGCCTGU ACUGUCUG CAGGUCC	1531	2110-2132
AD-172029 1.1	CUGGGAA UUUCCUCC ACCCUU	1084	1956-1976	AAGGGTGG AGGAAUU CCCAGCA	1532	1954-1976
AD-172029 2.1	GGGCCGCC UCCAUCC UACUU	1085	2015-2035	AAGUAGGA AUGGAGGC GGCCCUU	1533	2013-2035
AD-172029 3.1	UUCUACG GGCUCUAC UCUAUU	1086	1842-1862	AAUAGAGU AGAGCCCG UAGAAUG	1534	1840-1862
AD-172029 4.1	GCAGACA GUACAGG CUAGAUU	1087	2116-2136	AAUCUAGC CUGTACUG UCUGCAG	1535	2114-2136
AD-172029 5.1	UGGAGAC CCUACUGC UGAAUU	1088	1567-1587	AAUTCAGC AGUAGGGU CUCCAAU	1536	1565-1587
AD-172029 6.1	ACCUCUUU GGCAGCCU GAAUU	1089	1810-1830	AAUTCAGG CUGCCAAA GAGGUCU	1537	1808-1830
AD-172029 7.1	CCUUUCUG GCCUCCCA CUUGU	1090	2251-2271	ACAAGTGG GAGGCCAG AAAGGUG	1538	2249-2271
AD-172029 8.1	UGGAACU GCAGUGG ACAGUGU	1091	1616-1636	ACACTGTCC ACTGCAGU UCCAUC	1539	1614-1636
AD-172029 9.1	AGGAUGA CACGUGCC UGAUGU	1092	1657-1677	ACATCAGGC ACGUGUCA UCCUCC	1540	1655-1677

[1123]

AD-172030 0.1	GAAUGGA GUGCUIAA CCCUGGU	1093	1583-1603	ACCAGGGT UAGCACUC CAUUCAG	1541	1581-1603
AD-172030 1.1	GUGCUGU CAUAUGG CCUGGGU	1094	1719-1739	ACCCAGGC CAUAUGAC AGCACUC	1542	1717-1739
AD-172030 2.1	GUGCUGU CAUAUGG CUUGGGU	1095	1719-1739	ACCCAAGC CAUAUGAC AGCACUC	1543	1717-1739
AD-172030 3.1	GUGCUGU CAUAUGG UCUGGGU	1096	1719-1739	ACCCAGAC CAUAUGAC AGCACUC	1544	1717-1739
AD-172030 4.1	GCCCAAAG AAAGUAC UCAGGU	1097	1885-1905	ACCTGAGU ACUTUCUU UGGGCCA	1545	1883-1905
AD-172030 5.1	GUACUCA GGGAGCU CCUUCGU	1098	1896-1916	ACGAAGGA GCUCCUG AGUACUU	1546	1894-1916
AD-172030 6.1	GGAAUUU CCUCCACC CUUCGU	1099	1959-1979	ACGAAGGG UGGAGGAA AUUCCCA	1547	1957-1979
AD-172030 7.1	GGAAUUU CCUCCACC UUUCGU	1100	1959-1979	ACGAAAGG UGGAGGAA AUUCCCA	1548	1957-1979
AD-172030 8.1	GGAAUUU CCUCCACU CUUCGU	1101	1959-1979	ACGAAGAG UGGAGGAA AUUCCCA	1549	1957-1979
AD-172030 9.1	GUGUACA AGCAAAA CCCUCGU	1102	1788-1808	ACGAGGGT UUUGCUUG UACACGU	1550	1786-1808
AD-172031 0.1	CAGUCUG GUCAGAG CUGGAGU	1103	1683-1703	ACUCCAGC UCUGACCA GACUGCA	1551	1681-1703
AD-172031 1.1	UGCUAACC CUGGUGC UAGAGU	1104	1591-1611	ACUCUAGC ACCAGGGU UAGCACU	1552	1589-1611
AD-172031 2.1	UCAAAUU UCAGGACC UGCAGU	1105	2100-2120	ACUGCAGG UCCTGAAA UUUGAUG	1553	2098-2120
AD-172031 3.1	AGAACCAC CCAGCCCA GAAGU	1106	1329-1349	ACUTCTGG GCUGGGUG GUUCUCU	1554	1327-1349

[1124]

AD-172031 4.1	CAAACUA ACAAAAA CAUUUCU	1107	2434-2454	AGAAATGU UUUTGUUA GUUUGAG	1555	2432-2454
AD-172031 5.1	CAUGGAG UACCUCUC AGCUCU	1108	1376-1396	AGAGCTGA GAGGUACU CCAUGGU	1556	1374-1396
AD-172031 6.1	UCGUUGG ACCUCCAC ACUGCU	1109	1913-1933	AGCAGTGU GGAGGUCC AACGAAG	1557	1911-1933
AD-172031 7.1	ACCAUGG AGUACCUC UCAGCU	1110	1374-1394	AGCTGAGA GGUACUCC AUGGUGG	1558	1372-1394
AD-172036 8.1	GGCAGCCU GAAUGUC AAAGCU	1111	1818-1838	AGCTUTGA CAUTCAGG CUGCCAA	1559	1816-1838
AD-172036 9.1	UCCUAGCC ACCUUUCU GGCCU	1112	2242-2262	AGGCCAGA AAGGUGGC UAGGAAA	1560	2240-2262
AD-172037 0.1	UGCUGAA UGGAGUG CUAACCU	1113	1579-1599	AGGTUAGC ACUCCAUA CAGCAGU	1561	1577-1599
AD-172037 1.1	UCAGGACC UGCAGAC AGUACU	1114	2107-2127	AGUACTGU CUGCAGGU CCUGAAA	1562	2105-2127
AD-172037 2.1	ACAGCAUC AAAUUUC AGGACU	1115	2094-2114	AGUCCTGA AAUTUGAU GCUGUCA	1563	2092-2114
AD-172037 3.1	UUGCUGG GAAUUUC CUCCACU	1116	1953-1973	AGUGGAGG AAATUCCCA GCAACA	1564	1951-1973
AD-172037 4.1	AAUGCCUC CUGUCCCU AAACU	1117	2348-2368	AGUTUAGG GACAGGAG GCAUUGG	1565	2346-2368
AD-172037 5.1	UUGACGU GUACAAG CAAAACU	1118	1783-1803	AGUTUTGC UUGTACAC GUCAAAG	1566	1781-1803
AD-172037 6.1	GGCCGCCU CCAUUCCU ACUAU	1119	2016-2036	ATAGUAGG AAUGGAGG CGGCCCU	1567	2014-2036
AD-172037 7.1	ACUCAGG UCAGUAU CUAAUAU	1120	1412-1432	ATATUAGAU ACTGACCU GAGUAA	1568	1410-1432

[1125]	AD-172037 8.1	UGGGCCA UAUGUUG CUGGGAU	1121	1942-1962	ATCCCAGCA ACAUAUGG CCCAGG	1569	1940-1962
	AD-172037 9.1	UGCUGUC AUAUGGC CUGGGAU	1122	1720-1740	ATCCCAGGC CATAUGACA GCACU	1570	1718-1740
	AD-172038 0.1	UGAGUUG UGACUUU CAAGGAU	1123	1861-1881	ATCCUTGAA AGTCACAA CUCAUA	1571	1859-1881
	AD-172038 1.1	AGGCCCAA GCACAGCA AGGAU	1124	1746-1766	ATCCUTGCU GUGCUUGG GCCUCU	1572	1744-1766
	AD-172038 2.1	UGUACAA GCAAACC CUCGAU	1125	1789-1809	ATCGAGGG UUUTGCUU GUACACG	1573	1787-1809
	AD-172038 3.1	UGUACAA GCAAACC UUCGAU	1126	1789-1809	ATCGAAGG UUUTGCUU GUACACG	1574	1787-1809
	AD-172038 4.1	UGUACAA GCAAAC UCUCGAU	1127	1789-1809	ATCGAGAG UUUTGCUU GUACACG	1575	1787-1809
	AD-172038 5.1	UCUAUGA GUUGUGA CUUUCAU	1128	1857-1877	ATGAAAGU CACAACUC AUAGAGU	1576	1855-1877
	AD-172038 6.1	AAAGACU AUGACAG CAUCAAU	1129	2084-2104	ATUGATGCU GUCAUAGU CUUUGC	1577	2082-2104

[1126] 表6. 人CIDEB dsRNA药剂的经修饰的有义链和反义链序列

双链体 ID	有义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	反义序列 5'至 3'	SEQ ID NO:	mRNA 靶序列	SEQ ID NO:
AD-1699864.1	gsusccugggCf UfGfagauccca guL96	1578	asdCsugdGgdA ucucdAgCfccag gacsasa	2026	GGAAGGAA AGAGCAGA UCCCAGG	2474
AD-1699867.1	csusgggcugAf GfAfucccaggu uuL96	1579	asdAsacdCudG ggaudCuCfagcc cagsgsa	2027	AGGAAAGA GCAGAUCC CAGGUUU	2475
AD-1699868.1	usgsggcugaGf AfUfcccaggu uuL96	1580	asdAsaadCcdT gggadTcUfcagc ccasgsg	2028	GGAAAGAG CAGAUCCC AGGUUUG	2476
AD-1699869.1	gsgsgcugagAf UfCfccagguu guL96	1581	asdCsaadAcdC ugggdAuCfuca gccccasg	2029	GAAAGAGC AGAUSCCA GGUUUGU	2477

[1128]

AD-1699870.1	gsgscugagaUf CfCfcagguuug uuL96	1582	asdAscAdAadC cuggdGaUfcuc agccscsa	2030	AAAGAGCA GAUCCCAG GUUUGUA	2478
AD-1699871.1	gscsugagauCf CfCfagguuugu auL96	1583	asdTsacdAadA ccugdGgAfucu cagcscsc	2031	AAGAGCAG AUCCCAGG UUUGUAA	2479
AD-1699872.1	csusgagauCf CfAfgguuugua auL96	1584	asdTsuadCadA accudGgGfauc ucagcscsc	2032	AGAGCAGA UCCCAGGU UUGUAAAC	2480
AD-1699873.1	usgsagauccCf AfGfguuuguaa cuL96	1585	asdGsuudAcdA aaccdTgGfgauc ucasgsc	2033	GAGCAGAU CCCAGGUU UGUAACA	2481
AD-1699875.1	asgsaucccaGf GfUfuuguaaca guL96	1586	asdCsugdTudA caaadCcUfggga ucuscscsa	2034	GCAGAUCC CAGGUUUG UAACAGA	2482
AD-1699882.1	asgsguuuguAf AfCfagaaaaca cuL96	1587	asdGsugdTudT ucugdTuAfcaaa ccusgsg	2035	CCAGGUUU GUAACAGA AAACACC	2483
AD-1699891.1	ascsgaaaaCf AfCfcacuaaag cuL96	1588	asdGscudTudA guggdTgUfuuu cugususa	2036	UAACAGAA AACACCAC UAAAGCC	2484
AD-1699892.1	csasgaaaacAf CfCfcacuaaagc cuL96	1589	asdGsgcdTudTa gugdGuGfuuuu cugsusu	2037	AACAGAAA ACACCACU AAAGCCC	2485
AD-1699904.1	asgsaaccacCf CfAfgcccagaa guL96	1590	asdCsuudCudG ggcudGgGfugg uucuscscsu	2038	AGAGAACC ACCCAGCCC AGAAGU	2486
AD-1699907.1	ascscaccaGf CfCfcagaaguu cuL96	1591	asdGsaadCudT cuggdGcUfggg uggususc	2039	GAACCACCC AGCCCAGA AGUUCC	2487
AD-1699948.1	csasccauggAf GfUfaccucuca guL96	1592	asdCsugdAgdA gguadCuCfcu ggugsgsa	2040	UCCACCAU GGAGUACC UCUCAGC	2488
AD-1699949.1	ascscauggaGf UfAfccucucag cuL96	1593	asdGscudGadG aggudAcUfcca uggusgsg	2041	CCACCAUG GAGUACCU CUCAGCU	2489
AD-1699951.1	csasuggaguAf CfCfucucagcu cuL96	1594	asdGsagdCudG agagdGuAfcuc caugsgsu	2042	ACCAUGGA GUACCUCU CAGCUCU	2490
AD-1699964.1	csusuacucaGf GfUfcaguuacu auL96	1595	asdTsagdAudA cugadCcUfgag uaagsusc	2043	GACUUACU CAGGUCAG UAUCUAA	2491
AD-1699967.1	ascsucagguCf AfGfuaucuaau	1596	asdTsaudTadGa uacdTgAfcuga	2044	UUACUCAG GUCAGUAU	2492

[1129]

	auL96		gusasa		CUAAUUAU	
AD-1699970.1	csasggucagUf AfUfcuaauuaa auL96	1597	asdTsuadTadTu agadTaCfugacc ugsasg	2045	CUCAGGUC AGUAUCUA AUUAUAG	2493
AD-1699971.1	asgsgucaguAf UfCfuaauuaa guL96	1598	asdCsuudAudA uuagdAuAfcug accusgsa	2046	UCAGGUCA GUAUCUAA UAUAAGC	2494
AD-1699972.1	gsgsucaguaUf CfUfaauuaag cuL96	1599	asdGscudTadTa uuadGaUfacug accsusg	2047	CAGGUCAG UAUCUAAU AUAAGCU	2495
AD-1699973.1	gsuscaguauCf UfAfaauuaagc uuL96	1600	asdAsgcdTudA uauudAgAfuac ugacsusu	2048	AGGUCAGU AUCUAAUA UAAGCUC	2496
AD-1699976.1	asgsuaucuaAf UfAfuaagcucg guL96	1601	asdCscgdAgdC uuauudAuUfaga uacusgsa	2049	UCAGUAUC UAAUAUAA GCUCGGA	2497
AD-1699977.1	gsusaucuaaUf AfUfaagcucgg auL96	1602	asdTscddGadG cuuadTaUfuaga uacsusg	2050	CAGUAUCU AAUAUAAG CUCGGAG	2498
AD-1699978.1	usasucuaauAf UfAfgcucgga guL96	1603	asdCsucdCgdA gcuudAuAfuua gauascusu	2051	AGUAUCUA AUUAUAGC UCGGAGU	2499
AD-1699979.1	asuscuaauaUf AfAfgcucggag uuL96	1604	asdAscudCcdG agcudTaUfauua gausasc	2052	GUAUCUAA UAUAAGCU CGGAGUU	2500
AD-1699982.1	usasauuaaGf CfUfcggaguuu guL96	1605	asdCsaadAcdTc cgadGcUfuua uuasgsa	2053	UCUAAUAU AAGCUCGG AGUUUGG	2501
AD-1699983.1	asasuuaagCf UfCfaggaguug guL96	1606	asdCscadAadC uccgdAgCfuua uauusasg	2054	CUAAUAUA AGCUCGGA GUUUGGA	2502
AD-1699984.1	asusauaagCf CfGfgaguugg auL96	1607	asdTscddAadA cuccdGaGfcuua uauusasa	2055	UAAUAUAA GCUCGGAG UUUGGAC	2503
AD-1699985.1	usasuaagcuCf GfGfaguugga cuL96	1608	asdGsucdCadA acucdCgAfgcu uauasusu	2056	AAUAUAAG CUCGGAGU UUGGACG	2504
AD-1699986.1	asusaagcucGf GfAfguuuggac guL96	1609	asdCsgudCcdA aacudCcGfagcu uauasusu	2057	AUAUAAGC UCGGAGUU UGGACGG	2505
AD-1699987.1	usasagcucgGf AfGfuuggacg guL96	1610	asdCscgdTcdCa aacdTcCfagc uauasusu	2058	UAUAAGCU CGGAGUUU GGACGGA	2506

[1130]

AD-1699988.1	asasgcucggAf GfUfuggacgg auL96	1611	asdTscddGudC caaadCuCfcgag cuusasu	2059	AUAAGCUC GGAGUUUG GACGGAG	2507
AD-1699989.1	asgscucggaGf UfUfuggacgga guL96	1612	asdCsucdCgdT ccaadAcUfccga gcususa	2060	UAAGCUCG GAGUUUGG ACGGAGG	2508
AD-1699990.1	gscsucggagUf UfUfuggacggag guL96	1613	asdCscudCcdG uccadAaCfuccg agsusu	2061	AAGCUCGG AGUUUGGA CGGAGGG	2509
AD-1700015.1	asgscgaccuUf UfCfcgugucug uuL96	1614	asdAscadGadC acggdAaAfggu cgcusgsg	2062	CCAGCGACC UUUCCGUG UCUGUG	2510
AD-1700035.1	gsasucacaaGf CfGfgaccaucc guL96	1615	asdCsggdAudG guccdGcUfugu gaucsasc	2063	GUGAUCAC AAGCGGAC CAUCCGG	2511
AD-1700037.1	uscsacaagcGf GfAfccauccgg auL96	1616	asdTscddGgdA uggudCcGfcuu gugasusc	2064	GAUCACAA GCGGACCA UCCGGAA	2512
AD-1700038.1	csascaagegGf AfCfcauccgga auL96	1617	asdTsucdCgdG auggdTcCfugu gugsasu	2065	AUCACAAG CGGACCAU CCGAAA	2513
AD-1700039.1	ascsaagcggAf CfCfcauccgga auL96	1618	asdTsuudCcdG gaugdGuCfcgc uugusgsa	2066	UCACAAGC GGACCAUC CGGAAAG	2514
AD-1700040.1	csasagecgaCf CfAfuuccgaaa guL96	1619	asdCsuudTcdC ggaudGgUfccg cuugsusg	2067	CACAAGCG GACCAUCC GGAAAGG	2515
AD-1700041.1	asasgcggacCf AfUfccggaag guL96	1620	asdCscudTudC cggadTgGfuccg cuusgsu	2068	ACAAGCGG ACCAUCCG GAAAGGC	2516
AD-1700077.1	gsgsagcugcUf AfGfcaaagca uuL96	1621	asdAsugdCudT uggcdTaGfcagc uccsusg	2069	CAGGAGCU GCUAGCCA AAGCAUU	2517
AD-1700080.1	gscsugcuagCf CfAfaagcauug guL96	1622	asdCscadAudG cuuudGgCfuag cagsusc	2070	GAGCUGCU AGCCAAAG CAUUGGA	2518
AD-1700081.1	csusgcuagcCf AfAfagcauugg auL96	1623	asdTscddAadTg cuudTgGfcuagc agsesu	2071	AGCUGCUA GCCAAAGC AUUGGAG	2519
AD-1700082.1	usgscuagccAf AfAfgcauugga guL96	1624	asdCsucdCadA ugcudTuGfgcua gcasgsc	2072	GCUGCUAG CCAAAGCA UUGGAGA	2520
AD-1700083.1	gscsuagccaAf AfGfcauuggag	1625	asdTscudCcdA augcdTuUfggcu	2073	CUGCUAGC CAAAGCAU	2521

[1131]

	auL96		agcsasg		UGGAGAC	
AD-1700091.1	asasgcauugGf AfGfaccuacu guL96	1626	asdCsagdTadG ggudTcCfaaug cuusug	2074	CAAAGCAU UGGAGACC CUACUGC	2522
AD-1700092.1	asgscauuggAf GfAfccuacug cuL96	1627	asdGscadGudA ggudCuCfcaa ugcususu	2075	AAAGCAUU GGAGACCC UACUGCU	2523
AD-1700094.1	csasuuggagAf CfCfcuacugcu guL96	1628	asdCsagdCadG uaggdGuCfucc aaugscsu	2076	AGCAUUGG AGACCCUA CUGCUGA	2524
AD-1700097.1	usgsgagaccCf UfAfcugcugaa uuL96	1629	asdAsuudCadG cagudAgGfguc uccasasu	2077	AUUGGAGA CCCUACUGC UGAAUG	2525
AD-1700099.1	gsasgaccuAf CfUfgcugaaug guL96	1630	asdCscadTudCa gcadGuAfgggu cucscsa	2078	UGGAGACC CUACUGCU GAAUGGA	2526
AD-1700100.1	asgsaccuaCf UfGfcugaauug auL96	1631	asdTscadAudTc agcdAgUfaggg ucuscsc	2079	GGAGACCC UACUGCUG AAUGGAG	2527
AD-1700101.1	gsasccuacUf GfCfugaauuga guL96	1632	asdCsudCadT ucagdCaGfuag ggucsusc	2080	GAGACCCU ACUGCUGA AUGGAGU	2528
AD-1700104.1	cscsuacugUf GfAfauggagug cuL96	1633	asdGscadCudC cauudCaGfcagu aggsgsu	2081	ACCCUACU GCUGAAUG GAGUGCU	2529
AD-1700109.1	usgscugaauGf GfAfgucuaac cuL96	1634	asdGsgudTadG cacudCcAfuuca gcsagsu	2082	ACUGCUGA AUGGAGUG CUAACCC	2530
AD-1700112.1	usgsaauggaGf UfGfcuaaccu guL96	1635	asdCsagdGgdT uagcdAcUfccau ucasgsc	2083	GCUGAAUG GAGUGCUA ACCCUGG	2531
AD-1700113.1	gsasauggagUf GfCfuaaccug guL96	1636	asdCscadGgdG uuagdCaCfuca uucsasg	2084	CUGAAUGG AGUGCUIA CCCUGGU	2532
AD-1700114.1	asasuggaguGf CfUfaaccugg uuL96	1637	asdAsccdAgdG guuadGcAfcuc cauuscsc	2085	UGAAUGGA GUGCUIAAC CCUGGUG	2533
AD-1700115.1	asusggagugCf UfAfaccuggu guL96	1638	asdCsacdCadG ggudAgCfacu ccaususc	2086	GAAUGGAG UGCUIAAC CUGGUGC	2534
AD-1700116.1	usgsgagugUf AfAfccuggug cuL96	1639	asdGscadCcdA ggudTaGfcacu ccasusu	2087	AAUGGAGU GCUAACCC UGGUGCU	2535

[1132]

AD-1700121.1	usgscuaaccCf UfGfgugcuaga guL96	1640	asdCsucdTadG caccdAgGfguu agcascsu	2088	AGUGC CUAA CCCUGGUG CUAGAGG	2536
AD-1700122.1	gscsuaaccUf GfGfugcuagag guL96	1641	asdCscudCudA gcacdCaGfggu uagcsasc	2089	GUGC CUAAC CCUGGUGC UAGAGGA	2537
AD-1700125.1	asasccuggUf GfCfuagaggag guL96	1642	asdCscudCcdTc uagdCaCfcagg uusasg	2090	CUAACCCU GGUGCUAG AGGAGGA	2538
AD-1700148.1	gsasacugcaGf UfGfgacaguga guL96	1643	asdCsucdAcdT guccdAcUfgca guucscsa	2091	UGGAACUG CAGUGGAC AGUGAGG	2539
AD-1700149.1	asascugcagUf GfGfacagugag guL96	1644	asdCscudCadC ugudCaCfugca guuscsc	2092	GGAACUGC AGUGGACA GUGAGGA	2540
AD-1700156.1	gsusggacagUf GfAfggacuucu uuL96	1645	asdAsagdAadG uccudCaCfuguc cacsug	2093	CAGUGGAC AGUGAGGA CUUCUUC	2541
AD-1700158.1	gsgsacagugAf GfGfacuucuuc cuL96	1646	asdGsgadAgdA agudCuCfacug uccsasc	2094	GUGGACAG UGAGGACU UCUCCA	2542
AD-1700159.1	gsascagugaGf GfAfcuucuucc auL96	1647	asdTsggdAadG aagudCcUfcacu guucscsa	2095	UGGACAGU GAGGACUU CUUCCAG	2543
AD-1700160.1	ascasagugagGf AfCfuucuucca guL96	1648	asdCsugdGadA gaagdTcCfucac uguscsc	2096	GGACAGUG AGGACUUC UCCAGC	2544
AD-1700166.1	asgsgacuucUf UfCfcagcugcu guL96	1649	asdCsagdCadG cuggdAaGfaag uccuscsa	2097	UGAGGACU UCUCCAG CUGCUGG	2545
AD-1700167.1	gsgsacuucuUf CfCfagcugcug guL96	1650	asdCscadGcdA gcugdGaAfgaa guccsusc	2098	GAGGACUU CUUCCAGC UGCUGGA	2546
AD-1700180.1	csusgcuggaGf GfAfugacacgu guL96	1651	asdCsacdGudG ucaudCcUfccag cagscsu	2099	AGCUGCUG GAGGAUGA CACGUGC	2547
AD-1700187.1	asgsgaugacAf CfGfugccugau guL96	1652	asdCsaudCadG gcacdGuGfuca uccuscsc	2100	GGAGGAUG ACACGUGC CUGAUGG	2548
AD-1700188.1	gsgsaugacaCf GfUfgccugaug guL96	1653	asdCscadTcdA ggcadCgUfguc auccsusc	2101	GAGGAUGA CACGUGCC UGAUGGU	2549
AD-1700189.1	gsasugacacGf UfGfccugaugg	1654	asdAsccdAudC aggcdAcGfugu	2102	AGGAUGAC ACGUGCCU	2550

	uuL96		caucscsu		GAUGGUG	
AD-1700190.1	asusgacacgUf GfCfcugauggu guL96	1655	asdCsacdCadTc aggdCaCfugugu caucscsc	2103	GGAUGACA CGUGCCUG AUGGUGU	2551
AD-1700191.1	usgsacacguGf CfCfugauggug uuL96	1656	asdAscadCcdA ucagdGcAfcgu gucasusc	2104	GAUGACAC GUGCCUGA UGGUGUU	2552
AD-1700193.1	asesacgugcCf UfGfauuggugu uguL96	1657	asdCsaadCadC caucdAgGfcag uguscsa	2105	UGACACGU GCCUGAUG GUGUUGC	2553
AD-1700213.1	csasgucuggUf CfAfgagcugga guL96	1658	asdCsucdCadG cucudGaCfcaga cugscsa	2106	UGCAGUCU GGUCAGAG CUGGAGC	2554
AD-1700242.1	gsasguggagUf GfCfugucauau guL96	1659	asdCsaudAudG acagdCaCfucca cucscsu	2107	AGGAGUGG AGUGCUGU CAUAUGG	2555
AD-1700243.1	asgsuggaguGf CfUfgucauau guL96	1660	asdCscadTadTg acadGcAfcucca cuscsc	2108	GGAGUGGA GUGCUGUC AUAUGGC	2556
AD-1700244.1	gsusggagugCf UfGfucauau cuL96	1661	asdGscddAudA ugacdAgCfacuc cacsusc	2109	GAGUGGAG UGCUGUCA UAUGGCC	2557
AD-1700245.1	usgsgagugcUf GfUfcuauuggc cuL96	1662	asdGsgcdCadT augadCaGfcacu ccasesu	2110	AGUGGAGU GCUGUCAU AUGGCCU	2558
AD-1700248.1	asgsugcuguCf AfUfauuggccug guL96	1663	asdCscadGgdC cauadTgAfcagc acusesc	2111	GGAGUGCU GUCAUAUG GCCUGGG	2559
AD-1700249.1	gsusgcugucAf UfAfggcccugg guL96	1664	asdCscddAgdG ccaudAuGfacag cacsusc	2112	GAGUGCUG UCAUAUGG CCUGGGA	2560
AD-1700250.1	usgscugucaUf AfUfggcccuggg auL96	1665	asdTscddCadG gccadTaUfgaca gcasesu	2113	AGUGCUGU CAUAUGGC CUGGGAC	2561
AD-1700252.1	csusgucauaUf GfGfccugggac guL96	1666	asdCsgudCcdC aggcdCaUfaua cagsesa	2114	UGCUGUCA UAUGGCCU GGGACGG	2562
AD-1700272.1	asgsgcccaaGf CfAfcagcaagg auL96	1667	asdTscddTudGc ugudGcUfuggg ccusesu	2115	AGAGGCCC AAGCACAG CAAGGAC	2563
AD-1700279.1	asgscacagcAf AfGfgacaucgc cuL96	1668	asdGsgcdGadT gucddTuGfcugu gcusug	2116	CAAGCACA GCAAGGAC AUCGCCC	2564

[1133]

[1134]

AD-1700280.1	gscsacagcaAf GfGfacaucgcc cuL96	1669	asdGsggdCgdA ugucdCuUfgcu gugcsusu	2117	AAGCACAG CAAGGACA UCGCCCCG	2565
AD-1700303.1	uscsaccuuuGf AfCfuguguacaa guL96	1670	asdCsuudGudA cacgdTcAfaagg ugasasu	2118	AUUCACCU UUGACGUG UACAAGC	2566
AD-1700309.1	ususgacgugUf AfCfaagcaaaa cuL96	1671	asdGsuudTudG cuugdTaCfacgu caasag	2119	CUUUGACG UGUACAAG CAAAACC	2567
AD-1700312.1	ascsguguacAf AfGfcaaaaccc uuL96	1672	asdAsggdGudT uugcdTuGfuaca cguscsa	2120	UGACGUGU ACAAGCAA AACCCUC	2568
AD-1700314.1	gsusguacaaGf CfAfaaacccuc guL96	1673	asdCsgadGgdG uuudGcUfugu acacsusu	2121	ACGUGUAC AAGCAAAA CCCUCGA	2569
AD-1700315.1	usgsuacaagCf AfAfaaccucg auL96	1674	asdTscgdAgdG guudTgCfuug uacascsg	2122	CGUGUACA AGCAAAAC CCUCGAG	2570
AD-1700316.1	gsusacaagCf AfAfaaccucg guL96	1675	asdCsudGadG ggudTuGfcuu guacsasc	2123	GUGUACAA GCAAAACC CUCGAGA	2571
AD-1700317.1	usascaagcaAf AfAfccucgag auL96	1676	asdTscudCgdA gggdTuUfgcu uguascsa	2124	UGUACAAG CAAAACCC UCGAGAC	2572
AD-1700318.1	ascsaagcaAf AfCfccucgaga cuL96	1677	asdGsudTedG agggdTuUfugc uugusasc	2125	GUACAAGC AAAACCCU CGAGACC	2573
AD-1700323.1	csasaaaccUf CfGfagaccucu uuL96	1678	asdAsagdAgdG ucudGaGfggu uuugscsu	2126	AGCAAAAC CCUCGAGA CCUCUUU	2574
AD-1700324.1	asasaaccuCf GfAfgaccucu uuL96	1679	asdAsaadGadG gucudCgAfggg uuuusgsc	2127	GCAAAACC CUCGAGAC CUCUUUG	2575
AD-1700325.1	asasaccucGf AfGfaccucuuu guL96	1680	asdCsaadAgdA ggucdTcGfaggg uuusug	2128	CAAAACCC UCGAGACC UCUUUGG	2576
AD-1700327.1	ascscucgaGf AfCfcucuugg cuL96	1681	asdGscddAadA gaggdTcUfcgag ggususu	2129	AAACCCUC GAGACCUC UUUGGCA	2577
AD-1700328.1	csescucgagAf CfCfucuuggc auL96	1682	asdTsgcdCadA agagdGuCfucg agggusu	2130	AACCCUCG AGACCUCU UUGGCAG	2578
AD-1700329.1	csescucgagAf CfUfcuuuggca	1683	asdCsugdCcdA aagadGgUfcuc	2131	ACCCUCGA GACCUCU	2579

[1135]

	guL96		gaggsgsu		UGGCAGC	
AD-1700336.1	ascscucuuuGf GfCfagccugaa uuL96	1684	asdAsuudCadG gcugdCcAfaaga gguscsu	2132	AGACCUCU UUGGCAGC CUGAAUG	2580
AD-1700339.1	uscsuuuggcAf GfCfcugaaugu cuL96	1685	asdGsacdAudT caggdCuGfcaa agasgsg	2133	CCUCUUUG GCAGCCUG AAUGUCA	2581
AD-1700344.1	gsgscagccuGf AfAfugucuaag cuL96	1686	asdGscudTudG acaudTcAfggcu gccsasa	2134	UUGGCAGC CUGAAUGU CAAAGCC	2582
AD-1700350.1	csusgaauguCf AfAfagccacau uuL96	1687	asdAsaudGudG gcuudTgAfcau ucagsgsc	2135	GCCUGAAU GUCAAAGC CACAUUC	2583
AD-1700352.1	gsasaugucaAf AfGfccacauuc uuL96	1688	asdAsgadAudG uggcdTuUfgaca uucsasg	2136	CUGAAUGU CAAAGCCA CAUUCUA	2584
AD-1700353.1	asasugucuaAf GfCfcacauucu auL96	1689	asdTsagdAadT guggdCuUfuga cauuscsa	2137	UGAAUGUC AAAGCCAC AUUCUAC	2585
AD-1700354.1	asusgucaaaGf CfCfacauucua cuL96	1690	asdGsuadGadA ugugdGcUfuug acaususc	2138	GAAUGUCA AAGCCACA UUCUACG	2586
AD-1700355.1	usgsucaaaGf CfAfcuucuaac guL96	1691	asdCsgudAgdA augudGgCfuuu gacasusu	2139	AAUGUCA AGCCACAU UCUACGG	2587
AD-1700356.1	gsuscaaaGf AfCfauucuaac guL96	1692	asdCscgdTadG aaugdTgGfcuu ugacsasu	2140	AUGUCAAA GCCACAUU CUACGGG	2588
AD-1700357.1	uscsaaagccAf CfAfuucuaacg guL96	1693	asdCscgdGudA gaaudGuGfgcu uugascsa	2141	UGUCAAAAG CCACAUUC UACGGGC	2589
AD-1700358.1	csasaagccaCf AfUfucuaacggg cuL96	1694	asdGscgdCgdT agaadTgUfggcu uugsasc	2142	GUCAAAGC CACAUUCU ACGGGCU	2590
AD-1700359.1	asasagccacAf UfUfcuaacggc uuL96	1695	asdAsgcdCcdG uagadAuGfugg cuusgsa	2143	UCAAAGCC ACAUUCUA CGGGCUC	2591
AD-1700365.1	ascsauucuaCf GfGfgcucua cuL96	1696	asdGsagdTadG agccdCgUfagaa ugusgsg	2144	CCACAUUC UACGGGCU CUACUCU	2592
AD-1700366.1	csasuucuaCf GfGfcucuaac uuL96	1697	asdAsgadGudA gagcdCcGfuaga augusg	2145	CACAUUCU ACGGGCU UACUCUA	2593

[1136]

AD-1700368.1	ususcuacggGf CfUfcuacucua uuL96	1698	asdAsuadGadG uagadGcCfcgua gaasug	2146	CAUUCUAC GGGCUCUA CUCUAUG	2594
AD-1700369.1	uscsuacgggCf UfCfuacucua guL96	1699	asdCsaudAgdA guagdAgCfccg uagasasu	2147	AUUCUACG GGCUCUAC UCUAUGA	2595
AD-1700370.1	csusacgggcUf CfUfacucuaug auL96	1700	asdTscadTadGa guadGaGfcccg uagsasa	2148	UUCUACGG GCUCUACU CUAUGAG	2596
AD-1700371.1	usascgggcuCf UfAfcucuauga guL96	1701	asdCsucdAudA gagudAgAfgcc cguasgsa	2149	UCUACGGG CUCUACUC UAUGAGU	2597
AD-1700372.1	ascsgggcucUf AfCfucuaugag uuL96	1702	asdAscudCadT agagdTaGfagcc cgusasg	2150	CUACGGGC UCUACUCU AUGAGUU	2598
AD-1700374.1	gsgsgcucuaCf UfCfuaugagu guL96	1703	asdCsaadCudC auagdAgUfaga gccccgsu	2151	ACGGGCUC UACUCUAU GAGUUGU	2599
AD-1700375.1	gsgscucuaCf CfUfaugaguug uuL96	1704	asdAscadAcdT cauadGaGfuaga gccscsg	2152	CGGGCUCU ACUCUAUG AGUUGUG	2600
AD-1700376.1	gscsucuacuCf UfAfugaguug uguL96	1705	asdCsacdAadC ucaudAgAfgua gagcscsc	2153	GGGCUCUA CUCUAUGA GUUGUGA	2601
AD-1700378.1	uscsuacucuAf UfGfaguuguga cuL96	1706	asdGsucdAcdA acucdAuAfgag uagasgsc	2154	GCUCUACU CUAUGAGU UGUGACU	2602
AD-1700383.1	uscsuauagagUf UfGfugacuuuc auL96	1707	asdTsgadAadG ucacdAaCfucua agasgsu	2155	ACUCUAUG AGUUGUGA CUUUCAA	2603
AD-1700384.1	csusaugaguUf GfUfgacuuuca auL96	1708	asdTsugdAadA gucadCaAfcuca uagsasg	2156	CUCUAUGA GUUGUGAC UUUCAAG	2604
AD-1700385.1	usasugaguGf UfGfacuuuca guL96	1709	asdCsuudGadA agucdAcAfacuc auasgsa	2157	UCUAUGAG UUGUGACU UUCAAGG	2605
AD-1700386.1	asusgaguugUf GfAfcuuucaag guL96	1710	asdCscudTgdA aagudCaCfaacu causasg	2158	CUAUGAGU UGUGACUU UCAAGGA	2606
AD-1700387.1	usgsaguuguGf AfCfuuucaagg auL96	1711	asdTscddTudGa aagdTcAfcacu casusa	2159	UAUGAGUU GUGACUUU CAAGGAC	2607
AD-1700388.1	gsasguugugAf CfUfuucaagga	1712	asdGsucdCudT gaaadGuCfaca	2160	AUGAGUUG UGACUUUC	2608

[1137]

	cuL96		cucsasu		AAGGACU	
AD-1700408.1	ususggcccaAf AfGfaaguacu cuL96	1713	asdGsagdTadC uuudTuUfggg ccaasgsu	2161	ACUUGGCC CAAAGAAA GUACUCA	2609
AD-1700410.1	gsgscccaaaGf AfAfaguacuca guL96	1714	asdCsugdAgdT acuudTeUfuugg gccsasa	2162	UUGGCCCA AAGAAAGU ACUCAGG	2610
AD-1700411.1	gscsccaaagAf AfAfguacucag guL96	1715	asdCscudGadG uacudTuCfuuug ggcsesa	2163	UGGCCCAA AGAAAGUA CUCAGGG	2611
AD-1700413.1	cscsaaagaaAf GfUfacucaggg auL96	1716	asdTscddCudG aguadCuUfucu uuggsgsc	2164	GCCCAAAG AAAGUACU CAGGGAG	2612
AD-1700414.1	csasaagaaaGf UfAfcucagga guL96	1717	asdCsuedCcdT gagudAcUfuuc uuugsgsg	2165	CCCAAAGA AAGUACUC AGGGAGC	2613
AD-1700422.1	gsusacucagGf GfAfgcuccuuc guL96	1718	asdCsgadAgdG agcudCcCfugag uacsusu	2166	AAGUACUC AGGGAGCU CCUUCGU	2614
AD-1700423.1	usascucaggGf AfGfcuccuucg uuL96	1719	asdAscgdAadG gagcdTcCfcuga guacsusu	2167	AGUACUCA GGGAGCUC CUUCGUU	2615
AD-1700424.1	ascsucagggAf GfCfuccuucgu uuL96	1720	asdAsacdGadA ggagdCuCfcu gagusasc	2168	GUACUCAG GGAGCUCC UUCGUUG	2616
AD-1700425.1	csuscagggGf CfUfccuucguu guL96	1721	asdCsaadCgdA aggadGcUfccu gagsusa	2169	UACUCAGG GAGCUCCU UCGUUGG	2617
AD-1700426.1	uscsagggagCf UfCfcuucguug guL96	1722	asdCscadAcdG aaggdAgCfucc ugasgsu	2170	ACUCAGGG AGCUCCUU CGUUGGA	2618
AD-1700427.1	csasgggagCf CfCfuucguugg auL96	1723	asdTscddAadC gaagdGaGfcucc cugsasg	2171	CUCAGGGA GCUCCUUC GUUGGAC	2619
AD-1700428.1	asgsggagcuCf CfUfucguugga cuL96	1724	asdGsuedCadA cgaadGgAfgcu cccusgsa	2172	UCAGGGAG CUCCUUCG UUGGACC	2620
AD-1700439.1	uscsguuggaCf CfUfccacacug cuL96	1725	asdGscadGudG uggadGgUfcca acgasasg	2173	CUUCGUUG GACCUCCAC ACUGCU	2621
AD-1700461.1	csasaggccuGf GfGfccauaugu uuL96	1726	asdAsacdAudA uggcdCcAfggc cuugsesa	2174	UGCAAGGC CUGGGCCA UAUGUUG	2622

[1138]

AD-1700462.1	asasggccugGf GfCfcauanguu guL96	1727	asdCsaadCadTa uggdCcCfaggcc uusgsc	2175	GCAAGGCC UGGGCCA AUGUUGC	2623
AD-1700464.1	gsgsccugggCf CfAfuanguugc uuL96	1728	asdAsgcdAadC auaudGgCfccag gccsusu	2176	AAGGCCUG GGCCAUAU GUUGCUG	2624
AD-1700465.1	gsescugggcCf AfUfauguugcu guL96	1729	asdCsagdCadA cauadTgGfccca ggcsesu	2177	AGGCCUGG GCCAUAUG UUGCUGG	2625
AD-1700468.1	usgsggccauAf UfGfuugcugg gauL96	1730	asdTscddCadGc aacdAuAfuggc ccasgsg	2178	CCUGGGCC AUAUGUUG CUGGGAA	2626
AD-1700473.1	csasuauguuGf CfUfgggaauuu cuL96	1731	asdGsaadAudT cccadGcAfacau augsgsc	2179	GCCAUAUG UUGCUGGG AAUUUCC	2627
AD-1700474.1	asusauguugCf UfGfggaauuuc cuL96	1732	asdGsgadAadT ucccdAgCfaaca uausgsg	2180	CCAUAUGU UGCUGGGA AUUUCU	2628
AD-1700476.1	asusguugcuGf GfGfaauuuccu cuL96	1733	asdGsagdGadA auucdCcAfgcaa causasu	2181	AUAUGUUG CUGGGAAU UUCUCC	2629
AD-1700477.1	usgsuugcugGf GfAfauuuccuc cuL96	1734	asdGsgadGgdA aaudCcCfagca acasusa	2182	UAUGUUGC UGGGAAUU UCCUCCA	2630
AD-1700479.1	ususgcugggAf AfUfuuccucca cuL96	1735	asdGsugdGadG gaaadTuCfccag caascsa	2183	UGUUGCUG GGAAUUUC CUCCACC	2631
AD-1700482.1	csusgggaauUf UfCfcuccacce uuL96	1736	asdAsggdGudG gaggdAaAfuuc ccagscsa	2184	UGCUGGGA AUUUCUCC CACCCUU	2632
AD-1700485.1	gsgsaauuucCf UfCfcaccuuc guL96	1737	asdCsgadAgdG guggdAgGfaaa uuccscsa	2185	UGGGAAUU UCCUCCACC CUUCGU	2633
AD-1700486.1	gsasauuuccUf CfCfaccuucg uuL96	1738	asdAsegdAadG ggugdGaGfgaa auucscsc	2186	GGGAAUUU CCUCCACCC UUCGUC	2634
AD-1700487.1	asasuuccuCf CfAfcccuucgu cuL96	1739	asdGsacdGadA gggudGgAfgga aauscsa	2187	GGAAUUUC CUCCACCCU UCGUCA	2635
AD-1700488.1	asusuuccucCf AfCfcuucguc auL96	1740	asdTsgadCgdA agggdTgGfagg aaususc	2188	GAAUUUCC UCCACCCUU CGUCAU	2636
AD-1700489.1	ususuccuccAf CfCfcuucguca	1741	asdAsugdAcdG aaggdGuGfgag	2189	AAUUUCU CCACCCUUC	2637

[1139]

	uuL96		gaaasusu		GUCAUG	
AD-1700490.1	ususccuccaCf CfCfuucgucau guL96	1742	asdCsaudGadC gaagdGgUfgga ggaasasu	2190	AUUUCCUC CACCCUUCG UCAUGC	2638
AD-1700517.1	asasgggccgCf CfUfccauuccu auL96	1743	asdTsagdGadA uggadGgCfggc ccuuscsu	2191	AGAAGGGC CGCCUCCAU UCCUAC	2639
AD-1700519.1	gsgsgccgccUf CfCfauuccuac uuL96	1744	asdAsgudAgdG aaugdGaGfgcg gccccusu	2192	AAGGGCCG CCUCCAUUC CUACUA	2640
AD-1700520.1	gsgsccgccuCf CfAfuuccuacu auL96	1745	asdTsagdTadGg aaudGgAfggcg gccccsu	2193	AGGGCCGC CUCCAUUCC UACUAA	2641
AD-1700522.1	csesgccuccAf UfUfccuacuaa guL96	1746	asdCsuudAgdT aggadAuGfgag gcgsgscsc	2194	GGCCGCCUC CAUUCCUA CUAAGG	2642
AD-1700542.1	csescacugcAf AfAfgacuanga cuL96	1747	asdGsudAudA gucudTuGfcagu gggsusc	2195	GACCCACU GCAAAGAC UAUGACA	2643
AD-1700544.1	csascugcaaAf GfAfcuaugaca guL96	1748	asdCsugdTcdA uagudCuUfugc agugsgsg	2196	CCCACUGCA AAGACUAU GACAGC	2644
AD-1700550.1	asasagacuaUf GfAfcagecauca auL96	1749	asdTsugdAudG cugudCaUfagu cuuusgsc	2197	GCAAAGAC UAUGACAG CAUCAA	2645
AD-1700553.1	gsascuaugaCf AfGfcaucaaa uuL96	1750	asdAsaudTudG augcdTgUfcaua gucsusu	2198	AAGACUAU GACAGCAU CAAUUU	2646
AD-1700554.1	ascsuauagacAf GfCfaucaaa uuL96	1751	asdAsaadTudT gaugdCuGfuca uaguscsu	2199	AGACUAUG ACAGCAUC AAUUUC	2647
AD-1700555.1	csusaugacaGf CfAfucaaa uuL96	1752	asdGsaadAudT ugaudGcUfguc auagsusc	2200	GACUAUGA CAGCAUCA AAUUUCA	2648
AD-1700556.1	usasugacagCf AfUfcaaa uuL96	1753	asdTsgadAadTu ugadTgCfuguca uasgsu	2201	ACUAUGAC AGCAUCA AUUCAG	2649
AD-1700557.1	asusgacagcAf UfCfaaa uuL96	1754	asdCsugdAadA uuugdAuGfcug ucausasg	2202	CUAUGACA GCAUCAA UUUCAGG	2650
AD-1700558.1	usgsacagcaUf CfAfaaa uuL96	1755	asdCscudGadA auuudGaUfgcu gucasusa	2203	UAUGACAG CAUCAA UUCAGGA	2651

[1140]

AD-1700560.1	ascagcaucAf AfAfuucagga cuL96	1756	asdGsucdCudG aaaudTuGfaugc ugusca	2204	UGACAGCA UCAAAUUU CAGGACC	2652
AD-1700563.1	gscsaucaaaUf UfUfcaggaccu guL96	1757	asdCsagdGudC cugadAaUfuug augcsusg	2205	CAGCAUCA AAUUUCAG GACCUGC	2653
AD-1700566.1	uscsaaauuuCf AfGfgaccugca guL96	1758	asdCsugdCadG gucddTgAfaau ugasusg	2206	CAUCAAU UUCAGGAC CUGCAGA	2654
AD-1700573.1	uscsaggaccUf GfCfagacagua cuL96	1759	asdGsuadCudG ucugdCaGfguc cugasasa	2207	UUUCAGGA CCUGCAGA CAGUACA	2655
AD-1700575.1	asgsgaccugCf AfGfacaguaca guL96	1760	asdCsugdTadC uguedTgCfagg uccusgsa	2208	UCAGGACC UGCAGACA GUACAGG	2656
AD-1700576.1	gsgsaccugcAf GfAfcaguacag guL96	1761	asdCseudGudA cugudCuGfcag guccsusg	2209	CAGGACCU GCAGACAG UACAGGC	2657
AD-1700578.1	ascscugcagAf CfAfguacagge uuL96	1762	asdAsgcdCudG uacudGuCfugc agguscsc	2210	GGACCUGC AGACAGUA CAGGCUA	2658
AD-1700580.1	csusgcagacAf GfUfacaggcua guL96	1763	asdCsudGcdC ugudCuGfucu gcagsgsu	2211	ACCUGCAG ACAGUACA GGCUAGA	2659
AD-1700582.1	gscsagacagUf AfCfaggcuaga uuL96	1764	asdAsuedTadG ccugdTaCfuguc ugcsasg	2212	CUGCAGAC AGUACAGG CUAGUA	2660
AD-1700623.1	ascsgccucaCf AfUfcccaaguc uuL96	1765	asdAsgadCudT gggadTgUfgag gcgususa	2213	UAACGCCU CACAUCCCA AGUCUA	2661
AD-1700670.1	ususccuagcCf AfCfcuuucugg cuL96	1766	asdGscddAgdA aaggdTgGfcuag gaasasg	2214	CUUUCUA GCCACCUU UCUGGCC	2662
AD-1700671.1	uscscuagccAf CfCfuucuggc cuL96	1767	asdGsgcdCadG aaagdGuGfgcu aggasasa	2215	UUUCCUAG CCACCUUUC UGGCCU	2663
AD-1700680.1	csesuucugGf CfCfucccacuu guL96	1768	asdCsaadGudG ggagdGcCfagaa aggsusg	2216	CACCUUUC UGGCCUCCC ACUUGC	2664
AD-1700681.1	csusuucuggCf CfUfccacuug cuL96	1769	asdGscadAgdT gggadGgCfcag aaagsgsu	2217	ACCUUUCU GGCCUCCCA CUUGCC	2665
AD-1700684.1	uscsgggccuCf CfCfacuugccc	1770	asdAsggdGcdA agugdGgAfggc	2218	UUUCUGGC CUCCACUU	2666

[1141]

	uuL96		cagasasa		GCCCUG	
AD-1700710.1	gsgscaucuuGf AfUfccagccu guL96	1771	asdCsagdGcdT gggadTcAfagau gccsusg	2219	CAGGCAUC UUGAUCCC AGCCUGA	2667
AD-1700736.1	asasugccucCf UfGfuccuaaa cuL96	1772	asdGsuudTadG ggacdAgGfagg causgsg	2220	CCAAUGCC UCCUGUCCC UAAACU	2668
AD-1700737.1	asusgccuccUf GfUfccuaaac uuL96	1773	asdAsgudTudA gggadCaGfgag gcausug	2221	CAAUGCCU CCUGUCCCU AAACUC	2669
AD-1700738.1	usgsccuccuGf UfCfccuaaacu cuL96	1774	asdGsagdTudTa gggdAcAfggag gcasusu	2222	AAUGCCUC CUGUCCCU AAACUCC	2670
AD-1700780.1	csasaacuaaCf AfAfaacauuu cuL96	1775	asdGsaadAudG uuuudTgUfuag uuugsasg	2223	CUCAAAACU AACAAAAA CAUUUCC	2671
AD-1700781.1	asasacuaacAf AfAfaacauuuc cuL96	1776	asdGsgadAadT guuudTuGfuua guuusgsa	2224	UCAAAACUA ACAAAAAC AUUUCCA	2672
AD-1700782.1	asascuaacaAf AfAfacauuucc auL96	1777	asdTsggdAadA uguudTuUfguu aguusug	2225	CAAACUAA CAAAAACA UUUCCAA	2673
AD-1700791.1	gsusccugGfgC fUfGfagauccc aguL96	1778	asCfsugdGg (Agn)ucucagCf cCfaggacsasa	2226	GGAAGGAA AGAGCAGA UCCCAGG	2674
AD-1700793.1	usgsagauCfcC fAfGfguuugua acuL96	1779	asGfsuudAc (Agn)aaccugGf gAfucucasgsc	2227	GAGCAGAU CCCAGGUU UGUAACA	2675
AD-1700794.1	gsasgaucCfcA fGfGfuuuguaa cauL96	1780	asUfsgudTa (Cgn)aaaccuGf gGfaucucsasg	2228	AGCAGAU CCAGGUUU GUAACAG	2676
AD-1700795.1	gsasucccAfgG fUfUfuguaaca gauL96	1781	asUfscudGu (Tgn)aaaacCfu Gfggaucsusc	2229	CAGAUCCC AGGUUUGU AACAGAA	2677
AD-1700796.1	cscsagguUfuG fUfAfacagaaa acuL96	1782	asGfsuudTu (Cgn)uguuacAf aAfccuggsgsa	2230	UCCCAGGU UUGUAACA GAAAACA	2678
AD-1700797.1	csasgguuUfgU fAfAfcagaaaa cauL96	1783	asUfsgudTu (Tgn)cuguuaCf aAfacuggsgsg	2231	CCCAGGUU UGUAACAG AAAACAC	2679
AD-1700798.1	asgsguuuGfuA fAfCfagaaaaa cuL96	1784	asGfsugdTu (Tgn)ucuguuAf cAfaaccusgsg	2232	CCAGGUUU GUAACAGA AAACACC	2680

[1142]

AD-1700799.1	gsgsuuugUfaA fCfAfgaaaacac cuL96	1785	asGfsgudGu (Tgn)uucuguUf aCfaaaccsusg	2233	CAGGUUUG UAACAGAA AACACCA	2681
AD-1700800.1	usasacagAfaA fAfCfaccacuaa auL96	1786	asUfsuudAg (Tgn)gguguuUf uCfuguuascsa	2234	UGUAACAG AAAACACC ACUAAAG	2682
AD-1700801.1	csasgaaaAfcA fCfCfacuaaagc cuL96	1787	asGfsgcdTu (Tgn)agugguGf uUfuucugsusu	2235	AACAGAAA ACACCACU AAAGCCC	2683
AD-1700802.1	csascaggAfgA fGfAfacaccca guL96	1788	asCfsugdGg (Tgn)gguuCuCf uCfcugugscsu	2236	AGCACAGG AGAGAACC ACCCAGC	2684
AD-1700804.1	gsasaccaCfcCf AfGfccagaag uuL96	1789	asAfsudTc(Tg n)gggcuGfgUf gguuucsusc	2237	GAGAACCA CCCAGCCA GAAGUU	2685
AD-1700805.1	asascacCfcAf GfCfccagaagu uuL96	1790	asAfsacdTu (Cgn)uggguGf gGfugguuscsu	2238	AGAACCAC CCAGCCCAG AAGUUC	2686
AD-1700806.1	ascscaccCfaGf CfCfcagaagu cuL96	1791	asGfsaadCu (Tgn)cuggcuUf gGfguggususc	2239	GAACCACCC AGCCCAGA AGUUCC	2687
AD-1700807.1	cscsaccAfgCf CfCfagaaguuc cuL96	1792	asGfsgadAc (Tgn)ucuggCf uGfguggsusu	2240	AACCACCCA GCCAGAA GUUCCA	2688
AD-1700808.1	csasccaGfcCf CfAfgaaguucc auL96	1793	asUfsggdAa (Cgn)uucuggGf cUfggugsgsu	2241	ACCACCCAG CCCAGAAG UUCCAG	2689
AD-1700809.1	cscsagaaGfuU fCfCfagggaag gauL96	1794	asUfscddTu (Cgn)ccuggaAf cUfucuggsgsc	2242	GCCCAGAA GUUCCAGG GAAGGAA	2690
AD-1700810.1	csasgaagUfuC fCfAfgggaagg aauL96	1795	asUfsudCu (Tgn)cccuggAf aCfuucugsgsg	2243	CCCAGAAG UUCCAGGG AAGGAAC	2691
AD-1700811.1	asgsaaguUfcC fAfGfggaagga acuL96	1796	asGfsuudCc (Tgn)uccugGf aAfcuucusgsg	2244	CCAGAAGU UCCAGGGA AGGAACU	2692
AD-1700812.1	gsasaguuCfcA fGfGfgaaggaa cuuL96	1797	asAfsudTc (Cgn)uuccuGf gAfacuucsusg	2245	CAGAAGUU CCAGGGAA GGAACUC	2693
AD-1700813.1	asasguucCfaG fGfGfaaggaac ucuL96	1798	asGfsagdTu (Cgn)cuuccUf gGfaacuucsus	2246	AGAAGUUC CAGGGAAG GAACUCU	2694
AD-1700814.1	asgsuuccAfgG fGfAfggaacu	1799	asAfsagdGu (Tgn)ccuuccCf	2247	GAAGUUCC AGGGAAGG	2695

[1143]

	cuuL96		uGfgaacususc		AACUCUC	
AD-1700815.1	gsusuccaGfgG fAfAfggaacuc ucuL96	1800	asGfsagdAg (Tgn)uccuucCf cUfggaacsusu	2248	AAGUUCCA GGGAAGGA ACUCUCC	2696
AD-1700816.1	gsusccacCfaU fGfGfaguaccu cuuL96	1801	asAfsagdGg (Tgn)acuccaUf gGfuggacscsg	2249	CGGUCCACC AUGGAGUA CCUCUC	2697
AD-1700817.1	csasccauGfgA fGfUfaccucuc aguL96	1802	asCfsugdAg (Agn)gguacuCf cAfuggugsgsa	2250	UCCACCAU GGAGUACC UCUCAGC	2698
AD-1700819.1	cscsauggAfgU fAfCfcucucag cuuL96	1803	asAfsgcdTg (Agn)gagguaCf uCfcauggsusg	2251	CACCAUGG AGUACCUC UCAGCUC	2699
AD-1700821.1	asusggagUfaC fCfUfcucagcu cuuL96	1804	asAfsgadGc (Tgn)gagaggUf aCfuccausgsg	2252	CCAUGGAG UACCUCUC AGCUCUG	2700
AD-1700822.1	ususacucAfgG fUfCfaguaucu aauL96	1805	asUfsuadGa (Tgn)acugacCf uGfaguaasgsu	2253	ACUUACUC AGGUCAGU AUCUAAU	2701
AD-1700824.1	uscsaguaUfcU fAfAfuuaagc ucuL96	1806	asGfsagdCu (Tgn)auauuaGf aUfacugascs	2254	GGUCAGUA UCUAAUAU AAGCUCG	2702
AD-1700825.1	csasguauCfuA fAfUfauaagcu cguL96	1807	asCfsgadGc (Tgn)uauuuAf gAfuaucgsasc	2255	GUCAGUAU CUAAUAUA AGCUCGG	2703
AD-1700826.1	asgsuaucUfaA fUfAfuuaagcuc gguL96	1808	asCfscgdAg (Cgn)uuauuUf aGfauacusgsa	2256	UCAGUAUC UAAUAUAA GCUCGGA	2704
AD-1700828.1	uscsuaauAfuA fAfGfCfcucggag uuuL96	1809	asAfsacdTc(Cg n)gagcuuAfuAf uuagasusa	2257	UAUCUAAU AUAAGCUC GGAGUUU	2705
AD-1700829.1	csusaauaUfaA fGfCfucggagu uuuL96	1810	asAfsaadCu (Cgn)cgagcuUf aUfauuagsasu	2258	AUCUAAUA UAAGCUCG GAGUUUG	2706
AD-1700830.1	usasagcuCfGg fAfGfuuuggac gguL96	1811	asCfscgdTc(Cg n)aaacucCfGfAf gcuuasusa	2259	UAUAAGCU CGGAGUUU GGACGGA	2707
AD-1700831.1	asasgcucGfgA fGfUfuuggacg gauL96	1812	asUfscddGu (Cgn)caaacuCf cGfagcuusasu	2260	AUAAGCUC GGAGUUUG GACGGAG	2708
AD-1700832.1	gsgsaguuUfgG fAfCfaggaggu cuuL96	1813	asAfsgadCc (Cgn)uccgucCf aAfaccscgsa	2261	UCGGAGUU UGGACGGA GGUCUG	2709

[1144]

AD-1700833.1	usgsgacGfaGfGfGfucuggaccuuL96	1814	asAfsfgdTc(Cgn)agaccUfcFguccasasa	2262	UUUGGACG GAGGGUCU GGACCUC	2710
AD-1700834.1	asgscgacCfuUfUfCfcgugucuuL96	1815	asAfscaDga(Cgn)acggaaAfgGfucgcsusg	2263	CCAGCGACC UUUCCGUG UCUGUG	2711
AD-1700837.1	csasagcgGfaCfCfAfuccggaaaguL96	1816	asCfsuudTc(Cgn)ggauggUfcFgcuugsusg	2264	CACAAGCG GACCAUCC GGAAAGG	2712
AD-1700838.1	csasuccgGfaAfAfGfgccugacaguL96	1817	asCfsugdTc(Agn)ggccuuUfcFggaugsgsu	2265	ACCAUCCG GAAAGGCC UGACAGC	2713
AD-1700839.1	asgsgagcUfgCfUfAfGCCaaagcauL96	1818	asUfsgcdTu(Tgn)ggcuagCfaGfcuccusgsg	2266	CCAGGAGC UGCUAGCC AAAGCAU	2714
AD-1700840.1	gsgsagcuGfcUfAfGfcaaaagcauuL96	1819	asAfsugdCu(Tgn)uggcuaGfcAfgcuccsusg	2267	CAGGAGCU GCUAGCCA AAGCAUU	2715
AD-1700841.1	gsasgcugCfuAfGfCfaaaagcauuuL96	1820	asAfsaudGc(Tgn)uuggcuAfgCfagcuscusu	2268	AGGAGCUG CUAGCCAA AGCAUUG	2716
AD-1700842.1	asgscugcUfaGfCfCfaaagcauuguL96	1821	asCfsaadTg(Cgn)uuuggcUfaGfcagcuscsc	2269	GGAGCUGC UAGCCAAA GCAUUGG	2717
AD-1700843.1	csusagccAfaAfGfCfauuggagacuL96	1822	asGfsudTc(Cgn)aaugcuUfuGfGcuagscsa	2270	UGCUAGCC AAAGCAUU GGAGACC	2718
AD-1700844.1	usasgccaAfaGfCfAfauuggagaccuL96	1823	asGfsgudCu(Cgn)caaugcUfuUfGgcuasgsc	2271	GCUAGCCA AAGCAUUG GAGACCC	2719
AD-1700845.1	asgscuuGfgAfGfAfccuacugcuL96	1824	asGfscadGu(Agn)gggucUfcAfaugcususu	2272	AAAGCAUU GGAGACCC UACUGCU	2720
AD-1700846.1	gscsauugGfaGfAfCfcuacugcuuL96	1825	asAfsgcdAg(Tgn)aggucUfcCfaaugcususu	2273	AAGCAUUG GAGACCCU ACUGCUG	2721
AD-1700848.1	asusuggaGfaCfCfCfuacugcugauL96	1826	asUfscadGc(Agn)guaggUfcUfccausgsc	2274	GCAUUGGA GACCCUAC UGCUGAA	2722
AD-1700850.1	gsgsagacCfcUfAfCfugcugaauguL96	1827	asCfsaudTc(Agn)gcaguaGfgGfucuccsasa	2275	UUGGAGAC CCUACUGC UGAAUGG	2723
AD-1700851.1	gsasgaccCfuAfCfUfgcugaau	1828	asCfscadTu(Cgn)agcaguAf	2276	UGGAGACC CUACUGCU	2724

[1145]

	gguL96		gGfgucucscsa		GAAUGGA	
AD-1700852.1	ascscuaCfuG fCfUfgaaugga guuL96	1829	asAfsudCc (Agn)uucagcAf gUfaggguscsu	2277	AGACCCUA CUGCUGAA UGGAGUG	2725
AD-1700853.1	csescuacUfgC fUfGfauggag uguL96	1830	asCfsacdTc(Cg n)auucagCfaGf uagggususc	2278	GACCCUAC UGCUGAAU GGAGUGC	2726
AD-1700854.1	csesuacuGfcU fGfAfauggagu gcuL96	1831	asGfscadCu (Cgn)cauucGf cAfguaggsusu	2279	ACCCUACU GCUGAAUG GAGUGCU	2727
AD-1700855.1	csusacugCfuG fAfAfauggagug cuuL96	1832	asAfsgcdAc (Tgn)ccauucAf gCfaguagsgsg	2280	CCCUACUGC UGAAUGGA GUGCUA	2728
AD-1700856.1	usascugcUfgA fAfUfggagugc uauL96	1833	asUfsagdCa (Cgn)uccauucf aGfcaguasgsg	2281	CCUACUGC UGAAUGGA GUGCUAA	2729
AD-1700858.1	gscsugaaUfgG fAfGfugcuaac ccuL96	1834	asGfsggdTu (Agn)gcacucCf aUfucagsasg	2282	CUGCUGAA UGGAGUGC UAACCCU	2730
AD-1700859.1	csusgaauGfgA fGfUfgcuaacc cuuL96	1835	asAfsaggdGu (Tgn)agcacuCf cAfuucagscsa	2283	UGCUGAAU GGAGUGCU AACCCUG	2731
AD-1700860.1	usgsaaugGfaG fUfGfcaaac uguL96	1836	asCfsagdGg (Tgn)uagcacUf cCfauucasgsc	2284	GCUGAAUG GAGUGCUA ACCCUGG	2732
AD-1700863.1	usgsgaguGfcU fAfAfccuggu gcuL96	1837	asGfscadCc (Agn)ggguuaGf cAfcuccasusu	2285	AAUGGAGU GCUAACCC UGGUGCU	2733
AD-1700864.1	gsgsagugCfuA fAfCfcuggug cuuL96	1838	asAfsgcdAc (Cgn)aggguuAf gCfacuccsasusu	2286	AUGGAGUG CUAACCCU GGUGCUA	2734
AD-1700865.1	gsasgugcUfaA fCfCfcuggugc uauL96	1839	asUfsagdCa (Cgn)cagggUf aGfcacucscsa	2287	UGGAGUGC UAACCCUG GUGCUAG	2735
AD-1700867.1	asasccuGfgU fGfCfuagagga gguL96	1840	asCfsudCc (Tgn)cuagcaCf cAfggguusasg	2288	CUAACCCU GGUGCUAG AGGAGGA	2736
AD-1700868.1	csescuggUfgC fUfAfgaggagg auuL96	1841	asAfsudCu (Cgn)cucuagCf aCfcaggsusu	2289	AACCCUGG UGCUAGAG GAGGAUG	2737
AD-1700869.1	gsgsugcuAfgA fGfGfaggaugg aaL96	1842	asUfsudCa (Tgn)ccuccuCf uAfgcaccsasg	2290	CUGGUGCU AGAGGAGG AUGGAAC	2738

[1146]

AD-1700870.1	gsusgcuaGfaG fGfAfggaugga acuL96	1843	asGfsuudCc (Agn)uccuccUf cUfagcacsca	2291	UGGUGCUA GAGGAGGA UGGAACU	2739
AD-1700871.1	csusagagGfaG fGfAfggaacu gcuL96	1844	asGfscadGu (Tgn)ccauccUf cCfucuagsca	2292	UGCUAGAG GAGGAUGG AACUGCA	2740
AD-1700872.1	gsasggauGfgA fAfCfugcagug gauL96	1845	asUfscddAc (Tgn)gcaguuCf cAfuccucscsu	2293	AGGAGGAU GGAACUGC AGUGGAC	2741
AD-1700873.1	gsgsauggAfaC fUfGfcagugga cauL96	1846	asUfsgudCc (Agn)cugcagUf uCfcaucscusc	2294	GAGGAUGG AACUGCAG UGGACAG	2742
AD-1700874.1	gsasuggaAfcU fGfCfaguggac aguL96	1847	asCfsugdTc (Cgn)acugcaGf uUfccaucscsu	2295	AGGAUGGA ACUGCAGU GGACAGU	2743
AD-1700875.1	asusggaaCfuG fCfAfguggaca guuL96	1848	asAfsudGu (Cgn)cacugcAf gUfuccaucsc	2296	GGAUGGAA CUGCAGUG GACAGUG	2744
AD-1700876.1	usgsaacUfgC fAfGfuggacag uguL96	1849	asCfsacdTg(Tg n)ccacugCfaGf uuccasusc	2297	GAUGGAAC UGCAGUGG ACAGUGA	2745
AD-1700877.1	gsasacugCfaG fUfGfgacagug aguL96	1850	asCfsudAc (Tgn)guccacUf gCfaguucscsa	2298	UGGAACUG CAGUGGAC AGUGAGG	2746
AD-1700878.1	ascugcaGfuG fGfAfcagugag gauL96	1851	asUfscddTc (Agn)cuguccAf cUfgcagususc	2299	GAACUGCA GUGGACAG UGAGGAC	2747
AD-1700879.1	csusgcagUfgG fAfCfagugagg acuL96	1852	asGfsudCu (Cgn)acugucCf aCfugcagsusu	2300	AACUGCAG UGGACAGU GAGGACU	2748
AD-1700880.1	usgscaguGfgA fCfAfgugagga cuuL96	1853	asAfsudCc (Tgn)cacuguCf cAfcugcasgsu	2301	ACUGCAGU GGACAGUG AGGACUU	2749
AD-1700881.1	gscsagugGfaC fAfGfugaggac uuuL96	1854	asAfsagdTc (Cgn)ucacugUf cCfacugcsasg	2302	CUGCAGUG GACAGUGA GGACUUC	2750
AD-1700882.1	csasuggAfaA fGfUfgaggacu ucuL96	1855	asGfsaadGu (Cgn)cucacuGf uCfcaucscsa	2303	UGCAGUGG ACAGUGAG GACUUCU	2751
AD-1700883.1	asgsuggaCfaG fUfGfaggacuu cuuL96	1856	asAfsgadAg (Tgn)ccucacUf gUfccacusgsc	2304	GCAGUGGA CAGUGAGG ACUUCUU	2752
AD-1700885.1	usgsgacaGfuG fAfGfgacuucu	1857	asGfsaadGa (Agn)guccucAf	2305	AGUGGACA GUGAGGAC	2753

[1147]

	ucuL96		cUfguccasesu		UUCUCC	
AD-1700887.1	csasgugaGfgA fCfUfucuucca gcuL96	1858	asGfscudGg (Agn)agaaguCf cUfcacugsusc	2306	GACAGUGA GGACUUCU UCCAGCU	2754
AD-1700888.1	usgsaggaCfuU fCfUfuccagcu gcuL96	1859	asGfscadGc (Tgn)ggaagaAf gUfcucasesu	2307	AGUGAGGA CUUCUCC AGCUGCU	2755
AD-1700889.1	gsasggacUfuC fUfUfccagcug cuuL96	1860	asAfsgcdAg (Cgn)uggaagAf aGfucccsasc	2308	GUGAGGAC UUCUCCA GCUGCUG	2756
AD-1700891.1	gsgsacuuCfuU fCfCfagcugcu gguL96	1861	asCfscadGc (Agn)gcuggaAf gAfaguccsusc	2309	GAGGACUU CUUCCAGC UGCUGGA	2757
AD-1700892.1	uscsuuccAfgC fUfGfcuggagg auuL96	1862	asAfsudCu (Cgn)cagcagCf uGfgaagasasg	2310	CUUCUCC AGCUGCUG GAGGAUG	2758
AD-1700893.1	csasgcugCfuG fGfAfggaugac acuL96	1863	asGfsugdTc (Agn)uccuccAf gCfagcugsgsa	2311	UCCAGCUG CUGGAGGA UGACACG	2759
AD-1700894.1	gscsugcuGfgA fGfGfaugacac guuL96	1864	asAfsogdTg (Tgn)cauccuCf cAfgcagsusg	2312	CAGCUGCU GGAGGAUG ACACGUG	2760
AD-1700895.1	csusggagGfaU fGfAfcacugc cuuL96	1865	asAfsogdCa (Cgn)gugucaUf cCfuccagsesa	2313	UGCUGGAG GAUGACAC GUGCCUG	2761
AD-1700897.1	gsgsaugaCfaC fGfUfgccugau gguL96	1866	asCfscadTc(Ag n)ggcagUfgUf cauccsusc	2314	GAGGAUGA CACGUGCC UGAUGGU	2762
AD-1700898.1	gsasugacAfcG fUfGfccugaug guuL96	1867	asAfsccdAu (Cgn)aggcacGf uGfucaucsesu	2315	AGGAUGAC ACGUGCCU GAUGGUG	2763
AD-1700899.1	gsascagUfgC fCfUfgauggug uuuL96	1868	asAfsacdAc (Cgn)aucaggCf aCfugucsas	2316	AUGACACG UGCCUGAU GGUGUUG	2764
AD-1700900.1	gscsagucUfgG fUfCfagagcug gauL96	1869	asUfsccdAg (Cgn)ucugacCf aGfacucesasa	2317	UUGCAGUC UGGUCAGA GCUGGAG	2765
AD-1700902.1	usascaagGfaG fUfGfgagugcu guuL96	1870	asAfsacdGc (Agn)uccacUf cCfuuguasgsg	2318	CCUACAAG GAGUGGAG UGCUGUC	2766
AD-1700903.1	ascsaaggAfgU fGfGfagugcug ucuL96	1871	asGfsacdAg (Cgn)acuccaCf uCfcuugusasg	2319	CUACAAGG AGUGGAGU GCUGUCA	2767

[1148]

AD-1700904.1	asasggagUfgG fAfGfugcuguc auuL96	1872	asAfsugdAc (Agn)gcacucCf aCfuccuusgsu	2320	ACAAGGAG UGGAGUGC UGUCAUA	2768
AD-1700905.1	gsgsagugGfaG fUfGfGfcugucau auuL96	1873	asAfsuadTg (Agn)cagcacUf cCfacuccsusu	2321	AAGGAGUG GAGUGCUG UCAUAUG	2769
AD-1700906.1	usgsgaguGfcU fGfUfcuauugg ccuL96	1874	asGfsgcdCa (Tgn)augacaGf cAfcuccasesu	2322	AGUGGAGU GCUGUCAU AUGGCCU	2770
AD-1700907.1	gsgsagugCfuG fUfCfauauggc cuuL96	1875	asAfsugdCc (Agn)uauagAcAf gCfacuccsasc	2323	GUGGAGUG CUGUCAUA UGGCCUG	2771
AD-1700908.1	gsasgugcUfgU fCfAfuauuggcc uguL96	1876	asCfsagdGc (Cgn)auaugaCf aGfcacucscsa	2324	UGGAGUGC UGUCAUAU GGCCUGG	2772
AD-1700909.1	asgsugcuGfuC fAfUfauuggccu gguL96	1877	asCfscadGg (Cgn)cauauagAf cAfgcacuscsc	2325	GGAGUGC GUCAUAUG GCCUGGG	2773
AD-1700912.1	gscsugucAfuA fUfGfGfccuggg acuL96	1878	asGfsudCc (Agn)ggccauAf uGfacagcsasc	2326	GUGCUGUC AUAUGGCC UGGGACG	2774
AD-1700913.1	csusgucaUfaU fGfGfccuggga cguL96	1879	asCfsgudCc (Cgn)aggccaUf aUfgacagscsa	2327	UGCUGUCA UAUGGCCU GGGACGG	2775
AD-1700915.1	csasagcaCfaGf CfAfggacauc guL96	1880	asCfsgadTg (Tgn)ccuugcUf gUfgcuugsgsg	2328	CCCAAGCAC AGCAAGGA CAUCGC	2776
AD-1700916.1	asusucacCfuU fUfGfacugua cauL96	1881	asUfsgudAc (Agn)cgucAAf gGfugaauscsg	2329	CGAUUCAC CUUUGACG UGUACAA	2777
AD-1700917.1	ususcaccUfuU fGfAfcguguac aauL96	1882	asUfsugdTa (Cgn)acgucaAf aGfgugaasusc	2330	GAUUCACC UUUGACGU GUACAAG	2778
AD-1700918.1	uscsaccuUfuG fAfCfGfuguaca aguL96	1883	asCfsuudGu (Agn)cagcucAf aAfggugasasu	2331	AUUCACCU UUGACGUG UACAAGC	2779
AD-1700919.1	csasccuuUfgA fCfGfuguacaa gcuL96	1884	asGfscudTg (Tgn)acacguCf aAfggugsasa	2332	UUCACCUU UGACGUGU ACAAGCA	2780
AD-1700920.1	cscsuuugAfcG fUfGfuacaagc aauL96	1885	asUfsugdCu (Tgn)guacacGf uCfaaaggsusg	2333	CACCUUUG ACGUGUAC AAGCAA	2781
AD-1700922.1	usgsacguGfuA fCfAfagcaaac	1886	asGfsgudTu (Tgn)gcuuguAf	2334	UUUGACGU GUACAAGC	2782

[1149]

	cuL96		cAfcgucasasa		AAAACCC	
AD-1700923.1	gsascgugUfaC fAfAfgcaaac ccuL96	1887	asGfsggdTu (Tgn)ugcuugUf aCfacgucsasa	2335	UUGACGUG UACAAGCA AAACCCU	2783
AD-1700924.1	ascsguguAfaA fAfGfcaaaccc uuL96	1888	asAfsaggdGu (Tgn)uugcuGf uAfcacguscsa	2336	UGACGUGU ACAAGCAA AACCCUC	2784
AD-1700925.1	csgsuguaCfaA fGfCfaaacccu cuL96	1889	asGfsagdGg (Tgn)uuugcuUf gUfacacgsusc	2337	GACGUGUA CAAGCAAA ACCCUCG	2785
AD-1700929.1	csasagcaAfaA fCfCfcucgaga ccuL96	1890	asGfsgudCu (Cgn)gagguUf uUfgcuugsusa	2338	UACAAGCA AAACCCUC GAGACCU	2786
AD-1700930.1	asasgcaaAfaCf CfCfucgagacc uuL96	1891	asAfsaggdTc (Tgn)cgagggUf uUfugcuusgsu	2339	ACAAGCAA AACCCUCG AGACCCUC	2787
AD-1700931.1	asgscaaaAfaCf CfUfcgagaccu cuL96	1892	asGfsagdGu (Cgn)ucgaggGf uUfuugcususg	2340	CAAGCAAA ACCCUCGA GACCUCU	2788
AD-1700934.1	gsasgaccUfcU fUfUfggcagcc uguL96	1893	asCfsagdGc (Tgn)gccaaaGf aGfgucucsgsa	2341	UCGAGACC UCUUUGGC AGCCUGA	2789
AD-1700936.1	cscsucuUfgG fCfAfgccugaa uguL96	1894	asCfsaudTc (Agn)ggcugcCf aAfaagagsusc	2342	GACCUCUU UGGCAGCC UGAAUGU	2790
AD-1700937.1	csuscuuGfgC fAfGfccugaau guuL96	1895	asAfsadTu (Cgn)aggcugCf cAfaagagsu	2343	ACCUCUUU GGCAGCCU GAAUGUC	2791
AD-1700938.1	csusuuggCfaG fCfCfugaangu cauL96	1896	asUfsgadCa (Tgn)ucaggeUf gCfcaagsasg	2344	CUCUUUGG CAGCCUGA AUGUCA	2792
AD-1700939.1	ususuggcAfgC fCfUfgaauguc aauL96	1897	asUfsugdAc (Agn)uucaggCf uGfcaagsa	2345	UCUUUGGC AGCCUGAA UGUCAAA	2793
AD-1700940.1	usgsgcagCfcU fGfAfaugucaa aguL96	1898	asCfsuudTg (Agn)cauucGf gCfugccasasa	2346	UUUGGCAG CCUGAAUG UCAAGC	2794
AD-1700942.1	gscsagccUfgA fAfUfgucaaag ccuL96	1899	asGfsgedTu (Tgn)gacauCf aGfgcugcsca	2347	UGGCAGCC UGAAUGUC AAAGCCA	2795
AD-1700943.1	csasgccuGfaA fUfGfucaaagc cauL96	1900	asUfsggdCu (Tgn)ugacauUf cAfggcugscsc	2348	GGCAGCCU GAAUGUCA AAGCCAC	2796

[1150]

AD-1700944.1	asgscugAfaU fGfUfcaaagcc acuL96	1901	asGfsugdGc (Tgn)uugacaUf uCfaggcusgsc	2349	GCAGCCUG AAUGUCA AGCCACA	2797
AD-1700947.1	asusgucaAfaG fCfCfacauucu acuL96	1902	asGfsuadGa (Agn)uguggcUf uUfgacaususc	2350	GAAUGUCA AAGCCACA UUCUACG	2798
AD-1700948.1	asgscacAfuU fCfUfacgggcu cuuL96	1903	asAfsgadGc (Cgn)cguagaAf uGfuggcususu	2351	AAAGCCAC AUUCUACG GGCUCUA	2799
AD-1700949.1	gscscacaUfC fUfAfcgggcuc uauL96	1904	asUfsagdAg (Cgn)ccguagAf aUfguggcsusu	2352	AAGCCACA UUCUACGG GCUCUAC	2800
AD-1700950.1	csascauuCfuA fCfGfggcucua cuuL96	1905	asAfsagdAg (Agn)gcccguAf gAfaugugsgsc	2353	GCCACAUU CUACGGGC UCUACUC	2801
AD-1700952.1	csasuucuAfcG fGfGfcucuacu cuuL96	1906	asAfsagdGu (Agn)gagcccGf uAfgaaugsusg	2354	CACAUUCU ACGGGCUC UACUCUA	2802
AD-1700953.1	asusucuaCfG fGfCfucuauc uauL96	1907	asUfsagdAg (Tgn)agagccCf gUfagaugsusu	2355	ACAUUCUA CGGGCUCU ACUCUAU	2803
AD-1700955.1	uscsuacgGfgC fUfCfuacucua uguL96	1908	asCfsaudAg (Agn)guagagCf cCfaguagasasu	2356	AUUCUACG GGCUCUAC UCUAUGA	2804
AD-1700957.1	ascsgggcUfcU fAfcfucuauga guuL96	1909	asAfsudCa (Tgn)agaguaGf aGfcccusasg	2357	CUACGGGC UCUACUCU AUGAGUU	2805
AD-1700958.1	gsgsgcucUfaC fUfCfuauagagu uguL96	1910	asCfsaadCu (Cgn)auagagUf aGfagccsgsu	2358	ACGGGCUC UACUCUAU GAGUUGU	2806
AD-1700959.1	gsgscucuAfcU fCfUfaugaguu guuL96	1911	asAfsadAc (Tgn)cauagaGf uAfgagccscsg	2359	CGGGCUCU ACUCUAUG AGUUGUG	2807
AD-1700960.1	csusacucUfaU fGfAfguuguga cuuL96	1912	asAfsagdCa (Cgn)aacucaUf aGfaguagsasg	2360	CUCUACUC UAUGAGUU GUGACUU	2808
AD-1700961.1	usascucuAfuG fAfcfUfugugac uuuL96	1913	asAfsagdTc (Agn)caacucAf uAfgaguasgsa	2361	UCUACUCU AUGAGUUG UGACUUU	2809
AD-1700962.1	asesucuaUfgA fGfUfugugacu uuuL96	1914	asAfsaadGu (Cgn)acaacuCf aUfagagusasg	2362	CUACUCUA UGAGUUGU GACUUUC	2810
AD-1700963.1	csuscuaUgfaG fUfUfugacuu	1915	asGfsaadAg (Tgn)cacaacUfc	2363	UACUCUAU GAGUUGUG	2811

[1151]

	ucuL96		Afuagagsusa		ACUUUCA	
AD-1700965.1	csusaugaGfuU fGfUfgacuuuc aauL96	1916	asUfsugdAa (Agn)gucacaAf cUfcuagsasg	2364	CUCUAUGA GUUGUGAC UUUCAAG	2812
AD-1700967.1	gsasguugUfgA fCfUfuucaagg acuL96	1917	asGfsudCu (Tgn)gaaaguCf aCfaacucsasu	2365	AUGAGUUG UGACUUUC AAGGACU	2813
AD-1700968.1	asgsuuguGfaC fUfUfucaagga cuuL96	1918	asAfsugdCc (Tgn)ugaaagUf cAfaacuscasa	2366	UGAGUUGU GACUUUCA AGGACUU	2814
AD-1700969.1	ususggccCfaA fAfGfaaguac ucuL96	1919	asGfsagdTa (Cgn)uuucuuUf gGfgccaasgsu	2367	ACUUGGCC CAAAGAAA GUACUCA	2815
AD-1700970.1	usgsccccAfaA fGfAfaaguacu cauL96	1920	asUfsgadGu (Agn)cuuucUf uGfgcccasasg	2368	CUUGGCC AAAGAAAG UACUCAG	2816
AD-1700971.1	gsgscccaAfaG fAfAfaaguacuc aguL96	1921	asCfsugdAg (Tgn)acuuucUf uUfgggccsasa	2369	UUGGCCCA AAGAAAGU ACUCAGG	2817
AD-1700973.1	cscscaaaGfaAf AfGfuacucagg guL96	1922	asCfscddTg (Agn)guacuuUf cUfuugggscsc	2370	GGCCCAA GAAAGUAC UCAGGGA	2818
AD-1700975.1	asasagaaAfgU fAfCfucagggga gcuL96	1923	asGfscudCc (Cgn)ugaguaCf uUfucuuusgsg	2371	CCAAAGAA AGUACUCA GGGAGCU	2819
AD-1700976.1	asasgaaaGfuA fCfUfcagggag cuuL96	1924	asAfsagdTc (Cgn)cugaguAf cUfuucuuusug	2372	CAAAGAAA GUACUCAG GGAGCUC	2820
AD-1700977.1	asgsaaagUfaC fUfCfagggagc ucuL96	1925	asGfsagdCu (Cgn)ccugagUf aCfuucucusu	2373	AAAGAAAG UACUCAGG GAGCUCC	2821
AD-1700978.1	asgsuacuCfaG fGfGfagcuccu ucuL96	1926	asGfsaadGg (Agn)gcuccUf gAfguacususu	2374	AAAGUACU CAGGGAGC UCCUUCG	2822
AD-1700980.1	asgsaggagCfuC fCfUfucguugg acuL96	1927	asGfsudCa (Agn)egaaggAf gCfucccusgsa	2375	UCAGGGAG CUCCUUCG UUGGACC	2823
AD-1700981.1	gsgsagcuCfcU fUfCfguuggac cuuL96	1928	asAfsaggdTc (Cgn)aacgaaGf gAfgcuccscsu	2376	AGGGAGCU CCUUCGUU GGACCUC	2824
AD-1700982.1	ususcguuGfgA fCfCfuccacacu guL96	1929	asCfsagdTg (Tgn)ggagguCf cAfacgaasgsg	2377	CCUUCGUU GGACCUC ACACUGC	2825

[1152]

AD-1700984.1	csgsuuggAfcC fUfCfcacacug cuuL96	1930	asAfsgcdAg (Tgn)guggagGf uCfcaacgsasa	2378	UUCGUUGG ACCUCCACA CUGCUG	2826
AD-1700985.1	gsasccucCfaCf AfCfugcugcaa guL96	1931	asCfsuudGc (Agn)gcagugUf gGfaggucscsa	2379	UGGACCUC CACACUGC UGCAAGG	2827
AD-1700986.1	gsgsccugGfgC fCfAfuauug cuuL96	1932	asAfsgcdAa (Cgn)auaugCf cCfaggccsusu	2380	AAGGCCUG GGCCAUAU GUUGCUG	2828
AD-1700988.1	gsgsgccaUfaU fGfUfugcuggg aauL96	1933	asUfsudCc (Agn)gcaacaUf aUfsgcccsasg	2381	CUGGGCCA UAUGUUGC UGGAAU	2829
AD-1700989.1	gsgsccauAfuG fUfUfugcugga aauL96	1934	asAfsuudCc (Cgn)agcaacAf uAfuaggccscsa	2382	UGGGCCAU AUGUUGCU GGGAAU	2830
AD-1700990.1	cscsauauGfuU fGfCfugggaau uuuL96	1935	asAfsaadTu (Cgn)ccagcaAf cAfuauaggscsc	2383	GGCCAUAU GUUGCUGG GAAUUUC	2831
AD-1700991.1	csasuaugUfuG fCfUfuggaau ucuL96	1936	asGfsaadAu (Tgn)cccagcAf aCfauaugsgsc	2384	GCCAU AUG UUGCUGGG AAUUCC	2832
AD-1700992.1	usgsuugcUfgG fGfAfauuuccu ccuL96	1937	asGfsgadGg (Agn)aauuccCf aGfcaacasusa	2385	UAUGUUGC UGGGAAUU UCCUCCA	2833
AD-1700995.1	usgsggaaUfuU fCfCfuccaccu uuL96	1938	asAfsagdGg (Tgn)ggaggaAf aUfucccasgsc	2386	GCUGGGAA UUUCCUCC ACCCUUC	2834
AD-1700997.1	ususccucCfaC fCfCfuucguca uguL96	1939	asCfsaudGa (Cgn)gaaggUf gGfaggaasasu	2387	AUUUCCUC CACCCUUCG UCAUGC	2835
AD-1700998.1	asasgggcCfgC fCfUfccauucc uauL96	1940	asUfsagdGa (Agn)uggaggCf gGfccuuuscsu	2388	AGAAGGGC CGCCUCCAU UCCUAC	2836
AD-1701001.1	gscscgccUfcC fAfUfuccuacu aauL96	1941	asUfsuadGu (Agn)ggaugGf aGfgcgscscsc	2389	GGCCCGCC UCCAUUCC UACUAAG	2837
AD-1701002.1	cscsgccuCfcA fUfUfccuacua aguL96	1942	asCfsuudAg (Tgn)aggaauGf gAfgggcgscsc	2390	GGCCGCCUC CAUCCUA CUAAGG	2838
AD-1701003.1	cscscacuGfcA fAfAfgacuau acuL96	1943	asGfsudAu (Agn)gucuuuGf cAfgugggsusc	2391	GACCCACU GCAAAGAC UAUGACA	2839
AD-1701004.1	cscsacugCfaA fAfGfacuaua	1944	asUfsgudCa (Tgn)agucuuUf	2392	ACCCACUGC AAAGACUA	2840

[1153]

	cauL96		gCfaguggsgsu		UGACAG	
AD-1701005.1	csascugcAfaA fGfAfcuaugac aguL96	1945	asCfsugdTc (Agn)uagucuUf uGfcagugsgsg	2393	CCCACUGCA AAGACUAU GACAGC	2841
AD-1701007.1	asasgacuAfuG fAfCfagcauca aauL96	1946	asUfsuudGa (Tgn)gcugucAf uAfgucuusug	2394	CAAAGACU AUGACAGC AUCAAAU	2842
AD-1701009.1	gsascagcAfuC fAfAfauuucag gauL96	1947	asUfscddTg (Agn)aauuugAf uGfcugucsasu	2395	AUGACAGC AUCAAAUU UCAGGAC	2843
AD-1701011.1	csasgcauCfaA fAfUfuucagga ccuL96	1948	asGfsgudCc (Tgn)gaaauUf gAfugcugsusc	2396	GACAGCAU CAAAUUUC AGGACCU	2844
AD-1701012.1	asgscaucAfaA fUfUfucaggac cuuL96	1949	asAfsggdTc (Cgn)ugaaauUf uGfaugcusgsu	2397	ACAGCAUC AAAUUUCA GGACCUG	2845
AD-1701013.1	gscsaucaAfaU fUfUfcaggacc uguL96	1950	asCfsagdGu (Cgn)cugaaaUf uUfgaugcsusg	2398	CAGCAUCA AAUUUCAG GACCUGC	2846
AD-1701014.1	csasucaaAfuU fUfCfaggaccu gcuL96	1951	asGfscadGg (Tgn)ccugaaAf uUfugaugscsu	2399	AGCAUCA AUUUCAGG ACCUGCA	2847
AD-1701016.1	asusucaGfgA fCfCfugcagac aguL96	1952	asCfsugdTc(Tg n)gcagguCfcUf gaaaususu	2400	AAAUUUCA GGACCUGC AGACAGU	2848
AD-1701017.1	ususucagGfaC fCfUfgcagaca guuL96	1953	asAfsudGu (Cgn)ugcaggUf cCfugaasusu	2401	AAUUUCAG GACCUGCA GACAGUA	2849
AD-1701019.1	csasggacCfuG fCfAfgacagua cauL96	1954	asUfsgudAc (Tgn)gucugcAf gGfuccugsasa	2402	UUCAGGAC CUGCAGAC AGUACAG	2850
AD-1701020.1	gsasccugCfaG fAfCfaguacag gcuL96	1955	asGfscddTg (Tgn)acugucUf gCfaggucscsu	2403	AGGACCUG CAGACAGU ACAGGCU	2851
AD-1701022.1	cscsugcaGfaC fAfGfuacagge uauL96	1956	asUfsagdCc (Tgn)guacugUf cUfgcaggsusc	2404	GACCUGCA GACAGUAC AGGCUAG	2852
AD-1701023.1	csusgcagAfcA fGfUfacaggcu aguL96	1957	asCfsuadGc (Cgn)uguacuGf uCfugcagsgsu	2405	ACCUGCAG ACAGUACA GGCUAGA	2853
AD-1701024.1	usgscagaCfaG fUfAfcaggcua gauL96	1958	asUfscudAg (Cgn)cuguacUf gUfugcasgsg	2406	CCUGCAGA CAGUACAG GCUAGAU	2854

[1154]

AD-1701026.1	csasgacaGfuA fCfAfggcuaga uauL96	1959	asUfsaudCu (Agn)gccuguAf cUfgucugscsa	2407	UGCAGACA GUACAGGC UAGAUAA	2855
AD-1701027.1	gsascaguAfcA fGfGfcuagaua acuL96	1960	asGfsuudAu (Cgn)uagccuGf uAfcugucsusg	2408	CAGACAGU ACAGGCUA GAUAACC	2856
AD-1701029.1	cscsuageCfaCf CfUfuucuggcc uuL96	1961	asAfsaggdCc (Agn)gaaaggUf gGfcuaggsasa	2409	UUCUAGC CACCUUUC UGGCCUC	2857
AD-1701031.1	csusuucuGfgC fCfUfccacuu gcuL96	1962	asGfscadAg (Tgn)ggaggCf cAfgaaagsgu	2410	ACCUUUCU GGCCUCCCA CUUGCC	2858
AD-1701032.1	uscsuggcCfuC fCfCfacuugcc cuuL96	1963	asAfsaggdGc (Agn)agugggAf gGfccagasasa	2411	UUUCUGGC CUCCACUU GCCUG	2859
AD-1701033.1	gsgscaucUfuG fAfUfccagcc uguL96	1964	asCfsagdGc (Tgn)gggaucAf aGfaugccsusg	2412	CAGGCAUC UUGAUCCC AGCCUGA	2860
AD-1701034.1	gscsauCuUfgA fUfCfccagccu gauL96	1965	asUfscadGg (Cgn)ugggauCf aAfgaugcscsu	2413	AGGCAUCU UGAUCCCA GCCUGAC	2861
AD-1701035.1	ascscaaUgfcCf UfCfcuguccu auL96	1966	asUfsagdGg (Agn)caggagGf cAfuuggusag	2414	CUACCAAU GCCUCCUG UCCCAA	2862
AD-1701037.1	asusgccuCfcU fGfUfccuaaa cuuL96	1967	asAfsagdTu (Agn)gggacaGf gAfggcausug	2415	CAAUGCCU CCUGUCCCU AAACUC	2863
AD-1701038.1	gsescuccUfgU fCfCfcuaaacuc cuL96	1968	asGfsgadGu (Tgn)uagggaCf aGfgaggcsasu	2416	AUGCCUCC UGUCCCUA AACUCC	2864
AD-1720280.1	asasaaccuCf GfAfgaccuu uuL96	1969	asdAsadAg(Ag n)ggucudCgAf gGfguuusgsc	2417	GCAAAACC CUCGAGAC CUCUUUG	2865
AD-1720281.1	csusgggcuGfA GfAfuuccaggu uuL96	1970	asdAsadCc(Tgn )gggcuCuCfa Gfccagsgsa	2418	AGGAAAGA GCAGAUCC CAGGUUU	2866
AD-1720282.1	gsusggacagUf GfAfggacuucu uuL96	1971	asdAsadGa(Ag n)guccudCaCfu Gfuccacsusg	2419	CAGUGGAC AGUGAGGA CUUCUUC	2867
AD-1720283.1	csasaaaccUf CfGfagaccucu uuL96	1972	asdAsadGg (Tgn)cucdGaGf gGfuuuugscsu	2420	AGCAAAAC CCUCGAGA CCUCUUU	2868
AD-1720284.1	csusgaauguCf AfAfgaccacu	1973	asdAsadTg(Tgn )ggcuudTgAfc	2421	GCCUGAAU GUCAAAGC	2869

[1155]

	uuL96		Afuucagsgsc		CACAUUC	
AD-1720285.1	gsgscucuAfcU fCfUfaugaguu guuL96	1974	asdAscAdAc (Tgn)cauadGa GfuAfgagccscs g	2422	CGGGCUCU ACUCUAUG AGUUGUG	2870
AD-1720286.1	asasuggaguGf CfUfaaccugg uuL96	1975	asdAscc(Agn)g dGguuadGcAfc Ufccauuscsa	2423	UGAAUGGA GUGCUAAC CCUGGUG	2871
AD-1720287.1	asasuggaguGf CfUfaaccuugg uuL96	1976	asdAsccdAadG guuadGcAfcuc cauuscsa	2424	UGAAUGGA GUGCUAAC CCUGGUG	2872
AD-1720288.1	asasuggaguGf CfUfaacucugg uuL96	1977	asdAsccdAgdA guuadGcAfcuc cauuscsa	2425	UGAAUGGA GUGCUAAC CCUGGUG	2873
AD-1720289.1	ascscuaCfuG fCfUfgaaugga guuL96	1978	asdAscudCc (Agn)uucadGc AfgUfagguscs u	2426	AGACCCUA CUGCUGAA UGGAGUG	2874
AD-1720290.1	ascscugcagAf CfAfguacaggc uuL96	1979	asdAsgdCc(Tg n)guacudGuCfu Gfcagguscsc	2427	GGACCUGC AGACAGUA CAGGCUA	2875
AD-1720291.1	csusgggaauUf UfCfcuccacce uuL96	1980	asdAsgdGg(Tg n)ggaggdAaAf uUfccagscsa	2428	UGCUGGGA AUUUCUC CACCCUU	2876
AD-1720292.1	gsgsgccgccUf CfCfauuccuac uuL96	1981	asdAsguadGg (Agn)augdGaG fgCfggcccsusu	2429	AAGGGCCG CCUCCAUC CUACUA	2877
AD-1720293.1	ususcuacggGf CfUfcuacucua uuL96	1982	asdAsudAg (Agn)guagadGc CfcGfuagaasus g	2430	CAUUCUAC GGGCUCUA CUCUAUG	2878
AD-1720294.1	gscsagacagUf AfCfagguaga uuL96	1983	asdAsudCu(Ag n)gccugdTaCfu Gfucugcsasg	2431	CUGCAGAC AGUACAGG CUAGUA	2879
AD-1720295.1	usgsgagaccCf UfAfcugcugaa uuL96	1984	asdAsudTc(Ag n)gcagudAgGf gUfcuccasasu	2432	AUUGGAGA CCCUACUGC UGAAUG	2880
AD-1720296.1	ascscucuuuGf GfCfagccugaa uuL96	1985	asdAsudTc(Ag n)ggcugdCcAfa Afgagguscsu	2433	AGACCUCU UUGGCAGC CUGAAUG	2881
AD-1720297.1	csesuucugGf CfCfuuccacuu guL96	1986	asdCsadAg(Tg n)gggagdGcCfa Gfaaaggsusg	2434	CACCUUUC UGGCCUCCC ACUUGC	2882
AD-1720298.1	usgsaacUfgC	1987	asdCsacdTg	2435	GAUGGAAC	2883

[1156]

	fAfGfuggacag uguL96		(Tgn)ccacdTgC faGfuuccasusc		UGCAGUGG ACAGUGA	
AD-1720299.1	asgsgaugacAf CfGfugccugau guL96	1988	asdCsadTc(Agn) jggcadGuGfu Cfauccuscsc	2436	GGAGGAUG ACACGUGC CUGAUGG	2884
AD-1720300.1	gsasauggagUf GfCfuaaccug guL96	1989	asdCscagdGg (Tgn)uagdCaCf uCfauucsasg	2437	CUGAAUGG AGUGCUIAA CCCUGGU	2885
AD-1720301.1	gsusgcugucAf UfAfuggccugg guL96	1990	asdCsc(Agn)g dGccaudAuGfa Cfagcacsusc	2438	GAGUGCUG UCAUAUGG CCUGGGA	2886
AD-1720302.1	gsusgcugucAf UfAfuggcuug guL96	1991	asdCscdAadG ccaudAuGfacag cacsusc	2439	GAGUGCUG UCAUAUGG CCUGGGA	2887
AD-1720303.1	gsusgcugucAf UfAfuggucug guL96	1992	asdCscdAgdA ccaudAuGfacag cacsusc	2440	GAGUGCUG UCAUAUGG CCUGGGA	2888
AD-1720304.1	gscscaaagAf AfAfguacucag guL96	1993	asdCscdTg(Ag n)guacudTuCfu Ufugggcsca	2441	UGGCCCAA AGAAAGUA CUCAGGG	2889
AD-1720305.1	gsusacucagGf GfAfguccuuc guL96	1994	asdCsgaadGg (Agn)gcdCcCf uGfaguacsusu	2442	AAGUACUC AGGGAGCU CCUUCGU	2890
AD-1720306.1	gsgsaauuucCf UfCfcaccuuc guL96	1995	asdCsga(Agn)g dGguggdAgGfa Afauccscsa	2443	UGGGAAUU UCCUCCACC CUUCGU	2891
AD-1720307.1	gsgsaauuucCf UfCfcaccuuc guL96	1996	asdCsgadAadG guggdAgGfaaa uuccscsa	2444	UGGGAAUU UCCUCCACC CUUCGU	2892
AD-1720308.1	gsgsaauuucCf UfCfcacucuuc guL96	1997	asdCsgadAgdA guggdAgGfaaa uuccscsa	2445	UGGGAAUU UCCUCCACC CUUCGU	2893
AD-1720309.1	gsusguacaaGf CfAfaaaccuc guL96	1998	asdCsgagdGg (Tgn)uuudGcU fuGfuacacsgsu	2446	ACGUGUAC AAGCAAAA CCCUCGA	2894
AD-1720310.1	csasgucuggUf CfAfgagcugga guL96	1999	asdCsudCc(Ag n)gcucudGaCfc Afgacugscsa	2447	UGCAGUCU GGUCAGAG CUGGAGC	2895
AD-1720311.1	usgscuaaccCf UfGfgugcuaga guL96	2000	asdCsudCu(Ag n)gcaccdAgGfg Ufuagcscsu	2448	AGUGCUIAA CCCUGGUG CUAGAGG	2896
AD-1720312.1	uscsaaauuucCf AfGfgaccugca guL96	2001	asdCsudGc(Ag n)jgguccdTgAfa Afuugasusg	2449	CAUCAAAU UUCAGGAC CUGCAGA	2897

[1157]

AD-1720313.1	asgsaaccacCf CfAfgcccagaa guL96	2002	asdCsudTc(Tgn) jgggcudGgGfu Gfguucscsu	2450	AGAGAACC ACCCAGCCC AGAAGU	2898
AD-1720314.1	csasaacuaaCf AfAfaaacuuu cuL96	2003	asdGsadAa(Tg n)guuuudTgUf uAfguuugsasg	2451	CUCAAAACU AACAAAAA CAUUUCC	2899
AD-1720315.1	csasuggaguAf CfCfucucagcu cuL96	2004	asdGsadGc(Tg n)gagagdGuAfc Ufccaugsgsu	2452	ACCAUGGA GUACCUCU CAGCUCU	2900
AD-1720316.1	uscsguuggaCf CfUfccacacug cuL96	2005	asdGscdAg(Tg n)guggadGgUf cCfaacgasasg	2453	CUUCGUUG GACCUCCAC ACUGCU	2901
AD-1720317.1	ascscauggaGf UfAfccucucag cuL96	2006	asdGscdTg(Ag n)gaggudAcUfc Cfauggusgsg	2454	CCACCAUG GAGUACCU CUCAGCU	2902
AD-1720368.1	gsgscagccuGf AfAfugucuaag cuL96	2007	asdGscdTg(Tgn) gacaudTcAfgG fcugccsasa	2455	UUGGCAGC CUGAAUGU CAAAGCC	2903
AD-1720369.1	uscscuagccAf CfCfuucuggc cuL96	2008	asdGsgdCc(Ag n)gaaagdGuGfg Cfuaggasasa	2456	UUUCCUAG CCACCUUUC UGGCCU	2904
AD-1720370.1	usgscugaauGf GfAfgugcuaac cuL96	2009	asdGsgdTg(Ag n)gcacudCcAfu Ufcagcasgsu	2457	ACUGCUGA AUGGAGUG CUAACCC	2905
AD-1720371.1	uscscaggaccUf GfCfagacagua cuL96	2010	asdGsudAc(Tg n)gucugdCaGfg Ufccugasasa	2458	UUUCAGGA CCUGCAGA CAGUACA	2906
AD-1720372.1	ascscagcaucAf AfAfuucagga cuL96	2011	asdGsudCc(Tg n)gaaudTuGfa Ufgcuguscsa	2459	UGACAGCA UCAAAUUU CAGGACC	2907
AD-1720373.1	ususgcugggAf AfUfuuccucca cuL96	2012	asdGsudGg (Agn)ggaadTu CfcCfagcaascsa	2460	UGUUGCUG GGAAUUUC CUCCACC	2908
AD-1720374.1	asasugccucCf UfGfuccuaaa cuL96	2013	asdGsudTu(Ag n)jggacdAgGfa Gfgcauusgsg	2461	CAAUGCC UCCUGUCCC UAAACU	2909
AD-1720375.1	ususgacgugUf AfCfaagcaaaa cuL96	2014	asdGsudTu(Tgn) jgcuugdTaCfaC fgucaasasg	2462	CUUUGACG UGUACAAG CAAACC	2910
AD-1720376.1	gsgscgccuCf CfAfuuccuacu auL96	2015	asdTsadGu(Ag n)jggaudGgAf gGfggcccscsu	2463	AGGGCCGC CUCCAUUC UACUAA	2911
AD-1720377.1	ascsucagguCf AfGfuaucaau	2016	asdTsadTu(Agn) jgauacdTgAfcC	2464	UUACUCAG GUCAGUAU	2912

	auL96		fugagusasa		CUAAUUAU	
AD-1720378.1	usgsggccauAf UfGfuugcugg gauL96	2017	asdTscdCc(Agn )gcaacdAuAfu Gfgccasgsg	2465	CCUGGGCC AUAUGUUG CUGGGAA	2913
AD-1720379.1	usgscugucaUf AfUfggccuggg auL96	2018	asdTscdCc(Agn )ggccadTaUfgA fcagcascsu	2466	AGUGCUGU CAUAUGGC CUGGGAC	2914
AD-1720380.1	usgsaguuguGf AfCfuucaagg auL96	2019	asdTscdCu(Tgn )gaaagdTcAfcA facucasusa	2467	UAUGAGUU GUGACUUU CAAGGAC	2915
AD-1720381.1	asgsgcccaaGf CfAfcagcaagg auL96	2020	asdTscdCu(Tgn )gcugudGcUfu Gfggccscsu	2468	AGAGGCC AAGCACAG CAAGGAC	2916
[1158] AD-1720382.1	usgsuacaagCf AfAfaaccucg auL96	2021	asdTscg(Agn)g dGguudTgCfu Ufguacascsg	2469	CGUGUACA AGCAAAC CCUCGAG	2917
AD-1720383.1	usgsuacaagCf AfAfaaccuucg auL96	2022	asdTscgdAadG guudTgCfuug uacascsg	2470	CGUGUACA AGCAAAC CCUCGAG	2918
AD-1720384.1	usgsuacaagCf AfAfaacucug auL96	2023	asdTscgdAgdA guudTgCfuug uacascsg	2471	CGUGUACA AGCAAAC CCUCGAG	2919
AD-1720385.1	uscsuagagUf UfGfugacuuc auL96	2024	asdTsgdAa(Ag n)gucacdAaCfu Cfauagasgsu	2472	ACUCUAUG AGUUGUGA CUUCAA	2920
AD-1720386.1	asasagacuaUf GfAfcagcauca auL96	2025	asdTsudGa(Tgn )gcugudCaUfa Gfucuuusgsc	2473	GCAAAGAC UAUGACAG CAUCAA	2921

[1159] 实例2:CIDEB siRNA的体外筛选

[1160] 实验方法

[1161] 细胞培养和转染:

[1162] Hepa1c1c7细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>的气氛中,在补充有10%FBS(ATCC)的最低必需培养基(吉博科公司(Gibco))中生长至接近汇合,然后通过胰蛋白酶消化从板中释放。转染通过将14.8μl的Opti-MEM加0.2μl的Lipofectamine RNAiMax每孔(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen,Carlsbad CA.),目录号13778-150)添加到5μl的每种siRNA双链体到96孔板中的单个孔中进行。然后将混合物在室温下温育15分钟。然后将八十μl不含抗生素的含有约2 x 10<sup>4</sup>个细胞的完全生长培养基添加到siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞温育24小时。在10nM、1nM和/或0.1nM的最终双链体浓度下进行单剂量实验。

[1163] Panc-1细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>的气氛中,在补充有10%FBS(ATCC)的最低必需培养基(吉博科公司(Gibco))中生长至接近汇合,然后通过胰蛋白酶消化从板中释放。转染通过将14.6μl的Opti-MEM加0.4μl的Lipofectamine 2000每孔添加到5μl的每种siRNA双链体到96孔板中的单个孔中进行。然后将混合物在室温下温育15分钟。然后将八十μl不含抗生素的含有约1.5 x 10<sup>4</sup>个细胞的完全生长培养基添加到siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞温育24小时。在10nM和0.1nM的最终双链体浓度下进行剂量实验。

[1164] Hep3B细胞在37°C下在5%CO<sub>2</sub>的气氛中,在补充有10%FBS(ATCC)的最低必需培养基(吉博科公司(Gibco))中生长至接近汇合,然后通过胰蛋白酶消化从板中释放。转染通过将14.6μl的Opti-MEM加0.4μl的Lipofectamine RNAiMax每孔添加到5μl的每种siRNA双链体到96孔板中的单个孔中来进行。然后将混合物在室温下温育15分钟。然后将八十μl不含抗生素的含有约 $1.5 \times 10^4$ 个细胞的完全生长培养基添加到siRNA混合物中。在RNA纯化之前将细胞温育24小时。在10nM、1nM和0.1nM的最终双链体浓度下进行剂量实验。

[1165] 使用DYNABEADS mRNA分离药剂盒的总RNA分离:

[1166] 使用DYNABEADS(英杰公司,目录号61012)在BioTek-EL406平台上使用自动化方案分离RNA。简而言之,将70μl的裂解/结合缓冲液和10μl的含有3μl磁珠的裂解缓冲液添加到具有细胞的板中。在室温下将板在电磁振荡器上温育10分钟,并且然后捕获磁珠并去除上清液。然后用150μl洗涤缓冲液A洗涤珠结合的RNA 2次,并且用洗涤缓冲液B洗涤一次。然后用150μl洗脱缓冲液洗涤珠,重新捕获并去除上清液。

[1167] 使用ABI大容量cDNA逆转录药剂盒(加利福尼亚州福斯特市的应用生物系统公司(Applied Biosystems,Foster City,CA),目录号4368813)的合成:

[1168] 向上述分离的RNA中添加十μl的主混合物,所述主混合物每次反应含有1μl的10X缓冲液、0.4μl的25X dNTP、1μl的10x随机引物、0.5μl的逆转录酶、0.5μl的RNase抑制剂和6.6μl的H<sub>2</sub>O。将板密封、混合,并且在电磁振荡器上在室温下温育10分钟,然后在37°C下2小时。

[1169] 实时PCR:

[1170] 将两μl的cDNA和5μl的Lightcycler 480探针主混合物(罗氏公司,目录号04887301001)添加到384孔板中的每孔0.5μl的人GAPDH TaqMan探针和0.5μl的人CIDEB探针中(罗氏公司,目录号04887301001)。实时PCR是在LightCycler480实时PCR系统(罗氏公司)中进行的。测试每个双链体至少两次,并且将数据相对于用非靶向对照siRNA转染的细胞归一化。为了计算相对变化倍数,将实时数据使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法进行分析,并且相对于使用利用非靶向对照siRNA转染的细胞进行的测定归一化。

[1171] 表6中列出的dsRNA药剂在Hep3B细胞中的筛选结果在表7中示出。在Hep3B细胞中对表4中列出的dsRNA药剂进行另外的单剂量(10nM)筛选。将CIDEB信号相对于GAPDH进行归一化。在表8中示出了结果。

[1172] 表7.Hep3B细胞中的CIDEB单剂量筛选

[1173]

双链体 ID	10 nM 剂量		1 nM 剂量		0.1 nM 剂量	
	剩余的 CIDEB mRNA 平均%	SD	剩余的 CIDEB mRNA 平均%	SD	剩余的 CIDEB mRNA 平均%	SD
AD-1700791.1	88.90	10.50	99.00	15.60	151.20	9.60
AD-1699864.1	92.80	20.20	107.70	22.30	140.30	17.20
AD-1699867.1	27.40	8.30	41.80	6.50	72.30	3.30
AD-1720281.1	77.20	10.40	91.20	14.40	92.70	19.30
AD-1699868.1	41.80	9.30	40.30	12.80	73.30	4.20
AD-1699869.1	63.10	8.70	93.40	1.80	94.50	9.70
AD-1699870.1	54.70	10.50	77.00	15.50	95.70	6.10
AD-1699871.1	32.60	6.70	55.70	7.40	62.00	7.70
AD-1699872.1	49.30	7.50	79.70	18.10	87.40	24.30
AD-1700793.1	44.90	7.40	60.30	6.80	67.40	8.50
AD-1699873.1	42.30	8.10	60.70	5.70	74.90	14.20
AD-1700794.1	78.00	14.40	87.00	8.10	82.70	10.40
AD-1699875.1	47.50	13.10	94.00	11.70	104.60	12.80
AD-1700795.1	73.30	11.30	29.70	9.70	73.80	10.10
AD-1700796.1	58.60	15.10	61.10	10.30	67.40	3.60
AD-1700797.1	62.20	7.50	65.00	15.00	61.30	11.70
AD-1700798.1	29.90	2.50	38.50	13.10	72.50	10.40
AD-1699882.1	42.40	7.40	47.40	11.50	68.00	13.80
AD-1700799.1	40.40	3.40	66.10	11.30	95.40	11.80
AD-1700800.1	46.90	8.60	40.00	9.40	75.00	7.50
AD-1699891.1	55.50	7.50	88.80	7.80	115.80	19.50
AD-1700801.1	54.10	3.90	81.00	15.40	96.80	11.20
AD-1699892.1	66.20	2.70	103.90	15.40	110.00	8.60
AD-1700802.1	19.30	4.60	57.70	8.30	110.90	16.20

[1174]

AD-1699904.1	36.80	9.60	64.00	11.40	98.10	13.00
AD-1720313.1	80.30	14.70	94.40	20.60	91.30	8.30
AD-1700804.1	43.00	6.20	70.40	21.00	102.60	13.70
AD-1700805.1	36.30	6.40	49.90	4.20	83.20	14.30
AD-1700806.1	7.00	2.20	39.90	7.30	79.20	15.20
AD-1699907.1	18.00	4.20	48.80	12.30	94.00	11.30
AD-1700807.1	10.80	1.90	51.50	5.70	98.40	3.80
AD-1700808.1	31.30	3.20	70.10	15.30	94.90	16.40
AD-1700809.1	34.00	3.90	92.20	13.00	113.70	4.20
AD-1700810.1	15.60	1.10	25.70	3.00	99.20	7.70
AD-1700811.1	17.30	2.80	37.20	7.40	78.00	10.10
AD-1700812.1	35.90	5.40	38.10	10.60	33.40	0.30
AD-1700813.1	2.20	0.70	7.90	1.40	59.20	12.30
AD-1700814.1	11.70	2.00	32.60	6.90	110.80	15.90
AD-1700815.1	21.00	4.60	27.10	5.80	58.50	12.30
AD-1700816.1	5.10	1.10	20.70	2.60	87.20	13.70
AD-1700817.1	7.70	0.60	38.60	6.40	106.50	8.40
AD-1699948.1	7.30	0.50	13.90	2.90	99.50	12.00
AD-1699949.1	5.30	0.60	24.20	3.10	89.60	8.60
AD-1720317.1	3.70	1.10	12.20	2.30	98.60	7.60
AD-1700819.1	3.40	0.80	27.70	6.70	62.90	9.10
AD-1699951.1	7.80	1.40	12.50	3.90	37.60	2.60
AD-1720315.1	3.60	1.60	7.70	2.60	40.10	6.20
AD-1700821.1	4.70	1.10	10.80	1.00	71.90	10.20
AD-1699964.1	3.50	0.70	6.50	2.30	45.90	11.40
AD-1700822.1	59.70	12.40	58.70	12.40	78.20	14.00
AD-1699967.1	3.60	1.20	14.80	2.10	100.00	12.10
AD-1720377.1	4.00	1.50	38.70	2.60	82.10	12.20
AD-1699970.1	3.90	1.00	7.70	0.80	54.70	10.30
AD-1699971.1	3.50	1.80	7.60	2.00	51.80	1.60
AD-1699972.1	8.00	1.20	44.80	5.80	106.00	7.20
AD-1699973.1	6.00	1.70	16.20	4.20	102.10	14.00
AD-1700824.1	56.40	12.10	40.80	13.00	75.10	14.70
AD-1700825.1	5.00	1.90	17.40	3.70	41.50	23.90
AD-1700826.1	11.70	3.60	22.20	4.60	30.80	8.80

[1175]

AD-1699976.1	6.20	1.20	7.70	1.10	23.60	4.70
AD-1699977.1	10.80	1.80	37.10	3.60	86.20	20.00
AD-1699978.1	9.60	1.60	31.00	6.60	105.90	13.10
AD-1699979.1	14.40	3.30	37.10	3.20	116.60	19.40
AD-1700828.1	16.10	2.70	27.50	2.90	129.30	10.40
AD-1700829.1	8.90	2.80	15.80	3.40	68.10	4.80
AD-1699982.1	5.50	0.70	15.20	4.50	84.10	10.60
AD-1699983.1	25.10	7.80	85.60	8.80	99.40	15.50
AD-1699984.1	29.70	1.60	37.00	15.20	95.70	14.50
AD-1699985.1	4.60	0.40	14.20	2.80	68.10	11.90
AD-1699986.1	34.00	4.20	48.70	11.30	111.80	15.60
AD-1700830.1	51.30	8.70	62.90	7.00	NA	NA
AD-1699987.1	30.60	6.50	52.60	8.90	44.50	16.50
AD-1699988.1	14.30	1.80	53.90	5.90	95.90	2.20
AD-1700831.1	57.20	8.20	96.80	5.40	124.70	15.30
AD-1699989.1	5.30	0.70	47.50	6.00	101.10	15.20
AD-1699990.1	39.80	11.40	41.50	10.10	88.30	9.30
AD-1700832.1	64.90	16.10	47.00	19.10	83.30	2.90
AD-1700833.1	19.90	3.70	27.60	1.10	81.00	8.50
AD-1700834.1	27.80	3.90	52.90	8.40	51.00	12.80
AD-1700015.1	7.50	2.40	19.60	1.70	93.20	28.00
AD-1700035.1	17.30	2.20	35.20	7.10	63.30	27.50
AD-1700037.1	79.80	21.40	79.30	10.30	121.70	24.40
AD-1700038.1	14.60	1.90	34.80	5.50	71.00	2.50
AD-1700039.1	13.40	2.80	21.20	1.00	66.60	12.70
AD-1700837.1	27.10	8.60	44.20	6.10	96.10	12.00
AD-1700040.1	18.30	3.90	45.90	8.20	80.60	17.60
AD-1700041.1	85.20	12.40	57.70	9.70	93.80	4.80
AD-1700838.1	20.60	6.60	53.80	6.90	114.40	34.60
AD-1700839.1	35.10	2.40	61.20	5.90	97.90	10.40
AD-1700840.1	29.50	1.40	57.10	12.40	88.60	8.60
AD-1700077.1	14.00	1.70	29.60	8.30	87.70	16.40
AD-1700841.1	7.10	1.00	21.90	5.20	105.40	13.10
AD-1700842.1	9.30	1.50	42.90	10.00	117.30	6.70
AD-1700080.1	17.10	1.30	72.40	6.50	62.60	17.90

[1176]

AD-1700081.1	16.20	6.70	63.30	8.60	104.20	18.00
AD-1700082.1	6.50	2.20	16.60	3.60	67.10	6.00
AD-1700083.1	9.70	1.60	30.30	6.10	91.20	13.40
AD-1700843.1	38.00	11.60	61.70	6.20	54.70	16.90
AD-1700844.1	3.10	1.60	14.20	3.40	75.40	3.70
AD-1700091.1	13.40	0.60	31.60	4.60	68.90	5.00
AD-1700845.1	16.10	5.30	54.50	11.00	49.70	11.80
AD-1700092.1	5.80	0.60	24.80	1.10	93.80	18.00
AD-1700846.1	3.90	0.30	36.70	14.00	118.60	34.70
AD-1700094.1	5.00	1.00	22.30	2.60	88.70	29.10
AD-1700848.1	3.60	1.10	22.10	3.20	99.30	8.80
AD-1700097.1	10.10	2.30	34.30	10.90	85.90	12.50
AD-1720295.1	65.40	5.40	86.20	6.30	102.10	15.80
AD-1700850.1	21.90	7.20	75.90	7.50	86.30	14.20
AD-1700851.1	35.20	6.20	81.10	18.50	78.60	29.30
AD-1700099.1	17.40	3.90	29.40	12.60	42.00	18.00
AD-1700100.1	14.00	2.40	60.00	1.50	110.20	4.40
AD-1700101.1	28.70	8.00	98.10	12.00	123.70	13.20
AD-1700852.1	19.70	2.30	71.30	7.30	106.20	14.50
AD-1720289.1	14.40	3.90	46.30	3.50	41.40	2.30
AD-1700853.1	14.40	1.70	90.70	7.00	116.20	15.10
AD-1700854.1	27.20	6.90	62.20	8.80	81.90	10.10
AD-1700104.1	31.50	28.20	49.30	11.40	98.00	9.90
AD-1700855.1	3.30	1.10	11.70	2.20	84.40	19.20
AD-1700856.1	7.80	1.10	29.30	5.00	69.60	6.90
AD-1700109.1	13.60	3.70	37.10	7.90	82.80	15.90
AD-1720370.1	4.00	0.60	13.70	4.40	80.70	15.10
AD-1700858.1	14.70	1.30	74.20	6.60	106.00	3.90
AD-1700859.1	7.70	3.00	32.10	12.30	99.40	24.30
AD-1700860.1	12.70	1.60	64.00	2.20	100.90	1.40
AD-1700112.1	8.70	1.30	20.30	2.90	107.30	11.10
AD-1700113.1	16.60	4.20	63.60	4.10	77.70	10.50
AD-1720300.1	27.30	7.70	81.20	12.70	82.30	21.90
AD-1700114.1	15.10	3.30	37.90	6.00	101.70	8.00
AD-1720286.1	9.10	2.80	25.40	5.00	103.60	10.80

[1177]

AD-1720287.1	31.10	3.70	74.40	20.90	116.20	21.00
AD-1720288.1	6.30	1.10	34.40	1.60	119.50	5.00
AD-1700115.1	24.50	2.30	70.80	9.20	90.30	29.30
AD-1700863.1	23.20	9.00	56.20	7.00	106.00	10.00
AD-1700116.1	15.70	2.40	47.40	6.60	71.10	11.70
AD-1700864.1	33.10	1.50	79.20	28.00	69.70	15.30
AD-1700865.1	12.00	1.90	41.00	7.60	89.90	6.80
AD-1700121.1	35.50	6.10	92.50	16.90	113.60	16.00
AD-1720311.1	38.70	2.40	61.80	3.00	104.60	11.90
AD-1700122.1	46.30	6.30	40.00	11.20	83.10	9.50
AD-1700867.1	23.70	4.00	38.40	11.00	80.80	12.10
AD-1700125.1	10.90	1.60	42.70	10.50	92.70	7.30
AD-1700868.1	43.00	3.60	85.80	13.80	80.60	17.10
AD-1700869.1	14.20	3.20	47.50	11.00	67.80	6.70
AD-1700870.1	4.00	1.10	28.00	7.20	75.90	14.00
AD-1700871.1	2.00	0.20	13.80	3.70	77.60	6.90
AD-1700872.1	5.30	1.30	29.50	7.60	68.50	14.00
AD-1700873.1	24.00	5.40	49.20	4.60	80.50	12.60
AD-1700874.1	67.90	11.70	95.50	18.20	115.20	7.10
AD-1700875.1	11.20	3.10	45.80	29.40	100.30	5.40
AD-1700876.1	35.20	11.40	83.30	8.90	108.00	17.90
AD-1720298.1	13.70	2.30	47.80	4.50	129.30	28.70
AD-1700877.1	17.70	2.60	78.30	6.40	95.40	12.00
AD-1700148.1	5.40	1.10	22.50	5.00	85.10	8.40
AD-1700149.1	23.20	9.10	51.70	9.30	45.80	15.30
AD-1700878.1	8.90	1.60	57.70	9.30	86.10	11.20
AD-1700879.1	72.70	12.80	74.60	26.30	90.30	15.10
AD-1700880.1	7.70	1.90	27.60	7.70	67.50	6.50
AD-1700881.1	2.60	1.10	9.70	2.30	97.60	13.30
AD-1700882.1	6.50	1.20	23.50	7.20	88.60	19.70
AD-1700883.1	4.30	0.40	20.30	4.80	97.00	15.50
AD-1700156.1	5.20	1.00	18.50	4.10	66.10	8.80
AD-1720282.1	7.20	1.30	12.80	1.00	96.00	5.10
AD-1700885.1	14.20	2.20	45.70	5.20	95.30	8.10
AD-1700158.1	6.20	0.90	29.90	3.50	99.10	7.20

[1178]

AD-1700159.1	5.20	1.50	18.30	2.70	84.30	11.90
AD-1700160.1	5.40	1.50	19.20	4.20	119.70	13.70
AD-1700887.1	29.30	6.00	51.90	5.70	78.50	11.50
AD-1700888.1	6.70	1.10	37.80	6.30	94.20	11.10
AD-1700889.1	26.40	4.20	77.90	26.00	83.60	11.10
AD-1700166.1	35.00	5.80	109.20	19.10	114.50	16.10
AD-1700167.1	41.80	12.40	78.70	11.50	75.20	9.70
AD-1700891.1	34.90	2.00	97.10	6.20	90.10	15.60
AD-1700892.1	74.40	8.70	84.00	22.10	84.70	9.20
AD-1700893.1	6.40	2.50	29.60	4.80	82.20	3.80
AD-1700894.1	30.60	1.60	84.70	25.00	99.90	6.10
AD-1700180.1	6.00	0.90	27.30	1.70	59.90	8.50
AD-1700895.1	4.10	0.90	26.20	5.80	98.40	21.30
AD-1700187.1	7.70	1.30	30.70	6.80	90.60	11.90
AD-1720299.1	13.70	2.10	54.40	3.90	85.40	12.50
AD-1700188.1	17.30	4.60	47.70	14.40	66.40	16.60
AD-1700897.1	55.90	10.80	99.50	8.20	74.20	4.10
AD-1700898.1	93.60	13.90	110.20	24.00	109.30	12.20
AD-1700189.1	52.60	7.80	77.40	13.30	93.30	7.40
AD-1700190.1	8.50	2.20	51.00	3.20	72.50	10.90
AD-1700191.1	4.70	0.40	16.30	2.80	102.90	5.30
AD-1700899.1	29.20	1.80	36.80	4.80	97.30	7.20
AD-1700193.1	16.60	2.20	57.60	10.60	106.70	5.90
AD-1700900.1	46.40	4.40	73.10	9.30	86.10	9.80
AD-1700213.1	8.50	1.10	71.30	4.20	102.50	17.40
AD-1720310.1	8.60	1.60	39.20	7.10	130.30	5.30
AD-1700902.1	8.10	4.30	45.70	4.30	111.90	15.50
AD-1700903.1	16.90	3.30	68.70	15.00	96.10	6.40
AD-1700904.1	15.60	2.30	36.60	6.90	79.30	9.10
AD-1700905.1	7.70	1.70	19.50	2.30	50.80	17.60
AD-1700242.1	8.80	1.00	30.90	4.40	109.10	9.10
AD-1700243.1	24.70	5.30	66.40	7.90	65.50	19.60
AD-1700244.1	11.50	0.90	46.60	6.80	84.90	4.00
AD-1700906.1	86.90	6.40	97.90	10.00	98.40	5.00
AD-1700245.1	49.20	3.70	89.60	8.20	116.20	5.10

[1179]

AD-1700907.1	34.70	12.20	87.10	23.80	96.70	15.50
AD-1700908.1	63.10	11.60	91.30	13.60	99.30	20.20
AD-1700909.1	59.00	9.20	96.30	8.70	69.00	11.00
AD-1700248.1	26.70	7.90	59.50	10.10	89.30	13.50
AD-1700249.1	45.10	4.50	90.70	4.50	NA	NA
AD-1720301.1	52.70	8.10	85.10	11.10	72.90	16.20
AD-1720302.1	58.90	15.30	68.90	9.00	71.30	21.50
AD-1720303.1	40.30	7.70	79.90	12.30	79.40	21.50
AD-1700250.1	26.10	4.80	75.80	10.10	102.40	16.20
AD-1720379.1	47.20	10.00	97.90	19.90	117.60	12.20
AD-1700912.1	84.60	10.20	86.70	10.50	86.40	20.90
AD-1700913.1	82.20	14.30	105.20	16.40	120.70	10.30
AD-1700252.1	17.90	1.50	60.80	8.90	116.20	14.10
AD-1720381.1	45.80	7.20	70.20	6.30	108.00	15.70
AD-1700272.1	34.00	4.60	86.00	9.90	115.40	20.90
AD-1700915.1	5.00	0.70	14.10	3.80	68.60	8.30
AD-1700279.1	16.50	2.50	60.80	5.10	90.10	13.30
AD-1700280.1	8.00	3.70	25.60	5.90	89.00	10.80
AD-1700916.1	7.10	2.70	23.20	5.90	69.30	14.50
AD-1700917.1	17.60	3.70	25.30	7.90	65.70	8.40
AD-1700918.1	27.80	8.10	51.10	11.90	102.80	5.10
AD-1700303.1	4.70	1.70	13.60	4.60	79.00	15.00
AD-1700919.1	8.50	1.30	47.50	6.90	104.70	9.70
AD-1700920.1	14.10	2.30	24.40	4.60	66.30	18.10
AD-1700309.1	4.30	0.70	17.50	5.70	43.00	6.40
AD-1720375.1	5.90	1.60	14.80	7.20	29.50	5.80
AD-1700922.1	8.60	0.60	29.70	6.10	80.70	12.00
AD-1700923.1	6.10	1.30	23.60	6.30	46.90	25.40
AD-1700312.1	2.70	0.50	6.90	2.50	54.70	5.50
AD-1700924.1	32.60	13.00	57.40	10.30	101.80	15.30
AD-1700925.1	3.10	0.80	9.90	1.50	62.30	8.20
AD-1700314.1	3.40	1.00	3.80	1.40	37.20	11.50
AD-1720309.1	5.10	0.50	12.70	1.40	37.50	21.80
AD-1700315.1	5.30	1.40	11.80	1.00	62.10	11.00
AD-1720382.1	6.30	1.40	14.50	1.80	74.60	7.90

[1180]

AD-1720383.1	8.70	5.10	28.60	3.20	92.20	3.20
AD-1720384.1	9.10	4.00	11.30	2.30	45.70	4.60
AD-1700316.1	8.80	1.20	38.50	6.20	118.30	5.00
AD-1700317.1	6.10	1.00	17.60	1.70	87.40	5.60
AD-1700318.1	2.20	0.50	10.80	6.10	55.00	12.00
AD-1700929.1	10.10	2.10	41.20	4.60	80.00	7.60
AD-1700930.1	5.00	1.80	9.50	3.20	91.80	8.60
AD-1700931.1	26.40	3.10	44.80	4.30	76.50	5.80
AD-1700323.1	3.60	0.40	9.10	2.20	85.70	8.30
AD-1720283.1	4.40	1.00	10.40	2.90	66.70	3.50
AD-1700324.1	5.50	2.50	10.10	3.00	71.20	9.60
AD-1720280.1	19.30	3.30	14.40	6.30	81.60	7.10
AD-1700325.1	18.40	2.00	66.70	13.20	113.10	9.10
AD-1700327.1	4.00	0.90	40.20	9.10	98.90	18.00
AD-1700328.1	15.60	1.90	64.90	11.20	92.40	14.80
AD-1700329.1	3.00	1.60	29.10	1.50	114.60	3.90
AD-1700934.1	51.80	3.60	101.90	18.00	104.70	7.20
AD-1700336.1	12.10	2.80	41.70	7.80	92.70	10.50
AD-1720296.1	62.10	11.20	96.90	14.60	84.90	19.00
AD-1700936.1	51.10	7.00	112.80	5.70	94.20	11.60
AD-1700937.1	72.00	17.20	108.40	6.20	134.20	13.90
AD-1700339.1	11.40	3.40	32.70	7.90	49.00	16.70
AD-1700938.1	6.90	1.60	39.40	4.40	82.60	7.60
AD-1700939.1	85.80	10.00	81.50	20.20	103.20	26.50
AD-1700940.1	65.80	14.30	99.20	19.70	90.40	15.30
AD-1700344.1	9.30	1.20	40.60	4.10	99.40	3.90
AD-1720368.1	9.20	2.10	36.20	2.60	101.10	15.10
AD-1700942.1	35.00	8.20	89.10	21.90	100.00	26.10
AD-1700943.1	5.30	1.40	23.30	7.20	53.90	1.30
AD-1700944.1	5.70	1.20	34.60	2.70	70.60	6.30
AD-1720284.1	4.90	1.20	20.30	1.50	104.40	12.90
AD-1700350.1	31.40	4.90	70.00	4.80	117.60	13.90
AD-1700352.1	3.30	0.80	8.90	1.20	116.20	12.30
AD-1700353.1	12.70	5.10	19.60	3.30	57.00	7.80
AD-1700947.1	5.60	0.30	17.50	5.40	86.00	14.10

[1181]

AD-1700354.1	2.30	0.30	4.00	1.50	69.50	6.70
AD-1700355.1	5.00	1.10	8.80	1.00	69.30	12.30
AD-1700356.1	16.80	2.40	53.10	8.20	NA	NA
AD-1700357.1	22.00	2.00	72.30	7.70	79.60	14.10
AD-1700358.1	2.90	0.30	19.90	2.60	75.20	3.00
AD-1700359.1	16.70	2.60	50.60	19.70	112.30	19.00
AD-1700948.1	9.70	3.00	31.70	9.50	79.90	13.70
AD-1700949.1	16.30	1.30	40.90	1.30	60.30	6.70
AD-1700950.1	16.90	7.00	35.70	10.10	82.60	18.60
AD-1700365.1	3.30	0.40	17.10	3.40	72.60	11.90
AD-1700952.1	53.20	9.20	87.00	25.10	83.30	16.80
AD-1700366.1	4.20	0.40	41.80	12.00	91.30	18.00
AD-1700953.1	24.50	6.40	64.70	12.30	71.10	8.60
AD-1720293.1	34.70	7.10	13.20	0.40	61.70	25.00
AD-1700368.1	8.90	2.00	32.80	4.00	86.50	5.70
AD-1700955.1	22.40	0.80	68.50	11.50	77.60	15.50
AD-1700369.1	3.90	1.80	25.60	3.70	80.40	10.10
AD-1700370.1	37.10	3.80	43.90	19.10	94.50	10.70
AD-1700371.1	6.70	2.30	21.00	2.90	114.80	4.20
AD-1700957.1	49.80	8.40	84.60	18.90	92.50	26.30
AD-1700372.1	6.60	0.60	27.70	5.80	95.70	17.40
AD-1700374.1	3.50	0.40	11.50	0.60	38.20	8.50
AD-1700958.1	53.10	2.30	100.80	10.40	89.10	11.80
AD-1700959.1	38.60	0.50	71.60	3.90	92.20	6.30
AD-1720285.1	23.80	7.00	47.20	9.00	85.30	23.20
AD-1700375.1	4.60	1.10	30.30	6.40	93.00	16.90
AD-1700376.1	6.10	1.10	19.30	7.60	76.10	6.00
AD-1700378.1	3.10	1.20	27.10	8.40	79.90	13.10
AD-1700960.1	26.70	5.10	38.50	11.60	61.00	3.70
AD-1700961.1	4.30	0.80	11.90	1.30	116.60	6.70
AD-1700962.1	51.00	10.60	30.90	3.10	71.80	22.90
AD-1700963.1	3.40	0.20	28.70	4.40	99.00	8.10
AD-1700383.1	4.60	1.10	11.10	6.40	69.10	10.20
AD-1720385.1	4.00	0.70	16.50	4.40	89.10	4.50
AD-1700965.1	12.20	4.20	16.50	0.60	44.30	7.90

[1182]

AD-1700384.1	5.30	1.60	11.60	5.40	53.40	20.40
AD-1700385.1	3.10	0.60	11.40	4.40	88.40	10.70
AD-1700386.1	6.10	0.80	10.70	5.10	47.80	19.00
AD-1700387.1	11.70	2.40	37.20	6.20	135.50	4.40
AD-1720380.1	5.50	1.30	12.80	1.80	100.60	18.50
AD-1700967.1	4.40	0.80	20.60	5.10	68.30	10.90
AD-1700388.1	3.80	0.30	17.60	4.30	71.10	20.40
AD-1700968.1	6.10	2.20	9.30	3.70	57.80	14.10
AD-1700969.1	5.40	1.80	20.60	1.00	94.80	12.70
AD-1700408.1	1.80	0.50	5.80	2.00	54.20	10.80
AD-1700970.1	16.10	3.10	54.70	10.10	105.40	13.00
AD-1700971.1	34.30	8.70	82.40	15.30	107.40	15.10
AD-1700410.1	2.50	0.20	12.20	3.80	95.60	18.30
AD-1700411.1	8.20	2.20	21.70	7.50	63.60	14.90
AD-1720304.1	6.30	2.60	14.30	7.70	76.30	12.80
AD-1700973.1	16.10	6.40	64.00	3.00	45.20	12.20
AD-1700413.1	25.70	6.40	83.40	5.30	129.00	8.50
AD-1700414.1	7.20	1.30	45.20	9.60	125.30	17.80
AD-1700975.1	17.50	5.80	50.20	7.50	101.50	16.30
AD-1700976.1	8.80	1.60	32.00	8.10	97.10	6.90
AD-1700977.1	10.70	1.70	26.60	5.00	48.90	4.90
AD-1700978.1	15.30	8.80	21.50	5.00	80.20	13.10
AD-1700422.1	31.50	6.10	62.90	9.00	96.10	4.30
AD-1720305.1	57.00	8.60	73.70	10.10	120.40	6.50
AD-1700423.1	27.10	6.00	27.10	8.50	71.10	26.30
AD-1700424.1	4.00	0.40	15.90	1.80	106.10	16.00
AD-1700425.1	6.50	0.80	43.50	9.50	110.30	8.90
AD-1700426.1	29.00	5.00	80.60	15.50	84.50	21.00
AD-1700427.1	30.30	6.20	49.40	28.80	103.70	7.20
AD-1700980.1	28.90	5.80	57.20	5.30	68.90	13.30
AD-1700428.1	10.00	1.30	37.70	8.40	66.20	18.80
AD-1700981.1	70.90	17.00	89.10	27.90	89.60	12.40
AD-1700982.1	11.70	5.90	36.50	3.40	93.70	21.90
AD-1700439.1	5.30	2.60	38.90	10.50	112.10	8.30
AD-1720316.1	33.30	5.70	66.20	7.50	90.90	11.00

[1183]

AD-1700984.1	56.50	12.40	98.20	31.40	114.50	13.90
AD-1700985.1	9.20	3.50	41.30	9.80	92.40	9.20
AD-1700461.1	2.90	0.30	6.50	1.50	72.20	18.30
AD-1700462.1	40.30	6.00	92.30	11.20	59.00	6.30
AD-1700986.1	93.90	18.50	105.10	29.10	103.00	24.00
AD-1700464.1	18.80	3.60	48.90	9.50	109.00	10.90
AD-1700465.1	34.70	5.80	84.10	8.60	106.50	18.90
AD-1700468.1	10.40	0.90	54.10	9.10	64.80	13.00
AD-1720378.1	11.50	1.30	72.70	3.80	90.40	13.60
AD-1700988.1	10.70	1.50	34.50	7.80	56.30	20.30
AD-1700989.1	73.60	18.20	92.30	9.60	93.60	12.60
AD-1700990.1	2.40	0.60	7.50	1.00	72.10	11.90
AD-1700473.1	3.30	0.90	7.40	0.90	50.10	5.40
AD-1700991.1	3.20	1.10	9.20	1.60	100.50	8.00
AD-1700474.1	4.90	0.50	23.90	4.30	91.60	5.30
AD-1700476.1	2.30	0.80	5.60	0.60	43.50	5.60
AD-1700992.1	92.10	8.00	107.60	10.00	85.50	17.40
AD-1700477.1	12.70	1.50	65.60	9.30	83.00	9.30
AD-1700479.1	3.50	0.80	17.40	0.80	68.80	11.00
AD-1720373.1	3.10	1.00	11.10	3.30	58.70	12.70
AD-1700482.1	7.50	1.50	38.40	5.20	91.20	6.30
AD-1720291.1	25.70	6.90	24.20	1.80	80.90	24.50
AD-1700995.1	3.10	0.90	5.20	1.80	67.00	15.40
AD-1700485.1	16.40	1.20	36.80	4.10	103.00	14.40
AD-1720306.1	30.40	5.50	34.90	7.10	87.90	10.40
AD-1720307.1	55.10	15.00	71.40	4.10	102.90	9.10
AD-1720308.1	4.70	0.50	10.10	1.40	66.10	5.00
AD-1700486.1	75.60	8.60	66.70	28.30	78.20	19.50
AD-1700487.1	6.80	1.70	10.30	3.20	58.70	8.50
AD-1700488.1	15.60	2.00	51.30	15.20	111.30	23.70
AD-1700489.1	51.30	2.50	83.20	12.30	73.60	5.50
AD-1700997.1	13.30	2.40	93.60	9.10	75.40	19.50
AD-1700490.1	10.50	2.00	70.70	9.00	89.50	11.40
AD-1700998.1	66.00	11.40	64.00	8.40	70.00	10.70
AD-1700517.1	25.80	5.30	61.30	5.90	84.70	11.60

[1184]

AD-1700519.1	48.60	13.10	84.20	39.10	111.20	10.60
AD-1720292.1	76.80	8.50	70.20	2.80	74.50	12.10
AD-1700520.1	12.80	3.00	46.20	8.80	85.00	10.20
AD-1720376.1	50.40	10.70	79.60	4.60	93.70	7.40
AD-1701001.1	53.90	6.70	88.90	7.10	115.50	27.10
AD-1701002.1	79.10	10.40	110.00	19.60	111.90	8.60
AD-1700522.1	71.90	7.70	94.40	22.70	115.00	17.00
AD-1701003.1	6.60	1.20	67.80	9.00	90.70	14.20
AD-1700542.1	6.30	0.90	30.00	7.00	101.50	13.60
AD-1701004.1	8.00	3.50	17.30	3.40	76.60	10.50
AD-1701005.1	3.50	1.50	16.00	3.90	90.10	10.00
AD-1700544.1	3.60	0.70	11.60	3.80	84.10	9.30
AD-1700550.1	4.10	1.90	4.80	2.20	46.60	6.90
AD-1720386.1	6.20	1.70	11.60	5.40	64.50	9.00
AD-1701007.1	11.30	2.10	11.00	3.70	42.10	5.90
AD-1700553.1	3.80	0.70	6.00	2.30	77.80	6.40
AD-1700554.1	4.80	0.90	6.60	1.20	73.50	17.60
AD-1700555.1	5.10	1.20	6.40	1.00	63.80	9.50
AD-1700556.1	4.40	1.50	10.70	1.80	61.00	10.00
AD-1700557.1	5.10	2.60	23.10	7.50	95.90	9.40
AD-1700558.1	5.90	0.80	6.60	1.40	63.40	12.50
AD-1701009.1	18.30	3.10	46.80	5.00	99.80	6.40
AD-1700560.1	6.20	4.60	17.50	4.90	63.90	3.30
AD-1720372.1	3.20	1.00	7.30	1.30	56.50	14.90
AD-1701011.1	3.10	0.90	18.50	2.70	75.10	7.90
AD-1701012.1	7.50	2.60	15.00	2.80	78.00	13.90
AD-1701013.1	27.60	5.60	68.10	10.00	115.30	30.40
AD-1700563.1	8.20	1.50	29.30	4.50	114.10	11.00
AD-1701014.1	8.40	0.60	29.90	2.60	83.40	10.10
AD-1700566.1	3.00	1.30	8.10	1.60	82.30	8.40
AD-1720312.1	5.80	3.20	17.10	2.10	108.80	7.00
AD-1701016.1	4.70	0.20	14.90	2.40	83.40	12.00
AD-1701017.1	9.30	1.80	26.60	3.50	115.80	5.30
AD-1700573.1	2.80	1.70	12.70	2.20	67.70	8.00
AD-1720371.1	7.90	0.80	12.40	2.00	74.20	10.60

[1185]

AD-1701019.1	7.50	2.40	18.30	2.90	86.50	14.90
AD-1700575.1	9.70	1.80	18.90	2.60	106.30	9.00
AD-1700576.1	31.80	6.50	61.00	5.90	84.80	8.00
AD-1701020.1	7.00	1.50	41.80	5.50	105.50	10.20
AD-1700578.1	9.20	2.00	18.80	3.70	96.70	3.20
AD-1720290.1	5.40	1.50	19.00	3.20	95.50	1.80
AD-1701022.1	5.00	0.30	14.60	2.00	68.70	11.30
AD-1701023.1	10.20	1.40	36.00	9.10	107.40	12.00
AD-1700580.1	7.60	2.10	33.10	6.10	107.50	11.70
AD-1701024.1	12.10	5.90	39.70	10.90	91.00	8.00
AD-1700582.1	8.20	1.30	14.80	3.80	56.90	7.40
AD-1720294.1	5.40	1.20	14.10	2.80	63.40	14.00
AD-1701026.1	3.20	0.50	28.60	3.40	84.40	8.70
AD-1701027.1	5.20	1.00	27.10	3.30	82.10	8.50
AD-1700623.1	5.50	1.20	13.10	5.90	95.90	10.40
AD-1700670.1	42.70	7.00	93.20	12.10	96.70	6.20
AD-1700671.1	62.40	12.30	81.80	11.60	82.40	19.80
AD-1720369.1	21.80	3.80	67.10	11.30	98.80	11.70
AD-1701029.1	13.80	5.60	52.00	16.10	96.50	25.40
AD-1700680.1	20.10	1.00	82.90	10.20	99.20	14.30
AD-1720297.1	79.80	3.70	105.80	12.80	101.50	17.30
AD-1701031.1	16.10	3.90	19.90	2.10	93.50	2.90
AD-1700681.1	8.10	1.70	35.00	5.60	76.20	15.60
AD-1701032.1	22.40	8.30	65.10	19.30	80.30	1.10
AD-1700684.1	10.10	3.80	29.70	5.60	96.90	8.50
AD-1701033.1	98.60	7.10	117.50	19.10	123.90	3.90
AD-1700710.1	93.80	16.60	112.90	16.20	122.60	15.20
AD-1701034.1	93.50	11.40	105.10	3.80	110.30	8.20
AD-1701035.1	18.80	1.00	65.90	10.50	89.30	7.70
AD-1700736.1	9.00	3.10	18.80	5.60	72.10	5.00
AD-1720374.1	45.60	14.20	55.40	12.00	61.70	10.40
AD-1701037.1	37.60	12.00	66.20	11.70	69.90	13.10
AD-1700737.1	17.30	3.70	58.00	8.00	71.60	19.10
AD-1700738.1	11.70	1.60	37.80	8.60	92.00	10.90
AD-1701038.1	23.60	1.40	113.80	9.20	93.10	11.80

[1186]	AD-1700780.1	3.90	2.20	6.10	1.50	35.40	11.10
	AD-1720314.1	3.40	1.00	7.30	2.00	59.20	13.00
	AD-1700781.1	3.00	0.70	6.90	1.90	51.30	5.40
	AD-1700782.1	5.80	1.60	8.80	2.90	58.30	14.20

[1187] 表8. Hep3B细胞中的CIDEB单剂量筛选

	双链体 ID	剩余的 CIDEB mRNA 平均%		双链体 ID	剩余的 CIDEB mRNA 平均%	
		10 nM			10 nM	
		平均值	SD		平均值	SD
	AD-1686813	7.034	0.258	AD-1686057.1	5.373	0.633
	AD-1686803.1	7.037	0.549	AD-1686053.1	56.574	3.938
	AD-1686794.1	6.698	0.335	AD-1686028.1	46.840	2.177
	AD-1686783.1	9.004	0.720	AD-1686016.1	9.940	0.590
	AD-1686781.1	26.941	1.075	AD-1686007.1	18.073	1.221
	AD-1686770.1	7.394	0.857	AD-1685994.1	9.314	0.297
	AD-1686761.1	29.344	3.097	AD-1685983.1	15.368	0.551
	AD-1686751.1	75.987	4.650	AD-1685969.1	9.303	0.607
	AD-1686747.1	74.602	6.448	AD-1685956.1	24.725	7.404
	AD-1686738.1	33.637	1.984	AD-1685935.1	38.364	1.701
[1188]	AD-1686729.1	24.804	3.052	AD-1685931.1	40.894	1.620
	AD-1686720.1	20.335	0.768	AD-1685921.1	48.205	4.328
	AD-1686709.1	10.072	0.802	AD-1685912.1	54.202	3.053
	AD-1686693.1	15.320	1.441	AD-1685902.1	91.948	4.558
	AD-1686680.1	8.115	0.694	AD-1685898.1	98.617	4.497
	AD-1686669.1	11.933	1.964	AD-1685889.1	84.955	2.049
	AD-1686658.1	9.575	0.485	AD-1685878.1	95.346	1.773
	AD-1686649.1	7.356	0.570	AD-1685869.1	87.386	2.693
	AD-1686639.1	11.744	0.890	AD-1685856.1	90.274	1.411
	AD-1686626.1	9.617	0.753	AD-1685847.1	61.105	2.592
	AD-1686616.1	10.909	0.749	AD-1685838.1	83.672	4.357
	AD-1686606.1	9.636	0.540	AD-1685826.1	77.305	2.383
	AD-1686597.1	7.108	0.308	AD-1685810.1	100.598	6.749
	AD-1686585.1	5.715	1.579	AD-1685798.1	81.801	6.236
	AD-1686576.1	8.745	0.449	AD-1685788.1	76.643	16.621

[1189]

AD-1686566.1	7.504	0.442	AD-1685779.1	93.379	8.610
AD-1686565.1	51.547	2.866	AD-1685770.1	94.639	5.122
AD-1686556.1	34.239	2.082	AD-1685744.1	93.333	6.221
AD-1686543.1	50.576	2.174	AD-1685735.1	72.951	5.540
AD-1686540.1	50.093	4.978	AD-1685726.1	92.927	8.552
AD-1686531.1	56.092	3.563	AD-1685717.1	84.588	8.485
AD-1686518.1	10.338	0.356	AD-1685708.1	85.659	6.249
AD-1686508.1	56.285	2.808	AD-1685699.1	93.319	3.803
AD-1686491.1	19.182	0.216	AD-1685689.1	98.857	4.806
AD-1686475.1	52.270	2.123	AD-1685673.1	78.962	3.900
AD-1686466.1	8.819	0.655	AD-1685664.1	96.600	15.224
AD-1686451.1	12.861	0.277	AD-1685648.1	89.253	4.285
AD-1686435.1	20.744	0.806	AD-1685637.1	82.011	1.907
AD-1686426.1	15.031	0.938	AD-1685627.1	91.683	23.711
AD-1686417.1	12.149	0.855	AD-1685614.1	89.157	4.921
AD-1686403.1	15.485	1.878	AD-1685610.1	78.640	8.712
AD-1686394.1	12.687	0.710	AD-1685599.1	83.195	5.391
AD-1686377.1	15.920	0.978	AD-1685587.1	93.563	13.290
AD-1686366.1	17.513	1.255	AD-1685570.1	88.283	6.794
AD-1686354.1	18.012	0.876	AD-1685561.1	88.025	5.340
AD-1686343.1	19.232	1.476	AD-1685549.1	82.656	5.181
AD-1686334.1	24.115	1.100	AD-1685538.1	88.232	3.361
AD-1686319.1	13.232	0.799	AD-1685528.1	92.786	7.624
AD-1686286.1	22.559	0.512	AD-1685512.1	97.641	6.841
AD-1686274.1	29.551	0.741	AD-1685503.1	95.865	17.990
AD-1686265.1	70.105	5.349	AD-1685491.1	94.393	11.080
AD-1686251.1	14.695	1.084	AD-1685469.1	85.615	7.133
AD-1686242.1	4.855	0.629	AD-1685418.1	86.858	2.046
AD-1686225.1	10.479	0.390	AD-1685406.1	76.723	3.400
AD-1686216.1	15.955	1.165	AD-1685388.1	83.950	4.269
AD-1686207.1	10.015	1.533	AD-1685379.1	82.859	3.868
AD-1686197.1	4.724	1.010	AD-1685366.1	85.364	1.718
AD-1686181.1	15.356	0.366	AD-1685284.1	82.852	1.693
AD-1686171.1	19.964	0.716	AD-1685271.1	84.648	3.346
AD-1686159.1	12.973	0.587	AD-1685250.1	86.016	3.414

[1190]	AD-1686147.1	6.105	1.495	AD-1685240.1	79.332	2.819
	AD-1686136.1	5.802	0.945	AD-1685228.1	90.535	6.335
	AD-1686126.1	11.135	1.538	AD-1685217.1	80.884	4.373
	AD-1686116.1	14.156	3.058	AD-1685207.1	74.123	2.932
	AD-1686098.1	22.948	0.996	AD-1685198.1	85.722	6.301
	AD-1686086.1	53.797	3.239	AD-1685173.1	83.069	7.260
	AD-1686075.1	34.648	2.855	AD-1685156.1	99.596	11.628
	AD-1686066.1	54.370	2.364			

[1191] 实例3. 体外筛选方法

[1192] 双链体的子集还通过原代人肝细胞和原代食蟹猴肝细胞中的转染和自由摄取来评估。

[1193] 细胞培养和转染:

[1194] 在原代人肝细胞 (PHH, BioIVT) 和原代食蟹猴肝细胞 (PCH, BioIVT) 中进行转染和自由摄取测定。转染通过将 Opti-MEM 加 0.1 $\mu$ l 的 Lipofectamine RNAiMax 每孔 (加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司, 目录号 13778-150) 添加到在 384 孔板中每孔 5 $\mu$ l 的 siRNA 双链体中并在室温下温育 15 分钟来进行。然后将 40 $\mu$ l 的含有约  $10 \times 10^3$  个细胞的 Invitrogen CP 培养基 (BioIVT, 目录号 Z99029) 添加到 siRNA 混合物中。在 RNA 纯化之前将细胞温育 24 小时。在 10nM、1nM、0.1nM 和 0.01nM 下进行实验。自由摄取测定与不使用 Liporectamine RNAimax 的转染测定法类似地进行, 并且在 RNA 纯化之前将细胞温育 48 小时。在 250nM、100nM、10nM、1nM 下进行实验。

[1195] 使用 DYNABEADS mRNA 分离试剂盒的总 RNA 分离

[1196] 使用 Highres Biosolution 整合系统使用 Dynabeads<sup>TM</sup> mRNA DIRECT<sup>TM</sup> 纯化试剂盒 (Invitrogen<sup>TM</sup>, 目录号 61012) 分离 RNA。简而言之, 将 70 $\mu$ l 的裂解/结合缓冲液和 10 $\mu$ l 的含有 3 $\mu$ l 磁珠的裂解缓冲液添加到具有细胞的板中。在室温下将板在电磁振荡器上温育 10 分钟, 并且然后捕获磁珠并去除上清液。然后用 90 $\mu$ l 洗涤缓冲液 A 洗涤珠结合的 RNA 2 次, 并且用 90 $\mu$ l 洗涤缓冲液 B 洗涤一次。然后用 90 $\mu$ l 洗脱缓冲液洗涤珠, 重新捕获并去除上清液。根据制造商的建议, 使用具有 RNase 抑制剂 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>, 目录号 4374967) 的高容量 cDNA 逆转录试剂盒合成互补 DNA (cDNA)。向上述分离的 RNA 中添加主混合物, 所述主混合物每次反应含有 1 $\mu$ l 的 10X 缓冲液、0.4 $\mu$ l 的 25X 脱氧核糖核苷酸三磷酸酯、1 $\mu$ l 的 10X 随机引物、0.5 $\mu$ l 的逆转录酶、0.5 $\mu$ l 的 RNase 抑制剂和 6.6 $\mu$ l 的 H<sub>2</sub>O。将板密封、混合, 并且在电磁振荡器上在室温下温育 10 分钟, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时。

[1197] 通过进行 RT-qPCR 分析来定量 CIDEB mRNA 水平。将 2 $\mu$ l 的 cDNA 添加到主混合物中, 所述主混合物在 384 孔板中的每个孔中含有 0.5 $\mu$ l 的人或 cyno GAPDH TaqMan 探针、0.5 $\mu$ l 的人或 cyno CIDEB 探针和 5 $\mu$ l 的 Lightcycler 480 探针主混合物 (罗氏公司, 目录号 04887301001)。实时 PCR 是在 LightCycler 480 实时 PCR 系统 (罗氏公司) 中进行的。为了计算相对倍数变化, 使用  $\Delta - \Delta$  阈值循环 (相对定量) ( $\Delta \Delta C_q$  [RQ]) 方法 [Schmittgen 和 Livak 2008] 分析实时数据, 并且相对于使用用 PBS 转染的细胞进行的对照测定归一化。对于所有样品, 首先将 CIDEB mRNA 水平相对于作为参考基因的 GAPDH 归一化。数据被表示为剩余的

CIDEB mRNA相对于平均PBS对照的百分比,并且误差被表示为标准偏差(SD),气来源于4次转染重复。

[1198] PCH中dsRNA药剂的单剂量转染筛选和自由摄取筛选的结果示于表9中,并且PHH细胞示于表10中。

[1199] 表9.原代食蟹猴肝细胞中的转染和自由摄取

[1200]

双链体 ID	转染								自由摄取							
	10 nM		1 nM		0.1 nM		0.01 nM		250 nM		100 nM		10 nM		1 nM	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
AD-1700826.1	9	2	16	5	17	5	25	6	36	5	47	2	73	11	60	2
AD-1699971.1	2	1	5	1	5	1	8	1	16	5	23	4	31	4	44	5
AD-1720309.1	8	1	17	2	22	3	31	3	36	6	41	5	53	12	68	7
AD-1720382.1	7	1	11	3	12	2	18	3	35	5	30	5	46	10	59	8
AD-1700355.1	6	0	14	1	15	3	22	5	25	5	35	7	42	10	55	2
AD-1720294.1	2	0	4	0	7	1	11	3	28	5	31	3	43	7	52	7
AD-1700411.1	10	1	24	2	41	6	45	7	46	7	55	4	55	2	71	7
AD-1700383.1	6	1	11	2	11	1	16	3	25	2	32	6	50	9	60	10
AD-1720304.1	11	4	19	1	29	5	36	4	40	10	48	9	49	1	58	5
AD-1700082.1	5	0	13	2	13	2	24	3	27	5	32	7	43	9	54	5
AD-1700872.1	3	1	7	1	6	1	13	2	21	4	35	1	44	4	54	9
AD-1700990.1	4	1	8	2	5	1	13	2	46	14	43	7	139	23	64	7
AD-1700558.1	7	1	17	4	23	4	25	2	35	9	42	3	53	9	64	6
AD-1700782.1	3	1	7	1	7	1	16	2	23	3	26	2	49	2	50	8
AD-1720375.1	15	3	22	4	14	2	27	5	55	5	59	4	69	7	82	5
AD-1700358.1	5	1	13	2	18	2	19	2	30	5	37	6	57	5	44	3
AD-1720314.1	16	5	10	2	9	2	14	2	23	6	37	5	40	8	51	10

[1201]

AD-1700156.1	5	3	9	1	8	1	16	3	26	6	40	6	49	5	70	9
AD-1699964.1	2	0	5	1	4	1	11	3	16	2	19	2	35	6	49	9
AD-1699976.1	1	0	3	0	6	2	6	1	15	2	18	2	32	2	37	2
AD-1701007.1	7	1	9	1	10	1	16	2	28	4	41	4	56	10	53	2
AD-1700386.1	8	1	13	2	15	2	20	3	24	1	32	4	40	7	54	5
AD-1700995.1	3	1	6	1	5	0	12	1	18	2	27	3	32	3	53	8
AD-1700376.1	4	1	7	2	8	1	11	2	20	1	26	2	47	8	49	3
AD-1700915.1	7	1	14	2	16	1	25	4	37	3	32	7	43	11	54	3
AD-1700384.1	6	1	11	2	12	1	18	3	34	3	43	4	63	9	61	5
AD-1700925.1	8	2	14	3	19	3	26	6	35	8	39	4	61	11	46	0
AD-1700378.1	6	1	15	3	15	3	21	4	32	5	34	6	50	5	60	4
AD-1700870.1	4	1	10	1	14	3	24	4	29	3	36	3	54	6	57	2
AD-1700353.1	13	1	21	1	16	1	35	11	44	4	55	3	63	7	88	3
AD-1720371.1	11	2	22	5	28	8	28	7	38	4	47	3	60	10	63	2
AD-1700374.1	4	0	8	1	9	1	14	2	26	3	33	3	54	7	54	3
AD-1700825.1	12	2	22	3	18	4	27	5	40	7	46	11	58	6	71	11
AD-1720386.1	3	1	5	1	6	1	10	2	27	2	38	4	53	8	56	6
AD-1720315.1	2	0	4	1	4	1	8	1	14	3	23	2	27	6	34	6
AD-1700159.1	2	0	5	1	5	1	9	2	19	2	26	5	44	3	50	1
AD-1700923.1	7	1	16	2	22	4	24	4	29	1	39	7	57	4	52	7
AD-1700369.1	5	2	6	1	11	2	14	1	20	3	24	5	37	8	39	8
AD-1701016.1	5	1	14	3	12	2	20	0	29	5	33	5	43	7	60	4
AD-1700148.1	3	1	6	1	7	1	12	1	18	4	23	4	25	5	46	4
AD-1700318.1	5	1	9	1	13	4	17	1	26	4	30	5	36	8	50	9
AD-1700781.1	2	1	7	2	11	2	12	3	33	16	29	6	47	4	51	7
AD-1700905.1	10	1	15	2	16	2	22	2	40	7	49	8	54	8	57	5
AD-1720308.1	3	1	8	1	10	1	15	2	21	2	29	4	30	7	60	10
AD-1700916.1	16	3	20	2	19	3	23	3	43	3	54	9	62	11	63	9
AD-1700461.1	5	1	7	2	5	1	13	2	29	3	42	8	52	9	64	8
AD-1700871.1	2	1	6	2	12	3	11	3	16	3	19	4	41	10	46	7
AD-1720373.1	4	1	11	3	14	2	20	1	27	2	29	4	49	4	54	8
AD-1701004.1	4	1	9	0	13	2	18	1	35	5	42	4	63	12	60	8
AD-1700556.1	2	0	5	1	5	0	17	7	21	1	24	2	38	9	50	8
AD-1720283.1	14	5	20	5	16	1	30	3	41	2	49	4	54	2	77	13
AD-1700303.1	5	0	10	3	8	1	15	2	25	7	34	7	31	3	45	9

[1202]

AD-1720370.1	2	0	4	1	6	1	10	1	19	6	25	5	39	5	51	11
AD-1700573.1	4	1	8	1	12	2	17	2	19	5	28	6	36	6	44	2
AD-1720372.1	3	1	9	1	12	1	16	1	26	3	36	7	48	6	59	4
AD-1700473.1	2	1	4	1	5	1	8	1	14	3	21	2	23	6	40	8
AD-1700821.1	2	0	4	1	3	0	6	1	11	1	15	4	20	1	33	1
AD-1720384.1	4	0	7	1	7	1	12	2	25	8	31	4	40	6	47	10
AD-1700314.1	5	1	10	2	9	1	16	1	20	4	25	3	41	6	48	2
AD-1700582.1	2	1	4	1	6	1	9	1	21	4	25	2	34	2	48	5
AD-1700385.1	6	1	10	1	9	1	15	3	23	5	30	6	34	7	48	8
AD-1700544.1	2	0	7	1	8	1	15	3	21	5	29	4	43	4	49	8
AD-1699970.1	1	0	2	1	2	0	4	1	11	2	13	3	29	6	31	1
AD-1700967.1	7	1	12	1	16	2	27	7	28	4	37	7	44	8	56	8
AD-1700844.1	2	0	5	0	9	1	13	2	23	4	31	4	53	7	47	5
AD-1700555.1	1	0	4	1	4	1	8	0	12	2	18	5	23	10	36	8
AD-1700880.1	5	2	6	1	10	1	12	1	24	4	41	7	43	12	53	1
AD-1700388.1	7	2	12	2	16	3	20	2	24	4	34	10	35	6	54	8
AD-1700560.1	5	1	15	2	22	3	28	4	31	6	38	3	54	4	59	4
AD-1700550.1	2	0	4	1	4	0	7	1	18	0	22	3	39	6	43	3
AD-1700180.1	1	0	3	1	5	1	10	1	22	4	30	3	43	4	46	4
AD-1700312.1	8	3	11	3	7	1	21	7	25	1	31	2	36	3	49	4
AD-1699985.1	2	0	7	1	10	1	13	3	29	0	33	2	48	7	49	3
AD-1701011.1	5	1	12	2	20	4	23	3	28	3	41	2	57	9	57	6
AD-1700476.1	3	1	8	1	14	2	15	1	23	3	37	9	57	11	57	9
AD-1701022.1	3	0	6	1	6	1	13	2	23	4	30	1	38	3	59	3
AD-1700554.1	3	1	5	1	5	1	14	3	18	3	21	6	41	6	63	7
AD-1699951.1	2	0	4	1	5	1	8	1	12	2	16	2	22	4	34	6
AD-1700408.1	5	1	8	2	12	2	13	4	26	6	33	2	57	9	45	5
AD-1700487.1	4	0	11	2	11	2	21	2	28	6	19	2	43	10	51	1
AD-1700943.1	5	1	9	1	9	0	18	0	33	6	43	2	50	5	68	12
AD-1700736.1	9	2	18	3	19	3	29	2	49	12	61	9	68	15	84	12
AD-1700813.1	3	1	6	1	9	2	12	2	26	6	31	4	36	8	44	3
AD-1700968.1	4	1	8	1	8	2	13	2	23	4	31	8	54	8	50	7
AD-1700780.1	4	1	3	1	5	4	8	2	9	1	14	3	19	3	31	9
AD-1700324.1	9	2	14	2	11	2	21	6	NA							
AD-1700566.1	1	0	4	0	5	1	8	1	15	4	17	1	23	5	34	6

[1203]

AD-1700354.1	4	1	7	1	9	1	10	1	20	3	23	5	30	6	51	5
AD-1700365.1	8	2	14	3	22	3	29	6	33	7	45	5	69	4	61	7
AD-1700553.1	2	1	4	1	4	1	9	2	13	2	23	4	30	4	38	6

[1204] 表10:原代人肝细胞中的转染和自由摄取

双链体 ID	转染								自由摄取							
	10 nM		1 nM		0.1 nM		0.01 nM		250 nM		100 nM		10 nM		1 nM	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
AD-1700826.1	13	2	24	3	28	7	32	6	33	3	34	3	77	4	108	22
AD-1699971.1	5	1	9	1	15	3	13	3	7	3	8	2	16	3	50	14
AD-1720309.1	12	0	25	4	42	7	48	6	47	10	58	11	75	9	75	22
AD-1720382.1	8	2	10	3	7	4	14	2	21	2	25	3	38	6	73	8
AD-1700355.1	12	1	17	3	25	5	29	10	28	9	32	8	54	4	98	14
AD-1720294.1	4	1	8	1	13	1	16	2	16	3	15	1	25	4	67	12
AD-1700411.1	19	2	33	4	59	10	59	14	63	4	68	14	94	5	115	15
AD-1700383.1	5	3	4	4	7	4	13	4	15	3	15	3	32	7	75	17
AD-1720304.1	17	3	30	4	41	5	41	7	54	10	60	4	73	7	102	10
AD-1700082.1	13	3	23	5	28	7	28	7	37	8	43	4	61	14	93	5
AD-1700872.1	7	1	11	3	16	2	16	2	25	6	25	3	40	4	77	15
AD-1700990.1	4	0	7	2	8	2	8	3	5	2	8	2	18	2	33	8
AD-1700558.1	12	1	21	2	28	3	29	4	32	7	40	5	68	4	100	12
AD-1700782.1	8	1	13	1	17	2	22	3	24	2	22	4	43	3	91	19
AD-1720375.1	16	2	20	1	25	4	27	3	38	7	30	2	55	2	88	3
AD-1700358.1	11	2	22	2	28	2	31	3	37	5	36	2	61	8	82	8
AD-1720314.1	5	2	9	3	11	2	10	2	10	2	11	3	19	7	41	20
AD-1700156.1	6	1	8	1	11	2	10	2	14	5	18	3	32	3	55	8
AD-1699964.1	3	0	8	2	9	2	12	2	7	1	7	1	15	1	54	11
AD-1699976.1	6	2	11	2	12	1	13	1	8	2	10	2	24	4	60	12
AD-1701007.1	15	4	15	4	16	3	17	4	11	2	12	2	24	2	61	4
AD-1700386.1	10	0	18	3	29	4	23	2	27	2	38	8	45	9	81	6
AD-1700995.1	5	1	9	2	9	2	10	2	8	1	11	3	21	4	55	19
AD-1700376.1	6	0	13	2	16	2	15	3	9	2	14	3	32	6	70	8
AD-1700915.1	12	1	19	3	29	8	34	8	34	10	33	7	48	9	96	17

[1205]

[1206]

AD-1700384.1	8	2	16	2	18	2	20	2	30	4	36	8	46	8	92	2
AD-1700925.1	18	1	27	7	38	4	46	2	70	16	68	9	82	11	122	8
AD-1700378.1	11	2	19	4	28	2	27	3	34	6	42	9	62	12	97	10
AD-1700870.1	14	2	20	4	31	3	35	4	41	8	37	2	71	10	118	4
AD-1700353.1	18	1	22	5	26	4	29	4	44	5	49	4	64	13	107	1
AD-1720371.1	12	3	21	5	26	2	27	5	26	1	29	7	51	7	75	22
AD-1700374.1	8	1	15	2	18	2	18	1	15	1	18	3	37	7	77	17
AD-1700825.1	15	1	20	4	30	6	37	8	46	4	57	10	75	11	115	19
AD-1720386.1	6	1	10	2	12	2	13	2	16	2	15	2	30	5	76	6
AD-1720315.1	6	1	10	2	15	2	14	6	11	5	14	5	24	7	50	21
AD-1700159.1	5	0	12	3	13	4	16	3	15	3	20	3	32	5	91	11
AD-1700923.1	17	3	29	6	39	3	45	10	53	10	61	8	84	9	103	11
AD-1700369.1	5	0	10	1	13	1	17	1	6	1	9	1	26	2	56	16
AD-1701016.1	8	2	13	3	18	6	13	5	22	7	22	4	46	4	92	25
AD-1700148.1	7	3	13	2	18	3	17	4	18	6	17	2	38	7	69	6
AD-1700318.1	13	3	18	3	25	3	28	5	32	7	32	8	52	3	88	3
AD-1700781.1	10	1	18	3	20	2	21	3	25	4	23	3	55	9	96	24
AD-1700905.1	13	4	15	3	17	4	24	3	24	4	38	6	25	12	54	11
AD-1720308.1	10	1	17	3	20	2	23	3	19	3	24	6	42	2	78	6
AD-1700916.1	8	2	12	1	15	2	17	3	21	8	8	3	42	8	67	9
AD-1700461.1	6	2	7	3	7	3	10	4	11	3	11	5	17	5	43	18
AD-1700871.1	9	1	13	2	13	2	15	3	10	2	13	2	36	8	65	8
AD-1720373.1	11	0	18	2	27	2	30	3	25	4	33	6	56	6	90	8
AD-1701004.1	6	1	11	1	14	2	15	2	16	3	15	4	35	6	56	12
AD-1700556.1	5	1	8	1	12	2	15	3	10	1	9	2	24	6	67	4
AD-1720283.1	12	1	14	1	21	2	16	3	33	3	31	2	38	5	78	11
AD-1700303.1	9	2	16	4	20	3	19	5	24	3	28	4	48	2	60	8
AD-1720370.1	9	1	15	2	14	3	17	2	12	2	17	4	38	4	65	10
AD-1700573.1	9	1	15	1	18	2	19	2	16	2	21	3	46	11	85	12
AD-1720372.1	10	2	14	2	20	3	22	3	15	3	21	5	48	6	92	16
AD-1700473.1	5	1	9	3	13	4	15	7	9	2	11	3	23	2	52	16
AD-1700821.1	3	0	5	1	9	2	10	1	4	1	5	1	12	3	33	17
AD-1720384.1	5	1	8	3	11	2	14	1	10	2	11	3	28	6	60	26
AD-1700314.1	6	3	7	3	15	0	21	3	11	2	19	4	39	3	83	14
AD-1700582.1	5	1	9	2	15	4	13	2	11	2	13	3	20	5	55	4

AD-1700385.1	9	1	13	2	20	3	21	6	12	5	22	4	42	7	57	9
AD-1700544.1	7	1	11	2	17	4	19	6	10	3	13	3	24	2	67	5
AD-1699970.1	3	1	6	2	8	1	8	1	5	1	5	1	10	4	24	3
AD-1700967.1	12	1	24	4	27	3	25	4	40	8	45	11	67	7	100	9
AD-1700844.1	9	1	16	2	21	1	24	1	24	6	28	7	57	8	98	10
AD-1700555.1	4	1	8	1	11	1	9	2	4	1	6	2	12	1	22	8
AD-1700880.1	5	2	10	2	12	4	10	4	9	3	19	4	35	3	42	13
AD-1700388.1	10	0	16	4	27	6	25	2	30	2	36	4	55	8	87	17
AD-1700560.1	11	2	16	2	23	2	25	2	28	5	35	8	61	11	95	9
AD-1700550.1	4	0	10	1	10	1	12	1	7	1	8	2	16	1	51	15
AD-1700180.1	7	1	11	1	16	2	16	1	18	2	14	2	33	1	64	12
AD-1700312.1	5	1	9	1	14	2	12	2	10	3	11	0	27	5	71	10
AD-1699985.1	8	1	20	4	22	4	26	5	31	9	41	9	62	5	105	9
AD-1701011.1	9	1	19	1	23	3	24	3	26	4	31	4	53	3	88	11
AD-1700476.1	12	4	18	2	27	6	31	9	41	1	45	4	59	13	109	7
AD-1701022.1	6	1	10	4	14	2	14	1	15	2	13	2	29	4	69	5
AD-1700554.1	4	1	7	1	6	3	10	2	4	1	3	1	10	3	23	11
AD-1699951.1	6	1	10	2	17	4	13	6	13	4	13	6	26	3	48	5
AD-1700408.1	9	3	15	5	22	2	22	4	29	4	31	6	53	10	95	10
AD-1700487.1	6	2	11	3	14	3	13	5	20	6	27	6	37	11	51	12
AD-1700943.1	8	1	13	2	16	3	21	8	28	4	31	4	53	3	105	17
AD-1700736.1	12	1	17	3	24	4	28	2	56	11	55	7	71	7	103	20
AD-1700813.1	9	1	14	3	14	4	16	4	23	4	25	1	45	2	67	10
AD-1700968.1	6	2	10	1	12	3	8	3	10	3	19	3	35	11	41	29
AD-1700780.1	1	0	3	1	9	2	7	2	4	1	4	1	10	4	22	9
AD-1700324.1	8	2	9	2	10	1	12	4	18	1	20	4	33	6	44	11
AD-1700566.1	10	2	17	3	19	1	20	3	35	5	29	5	51	5	90	9
AD-1700354.1	7	1	11	2	16	2	16	1	9	2	12	3	28	4	49	8
AD-1700365.1	20	2	35	4	42	3	44	5	58	10	61	11	81	5	112	12
AD-1700553.1	2	0	5	1	6	1	6	2	3	0	5	2	8	3	30	11

[1208] 实例4. dsRNA双链体的体内筛选

[1209] (1) 单剂量研究 (3mg/kg)

[1210] 从上述体外研究中鉴定的所关注的双链体在体内进行评估。具体地,在给药前第14天,经由眶后递送,静脉内用编码人CIDEB的腺相关病毒8(AAV8)载体的 $2 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒来转导野生型小鼠(C57BL/6)。具体地,向小鼠施用AAV8,所述AAV8编码编码开放阅读框的人CIDEB mRNA的一部分和被称为NM\_001393338.1的人CIDEB mRNA的3'UTR,称为VCAV-07736-AAV8.HsCideb-FL-trd。

[1211] 在第0天,以三只小鼠为一组,皮下施用单次3mg/kg剂量的所关注的双链体或磷酸

盐缓冲盐水 (PBS)。表11提供了处理设计并且提供了所关注的的双链体。在给药后第7天,处死动物,并且收集肝脏样品并在液氮中快速冷冻。提取肝脏mRNA并通过RT-QPCR方法进行分析。

[1212] 对于所有样品,首先将人CIDEB Cq值相对于作为参考基因的Gapdh Cq值进行归一化,以计算每只动物的肝脏CIDEB mRNA水平。对于每组,将相对于来自个体处理动物的Gapdh的肝脏CIDEB mRNA水平相对于来自PBS组的相对CIDEB mRNA水平的组平均值(±标准偏差[SD])进行归一化。

[1213] 数据被表示为基线值的百分比,并且被表示为平均值加标准偏差。表12中列出的和图1所示的结果证明,测试的示例性双链体药剂有效降低了体内人CIDEB信使RNA的水平。

[1214] 表11. 体内单剂量研究的研究设计

测试组	测试材料	雄性数量	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	剂量浓度 (mg/mL)	途径/方案
G1	PBS	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G2	原初	3	3	10	0.3	N/A
G3	AD-1700554.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G4	AD-1700383.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G5	AD-1700374.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G6	AD-1700995.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G7	AD-1720294.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G8	AD-1720314.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G9	AD-1700556.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G10	AD-1700782.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G11	AD-1700376.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G12	AD-1700544.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G13	AD-1699964.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G14	AD-1700314.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G15	AD-1700148.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G16	AD-1700573.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G17	AD-1699971.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G18	AD-1700473.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G19	AD-1700369.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G20	AD-1699976.5	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G21	AD-1700555.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G22	AD-1720315.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G23	AD-1700821.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G24	AD-1699970.3	3	3	10	0.3	SC/单剂量

[1217] 表12. 体内单剂量研究的qPCR结果

组	小鼠#	双链体	#消息/小鼠				平均值/小鼠	组平均值	标准偏差/组
1	1	PBS	131.8	124.7	123.0	118.0	124.4	104.3	33.86
	2		123.0	122.1	125.6	123.0	123.4		
	3		65.9	67.3	63.7	64.1	65.2		
2	4	原初	65.9	69.2	64.1	59.8	64.7	79.3	20.60
	5								
	6		97.2	95.8	90.6	91.9	93.9		
3	7	AD-1700554.3	31.2	34.1	32.7	32.7	32.7	19.6	12.56
	8		19.2	18.2	18.8	18.2	18.6		
	9		8.0	7.8	7.6	7.1	7.6		
4	10	AD-1700383.3	69.2	65.9	65.9	63.2	66.0	66.5	1.71
	11		68.7	61.9	65.0	64.5	65.0		
	12		70.1	70.1	67.8	65.4	68.4		
5	13	AD-1700374.3	12.7	12.7	13.5	12.1	12.7	17.4	5.40
	14		16.0	15.7	15.9	17.2	16.2		
	15		23.8	23.0	22.8	23.6	23.3		
6	16	AD-1700995.3	26.9	30.5	26.8	28.9	28.3	29.0	4.39
	17		34.1	34.8	32.5	33.4	33.7		
	18		25.3	25.1	24.8	24.8	25.0		
7	19	AD-1720294.3						48.5	35.86
	20		14.4	16.1	13.3	14.5	14.6		
	21		37.8	40.0	36.8	39.5	38.5		
8	22	AD-1720314.3	26.9	30.5	27.1	27.5	28.0	35.6	12.70

[1218]

	23		47.2	53.2	51.0	49.6	50.2		
	24		27.1	29.9	29.9	26.9	28.5		
9	25	AD-1700556.3	14.2	16.1	16.6	16.5	15.9	17.5	3.58
	26		14.3	14.5	16.6	14.7	15.1		
	27		21.9	21.7	21.3	21.6	21.6		
10	28	AD-1700782.3	21.0	22.7	20.9	22.0	21.6	19.7	4.09
	29		15.0	15.4	15.1	14.7	15.0		
	30		23.1	22.3	22.2	22.3	22.5		
11	31	AD-1700376.3	14.5	14.1	14.4	14.5	14.4	15.7	8.40
	32		8.2	7.8	8.1	8.1	8.1		
	33		23.6	26.4	26.0	22.8	24.7		
12	34	AD-1700544.3	28.5	27.1	27.5	26.9	27.5	22.8	11.68
	35		31.2	32.0	31.6	30.5	31.3		
	36		9.2	10.1	9.7	9.0	9.5		
13	37	AD-1699964.3	12.1	12.4	12.2	12.3	12.3	11.0	1.61
	38		8.4	9.3	9.5	9.4	9.2		
	39		11.6	11.6	11.3	11.1	11.4		
14	40	AD-1700314.3	10.9	11.1	10.9	10.9	11.0	11.3	2.31
	41		13.9	14.0	13.7	13.6	13.8		
	42		9.5	9.5	9.1	8.9	9.2		
15	43	AD-1700148.3	46.0	46.3	47.6	47.9	46.9	44.1	6.55
	44		36.6	36.6	36.3	36.8	36.6		
	45		48.2	48.9	47.9	49.6	48.7		
16	46	AD-1700573.3	20.4	20.7	21.0	21.9	21.0	25.6	4.38
	47		29.7	30.5	29.9	28.9	29.8		
	48		25.5	26.4	25.7	26.0	25.9		
17	49	AD-1699971.3	43.2	44.7	40.8	41.4	42.5	29.3	16.43
	50		11.1	11.0	11.0	10.5	10.9		
	51		35.3	34.8	35.6	32.0	34.4		
18	52	AD-1700473.3	46.6	45.0	46.6	45.6	46.0	23.5	20.90
	53		19.5	20.1	20.1	20.6	20.1		
	54		4.6	4.5	4.6	4.6	4.6		
19	55	AD-1700369.3	13.9	13.2	13.3	13.2	13.4	14.2	0.75
	56		15.1	14.8	15.0	14.7	14.9		
	57		14.1	13.9	14.0	15.1	14.3		

[1219]

20	58	<b>AD-1699976.5</b>	16.0	15.5	14.4	15.2	15.3	<b>24.1</b>	14.83
	59		41.4	42.9	42.9	37.8	41.3		
	60		15.4	15.5	16.5	16.1	15.9		
21	61	<b>AD-1700555.3</b>	3.7	3.7	3.6	3.3	3.6	<b>9.1</b>	5.50
	62		16.1	15.7	13.0	13.5	14.6		
	63		10.2	9.1	8.8	8.7	9.2		
[1220] 22	64	<b>AD-1720315.3</b>	45.6	44.1	42.9	45.3	44.5	<b>64.9</b>	23.44
	65		90.0	91.3	91.3	89.4	90.5		
	66		57.4	61.1	59.8	60.6	59.7		
23	67	<b>AD-1700821.3</b>	13.3	13.8	13.9	13.6	13.6	<b>14.8</b>	2.18
	68		17.1	17.3	18.2	16.9	17.4		
	69		13.3	13.9	13.7	13.3	13.5		
24	70	<b>AD-1699970.3</b>	27.1	27.5	24.6	25.1	26.1	<b>19.0</b>	7.21
	71		12.9	11.4	11.8	10.6	11.7		
	72		19.1	19.5	18.5	19.6	19.2		

[1221] (2) 多剂量研究(0.75mg/kg和1.5mg/kg)

[1222] 从上述体外研究中鉴定的所关注的双链体在体内进行评估。具体地,在给药前第14天,经由眶后递送通过静脉内,用编码人CIDEB的腺相关病毒8(AAV8)载体的 $2 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒转导野生型小鼠(C57BL/6)。具体地,向小鼠施用AAV8,所述AAV8编码开放阅读框的人CIDEB mRNA的一部分和被称为NM\_001393338.1的人CIDEB mRNA的3'UTR,称为VCAV-07736-AAV8.HsCideb-FL-trd。

[1223] 在第0天,以三只小鼠为一组,皮下施用单次0.75或1.5mg/kg剂量的所关注的双链体或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。表13提供了研究设计并且提供了所关注的双链体。在给药后第10天,处死动物,并且收集肝脏样品并在液氮中快速冷冻。提取肝脏mRNA并通过RT-QPCR方法进行分析。

[1224] 对于所有样品,首先将人CIDEB Cq值相对于作为参考基因的Gapdh Cq值进行归一化,以计算每只动物的肝脏CIDEB mRNA水平。对于每组,将相对于来自个体处理动物的Gapdh的肝脏CIDEB mRNA水平相对于来自PBS组的相对CIDEB mRNA水平的组平均值( $\pm$ 标准偏差[SD])进行归一化。

[1225] 数据被表示为基线值的百分比,并且被表示为平均值加标准偏差。表14中列出的和图2中所示的结果证明,测试的示例性双链体药剂有效且剂量依赖性地降低了体内人CIDEB信使RNA的水平。

[1226] 表13. 体内多剂量研究的研究设计

[1227]

测试组	测试材料	雄性数量	剂量水平	剂量体积	剂量浓度	途径/ 方案
			(mg/kg)	(mL/kg)	(mg/mL)	
G1	PBS	3	3	10	0.3	SC/单剂量
G2	原初	3	3	10	0.3	N/A
G3	AD-1700555.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G4	AD-1700555.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G5	AD-1699964.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G6	AD-1699964.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G7	AD-1700314.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G8	AD-1700314.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G9	AD-1700369.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G10	AD-1700369.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G11	AD-1700821.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G12	AD-1700821.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G13	AD-1700376.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G14	AD-1700376.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G15	AD-1700374.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G16	AD-1700374.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G17	AD-1700556.3	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G18	AD-1700556.3	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量
G19	AD-1699976.5	3	1.5	10	0.15	SC/单剂量
G20	AD-1699976.5	3	0.75	10	0.075	SC/单剂量

[1228] 表14. 体内多剂量研究的qPCR结果

[1229]

组	小鼠#	双链体	#消息/小鼠				平均值/小鼠	组平均值	标准偏差/组
1	1	PBS	101.0	102.4	101.7	99.6	101.2	100.0	1.01
	2		103.1	101.0	97.5	96.9	99.6		
	3		100.3	101.0	97.5	98.2	99.3		
2	4	原初	68.5	71.9	66.2	70.9	69.4	99.7	69.67
	5		177.1	191.1	175.8	173.4	179.3		
	6		50.1	51.9	50.5	48.4	50.2		
3	7	AD-1700555.3	10.0	10.9	10.9	10.0	10.5	20.8	11.21

	8	<b>1.5mpk</b>	18.9	20.4	18.5	18.9	19.1		
	9		32.2	34.0	33.1	31.5	32.7		
4	10	<b>AD-1700555.3 0.75mpk</b>	43.7	46.8	45.5	42.8	44.7	<b>42.2</b>	2.16
	11		41.0	43.4	40.2	40.4	41.2		
	12		41.3	42.5	40.4	38.5	40.7		
5	13	<b>AD-1699964.3 1.5mpk</b>	37.7	39.3	37.0	36.7	37.7	<b>26.3</b>	16.14
	14								
	15		15.0	15.0	14.8	14.6	14.9		
6	16	<b>AD-1699964.3 0.75mpk</b>	67.6	67.1	64.8	67.1	66.6	<b>69.6</b>	13.85
	17		84.9	87.3	83.8	82.6	84.6		
	18		59.2	57.6	55.6	57.2	57.4		
7	19	<b>AD-1700314.3 1.5mpk</b>	22.1	22.1	21.8	21.8	22.0	<b>25.2</b>	0.66
	20		25.1	26.9	26.1	24.6	25.7		
	21		24.2	25.4	24.6	24.7	24.7		
8	22	<b>AD-1700314.3 0.75mpk</b>						<b>60.9</b>	7.08
	23		57.2	56.4	54.5	55.6	55.9		
	24		67.1	67.6	63.9	65.3	66.0		
9	25	<b>AD-1700369.3 1.5mpk</b>	30.2	30.4	30.0	30.0	30.2	<b>34.6</b>	8.85
	26		43.7	45.2	44.9	45.5	44.8		
	27		28.2	28.2	29.4	29.6	28.9		
10	28	<b>AD-1700369.3 0.75mpk</b>	47.8	49.1	50.8	50.5	49.6	<b>48.3</b>	38.49
	29		9.1	9.4	9.1	9.2	9.2		
	30		86.7	89.1	87.3	81.5	86.2		
11	31	<b>AD-1700821.3 1.5mpk</b>	37.0	37.5	37.2	37.7	37.4	<b>25.0</b>	21.40
	32		0.3	0.2	0.2	0.3	0.2		
	33		37.5	37.2	37.7	36.7	37.3		
12	34	<b>AD-1700821.3 0.75mpk</b>	51.9	54.5	52.3	52.6	52.8	<b>43.5</b>	16.48
	35		24.1	24.6	24.6	24.6	24.4		
	36		53.0	54.5	54.5	50.5	53.1		
13	37	<b>AD-1700376.3 1.5mpk</b>	29.6	30.9	28.8	28.4	29.4	<b>37.1</b>	6.74
	38		38.5	43.4	39.3	38.3	39.9		
	39		43.1	41.9	40.7	42.5	42.0		
14	40	<b>AD-1700376.3 0.75mpk</b>	79.8	80.9	79.8	80.9	80.3	<b>68.3</b>	23.43
	41		42.5	42.2	41.6	38.8	41.3		
	42		82.6	84.3	83.8	82.0	83.2		

[1230]

[1231]

15	43	AD-1700374.3 1.5mpk	22.0	22.9	22.6	22.8	22.6	32.2	12.26
	44		28.2	27.1	28.8	28.2	28.1		
	45		47.4	47.8	44.0	44.9	46.0		
16	46	AD-1700374.3 0.75mpk	72.9	76.5	75.5	76.5	75.4	56.7	25.04
	47		29.2	28.0	27.4	28.2	28.2		
	48		68.5	66.6	64.8	65.7	66.4		
17	49	AD-1700556.3 1.5mpk	63.0	64.8	58.0	60.9	61.7	29.6	30.64
	50		27.6	26.5	26.9	25.2	26.6		
	51		0.7	0.6	0.6	0.6	0.6		
18	52	AD-1700556.3 0.75mpk	63.9	64.4	65.3	62.2	63.9	89.3	22.06
	53		98.9	102.4	102.4	96.9	100.1		
	54		105.3	101.7	103.8	104.5	103.8		
19	55	AD-1699976.5 1.5mpk	35.7	36.0	37.7	38.3	36.9	35.3	4.49
	56		30.0	29.8	31.3	30.0	30.3		
	57		37.5	40.7	40.4	36.7	38.8		
20	58	AD-1699976.5 0.75mpk	62.2	61.3	61.7	59.6	61.2	72.1	18.75
	59		97.5	95.5	93.6	88.5	93.8		
	60		62.2	61.3	61.3	60.9	61.4		

[1232] CIDEb序列

[1233] SEQ ID NO:1

[1234] >NM\_001393338.1智人细胞死亡诱导DFFA样效应子b(CIDEb),转录物变体7,mRNA

[1235] CCCTTCCGGTGGAGCCAGCGCTGCGACCGCCTGCAGAAGGTTGACTGCGTGGTAGGGGGCCCA  
GAGCAAGCCGAAGGCAAGCACGATGGCGCTCACCAGCCGGCCACCCGCGCCCCGTGCCGCC  
GGAGCCCAGCGGGCGCCCCGAGCCGTGCCAGCGTCACGCTGTAGCAGCCGAGCATCAGCCC  
GAAAGGAAGCACGAAAGCGGTCAGAGTCTCCAGGCTCAGGTGGGCGGGCGGCGTGGACCGCGA  
CGGGTGGCACAGCTGGCATAACGCGTCCCTCCACAGGTGGCGGTAGACGGCGGGCCGGGACGGC  
GAGCAACAGGGCGGCCAGCCAGACCGCCAGCAGCAGGCGGCGGGCCAGGGCCGGGCTGCGCAG  
CCGAGGCGCCAGGAAGGGGCGGGTACTGCGAGGCGAGCGCTGCAGGCTGAGCAGGCCGCTGAG  
CAGCACGCTGGCGTACATGCTGAGCGCGCACACGTAAGTACACCGCCTTGCAGCCCGCCTGGCC  
CAGCGGCCAGGCCTGCCGGTCCAGGAAGGCCACAAAGAGCGGCGTGCAGCAGCAGCACCGCGCC  
GTCCGGCCAGCGCCAGGTGCAGCACAAGCGTGGCCGCCAGCGGTCGCCCCCGTGCAGGCCGCCA  
GCCCGCCAAGCTCCACACCACGAAGCCGTTGCCAGGAGCCAGCAGCGCCGCCAGCAGCAG  
GAAGGCTGTGCCTGTGGCCCGGAAGTCTTCCAGCTCAGCAGTGTCTCGTTCCTGGGGGACG  
GTAGCAGACCGACATCCTTCTGGGCCTACAGCCTGCCTCTTTTCTGCCTGGGAGTCTGACTT  
CCACGAGGACCCAGACCCACCTCAAACACAACCTCCTTCTTGGAAACCCAGATCCCCTGCTCCC  
AGTCAGTTGACCTGCCCACTCCTGGCCTCCTTCCAGAGCTCAGTGGACACAGAAAAAAGT  
GGGGAAGCTGGGGGACCCTACAAGGATCCTTGGCAGGAAAGCAGGGATTGTGTTTCATTTGAGG  
GTTTCACTGTGAGTGTGAGTCTCAGCTTCCATGCAACTGTCCATCACGGCTGCAACTGAAATC  
AGAGCTGGGACACAGCGCACCAGAAGCTAAAGTCTTGATGCCATCAAAGGACATCCCTGCCCC  
ATTCACATCTCTGTACGTCCACTAATCGGCAAAAGGAGAAAAGTGAAGAAAGATGACCTAAG  
TGTGACTGCAGCAGGAGCTCTGAAAATGAAGCCAGAGCAGTGCAGCCAGCCCCTCCTCCGAC

[1236] CAAGGAGGAAGGAAAGAGCAGATCCCAGGTTTGTAAACAGAAAACACCACTAAAGCCCCAGCAC  
 AGGAGAGAACCACCCAGCCCAGAAGTTCAGGGAAGGAACTCTCCGGTCCACCATGGAGTACC  
 TCTCAGCTCTGAACCCAGTGACTTACTCAGGTCAGTATCTAATATAAGCTCGGAGTTTGGAC  
 GGAGGGTCTGGACCTCAGCTCCACCACCCAGCGACCTTTCGGTGTCTGTGATCACAAGCGGA  
 CCATCCGGAAAGGCCTGACAGCTGCCACCCGCCAGGAGCTGCTAGCCAAAGCATTGGAGACCC  
 TACTGCTGAATGGAGTGCTAACCCCTGGTGTAGAGGAGGATGGAAGTGCAGTGGACAGTGAGG  
 ACTTCTTCCAGCTGCTGGAGGATGACACGTGCCTGATGGTGTTCAGTCTGGTTCAGAGCTGGA  
 GCCCTACAAGGAGTGGAGTGCTGTCATATGGCCTGGGACGGGAGAGGCCCAAGCACAGCAAGG  
 ACATCGCCCGATTACCTTTGACGTGTACAAGCAAACCCCTCGAGACCTCTTTGGCAGCCTGA  
 ATGTCAAAGCCACATTTCTACGGGCTCTACTCTATGAGTTGTGACTTTCAAGGACTTGGCCCAA  
 AGAAAGTACTCAGGGAGCTCCTTCGTTGGACCTCCACACTGCTGCAAGGCCTGGGCCATATGT  
 TGCTGGGAATTTCTCCACCCTTCGTTCATGCAGTGGAGGGGGCTGAGCAGTGGCAGCAGAAGG  
 GCCGCTCCATTCTACTAAGGGGCTCTGAGCTTCTGCCCCAGAATCATTTCCAACCGACCCA  
 CTGCAAAGACTATGACAGCATCAAATTTAGGACCTGCAGACAGTACAGGCTAGATAACCCAC  
 CCAATTTCCCCACTGTCCTCTGATCCCCTCGTGACAGAACCCTTCAGCATAACGCCTCACATC  
 CCAAGTCTATAACCTTACCTGAAGAATGCTGTTCTTTCTAGCCACCTTTCTGGCCTCCCCT  
 TGCCCTGAAAGGCCAAGATCAAGATGTCCCCCAGGCATCTTGATCCCAGCCTGACTGCTGCTA  
 CATCTAATCCCCTACCAATGCCTCCTGTCCCTAAACTCCCCAGCATACTGATGACAGCCCTCT  
 CTGACTTTACCTTGAATCTGTCTTCATACCCTTCCCCTCAAACAAACAAATTTCCAAT  
 AAAAAATATCAAATATTTACCACTAA

[1237] SEQ ID NO:2

[1238] >SEQ ID NO:1的反向补体

TTAGTGGTAAATATTTGATATTTTATTGGAAATGTTTTTGTAGTTTGGAGGGAAGGGTATG  
 AAGACAGATCTCAAGGTAAAGTCAAGAGGGCTGTTCATCAGTATGCTGGGGAGTTTAGGGACA  
 GGAGGCATTGGTAGGGGATTAGATGTAGCAGCAGTCAAGGCTGGGATCAAGATGCCTGGGGGAC  
 ATCTTGATCTTGGCCTTTAGGGCAAGTGGGAGGCCAGAAAGGTGGCTAGGAAAGAACAGCAT  
 TCTTCAGGTAAGGGTATAGACTTGGGATGTGAGGCGTTATGCTGAAAGGTCTGTACAGGGG  
 GATCAGAGGACAGTGGGGAAATTTGGGTGGGTATCTAGCCTGTAAGTGTCTGCAGGTCTGAAA  
 TTTGATGCTGTATAGTCTTTGCAGTGGGTGGGTGGAATGATTTCTGGGGGCAGAAGCTCAGA  
 GCCCCTTAGTAGGAATGGAGGCGGCCCTTCTGCTGCCACTGCTCAGCCCCCTCCACTGCATGA  
 CGAAGGGTGGAGGAAATTTCCAGCAACATATGGCCAGGCCTTGCAAGCAGTGTGGAGGTCCAA  
 CGAAGGAGCTCCCTGAGTACTTTCTTTGGGCCAAGTCTTGAAAGTCACAACTCATAGAGTAG  
 AGCCCGTAGAATGTGGCTTTGACATTCAGGCTGCCAAAGAGGTCTCGAGGGTTTTGCTTGTAC  
 ACGTCAAAGGTGAATCGGGCGATGTCCTTGCTGTGCTTGGGCCTCTCCCGTCCCAGGCCATAT  
 GACAGCACTCCACTCCTTGTAGGGCTCCAGCTCTGACCAGACTGCAACACCATCAGGCACGTG  
 TCATCCTCCAGCAGCTGGAAGAAGTCCCTCACTGTCCACTGCAGTTCATCCTCCTCTAGCACC  
 AGGGTTAGCACTCCATTCAGCAGTAGGGTCTCCAATGCTTTGGCTAGCAGCTCCTGGCGGGTG  
 GCAGCTGTGAGGCTTTCCGGATGGTCCGCTTGTGATCACAGACACGGAAAGGTGCTGGGGT  
 GGTGGAGCTGAGGTCCAGACCCCTCCGTCCAAACTCCGAGCTTATATTAGATACTGACCTGAGT  
 AAGTCACTGGGGTTCAGAGCTGAGAGGTAATCCATGGTGGACCGGAGAGTTCCTTCCCTGGAA  
 CTTCTGGGCTGGGTGGTTCTCTCCTGTGCTGGGGCTTTAGTGGTGTCTTTCTGTTACAAACCTG  
 GGATCTGCTCTTTCCCTCCTTGGTCCGAGGAGGGGCTGGCTCACTGCTCTGGCTTCATTT  
 TCCAGAGCTGCCTGCTGCAGTCAACTTAGGTCATCTTCTCTCACTTTTCTCCTTTTGCCTGAT  
 TAGTGGACGTGACAGAGATGTGAATGGGGCAGGGATGTCTTTGATGGCATCAAGACTTAGC  
 TTCTGGTGCCTGTGTCCCAGCTCTGATTTTCAAGTGCAGCCGTGATGGACAGTTGCATGGAAG  
 CTGAGACTCTCACTGACAGTGAACCCCTCAAATGAACACAATCCCTGCTTTCCTGCCAAGGAT  
 CCTTGTAGGGTCCCCAGCTTCCCCACTTTTTTTCTGTGTCCACTGAGCTCTGGGAAGGAGGC  
 CAGGAGTGGGGCAGGTCAACTGACTGGGAGCAGGGGATCTGGGTTCCAAGAAGGAGTTGTGTT  
 TGAGGTGGGGTCTGGGTCTCGTGGAAAGTCAAGACTCCCAGGCAGAAAAGAGGCAGGCTGTAG  
 GCCCAGAAGGATGTGGTCTGCTACCCTCCCCAGGGAACGAGACACTGCTGAGCTGGAAGAC

[1240]

TTCGCGGGCCACAGGCACAGCCTTCCTGCTGCTGGCGGGCTGCTGGGGCTGCCTGGCAACGG  
CTTCGTGGTGTGGAGCTTGGCGGGCTGGCGGCCTGCACGGGGGCGACCGCTGGCGGCCACGCT  
TGTGCTGCACCTGGCGCTGGCCGACGGCGCGGTGCTGCTGCTCACGCCGCTCTTTGTGGCCTT  
CCTGACCCGGCAGGCCTGGCCGCTGGGCCAGGCGGGCTGCAAGGCGGTGTACTACGTGTGCGC  
GCTCAGCATGTACGCCAGCGTGCTGCTCACCGGCCTGCTCAGCCTGCAGCGCTGCCTCGCAGT  
CACCCGCCCTTCCTGGCGCCTCGGCTGCGCAGCCCGGCCCTGGCCCGCCGCTGCTGCTGGC  
GGTCTGGCTGGCCGCCCTGTTGCTCGCCGTCCCGGCCGCGGTCTACCGCCACCTGTGGAGGA  
CCGCGTATGCCAGCTGTGCCACCCGTCGCCGGTCCACGCCCGCCACCTGAGCCTGGAGAC  
TCTGACCGCTTTCGTGCTTCCTTTCGGGCTGATGCTCGGCTGCTACAGCGTGACGCTGGCAG  
GCTGCGGGGCGCCCGCTGGGGCTCCGGGCGGCACGGGGCGCGGTGGGCCGGCTGGTGGCGC  
CATCGTGCTTGCTTCGGCTTGTCTGGGCCCTACCACGCAGTCAACCTTCTGCAGGCGGT  
CGCAGCGCTGGCTCCACCGGAAGG

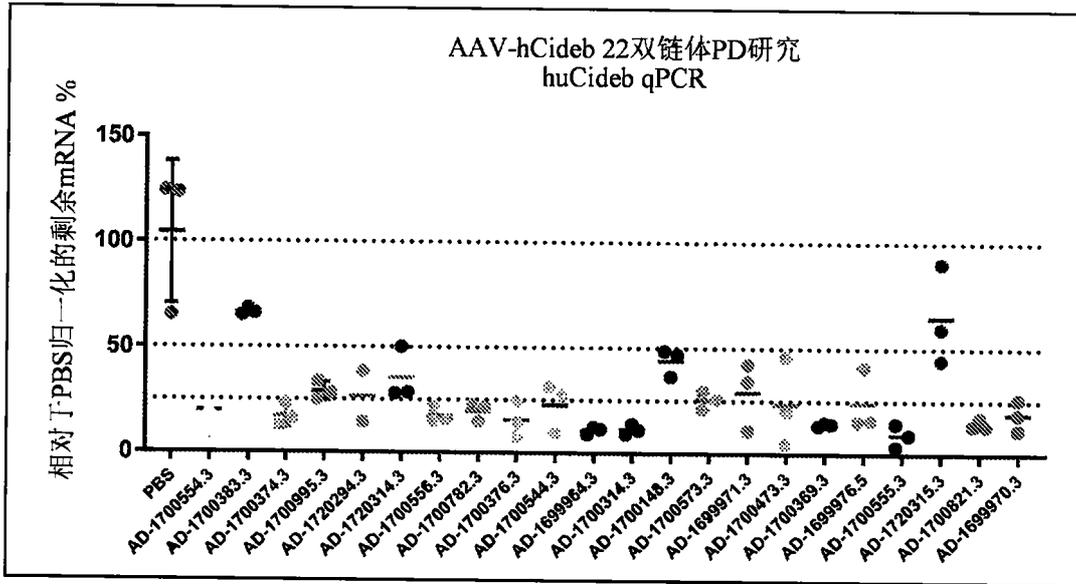


图1

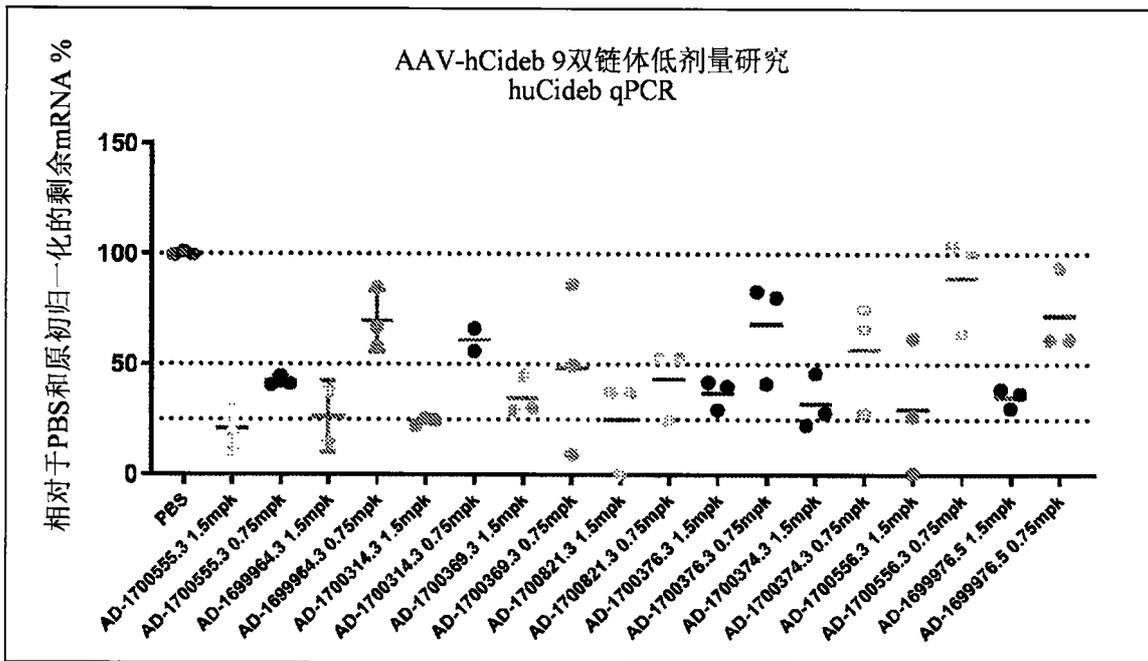


图2