



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106592 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580071209.X

(22)申请日 2015.12.28

(30)优先权数据

2014-266198 2014.12.26 JP

62/184,209 2015.06.24 US

62/266,668 2015.12.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/067557 2015.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/106402 EN 2016.06.30

(71)申请人 日东电工株式会社

地址 日本大阪府

(72)发明人 应文斌 味吞宪二郎

J·哈波尔斯 西拿希玛 曾国贤
高桥博一

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 杨宏军 牛蔚然

(51)Int.Cl.

A61K 31/713(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页
序列表44页

(54)发明名称

用于P21基因调节的RNA干扰剂

(57)摘要

本发明提供了使用RNA干扰来调节人p21的表达的化合物、组合物和方法。RNA干扰分子可用于预防或治疗诸如恶性肿瘤的疾病的方法。提供了具有一个或多个经修饰或经化学修饰的核苷酸的一系列siRNA结构。有利的结构包括具有位于种子区域的2'-脱氧核苷酸以及其它核苷酸修饰的siRNA。

1. 一种核酸分子,其用于抑制p21的表达,所述核酸分子包含有义链和反义链,其中所述的链形成双链体区域,并且其中所述反义链是SEQ ID NO:57,所述有义链是SEQ ID NO:71。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述双链体区域中的一个或多个所述核苷酸经修饰或经化学修饰。

3. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述经修饰或经化学修饰的核苷酸是2'-脱氧核苷酸、2'-O-烷基取代的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸、锁定的核苷酸或其任意组合。

4. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述反义链具有多个位置处的脱氧核苷酸,所述多个位置是以下之一:

位于所述反义链的5'端的第4、6和8位中的每一个;

位于所述反义链的5'端的第3、5和7位中的每一个;

位于所述反义链的5'端的第1、3、5和7位中的每一个;

位于所述反义链的5'端的第3至8位中的每一个;或者

位于所述反义链的5'端的第5至8位中的每一个。

5. 根据权利要求4所述的核酸分子,其中所述分子在所述双链体区域中具有一个或多个2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸。

6. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述反义链是SEQ ID NO:59,所述有义链是SEQ ID NO:73。

7. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述反义链是SEQ ID NO:58,所述有义链是SEQ ID NO:72。

8. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述反义链是SEQ ID NO:60,所述有义链是SEQ ID NO:74。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸分子,其中所述分子以小于50pM的IC₅₀抑制p21mRNA的表达。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸分子,其中单次施用所述分子在体内抑制至少25%的p21mRNA表达水平。

11. 一种药物组合物,其包含权利要求1至8中任一项所述的核酸分子和可药用运载体。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述运载体包括脂质分子或脂质体。

13. 一种载体或细胞,其包含权利要求1至8中任一项所述的核酸分子。

14. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸分子用于遏制细胞中p21表达的用途。

15. 一种用于抑制p21表达的核酸分子,其包含有义链和反义链,其中所述的链形成双链体区域,并且其中所述反义链是SEQ ID NO:28,所述有义链是SEQ ID NO:56。

16. 根据权利要求15所述的核酸分子,其中所述双链体区域中的一个或多个所述核苷酸经修饰或经化学修饰。

17. 根据权利要求16所述的核酸分子,其中所述经修饰或经化学修饰的核苷酸是2'-脱氧核苷酸、2'-O-烷基取代的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸、锁定核苷酸或其任意组合。

18. 根据权利要求16所述的核酸分子,其中所述反义链在多个位置具有脱氧核苷酸,所

述多个位置是以下之一：

位于所述反义链的5'端的第4、6和8位中的每一个；

位于所述反义链的5'端的第3、5和7位中的每一个；

位于所述反义链的5'端的第1、3、5和7位中的每一个；

位于所述反义链的5'端的第3至8位中的每一个；或者

位于所述反义链的5'端的第5至8位中的每一个。

19. 根据权利要求18所述的核酸分子，其中所述分子在所述双链体区域中具有一个或更多个2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸。

20. 根据权利要求15至19中任一项所述的核酸分子，其中所述分子以小于100pM的IC₅₀抑制p21mRNA的表达。

21. 根据权利要求15至19中任一项所述的核酸分子，其中单次施用所述分子在体内抑制至少25%的p21mRNA表达水平。

22. 一种药物组合物，其包含权利要求15至19中任一项所述的核酸分子和可药用运载体。

23. 根据权利要求22所述的药物组合物，其中所述运载体是脂质分子或脂质体。

24. 一种载体或细胞，其包含权利要求15至19中任一项所述的核酸分子。

25. 根据权利要求15至19中任一项所述的核酸分子用于抑制细胞中p21的表达的用途。

用于P21基因调节的RNA干扰剂

技术领域

[0001] 本发明涉及由基于核酸的分子构成的生物药物和治疗剂领域。更特别地,本发明涉及利用RNA干扰(RNAi)来调节人p21的表达的化合物和组合物。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包括于2015年12月23日创建的命名为ND5123591W0_SL.txt的作为ASCII文件以电子方式提交的序列表,其大小为31,127字节,该序列表通过引用整体并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] p21是细胞周期调节蛋白,其由CDKN1A基因编码,并且属于CIP/KIP家族。该蛋白具有通过结合复合物而对细胞周期蛋白CDK复合物的作用加以抑制、由此在G1期和G2/M期抑制细胞周期进展的功能。具体来说,p21基因会被肿瘤抑制基因之一p53激活。据报道,由于DNA损伤等激活p53后,p53激活p21,使得细胞周期停滞在G1期和G2/M期。

[0006] p21在多种人类癌症中过表达,包括前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌和鳞状细胞癌,并且在许多情况下,p21上调与肿瘤级别、侵袭性和攻击性正相关。参见例如Chang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,第97卷,No.8,第4291-96页。另据报道,p21的上调与许多形式的癌症(包括脑癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌和食道细胞癌)的致癌性和不良预后相关。参见例如Winters等,Breast Cancer Research,2003,第5卷,No.6,第R242-R249页。此外,疾病可以是年龄相关疾病,包括动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、淀粉样变性和关节炎。参见例如Chang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000,第97卷,No.8,第4291-96页。

[0007] 迫切需要用于调节与癌症相关的基因的表达的组合物和方法。用于抑制p21表达的治疗剂将要求高效的siRNA序列和结构。

[0008] 人们需要用于调节p21表达的siRNA序列、化合物和结构,其用于治疗疾病,例如恶性肿瘤。

发明内容

[0009] 本发明涉及使用RNA干扰来调节人p21表达的化合物、组合物和方法。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了用于对p21进行RNA干扰基因沉默的分子。

[0011] 在另一些实施方案中,本发明的结构、分子和组合物可用于预防或治疗与p21相关的疾病或改善与p21相关的病症或障碍(包括恶性肿瘤)的症状的方法。

[0012] 本发明的实施方案包括以下内容:

[0013] 一种核酸分子,其用于抑制p21的表达,所述核酸分子包含有义链和反义链,其中所述的链形成双链体区域。所述核酸分子可具有在所述双链体区域中经修饰或经化学修饰的一个或更多个所述核苷酸。

[0014] 在一些实施方案中,所述核酸分子可具有经修饰或经化学修饰的核苷酸,所述经修饰或经化学修饰的核苷酸是2'-脱氧核苷酸、2'-O-烷基取代的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸、锁定的核苷酸或其任意组合。

[0015] 更特别地,所述核酸siRNA分子可具有如下反义链,其中所述反义链具有多个位置

处的脱氧核苷酸,所述多个位置是以下之一:

[0016] 位于所述反义链的5'端的第4、6和8位中的每一个;

[0017] 位于所述反义链的5'端的第3、5和7位中的每一个;

[0018] 位于所述反义链的5'端的第1、3、5和7位中的每一个;

[0019] 位于所述反义链的5'端的第3至8位中的每一个;或者

[0020] 位于所述反义链的5'端的第5至8位中的每一个。

[0021] 在某些实施方案中,所述核酸siRNA分子可在所述双链体区域中具有一个或更多个2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸。

[0022] 本发明还提供了可以以小于50pM的IC₅₀抑制p21 mRNA的表达的核酸分子。

[0023] 在某些实施方案中,所述核酸siRNA分子可在单次施用所述分子之后在体内抑制至少25%的p21 mRNA表达水平。

[0024] 本发明的实施方案还提供了药物组合物,所述药物组合物包含所述核酸分子和可药用载体。在一些实施方案中,所述载体可以是脂质分子或脂质体。本发明还提供了包含任意所述核酸siRNA分子的载体或细胞。

[0025] 本发明还涉及通过向有需要的受试者施用含任意所述核酸siRNA分子的组合物来治疗疾病的方法。例如,所述疾病可以是恶性肿瘤、癌症、由表达突变的KRAS的细胞引起的癌症、肉瘤或癌等。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明涉及用于调节p21表达的基于核酸的治疗剂的化合物、组合物和方法。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供了在RNA干扰中有活性的分子,以及能沉默p21表达的结构和组合物。

[0029] 本公开的结构和组合物可用于预防或治疗各种疾病例如恶性肿瘤。

[0030] 在另一些实施方案中,本发明提供了用于递送和摄取本发明的一种或更多种治疗性RNAi分子的组合物及其使用方法。本发明的基于RNA的组合物可用于预防或治疗恶性肿瘤例如癌症的方法。

[0031] 本发明的治疗性组合物包括在RNA干扰中有活性的核酸分子。治疗性核酸分子可以靶向用于基因沉默的CDKN1A (p21)。

[0032] 在各种实施方案中,本发明提供了可以作为小干扰RNA (siRNA) 起作用并且可以调节或沉默p21表达的一系列分子。

[0033] 本发明的siRNA可用于预防或治疗恶性肿瘤。

[0034] 本发明的实施方案还提供了用于将本发明的siRNA递送至需要预防或治疗恶性肿瘤的受试者的介质、制剂或脂质纳米颗粒制剂。本发明还涉及向哺乳动物施用siRNA作为治疗剂的方法。

[0035] 通过向有需要的受试者施用化合物或组合物,本发明的治疗性分子和组合物可用于针对预防或治疗p21相关疾病的RNA干扰。

[0036] 本发明的方法可以利用本发明化合物来预防或治疗恶性肿瘤。恶性肿瘤可以呈现为各种疾病,例如高度表达p21的癌症、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西氏肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、癌、脑肿瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食管癌、胃癌、十二指肠癌、阑尾癌、结肠直肠癌、直肠

癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肛门癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、卵巢癌、皮肤癌、白血病、恶性淋巴瘤、上皮性恶性肿瘤和非上皮性恶性肿瘤。

[0037] 在某些实施方案中,本发明的治疗性分子的组合可用于沉默或抑制p21基因表达。

[0038] 本发明提供了一系列RNAi分子,其中每个分子具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;分子的每条链长度为15至30个核苷酸;反义链的15至30个核苷酸的连续区域与编码p21的mRNA的序列互补;并且所述有义链的至少一部分与所述反义链的至少一部分互补,并且所述分子具有长度为15至30个核苷酸的双链体区域。

[0039] 本发明的RNAi分子可具有与编码p21的mRNA序列互补的反义链的15至30个核苷酸的连续区域,所述连续区域位于分子的双链体区域。

[0040] 在一些实施方案中,RNAi分子可具有与编码p21的mRNA的序列互补的反义链的15至30个核苷酸的连续区域。

[0041] 本发明的一些实施方案可进一步提供用于在有需要的哺乳动物中预防、治疗或改善恶性肿瘤的一种或更多种症状、或降低发生恶性肿瘤的风险、或延缓恶性肿瘤的发作的方法。

[0042] P21和RNAi分子

[0043] p21存在于包括人在内的各种动物中。人CDKN1A (p21) 的序列信息可见于:NM_000389.4、NM_078467.2、NM_001291549.1、NM_001220778.1、NM_001220777.1 (NP_001207707.1、NP_001278478.1、NP_001207706.1、NP_510867.1、NP_000380.1)。

[0044] 靶标人p21 mRNA公开于GenBank登记号NM_000389.4 (CDKN1A),并且长度为2175个碱基对。

[0045] 本领域普通技术人员将理解,已被报道的序列可能因时间而有所变化,因此,相应地,本文所述核酸分子中需要进行的任何变化也涵盖在本发明内。

[0046] 本发明的实施方案可提供使用小核酸分子进行p21表达的基因沉默的组合物和方法。核酸分子的实例包括在RNA干扰(RNAi分子)、短干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)和短发夹RNA(shRNA)分子以及DNA指导的RNA(ddRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)和重复相关siRNA(rasiRNA)中有活性的分子。这样的分子能够介导针对p21基因表达的RNA干扰。

[0047] 本文公开的组合物和方法还可用于治疗受试者中的各种恶性肿瘤。

[0048] 本发明的核酸分子和方法可用于下调编码p21的基因的表达。

[0049] 本发明的组合物和方法可以包括一个或多个核酸分子,其可以独立地或组合地对p21蛋白和/或编码p21蛋白的基因、编码与p21相关的疾病、病症或障碍(例如恶性肿瘤)的维持和/或发生相关的p21的基因和/或蛋白质的表达加以调节或调控。

[0050] 参考p21的示例性序列描述本发明的组合物和方法。本领域普通技术人员将理解,本发明的各个方面和实施方案涉及任何相关的p21基因、序列或变体,例如同源基因和转录变体,以及多态性,包括与任何p21基因相关的单核苷酸多态性(SNP)。

[0051] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法可提供下调p21基因(例如,人CDKN1A)表达的双链短干扰核酸(siRNA)分子。

[0052] 本发明的RNAi分子可以靶向p21和任何同源序列,例如使用互补序列或通过并入非典型(canonical)碱基对例如错配和/或摆动(wobble)碱基对(其可提供额外的靶序列)。

[0053] 在鉴定错配的情况下,可以使用非典型碱基对(例如,错配和/或摆动碱基)来产生

靶向多于一个基因序列的核酸分子。

[0054] 例如,非典型碱基对(例如UU和CC碱基对)可用于产生能够靶向共享序列同源性的不同p21靶标的序列的核酸分子。因此,RNAi分子可以靶向同源基因之间保守的核苷酸序列,单个RNAi分子可用于抑制多于一个基因的表达。

[0055] 在一些方面,本发明的组合物和方法包括对p21 mRNA有活性的RNAi分子,其中RNAi分子包括与编码p21序列的任何mRNA互补的序列。

[0056] 在一些实施方案中,本公开的RNAi分子可具有针对p21RNA的活性,其中RNAi分子包括与具有变体p21编码序列的RNA互补的序列,例如本领域已知的与恶性肿瘤相关的突变体p21基因。

[0057] 在另一些实施方案中,本发明的RNAi分子可包括可与p21基因的核苷酸序列相互作用并介导p21基因表达沉默的核苷酸序列。

[0058] 用于抑制p21表达的核酸分子可具有有义链和反义链,其中所述链形成双链体区域。核酸分子可以在双链体区域中具有一个或多个核苷酸,所述一个或多个核苷酸经修饰或经化学修饰,包括本领域已知的这样的修饰。siRNA的悬挂中的任何核苷酸也可以是经修饰或经化学修饰的。

[0059] 在一些实施方案中,优选的经修饰或经化学修饰的核苷酸是2'-脱氧核苷酸。在另一些实施方案中,经修饰或经化学修饰的核苷酸可包括2'-O-烷基取代的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸、锁定的核苷酸(locked nucleotide)或其任意组合。

[0060] 在某些实施方案中,优选的结构可以具有在多个位置含有脱氧核苷酸的反义链,所述多个位置是以下之一:位于所述反义链的5'端的第4、6和8位中的每一个;位于所述反义链的5'端的第3、5和7位中的每一个;位于所述反义链的5'端的第1、3、5和7位中的每一个;位于所述反义链的5'端的第3至8位中的每一个;或者位于所述反义链的5'端的第5至8位中的每一个。这些结构中的任何一个均可以与双链区域中的一个或多个2'-脱氧-2'-氟取代的核苷酸组合。

[0061] 本发明的核酸分子可以抑制p21 mRNA的表达,其有利的IC₅₀小于约200pM。此外,单次施用后,核酸分子可以在体内抑制至少25%的p21 mRNA表达水平。

[0062] 本发明涵盖药物组合物,其可以含有与可药用运载体组合的如本文所述的一种或更多种siRNA。可以使用任何合适的运载体,包括本领域已知的运载体,以及脂质分子、纳米颗粒或脂质体,其均可以包封siRNA分子。

[0063] 本发明公开了用于治疗可能与p21表达相关的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用含有一种或更多种siRNA的组合物。待治疗的疾病可以包括恶性肿瘤、癌症、由表达突变的KRAS的细胞引起的癌症、肉瘤和癌等。

[0064] 靶向p21 mRNA的本发明的RNAi分子的实例示于表1中。

[0065] 表1:针对p21的RNAi分子序列

[0066]

Ref Pos	SEQ ID NO	有义链 (5'→3') SEQ ID NOS:1 至 28	SEQ ID NO	反义链 (5'→3') SEQ ID NOS:29 至 56
2085	1	CUUAGUGACUUUACUUGUAmUmU	29	UACAAGUAAAGUCACUAAGmUmU
500	2	CAGACCAGCAUGACAGAUUmUmU	30	AAUCUGUCAUGCUGGUCUGmUmU
540	3	UGAUCUUCUCCAAGAGGAAmUmU	31	UUCCUCUUGGAGAAGAJCAmUmU
1706	4	GUUCAUUGCACUUUGAUUAmUmU	32	UAAUCAAGUGCAAUAGAACmUmU
1709	5	CAUUGCACUUUGAUUAGCAmUmU	33	UGCUAUCAAAGUGCAAUGmUmU
210	6	AGCGAUGGAACUUCGACUUmUmU	34	AAGUCGAAGUCCAUCGCUmUmU
211	7	GCGAUGGAACUUCGACUUmUmU	35	AAAGUCGAAGUCCAUCGCmUmU
1473	8	GGGAAGGGACACACAAGAAmUmU	36	UUCUUGUGUGUCCCUJCCmUmU
1507	9	UCUACCUCAGGCAGCUCAAmUmU	37	UUGAGCUGCCUGAGGUAGAmUmU
2067	10	GGUGCUCAAUAAAUGAUUCmUmU	38	GAAUCAUUUAUUGAGCACcmUmU
1063	11	CAUCAUCAAACUUUGGAmUmU	39	UCCAAAGUUUUUGAUGAUGmUmU
1735	12	AAGGAGUCAGACAUUUUAAmUmU	40	UUAAAUGUCUGACUCCUUmUmU
783	13	GUGCUGGGCAUUUUUAUUUmUmU	41	AAAUAAAAAUGCCAGCACmUmU

[0067]

Ref Pos	SEQ ID NO	有义链 (5'→3') SEQ ID NOS:1 至 28	SEQ ID NO	反义链 (5'→3') SEQ ID NOS:29 至 56
869	14	GCCGGCUUCAUGCCAGCUAmUmU	42	UAGCUGGCAUGAAGCCGGCmUmU
1060	15	GGGCAUCAUCAAACUUUmUmU	43	AAAGUUUUUGAUGAUGCCcmUmU
1492	16	GAAGGGCACCCUAGUUCUAmUmU	44	UAGAACUAGGGUGCCCJUCmUmU
1704	17	CAGUUCAUUGCACUUUGAUmUmU	45	AUCAAGUGCAAUGAACUGmUmU
1733	18	ACAAGGAGUCAGACAUUUUmUmU	46	AAAUGUCUGACUCCUJGUUmUmU
1847	19	UGGAGGCACUGAAGUGCUUmUmU	47	AAGCACUUCAGUGCCUCCAmUmU
2000	20	GCAGGGACCACACCUGUAmUmU	48	UACAGGGUGUGGUCCCJGCmUmU
2014	21	CUGUACUGUUCUGUGUCUUmUmU	49	AAGACACAGAACAGUACAGmUmU
677	22	UUAAACACCUCUCAUGUAmUmU	50	UACAUGAGGAGGUGUUJAAmUmU
475	23	AGACUCUCAGGGUCGAAAAmUmU	51	UUUUCGACCCUGAGAGJCUmUmU
508	24	CAUGACAGAUUUCUACCACmUmU	52	GUGGUAGAAAUCUGUCAUGmUmU
514	25	AGAUUUCUACCACUCCAAAmUmU	53	UUUGGAGUGGUAGAAAJCmUmU
549	26	CCAAGAGGAAGCCCUAAUCmUmU	54	GAUUAGGGCUUCCUCUJGmUmU
382	27	GACAGCAGAGGAAGACCAUmUmU	55	AUGGUCUCCUCUGCUGUCmUmU
2042	28	CUCCCACAAUGCUGAAUAUmUmU	56	AUAUUCAGCAUUGUGGGAGmUmU

[0068] 表1备注:大写的A、G、C和U分别表示ribo-A、ribo-G、ribo-C和ribo-U。小写字母a、g、c、t分别表示2'-脱氧-A、2'-脱氧-G、2'-脱氧-C和胸苷。mU是2'-甲氧基-U。

[0069] 本发明靶向p21 mRNA的RNAi分子的实例示于表2中。

[0070] 表2:针对p21的RNAi分子序列

[0071]

Ref Pos	SEQ ID NO	有义链 (5'→3') SEQ ID NOS:57 至 70	SEQ ID NO	反义链 (5'→3') SEQ ID NOS:71 至 84
1735'	57	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> NN	71	UUAAA <u>AUGUCUGACUCCU</u> UNN
1	58	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	72	UU <u>AaAaUgUCUGACUCCU</u> UUU
2	59	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	73	UU <u>AaAaUgUCUGACUCCU</u> UUU
3	60	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	74	UU <u>AaAaUgUCUGACUCCU</u> UUU
4	61	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	75	UU <u>AaAaUgUCUGACUCCU</u> UUU
5	62	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	76	UU <u>aaaauGUCUGACUCCU</u> UUU
6	63	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	77	UU <u>AaauGUCUGACUCCU</u> UUU
7	64	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	78	u <u>UaAaAuGUCUGACUCCU</u> UUU
8	65	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	79	UU <u>aAaAuGUCUGACUCCU</u> UUU
9	66	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	80	UU <u>AaAaUgUCUGACUCCU</u> UUU
10	67	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	81	UUAAA <u>AUGUCUGACUCCU</u> UUU
11	68	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	82	UUAAA <u>AUGUCUGACUCCU</u> UUU
12	69	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	83	UUAAA <u>AUGUCUGACUCCU</u> UUU
13	70	AAGGAGUCAGACA <u>UUUUAA</u> U	84	UUAAA <u>AUGUCUGACUCCU</u> UUU

[0072] 表2备注:大写的A、G、C和U分别表示ribo-A、ribo-G、ribo-C和ribo-U。小写字母a、g、c、t分别表示2'-脱氧-A、2'-脱氧-G、2'-脱氧-C和脱氧胸苷(dT=T=t)。下划线是指2'-OMe取代的,例如U.N是A、C、G、U、U、a、c、g、u、t或经修饰、反向的或经化学修饰的核苷酸。

[0073] 在一些实施方案中,本发明提供了一系列核酸分子,其中a)该分子具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;b)分子的每条链长度为15至30个核苷酸;c)反义链的15至30个核苷酸的连续区域与编码p21的mRNA序列互补;和d)有义链的至少一部分与反义链的至少一部分互补,并且该分子具有长度为15至30个核苷酸的双链体区域。

[0074] 在一些实施方案中,核酸分子可具有与编码p21的mRNA的序列互补并且位于分子的双链体区域中的、反义链的15至30个核苷酸的连续区域。

[0075] 在另一些实施方案中,核酸分子可具有与编码p21的mRNA的序列互补的、反义链的15至30个核苷酸的连续区域。

[0076] 在另一些方面,本发明的核酸分子可以使分子的每条链的长度为18至22个核苷酸。核酸分子可具有长度为19个核苷酸的双链体区域。

[0077] 在某些实施方案中,核酸分子可具有以单链连接并形成在一端通过环连接的双链体区域的多核苷酸有义链和多核苷酸反义链。

[0078] 本发明的核酸分子可具有平末端,并且可具有一个或多个3'悬挂。

[0079] 本发明的核酸分子可以是有基因沉默活性的RNAi分子,例如有基因沉默活性的dsRNA、siRNA、微RNA或有基因沉默活性的shRNA以及DNA指导的RNA(ddRNA)、Pwi相互作用RNA(piRNA)和重复相关的siRNA(rasiRNA)。

[0080] 本发明提供了具有抑制p21表达的活性的一系列核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子可具有小于100pM的针对p21敲低的IC₅₀。

[0081] 在另一些实施方案中,所述核酸分子可具有小于50pM的针对p21敲低的IC₅₀。

[0082] 本发明还涵盖含有一种或更多种本发明的核酸分子和可药用运载体的组合物。所

述运载体可以是脂质分子或脂质体。

[0083] 本发明的化合物和组合物可用于通过向有需要的受试者施用化合物或组合物来预防或治疗p21相关疾病的方法。

[0084] 在另一些方面,本发明包括通过向有需要的受试者施用含有一种或更多种本发明核酸分子的组合物来治疗与p21表达相关的疾病的方法。该疾病可以是恶性肿瘤,其可以呈现为诸如与p21表达相关的癌症等疾病。

[0085] 本发明的方法可利用本发明化合物来预防或治疗恶性肿瘤。恶性肿瘤可以呈现为各种疾病,例如与p21表达相关的癌症、由表达突变的KRAS引起的癌症、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、癌、脑肿瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食管癌、胃癌、十二指肠癌、阑尾癌、结肠直肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌症、肾癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、卵巢癌、皮肤癌、白血病、恶性淋巴瘤、上皮性恶性肿瘤和非上皮性恶性肿瘤。

[0086] 经修饰和经化学修饰的siRNA

[0087] 本发明的实施方案包括经修饰或经化学修饰以提供治疗用途的增强特性的siRNA分子,例如针对基因沉默提高的活性和效力。本发明提供了经修饰或经化学修饰的siRNA分子,其可具有提高的血清稳定性以及降低的脱靶效应,而不会损失siRNA分子的基因调节和基因沉默活性和效力。在一些方面,本发明提供了多种组合的具有修饰或化学修饰的siRNA,其增强siRNA的稳定性和效力。

[0088] 本文所用术语经修饰和经化学修饰是指在siRNA的天然核苷酸或核酸结构的结构中所作的改变,其包括具有一个或多个核苷酸类似物、改变的核苷酸、非标准核苷酸、非天然核苷酸及其组合的siRNA。

[0089] 在一些实施方案中,siRNA中经修饰或经化学修饰的结构数目可以包括siRNA分子的所有结构组分和/或所有核苷酸。

[0090] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有核苷酸糖基修饰、核苷酸核碱基修饰、核酸主链或键修饰、在siRNA链末端的一种或更多种核苷酸的结构修饰及其组合的siRNA。

[0091] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括在糖的2'碳上具有取代基修饰的siRNA。

[0092] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括在链的5'端、3'端或两端具有修饰的siRNA。

[0093] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有在链之间产生互补错配的修饰的siRNA。

[0094] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有5'-丙胺末端、5'-磷酸化末端、3'-嘌呤霉素末端或3'-生物素末端基团的siRNA。

[0095] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有2'-氟取代的核糖核苷酸、2'-OMe取代的核糖核苷酸、2'-脱氧核糖核苷酸、2'-氨基取代的核糖核苷酸、2'-硫代取代核糖核苷酸的siRNA。

[0096] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个5-精氨酸、5-卤代胞苷、5-甲基胞苷、核糖胸苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、4-硫代嘌呤或5-氨基烯酰尿苷的

siRNA。

[0097] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个硫代磷酸酯基团的siRNA。

[0098] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个2'-氟取代的核糖核苷酸、2'-氟尿嘧啶、2'-氟胞苷、2'-脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧腺苷或2'-脱氧鸟苷的siRNA。

[0099] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个硫代磷酸酯键的siRNA。

[0100] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个亚烷基二醇键、氧基-烷硫基键或氧羰氧基键的siRNA。

[0101] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个脱氧无碱基基团、肌苷、N3-甲基-腺、N6,N6-二甲基-腺苷、假尿苷、嘌呤核糖核苷和利巴韦林的siRNA。

[0102] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个3'或5'反向末端基团的siRNA。

[0103] 经修饰和经化学修饰的siRNA的实例包括具有一个或多个5-(2-氨基)丙基脲、5-溴嘌呤、腺苷、8-溴鸟苷、7-脱氮腺苷或N6-甲基腺苷的siRNA。

[0104] 调节p21和治疗恶性肿瘤的方法

[0105] 本发明的实施方案可提供可用于下调或抑制p21和/或p21蛋白表达的RNAi分子。

[0106] 在一些实施方案中,本发明的RNAi分子可用于下调或抑制由可能与诸如恶性肿瘤的疾病或病症相关的CDKN1A单元型多态性引起的CDKN1A和/或p21蛋白的表达。

[0107] 可以使用p21蛋白或mRNA水平的监测来表征基因沉默,并确定本发明的化合物和组合物的效力。

[0108] 本公开的RNAi分子可以单独使用或与其他siRNA组合用于调节一种或更多种基因的表达。

[0109] 本公开的RNAi分子可以单独使用,或组合使用,或与其它已知用于预防或治疗与p21相关的疾病、或改善与p21相关的病症或障碍(包括恶性肿瘤)的症状的药物联用。

[0110] 本发明的RNAi分子可用于以序列特异性方式调节或抑制p21的表达。

[0111] 本公开的RNAi分子可以包括引导链,对其而言,一系列连续核苷酸与p21 mRNA至少部分互补。

[0112] 在某些方面,可以使用本发明的RNAi分子通过RNA干扰治疗恶性肿瘤。

[0113] 可以在合适的基于细胞的模型以及离体或体内动物模型中表征恶性肿瘤的治疗。

[0114] 可以通过对受影响的器官或组织的非侵袭性医学扫描来表征恶性肿瘤的治疗。

[0115] 本发明的一些实施方案可包括用于预防、治疗或改善有此需要的受试者中p21相关疾病或病症的症状的方法。

[0116] 在一些实施方案中,用于预防、治疗或改善受试者恶性肿瘤症状的方法可包括向受试者施用本发明的RNAi分子以调节受试者或生物体中CDKN1A基因(p21)的表达。

[0117] 在一些实施方案中,本发明涵盖通过使细胞或生物体与本发明的RNAi分子接触来下调细胞或生物体中CDKN1A基因(p21)的表达的方法。

[0118] 本发明的实施方案包括根据上述实例经修饰或经化学修饰的表1和表2的siRNA分子。

[0119] RNA干扰

[0120] RNA干扰(RNAi)是指由短干扰RNA(siRNA)介导的动物中的序列特异性转录后基因沉默。参见例如Zamore等,Cell,2000,第101卷,第25-33页;Fire等,Nature,1998,第391卷,第806811页;Sharp,Genes&Development,1999,第13卷,第139-141页。

[0121] 细胞中的RNAi应答可以通过双链RNA(dsRNA)来触发,虽然该机制尚未完全理解。细胞中的某些dsRNA可以经历Dicer酶、核糖核酸酶III酶的作用。参见例如Zamore等,Cell,2000,第101卷,第25-33页;Hammond等,Nature,2000,第404卷,第293-296页。Dicer可以将dsRNA加工成dsRNA的较短片段,其为siRNA。

[0122] 通常,siRNA的长度可以为约21至约23个核苷酸,并且包括长度为约19个核苷酸的碱基对双链体区域。

[0123] RNAi涉及被称为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的核酸内切酶复合物。siRNA具有进入RISC复合物并介导对具有与siRNA双链体的反义链互补的序列的单链RNA靶标加以切割的反义链或引导链。siRNA的另一条链是乘客链(passenger strand)。对靶标RNA的切割发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中部。参见例如Elbashir等,Genes&Development,2001,第15卷,第188-200页。

[0124] 本文所用术语“有义链”是指与siRNA分子的相应反义链的至少一部分部分或完全互补的siRNA分子的核苷酸序列。siRNA分子的有义链可以包括与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0125] 本文所用术语“反义链”是指与靶核酸序列的至少一部分部分或完全互补的siRNA分子的核苷酸序列。siRNA分子的反义链可以包括与siRNA分子的相应有义链的至少一部分互补的核酸序列。

[0126] 通过以序列特异性方式介导RNA干扰,RNAi分子可以下调或敲低基因表达。参见例如Zamore等,Cell,2000,第101卷,第25-33页;Elbashir等,Nature,2001,第411卷,第494-498页;Kreutzer等,W02000/044895;Zernicka-Goetz等,W02001/36646;Fire等,W01999/032619;Plaetinck等,W02000/01846;Mello等,W02001/029058。

[0127] 本文所用术语“抑制”、“下调”或“减少”相对于基因表达意为基因的表达或编码一种或更多种蛋白质的mRNA分子的水平或一种或更多种编码的蛋白质的活性降低到低于不存在本发明的RNAi分子或siRNA时观察到的活性。例如,从不存在本发明的RNAi分子或siRNA的情况下观察到的,表达水平、mRNA水平或编码的蛋白质活性水平可以降低至少1%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少90%或更多。

[0128] RNAi分子也可用于敲低病毒基因表达,由此影响病毒复制。

[0129] RNAi分子可以由分离的多核苷酸链构成:有义链或乘客链,以及,反义链或引导链。引导链和乘客链至少部分互补。引导链和乘客链可形成具有约15至约49个碱基对的双链体区域。

[0130] 在一些实施方案中,siRNA的双链体区域可具有17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、34、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48或49个碱基对。

[0131] 在某些实施方案中,RNAi分子可以在RISC复合物中是活性的,其具有具RISC活性的双链体区域的长度。

[0132] 在另外一些实施方案中, RNAi分子可以作为Dicer底物起作用, 转化为可在RISC复合物中有活性的RNAi分子。

[0133] 在一些方面, RNAi分子可以在长分子的相对端具有互补的引导序列部分和乘客序列部分, 使得分子可以与互补序列部分形成双链体区域, 并且链在核苷酸或非核苷酸接头的双链体区域的一端连接。例如, 发夹布置、或茎和环布置。与链的接头的相互作用可以是共价键或非共价相互作用。

[0134] 本公开的RNAi分子可以包括将核酸的有义区连接到核酸的反义区的核苷酸、非核苷酸或混合的核苷酸/非核苷酸接头。核苷酸接头可以是长度为 ≥ 2 个核苷酸的接头, 例如长度为约3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸的接头。核苷酸接头可以是核酸适体。本文所用的“适体”或“核酸适体”是指特异性结合靶分子的核酸分子, 其中核酸分子具有包含靶分子在其天然环境中识别的序列的序列。或者, 适体可以是结合不天然地结合核酸靶分子的核酸分子。例如, 适体可用于结合蛋白质的配体结合结构域, 从而防止天然配体与蛋白质的相互作用。参见例如, Gold等, *Annu Rev Biochem*, 1995, 第64卷, 第763-797页; Brody等, *J. Biotechnol.*, 2000, 第74卷, 第5-13页; Hermann等., *Science*, 2000, 第287卷, 第820-825页。

[0135] 非核苷酸接头的实例包括脱碱基核苷酸、聚醚、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、聚炔或其它聚合物, 例如聚乙二醇, 例如具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。一些实例描述于Seela等, *Nucleic Acids Research*, 1987, 第15卷, 第3113-3129页; Cload等, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 第113卷, 第6324-6326页; Jaeschke等, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 第34卷, 第301页; Arnold等, W01989/002439; Usman等, W01995/006731; Dudycz等, W01995/011910和Ferentz等, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 第113卷, 第4000-4002页。

[0136] RNAi分子可具有来自双链体区域的一个或更多个悬挂。作为非碱基配对的单链区域的悬挂长度可以为1至8个核苷酸, 或更长。悬挂可以是3'端悬挂, 其中链的3'端具有1至8个核苷酸的单链区域。悬挂可以是5'端悬挂, 其中链的5'-端具有1至8个核苷酸的单链区域。

[0137] RNAi分子的悬挂可具有相同的长度, 或可以是不同的长度。

[0138] RNAi分子可具有一个或更多个平末端, 其中双链体区域末端没有悬挂, 所述的链与双链体区域的末端碱基配对。

[0139] 本公开的RNAi分子可具有一个或更多个平末端, 或者可具有一个或更多个悬挂, 或者可具有平末端和悬挂的组合。

[0140] RNAi分子的链的5'端可以是平末端, 或者可以是悬挂。RNAi分子的链的3'端可以是平末端, 或者可以是悬挂。

[0141] RNAi分子的链的5'端可以是平末端, 而3'端为悬挂。RNAi分子的链的3'端可以是平末端, 而5'-端是悬挂。

[0142] 在一些实施方案中, RNAi分子的两端都是平末端。

[0143] 在另一些实施方案中, RNAi分子的两端具有悬挂。

[0144] 在5'和3'端的悬挂可具有不同的长度。

[0145] 在某些实施方案中, RNAi分子可具有平末端, 其中反义链的5'端和有义链的3'端不具有任何悬挂的核苷酸。

[0146] 在另一些实施方案中, RNAi分子可具有平末端, 其中反义链的3'端和有义链的5'端不具有任何悬挂的核苷酸。

[0147] RNAi分子在双链体区域的碱基配对中可能具有错配。

[0148] RNAi分子悬挂的任何核苷酸均可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。

[0149] 一个或多个脱氧核糖核苷酸可以在5'端, 其中RNAi分子的另一条链的3'端可能不具有悬挂, 或者可能不具有脱氧核糖核苷酸悬挂。

[0150] 一个或多个脱氧核糖核苷酸可以在3'端, 其中RNAi分子的另一条链的5'-端可能不具有悬挂, 或可能不具有脱氧核糖核苷酸悬挂。

[0151] 在一些实施方案中, RNAi分子的一个或多个或全部悬挂核苷酸可以是2'-脱氧核糖核苷酸。

[0152] Dicer底物RNAi分子

[0153] 在一些方面, RNAi分子可具有适合作为Dicer底物的长度, 其可被加工成产生RISC活性RNAi分子。参见例如Rossi等, US2005/0244858。

[0154] 作为Dicer底物的双链RNA (dsRNA) 可具有足以使得其由Dicer加工成产生活性RNAi分子的长度, 并且还可以包括以下特性中的一个或多个: (i) Dicer底物dsRNA可以是不对称的, 例如, 在反义链上具有3'悬挂, 和(ii) Dicer底物dsRNA可以在有义链上具有经修饰的3'端以引导Dicer结合的取向和dsRNA加工成活性RNAi分子。

[0155] 在某些实施方案中, Dicer底物dsRNA中最长链的长度可以为24至30个核苷酸。

[0156] Dicer底物dsRNA可以是对称的或不对称的。

[0157] 在一些实施方案中, Dicer底物dsRNA可具有22至28个核苷酸的有义链和24至30个核苷酸的反义链。

[0158] 在某些实施方案中, Dicer底物dsRNA可在反义链的3'端具有悬挂。

[0159] 在另一些实施方案中, Dicer底物dsRNA可具有长度为25个核苷酸的有义链和长度为27个核苷酸的反义链, 具有2碱基3'悬挂。悬挂的长度可以为1、2或3个核苷酸。有义链也可具有5'磷酸根。

[0160] 不对称的Dicer底物dsRNA可以在有义链的3'端具有两个脱氧核糖核苷酸来代替两个核糖核苷酸。

[0161] Dicer底物dsRNA的有义链的长度可以为约22至约30、或约22至约28、或约24至约30、或约25至约30、或约26至约30、或约26和29、或约27至约28个核苷酸。

[0162] Dicer底物dsRNA的有义链的长度可以为22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0163] 在某些实施方案中, Dicer底物dsRNA可具有长度为至少约25个核苷酸且长度不超过约30个核苷酸的有义链和反义链。

[0164] 在某些实施方案中, Dicer底物dsRNA可具有长度为26至29个核苷酸的有义链和反义链。

[0165] 在某些实施方案中, Dicer底物dsRNA可具有长度为27个核苷酸的有义链和反义链。

[0166] Dicer底物dsRNA的有义链和反义链可以与平末端长度相同, 或者与悬挂长度不同, 或者可具有平末端和悬挂。

[0167] Dicer底物dsRNA可具有长度为19、20、21、22、23、24、25、26或27个核苷酸的双链体区域。

[0168] Dicer底物dsRNA的反义链可具有在生物条件下,例如在真核细胞的细胞质内与有义链的至少一部分序列退火的任何序列。

[0169] 具有有义链和反义链的Dicer底物可以通过第三结构(例如接头基团或接头寡核苷酸)连接。接头连接dsRNA的两条链,例如使得在退火时形成发夹。

[0170] Dicer底物的有义链和反义链通常是互补的,但在碱基配对中可具有错配。

[0171] 在一些实施方案中,Dicer底物dsRNA可以是不对称的,使得有义链具有22至28个核苷酸,反义链具有24至30个核苷酸。

[0172] Dicer底物dsRNA的一条链,特别是反义链的区域可具有至少19个核苷酸的序列长度,其中这些核苷酸位于邻近于反义链3'端的21个核苷酸的区域并且与从靶基因产生的RNA的核苷酸序列充分互补。

[0173] Dicer底物dsRNA的反义链可以在5'端具有1至9个核糖核苷酸,得到22至28个核苷酸的长度。当反义链具有21个核苷酸的长度时,可以在3'端加入1至7个核糖核苷酸或2至5个核糖核苷酸或4个核糖核苷酸。加入的核糖核苷酸可具有任何序列。

[0174] Dicer底物dsRNA的有义链可具有24至30个核苷酸。有义链可以与反义链基本上互补,以在生物条件下与反义链退火。

[0175] RNAi分子的使用方法

[0176] 本发明的核酸分子和RNAi分子可通过直接施用分子或与运载体或稀释剂组合的分子递送至细胞或组织。

[0177] 本发明的核酸分子和RNAi分子可以通过直接施用分子与运载体或稀释剂或辅助、促使或促进进入细胞的任何其它递送介质来递送或施用于细胞、组织、器官或受试者,所述其它递送介质例如病毒序列、病毒物质或脂质或脂质体制剂。

[0178] 本发明的核酸分子和RNAi分子可与阳离子脂质复合,包装在脂质体内,或以其它方式递送至靶细胞或组织。核酸或核酸复合物可以通过直接皮肤施、透皮施用或注射离体或体内局部施用于相关组织。

[0179] 递送系统可包括例如水性和非水性凝胶、乳膏、乳剂、微乳剂、脂质体、软膏、水性和非水性溶液、洗剂、气溶胶、烃基和粉末,并且可以含有赋形剂例如增溶剂和渗透促进剂。

[0180] 本公开的组合物和方法可包括以允许核酸分子表达的方式包含编码本发明的至少一种RNAi分子的核酸序列的表达载体。

[0181] 本发明的核酸分子和RNAi分子可以从插入DNA或RNA载体的转录单元表达。重组载体可以是DNA质粒或病毒载体。可以使用提供核酸分子的瞬时表达的病毒载体。

[0182] 例如,载体可以包含编码双链体的RNAi分子的两条链或者自身互补因此形成RNAi分子的单个核酸分子的序列。表达载体可以包括编码两个或更多个核酸分子的核酸序列。

[0183] 核酸分子可以在细胞内从真核启动子表达。本领域技术人员认识到任何核酸均可在真核细胞中从适当的DNA/RNA载体表达。

[0184] 在一些方面,病毒构建体可用于将表达构建体引入细胞,用于由表达构建体编码的dsRNA构建体的转录。

[0185] 脂质制剂可以通过静脉内、肌内或腹膜内注射或口服或通过吸入或本领域已知的

其它方法施用于动物。

[0186] 用于施用寡核苷酸的可药用制剂是已知的并且可以使用。

[0187] 用于体外敲低的实施例方案

[0188] 在转染前一天,用100 μ l含有10%FBS的DMEM (HyClone Cat.#SH30243.01) 将细胞以 2×10^3 个细胞/孔于96孔板中铺板,并在空气中含有5%CO₂的加湿气氛的37 $^{\circ}$ C培养箱中培养。在转染前,将培养基更换为90 μ l含有2%FBS的Opti-MEM I还原血清培养基(Life Technologies Cat.#31985-070)。在室温下将0.2 μ l Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies Cat.#13778-100) 与4.8 μ l Opti-MEM I混合5分钟。将1 μ l siRNA与4 μ l Opti-MEM I混合,并与LF2000溶液混合,然后轻轻混匀,不进行涡旋。在室温下等待5分钟。在室温下孵育混合物10分钟,以形成RNA-RNAiMax复合物。将10 μ l RNA-RNAi Max复合物加入到孔中,用手轻轻摇板。将细胞在空气中含有5%CO₂的加湿气氛的37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育2小时。将培养基更换为含有2%FBS的新鲜-MEM I还原血清培养基(Life Technologies Cat.#31985-070)。转染24小时后,用冰冷的PBS洗涤细胞一次。在室温下用50 μ l Cell-to-Ct裂解缓冲液(Life Technologies Cat.#4391851C)裂解细胞5至30分钟。加入5 μ l终止液,室温孵育2分钟。立即用TAQMAN通过RT-qPCR测量mRNA水平。或者,可以在-80 $^{\circ}$ C冷冻样品并在其后进行测定。

[0189] 用于筛选测量的阳性对照是具有如下有义链和反义链对的分子。

[0190] SEQ ID NO:85

[0191] 有义:UCCUAAGAGUGCUGGGCAUdTdT

[0192] SEQ ID NO:86

[0193] 反义:AUGCCCAGCACUCUUAGGAdTdT。

[0194] 用于血清稳定性的实施例方案

[0195] 在37 $^{\circ}$ C用10%人血清孵育0.2mg/ml siRNA。在某些时间点(0、5、15和30分钟),等分为200 μ l样品并用200 μ l萃取溶剂(氯仿:苯酚:异戊醇=24:25:1)萃取。在室温下涡旋样品并以13,000rpm离心10分钟,然后转移上层溶液并用0.45 μ m滤器过滤。将滤出物转移到300 μ l HPLC注射瓶中。对于LCMS,流动相为MPA:100mM HFIP+7mM TEA在水中,MPB:50%乙醇+50%乙腈。柱:Waters Acquity OST 2.1 \times 50mm,1.7 μ m。

实施例

[0196] 实施例1.发现靶向p21的本发明的siRNA在体外有基因沉默活性。发现p21 siRNA对于基因敲低的剂量依赖性活性显示出低于约3皮摩尔(pM)的IC₅₀和低至1pM的IC₅₀。

[0197] 在A549细胞系中进行体外转染以测定siRNA敲低效力。如表3所示,用表1的siRNA观察对于p21 mRNA的剂量依赖性敲低。

[0198] 表3:A549细胞系中p21 mRNA的剂量依赖性敲低

[0199]

P21 siRNA结构	IC ₅₀ (pM)
1735 (SEQ ID NOs:4075和4103)	0.3
2042 (SEQ ID NOs:4091和4119)	10

[0200] 如表3所示,表1的p21 siRNA的活性在0.3至10pM范围内,其适用于许多用途,包括

作为体内使用的药剂。

[0201] 实施例2:具有位于siRNA的反义链的种子区域中的脱氧核苷酸的本发明的p21 siRNA的结构出人意料地提供有利地提高的基因敲低活性。

[0202] 在A549细胞系中进行体外转染,以测定基于结构1735'(SEQ ID NO:57和71)的p21 siRNA的敲低效力。用基于结构1735'的p21 siRNA观察到p21 mRNA的剂量依赖性敲低,如表4所示。

[0203] 表4:对于基于结构1735'的p21 siRNA,A549细胞系中p21 mRNA的剂量依赖性敲低
[0204]

P21 siRNA 结构	IC50 (pM)
在双链体区域无脱氧核苷酸的 1735 (SEQ ID NO: 12 和 40)	0.3
具有在种子区域反义链的第 4、6 和 8 位的脱氧核苷酸和另外的 2'-OMe 核苷酸的 1735(SEQ ID NO: 58 和 72)	0.05
具有在种子区域反义链的第 4、6 和 8 位的脱氧核苷酸和另外的 2'-OMe 核苷酸的 1735(SEQ ID NO: 59 和 73)	0.001
具有在种子区域反义链的第 4、6 和 8 位的脱氧核苷酸和另外的 2'-OMe 核苷酸的 1735(SEQ ID NO: 60 和 74)	0.1

[0205] 如表4所示,与双链体区域中没有脱氧核苷酸的p21 siRNA相比,基于在反义链的种子区域中具有三个脱氧核苷酸的结构1735'的p21 siRNA的活性惊人地、出人意料地提高了多达300倍。

[0206] 这些数据显示,与双链体区域中没有脱氧核苷酸的p21 siRNA相比,具有在反义链的种子区域中具有脱氧核苷酸的结构p21 siRNA惊人地提高了基因敲低活性。

[0207] 针对在反义链的种子区域中具有3个脱氧核苷酸的p21 siRNA在表4中示出的活性为0.001至0.1pM,其例外地适于许多用途,包括作为待体内使用的药剂。

[0208] 本文描述的实施方案不是限制性的,并且本领域技术人员可以容易地理解,可以不进行过度实验而测试本文所述修饰的特定组合以鉴定具有改进的RNAi活性的核酸分子。

[0209] 出于所有目的,本文特别提及的所有出版物、专利和文献通过引用整体并入本文。

[0210] 应当理解,本发明不限于所述特定方法、方案、材料和试剂,因为它们可能变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明的范围。对于本领域技术人员将显而易见的是,在不背离本说明书的范围和总之的情况下,可以对本文所公开的描述进行各种替换和修改,并且这些实施方案在本说明书和所附权利要求的范围内。

[0211] 必须指出,本文和所附权利要求中所使用的单数形式包括复数指称,上下文另有明确说明除外。同样地,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个(一种或更多种)”和“至少一个/种”在本文可以互换使用。另外要注意,术语“包括”、“包含”、“含有”、“含”和“具有”可以互换使用,并且应该被广义、无限制地解释。

[0212] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的记载仅仅意在作为对单独提到落入该范围的每个单独的值的速记法,每个单独的值均被并入说明书中,如同它们被单独记载于本文中一样。对于马库什组,本领域技术人员将认识到,该描述包括个体成员以及马库什组成员的亚组。

[0213] 即使没有进一步的阐述,认为本领域技术人员亦可基于上述描述最大程度地利用本发明。因此,所附的具体实施方案应被解释为仅是说明性的,而不是以任何方式限制本公开的其余部分。

[0214] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合而联用。本说明书中公开的每个特征可以由服务于相同、等同或相似目的的替代特征来代替。

序列表

<110> 日东电工株式会社
 <120>用于 P21 基因调节的 RNA 干扰剂
 <130> ND5123591W0
 <140>
 <141>
 <150> 62/266,668
 <151> 2015-12-13
 <160> 86
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 [0001]
 <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-甲氧基-核苷酸
 <400> 1
 cuuagugacu uuacuuguau u 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成

寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 2

cagaccagca ugacagauuu u

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

[0002]

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 3

ugaucuucuc caagaggaau u

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 4	
	guucauugca cuuugauuau u	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
[0003]	<400> 5	
	cauugcacuu ugauuagcau u	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 6	
	agcgauggaa cuucgacuuu u	21

	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 7	
	gcgauggaac uucgacuuuu u	21
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> RNA	
[0004]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 8	
	gggaaggac acacaagaau u	21
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 9

ucuaccucag gcagcucaau u

21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0005]

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 10

ggugcucaau aaaugauucu u

21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 11	
	caucaucaaaa aacuuuggau u	21
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
[0006]	<400> 12	
	aaggagucag acauuuuaau u	21
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 13	
	gugcugggca uuuuuuuuuu u	21

<210> 14
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 14
 gccggcuuca ugccagcuau u

21

[0007]

<210> 15
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 15
 gggcaucauc aaaaacuuuu u

21

<210> 16
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 16	
	gaagggcacc cuaguucuau u	21
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
[0008]		
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 17	
	caguucaaug cacuuugauu u	21
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	

	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 18	
	acaaggaguc agacauuuuu u	21
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
[0009]	<400> 19	
	uggaggcacu gaagugcuuu u	21
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 20	
	gcaggacca cacccuguau u	21

	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 21	
	cuguacuguu cugugucuuu u	21
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 22	
	uuaaacaccu ccucauguau u	21
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

[0010]

- <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
- <220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-甲氧基-核苷酸
- <400> 23
 agacucucag ggucgaaaau u 21
- <210> 24
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- [0011] <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
- <220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-甲氧基-核苷酸
- <400> 24
 caugacagau uuucaccacu u 21
- <210> 25
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 25	
	agauuucuaac cacuccaaau u	21
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
[0012]	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 26	
	ccaagaggaa gcccuaaucu u	21
	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 27	

gacagcagag gaagaccauu u 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 28

cucccacaau gcugaauauu u 21

[0013]

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 29

uacaaguaaa gucacuaagu u 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 30

aaucugucau gcuggucugu u

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 31

uuccucuugg agaagaucau u

21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 32	
	uaaucaaaagu gcaaugaacu u	21
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
[0015]	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 33	
	ugcuaaucaa agugcaaugu u	21
	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	

<400> 34
aagucgaagu uccaucgcuu u 21

<210> 35
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20).. (21)
<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 35
aaagucgaag uccaucgcu u 21

[0016]

<210> 36
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20).. (21)
<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 36
uucuugugug ucceuucccu u 21

<210> 37
<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 37

uugagcugcc ugagguagau u

21

<210> 38

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 38

gaaucauuua uugagcaccu u

21

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

	<220>		
	<221> modified_base		
	<222> (20).. (21)		
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸		
	<400> 39		
	uccaaaguuu uugaugaugu u		21
	<210> 40		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸		
	<220>		
[0018]	<221> modified_base		
	<222> (20).. (21)		
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸		
	<400> 40		
	uuaaauguc ugacuccuuu u		21
	<210> 41		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸		
	<220>		
	<221> modified_base		
	<222> (20).. (21)		
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸		

	<400> 41	
	aaauaaaaau gccagcacu u	21
	<210> 42	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 42	
	uagcuggcau gaagccgcu u	21
[0019]		
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 43	
	aaaguuuuug augaugcccu u	21
	<210> 44	

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 44

uagaacuagg gugccuucu u

21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 45

aucaaagugc aaugaacugu u

21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成

寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 46

aaaaugucug acuccuuguu u

21

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

[0021]

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 47

aagcacuuca gugccuccau u

21

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 48	
	uacagggugu ggucccugcu u	21
	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
[0022]	<400> 49	
	aagacacaga acaguacagu u	21
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 50	
	uacaugagga gguguuaau u	21

	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 51	
	uuuucgacc u g a g a g u c u u u	21
	<210> 52	
	<211> 21	
	<212> RNA	
[0023]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 52	
	g u g g u a g a a a u c u g u c a u g u u	21
	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 53

uuuggagugg uagaaucuu u

21

<210> 54

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0024]

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-甲氧基-核苷酸

<400> 54

gauuagggcu uccucuuggu u

21

<210> 55

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
	<400> 55	
	augguuuucc ucugcugucu u	21
	<210> 56	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-甲氧基-核苷酸	
[0025]	<400> 56	
	auauucagca uuguggagu u	21
	<210> 57	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> a, c, t, g, u, unknown or other	
	<400> 57	
	aaggagucag acauuuuaan n	21

<210> 58
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

[0026] <220>
 <221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 58
 aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 59
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1).. (3)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (8).. (8)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (12).. (12)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

[0027] <220>
 <221> modified_base
 <222> (14).. (15)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (17).. (17)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20).. (21)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 59
 aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 60
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1).. (3)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (8).. (8)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (12).. (12)

<223> 2'-OMe-核苷酸

[0028]

<220>

<221> modified_base

<222> (14).. (15)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (17).. (17)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 60

aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 61

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成
 寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

[0029] <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 61
 aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 62
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成
 寡核苷酸

	<220>		
	<221> modified_base		
	<222> (20)..(21)		
	<223> 2'-OMe-核苷酸		
	<400> 62		
	aaggagucag acauuuuaau u		21
	<210> 63		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸		
	<220>		
[0030]	<221> modified_base		
	<222> (20)..(21)		
	<223> 2'-OMe-核苷酸		
	<400> 63		
	aaggagucag acauuuuaau u		21
	<210> 64		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸		
	<220>		
	<221> modified_base		
	<222> (20)..(21)		
	<223> 2'-OMe-核苷酸		

<400> 64
aaggagucag acauuuuaau u 21

<210> 65
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20).. (21)
<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 65
aaggagucag acauuuuaau u 21

[0031]

<210> 66
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20).. (21)
<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 66
aaggagucag acauuuuaau u 21

<210> 67
<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 67

aaggagucag acauuuuuuuu u

21

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (8).. (8)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (12).. (12)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (17).. (17)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 68

aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 69

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1).. (3)

<223> 2'-OMe-核苷酸

[0033]

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 69

aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 70

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1).. (3)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (8).. (8)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (12).. (12)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (17).. (17)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

[0034]

<400> 70

aaggagucag acauuuuaau u

21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> a, c, t, g, u, unknown or other

	<400> 71	
	uuaaaauguc ugacuccuun n	21
	<210> 72	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (2)..(2)	
[0035]	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<220>	
	<221> modified base	
	<222> (7)..(7)	
	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<400> 72	
	uuaaaauguc ugacuccuuu u	21
	<210> 73	

<211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>
 <223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

[0036]

<220>
 <221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 73
 uuaaaaauguc ugacuccuuu u

21

<210> 74
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成

寡核苷酸

<220>

<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (2).. (2)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 74

uuaaauguc ugacuccuuu u.

21

[0037]

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (2).. (2)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

	<400> 75	
	uuaaaauguc ugacuccuuu u	21
	<210> 76	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<220>	
	<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述：合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (7).. (7)	
[0038]	<223> 2'-deoxy-核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<400> 76	
	uuaaaauguc ugacuccuuu u	21
	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<220>	
	<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述：合成寡核苷酸	

寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (7).. (7)

<223> 2'-deoxy-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 77

uuaaaaauguc ugacuccuuu u

21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

[0039]

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成
寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1).. (1)

<223> 2'-deoxy-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (7).. (7)

<223> 2'-deoxy-核苷酸

<220>

<221> modified base

<222> (20).. (21)

	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<400> 78	
	uuaaaauguc ugacuccuuu u	21
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	
[0040]	<221> modified_base	
	<222> (7).. (7)	
	<223> 2'-deoxy-核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20).. (21)	
	<223> 2'-OMe-核苷酸	
	<400> 79	
	uuaaaauguc ugacuccuuu u	21
	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<220>	

<223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 80

uuaaauguc ugacuccuuu u.

21

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0041]

<220>

<221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 81

uuaaaaauguc ugacuccuuu u 21

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 82

uuaaaaauguc ugacuccuuu u 21

[0042]

<210> 83

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe-核苷酸

<400> 83

uuaaaaauguc ugacuccuuu u 21

<210> 84

<211> 21

<212> RNA

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (20)..(21)
 <223> 2'-OMe-核苷酸
 <400> 84
 uuaaaauguc ugacuccuuu u. 21
- <210> 85
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 [0043] <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
 <220>
 <223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成寡核苷酸
 <400> 85
 uccuaagagu gcuggcaut t. 21
- <210> 86
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸
 <220>
 <223> 对组合的 DNA/RNA 分子的描述: 合成

寡核苷酸

[0044]

〈400〉 86

augcccagca cucuuaggat t

21