

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2013年4月25日 (25.04.2013)



(10) 国际公布号  
WO 2013/056670 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/083195
- (22) 国际申请日: 2012年10月19日 (19.10.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201110319067.8 2011年10月19日 (19.10.2011) CN
- (71) 申请人: 苏州瑞博生物技术有限公司 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省昆山市巴城镇石牌瑞典工业园纬三东路, Jiangsu 215347 (CN)。
- (72) 发明人: 张鸿雁 (ZHANG, Hongyan); 中国北京市海淀区上地开拓路5号中关村生物医药园A206, Beijing 100085 (CN)。 梁子才 (LIANG, Zicai); 中国北京市海淀区圆明园东门褐石园 29-203, Beijing 100084 (CN)。
- (74) 代理人: 北京润平知识产权代理有限公司 (RUN-PING & PARTNERS); 中国北京市海淀区北四环西路9号银谷大厦515室, Beijing 100190 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) Title: SMALL INTERFERENCE RNAS, USES THEREOF AND METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF PLK1 GENE

(54) 发明名称: 小干扰RNA及其应用和抑制plk1基因表达的方法

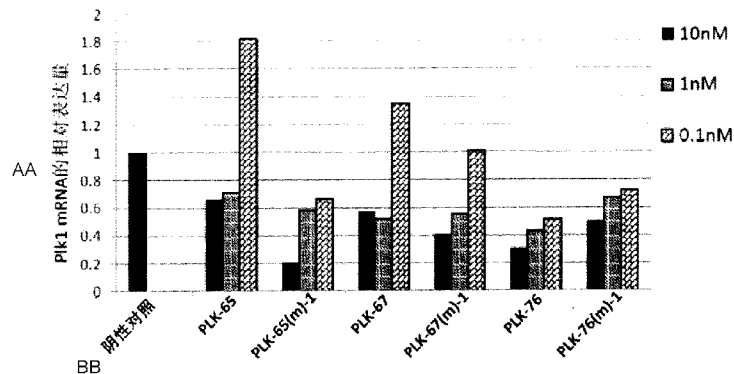


图 3 / FIG. 3

AA THE RELATIVE EXPRESSION LEVEL OF PLK1 MRNA  
BB NEGATIVE CONTROL

(57) Abstract: The present invention provides siRNAs for inhibiting the expression of plk1 gene, and the method for inhibiting the expression of plk1 gene in mammalian cells. The siRNAs of the prevent invention have the double-stranded structure, and said double-stranded structure is composed of the first single strand and the second single strand that are fully complementary, wherein the sequence of said first single strand is the same as the target sequence within the sequence as shown in SEQ ID NO:1, and the sequence of said second single strand is complementary to the target sequence within the sequence as shown in SEQ ID NO:1. The siRNAs of the present invention can sequence specifically mediate the inhibition of plk1 gene expression, and have a good serum stability. By the introduction of the siRNAs of the present invention into the tumor cells, the expression of plk1 gene can be effectively inhibited, and the growth of tumor cells is inhibited and the apoptosis of tumor cells is promoted.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2013/056670 A1



**本国际公布:**

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

---

本发明提供抑制 plk1 基因表达的 siRNA，及抑制哺乳动物细胞内 plk1 基因表达的方法。本发明的 siRNA 具有双链结构，所述双链结构由完全互补的第一单链和第二单链组成，其中，所述第一单链的序列与由 SEQ ID NO:1 表示的序列中的靶位点序列相同，所述第二单链的序列与由 SEQ ID NO:1 表示的序列中的靶位点序列互补。本发明的 siRNA 能够序列特异性地介导 plk1 基因表达的抑制，并具有很好的血清稳定性。通过将本发明的 siRNA 导入至肿瘤细胞内，可以有效地抑制 plk1 基因的表达，并抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡。

## 小干扰 RNA 及其应用和抑制 plk1 基因表达的方法

### 技术领域

本发明涉及一种 siRNA 及其应用和抑制 plk1 基因表达的方法。具体而言，本发明  
5 涉及一种抑制 plk1 基因表达的 siRNA 和应用，以及利用 siRNA 抑制 plk1 基因表达的方  
法。

### 背景技术

Polo 样激酶 1 (polo-like kinase-1, plk1) 是一种高度保守的丝/苏氨酸激酶。人 plk1  
10 基因定位于染色体的 16p12 位点，编码的 mRNA 长约 2.3 kb、蛋白质分子量约为 67 kd。  
plk1 蛋白在其 N 端有一个高度保守的催化区域，在其 C 端通常具有 3 个被称作为 Polo  
盒 (polo box) 的保守区域。研究发现，plk1 有诱导 DNA 合成、DNA 完整性的检修以  
及防止细胞凋亡方面的作用。plk1 还能通过磷酸化 p53 而抑制其转活性，进而抑制 p53  
15 发挥检验点 (check-point) 蛋白和诱导细胞凋亡的功能。p53 是 G1 期主要的调控蛋白，  
plk1 对抑癌基因 p53 的抑制作用诱导持续的、甚至是永久性的 G1 期阻滞。另外，plk1  
与肿瘤的发生与发展密切相关，plk1 基因的表达被抑制之后，会抑制细胞的增殖、促进  
细胞的凋亡，进而抑制肿瘤生长。plk1 还可以通过抑制 MAVS 调节干扰素 IFN 的诱导  
生成，破坏先天性免疫。

plk1 在包括乳腺癌、肝癌、肺癌和结肠癌的大多数人类肿瘤组织中均有高表达。  
20 plk1 的高表达和肿瘤患者的生存率之间具有统计相关性，肿瘤组织中 plk1 的表达水平  
还与肿瘤的转移及预后密切相关。这说明 plk1 在肿瘤的生成和发展过程中可能发挥着重  
要的作用，并且是一个潜在的抗肿瘤药物作用靶点。研究进展还表明，阻断 plk1 的表达  
或抑制其激酶活性可以有效抑制肿瘤细胞增殖并介导其凋亡，但对正常细胞没有明显影  
响。目前处于临床前或临床试验阶段的多种 plk1 抑制剂都表现出了高药性、低毒性的特  
25 点。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。手术、放疗、化疗、内分泌治疗并列成为  
乳腺癌的四大临床处置手段。对于大多数乳腺癌患者来说，在初诊确定时癌细胞就有可  
能已迁移至其他组织，而化疗作为重要的全身性干预手段在乳腺癌治疗中占有极其重要  
的地位。目前主要的化疗手段是小分子药物和大分子靶向药物，但药效和随之产生的耐  
30 药性是乳腺癌治疗中常用的小分子药物面临的主要问题，而适用人群范围窄则是大分子  
靶向药物的面临的主要问题。因此，可抑制癌基因表达的小干扰核酸作为替代型药物有

望解决小分子药物和靶向抗体药物不能解决的问题。从抗肿瘤药物提高治疗有效性、耐药性、降低毒副作用等几个方面讲，作为与目前临床使用的主流药物的作用机制完全不同的新兴药物分子，开发有效的 siRNA 药物已成为目前临床实际应用的迫切要求。

## 5 发明内容

本发明的目的在于提供用于抑制 plk1 基因表达的 siRNA、含有所述 siRNA 作为药物活性成分的药物组合物、利用所述 siRNA 或药物组合物抑制 plk1 基因表达的方法，以及所述 siRNA 或药物组合物在治疗和/或预防癌症疾病中的应用。

即，本发明通过提供以下技术方案得以实现本发明的上述目的。

10 一方面，本发明提供一种具有双链结构的 siRNA，所述双链结构由完全互补的第一单链和第二单链组成，其中，所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶位点序列相同且由 SEQ ID NOs:2-133 表示的核苷酸序列，与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶位点序列互补且由 SEQ ID NOs:134-265 表示的核苷酸序列。

15 根据本发明的一种实施方式，所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列相同且由 SEQ ID NOs:4、17、38、42、55、65、66、68、77、93、103、104、109 或 129 表示的核苷酸序列，与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列互补且由 SEQ ID NOs:136、149、170、174、187、197、198、200、209、225、235、236、241  
20 或 261 表示的核苷酸序列。

根据本发明一种优选的实施方式，所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列相同且由 SEQ ID NOs:66、68 或 77 表示的核苷酸序列，与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列互补且由 SEQ ID NOs:198、200 或 209 表示的核苷酸序列。

25 根据本发明的另一种实施方式，所述第一单链和所述第二单链中至少一条单链的 3' 末端可以连接 1 至 3 个核苷酸，从而在所述第一单链和所述第二单链互补形成所述双链结构后，在所述双链结构的至少一个末端形成由所述 1 至 3 个核苷酸构成的 3' 突出端。其中，优选所述 3' 突出端为由连续的两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT 或连续的两个尿嘧啶核苷酸 UU 构成。

30 根据本发明的另一种实施方式，所述第一单链和所述第二单链中分别包含至少一个被修饰的核苷酸基团。其中，所述被修饰的核苷酸基团为磷酸基团、核糖基团或碱基中的至少一种被修饰的核苷酸基团。优选所述被修饰的核苷酸基团为核糖基团的 2'-羟

基被甲氧基或氟取代的核苷酸基团。

另一方面,本发明提供一种药物组合物,其中含有所述抑制 plk 1 基因表达的 siRNA 作为药物活性成分,以及还含有阳离子组分、非阳离子组分和药学上可接受的载体。

根据本发明中的一种实施方式,所述阳离子组分选自 N,N-二羟乙基-N-甲基  
5 -N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵、(2,3-二油氧基丙基)三甲基氯化铵、N-(1-(2,3-二油  
酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵、聚乙烯亚胺、聚 β-氨基酯和壳聚糖季铵盐中的至少  
一种,所述非阳离子组分选自聚乙二醇-聚乳酸两嵌段共聚物、聚乙二醇-聚乳酸三嵌段  
共聚物、聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)两嵌段共聚物和聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)三  
10 嵌段共聚物中的至少一种,所述药学上可接受的载体选自 pH 值为 4.0-9.0 的磷酸盐缓冲  
液、pH 值为 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液、生理盐水或质量百分比浓度为  
7-15%的蔗糖溶液。

另一方面,本发明提供一种抑制哺乳动物细胞内 plk1 基因表达的方法,该方法包  
括向哺乳动物细胞内导入如上所述的 siRNA 的处置,从而使所述 siRNA 能够序列特异  
性地诱导所述 plk1 基因表达的抑制。

15 根据本发明的一种实施方式,所述处置是将所述 siRNA 直接地进行导入,或以如  
上所述的含有 siRNA 的药物组合物的形式进行导入。

另一方面,本发明提供如上所述的 siRNA、及药物组合物在制备治疗和/或预防肿  
瘤的药物中的应用。其中,所述肿瘤为 plk1 基因异常高表达的乳腺癌、肝癌、肺癌、宫  
颈癌或结肠癌。

20 本发明提供的 siRNA 能够序列特异性地介导 plk1 基因表达的抑制,并具有很好的  
血清稳定性。通过将本发明的 siRNA 导入至肿瘤细胞内,可以有效地抑制内源性 plk1  
基因的表达,从而抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡。

## 附图说明

25 图 1 示出实施例 2 的 siRNA 抑制 plk1 mRNA 表达水平的检测结果。

图 2 示出实施例 3 的化学修饰前后的 siRNA 的血清稳定性的检测结果。

图 3 示出实施例 4 的化学修饰前后的 siRNA 抑制 plk1 mRNA 表达水平的检测结果。

图 4 为实施例 6 的通过尾静脉注射方式系统给药含 plk 1 siRNA 的药物组合物时对  
乳腺癌细胞生长的抑制效果图。

30 图 5 为实施例 7 的通过尾静脉注射方式系统给药含 plk 1 siRNA 的药物组合物时对  
宫颈癌细胞生长的抑制效果图。

## 具体实施方式

对于本说明书中使用的术语，其定义如下。

术语“polo 样激酶 1”、“plk 1”或“plk 1 激酶”意指一种含激酶区域 (kinase domain) 及 polo 盒区域 (polo-box domain) 的丝氨酸/苏氨酸激酶。关于 plk1 激酶的性质与功能，  
5 详细描述可参见 Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2004, 5:429-。现已知 plk1 激酶的活性及细胞内表达水平对于细胞有丝分裂具有关键性调节作用。本发明中所使用的 plk1 mRNA 序列为 Genebank 注册号为 NM\_005030.3 的序列 (SEQ ID NO:1)。

术语“mRNA (messenger RNA, 信使 RNA)”意指作为体内蛋白质翻译的模板将基因的编码信息由 DNA 传导至蛋白质产物的 RNA 分子。

10 术语“RNA 干扰 (RNA interference)”或“RNAi”指一种存在生物体内的转录后基因表达调控现象，该现象由单链或双链 RNA 介导的靶 mRNA 特异性降解而引起。关于 RNAi 调控机制的细节可参见 Biotech.Adv. 2008, 26(3):202-等文献的描述。

本发明中，如无特殊说明，术语“小干扰 RNA (small interference/small-interfering RNA)”、或“siRNA”意指能够序列特异性地诱导 RNAi 现象、且由两条长度为 15-27 个核苷酸的单链 RNA 组成、及具有部分或完全互补的双链结构的 RNA 分子。本发明所涉及的 siRNA 中，互补双链结构的长度可以为 17-25 个、18-22 个、或 19-21 个碱基对。本发明所涉及的 siRNA 可以是由两条长度为 15-27 个核苷酸的单链 RNA 组成的平末端的双链 RNA 结构，或也可以是在双链结构的至少一个末端具有由 1-3 个连续的核苷酸组成的 3' 突出端的结构。本发明中，作为所述 3' 突出端，优选由两个连续的脱氧胸腺嘧啶  
15 核苷酸 dTdT、或由两个连续的尿嘧啶核苷酸 UU 组成。

本发明中，如无特殊说明，术语“第一单链”、或“正义链”是指 siRNA 两条单链中的一条单链，该单链具有与靶 mRNA 中的该 siRNA 作用位点核苷酸序列部分或完全相同的核苷酸序列；术语“第二单链”、或“反义链”则指在 siRNA 两条单链中的另一条单链，该单链具有与靶 mRNA 中的该 siRNA 作用位点核苷酸序列部分或完全互补的核苷酸序  
20 列。本发明中提到 siRNA 的第一单链（或正义链）可与相应的第二单链（或反义链）形成部分或完全互补的双链结构。

术语“互补”意指两条核酸链的碱基根据鸟嘌呤 G 与胞嘧啶 C、腺嘌呤 A 与尿嘧啶 U/胸腺嘧啶 T 碱基配对原则形成反平行互补配对的情况。

本发明中，如无特殊说明，术语“抑制 (suppress/suppressing, inhibit/inhibiting)”意指由于 siRNA、或其他小干扰核酸 (small-interfering nucleic acid, siNA) 抑制剂介导的 mRNA 降解而使靶基因表达得以显著下调 (down-regulation) 的情况。所述“显著下调”指靶基因表达相对于正常或处理前水平下降 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、  
30

40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%以上或100%的情况。

术语“系统给药”、或“系统输送”意指将 siRNA 等药物活性成分输送至体内广泛组织区域的一种给药方式。为了达到系统给药的效果，通常需要药物活性成分、或药物组  
5 合物具有较长的血液滞留时间，且不易被肝、肾等主要代谢器官吸收清除。作为 siRNA 的系统给药方式，可采用静脉注射、皮下注射、腹腔内注射、或口服等方式。本发明中，优选采用静脉注射方式进行 siRNA 的系统给药。

术语“局部给药”、“局部输送”意指将 siRNA 等药物活性成分输送至局部组织区域的一种给药方式。例如，可以通过将 siRNA 等药物活性成分直接注射或涂覆在病变组织  
10 区域中来实现 siRNA 的局部给药。作为适于 siRNA 等药物活性成分局部给药的组织区域，例如为皮肤、眼部玻璃体腔、肝、肾、肺等器官组织。

本发明中，siRNA 的设计是以 plk1 的 mRNA 序列为模板，针对 plk1 基因的保守区选取 15-27 个核苷酸长度的靶序列，从而得到相应的 siRNA。本发明中使用的 plk1  
15 mRNA 序列为 Genebank 注册号为 NM\_005030.3 的序列 (SEQ ID NO:1)，其长度为 2204 个核苷酸，编码区自 54 位的起始密码子 ATG 起始至 1865 位的终止密码子 TAA 为止。具体来说，本发明的 siRNA 的设计按以下原则进行。

首先，在 plk1 mRNA 的全长序列范围内选取 15-27 个核苷酸长度的序列。15-27  
20 个核苷酸长度的序列的选取主要参考以下几项原则：1) GC 含量在 35-60%之间，2) 避免处于重复序列或低复杂性序列区域内，3) 避免出现 4 个以上的连续核苷酸序列，4) 避免处于包含读码框起始密码和终止密码的 50-100 个核苷酸序列区域之内。除此之外，还要分析核苷酸序列的组成和热力学性质，确保进入体内后双链容易解链，并避免免疫反应的发生。随后，通过 BLAST 分析，将候选 siRNA 的靶位点序列同人类基因组序列进行同一性比对，排除同其它基因具有 16 个核苷酸长度以上同一性的序列，以确保候  
25 选 siRNA 的靶位点序列不与其他非相关基因的序列之间具有高相似性，从而保证设计的 siRNA 仅对靶基因 plk1 具有特异的抑制作用。

本发明中，siRNA 的设计包括与 plk1 mRNA 中的靶作用位点相同的第一单链的设计、以及与 plk1 mRNA 中的靶作用位点互补的第二单链的设计。本发明中，siRNA 的第二单链（或反义链）与 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列互补，并通过 RNAi 机制  
30 序列特异性地诱导 plk1 mRNA 的降解，从而对 plk1 基因表达形成抑制。本发明所设计的第一单链和第二单链彼此完全互补，经退火可形成平末端的，即，不具有 3'突出端的双链结构。

本发明的一个实施方式中，在根据上述原则设计的 15-27 个核苷酸长度的一条 RNA

单链的 3' 末端加上两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT, 互补的另一条 RNA 单链同样也做 3' 末端加上两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT 的处理。这样, 两条互补的 RNA 单链退火形成双链结构后, 在所述双链结构的两端可分别形成由两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT 构成的 3' 突出端。本发明的另一个实施方式中, 只在 siRNA 的一条 RNA 单链的末端加上两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT, 由此, 两条互补的 RNA 单链退火形成双链结构后, 在所述双链结构的一个末端形成由两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT 构成的 3' 突出端。

本发明的 siRNA 的一条 RNA 单链可以通过固相或液相核酸合成方法进行合成。这些方法包括四个工艺步骤。即, 1) 寡聚的合成、2) 脱保护、3) 纯化分离、及 4) 脱盐的四个工艺步骤。这四个步骤中的技术细节为本领域技术人员所公知, 在此不再赘述。

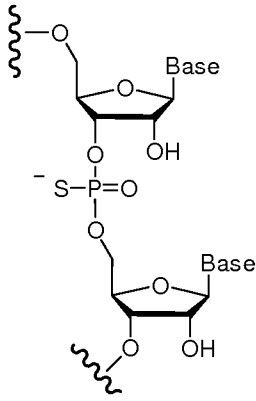
除化学合成外, 本发明的 siRNA 也可通过质粒和/或病毒载体的表达而得到。例如, 设计一个长度为 50-90 个核苷酸的 DNA 序列, 并在其两端加上两个不同的限制酶切位点, 例如加上 BamHI 和 EcoRI 的酶切位点。由所设计的 DNA 编码的 RNA 转录产物具有中间一段序列可形成环(loop)结构, 经 U 字折返 (U-turn) 后的环两端的序列可形成互补配对的双链结构。通过克隆技术将所设计的 DNA 插入到用相应限制酶酶切过的表达载体中。将表达载体导入至细胞中, 由所设计的 DNA 序列生成的 RNA 转录产物可被细胞固有的 siRNA 加工机制加工成成熟的 siRNA。由此, 即可在细胞中一时或稳定地表达 siRNA。

本发明对 siRNA 进行的化学修饰可以是以下一种或一种以上化学修饰的组合:

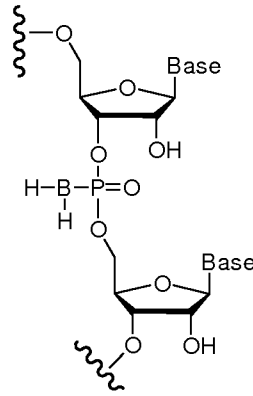
- 1) 对 RNA 链骨架结构中连接核苷酸残基的磷酸二酯键的修饰,
- 2) 对 RNA 链骨架结构中核糖的修饰,
- 3) 对 RNA 的核苷酸残基中碱基的修饰。

例如, 本发明提到的磷酸基团的修饰是指对磷酸基团中的氧进行修饰, 包括硫代磷酸修饰 (Phosphorothioate) 和硼烷化磷酸盐修饰 (Boranophosphate)。如下式所示分别用硫和硼烷基置换磷酸基团中的氧, 两种修饰都能稳定核酸的结构, 保持碱基配对的高特异性和高亲和力。



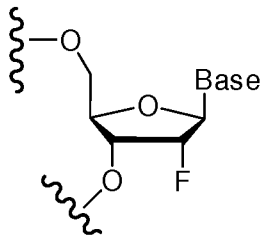


硫代磷酸修饰

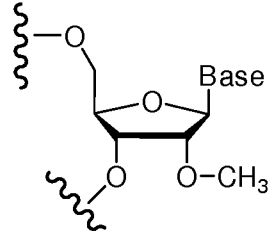


硼烷化磷酸盐修饰

5 本发明中，核糖基团的修饰是指对核糖基团中 2'-羟基(2'-OH)的修饰。在核糖基团的 2'-羟基位置引入某些取代基如甲氧基或氟后，使血清中的核糖核酸酶不易切割核酸，由此增加了核酸的稳定性，使核酸具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。对核苷酸戊糖中 2'-羟基的修饰包括 2'-氟修饰 (2'-fluro modification)、2'-甲氧基修饰 (2'-methoxy modification)、2'-甲氧乙氧基修饰 (2'- methoxyethoxy modification)、2'-2,4-二硝基苯酚  
10 修饰 (2'-DNP modification)、锁核酸修饰 (Locked nucleic acid modification)、2'-氨基修饰 (2'-Amino modification)、2'-脱氧修饰 (2'-deoxy modification)等。

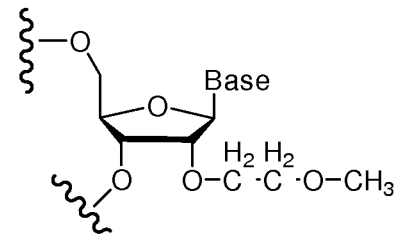


2'-氟修饰

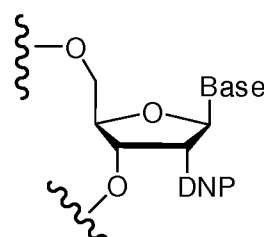


2'-甲氧基修饰

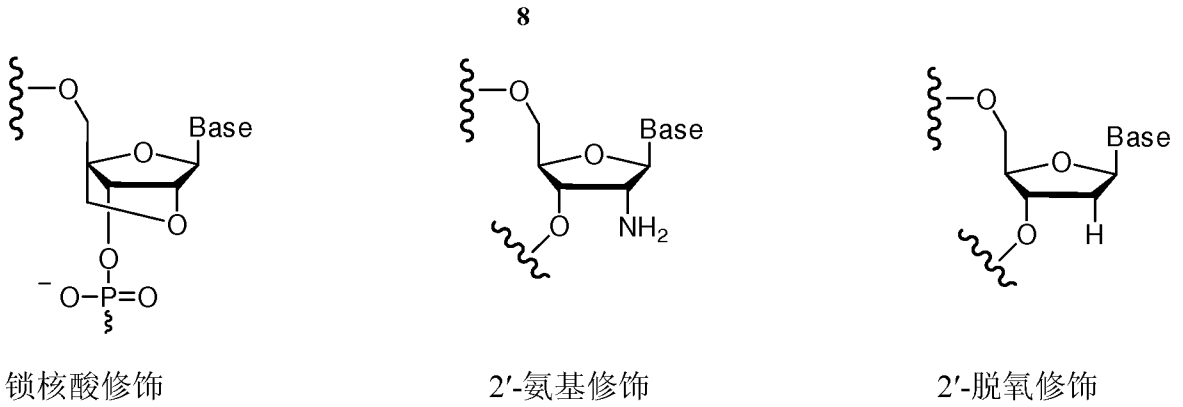
15



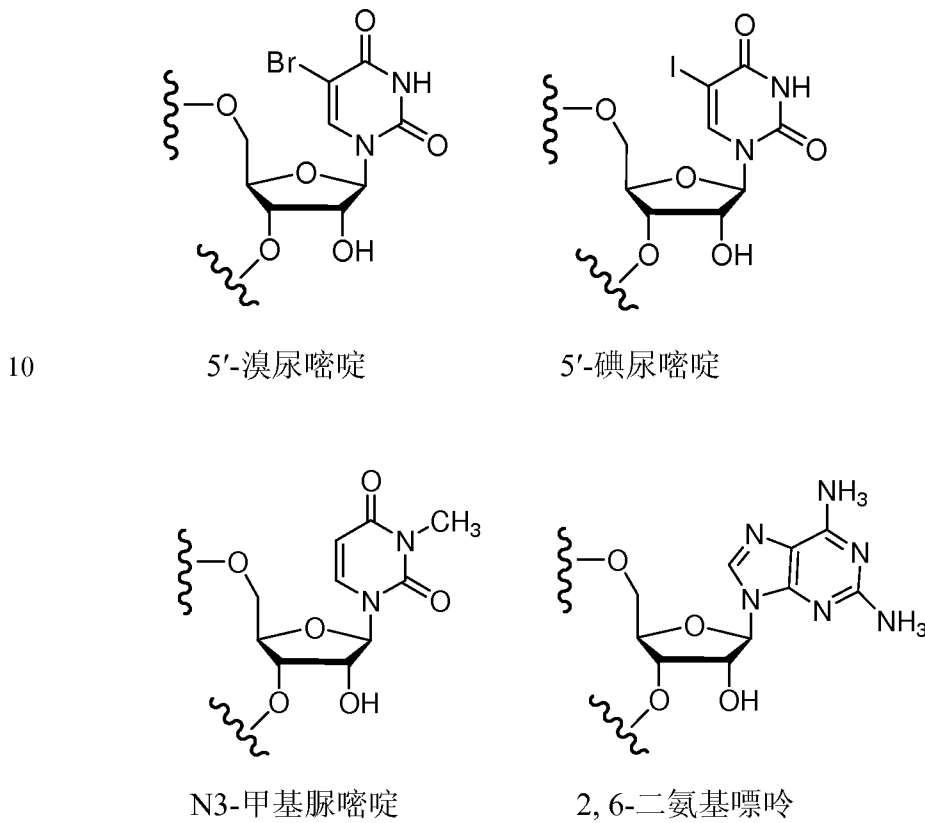
2'-甲氧乙氧基修饰



2'-2,4-二硝基苯酚修饰



5 本发明中，碱基的修饰是指对核苷酸基团中的碱基进行修饰，如在尿嘧啶的 5' 位点引入溴或碘的 5'-溴尿嘧啶 (5'-bromo-uracil) 和 5'-碘尿嘧啶 (5'-iodo-uracil) 修饰是常使用的碱基修饰方法，其他还有 N3-甲基尿嘧啶 (N3-methyl-uracil) 修饰、2,6-二氨基嘌呤 (2,6-diaminopurine) 修饰等。



15 本发明中，核糖基团被修饰的核苷酸基团优选为核糖基团的 2'-羟基被甲氧基或氟取代的核苷酸基团。修饰后的 siRNA 抵抗核酸酶酶解的能力增强，但其抑制 plk1 基因表达的活性不会因修饰产生明显变化。

在本发明的一个实施方式中，为了促进 siRNA 的脂溶性，可以在 siRNA 的正义链

的 5' 或 3' 末端引入如胆固醇、脂蛋白、维生素 E、脂肪链等亲脂性基团，这些亲脂性基团可以通过共价键与 siRNA 结合。所述亲脂性基团也可通过非共价键与 siRNA 结合，例如，siRNA 通过疏水键或离子键与中性磷脂分子、多肽、多糖等结合。已知在 siRNA 上通过共价结合或非共价结合引入亲脂性基团可以增加 siRNA 的体内稳定性、血液代谢特性和生物学活性。在本发明的一个实施方式中，siRNA 的第一单链（或正义链）的 5' 末端和/或 3' 末端连接有 5'-和/或 3'-帽子（5'- and/or 3'-cap）。所述 5'-和/或 3'-帽子结构可以使 siRNA 抵御核酸外切酶的攻击，进而提高 siRNA 的体内稳定性。作为所述 5'-和/或 3'-帽子，可以列举但不限于甘油、无碱基反向脱氧异核苷（inverted deoxy abasic moiety）、4',5'-亚甲基核苷（4',5'-methylene nucleotide）等。在本发明的一个实施方式中，siRNA 的第二单链（或反义链）的 5' 末端连接有磷酸基团。已知 siRNA 的反义链的 5' 端磷酸基团可以提高 siRNA 的活性。

本发明中，所述抑制 plk1 基因表达的 siRNA 可与协助药物体内输送的载体体系形成药物组合物，并以药物组合物形式在哺乳动物体内施用。所述载体体系包括但不限于阳离子组分、非阳离子组分、以及药学上可接受的载体。本发明中，所述阳离子组分可以是但不限于带正电的多肽或蛋白质、阳离子脂质、带正电的聚合物等。作为所述带正电的多肽或蛋白质，可列举寡聚精氨酸、寡聚赖氨酸、鱼精蛋白等。作为所述阳离子脂质，可以是选自二甲基二(十八烷基)溴化铵盐（DDAB）、1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵丙烷、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷（DOTAP）、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷甲基硫酸盐、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵丙烷、1,2-二硬脂酰基-3-三甲基铵丙烷、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵（DOTMA）、二肉豆蔻酰基氧基丙基二甲基羟基乙基溴化铵盐（DMRIE）、二油酰氧基丙基二甲基羟基乙基溴化铵（DORIE）、二甲基二(十二烷基)溴化铵、N-( $\alpha$ -三甲基铵基乙酰基)-二(十二烷基)-D-谷氨酰胺盐酸盐、N-( $\alpha$ -三甲基铵基乙酰基)-O,O'-双-(1H,1H,2H,2H-全氟癸烷基)-L-谷氨酰胺盐酸盐、O,O'-二(十二烷酰基)-N-( $\alpha$ -三甲基铵基乙酰基)二乙醇胺盐酸盐、甲基烯丙基二(十二烷基)溴化铵、N- $\{p$ -( $w$ -三甲基铵基丁基氧基)-苯甲酰基}-二(十二烷基)-L-谷氨酰胺盐酸盐、9-( $w$ -三甲基铵基丁基)-3,6-双(十二烷酰基)咪唑溴化物、二甲基二(十八烷基)铵盐酸盐、N- $w$ -三甲基铵基癸酰基-二(十六烷基)-D-谷氨酰胺溴化物、N- $\{p$ -( $w$ -三甲基铵基己基氧基)-苯甲酰基}-二(十四烷基)-L-谷氨酰胺溴化物、 $p$ -( $w$ -三甲基铵基癸基氧基)- $p'$ -辛氧基偶氮苯溴化物盐（MC-1-0810）、 $p$ - $\{w$ -( $b$ -羟基乙基)二甲基-铵基-癸基氧基}- $p'$ -辛氧基偶氮苯溴化物盐（MC-3-0810）、O,O',O''-三(十二烷酰基)-N-( $w$ -三甲基-铵基癸酰基)-三(羟基甲基)氨基甲烷溴化物盐（TC-1-12）、1,2-二月桂基-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰基-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰基-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二硬脂酰基-甘油-3-乙基

磷酸胆碱、1,2-二油酰基-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1-棕榈酰基-2-油酰基-甘油-3-乙基磷酸胆碱、N,N-二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵(BHEM-Chol)、(2,3-二油氧基丙基)三甲基氯化铵(DOTAP)和N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵中的至少一种阳离子脂质。作为所述带正电的聚合物,可以是选自聚乙烯亚胺、  
5 聚β-氨基酯、壳聚糖季铵盐中的至少一种正电性聚合物。本发明中,优选N,N-二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵、(2,3-二油氧基丙基)三甲基氯化铵、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵、或聚己内酯-聚(N,N-二甲氨基乙基甲基丙烯酸酯)嵌段共聚物类聚β-氨基酯作为阳离子组分。

本发明所述的药物组合物中,所述非阳离子组分可以是但不限于中性的膜融合脂  
10 质(fusogenic lipid)、阴离子脂质、两亲性聚合物等。作为所述膜融合脂质,可以列举二油酰基磷脂酰乙醇胺、二油酰基磷脂酰胆碱、反式磷脂酰基乙醇胺、1,2-双(10,12-二十三烷二酰基)-磷酸乙醇胺、1,2-二反油酰基磷酸乙醇胺、1,2-二(十六烷基)磷酸乙醇胺、1,2-二己酰基磷酸乙醇胺、1,2-二月桂酰基磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基磷酸乙醇胺、1,2-二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈油酰基磷酸乙醇胺、  
15 1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺、1,2-二植烷酰基磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰基磷酸乙醇胺、1-棕榈酰基-2-油酰基磷酸乙醇胺、1-棕榈酰基-2-(10,12-二十三烷二酰基)磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-己酰胺、1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-己酰胺、N,N-二甲基-1,2-二油酰基磷酸乙醇胺、N,N-二甲基-1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺、N-十二烷酰基-1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺、N-十二烷酰基-1,2-二油酰基磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺  
20 -N-十二烷基胺、1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-十二烷基胺、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-戊二酰、1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-戊二酰、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-乳糖、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-[4(p-马来酰亚胺甲基)环己烷-羧酸盐]、二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-[4(p-马来酸亚胺甲基)环己烷-羧酸盐]、1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-[4(p-马来酰亚胺苯基)丁酰胺]、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-[4(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐]、N-甲基-1,2-  
25 二油酰基磷酸乙醇胺、N-甲基-二棕榈酰基磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基磷酸乙醇胺-N-[3-(2-吡啶二硫)丙酸盐]、1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺-N-[3-(2-吡啶二硫)丙酸盐]、N-(琥珀酰)-1,2-二油酰基磷酸乙醇胺、N-(琥珀酰)-1,2-二棕榈酰基磷酸乙醇胺等。本发明的药物组合物中,通过含有上述膜融合脂质,能够进一步提高所述药物组合物在哺乳动物体内的转运及输送效率。作为所述两亲性聚合物,可以列举聚乙二醇-聚乳酸两嵌段共聚物、  
30 聚乙二醇-聚乳酸三嵌段共聚物、聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)两嵌段共聚物、或聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)三嵌段共聚物、聚己内酯-聚磷酸酯两嵌段共聚物、聚己内酯-聚磷酸酯三嵌段共聚物、聚乙二醇-聚己内酯两嵌段共聚物、聚乙二醇-聚己内酯三嵌段共

聚物等。其中，在本发明的药物组合物中优选使用二油酰基磷脂酰乙醇胺、或聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物作为非阳离子组分。

本发明的药物组合物中，所述药学上可接受的载体可以是 pH 值为 4.0-9.0 的磷酸盐缓冲液、pH 值为 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液、生理盐水、或 7-15% 的蔗糖溶液，其中，优选使用 pH 值为 4.0-9.0 的磷酸缓冲液作为本发明的药学上可接受的载体。本发明的药物组合物中还可以含有保护剂和/或渗透压调节剂。保护剂选自肌醇、山梨醇和蔗糖中的一种或几种，渗透压调节剂可以是氯化钠和/或氯化钾。以注射用液体制剂形式的药物组合物为例，所述保护剂的含量可以是 0.01-30 重量%。对于渗透压调节剂的含量没有特殊限定，只要可保持液体制剂的渗透压为 200-700 毫渗摩尔/千克即可。向动物或人类个体施用本发明的液体制剂形式的药物组合物时，其剂量可以为本领域常用的剂量。例如，单次注射的剂量可以是在 1-10g/kg 体重的范围内。具体使用时，剂量选择可以由各种参数、尤其根据待动物或人类个体的年龄、体重和症状等来确定。

本发明中，以所述 siRNA 作为活性成分的药物组合物中还可以包含可增强药物组合物的稳定性、维持和增强 siRNA 的抑制效果、可促进药物组合物的代谢特性及组织靶向性的辅助组分。作为辅助组分，可列举但不限于胆固醇、多肽、蛋白质、多糖、脂肪链、中性磷脂、及聚乙二醇-脂质（PEG-lipid）中的一种或几种。对于这些辅助组分在本发明的药物组合物中的用量没有特别的限制，只要能够增强药物组合物的稳定性、血液代谢性能、靶向输送效果即可。

根据本发明提供的抑制哺乳动物细胞内 plk1 基因表达的方法，该方法包括向哺乳动物细胞内导入上述提到的抑制 plk1 基因表达的 siRNA，从而使导入的 siRNA 能够序列特异性地诱导所述 plk1 基因表达的抑制。

本发明中，在体外将 siRNA 导入到细胞内时可以采用已知方法进行。常用的体外 siRNA 导入方法如电穿孔法、显微注射法、磷酸钙法、DEAE-葡聚糖法、病毒包裹法及脂质体包裹法等。其中，脂质体包裹法已成为 siRNA 的常规体外导入方法。本发明中，作为脂质体可利用市售的阳离子脂质体，例如利用 Lipofectamin 2000（Invitrogen 公司制）、Oligofectamine（Invitrogen 公司制）及 Tfx50（Promega 公司制）等。对于 siRNA 和阳离子脂质体的配合比率没有特殊限定，只要可有效地进行导入且不对细胞显示剂量毒性即可，例如，相对于 100 重量份的小干扰 RNA，阳离子脂质体的含量可以为 100-10000000 重量份。本发明中，将 siRNA 导入到哺乳动物体内细胞时的方法有两种。一是将裸的 siRNA（naked siRNA）直接导入到易于到达的皮肤组织细胞、眼部组织细胞、肺部组织细胞中等；二是以本发明的药物组合物形式进行 siRNA 系统输送。

以下，结合实施例进一步说明本发明。除非特别说明，本发明所用到的试剂、培

培养基等实验材料均为市售商品。

### 实施例 1: siRNA 的设计与合成

针对人 plk1 的 mRNA 序列 (Genebank 注册号: NM\_005030.3, SEQ ID NO: 1) 并根据上述提到的设计原则得到了 132 个 siRNA, 得到的 siRNA 的序列示于表 1。其中, 127 条 siRNA (PLK-1~PLK-127) 分布于 plk1 基因的编码区, 最后 5 条 siRNA (PLK-128~PLK-132) 分布于 plk1 基因的 3'端非翻译区。表 1 中, 对于一个 siRNA, 分别示出其正义链、及互补的反义链序列, 具体如, siRNA PLK-1 的正义链具有由 SEQ ID NO:2 表示的序列, 且与 plk1 mRNA 序列中相应的靶位点序列相同, 反义链具有由 SEQ ID NO:134 表示的序列, 与 plk1 mRNA 序列中相应的靶位点序列互补; 其他 siRNA 的两条单链序列也如同 siRNA PLK-1 依次对各自的两条单链进行序列编号。

表 1: 针对人 mRNA 的 siRNA 序列

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人mRNA (NM_005030.3) 中对应的靶位点序列
PLK-1	2	GCUCCACCGGCGAAAGAGA	153-171
	134	UCUCUUUCGCCGGUGGAGC	
PLK-2	3	CCAAGUGCUUCGAGAUCUC	247-265
	135	GAGAUCUCGAAGCACUUGG	
PLK-3	4	GUGCUUCGAGAUCUCGGAC	251-269
	136	GUCCGAGAUCUCGAAGCAC	
PLK-4	5	UCUCGGACGCGGACACCAA	262-280
	137	UUGGUGUCCGCGUCCGAGA	
PLK-5	6	CAAGAUUGUGCCUAAGUCU	296-314
	138	AGACUUAGGCACAAUCUUG	
PLK-6	7	GAUUGUGCCUAAGUCUCUG	299-317
	139	CAGAGACUUAGGCACAAUC	
PLK-7	8	CUAAGUCUCUGCUCUCAA	307-325
	140	UUGAGCAGCAGAGACUUAG	
PLK-8	9	AAGCCGCACCAGAGGGAGA	324-342
	141	UCUCCCUCUGGUGCGGCUU	
PLK-9	10	GAUGUCCAUGGAAUAUCC	344-362
	142	GGAUUUUCCAUGGACAUC	
PLK-10	11	AUGGAAUAUCCAUUCACC	351-369
	143	GGUGAAUGGAUUAUUCCA	
PLK-11	12	GAAUAUCCAUUCACCGCA	354-372
	144	UGC GGUGAAUGGAUUAUUUC	
PLK-12	13	AUAUCCAUUCACCGCAGCC	357-375
	145	GGCUGCGGUGAAUGGAUUA	
PLK-13	14	ACCAGCACGUCGUAGGAUU	382-400

	146	AAUCCUACGACGUGCUGGU	
PLK-14	15	UCGUAGGAUUCCACGGCUU	391-409
	147	AAGCCGUGGAAUCCUACGA	
PLK-15	16	CGUAGGAUUCCACGGCUUU	392-410
	148	AAAGCCGUGGAAUCCUACG	
PLK-16	17	CGACUUCGUGUUCGUGGUG	422-440
	149	CACCACGAACACGAAGUCG	
PLK-17	18	ACUUCGUGUUCGUGGUGUU	424-442
	150	AACACCACGAACACGAAGU	
PLK-18	19	GCUGCACAAGAGGAGGAAA	473-491
	151	UUUCCUCCUCUUGUGCAGC	
PLK-19	20	CUGCACAAGAGGAGGAAAG	474-492
	152	CUUCCUCCUCUUGUGCAG	
PLK-20	21	GGAGGAAAGCCCUGACUGA	484-502
	153	UCAGUCAGGGCUUCCUCC	
PLK-21	22	CCGAUACUACCUACGGCAA	512-530
	154	UUGCCGUAGGUAGUAUCGG	
PLK-22	23	CGAUACUACCUACGGCAA	513-531
	155	UUUGCCGUAGGUAGUAUCG	
PLK-23	24	GAUACUACCUACGGCAAU	514-532
	156	AUUUGCCGUAGGUAGUAUC	
PLK-24	25	CCUACGGCAAUUGUGCUU	521-539
	157	AAGCACAAUUGCCGUAGG	
PLK-25	26	AUUGUGCUUGGCUGCCAGU	531-549
	158	ACUGGCAGCCAAGCACAAU	
PLK-26	27	GCCAGUACCUGCACCGAAA	544-562
	159	UUUCGGUGCAGGUACUGGC	
PLK-27	28	CUGCACCGAAACCGAGUUA	552-570
	160	UAACUCGGUUUCGGUGCAG	
PLK-28	29	GCACCGAAACCGAGUUAU	554-572
	161	AAUAAACUCGGUUUCGGUGC	
PLK-29	30	CCGAAACCGAGUUAUUCAU	557-575
	162	AUGAAUAAACUCGGUUUCGG	
PLK-30	31	AAACCGAGUUAUUCaucga	560-578
	163	UCGAUGAAUAAACUCGGUUU	
PLK-31	32	ACCGAGUUAUUCaucgaga	562-580
	164	UCUCGAUGAAUAAACUCGGU	
PLK-32	33	AGUUAUUCaucgagaccuc	566-584
	165	GAGGUCUCGAUGAAUAAACU	
PLK-33	34	GAGACCUCaAGCUGGGCAA	577-595
	166	UUGCCCAGCUUGAGGUCUC	
PLK-34	35	UGAAUGAAGAUCUGGAGGU	604-622
	167	ACCUCCAGAUCUUCauuca	
PLK-35	36	GAAUGAAGAUCUGGAGGUG	605-623
	168	CACCUCCAGAUCUUCauuc	

PLK-36	37	AUGAAGAUCUGGAGGUGAA	607-625
	169	UUCACCUCCAGAUCUUCAU	
PLK-37	38	UGAAGAUCUGGAGGUGAAA	608-626
	170	UUUCACCUCCAGAUCUUCA	
PLK-38	39	GGCAACCAAAGUCGAAUAU	644-662
	171	AUAUUCGACUUUGGUUGCC	
PLK-39	40	CAACCAAAGUCGAAUAUGA	646-664
	172	UCAUAUUCGACUUUGGUUG	
PLK-40	41	ACCAAAGUCGAAUAUGACG	648-666
	173	CGUCAUAUUCGACUUUGGU	
PLK-41	42	CCAAAGUCGAAUAUGACGG	649-667
	174	CCGUCAUAUUCGACUUUGG	
PLK-42	43	AGUCGAAUAUGACGGGGAG	653-671
	175	CUCCCCGUCAUAUUCGACU	
PLK-43	44	UAUGACGGGGAGAGGAAGA	660-678
	176	UCUUCCUCUCCCCGUCAUA	
PLK-44	45	CUGUGUGGGACUCCUAAUU	684-702
	177	AAUUAGGAGUCCCACACAG	
PLK-45	46	GUGGGACUCCUAAUUACAUA	688-706
	178	AUGUAAUUAGGAGUCCCAC	
PLK-46	47	UGGGACUCCUAAUUACAUA	689-707
	179	UAUGUAAUUAGGAGUCCCA	
PLK-47	48	GACUCCUAAUUACAUAAGCU	692-710
	180	AGCUAUGUAAUUAGGAGUC	
PLK-48	49	CUAAUUACAUAAGCUCCCGA	697-715
	181	UCGGGAGCUAUGUAAUUAG	
PLK-49	50	UUACAUAAGCUCCCGAGGUG	701-719
	182	CACCUCGGGAGCUAUGUAA	
PLK-50	51	GCAAGAAAGGGCACAGUUU	724-742
	183	AAACUGUGCCCUUUCUUGC	
PLK-51	52	GAAAGGGCACAGUUUCGAG	728-746
	184	CUCGAAACUGUGCCCUUUC	
PLK-52	53	CCAUUGGGUGUAUCAUGUA	760-778
	185	UACAUGAUACACCCAAUGG	
PLK-53	54	CAUUGGGUGUAUCAUGUAU	761-779
	186	AUACAUGAUACACCCAAUG	
PLK-54	55	GGUGUAUCAUGUAUACCUU	766-784
	187	AAGGUAAUCAUGAUACACC	
PLK-55	56	AUCAUGUAUACCUUGUUAG	771-789
	188	CUAACAAGGUAAUCAUGAU	
PLK-56	57	AUGUAUACCUUGUUAGUGG	774-792
	189	CCACUAACAAGGUAAUCAU	
PLK-57	58	AUACCUUGUUAGUGGGCAA	778-796
	190	UUGCCCACUAACAAGGUAAU	
PLK-58	59	CUUGUUAGUGGGCAAACCA	782-800



	191	UGGUUUGCCCACUAACAAG	
PLK-59	60	UUUGAGACUUCUUGCCUAA	804-822
	192	UUAGGCAAGAAGUCUCAA	
PLK-60	61	AGAGACCUACCUCGGAUC	824-842
	193	GAUCCGGAGGUAGGUCUCU	
PLK-61	62	GAGACCUACCUCGGAUCA	825-843
	194	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC	
PLK-62	63	CCUCCGGAUCAAGAAGAAU	833-851
	195	AUUCUUCUUGAUCCGGAGG	
PLK-63	64	CCGGAUCAAGAAGAAUGAA	836-854
	196	UUCAUUCUUCUUGAUCCGG	
PLK-64	65	CGGAUCAAGAAGAAUGAAU	837-855
	197	AUUCAUUCUUCUUGAUCCG	
PLK-65	66	GGAUCAAGAAGAAUGAAUA	838-856
	198	UAUUCAUUCUUCUUGAUCC	
PLK-66	67	GAUCAAGAAGAAUGAAUAC	839-857
	199	GUAUUCAUUCUUCUUGAUC	
PLK-67	68	CAAGAAGAAUGAAUACAGU	842-860
	200	ACUGUAUUCAUUCUUCUUG	
PLK-68	69	GAAGAAUGAAUACAGUAUU	845-863
	201	AAUACUGUAUUCAUUCUUC	
PLK-69	70	GAAUGAAUACAGUAUUC	848-866
	202	GGGAAUACUGUAUUCUUC	
PLK-70	71	UGAAUACAGUAUUC	851-869
	203	CUUGGGAAUACUGUAUUC	
PLK-71	72	UACAGUAUUC	855-873
	204	UGUGCUUGGGAAUACUGUA	
PLK-72	73	GUAUUC	859-877
	205	UUGAUGUGCUUGGGAAUAC	
PLK-73	74	GAUGCUUCAGACAGAUCC	905-923
	206	GGGAUCUGUCUGAAGCAUC	
PLK-74	75	CAACCAUUAACGAGCUGCU	934-952
	207	AGCAGCUCGUUAAUGGUUG	
PLK-75	76	CCAUUAACGAGCUGCUUAA	937-955
	208	UUAAGCAGCUCGUUAAUGG	
PLK-76	77	CGAGCUGCUUAAUGACGAG	944-962
	209	CUCGUCAUUAAGCAGCUCG	
PLK-77	78	GCUUAAUGACGAGUUCUUU	950-968
	210	AAAGAACUCGUCAUUAAGC	
PLK-78	79	CUUAAUGACGAGUUCUUUA	951-969
	211	UAAAGAACUCGUCAUUAAG	
PLK-79	80	UGACGAGUUCUUUACUUCU	956-974
	212	AGAAGUAAAGAACUCGUCA	
PLK-80	81	GAGUUCUUUACUUCUGGCU	960-978
	213	AGCCAGAAGUAAAGAACUC	

PLK-81	82	GUUCUUUACUUCUGGCUAU	962-980
	214	AUAGCCAGAAGUAAAGAAC	
PLK-82	83	CUUUACUUCUGGCUAUAUC	965-983
	215	GAUAUAGCCAGAAGUAAAG	
PLK-83	84	GACCAUUCCACCAAGGUUU	1010-1028
	216	AAACCUUGGUGGAAUGGUC	
PLK-84	85	CCCUCACAGUCCUCAUAA	1069-1087
	217	UUAUUGAGGACUGUGAGGG	
PLK-85	86	CCUCACAGUCCUCAUAAA	1070-1088
	218	UUUAUUGAGGACUGUGAGG	
PLK-86	87	CAGUCCUCAUAAAGGCUU	1075-1093
	219	AAGCCUUUAUUGAGGACUG	
PLK-87	88	CUCAAUAAAGGCUUGGAGA	1080-1098
	220	UCUCCAAGCCUUUAUUGAG	
PLK-88	89	UCAUAAAGGCUUGGAGAA	1081-1099
	221	UUCUCCAAGCCUUUAUUGA	
PLK-89	90	CAAUAAAGGCUUGGAGAAC	1082-1100
	222	GUUCUCCAAGCCUUUAUUG	
PLK-90	91	UAAAGGCUUGGAGAACCCC	1085-1103
	223	GGGGUUCUCCAAGCCUUUA	
PLK-91	92	AGAAGAACCAGUGGUUCGA	1127-1145
	224	UCGAACCACUGGUUCUUCU	
PLK-92	93	GAACCAGUGGUUCGAGAGA	1131-1149
	225	UCUCUCGAACCACUGGUUC	
PLK-93	94	CCAGUGGUUCGAGAGACAG	1134-1152
	226	CUGUCUCUCGAACCACUGG	
PLK-94	95	AGACAGGUGAGGUGGUCGA	1147-1165
	227	UCGACCACCUCACCUGUCU	
PLK-95	96	GGCAAGAGGAGGCUGAGGA	1240-1258
	228	UCCUCAGCCUCCUCUUGCC	
PLK-96	97	GCAAGAGGAGGCUGAGGAU	1241-1259
	229	AUCCUCAGCCUCCUCUUGC	
PLK-97	98	AAGAGGAGGCUGAGGAUCC	1243-1261
	230	GGAUCCUCAGCCUCCUCUU	
PLK-98	99	CCAUCUUCUGGGUCAGCAA	1273-1291
	231	UUGCUGACCCAGAAGAUGG	
PLK-99	100	UCAGCAAGUGGGUGGACUA	1285-1303
	232	UAGUCCACCCACUUGCUGA	
PLK-100	101	CAGCAAGUGGGUGGACUAU	1286-1304
	233	AUAGUCCACCCACUUGCUG	
PLK-101	102	GCAAGUGGGUGGACUAUUC	1288-1306
	234	GAAUAGUCCACCCACUUGC	
PLK-102	103	GGACUAUUCGGACAAGUAC	1298-1316
	235	GUACUUGUCCGAAUAGUCC	
PLK-103	104	GGUAUCAGCUCUGUGAUAA	1324-1342

	236	UUAUCACAGAGCUGAUACC	
PLK-104	105	GGUGCUCUCAAUGACUCA	1352-1370
	237	UGAGUCAUUGAAGAGCACC	
PLK-105	106	GCUCUCAAUGACUCAACA	1355-1373
	238	UGUUGAGUCAUUGAAGAGC	
PLK-106	107	UGACUCAACACGCCUCAUC	1364-1382
	239	GAUGAGGCGUGUUGAGUCA	
PLK-107	108	CACGCCUCAUCCUCUACAA	1372-1390
	240	UUGUAGAGGAUGAGGCGUG	
PLK-108	109	CUACAAUGAUGGUGACAGC	1385-1403
	241	GCUGUCACCAUCAUUGUAG	
PLK-109	110	GGUGACAGCCUGCAGUACA	1395-1413
	242	UGUACUGCAGGCUGUCACC	
PLK-110	111	GUGACAGCCUGCAGUACAU	1396-1414
	243	AUGUACUGCAGGCUGUCAC	
PLK-111	112	CCCAACUCCUUGAUGAAGA	1458-1476
	244	UCUUCAUCAAGGAGUUGGG	
PLK-112	113	CCAACUCCUUGAUGAAGAA	1459-1477
	245	UUCUUCAUCAAGGAGUUGG	
PLK-113	114	ACUCCUUGAUGAAGAAGAU	1462-1480
	246	AUCUUCUUCAUCAAGGAGU	
PLK-114	115	CUCCUUGAUGAAGAAGAUC	1463-1481
	247	GAUCUUCUUCAUCAAGGAG	
PLK-115	116	GAAGAAGAUACCCUCCUU	1472-1490
	248	AAGGAGGGUGAUCUUCUUC	
PLK-116	117	GAAGAUACCCUCCUAAA	1475-1493
	249	UUUAAGGAGGGUGAUCUUC	
PLK-117	118	GAUCACCCUCCUAAAUAU	1478-1496
	250	AUAUUUAAGGAGGGUGAUC	
PLK-118	119	AUAUUUCCGCAAUUACAUG	1493-1511
	251	CAUGUAAUUGCGGAAUAU	
PLK-119	120	UUACAUGAGCGAGCACUUG	1505-1523
	252	CAAGUGCUCGCUCAUGUAA	
PLK-120	121	GCAGCGUGCAGAUCAACUU	1636-1654
	253	AAGUUGAUCUGCACGCUGC	
PLK-121	122	GCGUGCAGAUCAACUUCUU	1639-1657
	254	AAGAAGUUGAUCUGCACGC	
PLK-122	123	AGAUCAACUUCUCCAGGA	1645-1663
	255	UCCUGGAAGAAGUUGAUCU	
PLK-123	124	GAUCAACUUCUCCAGGAU	1646-1664
	256	AUCCUGGAAGAAGUUGAUC	
PLK-124	125	UCAACUUCUUCUCCAGGAUCA	1648-1666
	257	UGAUCCUGGAAGAAGUUGA	
PLK-125	126	CUUCUCCAGGAUCACACC	1652-1670
	258	GGUGUGAUCCUGGAAGAAG	

PLK-126	127	GAUCACACCAAGCUCAUCU	1662-1680
	259	AGAUGAGCUUGGUGUGAUC	
PLK-127	128	UGAUGGCAGCCGUGACCUA	1690-1708
	260	UAGGUCACGGCUGCCAUCA	
PLK-128	129	GCAGAGCUGCAUCAUCCUU	1982-2000
	261	AAGGAUGAUGCAGCUCUGC	
PLK-129	130	CCCACCAUAUGAAUUGUAC	2081-2099
	262	GUACAAUUCAUAUGGUGGG	
PLK-130	131	CCACCAUAUGAAUUGUACA	2082-2100
	263	UGUACAAUUCAUAUGGUGG	
PLK-131	132	CACCAUAUGAAUUGUACAG	2083-2101
	264	CUGUACAAUUCAUAUGGUG	
PLK-132	133	UCCUUCCUUGGCCUUUAUG	2127-2145
	265	CAUAAAGCCAAGGAAAGGA	

对于上述 132 个 siRNA，进一步依据物种同源性分析得到 12 个人-小鼠同源的 siRNA 序列，结果示于表 2；同样，得到 11 个人-大鼠同源的 siRNA 序列、105 个人-猕猴同源的 siRNA 序列、119 个人-黑猩猩同源的 siRNA 序列，这些结果分别示于表 3-表 5 中。

5 表 2：人-小鼠同源的 siRNA 序列

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人 mRNA (NM_005030.3) 中对应的靶位点序列	小鼠 mRNA (NM_011121.3) 中对应的靶位点序列
PLK-60	61	AGAGACCUACCUCCGGAUC	824-842	877-895
	193	GAUCCGGAGGUAGGUCUCU		
PLK-61	62	GAGACCUACCUCCGGAUCA	825-843	878-896
	194	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC		
PLK-70	71	UGAAUACAGUAUCCCAAG	851-869	904-922
	203	CUUGGAAUACUGUAUUCA		
PLK-71	72	UACAGUAUCCCAAGCACA	855-873	908-926
	204	UGUGCUUGGAAUACUGUA		
PLK-72	73	GUAUCCCAAGCACAUCAA	859-877	912-930
	205	UUGAUGUGCUUGGAAUAC		
PLK-95	96	GGCAAGAGGAGGCUGAGGA	1240-1258	1293-1311
	228	UCCUCAGCCUCCUCUUGCC		
PLK-96	97	GCAAGAGGAGGCUGAGGAU	1241-1259	1294-1312
	229	AUCCUCAGCCUCCUCUUGC		
PLK-97	98	AAGAGGAGGCUGAGGAUCC	1243-1261	1296-1314
	230	GGAUCCUCAGCCUCCUCUU		
PLK-98	99	CCAUCUUCUGGGUCAGCAA	1273-1291	1326-1344
	231	UUGCUGACCCAGAAGAUGG		
PLK-99	100	UCAGCAAGUGGGUGGACUA	1285-1303	1338-1356
	232	UAGUCCACCCACUUGCUGA		
PLK-100	101	CAGCAAGUGGGUGGACUAU	1286-1304	1339-1357
	233	AUAGUCCACCCACUUGCUG		
PLK-101	102	GCAAGUGGGUGGACUAUUC	1288-1306	1341-1359
	234	GAAUAGUCCACCCACUUGC		

表 3: 人-大鼠同源的 siRNA 序列

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人mRNA (NM_005030.3) 中对应的靶位点序列	大鼠mRNA (NM_017100.1) 中对应的靶位点序列
PLK-60	61	AGAGACCUACCUCCGGAUC	824-842	865-883
	193	GAUCCGGAGGUAGGUCUCU		
PLK-61	62	GAGACCUACCUCCGGAUCA	825-843	866-884
	194	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC		
PLK-70	71	UGAAUACAGUAUUCCCAAG	851-869	892-910
	203	CUUGGAAUACUGUAUUCA		
PLK-71	72	UACAGUAUUCCCAAGCACA	855-873	896-914
	204	UGUGCUUGGAAUACUGUA		
PLK-72	73	GUAUUCCCAAGCACAUCAA	859-877	900-918
	205	UUGAUGUGCUUGGAAUAC		
PLK-106	107	UGACUCAACACGCCUCAUC	1364-1382	1405-1423
	239	GAUGAGGCGUGUUGAGUCA		
PLK-107	108	CACGCCUCAUCCUCUACAA	1372-1390	1413-1431
	240	UUGUAGAGGAUGAGGCGUG		
PLK-111	112	CCCAACUCCUUGAUGAAGA	1458-1476	1499-1517
	244	UCUUCAUCAAGGAGUUGGG		
PLK-112	113	CCAACUCCUUGAUGAAGAA	1459-1477	1500-1518
	245	UUCUUCAUCAAGGAGUUGG		
PLK-113	114	ACUCCUUGAUGAAGAAGAU	1462-1480	1503-1521
	246	AUCUUCUUCAUCAAGGAGU		
PLK-114	115	CUCUUGAUGAAGAAGAUC	1463-1481	1504-1522
	247	GAUCUUCUUCAUCAAGGAG		

表 4: 人-猕猴同源的 siRNA 序列

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人mRNA (NM_005030.3) 中对应的靶位点序列	猕猴 mRNA (XM_001092070.2) 中对应的靶位点序列
PLK-1	2	GCUCCACCGCGCAAAGAGA	153-171	376-394
	134	UCUCUUUCGCCGUGGAGC		
PLK-2	3	CCAAGUGCUUCGAGAUCUC	247-265	470-488
	135	GAGAUCUCGAAGCACUUGG		
PLK-3	4	GUGCUUCGAGAUCUCGGAC	251-269	474-492
	136	GUCCGAGAUCUCGAAGCAC		
PLK-4	5	UCUCGGACGCGGACACCAA	262-280	485-503
	137	UUGGUGUCCGCGUCCGAGA		
PLK-5	6	CAAGAUUGUGCCUAAGUCU	296-314	519-537
	138	AGACUUAGGCACAAUCUUG		
PLK-6	7	GAUUGUGCCUAAGUCUCUG	299-317	522-540
	139	CAGAGACUUAGGCACAAUC		
PLK-8	9	AAGCCGCACCAGAGGGAGA	324-342	547-565
	141	UCUCCCUCUGGUGCGGCUU		
PLK-9	10	GAUGUCCAUGGAAUAUCC	344-362	567-585
	142	GGUAUUUCCAUGGACAUC		
PLK-10	11	AUGGAAUAUCCAUUCACC	351-369	574-592
	143	GGUGAAUGGAUAUUCCAUC		

PLK-11	12	GAAAUAUCCAUUCACCGCA	354-372	577-595
	144	UGCGGUGAAUGGAUUAUUUC		
PLK-12	13	AUAUCCAUUCACCGCAGCC	357-375	580-598
	145	GGCUGCGGUGAAUGGAUUAU		
PLK-13	14	ACCAGCACGUCGUAGGAUU	382-400	605-623
	146	AAUCCUACGACGUGCUGGU		
PLK-14	15	UCGUAGGAUUCCACGGCUU	391-409	614-632
	147	AAGCCGUGGAAUCCUACGA		
PLK-15	16	CGUAGGAUUCCACGGCUUU	392-410	615-633
	148	AAAGCCGUGGAAUCCUACG		
PLK-16	17	CGACUUCGUGUUCGUGGUG	422-440	645-663
	149	CACCACGAACACGAAGUCG		
PLK-17	18	ACUUCGUGUUCGUGGUGUU	424-442	647-665
	150	AACACCACGAACACGAAGU		
PLK-18	19	GCUGCACAAGAGGAGGAAA	473-491	696-714
	151	UUUCCUCCUCUUGUGCAGC		
PLK-19	20	CUGCACAAGAGGAGGAAAG	474-492	697-715
	152	CUUCCUCCUCUUGUGCAG		
PLK-20	21	GGAGGAAAGCCUGACUGA	484-502	707-725
	153	UCAGUCAGGGCUUCCUCC		
PLK-27	28	CUGCACCGAAACCGAGUUA	552-570	775-793
	160	UAACUCGGUUUCGGUGCAG		
PLK-28	29	GCACCGAAACCGAGUUAUU	554-572	777-795
	161	AAUAACUCGGUUUCGGUGC		
PLK-33	34	GAGACCUCAAGCUGGGCAA	577-595	800-818
	166	UUGCCCAGCUUGAGGUCUC		
PLK-34	35	UGAAUGAAGAUCUGGAGGU	604-622	827-845
	167	ACCUCCAGAUCUUAUUA		
PLK-35	36	GAAUGAAGAUCUGGAGGUG	605-623	828-846
	168	CACCUCCAGAUCUUAUUC		
PLK-36	37	AUGAAGAUCUGGAGGUGAA	607-625	830-848
	169	UUCACCUCAGAUUCUUAU		
PLK-37	38	UGAAGAUCUGGAGGUGAAA	608-626	831-849
	170	UUUCACCUCAGAUUCUUA		
PLK-38	39	GGCAACCAAAGUCGAAUAU	644-662	867-885
	171	AUAUUCGACUUUGGUUGCC		
PLK-39	40	CAACCAAAGUCGAAUAUGA	646-664	869-887
	172	UCAUAUUCGACUUUGGUUG		
PLK-40	41	ACCAAAGUCGAAUAUGACG	648-666	871-889
	173	CGUCAUAUUCGACUUUGGU		
PLK-41	42	CCAAAGUCGAAUAUGACGG	649-667	872-890
	174	CCGUCAUAUUCGACUUUGG		
PLK-42	43	AGUCGAAUAUGACGGGGAG	653-671	876-894
	175	CUCCCCGUCAUAUUCGACU		
PLK-43	44	UAUGACGGGGAGAGGAAGA	660-678	883-901

	176	UCUUCCUCUCCCCGUCAUA		
PLK-47	48	GACUCCUAAUUACAUAGCU	692-710	915-933
	180	AGCUAUGUAAUUAGGAGUC		
PLK-48	49	CUAAUUACAUAGCUCCCGA	697-715	920-938
	181	UCGGGAGCUAUGUAAUUAG		
PLK-49	50	UUACAUAGCUCCCGAGGUG	701-719	924-942
	182	CACCUCGGGAGCUAUGUAA		
PLK-50	51	GCAAGAAAGGGCACAGUUU	724-742	947-965
	183	AAACUGUGCCCUUUCUUGC		
PLK-51	52	GAAAGGGCACAGUUUCGAG	728-746	951-969
	184	CUCGAAACUGUGCCCUUUC		
PLK-54	55	GGUGUAUCAUGUAUACCUU	766-784	989-1007
	187	AAGGUAUACAUGAUACACC		
PLK-55	56	AUCAUGUAUACCUUGUUAG	771-789	994-1012
	188	CUAACAAGGUAUACAUGAU		
PLK-56	57	AUGUAUACCUUGUUAGUGG	774-792	997-1015
	189	CCACUAACAAGGUAUACA		
PLK-57	58	AUACCUUGUUAGUGGGCAA	778-796	1001-1019
	190	UUGCCCACUAACAAGGUAU		
PLK-58	59	CUUGUUAGUGGGCAAACCA	782-800	1005-1023
	191	UGGUUUGCCCACUAACAAG		
PLK-59	60	UUUGAGACUUCUUGCCUAA	804-822	1027-1045
	192	UUAGGCAAGAAGUCUCAAA		
PLK-60	61	AGAGACCUACCUCGGGAUC	824-842	1047-1065
	193	GAUCCGGAGGUAGGUCUCU		
PLK-61	62	GAGACCUACCUCGGGAUCA	825-843	1048-1066
	194	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC		
PLK-62	63	CCUCCGGAUCAAGAAGAAU	833-851	1056-1074
	195	AUUCUUCUUGAUCCGGAGG		
PLK-63	64	CCGGAUCAAGAAGAAUGAA	836-854	1059-1077
	196	UUCAUUCUUCUUGAUCCGG		
PLK-64	65	CGGAUCAAGAAGAAUGAAU	837-855	1060-1078
	197	AUCAUUCUUCUUGAUCCG		
PLK-65	66	GGAUCAAGAAGAAUGAAUA	838-856	1061-1079
	198	UAUCAUUCUUCUUGAUCC		
PLK-66	67	GAUCAAGAAGAAUGAAUAC	839-857	1062-1080
	199	GUAUUCUUCUUCUUGAUCC		
PLK-67	68	CAAGAAGAAUGAAUACAGU	842-860	1065-1083
	200	ACUGUAUUCUUCUUCUUG		
PLK-68	69	GAAGAAUGAAUACAGUAUU	845-863	1068-1086
	201	AAUACUGUAUUCUUCUUC		
PLK-69	70	GAAUGAAUACAGUAUUC	848-866	1071-1089
	202	GGAAUACUGUAUUCUUC		
PLK-70	71	UGAAUACAGUAUUC	851-869	1074-1092
	203	CUUGGAAUACUGUAUUC		

PLK-71	72	UACAGUAUUCCCAAGCACA	855-873	1078-1096
	204	UGUGCUUGGGAAUACUGUA		
PLK-72	73	GUAUUCCCAAGCACAUCAA	859-877	1082-1100
	205	UUGAUGUGCUUGGGAAUAC		
PLK-73	74	GAUGCUUCAGACAGAUCCC	905-923	1128-1146
	206	GGGAUCUGUCUGAAGCAUC		
PLK-80	81	GAGUUCUUUACUUCUGGCU	960-978	1183-1201
	213	AGCCAGAAGUAAAGAACUC		
PLK-81	82	GUUCUUUACUUCUGGCUAU	962-980	1185-1203
	214	AUAGCCAGAAGUAAAGAAC		
PLK-82	83	CUUUACUUCUGGCUAUUUC	965-983	1188-1206
	215	GAUAUAGCCAGAAGUAAAG		
PLK-84	85	CCCUCACAGUCCUCAUAA	1069-1087	1292-1310
	217	UUAUUGAGGACUGUGAGGG		
PLK-85	86	CCUCACAGUCCUCAUAAA	1070-1088	1293-1311
	218	UUUAUUGAGGACUGUGAGG		
PLK-86	87	CAGUCCUCAUAAAAGGCUU	1075-1093	1298-1316
	219	AAGCCUUUAUUGAGGACUG		
PLK-87	88	CUCAUAAAAGGCUUGGAGA	1080-1098	1303-1321
	220	UCUCCAAGCCUUUAUUGAG		
PLK-88	89	UCAUAAAAGGCUUGGAGAA	1081-1099	1304-1322
	221	UUCUCCAAGCCUUUAUUGA		
PLK-89	90	CAUAAAAGGCUUGGAGAAC	1082-1100	1305-1323
	222	GUUCUCCAAGCCUUUAUUG		
PLK-90	91	UAAAGGCUUGGAGAACCCC	1085-1103	1308-1326
	223	GGGUUCUCCAAGCCUUUA		
PLK-92	93	GAACCAGUGGUUCGAGAGA	1131-1149	1354-1372
	225	UCUCUCGAACCACUGGUUC		
PLK-93	94	CCAGUGGUUCGAGAGACAG	1134-1152	1357-1375
	226	CUGUCUCUCGAACCACUGG		
PLK-94	95	AGACAGGUGAGGUGGUCGA	1147-1165	1370-1388
	227	UCGACCACCUCACUGUCU		
PLK-95	96	GGCAAGAGGAGGCUGAGGA	1240-1258	1463-1481
	228	UCCUCAGCCUCCUCUUGCC		
PLK-96	97	GCAAGAGGAGGCUGAGGAU	1241-1259	1464-1482
	229	AUCCUCAGCCUCCUCUUGC		
PLK-97	98	AAGAGGAGGCUGAGGAUCC	1243-1261	1466-1484
	230	GGAUCCUCAGCCUCCUCUU		
PLK-98	99	CCAUCUUCUGGGUCAGCAA	1273-1291	1496-1514
	231	UUGCUGACCCAGAAGAUGG		
PLK-99	100	UCAGCAAGUGGGUGGACUA	1285-1303	1508-1526
	232	UAGUCCACCCACUUGCUGA		
PLK-100	101	CAGCAAGUGGGUGGACUAU	1286-1304	1509-1527
	233	AUAGUCCACCCACUUGCUG		
PLK-101	102	GCAAGUGGGUGGACUAUUC	1288-1306	1511-1529



	234	GAAUAGUCCACCCACUUGC		
PLK-102	103	GGACUAUUCGGACAAGUAC	1298-1316	1521-1539
	235	GUACUUGUCCGAAUAGUCC		
PLK-103	104	GGUAUCAGCUCUGUGAUA	1324-1342	1547-1565
	236	UUAUCACAGAGCUGAUACC		
PLK-104	105	GGUGCUCUCAAUGACUCA	1352-1370	1575-1593
	237	UGAGUCAUUGAAGAGCACC		
PLK-105	106	GCUCUCAAUGACUCAACA	1355-1373	1578-1596
	238	UGUUGAGUCAUUGAAGAGC		
PLK-106	107	UGACUCAACACGCCUCAUC	1364-1382	1587-1605
	239	GAUGAGGCGUGUUGAGUCA		
PLK-107	108	CACGCCUCAUCCUCUACAA	1372-1390	1595-1613
	240	UUGUAGAGGAUGAGGCGUG		
PLK-109	110	GGUGACAGCCUGCAGUACA	1395-1413	1618-1636
	242	UGUACUGCAGGCUGUCACC		
PLK-110	111	GUGACAGCCUGCAGUACAU	1396-1414	1619-1637
	243	AUGUACUGCAGGCUGUCAC		
PLK-111	112	CCCAACUCCUUGAUGAAGA	1458-1476	1681-1699
	244	UCUUCAUCAAGGAGUUGGG		
PLK-112	113	CCAACUCCUUGAUGAAGAA	1459-1477	1682-1700
	245	UUCUUCAUCAAGGAGUUGG		
PLK-113	114	ACUCCUUGAUGAAGAAGAU	1462-1480	1685-1703
	246	AUCUUCUUCAUCAAGGAGU		
PLK-114	115	CUCCUUGAUGAAGAAGAU	1463-1481	1686-1704
	247	GAUCUUCUUCAUCAAGGAG		
PLK-115	116	GAAGAAGAUACCCUCCUU	1472-1490	1695-1713
	248	AAGGAGGGUGAUCUUCUUC		
PLK-116	117	GAAGAUCACCCUCCUAAA	1475-1493	1698-1716
	249	UUUAAGGAGGGUGAUCUUC		
PLK-117	118	GAUCACCCUCCUAAAUAU	1478-1496	1701-1719
	250	AUAUUUAAGGAGGGUGAUC		
PLK-118	119	AUAUUCCGCAAUACAUG	1493-1511	1716-1734
	251	CAUGUAAUUGCGGAAUAU		
PLK-120	121	GCAGCGUGCAGAUCAACUU	1636-1654	1859-1877
	253	AAGUUGAUCUGCACGCUGC		
PLK-121	122	GCGUGCAGAUCAACUUCUU	1639-1657	1862-1880
	254	AAGAAGUUGAUCUGCACGC		
PLK-122	123	AGAUCAACUUCUCCAGGA	1645-1663	1868-1886
	255	UCCUGGAAGAAGUUGAUCU		
PLK-123	124	GAUCAACUUCUCCAGGAU	1646-1664	1869-1887
	256	AUCCUGGAAGAAGUUGAUC		
PLK-124	125	UCAACUUCUCCAGGAUCA	1648-1666	1871-1889
	257	UGAUCCUGGAAGAAGUUGA		
PLK-125	126	CUUCUCCAGGAUCACACC	1652-1670	1875-1893
	258	GGUGUGAUCCUGGAAGAAG		

PLK-126	127	GAUCACACCAAGCUCAUCU	1662-1680	1885-1903
	259	AGAUGAGCUUGGUGUGAUC		
PLK-127	128	UGAUGGCAGCCGUGACCUA	1690-1708	1913-1931
	260	UAGGUCACGGCUGCCAUCA		
PLK-128	129	GCAGAGCUGCAUCAUCCUU	1982-2000	2205-2223
	261	AAGGAUGAUGCAGCUCUGC		
PLK-129	130	CCCACCAUAUGAAUUGUAC	2081-2099	2303-2321
	262	GUACAAUUCAUAUGGUGGG		
PLK-130	131	CCACCAUAUGAAUUGUACA	2082-2100	2304-2322
	263	UGUACAAUUCAUAUGGUGG		
PLK-131	132	CACCAUAUGAAUUGUACAG	2083-2101	2305-2323
	264	CUGUACAAUUCAUAUGGUG		

表 5: 人-黑猩猩同源的 siRNA 序列

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人mRNA (NM_005030.3)中对应的靶位点序列	黑猩猩mRNA (XM_001163623.2)中对应的靶位点序列
PLK-2	3	CCAAGUGCUUCGAGAUCUC	247-265	885-903
	135	GAGAUCUCGAAGCACUUGG		
PLK-3	4	GUGCUUCGAGAUCUCGGAC	251-269	889-907
	136	GUCCGAGAUCUCGAAGCAC		
PLK-5	6	CAAGAUUGUGCCUAAGUCU	296-314	934-952
	138	AGACUUAGGCACAAUCUUG		
PLK-6	7	GAUUGUGCCUAAGUCUCUG	299-317	937-955
	139	CAGAGACUUAGGCACAAUC		
PLK-8	9	AAGCCGCACCAGAGGGAGA	324-342	962-980
	141	UCUCCUCUGGUGCGGCUU		
PLK-9	10	GAUGUCCAUGGAAUAUCC	344-362	982-1000
	142	GGAUAAUUCCAUGGACAUC		
PLK-10	11	AUGGAAUAUCCAUUCACC	351-369	989-1007
	143	GGUGAAUGGAUAAUUCCAU		
PLK-11	12	GAAUAUCCAUUCACCGCA	354-372	992-1010
	144	UGCGGUGAAUGGAUAAUUUC		
PLK-12	13	AUAUCCAUUCACCGCAGCC	357-375	995-1013
	145	GGCUGCGGUGAAUGGAUUAU		
PLK-13	14	ACCAGCACGUCGUAGGAUU	382-400	1020-1038
	146	AAUCCUACGACGUGCUGGU		
PLK-14	15	UCGUAGGAUUCACGGCUU	391-409	1029-1047
	147	AAGCCGUGGAAUCCUACGA		
PLK-15	16	CGUAGGAUUCACGGCUUU	392-410	1030-1048
	148	AAAGCCGUGGAAUCCUACG		
PLK-16	17	CGACUUCGUGUUCGUGGUG	422-440	1060-1078
	149	CACCACGAACACGAAGUCG		
PLK-17	18	ACUUCGUGUUCGUGGUGUU	424-442	1062-1080
	150	AACACCACGAACACGAAGU		
PLK-18	19	GCUGCACAAGAGGAGGAAA	473-491	1111-1129

	151	UUUCCUCCUCUUGUGCAGC		
PLK-19	20	CUGCACAAGAGGAGGAAAG	474-492	1112-1130
	152	CUUCCUCCUCUUGUGCAG		
PLK-21	22	CCGAUACUACCUACGGCAA	512-530	1150-1168
	154	UUGCCGUAGGUAGUAUCGG		
PLK-22	23	CGAUACUACCUACGGCAA	513-531	1151-1169
	155	UUUGCCGUAGGUAGUAUCG		
PLK-23	24	GAUACUACCUACGGCAAU	514-532	1152-1170
	156	AUUUGCCGUAGGUAGUAUC		
PLK-24	25	CCUACGGCAAUUGUGCUU	521-539	1159-1177
	157	AAGCACAAUUUGCCGUAGG		
PLK-25	26	AUUGUGCUUGGCUGCCAGU	531-549	1169-1187
	158	ACUGGCAGCCAAGCACAAU		
PLK-26	27	GCCAGUACCUGCACCGAAA	544-562	1182-1200
	159	UUUCGGUGCAGGUACUGGC		
PLK-27	28	CUGCACCGAAACCGAGUUA	552-570	1190-1208
	160	UAACUCGGUUUCGGUGCAG		
PLK-28	29	GCACCGAAACCGAGUUAU	554-572	1192-1210
	161	AAUAACUCGGUUUCGGUGC		
PLK-33	34	GAGACCUCAAGCUGGGCAA	577-595	1215-1233
	166	UUGCCCAGCUUGAGGUCUC		
PLK-34	35	UGAAUGAAGAUCUGGAGGU	604-622	1242-1260
	167	ACCUCCAGAUCUUCAUUA		
PLK-35	36	GAAUGAAGAUCUGGAGGUG	605-623	1243-1261
	168	CACCUCAGAUUCUUAUUC		
PLK-36	37	AUGAAGAUCUGGAGGUGAA	607-625	1245-1263
	169	UUCACCUCCAGAUCUUAU		
PLK-37	38	UGAAGAUCUGGAGGUGAAA	608-626	1246-1264
	170	UUUCACCUCCAGAUCUUA		
PLK-38	39	GGCAACCAAAGUCGAAUAU	644-662	1282-1300
	171	AUAUUCGACUUUGGUUGCC		
PLK-39	40	CAACCAAAGUCGAAUAUGA	646-664	1284-1302
	172	UCAUAUUCGACUUUGGUUG		
PLK-40	41	ACCAAAGUCGAAUAUGACG	648-666	1286-1304
	173	CGUCAUAUUCGACUUUGGU		
PLK-41	42	CCAAAGUCGAAUAUGACGG	649-667	1287-1305
	174	CCGUCAUAUUCGACUUUGG		
PLK-42	43	AGUCGAAUAUGACGGGGAG	653-671	1291-1309
	175	CUCCCCGUCAUAUUCGACU		
PLK-43	44	UAUGACGGGGAGAGGAAGA	660-678	1298-1316
	176	UCUCCUCUCCCCGUCAUA		
PLK-44	45	CUGUGUGGGACUCCUAAUU	684-702	1322-1340
	177	AAUUAGGAGUCCACACAG		
PLK-45	46	GUGGGACUCCUAAUUACAU	688-706	1326-1344
	178	AUGUAAUUAGGAGUCCAC		

PLK-46	47	UGGGACUCCUAAUUACAUA	689-707	1327-1345
	179	UAUGUAAUUAGGAGUCCCA		
PLK-47	48	GACUCCUAAUUACAUAAGCU	692-710	1330-1348
	180	AGCUAUGUAAUUAGGAGUC		
PLK-48	49	CUAAUUACAUAAGCUCCCGA	697-715	1335-1353
	181	UCGGGAGCUAUGUAAUUAG		
PLK-49	50	UUACAUAAGCUCCCGAGGUG	701-719	1339-1357
	182	CACCUCGGGAGCUAUGUAA		
PLK-50	51	GCAAGAAAGGGCACAGUUU	724-742	1362-1380
	183	AAACUGUGCCCUUUCUUGC		
PLK-51	52	GAAAGGGCACAGUUUCGAG	728-746	1366-1384
	184	CUCGAAACUGUGCCCUUUC		
PLK-52	53	CCAUUGGGUGUAUCAUGUA	760-778	1398-1416
	185	UACAUGAUACACCCAAUGG		
PLK-53	54	CAUUGGGUGUAUCAUGUAU	761-779	1399-1417
	186	AUACAUGAUACACCCAAUG		
PLK-54	55	GGUGUAUCAUGUAUACCUU	766-784	1404-1422
	187	AAGGUUAUCAUGAUACACC		
PLK-55	56	AUCAUGUAUACCUUGUUAG	771-789	1409-1427
	188	CUAACAAGGUUAUCAUGAU		
PLK-56	57	AUGUAUACCUUGUUAGUGG	774-792	1412-1430
	189	CCACUAACAAGGUUAUCAU		
PLK-57	58	AUACCUUGUUAGUGGGCAA	778-796	1416-1434
	190	UUGCCACUAACAAGGUAU		
PLK-58	59	CUUGUUAGUGGGCAAACCA	782-800	1420-1438
	191	UGGUUUGCCCACUAACAAG		
PLK-59	60	UUUGAGACUUCUUGCCUAA	804-822	1442-1460
	192	UUAGGCAAGAAGUCUCAA		
PLK-60	61	AGAGACCUACCUCCGGAUC	824-842	1462-1480
	193	GAUCCGGAGGUAGGUCUCU		
PLK-61	62	GAGACCUACCUCCGGAUCA	825-843	1463-1481
	194	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC		
PLK-62	63	CCUCCGGAUCAAGAAGAAU	833-851	1471-1489
	195	AUUCUUCUUGAUCCGGAGG		
PLK-63	64	CCGGAUCAAGAAGAAUGAA	836-854	1474-1492
	196	UUCAUUCUUCUUGAUCCGG		
PLK-64	65	CGGAUCAAGAAGAAUGAAU	837-855	1475-1493
	197	AUUCAUUCUUCUUGAUCCG		
PLK-65	66	GGAUCAAGAAGAAUGAAUA	838-856	1476-1494
	198	UAUUCAUUCUUCUUGAUCC		
PLK-66	67	GAUCAAGAAGAAUGAAUAC	839-857	1477-1495
	199	GUAUUCAUUCUUCUUGAUC		
PLK-67	68	CAAGAAGAAUGAAUACAGU	842-860	1480-1498
	200	ACUGUAUUCAUUCUUCUUG		
PLK-68	69	GAAGAAUGAAUACAGUAUU	845-863	1483-1501

	201	AAUACUGUAUUCAUUCUUC		
PLK-69	70	GAAUGAAUACAGUAUUC	848-866	1486-1504
	202	GGGAAUACUGUAUUCAUUC		
PLK-70	71	UGAAUACAGUAUUC	851-869	1489-1507
	203	CUUGGGAAUACUGUAUUC		
PLK-71	72	UACAGUAUUC	855-873	1493-1511
	204	UGUGCUUGGGAAUACUGUA		
PLK-72	73	GUAUUC	859-877	1497-1515
	205	UUGAUGUGCUUGGGAAUAC		
PLK-73	74	GAUGCUUCAGACAGAUCC	905-923	1543-1561
	206	GGGAUCUGUCUGAAGCAUC		
PLK-74	75	CAACCAUUAACGAGCUGCU	934-952	1572-1590
	207	AGCAGCUCGUUAAUGGUUG		
PLK-75	76	CCAUUAACGAGCUGCUUAA	937-955	1575-1593
	208	UUAAGCAGCUCGUUAAUGG		
PLK-80	81	GAGUUCUUUACUUCUGGCU	960-978	1598-1616
	213	AGCCAGAAGUAAAGAACUC		
PLK-81	82	GUUCUUUACUUCUGGCUAU	962-980	1600-1618
	214	AUAGCCAGAAGUAAAGAAC		
PLK-82	83	CUUUACUUCUGGCUAUUAUC	965-983	1603-1621
	215	GAUAUAGCCAGAAGUAAAG		
PLK-84	85	CCCUCACAGUCCUCAAUAA	1069-1087	1707-1725
	217	UUAUUGAGGACUGUGAGGG		
PLK-85	86	CCUCACAGUCCUCAAUAAA	1070-1088	1708-1726
	218	UUUAUUGAGGACUGUGAGG		
PLK-86	87	CAGUCCUCAAUAAAGGCUU	1075-1093	1713-1731
	219	AAGCCUUUAUUGAGGACUG		
PLK-87	88	CUCAUAAAGGCUUGGAGA	1080-1098	1718-1736
	220	UCUCCAAGCCUUUAUUGAG		
PLK-88	89	UCAUAAAGGCUUGGAGAA	1081-1099	1719-1737
	221	UUCUCCAAGCCUUUAUUGA		
PLK-89	90	CAUAAAGGCUUGGAGAAC	1082-1100	1720-1738
	222	GUUCUCCAAGCCUUUAUUG		
PLK-90	91	UAAAGGCUUGGAGAACCC	1085-1103	1723-1741
	223	GGGGUUCUCCAAGCCUUUA		
PLK-91	92	AGAAGAACCAGUGGUUCGA	1127-1145	1765-1783
	224	UCGAACCACUGGUUCUUCU		
PLK-92	93	GAACCAGUGGUUCGAGAGA	1131-1149	1769-1787
	225	UCUCUCGAACCACUGGUUC		
PLK-93	94	CCAGUGGUUCGAGAGACAG	1134-1152	1772-1790
	226	CUGUCUCUCGAACCACUGG		
PLK-94	95	AGACAGGUGAGGUGGUCGA	1147-1165	1785-1803
	227	UCGACCACCUCACCUGUCU		
PLK-95	96	GGCAAGAGGAGGUCUGAGGA	1240-1258	1878-1896
	228	UCCUCAGCCUCCUCUUGCC		

PLK-96	97	GCAAGAGGAGGCUGAGGAU	1241-1259	1879-1897
	229	AUCCUCAGCCUCCUCUUGC		
PLK-97	98	AAGAGGAGGCUGAGGAUCC	1243-1261	1881-1899
	230	GGAUCCUCAGCCUCCUCUU		
PLK-98	99	CCAUCUUCUGGGUCAGCAA	1273-1291	1911-1929
	231	UUGCUGACCCAGAAGAUGG		
PLK-99	100	UCAGCAAGUGGGUGGACUA	1285-1303	1923-1941
	232	UAGUCCACCCACUUGCUGA		
PLK-100	101	CAGCAAGUGGGUGGACUAU	1286-1304	1924-1942
	233	AUAGUCCACCCACUUGCUG		
PLK-101	102	GCAAGUGGGUGGACUAUUC	1288-1306	1926-1944
	234	GAAUAGUCCACCCACUUGC		
PLK-102	103	GGACUAUUCGGACAAGUAC	1298-1316	1936-1954
	235	GUACUUGUCCGAAUAGUCC		
PLK-103	104	GGUAUCAGCUCUGUGAUAA	1324-1342	1962-1980
	236	UUAUCACAGAGCUGAUACC		
PLK-104	105	GGUGCUCUCAAUGACUCA	1352-1370	1990-2008
	237	UGAGUCAUUGAAGAGCACC		
PLK-105	106	GCUCUCAAUGACUCAACA	1355-1373	1993-2011
	238	UGUUGAGUCAUUGAAGAGC		
PLK-106	107	UGACUCAACACGCCUCAUC	1364-1382	2002-2020
	239	GAUGAGGCGUGUUGAGUCA		
PLK-107	108	CACGCCUCAUCCUCUACAA	1372-1390	2010-2028
	240	UUGUAGAGGAUGAGGCGUG		
PLK-108	109	CUACAAUGAUGGUGACAGC	1385-1403	2023-2041
	241	GCUGUCACCAUCAUUGUAG		
PLK-109	110	GGUGACAGCCUGCAGUACA	1395-1413	2033-2051
	242	UGUACUGCAGGCUGUCACC		
PLK-110	111	GUGACAGCCUGCAGUACAU	1396-1414	2034-2052
	243	AUGUACUGCAGGCUGUCAC		
PLK-111	112	CCCAACUCCUUGAUGAAGA	1458-1476	2096-2114
	244	UCUUCAUCAAGGAGUUGGG		
PLK-112	113	CCAACUCCUUGAUGAAGAA	1459-1477	2097-2115
	245	UUCUUCAUCAAGGAGUUGG		
PLK-113	114	ACUCCUUGAUGAAGAAGAU	1462-1480	2100-2118
	246	AUCUUCUUCAUCAAGGAGU		
PLK-114	115	CUCCUUGAUGAAGAAGAUC	1463-1481	2101-2119
	247	GAUCUUCUUCAUCAAGGAG		
PLK-115	116	GAAGAAGAUACCCUCCUU	1472-1490	2110-2128
	248	AAGGAGGGUGAUCUUCUUC		
PLK-116	117	GAAGAUCACCCUCCUAAA	1475-1493	2113-2131
	249	UUUAAGGAGGGUGAUCUUC		
PLK-117	118	GAUCACCCUCCUAAAUAU	1478-1496	2116-2134
	250	AUAUUUAAGGAGGGUGAUC		
PLK-118	119	AUAUUUCCGCAAUUACAUG	1493-1511	2131-2149

	251	CAUGUAAUUGCGGAAAUAU		
PLK-119	120	UUACAUGAGCGAGCACUUG	1505-1523	2143-2161
	252	CAAGUGCUCGCUCAUGUAA		
PLK-120	121	GCAGCGUGCAGAUAACUUCU	1636-1654	2274-2292
	253	AAGUUGAUCUGCACGCGUC		
PLK-121	122	GCGUGCAGAUAACUUCUUCU	1639-1657	2277-2295
	254	AAGAAGUUGAUCUGCACGC		
PLK-122	123	AGAUAACUUCUUCAGGA	1645-1663	2283-2301
	255	UCCUGGAAGAAGUUGAUCU		
PLK-123	124	GAUCAACUUCUUCAGGAU	1646-1664	2284-2302
	256	AUCCUGGAAGAAGUUGAUC		
PLK-124	125	UCAACUUCUUCAGGAUCA	1648-1666	2286-2304
	257	UGAUCCUGGAAGAAGUUGA		
PLK-125	126	CUUCUUCAGGAUCACACC	1652-1670	2290-2308
	258	GGUGUGAUCCUGGAAGAAG		
PLK-126	127	GAUCACACCAAGCUCAUCU	1662-1680	2300-2318
	259	AGAUGAGCUUGGUGUGAUC		
PLK-127	128	UGAUGGCAGCCGUGACCUA	1690-1708	2328-2346
	260	UAGGUCACGGCUGCCAUCA		
PLK-128	129	GCAGAGCUGCAUCAUCCU	1982-2000	2620-2638
	261	AAGGAUGAUGCAGCUCUGC		
PLK-129	130	CCCACCAUAUGAAUUGUAC	2081-2099	2718-2736
	262	GUACAAUUCAUAUGGUGGG		
PLK-130	131	CCACCAUAUGAAUUGUACA	2082-2100	2719-2737
	263	UGUACAAUUCAUAUGGUGG		
PLK-131	132	CACCAUAUGAAUUGUACAG	2083-2101	2720-2738
	264	CUGUACAAUUCAUAUGGUG		
PLK-132	133	UCCUUUCCUUGGCUUUAUG	2127-2145	2764-2782
	265	CAUAAAGCCAAGGAAAGGA		

对于上述经由设计得到的 132 个 siRNA 进一步进行优选。此时，考虑点包括以下六个方面。即，1) 需使所选 siRNA 的作用靶点均匀分布在 mRNA 全长序列中，2) 避免作用靶点位于 mRNA 复杂的二级或三级结构域中，3) siRNA 的作用靶点序列位于 plk1 mRNA 的编码区。plk1 mRNA 的 5' 端非编码区只有 53 个核苷酸长度，这个区域的序列可能会被结合的翻译调控蛋白和核糖体亚基等封闭，因此并不适合于作为 siRNA 的作用靶点。对于编码区和 3' 端非编码区的靶点，则应优先考虑位于编码区的靶点，尤其需避免靶点位于 3' 端非编码区中接近 poly(A) 尾的低复杂性且长度易变区域，4) 优先选择第一单链中第 1 个碱基为 G/C，第 13 个碱基不是 G，第 19 个碱基是 A 而不是 G 的序列，5) 优先选择第一单链中第 3 个碱基是 A，第 10 个碱基是 U 的序列，6) 避免含有单核苷酸多态性位点。基于以上考虑，从 132 个设计的 siRNA 序列中最终优选出 14 个 siRNA

序列, 结果示于表 6。

siRNA 的寡聚核苷酸单链按照本领域公知的方法进行化学合成。合成的寡聚核苷酸的序列示于表 6。合成时, 在寡聚核苷酸单链的 3' 末端加上两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT (表 6 中, 用下划线标记)。互补的寡聚核苷酸单链退火形成双链 RNA, 双链结构的

5 的两端分别具有 dTdT 的 3' 突出端。

表 6

编号	SEQ ID No.	核苷酸序列 (5'→3')	人 mRNA (NM_005030.3) 中对应的靶位点序列
PLK-3	4	GUGC <u>UUCGAGAUCUCGGACdTdT</u>	251-269
	136	GUCCGAG <u>AUCUCGAAGCACdTdT</u>	
PLK-16	17	CGACUUCGUG <u>UUCGUGGUGdTdT</u>	422-440
	149	CACCACGAACACGAAGUCG <u>dTdT</u>	
PLK-37	38	UGAAGAUCUGGAGGUGAA <u>AdTdT</u>	608-626
	170	UUUCACCUCCAGAU <u>CUUCAdTdT</u>	
PLK-41	42	CCAAAGUCGAAUAUGACGG <u>dTdT</u>	649-667
	174	CCGUCAUAUUCGACU <u>UUGGdTdT</u>	
PLK-54	55	GGUGUAUCAUGUAUACCU <u>UdTdT</u>	766-774
	187	AAGGUAUACAUGAUACAC <u>CCdTdT</u>	
PLK-64	65	CGGAUCAAGAAGAAUGAA <u>UdTdT</u>	837-855
	197	AUUCAUUCUUCUUGAUCCG <u>dTdT</u>	
PLK-65	66	GGAUCAAGAAGAAUGAAU <u>AdTdT</u>	838-856
	198	UAUUCAUUCUUCUUGAUCC <u>dTdT</u>	
PLK-67	68	CAAGAAGAAUGAAUACAGU <u>dTdT</u>	842-860
	200	ACUGUAUUCAUUCUUCUUG <u>dTdT</u>	
PLK-76	77	CGAGCUCGUAAUGACGAG <u>dTdT</u>	944-962
	209	CUCGUCAUUAAGCAGCUCG <u>dTdT</u>	
PLK-92	93	GAACCAGUGGUUCGAGAG <u>AdTdT</u>	1131-1149
	225	UCUCUCGAACCACUGGUUC <u>dTdT</u>	
PLK-102	103	GGACUAUUCGGACAAGUAC <u>dTdT</u>	1298-1316
	235	GUACUUGUCCGAAUAGUCC <u>dTdT</u>	
PLK-103	104	GGUAUCAGCUCUGUGAUAA <u>AdTdT</u>	1324-1342
	236	UUAUCACAGAGCUGAUAC <u>CCdTdT</u>	
PLK-108	109	CUACAAUGAUGGUGACAGC <u>dTdT</u>	1385-1403
	241	GCUGUCACCAUCAUUGUAG <u>dTdT</u>	
PLK-128	129	GCAGAGCUGCAUCAUC <u>CUdTdT</u>	1982-2000
	261	AAGGAUGAUGCAGCUCUGC <u>dTdT</u>	

实施例 2: siRNA 对 plk1 基因表达的抑制效果验证

(siRNA 的转染)

10 将人类肝癌细胞株 HepG2 用含 10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基接种于 24 孔板, 细胞密度为  $4 \times 10^5$  细胞/孔,



每孔 0.5 ml, 37℃培养过夜。

转染的具体操作步骤如下。将 100 ng 实施例 1 中合成的 14 个 siRNA PLK-3、16、37、41、54、64、65、67、76、92、102、103、108 和 128 分别稀释于 50 μl DEME 无血清培养基中, 同时将 1 μl Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司制) 稀释于 50 μl DEME 无血清培养基中, 将上述两种溶液分别在室温下孵育 5 分钟后, 均匀混合。混合溶液于室温静置 20 分钟后, 把 100 μl 的上述混合溶液加入到接种有 HepG2 细胞的 24 孔板中。siRNA 的最终浓度约为 10 nM。细胞于 37 °C 培养 4 小时, 再加入 1 ml 含 10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基, 然后在 37 °C 再培养 24 小时。作为阴性对照, 同时转染正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT-3'、互补的反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3' 的阴性对照 siRNA (N.C.siRNA)。

(siRNA 对 plk1 mRNA 表达水平的抑制效果)

通过荧光定量实时 PCR (Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) 检测分别转染了 siRNA PLK-3、16、37、41、54、64、65、67、76、92、102、103、108 和 128 的 HepG2 细胞中 plk1 mRNA 的表达量, 具体步骤如下。即, 培养转染的细胞 24 小时后, 用 RNeasy mini Kit (Qiagen 公司制) 提取细胞中的总 RNA。用紫外分光光度计测定提取的 RNA 样品的 OD280 和 OD260 的吸光度, 并利用公式: RNA 浓度 (μg/μL) = 0.04 × OD260 × 稀释倍数, 计算 RNA 样品的浓度。然后用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara 公司制) 合成 cDNA, 每个样品使用 2 μg 通过上述步骤提取的总 RNA。在合成 cDNA 后, 利用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara 公司制) 试剂盒进行荧光定量实时 PCR 反应。其中, 用于扩增 plk1 和作为定量 PCR 反应的内参的 β-actin 的 PCR 扩增引物如表 7 所示。

表 7

	上游引物	下游引物
plk1	5'-GCCCCTCACAGTCCTCAATA-3'	5'-TACCCAAGGCCGTACTTGTC-3'
β-actin	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

siRNA 对 plk1 mRNA 表达水平的抑制率按如下等式计算。抑制率 = [1 - (实验孔 plk1 mRNA 的表达量 / 实验孔 β-Actin mRNA 的表达量) / (阴性对照孔 plk mRNA 的表达量 / 阴性对照孔 β-Actin mRNA 的表达量)] × 100%。结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 本发明的 siRNA 均具有抑制 plk1 mRNA 表达水平的效果。其中, siRNA PLK-65、siPLK-67

和 siPLK-76 对 plk1 mRNA 表达水平的抑制率均高于 60%，分别为 64%、68%和 78%，这说明本发明的 siRNA 对 plk1 基因表达具有抑制活性，可用于抑制 plk1 基因的表达。

### 制备例 1

- 5 委托苏州瑞博生物技术有限公司合成表 8 中所列的寡聚核苷酸。这些寡聚核苷酸中包含修饰的核苷酸基团，互补的寡聚核苷酸链退火形成修饰的 siRNA，分别标记为 PLK(m)-65-1、PLK(m)-65-2、PLK(m)-67-1、PLK(m)-67-2 和 PLK(m)-76-1。其中，(OMe)代表它左边的核苷酸残基中戊糖基团的 2'羟基被甲氧基取代，(F)代表它左边的核苷酸残基中戊糖基团的 2'羟基被氟取代。这些 siRNA 未加修饰前的核苷酸序列分别对应于
- 10 实施例 1 中的 PLK-65、PLK-67 和 PLK-76。

表 8

编号	核苷酸序列 (5'→3')
PLK(m)-65-1	G(OMe)GAUC(OMe)A(OMe)AGAAGAAU(OMe)GAAUA(OMe)dTdT
	UA(OMe)UUCAUUCUUCUUG(OMe)AUCCdTdT
PLK(m)-65-2	G(OMe)GAUC(OMe)A(OMe)AGAAGAAU(OMe)GAAU(OMe)AdTdT
	UA(OMe)UUC(F)AUUCUUCUUGAU(F)CCdTdT
PLK(m)-67-1	C(OMe)A(OMe)AGAAGAAUGAAU(OMe)AC(OMe)AGUdTdT
	AC(OMe)UG(OMe)UAUUCAUUCUUCUU(F)GdTdT
PLK(m)-67-2	C(OMe)A(OMe)AGAAGAAUGAAU(OMe)AC(OMe)A(OMe)GUdTdT
	AC(OMe)U(F)GUAUUCAUUCUUCUU(F)GdTdT
PLK(m)-76-1	C(OMe)GAGCU(OMe)GCUUAAUG(OMe)ACGAGdTdT
	CU(OMe)CGUC(F)AUUAAGCAGCUCGdTdT

### 实施例 3：化学修饰对小干 RNA 血清稳定性的影响的评价

- 15 对制备例 1 中得到的 PLK(m)-65-1、PLK(m)-65-2、PLK(m)-67-1、PLK(m)-67-2 和 PLK(m)-76-1，以及实施例 1 中得到的 PLK-65、PLK-67 和 PLK-76 测定其在血清环境中的稳定性。具体步骤如下。

- 20 将 10  $\mu$ l 上述修饰和未修饰的 siRNA (20  $\mu$ mol) 分别与 50  $\mu$ l 胎牛血清 (FBS, 购自 HyClone, 货号 GTB0060) 和 40  $\mu$ l PBS 混合后, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 0、2、4、8、24、48 和 72 小时后得到处理样品。处理样品取样 10  $\mu$ l 进行 20%的 PAGE 凝胶电泳。由上述处理样品的电泳条带光强度与 0 小时的电泳条带光强度的比值计算降解率, 结果如图 2 及表 9 所示。表 9 中列出的降解率为由 72 小时的电泳条带光强度与 0 小时的电泳条带光强度的比值算出的降解率。由图 2 及表 9 可以看出, 在血清环境中, 修饰的 siRNA 的稳定性相比未修饰的 siRNA 的稳定性明显提高。

表 9

修饰的 siRNA	降解率(%)	未修饰的 siRNA	降解率(%)
PLK(m)-65-1	25.13±3.71	PLK-65	94.67±2.87
PLK(m)-65-2	10.98±5.95		
PLK(m)-67-1	8.64±2.24	PLK-67	86.64±5.21
PLK(m)-67-2	5.71±3.84		
PLK(m)-76-1	8.95±5.74	PLK-76	72.34±3.53

#### 实施例 4: 化学修饰前后 siRNA 对 plk1 mRNA 表达水平的抑制效果验证

按照与实施例 2 相同的方法, 对制备例 1 中得到的 siPLK(m)-65-1、siPLK(m)-67-1 和 siPLK(m)-76-1, 以及实施例 1 中得到的 siPLK-65、PLK-67 和 PLK-76 分别测定其对 plk1 mRNA 表达水平的抑制效果。转染时, 对于上述各 siRNA 采用梯度剂量进行转染, 使其终浓度分别为 0.1 nM、1 nM 和 10 nM。作为阴性对照, 采用与实施例 2 中相同的正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT-3'、互补的反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'的阴性对照 siRNA (N.C.siRNA)。荧光定量实时 PCR 测定结果如图 3 所示。由图 3 可知, 修饰的 siRNA 对于 plk1 mRNA 表达量具有与未修饰的 siRNA 类似的抑制效果。采用 10 nM 剂量时, PLK(m)-65-1、PLK(m)-67-1 相比对应的未修饰的 siRNA PLK-65、PLK-67 具有更为优异的抑制效果。显然, 这是由于所述修饰增强了 siRNA 的稳定性, 并由此加长了 siRNA 在细胞内存留时间的缘故。

#### 实施例 5: 局部给药 siRNA 对于乳腺癌细胞生长的抑制

在 BALB/c 裸鼠第二个乳腺的脂肪垫下原位接种人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s ( $5 \times 10^6$  个细胞/每只裸鼠), 14 天左右后形成可见肿瘤。肿瘤的体积按以下公式计算:  $V=0.5 \times a \times b^2$ , 其中, a 指肿瘤长径, b 指肿瘤短径。每 5 只接种的裸鼠作为一组, 每组裸鼠的肿瘤体积平均约为 50 mm<sup>3</sup>。

作为处理组, 将 10 μg siRNA PLK-65、PLK(m)-65-1、PLK(m)-65-2、PLK-67、PLK(m)-67-1、PLK(m)-67-2、PLK-76 和 PLK(m)-76-1 分别溶于 100 μl 的磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.4) 中, 并直接进行瘤内注射。作为阴性对照组, 采用实施例 2 中提到的阴性对照 siRNA (N.C.siRNA, 正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT-3'、互补的反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3')。每隔一天, 再将 10 μg 上述 siRNA 进行瘤内注射一次。第一次注射起 20 天后, 按照如上所述的方法测量肿瘤体积,

结果如表 10 所示。

表 10

	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )
阴性对照	160±20
PLK-65	95±10
PLK(m)-65-1	60±20
PLK(m)-65-2	75±15
PLK-67	80±20
PLK(m)-67-1	80±30
PLK(m)-67-2	90±15
PLK-76	80±25
PLK(m)-76-1	75±20

由表 10 可知, 与阴性对照组相比, PLK-65、PLK(m)-65-1、PLK(m)-65-2、PLK-67、  
5 PLK(m)-67-1、PLK(m)-67-2、PLK-76 和 PLK(m)-76-1 处理组的肿瘤细胞生长均得到了  
显著抑制。

实施例 6: 通过尾静脉注射系统给药 siRNA 药物组合物时对于乳腺癌细胞生长的  
抑制

10 (siRNA 药物组合物的制备)

本实施例中, 采用聚乙二醇-聚乳酸两嵌段共聚物 (PEG-PLA)、及阳离子脂质 N,N-  
二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基) 乙基溴化铵 (BHEM-Chol) 制备 siRNA 药  
物组合物, 具体制备步骤参考了 Yang XZ., et al. J.Cont.Release 2011,156(2):203 中的方法。  
即, 将 25 mg PEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>25000</sub> 和 1 mg BHEM-Chol 溶于 0.5 mL 氯仿中, 加入 siRNA  
15 (0.025 mL, 0.2 mg) 水溶液后, 冰浴下超声形成初始乳液; 随后, 将初始乳液加入到  
1.5 mL 的 1% 聚乙烯醇 (Polyvinyl alcohol,PVA) 水溶液中, 冰浴下超声乳化得到乳液,  
将乳液加入到 25 mL 的 0.3% PVA 水溶液中; 减压下蒸除有机溶剂, 离心收集沉积物,  
用水重悬并离心收集 2 次以除去 PVA, 从而得到含小干扰核酸的给药组合物。通过上述  
步骤得到的药物组合物中, 各组分的质量比为 siRNA/阳离子脂质/聚合物=0.2/1.0/25.0。

20 (siRNA 药物组合物尾静脉注射给药对于乳腺癌细胞生长的抑制)

在 BALB/c 裸鼠右侧第二个乳腺的脂肪垫下原位接种人乳腺癌细胞株  
MDA-MB-435s (5×10<sup>6</sup> 个细胞), 14 天左右后形成可见肿瘤, 肿瘤体积平均约为 50 mm<sup>3</sup>。  
将裸鼠随机分成 4 组, 每组为 8 只裸鼠, 分别通过尾静脉注射进行给药。给药剂量以有

效 siRNA 的量计算为 1 mg/kg (约 20  $\mu\text{g}$  siRNA/每只小鼠), 隔天给药一次, 共给药 10 次。作为阴性对照组, 通过尾静脉注射 150  $\mu\text{l}$  PBS 溶液 (阴性对照组 1)、及通过上述步骤制备的含 20  $\mu\text{g}$  实施例 2 中提到的阴性对照 siRNA (正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT-3'、互补的反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3') 的 PBS 溶液 150  $\mu\text{l}$  (N.C.siRNA 药物组合物, 阴性对照组 2)。作为处理组, 分别通过尾静脉注射通过上述步骤制备的、含 20  $\mu\text{g}$  PLK(m)-65-1 的 PBS 溶液 150  $\mu\text{l}$  (PLK(m)-65-1 药物组合物, 处理组 1)、或含 20  $\mu\text{g}$  PLK(m)-67-1 的 PBS 溶液 150  $\mu\text{l}$  (PLK(m)-67-1 药物组合物, 处理组 2)。每次给药后均对肿瘤大小进行测量, 得到肿瘤生长数据。肿瘤的大小按以下公式计算:  $V=0.5 \times a \times b^2$ , 其中, a 指肿瘤长径, b 指肿瘤短径。分析结果时, 将每组小鼠第一次给药时的“肿瘤大小平均值”(即给药第 0 天)定为 100%, 其标准方差除以肿瘤大小平均值得到相对标准方差。之后的给药过程中, 每次测得的各组肿瘤大小平均值及标准方差同样对第 0 天肿瘤大小平均值进行校正, 即得到如图 4 所示的肿瘤细胞生长抑制曲线。由图 4 可以看出, 与阴性对照组相比, 通过尾静脉注射系统给药含 PLK(m)-65-1 及 PLK(m)-67-1 的药物组合物可以有效促进乳腺癌细胞凋亡, 并抑制肿瘤组织生长。

实施例 7: 通过尾静脉注射给药 siRNA 药物组合物时对于宫颈癌细胞生长的抑制 (siRNA 药物组合物的制备)

本实施例中, 采用聚己内酯-聚(N,N-二甲氨基乙基甲基丙烯酸酯)嵌段共聚物 (PCL-PDMAEMA)、聚乙二醇嵌段修饰有叶酸的聚乙二醇-聚谷氨酸嵌段共聚物 (folate-PEG-PGA) 制备 siRNA 药物组合物。其中, PCL-PDMAEMA 为聚  $\beta$ -氨基酯类两亲性阳离子聚合物, PEG-PGA 为辅助性的聚合物。siRNA 药物组合物的制备步骤参考了 Huang YY., et al. Biomaterials.2012,(18):4653 中的方法。即, 20  $\mu\text{l}$  siRNA 脱离子水溶液 (含约 1  $\mu\text{g}$  siRNA) 与 50  $\mu\text{l}$  PCL<sub>5000</sub>-PDMAEMA<sub>2000</sub> 的 PBS 溶液混合, 室温静置 20 分钟后, 再加入 50  $\mu\text{l}$  folate-PEG<sub>5000</sub>-PGA<sub>46000</sub> 的水溶液充分混合, 室温孵育 20 分钟, 之后用 PBS 调整体系即得到所需的药物组合物。其中, PCL<sub>5000</sub>-PDMAEMA<sub>2000</sub> 的氮 (N)、siRNA 的磷 (P)、PEG<sub>5000</sub>-PGA<sub>46000</sub> 的碳 (C) 的摩尔比为 5:1:8。

(siRNA 药物组合物尾静脉注射给药对于宫颈癌细胞生长的抑制)

在 BALB/c 裸鼠右腋下接种人宫颈癌细胞 Hela ( $5 \times 10^6$  个细胞), 10 天左右后形成可见肿瘤, 肿瘤体积平均约为 50  $\text{mm}^3$ 。将裸鼠随机分成 3 组, 每组为 7 只裸鼠, 分

别通过尾静脉注射进行给药。给药剂量以有效 siRNA 的量计算为 2 mg/kg (约 40  $\mu\text{g}$  siRNA/每只小鼠), 每三天给药一次, 共给药 7 次。作为阴性对照组, 通过尾静脉注射 200  $\mu\text{l}$  空白 PBS 溶液 (阴性对照组 1)、及用 200  $\mu\text{l}$  PBS 溶解的 PLK(m)-67-1 (裸 PLK(m)-67-1, 阴性对照组 2)。作为处理组, 通过尾静脉注射通过上述步骤制备的、含 40  $\mu\text{g}$  PLK(m)-67-1 的 PBS 溶液 200  $\mu\text{l}$  (PLK(m)-67-1 药物组合物, 处理组)。每次给药后均对肿瘤大小进行测量, 得到肿瘤生长数据。肿瘤的大小按以下公式计算:  $V=0.5 \times a \times b^2$ , 其中, a 指肿瘤长径, b 指肿瘤短径。分析结果时, 将每组小鼠第一次给药时的“肿瘤大小平均值”(即给药第 0 天)定为 100%, 其标准方差除以肿瘤大小平均值得到相对标准方差。之后的给药过程中, 每次测得的各组肿瘤大小平均值及标准方差同样对第 0 天肿瘤大小平均值进行校正, 即得到如图 5 所示的肿瘤细胞生长抑制曲线。由图 5 可以看出, 与阴性对照组相比, 通过尾静脉注射系统给药含 PLK(m)-67-1 的药物组合物可以有效促进宫颈癌细胞凋亡, 并抑制肿瘤组织生长。

## 权利要求

1、一种具有双链结构的 siRNA，所述双链结构由完全互补的第一单链和第二单链组成，其中，

所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶位点序列相同  
5 且由 SEQ ID NOs:2-133 表示的核苷酸序列，

与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶位点序列互补且由 SEQ ID NOs:134-265 表示的核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的 siRNA，其中，

10 所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列相同且由 SEQ ID NOs:4、17、38、42、55、65、66、68、77、93、103、104、109 或 129 表示的核苷酸序列，

与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列互补且由 SEQ ID NOs:136、149、170、174、187、197、198、200、  
15 209、225、235、236、241 或 261 表示的核苷酸序列。

3、根据权利要求 2 所述的 siRNA，其中，

所述第一单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列相同且由 SEQ ID NOs:66、68 或 77 表示的核苷酸序列，

20 与所述第一单链互补的所述第二单链具有与由 SEQ ID NO:1 表示的 plk1 mRNA 序列中的靶作用位点序列互补且由 SEQ ID NOs:198、200 或 209 表示的核苷酸序列。

4、根据权利要求 1-3 中任意一项所述的 siRNA，其中，所述第一单链和所述第二单链中至少一条单链的 3' 末端连接有 1 至 3 个核苷酸，从而在所述第一单链和所述第二单链互补形成所述双链结构后，在所述双链结构的至少一个末端形成由所述 1 至 3 个核苷酸构成的 3' 突出端。  
25

5、根据权利要求 4 所述的 siRNA，其中，所述 3' 突出端为连续的两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸 dTdT 或连续的两个尿嘧啶核苷酸 UU。

30

6、根据权利要求 1-5 中任意一项所述的 siRNA，其中，所述第一单链和所述第二单链中分别包含至少一个被修饰的核苷酸基团。

7、根据权利要求 6 所述的 siRNA，其中，所述被修饰的核苷酸基团为磷酸基团、核糖基团或碱基中的至少一种被修饰的核苷酸基团。

8、根据权利要求 7 所述的 siRNA，其中，所述被修饰的核苷酸基团为核糖基团的 2'-羟基被甲氧基或氟取代的核苷酸基团。

9、一种药物组合物，其中，含有权利要求 1-8 中任意一项所述的 siRNA 作为药物活性成分，以及还含有阳离子组分、非阳离子组分和药学上可接受的载体。

10、根据权利要求 9 所述的药物组合物，其中，所述阳离子组分选自 N,N-二羟乙基-N-甲基-N-2-(胆固醇氧羰基氨基)乙基溴化铵、(2,3-二油氧基丙基)三甲基氯化铵、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵、聚乙烯亚胺、聚 $\beta$ -氨基酯和壳聚糖季铵盐中的至少一种，所述非阳离子组分选自聚乙二醇-聚乳酸两嵌段共聚物、聚乙二醇-聚乳酸三嵌段共聚物、聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)两嵌段共聚物和聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)三嵌段共聚物中的至少一种，所述药学上可接受的载体选自 pH 值为 4.0-9.0 的磷酸盐缓冲液、pH 值为 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液、生理盐水或质量百分比浓度为 7-15%的蔗糖溶液。

11、一种抑制哺乳动物细胞内 plk1 基因表达的方法，该方法包括向哺乳动物细胞内导入权利要求 1-8 中任意一项所述的 siRNA，从而使所述 siRNA 能够序列特异性地诱导所述 plk1 基因表达的抑制。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述导入的方式包括将所述 siRNA 直接地进行导入，或以权利要求 9 或 10 所述的药物组合物的形式进行导入。

13、权利要求 1-10 中任意一项所述的 siRNA 或药物组合物在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的应用。

14、根据权利要求 13 所述的应用，其中，所述肿瘤为 plk1 基因异常高表达的乳腺癌、肝癌、肺癌、宫颈癌或结肠癌。



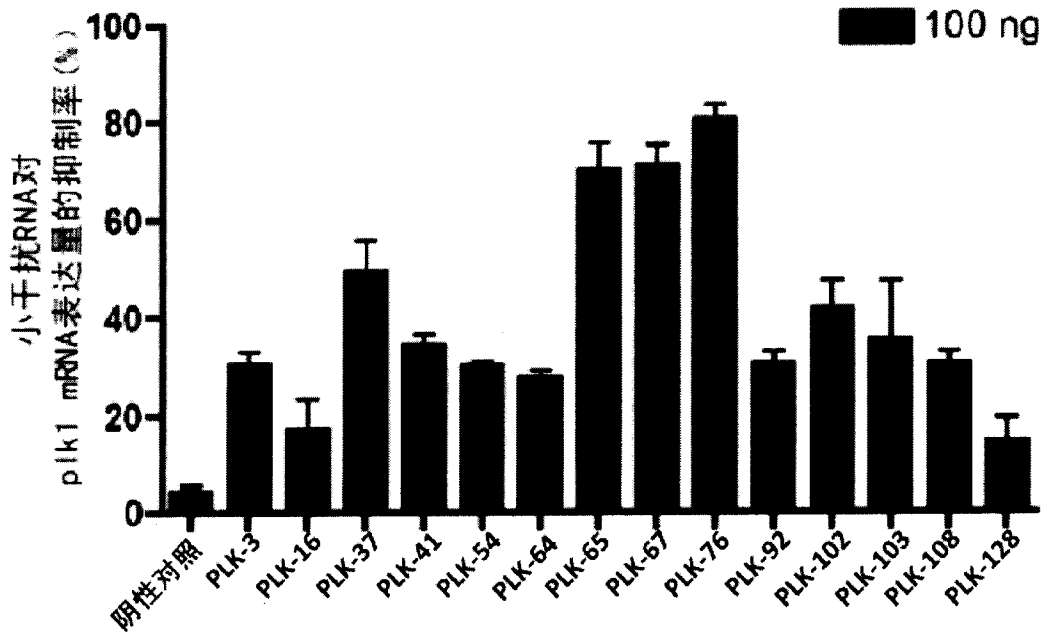


图 1

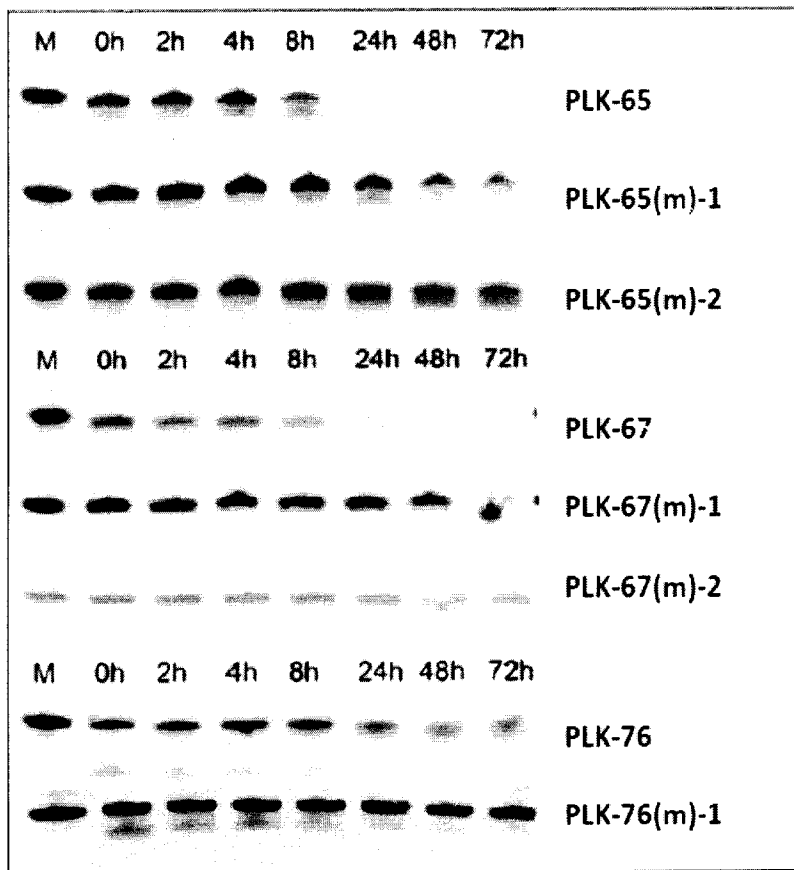


图 2

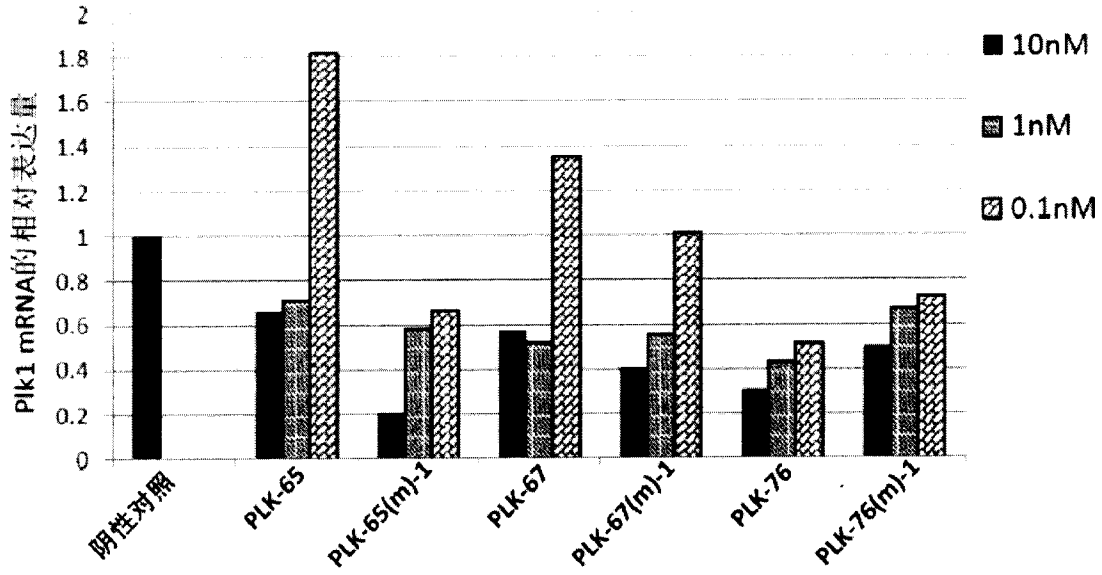


图 3

### 乳腺癌细胞生长抑制曲线

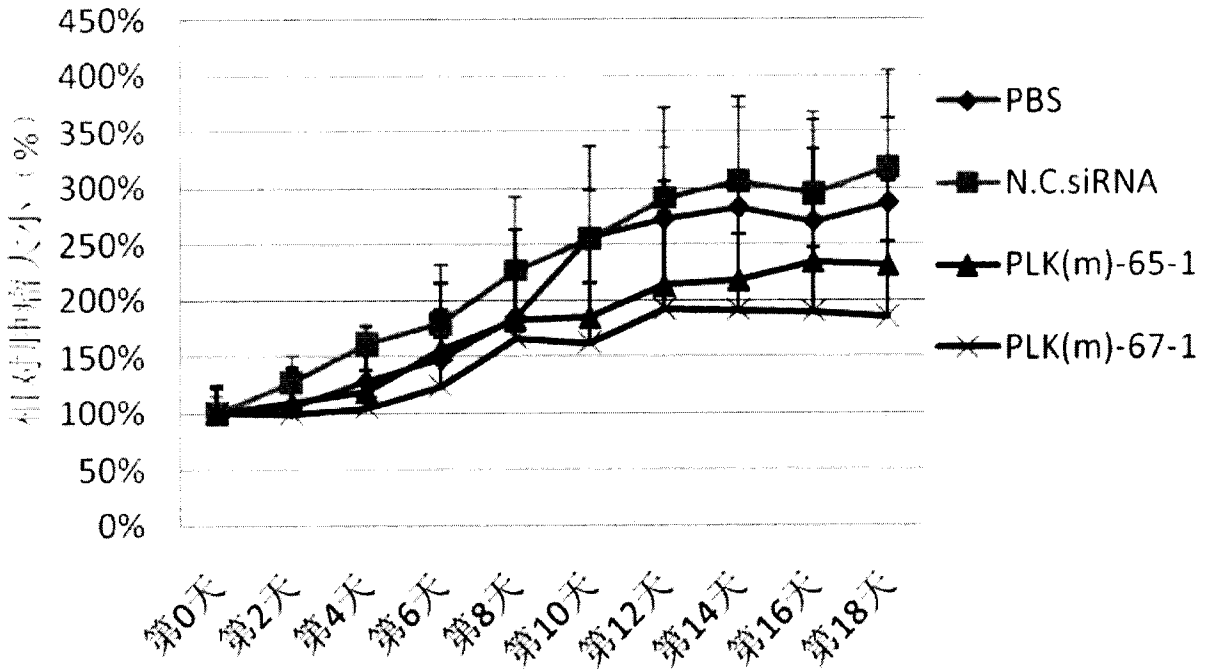


图 4

### 宫颈癌细胞生长抑制曲线

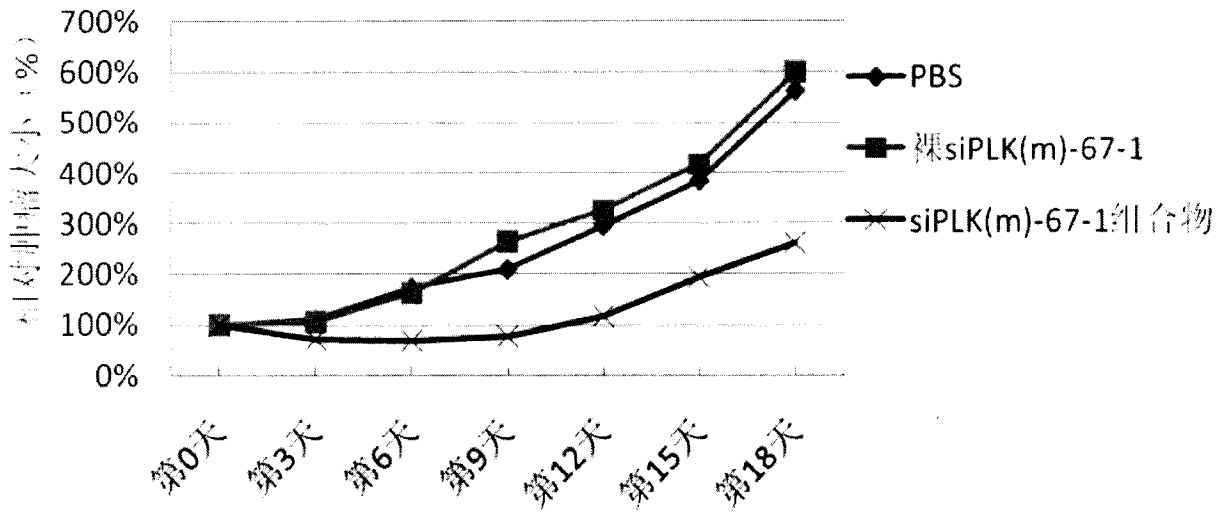


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2012/083195**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, JPABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNTXT, TWTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CATXT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, BAIDU, GOOGLE SCHOLAR and key words: plk1, siRNA, polo like kinase 1, small interference RNA, small interfering RNA, cationic, non cationic, PEG, polyethylene glycol, SUZHOU RIBO etc.

GENBANK, EMBL: sequence search on SEQ ID NOs: 1-265

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009082817 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.), 09 July 2009 (09.07.2009), see abstract, claims 1-94, and description, paragraphs [0436]-[0437] and [0455]-[0457]	1, 4-9, 13-14
Y	see abstract, claims 1-94, and description, paragraphs [0436]-[0437] and [0455]-[0457]	6-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
06 January 2013 (06.01.2013)

Date of mailing of the international search report  
**17 January 2013 (17.01.2013)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**LIN, Junkai**  
Telephone No.: (86-10) **62412317**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2012/083195**

<b>C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1651450 A (HANGZHOU NEW RAYJAY BIOMED CORPORATION), 10 August 2005 (10.08.2005) see claims 1-2, 5, 9 and 11-18, description, pages 2-3, and embodiments 2-4	1-2, 4-8, 13-14
Y	see claims 1-2, 5, 9 and 11-18, and description, pages 2-3, and embodiments 2-4	6-10
X	CN 102102101 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY), 22 June 2011 (22.06.2011), see claims 1-3, and description, embodiments 2 and 4-5	1-5, 13-14
Y	see claims 1-3, and description, embodiments 2 and 4-5	6-10
X	YANG, X.Z. et al., Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 01 August 2011 (01.08.2011), vol. 156, no. 2, pages 203-211, ISSN 0168-3659 see abstract, page 204, 2.1 and 2.3, and page 210, left column, paragraph 2	1, 4-5, 9-10, 13-14
Y	see abstract, page 204, 2.1 and 2.3, and page 210, left column, paragraph 2	6-10
X	SUN, Wei et al., Small interfering RNA-mediated knockdown of polo-like kinase 1 promotes apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line BCL-7402, WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY, 28 September 2011 (28.09.2011), vol. 19, no. 27, pages 2822-2828, ISSN 2219-2859 see abstract, and page 2823, 1.2.1	1, 4-5, 13-14
Y	see abstract, and page 2823, 1.2.1	6-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083195

### Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 11-12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
the subject matter of claims 11-12 relates to a method of treatment of the human or animal body, and does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

### Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the extra sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

#### Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083195

### CONTINUATION: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The present application was found to include 132 inventions, as follows:

Inventions 1-2, 4-15, 17-36, 38-40, 42-53, 55-63, 66, 68-75, 77-91, 93-101, 104-107, 109-127 and 129-132: claims 1, 4-10 and 13-14 (partial) respectively relate to double-strand siRNA of a first single strand and a second single strand complementary to said first single strand of a nucleotide sequence indicated by SEQ ID NOs: 2-3, 5-16, 18-37, 39-41, 43-54, 56-64, 67, 69-76, 78-92, 94-102, 105-108, 110-128 or 130-133, a drug composition comprising said siRNA, and pharmaceutical use of said siRNA or drug composition;

inventions 3, 16, 37, 41, 54, 64, 92, 102-103, 108 and 128: claims 1-2, 4-10 and 13-14 (partial) respectively relate to double-strand siRNA of a first single strand and a second single strand complementary to said first single strand of a nucleotide sequence indicated by SEQ ID NOs: 4, 17, 38, 42, 55, 65, 93, 103-104, 109 or 129, a drug composition comprising said siRNA, and pharmaceutical use of said siRNA or drug composition; and

inventions 65, 67 and 76: claims 1-10 and 13-14 (partial) respectively relate to double-strand siRNA of a first single strand and a second single strand complementary to said first single strand of a nucleotide sequence indicated with SEQ ID NO: 66, 68 or 77, a drug composition comprising said siRNA, and pharmaceutical use of said siRNA or drug composition.

These inventions are not so correlative as to form a general inventive concept; therefore, these inventions do not meet the requirements of PCT Rule 13.1, for the following reasons: the same or corresponding technical feature among inventions 1-132 is double-strand siRNA used for inhibiting polo-like kinase 1 (plk1) expression; however, this same or corresponding technical feature has been disclosed in the prior art, for example, see WO 2009082817 A1, description, paragraph [0436], table 1, where discloses the PLK 772 of siRNA sequences that target human PLK-1, wherein the nucleotide sequence of the sense strand thereof is the same as the nucleotide sequence indicated by SEQ ID NO: 62 in the present application, and the nucleotide sequence of the antisense strand thereof is the same as the nucleotide sequence indicated with SEQ ID NO: 194 in the present application; moreover, see CN 102102101 A, claims 1-2, where discloses Plk1-siRNA-838, wherein the nucleotide sequence of the sense strand thereof comprises the nucleotide sequence indicated by SEQ ID NO: 66 in the present application and two extra nucleotides TT located at 3' end, and the nucleotide sequence of the antisense strand thereof comprises the nucleotide sequence indicated by SEQ ID NO: 198 in the present application and two extra nucleotides TT located at 3' end. Therefore, the abovementioned 132 inventions do not share a same or corresponding special technical feature.

### CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2012/083195**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2009082817 A1	09.07.2009	US 2009291131 A1	26.11.2009
		US 2010130588 A1	27.05.2010
		AU 2008342535 A1	09.07.2009
		EP 2238251 A1	13.10.2010
		CA 2710713 A1	09.07.2009
		JP 2011507534 A	10.03.2011
		US 8058069 B2	15.11.2011
CN 1651450 A	10.08.2005	CN 100368423 C	13.02.2008
CN 102102101 A	22.06.2011	None	



<b>A. 主题的分类</b>		
续见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, CPRSABS, JPABS, CNMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNTXT, TWTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CATXT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, BAIDU, GOOGLE SCHOLAR 和关键词: polo 样激酶 1, 保罗样激酶 1, plk1, siRNA, 小干扰 RNA, 阳离子, 非阳离子, 聚乙二醇, 苏州瑞博, polo like kinase 1, small interference RNA, small interfering RNA, cationic, non cationic, PEG, polyethylene glycol, Suzhou Ribo 等; . GENBANK, EMBL: 关于 SEQ ID NOs: 1-265 的序列检索。		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
	WO 2009082817A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 09.7 月 2009(09.07.2009)	
X	参见摘要, 权利要求 1-94, 说明书第[0436]-[0437]和[0455]-[0457]段	1, 4-9, 13-14
Y	参见摘要, 权利要求 1-94, 说明书第[0436]-[0437]和[0455]-[0457]段	6-10
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 06.1 月 2013(06.01.2013)		国际检索报告邮寄日期 <b>17.1 月 2013 (17.01.2013)</b>
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员  <b>林峻凯</b>  电话号码: (86-10) <b>62412317</b>

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
	CN 1651450A (杭州新瑞佳生物医药技术开发有限公司) 10.8 月 2005(10.08.2005)	
X	参见权利要求 1-2、5、9 和 11-18, 说明书第 2-3 页和实施例 2-4	1-2, 4-8, 13-14
Y	参见权利要求 1-2、5、9 和 11-18, 说明书第 2-3 页和实施例 2-4	6-10
	CN 102102101A (重庆医科大学) 22.6 月 2011(22.06.2011)	
X	参见权利要求 1-3, 说明书实施例 2 和 4-5	1-5, 13-14
Y	参见权利要求 1-3, 说明书实施例 2 和 4-5	6-10
	YANG, X. Z. 等, Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy, Journal of Controlled Release, 01.8 月 2011(01.08.2011), 第 156 卷, 第 2 期, 第 203-211 页, ISSN 0168-3659	
X	参见摘要, 第 204 页 2.1 和 2.3, 第 210 页左栏第 2 段	1, 4-5, 9-10, 13-14
Y	参见摘要, 第 204 页 2.1 和 2.3, 第 210 页左栏第 2 段	6-10
	孙威等, 靶向 PIK1 的 siRNA 对肝癌细胞凋亡的影响, 世界华人消化杂志, 28.9 月 2011(28.09.2011), 第 19 卷, 第 27 期, 第 2822-2828 页, ISSN 2219-2859	
X	参见摘要, 第 2823 页 1.2.1	1, 4-5, 13-14
Y	参见摘要, 第 2823 页 1.2.1	6-10

**第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)**

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 11-12  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:  
权利要求 11-12 的主题涉及人体或动物体的治疗方法, 属于 PCT 实施细则第 39.1(iv)规定的无须检索的情况。
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,  
具体地说:
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

**第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)**

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

续见附加页

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。
3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。  
具体地说, 是权利要求:
4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明:  申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。  
 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。  
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2012/083195**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 2009082817A1	09.07.2009	US 2009291131A1	26.11.2009
		US 2010130588A1	27.05.2010
		AU 2008342535A1	09.07.2009
		EP 2238251A1	13.10.2010
		CA 2710713A1	09.07.2009
		JP 2011507534A	10.03.2011
		US 8058069B2	15.11.2011
CN 1651450A	10.08.2005	CN 100368423C	13.02.2008
CN 102102101A	22.06.2011	无	

## 续：第III栏 缺乏发明单一性的意见

本国际申请包括下列 132 项发明：

发明 1-2、4-15、17-36、38-40、42-53、55-63、66、68-75、77-91、93-101、104-107、109-127 和 129-132；权利要求 1、4-10 和 13-14（所有的一部分），分别涉及具有 SEQ ID NOs: 2-3、5-16、18-37、39-41、43-54、56-64、67、69-76、78-92、94-102、105-108、110-128 或 130-133 所示的核苷酸序列的第一单链和与所述第一单链互补的第二单链的双链 siRNA，包含所述 siRNA 的药物组合物，所述 siRNA 或药物组合物的制药应用；

发明 3、16、37、41、54、64、92、102-103、108 和 128；权利要求 1-2、4-10 和 13-14（所有的一部分），分别涉及具有 SEQ ID NOs: 4、17、38、42、55、65、93、103-104、109 或 129 所示的核苷酸序列的第一单链和与所述第一单链互补的第二单链的双链 siRNA，包含所述 siRNA 的药物组合物，所述 siRNA 或药物组合物的制药应用；

发明 65、67 和 76；权利要求 1-10 和 13-14（所有的一部分），分别涉及具有 SEQ ID NOs: 66、68 或 77 所示的核苷酸序列的第一单链和与所述第一单链互补的第二单链的双链 siRNA，包含所述 siRNA 的药物组合物，所述 siRNA 或药物组合物的制药应用。

这些发明不能相互关联，从而不能形成一个总的发明构思，因此不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定，理由如下：发明 1-132 之间相同或相应的技术特征是用于抑制 plk1 基因表达的双链 siRNA，然而，该相同或相应的技术特征已为现有技术所公开，例如，参见 WO2009082817A1 说明书第[0436]段表 1，其中公开了靶向人 PLK-1 的 siRNA 序列 PLK772，其正义链的核苷酸序列与本申请的 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列完全相同，其反义链的核苷酸序列与本申请的 SEQ ID NO: 194 所示的核苷酸序列完全相同；以及参见 CN 102102101A 的权利要求 1-2，其中公开了 Plk1-siRNA-838，其正义链的核苷酸序列包含本申请的 SEQ ID NO: 66 所示的核苷酸序列以及位于 3'末端的额外的 2 个核苷酸 TT，其反义链的核苷酸序列包含本申请的 SEQ ID NO: 198 所示的核苷酸序列以及位于 3'末端的额外的 2 个核苷酸 TT。从而以上 132 项发明不具有相同或相应的特定技术特征。

## 续：A. 主题的分类

C12N 15/113 (2010.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i