(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
2021 年 12 月 16 日 (16.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/249064 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/091834

(22) 国际申请日: 2021 年 5 月 6 日 (06.05.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010524139.1 2020年6月10日 (10.06.2020) CN

(71) 申请人: 中美瑞康核酸技术（南通）研究院有限公司 (**RACTIGEN THERAPEUTICS**) [CN/CN]; 中国江苏省南通市如东县掘港街道珠江路888号如东高新区生命健康产业园18号楼, Jiangsu 226400 (CN)。

(72) 发明人: 李龙承 (**LI, Longcheng**); 中国江苏省南通市如东县掘港街道珠江路888号如东高新区生命健康产业园18号楼, Jiangsu 226400 (CN)。 姜武林 (**KANG, Moorim**); 中国江苏省南通市如东县掘港街道珠江路888号如东高新区生命健康产业园18号楼, Jiangsu 226400 (CN)。

(74) 代理人: 泰和泰律师事务所 (**TAHOTA LAW FIRM**); 中国四川省成都市高新区天府大道中段199号棕榈泉国际中心16楼, Sichuan 610041 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) **Title:** NUCLEIC ACID MOLECULE TARGETING MITF GENE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向MITF基因的核酸分子及其用途

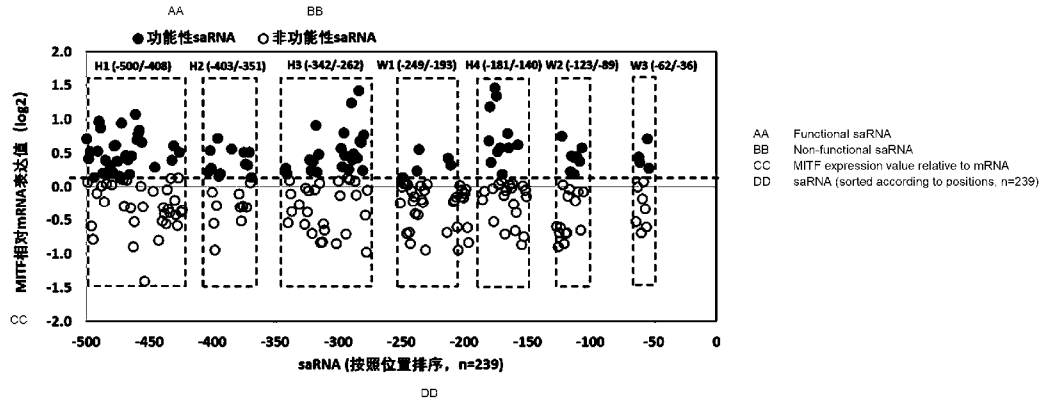


图 2

(57) **Abstract:** Provided is a small activating nucleic acid molecule, which is a nucleic acid molecule targeting the MITF gene and at least contains a first oligonucleotide chain. Also provided are a composition or preparation containing the small activating nucleic acid molecule and the use thereof. The use of the small activating nucleic acid molecule or the composition or preparation containing the small activating nucleic acid molecule can activate or up-regulate the expression of the MITF gene in cells, and treat diseases or conditions related to the insufficient or reduced expression of the MITF protein.

(57) 摘要: 提供了一种小激活核酸分子，该小激活核酸分子是靶向MITF基因的核酸分子，其至少包含第一寡核苷酸链。还提供了包含该小激活核酸分子的组合物或制剂及其用途。使用该小激活核酸分子或含有该小激活核酸分子的组合物或制剂可激活或上调MITF基因在细胞中的表达，治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况。

WO 2021/249064 A1

[见续页]

NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

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))。

靶向 MITF 基因的核酸分子及其用途

技术领域

本发明属于核酸技术领域，具体来讲，涉及一种与基因激活相关的具有双链结构的核酸分子，例如小激活核酸分子，尤其涉及靶向MITF基因的核酸分子，还涉及小激活核酸分子在激活/上调小眼畸形转录因子（microphthalmia-associated transcription factor, MITF）在基因转录中的应用。本发明一般地提供化合物，药物组合物及其使用方法， 更具体地，本发明将受益于增加MITF基因表达的疾病，如白癜风治疗中的应用。

背景技术

白癜风（vitiligo）是一种以局部表皮及毛发黑色素细胞减少，进而形成不规则白斑为特征的后天色素减退性皮肤病。据统计，白癜风患者占全球人口的比例约0.5%-2%，无明显的性别差异(Picardo等，2015)。根据临床特征可分为寻常型白癜风和节段型白癜风，寻常型白癜风与自身免疫调节或氧化应激进一步造成黑色素细胞受损有关，节段型白癜风与遗传因素有关(Gauthier, Cario Andre, and Taieb 2003; Dell'anna and Picardo 2006)。

白癜风与家族遗传、自身免疫调节、氧化应激和功能性黑色素细胞受损等因素有关。白癜风的发生具有明显的家族聚集倾向，白癜风患者的家族史阳性率约为6.25%～40%，一级亲属的患病风险是一般人群的18倍，有阳性家族史的患者通常发病较早(Sehgal and Srivastava 2007)。白癜风患者由于免疫反应产生的细胞因子（IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-8）升高，体外实验表明大量的促炎因子会抑制黑素的合成以及与黑素合成有关的转录因子的表达(Kotobuki等，2012)。有50% - 93%的白癜风患者血清中可检测到抗黑色素细胞抗体，这些抗体可通过免疫复合物激活补体和（或）抗体依赖细胞介导的细胞毒作用导致黑色素细胞减少或消失(Kemp等，2007)。Dell'Anna实验室提出白癜风患者体内氧化应激的失衡可能来源于表皮细胞中异常的心磷脂，它能导致线粒体电子传递链活性下降，诱导活性氧族（reactive oxygenspecies，ROS）过度产生，进而导致黑色素细胞死亡(Dell'Anna等，2007)。

黑色素细胞的丢失是白癜风发病的关键因素，黑色素细胞受到理化损伤后释放抗原，刺激机体产生抗黑色素细胞抗体，导致大量的黑色素细胞失活，加重表皮色素脱失。实验

表明皮损中的黑色素在其穿越表皮时损伤或丢失，这可能是由于黑色素细胞与基底膜、角质形成细胞的粘附缺陷所致(Kumar, Parsad, and Kanwar 2011)。黑色素细胞功能失调主要表现为黑色素细胞数量减少、黑色素细胞黏附和迁移失调、黑色素细胞过度凋亡和黑色素细胞发育、分化失常等。

由MITF基因编码的小眼畸形转录因子是一种具有碱性－螺旋－环－螺旋－亮氨酸拉链（bHLH-Zip）结构的转录因子，以二聚体形式结合DNA。在黑色素细胞、视网膜色素上皮细胞、破骨细胞和肥大细胞的发育过程中起关键作用。MITF与相关因子转录因子EB（transcription factor EB, TFEB）、TFE3和TFEC一起构成MiT家族(Hemesath等，1994)。MITF是MiT家族中唯一对正常黑色素细胞发育有重要作用的因子(Levy, Khaled, and Fisher 2006)。MITF不仅是黑色素细胞发育、增殖和存活的必要调节因子，而且对调节相关酶和黑素体蛋白表达具有至关重要的作用。酪氨酸酶、TYRP1和DCT三种主要色素沉着相关酶的启动子中均含有MITF的通用结合位点（TCATGTG），为MITF转录调控的靶基因(Bentley, Eisen, and Goding 1994)。

已发现MITF突变可导致多种人类疾病，包括瓦登伯格综合征2A型（Waardenburg syndrome type 2A，WS2A）、蒂策综合征（Tietz syndrome）以及COMMAD综合征，都表现出严重的耳聋和色素沉着障碍，其中前两者表现为常染色体显性遗传。

现阶段虽治疗白癜风的方法多样，但仍没有彻底治愈白癜风的方法。单纯改善外观可以用化妆品掩饰白斑，其他治疗方法有类固醇激素、紫外线照射、手术等。紫外线-B照射可以使白斑的边界模糊化，但光疗法有致癌的风险。早期Kwinter等利用高效糖皮质激素局部外涂治疗70例儿童白癜风患者，其有效率达64% (Kwinter等，2007)，但复发率高。临床上常用补骨脂类药物作为光敏剂配合长波紫外线对白癜风患者进行补骨脂素光化学疗法(PUVA)，用以改善皮损处黑色素细胞的合成和抗凋亡等作用(Iannella等， 2016)。阿法美拉肽（Afamelanotide）是唯一被美国食品药品监督管理局（FDA）批准进行临床前试验的药物，但阿法美拉肽需与窄波段紫外线B光疗（NB-UVB）进行联合试验。因为需要窄波段紫外线B光疗（NB-UVB）激活黑素皮质激素受体1（MCIR），阿法美拉肽才能和MCIR结合进而产生黑色素(Lim等，2015; Grimes等，2013)，但是具体的NB-UVB作用时间以及药物的剂量还需要进一步的试验。外科疗法中的自体吸疤表皮移植、自体微移植、自体黑

色素细胞移植、混合表皮移植和微着色法等也有很好的疗效，但此类手术有严格的禁忌症，治疗方法局限。

这些治疗方法虽各有一定效果，但容易复发，副作用大，药物的有效剂量还有待进一步确定，给临床治疗带来很大的局限性。

发明内容

为解决上述一方面或几方面的问题，本发明提供了一种基于RNA激活过程的小激活核酸分子（small activating RNA, saRNA），通过激活/上调MITF基因表达来治疗由MITF蛋白质缺乏或不足或者由MITF单等位基因突变导致的疾病或状况，如白癜风、瓦登伯格综合征2A型或蒂策综合征。

本发明的一个目标是提供基于RNA激活过程的小激活核酸分子，其通过激活/上调MITF基因转录，从而增加MITF蛋白的表达量，或者小激活核酸分子用于制备治疗与MITF蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况的药物。

本发明的另一目标是提供包含小激活核酸分子的组合物或制剂。

本发明的又一目标为提供小激活核酸分子或包含其的组合物或制剂在制备用于激活/上调MITF基因在细胞中的表达的药物中的应用。

本发明的又一目标为提供激活/上调MITF基因在细胞中的表达的方法。

本发明的又一目标为提供激活/上调MITF基因在细胞中的表达的方法，可用于治疗因MITF单等位基因突变所致的疾病，如瓦登伯格综合征2A型和蒂策综合征。

本发明的再一目标为提供小激活核酸分子或包含其的组合物或制剂在制备用于治疗与MITF蛋白质缺乏或不足相关的疾病或状况如白癜风治疗中的应用。

本发明的另一目标为提供分离的MITF基因小激活核酸分子靶位点，其中所述靶位点包括选自SEQ ID NO:299- SEQ ID NO:305的任一条序列上的任意连续16-35个核苷酸的序列或与上述任意连续16-35个核苷酸组成的序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%的同源性的序列。

在本发明的一个方面，提供了小激活核酸分子例如小激活RNA（saRNA）分子，所述小激活核酸分子至少包含第一寡核苷酸链，所述第一寡核苷酸链与人MITF基因启动子区

的任一长度为16-35个核苷酸的连续片段具有至少75%的同源性或互补性。进一步地，所述人MITF基因启动子区优选为从MITF基因的转录起始位点（TSS）至其上游的500个核苷酸的区域（SEQ ID NO:1），所述第一寡核苷酸链与从MITF基因的转录起始位点（TSS）至其上游的500个核苷酸的区域（SEQ ID NO:1）中的任一长度为16-35个核苷酸的连续片段具有至少75%的同源性或互补性。

在本发明的一个方面，提供了小激活核酸分子例如小激活RNA（saRNA）分子，其激活或者上调细胞中MITF基因的表达，所述小激活核酸分子的一条链与MITF基因启动子区的任一长度为16-35个核苷酸的核酸序列具有至少75%的同源性或互补性，启动子区是指包括转录起始位点上游的500个核苷酸（其序列为SEQ ID NO:1），从而实现MITF基因表达的激活或者上调。具体地，小激活核酸分子的一条链包括与选自与MITF基因启动子中距转录起始位点的-500至-408区域（区域H1，SEQ ID NO:299）、-403至-351区域（区域H2, SEQ ID NO:300）、-342至-262区域（区域H3, SEQ ID NO:301）、-181至-140区域（区域H4, SEQ ID NO:302）、-250至-193区域（区域W1，SEQ ID NO:303）、-123至-89区域（区域W2，SEQ ID NO:304）、-62至-36区域（区域W3，SEQ ID NO:305）中的连续16-35个核苷酸具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%的同源性或互补性的核酸序列，热点和次热点区域序列如表5所示。更具体地，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自SEQ ID NO:8-104的任一核苷酸序列具有至少75%、例如至少约79%、约80、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同源性或互补性。在一个具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链包括与选自SEQ ID NO:8-104的任一核苷酸序列具有至少75%、例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同源性或互补性的核酸序列。在另一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链由与选自SEQ ID NO: 8-104的任一核苷酸序列具有至少75%、例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同源性或互补性的核酸序列组成。在还一实施方式中，本发明的小激活核酸分子的一条链是与选自SEQ ID NO: 8-104的任一核苷酸序列具有至少75%、例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同源性或互补性的核酸序列。

本发明的小激活核酸分子包括靶向MITF基因启动子区的双链小激活核酸分子例如小

激活RNA（saRNA）分子，其包含第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链，第一寡核苷酸链与MITF基因启动子中距转录起始位点的-500至-408区域（区域H1，SEQ ID NO:299）、-403至-351区域（区域H2, SEQ ID NO:300）、-342至-262区域（区域H3, SEQ ID NO:301）、-181至-140区域（区域H4, SEQ ID NO:302）、-250至-193区域（区域W1，SEQ ID NO:303）、-123至-89区域（区域W2，SEQ ID NO:304）、-62至-36区域（区域W3，SEQ ID NO:305）中的连续16-35个核苷酸具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同源性或互补性，第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链能通过互补形成双链核酸结构，双链核酸结构能够激活MITF基因在细胞中的表达。

本发明的小激活核酸分子的第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链可以存在于两条不同的核酸链上，也可以存在于同一条核酸链上。当第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链分别位于两条链上时，小激活核酸分子的至少一条链可以在5’端和/或3’端具有突出（或称为悬垂），例如在3’端可以具有0-6个核苷酸的突出，如，0、1、2、3、4、5或6个核苷酸的突出。优选地，本发明的小激活核酸分子的两条链都具有突出，更优选地，小激活核酸分子的两条链的3’端均可以具有0-6个核苷酸的突出，例如，具有0、1、2、3、4、5或6个核苷酸的突出，最优选地，具有2个或3个核苷酸的突出。优选地，突出端的核苷酸类型可以是dT（胸腺嘧啶脱氧核苷酸，或写作T）。优选地，5’端和/或3’端的突出为dTdT或dTdTdT。

本发明的小激活核酸分子也可以包括可形成双链区发夹结构的小激活核酸分子，例如单链小激活RNA分子。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子包括靶向MITF基因启动子区的单链小激活RNA分子，其中所述单链小激活核酸分子可形成双链区发夹结构。当第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链存在于同一条核酸链上时，优选地，本发明的小激活核酸分子可以为发夹型单链核酸分子，其中第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链具有能形成双链核酸结构的互补区域，所述双链核酸结构可以通过例如RNA激活机制促进MITF基因在细胞中的表达。

上述小激活核酸分子中，第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链的长度可以分别为16-35个核苷酸，例如，可以为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。

在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一寡核苷酸链与选自SEQ ID NO:

8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性，或者小激活核酸分子的第二寡核苷酸链与选自SEQ ID NO: 8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一寡核苷酸链包括与选自SEQ ID NO: 8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性的核酸序列，或者由与选自SEQ ID NO: 8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性的核酸序列组成，或本发明的小激活核酸分子的第二寡核苷酸链包括与选自SEQ ID NO: 8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性的核酸序列，或者由与选自SEQ ID NO: 8-104中的任一核苷酸序列具有至少75%，例如至少约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的同一性或同源性或互补性的核酸序列组成。在具体的实施方式中，本发明的小激活核酸分子的第一寡核苷酸链可以包括选自SEQ ID NO:105-201的任一核苷酸序列，和/或其第二寡核苷酸链可以包括选自SEQ ID NO:202-298的任一核苷酸序列。在一个实施方式中，本文所述的小激活核酸分子可以是合成的、体外转录的或者载体表达的。

本文所述小激活核酸分子中所有的核苷酸都可以为天然的未经化学修饰的核苷酸，也可以包括至少一种修饰。在一个实施方式中，本文所述的小激活核酸分子中的修饰可以包括化学修饰，如在至少一个核苷酸可以具有化学修饰，本发明使用的化学修饰可以包括或选自如下修饰中的一种或多种，或其任意组合：

（1）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰；

（2）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的核糖的2'-OH的修饰；

（3）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的碱基的修饰；

（4）所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸为锁核酸。

所述化学修饰为本领域技术人员所公知，所述磷酸二酯键的修饰是指对磷酸二酯键中的氧进行修饰，包括但不限于，硫代磷酸修饰和硼烷化磷酸盐修饰。两种修饰都能稳定

saRNA结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。

核糖修饰是指对核苷酸戊糖中2'-OH的修饰，即，在核糖的羟基位置引入某些取代基，例如，包括但不限于，2'-氟代修饰、2'-氧甲基修饰、2'-氧亚乙基甲氧基修饰、2,4'-二硝基苯酚修饰、锁核酸(LNA) 、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰等。

碱基修饰是指对核苷酸的碱基进行修饰，例如，包括但不限于，5′-溴尿嘧啶修饰、5′-碘尿嘧啶修饰、N-甲基脲嘧啶修饰、2,6－二氨基嘌呤修饰等。

这些修饰可以增加小激活核酸分子的生物可利用性，提高与靶序列的亲和性，增强在细胞内抵抗核酸酶水解的能力。

此外，为了促进小激活核酸分子进入细胞，可以在以上修饰的基础上，在小激活核酸分子的第一寡核苷酸链和/或第二寡核苷酸链的末端引入例如胆固醇等亲脂性基团，以利于通过由脂质双分子层构成的细胞膜及核膜与细胞核内的基因启动子区发生作用。

本发明提供的小激活核酸分子在与细胞接触或引入细胞后可有效激活或上调细胞中MITF基因的表达，优选情况下表达至少上调30%。

本发明的另一方面还涉及编码本文所述的小激活核酸分子的核酸。在一个实施方式中，所述核酸可以是DNA分子。在一个实施方式中，所述核酸为表达载体，该表达载体包含编码本文所述的小激活核酸分子的片段，将该表达载体引入细胞后，可表达本文所述的小激活核酸分子。

在本发明的另一方面，提供了包含上文所述的小激活核酸分子或编码本文所述的小激活核酸分子的核酸的细胞。在一个实施方式中，本发明的小激活核酸分子可以是靶向MITF基因启动子区的双链小激活核酸分子例如双链小激活RNA（saRNA）分子，其包括第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链。在另一实施方式中，本发明的小激活核酸分子可以是靶向MITF基因启动子区的单链小激活核酸分子例如双链小激活RNA（saRNA）分子。

本发明的另一方面提供了组合物（例如药物组合物），该组合物包含本发明所述的小激活核酸分子或编码本文所述的小激活核酸分子的核酸和任选地，药学上可接受的载体。在一个实施方式中，所述药学上可接受的载体可以包括或选自脂质体、高分子聚合物或多肽。

在本发明的另一方面，提供了制剂，该制剂包括：本发明所述的小激活核酸分子、编

码本发明所述的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。

在本发明的另一方面，提供了试剂盒，所述试剂盒包括：本发明的小激活核酸分子、编码本文所述的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物在制备用于激活/上调MITF基因在细胞中的表达的药物或制剂中的应用。

本发明的另一方面还涉及激活/上调MITF基因在细胞中的表达的方法，该方法包括给所述细胞施用本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂。在一个实施方式中，激活/上调MITF基因在细胞中的表达的方法包括给所述细胞施用本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。上述细胞包括哺乳动物细胞，例如来自人体的细胞，如人黑色素细胞（HEM）和人皮肤角质形成细胞（NHEK），上述细胞可以是离体的，也可以存在于哺乳动物体中，如人体中。

本发明的小激活核酸分子可以被直接导入细胞中，也可以是将编码本发明的小激活核酸分子的核酸序列导入细胞后在细胞内产生；所述细胞优选为哺乳动物细胞，更优选为人类细胞。上述细胞可以是离体的，如细胞系或细胞株等，也可以存在于哺乳动物体中，如人体中。该人体可以是具有与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的患者。本发明所述的小激活核酸分子可以被施以足够的量以实现对与MITF蛋白量的缺乏或与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的治疗。具体情况下，所述与MITF蛋白量的缺乏或与MITF表达不足或减少相关的疾病或状况可以包括例如白癜风等。

本发明另一方面提供了分离的MITF基因小激活核酸分子作用位点，该位点具有MITF基因的启动子区(SEQ ID NO:1)上任意连续的16-35个核苷酸的序列，优选情况下，所述作用位点包括或选自SEQ ID NO:299-305的任一条序列上的任意连续16-35个核苷酸的序列。具体地，所述作用位点可以包括或选自SEQ ID NO:8-104中的任一核苷酸序列。

本发明的另一方面涉及治疗个体中与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的方法，包括给所述个体施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。在一个实施方式中，本发明的治疗个体中与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的方法包括给个体施用治疗有效量的本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物和治疗有效量的其它剂，所述其它剂包括例如小分子化合物、抗体、多肽、蛋白等。所述个体可以是哺乳动物，包括例如人。在一个实施方案中，与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况可以包括例如白癜风。根据临床特征可分为寻常型白癜风和节段型白癜风，寻常型白癜风与自身免疫调节或氧化应激进一步造成黑色素细胞受损有关，节段型白癜风与遗传因素有关。白癜风与家族遗传、自身免疫调节、氧化应激和功能性黑色素细胞受损等因素有关。

本发明的另一方面涉及治疗个体中白癜风的方法，包括给所述个体施用治疗有效量的本发明的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物。在一个实施方式中，本发明的治疗白癜风的方法包括给个体施用治疗有效量的本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物和治疗有效量的其它剂，所述其它剂包括例如小分子化合物、抗体、多肽、蛋白等。所述个体可以是哺乳动物，包括例如人。在上述方法中，白癜风包括寻常型白癜风和节段型白癜风等。在上述方法中，个体包括哺乳动物，例如人。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物在制备用于治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的药物中的应用。所述个体可以是哺乳动物，例如人。在一个实施方案中，所述与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病可以包括例如白癜风等。优选地，与MITF蛋

白表达不足或减少相关的疾病或状况是白癜风，更优选地，与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况包括寻常型白癜风和节段型白癜风等。

在一个实施方式中，提供了本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物可以用于制备治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病如白癜风的药物。在一个实施方案中，所述与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病可以包括例如白癜风等。优选地，与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况是白癜风，更优选地，与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况包括寻常型白癜风和节段型白癜风等。

本发明的另一方面涉及本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂在制备用于治疗白癜风的药物或药物组合中的应用。优选地，白癜风包括寻常型白癜风和节段型白癜风等。

在一个实施方式中，提供了本发明所述的小激活核酸分子、编码本发明的小激活核酸分子的核酸、包含本发明的小激活核酸分子或编码本发明的小激活核酸分子的核酸的细胞、或包含本发明的小激活核酸分子的组合物或制剂在制备用于治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病的药物或药物组合中的应用。

与现有技术相比，本发明具有以下一方面或几方面的有益效果：

本发明提供的能够激活/上调MITF基因表达的小激活核酸分子例如小激活RNA（saRNA），能够持久地激活MITF基因，因而高效、特异地上调或恢复MITF基因和蛋白的表达并同时具有较低的毒副作用，可用于治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或病症例如白癜风，或者制备用于治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或病症的药物或制剂，例如瓦登伯格综合征2A型和蒂策综合征等。

附图说明

图1为saRNA介导的人MITF mRNA表达改变。靶向人MITF启动子的239个saRNA以25 nM终浓度转染HEM细胞，转染72小时后用一步法RT-qPCR分析MITF mRNA表达。图示为

相对于对照处理（Mock）的MITF的mRNA表达改变（log2）从最高到最低排序。纵坐标值代表2个重复处理的平均值±SD。

图2为saRNA在人MITF启动子上的热点区域。靶向人MITF启动子的239个saRNA以25 nM终浓度转染HEM细胞72小时，转染结束后用一步法RT-qPCR分析MITF mRNA表达。图示为相对于对照处理（Mock）的MITF表达改变，按照saRNA在MITF启动子上的靶点位置从-500到-0排序。黑色实心点表示功能性saRNA，白色空心点表示非功能性saRNA，虚线条框示功能性saRNA聚集的热点区（H1~H4）和次热点区（W1~W3）。纵坐标值代表2个重复处理的平均值±SD。

图3为二步法RT-qPCR验证高通量筛选结果。用图3所示saRNA以25 nM终浓度转染HEM细胞72小时，转染结束后用Qiagen RNeasy试剂盒提取RNA，反转录后用ABI 7500 快速实时PCR系统进行qPCR扩增，同时扩增HPRT1基因作为内参。图示为单个saRNA处理细胞后MITF相对mRNA的表达值。 Mock、dsCon2和RAG4-618i分别为空白转染、无关序列双链RNA转染及小干扰RNA对照转染。纵坐标值代表2个重复处理的平均值±SD。

图4为二步法RT-qPCR验证高通量筛选结果。用图4所示saRNA以25 nM终浓度转染NHEK细胞72小时，转染结束后用Qiagen RNeasy试剂盒提取RNA，反转录后用ABI 7500 快速实时PCR系统进行qPCR扩增，同时扩增HPRT1基因作为内参。图示为单个saRNA处理细胞后MITF相对mRNA的表达值。 Mock、dsCon2和RAG4-618i分别为空白转染、无关序列双链RNA转染及小干扰RNA对照转染。纵坐标值代表2个重复处理的平均值±SD。

图5为saRNA促进人NHEK细胞中MITF蛋白表达。用图5所示saRNA以25 nM终浓度转染NHEK细胞5天，收集细胞并提取细胞总蛋白后用western blot检测MITF蛋白表达水平，同时检测微管蛋白（α/β-Tubulin）作为内参。图示为单个saRNA处理的细胞的MITF相对蛋白表达值。 Mock、dsCon2和RAG4-618i分别为空白转染、无关序列双链RNA转染及小干扰RNA对照转染。

图6为saRNA促进HEM细胞中MITF蛋白表达。用图6所示saRNA以25 nM终浓度转染HEM细胞72小时，收集细胞并提取细胞总蛋白后用western blot检测MITF蛋白表达水平，同时检测微管蛋白（α/β-Tubulin）作为内参。图示为单个saRNA处理的细胞的MITF相对蛋白表达值。 Mock、dsCon2和RAG4-618i分别为空白转染、无关序列双链RNA转染及小干

扰RNA对照转染。

具体实施方式

在本发明中，相关术语采用如下定义：

如本文所用的术语“互补”是指两条寡核苷酸链彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的寡核苷酸链中的核苷酸之间通过氢键形成。互补寡核苷酸链可以沃森-克里克（Watson-Crick）方式碱基配对（例如，A-T，A-U，C-G），或以允许形成双链体的任何其他方式（例如Hoogsteen型或者反向Hoogsteen型碱基配对）进行碱基配对。

互补包括完全互补和不完全互补两种情况。完全互补或100％互补是指双链寡核苷酸分子的双链区中来自第一条寡核苷酸链的每个核苷酸可以与第二条寡核苷酸链相应位置的核苷酸形成氢键而没有“错配”的情况。不完全互补是指两条链的核苷酸单元不能全部互相氢键结合的情况。例如，对于两条双链区为20个核苷酸长度的寡核苷酸链，如果每条链上只有两个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出10%的互补性。在同一实例中，如果每条链上的18个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出90%的互补性。实质互补是指至少约75%、约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%、或约100%的互补。

如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物，包括但不限于DNA，RNA或DNA/RNA杂交体的单链或双链分子，包括规则地和不规则地交替的脱氧核糖基部分和核糖基部分的寡核苷酸链，以及这些种类的寡核苷酸的修饰和以及天然存在的或非天然存在的骨架。本发明中所述的用于激活靶基因转录的寡核苷酸为小激活核酸分子。

如本文所用的术语“寡核苷酸链”和“寡核苷酸序列”可互换地使用，是指35个以下碱基的短链核苷酸的总称（包括脱氧核糖核酸DNA、核糖核酸RNA在内的核苷酸链，也包括由一个或多个脱氧核苷酸以及一个或多个核糖核苷酸共同形成的混合寡核苷酸链）。在本发明中，寡核苷酸链的长度可以是16至35个核苷酸的任一长度。

如本文所用，术语“第一寡核苷酸链” 可以是正义链也可以是反义链，小激活RNA的正义链是指小激活RNA双链体中含与靶基因的启动子DNA序列的编码链具有同一性的核酸链，反义链是指小激活RNA双链体中与正义链互补的核酸链。

如本文所用，术语“第二寡核苷酸链” 也可以是正义链或者反义链。当第一寡核酸链为正义链时，第二寡核酸链为反义链，当第一寡核酸链为反义链时，第二寡核酸链为正义链。

如本文所用的术语“基因”是指编码一条多肽链或转录一条功能RNA所需的全部核苷酸序列。“基因”可以是对于宿主细胞而言内源的或完全或部分重组的基因（例如，由于引入编码启动子的外源寡核苷酸和编码序列或将邻近内源编码序列的异源启动子导入宿主细胞）。例如，术语“基因”包括可以由外显子和内含子组成的核酸序列。编码蛋白质的序列是，例如，包含在起始密码子和终止密码子之间的开放阅读框中的外显子内的序列，如本文所用，“基因”可以指包括例如基因调控序列例如启动子，增强子和本领域已知的控制另一基因的转录，表达或活性的所有其他序列，无论另一基因是否包含编码序列或非编码序列。在一种情况下，例如，“基因”可以用于描述包含调控序列例如启动子或增强子的功能性核酸。重组基因的表达可以通过一种或多种异源调节序列来控制。

如本文所用的术语“靶基因”可以是天然存在于生物体中的核酸序列、转基因、病毒或细菌序列、染色体或染色体外和/或瞬时或稳定转染或掺入细胞和/或其染色质。靶基因可以为蛋白质编码基因，也可为非蛋白质编码基因（例如微小RNA基因、长链非编码RNA基因）。靶基因通常含有启动子序列，设计与启动子序列具有同一性（也称同源性）的小激活核酸分子可以实现对靶基因的正向调控，表现为靶基因表达的上调。“靶基因启动子序列”是指靶基因的非编码序列，在本发明中涉及“与靶基因启动子序列互补”中靶基因启动子序列是指该序列的编码链，亦称非模板链，即为与该基因编码序列为同一序列的核酸序列。“靶点”或“靶点序列”是指靶基因启动子序列中小激活核酸分子的正义寡核苷酸链或反义寡核苷酸与之同源或互补的序列片段。

如本文所用，术语“正义链”、“正义核酸链”可互换地使用，小激活核酸分子的正义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中含与靶基因的启动子序列的编码链具有同一性的第一寡核苷酸链。

如本文所用，术语“反义链”、“反义核酸链”可互换地使用，小激活核酸分子的反义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中与正义寡核苷酸链互补的第二寡核苷酸链。

如本文所用的术语“编码链”是指靶基因中不能进行转录的那一条DNA链，该链的核

苷酸序列与转录生成的RNA的序列一致（在RNA中是以U取代了DNA中的T）。本发明中所述的靶基因启动子双链DNA序列的编码链是指与靶基因DNA编码链在同一条DNA链上的启动子序列。

如本文所用的术语“模板链”是指靶基因的双链DNA中与编码链互补的另一条链，可作为模板转录为RNA的那条链，该链与转录的RNA碱基互补（A-U，G-C）。在转录过程中，RNA聚合酶与模板链结合，并沿着模板链的3'→5'方向移动，按照5'→3'方向催化RNA的合成。本发明中所述的靶基因启动子双链DNA序列的模板链是指与靶基因DNA模板链在同一条DNA链上的启动子序列。

如本文所用的术语“启动子”是指通过与蛋白质编码或RNA编码核酸序列在位置上关联而对它们的转录发挥调控作用的序列。通常，真核基因启动子包含100~5,000个碱基对，尽管此长度范围并不意味着限制本文所用的术语“启动子”。虽然启动子序列一般位于蛋白质编码或者RNA编码序列的5'端，但启动子序列也可存在于外显子及内含子序列中。

如本文所用的术语“转录起始位点”是指在基因的模板链上标志转录起始的核苷酸。转录起始位点可出现于启动子区的模板链上。一个基因可以有多于一个的转录起始位点。

如本文所用的术语“同一性”或“同源性”是指小激活RNA的其中一条寡核苷酸链（正义链或者反义链）与靶基因的启动子序列的某一区域的编码链或者模板链存在的相似性。在本文中，所述“同一性”或“同源性”可以是至少约75%、约79%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%。

如本文所用的术语“突出”、“overhang”、“悬垂”可互换地使用，是指寡核苷酸链末端（5'或3'）非碱基配对核苷酸，其是由延伸超出双链寡核苷酸内的其中一条链的另一条链产生的。延伸超出双链体3'和/或5'端的单链区域被称为突出。

如本文所用，术语“基因激活”或“激活基因” 或“基因上调”或“上调基因”可互换地使用，是指通过测量基因转录水平、mRNA水平、蛋白水平、酶活性、甲基化状态、染色质状态或构型、翻译水平、或其在细胞或生物系统中的活性或状态来测定某一核酸转录、翻译或表达或活性的增加。这些活动或状态可以直接或间接的测定。此外，“基因激活”、“激活基因”、“基因上调”、“上调基因”是指与核酸序列相关的活性增加，而不管发生这种激活的机制如何，例如其作为调节序列发挥调控作用、被转录成RNA，被翻译为蛋白质并增

加蛋白质的表达。

如本文所用，术语“小激活RNA”、“saRNA”、“小激活核酸分子”可互换地使用，是指能够促进基因表达的核酸分子，并且可以由包含与靶基因的非编码核酸序列（例如启动子、增强子等）具有序列同一性或同源性的核苷酸序列的第一核酸片段（反义核酸链，也称反义寡核苷酸链）和包含与第一核酸片段互补的核苷酸序列的第二核酸片段（正义核酸链，也称有义链或正义寡核苷酸链）组成，其中所述第一核酸片段和第二核酸片段形成双链体。小激活核酸分子也可以由合成的或者载体表达的可形成双链区发夹结构的单链RNA分子组成，其中第一区域包含与基因的启动子靶序列具有序列同一性的核苷酸序列，第二区域包含的核苷酸序列与第一区域互补。小激活核酸分子的双链体区域长度通常为约10至约50个碱基对、约12个至约48个碱基对、约14个至约46个碱基对、约16个至约44个碱基对、约18个至约42个碱基对、约20个至约40个碱基对、约22个至约38个碱基对、约24个至约36个碱基对、约26个至约34个碱基对、约28个至约32个碱基对、通常约10个、约15个、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50个碱基对。此外，术语“saRNA”、“小激活RNA”和“小激活核酸分子”还含有除核糖核苷酸部分之外的核酸，包括但不限于修饰的核苷酸或类似物。

如本文所用，术语“热点（hot spot，H区）”是指长度至少为25 bp 的基因启动子区域，在这些区域，呈现出功能性小激活核酸分子靶点的聚集，即靶向这些热点区域的小激活核酸分子至少30%能够诱导靶基因mRNA表达达到1.1倍及以上；术语“次热点（warm spot，W区）”是指长度至少为25 bp 的基因启动子区域，在这些区域，呈现出功能性小激活核酸分子靶点的聚集，即靶向这些热点区域的小激活核酸分子8-30%能够诱导靶基因mRNA表达达到1.1倍及以上。

如本文所用，术语“合成”是指寡核苷酸的合成方式，包括任何能够合成RNA的方式，例如化学合成、体外转录、载体表达等。

本发明通过RNA激活方式上调MITF基因的表达，通过增加MITF蛋白的表达量来治疗相关疾病，尤其是白癜风。本发明中MITF基因有时也称为靶基因。

本发明提供的小激活核酸分子的制备方法包括序列设计和序列合成。

本发明的小激活核酸分子序列的合成可以采用化学合成的方法，或者委托专门从事

核酸合成的生物技术公司合成。

一般来说，化学合成的方法包括以下四个过程：（1）寡聚核糖核苷酸的合成；（2）脱保护；（3）纯化分离；（4）脱盐及退火。

例如，本发明所述saRNA化学合成的具体步骤如下：

（1）寡聚核糖核苷酸的合成

在自动DNA/RNA合成仪（例如，Applied Biosystems EXPEDITE8909）上设定合成1微摩尔的RNA，同时设定每个循环的偶联时间为10-15分钟，起始物为固相连接的5’-O-对二甲氧基三苯甲基-胸苷支持物，第一个循环在固相支持物上连接一个碱基，然后在第n次（19≥n≥2）循环中，在第n-1次循环所连接的碱基上连接一个碱基，重复此循环直至完成全部核酸序列的合成。

（2）脱保护

将连接有saRNA的固相支持物加入到试管中，并在此试管中加入1毫升的乙醇/氨水溶液(体积比为1：3)，然后密封，置于25-70°C温箱中，孵育2-30小时，过滤含有saRNA的固相支持物的溶液并收集滤液，用双蒸水淋洗固相支持物2次（每次1毫升）并收集滤液，合并收集洗脱液，在真空条件下干燥1-12小时。然后，加入1毫升四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液（1M），室温放置4-12小时，再加入2毫升正丁醇，高速离心收集沉淀即得到saRNA单链的粗产物。

（3）纯化分离

将得到的saRNA的粗产物溶解于2毫升浓度为1摩尔/升的三乙胺乙酸盐溶液中，然后通过高压液相色谱反相C18柱进行分离，得到纯化的saRNA单链产物。

（4）脱盐及退火

用体积排阻凝胶过滤法去除盐份，将正义链和反义链的寡聚核糖核酸单链按相同摩尔比混合在1-2毫升的缓冲液中（10 mM Tris，pH＝7.5-8.0，50 mM NaCl），将此溶液加热至95°C，然后缓缓将此溶液冷却至室温，得到含有saRNA的溶液。

本研究发现，将上述saRNA导入细胞后，能够有效增加MITF mRNA和蛋白质的表达。

下面结合具体实施例及附图，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常

规条件，例如Sambrook等，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

下面将结合实施例对本公开的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本公开，而不应视为对本公开的范围的限定。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例**1** 靶向人**MITF**基因启动子的**saRNA**的设计与合成

为了筛选能够激活MITF基因表达的功能性小激活RNA，以MITF 500 bp的启动子序列为模板，从TSS上游-500 bp处开始选定大小为19 bp的靶点。然后对靶点序列进行过滤处理，保留靶点序列的标准为：1）GC含量在40%~65%之间；2）不含有5个或者多于5个的连续同一核苷酸；3）不含多于3个的二核苷酸重复序列；4）不含多于3个的三核苷酸重复序列。过滤后，剩余239个靶点序列作为候选进入筛选过程。基于这些候选序列，化学合成相应的双链小激活RNA。

其中，该实验中使用的双链小激活RNA的正义和反义链的长度均为21个核苷酸，所述双链saRNA的第一核糖核酸链（正义链）的5’区域的19个核苷酸与启动子靶点序列具有100%的同一性，其3’末端含有TT序列；第二核糖核酸链的5’区域的19个核苷酸与第一核糖核酸链序列互补，其3’末端含有TT序列。将前述双链saRNA的两条链以同等量的摩尔数混合，退火后形成双链saRNA。

人MITF启动子序列如下所示，其对应于序列表中SEQ ID NO: 1从5’至3’的位置1至位置500：

-500 gcgaaggaaa gttcttcctc gttgttccaa tccgaggaca agctgatatg

-450 tcgcagcagc ccagggaagc atgcgagctg ataggaagtc cttttatttt

-400 aagacaggct cgaatgctaa aactttcttg tgccaaaacc cttgactatt

-350 ttatttttaa aataagcact tggcgtgccc tcgcagatgt ctgagctgag

-300 aggtcggggc gatggtagaa gagcagtcag tgtccattct tattcatatt

-250 aagtagccaa gtctgtaccc ttgaagcaag tggggagaga ggagggagag

-200 gagctgctga cattgacaat gaatccaaac aggagttgca ctagcggtgt

-150 ccaccacgtt gcctctcccc cgcctggcct tctgggagct gtagttttcg

-100 tgggagcggc tccccaggcg agctgggaat gccccgcccg ggccgaacta

-50 cagatcccag gcggcgctcg gccgccagcc cctcccgccc gggtgcgagt

实施例**2** 靶向人**MITF**启动子的**saRNA**的高通量筛选

（1）细胞培养和转染

人黑色素细胞（HEM）（购自北京北纳创联生物科技有限公司，BNCC350795）和正常人皮肤角质形成细胞（NHEK）（购自北京北纳创联生物科技有限公司，BNCC340593）培养在DMEM培养基（Gibco）中，培养基含有10%小牛血清（Sigma-Aldrich）和1%青霉素/链霉素（Gibco）。细胞在5%的CO_2，37℃条件下培养。HEM细胞以每孔2000个细胞铺板到96孔板中，依照制造商的说明，使用RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA)以25 nM（除非另有说明）浓度转染小激活RNA，转染时间为72小时，每种处理使用2个复孔。

（2）一步法RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入150 μl PBS清洗一次，弃掉PBS，每孔加入50 μl细胞裂解液，室温孵育5分钟。每孔取1 μl细胞裂解液使用一步法TB GreenTM PrimeScripTM RT-PCR 试剂盒 II (Takara, RR086A)。

在ABI 7500 快速实时（Fast Real-time） PCR 系统（Applied Biosystems）进行qPCR分析，每个样本重复3个复孔扩增，PCR反应条件见表1。

表1 PCR反应制备

试剂	体积
2 × 一步法 TB Green RT-PCR 缓冲液 4	2.5 μl
PrimeScript 1 step 酶混合物 2	0.2 μl
正向和反向引物混合物（5 μM）	0.4 μl
无 RNase dH_2O	1.4 μl
粗制裂解物（RNA）	0.5 μl
总计	5 μl

反应条件为：阶段1-反转录反应：42℃，5分钟；95℃10秒；阶段2-PCR反应：95℃ 5秒，60℃ 20 秒，扩增45个循环。以HPRT1及TBP为内参基因。MITF、HPRT1及TBP所用PCR引物见表2，其中MITF用MITF F1/R1引物对扩增。

表2 RT-qPCR分析的引物序列

引物名称	序列号	序列 (5'-3')
MITF F1 MITF R1	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:3	CGACAGAAGAAACTGGAGCAC CCCGTGGATGGAATAAGGGAAA
HPRT1 F HPRT1 R	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:5	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC
TBP F TBP R	SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:7	TGCTCACCCACCAACAATTTAG TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG

为了计算某个saRNA转染样本的MITF（目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用公式1代入目的基因及2个内参基因的Ct值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / ((2^{(Ct\mathrm{R}1m-Ct\mathrm{R}1s)} * 2^{(Ct\mathrm{R}2m-CtR2s)})^{(1/2)}) \quad \text{(公式1)}$$

其中，CtTm为来自对照处理（Mock）样本的目的基因的Ct值，CtTs为来自saRNA处理样本的目的基因的Ct值，CtR1m为来自Mock处理样本的内参基因1的Ct值，CtR1s为来自saRNA处理样本的内参基因1的Ct值，CtR2m为来自对照处理样本的内参基因2的Ct值，CtR2s为来自saRNA处理样本的内参基因2的Ct值。

（3）功能性saRNA筛选

为了获得能够激活MITF转录的saRNA，用上述239个saRNA分别转染HEM细胞，转染浓度为25 nM，转染72小时后以如上所述相同的方法，裂解细胞并进行一步法RT-qPCR分析，得到每个saRNA处理样本的MITF基因的相对（与对照处理组比较）表达值。如表3所示，有29（12.1%）个saRNA显示出高度激活作用（≥1.5倍），68（28.5%）个saRNA显示出轻度激活作用（≥1.1倍），有142（59.4%）个saRNA对MITF的表达不产生显著的上调影响。激活的最大幅度为2.75倍，最大抑制幅度为0.38倍，这些具有激活活性的saRNA被称为功能性saRNA。

表3 人MITF saRNA高通量筛选结果统计

saRNA 活性分类	MITF 改变幅度的 log_2 值（倍数）	saRNA 数量	百分比
高度激活	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤1.46（2.75）	29	12.1%
轻度激活	≥ 0.13 (1.10）~ < 0.58 (1.50)	68	28.5%
无激活作用	< 0.13 (1.10）	142	59.4%
总计		239	100%

如图1所示，进一步显示了人MITF saRNA的MITF表达改变从最高到最低排序。其中MITF活性saRNA序列（功能性saRNA序列）、活性靶点序列以及MITF mRNA表达改变，如表4所示（表4所列出的各活性靶点序列对应序列表中的SEQ NO: 8-104，各saRNA正义序列对应序列表中的SEQ ID NO:105-201，各saRNA反义序列对应序列表中的SEQ ID NO: 202-298）。表5所示为功能性saRNA所处的不同热点和次热点区域及相关序列（SEQ ID NO: 299-305）。

表4 功能性saRNA序列、其活性靶点序列以及其导致的MITF mRNA表达改变

	saRNA	活性靶点序列 (5'-3')	功能性 saRNA 序列 (5'-3')	MITF mRNA 相对表达改变倍数
热点区	RAG4-500	GCGAAGGAAAGTTCTTCCT	GCGAAGGAAAGUUCUUCCUTT (正义) AGGAAGAACUUUCCUUCGCTT (反义)	1.64
	RAG4-498	GAAGGAAAGTTCTTCCTCG	GAAGGAAAGUUCUUCCUCGTT (正义) CGAGGAAGAACUUUCCUUCTT (反义)	1.34
	RAG4-497	AAGGAAAGTTCTTCCTCGT	AAGGAAAGUUCUUCCUCGUTT (正义) ACGAGGAAGAACUUUCCUUTT (反义)	1.44
	RAG4-494	GAAAGTTCTTCCTCGTTGT	GAAAGUUCUUCCUCGUUGUTT (正义) ACAACGAGGAAGAACUUUCTT (反义)	1.10
	RAG4-491	AGTTCTTCCTCGTTGTTCC	AGUUCUUCCUCGUUGUUCCTT (正义) GGAACAACGAGGAAGAACUTT (反义)	1.45
	RAG4-490	GTTCTTCCTCGTTGTTCCA	GUUCUUCCUCGUUGUUCCATT (正义) UGGAACAACGAGGAAGAACTT (反义)	1.97
	RAG4-489	TTCTTCCTCGTTGTTCCAA	UUCUUCCUCGUUGUUCCAATT (正义) UUGGAACAACGAGGAAGAATT (反义)	1.84
	RAG4-487	CTTCCTCGTTGTTCCAATC	CUUCCUCGUUGUUCCAAUCTT (正义) GAUUGGAACAACGAGGAAGTT (反义)	1.15
	RAG4-485	TCCTCGTTGTTCCAATCCG	UCCUCGUUGUUCCAAUCCGTT (正义) CGGAUUGGAACAACGAGGATT (反义)	1.32

	RAG4-483	CTCGTTGTTCCAATCCGAG	CUCGUUGUUCCAAUCCGAGTT (正义) CUCGGAUUGGAACAACGAGTT (反义)	1.16
	RAG4-482	TCGTTGTTCCAATCCGAGG	UCGUUGUUCCAAUCCGAGGTT (正义) CCUCGGAUUGGAACAACGATT (反义)	1.16
	RAG4-481	CGTTGTTCCAATCCGAGGA	CGUUGUUCCAAUCCGAGGATT (正义) UCCUCGGAUUGGAACAACGTT (反义)	1.23
	RAG4-479	TTGTTCCAATCCGAGGACA	UUGUUCCAAUCCGAGGACATT (正义) UGUCCUCGGAUUGGAACAATT (反义)	1.16
	RAG4-478	TGTTCCAATCCGAGGACAA	UGUUCCAAUCCGAGGACAATT (正义) UUGUCCUCGGAUUGGAACATT (反义)	1.53
	RAG4-477	GTTCCAATCCGAGGACAAG	GUUCCAAUCCGAGGACAAGTT (正义) CUUGUCCUCGGAUUGGAACTT (反义)	1.54
	RAG4-476	TTCCAATCCGAGGACAAGC	UUCCAAUCCGAGGACAAGCTT (正义) GCUUGUCCUCGGAUUGGAATT (反义)	1.31
	RAG4-475	TCCAATCCGAGGACAAGCT	UCCAAUCCGAGGACAAGCUTT (正义) AGCUUGUCCUCGGAUUGGATT (反义)	1.30
	RAG4-474	CCAATCCGAGGACAAGCTG	CCAAUCCGAGGACAAGCUGTT (正义) CAGCUUGUCCUCGGAUUGGTT (反义)	1.12
	RAG4-473	CAATCCGAGGACAAGCTGA	CAAUCCGAGGACAAGCUGATT (正义) UCAGCUUGUCCUCGGAUUGTT (反义)	1.10
	RAG4-472	AATCCGAGGACAAGCTGAT	AAUCCGAGGACAAGCUGAUTT (正义) AUCAGCUUGUCCUCGGAUUTT (反义)	1.93
	RAG4-469	CCGAGGACAAGCTGATATG	CCGAGGACAAGCUGAUAUGTT (正义) CAUAUCAGCUUGUCCUCGGTT (反义)	1.39
	RAG4-467	GAGGACAAGCTGATATGTC	GAGGACAAGCUGAUAUGUCTT (正义) GACAUAUCAGCUUGUCCUCTT (反义)	1.33
	RAG4-466	AGGACAAGCTGATATGTCG	AGGACAAGCUGAUAUGUCGTT (正义) CGACAUAUCAGCUUGUCCUTT (反义)	1.14
	RAG4-464	GACAAGCTGATATGTCGCA	GACAAGCUGAUAUGUCGCATT (正义) UGCGACAUAUCAGCUUGUCTT (反义)	1.37
	RAG4-461	AAGCTGATATGTCGCAGCA	AAGCUGAUAUGUCGCAGCATT (正义) UGCUGCGACAUAUCAGCUUTT (反义)	2.10
	RAG4-460	AGCTGATATGTCGCAGCAG	AGCUGAUAUGUCGCAGCAGTT (正义) CUGCUGCGACAUAUCAGCUTT (反义)	1.63
	RAG4-459	GCTGATATGTCGCAGCAGC	GCUGAUAUGUCGCAGCAGCTT (正义) GCUGCUGCGACAUAUCAGCTT (反义)	1.72
	RAG4-458	CTGATATGTCGCAGCAGCC	CUGAUAUGUCGCAGCAGCCTT (正义) GGCUGCUGCGACAUAUCAGTT (反义)	1.79
	RAG4-456	GATATGTCGCAGCAGCCCA	GAUAUGUCGCAGCAGCCCATT (正义) UGGGCUGCUGCGACAUAUCTT (反义)	1.58
	RAG4-446	AGCAGCCCAGGGAAGCATG	AGCAGCCCAGGGAAGCAUGTT (正义) CAUGCUUCCCUGGGCUGCUTT (反义)	1.23
	RAG4-432	GCATGCGAGCTGATAGGAA	GCAUGCGAGCUGAUAGGAATT (正义) UUCCUAUCAGCUCGCAUGCTT (反义)	1.32

	RAG4-431	CATGCGAGCTGATAGGAAG	CAUGCGAGCUGAUAGGAAGTT (正义) CUUCCUAUCAGCUCGCAUGTT (反义)	1.53
	RAG4-427	CGAGCTGATAGGAAGTCCT	CGAGCUGAUAGGAAGUCCUTT (正义) AGGACUUCCUAUCAGCUCGTT (反义)	1.10
	RAG4-426	GAGCTGATAGGAAGTCCTT	GAGCUGAUAGGAAGUCCUUTT (正义) AAGGACUUCCUAUCAGCUCTT (反义)	1.43
	RAG4-403	TTTAAGACAGGCTCGAATG	UUUAAGACAGGCUCGAAUGTT (正义) CAUUCGAGCCUGUCUUAAATT (反义)	1.17
	RAG4-402	TTAAGACAGGCTCGAATGC	UUAAGACAGGCUCGAAUGCTT (正义) GCAUUCGAGCCUGUCUUAATT (反义)	1.46
	RAG4-401	TAAGACAGGCTCGAATGCT	UAAGACAGGCUCGAAUGCUTT (正义) AGCAUUCGAGCCUGUCUUATT (反义)	1.21
	RAG4-396	CAGGCTCGAATGCTAAAAC	CAGGCUCGAAUGCUAAAACTT (正义) GUUUUAGCAUUCGAGCCUGTT (反义)	1.65
	RAG4-395	AGGCTCGAATGCTAAAACT	AGGCUCGAAUGCUAAAACUTT (正义) AGUUUUAGCAUUCGAGCCUTT (反义)	1.12
	RAG4-394	GGCTCGAATGCTAAAACTT	GGCUCGAAUGCUAAAACUUTT (正义) AAGUUUUAGCAUUCGAGCCTT (反义)	1.15
	RAG4-385	GCTAAAACTTTCTTGTGCC	GCUAAAACUUUCUUGUGCCTT (正义) GGCACAAGAAAGUUUUAGCTT (反义)	1.48
	RAG4-375	TCTTGTGCCAAAACCCTTG	UCUUGUGCCAAAACCCUUGTT (正义) CAAGGGUUUUGGCACAAGATT (反义)	1.43
	RAG4-374	CTTGTGCCAAAACCCTTGA	CUUGUGCCAAAACCCUUGATT (正义) UCAAGGGUUUUGGCACAAGTT (反义)	1.27
	RAG4-372	TGTGCCAAAACCCTTGACT	UGUGCCAAAACCCUUGACUTT (正义) AGUCAAGGGUUUUGGCACATT (反义)	1.26
	RAG4-371	GTGCCAAAACCCTTGACTA	GUGCCAAAACCCUUGACUATT (正义) UAGUCAAGGGUUUUGGCACTT (反义)	1.43
	RAG4-369	GCCAAAACCCTTGACTATT	GCCAAAACCCUUGACUAUUTT (正义) AAUAGUCAAGGGUUUUGGCTT (反义)	1.11
	RAG4-342	AAAATAAGCACTTGGCGTG	AAAAUAAGCACUUGGCGUGTT (正义) CACGCCAAGUGCUUAUUUUTT (反义)	1.21
	RAG4-341	AAATAAGCACTTGGCGTGC	AAAUAAGCACUUGGCGUGCTT (正义) GCACGCCAAGUGCUUAUUUTT (反义)	1.15
	RAG4-323	CCCTCGCAGATGTCTGAGC	CCCUCGCAGAUGUCUGAGCTT (正义) GCUCAGACAUCUGCGAGGGTT (反义)	1.32
	RAG4-322	CCTCGCAGATGTCTGAGCT	CCUCGCAGAUGUCUGAGCUTT (正义) AGCUCAGACAUCUGCGAGGTT (反义)	1.19
	RAG4-320	TCGCAGATGTCTGAGCTGA	UCGCAGAUGUCUGAGCUGATT (正义) UCAGCUCAGACAUCUGCGATT (反义)	1.30
	RAG4-318	GCAGATGTCTGAGCTGAGA	GCAGAUGUCUGAGCUGAGATT (正义) UCUCAGCUCAGACAUCUGCTT (反义)	1.89
	RAG4-317	CAGATGTCTGAGCTGAGAG	CAGAUGUCUGAGCUGAGAGTT (正义) CUCUCAGCUCAGACAUCUGTT (反义)	1.17

	RAG4-316	AGATGTCTGAGCTGAGAGG	AGAUGUCUGAGCUGAGAGGTT (正义) CCUCUCAGCUCAGACAUCUTT (反义)	1.40
	RAG4-298	GTCGGGGCGATGGTAGAAG	GUCGGGGCGAUGGUAGAAGTT (正义) CUUCUACCAUCGCCCCGACTT (反义)	1.49
	RAG4-297	TCGGGGCGATGGTAGAAGA	UCGGGGCGAUGGUAGAAGATT (正义) UCUUCUACCAUCGCCCCGATT (反义)	1.24
	RAG4-296	CGGGGCGATGGTAGAAGAG	CGGGGCGAUGGUAGAAGAGTT (正义) CUCUUCUACCAUCGCCCCGTT (反义)	1.75
	RAG4-295	GGGGCGATGGTAGAAGAGC	GGGGCGAUGGUAGAAGAGCTT (正义) GCUCUUCUACCAUCGCCCCTT (反义)	1.39
	RAG4-293	GGCGATGGTAGAAGAGCAG	GGCGAUGGUAGAAGAGCAGTT (正义) CUGCUCUUCUACCAUCGCCTT (反义)	1.10
	RAG4-292	GCGATGGTAGAAGAGCAGT	GCGAUGGUAGAAGAGCAGUTT (正义) ACUGCUCUUCUACCAUCGCTT (反义)	1.20
	RAG4-290	GATGGTAGAAGAGCAGTCA	GAUGGUAGAAGAGCAGUCATT (正义) UGACUGCUCUUCUACCAUCTT (反义)	2.37
	RAG4-289	ATGGTAGAAGAGCAGTCAG	AUGGUAGAAGAGCAGUCAGTT (正义) CUGACUGCUCUUCUACCAUTT (反义)	1.33
	RAG4-288	TGGTAGAAGAGCAGTCAGT	UGGUAGAAGAGCAGUCAGUTT (正义) ACUGACUGCUCUUCUACCATT (反义)	1.41
	RAG4-285	TAGAAGAGCAGTCAGTGTC	UAGAAGAGCAGUCAGUGUCTT (正义) GACACUGACUGCUCUUCUATT (反义)	1.35
	RAG4-284	AGAAGAGCAGTCAGTGTCC	AGAAGAGCAGUCAGUGUCCTT (正义) GGACACUGACUGCUCUUCUTT (反义)	2.68
	RAG4-283	GAAGAGCAGTCAGTGTCCA	GAAGAGCAGUCAGUGUCCATT (正义) UGGACACUGACUGCUCUUCTT (反义)	1.61
	RAG4-282	AAGAGCAGTCAGTGTCCAT	AAGAGCAGUCAGUGUCCAUTT (正义) AUGGACACUGACUGCUCUUTT (反义)	1.58
	RAG4-281	AGAGCAGTCAGTGTCCATT	AGAGCAGUCAGUGUCCAUUTT (正义) AAUGGACACUGACUGCUCUTT (反义)	1.19
	RAG4-280	GAGCAGTCAGTGTCCATTC	GAGCAGUCAGUGUCCAUUCTT (正义) GAAUGGACACUGACUGCUCTT (反义)	1.71
	RAG4-181	TGAATCCAAACAGGAGTTG	UGAAUCCAAACAGGAGUUGTT (正义) CAACUCCUGUUUGGAUUCATT (反义)	1.61
	RAG4-180	GAATCCAAACAGGAGTTGC	GAAUCCAAACAGGAGUUGCTT (正义) GCAACUCCUGUUUGGAUUCTT (反义)	2.28
	RAG4-179	AATCCAAACAGGAGTTGCA	AAUCCAAACAGGAGUUGCATT (正义) UGCAACUCCUGUUUGGAUUTT (反义)	1.29
	RAG4-176	CCAAACAGGAGTTGCACTA	CCAAACAGGAGUUGCACUATT (正义) UAGUGCAACUCCUGUUUGGTT (反义)	2.75
	RAG4-175	CAAACAGGAGTTGCACTAG	CAAACAGGAGUUGCACUAGTT (正义) CUAGUGCAACUCCUGUUUGTT (反义)	2.54
	RAG4-174	AAACAGGAGTTGCACTAGC	AAACAGGAGUUGCACUAGCTT (正义) GCUAGUGCAACUCCUGUUUTT (反义)	1.44

	RAG4-172	ACAGGAGTTGCACTAGCGG	ACAGGAGUUGCACUAGCGGTT (正义) CCGCUAGUGCAACUCCUGUTT (反义)	1.49
	RAG4-170	AGGAGTTGCACTAGCGGTG	AGGAGUUGCACUAGCGGUGTT (正义) CACCGCUAGUGCAACUCCUTT (反义)	1.14
	RAG4-166	GTTGCACTAGCGGTGTCCA	GUUGCACUAGCGGUGUCCATT (正义) UGGACACCGCUAGUGCAACTT (反义)	1.73
	RAG4-165	TTGCACTAGCGGTGTCCAC	UUGCACUAGCGGUGUCCACTT (正义) GUGGACACCGCUAGUGCAATT (反义)	1.50
	RAG4-158	AGCGGTGTCCACCACGTTG	AGCGGUGUCCACCACGUUGTT (正义) CAACGUGGUGGACACCGCUTT (反义)	1.55
次热点区	RAG4-249	AGTAGCCAAGTCTGTACCC	AGUAGCCAAGUCUGUACCCTT (正义) GGGUACAGACUUGGCUACUTT (反义)	1.10
	RAG4-238	CTGTACCCTTGAAGCAAGT	CUGUACCCUUGAAGCAAGUTT (正义) ACUUGCUUCAAGGGUACAGTT (反义)	1.18
	RAG4-236	GTACCCTTGAAGCAAGTGG	GUACCCUUGAAGCAAGUGGTT (正义) CCACUUGCUUCAAGGGUACTT (反义)	1.47
	RAG4-213	AGAGGAGGGAGAGGAGCTG	AGAGGAGGGAGAGGAGCUGTT (正义) CAGCUCCUCUCCCUCCUCUTT (反义)	1.35
	RAG4-211	AGGAGGGAGAGGAGCTGCT	AGGAGGGAGAGGAGCUGCUTT (正义) AGCAGCUCCUCUCCCUCCUTT (反义)	1.25
	RAG4-123	CCTTCTGGGAGCTGTAGTT	CCUUCUGGGAGCUGUAGUUTT (正义) AACUACAGCUCCCAGAAGGTT (反义)	1.69
	RAG4-116	GGAGCTGTAGTTTTCGTGG	GGAGCUGUAGUUUUCGUGGTT (正义) CCACGAAAACUACAGCUCCTT (反义)	1.17
	RAG4-115	GAGCTGTAGTTTTCGTGGG	GAGCUGUAGUUUUCGUGGGTT (正义) CCCACGAAAACUACAGCUCTT (反义)	1.38
	RAG4-114	AGCTGTAGTTTTCGTGGGA	AGCUGUAGUUUUCGUGGGATT (正义) UCCCACGAAAACUACAGCUTT (反义)	1.36
	RAG4-113	GCTGTAGTTTTCGTGGGAG	GCUGUAGUUUUCGUGGGAGTT (正义) CUCCCACGAAAACUACAGCTT (反义)	1.14
	RAG4-111	TGTAGTTTTCGTGGGAGCG	UGUAGUUUUCGUGGGAGCGTT (正义) CGCUCCCACGAAAACUACATT (反义)	1.36
	RAG4-109	TAGTTTTCGTGGGAGCGGC	UAGUUUUCGUGGGAGCGGCTT (正义) GCCGCUCCCACGAAAACUATT (反义)	1.30
	RAG4-107	GTTTTCGTGGGAGCGGCTC	GUUUUCGUGGGAGCGGCUCTT (正义) GAGCCGCUCCCACGAAAACTT (反义)	1.49
	RAG4-62	CGGGCCGAACTACAGATCC	CGGGCCGAACUACAGAUCCTT (正义) GGAUCUGUAGUUCGGCCCGTT (反义)	1.36
	RAG4-61	GGGCCGAACTACAGATCCC	GGGCCGAACUACAGAUCCCTT (正义) GGGAUCUGUAGUUCGGCCCTT (反义)	1.29
	RAG4-55	AACTACAGATCCCAGGCGG	AACUACAGAUCCCAGGCGGTT (正义) CCGCCUGGGAUCUGUAGUUTT (反义)	1.64
	RAG4-54	ACTACAGATCCCAGGCGGC	ACUACAGAUCCCAGGCGGCTT (正义) GCCGCCUGGGAUCUGUAGUTT (反义)	1.21

表 5 功能性 saRNA 的热点和次热点区域及序列

热点区域	热点区域序列
H1 (-500/-408)	gcgaaggaaagttcttcctcgttgttccaatccgaggacaagctgatatgtcgcagcagcccagggaagc atgcgagctgataggaagtcctt
H2 (-403/-351)	tttaagacaggctcgaatgctaaaactttcttgtgccaaaaccttgactatt
H3 (-342/-262)	aaaataagcacttggcgtgccctcgcagatgtctgagctgagaggtcggggcgatggtagaagagcagt cagtgtccattc
H4 (-181/-140)	tgaatccaaacaggagttgcactagcggtgtccaccacgttg
次热点区域	次热点区域序列
W1 (-249/-193)	agtagccaagtctgtacccttgaagcaagtggggagagaggagggagaggagctgct
W2 (-123/-89)	ccttctgggagctgtagttttcgtgggagcggctc
W3 (-62/-36)	cgggccgaactacagatcccaggcggc

实施例 **3 saRNA** 促进人黑色素细胞（**HEM**）中 **MITF mRNA** 的表达

（1）细胞培养和转染

细胞培养如实施例 2 所述，人黑色素细胞（HEM）以每孔 20×10^4 铺板到六孔板中，以 25 nM 终浓度转染小激活 RNA，转染 72 小时，每种处理使用 2 个复孔。

（2）二步法 RT-qPCR

转染结束后，弃掉培养基，每孔加入 500 μl 细胞裂解液，室温孵育 5 分钟。用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后在 ABI 7500 快速实时（Fast Real-time） PCR 系统（Applied Biosystems）进行 qPCR 分析，每个样本重复 3 个复孔扩增，PCR 反应条件见表 6 和表 7。

表6 RT反应制备

试剂（RT 反应 1）	体积
5×gDNA Eraser 缓冲液	2 μl
gDNA Eraser	1 μl
总量 RNA（1 μg）+ D.W	7 μl
终体积	10 μl
42℃ 2 min ， 储存于 4℃	

试剂（RT 反应 2）	体积
5 × PrimeScript 缓冲液 2	4 μl
PrimeScript RT 酶混合物 1	1 μl
RT 引物混合物	1 μl
无 RNase dH_2O	4 μl
RT 反应 1	10 μl
终体积	20 μl
37℃ 15 min，85℃ 5 sec， 储存于 4℃	

表7 RT-qPCR反应制备

试剂	体积
SYBR Premix Ex Taq II (2 ×)	5 μl
ROX 参考染料 II (50 ×)	0.2 μl
正向和反向引物混合物 (5 μM)	0.8 μl
cDNA (RT 产物)	4 μl
总计	10 μl

反应条件为：95℃ 30秒，95℃ 5秒，60℃ 30秒，扩增40个循环。同时扩增HPRT1基因作为内参，其中MITF用MITF F1/R1引物对扩增，扩增引物见表2。

为了计算某个saRNA转染样本的MITF（目的基因）的相对于对照处理（Mock）的表达值（Erel），用公式2代入目的基因及1个内参基因的Ct值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \quad \text{(公式 2)}$$

其中，CtTm 为来自对照处理（Mock）样本的目的基因的 Ct 值，CtTs 为来自 saRNA 处理样本的目的基因的 Ct 值，CtRm 为来自 Mock 处理样本的内参基因的 Ct 值，CtRs 为来自 saRNA 处理样本的内参基因的 Ct 值。

图 3 所示为不同 saRNA 处理后细胞中 MITF 相对 mRNA 的表达值。以对照组（Mock）作为空白转染对照，与对照组相比， siRNA (RAG4-618i) 组的 mRNA 相对表达值敲降了 81.0%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。与对照组相比，不同 saRNA 处理细胞后其 MITF mRNA 的表达均有升高，尤其是 RAG4-175，RAG4-176 和 RAG4-290 分别上调了 MITF 表达达 3.9 倍、3.1 倍和 6.1 倍。其它的 saRNA（RAG4-284，RAG4-123，

RAG4-396，RAG4-461，RAG4-490，RAG4-316 和 RAG4-318）增加了 MITF mRNA 相对表达达到 2 倍左右。这说明随机选择的功能性 saRNA 其活性在 HEM 细胞能够被验证。

实施例 **4 saRNA** 促进 **NHEK** 细胞中 **MITF mRNA** 的表达

细胞培养如实施例 2 所述，人皮肤角质化形成细胞（NHEK）以每孔 20×10^4 铺板到六孔板中，以 25 nM 终浓度转染小激活 RNA，转染 72 小时，每种处理使用 2 个复孔。二步法 RT-qPCR 如实施例 3 所述。

如图 4 所示为不同 saRNA 处理后细胞中 MITF 相对 mRNA 的表达值。以对照组（Mock）作为空白转染对照，与对照组相比，siRNA (RAG4-618i) 组的 mRNA 相对表达值下降了 88.5%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。与对照组相比，经 RAG4-290 处理后的激活效果尤为明显，MITF 相对 mRNA 的表达值上升了 13.1 倍。RAG4-175，RAG4-176 和 RAG4-316 组的 mRNA 相对表达值均高于对照组，其 mRNA 相对表达值分别上升了 5.7 倍、3.7 倍和 3.5 倍，有明显的激活效果。RAG4-284，RAG4-123，RAG4-396，RAG4-461，RAG4-490 和 RAG4-318 组的 mRNA 相对表达值大约高于对照组 2 倍，也有一定的激活效果。在这说明随机选择的功能性 saRNA 的活性在 NHEK 细胞能够被验证。

实施例 **5 saRNA** 促进 **NHEK** 细胞中 **MITF** 蛋白的表达

细胞培养如实施例 2 所述，人黑色素细胞（NHEK）以每孔 20×10^4 铺板到六孔板中，以 25 nM 终浓度转染小激活 RNA，转染 5 天。使用适量含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液（1×RIPA 缓冲液, Cell Signaling Technology）裂解。BCA 法进行蛋白质定量，随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转至 0.45 μm 的 PVDF 膜。所用一抗为：兔单克隆抗 MITF (Cell Signaling Technology, #12590)，α/β-微管蛋白抗体(Cell Signaling Technology, 2148s)对印迹进行检测；二抗用抗兔 IgG, HRP-连接的抗体 (Cell Signaling Technology)。用 Image Lab (BIO-RAD, Chemistry Doctm MP Imaging System)扫膜检测信号。

如图 5 所示为不同 saRNA 处理后细胞中 MITF 蛋白的相对表达量。与对照组相比，siRNA (RAG4-618i) 组的 MITF 蛋白相对表达量下降了约 50%，这说明 siRNA 作为小干扰 RNA 对照转染是成功的。与对照组相比，各 saRNA 均能提高 MITF 蛋白的表达量，其中，RAG4-416，RAG4-490 和 RAG4-318 上调 MITF 蛋白表达量均在 1.5 倍以上，尤以

RAG4-318 激活效果最为明显，其增加 MITF 蛋白表达量达 1.71 倍。这说明随机选择的功能性 saRNA 的活性可以在蛋白水平被验证。

实施例 **6 saRNA** 促进人黑色素细胞（**HEM**）中 **MITF** 蛋白的表达

细胞培养如实施例 2 所述，人黑色素细胞（HEM）以每孔 20×10^4 铺板到六孔板中，以 25 nM 终浓度转染小激活 RNA，转染 72 小时。蛋白裂解及检测方法如实施例 5 所述。

如图 6 所示为不同 saRNA 处理后细胞中 MITF 蛋白的相对表达量。与对照组相比，各 saRNA 均能提高 MITF 蛋白的表达量， RAG4-396 和 RAG4-490 组的蛋白表达量上升了 1.4 倍。RAG4-175，RAG4-176，RAG4-290，RAG4-284 和 RAG4-123 各组 MITF 蛋白表达量均高于对照组，其激活水平均在 1.5 倍以上，激活效果明显。这说明随机选择的功能性 saRNA 的活性可以在蛋白水平被验证。

综合上述结果，申请人通过高通量筛选靶向人 MITF 基因启动子的 saRNA，发现了多个能够显著激活 MITF 基因表达的人 saRNA。这些 saRNA 能够在 mRNA 和蛋白表达层面上调细胞内 MITF 基因的表达，可用于 MITF 蛋白表达下降或者不足引发的疾病或病症，如白癜风，或用于制备治疗上述疾病或病症的方法或药物。

以上已经描述了本公开的各实施例，上述说明是示例性的，并非穷尽性的，并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下，对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。本文中所用术语的选择，旨在最好地解释各实施例的原理、实际应用或对市场中的技术改进，或者使本技术领域的其它普通技术人员能理解本文披露的各实施例。

参考文献：

1. Picardo, M., M. L. Dell'Anna, K. Ezzedine, I. Hamzavi, J. E. Harris, D. Parsad, and A. Taieb. 2015. 'Vitiligo', Nat Rev Dis Primers, 1: 15011.

2. Gauthier, Y., M. Cario Andre, and A. Taieb. 2003. 'A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy?', Pigment Cell Res, 16: 322-32.

3. Dell'anna, M. L., and M. Picardo. 2006. 'A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo', Pigment Cell Res, 19: 406-11.

4. Sehgal, V. N., and G. Srivastava. 2007. 'Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological

features', Indian J Dermatol Venereol Leprol, 73: 149-56.

5. Kotobuki, Y., A. Tanemura, L. Yang, S. Itoi, M. Wataya-Kaneda, H. Murota, M. Fujimoto, S. Serada, T. Naka, and I. Katayama. 2012. 'Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris', Pigment Cell Melanoma Res, 25: 219-30.

6. Kemp, E. H., N. G. Gavalas, D. J. Gawkrodger, and A. P. Weetman. 2007. 'Autoantibody responses to melanocytes in the depigmenting skin disease vitiligo', Autoimmun Rev, 6: 138-42.

7. Dell'Anna, M. L., M. Ottaviani, V. Albanesi, A. P. Vidolin, G. Leone, C. Ferraro, A. Cossarizza, L. Rossi, and M. Picardo. 2007. 'Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo', J Invest Dermatol, 127: 1226-33.

8. Kumar, R., D. Parsad, and A. J. Kanwar. 2011. 'Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo', Br J Dermatol, 164: 187-91.

9. Hemesath, T. J., E. Steingrimsson, G. McGill, M. J. Hansen, J. Vaught, C. A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and D. E. Fisher. 1994. 'microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family', Genes Dev, 8: 2770-80.

10. Levy, C., M. Khaled, and D. E. Fisher. 2006. 'MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene', Trends Mol Med, 12: 406-14.

11. Kwinter, J., J. Pelletier, A. Khambalia, and E. Pope. 2007. 'High-potency steroid use in children with vitiligo: a retrospective study', J Am Acad Dermatol, 56: 236-41.

12. Iannella, G., A. Greco, D. Didona, B. Didona, G. Granata, A. Manno, B. Pasquariello, and G. Magliulo. 2016. 'Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches', Autoimmun Rev, 15: 335-43.

13. Lim, H. W., P. E. Grimes, O. Agbai, I. Hamzavi, M. Henderson, M. Haddican, R. V. Linkner, and M. Lebwohl. 2015. 'Afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for the treatment of vitiligo: a randomized multicenter trial', JAMA Dermatol, 151: 42-50.

14. Grimes, P. E., I. Hamzavi, M. Lebwohl, J. P. Ortonne, and H. W. Lim. 2013. 'The efficacy of afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for repigmentation of vitiligo', JAMA Dermatol, 149: 68-73.

权利要求书

1. 一种小激活核酸分子，所述小激活核酸分子至少包含第一寡核苷酸链，所述第一寡核苷酸链与人MITF基因启动子区的任一长度为16-35个核苷酸的连续片段具有至少75%的同源性或互补性。

2. 根据权利要求1所述的小激活核酸分子，其中所述小激活核酸分子包含第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链，所述第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链通过完全互补或不完全互补形成双链结构。

3. 根据权利要求2所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链与SEQ ID NO:299、SEQ ID NO:300、SEQ ID NO:301、SEQ ID NO:302、SEQ ID NO:303、SEQ ID NO:304或SEQ ID NO:305中的任一长度为16-35个核苷酸的连续片段具有至少75%的同源性或互补性。

4. 根据权利要求2所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链与选自SEQ ID NO:8-104的任一核苷酸序列具有至少75%的同源性或互补性。

5. 根据权利要求4所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链包括选自SEQ ID NO:105-201的任一核苷酸序列，或所述第二寡核苷酸链包括选自SEQ ID NO:202-298的任一核苷酸序列。

6. 根据权利要求2-5任一项所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链的长度为16-35个核苷酸，所述第二寡核苷酸链的长度为16-35个核苷酸。

7. 根据权利要求2-6任一项所述的小激活核酸分子，其中所述小激活核酸分子为双链核酸，所述第一寡核苷酸链和所述第二寡核苷酸链分别位于所述双链核酸的两条链上。

8. 根据权利要求7所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链和/或所述第二寡核苷酸链在5’端和/或3’端具有突出。

9. 根据权利要求8所述的小激活核酸分子，其中所述突出为0-6个核苷酸的突出。

10. 根据权利要求9所述的小激活核酸分子，其中所述突出为dTdT或dTdTdT。

11. 根据权利要求2-6任一项所述的小激活核酸分子，其中所述小激活核酸分子为单链核酸，所述单链核酸中具有可形成双链区的发夹结构，所述第一寡核苷酸链和所述第二寡核苷酸链具有可形成双链结构的互补区域。

12. 根据权利要求2-11任一项所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链和所述第二寡核苷酸链具有至少75%的互补性。

13. 根据权利要求1-12任一项所述的小激活核酸分子，其中构成所述小激活核酸分子的核苷酸为天然的未经化学修饰的核苷酸。

14. 根据权利要求1-12任一项所述的小激活核酸分子，其中所述小激活核酸分子的一个或多个核苷酸为具有化学修饰的核苷酸。

15. 根据权利要求14所述的小激活核酸分子，其中所述化学修饰为选自以下修饰的一种或多种：对核苷酸的磷酸二酯键的修饰、对核苷酸中核糖的2'-OH的修饰、对核苷酸中碱基的修饰。

16. 根据权利要求14所述的小激活核酸分子，其中所述化学修饰为选自以下修饰的一种或多种：硫代磷酸修饰、硼烷化磷酸盐修饰、2'-氟代修饰、2'-氧甲基修饰、2'-氧亚乙基甲氧基修饰、2,4'-二硝基苯酚修饰、锁核酸修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰、5'-溴尿嘧啶修饰、5'-碘尿嘧啶修饰、N-甲基脲嘧啶修饰、2,6－二氨基嘌呤修饰。

17. 根据权利要求14-16任一项所述的小激活核酸分子，其中所述第一寡核苷酸链和/或所述第二寡核苷酸链的末端连接亲脂性基团，所述亲脂性基团为选自脂质体、高分子化合物、多肽或胆固醇的一种或多种。

18. 一种核酸分子，其包含编码根据权利要求1-13任一项所述的小激活核酸分子的片段。

19. 根据权利要求18所述的核酸分子，其中所述核酸分子为表达载体。

20. 一种细胞，其包含根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子。

21. 一种药物组合物，包含：

根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，和

任选地，药学上可接受的载体。

22. 一种制剂，其包含根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求20所述的细胞，或根据权利要求21所

述的药物组合物。

23. 一种试剂盒，其包含根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求20所述的细胞，或根据权利要求21所述的药物组合物。

24. 根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求20所述的细胞，或根据权利要求21所述的药物组合物在制备用于激活或上调MITF基因在细胞中的表达的药物或制剂中的用途。

25. 一种激活或上调MITF基因在细胞中的表达的方法，所述方法包括向所述细胞使用根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求21所述的组合物，或根据权利要求22所述的试剂。

26. 一种治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的方法，所述方法包括向有需要的个体施用根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求21所述的组合物，或根据权利要求22所述的制剂。

27. 根据权利要求1-17任一项所述的小激活核酸分子，或根据权利要求18-19任一项所述的核酸分子，或根据权利要求20所述的细胞，或根据权利要求21所述的药物组合物在制备用于治疗与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途，其中，所述与MITF蛋白表达不足或减少相关的疾病或状况为白癜风，或瓦登伯格综合征2A型，或蒂策综合征。

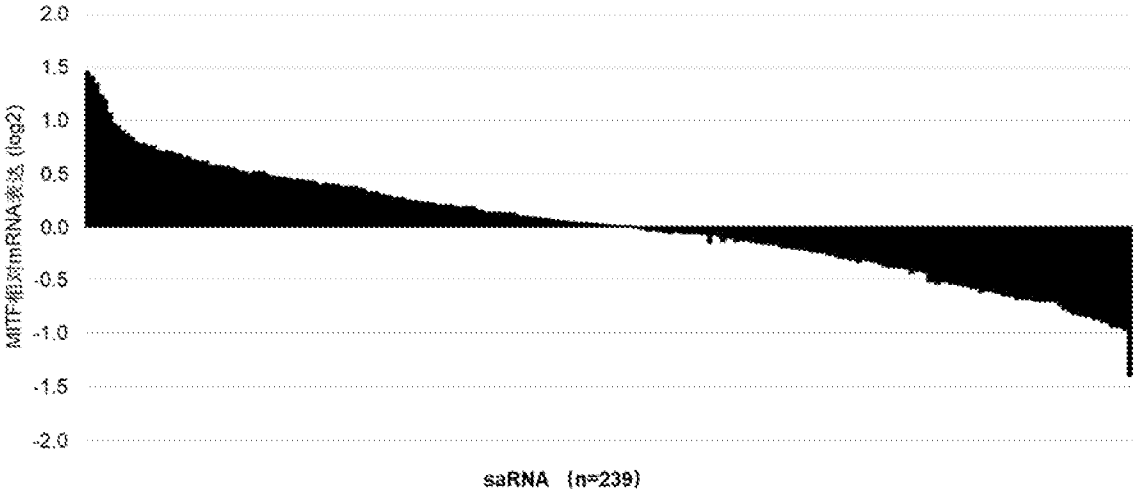

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
MITF相对mRNA表达 (log2)
saRNA (n=239)

图 1

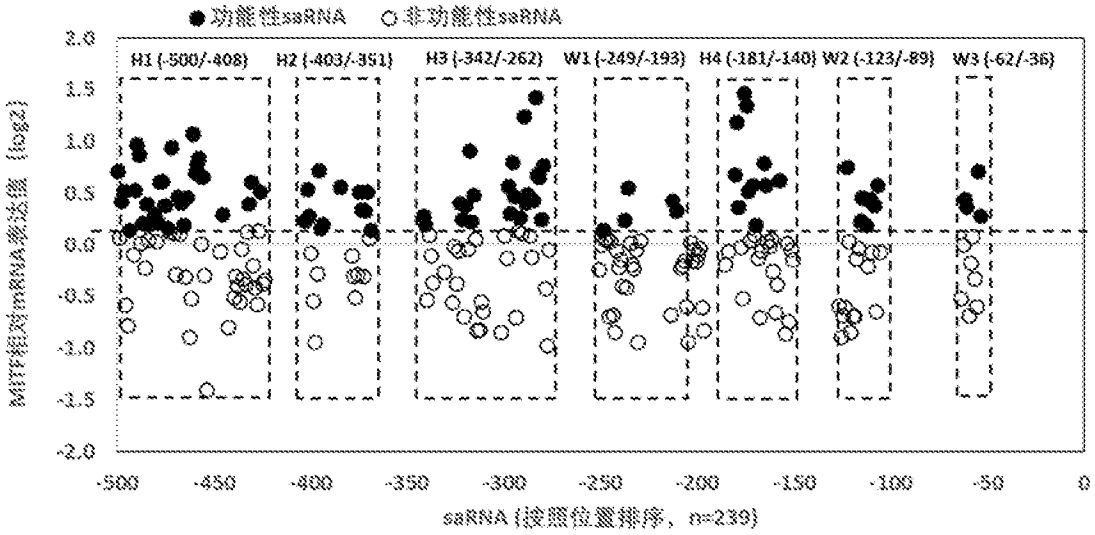

功能性saRNA
非功能性saRNA
H1 (-500/-408)
H2 (-403/-351)
H3 (-342/-262)
W1 (-249/-193)
H4 (-181/-140)
W2 (-123/-89)
W3 (-62/-36)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
MITF相对mRNA表达值 (log2)
-500
-450
-400
-350
-300
-250
-200
-150
-100
-50
0
saRNA (按照位置排序，n=239)

图 2

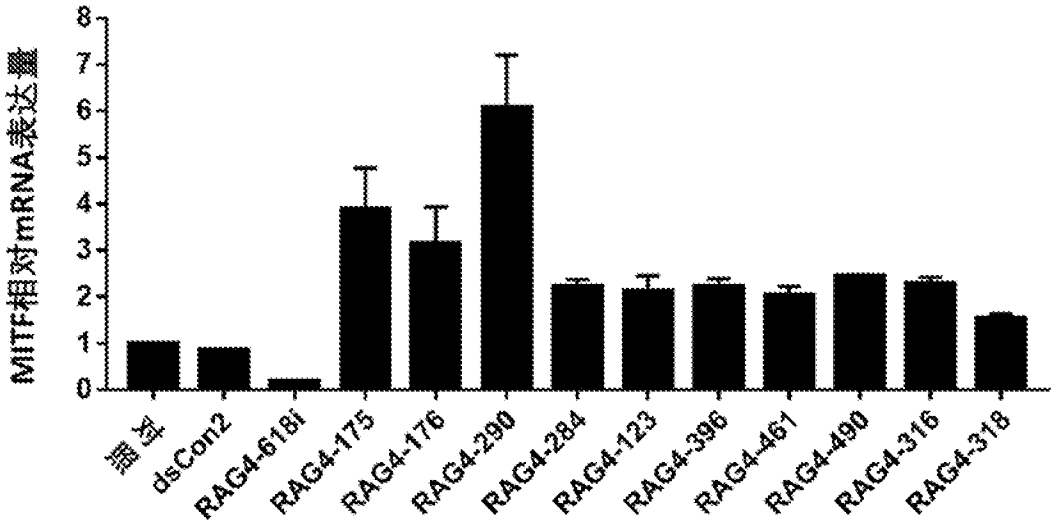

MITF相对mRNA表达量
0
1
2
3
4
5
6
7
8
溴迷
dsCon2
RAG4-618i
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-290
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318

图 3

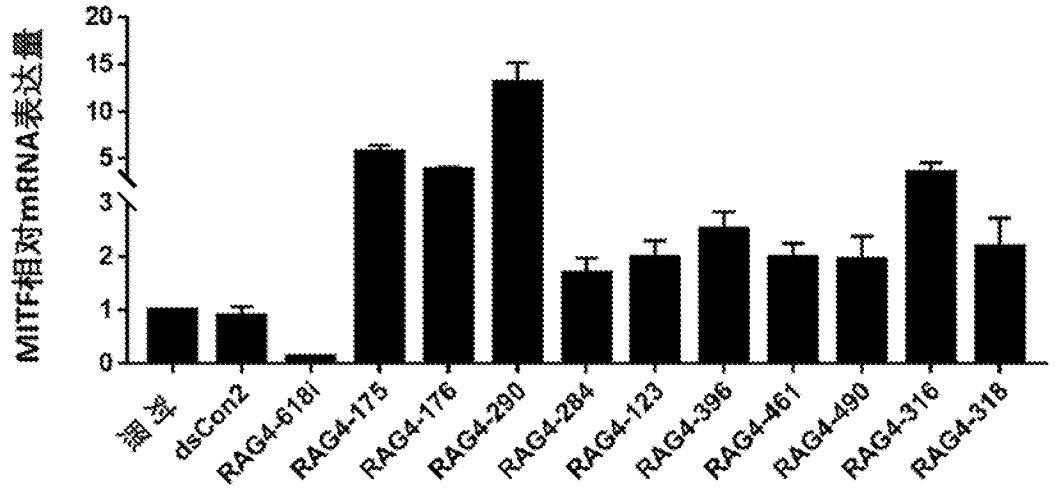

MITF相对mRNA表达量
0
1
2
3
5
10
15
20
溴迷
dsCon2
RAG4-618i
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-290
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318

图 4

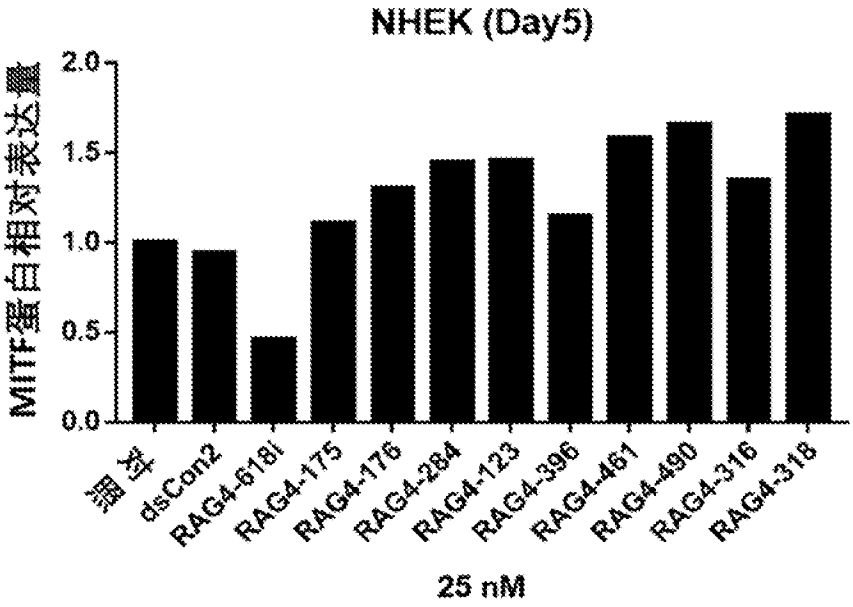

NHEK (Day5)
MITF蛋白相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
溶剂
dsCon2
RAG4-618I
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-461
RAG4-490
RAG4-316
RAG4-318
25 nM

图 5

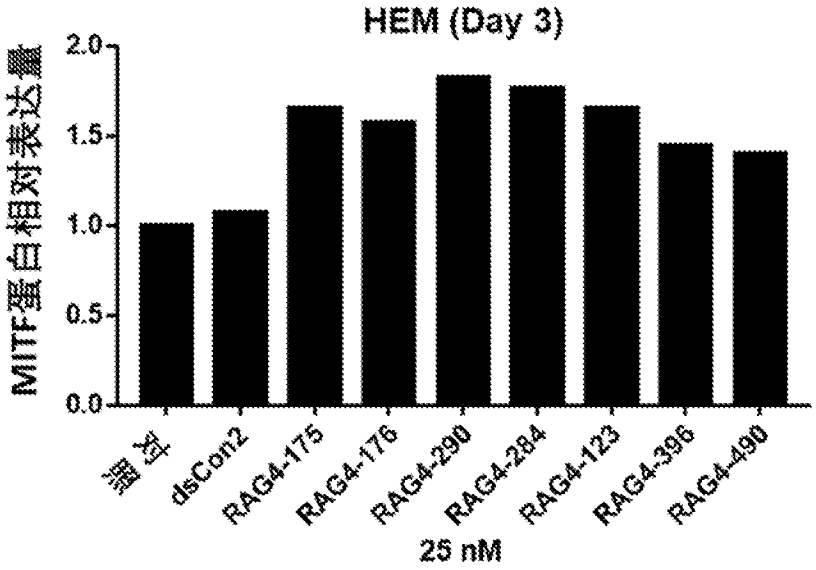

HEM (Day 3)
MITF蛋白相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
溶剂
dsCon2
RAG4-175
RAG4-176
RAG4-290
RAG4-284
RAG4-123
RAG4-396
RAG4-490
25 nM

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/091834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

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)

Database: CNABS, VEN (DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Search Terms: 小激活核酸, 小激活RNA, 寡核苷酸, 白癜风, 白皮病, 启动子, 小眼畸形相关转录因子, saRNA, RNAa, Vitiligo, leucoderma, promoter, MITF, 序列比对, sequence alignment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109071603 A (CAREGEN CO., LTD.) 21 December 2018 (2018-12-21) see entire document	1-24, 27, 28
A	CN 102429894 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 02 May 2012 (2012-05-02) see entire document	1-24, 27, 28
A	CN 110959042 A (SINO-US INSTITUTE OF RNA TECHNOLOGY) 03 April 2020 (2020-04-03) see entire document	1-24, 27, 28
A	CN 106032532 A (PEKING UNION MEDICAL COLLEGE HOSPITAL, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 19 October 2016 (2016-10-19) see entire document	1-24, 27, 28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 July 2021	**12 August 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/091834

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/091834

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.: **25-26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claims 25 and 26 relates to methods of treatment of diseases in the human or animal body.

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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/091834

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109071603	A	21 December 2018	ES	2796401	T3	26 November 2020
				EP	3418292	A4	20 March 2019
				JP	6672483	B2	25 March 2020
				KR	20170097832	A	29 August 2017
				KR	101841748	B1	08 May 2018
				EP	3418292	A1	26 December 2018
				US	10526373	B2	07 January 2020
				US	2019119321	A1	25 April 2019
				WO	2017142264	A1	24 August 2017
				EP	3418292	B1	08 April 2020
				JP	2020105198	A	09 July 2020
				JP	2019508488	A	28 March 2019
				EP	3495383	A1	12 June 2019
CN	102429894	A	02 May 2012	EP	2789333	A4	03 June 2015
				CA	2877423	A1	13 June 2013
				EP	2789333	A1	15 October 2014
				IN	1411KON2014	A	23 October 2015
				CA	2877423	C	01 May 2018
				JP	2015500249	A	05 January 2015
				WO	2013083040	A1	13 June 2013
				CN	102429894	B	13 March 2013
				US	2015065580	A1	05 March 2015
				EP	2789333	B1	15 May 2019
CN	110959042	A	03 April 2020	CA	3094575	A1	17 October 2019
				AU	2019252204	A1	26 November 2020
				WO	2019196887	A1	17 October 2019
				KR	20200140377	A	15 December 2020
				AU	2019252204	A2	17 December 2020
				EP	3778892	A1	17 February 2021
				IL	277921	D0	30 November 2020
CN	106032532	A	19 October 2016	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/091834

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

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））

数据库：CNABS, VEN（DWPI+SIPOABS），CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统；检索词：小激活核酸，小激活RNA，寡核苷酸，白癜风，白皮病，启动子，小眼畸形相关转录因子，saRNA, RNAa, Vitiligo, leucoderma, promoter, MITF, 序列比对

C. 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
A	CN 109071603 A (凯尔格恩有限公司) 2018年 12月 21日 (2018-12-21) 参见全文	1-24, 27-28
A	CN 102429894 A (中国药科大学) 2012年 5月 2日 (2012-05-02) 参见全文	1-24, 27-28
A	CN 110959042 A (中美瑞康核酸技术南通研究院有限公司) 2020年 4月 3日 (2020-04-03) 参见全文	1-24, 27-28
A	CN 106032532 A (中国医学科学院北京协和医院) 2016年 10月 19日 (2016-10-19) 参见全文	1-24, 27-28

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2021年 7月 22日	2021年 8月 12日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 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 石迪 电话号码 010-62411299

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/091834

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/091834

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： 25-26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求25-26的主题涉及针对人或动物的疾病治疗方法。

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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/091834

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109071603	A	2018年 12月 21日	ES	2796401	T3	2020年 11月 26日
				EP	3418292	A4	2019年 3月 20日
				JP	6672483	B2	2020年 3月 25日
				KR	20170097832	A	2017年 8月 29日
				KR	101841748	B1	2018年 5月 8日
				EP	3418292	A1	2018年 12月 26日
				US	10526373	B2	2020年 1月 7日
				US	2019119321	A1	2019年 4月 25日
				WO	2017142264	A1	2017年 8月 24日
				EP	3418292	B1	2020年 4月 8日
				JP	2020105198	A	2020年 7月 9日
				JP	2019508488	A	2019年 3月 28日
				EP	3495383	A1	2019年 6月 12日
CN	102429894	A	2012年 5月 2日	EP	2789333	A4	2015年 6月 3日
				CA	2877423	A1	2013年 6月 13日
				EP	2789333	A1	2014年 10月 15日
				IN	1411KON2014	A	2015年 10月 23日
				CA	2877423	C	2018年 5月 1日
				JP	2015500249	A	2015年 1月 5日
				WO	2013083040	A1	2013年 6月 13日
				CN	102429894	B	2013年 3月 13日
				US	2015065580	A1	2015年 3月 5日
				EP	2789333	B1	2019年 5月 15日
CN	110959042	A	2020年 4月 3日	CA	3094575	A1	2019年 10月 17日
				AU	2019252204	A1	2020年 11月 26日
				WO	2019196887	A1	2019年 10月 17日
				KR	20200140377	A	2020年 12月 15日
				AU	2019252204	A2	2020年 12月 17日
				EP	3778892	A1	2021年 2月 17日
				IL	277921	D0	2020年 11月 30日
CN	106032532	A	2016年 10月 19日		无		