



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103917647 B

(45)授权公告日 2020.07.10

(21)申请号 201280054213.1

(22)申请日 2012.11.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103917647 A

(43)申请公布日 2014.07.09

(30)优先权数据
61/554,982 2011.11.03 US
61/663,627 2012.06.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/062894 2012.11.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/067076 EN 2013.05.10

(73)专利权人 夸克制药公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 埃琳娜·费因斯坦

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理
有限公司 11728

代理人 尹吉伟

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 27/16(2006.01)

C12N 9/64(2006.01)

(56)对比文件

WO 2011072091 A1,2011.06.16,第5页第
20-30行,第126-130页的实施例1.

WO 2009044392 A2,2009.04.09,第108-109
页实施例6.

WO 2011072091 A1,2011.06.16,第5页第
20-30行,第126-130页的实施例1.

DEBASHREE MUKHERJEA ET

AL..Transtympanic administration of short
interfering siRNA for the NOX3 isoform of
NADPH oxidase protects against cisplatin-
induced hearing loss in the rat.

《ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING》.2010,
第589-598页.

审查员 沈晶晶

权利要求书1页 说明书35页

序列表26页 附图11页

(54)发明名称

用于神经保护的方法和组合物

(57)摘要

本文公开了用于为内耳中的神经元提供神
经保护的方法和试剂盒及治疗内耳疾病和病症,
包括耳鸣和美尼尔氏症的方法。

1. 下调编码具有SEQ ID NO:1-3中任一个列出的序列的mRNA的CASP2基因的表的双链RNA (dsRNA) 化合物在制备用于有需要的受试者耳内神经元的神经保护的药物中的用途, 所述神经元被包含在螺旋神经节和/或前庭神经节内, 其中所述受试者患有或易患美尼尔氏症。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述dsRNA化合物由SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的用途, 其中所述神经保护包括保护所述神经元免于细胞死亡。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述神经元的细胞死亡包括凋亡性细胞死亡。

5. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述美尼尔氏症与选自阵发性眩晕、听力丧失、耳鸣和耳胀的症状相关。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述神经保护包括恢复耳蜗功能和/或前庭功能。

7. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述dsRNA化合物下调所述受试者内耳中细胞内的CASP2表达。

8. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述dsRNA化合物的结构为:

有义链SEQ ID NO:24:5'z"-GCCAGAAUGUGGAACUCCU-Z'3'

反义链SEQ ID NO:25:3'Z-CGGUCUUACACCUUGAGGA 5'

其中每个A、C、U和G均为未经修饰或经修饰的核糖核苷酸或脱碱基核苷酸并且每个连续的核糖核苷酸或脱碱基核苷酸通过磷酸二酯键与下一个核糖核苷酸或脱碱基核苷酸连接; 其中所述有义链包含, 从5'端开始计数, 在位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和19的未经修饰的核糖核苷酸、在位置18的L-脱氧胞苷; 其中所述反义链包含至少5个交替的未经修饰和经2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸; 并且其中z"、Z和Z'中的每一个独立地存在或不存在, 但是如果存在, Z和Z'独立地包括在其所在链的3'端共价连接的1-5个连续核苷酸或非核苷酸部分或其组合, Z"为在所述有义链的5'端共价连接的加帽部分。

9. 根据权利要求8所述的用途, 其中Z和Z'的每个均不存在, 其中在SEQ ID NO:24中列出的所述有义链包含, 从5'端开始计数, 在位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和19的未经修饰的核糖核苷酸、在位置18的L-脱氧胞苷; 并且其中在SEQ ID NO:25中列出的所述反义链包含, 从5'端开始计数, 在位置2、4、6、8、11、13、15、17和19的每一处的2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸和在位置1、3、5、7、9、10、12、14、16和18的每一处的未经修饰的核糖核苷酸。

10. 根据权利要求9所述的用途, 其中所述有义链是SEQ ID NO:26, 且z"与所述有义链SEQ ID NO:26的5'端共价连接并且包含反向脱氧脱碱基部分。

11. 根据权利要求9或10中任一项所述的用途, 其中所述反义链包含从5'端开始计数, 在SEQ ID NO:27中列出的位置2、4、6、8、11、13、15、17和19上的2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸。

12. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中配制所述药物用于经鼓室施用。

13. 根据权利要求12所述的用途, 其中将所述药物配制成滴耳剂。

14. 下调编码具有SEQ ID NO:1-3中任一个列出的序列的mRNA的CASP2基因的表的双链RNA (dsRNA) 化合物在制备用于治疗患有或易患美尼尔氏症的受试者的药物中的用途。

用于神经保护的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2011年11月3日提交的标题为“Compositions and Methods For Treating Ménière's Disease”的美国临时申请序列No.61/554,982和2012年6月25日提交的标题为“Compositions and Methods For Treating Ménière's Disease”的美国临时申请序列No.61/663,627的权益,其通过引用整体并入本文并用于所有目的。

[0003] 序列表

[0004] 本申请通过引用并入命名为“240_PCT1_ST25.txt”,大小为33kb并于2012年11月1日以IBM-PCT机器格式创建,具有与MS-Windows的操作系统兼容性的文件中存在的核苷酸和/或氨基酸序列。

技术领域

[0005] 本文提供了靶向CASP2、NOX3、CAPNS1或RHOA的双链RNA化合物,用于受试者耳内神经元的神经保护和丧失的耳蜗和/或前庭功能的恢复和/或伴随症状的缓解的用途。进一步提供了用于治疗处于美尼尔氏症(Ménière's disease)或类似疾病和病症的风险或患有美尼尔氏症或类似疾病和病症的受试者的方法和试剂盒。

[0006] 发明背景

[0007] 人耳由3个主要结构组件组成:外耳、中耳和内耳,一起起到将声波转换为神经冲动的作用,神经冲动传送到大脑,在大脑内将神经冲动感知为声音。内耳也帮助维持平衡。

[0008] 中耳和内耳的解剖对于本领域的普通技术人员而言众所周知(见,例如,Atlas of Sensory Organs:Functional and Clinical Analysis,Andrs Csillag,Humana Press (2005),第1-82页,通过引用并入本文)。简言之,中耳由鼓膜和含有3个称为听小骨的小骨头的小充气室组成,听小骨连接鼓膜与内耳。

[0009] 内耳(迷路)是由听觉器官耳蜗和平衡器官前庭系统组成的复杂结构。前庭系统由决定位置感觉的球囊和椭圆囊及帮助维持平衡的半规管组成。

[0010] 耳蜗收容部分由约20,000个称为“内耳毛细胞”或“毛细胞”的特化感觉细胞组成的Corti器官。这些细胞具有延伸到耳蜗流体中的小发际突出部分(纤毛)。从中耳内的听小骨发射到内耳中的卵圆窗的声振动引起流体和纤毛振动。耳蜗不同部分的毛细胞响应于不同声频振动并且将振动转换为神经冲动,神经冲动发送到大脑进行处理和解释。内耳毛细胞被内耳支持细胞包围。支持细胞位于内耳中的感觉毛细胞之下,至少部分包围并物理上支持感觉毛细胞。支持细胞的代表性实例包括内杆(柱细胞)、外杆(柱细胞)、内指细胞、外指细胞(Deiters)、Held细胞、Hensen细胞、Claudius细胞、Boettcher细胞、齿间细胞和听齿(Huschke)。

[0011] 螺旋神经节是将一种声音表现从耳蜗发送到大脑的一类神经细胞。在耳蜗的螺旋结构中发现螺旋神经节神经元的细胞体并且是中枢神经系统的一部分。其树突产生与毛细胞基部的突触性接触,并且其轴突捆在一起形成第八脑神经(前庭蜗神经)的听觉部分。前庭神经节(也称为史卡巴神经节(Scarpa's ganglion))是前庭神经的神经节,其含有周围

突与前庭感觉末梢器官的毛细胞形成突触性接触的双极初级传入神经元的细胞体。

[0012] 美国专利申请公布No.20090162365和20110112168涉及siRNA化合物、包含siRNA化合物的组合物及其用于治疗与促凋亡基因表达相关的疾病和病症的使用方法。

[0013] 美国专利No.7,825,099涉及通过抑制促凋亡基因治疗听力损伤的方法。

[0014] 美国专利No.8,088,359和美国专利申请公布No.20120252868涉及治疗听力丧失和幻听的方法。

[0015] 美国专利申请公布No.20110142917公开了将dsRNA分子递送到耳内的非侵入性方法。

[0016] 美国专利申请公布No.20110034534尤其涉及靶向CAPNS1的dsRNA分子。

[0017] 美国专利申请公布No.20110229557涉及用于治疗眼病的各种基因靶标(包括CASP2)的dsRNA分子。

[0018] PCT专利公布No.WO2011/163436公开了靶向RHOA的dsRNA。

[0019] 耳鸣和美尼尔氏症在全世界影响了许多人并且当前疗法在预防神经元变性和伴随听力丧失的进展上尚未成功。保护内耳神经元,包括毛细胞及螺旋和前庭神经节细胞,免受损伤和细胞死亡(例如,凋亡),从而减少或预防听力丧失(例如在美尼尔氏症患者中)的治疗性治疗将非常可取。相应地,一方面提供了使用先前不知道具有此类活性的dsRNA化合物,用于受试者,包括患有耳鸣或美尼尔氏症或有类似症状的人受试者的耳内神经元的神经保护的方法。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明涉及为受试者耳内的神经元,例如螺旋神经节细胞和前庭神经节细胞提供神经保护的方法和试剂盒。一方面,本文公开了一种双链RNA(dsRNA)化合物,其下调编码具有SEQ ID NO:1-3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5-6或SEQ ID NO:7中任一个列出的序列的mRNA的CASP2基因、NOX3基因、CAPNS1基因或RHOA基因的表达,用于有需要的受试者耳内神经元的神经保护。在各个方面提供了为耳内神经元提供神经保护的方法,所述方法包括向所述受试者的耳部施用治疗有效量的下调CASP2基因、NOX3基因、CAPNS1基因或RHOA基因的表达的双链RNA(dsRNA)分子化合物,从而为所述受试者耳内的神经细胞提供神经保护。在一些实施方案中,所述神经元为神经节。在一些实施方案中,所述神经元包含在神经节内。在一些实施方案中,所述神经元包含螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞。在一些实施方案中,CASP2基因编码具有SEQ ID NO:1-3中任一个列出的序列的mRNA。在一些实施方案中,NOX3基因编码具有SEQ ID NO:4中列出的序列的mRNA。在一些实施方案中,CAPNS1基因编码具有SEQ ID NO:5-6中任一个列出的序列的mRNA。在一些实施方案中,RHOA基因编码具有SEQ ID NO:7中列出的序列的mRNA。在一些实施方案中,CASP2为优选靶基因并且在优选实施方案中dsRNA分子化合物包含具有SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和具有SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链。在一些实施方案中神经保护包括减少、预防或降低神经元细胞死亡,优选凋亡性细胞死亡。根据一些实施方案,神经元的细胞死亡与疾病或病症、局部缺血、物理/机械创伤、对化学试剂或传染物的暴露、免疫反应或营养失衡中的一项或多项相关。在一些实施方案中神经元的细胞死亡与局部缺血相关。在一些实施方案中神经元的细胞死亡与疾病或病状相关。在一些实施方案中,所述疾病为遗传性疾病或病症。在各个实施方案中,所述疾病或病状选自与听觉器官病理异常相关的病症和与前庭器官病理

异常相关的病症。在一些实施方案中,听觉器官为Corti器官。前庭神经节是第八脑神经前庭部分的感觉神经节,位于内耳道外侧端的上部。在一些实施方案中,前庭器官选自椭圆囊、球囊、内耳道和壶腹。

[0022] 在一些实施方案中,所述受试者患有或处于发展一种或多种疾病或病状或其选自阵发性眩晕、听力丧失、耳鸣和耳胀的症状的风险。在某些实施方案中,所述受试者患有或易于发展美尼尔氏症。

[0023] 在一些实施方案中,本文提供了一种治疗患有美尼尔氏症的受试者的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的下调CASP2、NOX3、RHOA或CAPNS1基因的表达的dsRNA化合物,从而治疗所述受试者。

[0024] 在一些实施方案中,所述方法包括减弱患有美尼尔氏症的受试者中美尼尔氏症的症状,包括向所述受试者施用治疗有效量的下调CASP2、NOX3、RHOA或CAPNS1基因的表达的dsRNA化合物,从而减弱美尼尔氏症的症状。在一些实施方案中,所述症状包括耳鸣、进行性听力丧失、ELH、眩晕、恶心或耳胀中的一种或多种。在一些实施方案中所述方法包括缓解美尼尔氏症的一种或多种症状。在一些实施方案中所述方法提供了听力的部分恢复或完全恢复。

[0025] 在一些实施方案中所述方法和试剂盒包括在受试者中挽救螺旋神经节和/或前庭神经节免于凋亡。在一些实施方案中所述方法包括促进螺旋神经节和/或前庭神经节的存活。在一些实施方案中所述方法包括预防受试者中螺旋神经节细胞和或前庭神经节细胞的凋亡性细胞死亡。在一些实施方案中所述方法包括提供受试者中螺旋神经节细胞和或前庭神经节细胞的神经保护。在一些实施方案中所述方法包括恢复受试者中的耳蜗功能。耳蜗功能包括部分或完全恢复听力。在一些实施方案中所述方法包括恢复受试者中的前庭功能。前庭功能包括部分或完全恢复平衡。

[0026] 进一步提供了治疗患有美尼尔氏症的受试者的试剂盒,其包含治疗有效量的下调CASP2、NOX3、RHOA或CAPNS1基因的表达的dsRNA化合物。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包括向受试者施用dsRNA化合物的装置;并且任选包括使用说明。在一些实施方案中,所述试剂盒包含下调CASP2基因的表达的dsRNA化合物。在优选实施方案中,CASP2基因编码SEQ ID NO:1-3中任一个列出的mRNA。在优选实施方案中,所述试剂盒提供了包含具有SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和具有SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链的dsRNA化合物。

[0027] 在一些实施方案中,所述方法和试剂盒牵涉使用dsRNA化合物(例如,短干扰核酸(siNA)、短干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)或短发夹RNA(shRNA)),其结合编码选自SEQ ID NO:1-3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5-6和SEQ ID NO:7分别例示的CASP2、NOX3、CAPNS1和RHOA的人靶基因的核苷酸序列(例如mRNA序列)。在优选实施方案中,所述方法和试剂盒牵涉使用结合SEQ ID 1-3中任一个列出的人CASP2mRNA的dsRNA化合物。

[0028] 在优选实施方案中,CASP2dsRNA化合物包含有义链和反义链,其中所述反义链包含核苷酸序列(5' >3') AGGAGUCCACAUUCUGGC (SEQ ID NO:9)。在优选实施方案中,dsRNA化合物具有结构:

[0029] 5' z"-GCCAGAAUGUGGAACUCCU-Z 3' (有义链, SEQ ID NO:8)
 3' Z'-CGGUCUUACACCUUGAGGA 5' (反义链, SEQ ID NO:9)

[0030] 其中每个A、C、U和G均为未经修饰的核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸或非常规部分并且每个连续核糖核苷酸或非常规部分通过共价键与下一个核糖核苷酸或非常规部分连接；

[0031] 其中Z和Z' 的每一个独立地存在或不存在，但是如果存在，独立地包括在其所在链的3' 端共价连接的1-5个连续核苷酸或非核苷酸部分或其组合；并且

[0032] 其中z'' 可能存在或不存在，但是如果存在，为在所述有义链的5' 端共价连接的加帽部分。在一些实施方案中，dsRNA化合物包含未经修饰和经修饰的核糖核苷酸。在优选实施方案中，dsRNA化合物包含未经修饰和经修饰的核糖核苷酸至少一个非常规部分。

[0033] 在一些实施方案中，dsRNA进一步包含至少一个非常规部分。在某些优选实施方案中，CASP2 dsRNA具有结构：

[0034] 5' z''-GCCAGAAUGUGGAACUCCU-Z' 3' (有义链, SEQ ID NO:24)
3' Z-CGGUCUUACACCUUGAGGA 5' (反义链, SEQ ID NO:25)

[0035] 其中每个A、C、U和G均为未经修饰或经修饰的核糖核苷酸或非常规部分并且每个连续核糖核苷酸或非常规部分通过磷酸二酯键与下一个核糖核苷酸或非常规部分连接；其中所述有义链包含，从5' 端开始计数，在位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和19的未经修饰的核糖核苷酸、位置18的L-脱氧胞苷；其中所述反义链包含至少五(5) 个交替的未经修饰和经2' -O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；并且其中z''、Z和Z' 任选不存在。在一些实施方案中，反义链包含位置(5' >3') 1、3、5、7、9、11、13、15、17和19存在的经2' -O-甲基糖修饰的核糖核苷酸和位置2、4、6、8、10、12、14、16和18存在的未经修饰的核糖核苷酸；优选地，反义链包含位置(5' >3') 2、4、6、8、11、13、15、17和19上经2' O-甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[0036] 在优选实施方案中，dsRNA化合物具有结构：

[0037] 5' iB-GCCAGAAUGUGGAACUCCU-Z' 3' (有义链, SEQ ID NO:26)
3' Z -CGGUCUUACACCUUGAGGA 5' (反义链, SEQ ID NO:27)

[0038] 其中每个A、C、U和G均为未经修饰的核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸或非常规部分并且每个连续核糖核苷酸或非常规部分通过共价键与下一个核糖核苷酸或非常规部分连接；

[0039] 其中每个Z和Z' 均不存在，其中所述有义链包含，从5' 端开始计数，在位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和19的未经修饰的核糖核苷酸、位置18的L-脱氧胞苷并且z'' 存在且包含反向脱氧脱碱基部分；并且

[0040] 其中所述反义链包含，从5' 端开始计数，在位置2、4、6、8、11、13、15、17和19的每一处的2' O-甲基糖修饰的核糖核苷酸和在位置1、3、5、7、9、10、12、14、16和18的每一处的未经修饰的核糖核苷酸。这种分子也称为1007。

[0041] dsRNA化合物通过常规施用途径的任一种施用，包括牵涉侵入性和非侵入性递送方法。应该注意的是，dsRNA化合物可作为化合物本身或作为药学上可接受的盐施用或可单独施用或作为活性成分与药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物组合施用。

[0042] dsRNA化合物优选经鼓室，包括局部或经注射施用。可制备液体形式进行施用。液

体组合物包括有或无有机共溶剂的水溶液、水或油悬浮液、具有食用油的乳液以及类似药物媒介物。在一个实施方案中,施用包括局部施用,尤其是向耳道的局部施用、向鼓膜的局部施用或其组合,从而使dsRNA化合物通过鼓膜。在一些实施方案中,将本申请的化合物作为滴耳剂施加鼓膜上。在一些优选实施方案中,通过经鼓室注射或通过滴耳剂施用dsRNA化合物。

[0043] 在各个实施方案中,特别是局部施用本发明的药物组合物的实施方案中,药物组合物进一步包含也称为促渗剂的渗透性促进剂。

[0044] 在各个实施方案中,促渗剂选自促进治疗性寡核苷酸渗透过患有美尼尔氏症的受试者耳内的鼓膜的任何化合物或两种或更多种化合物的任何组合。在某些实施方案中,渗透性促进剂为多元醇。在一些实施方案中,寡核苷酸与多元醇混合。在一些实施方案中,多元醇选自甘油、丙二醇、聚乙二醇、山梨糖醇、木糖醇、麦芽糖醇及其组合。

[0045] 根据一个实施方案,多元醇为甘油。在各个实施方案中,按药物组合物的体积计,甘油存在的最终浓度为约0.1%至约35%、约1%至约30%、约5%至约25%,优选约10%至约20%。

[0046] 在一些实施方案中,当受试者的头部斜向一侧而治疗的耳部朝上时,向耳道施加药物组合物。在一些实施方案中,对于液体而言使用容器,例如使用(例如)10-100 μ l/滴的滴管或管芯向耳部施加药物组合物。

[0047] 本发明的另一实施方案提供了以上任一组合物在制备用于治疗患有美尼尔氏症的受试者的药剂中的用途。进一步提供了抑制CASP2的表达,为有需要的受试者耳内的神经元提供神经保护的化合物。

[0048] 现将描述的方法、材料和实施例仅为说明性而非旨在限制;与本文所述材料和方法类似或等效的材料和方法可用于本发明的实践或试验中。本发明的其它特征和优点从下列发明详述和权利要求中将显而易见。

[0049] 本公开旨在包括在本文各个实施方案中公开的特征组合的任何和所有改编或变化。虽然本文已经说明和描述了特定实施方案,但是应认识到,本发明涵盖这些实施方案的特征的任何排列以达到相同目的。查看本说明书后,对于本领域的技术人员而言,以上形成本文未特别描述的实施方案的特征的组合将显而易见。

[0050] 附图简述

[0051] 图1示出了野生型(左图)和Phex^{hyp-Duk}突变(右图)内耳组织的组织切片。箭头示出了内淋巴积水(ELH)。在左下图中,G指螺旋神经节神经元,而在右下图中M指突变螺旋神经节神经元,其中在Phex^{hyp-Duk}突变小鼠中的更少(比较G与M)。Phex^{hyp-Duk}突变小鼠自发发展内淋巴积水并因此呈现平衡问题和听力丧失表现型。主要缺陷之一是因细胞死亡或凋亡引起内耳神经节(前庭和螺旋)中的神经元损失。

[0052] 图2示出了通过滴耳剂递送对siRNA安全性评估的实验设计。“Px”指产后x天。

[0053] 图3为柱状图,显示用dsRNA或媒介物滴耳剂对内耳的每周治疗不影响野生型小鼠的听力功能。

[0054] 图4A和4B示出了测试试验分子在鼠美尼尔氏症模型中保护听力功能的功效的实验设计。(P15、P29、P90-产后天数;在P15之前递送siRNA不可能,因为耳通道关闭;P29-30之前的ABR测量在技术上不可能)。

[0055] 图5A-5D示出了对阴性对照(经媒介物治疗或经siEGFP治疗)或经siRNA治疗的Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠的听力功能(ABR)的时程分析。图上的数据示出在指定试验声频(kHz)下的听觉诱发脑干反应(ABR)阈值(db)。图5E为柱状图,显示与经媒介物治疗和经siEGFP治疗的动物相比,在P90时经siRNA治疗的动物体内ABR相对提高。

[0056] 图6A-6F示出了Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠内耳神经元的组织学评估和siCASP2(1007)对螺旋和前庭神经节提供的显著神经保护。图6A和6B中的箭头示出了螺旋神经节(SG)。图6A和6B示出了经媒介物治疗的Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠SG的病症和死亡并且图6B和6D示出了对经siCASP2治疗的Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠SG的挽救。图6E和6F分别示出了经媒介物治疗的Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠和经siCASP2治疗的Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠中前庭神经节的单独组织切片。

[0057] 图7A-7D示出了Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠内耳神经元的组织学评估和与经媒介物治疗和经siEGFP治疗的动物(图7A)相比,siCAPNS1(图7B)、siNOX3(图7C)和siRHOA(图7D)对螺旋神经节提供的显著神经保护。

[0058] 图8A-8D示出了Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠内耳神经元的组织学评估和与经媒介物治疗和经siEGFP治疗的动物(图8A)相比,siCAPNS1(图8B)、siNOX3(图8C)和siRHOA(图8D)对前庭神经节提供的显著神经保护。

[0059] 图9A和9B示出了在P90时对经siCASP2治疗的耳内螺旋神经节细胞的保护。

[0060] 发明详述

[0061] 本申请提供了寡核苷酸分子、包含寡核苷酸分子的组合物、其使用方法和治疗美尼尔氏症和改善一种或多种伴随症状,包括波动性听力丧失、阵发性眩晕和/或耳鸣的试剂盒。本发明部分基于发现对选自半胱天冬酶2(CASP2)、NADPH氧化酶3(NOX3)、钙蛋白酶S1(CAPNS1)和Ras同源基因家族成员A(RHOA)中的任一靶基因的抑制。

[0062] 一方面,本文提供了一种对有需要的受试者的螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞提供神经保护的方法,包括向受试者施用治疗有效量的抑制CASP2表达的寡核苷酸分子,从而在螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞中提供神经保护。另一方面,本文提供了一种治疗患有美尼尔氏症的受试者的方法,包括向受试者施用抑制CASP2表达的寡核苷酸分子,从而治疗患者。美尼尔氏症,也称为特发性内淋巴积水(ELH),是导致眩晕和耳鸣的内耳病症,并且最终神经元损害导致听力丧失。美尼尔氏症的确切原因未知,但是认为潜在机制是归因于内淋巴积累的膜迷路变形。内淋巴主要由耳蜗中的血管纹产生并且也由半月板和前庭迷路中的暗细胞产生(Sajjadi H, Paparella MM. Ménière's disease. Lancet. 372(9636):406-14)。如果内淋巴从内淋巴流动空间通过前庭导水管流到内淋巴囊受阻,则可发生内淋巴积水。美尼尔氏症可影响受试者的一只或两只耳朵。与美尼尔氏症相关的主要病态是眩晕虚弱性和进行性听力丧失。

[0063] 在各个实施方案中,所述方法包括减轻受试者的听力丧失。在一些实施方案中,所述方法包括预防患有美尼尔氏症的受试者的进行性听力丧失。在一些实施方案中,所述方法包括保护螺旋神经节细胞免于细胞死亡。在一些实施方案中,所述方法包括保护前庭神经节细胞免于细胞死亡。

[0064] 在一个优选实施方案中,受试者为哺乳动物,优选为人受试者。

[0065] 在各个实施方案中,下调CASP2的分子为半胱天冬酶2抑制剂,例如双链RNA寡核苷酸,任选siNA,更优选在下文表A中详述的dsRNA分子并且尤其是,包含下列反义序列5'

AGGAGUCCACAUUCUGGC (也称为CASP2_4)的siNA,并且使用这种寡核苷酸制备用于治疗本文公开的病状和病症的药剂。在一个实施方案中,所述病症牵涉螺旋神经节死亡或前庭神经节死亡。在一些实施方案中,细胞死亡包括凋亡性细胞死亡。

[0066] 表A:用于本文公开的方法中的半胱天冬酶2寡核苷酸序列的非限制性实例

ID	SEQ ID NO:	有义SEQ(5'>3')	SEQ ID NO:	反义SEQ(5'>3')	残留%
CASP2_4	8	GCCAGAAUGU GGAACUCCU	9	AGGAGUCC ACAUUCUGGC	11,18
CASP2_1	18	GCACUCCUGAA UUUUAUCA	19	UGAUAAAAU UCAGGAGUG C	12,8
CASP2_2	20	GCACAGGAAA UGCAAGAGA	21	UCUCUUGCAU UUCCUGUGC	25,38
CASP2_3	22	GGGCUUGUGA UAUGCACGU	23	ACGUGCAUA UCACAAGCCC	22,39

[0068] 在PCT公布No.WO 2008/050329和WO 2010/048352中提供了关于这些dsRNA的附加信息以及用于本方法的靶向或下调CASP2、NOX3或RHOA的另外的dsRNA。在美国专利申请公布No.20110034534中提供了用于本方法的靶向或下调CAPNS1的dsRNA的非限制性实例。

[0069] 不受理论约束,CASP2是在轴索损伤后,在神经节细胞(GC)中特异性表达和激活的促凋亡基因。本受让人先前已经证明,在视神经损害的大鼠模型中CASP2的抑制导致对视网膜神经节细胞(RGC)从凋亡性死亡的强力挽救(PMID:21677688)。在一些实施方案中,所述方法包括使用下调或抑制CASP2表达的寡核苷酸分子。在一些实施方案中,所述方法包括使用下调或抑制NOX3表达的寡核苷酸分子。在一些实施方案中,所述方法包括使用下调或抑制CAPNS1表达的寡核苷酸分子。在一些实施方案中,所述方法包括使用下调或抑制RHOA表达的寡核苷酸分子。

[0070] 定义

[0071] 为方便起见,本文描述了在说明书、实施例和权利要求中采用的某些术语。

[0072] 值得注意的是,除非内容另有明确规定,如本文所使用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式。

[0073] 根据马库什组或其它备选方案分组描述本发明的方面或实施方案时,本领域的技术人员将认识到由此还根据所述群组的任何独立成员或亚组成员描述本发明。

[0074] “抑制剂”是能够将(部分或完全)基因的表达或此类基因产物的活性减少至足以达到所需生物或生理效应的程度的化合物。如本文所使用的术语“抑制剂”指dsRNA抑制剂,包括siRNA抑制剂。

[0075] 如本文所使用,关于基因表达的术语“抑制”、“下调”或“减少”意指基因的表达或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的RNA分子或等效RNA分子(例如,mRNA)的水平或一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性降低,低于在抑制因子(例如核酸分子,例如具有本文所述结构特征的siNA)缺乏时观察到的水平;例如表达可降低至90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或低于在抑制剂缺乏时观察到的表达。在本文公开的方法和试剂盒的一些实施方案中,与对照神经元细胞群相比,在神经元细胞群中靶基因的下调导致神经元细胞死亡减少至少10%。

[0076] “双链RNA抑制剂”是能够将基因的表达或此类基因产物的活性减少至足以达到所

需生物或生理效应的程度的化合物。如本文所使用的术语指siRNA、shRNA和合成shRNA中的一种或多种。抑制也可称为下调或对于RNAi而言,也可称为沉默。

[0077] 如本文所使用的术语“抑制”指将基因的表达或此类基因产物的活性减少至足以达到所需生物或生理效应的程度。完全或部分抑制。例如APP基因的“抑制”意指对基因表达(转录或翻译)或一种或多种变体的多肽活性或其SNP(单核苷酸多态性)的抑制。

[0078] SEQ ID NO:1指智人半胱天冬酶2、凋亡相关半胱氨酸肽酶(CASP2)、转录产物变体1、mRNA gi|320461578|ref|NM_032982.3|;

[0079] SEQ ID NO:2指智人半胱天冬酶2、凋亡相关半胱氨酸肽酶(CASP2)、转录产物变体3、mRNA gi|320461587|ref|NM_032983.3|;

[0080] SEQ ID NO:3指智人半胱天冬酶2、凋亡相关半胱氨酸肽酶(CASP2)、转录产物变体2、mRNA gi|331999981|ref|NM_001224.4|;

[0081] SEQ ID NO:4指智人NADPH氧化酶3(NOX3)、mRNA gi|229331997|ref|NM_015718.2|;

[0082] SEQ ID NO:5指智人钙蛋白酶、小亚基1(CAPNS1)、转录产物变体1、mRNA gi|51599152|ref|NM_001749.2|;

[0083] SEQ ID NO:6指智人钙蛋白酶、小亚基1(CAPNS1)、转录产物变体2、mRNA gi|51599150|ref|NM_001003962.1|;

[0084] SEQ ID NO:7指智人ras同源家族成员A(RHOA)、mRNA gi|50593005|ref|NM_001664.2|。

[0085] 本发明的一方面包括本文公开的dsRNA的“神经保护”活性。本发明的方法提供了对神经元损伤、死亡或衰老的防护或保护或提高神经元功能。如本文所使用,术语“神经保护”涉及阻止和/或减缓和/或减弱和/或倒转神经退化的进展。如本文所使用,术语“神经退化”意指神经元的进行性损失。这包括但不限于神经元的立即损失,接着是连接或相邻神经元的随后损失。

[0086] “神经元”、“神经元细胞”、“神经细胞(nerve cell)”和“神经细胞(neural cell)”(包括神经前体细胞和神经干细胞)可交换用于指神经细胞,即负责将神经冲动从身体的一个部位传导至另一部位的细胞。大多数神经元由3个不同部分组成:含有细胞核的细胞体和两种不同类型的胞质突:树突和轴突。树突是神经元的接收部分,一般是细胞体高度分支的厚伸出部分。轴突通常是经特化以传导神经冲动远离细胞体至另一神经元或肌肉或腺体组织的一个细长突。轴突可具有称为“轴突侧支”的侧枝。轴突侧支和轴突可通过分支为许多称为终树突的细丝结束。终树突的远端称为突触终球或轴突末端,其含有储存神经递质的突触小泡。轴突可被称为髓鞘的多层白色磷脂分段覆盖物包围,其由周围神经系统中的施旺细胞(Schwann cell)和中枢神经系统中的少突胶质细胞形成。含有此类覆盖物的轴突“有髓鞘”。神经元包括将冲动从外周的感受器传输到大脑和脊髓并且从中枢神经系统下方中心传输到上方中心的感觉(传入)神经元。神经元也可为将冲动从大脑和脊髓传送到外周的效应器并且从中枢神经系统上方中心传送到下方中心的运动(传出)神经元。其它神经元是将冲动从感觉神经元运送到运动神经元并且位于中枢神经系统内的联络(连接或中间)神经元。排列成束的传入和传出神经元的突出在位于CNS外部时称为“神经”或者如果在CNS内部,称为纤维束。

[0087] 术语“局部施用”或“局部施加”用于指优选向受试者的耳道,但是若局部施用相关时也任选向鼓膜局部施用组合物。

[0088] 术语“耳部”和“耳”在本文中可交换使用并且通常指耳内和/或周围的组织,包括外耳、中耳和内耳。

[0089] 术语“耳道”或“外耳道”用于指从外耳到中耳的管道。

[0090] “鼓膜”(也称为鼓室或耳膜)指将外耳与中耳分隔开的薄膜。

[0091] 术语例如“药物组合物”或“耳部药物组合物”或“眼部药物组合物”、“药物配方”或“药物制剂”在本文中可交换用于通常指适合向耳部,特别是向动物或人内耳的组织施用和递送一种或多种寡核苷酸活性化合物的配方。

[0092] 如本文所使用的“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”包括对哺乳动物,特别是人的疾病或病状的任何治疗,并且包括:(a)预防所述疾病或病状在易患所述疾病或病状,但是尚未诊断为有所述疾病或病状的受试者中发生;(b)抑制所述疾病或病状,即减轻或阻止或减缓或延迟其发展或进展;(c)缓解和/或改善所述疾病或病状,即引起所述疾病或病状和/或其症状消退;或(d)治愈所述疾病或病状,即终止其发展或进展。通过本发明的方法治疗的受试者群体包括患有不良病状或疾病的受试者以及处于发展所述病状或疾病的风险的受试者。

[0093] 如本文所使用,术语“药学上可接受的”指除治疗剂外的组分,包含所述配方,适合向根据本发明治疗的患者/受试者施用。

[0094] “促渗剂”或“渗透性促进剂”指促进治疗性寡核苷酸渗透过动物或人耳内的鼓膜的化合物或化合物组合。

[0095] 如本文所使用,术语“组织”指在执行特定功能时联合的相似特化细胞的集合。

[0096] 如本文所使用,术语“多核苷酸”和“核酸”可交换使用并且指包含脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的核苷酸序列。应将术语理解为包括作为等效物的由核苷酸类似物产生的RNA或DNA类似物。本申请从头至尾,列出mRNA序列作为表示相应基因。

[0097] “寡核苷酸”和“寡聚物”可交换使用并且指约2至约50个核苷酸的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸序列。每个DNA或RNA核苷酸可独立地为天然或合成的,和或经修饰或未经修饰。修饰包括对寡核苷酸中的糖部分、碱基部分和或核苷酸之间连键的改变。本发明的化合物涵盖包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、非常规部分及其组合的分子。寡核苷酸意在涵盖单链分子(包括反义链和shRNA)和双链分子(包括双链RNA(dsRNA)、siNA、siRNA和miRNA)。

[0098] 大体上互补指与另一序列大于约84%的互补性。例如在由19个碱基对组成的双链体区,一个错配导致94.7%互补性,两个错配导致约89.5%互补性并且3个错配导致约84.2%互补性,致使双链体区大体上互补。相应地,大体上相同指与另一序列大于约84%的同源性。在一些优选实施方案中,有义链和反义链完全互补(100%)。在一些实施方案中,反义链与靶mRNA完全互补(100%)。在一些实施方案中,有义反义链包含与靶mRNA的一个错配。例如,在反义链的第一个位置有A、C或G的反义链在第一个位置产生“U”(5'),从而在反义链和靶mRNA之间产生错配。

[0099] “核苷酸”意在涵盖可为天然或合成和或经修饰或未经修饰的脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。修饰包括对寡核苷酸中的糖部分、碱基部分和或核苷酸之间连键的改变。如本

文所使用,术语“核糖核苷酸”涵盖天然或合成、未经修饰和经修饰的核糖核苷酸。修饰包括对寡核苷酸中的糖部分、碱基部分和/或核苷酸之间连键的改变。

[0100] 核苷酸可选自自然存在或合成的经修饰碱基。自然存在的碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核苷酸的经修饰碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基、2-丙基和其它烷基腺嘌呤、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、6-氮杂胞嘧啶和6-氮杂胸腺嘧啶、假尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤、8-氨基腺嘌呤、8-硫醇腺嘌呤、8-硫醇烷基腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤和其它8-取代的腺嘌呤、8-卤代鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-硫醇鸟嘌呤、8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和其它经取代的鸟嘌呤、其它氮杂和去氮腺嘌呤、其它氮杂和去氮鸟嘌呤、5-三氟甲基尿嘧啶和5-三氟胞嘧啶。在一些实施方案中,寡聚物中的一个或多个核苷酸经肌苷取代。

[0101] 在本发明的一些实施方案中,抑制性寡核苷酸化合物包含未经修饰和经修饰的核苷酸和/或非常规部分。化合物包含选自糖修饰、碱基修饰和核苷酸间连键修饰的至少一个经修饰核苷酸并且可含有DNA和经修饰的核苷酸例如LNA(锁核酸)、ENA(乙烯桥接核酸)、PNA(肽核酸)、阿拉伯糖苷、膦酰羧酸酯或膦基羧酸酯核苷酸(PACE核苷酸)、镜像核苷酸或具有6碳糖的核苷酸。

[0102] 核苷酸/寡核苷酸的所有类似物或修饰与本发明一起采用,条件是所述类似物或修饰大体上不会对核苷酸/寡核苷酸的功能产生不利影响。可接受的修饰包括糖部分的修饰、碱基部分的修饰和核苷酸间连键的修饰及其组合。

[0103] 糖修饰包括在糖残基2'部分上的修饰并且涵盖氨基、氟、烷氧基(例如甲氧基)、烷基、氨基、氟、氯、溴、CN、CF、咪唑、羧酸酯、硫醇酯、C₁-C₁₀低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基、OCF₃、OCN;O-、S-或N-烷基;O-、S或N-烯基;SOCH₃;SO₂CH₃;ONO₂;NO₂、N₃;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷氨基;聚烷氨基或经取代的甲硅烷基,其中如欧洲专利EP 0 586 520 B1或EP 0 618 925 B1中所述。

[0104] 在一个实施方案中,双链RNA化合物包含至少一个包含糖部分上的2'修饰(“2'糖修饰”)的核苷酸。在某些实施方案中,化合物包含任选在交替位置上的2' O-烷基或2' -氟或2' O-烯丙基或任何其它2'修饰。其它稳定修饰也可能(例如末端修饰)。在一些实施方案中,优选的2' O-烷基为2' O-甲基(甲氧基)糖修饰。

[0105] 在一些实施方案中,寡核苷酸的骨架经修饰并且包含磷酸-D-核糖实体,但是也可能含有硫代磷酸-D-核糖实体、三酯、硫醇酯、2' -5' 桥接骨架(也可称为5' -2')、PACE等。

[0106] 如本文所使用,术语“非配对核苷酸类似物”指包含非碱基配对部分的核苷酸类似物,包括但不限于:6脱氨基腺苷(水粉蕈素(Nebularine))、4-Me-吡啶、3-硝基吡咯、5-硝基吡啶、Ds、Pa、N3-Me ribo U、N3-Me ribo T、N3-Me dC、N3-Me-dT、N1-Me-dG、N1-Me-dA、N3-乙基-dC、N3-Me dC。在一些实施方案中,非碱基配对核苷酸类似物为核糖核苷酸。在一些实施方案中,为脱氧核糖核苷酸。另外,可制备多聚核苷酸的类似物,其中一个或多个核苷酸的结构基本上改变并且更适合作为治疗或实验试剂。核苷酸类似物的实例为肽核酸(PNA),其中DNA(或RNA)中的脱氧核糖(或核糖)磷酸盐骨架经与在肽中发现的类似的聚酰胺骨架置换。已经证实PNA类似物抗酶促降解并且在体内外具有更强的稳定性。用于合成寡核苷酸的其它修饰包括聚合物骨架、环状骨架、无环骨架、硫代磷酸盐-D-核糖骨架、三酯骨架、硫醇酯骨架、2' -5' 连接骨架(也成为2' 5' 核苷酸或2' 5' 核糖核苷酸[具3' OH])、人造核酸、吗啉

代核酸、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、阿拉伯糖苷和镜像核苷(例如, β -L-脱氧核糖核苷代替 β -D-脱氧核糖核苷)。Elmen等,(NAR 2005,33(1):439-447)中公开了包含LNA核苷酸的siRNA化合物的实例。

[0107] 在一些实施方案中,使用一种或多种反向核苷酸,例如反向胸腺嘧啶或反向腺嘌呤合成双链RNA化合物(见,例如,Takei等,2002,JBC 277(26):23800-06)。

[0108] 其它修饰包括寡核苷酸的5'和/或3'部分上的末端修饰并且也称为加帽部分。此类末端修饰选自核苷酸、经修饰的核苷酸、脂质、肽、糖和反向脱碱基部分。

[0109] 在本发明中有时称为“脱碱基核苷酸”或“脱碱基核苷酸类似物”的部分更优选称为假核苷酸或非常规部分。核苷酸是由核糖或脱氧核糖、磷酸盐和碱基(在DNA中为腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶;在RNA中为腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶或胞嘧啶)组成的核酸单体单元。经修饰的核苷酸包含在糖、磷酸盐和或碱基的一种或多种中的修饰。脱碱基假核苷酸缺乏碱基,因此严格来说不是核苷酸。

[0110] 如本文所使用的术语“加帽部分”(“z”)包括脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、包括2' O烷基修饰的经修饰的脱碱基核糖和脱碱基脱氧核糖部分;反向脱碱基核糖和脱碱基脱氧核糖部分及其修饰;C6-亚氨基-Pi;镜像核苷酸,包括L-DNA和L-RNA;5' O-Me核苷酸;和核苷酸类似物,包括4',5'-亚甲基核苷酸;1-(β -D-赤呋喃糖基)核苷酸;4'-硫代核苷酸、碳环形核苷酸;5'-氨基-烷基磷酸酯;1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯、3-氨基丙基磷酸酯;6-氨基己基磷酸酯;12-氨基十二烷基磷酸酯;羟丙基磷酸酯;1,5-失水己糖醇核苷酸; α -核苷酸;苏-戊呋喃糖基核苷酸;无环3',4'-seco核苷酸;3,4-二羟丁基核苷酸;3,5-二羟戊基核苷酸;5'-5'-反向脱碱基部分;1,4-丁二醇磷酸酯;5'-氨基;和桥接或非桥接甲基磷酸酯和5'-巯基部分。

[0111] 某些优选加帽部分为脱碱基核糖或脱碱基脱氧核糖部分;反向脱碱基核糖或脱碱基脱氧核糖部分;C6-氨基-Pi;镜像核苷酸,包括L-DNA和L-RNA。另一优选加帽部分为源自丙二醇的C3非核苷酸部分。

[0112] 如本文所使用的术语“非常规部分”指脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、脱氧核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、镜像核苷酸、非碱基配对核苷酸类似物和通过2'-5'核苷酸间磷酸键与相邻核苷酸连接的核苷酸;桥接核酸,包括LNA和乙烯桥接核酸。

[0113] 在本发明的一些实施方案中,优选的非常规部分为脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、脱氧核糖核苷酸、镜像核苷酸和通过2'-5'核苷酸间磷酸键与相邻核苷酸连接的核苷酸。

[0114] 脱碱基脱氧核糖部分包括(例如)脱碱基脱氧核糖-3'-磷酸;1,2-二脱氧-D-呋喃核糖-3-磷酸;1,4-脱水-2-脱氧-D-核糖醇-3-磷酸。反向脱碱基脱氧核糖部分包括反向脱氧核糖脱碱基;3',5'反向脱氧脱碱基5'-磷酸。

[0115] “镜像核苷酸”是对自然存在或通常采用的核苷酸有逆转手性的核苷酸,即自然存在的(D-核苷酸)的镜像(L-核苷酸),在为镜像核糖核苷酸的情况下也称为L-RNA,和“镜像异构体(spiegelmer)”。核苷酸可为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸并且可进一步包含至少一个糖、碱基和或骨架修饰。见美国专利No.6,586,238。同样,美国专利No.6,602,858公开了包含至少一个L-核苷酸取代的核酸催化剂。镜像核苷酸包括(例如)L-DNA(L-脱氧核糖腺苷-3'-磷酸(镜像dA);L-脱氧核糖胞苷-3'-磷酸(镜像dC);L-脱氧核糖鸟苷-3'-磷酸(镜像

dG);L-脱氧核糖胸苷-3'-磷酸(镜像dT)和L-RNA(L-核糖腺苷-3'-磷酸(镜像rA);L-核糖胞苷-3'-磷酸(镜像rC);L-核糖鸟苷-3'-磷酸(镜像rG);L-核糖尿嘧啶-3'-磷酸(镜像rU)。

[0116] 经修饰的脱氧核糖核苷酸包括(例如)可用作5'末端位置(位置编号1)处的核苷酸的5' OMe DNA(5-甲基-脱氧核糖鸟苷-3'-磷酸);PACE(脱氧核糖腺嘌呤3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胞苷3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖鸟苷3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胸苷3'磷酸基乙酸酯)。

[0117] 桥接核酸包括LNA(2'-0,4'-C-亚甲基桥接核酸腺苷3'单磷酸、2'-0,4'-C-亚甲基桥接核酸5-甲基-胞苷3'单磷酸、2'-0,4'-C-亚甲基桥接核酸鸟苷3'单磷酸、5-甲基-尿苷(或胸苷)3'单磷酸);和ENA(2'-0,4'-C-乙烯桥接核酸腺苷3'单磷酸、2'-0,4'-C-乙烯桥接核酸5-甲基-胞苷3'单磷酸、2'-0,4'-C-乙烯桥接核酸鸟苷3'单磷酸、5-甲基-尿苷(或胸苷)3'单磷酸)。根据一方面,本发明提供了包含未经修饰和经修饰的核苷酸的抑制性寡核苷酸化合物。化合物包含选自糖修饰、碱基修饰和核苷酸间连键修饰的至少一个经修饰核苷酸并且可含有DNA和经修饰的核苷酸例如LNA(锁核酸),包括ENA(乙烯桥接核酸);PNA(肽核酸);阿拉伯糖苷;PACE(磷酸基乙酸酯及其衍生物)、镜像核苷酸或具有6碳糖的核苷酸。

[0118] 本文公开的任何修饰均可用于制备并入本发明组合物中的寡核苷酸。例如,在全部转让给本发明受让人的PCT公布No.WO2006/023544、WO 2010/048352、WO2009/116037、WO 2009/147684、WO 2011/066475、WO 2011/084193中公开了优选修饰方案。

[0119] 序列表中列出了半胱天冬酶2(人CASP2)mRNA的示例性核酸序列,例如列为SEQ ID NO:1-3。本领域的普通技术人员将理解,指定序列可随时间变化并且相应并入本文核酸分子中所需的任何变化。本文公开的方法进一步涵盖使用下调NOX3、CAPNS1(钙蛋白酶S1)和RHOA的表达的dsRNA分子。

[0120] RNA干扰和siNA核酸分子

[0121] RNA干扰指在动物中由短干扰RNA(siRNA)介导的序列特异性转录后基因沉默过程(Zamore等,2000,Cell,101,25-33;Fire等,1998,Nature,391,806;Hamilton等,1999,Science,286,950-951;Lin等,1999,Nature,402,128-129;Sharp,1999,Genes&Dev.,13:139-141;和Strauss,1999,Science,286,886)。植物中的相应过程(Heifetz等,国际PCT公布No.WO 99/61631)常常称为转录后基因沉默(PTGS)或RNA沉默。转录后基因沉默过程被认为是用于防止外源基因表达的进化保守性细胞防御机制(Fire等,1999,Trends Genet.,15,358)。对外源基因表达的防护可能已经响应于由病毒感染或转座元件向宿主基因组中随机整合引起的双链RNA(dsRNA)生成,经由特异性破坏同源单链RNA或病毒基因组RNA的细胞反应进化。细胞中dsRNA的存在通过尚未完全表征的机制触发RNAi反应。这种机制似乎不同于牵涉双链RNA特异性核糖核酸酶的其它已知机制,例如由dsRNA介导的蛋白激酶PKR和2',5'-寡腺苷酸合成酶激活引起的,导致mRNA受核糖核酸酶L非特异性裂解的干扰素反应(见例如美国专利No.6,107,094、5,898,031;Clemens等,1997,J.Interferon&Cytokine Res.,17,503-524;Adah等,2001,Curr.Med.Chem.,8,1189)。

[0122] 细胞中长dsRNA的存在刺激称为dicer的核糖核酸酶III酶的活性(Bass,2000,Cell,101,235;Zamore等,2000,Cell,101,25-33;Hammond等,2000,Nature,404,293)。将dsRNA加工成称为短干扰RNA(siRNA)的dsRNA短片牵涉dicer(Zamore等,2000,Cell,101,25-33;Bass,2000,Cell,101,235;Berstein等,2001,Nature,409,363)。源自dicer活性的

短干扰RNA通常长度为约21至约23个核苷酸并且包括约19个碱基对的双链体 (Zamore等, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Elbashir等, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188)。从翻译控制中牵涉的保守性结构的前体RNA切除21和22-核苷酸的小时序RNA (stRNA) 也已牵涉dicer (Hutvagner等, 2001, *Science*, 293, 834)。RNAi响应也是内切核酸酶复合物的特征, 通常称为RNA诱导的沉默复合物 (RISC), 其介导具有与siRNA双链体的反义链互补的序列的单链RNA的裂解。靶RNA的裂解在与siRNA双链体的反义链互补的区域中间发生 (Elbashir等, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188)。

[0123] 已经在各种系统中研究了RNAi。Fire等 (1998, *Nature*, 391, 806) 首次在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中观察到RNAi。Bahramian和Zarbl, (1999, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 274-283) 及Wianny和Goetz, (1999, *Nature Cell Biol.*, 2, 70) 描述了哺乳动物系统中dsRNA介导的RNAi。Hammond等, (2000, *Nature*, 404, 293) 描述了经dsRNA转染的果蝇 (*Drosophila*) 细胞中的RNAi。Elbashir等 (2001, *Nature*, 411, 494) 和Tuschl等 (PCT公布No. WO 01/75164) 描述了在培养的哺乳动物细胞, 包括人胚肾细胞和HeLa细胞中, 通过引入合成的21-核苷酸RNA双链体诱导的RNAi。对果蝇胚胎溶解产物的研究 (Elbashir等, 2001, *EMBO J.*, 20, 6877) 和Tuschl等 (PCT公布No. WO 01/75164) 已经揭示了对介导有效RNAi活性必需的siRNA长度、结构、化学组成和序列的某些要求。

[0124] 核酸分子 (例如具有本文公开的结构特征) 可通过以序列特异性方式介导RNA干扰“RNAi”或基因沉默抑制或下调基因表达或病毒复制; 见例如, Zamore等, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Bass, 2001, *Nature*, 411, 428-429; Elbashir等, 2001, *Nature*, 411, 494-498; 和Kreutzer等, PCT公布No. WO 00/44895; Zernicka-Goetz等, PCT公布No. WO01/36646; Fire, PCT公布No. WO 99/32619; Plaetinck等, PCT公布No. WO 00/01846; Mello和Fire, PCT公布No. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, PCT公布No. WO 99/07409; 和Li等, PCT公布No. WO 00/44914; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; Volpe等, 2002, *Science*, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; 和Hall等, 2002, *Science*, 297, 2232-2237; Hutvagner和Zamore, 2002, *Science*, 297, 2056-60; McManus等, 2002, *RNA*, 8, 842-850; Reinhart等, 2002, *Gene&Dev.*, 16, 1616-1626; 和Reinhart&Bartel, 2002, *Science*, 297, 1831)。

[0125] siNA核酸分子可由两条单独的多聚核苷酸链装配而成, 其中一条链为有义链而另一条为反义链, 其中反义链和有义链自我互补 (即每条链包括与另一条链的核苷酸序列互补的核苷酸序列); 例如其中反义链和有义链形成具有与本文对所提供的核酸分子描述的相同任何长度和结构的双链体或双链结构, 例如其中双链区 (双链体区) 约15至约49 (例如, 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48或49) 个碱基对; 反义链包括与靶核酸分子 (即, mRNA) 中的核苷酸序列或其一部分互补的核苷酸序列并且有义链包括与靶核酸序列或其一部分相对应的核苷酸序列 (例如, 本文核酸分子的约17至约49个或更多个核苷酸与靶核酸或其一部分互补)。

[0126] 在某些方面和实施方案中, 本文提供的核酸分子 (例如, siNA分子) 可为“RISC长度”分子或可为以下更加详细描述的Dicer底物。较长分子例如pre-miRNA也可在RISC中起作用。

[0127] siNA核酸分子可包括单独的有义和反义序列或区域,其中如本领域中所知,有义和反义区通过核苷酸或非核苷酸连接子分子共价连接,或通过离子相互作用、氢键结合、范德华相互作用(van der Waals interaction)、疏水相互作用和/或堆积相互作用交替地非共价连接。核酸分子可包括与靶基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列。核酸分子可按引起靶基因表达抑制的方式与靶基因的核苷酸序列相互作用。

[0128] 可选地,siNA核酸分子由单个多聚核苷酸装配而成,其中核酸分子自我互补的有义和反义区借助于基于核酸或不基于核酸的连接子连接,即,反义链和有义链是具有折叠形成双链体区(例如形成本领域众所周知的“发夹结构”)的反义区和有义区的单个多聚核苷酸的一部分。此类siNA核酸分子可为具有双链体、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构,具有自我互补的有义和反义区的多聚核苷酸,其中反义区包括与单独靶核酸分子中的核苷酸序列或其一部分互补的核苷酸序列并且有义区具有与靶核酸序列(例如,mRNA的序列)相对应的核苷酸序列。此类siNA核酸分子可为具有两个或更多个环结构和包含自我互补的有义和反义区的茎的环状单链多聚核苷酸,其中反义区包括与靶核酸分子中的核苷酸序列或其一部分互补的核苷酸序列并且有义区具有与靶核酸序列或其一部分相对应的核苷酸序列,并且其中环状多聚核苷酸可在体内或体外加工以生成能够介导RNAi的活性核酸分子。

[0129] 下列命名常常部分用于描述siNA分子的长度和突出并且可在整篇说明书和实施例中使用。给予双链体的名称指示寡聚物的长度和突出的存在或不存在。例如,“21+2”双链体含有两条核酸链,二者长度均为21个核苷酸,也称为21-mer siRNA双链体或21-mer核酸并且具有2个核苷酸3'-突出。“21-2”设计指具有2个核苷酸5'-突出的21-mer核酸双链体。21-0设计是没有突出(平末端)的21-mer核酸双链体。“21+2UU”是具有2-核苷酸3'-突出的21-mer双链体并且3'-端的2个末端核苷酸均为U残基(这可能导致与靶序列的错配)。前述命名可适用于不同长度的链、双链体和突出的siNA分子(例如19-0、21+2、27+2等)。在替代性但相似的命名中,“25/27”是具有25碱基有义链和27碱基反义链和2-核苷酸3'-突出的不对称双链体。“27/25”是具有27碱基有义链和25碱基反义链的不对称双链体。

[0130] 化学修饰

[0131] 在某些方面和实施案中,本文提供的核酸分子(例如,dsRNA包括siNA分子)包括一个或多个修饰(或化学修饰),包括一个或多个非常规部分的存在。在某些实施案中,此类修饰包括对核酸分子或多聚核苷酸的任何改变,将使得所述分子不同于标准核糖核苷酸或RNA分子(即,包括标准腺嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或鸟嘌呤部分的分子);其可称为“未经修饰的”核糖核苷酸或未经修饰的核糖核酸。传统DNA碱基和具有腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或鸟嘌呤表示的2'-脱氧糖的多聚核苷酸可称为“未经修饰的脱氧核糖核苷酸”或“未经修饰的脱氧核糖核酸”;相应地,除非明确指出相反,如本文所使用的术语“未经修饰的核苷酸”或“未经修饰的核酸”指“未经修饰的核糖核苷酸”或“未经修饰的核糖核酸”。此类修饰可在核苷酸糖、核苷酸碱基、核苷酸磷酸基团和/或多聚核苷酸的磷酸骨架中并且包括RNA和DNA的对映异构体。

[0132] 在某些实施案中,如本文所公开的修饰可用于增加分子的RNAi活性和/或增加分子的体内稳定性,特别是在血清中的稳定性,和/或增加分子的生物利用率。修饰的非限制性实例包括但不限于核苷酸间或核苷间连键;核酸分子任何位置和链上的脱氧核糖核苷

酸或双脱氧核糖核苷酸；在2'-位置具有优选选自氨基、氟、甲氧基、烷氧基和烷基的修饰的核酸(例如,核糖核酸)；2'-脱氧核糖核苷酸、2'-O-甲基核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、“无环”核苷酸、5-C-甲基核苷酸、生物素基团和末端甘油基和/或反向脱氧脱碱基残基并入、位阻分子例如荧光分子等。其它核苷酸修饰因子可包括3'-脱氧腺苷(蛹虫草菌素(cordycepin))、3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)、2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)及3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)和2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸。下面更加详细地描述了关于各种修饰的更多详情。

[0133] 经修饰的核苷酸包括具有Northern构象(例如,Northern假回转环,见例如Saenger,Principles of Nucleic Acid Structure,Springer-Verlag编辑,1984)的核苷酸。具有northern构型的核苷酸的非限制性实例包括锁核酸(LNA)核苷酸(例如,2'-O,4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷酸)；2'-甲氧基乙氧基(MOE)核苷酸；2'-甲基-硫代-乙基、2'-脱氧-2'-氟代核苷酸、2'-脱氧-2'-氯代核苷酸、2'-叠氮核苷酸和2'-O-甲基核苷酸。例如,在Elman等,2005;Kurreck等,2002;Crinelli等,2002;Braasch和Corey,2001;Bondensgaard等,2000;Wahlestedt等,2000;和专利公布No.WO 00/47599、WO 99/14226及WO 98/39352和WO 2004/083430中描述了锁核酸或LNA。在一个实施方案中,LNA并入有义链的5'末端。

[0134] 化学修饰还包括为非核苷酸、无环类似物的未锁核酸或UNA,其中C2'-C3'键不存在(虽然UNA不是真正的核苷酸,但是将其明确地包括在本文所考虑到的“经修饰”核苷酸或经修饰核酸范围之内)。在特定实施方案中,具有突出的核酸分子可经修饰为在突出位置(即,2核苷酸突出)具有UNA。在其它实施方案中,在3'-或5'-端包括UNA。UNA可位于沿着核酸链的任何地方,即在位置7处。核酸分子可含有一个或一个以上的UNA。在Nucleic Acids Symposium Series No.52,第133-134页(2008)中公开了示例性UNA。在某些实施方案中,如本文所述的核酸分子(例如,siNA分子)包括一个或多个UNA;或一个UNA。在一些实施方案中,如本文所述具有3'-突出的核酸分子(例如,siNA分子)在3'突出中包括一个或两个UNA。在一些实施方案中,如本文所述的核酸分子(例如,siNA分子)在反义链中包括UNA(例如一个UNA);例如在反义链的位置6或位置7中。化学修饰还包括例如本文公开的非配对核苷酸类似物。化学修饰进一步包括

[0135] 化学修饰还包括在寡核苷酸的5'和/或3'部分上的末端修饰并且也称为加帽部分。此类末端修饰选自核苷酸、经修饰的核苷酸、脂质、肽和糖。

[0136] 化学修饰还包括六元“六元环核苷酸类似物”。在Allart等(Nucleosides&Nucleotides,1998,17:1523-1526;和Perez-Perez等,1996,Bioorg.and Medicinal Chem Letters 6:1457-1460)中公开了六元环核苷酸类似物的实例。在专利申请公布No.WO 2006/047842中公开了包括含己糖醇和阿卓糖醇核苷酸单体的6-元环核苷酸类似物的寡核苷酸。

[0137] 化学修饰还包括与一般自然存在的核苷酸相比,具有逆转手性的“镜像”核苷酸;即镜像核苷酸可为自然存在的D-核苷酸的“L-核苷酸”类似物(见美国专利No.6,602,858)。镜像核苷酸可进一步包括例如本文所述的至少一个糖或碱基修饰和/或骨架修饰,例如硫代磷酸酯或膦酸酯部分。美国专利No.6,602,858公开了包括至少一个L-核苷酸取代的核酸

催化剂。镜像核苷酸包括(例如)L-DNA(L-脱氧核糖腺苷-3'-磷酸(镜像dA);L-脱氧核糖胞苷-3'-磷酸(镜像dC);L-脱氧核糖鸟苷-3'-磷酸(镜像dG);L-脱氧核糖胸苷-3'-磷酸(镜像dT)和L-RNA(L-核糖腺苷-3'-磷酸(镜像rA);L-核糖胞苷-3'-磷酸(镜像rC);L-核糖鸟苷-3'-磷酸(镜像rG);L-核糖尿嘧啶-3'-磷酸(镜像dU))。

[0138] 在一些实施方案中,经修饰的核糖核苷酸包括经修饰的脱氧核糖核苷酸,例如可用作5'末端位置(位置编号1)处的核苷酸的5' OMeDNA(5-甲基-脱氧核糖鸟苷-3'-磷酸);PACE(脱氧核糖腺嘌呤3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胞苷3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖鸟苷3'磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胸苷3'磷酸基乙酸酯)。

[0139] 修饰可存在于本文公开的核酸分子的一条或多条链上,例如有义链、反义链或两条链上。在某些实施方案中,反义链可包括修饰而有义链仅可包括未经修饰的RNA。

[0140] 核碱基

[0141] 本文公开的核酸的核碱基可包括未经修饰的核糖核苷酸(嘌呤和嘧啶),例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿苷。一条或两条链上的核碱基可经天然和合成的核碱基修饰,例如胸腺嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、肌苷、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、任何“通用碱基”核苷酸;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、氨基、硫醇、硫代烷基、羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、脱氮嘌呤、嘌呤和嘧啶的杂环取代类似物(例如氨基乙氧基吩噻嗪)、嘌呤和嘧啶的衍生物(例如,1-烷基-、1-烯基-、杂芳烃-和1-炔基衍生物)及其互变异构体,8-氧代-N⁶-甲基腺嘌呤、7-二氮杂黄嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(1-丙炔基)尿嘧啶、5-(1-丙炔基)胞嘧啶和4,4-桥亚乙基胞嘧啶)。适合碱基的其它实例包括非嘌呤基和非嘧啶基碱基,例如2-氨基吡啶和三嗪。

[0142] 糖部分

[0143] 本文公开的核酸中的糖部分可包括没有任何修饰的2'-羟基-戊呋喃糖基糖部分。可选地,糖部分可经修饰,例如2'-脱氧-戊呋喃糖基糖部分、D-核糖、己糖,在戊呋喃糖基糖部分的2'位置的修饰,例如2'-O-烷基(包括2'-O-甲基和2'-O-乙基),即2'-烷氧基、2'-氨基、2'-O-烯丙基、2'-S-烷基、2'-卤素(包括2'-氟、氯和溴)、2'-甲氧基乙氧基、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-2-甲氧基乙基、2'-烯丙氧基(-OCH₂CH=CH₂)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、丙炔基、CF₃、氰基、咪唑、羧酸酯、硫醇酯、C₁-C₁₀低级烷基、经取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基、OCF₃、OCN、O-、S-或N-烷基;O-、S或N-烯基;SOCH₃;SO₂CH₃;ONO₂;NO₂;N₃;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷氨基;聚烷氨基或经取代的甲硅烷基,其中如欧洲专利EP 0 586 520 B1或EP 0 618 925 B1中所述。

[0144] 烷基包括饱和脂族基,包括直链烷基(例如,甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等)、支链烷基(异丙基、叔丁基、异丁基等)、环烷基(脂环族)基团(环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基)、经烷基取代的环烷基和经环烷基取代的烷基。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其骨架中有6个或更少的碳原子(例如,对于直链而言为C₁-C₆,对于支链而言为C₃-C₆),并且更优选为4个或更少。同样,优选的环烷基在其环结构中具有3-8个碳原子,并且更有选在环结构中具有5或6个碳。术语C₁-C₆包括含1-6个碳原子的烷基。烷基可为经取代的烷基,例如有取代基置换烃骨架的一个或多个碳上的氢的烷基部分。

此类取代基可包括(例如)烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷氨基羰基、二烷氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸基、亚膦基、氰基、氨基(包括烷氨基、二烷氨基、芳氨基、二芳氨基和烷基芳氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸基、氨磺酰、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或芳香族或杂芳族部分。

[0145] 烷氧基包括与氧原子共价连接的经取代和未经取代的烷基、烯基和炔基。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基和戊氧基。经取代的烷氧基的实例包括卤化烷氧基。烷氧基可经基团取代,例如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷氨基羰基、二烷氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸基、亚膦基、氰基、氨基(包括烷氨基、二烷氨基、芳氨基、二芳氨基和烷基芳氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸基、氨磺酰、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或芳香族或杂芳族部分。经卤素取代的烷氧基的实例包括但不限于氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、氯甲氧基、二氯甲氧基、三氯甲氧基等。

[0146] 在一些实施方案中,戊呋喃糖基环可经缺乏戊呋喃糖基环的C2'-C3'-键的无环衍生物置换。例如,非环核苷酸可用2-羟基乙氧基甲基取代dNMP中通常存在的2'-脱氧核糖呋喃基糖。

[0147] 卤素包括氟、溴、氯和碘。

[0148] 骨架

[0149] 本文公开的核酸的核苷亚基可通过磷酸二酯键相互连接。磷酸二酯键可任选用其它连键取代。例如,硫代磷酸酯、硫代磷酸-D-核糖实体、三酯、硫醇酯、2'-5' 桥接骨架(也可称为5'-2')、PACE、3'-(或-5')脱氧-3'-(或-5')硫代-硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、3'-(或-5')脱氧亚膦酸酯、硼代磷酸酯、3'-(或-5')脱氧-3'-(或-5')氨基氨基磷酸酯、氢膦酸酯、膦酸酯、硼代磷酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯修饰,例如烷基磷酸三酯、磷酸三酯磷连键、5'-乙氧基磷酸二酯、P-烷氧基磷酸三酯、甲基膦酸酯和不含磷的键,例如碳酸酯、氨基甲酸酯、甲硅烷基、硫、磺酸酯、磺胺、甲缩醛、硫代甲酰基、胍、亚甲基亚氨基、亚甲基甲基亚氨基、亚甲基亚胍基、亚甲基二甲基亚胍基和亚甲氧基甲基亚氨基连键。

[0150] 本文公开的核酸分子可包括肽核酸(PNA)骨架。PNA骨架包括通过肽键连接的重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元。各种碱基例如嘌呤、嘧啶、天然和合成的碱基可通过亚甲基羰基键与骨架连接。

[0151] 末端磷酸

[0152] 可对末端磷酸基团进行修饰。不同稳定化学结构的非限制性实例均可用于(例如)稳定核酸序列的3'-端,包括(1) [3-3']-反向脱氧核糖;(2) 脱氧核糖核苷酸;(3) [5'-3']-3'-脱氧核糖核苷酸;(4) [5'-3']-核糖核苷酸;(5) [5'-3']-3'-O-甲基核糖核苷酸;(6) 3'-甘油基;(7) [3'-5']-3'-脱氧核糖核苷酸;(8) [3'-3']-脱氧核糖核苷酸;(9) [5'-2']-脱氧

方案中(N)_x和(N')_y是PCT专利公布No.WO 2008/050329、WO 2009/044392、WO2008/106102、WO 2009/001359、WO/2009/090639中提供的寡核苷酸对,其通过引用整体并入本文。

[0164] 在一些实施方案中,x=y并且x和y的每一个为19、20、21、22或23。在各个实施方案中,x=y=19。在一些实施方案中,反义链和有义链通过碱基配对形成双链体。

[0165] 根据一个实施方案,提供了用于受试者耳内神经元的神经保护的经修饰核酸分子,其具有下面列出的结构(A2):

[0166] (A2) 5' N1-(N)_x-Z 3' (反义链)

[0167] 3' Z'-N2-(N')_y-z'' 5' (有义链)

[0168] 其中N2、N和N'的每一个独立地为未经修饰或经修饰的核苷酸或非常规部分;

[0169] 其中(N)_x和(N')_y的每一个是其中每个连续N或N'通过共价键与下一个N或N'连接的寡核苷酸;

[0170] 其中x和y的每一个独立地为17-39的整数;

[0171] 其中(N')_y的序列与(N)_x的序列有互补性并且(N)_x与靶mRNA中的连续序列有互补性;

[0172] 其中N1与(N)_x共价结合并且与靶mRNA错配,其中在SEQ ID NO:1-3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5-6或SEQ ID NO:7中的任一个列出了靶mRNA;

[0173] 其中N1是选自尿苷、经修饰尿苷、核糖胸苷、经修饰的核糖胸苷、脱氧核糖胸苷、经修饰的脱氧核糖胸苷、核糖腺嘌呤、经修饰的核糖腺嘌呤、脱氧核糖腺嘌呤或经修饰的脱氧核糖腺嘌呤的部分;

[0174] 其中N1和N2形成碱基对;

[0175] 其中Z和Z'的每一个独立地存在或不存在,但是如果存在,独立地为在其所在链的3'端共价连接的1-5个连续核苷酸或非核苷酸部分或其组合;并且

[0176] 其中z''可能存在或不存在,但是如果存在,为在(N')_y的5'端共价连接的加帽部分。

[0177] 在一些实施方案中连接每个连续N或N'的共价键为磷酸二酯键。

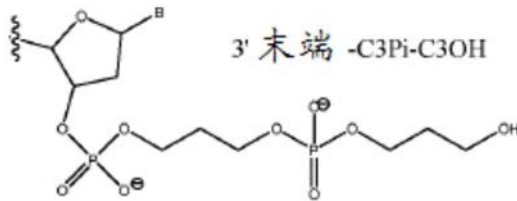
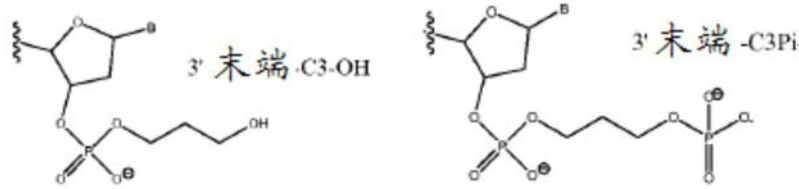
[0178] 在一些实施方案中Z和Z'不存在。在其它实施方案中Z和Z'的其中一个存在并且包含通过引用整体并入本文的PCT专利公布no.WO/2011/085056中公开的非核苷酸突出部分。

[0179] 在结构A1的特定实施方案中x=y=19并且Z包含至少一个C3烷基突出。在结构A2的特定实施方案中x=y=18并且Z包含至少一个C3烷基突出。在一些实施方案中C3-C3突出经共价连键,优选磷酸二酯键与(N)_x或(N')_y的3'末端共价连接。在一些实施方案中第一个C3和第二个C3之间的连键为磷酸二酯键。在一些实施方案中3'非核苷酸突出为C3Pi-C3Pi。在一些实施方案中3'非核苷酸突出为C3Pi-C3Ps。在一些实施方案中3'非核苷酸突出为C3Pi-C3OH(OH为羟基)。在一些实施方案中3'非核苷酸突出为C3Pi-C3OH。

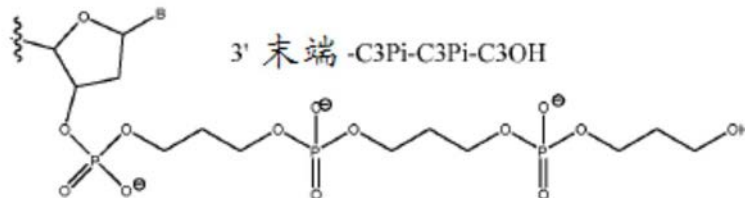
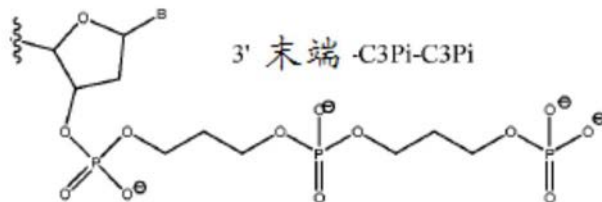
[0180] 在各个实施方案中,烷基部分包含烷基衍生物,包括包含末端羟基、末端氨基或末端磷酸基团的C3烷基、C4烷基、C5烷基或C6烷基部分。在一些实施方案中,烷基部分为C3烷基或C3烷基衍生物部分。在一些实施方案中,C3烷基部分包含丙醇、丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯或其组合。C3烷基部分经磷酸二酯键与(N')_y的3'末端和/或(N)_x的3'末端共价连接。在一些实施方案中,烷基部分包含丙醇、丙基磷酸酯或丙基硫代磷酸酯。在一些实施方案中,Z和Z'的每一个独立地选自丙醇、磷酸丙酯、硫代磷酸丙酯、其组合或其多个,尤其是2

或3个共价连接的丙醇、丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯或其组合。在一些实施方案中,Z和Z'的每一个独立地选自丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯、丙基磷酸-丙醇;丙基磷酸-丙基硫代磷酸酯;丙基磷酸-丙基磷酸酯;(丙基磷酸酯)3、(丙基磷酸酯)2-丙醇、(丙基磷酸酯)2-丙基硫代磷酸酯。任何丙烷或丙醇偶联部分均可包括在Z或Z'中。

[0181] 示例性3'末端非核苷酸部分的结构如下:



[0182]



[0183] 在一些实施方案中,反义链的5'末端核苷酸(反义链的位置1)与靶mRNA错配。在一些实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是经修饰的核糖腺苷或经修饰的核糖尿苷。

[0184] 在一些实施方案中,(N)_x和(N')_y的每一个独立地在3'和5'末端经磷酸化或非磷酸化。

[0185] 除非另外指出,在本文讨论的结构的首选实施方案中,每个连续N和N'之间的共价键为磷酸二酯键。

[0186] 共价键指连接一个核苷酸单体与相邻核苷酸单体的核苷酸间连键。共价键包括(例如)磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、P-烷氧基键、P-羧基键等。RNA和DNA的正常核苷间连键为3'-5'磷酸二酯键。在某些优选实施方案中,共价键为磷酸二酯键。共价键涵盖不含磷的核苷间连键,例如尤其是W0 2004/041924中公开的核苷间连键。除非另外指出,在本文讨论的结构的首选实施方案中,每个连续N和N'之间的共价键为磷酸二酯键。

[0187] 对于以上所有结构而言,在一些实施方案中(N)_x的寡核苷酸序列与(N')_y的寡核苷酸序列完全互补。在其它实施方案中(N)_x和(N')_y大体上互补。在某些实施方案中(N)_x与

靶mRNA中的18-40个连续核苷酸完全互补。在其它实施方案中(N)_x与靶mRNA中的18-40个连续核苷酸大体上互补。

[0188] 在一些实施方案中,(N)_x和(N')_y在3'和5'末端均未磷酸化。在其它实施方案中,(N)_x和(N')_y任一个或二者在3'末端(3'Pi)磷酸化。在又一实施方案中,(N)_x和(N')_y任一个或二者在3'末端经不可裂解的磷酸基团磷酸化。在又一实施方案中,(N)_x和(N')_y任一个或二者在末端2'末端位置使用可裂解或不可裂解的磷酸基团磷酸化。进一步地,本发明的抑制性核酸分子可包含一个或多个空位和/或一个或多个切口和/或一个或多个错配。不希望受理论约束,空位、切口和错配具有部分破坏核酸/siRNA稳定的优点,以致其更易于通过内源性细胞机制例如DICER、DROSHA或RISC加工成其抑制组分。

[0189] 双链RNA化合物的合成

[0190] 通过本领域众所周知合成核糖核酸(或脱氧核糖核酸)寡核苷酸的任何方法合成用于制备本发明药物组合物的双链RNA化合物。其中,在Beaucage和Iyer, *Tetrahedron* 1992;48:2223-2311;Beaucage和Iyer, *Tetrahedron* 1993;49:6123-6194和Caruthers等 *Methods Enzymol.* 1987;154:287-313中描述了此类合成;其中,在Eckstein, *Ann.Rev.Biochem.* 1985;54:367-402中描述了硫醇酯的合成,在Sproat,由Herdewijn P.编辑的Humana Press 2005中;Kap.2:17-31中描述了RNA分子的合成并且其中,在Pingoud等,由Oliver R.W.A.编辑的IRL Press 1989中;Kap.7:183-208中描述了各自的下游工艺。

[0191] 其它合成程序在本领域中已知,例如Usman等,1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe等,1990, *NAR.*, 18, 5433; Wincott等,1995, *NAR.* 23, 2677-2684;和Wincott等,1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59中描述的程序,可利用常见核酸保护和偶联基团,例如5'-端的二甲氧基三苯甲基和3'-端的亚磷酰胺。根据需要并入经修饰的(例如2'-O-甲基化)核苷酸和未经修饰的核苷酸。

[0192] 用于制备本发明药物组合物的寡核苷酸可单独合成并且在合成后连在一起,例如通过连接(Moore等,1992, *Science* 256, 9923; Draper等, 专利公布No. WO 93/23569; Shabarova等,1991, *NAR* 19, 4247; Bellon等,1997, *Nucleosides&Nucleotides*, 16, 951; Bellon等,1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204)或在合成和/或去保护后杂交。

[0193] 应该注意的是,可使用市场上可买到的机器(尤其,可从Applied Biosystems获得),根据本文公开的序列制备寡核苷酸。使用本领域众所周知的方法连接化学合成片段的重叠配对(例如,见美国专利No. 6,121,426)。链单独合成,然后在管内彼此退火。然后,通过HPLC将双链siRNA与未退火(例如由于其中之一过量)的单链寡核苷酸分开。关于本发明的siRNA或siRNA片段,可合成两个或更多个此类序列并且连在一起供本发明使用。

[0194] 也可通过例如美国专利公布No. US 2004/0019001中描述的串联合成法合成用于制备本发明药物组合物的双链RNA化合物,其中将两条siRNA链合成为被可裂解连接子分隔开的单个相连寡核苷酸片段或链,随后裂解可裂解连接子以提供杂交和允许纯化siRNA双链体的单独siRNA片段或链。连接子选自多聚核苷酸连接子或非核苷酸连接子。

[0195] 本发明的组合物优选包含两个或更多个寡核苷酸,这些寡核苷酸可单独合成并且在合成之后混在一起或(共价或非共价)连接在一起,或根据以上详述的工艺一起合成。

[0196] 药物组合物

[0197] 虽然对于本发明的寡核苷酸化合物而言,可能作为原材料施用,但是优选将其作

为药物组合物呈现。在一些实施方案中,用内源性细胞内复合物生成寡聚核糖核苷酸化合物。

[0198] 使用任何经化学修饰或未经修饰的双链RNA寡核苷酸化合物制备本文公开的药物组合物。为Dicer底物的siRNA或不对称siRNA可与本发明一起使用。用于本发明的双链RNA寡核苷酸化合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐或在施用给哺乳动物(包括人)之后能够治疗耳部疾病、病症和损伤的任何其它化合物。术语“药学上可接受的盐”指生理和药学上可接受的盐,即保持母体化合物的所需生物活性并且不会给予其不良毒理学作用的盐。在一些实施方案中,根据在本文公开的结构中列出的下列修饰之一或如串联siRNA或RNAstar(见WO 2007/091269),使用经化学和或结构修饰的双链RNA化合物制备本发明的药物组合物。某些优选分子是经化学合成和修饰的靶向CASP2、NOX3、CAPNS1或RHOA的dsRNA分子。某些优选分子是利用CASP2_4寡聚核糖核苷酸序列的dsRNA。

[0199] 本发明进一步提供了包含一种或多种抑制性寡核苷酸化合物、渗透性促进剂和药学上可接受的媒介物或载体的药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含两种或更多种不同寡核苷酸/siRNA化合物的混合物。

[0200] 化合物可经口服、皮下或肠胃外,包括静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内、鼻内、经鼓室以及鞘内和输注技术施用。化合物的植入物也有用。优选施用模式为经鼓室。可制备液体形式进行注射,术语包括皮下、经皮、静脉内、肌肉内、鞘内、经鼓室注射和其它肠胃外施用途径。液体组合物包括有和无有机共溶剂的水溶液、水或油悬浮液、具有食用油的乳液以及类似药物媒介物。在一个实施方案中,施用包括静脉内施用。在优选实施方案中,施用包括局部施用,尤其是向耳道的局部施用、向鼓膜的局部施用或其组合。在一些实施方案中,将本申请的化合物作为滴耳剂施加鼓膜上。在一些优选实施方案中,通过经鼓室注射或通过滴耳剂施用dsRNA分子。

[0201] 在各个实施方案中,特别是局部施用本发明的药物组合物的实施方案中,药物组合物进一步包含渗透性促进剂,也称为促渗剂。在各个实施方案中,促渗剂选自促进治疗性寡核苷酸渗透过患有或有内耳疾病、病症或损伤,优选美尼尔氏症风险的受试者耳内的皮肤和/或鼓膜的任何化合物或两种或更多种化合物的任何组合。在一些实施方案中,促渗剂/渗透性促进剂选自但不限于聚乙二醇(PEG)、甘油(丙三醇)、麦芽糖醇、山梨糖醇等;二甘醇一乙醚、氮酮、杀藻胺(ADBAC)、氯化十六烷基吡啶、鲸蜡基甲基溴化氨、葡聚糖硫酸酯、月桂酸、薄荷醇、甲氧基水杨酸酯、油酸、磷脂酰胆碱、聚氧乙烯、聚山梨醇酯80、甘胆酸钠、硫酸月桂酯钠、水杨酸钠、牛磺胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠、亚砷、脱氧胆酸钠、甘氨酸脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和表面活性剂例如硫酸月桂酯钠、月桂醇聚醚-9、氯化十六烷基吡啶和聚氧乙烯单烷基醚、苯甲酸(例如水杨酸钠和甲氧基水杨酸酯)、脂肪酸(例如月桂酸、油酸、十一烷酸和油酸甲酯)、脂肪醇(例如辛醇和壬醇)、月桂氮酮、环糊精、麝香草酚(thymol)、柠檬烯(limonene)、脲、壳聚糖和其它天然和合成的聚合物。

[0202] 在某些实施方案中,渗透性促进剂为多元醇。在一些实施方案中,寡核苷酸与多元醇混合。本发明溶液中包含的适合多元醇包括甘油和糖醇例如山梨糖醇、甘露糖醇或木糖醇、聚乙二醇及其衍生物。

[0203] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物还包括一种或多种各种其它的药学上可接受的成分,例如但不限于缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、载体、溶剂、稀释剂、共溶剂、造粘

剂/增粘剂、赋形剂、佐剂和媒介物中的一种或多种。在某些实施方案中,在本发明的组合物中包括接受的防腐剂例如杀藻胺和依地酸二钠(EDTA),浓度足够有效的抑菌作用,按组合物的重量计约0.0001-0.1%。

[0204] 根据一个实施方案,多元醇为甘油。在各个实施方案中,甘油存在的最终浓度按药物组合物的体积计,约0.1%至约35%;约1%至约30%;约5%至约25%,优选约10%至约20%。在一些实施方案中,按药物组合物的体积计,药物组合物中甘油的最终浓度为约2%、2.5%、5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、22.5%、25%、27.5%或约30%。在一个实施方案中,按药物组合物的体积计,药物组合物中甘油的最终浓度为约2%。在另一实施方案中,按药物组合物的体积计,药物组合物中甘油的最终浓度为约5%或约10%。在又一实施方案中,按药物组合物的体积计,药物组合物中甘油的最终浓度为约20%。在一些实施方案中,施加之前使药物组合物达到受试者的体温,约30°C至约38°C。在通过引用整体并入本文的PCT专利公布no.WO2011/072091中公开了治疗耳病的某些方法。

[0205] 在各个实施方案中,配制寡核苷酸组合物以通过任何适合施用模式局部施用。本发明药物组合物的适合施用模式包括侵入性和非侵入性施用模式,例如但不限于滴注(例如,滴耳溶液)、注射(可注射制剂)、沉积(固体或半固体制剂,例如软膏、凝胶)、输注或喷涂。在某些实施方案中,局部施用本发明的组合物。递送可通过任何方式(例如滴剂、喷雾)实现,使用任何有效仪器将组合物放入内耳或注射组合物(例如通过鼓膜)。

[0206] 本发明还提供了根据本领域技术人员已知的配制技术制备本发明的药物组合物的工艺。在一些实施方案中,制备本发明的药物组合物的工艺包括按任何适合顺序合并治疗有效量的至少一种寡核苷酸化合物、一种或多种渗透性促进剂和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体或其混合物,此类组合物优选具有延长的如本文所述的化学和/或物理稳定性。在一些实施方案中,制备本发明的药物组合物的工艺包括按任何适合顺序合并治疗有效量的至少一种寡核苷酸化合物、一种或多种渗透性促进剂和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体或其混合物和抗菌剂和/或防腐剂。在一些实施方案中,药物组合物包括药理学上可接受的表面活性剂以帮助溶解双链RNA化合物。在某些实施方案中,本发明的药物组合物进一步包含附加治疗活性剂,此类组合物在如本文所述的联合疗法中有益。在本发明的一些实施方案中,附加药物活性剂选自但不限于,例如非固醇类抗炎药、皮质类固醇、抗真菌剂、抗生素等。

[0207] 另一方面,本发明提供了根据本发明所述的药物组合物,用于治疗美尼尔氏症;减轻选自耳鸣、EHL、阵发性眩晕和听力丧失的一种或多种症状;减轻进行性听力丧失,提供螺旋神经节细胞的神经保护,给予前庭神经节细胞的神经保护,防止螺旋神经节细胞中的凋亡性细胞死亡和防止前庭神经节细胞中的凋亡性细胞死亡。

[0208] 用于改善本文公开的分子的递送的组合物包括双链RNA分子与靶向分子的偶联物。偶联物通常通过靶向分子与双链RNA分子有义链的共价结合形成,以便不破坏沉默活性。用于本发明的潜在靶向分子包括蛋白质、肽和适体以及天然化合物,例如胆固醇。对于靶向抗体而言,已使用与鱼精蛋白融合蛋白的偶联(见例如:Song等, *Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors*, *Nat Biotechnol.* 2005.23(6):709-17)。

[0209] 还提供了试剂盒、容器和包括如本文提供的用于减少CASP2、NOX3、CAPNS1表达的

核酸分子(例如siRNA分子)的制剂,用于向患者施用或分配核酸分子。试剂盒可包括至少一个容器和至少一个标签。适合的容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可由各种材料构成,例如玻璃、金属或塑料。试剂盒可进一步包括相关指示和/或说明;也可包括用于此类目的试剂和其它组合物或工具。

[0210] 容器可选地容纳对治疗、诊断、预测或预防病状有效的组合物并且可具有无菌入口(例如容器可为静脉溶液包或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的活性剂可为能够特异性结合和/或调节CASP2、NOX3、CAPNS1功能的核酸分子。

[0211] 试剂盒可进一步包括第二个容器,其包括药学上可接受的缓冲剂,例如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和/或右旋糖溶液。试剂盒可进一步包括从商业和用户的角度来看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、搅拌器、针头、注射器和/或有指示和/或使用说明的包装说明书。

[0212] 在使用之前包装核酸分子的单位剂量安瓿或多剂量容器可包括装入一定量的dsRNA或含有适合其药学有效剂量的dsRNA或多个有效剂量的溶液的密封容器。dsRNA包装成无菌制剂,并且密封容器设计为保持制剂的无菌性直至使用。

[0213] 其中dsRNA包括编码细胞免疫反应元件或其片段的序列的容器可包括有标签的包装,并且标签可能带有政府机构,例如食品和药物管理局规定形式的公告,所述公告反映了所述机构根据联邦法律批准生产、使用或销售其中的多聚核苷酸材料供人施用。

[0214] 联邦法律要求人治疗中药物组合物的使用应通过联邦政府机构批准。在美国,由食品和药物管理局负责实施,发布了获得此类批准的适当法规,在美国法典第21篇第301-392条中有详细描述。美国法典第42篇第262条提供了对生物材料,包括由动物组织制成的产品的法规。大多数外国国家要求类似批准。法规因国家不同而不同,但是个别程序为本领域的技术人员众所周知并且本文提供的组合物和方法优选地相应遵守。

[0215] 施用

[0216] 本文公开的方法包括根据良好医疗实践的分子的施用和给药,考虑到了个别患者的临床状况、待治疗的疾病、施用部位和方法、施用的时间安排、患者年龄、性别、体重和医师所知的其它因素。

[0217] “治疗有效剂量”或“治疗有效量”指在受试者或其生理系统中有效实现改善的药物化合物或组合物的量,所述改善包括但不限于存活率提高、恢复更快、抑制疾病进展或症状改善或消除和由本领域技术人员根据适当确定措施选择的其它指标。

[0218] 因此如本领域已知,由此类因素决定用于本文目的的“治疗有效剂量”或“治疗有效量”。所述剂量必须有效实现改善,包括但不限于存活率提高或恢复更快或症状改善或消除和由本领域技术人员根据适当措施选择的其它指标。本发明的药物组合物呈单剂量或多剂量施用。

[0219] 剂量尤其由寡核苷酸的活性、所述病症的适应症和严重程度决定并且包括在药学上可接受的赋形剂或载体中施用总计约0.1ng至约10mg、约1ng至约1mg或约10ng至约1mg寡核苷酸的剂量。组合物中双链RNA化合物的浓度介于0.1mg/ml至100mg/ml之间,优选介于1mg/ml至100mg/ml之间,并且更优选介于5mg/ml至20mg/ml之间。

[0220] 在一些实施方案中,对于人而言寡核苷酸化合物的有效剂量在1ng/kg至约20-100mg/kg体重/天,优选约0.01mg至约2-10mg/kg体重/天,按单剂量或多剂量方案,每天一

次或每天两次或三次或更多次,施用1-4周或更长时间或甚至在受试者的生命期内施用。

[0221] 通过任何适合施用模式向受试者施用本发明的药物组合物。本发明寡核苷酸组合物的适合施用模式包括侵入性和非侵入性施用模式,例如但不限于滴注(滴耳剂)、注射、沉积或喷涂到耳部。在某些实施方案中,本发明的组合物作为滴耳剂向耳道局部施用或通过插管注射到耳道内或通过鼓膜注射(经鼓室注射)。在许多情况下,施用模式可取决于许多因素,包括但不限于患病耳、治疗的疾病或病状或损伤的性质和严重程度以及个别受试者的其它临床状况。

[0222] 在各个实施方案中,按提供预防或治疗作用有效的量递送本发明的药物组合物。预防或治疗作用的实例包括抑制靶蛋白表达或敲除至少一个靶基因。在某些实施方案中,抑制至少一个靶基因的表达赋予细胞和/或组织神经保护性。

[0223] 相应地,呈允许活性成分(即至少一种寡核苷酸化合物)预防、抑制、改善或治疗本文公开的疾病和病状的任何形式施用本发明的药物组合物。通过非限制性实例的方式,药物组合物可配制成乳膏、泡沫、糊剂、软膏、乳液、液体溶液、凝胶、喷雾、悬浮液、微乳液、微球、微胶囊、纳米球、纳米粒子、脂囊泡、脂质体、多聚囊泡、贴片、生物插入物、气溶胶、聚合材料或聚合样材料和/或本领域已知的任何其它形式,包括适合已知或新型药物递送系统或装置的任何形式,例如可移动和/或可吸收、可溶解和/或可降解的植入物。例如,可通过玻璃体内或经鼓室注射侵入性地;或例如通过滴耳剂、耳泡沫、喷雾、凝胶、乳膏或软膏局部利用无菌液体药物组合物、溶液或悬浮液。液体组合物包括有或无有机共溶剂的水溶液、水或油悬浮液、具有食用油的乳液以及类似药物媒介物。

[0224] 耳部疾病和病症

[0225] 本文公开了用于受试者耳内神经元的神经保护的方法和试剂盒。所述方法和试剂盒用于提供螺旋神经节的神经保护,从而减弱或防止耳蜗功能,包括进行性听力丧失和耳鸣。保护神经元免受各种创伤,包括外伤、局部缺血、化学试剂(例如耳毒素)、传染物、免疫反应或营养失衡引起的损伤或损害。在一些实施方案中本文提供了减少患有与听觉系统和/或前庭系统组织中的病理异常或变化相关的疾病的受试者的螺旋神经节和/或前庭神经节中神经元细胞的损失的方法,包括向受试者的耳部施用下调CASP2基因、NOX3基因、CAPNS1基因或RHOA基因的表的双链RNA(dsRNA)化合物的剂量,从而对受试者耳中的螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞提供神经保护。在一些实施方案中,与对照神经细胞群相比,在神经细胞群中所述施用导致神经细胞死亡减少至少10%。在各个实施方案中所述异常或变化特别与听觉器官组织的病理异常/变化和/或前庭器官组织的病理异常/变化相关,此类变化例如神经元退化或神经元细胞死亡。在一些实施方案中,dsRNA化合物下调CASP2基因并且包含具有SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和具有SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链,优选SEQ ID NO:24或26中列出的有义链和SEQ ID NO:25或27中列出的反义链。

[0226] 在一些实施方案中本文公开的方法包括预防、治疗或减轻受试者听觉系统和/或前庭系统组织中病理异常/变化相关的耳病的影响,包括向受试者的耳部施用下调CASP2基因、NOX3基因、CAPNS1基因或RHOA基因的表的双链RNA(dsRNA)化合物的剂量,从而对受试者耳中的螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞提供神经保护。在一些实施方案中,与对照神经细胞群相比,在神经细胞群中所述施用导致神经细胞死亡减少至少10%。在各个实施

方案中所述异常或变化特别与听觉器官组织的病理异常/变化和/或前庭器官组织的病理异常/变化相关,此类变化例如神经元退化或神经元细胞死亡。在一些实施方案中,dsRNA化合物下调CASP2基因并且包含具有SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和具有SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链,优选SEQ ID NO:24或26中列出的有义链和SEQ ID NO:25或27中列出的反义链。

[0227] 在本文公开的上下文中用“耳毒素”意指通过其化学作用损伤、损害或抑制与听力或平衡有关的神经元的活性,而损害听力和/或平衡的物质。耳毒素包括治疗性药物,包括抗肿瘤剂、水杨酸盐、袪利尿剂、奎宁和氨基糖苷类抗生素、食物或药剂中的污染物及环境或工业污染物。

[0228] 相应地,一方面提供了为受试者耳内的神经元提供神经保护的方法和试剂盒,从而通过向受试者施用本文公开的dsRNA预防、减轻或治疗听力损伤、病症或失衡,例如耳毒素诱导的听力损伤、病症或失衡。

[0229] 耳毒性氨基糖苷类抗生素包括但不限于新霉素(neomycin)、巴龙霉素(paromomycin)、核糖霉素(ribostamycin)、利维霉素(lividomycin)、卡那霉素(kanamycin)、丁胺卡那霉素(amikacin)、托普霉素(tobramycin)、紫霉素(viomycin)、庆大霉素(gentamicin)、西索米星(sisomicin)、乙基西梭霉素(netilmicin)、链霉素(streptomycin)、地贝卡星(dibekacin)、福提霉素(fortimicin)和双氢链霉素(dihydrostreptomycin)或其组合。特定抗生素包括新霉素B、卡那霉素A、卡那霉素B、庆大霉素C1、庆大霉素C1a、庆大霉素C2和已知具有强毒性,特别是耳毒性和肾毒性,降低此类抗菌剂的实用性的抗生素。

[0230] 对于抗癌剂而言耳毒性也是严重的剂量限制性副作用。耳毒性肿瘤剂包括但不限于长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、顺铂(cisplatin)和顺铂样化合物及紫杉醇(taxol)和紫杉醇样化合物。顺铂样化合物尤其包括(卡铂)(Paraplatin®)、四铂(tetraplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、奥沙利铂脂质体(aroplatin)和反铂(transplatin)并且是铂基化学治疗剂。

[0231] 具有已知耳毒性副作用的利尿剂,特别是“袪”利尿剂包括但不限于利尿磺胺(furosemide)、利尿酸(ethacrylic acid)和汞剂(mercurial)。

[0232] 耳毒性奎宁包括但不限于通常用于治疗疟疾的奎宁合成代用品。在一些实施方案中,听力障碍是5型磷酸二酯酶(PDE-5)抑制剂,包括西地那非(sildenafil)(Viagra®)、伐地那非(vardenafil)(Levitra®)和他达拉非(tadalafil)(Cialis)的副作用。

[0233] 水杨酸盐,例如阿斯匹林(aspirin)具有耳毒性副作用,包括耳鸣(“耳内振鸣(ringing)”)和暂时性听力损失。而且,如果长时间高剂量用药,听力损伤可变为持续性且不可逆。

[0234] 本文进一步公开了用于为耳部神经元提供神经保护的方法和试剂盒,其中神经元受机械和物理性外伤损害。

[0235] 在各个实施方案中,本文提供了一种用于受试者耳内前庭神经节的神经保护的方法。所述方法和试剂盒用于提供前庭神经节的神经保护,从而减弱或防止前庭功能,包括但不限于恶心、失去平衡或眩晕。在大多数哺乳动物(包括人)中,前庭感觉系统有助于平衡及

空间定位和稳定性感觉。

[0236] 美尼尔氏症

[0237] 美尼尔氏症,也称为特发性内淋巴积水 (ELH),是一种导致眩晕和耳鸣的内耳病症,并且最终神经损伤导致听力丧失。美尼尔氏症的原因仍不清楚。特征在于耳蜗前庭功能障碍和内淋巴积水(尸检)。美尼尔氏症的主要体征和症状是:

[0238] a) 阵发性眩晕。眩晕发作通常毫无征兆地发生并且一般持续约20分钟到2个小时或更长时间,长达24小时。严重的眩晕可引起恶心和呕吐。

[0239] b) 听力丧失。美尼尔氏症中的听力丧失可能波动,特别是在病程早期。最后,大多数人经历一定程度的永久性听力丧失。听力丧失可为单侧或双侧。

[0240] c) 耳鸣。耳鸣是在耳内感受到振鸣、嗡嗡声(buzzing)、轰鸣(roaring)、鸣笛(whistling)或嘶嘶声(hissing)。美尼尔氏症,耳鸣往往很低沉。

[0241] d) 耳胀。耳胀是感觉到耳内闷胀或压力。

[0242] 不希望受理论约束,人们通常认为耳蜗毛细胞和前庭毛细胞在美尼尔氏症患者中死亡,从而引起听力丧失。毛细胞是位于内耳中的感觉感受器。听觉毛细胞位于耳蜗的Corti器官中并且牵涉于检测声音和将声音转换为通过神经纤维发送到大脑的电信号。前庭毛细胞位于内耳的前庭(平衡)器官(椭圆囊、球囊、壶腹)中。它们检测头部位置的变化并将信号发送到大脑以帮助维持身体姿态、眼睛位置和平衡。在听觉或前庭毛细胞缺乏时,源自声波或重力的能量不会转换为神经信号,并且听力或平衡缺陷随之发生。

[0243] 在优选实施方案中,治疗的受试者为温血动物并且,特别是哺乳动物,并且优选人。

[0244] “治疗受试者”指向受试者施用缓和或减轻疾病或病状相关症状、延迟疾病发作、减缓疾病进展、降低严重程度或治愈疾病或防止疾病发生有效的治疗性物质。“治疗”指治疗性治疗和防治或预防性措施,其中目的是预防疾病、减缓疾病进展或减少疾病的症状。需要治疗的受试者包括已经在经历所述疾病或病状的受试者、处于所述疾病或病状的风险或易患所述疾病或病状的受试者和要预防所述疾病或病状的受试者。在美尼尔氏症发作之前、期间或之后施用本发明的组合物。

[0245] 本文提供了减少患有与听觉系统和/或前庭系统中的病理异常相关的疾病的受试者的螺旋神经节和/或前庭神经节内的神经细胞损失的方法,包括向受试者的耳部施用下调CASP2基因表达的双链RNA(dsRNA)化合物的剂量,其中所述基因编码SEQ ID NO:1-3中任一个列出的mRNA,从而对受试者耳内的螺旋神经节细胞和/或前庭神经节细胞提供神经保护。在优选实施方案中,dsRNA化合物包含具有SEQ ID NO:8中列出的核苷酸序列的有义链和具有SEQ ID NO:9中列出的核苷酸序列的反义链。

[0246] 联合疗法

[0247] 治疗美尼尔氏症和本文公开的相关疾病和病症的方法包括施用针对CASP2基因的双链RNA化合物。进一步公开了联合疗法,其包括治疗患有美尼尔氏症或受美尼尔氏症影响或易患美尼尔氏症的受试者的已知治疗,连同新型药物组合物并且将本文所述的疗法视为本发明的一部分。

[0248] 用“连同”或“结合”意指在施用本发明的药物组合物之前、同时或之后施用另外的药学上有效的化合物。因此和相同或单独药物制剂依次或同时施用以上提到的组合的单独

组分。通过任何适合途径施用第二治疗剂,例如通过眼睛、耳部、口腔、面颊、吸入、舌下、直肠、阴道、经尿道、鼻内、局部、经由皮肤(即,经皮)或肠胃外(包括静脉内、肌肉内、皮下和冠状动脉内)施用。

[0249] 在一些实施方案中,本文公开的分子和第二治疗剂/组合物通过相同途径施用,呈单一组合物或作为两种或更多种不同的药物组合物提供。然而,在其它实施方案中,本发明新型药物组合物和第二治疗性组合物/治疗剂的不同施用途径可能或优选。本领域的技术人员知道单独或组合施用每种治疗剂的最佳模式。

[0250] 已经以说明方式描述了本发明,并且应理解所用术语旨在具有描述而非限制性语言的性质。

[0251] 根据以上教导,本发明的许多修饰和变型是可能。因此,应理解在本发明所附权利要求的范围内,除非特别描述,可实践本发明。

[0252] 本申请从头到尾,作者按年份和专利编号引用了各种出版物,包括美国专利。这些出版物及专利和专利申请的公开内容整体据此通过引用并入本申请,以便更全面地描述本发明所属领域的状态。

[0253] 下面参考实施例详细说明了本发明,但是不应解释为对其的限制。

[0254] 本文对任何文件的引用均不作为承认此文件是相关现有技术或视为符合本申请任何权利要求的可专利性的材料。关于任何文件的内容或日期的任何声明均基于在提交时申请人可用的信息并不构成关于此类声明正确性的承认。

实施例

[0255] 没有进一步详述描述,据信本领域的技术人员可使用前面的描述,最大限度地利用本发明。因此,下列优选特定实施方案应解释为仅为说明性,而不以任何方式限制要求保护的发明。

[0256] 通用方法-分子生物学和免疫测定

[0257] 如同在Sambrook等,Molecular cloning:A laboratory manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New-York(1989,1992)和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley和Sons,Baltimore,Maryland(1988)中,并且如同在Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley和Sons,Baltimore,Maryland(1989)中和如同在Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning,John Wiley&Sons,New York(1988)中,并且如同在Watson等,Recombinant DNA,Scientific American Books,New York中和在Birren等(编辑)Genome Analysis:A Laboratory Manual Series,第1-4卷Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998)中和美国专利No.4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659和5,272,057中列出并且通过引用并入本文的方法论,通常基本上按照本领域已知、本文未具体描述的标准分子生物学方法。如PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications,Academic Press,San Diego,CA(1990)中所讨论那样,进行聚合酶链式反应(PCR)。原位PCR结合流式细胞术(FACS)可用于检测含特定DNA和mRNA序列的细胞(Testoni等,Blood 1996,87:3822.)。进行qPCR和RT-PCR的方法在本领域中众所周知。

[0258] 如同在Organic syntheses:第1-79卷,编辑不同,J.Wiley,New York,(1941-

2003);Gewert等,Organic synthesis workbook,Wiley-VCH,Weinheim(2000);Smith&March,Advanced Organic Chemistry,Wiley-Interscience;第5版(2001)中,通常基本上按照本领域已知,本文未具体描述的标准有机合成方法。

[0259] 如同在Pergamon Press出版的不同作者和编辑的“Comprehensive Medicinal Chemistry”系列中一样,通常基本上按照本领域已知,本文未具体描述的标准药物化学方法。

[0260] 一般而言,ELISA为优选免疫测定法。ELISA测定法为本领域技术人员众所周知。多克隆和单克隆抗体均可用于测定。在适当情况下,如本文领域人员已知,可使用其它免疫测定法,例如放射免疫测定法(RIA)。在专利和科学文献中广泛描述了可用的免疫测定法。见,例如,美国专利No.3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771和5,281,521以及Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor,New York,1989。

[0261] siRNA活性

[0262] 使用专利算法或本领域已知的算法生成用于生成活性和治疗上有用的dsRNA的有义和反义序列。

[0263] 一般而言,在6孔板上每个孔接种约 $1.5-2 \times 10^5$ 个试验细胞(对于靶向人基因的siRNA而言为HeLa细胞和/或293T细胞而对于靶向大鼠/小鼠基因的siRNA而言为NRK52细胞(正常大鼠肾近端小管细胞)和/或NMuMG细胞(小鼠乳腺上皮细胞系))(70-80%汇合)。

[0264] 约24小时后,使用Lipofectamine™2000试剂(Invitrogen),在5nM或20nM的最终浓度下用siRNA化合物转染细胞。在37°C下在CO₂培育箱中培育细胞72小时。

[0265] 使用PTEN-Cy3标记的siRNA化合物作为转染的阳性对照。测试各种经化学修饰的siRNA化合物的活性。使用GFP siRNA化合物作为siRNA活性的阴性对照。

[0266] 转染72小时后,收获细胞并且从细胞中提取RNA。通过荧光显微镜检查术测试转染效率。

[0267] 使用对表达内源基因的细胞中Casp2基因的qPCR分析测定使用特定优选siRNA结构对基因表达的抑制。

[0268] 一般而言,具有选择用于体外测试的特定序列的siRNA对人和第二物种,例如非人灵长类动物、大鼠或兔子基因有特异性。

[0269] 血清稳定性实验

[0270] 测试根据本发明所述的经化学修饰的siRNA化合物在人血清中的双链体稳定性,如下:

[0271] 在37°C下在100%人血清(Sigma Cat#H4522)中培育最终浓度为7uM的siRNA分子。(siRNA原液100uM稀释于人血清中1:14.29)。

[0272] 在不同时间点(0、30分钟、1小时、3小时、6小时、8小时、10小时、16小时和24小时)将5u1添加到15u1 1.5×TBE上样缓冲液中。立即将样品在液氮中冷冻并保持在-20°C。

[0273] 将每个样品装载到根据本领域已知方法制备的非变性20%丙烯酰胺凝胶上。在紫外光下用溴化乙锭使寡聚物可见。

[0274] 实施例1:小鼠内耳中CASP2的表达

[0275] Phex^{hyp-Duk}遗传小鼠模型模拟人美尼尔氏症的症状,包括内淋巴积水(ELH)和进行性听力丧失。在Megerian等(“A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss”,Hearing Res 2008;237(1-2):90-105)中详述了这种模型,其据此通过引用整体并入。突变小鼠在出生后立即自发发展伴有前庭功能受损的ELH,接着前庭和螺旋神经节中的神经元凋亡。最后,前庭和耳蜗腔隙中的感觉细胞退化并且出现进行性听力丧失和平衡损坏。

[0276] 在野生型和Phex^{hyp-Duk}小鼠中评定小鼠内耳中CASP2的表达。在包括3周龄、2月龄和3月龄的野生型和Phex^{hyp-Duk}突变雄性小鼠的2个单独实验中定性评估Casp2蛋白质水平。解剖小鼠的内耳,固定、包埋在石蜡中并切片以获得表示听觉和前庭腔隙以及螺旋神经节的载玻片。载玻片用于组织学评估。每只耳朵3个载玻片用于内耳中dsRNA分布的原位杂交分析。使用Casp2抗体(Santa Cruz,SC-623),通过载玻片的免疫组织化学评定Casp2蛋白质表达,并且用Tyramid扩增系统(TSATM,PerkinElmer)扩增HRP信号序列。

[0277] 在所有样品,特别是Corti染色器官(OC)中,在毛细胞、螺旋神经节(SG)、耳蜗神经和前庭感觉上皮细胞(斑点)中观察到Casp2阳性细胞。另外,在少数样品中在骨陷窝(可能是骨髓)和血管(内皮细胞)中出现非特异性染色。在测试年龄,在Casp2前体蛋白质水平上没有观察到突变型和野生型之间有差异。本文在以下表1中提供了染色结果。

[0278] 表1.野生型和Phex^{hyp-Duk}突变小鼠内耳中的CASP2表达模式

	样品名称	染色模式
	1 3周龄Phex/Y #S515	corti器官(OC)-毛细胞螺旋神经节(SG)和前庭感觉上皮细胞(斑点)
	2 3周龄Phex/Y #S517	OC-毛细胞、赖斯纳氏膜(Reissner's membrane)和SG
	3 3周龄+/Y #S518	OC-毛细胞、SG和前庭感觉上皮细胞中(斑点)
	4 3周龄+/Y #S519	OC-毛细胞、SG和前庭感觉上皮细胞(斑点)
[0279]	5 2月龄Phex/Y #S77	OC-毛细胞、SG和耳蜗神经
	6 2月龄+/Y #S79	OC-毛细胞、SG和耳蜗神经
	7 3月龄Phex/Y #S100	OC-毛细胞和SG(组织形态的损害)
	8 3月龄Phex/Y #S99	OC-毛细胞和SG(组织形态的损害)
	9 3月龄+/Y #S104	OC-毛细胞、SG和前庭感觉上皮细胞(斑点)
	10 3月龄+/Y #S105	OC-毛细胞、SG、前庭感觉上皮细胞(斑点)和耳蜗神经

[0280] 实施例2:Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠(美尼尔氏症模型)中siRNA向小鼠内耳递送的评估和4种siRNA分子的功效

[0281] 目的:使用美尼尔氏症(MD)的小鼠模型评估沉默4种靶基因的几种dsRNA分子的安全性和潜在疗效。

[0282] Phex^{hyp-Duk}遗传小鼠模型模拟人美尼尔氏症的症状,包括内淋巴积水(ELH)和进行性听力丧失。在Megerian等(“A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss”,Hearing Res 2008;237(1-2):90-105)中详述了这种模型,其据此通过引用整体并入。

[0283] 通过以下进行对内耳中dsRNA的安全性和疗效的评定:

- [0284] 评估Ecog性能状态；
- [0285] 评估内耳的组织切片；
- [0286] 评估内耳功能(双侧)；
- [0287] 非侵入性听力测试；
- [0288] 卡嗒声(Click)、8、16和32Hz下的听觉诱发脑干反应(ABR)；
- [0289] 畸变产物耳声发射(DPOAE)-4、6、8、10、12、14、16、18和20kHz下的幅度；
- [0290] 非侵入性前庭功能测试；
- [0291] 前庭诱发肌性电位。
- [0292] 研究分两个阶段进行：
- [0293] 研究1.对正常野生型小鼠的初步dsRNA内耳递送和安全性研究。
- [0294] 研究2.对雄性Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠中靶向4种不同基因的dsRNA分子的疗效的评估。
- [0295] 研究1的目的：使用滴耳剂非侵入性内耳递送和向小鼠内耳多次施用dsRNA的安全性评定。研究1：表2和图2中示出了研究设计。
- [0296] 表2：研究1设计

分组 (n=3)	物品	治疗频率*	功能测试	终止
1	siRNA	P15	无	P16
2	siRNA	P15、P22	P22	P23
3	siRNA	P15、P22、P29	P29	P30
4	siRNA	P15、P22、P29、P36	P36	P37
[0297] 5	siRNA	P15、P22、P29、P36、P42	P42	P43
6	siRNA	P15、P22、P29、P36、P42、P49	P49	P50
7	媒介物	P15、P22、P29、P36、P42、P49	P49	P50
8	完整	无	P22、P29、P36、P42、P49	P50

[0298] *P=出生后的天数,即P15指出生后15天。

[0299] 从P15开始,每周为各3只小鼠的7个组递送dsRNA或媒介物。在最后一次施用试验或对照物品前当天及其施用之前进行功能测试。dsRNA分子的施用需要动物固定(麻醉)40-60分钟。因此,进行需要麻醉的功能测试性能时间表的优化。对相同年龄的完整未治疗小鼠的功能测试用作基线对照。

[0300] 图3显示,通过ABR阈值评定,每周用dsRNA或媒介物滴耳剂对野生型小鼠内耳的治疗不影响听力功能。对于每次kHz测量,经siRNA治疗的动物的结果在左侧,未经治疗的动物在中间而经媒介物治疗的动物在右侧。

[0301] 研究2.对雄性Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠中靶向4种不同基因CASP2、NOX3、CAPNS1和RHOA的4种dsRNA分子的疗效的初步评估。

[0302] 研究目的:通过使用功能和组织评估,评定美尼尔氏症小鼠遗传模型中dsRNA试验分子的功效。

[0303] 研究2:表3和图4A和4B中示出了研究设计。图4A示出了Phex^{hyp-Duk}/Y内耳中事件的

近似时间轴。虚线指出现表现型、轻度听力丧失 (HL)、内淋巴积水 (ELH) 体征、螺旋神经节细胞 (SGC) 退化或毛细胞退化, 动物间发作、表现和严重程度有一些可变性。虚线后面的实线指表现型随年龄而建立。(来自于Hear Res.2008March;237 (1-2) :90-105)。

[0304] 表3:研究2设计

分组 (n=12)	物品	治疗频率	功能测试	终止
1	siCASP2 (测试1)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
2	siNOX3 (测试2)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
3	siCAPNS (测试3)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
[0305] 4	siRHOA (测试4)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
5	siCNL (阴性对照)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
6	媒介物 (阴性对照)	P15、P22、P29、P36、 P42、P49、P56、P63、 P63、P70、P77、P84	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90
7	完整 (阴性对照)	无	P29、P36、P42、P49、 P56、P63、P63、P70、 P77、P84、P90	P90

[0306] 从P15开始,每周为各12只小鼠的6个组递送dsRNA或媒介物并且直至P63。在施用试验或对照物品当天及其施用之前每周进行功能测试。dsRNA施用需要动物固定(麻醉)40-60分钟并且进行需要麻醉的功能测试性能时间表的优化。对相同年龄的完整未治疗小鼠的功能测试用作基线对照。

[0307] 在菌落扩增过程中递增地向研究组增加动物。

[0308] 进行统计分析以比较年龄匹配的经治疗和对照Phex^{Hyp-Duk}/Y小鼠之间听觉、前庭和行为测试的结果。P<0.05视为差异显著。

[0309] 终止后,解剖小鼠的内耳,固定、包埋在石蜡中并切片以表示听觉和前庭腔隙以及螺旋神经节。载玻片用于内耳形态学的组织学评估。用于制备该研究中利用的药物组合物的CASP2dsRNA化合物(CASP2siRNA,指定为siCASP2、QPI1007或1007)是具有两条单独链的19-核苷酸平端双链体,反义链(AS,引导链)包含在位置1、3、5、7、9、10、12、14、16和18(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸和位置2、4、6、8、11、13、15、17和19(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸;并且有义链(SEN,随从链)包含未经修饰的核糖核苷酸和在位置18(加下划线的粗体)的L-脱氧核糖核苷酸及5'末端的反向脱氧核糖脱碱基部分(iB),如下所示:

[0310] SEN 5' iB-GCCAGAAUGUGGAACUCCU 3' (SEQ ID NO:26)

AS 3' cGgUcUuAcACcUuGaGgA 5' (SEQ ID NO:27)

[0311] NOX3dsRNA化合物 (siNOX3_4) 是具有两条单独链的19-核苷酸平端双链体(人、小鼠、大鼠跨物种),反义链(AS,引导链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸;并且有义链(SS,随从链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸。有义链的3'末端和反义链的3'末端均未磷酸化。

[0312] siNOX3_4

5' UcCuGgAaCuUcAcAuGaA 3' SS (SEQ ID NO:10)

[0313]

3' aGgAcCuUgAaGuGuAcUu 5' AS (SEQ ID NO:11)

[0314] CAPNS1 dsRNA化合物 (siCAPNS1_13) 是具有两条单独链的19-核苷酸平端双链体,反义链(AS,引导链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸;并且有义链(SS,随从链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸;

[0315] siCAPNS1_13

5' GcUaCaGaAcUcAuGaAuA 3' SS (SEQ ID NO:12)

[0316]

3' cGaUgUcUuGaGuAcUuAu 5' AS (SEQ ID NO:13)

[0317] RHOA dsRNA化合物 (siRHOA_4) 是具有两条单独链的19-核苷酸平端双链体,反义链(AS,引导链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸;并且有义链(SS,随从链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸;

[0318] siRHOA_4

5' GcCaCuUaAuGuAuGuUaC 3' SS (SEQ ID NO:14)

[0319]

3' cGgUgAaUuAcAuAcAaUg 5' AS (SEQ ID NO:15)

[0320] EGFP(增强型荧光绿色蛋白)对照dsRNA化合物 (siEGFP_5) 是具有两条单独链的19-核苷酸平端双链体,反义链(AS,引导链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸;并且有义链(SS,随从链)包含位置2、4、6、8、10、12、14、16和18(小写字母)的经2' OMe糖修饰的核糖核苷酸和位置1、3、5、7、9、11、13、15、17和19(大写字母)的未经修饰的核糖核苷酸;

[0321] siEGFP_5

[0322] 5' GgCuAcGuCcAgGaGcGcAcC 3' SS (SEQ ID NO:16)
3' cCgAuGcAgGuCcUcGcGuGg 5' AS (SEQ ID NO:17)

[0323] 结果和结论

[0324] ABR功能测试的结果:Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠在所有频率下均展示出听力明显丧失。在开始系统测量之前P29出现听力功能严重丧失并且在阴性对照组而非siRNA治疗组中有进一步恶化的趋势。已经在P29,经siRNA治疗的小鼠(在P15和P22治疗2次)的听力功能在所有频率下似乎都比经媒介物治疗的小鼠明显更好并且有利于经siRNA治疗的小鼠的这种差异随时间变得更加显著。从P70开始,与经siEGFP治疗的动物相比,在所有siRNA治疗组中在16-32kHz下的听力功能变得明显更好。图5E中示出了P90天时的ABR结果。在所有图5A-5D中,带开口正方形的虚线表示媒介物;带开口三角形的短破折号虚线表示经siCASP2治疗的动物;带加号(“+”)的中长破折号虚线表示经siEGFP治疗的动物;带实心圆圈的中长破折号虚线表示经siEGFP治疗的动物;带星号的长破折号虚线表示经siRHOA治疗的动物;带空心圆圈的实线表示经siCAPNS1治疗的动物。x轴提供了P29-P90的每周测试天数而y轴提供了来自ABR试验的dB读数。y轴是4次试验中的不同尺度,卡嗒声为~75-87.5dB,8KHz为~60-80,16KHz为~40-70并且32KHz为~55-75。

[0325] 图5E显示在P90天,在经试验化合物治疗的动物中ABR提高。在媒介物和siEGFP之间没有统计上显著的差异。对于正常小鼠而言在卡嗒声下的ABR:55dB;在8kHz下:40dB;16kHz:35dB;在32kHz下:40dB。

[0326] 结论:在siCASP2、siCAPNS1、siNOX3和siRHOA治疗组中,Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠显示出听力功能保护。组织学验证了对螺旋神经节和前庭神经节神经元的神经保护。

[0327] 组织学染色的结果:在研究终止时对由所有小鼠制备的内耳切片的组织学分析证明,与对照相比,大体上且明显保护了经siRNA治疗的小鼠中的螺旋和前庭神经节细胞。对这种模型而言典型的ELH(内淋巴积水)表现型不受siRNA治疗影响。不出所料,在疾病的这个阶段(P90),在所有研究组中均未观察到感觉上皮细胞的变化。与媒介物治疗组相比,在Phex^{hyp-Duk}/Y小鼠经dsRNA治疗的耳内,螺旋神经节细胞和前庭神经节细胞显示出对凋亡性死亡的显著防护。比较图6B与6A、6D与6C和6F与6E。黑色(畸变组织)示出了图6A中的神经节细胞死亡区域和图6B中的致密神经节区域。耳蜗毛细胞和前庭毛细胞似乎在所述模型中不受影响并且与对照相比,用siCASP2治疗未产生附加效应。用经siCAPNS1、siNOX3和siRHOA治疗的动物得到类似结果。图7A示出了来自经媒介物治疗(左图)或siEGFP治疗(右图)的Phex^{hyp-Duk}突变小鼠的耳蜗顶回中的神经节细胞。图7B、7C和7D分别示出了来自经siCAPNS1、siNOX3和siRHOA治疗的动物的耳蜗顶回中的神经节细胞。所有放大倍数均为×63。图8A示出了来自经媒介物治疗(左图)或siEGFP治疗(右图)的Phex^{hyp-Duk}突变小鼠的前庭神经节细胞。图8B、8C和8D分别示出了来自经siCAPNS1、siNOX3和siRHOA治疗的动物的前庭神经节细胞。所有放大倍数均为×63。螺旋神经节细胞的存活率是听力保护中的关键因素。

[0328] 在这项研究中小鼠体内的dsRNA递送通过滴耳剂施加实现。在临床环境下,经鼓室注射药物是在临床上的常规并且使用滴耳剂递送dsRNA是可能的。此外,在本文公开的研究中利用的dsRNA仅仅是下调具有不同序列和结构的CASP2、NOX3、CAPNS1和RHOA的dsRNA的非

限制性实例,并且具有在下调其各自基因中有活性的不同序列和结构的dsRNA物种在实践本文公开的方法和试剂盒中 useful。

[0329] 本文已经广泛地从种属上描述了本发明。属于类属公开内容的每个狭窄物种和亚属分组也构成本发明的一部分。这包括对本发明的类属描述,附带条件或消极限制是去除来自所述属的任何主题,而不管是否在本文中明确叙述了去除的材料。其它实施方案在下列权利要求中。

序列表

	<110> 夸克制药公司 埃琳娜·费因斯坦	
	<120> 用于神经保护的方法和组合物	
	<130> 240/PCT1	
	<150> 61/554,982	
	<151> 2011-11-03	
	<150> 61/663,627	
	<151> 2012-06-25	
	<160> 27	
	<170> PatentIn 版本 3.3	
	<210> 1	
	<211> 4241	
	<212> RNA	
[0001]	<213> 智人	
	<400> 1	
	uuuugucugu ccgccgagca ccccauuca ccccauugga ccgcgcggcc gccgcuagag	60
	cucugcgccu ggcacgcac cgggccgggg acuggguggc cuggugugug ggcgcggcag	120
	ggcgaggcg caggcgagc gucgucggc gucugagggg agggauugg ggaagcgac	180
	ggccccggg uuguuuggg uguggcggu ggcagcgga gagccggga aaagcggga	240
	auggcgggc cgagcgggg gucuugguc accuuccagc acaaggagcu gauggccgu	300
	gacaggggac gcaggauuu gggagugugu ggcaugcauc cucaucauca ggaaacucua	360
	aaaaagaacc gagugggcu agccaacag cuguuguuga gcgaauguu agaacaucu	420
	cuggagaagg acaucaucac cuuggaaaug agggagcuca uccaggccaa agugggcagu	480
	uucagccaga auguggaacu ccucaacuug cugccuaaga ggggucacca agcuuuugau	540
	gccuucugug aagcacugag ggagaccaag caaggccacc uggaggauau guugcucacc	600

	accuuucug ggcuuacagca uguacuccca ccguugagcu gugacuacga cuugagucuc	660
	ccuuuuccgg ugugugaguc cuguccccuu uacaagaagc uccgccuguc gacagauacu	720
	guggaacacu ccuagacaa uaaagauggu ccugucugcc uucaggugaa gccuugcacu	780
	ccugaauiuu aucaaacaca cuuccagcug gcauuuaggu ugcagucucg gccucguggc	840
	cuagcacugg uguugagcaa ugugcacuuc acuggagaga aagaacugga auuucgcucu	900
	ggaggggaug uggaccacag uacucuaguc acccucuca agcuuuuggg cuaugacguc	960
	cauguucuaug gugaccagac ugcacaggaa augcaagaga aacugcagaa uuugcacag	1020
	uuaccugcac accgagucac ggacuccugc aucguggcac uccucucgca ugguguggag	1080
	ggcgccaucu auggugugga ugggaaacug cuccagcucc aagagguuuu ucagcucuuu	1140
	gacaacgcca acugccaag ccuacagaac aaaccaaaaa uguucucau ccaggccugc	1200
	cguggagaug agacugaucg uggguugac caacaagaug gaaagaacca cgcaggaucc	1260
[0002]	ccugggugcg aggagaguga ugccgguaaa gaaaaguugc cgaagaugag acugcccacg	1320
	cgucagaca ugauaugcgg cuaugccugc cucaaaggga cugccccaug gcggaacacc	1380
	aaacagguu ccugguacau cgaggcucu gcucaagugu uuucugagcg ggcuugugau	1440
	augcacgugg ccgacaugcu gguuaaggug aacgcacuaa ucaaggaucg ggaagguuau	1500
	gcuccggca cagaaucca ccggugcaag gagaugucug aauacugcag cacucuguc	1560
	cgccaccucu accuguuccc aggacaccu cccacaugau gucaccucc caucauccac	1620
	gccaagugga agccacugga ccacaggagg ugugauagag ccuuugaucu ucaggaugca	1680
	cgguuucugu ucugccccc cagggaugug ggaauccccc agacuuguuu ccugugcca	1740
	ucaucucugc cuuugagugu gggacuccag gccagcuccu uuucugugaa gccuuugcc	1800
	uguagagcca gccuugguug gaccuauugc caggauguu ucagcugcag uugaagagcc	1860
	ugacaaguga aguuguaaac acaguguggu uauggggaga gggcauuaa auucccaua	1920

	uuuguguuca guuccagcuu uuguagaugg cacuuuagug auugcuuuua uuacauuagu	1980
	uaagaugucu gagagaccuu cuccuauuuu uuauuucauu cauauccucc gccuuuuug	2040
	uccuagagug agaguuugga agguguccaa auuuuaugua gacauuauu uuuugcucug	2100
	aagaagcaaa caugacuaga gacgcacuu gcugcagugu ccagaagcgg ccugugcguu	2160
	cccuucagua cugcagcggc acccagugga aggacacucu uggcucguuu gggcucaagg	2220
	caccgcagcc ugucagccaa cauugccuug cauuguuacc uuauugaucu uugcccaugg	2280
	aagucucaaa gaucuuucgu ugguuguuuc ucugagcuuu guuacugaaa ugagccucgu	2340
	ggggagcauc agagaaggcc aggaagaauug guguguuucc cuagacucug uaaccaccuc	2400
	ucugucuuuu uccuuccuga gaaacgucca ucucucucc uuacuauucc cacuucauu	2460
	caaucaaccu gcacuucuaa ucuagauuuc uagaaaagcu uccuagcuua ucucccugcu	2520
	ucauauucuu ccuucuuuuu ccuucuuuuc auccuguugg cugcugccac caaauuguc	2580
[0003]	uagaauccug cuuuacagga ucauguuuuu gcucuuagau guuauuguagu ucuuuguucc	2640
	ugcuuuucuu uucaguauua aacucucuuu ugauuuuug uggcuuuuu uucagugcca	2700
	uacauguuuu uguuuuuaac cuagaaaccu uuauccucg uuauucugaaa cuucccaacu	2760
	ucccuguucu uuaagacuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugagacaga gucucgcucu	2820
	gucgccagg cuggagggca guggcacgau cucagcucac ugcaagcucc aacuccggg	2880
	uucagccau ucuccugccu cagccuucca aguagcuggg acuacaggug cccgccaccg	2940
	ugcccgccua auuuuuuuuu auuuuuuagua gagacagggg uucaccaugu uagccggggu	3000
	ggucuugauc uccugaccuc augauccacc caccucagcc ucccaaagug uugggauuac	3060
	aggcgugagc cacugcggc gggcaagacc uuuuuuuuuu aaaaaaaaaa aaaaaacuuc	3120
	cauucuuuuu uccuccaguc uguucucaca uaacagagua guuuugguuu uuauuuuuuu	3180
	uugguuguuu gcuguuuuuu guuuuuuuuag gugaguucuc acuauuuuuc ucagacuggu	3240

	cucgaacucc uggccucaag ccaucuucc gccucagccu cucaaauagc ugggcuuaca	3300
	ggcaugagcc accacaccug gccaggauuu gguuguuuua auauaaaucu gaucaccccc	3360
	cugcuuagaa ccuucugcu uucuauuacc ccucauuuaa aauguaaacu cuucaccuug	3420
	guuuauagaga acugguucuu gccuuccccu ugaaccucau uaaaugguga uuucuugcua	3480
	agcuccagcc cgaguggucu ccucucagcu ucuaauuuug ugcucuucc ugccuuuuuc	3540
	cugggccuuc ucagcucucc acccccacca cucuugacuc aggugguguc cuucuuccuc	3600
	aagucuugac aaaucccggg ccuucaguc ccugagcagu cuacuucugu gucugucacc	3660
	acaucuuguc uuuucccuc auugcauuua uugcaguuaa uauauaugcu acuuuuacu	3720
	gucauuucu gucucuccua ccaggcugua aaugaggca gaaaccuugu uuguuuuuuu	3780
	caccauag uaccaaugc uuggcacua gugggccuuc auuuuuuuuu uguugaauaa	3840
[0004]	aagaggaag aaggcaagc aaccuuagcu acauuccuac cuuuugauaa aauguuccu	3900
	uugacaauau acacggauua uuauuuguac uuuguuuuuu cauguguuuu gcuuuuaucc	3960
	acuggcauuu uuagcuccu gaagacauau caugugugag auuacuuccu ucacaucucc	4020
	caugguccu agcaaaugc uaggccugua guagucaagg ugcucaauaa auuuuuuuuu	4080
	gggugguuug ugagccuugc ugccaagucc ugccuuuggg ugcacauagu auggaaguau	4140
	uugagagaga gaaccuuucc acuccacug ccaggauuuu guauugccau cgggugccaa	4200
	auaaaugcuc auuuuuuuua cugaaaaaa aaaaaaaaa a	4241
	<210> 2	
	<211> 4023	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 2	
	uuuugucugu ccgccgagca cccacuua cccauugga ccgcgggcc gccguagag	60

	cucugcgccu gcgcacgcac cgggccgggg acuggguggc cuggugugug ggcgcggcag	120
	ggcgcaggcg caggcgcaqu gugcguccg gucuagggg agggaugugg gggaagcgac	180
	ggccccgggu uuguuugggc ugugggcggg gcgcagcggg gagccccgga aaagcgggaa	240
	auggcggcgc cgagcgcggg gucuuggucc accuuccagc acaaggagcu gauggccgcu	300
	gacaggggac gcaggauauu gggagugugu ggcaugcauc cucaucauca ggaaacucua	360
	aaaaagaacc gaguggugcu agccaaacag cuguuguuga gcgaauguu agaacaucuu	420
	cuggagaagg acaucaucac cuuggaaaug agggagcuca uccaggccaa agugggcagu	480
	uucagccaga auguggaacu ccucaacuug cugccuaaga ggggucucca agcuuuugau	540
	gccuucugug aagccuugca cuccugaauu uuaucaaca cacuuccagc uggcauauag	600
	guugcagucu cggccucgug gccuagcacu gguguugagc aaugugcacu ucacuggaga	660
	gaaagaacug gaauuucgcu cuggagggga uguggaccac aguacucuag ucaccucuu	720
[0005]	caagcuuuug ggcuaugacg uccauguucu augugaccag acugcacagg aaaugcaaga	780
	gaaacugcag aauuuugcac aguuaccugc acaccgaguc acggacuccu gcaucguggc	840
	acuccucugc cauggugugg agggcgccau cuauggugug gaugggaaac ugcuccagcu	900
	ccaagagguu uuucagcucu uugacaacgc caacugccca agccuacaga acaaacaaa	960
	aauguucuuc auccaggccu gccguggaga ugagacugau cgugggguug accaacaaga	1020
	uggaaagaac cacgcaggau cccugggug cgaggagagu gaugccggua aagaaaagu	1080
	gccgaagaug agacugccca cgcgcucaga caugauaugc ggcuangccu gccucaaaag	1140
	gacugccgcc augcggaaca ccaaagagg uuccugguac aucgaggcuc uugcucaagu	1200
	guuuucugag cgggcuugug auaugcacgu ggccgacaug cugguuuagg ugaacgcacu	1260
	uaucaaggau cgggaagguu augcuccugg cacagaauc caccggugca aggagaugc	1320
	ugaauacugc agcacucugu gccgccaccu cuaccuguuc ccaggacacc cucccacau	1380

	augucaccuc cccaucucc acgccaagug gaagccacug gaccacagga ggugugauag	1440
	agccuuugau cuucaggaug cacgguuucu guucugcccc cucaggaug ugggaaucuc	1500
	ccagacuugu uuccugugcc caucaucucu gccuuugagu gugggacucc aggccagcuc	1560
	cuuuucugug aagcccuuug ccuguagagc cagccuuggu uggaccuauu gccaggaug	1620
	uuucagcugc aguugaagag ccugacaagu gaaguuguaa acacagugug guuaugggga	1680
	gagggcauau aaauucccca uuuuuguguu caguuccagc uuuuguagau ggcacuuuag	1740
	ugauugcuuu uauuacauua guuaagaugu cugagagacc aucuccuauc uuuuauuua	1800
	uucauauccu ccgccuuuu uguccuagag ugagaguug gaaggugucc aaauuaaug	1860
	uagacauuau cuuuuggcuc ugaagaagca aacaugacia gagacgcacc uugcugcagu	1920
	guccagaagc ggccugugcg uucccuucag uacugcagcg ccaccagug gaaggacacu	1980
	cuuggcucgu uugggcuaa ggcaccgag ccugucagcc acauugccu ugcauuugua	2040
[0006]	ccuuauugau cuuugcccau ggaagucua aagaucuuuc guugguuguu ucucugagcu	2100
	uuguuacuga aaugagccuc guggggagca ucagagaagg ccaggaagaa ugguguguuu	2160
	ccuagacuc uguaaccacc ucucugucu uuuccuuccu gagaacguc caucucucuc	2220
	ccuacuauu cccacuua uucaauaac cugcacuua uaucuagau ucuagaaaag	2280
	cuuccuagcu uaucuccug cuucauacu cucccuucu uaccuauu ucauccuguu	2340
	ggcugcugcc accaaaucug ucuagaaucc ugcuuuacag gaucauguaa augcucaaag	2400
	auguaaugua guucuuuguu ccugcuucu cuucaguuu uaaacucucc uuugauaua	2460
	uguggcuuuu auuucagugc cauacauguu auuguuuuca accuagaaac cuuuauccu	2520
	gcuuaucuga aacuuccca cuucccuguu cuuuuagacu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	2580
	uuuugagaca gagucugcu cugucgcca ggcuggaggg caguggcacg aucucagcuc	2640
	acugcaagcu ccaacucccg gguucagcc auucuccugc cucagccuuc caaguagcug	2700

	ggacuacagg ugccccccac cgugcccggc uaauuuuuuu guauuuuuuag uagagacagg	2760
	guuucaccau guuagccggg auggucuuga ucuccugacc ucaugaucca cccaccucag	2820
	ccuccaaaag uguugggauu acaggcguga gccacugcgc ccgggcaaga ccuuuuuuua	2880
	aaaaaaaaa aaaaaaacu uccauucuuu cuuccuccag ucuguucuca cauaacagag	2940
	uaguuuuggu uuuuaauuuu uuuugguuugu uugcuguuuu uuguuuuuua aggugaguuc	3000
	ucacuauguu ucucagacug gucucgaacu ccuggccuca agccaucuuu ccgccucagc	3060
	cucuaaaaua gcugggcuua caggcaugag ccaccacacc uggccaggau uugguuguuu	3120
	aaauaauaau cigaucaccc ccugcuuag aaccuucug cuuucuaaua cccucauuu	3180
	aaaauaaua cucuucaccu ugguuuauga gaacugguuc uugccuucc cuugaaccuc	3240
	auuaaauggu gauuuuugc uaagcuccag ccgaguggu cuccucucag cuucuaauu	3300
[0007]	ugugcucuuu ccugccuuu uccugggcu ucucagcucu ccacccccac cacucuugac	3360
	ucagggugug uccuucuuu ucaagucuuu acauuuccg ggcccuucag uccugagca	3420
	gucuacuucu gugucuguca ccacaucuug ucuuuuccc ucauugcauu uauugcaguu	3480
	uauauauaug cuacuuuuac uuguucauuu cugucuccc uaccaggcug uaaaugaggg	3540
	cagaaaccuu guuuguuuua uucaccauca uguaccaagu gcuuggcaca uagugggcu	3600
	ucauuuuuug uuuguugaau aaaagaggga agaaggcaag ccaaccuuag cuacaauccu	3660
	accuuuugau aaaauguucc uuugacaau auacacggau uauuuuuugu acuuuguuuu	3720
	uccauguguu uugcuuuuuu ccacuggcau uuuuagcucc uugaagcau aucaugugug	3780
	agauaacuuc cuucacauu cccauggucc cuagcaaaau gcuaggccug uaguagucua	3840
	ggugcucaau aaauuuuuu uugggugguu ugugagccuu gcugccaagu ccugccuuug	3900
	ggucgacuaa guauggaagu auuugagaga gagaaccuuu ccacuccac ugccaggauu	3960
	uuguauugcc aucgggugcc aaauuuuugc ucauuuuuu uacugaaaaa aaaaaaaaaa	4020

aaa	4023
<210> 3	
<211> 4057	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 3	
agaggaagag aacgauuuuaa ggagcgaaaua cuacugguaa acuaauggaa gaaaucugcu	60
gcaccacugg auauugggag uguguggcau gcauccucau caucaggaaa cucuaaaaaa	120
gaaccgagug gugcuagcca aacagcuguu guugagcgaa uuguuagaac aucuucugga	180
gaaggacauc aucaccuugg aaaugaggga gcucauccag gccaaagugg gcaguucag	240
ccagaaugug gaacuccuca acuugcugcc uaagaggggu cccaagcuu uugaugccuu	300
cugugaagca cugagggaga ccaagcaagg ccaccuggag gauauguugc ucaccaccu	360
[0008] uucugggcuu cagcauguac ucccaccguu gagcugugac uacgacuuga gucuccuuu	420
uccggugugu gaguccugc cccuuuaca gaagcuccgc cugucgacag auacugugga	480
acacuccua gacaauaaag augguccugu cugccuucag gugaagccuu gcacuccga	540
auuuuaaca acacacuucc agcuggcaua uagguugcag ucucggccuc guggccuagc	600
acugguguug agcaauguc acuucacugg agagaagaa cuggaauuuc gcucuggagg	660
ggauuggac cacaguacuc uagucaccu cuucaagcuu uugggcuau aguccaugu	720
ucuaugugac cagacugcag aggaaugca agagaacug cagaauuuug cacaguuacc	780
ugcacaccga gucacggacu ccugcaucgu ggcacuccuc ucgcauggug uggagggcgc	840
caucuauggu guggauggga aacugcucca gcuccaagag guuuuucagc ucuuugaca	900
cgccaacugc ccaagccuac agaacaacc aaaauguuc uucauccagg ccugccgugg	960
aggugcuauu ggaucccuug ggcaccuccu ucuguucacu gcugccaccg ccucucuugc	1020
ucuaugagac ugaucguggg guugaccaac aagauggaaa gaaccacgca ggaucccuug	1080

	ggugcgagga gagugaugcc gguaaagaaa aguugccgaa gaugagacug cccacgcgu	1140
	cagacaugau augcggcuau gccugccuca aagggacugc cgccaugcgg aacaccaaac	1200
	gagguuccug guacaucgag gcucuugcuc aaguguuuuc ugagcgggcu ugugauaugc	1260
	acguggccga caugcugguu aaggugaacg cacuuaucaa ggauccggaa gguaugcuc	1320
	cuggcacaga auuccaccgg ugcaaggaga ugucugaaua cugcagcacu cugugccgc	1380
	accucuaccu guucccagga caccucucca caugaugua ccucccauc auccagcca	1440
	aguggaagcc acuggaccac aggaggugug auagagccuu ugaucuucag gaugcacggu	1500
	uucuguucug ccccucagg gaugugggaa ucucccagac uuguuuccug ugcccacau	1560
	cucugccuuu gaguguggga cuccaggcca gcuccuuuc ugugaagccc uuugccgua	1620
	gagccagccu ugguuggacc uauugccagg aauguuucag cugcaguuga agagccugac	1680
	aagugaaguu guaaacacag ugugguuau gggagagggc auauaaauc cccauuuug	1740
[0009]	uguucaguuc cagcuuuugu agauggcacu uuagugauug cuuuuuuac auuaguuag	1800
	augucugaga gaccaucucc uaucuuuuu uucauucua uccuccgcc uuuuuguccu	1860
	agagugagag uuuggaaggu guccaaauuu aauguagaca uuaucuuuug gcucugaaga	1920
	agcaaacaug acuagagacg caccuugcug caguguccag aagcggccug ugcguuccu	1980
	ucaguacugc agcggcacc aguggaagga cacucuuggc ucguuugggc ucaaggcacc	2040
	gcagccuguc agccaacauu gccuugcauu uguaccuuau ugaucuuugc ccauggaagu	2100
	cuaaagauc uuucguuggu uguuucucug agcuuuguua cugaaaugag ccucguggg	2160
	agcaucagag aaggccagga agaauaggugu guuuccuag acucuguaac caccucucug	2220
	ucuuuuuccu uccugagaaa cguccaucuc ucuccuuac uauuccacu uucauucuu	2280
	caaccugcac uucauucua gauuucuaa aaagcuuccu agcuuauuc ccugcuucau	2340
	aucucuccu ucuuuaccu cauucucc uguuggcugc ugccacaaa ucugucuaga	2400

	auccugcuuu acaggaucau guaaaugcuc aaagauguaa uguaguucuu uguuccugcu	2460
	uucucuuuca guauuaaacu cuccuuugau auuauguggc uuuuuuuuca gugccauaca	2520
	uguuuuuuu uucaaccuag aaaccuuuuu cccugcuuuu cugaaacuuc ccaacuuccc	2580
	uguucuuuaa gacuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuga gacagagucu cgcucugucg	2640
	cccaggcugg agggcagugg cacgaucuca gcucacugca agcuccaacu cccggguuca	2700
	cgccauucuc cugccucagc cuuccaagua gcugggacua caggugcccg ccaccgugcc	2760
	cggcuaauuu uuuuguauuu uuaguagaga caggguuuca ccauguuagc cgggaugguc	2820
	uugaucuccu gaccucauga uccaccacc ucagccuccc aaaguguugg gauuacaggc	2880
	gugagccacu gcgcccgggc aagaccuuuu uuuuuuuuuu aaaaaaaaa aacuuccauu	2940
	cuuucuccu ccagucuguu cucacauaac agaguaguuu ugguuuuuuu uuuuuuuugg	3000
	uuguuugcug uuuuuuguuu uuuuagguga guucucacua uguuucucag acuggucucg	3060
[0010]	aacuccuggc cucaagccau cuucccgccu cagccucua auuagcuggg cuuacaggca	3120
	ugagccacca caccuggcca ggauuugguu guuuuuuuu aaucugauc acccccugc	3180
	uuagaaccu ucugcuuuu auuaccucc auuuuuuuu uaaacucuc accuugguuu	3240
	augagaacug guucugccu ucccuugaa ccucauuuuu uggugauuuc uugcuagcu	3300
	ccagcccag uggucuccuc ucagcuucua auuuugugcu cuuuccugcc cuuuuccugg	3360
	gccuucucag cucuccacc ccaccacuc ugacucaggu gguguccuuc uuccucaagu	3420
	cuugacaauu cccgggccc ucaguccug agcaguciac uucuguguc gucaccacau	3480
	cuugucuuuu cccucuuug cauuuuuugc aguuuuuuu uaugcuacu uacuuguuc	3540
	auuucuguc cccuaccag gcuguuuuu agggcagaaa ccuuguuuu uuuuuuucc	3600
	aucauguacc aagucuuug cacauagugg gccuucuuu aauguuuuu gaauuuuaga	3660
	gggaagaagg caagccaacc uuagcuaca uccuaccuuu ugauuuuuu uuccuuuuga	3720

	caauauacac ggauuuuuau uuguacuuug uuuuuccaug uguuuugcuu uuauccacug	3780
	gcuuuuuuag cuccuugaag acauaucaug ugugagauaa cuuccuucac aucuccaag	3840
	gucccuagca aaaugcuagg ccuguaguag ucaaggugcu cauuuuuuau uuguuuuggu	3900
	gguuuugag ccuugcugcc aaguccugcc uuugggucga cauaguaugg aaguauuuga	3960
	gagagagaac cuuuccacuc ccacugccag gauuuuguau ugccaucggg ugccaaauaa	4020
	augcucauau uuauuacuga aaaaaaaaa aaaaaaa	4057
	<210> 4	
	<211> 4057	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 4	
[0011]	agaggaagag aacgauuuuaa ggagcgaaua cuacugguaa acuaauggaa gaaucugcu	60
	gcaccacugg auauugggag uguguggcau gcauccucau caucaggaaa cucuaaaaaa	120
	gaaccgagug gugcuagcca aacagcuguu guugagcga uuguuagaac aucuucugga	180
	gaaggacauc aucaccuugg aaugaggga gcucauccag gccaauggg gcaguucag	240
	ccagaaugug gaacuccuca acuugcugcc uaagaggggu cccaagcuu uugaugccuu	300
	cugugaagca cugagggaga ccaagcaagg ccaccuggag gauauguugc ucaccaccu	360
	uucugggcuu cagcauguac ucccaccguu gagcugugac uacgacuuga gucuccuuu	420
	uccggugugu gaguccuguc ccuuuacaa gaagcuccgc cugucgacag auacugugga	480
	acacuccua gacaauaaag auggucugu cugccuucag gugaagccuu gcacuccuga	540
	auuuuuacaa acacacuucc agcuggcaua uagguugcag ucucggccuc guggccuagc	600
	acugguguug agcaauguc acuucacugg agagaaaga cuggaauuuc gcucuggagg	660
	ggauguggac cacaguacuc uagucaccu cuucaagcuu uugggcuaug acguccaugu	720

	ucuaugugac cagacugcac aggaaaugca agagaaacug cagaauuuug cacaguuacc	780
	ugcacaccga gucacggacu ccugcaucgu ggcacuccuc ucgcauggug uggagggcgc	840
	caucuauggu guggauggga aacugcucca gcuccaagag guuuuucagc uuuugacaa	900
	cgccaacugc ccaagccuac agaacaaacc aaaaanguuc uucauccagg ccugccgugg	960
	aggugcuauu ggaucccuug ggcaccuccu ucuguucacu gcugccaccg ccucucuugc	1020
	ucuaugagac ugaucguggg guugaccaac aagauggaaa gaaccacgca ggaucccuug	1080
	ggugcgagga gagugaugcc gguaaagaaa aguugccgaa gaugagacug cccacgcgcu	1140
	cagacaugau augcggcuau gccugccuca aagggacugc cgccaugcgg aacaccaaac	1200
	gagguuccug guacaucgag gcucuugcuc aaguguuuuc ugagcgggcu ugugauaugc	1260
	acguggccga caugcugguu aaggugaacg cacuuaucaa ggauccggaa gguuauugcuc	1320
	cuggcacaga auuccaccgg ugcaaggaga ugucugaaua cugcagcacu cugugccgcc	1380
[0012]	accucuaccu guucccagga caccuccca caugauguca ccucccauc auccagcca	1440
	aguggaagcc acuggaccac aggaggugug auagagccuu ugaucuucag gaugcacggu	1500
	uucuguucug cccucucagg gaugugggaa ucuccagac uuguuuccug ugcccaucau	1560
	cucugccuuu gaguguggga cuccaggcca gcuccuuuuc ugugaagccc uuugccgua	1620
	gagccagccu ugguuggacc uauugccagg aauguuucag cugcaguuga agagccugac	1680
	aagugaaguu guaaacacag ugugguuau gggagagggc auauaaauc ccuauuuug	1740
	uguucaguuc cagcuuuugu agauggcacu uuagugauug cuuuuuuac auuaguuuag	1800
	augucugaga gaccaucucc uaucuuuuau uucauucaua uccuccgcc uuuuuguccu	1860
	agagugagag uuuggaaggu guccaaaauu aauguagaca uuauuuuuug gcucugaaga	1920
	agcaacaug acuagagacg caccuugcug caguguccag aagcggccug ugcguuccu	1980
	ucaguacugc agcggcacc aguggaagga cacucuuggc ucguuugggc ucaaggcacc	2040

	gcagccuguc agccaacauu gccuugcauu uguaccuuau ugaucuuugc ccauggaagu	2100
	cucaaagauc uuucguuggu uguuucucug agcuuuguua cugaaaugag ccucgugggg	2160
	agcaucagag aagggcagga agaauaggugu guuuccuag acucuguaac caccucucug	2220
	ucuuuuuccu uccugagaaa cguccaucuc ucucuccuac uauuccacu uucauuaau	2280
	caaccugcac uucauauca gauuucuaga aaagcuuccu agcuuauuc ccugcuuau	2340
	aucucuccu ucuuuaccuu cauuaucucc uguuggcugc ugccacaaa ucugucuaga	2400
	auccugcuuu acaggaucau guaaaugcuc aaagauguaa uguaguucuu uguuccugcu	2460
	uucucuuaa guuuuuuuu cuccuuugau auuauguggc uuuuuuuuca gugccauaca	2520
	uguuuuuguu uucaaccuag aaaccuuuuu ccucuguuau cugaaacuuc ccaacuucc	2580
	uguucuuuaa gacuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuga gacagagucu cgcucugucg	2640
	cccaggcugg agggcagugg cacgaucua gcucacugca agcuccaacu cccggguuca	2700
[0013]	cgccauucuc cugccucagc cuccaagua gcugggacua caggugcccg ccaccugcc	2760
	cggcuaauuu uuuguuuuu uuaguagaga caggguuca ccauguuagc cgggaugguc	2820
	uugaucuccu gaccucauga uccaccacc ucagccucc aaaguguugg gauuacaggc	2880
	gugagccacu gcgcccgggc aagaccuuuu uuuaaaaaa aaaaaaaaa aacuuccauu	2940
	cuuucuccu ccagucuguu cucacuaac agaguuuuu ugguuuuua uuuuuuuugg	3000
	uuguuugcug uuuuuuuuu uuuaagguga guucucacua uguuucucag acuggucug	3060
	aacuccugc cucaagccau cuuccgccu cagccucua aauagcuggg cuuacaggca	3120
	ugagccacca caccuggcca ggauuugguu guuuuuuuu aaucugauc acccccugc	3180
	uuagaaccu ucugcuuuc auuaccucc auuuuuuuu uaaacucuc accuuguuu	3240
	augagaacug guucuuuccu ucccuugaa ccucauuuu ugguguuuc uugcuagcu	3300
	ccagcccagc uggucuccuc ucagcuucua auuuuuguc cuuuccgcc cuuuuccgg	3360

	gccuucucag cucuccaccc ccaccacucu ugacucaggu gguguccuuc uuccucaagu	3420
	cuugacaauu cccgggcccu ucagucccug agcagucuac uucugugucu gucaccacau	3480
	cuugucuuuu cccucacuug cauuuauugc aguuuauua uaugcuacu uuaucuguuc	3540
	auucugucu cccuaccag gcuguaaaug agggcagaaa ccuuguuugu uuuauucacc	3600
	aucauguacc aagugcuugg cacauagugg gccuacaua aauguuuguu gaauaaaaga	3660
	gggaagaagg caagccaacc uuagcuaca uccuaccuuu ugauaaaug uuccuuuga	3720
	cauuauacac ggauuuuuu uuguacuug uuuuuccaug uguuuugcu uuauccacug	3780
	gcuuuuuag cuccuugaag acauaucaug ugugagaua cuuccuucac aucuccaug	3840
	gucccuagca aaaugcuagg ccuguaguag ucaaggugcu cauaaaauu uuguuugggu	3900
	gguuugugag ccuugcugcc aaguccugcc uuugggucga cauaguauug aaguauuga	3960
	gagagagaac cuuuccacuc ccacugccag gauuuuguau ugccaucggg ugccaaaua	4020
[0014]	augcucauau uuauuacuga aaaaaaaaa aaaaaa	4057
	<210> 5	
	<211> 1492	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 5	
	cgggcgacag cagggccgcg gugcaguguc cgaccgaga guugcgccu gagucaccgg	60
	cccccccuc cggagccgga cgcugcggga ggcccgggag cggcagugga accgacucc	120
	agaacuccgg acgugugcgg cgagugagu cgagccaug uuccugguu acucguucu	180
	gaagggcggc ggcggcggcg gcggggagg cggggccug gguggggcc ugghaaugu	240
	gcuuggaggc cugaucagcg gggccggggg cggcggcggc ggcggcggcg gcggcggcg	300
	ugguggaggc ggcggugcgg guggaacggc caucgcauc cuaggcggag ucaucagcg	360
	caucagcggag gcggcugcgc aguacaacc ggagccccg cccccagca cacauuacuc	420

	caacauugag gccaacgaga gugaggaggu ccggcaguuc cggagacucu uugcccagcu	480
	ggcuggagau gacauggagg ucagcgccac agaacucaug aacauucuca auaagguugu	540
	gacacgacac ccugaucuga agacugaugg uuuuggcauu gacacauguc gcagcauggu	600
	ggccgugaug gauagcgaca ccacaggcaa gcugggcuuu gaggaauuca aguacuugug	660
	gaacaacauc aaaagguggc aggccauaua caaacaguuc gacacugacc gaucaggac	720
	cauuugcagu agugaacucc caggugccuu ugaggcagca ggguuccacc ugaauagca	780
	ucucuauaac augaucaucc gacgcuacuc agauggaaugu gggaacaugg auuuugacaa	840
	cuucaucagc ugcuugguca ggcuaggacg cauguuccgu gccuucuuuu cucuugacaa	900
	agauggcacu ggacaaaucc aggugaacau ccaggagugg cucgagcuga cuauguauuc	960
	cugaacugga gccccagacc cgccccuca cugccuugcu auaggaguca ccuggagccu	1020
	eggucucucc cagggccgau ccugucugca gucaucauu uguggggccu gcugaccac	1080
[0015]	aagcuuuugu ucucucagua cuuguuacc agcuucuaa cauccagggc ccauuugcc	1140
	cugccuggag uuuuuuugg cucuaggaca cucuaacaag cucuguccac gggucucucc	1200
	auuccacca gcccugcac acaccacuc cguaacucuu cccuguaacc ugugccaagc	1260
	cuagcacuug ugaugccucc augccccgag gcccucucu caguucuggg aggaugacuc	1320
	caguuccugc acgccuggc acaccuuca cgguugcuac ccaggcggcc aagcuccaga	1380
	ccgugccaga cccaggugcc ccagugccuu ugucuauuuu cugcuccag ccugccagc	1440
	ccaggaggaa auaacaugc cccaguugcu gaucucuaaa aaaaaaaaaa aa	1492
	<210> 6	
	<211> 1200	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 6	

	cgggcgacag cagggcccg ggcaggccga cccgagaggg gcccgagcac cggccccgcc	60
	cccgagccg gacgcgcggg agggccggga gcggcaggga accgaccca gaacccggac	120
	gggcggcgga ggcagccag ccggaaccgc gaaggcggc ggcgccggcg gcgggggagg	180
	cgggggccgg gggggccgg gaaaggcgg ggcgacagc ggggcccggg gcggcggcg	240
	cggcggcggc ggcgccggcg gggggaggcg gcggggcggg gaacggccag cgcaccaggc	300
	ggagcacagc gccacagcga ggcgccgcgc agacaaccg gagccccgc ccccacgac	360
	acaaccaac agaggccaac gagaggagga ggccggcagc cggagaccgc ccagcggcgg	420
	agagacagga ggcagccca cagaaccaga acacaaaag gggacacgac acccgacgaa	480
	gacgaggggc agacacagcg cagcaggggc cggaggaagc gacaccacag gcaagcggc	540
	gaggaacaag acgggaaca cacaaggcg gcaggccaaa caaacagcga cagcaccgac	600
	agggaccagc agaggaaacc cagggccgag gcagcaggc caccgaagag caccaaacg	660
[0016]	acaccgacgc accagagaaa ggggaacagg agacaaccac agcgcggcag gcggacgcca	720
	gccggcccaa accgacaaag aggcacggac aaaccaggga acaccaggag ggcgacgca	780
	cagaccgaac ggagccccag accgcccc cagccgcaa ggagcaccgg agcccggccc	840
	ccagggccga ccgcgacga cacgggggcc gcgaccaca agcggccaga cgaccagcc	900
	caacaccagg gccaagccc gccggagccc ccggccagga caccaacaag ccgccacggg	960
	ccccaccca ccaggcccc acacaccac ccgaaccccc ccgaccggc aagccagcac	1020
	ggagccccag ccccgagggc ccccagcgg gaggagacc agccgcacg cccggcacac	1080
	cccacggca cccaggcggc caagcccaga ccggccagac ccaggcccc aggccgaac	1140
	gccccagccg ccaggcccag gaggaaaaa cagccccagg cgacaaaaa aaaaaaaaaa	1200
	<210> 7	
	<211> 1925	
	<212> RNA	

	<213> 智人	
	<400> 7	
	uggaugagcu gugagugcgc gcgcgugcgc ggggccgcga ccugugccgg cucgagcccg	60
	cugggcacuc ggagggcgcg acgucguucc ccgccuccc gccgcccgc gccucgcuc	120
	ucucgcgcu cccuccgcc gccgcgguc cuccgucggu ucucgguu guccacgguc	180
	uggucuucag cuaccgccu ucgucuccga guuugcgacu cgcggaccgg cgucgccggc	240
	gcgaagaggc uggacucgga uucguugccu gagcaauggc ugccaucggg aagaaacugg	300
	ugauuguugg ugauggagcc uguggaaga caugcuugcu cauagucuuc agcaaggacc	360
	aguucccaga gguguaugug cccacagugu uugagaacua uguggcagau aucgaggugg	420
	auggaaagca gguagaguug gcuuuguggg acacagcugg gcaggaagau uaugaucgcc	480
	ugaggcccu cuccuacca gauaccgaug uuauacugau guuuuuucc aucgacgcc	540
[0017]	cugauaguuu aaaaaauc ccagaaaagu ggaccccaga agucaagcau uucugucca	600
	acgugccau cauccgguu gggaauaaga aggaucuucg gaaugaugag cacacaaggc	660
	gggagcuagc caaugaag caggagccgg ugaaaccuga agaagcaga gauauggcaa	720
	acaggauugg cgcuuuuggg uacauaggagu guucagcaa gaccaaagau ggagugagag	780
	agguuuuga aauggcuacg agagcugcuc ugcaagcuag acgugggag aaaaaucug	840
	ggugccuugu cuugugaaac cuugcugcaa gcacagccu uaugcgguu auuugaagu	900
	gcguuuuuu aaucuagug uauguuacu ggccuuuuu auuuaucau aauuuaccua	960
	agauuacaaa ucagaaguc ucuugcuacc aguauuuga agccaacua gauuuuaac	1020
	gauguccaac ccgucuggcc caccagguc cuuuugacac ugcucuaaca gccuccucu	1080
	gcacuccac cugacacacc aggcgcuaau ucaaggaau ucuaacuuc uugcuuuu	1140
	cuagaaagag aaacaguugg uaacuuuugu gaauuaggcu gaaacuacu uauaacuaac	1200
	auguccgcc uuuuucug cagcugcaag guacucuggu gagucaccac uucaggccu	1260

	uacuccguaa cagauuuugu uggcrauagcu cugggguggg caguuuuuug aaaaugggcu	1320
	caaccagaaa agcccaaguu caugcagcug uggcagaguu acaguucugu gguuucaugu	1380
	uaguuaccuu auaguuacug uguauuuagu gccacuuauu guauguuacc aaaaauaaau	1440
	auaucuacc cagacuagau guaguauuuu uuguauaaau ggauuuucca auacugucau	1500
	ccucaaaaga aguguauugg uuuuuuaaaa aagaagugu auuuggaaa aaagucagau	1560
	ggaaaauua uuuuuuaaa ucccguuuug ucacuuuuuc uguaaaaaga uggccauuu	1620
	acccuuuuuc ggccccaugu aucucaguac cccauggagc ugggcuaagu aaauaggaau	1680
	ugguuucacg ccugaggcaa uuagacacuu uggaagugg cauaaccugu cucaccugga	1740
	cuuaagcauc uggcucuaau ucacagugcu cuuuucuccu cacuguauc agguuccuc	1800
	ccagaggagc caccaguucu caugggugc acucagucuc ucuucucucc agcugacuaa	1860
	acuuuuuuuc uguaccaguu aauuuuucca acuacuaaua gaauaaaggc aguuuucuaa	1920
[0018]	aaaaa	1925
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 化学合成	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 与位置 1(5')核糖核苷酸共价连接的任选加帽部分	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19)..(19)	
	<223> 与位置 19(3')核糖核苷酸共价连接的任选 3'突出部分	

<400> 8
gccagaaugu ggaacuccu 19

<210> 9
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 与位置 19(3')核糖核苷酸共价连接的任选加帽部分

<400> 9
aggaguucca caucuggc 19

[0019]

<210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成

<400> 10
uccuggaacu ucacaugaa 19

<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 化学合成

<400> 11

	uucaugugaa guuccagga	19
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 化学合成	
	<400> 12	
	gcuacagaac ucaugaaua	19
	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
[0020]	<223> 化学合成	
	<400> 13	
	uauucaugag uucuguagc	19
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 化学合成	
	<400> 14	
	gccacuuaau guauguuac	19
	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	

	<220>		
	<223>	化学合成	
	<400>	15	
		guaacauaca uuaaguggc	19
	<210>	16	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	化学合成	
	<400>	16	
		ggcuacgucc aggagcgcac c	21
	<210>	17	
	<211>	21	
[0021]	<212>	RNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	化学合成	
	<400>	17	
		ggugcgcuucc uggacguagc c	21
	<210>	18	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	化学合成	
	<400>	18	
		gcacuccuga auuuuauca	19
	<210>	19	

<211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <400> 19
 ugauaaaauu caggagugc 19

<210> 20
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <400> 20
 gcacaggaaa ugcaagaga 19

[0022]

<210> 21
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <400> 21
 ucucuugcau uuccugugc 19

<210> 22
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <400> 22

	gggcuuguga uaugcacgu	19
	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 化学合成	
	<400> 23	
	acgugcauau cacaagccc	19
	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
[0023]	<223> 化学合成	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 与位置 1(5')核糖核苷酸共价连接的任选加帽部分	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
	<223> L-脱氧胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19)..(19)	
	<223> 与位置 19(3')核糖核苷酸共价连接的任选 3'突出部分	
	<400> 24	
	gccagaaugu ggaacuccu	19
	<210> 25	

<211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 链包含至少五(5)个交替的未经修饰和经 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 与位置 9(3')核糖核苷酸共价连接的任选加帽部分

 <400> 25
 aggaguucca caucuggc 19

[0024]

<210> 26
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 化学合成

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 与位置 1(5')核糖核苷酸共价连接的反向脱氧脱碱基部分

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> L-脱氧胞苷

 <400> 26
 gccagaaugu ggaacuccu 19

- <210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工
- <220>
<223> 化学合成
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- [0025] <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(17)..(17)
	<223>	2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
[0026]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(19)..(19)
	<223>	2'O-甲基糖修饰的核糖核苷酸
	<400>	27
	aggaguucca caucuggc	19

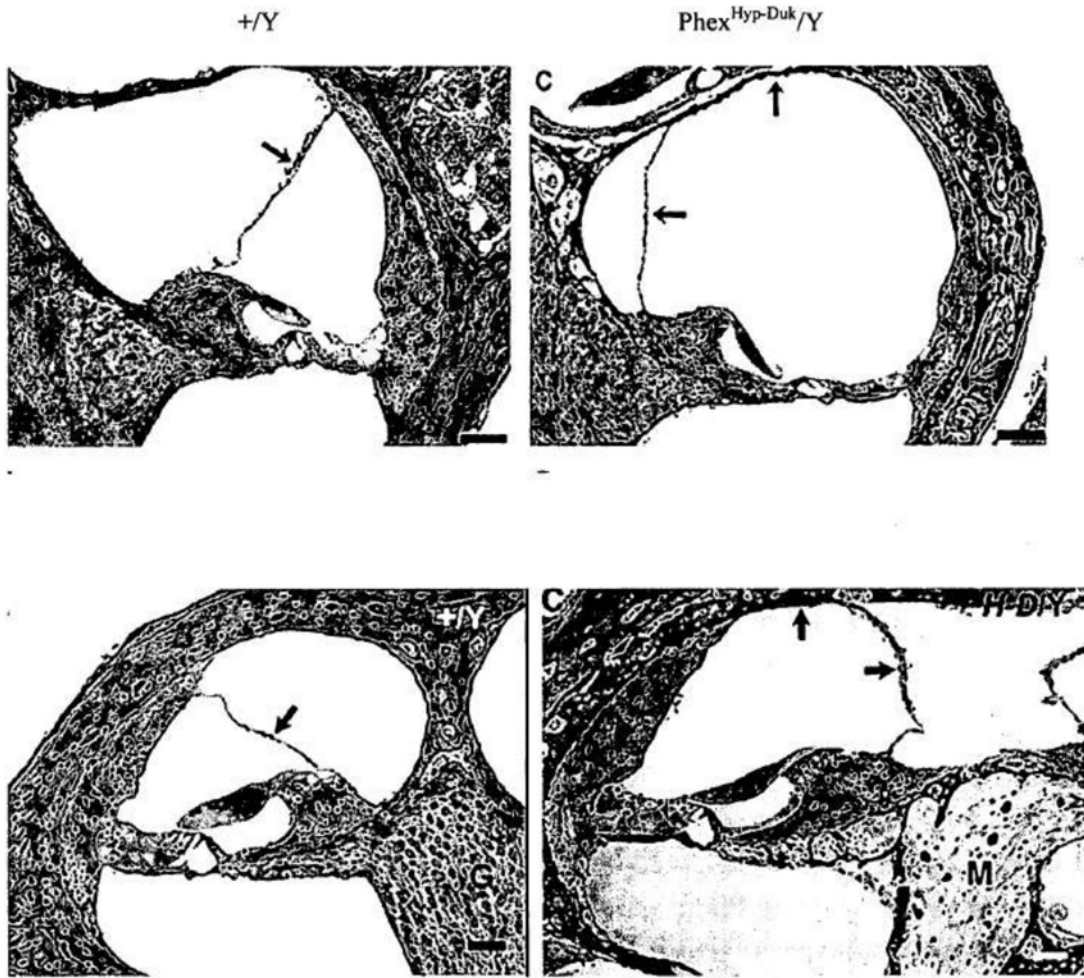


图1

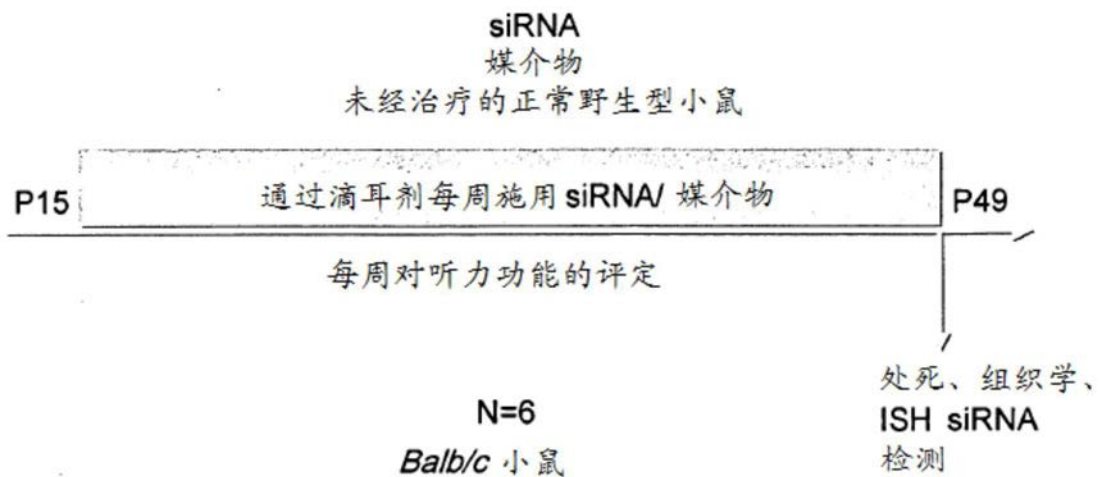


图2

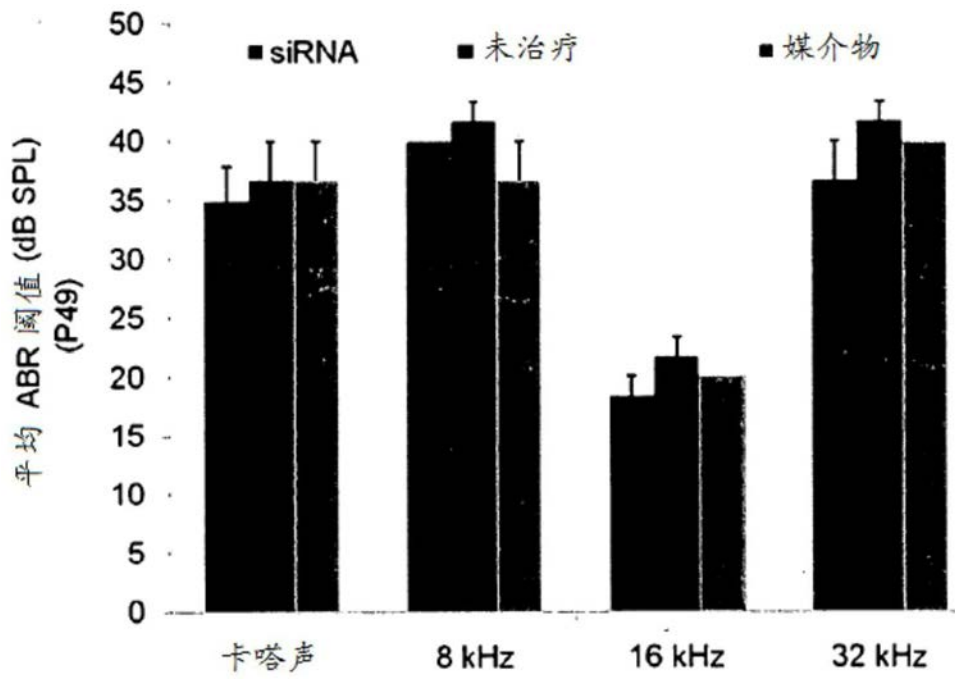


图3

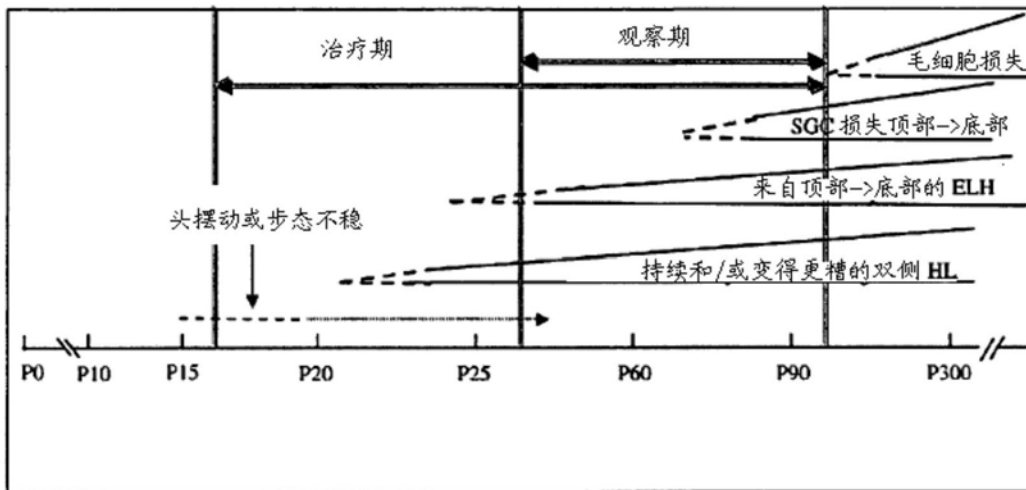


图4A



图4B

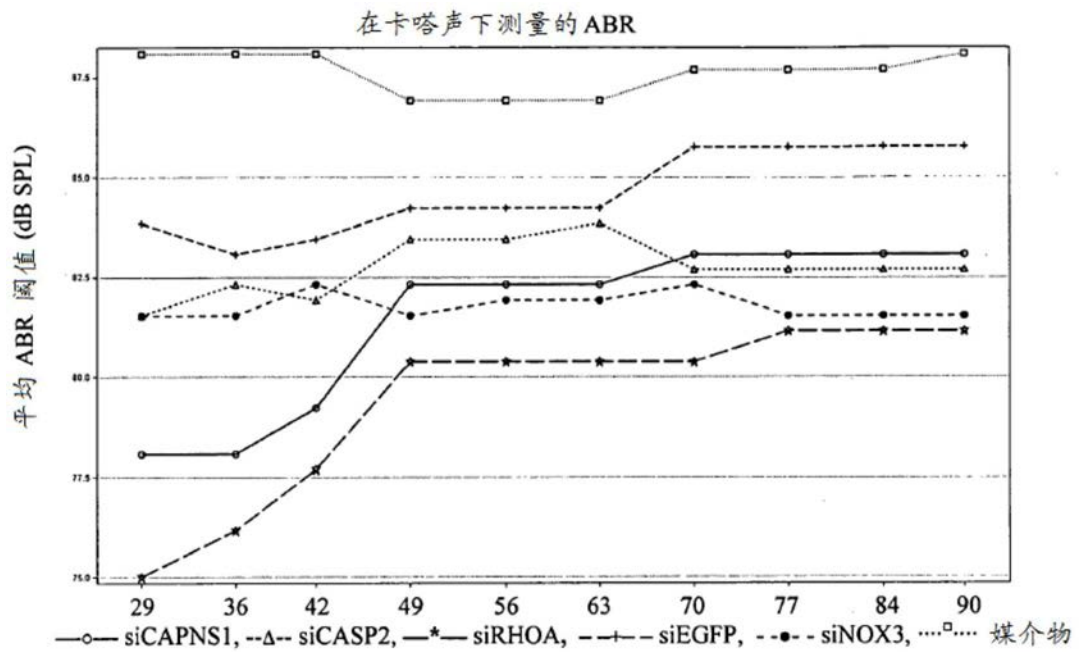


图5A

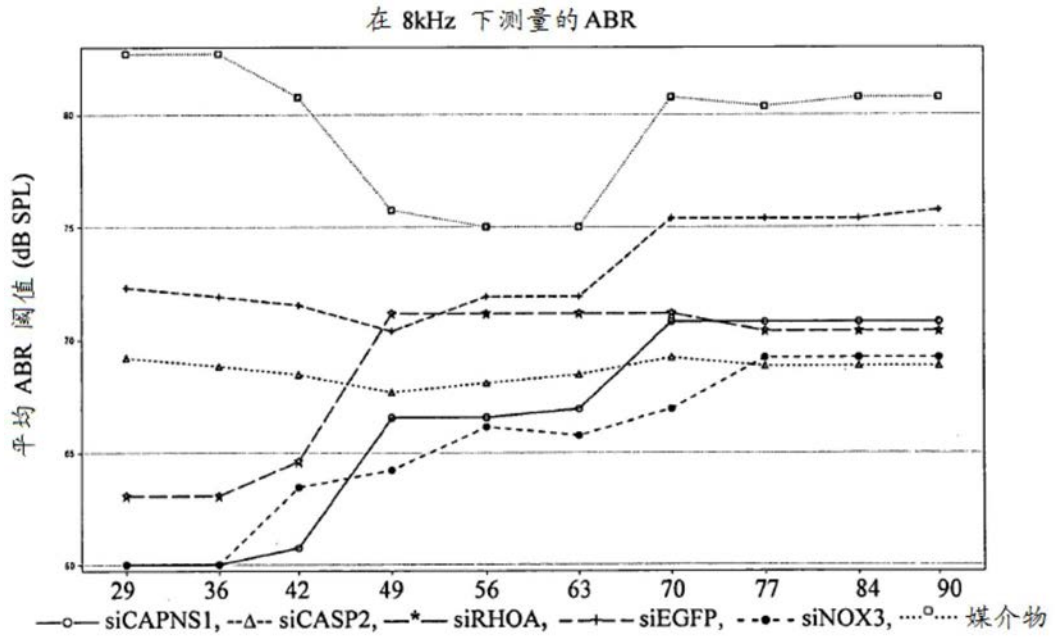


图5B

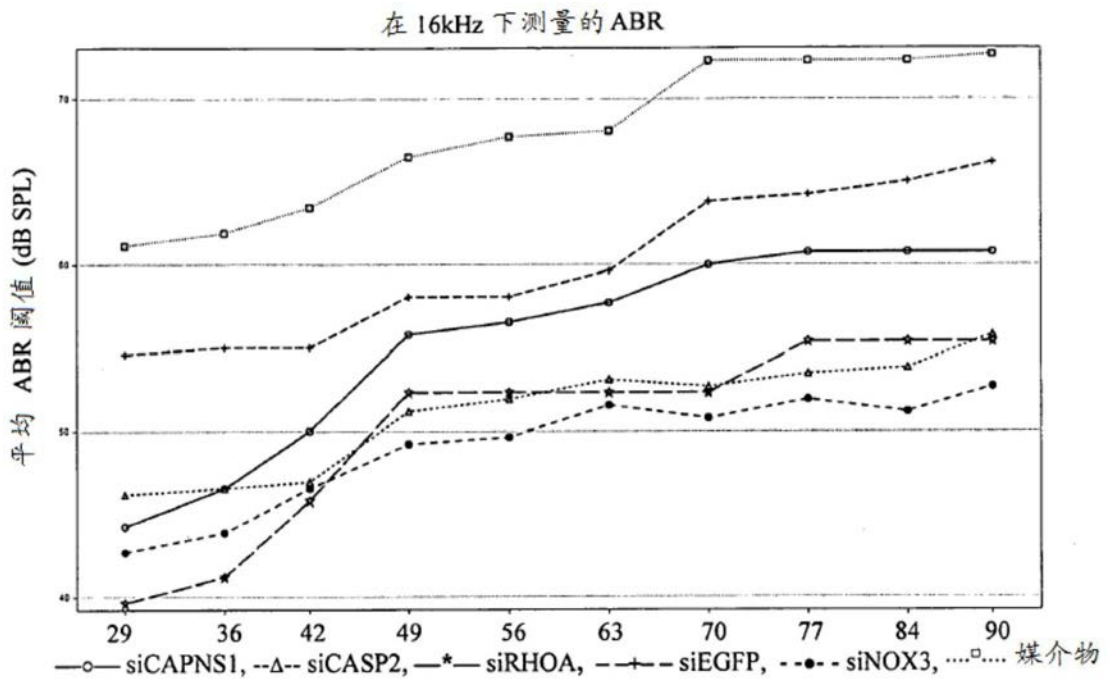


图5C

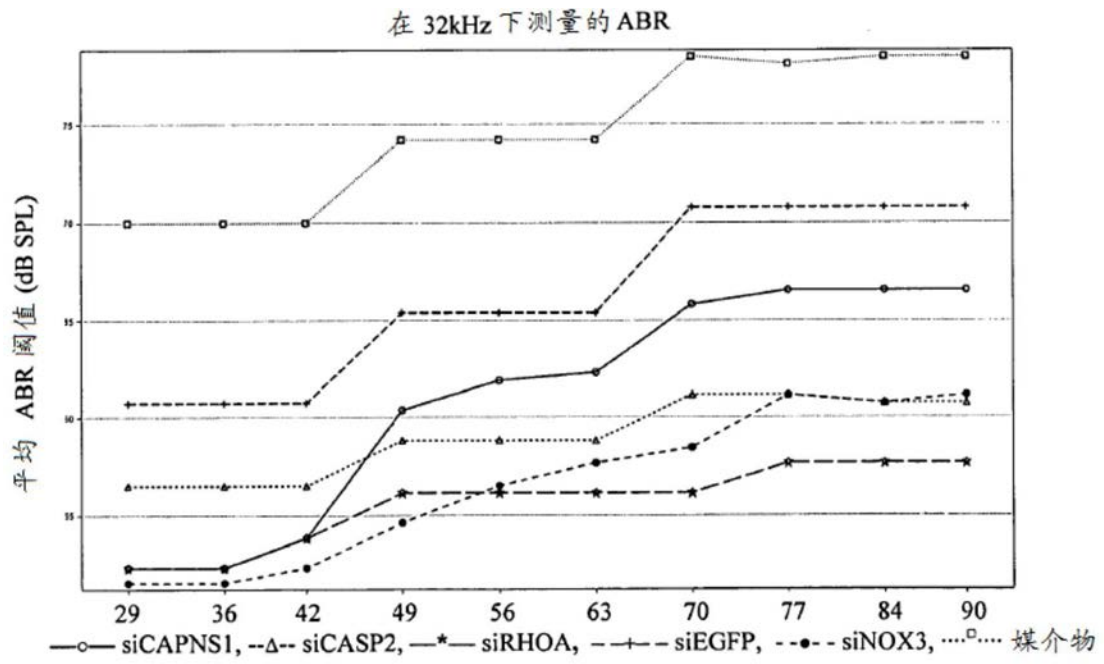


图5D

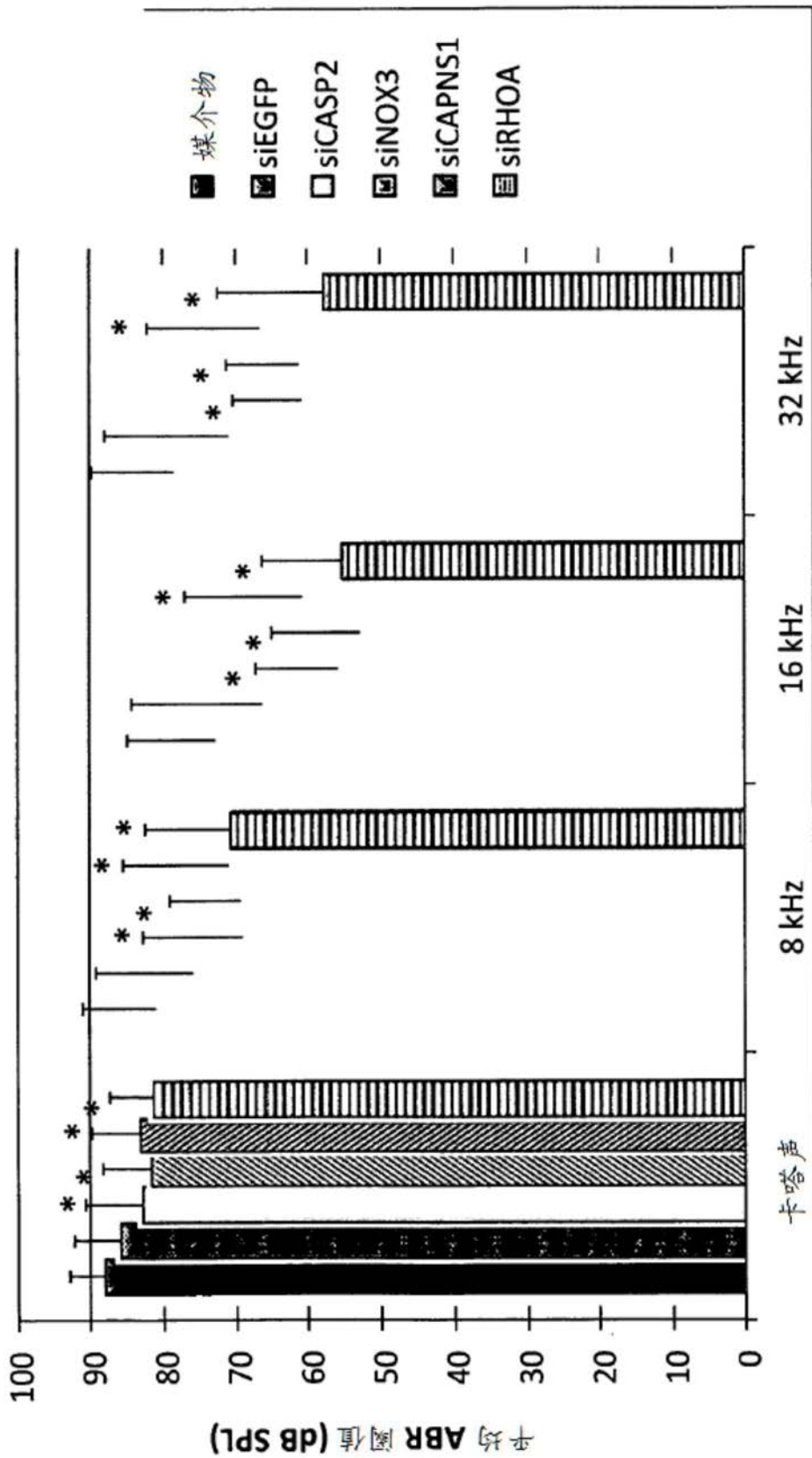


图5E

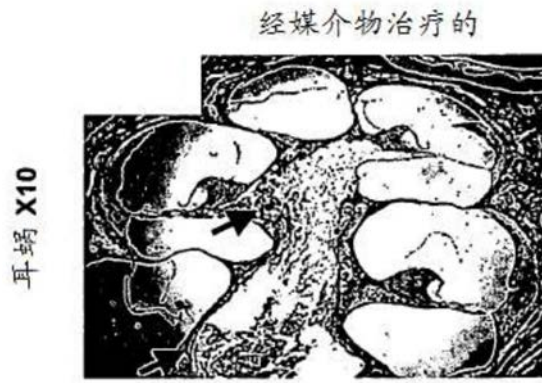


图6A

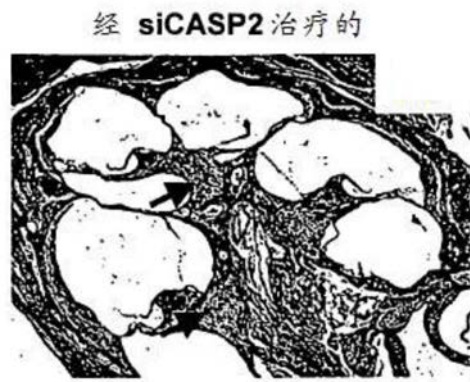


图6B

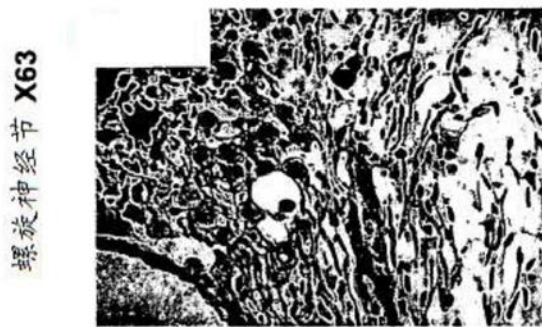


图6C

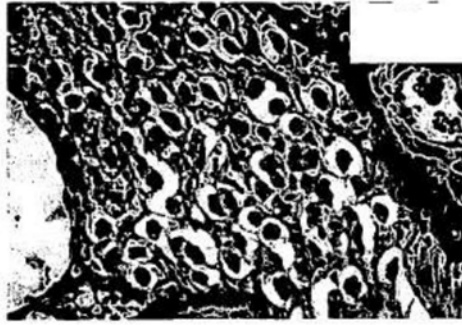


图6D

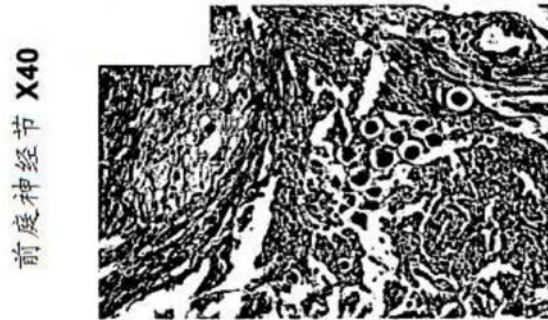


图6E



图6F

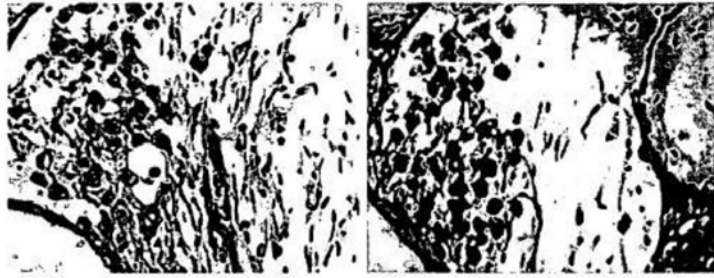


图7A

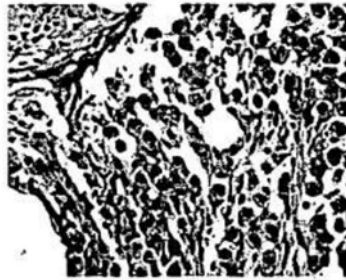


图7B

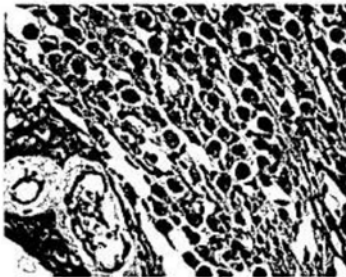


图7C

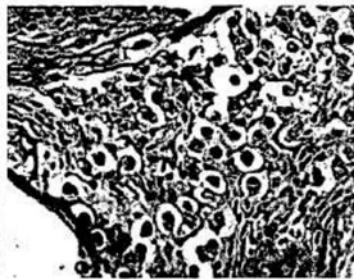


图7D

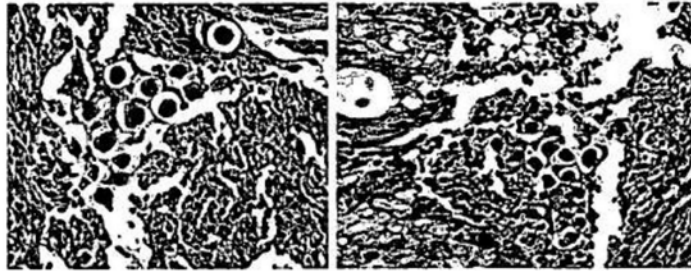


图8A

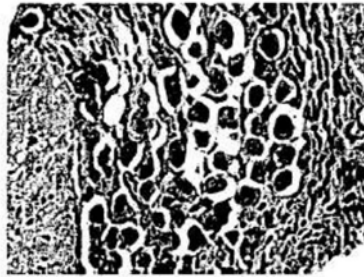


图8B

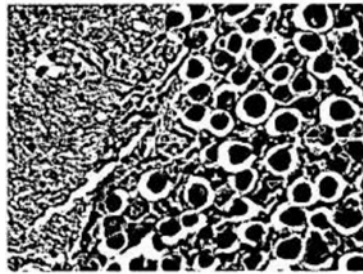


图8C

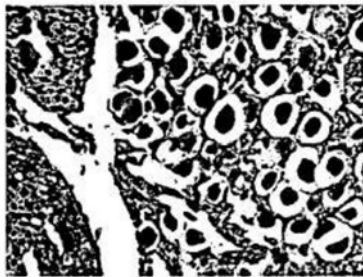


图8D

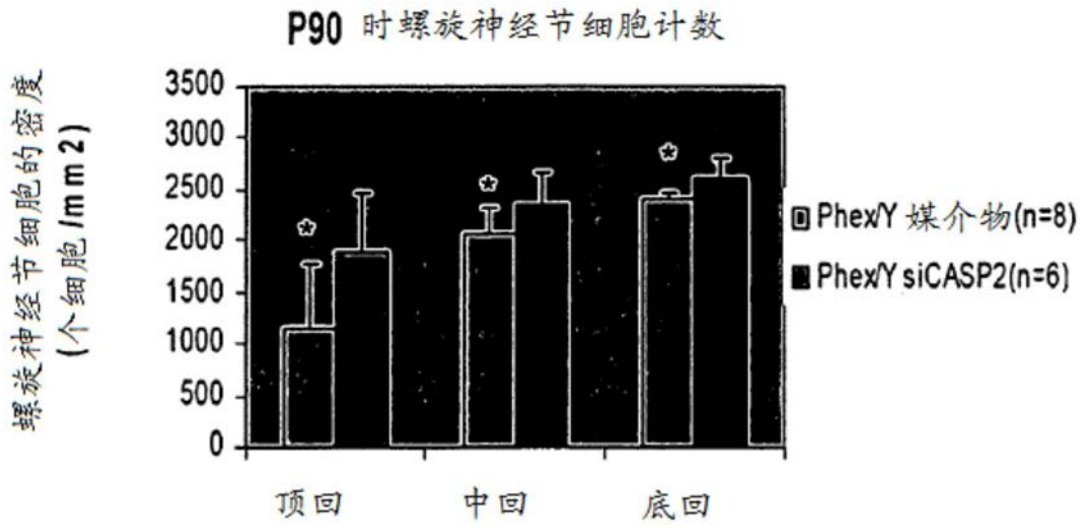


图9A



图9B