

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842381 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 22

(21) 申请号 200880113323. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 08. 27

C07H 21/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/968, 257 2007. 08. 27 US

61/029, 753 2008. 02. 19 US

61/038, 954 2008. 03. 24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/074531 2008. 08. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/029690 EN 2009. 03. 05

(71) 申请人 波士顿生物医药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 C·J·李 H·罗格夫

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 7 页 说明书 41 页 附图 39 页

(54) 发明名称

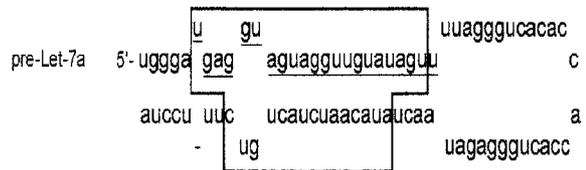
作为微小 RNA 模拟物或抑制剂的不对称 RNA 双链体的组合物

(57) 摘要

本发明提供在链长度上不对称的双链 RNA 分子。本发明的 RNA 分子, 不对称 RNA 双链体, 具有一个或两个末端突出端。在一个方面, 这些新 RNA 双链体分子充当 miRNA 的有效模拟物。在另一个方面, 它们设计为作为 miRNA 的有效抑制剂起作用。因此, 本发明的 RNA 分子可以用于调节 miRNA 途径活性, 具有对于研究、药物发现和开发、以及人类疾病治疗具有巨大的影响。

Let-7a miRNA oligo 5'-ACUAAUACAUAUCUACUGUCUUUC  
UUUGAUUUGUUGGAUGAUGGAGU-3'

Let-7a siRNA oligo 5'-AUACAUAUCUACUGUC  
UGAUUUGUUGGAUGAUGGAGU-3'



1. 一种微小 RNA(miRNA) 的模拟物,其包括:

包括第一长度的第一链和较短的第二长度的第二链的双链 RNA 分子,所述第一链具有与所述 miRNA 的至少部分基本上相同的序列,所述第一和第二链彼此基本上互补,从而它们形成至少一个双链区,其中所述 RNA 分子进一步包括 1-10 个核苷酸的末端突出端;和其中所述模拟物适应于模拟所述 miRNA 调节至少一种基因的表达。

2. 权利要求 1 的模拟物,其中所述 miRNA 是引导链。

3. 权利要求 1 的模拟物,其中所述 miRNA 是成熟 miRNA。

4. 权利要求 1 的模拟物,其中所述 miRNA 是包括成熟 miRNA 和基本上互补的过客链的内源 miRNA 双链体,并且其中所述模拟物的所述第二链具有与所述过客链的至少部分基本上相同的序列。

5. 权利要求 1 的模拟物,还包括在所述第一和第二链之间在序列上的至少一个错配或未配对的核苷酸。

6. 权利要求 5 的模拟物,其中由所述至少一个错配或未配对的核苷酸形成环。

7. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一和第二链在所述双链区中彼此完全互补。

8. 权利要求 1 的模拟物,其中所述末端突出端具有 1-8 个核苷酸。

9. 权利要求 1 的模拟物,其中所述末端突出端具有 1-3 个核苷酸。

10. 权利要求 1 的模拟物,其中所述末端突出端是 3' 突出端。

11. 权利要求 10 的模拟物,其中所述 3' 突出端在所述第一链上。

12. 权利要求 1 的模拟物,其中所述末端突出端是 5' 突出端。

13. 权利要求 12 的模拟物,其中所述 5' 突出端在所述第一链上。

14. 权利要求 1 的模拟物,还包括在所述第一链上的 3' 突出端和 5' 突出端。

15. 权利要求 14 的模拟物,其中所述 3' 和 5' 突出端都具有 1-3 个核苷酸。

16. 权利要求 1 的模拟物,还包括在一个末端上的一个末端突出端和在另一个末端上的平头末端。

17. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有 13-100 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 5-30 个核苷酸的长度。

18. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有 15-30 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 12-29 个核苷酸的长度。

19. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有 15-28 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 12-26 个核苷酸的长度。

20. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有 19-25 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 12-24 个核苷酸的长度。

21. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有 19-23 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 14-20 个核苷酸的长度。

22. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链比所述第二链长选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 个核苷酸的长度。

23. 权利要求 1 的模拟物,其中所述末端突出端进行抵抗降解作用的稳定化。

24. 权利要求 1 的模拟物,还包括在所述第一和第二链之至少一个中的切口。

25. 权利要求 1 的模拟物,其中所述双链区包括一个或多个未配对核苷酸的缺口。

26. 权利要求 1 的模拟物,还包括经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。
27. 权利要求 26 的模拟物,其中所述经修饰的核苷酸或类似物是糖、主链和 / 或碱基经修饰的核糖核苷酸。
28. 权利要求 27 的模拟物,其中所述主链经修饰的核糖核苷酸在与另一个核糖核苷酸的磷酸二酯键连接中具有修饰。
29. 权利要求 27 的模拟物,其中所述磷酸二酯键经修饰而包括氮或硫杂原子中的至少之一。
30. 权利要求 27 的模拟物,其中所述至少一个经修饰的核苷酸或类似物是非天然碱基或经修饰的碱基。
31. 权利要求 27 的模拟物,其中所述至少一个经修饰的核苷酸或类似物是肌苷或三苯甲基化碱基。
32. 权利要求 26 的模拟物,其中所述核苷酸类似物是糖经修饰的核糖核苷酸,其中 2' -OH 基团由选自 H、OR、R、卤素、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> 和 CN 的基团替代,其中每个 R 独立地选自 C1-C6 烷基、链烯基和炔基,并且卤素选自 F、Cl、Br 和 I。
33. 权利要求 26 的模拟物,其中所述核苷酸类似物是包含硫代磷酸酯基团的主链经修饰的核糖核苷酸。
34. 权利要求 1 的模拟物,还包括脱氧核苷酸。
35. 权利要求 34 的模拟物,其中所述脱氧核苷酸在选自 3' - 突出端、5' - 突出端和双链区的一个或多个区域中。
36. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链具有与所述 miRNA 的至少所述部分至少 60% 相同的序列。
37. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链与所述 miRNA 具有相同的种子区域。
38. 权利要求 1 的模拟物,其中所述双链区的 GC 含量是约 20-60%。
39. 权利要求 1 的模拟物,其中所述第一链包括具有至少一个选自 A、U 和 dT 的核苷酸的 5' 突出端。
40. 权利要求 1 的模拟物,其进一步与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸、胆固醇和适体的实体缀合。
41. 权利要求 1 的模拟物,其中所述双链 RNA 分子是合成或分离的。
42. 权利要求 1 的模拟物,其中所述双链 RNA 分子由重组载体或其后代转录。
43. 权利要求 1 的模拟物,其适于对所述至少一种基因的表达造成至少 20% 的调节。
44. 权利要求 1 的模拟物,其中所述 miRNA 是 Let7 家族的。
45. 权利要求 1 的模拟物,其包括下述双链体序列之一:  
有义 :5' -AUACAAUCUACUGUC  
反义 :5' -UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU,  
和  
有义 :5' -ACAACCUACUACCUC  
反义 :5' -AAUGAGGUAGUAGGUUGUAUG。
46. 一种成熟微小 RNA (miRNA) 的模拟物,其包括:  
包括 15-28 个核苷酸的第一链和 12-26 个核苷酸的较短第二链的双链 RNA 分子,所述

第一链具有与所述成熟 miRNA 的至少部分基本上相同的序列,所述第一和第二链彼此基本上互补从而它们形成至少一个双链区,其中所述第一链进一步包括 1-8 个核苷酸的 3' 突出端和 1-8 个核苷酸的 5' 突出端,

其中所述模拟物适应于模拟所述成熟 miRNA 调节至少一种基因的表达。

47. 权利要求 46 的模拟物,其中所述第二链与和所述成熟 miRNA 形成内源双链体的过客 RNA 链的至少部分具有基本上相同的序列。

48. 权利要求 46 的模拟物,还包括在所述第一和第二链之间在序列上的至少一个错配或未配对的核苷酸。

49. 权利要求 48 的模拟物,其中由所述至少一个错配或未配对的核苷酸形成环。

50. 权利要求 46 的模拟物,还包括脱氧核苷酸。

51. 权利要求 46 的模拟物,其中所述 3' 和 5' 突出端之至少一个进行抵抗降解作用的稳定化。

52. 权利要求 46 的模拟物,还包括在所述第一和第二链之至少一个中的切口。

53. 权利要求 46 的模拟物,其中所述双链区包括一个或多个未配对核苷酸的缺口。

54. 权利要求 46 的模拟物,还包括经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。

55. 一种微小 RNA(miRNA) 的抑制剂,其包括:

包括第一长度的第一链和较短的第二长度的第二链的双链 RNA 分子,所述第一链具有与靶 miRNA 的至少部分基本上互补的序列,所述第一和第二链彼此基本上互补从而它们形成至少一个双链区,其中所述 RNA 分子进一步包括 1-10 个核苷酸的末端突出端,

其中所述抑制剂适应于抑制所述靶 miRNA。

56. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述靶 miRNA 是引导链。

57. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述靶 miRNA 是成熟 miRNA。

58. 权利要求 55 的抑制剂,还包括在所述第一和第二链之间在序列上的至少一个错配或未配对的核苷酸。

59. 权利要求 58 的抑制剂,其中由所述至少一个错配或未配对核苷酸形成环。

60. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一和第二链在所述双链区中彼此完全互补。

61. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述末端突出端具有 1-8 个核苷酸。

62. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述末端突出端具有 1-3 个核苷酸。

63. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述末端突出端是 3' 突出端。

64. 权利要求 63 的抑制剂,其中所述 3' 突出端在所述第一链上。

65. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述末端突出端是 5' 突出端。

66. 权利要求 65 的抑制剂,其中所述 5' 突出端在所述第一链上。

67. 权利要求 55 的抑制剂,还包括在所述第一链上的 3' 突出端和 5' 突出端。

68. 权利要求 67 的抑制剂,其中所述 3' 和 5' 突出端都具有 1-3 个核苷酸。

69. 权利要求 55 的抑制剂,还包括在一个末端上的一个末端突出端和在另一个末端上的平头末端。

70. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链具有 10-100 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 5-30 个核苷酸的长度。

71. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链具有 15-60 个核苷酸的长度,并且所述第二

链具有 5-28 个核苷酸的长度。

72. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链具有 15-28 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 12-26 个核苷酸的长度。

73. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链具有 19-25 个核苷酸的长度,并且所述第二链具有 12-20 个核苷酸的长度。

74. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链比所述第二链长选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 个核苷酸的长度。

75. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述末端突出端进行抵抗降解作用的稳定化。

76. 权利要求 55 的抑制剂,还包括在所述第一和第二链之至少一个中的切口。

77. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述双链区包括一个或多个未配对核苷酸的缺口。

78. 权利要求 55 的抑制剂,还包括经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。

79. 权利要求 78 的抑制剂,其中所述经修饰的核苷酸或类似物是糖、主链和 / 或碱基经修饰的核糖核苷酸。

80. 权利要求 79 的抑制剂,其中所述主链经修饰的核糖核苷酸在与另一个核糖核苷酸的磷酸二酯键连接中具有修饰。

81. 权利要求 79 的抑制剂,其中所述磷酸二酯键经修饰而包括氮或硫杂原子中的至少之一。

82. 权利要求 79 的抑制剂,其中所述至少一个经修饰的核苷酸或类似物是非天然碱基或经修饰的碱基。

83. 权利要求 79 的抑制剂,其中所述至少一个经修饰的核苷酸或类似物是肌苷或三苯甲基化碱基。

84. 权利要求 78 的抑制剂,其中所述核苷酸类似物是糖经修饰的核糖核苷酸,其中 2' -OH 基团由选自 H、OR、R、卤素、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> 和 CN 的基团替代,其中每个 R 独立地选自 C1-C6 烷基、链烯基和炔基,并且卤素选自 F、Cl、Br 和 I。

85. 权利要求 78 的抑制剂,其中所述核苷酸类似物是包含硫代磷酸酯基团的主链经修饰的核糖核苷酸。

86. 权利要求 55 的抑制剂,还包括脱氧核苷酸。

87. 权利要求 86 的抑制剂,其中所述脱氧核苷酸在选自 3' - 突出端、5' - 突出端和双链区的一个或多个区域中。

88. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链具有与所述靶 miRNA 的至少所述部分至少 60% 互补的序列。

89. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述双链区的 GC 含量是约 20-60%。

90. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述第一链包括至少一个具有选自 A、U 和 dT 的核苷酸的 5' 突出端。

91. 权利要求 55 的抑制剂,其进一步与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸和适体的实体缀合。

92. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述双链 RNA 分子是合成或分离的。

93. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述双链 RNA 分子由重组载体或其后代转录。

94. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述靶 miRNA 选自 Let7、miR-21 和 miR-155。

95. 权利要求 55 的抑制剂,其包括下述双链体序列之一:

有义:5' -GGUAGUAGGUUGUAU

反义:5' -AACAUACAACCUACUACCUCA,

有义:5' -AUCAGACUGAUGUUG

反义:5' -AAUCAACAUCAGUCUGAUAAG,

和

有义:5' -AUGC UAAUCGUGAUA

反义:5' -AACUAUCACGAUUAGCAUAAA。

96. 一种成熟微小 RNA(miRNA) 的抑制剂,其包括:

包括 15-28 个核苷酸的第一链和 12-26 个核苷酸的较短第二链的双链 RNA 分子,所述第一链具有与所述成熟 miRNA 的至少部分基本上互补的序列,所述第一和第二链彼此基本上互补从而它们形成至少一个双链区,其中所述第一链进一步包括 1-8 个核苷酸的 3' 突出端和 1-8 个核苷酸的 5' 突出端,

其中所述抑制剂适应于抑制所述靶 miRNA。

97. 权利要求 96 的抑制剂,其中所述抑制剂能够使成熟 miRNA 的量减少至少 30%。

98. 权利要求 55 的抑制剂,其中所述靶 miRNA 选自 Let7、miR-21 和 miR-155。

99. 一种表达载体,其包括编码至少权利要求 1、46、55 或 96 的双链 RNA 分子的第一链的 DNA 序列,所述序列与启动子可操作地连接。

100. 权利要求 99 的表达载体,还包括编码至少权利要求 1、46、55 或 96 的双链 RNA 分子的第二链的第二 DNA 序列,所述序列与启动子可操作地连接。

101. 权利要求 99 的表达载体,其中所述载体选自病毒、真核和细菌表达载体。

102. 一种细胞,其包括权利要求 99 的表达载体。

103. 一种细胞,其包括权利要求 1、46、55 或 96 的双链 RNA 分子。

104. 一种制备微小 RNA(miRNA) 的模拟物的方法,所述方法包括步骤:

选择 miRNA 序列;

合成与所述 miRNA 中的至少一个连续核苷酸部分具有基本上相同的区域的第一 RNA 链;

合成较短的第二 RNA 链,和

在合适条件下组合所合成的链,以形成具有至少一个末端突出端的双链 RNA 分子,从而所述 RNA 分子能够模拟所述 miRNA 调节至少一种基因的表达。

105. 权利要求 104 的方法,其进一步包括化学修饰所述至少一个末端突出端以抵抗降解。

106. 权利要求 104 的方法,其进一步包括将至少一个脱氧核苷酸引入所述双链 RNA 分子内。

107. 权利要求 104 的方法,其进一步包括将至少一个经修饰的核苷酸或核苷酸类似物引入所述双链 RNA 分子内。

108. 权利要求 104 的方法,其进一步包括在所述合成步骤过程中、在所述合成后且在所述组合步骤前、或在所述组合步骤后,将至少一个经修饰的核苷酸或其类似物引入所述双链体 RNA 分子内。

109. 权利要求 104 的方法,其进一步包括将至少一个错配、切口或缺口引入所述双链区中。

110. 权利要求 104 的方法,其进一步包括使所述第一和第二链之至少一个与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸、胆固醇和适体的实体缀合。

111. 权利要求 104 的方法,其中酶促或生物合成所述 RNA 链中的至少一个。

112. 权利要求 104 的方法,分开或同时合成所述第一链和所述第二链。

113. 权利要求 104 的方法,其进一步包括修饰在所述链之一中的至少一个碱基。

114. 一种制备靶微小 RNA(miRNA) 的抑制剂的方法,所述方法包括步骤:

选择靶 miRNA 序列;

合成具有与所述靶 miRNA 中的至少一个连续核苷酸部分基本上互补的区域;

合成较短的第二 RNA 链,和

在合适条件下组合所合成的链,以形成具有至少一个末端突出端的双链 RNA 分子,从而所述 RNA 分子能够抑制所述靶 miRNA。

115. 权利要求 114 的方法,其进一步包括化学修饰所述至少一个末端突出端以抵抗降解。

116. 权利要求 114 的方法,其进一步包括将至少一个脱氧核苷酸引入所述双链 RNA 分子内。

117. 权利要求 114 的方法,其进一步包括将至少一个经修饰的核苷酸或核苷酸类似物引入所述双链 RNA 分子内。

118. 权利要求 114 的方法,其进一步包括将至少一个错配、切口或缺口引入所述双链区中。

119. 权利要求 114 的方法,其进一步包括使所述第一和第二链之至少一个与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸、胆固醇和适体的实体缀合。

120. 权利要求 114 的方法,其中酶促或生物合成所述 RNA 链中的至少一个。

121. 权利要求 114 的方法,分开或同时合成所述第一链和所述第二链。

122. 权利要求 114 的方法,其进一步包括修饰在所述链之一中的至少一个碱基。

123. 一种调节细胞或生物中的 miRNA 途径的方法,所述方法包括步骤:

在可以发生对所述 miRNA 的模拟的条件下,使所述细胞或生物与权利要求 1 或 46 的模拟物接触;和

使用所述模拟物调节至少一种基因的表达,从而调节内源 miRNA 途径。

124. 权利要求 123 的方法,其中所述模拟物中的所述双链 RNA 分子的所述第一链在其与 RISC 的相互作用中模拟所述内源 miRNA。

125. 一种调节细胞中的 miRNA 途径的方法,所述方法包括步骤:

在可以发生对所述靶 miRNA 的抑制的条件下,使所述细胞或生物与权利要求 55 或 96 的抑制剂接触;和

用所述抑制剂减少可用的靶 miRNA 的量,从而调节内源 miRNA 途径。

126. 权利要求 123 或 125 的方法,其中所述接触包括步骤:将所述模拟物或抑制剂分别引入培养中的或生物体中的靶细胞内,在所述靶细胞中可以发生基因表达的调节。

127. 权利要求 126 的方法,其中所述引入步骤选自转染、脂转染、电穿孔、感染、注射、

经口施用、吸入、局部和区域施用。

128. 权利要求 126 的方法,其中所述引入步骤包括使用药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂,其选自药学载体、正电荷载体、脂质体、蛋白质载体、聚合物、纳米颗粒、纳米乳液、脂质和类脂。

129. 权利要求 123 或 125 的方法用于确定基因在细胞或生物中的用途或功能的用途。

130. 权利要求 123 或 125 的方法用于调节至少一种基因在细胞或生物中的表达的用途。

131. 权利要求 130 的用途,其中所述基因与疾病、病理状况或非期望状况相关。

132. 权利要求 130 的用途,其中所述基因与人或动物疾病相关。

133. 权利要求 132 的用途,其中所述基因是致病微生物的基因。

134. 权利要求 132 的用途,其中所述基因是病毒基因。

135. 权利要求 132 的用途,其中所述基因是肿瘤相关基因。

136. 权利要求 132 的用途,其中所述基因与选自下述的疾病相关:自身免疫疾病、炎症性疾病、退行性疾病、感染性疾病、增生性疾病、代谢疾病、免疫介导的病症、变应性疾病、皮肤病学疾病、恶性疾病、胃肠道病症、呼吸病症、心血管病症、肾病症、类风湿性病症、神经学病症、内分泌紊乱和衰老。

137. 权利要求 123 或 125 的方法用于在体外或体内研究药物靶的用途。

138. 权利要求 123 或 125 的方法用于治疗或预防疾病或非期望状况的用途。

139. 一种药物组合物,其包括至少一种权利要求 1、46、55 或 96 的模拟物或抑制剂作为活性剂和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

140. 权利要求 139 的药物组合物,其中所述载体可以选自药学载体、正电荷载体、脂质体、蛋白质载体、聚合物、纳米颗粒、纳米乳液、脂质和类脂。

141. 一种治疗方法,其包括给有需要的受试者施用有效量的权利要求 139 的药物组合物。

142. 权利要求 141 的方法,其中所述药物组合物经由选自血管内(iv)、皮下(sc)、局部、po、吸入、肌内、腹膜内(ip)和区域途径的途径进行施用。

143. 权利要求 141 的方法,其在治疗癌症中使用。

144. 一种研究试剂,其包括权利要求 1、46 的模拟物,或权利要求 55 或 96 的抑制剂。

145. 一种试剂盒,其包括权利要求 144 的研究试剂。

146. 诊断患者的疾病或病症的方法,其包括使所述患者的细胞与权利要求 1、46 的模拟物,或权利要求 55 或 96 的抑制剂接触;和

寻找指示所述疾病或病症的至少一种改变。

## 作为微小 RNA 模拟物或抑制剂的不对称 RNA 双链体的组合 物

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2007 年 8 月 27 日提交的美国临时专利申请序列 NO. 60/968, 257、于 2008 年 2 月 19 日提交的美国临时专利申请序列 NO. 61/029, 753、和于 2008 年 3 月 24 日提交的美国临时专利申请序列 NO. 61/038, 954 的优先权和利益, 这些临时专利申请的完整内容引入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 微小 RNA (miRNA) 是一类内源小 RNA 分子, 其首先发现在翻译水平上调节基因表达, 是细胞的 RNA 干扰 (RNAi) 机制的一部分。miRNA 最先在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现, 之后已在植物和动物, 包括人, 中发现 miRNA。许多 miRNA 的序列在不同生物中是同源的, 提示 miRNA 是一个相对古老且重要的调节途径 (Grosshans 等人 *J Cell Biol* 156 :17-21 (2002))。miRNA 由 DNA 转录但不翻译成蛋白质的基因 (非蛋白质编码 RNA) 编码, 其调节多达 30% 的哺乳动物基因 (Czech, *NEJM* 354 :1194-1195 (2006) ;Mack, *Nature Biotech.* 25 :631-638 (2007) ;Eulalio, 等人, *Cell* 132 :9-14 (2008))。近期研究已发现 miRNA 通过阻断翻译或引起转录物降解来阻遏蛋白质产生, 从而调节基因表达。单个 miRNA 可以靶向 250-500 种不同 mRNA, 证明这类 RNA 是广泛细胞功能的极其重要的介体。由 miRNA 调节的许多基因是致病基因, 因此, 调节 miRNA 功能性的任何机制都具有极大的治疗潜力。

[0005] 在动物中, miRNA 首先由基因组表达为 RNA 转录物, 称为初级 miRNA (pri-miRNA)。它们由 RNA 聚合酶 II 转录, 并且可能形成发夹结构。在细胞核中, dsRNA 特异性核糖核酸酶 Droscha 将 pri-miRNA 加工成称为前 miRNA (pre-miRNA) 的、较短的、长约 70 至 100-核苷酸的茎环结构, 其随后可能通过核输出蛋白 -5 (Exp5) 输出到细胞质内。(Yi 等人 *GenesDev.* 17 : 3011-3016 (2003))。在细胞质中, RNA 酶 III 核糖核酸酶家族成员 Dicer 将前 miRNA 切割成在两末端处具有 3' 突出端的双链的引导 / 过客 (miRNA/miRNA\*) 双链体。miRNA 双链体的 2 条链在其序列中通常具有来自不完全互补性的错配, 并且当其分离时, 在许多情况下, 长约 19 至 23 个核苷酸的成熟 miRNA 与 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 或相似蛋白质复合物结合。RISC 也是实现由小或短干扰 RNA (siRNA) 介导的靶特异性 mRNA 降解的蛋白质复合物。

[0006] 尽管并未完全明了 miRNA 双链体或单链成熟 miRNA 如何与 RISC 相互作用, 但认为一旦成熟 miRNA 被 RISC 的催化成分 argonaute 选择为引导链后, 成熟 miRNA 将整合到复合物内, 并且与具有显著, 但通常并不完全, 互补序列的信使 RNA (mRNA) 分子结合。过客链 miRNA\* 可能被降解。之后由 miRNA-RISC 复合物结合的 mRNA 的翻译被阻遏, 导致相应基因的减少表达。在某些情况下, 结合的 mRNA 被切割或脱腺苷酸化且降解。

[0007] 并非承认本文引用的参考文献为请求保护的本发明的现有技术。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明与如下发现相关, 即, 发现在本文中称为“不对称干扰 RNA” (aiRNA) 的一类新的双链体 RNA 可以在哺乳动物细胞中有效地调节 miRNA 的活性。这类新 RNA 的标志是 2

条 RNA 链之间的长度不对称性。本发明提供了下述证据：可以构建在链长度上具有不对称性的双链 RNA 以模拟或抑制细胞中的 miRNA，和双向地调节，即上调和下调，miRNA 途径活性。

[0010] 在一个方面，本发明提供了微小 RNA (miRNA) 的模拟物 (mimetic)，其包括：包含具有第一长度的第一链和具有较短的第二长度的第二链的双链 RNA 分子，所述第一链具有与所述 miRNA 的至少部分基本上相同的序列，所述第一和第二链彼此基本上互补，由此它们形成至少一个双链区，其中所述 RNA 分子还包含 1-10 个核苷酸的末端突出端；并且其中所述模拟物适应于在调节至少一种基因的表达方面模拟所述 miRNA。

[0011] 在一个优选方面，本发明提供了成熟微小 RNA (miRNA) 的模拟物，该模拟物包括：包含具有 15-28 个核苷酸的第一链和具有 12-26 个核苷酸的较短第二链的双链 RNA 分子，所述第一链具有与所述成熟 miRNA 的至少部分基本上相同的序列，所述第一和第二链彼此基本上互补，从而它们形成至少一个双链区，其中所述第一链还包括 1-8 个核苷酸的 3' 突出端和 1-8 个核苷酸的 5' 突出端，其中所述模拟物适应于在调节至少一种基因的表达方面模拟所述成熟 miRNA。

[0012] 在一个特征中，由本发明的模拟物模拟的 miRNA 是引导链或成熟 miRNA。在一个实施方案中，该 miRNA 是包括成熟 miRNA 和基本上互补的过客链的内源 miRNA 双链体；所述模拟物的所述第二链具有与所述过客链的至少部分基本上相同的序列。

[0013] 在再一方面，本发明提供了微小 RNA (miRNA) 的抑制剂，其包括：包含具有第一长度的第一链和具有较短的第二长度的第二链的双链 RNA 分子，所述第一链具有与靶 miRNA 的至少部分基本上互补的序列，所述第一和第二链彼此基本上互补，从而它们形成至少一个双链区，其中所述 RNA 分子还包括 1-10 个核苷酸的末端突出端，其中所述抑制剂适应于抑制所述靶 miRNA。

[0014] 在一个优选方面，本发明提供了成熟微小 RNA (miRNA) 的抑制剂，其包括：包含 15-28 个核苷酸的第一链和 12-26 个核苷酸的较短第二链的双链 RNA 分子，所述第一链具有与所述成熟 miRNA 的至少部分基本上互补的序列，所述第一和第二链彼此基本上互补，从而它们形成至少一个双链区，其中所述第一链还包括 1-8 个核苷酸的 3' 突出端和 1-8 个核苷酸的 5' 突出端，其中所述抑制剂适应于抑制所述靶 miRNA。

[0015] 在一个特征中，由本发明的抑制剂靶向的 miRNA 是引导链或成熟链。在某些实施方案中，本发明抑制剂能够使成熟 miRNA 的量减少约至少 30%、50%、70%、80% 或 90%。

[0016] 在一个特征中，本发明的模拟物和抑制剂还包括在所述第一链和第二链之间在序列上的至少一个错配或未配对的核苷酸。在一个实施方案中，该至少一个错配或未配对核苷酸形成环。在一个备选实施方案中，模拟物和抑制剂中第一和第二链在所述双链区中彼此完全互补。

[0017] 本发明的模拟物和抑制剂的末端突出端在某些实施方案中为 1-8 个核苷酸，并且在某些实施方案中为 1-3 个核苷酸。末端突出端可以是 3' 突出端，并且在一个优选实施方案中，在较长链，即，第一链上。在另一个实施方案中，末端突出端是 5' 突出端，并且在一个优选实施方案中，在第一链上。在某些实施方案中，模拟物和抑制剂在所述第一链上既具有 3' 突出端又具有 5' 突出端，并且优选地，所述 3' 和 5' 突出端都具有 1-3 个核苷酸。在另一个实施方案中，本发明的模拟物和抑制剂在一端具有一个末端突出端而在另一端具有

平头末端。

[0018] 在模拟物的各实施方案中：所述第一链（较长链）具有 13-100 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 5-30 个核苷酸的长度；所述第一链具有 15-30 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 12-29 个核苷酸的长度；所述第一链具有 15-28 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 12-26 个核苷酸的长度；所述第一链具有 19-25 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 12-24 个核苷酸的长度；所述第一链具有 19-23 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 14-20 个核苷酸的长度。

[0019] 在抑制剂的各实施方案中：所述第一链（较长链）具有 10-100 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 5-30 个核苷酸的长度；所述第一链具有 15-60 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 5-28 个核苷酸的长度；所述第一链具有 15-28 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 12-26 个核苷酸的长度；所述第一链具有 19-25 个核苷酸的长度，并且所述第二链具有 12-20 个核苷酸的长度。

[0020] 在一个特征中，在本发明的模拟物和抑制剂中，所述第一链比所述第二链长选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 个核苷酸的长度。

[0021] 在一个特征中，在本发明的模拟物和抑制剂中，所述末端突出端进行稳定化以抵抗降解。

[0022] 在一个特征中，模拟物和抑制剂还具有在所述第一链和第二链之至少一个中的至少一个切口。在另一个特征中，模拟物或抑制剂的双链区还包括一个或多个未配对核苷酸的缺口。

[0023] 在一个特征中，模拟物和抑制剂包括经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。在另一个特征中，它们包括至少一个脱氧核苷酸，其可以在选自 3' - 突出端、5' - 突出端和双链区的一个或多个区域中。

[0024] 在一个特征中，在本发明的模拟物中，所述第一链具有与所述 miRNA 的至少所述部分至少 60%，或在某些实施方案中，至少 70% 相同的序列。在一个实施方案中，模拟物的所述第一链与所述 miRNA 具有相同的种子区域。

[0025] 在一个特征中，在本发明的抑制剂中，所述第一链具有与其靶 miRNA 的至少所述部分至少 60%，或在某些实施方案中，至少 70% 互补的序列。

[0026] 在一个实施方案中，在本发明的模拟物和抑制剂中双链区的 GC 含量是约 20-60%，或优选约 30-50%。

[0027] 在模拟物和抑制剂的一个实施方案中，所述第一链包括具有至少一个选自 A、U 和 dT 的核苷酸的序列基序。在一个进一步的实施方案中，5' 突出端具有序列基序“AA”、“UU”或“dTd”。在一个特征中，本发明的模拟物和抑制剂还与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸、胆固醇和适体的实体缀合。

[0028] 在本发明的模拟物和抑制剂的一个特征中，双链 RNA 分子是合成或分离的。在一个实施方案中，本发明双链 RNA 分子，无论是模拟物还是抑制剂，由重组载体或其后代转录。

[0029] 在一个特征中，本发明的模拟物适应于对所述至少一种基因的表达造成至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 的调节。在一个实施方案中，本发明的模拟物模拟 Let7 家族的 miRNA。

[0030] 在一个实施方案中,本发明的模拟物包括下述双链体序列之一:

[0031] 有义:5' -AUACAAUCUACUGUC

[0032] 反义:5' -UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU,

[0033] 和

[0034] 有义:5' -ACAACCUACUACCUC

[0035] 反义:5' -AAUGAGGUAGUAGGUUGUAUG。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明的抑制剂包括下述双链体序列之一:

[0037] 有义:5' -GGUAGUAGGUUGUAU

[0038] 反义:5' -AACAUACAACCUACUACCUCA,

[0039] 有义:5' -AUCAGACUGAUGUUG

[0040] 反义:5' -AAUCAACAUCAGUCUGAUAAAG,

[0041] 和

[0042] 有义:5' -AUGC UAAUCGUGUAU

[0043] 反义:5' -AACUAUCACGAUUAGCAUAAA。

[0044] 在一个方面,本发明提供了包括DNA序列的表达载体,所述DNA序列编码本发明模拟物和抑制剂的双链RNA分子的至少第一链,所述序列与表达控制序列例如启动子可操作地连接。

[0045] 在一个实施方案中,表达载体还包括第二DNA序列,其编码本发明模拟物和抑制剂的双链RNA分子的至少第二链,所述序列与第二启动子可操作地连接。载体可以选自病毒、真核和细菌表达载体。

[0046] 在一个方面,本发明提供了包括上述表达载体的细胞。在另一个方面,本发明提供了包括本发明的双链RNA分子的细胞。

[0047] 在再一方面,本发明提供了制备微小RNA(miRNA)的模拟物的方法,所述方法包括步骤:选择miRNA序列;合成具有与所述miRNA中的至少一个连续核苷酸部分基本上相同的区域的第一RNA链;合成较短的第二RNA链,将所合成的链在合适条件下组合以形成具有至少一个末端突出端的双链RNA分子,从而使得所述RNA分子在调节至少一种基因的表达方面能够模拟所述miRNA。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了制备靶微小RNA(miRNA)的抑制剂的方法,所述方法包括步骤:选择靶miRNA序列;合成具有与所述靶miRNA中的至少一个连续核苷酸部分基本上互补的区域的第一RNA链;合成较短的第二RNA链,将所合成的链在合适条件下组合以形成具有至少一个末端突出端的双链RNA分子,从而使得所述RNA分子能够抑制所述靶miRNA。

[0049] 在一个特征中,制备本发明模拟物或抑制剂的方法还包括一个或多个下述步骤:化学修饰所述至少一个末端突出端以抵抗降解;将至少一个脱氧核苷酸引入所述双链RNA分子内;将至少一个经修饰的核苷酸或核苷酸类似物引入所述双链RNA分子内;将至少一个错配、切口或缺口引入所述双链区中;使所述第一和第二链之至少一个与选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸、胆固醇和适体的实体缀合;修饰链之一中的至少一个碱基。在一个实施方案中,制备模拟物或抑制剂的方法还包括在合成步骤过程中、在合成后且在组合步骤前、或在组合步骤后,将至少一个经修饰的核苷酸类似物引入双链体RNA分子内的步骤。

[0050] 在一个特征中,在制备模拟物或抑制剂的方法中,酶促或生物合成 RNA 链中的至少一个。在某些实施方案中,分开或同时合成第一链和第二链。

[0051] 在另一个方面,本发明提供了调节细胞或生物中的 miRNA 途径的方法,所述方法包括步骤:在可以发生对所述 miRNA 的所述模拟的条件下,使所述细胞或生物与本发明的模拟物接触;和使用所述模拟物调节至少一种基因的表达,从而调节内源 miRNA 途径。在一个实施方案中,模拟物的双链 RNA 分子中第一链在其与 RISC 的相互作用中模拟所述内源 miRNA。

[0052] 在另一个方面,本发明提供了调节细胞中的 miRNA 途径的方法,所述方法包括步骤:在可以发生对所述靶 miRNA 的所述抑制的条件下,使所述细胞或生物与本发明的抑制剂接触;和用所述抑制剂减少可用的靶 miRNA 量,从而调节内源 miRNA 途径。

[0053] 在一个特征中,本发明的调节方法,无论使用模拟物还是抑制剂,进一步包括将所述双链体 RNA 分子引入培养中的或生物体中的靶细胞内的步骤,在所述靶细胞中可以发生基因表达的调节。

[0054] 在一个实施方案中,引入步骤选自转染、脂转染、电穿孔、感染、注射、经口施用、吸入、局部和区域施用。此外,引入步骤可以使用药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂,其选自药学载体、正电荷载体、脂质体、蛋白质载体、聚合物、纳米颗粒、纳米乳液(nanoemulsion)、脂质和类脂(lipoid)。

[0055] 在另一个方面,本发明提供了本发明的调节方法用于各种目的的用途,包括:确定基因在细胞或生物中的功能或用途,调节至少一种基因在细胞或生物中的表达。在一个实施方案中,基因与疾病、病理状况或非期望状况相关。在另一个实施方案中,基因与人或动物疾病相关。基因可以是致病微生物的基因、病毒基因、肿瘤相关基因等等。在一个实施方案中,基因与选自下述的疾病相关:自身免疫疾病、炎性疾病、退行性疾病、感染性疾病、增生性疾病、代谢疾病、免疫介导的病症、变应性疾病、皮肤病学疾病、恶性疾病、胃肠道病症、呼吸病症、心血管病症、肾病症、类风湿性病症、神经学病症、内分泌紊乱和衰老。在一个特征中,本发明的方法用于在体外或体内研究药物靶。在再一特征中,本发明的方法用于治疗或预防疾病或非期望状况。

[0056] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包括至少一种本发明的模拟物或抑制剂作为活性剂和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。载体可以选自药学载体、正电荷载体、脂质体、蛋白质载体、聚合物、纳米颗粒、纳米乳液、脂质和类脂。

[0057] 在另一个方面,本发明提供了治疗方法,其包括给有需要的受试者施用有效量的本发明药物组合物。在各种实施方案中,药物组合物经由选自血管内(iv)、皮下(sc)、局部、po、吸入、肌内、腹膜内(ip)和区域施用的途径进行施用。在各种实施方案中,药物组合物的有效量是约 1ng 至 1g/天、100ng 至 1g/天、或 1 $\mu$ g 至 500mg/天。在一个实施方案中,该方法在治疗癌症中使用。

[0058] 在再一方面,本发明提供了包括本发明的模拟物或本发明的抑制剂的研究试剂。本发明还提供了包括所述研究试剂的试剂盒。

[0059] 在再一方面,本发明提供了诊断患者的疾病或病症的方法,其包括使患者的细胞与本发明的模拟物或抑制剂接触;和寻找指示所述疾病或病症的至少一种改变。

[0060] 本发明的其他特征和优点从本文提供的其它描述,包括不同实施例中,将是显而易

易见的。所提供的实施例举例说明在实践本发明中有用的不同成分和方法。实施例不限制请求保护的本发明。基于本公开内容,技术人员可以鉴定和采用对于实践本发明有用的其他成分和方法。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1A 显示既具有 3' - 突出端又具有 5' - 突出端的双链体 RNA 分子的结构。

[0063] 图 1B 显示在链之一中具有切口的图 1A 的双链体 RNA 分子。

[0064] 图 1C 显示在链之一中具有缺口的图 1A 的双链体 RNA 分子。

[0065] 图 2A 显示具有平头末端和 5' - 突出端的双链体 RNA 分子的结构。

[0066] 图 2B 显示具有平头末端和 3' - 突出端的双链体 RNA 分子的结构。

[0067] 图 2C 显示在两末端上均具有 3' - 突出端的双链体 RNA 分子的结构。

[0068] 图 2D 显示在两末端上均具有 5' - 突出端的双链体 RNA 分子的结构。

[0069] 图 2E 显示既具有 3' - 突出端又具有 5' - 突出端的双链体 RNA 分子的备选结构。

[0070] 图 2F 显示在两末端上均具有 3' - 突出端的双链体 RNA 分子的备选结构。

[0071] 图 3 显示通过 aiRNA (不对称干扰 RNAs) 诱导的  $\beta$ - 联蛋白的基因沉默。图 3A 显示寡聚物的验证。在退火后,寡聚物通过 20% 聚丙烯酰胺凝胶加以证实。泳道 1, 21nt/21nt; 泳道 2, 12nt(a)/21nt; 泳道 3, 12nt(b)/21nt; 泳道 4, 13nt/13nt; 泳道 5, 13nt/21nt; 泳道 6, 14nt/14nt; 泳道 7, 14nt(a)/21nt; 泳道 8, 14nt(b)/21nt; 泳道 9, 15nt/15nt; 泳道 10, 15nt/21nt。

[0072] 图 3B 显示寡聚物在基因沉默中的作用。HeLa 细胞以 200,000 细胞 / 孔接种到 6 孔培养板内。24 小时后,它们用 scramble siRNA (泳道 1)、靶向 E2F1 的 21-bp siRNA (泳道 2, 作为特异性的对照) 或靶向  $\beta$ - 联蛋白的 21-bp siRNA (泳道 3, 作为阳性对照)、或相同浓度的不同长度混合的 aiRNA: 12nt(a)/21nt (泳道 4); 12nt(b)/21nt (泳道 5); 13nt/21nt (泳道 6); 14nt(a)/21nt (泳道 7); 14nt(b)/21nt (泳道 8); 15nt/21nt (泳道 9), 进行转染。在转染后 48 小时收获细胞。通过蛋白质印迹测定  $\beta$ - 联蛋白的表达。E2F1 和肌动蛋白用作对照。

[0073] 图 4 和 5 显示含或不含碱基置换的 aiRNA 寡聚物在介导基因沉默中的结构 - 活性关系。用所示 aiRNA 转染 HeLa 细胞。在转染后 48 小时收获细胞并且产生裂解物。执行蛋白质印迹以检测  $\beta$ - 联蛋白和肌动蛋白的水平。si 表示  $\beta$ - 联蛋白 siRNA 寡核苷酸。每个泳道上方的数字标记对应于表 3 中的 aiRNA 寡聚物。

[0074] 图 6 显示对 aiRNA 触发的基因沉默的机制的分析。

[0075] 图 6a 显示在用 aiRNA 或 siRNA 转染所示天数的细胞中  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 水平的 RNA 印迹分析。

[0076] 图 6b 显示  $\beta$ - 联蛋白的 5'-RACE-PCR 示意图,显示 mRNA 切割和预期的 PCR 产物。

[0077] 图 6c 显示从用 aiRNA 转染 4 或 8 小时的细胞通过 5'-RACE-PCR 扩增由 aiRNA 介导的  $\beta$ - 联蛋白切割产物。

[0078] 图 6d 显示通过测序 5'-RACE-PCR 片段验证的  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 切割位点的示意图。

[0079] 图 6e 显示 aiRNA 和 siRNA 的差异 RISC 装载效率。在用 pCMV-Ago2 转染后 48 小时,将 aiRNA 或 siRNA 双链体转染到 HeLa 细胞内。在 aiRNA 或 siRNA 转染后于所示时间点

将 Ago2 免疫沉淀,并且执行 RNA 印迹分析以测定与 Ago2/RISC 结合的小 RNA 的水平。在 IP 后通过蛋白质印迹测定 Ago2 的水平(显示在下方)。

[0080] 图 6f 显示敲低 Ago2 或 Dicer 对 aiRNA 和 siRNA 的基因沉默活性的影响。用 scramble siRNA(siCon)、或靶向 Ago2(siAgo2) 或 Dicer(siDicer) 的 siRNA 转染细胞 24 小时后,用 scramble aiRNA(Con) 或靶向 Stat3 的 aiRNA(ai) 转染。在 aiStat3 转染后 48 小时收获细胞,并且执行蛋白质印迹分析。

[0081] 图 7 显示与 siRNA 比较,aiRNA 掺入 RISC 内的优势。

[0082] 图 7A 显示 aiRNA 比 siRNA 更有效地进入 RISC。转染了 Ago2 表达质粒的细胞用 aiRNA 或 siRNA 转染所示时间。在细胞裂解后,将 Ago2 免疫沉淀,从免疫沉淀物中提取 RNA,并且在 15% 丙烯酰胺凝胶上分离。在转移后,使膜与探针杂交,以检测 aiRNA 或 siRNA 的 21mer 反义链。IgG 对照泳道显示与 Ago2 免疫沉淀物相比缺乏信号。

[0083] 图 7B 显示 aiRNA 的有义链不停留在 RISC 中。剥离 (A) 的膜上的探针,并且重新用探针探测,以检测转染的寡聚物的有义链。(A) 和 (B) 中的卡通图说明有义链(上方链)、反义链(下方链)或双链体在膜上的位置。

[0084] 图 8 显示通过 aiRNA 的 RISC 装载机制。

[0085] 图 8A 显示对 aiRNA 或 siRNA 的不同链和 Ago2 之间的相互作用的免疫沉淀分析。包含超表达的 Ago2 的 HeLa S-10 裂解物与包含 <sup>32</sup>P 末端标记的有义链或反义链的所示 aiRNA 或 siRNA 双链体一起温育。(\*) 号标明该标记物的位置。在 Ago2 免疫沉淀后,分离 RNA 并且在 15% 丙烯酰胺凝胶上分离,对胶片进行曝光。与 Ago2 结合的 RNAs 显示在沉淀级分中,而未与 Ago2 结合的 RNA 保留在上清液(Sup)中。

[0086] 图 8B 显示有义链切割在 aiRNA 活性中的作用。用 aiRNA、或用有义链在位置 8(预测的 Ago2 切割位点)或位置 9(作为对照)处具有 2'-O-甲基的 aiRNA,转染细胞。在转染后 4 小时收集 RNA,并且执行 qRT-PCR,以测定剩余的 β- 联蛋白 mRNA 的相对水平。

[0087] 图 9 显示 aiRNA 和 siRNA 竞争分析。

[0088] 图 9A 示例包含 <sup>32</sup>P 末端标记的反义链的 siRNA 和 aiRNA 双链体。(\*) 号标明该标记的位置。

[0089] 图 9B 显示冷 aiRNA 不与标记的 siRNA 竞争 Ago2。包含超表达的 Ago2 的 HeLa S-10 裂解物与 <sup>32</sup>P 末端标记的 siRNA 及冷 aiRNA 或 siRNA 双链体一起温育,之后免疫沉淀 Ago2。随后分离 RNA,并且在 15% 丙烯酰胺凝胶上分析。

[0090] 图 9C 显示冷 siRNA 不与标记的 aiRNA 竞争 Ago2。将与 B 中所用相同的 S-10 裂解物与 <sup>32</sup>P 末端标记的 aiRNA 及冷 aiRNA 或 siRNA 双链体一起温育,之后免疫沉淀 Ago2。随后分离 RNA,并且在 15% 丙烯酰胺凝胶上分析。

[0091] 图 10 示例 aiRNA 和 siRNA 的模型,显示了在 RISC 装载和成熟 RISC 产生中观察到的差异。

[0092] 图 11 显示具有反义突出端的 14-15bp 不对称 RNA 双链体(aiRNA)诱导了有力、有效的、快速且持久的基因沉默。

[0093] 图 11A 为显示靶向 β- 联蛋白的 siRNA 和 aiRNA 的序列和设计的示意图。

[0094] 图 11B 显示由各种长度的 aiRNA 诱导的基因沉默。在用所示 aiRNA 转染 48 小时的细胞中,通过蛋白质印迹分析 β- 联蛋白的蛋白质水平。

[0095] 图 11C 显示 aiRNA 在诱导  $\beta$ - 联蛋白的蛋白质耗竭方面比 siRNA 更有力和有效。用靶向  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 或 siRNA 以所示浓度转染 HeLa 细胞。在转染后 48 小时, 制备细胞裂解物并且进行蛋白质印迹分析。

[0096] 图 11D 显示 aiRNA 在减少  $\beta$ - 联蛋白的 RNA 水平方面比 siRNA 更有效、快速和持久。细胞用 10nM 15bp aiRNA 或 21-mer siRNA 转染所示天数后, 进行 RNA 印迹分析。

[0097] 图 12 显示 aiRNA 介导快速且有利的沉默。

[0098] 图 12A 显示用于靶向  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 和 siRNA 的序列和结构。

[0099] 图 12B 显示对来自转染了对照 aiRNA 或靶向  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 的细胞的  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 的水平进行的 RT-PCR。在转染后于所示时间收集 RNA。

[0100] 图 12C 显示在用对照、aiRNA 或 siRNA 转染所示小时数的细胞中对  $\beta$ - 联蛋白的 mRNA 水平的定量实时 RT-PCR。

[0101] 图 12D 显示在用对照、aiRNA 或 siRNA 转染所示时间的细胞中对  $\beta$ - 联蛋白的蛋白质水平的蛋白质印迹分析。

[0102] 图 13 显示 aiRNA 与 siRNA 在针对多种靶的基因沉默功效和持久性方面的比较。用 scramble siRNA (c)、靶向 (a)  $\beta$ - 联蛋白 (以 10nM)、(b) Stat3、(c) EF2、或 (d) NQO1 (以 20nM) 的 aiRNA (ai) 或 siRNA (si) 转染 HeLa 细胞。在所示时间点纯化 RNA 和蛋白质, 并且通过定量实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 mRNA 水平, 和通过蛋白质印迹分析蛋白质水平。相对于 siCon 转染的细胞, 标化 qRT-PCR 数据。

[0103] 图 14 显示 aiRNA 介导的基因沉默在多种细胞系中对各种基因是有效的。

[0104] 图 14a 显示在不同哺乳动物细胞系中 aiRNA 双链体比 siRNA 更有效地靶向  $\beta$ - 联蛋白。

[0105] 图 14b 显示来自用 20nM 所示 aiRNA 或 siRNA 转染 48 小时的细胞的 Nbs1、存活蛋白、Parp1、p21 的蛋白质印迹分析。

[0106] 图 14c 显示来自用 20nM 所示 aiRNA 或 siRNA 转染 48 小时的细胞的 Rsk1、PCNA、p70S6K、mTOR 和 PTEN 的蛋白质印迹分析。

[0107] 图 14d 显示 aiRNA 对 k-Ras 的等位基因特异性基因沉默。通过蛋白质印迹分析, 测试靶向野生型 k-Ras 的 aiRNA 在 k-Ras 野生型 (DLD1) 和 k-Ras 突变型 (SW480) 细胞系中对 k-Ras 的沉默。

[0108] 图 15 显示 aiRNAs 的通过有义链的脱靶基因沉默的缺乏、以及 aiRNA 的免疫刺激作用和血清稳定性。

[0109] 图 15a 显示在模拟 (mock) 处理的或与  $\beta$ - 联蛋白 siRNA 或 aiRNA 双链体温育 16 小时的 PBMC 中干扰素诱导型基因的表达的 RT-PCR 分析。

[0110] 图 15b 显示在模拟转染的或用 EF2 或存活蛋白 aiRNA 或 siRNA 转染 24 小时的 HeLa 细胞中干扰素诱导型基因的表达的 RT-PCR 分析。

[0111] 图 15c 显示对已知干扰素应答相关基因的表达改变的微阵列分析。通过微阵列分析从 aiRNA 和 siRNA 转染的 HeLa 细胞中分离的总 RNA。

[0112] 图 15d 显示对于 aiRNA 未检测出有义链介导的脱靶基因沉默。用 aiRNA 或 siRNA 和表达 Stat3 (有义 RNA) 的质粒或表达反义 Stat3 (反义 RNA) 的质粒共转染细胞。在转染后 24 小时收获细胞并且收集 RNA, 通过定量实时 PCR 或 RT-PCR 测定 Stat3 有义或反义

RNA(插入片段)的相对水平。

[0113] 图 15e 显示 aiRNA 和 siRNA 双链体在人血清中的稳定性。aiRNA 和 siRNA 双链体在 10%人血清中在 37°C 温育所示时间,之后凝胶电泳。显示剩余的双链体(对照%)。

[0114] 图 15f 说明对 aiRNA 双链体介导的基因特异性沉默所提出的模型。

[0115] 图 16 显示在 SW480 人结肠异种移植小鼠模型中,针对  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 的有力抗肿瘤活性。具有建立的皮下 SW480 人结肠癌的免疫抑制小鼠每天静脉内(iv)给予 0.6nmol PEI- 复合的  $\beta$ - 联蛋白 siRNAs、PEI- 复合的  $\beta$ - 联蛋白 aiRNAs、或作为阴性对照的 PEI- 复合的无关 siRNA。在处理过程中定期评估肿瘤大小。每个点表示 6 个肿瘤的平均值  $\pm$  SEM。

[0116] 图 17 显示在 HT29 人结肠异种移植小鼠模型中,针对  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 的有力抗肿瘤活性。具有建立的皮下 HT29 人结肠癌的免疫抑制小鼠每隔一天静脉内(iv)给予 0.6nmol PEI- 复合的  $\beta$ - 联蛋白 siRNAs、PEI- 复合的  $\beta$ - 联蛋白 aiRNAs、或作为阴性对照的 PEI- 复合的无关 siRNA。在处理过程中定期评估肿瘤大小。每个点表示 5 个肿瘤的平均值  $\pm$  SEM。

[0117] 图 18 显示 Let-7a 模拟物 aiRNA 可以以相等或更佳功效如 Let-7a 一样起作用。

[0118] 图 18A 显示 Let-7a 和 Let-7a 模拟物 aiRNA 的序列。

[0119] 图 18B 显示 Let-7a 模拟物 aiRNA 可以下调 Let-7a 的靶 k-Ras 的 mRNA 水平。

[0120] 图 19A 显示所示 aiRNA 模拟物和抑制剂的序列和结构。

[0121] 图 19B 显示所示成熟 miRNA 的序列。

[0122] 图 20A 显示 Let-7c 模拟物 aiRNA 和 aiRNA Let-7c 抑制剂对 k-Ras 的 mRNA 水平的影响。

[0123] 图 20B 显示 Let-7c 模拟物 aiRNA 和 aiRNA Let-7c 抑制剂对 k-Ras 的蛋白质水平的影响。

[0124] 图 21 显示所设计的 aiRNA 可以抑制 miRNA。

[0125] 图 21A 显示抗 -Let7c aiRNA 有力抑制 Let-7c 的表达。

[0126] 图 21B 显示抗 -miR21 aiRNA 有力抑制 miR21 的表达。

[0127] 图 21C 显示抗 -miR155 aiRNA 有力抑制 miR155 的表达。

[0128] 图 22A 显示 MCF7 细胞表达高水平的 miR-21。

[0129] 图 22B 显示 FaDu 细胞表达高水平的 miR-155。

[0130] 图 23 显示抗 -Let7c aiRNA 比商购可得的 miRNA 抑制剂更有效。

[0131] 图 24 显示抗 -miR21 aiRNA 比商购可得的 miRNA 抑制剂更有效。

[0132] 图 25 显示抗 -miR155 aiRNA 比商购可得的 miRNA 抑制剂更有效。

[0133] 图 26 比较抗 -Let7c aiRNA 与商购可得的 miRNA 抑制剂的效力。

[0134] 图 27 比较抗 -miR21 aiRNA 与商购可得的 miRNA 抑制剂的效力。

[0135] 图 28 比较抗 -miR155 aiRNA 与商购可得的 miRNA 抑制剂的效力。

[0136] 图 29 显示 aiRNA 抑制 miRNA 的一种可能的理论机制。

[0137] 图 30 和 31 列出已知的人 miRNA。

[0138] 发明详述

[0139] 在说明书和权利要求中,除非上下文另有明确说明,单数形式“a”、“an”和“the”

包括对复数的提及。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0140] 如本文所使用的,“双链 RNA”、“双链体 RNA”或“RNA 双链体”指具有 2 条链并且具有至少一个双链区的 RNA,其包括在双链区内或在 2 个相邻的双链区之间具有至少一个缺口、切口、凸起、环和 / 或鼓泡的 RNA 分子。如果一条链在 2 个双链区之间具有缺口或单链的未配对核苷酸区,那么该链视为具有多个片段。如本文所使用的,双链 RNA 可以在任一末端或 2 个末端上具有末端突出。在某些实施方案中,双链体 RNA 的 2 条链可以通过化学接头连接。

[0141] 如本文所使用的,“反义链”指与靶信使 RNA 具有基本上序列互补性的 RNA 链。反义链可以是 siRNA 分子的一部分、miRNA/miRNA\* 双链体的一部分、或单链成熟 miRNA。

[0142] 如本文所用的,术语“分离的”或“纯化的”是指,物质实质上或基本上不含在其天然状态下与其正常相伴的成分。纯度和均质性一般利用分析化学技术来确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。

[0143] 如本文所使用的,“调节”及其语法等同体是指,增加或减少(例如沉默),换言之,上调或下调。

[0144] 如本文所用,术语“受试者”是指,任何将作为特定治疗的接受者的动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿类动物等。一般,术语“受试者”和“患者”就人类受试者而言在本文可互换使用。

[0145] 如本文所用的,诸如“治疗”或“缓解”等术语既指 1) 治愈、减缓、减轻所诊断病情或病症的症状,和 / 或中断其进展的治疗性措施,又指 2) 防止或减缓所靶向病情或病症的发展的防范性或预防性措施。因而,需要治疗的包括已经患有病症的那些;易患病症的那些;以及欲预防病症的那些。如果患者显示出如下一种或多种状况,则该受试者被本发明的方法成功地“治疗”:癌细胞数量的减少或完全无癌细胞;肿瘤大小的减小;抑制或不存癌细胞向周围器官的浸润、包括癌向软组织和骨的扩散;抑制或不存肿瘤转移;抑制或不存肿瘤生长;与具体癌症相关的一种或多种症状的减轻;减小的发病率和死亡率;和生活质量的提高。

[0146] 如本文所用,当用在生物活性的语境中时,术语“抑制”及其语法等同体是指生物活性的下调,这可以减小或消除所靶向的功能,例如蛋白质的生产或分子的磷酸化。在特别的实施方案中,抑制可以指所靶向活性的约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的减小。当用于病症或疾病的语境中时,该术语是指成功地防止症状发作、缓解症状或消除疾病、病情或病症。

[0147] 如本文所使用的,术语“基本上互补”是指,在 2 个核酸之间的碱基配对双链区而非任何单链区中的互补,所述单链区例如末端突出端或 2 个双链区之间的缺口区。互补无需是完全的;例如,在 2 个核酸之间可以存在任何数目的碱基对错配。然而,如果错配数目大到即使是在最低严格杂交条件下也无法发生杂交时,那么该序列不是基本上互补的序列。当 2 个序列在本文中称为“基本上互补”时,意味着这两个序列彼此充分互补以能在所选反应条件下发生杂交。核酸互补性和足以达到特异性的杂交严格性之间的关系是本领域众所周知的。2 条基本上互补的链可以例如是完全互补的,或可以包含 1 个至多个错配,只要杂交条件足以允许例如区分配对序列和非配对序列即可。因此,基本上互补的序列可以指在双链区中具有 100、95、90、80、75、70、60、50% 或更少或之间的任何百分数的碱基对互

补性的序列。

[0148] 如本文所使用的, antagomirs 是 miRNA 抑制剂, 可以用于沉默内源 miRNA。

[0149] 如本文所使用的, 模拟物 (mimetics 或 mimics) 是 miRNA 激动剂, 可以用于作为功能等价物替换内源 miRNA, 并由此上调受此内源 miRNA 影响的途径。

[0150] 作为一种天然的转录后基因沉默形式且每一个都具有广泛范围的靶标, miRNA 在疾病治疗和预防中呈现出极大的机会。如可以设想的, 依赖于具体 miRNA 的调节性靶标, 可能希望上调或下调细胞中的该 miRNA 的水平。例如, 如果其 mRNA 靶对应于一种或多种肿瘤抑制基因, 那么可能希望下调该 miRNA, 例如 miR-21。另一方面, 如果其靶包括癌基因的 mRNA, 例如, 靶向 RAS 癌基因家族的 mRNA 的 let-7miRNA, 那么可能希望上调该 miRNA。在多种 miRNA 调节一个基因靶或一个相关基因靶网络的情况下, 可能希望上调某种 miRNA 而同时下调其他 miRNA。

[0151] 目前, 设计来调节 RNA 的有效工具包括单链 RNA (例如反义) 和双链 RNA, 在双链 RNA 中 2 条链通常是相同长度的 (例如, 由具有对称的 2-nt3' 突出端的 21 个核苷酸 dsRNA 组成的 siRNA)。在这些中, siRNA 在真核生物中经由与 miRNA 不同的外来机制 (一般通过病毒或人工引入) 引发 RNAi, 但最终它与 miRNA 利用相同的 RISC 来实现更特异性的基因沉默。单链反义寡核苷酸在细胞中不稳定, 并且尽管已对其尝试各种化学修饰, 但它们作为 miRNA 抑制剂在很大程度上仍是无效的 (Vermeulen A. 等人 RNA 13 :726-730(2007))。总之, 尽管 miRNA 已发现超过 10 年, 但在设计 miRNA 的有效调节剂, 无论是模拟物还是抑制剂, 方面, 仅取得很少的进展 (Mack G. Nat Biotech 25(6) :631-638(2007))。

[0152] 本发明提供了称为不对称干扰 RNA (aiRNA) 的新结构支架, 其可以用于实现 siRNA 样结果 (在与本申请同一天提交的、名称为“Composition of asymmetric interfering RNA and uses thereof”的、共同拥有的 PCT 和美国申请中详细描述, 其完整内容引入本文作为参考)、以及调节 miRNA 途径活性。

[0153] aiRNA 的新结构设计不仅在实现基因调节方面是功能上有效的, 还提供超过现有技术 RNAi 调节剂 (主要是反义, siRNA) 的几个优点。在这些优点中, aiRNA 可以比现有 siRNA 构建体具有长度短得多的 RNA 双链体结构, 这将减少合成成本和消除或减少长度依赖性的、自宿主细胞的非特异性干扰素样免疫应答的触发。aiRNA 中过客链的较短长度还将消除或减少 RISC 中过客链的非故意掺入, 从而又可以减少在 miRNA 介导的基因沉默中观察到的脱靶效应。aiRNA 可以用于目前基于 miRNA 的技术正在应用或考虑应用的所有领域, 包括生物学研究、生物技术和医药工业中的 R&D 研究、以及基于 miRNA 的诊断和治疗。

#### [0154] 1.0. aiRNA 结构支架

[0155] 本发明涉及能够调节 miRNA 介导的基因沉默的不对称双链 RNA 分子。在一个实施方案中, 本发明的 RNA 分子包括第一链和第二链, 其中第二链与第一链基本上互补, 并且第一链和第二链形成至少一个双链区, 其中第一链长于第二链 (长度不对称)。本发明的该 RNA 分子具有至少一个双链区、以及独立地选自 5' - 突出端、3' - 突出端和平头末端的 2 个末端 (例如, 参见图 1A, 2A-2D)。在另一个实施方案中, 第一链短于第二链。两者形成至少一个双链区, 并且可以具有独立地选自 5' - 突出端、3' - 突出端和平头末端的 2 个末端 (例如, 参见图 2E-2F)。

[0156] 在单个核苷酸的改变、添加和缺失可关键性地影响分子的功能性的小 RNA 调节剂

制备领域 (Elbashir 等人, 2001c) 中, aiRNA 支架提供了与具有 21-nt 双链 RNA 的经典 siRNA 结构不同的结构平台, 经典 siRNA 结构在每条链及其相应的 3' 突出端上是对称的。此外, 本发明的 aiRNA 提供一种非常需要的设计新型小分子调节剂的新方法, 如下文实施例中的数据显示的, 该新型小分子调节剂可以克服目前在基于 RNAi 的研究和药物开发中遇到的障碍。例如, 自结构上模拟 siRNA 的 aiRNA 得到的数据显示, aiRNA 在诱导基因沉默方面比 siRNA 更有效、有力、快速开始、持久和特异。

[0157] 本发明 RNA 分子的任何单链区, 包括任何末端突出和在 2 个双链区之间的缺口, 都可以通过化学修饰或二级结构进行抵抗降解的稳定化。RNA 链可以具有未配对或不完全配对的核苷酸。每条链可以具有一个或多个切口 (在核酸主链中的切开, 例如参见图 1B)、缺口 (具有一个或多个缺失核苷酸的断裂链, 例如参见图 1C)、和经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。不仅 RNA 分子中的任何或所有核苷酸可以进行化学修饰, 而且每条链可以与一个或多个结构部分缀合以增强其功能性, 所述结构部分例如一或多个肽、抗体、抗体片段、适体、聚合物、脂质、寡核苷酸等等。在某些其他实施方案中, 加入结构部分以增强一种或多种药理学性质, 例如药物吸收。

[0158] 在一个实施方案中, 第一链比第二链长至少 1nt。在一个进一步的实施方案中, 第一链比第二链长至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20nt。在另一个实施方案中, 第一链比第二链长 20-100nt。在一个进一步的实施方案中, 第一链比第二链长 2-12nt。在一个更进一步的实施方案中, 第一链比第二链长 3-10nt。

[0159] 在一个实施方案中, 第一链或长链具有 5-100nt、或优选 10-30 或 12-30nt、或更优选 15-28nt 的长度。在一个实施方案中, 第一链长度是 21 个核苷酸。在一个实施方案中, 第二链或短链具有 3-30nt、或优选 3-29nt 或 10-26nt、或更优选 12-26nt 的长度。在一个实施方案中, 第二链具有 15 个核苷酸的长度。

[0160] 在一个实施方案中, 双链区具有 3-98bp 的长度。在一个进一步的实施方案中, 双链区具有 5-28bp 的长度。在一个更进一步的实施方案中, 双链区具有 10-19bp 的长度。双链区的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30bp。

[0161] 在一个实施方案中, RNA 分子的双链区不包含任何错配或凸起, 并且 2 条链在双链区中彼此完全互补。在另一个实施方案中, RNA 分子的双链区包含错配和 / 或凸起。

[0162] 在一个实施方案中, 末端突出端是 1-10 个核苷酸。在一个进一步的实施方案中, 末端突出端是 1-8 个核苷酸。在另一个实施方案中, 末端突出端是 3nt。

[0163] 1.1. 既具有 5' - 突出端又具有 3' - 突出端的双链体 RNA 分子

[0164] 参考图 1A, 在本发明的一个实施方案中, 双链 RNA 分子在第一链上具有 5' - 突出端和 3' - 突出端。该 RNA 分子包括第一链和第二链; 第一链和第二链形成具有基本上互补序列的至少一个双链区, 其中第一链长于第二链。在第一链上, 在双链区侧翼, 在 5' 和 3' 末端上都存在未配对的突出端。

[0165] 在一个实施方案中, 第一链比第二链长至少 2nt。在一个进一步的实施方案中, 第一链比第二链长至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20nt。在另一个实施方案中, 第一链比第二链长 20-100nt。在一个进一步的实施方案中, 第一链比第二链长 2-12nt。在一个更进一步的实施方案中, 第一链比第二链长 3-10nt。

[0166] 在一个实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度,并且第二链具有 3-30 个核苷酸的长度。在一个更进一步的实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度,并且第二链具有 3-18 个核苷酸的长度。

[0167] 在一个实施方案中,第一链具有 10-30 个核苷酸的长度。在一个进一步的实施方案中,第一链具有 10-30 个核苷酸的长度,并且第二链具有 3-28 个核苷酸的长度。在一个更进一步的实施方案中,第一链具有 10-30 个核苷酸的长度,并且第二链具有 3-19 个核苷酸的长度。

[0168] 在一个实施方案中,第一链具有 12-26 个核苷酸的长度。在一个进一步的实施方案中,第一链具有 12-26 个核苷酸的长度,并且第二链具有 10-24 个核苷酸的长度。在一个更进一步的实施方案中,第一链具有 12-26 个核苷酸的长度,并且第二链具有 10-19 个核苷酸的长度。

[0169] 在一个实施方案中,第一链具有 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30nt 的长度。在另一个实施方案中,第二链具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28nt 的长度。

[0170] 在一个实施方案中,第一链具有 21nt 的长度,并且第二链具有 15nt 的长度。该具体实施方案有时在下文中称作“15/21”构型。在某些“15/21”构型中,长链在 3' 末端和 5' 末端均具有 3-nt 的突出端。

[0171] 在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 1-8nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 2-6nt 的长度。在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0172] 在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 1-6nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 2-4nt 的长度。在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0173] 在一个实施方案中,3' - 突出端的长度等于 5' - 突出端的长度。在另一个实施方案中,3' - 突出端长于 5' - 突出端。在一个备选实施方案中,3' - 突出端短于 5' - 突出端。

[0174] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括约 15nt 的基本上互补序列的双链区、3-nt 3' - 突出端和 3-nt 5' - 突出端。第一链是 21nt 并且第二链是 15nt。在一个特征中,各种实施方案的双链区由完全互补的序列组成。在一个备选特征中,双链区包括至少一个切口(图 1B)、缺口(图 1C)和 / 或错配(凸起或环)。

[0175] 在一个实施方案中,双链区具有 3-98bp 的长度。在一个进一步的实施方案中,双链区具有 5-28bp 的长度。在一个更进一步的实施方案中,双链区具有 10-19bp 的长度。双链区的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30bp。可以存在一个以上双链区。

[0176] 在一个实施方案中,第一链是引导链(guide strand),其能够靶向基本上互补的基因转录物例如信使 RNA(mRNA),通过切割或通过翻译阻遏实现基因沉默。

[0177] 以上讨论的相同原则和特征也适用于第二链长于第一链(图 2E)的实施方案。

[0178] 1.2. 具有平头末端以及 5' - 突出端或 3' - 突出端的双链体 RNA 分子

[0179] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区、一个平头末端和一个 5' - 突出

端或 3' - 突出端 (参见例如图 2A 和 2B)。该 RNA 分子包括第一链和第二链,其中第一链和第二链形成双链区,其中第一链长于第二链。

[0180] 在一个实施方案中,双链区具有 3-98bp 的长度。在一个进一步的实施方案中,双链区具有 5-28bp 的长度。在一个更进一步的实施方案中,双链区具有 10-18bp 的长度。双链区的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30bp。双链区可以具有与就其他实施方案描述的特性类似的特性,故不必在此重复。例如,双链区可以由完全互补的序列组成,或包括至少一个切口、缺口和 / 或错配 (凸起或环)。

[0181] 在一个实施方案中,第一链比第二链长至少 1nt。在一个进一步的实施方案中,第一链比第二链长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20nt。在另一个实施方案中,第一链比第二链长 20-100nt。在一个进一步的实施方案中,第一链比第二链长 2-12nt。在一个更进一步的实施方案中,第一链比第二链长 4-10nt。

[0182] 在一个实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度,并且第二链具有 3-30 个核苷酸的长度。在一个更进一步的实施方案中,第一链具有 10-30nt 的长度,并且第二链具有 3-19 个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,第一链具有 12-26 个核苷酸的长度,并且第二链具有 10-19 个核苷酸的长度。

[0183] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区、平头末端和 3' - 突出端 (参见例如图 2B)。

[0184] 在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 1-8nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 2-6nt 的长度。在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0185] 在一个备选实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区、平头末端和 5' - 突出端 (参见例如图 2A)。

[0186] 在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 1-6nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 2-4nt 的长度。在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0187] 1.3. 具有两个 5' - 突出端或两个 3' - 突出端的双链体 RNA 分子

[0188] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区、和两个 3' - 突出端或两个 5' - 突出端 (参见例如图 2C 和 2D)。该 RNA 分子包括第一链和第二链,其中第一链和第二链形成双链区,其中第一链长于第二链。

[0189] 在一个实施方案中,双链区具有 3-98bp 的长度。在一个进一步的实施方案中,双链区具有 5-28bp 的长度。在一个更进一步的实施方案中,双链区具有 10-18bp 的长度。双链区的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30bp。

[0190] 在一个实施方案中,第一链比第二链长至少 1nt。在一个进一步的实施方案中,第一链比第二链长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20nt。在另一个实施方案中,第一链比第二链长 20-100nt。在一个进一步的实施方案中,第一链比第二链长 2-12nt。在一个更进一步的实施方案中,第一链比第二链长 4-10nt。

[0191] 在一个实施方案中,第一链具有 5-100nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,第

一链具有 5-100nt 的长度,并且第二链具有 3-30 个核苷酸的长度。在一个更进一步的实施方案中,第一链具有 10-30nt 的长度,并且第二链具有 3-18 个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,第一链具有 12-26 个核苷酸的长度,并且第二链具有 10-16 个核苷酸的长度。

[0192] 在一个备选实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区和两个 3' - 突出端(参见例如图 2C)。双链区具有与就其他实施方案所描述的类似特性。

[0193] 在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 1-6nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,3' - 突出端具有 2-4nt 的长度。在一个实施方案中,3' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0194] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括双链区和两个 5' - 突出端(参见例如图 2D)。

[0195] 在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1-10nt 的长度。在一个进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 1-6nt 的长度。在一个更进一步的实施方案中,5' - 突出端具有 2-4nt 的长度。在一个实施方案中,5' - 突出端具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的长度。

[0196] 上文讨论的相同原则和特征也适用于第二链长于第一链的实施方案(图 2F)。

[0197] 2.0. aiRNA 的设计

[0198] 为了易于理解,本发明的原则在下文中有时使用如下例子进行解释和举例说明,在所述例子中 (a) 在 siRNA 应用中,反义链是 aiRNA 分子的较长链;(b) 在 miRNA 模拟物应用中,具有与成熟 miRNA 相似的序列的反义链是 aiRNA 分子的较长链;和 (c) 在 miRNA 抑制剂应用中,具有与成熟 miRNA 基本上互补的序列的有义链是 aiRNA 分子的较长链。然而,相反情况也可以存在并且考虑作为本发明的部分,即在 siRNA 应用和 miRNA 模拟物应用中,反义链可以是 aiRNA 的较短链,在 miRNA 抑制剂应用中,有义链可以是较短链——在其他例子中描述的特征和原则适用于这些情况,故不必重复。

[0199] siRNA 和 miRNA 已经广泛用作研究工具,并且被开发作为药物候选物。(参见例如, Dykxhoorn, Novina & Sharp. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:457-467(2003); Kim & Rossi, *Nature Rev. Genet.* 8:173-184(2007); deFougerolles 等人 *Nature Rev. Drug Discov.* 6:443-453(2007); Czech, *NEJM* 354:1194-1195(2006); 和 Mack, *Nature Biotech.* 25:631-638(2007))。本发明的双链体 RNA 分子,即 aiRNA,可以衍生自本领域已知的 siRNA 和 miRNA。

[0200] 本发明提供将 siRNA 或 miRNA 转化成 aiRNA 的方法。该转化导致与原始分子相比具有至少一种改善的性质的新双链体 RNA 分子。该性质可以是大小、功效、效力、开始的速度、持久性、合成成本、脱靶效应、干扰素应答或递送。

[0201] 在一个实施方案中,原始分子是双链体 RNA 分子,例如 siRNA 或 miRNA/miRNA\* (引导/过客) 双联体。该双链体 RNA 分子包括形成至少一个双链区的反义链(例如引导链)和有义链(例如过客链)。该方法包括改变一条或两条链的长度,从而使得反义链长于有义链。在一个实施方案中,有义过客链被缩短。在另一个实施方案中,反义引导链被延长。在一个更进一步的实施方案中,有义链被缩短并且反义链被延长。可以合成不变的或具有改变大小的反义和有义 RNA 链,并且随后在形成 aiRNA 分子条件下组合。

[0202] 在再一实施方案中,该方法包括改变反义和/或有义链的长度,从而使得形成具有 1-6 个核苷酸的 3' - 突出端和 1-6 个核苷酸的 5' - 突出端中的至少之一的双链体 RNA

分子。

[0203] 在一个实施方案中,原始分子是单链 RNA 分子,例如成熟引导 miRNA 或过客 miRNA。该方法包括合成与该单链模板或其部分基本上互补的较短 RNA 链,并将该合成的链与原始单链 RNA 分子或其缩短形式在杂交条件下组合,在所述杂交条件下形成不对称链长度的 aiRNA 分子。在一个实施方案中,模板 RNA 是成熟引导 miRNA,并且所得到的 aiRNA 是其模拟物。在另一个实施方案中,模板 RNA 是 miRNA/miRNA\* 双链体中的过客链(miRNA\*),并且所得到的 aiRNA 是引导 miRNA 的抑制剂。

[0204] 备选地,可以从头设计本发明的双链体 RNA 分子。利用 siRNA 和 miRNA 的设计方法,例如基因步移法,可以设计本发明的双链体 RNA 分子。

[0205] 本发明的 RNA 分子可以用生物信息学方法进行设计,并且随后在体外和体内进行测试,以确定其对靶基因的调节功效和任何脱靶效应的存在。基于这些研究,随后可以选择且修饰该 RNA 分子的序列,以改善对靶基因的调节功效和使脱靶效应最小化。(参见例如,Patzel, Drug Discovery Today 12:139-148(2007))。

#### [0206] 2.1. 双链体 RNA 分子中的未配对或错配区域

[0207] aiRNA 双链体的 2 条单链可以具有至少一个未配对的或不完全配对的(包含例如一个或多个错配)区域。在一个实施方案中,未配对或不完全配对的区域是 RNA 分子的至少一个末端区域,包括具有平头末端的末端区域、具有 3' - 凹缺或 5' 突出端的末端区域、和具有 5' 凹缺或 3' 突出端的末端区域。如本文所使用的,末端区域是 RNA 分子中包括一个末端和邻近区域的区域。

[0208] 在一个实施方案中,未配对或不完全配对的区域在 aiRNA 分子的双链区中。在一个进一步的实施方案中,不对称 RNA 双链体具有未配对的凸起或环结构。

#### [0209] 2.2. 双链体 RNA 分子中的序列基序

[0210] 在本发明 aiRNA 分子的设计中,总体 GC 含量可以改变。在一个实施方案中,双链区的 GC 含量是 20-70%。在一个进一步的实施方案中,双链区的 GC 含量小于 50%、或优选 30-50%,以使得链分离更容易,这是因为 G-C 配对强于 A-U 配对。

[0211] 在某些实施方案中,末端突出端,例如 5' 末端,的核苷酸序列可以独立于任何模板序列(例如靶 mRNA 序列)进行设计,即不必与靶 mRNA(在 siRNA 或 miRNA 模拟物的情况下)或靶 miRNA(在 miRNA 抑制剂的情况下)基本上互补。在一个实施方案中,较长链或反义链的突出端,例如在 5' 或 3', 具有至少一个 A、U 或 dT。在一个实施方案中,该突出端具有至少一个“AA”、“UU”或“dTdT”基序,其与某些其他基序比较已显示出增加的功效。在一个实施方案中,较长链或反义链的 5' 突出端具有“AA”基序。在另一个实施方案中,较长链或反义链的 3' 突出端具有“UU”基序。

#### [0212] 2.3. 核苷酸置换

[0213] 本发明 RNA 分子中的一个或多个核苷酸可以用脱氧核苷酸或经修饰的核苷酸或核苷酸类似物进行置换。置换可以在 RNA 分子中的任何地方发生,例如发生在一个或两个突出端区域、和 / 或双链区。在某些情况下,置换增强 RNA 分子的物理性质,例如链亲和力、溶解性和抵抗 RNA 酶降解的抗性或其他方面增强的稳定性。

[0214] 在一个实施方案中,经修饰的核苷酸或类似物是糖、主链和 / 或碱基经修饰的核糖核苷酸。主链经修饰的核糖核苷酸可以在与另一个核糖核苷酸的磷酸二酯键连接中具有

修饰。在一个实施方案中，RNA 分子中的磷酸二酯键被修饰，以包括至少氮和 / 或硫杂原子。在一个实施方案中，经修饰的核苷酸或类似物是非天然碱基或经修饰的碱基。在一个实施方案中，经修饰的核苷酸或类似物是肌苷或三苯甲基化碱基。

[0215] 在再一实施方案中，核苷酸类似物是糖经修饰的核糖核苷酸，其中 2' -OH 基团由选自 H、OR、R、卤素、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> 和 CN 的基团替代，其中每个 R 独立地选自 C1-C6 烷基、链烯基和炔基，并且卤素选自 F、Cl、Br 和 I。

[0216] 在一个实施方案中，核苷酸类似物是包含硫代磷酸酯基团的主链经修饰的核糖核苷酸。

[0217] 2.4. 作为 miRNA 模拟物的 aiRNA

[0218] 可以提供新的双链 aiRNA 构建体，以补偿受试者中的功能性内源 miRNA 的缺乏或水平不足。在第一方法中，选择包含成熟 miRNA 的内源双链区作为模板用于设计 aiRNA 模拟物。此种模板可以是单链成熟 miRNA 的任何合适的内源前体，包括 pir-miRNA、前 miRNA、和源于前 miRNA 的核糖核酸酶 Dicer 消化的引导 / 过客 (miRNA/miRNA\*) 双链体。参考图 18A，这些潜在模板可以保留由双链区内的核苷酸错配引起的二级结构，例如凸起，其可以拷贝到 aiRNA 设计内。因为此种二级结构可能在成熟 miRNA 的基因沉默功能中起作用，例如促进链分离，所以这种方法有利地为 aiRNA 保留了这种可能性。

[0219] 在图 18A 中显示的特定实施方案中，在底部显示的茎 - 环结构代表人 Let7a 基因的前 miRNA (pre-Let7a)，其中最终成为成熟 miRNA 的 22 个核苷酸标有下划线。在 hsa-Let7a miRNA 的 aiRNA 模拟物 (“Let-7a aiRNA 寡聚物”) 的设计中，双链区的有下划线部分用作 aiRNA 的 21-nt 较长链的基础。来自 pre-Let7a (其整体是一个单链茎 - 环发夹分子) 双链区中的基本上但不完全互补序列的 15-nt 段用作较短链以完成 aiRNA 设计。如该图中所示，至少源于原始 pre-miRNA 中的 “GU/UG” 错配的鼓泡结构被保留在 aiRNA 设计中。在这个具体例子中，aiRNA 的较长链在 3' 和 5' 末端上都具有 3-nt 突出端。

[0220] 此外，如上在部分 2.0 中所述，通过改变链长可以将引导 / 过客 miRNA 双链体转变成 aiRNA。

[0221] 在第二方法中，将成熟 miRNA 序列的一部分拷贝到 aiRNA 的较长链内，并且不考虑成熟 miRNA 的天然前体中可能已存在的任何二级结构，产生基本上互补、优选完全互补的较短链。图 4A 显示 hsa-Let-7c miRNA 的模拟物 (“aiLet-7c 模仿物”) 等。成熟人 Let7c miRNA 的序列 (miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) 登记号 MIMAT0000064) 是：

[0222] hsa-Let-7c :5' -UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU

[0223] 将前 19 个核苷酸 (在图 19A 中有下划线的) 拷贝到 aiLet-7c 模仿物的较长链内于 5' 末端 “AA” 基序后。另外提供由 15 个核苷酸组成的完全互补的序列作为较短链，从而在较长链的 3' 和 5' 末端上各留下 3-nt 突出端。将 “AA” 基序加到较长链的 5' 末端，这是因为在尝试的基序中，它看起来可以在增强 aiRNA 功能性方面提供某些优点。如下文实施例中所示，2 种方法都可行。在一个实施方案中，aiRNA 模拟物采用 “15/21” 构型。然而，本文当然还可以使用其他 aiRNA 构型。

[0224] 本发明可以用于制备任何物种的任何给定 miRNA 的模拟物，所述物种包括植物 (例如，拟南芥属 (*Arabidopsis*))、蠕虫 (例如，秀丽线虫 (*C. elegans*))、昆虫 (例如，果蝇 (*Drosophila*)) 和动物，包括哺乳动物物种如小鼠和人。目前已知且可以用于产生本发明的

RNA 分子的人 miRNA 列在图 30 和 31 中。

### [0225] 2.5. 作为 miRNA 抑制剂的 aiRNA

[0226] 还可以提供双链 aiRNA 以抑制内源 miRNA, 例如通过减少细胞中的活性 miRNA 水平。目前的 antagomirs 基于单链反义寡核苷酸, 其在真核生物细胞中是出了名的不稳定。相比之下, 本发明 aiRNA 结构支架是双链的, 因此在细胞中稳定得多。如下文实施例 7 中所示, 它的新不对称设计显然可以在哺乳动物细胞内实现靶 miRNA 的有效抑制。

[0227] 在一个实施方案中, aiRNA 的第一链, 优选长链, 由与靶 miRNA 的至少部分基本上互补的序列组成。随后制备另一条 aiRNA 链, 优选短链, 以在序列上基本上互补, 优选完全互补, 第一链。在一个实施方案中, 短链在双链区中与长链不完全, 即仅部分地, 互补。

[0228] 在一个实施方案中, aiRNA 构建体的较长链设计为与靶 miRNA 的至少部分完全互补。例如, 图 19A 显示分别针对 hsa-Let-7c、miR-21 和 miR-155 的 3 种抑制剂构建体。每种抑制剂的相应靶 miRNA 序列显示于图 19B 中。每种抑制剂在 5' 末端处的“AA”基序后包括与成熟靶 miRNA 的前 19 个核苷酸完全互补的序列。在显示的例子中, aiRNA 构建体采用“15/21”构型, 其中较长的 21-nt 链在 3' 和 5' 末端上具有突出端。本文当然还可以使用其他 aiRNA 构型。

[0229] 尽管不希望受理论束缚, 但图 29 和以下给出了本发明 aiRNA 抑制 miRNA 的一种可能机制: 在细胞内, 内源 miRNA/miRNA\* 双链体和引入的 aiRNA 双链体的链不断地处于动态平衡中, 在该条件下有某些双链体不断地碱基配对在一起, 而其他的不断地分开。在任何给定时间, 形成和拆开的双链体之间的比, 或换言之, 结合速率和解离速率之间的比, 在很大程度上依赖于形成双链体的 2 条链之间的亲和力。尽管目前还不明了, 但 aiRNA 的较长链, 可能由于其设计的互补性或缺乏促进链分离的结构, 一旦与靶 miRNA 链碱基配对, 将对靶 miRNA 显示出比内源过客 miRNA (miRNA\*) 链更强的亲和力 (即, 更低的解离速率)。当在内源 miRNA/miRNA\* 双链体中存在有利于解离的错配或未配对区域时, 这可能尤其如此。由此, 随着时间过去, aiRNA 的较长链能够与内源过客 miRNA 竞争以和成熟引导 miRNA 形成更持久的双链体, 从而减少在任何给定时间时可用于实现预期基因沉默的未结合的引导 miRNA 的量。与对称构建体比较, aiRNA 构建体的长度不对称性有利于较长链和较短链之间的解离, 使得更多的较长链可用于竞争靶 miRNA 链。

[0230] 在一个优选实施方案中, aiRNA 的较长链与所靶向的引导 miRNA 的至少部分具有完全的碱基对互补性, 但这不必是必需的——只要互补性对于较长链足够高以致可以和内源过客 miRNA 竞争与引导 miRNA 形成双链体即可。

[0231] 本发明可以用于制备任何物种的任何给定 miRNA 的抑制剂, 所述物种包括植物 (例如, 拟南芥属)、蠕虫 (例如, 秀丽线虫)、昆虫 (例如, 果蝇) 和动物, 包括哺乳动物物种如小鼠和人。目前已知且可以用于产生本发明 RNA 分子的人 miRNA 列表在图 30 和 31 中。

### [0232] 3. 用途

#### [0233] 3.1. 研究和药物开发工具

[0234] 微小 RNA 在细胞中发挥基因调节功能; 已发现某些与各种类型的人类疾病, 包括癌症、病毒感染等相关。因此, miRNA 模拟物和抑制剂可以用于研究由 miRNA 调节的基因靶, 以及各种 miRNA 途径的机制和成分及其相互作用。

[0235] 本发明的方法和构建体可以用于在体外和体内研究 miRNA 途径和相关基因的功能。

能。本发明的 RNA 分子还可以用于转染培养的动物细胞,作为药物靶 / 途径鉴定和验证中的研究工具。例如,在将本发明的 RNA 分子转染或以其他方式递送到宿主细胞内后,可以监控这些细胞的表型或形态改变,这些改变可以提示某个目的途径已受影响。此种表型改变可以涉及细胞核数目、细胞核形态、细胞死亡、细胞增殖、DNA 断裂、细胞表面标记和有丝分裂指数等。在另一个例子中,可以分离或鉴定宿主细胞中的分子 / 底物和转染到细胞内的 miRNA 调节剂 (模拟物或抑制剂) 之间的相互作用,以发现潜在治疗靶。靶可以在上游并且调节 miRNA 活性,或靶可以在下游并且其活性由 miRNA 调节。此外,本发明的 RNA 分子可以用于在体内进行药物靶发现和验证,例如在具有患病组织或细胞群体的异种移植物动物模型中。

[0236] 鉴于 miRNA 网络或多个 miRNA 可以靶向相同基因产物或途径的证据 (Sethupathy P. 等人 RNA 12 :192-197 (2006)), 可以使用本发明的多种 RNA 分子,包括不同 miRNA 的模拟物、不同 miRNA 的抑制剂、以及不同 miRNA 的模拟物和抑制剂的混合物,研究各种 miRNA 途径之间的相互关系,包括对相同基因产物的共调节。

[0237] 就另外的体内应用而言,因为本发明提供了功能性 miRNA 模拟物和抑制剂,在将它们分别引入宿主体内后,可以采用系统生物学方法,研究被模拟或抑制的特定 miRNA 对不同细胞类型和不同组织的作用。

[0238] 此外,鉴于本发明 RNA 分子能够调节由 miRNA 介导的转录后基因沉默,故本发明的 RNA 分子可以用于在动物模型中造成不同于遗传工程化敲除模型的基因“敲低” (knockdown),以研究和验证基因功能。

[0239] 本发明的 RNA 分子可以以双链的双链体形式提供作为研究试剂,或可以分开为单链提供以双链形式使用。因此,本发明还提供了试剂盒,其包含以任何合适形式,包括上文描述那些形式,的本发明的 RNA 分子。

### [0240] 3.2. 治疗用途

[0241] 本发明的 RNA 分子可以用于治疗和 / 或预防各种疾病,包括在 Dykxhoorn, Novina & Sharp. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 :457-467 (2003) ; Kim & Rossi, Nature Rev. Genet. 8 : 173-184 (2007) ; de Fougerolles 等人 Nature Rev. Drug Discov. 6 :443-453 (2007) ; Czech, NEJM 354 :1194-1195 (2006) ; 和 Mack, Nature Biotech. 25 :631-638 (2007) ; Tong 和 Nemunaitis, Cancer Gene Therapy 15 :341-355 (2008) 中概述的疾病。

[0242] 在一个实施方案中,本发明的模拟物用于将所需 miRNA 功能重构至正常水平,从而治疗疾病或减轻症状。在另一个实施方案中,本发明的抑制剂用于减少或消除非期望的 miRNA 活性,从而治疗由该 miRNA 的超表达或错误表达引起的疾病。还可以组合使用多种模拟物、多种抑制剂、以及模拟物和抑制剂的混合物。

[0243] 在一个实施方案中,本发明通过靶向一种或多种癌症相关基因用作癌症治疗或预防癌症。可以通过如下方式实现该方法:使用本发明的 miRNA 模拟物和 / 或抑制剂上调肿瘤抑制基因,和 / 或使用本发明的 miRNA 抑制剂和 / 或模拟物沉默涉及细胞增殖或其他癌症表型的基因。

[0244] 在一个实施方案中,根据本发明的治疗性模拟物模拟靶向癌基因的 miRNA。此种肿瘤抑制性 miRNA 的例子可以包括:let-7 家族、miR-15a、miR-16-1、miR-34a、miR-143、miR-145 等等。由这些 miRNA 靶向的各种癌基因的例子包括 k-Ras 和 bcl-2。例如,已显

示 k-Ras 由 miRNA Let-7 调节。这些癌基因在大多数临床病例中是活跃且相关的。例如, k-Ras 在大多数人结肠癌、胰腺癌和非小细胞肺癌中是异常活跃的。此外, k-Ras 突变赋予针对化学治疗和目前靶向治疗的抗性。

[0245] 在一个实施方案中,根据本发明的治疗性抑制剂抑制靶向肿瘤抑制基因的 miRNA。此种 miRNA 的例子可以包括 miR-17/92 簇、miR-21、miR-106、miR-155、miR-221、miR-222 等等。由这些 miRNA 靶向的肿瘤抑制基因的例子包括 ERK5 和 p27 (kip1) (Tong 和 Nemunaitis, CancerGene Therapy 15 :341-355 (2008))。

[0246] 这些 RNA 分子还可以用于调节由被模拟或抑制的 miRNA 靶向的非癌基因。本发明的 RNA 分子还可以用于治疗或预防眼疾病 (例如老年性黄斑变性 (AMD) 和糖尿病性视网膜病 (DR)); 感染性疾病 (例如 HIV/AIDS、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、RCV、巨细胞病毒 (CMV)、登革热、西尼罗病毒); 呼吸性疾病 (例如呼吸道合胞病毒 (RSV)、哮喘、囊性纤维化); 神经学疾病 (例如亨廷顿氏病 (HD)、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、脊柱损伤、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、疼痛); 心血管疾病; 代谢病症 (例如糖尿病); 遗传病症; 和炎症病变 (例如, 炎症肠病 (IBD)、关节炎、类风湿性关节炎、自身免疫病症)、皮肤病学疾病、心理障碍 (例如, 双相型障碍)。

#### [0247] 4. 制造和使用

##### [0248] 4.1. 制造 aiRNA 分子

[0249] 本发明的 RNA 分子可以经由任何合适方法进行制备,包括通过化学反应和合成、通过生物学工艺、和 / 或酶实现的工艺。

[0250] 给定序列的 RNA 分子的化学合成是本领域众所周知的。用于制备 RNA 分子的生物学工艺也是众所周知的。例如,可以构建具有合适启动子的 DNA 表达载体 (病毒、真核或细菌的),在转染到宿主细胞 (例如细菌) 内后,将相应 DNA 序列转录成所设计的 RNA 序列。在一个实施方案中,转录物可以是最终 RNA 双链体的前体,从而需要酶作用例如核糖核酸酶实现的位点特异性切割。例如,本发明的 aiRNA 分子的 2 条链可以转录成一条单链,其需要切割成 2 条分开的链以形成本发明的双链 RNA 分子。

[0251] 本发明的一个方面涉及表达载体,其包括编码本发明双链 RNA 分子的部分或全部 (例如,不对称链之一) 的 DNA 序列,所述 DNA 序列与表达控制序列例如启动子可操作地连接。在一个实施方案中,载体是单链性的。在一个进一步的实施方案中,提供各自编码本发明 RNA 分子的不同链的 2 种不同载体以共转染细胞,在所述细胞内 2 条表达的链形成双链体。在另一个实施方案中,载体是双链性的,每条链包含与表达控制序列可操作地连接的编码 RNA 分子的不同链的 DNA 序列。此外,本发明提供了包括这些表达载体的细胞。该细胞可以是哺乳动物、禽类或细菌细胞。

[0252] aiRNA 分子的 2 条链可以在任何上述工艺中分开或同时制造。例如,在生物学工艺中,可以构建 2 种载体以分别表达 aiRNA 的较短链和较长链,或可以构建具有 2 条链的单个载体以同时表达 aiRNA 分子的 2 条链。

##### [0253] 4.2. RNA 分子的修饰

[0254] 裸 RNA 分子是相对不稳定的,可以在体内被相对快速地降解。化学修饰可以引入本发明的 RNA 分子,包括 siRNA、miRNA 的模拟物和 miRNA 的抑制剂中,以改善其半衰期和进一步减少出现非特异性基因打靶效应的危险而不降低其生物活性。

[0255] 为改善各种 RNA 分子,包括反义 RNA、核酶、适体和 RNAi,的稳定性,已研究了对 RNA 分子的修饰(参见例如,Chiu & Rana, RNA9 :1034-1048(2003);Czauderna 等, Nucleic Acids Research 31 :2705-2716(2003);Zhang HY 等, Curr Top Med Chem. 6 : 893-900(2006);Kim & Rossi, Nature Rev. Genet. 8 :173-184(2007);de Fougerolles 等. Nature Rev. Drug Discov. 6 :443-453(2007); 和 Schmit, Nature Biotech. 25 : 273-275(2007);和 Mack, Nature Biotech. 25 :631-638(2007))。

[0256] 本领域技术人员已知的任何稳定化修饰均可以用于改善本发明 RNA 分子的稳定性。在本发明 RNA 分子内,可以将化学修饰引入磷酸主链(例如,硫代磷酸酯键)、核糖(例如,锁核酸、2'-脱氧-2'-氟尿苷、2'-O-甲基)、和/或碱基(例如,2'-氟嘧啶)。此种化学修饰的几个例子在下文中概述。

[0257] 可以采用在核糖的 2' 位处的化学修饰,例如 2'-O-甲基嘌呤和 2'-氟嘧啶(其可以增加抵抗血清中的核酸内切酶活性的抗性),稳定本发明的 RNA 分子。应小心选择引入该修饰的位置,以避免显著降低 RNA 分子的沉默效力。例如,在引导链的 5' 末端上的该修饰可以减少沉默活性。另一方面,2'-O-甲基修饰可以在双链区在 2 条 RNA 链之间交错,以改善稳定性同时保存基因沉默效力。2'-O-甲基修饰还可以消除或减少干扰素诱导。

[0258] 另一种稳定化修饰是硫代磷酸酯(P=S)键连接。硫代磷酸酯(P=S)键引入 RNA 分子内,例如在 3'-突出端处,可以提供对抗核酸外切酶的保护作用。

[0259] 脱氧核糖核苷酸引入 RNA 分子内也可以减少制造成本且增加稳定性。

[0260] 在一个实施方案中,对 3'-突出端、5'-突出端或两者进行抗降解作用的稳定化。

[0261] 在一个实施方案中, RNA 分子包含至少一个经修饰的核苷酸或其类似物。在一个进一步的实施方案中,经修饰的核糖核苷酸在其糖、主链、碱基或三者的任何组合上是经修饰的。

[0262] 在一个实施方案中,核苷酸类似物是糖经修饰的核糖核苷酸。在一个进一步的实施方案中,核苷酸类似物的 2'-OH 基团由选自 H、OR、R、卤素、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> 或 CN 的基团替代,其中每个 R 独立地是 C1-C6 烷基、链烯基或炔基,并且卤素是 F、Cl、Br 或 I。

[0263] 在一个备选实施方案中,核苷酸类似物是包含硫代磷酸酯基团的主链经修饰的核糖核苷酸。

[0264] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包含至少一个脱氧核苷酸。在一个进一步的实施方案中,第一链包括 1-6 个脱氧核苷酸。在一个更进一步的实施方案中,第一链包括 1-3 个脱氧核苷酸。在另一个实施方案中,3'-突出端包括 1-3 个脱氧核苷酸。在一个进一步的实施方案中,5'-突出端包括 1-3 个脱氧核苷酸。在一个备选实施方案中,第二链包括 1-5 个脱氧核苷酸。

[0265] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子包括包含至少一个脱氧核苷酸的 3'-突出端或 5'-突出端。在另一个实施方案中, RNA 3'-突出端和/或 5'-突出端由脱氧核苷酸组成。

[0266] 在一个实施方案中,双链体 RNA 分子与实体缀合。在一个进一步的实施方案中,实体选自肽、抗体、聚合物、脂质、寡核苷酸和适体。

[0267] 在另一个实施方案中,第一链和第二链通过化学接头连接。

### [0268] 4.3. RNA 分子的体内递送

[0269] RNAi 治疗应用的一个主要障碍是 siRNA 向靶细胞的递送 (Zamore PD, Aronin N. *Nature Medicine* 9:266-8(2003))。已开发各种方法用于递送 RNA 分子,特别是 siRNA 分子(参见例如, Dykxhoorn, Novina & Sharp. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:457-467(2003); Kim & Rossi, *Nature Rev. Genet.* 8:173-184(2007); 和 de Fougères 等. *Nature Rev. Drug Discov.* 6:443-453(2007))。本领域技术人员已知的任何递送方法都可以用于递送本发明的 RNA 分子。

[0270] 递送中的主要问题包括在血清中的不稳定性、非特异性分布、组织屏障和非特异性干扰素应答 (Lu & Woodle, *Methods in Mol Biology* 437:93-107(2008))。与其 siRNA 和 miRNA 对应物比较, aiRNA 分子具有几个优点, 这些优点使得更广泛范围的方法能够用于递送目的。首先, aiRNA 可以设计为比其 siRNA 和 miRNA 对应物小, 由此减少或消除任何干扰素应答。其次, aiRNA 更有力、开始得更快速、更有效且持久, 因此为达到治疗目标需要更少量/剂量的 aiRNA。第三, aiRNA 是双链的且比单链反义寡聚物和 miRNA 更稳定, 并且它们可以进一步进行化学修饰以增强稳定性。因此, 本发明的 RNA 分子可以经由各种全身或局部递送途径递送到受试者内。在某些实施方案中, 本发明的分子通过全身递送途径进行递送, 包括静脉内 (I.V.) 和腹膜内 (ip)。在其他实施方案中, 本发明的分子通过局部递送途径进行递送, 例如鼻内、玻璃体内、气管内、脑内、肌内、关节内和肿瘤内。

[0271] 递送技术的例子包括裸 RNA 分子的直接注射、RNA 分子与天然配体例如胆固醇或适体的缀合、脂质体制剂的递送、和与抗体-鱼精蛋白融合蛋白的非共价结合。其他载体选择包括带正电荷的载体(例如, 阳离子脂质和聚合物)和各种蛋白质载体。在一个实施方案中, 本发明分子的递送使用基于阳离子脂质体复合物或聚合物复合物系统的配体靶向递送系统 (Woodle 等人 *J Control Release* 74:309-311; Song 等人 *Nat Biotechnol.* 23(6):709-717(2005); Morrissey 等人 *Nat Biotechnol.* 23(8):1002-1007(2005))。

[0272] 在一个实施方案中, 本发明的分子用胶原载体例如 atelocollagen 进行配制, 用于体内递送。已报告 atelocollagen 保护 siRNA 免遭 RNA 酶降解, 并且使得能够持续释放 (Minakuchi 等人 *Nucleic Acids Res.* 32:e109(2004); Takei 等人 *Cancer Res.* 64:3365-3370(2004))。在另一个实施方案中, 本发明的分子用纳米颗粒进行配制或形成纳米乳液, 例如 RGD 肽配体靶向的纳米颗粒。已证实, 不同的 siRNA 寡聚物可以组合在相同的 RGD 配体靶向纳米颗粒中, 以同时靶向几种基因 (Woodle 等人 *Materials Today* 8(suppl 1):34-41(2005))。

[0273] 病毒载体也可以用于递送本发明的 RNA 分子。在一个实施方案中, 慢病毒载体用于递送 RNA 分子转基因, 该转基因可以整合到基因组内用于稳定表达。在另一个实施方案中, 腺病毒和腺相关病毒 (AAV) 用于递送 RNA 分子转基因, 该转基因不整合到基因组内并具有附加型表达。

[0274] 此外, 细菌可以用于递送本发明的 RNA 分子(参见 Xiang, Fruehauf, & Li, *Nature Biotechnology* 24:697-702(2006))。

### [0275] 4.4. 药物组合物和制剂

[0276] 本发明的药物组合物和制剂, 除 RNA 成分外, 可以与针对 siRNA、miRNA 和反义 RNA 开发的药物组合物和制剂相同或相似(参见例如, Kim & Rossi, *Nature Rev. Genet.* 8:

173-184(2007) ;和 de Fougerolles 等, NatureRev. Drug Discov. 6 :443-453(2007))。这些药物组合物和制剂中的 siRNA、miRNA 和反义 RNA 可以由本发明的双链体 RNA 分子替换。药物组合物和制剂还可以进一步修饰,以适应本发明的双链体 RNA 分子。

[0277] 所公开的双链体 RNA 分子的“药学上可接受的盐”或“盐”是所公开的双链体 RNA 分子的产物,其包含离子键,并且一般通过使所公开的双链体 RNA 分子与酸或碱反应而产生,且适于施用给受试者。药学上可接受的盐可以包括但不限于,酸加成盐,包括盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、乙酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐和酒石酸盐;碱金属阳离子,例如 Na、K、Li,碱土金属盐,例如 Mg 或 Ca,或有机胺盐。

[0278] “药物组合物”是以适于施用给受试者的形式包含所公开的双链体 RNA 分子的制剂。在一个实施方案中,药物组合物是散装或单位剂型。单位剂型可以是各种形式,包括例如胶囊、IV 袋、片剂、气雾剂吸入器上的单泵、或小瓶。在单位剂量组合物中活性成分(例如所公开的双链体 RNA 分子或其盐的制剂)量是有效量,可以根据所涉及的具体治疗而改变。本领域技术人员将明了依赖于患者的年龄和状况,有时必须对剂量进行常规的改变。剂量还取决于施用途径。可以考虑各种途径,包括经口、肺、直肠、肠胃外、经皮、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鼻内等。用于本发明双链体 RNA 分子的局部或经皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。在一个实施方案中,活性双链体 RNA 分子在无菌条件下与药学上可接受的载体,以及需要的任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

[0279] 本发明还提供药物制剂,其包括与至少一种药学上可接受的赋形剂或载体组合的本发明双链体 RNA 分子。如本文所使用的,“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”意欲包括与药学施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适载体在“Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版,”Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 中描述,其引入本文作为参考。此类载体或稀释剂的例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、和 5% 人血清白蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介物,例如不挥发性油。此种介质和试剂用于药学活性物质的使用是本领域众所周知的。除非任何方便的介质或试剂与活性双链体 RNA 分子不相容,否则考虑其在组合物中的使用。增补性活性双链体 RNA 分子也可以掺入组合物内。

[0280] 在一个实施方案中,药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂包括用于静脉内递送的脂质。脂质可以是:磷脂、合成的磷脂酰胆碱、天然磷脂酰胆碱、鞘磷脂、神经酰胺、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、胆固醇、胆固醇硫酸盐、以及半抗原和 PEG 缀合的脂质。脂质可以为纳米乳液、胶束、乳液、悬浮液、纳米悬浮液、niosomes 或脂质体的形式。在一个实施方案中,药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂为胶束乳液、悬浮液或纳米颗粒悬浮液的形式,并且它可以进一步包括静脉内可接受的蛋白质,例如人白蛋白或其衍生物,用于静脉内递送。

[0281] 在一个实施方案中,药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂包括用于经口递送的蜡质材料。蜡质材料可以是甘油单、二或三酯,PEG 的单、二脂肪酸酯,PEG 缀合的维生素 E(维生素 E TPGs),Gelucire 和 / 或 Gelucire44/14。在一个实施方案中,药学上可接受

的赋形剂,例如 Gelucire 44/14,与表面活性剂混合,所述表面活性剂可以是 Tween 80 或 Tween 20。可以进一步配制药组组合物的这些实施方案用于经口施用。用于配制的方法公开于 PCT 国际申请 PCT/US02/24262(W003/011224)、美国专利申请公开号 2003/0091639 和美国专利申请公开号 2004/0071775 中,所述专利申请各自引入本文作为参考。

[0282] 本发明的双链体 RNA 分子可以通过下述方式制备的合适剂型进行施用:根据常规工艺(即,通过产生本发明的药物组合物),将治疗有效量(例如,足以通过抑制肿瘤生长、杀死肿瘤细胞、治疗或预防细胞增生性病等达到所需疗效的有效水平)的本发明双链体 RNA 分子(作为活性成分)与标准药载体或稀释剂混合。这些工艺可以酌情地包括混合、粒化和压片或溶解成分以获得所需制剂。在另一个实施方案中,治疗有效量的本发明双链体 RNA 分子在不含标准药载体或稀释剂的合适剂型中施用。

[0283] 药学上可接受的载体包括固体载体,例如乳糖、白土、蔗糖、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸等。示例性液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、水等。类似地,载体或稀释剂可以包括本领域已知的时间延迟材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,单独地或连同蜡、乙基纤维素、羟丙甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯等。其他填充剂、赋形剂、调味剂和其他添加剂,例如本领域已知的那些,也可以包括在本发明的药物组合物中。

[0284] 包含本发明的活性双链体 RNA 分子的药物组合物可以以一般已知的方式进行制造,例如借助于常规混合、溶解、粒化、锭剂制造、研末、乳化、封装、截留或冻干工艺。药物组合物可以使用一种或多种生理可接受的载体,包括赋形剂和/或辅助剂,以常规方式配制,所述载体可以促进活性双链体 RNA 分子加工成可以药学使用的制剂。当然,合适制剂依赖于所选择的施用途径。

[0285] 本发明的双链体 RNA 分子或药物组合物可以通过目前用于化学治疗的许多熟知方法施用给受试者。例如,对于癌症的治疗,本发明的双链体 RNA 分子可以直接注射到肿瘤内、注射到血流内或体腔内或口服或用贴剂通过皮肤应用。对于银屑病的治疗,全身施用(例如经口施用)或局部施用于受累的皮肤区域是优选的施用途径。所选择的剂量应足以构成有效治疗,但又不高至引起无法接受的副作用。应在治疗过程中和治疗后的一段合理时期严密地监视疾病(例如癌症、银屑病等)的状况和患者的健康。

[0286] 本发明的双链体 RNA 分子或药物组合物可以以任何合适的给药范围、给药频率和血浆浓度施用于受试者。在一个实施方案中,受试者用本发明的药物组合物以 1ng 至 1g/天、100ng 至 1g/天、或 1 $\mu$ g 至 500mg/天等的有效剂量进行治疗。

## 实施例

[0287] 下文提供了实施例以进一步举例说明本发明的不同特征。这些实施例还举例说明对于实践本发明有用的方法。这些实施例对请求保护的本发明不构成限制。

[0288] 方法与材料

[0289] 细胞培养和试剂

[0290] HeLa、SW480、DLD1、HT29 和 H1299 细胞得自 ATCC,并且在包含 10% 胎牛血清(FBS)、100 单位/ml 青霉素、100 $\mu$ g/ml 链霉素和 2mM L-谷氨酰胺(Invitrogen)的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基(DMEM)中培养。新鲜的外周血单核细胞(PBMC)得自

AllCells LLC, 并且维持在包含 10% FBS 和 pen/strep (Invitrogen) 的 RPMI-1640 培养基中。本研究中描述的小 RNA 由 Dharmacon、Qiagen 或 Integrated DNA technologies 合成 (表 2), 并且根据制造商的说明书进行退火 (图 3a)。靶向人 Ago2 和 Dicer 的 siRNA (Ambion) 以 100nM 使用。使用 DharmaFECT1 (Dharmacon) 以所示浓度执行 RNA 的转染。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染人 Argonaute2 (Ago2) 表达载体 (OriGene)。通过使 aiRNA 或 siRNA 双链体与 10% 人血清 (Sigma) 一起温育所示时间量, 随后进行非变性 TBE- 丙烯酰胺凝胶电泳和溴化乙啶染色, 测定血清稳定性。

#### [0291] RNA 印迹分析

[0292] 为了测定  $\beta$ - 联蛋白的水平, 在不同时间点用 TRIZOL (Invitrogen) 从 siRNA 或 aiRNA 转染的 HeLa 细胞中提取总 RNA。将 20  $\mu$ g 总细胞 RNA 加载到变性琼脂糖凝胶的各泳道。在电泳后, 将 RNA 转移至 Hybond-XL Nylon 膜 (Amersham Biosciences), UV 交联, 并且在 80°C 烘烤 30 分钟。使用 Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene), 由  $\beta$ - 联蛋白 cDNA 片段 (1-568nt) 和肌动蛋白 cDNA 片段 (1-500nt), 制备检测  $\beta$ - 联蛋白和肌动蛋白 mRNA 的探针。为了分析小 RNA RISC 装载, 在用 pCMV-Ago2 转染后 48 小时, 将 siRNA 或 aiRNA 转染到 HeLa 细胞内。细胞在所示时间点进行裂解, 并且用 Ago2 抗体进行免疫沉淀。洗涤免疫沉淀物, 通过 TRIZOL 提取从复合物中分离 RNA, 并且加载到 15% TBE-Urea PAGE 凝胶 (Bio-Rad) 上。在电泳后, 将 RNA 转移至 Hybond-XL Nylon 膜。mirVanamiRNA Probe Kit (Ambion) 用于产生 5' <sup>32</sup>P 标记的 RNA 探针。反义探针 (5' -GUAGCUGAUUAUGGACUU-3')。有义探针 (5' -UCCAUCAUAUCAGC-3')。

#### [0293] 体外 Ago2-RISC 装载

[0294] aiRNA 或 siRNA 有义和反义链使用 T4 激酶 (Promega) 进行 <sup>32</sup>P 末端标记。末端标记的 RNA 通过苯酚 / 氯仿 / 异戊醇纯化, 用 EtOH 沉淀, 并重悬于水中。标记的 RNA 随后与所述的 siRNA 或 aiRNA 反义链退火。对于体外裂解物, HeLa 细胞用人 Ago2 表达载体转染 24 小时, 并且基本上如所述的 (Dignam 等人, 1983) 产生 S10 裂解物。随后将 5' 有义链或反义链标记的双链体 aiRNA 或 siRNA 加入 Ago2-S10 裂解物中。在 37°C 温育 5 分钟后, 如所述的免疫沉淀 Ago2, 在 20% TBE- 丙烯酰胺凝胶上分离 Ago2- 结合的 (沉淀) 和 Ago2- 未结合的 (上清液) 级分, 用凝胶曝光胶片以检测有义链 -Ago2 结合。对于 aiRNA 和 siRNA 竞争实验, 高达 100 倍的冷 aiRNA 和 siRNA 用于与 <sup>32</sup>P 标记的 aiRNA 或 siRNA 竞争装载至 RISC。简言之, 由转染了所述 Ago2 表达载体的 HeLa 细胞产生 S10 裂解物。随后将标记的 aiRNA 或 siRNA 加入 S10 裂解物中, 紧接着加入未标记的 aiRNA 或 siRNA。使反应在 37°C 温育 5 分钟, 并且如上所述进行加工。

#### [0295] qRT-PCR

[0296] 在转染后所示时间点收获用 siRNA、所示 aiRNA、所示 aiRNA 抗 -miRNA (anti-miRNA)、或商业可得 miRNA 抑制剂 (Ambion) 转染的细胞。用 TRIZOL 分离 RNA。使用 TaqMan 一步 RT-PCR 试剂, 和 StepOne 实时 PCR 以及用于所示 mRNA 的引物探针组 (Applied Biosystems), 执行 qRT-PCR。数据相对于对照转染细胞呈现, 并且每个样品相对于肌动蛋白 mRNA 水平进行标准化。对于 miRNA, 使用 TaqMan 微小 RNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems) 执行 miRNA 的逆转录, 并且在 StepOne 实时 PCR 机器 (Applied Biosciences) 上, 使用 TaqMan 微小 RNA 测定法 (Applied Biosystems), 对 cDNA

实施实时 PCR, 每种样品针对 U6snRNA 进行标准化。对于图 14d 中的实验, 通过将 Stat3 cDNA(Origene) 克隆到 pcDNA3.1<sup>+</sup> 或 pcDNA3.1<sup>-</sup> 内的 HindIII-XhoI 位点, 制备 Stat3 构建体。随后用 Stat3 正向或反向表达载体与 aiStat3 或 siStat3 共转染 HeLa 细胞 24 小时。随后收获细胞, 通过 TRIZOL 分离 RNA, 并且使用 TaqMan 一步 RT-PCR 试剂和用于 Stat3 或肌动蛋白的引物探针组 (Applied Biosystems) 执行 qRT-PCR。使用 Superscript One-Step RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen), 以及 Stat3 正向 (5'-GGATCTAGAATCAGCTACAGCAGC-3') 和 Stat3 反向 (5'-TCCTCTAGAGGGCAATCTCCATTG-3') 引物, 以及肌动蛋白正向 (5'-CCATGGATGATGATATCGCC-3') 和肌动蛋白反向 (5'-TAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3') 引物, 对相同 RNA 样品执行 RT-PCR。

#### [0297] RT-PCR

[0298] 使用 TRIZOL 制备总 RNA, 并且使用随机引物用 Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen) 合成 cDNA。PCR 使用 Pfx 聚合酶运行 20 个循环。引物: 肌动蛋白 -1, 5' CCATGGATGATGATATCGCC-3'; 肌动蛋白 -2, 5' -TAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3';  $\beta$ - 联蛋白 -1, 5' -GACAATGGCTACTCAAGCTG-3';  $\beta$ - 联蛋白 -2, 5' -CAGGTCAGTATCAAACCAGG-3'。

#### [0299] 蛋白质印迹

[0300] 细胞用冰冷的磷酸盐缓冲盐水洗涤 2 次, 并且在裂解缓冲液 (50mM HEPES、pH 7.5、0.5% Nonidet P-40、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM 原钒酸钠、1mM 二硫苏糖醇、1mM NaF、2mM 苯甲基磺酰氟以及各 10  $\mu$ g/ml 的胃酶抑素、亮抑酶肽和抑肽酶) 中裂解。通过 SDS-PAGE 分离 20  $\mu$ g 可溶蛋白质, 并且转移至 PVDF 膜。在本研究中使用抗  $\beta$ - 联蛋白 ( $\beta$ -catenin)、Nbs1、存活蛋白、p21、Rsk1、k-Ras、Stat3、PCNA、NQO1、肌动蛋白 (Santa Cruz)、EF2、p70S6K、mTOR、PTEN (Cell Signaling Technology)、Ago2 (Wako)、Dicer (Novus) 和 Parp1 (EMD Biosciences) 的一抗。通过增强的化学发光 (GE Biosciences) 显现抗原-抗体复合物。

#### [0301] 时 miRNA 的 RT-PCR 和蛋白质印迹分析

[0302] 用 100nM 所示 aiRNA 或微小 RNA 抑制剂转染 HeLa 细胞。转染后 24 小时, 收获细胞, 用于通过 TRIZOL (Invitrogen) 制备 RNA, 或用于通过使用全细胞提取缓冲液 (50mM HEPES、2mM 氯化镁、250mM 氯化钠、0.1mM EDTA、1mM EGTA、0.1% Nonidet P-40、1mM 二硫苏糖醇、1 $\times$  哺乳动物蛋白酶抑制剂混合物 [Sigma]、1 $\times$  磷酸酶抑制剂混合物 I 和 II [Sigma]) 在冰上温育 30 分钟制备蛋白质。通过在 13,000 $\times$ g 在微量离心机中离心, 分离可溶性蛋白质, 将上清液贮藏于 -70 $^{\circ}$ C。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 分离蛋白质, 然后通过电印迹转移至聚偏二氟乙烯膜。将用于检测 k-Ras 和肌动蛋白的一抗 (Santa Cruz Biotechnology) 与膜一起温育, 随后加入 HRP 连接的二抗 (GE Biosciences), 并且通过化学发光 (GE Biosciences) 显现。使用 Superscript One-Step RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen), 以及 k-Ras 正向 (5'-AGTACAGTGCAATGAGGGACCACT) 和 k-Ras 反向 (5'-AGCATCCTCCACTCTCTGTCTTGT), 以及肌动蛋白正向 (5'-CCATGGATGATGATATCGCC-3') 和肌动蛋白反向 (5'-TAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3') 引物, 对 RNA 样品执行 RT-PCR。

#### [0303] 5'-RACE 分析

[0304] 无需任何先前加工, 来自用非沉默 aiRNA 或 aiRNA 处理的 HeLa 细胞的总 RNA (5  $\mu$ g) 与 GeneRacer<sup>TM</sup> RNA 衔接子 (Invitrogen, 5'-CGACUGGAGC ACGAG GACAC

UGACAUGGACU GAAGGAG UAGAAA-3') 连接。使用随机引物将连接的 RNA 逆转录成 cDNA。为了检测切割产物,使用与 RNA 衔接子互补的引物 (GeneRacer™ 5' Nested Primer :5' -GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3') 和  $\beta$ - 联蛋白特异性引物 (GSP : 5' -CGCATGATAGCGTGTCTGGAAGCTT-3') 执行 PCR。扩增片段在 1.4% 琼脂糖凝胶上分离,并且使用 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) 确定大小。通过 DNA 测序进一步验证特异性切割位点。

[0305] 干扰素应答检测

[0306] 对于图 15a 中的实验,使 PBMC 直接与 100nM  $\beta$ - 联蛋白 siRNA 或 aiRNA 一起温育。在 16 小时使用 TRIZOL 纯化总 RNA,并且按制造商 (System Biosciences) 所述的通过 RT-PCR 测定响应干扰素的基因表达的水平。对于图 15b 中的实验,HeLa 细胞进行模拟转染或用 100nM 所示 aiRNA 或 siRNA 转染 24 小时。使用 TRIZOL 纯化总 RNA,并且通过 RT-PCR 测定响应干扰素的基因表达的水平。对于微阵列分析,HeLa 细胞用 100nM aiRNA 或 siRNA 进行转染。在 24 小时使用 TRIZOL 纯化总 RNA,并且根据制造商的方案 (ExpressionAnalysis, Inc.), RNA 用于与 Human GenomeU133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix) 杂交。来自 DharmaFECT 1 处理的细胞的 RNA 用作对照。为了计算转录物表达值,使用 Microarray Suite 5.0 以及分位数标准化 (quantile normalization),在本研究中具有足够杂交信号的转录物被称为存在 (P)。

[0307] aiRNA 和 siRNA 序列

[0308] aiRNA 和 siRNA 双链体的序列和结构在表 2 中列出。在 k-Ras aiRNA 中框出了点突变的位置。

[0309] 表 2

[0310]



干扰素应答的倾向、增加的合成成本和递送问题的一个重要因素 (Elbashir 等人, 2001b ; Sledz 等人, 2003)。我们设计了靶向不同哺乳动物基因的一系列 12 至 21bp 短 dsRNA, 该短 dsRNA 具有 2 核苷酸 3' 突出端或平头末端。在长度减少到低于 19bp 后检测不到基因沉默 (数据未显示), 这与在黑腹果蝇 (*Drosophila Melanogaster*) 细胞裂解物中的先前报告一致 (Elbashir 等人, 2001b), 并与 19-21bp 是介导 RNAi 的最短 siRNA 双链体的观念一致 (Elbashir 等人, 2001a ; Elbashir 等人, 2001b ; Elbashir 等人, 2001c ; Rana, 2007 ; Zamore 等人, 2000)。

[0317] 接下来我们测试了具有不对称构型的突出端的非 siRNA 支架 RNA 双链体是否能够介导基因沉默。siRNA 双链体包含对称的有义链和反义链。虽然包含 3' 突出端的双链体 siRNA 结构是掺入 RISC 复合物内所需的, 但在 Argonaute (Ago) 介导的有义链切割后, 由反义链指导靶 mRNA 的切割 (Hammond 等人, 2001 ; Matranga 等人, 2005 ; Tabara 等人, 1999)。我们寻求制备在反义链的 3' 和 5' 末端具有突出端的各种长度的不对称 RNA 双链体。

[0318] 在退火后通过 20% 聚丙烯酰胺凝胶验证具有表 3 中所示序列的寡聚物。如图 3A 中所示, 每个泳道按如下加样: 泳道 1, 21nt/21nt ; 泳道 2, 12nt(a)/21nt ; 泳道 3, 12nt(b)/21nt ; 泳道 4, 13nt/13nt ; 泳道 5, 13nt/21nt ; 泳道 6, 14nt/14nt ; 泳道 7, 14nt(a)/21nt ; 泳道 8, 14nt(b)/21nt ; 泳道 9, 15nt/15nt ; 泳道 10, 15nt/21nt。

[0319] 表 3

[0320]

寡聚物	序列	SEQ ID NO :
21nt/21nt	5' -GUAGCUGAUUAUGGACTT-3' 3' -TTCAUCGACUAUAACUACCUG-5'	1 2
12nt/21nt(a)	5' -UGAUUAUGG-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	3 4
12nt/21nt(b)	5' -CUGAUUAUG-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	5 4
13nt/21nt	5' -CUGAUUAUGG-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	6 4
14nt/21nt(a)	5' -GCUGAUUAUGG-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	7 4

寡聚物	序列	SEQ ID NO :
14nt/21nt (b)	5' -CUGAUUUGAUGGA-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	8 4
15nt/21nt	5' -GCUGAUUUGAUGGA-3' 3' -CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	9 4

[0321] HeLa 细胞以 200,000 细胞 / 孔接种到 6 孔培养板内。如图 3B 中所示,24 小时后,细胞用 scramble siRNA (泳道 1)、靶向 E2F1 的 21-bp siRNA (泳道 2,作为特异性的对照) 或靶向  $\beta$ - 联蛋白的 21-bp siRNA (泳道 3,作为阳性对照)、或相同浓度的不同长度混合的 aiRNA :12nt(a)/21nt(泳道 4);12nt(b)/21nt(泳道 5);13nt/21nt(泳道 6);14nt(a)/21nt(泳道 7);14nt(b)/21nt(泳道 8);15nt/21nt(泳道 9),进行转染。在转染后 48 小时收获细胞。通过蛋白质印迹测定  $\beta$ - 联蛋白的表达。E2F1 和肌动蛋白用作对照。结果证实不对称干扰 RNA(aiRNA) 在哺乳动物细胞中引起基因特异性沉默。

[0322] 为了确定在 aiRNA 功能中重要的 aiRNA 结构特征,基于对核心 15/21 双重反义突出端结构的修饰,我们产生了多种 aiRNA 寡核苷酸(表 4)。在表 4 中概括的 aiRNA 包含修饰,包括但不限于,有义和反义链的长度、有义和反义突出端的程度、和 RNA-DNA 杂合寡核苷酸。

[0323] 通过改变有义链、反义链或两者,对亲本 15/21 aiRNA 结构进行了修饰(表 4)。以 50nM 用经修饰的 aiRNA 双链体转染 HeLa 细胞 48 小时。使用  $\beta$ - 联蛋白和肌动蛋白的蛋白质印迹,检查与亲本 15/21 aiRNA 和常规 siRNA 结构相比的基因沉默程度。还测试了包含双重有义链突出端的 aiRNA 修饰。这些寡核苷酸包含与不同长度反义链配对的 21 碱基有义链。此外,还检查了已用 DNA 碱基进行修饰的 aiRNA 寡核苷酸的活性。对反义和有义链均进行了 DNA 置换(表 3)。所测试的 RNA-DNA 杂合寡核苷酸包含在有义或反义链中的 1 个或多个 DNA 置换,或包含与所示长度的 DNA 有义链配对的 21 碱基反义 RNA。这各种 aiRNA 的基因沉默结果显示于图 4 和 5 中。

[0324] 这些数据总的提供了关于 aiRNA 功能的结构线索。

[0325] 就有义链而言,我们的数据指出 15 个碱基的长度工作良好,而 14 至 19 个碱基的长度保持功能。有义链可以匹配反义链的任何部分,条件是满足反义突出端规则。在有义链的 5' 或 3' 末端处单 RNA 碱基的 DNA 替换是耐受的,并且甚至可能提供增加的活性。

[0326] 就反义链长度而言,21 个碱基的长度工作良好,19-22 个碱基保持活性,当长度降低到低于 19 个碱基或增至超过 22 个碱基时,活性降低。反义链的 3' 末端要求 1-5 个碱基的突出端,其中 2-3 碱基突出端是优选的,平头末端显示活性的减少。与靶 RNA 序列的碱基配对是优选的,并且不超过 3 个碱基的 DNA 碱基替换在无同时的 5' DNA 碱基替换时是耐受的。反义链的 5' 末端优选 0-4 碱基突出端,并且不需要突出端以保持活性。反义链的 5' 末端可以耐受 2 个碱基不匹配靶 RNA 序列,并且在无同时的 3' DNA 碱基替换时可以耐受高达 3 个碱基的 DNA 碱基置换。

[0327] 就错配或化学修饰的碱基而言,我们发现,对有义或反义链中的错配和一个或多个化学修饰碱基, aiRNA 结构均可以耐受。

[0328] 表 4 :用于图 4-5 的 aiRNA 序列

[0329]

aiRNA#	通式结构	序列
1	15-21 (NNN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
2	15-21a (NNNNNN--- 平头末端)	5' -GAUUAUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
3	15-21b (平头末端 ---NNNNNN)	5' -GUAGCUGAUUUGAU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
4	15-21c (NNNN---NN)	5' -CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
5	15-21d (NN---NNNN)	5' -AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
7	15-18b (平头末端切口 3' ---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
8	15-21d (N---NNNN)	5' -UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
9	15-21e (NNNN---N)	5' -UGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
10	15-22a (NNNN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'

aiRNA#	通式结构	序列
11	15-22b (NNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA-5'
13	15-24a (NNNNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUGUAA-5'
14	15-24b (NNNN---NNNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGUCA-5'
15	15-27 (NNNNNN---NNNNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA GUUCAUCGACUAUAACUACCUGUCA-5'
16	15-20a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
17	15-20b (NNNN---N)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
18	15-20c (NN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
21	15-19c (NNNN- 平头末端)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCU-5'
22	15-18a (NN---N)	5' -GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUG-5'
23	15-18b (NNN- 平头末端)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCU-5'

aiRNA#	通式结构	序列
24	15-18c (平头末端 ---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
25	15-17a (NN--- 平头末端)	5' -GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
26	15-17b (平头末端 ---NN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGA-5'
29	14-20 (NNN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
30	14-19a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUG-5'
31	14-19b (NN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGG AUCGACUAUAACUACCUGA-5'
33	14-18b (NNN---N)	5' -GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
34	16-21a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
35	16-21b (NN---NNN)	5' -AGCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
36	17-21 (NN---NN)	5' -AGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'

aiRNA#	通式结构	序列
37	18-21a (NN---N)	5' -AGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
38	18-21b (N---NN)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
39	18-21c (NNN---平头末端)	5' -GCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
40	19-21a (NN---平头末端)	5' -AGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
41	18-21b (平头末端---NNN)	5' -GUAGCUGAUUUGAUGGA CAUCGUCUAUAACUACCUGAA-5'
42	19-21c (N---N)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
43	20-21a (N---平头末端)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
44	20-21b (平头末端---N)	5' -GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
45	错配和 miRNA	5' -GCUGAUUUGAAGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
46	5' 末端与靶同源	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGUC-5'
47	NNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNDDDD-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'

aiRNA#	通式结构	序列
48	NNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
49	NNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNDDD-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUgaa-5'
51	DNDNNNNNNNDNDND 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -gCtGAUAUUGaUgGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
52	DNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
53	NNNNNNNNNNNNND 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
54		5' -UAGCUGAUUUGAUG UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
55		5' -GUAGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
56		5' -AGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
57	DNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -gCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
58	DNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNDDD-5'	5' -gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'
59	NNNNNNNNNNNNND 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUGAA-5'

aiRNA#	通式结构	序列
60	NNNNNNNNNNNNND 3' NNNNNNNNNNNNNNNNDDD-5'	5' -GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'
61	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNN-5	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU catCGACUAUAACUACCUgaa-5'
62	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNNDDD-5'	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'

[0330]

[0331] 在表 4 中, A、U、G 和 C 表示核苷酸, 而 a、t、g 和 c 表示脱氧核苷酸。

[0332] 实施例 2. 由 aiRNA 触发的基因沉默的机制

[0333] 为了研究由 aiRNA 诱导的基因敲低的机制, 我们首先确定由 aiRNA 导致的基因沉默在翻译水平还是 mRNA 水平上发生。在用 10nM 15bpaiRNA 转染的细胞中进行  $\beta$ - 联蛋白的 RNA 印迹分析, 显示 aiRNA 在 24 小时内使 mRNA 水平减少超过 95%, 并且该减少持续 4 天以上 (图 6a), 提示 aiRNA 在 mRNA 水平上介导基因沉默。与 siRNA 相比, 由 aiRNA 诱导的  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 减少实质性地更快速、更有效和持久 (图 6a)。我们进一步确定 15bp aiRNA 是否催化  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 的位点特异性切割。通过 cDNA 末端的快速扩增 (5'-RACE) 和 PCR, 就  $\beta$ - 联蛋白 mRNA 切割片段的存在, 检查从用 15bp aiRNA 转染的细胞中分离的总 RNA (图 6b)。在 aiRNA 转染后 4 和 8 小时检测到  $\beta$ - 联蛋白切割片段 (图 6c)。序列分析显示切割在 aiRNA 靶序列内在相对于 aiRNA 反义链 5' 末端的碱基 10 和 11 之间发生 (图 6d)。在用 scrambled aiRNA 转染后未观察到此种切割片段 (图 6c)。这些结果证实 aiRNA 通过序列特异性切割靶 mRNA 而诱导强有力的有效基因沉默。

[0334] 接下来我们确定该新的 aiRNA 不对称支架是否能够掺入 RISC 内。RNAi 通过 RISC 酶复合物催化, 其中 Argonaute 蛋白质 (Ago) 作为复合物的催化单位 (Liu 等人, 2004; Matranga 等人, 2005)。为了确定 aiRNA 是否掺入 Ago/RISC 复合物内, 在用 aiRNA 转染细胞后, 自表达 myc 标签 -Ago1 的细胞免疫沉淀 myc 标签 - 人 Ago1 (Siolas 等人, 2005)。通过对 Ago 免疫沉淀物的 RNA 印迹, 检测与 RISC 复合物结合的小 RNA。RNA 印迹分析揭示 aiRNA 以高效率进入 RISC 复合物内 (图 6e)。这些数据说明 aiRNA 的不对称支架可以有效掺入 RISC 内。

[0335] 因为 aiRNA 诱导比 siRNA 更有效的基因沉默, 所以我们测试 aiRNA 是否能够比 siRNA 更有效地产生 RISC 复合物。如图 6e 中所示, aiRNA-Ago2/RISC 复合物比 siRNA-Ago2/RISC 复合物更快速且更有效地形成, 其中在 RISC 复合物中包含的 aiRNA 比相应 siRNA 多 (图 6e 和图 7A)。值得注意的是, siRNA 表现出典型模式 (21), 这与 siRNA 形成二级结构相一致 (图 6e 和图 7)。相反地, aiRNA 表现出单条带, 说明长度较短的 aiRNA 可以减少或消除伴随 siRNA 发生的二级结构形成。

[0336] 此外, aiRNA 的不对称构型可以促进具有反义链的活性 RISC 的形成, 减少由有义链形成的无效 RISC( 参考文献 16)。我们的数据证明确实如此( 如图 7B 中所示), 在 RISC 复合物中不能检测出有义链。图 8A 还证实尽管 aiRNA 的反义链与 Ago2 强烈结合, 但有义链却不发生结合。相反地, siRNA 的反义和有义链都与 Ago2 结合。这些数据提示, aiRNA 在细胞中具有比 siRNA 更高的 RISC 形成效率, 这可解释 aiRNA 的优良基因沉默效率。

[0337] 此外, 已证实, 为了具有功能, siRNA 的有义链需要被切割。因此, 我们测试了对于 aiRNA 是否存在相同需求。为此, 用 2'-O- 甲基修饰在 aiRNA 有义链的位置 8 或 9 处的核苷酸, 以使得其无法切割。结果显示, 具有无法切割的有义链的 aiRNA 仍是有功能的( 图 8B), 说明 aiRNA 就其机制而言与 siRNA 非常不同。

[0338] 进一步, 我们调查了对于 aiRNA 和 siRNA 是否存在任何不同的装载口袋。使用冷 aiRNA 或 siRNA 与放射性标记的 siRNA 或 aiRNA 竞争 RISC 复合物( 图 9)。令人惊讶的是, 结果显示, 冷 aiRNA 不与 siRNA 竞争 RISC 复合物( 图 9B), 并且冷 siRNA 也不与 aiRNA 竞争 RISC 复合物( 图 9C)。这些数据指出 aiRNA 和 siRNA 可能装载至 RISC 复合物的不同口袋。

[0339] 上面的数据总的说明, aiRNA 是可以掺入 RISC 内的第一种非 siRNA 支架, 由此提供了与 RISC 相互作用的新结构支架。aiRNA 和 siRNA 的 RISC 装载差异在图 10 显示的模型中说明。简言之, 因为不对称性质, 仅反义链被选择保留在 RISC 复合物中, 由此导致 100% 的链选择效率。相反地, siRNA 在结构上是对称的。siRNA 的反义链和有义链都有机会被选择保留在 RISC 复合物中, 因此 siRNA 具有低效的链选择, 并且同时由于有义链 RISC 复合物而引起非特异性基因沉默。

[0340] 实施例 3. aiRNA 介导比 siRNA 更快速、有力、有效且持久的基因沉默

[0341] 为了比较 aiRNA 与 siRNA 的基因沉默性质, 我们首先确定用于基因沉默的最佳 aiRNA 结构。

[0342] siRNA 双链体包含对称的有义链和反义链。虽然包含 3' 突出端的双链体 siRNA 结构是掺入 RISC 复合物内所需的, 但在 Argonaute (Ago) 介导的有义链切割后, 靶 mRNA 的切割由反义链指导 (Hammond 等人, 2001 ;Matranga 等人, 2005 ;Tabara 等人, 1999)。我们寻求制备在反义链的 3' 和 5' 末端处具有突出端的各种长度的不对称 RNA 双链体。设计了具有 3' 和 5' 反义突出端的 12 至 15bp 的一组不对称 RNA 双链体, 以靶向  $\beta$ - 联蛋白( 图 11A),  $\beta$ - 联蛋白是牵涉癌症和干细胞的一种内源基因 (Clevers, 2006)。具有标准构型的最佳化 siRNA 已被设计出来靶向  $\beta$ - 联蛋白用于触发 RNAi (Xiang 等人, 2006)。在由 siRNA 靶向的相同序列内设计针对  $\beta$ - 联蛋白的所有 aiRNA( 图 11A)。结果显示, 用 15bp aiRNA 达到了最佳基因沉默( 图 11B)。因此, 我们在后续实验中使用 15bp aiRNA 与 21-mer siRNA 双链体进行比较。

[0343] 令人惊讶的是, 发现 aiRNA 诱导对  $\beta$ - 联蛋白蛋白质的有力 and 高效减少, 同时不伤害非靶对照基因肌动蛋白( 图 11C)。

[0344] 接下来, 我们检查了由靶向  $\beta$ - 联蛋白的 aiRNA 和 siRNA 介导的基因沉默的开始。所使用的 aiRNA 和 siRNA 的序列显示于图 11A 中。如图 12 中所示, aiRNA 具有更快的开始( 图 12C 和 D) 以及更佳的功效( 图 12B 和 D)。

[0345] 还比较了 aiRNA 和 siRNA 对各种靶和多种人细胞系的基因沉默作用。设计 aiRNA, 靶向不同功能类型的基因, 包括 Stat3( 图 13b)、NQO1( 图 12d)、延伸因子 2(EF2)( 图 13c)、

Nbs1(图 14b)、存活蛋白(图 14b)、Parp1(图 14b)、p21(图 14b)、Rsk1(图 14c)、PCNA(图 14c)、p70S6K(图 14c)、mTOR(图 14c)和 PTEN(图 14c)以及  $\beta$ -联蛋白(图 13a),其中靶向基因中已经被 siRNA 以低效率靶向的相同序列(Rogoff 等人,2004)处。如图 13 和 14 中所示,aiRNA 在沉默 Stat3、 $\beta$ -联蛋白、Rsk1、p70S6K、Nbs1、mTOR 和 EF2 方面比 siRNA 更有效,在沉默 NQO1、PCNA、存活蛋白、PTEN、Parp1 和 p21 方面与 siRNA 一样有效。因为靶序列是基于针对 siRNA 的优化来选择的,所以可能地 aiRNA 的功效和效力可以通过针对 aiRNA 优化的靶位点而得到进一步增加。此外,我们的数据还显示 aiRNA 可以在多种细胞系,包括 HeLa(图 13a)、H1299(图 14a,左图)和 D1d1(图 14a,右图),中比 siRNA 更有效地抗  $\beta$ -联蛋白。

[0346] 总之,这些数据证实 aiRNA 在哺乳动物细胞中可以比 siRNA 更有效、有力、快速开始和持久地介导基因沉默。

#### [0347] 实施例 4. 由 aiRNA 介导的基因沉默的特异性

[0348] 接下来,我们研究了由 aiRNA 介导的基因沉默的特异性。首先分析靶向野生型 k-Ras 等位基因的 aiRNA。DLD1 细胞包含野生型 k-Ras,而 SW480 细胞包含具有单碱基对置换的突变型 k-Ras(图 14d)。用靶向野生型 k-Ras 的 aiRNA 转染 DLD1 细胞显示出有效沉默,但在 SW480 细胞中未观察到突变型 k-Ras 的沉默。这些数据证实 aiRNA 介导等位基因特异性基因沉默。

[0349] 干扰素样应答的激活是基因沉默的主要非特异性机制。siRNA 用于基因沉默的一个主要原因是短于 30bp 的 dsRNA 在哺乳动物细胞中具有降低的激活干扰素样应答的能力(Bernstein 等人,2001;Martinez 和 Tuschl,2004;Sledz 等人,2003)。我们检查了 aiRNA 是否在哺乳动物细胞中显示出激活干扰素样应答的任何迹象。从转染了抗  $\beta$ -联蛋白的 aiRNA 的 PBMC 细胞和转染了抗 EF2 或存活蛋白的 aiRNA 的 HeLa 细胞中收集 RNA,通过 RT-PCR 分析干扰素诱导型基因。通过 RT-PCR 发现 aiRNA 转染显示出不增加所测试的任何干扰素诱导型基因,而靶 mRNA 的水平相对于对照转染细胞减少(图 15a 和 b)。还执行微阵列分析,以比较由 aiRNA 和 miRNA 诱导的已知干扰素应答相关基因的表达改变。如图 15c 中所示,与 siRNA 比较,对于 aiRNA 观察到少得多的改变。

[0350] 此外,如上所述,有义链-RISC 复合物可以引起非特异性基因沉默。为了比较 aiRNA 和 siRNA 通过有义链-RISC 复合物介导的非特异性基因沉默,用 aiRNA 或 siRNA 和表达 Stat3(有义 RNA)的质粒或表达反义 Stat3(反义 RNA)的质粒共转染细胞。在转染后 24 小时收获细胞并且收集 RNA,通过定量实时 PCR 或 RT-PCR 测定 Stat3 有义或反义 RNA(插入片段)的相对水平。结果显示,aiRNA 对反义 Stat3mRNA 没有作用,而 siRNA 则有作用(图 15d)。这个结果说明 aiRNA 完全消除了由有义链-RISC 复合物介导的非期望的非特异性基因沉默。

[0351] 总之,已证实,aiRNA 是新一类的基因沉默诱导物、非 siRNA 型的最小的 RISC 底物结构支架、和 RNAi 介体(图 15f)。我们的数据提示,aiRNA 通过 RISC——细胞 RNAi 机器——工作。在掺入 RISC 后,aiRNA 介导在相对于 aiRNA 反义链 5' 末端的碱基 10 和 11 之间对 mRNA 的序列特异性切割。aiRNA 的不对称构型可以比 siRNA 更有效地与 RISC 相互作用。与高 RISC 结合效率一致,aiRNA 在介导针对本研究中测试的基因的基因特异性沉默方面比 siRNA 更有力、有效、快速开始和持久。尽管先前研究已提出 Dicer 在促进有效 RISC

形成中的作用,但我们的数据说明,aiRNA 可以不依赖于 Dicer 介导的加工而以高效率导致活性 RISC 复合物。

[0352] 这种新 RNA 双链体支架的关键特征是在 3' 和 5' 末端的反义突出端。12-15bp aiRNA 是已知诱导 RNAi 的最短 RNA 双链体。尽管长 dsRNA 在秀丽线虫 (*C. elegans*) 和黑腹果蝇中触发有力的基因沉默,但在哺乳动物细胞中基因特异性沉默在使用 siRNA 双链体前是不可能的。由 Dicer 消化限定的 siRNA 支架的特征在于 19-21bp 链长度和 3' 突出端上的对称性 (Bernstein 等人,2001),这已被视为是掺入 RISC 以介导 RNAi 所必需的结构。因此,对 RNAi 诱导物的优化努力一直集中于 siRNA 前体,其总是大于 siRNA (Soutschek 等人,2004 ;Zhang 和 Farwell,2007)。我们的数据提示,siRNA 不是掺入 RISC 以介导 RNAi 的必需支架。不同长度的 aiRNA 显示出了一系列的基因沉默功效和 RISC 掺入效率,从而提供了理解 RISC 掺入和激活机制的独特机会。需要研究以进一步理解 aiRNA 在 RISC 掺入和 RNAi 诱导中的结构-活性关系,这将有助于建立通过靶序列选择、长度、结构、化学组成和修饰来优化 aiRNA 用于各种 RNAi 应用的理论基础。

#### [0353] 实施例 5. aiRNA 在体内比 siRNA 更有效

[0354] 为了研究 aiRNA 在体内是否有效并且与 siRNA 比较,测试了 aiRNA 和 siRNA 在人结肠癌异种移植模型中的作用。

[0355] 人结肠癌是美国第二大癌症死亡原因。Wnt  $\beta$ -联蛋白信号途径受到紧密调节,并且在发育、组织稳态和再生中具有重要功能。Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号的失调在各种人癌症中频繁出现。单独 80% 的结直肠癌就揭示出通过肿瘤抑制基因腺瘤性结肠息肉的失活或原癌基因  $\beta$ -联蛋白的突变而激活该途径。

[0356] 已发现 Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号的激活对于不同组织癌症的起始和发展都是重要的。因此,Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号的靶向抑制是用于治疗各种起源的癌症的合理和有希望的新方法。

[0357] 在体外,通过核酶靶向,已证实  $\beta$ -联蛋白表达在人结肠癌 SW480 细胞中的减少和相关的细胞死亡诱导的减少,说明  $\beta$ -联蛋白表达对于体外的肿瘤生长是限速的。

[0358] 将 SW480 人结肠癌细胞皮下接种到雌性无胸腺裸鼠 ( $8 \times 10^6$  细胞 / 小鼠) 内,并且允许形成可触摸肿瘤。在这个研究中,当肿瘤达到约  $120 \text{mm}^3$  时开始给药。动物每天静脉内 (iv) 给予  $0.6 \text{nmol}$  PEI-复合的  $\beta$ -联蛋白 siRNA、PEI-复合的  $\beta$ -联蛋白 aiRNA、或作为阴性对照的 PEI-复合的无关 siRNA。动物接受总共 10 剂 siRNA、aiRNA 或对照。在处理过程中测量肿瘤。如图 16 中所示,用 siRNA 和 aiRNA 作为单一疗法以  $0.6 \text{nmol mg/kg}$  进行的静脉内处理显著地抑制了肿瘤生长。siRNA 的 % T/C 值经计算为 48.8%, p 值为 0.0286。而用  $\beta$ -联蛋白-特异性 aiRNA 进行的处理导致了肿瘤生长有力得多的减少。% T/C 值经计算为 9.9%, p 值为 0.0024。无由于 siRNA、aiRNA 或对照的 iv 施用导致的体重显著改变。这些数据说明,通过 PEI 复合全身性体内应用 aiRNA 以靶向  $\beta$ -联蛋白,提供了一种开发高效、特异且安全的药剂用于治疗应用于结肠癌患者的途径。

[0359] 此外,我们还在 HT29 人结肠癌异种移植模型中测试了 aiRNA 和 siRNA 的作用。将 HT29 人结肠癌细胞皮下接种到雌性无胸腺裸鼠 ( $6 \times 10^6$  细胞 / 小鼠) 内,并且允许形成可触摸肿瘤。在这个研究中,当肿瘤达到约  $200 \text{mm}^3$  时开始给药。动物每隔一天用  $0.6 \text{nmol}$  PEI-复合的  $\beta$ -联蛋白 siRNA、PEI-复合的  $\beta$ -联蛋白 aiRNA、或作为阴性对照的 PEI-复

合的无关 siRNA 进行静脉内 (iv) 处理。动物接受总共 8 剂 siRNA、aiRNA 或对照。在处理中测量肿瘤。如图 17 中所示,用 siRNA 和 aiRNA 作为单一疗法以 0.6nmol mg/kg 进行的静脉内处理显著地抑制了肿瘤生长。siRNA 的 % T/C 值经计算为 78%,p 值为 0.21。再次,用  $\beta$ - 联蛋白 - 特异性 aiRNA 的处理导致了肿瘤生长甚至更为有力的减少。% T/C 值经计算为 41%, p 值为 0.016。不存在由于 siRNA、aiRNA 或对照的 iv 施用导致的体重显著改变。这些数据再次说明,通过 PEI 复合全身性体内应用 aiRNA 靶向  $\beta$ - 联蛋白,提供了一种开发高效、特异且安全的药剂用于治疗应用于结肠癌患者的途径。

[0360] 总之, aiRNA 可以显著改善广泛的 RNAi 应用。基于 siRNA 的治疗已遇到挑战,包括有限的功效、递送困难、干扰素样应答和制造成本 (deFougerolles 等人,2007 ;Iorns 等人,2007 ;Rana,2007)。aiRNA 的改善的功效、效力、持久性和更小的尺寸可以帮助或克服这些挑战,这是因为 aiRNA 更小并可能需要更少的材料用于其递送。因此,aiRNA 代表了新的进入 RISC 的最小 RNA 双链体,其在哺乳动物细胞中比 siRNA 更有效、有力、更快开始作用和更持久地介导基因沉默,其对于基因功能研究和基于 RNAi 的治疗中的广泛 RNAi 应用,具有显著的潜力。

#### [0361] 实施例 6. aiRNA 充当模拟 miRNA

[0362] 微小 RNA (miRNA) 是与 siRNA 具有某些相似性的另外基因表达调节剂。然而,miRNA 主要通过 siRNA 介导的靶切割不同的一种或多种机制调节基因表达。经由 miRNA 的沉默通过 miRNA 与靶 RNA 的 3' 非翻译区 (UTR) 的相互作用而发生,这导致翻译抑制和 / 或靶 RNA 降解。与 siRNA 的单一靶特异性不同,单个 miRNA 可以调节多种靶的表达。

[0363] 测试 aiRNA 结构作为 miRNA (amiRNA) 起作用的能力。具体地在本实施例中,构建了具有 21-nt 长链和 15-nt 短链的 aiRNA (Let-7a aiRNA),形成侧翼为 3-nt 3' 突出端和 3-nt 5' 突出端的 15nt 双链区,所述 2 个突出端都在长链上。构建该 aiRNA 作为 Let-7a miRNA 的模拟物。如图 18A 中所示,整个 aiRNA 构建体 (加框区域) 直接衍生自 Let-7a 的 pre-miRNA (pre-Let-7a) 的茎-环结构的一部分,并且保留内源 pre-miRNA 结构中的二级结构——起因于 2-bp 错配的凸起。选择加框区域,从而 aiRNA 的较长链包含 Let-7a 的成熟引导 miRNA 的大部分,其序列在 pre-Let-7a 结构中有下划线。

[0364] 图 18A 中也显示了阳性对照 Let7a miRNA 寡聚物的序列结构,其为对称链长度 (23nt) 的双链 RNA 分子,包括与 Let-7a aiRNA 相同的 Let-7amiRNA 序列部分 (有下划线的)。Hela 和 D1d1 细胞用 miRNA 双链体或 aiRNA 双链体以 100nM 转染 24 小时,此时分离 RNA,并且执行 RT-PCR,以检测 Let-7a miRNA 的已知沉默靶标 k-Ras mRNA 的水平。如图 18B 中所示, aiRNA 双链体 (标记为 aiLet7) 和 miRNA 双链体 (标记为 miLet7) 都导致 2 种细胞系中的 k-Ras mRNA 减少。这些数据说明 aiRNA 可以充当模拟物在 miRNA 途径中起作用以改变基因表达。

[0365] 接下来测定了 miRNA 模拟物 aiRNA 是否能够改变已知 miRNA 靶标的蛋白质水平。k-Ras 基因可以被 Let7 miRNA 家族成员调节。因此测定在用 miRNA 模拟物 aiRNA 转染后 k-Ras mRNA 和 / 或蛋白质是否受到了调节。通过 RT-PCR 测定 k-Ras mRNA 水平,并且通过蛋白质印迹分析测定 k-Ras 蛋白质水平 (图 19)。Let7 模拟物 aiRNA 下调了 k-Ras mRNA 水平 (图 20A),并且 Let7 模拟物 aiRNA 也下调了蛋白质水平 (图 20B)。

#### [0366] 实施例 7. aiRNA 充当 miRNA 抑制剂

[0367] 为了察看 aiRNA 结构是否可以用于制备 miRNA 的抑制剂,设计了针对 hsa-Let-7c、hsa-miR-21 和 hsa-miR-155 的 aiRNA。它们的序列显示于图 19A 中。成熟 hsa-Let-7c、hsa-miR-21 和 hsa-miR-155 的全长显示于图 19B 中。执行 RT-PCR 和蛋白质印迹分析,以分析 aiRNA-Let7c 抑制剂对 Let-7c 的靶标之一 k-Ras 表达的影响。如图 20A 中所示, k-Ras mRNA 水平被 aiRNA-Let7c 模拟物下调,被 aiRNA-Let7c 抑制剂上调。如图 20B 中所示,在蛋白质水平上观察到相似结果。

[0368] 还通过 qRT-PCR,测定在用 aiRNA-Let7c 抑制剂处理的 HeLa 细胞中的 Let-7c 相对水平(图 21A)、在用 aiRNA-miR21 抑制剂处理的 MCF-7 细胞中的 miR-21 相对水平(图 21B)、或是在用 aiRNA-miR155 抑制剂处理的 FaDu 细胞中的 miR-155 相对水平(图 21C)。如图 21 中所示,这些 aiRNA 可以有力地抑制其特异性靶——内源的相应 miRNA。注意, MCF7 细胞包含相对高水平的 miR-21(图 22A), FaDu 细胞包含相对高水平的 miR-155(图 22B)。这些细胞系因此用于测试转染 aiRNA miRNA 抑制剂是否能够分别减少 MCF7 和 FaDu 细胞中的 miR-21 或 miR-155 水平。

[0369] 接下来比较了 aiRNA miRNA 抑制剂与商购可得的 miRNA 抑制剂(Ambion)的功效。100nM aiRNA miRNA 抑制剂或 Ambion 抑制剂的转染导致在转染后 24 小时 Let-7c 水平的减少(图 23)、72 小时 miR-21 水平的减少(图 24)、和 72 小时 miR-155 水平的减少(图 25)。在所有情况下, aiRNAmiRNA 显示出可比或增强的功效。

[0370] 接下来比较了 aiRNA miRNA 抑制剂与来自 Ambion 的商购可得的 miRNA 抑制剂的效力。细胞用靶向 Let-7c(图 26)、miR-21(图 27)、或 miR-155(图 28)的 aiRNA 或 miRNA 抑制剂以 1、10 和 100nM 转染 24 小时。随后执行定量 RT-PCR(qRT-PCR)分析,以相对于非靶向对照 aiRNA 转染的细胞测定剩余的 miRNA 水平。aiRNA miRNA 在 10 和 100nM 剂量时显示与商业抑制剂相似的效力。在 1nM 剂量时,在 miR-21 的情况下, aiRNA 显示增强的效力,在 miR-155 的情况下,相似的效力,或在 Let-7c 的情况下,减少的效力。

[0371] 总之,这些数据证实: aiRNA 结构既可以用作内源 miRNA 的抑制剂,与 antagomir 比较显示出增强的基因沉默功效和/或持续时间;此外, aiRNA 结构也可以用作 miRNA 功能的模拟物,引起对内源 miRNA 靶基因表达的阻遏。

[0372] 本文引用的所有参考文献为了所有目的完整地并入本文作为参考,其程度与就每个出版物或专利或专利申请特别地且单独地指出为了所有目的整体引入作为参考一样。如果引入作为参考的出版物和专利或专利申请与说明书中包含的公开内容冲突,则说明书旨在取代和/或优先于任何此类冲突性材料。

[0373] 说明书和权利要求中用于表达成分、反应条件、分析结果等等的量的所有数字,应理解为在所有情况下由术语“约”进行修饰。因此,除非另有说明,在说明书和后附权利要求中所述的数值参数是近似值,其可以根据寻求通过本发明获得的所需性质而改变。最低限度地,且并未旨在限制对本发明权利要求的范围适用于等同原则,每个数值参数应根据有效数字的数和通常的舍入方法进行解释。

[0374] 对于本领域技术人员显而易见的,无需背离本发明的精神和范围即可进行本发明的修饰和改变。本文描述的具体实施方案仅提供用于举例说明并不意欲以任何方式构成限制。本说明书和实施例旨在视为仅示例性的,本发明的真实范围和精神由下述权利要求表明。

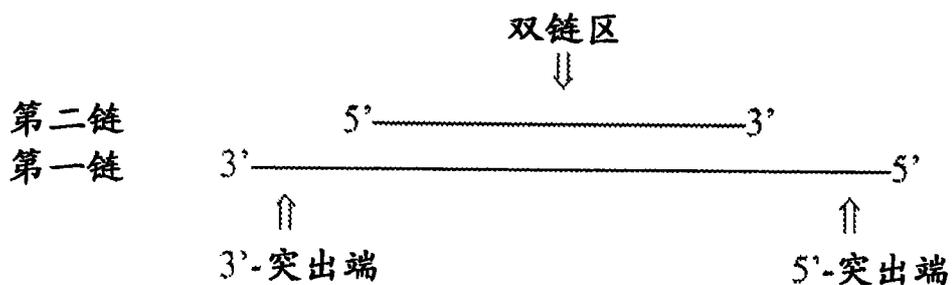


图 1A

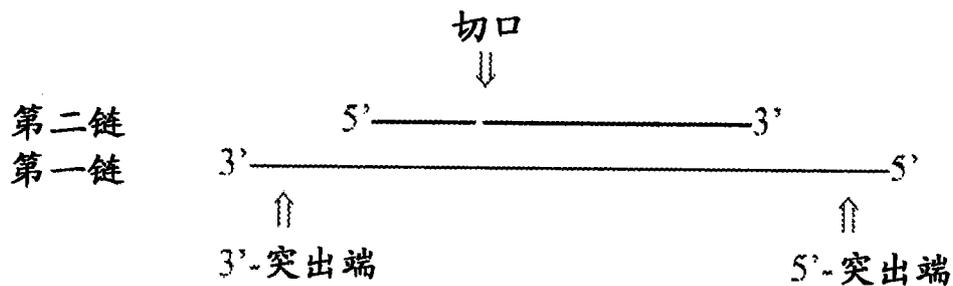


图 1B

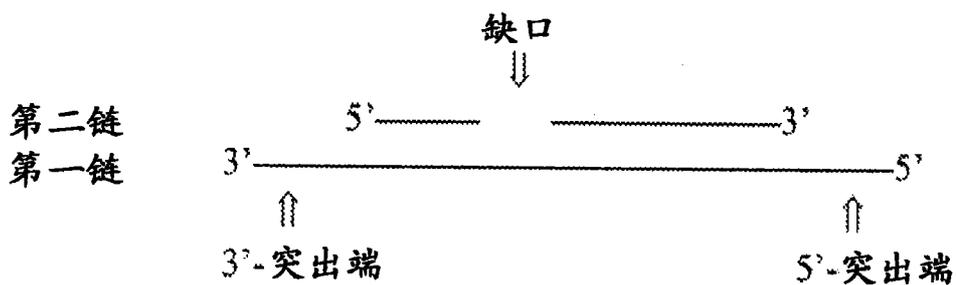


图 1C

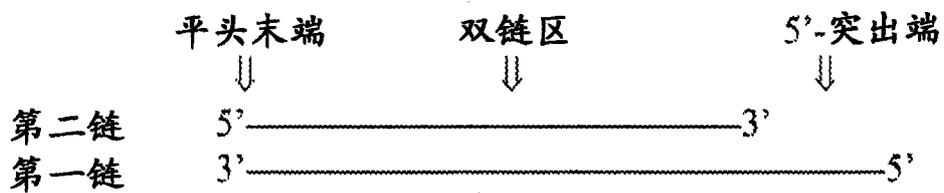


图 2A

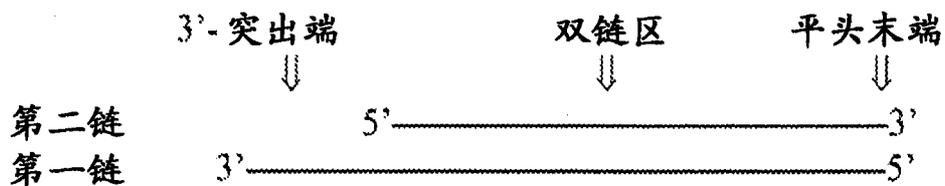


图 2B

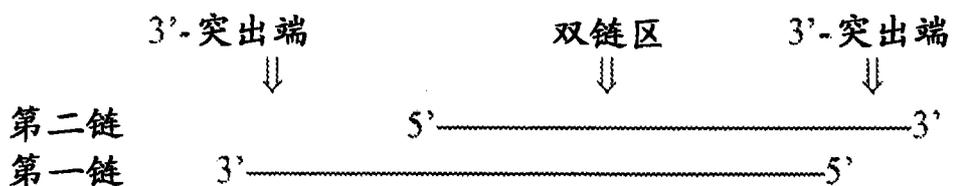


图 2C

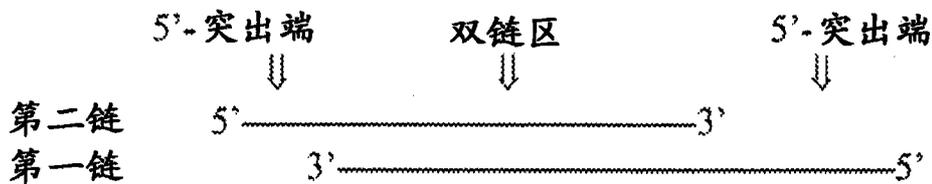


图 2D

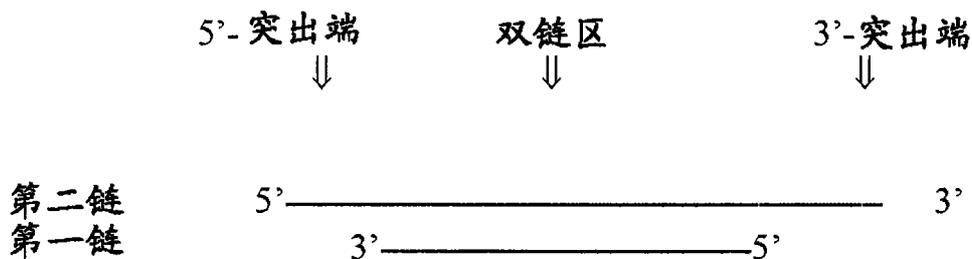


图 2E

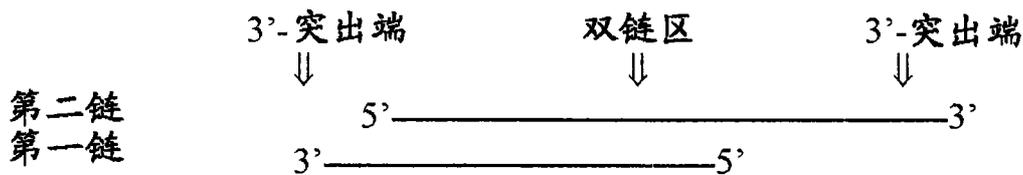


图 2F

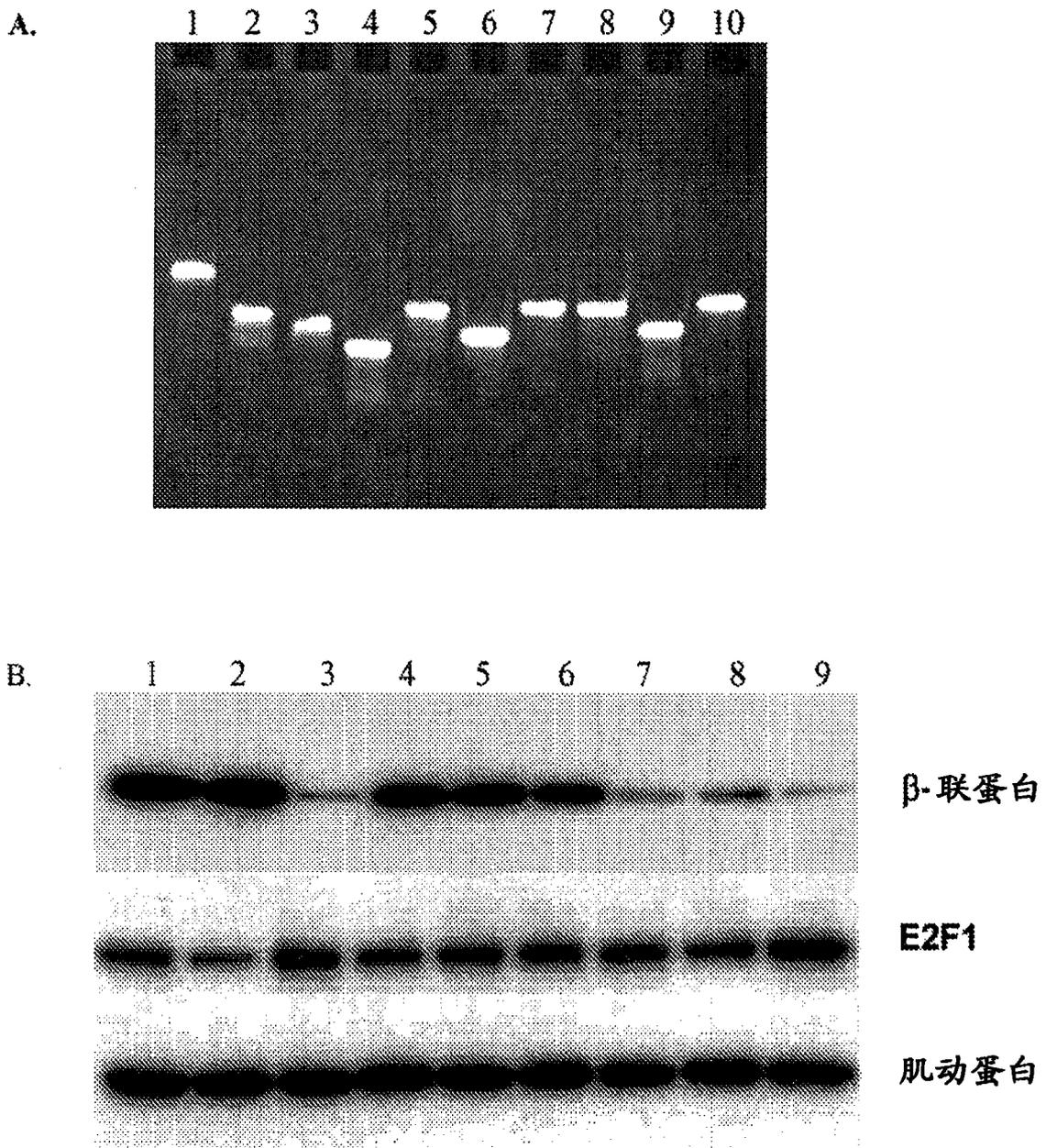


图 3

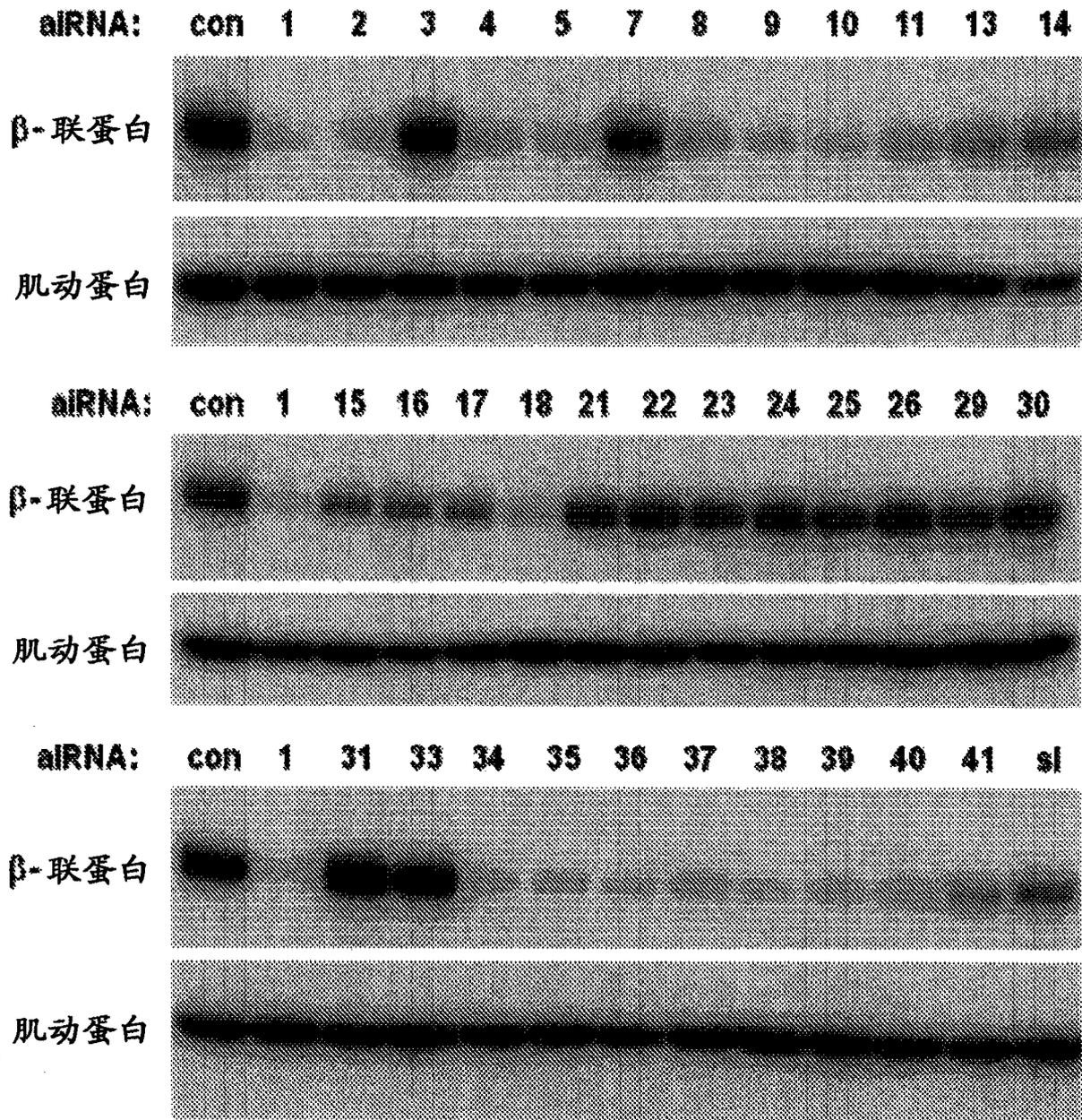


图 4

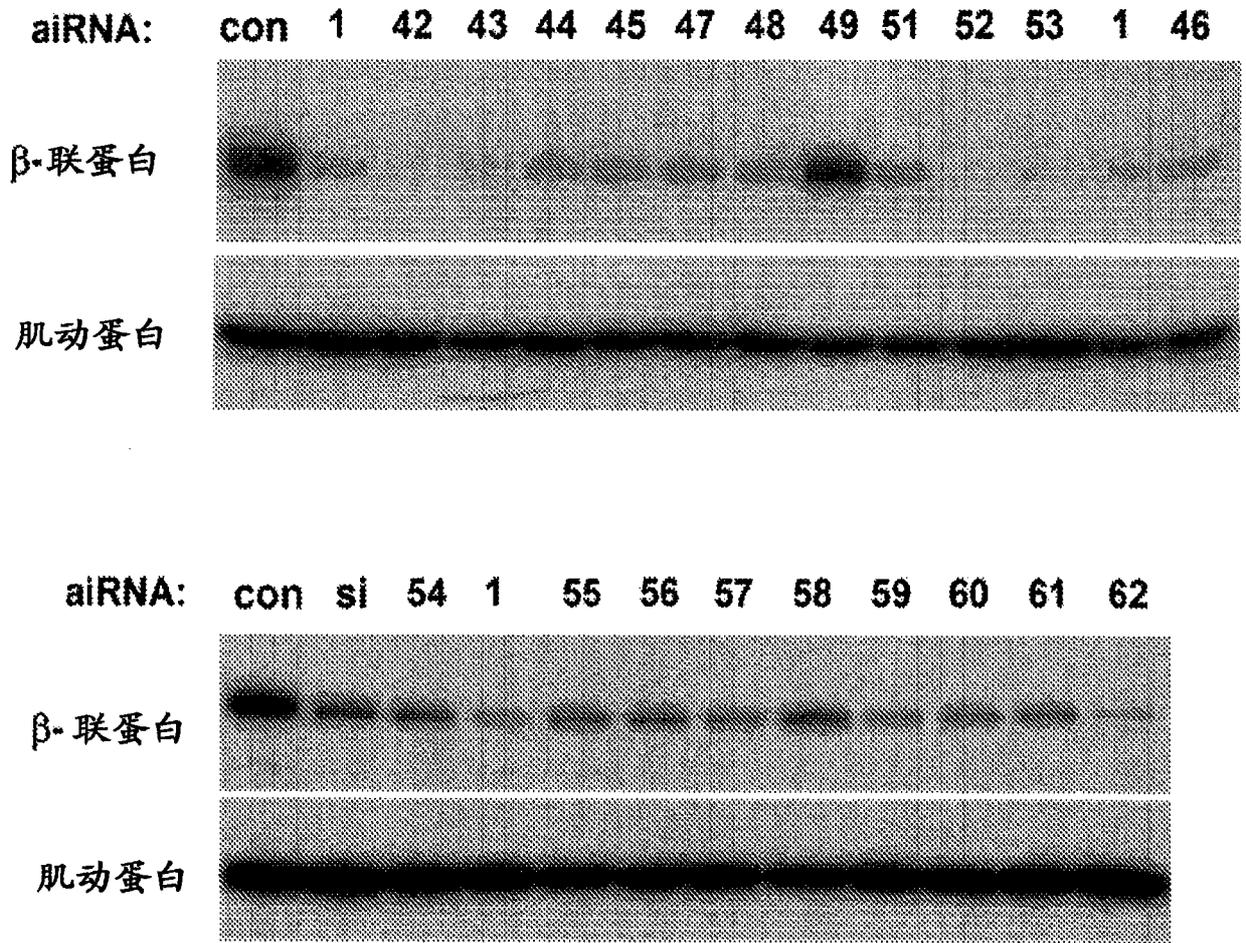


图 5

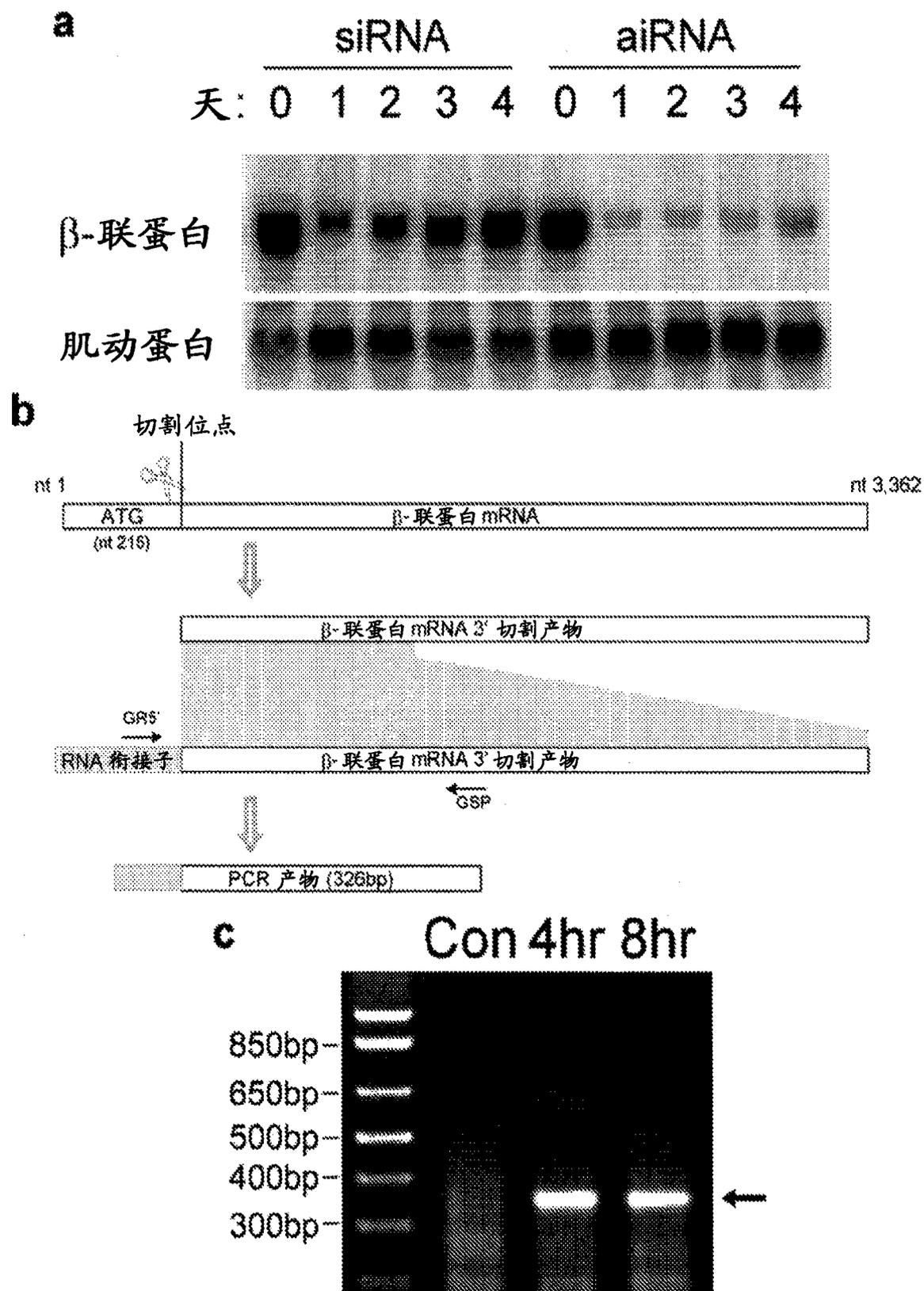


图 6a-6c

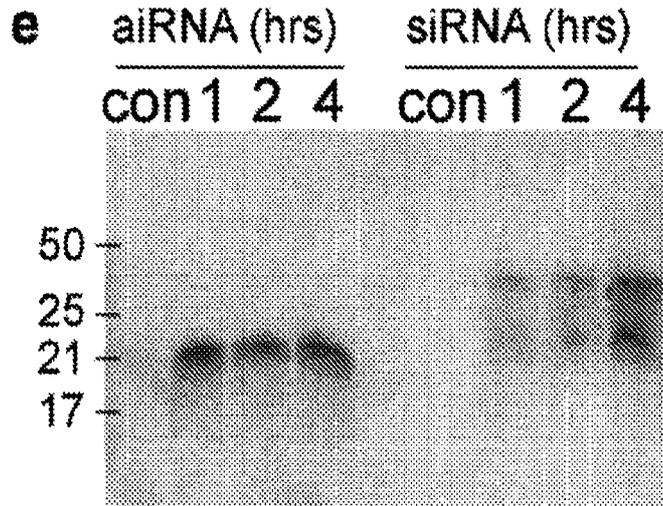
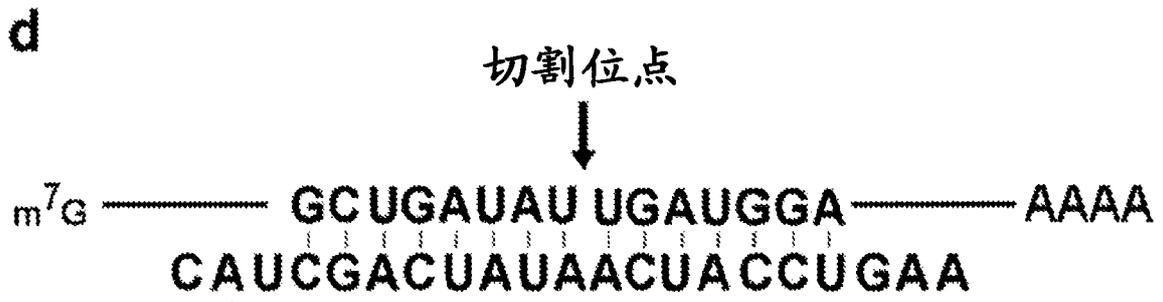


图 6d-6f

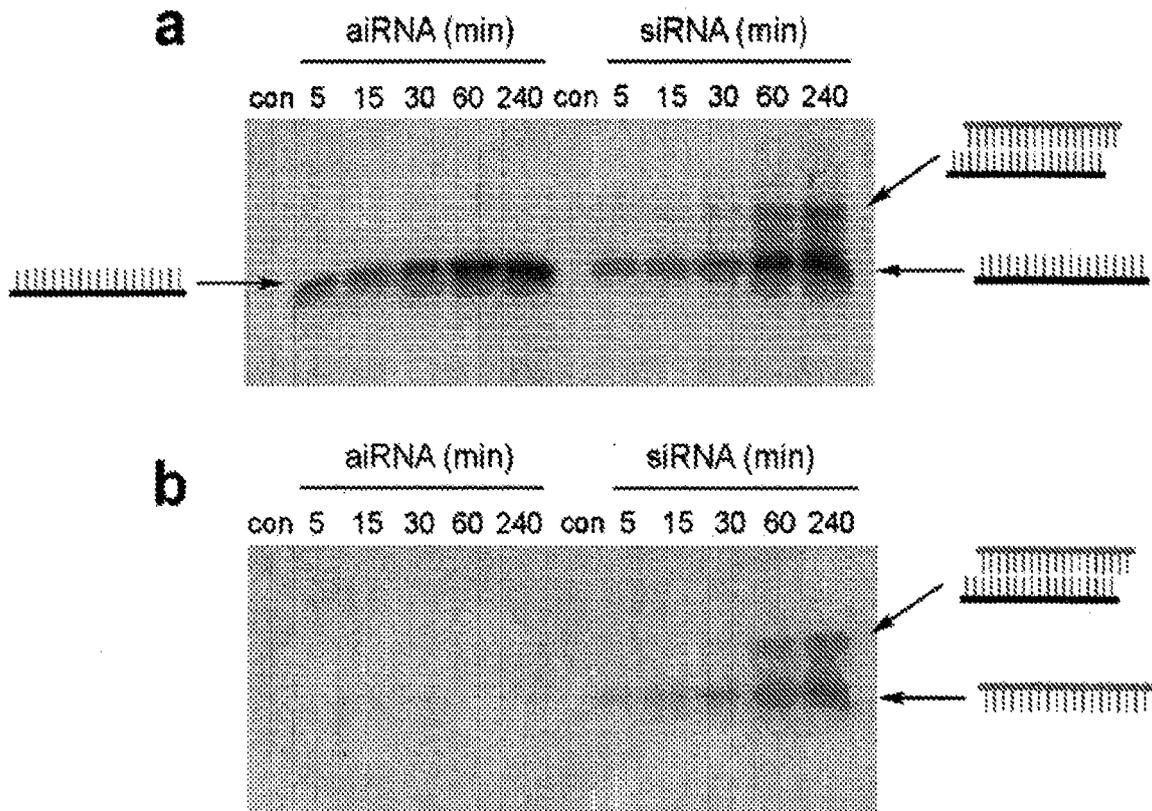


图7

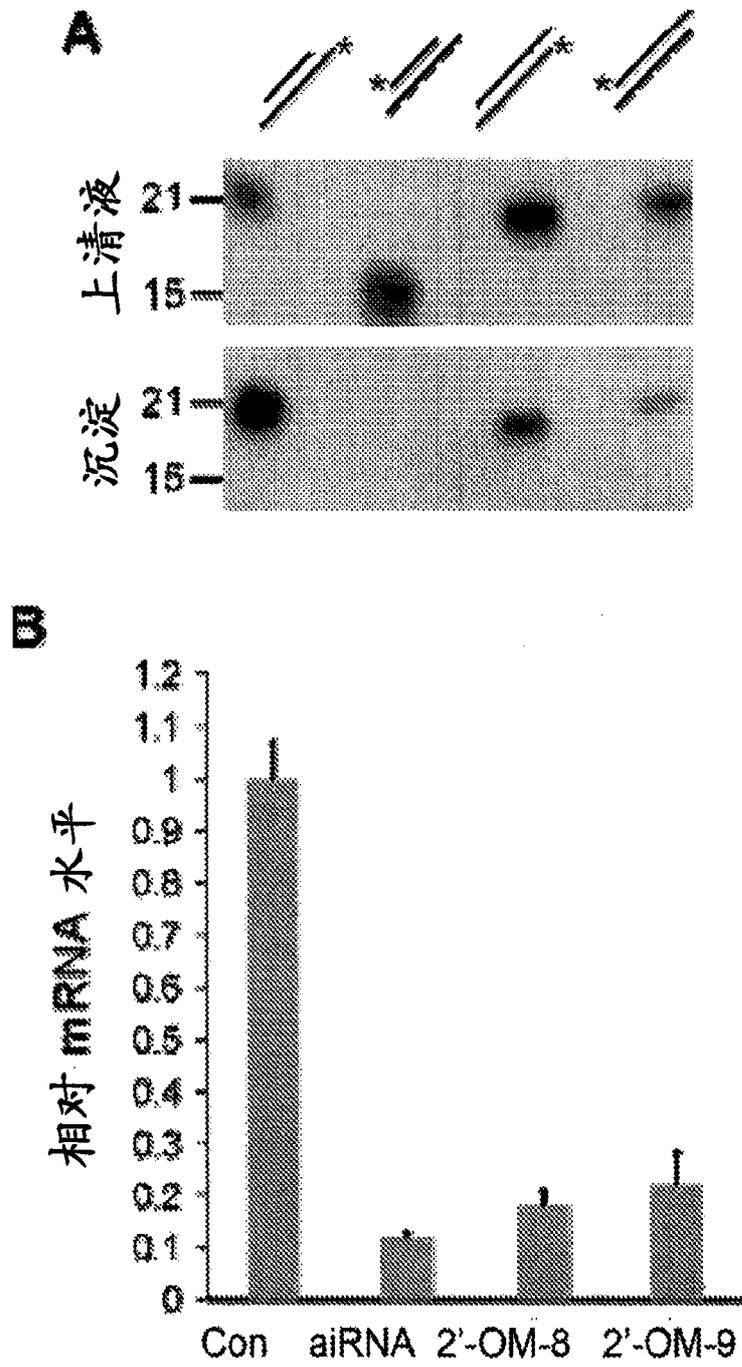


图 8

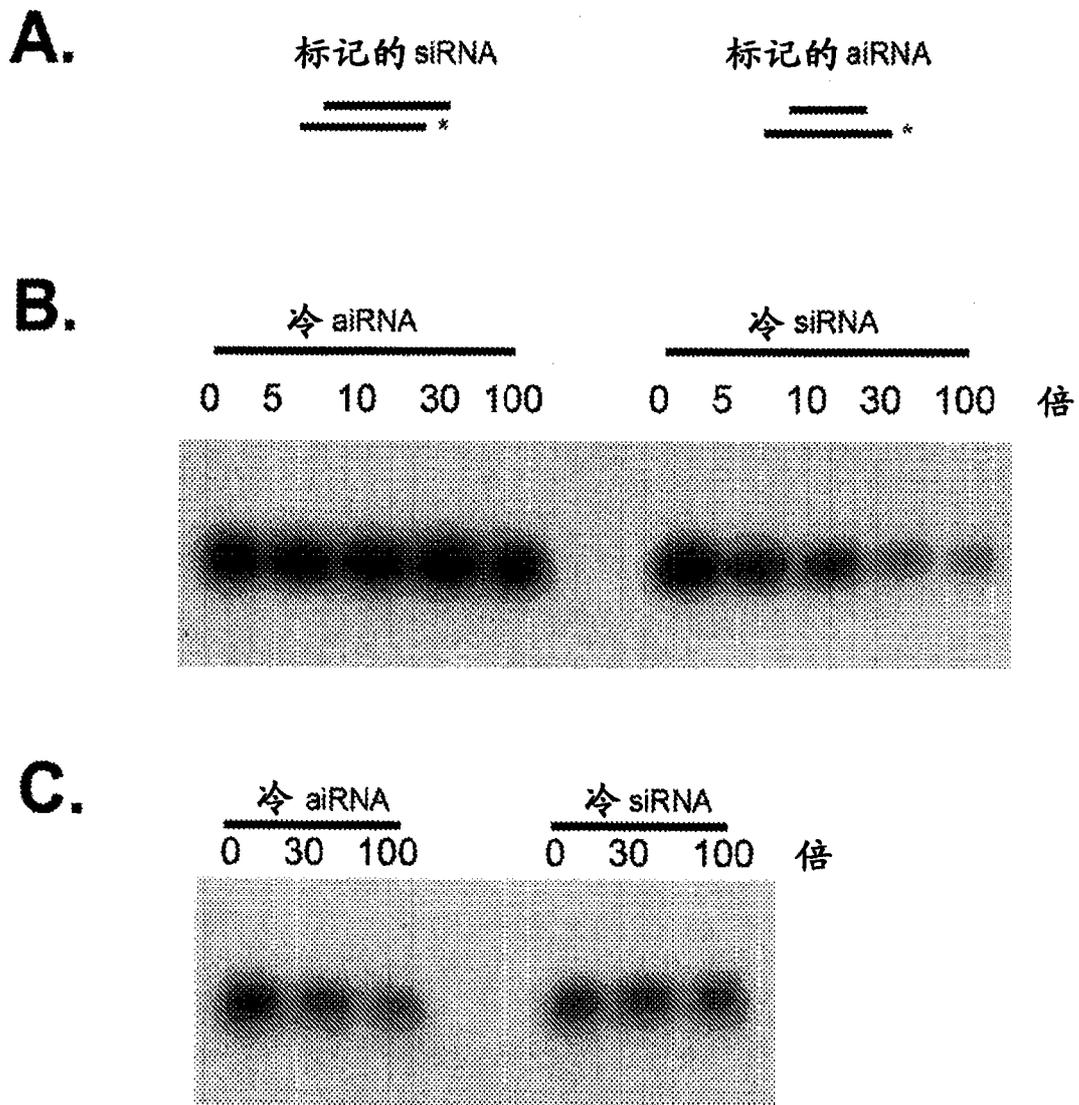


图 9

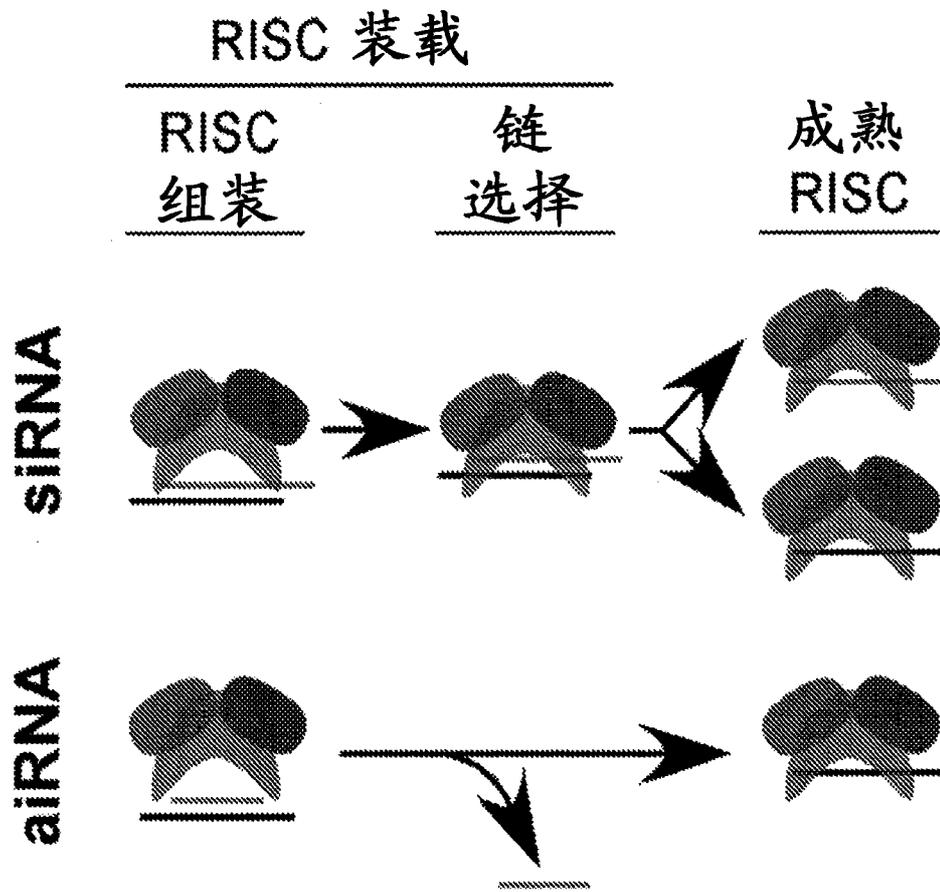


图 10

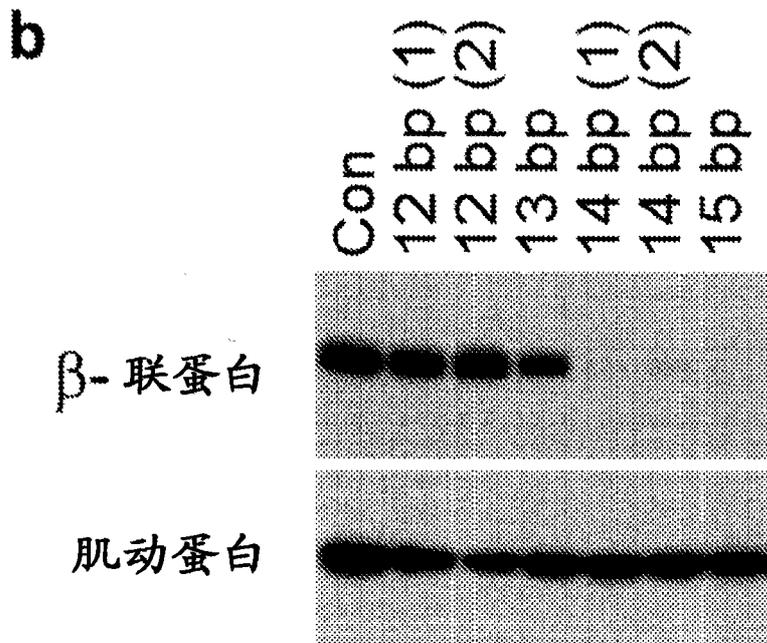
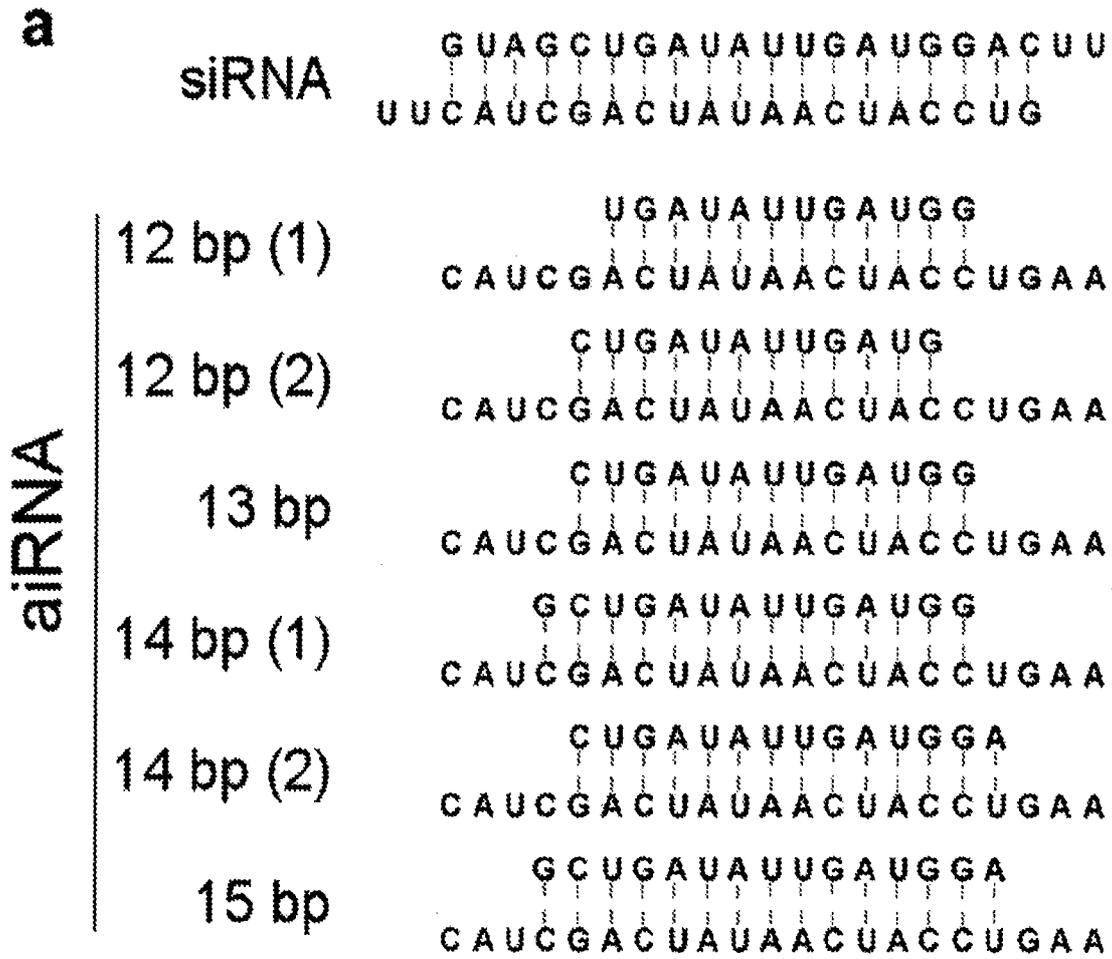


图 11A-11B

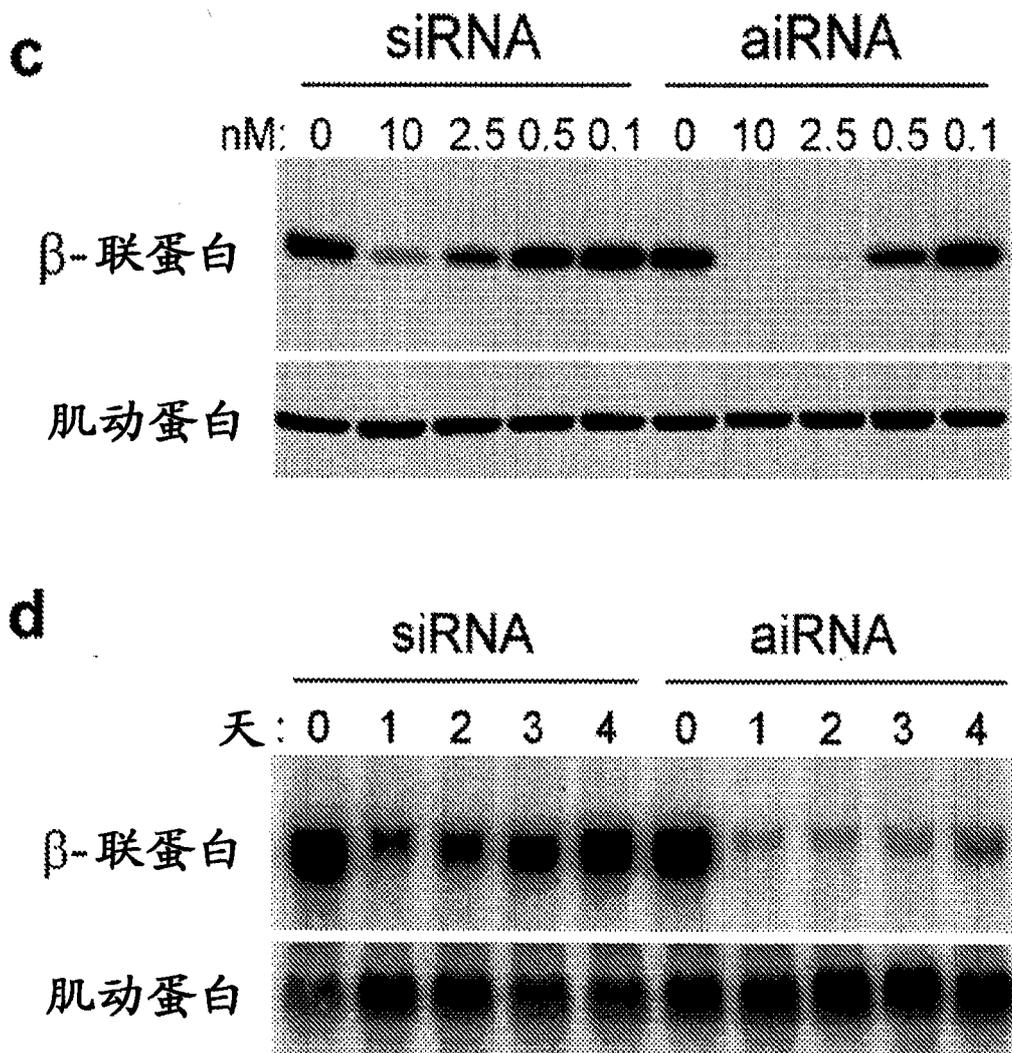


图 11C-11D

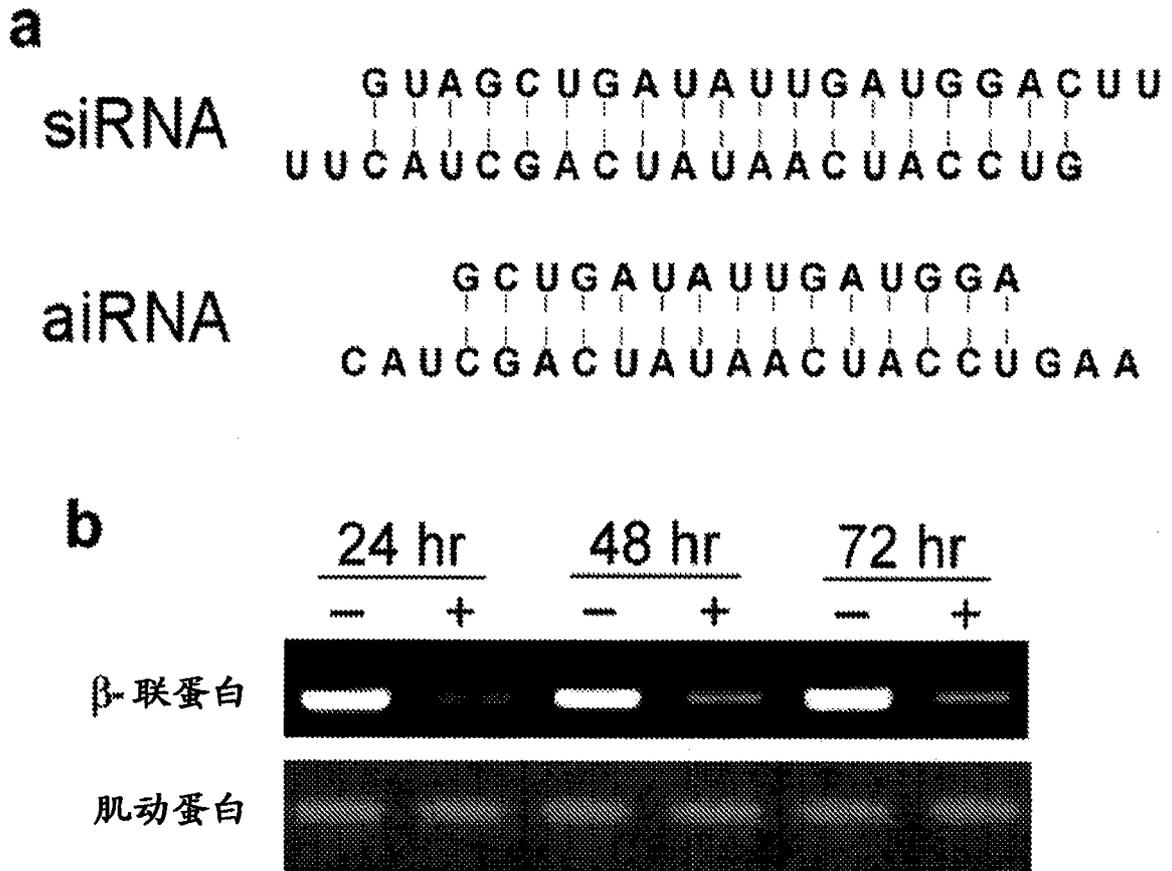


图 12A-12B

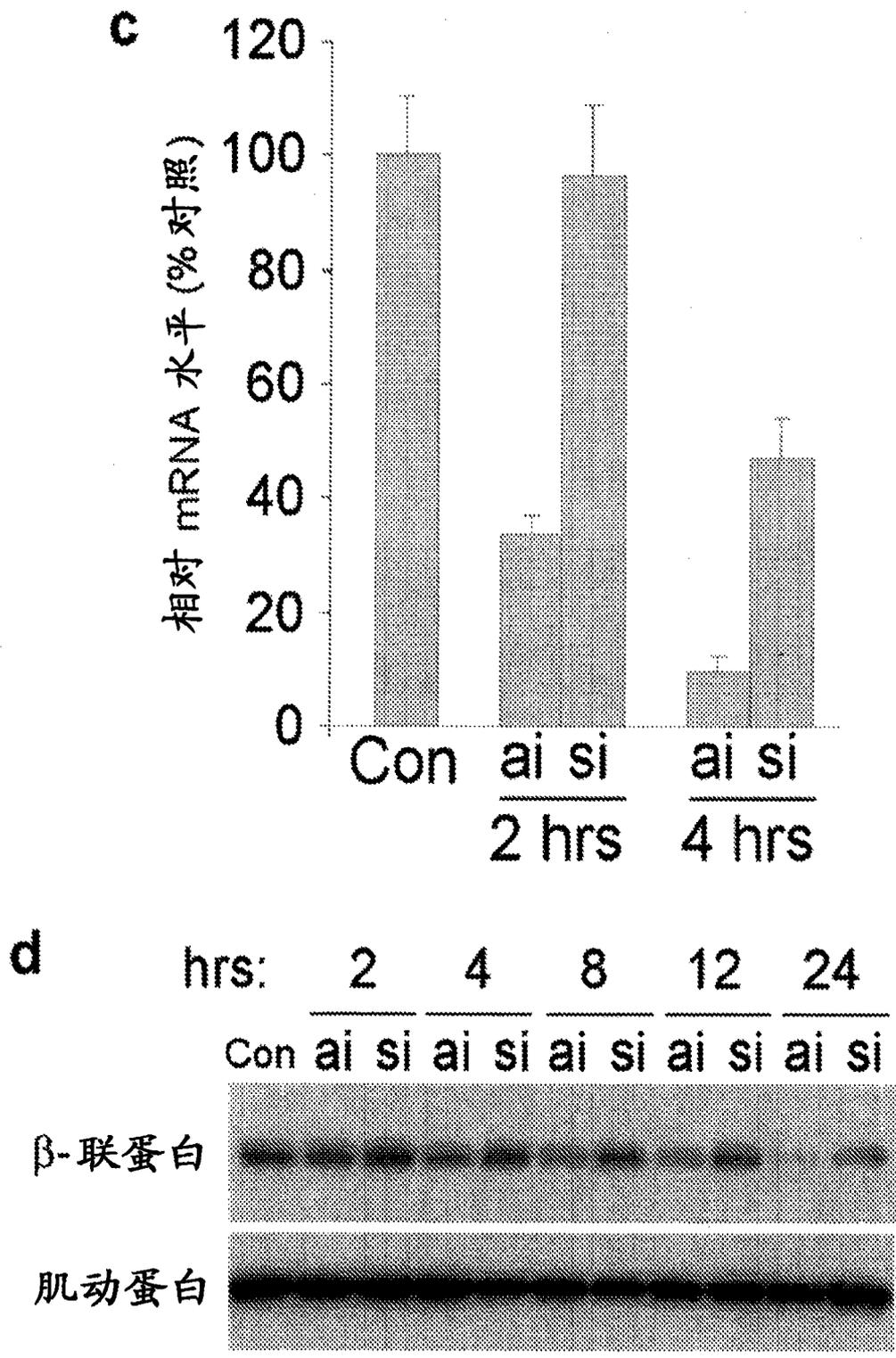


图 12C-12D

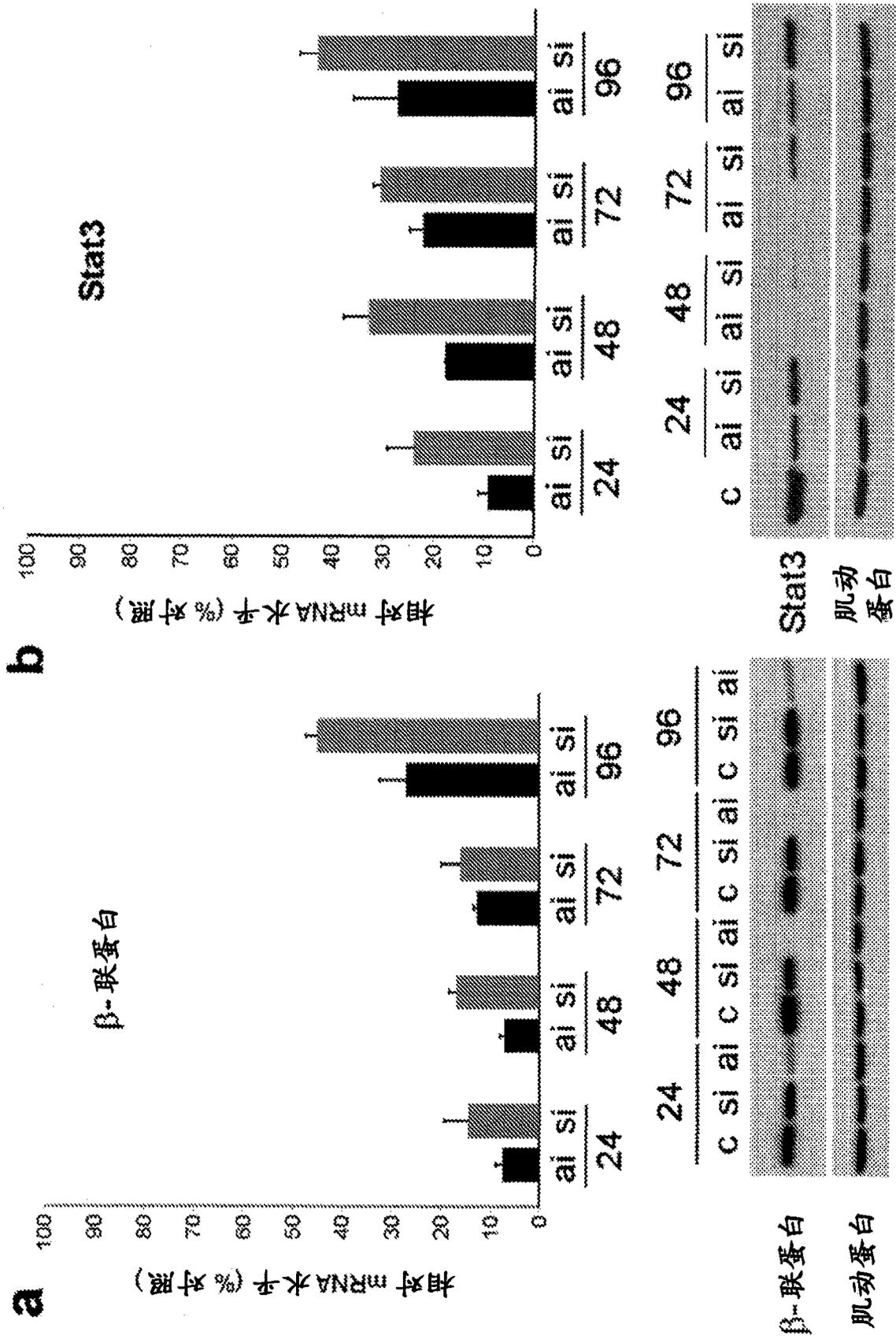


图 13a-13b

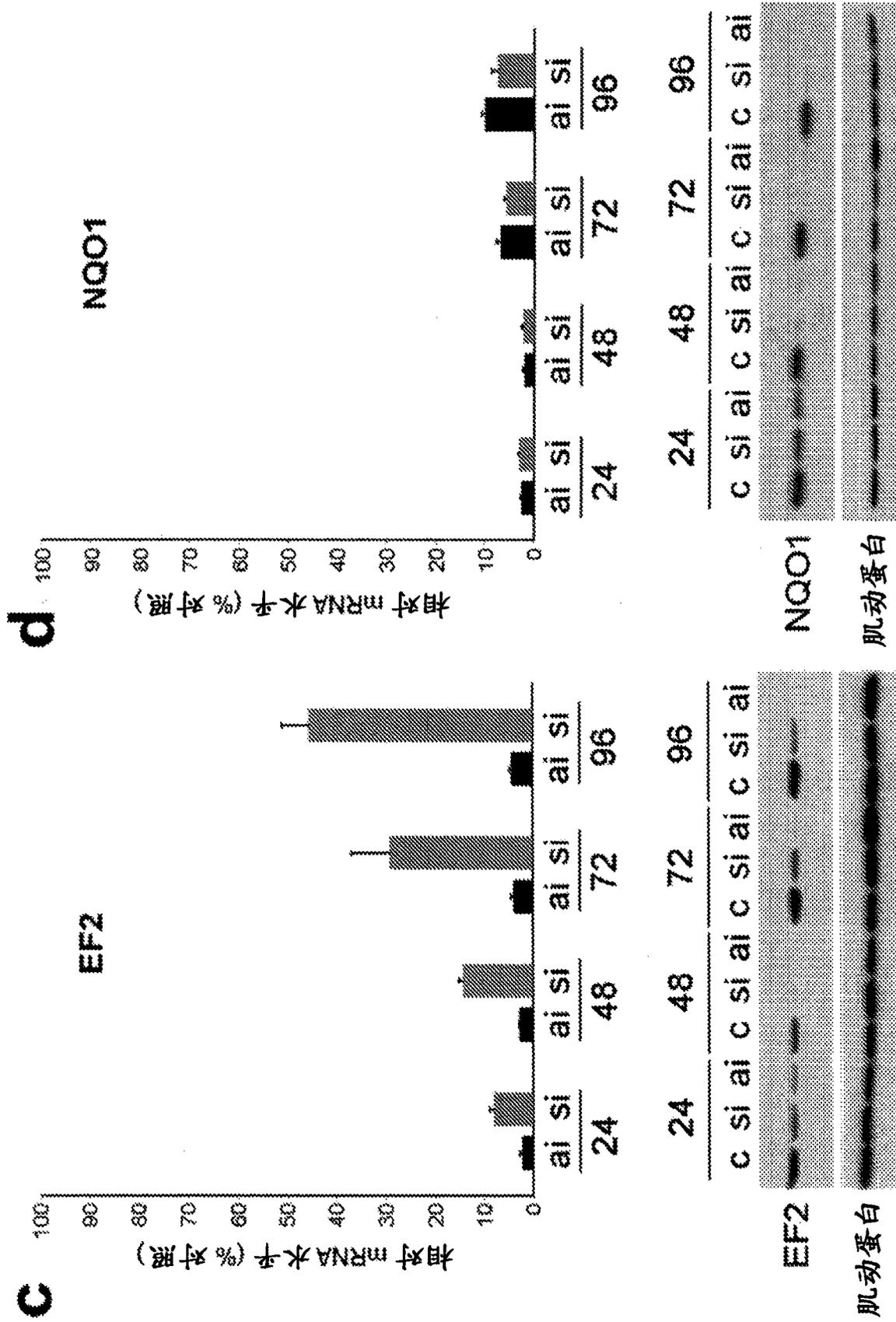


图 13c-13d

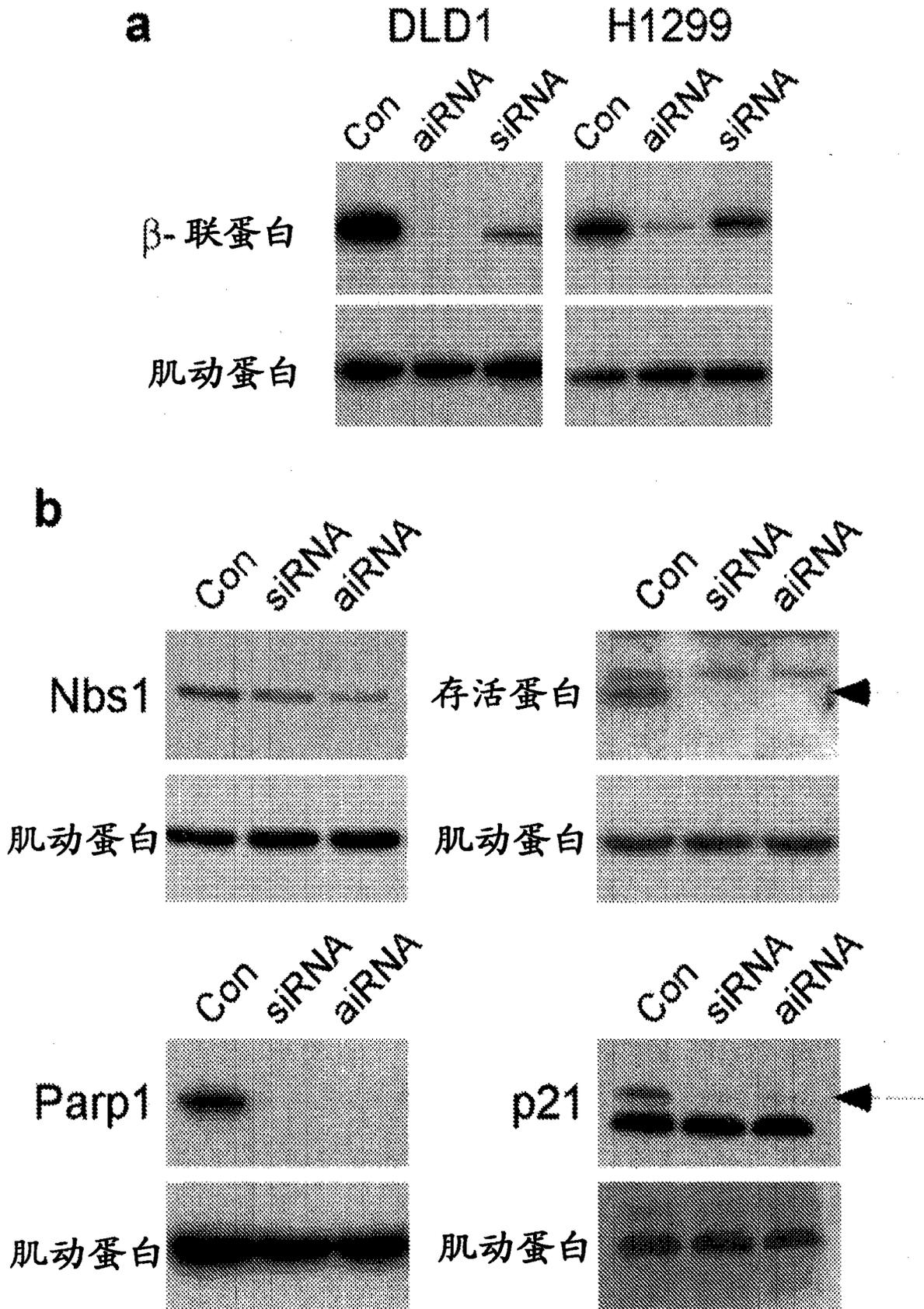


图 14a-14b

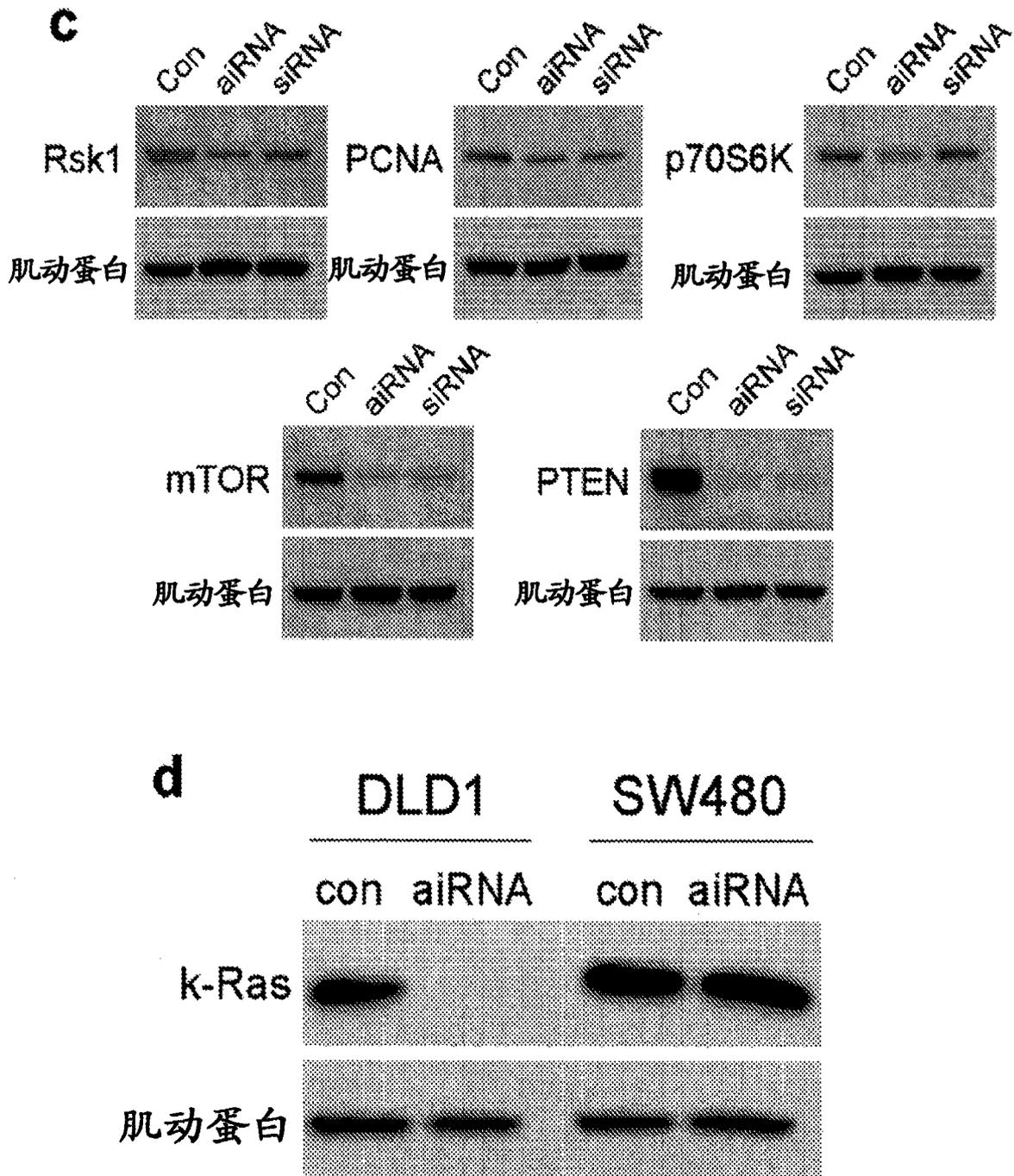


图 14c-14d

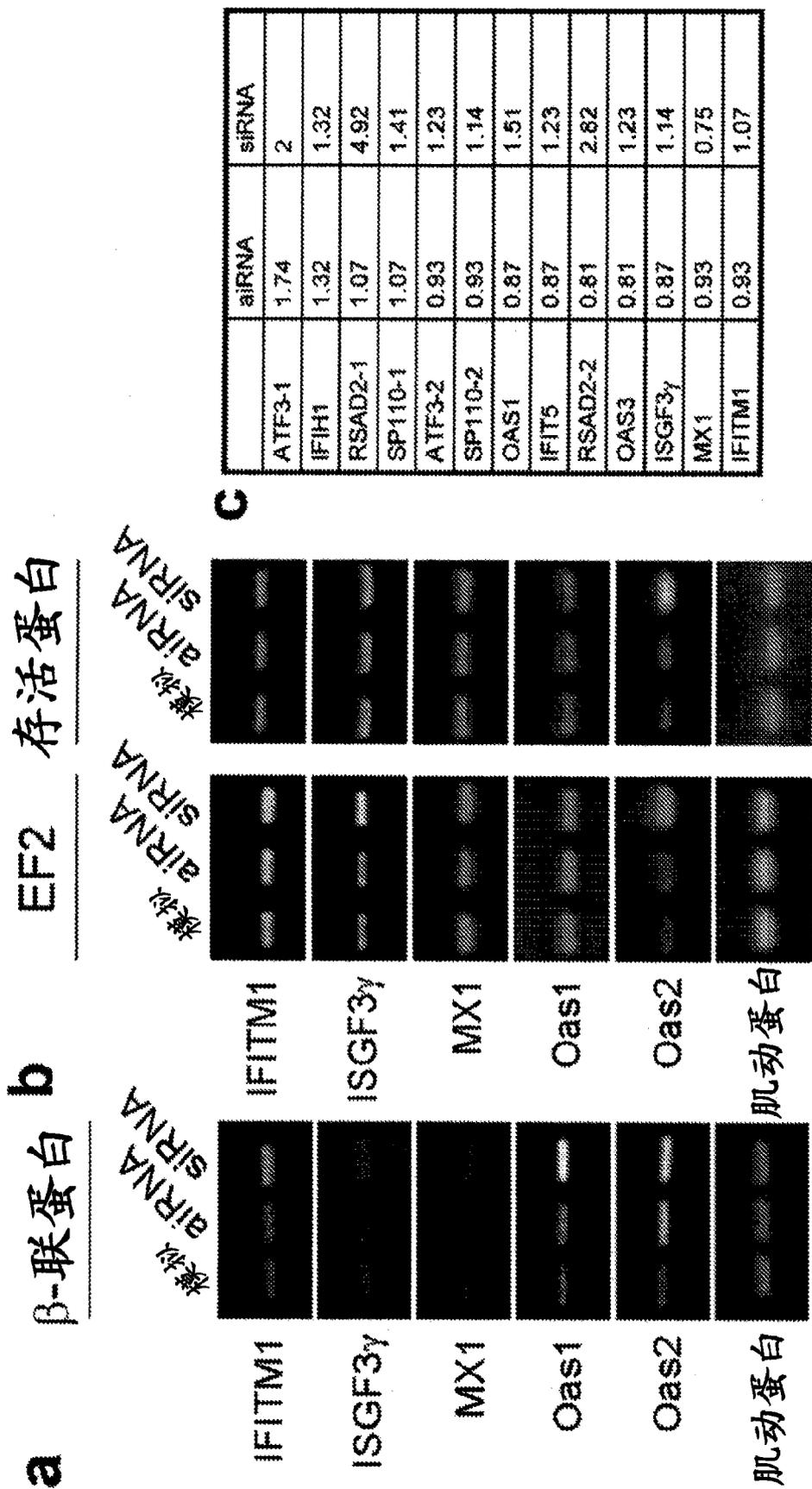


图 15a-15c

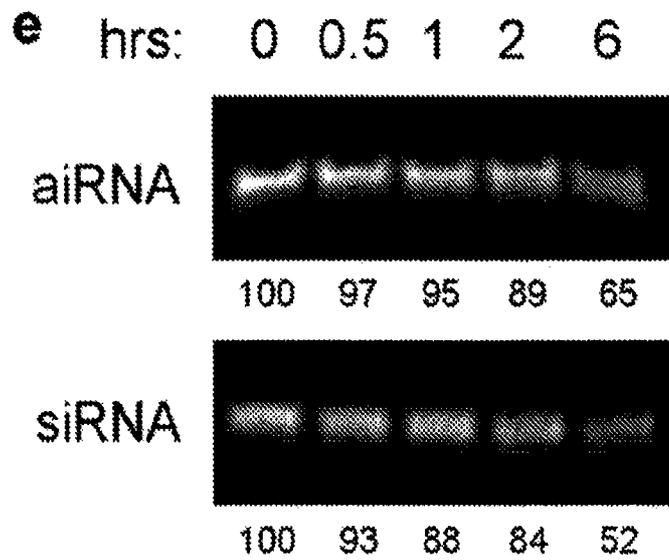
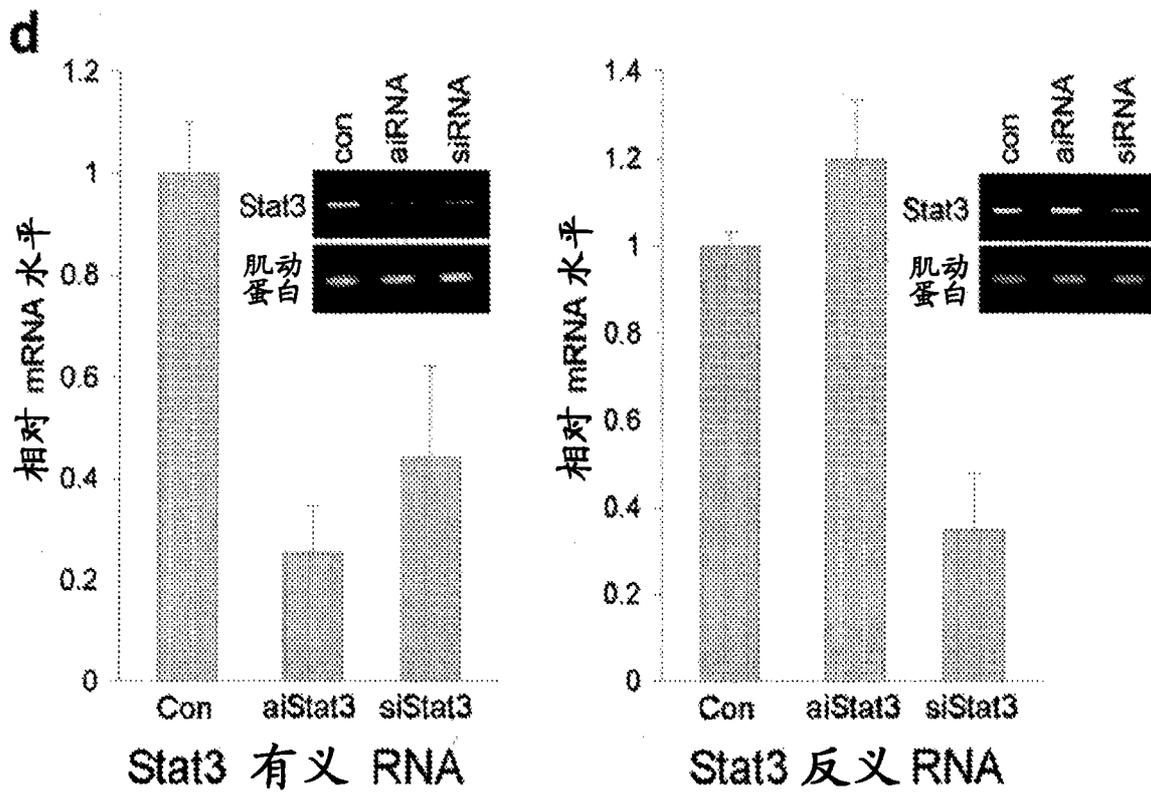


图 15d-15e

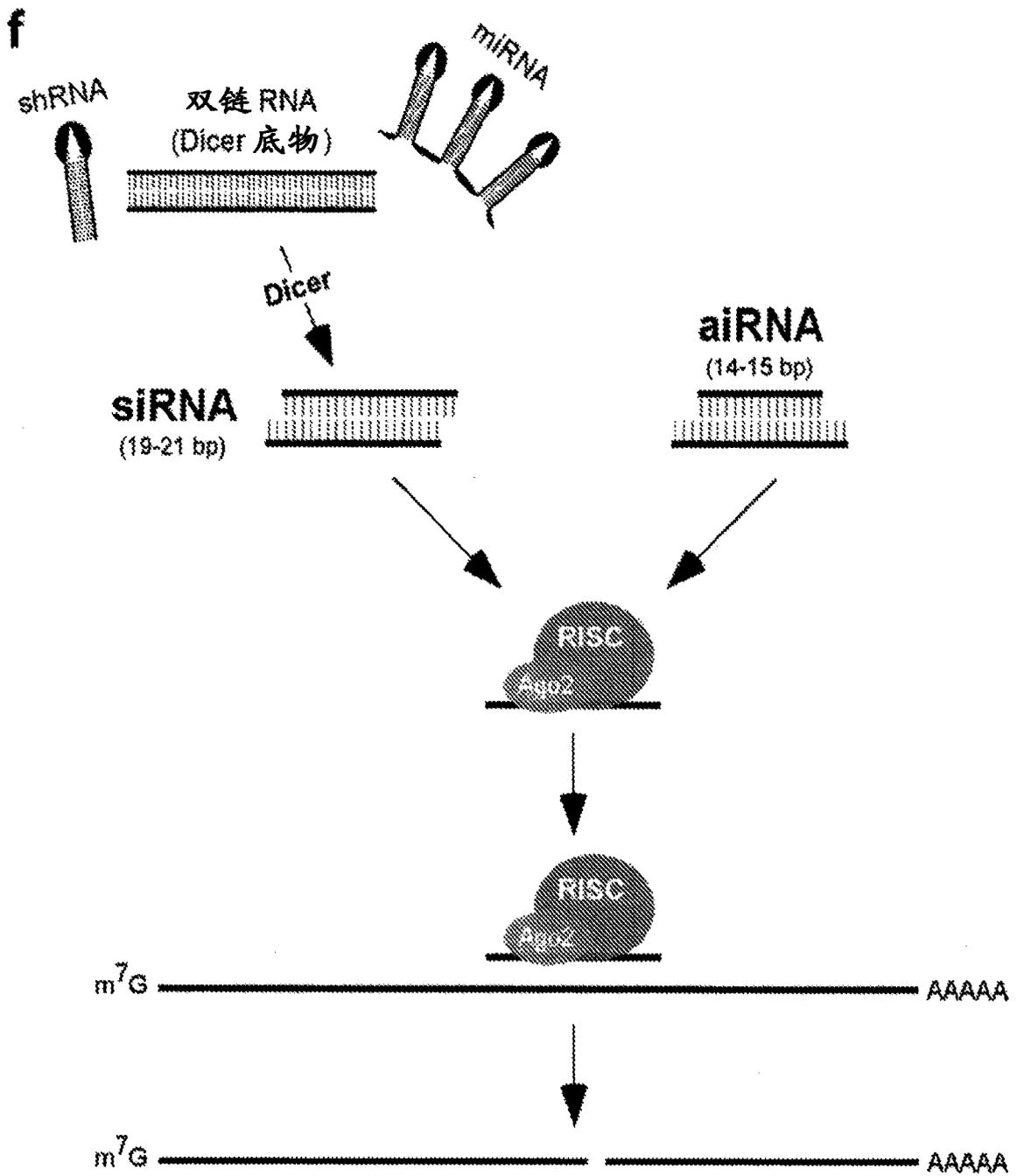


图 15f

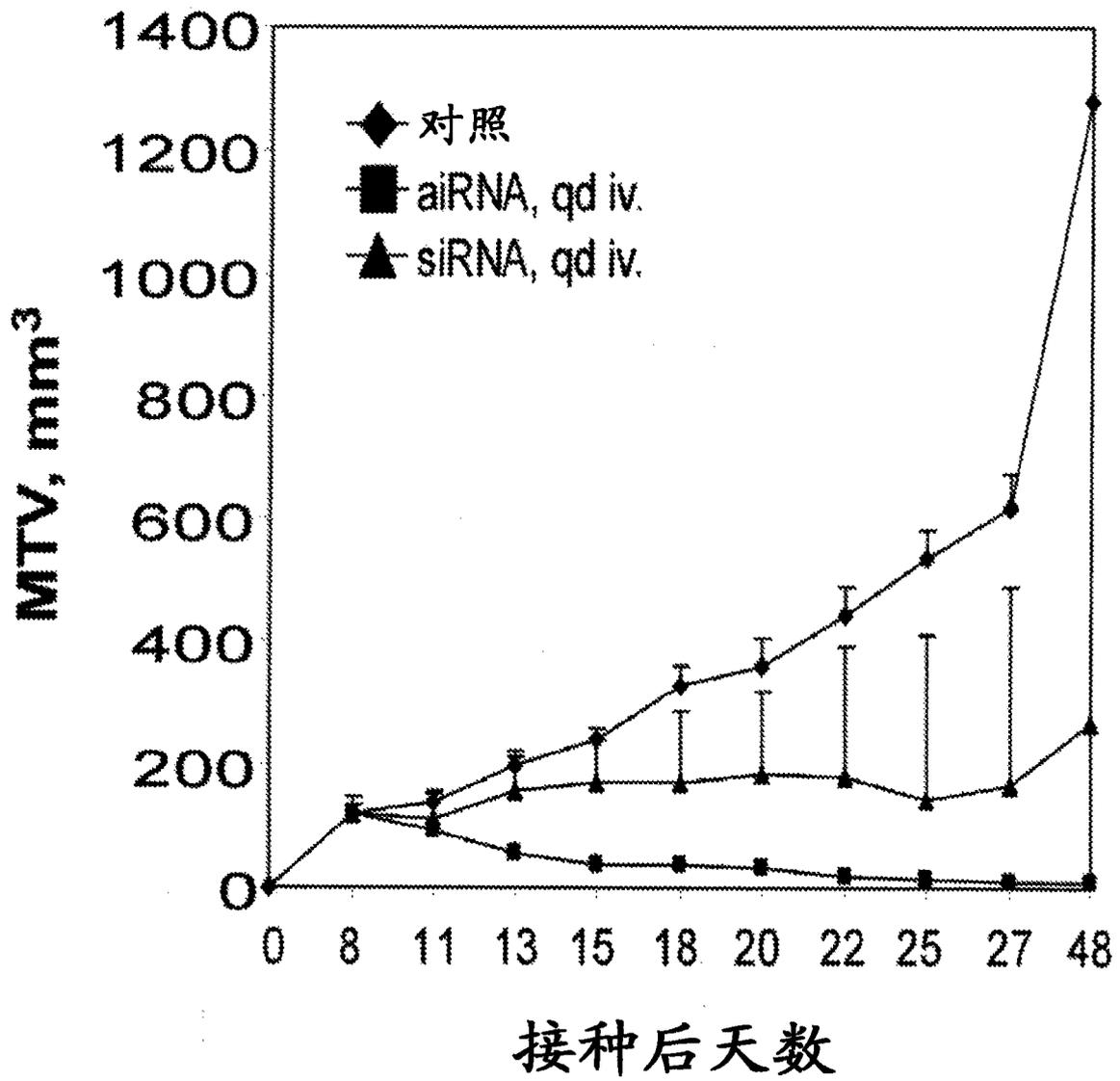


图 16

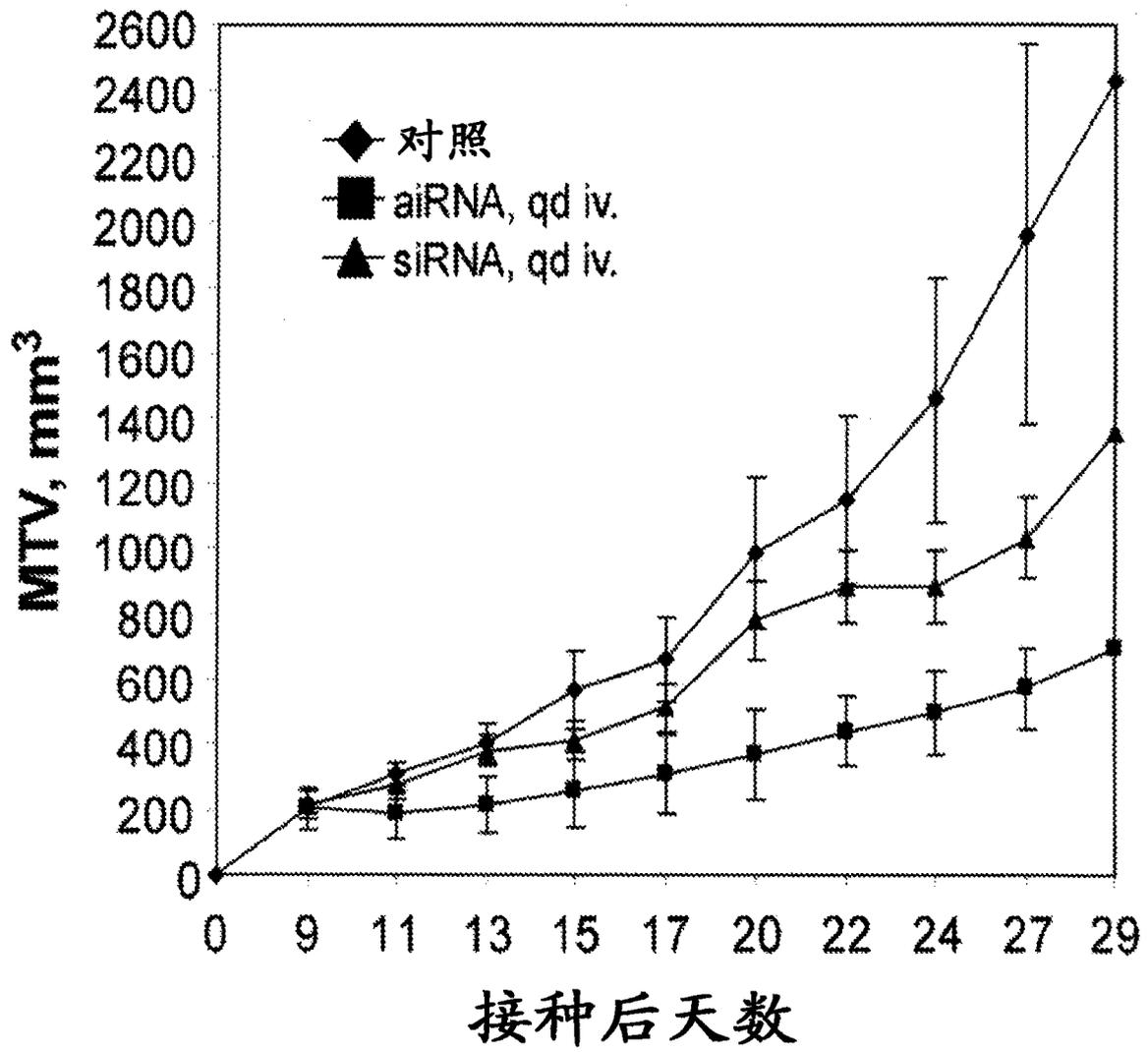


图 17

Let-7a miRNA oligo 5'-ACUAUACAAUCUACUGUCUUUC  
UUUGAUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5'

Let-7a aiRNA oligo 5'-AUACAAUCUACUGUC  
UGAUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5'

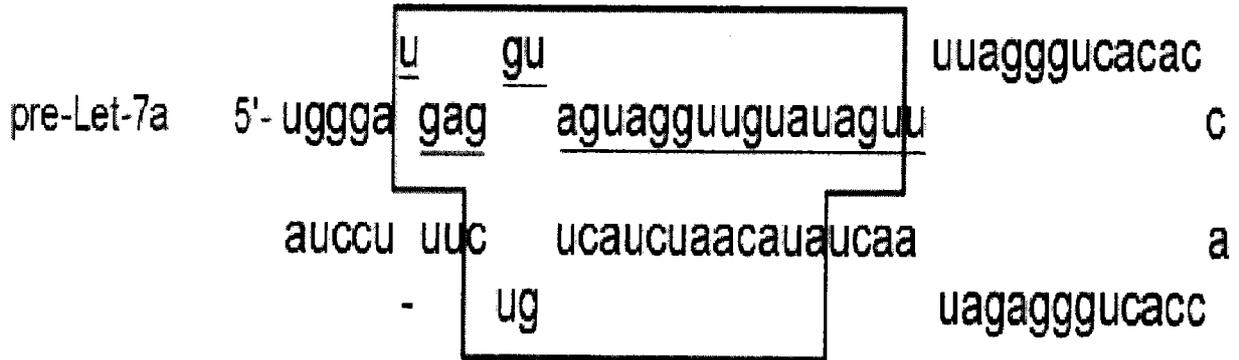


图 18A

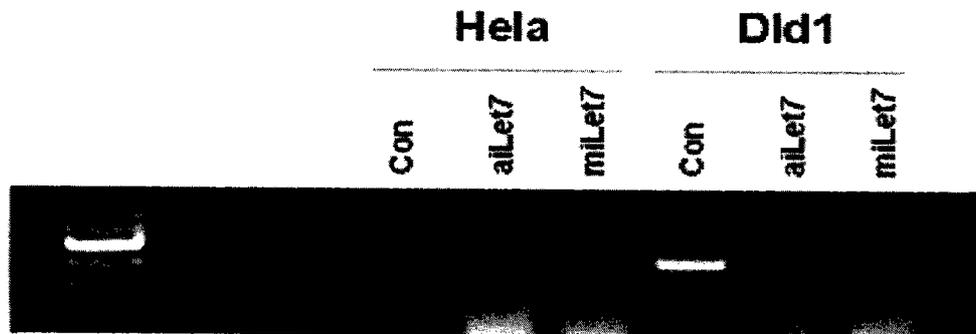


图 18B

**aiLet-7c 模拟物:** 5'-ACAACCUACUACCUC  
GUAUGUUGGAUGAUGGAGUAA-5'

**Let-7c 抑制剂:** 5'-GGUAGUAGGUUGUAU  
ACUCCAUCAUCCAACAUAACA-5'

**miR-21 抑制剂:** 5'-AUCAGACUGAUGUUG  
GAAUAGUCUGACUACAACUAA-5'

**miR-155 抑制剂:** 5'-AUGC UAAUCGUGAUA  
AAUUACGAUUAGCACUAUCA-5'

图 19A

**hsa-Let-7c**  
成熟 miRNA: UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU

**hsa-miR-21**  
成熟 miRNA: UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

**hsa-miR-155**  
成熟 miRNA: UUAAUGC UAAUCGUGAUAAGGGGU

图 19B

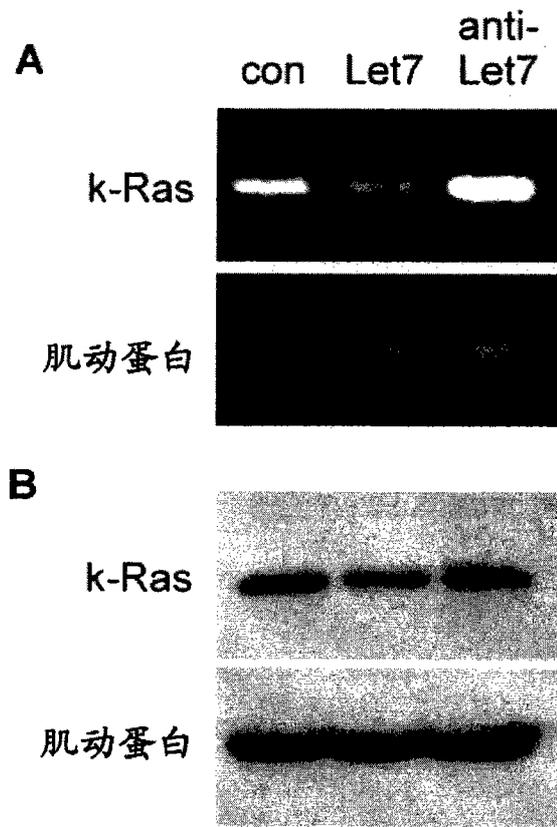


图 20

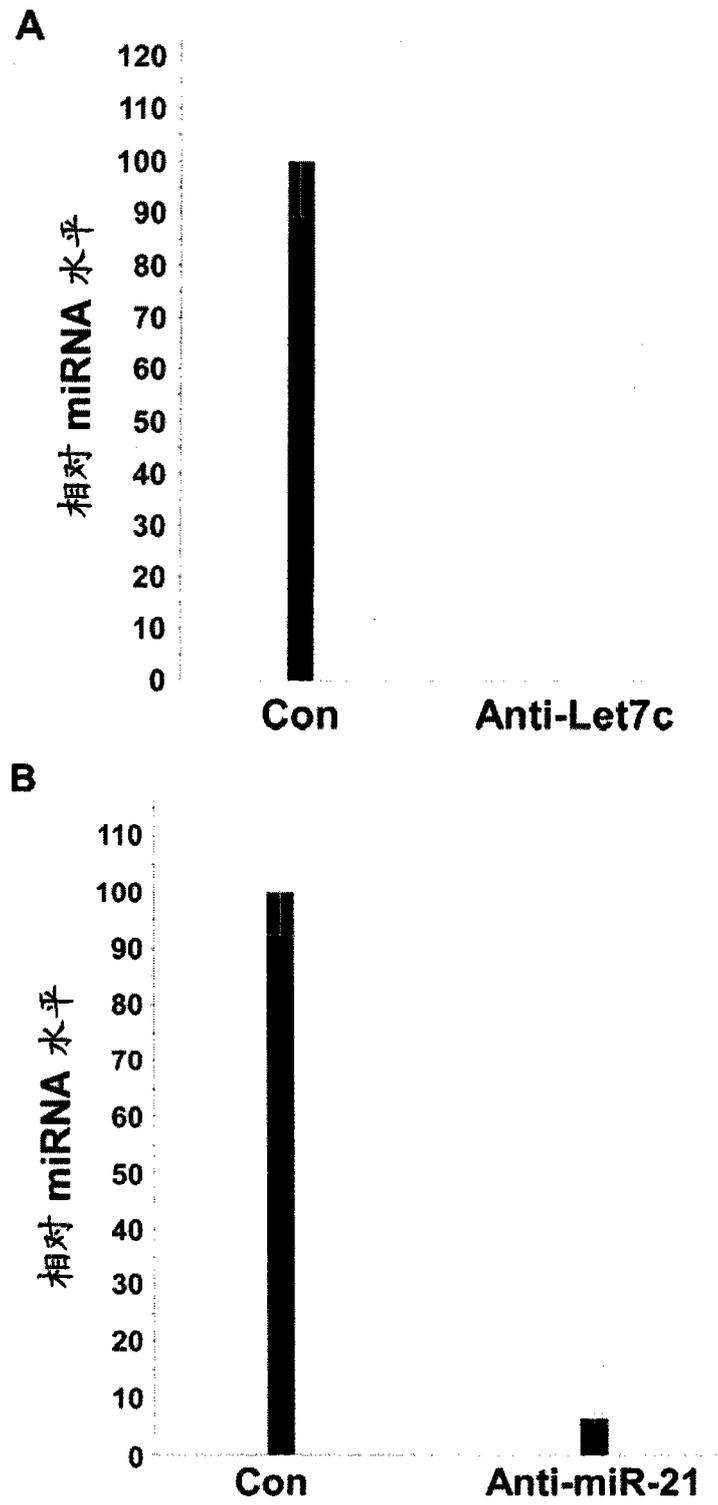


图 21

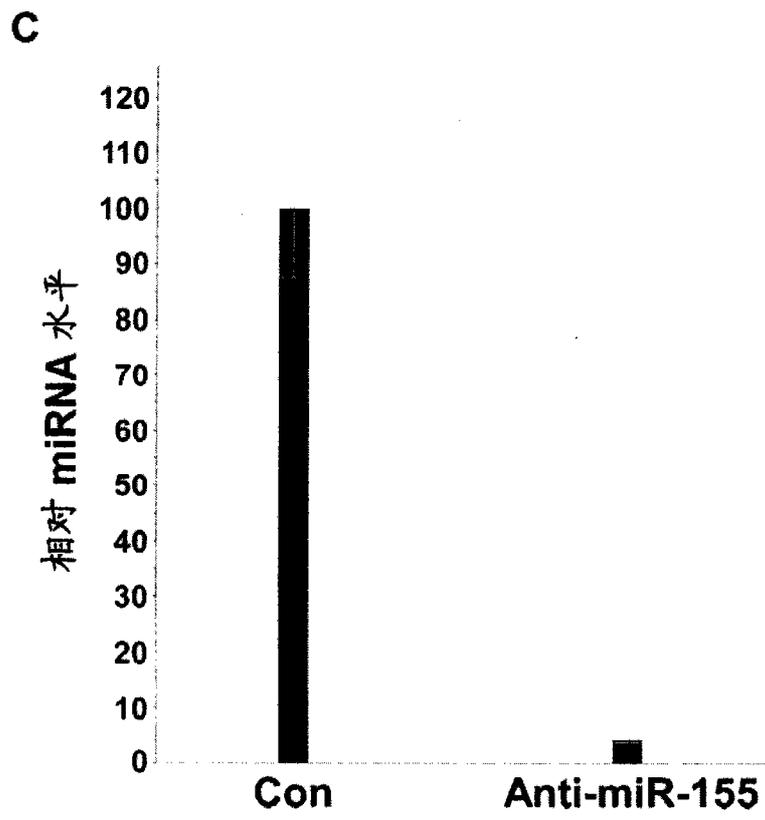


图 21

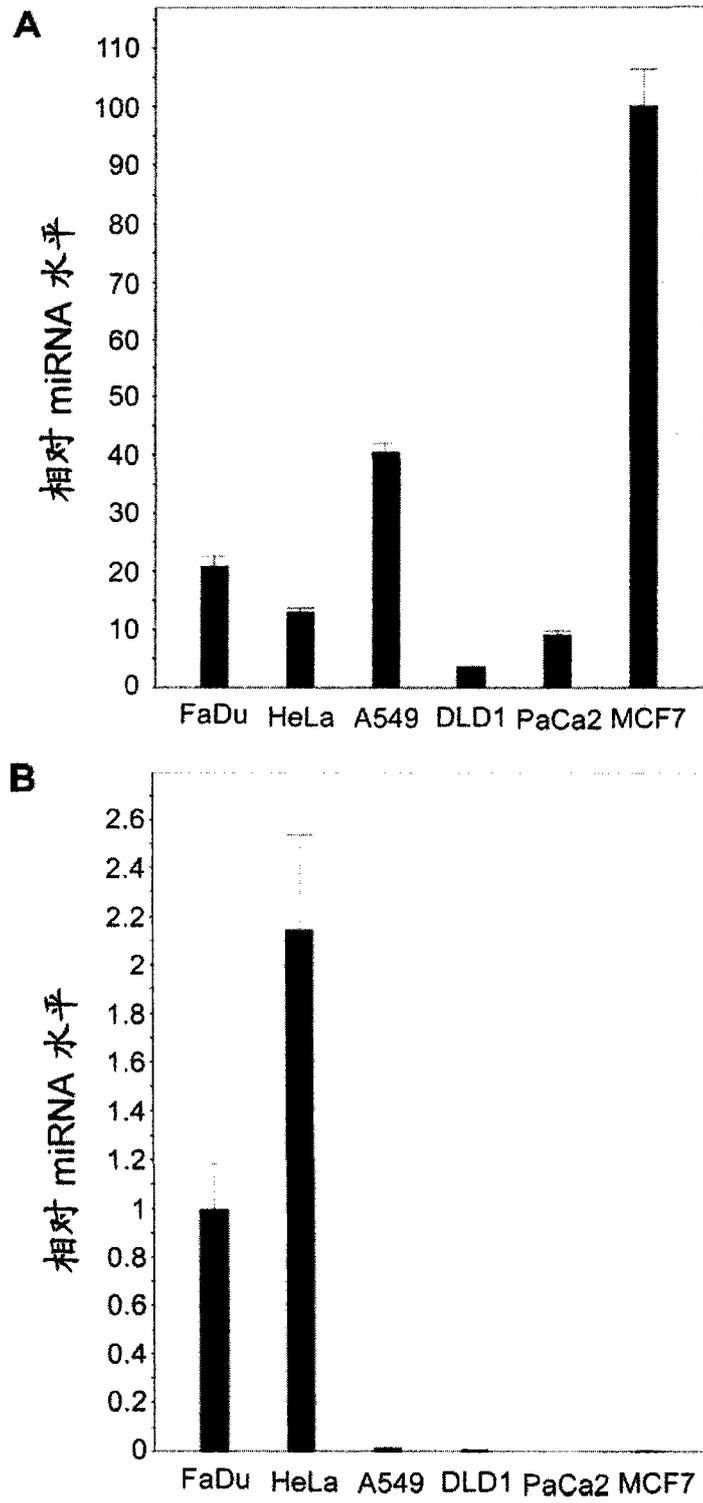


图 22

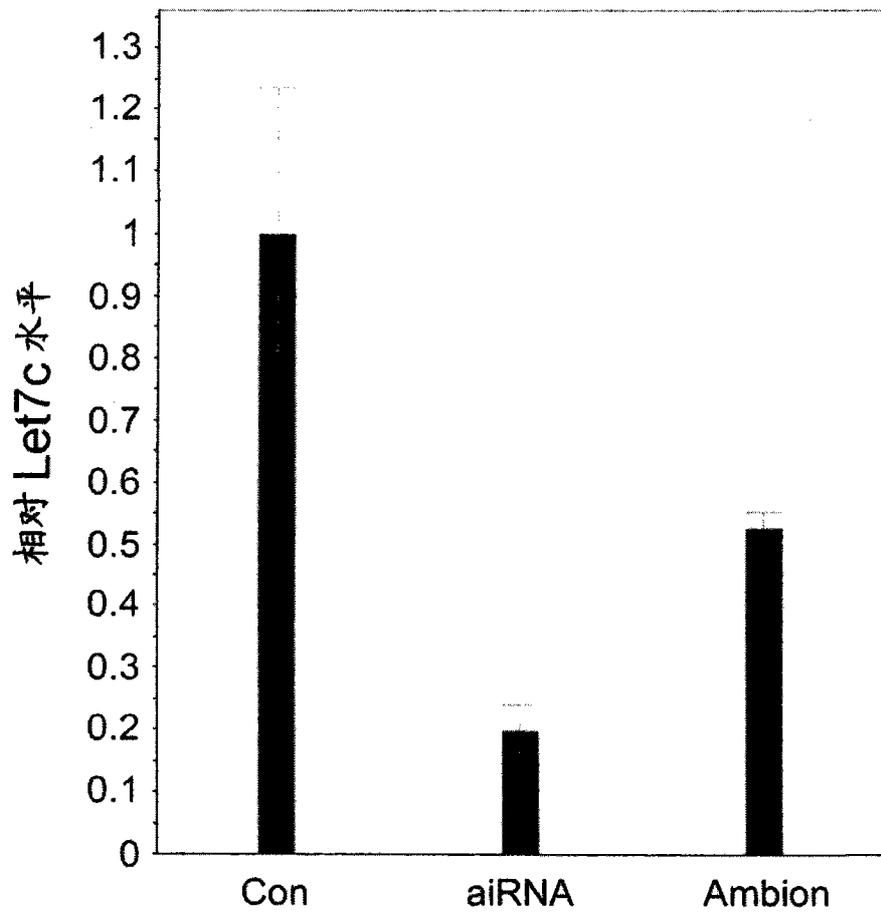


图 23

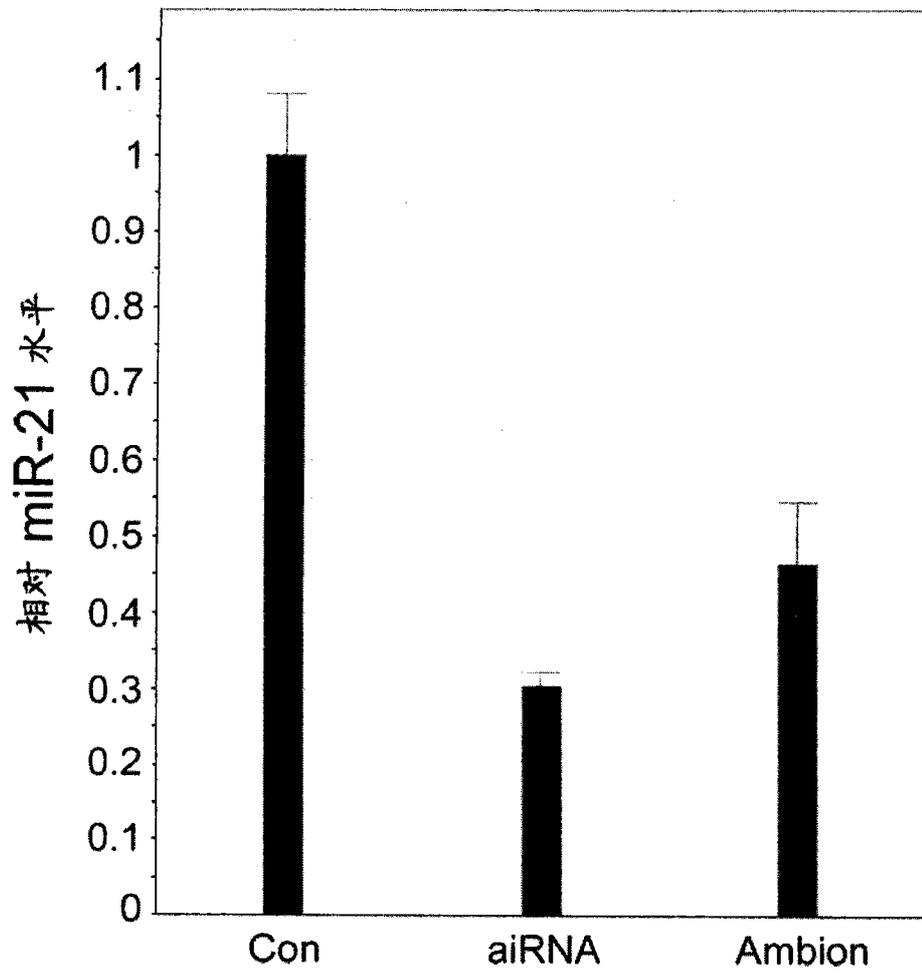


图 24

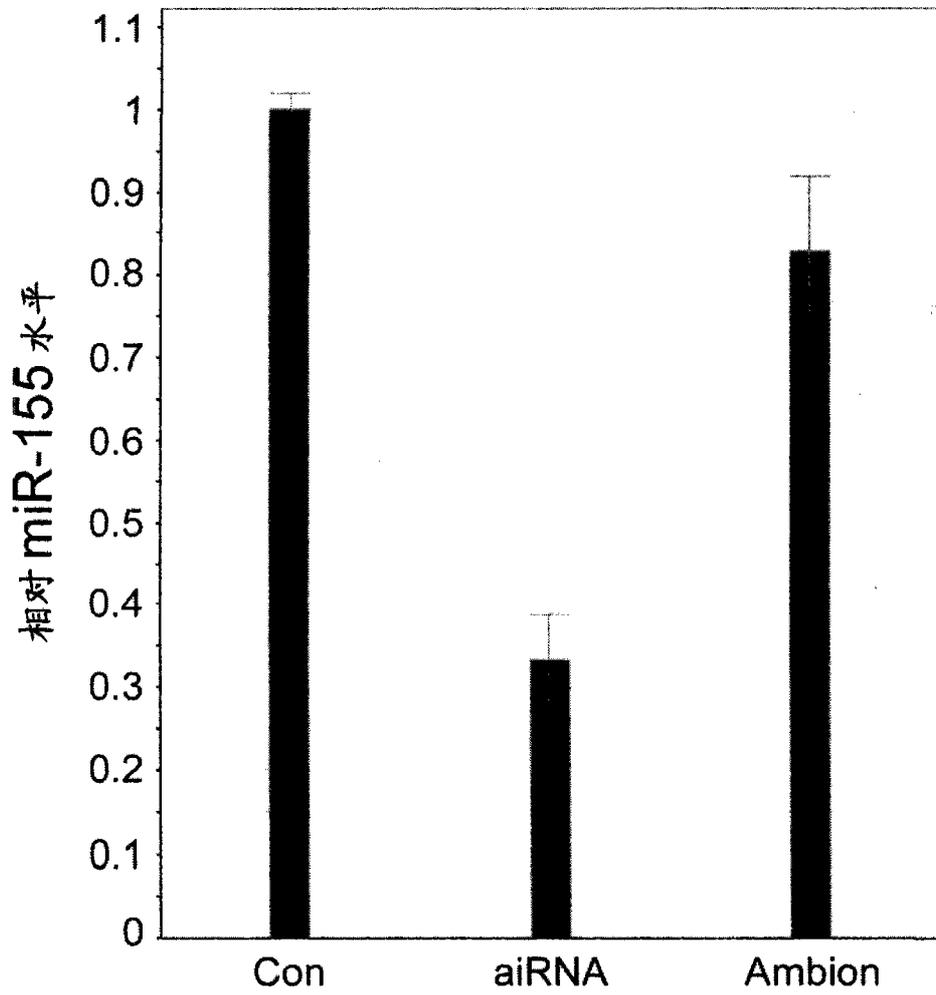


图 25

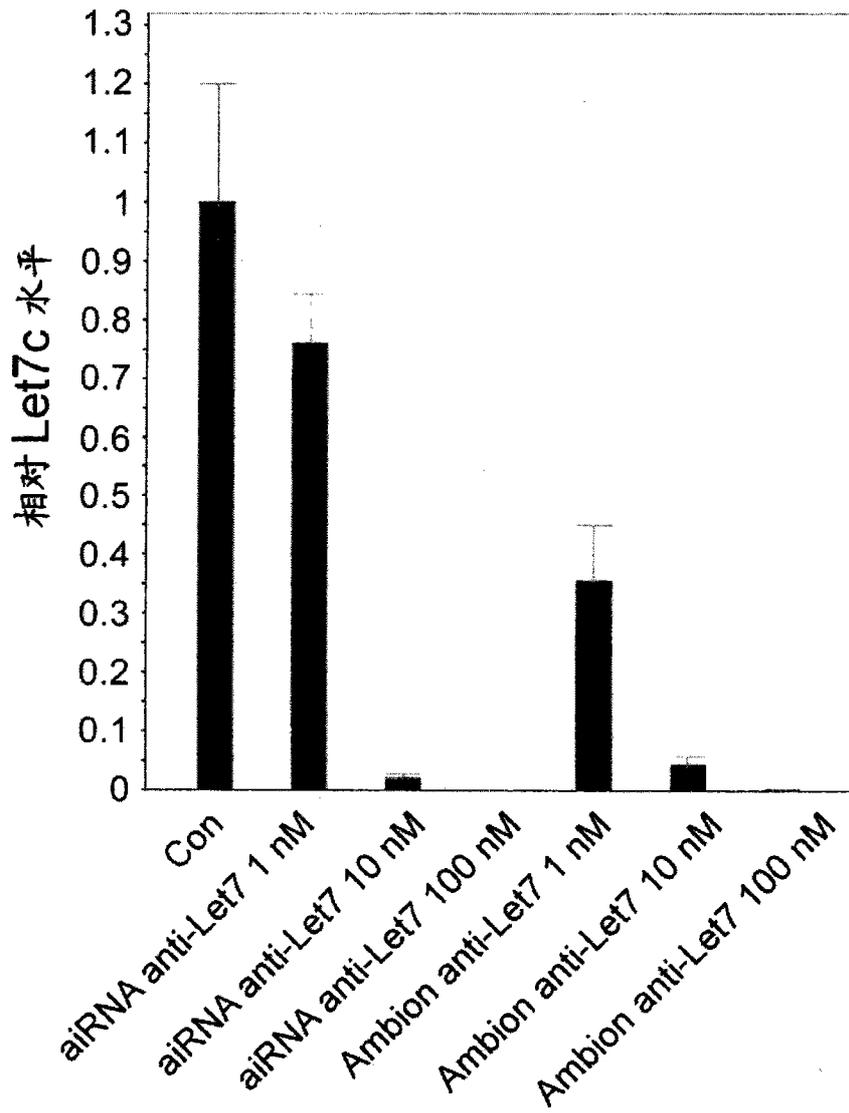


图 26

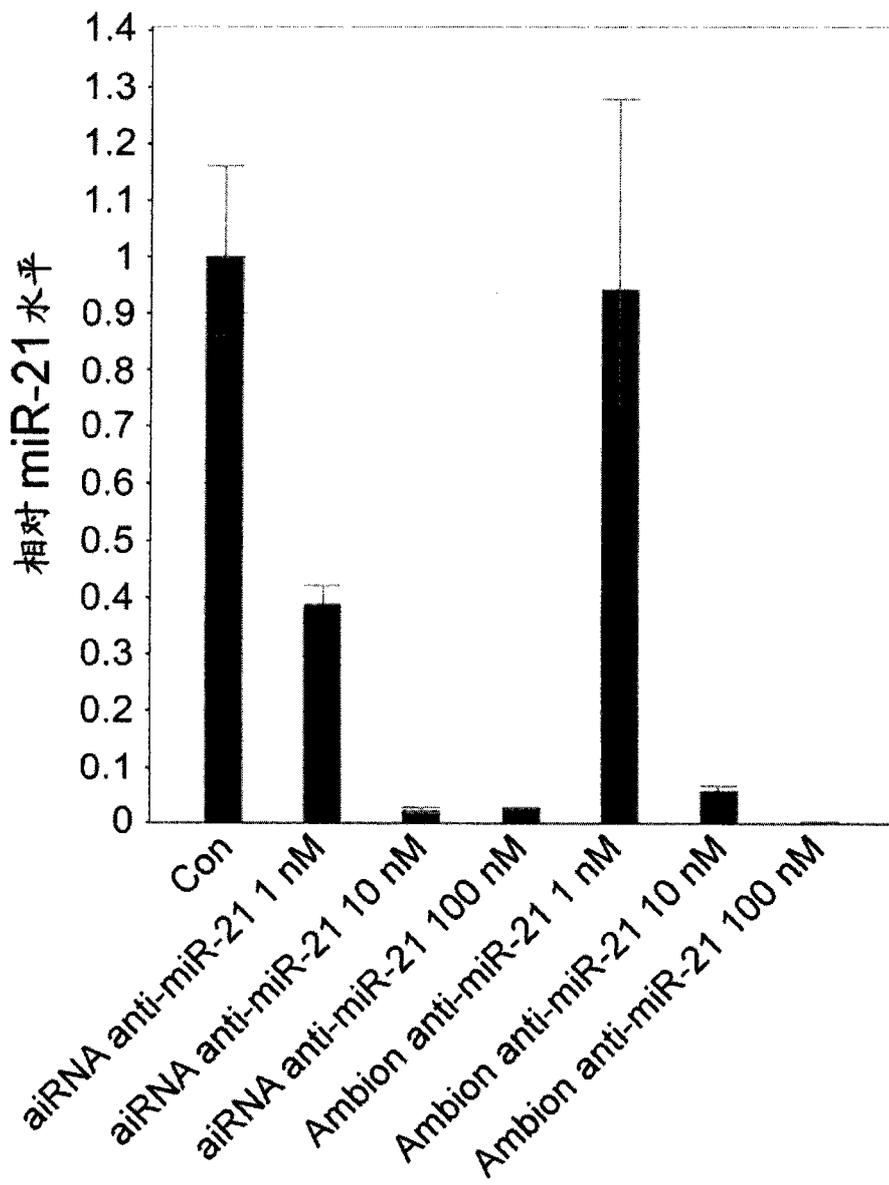


图 27

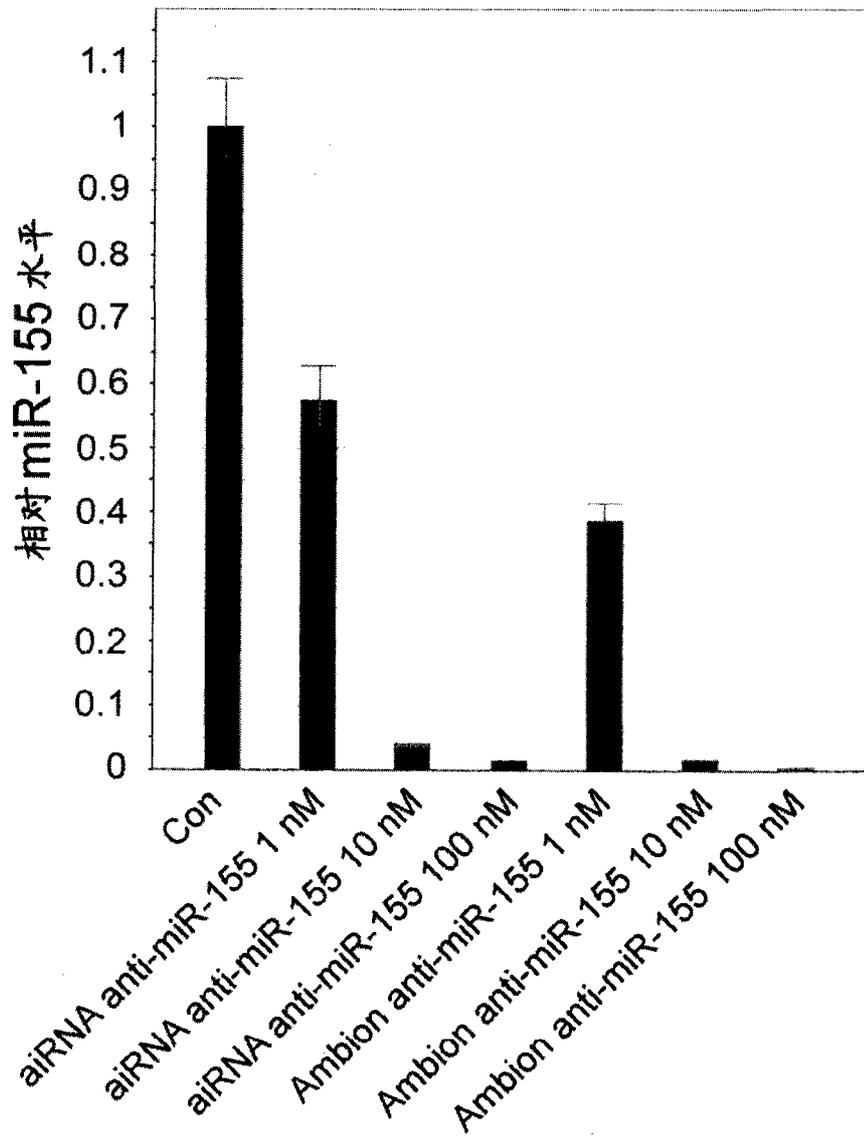


图 28

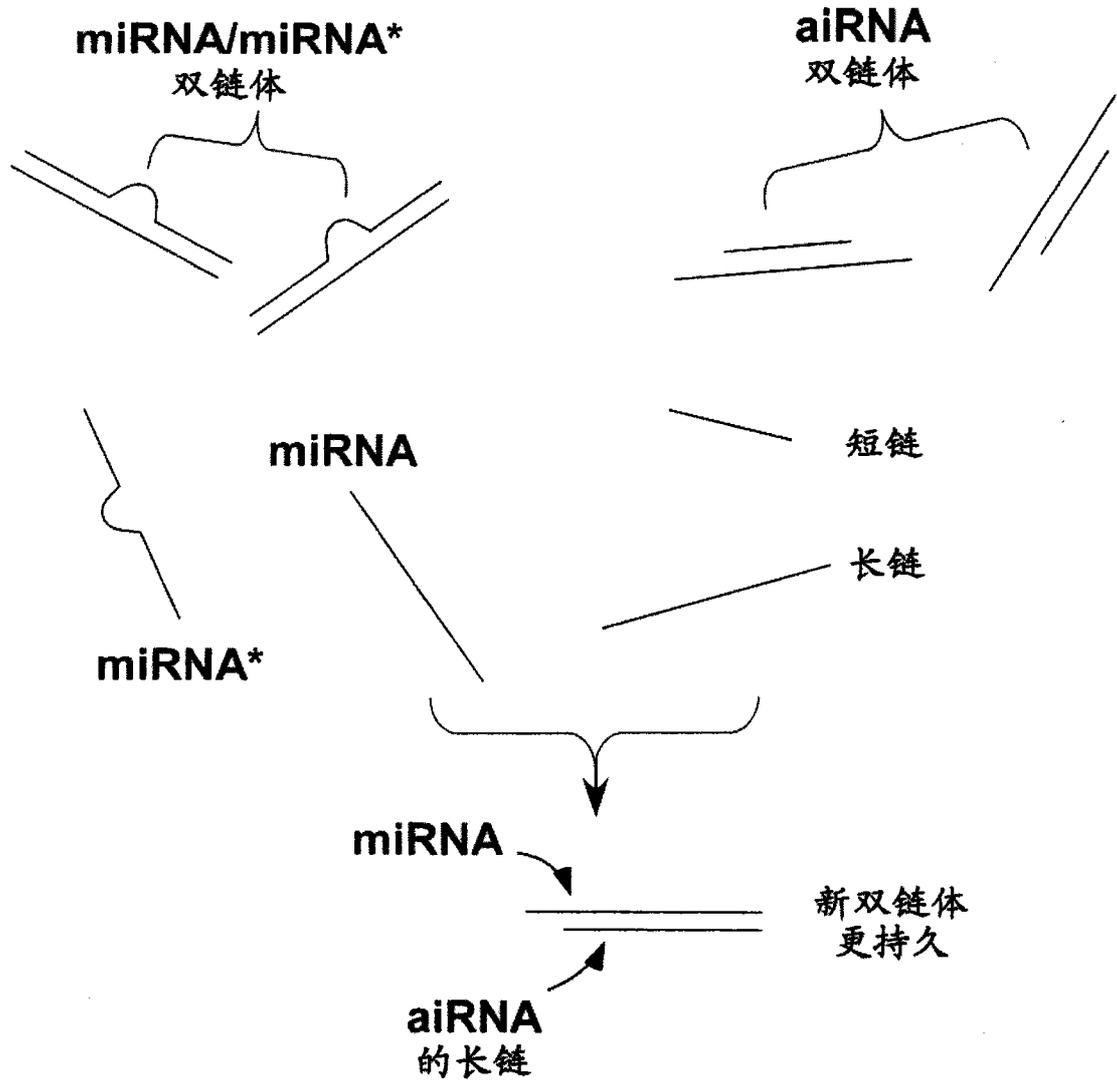


图 29

hsa-let-7a-1	hsa-mir-29a	hsa-mir-128-2	hsa-mir-184	hsa-mir-220c	hsa-mir-365-2	hsa-mir-483
hsa-let-7a-2	hsa-mir-29b-1	hsa-mir-129-1	hsa-mir-185	hsa-mir-221	hsa-mir-367	hsa-mir-484
hsa-let-7a-3	hsa-mir-29b-2	hsa-mir-129-2	hsa-mir-186	hsa-mir-222	hsa-mir-369	hsa-mir-485
hsa-let-7b	hsa-mir-29c	hsa-mir-130a	hsa-mir-187	hsa-mir-223	hsa-mir-370	hsa-mir-486
hsa-let-7c	hsa-mir-30a	hsa-mir-130b	hsa-mir-188	hsa-mir-224	hsa-mir-371	hsa-mir-487a
hsa-let-7d	hsa-mir-30b	hsa-mir-132	hsa-mir-190	hsa-mir-296	hsa-mir-372	hsa-mir-487b
hsa-let-7e	hsa-mir-30c-1	hsa-mir-133a-1	hsa-mir-190b	hsa-mir-297	hsa-mir-373	hsa-mir-488
hsa-let-7f-1	hsa-mir-30c-2	hsa-mir-133a-2	hsa-mir-191	hsa-mir-298	hsa-mir-374a	hsa-mir-489
hsa-let-7f-2	hsa-mir-30d	hsa-mir-133b	hsa-mir-192	hsa-mir-299	hsa-mir-374b	hsa-mir-490
hsa-let-7g	hsa-mir-30e	hsa-mir-134	hsa-mir-193a	hsa-mir-300	hsa-mir-375	hsa-mir-491
hsa-let-7i	hsa-mir-31	hsa-mir-135a-1	hsa-mir-193b	hsa-mir-301a	hsa-mir-376a-1	hsa-mir-492
hsa-mir-1-1	hsa-mir-32	hsa-mir-135a-2	hsa-mir-194-1	hsa-mir-301b	hsa-mir-376a-2	hsa-mir-493
hsa-mir-1-2	hsa-mir-33a	hsa-mir-135b	hsa-mir-194-2	hsa-mir-302a	hsa-mir-376b	hsa-mir-494
hsa-mir-7-1	hsa-mir-33b	hsa-mir-136	hsa-mir-195	hsa-mir-302b	hsa-mir-376c	hsa-mir-495
hsa-mir-7-2	hsa-mir-34a	hsa-mir-137	hsa-mir-196a-1	hsa-mir-302c	hsa-mir-377	hsa-mir-496
hsa-mir-7-3	hsa-mir-34b	hsa-mir-138-1	hsa-mir-196a-2	hsa-mir-302d	hsa-mir-378	hsa-mir-497
hsa-mir-9-1	hsa-mir-34c	hsa-mir-138-2	hsa-mir-196b	hsa-mir-302e	hsa-mir-379	hsa-mir-498
hsa-mir-9-2	hsa-mir-92a-1	hsa-mir-139	hsa-mir-197	hsa-mir-302f	hsa-mir-380	hsa-mir-499
hsa-mir-9-3	hsa-mir-92a-2	hsa-mir-140	hsa-mir-198	hsa-mir-320a	hsa-mir-381	hsa-mir-500
hsa-mir-10a	hsa-mir-92b	hsa-mir-141	hsa-mir-199a-1	hsa-mir-320b-1	hsa-mir-382	hsa-mir-501
hsa-mir-10b	hsa-mir-93	hsa-mir-142	hsa-mir-199a-2	hsa-mir-320b-2	hsa-mir-383	hsa-mir-502
hsa-mir-15a	hsa-mir-95	hsa-mir-143	hsa-mir-199b	hsa-mir-320c-1	hsa-mir-384	hsa-mir-503
hsa-mir-15b	hsa-mir-96	hsa-mir-144	hsa-mir-200a	hsa-mir-320c-2	hsa-mir-409	hsa-mir-504
hsa-mir-16-1	hsa-mir-98	hsa-mir-145	hsa-mir-200b	hsa-mir-320d-1	hsa-mir-410	hsa-mir-505
hsa-mir-16-2	hsa-mir-99a	hsa-mir-146a	hsa-mir-200c	hsa-mir-320d-2	hsa-mir-411	hsa-mir-506
hsa-mir-17	hsa-mir-99b	hsa-mir-146b	hsa-mir-202	hsa-mir-323	hsa-mir-412	hsa-mir-507
hsa-mir-18a	hsa-mir-100	hsa-mir-147	hsa-mir-203	hsa-mir-324	hsa-mir-421	hsa-mir-508
hsa-mir-18b	hsa-mir-101-1	hsa-mir-147b	hsa-mir-204	hsa-mir-325	hsa-mir-422a	hsa-mir-509-1
hsa-mir-19a	hsa-mir-101-2	hsa-mir-148a	hsa-mir-205	hsa-mir-326	hsa-mir-423	hsa-mir-509-2
hsa-mir-19b-1	hsa-mir-103-1	hsa-mir-148b	hsa-mir-206	hsa-mir-328	hsa-mir-424	hsa-mir-509-3
hsa-mir-19b-2	hsa-mir-103-2	hsa-mir-149	hsa-mir-208a	hsa-mir-329-1	hsa-mir-425	hsa-mir-510
hsa-mir-20a	hsa-mir-105-1	hsa-mir-150	hsa-mir-208b	hsa-mir-329-2	hsa-mir-429	hsa-mir-511-1
hsa-mir-20b	hsa-mir-105-2	hsa-mir-151	hsa-mir-210	hsa-mir-330	hsa-mir-431	hsa-mir-511-2
hsa-mir-21	hsa-mir-106a	hsa-mir-152	hsa-mir-211	hsa-mir-331	hsa-mir-432	hsa-mir-512-1
hsa-mir-22	hsa-mir-106b	hsa-mir-153-1	hsa-mir-212	hsa-mir-335	hsa-mir-433	hsa-mir-512-2
hsa-mir-23a	hsa-mir-107	hsa-mir-153-2	hsa-mir-214	hsa-mir-337	hsa-mir-448	hsa-mir-513a-1
hsa-mir-23b	hsa-mir-122	hsa-mir-154	hsa-mir-215	hsa-mir-338	hsa-mir-449a	hsa-mir-513a-2
hsa-mir-24-1	hsa-mir-124-1	hsa-mir-155	hsa-mir-216a	hsa-mir-339	hsa-mir-449b	hsa-mir-513b
hsa-mir-24-2	hsa-mir-124-2	hsa-mir-181a-1	hsa-mir-216b	hsa-mir-340	hsa-mir-450a-1	hsa-mir-513c
hsa-mir-25	hsa-mir-124-3	hsa-mir-181a-2	hsa-mir-217	hsa-mir-342	hsa-mir-450a-2	hsa-mir-514-1
hsa-mir-26a-1	hsa-mir-125a	hsa-mir-181b-1	hsa-mir-218-1	hsa-mir-345	hsa-mir-450b	hsa-mir-514-2
hsa-mir-26a-2	hsa-mir-125b-1	hsa-mir-181b-2	hsa-mir-218-2	hsa-mir-346	hsa-mir-451	hsa-mir-514-3
hsa-mir-26b	hsa-mir-125b-2	hsa-mir-181c	hsa-mir-219-1	hsa-mir-361	hsa-mir-452	hsa-mir-515-1
hsa-mir-27a	hsa-mir-126	hsa-mir-181d	hsa-mir-219-2	hsa-mir-362	hsa-mir-453	hsa-mir-515-2
hsa-mir-27b	hsa-mir-127	hsa-mir-182	hsa-mir-220a	hsa-mir-363	hsa-mir-454	hsa-mir-516a-1
hsa-mir-28	hsa-mir-128-1	hsa-mir-183	hsa-mir-220b	hsa-mir-365-1	hsa-mir-455	hsa-mir-516a-2

图 30

hsa-mir-516b-1	hsa-mir-548c	hsa-mir-571	hsa-mir-619	hsa-mir-665	hsa-mir-941-4	hsa-mir-1255a	hsa-mir-1296
hsa-mir-516b-2	hsa-mir-548d-1	hsa-mir-572	hsa-mir-620	hsa-mir-668	hsa-mir-942	hsa-mir-1255b-1	hsa-mir-1297
hsa-mir-517a	hsa-mir-548d-2	hsa-mir-573	hsa-mir-621	hsa-mir-671	hsa-mir-943	hsa-mir-1255b-2	hsa-mir-1298
hsa-mir-517b	hsa-mir-548e	hsa-mir-574	hsa-mir-622	hsa-mir-675	hsa-mir-944	hsa-mir-1256	hsa-mir-1299
hsa-mir-517c	hsa-mir-548f-1	hsa-mir-575	hsa-mir-623	hsa-mir-708	hsa-mir-1178	hsa-mir-1257	hsa-mir-1300
hsa-mir-518a-1	hsa-mir-548f-2	hsa-mir-576	hsa-mir-624	hsa-mir-720	hsa-mir-1179	hsa-mir-1258	hsa-mir-1301
hsa-mir-518a-2	hsa-mir-548f-3	hsa-mir-577	hsa-mir-625	hsa-mir-744	hsa-mir-1180	hsa-mir-1259	hsa-mir-1302-1
hsa-mir-518b	hsa-mir-548f-4	hsa-mir-578	hsa-mir-626	hsa-mir-758	hsa-mir-1181	hsa-mir-1260	hsa-mir-1302-2
hsa-mir-518c	hsa-mir-548f-5	hsa-mir-579	hsa-mir-627	hsa-mir-760	hsa-mir-1182	hsa-mir-1261	hsa-mir-1302-3
hsa-mir-518d	hsa-mir-548g	hsa-mir-580	hsa-mir-628	hsa-mir-765	hsa-mir-1183	hsa-mir-1262	hsa-mir-1302-4
hsa-mir-518e	hsa-mir-548h-1	hsa-mir-581	hsa-mir-629	hsa-mir-766	hsa-mir-1184	hsa-mir-1263	hsa-mir-1302-5
hsa-mir-518f	hsa-mir-548h-2	hsa-mir-582	hsa-mir-630	hsa-mir-767	hsa-mir-1185-1	hsa-mir-1264	hsa-mir-1302-6
hsa-mir-519a-1	hsa-mir-548h-3	hsa-mir-583	hsa-mir-631	hsa-mir-768	hsa-mir-1185-2	hsa-mir-1265	hsa-mir-1302-7
hsa-mir-519a-2	hsa-mir-548h-4	hsa-mir-584	hsa-mir-632	hsa-mir-769	hsa-mir-1197	hsa-mir-1266	hsa-mir-1302-8
hsa-mir-519b	hsa-mir-548i-1	hsa-mir-585	hsa-mir-633	hsa-mir-770	hsa-mir-1200	hsa-mir-1267	hsa-mir-1303
hsa-mir-519c	hsa-mir-548i-2	hsa-mir-586	hsa-mir-634	hsa-mir-802	hsa-mir-1201	hsa-mir-1268	hsa-mir-1304
hsa-mir-519d	hsa-mir-548i-3	hsa-mir-587	hsa-mir-635	hsa-mir-873	hsa-mir-1202	hsa-mir-1269	hsa-mir-1305
hsa-mir-519e	hsa-mir-548i-4	hsa-mir-588	hsa-mir-636	hsa-mir-874	hsa-mir-1203	hsa-mir-1270	hsa-mir-1306
hsa-mir-520a	hsa-mir-548j	hsa-mir-589	hsa-mir-637	hsa-mir-875	hsa-mir-1204	hsa-mir-1271	hsa-mir-1307
hsa-mir-520b	hsa-mir-548k	hsa-mir-590	hsa-mir-638	hsa-mir-876	hsa-mir-1205	hsa-mir-1272	hsa-mir-1308
hsa-mir-520c	hsa-mir-548l	hsa-mir-591	hsa-mir-639	hsa-mir-877	hsa-mir-1206	hsa-mir-1273	hsa-mir-1321
hsa-mir-520d	hsa-mir-548m	hsa-mir-592	hsa-mir-640	hsa-mir-885	hsa-mir-1207	hsa-mir-1274a	hsa-mir-1322
hsa-mir-520e	hsa-mir-548n	hsa-mir-593	hsa-mir-641	hsa-mir-886	hsa-mir-1208	hsa-mir-1274b	hsa-mir-1323
hsa-mir-520f	hsa-mir-548o	hsa-mir-595	hsa-mir-642	hsa-mir-887	hsa-mir-1224	hsa-mir-1275	hsa-mir-1324
hsa-mir-520g	hsa-mir-548p	hsa-mir-596	hsa-mir-643	hsa-mir-888	hsa-mir-1225	hsa-mir-1276	hsa-mir-1825
hsa-mir-520h	hsa-mir-549	hsa-mir-597	hsa-mir-644	hsa-mir-889	hsa-mir-1226	hsa-mir-1277	hsa-mir-1826
hsa-mir-521-1	hsa-mir-550-1	hsa-mir-598	hsa-mir-645	hsa-mir-890	hsa-mir-1227	hsa-mir-1278	hsa-mir-1827
hsa-mir-521-2	hsa-mir-550-2	hsa-mir-599	hsa-mir-646	hsa-mir-891a	hsa-mir-1228	hsa-mir-1279	
hsa-mir-522	hsa-mir-551a	hsa-mir-600	hsa-mir-647	hsa-mir-891b	hsa-mir-1229	hsa-mir-1280	
hsa-mir-523	hsa-mir-551b	hsa-mir-601	hsa-mir-648	hsa-mir-892a	hsa-mir-1231	hsa-mir-1281	
hsa-mir-524	hsa-mir-552	hsa-mir-602	hsa-mir-649	hsa-mir-892b	hsa-mir-1233	hsa-mir-1282	
hsa-mir-525	hsa-mir-553	hsa-mir-603	hsa-mir-650	hsa-mir-920	hsa-mir-1234	hsa-mir-1283-1	
hsa-mir-526a-1	hsa-mir-554	hsa-mir-604	hsa-mir-651	hsa-mir-921	hsa-mir-1236	hsa-mir-1283-2	
hsa-mir-526a-2	hsa-mir-555	hsa-mir-605	hsa-mir-652	hsa-mir-922	hsa-mir-1237	hsa-mir-1284	
hsa-mir-526b	hsa-mir-556	hsa-mir-606	hsa-mir-653	hsa-mir-923	hsa-mir-1238	hsa-mir-1285-1	
hsa-mir-527	hsa-mir-557	hsa-mir-607	hsa-mir-654	hsa-mir-924	hsa-mir-1243	hsa-mir-1285-2	
hsa-mir-532	hsa-mir-558	hsa-mir-608	hsa-mir-655	hsa-mir-933	hsa-mir-1244	hsa-mir-1286	
hsa-mir-539	hsa-mir-559	hsa-mir-609	hsa-mir-656	hsa-mir-934	hsa-mir-1245	hsa-mir-1287	
hsa-mir-541	hsa-mir-561	hsa-mir-610	hsa-mir-657	hsa-mir-935	hsa-mir-1246	hsa-mir-1288	
hsa-mir-542	hsa-mir-562	hsa-mir-611	hsa-mir-658	hsa-mir-936	hsa-mir-1247	hsa-mir-1289-1	
hsa-mir-543	hsa-mir-563	hsa-mir-612	hsa-mir-659	hsa-mir-937	hsa-mir-1248	hsa-mir-1289-2	
hsa-mir-544	hsa-mir-564	hsa-mir-613	hsa-mir-660	hsa-mir-938	hsa-mir-1249	hsa-mir-1290	
hsa-mir-545	hsa-mir-566	hsa-mir-614	hsa-mir-661	hsa-mir-939	hsa-mir-1250	hsa-mir-1291	
hsa-mir-548a-1	hsa-mir-567	hsa-mir-615	hsa-mir-662	hsa-mir-940	hsa-mir-1251	hsa-mir-1292	
hsa-mir-548a-2	hsa-mir-568	hsa-mir-616	hsa-mir-663	hsa-mir-941-1	hsa-mir-1252	hsa-mir-1293	
hsa-mir-548a-3	hsa-mir-569	hsa-mir-617	hsa-mir-663b	hsa-mir-941-2	hsa-mir-1253	hsa-mir-1294	
hsa-mir-548b	hsa-mir-570	hsa-mir-618	hsa-mir-664	hsa-mir-941-3	hsa-mir-1254	hsa-mir-1295	

图 31