



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104975020 B

(45)授权公告日 2020.01.17

(21)申请号 201510113335.9

(22)申请日 2009.02.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104975020 A

(43)申请公布日 2015.10.14

(30)优先权数据
61/065,335 2008.02.11 US

(62)分案原申请数据
200980112313.3 2009.02.11

(73)专利权人 菲奥医药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 帕梅拉·A·帕夫科
乔安妮·卡门斯 (续)

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)

(56)对比文件
US 2003/0143732 A1,2003.07.31,说明书附图5,说明书第33段,第39-40段,第56段,第181-182段,第203-216段,实施例7.
US 2003/0143732 A1,2003.07.31,说明书

附图5,说明书第33段,第39-40段,第56段,第181-182段,第203-216段,实施例7.

WO 2004/090105 A2,2004.10.21,摘要,说明书表1,权利要求12.

WO 2004/090105 A2,2004.10.21,摘要,说明书表1,权利要求12.

WO 2005/097992 A2,2005.10.20,第3-7页,第25-31页,第34-36页.

WO 2005/097992 A2,2005.10.20,第3-7页,第25-31页,第34-36页.

WO 2007/044362 A2,2007.04.19,全文.

WO 2007/030167 A1,2007.03.15,第8页,第59页表3,实施例4-8,权利要求.

WO 2007/030167 A1,2007.03.15,第8页,第59页表3,实施例4-8,权利要求.

US 2007/0173473 A1,2007.07.26,说明书附图5,说明书第37-44段,第55-56段,第98-110段,实施例7.

US 2007/0173473 A1,2007.07.26,说明书附图5,说明书第37-44段,第55-56段,第98-110段,实施例7.

WO 2006/060246 A2,2006.06.08,全文.

(续)

审查员 程珂

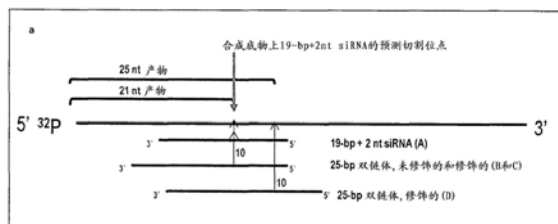
权利要求书2页 说明书63页 附图36页

(54)发明名称
经修饰的RNAi多核苷酸及其用途

(57)摘要

本发明涉及经修饰的RNAi多核苷酸及其用途,具体涉及改进的RNAi构建体及其用途。所述构建体具有19-49个核苷酸的双链区域,具有选择性最小修饰,以赋予生物活性、毒性、稳定性和靶基因特异性的最佳平衡。如可修饰有义链(如有义链的一端或两端被四个2'-O-甲基修饰),使得所述构建体不被Dicer或其他RNA酶III切割,并且全长反义链被载入RISC中。另外,所述反义链也可在5'端第二个核苷酸处被2'-O-甲基修

饰,以大大降低脱靶沉默。本发明的构建体在很大程度上避免了在哺乳动物细胞中的干扰素应答和序列非依赖性凋亡,显示出更好的血清稳定性和提高的靶标特异性。



CN 104975020 B

[接上页]

(72)发明人 托德·M·伍尔夫 威廉·萨洛蒙
阿纳斯塔西娅·赫沃罗娃

(56)对比文件

Philipp J.F. Leuschner等.Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells.《EMBO reports》.2006,第7卷(第3期),第315页图1,第315页右栏第1段,第317页图3,第318页左栏第1段.

Choung等.Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy.《Biochemical and

Biophysical Research Communications》.2006,第342卷(第3期),第919-927页.

Bryan A. Kravynack等.Small interfering RNAs containing full 2'-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity.《RNA》.2006,第12卷(第1期),第163-176页.

Jackson Aimee L等.Position-specific chemical modification of siRNAs reduces off-target transcript silencing.《RNA》.2006,第12卷(第7期),第1197-1205页.

1. 用于抑制靶基因表达的平末端双链RNA (dsRNA) 构建体, 所述dsRNA构建体包含:

(1) 具有5'端和3'端的有义链, 其中所述有义链的长度为26、27、28、29或30个核苷酸, 其中所述有义链的5'端12个核苷酸和3'端10个核苷酸是2'-修饰的核糖, 其防止所述dsRNA构建体被Dicer加工, 其中所述2'-修饰核糖是2'-O-甲基核苷酸, 和,

(2) 具有5'端和3'端的反义链, 其中所述反义链的长度为26、27、28、29或30个核苷酸并且所述反义链是未修饰的, 所述反义链与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交, 并且

其中所述dsRNA构建体以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

2. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述反义链指导靶基因mRNA在从反义链5'端起第10和第11个核苷酸之间的单个位点发生均一切割。

3. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述dsRNA的有义链可在从有义链3'端起第10和第11个核苷酸之间的单个位点被RISC切割。

4. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述dsRNA的有义链在从该有义链的3'端起第二个核苷酸处包含错配核苷酸。

5. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述dsRNA与具有相同序列的未修饰dsRNA相比具有提高的血清和/或脑脊液稳定性。

6. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述有义链3'端的最后2至8个核苷酸与其相应反义链核苷酸错配。

7. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述dsRNA在原代细胞中不诱导干扰素应答。

8. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述有义链的任一端和/或所述反义链的3'端被保护基封闭。

9. 根据权利要求8的dsRNA构建体, 其中所述保护基是倒置的核苷酸、倒置的无碱基部分或者氨基端修饰的核苷酸。

10. 根据权利要求9的dsRNA构建体, 其中所述倒置的核苷酸包括倒置的脱氧核苷酸。

11. 根据权利要求9的dsRNA构建体, 其中所述倒置无碱基部分包括倒置的脱氧无碱基部分。

12. 根据权利要求11的dsRNA构建体, 其中所述倒置的脱氧无碱基部分是3', 3'-连接的或5', 5'-连接的脱氧无碱基部分。

13. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述靶基因是SOD1、PPIB、RIP140、PCSK9、TNF α 、脂肪细胞脂质结合蛋白或者MAP4K4。

14. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中2'修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸是嘌呤核苷酸, 任选地具有一个或多个硫代磷酸酯连接。

15. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中2'修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸形成一个或多个各为1-5个核苷酸的凸出。

16. 根据权利要求1的dsRNA构建体, 其中所述反义链的5'端是磷酸化的。

17. 用于抑制靶基因表达的RNA构建体, 其中所述构建体与权利要求1-16中任一项的dsRNA相同, 差别仅在于有义链上的单个缺口。

18. 根据权利要求17的RNA构建体, 其中所述缺口占据与距反义链5'端10个碱基的核苷酸相对的位置。

19. 根据权利要求18的RNA构建体,其中所述缺口占据与距反义链5'端5-15个碱基的核苷酸相对的位置。

20. 根据权利要求18-19中任一项的RNA构建体,其中每个双链体区域的AG小于-13kcal/mol。

21. 载体,其表达权利要求1所述dsRNA构建体的至少一条链。

22. 细胞,其包含权利要求21的载体或权利要求1的dsRNA构建体。

23. 根据权利要求22的细胞,其中所述细胞是培养的哺乳动物细胞。

24. 根据权利要求22的细胞,其中所述细胞是人细胞。

25. 组合物,其包含权利要求1的dsRNA构建体以及可药用载体或稀释剂。

26. 权利要求1的dsRNA构建体在制备用于抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的组合物中的用途。

27. 根据权利要求26的用途,其中所述哺乳动物细胞是培养的细胞。

28. 根据权利要求26的用途,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

29. 根据权利要求26的用途,其中所述哺乳动物细胞在递送试剂存在下进行接触。

30. 根据权利要求29的用途,其中所述递送试剂是脂质。

31. 根据权利要求30的用途,其中所述脂质是阳离子脂质。

32. 根据权利要求29的用途,其中所述递送试剂是脂质体。

33. 表达权利要求1所述dsRNA构建体的至少一条链的载体在制备用于抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的组合物中的用途。

34. 改进小干扰RNA (siRNA) 的基因沉默作用的方法,其包括修饰所述siRNA的有义核苷酸,以变成权利要求1的dsRNA构建体。

35. 对siRNA构建体向靶位点的体内递送进行评估的方法,其包括将该siRNA构建体与靶向PPIB的权利要求1所述dsRNA构建体共递送,以及测定靶位点处PPIB功能的抑制,其中在靶位点处PPIB功能的成功抑制指示siRNA构建体成功体内递送至靶位点。

经修饰的RNAi多核苷酸及其用途

[0001] 本申请是申请号为200980112313.3的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/US2009/000852的中国国家阶段申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及经修饰的RNAi多核苷酸及其用途,更具体地,涉及改进的RNAi构建体及其用途。

背景技术

[0003] 互补寡核苷酸序列是有前途的治疗剂以及阐明基因功能的有用研究工具。但是,现有技术的寡核苷酸分子有一些阻碍其临床开发的问题,往往使得难以使用这些组合物实现预期的对基因表达(包括蛋白质合成)的有效抑制。

[0004] 例如,经典siRNA具有局限性和缺点,其可导致这些试剂仅在一定程度上可用作人的治疗剂。特别地,经典siRNA是双链的。对于每个分子,需要合成两条链并配对。经典siRNA由天然核糖核苷酸制得,对核酸酶和自发水解敏感。经典siRNA的链彼此配对(每一端一条链的突出端除外),约长19至23个核苷酸。这种构造限制了化合物的多样性和活性。例如,越长的寡核苷酸可具有越高的靶RNA结合活性,这常常与高活性相关联。经典siRNA的突出端导致了不稳定性(因为在大多数情况下单链比双链更具核酸酶抗性)和降解,并且可能是分子彼此“粘结”或者与其他核苷酸“粘结”的原因。

[0005] 另外,普遍认为在哺乳动物细胞中长约21聚体(21-mer)的双链RNA被Dicer或Dicer样RNA酶III切割,得到经典siRNA产物。然后,Dicer切割产物的一条链加载于RISC复合物上,引导已加载的RISC复合物实现RNA干扰(RNAi)。但是,因为Dicer不是序列特异性的,因此未修饰长dsRNA的Dicer切割产物是21聚体的异质混合物,其各具有不同的生物活性和/或药理特性。另外,每个21聚体可具有独特的脱靶效应(例如抑制非预期靶标的功能,其由于例如Dicer切割产物与靶标mRNA之间的假序列同源性)。换句话说,活性药物(例如21聚体)可为具有相对不可预知的靶标特异性、生物活性和/或药理特性的多种物质。另外,Dicer产物短于亲代,导致了低亲和力的引导链。

[0006] 其他问题包括在施加到生物系统时siRNA对非特异性核酸酶降解敏感。因此,通过设计没有上述问题或者程度减轻的改进寡核苷酸来改进现有技术寡核苷酸是非常有利的。

发明内容

[0007] 本发明的一个方面涉及12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链在从所述反义链5'端起的第二个核苷酸处包含2'-修饰核糖,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0008] 本发明的另一个方面提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链在该反义链的3'端包含(i)至少四个连续的具有不可水解的核苷酸间连接的2'-修饰核糖,(ii)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个2'-修饰核糖,优选2'-O-甲基修饰核糖,或者(iii)保护基,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0009] 本发明的另一个方面提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖,以及所述有义链在从该有义链3'端起第二个核苷酸处包含错配核苷酸,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0010] 本发明的另一个方面提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各自存在四个连续2'-O-甲基核苷酸,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链:(a)包含具有硫代磷酸酯连接的四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸;或者(b)在从5'端起的第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸并且没有其他修饰核苷酸,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0011] 本发明的另一个方面提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链在5'和3'端分别包含12和10个连续2'-O-甲基核苷酸,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链:(a)是未修饰的;(b)包含具有硫代磷酸酯连接的四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸;或者(c)在从5'端起的第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸并且没有其他修饰核苷酸,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0012] 在某些实施方案中,反义链指导靶基因mRNA在从反义链5'端起的第10和第11个核苷酸之间的单位点发生均一切割。

[0013] 在某些实施方案中,dsRNA的有义链可被RISC在从有义链3'端起的第10和第11个核苷酸之间的单位点进行切割。

[0014] 在某些实施方案中,dsRNA构建体是平末端的。

[0015] 在某些实施方案中,有义链的5'端12个核苷酸和3'端10个核苷酸是2'-修饰核糖。

[0016] 在某些实施方案中,有义链的每一端包含一段连续的2'-修饰核糖。

[0017] 在某些实施方案中,有义链的每一端包含一段连续的四个2'-修饰核糖。

[0018] 在某些实施方案中,所述反义链包含不连续的2'-修饰核糖,其中第10和第11个反

义核苷酸是未修饰的。

[0019] 在某些实施方案中,所述反义链2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸各包含2'-修饰核糖。

[0020] 在某些实施方案中,所述反义链上最靠近5'端的2'-修饰核糖是第二个核苷酸。

[0021] 在某些实施方案中,dsRNA构建体是:12-35个核苷酸长;25-30个核苷酸长;25、26、27、28、29或30个核苷酸长;>22个核苷酸长;>25个核苷酸长;或者31-49个核苷酸长。

[0022] 在某些实施方案中,有义链的每一端独立地包含4-16个2'-修饰核糖和/或不可水解的核苷酸间连接。

[0023] 在某些实施方案中,有义链的每一端包含对称或不对称个数的2'-修饰核糖。

[0024] 在某些实施方案中,2'-修饰核糖是2'-O-羟基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-H(脱氧核糖核苷酸)或其组合。

[0025] 在某些实施方案中,2'-O-羟基核苷酸是2'-O-甲基核苷酸。

[0026] 在某些实施方案中,2'-O-羟基核苷酸是2'-O-烯丙基核苷酸。

[0027] 在某些实施方案中,所述反义链在从反义链5'端起的第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸并且没有其他经修饰核苷酸。

[0028] 在某些实施方案中,与在所述位置不含2'-修饰的相似构建体相比,所述dsRNA具有提高的靶标特异性或者降低的脱靶沉默(off-target silencing)。

[0029] 在某些实施方案中,所述反义链包含具有硫代磷酸酯连接的至少四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸。

[0030] 在某些实施方案中,dsRNA的有义链在从有义链3'端起的第2个核苷酸处包含错配核苷酸。

[0031] 在某些实施方案中,与具有相同序列的未修饰dsRNA相比,所述dsRNA在血清和/或脑脊液中的稳定性提高。

[0032] 在某些实施方案中,所述有义链3'端的最后第2-8个核苷酸与对应的反义链核苷酸错配。

[0033] 在某些实施方案中,所述dsRNA在原代细胞中不诱导干扰素应答。

[0034] 在某些实施方案中,有义链的任一端和/或反义链的3'端被保护基封闭。

[0035] 在某些实施方案中,所述保护基是倒置的核苷酸、倒置的无碱基部分或者氨基端经修饰的核苷酸。

[0036] 在某些实施方案中,所述倒置的核苷酸包括倒置的脱氧核苷酸。

[0037] 在某些实施方案中,所述倒置的无碱基部分包括倒置的脱氧无碱基部分。

[0038] 在某些实施方案中,所述倒置的脱氧碱基部分是3',3'连接或5',5'连接的脱氧碱基部分。

[0039] 在某些实施方案中,有义和/或反义链末端的核苷酸交替包含2'-修饰核糖,其中每个2'-修饰核糖对着相对链上的未修饰核苷酸。

[0040] 在某些实施方案中,第一个2'-修饰反义核苷酸是最5'端的反义核苷酸或者从所述反义链5'端起的第二个核苷酸。

[0041] 在某些实施方案中,所述靶基因是SOD1、PPIB、RIP 140、PCSK9、TNF α 、AP2(脂肪细胞脂质结合蛋白)或MAP4K4。

[0042] 在某些实施方案中,2'-修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸是2'-F修饰的。

[0043] 在某些实施方案中,2'-修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸是嘌呤核苷酸,任选地具有2'-F修饰和/或硫代磷酸酯连接。

[0044] 在某些实施方案中,2'-修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸形成一个或多个凸出(bulge),各为1-5个核苷酸。

[0045] 在某些实施方案中,每段连续2'-修饰核糖核苷酸独立地起始自末端核苷酸、从末端核苷酸起的第二个核苷酸或者从末端核苷酸起的第三个核苷酸。

[0046] 在某些实施方案中,反义链中50-100%的嘧啶核苷酸独立地为2'-F修饰的或者2'-O-甲基修饰的。

[0047] 在某些实施方案中,反义链的5'端是磷酸化的。

[0048] 在一个相关方面,本发明还提供了用于抑制靶基因表达的构建体,其中所述构建体与任意本发明dsRNA相同,只是有义链上有单个缺口。例如,所述缺口可占据与反义链5'端开始约10个碱基的核苷酸相对的位置。所述缺口也可占据与反义链5'端开始约5-15个碱基的核苷酸相对的位置。在某些实施方案中,每个双链体区域的 ΔG 小于约-13kcal/mol。

[0049] 本发明的另一个方面提供了表达本发明dsRNA至少一条链(例如未修饰有义链等)的载体。

[0050] 本发明的另一个方面提供了包含本发明载体或者本发明dsRNA的细胞。

[0051] 在某些实施方案中,所述细胞是培养的哺乳动物细胞。

[0052] 在某些实施方案中,所述细胞是人细胞。

[0053] 本发明的另一个方面提供了包含权利要求1-5任一项的dsRNA以及可药用载体或稀释剂的组合物。

[0054] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括将所述哺乳动物细胞与本发明dsRNA构建体相接触。

[0055] 在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是在培养物中。

[0056] 在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是人细胞。

[0057] 在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞在递送试剂存在下接触。

[0058] 在某些实施方案中,所述递送试剂是脂质。

[0059] 在某些实施方案中,所述脂质是阳离子脂质。

[0060] 在某些实施方案中,所述递送试剂是脂质体。

[0061] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括将所述哺乳动物细胞与表达本发明dsRNA构建体至少一条链的载体相接触。

[0062] 本发明的另一个方面提供了改进小干扰RNA(siRNA)基因沉默效果的方法,其包括修饰siRNA的有义和/或反义核苷酸使其变成本发明dsRNA构建体。

[0063] 本发明的另一个方面提供了评价siRNA构建体在体内递送到靶位点的方法,其包括将siRNA构建体与靶向PPIB的任何本发明dsRNA构建体共递送,以及测定在靶位点处PPIB功能的抑制,其中在靶位点处PPIB功能的成功抑制指示siRNA构建体成功地体内递送至靶位点。

[0064] 本发明的另一个方面涉及本文公开的任何dsRNA构建体,例如表格中公开的那些和/或针对SOD1或其他具体靶基因公开的那些。

[0065] 还考虑,适当时,此处及说明书中其他地方所述的任何实施方案可与任何其他实

施方案相组合。

附图说明

[0066] 图1显示本发明的某些经修饰RNAi构建体(为简单起见,称为替代性RNAi化合物)。

[0067] 图2说明了用R1 siRNA或替代性RNAi化合物转染后24小时的SOD1表达。

[0068] 图3显示具有降低SOD1 mRNA水平之活性的替代性RNAi化合物的序列。

[0069] 图4显示针对所选靶位点的某些示例性替代性RNAi化合物(例如具有平末端的25聚体,其在有义链每个末端具有四个2'OMe)对小鼠和人SOD1是有效的。

[0070] 图5A显示了SOD1替代性RNAi化合物的剂量应答分析,以及EC₅₀值<50pM的活性双链体的鉴定。图5B显示了在人HEK293细胞中SOD1替代性RNAi化合物的剂量应答分析,以及EC₅₀值约为50pM的活性双链体的鉴定。图5C显示了在小鼠NIH3T3细胞中SOD1替代性RNAi化合物的剂量应答分析,以及EC₅₀值约为50pM的活性双链体的鉴定。

[0071] 图6A显示了在siRNA或替代性RNAi化合物转染后,一种遍在蛋白质PPIB(亲环蛋白B)的表达。图6B显示人HEK293细胞中PPIB替代性RNAi化合物的剂量应答分析,以及EC₅₀值对于25聚体和27聚体分别约为25或72pM的活性双链体的鉴定。图6C显示小鼠NIH3T3细胞中PPIB替代性RNAi化合物的剂量应答分析,以及EC₅₀值对于25聚体和27聚体分别约为200或约500pM的活性双链体的鉴定。

[0072] 图7证明了具有有义链修饰的替代性RNAi化合物25聚体不被Dicer酶切割。

[0073] 图8A证明,发现25聚体双链体与RNAi沉默性Ago2复合物结合。图8B显示了靶向SOD1的RNA双链体中引导链的Northern印迹。图8C显示了对表达c-myc Ago2的293细胞进行转染后SOD1的表达。

[0074] 图9A和9B显示了在长于21nt的非Dicer加工之双链体反义链中从5'端起10nt处的均一切割点。化学合成了合成底物,以对应于SOD1基因中含有所测RNA双链体靶序列的50nt区域。图9A是合成底物的示意图以及预测的切割位置和产物。在图9B中,按照方法中所述的,将靶向SOD1的RNA双链体转染进表达c-myc Ago2的293细胞。收获、裂解细胞,对c-myc Ago2进行免疫沉淀,在缓冲液中重构。按照方法中所述,将免疫沉淀物与50nt ³²-p标记的合成底物在30℃下孵育2小时。2小时孵育后,将样品与大小标记(下划线显示)一起加样于变性聚丙烯酰胺凝胶上。样品字母对应于图A中示意图所示的下列双链体。A=未修饰19-bp+2nt siRNA,B=未修饰25-bp双链体,C=具有4/4 2'OMe的25-bp双链体,D=具有4/4 2'OMe的25-bp双链体,E=荧光素酶对照双链体。

[0075] 图10A显示两个示例性序列,ID No.10015和10023,其用于大范围化学修饰分析。

[0076] 图10B列出了有义链(001、002、003等)和反义链(011、012、013等)的每个修饰化学基团ID,表明对于每个ID的所设计和/或测试的所有25聚体的每个核苷酸位置上修饰的详细总结。

[0077] 图11说明了不同程度的SOD1mRNA水平降低,其取决于有义链和反义链上修饰的类型。

[0078] 图12A-12C显示了双链体抑制SOD1表达的相对活性,其作为与仅改变有义链上2'OMe位置的函数。每个双链体基于ID No.10015或10023的序列。

[0079] 图13A-13D显示了双链体抑制SOD1表达的相对活性,其作为将改变有义链上2'OMe

位置与所示多种反义化学基团(011、013、042等,参见图11B)相组合的函数。

[0080] 图14A和14B证明了双链体由于每个双链体的修饰而在血清和/或脑脊液中稳定性的提高。

[0081] 图15A证明了Dicer不是大于21bp的双链体的RNAi活性所必需的。柱表示根据bDNA杂交测定所测量的转染后48小时SOD1的mRNA水平。显示三个双链体的SOD1mRNA降低的数据;19-bp+2nt siRNA(实心白色柱),未修饰(0/0)25-bp双链体(实心黑色柱)以及“4/4”2'-OMe25bp双链体(条纹柱)。图15B显示用于该研究的序列。

[0082] 图16A显示,类似于图15A的结果,Dicer不是27bp双链体的RNAi活性所必需的。柱表示根据bDNA杂交测定所测量的转染后48小时PPIB mRNA水平。实心白色柱是19-bp+2nt siRNA,斑点柱是未修饰25-bp双链体,实心黑色柱是具有2'-OMe化学基团的25-bp双链体,条纹柱是具有2'-OMe化学基团的27-bp双链体。序列在图16B中显示。

[0083] 图17显示2'-O-Me修饰抑制并防止Dicer酶将>21nt的RNA双链体加工成siRNA。图17A是应用于靶向SOD1的RNA双链体的化学修饰示意图。双链体中R表示没有2'位修饰的正常或未修饰RNA核苷酸。M表示RNA核苷酸2'位的O-甲基修饰。除非另作说明,大多数核苷酸修饰位于乘客链(passenger strand)。图17B是如本发明所述与重组人dicer酶过夜孵育后RNA双链体的TBE-聚丙烯酰胺凝胶。M泳道表示siRNA标记,大小(上到下):25-bp、21-bp、17-bp。图17C显示用“2/2”2'-O-Me化学基团对25-bp RNA双链体进行加工的定量。使用LabWorks软件对部分加工的条带密度进行定量。图17D是如本文所述与重组人Dicer酶过夜孵育后在双链体的每一端具有不同组合的(4)2'-O-Me的RNA双链体的TBE-聚丙烯酰胺凝胶。图17E显示与靶向SOD1基因中不同序列的2'-O-Me修饰的25-bp双链体相似的结果。

[0084] 表1提供了针对SOD1和PPIB的替代性RNAi化合物序列。完整序列名称由基因名一起始位点-长度-替代性RNAi化合物ID号表示。“P”表示5'磷酸酯,而“m”表示2'-O-甲基碱基修饰。“F”表示2'氟代碱基修饰。“*”表示硫代磷酸酯骨架连接,而“.”表示正常RNA骨架连接。

[0085] 表2提供针对SOD1的其他替代性RNAi化合物序列。表1中所用命名法适用于表2。

[0086] 表3是RNA双链体列表。按照方法中所述,化学合成单链RNA或双链体RNA并退火。“G”=鸟嘌呤,“U”=尿嘧啶,“C”=胞嘧啶,“A”=腺嘌呤,“m”=2'-O甲基碱基修饰,“.”=正常RNA骨架连接。极性显示为PS=乘客链或有义链,以及GS=引导链或反义链。括号中的数目对应于双链体检索的内部序列数据库编号。

[0087] 表4是上述某些附图中的RNA双链体列表。按照方法中所述地,化学合成单链RNA或双链体RNA并退火。“G”=鸟嘌呤,“U”=尿嘧啶,“C”=胞嘧啶,“A”=腺嘌呤,“m”=2'-O甲基碱基修饰,“.”=正常RNA骨架连接。极性显示为PS=乘客链或有义链,以及GS=引导链或反义链。括号中的数目对应于双链体搜索的内部序列数据库编号。

[0088] 表5是切割测定中所用的RNA大小标志物和合成底物的列表。

具体实施方式

[0089] I. 综述

[0090] 本发明部分基于以下出人意料的发现,某些较长的dsRNA(例如双链区域超过21个碱基对的那些)在有义链经修饰时(例如有义链的两端都由例如2'-O-甲基修饰)不被Dicer或其他Dicer样RNA酶III切割,并且这些dsRNA的反义链可载入RISC复合物中,其中所述反

义链的5'端与21聚体(即Dicer切割产物)的5'端对齐。本领域教导,如果RNAi化合物形成Dicer的底物,则RNAi化合物活性增加(相比于siRNA),而本申请人事实上发现了不是Dicer底物的极高活性的RNAi化合物。本发明另外部分基于以下发现,加载了这些较长反义(引导)链的RISC复合物将在对应于从反义(引导)序列5'端起第10和11个核苷酸之间位置的单个位置切割靶标mRNA。

[0091] 本申请人的发现直接意味着,这些较长dsRNA的反义链变成单一种类的活性RNAi试剂,因此利于具有较高靶标特异性和更明确的生物活性和/或药理特性的RNAi试剂或治疗剂的开发。

[0092] 此外,根据较长dsRNA可改造以抵抗Dicer切割的这一知识,以及Dicer抗性反义链可在确定位置加载于RISC复合物以产生单一种类活性RNAi试剂这一知识,可将其他特征或修饰改造进有义链和/或反义链中,以改进RNAi试剂或治疗剂的特性。特别地,现在可确定引导链中的修饰相对于5'端的位置,此定位对于确定这些经修饰RNAi化合物的特异性和活性来说是关键性的。

[0093] 使用示例性靶基因超氧化物歧化酶1(SOD1),本申请人设计并检测了许多有义和反义修饰及其组合,鉴定出多个使得长dsRNA具有Dicer抗性的特异性修饰,提供了有效靶基因沉默和/或许多其他相关益处。

[0094] 因此,在一个方面中,本发明涉及12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0095] 在某些实施方案中,所述反义链是未修饰的。在其他一些实施方案中,所述反义链在从反义链5'端起的第二个核苷酸处包含2'-修饰核糖。

[0096] 本文使用的“2'-修饰核糖”包括不具有2'-OH基团的核糖。例如,2'-修饰核糖可以是2'-O-羟基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-H(脱氧核糖核苷酸)或其组合。

[0097] 在某些实施方案中,具有上述反义修饰的本发明dsRNA与没有所述反义修饰的相似构建体相比,显示显著(例如至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多)更少的“脱靶”基因沉默,因此大大改善了RNAi试剂或治疗剂的整体特异性。

[0098] 本文使用的“脱靶”基因沉默指非预期的基因沉默,这是由于例如反义(引导)序列与非预定靶mRNA序列之间的假序列同源性。

[0099] 在另一个方面中,本发明提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各自的一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链和所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链在反义链的3'端包含(i)至少四个连续的具有不可水解的核苷酸间连接的2'-修饰核糖,(ii)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个2'-修饰核糖,优选2'-O-甲基修饰核糖,或者(iii)保护基,其中(a)所

述dsRNA对Dicer的切割有抗性, (b) 所述反义链与RISC相结合, 以及(c) 所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0100] 根据本发明的此方面, 某些反义修饰进一步提高核酸酶稳定性和/或降低干扰素诱导, 而不显著降低RNAi活性(或者完全不降低RNAi活性)。

[0101] 在另一个方面中, 本发明提供19-49个核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体, 其用于抑制靶基因的表达, 所述dsRNA包含: (1) 具有5'端和3'端的有义链, 其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'-修饰核糖, 并且所述有义链在从有义链3'端起的第二个核苷酸处包含错配核苷酸, 和(2) 具有5'端和3'端的反义链, 其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交, 其中(a) 所述dsRNA对Dicer的切割有抗性, (b) 所述反义链与RISC相结合, 以及(c) 所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0102] 根据本发明的该方面, 某些有义链3'端处的错配允许更有效地将反义链装载入RISC复合物, 因此导致更强的RNAi活性。优选的这些有义链错配包括: 有义链倒数第二个核苷酸处的错配(与RISC复合物中Dicer抗性反义链的第二个核苷酸碱基配对); 在有义链最3'端的9个核苷酸处错配, 最3'端的核苷酸除外。

[0103] 除非有另外指明, 否则均认为本发明的不同特征(例如不同的有义和/或反义链修饰)可进行组合, 以产生相对于常规siRNA构建体具有多个优点或特征的RNAi构建体。

[0104] 例如, 对于本发明的全部可适用方面, 反义链可在反义链5'端第二个核苷酸处包含2'-修饰核糖, 例如2'-O-甲基修饰核苷酸, 优选没有其他修饰核苷酸。与在所述位置不含2'-O-甲基修饰的相似构建体相比, 具有这些修饰的所述dsRNA可具有提高的靶标特异性或者降低的脱靶沉默。

[0105] 对于本发明的全部可适用方面, 反义链可包含至少四个连续2'-修饰核糖, 例如2'-O-甲基修饰的3'端核苷酸, 其具有不可水解的核苷酸间连接, 例如硫代磷酸酯连接。

[0106] 对于本发明的全部可适用方面, dsRNA可被RISC在有义链3'端第10和第11个核苷酸之间的单个位点处切割。

[0107] 对于本发明的所有可适用方面, 25聚体的5'端12个核苷酸和3'端10个核苷酸可以是2'-修饰核糖。可以根据构建体的全长来调节修饰碱基的数目。例如, 对于27聚体, 5'端的12-14个核苷酸以及3'端的10-12个核苷酸可以是2'-修饰核苷酸等。

[0108] 对于本发明的所有可适用方面, dsRNA可在有义链3'端第2个核苷酸处包含错配核苷酸。

[0109] 特定反义和有义修饰的某些组合甚至可以导致出人意料的优点, 部分表现为抑制靶基因表达能力的提高, 血清稳定性提高和/或靶标特异性提高, 等等。

[0110] 因此, 在另一个方面中, 本发明提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体, 其用于抑制靶基因的表达, 所述dsRNA包含: (1) 具有5'端和3'端的有义链, 其中所述有义链的所述5'和3'端各存在四个连续2'-O-甲基核苷酸, 和(2) 具有5'端和3'端的反义链, 其与所述有义链和所述靶基因的mRNA杂交, 其中所述反义链: (a) 包含具有硫代磷酸酯连接的四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸; 或者(b) 在5'端第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸并且没有其他修饰核苷酸, 其中(a) 所述dsRNA对Dicer的切割有抗性, (b) 所述反义链与RISC相结合, 以及(c) 所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0111] 在另一个方面中,本发明提供12-49个(优选19-49个)核苷酸长的双链RNA(dsRNA)构建体,其用于抑制靶基因的表达,所述dsRNA包含:(1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端处分别包含12和10个连续2'-O-甲基核苷酸,和(2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链:(a)是未修饰的;(b)包含具有硫代磷酸酯连接的四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸;或者(c)在5'端第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸并且没有其他修饰核苷酸,其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC相结合,以及(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0112] 在某些实施方案中,本发明dsRNA的反义链指导靶基因转录本在反义链5'端第10和第11个核苷酸之间单个位点发生均一切割。

[0113] 在某些实施方案中,dsRNA的有义链可被RISC在有义链3'端第10和第11个核苷酸之间的单个位点进行切割。

[0114] 根据本发明的该实施方案,某些有义链序列可被加载了Dicer抗性引导序列的RISC复合物在切割等同mRNA的位置进行切割。不受任何特定理论的限制,这一部分是由于有义链与靶mRNA具有相同或相似的序列。因此,本发明dsRNA构建体包含具有可在第10和11个3'端核苷酸之间发生切割的有义链的那些。

[0115] 本发明的构建体可具有不同长度。在某些实施方案中,所述构建体的优选长度是12-35个或者12-49个,优选19-49个核苷酸。在某些实施方案中,所述构建体的长度大于或等于22个核苷酸。在某些实施方案中,所述构建体的长度大于或等于25个核苷酸。在某些实施方案中,所述构建体的长度是26、27、28、29、30或31-49个核苷酸。其他长度也是可能的,前提是长度的下限是Dicer底物的最小长度,上限是在靶细胞中一般不会引发PKR应答的长度。在某些实施方案中,修饰可改变该上限,使得可容许更长的长度(例如50、60、70、80、90、100bp)。

[0116] 在某些实施方案中,dsRNA构建体是平末端的。在其他一些实施方案中,一条或两条链中可存在1-4个核苷酸的5'和/或3'端突出端。

[0117] 对于25聚体构建体,有义链的每一端可独立地包含4-16个修饰核苷酸和/或不可水解的连接(例如硫代磷酸酯连接)。可以根据构建体的全长来调节修饰碱基的数目。例如,对于27聚体,有义链的每一端可独立地包含4-18个2'-修饰核苷酸和/或硫代磷酸酯连接等。

[0118] 在某些实施方案中,有义链的5'端12个核苷酸和3'端10个核苷酸是2'-修饰核糖。

[0119] 在某些实施方案中,有义链的每一端包含一段连续的2'-修饰核糖,但是各自可具有相同数目或不同数目的2'-修饰核糖。

[0120] 在某些实施方案中,有义链的每一端包含一段连续四个2'-修饰核糖。

[0121] 在某些实施方案中,所述反义链包含不连续的2'-修饰核糖,其中第10和第11个核苷酸是未修饰的。例如,所述反义链可各在2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸中包含2'-修饰核糖。所述反义链上最5'端的2'-修饰核糖可以是第二个核苷酸或者第一个核苷酸。

[0122] 在某些实施方案中,2'-修饰核糖是2'-O-烷基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-H(脱氧核糖核苷酸)或其组合。

[0123] 在某些实施方案中,所述2'-修饰核苷酸是嘧啶核苷酸(例如C/U)。

- [0124] 例如,2'-O-烷基核苷酸可以是2'-O-甲基核苷酸或者2'-O-烯丙基核苷酸。
- [0125] 在某些实施方案中,所述反义链在反义链的5'端第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸,并且没有其他修饰核苷酸。
- [0126] 在某些实施方案中,与具有相同序列的未修饰dsRNA相比,所述经修饰的dsRNA在血清和/或脑脊液中具有提高的稳定性。
- [0127] 在某些实施方案中,与在所述位置不含2'-修饰的相似构建体相比,所述dsRNA具有提高的靶标特异性或者降低的脱靶沉默。
- [0128] 在某些实施方案中,所述反义链包含具有硫代磷酸酯连接的至少四个连续2'-O-甲基修饰3'端核苷酸。
- [0129] 在某些实施方案中,dsRNA的有义链在有义链3'端第2个核苷酸处包含错配核苷酸。
- [0130] 在某些实施方案中,所述有义链3'端最后第2-8个核苷酸与对应的反义链核苷酸错配。
- [0131] 在某些实施方案中,dsRNA在原代细胞中不诱导干扰素应答,所述细胞例如哺乳动物原代细胞,包括来自人、小鼠或其他啮齿动物以及其他非人哺乳动物的原代细胞。
- [0132] 在某些实施方案中,所述dsRNA还可用于抑制无脊椎动物生物体中靶基因的表达。
- [0133] 在某些实施方案中,从5'端起的第10和第11个反义核苷酸是未修饰的。
- [0134] 为进一步提高本发明构建体的体内稳定性,可用保护基封闭有义链的任一端和/或反义链的3'端。例如,可使用保护基例如倒置核苷酸、倒置无碱基部分或者氨基端修饰的核苷酸。倒置核苷酸可包括倒置脱氧核苷酸。所述倒置无碱基部分可包括倒置脱氧无碱基部分,例如3',3'连接或5',5'连接的脱氧无碱基部分。
- [0135] 在某些实施方案中,有义和/或反义链末端的核苷酸交替由2'-O-烷基修饰所修饰,其中每个2'-O-修饰核糖对着相对链上的未修饰核苷酸。在一个优选实施方案中,第一个2'-O-修饰反义核苷酸(具有此修饰模式)是最5'端的反义核苷酸。
- [0136] 在某些实施方案中,有义和/或反义链末端的核苷酸交替包含2'-修饰核糖,其中每个2'-修饰核糖对着相对链上的未修饰核苷酸。在某些实施方案中,第一个2'-修饰反义核苷酸是最5'端的反义核苷酸或者所述反义链5'端的第二个核苷酸。
- [0137] 在某些实施方案中,具有与本文所述任意替代性RNAi化合物相同或相似的结构但是差异在于无Dicer切割抗性的RNAi构建体也是想要的,只要它们显示针对各自预期靶标(例如mRNA)的高活性。
- [0138] 在某些实施方案中,本发明双链RNA可以在一点或多点处发生化学交联,或者在一端或两端由核苷酸环结构相连(例如单链发夹结构或环结构)。在一个实施方案中,化学交联或者发夹结构的环位于反义链的3'端(例如将反义链的3'端与有义链的5'端相连)。在另一个实施方案中,化学交联或者发夹结构的环位于反义链的5'端(例如将有义链的3'端与反义链的5'端相连)。在这些实施方案中,交联或环构建体的其他结构特征(例如有义链上5'端和3'端修饰和/或反义链上的其他修饰)与本文所述dsRNA的结构特征基本上相同。
- [0139] 本发明的双链和/或双链体寡核苷酸构建体能够抑制靶基因编码的任何靶蛋白的合成。本发明包括体外或体内抑制细胞中靶基因表达的方法。所述靶基因可以是细胞内源的或外源的(例如通过病毒或使用DNA重组技术引入的)。这些方法可包括以足以抑制靶基

因表达的量将RNA引入细胞,其中RNA是双链体。例如,此类RNA分子可具有第一链,其具有对应于靶基因核苷酸序列的核糖核苷酸序列,以及第二链,其具有与靶基因核苷酸序列互补的核糖核苷酸序列,其中所述第一链和第二链是分开的互补链,它们彼此杂交形成所述双链分子,使得所述双链体组合物抑制靶基因的表达。可广泛用于本申请以说明本发明一般性原理的示例性(非限制性)靶基因包括SOD1、PPIB、RIP 140、PCSK9、TNF α 、AP2(脂肪细胞脂质结合蛋白)或MAP4K4,以上仅为几个例子。

[0140] 不受任何特定理论的限制,RNAi实体的“有义”链上的2'-O-甲基封闭区域(例如有义链末端的区域)可导致与没有这些修饰的构建体相比稳定性、特异性显著增加并使免疫应答尽可能小。在一些情况下,通过将修饰施加于反义链而进一步提高RNAi双链体稳定性甚至更有利。特别地,一些优选化学修饰模式可包括含有大多数由2'-O-甲基修饰的C和U或者由2'-F修饰的C和U的反义链。在一些情况下,所述反义链可以由几种化学修饰的混合来修饰。

[0141] 在某些实施方案中,经大量修饰的反义链可能不是良好的激酶底物。因此,可利用反义链的化学磷酸化来减轻该问题。另外,一些优选序列可在有义链未修饰区域中仅含有嘌呤核苷酸(即A和G)和/或2'-F或硫代磷酸酯(PS)修饰。在一些情况下,另外引入PS修饰与2'-O-甲基和2'-F的组合可以是优选的。

[0142] 在一些情况下,同时修饰有义链和反义链对实现构建体的最大稳定性而言是优选的。因为经大量修饰的双链体有时是RISC组装的差底物,在一些优选实施方案中,一个或多个凸出(例如约1-5个核苷酸大小)的存在可能是提高RISC进入和效力所必需的,或者至少是有利的。

[0143] 在其他一些实施方案中,经大量修饰的双链体可含有有义链上的单个缺口。优选缺口位置可以在相对链上从反义链5'端起起的10bp处。在一些实施方案中,所述缺口可位于从上述优选位置(即相对链上从反义链5'端起起的10bp)起的5个碱基内。在一些实施方案中,可对本发明构建体应用提供双链体稳定性的其他化学修饰。在一些实施方案中,所述序列可选择成具有某些热力学特性,例如每个双链体区域的 $\Delta G < -13\text{kcal/mol}$ 。

[0144] 因此,在某些实施方案中,本发明的构建体可在有义链/乘客链或者反义链/引导链上含有某些修饰,或者以上两者皆有,并赋予所述构建体某些优点。

[0145] 例如,在某些实施方案中,2'-修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸(例如有义链的中间部分或区段)是2'-F修饰的。作为替代或补充,该部分可仅含有嘌呤核苷酸,并任选地对于一些或全部核苷酸而言具有2'-F修饰和/或硫代磷酸酯连接。作为替代或补充,有义链的该部分可形成一个或多个凸出,例如约各1-5个核苷酸的凸出。

[0146] 如本文使用的,2'-修饰核糖核苷酸的连续区段不需要起始自5'-端或3'-端核苷酸,尽管这些区段优选起始自末端核苷酸。因此,在某些实施方案中,每段连续2'-修饰核糖核苷酸独立地起始自末端核苷酸,从末端核苷酸算起的第二核苷酸,或者从末端核苷酸算起的第三核苷酸,等等。

[0147] 在某些实施方案中,反义链中约50-100%的嘧啶核苷酸独立地是2'-F修饰的或者2'-O-甲基修饰的。

[0148] 在某些实施方案中,反义链的5'端可以是磷酸化的。

[0149] 在某些相关实施方案中,本发明还提供了用于抑制靶基因表达的RNA构建体,其中

所述构建体与如上所述任意dsRNA相同,唯一不同是有义链上有单个缺口。因此,在这些实施方案中,RNA构建体事实上含有通过杂交形成双链结构的三个多核苷酸。所述反义链是单链多核苷酸,而另外两个多核苷酸都与所述反义多核苷酸杂交,形成对应于本文所述任何其他dsRNA构建体的“有义链”。

[0150] 缺口的位置在本实施方案中可发生变化。例如,所述缺口可占据与据反义链5'端约10个碱基的核苷酸相对的位置。或者,所述缺口可以距此位置为5个核苷酸以内(例如所述缺口占据与距反义链5'端约5-15个碱基的核苷酸相对的位置)。此类型构建体中双链区域的序列也可选择成使得每个双链体区域的 ΔG 小于约-13kcal/mol。

[0151] 本发明还涉及表达本发明dsRNA构建体至少一条链的载体,以及包含这些载体或者本发明dsRNA构建体的细胞。所述细胞可以是培养物中的哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0152] 本发明还涉及包含本发明dsRNA构建体以及可药用载体或稀释剂的组合物。

[0153] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括将所述哺乳动物细胞与任何本发明dsRNA构建体相接触。

[0154] 所述方法可以在体外或体内进行,例如,在培养的哺乳动物细胞(例如培养的人细胞)中进行。

[0155] 靶细胞(例如哺乳动物细胞)可以在递送试剂存在下接触,所述递送试剂例如脂质(例如阳离子脂质)或者脂质体。

[0156] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括将所述哺乳动物细胞与表达本发明任意dsRNA构建体的至少一条链的载体相接触。

[0157] 本发明的另一个方面提供了改进小干扰RNA(siRNA)基因沉默效果的方法,其包括修饰siRNA的有义和/或反义核苷酸使其变成本发明的任何dsRNA构建体。

[0158] 本发明的另一个方面提供了评价siRNA构建体体内递送到靶位点的方法,包括将siRNA构建体与设计为靶向几乎所有组织中普遍表达的遍在基因PPIB的任何本发明dsRNA构建体共递送,以及测定PPIB在靶位点处功能的抑制,其中PPIB功能在靶位点处的成功抑制指示siRNA构建体成功体内递送至靶位点。

[0159] 本发明的更详细方面描述于下列部分。

[0160] II. 双链体结构

[0161] 双链体特征

[0162] 本发明的双链寡核苷酸可通过两个独立的互补核酸链形成。双链体可在含有靶基因之细胞的内部或外部形成。

[0163] 本文所使用的术语“双链”包括包含这样的分子区域的一种或多种核酸分子,其中至少一部分核酸单体是互补的并且通过氢键形成双链体。

[0164] 本文使用的术语“双链体”包括双链核酸分子中与互补序列氢键键合的区域。本发明的双链寡核苷酸可包括对靶基因来说是有义的核苷酸序列以及对靶基因来说是反义的互补序列。所述有义和反义核苷酸序列对应于靶基因序列,例如与靶基因序列相同或具有足以实现靶基因抑制的同一性(例如约至少约98%同一性、96%同一性、94%同一性、90%同一性、85%同一性或者80%同一性)。

[0165] 在某些实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上是双链的,即在分子的任一端都没有突出的单链序列,即为平末端。在其他一些实施方案中,各个核酸分子可具

有不同的长度。换句话说,本发明的双链寡核苷酸并非在其整个长度上都是双链的。例如,当使用两个独立的核酸分子时,所述分子之一(例如包含反义序列的第一分子)可比与其杂交的第二分子长(留下该分子的一部分是单链的)。同样地,当使用单个核酸分子时,所述分子任一端的部分可保持为单链。

[0166] 在一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸含有错配和/或环或凸出,但是在所述寡核苷酸长度的至少约70%上是双链的。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在所述寡核苷酸长度的至少约80%上是双链的。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在所述寡核苷酸长度的至少约90%–95%上是双链的。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在所述寡核苷酸长度的至少约96%–98%上是双链的。在某些实施方案中,本发明的双链寡核苷酸含有至少或者最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个错配。

[0167] 修饰

[0168] 本发明的核苷酸可以在不同位置上修饰,包括糖部分、磷酸二酯键和/或碱基。

[0169] 糖部分包括天然未修饰糖例如单糖(例如戊糖,例如核糖、脱氧核糖),修饰的糖和糖类似物。一般说来,核苷酸单体(特别是糖部分)包括例如卤素、杂原子、脂肪基对一个或多个羟基的取代,或者羟基官能化为醚、胺、硫醇等等。

[0170] 一组特别有用的修饰核苷酸单体是2'-O-甲基核苷酸。这些2'-O-甲基核苷酸可称为“甲基化的”,相应核苷酸可由非甲基化核苷酸之后烷基化制成,或者直接由甲基化核苷酸试剂制成。经修饰核苷酸单体可以与未修饰核苷酸单体组合使用。例如,本发明寡核苷酸可同时含有甲基化和非甲基化核苷酸单体。

[0171] 一些示例性修饰核苷酸单体包括糖或主链被修饰的核糖核苷酸。修饰核糖核苷酸可含有非天然碱基(代替天然碱基),例如在5'位修饰的尿苷或胞苷,例如5'-(2-氨基)丙基尿苷和5'-溴尿苷;在8位修饰的腺苷和鸟苷,例如8-溴鸟苷;脱氮核苷酸,例如7-脱氮腺苷;和N-烷基化核苷酸,例如N6-甲基腺苷。另外,糖被修饰的核糖核苷酸可具有由H、烷氧基(或OR)、R或烃基、卤素、SH、SR、氨基(例如NH₂、NHR、NR₂)或CN基取代的2'-OH基团,其中R是低级烷基、烯基或炔基。

[0172] 修饰核糖核苷酸还可具有连接被修饰基团所取代的相邻核糖核苷酸的磷酸酯基团,例如硫代磷酸酯基团。更一般地说,可组合多种核苷酸修饰。

[0173] 在一个实施方案中,有义寡聚物可具有末端的2'-修饰(例如每一端的2个、每一端的3个和每一端的4个等;以及一端的1个、一端的2个、一端的3个和一端的4个,等;以及甚至不平衡的组合,例如一端的12个和另一端的10个,等)。同样地,反义链可具有末端的2'-修饰(例如每一端的1个、每一端的2个、每一端的3个和每一端的4个等等;以及一端的1个、一端的2个、一端的3个和一端的4个,等等;以及甚至不平衡的组合例如一端的1个和另一个的2个,等等)。在优选的方面,所述2'-修饰是有义RNA链和/或反义链中的2'-O-甲基修饰。

[0174] 根据本发明,有义链可容许许多2'-修饰(例如2'-O-甲基修饰),只要中央连接是未修饰的即可。本文使用的“中央”不限于表示有义链的几何学中点。而是可包括有义链的5'-端部分和3'-端部分之间的任何位置。有义链的5'-端部分和3'-端部分不一定是对称的。

[0175] 因此,在某些实施方案中,有义链不是完全修饰的(即,至少一个或更多有义链核苷酸是未修饰的)。在某些实施方案中,未修饰有义链核苷酸在有义链的中央部分中,或者

在5'端修饰有义核苷酸区段和3'端修饰有义核苷酸区段之间。

[0176] 另外根据本发明,有义链对2'-修饰的容许度不一定是对称的。相反,在使用例如25或26个核苷酸的有义链时,不对称的构造可能是希望的。2'-修饰增加了核酸酶稳定性,降低了干扰素诱导,并且更易于合成。因此,可能希望在有义链上包含更多这样的2'-修饰核糖(尤其是2'-O-甲基修饰的),只要遵从本发明的教导保持了RNAi的活性即可。

[0177] 在本发明的一些实施方案中,本发明的高度修饰有义链可以与未修饰的或者少许修饰的反义链相组合,以得到最大的引导链活性。

[0178] 为了进一步使得核酸酶内切酶和外切酶抗性最大化,除了在末端使用2'-修饰核苷酸单体之外,还可使用磷酸二酯之外的核苷酸单体内连接。例如,这种末端封闭可单独使用或者与2'-O-甲基连接之间的硫代磷酸酯连接一起使用。优选的2'-修饰核苷酸单体是2'-修饰的末端核苷酸。

[0179] 尽管反义链可以与靶基因的至少一部分基本相同(至少是对于碱基配对特性来说),但是序列不一定是完全相同才可使用,例如用于抑制靶基因表型的表达。一般地,可使用更高的同源性来补偿较短反义基因的使用。在一些情况下,反义链一般与靶基因基本相同(尽管是反义取向)。

[0180] 本发明组合物的一个具体实例在有义寡核苷酸两端以及反义寡核苷酸的仅3'端具有末端封闭。不受理论的限制,2'-O修饰的有义链可能不如未修饰形式,这可能是因为它没有有效展开。因此,在某些实施方案中,可将错配引入有义链的特定位置(修饰2'-O-甲基有义链,或者甚至未修饰有义链),以便于更容易地载入RISC复合物中。

[0181] 在某些实施方案中,所述有义链的长度可以是30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18个核苷酸。相似地,所述反义链的长度可以是30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19或18个核苷酸。此外,当从这些有义和反义分子形成双链核酸分子时,所得双链体可具有平末端,或者在一端或每一端独立地具有0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个核苷酸的突出端。此外,本发明的双链核酸分子可由有义链和反义链构成,其中这些链的长度如上所述,并且具有相同或不同的长度,但是仅仅具有10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸的序列互补性。出于说明的目的,在有义链是20个核苷酸长、反义链是25个核苷酸长且两条链具有仅15个核苷酸的序列互补性时,可以形成在一端具有10个核苷酸的突出而另一端具有5个核苷酸的突出的双链核酸分子。

[0182] 在希望使得细胞胁迫应答最小化的情况下,使用2'-O-甲基RNA也可以是有利的。被认为识别未修饰RNA的细胞机器可能不识别具有2'-O-甲基核苷酸单体的RNA。使用2'-O-甲基化或部分2'-O-甲基化RNA可避免对双链核酸的干扰素应答,同时保持靶标RNA的抑制。在诱导干扰素应答的短RNAi(例如siRNA)序列和可诱导干扰素应答的长RNAi序列中这都可以是有用的,例如,以避免干扰素或其他细胞胁迫应答。

[0183] 总的说来,修饰的糖可包含D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基和2'-O-乙基),即2'-烷氧基、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤素(包括2'-氟)、2'-甲氧乙氧基、2'-烯丙基氧基(-OCH₂CH=CH₂)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基和氰基等等。在一个实施方案中,所述糖部分可以是己糖,并引入寡核苷酸中,如所述(Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992))。示例性核苷酸单体可见于,例如美国专利No. 5,849,902,其通过引用并入本文。

[0184] 术语“烷基”包括饱和脂肪基,包括直链烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等),支链烷基(异丙基、叔丁基、异丁基等),环烷基(脂环族)基团(环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基),烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其主链上具有6个或更少的碳原子(例如对直链来说为 C_1-C_6 ,对支链来说为 C_3-C_6),更优选4个或更少。同样地,优选的环烷基在其环结构中具有3-8个碳原子,更优选在环结构中具有5或6个碳。术语 C_1-C_6 包括含有1至6个碳原子的烷基。

[0185] 此外,除非另作说明,术语烷基包括“未取代烷基”和“取代的烷基”,后者指具有替代烃主链一个或多个碳上的氢的独立选择取代基的烷基部分。这些取代基可包括如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸基、膦酸基(phosphonato)、亚膦酸基(phosphinato)、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷基硫基、芳基硫基、硫代羧酸基、硫酸基、烷基亚硫酸基、磺基(sulfonato)、氨基磺酰基、磺胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香或杂芳香部分。环烷基可以进一步取代,例如由如上所述取代基取代。“烷基芳基”或“芳基烷基”部分是由芳基取代的烷基(例如苯甲基)。术语“烷基”还包括天然和非天然氨基酸的侧链。术语“正烷基”表示直链(即无支链的)未取代烷基。

[0186] 术语“烯基”包括长度和可能的取代基与如上所述烷基相似但含有至少一个双键的不饱和脂肪基。例如,术语“烯基”包括直链烯基(例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基等)、支链烯基、环烯基(脂环族)基团(环丙烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环壬烯基)、烷基或烯基取代的环烯基,以及环烷基或环烯基取代的烯基。在某些实施方案中,直链或支链烯基在其主链上具有6个或更少的碳原子(例如对直链来说为 C_2-C_6 ,对支链来说为 C_3-C_6)。同样地,优选的环烯基在其环结构中具有3-8个碳原子,更优选在环结构中具有5或6个碳。术语 C_2-C_6 包括含有2至6个碳原子的烯基。

[0187] 此外,除非另作说明,术语烯基包括“未取代烯基”和“取代的烯基”,后者指具有替代烃主链一个或多个碳上的氢的独立选择取代基的烯基部分。这些取代基可包括例如烷基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸基、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷基硫基、芳基硫基、硫代羧酸基、硫酸基、烷基亚硫酸基、磺基、氨基磺酰基、磺胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香或杂芳香部分。

[0188] 术语“炔基”包括长度和可能的取代基与如上所述烷基相似但含有至少一个三键的不饱和脂肪基。例如,术语“炔基”包括直链炔基(例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基等)、支链炔基以及环烷基或环烯基取代的炔基。在某些实施方案中,直链或支链炔基在其主链上具有6个或更少的碳原子(例如对直链来说为 C_2-C_6 ,对支链来说为 C_3-C_6)。术语 C_2-C_6 包括含有2至6个碳原子的炔基。

[0189] 此外,除非另作说明,术语炔基包括“未取代炔基”和“取代的炔基”,后者指具有替代烃主链一个或多个碳上氢的独立选择的取代基的炔基部分。这些取代基可包括如烷基、

炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸基、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脞基、亚氨基、巯基、烷基硫基、芳基硫基、硫代羧酸基、硫酸基、烷基亚硫酰基、砷基、氨磺酰基、磺胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香或杂芳香部分。

[0190] 除非碳的数目另有说明,否则本文使用的“低级烷基”表示如上定义但在其主链结构中具有一至五个碳原子的烷基。“低级烯基”和“低级炔基”具有例如2-5个碳原子的链长度。

[0191] 术语“烷氧基”包括与氧原子共价连接的取代和未取代的烷基、烯基和炔基。烷氧基的例子包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基和戊氧基。取代烷氧基的实例包括卤代烷氧基。烷氧基可以独立地由选定的基团取代,例如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸基、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脞基、亚氨基、巯基、烷基硫基、芳基硫基、硫代羧酸基、硫酸基、烷基亚硫酰基、砷基、氨磺酰基、磺胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香或杂芳香部分。卤素取代的烷氧基的实例包括但不限于氟代甲氧基、二氟代甲氧基、三氟代甲氧基、氯代甲氧基、二氯代甲氧基、三氯代甲氧基等。

[0192] 术语“杂原子”包括除了碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子是氮、氧、硫和磷。

[0193] 术语“羟基”包括具有-OH或-O⁻(具有合适的平衡离子)的基团。

[0194] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。术语“全卤化”泛指其中全部氢被卤素原子取代的部分。

[0195] 术语“取代的”包括独立选择的取代基,其可置于所述部分并且其使得所述分子实现预定功能。取代基实例包括烷基、烯基、炔基、芳基、(CR'R'')₀₋₃NR'R''、(CR'R'')₀₋₃CN、NO₂、卤素、(CR'R'')₀₋₃C(卤素)₃、(CR'R'')₀₋₃CH(卤素)₂、(CR'R'')₀₋₃CH₂(卤素)、(CR'R'')₀₋₃CONR'R''、(CR'R'')₀₋₃S(O)_{i-2}NR'R''、(CR'R'')₀₋₃CHO、(CR'R'')₀₋₃O(CR'R'')₀₋₃H、(CR'R'')₀₋₃S(O)₀₋₂R'、(CR'R'')₀₋₃O(CR'R'')₀₋₃H、(CR'R'')₀₋₃COR'、(CR'R'')₀₋₃CO₂R'或(CR'R'')₀₋₃OR'基团,其中每个R'和R''各自独立地为氢、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基或芳基,或者R'和R''一起为苯亚甲基或者-(CH₂)₂O(CH₂)₂-基团。

[0196] 术语“胺”或“氨基”包括其中氮原子共价连接至少一个碳或杂原子的化合物或部分。术语“烷基氨基”包括其中氮与至少一个其它烷基相连的基团和化合物。术语“二烷基氨基”包括其中氮原子与至少两个其它烷基相连的基团。

[0197] 术语“醚”包括含有与两个不同碳原子或杂原子键合的氧的化合物或部分。例如,该术语包括“烷氧基烷基”,其表示与共价键合另一个烷基的氧原子共价键合的烷基、烯基或炔基。

[0198] 术语“碱基”包括已知的嘌呤和嘧啶杂环碱基、脱氮嘌呤和类似物(包括杂环取代

类似物,例如氨基乙氧基吩噻嗪),衍生物(例如1-烷基-、1-烯基-、杂芳基-和1-炔基衍生物)以及其互变异构体。嘌呤的实例包括腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和黄嘌呤以及其类似物(例如8-氧代-N⁶-甲基腺嘌呤或7-二氮杂黄嘌呤)和衍生物。嘧啶包括例如胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶,及其类似物(例如5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(1-丙基)尿嘧啶、5-(1-丙基)胞嘧啶和4,4-桥亚乙基腺嘌呤)。合适碱基的其它实例包括非嘌呤和非嘧啶碱基,例如2-氨基吡啶和三嗪。

[0199] 在一个优选实施方案中,本发明寡核苷酸的核苷酸单体是RNA核苷酸。在另一个优选实施方案中,本发明寡核苷酸的核苷酸单体是修饰的RNA核苷酸。因此,所述寡核苷酸含有修饰的RNA核苷酸。

[0200] 术语“核苷”包括与糖部分共价相连的碱基,优选核糖或脱氧核糖。优选核苷的实例包括核糖核苷和脱氧核糖核苷。核苷还包括与氨基酸或氨基酸类似物相连的碱基,其可包含游离羧基、游离氨基或保护基。合适的保护基是本领域中公知的(参见P.G.M. Wuts和T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第二版, Wiley-Interscience, New York, 1999)。

[0201] 术语“核苷酸”包括另外包含磷酸基或磷酸类似物的核苷。

[0202] 本文使用的术语“连接”包括天然的未修饰磷酸二酯部分(-O-(P(O²⁻))-O-), 其将相邻的核苷酸单体共价连接。本文使用的术语“取代连接”包括共价连接相邻核苷酸单体的天然磷酸二酯基的任何类似物或衍生物。取代连接包括磷酸二酯类似物,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和P-乙氧基磷酸二酯、P-乙氧基磷酸三酯、P-烷氧基磷酸三酯、甲基磷酸酯和不含磷的连接,例如乙缩醛和酰胺。合适的取代连接是本领域中已知的(例如Bjergarde等1991. *Nucleic Acids Res.* 19:5843; Caruthers等1991. *Nucleosides Nucleotides.* 10:47)。在某些实施方案中,不可水解的连接是优选的,例如硫代磷酸酯连接。

[0203] 在某些实施方案中,本发明的寡核苷酸包括3'和5'端(环形寡核苷酸除外)。在一个实施方案中,寡核苷酸的3'和5'端基本被保护而免受核酸酶影响,例如通过修饰3'或5'连接(例如美国专利No. 5,849,902和W098/13526)。例如,可通过包含“封闭基团”来使得寡核苷酸具有抗性。本文使用的术语“封闭基团”指可与寡核苷酸或核苷酸单体连接的取代基(例如除了OH基团之外),其作为保护基或用于合成的偶联基团(例如FITC、丙基(CH₂-CH₂-CH₃)、乙二醇(-O-CH₂-CH₂-O-)磷酸酯(P(O₃²⁻)-)、氢磷酸酯或者亚磷酸酯)。“封闭基团”还包括“末端封闭基团”或者“核酸外切酶封闭基团”,其保护寡核苷酸的5'和3'端,包括经修饰核苷酸和非核苷酸核酸的外切酶抗性结构。

[0204] 示例性末端封闭基团包括帽结构(例如7-甲基鸟苷帽)、倒置核苷酸单体例如3'-3'或5'-5'端倒置(见例如Ortiagao等1992. *Antisense Res. Dev.* 2:129)、甲基磷酸酯、亚磷酸酯、非核苷酸基团(例如非核苷酸接头、氨基接头、缀合物)等。3'端核苷酸单体可包含修饰的糖部分。3'端核苷酸单体包括3'-O,其可任选地由防止3'-核酸外切酶降解所述寡核苷酸的封闭基团取代。例如,可通过3'-3'核苷酸间连接将3'-羟基与核苷酸酯化。例如,烷氧基自由基可以是甲氧基、乙氧基或异丙氧基,优选是乙氧基。任选地,可通过取代连接来连接3'端的3'-3'连接核苷酸。为了减少核酸酶降解,最5'端的3'-5'连接可以是经修饰的连接,例如硫代磷酸酯或者P-烷氧基磷酸三酯连接。优选地,最5'端的两个3'-5'连接可以是经修饰的连接。任选地,5'端羟基部分可以用含磷部分酯化,例如磷酸酯、硫代磷酸酯或P-

乙氧基磷酸酯。

[0205] 在一个实施方案中,寡核苷酸的有义链包含允许RNAi活性但是使得有义链在基因靶向方面没有活性的5'基团。优选地,这些5'修饰基团是磷酸基或者大于磷酸基的基团。此类型的寡核苷酸经常在细胞中显示出对反义链核苷酸序列相应靶基因的特异性增加。这是因为此类寡核苷酸中的有义链经常使得不能介导可能与其非特异性结合的任何核苷酸序列的切割,因此不会使得细胞中任何其他基因失活。所以,所观察到的转染此类寡核苷酸的细胞内基因表达的降低经常是由于反义链的直接或间接作用。本文使用的术语“对靶基因的特异性”表示寡核苷酸对细胞作用可直接或间接归因于所述寡核苷酸中存在的反义核苷酸序列对靶基因表达的抑制的程度。

[0206] 因此,根据另一个实施方案,本发明提供了提高寡核苷酸对细胞中靶基因特异性的方法,其中所述寡核苷酸包含有义链和反义链,其中有义链和反义链都能够结合对应核苷酸序列(如果细胞中存在的话),所述方法包括以下步骤:在所述寡核苷酸与所述细胞接触之前,用磷酸基团或者大于磷酸基团的基团修饰所述有义链的5'端羟基部分,从而使得所述有义链不能介导可能与其非特异性结合的任何核苷酸序列的切割,因此不会使得细胞中任何其他基因失活。

[0207] 提高靶基因特异性或者减少脱靶沉默作用的另一个方法是在对应于Dicer所切割21聚体的5'端第二个核苷酸的位置处引入2'-修饰(例如2'-O甲基修饰)。申请人的发现允许将此2'-修饰置于Dicer抗性dsRNA中,由此使得能够设计具有较少或没有脱靶沉默的更好的siRNA构建体。

[0208] 在一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸可包含一个为DNA的核酸分子和一个为RNA的核酸分子(即为其双链体)。本发明的反义序列可以是“嵌合寡核苷酸”,其包含RNA样和DNA样区域。

[0209] “RNA酶H活化区”的表述包括寡核苷酸(例如嵌合寡核苷酸)中的区域,其能够募集RNA酶H以切割所述寡核苷酸所结合的靶RNA链。通常,RNA酶活化区含有DNA或DNA样核苷酸单体的最小核心(至少约3-5个,通常约3-12个,更常见约5-12个,更优选约5-10个相邻的核苷酸单体)。(参见例如美国专利No.5,849,902)。优选地,RNA酶H活化区包含含有约9个相邻含脱氧核糖的核苷酸单体。

[0210] “非活化区”的表述包括反义序列(例如嵌合寡核苷酸)中不募集或活化RNA酶H的区域。优选地,非活化区不包含硫代磷酸酯DNA。本发明的寡核苷酸包含至少一个非活化区。在一个实施方案中,可以使非活化区对于核酸酶稳定,或者可通过对靶标互补并与将和所述寡核苷酸结合的靶核酸分子形成氢键从而提供对靶标的特异性。

[0211] 在一个实施方案中,相邻多核苷酸的至少一部分通过取代连接相连,例如硫代磷酸酯连接。

[0212] 在某些实施方案中,大多数或所有有义链核苷酸(2'-修饰或未修饰)通过硫代磷酸酯连接连接。由于其对血清蛋白的更高亲合力,这些构建体倾向于具有改善的药代动力学。一旦引导链载入RISC,有义链中的硫代磷酸酯连接一般不影响引导链的活性。

[0213] 本发明的反义序列可包含“吗啉代寡核苷酸”。吗啉代寡核苷酸是非离子的,通过不依赖于RNA酶H的机制起作用。吗啉代寡核苷酸的4种基因碱基(腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶)的每一种与6元吗啉环相连。通过以例如非离子型磷酰胺亚基内连接来

连接4种不同亚基类型,从而产生吗啉代寡核苷酸。吗啉代寡核苷酸具有许多优点,包括完全的核酸酶抗性(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1996.6:267);可预测的靶向性(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);可靠的细胞内活性(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:63);出色的序列特异性(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:151);最小的非反义活性(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);以及简单的渗透或刮擦递送(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:291)。吗啉代寡核苷酸还因为其高剂量下的无毒性而优选。制备吗啉代寡核苷酸的讨论可见于Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:187。

[0214] III. 合成

[0215] 本发明的寡核苷酸可通过本领域中任何已知方法合成,例如使用酶催化合成和/或化学合成。可体外(例如使用酶催化合成和化学合成)或体内(使用本领域中公知的重组DNA技术)合成寡核苷酸。

[0216] 在一个优选实施方案中,将化学合成用于修饰的多核苷酸。直链寡核苷酸的化学合成是本领域中公知的,其可通过溶液相或固相技术实现。优选地,通过固相方法进行合成。可通过几种不同合成方法的任意种制备寡核苷酸,包括亚磷酰胺、亚磷酸三酯、H-磷酸酯和磷酸三酯法,通常通过自动合成法进行。

[0217] 寡核苷酸合成方案是本领域中公知的,可见于例如美国专利No.5,830,653;W0 98/13526;Stec等1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077;Stec等1985. J. Org. Chem. 50:3908;Stec等J. Chromatog. 1985. 326:263;LaPlanche等1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081;Fasman G.D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.; Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1;美国专利No.5,013,830;美国专利No.5,214,135;美国专利No.5,525,719;Kawasaki等1993. J. Med. Chem. 36:831;W0 92/03568;美国专利No.5,276,019;以及美国专利No.5,264,423。

[0218] 所选的合成法可取决于所需寡核苷酸的长度,这一选择在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,亚磷酰胺和亚磷酸三酯法可产生具有175个或更多核苷酸的寡核苷酸,而H-磷酸酯法可用于小于100个核苷酸的寡核苷酸。如果在寡核苷酸中掺入修饰碱基,特别地,如果使用经修饰磷酸二酯连接的话,则按照需要根据已知方法改变合成方法。在这点上,Uhlmann等(1990, Chemical Reviews 90:543-584)提供了参考文献并给出了产生具有修饰碱基和修饰磷酸二酯连接的方法。Sonveaux. 1994. "Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis";Agrawal. Methods in Molecular Biology 26:1给出了产生寡核苷酸的其他示例性方法。"Oligonucleotide Synthesis-A Practical Approach"(Gait, M.J. IRL Press at Oxford University Press. 1984)中也给出了示例性合成方法。此外,序列确定的线性寡核苷酸(包括具有修饰核苷酸的一些序列)易于得自一些商业来源。

[0219] 可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或者通过许多色谱方法中的任意种(包括凝胶色谱和高压液相色谱)来纯化寡核苷酸。为了证实核苷酸序列,尤其是未修饰核苷酸序列,可对寡核苷酸进行任何已知方法的DNA测序,包括Maxam和Gilbert测序、Sanger测序、毛细管电泳测序、漂移点测序方法或者通过使用与Hybond纸结合的寡核苷酸的选择性化学降解。短寡核苷酸的序列还可通过激光解吸质谱或者通过快速原子轰击来分析(McNeal等, 1982,

J. Am. Chem. Soc. 104:976; Viari, 等, 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn 等, 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671)。针对RNA寡核苷酸的测序方法也是可用的。

[0220] 所合成的寡核苷酸的品质可如下进行验证:通过毛细管电泳和变性强阴离子HPLC (SAX-HPLC) 测试寡核苷酸,其使用例如Bergot和Egan.1992. J. Chrom. 599:35的方法。

[0221] 其他示例性合成方法是本领域中公知的(参见例如Sambrook等, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984; Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 或者Methods in Enzymology系列 (Academic Press, Inc.))。

[0222] 在某些实施方案中,本发明RNAi构建体或者其至少一部分转录自编码本发明构建体的表达载体。任何本领域公知的载体均可用于此目的。转录的RNAi构建体可被分离并纯化,然后进行所需的修饰(例如用经修饰有义链替换未修饰有义链等等)。

[0223] IV. 递送/运载体

[0224] 细胞对寡核苷酸的摄取

[0225] 寡核苷酸和寡核苷酸组合物与一个或多个细胞或者细胞裂解物相接触(即接触到,本文也称为施用或递送至)并且被其摄取。术语“细胞”包括原核细胞和真核细胞,优选脊椎动物细胞,更优选哺乳动物细胞。在一个优选实施方案中,本发明的寡核苷酸组合物与人细胞相接触。

[0226] 本发明的寡核苷酸组合物可体外接触细胞,例如在试管或培养皿中(并且可以或者可以不引入对象中),或者体内接触细胞,例如在对象例如哺乳动物对象中。细胞以缓慢的速率通过胞吞作用摄取寡核苷酸,但是胞吞的寡核苷酸一般是隔离的并且不可利用,例如与靶核酸分子杂交。在一个实施方案中,可通过电穿孔或者磷酸钙沉淀促进细胞摄取。但是,这些方法仅可用于体外或离体实施方案,并且不方便,有时与细胞毒性有关。

[0227] 在另一个实施方案中,可通过合适的本领域公知方法增强寡核苷酸递送进细胞,包括磷酸钙、DMSO、甘油或葡聚糖、电穿孔或者通过转染,例如使用阳离子、阴离子或中性脂质组合物或脂质体,利用本领域已知的方法(参见例如WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; 美国专利No. 4,897,355; Bergan等1993. Nucleic Acids Research. 21:3567)。也可通过使用载体(参见例如Shi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9; Reichhart J M等Genesis. 2002. 34(1-2):1604, Yu等2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047; Sui等2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515)病毒,使用多胺或多聚阳离子缀合物(例如聚赖氨酸)、鱼精蛋白或Ni、N12-双(乙基)精胺介导寡核苷酸的增强递送(参见例如Bartzatt, R. 等1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133; Wagner E. 等1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255)。

[0228] 寡核苷酸摄取的最佳方案取决于许多因素,最关键的是所用的细胞类型。对摄取来说重要的其他因素包括但不限于寡核苷酸的性质和浓度,细胞的汇合度,细胞培养物的类型(悬浮培养或贴壁)以及培养细胞的培养基类型。

[0229] 缀合剂

[0230] 缀合剂以共价形式结合寡核苷酸。在一个实施方案中,可通过与缀合剂结合来衍生或化学修饰寡核苷酸,以促进细胞摄取。例如,将胆固醇部分共价连接到寡核苷酸可将细

胞摄取提高5-10倍,其继而将DNA结合提高约10倍(Boutorin等,1989,FEBS Letters 254:129-132)。与未修饰寡核苷酸相比,于辛基、十二基和十八基残基的缀合将细胞摄取提高3、4和10倍(Vlassov等,1994,Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。相似地,用聚-L-赖氨酸衍生寡核苷酸可有助于细胞对寡核苷酸的摄取(Schell,1974,Biochem.Biophys.Acta 340:323,以及Lemaitre等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:648)。

[0231] 某些蛋白质运载体也可促进细胞对寡核苷酸的摄取,包括例如血清白蛋白、具有运输至核的信号的核蛋白以及能够穿透细胞膜的病毒或细菌蛋白。所以,在与寡核苷酸相关联或者相连时,蛋白质运载体是有用的。因此,本发明提供了用能够促进细胞摄取的基团对寡核苷酸进行衍生,包括碳氢化合物和非极性基团、胆固醇、长链醇(即己醇)、聚L-赖氨酸和蛋白质,以及其他芳基或类固醇基团和具有相似有益作用的聚阳离子,例如苯基或萘基,喹啉、葱或菲基团、脂肪酸、脂肪醇和倍半萜烯、双萜和类固醇。使用缀合剂的一个主要优点是增加了最初的膜相互作用,其导致寡核苷酸有更高的细胞积累。

[0232] 其他缀合剂包括多种维生素,例如脂溶性维生素,其可用作缀合物以将RNAi构建体特异性递送进脂肪组织——存储这些维生素的主要位置。这些基于维生素的缀合剂特别可用于靶向某些代谢疾病靶标,例如糖尿病/肥胖。在脂溶性维生素(例如维生素A、D、E、K等等)中,维生素K在一些实施方案中可能是优选的,因为没有已知的摄入上限(尽管大剂量可导致红细胞破裂并且可能导致肝脏疾病)。相比较而言,维生素A和D具有更明确的毒性和确定的摄入上限。

[0233] 在某些实施方案中, γ 羧基谷氨酸残基可与本发明RNAi构建体缀合,以增加其膜粘性和/或减缓清除并提高总体摄入(见上文)。

[0234] 可用于本发明构建体的某些缀合剂包括W004048545A2和US20040204377A1中所述的(其全部通过引用整体并入本文),例如Tat肽、基本类似于W004048545A2和US20040204377A1的SEQ ID NO:12序列的序列、homeobox (hox) 肽、MTS、VP22、MPG、至少一个树枝状体(例如PAMAM)等等。

[0235] 可用于本发明构建体的其他缀合剂包括W007089607A2(并入本文)中所述的那些,其描述了用于体内和体外递送核酸分子(例如本发明dsRNA构建体)和/或其他药剂的多种纳米运载体以及递送复合物。使用这些递送复合物,可在与包含缀合有至少一个功能性表面基团的核心的纳米运载体缀合或结合的情况下递送本发明dsRNA。所述核心可以是纳米颗粒,例如树枝状体(例如聚赖氨酸树枝状体)。所述核心也可以是纳米管,例如单壁纳米管或多壁纳米管。所述功能性表面基团是脂质、细胞类型特异性靶向部分、荧光分子和电荷控制分子中的至少一种。例如,所述靶向部分可以是组织选择性肽。所述脂质可以是油酰基脂质或其衍生物。示例性纳米运载体包括NOP-7或HBOLD。

[0236] 包被剂

[0237] 包被剂将寡核苷酸装在囊泡之内。在本发明的另一个实施方案中,寡核苷酸可以与运载体或载体相关联,例如脂质体或胶束,也可使用其他运载体,如本领域技术人员所知。脂质体是由脂双层形成的囊泡,其具有类似于生物膜的结构。这些运载体用于促进寡核苷酸的细胞摄取或靶向,或者改进寡核苷酸的药代动力学或者毒理学特性。

[0238] 例如,本发明的寡核苷酸也可包装在脂质体、药物组合物中施用,其中包含活性成

分,其分散或者以不同方式存在于由附着于脂质层的水同心层组成的微粒中。根据溶解度,所述寡核苷酸在水层和脂质层中均可存在,或者存在于一般称为脂质体悬液中。疏水层一般(但不绝对)包含磷脂例如卵磷脂和鞘磷脂、类固醇例如胆固醇、或多或少的离子型表面活性剂例如二酰基磷脂、十八胺或磷酸,或者其他疏水性物质。脂质体的直径一般为约15纳米至约5微米。

[0239] 使用脂质体作为药物递送载体提供了数个优点。脂质体增加了细胞内稳定性,提高了摄取效率并提高了生物活性。脂质体是中空球形囊泡,其由以类似于形成细胞膜的脂质的形式排列的脂质构成。它们具有内部水性空间,用以包装水溶性化合物,其大小为直径0.05微米至数微米。一些研究显示,脂质体可递送核酸至细胞,并且核酸保持生物活性。例如,最初设计为研究工具的脂质递送载体(例如Lipofectin或LIPOFECTAMINE™2000)可将完整核酸分子递送至细胞。

[0240] 使用脂质体的具体优点包括:它们无毒并且在组合物中可生物降解;它们显示长的循环半衰期;并且识别分子可易于连接到它们表面从而靶向至组织。最后,基于脂质体的药物(液体悬液或冻干产品)的低成本制造证明了该技术作为可接受的药物递送系统的生命力。

[0241] 络合剂

[0242] 络合剂通过强的非共价吸引力(例如静电、范德华力、 π -堆叠等相互作用)与本发明寡核苷酸结合。在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸可以与络合剂络合以增加细胞对寡核苷酸的摄取。络合剂的实例包括阳离子脂质。阳离子脂质可用于递送寡核苷酸至细胞。

[0243] 术语“阳离子脂质”包括具有极性和非极性结构域的脂质和合成脂质,并且其能够在生理pH或其附近带正电,并结合聚阴离子(例如核酸),并且利于核酸递送进细胞。一般说来,阳离子脂质包括饱和和不饱和烷基和脂环与胺、酰胺或其衍生物的醚和酯。阳离子脂质的直链和支链烷基和烯基基团可含有例如1至约25个碳原子。优选直链或支链烷基或烯基基团具有6个或更多的碳原子。脂环基包括胆固醇及其他类固醇基团。阳离子脂质可与多种平衡离子(阴离子)制备在一起,包括例如 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 F^- 、乙酸根、三氟乙酸根、硫酸根、亚硝酸根和硝酸根。

[0244] 阳离子脂质的实例包括聚亚乙基亚胺、聚酰胺胺(PAMAM)星暴树枝状体、Lipofectin(DOTMA和DOPE的组合)、Lipofectase、LIPOFECTAMINE™(例如LIPOFECTAMINE™2000)、DOPE、Cytfectin(Gilead Sciences,Foster City,Calif)和Eufectins(JBL,San Luis Obispo,Calif)。示例性阳离子脂质体可制备自N-[1-(2,3-二油酰基氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵甲基硫酸酯(DOTAP)、 3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺羧基氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟醋酸丙铵(DOSPA)、1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵;以及二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)。例如,发现阳离子脂质N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)将硫代磷酸酯寡核苷酸的反义作用增加1000倍。(Vlassov等,1994,Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。寡核苷酸也可与例如聚(L-赖氨酸)或亲和素络合,此混合物中可以包含或不包含脂质,例如十八烷基-聚(L-赖氨酸)。

[0245] 在本领域中阳离子脂质已用于将寡核苷酸递送至细胞(参见例如美国专利Nos.5,

855,910;5,851,548;5,830,430;5,780,053;5,767,099;Lewis等1996.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:3176;Hope等1998.Molecular Membrane Biology 15:1)。可用于促进摄取本发明寡核苷酸的其他脂质组合物可用于权利要求的方法。除了上文所列出的之外,其他脂质组合物也是本领域已知的,包括例如美国专利No.4,235,871;美国专利No.4,501,728;4,837,028;4,737,323中教导的。

[0246] 在一个实施方案中,脂质组合物还可包含诸如病毒蛋白质的物质以增加寡核苷酸的脂质介导转染(Kamata,等,1994.Nucl.Acids.Res.22:536)。在另一个实施方案中,寡核苷酸作为组合物的一部分与细胞接触,所述组合物包含寡核苷酸、肽和脂质,如美国专利5,736,392中所教导的。还描述了具有血清抗性的改进脂质(Lewis,等,1996.Proc.Natl.Acad.Sci.93:3176)。阳离子脂质以及其他络合剂发挥作用以增加通过胞吞运送进入细胞的寡核苷酸数。

[0247] 在另一个实施方案中,N-取代的甘氨酸寡核苷酸(类肽(peptoid))可用于优化寡核苷酸的摄取。类肽已用于产生用于转染的阳离子脂质样化合物。(Murphy,等,1998.Proc.Natl.Acad.Sci.95:1517)。类肽可使用标准方法合成(例如Zuckermann,R.N.,等1992.J.Am.Chem.Soc.114:10646;Zuckermann,R.N.,等1992.Int.J.Peptide Protein Res.40:497)。阳离子脂质与类肽、类脂的组合也可用于优化本发明寡核苷酸的摄取(Hunag,等,1998.Chemistry and Biology.5:345)。类脂可通过精制类肽寡核苷酸以及通过氨基将氨基端子单体与脂质偶联来合成。(Hunag,等,1998.Chemistry and Biology.5:345)。

[0248] 本领域中已知带正电荷的氨基酸可用于产生高活性的阳离子脂质(Lewis等1996.Proc.Natl.Acad.Sci.US.A.93:3176)。在一个实施方案中,用于递送本发明寡核苷酸的组合物包含许多与亲脂性部分相连的精氨酸、赖氨酸、组氨酸或鸟氨酸残基(参见例如美国专利No.5,777,153)。

[0249] 在另一个实施方案中,递送本发明寡核苷酸的组合物包含具有约一至约四个碱性残基的肽。这些碱性残基可位于例如肽的氨基端、C端或者内部。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已有定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸(也可以认为是非极性的)、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -支链侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。除了碱性氨基酸之外,所述肽的大多数或所有其他残基可选自非碱性氨基酸,例如除赖氨酸、精氨酸或组氨酸以外的氨基酸。优选地,多数使用具有长中性侧链的中性氨基酸。

[0250] 在一个实施方案中,用于递送本发明寡核苷酸的组合物包含具有一个或多个 γ 羧基谷氨酸残基或者 γ -Gla残基的天然或合成多肽。这些 γ 羧基谷氨酸残基可使得多肽能够彼此结合以及与膜表面结合。换句话说,具有一系列 γ -Gla的多肽可用作一般性递送模块,其帮助RNAi构建体粘附至与其接触的任何膜。这可以至少减缓RNAi构建体从血流中的清除,并提高其归巢至靶标的机会。

[0251] γ 羧基谷氨酸残基可存在于天然蛋白质(例如凝血酶原具有10个 γ -Gla残基)。或

者,可通过使用例如维生素K依赖性羧化酶的羧化作用将它们引入纯化的重组产生的或者化学合成的多肽。 γ 羧基谷氨酸残基可以是连续的或非连续的,可以调节/调整这些 γ 羧基谷氨酸残基的总数和位置,以实现不同水平的多肽“粘附性”。

[0252] 在一个实施方案中,要与本发明寡核苷酸组合物接触的细胞与包含该寡核苷酸的混合物以及包含脂质的混合物接触(例如上文所述的脂质或脂质组合物之一)接触约12小时至约24小时。在另一个实施方案中,要与本发明寡核苷酸组合物接触的细胞与包含该寡核苷酸的混合物以及包含脂质的混合物(例如上文所述的脂质或脂质组合物之一)接触约1至约五天。在一个实施方案中,所述细胞与包含脂质和寡核苷酸的混合物接触约三天至长达约30天。在另一个实施方案中,包含脂质的混合物与细胞接触至少约5天至约20天。在另一个实施方案中,包含脂质的混合物与细胞接触至少约七天至约15天。

[0253] 例如,在一个实施方案中,寡核苷酸组合物可在脂质例如cytofectin CS或GSV(可得自Glen Research;Sterling, Va.)、GS3815、GS2888存在下与细胞接触如本文所述的长孵育时间。

[0254] 在一个实施方案中,细胞与包含脂质和寡核苷酸组合物的混合物的孵育不降低细胞的活力。优选地,在转染时间段后,细胞基本上存活。在一个实施方案中,在转染之后,细胞至少约70%至至少约100%存活。在另一个实施方案中,在转染之后,细胞至少约80%至95%存活。在又一个实施方案中,在转染之后,细胞至少约85%至90%存活。

[0255] 在一个实施方案中,通过连接肽序列对寡核苷酸进行修饰,所述肽序列将寡核苷酸转运进细胞,本文称为“转运肽”。在一个实施方案中,所述组合物包含与编码蛋白质的靶核酸分子互补的寡核苷酸以及共价连接的转运肽。

[0256] 表述“转运肽”包括利于将寡核苷酸转运进细胞的氨基酸序列。促进与其连接的部分转运进细胞的示例性肽是本领域已知的,包括例如HIV TAT转录因子、乳铁蛋白、疱疹VP22蛋白和成纤维细胞生长因子2(Pooga等1998.Nature Biotechnology.16:857;and Derossi等1998.Trends in Cell Biology.8:84;Elliott和O'Hare.1997.Cell 88:223)。

[0257] 寡核苷酸也可使用已知方法连接到转运肽,例如(Prochiantz, A.1996.Curr.Opin.Neurobiol.6:629;Derossi等1998.Trends Cell Biol.8:84;Troy等1996.J.Neurosci.16:253),Viyes等1997.J.Biol.Chem.272:16010)。例如,在一个实施方案中,带有活化巯基的寡核苷酸通过该巯基连接到转运肽中存在的半胱氨酸(例如存在于天线同源域的第二和第三螺旋之间的 β 转角中的半胱氨酸,如Derossi等1998.Trends Cell Biol.8:84;Prochiantz.1996.Current Opinion in Neurobiol.6:629;Allinquant等1995.J Cell Biol.128:919所述)。在另一个实施方案中,Boc-Cys-(Npys)OH基团可与转运肽偶联作为最后一个(N端)氨基酸,带有SH基团的寡核苷酸可与所述肽偶联(Troy等1996.J.Neurosci.16:253)。

[0258] 在一个实施方案中,接头基团可与核苷酸单体连接,所述转运肽可共价连接至所述接头。在一个实施方案中,接头既可用作转运肽的连接位点,又能提供针对核酸酶的稳定性。合适接头的实例包括取代或未取代的 C_1 - C_{20} 烷基链、 C_2 - C_{20} 烯基链、 C_2 - C_{20} 炔基链、肽和杂原子(例如S、O、NH等)。其他示例性接头包括双官能交联剂例如硫代琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)(参见例如Smith等Biochem J 1991.276:417-2)。

[0259] 在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸作为分子缀合物合成,其利用受体介导的

内吞机制以递送基因进入细胞(参见例如Bunnell等1992.Somatic Cell and Molecular Genetics.18:559,以及其中引用的参考文献)。靶向剂

[0260] 寡核苷酸的递送也可通过将寡核苷酸靶向至细胞受体来改善。靶向部分可与寡核苷酸缀合或者连接至与寡核苷酸相连的运载体基团(即聚(L-赖氨酸)或脂质体)。该方法很适于显示特异性受体介导胞吞作用的细胞。

[0261] 例如,表达甘露糖6-磷酸特异性受体的细胞对与6-磷酸甘露糖基化蛋白缀合的寡核苷酸的内化比游离寡核苷酸高20倍。还可使用可生物降解接头将寡核苷酸与细胞受体的配体相连。在另一个实例中,递送构建体是甘露糖基化链霉亲和素,其与生物素化寡核苷酸形成紧密复合物。发现甘露糖基化链霉亲和素将生物素化寡核苷酸的内化提高20倍(Vlassov等1994.Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

[0262] 另外,特异性配体可与基于聚赖氨酸的递送系统中的聚赖氨酸组分相缀合。例如,转铁蛋白-聚赖氨酸、腺病毒-聚赖氨酸和流感病毒血凝素HA-2的N端融合肽-聚赖氨酸缀合物大大提高了真核细胞中的受体介导DNA递送。已经使用了肺泡巨噬细胞中与聚(L-赖氨酸)缀合的甘露糖基化糖蛋白来提高细胞对寡核苷酸的摄取。Liang等1999.Pharmazie54:559-566。

[0263] 因为恶性细胞对必需营养物(例如叶酸和转铁蛋白)的需要增加,因此这些营养物可用于将寡核苷酸靶向至癌细胞。例如,叶酸在与聚(L-赖氨酸)相连时,在早幼粒白血病(HL-60)细胞和人黑素瘤(M-14)细胞中观察到寡核苷酸摄取增加。Ginobbi等1997.Anticancer Res.17:29。在另一个实例中,用马来酸化牛血清白蛋白、叶酸或高铁原卟啉IX包被的脂质体在小鼠巨噬细胞、KB细胞和2.2.15人肝癌细胞中显示细胞对寡核苷酸的摄取增加。Liang等1999.Pharmazie 54:559-566。

[0264] 脂质体在肝、脾和网状内皮系统中天然积累(所谓的被动靶向)。通过用蛋白A将脂质体与多种配体例如抗体相偶联,它们可主动靶向至特定细胞群体。例如,带有蛋白A的脂质体可以用H-2K特异性抗体预处理,其靶向L细胞中表达的小鼠主要组织相容性复合体编码的H-2K蛋白。(Vlassov等1994.Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

[0265] V. 施用

[0266] 施用或递送寡核苷酸的最佳途径可根据所需结果和/或所治疗对象而不同。本文使用的“施用”指使细胞与寡核苷酸相接触,其可在体外或体内进行。可调节寡核苷酸的剂量以最优地降低从靶核酸分子翻译的蛋白质表达(例如作为RNA稳定性的读数或者治疗应答来衡量),而无需过度实验。

[0267] 例如,可测定核酸靶标所编码蛋白质的表达,以确定给药方案是否需要相应地进行调节。另外,细胞中或者细胞所产生的RNA或蛋白质水平的提高或降低可使用任何本领域公知的技术来测量。通过确定转录是否降低,可确定所述寡核苷酸诱导靶RNA切割的有效性。

[0268] 任何上述寡核苷酸组合物可单独使用或者与可药用载体联合使用。本文使用的“可药用载体”包括合适的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域中公知的。任何常规介质或试剂除非与活性成分不相容,否则均可用于所述治疗组合物中。还可将补充性活性成分掺入所述组合物中。

[0269] 寡核苷酸可掺入脂质体或聚乙二醇修饰的脂质体中或者与阳离子脂质混合,用以肠胃外施用。在脂质体中掺入额外的物质(例如,对特定靶细胞上存在的膜蛋白有反应性的抗体)可有助于将寡核苷酸靶向至特定细胞类型。

[0270] 此外,本发明提供了用渗透泵施用本发明寡核苷酸,其提供这些寡核苷酸的连续输注,例如,Rataiczak等所述(1992Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:11823-11827)。这些渗透泵是市售的,例如来自Alzet Inc.(Palo Alto,Calif)。在阳离子脂质载体中的局部施用和肠胃外施用是优选的。

[0271] 对于体内应用,本发明的制剂可以适于所选施用途径(例如胃肠外、经口或者腹膜内)的多种形式施用给患者。优选肠胃外施用,包括通过下列途径的施用:静脉内;肌内;间质内;动脉内;皮下;眼内;滑膜内;透上皮的,包括透皮的;通过吸入的肺部施用;眼部施用;舌下和口腔施用;局部施用包括眼部;皮肤施用;眼施用;直肠施用;以及通过吹入的鼻吸入。

[0272] 用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶性或水分散性形式的活性化合物的水溶液。另外,可施用合适油性注射悬液形式的活性化合物的悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油,例如芝麻油或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯或甘油三酯。水性注射悬液可含有增加所述悬液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖,任选地所述悬液还可含有稳定剂。本发明的寡核苷酸可配制在液体溶液中,优选在生理相容的缓冲液(例如Hank溶液或者Ringer溶液)中。另外,所述寡核苷酸可配制为固体形式,临用前再溶解或悬浮。本发明还包括冻干形式。

[0273] 用于局部施用的药物制剂包括透皮贴剂、软膏剂、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、喷雾剂、栓剂、液体剂和粉剂。另外,常规药物载体、水性、粉末或油性基底或者增稠剂可用于局部施用的药物制剂中。

[0274] 用于经口施用的药物制剂包括粉剂或颗粒剂、水或非水介质中的混悬剂或溶液剂、胶囊剂、扁囊剂或片剂。另外,增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或者粘合剂可用于经口施用的药物制剂中。

[0275] 对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用对于待透过屏障来说合适的渗透剂。这些渗透剂是本领域已知的,包括例如(对于透粘膜施用来说)胆汁酸盐和羧链孢酸衍生物以及去污剂。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾或栓剂来完成。对于经口施用,寡核苷酸配制成常规经口施用形式,例如胶囊、片剂和滋补剂。对于局部施用,本发明寡核苷酸配制成本领域已知软膏剂、油膏剂、凝胶剂或霜剂。

[0276] 可选择用于例如体外、全身或者局部施用的药物递送载体。这些载体可设计成作为缓释储库或者直接将其内含物递送至靶细胞。使用一些直接递送载体的优点是每次摄取递送多个分子。这些载体已显示提高药物的循环半衰期,否则的话所述药物将快速从血流中清除。属于此类型的这些专用药物递送工具的一些实例有脂质体、水凝胶、环糊精、可生物降解的纳米胶囊以及生物粘附微球。

[0277] 所述寡核苷酸可全身性施用给对象。全身性吸收指药物进入血流,然后分布于整个身体。导致全身性吸收的施用途径包括:静脉内、皮下、腹膜内和鼻内。这些施用途径的每一种都将寡核苷酸递送至可接近的患病细胞。皮下施用之后,治疗剂进入局部淋巴结,通过淋巴网络继而进入循环。进入循环的速率已显示是分子量或大小的函数。使用脂质体或其

他药物载体将寡核苷酸定位于淋巴结处。可修饰寡核苷酸以扩散进细胞,或者脂质体可直接参与递送未修饰或经修饰寡核苷酸进入细胞。

[0278] 所选的递送方法会导致进入细胞。优选的递送方法包括脂质体(10-400nm)、水凝胶、控释聚合物以及其他可药用载体,以及显微注射或电穿孔(对于离体治疗)。

[0279] 本发明的药物制剂可制备和配制成乳液。乳液是一种液体以通常超过0.1 μ m直径的液滴形式分散于另一种液体的通常为异质的体系。本发明的乳液可含有赋形剂,例如乳化剂、稳定剂、染料、脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酸酯、润湿剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂根据需要也可存在于乳液中。这些赋形剂可以在水相、油相中以溶液形式存在,或者其自身作为分散相存在。

[0280] 可用于本发明乳液制剂的天然乳化剂的实例包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。细微颗粒固体也用作良好的乳化剂,尤其是与表面活性剂组合以及在粘性制剂中。可用作乳化剂的细微颗粒固体的实例包括极性无机固体,例如重金属氢氧化物、不膨胀粘土例如膨润土、硅镁土、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶体硅酸铝和胶体硅酸镁铝、染料,以及非极性固体例如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0281] 可包含在乳液制剂中的防腐剂的实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。可包含在乳液制剂中的抗氧化剂的实例包括自由基清除剂例如维生素E、烷基没食子酸酯、丁基羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯,或者还原剂例如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,以及抗氧化剂协同剂例如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0282] 在一个实施方案中,寡核苷酸的组合物配制成微乳剂。微乳剂是水、油和两亲性物质的体系,其为单一光学各向同性(single optically isotropic)的热力学稳定液体溶液。通常,微乳剂通过如下制备,首先将油分散于表面活性剂水溶液中,然后加入足量的第四组分,一般为中等链长的醇,形成透明体系。

[0283] 可用于制备微乳剂表面活性剂包括但不限于离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂、Brij 96、聚环氧乙烷油基醚、脂肪酸聚甘油酯、单月桂酸四甘油酯(ML310)、单油酸四甘油酯(MO310)、单油酸六甘油酯(PO310)、五油酸六甘油酯(PO500)、单癸酸十甘油酯(MCA750)、单油酸十甘油酯(MO750)、倍半油酸十甘油酯(SO750)、十油酸十甘油酯(DA0750),单独地或者与辅助表面活性剂组合。辅助表面活性剂通常为短链醇例如乙醇、1-丙醇和1-丁醇,用于通过渗入表面活性剂膜并由于表面活性剂分子中产生空隙空间因此产生无序的膜从而提高界面流动性。

[0284] 但是,微乳剂可在不使用辅助表面活性剂的情况下制备,本领域中已知不含醇的自乳化微乳液体系。水相通常可以是(但不限于)水、药物水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇以及乙二醇的衍生物。油相可包括但不限于下列物质例如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中等链(C₈-C₁₂)单、二和三甘油酯、聚氧乙烷化脂肪酸甘油酯、脂肪醇、聚醇化甘油酯、饱和聚醇化C₈-C₁₀甘油酯、植物油和硅油。

[0285] 从药物溶解性和增加药物吸收的观点来看,微乳剂是特别引人注意的。已经提出使用基于脂质的微乳剂(水包油和油包水)来提高药物的经口生物利用率。

[0286] 微乳剂提供了改善的药物溶解性,保护药物免受酶促水解,由于表面活性剂诱导膜流体性和渗透性的变化而可以增强药物吸收,易于制备,相对于固体剂型而言易于经口施用,提高了临床效力,以及降低了毒性(Constantinides等Pharmaceutical Research,

1994,11:1385;Ho等,J.Pharm.Sci.,1996,85:138-143)。微乳剂在化妆品和药物应用中均有效地透皮递送活性组分。预计本发明的微乳剂组合物和制剂将利于提高寡核苷酸从胃肠道中全身性吸收,以及改善寡核苷酸在胃肠道、阴道、口腔和其他施用区域中局部细胞中的摄取。

[0287] 在一个实施方案中,本发明使用多种穿透增强剂以影响核酸(特别是寡核苷酸)向动物皮肤的有效递送。如果用穿透增强剂处理要穿过的膜,那么甚至非亲脂性药物也可穿过细胞膜。除了提高非亲脂性药物穿过细胞膜的扩散,穿透增强剂也用于提高亲脂性药物的透过性。

[0288] 可用于本发明的五种类型穿透增强剂包括:表面活性剂、脂肪酸、胆汁酸盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。可使用其他物质来增强所施用寡核苷酸的穿透,包括:醇例如乙二醇和丙二醇、吡咯例如2-15吡咯、氮酮和萜烯例如18-萜二烯,以及薄荷酮。

[0289] 寡核苷酸(尤其是脂质制剂中的)也可通过用阳离子脂质制剂涂敷医学装置(例如导管,如血管成形术气囊导管)来施用。涂敷可通过例如将医学装置浸入脂质制剂或者脂质制剂与合适溶剂的混合物来实现,所述溶剂例如基于水的缓冲液、水性溶剂、乙醇、二氯甲烷、氯仿等。根据需要,一定量的制剂自然粘附于随后施用给患者的所述装置的表面上。或者,可将脂质制剂的冻干混合物特异性结合于装置的表面上。这些结合技术描述于例如K.Ishihara等,Journal of Biomedical Materials Research,Vol.27,pp.1309-1314(1993),其内容通过引用以整体并入本文。

[0290] 如本领域技术人员显而易见地,待施用的有用剂量和特定施用模式将根据例如下列的因素而不同,例如细胞类型、或者用于体内施用、年龄、体重以及要治疗的具体动物及其区域、所用的具体寡核苷酸和递送方法、考虑的治疗或诊断用途以及制剂的形式例如混悬液、乳液、胶束或脂质体。通常,以低水平施用剂量并提高,直至实现期望的效果。当脂质用于递送寡核苷酸时,所施用的脂质化合物的量可改变,一般取决于待施用的寡核苷酸物质的量。例如,脂质化合物与寡核苷酸试剂的重量比优选为约1:1至约15:1,更优选重量比为约5:1至约10:1。一般来说,所施用的阳离子脂质化合物的量在为0.1毫克(mg)至约1克(g)不等。作为一般性指导,通常每千克患者体重施用约0.1mg至约10mg的特定寡核苷酸试剂,约1mg至约100mg的脂质组合物,但是也可使用更高和更低的量。

[0291] 本发明的试剂以适于药物施用的生物学相容形式施用给对象,或者与细胞相接触。“适于施用的生物学相容形式”表示所述寡核苷酸以寡核苷酸的治疗性作用超过任何有毒作用的形式施用。在一个实施方案中,寡核苷酸可施用给对象。对象的实例包括哺乳动物例如人及其他灵长类;牛、猪、马和农场(农业)动物;狗、猫以及其他驯化宠物;小鼠、大鼠和转基因非人动物。

[0292] 施用活性量的本发明寡核苷酸定义为在实现预期结果所需的剂量和时间下有效的量。例如,活性量的寡核苷酸可根据例如下列的因素而改变,所述因素例如细胞类型、所用寡核苷酸,以及对于体内用途而言的个体疾病状态、年龄、性别和体重,以及寡核苷酸在个体中引发所需应答的能力。细胞内寡核苷酸治疗性水平的确立取决于摄取和流出或降解的速率。降低降解程度延长了寡核苷酸的胞内半衰期。因此,化学修饰的寡核苷酸(例如具有磷酸酯主链的修饰)可能需要不同的剂量。

[0293] 寡核苷酸的确切剂量和所施用剂量数将取决于实验和临床试验产生的数据。几个

因素例如所需效果、递送载体、疾病指征和给药途径会影响剂量。剂量可由本领域技术人员容易地确定并配成本发明药物组合物。优选地,治疗持续时间将至少延续至疾病症状期间。

[0294] 可调节剂量方案以提供最佳治疗应答。例如,寡核苷酸可重复施用,例如一些剂量可每日施用,或者剂量可根据治疗情况的紧急性而相应地降低。本领域技术人员将能够容易地确定施用本发明寡核苷酸的合适剂量和时间表,不论所述寡核苷酸是施用给细胞还是对象。

[0295] VI. 寡核苷酸稳定性测定

[0296] 优选地,本发明的双链寡核苷酸是稳定的,即基本对核酸内切酶和核酸外切酶降解有抗性。当对内源细胞核酸酶攻击的抗性比相应单链寡核苷酸至少强约3倍时,寡核苷酸定义为基本上对核酸酶有抗性,当至少强约6倍时其为高核酸酶抗性。这可通过施用本领域已知的技术显示本发明的寡核苷酸基本上对核酸酶有抗性来证明。

[0297] 可证明基本稳定性的一种方法是通过显示本发明寡核苷酸在递送至细胞时发挥功能,例如它们降低靶核酸分子的转录或翻译,例如通过测定蛋白水平或者通过测定mRNA的切割。测量靶RNA稳定性的测定可在转染后约24小时后进行(例如使用本领域中已知的Northern印迹技术、RNA酶保护测定或者QC-PCR测定)。或者,可测量靶蛋白的水平。优选地,除了检测目的RNA或蛋白水平之外,还将测量对照非靶标基因的RNA或蛋白水平(例如肌动蛋白,或者优选具有与靶标相似的序列的对照)作为特异性对照。可使用任何本领域公知的技术进行RNA或蛋白质测量。优选地,在转染后约16-24小时开始进行测量。(M.Y.Chiang,等1991.J Biol Chem.266:18162-71;T.Fisher,等1993.Nucleic Acids Research.21:3857)。

[0298] 可使用本领域已知的技术例如通过检测基因转录或蛋白质合成中的抑制测量本发明的寡核苷酸组合物抑制蛋白质合成的能力。例如,可进行核酸酶S1作图。在另一个实例中,可使用Northern印迹分析来测量编码特定蛋白质的RNA的存在。例如,可通过氯化铯垫制备总RNA(参见例如Ausebel等,1987.Current Protocols in Molecular Biology (Greene&Wiley,New York))。然后,可使用RNA和探针产生Northern印迹(参见例如Id.)。在另一个实例中,可测量靶蛋白所产生的特定mRNA的水平,例如使用PCR。在又一个实施例中,可使用Western印迹测量靶蛋白的存在量。在另一个实施方案中,可检测受蛋白质质量影响的表型。进行Western印迹的技术是本领域中公知的,参见例如Chen等J.Biol.Chem.271:28259。

[0299] 在另一个实施例中,靶基因的启动子序列可与报告基因连接,可监测报告基因的转录(例如下文中更详细所述)。或者,可通过将靶核酸分子的一部分与报告基因融合使得报告基因转录来鉴定不靶向启动子的寡核苷酸组合物。通过监测在寡核苷酸组合物存在下报告基因表达的变化,可以确定寡核苷酸组合物抑制报告基因表达的有效性。例如,在一个实施方案中,有效的寡核苷酸组合物会降低报告基因的表达。

[0300] “报告基因”是表达可检测基因产物的核酸,其可以是RNA或蛋白质。mRNA表达的检测可通过Northern印迹进行,蛋白质的检测可通过用蛋白质特异性抗体进行染色来实现。优选的报告基因产生容易检测的产物。报告基因可与调节性DNA序列有效连接,使得对报告基因产物的检测提供了调节性序列之转录活性的度量。在一些优选实施方案中,通过与产

物有关的固有活性来检测报告基因的基因产物。例如,报告基因可编码基因产物,其由于酶活性而产生基于颜色、荧光或发光的可检测信号。报告基因的实例包括但不限于编码氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶的那些。

[0301] 本领域技术人员容易分辨许多适用于本发明的报告基因。它们包括但不限于氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶、人生长激素(hGH)和 β -半乳糖苷酶。这些报告基因的实例可见于F.A.Ausubel等编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons, New York, (1989)。任何编码可检测产物的基因(例如具有可检测酶活性或者可产生特异性抗体的任何产物)均可用作本方法中的报告基因。

[0302] 一种报告基因系统是萤火虫萤光素酶报告系统。(Gould,S.J.和Subramani,S.1988.Anal.Biochem.,7:404-408其通过引用并入本文)。萤光素酶测定快速且灵敏。在该测定中,制备测试细胞的裂解物,并与ATP和底物萤光素混合。所编码的酶萤光素酶催化底物发生快速的ATP依赖性氧化,产生发光产物。测定总的光输出,其在宽的酶浓度范围内与萤光素酶的存在量成正比。

[0303] CAT是另一种经常使用的报告基因系统;该系统的主要优点是已经得到了广泛验证并且广泛接受作为启动子活性的度量。(Gorman C.M.,Moffat,L.F.和Howard,B.H.1982.Mol.Cell.Biol.,2:1044-1051)。在该系统中,用CAT表达载体转染测试细胞,在原始转染2-3天内与候选物质一起孵育。随后,制备细胞提取物。将提取物与乙酰辅酶A和放射性氯霉素一起孵育。孵育后,通过薄层色谱将乙酰化氯霉素与非乙酰化形式分离开。在该测定中,乙酰化程度反映了具有特定启动子的CAT基因活性。

[0304] 另一个合适的报告基因系统基于hGH的免疫检测。该系统也是快速且易用的。(Selden,R.,Burke-Howie,K.Rowe,M.E.,Goodman,H.M.和Moore,D.D.(1986),Mol.Cell,Biol.,6:3173-3179,通过引用并入本文)。hGH系统的有利之处在于表达的hGH多肽在培养基中而不是在细胞提取物中进行测定。因此,该系统不需要破坏测试细胞。应了解,该报告基因系统的原理不限于hGH,而是适用于有特异性可接受的抗体可用或可制备的任何多肽。

[0305] 在一个实施方案中,测量本发明双链寡核苷酸的核酸酶稳定性,并与对照进行比较,所述对照例如本领域中常用的RNAi分子(例如长度小于25个核苷酸并且包含两个核苷酸碱基的突出端的双链寡核苷酸)或者具有平末端的未修饰RNA双链体。

[0306] VII. 治疗用途

[0307] 通过抑制基因表达,本发明的寡核苷酸组合物可用于治疗任何涉及蛋白质表达的疾病。例如,可由寡核苷酸组合物治疗的疾病实例包括:癌症、视网膜病、自身免疫病、炎症性疾病(即ICAM-1相关疾病、银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩病)、病毒疾病(即HIV、丙型肝炎)和心血管疾病。

[0308] 在一个实施方案中,用寡核苷酸体外治疗细胞可用于对取自对象的细胞进行离体治疗(例如用于白血病或病毒感染的治疗),或者治疗并非来自该对象但施用给该对象的细胞(例如消除待移植入对象的细胞上的移植抗原表达)。另外,细胞的体外处理可用于非治疗性情况,例如用于评价基因功能,研究基因调控和蛋白质合成或者评价对设计用于调节基因表达或蛋白质合成的寡核苷酸的改进。体内处理细胞可用于希望抑制蛋白质表达的某些临床情况。已经报道了反义治疗施用于众多的医学状况(参见例如美国专利No.5,830,653)以及呼吸道合胞体病毒感染(WO 95/22,553)、流感病毒(WO 94/23,028)和恶性肿瘤

(WO 94/08,003)。反义序列临床用途的其他实例综述于例如Glaser,1996.Genetic Engineering News 16:1。寡核苷酸切割的示例性靶标包括如蛋白激酶Ca、ICAM-1、c-raf激酶、p53、c-myb和可见于慢性粒性白血病中的bcr/abl融合基因。

[0309] SOD1中的突变导致某些形式的家族性ALS疾病。反义寡核苷酸或RNAi对SOD1表达的抑制在动物模型中已经显示减缓ALS样症状的发展。作为本发明主题的高活性、核酸酶稳定且特异性的化合物非常适于针对ALS的治疗性应用。

[0310] 除非另有陈述,本发明的实施将利用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,其在本领域技术人员的能力范围内。这些技术在文献中有完全的说明。参见,例如Sambrook,J.等的Molecular Cloning A Laboratory Manual,第二版(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989));Ausubel,F.等的Short Protocols in Molecular Biology,第三版(Wiley,N.Y.(1995));DNA Cloning,第I和II卷(D.N.Glover ed.,1985);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait ed.(1984));Mullis等美国专利No.4,683,195;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.(1984));the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London(1987));Handbook Of Experimental Immunology,卷I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds.(1986));以及Miller,J.Experiments in Molecular Genetics(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1972))。

[0311] 实施例

[0312] 现已一般性地描述了本发明,通过下列实施例将更容易理解本发明,其仅用于说明本发明的某些方面和实施方案,不意在限制本发明。

[0313] 尽管下文大多数实施例使用SOD1和/或PPIB基因作为靶基因,但是本发明的方法和试剂普遍可用于任何其他基因,并且不限于此。为简单起见,本发明RNAi构建体在以下实施例中有时称为“替代性RNAi化合物”。

[0314] 实施例1:替代性RNAi化合物在体外与标准siRNA同样有效或更有效

[0315] 为了证明本发明经修饰RNAi构建体(“替代性RNAi化合物”)至少(如果不超过的话)与标准siRNA或者具有不同化学修饰的siRNA同样有效,进行下列并列比较实验。

[0316] 使用LIPOFE CTAMINE™ RNAiMAX(Invitrogen)作为转染剂,将靶向SOD1的替代性RNAi化合物(5nM)逆转染进悬浮的HEK293细胞中。在第24小时裂解细胞,使用bDNA测定(Panomics **QUANTIGENE®**)定量SOD1 mRNA水平。

[0317] bDNA测定是夹心法核酸杂交方法,其使用bDNA分子来扩增来自所捕获靶标RNA的信号。根据制造商,bDNA技术构成了FDA批准的用于HIV、HCV和HBV病毒负荷的临床诊断VERSANT 3.0测定的基础,其由Siemens以商品提供并且已经使用了十数年。bDNA测定的另一个优点是RNA直接从样品来源测量,而没有RNA纯化或酶操作,从而避免了这些过程引入的低效率和变异性或者其固有的误差。

[0318] 在该测定中,将SOD1 mRNA相对于亲和环素B(PPIB) mRNA归一化。如图2所示,“R1原始化学基团”表示双链21聚体RNAi构建体,其与起始自NCBI RefSeq ID NM 00454的436位核苷酸的SOD1 mRNA杂交。有义链和反义链的5'端都是磷酸化的,两条链的末端核苷酸均以2'-氟代和/或硫代磷酸酯连接修饰。参见图1中ID No.10105所示序列。

[0319] 经修饰2'-OMe形式的R1在图1中显示为ID号10104,其中10105的2'-F核苷酸已经被2'-O-Me取代(ID No.10104)。

[0320] ID No.10023是25聚体平末端替代性RNAi化合物,其与起始于434位核苷酸的SOD1 mRNA杂交(即在21聚体R1序列的每一端各添加两个核苷酸)。最5'端的4个核苷酸和最3'端的4个核苷酸由2'-O-甲基修饰(反义链未修饰)。

[0321] 用于siRNA或替代性RNAi化合物的相关化学基团的“MM对照”以平均值显示。如图2所示,应用2'OMe化学基团和/或延长R1序列的长度倾向于提高活性。这可以是有益的,不但因为产生2'OMe修饰的成本一般小于产生2'-F修饰,而且因为具有2'F修饰的siRNA在动物中产生毒性,而具有2'OMe的替代性RNAi化合物即使在更高剂量下仍不显示毒性。

[0322] 因此,在体外,替代性RNAi化合物至少与现有技术的2'-F修饰siRNA一样有效,或者更有效。

[0323] 实施例2:示例性SOD1替代性RNAi化合物的体外活性

[0324] 本实施例证明,靶基因上一些靶标区域(在此情况下,为SOD1基因)可以是比其他更好的靶标位点。使用LIPOFECTAMINE™ RNAi MAX (Invitrogen)作为转染剂将靶向SOD1的不同25聚体替代性RNAi化合物(5nM)逆转染进悬浮的HEK293细胞。第24小时裂解细胞,使用bDNA测定(Panomics QUANTIGENE)对SOD1 mRNA水平进行定量。将SOD1 mRNA相对于亲和环素B(PPIB)mRNA归一化。MM-10025表示化学性质匹配的错配对照。

[0325] 尽管这里测试的所有替代性RNAi化合物都具有相同的修饰化学基团(例如在两端用2'-O-甲基修饰有义链),但是,相比于化学匹配对照,初次筛选中七种替代性RNAi化合物将归一化SOD1水平降低 $\geq 90\%$,而其他替代性RNAi化合物的大多数将归一化SOD1水平降低 $\geq 60\%$ 。参见图3。

[0326] 实施例3:针对SOD1的替代性RNAi化合物

[0327] 此实施例证明了某些本发明替代性RNAi化合物(具有平末端的25聚体,有义链的每一端具有四个2'OMe)有效敲低SOD1表达。

[0328] 使用LIPOFECTAMINE™ RNAi MAX (Invitrogen)作为转染剂将靶向人SOD1的八种替代性RNAi化合物(5nM)逆转染进悬浮的HEK293细胞。第24小时裂解细胞,使用bDNA测定(Panomics **QUANTIGENE**®)对SOD1 mRNA水平进行定量。将SOD1 mRNA水平相对于亲和环素B(PPIB)mRNA进行归一化,并与设定为100的化学匹配对照相比较。MM-1025是替代性RNAi化合物化学性质的化学匹配对照。另外,给出R1的活性(经修饰21聚体siRNA序列和化学构型,参见实施例1)用以比较。MM-10032是R1的化学匹配对照。

[0329] 如图4所示,本发明替代性RNAi化合物具有针对SOD1靶基因的极佳活性。活性相对于21聚体的修饰双链体R1有所提高。这些序列还保留了针对小鼠SOD1基因的活性。

[0330] 实施例4:SOD1替代性RNAi化合物的剂量应答分析

[0331] 使用0.01nM至10nM的浓度用靶向SOD1的替代性RNAi化合物转染HEK293细胞。在这些研究中,通过向转染反应中添加非靶向性填充RNA双链体而将每种浓度下的总双链体浓度维持在25nM。根据制造商的建议,该方法使得能够以维持细胞转染的方式检测极低浓度的靶向双链体。在转染后第48小时通过QuantiGene bDNA测定检测人SOD1mRNA。替代性RNAi化合物10014已经在上述研究中测试多次,这里将其包含在内作为对照,用以比较。将本研究中测试的其他双链体鉴定单浓度实验中的命中,继续进行EC₅₀测定。双链体10011、10014

和10097是小鼠/人同源的,在小鼠和人细胞培养物中具有已证实的活性。双链体10089和10097的活性尚未在小鼠细胞中证实,但是这些双链体具有人/小鼠序列同源性。

[0332] 使用最佳转染条件的剂量滴定研究允许直接比较双链体的效力。特别地,在这些研究中鉴定到 EC_{50} 值相对于原始命中改善的以及值 $<50\text{pM}$ 的活性双链体(参见图5A)。

[0333] 图5B显示未修饰的25-bp平末端双链体(实心圆)或者本发明具有“4/4”2'-O-Me乘客链修饰的25-bp平末端双链体(空心方块)的示例性剂量滴定曲线的比较。用任一构建体分别转染人HEK293细胞。两种RNA双链体都靶向SOD1基因,其设计成在人和小鼠细胞中都同源的基因区域。在转染后48小时裂解细胞,如本文所述使用bDNA杂交测定测量mRNA水平。未修饰25-bp双链体和“4/4”2'-O-Me化学基团25-bp双链体的 EC_{50} 值分别为 $0.072\text{nM}\pm 20\text{nM}$ 和 $0.062\text{nM}\pm 0.031\text{nM}$ 。

[0334] 图5C显示在小鼠NIH3T3细胞中进行的基本相同的实验。未修饰25-bp双链体和“4/4”2'-O-Me化学基团25-bp双链体的 EC_{50} 值分别为 $0.079\text{nM}\pm 0.042\text{nM}$ 和 $0.037\text{nM}\pm 0.013\text{nM}$ 。

[0335] 这些实验显示,本发明25-bp经修饰RNA双链体的沉默活性在皮摩尔浓度范围内是一致的,相当于相同序列的未修饰25-bp双链体的沉默活性。

[0336] 实施例5:具有针对PPIB的高效力的替代性RNAi化合物

[0337] 实施例4的结果既不是位点特异性的也不是基因特异性的,因为在比较靶向SOD1基因或者亲和环素B(PPIB)基因(一种在大多数(如果不是全部的话)组织中表达的遍在基因)中其它位点的经修饰和未修饰双链体时,也观察到强基因沉默活性。

[0338] 用siRNA或替代性RNAi化合物转染HEK293细胞,孵育24小时。使用bDNA测定(Panomics)和人PPIB或SOD1特异性探针测量基因表达。通过将PPIB表达相对SOD1表达(对照基因)归一化来进行分析。使用荧光素酶siRNA或替代性RNAi化合物的阴性对照来调整百分比PPIB敲低。

[0339] 图6A显示,靶向PPIB的25聚体替代性RNAi化合物ID NO.10457(在有义链每端具有4个2'-O-Me的平末端25聚体“4/4”)保持或提高了未修饰21聚体siRNA所证明的高效力。构建体10167是来自文献的靶向PPIB的未修饰21聚体siRNA。构建体10169具有与10167相同的序列,但是在有义链的前4个和最后4个核苷酸上具有2'-O-Me修饰。

[0340] 图6B显示下列项的示例性剂量滴定曲线的比较:19-bp+2nt siRNA(图6B,实心圆);乘客链上具有2'-O-Me的19-bp+2nt siRNA(图6B,空心圆);具有2'-O-Me乘客链修饰的25-bp平末端双链体(图6B,空心方块);或者具有2'-O-Me乘客链修饰的27-bp平末端双链体(图6B,空心三角)。RNA双链体靶向PPIB基因中在人和小鼠中同源的区域。另外,所述双链体设计成不论长度均保留相同的mRNA切割位点。 EC_{50} 值为:未修饰19-bp+2nt siRNA= $0.043\text{nM}\pm 0.019\text{nM}$,具有2'-O-Me的19-bp+2nt siRNA= $0.276\text{nM}\pm 0.144\text{nM}$,25-bp双链体2'-O-Me= $0.025\text{nM}\pm 0.009\text{nM}$,27-bp双链体2'-O-Me= $0.072\text{nM}\pm 0.035\text{nM}$ 。

[0341] 在小鼠NIH3T3细胞中重复相同实验(图6C)。 EC_{50} 值为:未修饰19-bp+2nt siRNA= $0.482\text{nM}\pm 0.076\text{nM}$,具有2'-O-Me的19-bp+2nt siRNA= $1.235\text{nM}\pm 0.194\text{nM}$,25-bp双链体2'-O-Me= $0.219\text{nM}\pm 0.044\text{nM}$,27-bp双链体2'-O-Me= $0.518\text{nM}\pm 0.099\text{nM}$ 。

[0342] 实施例6:化学修饰阻止Dicer加工替代性RNAi化合物

[0343] 本申请人的关键发现之一是某些经修饰双链RNA不被Dicer切割,尽管现有技术教导称Dicer将长于21聚体的dsRNA切割为21聚体的产物。另外,本申请人显示,Dicer抗性

dsRNA的反义链可掺入RISC复合物中,用作RNA干扰的引导序列。这种Dicer抗性dsRNA的5'-端核苷酸(而不是3'端或其他核苷酸)在RISC复合物中与Dicer切割的21聚体的5'端排在一起。

[0344] 在第一个实验中,将几种RNAi双链体(包括具有不同修饰化学基团的几种25聚体替代性RNAi化合物(见下文))在有或没有重组人Dicer酶(0.5单位)(Genlantis, San Diego, CA)的情况下在37°C下在250mM NaCl、30mM HEPES (pH 8.0)、0.05mM EDTA、2.5mM MgCl₂反应缓冲液中孵育8小时。孵育后,通过加入加样缓冲液并在液氮中速冻来停止反应。将每个样品的等分试样(15pmol)在TBE缓冲液中的非变性20%聚丙烯酰胺凝胶上电泳。交替上样没有和有Dicer酶样品,如凝胶顶部所示。如图7所示,与没有修饰的25聚体平末端双链体相反,平末端25聚体双链体的多种2'-O-Me修饰抵抗了Dicer的切割。

[0345] 这表明,替代性RNAi化合物双链体将在细胞中作为均一物质发挥功能,而不是被切割成多种不同的21聚体双链体或其他较短的物质才具有活性。这些发现对于临床开发来说具有重要的意义,因为活性药物是单一物质。这与目前认为长于21聚体的双链体被加工成该长度的模型是不同的。此外,来自在双链体RNA的一侧显示修饰的27聚体双链体的数据显示出加工。例如,Kubo等(Oligonucleotides 17 (4):445-464,2007)显示,dicer将加工在相同侧具有修饰的长双链体。

[0346] 这里,本申请人证明了,较长dsRNA的某些有义链和/或反义链修饰(例如在序列的某一端具有4x2'-O-甲基修饰的平末端25聚体双链体)不被Dicer酶切割。注意到,本文所述的其他修饰策略也可消除被Dicer切割的能力。一般在有义链的5'和3'端均包含修饰。

[0347] 实施例7:载有替代性RNAi化合物的Ago2的免疫沉淀的Northern印迹

[0348] 本实施例证明了,本发明的Dicer抗性dsRNA加载到RISC复合物上,并具有基因沉默活性。

[0349] 用25聚体(表4中的10174)或26聚体(表4中的10175)替代性RNAi化合物双链体转染稳定表达myc-Ago2的293S细胞(Hannon Lab, CSHL惠赠)。24小时后,收集细胞裂解物,使用缀合有抗c-myc抗体(Sigma)的琼脂糖珠进行免疫沉淀,以沉淀myc-Ago2蛋白。使载入Ago2的RNA沉淀,加样至15%聚丙烯酰胺凝胶。凝胶上包含21-26nt的³²P末端标记的单链RNA标记,以确定大小。将RNA从聚丙烯酰胺凝胶转移到尼龙膜,并将其UV交联至膜上。将该膜与对所转染的替代性RNAi化合物具有特异性的³²p标记LNA探针一起过夜孵育。清洗后,使用磷光成像系统(Fuji BAS-2500)显现印迹(图8A)。

[0350] 该结果进一步支持以下结论:25聚体或26聚体替代性RNAi化合物不作为RNAi加工的一部分被Dicer切割。另外,发现25聚体和26聚体双链体与RISC复合物中的RNAi沉默性Ago2相关联。序列在表4中显示。

[0351] 在相似的实验中,用多种针对SOD1的双链体(例如无修饰的21聚体;无修饰的25聚体;以及具有4/4 2'-O-Me修饰的25聚体)转染表达c-myc Ago2的293细胞。收获细胞、裂解,如上所述对c-myc Ago2进行免疫沉淀。免疫沉淀后,提取IP级分中的RNA并沉淀。将RNA上样至变性聚丙烯酰胺凝胶,转移到尼龙膜,如本文所述使用对所转染RNA双链体引导链具有特异性的LNA探针进行检测。

[0352] 图8B显示SOD1靶向性RNA双链体之引导链的Northern印迹。将单链RNA与所捕获的引导链RNA并排电泳。大小标记以下划线显示,对应于21至25nt长的大小。通过与21-25nt的

单链RNA标记进行比较,确定两种所测25-bp双链体的Ago2:RISC相连引导链为25nt长。这些数据证实,经修饰引导链以全长形式结合Ago2:RISC。在该研究中注意到,未修饰25-bp双链体未被有效切割成预计由细胞中有效Dicer加工产生的较小产物。因为这些经改造293细胞系显著过表达c-myc标记的Ago2蛋白,因此Ago2:RISC复合物的丰度有可能导致RNA双链体在能够被Dicer加工之前加载。

[0353] 通过在免疫沉淀前测定细胞裂解物等分试样中靶标mRNA的减少,来证实这些细胞中的高活性。图8C显示转染表达c-myc Ago2的293细胞后的SOD1表达。在c-myc Ago2免疫沉淀之前,取一部分细胞裂解物用纯化细胞总RNA。如方法中所述,纯化RNA,使用bDNA测定来测量基因表达。将SOD1表达水平相对于PPIB归一化,相对于萤光素酶靶向对照双链体进行调节。转染SOD1靶向RNA双链体的终浓度为25nM。实施例8:使用纯化RISC进行合成底物的mRNA切割测定

[0354] 本实施例证明了,替代性RNAi化合物中Dicer抗性反义链(引导链)的5'端与Dicer切割产物(21聚体)的5'端对齐,(靶标mRNA上的)切割位点在引导序列5'端起的第10和11核苷酸之间。

[0355] 在一个实验中,用几种替代性RNAi化合物双链体(10023和10174)以及21聚体经修饰dsRNA 10036(R1)转染稳定表达myc-Ago2的293S细胞(Hannon Lab,CSHL惠赠)。24小时后,收集细胞裂解物,使用缀合有抗c-myc抗体(Sigma)的琼脂糖珠进行免疫沉淀。将免疫沉淀(IP)样品在37℃下与合成的放射性标记的50nt底物孵育2小时(表5)。然后,在15%聚丙烯酰胺凝胶上将样品进行电泳,用磷光成像仪(Fuji BAS-2500)成像。

[0356] 注意到,相比于R1/10036,25聚体替代性RNAi化合物10023具有4个额外的5'端,因此其预计切割产物将比10036长4个核苷酸。相比于R1/10036,25聚体替代性RNAi化合物10174具有4个额外的3'端核苷酸,但5'端相同,因此其预计切割产物与10036相同。

[0357] 对于长于21nt的非Dicer加工的双链体,靶标合成底物的切割在从反义链5'端起10nt的均一位点进行(数据未显示)。具有单一的切割位置,其不产生一系列条带,而是产生一个产物条带。该结果与活性双链体的设计有关,并且使得能够根据对切割位置的了解将化学基团和序列修饰定位在任何长度的双链体上。这一结果确定了关键残基。

[0358] 设计成引导SOD1基因上不同位点的切割的三种其他双链体进一步证实了这一结果(参见图9A和9B)。具体地,化学合成了合成底物,以对应于SOD1基因中含有所测RNA双链体靶序列的50nt区域。图9A是合成底物以及预计切割位置和产物的示意图。在图9B中,如方法中所述,将靶向SOD1的RNA双链体转染进表达c-myc Ago2的293细胞中。收获细胞、裂解,免疫沉淀c-myc Ago2,在缓冲液中重构。如方法中所述,将免疫沉淀与50nt 32-P标记的合成底物在30℃下孵育2小时。孵育2小时后,将样品与大小标记(下划线显示)上样于变性聚丙烯酰胺凝胶。样品字母对应于示意图a中所示的下列双链体。A=未修饰19-bp+2nt siRNA,B=未修饰25-bp双链体,C=具有4/4 2'OMe的25-bp双链体,D=具有4/4 2'OMe的25-bp双链体,E=萤光素酶对照双链体。

[0359] 实施例9:化学修饰阻止Dicer加工

[0360] 上述研究显示,25-bp RNA双链体能够实现有效的基因沉默,完全加载进Ago2:RISC中,并切割引导链的10位核苷酸相对的预定靶标。上述研究显示,核酸的甲基化修饰可阻止核酸内切酶活性,有可能抑制Dicer加工大于21-bp的双链体的能力。为了研究这些化

学修饰RNA双链体的Dicer加工,测试一组修饰结构对体外Dicer切割的敏感性(图17A)。因为活性和靶标特异性由载入RISC的引导链序列的5'位置确定,所以对切割产物的了解(如果有的话)将帮助阐明Dicer加工在RNAi活性中的作用。

[0361] 在乘客链的两端(5'和3')用不同数量的2'OMe核苷酸修饰靶向SOD1基因的一系列双链体。将这些双链体与重组人Dicer酶一起孵育,对加工进行分析(图17B)。未修饰25-bp双链体和乘客链的两端各具有一个2'OMe修饰的双链体(1/1)被完全加工成21-bp siRNA产物。在本研究中,乘客链的两端各具有两个2'OMe的双链体(2/2)显示在这些条件下(16小时孵育)部分被加工,约30%的双链体保持未加工(图17C)。但是,在乘客链的两端各具有3个或4个2'OMe修饰核苷酸的双链体(3/3或4/4)不被Dicer酶加工。

[0362] 已有报道称,Dicer底物两条链的3'端上保护基的存在可以阻断加工。研究了带有额外修饰结构的这一相同SOD1靶向双链体序列的Dicer加工。所测试的结构包括双链体每个链(乘客链或引导链)的两个5'端、两个3'端或者两端(5'和3')上的四个2'-O-Me修饰。所有这些修饰模式都阻断Dicer加工(图17D)。使用靶向SOD1基因中不同序列的2'-O-Me修饰的25-bp双链体获得了类似结果(图17E)。具体地,将靶向人SOD1序列的25-bp双链体(参见表4)与Dicer酶一起孵育16小时,如本文所述加样至TBE-聚丙烯酰胺凝胶。通过SYBR green染料和UV透射仪对凝胶进行显影。所述序列在双链体的两端均具有高GC碱基含量,其有助于更强的核酸酶抗性。“M”表示本文所述的市售siRNA标记。

[0363] 实施例9:含2'OMe的替代性RNAi化合物的活性比较

[0364] 本实施例描述了本发明替代性RNAi化合物构建体的许多可能设计,并提供了多种含2'OMe替代性RNAi化合物的示例性活性比较数据。

[0365] 如图10B所示,将具有化学修饰的基于10015或10023序列的多种替代性RNAi化合物(参见图10A)进行比较。例如,如图10B所示,“0811”表示有义链的008化学基团和反义链的011化学基团。为了比较,0111(即001-011)是许多先前的例子中所用的原始替代性RNAi化合物筛选化学基团。结果显示,一些修饰导致在降低SOD1活性水平方面的高活性(图11)。

[0366] 替代性RNAi化合物的有义链上不同数量的2'OMe修饰的活性比较。为了研究有义链上2'OMe的位置对给定双链体活性程度的影响,将具有有义链上不同数量的2'OMe修饰的基于10015或10023序列的多种替代性RNAi化合物进行比较(图12A、12B、12C)。所有双链体均具有未修饰反义链(即化学基团011,参见图10B)。图12A显示沉默SOD1相对于PPIB(管家基因)归一化的相对活性。图12B和12C是视图,其显示2'OMe的位置(相对于反义链编号),以及与原始001化学基团的比较(参见图10B)。该图显示每个双链体的活性,以高于或低于011化学基团相对百分比的形式。对应于025、024、009、036、021、010、039、033和008的10015序列的ID(图12B)显示更好的活性,选择一些进行进一步活性分析。10023序列的类似分析也显示于图12C中。

[0367] 本研究通过将不同的链定制退火在一起并用5nM双链体转染HEK293细胞来进行。转染后24小时使用bdNA测定测量针对SOD1的双链体的活性,相对于PPIB进行归一化。如上所述的作用机理研究允许预测放置其他修饰以改进活性和功能性。

[0368] 具有不重叠序列的两种构建体(10015和10023)的结果在所测特异性修饰化学基团方面非常一致(例如019化学基团修饰的10015与019化学基团修饰的10023具有基本相同的结果,等等)。这表明,修饰化学基团(而不是靶序列)是所观察到的RNAi介导基因沉默差

异的主要原因。

[0369] 鉴定了几个优选的有义链修饰方案,本申请人如下继续测试了几个有义-反义修饰组合。

[0370] 不同2'OMe修饰模式的活性比较。继续测试基于10015或10023序列的多种替代性RNAi化合物,以作为广泛的仅有关义2'OMe分析的继续。图13A(24小时)和13B(48小时)显示相对于PPIB(管家基因)归一化的沉默性SOD1的相对活性。图14C和14D是可视图,显示2'OMe(相对于反义链编号)的相对位置以及与原化学基团(001)的比较。该图是彩色的,以表示双链体上存在的反义化学基团的类型。这些图中所示的活性是相对于001-011的(原始替代性RNAi化合物)。在本实验中,对应于含具有042化学基团(2位的2'OMe)反义链双链体的ID显示更好的活性。

[0371] 本实验通过将不同的链定制退火在一起并用5nM双链体转染HEK293细胞来进行。转染后24或48小时使用bDNA测定测量针对SOD1的双链体的活性,相对于PPIB进行归一化。如上所述的作用机理研究允许我们安排其他修饰以改进活性和功能性。

[0372] 这些结果证实,有义链上增加的2'OMe修饰实现了更好的或相当的活性。另外,还有具有改善活性的有利特征的额外设计。我们出人意料地发现,5'端的12个2'OMe和3'端的10个2'OMe对25聚体有义链的修饰(即有义化学基团039)导致活性增加。这种几乎完全修饰的形式在多于一种双链体中和多于项研究中提高了活性。发现在上述研究中增加活性的下列化学基团以高亮显示:

[0373] • 001-011

[0374] • 001-042

[0375] • 001-013

[0376] • 039-011

[0377] • 039-042

[0378] • 039-013

[0379] • MM001-011

[0380] 此外,如图14D所示,反义链的2位核苷酸上的修饰显示使活性增加。已有报道称反义链2位核苷酸上的修饰提高了靶标切割的特异性,使mRNA减少更局限在靶基因处。

[0381] 另外,有义链中与5'反义序列中2-8位核苷酸相对的错配(化学基团MM001)允许更有效的装载进RISC复合物。我们证实了,有义链3'上2位核苷酸的错配导致更有效的mRNA减少活性。上文所述作用机制的研究允许将修饰正确安置在未被Dicer加工的长于21nt的双链体。

[0382] 实施例10:体外稳定性测定

[0383] 本实施例显示,除了上文所述益处之外,本发明替代性RNAi化合物构建体在血清中更加稳定,因此预计具有更好的体内效力。

[0384] 将具有所示多种修饰的基于序列10023(图14A)或10015(图14B)的双链体在10%人血清中在37°C下孵育多至2小时(在图下方以分钟显示)。用氯仿猝灭样品,将水相在20%TBE凝胶中进行电泳。用SYBR green对凝胶染色。“M”表示siRNA标记(25聚体、21聚体、17聚体双链体),而“C”显示未在血清中孵育的双链体。对于10015序列,在相同条件下,所有修饰都导致比未修饰的811双链体更稳定的双链体(008有义化学基团、011反义化学基团)。替代

性RNAi化合物修饰111(即001有义、011反义)是所测的最稳定的之一。有义链上具有039化学基团的修饰(3911)也使得双链体稳定,并显示活性增加。但是,在相同条件下,相比于未修饰序列(811),10023序列的修饰不改变稳定性。相比于其他修饰,039修饰(3911)显示对降解的中等抑制(将主要降解产物的强度与全长进行比较)。

[0385] 实施例11:在无Dicer的情况下使用21-27bp双链体的RNAi

[0386] 本实施例证明,实现21-27bp双链体的RNAi不需要Dicer。这里,研究了缺乏Dicer酶的小鼠胚胎干细胞系中靶基因的沉默(Murchison等,2005),使得能够更直接地测试Dicer在合成的化学修饰双链体的RNAi中的作用。用RNA双链体转染Dicer纯合空白(-/-)或杂合(+/-)突变体细胞,对靶mRNA的减少进行定量。

[0387] Dicer酶纯合空白或杂合的小鼠来源胚胎干细胞由Murchison及其同事产生,如前所述培养(Murchison等,2005)。将前述条件针对本文所述的96孔剂量应答方法进行修改,以进行剂量应答转染(Schaniel等,2006)。靶向与小鼠SOD1有100%同源性的SOD1基因的活性RNA双链体以0.05nM至10nM的浓度范围转染,RNA终浓度25nM。使用非靶性对照双链体的DY547标记形式监测转染效率。转染后,孵育细胞48小时,如上所述使用QuantiGene bDNA杂交测定(Panomics)来测定基因沉默活性。

[0388] 图15A中的柱表示根据bDNA杂交测定所测量的转染后48小时SOD1mRNA水平。将SOD1表达水平针对PPIB基因进行归一化,调节为萤光素酶对照双链体的百分比。所测试的三种双链体是:19-bp+2nt siRNA(实心白色柱)、25-bp平末端未修饰双链体(黑色实心柱)以及具有“4/4”2'-O-Me修饰的25-bp平末端双链体(条纹柱)。本研究所用的确切序列显示于图15B。

[0389] 与之前发表的数据相一致,19-bp+2nt siRNA双链体有效沉默靶基因(Murchison等,2005)。有趣的是,25-bp双链体(经修饰和未修饰的)在Dicer缺陷细胞中以至少相同的效率沉默靶基因(图15A)。事实上,相比于含有Dicer蛋白的细胞,基因沉默活性在Dicer缺陷细胞中略微更高。此结果可解释如下:Dicer缺陷细胞没有内源miRNA竞争占据Ago2:RISC,因此转染的双链体可显得更有效。这些结果证实RNA双链体的有效沉默不需要Dicer。

[0390] 通过测试针对PPIB基因的序列,将此结果扩展至最多27-bp长的双链体(图16A)。在此处,实心白色柱是19-bp+2nt siRNA,点状柱是未修饰25-bp双链体,实心黑色柱是2'-O-Me化学基团的25-bp双链体,条纹柱是具有2'-O-Me化学基团的27-bp双链体。在Dicer缺陷型细胞中,沉默活性产生与SOD1靶向双链体所见相似的结果。序列在图16B中显示。

[0391] 方法

[0392] 实施例中使用的某些方法在下文中提供,仅用于说明的目的。

[0393] 化学合成RNA。通过整合DNA技术或ThermoFisher Dhannacon产品合成单链RNA。如下形成RNA双链体:混合等摩尔比例的单链RNA,在90°C下孵育1分钟,然后在37°C下孵育1小时。所有单链RNA和RNA双链体均保存在-20°C下。RNA序列信息参见表3和表4。

[0394] 剂量应答转染。在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的Dulbecco修改的Eagle培养基(DEME)中培养HEK293细胞(ATCC)。在含有10%小牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM中培养NIH3T3细胞(ATCC)。根据ATCC的建议,所有细胞在37°C、10%CO₂下孵育。根据制造商所述和优化的条件,以剂量依赖性形式(0.005nM至5nM)使用Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)试剂逆转染RNA双链体。将RNA双链体与非靶向性对照双链体复合,产

生所终浓度25nM的转染RNA双链体。非靶向性的化学基团及长度匹配的对照双链体靶向萤光素酶基因。使用不含抗生素的培养基在96孔板中进行转染,在正常培养条件下孵育48小时。使用QuantiGene bDNA杂交测定 (Panomics) 测量基因沉默。裂解细胞,在制造商所述的测定条件下测量mRNA水平。使用物种特异性探针组 (Panomics) 测定SOD1基因和PPIB基因的基因表达。将基因表达值相对于PPIB基因归一化,后者由于表达不受SOD1沉默的影响而用作看家基因对照。将百分比沉默和EC₅₀值是基于非靶向对照双链体的归一化SOD1表达。使用KaleidaGraph (Synergy Software) 计算所述值并作图。

[0395] Argonaute-2免疫沉淀以及从RISC中提取复合的RNA。如所述将RNA双链体退火,转染进稳定表达c-myc Ago2的293T细胞 (Hannon lab, Cold Spring Harbor Labs)。在0.5ug/ml G418存在下,如上所述培养293细胞,以选择性表达c-myc Ago2。根据制造商所述,使用Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 在10cm平板中进行RNA双链体的转染。在不含抗生素的培养基中转染细胞, RNA双链体的终浓度为25nM。孵育细胞48小时,然后收获并免疫沉淀 (IP) c-myc Ago2。如前所述进行细胞收获和IP。从平板收获细胞,用1×PBS清洗一次,用2ml低渗裂解缓冲液 (HLB) (10mM Tris pH 7.5, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM DTT, 和蛋白酶抑制剂) 清洗一次。然后,在0.5ml HLB中重构细胞,使之在冰上膨胀15分钟。取一部分细胞裂解物 (50ul), 加至200ul Trizol (Invitrogen) 中,用于随后使用QuantiGene bDNA杂交测定 (Panomics) 进行基因沉默测定。将细胞裂解物添加至具有紧密研棒的1ml杜恩斯匀浆器中,在冰上将细胞进行30次冲击的匀浆。通过离心 (14000rpm, 4℃下30分钟) 使细胞裂解物澄清,将上清液转移至新管。向上清液或胞浆级分中加入1ml缓冲液 (LB650) (0.5% NP40, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 20mM Tris pH 7.5, 5mM DTT, 650mM KCl, 和蛋白酶抑制剂)。向每个管中加入缀合有琼脂糖珠 (Sigma) 的抗c-myc抗体,将管在4℃下转动孵育过夜。过夜孵育之后,以3000rpm将IP反应物离心2分钟,然后将所述珠在LB650缓冲液中清洗三次。清洗珠之后,加入200ul Trizol (Invitrogen), 以将RNA与捕获Ago2的抗体解离。按照制造商的说明所述,沉淀RNA,然后用乙醇清洗。在20ul TE缓冲液中重构RNA。

[0396] 从Ago2免疫沉淀捕获的RNA的Northern印迹。将RNA上样于15%聚丙烯酰胺TBE-尿素变性凝胶。将之前标记的21至25nt的³²P末端大小标记与IP反应物并行电泳,以确定所捕获RNA的大小。将凝胶转移至尼龙膜,对RNA进行UV交联。使用UltraHyb-Oligo缓冲液 (Ambion) 将膜在42℃下预杂交30分钟,然后向杂交缓冲液中加入之前制备的与引导链互补的³²p标记封闭的核酸探针。在42℃下过夜孵育之后,在清洗缓冲液 (1X SSC缓冲液, 0.1% SDS) 中将膜清洗两遍。通过曝光于BioMAX放射自显影胶片 (Kodak) 来显示印迹。使用自显影胶片冲洗装置对胶片进行显影。

[0397] mRNA切割定位测定。如上所述,用RNA双链体转染表达c-myc Ago2的293细胞。也如上所述进行Ago2的免疫沉淀。最终的清洗后,将含有加载了转染RNA之Ago2复合物的琼脂糖珠在10ul缓冲液 (100mM KCl, 2mM MgCl₂和10mM Tris pH 7.5) 中重构。对与所转染25-bp双链体或19-bp+2nt siRNA靶向的人SOD1基因50nt区域匹配的化学合成的合成底物进行³²p-5'端标记以及凝胶纯化。将合成底物特别设计成具有对应于19-bp+2nt siRNA或25-bp双链体的引导链中10位的21位碱基。对标记的RNA进行凝胶纯化,并在异丙醇中沉淀。将切割反应设置为20ul终体积。将IP反应物 (10ul) 添加到4ul标记的合成底物、1ul RNAsin和5ul缓冲液 (100mM KCl, 2mM MgCl₂和10mM Tris pH 7.5) 中。将反应物在30℃下孵育2小时。孵育

之后,将所述反应物在15%聚丙烯酰胺TBE-尿素凝胶上电泳。将凝胶针对放射自显影胶片进行曝光,使用如上所述的方法显影。使用在与切割测定反应物并行电泳的³²p标记大小标记RNA确定切割产物的大小。

[0398] Dicer加工测定。根据制造商的建议以及之前所述的条件,将RNA双链体与重组人Dicer酶(Genlantis)一起孵育。在有和没有Dicer酶的情况下,在37°C下将样品孵育过夜(~16小时)。添加TBE凝胶上样缓冲液停止反应,在液氮中速冻。将已终止反应的一部分(16pmol)在非变性TBE缓冲的20%聚丙烯酰胺凝胶上电泳。将siRNA标记(New England Biolabs)在凝胶上与样品并行电泳。使用SYBR Green II(Invitrogen)将凝胶染色20分钟,然后使用UV透射仪和CCD照相机显影。使用UVP BioChem成像工作站和Lab Works软件(UVP)进行UV成像和相对定量分析。

[0399] Dicer缺陷型细胞的转染。如前所述产生和培养Dicer缺陷型细胞。通过修改之前所述的条件以适应如上所述96孔剂量应答方法来进行剂量应答转染。将靶向与小鼠SOD1有100%同源性的人SOD1基因的RNA双链体以0.05nM至10nM的浓度范围进行转染。使用DY547标记的对照双链体监测转染效率。转染后,孵育细胞48小时,然后如上所述使用QuantiGene bDNA杂交测定(Panomics)来测定基因沉默活性。裂解细胞,如上所述根据制造商的建议进行测定。

[0400] 表3

[0401]

序列名	极性	序列(5'→3')
图9		
A (11892)	PS	G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.U.U
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U
B (11893)	PS	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
C (11897)	PS	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA

[0402]

	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
D (10357)	PS	mA.mG.mG.mU.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.mA.mA.mG
	GS	C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U
E (10461)	PS	mG.mC.mA.mC.U.C.U.G.A.U.U.G.A.C.A.A.A.U.A.C.G.mA.mU.mU
	GS	A.A.A.U.C.G.U.A.U.U.U.G.U.C.A.A.U.C.A.G.A.G.U.G.C
图15B		
19-bp + 2nt 双链体 (11892)	PS	G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.U.U
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U
0 / 0 (11893)	PS	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
4 / 4 (11897)	PS	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
图17B		
0 / 0 (11893)	PS	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
1 / 1 (11894)	PS	mG.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
2 / 2 (11895)	PS	mG.mG.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.mU.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
3 / 3 (11896)	PS	mG.mG.mC.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.mG.mU.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
4 / 4 (11897)	PS	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA

[0403]

	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
图17D		
4/4 PS (11897)	PS	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
4/4 AS (11904)	PS	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	GS	mU.mA.mC.mU.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.mU.mG.mC.mC
4/0-4/ 0 (11906)	PS	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	GS	mU.mA.mC.mU.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
0/4-0/ 4 (11907)	PS	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA
	GS	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.mU.mG.mC.mC

[0404] 表4

[0405]

序列名	极性	序列 (5' → 3')
图6C		
19-bp + 2 nt 未修饰 (10167)	PS	G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.A.A.A.U.U
	GS	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.U.U
19-bp + 2 nt, 带有 2'OMe (10459)	PS	mG.mG.mA.mA.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.A.A.mA.mA.mU.mU
	GS	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.U.U
25聚体, 带有 2'OMe (10460)	PS	mC.mU.mC.mU.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.mA.mA.mA.mA
	GS	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.G.A.A.G.A.G
27聚体, 带有	PS	mG.mU.mC.mU.C.U.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.mA.mA.mA.mA

[0406]

2'OMe (10462)		
	GS	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.G.A.A.G.A.G.A.C
实施例7		
10036	PS	C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C
	GS	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
10023	PS	mG.mC.mC.mG.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.mU.mC.mU.mG
	GS	C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
10174	PS	mU.mG.mU.mG.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.mA.mG.mA.mU
	GS	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A
10175	PS	mG.mU.mG.mU.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.mA.mG.mA.mU
	GS	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C
图17E		
19-bp + 2 nt siRNA (10036)	PS	C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C
	GS	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
25-bp 4 / 4 仅有义 (10023)	PS	mG.mC.mC.mG.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.mU.mC.mU.mG
	GS	C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
25-bp 0 / 0 (10777)	PS	G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G
	GS	C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C

[0407] 表5

[0408]

序列名	序列 (5' → 3')
大小标记	
21 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAU
22 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAUU
23 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAUUU
24 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAUUUA

[0409]

25 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAUUUAA
26 nt	AGAGCAGUGGCUGGUUGAGAUUUAAU
合成底物	
合成底物 图9A	ACUUGGGCAAAGGUGGAAAUGAAGAAAGUACAAAGACAGGAAACGCU GGA
合成底物 实施例8	GAUGGUGUGGCCGAUGUGUCUAUUGAAGAUUCUGUGAUCUCACUCUC AGG

[0410] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0411] 1.用于抑制靶基因表达的长度为12至49个核苷酸的双链RNA (dsRNA) 构建体,所述dsRNA包含:

[0412] (1) 具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'修饰的核糖,和,

[0413] (2) 具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链在从该反义链5'端起的第二个核苷酸处包含2'修饰的核糖,

[0414] 其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC结合,并且(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0415] 2.用于抑制靶基因表达的长度为12-49个核苷酸的双链RNA (dsRNA) 构建体,所述dsRNA包含:

[0416] (1) 具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'修饰的核糖,和,

[0417] (2) 具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交以及与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链在该反义链的3'端包含:

[0418] (i) 具有不可水解的核苷酸间连接的至少四个连续的2'-修饰核糖,

[0419] (ii) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个2'修饰的核糖,优选2'-O-甲基修饰的核糖,或,

[0420] (iii) 保护基,

[0421] 其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC结合,并且(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0422] 3.用于抑制靶基因表达的长度为12-49个核苷酸的双链RNA (dsRNA) 构建体,所述dsRNA包含:

[0423] (1) 具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各有一个或多个核苷酸具有2'修饰的核糖,并且所述有义链在从该有义链3'端起的第二个核苷酸处包含错配核苷酸,和,

[0424] (2) 具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,

[0425] 其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC结合,并且(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0426] 4.用于抑制靶基因表达的长度为12-49个核苷酸的双链RNA(dsRNA)构建体,所述dsRNA包含:

[0427] (1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链的所述5'和3'端各存在四个连续的2'-O-甲基核苷酸,和,

[0428] (2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链:

[0429] (a)包含具有硫代磷酸酯连接的至少四个连续2'-O-甲基修饰的3'端核苷酸;或,

[0430] (b)在5'端第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且没有其他经修饰核苷酸,

[0431] 其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC结合,并且(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0432] 5.用于抑制靶基因表达的长度为12-49个核苷酸的双链RNA(dsRNA)构建体,所述dsRNA包含:

[0433] (1)具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链在5'端和3'端分别包含12个和10个连续的2'-O-甲基核苷酸,和,

[0434] (2)具有5'端和3'端的反义链,其与所述有义链杂交并与所述靶基因的mRNA杂交,其中所述反义链:

[0435] (a)是未修饰的;

[0436] (b)包含具有硫代磷酸酯连接的至少四个连续的2'-O-甲基修饰3'端核苷酸;或,

[0437] (c)在5'端第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且没有其他经修饰核苷酸,

[0438] 其中(a)所述dsRNA对Dicer的切割有抗性,(b)所述反义链与RISC结合,并且(c)所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0439] 6.根据权利要求1-5中任一项的dsDNA,其中所述反义链指导靶基因mRNA在从反义链5'端起第10和第11个核苷酸之间的单个位点发生均一切割。

[0440] 7.根据项1-5中任一项的dsDNA,其中所述dsRNA的有义链可在从有义链3'端起第10和第11个核苷酸之间的单个位点被RISC切割。

[0441] 8.根据项1-5中任一项的dsDNA,其中所述dsRNA构建体是平末端的。

[0442] 9.根据项1-4中任一项的dsDNA,其中所述有义链的5'端12个核苷酸和3'端10个核苷酸是2'-修饰的核糖。

[0443] 10.根据项1-5中任一项的dsDNA,其中所述有义链的每一端包含一段连续的2'-修饰核糖。

[0444] 11.根据项1-5中任一项的dsDNA,其中所述有义链的每一端包含一段连续的四个2'-修饰核糖。

[0445] 12.根据项1-3中任一项的dsDNA,其中所述反义链包含不连续的2'-修饰核糖,其中第10和第11个反义核苷酸是未修饰的。

[0446] 13.根据项12的dsRNA,其中反义链的2、3、4、5、6、7、8或9个核苷酸各包含2'-修饰

的核糖。

- [0447] 14. 根据项13的dsRNA,其中反义链上最靠近5'端的2'-修饰核糖是第二个核苷酸。
- [0448] 15. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述dsRNA构建体的长度是:12-35个核苷酸;25-30个核苷酸;25、26、27、28、29或30个核苷酸;>22个核苷酸;>25个核苷酸;或者31-49个核苷酸。
- [0449] 16. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述有义链的每一端各自独立地包含4至16个2'-修饰核糖和/或不可水解的核苷酸间连接。
- [0450] 17. 根据项16的dsRNA,其中所述有义链的每一端各包含对称或不对称数目的2'-修饰核糖。
- [0451] 18. 根据项16的dsRNA,其中所述2'-修饰核糖是2'-O-烃基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-H(脱氧核糖核苷酸)或其组合。
- [0452] 19. 根据项18的dsRNA,其中所述2'-O-烃基核苷酸是2'-O-甲基核苷酸。
- [0453] 20. 根据项18的dsRNA,其中所述2'-O-烃基核苷酸是2'-O-烯丙基核苷酸。
- [0454] 21. 根据项1和3-5中任一项的dsRNA,其中所述反义链在该反义链5'端的第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且没有其他经修饰核苷酸。
- [0455] 22. 根据项21的dsRNA,其中所述dsRNA与在所述位置没有2'修饰的相似构建体相比具有增强的靶标特异性或降低的脱靶沉默。
- [0456] 23. 根据项1和3-5中任一项的dsRNA,其中所述反义链包含具有硫代磷酸酯连接的至少四个连续的2'-O-甲基修饰的3'端核苷酸。
- [0457] 24. 根据项1、4和5中任一项的dsRNA,其中所述dsRNA的有义链在从该有义链的3'端起第二个核苷酸处包含错配核苷酸。
- [0458] 25. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述dsRNA与具有相同序列的未修饰dsRNA相比具有提高的血清和/或脑脊液稳定性。
- [0459] 26. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述有义链3'端的最后2至8个核苷酸与其相应反义链核苷酸错配。
- [0460] 27. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述dsRNA在原代细胞中不诱导干扰素应答。
- [0461] 28. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述有义链的任一端和/或所述反义链的3'端被保护基封闭。
- [0462] 29. 根据项28的dsRNA,其中所述保护基是倒置的核苷酸、倒置的无碱基部分或者氨基端修饰的核苷酸。
- [0463] 30. 根据项29的dsRNA,其中所述倒置的核苷酸包括倒置的脱氧核苷酸。
- [0464] 31. 根据项29的dsRNA,其中所述倒置无碱基部分包括倒置的脱氧无碱基部分。
- [0465] 32. 根据项31的dsRNA,其中所述倒置的脱氧无碱基部分是3',3'-连接的或5',5'-连接的脱氧无碱基部分。
- [0466] 33. 根据项1或3的dsRNA,其中有义链和/或反义链末端的核苷酸交替包含2'-修饰核糖,并且其中每一个2'-修饰核糖对着相对链上的未修饰核苷酸。
- [0467] 34. 根据项33的dsRNA,其中第一个2'-修饰反义核苷酸是最靠近5'端的反义核苷酸或者从反义链5'端起的第二个核苷酸。

- [0468] 35. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述靶基因是SOD1、PPIB、RIP140、PCSK9、TNF α 、AP2(脂肪细胞脂质结合蛋白)或者MAP4K4。
- [0469] 36. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中2'修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸是2'-F修饰的。
- [0470] 37. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中2'修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸是嘌呤核苷酸,任选地具有2'-F修饰和/或硫代磷酸酯连接。
- [0471] 38. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中2'修饰核糖核苷酸之间的有义链核苷酸形成一个或多个各为1-5个核苷酸的凸出。
- [0472] 39. 根据项10的dsRNA,其中每一段所述连续的2'修饰核糖核苷酸独立地起始自末端核苷酸、末端核苷酸起的第二个核苷酸或者末端核苷酸起的第三个核苷酸。
- [0473] 40. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述反义链中50%-100%的嘧啶核苷酸独立地是2'-F修饰的或者2'-O-甲基修饰的。
- [0474] 41. 根据项1-5中任一项的dsRNA,其中所述反义链的5'端是磷酸化的。
- [0475] 42. 用于抑制靶基因表达的RNA构建体,其中所述构建体与项1-41中任一项的dsRNA相同,差别仅在于有义链上的单个缺口。
- [0476] 43. 根据项42的RNA构建体,其中所述缺口占据与距反义链5'端约10个碱基的核苷酸相对的位置。
- [0477] 44. 根据项42的RNA构建体,其中所述缺口占据与距反义链5'端约5-15个碱基的核苷酸相对的位置。
- [0478] 45. 根据项42-44中任一项的RNA构建体,其中每个双链体区域的 ΔG 小于约-13kcal/mol。
- [0479] 46. 载体,其表达项1-5中任一项所述dsRNA的至少一条链。
- [0480] 47. 细胞,其包含项46的载体或项1-5中任一项的dsRNA。
- [0481] 48. 根据项47的细胞,其中所述细胞是培养的哺乳动物细胞。
- [0482] 49. 根据项47的细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [0483] 50. 组合物,其包含项1-5中任一项的dsRNA以及可药用载体或稀释剂。
- [0484] 51. 用于抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括使所述哺乳动物细胞与项1-5中任一项的dsRNA构建体相接触。
- [0485] 52. 根据项51的方法,其中所述哺乳动物细胞是培养的细胞。
- [0486] 53. 根据项51的方法,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。
- [0487] 54. 根据项51的方法,其中所述哺乳动物细胞在递送试剂存在下进行接触。
- [0488] 55. 根据项54的方法,其中所述递送试剂是脂质。
- [0489] 56. 根据项55的方法,其中所述脂质是阳离子脂质。
- [0490] 57. 根据项54的方法,其中所述递送试剂是脂质体。
- [0491] 58. 用于抑制哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,其包括使所述哺乳动物细胞与表达项1-5中任一项所述dsRNA构建体的至少一条链的载体相接触。
- [0492] 59. 改进小干扰RNA(siRNA)的基因沉默作用的方法,其包括修饰所述siRNA的有义和/或反义核苷酸,以变成项1-5中任一项的dsRNA构建体。
- [0493] 60. 对siRNA构建体向靶位点的体内递送进行评估的方法,其包括将该siRNA构建体

与靶向PPIB的项1-5中任一项所述dsRNA构建体共递送,以及测定靶位点处PPIB功能的抑制,其中在靶位点处PPIB功能的成功抑制指示siRNA构建体成功体内递送至靶位点。

[0494] 参考文献

[0495] 1.Chu,C.Y.&Rana,T.M.Small RNAs:regulators and guardians of the genome.J.Cell.Physiol.213,412-419 (2007) .

[0496] 2.Choung,S.,Kim,Y.J.,Kim,S.,Park,H.O.&Choi,Y.C.Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy.Biochem.Biophys Res.Commun.342,919-927 (2006) .

[0497] 3.Chiu,Y.L.&Rana,T.M.siRNA function in RNAi:a chemical modification analysis.RNA9,1034-1048 (2003) .

[0498] 4.Kubo,T.,Zhelev,Z.,Ohba,H.&Bakalova,R.Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity.Oligonucleotides 17,445-464 (2007) .

[0499] 5.Li,S.,Crothers,J.,Haqq,C.M.&Blackburn,E.H.Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA.J.Biol.Chem.280,23709-23717 (2005) .

[0500] 6.Kim,D.H.et al.Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy.Nat.Biotechnol.23,222-226 (2005) ,

[0501] 7.Hutvagner,G.&Simard,M.J.Argonaute proteins:key players in RNA silencing.Nat.Rev.Mol.Cell Biol.9,22-32 (2008) .

[0502] 8.MacRae,I.J.,Ma,E.,Zhou,M.,Robinson,C.V.&Doudna,J.A.In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105,512-517 (2008) .

[0503] 9.Murchison,E.P.,Partridge,J.F.,Tam,O.H.,Cheloufi,S.&Hannon,G.J.Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.102,12135-12140 (2005) .

[0504] 10.Elbashir,S.M.,Martinez,J.,Patkaniowska,A.,Lendeckel,W.&Tuschl,T.Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate.EMBO J.20,6877-6888 (2001) .

[0505] 11.Liu,J.et al,Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.Science 305,1437-1441 (2004) .

[0506] 12.Kessler,C.&Manta,V.Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review(Edition 3).Gene 92,1-248 (1990) .

[0507] 13.Yoshinari,K.,Miyagishi,M.&Taira,K.Effects on RNAi of the tight structure,sequence and position of the targeted region.Nucleic Acids Res 32, 691-699 (2004) .

[0508] 14.Robbins,M.et al.2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists.Mol.Ther.15,1663-1669 (2007) .

- [0509] 15. Jackson, A.L. et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12, 1197-1205 (2006).
- [0510] 16. Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C. & MacLachlan, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol. Ther.* 13, 494-505 (2006).
- [0511] 17. Du, Z., Lee, J.K., Tjhen, R., Stroud, R.M. & James, T.L. Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2391-2396 (2008).
- [0512] 18. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200 (2001).
- [0513] 19. Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. & Hammond, S.M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16, 2491-2496 (2002).
- [0514] 20. Schaniel, C. et al. Delivery of short hairpin RNAs--triggers of gene silencing--into mouse embryonic stem cells. *Nat. Methods* 3, 397-400 (2006).

[0515] 等同方案

[0516] 本领域技术人员将了解, 或者使用不超过常规的实验能够确定, 许多本发明所述具体实施方案的等同方案。这些等同方案预期涵盖在权利要求中。本文引用的所有专利、公开专利申请和其他参考文献的全部内容通过引用以整体并入本文。

表1: SOD1和PPIB的替代性RNAi化合物序列

完整序列名	ID号	极性	序列(5'→3')
SOD1-125-25-10001	10001	有义	P.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A
		反义	U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U.C
SOD1-376-25-10002	10002	有义	P.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C
		反义	G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C
SOD1-371-25-10003	10003	有义	P.C.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G
		反义	C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G.G
SOD1-533-25-10004	10004	有义	P.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A
		反义	U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U
SOD1-062-25-10005	10005	有义	P.G.U.G.C.U.G.G.U.U.U.G.C.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C.U
		反义	A.G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C.G.C.A.A.A.C.C.A.G.C.A.C
SOD1-074-25-10006	10006	有义	P.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C.U.G.C.A.G.C.G.U.C.U.G.G.G
		反义	C.C.C.A.G.A.C.G.C.U.G.C.A.G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C
SOD1-202-25-10007	10007	有义	P.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U
		反义	A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G
SOD1-201-25-10008	10008	有义	P.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G
		反义	C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A
SOD1-320-25-10009	10009	有义	P.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A
		反义	U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A
SOD1-325-25-10010	10010	有义	P.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U
		反义	A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G
SOD1-396-25-10011	10011	有义	P.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A
		反义	U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C
SOD1-431-25-10012	10012	有义	P.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U
		反义	A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C
SOD1-440-25-10013	10013	有义	P.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U
		反义	A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C
SOD1-457-25-10014	10014	有义	P.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U
		反义	A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A
SOD1-530-25-10015	10015	有义	P.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
		反义	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C
SOD1-520-25-10016	10016	有义	P.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U
		反义	A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U
SOD1-568-25-10017	10017	有义	P.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U
		反义	A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G
SOD1-609-25-10018	10018	有义	P.A.A.U.A.A.A.C.A.U.U.C.C.C.U.U.G.G.A.U.G.U.A.G.U.C
		反义	G.A.C.U.A.C.A.U.C.C.A.A.G.G.G.A.A.U.G.U.U.U.A.U.U
SOD1-662-25-10019	10019	有义	P.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G.U.A.U.C.C.U.G.A.U

[0517]

[0518]

		反义	A.U.C.A.G.G.A.U.A.C.A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C
SOD1-751-25-10020	10020	有义	P.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A
		反义	U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G.G
SOD1-844-25-10021	10021	有义	P.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C.A.C.A.G.A.U.G.G.G.U.A.U
		反义	A.U.A.C.C.C.A.U.C.U.G.U.G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G
SOD1-858-25-10022	10022	有义	P.C.A.G.A.U.G.G.G.U.A.U.U.A.A.A.C.U.U.G.U.C.A.G.A.A
		反义	U.U.C.U.G.A.C.A.A.G.U.U.U.A.A.U.A.C.C.C.A.U.C.U.G
SOD1-434-25-10023	10023	有义	P.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G
		反义	C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
SOD1-261-25-10024	10024	有义	P.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U
		反义	A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C
SOD1-434-25-10026	10026	有义	P.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G
		反义	C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
SOD1-125-25-10027	10027	有义	P.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A
		反义	U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U.C
SOD1-751-25-10028	10028	有义	P.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A
		反义	U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G.G
SOD1-376-25-10029	10029	有义	P.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C
		反义	G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C
SOD1-533-25-10030	10030	有义	P.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A
		反义	U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U
SOD1-436-21-10033 (R1 变体)	10033	有义	P.C*G*A*FU.G.FU.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G*A.FU*FU*C
		反义	P.A.FU.FC.FU.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.FC.A*FU*FC*G*G*C
SOD1-395-21-10034 (R2)	10034	有义	P.G*G*A*G.A.FC.FU.U.G.G.G.C.A.A.FU.G.FU*G*A*FU*U
		反义	P.U.FC.A.FC.A.FU.FU.G.C.C.C.A.A.G.FU.FC.FU*FC*FC*U*U
SOD1-436-21-10036 (R1 未修饰)	10036	有义	P.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C
		反义	P.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C
SOD1-395-21-10037 (R2 未修饰)	10037	有义	P.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.U.U
		反义	P.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.U.U
SOD1-318-25-10078	10078	有义	P.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U
		反义	A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G.C
SOD1-319-25-10079	10079	有义	P.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U
		反义	A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G
SOD1-321-25-10080	10080	有义	P.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A
		反义	U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C
SOD1-322-25-10081	10081	有义	P.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U
		反义	A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A
SOD1-432-25-10082	10082	有义	P.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C
		反义	G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A
SOD1-433-25-10083	10083	有义	P.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U
		反义	A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C
SOD1-435-25-10084	10084	有义	P.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U

[0519]

		反义	A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G
SOD1-436-25-10085	10085	有义	P.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G
		反义	C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G
SOD1-528-25-10086	10086	有义	P.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G
		反义	C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A
SOD1-529-25-10087	10087	有义	P.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U
		反义	A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C
SOD1-531-25-10088	10088	有义	P.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C
		反义	G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C
SOD1-532-25-10089	10089	有义	P.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A
		反义	U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G
SOD1-566-25-10090	10090	有义	P.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G
		反义	C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U
SOD1-567-25-10091	10091	有义	P.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G
		反义	C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U
SOD1-569-25-10092	10092	有义	P.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G
		反义	C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C
SOD1-570-25-10093	10093	有义	P.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U
		反义	A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G
SOD1-369-25-10094	10094	有义	P.G.G.C.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U
		反义	A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G.G.C.C
SOD1-370-25-10095	10095	有义	P.G.C.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U
		反义	A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G.G.C
SOD1-372-25-10096	10096	有义	P.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G
		反义	C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G
SOD1-373-25-10097	10097	有义	P.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A
		反义	U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U
SOD1-436-21-10104 (R1, 带有 2'Ome)	10104	有义	P.C*G*A*mU.G.mU.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G*A.mU*mU*C
		反义	P.A.mU.mC.mU.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.mC.A*mU*mC*G*G*C
SOD1-436-21-10105 (R1)	10105	有义	P.C*G*A*fU.G.fU.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G*A*fU*fU*C
		反义	P.A.fU.fC.fU.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.fC.A*fU*fC*G*G*C
SOD1-430-25-10174	10174	有义	5' - P.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U
		反义	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A
SOD1-429-26-10175	10175	有义	5' - P.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U
		反义	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C
PPIB-10167	10167	反义	5'-U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C
PPIB-10169	10169	反义	5'-mU.mU.mU.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.mU.mU.mC.mC

[0520]

表2: SOD1的其他替代性RNAi化合物序列		
设计的其他序列		
	10255	有义 P.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A

[0521]

	反义	U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U
10256	有义	P.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A
	反义	U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U
10257	有义	P.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U
	反义	A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G
10258	有义	P.A.U.G.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A
	反义	U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G.C.U.U.U.U.U.C.A.U
10259	有义	P.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A
	反义	U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G
10260	有义	P.G.G.C.C.G.C.A.C.A.C.U.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A.A.A
	反义	U.U.U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C.A.G.U.G.U.G.C.G.G.C.C
10261	有义	P.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U
	反义	A.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.U.G.A.G.A.G.U
10262	有义	P.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U
	反义	A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A
10263	有义	P.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A
	反义	U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U
10264	有义	P.G.U.G.G.G.C.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A
	反义	U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G.G.C.C.C.A.C
10265	有义	P.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A
	反义	U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G
10266	有义	P.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A.A.A.C.A.C.G.G.U.G.G.G.C.C.A
	反义	U.G.G.C.C.C.A.C.C.G.U.G.U.U.U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A
10267	有义	P.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G
	反义	C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G.C.U.U.U.U.U
10268	有义	P.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G.U.G.U.G.G.G.G.A.A
	反义	U.U.C.C.C.C.A.C.A.C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U
10269	有义	P.U.G.U.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G
	反义	C.A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C.A.G.G.A.U.A.A.C.A
10270	有义	P.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A
	反义	U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G
10271	有义	P.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A
	反义	U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U
10272	有义	P.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A
	反义	U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G
10273	有义	P.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U
	反义	A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A
10274	有义	P.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G
	反义	C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U
10275	有义	P.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G
	反义	C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A
10276	有义	P.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A
	反义	U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U
10277	有义	P.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A
	反义	U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U
10278	有义	P.U.U.G.G.C.C.G.C.A.C.A.C.U.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A
	反义	U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C.A.G.U.G.U.G.C.G.G.C.C.A.A
10279	有义	P.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A
	反义	U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A
10280	有义	P.G.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G
	反义	C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G.C.U.U.U.U.U.C
10281	有义	P.C.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C
	反义	G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.G
10282	有义	P.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C
	反义	G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U
10283	有义	P.G.G.G.G.A.A.G.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A
	反义	U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G.C.U.U.C.C.C.C

[0522]

10284	有义	P.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C
10285	有义	P.G.U.G.U.G.G.G.G.A.A.G.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A
	反义	U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G.C.U.U.C.C.C.C.A.C.A.C
10286	有义	P.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U.G
	反义	C.A.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G
10287	有义	P.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A
	反义	U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G
10288	有义	P.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A
	反义	U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A
10289	有义	P.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G.U
	反义	A.C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U
10290	有义	P.G.G.C.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U
	反义	A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.G.C.C
10291	有义	P.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A
	反义	U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A
10292	有义	P.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G
	反义	C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U
10293	有义	P.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C
	反义	G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A
10294	有义	P.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C
	反义	G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U
10295	有义	P.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A
	反义	U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A
10296	有义	P.A.G.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A
	反义	U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C.C.U
10297	有义	P.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U
	反义	A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G
10298	有义	P.A.A.A.C.A.U.U.C.C.C.U.U.G.G.A.U.G.U.A.G.U.C.U.G.A
	反义	U.C.A.G.A.C.U.A.C.A.U.C.C.A.A.G.G.G.A.A.U.G.U.U.U
10299	有义	P.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A
	反义	U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A
10300	有义	P.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U.A
	反义	U.A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A
10301	有义	P.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A
	反义	U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A
10302	有义	P.G.C.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U
	反义	A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.G.C
10303	有义	P.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A
	反义	U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U
10304	有义	P.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U
	反义	A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C
10305	有义	P.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A.A
	反义	U.U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G
10306	有义	P.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A
	反义	U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A
10307	有义	P.G.G.G.A.A.G.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A
	反义	U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G.C.U.U.C.C.C
10308	有义	P.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G
	反义	C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G
10309	有义	P.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A
	反义	U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C
10310	有义	P.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A
	反义	U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G
10311	有义	P.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U
	反义	A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G
10312	有义	P.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A

[0523]

	反义	U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U
10313	有义	P.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C
10314	有义	P.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G.U.G.U
	反义	A.C.A.C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C
10315	有义	P.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G
	反义	C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G
10316	有义	P.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U
	反义	A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C
10317	有义	P.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G
	反义	C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U
10318	有义	P.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U
	反义	A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A
10319	有义	P.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C
	反义	G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C
10320	有义	P.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U
	反义	A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U
10321	有义	P.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A
	反义	U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C
10322	有义	P.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G
	反义	C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G
10323	有义	P.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U
	反义	A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A
10324	有义	P.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G
	反义	C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G
10325	有义	P.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A
	反义	U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C
10326	有义	P.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A
	反义	U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A
10327	有义	P.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A
	反义	U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C.C
10328	有义	P.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G
	反义	C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C
10329	有义	P.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A
	反义	U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A
10330	有义	P.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A
	反义	U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C
10331	有义	P.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A
	反义	U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A
10332	有义	P.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A
	反义	U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G
10333	有义	P.U.G.G.G.C.C.A.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U
	反义	A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U.U.G.G.C.C.C.A
10334	有义	P.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U
	反义	A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C
10335	有义	P.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U
	反义	A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C
10336	有义	P.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G
	反义	C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C
10337	有义	P.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U
	反义	A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A
10338	有义	P.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G
	反义	C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C
10339	有义	P.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G
	反义	C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G.C
10340	有义	P.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G
	反义	C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A

[0524]

10341	有义	P.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U
	反义	A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C
10342	有义	P.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U
	反义	A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C
10343	有义	P.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U
	反义	A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G
10344	有义	P.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U
	反义	A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U
10345	有义	P.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U
	反义	A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U
10346	有义	P.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G
	反义	C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C
10347	有义	P.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A
	反义	U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A
10348	有义	P.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A
	反义	U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U.C
10349	有义	P.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.A.U.C.U.C.A
	反义	U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A
10350	有义	P.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G
	反义	C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C
10351	有义	P.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U
	反义	A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A
10352	有义	P.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U
	反义	A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G
10353	有义	P.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U.G.G.C.C.G.C.A.C.A.C.U
	反义	A.G.U.G.U.G.C.G.G.C.C.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U
10354	有义	P.G.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A
	反义	U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G.C
10355	有义	P.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.A.G.U.G.G.A.A.A
	反义	U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G
10356	有义	P.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C
10357	有义	P.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G
	反义	C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U
10358	有义	P.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A
	反义	U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C
10359	有义	P.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G
	反义	C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C
10360	有义	P.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U
	反义	A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U
10361	有义	P.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A
	反义	U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U
10362	有义	P.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U
	反义	A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U
10363	有义	P.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U
	反义	A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U
10364	有义	P.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U
	反义	A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U
10365	有义	P.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U
	反义	A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C
10366	有义	P.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G
	反义	C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C
10367	有义	P.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U.A.A
	反义	U.U.A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C
10368	有义	P.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U.A.A.U
	反义	A.U.U.A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C
10369	有义	P.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U.A.A.U.U

[0525]

	反义	A.A.U.U.A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U
10370	有义	P.U.G.U.G.G.U.G.U.A.A.U.U.G.G.G.A.U.C.G.C.C.C.A.A.U
	反义	A.U.U.G.G.G.C.G.A.U.C.C.C.A.A.U.U.A.C.A.C.C.A.C.A
10371	有义	P.U.G.G.U.G.U.A.A.U.U.G.G.G.A.U.C.G.C.C.C.A.A.U.A.A
	反义	U.U.A.U.U.G.G.G.C.G.A.U.C.C.C.A.A.U.U.A.C.A.C.C.A
10372	有义	P.C.U.G.G.C.C.U.A.U.A.A.A.G.U.A.G.U.C.G.C.G.G.A.G.A
	反义	U.C.U.C.C.G.C.G.A.C.U.A.C.U.U.U.A.U.A.G.G.C.C.A.G
10373	有义	P.G.G.C.C.A.G.A.G.U.G.G.G.C.G.A.G.G.C.G.C.G.G.A.G.G
	反义	C.C.U.C.C.G.C.G.C.C.U.C.G.C.C.C.A.C.U.C.U.G.G.C.C
10374	有义	P.C.C.A.G.A.G.U.G.G.G.C.G.A.G.G.C.G.C.G.G.A.G.G.U.C
	反义	G.A.C.C.U.C.C.G.C.G.C.C.U.C.G.C.C.C.A.C.U.C.U.G.G
10375	有义	P.A.G.U.G.G.G.C.G.A.G.G.C.G.C.G.G.A.G.G.U.C.U.G.G.C
	反义	G.C.C.A.G.A.C.C.U.C.C.G.C.G.C.C.U.C.G.C.C.C.A.C.U
10376	有义	P.G.G.C.G.A.G.G.C.G.C.G.G.A.G.G.U.C.U.G.G.C.C.U.A.U
	反义	A.U.A.G.G.C.C.A.G.A.C.C.U.C.C.G.C.G.C.C.U.C.G.C.C
10377	有义	P.A.G.G.C.G.C.G.G.A.G.G.U.C.U.G.G.C.C.U.A.U.A.A.A.G
	反义	C.U.U.U.A.U.A.G.G.C.C.A.G.A.C.C.U.C.C.G.C.G.C.C.U
10378	有义	P.G.C.G.G.A.G.G.U.C.U.G.G.C.C.U.A.U.A.A.A.G.U.A.G.U
	反义	A.C.U.A.C.U.U.U.A.U.A.G.G.C.C.A.G.A.C.C.U.C.C.G.C
10379	有义	P.A.G.G.U.C.U.G.G.C.C.U.A.U.A.A.A.G.U.A.G.U.C.G.C.G
	反义	C.G.C.G.A.C.U.A.C.U.U.U.A.U.A.G.G.C.C.A.G.A.C.C.U
10380	有义	P.G.C.C.U.A.U.A.A.A.G.U.A.G.U.C.G.C.G.G.A.G.A.C.G.G
	反义	C.C.G.U.C.U.C.C.G.C.G.A.C.U.A.C.U.U.U.A.U.A.G.G.C
10381	有义	P.G.G.U.G.C.U.G.G.U.U.U.G.C.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C
	反义	G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C.G.C.A.A.A.C.C.A.G.C.A.C.C
10382	有义	P.C.U.G.G.U.U.U.G.C.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C.U.G.C.A
	反义	U.G.C.A.G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C.G.C.A.A.A.C.C.A.G
10383	有义	P.U.U.U.G.C.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C.U.G.C.A.G.C.G.U
	反义	A.C.G.C.U.G.C.A.G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C.G.C.A.A.A
10384	有义	P.C.G.U.C.G.U.A.G.U.C.U.C.C.U.G.C.A.G.C.G.U.C.U.G.G
	反义	C.C.A.G.A.C.G.C.U.G.C.A.G.G.A.G.A.C.U.A.C.G.A.C.G
10385	有义	P.G.G.U.U.U.C.C.G.U.U.G.C.A.G.U.C.C.U.C.G.G.A.A.C.C
	反义	G.G.U.U.C.C.G.A.G.G.A.C.U.G.C.A.A.C.G.G.A.A.A.C.C
10386	有义	P.U.C.C.G.U.U.G.C.A.G.U.C.C.U.C.G.G.A.A.C.C.A.G.G.A
	反义	U.C.C.U.G.G.U.U.C.C.G.A.G.G.A.C.U.G.C.A.A.C.G.G.A
10387	有义	P.U.U.G.C.A.G.U.C.C.U.C.G.G.A.A.C.C.A.G.G.A.C.C.U.C
	反义	G.A.G.G.U.C.C.U.G.G.U.U.C.C.G.A.G.G.A.C.U.G.C.A.A
10388	有义	P.A.G.U.C.C.U.C.G.G.A.A.C.C.A.G.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G
	反义	C.G.C.C.G.A.G.G.U.C.C.U.G.G.U.U.C.C.G.A.G.G.A.C.U
10389	有义	P.C.U.C.G.G.A.A.C.C.A.G.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.C.C
	反义	G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U.C.C.U.G.G.U.U.C.C.G.A.G
10390	有义	P.G.A.A.C.C.A.G.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G
	反义	C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U.C.C.U.G.G.U.U.C
10391	有义	P.C.A.G.G.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G
	反义	C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U.C.C.U.G
10392	有义	P.A.C.C.U.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A.U
	反义	A.U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G.A.G.G.U
10393	有义	P.C.G.G.C.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A.U.G.G.C.G
	反义	C.G.C.C.A.U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C.G.C.C.G
10394	有义	P.G.U.G.G.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A.U.G.G.C.G.A.C.G.A
	反义	U.C.G.U.C.G.C.C.A.U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G.C.C.A.C
10395	有义	P.C.C.U.A.G.C.G.A.G.U.U.A.U.G.G.C.G.A.C.G.A.A.G.C.C
	反义	G.C.C.U.U.C.G.U.C.G.C.C.A.U.A.A.C.U.C.G.C.U.A.G.G
10396	有义	P.G.C.G.A.G.U.U.A.U.G.G.C.G.A.C.G.A.A.G.G.C.C.G.U.G
	反义	C.A.C.G.G.C.C.U.U.C.G.U.C.G.C.C.A.U.A.A.C.U.C.G.C
10397	有义	P.G.U.U.A.U.G.G.C.G.A.C.G.A.A.G.G.C.C.G.U.G.U.G.C.G
	反义	C.G.C.A.C.A.C.G.G.C.C.U.U.C.G.U.C.G.C.C.A.U.A.A.C

[0526]

10398	有义	P.U.G.G.C.G.A.C.G.A.A.G.G.C.C.G.U.G.U.G.C.G.U.G.C.U
	反义	A.G.C.A.C.G.C.A.C.A.C.G.G.C.C.U.U.C.G.U.C.G.C.C.A
10399	有义	P.G.A.C.G.A.A.G.G.C.C.G.U.G.U.G.C.G.U.G.C.U.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.A.G.C.A.C.G.C.A.C.A.C.G.G.C.C.U.U.C.G.U.C
10400	有义	P.A.C.G.A.A.G.G.C.C.G.U.G.U.G.C.G.U.G.C.U.G.A.A.G.G
	反义	C.C.U.U.C.A.G.C.A.C.G.C.A.C.A.C.G.G.C.C.U.U.C.G.U
10401	有义	P.G.G.C.A.U.C.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G
	反义	C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U.G.A.U.G.C.C
10402	有义	P.A.U.C.A.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A
	反义	U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U.U.G.A.U
10403	有义	P.A.U.U.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G
	反义	C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A.A.A.U
10404	有义	P.U.C.G.A.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C
	反义	G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C.U.C.G.A
10405	有义	P.G.C.A.G.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G
	反义	C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U.C.U.G.C
10406	有义	P.A.A.G.G.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G
	反义	C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U.C.C.U.U
10407	有义	P.A.A.A.G.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G.U.G.U.G
	反义	C.A.C.A.C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A.C.U.U.U
10408	有义	P.U.A.A.U.G.G.A.C.C.A.G.U.G.A.A.G.G.U.G.U.G.G.G.G.A
	反义	U.C.C.C.C.A.C.A.C.C.U.U.C.A.C.U.G.G.U.C.C.A.U.U.A
10409	有义	P.G.G.A.A.G.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G.C.U.U.C.C
10410	有义	P.G.C.A.U.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U
	反义	A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A.A.U.G.C
10411	有义	P.U.A.A.A.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U
	反义	A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C.U.U.U.A
10412	有义	P.G.G.A.C.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.U.G.A.U
	反义	A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A.G.U.C.C
10413	有义	P.U.G.A.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A
	反义	U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G.U.C.A
10414	有义	P.C.U.G.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U
	反义	A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U.C.A.G
10415	有义	P.A.A.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A
	反义	U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C.U.U
10416	有义	P.G.G.C.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G
	反义	C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G.G.C.C
10417	有义	P.C.U.G.C.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U
	反义	A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U.G.C.A.G
10418	有义	P.A.U.G.G.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G
	反义	C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U.C.C.A.U
10419	有义	P.A.U.U.C.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U
	反义	A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G.G.A.A.U
10420	有义	P.C.A.U.G.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A
	反义	U.A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A.C.A.U.G
10421	有义	P.U.U.C.A.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C
	反义	G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A.U.G.A.A
10422	有义	P.U.G.A.G.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C
	反义	G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A.C.U.C.A
10423	有义	P.U.U.U.G.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A
	反义	U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C.C.A.A.A
10424	有义	P.G.A.G.A.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G
	反义	C.U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A.U.C.U.C
10425	有义	P.U.A.A.U.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A
	反义	U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U.A.U.U.A
10426	有义	P.A.C.A.G.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C

[0527]

	反义	G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G.C.U.G.U
10427	有义	P.C.A.G.G.C.U.G.U.A.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A
	反义	U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G.U.A.C.A.G.C.C.U.G
10428	有义	P.C.C.A.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.A.A.U.C.C
	反义	G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C.U.G.G
10429	有义	P.G.U.G.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U
	反义	A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G.C.A.C
10430	有义	P.C.A.G.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C
	反义	G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C.C.U.G
10431	有义	P.G.U.C.C.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G
	反义	C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A.G.G.A.C
10432	有义	P.U.C.A.C.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A.A.A
	反义	U.U.U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A.G.U.G.A
10433	有义	P.U.U.U.A.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A.A.A.C.A.C.G
	反义	C.G.U.G.U.U.U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U.U.A.A.A
10434	有义	P.A.U.C.C.U.C.U.A.U.C.C.A.G.A.A.A.A.C.A.C.G.G.U.G.G
	反义	C.C.A.C.C.G.U.G.U.U.U.U.C.U.G.G.A.U.A.G.A.G.G.A.U
10435	有义	P.A.A.G.G.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.A.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G
	反义	C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U.C.C.U.U
10436	有义	P.A.U.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U
	反义	A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C.A.U
10437	有义	P.G.A.A.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G
	反义	C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C.U.U.C
10438	有义	P.G.A.G.A.G.G.C.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A
	反义	U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U.G.C.C.U.C.U.C
10439	有义	P.A.U.G.U.U.G.G.A.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.U.G.U.G.A.C
	反义	G.U.C.A.C.A.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.U.C.C.A.A.C.A.U
10440	有义	P.C.A.A.U.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.G.A.U.G.G.U
	反义	A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C.A.U.U.G
10441	有义	P.G.U.G.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.G
	反义	C.C.A.C.A.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U.C.A.C
10442	有义	P.A.C.U.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G
	反义	C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C.A.G.U
10443	有义	P.G.C.U.G.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G
	反义	C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U.C.A.G.C
10444	有义	P.A.C.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C
	反义	G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U.G.U
10445	有义	P.A.A.A.G.A.U.G.G.U.G.U.G.G.C.C.G.A.U.G.U.G.U.C.U.A
	反义	U.A.G.A.C.A.C.A.U.C.G.G.C.C.A.C.A.C.C.A.U.C.U.U.U
10446	有义	P.A.U.G.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U
	反义	A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.C.A.U
10447	有义	P.U.G.U.C.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C
	反义	G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A
10448	有义	P.U.A.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C
	反义	G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A.U.A
10449	有义	P.U.U.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C
	反义	G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U.C.A.A
10450	有义	P.A.A.G.A.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G
	反义	C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A.U.C.U.U
10451	有义	P.U.U.C.U.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C
	反义	G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.C.A.G.A.A
10452	有义	P.G.U.G.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U
	反义	A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U.C.A.U
10453	有义	P.A.U.C.U.C.A.C.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A
	反义	U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A.G.U.G.A.G.A.U
10454	有义	P.U.C.U.C.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U.G.G
	反义	C.C.A.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U.G.A.G.A

[0528]

10455	有义	P.A.G.G.A.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U.G.G.C.C.G.C
	反义	G.C.G.G.C.C.A.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.G.G.U.C.U.C.C.U
10456	有义	P.G.A.C.C.A.U.U.G.C.A.U.C.A.U.U.G.G.C.C.G.C.A.C.A.C
	反义	G.U.G.U.G.C.G.G.C.C.A.A.U.G.A.U.G.C.A.A.U.C.A.A.A.A
10464	有义	P.A.A.A.G.A.A.U.C.C.A.A.A.U.U.C.A.A.A.C.U.A.A.A.A.A
	反义	U.U.U.U.A.G.U.U.U.G.A.A.U.U.U.G.G.A.U.U.C.U.U.U
10465	有义	P.A.U.U.A.A.A.A.G.A.A.U.C.C.A.A.A.U.U.C.A.A.A.C.U.A
	反义	A.U.U.A.A.A.A.G.A.A.U.C.C.A.A.A.U.U.C.A.A.A.C.U.A
10466	有义	P.G.G.C.U.A.U.U.A.A.A.A.G.A.A.U.C.C.A.A.A.U.U.C.A.A
	反义	U.U.G.A.A.U.U.U.G.G.A.U.U.C.U.U.U.U.A.A.U.A.G.C.C
10467	有义	P.A.U.G.A.G.G.C.U.A.U.U.A.A.A.A.G.A.A.U.C.C.A.A.A.U
	反义	A.U.U.U.G.G.A.U.U.C.U.U.U.U.A.A.U.A.G.C.C.U.C.A.U
10468	有义	P.U.A.U.U.A.U.G.A.G.G.C.U.A.U.U.A.A.A.A.G.A.A.U.C.C
	反义	G.G.A.U.U.C.U.U.U.U.A.A.U.A.G.C.C.U.C.A.U.A.A.U.A
10469	有义	P.C.A.C.U.U.A.U.U.A.U.G.A.G.G.C.U.A.U.U.A.A.A.A.G.A
	反义	U.C.U.U.U.U.A.A.U.A.G.C.C.U.C.A.U.A.A.U.A.A.G.U.G
10470	有义	P.A.U.G.G.C.A.C.U.U.A.U.U.A.U.G.A.G.G.C.U.A.U.U.A.A
	反义	U.U.A.A.U.A.G.C.C.U.C.A.U.A.A.U.A.A.G.U.G.C.C.A.U
10471	有义	P.C.U.G.U.A.U.G.G.C.A.C.U.U.A.U.U.A.U.G.A.G.G.C.U.A
	反义	U.A.G.C.C.U.C.A.U.A.A.U.A.A.G.U.G.C.C.A.U.A.C.A.G
10472	有义	P.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G.U.G.A.A.U.A.A.A.A.A.C.C
	反义	G.G.U.U.U.U.A.U.U.C.A.C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A
10473	有义	P.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G.U.G.A.A.U.A.A.A.A.A
	反义	U.U.U.U.U.A.U.U.C.A.C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A
10474	有义	P.U.U.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G.U.G.A.A.U.A.A.A
	反义	U.U.U.A.U.U.C.A.C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A.A.A
10475	有义	P.U.C.U.U.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G.U.G.A.A.U.A
	反义	U.A.U.U.C.A.C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A.A.A.G.A
10476	有义	P.U.U.U.C.U.U.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G.U.G.A.A
	反义	U.U.C.A.C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A.A.A.G.A.A.A
10477	有义	P.A.G.A.A.U.U.U.C.U.U.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G.C.C.U.G
	反义	C.A.G.G.C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A.A.A.G.A.A.A.U.C.U
10478	有义	P.U.G.U.C.A.G.A.A.U.U.U.C.U.U.U.G.U.C.A.U.U.C.A.A.G
	反义	C.U.U.G.A.A.U.G.A.C.A.A.A.G.A.A.A.U.U.C.U.G.A.C.A
10479	有义	P.A.A.C.U.U.G.U.C.A.G.A.A.U.U.U.C.U.U.U.G.U.C.A.U.U
	反义	A.A.U.G.A.C.A.A.A.G.A.A.A.U.U.C.U.G.A.C.A.A.G.U.U
10480	有义	P.A.U.U.A.A.A.C.U.U.G.U.C.A.G.A.A.U.U.U.C.U.U.U.G.U
	反义	A.C.A.A.A.G.A.A.A.U.U.C.U.G.A.C.A.A.G.U.U.U.A.A.U
10481	有义	P.G.G.U.A.U.U.A.A.A.C.U.U.G.U.C.A.G.A.A.U.U.U.C.U.U
	反义	A.A.G.A.A.A.U.U.C.U.G.A.C.A.A.G.U.U.U.A.A.U.A.C.C
10482	有义	P.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C.A.C.A.G.A.U.G.G
	反义	C.C.A.U.C.U.G.U.G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A
10483	有义	P.A.U.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C.A.C.A.G.A.U
	反义	A.U.C.U.G.U.G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U
10484	有义	P.G.U.A.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C.A.C.A.G
	反义	C.U.G.U.G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U.A.C
10485	有义	P.C.U.G.U.A.U.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C.A.C
	反义	G.U.G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U.A.C.A.G
10486	有义	P.A.C.C.U.G.U.A.U.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A.A.A.U.C
	反义	G.A.U.U.U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U.A.C.A.G.G.U
10487	有义	P.A.A.U.G.A.C.C.C.U.G.U.A.U.U.U.U.G.C.C.A.G.A.C.U.U.A
	反义	U.A.A.G.U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U.A.C.A.G.G.U.C.A.U.U
10488	有义	P.U.U.U.C.A.A.U.G.A.C.C.U.G.U.A.U.U.U.U.G.C.C.A.G.A
	反义	U.C.U.G.G.C.A.A.A.A.U.A.C.A.G.G.U.C.A.U.U.G.A.A.A
10489	有义	P.U.C.U.G.U.U.U.C.A.A.U.G.A.C.C.U.G.U.A.U.U.U.U.G.C
	反义	G.C.A.A.A.A.U.A.C.A.G.G.U.C.A.U.U.G.A.A.A.C.A.G.A
10490	有义	P.A.A.U.G.U.C.U.G.U.U.U.C.A.A.U.G.A.C.C.U.G.U.A.U.U

[0529]

	反义	A.A.U.A.C.A.G.G.U.C.A.U.U.G.A.A.A.C.A.G.A.C.A.U.U
10491	有义	P.U.U.A.A.A.A.U.G.U.C.U.G.U.U.U.C.A.A.U.G.A.C.C.U.G
	反义	C.A.G.G.U.C.A.U.U.G.A.A.A.C.A.G.A.C.A.U.U.U.U.A.A
10492	有义	P.U.C.A.G.U.U.A.A.A.A.U.G.U.C.U.G.U.U.U.C.A.A.U.G.A
	反义	U.C.A.U.U.G.A.A.A.C.A.G.A.C.A.U.U.U.U.A.A.C.U.G.A
10493	有义	P.A.A.A.C.U.C.A.G.U.U.A.A.A.A.U.G.U.C.U.G.U.U.U.C.A
	反义	U.G.A.A.A.C.A.G.A.C.A.U.U.U.U.A.A.C.U.G.A.G.U.U.U
10494	有义	P.U.A.U.A.A.A.A.C.U.C.A.G.U.U.A.A.A.A.U.G.U.C.U.G.U
	反义	A.C.A.G.A.C.A.U.U.U.U.A.A.C.U.G.A.G.U.U.U.U.A.U.A
10495	有义	P.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.C.A.G.U.U.A.A.A.A.U.G.U
	反义	A.C.A.U.U.U.U.A.A.C.U.G.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C
10496	有义	P.U.A.U.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.C.A.G.U.U.A.A.A
	反义	U.U.U.A.A.C.U.G.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.A.U.A
10497	有义	P.U.U.U.G.U.A.U.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.C.A.G.U
	反义	A.C.U.G.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.A.U.A.C.A.A.A
10498	有义	P.A.A.G.A.U.U.U.G.U.A.U.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.C.U
	反义	A.G.U.U.U.U.A.U.A.A.A.A.A.C.U.A.U.A.C.A.A.A.A.C.U.U
10499	有义	P.U.U.G.G.A.A.G.A.U.U.U.G.U.A.U.A.G.U.U.U.U.A.U.A.A
	反义	U.U.A.U.A.A.A.A.C.U.A.U.A.C.A.A.A.A.U.C.U.U.C.C.A.A
10500	有义	P.U.C.A.C.U.U.G.G.A.A.G.A.U.U.U.G.U.A.U.A.G.U.U.U.U
	反义	A.A.A.A.C.U.A.U.A.C.A.A.A.A.U.C.U.U.C.C.A.A.G.U.G.A
10501	有义	P.A.U.G.A.U.C.A.C.U.U.G.G.A.A.G.A.U.U.U.G.U.A.U.A.G
	反义	C.U.A.U.A.C.A.A.A.U.C.U.U.C.C.A.A.G.U.G.A.U.C.A.U
10502	有义	P.A.U.U.U.A.U.G.A.U.C.A.C.U.U.G.G.A.A.G.A.U.U.U.G.U
	反义	A.C.A.A.A.U.C.U.U.C.C.A.A.G.U.G.A.U.C.A.U.A.A.A.U
10503	有义	P.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A.U.C.A.C.U.U.G.G.A.A.G.A.U
	反义	A.U.C.U.U.C.C.A.A.G.U.G.A.U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U
10504	有义	P.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A.U.C.A.C.U.U.G.G.A
	反义	U.C.C.A.A.G.U.G.A.U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U
10505	有义	P.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A.U.C.A.C.U
	反义	A.G.U.G.A.U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U
10506	有义	P.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A.U.G.A.U
	反义	A.U.C.A.U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G
10507	有义	P.G.U.A.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A.U.U.U.A
	反义	U.A.A.A.U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G.G.U.A.C
10508	有义	P.U.A.A.A.G.U.A.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A.C.U.G.A
	反义	U.C.A.G.U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G.G.U.A.C.U.U.U.A
10509	有义	P.G.C.U.U.U.A.A.A.G.U.A.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A.G.A.A.A
	反义	U.U.U.C.U.C.A.C.U.A.C.A.G.G.U.A.C.U.U.U.A.A.A.G.C
10510	有义	P.A.G.U.U.G.C.U.U.U.A.A.A.G.U.A.C.C.U.G.U.A.G.U.G.A
	反义	U.C.A.C.U.A.C.A.G.G.U.A.C.U.U.U.A.A.A.G.C.A.C.A.U
10511	有义	P.U.C.A.G.A.G.U.U.G.C.U.U.U.A.A.A.G.U.A.C.C.U.C.U.A
	反义	U.A.C.A.G.G.U.A.C.U.U.U.A.A.A.G.C.A.A.A.C.U.C.U.G.A
10512	有义	P.U.U.U.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G.C.U.U.U.A.A.A.G.U.A.C.C
	反义	G.G.U.A.C.U.U.U.A.A.A.G.C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.A.A.A
10513	有义	P.U.G.A.C.U.U.U.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G.C.U.U.U.A.A.A.G
	反义	C.U.U.U.A.A.A.G.C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.A.A.A.G.U.C.A
10514	有义	P.U.G.U.G.U.G.A.C.U.U.U.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G.C.U.U.U
	反义	A.A.A.G.C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.A.A.A.G.U.C.A.C.A.C.A
10515	有义	P.U.A.A.U.U.G.U.G.U.G.A.C.U.U.U.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G
	反义	C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.A.A.A.G.U.C.A.C.A.C.A.A.U.U.A
10516	有义	P.A.G.U.G.U.A.A.U.U.G.U.G.U.G.A.C.U.U.U.U.U.C.A.G.A
	反义	U.C.U.G.A.A.A.A.G.U.C.A.C.A.C.A.A.U.U.A.C.A.C.U
10517	有义	P.U.A.A.A.A.G.U.G.U.A.A.U.U.G.U.G.U.G.A.C.U.U.U.U.U
	反义	A.A.A.A.A.G.U.C.A.C.A.C.A.A.U.U.A.C.A.C.U.U.U.A
10518	有义	P.A.U.C.U.U.A.A.A.A.G.U.G.U.A.A.U.U.G.U.G.U.G.A.C.U
	反义	A.G.U.C.A.C.A.C.A.A.U.U.A.C.A.C.U.U.U.U.A.A.G.A.U

[0530]

10519	有义	P.U.G.U.A.A.U.C.U.U.A.A.A.A.G.U.G.U.A.A.U.U.G.U.G.U
	反义	A.C.A.C.A.A.U.U.A.C.A.C.U.U.U.U.A.A.G.A.U.U.A.C.A
10520	有义	P.A.C.A.C.U.G.U.A.A.U.C.U.U.A.A.A.A.G.U.G.U.A.A.U.U
	反义	A.A.U.U.A.C.A.C.U.U.U.U.A.A.G.A.U.U.A.C.A.G.U.G.U
10521	有义	P.U.U.A.A.A.C.A.C.U.G.U.A.A.U.C.U.U.A.A.A.A.G.U.G.U
	反义	A.C.A.C.U.U.U.U.A.A.G.A.U.U.A.C.A.G.U.G.U.U.U.A.A
10522	有义	P.A.A.C.A.U.U.A.A.A.C.A.C.U.G.U.A.A.U.C.U.U.A.A.A.A
	反义	U.U.U.U.A.A.G.A.U.U.A.C.A.G.U.G.U.U.U.A.A.U.G.U.U
10523	有义	P.G.A.U.A.A.A.C.A.U.U.A.A.A.C.A.C.U.G.U.A.A.U.C.U.U
	反义	A.A.G.A.U.U.A.C.A.G.U.G.U.U.U.A.A.U.G.U.U.U.A.U.C
10524	有义	P.U.C.C.U.G.A.U.A.A.A.C.A.U.U.A.A.A.C.A.C.U.G.U.A.A
	反义	U.U.A.C.A.G.U.G.U.U.U.A.A.U.G.U.U.U.A.U.C.A.G.G.A
10525	有义	P.U.G.U.A.U.C.C.U.G.A.U.A.A.A.C.A.U.U.A.A.A.C.A.C.U
	反义	A.G.U.G.U.U.U.A.A.U.G.U.U.U.A.U.C.A.G.G.A.U.A.C.A
10526	有义	P.G.A.A.A.U.G.U.A.U.C.C.U.G.A.U.A.A.A.C.A.U.U.A.A.A
	反义	U.U.U.A.A.U.G.U.U.U.A.U.C.A.G.G.A.U.A.C.A.U.U.U.C
10527	有义	P.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G.U.A.U.C.C.U.G.A.U.A.A.A.C.A.U
	反义	A.U.G.U.U.U.A.U.C.A.G.G.A.U.A.C.A.U.U.U.C.U.A.C.A
10528	有义	P.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G.U.A.U.C.C.U.G.A.U.A.A
	反义	U.U.A.U.C.A.G.G.A.U.A.C.A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A
10529	有义	P.C.U.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G.U.A.U.C.C.U.G
	反义	C.A.G.G.A.U.A.C.A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C.A.G
10530	有义	P.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U.G.U.A.U
	反义	A.U.A.C.A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C.A.G.G.A.U.A
10531	有义	P.C.U.G.U.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G.A.A.A.U
	反义	A.U.U.U.C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C.A.G.G.A.U.A.A.C.A.G
10532	有义	P.U.C.A.U.C.U.G.U.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A.G.C.U.G.U.A.G
	反义	C.U.A.C.A.G.C.U.A.G.C.A.G.G.A.U.A.A.C.A.G.A.U.G.A
10533	有义	P.U.A.A.C.U.C.A.U.C.U.G.U.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A.G.C.U
	反义	A.G.C.U.A.G.C.A.G.G.A.U.A.A.C.A.G.A.U.G.A.G.U.A
10534	有义	P.C.C.U.U.A.A.C.U.C.A.U.C.U.G.U.U.A.U.C.C.U.G.C.U.A
	反义	U.A.G.C.A.G.G.A.U.A.A.C.A.G.A.U.G.A.G.U.U.A.A.G.G
10535	有义	P.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.G.U.G.U.A.A.U.U.G.G
	反义	C.C.A.A.U.U.A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C
10536	有义	P.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U.G.U.G.U
	反义	A.C.A.C.C.A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G
10537	有义	P.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C.U.U.G.U
	反义	A.C.A.A.G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U
10538	有义	P.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G.G.C
	反义	G.C.C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G
10539	有义	P.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U.U.U.G
	反义	C.A.A.A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C
10540	有义	P.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C.G.U
	反义	A.C.G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U
10541	有义	P.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G.U.C
	反义	G.A.C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U
10542	有义	P.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A.A.G
	反义	C.U.U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C
10543	有义	P.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G.A
	反义	U.C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U
10544	有义	P.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G.G
	反义	C.C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U
10545	有义	P.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C.G.C.U.G
	反义	C.A.G.C.G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C
10546	有义	P.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G.A.A.A.C
	反义	G.U.U.U.C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A
10547	有义	P.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A.G.A.C.A.G.G

[0531]

	反义	C.C.U.G.U.C.U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C
10548	有义	P.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.C.A.A.A
	反义	U.U.U.G.U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U
10549	有义	P.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A
	反义	U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A
10550	有义	P.A.U.G.A.C.U.U.G.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A
	反义	U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C.C.A.A.G.U.C.A.U
10551	有义	P.G.U.C.C.A.U.G.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A.U.G.A.C.U.U.G.G
	反义	C.C.A.A.G.U.C.A.U.C.U.G.C.U.U.U.U.U.C.A.U.G.G.A.C
10552	有义	P.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A.U.G.A.C
	反义	G.U.C.A.U.C.U.G.C.U.U.U.U.U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C
10553	有义	P.C.A.C.U.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A.A.A.A.A.G.C.A.G.A
	反义	U.C.U.G.C.U.U.U.U.U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C.A.G.U.G
10554	有义	P.G.C.A.C.A.C.U.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A.A.A.A.A.G.C
	反义	G.C.U.U.U.U.U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C.A.G.U.G.U.G.C
10555	有义	P.U.G.G.C.C.G.C.A.C.A.C.U.G.G.U.G.G.U.C.C.A.U.G.A.A
	反义	U.U.C.A.U.G.G.A.C.C.A.C.C.A.G.U.G.U.G.C.G.G.C.C.A

完整序列名 设计和测试的序列	ID号	极性	序列(5'→3')
SOD1-436-21-10033 (R1 变体)	10033	有义	FCGATGUGGUGUCUAUUGAAGATGATGTC
SOD1-395-21-10034 (F2)	10034	有义	PAUUCUUCAAUAGACACATCAATGTCGGC
SOD1-436-21-10036 (R1, 未修饰)	10036	有义	PUCATCAUUGGCCCAAGUUGATGTCATGTC
SOD1-395-21-10037 (R2, 未修饰)	10037	有义	PCGAGUGUCUAUUGAAGACACACUUGGC
SOD1-436-21-10104 (R1 变体, 带有2' Ome)	10104	有义	FGGAGACUUUGGCCCAUUGUGAAU
SOD1-436-21-10105 (R1)	10105	有义	PUCACAUUGGCCCAAGUCUCUU
设计的其他序列 (R1, 未修饰, 无突出端)	10881	有义	FCGAGUGUCUAUUGAAGAAU
(R1, 未修饰, 无突出端或5'P)	10882	有义	PAUCUUCAAUAGACACAUUG
(R1, 未修饰, 无5'P)	10883	有义	CGAUGUCUAUUGAAGAAU
(R1, 带有代替2'P的2' Ome)	10884	有义	AUCUUCAAUAGACACAUUG
(R1, 带有代替2'P的2' Ome, 无突出端)	10885	有义	CGAUGUCUAUUGAAGAAU
(R1, 带有代替2'P的2' Ome, 无突出端)	10886	有义	AUCUUCAAUAGACACAUUG
R1w/ 001-011 化学基团, 平末端	10887	有义	FCGATGUGGUGUCUAUUGAAGATGTC
R1w/ 001-042 化学基团, 平末端	10887	有义	PAUUCUUCAAUAGACACAUUG
R1w/ M14001-011 化学基团, 平末端	10888	有义	CGAUGUCUAUUGAAGAAU
R1w/ 大量2' Ome 有义, 平末端	10889	有义	AUCUUCAAUAGACACAUUG
R1 原始化学基团, 平末端	10891	有义	FCGATGUGGUGUCUAUUGAAGATGTC
R1w/ 011-013 化学基团	10892	有义	PAUUCUUCAAUAGACACAUUG
将R1转变成替代性RNAI化合物(长度更长)			
SOD1-430-25-10174 (测试的)	10174	有义	FCGATGUGGUGUCUAUUGAAGATGTC
SOD1-428-26-10175 (测试的)	10175	有义	PAUUCUUCAAUAGACACAUUG
SOD1-428-27-10890 (设计的)	10890	有义	CGAUGUCUAUUGAAGAAU

图1

用R1 siRNA或替代性RNAi化合物转染后24小时的SOD1表达

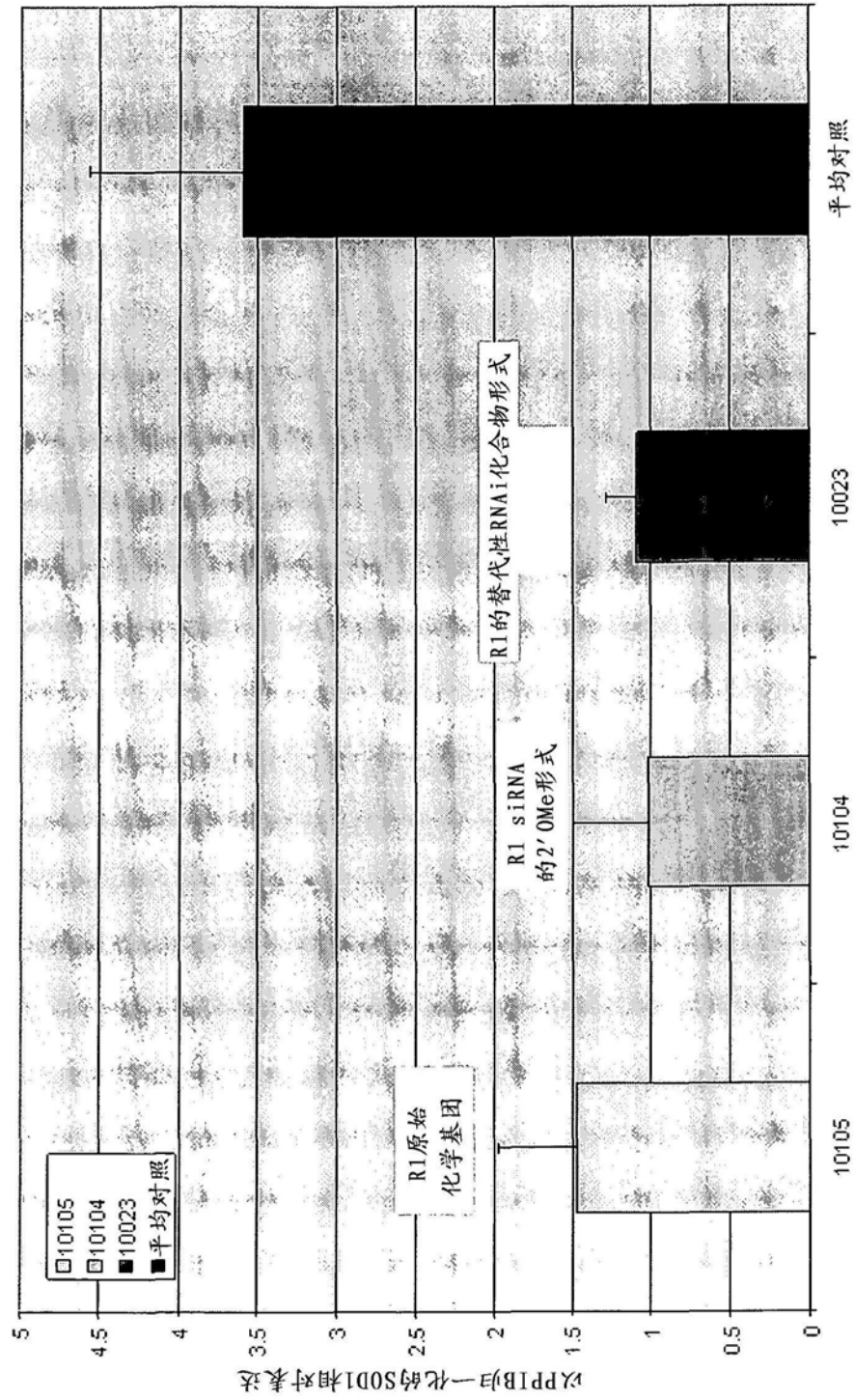


图2

HEK293细胞中的WS. 002. 1009 SOD1原始筛选, 转染后24小时的mRNA降低

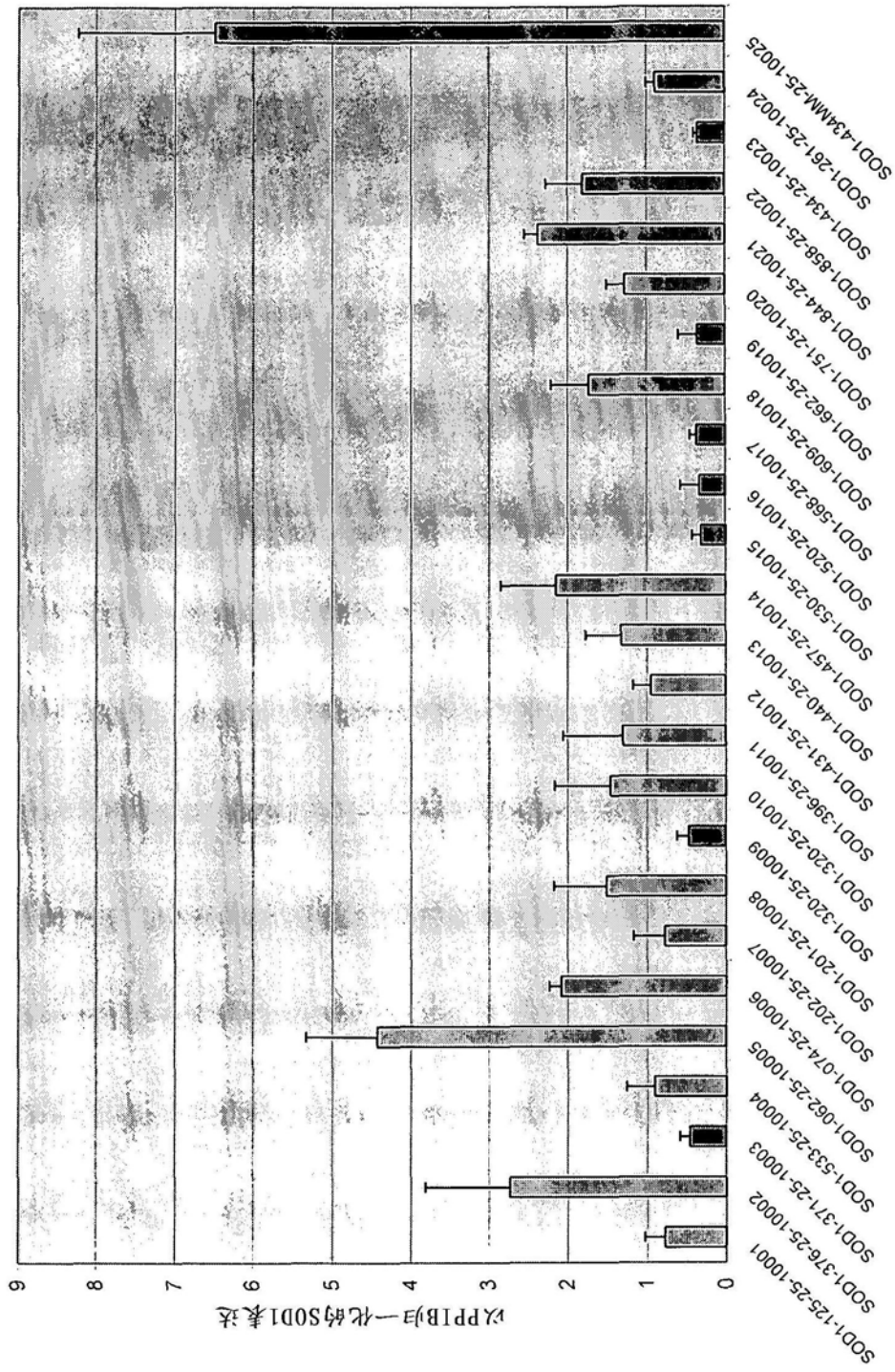


图3

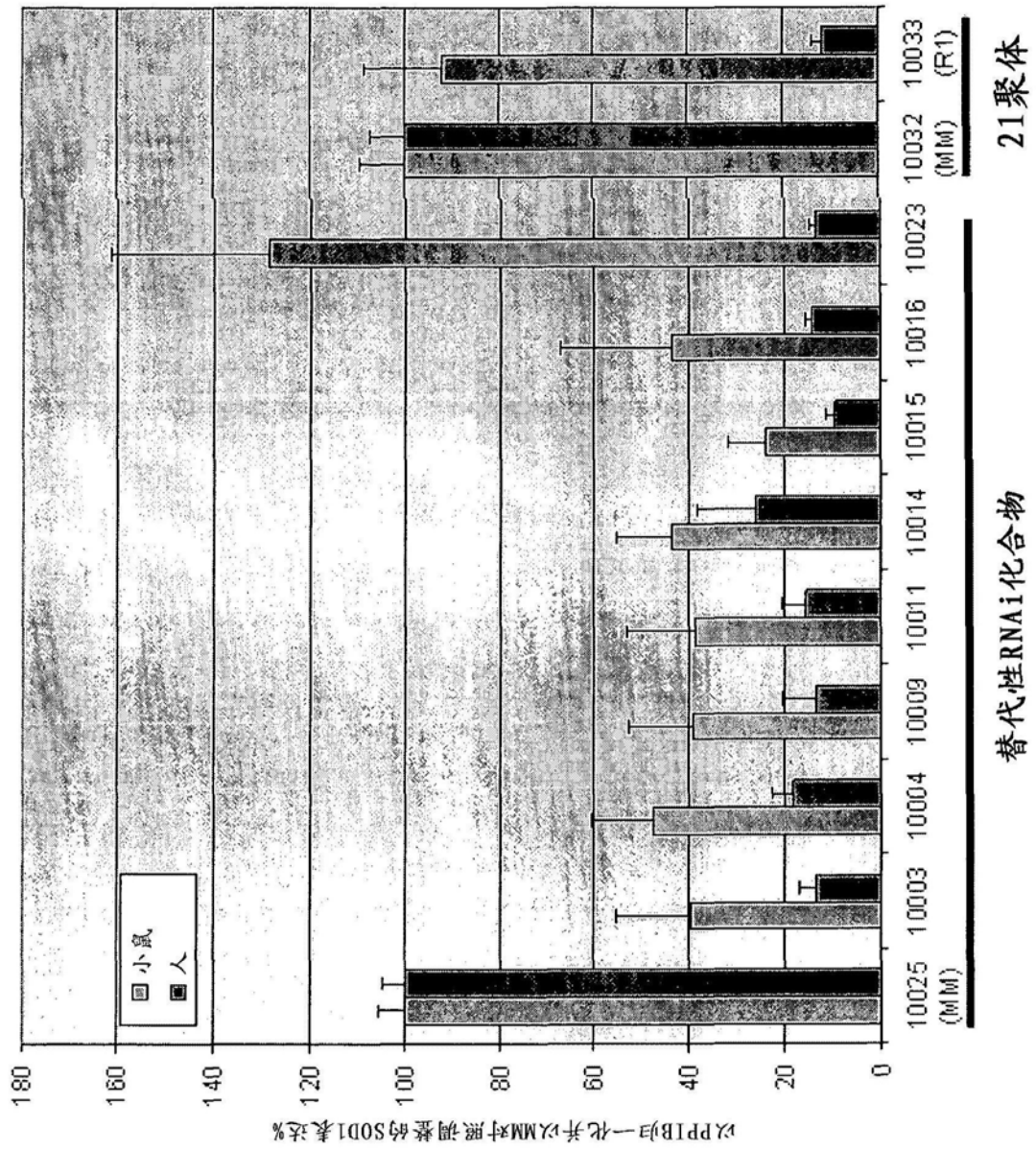


图4

替代性RNAi化合物处理后48小时剩余的hsOD1 mRNA %

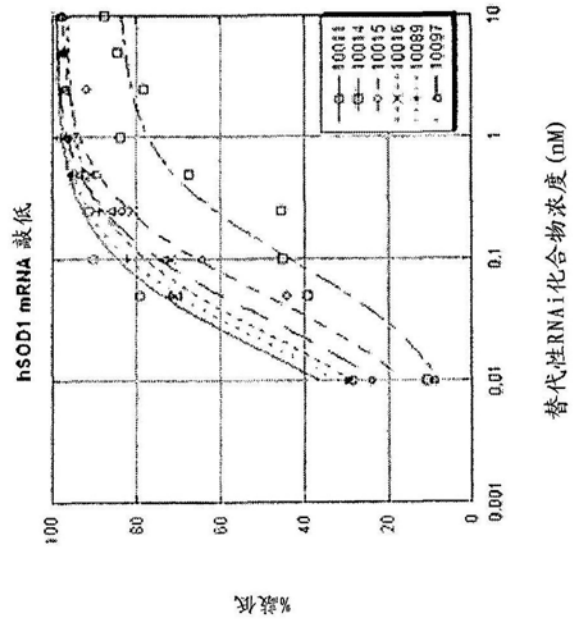
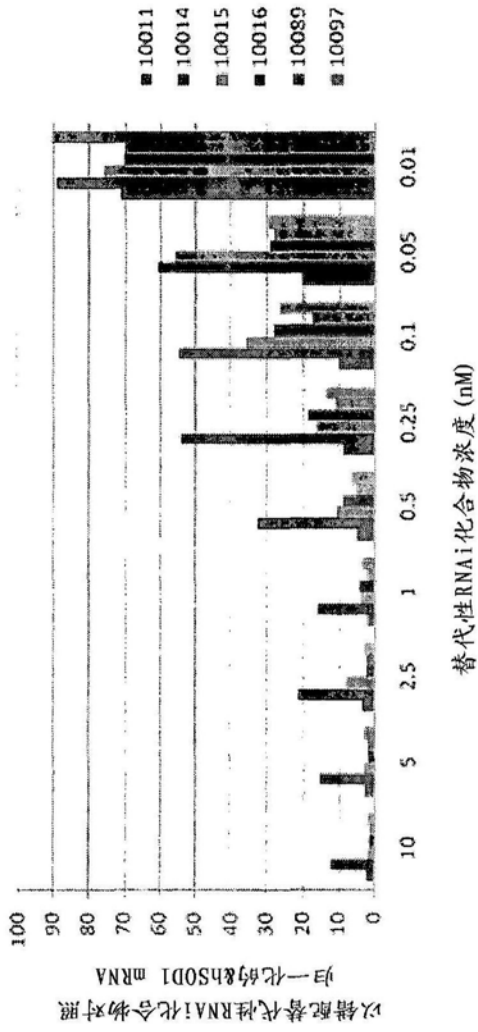


图5A

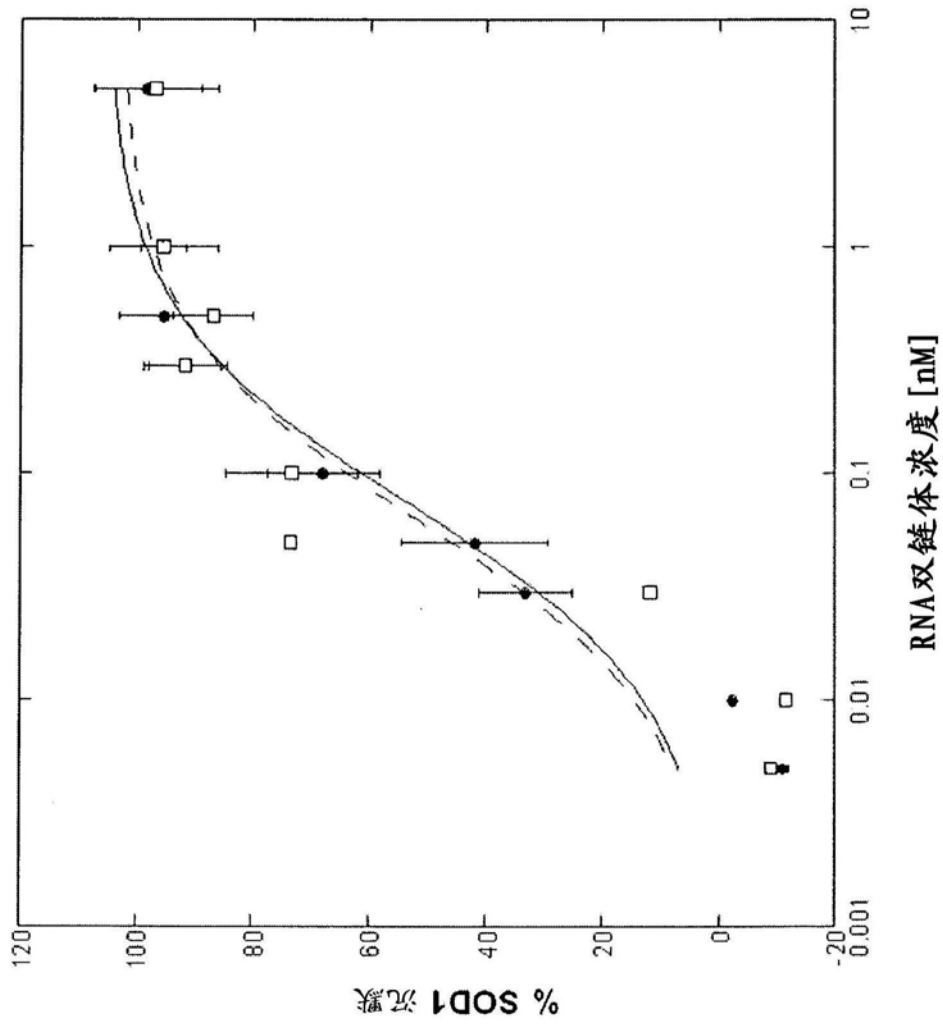


图5B

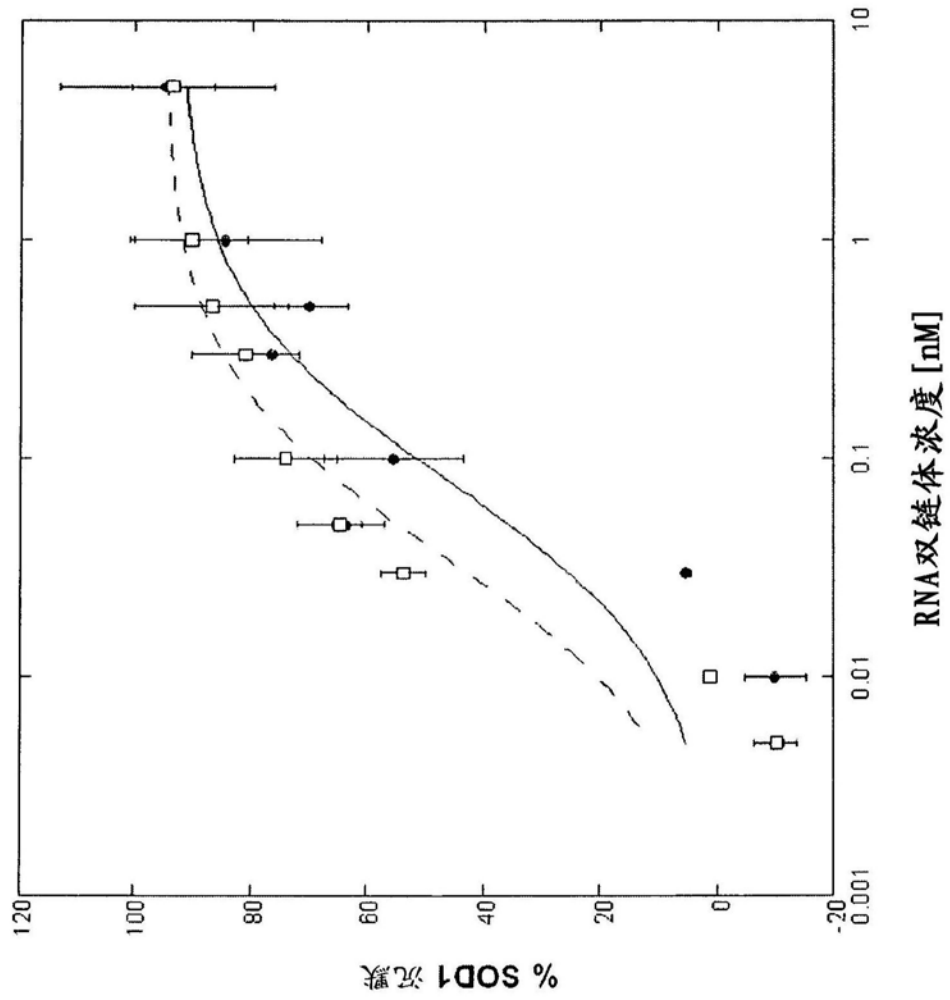


图5C

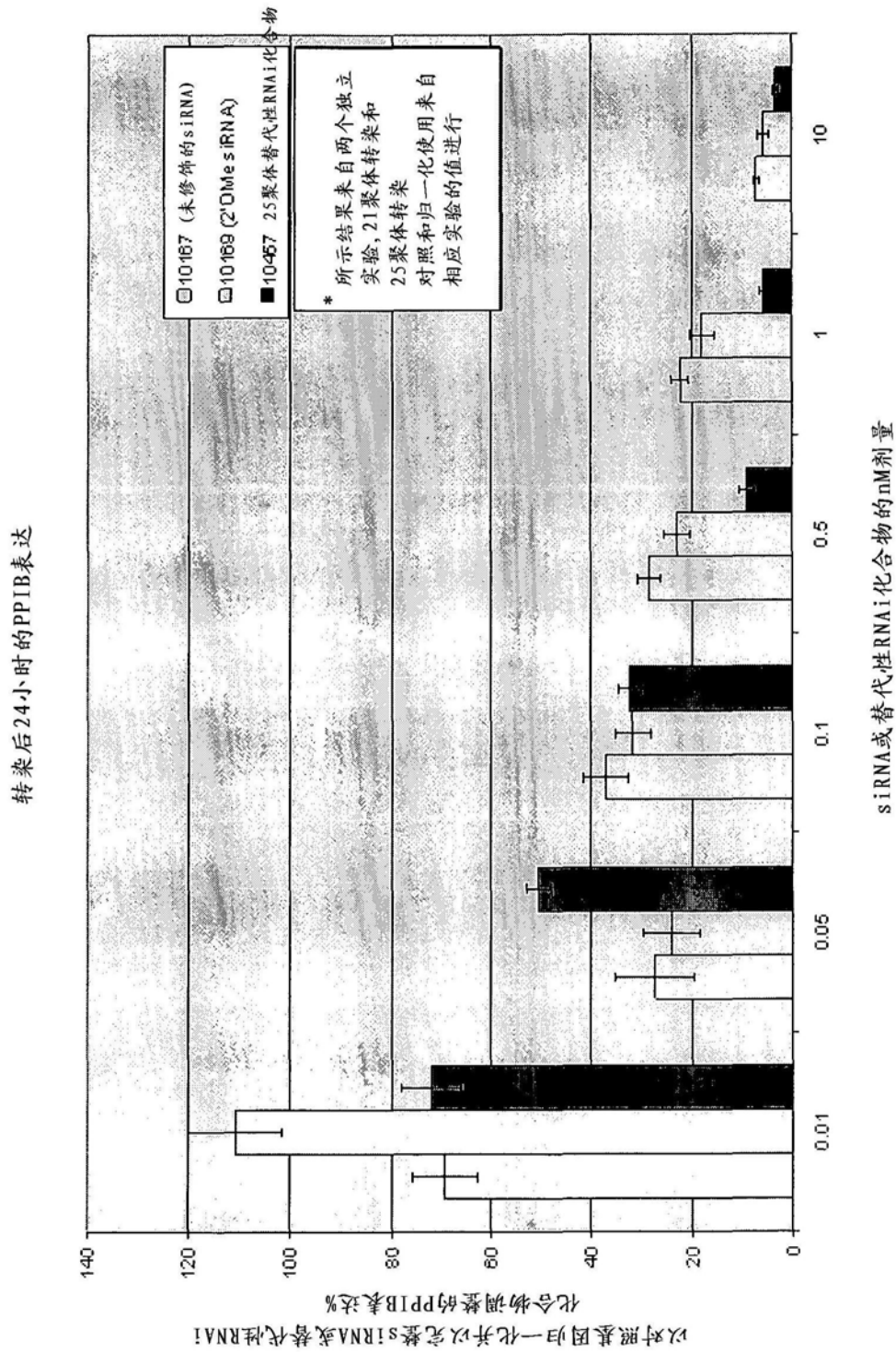


图6A

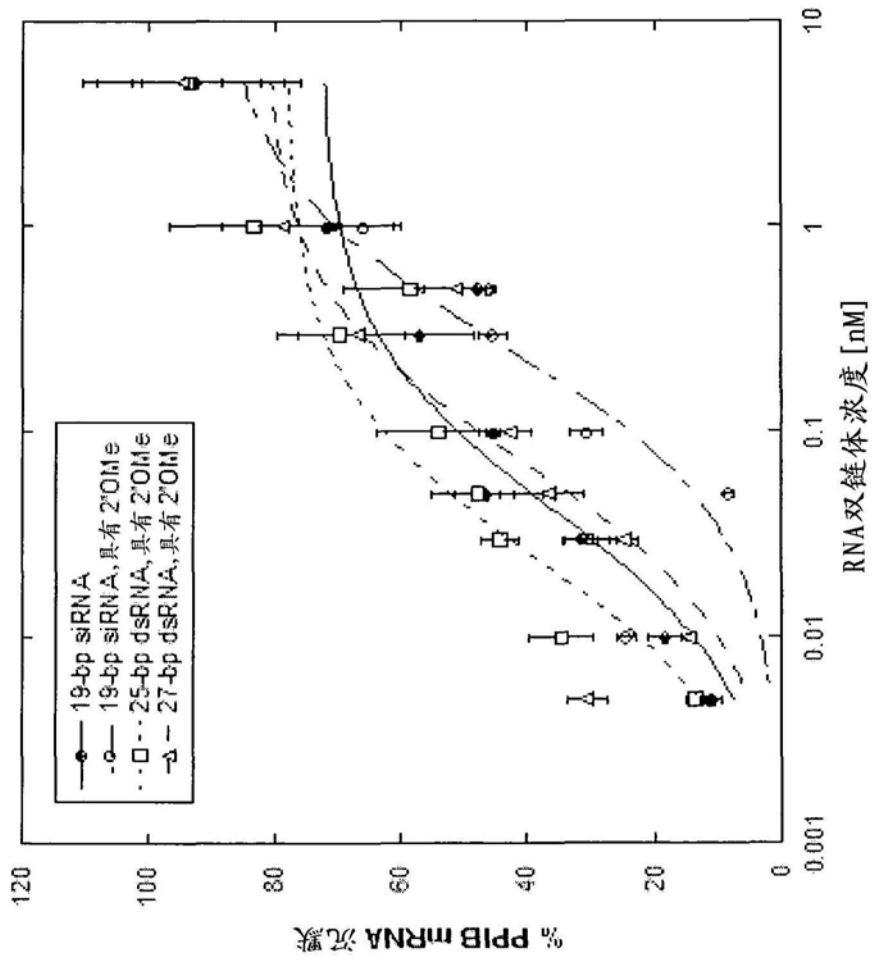


图6B

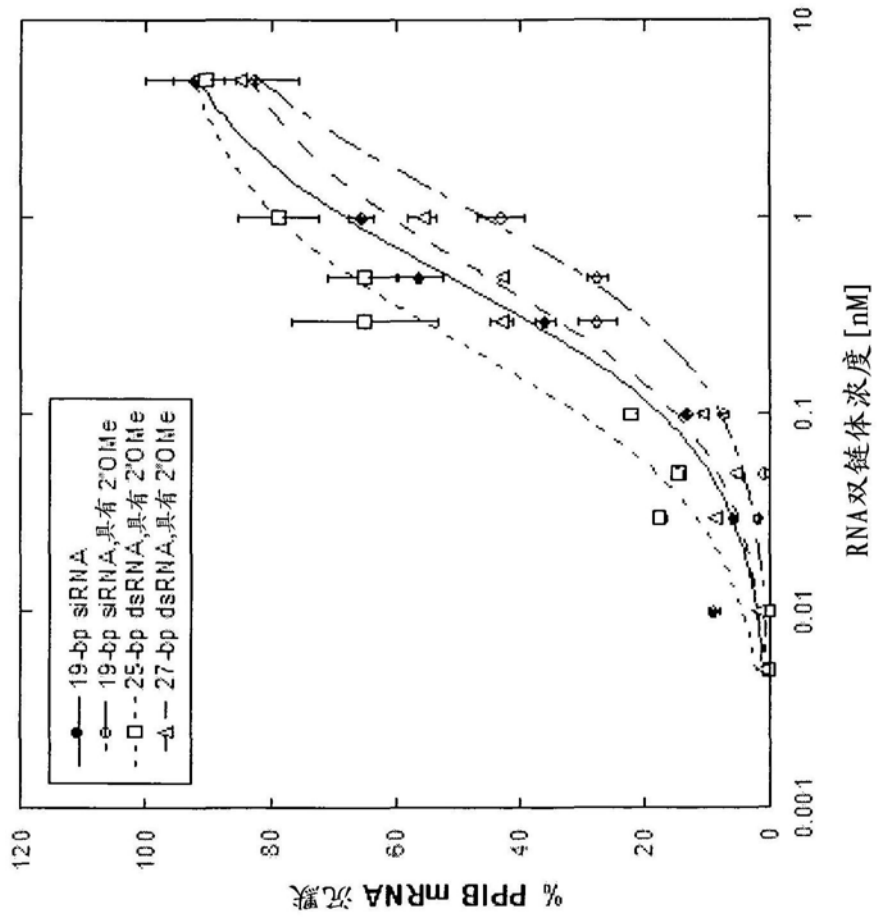


图6C

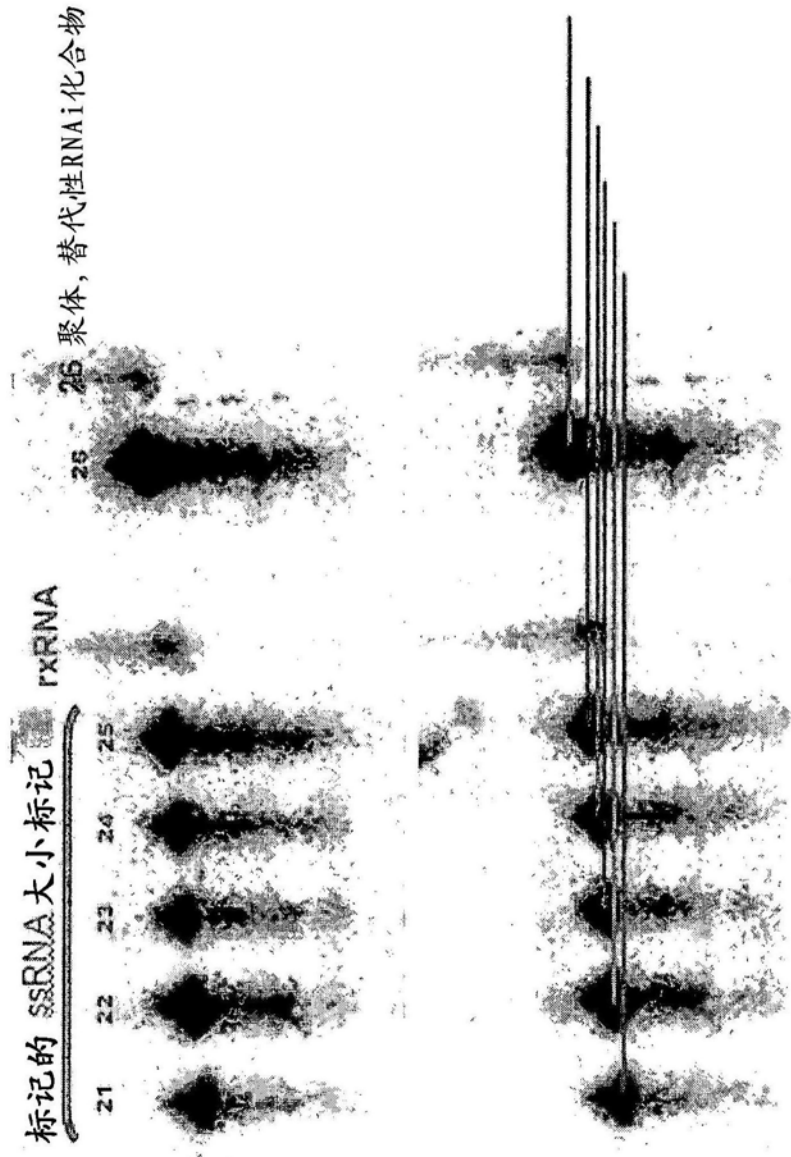


图8A

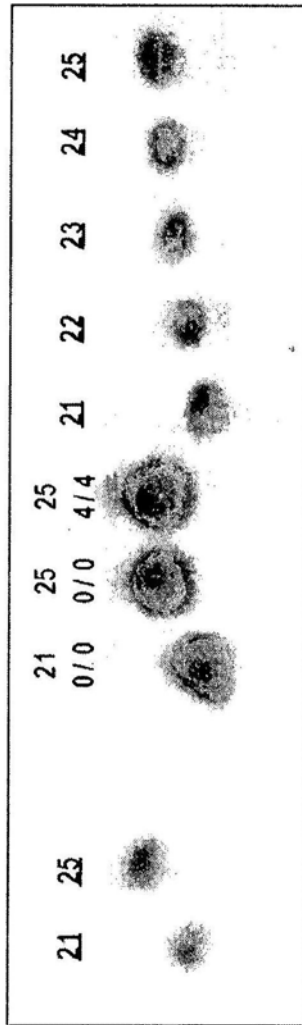


图8B

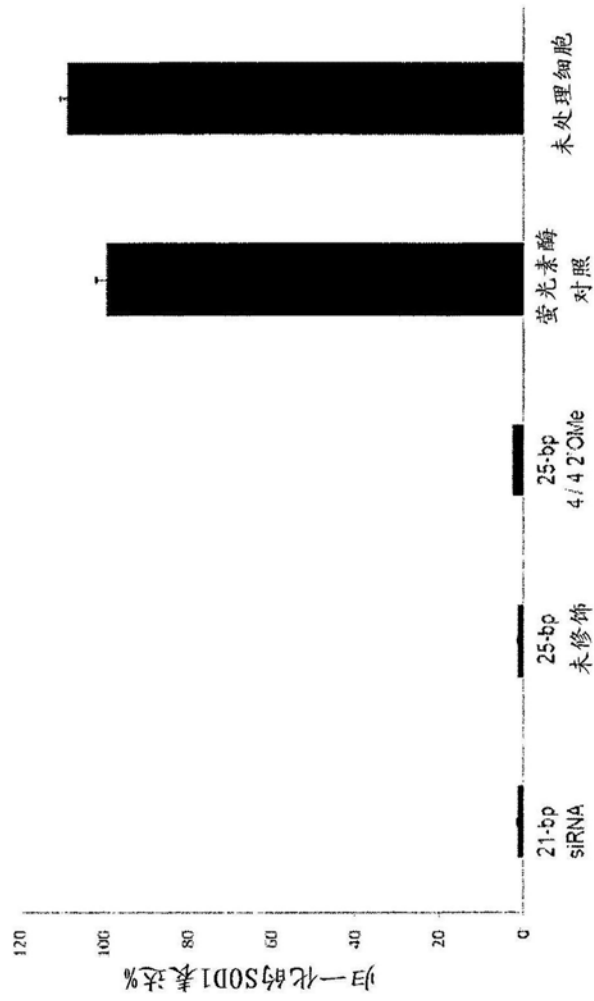


图8C

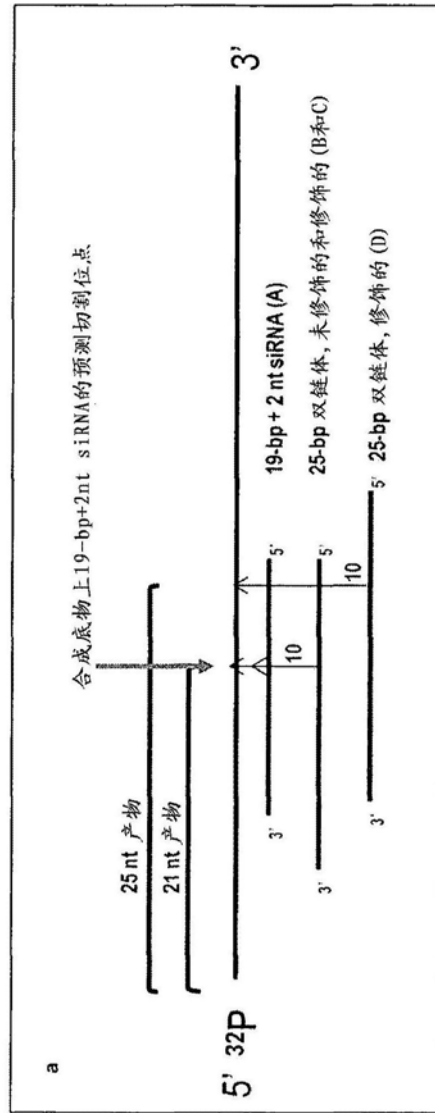


图9A

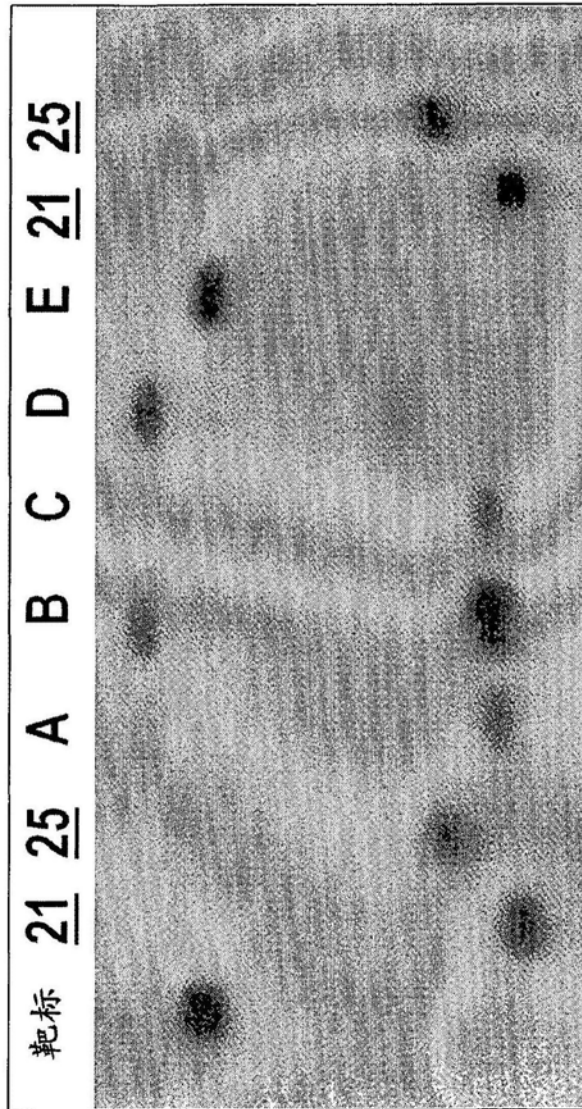


图9B

ID号	极性	序列 (5' → 3')
10015	有义	P.G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.D.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	反义	U.A.C.U.U.C.U.C.A.U.U.D.C.C.A.C.C.U.D.U.G.C.C
10023	有义	P.G.C.C.G.A.U.G.U.C.U.A.U.D.G.A.A.G.A.U.U.C.U.G
	反义	C.A.G.A.A.U.C.U.C.A.A.U.A.G.A.C.A.U.C.G.G.C

图10A

化学基团ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
东义(5'→3')	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
BARMA(原核的)	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
具有PS的BARMA	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
C和U上均为2'F	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
2'Ome, 中央为2'F	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
末端为交替的2'Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
末端为交替的2'Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
末端为2'F, 具有PS	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
未修饰																										
2和4	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
2和4	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
2和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
3和2	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
4和5	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
4和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
4和10	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
4和12	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
5和5	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
5和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
5和10	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
5和12	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
8和6	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
8和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
8和10	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
8和12	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
10和6	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
10和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
10和10	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
10和12	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
12和6	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
12和8	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
12和10	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
12和12	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
16和4	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	Ome	
24位SS碱基(从3'端起的第2个)																										
为根配, 4x2' Ome化学基团																										
0和5有根配																										
SS的5'端为UCUCUU																										
SS的3'端为UCUCUU																										
反义(3'→5')																										
未修饰																										
3'端为4个2'Ome																										
3'端为(4)2'Ome' 具有PS																										
均为2'F																										
3'端为(4)2'Ome, 其余为2'F																										
交替的2'Ome																										
交替的2'Ome																										
末端为2'F, 3'端具有6个PS																										
AS的nt12具有2'Ome,																										
无其他修饰																										
AS的3'端为AAGACA																										
AS的5'端为AAGACA																										
以上的对照																										
红色: MM																										
绿色: 碱基对碱基对																										

图10B

在针对SOD1之活性进行的双链体10015测试中选择的2' OMe替代性化学基团

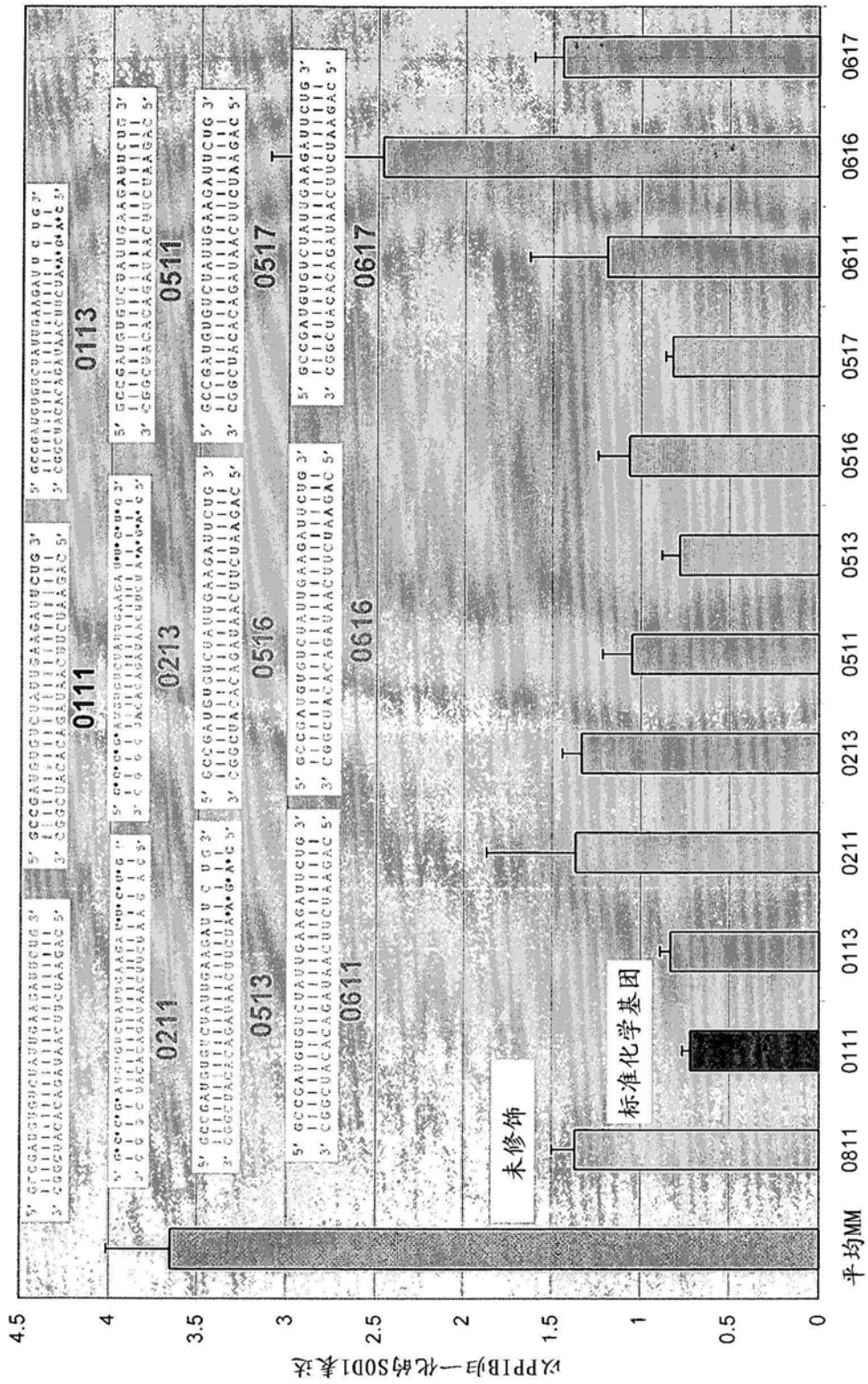


图11

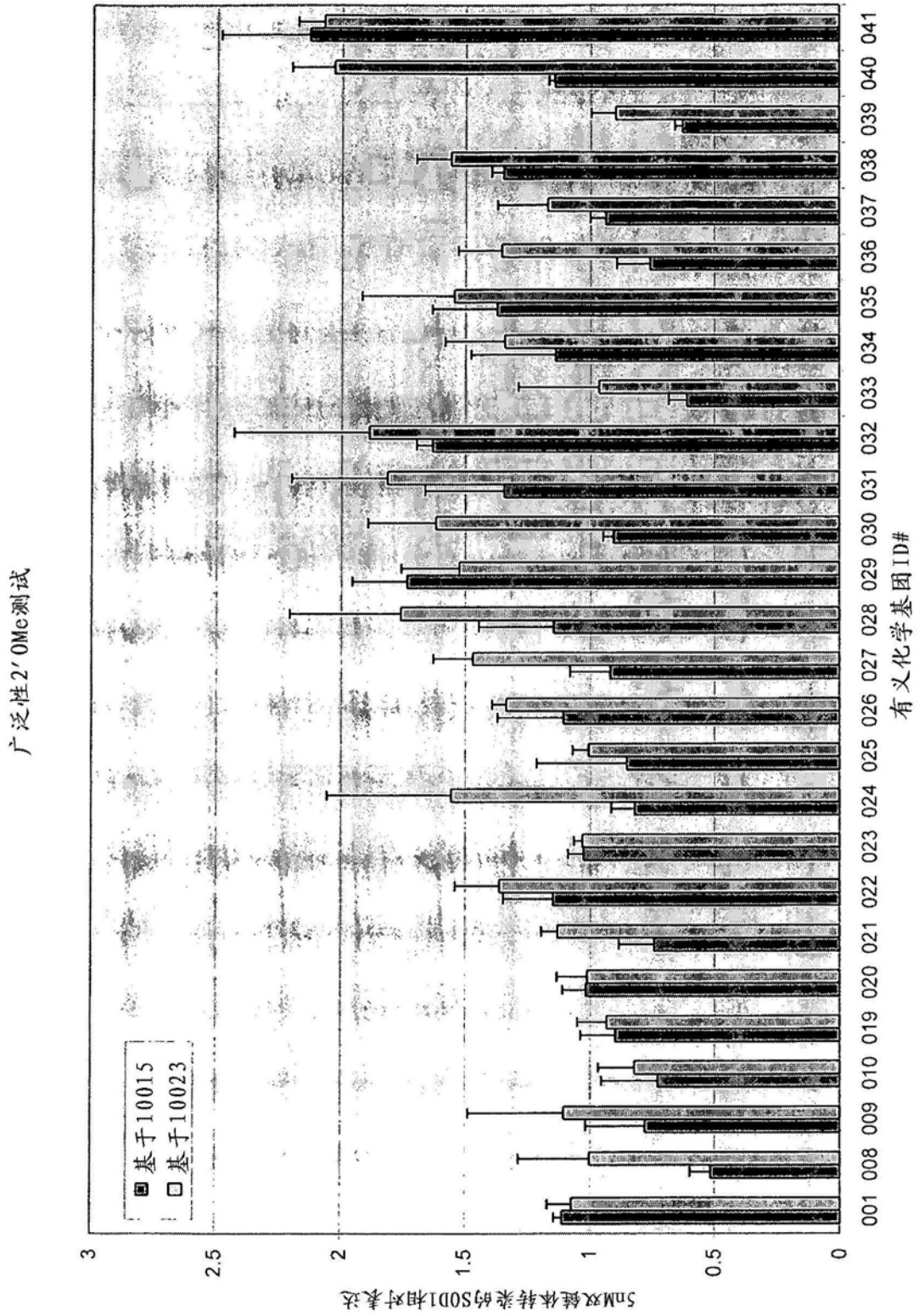


图12A

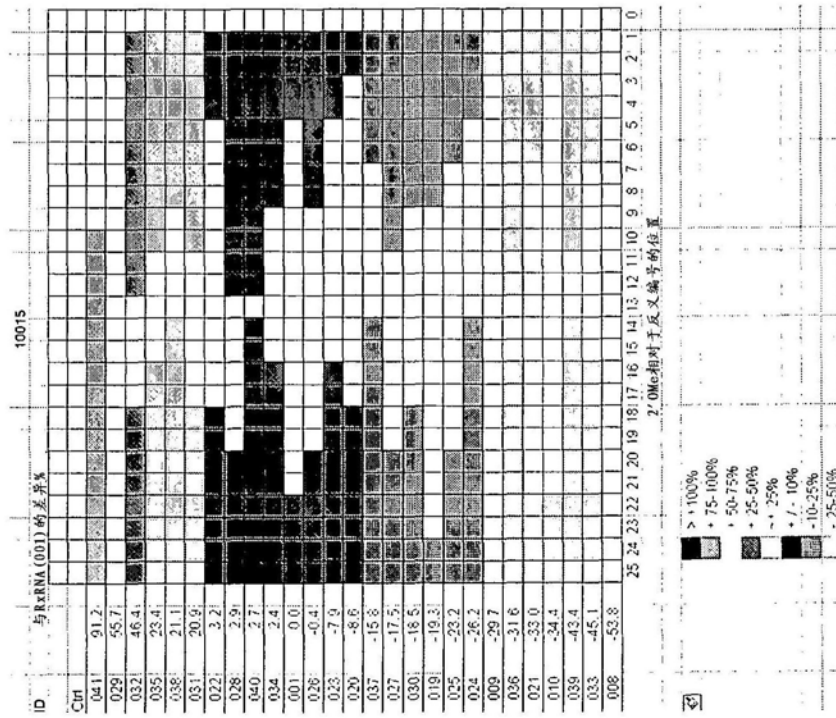


图12B

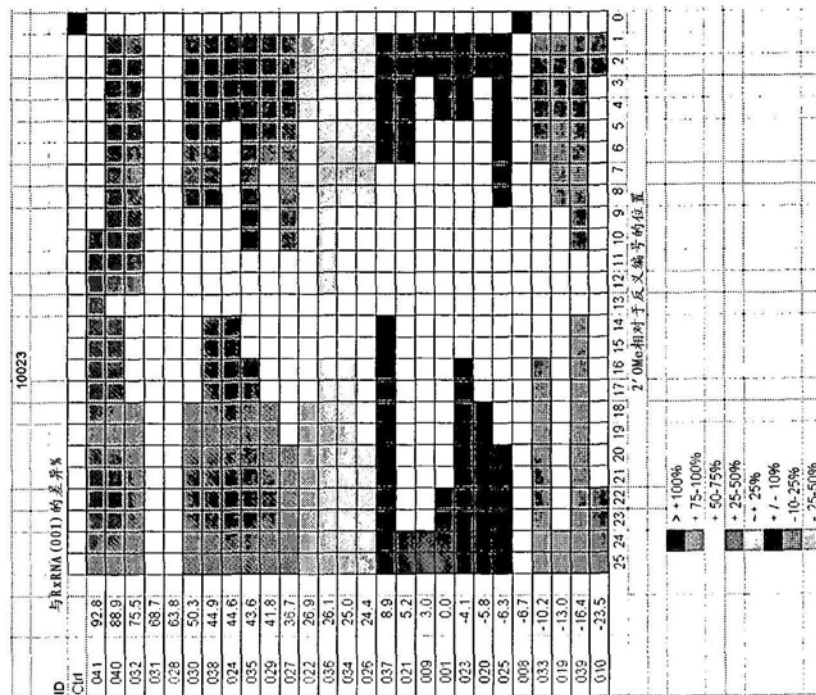


图12C

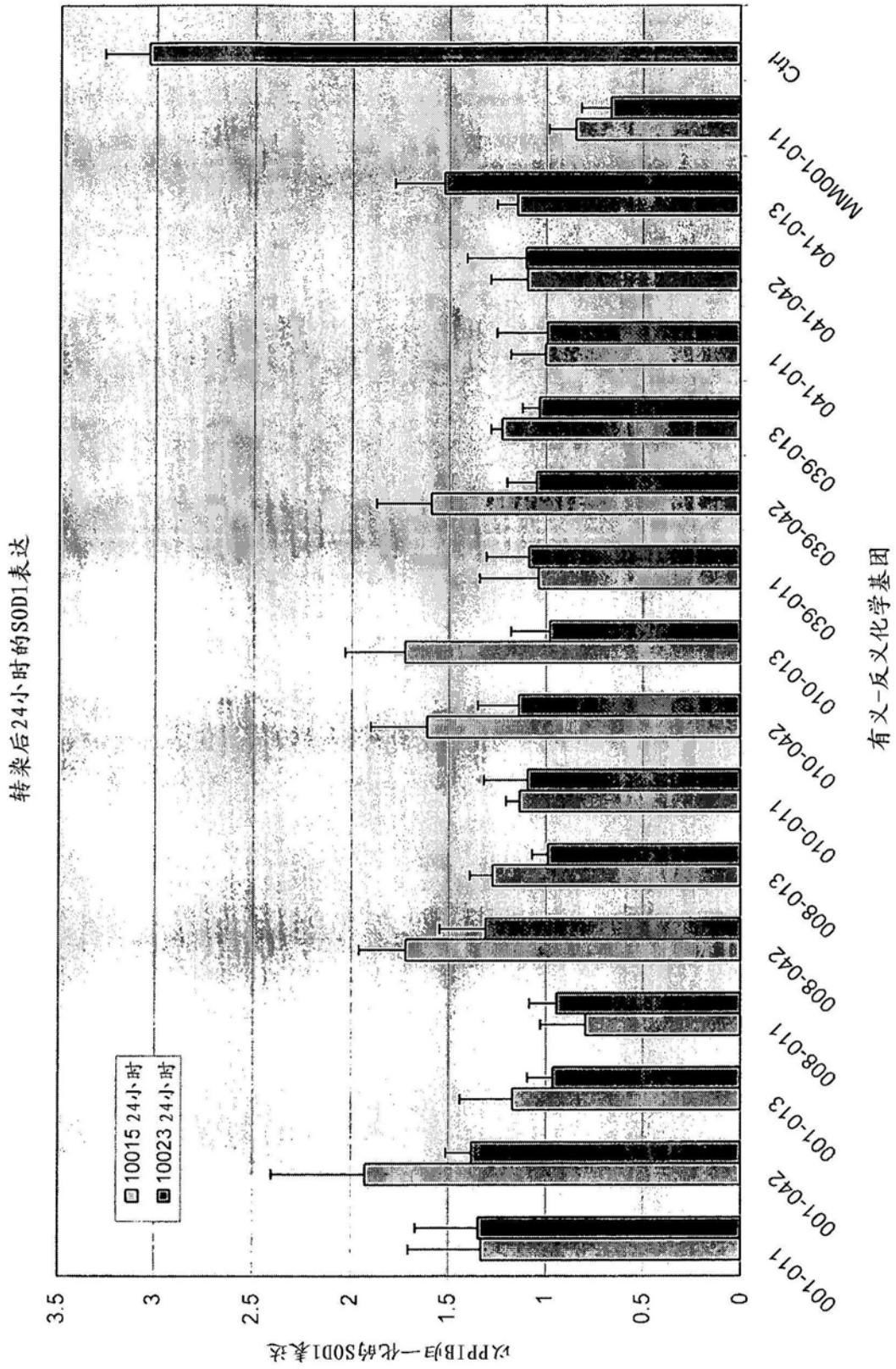


图13A

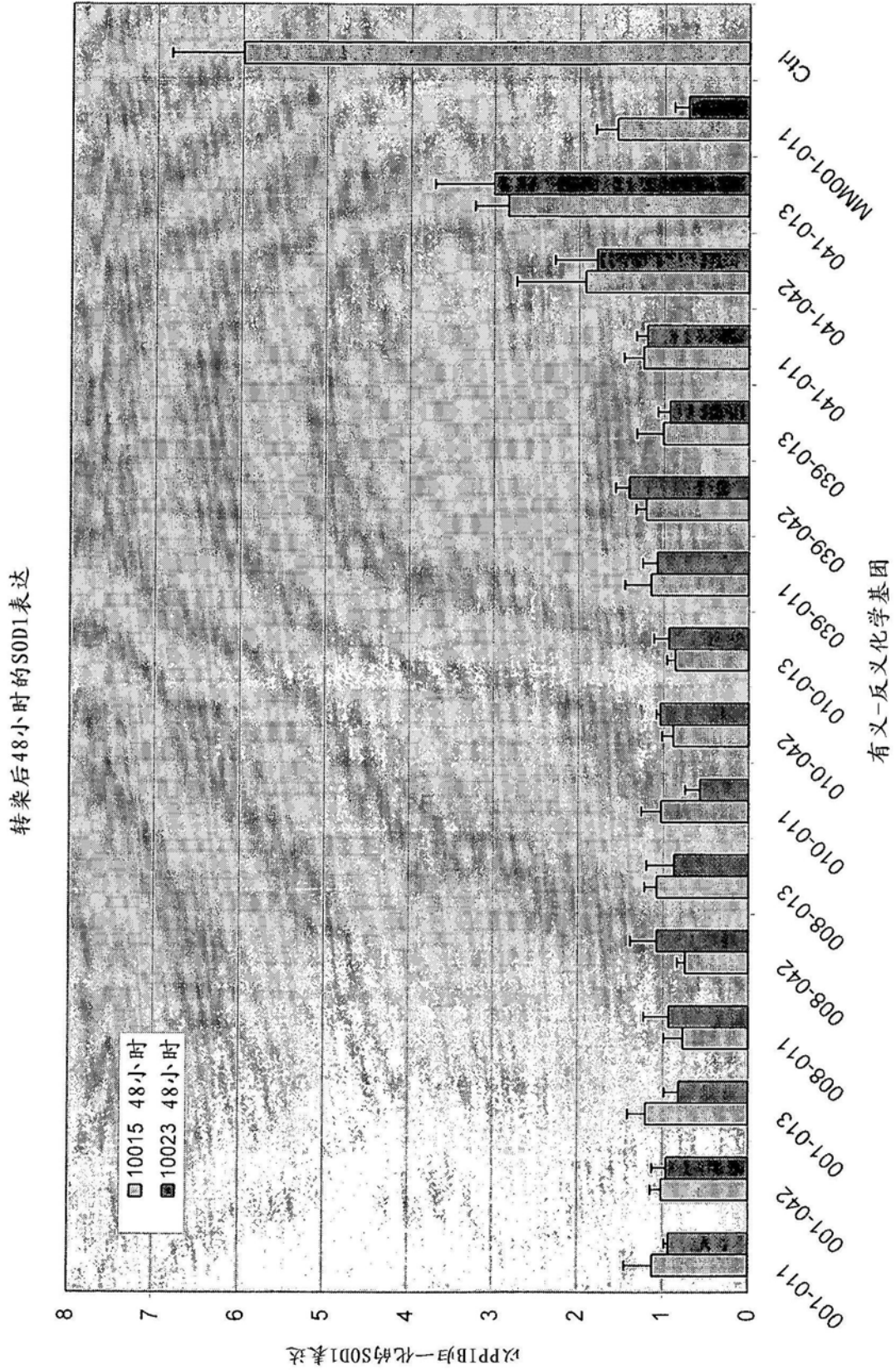


图13B

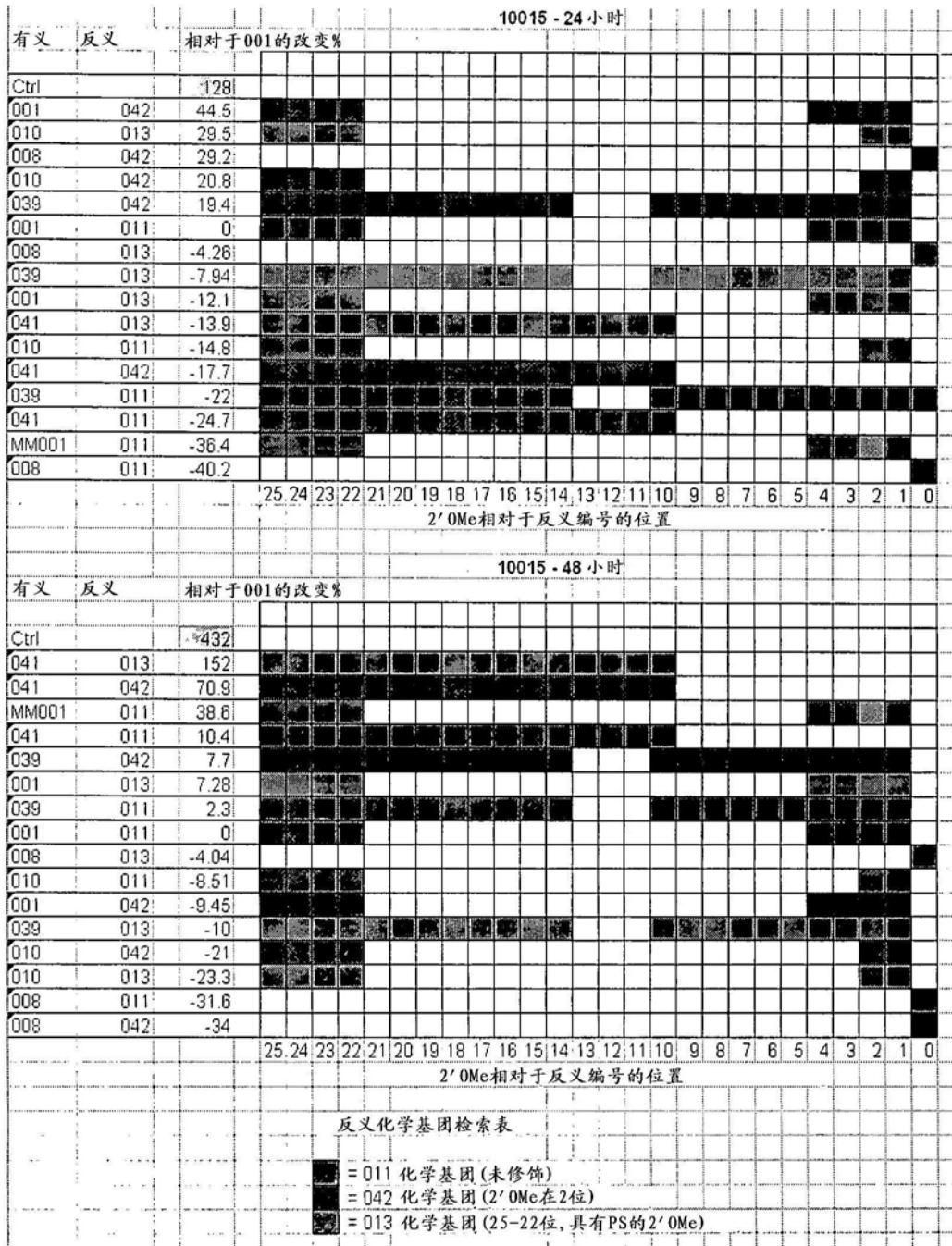


图13C

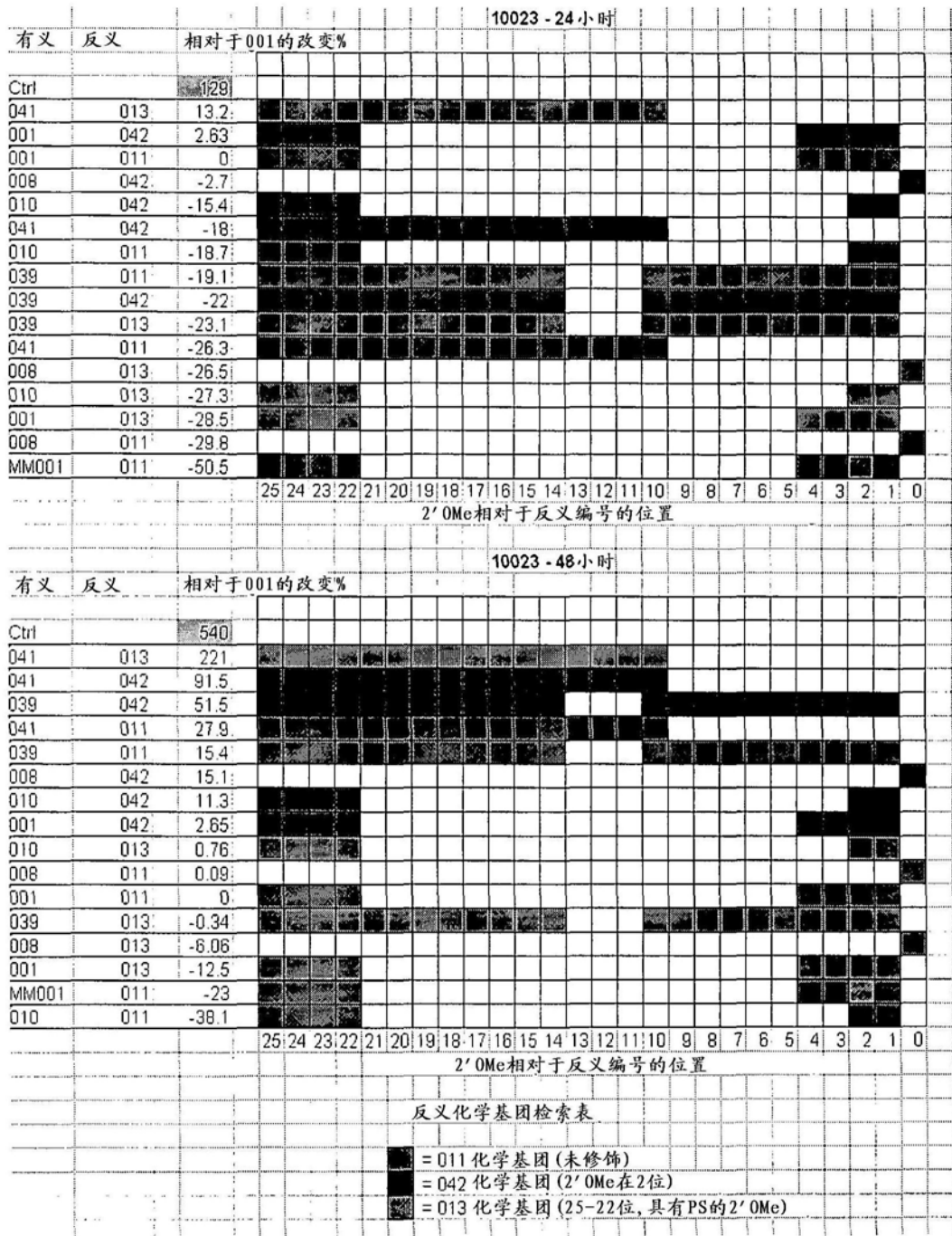


图13D

A 基于序列10023

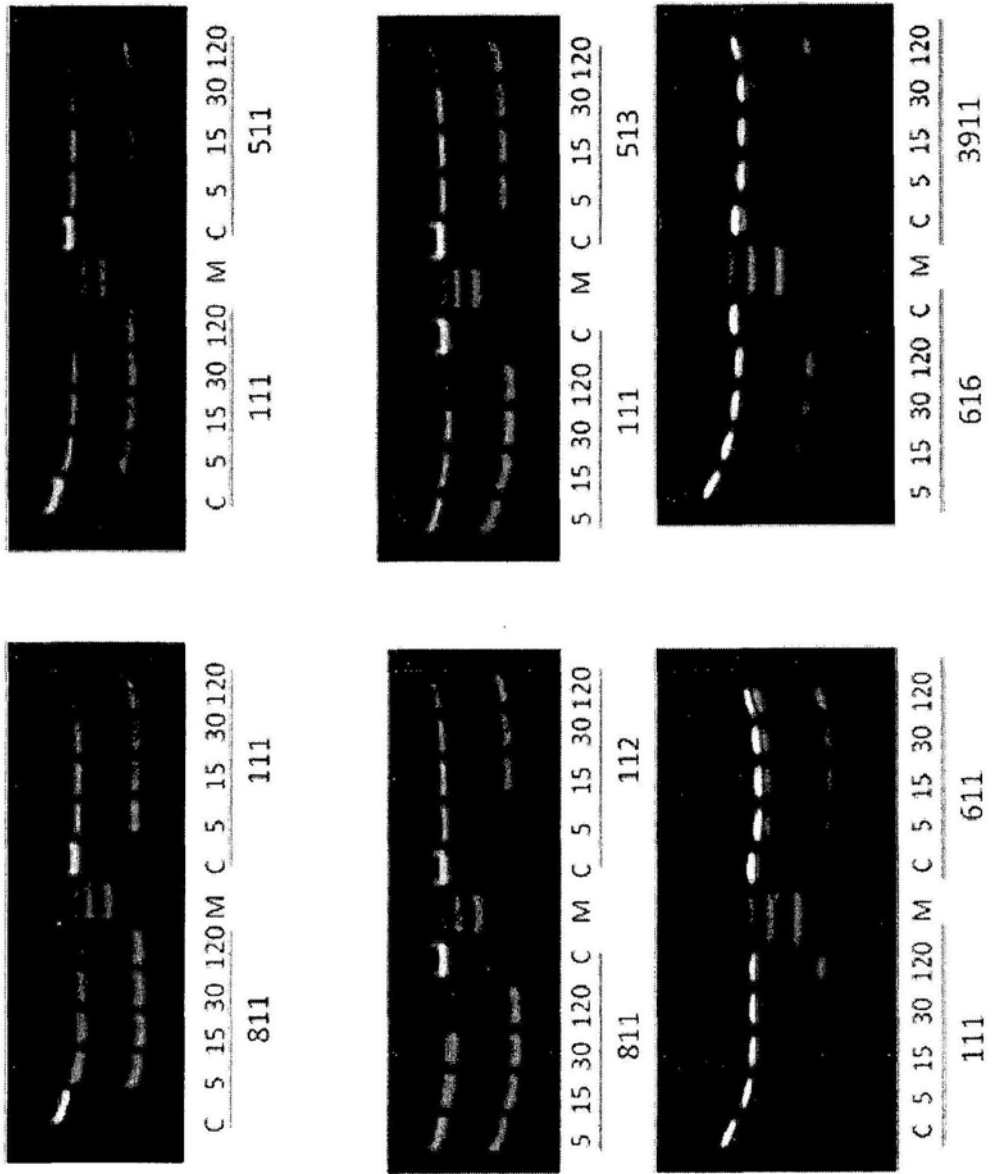


图14A

B 基于序列10015

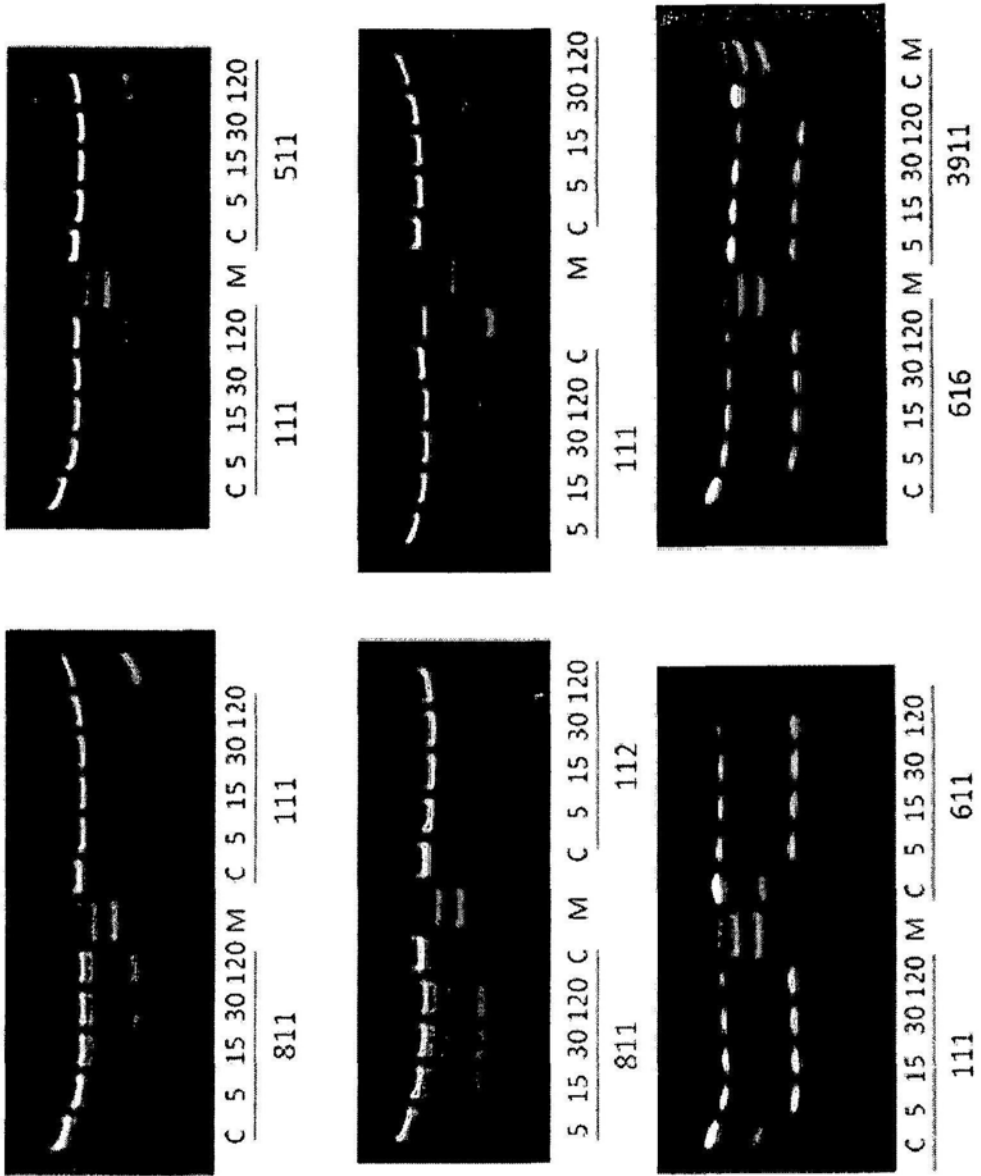


图14B

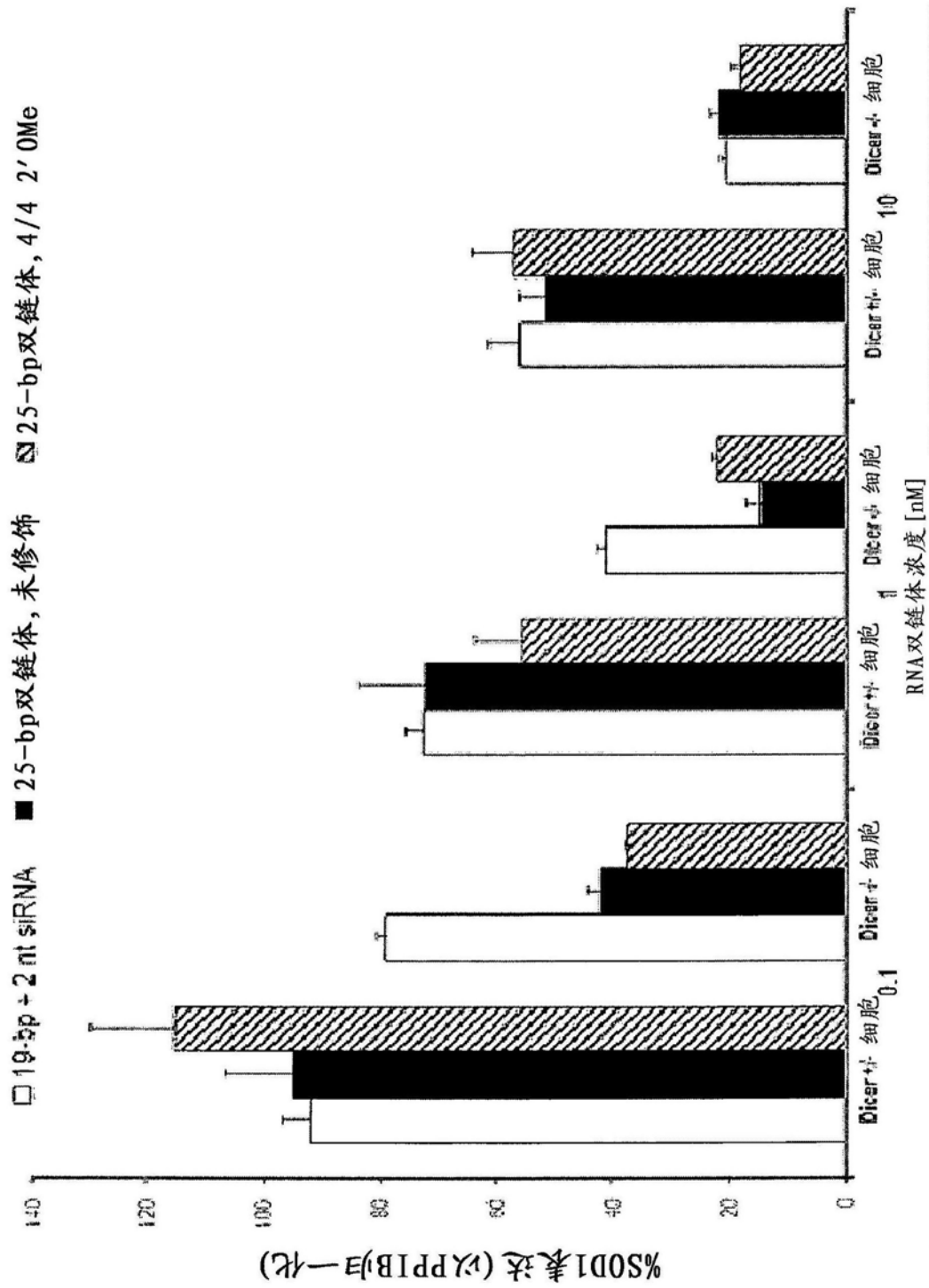


图15A

序列名	极性	序列 (5' → 3')
19-bp + 2 nt 双链体 (11892)	有义	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.C.U.U
	反义	G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A.U.U
(11893)	有义	G.G.C.A.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.A.G.U.A
	反义	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.G.C.C
(11897)	有义	mG.mG.mC.mA.A.A.G.G.U.G.G.A.A.A.U.G.A.A.G.A.A.mA.mG.mU.mA
	反义	U.A.C.U.U.U.C.U.U.C.A.U.U.U.C.C.A.C.C.U.U.U.G.C.C

图15B

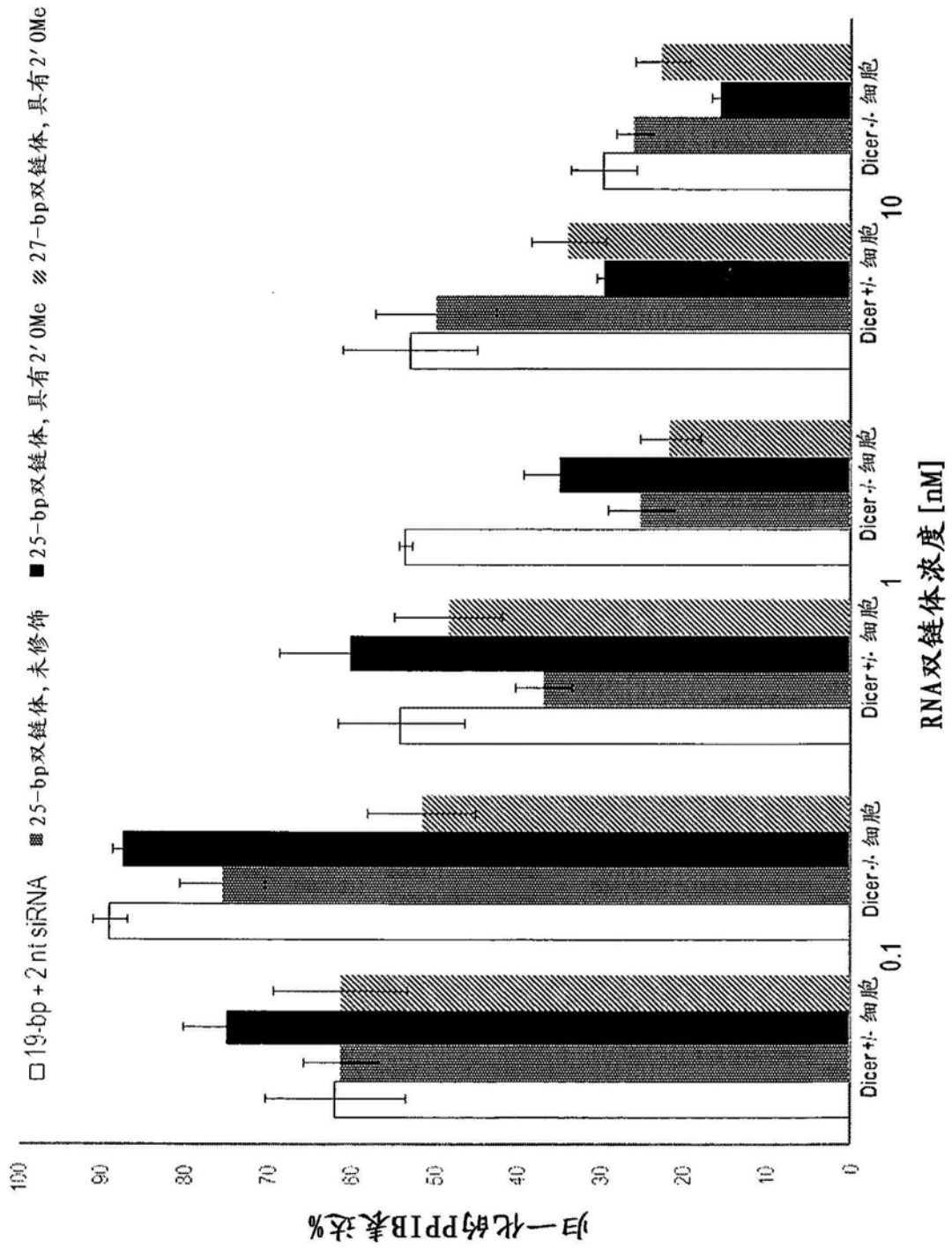


图16A

序列名	极性	序列 (5' → 3')
19-bp + 2 nt 未修饰 (10167)	有义	G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.C.A.A.A.A.A.U.U
	反义	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.U.U
25-bp 未修饰 (11388)	有义	C.U.C.U.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.A.A.A
	反义	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.G.A.A.G.A.G
25-bp, 具有 2'OMe (10460)	有义	mC.mU.mC.mU.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.mA.mA.mA
	反义	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.G.A.A.G.A.G
27-bp, 具有 2'OMe (10462)	有义	mG.mU.mC.mU.C.U.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.U.G.U.U.C.C.A.mA.mA.m A.mA
	反义	U.U.U.U.U.G.G.A.A.C.A.G.U.C.U.U.U.C.C.G.A.A.G.A.G.A.C

图16B

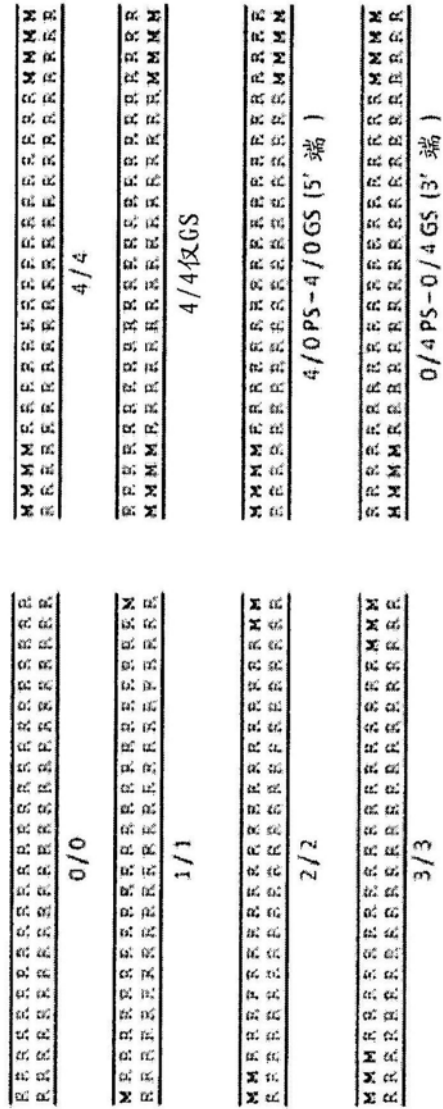


图17A

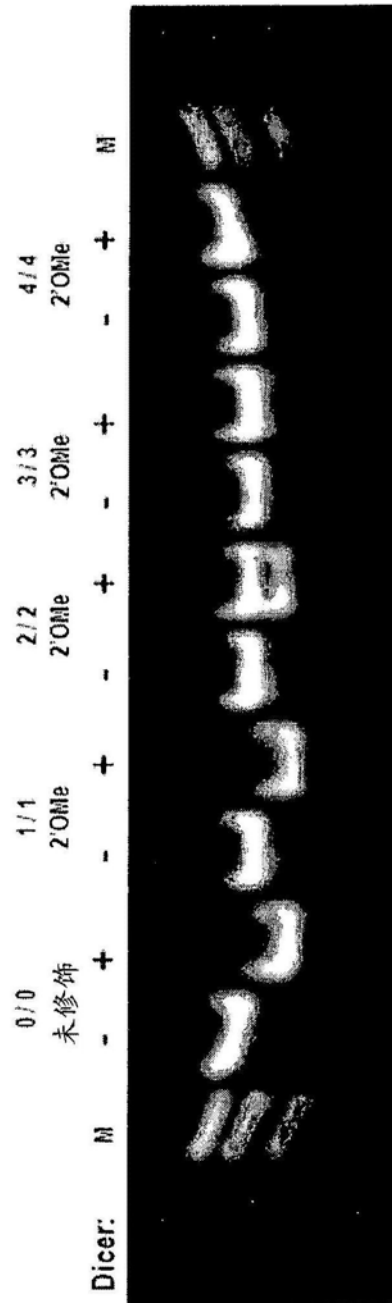


图17B

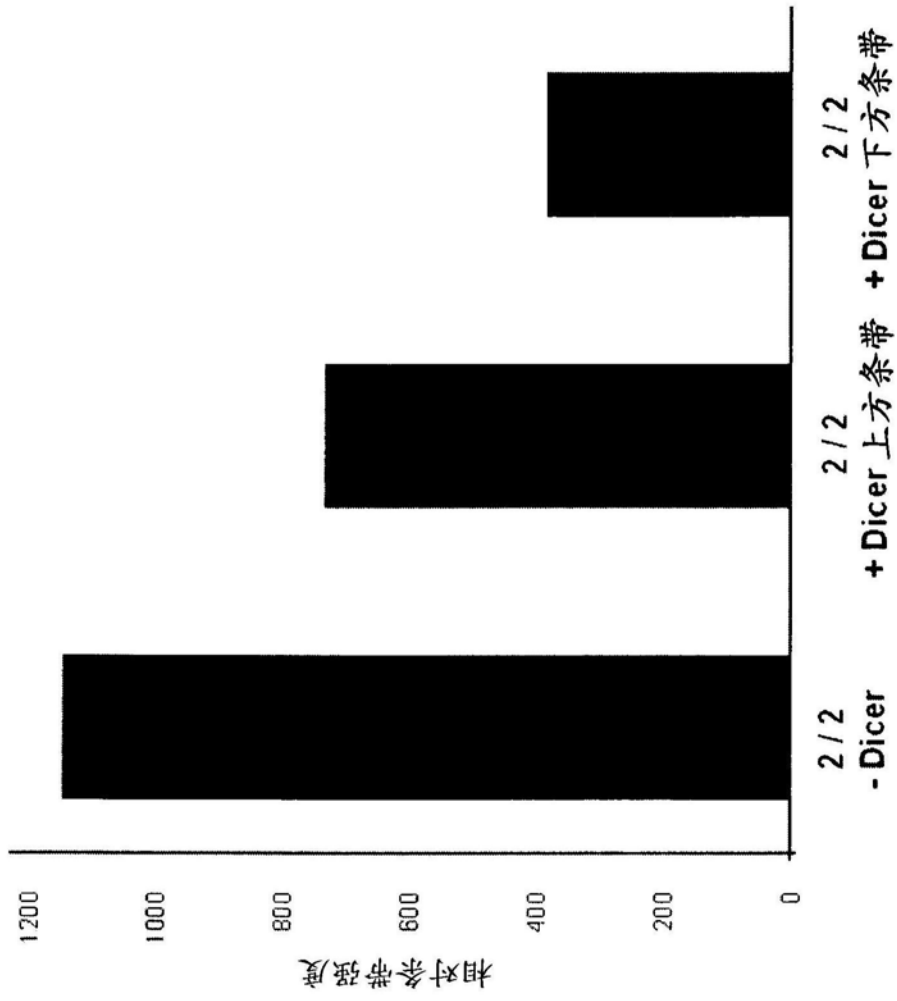


图17C

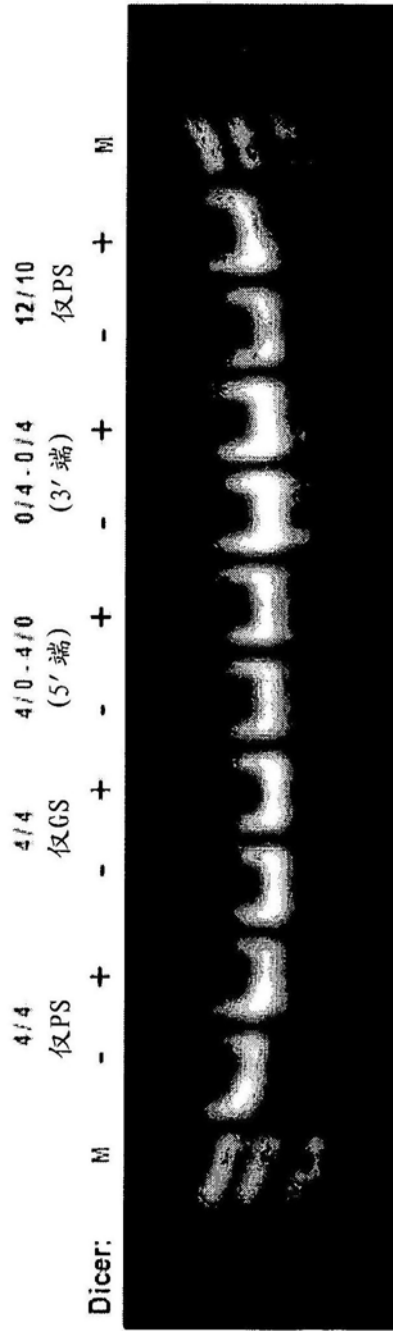


图17D

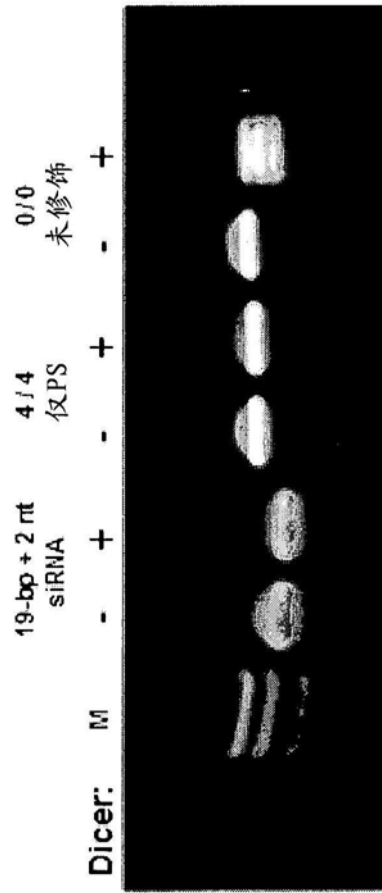


图17E