



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849008 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 200880113683.4

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2008.09.17

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/11 (2006.01)

60/973,548 2007.09.19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/076675 2008.09.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/039173 EN 2009.03.26

(71) 申请人 应用生物系统有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 N·普瑞 I·查尔斯

S·马格达雷诺 A·乌拉索夫

C·博内特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

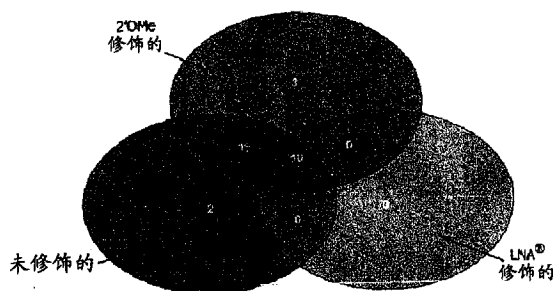
权利要求书 5 页 说明书 51 页 附图 51 页

(54) 发明名称

用于减少 RNAi 中的脱靶表型效应的 siRNA 的不依赖于序列的修饰形式和其稳定形式

(57) 摘要

提供了 siRNA 的具有修饰核苷酸的修饰形式。本文中提供的具有修饰形式和修饰核苷酸的短干扰 RNA 在内源基因的 RNA 干扰中减少脱靶效应。已证明另外的修饰形式化的 siRNA 对于富含核酸酶的环境是稳定的。出人意料地,增加或保持链偏向性,虽然是保持内源 RNA 干扰的效力所必需的,但不足以在细胞生物学测定中减少脱靶效应。



1. 一种化学合成的过客（有义）寡核苷酸，其具有 15 至 30 个核苷酸的长度并且包含：不依赖于序列的修饰形式 (1)、不依赖于序列的修饰形式 (2) 和不依赖于序列的修饰形式 (3) 中的一个：

(1) $5' \text{ N}_p\text{-m-m-N}_x\text{-m-m-N}_q\text{-n}_r3'$ ，其中 p 为 0 或 1； x 为 7、8、9、10 或 11； r 为 0、1 或 2；以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+x+r+4)$ 的整数；

(2) $5' \text{ N}_p\text{-m-m-N}_y\text{-m-N}_z\text{-m-N}_q\text{-n}_r3'$ ，其中 p 为 0 或 1； y 为 7、8 或 9 并且 z 为 1；或 y 为 7 并且 z 为 2 或 3； r 为 0、1 或 2；以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+4)$ 的整数；

(3) $5' \text{ m-N}_1\text{-m-N}_x\text{-m-m-N}_q\text{-n}_r3'$ ，其中 x 为 8、9 或 10； r 为 0、1 或 2；以及 q 为表示过客链的长度减去 $(x+r+5)$ 的整数；

其中，

各 m 独立地是二环核苷酸或三环核苷酸；

各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸；

当 m 是二环核苷酸时，各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸，和

当 m 是三环核苷酸时，各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸。

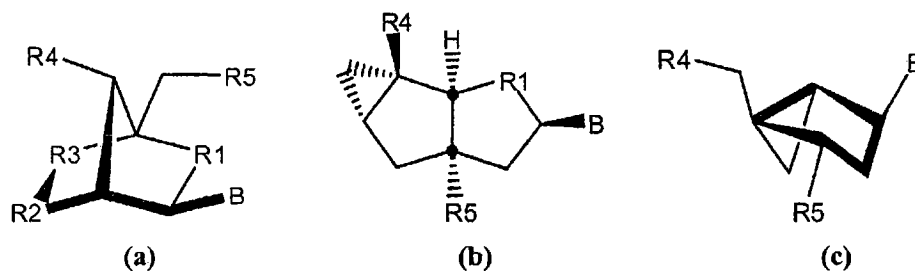
2. 包含权利要求 1 的过客（有义）寡核苷酸和引导（反义）寡核苷酸的化学合成的短干扰 RNA，所述引导（反义）寡核苷酸具有 15 至 30 个核苷酸，与至少 12 个核苷酸的过客（有义）寡核苷酸连续互补的区域；引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性。

3. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA，其中所述过客（有义）寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式 (1)， p 为 0， x 为 10 且 r 为 2。

4. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA，其中所述过客（有义）寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式 (1)， p 为 0， x 为 9 或 11 且 r 为 2。

5. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA，其中所述过客（有义）寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式 (2)， p 为 0， y 为 9 且 r 为 2。

6. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA，其中至少一个 m 具有结构 (a)、(b) 或 (c)：



其中

R_1 和 R_2 独立地是 O、S、 CH_2 或 NR，其中 R 是氢或 C_{1-3} -烷基；

R_3 是 CH_2 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ 、 CH-CH 或 $\text{CH}_2\text{-NR}$ ，其中 R 是氢或 C_{1-3} -烷基；

R_4 和 R_5 独立地是核苷间的连接、末端基团或保护基团；

R_4 和 R_5 中至少一个是核苷间的连接；和

B 是核碱基、核碱基衍生物或核碱基类似物。

7. 权利要求 6 的化学合成的短干扰 RNA，其中所述过客（有义）寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式 (1)， p 为 0， x 为 10， r 为 2，并且各 m 具有结构 (a)，其中 R_1 是 O， R_2 是

0 且 R3 是 CH₂。

8. 权利要求 6 的化学合成的短干扰 RNA, 其中所述过客(有义)寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式(1), p 为 1, x 为 9 或 10, r 为 2, 并且各 m 具有结构(a), 其中 R1 是 0, R2 是 0 且 R3 是 CH₂。

9. 权利要求 6 的化学合成的短干扰 RNA, 其中所述过客(有义)寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式(3), x 为 9 或 10, r 为 2, 并且各 m 具有结构(a), 其中 R1 是 0, R2 是 0 且 R3 是 CH₂。

10. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA, 其中所述过客(有义)寡核苷酸和所述引导(反义)寡核苷酸通过核苷酸环或连接体环共价连接, 从而形成短发夹寡核苷酸。

11. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA, 其中所述 siRNA 的各 3' 末端独立地具有 1 个、2 个或 3 个核苷酸的悬突。

12. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA, 其中至少一个核苷间的连接不是磷酸二酯核苷间连接。

13. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA, 其中所述化学合成的短干扰 RNA 进一步与靶向细胞的配体结合。

14. 权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA, 其中用磷酸盐/酯、C₁₋₁₂-烷基、C₁₋₁₂-烷基胺、C₁₋₁₂-烯基、C₁₋₁₂-炔基、C₁₋₁₂-环烷基、C₁₋₁₂-芳烷基、芳基、酰基或甲硅烷基取代基进一步衍生 5' 末端。

15. 包含权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA 和生物学上可接受的载体的组合物。

16. 包含权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA 和转染剂的试剂盒。

17. 使关于通过 RNA 干扰抑制靶基因表达的脱靶事件减少至最少的方法, 该方法包括: 将含有靶基因的细胞与足以减少脱靶事件同时保持效力的量的权利要求 2 的化学合成的短干扰 RNA 接触。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述基因是内源基因。

19. 权利要求 17 的方法, 其中所述接触是含有所述细胞的细胞培养物或含有所述细胞的组织与所述化学合成的短干扰 RNA 的体外接触。

20. 权利要求 17 的方法, 其中所述接触是含有所述细胞的组织、含有所述细胞的体液或含有所述细胞的器官与所述化学合成的短干扰 RNA 的离体接触。

21. 权利要求 17 的方法, 其中所述接触是含有所述细胞的器官或动物与所述化学合成的短干扰 RNA 的体内接触。

22. 在通过 RNA 干扰抑制外源提供的靶基因的表达中使由过客链产生的切割减少至最少的方法, 该方法包括: 将含有所述靶基因的细胞与足以使过客链产生的切割减少至最少同时保持引导链的效力的量的化学合成的短干扰 RNA 接触, 所述短干扰 RNA 包含:

过客(有义)寡核苷酸, 其具有 15 至 30 个核苷酸的长度, 并且包含如下的不依赖于序列的修饰形式(1)、不依赖于序列的修饰形式(2)和不依赖于序列的修饰形式(3)中的一个:

(1) 5' N_p-m-m-N_x-m-m-N_q-n_r3', 其中 p 为 0 或 1; x 为 7、8、9、10 或 11; r 为 0、1 或 2; 并且 q 是表示过客链的长度减去 (p+x+r+4) 的整数;

(2) 5' N_p-m-m-N_y-m-N_z-m-N_q-n_r 3', 其中 p 为 0 或 1; y 为 7、8 或 9 并且 z 为 1; 或 y 为

7 并且 z 为 2 或 3; r 为 0、1 或 2; 并且 q 是表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+4)$ 的整数;

(3) $5' \text{ } m\text{-}N_1\text{-}m\text{-}N_x\text{-}m\text{-}m\text{-}N_q\text{-}n_r \text{ } 3'$, 其中 x 为 8、9 或 10; r 为 0、1 或 2; 并且 q 为表示过客链的长度减去 $(x+r+5)$ 的整数;

其中

各 m 独立地是 $2'$ - 修饰的核苷酸;

各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸;

各 N 独立地是未修饰的核苷酸;

和

引导 (反义) 寡核苷酸, 其具有 15 至 30 个核苷酸, 与至少 12 个核苷酸的过客 (有义) 寡核苷酸连续互补的区域; 引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性。

23. 权利要求 22 的方法, 其中所述 $2'$ - 修饰的核苷酸的 $2'$ 修饰包括 H、溴、氯、碘、氟、阿拉伯糖构象中的氟 (FANA)、SH、 NH_2 、CN、叠氮化合物或 OR、R、SR、NHR 或 N(R)_2 , 其中 R 是烷基、烯基、炔基、烷氧基、氧烷基、烷氧基烷基或烷基胺, 其中烷基部分是 C1-C6。

24. 短干扰 RNA, 其包含:

过客 (有义) 寡核苷酸, 其具有 17 至 30 个核苷酸的长度并且包含: 不依赖于序列的修饰形式 (4)、形式 (5) 和形式 (6) 中的一个:

(4) $5' \text{ } m_p\text{-}N_x\text{-}m\text{-}m\text{-}N_q\text{-}n_r \text{ } 3'$, 其中当 p 为 0 时, x 为 12; 当 p 为 1 时, x 为 11; 当 p 为 2 时, x 为 10; 当 p 为 3 时, x 为 9; 当 p 为 4 时, x 为 8; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+x+r+2)$ 的整数;

(5) $5' \text{ } m\text{-}m\text{-}N_x\text{-}m\text{-}N_q\text{-}n_r \text{ } 3'$, 其中 x 为 11; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(x+r+3)$ 的整数;

(6) $5' \text{ } m_p\text{-}N_y\text{-}m\text{-}N_z\text{-}m\text{-}N_q\text{-}n_r \text{ } 3'$, 其中 p 为 3; y 为 9 并且 z 为 1; r 为 0、1 或 2; 以及 q 为表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+2)$ 的整数;

和

引导 (反义) 寡核苷酸, 其具有 17 至 30 个核苷酸, 与至少 12 个核苷酸的过客 (有义) 寡核苷酸连续互补的区域; 引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性;

其中

各 m 独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 $2'$ - 修饰的核苷酸;

各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸, 且为悬突核苷酸;

当 m 是二环核苷酸时, 各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸,

当 m 是三环核苷酸时, 各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸, 和

当 m 是 $2'$ - 修饰的核苷酸时, 各 N 独立地是除了 $2'$ - 修饰的核苷酸外的核苷酸。

25. 权利要求 24 的短干扰 RNA, 其中

所述过客 (有义) 寡核苷酸具有不依赖于序列的修饰形式 (4), p 为 2, x 为 10, r 为 2, 各 n 是悬突核苷酸, 并且各 n 独立地是修饰的核苷酸,

所述引导 (反义) 寡核苷酸包含 2 个 $3'$ - 悬突修饰的核苷酸, 和

各修饰的核苷酸独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 $2'$ - 修饰的核苷酸。

26. 权利要求 25 的短干扰 RNA, 其中所述过客寡核苷酸的 $3'$ 倒数第三个位点和 $3'$ 倒数第四个位点中的至少一个是修饰的核苷酸。

27. 权利要求 25 的短干扰 RNA, 其中

当长度为 17 个核苷酸时, 所述引导寡核苷酸的位点 2 和 3 中的至少一个是修饰的核苷酸;

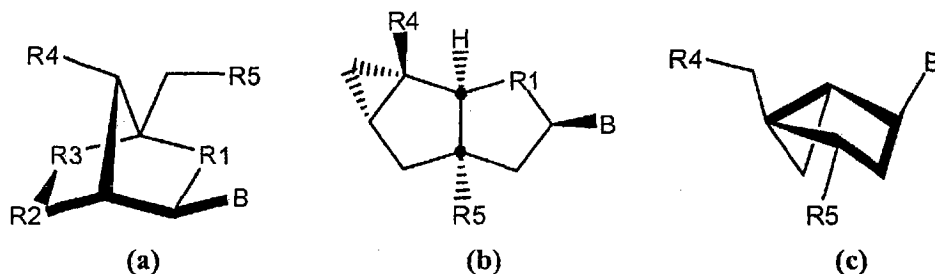
当长度为 18 个核苷酸时, 所述引导寡核苷酸的位点 2、3 和 4 中的至少一个是修饰的核苷酸;

当长度为 19 个核苷酸时, 所述引导寡核苷酸的位点 2、3、4 和 5 中的至少一个是修饰的核苷酸;

当长度为 20 个核苷酸时, 所述引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5 和 6 中的至少一个是修饰的核苷酸; 和

当长度为 21-30 个核苷酸时, 所述引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7 中的至少一个是修饰的核苷酸。

28. 权利要求 24、25、26 或 27 的短干扰 RNA, 其中所述过客 (有义) 寡核苷酸的至少一个 m 具有结构 (a)、(b) 或 (c):



其中

R1 和 R2 独立地是 O、S、CH₂ 或 NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

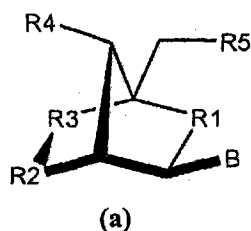
R3 是 CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH 或 CH₂-NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

R4 和 R5 独立地是核苷间的连接、末端基团或保护基团;

R4 和 R5 中至少一个是核苷间的连接; 和

B 是核碱基、核碱基衍生物或核碱基类似物。

29. 权利要求 24、25、26 或 27 的短干扰 RNA, 其中各修饰的核苷酸具有结构 (a):



其中

R1 和 R2 独立地是 O、S、CH₂ 或 NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

R3 是 CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH 或 CH₂-NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

R4 和 R5 独立地是核苷间的连接、末端基团或保护基团;

R4 和 R5 中至少一个是核苷间的连接; 和

B 是核碱基、核碱基衍生物或核碱基类似物。

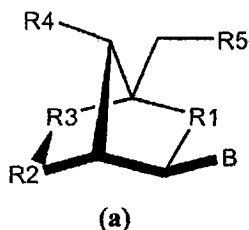
30. 包含权利要求 24 至 29 中任一项的短干扰 RNA 和生物学上可接受的载体的组合物。

31. 在有此需要的受试者中减少关于通过 RNA 干扰抑制靶基因表达的脱靶事件的方法,该方法包括:将所述受试者与足以减少脱靶事件同时保持效力的量的权利要求 25 至 30 的任一项的短干扰 RNA 接触。

32. 权利要求 31 的方法,其中接触是通过血管内注射的施用。

33. 一种方法,其包括:

获得权利要求 26 或 27 的短干扰 RNA,其中各修饰的核苷酸具有结构 (a):



其中

R1 和 R2 独立地是 O、S、CH₂ 或 NR,其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

R3 是 CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH-CH 或 CH₂-NR,其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基;

R4 和 R5 独立地是核苷间的连接、末端基团或保护基团;

R4 和 R5 中至少一个是核苷间的连接;和

B 是核碱基、核碱基衍生物或核碱基类似物

和

将所述短干扰 RNA 体内施用至有此需要的受试者;

其中在施用后,与缺乏修饰的核苷酸的短干扰 RNA 的量相比,体内存在更大量的所述短干扰 RNA。

用于减少 RNAi 中的脱靶表型效应的 siRNA 的不依赖于序列的修饰形式和其稳定形式

[0001] 领域

[0002] 本教导总地来说涉及用于减少 RNA 干扰中不依赖于序列的脱靶表型效应 (off-target phenotypic effect) 的组合物、方法和试剂盒。

[0003] 引言

[0004] 短干扰 RNA (siRNA) 有效地诱导互补 mRNA 的切割,从而使 mRNA 无功能,且在细胞中导致功能性蛋白质的丧失。此类分子借以发挥作用的机制已得到部分表征。简而言之, siRNA 的 2 条 RNA 链中的一条被整合入称为 RISC 的酶复合物中,然后该复合物能够结合并且切割含有互补序列的 mRNA,从而消除成熟 mRNA 使之不能翻译成蛋白质。siRNA 的两条链中的每一条都可被整合入 RISC 复合物。然而,在其 5' 末端具有较弱的碱基配对的链优先用于整合。因此,任何 siRNA 都将导致产生激活的 RISC 复合物的混合物 (其可切割预期的靶 RNA 和非靶向的 RNA)。在生物学应用中,期望绝大部分,优选所有的激活的 RISC 复合物包含与期望的靶互补的 siRNA 链。本教导提供了不仅可用于减少 mRNA 被非期望的 siRNA 链切割而且还可用于减少内源基因的干扰的脱靶效应的方法、组合物和试剂盒。

[0005] 概述

[0006] 出人意料地,增加或维持链偏向性 (strand bias),虽然是维持内源 RNA 干扰的效力所必需的,但不足以在细胞生物学测定中减少脱靶效应。本文中研究了在其中外源提供靶 mRNA 以及其中靶 mRNA 是内源 mRNA 的条件下,在其中将不同类型的修饰核苷酸引入 siRNA 的条件下以及在将不同修饰形式引入 siRNA 的条件下,减少或使脱靶效应降至最低同时维持效力的能力。此外,针对许多靶 RNA 中的每一个靶 RNA,研究了多种 siRNA 修饰形式。因此,减少或使脱靶事件降至最低并且维持高效 siRNA 的效力 (如在表型和细胞生物学水平上观察到的) 的修饰的核苷酸和修饰形式可用于任何 siRNA 序列,并且不依赖于 siRNA 的碱基序列。即,本文中提供的修饰形式是不依赖于序列的修饰。

[0007] 在一些实施方案中,提供了化学合成的过客 (passenger) (有义) 寡核苷酸,其具有 15 至 30 个核苷酸的长度并且包含如下的不依赖于序列的修饰形式 (1)、不依赖于序列的修饰形式 (2) 和不依赖于序列的修饰形式 (3) 中的一个:

[0008] (1) $5' N_p-m-m-N_x-m-m-N_q-n_r3'$, 其中 p 为 0 或 1; x 为 7、8、9、10 或 11; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 (p+x+r+4) 的整数;

[0009] (2) $5' N_p-m-m-N_y-m-N_z-m-N_q-n_r3'$, 其中 p 为 0 或 1; y 为 7、8 或 9 并且 z 为 1; 或 y 为 7 并且 z 为 2 或 3; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 (p+y+z+r+4) 的整数;

[0010] (3) $5' m-N_1-m-N_x-m-m-N_q-n_r3'$, 其中 x 为 8、9 或 10; r 为 0、1 或 2; 以及 q 为表示过客链的长度减去 (x+r+5) 的整数;

[0011] 其中各 m 独立地是二环核苷酸或三环核苷酸; 各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸; 当 m 是二环核苷酸时, 各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸, 以及当 m 是三环核苷酸时, 各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸。

[0012] 在一些实施方案中,提供了化学合成的短干扰 RNA,其包含上述过客(有义)寡核苷酸和引导(反义)寡核苷酸,所述引导寡核苷酸具有 15 至 30 个核苷酸,与至少 12 个核苷酸的过客(有义)寡核苷酸连续互补的区域;引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性。

[0013] 在一些实施方案中,提供了短干扰 RNA,其包含过客(有义)寡核苷酸和引导(反义)寡核苷酸,所述过客寡核苷酸具有 17 至 30 个核苷酸的长度并且包含不依赖于序列的修饰形式(4)、形式(5)和形式(6)中的一个,所述引导寡核苷酸具有 17 至 30 个核苷酸,与至少 12 个核苷酸的过客(有义)寡核苷酸连续互补的区域;引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性,

[0014] (4) $5' \text{ m}_p\text{-N}_x\text{-m-m-N}_q\text{-n}_r3'$, 其中当 p 为 0 时, x 为 12; 当 p 为 1 时, x 为 11; 当 p 为 2 时, x 为 10; 当 p 为 3 时, x 为 9; 当 p 为 4 时, x 为 8; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+x+r+2)$ 的整数;

[0015] (5) $5' \text{ m-m-N}_x\text{-m-N}_q\text{-n}_r3'$, 其中 x 为 11; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(x+r+3)$ 的整数;

[0016] (6) $5' \text{ m}_p\text{-N}_y\text{-m-N}_z\text{-m-N}_q\text{-n}_r3'$, 其中 p 为 3; y 为 9 并且 z 为 1; r 为 0、1 或 2; 以及 q 为表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+2)$ 的整数;

[0017] 其中各 m 独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 2' - 修饰的核苷酸; 各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸并且为悬突核苷酸; 当 m 是二环核苷酸时, 各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸, 当 m 是三环核苷酸时, 各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸, 以及当 m 是 2' - 修饰的核苷酸时, 各 N 独立地是除了 2' - 修饰的核苷酸外的核苷酸。

[0018] 在短干扰 RNA 的实施方案中, 过客(有义)寡核苷酸具有不依赖于序列的修饰形式(4), p 为 2, x 为 10, r 为 2, 各 n 是悬突核苷酸, 并且各 n 独立地是修饰的核苷酸; 引导(反义)寡核苷酸包含 2 个 3' - 悬突修饰的核苷酸; 并且各修饰的核苷酸独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 2' - 修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 过客寡核苷酸的 3' 倒数第三个位点和 3' 倒数第四个位点中的至少一个是修饰的核苷酸。3' 倒数第三个位点是从最后一个位点算起的第三个位点, 即在倒数第二个位点之前的位点(例如, 图 1H 的形式 DH47)。3' 倒数第四个位点是从最后一个位点算起的第四个位点, 即, 倒数第三个位点之前的位点(例如, 图 1H 的形式 DH29)。这样的 siRNA 例如在血清或血浆存在的情况下对于核酸酶是特别稳定的。

[0019] 在短干扰 RNA 的一些实施方案中, 当长度为 17 个核苷酸时, 引导寡核苷酸的位点 2 和 3 中的至少一个是修饰的核苷酸; 当长度为 18 个核苷酸时, 引导寡核苷酸的位点 2、3 和 4 中的至少一个是修饰的核苷酸; 当长度为 19 个核苷酸时, 引导寡核苷酸的位点 2、3、4 和 5 中的至少一个是修饰的核苷酸; 当长度为 20 个核苷酸时, 引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5 和 6 中的至少一个是修饰的核苷酸; 以及当长度为 21 至 30 个核苷酸时, 引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7 中的至少一个是修饰的核苷酸。图 1K 的形式 DH1 和形式 DH39-DH43 提供了具有 21 个核苷酸的长度并且引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7 中的至少一个是修饰的核苷酸的 siRNA 修饰形式的实例。在一些实施方案中, 引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7(取决于上文引述的长度)中只有一个是修饰的核苷酸。这样的 siRNA 例如在血清存在的

情况下对核酸酶也是特别稳定的。

[0020] 提供了减少或使关于通过 RNA 干扰抑制靶基因的表达的脱靶事件减少至最少的方法,该方法包括将含有靶基因的细胞与足以减少脱靶事件同时保持效力的量的上述化学合成的短干扰 RNA 接触,其中各 m 独立地是二环核苷酸或三环核苷酸。短语“同时保持效力”在本文中用于使用足够量的 siRNA 以减少脱靶事件同时保持效力的背景中。在该背景中,所述短语是指减少脱靶事件时对于减少 siRNA 的抑制 (knockdown) 活性的耐受性,其由减少的抑制活性是否引起基因相关表型来指示。一般而言,“同时保持效力”是指抑制减少至正常抑制水平的 80% 是可接受的。然而,对特定基因的减少的抑制的耐受性可在正常抑制的 50% 至 95% 的范围内。

[0021] 在另外的实施方案中,提供了在通过 RNA 干扰抑制外源提供的靶基因的表达中减少或使由过客链导致的切割降至最低的方法,该方法包括将含有靶基因的细胞与足以减少或使由过客链导致的切割降至最低同时保持引导链的效力的量的化学合成的短干扰 RNA 接触,短干扰 RNA 的过客链包含不依赖于序列的修饰形式 (1)、(2)、(3)、(4)、(5) 或 (6) 中的一个,其中各 m 独立地是 2' - 修饰的核苷酸;各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸;并且各 N 独立地是未修饰的核苷酸。将切割的减少与未修饰的 siRNA 的切割的减少相比较。

[0022] 在一些实施方案中,接触是含有细胞的细胞培养物或含有细胞的组织与化学合成的短干扰 RNA 的体外接触。在另外的实施方案中,接触是含有细胞的组织、含有细胞的体液或含有细胞的器官与化学合成的短干扰 RNA 的离体接触。在其他实施方案中,接触是含有细胞的器官或动物与化学合成的短干扰 RNA 的体内接触。在一些实施方案中,接触是具有赋予其核酸酶稳定性的修饰形式的短干扰 RNA 至有此需要的受试者的体内血管内施用。如实施例 8 的数据所显示的,当与在相同的施用后时间点上存在于体内的缺乏修饰核苷酸的对照短干扰 RNA 的量相比时,在施用后体内存在更大量的稳定的短干扰 RNA。

[0023] 由本文中的实施方案提供的和在外源提供的基因上进行的 RNA 干扰测定显示:不同修饰形式中许多类型的修饰核苷酸提供了增强的链偏向性同时保持效力。参见图 4A 和图 4B 中关于使用二环核苷酸的形式 H、K 和 O 的数据以及图 6A 和图 6B 中关于使用 2' -O- 甲基核苷酸的形式 H、K 和 O 的数据。

[0024] 出人意料地,此类修饰的核苷酸和修饰形式在内源基因的 RNA 干扰中减少或使脱靶事件减少至最少的能力不同。进行微阵列分析以测定差异表达的基因的数目,其是由引入的 siRNA 导致的脱靶效应的量度。差异表达的基因定义为由于 RNA 干扰而具有至少 2 倍变化 (p 值小于 0.001) 的基因。与由具有相同 siRNA 序列的未修饰形式 A siRNA 导致的差异表达的基因的数目相比,LNA®核苷酸修饰形式 H siRNA 产生减少 38% 至 68% 的差异表达的基因。相比之下,当与未修饰形式 A siRNA 比较时,2' -O- 甲基修饰形式 H siRNA 产生减少 0% 至 22% 的差异表达的基因。因此,LNA®核苷酸修饰的 siRNA 在减少脱靶效应上比 2' -O- 甲基修饰的 siRNA 更有效,如通过全基因特征谱分析所确定的。参见图 9A 至图 9C。

[0025] 使用实施例 6 举例说明的细胞生物学研究确认这些出人意料的发现。当就内源基因的 siRNA 干扰分析结果的集合时,很明显,图 11C 中显示的各种修饰形式中 2' -O- 甲基修饰的核苷酸与未修饰形式相比,未将“脱靶”表型消除至统计学上显著的程度。这些结果

与图 10E 的结果相反,这显示具有形式 H 的 siRNA 消除脱靶效应的统计学上显著的能力,如通过与未修饰形式 A 相比更低的细胞凋亡信号所证明的。

[0026] 在一些实施方案中,化学合成的短干扰 RNA 还与下文中进一步描述的靶向细胞的配体 (cell-targeting ligand) 结合。

[0027] 本文中的实施方案涉及包含过客寡核苷酸、引导寡核苷酸或化学合成的短干扰 RNA 以及生物学上可接受的载体的组合物。此外,本文中的实施方案还涉及例如包含过客寡核苷酸、引导寡核苷酸或化学合成的短干扰 RNA 以及转染剂的试剂盒。实施方案的具有含有修饰核苷酸的修饰形式的短干扰 RNA 提供了提高的功效从而节省了设计和测试 siRNA 的时间,提供了提高的特异性从而节省了花费在虚假结果上的时间和金钱,提供了提高的效力从而允许使用更少的材料获得期望的效果。提高的功效和特异性还允许每基因使用更少的 siRNA 进行单个基因和文库筛选研究。

[0028] 在另一个实施方案中,减少 RNA 干扰的脱靶效应的方法包括获得具有过客有义链 (其包含与靶转录的 RNA 同源的区域) 且具有与所述有义链互补的引导反义链的 siRNA,所述 siRNA 具有修饰形式 H、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB 3、JB4 或 JB5,和将所述 siRNA 与细胞接触。通过与由未修饰的 siRNA (其具有与修饰形式化的 (modification-formatted) siRNA 相同的序列) 引起的脱靶效应相比,测量脱靶效应的降低。

[0029] 在另外的实施方案中,增加 siRNA 在富含核酸酶的环境中的稳定性的方法包括获得具有过客有义链 (其包含与靶转录的 RNA 同源的区域)、具有与所述有义链互补的引导反义链且具有 3' 悬突核苷酸的 siRNA,所述 siRNA 具有修饰形式 DH47、DH29、DH1、DH 39、DH40、DH41、DH42 或 DH43,和将所述 siRNA 与富含核酸酶的环境相接触。通过与具有形式 F,具有相同类型的修饰核苷酸并且具有相同序列的 siRNA 的稳定性相比,测量 siRNA 的增加的稳定性。

[0030] 另外的实施方案包括具有本文中提供的修饰形式的 siRNA,其在体外、离体或体内应用中用于 RNA 干扰以抑制靶基因的表达。当已知靶基因的表达与疾病相关时,本文中的 siRNA 可用于所述疾病的筛查、诊断或治疗。

[0031] 本文中描述的 siRNA 性能研究的出人意料的方面是,基于报告子的链型测定 (reporter-based strandedness assay) 不能在细胞表型水平上预测修饰形式化的 siRNA 的性能。使用下文中描述的微阵列全基因特征谱或基于细胞的测定来观察表型水平上的性能的差异。

[0032] 根据本文中的描述,本教导的这些和其他特征将变得更显然。

[0033] 附图

[0034] 本领域技术人员将理解,下述附图仅用于举例说明的目的。附图无意以任何方式限定本教导的范围。

[0035] 图 1A 至图 1K 提供了用于 siRNA 研究的修饰形式。位于核苷酸上面的数字表示核苷酸在 siRNA 中相对于形式的 5' 末端的位置。m = 修饰的核苷酸, N = 核苷酸或具有除了 m 的修饰外的修饰的核苷酸, n = 核苷酸或修饰的核苷酸, P = 磷酸基团。

[0036] 图 2A 至图 2B 提供了用于不同工作实例的表达报告载体的示意图。图 2A 显示包含萤火虫萤光素酶报告基因的 pMIR-REPORT™ miRNA 表达报告载体 (Ambion/Applied Biosystems) 的图谱。将不同目的基因 (GOI) 的编码区插入位于萤光素酶基因的 3' 末端

的多克隆位点 (MCS) 中的 HindIII (核苷酸位点 463) 与 SpeI (核苷酸位点 525) 限制性内切核酸酶位点之间。图 2B 显示包含 β -半乳糖苷酶报告基因的 pMIR-REPORT™ β -gal 对照载体 (Ambion/Applied Biosystems) 的图谱。将对照载体与携带 GOI 的 pMIR-REPORT™ miRNA 表达报告载体进行共转染, 所述对照载体用作转染标准化对照。

[0037] 图 3A 至图 3B 提供了描述 pMIR-REPORT™ miRNA 表达载体中克隆的 GOI 的 miRNA 与萤光素酶基因的 mRNA 之间的方向关系的示意图。图 3A 提供了正向定向 (forward orientation), 即 GOI mRNA 的 5' - 末端与 fLuc mRNA 的 3' - 末端紧邻。图 3B 提供了反向定向, 即 GOI mRNA 的 5' - 末端远离 fLuc mRNA 的 3' - 末端。

[0038] 图 4A 至图 4E 提供了针对具有未修饰形式 A 和指定的修饰形式的 siRNA 进行的实施例 2 和 3 中描述的链测定的结果。

[0039] 图 4A 提供了在进行具有指定的修饰形式的 siRNA 的 RNAi 研究后存在的标准化的报告蛋白的量。深色条块表示引导链的抑制活性, 浅色条块表示过客链的抑制活性。为了展示修饰的 siRNA 链的链型结果的分布, 以箱线图 (box plot) 形式 (也称为“箱须”图) 提供图 4B 至图 4E 的数据。“箱须”图的深色水平条表示数据集的中值, 箱表示数据在数据集的下四分位数和上四分位数上的分布, 虚线 (须) 表示数据集的最小和最大值, 椭圆形表示各修饰形式的数据集中的异常值。

[0040] 图 4B 提供了通过下式测量的 siRNA 过客链的抑制活性: 过客链活性 $P = (\text{来自用测试 siRNA 处理的反向克隆的剩余的 fLUC 活性} / \beta \text{ gal 活性}) / (\text{来自用 Neg 对照 siRNA 处理的反向克隆的剩余的 fLUC 活性} / \beta \text{ gal 活性})$ 。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.1434; 形式 F, 0.1011; 形式 G, 0.0002052; 形式 H, 0.0001755; 形式 J, 0.0002052; 形式 K, 0.006516; 形式 M, 0.002246; 形式 O, 0.0009626。

[0041] 图 4C 提供了通过下式测量的引导链的抑制活性: 引导链活性 $G = (\text{来自用测试 siRNA 处理的正向克隆的剩余的 fLUC 活性} / \beta \text{ gal 活性}) / (\text{来自用 Neg 对照 siRNA 处理的正向克隆的剩余的 fLUC 活性} / \beta \text{ gal 活性})$ 。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.0001271; 形式 F, 0.8774; 形式 G, 0.0006498; 形式 H, 0.8115; 形式 J, 0.000006557; 形式 K, 0.01051; 形式 M, 0.7898; 形式 O, 0.8774。

[0042] 图 4D 提供了图 4B 和图 4C 的 siRNA 的过客链与引导链之间的 fLUC 活性的差异。通过将标准化的正向 fLUC 活性减去标准化的反向 fLUC 活性来计算活性差异, 或差异 $= P - G$ 。因此, 如果过客链活性小于 (较低的抑制, 即, 较高的萤光素酶活性) 引导链 (较高的抑制, 即, 较低的萤光素酶活性), 则活性差异的值预期大于 0。低于 0 的值表示过客链比引导链更具活性。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.00792; 形式 F, 0.06043; 形式 G, 0.9664; 形式 H, 0.0014; 形式 J, 0.008715; 形式 K, 0.6634; 形式 M, 0.002516; 形式 O, 0.0006498。

[0043] 图 4E 显示计算为 $(\log_2(P) - \log_2(G))$ 的活性倍数变化, 其提供了与修饰形式对图 4D 的 siRNA 的过客链的影响相比, 所述修饰形式对引导链的影响的量度。因此, 活性倍数变化越大, siRNA 的引导链偏向性越大。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.0002781; 形式 F, 0.08937; 形式 G, 0.2076; 形式 H,

0.01944 ;形式 J,0.0003223 ;形式 K,0.8553 ;形式 M,0.002516 ;形式 O,0.003504。

[0044] 图 5A 至图 5C 提供了实施例 3 中描述的关于其中修饰形式进行链转换（与图 4A 至图 4E 的研究相比）的研究的结果。即，例如对于修饰 F，将过客（有义）链的 1、20、21 修饰引入引导（反义）链并且将引导（反义）链的 20、21 修饰引入过客（有义）链。

[0045] 图 5A 提供了在对 12 个不同的具有链转换修饰的 siRNA 进行 RNAi 研究后存在的标准化的报告蛋白的量。深色条块表示引导链的抑制活性，浅色条块表示过客链的抑制活性。

[0046] 图 5B 以箱线图形式提供了图 5A 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的差异。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果对于所有形式都是相同的，0.03125。

[0047] 图 5C 提供了图 5B 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的倍数变化。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果对于所有形式都是相同的，0.03125。

[0048] 图 6A 至图 6C 提供了实施例 3 中描述的关于其中修饰形式的修饰核苷酸被 2' -O 甲基化的研究的链测定的结果。

[0049] 图 6A 提供了在对 6 个不同的具有指定的修饰形式的 siRNA 进行 RNAi 研究后存在的标准化的报告蛋白的量。深色条块表示引导链的抑制活性，浅色条块表示过客链的抑制活性。

[0050] 图 6B 以箱线图形式提供了图 6A 的 siRNA 组和实施例 3 中描述的额外的 18 个不同 siRNA 的组的过客链与引导链之间的 fLUC 活性的差异。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果如下：形式 H-1,0.001918；形式 H,0.00001574；形式 H+1,0.001091；形式 V-2,0.0002131；形式 K,0.0003619；形式 O,0.406。

[0051] 图 6C 提供了图 6B 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的倍数变化。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果如下：形式 H-1,0.02514；形式 H,0.00001574；形式 H+1,0.007443；形式 V-2,0.0001464；形式 K,0.0003619；形式 O,0.5446。

[0052] 图 7A 至图 7B 提供了实施例 3 中描述的关于其中修饰形式的修饰核苷酸是 2'，5' - 连接的核苷酸的研究的链测定的结果。

[0053] 图 7A 提供了具有未修饰形式 A 的 siRNA 和具有修饰形式 H-1、H、H+1、V-2、K 和 O 的 siRNA 的引导链与过客链的抑制活性的差异。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果如下：形式 H-1,0.3594；形式 H,0.07422；形式 H+1,0.5703；形式 V-2,0.4258；形式 K,0.2031；形式 O,0.01953。

[0054] 图 7B 提供了图 7A 的 siRNA 的过客链与引导链之间的抑制活性的倍数变化。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果如下：形式 H-1,0.3008；形式 H,0.01953；形式 H+1,0.2031；形式 V-2,0.4961；形式 K,0.1921；形式 O,0.00909。

[0055] 图 8 提供了 8 个内源靶的每一个的 6 个 siRNA 的抑制活性数据。48 个 siRNA 中的每一个具有指定的修饰形式，所述修饰形式掺入了实施例 4 中描述的二环修饰的核苷酸。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验（成对的）的结果如下：

形式 E, 0.000000008657 ; 形式 F, 0.4631 ; 形式 G, 0.000009698 ; 形式 H, 0.5569 ; 形式 J, 0.00000000191 ; 形式 K, 0.00001336 ; 形式 M, 0.7269 ; 形式 O, 0.0593。

[0056] 图 9A 至图 9C 提供了通过微阵列分析确定的和实施例 5 描述的未修饰的 siRNA、2' -O- 甲基 -siRNA 或二环修饰的 siRNA 之间的 2 倍差异表达的基因的交集的维恩图。对于各图, 左下组 (如果有颜色的话为红色) 表示在未修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的基因, 上方组 (如果有颜色的话为蓝色) 表示在 2' -O- 甲基形式 H 修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的基因, 右下组 (如果有颜色的话为绿色) 表示在二环修饰的核苷酸(LNA®)形式 H 修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的基因。图 10A 至图 10E 提供关于 LNA®修饰形式在细胞生物学研究中对靶 (on-target) 和脱靶表型的影响的数据。阴性对照 (Neg) 是混杂的 (scrambled) 非靶向性 siRNA, 对于所述混杂的非靶向性 siRNA, 有丝分裂或细胞凋亡的定量被标准化为 1.0 的值。参见实施例 6。图 10A 提供了由于具有 LNA®修饰形式 E、F、G、H、J、K、M 和 O 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期增加有丝分裂, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期对有丝分裂没有作用, 以及所述基因靶的一个亚组的抑制预期减少有丝分裂, 如实施例 6 所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.805 ; 形式 F, 0.5483 ; 形式 G, 0.3215 ; 形式 H, 0.004561 ; 形式 J, 0.000952 ; 形式 K, 0.01974 ; 形式 M, 0.1007 ; 形式 O, 0.9438。

[0057] 图 10B 如图 10A 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期减少有丝分裂。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.3247 ; 形式 F, 0.4683 ; 形式 G, 0.1815 ; 形式 H, 0.03423 ; 形式 J, 0.01387 ; 形式 K, 0.09874 ; 形式 M, 0.5509 ; 形式 O, 0.6705。

[0058] 图 10C 提供了由于具有 LNA®修饰形式 E、F、G、H、J、K、M 和 O 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的细胞凋亡片段的箱线图, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期增加细胞凋亡, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期对细胞凋亡没有作用, 如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.2641 ; 形式 F, 0.5366 ; 形式 G, 0.0001888 ; 形式 H, 0.0000102 ; 形式 J, 0.00000263 ; 形式 K, 0.000000553 ; 形式 M, 0.5366 ; 形式 O, 0.05753。

[0059] 图 10D 如图 10C 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期增加细胞凋亡, 如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.2188 ; 形式 F, 0.4375 ; 形式 G, 0.3125 ; 形式 H, 0.2188 ; 形式 J, 0.03125 ; 形式 K, 0.03125 ; 形式 M, 1 ; 形式 O, 0.2188。

[0060] 图 10E 如图 10C 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期对细胞凋亡没有作用, 如实施例 6 中所描述的。然而, 特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有增加的中值和更大的数据分布) 来证明。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 E, 0.5303 ; 形式 F, 0.804 ; 形式 G, 0.00005488 ; 形式 H, 0.00001347 ; 形式 J, 0.0001253 ; 形式 K, 0.00003023 ; 形式 M, 0.441 ; 形式 O, 0.1551。

[0061] 图 11A 至图 11F 提供了关于 2' -O- 甲基化修饰形式在细胞生物学研究中对靶

和脱靶表型的影响的数据。阴性对照 (Neg) 是混杂的非靶向性 siRNA, 对于所述混杂的非靶向性 siRNA, 有丝分裂或细胞凋亡的定量被标准化为 1.0 的值。参见实施例 6。

[0062] 图 11A 提供了由于具有未修饰形式 A 和具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期增加有丝分裂, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期对有丝分裂没有作用, 如实施例 6 所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.3529; 形式 K, 0.3289。

[0063] 图 11B 如图 11A 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期增加有丝分裂。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.3125; 形式 K, 0.5469。

[0064] 图 11C 如图 11A 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期对有丝分裂没有作用。然而, 特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有更大的数据分布) 来证明。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.9102; 形式 K, 0.4961。

[0065] 图 11D 提供了由于具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的细胞凋亡片段的箱线图, 所述基因靶的一个亚组的抑制预期增加细胞凋亡, 所述基因靶的一个亚组预期对细胞凋亡没有作用, 如实施例 6 所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.3529; 形式 K, 0.3529。

[0066] 图 11E 如图 11D 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期增加细胞凋亡, 如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.3125; 形式 K, 0.5469。

[0067] 图 11F 如图 11D 一样提供了基因的亚组的箱线图, 所述基因亚组的抑制预期对细胞凋亡没有作用, 如实施例 6 所描述的。然而, 特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.9102; 形式 K, 0.7344。

[0068] 图 12A-1 提供了计算为 P-G 的过客链与引导链之间的活性的差异, 其中如图 4B 和图 4C 一样针对未修饰形式 A 和针对测试形式 H、H+1、H-1、H-2、V、V-1、V-2、K 和 Q (其中修饰是 **LNA®** 残基) 定义 P 和 G。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.04199; 形式 H+1, 0.123; 形式 H-1, 0.1748; 形式 H-2, 0.2402; 形式 V, 0.06738; 形式 V-1, 0.05371; 形式 V-2, 0.5771; 形式 K, 0.4648; 形式 Q, 0.1016。

[0069] 图 12A-2 提供了图 12A-1 的 siRNA 的过客链和引导链之间的活性的倍数变化。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0.3652; 形式 H+1, 0.2783; 形式 H-1, 0.2402; 形式 H-2, 0.4131; 形式 V, 0.2061; 形式 V-1, 0.1016; 形式 V-2, 0.7002; 形式 K, 0.6377; 形式 Q, 0.7002。

[0070] 图 12B 提供了具有未修饰形式 A 的 siRNA 和具有 **LNA®** 修饰形式 H、H-2、H-1、

H+1、Q、K、V、V-1 和 V-2 的 siRNA 对内源靶的抑制活性的数据,如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H, 0.029598160;形式 H-2, 0.004296849;形式 H-1, 0.000833165;形式 H+1, 0.052779900;形式 Q, 0.011454170;形式 K, 0.745852000;形式 V, 0.005660834;形式 V-1, 0.998100800;形式 V-2, 0.374661100。

[0071] 图 12C 提供了由于具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、H+1、H-1、H-2、K、Q、V、V-1 和 V-2 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图,所述基因靶的抑制预期增加有丝分裂,如实施例 6 所描述的。阴性对照(Neg)是混杂的非靶向性 siRNA,对于所述混杂的非靶向性 siRNA,有丝分裂的定量被标准化为 1.0 的值。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H, 0.01563;形式 H+1, 0.1953;形式 H-1, 0.07813;形式 H-2, 0.07813;形式 V, 0.05469;形式 V-1, 0.1953;形式 V-2, 1;形式 K, 0.1953;形式 Q, 0.1953。

[0072] 图 12D 提供了由于具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、H+1、H-1、H-2、K、Q、V、V-1 和 V-2 的 siRNA 沉默一组基因靶而引起的标准化的细胞凋亡片段的箱线图,所述基因靶的抑制预期对细胞凋亡没有作用。阴性对照(Neg)是混杂的非靶向性 siRNA,对于所述混杂的非靶向性 siRNA,细胞凋亡的定量被标准化为 1.0 的值。然而,特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图(与 Neg 对照相比,其具有增加的中值和更大的数据分布)来证明。比较未修饰形式 A 对照与各个修饰形式的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果(针对标准化的细胞凋亡片段计算为对照的百分比)是:形式 H, 0.04199;形式 H+1, 0.2061;形式 H-1, 0.2783;形式 H-2, 0.6377;形式 V, 0.05371;形式 V-1, 0.4648;形式 V-2, 0.006836;形式 K, 0.01855;形式 Q, 0.024。

[0073] 图 13A-1 提供了计算为 P-G 的过客链与引导链之间的活性的差异,其中如图 4B 和图 4C 一样针对具有未修饰形式 A 和修饰形式 H、H+1、H-1、V-2、K 和 O(其中修饰是 2'-O-甲基修饰核苷酸)的 siRNA 定义 P 和 G。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H, 0.00001574;形式 H+1, 0.001091;形式 H-1, 0.001918;形式 V-2, 0.0002131;形式 K, 0.0003619;形式 O, 0.406。

[0074] 图 13A-2 提供了图 13A-1 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的倍数变化。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H, 0.00001574;形式 H+1, 0.007443;形式 H-1, 0.02514;形式 V-2, 0.0001464;形式 K, 0.0003619;形式 O, 0.5446。

[0075] 图 13B 提供了具有未修饰形式 A 和修饰形式 H、H+1、H-1、K、V-2 和 O(其中修饰是 2'-O-甲基修饰的核苷酸)的 siRNA 对内源靶的抑制活性的数据。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H, 3.47E-06;形式 H+1, 0.001957517;形式 H-1, 8.79E-09;形式 K, 0.005446013;形式 V-2, 1.95E-09;和形式 O, 0.9972392。

[0076] 图 13C 提供了由于具有未修饰形式 A 和具有修饰形式 H、H-1、K 和 V(具有 2'-O-甲基修饰核苷酸)的 siRNA 沉默一组基因靶而产生的标准化的有丝分裂细胞的箱

线图,所述基因靶的抑制预期增加有丝分裂,如实施例 6 所描述的。将各修饰形式与未修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H,0.1953;形式 H-1,0.6406;形式 V,0.1953;形式 K,0.6406。

[0077] 图 13D 提供由于具有未修饰形式 A 和具有修饰形式 H、H-1、V 和 K(具有 2' -O- 甲基修饰核苷酸)的 siRNA 沉默一组基因靶而产生的标准化的细胞凋亡片段的箱线图,所述基因靶的抑制预期对细胞凋亡没有作用,如实施例 6 中所描述的。然而,特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图(与 Neg 对照相比,其具有更大的数据分布)来证明。将未修饰形式 A 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果是:形式 H,0.9102;形式 H-1,0.25;形式 V,0.6523;形式 K,0.7344。

[0078] 图 14A 提供了具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 的 siRNA 对内源靶的 mRNA 抑制活性的箱线图。将未修饰形式 A 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 H,0.005302;形式 M,0.02475;形式 W,1;形式 W+1,0.8423;形式 W-1,0.5096;形式 Y,0.932;形式 Y+1,0.887;形式 Y-1,0.5891。

[0079] 图 14B 提供了具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、M、JB1、JB2、JB3、JB4 和 JB5 的 siRNA 对内源靶的 mRNA 抑制活性的箱线图。将未修饰形式 A 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 H,0.005302;形式 M,0.02475;形式 JB1,0.009613;形式 JB2,0.7259;形式 JB 3,0.4213;形式 JB4,0.04904;形式 JB5,0.972。

[0080] 图 15A 至图 15D 提供了关于具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 的 siRNA 在细胞生物学研究中对中靶和脱靶表型的影响的数据。参见实施例 6。

[0081] 图 15A 提供了实施例 6 中描述的关于一组基因靶的标准化的有丝分裂细胞的箱线图,所述基因靶的抑制预期减少有丝分裂,如实施例 6 中所描述的。阴性对照(Neg)是混杂的非靶向性 siRNA,对于所述混杂的非靶向性 siRNA,有丝分裂的定量被标准化为 1.0 的值。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H,0.4961;形式 M,1;形式 W,0.01953;形式 W+1,0.5703;形式 W-1,0.07422;形式 Y,0.03906;形式 Y+1,0.4961;形式 Y-1,0.09766。

[0082] 图 15B 如图 15A 一样提供了一组基因靶的箱线图,所述基因靶的抑制预期不影响有丝分裂。然而,特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图(与 Neg 对照相比,其具有大约 0.7 的中值)来证明。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 H,0.5;形式 M,0.75;形式 W,0.25;形式 W+1,0.25;形式 W-1,0.25;形式 Y,0.25;形式 Y+1,0.25;形式 Y-1,1。

[0083] 图 15C 提供了关于一组基因靶的标准化的细胞凋亡片段的箱线图,所述基因靶的抑制预期增加细胞凋亡,如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果如下:形式 H,0.75;形式 M,0.25;形式 W,0.25;形

式 W-1, 1 ;形式 W+1, 0. 25 ;形式 Y, 0. 25 ;形式 Y-1, 0. 25 ;形式 Y+1, 0. 25。

[0084] 图 15D 如图 15C 一样提供了基因靶的亚组的箱线图, 所述基因靶亚组的抑制预期对细胞凋亡没有作用。然而, 特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有大于 3.5 的中值和更大的数据分布) 来证明。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0. 01221 ;形式 M, 0. 8501 ;形式 W, 0. 07715 ;形式 W+1, 0. 06396 ;形式 W-1, 0. 1763 ;形式 Y, 0. 03418 ;形式 Y+1, 0. 021 ;形式 Y-1, 0. 2036。

[0085] 图 16A 至图 16D 提供了关于具有未修饰形式 A 和具有 LNA® 修饰形式 H、M、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5 的 siRNA 在细胞生物学研究中对中靶和脱靶表型的影响的数据。参见实施例 6。

[0086] 图 16A 提供了关于一组基因靶的标准化的有丝分裂细胞的箱线图, 所述基因靶的抑制预期减少有丝分裂。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0. 4961 ;形式 M, 1 ;形式 JB 1, 0. 3594 ;形式 JB2, 0. 6523 ;形式 JB3, 0. 02734 ;形式 JB4, 0. 1641 ;形式 JB5, 0. 2031。

[0087] 图 16B 如图 16A 一样提供了一组基因靶的箱线图, 所述基因靶的抑制预期不影响有丝分裂。然而, 特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有大约 0.65 的中值, 从而展示有丝分裂的减少) 来证明。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0. 5 ;形式 M, 0. 75 ;形式 JB1, 0. 25 ;形式 JB2, 0. 25 ;形式 JB 3, 0. 75 ;形式 JB4, 0. 25 ;形式 JB5, 0. 25。

[0088] 图 16C 提供了由于沉默一组基因靶而引起的标准化的细胞凋亡片段的箱线图, 所述基因靶的抑制预期增加细胞凋亡, 如实施例 6 中所描述的。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0. 75 ;形式 M, 0. 25 ;形式 JB1, 0. 25 ;形式 JB2, 0. 25 ;形式 JB 3, 0. 25 ;形式 JB4, 0. 5 ;形式 JB5, 0. 75。

[0089] 图 16D 如图 16C 一样提供了一组基因靶的箱线图, 所述基因靶的抑制预期对细胞凋亡没有作用。然而, 特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照处理的样品相比, 其具有增加的大于 3 的中值和更大的数据分布) 来证明。将各修饰形式与未修饰 siRNA 形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的结果如下: 形式 H, 0. 01221 ;形式 M, 0. 8501 ;形式 JB1, 0. 0009766 ;形式 JB2, 0. 0004883 ;形式 JB 3, 0. 0004883 ;形式 JB4, 0. 003418 ;形式 JB5, 0. 003418。

[0090] 图 17 提供了作为未修饰 siRNA 在 37°C 下于 90% 血清中的时间的函数的血清稳定性的测定。显示了在 0、5、10、15、30、60、120 分钟的温育时 8 个不同 siRNA 的剩余全长 siRNA 双链体的百分比。

[0091] 图 18A 提供了当在实施例 7 中描述的条件用 90% 的血清处理时, 保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于未修饰形式 A siRNA、siRNA 修饰形式 F (该形式被 Elmen 等人 (Nucleic Acids Research 33 :1, 439-447, 2005) 引述为 siLNA5 并且在本文中用

作稳定性的参照对照)和具有修饰形式 H、DH21、DH20、DH3、DH30、DH35、DH6、DH34 和 DH2 的 siRNA(其中修饰是**LNA®**残基)的数据。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的结果是:形式 H,0.007813;形式 DH21,0.007813;形式 DH20,0.007813;形式 DH3,0.007813;形式 DH30,0.007813;形式 DH35,0.01563;形式 DH6,0.007813;形式 DH34,0.02488;形式 DH2,0.2049。

[0092] 图 18B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA,由以形式 A、F、H、DH21、DH20、DH3、DH30、DH35、DH6、DH34、DH2(如实施例 7 中所描述的)存在的**LNA®**修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 F,0.05469;形式 H,0.3828;形式 DH21,0.007813;形式 DH20,0.007813;形式 DH 3,0.007813;形式 DH30,0.007813;形式 DH 35,0.01563;形式 DH6,0.007813;形式 DH34,0.03906;形式 DH2,0.6406。

[0093] 图 19A 提供了当在实施例 7 中描述的条件用 90%的血清处理时,保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于修饰形式 F、DH2、DH19、DH4、DH31、DH27 和 DH25 的数据,其中修饰是**LNA®**残基。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 DH2,0.2049;形式 DH 19,0.1953;形式 DH4,0.02249;形式 DH31,0.01563;形式 DH27,0.1094;形式 DH25,0.1094。

[0094] 图 19B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA,由以形式 F、DH2、DH19、DH4、DH31、DH27 和 DH25(如由实施例 7 所描述的)存在的**LNA®**修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 F,0.05469;形式 DH2,0.6406;形式 DH19,0.01563;形式 DH4,0.007813;形式 DH31,0.01563;形式 DH27,0.01563;形式 DH25,0.007813。

[0095] 图 20A 提供了当在实施例 7 描述的条件用血清处理时,保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于修饰形式 F、DH2、DH47、DH29、DH28 和 DH18 的数据,其中修饰是**LNA®**残基。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 DH2,0.2049;形式 DH47,0.03906;形式 DH29,0.07813;形式 DH28,0.01415;形式 DH18,0.06836。

[0096] 图 20B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA,由以形式 F、DH2、DH47、DH29、DH28 和 DH18(如实施例 7 所描述的)存在的**LNA®**修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:F,0.05469;形式 DH2,0.6406;形式 DH47,0.3125;形式 DH29,0.02249;形式 DH28,0.01563;形式 DH18,0.01563。)

[0097] 图 21A 提供了当在实施例 7 中描述的条件用血清处理时,保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于修饰形式 F、DH 36、DH2、DH9、DH46、DH 33 和 DH10 的数据,其中所述修饰是**LNA®**残基。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性的计算结果是:形式 DH36,0.1609;形式 DH2,0.2049;形式 DH9,0.5534;形式 DH46,0.02071;形式 DH33,0.1508;形式 DH10,0.05469。

[0098] 图 21B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA,由以形式 F、DH 36、DH2、DH9、DH46、DH33 和 DH10(如实施例 7 所描述的)存在的**LNA®**修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 对照与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验(成对的)的统计学显著性

的计算结果是：形式 F, 0.05469；形式 DH 36, 0.01563；形式 DH2, 0.6406；形式 DH9, 0.1484；形式 DH46, 0.1484；形式 DH 33, 0.007813；形式 DH10, 0.007813。

[0099] 图 22A 提供了当在实施例 7 中描述的条件下用血清处理时, 保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于修饰形式 F、DH2、DH7、DH23、DH1、DH48、DH49、DH44 和 DH45 的数据, 其中修饰是 **LNA®** 残基。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的统计学显著性的计算结果是：形式 DH2, 0.2049；形式 DH7, 0.3828；形式 DH23, 0.03461；形式 DH1, 0.1484；形式 DH48, 0.6406；形式 DH49, 0.1410；形式 DH44, 0.3125；形式 DH45, 0.1052。

[0100] 图 22B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA, 由以形式 F、DH2、DH7、DH23、DH1、DH48、DH49、DH44 和 DH45 (如实施例 7 所描述的) 存在的 **LNA®** 修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的统计学显著性的计算结果是：形式 F, 0.05469；形式 DH2, 0.6406；形式 DH7, 0.05469；形式 DH23, 0.007813；形式 DH1, 0.007813；形式 DH48, 0.1953；形式 DH49, 0.4609；形式 DH44, 0.007813；形式 DH45, 0.01563。

[0101] 图 23A 提供了当在实施例 7 中描述的条件下用血清处理时, 保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。提供了关于修饰形式 F、DH2、DH38、DH1、DH39、DH40、DH41、DH42 和 DH43 的数据, 其中修饰是 **LNA®** 残基。将形式 F 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 的统计学显著性的计算结果是：形式 DH2, 0.2049；形式 DH 38, 0.04206；形式 DH1, 0.1484；形式 DH 39, 0.07813；形式 DH40, 0.2500；形式 DH41, 0.2620；形式 DH42, 0.1094；形式 DH43, 0.3621。

[0102] 图 23B 提供了相对于 Neg 对照 siRNA, 由以形式 F、DH2、DH38、DH1、DH 39、DH40、DH41、DH42 和 DH43 (如实施例 7 所描述的) 存在的 **LNA®** 修饰的 siRNA 产生的 mRNA 抑制的分数的箱线图。将未修饰形式 A 与各修饰形式进行比较的 Wilcoxon 检验 (成对的) 统计学显著性的计算结果是：形式 F, 0.05469；形式 DH2, 0.6406；形式 DH38, 0.007813；形式 DH1, 0.007813；形式 DH39, 0.007813；形式 DH40, 0.01563；形式 DH41, 0.007813；形式 DH42, 0.007813；形式 DH43, 0.02344。

[0103] 图 24 提供了体内存在的稳定的 siRNA 的定量。比较存在于加料的对照动物 (spiked control animal) 的肝中的 siRNA 的量与存在于注射了未修饰形式 A siRNA 和具有形式 DH1 或形式 DH47 的 **LNA®** 修饰形式化的稳定的 siRNA 的测试动物的肝中的 siRNA 的量。CT 是循环阈值。

[0104] 各种实施方案的描述

[0105] 应理解, 上述一般描述和下列详细描述只是示例性和说明性的, 无意限定本教导的范围。在本申请中, 除非明确地指出, 否则使用的单数包括复数。例如“至少一个”意指可存在一个以上。同样, 使用的“包含”、“含有”和“包括”, 或此类根词的变体例如但不限于“包含 (comprises)”、“含有 (contained)”和“包括 (including)”无意是限定性的, 其是指“包括下列元素但不排除其他元素”。术语“基本上由……组成”或“基本上由……组成的”, 如本文中所使用的, 不包括对组合具有任何实质意义的其他元素。除非另外指出, 否则使用的“或”是指“和 / 或”。术语“和 / 或”是指其之前和之后的项可合在一起或分开。为了举例说明的目的, 而非作为限制, “X 和 / 或 Y”可表示“X”或“Y”或“X 和 Y”。

[0106] 当本文中提供值的范围时,除非另外明确地指出,否则范围包括起始值和终值以及其间的任何值或值的范围。例如,“0.2 至 0.5”是指 0.2、0.3、0.4、0.5;其间的范围例如 0.2 至 0.3、0.3 至 0.4、0.2 至 0.4;其间的增量(increment)例如 0.25、0.35、0.225、0.335、0.49;其间的增量范围例如 0.26 至 0.39 等。

[0107] 本申请中引用的所有文献和相似材料包括但不限于专利、专利申请、论文、书、专题论文(treatise)和国际互联网网页,无论此类文献和相似材料的形式,明确地以其全文通过引用合并入本文用于任何目的。在一个或多个合并的文献和相似材料以与本申请中的术语的定义矛盾的方式定义或使用该术语时,以本申请的定义为准。当结合不同实施方案描述本教导时,本教导不意欲限定于此类实施方案。相反,本教导包括各种改变、修饰和等价物,如本领域技术人员所理解的。

[0108] 术语“或其组合”,如本文中所使用的,是指该术语前面所列项的所有排列和组合。例如“A、B、C 或其组合”意欲包括:A、B、C、AB、AC、BC 或 ABC 中的至少一个,并且如果顺序在特定背景中是重要的话,还包括 BA、CA、CB、ACB、CBA、BCA、BAC 或 CAB。对于该示例,明确包括的是含有一个或多个项目或项的重复的组合,例如 BB、AAA、AAB、BBC、AAABCCCC、CBAAAA、CABABB 等。本领域技术人员将理解,除非根据上下文明显地表现出来,否则通常对任何组合中的项目或项的数目没有限制。术语“替代物”,如本文中所使用的,意指表示另一种产物的存在的产物。例如,扩增产物是已被扩增的核酸的替代物。

[0109] 如本文中所使用的,siRNA 的“修饰形式(modification format)”是指修饰的核苷酸和“除了修饰的之外的(other-than modified)”核苷酸的模式,如由图 1A 至图 1K 所示的模式或形式举例说明的。下面描述修饰的核苷酸。“除了修饰的之外的”是指未修饰的核苷酸或具有除了特定形式中的修饰核苷酸的修饰之外的修饰的修饰核苷酸。

[0110] 如本文中所使用的,“不依赖于序列的修饰”是指实施方案提供的修饰核苷酸和修饰形式可用于任何 siRNA 序列而不考虑该 siRNA 的具体序列。

[0111] “中靶(on-target)”事件,如本文中所使用的,是指靶基因的 mRNA 受经设计靶向该基因的 siRNA 影响(即,抑制),如通过减少的表达、降低的 mRNA 水平或特定表型的丧失或获得所证明的。例如,“中靶”事件可通过另一种方法例如使用已知影响该靶的药物,或例如通过引入来自直向同源物的靶 mRNA 拯救丧失的表型来验证。

[0112] “脱靶事件”,如本文中所使用的,意指 RNA 干扰中除了期望的事件外的任何事件。脱靶事件的实例是不被靶向的基因的 mRNA 受 siRNA 影响(即,抑制)。这样的“脱靶事件”不能通过提供来自适当的相关直向同源物的靶 mRNA 来拯救。“脱靶事件”可归因于以改变非靶的表达的方式与另一种 mRNA、内源 RNA、DNA 或蛋白质的相互作用。这样的脱靶事件可归因于例如整合入 RISC 的核苷酸序列与非靶 mRNA 之间的错配碱基配对或细胞环境中的非特异性相互作用。不恰当的 RISC 结合、不恰当的 RISC 介导的相互作用和不恰当的 RISC 介导的切割可促成脱靶事件。脱靶事件还可归因于细胞毒性应答、干扰素应答、microRNA 作用或与非编码 RNA 的相互作用。最常见的脱靶事件可能是不期望的过客(有义)链至 RISC 复合物内的整合。然而,受 siRNA 影响的脱靶事件并非完全可预测的并且倾向于是非特异性的。脱靶事件产生脱靶效应,所述术语在本文中可互换使用。

[0113] 术语“效力”,如本文中所使用的,是将其靶 mRNA 抑制至起始 mRNA 水平的 50% 所需的单个 siRNA 或 siRNA 的混合物的浓度的量度。通常,用 IC₅₀(半最大(50%)mRNA 抑制

所需的 siRNA 的浓度)来描述效力。在本文中通过转染一系列 siRNA 浓度(例如,在 100nM 至 10pm 范围中的至少 6 个浓度),然后对样品进行 qRT-PCR 分析来测定效力。将结果作图,通过外推获得 50%的 mRNA 抑制时的浓度来测定 IC50。使用曲线拟合程序来测定获得 50%的 mRNA 靶的抑制所需的 siRNA 的浓度。如本文中所使用的,术语“效力”可与术语“抑制活性”(其是与暴露于阴性对照 siRNA 后存在的 mRNA 的量相比,暴露于测试 siRNA 后 mRNA 的减少的量的量度)互换使用。

[0114] 术语“功效”,如本文中所使用的,是产生最小阈值的 mRNA 抑制的 siRNA 的百分比。术语功效通常用于 siRNA 的集合或用于 siRNA 设计算法的预测力。通过 qRT-PCR 或靶 mRNA 的 siRNA 抑制的基于载体的测量来测量功效,其结果表示为产生最小阈值的抑制的 siRNA 的百分比,例如,产生 70%或更高水平的抑制的 siRNA 的百分比。

[0115] 术语“特异性”,如本文中所使用的,是 siRNA 在 mRNA 水平或蛋白质水平上影响基因调控的精确性的量度,或由于靶基因功能的抑制而展示的真实表型。通过测定作为 siRNA 转染的结果相对于某个阈值发生变化的基因的数目来测量特异性,所述基因不是期望的靶并且已知不处于靶基因的信号转导途径中。工业标准阈值是 2 倍变化。在细胞生物学研究中,针对特定靶的高特异性 siRNA 导致具有极少或没有预料之外的表型的重叠表型。特异性较差的 siRNA 导致由于脱靶效应而引起的表型。

[0116] “提高的”效力是指在相同的浓度下与另一种 siRNA 相比具有更低的 IC50 或更高的百分比抑制的 siRNA,“提高的”特异性是指与另一种 siRNA 相比影响更少的基因的 siRNA,“提高的”功效是指使用算法产生的一组 siRNA,其中与使用不同算法产生的另一 siRNA 组相比,该 siRNA 组中更大百分比的 siRNA 产生最小指定量的抑制。

[0117] 为了进行本文中的研究,将测试结果与对照结果相比,并且将所有结果针对设计为非靶向性的无义 siRNA 进行标准化。用于成对样品的 Wilcoxon 检验是成对样品 t 检验的非参数等价检验。Wilcoxon 检验排列样品 1 和样品 2 中的成对数据之间的差的绝对值并且计算关于正差和负差(差计算为样品 2-样品 1)的数目的统计值。所使用的软件是可免费从 cran.org 获得的“R Package”。

[0118] 术语“核苷酸”通常指以单体形式存在的或存在于二核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸中的核苷的磷酸酯。核苷通常是与核糖(核糖核苷)或脱氧核糖(脱氧核糖核苷)的 C-1' 碳连接的嘌呤碱基或嘧啶碱基。天然发生的嘌呤碱基通常包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)。天然发生的嘧啶碱基通常包括胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)和胸腺嘧啶(T)。当核苷碱基是嘌呤时,核糖或脱氧核糖在嘌呤的 9 位上连接至核碱基(nucleobase),当核碱基是嘧啶时,核糖或脱氧核糖在嘧啶的 1 位上连接至核碱基。核糖核苷酸是核糖核苷的磷酸酯,脱氧核糖核苷酸是脱氧核糖核苷的磷酸酯。术语“核苷酸”是核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的统称。二核苷酸通常具有通过 3' -5' 磷酸二酯连接共价键合的两个核苷酸。寡核苷酸通常具有 2 个以上的核苷酸,多核苷酸通常是指核苷酸单体的聚合物。本申请者为了方便起见在本文中可互换地使用术语“核苷酸”和“核苷”,尽管本领域技术人员根据术语出现的上下文,易于理解可使用哪个术语。

[0119] 核苷酸单体通过“核苷间或核苷酸间的连接”例如磷酸二酯连接(phosphodiester linkage)连接,其中,如本文中所用的,术语“磷酸二酯连接”是指磷酸二酯键(phosphodiester bond)或包含其磷酸盐/酯类似物(包括结合的抗衡离子例如 H^+ 、 NH_4^+ 、

Na⁺, 如果此类抗衡离子存在的话) 的键。下文描述另外的核苷间或核苷酸间的连接。当寡核苷酸由字母序列表示时, 应理解, 除非另外指出或根据上下文期望相反方向对于本领域技术人员来说是显然的, 否则核苷酸以 5' 至 3' 的顺序从左至右排列。合成寡核苷酸的方法的描述尤其可见于美国专利 4, 373, 071、4, 401, 796、4, 415, 732、4, 458, 066、4, 500, 707、4, 668, 777、4, 973, 679、5, 047, 524、5, 132, 418、5, 153, 319 和 5, 262, 530。寡核苷酸可以是任何长度。

[0120] “碱基配对”, 如本文中所使用的, 是指标准 Watson-Crick 碱基配对。常见于双链(双链体)核酸中的碱基配对是 G:C、A:T 和 A:U。此类碱基对称为互补碱基对, 一个碱基与其配对的碱基互补。当与互补核苷酸或核苷酸类似物配对时, 下文中描述的核苷酸类似物也能够形成氢键。

[0121] 如本文中所使用的, 术语“互补”或“互补性”不仅用于指碱基对而且还用于指通过 Watson-Crick 碱基配对法则产生联系的寡核苷酸的反向平行链, 能够按照标准互补法则进行碱基配对的或能够在相对严格条件下与特定核酸区段杂交的核酸序列。例如, 序列 5' -AGTTC-3' 与序列 5' -GAAC-3' 互补。术语“完全互补”或“100% 互补”等是指反向平行链之间的碱基完全配对(多核苷酸双链体中无错配)的互补序列。核酸聚合物可以只在它们的完整序列的一部分上互补。术语“部分互补性”、“部分互补”、“不完全互补性”或“不完全互补”等是指低于 100% 完全配对(例如在多核苷酸双链体中存在至少一个错配)的反向平行多核苷酸链之间的碱基的任何比对。此外, 两个序列, 如果在它们的比对中存在一个或多个错配、缺口或插入, 那么它们被认为在它们的长度的一部分上是互补的。

[0122] 此外, 靶多核苷酸的“互补物”是指可在反向平行缔合中与靶多核苷酸的至少一部分结合的多核苷酸。反向平行缔合可以是分子内的, 例如以核酸分子内的发夹环的形式存在, 或分子间的, 例如当两个或多个单链核酸分子彼此杂交时。术语“相应于”, 当指核酸时, 意指特定序列足以与反向平行序列互补, 这样两个序列在适当的条件下将退火并且形成双链体。

[0123] 如本文中所使用的, “过客(有义)”链、区域或寡核苷酸是指具有与 DNA 的有义链的至少一部分或 mRNA 的至少一部分的核苷酸序列相同的核苷酸序列的核苷酸序列。“过客(有义)链”包括与另一个多核苷酸的互补引导(反义)区形成双链体的多核苷酸的有义区域。发夹单链寡核苷酸(shRNA)还可在相同分子内包含过客(有义)区和引导(反义)区, 所述区域形成通过环序列或环连接体部分连接的双链体结构, 如下面进一步描述的。发夹可以为左手方向(即, 5' -反义-环-有义-3')或右手方向(即, 5' -有义-环-反义-3')。

[0124] 如本文中所使用的, “siRNA”是指通过 RNA 干扰(RNAi)途径诱导基因沉默的短干扰 RNA 双链体。短干扰 RNA 的长度可以变化, 并且可在反义与有义区域之间以及反义区域与靶 mRNA 序列之间包含至多一个或两个错配碱基对。各 siRNA 可包含 15 至 30 个碱基对, 或 18 至 25 个碱基对, 或 19 至 22 个碱基对或 21 个碱基对或 19 个碱基对。在一些实施方案中, siRNA 在 5' 末端、3' 末端或 5' 末端和 3' 末端上独立地具有 1、2、3、4 或 5 个未配对的悬突核苷酸。在一些实施方案中, siRNA 具有平末端。此外, 术语“siRNA”包括两条分开的链的双链体以及可形成发夹结构的单链(shRNA)。shRNA 可具有例如 4 至 30 个或 6 至 20 个或 7 至 15 个核苷酸的核苷酸环序列, 或可包含非核苷酸部分例如烃连接区(hydrocarbon

linking region), 或其组合。shRNA 可包含错配或凸出 (bulge)。

[0125] 在一些实施方案中, 本教导包括修饰的核苷酸, 其与非修饰的核苷酸相比具有增强的碱基配对的亲和力或赋予核苷酸序列 (所述修饰的核苷酸是该核苷酸序列的一部分) 增强的亲和力。修饰的核苷酸, 如本文中所涉及的, 使 RNA 的构象平衡移向与 RNA 双链体的 A 型几何形状 (A-form geometry) 一致的 northern (C3' -endo) 构象。DNA:RNA 双链体也可藉此来稳定。在一些实施方案中, 通过构建具有二环核苷酸、三环核苷酸或 2' - 修饰的核苷酸的过客 (有义) 寡核苷酸来获得增强的碱基配对的亲和力。

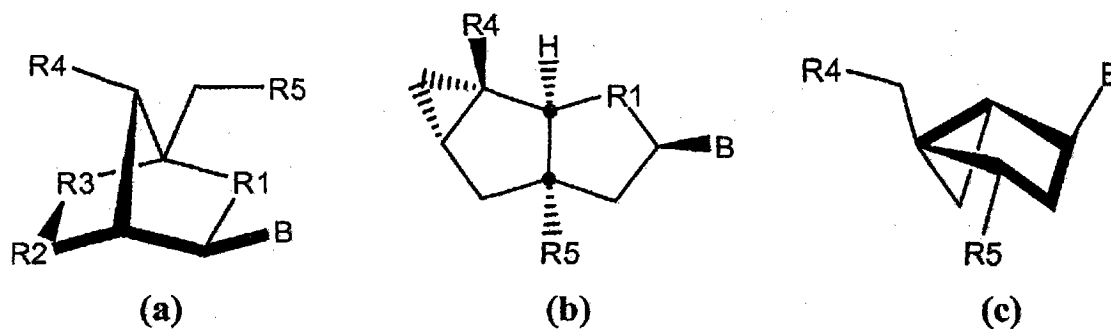
[0126] 在一些实施方案中, siRNA 的修饰核苷酸独立地包括修饰的糖部分、修饰的碱基部分、修饰的核苷间部分或任何这些修饰部分的组合。

[0127] 在一些实施方案中, 修饰的核苷酸包括修饰的糖部分, 包括但不限于, 2' - 卤代 (其中卤代是氯代、氟代、溴代或碘代); 阿拉伯糖构象中的阿糖基 (arabino) 或 2' - 氟代 (FANA); 2' -H, -SH, -NH₂, -CN、叠氮化合物; 或 -OR, -R, -SR, -NHR 或 -N(R)₂, 其中 R 是烷基、烯基、炔基、烷氧基 (alkoxy)、氧烷基 (oxyalkyl)、烷氧基烷基、烷基胺, 其中烷基部分是 C1-C6。

[0128] 另外的 2' 修饰包括 2' -O-(CH₂)₄NH₂; 2' -O-蒽醌基烷基 (anthraquinolylalkyl), 其中烷基包括甲基或乙基; 2' -O-(CH₂)₂-OCH₃; 2' -O-(CH₂CH₂O)_n-CH₃, 其中 n 是 1-4; 2' -O-CH₂-CHR-X, 其中 X = OH, F, CF₃ 或 OCH₃ 以及 R = H, CH₃, CH₂OH 或 CH₂OCH₃; 肽核酸单体或其衍生物 (PNA); 2' 修饰, 其中 2' - 位是烷氧基, 例如, 甲氧基、乙氧基、烯丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基和苯氧基等。

[0129] 在一些实施方案中, 修饰的核苷酸包括修饰的糖部分或假糖 (pseudosugar), 包括但不限于二环核苷酸结构 (a)、三环核苷酸结构 (b) 或二环核苷酸结构 (c):

[0130]



[0131] 其中 R1 和 R2 独立地是 O, S, CH₂ 或 NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基; R3 是 CH₂, CH₂-O, CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CH₂, CH = CH 或 CH₂-NR, 其中 R 是氢或 C₁₋₃-烷基; R4 和 R5 独立地是核苷间的连接、末端基团或保护基团; R4 和 R5 中至少一个是核苷间的连接; B 是核碱基、核碱基衍生物或核碱基类似物。在一些实施方案中, R4 和 R5 独立地是 H, OH, 磷酸盐 / 酯、C₁₋₁₂-烷基、C₁₋₁₂-烷基胺、C₁₋₁₂-烯基、C₁₋₁₂-炔基、C₁₋₁₂-环烷基、C₁₋₁₂-芳烷基、芳基、酰基、甲硅烷基、寡核苷酸、通过核苷间的连接键合的核苷、或其组合; 以及 R4 和 R5 中至少一个是寡核苷酸, 或通过核苷间的连接键合的核苷。可利用取代基例如磷酸盐 / 酯、C₁₋₁₂-烷基、C₁₋₁₂-烷基胺、C₁₋₁₂-烯基、C₁₋₁₂-炔基、C₁₋₁₂-环烷基、C₁₋₁₂-芳烷基、芳基、酰基或甲硅烷基进一步衍生 5' 末端。在一些实施方案中, 例如利用 C₁₂ 或 C₆ 取代基或利用磷酸盐 / 酯衍生 5' 末端。

[0132] 二环核苷酸包括上文中对于结构 (a) 和 (c) 所描述的二环核苷酸。结构 (a) 的二环核苷酸也称为锁核酸 (locked nucleic acid) 或 **LNA®**, 包括例如 β -D, 和 α -L 二环核苷酸、二环核苷酸例如木糖-锁核酸 (xylo-locked nucleic acid) (美国专利 7,084,125)、L-核糖-锁核酸 (美国专利 7,053,207)、1'-2' 锁核酸 (美国专利 6,734,291 和 6,639,059) 以及 3'-5' 锁核酸 (美国专利 6,083,482)。结构 (c) 的二环核苷酸和含有此类二环核苷酸的寡核苷酸的合成描述于例如 Maier 等人 (Nucleic Acids Research 2004, 32:12,3642-3650) 和 Maderia 等人 (Nucleic Acids Research 2007, 35:6,1978-1991) 中。结构 (b) 的三环核苷酸和含有此类三环核苷酸的寡核苷酸的合成描述于例如 Ittig 等人 (Nucleic Acids Research 2004, 32:1,346-353) 中。

[0133] 在一些实施方案中,核苷酸包括修饰的核苷间连接体部分,包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯 (phosphorodiselenoate)、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate、氨基磷酸酯 (phosphoramidate)、boronophosphate、thioformacetal ($-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$)、亚甲基 (甲基亚氨基)、二甲基胍基、磷酸基连接的吗啉代、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 和磷酸酯的任何类似物,其中磷原子为 +5 价氧化状态,并且一个或多个氧原子用非氧部分例如硫取代。肽核酸是其中主链包含合成的肽样连接 (酰胺键) (通常从 N-(2-氨基-乙基)-甘氨酸单位形成,导致无手性和不带电荷的分子) 的核酸类似物。示例性磷酸酯 / 盐类似物包含结合的抗衡离子例如 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ (如果此类抗衡离子存在的话)。

[0134] 在一些实施方案中,核苷酸包括修饰的碱基部分,包括但不限于嘧啶核碱基和嘌呤核碱基以及其衍生物和类似物,包括但不限于用烷基、羧基烷基、氨基、羟基、卤素 (即,氟、氯、溴或碘)、巯基或烷基巯基部分中的一个或多个取代的嘧啶和嘌呤。烷基 (例如,烷基、羧基烷基等) 部分包含 1 至 6 个碳原子。本文中涉及的另外的修饰的核苷酸包括氧杂环丁烷修饰的碱基 (关于包含氧杂环丁烷修饰的碱基的论述,参见美国公开专利申请案 20040142946)。

[0135] 嘧啶、嘧啶衍生物和嘧啶类似物包括但不限于溴乙胺 (bromothymine)、1-甲基假尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫代胞嘧啶、2-硫嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑吡啶、3-甲基胞嘧啶、3-(3-氨基-3-羧基-丙基) 尿嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、4-硫代尿嘧啶、N4, N4-乙烯基胞嘧啶 (ethanocytosine)、4-(6-氨基己基胞嘧啶)、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、5-(C3, C6)-炔基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-(羧基羟基甲基) 尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、硫代尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羧基-甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、5-碘-2'-脱氧尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、基于三环咪唑的嘧啶类似物、基于三环吩噻嗪的嘧啶类似物、异胞嘧啶 (isocytosine)、假异胞嘧啶 (pseudoisocytosine)、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶和通用核苷酸 (universal nucleotide)。

[0136] 在一些实施方案中,嘌呤、嘌呤衍生物和嘌呤类似物包括但不限于氮杂嘌呤、氮杂鸟嘌呤、氮杂腺嘌呤、脱氮嘌呤 (deazapurine)、脱氮鸟嘌呤、脱氮腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基肌苷、2-氨基嘌呤、2-氯-6-氨基嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、

2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、2-甲基硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、6-硫代腺嘌呤、6-硫代嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N, N-二甲基腺嘌呤、N6-异戊烯基腺嘌呤、N6, N6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、7-卤代-7-脱氮嘌呤,其中卤代是溴代、氟代、碘代或氯代、7-丙炔-7-脱氮嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫代鸟嘌呤、8-氧-N6-甲基腺嘌呤、N-((9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)-氨甲酰基)苏氨酸、甲硫基腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤、肌苷、wybutoxosine、wybutosine、异鸟嘌呤、Q核苷(queuosine)、β-D-甘露糖基Q核苷、β-D-半乳糖基Q核苷和通用核苷酸。

[0137] 通用碱基可以与一种类型以上的特定碱基或任何特定碱基碱基配对。在其他实施方案中,通用碱基不与任何碱基特异性形成氢键而通过疏水堆积与相同核酸链上的相邻碱基相互作用。通用碱基包括但不限于吡啶例如 7-氮杂吡啶、6-甲基-7-氮杂吡啶、丙炔基-7-氮杂-吡啶、联烯基-7-氮杂吡啶、异喹诺酮(isocarbostyryl)、丙炔基异喹诺酮、咪唑并吡啶(imidizopyridine)和 pyrrolpyridine。

[0138] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸以特定模式(在本文中称为“形式”)存在于 siRNA 中,如图 1A 至图 1K 所示的模式或形式所举例说明的。在一些实施方案中,化学合成的过客(有义)寡核苷酸具有 15 至 30 个核苷酸的长度并且包含不依赖于序列的修饰形式(1)、不依赖于序列的修饰形式(2)和不依赖于序列的修饰形式(3)中的一个:

[0139] (1) $5' N_p-m-m-N_x-m-m-N_q-n_r 3'$, 其中 p 为 0 或 1; x 为 7、8、9、10 或 11; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+x+r+4)$ 的整数;

[0140] (2) $5' N_p-m-m-N_y-m-N_z-m-N_q-n_r 3'$, 其中 p 为 0 或 1; y 为 7、8 或 9 并且 z 为 1; 或 y 为 7 并且 z 为 2 或 3; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+4)$ 的整数;

[0141] (3) $5' m-N_1-m-N_x-m-m-N_q-n_r 3'$, 其中 x 为 8、9 或 10; r 为 0、1 或 2; 以及 q 为表示过客链的长度减去 $(x+r+5)$ 的整数;

[0142] 其中各 m 独立地是二环核苷酸或三环核苷酸;各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸;且当 m 是二环核苷酸时,各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸;以及当 m 是三环核苷酸时,各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸。

[0143] 在一些实施方案中,提供了化学合成的过客(有义)寡核苷酸,所述寡核苷酸基本上由 15 至 30 个核苷酸的长度组成并且基本上由如下的不依赖于序列的修饰形式(1)、不依赖于序列的修饰形式(2)和不依赖于序列的修饰形式(3)中的一个组成:

[0144] (1) $5' N_p-m-m-N_x-m-m-N_q-n_r 3'$, 其中 p 为 0 或 1; x 为 7、8、9、10 或 11; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+x+r+4)$ 的整数;

[0145] (2) $5' N_p-m-m-N_y-m-N_z-m-N_q-n_r 3'$, 其中 p 为 0 或 1; y 为 7、8 或 9 并且 z 为 1; 或 y 为 7 并且 z 为 2 或 3; r 为 0、1 或 2; 以及 q 是表示过客链的长度减去 $(p+y+z+r+4)$ 的整数;

[0146] (3) $5' m-N_1-m-N_x-m-m-N_q-n_r 3'$, 其中 x 为 8、9 或 10; r 为 0、1 或 2; 以及 q 为表示过客链的长度减去 $(x+r+5)$ 的整数;

[0147] 其中各 m 独立地是二环核苷酸或三环核苷酸;各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核

苷酸或核糖核苷酸；当 m 是二环核苷酸时，各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸；以及当 m 是三环核苷酸时，各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸。

[0148] 在一些实施方案中，引导（反义）寡核苷酸包含 15 至 30 个核苷酸，与至少 12 个核苷酸的过客（有义）寡核苷酸连续互补的区域，并且与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性。在一些实施方案中，引导（反义）寡核苷酸包含与至少 13 个核苷酸至相应于寡核苷酸的全长的数目的核苷酸的过客（有义）寡核苷酸连续互补的区域。在一些实施方案中，引导（反义）寡核苷酸包含与过客（有义）寡核苷酸的全长（除了两个 3' 核苷酸以外）连续互补的区域。

[0149] 在一些实施方案中，引导（反义）寡核苷酸与靶 mRNA 的至少一部分具有至少 12 个连续核苷酸的互补性。在一些实施方案中，引导（反义）寡核苷酸与靶 mRNA 的至少一部分具有至少 13 个核苷酸至相应于引导寡核苷酸的全长的数目的核苷酸的互补性。在一些实施方案中，引导寡核苷酸与靶 mRNA 的一部分具有完全互补性（除了 2 个 3' 核苷酸以外）。

[0150] 在一些实施方案中，提供了包含过客（有义）寡核苷酸和引导（反义）寡核苷酸的短干扰 RNA，所述过客（有义）寡核苷酸具有 17 至 30 个核苷酸的长度并且包含不依赖于序列的修饰形式 (4)、形式 (5) 和形式 (6) 中的一个，所述引导（反义）寡核苷酸具有 17 至 30 个核苷酸，与至少 12 个核苷酸的过客（有义）寡核苷酸连续互补的区域；引导链还与靶 mRNA 的至少一部分具有互补性：

[0151] (4) $5' \text{ m}_p\text{-N}_x\text{-m-m-N}_q\text{-n}_r \text{ 3'}$ ，其中当 p 为 0 时，x 为 12；当 p 为 1 时，x 为 11；当 p 为 2 时，x 为 10；当 p 为 3 时，x 为 9；当 p 为 4 时，x 为 8；r 为 0、1 或 2；以及 q 是表示过客链的长度减去 (p+x+r+2) 的整数；

[0152] (5) $5' \text{ m-m-N}_x\text{-m-N}_q\text{-n}_r \text{ 3'}$ ，其中 x 为 11；r 为 0、1 或 2；以及 q 是表示过客链的长度减去 (x+r+3) 的整数；

[0153] (6) $5' \text{ m}_p\text{-N}_y\text{-m-N}_z\text{-m-N}_q\text{-n}_r \text{ 3'}$ ，其中 p 为 3；y 为 9 并且 z 为 1；r 为 0、1 或 2；以及 q 为表示过客链的长度减去 (p+y+z+r+2) 的整数；

[0154] 其中各 m 独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 2' - 修饰的核苷酸；各 n 独立地是脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸，并且是悬突核苷酸；当 m 是二环核苷酸时，各 N 独立地是除了二环核苷酸外的核苷酸，当 m 是三环核苷酸时，各 N 独立地是除了三环核苷酸外的核苷酸，以及当 m 是 2' - 修饰的核苷酸时，各 N 独立地是除了 2' - 修饰的核苷酸外的核苷酸。

[0155] 在短干扰 RNA 的实施方案中，过客（有义）寡核苷酸具有不依赖于序列的修饰形式 (4)，p 为 2，x 为 10，r 为 2，各 n 是悬突核苷酸，并且各 n 独立地是修饰的核苷酸，引导（反义）寡核苷酸包含 2 个 3' 悬突修饰的核苷酸；各修饰的核苷酸独立地是二环核苷酸、三环核苷酸或 2' 修饰的核苷酸。在一个实施方案中，过客寡核苷酸的 3' 倒数第三个位点和 3' 倒数第四个位点中的至少一个是修饰的核苷酸。3' 倒数第三个位点是从最后一个位点算起的第三个位点，即在倒数第二个位点之前的位点（例如，图 1H 的形式 DH47）。3' 倒数第四个位点是从最后一个位点算起的第四个位点，即，倒数第三个位点之前的位点（例如，图 1H 的形式 DH29）。这样的 siRNA 例如在血清存在的情况下对于核酸酶是特别稳定的。

[0156] 在短干扰 RNA 的一些实施方案中，当长度为 17 个核苷酸时，引导寡核苷酸的位点 2 和 3 中的至少一个是修饰的核苷酸；当长度为 18 个核苷酸时，引导寡核苷酸的位点 2、3 和

4 中的至少一个是修饰的核苷酸 ;当长度为 19 个核苷酸时,引导寡核苷酸的位点 2、3、4 和 5 中的至少一个是修饰的核苷酸 ;当长度为 20 个核苷酸时,引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5 和 6 中的至少一个是修饰的核苷酸 ;以及当长度为 21 至 30 个核苷酸时,引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7 中的至少一个是修饰的核苷酸。图 1K 的形式 DH1 和形式 DH39-DH43 提供了具有 21 个核苷酸的长度并且引导寡核苷酸的位点 2、3、4、5、6 和 7 中的至少一个是修饰的核苷酸的 siRNA 修饰形式的实例。这样的 siRNA 例如在血清或血浆存在的情况下对核酸酶也是特别稳定的。

[0157] 在一些实施方案中,过客(有义)寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式(1),其中 p 为 0, x 为 10 并且 r 为 2(形式 H,具有形式 H 的 21 聚体描述于图 1A);或不依赖于序列的修饰形式(1),其中 p 为 0, x 为 9 或 11,并且 r 为 2(形式 H-1 或形式 H+1,具有这样的形式的 21 聚体描述于图 1B);或不依赖于序列的修饰形式(2),其中 p 为 0, y 为 9,并且 r 为 2(形式 V,具有形式 V 的 21 聚体描述于图 1C)。

[0158] 在一些实施方案中,过客(有义)寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式(1),其中 p 为 1, x 为 9 或 10, r 为 2,(形式 W 或形式 W+1,具有这样的形式的 21 聚体描述于图 1D),并且各 m 具有结构(a),其中 R_1 是 0, R_2 是 0,并且 R_3 是 CH_2 。在一些实施方案中,过客(有义)寡核苷酸包含不依赖于序列的修饰形式(3), x 为 9 或 10, r 为 2,(形式 Y 或形式 Y+1,具有这样的形式的 21 聚体描述于图 1D),并且各 m 具有结构(a),其中 R_1 是 0, R_2 是 0,并且 R_3 是 CH_2 。

[0159] 在另外的实施方案中,引导(反义)链的各 N 是除了二环核苷酸以外的核苷酸。在一些实施方案中,引导(反义)链不具有修饰。

[0160] 在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 H,其中修饰的核苷酸 m 在所述形式的位点 1、2、13 和 14 上;各 m 是 **LNA®**;各 n 是脱氧核苷酸;并且各 N 是核糖核苷酸。在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 H,并且各 m 具有结构(a),其中 R_1 是 0, R_2 是 0,并且 R_3 是 CH_2 。

[0161] 在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 V,其中修饰的核苷酸 m 在所述形式的位点 1、2、12 和 14 上;各 m 是 **LNA®**;各 n 是脱氧核苷酸;并且各 N 是核糖核苷酸。在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 V,并且各 m 具有结构(a),其中 R_1 是 0, R_2 是 0,并且 R_3 是 CH_2 。在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 V-2,其拥有形式(2),其中 p 是 0 并且 y 是 7。

[0162] 在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 Q,其中修饰的核苷酸 m 在所述形式的位点 13 和 14 上;各 m 是 **LNA®**;各 n 是脱氧核苷酸;并且各 N 是核糖核苷酸。在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有修饰形式 Q,并且各 m 具有结构(a),其中 R_1 是 0, R_2 是 0,并且 R_3 是 CH_2 。

[0163] 在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有形式(4),其中当 p 为 0 时, x 为 12(形式 Q);当 p 为 1 时, x 为 11(形式 JB2);当 p 为 2 时, x 为 10(形式 H);当 p 为 3 时, x 为 9(形式 JB5),以及当 p 为 4 时, x 为 8(形式 JB 3) 并且 r 为 2。在一些实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有形式(5),其中 x 为 11(形式 JB1) 并且 r 为 2。在另外的实施方案中,siRNA 过客寡核苷酸具有形式(6),其中 p 为 3, y 为 9 并且 z 为 1(形式 JB4),并且 r 为 2。

[0164] 在一些实施方案中,化学合成的短干扰 RNA 包含通过核苷酸环或连接体环共价键

合的过客（有义）寡核苷酸和引导（反义）寡核苷酸，其形成短发夹寡核苷酸。

[0165] 在一些实施方案中，siRNA 的各 3' 末端独立地具有 1 个、2 个或 3 个核苷酸的悬突，在一些实施方案中，各 3' 末端具有 2 个核苷酸的悬突，其中各悬突的核苷酸包括脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中，至少一个悬突核苷酸是修饰的核苷酸。在一些实施方案中，siRNA 的各 3' 末端具有 2 个核苷酸的悬突，并且 1、2、3 或所有 4 个悬突核苷酸是修饰的核苷酸。在一些实施方案中，至少一个核苷间的连接不是磷酸二酯核苷间连接。

[0166] 化学合成：按照标准方法进行干扰 RNA 寡核苷酸合成。合成方法的非限定性实例包括使用二酯法、三酯法、多核苷酸磷酸化酶法和通过固相化学进行的体外化学合成。在下面更详细地论述此类方法。

[0167] 例如按照 Imanishi 在美国专利 6,770,748 和 6,268,490 中描述的；按照 Wengel 在美国专利 7,084,125、7,060,809、7,053,207、7,034,133、6,794,499，和 6,670,461 和美国公开申请案 2005/0287566 和 2003/0224377 中描述的；按照 Kochkine 在美国专利 6,734,291 和 6,639,059 以及美国公开申请案 2003/0092905 中描述的；和按照 Kauppinen 在美国公开申请案 2004/0219565 中描述的以及按照 Srivastava, P., 等人 (J. Am. Chem. Soc. 129,8362-8379,2007) 合成具有二环核苷酸结构（包括结构 (a) 的那些）的寡核苷酸。

[0168] 按照例如 Ittig, D. 等 (Nucleic Acids Res. 32 :1,346-353,2004) 合成具有三环核苷酸结构 (b) 的寡核苷酸。按照例如 Maier, M. A. 等人 (Nucleic Acids Res. 32 :12, 3642-3650,2004) 合成具有二环核苷酸结构 (c) 的寡核苷酸。按照 Dowler 等人 (Nucleic Acids Res. 2006,34 :6, p 1669-1675) 合成具有 FANA 取代基的寡核苷酸。

[0169] 寡核苷酸合成的二酯法是主要由 Khorana 等人 (Science,203,614.1979) 开发成可用状态的第一个合成方法。基本步骤是将两个适当保护的核苷酸连接起来，以形成包含磷酸二酯键的二核苷酸。二酯法已良好地建立并且已被用于合成 DNA 分子。

[0170] 二酯法与三酯法之间的主要差异是在后者中在反应物和产物的磷酸盐（酯）原子（phosphate atom）上存在额外的保护基团（Itakura 等人, J. Biol. Chem., 250 :45921975）。磷酸盐（酯）保护基团通常是氯苯基，其使核苷酸和多核苷酸中间物溶解在有机溶剂中。因此在氯仿溶液中进行纯化。该方法的其他改进包括 (i) 三聚体或更大的寡聚体的嵌段偶联（block coupling），(ii) 广泛使用高效液相色谱来纯化中间物和终产物，和 (iii) 固相合成。

[0171] 利用经开发用于多肽的固相合成的技术，已能够将起始核苷酸连接至固体支持材料，然后进行核苷酸的逐个加入。简化所有混合和清洗步骤，且该方法易于实现自动化。现可使用自动化核酸合成仪常规地进行此类合成。

[0172] 亚磷酰胺化学法 (Beaucage, S. L. 和 Iyer, R. P. Tetrahedron,1993(49)6123 ; Tetrahedron,1992(48)2223) 迄今已成为最广泛使用的用于寡核苷酸的合成的偶联化学法 (coupling chemistry)。如对于本领域技术人员来说是熟知的，寡核苷酸的亚磷酰胺合成包括通过与活化剂反应来活化核苷亚磷酰胺单体前体以形成活化的中间物，然后将活化的中间物顺序加至正在生长的寡核苷酸链（通常一端锚定在合适的固体支持物上）以形成寡核苷酸产物。

[0173] 可在反相纯化筒 (reversed phase purification cartridge)、离子交换 HPLC、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、氯化铯离心梯度、含有结合核酸的试剂（例如玻璃纤维）的

柱、过滤器或筒上或通过本领域技术人员已知的任何其他方法纯化 siRNA。可使用凝胶电泳来确定单链对双链结构,可使用离子交换 HPLC 来测定纯度,可使用 MALDI-MS 来确定身份(identity),可使用 UV 光谱法来定量测定 siRNA。

[0174] 含有内源靶基因的细胞可来源于或包含于任何生物体(例如,真核生物例如植物、动物、真菌;原核生物例如细菌)中。植物可以是单子叶植物、双子叶植物或裸子植物;动物可以是脊椎动物或无脊椎动物。微生物可用于农业或工业,或对于植物或动物可以是病原性的。真菌包括以霉菌和酵母形态学形式存在的生物。脊椎动物的实例包括鱼和哺乳动物(包括牛、山羊、猪、绵羊、仓鼠、小鼠、大鼠和人);无脊椎动物包括线虫、昆虫、蜘蛛和其他节肢动物。

[0175] 靶基因可以是来源于细胞的基因、内源基因、转基因或外源基因例如感染后存在于细胞中的病原体(例如病毒)的基因。具有靶基因的细胞可来自种系或体细胞、全能或多能细胞、分裂或非分裂细胞、实质或上皮细胞、永生化细胞或转化细胞等。细胞可以是配子或胚胎;如果是胚胎,其可以是单细胞胚胎或来自多细胞胚胎的组成细胞(constituent cell)。术语“胚胎”因此包括胎儿组织。具有靶基因的细胞可以是未分化的细胞例如干细胞,或分化的细胞例如来自器官或组织包括胎儿组织的细胞或存在于生物体中的任何其他细胞。分化的细胞类型包括脂肪细胞、成纤维细胞、肌细胞、心肌细胞、内皮细胞(endothelium)、神经元、神经胶质细胞、血细胞、巨核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、白细胞、粒细胞、角质形成细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、肝细胞以及内分泌腺或外分泌腺的细胞。

[0176] 在一些实施方案中,靶 RNA 是转录的 RNA,包括编码 RNA 和非编码 RNA。

[0177] 如本文中所使用的,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”包括它们的后代,所述后代是通过细胞分裂形成的任何和所有后代。应当理解,所有后代由于有意或无意的突变而可能不完全相同。宿主细胞可以进行“转染”或“转化”,这是指利用其将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。转化的细胞包括原代受试细胞和其后代。如本文中所使用的,术语“工程改造的”和“重组”细胞或宿主细胞意指指已向其中引入了外源核酸序列例如小干扰 RNA 或编码此类 RNA 的模板构建体的细胞。因此,重组细胞与不包含重组引入的核酸的天然存在的细胞是可区别的。

[0178] 在某些实施方案中,预期可将 RNA 或蛋白质性质的序列与其他选择的 RNA 或蛋白质性质的序列在相同宿主细胞中共表达。可通过用两种或更多种不同的重组载体共转染宿主细胞来实现共表达。备选地,可构建包含多个不同的 RNA 编码区的单个重组载体,然后其在该单个载体转染的宿主细胞中进行表达。

[0179] 在一些实施方案中,含有内源靶基因的组织是人组织。在某些实施方案中,组织包括血液,例如但不限于红细胞、白细胞、血小板、血浆、血清或全血。在某些实施方案中,组织包括实体组织(solid tissue)。在某些实施方案中,组织包括病毒、细菌或真菌。在某些实施方案中,组织包括离体组织。

[0180] 组织可包含待用核酸递送组合物或另外的试剂转化或接触的宿主细胞。组织可以是生物体的一部分或可从生物体分离。在某些实施方案中,组织和其组成细胞可包括但不限于血液(例如,造血细胞(例如人造血祖细胞、人造血干细胞、CD34⁺细胞、CD4⁺细胞)、淋巴细胞和其他血液谱系细胞)、骨髓、脑、干细胞、血管、肝、肺、骨、乳腺、软骨、宫颈、结肠、角

膜、胚胎、子宫内膜、内皮、上皮、食管、颜面 (facia)、成纤维细胞、滤泡、神经节细胞、神经胶质细胞、杯状细胞、肾、淋巴结、肌肉、神经元、卵巢、胰腺、外周血、前列腺、皮肤、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸。

[0181] 在一些实施方案中,提供了对细胞内和细胞外核酸酶稳定的修饰形式化的 siRNA。在本文中证实,此类 siRNA 在生物学液体存在的情况下保持全长的时间比之已前已知的稳定的 siRNA 更长。将对核酸酶稳定的 siRNA 用于含有特别高浓度的核酸酶的生物学液体和组织(包括例如血清、血浆和特别血管化的器官和组织)中。

[0182] 可将 siRNA 与靶向细胞的配体结合。如本文中所使用的,“靶向细胞的配体”是具有对于被靶向的位点例如细胞表面受体的特异性的细胞导向分子 (cell-directing molecule)。“对于被靶向的位点的特异性”是指在将靶向细胞的配体与细胞接触后,在离子强度、温度、pH 等的生理条件下,将发生特异性结合。细胞-配体相互作用可因配体的某些残基与细胞的特定残基的特定静电、疏水或其他相互作用而发生,从而在有效促进相互作用的条件下形成稳定的复合物。

[0183] 示例性靶向细胞的配体包括但不限于具有对于细胞受体、蛋白质例如抗体、脂肪酸、维生素、类黄酮、糖、抗原、受体、报告分子、报告酶、螯合剂、卟啉、嵌入剂、类固醇和类固醇衍生物、激素例如黄体酮(例如孕酮)、糖皮质激素(例如,皮质醇)、盐皮质激素(例如,醛固酮)、雄激素(例如,睾酮)和雌激素(例如,雌二醇)、组胺、模拟激素(hormone mimics)例如吗啡和大环化合物的亲和力的多核苷酸、寡核苷酸、聚酰胺、肽。具有对于细胞受体的亲和力的肽可包括内啡肽、脑啡肽、生长因子例如表皮生长因子、多聚 L 赖氨酸、激素、胰岛素、核糖核酸酶、血清白蛋白结合肽、能够通过主动运输或被动运输穿过细胞膜的蛋白质的肽区域和其他分子。

[0184] 根据实施方案的用于 siRNA 递送以影响 RNAi 的适当的方法包括通过其可将 siRNA 引入细胞器、细胞、组织或生物体的任何方法,如本文中所描述的或本领域技术人员所已知的。此类方法包括但不限于,例如通过注射(包括显微注射)进行的 siRNA 的直接递送、电穿孔、磷酸钙沉淀、使用 DEAE-葡聚糖然后使用聚乙二醇、直接的超声加载(direct sonic loading)、脂质体介导的转染、微粒轰击、使用碳化硅纤维的搅动、农杆菌介导的转化、PEG 介导的转化、干燥/抑制介导的吸收(desiccation/inhibition-mediated uptake)等。通过使用技术例如此类技术,可稳定地或瞬时地转化细胞器、细胞、组织或生物体。对于核酸酶降解是稳定的 siRNA(本文中提供了其实施方案)特别适合用于直接注射,如实施例 8 的数据所显示的,其中血清稳定的修饰形式化的 siRNA 以未修饰 siRNA 的 400% 的水平存在于体内。

[0185] 用于显现或检测 siRNA 的技术包括但不限于显微镜法、阵列、荧光测定法、light cycler 或其他实时 PCR 仪、FACS 分析、闪烁计数器、磷屏成像仪(phosphoimager)、Geiger 计数器、MRI、CAT、基于抗体的检测方法(Western、免疫荧光、免疫组织化学)、组织化学技术、HPLC、光谱法,质谱法;放射学技术、毛细管凝胶电泳和质量平衡技术。备选地,可标记核酸或给核酸加标签以允许它们有效分离。在本发明的其他实施方案中,对核酸进行生物素化。

[0186] “标记”或“报告子(reporter)”是指允许检测与其结合的物质的一部分或性质。可共价或非共价连接标记。标记的实例包括荧光标记(包括例如,猝灭剂或吸收剂)、

比色标记 (colorimetric label)、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、质量修饰 (mass-modifying) 基团、抗体、抗原、生物素、半抗原、酶 (包括例如过氧化物酶、磷酸酶等) 等。荧光标记可包括带负电荷的染料, 例如荧光素家族的染料, 包括例如 FAM、HEX、TET、JOE、NAN 和 ZOE; 或在电荷上是中性的染料例如罗丹明家族的染料, 包括例如 Texas Red、ROX、R110、R6G 和 TAMRA; 或带正电荷的染料, 例如青色素家族的染料, 包括例如 Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 和 Cy7。FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、ROX、R110、R6G 和 TAMRA 可从例如 Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, MA) 获得; Texas Red 可从例如 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) 获得; 以及 Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 和 Cy7 可从例如 Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ) 获得。在某些实施方案中, 荧光剂分子是荧光素染料, 猝灭剂分子是罗丹明染料。

[0187] 标记或报告子可包含荧光团和荧光猝灭剂。荧光猝灭剂可以是发荧光的荧光猝灭剂例如荧光团 TAMRA 或不发荧光的荧光猝灭剂 (NFQ), 例如, 组合的 NFQ- 小沟结合剂 (MGB) 例如由 Epoch Biosciences (Bothell, WA) 提供并且与 TAQMAN™ 探针 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 一起使用的 MGB ECLIPSE™ 小沟结合剂。荧光团可以是可被连接至核酸的任何荧光团, 例如, FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、Texas Red、ROX、R110、R6G、TAMRA、Cy2、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 和 Cy7 (如上文引用的) 以及 VIC、NED、LIZ、ALEXA、Cy9 和 dR6G。

[0188] 标记的另外的实例包括黑洞猝灭剂 (black hole quencher) (BHQ) (Biosearch)、Iowa Black (DDT)、QSY 猝灭剂 (Molecular Probes) 以及 Dabsyl 和 Dabcyl 磺酸酯 (盐)/羧酸酯 (盐) 猝灭剂 (Epoch)。标记还可包含荧光素染料的磺酸酯衍生物、荧光素的亚磷酰胺形式、CY5 的亚磷酰胺形式 (可例如从 Amersham 获得)、嵌入标记例如溴化乙锭以及 SYBR™ Green I 和 PICO GREEN™ (Molecular Probes)。

[0189] 在不同实施方案中, 荧光的检测可利用本领域技术人员已知的任何方法来进行, 并且可以是定性的或定量的。可以例如借助于荧光计获得定量的结果。在一些实施方案中, 可使用微阵列和相关软件例如使用 Applied Biosystems 1700 化学发光微阵列分析仪的 Applied Biosystems Array System 和其他可商购获得的阵列系统 (特别地, 可从 Affymetrix、Agilent、Illumina 和 NimbleGen 获得的系统) 来进行检测 (也参见 Gerry 等人, J. Mol. Biol. 292:251-62, 1999; De Bellis 等人, Minerva Biotech 14:247-52, 2002; 和 Stears 等人, Nat. Med. 9:140-45, 包括补充材料, 2003)。

[0190] 生物学可接受的载体是指提供适当的防腐作用 (当需要时), 并且以均一的剂量递送一种或多种本文的实施方案的干扰 RNA 的载体。载体的类型可取决于 siRNA 是以固体、液体还是气溶胶的形式使用, 以及取决于其对于施用途例如注射是否需要是无菌的。可以将 siRNA 组合物以游离碱、中性或盐形式配制入组合物。siRNA 的盐形式具有减少脱靶效应并且维持抑制活性的特性 (与本文中描述的 siRNA 相当)。盐形式的实例包括有机酸加成盐和碱加成盐。可以以可在细胞内代谢成活性形式的前药形式提供 siRNA 组合物; 此类前药形式可包括保护基团例如 S-乙酰硫代乙基 (S-acetylthioethyl) 或 S-新戊酰硫代乙基 (S-pivaloylthioethyl) 基团。

[0191] 在其中组合物以液体形式存在的实施方案中, 载体可以是溶剂或分散介质, 包括但不限于不含 RNA 酶的水、缓冲剂、盐溶液、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂质 (例如, 甘油三酯、植物油、脂质体)、甘氨酸、可接受的防腐剂 (例如, 抗菌剂、

抗真菌剂)、助溶剂(co-solvent)、表面活性剂、渗透促进剂(例如, cremephor 和 TWEEN™ 80(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯(monolaureate), Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.))、透明质酸、甘露醇、氯化苯甲烃胺、粘度构建剂(viscosity building agent)(例如, 羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素)、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、等渗剂、吸收延迟剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、增甜剂、芳香剂、染料和其组合。当期望时, 通过将 siRNA 与上文列举的各种其他成分一起掺入适当的溶剂, 然后过滤灭菌来制备无菌注射液。制剂包含与生物学可接受的载体混合的按重量计直至 99% 的本文实施方案中的干扰 RNA 或其盐。可以以溶液、悬浮液或乳剂的形式使用实施方案中的干扰 RNA。

[0192] 用于实施方案中的干扰 RNA 的可接受的载体包括基于脂质的试剂 siPORT™ NeoFX™ 转染剂(Ambion Cat. #AM4510)、基于多胺的试剂 siPORT™ Amine 转染剂(Ambion Cat. #AM4502)、基于阳离子和中性脂质的试剂 siPORT™ Lipid 转染剂(Ambion Cat. #AM4504)、基于阳离子脂质的转染剂 **TransIT®**-TKO(Mirus Corporation, Madison, Wis.)、**Lipofectin®**、Lipofectamine、Oligofectamine™(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 或 Dharmafect™(Dharmacon, Lafayette, Colo.)、另外的多聚阳离子例如聚乙烯亚胺、阳离子肽例如 Tat、聚精氨酸或穿透蛋白(penetratin)、或脂质体。例如, 脂质体可从标准的形成小囊泡的脂质和固醇例如胆固醇形成, 并且可以包含靶向性分子例如具有对于细胞表面抗原的结合亲和力的单克隆抗体。此外, 脂质体可以是 PEG 化的脂质体。

[0193] 可在溶液中、悬浮液中或生物可蚀解或生物不可蚀解递送装置中递送干扰 RNA。可单独地递送干扰 RNA 或将其作为例如与聚乙二醇部分、胆固醇部分或与生长因子(用于受体介导的内吞作用)的确定的共价缀合物的组分来进行递送。还可将干扰 RNA 与阳离子脂质、阳离子肽或阳离子聚合物复合; 与具有核酸结合特性的蛋白质、融合蛋白或蛋白质结构域(例如, 鱼精蛋白)复合; 或封装在纳米颗粒或脂质体中。可通过包含合适的靶向性部分例如抗体或抗体片段来实现组织或细胞特异性递送。除非其与 siRNA 不相容, 否则本文中的实施方案预期任何常规载体可用于组合物中或用作生物学载体。

[0194] 本文的实施方案中的干扰 RNA 可通过静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、损伤内(intralesionally)、颅内、关节内、心室内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、子宫内、直肠内、局部、瘤内、鞘内、肌内、皮下、结膜下、囊泡内(intravesicularlly)、经粘膜、心包内、脐带内(intr aumbilically)、眼内、口服、局部(topically)、局部地(locally)、吸入(例如, 气溶胶吸入)、注射、输注、连续输注、直接地局部灌注水浴靶细胞(bathing targetcell)、通过导管、通过灌洗、在乳膏剂中、在脂质组合物(例如, 脂质体)中, 或通过对于本领域技术人员来说是已知的其他方法或上述方法的任何组合来进行施用(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co. 1990)。

[0195] 离体或体内使用的剂量为 0.01 μ g 至 1g/kg 的体重, 可每天、每周、每月或每年施用一次或多次。通常, 本文的实施方案中的具有修饰的核苷酸和修饰形式的干扰 RNA 的有效量是这样的量, 其足以减少脱靶效应同时保持效力, 并且在靶细胞表面上产生 100pM 至 1 μ M, 或 1nM 至 100nM, 或 2nM 至大约 25nM, 或至大约 10nM 的细胞外浓度。获得该局部浓度所需的量可视许多因素(包括递送方法、递送位点、递送位点与靶细胞或组织之间细胞层的数目、递送是局部的还是全身性的等)而变化。递送位点上的浓度可以比靶细胞或组织

的表面上的浓度高得多。制剂的 pH 为大约 pH 4-9 或 pH 4.5 至 pH 7.4。

[0196] 在一些实施方案中,如下体外评估 siRNA 抑制内源靶基因表达水平的能力。使用 siPORT™ NeoFX™ 转染剂 (Ambion/Applied Biosystems Austin, TX Cat.#AM4510),利用厂商描述的“反向”转染方案转染细胞。将未修饰对照或修饰形式化的 siRNA 涂板入 96 孔组织培养板中以获得例如 1nM 或 5nM 的终浓度。将 siPORT™ NeoFX™ 转染剂与 siRNA 复合,进行至少 10 分钟,然后将刚刚经胰蛋白酶处理的细胞 (大约 4.0×10^3) 覆盖在 siRNA/转染剂复合物上。将板在 37°C 下在组织培养条件下温育 48 小时。

[0197] 在收获转染的细胞后,按照厂商方案,使用 MagMAX™-96 总 RNA 分离试剂盒 (Ambion, Inc. Austin TX Cat.#AM1830) 分离总 RNA。在 50 μ l 不含核酸酶的水中洗脱 RNA。按照厂商方案,使用 HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City CA, Cat.#4368814) 在 30 μ l 反应体积中产生 cDNA。使用 2 μ l cDNA 在 10 μ l 总 PCR 反应体积中进行 TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Inc., Cat.#4331182)。进行技术重复,计算每一个样品的 18S 值。通过使用下式计算 ddCT 来检查预扩增的均一性:

[0198] $ddCT = (siRNA \text{ 处理的 } Ct_{GOI} - siRNA \text{ 处理的 } Ct_{18S}) - (Neg \text{ 对照 } Ct_{GOI} - Neg \text{ 对照 } Ct_{18S})$

[0199] GOI = 内源目的基因

[0200] 18S = 18S 核糖体 RNA 标准化者 (normalizer)

[0201] siRNA 处理的 = 用 siRNA 处理的生物样品

[0202] Neg 对照 = 用与任何已知的靶 mRNA 没有同源性的 siRNA 处理的生物样品

[0203] 使用下式计算剩余物的百分比:

[0204] $\text{剩余物} \% = 100 \times 2^{-ddCT}$ 。

[0205] 可以例如通过 western 印迹在转染后大约 72 小时 (实际时间取决于蛋白质周转率) 估量靶蛋白质水平。用于从培养的细胞分离 RNA 和 / 或蛋白质的标准技术对于本领域技术人员来说是熟知的。

[0206] 用于显现或检测 siRNA 的技术包括上文中引述的那些。可标记核酸或给核酸加标签以使能够有效地分离它们。因此,可通过许多本领域检测方法中的任一个来研究任何给定的 siRNA 的沉默能力。

[0207] “试剂盒”,如本文中所使用的,是指用于在 RNA 干扰中减少脱靶效应的至少一些项目的组合。试剂盒的实施方案包括例如至少一种在本文实施方案的修饰形式中具有修饰核苷酸的 siRNA。所述至少一种 siRNA 可以是定制的。在一些实施方案中,试剂盒包括与生物学上可接受的载体例如缓冲剂一起的至少一种在修饰形式 H、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB3、JB4 或 JB5 中具有二环核苷酸的 siRNA,和转染剂或其他合适的递送媒介物。

[0208] 试剂盒的实施方案还可包含靶向人、小鼠和大鼠的所有细胞类型中的持家基因的已验证的阳性对照 siRNA。试剂盒的实施方案还可包括已验证的阴性对照 siRNA (其为非靶向性的)。siRNA 对照可以预先进行涂板,并且可用可检测标志物进行标记。

[0209] 试剂盒的实施方案还可包括用于估量期望的靶基因的抑制的试剂,例如用于通过免疫荧光或 Western 分析在蛋白质水平上监测抑制的抗体、用于估量酶促活性或报告蛋白的存在的试剂或用于估量细胞活力的试剂。可包括 RT-PCR 引物和探针以检测靶或报告子的 mRNA。试剂盒的实施方案还可包含 RNA 酶抑制剂。

[0210] 试剂盒的容器工具 (container means) 通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他包装工具, 可将组分置于所述容器中, 以及在一些实施方案中, 将组分适当地等分于所述容器中。在试剂盒中包括一种以上的组分 (可将它们包装在一起) 的情况下, 试剂盒通常还将包括至少一个可将另外的组分单独置于其中的第二、第三或其他另外的容器。然而, 可将组分的不同组合包装在容器工具中。本教导的试剂盒还通常包括用于包含在本文所示的修饰形式中具有修饰核苷酸的 siRNA 的工具和密闭的任何其他试剂容器 (用于商业销售)。此类容器可包括将期望的容器工具保留在其中的注射或吹塑塑料容器。当以一种和 / 或多种液体溶液的形式提供试剂盒的组分时, 液体溶液包括可以是无菌水溶液的水溶液。

[0211] 在某些实施方案中, 将至少一种试剂盒组分冻干并且以干粉的形式提供。当以干粉的形式提供试剂和 / 或组分时, 可通过加入合适的溶剂来重构粉剂。在某些实施方案中, 在另一个容器工具中提供溶剂。试剂盒还可包括用于装无菌的生物学上可接受的缓冲剂和 / 或其他稀释剂的另外的容器工具。

[0212] 试剂盒还可包括使用试剂盒组分以及使用未包括在试剂盒中的任何其他试剂的说明书。说明书可包括可以执行的变化。

[0213] 本方法和试剂盒的实施方案可用于高容量筛选 (high volume screening)。可使用本文中的实施方案构建 siRNA 或候选 siRNA 的文库。然后可将文库用于高通量测定, 包括微阵列。特别预期的是基于芯片的核酸技术, 其包括用于快速和精确地分析大量基因的定量方法。通过使用固定的探针阵列, 可以以高密度阵列的方式将芯片技术用于分离靶分子并且基于杂交筛选这些分子。术语“阵列”, 如本文中使用的, 是指核酸的系统性排列。例如, 将代表期望的来源 (例如, 人成年大脑) 的核酸群体划分入最小数目的库 (其中可使用期望的筛选方法检测或耗尽靶基因以及其可分配入单个多孔板)。阵列可以是可从期望的 mRNA 来源获得的核酸群体的水性悬浮液的阵列, 包括: 包含多个单独的孔的多孔板, 各单独的孔包含核酸群体的不同内容物的水性悬浮液。阵列、其用途和其实施的实例可见于美国专利 6,329,209、6,329,140、6,324,479、6,322,971、6,316,193、6,309,823、5,412,087、5,445,934 和 5,744,305, 其通过引用合并入本文。

[0214] 微阵列在本领域内是已知的并且由表面 (序列上相应于基因产物 (例如, cDNA、mRNA、cRNA、多肽和其片段) 的探针在已知的位置上与其特异性杂交或结合) 组成。在一个实施方案中, 微阵列是其中各位点代表分开的由基因编码的产物 (例如蛋白质或 RNA) 的结合位点, 且其中结合位点针对生物体基因组中大部分或几乎所有基因的产物的阵列 (即, 矩阵)。在优选实施方案中, “结合位点” 是特定的相关 cDNA 可与其特异性杂交的核酸或核酸类似物。结合位点的核酸或类似物可以是例如合成的寡聚物、全长 cDNA、比全长短的 cDNA 或基因片段。

[0215] 固体支持物可由玻璃、塑料 (例如, 聚丙烯、尼龙)、聚丙烯酰胺、硝酸纤维素或其他材料制造。用于将核酸附着至表面的示例性方法包括在玻璃板上进行印制或通过掩蔽 (masking)。原则上, 可使用任何类型的阵列, 例如尼龙杂交膜上的斑点印迹, 然而, 如本领域技术人员所公认的, 非常小的阵列是优选的, 因为杂交体积将更小。

[0216] 根据下列实施例可进一步理解本教导的实施方案, 所述实施例不应当解释为以任何方式限定本教导的范围。

[0217] 实施例 1

[0218] siRNA 修饰形式

[0219] 按照 Beaucage, S. L. 和 Iyer, R. P. (Tetrahedron, 1993(49)6123; Tetrahedron, 1992(48)2223), 使用标准的基于亚磷酰胺的核苷单体和已建立的固相寡聚循环来化学合成短干扰 RNA (siRNA)。在 BioAutomation MerMade192 合成仪 (BioAutomation Corp, Plano, TX) 上进行寡核苷酸的合成。将活化剂的 8 个等价物用于 **LNA®** 亚磷酰胺的每一个等价物以提供大于 98% (每碱基加入) 的令人满意的逐步偶联得率。使用一次性反相纯化筒或离子交换 HPLC 进行单个 siRNA 链的纯化。凝胶电泳用于确定退火样品的单链对双链的结构, 离子交换 HPLC 用于测定单链的纯度, MALDI 质谱法用于测定单链身份, UV 光谱法用于定量测定单链寡核苷酸和 siRNA。各 siRNA 的引导链和过客链的长度都为 21 个核苷酸, 每一个 siRNA 经设计在两个 3' 末端上都具有两个碱基的悬突。各引导 (反义) 链的位点 1 经设计为 "A 核苷酸" 或 "U 核苷酸"。当将胞嘧啶 (C) 核苷修饰为二环糖时, 经取代的核碱基为 5-甲基化胞嘧啶残基。当尿嘧啶 (U) 核苷被修饰为二环糖时, 经取代的核碱基为胞腺嘧啶 (T) 残基。悬突核苷酸如图 1A 至图 1K 中所述, 并且 (独立地) 是: 脱氧核苷酸、修饰的核苷酸或核糖核苷酸。在形式 "O" 的情况下, 对引导链进行化学磷酸化。合成所有其他 3' 末端和 5' 末端以包含羟基。

[0220] 引入 siRNA 分子的修饰的核苷酸包括锁核酸 (**LNA®** 残基), 特别是具有上述结构 (a) 的那些, 其中 R1 为 O, R2 为 O, R3 为 CH₂; 2' -O- 甲基核苷酸衍生物; 和 2' -5' 连接的核苷酸。 **LNA®** amidites 购自 Proligo (Boulder, CO) 和 Exiqon A/S (Vedbaek, Denmark), 2' -O- 甲基核苷酸衍生物以及 3' - 和 2' -TBDMS RNA amidites 购自 Chemgenes Corporation (Wilmington, MA)。

[0221] 引入 siRNA 的修饰形式包括图 1A (除了未修饰对照形式 A 以外, 形式 E、F、G、H、J、K 和 O)、图 1B (形式 M、H (重复的)、H(-1)、H(-2)、H(+1) 和 Q)、图 1C (形式 M (重复的)、H (重复的) V、V(-1)、V(-2)、V(+1))、图 1D (形式 W、W+1、W-1、Y、Y-1 和 Y+1)、图 1E (形式 JB1、JB2、JB3、JB4 和 JB5) 中所示的那些以及实施例 7 中进一步描述的图 1F 至图 1K 中所示的那些。

[0222] 修饰形式包括只在过客 (有义) 链上的修饰 (形式 E、H、K、M、H-1、H-2、H+1、Q、V、V-1、V-2、V+1、W、W+1、W-1、Y、Y-1、Y+1、JB1、JB2、JB3、JB4、JB5、DH3、DH30 和 DH28 (关于 DH 形式, 参见实施例 7)) 或在引导 (反义) 链和过客 (有义) 链上的修饰 (形式 F、G、J、O 以及除了 DH3、DH30 和 DH28 外的所有 DH 形式 (关于 DH 形式, 参见实施例 7))。下面进一步描述图 1A 至图 1E 的修饰形式。

[0223] 形式修饰位点 (从各链的 5' 末端开始编号)

[0224] 过客序列 引导序列

[0225]	A, 对照	无	无
[0226]	E	1, 20, 21	无
[0227]	F	1, 20, 21	20, 21
[0228]	G	1, 2, 13, 14	9, 10, 19, 20
[0229]	H	1, 2, 13, 14	无
[0230]	J	1, 2, 10, 14	11, 12, 19, 20

[0231]	K	1, 2, 10, 14	无
[0232]	O	1, 2	2+5' 磷酸
[0233]	M	1, 2	无
[0234]	H(-1)	1, 2, 12, 13	无
[0235]	H(-2)	1, 2, 11, 12	无
[0236]	H(+1)	1, 2, 14, 15	无
[0237]	Q	13, 14	无
[0238]	V	1, 2, 12, 14	无
[0239]	V(-1)	1, 2, 11, 13	无
[0240]	V(-2)	1, 2, 10, 12	无
[0241]	V(+1)	1, 2, 13, 15	无
[0242]	W	2, 3, 13, 14	无
[0243]	W+1	2, 3, 14, 15	无
[0244]	W-1	2, 3, 12, 13	无
[0245]	Y	1, 3, 13, 14	无
[0246]	Y-1	1, 3, 12, 13	无
[0247]	Y+1	1, 3, 14, 15	无
[0248]	JB1	1, 2, 14	无
[0249]	JB2	1, 13, 14	无
[0250]	JB3	1, 2, 3, 4, 13, 14	无
[0251]	JB4	1, 2, 3, 13, 15	无
[0252]	JB5	1, 2, 3, 13, 14	无

[0253] 之前Mook等人(Molecular Cancer Therapeutics March, 2007; 3, 833-843)报导了形式F。之前E l men等人(Nucleic Acids Research January 14, 2005. 33 :1, 439-447)报导了形式E和F。Jackson等人(RNA May 8, 2006; 12 :71197-1205)描述了形式O。

[0254] 实施例2

[0255] siRNA 沉默效应的测定方法

[0256] 如下测定由给定的siRNA的引导(反义)链和过客(有义)链介导的对外源提供的基因的切割活性。使用DNA连接酶和标准克隆技术将来自目的基因(GOI)的cDNA片段以正向或反向(相对于基因DNA的编码链的方向)克隆入pMIR-REPORT™ miRNA表达报告载体系统(Ambion/Applied Biosystems, Austin TX Cat#AM5795)。对于下列GOI, 全长cDNA克隆购自Open Biosystems(Huntsville, AL)。

[0257]	基因 ID	符号	描述
[0258]	983	CDC2	细胞分裂周期 2
[0259]	1017	CDK2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2
[0260]	701	BUB1B	不受苯并咪唑 1 同源物 β 抑制的
[0261]	BUB		1 出芽
[0262]	2222	FDFT1	法尼基二磷酸法尼基转移酶 1
[0263]	3156	HMGCR	3- 羟基 -2 甲基戊二酰基 - 辅酶 A 还原酶

[0264]	7456	WEE1	WEE1 同源物 (裂殖酵母 (<i>S. pombe</i>))
[0265]	5347	PLK1	Polo 样激酶 1
[0266]	1213	CLTC	网格蛋白, 重链 (Hc)
[0267]	836	CASP3	胱天蛋白酶 3, 细胞凋亡相关半胱氨酸肽酶
[0268]			
[0269]	595	CCND1	细胞周期蛋白 D1
[0270]	1595	CYP51A1	细胞色素 P450, 家族 51, 亚家族 A, 多肽 1
[0271]			

[0272] GOI 编码序列的长度的大小范围在 1.2kb 至大于 6kb。将来自各 GOI 的 cDNA 片段单独地亚克隆入 pMIR-REPORT™ miRNA 表达报告载体的 HindIII (核苷酸位点 463)/SpeI (核苷酸位点 525) 多克隆位点, 所述载体包含在哺乳动物启动子/终止子系统的控制下的萤火虫萤光素酶报告蛋白, 如图 2A 中所显示的。标准的基于 PCR 的技术用于对 HindIII 和 SpeI 限制性内切核酸酶位点进行工程改造。产生表达 mRNA 转录物的报告载体, 所述 mRNA 转录物包含以正向或反向 (相对于 fLuc mRNA, 如图 3A 和图 3B 中所示的) 融合至 GOI 的 mRNA 的萤光素酶 mRNA。fLuc-GOI 融合 mRNA 在位于最靠近 fLuc 编码序列的 5' 起始位点的 CMV 启动子的控制下表达。当将报告构建体和与 fLuc 或 cDNA GOI 互补的 siRNA 共转染入细胞时, 通过测量剩余的萤光素酶蛋白或通过剩余的 fLuc-GOI 融合 mRNA 来监控作为 RNA 干扰的结果的抑制。将来自各 GOI 的各方向的所有亚克隆片段的 5' 和 3' 末端 500 个核苷酸经历核苷酸序列分析以确认载体内包含的 cDNA 的身份和方向。因此, 这些载体用于监控由引导链 (正向克隆) 或过客链 (反向克隆) 介导的 siRNA 切割的底物来源。

[0273] 按照厂商的方案, 使用图 2B 中描述的 pMIR-REPORT™ β-半乳糖苷酶报告对照载体 (Ambion/Applied Biosystems, Austin TX Cat#AM5795) 标准化转染效率。β-gal 编码序列在 CMV 启动子的控制下表达。将获自 fLuc 报告基因的信号除以获自各自的 β-gal 报告基因的信号以计算各测定的标准化的萤光素酶活性。

[0274] 转染: 将 Hela 细胞 (ATCC No. CCL-2, Manassas, VA) 以大约 8.0×10^3 个细胞/孔的密度涂板在 96 孔组织培养板中。24 小时后, 使用标准转染方案, 用 siPORT™ Amine 转染剂 (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX Cat#AM4502) 以及终浓度 30nM 的待研究的 siRNA、40ngpMIR-REPORT™ 萤光素酶-GOI 质粒和 4ng pMIR-REPORT™ 转染对照质粒转染细胞。转染后 24 小时用完全培养基清洗细胞, 在转染 48 小时后收集细胞以进行分析。对于每一种质粒对各个待研究的 siRNA 进行 3 个生物学重复实验。平行地, 为了计算由测试 siRNA 的过客链和引导链产生的 mRNA 抑制的百分比, 在相同的实验条件下转染 **Silencer®** 阴性对照 siRNA (Ambion/Applied Biosystems, Austin TX Cat#AM4636) 以测量使用非靶向性 siRNA 的表达的基线水平。

[0275] Dual-**Light®** 组合报告基因测定系统: 按照厂商推荐的方案, 将 Applied Biosystems Dual-**Light®** 组合报告基因测定系统 (Applied Biosystems, Foster City CA Cat#T1003) 用于同时检测相同样品中的萤光素酶和 β-gal。使用 BMG LABTECH POLARstar Optima 读数器 (BMG LABTECH, Durham, NC) 进行发光读数。

[0276] 在 Dual-**Light®** 测定系统中在加入萤光素底物后 2 至 5 秒进行萤光素酶测定。在加入底物以进行 β-半乳糖苷酶的检测和测量之前, 使板静置至少 45 分钟。使用适当的

β -gal 读数标准化各孔以获得萤光素酶信号 / β -gal 信号的比。然后通过针对阴性对照 siRNA 转染的细胞标准化生物学样品来计算抑制或剩余的萤光素酶表达 %。

[0277] 实施例 3

[0278] siRNA 修饰形式的沉默效应可进行链转换 (Strand-Switch)

[0279] 为了进行该研究,对于 3 个外源提供的靶 mRNA 中的每一个,以未修饰形式 A 和 8 种不同测试修饰形式 (E、F、G、H、J、K、M 和 O) 中的每一种形式合成 2 个 siRNA。因此,各测试形式提供了 6 个 siRNA 的数据。对于图 4A 至图 4E 的数据,由形式字母指定的并且参照图 1A 和图 1B 的位点上的修饰核苷酸“m”是具有上述结构 (a) 的 LNA[®] 残基,其中 R1 是 O, R2 是 O, 以及 R3 是 CH₂。通过实验确定图 4A 举例说明的选择用于本研究的 siRNA 序列对两条链的部分都具有链沉默活性。这样的集合允许分析修饰具有的对引入链偏向性 (即,削弱一条链的沉默活性同时保持另一链的活性的能力) 的影响。对于该 siRNA 集合,显示了由未修饰引导链介导的萤光素酶 -GOI mRNA 的平均大约 70% 的抑制,显示了由未修饰过客链介导的萤光素酶 -GOI mRNA 的平均大约 58% 的抑制 (图 4A, 形式 A)。

[0280] 将在进行未修饰形式 A 和各测试修饰形式 (E、F、G、H、J、K、M 和 O) 的 RNAi 研究后存在的标准化的报告蛋白的量绘制于图 4A 中。深色条块表示由于引导链产生的沉默导致的剩余活性 %, 因为数据由具有正向定向的 GOI 的克隆产生。图 4A 的浅色条块表示由于过客链的沉默而导致的剩余活性 %, 因为数据由具有反向定向的 GOI 的克隆产生。通过混杂的 (无义) siRNA 的平行转染进行标准化,所述混杂的 siRNA 的转染导致两条链的少量抑制。该信号减少 (大约 20%) 导致报告蛋白的明显增加 (对于所有标准化的结果), 因为标准化基于无义 siRNA 的阴性值。该明显增加对于修饰靶 E、F、G、H、J、K、M 和 O 的过客链数据最为明显。该模型报告系统用于检测过客链和引导链的活性的变化。

[0281] 图 4A 的数据显示具有修饰形式 E、F、H、K、M 和 O 的 siRNA 的引导 (反义) 链获得基本上与对照形式 A 引导链相同的沉默活性。在修饰形式 G 和 J 存在的情况下, siRNA 的引导链沉默它们靶的能力降低, 在形式 J 的情况下, siRNA 的引导链沉默它们靶的能力降低至低于 20% 的平均抑制活性。

[0282] 虽然大部分图 4A 描述的修饰形式提供了与未修饰对照引导链相似的引导 (反义) 链介导的切割,但所有测试修饰形式严重地削弱了过客链沉默它们靶的能力,从而基本上使过客链失去干扰活性。

[0283] 为了进一步检查修饰形式对链活性的影响,将该用于链型测定的 siRNA 的组扩展至包括另外 18 种 siRNA。图 4B 至图 4E 的数据以箱线图形式 (也称为箱须图) 提供了更大的 siRNA 集合的测定结果。对于各图,深色水平条表示各修饰形式的数据集的中值。箱表示数据在各修饰形式的数据集的下四分位数和上四分位数上的分布,而虚线 (须) 表示各修饰形式的数据集的最小和最大值。圆圈表示各修饰形式的数据集中可能的异常值。

[0284] 图 4B 提供了在该更大的 siRNA 组的 siRNA 转染入 HeLa 细胞后过客链的活性。使用下式计算活性: $P(\text{过客链的活性}) = (\text{来自用测试 siRNA 处理的反向克隆的剩余 fLUC } \beta\text{-gal 活性}) / (\text{来自用 Neg 对照 siRNA 处理的反向克隆的剩余 fLUC } \beta\text{-gal 活性})$ 。图 4B 的数据显示修饰的 siRNA 形式的过客链的活性丧失,如通过中值过客链抑制活性的向上偏移所看到的 (与形式 A 的抑制活性相比)。修饰形式 G、H、J、K、M 和 O 的数据在统计学上是显著的 ($p < 0.05$), 从而证明修饰形式在降低过客链的活性上是有效的。

[0285] 图 4C 提供了在图 4B 中分析的 siRNA 组转染 HeLa 细胞后引导链的活性。使用下式计算活性： $G(\text{引导链的活性}) = (\text{来自用测试 siRNA 处理的正向克隆的剩余 fLUC } \beta\text{-gal 活性}) / (\text{来自用 Neg 对照 siRNA/ 处理的正向克隆的剩余 fLUC } \beta\text{-gal 活性})$ 。形式 E、F、H、M 和 O 对引导链的活性没有负影响（即，“无害”）。形式 E 似乎以统计学上显著的方式增加引导链减少萤光素酶信号的能力，如中值引导链活性的向下偏移所表明的（与未修饰形式 A 相比）。修饰形式 G、J 和 K 降低引导链的活性，如此类形式的中值的向上偏移所证明的（ $p < 0.05$ ）（与形式 A 的未修饰 siRNA 相比）。

[0286] 表 4D 的数据提供了使用下式获得的图 4B 和图 4C 的过客链与引导链之间的 fLUC 活性差异： $\text{活性差异} = P - G$ （使用上文所示的 P 和 G 的定义）。因为 fLUC 报告测定测量细胞中 siRNA 转染后的萤火虫萤光素酶的活性的量，因此更具活性的 siRNA 链抑制更多的 fLUC 报告基因 mRNA，且导致更低的萤光素酶活性的相对量。因此，如果过客链的活性低于引导链，则该活性差异计算的值将大于 0。如果过客链的活性大于引导链，则所述值将小于 0。修饰形式 J 减少测试 siRNA 的两条链之间的活性差异。

[0287] 图 4E 的数据提供了图 4B 和图 4C 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的倍数变化。使用上文所示的 P 和 G 的定义，将活性倍数变化计算为 $\log_2(P) - \log_2(G)$ 。0 值描述了各链具有相等沉默能力的 siRNA。活性倍数变化越大，siRNA 的引导链偏向性越大。图 4E 的箱线图的比较显示，与对照未修饰 siRNA 形式 A 的链偏向性相比，修饰形式 E、H、M 和 O 的过客链与引导链之间的链偏向性显著增加（ $p < 0.05$ ）。因此，具有修饰形式 E、H、M 和 O 的 siRNA，与未修饰形式 A 相比，展示增加的链型。形式 G、J 和 K 显示过客链和引导链之间更低的倍数差异，但只有形式 J 显著减小活性的倍数变化（与形式 A 相比）。形式 H 显示了最大的单独的链偏向性。

[0288] 对于各修饰形式，通过链转换（SW）修饰形式（从过客链至引导链以及从引导链至过客链）来进行研究以检测修饰形式影响高效力 siRNA 链的沉默活性的能力。即，例如，对于图 5A 的修饰形式 F_{SW} ，将形式 F 在过客（有义）链的位点 1、20 和 21 上的修饰（图 1A）引入引导（反义）链，将形式 F 在引导（反义）链的位点 20 和 21 上的修饰（图 1A）引入过客（有义）链。

[0289] 图 5A 的数据提供了链测定的结果，其中对于具有未修饰 siRNA 形式 A 的 12 个 siRNA 和具有转换的链修饰（与图 4A 的那些相比较）的相同的 12 个 siRNA，将进行 RNAi 研究后存在的标准化的报告蛋白的量作图。图 5A 数据所研究的 siRNA 的组与图 4A 数据所研究的组相异在于图 5A 数据的 siRNA 具有链偏向性，如由未修饰形式 A siRNA 的引导链与过客链之间剩余的 fLUC 信号的百分比的巨大差异所证明的。用于在该“链转换”测定中测量抑制的实验条件与用于产生图 4A 的数据的实验条件相同。

[0290] 如图 5A 的数据所提供的，引导链的沉默活性由于链转换修饰而显著降低。具有链转换的修饰形式的引导链获得平均低于 20% 的抑制。对于该 siRNA 集合，链转换的修饰形式 H_{SW} 是使引导（反义）链失活的最有效修饰形式之一。

[0291] 具有链转换的修饰形式的测试过客链提供了可变结果。然而，具有链转换的修饰形式的所有测试过客链在抑制上比图 5A 中的未修饰 siRNA 形式 A 中的过客链更有效。然而不希望受理论束缚，作为削弱引导链的效力的结果，过客链的效力很可能间接或继发地被增强，如由链转换修饰形式中的过客链获得的增强的抑制所表明的。

[0292] 图 5B 以箱线图的形式提供了图 5A 的数据,所述形式如上文对于图 4D 描述的。因此,如果过客链的活性低于引导链的活性,则预期差异将大于 0,这通过修饰形式 A 来证明,对于该修饰形式,该 siRNA 集合的中值活性差异为大约 0.65。链转换的修饰形式具有小于 0 的差异活性,表明形式 H_{SW} 、 M_{SW} 、 F_{SW} 、 E_{SW} 和 O_{SW} 使链型发生转换,从而有利于过客链而非引导链(与未修饰形式 A 相比)。对于链转换的修饰形式 M_{SW} (其具有大约 -0.5 的中值活性差异)观察到最大的链型增强。

[0293] 在图 5C 中,对于各修饰形式,提供了图 5B 的 siRNA 的过客链与引导链之间的活性的倍数变化($\log_2(P) - \log_2(G)$)。这些结果表明:赋予引导链抑制活性并且基本上使过客链失活的修饰形式,当进行链转换时,可降低引导链的抑制活性并且增加过客链的抑制活性。使用不同的修饰形式进行与图 4A 和图 4D 的研究(使用 **LNA®** 修饰核苷酸)相似的研究,其中修饰的核苷酸被 2' -O 甲基化。为了进行该研究,对于 3 个靶 mRNA 中的每一个,以未修饰形式 A 和各测试形式合成 2 个 siRNA。因此,各测试形式提供了 6 个 siRNA 的数据。如图 4A 的研究一样,选择用于该研究的特定 siRNA 序列是其未修饰形式 A siRNA 的两条链都显示沉默作用的 siRNA。未修饰 siRNA 的引导(反义)链平均使靶 mRNA 减少 70%,而过客(有义)链使靶 mRNA 减少 55%。

[0294] 关于过客(有义)链的活性,图 6A 的数据显示,在与 siRNA 于培养物中温育 48 小时后,基本上所有 mRNA 产物可获得用于萤光素酶测定。即,具有其中修饰的核苷酸被 2' -O 甲基化的修饰形式的测试 siRNA 显示了过客(有义)链的效力的显著丧失,如这些样品中剩余基因表达%的增加所表明的。该过客链的抑制功能的失活与使用 **LNA®** 修饰核苷酸的修饰形式的数据相符。还与 **LNA®** 修饰形式 H、K 和 O 的数据相符,与未修饰对照形式 A 相比,具有拥有 2' -O- 甲基核苷酸的修饰形式 H、K 和 O 的引导链的效力基本上未改变。因此,具有 2' -O- 甲基修饰的核苷酸的修饰形式似乎在链测定(对于所述测定,外源提供了靶)中对于保持引导(反义)链的活性同时使过客(有义)链的切割活性失活是同样有效的。

[0295] 图 6B 以箱线图的形式提供了图 6A 研究的 siRNA(6siRNA) 和另外 18 个 siRNA 序列的数据。形式 A 的组的活性差异显示大部分 siRNA 偏向于引导链(由大约 0.5 的中值所表明)。然而,与对照形式 A 相比,在指定的修饰形式中具有 2' OMe 的 siRNA 显示过客链与引导链之间的更大的差异。形式 H 和 H+1 诱导最大的链间差异。具有 2' -OMe 修饰碱基的形式 O 不能增加链间的活性差异。

[0296] 图 6C 中提供了过客链与引导链相比较的活性倍数变化,如之前所述进行计算。倍数变化分析显示与形式 A 的未修饰 siRNA 相比,形式 H 提供了最大的倍数变化。然而,对于形式 H-1、H、H+1、V-2 和 K 但非形式 O,也观察到链间活性的显著倍数变化,如图 6C 的附图说明中引用的 Wilcoxon 值确定的。

[0297] 在不同的修饰形式中研究了第三个类型的修饰核苷酸。图 7A 提供了其中修饰形式的修饰核苷酸是 2', 5' - 连接的核苷酸的链测定的结果。对于未修饰形式 A 和测试形式 H-1、H、H+1、V-2、K 和 O,将来自以正向和反向克隆的 GOI 的 pMIR-REPORT™ 研究的 fLuc 信号的活性差异(从而表示引导链与过客链的功效和抑制活性的差异)作图。未修饰对照形式 A 的链型结果与含有 2', 5' - 连接的碱基的测试形式的结果的比较表明,除了形式 O 外,通过包含 2', 5' - 连接的碱基修饰未获得 siRNA 的链型的统计学上显著的变化。具

有 2' -5' - 连接的碱基修饰的形式 0 减小了活性差异,从而表明引导链的抑制活性以统计学上显著的方式丧失。

[0298] 图 7B 提供过客链与引导链之间的活性倍数变化(如之前所述进行计算)。倍数变化分析显示含有 2' -5' 连接的核酸的形式 0 在负方向上影响 siRNA 的链型,如过客链与引导链之间的活性倍数变化的减少表明的。此外,来自以形式 H-1、H+1、V-2 和 K 存在的 2' -5' 连接的核酸的数据在统计学上是不显著的,从而,这些形式不适合于提高 siRNA 的链型。只有用 2' -5' 碱基修饰修饰的形式 H 显示链型的统计学上显著的增加,如图 7B 的附图说明中引用的 Wilcoxon 值所显示的。

[0299] 基于图 4A 和图 6A 的数据,关于引导链对过客链的切割活性的差异的统计学分析显示:链偏向性的最大变化由修饰形式 H 中的 **LNA®** 和 2' OMe 修饰的核苷酸引入。链型分析还显示形式 G、形式 J 和形式 K 以统计学上显著的方式降低了引导链的活性,从而之后不再考虑将它们用于增强 siRNA 特异性。具有 **LNA®** 修饰核苷酸的形式 H 诱导了引导链高于过客链的切割活性的平均 8 倍的差异,如图 4A 的数据所证明的。相比之下,未修饰对照形式 A 显示引导链高于过客链的平均 4 倍的增加的活性。因此,形式 H 修饰使通常存在于最佳设计的 siRNA 中的链偏向性加倍。

[0300] 此外,这些数据证明具有 **LNA®** 修饰残基的链转换的形式能够与它们使过客链失活一样有效地使引导链失活。

[0301] 图 12A-1 和图 12A-2 的数据表示在指定的形式中包含 **LNA®** 修饰核苷酸的 12 个 siRNA 的抑制活性。测试组的链型表明大部分 siRNA 不对称地偏向具有更高活性的引导链(图 12A-1 的形式 A 的 0.5 的中值活性差异所表明的)。然而,产生的具有修饰形式和 **LNA®** 残基的 siRNA 显示了与未修饰形式 A 相比,更大的过客链与引导链活性之间的差异。形式 H 修饰形式以统计学上显著的方式增加了链间的活性差异,但活性倍数变化不显著,如图 12A-2 的数据所显示的。

[0302] 图 13A-1 和图 13A-2 的数据表示在指定的形式中含有 2' OMe 修饰的核苷酸的 siRNA。测试组的链型表明大部分 siRNA 不对称地偏向具有更高活性的引导链,如图 13A-1 的 0.5 的中值活性差异表明的。然而,产生的具有 2' OMe 修饰的核苷酸的 siRNA 显示了与未修饰对照形式 A 相比,更大的过客链与引导链之间的倍数变化,如图 13A-2 所显示的。形式 H、K 和 V-2 诱导了最大的且统计学上显著的链间倍数变化 ($p < 0.05$)。除了形式 0 以外,所有形式的的数据与未修饰 siRNA 相比,在统计学上都是显著的。

[0303] 实施例 4

[0304] siRNA 修饰形式对内源基因的沉默的效应

[0305] 检测修饰形式化的 siRNA 对内源基因的沉默,以确定修饰形式是否改变 siRNA 抑制其 mRNA 靶的功效。为了进行该研究,通过以低浓度将修饰形式化的 siRNA 转染入 HeLa 细胞(ATCC No. CCL-2, Manassas, VA)、U2OS 细胞(人骨肉瘤细胞系, ATCC No. HTB-96) 和 HUH7 细胞(人肝细胞瘤细胞系, #JCRB 0403, Japanese Cancer Research Resource Bank, Tokyo, Japan) 来检测内源基因的抑制。本文中论述了 HeLa 细胞的数据。

[0306] 使用厂商描述的“反向”转染方案,利用 siPORT™NeoFX™ 转染剂(Ambion/Applied Biosystems Austin, TX Cat#AM4510) 转染 HeLa 细胞。将未修饰对照或修饰形式化的 siRNA 涂板至 96-孔组织培养板中以获得 1nM 或 5nM 的终浓度。将 siPORT™NeoFX™ 转染剂与 siRNA

复合,进行至少 10 分钟,然后将刚刚经胰蛋白酶处理的 HeLa 细胞(大约 4.0×10^3 个细胞)覆盖在 siRNA/ 转染剂复合物上。将板在 37°C 下于组织培养条件下温育 48 小时。

[0307] 使用厂商描述的“正向”转染方案,利用 **HyPerFect®** 转染剂 (Qiagen, Gaithersburg, MD) 转染 U2OS 细胞。将未修饰对照或修饰形式化的 siRNA 涂板至 96- 孔组织培养板中以获得 3nM 或 30nM 的终浓度。将 **HyPerFect®** 转染剂与 siRNA 复合,进行至少 10 分钟,然后将复合物加入培养中的 U2OS 细胞(大约 4.0×10^3 个细胞)中。将板在 37°C 下于组织培养条件下温育 48 小时。

[0308] 在收获转染的细胞后,按照厂商的方案使用 MagMAX™-96 总 RNA 分离试剂盒 (Ambion, Inc. Austin TX Cat. #AM1830) 分离总 RNA。将 RNA 洗脱在 50 μ l 不含核酸酶的水中。按照厂商的方案,在 30 μ l 反应体积中使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc. Foster City CA, Cat. #4368814) 产生 cDNA。在 10 μ l 的总 PCR 反应体积中使用 2 μ l cDNA 进行 **TaqMan®** Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Inc., Cat. #4331182)。进行技术重复,计算各样品的 18S 值。通过使用上述公式计算 ddCT 来检查预扩增的均一性。

[0309] 使用下列公式计算剩余%: 剩余% = $100 \times 2^{-(ddCT)}$ 。

[0310] 使用下列公式计算 mRNA 抑制的分数:

[0311] mRNA 抑制的分数 = $1 - (2^{-(ddCT)})$

[0312] 和

[0313] mRNA 抑制% = mRNA 抑制的分数 * 100。

[0314] 为了进行该抑制研究,针对 8 个内源靶 mRNA 中的每一个,以未修饰形式 A 和 8 个测试修饰形式 E、F、G、H、J、K、M 和 O 中的每一个形式合成 6 个 siRNA。从而,各测试形式提供了 48 个 siRNA 的数据。关于图 8 的数据,由形式字母指定的并且参照图 1A 至图 1C 的位点上的修饰核苷酸“m”是具有上述结构 (a) 的 **LNA®** 残基,其中 R1 是 O, R2 是 O, 并且 R3 是 CH₂。

[0315] 图 8 提供了关于 5nM 终浓度的修饰形式化的 siRNA 在 HeLa 细胞中沉默内源 mRNA 靶以及在转染后 48 小时使用 **TaqMan®** Gene Expression Assays 测定靶的抑制%的数据。这些研究的结果显示与对于未修饰形式 A 的组观察到的抑制活性相比,在形式 G、J 和 K 中包含 **LNA®** 的修饰形式化的 siRNA 削弱了 siRNA 的抑制活性,然而在形式 E、F、H、M 和 O 中包含 **LNA®** 的修饰形式化的 siRNA 保持或增加了抑制活性。因此,在不同位点上具有 **LNA®** 残基的几种修饰形式不负面影响 siRNA 的抑制活性,但足以增强引导链对过客链的链型。还在人肝细胞瘤细胞 (HUH7) 和人骨肉瘤细胞 (U2OS) 中测定了该 **LNA®** 修饰的 siRNA 的集合中 siRNA 的抑制活性。在这些细胞系中,通过考虑不同的转染效率,各修饰形式的 **LNA®** 修饰的 siRNA 展示了与在 HeLa 细胞中观察到的抑制活性相似的抑制活性(数据未显示)。因此,沉默性能不受使用的细胞系的类型影响。

[0316] 图 12B 提供了关于使用 **LNA®** 修饰核苷酸的修饰形式 H、H-2、H-1、H+1、Q、K、V、V-1 和 V-2 的另外的抑制活性数据。该数据集表示靶向 4 个不同内源 mRNA 靶的 24 个不同的 siRNA。以各形式合成 24 个 siRNA 中的每一个,同样地分析各组中 siRNA 的抑制活性。以 5nM 的终浓度转染 HeLa 细胞,在转染后 48 小时使用 **TaqMan®** Gene Expression Assay 进

行测定。结果显示以形式 K 和 V-2 存在的 siRNA 的抑制活性轻微减小（该减小与未修饰 siRNA 相比在统计学上不显著）。修饰形式 H、H-1、H-2、H+1、Q、V 和 V-1，与对于未修饰 siRNA 的组观察到的抑制活性相比，保持或增加了对 mRNA 靶的抑制活性。

[0317] 图 13B 的数据提供了使用 2' OMe 修饰的核苷酸的修饰形式 H、H+1、H-1、K、V-2 和 O 的抑制活性。该数据集表示靶向 4 个不同的内源 mRNA 靶的 24 个不同的 siRNA。以各形式合成 24 个 siRNA 中的每一个，然后同样地分析各组中 siRNA 的抑制活性。以 5nM 的终浓度转染 HeLa 细胞，转染后 48 小时使用 **TaqMan®** Gene Expression Assay 进行测定。结果显示修饰形式 H、H+1、H-1、K、V-2 和 O，与对于未修饰形式 A siRNA 观察到的抑制活性相比，保持或增加了抑制活性。

[0318] 图 14A 提供了与形式 A 相比的使用 **LNA®** 修饰核苷酸的修饰形式 H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 的另外的数据。该数据集表示靶向 5 个不同内源 mRNA 靶的 15 个不同的 siRNA。以指定的形式合成 15 个 siRNA 中的每一个，然后同样地分析各组中 siRNA 的抑制活性。以 30nM 的终浓度转染 U2OS 细胞，转染后 48 小时使用 **TaqMan®** Gene Expression Assay 进行测定。结果显示具有用 **LNA®** 残基修饰的修饰形式 W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 的 siRNA，当与未修饰 siRNA 形式 A 的抑制活性相比较时，保持抑制活性。具有修饰形式 M 的 siRNA，当与具有未修饰形式 A 的 siRNA 的抑制活性相比时，抑制活性被削弱（以统计学上显著的方式），具有修饰形式 H 的 siRNA，当与未修饰形式 A 的抑制活性相比时，提高了抑制活性（以统计学上显著的方式）。

[0319] 图 14B 的数据提供了使用 **LNA®** 修饰核苷酸的修饰形式 H、M、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5 与形式 A 相比较的抑制活性。该数据集表示靶向 5 个不同内源 mRNA 靶的 15 个不同的 siRNA。以指定的形式合成 15 个 siRNA 中的每一个，然后同样地分析各组中 siRNA 的抑制活性。以 30nM 的终浓度转染 U2OS 细胞，转染后 48 小时使用 **TaqMan®** Gene Expression Assay 进行测定。结果显示具有修饰形式 JB2、JB 3 和 JB5 的 siRNA 就抑制活性而言与未修饰形式 A 没有统计学上显著的差异；具有形式 H、JB1 和 JB4 的 siRNA，与形式 A 相比，提高了抑制活性，具有形式 M 的 siRNA，当与形式 A 相比时，具有较低的抑制活性。

[0320] 在本实施例中检查的 siRNA 修饰形式中，当与未修饰形式相比时，形式 G、J、K 和 M 削弱了抑制活性。

[0321] 实施例 5

[0322] 作为脱靶效应的量度的具有修饰形式 H 的 siRNA 对全基因表达特征谱的影响

[0323] 通过使用微阵列分析测量基因特征谱，将形式 H 中 **LNA®** 和 2' -O- 甲基修饰的核苷酸影响差异表达的基因的特征 (signature) 的能力与未修饰 siRNA 的能力相比。在一式四份的用 4 个经设计靶向 FDFT1 基因的 siRNA 转染的生物学样品上进行微阵列基因组分析。FDFT1 是参与胆固醇生物合成的基因，其对于用于检测的细胞不是必需的。该标准确保通过阵列分析检测到的基因表达的差异完全是 siRNA 介导的切割的结果而不是由于功能性 mRNA 靶的丧失而引起的任何生物级联的结果。

[0324] 使用上文中概述的标准方法，分别以未修饰形式 A、**LNA®** 修饰的形式 H 和 2' -O- 甲基修饰的形式 H 将 3 个 siRNA 序列（称为 siRNA#183、#184 和 #192）中的每一个转染入 HeLa 细胞，在 24 小时后收获转染的细胞。使用标准方法分离 RNA 以进行微阵列分析。将含有人探针组的 Affymetrix U133V2 微阵列芯片 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 用

于这些研究。对照包括阴性对照 siRNA、“模拟 (mock)”转染的细胞和未处理的细胞 (以记录在实验处理不存在的情况下基因表达的基线水平)。在对数据进行标准化后,分析结果以确定与模拟 (只有递送剂) 对照样品的结果相比,样品组的每一个样品中变化 2 倍或更大倍数的基因的身份。然后将使用计划对比 (planned contrast) 的单因素方差分析 (1-way ANOVA) 用于确定各模拟处理对实验条件的 p 值。然后以 2 倍变化和 $p < 0.001$ 来确定差异表达的基因探针组。差异表达的基因的数目是由于 siRNA 而引起的脱靶效应的量度。

[0325] 图 9A 至图 9C 提供了 siRNA#183 (图 9A)、siRNA#184 (图 9B) 和 siRNA#192 (图 9C) (3 个不同的经设计靶向 FDFT1 基因的 siRNA) 的结果的维恩图。各图描述了以指定的未修饰的、2' -O- 甲基或 LNA® 修饰的 siRNA 形式存在的 3 个 siRNA 中的每一个的结果。维恩图显示了在各实验条件中发生变化的特定基因的数目和 siRNA 条件之间基因的交集。对于各图,左下组 (如果有颜色的话为红色) 显示未修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的特定基因的数目,上组 (如果有颜色的话为蓝色) 显示 2' -O- 甲基形式 H 修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的特定基因的数目,右下组 (如果有颜色的话为绿色) 显示 LNA® 形式 H 修饰的 siRNA 处理的样品中变化 2 倍或更大倍数的特定基因的数目。

[0326] 对于 siRNA#183 (图 9A),未修饰的 siRNA 诱导 31 个基因 (2+19+10+0) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。2' -O- 甲基修饰的 siRNA 诱导 32 个基因 (3+0+10+19) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数,其中 29 个也受到未修饰的对照 siRNA 的影响。用 2' -O- 甲基修饰的 siRNA 处理的样品与未修饰 siRNA 处理的样品在脱靶基因的数目上只相差 3 个基因。LNA® 修饰的 siRNA 诱导 10 个基因 (0+0+10+0) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数,其全部也受未修饰对照和 2' -O- 甲基修饰影响。因此,这 10 个基因代表了依赖于序列的并且不能通过本文中提供的教导减弱的脱靶效应。因此,与 2' -O- 甲基修饰 (0% 的脱靶效应的减少) 相比,LNA® 修饰形式对脱靶基因表达变化的消除具有更显著的影响 (68% 的脱靶效应的减少)。

[0327] 对于 siRNA#184 (图 9B),未修饰的 siRNA 在 HeLa 细胞中诱导 70 个差异表达的基因 (14+23+33+1) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。2' -O- 甲基修饰的 siRNA 诱导 66 个基因 (9+1+33+23) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。相比之下,与未修饰 siRNA 的结果相比,LNA® 修饰的 siRNA 减少差异表达的基因的数目 50% (35 个基因 (0+1+33+1))。在 LNA® 修饰处理的样品中绝大部分差异表达的基因 (33 个基因) 也在未修饰 siRNA 和 2' -O- 甲基修饰的 siRNA 处理的样品中被鉴定为差异表达。这样的基因代表了依赖于序列的并且不能通过本文中提供的教导减弱的脱靶效应。因此,与 2' -O- 甲基修饰 (6% 的脱靶效应的减少) 相比,LNA® 修饰形式对脱靶基因表达变化的消除再次具有更显著的影响 (50% 的脱靶效应的减少)。

[0328] 对于 siRNA#192 (图 9C),未修饰的 siRNA 诱导 103 个差异表达的基因 (28+13+61+1) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。2' -O- 甲基修饰的 siRNA 诱导 81 个基因 (7+0+61+13) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。LNA® 修饰的 siRNA 诱导 64 个基因 (2+1+61+0) 的 mRNA 水平降低 2 倍或更大倍数。因此,与未修饰 siRNA 相比,LNA® 修饰消除了大约 38% 的脱靶效应。对于该 siRNA,61 个基因代表依赖于序列的并且不能通过本文中提供的教导减弱的脱靶效应。与 2' -O- 甲基修饰 (21% 的脱靶效应的减少) 相比,LNA®

修饰形式对脱靶基因表达变化的消除再次具有更显著的影响(38%的脱靶效应的减少)。

[0329] 总之,微阵列分析显示,当与未修饰形式 A siRNA 相比时,LNA®修饰的形式 H siRNA 产生减少 38%至 68%的差异表达的基因,当与未修饰形式 A siRNA 相比时,2'-O-甲基修饰的形式 H siRNA 产生减少 0%至 22%的差异表达的基因。因此,LNA®修饰的形式 H siRNA 提供最少数目的脱靶效应。

[0330] 实施例 6

[0331] 修饰形式化的 siRNA 在细胞生物学研究中的性能

[0332] 进行细胞生物学研究以测量修饰形式和修饰核苷酸的类型影响由 siRNA 引起的中靶和脱靶表型的能力。

[0333] 为了确定修饰形式化的 siRNA 是否保持“中靶”或期望的表型和减少“脱靶”或不期望的表型,选择诱导可测量的并且高度表征的生物学应答的 siRNA。因此,除了消除脱靶表型以外,还监控中靶表型的保持。以测试修饰形式合成 siRNA,将其转染入合适的细胞中以如下所述进行测定。

[0334] 进行在本文中称为“生长测定”的测定以研究修饰形式化的 siRNA 与未修饰 siRNA 和阴性对照 siRNA 相比在细胞水平上的差异。生长测定包括在以 30nM 和以 3nM 进行 siRNA 转染后测量 U2OS 骨肉瘤细胞系中细胞表型相关参数例如增殖、细胞凋亡和形态学。本文中论述了来自 30nM 的测定的结果,因为在更高的 siRNA 浓度下观察到更多的脱靶效应,从而消除此类脱靶效应的屏障(barrier)更高。生长测定分析包括下列抗原的免疫荧光检测,所述抗原为指定的表型的标志物:

[0335] 1. 切割的核纤层蛋白 A(细胞凋亡),

[0336] 2. 磷酸化的组蛋白 H3(有丝分裂),

[0337] 3. 微管蛋白(细胞骨架形态学,其为性质对照测量,即用于细胞结构的背景确定,以及其标记所有细胞),和

[0338] 4. Hoescht 染色(细胞核形态学,其提供细胞数目标准化)。

[0339] 使用 IMAGEEXPRESS^{Micro}™ 自动化荧光显微镜(Molecular Devices, Toronto, Canada),利用计算机控制的图像获取软件(Cellinger, Munich, Germany)和 METAMORPH®图像分析软件包(MolecularDevices, Toronto, Canada)驱动的 10X 物镜采集免疫荧光。采集各 384 孔样品中的 4 个位点,计算 3 个生物学重复实验的数据的平均值,将其与以相似方式处理的阴性 siRNA 对照样品(混杂的非靶向性 siRNA)相比。在进行图像分析后,根据下列方案评估数据:

[0340] 1) 指数计算:对于孔中的各位点,针对细胞核的总数标准化有丝分裂细胞核和细胞凋亡细胞核的数目,从总图像面积中减去非细胞背景的面积以计算细胞占据的面积,然后针对细胞核的数目进行标准化;

[0341] 2) 样品孔平均值计算:计算孔中所有位点的平均值,此外,计算每块板所有阴性对照孔的所有位点的平均值;

[0342] 3) 标准化:将一式三份重复的每一块板的样品和阳性对照针对阴性 siRNA 对照孔的平均值进行标准化;

[0343] 4) 一式三份重复的平均值计算:就各处理和读数(readout)计算一式三份的板的平均值。

[0344] 选择在不同细胞中在功能上被良好表征的测试基因（根据公开的文献）。测试基因包括表 1 的测试基因。

[0345] 表 1

[0346]

mRNA 靶			由基因产物的抑制引起的预期的中靶表型	
基因描述	基因符号	基因 ID	细胞凋亡	有丝分裂
不受苯并咪唑 1 同源物 β 抑制的 BUB1 出芽	BUB1B	701	中性	减少
WEE1 同源物(裂殖酵母)	WEE1	7465	增加	增加
细胞分裂周期 2	CDC2	983	中性	减少
细胞周期蛋白依赖性激酶 2	CDK2	1017	中性	减少
细胞周期蛋白 D1	CCND1	595	中性	减少
Polo 样激酶 1	PLK1	5347	增加	增加
胱天蛋白酶 3	CASP3	836	中性	中性
法尼基二磷酸法尼基转移酶 1	FDFT1	2222	中性	中性
低密度脂蛋白受体	LDLR	3949	中性	中性
固醇-C5-去饱和酶 (ERG3 Δ -5-去饱和酶同源物, 酿酒酵母)-样	SC5DL	6309	中性	中性

[0347] 鉴定提供可测量的预期表型（例如在 Wee1 或 PLK1 的抑制后有丝分裂增加 300 % (Watanabe, N. 等人 (2004)PNAS, 101, 4419-4424 ; Leach, S. D. 等人 (1998) Cancer Research, 58, 3132-3136 ; Cogswell, J. P. 等人 (2000) Cell Growth and Diff. 11, 615-623) 的强诱导的 siRNA。与 Neg 对照相比, BUB1B 基因的抑制预期减少有丝分裂的百分比 (Lampson, M. A. 和 Kapoor, T. M. (2004) Nature Cell Biology, 7, 93-98)。

[0348] 此外, 鉴定展示脱靶表型的 siRNA。例如, 针对 LDLR (预期不诱导细胞凋亡的基因) (关于其他此类基因, 参见表 1) 的 siRNA 显示增加细胞凋亡 500%。此类 siRNA 序列用作确定修饰形式是否可提高 siRNA 的特异性的工具。产生具有可观察的中靶表型和脱靶表型的 siRNA 的单独的组以包含几种修饰形式以及 2' -O- 甲基修饰的核苷酸或具有上述结构 (a) 的 LNA® 残基, 其中 R1 是 O, R2 是 O, 并且 R3 是 CH₂。就中靶和脱靶表型检测此类修饰的 siRNA 以确定可消除脱靶效应同时保持中靶表型的修饰形式。

[0349] 在图 10A 至图 10E、图 11A 至图 11F、图 12C 至图 12D、图 13C 至图 13D、图 15A 至 15D 和图 16A 至图 16D 中以箱须图的形式, 将修饰形式化的 siRNA 的基于细胞的测定结果作图, 以与在基于细胞的测定中平行分析的阴性对照 siRNA 处理的样品的标准化的值（在所述图中标记为 Neg）相比较。

[0350] 图 10A 提供了由于具有 LNA® 修饰形式 E、F、G、H、J、K、M 和 O 的 siRNA 产生的沉

默而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图。siRNA 靶向 BUB1B、WEE1、CDC2、CDK2、CASP3 和 CCND1 (这些基因对有丝分裂表型具有迥然不同的效应)。即,该组基因包括当被沉默时增加有丝分裂的亚组,当被沉默时减少有丝分裂的亚组以及当被沉默时预期对有丝分裂没有作用的亚组。由于此类迥然不同的效应,分析其抑制提供了预期的有丝分裂减少的表型的基因亚组,数据提供于图 10B 中。

[0351] 图 10B 数据显示在靶向基因 (BUB1B、CDC2、CCND1) 的 siRNA 的转染后标准化的有丝分裂细胞,所述基因的抑制预期减少有丝分裂 (Lampson, M. A. 和 Kapoor, T. M. (2004) *Nature Cell Biology*, 7, 93-98; Harborth, J. 等人 (2001) *Journal of Cell Science* 114, 4557-4565; Klier, M. (2008) *Leukemia*, EPUB)。因此,这些数据测量了中靶表型效应,即,该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。Neg 对照处理的样品的标准化的值显示大约 1.0 的中值。未修饰形式 A siRNA 提供了大约 0.55 的中值,这表示有丝分裂减少大约 2 倍。与 Neg 对照相比,所有修饰形式都减少了有丝分裂。具有修饰形式 H 和 J 的 siRNA 在它们对有丝分裂的影响上与未修饰形式 A 相比,提供了统计学上显著的差异 (较少的中靶效应),如通过 Wilcoxon 值以及有丝分裂的中值偏离未修饰形式 A 所证明的。因此,与图 8 的关于 mRNA 抑制的结果相一致,基于细胞的测定显示形式 J 与高度功能性的 siRNA 的期望的特征不相容。

[0352] 基于细胞的生长测定还通过定量来自展示切割的核纤层蛋白 A 的细胞的荧光信号测量与 Neg 对照处理的样品相比的细胞凋亡 (Rao, L. 等人 (1996) *J Cell Biology*, 135, 1441-1455)。历史上,在基因组范围的 siRNA 筛选实验中观察到的最普遍的预料之外的表型是细胞死亡。在用于此类研究的该 siRNA 集合中,包括了已知其诱导预料之外的细胞死亡的 siRNA 序列,这样的 siRNA 序列用作确定修饰形式是否可消除不希望的细胞表型的工具。

[0353] 图 10C 提供了定量由于用具有 LNA® 修饰形式 E、F、G、H、J、K、M 和 O 的 siRNA 处理 U2OS 细胞而产生的细胞凋亡片段的结果。阴性对照 siRNA 处理的样品用于确定 siRNA 转染后细胞凋亡的基线,将数据标准化为 1.0。该集合中的 siRNA 靶向下列基因: BUB1B、CDC2、CCND1、WEE1、CASP 3 和 CDK2 (一组基因靶,其一个亚组的抑制预期增加细胞凋亡,其一个亚组的抑制预期对细胞凋亡没有作用)。由于此类迥然不同的效应,分析其抑制提供了预期的细胞凋亡增加的表型的基因亚组,数据提供于图 10D 中。

[0354] 图 10D 提供了在靶向 WEE1 的 siRNA 转染后 U2OS 细胞中细胞凋亡测量的结果。WEE1 的抑制预期增加细胞凋亡 (Watanabe, N. 等人 (2004) *PNAS*, 101, 4419-4424; Leach, S. D. 等人 (1998) *Cancer Research*, 58, 3132-3136)。因此,这些数据测量了中靶表型效应,即,该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。Neg 对照 siRNA 处理的样品用于确定标准化的细胞凋亡的基线。靶向 WEE1 的形式 A 的未修饰 siRNA 与 NEG 处理的样品相比展示大约 7.5 的中值,从而提供了预期的表型变化。具有形式 J 和 K 的修饰形式化的 siRNA 通过以统计学上显著的方式减少细胞凋亡的量 (当与未修饰形式 A siRNA 相比时) 来减少中靶表型,从而证明形式 J 和 K 削弱了 siRNA 的性能。这些数据与图 8 的关于由具有修饰形式 J 和 K 的 siRNA 产生的抑制的数据相一致。

[0355] 图 10E 的数据提供了修饰形式化的 siRNA 消除基因亚组 (其抑制预期对细胞凋亡没有作用) 的脱靶表型的能力的分析。特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应

的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有增加的中值和更大的数据分布) 来证明 (图 10E)。研究的 siRNA 具有形式 A、E、F、G、H、J、K、M 和 O, 靶基因 (其抑制预期不诱导细胞凋亡) 包括 BUB1B、CCND1、CDK2 和 CDC2。将 Neg 对照处理的群体用于确定细胞凋亡的基线。具有形式 G、H、J 和 K 的 siRNA 显示统计学上显著的消除脱靶效应的能力, 如与未修饰形式 A 相比更低的细胞凋亡信号所证明的 (图 10E)。

[0356] 根据图 10D 的数据 (其中具有修饰形式 J 和 K 的 siRNA 显示削弱了 siRNA 的中靶功效) 和根据图 8 的数据 (其中具有修饰形式 G、J 和 K 的 siRNA 显示削弱了抑制活性), 形式 G、J 和 K 似乎对功能性 siRNA “有害”。

[0357] 通过使用含有 2' -O- 甲基化的残基而非 LNA® 残基的修饰核苷酸进行修饰形式的进一步表征, 以确定其他类型的修饰是否可降低 siRNA 的脱靶效应。图 11A 提供了由于具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 并且靶向 WEE1、PLK1、FDFT1、LDLR 和 SC5DL (这些基因对有丝分裂表型具有迥然不同的效应) 的 siRNA 产生的沉默而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图。即, 该组基因包括当被沉默时增加有丝分裂的亚组, 和当被沉默时预期对有丝分裂没有作用的亚组。由于这些迥然不同的效应, 分析其抑制提供了预期的有丝分裂增加的表型的基因亚组, 数据提供于图 11B 中。

[0358] 图 11B 提供了在靶向 WEE1 或 PLK1 的 siRNA 转染 (通过具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 的 siRNA) 后 U2OS 细胞中有丝分裂测量的结果。WEE1 或 PLK1 的该沉默导致 U2OS 细胞中有丝分裂增加, 这由 Watanabe, N. 等人 ((2004) PNAS, 101, 4419-4424), Leach, S. D. 等人 ((1998) Cancer Research, 58, 3132-3136) 和 Cogswell, J. P. 等人 ((2000) Cell Growth and Diff, 11, 615-623) 提出, 并且由具有未修饰形式 A 的 siRNA (其诱导了与 Neg 对照处理的样品相比增加大约 4 倍的有丝分裂) 的数据证实。因此, 这些数据测量了中靶表型效应, 即, 该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组 “无害”。如图 11B 的数据所显示的, 使用具有 2' OMe 修饰形式 H 和 K 的 siRNA 观察到相似水平的对有丝分裂的影响。该研究证明形式 H 和 K 中的 2' OMe 修饰对功能性 siRNA 无害。

[0359] 为了确定具有 2' OMe 修饰形式 H 和 K 的 siRNA 是否可减少脱靶效应, 将靶向基因亚组 (FDFT1、SC5DL 和 LDLR) (所述基因亚组的抑制预期对有丝分裂没有作用) 的 siRNA 转染入 U2OS 细胞, 然后测定对有丝分裂的影响。然而, 特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA, 当被修饰形式化时, 是否消除或减少脱靶效应。图 11C 提供了数据。siRNA 具有脱靶效应可通过未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比, 其具有更大的数据分布) 来证明 (图 11C)。当比较单独的 siRNA 序列时, 在形式 H 中具有 2' OMe 残基的 siRNA 降低了在未修饰 siRNA 形式 A 中观察到的许多脱靶表型。在形式 K 中具有 2' OMe 残基的 siRNA, 与未修饰 siRNA 相比, 提高了中值有丝分裂影响。然而, 关于形式 H 和 K 中该 2' -O- 甲基修饰的数据与未修饰形式 A 的数据在统计学上没有显著差异。

[0360] 图 11D 提供了定量由于用具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 的 siRNA 处理 U2OS 细胞而引起的细胞凋亡片段的结果。Neg 对照 siRNA 处理的样品用于确定 siRNA 转染后细胞凋亡的基线, 并且将数据标准化为 1.0。该集合中的 siRNA 靶向基因 WEE1、PLK1、FDFT1、LDLR 和 SC5DL, 所述基因的一个亚组的抑制预期增加细胞凋亡, 所述基因的一个亚组的抑制预期

对细胞凋亡没有作用。由于这些迥然不同的效应,分析其抑制提供了预期的细胞凋亡增加的表型的基因亚组,数据提供于图 11E 中。

[0361] 图 11E 提供了在靶向 WEE1 和 PLK1 的 siRNA 转染(通过 12 个具有 2' -O- 甲基修饰形式 H 和 K 的 siRNA 的组)后 U2OS 细胞中细胞凋亡测量的结果。因此这些数据测量了中靶表型效应,即,该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。Neg 对照 siRNA 处理的样品用于确定标准化的细胞凋亡的基线。靶向 WEE1 或 PLK1 的形式 A 的未修饰 siRNA 展示与 NEG 处理的样品相比细胞凋亡的中值增加大于大约 4 倍,从而提供了预期的表型变化。对于以形式 H 和形式 K 存在的 2' OMe 修饰的 siRNA 观察到相似水平的细胞凋亡。该研究表明 H 和 K 形式中的 2' OMe 修饰不降低 siRNA 的功效并且提供与在未修饰 siRNA 形式 A 中观察到的表型相似的表型。

[0362] 图 11F 的数据提供了 2' -O- 甲基修饰形式化的 siRNA 消除一组基因(FDFT1、LDLR 和 SC5DL)(其抑制预期对细胞凋亡没有作用)的脱靶表型的能力的分析。特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。研究的 siRNA 具有形式 A、H 和 K。Neg 对照处理的群体用于确定细胞凋亡的基线,所述群体具有范围特别宽的细胞凋亡结果。对照形式 A 的中值与 Neg 对照处理的样品的中值相似。当评估单独的 siRNA 序列时,在修饰形式 H 和 K 中具有 2' OMe 修饰核苷酸的 siRNA 减少在未修饰 siRNA 形式 A 中观察到的许多脱靶表型,但在测试群体中,未以统计学上显著的方式观察到脱靶效应的减少。

[0363] 检测另外的修饰形式(如提供了形式 H、H-2、H-1、H+1、Q、V、V-1、V-2 和 K 的图 1A 至图 1C 的示意图中所示)。LNA®修饰核苷酸具有结构(a),其中 R1 和 R2 是 O, R 3 是 CH₂, R4 和 R5 是如本文中描述的 siRNA 中的核苷酸的位点所确定的。就图 12C 的 siRNA 修饰形式在 U2OS 细胞中进行针对有丝分裂的中靶表型测定(即,“无害”测定)。如图 12C 的数据所显示的,未修饰 siRNA,与 Neg 对照处理的细胞相比,在 siRNA 处理的细胞中显示有丝分裂增加大约 2 倍。以这些形式存在的 LNA®修饰的修饰形式化的 siRNA 的中靶性能对预期的表型没有负面影响。修饰形式 H 在表型上提供了统计学上显著的增加。

[0364] 图 12D 提供了关于消除图 12C 的具有 LNA®修饰形式的 siRNA 的脱靶效应的数据。由于具有未修饰形式 A 和具有 LNA®修饰形式 H、H+1、H-1、H-2、K、Q、V、V-1 和 V-2 的 siRNA 沉默一组基因靶(其抑制预期对细胞凋亡没有作用)(FDFT1、LDLR 或 SC5DL)而产生的标准化的细胞凋亡片段的箱线图。阴性对照(Neg)是混杂的非靶向性 siRNA,对于所述混杂的非靶向性 siRNA,将细胞凋亡的定量标准化为 1.0 的值。然而,特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应由未修饰形式 A 的箱线图(与 Neg 对照相比,其具有增加的中值和更大的数据分布)来证明。在消除不希望的细胞凋亡表型上最有效的修饰形式是形式 H、K、Q 和 V-2,而修饰形式 H-2、H-1、H+1、V 和 V-1,当与未修饰 siRNA 相比时,不以任何统计学显著性改变细胞凋亡片段的测量值。

[0365] 对于修饰形式 H、H-1、K 和 V,由 2' OMe 核苷酸修饰的 siRNA 在基于 U2OS 细胞的测定中对中靶表型也没有负面影响,如图 13C 的数据所显示的。图 13C 提供了由于具有未修饰形式 A 和具有拥有 2' -O- 甲基修饰的核苷酸的所述修饰形式的 siRNA 沉默一组基因靶(WEE1 和 PLK1)而引起的标准化的有丝分裂细胞的箱线图,所述基因靶的抑制预期增加

有丝分裂。该测定是“无害”测定。未修饰 siRNA 显示与 Neg 对照处理的样品相比大约 2 倍的有丝分裂中值,如所预期的。修饰形式化的 siRNA 的数据显示具有 2' OMe 修饰核苷酸的 siRNA 在基于细胞的测定中对预期的表型不具有负面影响。

[0366] 图 13D 提供了由于具有未修饰形式 A 的 siRNA 和具有拥有 2' -O- 甲基修饰核苷酸的修饰形式 H、H-1、V 和 K 的 siRNA 沉默一组基因靶 (FDFT1、SC5DL 或 LDLR) 而引起的标准化的细胞凋亡片段的箱线图,所述基因靶的抑制预期对细胞凋亡没有作用。然而,特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可由未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比,其具有更大的数据分布) 来证明。对于每一种形式,siRNA 的组包含 13 个不同的 siRNA。具有 2' OMe 修饰形式的 siRNA 没有一个提供与未修饰对照形式 A 具有统计学上显著差异的数据,从而证明 2' OMe 修饰形式化的 siRNA 保持与对于未修饰形式 A siRNA 观察到的脱靶效应相同的脱靶效应。

[0367] 研究与形式 H 的修饰形式和图 1D 中所示的修饰形式相似的另外的修饰形式。图 15A 提供了关于在形式 A、H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 中具有 LNA® 修饰核苷酸的 siRNA 的标准化的有丝分裂细胞的箱线图。选择 siRNA 的组来抑制 BUB1B、CCND1 和 CDC2mRNA 以产生预期的 U2OS 细胞有丝分裂指数的减少。因此这些数据测量中靶表型效应,即,该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。如图 15A 的数据所提供的,用未修饰形式 A siRNA 处理的样品的有丝分裂中值,与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比,显示有丝分裂减少至大约 0.75。以形式 H、M、W+1、W-1、Y-1 和 Y+1 存在的修饰形式化的 siRNA 不显著改变此类 siRNA 对有丝分裂的影响,从而证明此类修饰形式“无害”。然而,修饰形式 Y 和 W 减少预期的 siRNA 的中靶影响,从而证明此类修饰形式干扰中靶功能。

[0368] 图 15B 如图 15A 一样提供了关于 CASP3 的箱线图, CASP3 的抑制预期不影响有丝分裂。然而,特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA,当被修饰形式化时,是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可由未修饰形式 A 的箱线图 (与 Neg 对照相比,其具有大约 0.7 的中值) 来证明。具有修饰形式 H、W、W+1、W-1、Y 和 Y+1 的 siRNA 逆转了形式 A 的 siRNA 显示的脱靶效应。具有形式 M 和 Y-1 的 siRNA 的修饰不逆转形式 A siRNA 的脱靶表型。对于图 15B 的数据,没有一个 Wilcoxon 值的 $p < 0.05$,这可能是由于每一个形式中 siRNA 的群体较小。

[0369] 图 15C 提供了关于靶向 WEE1 基因 (其抑制预期增加细胞凋亡) 的一组 siRNA (形式 A、H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1) 的标准化的细胞凋亡片段的箱线图。未修饰形式 A siRNA,与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比,显示大于 4.0 的细胞凋亡中值,从而证明由于 WEE1 抑制,细胞凋亡强烈增加。因此检测数据测量中靶表型效应,即,该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性未修饰 siRNA 的组“无害”。如图 15C 的数据所提供的,具有修饰形式 H、M 和 W-1 的 siRNA,与形式 A 相比,显示相似的细胞凋亡增加,然而形式 W、W+1、Y、Y+1 和 Y-1,与未修饰 siRNA 形式 A 相比,显示更小的对细胞凋亡的影响。对于图 15C 的数据,没有一个 Wilcoxon 值的 $p < 0.05$,这可能是由于每一个形式中 siRNA 的群体较小。尽管对细胞凋亡的影响减小,但化学修饰形式 W、W+1、Y、Y+1 和 Y-1 保持抑制靶 mRNA (图 14A) 和诱导细胞凋亡的能力 (与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比)。

[0370] 图 15D 提供关于具有修饰形式 A、H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1 和 Y-1 的 siRNA 沉默一

组基因靶（其抑制预期不影响细胞凋亡）的标准化的细胞凋亡片段的箱线图。该组中的 siRNA 靶向 BUB1B、CCND1、CDC2 或 CDK2。然而，特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA，当被修饰形式化时，是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可由非修饰形式 A 的箱线图（与 Neg 对照相比，其具有大于 3.5 的中值和更大的数据分布）来证明。与形式 A 相比，由具有形式 H、Y 和 Y+1 的 siRNA 产生的沉默显示统计学上显著的对脱靶效应的逆转。

[0371] 研究图 1E 中所示的另外的 siRNA 修饰形式。将 siRNA 转染入 U2OS 细胞，如本文中所述测量有丝分裂效应。图 16A 提供了关于具有未修饰形式 A 和具有 LNA® 修饰形式 H、M、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5 的 siRNA 的标准化的有丝分裂细胞的箱线图。选择 siRNA 的组（3 个 siRNA/靶 mRNA）来抑制 BUB1B、CCND1 和 CDC2mRNA 以产生预期的 U2OS 细胞有丝分裂指数的减少。因此，这些数据测量了中靶表型效应，即，该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。如图 16A 的数据所提供的，用未修饰形式 A siRNA 处理的样品的有丝分裂中值，与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比，显示有丝分裂减少至大约 0.75。以形式 H、M、JB1、JB2、JB4 和 JB5 存在的修饰形式化的 siRNA 没有显著改变 siRNA 对有丝分裂的中靶影响，从而证明此类形式能被 siRNA 耐受。然而，具有修饰形式 JB3 的 siRNA 显著减少了预期的靶向这些基因的 siRNA 的中靶影响，从而证明形式 JB3 干扰中靶功能。

[0372] 图 16B 如图 16A 一样提供了修饰形式（针对基因靶 CASP3，其抑制预期不影响有丝分裂）的箱线图。然而，特别地选择已在经验上证实有丝分裂脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA，当被修饰形式化时，是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可由未修饰形式 A 的箱线图（与 Neg 对照相比，其具有大约 0.65 的中值，从而展示有丝分裂的减少）证明。修饰形式 H、JB1、JB2、JB4 和 JB5 能够逆转此类脱靶效应，如图 16B 的数据所证明的。修饰形式 M 和 JB3 没有减少靶向 CASP3 的 siRNA 的脱靶表型，从而证明此类形式在消除脱靶表型上是无效的。对于图 16B 的数据，没有一个 Wilcoxon 值的 $p < 0.05$ ，这可能是由于每一个形式中 siRNA 的群体较小。

[0373] 图 16C 提供了由于具有修饰形式 A、H、M、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5 的 siRNA 沉默基因靶 WEE1（其抑制预期增加细胞凋亡）而产生的标准化的细胞凋亡片段的箱线图。因此这些数据测量了中靶表型效应，即，该测定确保修饰形式化的 siRNA 对功能性 siRNA 的组“无害”。如图 16C 的数据所提供的，用未修饰形式 A siRNA 处理的样品的细胞凋亡中值，与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比，显示细胞凋亡增加至大于 4.0，从而显示由于 WEE1 抑制，细胞凋亡强烈增加。具有修饰形式的 siRNA 诱导预期的表型至不同的程度，从而证明所有测试的形式对功能性 siRNA 的组无害。对于图 15B 的数据，没有一个 Wilcoxon 值的 $p < 0.05$ ，这可能是由于每一个形式中 siRNA 的群体较小。

[0374] 图 16D 如图 16C 一样提供了关于在形式 A、H、M、JB1、JB2、JB3、JB4 和 JB5 中具有 LNA 修饰的核苷酸的 siRNA 的修饰形式（针对包括 BUB1B、CCND1、CDC2 和 CDK2 的基因靶的组，所述基因靶的抑制预期对细胞凋亡没有作用）的箱线图。然而，特别地选择已在经验上证实细胞凋亡脱靶效应的 siRNA 来进行研究以确定这样的 siRNA，当被修饰形式化时，是否消除或减少脱靶效应。siRNA 具有脱靶效应可由未修饰形式 A 的箱线图（与 Neg 对照处理的样品相比，其具有大于 3 的增加了的中值和更大的数据分布）证明。如图 16D 的数据所显示的，当与形式 A 的脱靶效应相比时，具有修饰形式 H、JB1、JB2、JB3、JB4 和 JB5 的 siRNA

能够以统计学上显著的方式逆转细胞凋亡脱靶效应。具有形式 M 的 siRNA 不能将细胞凋亡效应逆转至统计学上显著的程度。

[0375] 总的来说,图 10E、11C、11F、12D、13D、15B、15D、16B 和 16D 的数据显示提供预料之外的脱靶表型效应的减少的修饰形式包括形式 G、H、J、K、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5。在这些修饰形式中,形式 G、J 和 K 对功能性 siRNA 抑制活性的能力“有害”。高度功能性的 siRNA 具有减少脱靶表型效应的性质,并且在抑制活性方面“无害”。给功能性 siRNA 提供这样的功能性的修饰形式包括形式 H、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB 3、JB4 和 JB5。

[0376] 就链型效应(图 4E、6C、7B、12A、13A、本文实施例 3 的数据)和就它们减少脱靶效应的能力(如上文所提供的)对这些修饰形式进行研究,以评估是否可根据链型测定来预测修饰形式化的 siRNA 在脱靶效应的消除中将起什么样的作用。使用经典报告子测定获得的实施例 3 的链型数据显示,可预期修饰形式 E、G、H、K、O 和 M 在细胞表型测定中表现良好。事实上,这些形式中有 3 个形式确实表现良好,但它们中有 3 个表现不良。因此,链型测定似乎在预测修饰形式化的 siRNA 在获得期望的细胞表型上是否具有功能中是无效的。

[0377] 实施例 7

[0378] 稳定的修饰形式化的 siRNA

[0379] 本实施例提供了修饰形式化的 siRNA,其除了上述保持抑制活性且消除脱靶效应的性质外,还对暴露于含有核酸酶的生物学液体特别稳定。Elmen 等人(Nucleic Acids Research 33 :1, 439-447, 2005)报导描述了称为 siLNA5 的稳定的 siRNA,其具有与本文中的形式 F 相同的修饰形式并且该形式用作参照对照用于本实施例的稳定性研究。术语“对暴露于生物学液体是稳定的”,如本文中所使用的,是指 siRNA 在含有核酸酶的生物学液体存在的情况下保持它们的全长,以与暴露于相同生物学液体且进行相同时间的具有修饰形式 F 的 siRNA 相比,相同或更大的程度。

[0380] 虽然本实施例提供了稳定的修饰形式,但之前的实施例提供的修饰形式化的 siRNA 适合用于其中几乎不用考虑核酸酶活性的环境中。

[0381] 关于形式 F,来自实施例 6 和图 10E 的数据显示具有修饰形式 F 的 siRNA 在消除脱靶细胞效应中基本上是无效的。

[0382] 对 8 个不同的靶向 CLTC 和 WEE 1mRNA 的 siRNA 进行研究以确定在 90%的小鼠血清中赋予 siRNA 稳定性的修饰形式。如实施例 1 中所述,针对下面描述的和图 1F 至图 1K 所示的修饰形式进行 siRNA 的合成。

[0383]	形式	修饰的位点(从各链的 5' 末端开始编号)	
[0384]		过客序列	引导序列
[0385]	A, 对照	无	无
[0386]	F(Elmen 等人)	1, 20, 21	20, 21
[0387]	H	1, 2, 13, 14	无
[0388]	DH21	1, 2, 13, 14	20, 21
[0389]	DH20	1, 2, 13, 14	19, 20, 21
[0390]	DH	31, 2, 13, 14, 20, 21	无
[0391]	DH30	1, 2, 13, 14, 19, 20	无
[0392]	DH35	1, 2, 13, 14, 20	21

[0393]	DH6	1, 13, 14, 21	21
[0394]	DH34	1, 2, 13, 14, 20, 21	21
[0395]	DH2	1, 2, 13, 14, 20, 21	20, 21
[0396]	DH19	1, 2, 13, 14, 19, 20	19, 20, 21
[0397]	DH4	1, 2, 13, 14, 19, 20	19, 20
[0398]	DH31	1, 2, 13, 14, 19, 20	20, 21
[0399]	DH27	1, 2, 7, 13, 14, 19, 20	20, 21
[0400]	DH25	1, 2, 6, 9, 13, 14, 19, 20	20, 21
[0401]	DH47	1, 2, 13, 14, 19, 20, 21	20, 21
[0402]	DH29	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	20, 21
[0403]	DH28	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	无
[0404]	DH18	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	19, 20, 21
[0405]	DH36	1, 2, 20, 21	20, 21
[0406]	DH9	1, 2, 13, 14, 20	20, 21
[0407]	DH46	1, 2, 13, 14, 21	20, 21
[0408]	DH33	1, 2, 13, 14, 20, 21	20
[0409]	DH10	1, 2, 13, 14, 20	20
[0410]	DH7	1, 2, 20, 21	2, 20, 21
[0411]	DH23	1, 2, 13, 14	2, 20, 21
[0412]	DH1	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 20, 21
[0413]	DH48	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 20
[0414]	DH49	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 21
[0415]	DH44	1, 2, 13, 14, 20	2, 20, 21
[0416]	DH45	1, 2, 13, 14, 21	2, 20, 21
[0417]	DH38	1, 2, 13, 14, 20, 21	1, 20, 21
[0418]	DH39	1, 2, 13, 14, 20, 21	3, 20, 21
[0419]	DH40	1, 2, 13, 14, 20, 21	4, 20, 21
[0420]	DH41	1, 2, 13, 14, 20, 21	5, 20, 21
[0421]	DH42	1, 2, 13, 14, 20, 21	6, 20, 21
[0422]	DH43	1, 2, 13, 14, 20, 21	7, 20, 21

[0423] 引入修饰形式化的 siRNA 的修饰的核苷酸是锁核酸 (**LNA®**残基), 特别是具有上述结构 (a) 的那些, 其中 R1 是 O, R2 是 O, 并且 R3 是 CH₂。

[0424] 如本文中所使用的, 稳定性测定提供了在修饰形式化的 siRNA 于 90% 的未经热灭活的小鼠血清 (cat#44135, JR Scientific, Inc., Woodland, CA) 中温育后存在的金长产物的量。用在使用之前已验证为具有强核酸酶活性的相同批次的小鼠血清处理所有 siRNA。使用人血清 (cat#CC-5500, SeraCare Life Sciences, Inc., Oceanside, CA) 和胎牛血清 (cat#SV 30014, HyClone, Logan, Utah) 获得相似的结果 (数据未显示)。

[0425] 对于每一个测定, 将 10 μ M 的修饰形式化的 siRNA 以 50 μ L 终体积于 37°C 下在 90% 的小鼠血清中温育, 进行时间曲线 (图 17) 中所指定的时间或进行 5 小时的时间 (图

18A 至图 23B)。平行于血清中的温育,用 PBS(cat#9625,Applied Biosystems,Austin,TX) 处理每一组的 siRNA,进行与血清处理的样品相同的时间以确定用于 HPLC 研究的全长产物的量的基线。在温育后,用酚(cat#9700,Applied Biosystems,Austin,TX) 抽提 siRNA,然后在 5 μ g 糖原载体(1 μ l/ 试管,产品编号 AM9510, Applied Biosystems, Austin, TX) 存在的情况下用乙醇沉淀以增加小 RNA 的回收。通过离心(以 15,000xg 进行 15 分钟)回收 siRNA 和切割产物,然后在进行 HPLC 分析之前将其溶解于 PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲的盐溶液)中。

[0426] 使用离子交换高效液相色谱(HPLC),利用连续梯度的含有乙腈的高氯酸钠(NaClO_4) 确定全长产物的量。固定相是与 Waters 2795 **ALLIANCE®** 分析 HPLC 系统和 EMPOWER™ Dissolution Software v2(Waters Corp, Milford, MA) 一起使用的 Dionex **DNAPAC®** 200 柱子(4mm $\times$ 250mm, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA)。保持温度以使 siRNA 双链体不变性。利用 Waters 2998 光电二极管阵列检测器(Waters Corp, Milford, MA) 在 254nm 处进行定量和 UV 检测。将 10 μ l–20 μ l 注射体积中的靶向 GAPdH 的 mRNA 的 siRNA(在各末端上具有 2 个 3' 悬突核苷酸的 21 聚体双链体)(10 μ M) 用于确定柱子质量和保留时间。HPLC 结果的分析基于未处理的 siRNA 的峰的总面积(areacount)(当作 100%)和血清处理的样品的相同保留时间($\pm$ 0.1–0.2 分钟)的峰的总面积(提供了计算的剩余的百分数)。

[0427] 分别就内源基因的抑制活性检测用于血清稳定性检测的相同 siRNA 以确定修饰形式是否改变 siRNA 抑制其 mRNA 靶的功效。如实施例 4 所述(除了在厂商描述的“正向”方案中,转染使用 Lipofectamine™2000(Invitrogen, Carlsbad, CA) 以外),以 5nM 的终浓度将修饰形式化的 siRNA 和未修饰对照 siRNA 转染入 Hela 细胞。在收获转染细胞后,按照厂商的方案,使用 **TaqMan®** Gene Expression Cells-to-CT™ 试剂盒(Applied Biosystems, Inc. Cat. #AM1728) 分离总细胞裂解物。如实施例 4 中所述进行 cDNA 的制备、基因表达测定和抑制活性的计算。

[0428] 图 17 的数据显示本研究的 8 个不同 siRNA 的未修饰形式在血清中降解,其中在暴露于血清 5 至 10 分钟内,50% 以上的全长分子降解。

[0429] 对于未修饰形式 A、稳定性对照形式 F 和修饰形式 H、DH21、DH20、DH3、DH30、DH35、DH6、DH34 和 DH2,图 18A 提供了当在描述的条件用 90% 的血清处理 5 小时时,保持全长的 siRNA 的百分比的箱线图。在描述的条件下,未修饰形式 A 和修饰形式 H 在血清中被完全降解。在描述的条件下,稳定性参照对照形式 F 在血清中具有大约 43% 的全长 siRNA 的中值。图 18A 的数据的分析表明只在一个 3' – 末端上的和 / 或其附近的核苷酸的修饰不足以在血清中保护修饰的 siRNA(形式 DH21、DH20、DH 3 和 DH 30,与形式 F 相比)。两个或三个悬突核苷酸的修饰也不足以在血清中保护修饰的 siRNA(形式 DH6、DH 34 和 DH 35,与形式 F 相比)。所有 4 个悬突核苷酸都被修饰的形式 DH2 在血清中提供了等于或好于形式 F 的保护作用。图 18B 提供了图 18A 中研究的 siRNA 的 mRNA 抑制(表示为 Neg 对照的百分比)的箱线图。如由图 18B 所显示的,未修饰形式 A siRNA 展示了与 Neg 对照 siRNA 处理的样品相比大约 85% 的中值抑制。siRNA 修饰形式 DH20,与形式 H 的抑制活性相比,特别地显示抑制活性的降低。这该组研究的修饰形式中,只有形式 DH2 由于其稳定性和抑制活性而被考虑用于进一步的分析。

[0430] 在有义链的 3' 末端的倒数第二和倒数第三位中提供两个修饰的核苷酸且在反义链的两个或三个末端残基中提供修饰的核苷酸 (DH4、DH31、DH19) 似乎对血清稳定性具有不利作用,如图 19A 所显示的。这些数据进一步支持将修饰核苷酸安置为悬突核苷酸。此外,如图 19B 的数据所显示的,形式 DH19、DH27 和 DH25,与形式 A 相比,显示抑制活性的显著降低。形式 DH 31 具有大于 70% 的抑制活性。保护内部残基 (如 DH27 (位点 7) 和 DH25 (位点 6 和 9)) 而让末端残基不受保护,在抑制活性方面产生相反效果 (当将数据与形式 DH2 的数据相比时)。

[0431] 图 20A 提供的数据显示与对照形式 F 相比,修饰形式 DH47 和 DH29 的稳定性增加,且 DH18 的稳定性甚至进一步增加。除了悬突位点和形式 H 的位点中的修饰核苷酸外,修饰形式 DH47 和 DH29 在有义链序列的倒数第三和倒数第四位中的一个位点 (即,对于 21 聚体,位点 18 和 19 之一) 上提供修饰核苷酸。形式 DH18 提供了与 DH29 一样的修饰核苷酸,此外,在反义链的倒数第三个位点 (即,对于 21 聚体,位点 19) 上提供了修饰核苷酸。形式 DH28 的数据,当直接与形式 DH 29 相比时,再次显示反义链的悬突位点上修饰核苷酸的缺乏破坏了受保护的有义链提供的稳定性。当与形式 F 相比时,形式 DH47 和 DH28 的数据具有 $p < 0.05$ 的 Wilcoxon 值。图 20B 的数据显示形式 DH47、DH29 和 DH28 具有大于 70% 的抑制活性。反义链的倒数第三个位点 (位点 19) 的修饰 (如形式 DH18),虽然提供了增强的稳定性,但将抑制活性削弱至大约 60% 的中值。基于上述数据,形式 DH47 和 DH29 都提供了超过对照形式 F 的增加的 siRNA 的稳定性,形式 DH47 提供了与未修饰形式 A 相当的抑制活性,形式 DH29 提供了大于 70% 的抑制活性。

[0432] 图 21A 中描述的具有修饰形式的 siRNA 没有一个提供超过具有修饰形式 F 或形式 DH2 的 siRNA 的增加了的血清稳定性。增加了的血清稳定性的缺乏进一步支持其中悬突核苷酸被修饰的修饰形式。图 21A 中研究的 siRNA 的抑制活性的数据都显示大于 70% 的活性,如图 21B 所显示的。

[0433] 图 22A 的具有修饰形式 F 的 siRNA 的血清稳定性与具有修饰形式 DH23、DH48、DH49、DH44 和 DH45 的 siRNA 的血清稳定性的比较进一步支持悬突核苷酸的位点上的修饰核苷酸。除了在悬突核苷酸的位点上具有修饰核苷酸外,反义链的位点 2 上的核苷酸的修饰 (例如形式 DH1 和 DH7) 增加了血清稳定性的中值 (图 22A)。图 22B 的数据显示图 22A 的所有形式化的 siRNA,除了形式 DH23 外,都获得大于 70% 的抑制活性。总的来说,除了悬突核苷酸的位点外,在引导链的位点 2 上具有修饰核苷酸的形式 DH1 和 DH7 提供了血清稳定性和抑制活性的性质。具有修饰形式 DH7 的 siRNA 在位点 13 和 14 上以及其附近的位点上缺乏修饰的核苷酸,因而可能不提供消除脱靶效应的性质。然而,这样的 siRNA 可在其中不预期脱靶效应的环境中用于沉默。

[0434] 图 23A 提供的数据检查除了形式 H 和悬突位点上的修饰核苷酸外在反义链的位点 1、2、3、4、5、6 或 7 (位点 #1 是 5' 核苷酸) 上的一个核苷酸修饰 (分别地 DH38、DH1、DH 39、DH40、DH41、DH42、DH43) 的效应。数据显示所有检测的形式化的 siRNA 都增加中值血清稳定性,并且随着修饰核苷酸进一步远离引导反义链的 5' 末端,稳定性倾向于减小。

[0435] 如图 23B 的数据所提供的,除了具有形式 DH38 的 siRNA 以外,所有形式化的 siRNA 具有大于 70% 的抑制活性。该观察结果突出了位于反义链的 5' 末端的修饰核苷酸的不相容性。将磷酸基团添加至反义链的 5' 末端部分地拯救了生物学活性,但以减小的稳定性为

代价（数据未显示）。总的来说，关于血清稳定性和抑制活性的数据显示在引导反义链的位点 2、3、4、5、6 或 7（参照 5' 末端）上的至少一个核苷酸修饰增强了 siRNA 稳定性同时还提供了至少 70% 的抑制活性。

[0436] 结合图 18A 至图 23B 的数据，提供大于形式 F 的血清稳定性同时保持至少 70% 的抑制活性的修饰形式是形式 DH47、DH29、DH7、DH1、DH 39、DH40、DH41、DH42 和 DH43。

[0437] 形式 DH7 在位点 13 和 14 上以及其附近的位点上缺乏修饰的核苷酸，因而可能不提供消除脱靶效应的性质。

[0438] 形式 DH47、DH29、DH1、DH 39、DH40、DH41、DH42 和 DH43 在过客有义链中在位点 1、2、13、14、20、21 上以及对于 DH47 和 DH29，在位点 18 或 19 之一上具有修饰的核苷酸；且在引导反义链中在位点 20 和 21 上以及对于 DH39 至 DH43，在位点 2、3、4、5、6 或 7 的任一个上具有修饰的核苷酸。其中在过客有义链的位点 1 上的两个核苷酸都被修饰的双链化碱基对显示对抑制活性是不利的（DH20、DH19、DH4、DH18）。

[0439] 实施例 8

[0440] 稳定 siRNA 的体内递送

[0441] 体内递送未修饰形式 A siRNA 和具有修饰形式 DH1 和 DH47 的稳定 siRNA，并且比较存在于对照动物和测试动物的肝中的全长 siRNA 的量。将允许 siRNA 和 miRNA 的可靠和有效定量并且只特异性检测全长分子的基于 **TaqMan®** 的茎-环 RT-PCR 测定（**TaqMan®** based stem-loop RT-PCR assay）用于分析（2004 年 9 月 21 日提交的属于 Chen 等人的美国公开专利申请 2005/0266418；Chen, C. 等人 *Nucleic Acids Research* 33, e 179, 2005）。

[0442] 如 Zhang 等人 (*Human Gene Therapy* 10, 1735-1737, 1999) 和 Lewis 等人 (*Nature Genetics* 32, 107-108, 2002) 所述，使用水动力 (hydrodynamic)（高压）尾静脉注射对小鼠施用靶向 Fas 基因的 siRNA (1 nmol, 稀释于 2.5 ml PBS 中 (10% 的小鼠体重))。针对每一个修饰形式化的 siRNA 注射 4 只小鼠。修饰的核苷酸是具有结构 (a) 的 **LNA®** 残基，其中 R1 是 O，R2 是 O 且 R3 是 CH₂。

[0443] 注射后 5 分钟时，杀死小鼠，收获完整肝脏，将其冷冻于干冰中。按照具有如下改进的厂商的方案，使用 mirVana™ PARIS™ 试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 从完整肝脏分离总 RNA。加入细胞裂解缓冲液 (Cell disruption buffer) (20 ml)，并将样品匀浆。将裂解物 (400 μl) 转移至新管中，向各管中加入变性溶液 (400 μl)，通过涡旋充分混合管。通过加入 800 μl 酚，涡旋 5 分钟，离心 10 分钟来进行酚抽提。将上层相 (300 μl) 转移入新管中并且与 375 μl (1.25 倍体积) 的 100% 乙醇混合。按照试剂盒的方案，将混合物通过过滤柱，使用 100 μl 洗脱缓冲液进行终洗脱。测量 RNA 的浓度并且将其调整至 10 ng/μl。

[0444] 用于定量 siRNA 的测定包括使用具有茎-环设计的 RT 引物逆转录 (RT) siRNA 的引导链，如对于 **TaqMan®** MicroRNA Reverse Transcription Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) 所描述的，然后进行 PCR。在 10 μl RT 反应中，将 1 ng/μl 的总 RNA 和 50 nM 的 RT 引物在 85°C 下变性 5 分钟，然后在 60°C 下进行 5 分钟，然后在 4°C 下退火。在加入酶混合物 (0.25 mM 各 dNTP, 终浓度；3.33 个单位/μl 的 MultiScribe™ 逆转录酶 (Applied Biosystems), 1X RT 缓冲液, 0.25 个单位/μl 的 RNA 酶抑制剂) 后，将反应混合物在 16°C 下

温育 30 分钟,在 42℃下温育 30 分钟,在 85℃下温育 5 分钟,然后在 4℃下温育。在 Applied Biosystems 7900HT 序列检测系统 (AppliedBiosystems) 上使用标准 **TaqMan®** PCR 方案进行实时 PCR。10 μ l PCR 反应混合物包含 1 μ l RT 产物、1X **TaqMan®** Universal PCR MasterMix、0.2 μ M **TaqMan®** 探针、1.5 μ M 正向引物和 0.7 μ M 反向引物。将反应物在 95℃下温育 10 分钟,然后进行 40 个循环:95℃下进行 15 秒和在 60℃下进行 1 分钟。

[0445] 在匀浆之前,用 300、200、100 和 50pmol 的 siRNA 给来自分开的对照未处理组的小鼠的冷冻完整肝脏加料 (spike)。此类“加料的”样品用作研究的对照并且提供用于比较注射的样品与对照样品之间的循环阈值 (Ct) 的标准曲线。如上所述从对照器官分离 RNA。术语“Ct”表示当信号首次被记录为统计学上显著的时,PCR 循环的次数。因此,Ct 值越低,核酸靶的浓度越高。在 **TAQMAN®** 测定中,通常各循环几乎倍增 PCR 产物的量,因此,如果不存在对反应的抑制并且反应对于纯化的核酸几乎 100%有效,那么荧光信号应当加倍。

[0446] 图 24 提供了“加料的”对照、未修饰形式 A 注射的动物以及形式 DH1 和形式 DH47siRNA 处理的动物的 Ct 值。在水动力注射后 5 分钟在肝中检测到大约 5%的未修饰形式 A siRNA。相比之下,检测到大约 20%的具有形式 DH1 和 DH47 的修饰形式化的 siRNA,与未修饰 siRNA 相比,400%的增加。该体内研究显示为了稳定而进行修饰形式化的 siRNA 在全身性施用后提供了显著增加的全长 siRNA 的递送。

[0447] 本文中已广泛地和一般地描述了本教导的组合物、方法和试剂盒。落在一般公开内容内的每一个更窄的种类和亚属 (sub-generic) 分类也形成了本教导的部分。这包括带有条件或负向限制 (从该属中除去任何主题物质,无论去除的物质是否明确地在本文中引用) 的本教导的一般描述。

[0448] 虽然已通过参考不同应用、方法和组合物描述了公开的教导,但应当理解可进行各种改变和修饰而不背离本文中的教导。前述实施例用于更好地说明本教导而非意欲限定本文的教导的范围。可根据下列权利要求进一步理解本教导的某些方面。

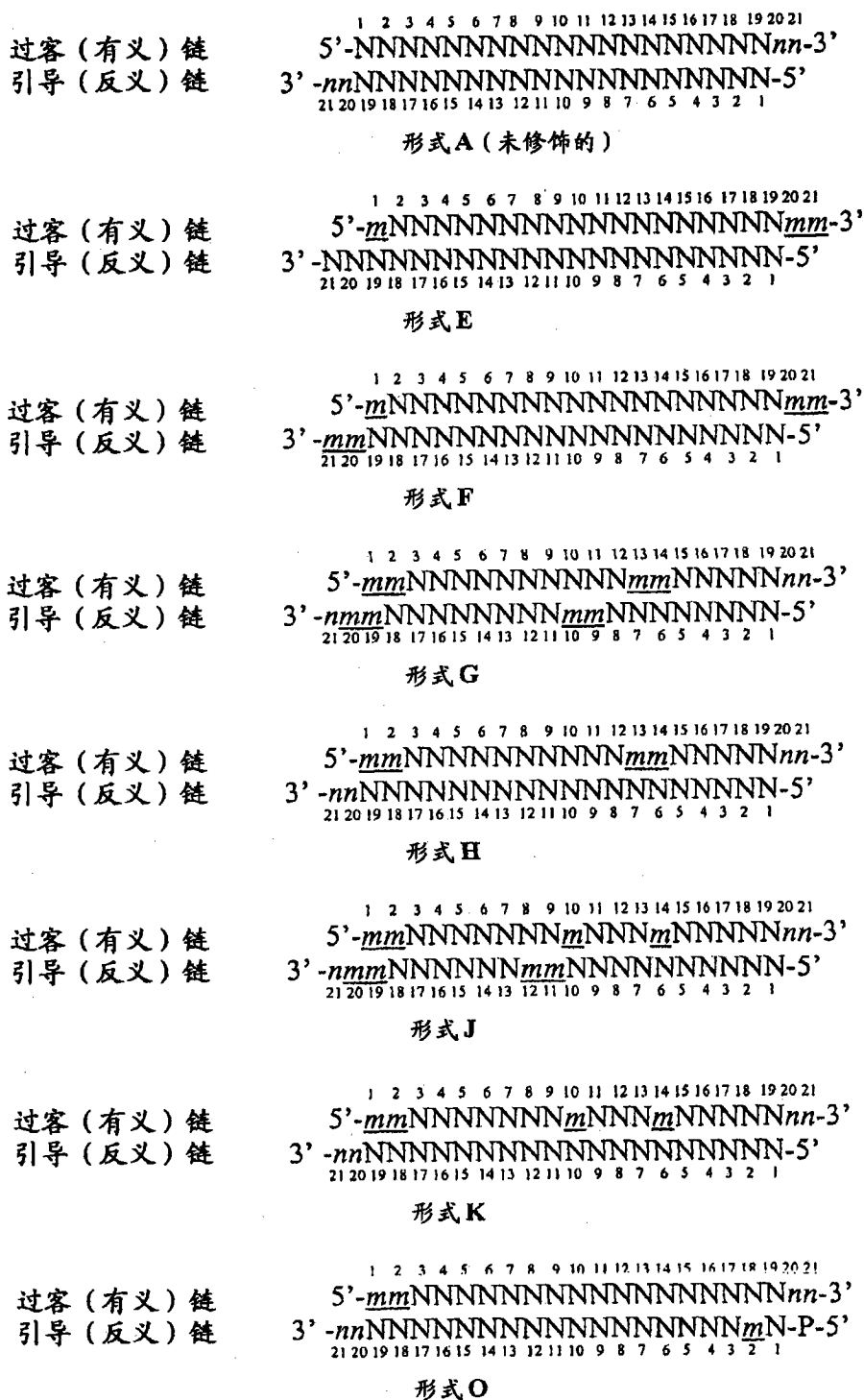


图 1A

过客(有义)链
引导(反义)链



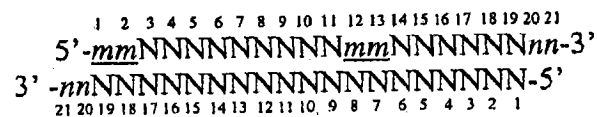
形式 M

过客(有义)链
引导(反义)链



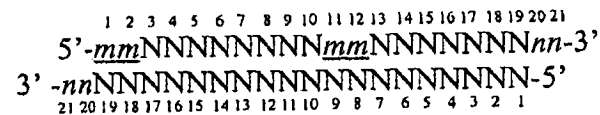
形式 H

过客(有义)链
引导(反义)链



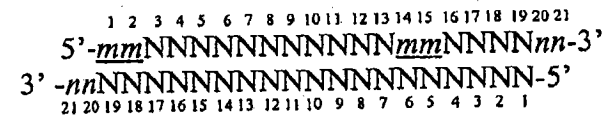
形式 H (-1)

过客(有义)链
引导(反义)链



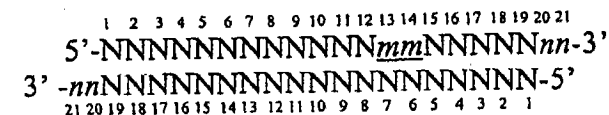
形式 H (-2)

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 H (+1)

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 Q

图 1B

形式 M

形式H

形式 V

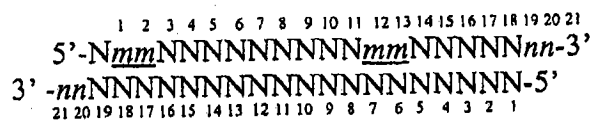
形式 V (-1)

形式 V (-2)

形式 V (+1)

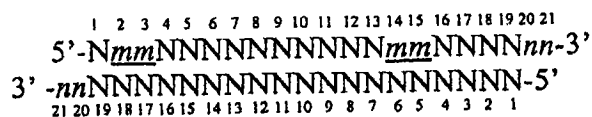
60

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



形式 W

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



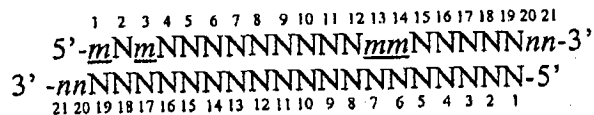
形式 W+1

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



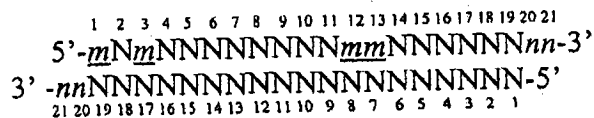
形式 W-1

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



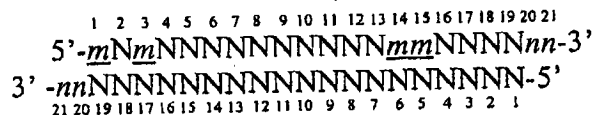
形式 Y

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



形式 Y-1

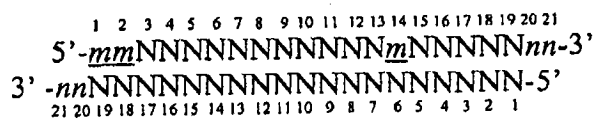
过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



形式 Y+1

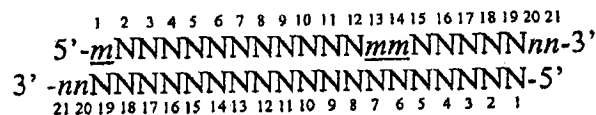
图 1D

过客(有义)链
引导(反义)链



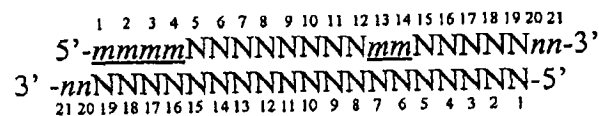
形式 JB1

过客(有义)链
引导(反义)链



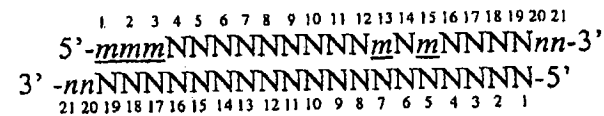
形式 JB2

过客(有义)链
引导(反义)链



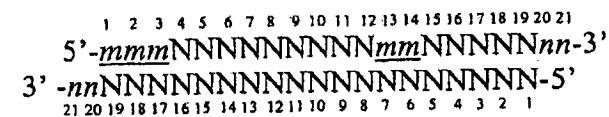
形式 JB3

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 JB4

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 JB5

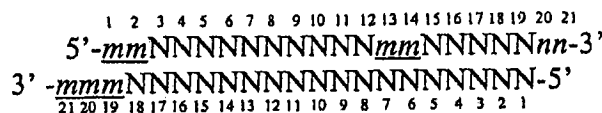
图 1E

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



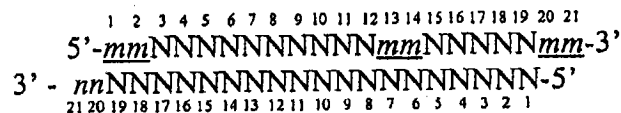
形式 DH21

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



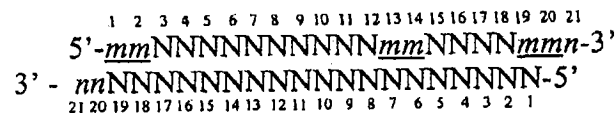
形式 DH20

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



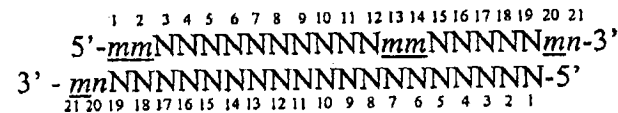
形式 DH3

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



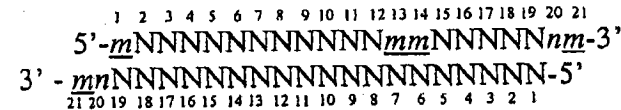
形式 DH30

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



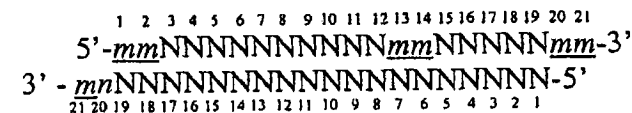
形式 DH35

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



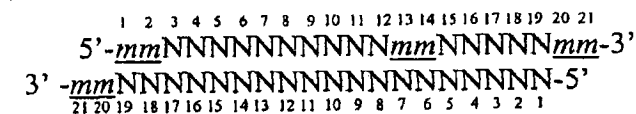
形式 DH6

过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



形式 DH34

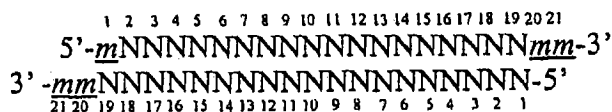
过客 (有义) 链
引导 (反义) 链



形式 DH2

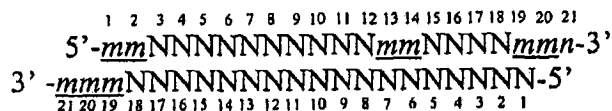
图 1F

过客(有义)链
引导(反义)链



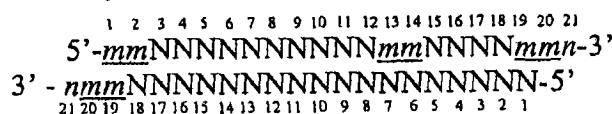
形式 F

过客(有义)链
引导(反义)链



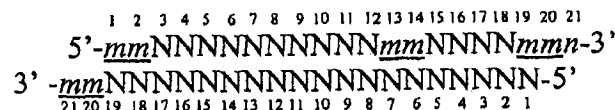
形式 DH19

过客(有义)链
引导(反义)链



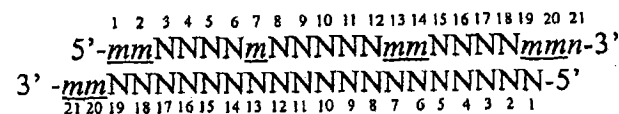
形式 DH4

过客(有义)链
引导(反义)链



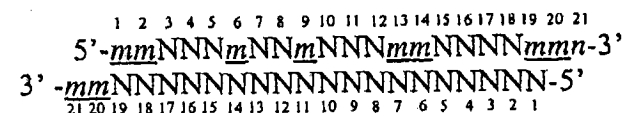
形式 DH31

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH27

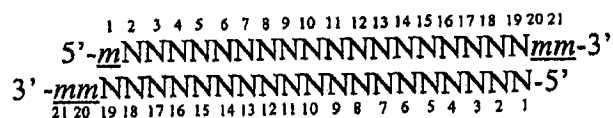
过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH25

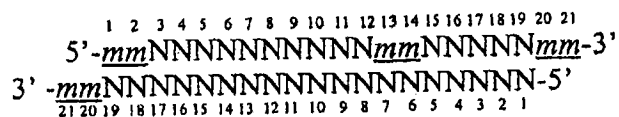
图 1G

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 F

过客(有义)链
引导(反义)链



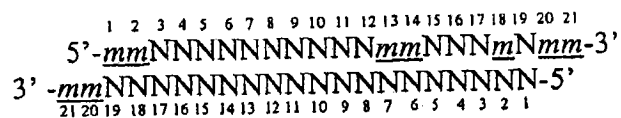
形式 DH2

过客(有义)链
引导(反义)链



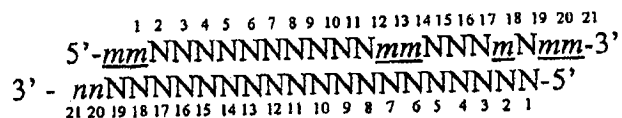
形式 DH47

过客(有义)链
引导(反义)链



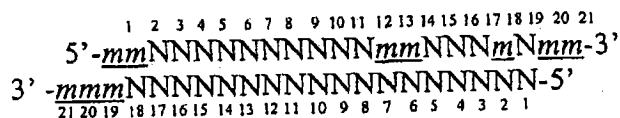
形式 DH29

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH28

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH18

图 1H

形式 F

形式 DH36

形式 DH2

形式 DH9

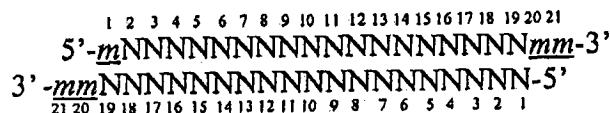
形式 DH46

形式 DH33

形式 DH10

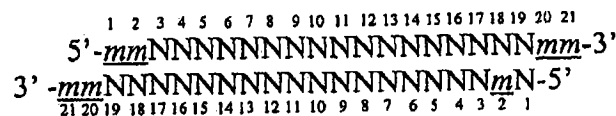
66

过客(有义)链
引导(反义)链



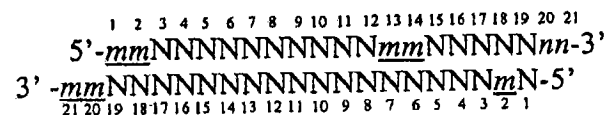
形式 F

过客(有义)链
引导(反义)链



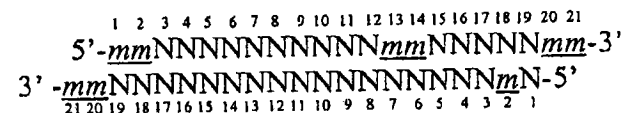
形式 DH7

过客(有义)链
引导(反义)链



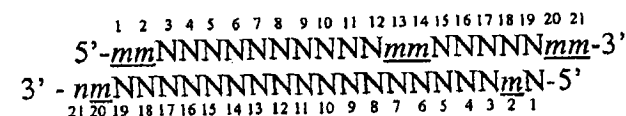
形式 DH23

过客(有义)链
引导(反义)链



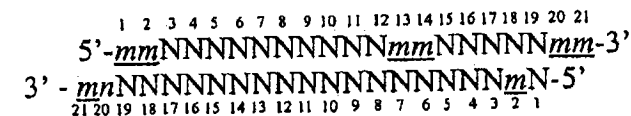
形式 DH1

过客(有义)链
引导(反义)链



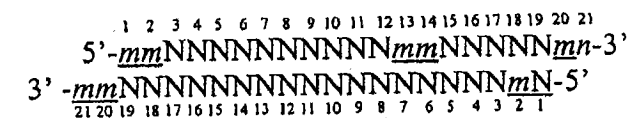
形式 DH48

过客(有义)链
引导(反义)链



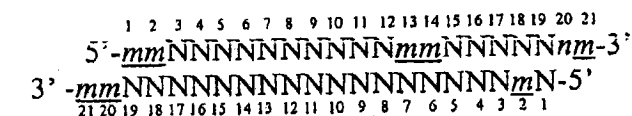
形式 DH49

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH44

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH45

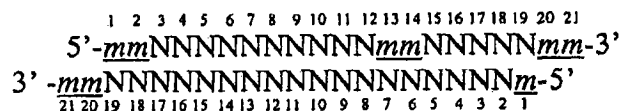
图 1J

过客(有义)链
引导(反义)链



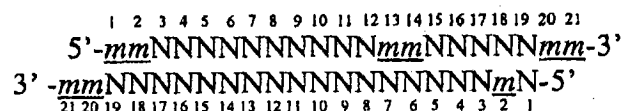
形式 F

过客(有义)链
引导(反义)链



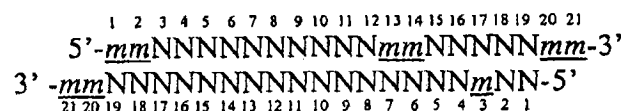
形式 DH38

过客(有义)链
引导(反义)链



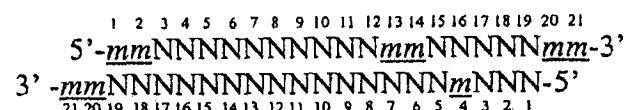
形式 DH1

过客(有义)链
引导(反义)链



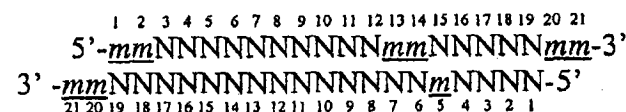
形式 DH39

过客(有义)链
引导(反义)链



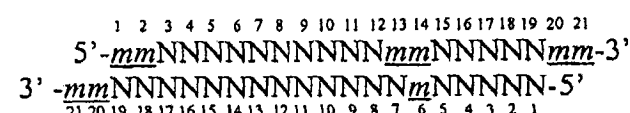
形式 DH40

过客(有义)链
引导(反义)链



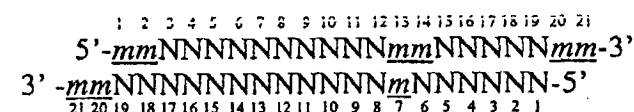
形式 DH41

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH42

过客(有义)链
引导(反义)链



形式 DH43

图 1K

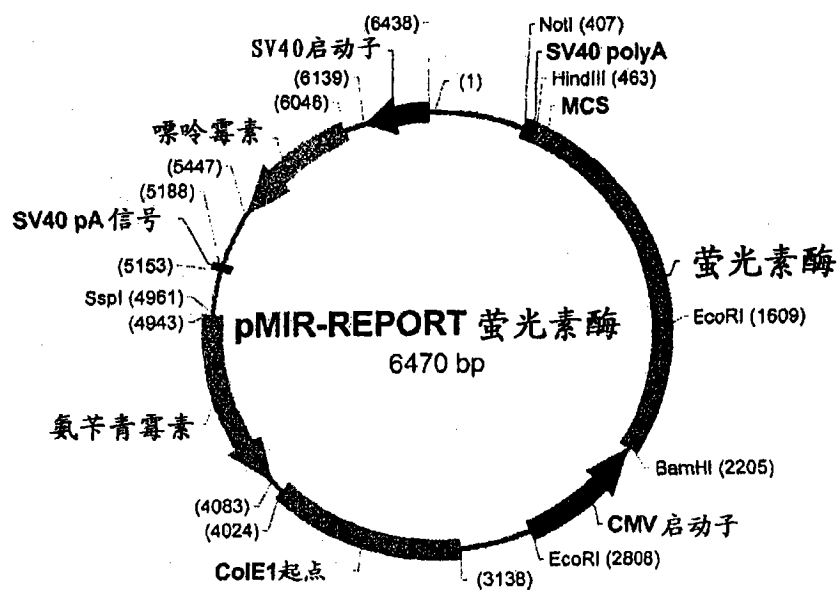


图 2A

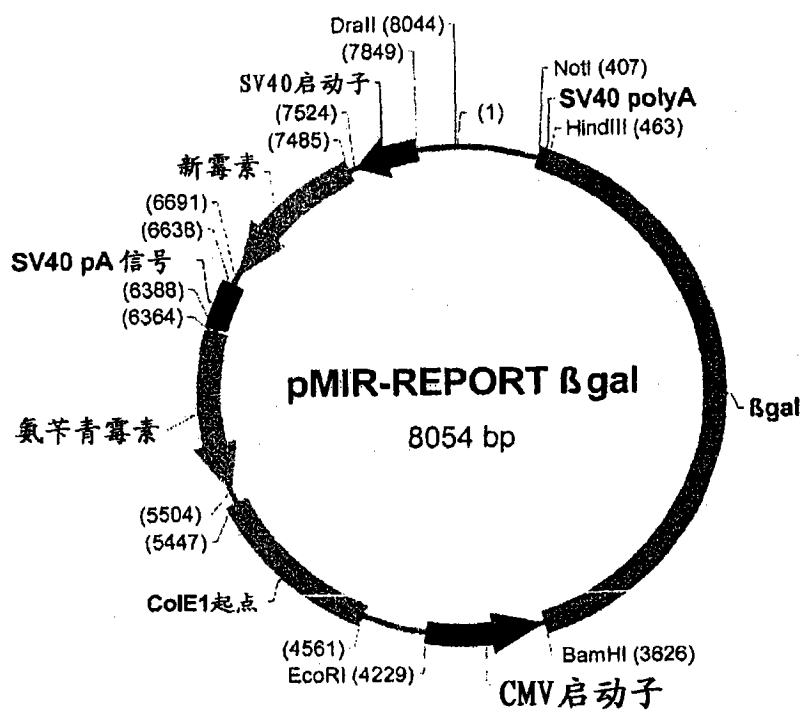


图 2B

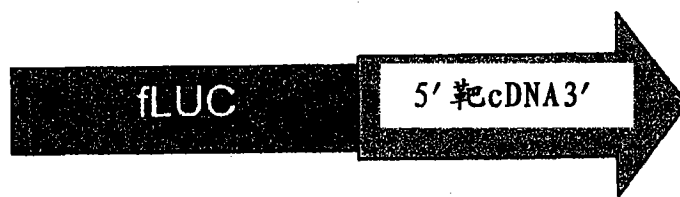


图 3A

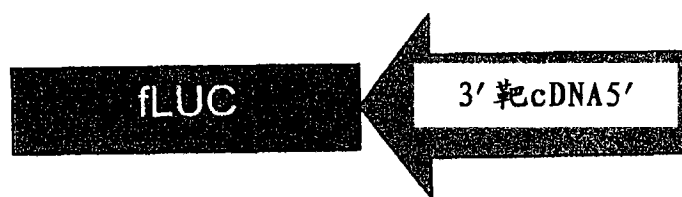


图 3B

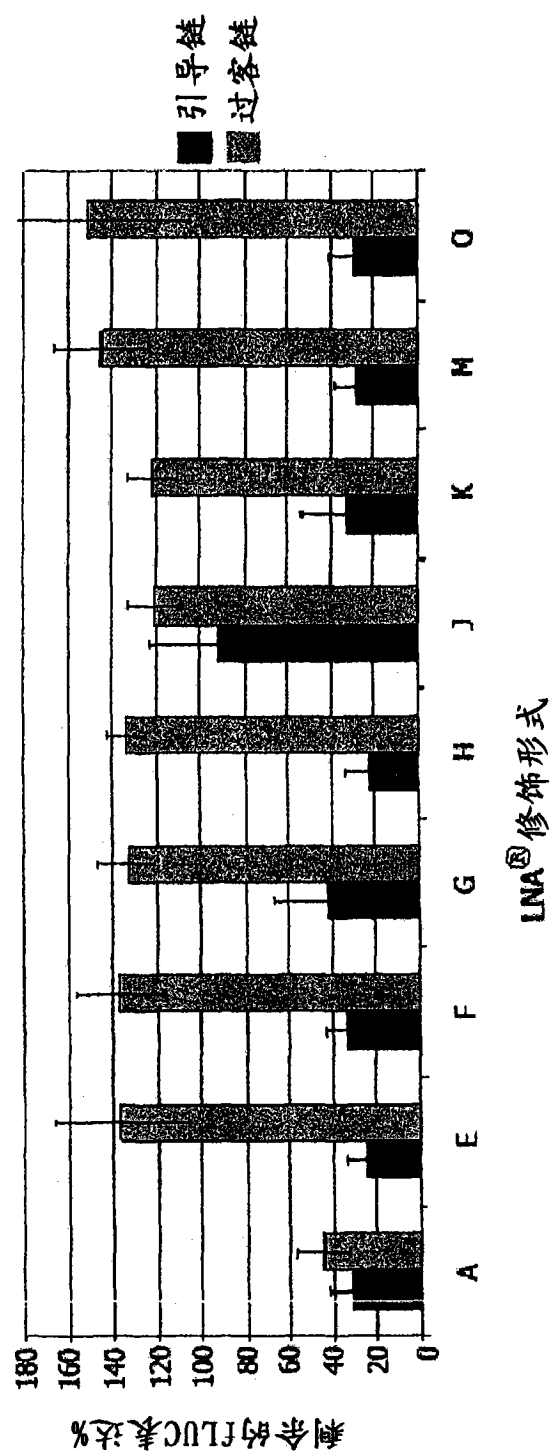


图 4A

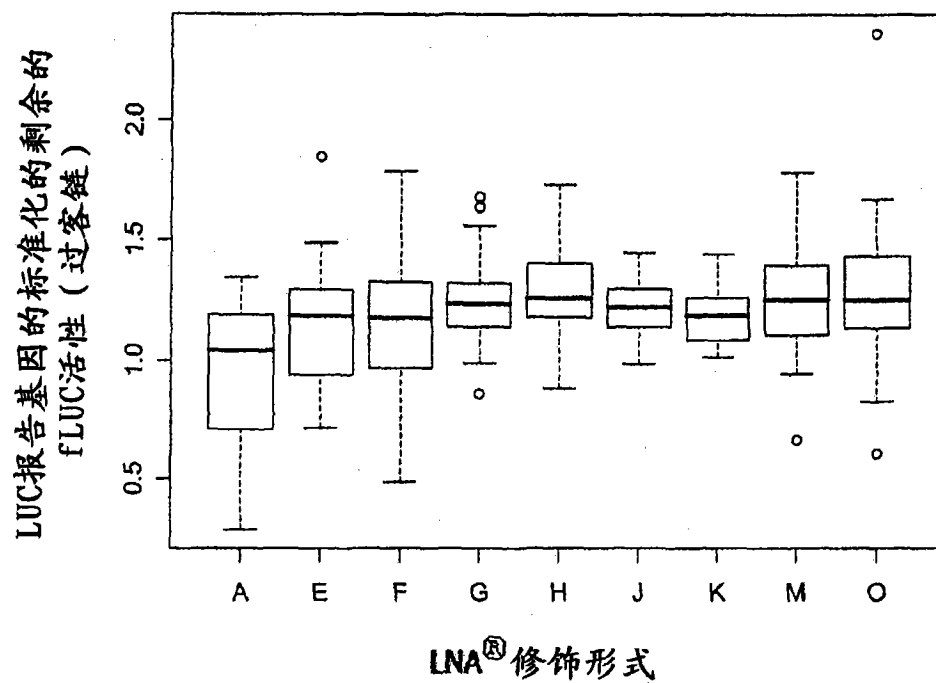


图 4B

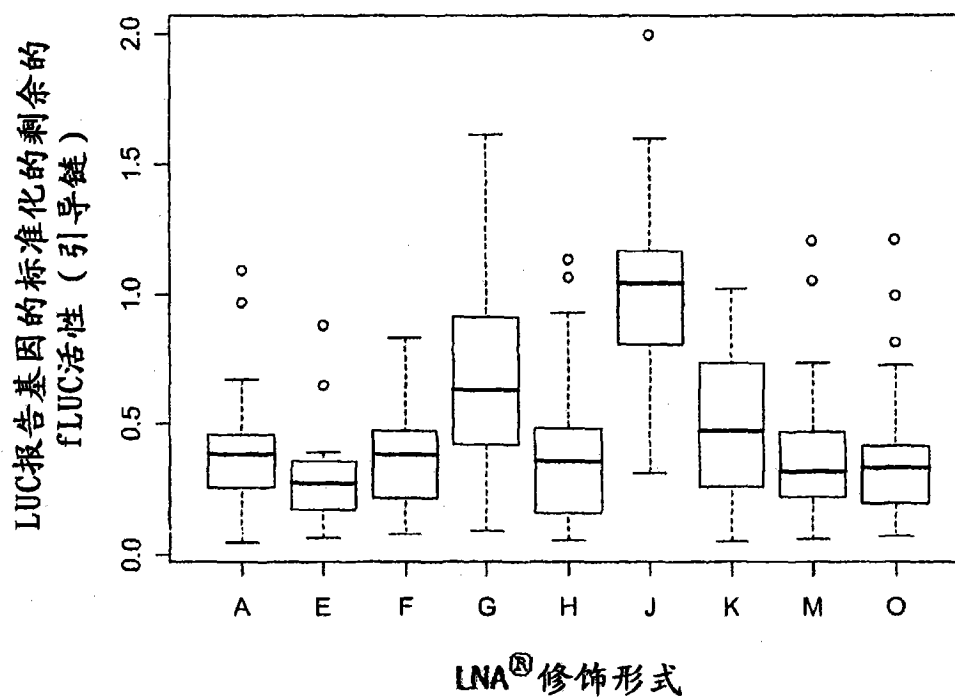


图 4C

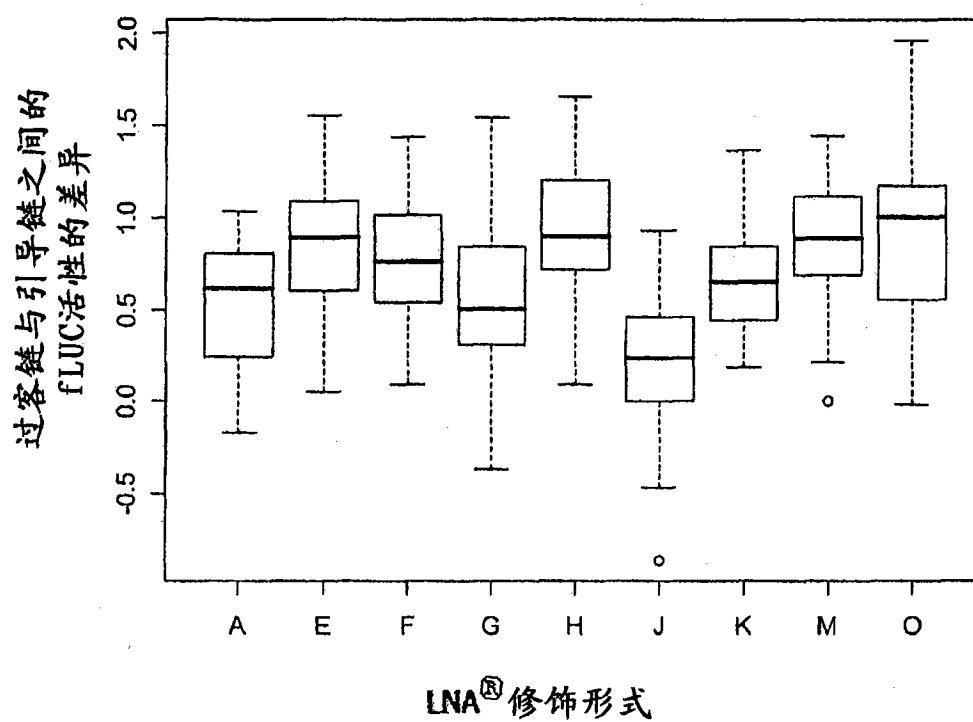


图 4D

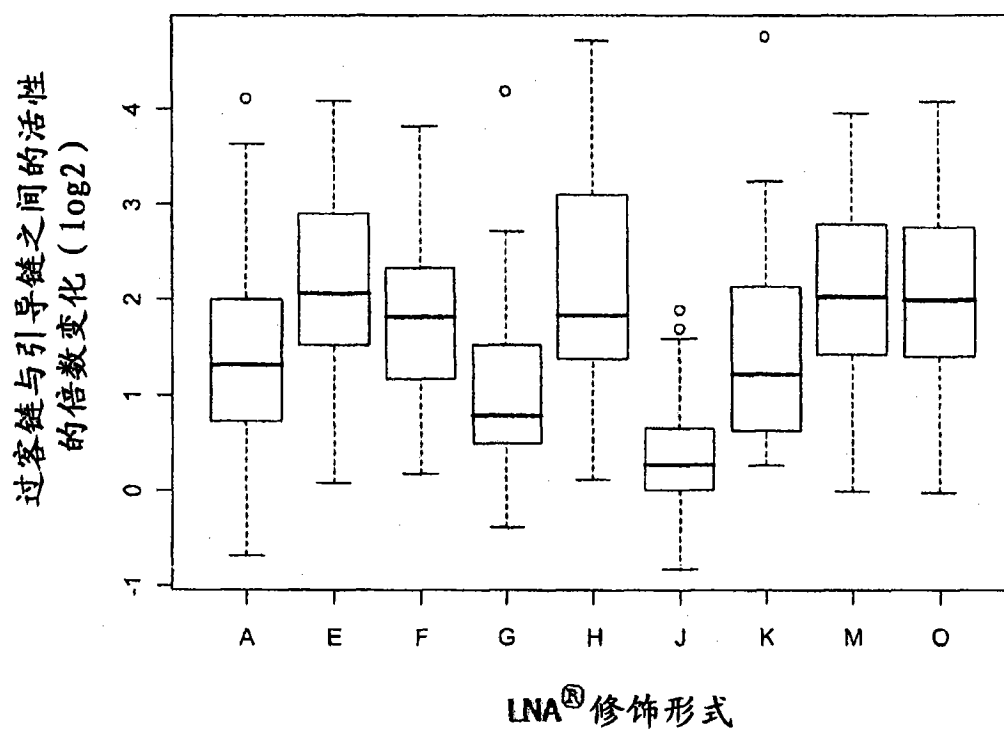


图 4E

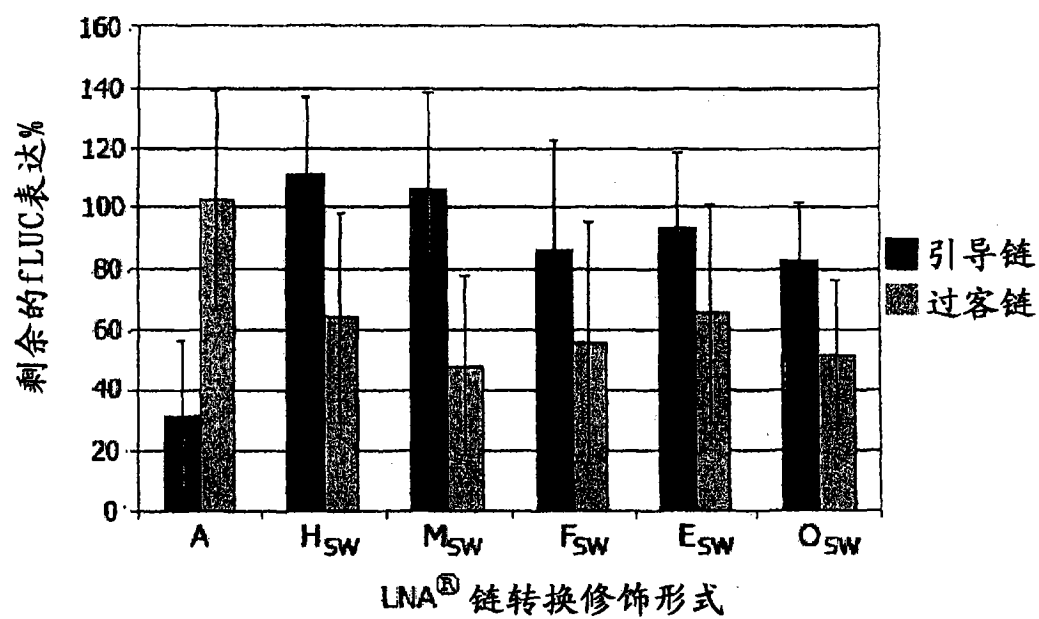


图 5A

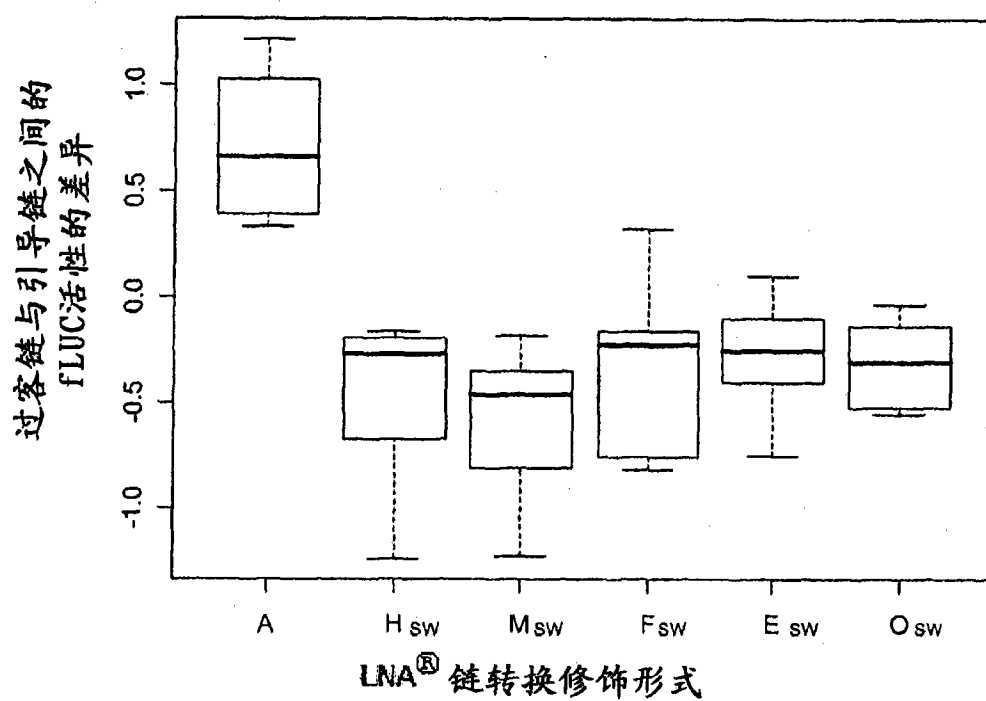


图 5B

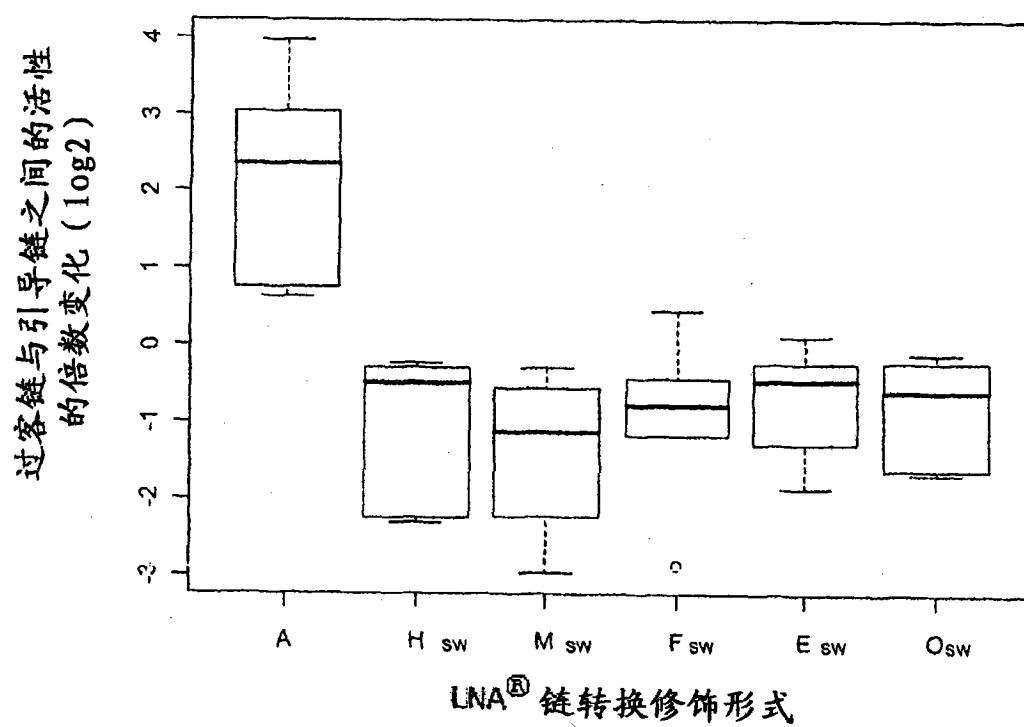


图 5C

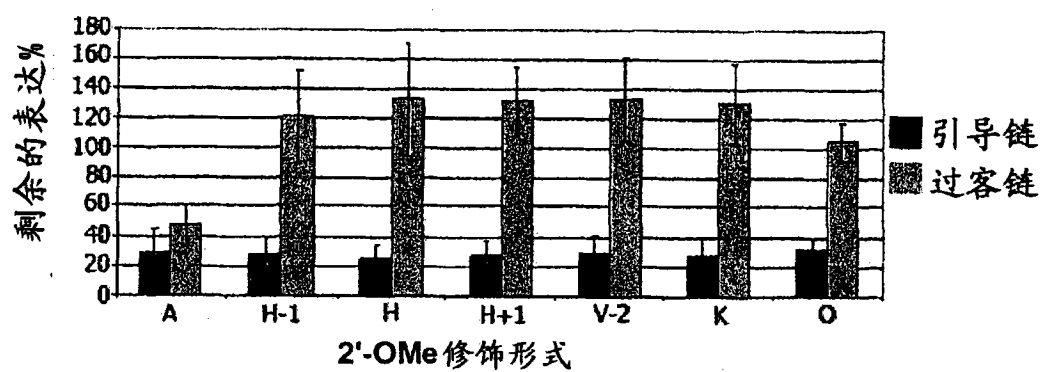


图 6A

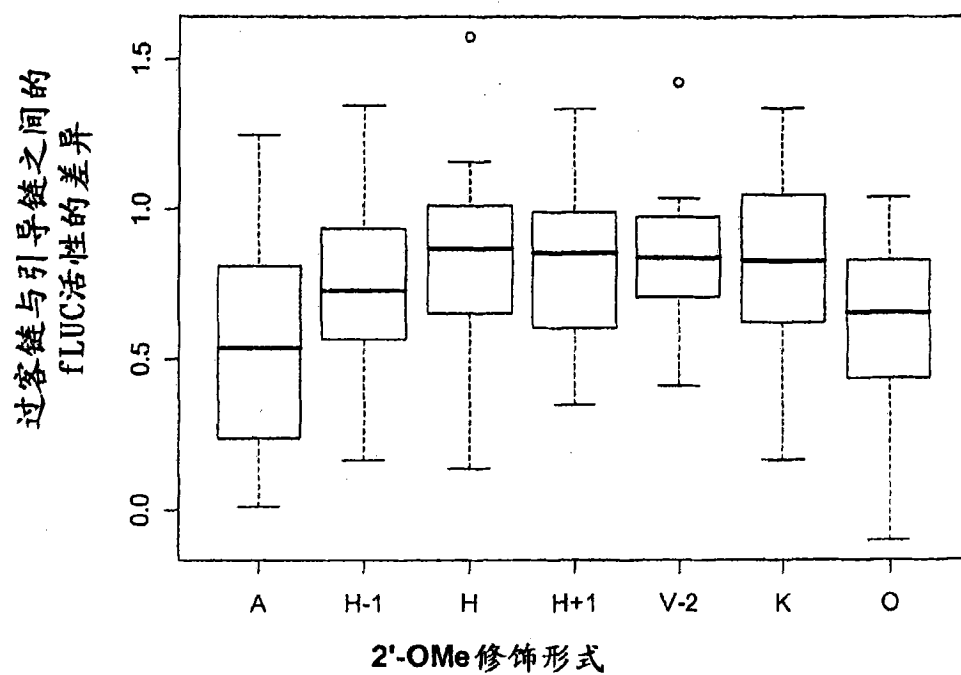


图 6B

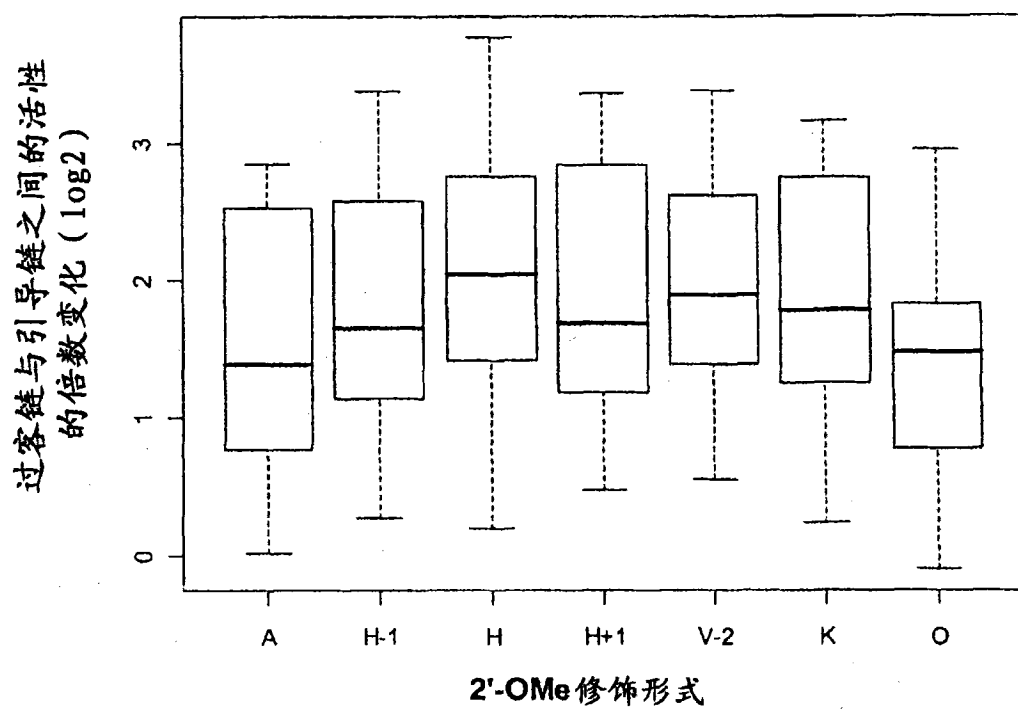


图 6C

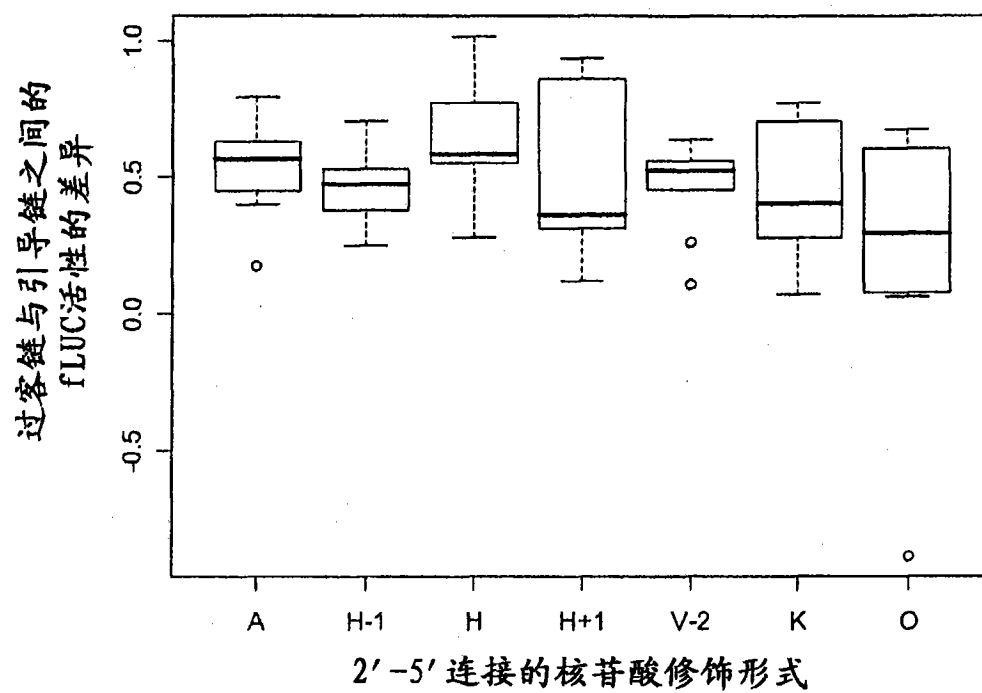


图 7A

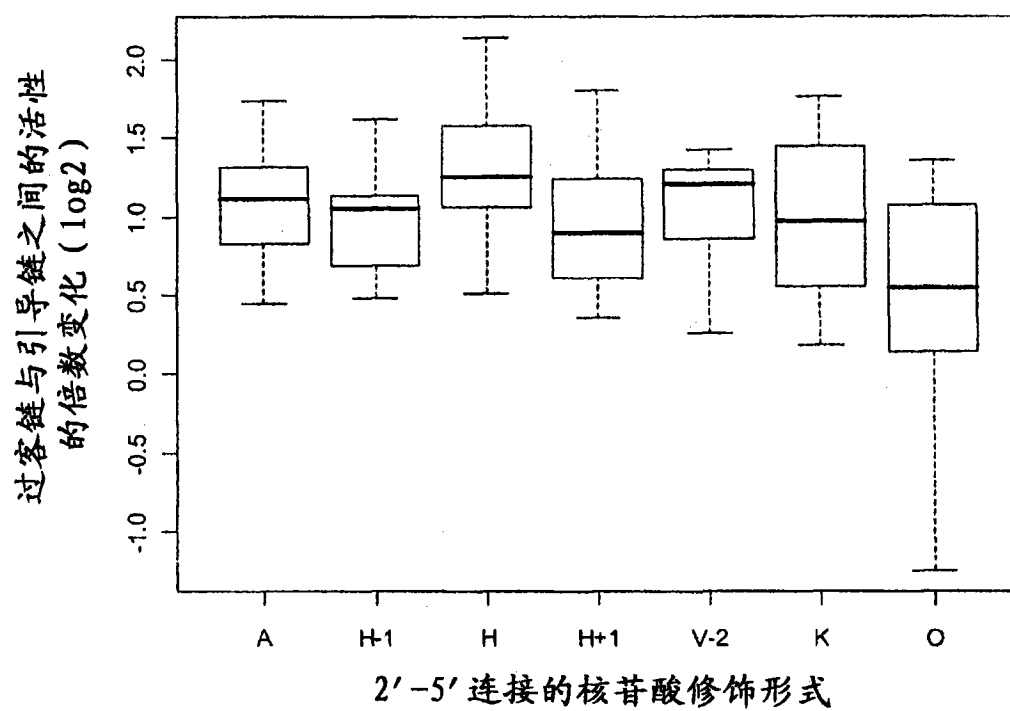


图 7B

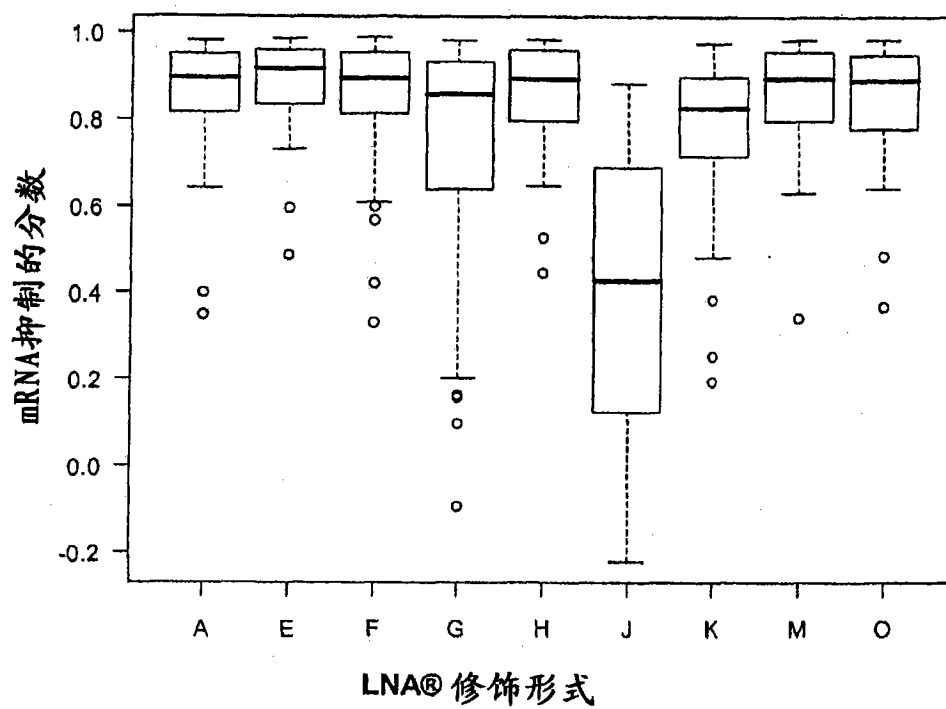


图 8

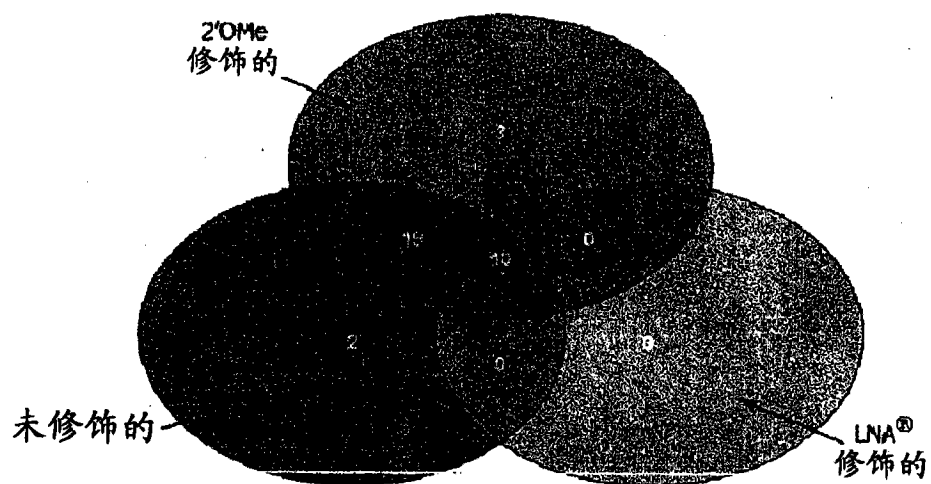


图 9A

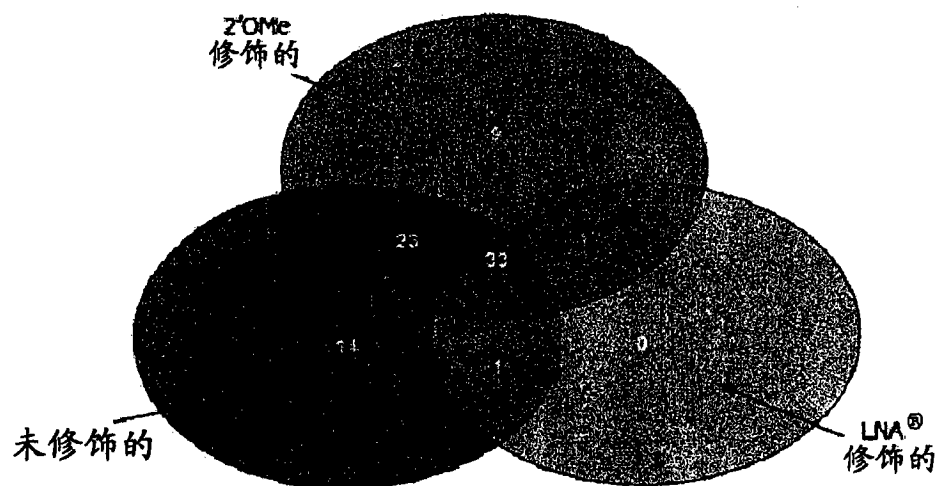


图 9B

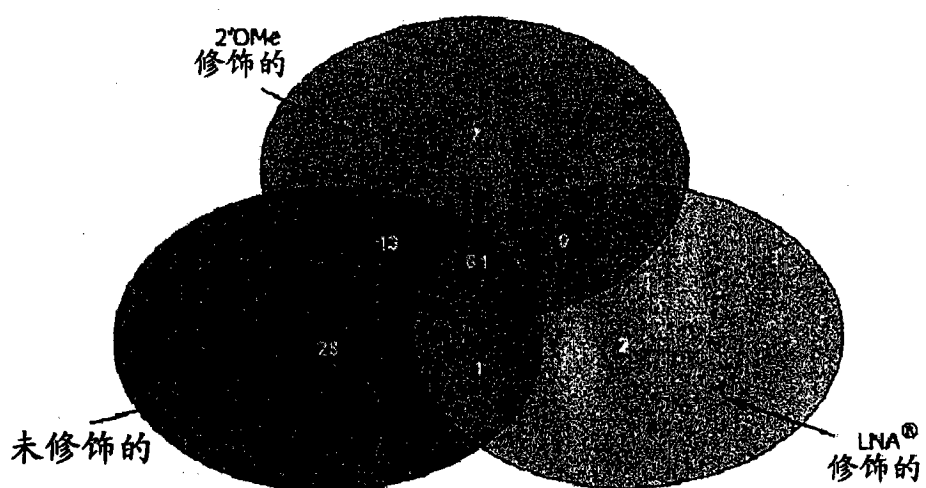


图 9C

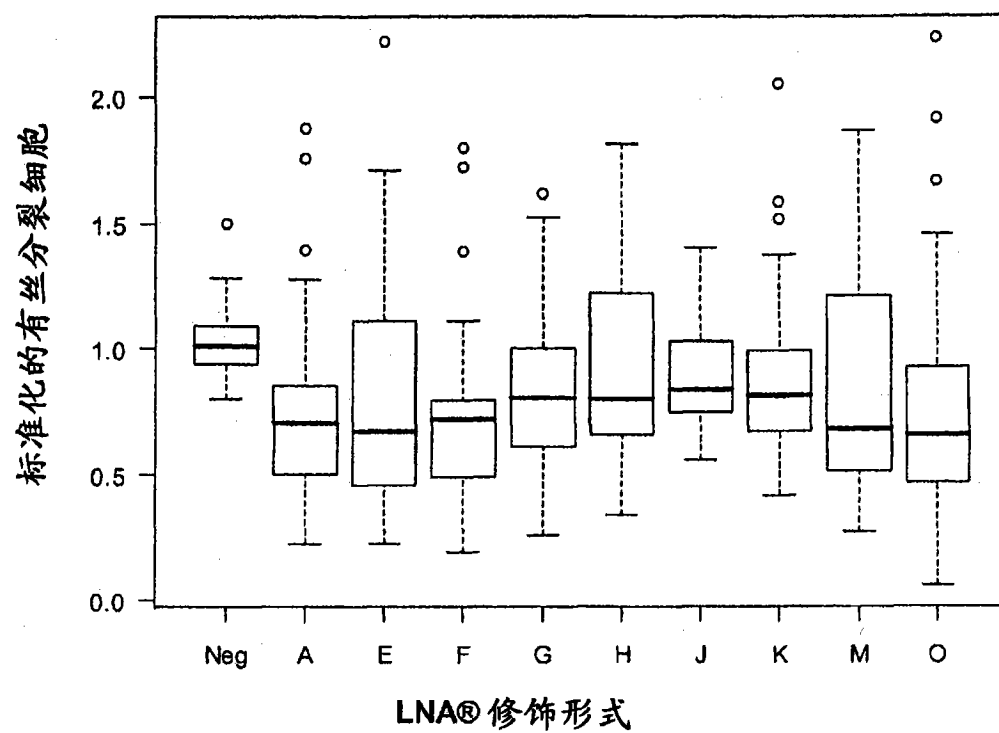


图 10A

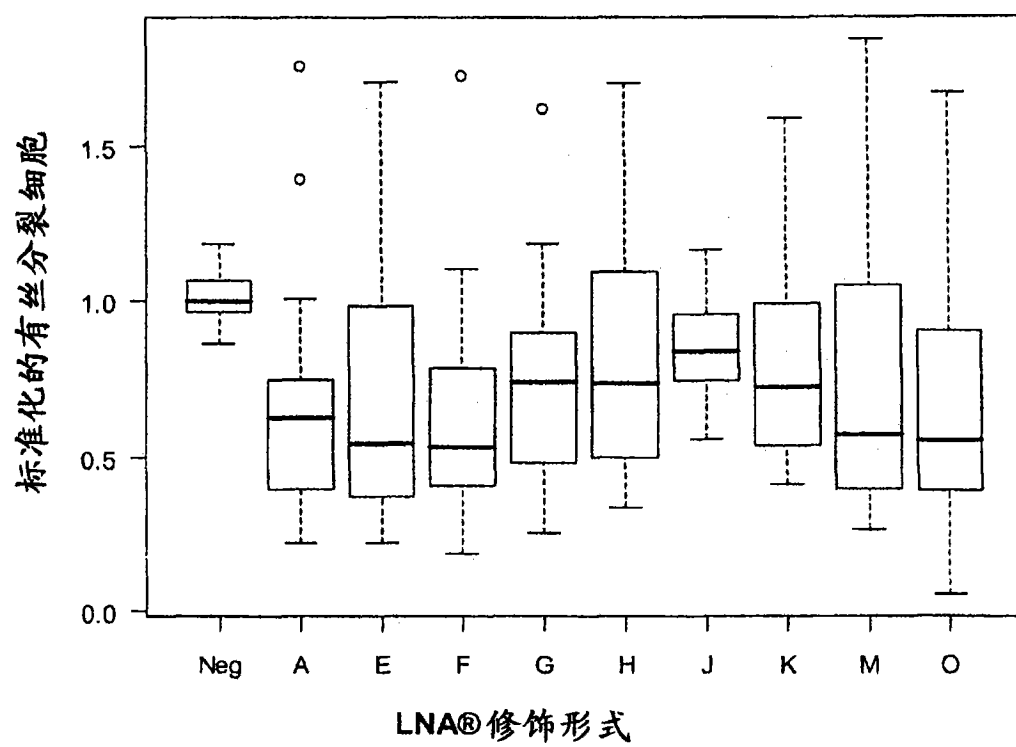


图 10B

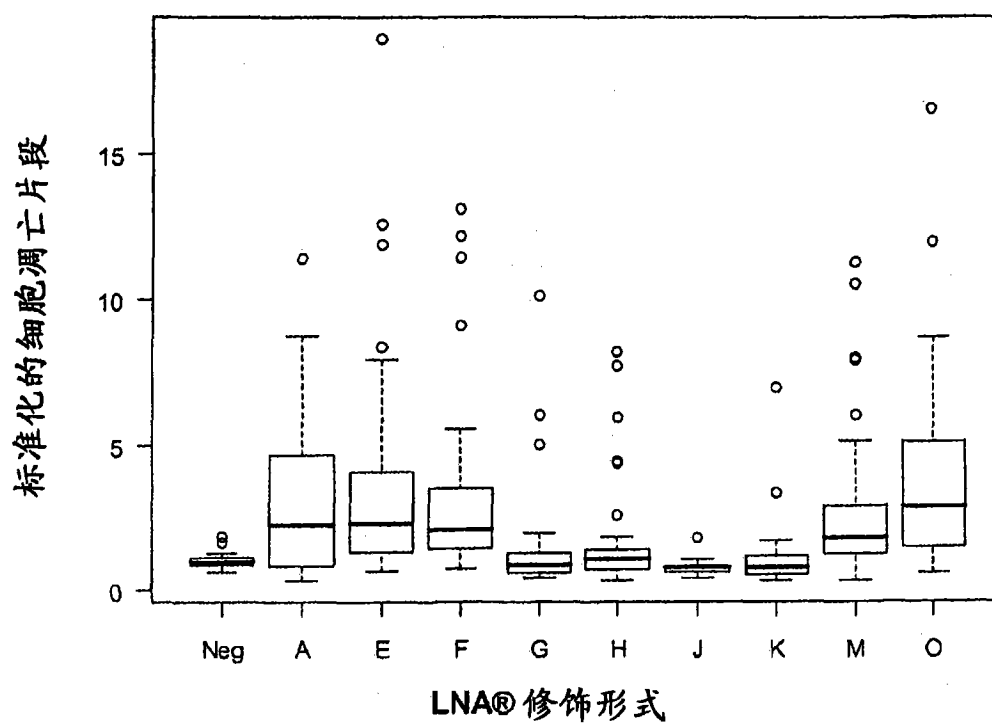


图 10C

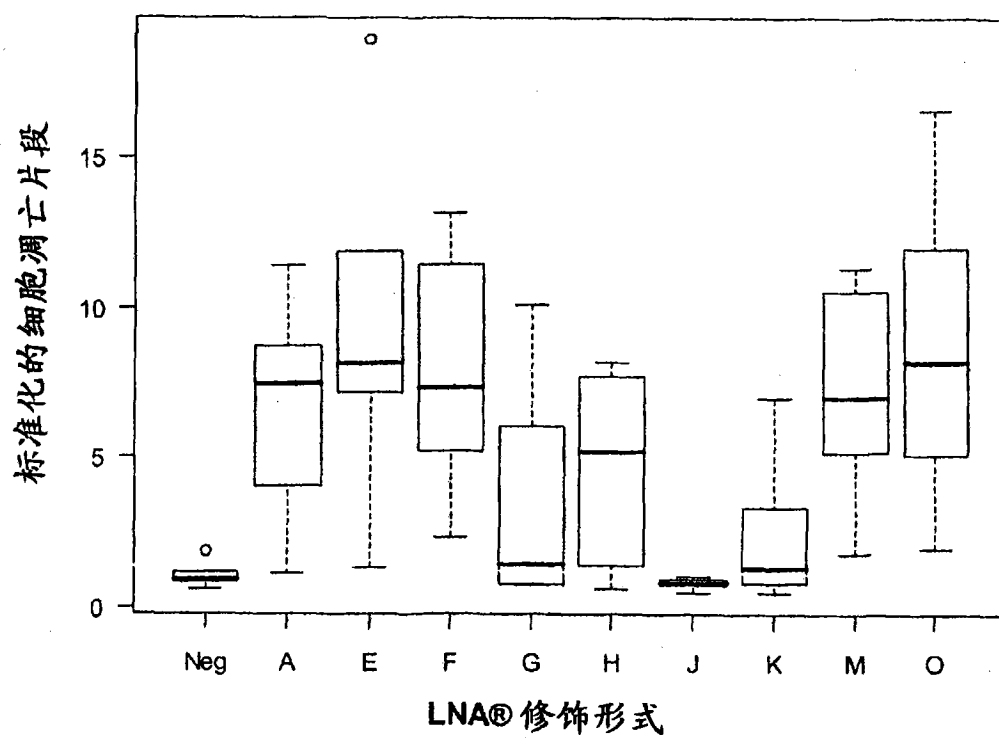


图 10D

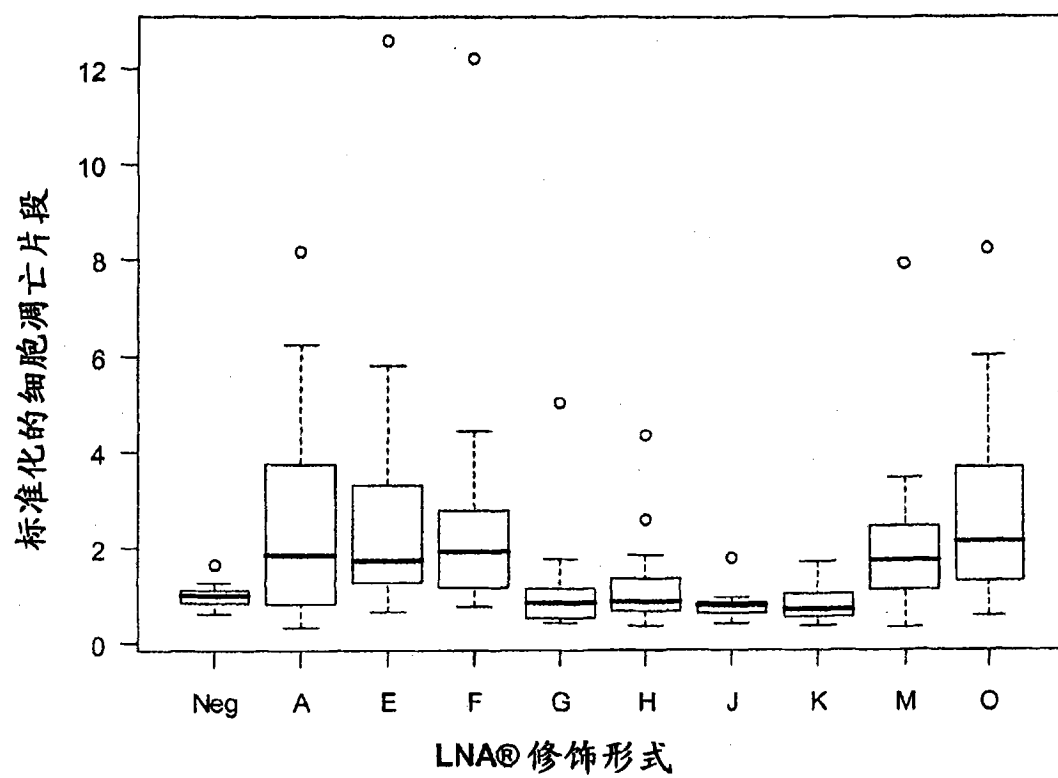


图 10E

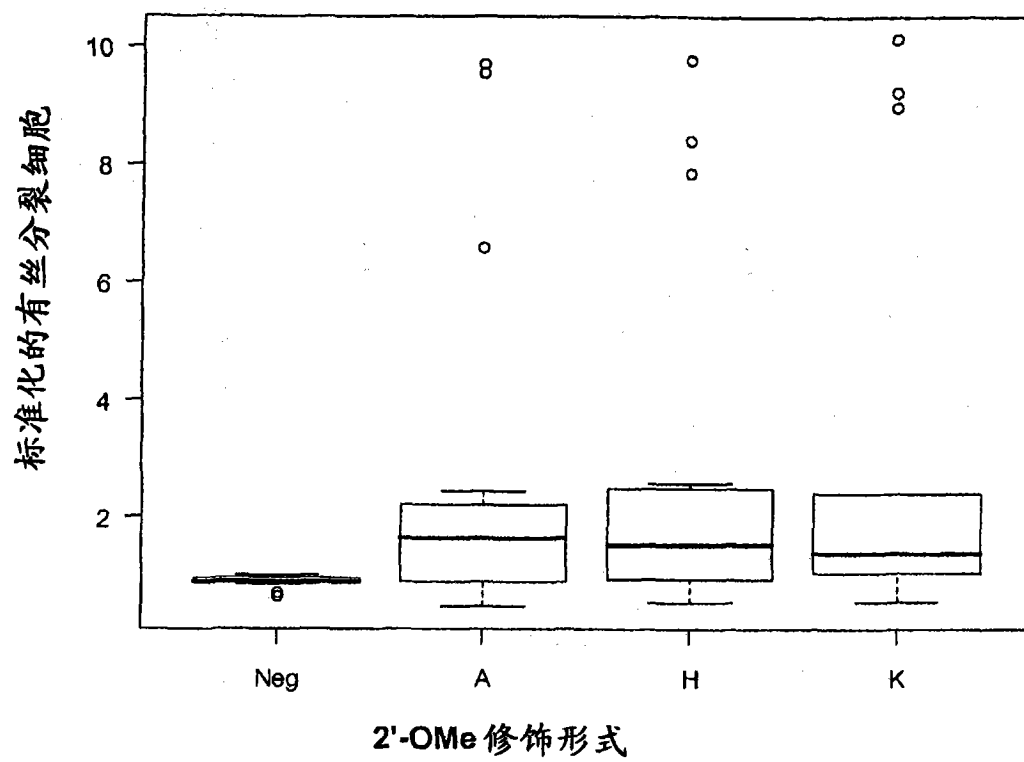


图 11A

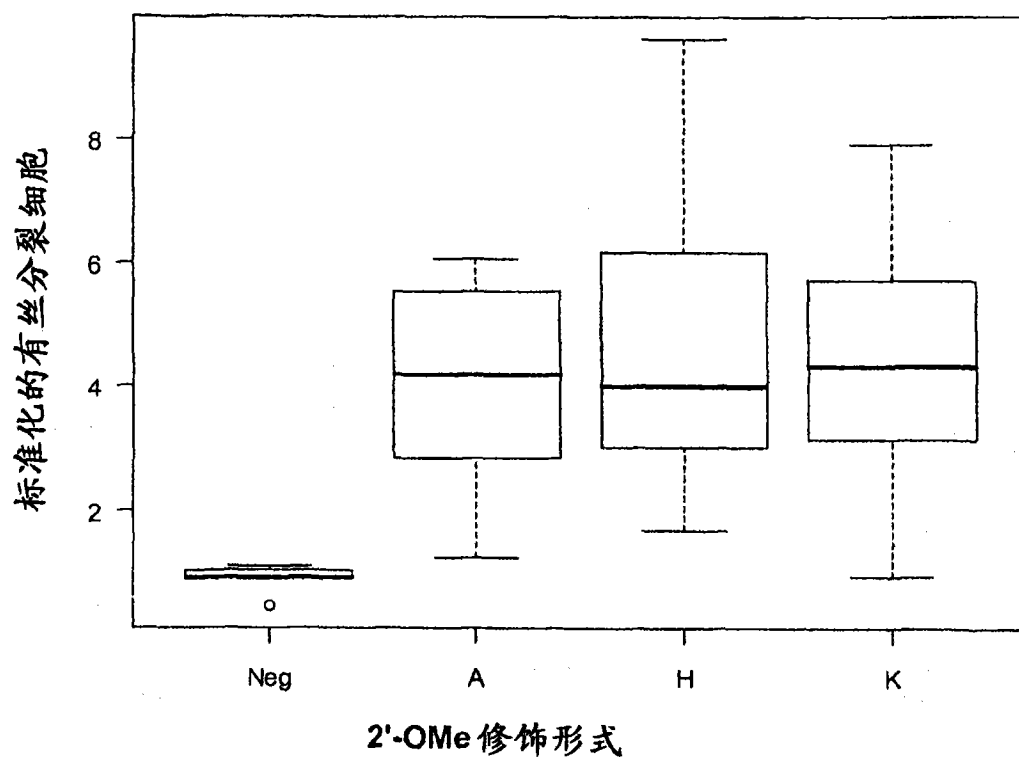


图 11B

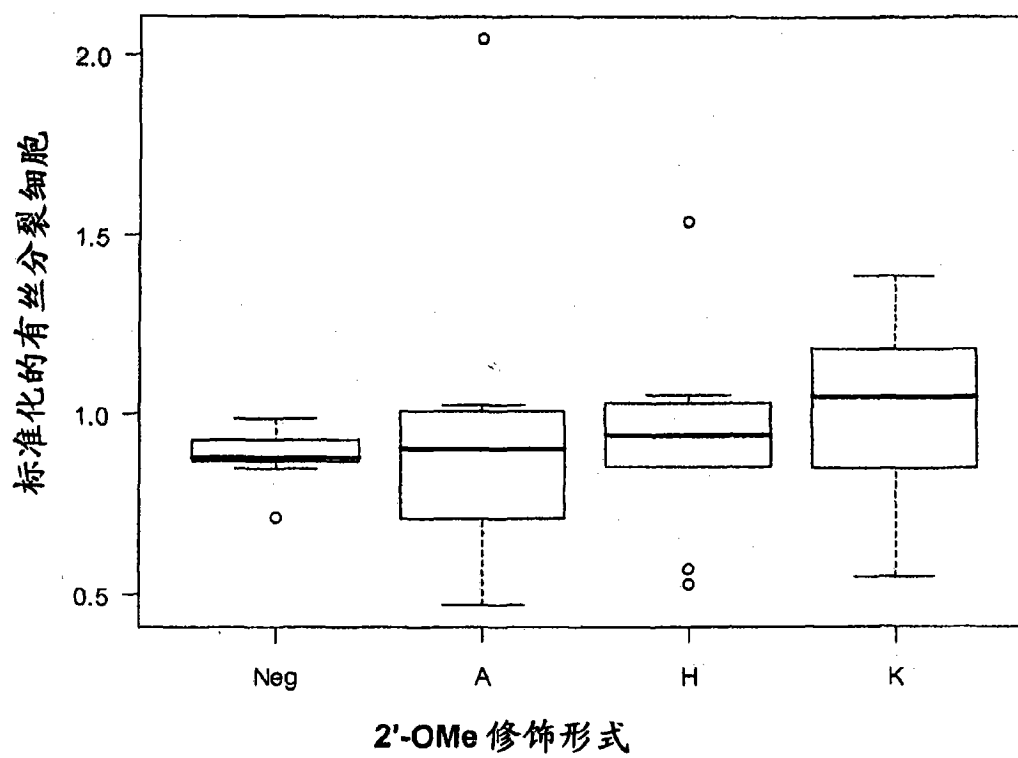


图 11C

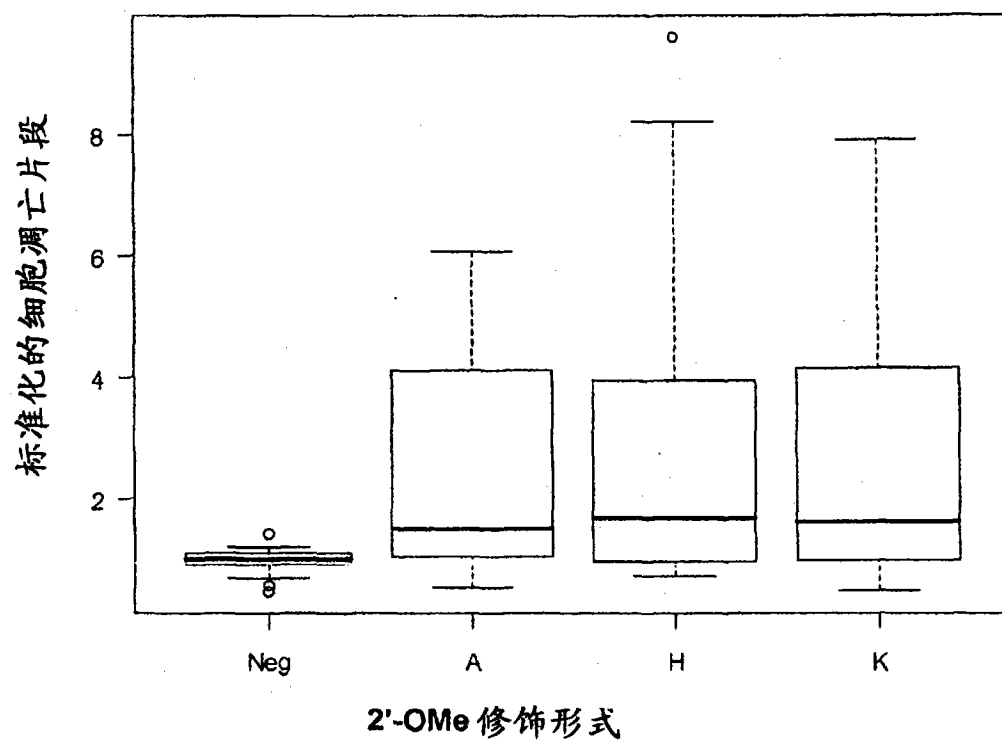


图 11D

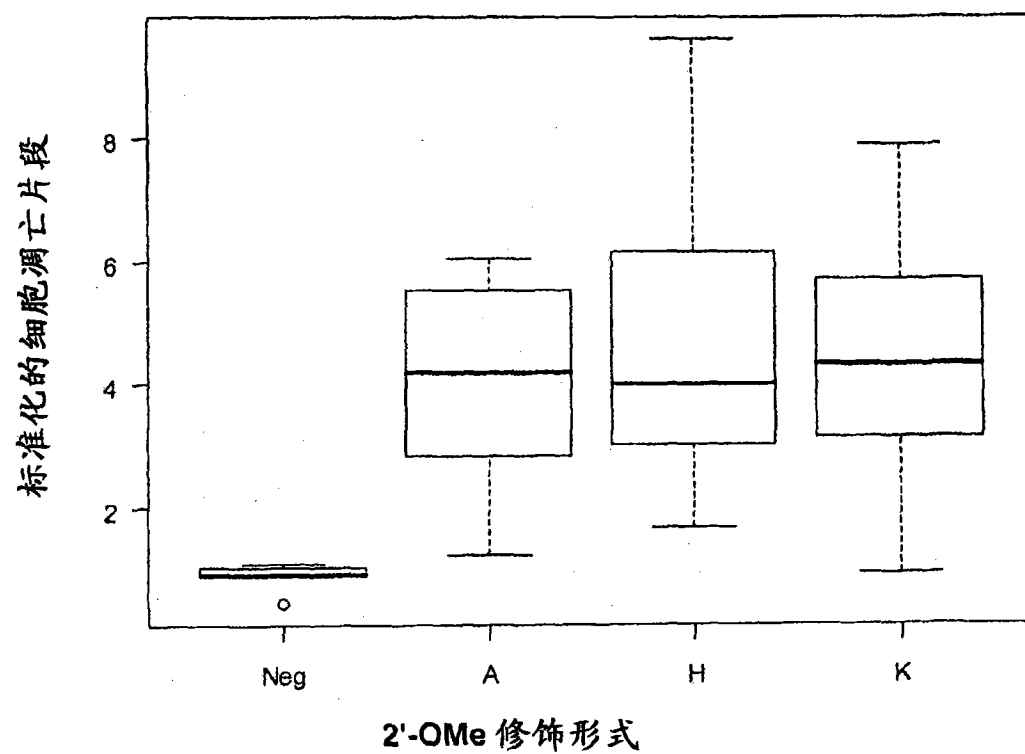


图 11E

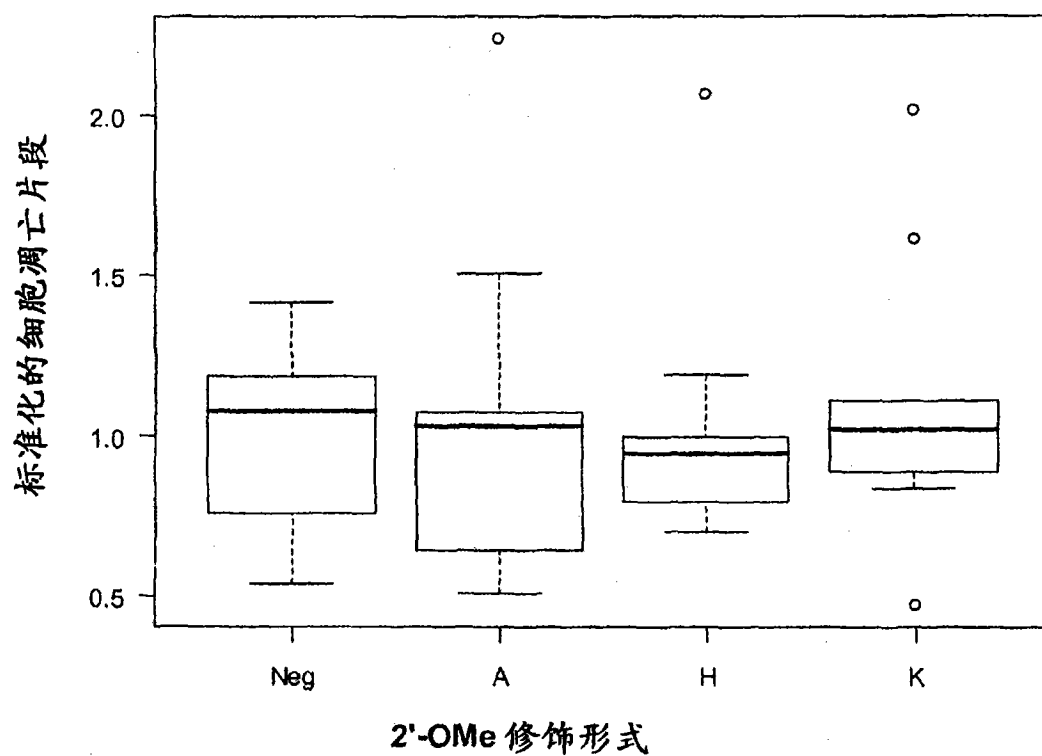


图 11F

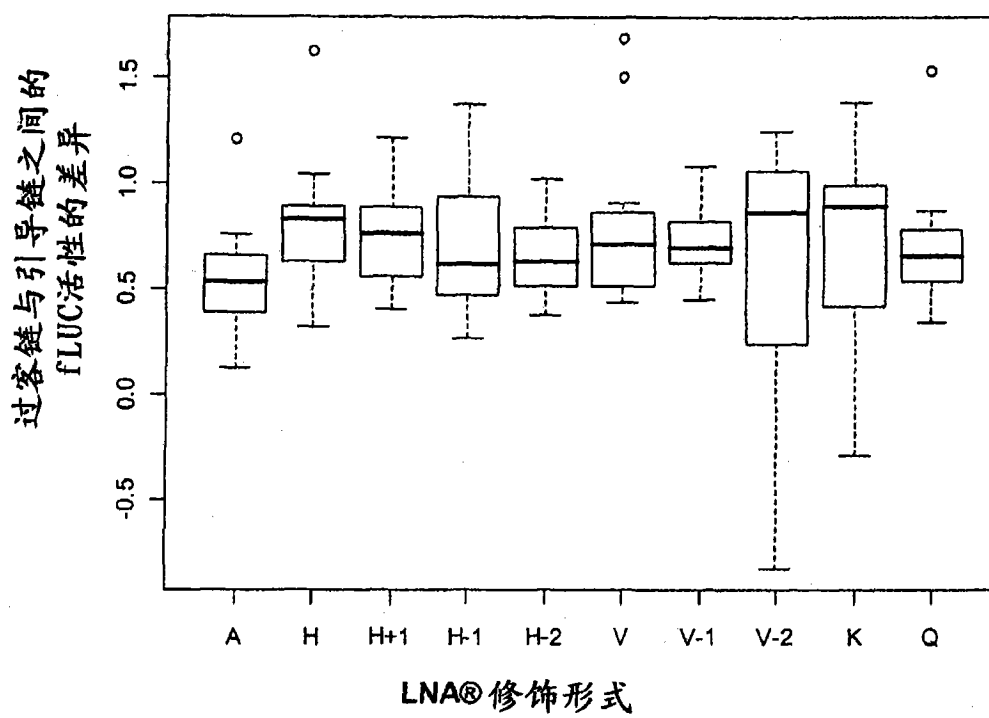


图 12A-1

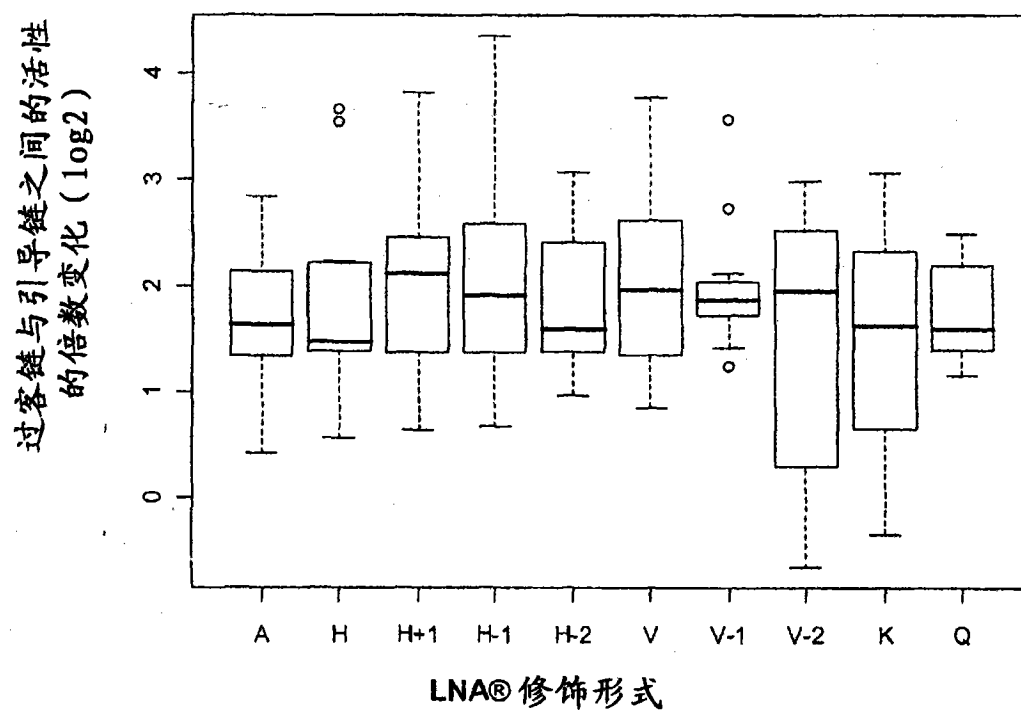


图 12A-2

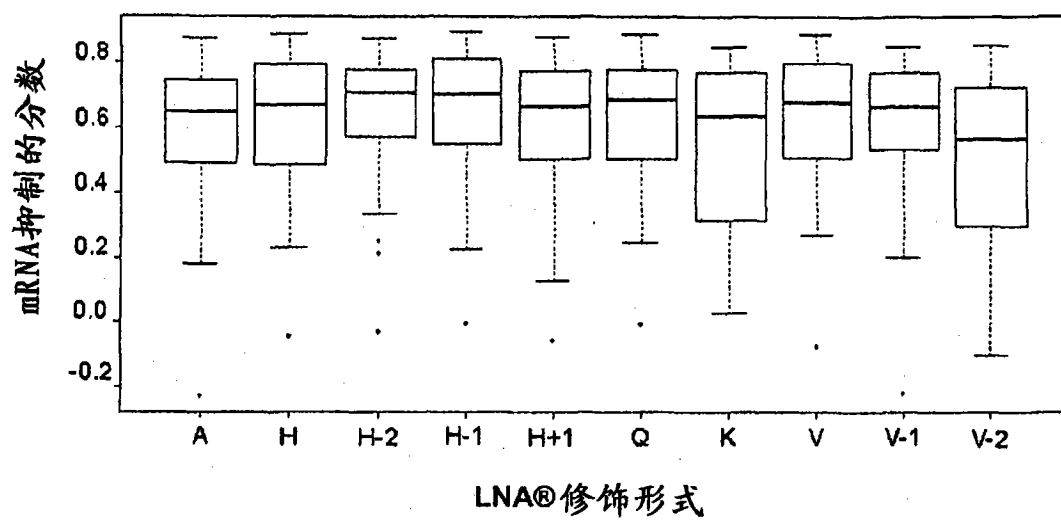


图 12B

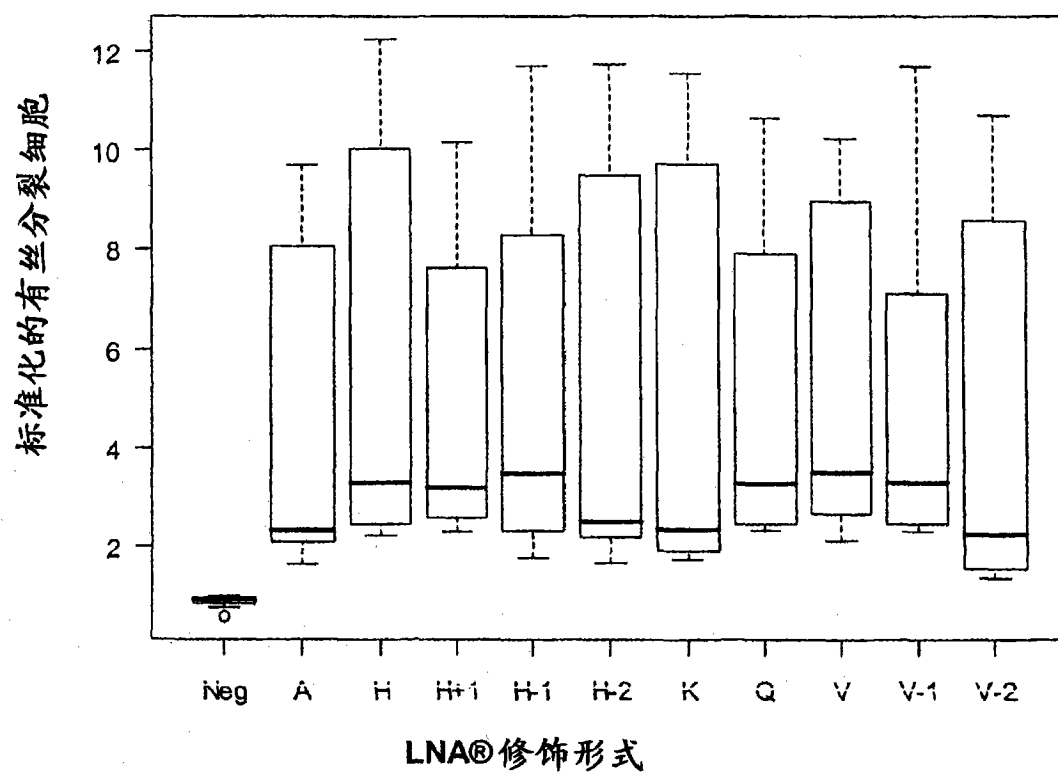


图 12C

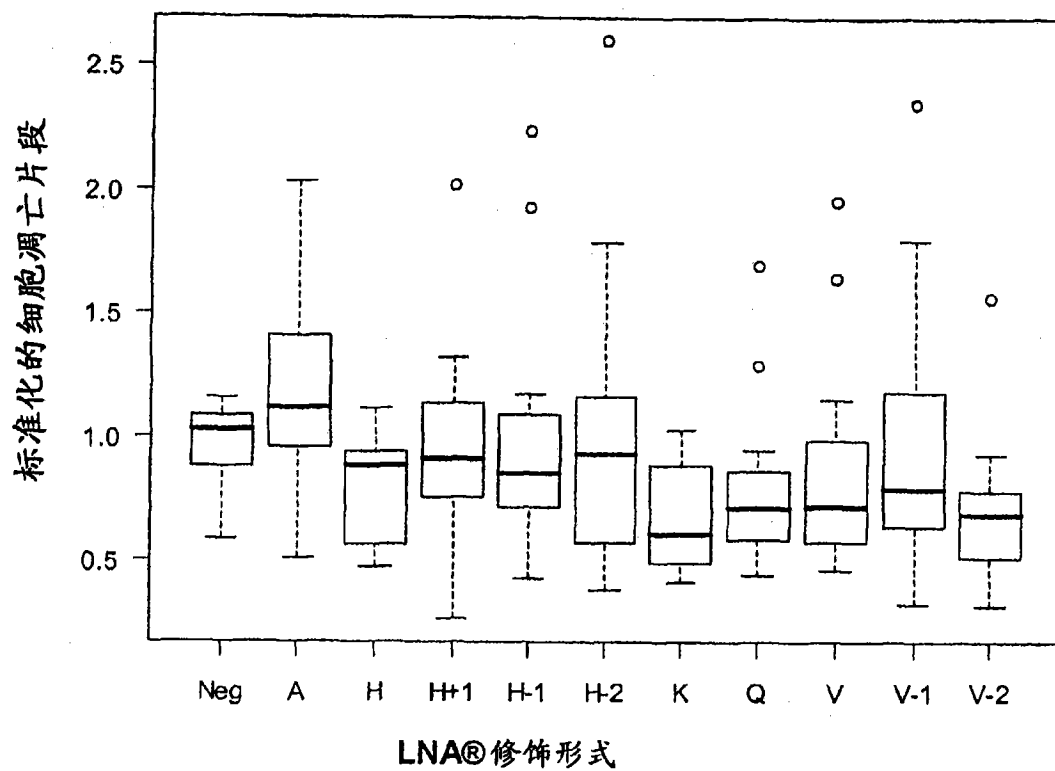


图 12D

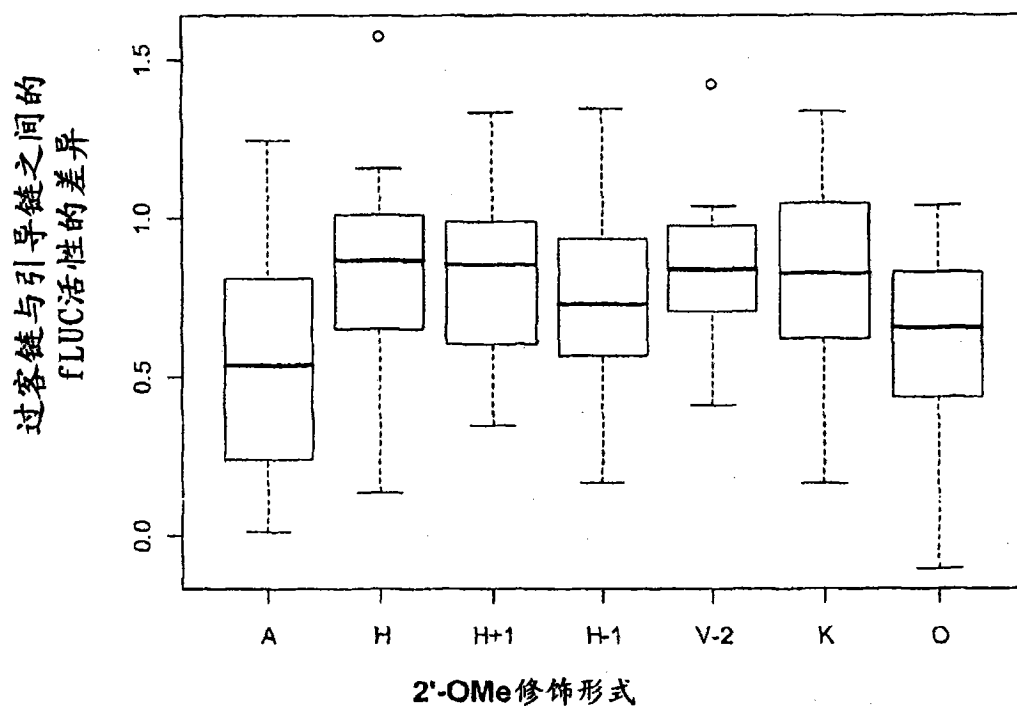


图 13A-1

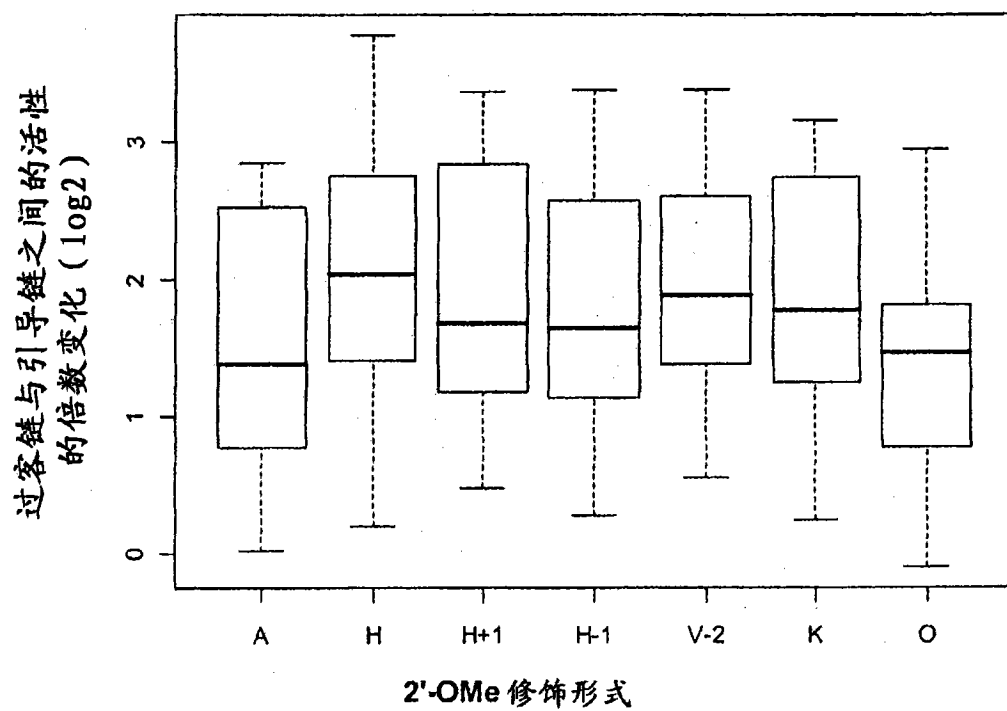


图 13A-2

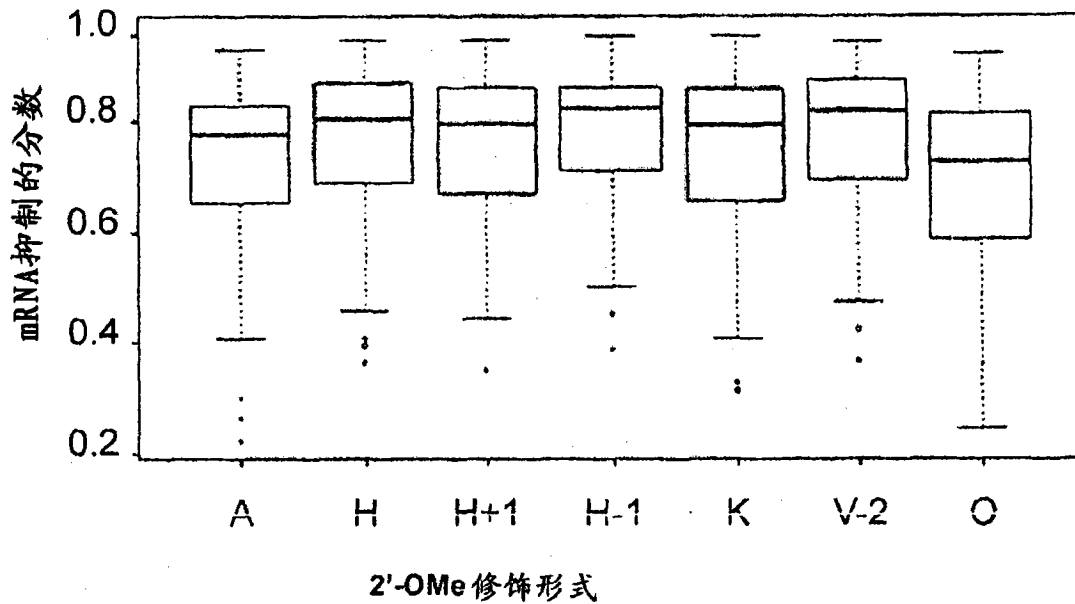


图 13B

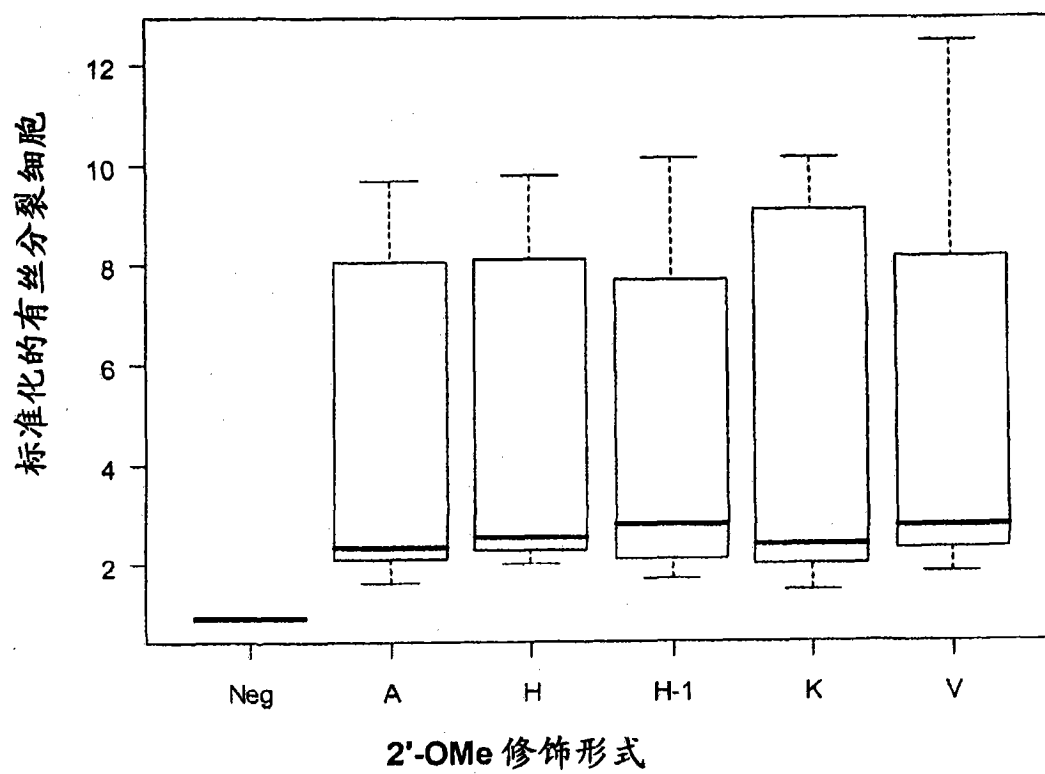


图 13C

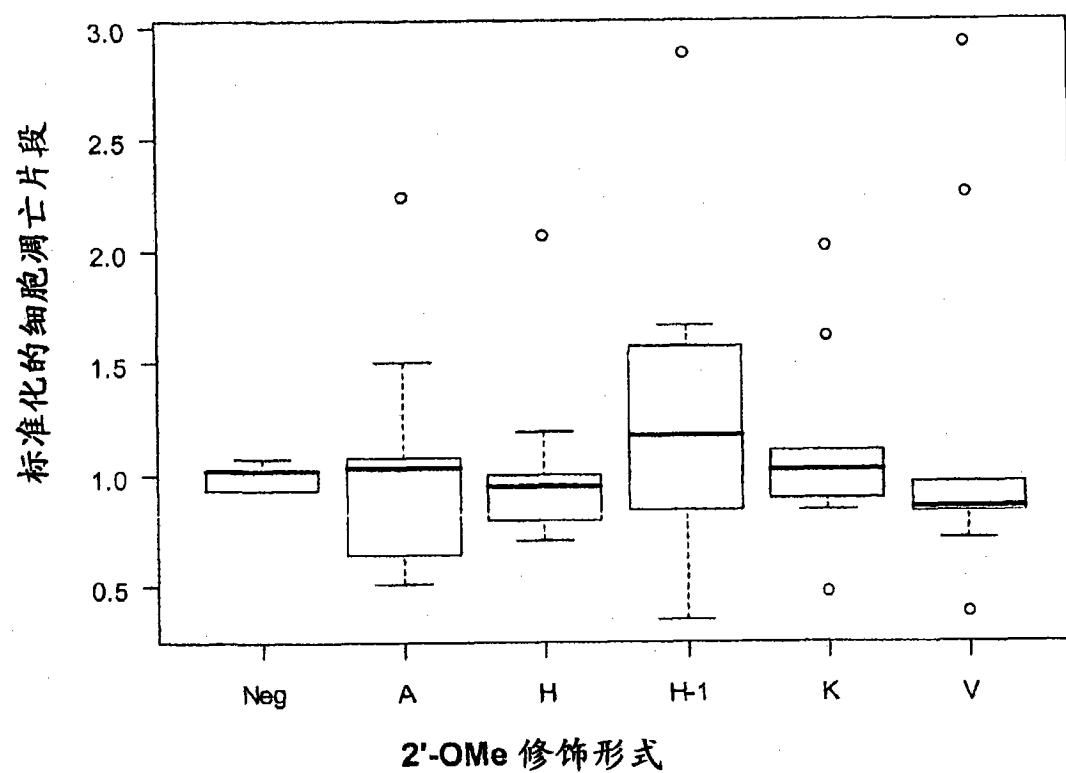


图 13D

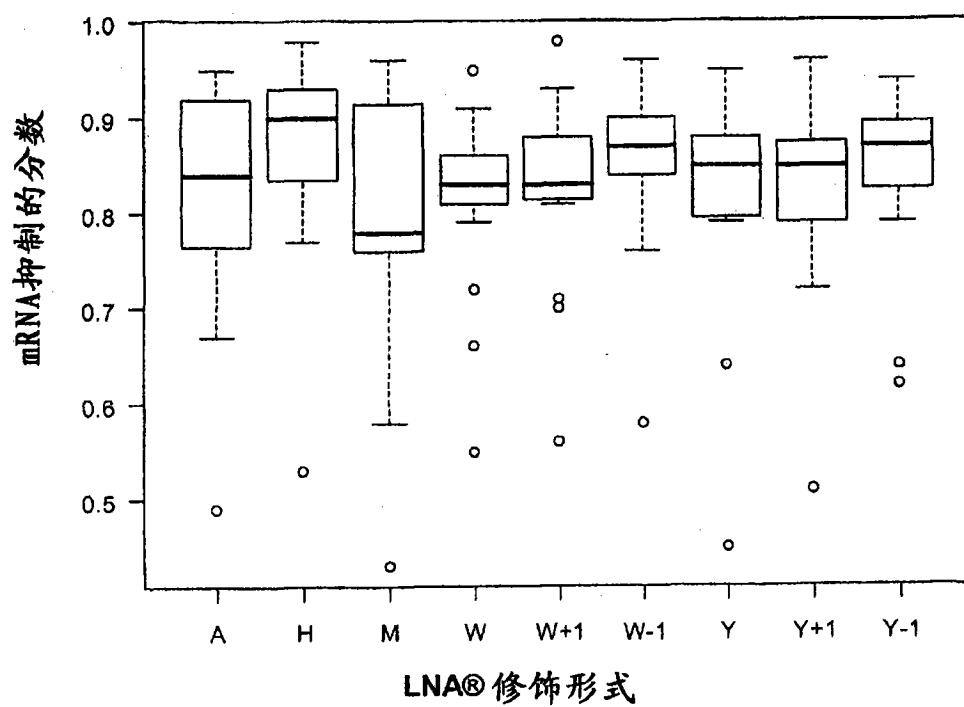


图 14A

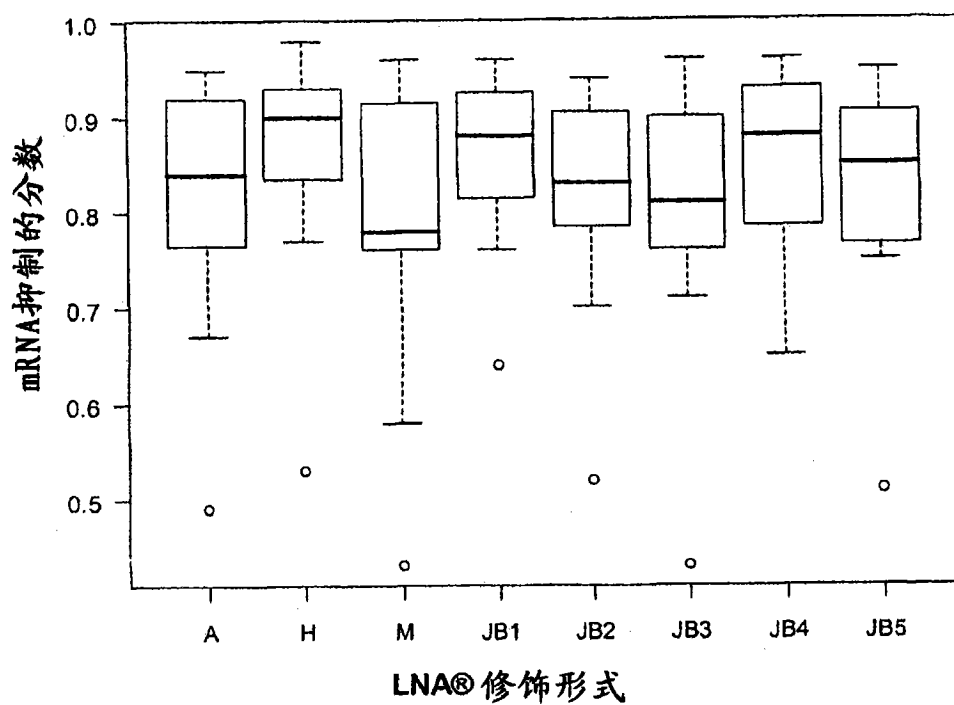


图 14B

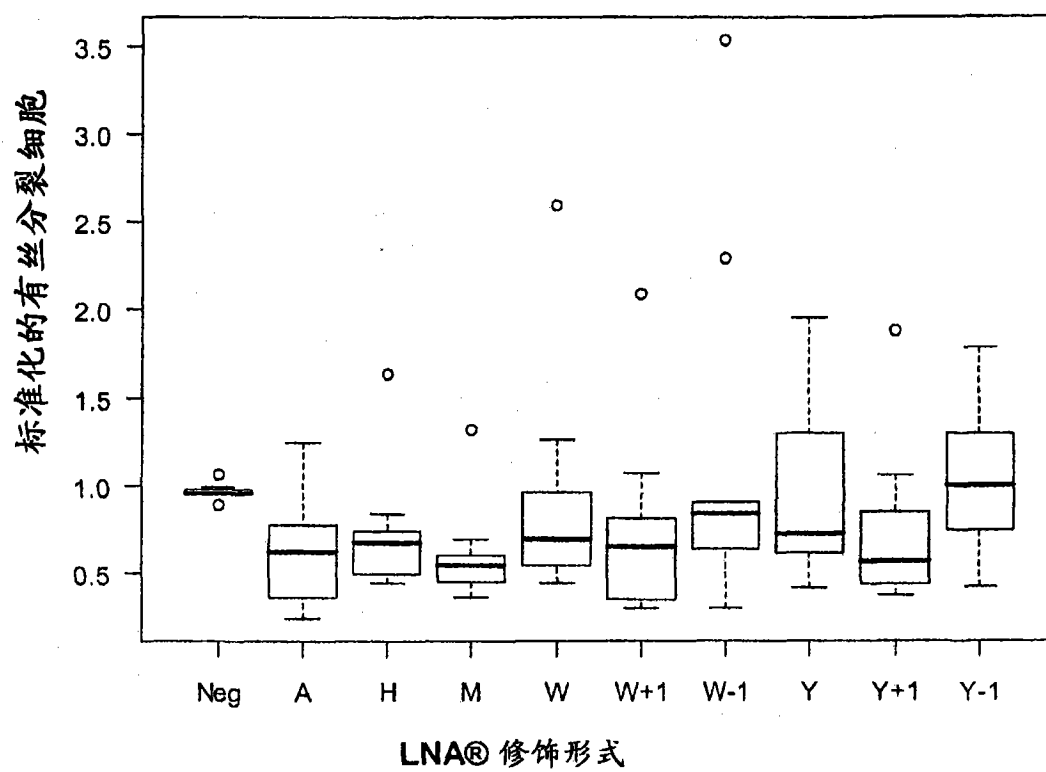


图 15A

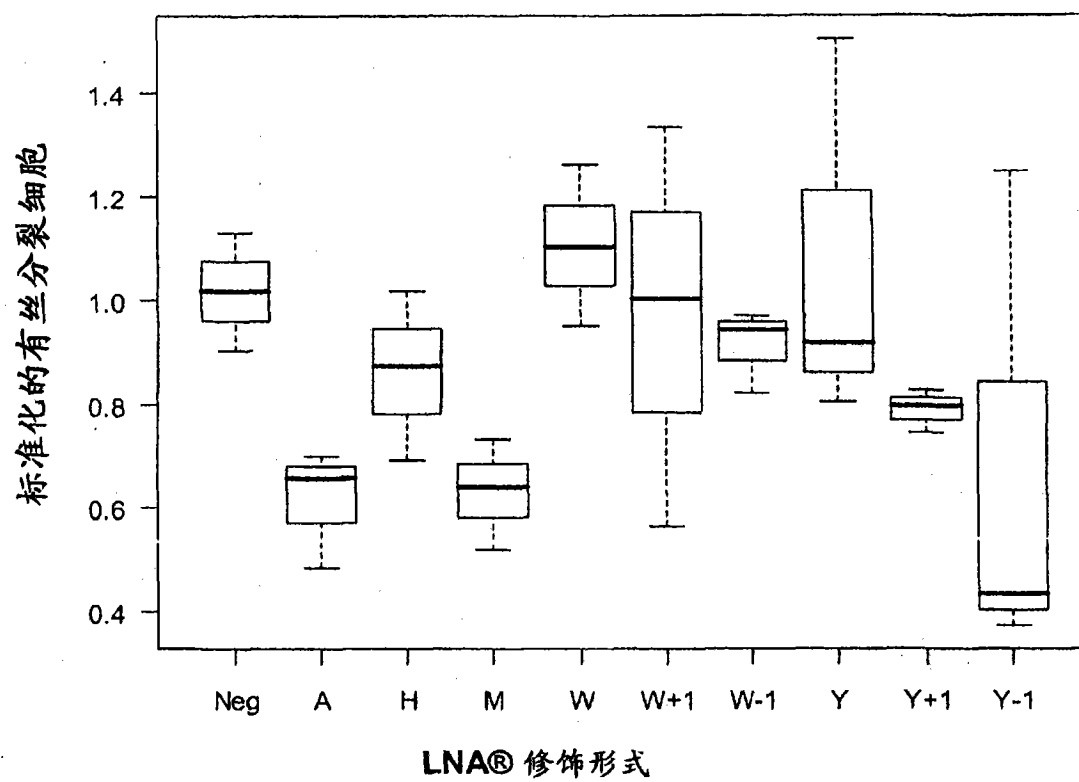


图 15B

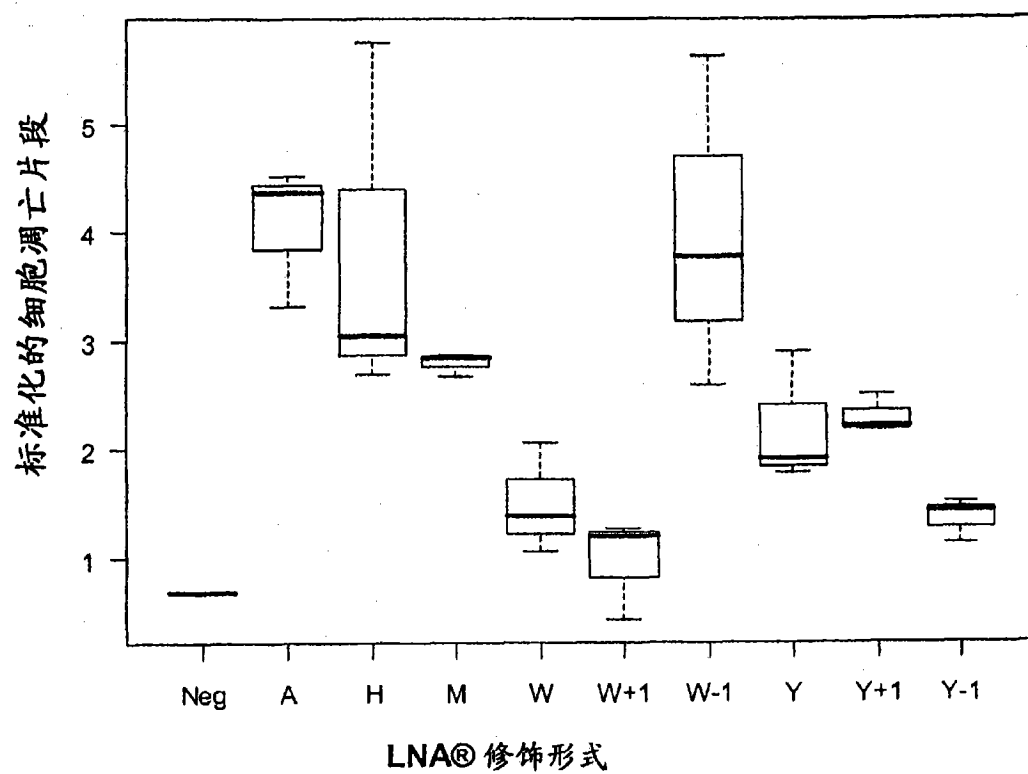


图 15C

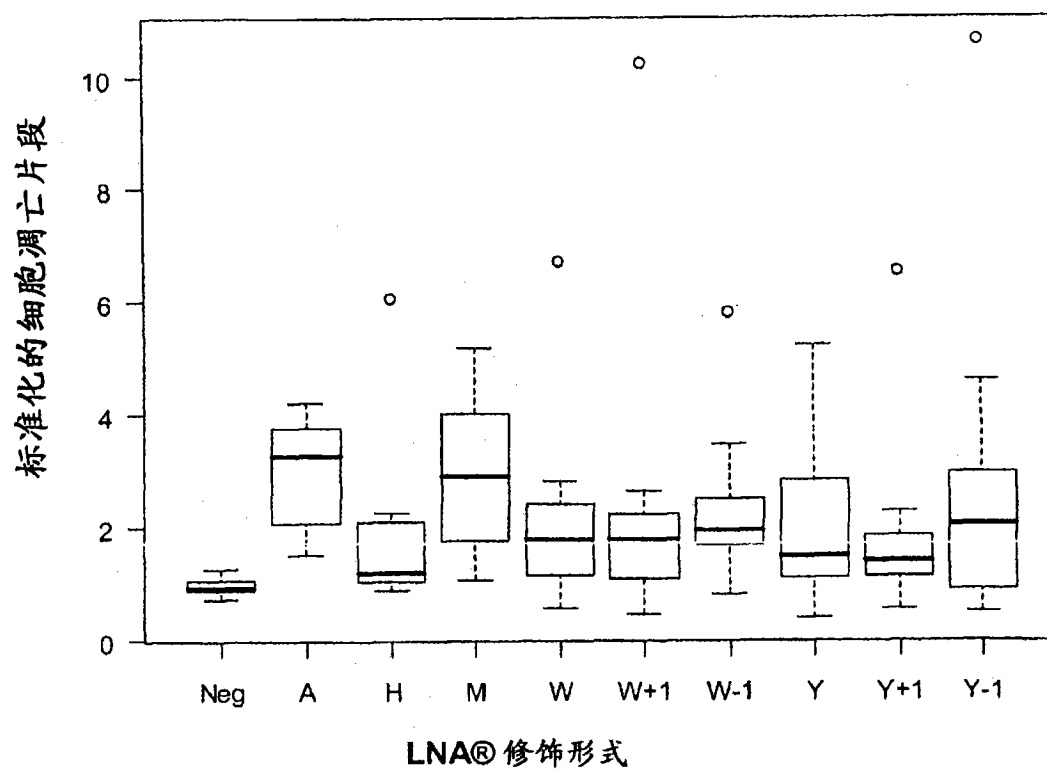


图 15D

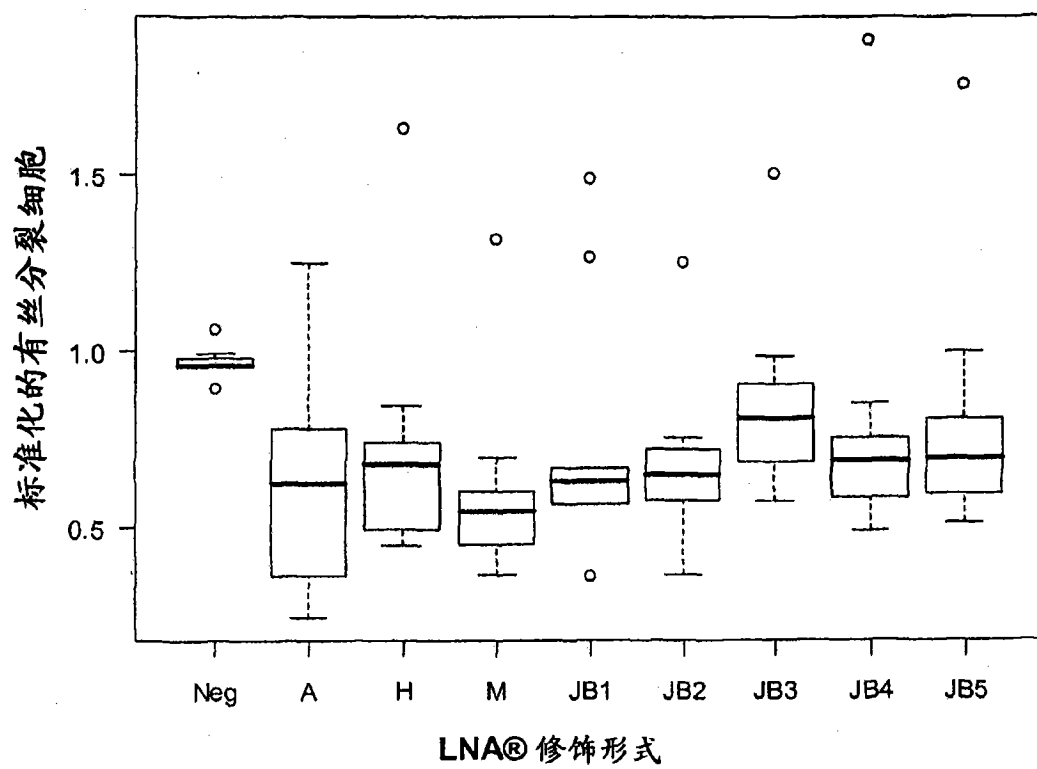


图 16A

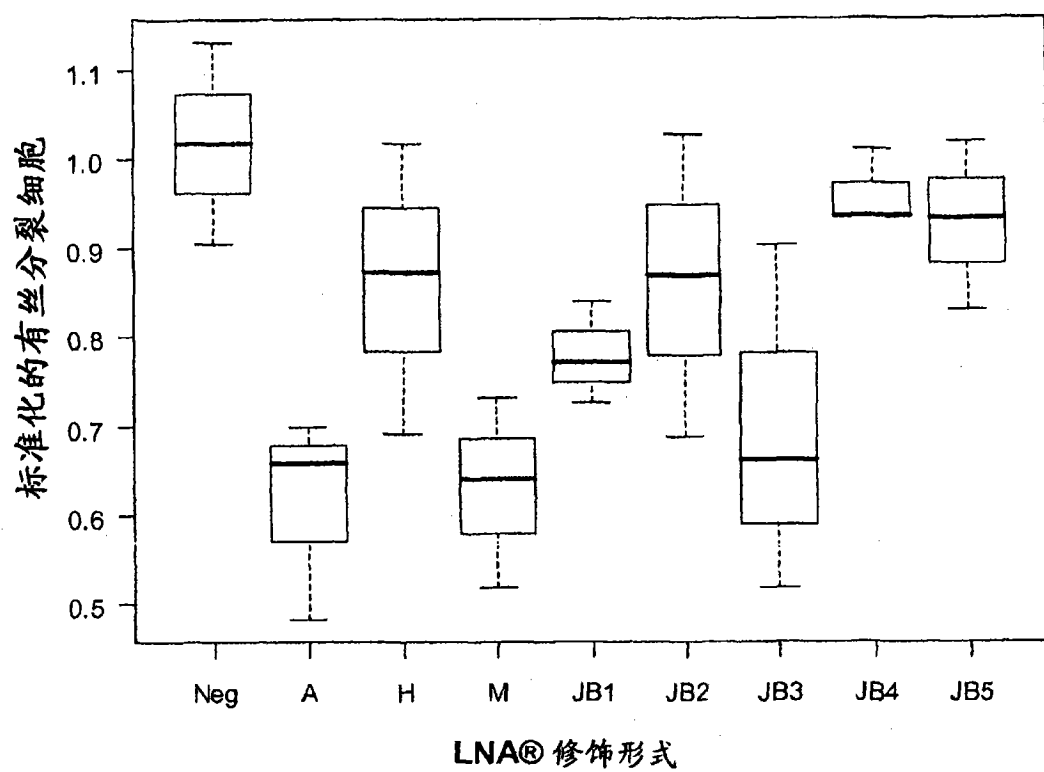


图 16B

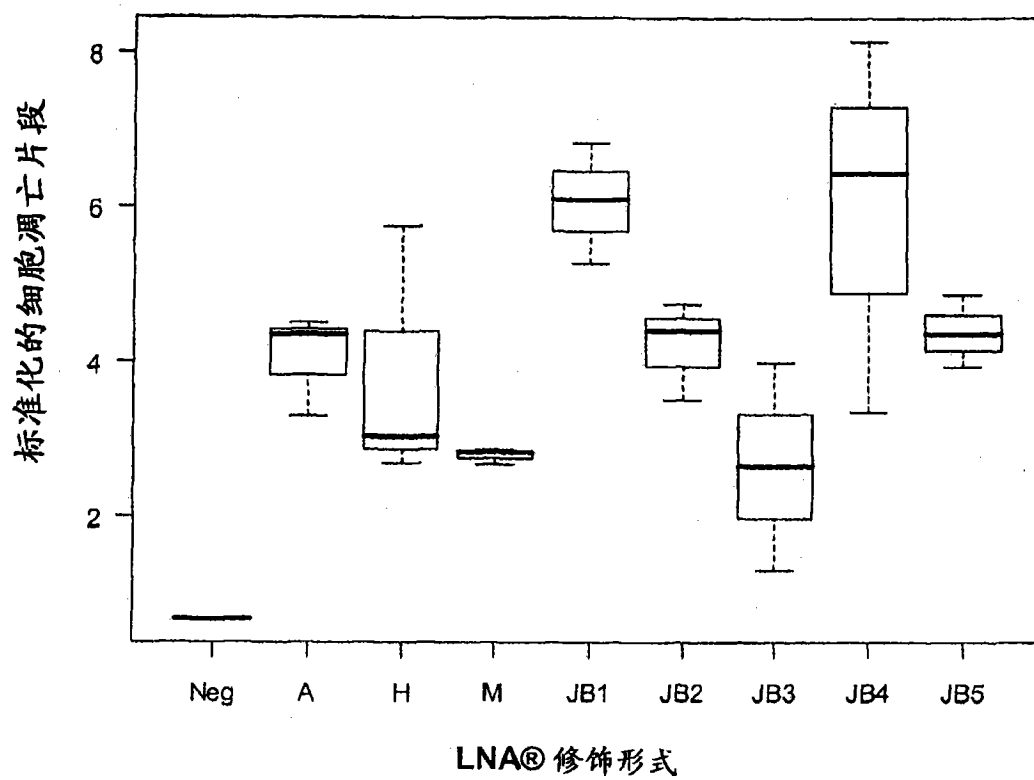


图 16C

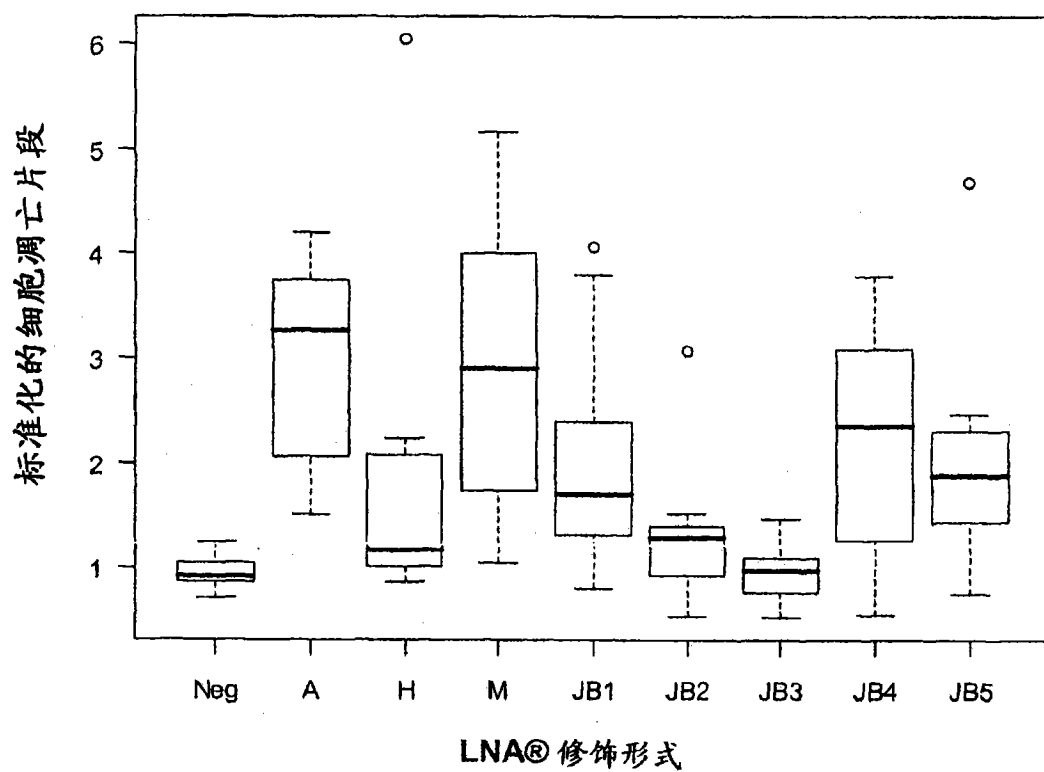


图 16D

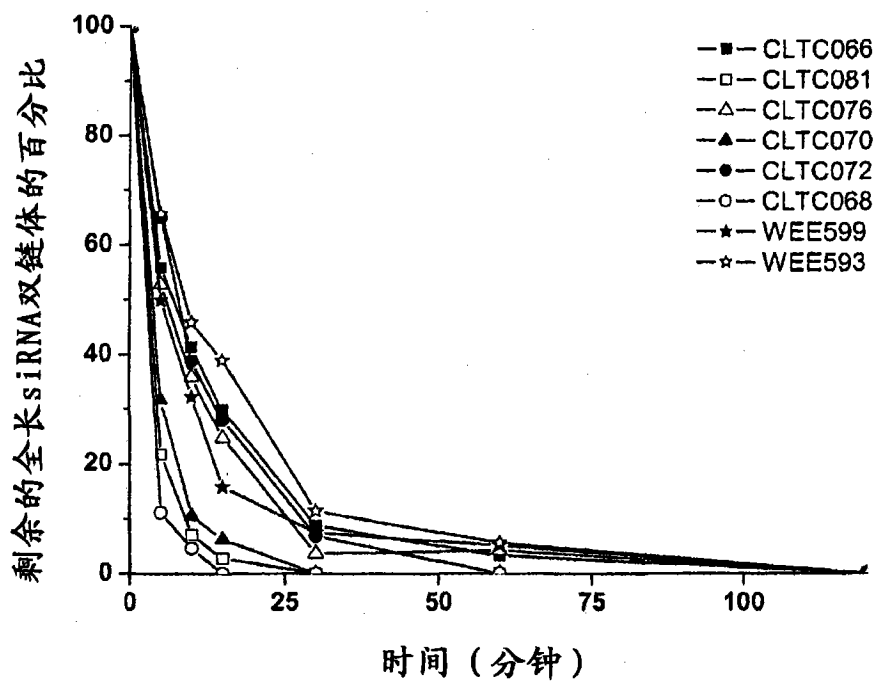


图 17

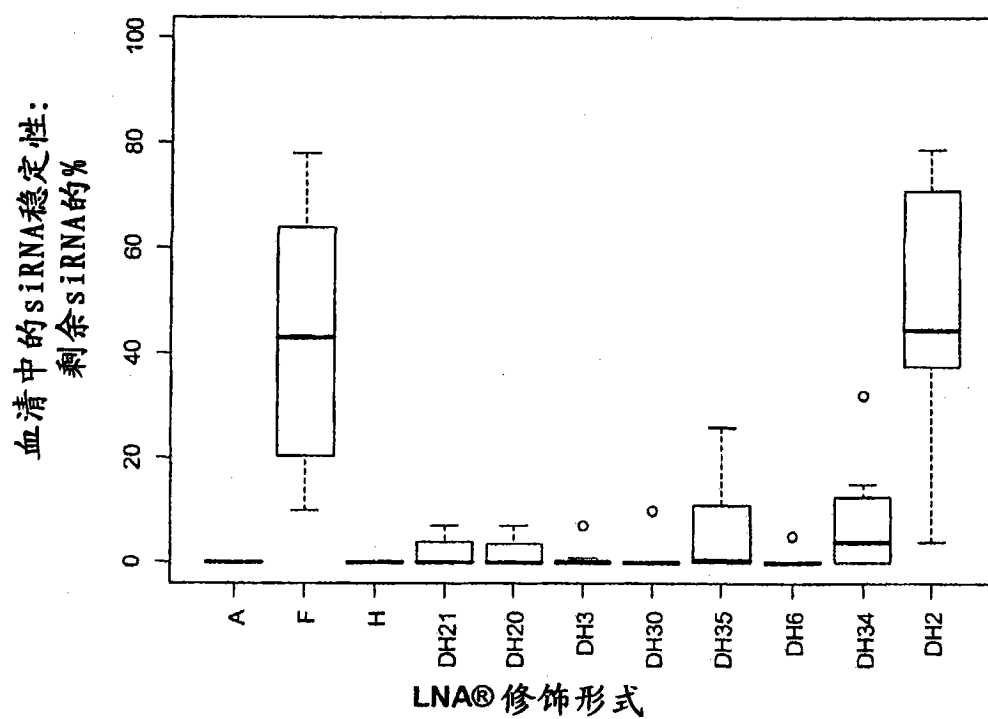


图 18A

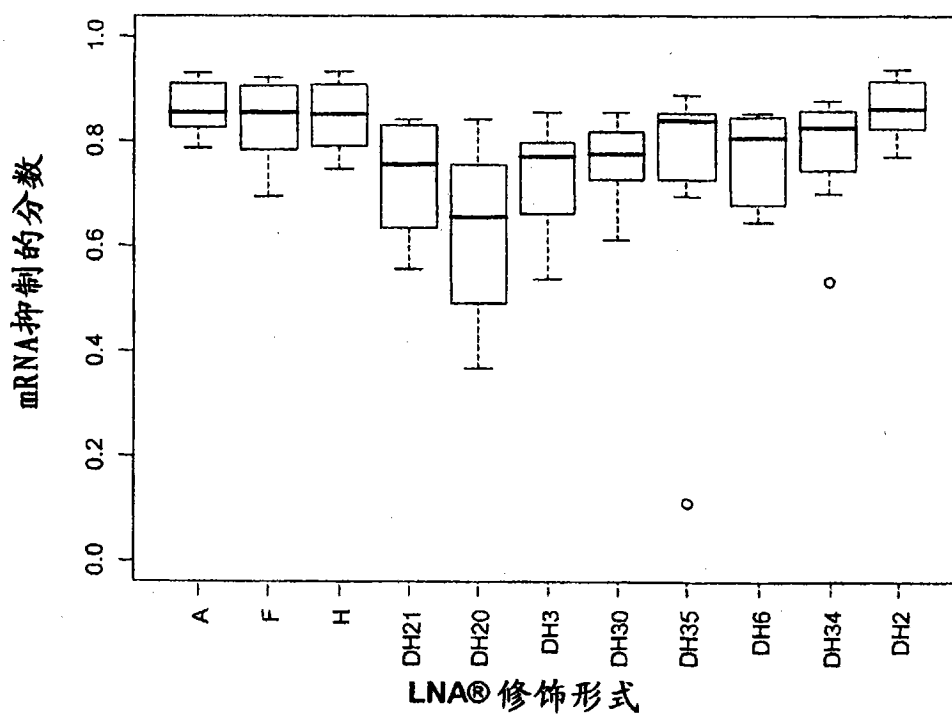


图 18B

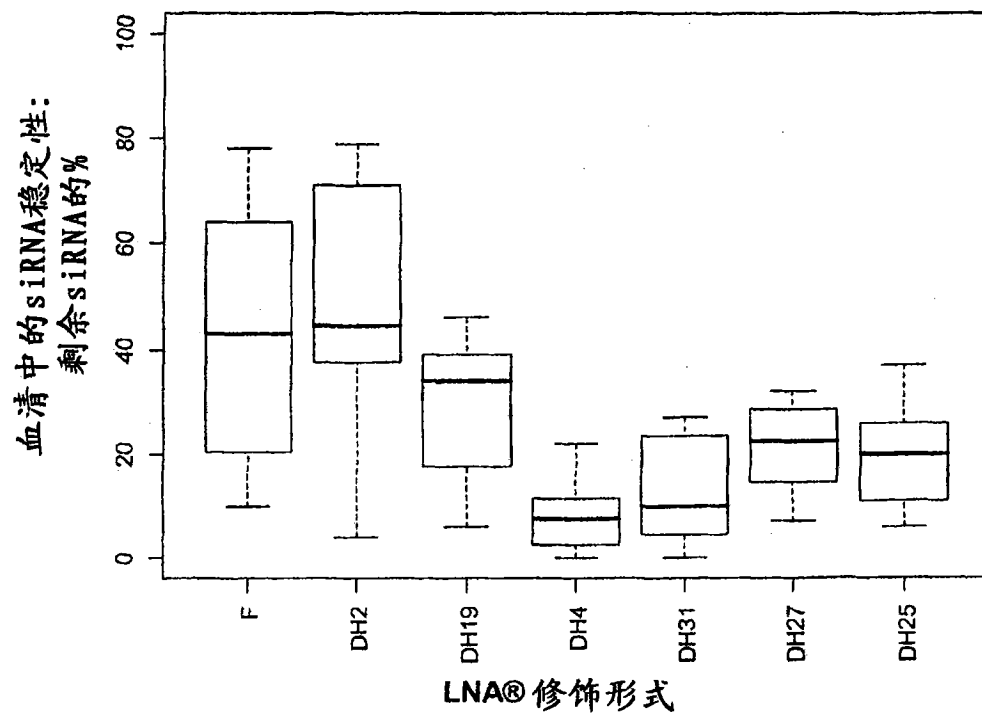


图 19A

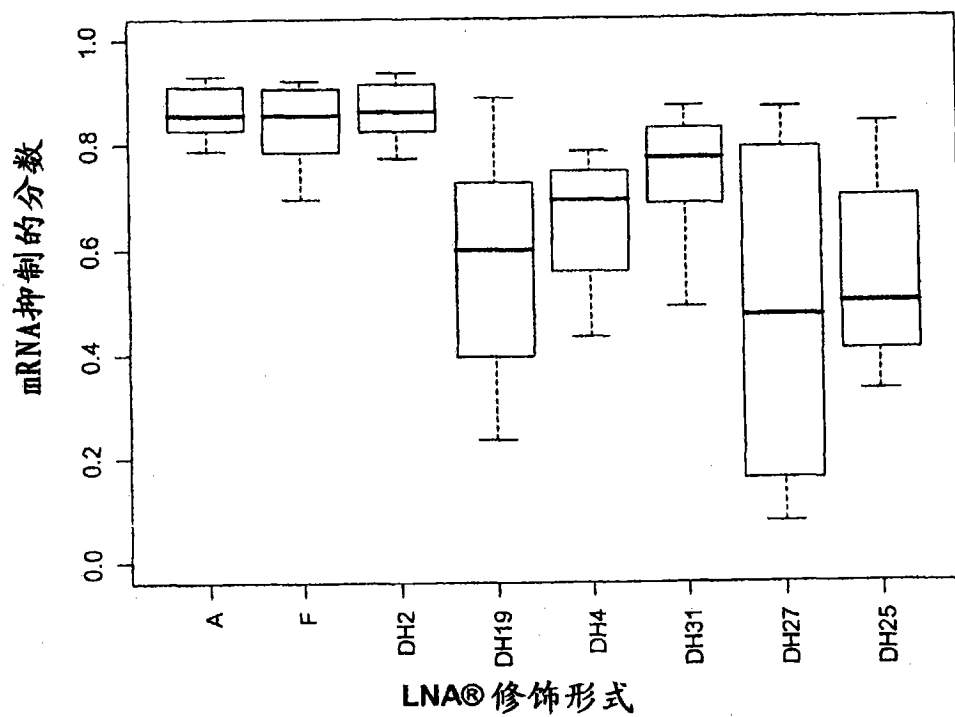


图 19B

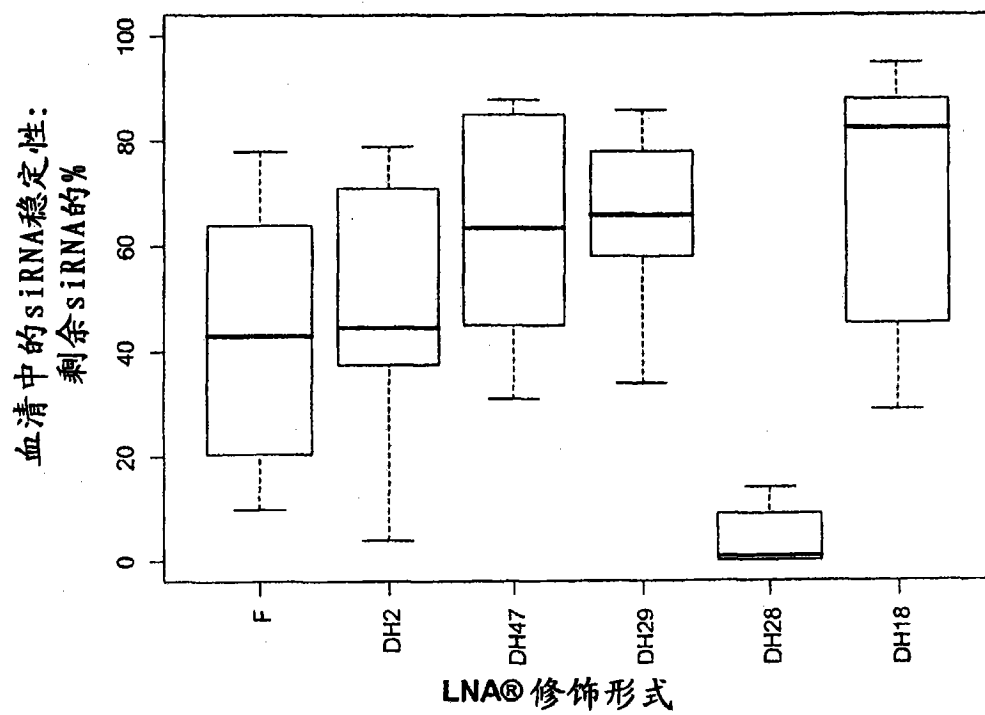


图 20A

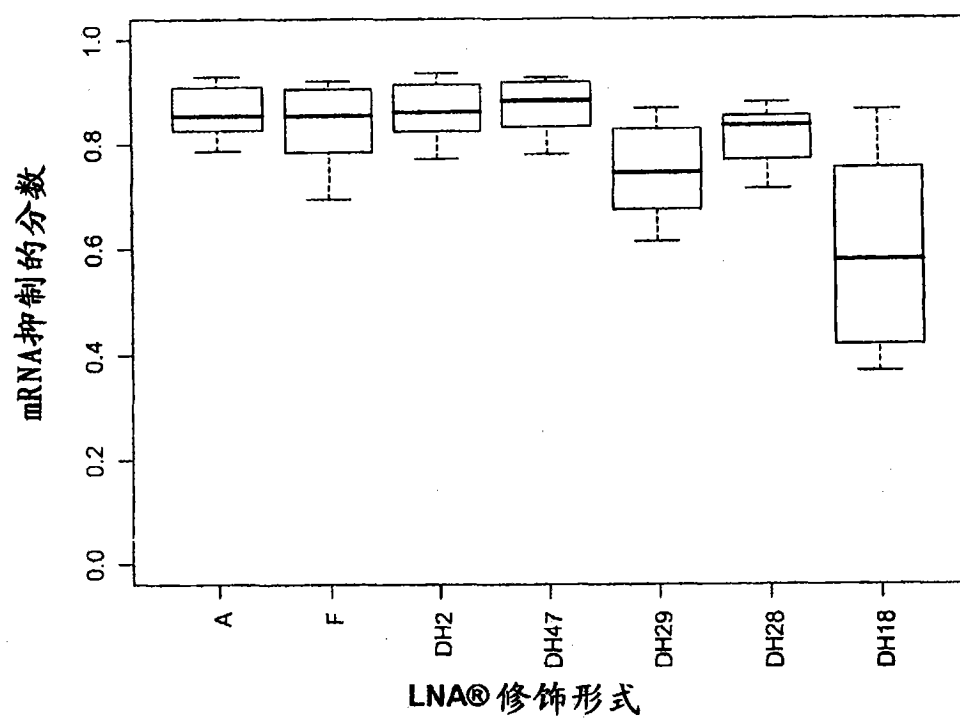


图 20B

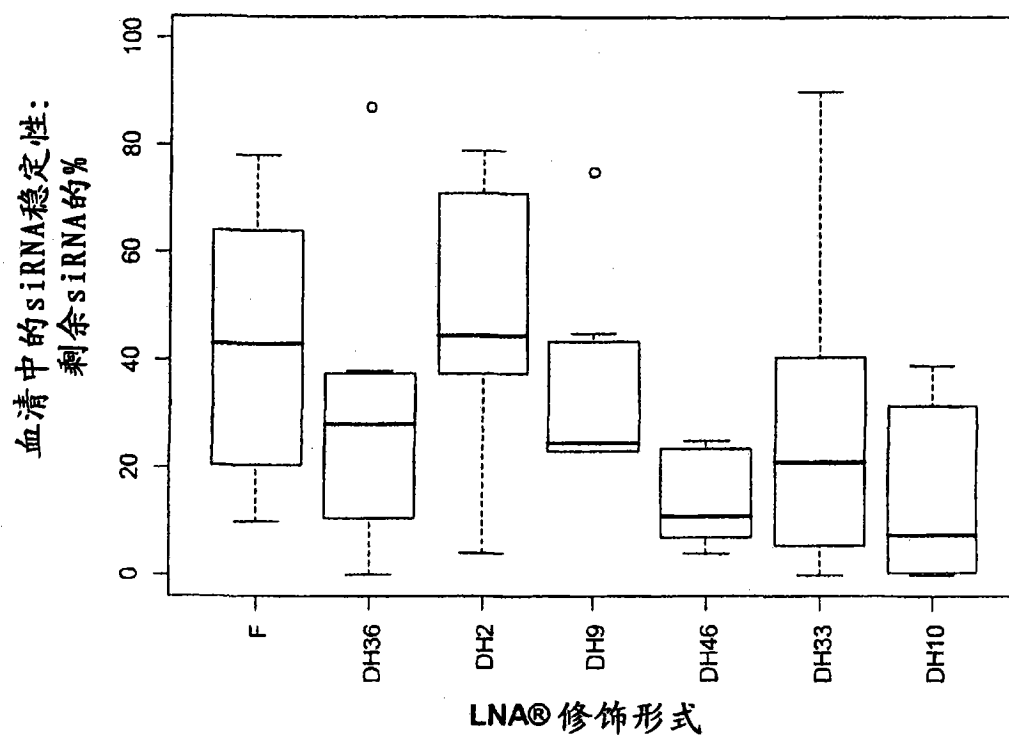


图 21A

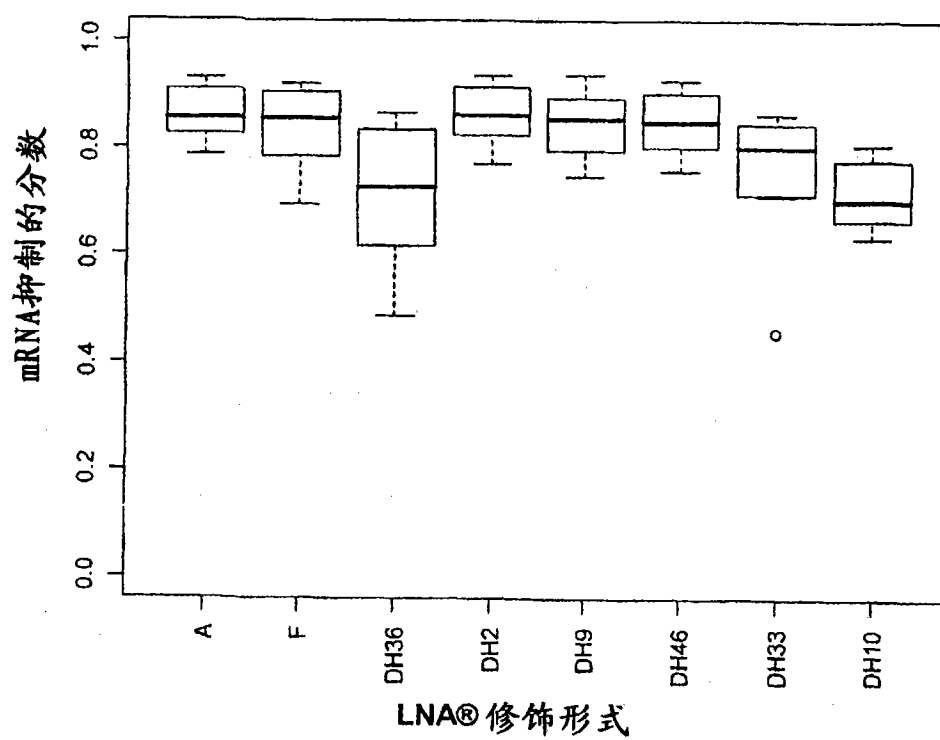


图 21B

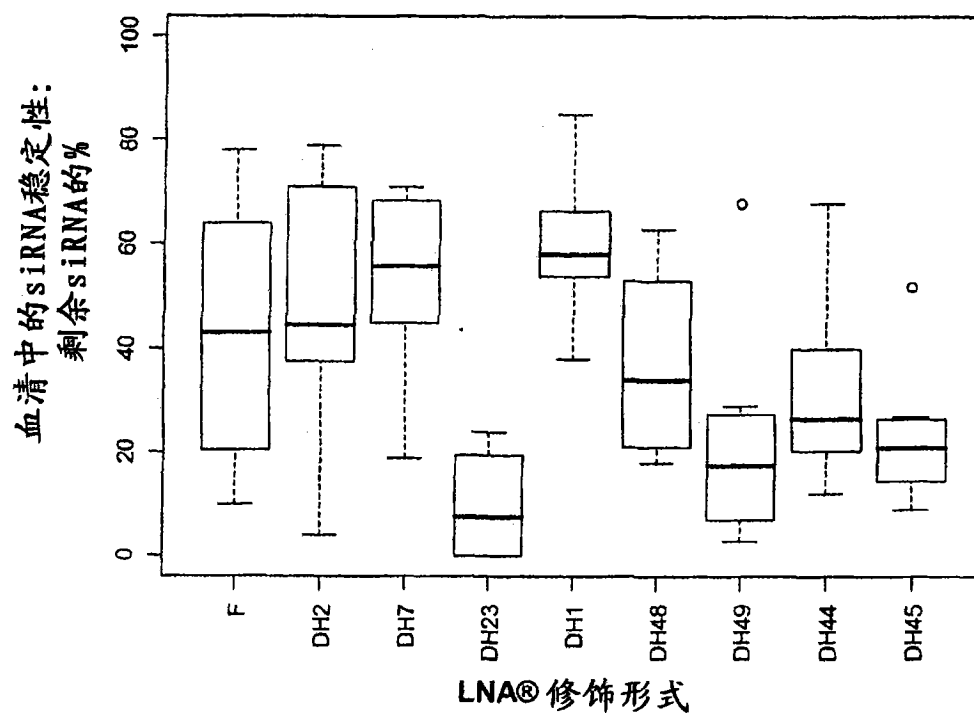


图 22A

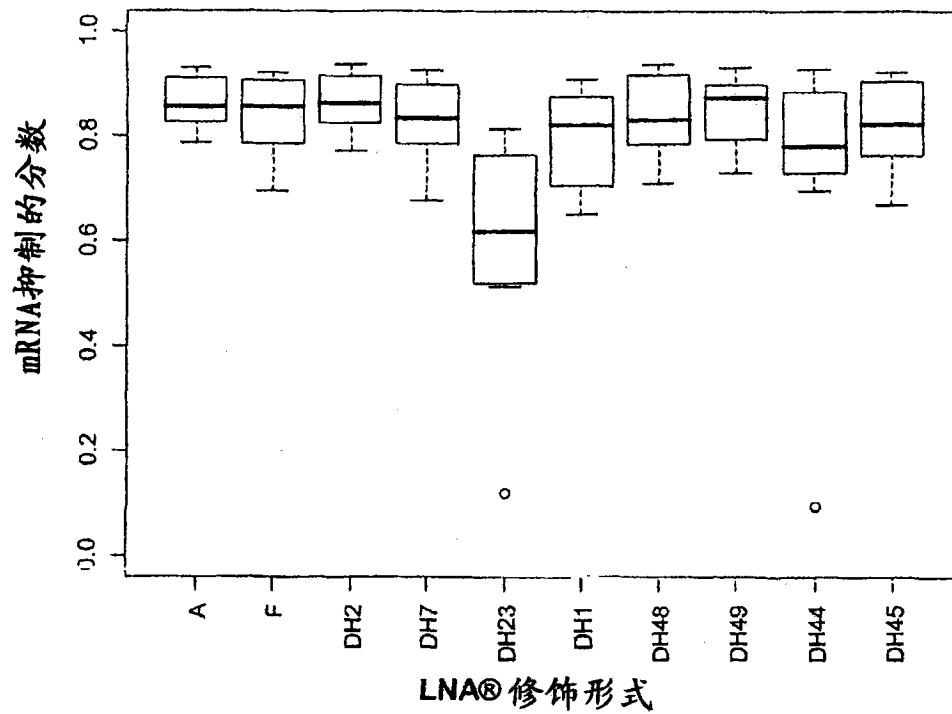


图 22B

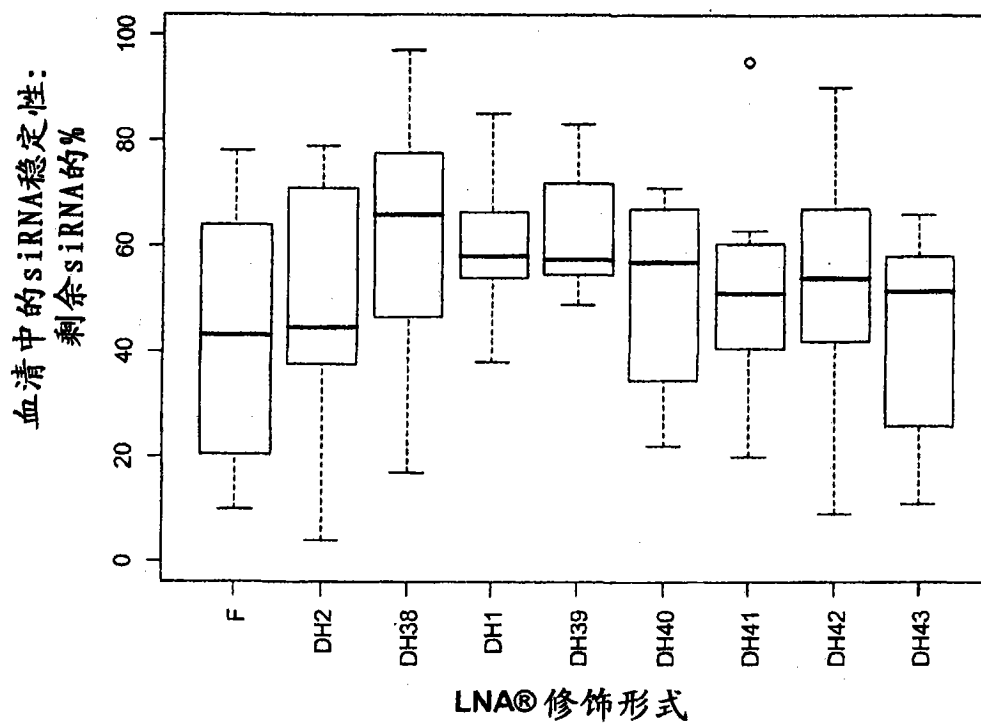


图 23A

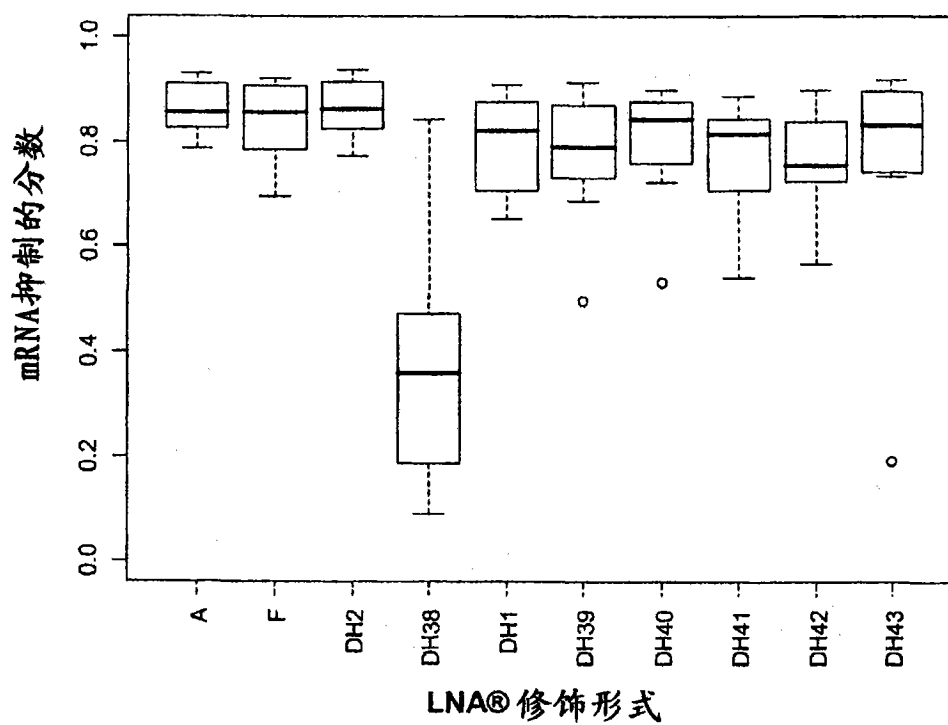


图 23B

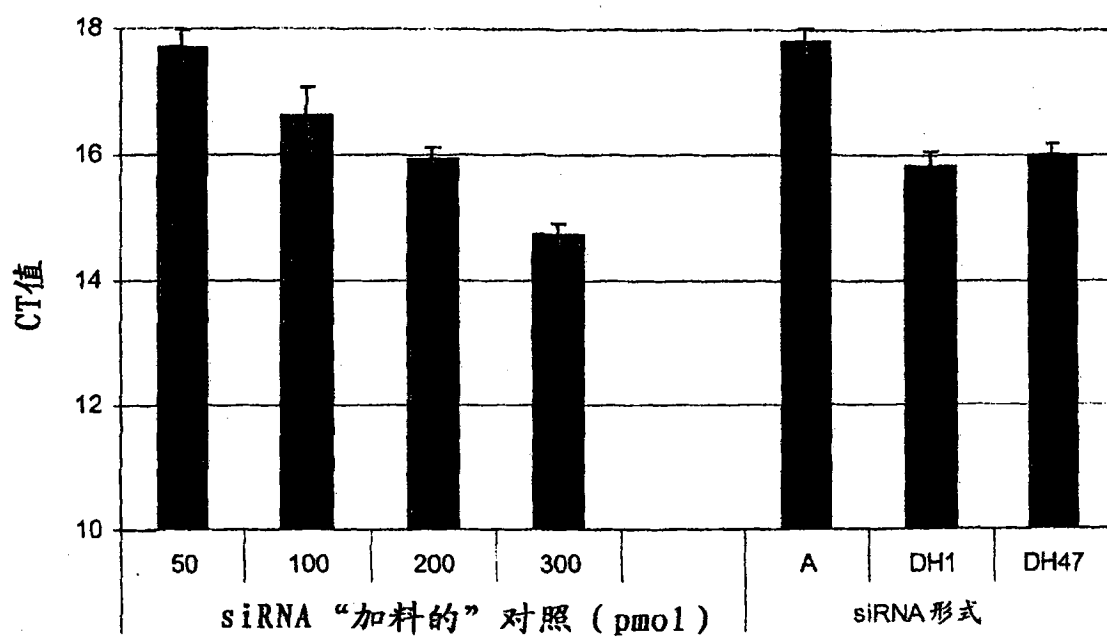


图 24