



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105814202 B

(45)授权公告日 2020.03.06

(21)申请号 201480061599.8

(22)申请日 2014.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105814202 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(30)优先权数据  
13004722.8 2013.09.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.05.11

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2014/002655 2014.09.30

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/043768 EN 2015.04.02

(73)专利权人 佐路闻蒂斯有限公司  
地址 德国波鸿

(72)发明人 S·施赖伯

(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  
代理人 袁泉

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/712(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 9/107(2006.01)

(56)对比文件

W0 2013020097 A1,2013.02.07,

李佳.小鼠胚胎干细胞Notch1基因沉默对  
Dvl-1和JNK-3表达的影响.《中国优秀硕士学位  
论文全文数据库(基础科学辑)》.2007,(第5期),  
A006-57.

Zhiwei Wang等.Down-regulation of  
Notch-1 contributes to cell growth  
inhibition and apoptosis in pancreatic  
cancer cells.《Mol Cancer Ther》.2006,第5卷  
(第3期),第483-493页.

审查员 严金波

权利要求书6页 说明书49页  
序列表36页 附图12页

(54)发明名称

NOTCH1特异性SIRNA分子

(57)摘要

本发明涉及包含双链结构的核酸分子,其中  
所述双链结构由第一链和第二链形成,其中所述  
第一链由下述核苷酸序列组成:5'  
acGaGcUgGaCcAcUgGuCdTsdt 3',并且所述第二  
链由下述核苷酸序列组成:5'  
GAcCaGuGgUcCaGcUcGudTsdt 3',其中小写核苷  
酸指示所述核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线  
的核苷酸指示所述核苷酸是2'-O-甲基修饰的,  
和其中dTsdT指示在3'末端处附着由两个dT核苷  
酸组成的二核苷酸,其中所述两个dT通过硫代磷  
酸酯键共价连接。

1. 包含双链结构的核酸分子，  
其中所述双链结构由第一链和第二链形成，  
其中所述第一链包含邻接核苷酸的第一段，并且所述第二链包含邻接核苷酸的第二段，  
其中邻接核苷酸的第一段包含核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUCdTdT 3' (SEQ ID NO:4)，  
其中邻接核苷酸的第二段包含核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGUdTdT 3' (SEQ ID NO:5)，并且  
其中所述核酸分子能够引起Notch 1基因的转录后沉默。
2. 权利要求1的核酸分子，其中基因的转录后沉默是RNA干扰。
3. 权利要求1的核酸分子，其中所述Notch 1基因是人Notch 1。
4. 权利要求1的核酸分子，其中所述核酸分子能够降解编码基因的mRNA或所述mRNA的前体。
5. 权利要求4的核酸分子，其中所述核酸分子在细胞中能够降解编码基因的mRNA或所述mRNA的前体。
6. 权利要求4的核酸分子，其中mRNA的cDNA的核苷酸序列可得自GenBank条目NM\_017617.3。
7. 权利要求1的核酸分子，其中所述cDNA由SEQ ID NO:2的核苷酸序列组成。
8. 权利要求1的核酸分子，其中邻接核苷酸的第一段包含19~25个核苷酸。
9. 权利要求8的核酸分子，其中邻接核苷酸的第一段包含19~23个核苷酸。
10. 权利要求1的核酸分子，其中邻接核苷酸的第二段包含19~25个核苷酸。
11. 权利要求10的核酸分子，其中邻接核苷酸的第二段包含19~23个核苷酸。
12. 权利要求9的核酸分子，其中所述核苷酸是邻接核苷酸。
13. 权利要求1的核酸分子，其中第一链由邻接核苷酸的第一段组成。
14. 权利要求1的核酸分子，其中第二链由邻接核苷酸的第二段组成。
15. 权利要求1的核酸分子，其中第一链由邻接核苷酸的第一段组成，并且第二链由邻接核苷酸的第二段组成。
16. 权利要求1的核酸分子，其中双链结构包含19~25个碱基对。
17. 权利要求16的核酸分子，其中双链结构包含19~23个碱基对。
18. 权利要求1的核酸分子，其中所述第一链和所述第二链彼此共价连接。
19. 权利要求18的核酸分子，其中所述第一链的3'末端与所述第二链的5'末端共价连接。
20. 权利要求1的核酸分子，其中形成邻接核苷酸的第一段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。
21. 权利要求1的核酸分子，其中形成邻接核苷酸的第二段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。
22. 权利要求20的核酸分子，其中形成邻接核苷酸的第一段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的，并且形成邻接核苷酸的第二段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。
23. 权利要求1的核酸分子，其中形成第一链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

24. 权利要求1的核酸分子,其中形成第二链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。
25. 权利要求23的核酸分子,其中形成第一链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的,并且形成第二链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。
26. 权利要求20的核酸分子,其中一个或多个核苷酸的修饰是一个或多个核苷酸的糖部分的修饰和/或一个或多个核苷酸的磷酸盐部分的修饰。
27. 权利要求26的核酸分子,其中糖部分的修饰选自2'-O-甲基和2'-F。
28. 权利要求26的核酸分子,其中磷酸盐部分的修饰是硫代磷酸酯连接在两个核苷酸之间。
29. 权利要求20的核酸分子,其中核苷酸中的一个或多个根据在段内的位置而被修饰。
30. 权利要求29的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的。
31. 权利要求29的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的奇数位置处的核苷酸是经修饰的。
32. 权利要求30的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,并且其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,其中在偶数位置处的核苷酸的修饰不同于在奇数位置处的核苷酸的修饰。
33. 权利要求30的核酸分子,其中
- (a) 在偶数位置处的核苷酸的修饰是2'-O-甲基修饰,并且在奇数位置处的核苷酸的修饰是2'-F修饰,或者
- (b) 在奇数位置处的核苷酸的修饰是2'-O-甲基修饰,并且在偶数位置处的核苷酸的修饰是2'-F修饰。
34. 权利要求23的核酸分子,其中核苷酸中的一个或多个根据在链内的位置而被修饰。
35. 权利要求34的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的。
36. 权利要求34的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的奇数位置处的核苷酸是经修饰的。
37. 权利要求35的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,并且其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,其中在偶数位置处的核苷酸的修饰不同于在链的奇数位置处的核苷酸的修饰。
38. 权利要求35的核酸分子,其中
- (a) 在偶数位置处的核苷酸的修饰是2'-O-甲基修饰,并且在奇数位置处的核苷酸的修饰是2'-F修饰,或者
- (b) 在奇数位置处的核苷酸的修饰是2'-O-甲基修饰,并且在偶数位置处的核苷酸的修饰是2'-F修饰。
39. 权利要求20的核酸分子,其中第一段在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的。
40. 权利要求39的核酸分子,其中第一段在5'末端处包含两个核苷酸,其中两个核苷酸

是2'-F修饰的。

41. 权利要求39的核酸分子,其中在第一段的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后立即跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

42. 权利要求39的核酸分子,其中在第一段的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

43. 权利要求20的核酸分子,其中第二段在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

44. 权利要求43的核酸分子,其中在第二段的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后立即跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

45. 权利要求43的核酸分子,其中在第一段的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

46. 权利要求39的核酸分子,其中第一段在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的,其中在第一段的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸,其中第二段在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中在第一段的整个长度或其部分上,所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的,并且其中在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

47. 权利要求39的核酸分子,其中第一段在其3'末端处包含两个dT核苷酸,并且第二段在其3'末端处包含两个dT核苷酸,其中两个dT核苷酸通过硫代磷酸酯键共价连接。

48. 权利要求20的核酸分子,其中第一链在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的。

49. 权利要求48的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后立即跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

50. 权利要求48的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

51. 权利要求20的核酸分子,其中第二链在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

52. 权利要求51的核酸分子,其中在第二链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后立即跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

53. 权利要求51的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

54. 权利要求48的核酸分子,其中第一链在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的,其中在第一链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至

少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸,其中第二链在5'末端处包含至少一个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的,并且其中在第一链的整个长度或其部分上,在5'→3'方向上在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

55. 权利要求48的核酸分子,其中第一链在其3'末端处包含两个dT核苷酸,并且第二链在其3'末端处包含两个dT核苷酸,其中两个dT核苷酸通过硫代磷酸酯键共价连接。

56. 权利要求1的核酸分子,其中

核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 如下进行修饰:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

57. 权利要求1的核酸分子,其中

核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGU 3' (SEQ ID NO:3) 如下进行修饰:

5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

58. 权利要求1的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

59. 权利要求1的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

60. 权利要求1的核酸分子,其中

(a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或

(b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

61. 权利要求1的核酸分子,其中核酸分子由下述组成:

(a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' GACCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或

(b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

62. 权利要求1的核酸分子, 其中核酸分子由下述组成:

(a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' GACCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或

(b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

63. 权利要求1的核酸分子, 其中核酸分子由下述组成:

(a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:69), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' GACCaGuGgUcCaGcUcGudTsdT 3' (SEQ ID NO:70), 或

(b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

5' acGaGcUgGaCcAcUgGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:69), 和

邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

5' ACcAgUgGuCcAgCuCgdTsdT 3' (SEQ ID NO:72),

其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的, 和

其中dTsdT指示在3'末端处附着由两个dT组成的二核苷酸, 其中所述两个dT通过硫代磷酸酯键共价连接。

64. 权利要求1的核酸分子, 其中所述核酸分子用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中。

65. 权利要求64的核酸分子, 其中药物敏感性是由NF- $\kappa$ B级联介导的和/或涉及NF- $\kappa$ B级联的药物敏感性。

66. 权利要求1~65之任一项的核酸分子在制备用于疾病治疗和/或预防的药物中的用途。

67. 权利要求66的用途, 其中所述疾病是能通过减少Notch 1基因的表达进行治疗的疾病。

68. 权利要求67的用途, 其中所述疾病是能通过减少编码Notch1的mRNA的翻译进行治疗的疾病。

69. 权利要求66的用途, 其中所述疾病选自食管癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌、舌癌、白血病、肾细胞癌、胃癌、结肠腺癌、子宫内膜癌/子宫体癌、宫颈癌/子宫颈癌、肝内胆管癌、肝细胞癌、骨肉瘤、膀胱癌、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、肺腺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和神经胶质瘤。

70. 权利要求66的用途, 其中所述药物用于连同进一步的药学活性剂一起施用。

71. 权利要求70的用途, 其中所述药学活性剂是细胞生长抑制剂。

72. 权利要求71的用途, 其中所述药学活性剂选自吉西他滨、多西他赛、顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、地塞米松和替莫唑胺。

73. 权利要求1~65之任一项目的核酸分子在制备用于恢复癌细胞的药物敏感性的制剂中的用途。

74. 权利要求73的用途, 其中药物敏感性是由NF- $\kappa$ B级联介导的和/或涉及NF- $\kappa$ B级联的药物敏感性。

75. 纳米乳剂, 其包含不连续相和连续水相以及根据权利要求1~65之任一项目的核酸分子。

76. 权利要求75的纳米乳剂, 其中所述不连续相包含全氟化碳相。

77. 权利要求75的纳米乳剂, 其中所述纳米乳剂包含内吞作用增强表面。

78. 权利要求77的纳米乳剂, 其中所述内吞作用增强表面包含内吞作用增强组分, 其中所述内吞作用增强组分选自经由胞吞作用诱导纳米乳剂或纳米乳剂颗粒的细胞摄取的至少一种化合物。

79. 权利要求75的纳米乳剂在制备用于疾病的治疗和/或预防的药物中的用途。

80. 权利要求75的纳米乳剂在制备用于恢复癌细胞的药物敏感性的制剂中的用途。

81. 药物组合物, 其包含:

权利要求1~65之任一项目的核酸分子和/或权利要求75~78之任一项目的纳米乳剂, 和药学可接受的赋形剂。

82. 权利要求81的药物组合物在制备用于疾病的治疗和/或预防的药物中的用途。

83. 权利要求81的药物组合物在制备恢复癌细胞的药物敏感性的制剂中的用途。

## NOTCH1特异性SIRNA分子

[0001] 本发明涉及包含双链结构的核酸分子,用于在疾病治疗和/或预防的方法中使用的包含双链结构的核酸分子,用于在恢复癌细胞的药物敏感性的方法中使用的包含双链结构的核酸分子,包含双链结构的核酸分子在制备药物中的用途,包含双链结构的核酸分子在制备用于恢复癌细胞的药物敏感性的试剂中的用途,包括包含双链结构的核酸分子的纳米乳剂,用于在疾病治疗和/或预防的方法中使用的纳米乳剂,用于在恢复癌细胞的药物敏感性的方法中使用的纳米乳剂,纳米乳剂结构用于药物制备的用途,纳米乳剂在用于恢复癌细胞的药物敏感性的试剂制备中的用途,包括包含双链结构的核酸分子的药物组合物,用于在疾病治疗和/或预防的方法中使用的药物组合物,用于在恢复癌细胞的药物敏感性的方法中使用的药物组合物,包括施用包含双链结构的核酸分子的用于疾病治疗和/或预防的方法,包括施用包含双链结构的核酸分子的用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法,包括包含双链结构的核酸分子的试剂盒,用于疾病治疗和/或预防的方法中的试剂盒,用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中的试剂盒,包含纳米乳剂的试剂盒,用于在疾病治疗和/或预防的方法中使用的试剂盒,以及用于在恢复癌细胞的药物敏感性的方法中使用的试剂盒。

[0002] Notch 1是编码单次跨膜受体的基因,所述单次跨膜受体也分类为1型跨膜蛋白质。人Notch 1由Ellisen LW等人(Ellisen LW等人,Cell 66(4),649-661(1991))首次描述。Notch 1是Notch家族的成员。该家族的成员共享结构特征,包括由多重表面生长因子样(EGF)重复组成的细胞外结构域,以及由多重不同结构域类型组成的细胞内结构域。Notch家族成员通过控制细胞命运决策在各种发育过程中起作用。Notch信号传导网络是进化上保守的细胞内信号传导途径,其调节物理上相邻细胞之间的相互作用。Notch 1及其翻译产物构成许多肿瘤实体中的成药靶。序列信息包括人Notch 1的cDNA的核苷酸序列可以例如从GenBank条目NM\_017617.3中检索。

[0003] 本领域一直需要在体外和体内沉默或敲低Notch 1的表达水平的手段,包括使用siRNA用于治疗疾病,所述疾病可以通过减少Notch 1基因的表达,并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA的翻译得到治疗或预防。可以以这种方式治疗的一组疾病是各种肿瘤疾病和癌症。

[0004] 因此,本发明根本的问题在于提供在体外和体内用于沉默或敲低Notch 1且更优选沉默或敲低Notch 1的表达水平的手段。本发明进一步的根本问题在于提供用于治疗疾病的方法,更优选如下疾病,所述疾病可以通过减少Notch 1基因的表达,并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA的翻译得到治疗或预防,以及在此类方法中有用的手段。本发明再进一步的根本问题在于提供用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法,以及在此类方法中有用的手段。最后,本发明根本的问题在于提供用于癌症治疗中的辅助疗法的方法,以及在此类方法中有用的手段。

[0005] 本发明根本的这些及其他问题通过所附加的独立权利要求的主题加以解决。优选实施方案可以得自所附加的独立权利要求。

[0006] 考虑到说明书,包括下文阐述的那些实施方案,某些实施方案对于技术人员将变



得显而易见。下文阐述的那些实施方案同样解决了本发明根本的上述及其他问题。

[0007] 实施方案1:包含双链结构的核酸分子,

[0008] 其中所述双链结构由第一链和第二链形成,

[0009] 其中所述第一链包含邻接核苷酸的第一段,并且所述第二链包含邻接核苷酸的第二段,

[0010] 其中邻接核苷酸的第一段包含

[0011] a) 核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与下述至少63%等同:

[0012] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0013] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8);或者

[0014] b) 核苷酸序列,其中所述核苷酸序列包含下述的至少一段8或9个核苷酸:

[0015] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0016] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8)

[0017] 并且

[0018] 其中所述核酸分子能够引起基因的转录后沉默。

[0019] 实施方案2:实施方案1的核酸分子,其中基因的转录后沉默是RNA干扰。

[0020] 实施方案3:实施方案1至2中任一项的核酸分子,其中所述基因是Notch 1,优选人Notch 1。

[0021] 实施方案4:实施方案1至3中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子优选在细胞中能够降解编码基因的mRNA或所述mRNA的前体。

[0022] 实施方案5:实施方案4的核酸分子,其中mRNA的cDNA的核苷酸序列可得自GenBank 条目NM\_017617.3。

[0023] 实施方案6:实施方案1至5中任一项的核酸分子,其中所述cDNA由SEQ ID NO:2的核苷酸序列组成。

[0024] 实施方案7:实施方案1至6中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段与邻接核苷酸的第一段的部分至少部分互补。

[0025] 实施方案8:实施方案1至7中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段与邻接核苷酸的第一段至少部分互补。

[0026] 实施方案9:实施方案1至8中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含13至29个核苷酸,优选17至25或19至25个核苷酸,并且更优选19至23个核苷酸。

[0027] 实施方案10:实施方案1至9中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段包含13至29个核苷酸,优选17至25或19至25个核苷酸,并且更优选19至23个核苷酸。

[0028] 实施方案11:实施方案1至10中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段和邻接核苷酸的第二段包含13至29个核苷酸,优选17至25或19至25个核苷酸,并且更优选19至23个核苷酸。

[0029] 实施方案12:实施方案9至11中任一项的核酸分子,其中所述核苷酸是邻接核苷酸。

[0030] 实施方案13:实施方案1至12中任一项的核酸分子,其中第一链由邻接核苷酸的第一段组成。

[0031] 实施方案14:实施方案1至13中任一项的核酸分子,其中第二链由邻接核苷酸的第

二段组成。

[0032] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的核酸分子,其中第一链由邻接核苷酸的第一段组成,并且第二链由邻接核苷酸的第二段组成。

[0033] 实施方案16:实施方案1至14中任一项的核酸分子,其中双链结构包含13至29个碱基对,优选16至27或19至25个碱基对,并且更优选19至23个碱基对。

[0034] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含

[0035] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0036] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8)。

[0037] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段包含

[0038] (i) 核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGU 3' (SEQ ID NO:3) 或

[0039] (ii) 核苷酸序列5' ACCAGUGGUCCAGCUCG 3' (SEQ ID NO:9)。

[0040] 实施方案19:实施方案17至18中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含

[0041] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0042] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8), 和

[0043] 邻接核苷酸的第二段包含

[0044] (i) 核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGU 3' (SEQ ID NO:3) 或

[0045] (ii) 核苷酸序列5' ACCAGUGGUCCAGCUCG 3' (SEQ ID NO:9)。

[0046] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子在至少一个末端处是平端。

[0047] 实施方案21:实施方案20的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的5'末端和第二链的3'末端限定的末端处是平端。

[0048] 实施方案22:实施方案20的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的3'末端和第二链的5'末端限定的末端处是平端。

[0049] 实施方案23:实施方案20至22中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的5'末端和第二链的3'末端限定的末端处以及在由第一链的3'末端和第二链的5'末端限定的末端处是平端。

[0050] 实施方案24:实施方案1至19中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子在至少一个末端处具有突出端。

[0051] 实施方案25:实施方案24的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的5'末端和第二链的3'末端限定的末端处具有突出端。

[0052] 实施方案26:实施方案25的核酸分子,其中所述突出端是5'突出端。

[0053] 实施方案27:实施方案25的核酸分子,其中所述突出端是3'突出端。

[0054] 实施方案28:实施方案24的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的3'末端和第二链的5'末端限定的末端处具有突出端。

[0055] 实施方案29:实施方案28的核酸分子,其中所述突出端是5'突出端。

[0056] 实施方案30:实施方案28的核酸分子,其中所述突出端是3'突出端。

[0057] 实施方案31:实施方案24的核酸分子,其中所述核酸分子在由第一链的5'末端和第二链的3'末端限定的末端处以及在由第一链的3'末端和第二链的5'末端限定的末端处

具有突出端。

[0058] 实施方案32:实施方案31的核酸分子,其中所述突出端是5'突出端。

[0059] 实施方案33:实施方案32的核酸分子,其中所述突出端是3'突出端。

[0060] 实施方案34:实施方案24至33中任一项的核酸分子,其中所述突出端由一个、两个、三个、四个或五个核苷酸组成。

[0061] 实施方案35:实施方案34的核酸分子,其中所述突出端由两个核苷酸组成。

[0062] 实施方案36:实施方案34至35中任一项的核酸分子,其中所述核苷酸是dT。

[0063] 实施方案37:实施方案1至19和24至36中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含

[0064] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUCdTdT 3' (SEQ ID NO:4) 或

[0065] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGUdTdT 3' (SEQ ID NO:10)。

[0066] 实施方案38:实施方案1至19和24至37中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段包含

[0067] (i) 核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGUdTdT 3' (SEQ ID NO:5) 或

[0068] (ii) 核苷酸序列5' ACCAGUGGUCCAGCUCGdTdT 3' (SEQ ID NO:11)。

[0069] 实施方案39:实施方案37至38中任一项的核酸分子,其中

[0070] 邻接核苷酸的第一段包含

[0071] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUCdTdT 3' (SEQ ID NO:4) 或

[0072] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGUdTdT 3' (SEQ ID NO:10), 和

[0073] 邻接核苷酸的第二段包含

[0074] (i) 核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGUdTdT 3' (SEQ ID NO:5) 或

[0075] (ii) 核苷酸序列5' ACCAGUGGUCCAGCUCGdTdT 3' (SEQ ID NO:11)。

[0076] 实施方案40:前述实施方案中任一项的核酸分子,其中所述第一链和所述第二链彼此共价连接,优选所述第一链的3'末端与所述第二链的5'末端共价连接。

[0077] 实施方案41:实施方案1至40中任一项的核酸分子,其中形成邻接核苷酸的第一段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0078] 实施方案42:实施方案1至41中任一项的核酸分子,其中形成邻接核苷酸的第二段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0079] 实施方案43:实施方案41和42中任一项的核酸分子,其中形成邻接核苷酸的第一段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的,并且形成邻接核苷酸的第二段的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0080] 实施方案44:实施方案1至43中任一项的核酸分子,其中形成第一链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0081] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的核酸分子,其中形成第二链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0082] 实施方案46:实施方案44至45中任一项的核酸分子,其中形成第一链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的,并且形成第二链的核苷酸中的一个或多个是经修饰的。

[0083] 实施方案47:实施方案41至46中任一项的核酸分子,其中一个或多个核苷酸的修饰是一个或多个核苷酸的糖部分的修饰和/或一个或多个核苷酸的磷酸盐部分的修饰。

[0084] 实施方案48:实施方案47的核酸分子,其中糖部分的修饰选自2' O-甲基和2' -F。

[0085] 实施方案49:实施方案47至48中任一项的核酸分子,其中磷酸盐部分的修饰是这样的,使得硫代磷酸酯连接在两个核苷酸之间形成。

[0086] 实施方案50:实施方案41至43和47至49中任一项的核酸分子,其中核苷酸中的一个或多个根据在段内的位置而被修饰。

[0087] 实施方案51:实施方案50的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的。

[0088] 实施方案52:实施方案50和51中任一项的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的奇数位置处的核苷酸是经修饰的。

[0089] 实施方案53:实施方案51至52中任一项的核酸分子,其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,并且其中在第一段和/或第二段的整个长度或其部分上,在段的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,其中在偶数位置处的核苷酸的修饰不同于在奇数位置处的核苷酸的修饰。

[0090] 实施方案54:实施方案51至53中任一项的核酸分子,其中(a)在偶数位置处的核苷酸的修饰是2' -O-甲基修饰,并且在奇数位置处的核苷酸的修饰是2' -F修饰,或者(b)在奇数位置处的核苷酸的修饰是2' -O-甲基修饰,并且在偶数位置处的核苷酸的修饰是2' -F修饰。

[0091] 实施方案55:实施方案44至50中任一项的核酸分子,其中核苷酸中的一个或多个根据在链内的位置而被修饰。

[0092] 实施方案56:实施方案55的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的。

[0093] 实施方案57:实施方案55和56中任一项的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的奇数位置处的核苷酸是经修饰的。

[0094] 实施方案58:实施方案56至57中任一项的核酸分子,其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,并且其中在第一链和/或第二链的整个长度或其部分上,在链的偶数位置处的核苷酸是经修饰的,其中在偶数位置处的核苷酸的修饰不同于在链的奇数位置处的核苷酸的修饰。

[0095] 实施方案59:实施方案56至58中任一项的核酸分子,其中(a)在偶数位置处的核苷酸的修饰是2' -O-甲基修饰,并且在奇数位置处的核苷酸的修饰是2' -F修饰,或者(b)在奇数位置处的核苷酸的修饰是2' -O-甲基修饰,并且在偶数位置处的核苷酸的修饰是2' -F修饰。

[0096] 实施方案60:实施方案41至54中任一项的核酸分子,其中第一段在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2' -F修饰的。

[0097] 实施方案61:实施方案60的核酸分子,其中在至少一个核苷酸后立即跟随的(在5' → 3' 方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是在第一段的整个长度或其部分上的2' O-甲基修饰的核苷酸。

[0098] 实施方案62:实施方案60和61中任一项的核酸分子,其中在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5' → 3' 方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是在第一段的整个长度或其部分上的2' -F修饰的核苷酸。

[0099] 实施方案63:实施方案41至55和60至62中任一项的核酸分子,其中第二段在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0100] 实施方案64:实施方案63的核酸分子,其中在第二段的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后立即跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

[0101] 实施方案65:实施方案63和64中任一项的核酸分子,其中在第一段的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0102] 实施方案66:实施方案60至65中任一项的核酸分子,其中第一段在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的,其中在第一段的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸,其中第二段在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中在第一段的整个长度或其部分上,所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的,并且其中在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0103] 实施方案67:实施方案60至66中任一项的核酸分子,其中第一段在其3'末端处包含两个dT核苷酸,并且第二段在其3'末端处包含两个dT核苷酸,其中两个dT核苷酸通过硫代磷酸酯键共价连接。

[0104] 实施方案68:实施方案41至49和55至59中任一项的核酸分子,其中第一链在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的。

[0105] 实施方案69:实施方案68的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后立即跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0106] 实施方案70:实施方案68和69中任一项的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

[0107] 实施方案71:实施方案41至49、55-59和68至70中任一项的核酸分子,其中第二链在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0108] 实施方案72:实施方案71的核酸分子,其中在第二链的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后立即跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸。

[0109] 实施方案73:实施方案71和72中任一项的核酸分子,其中在第一链的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0110] 实施方案74:实施方案68至73中任一项的核酸分子,其中第一链在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-F修饰的,其中在第一链的整个长度或其部分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-F修饰的核苷酸,其中第二链在5'末端处包含至少一个优选两个核苷酸,其中所述至少一个核苷酸是2'-O-甲基修饰的,并且其中在第一链的整个长度或其部

分上,在至少一个核苷酸后起始的第二跟随的(在5'→3'方向上)核苷酸和每一个后续第二核苷酸是2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0111] 实施方案75:实施方案68至74中任一项的核酸分子,其中第一链在其3'末端处包含两个dT核苷酸,并且第二链在其3'末端处包含两个dT核苷酸,其中两个dT核苷酸通过硫代磷酸酯键共价连接。

[0112] 实施方案76:实施方案1至75中任一项的核酸分子,其中

[0113] 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 如下进行修饰:

[0114] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

[0115] 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8) 如下进行修饰:

[0116] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13),

[0117] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0118] 实施方案77:实施方案1至76中任一项的核酸分子,其中

[0119] 核苷酸序列5' GACCAGUGGUCCAGCUCGU 3' (SEQ ID NO:3) 如下进行修饰:

[0120] 5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 和

[0121] 核苷酸序列5' ACCAGUGGUCCAGCUCG 3' (SEQ ID NO:9) 如下进行修饰:

[0122] 5' ACcAgUgGuCcAgCuGg 3' (SEQ ID NO:14),

[0123] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0124] 实施方案78:实施方案1至77中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

[0125] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6) 或

[0126] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13),

[0127] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0128] 实施方案79:实施方案1至78中任一项的核酸分子,其中邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

[0129] 5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7) 或

[0130] 5' ACcAgUgGuCcAgCuGg 3' (SEQ ID NO:14),

[0131] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0132] 实施方案80:实施方案1至79中任一项的核酸分子,其中

[0133] a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

[0134] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和

[0135] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

[0136] 5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或

[0137] b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:

[0138] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和

[0139] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:

- [0140] 5' GACCaGuGuCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或
- [0141] c) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0142] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和
- [0143] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0144] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14), 或
- [0145] d) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0146] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和
- [0147] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0148] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),
- [0149] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。
- [0150] 实施方案81: 实施方案1至80中任一项的核酸分子, 其中核酸分子由下述组成:
- [0151] a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0152] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和
- [0153] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0154] 5' GACCaGuGuCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或
- [0155] b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0156] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和
- [0157] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0158] 5' GACCaGuGuCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或
- [0159] c) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0160] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和
- [0161] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0162] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14), 或
- [0163] d) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0164] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和
- [0165] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0166] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),
- [0167] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。
- [0168] 实施方案82: 实施方案1至81中任一项的核酸分子, 其中核酸分子由下述组成:
- [0169] a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0170] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和
- [0171] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0172] 5' GACCaGuGuCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或
- [0173] b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0174] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和
- [0175] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0176] 5' GACCaGuGuCaGcUcGu 3' (SEQ ID NO:7), 或

- [0177] c) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0178] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuC 3' (SEQ ID NO:6), 和
- [0179] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0180] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14), 或
- [0181] d) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0182] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgU 3' (SEQ ID NO:13), 和
- [0183] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0184] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCg 3' (SEQ ID NO:14),
- [0185] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的。
- [0186] 实施方案83: 实施方案1至81中任一项的核酸分子, 其中核酸分子由下述组成:
- [0187] a) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0188] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:69), 和
- [0189] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0190] 5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGudTsdT 3' (SEQ ID NO:70), 或
- [0191] b) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0192] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgUdTsdT 3' (SEQ ID NO:71), 和
- [0193] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0194] 5' GAcCaGuGgUcCaGcUcGudTsdT 3' (SEQ ID NO:70), 或
- [0195] c) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0196] 5' acGaGcUgGaCcAcUgGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:69), 和
- [0197] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0198] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCgdTsdT 3' (SEQ ID NO:72), 或
- [0199] d) 邻接核苷酸的第一段包含下述核苷酸序列:
- [0200] 5' cgAgCuGgAcCaCuGgUdTsdT 3' (SEQ ID NO:71), 和
- [0201] 邻接核苷酸的第二段包含下述核苷酸序列:
- [0202] 5' ACcAgUgGuCcAgCuCgdTsdT 3' (SEQ ID NO:72),
- [0203] 其中小写核苷酸指示该核苷酸是2'-F修饰的, 并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的, 和
- [0204] 其中dTsdT指示在3'末端处附着由两个dT组成的二核苷酸, 其中所述两个dT通过硫代磷酸酯键共价连接。
- [0205] 实施方案84: 实施方案1至83中任一项的核酸分子, 其用于疾病治疗和/或预防的方法中。
- [0206] 实施方案85: 实施方案84的核酸分子, 其中所述疾病是可以通过减少Notch 1基因的表达, 并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA的翻译进行治疗的疾病。
- [0207] 实施方案86: 实施方案84至85中任一项的核酸分子, 其中所述疾病选自食管癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌、舌癌、白血病、肾细胞癌、胃癌、结肠腺癌、子宫内膜癌/子宫体、宫颈癌/子宫颈、肝内胆管癌、肝细胞癌、骨肉瘤、膀胱癌、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、肺腺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和神经胶质瘤。



[0208] 实施方案87:实施方案84至86中任一项的核酸分子,其中所述方法进一步包括药理学活性剂的施用。

[0209] 实施方案88:实施方案87的核酸分子,其中所述药理学活性剂是细胞生长抑制剂。

[0210] 实施方案89:实施方案88的核酸分子,其中所述药理学活性剂选自吉西他滨、多西他赛、顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、地塞米松和替莫唑胺。

[0211] 实施方案90:实施方案1至83中任一项的核酸分子,其用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中。

[0212] 实施方案91:实施方案90的核酸分子,其中药物敏感性是由NF- $\kappa$ B级联介导的和/或涉及NF- $\kappa$ B级联的药物敏感性。

[0213] 实施方案92:实施方案1至83中任一项的核酸分子在制备用于疾病治疗和/或预防的药物中的用途。

[0214] 实施方案93:实施方案92的用途,其中所述疾病是可以通过减少Notch 1基因的表达,并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA的翻译进行治疗的疾病。

[0215] 实施方案94:实施方案92至93中任一项的用途,其中所述疾病选自食管癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌、舌癌、白血病、肾细胞癌、胃癌、结肠腺癌、子宫内膜癌/子宫体、宫颈癌/子宫颈、肝内胆管癌、肝细胞癌、骨肉瘤、膀胱癌、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、肺腺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和神经胶质瘤。

[0216] 实施方案95:实施方案92至94中任一项的用途,其中所述药物用于连同进一步的药理学活性剂一起施用。

[0217] 实施方案96:实施方案95的用途,其中所述药理学活性剂是细胞生长抑制剂。

[0218] 实施方案97:实施方案96的用途,其中所述药理学活性剂选自吉西他滨、多西他赛、顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、地塞米松和替莫唑胺。

[0219] 实施方案98:实施方案1至83中任一项的核酸分子在制备用于恢复癌细胞的药物敏感性的试剂中的用途。

[0220] 实施方案99:实施方案98的用途,其中药物敏感性是由NF- $\kappa$ B级联介导的和/或涉及NF- $\kappa$ B级联的药物敏感性。

[0221] 实施方案100:包含不连续相和连续水相以及根据实施方案1至83中任一项的核酸分子的纳米乳剂。

[0222] 实施方案101:实施方案100的纳米乳剂,其中所述不连续相包含全氟化碳相。

[0223] 实施方案102:实施方案1至101中任一项的纳米乳剂,其中所述纳米乳剂包含内吞作用增强表面,优选地所述内吞作用增强表面包含内吞作用增强组分,其中所述内吞作用增强组分选自经由胞吞作用诱导纳米乳剂或纳米乳剂颗粒的细胞摄取的至少一种化合物。

[0224] 实施方案103:实施方案100至102中任一项的纳米乳剂,其用于疾病的治疗和/或预防中。

[0225] 实施方案104:实施方案100至102中任一项的纳米乳剂,其用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中。

[0226] 实施方案105:实施方案100至102中任一项的纳米乳剂在制备用于疾病的治疗和/或预防的药物中的用途。

[0227] 实施方案106:实施方案100至102中任一项的纳米乳剂在制备用于恢复癌细胞的

药物敏感性的药物中的用途。

[0228] 实施方案107:药物组合物,其包含实施方案1至83中任一项的核酸分子和/或实施方案100至102中任一项的纳米乳剂和药学可接受的赋形剂。

[0229] 实施方案108:实施方案107的药物组合物,其用于疾病的治疗和/或预防中。

[0230] 实施方案109:实施方案107的药物组合物,其用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中。

[0231] 实施方案110:用于疾病的治疗和/或预防的方法,其中所述方法包括给受试者施用实施方案1至83中任一项的核酸、实施方案100至102中任一项的纳米乳剂、和/或实施方案107的药物组合物。

[0232] 实施方案111:用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法,其中所述方法包括给受试者施用实施方案1至83中任一项的核酸、实施方案100至102中任一项的纳米乳剂、和/或实施方案107的药物组合物,其中所述受试者患有癌症,并且癌症的细胞是药物抗性的。

[0233] 本发明人已惊讶地发现包含双链结构的核酸分子能够引起基因的转录后沉默和特别的RNA干扰,

[0234] 其中所述双链结构由第一链和第二链形成,

[0235] 其中所述第一链包含邻接核苷酸的第一段,并且所述第二链包含邻接核苷酸的第二段,

[0236] 其中邻接核苷酸的第一段包含

[0237] a) 核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与下述至少63%等同:

[0238] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0239] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8);或者

[0240] b) 核苷酸序列,其中所述核苷酸序列包含下述的至少一段8或9个核苷酸:

[0241] (i) 核苷酸序列5' ACGAGCUGGACCACUGGUC 3' (SEQ ID NO:1) 或

[0242] (ii) 核苷酸序列5' CGAGCUGGACCACUGGU 3' (SEQ ID NO:8)。该核酸包括其实施方案中的全部在本文中将被称为本发明的核酸分子。

[0243] 在本发明内的是本发明的核酸分子是小干扰RNA(siRNA)。此类siRNA是本发明的核酸分子的特别优选的实施方案。在一个实施方案中,siRNA涉及Notch 1的表达的RNA转录物(在本文中有时被称为“靶核酸”)。如本文优选使用的,当提及基因表达时,术语“沉默”和“敲低”意指基因表达中的降低。本发明进一步涉及用于制备本发明的核酸分子的过程。

[0244] 在本发明的一个实施方案中,靶核酸是由哺乳动物Notch 1基因表达的RNA。在一个实施方案中,靶核酸是由小鼠Notch 1表达的RNA。在另一个实施方案中,靶核酸是由人Notch 1表达的RNA。在另一个实施方案中,靶核酸是人Notch 1mRNA。在另一个实施方案中,靶核酸是人Notch 1hnRNA。在另一个实施方案中,靶核酸是包含SEQ ID NO:12的序列的mRNA。

[0245] 在本发明的一个实施方案中,核酸分子不形成双链结构。在此类实施方案中,核酸分子由两条分开的单链形成(所述两条分开的单链可能个别存在,即处于非杂交状态中,使得不形成双链结构),或采取杂交形式,其中形成这样的双链结构,其不同于所需要的以便介导或触发RNA干扰的双链结构。备选地,形成双链结构的核酸分子是单链核酸分子,其中所述核酸分子不在自身上折回,使得形成双链结构,或使得形成这样的双链结构,其不同于

所需要的以便介导或触发RNA干扰的双链结构。在一个更优选的实施方案中,双链结构在体内条件下,并且更具体而言在核酸分子施用于受试者优选哺乳动物或哺乳动物细胞后形成。

[0246] 本发明的siRNA适合于抑制Notch 1的表达。根据本发明的siRNA因此适合于触发RNA干扰应答,导致哺乳动物细胞中的Notch 1mRNA的降低。根据本发明的siRNA进一步适合于通过减少在mRNA水平上的基因表达来减少Notch 1蛋白质的表达。

[0247] siRNA设计:本发明的siRNA包含两条核酸链,包含邻接核苷酸的第一段(其也被称为反义段)的第一链(其也被称为反义链),以及包含邻接核苷酸的第二段(其也被称为有义段)的第二链(其也被称为有义链)。核酸通常由核糖核苷酸或经修饰的核糖核苷酸组成;然而,如本文描述的核酸可包含脱氧核苷酸(DNA)。siRNA进一步包含通过反义链或反义段的全部或一部分以及有义链或有义段的全部或一部分形成的双链核酸部分或双链体区域。此类双链核酸部分或双链体区域在本文中也称为双链结构。与有义链或与反义段形成双链体区域的反义链或反义段的部分是反义链双链体区域或反义段区域,或者简单的反义双链体区域,并且与反义链或反义段形成双链体区域的有义链或有义段的部分是有义链双链体区域或有义段双链体区域,或者简单的有义双链体区域。双链体区域定义为以在反义链或反义段和有义链或有义段之间形成的第一个碱基对开始,并且以反义链或反义段和有义链或有义段之间形成的最后一个碱基对结束,所述第一个碱基对和最后一个碱基对包括在内。在双链体区域的任一侧上的siRNA部分是侧翼区。在反义双链体区域的任一侧上的反义链或反义段的部分是反义侧翼区。对反义双链体区域5'的反义链或反义段部分是反义5'侧翼区。对反义双链体区域5'的反义链或反义段部分是反义3'侧翼区。在有义双链体区域的任一侧上的有义链或有义段部分是有义侧翼区。对有义双链体区域5'的有义链或有义段部分是有义5'侧翼区。对有义双链体区域5'的有义链或有义段部分是有义3'侧翼区。

[0248] 同一性:在一个实施方案中,一个核苷酸序列与另一个核苷酸序列的同一性是在一个核苷酸序列和另一个核苷酸序列两者之间共享多少个核苷酸的指示。同一性表示为一个序列与另一个核苷酸序列共享的核苷酸数目与另一个核苷酸序列的核苷酸总数目的比率。同一性的最大值为100%。本领域技术人员应认识到一方面取决于一个核苷酸序列和另一个核苷酸序列的长度,以及在一个核苷酸序列和另一个核苷酸序列之间共享的核苷酸数目,同一性不一定是整数。如果如此计算的比率不是整数,则同一性仍优选指示为整数,所述整数尽可能接近于所计算的比率,并且这在技术上是有意义的。根据本发明,同一性可以是63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0249] 互补性:根据本发明,反义双链体区域和有义双链体区域可以是彼此完全互补的,并且是至少部分互补的。此类互补性基于沃森-克里克碱基配对(即A:U和G:C碱基配对)。取决于本发明的核酸分子和siRNA的长度,特别是不一定需要就反义和有义双链体区域之间的碱基互补性而言的完美匹配;然而,反义链和有义链必须能够在生理条件下杂交。

[0250] 在一个实施方案中,反义链和有义链之间的互补性是完美的,即在任一链中均不存在核苷酸错配或另外的/缺失的核苷酸。

[0251] 在一个实施方案中,反义段和有义段之间的互补性是完美的,即在任一段中均不

存在核苷酸错配或另外的/缺失的核苷酸。

[0252] 在一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域之间的互补性是完美的,即在任一链的双链体区域中均不存在核苷酸错配或另外的/缺失的核苷酸。

[0253] 在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域之间的互补性不是完美的。在一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域的互补序列之间的同一性选自至少75%、80%、85%、90%和95%;其中包含反义双链体区域和有义双链体区域的siRNA适合于降低Notch 1的表达。在另一个实施方案中,其中反义双链体区域和有义双链体区域的互补序列之间的同一性选自至少75%、80%、85%、90%和95%的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%或75%,所述比较siRNA具有在反义双链体区域和有义双链体区域之间含完美同一性的双链体区域。如本文使用的,术语“比较siRNA”是这样的siRNA,其与待比较的siRNA等同(除了指定差异之外),并且在等同条件下进行测试。

[0254] 使用siRNA的RNAi涉及在反义链或反义段的全部或一部分和靶核酸的一部分之间的双链体区域形成。与反义链或反义段形成双链体区域的靶核酸的一部分定义为以在反义链或反义段和靶序列之间形成的第一个碱基对开始,并且以在反义链或反义段和靶序列之间形成的最后一个碱基对结束,第一个碱基对和最后一个碱基对包括在内,是靶核酸序列或简单的靶序列。在反义链或反义段和有义链或有义段之间形成的双链体区域可以但无需与在反义链或反义段和靶序列之间形成的双链体区域一样。即,有义链或有义段可以具有与靶序列不同的序列;然而,反义链或反义段必须能够与有义链或有义段和靶序列两者形成双链体结构。

[0255] 在一个实施方案中,在反义链或反义段和靶序列之间的互补性是完美的,即在任一核酸中无核苷酸错配或另外的/缺失的核苷酸。

[0256] 在一个实施方案中,反义双链体区域即与有义链或有义段形成双链体区域的反义链或反义段的部分和靶序列之间的互补性是完美的,即在任一核酸中无核苷酸错配或另外的/缺失的核苷酸。

[0257] 在另一个实施方案中,反义双链体区域和靶序列之间的互补性不是完美的。在一个实施方案中,反义双链体区域和靶序列的互补序列之间的同一性选自至少75%、80%、85%、90%或95%;其中包含反义双链体区域的siRNA适合于降低Notch 1的表达。在另一个实施方案中,其中反义双链体区域和靶序列的互补序列之间的同一性选自至少75%、80%、85%、90%和95%的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%或75%,所述比较siRNA与反义链或反义段和靶序列具有完美同一性。

[0258] 在另一个实施方案中,本发明的siRNA包含双链体区域,其中所述反义双链体区域具有与有义双链体区域中的核苷酸不碱基配对的选自1、2、3、4和5的核苷酸数目,并且其中所述siRNA适合于降低Notch 1的表达。碱基配对的缺乏是由于碱基之间的互补性的缺乏,即无沃森-克里克碱基配对,或是因为在反义双链体区域或有义双链体区域上不存在相应的核苷酸,使得产生凸起。在一个实施方案中,包含具有与有义双链体区域不碱基配对的选自1、2、3、4和5的核苷酸数目的反义双链体区域的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,在所述比较siRNA中,所述反义双链体区域的所有核苷酸均与所述有义双链体区域的所有核苷酸碱基配对。

[0259] 在另一个实施方案中,反义链或反义段具有与有义链或有义段不碱基配对的选自

1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目,并且其中包含所述反义链的siRNA适合于降低Notch 1的表达。互补性的缺乏是由于碱基之间的互补性缺乏,或是因为在反义链或反义段或者有义链或有义段上不存在相应的核苷酸。相应的核苷酸的缺乏导致在反义链或反义段或者有义链或有义段中的单链突出端或凸起(如果在双链体区域中)。在一个实施方案中,包含具有与有义链或有义段不碱基配对的选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目的反义链或反义段的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,其中所述反义链或所述反义段的所有核苷酸均与有义链或有义段的所有核苷酸互补。在一个实施方案中,包含具有与靶序列错配的选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目的反义链或反义段的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,其中所述反义链或所述反义段的所有核苷酸均与所述有义链或所述有义段的所有核苷酸互补。在另一个实施方案中,错配核苷酸全部在双链体区域外。

[0260] 在另一个实施方案中,反义双链体区域具有与有义双链体区域不碱基配对的选自1、2、3、4或5的核苷酸数目,并且其中包含所述反义双链体区域的siRNA适合于降低Notch 1的表达。互补性的缺乏是由于碱基之间的互补性的缺乏,或是因为在反义双链体区域或有义双链体区域上不存在相应的核苷酸,使得在反义双链体区域或有义双链体区域中产生凸起。在一个实施方案中,包含具有与有义双链体区域不碱基配对的选自1、2、3、4和5的核苷酸数目的反义双链体区域的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,其中所述反义双链体区域的所有核苷酸均与所述有义双链体区域的所有核苷酸互补。

[0261] 在另一个实施方案中,反义链具有与靶序列不碱基配对的选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目,并且其中包含所述反义链的siRNA适合于降低Notch 1的表达。互补性的缺乏是由于碱基之间的互补性缺乏,或是因为在反义链或反义段或者靶序列上不存在相应的核苷酸。相应的核苷酸的缺乏导致在反义链或反义段或者靶序列中的凸起。在一个实施方案中,包含具有与靶序列不碱基配对的选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目的反义链或反义段的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,其中所述反义链或反义段的所有核苷酸均与所述靶序列的所有核苷酸互补。在一个实施方案中,包含具有与靶序列错配的选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸数目的反义链或反义段的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%或75%,其中所述反义链或所述反义段的所有核苷酸均与所述靶序列的所有核苷酸互补。

[0262] 在另一个实施方案中,siRNA的反义双链体区域以及有义双链体区域和靶序列两者之间的互补性是这样的,使得反义双链体区域和有义双链体区域或靶序列在生理条件下(在生理学缓冲液中37°C)彼此杂交,并且siRNA适合于降低Notch 1的表达。在一个实施方案中,包含在生理条件下与有义双链体区域和靶序列杂交的反义双链体区域的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%,所述比较siRNA在反义链或反义段和靶序列之间具有完美互补性。

[0263] 在另一个方面,siRNA的反义双链体区域和有义双链体区域之间的互补性是这样的,使得反义双链体区域和有义双链体区域在下述条件下杂交:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70°C,并且适合于降低Notch 1的表达。在一个实施方案中,包含在400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70°C的条件下彼此杂交的反义双链体区域和有义双

链体区域的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%，所述比较siRNA在反义双链体区域和有义双链体区域之间具有完美互补性。

[0264] 在另一个实施方案中，siRNA的反义链或反义段和靶序列之间的互补性是这样的，使得反义链或反义段和靶序列在下述条件下杂交：400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70℃，并且其中siRNA适合于降低Notch 1的表达。在一个实施方案中，包含在下述条件下与靶序列杂交的反义链或反义段的siRNA能够使Notch 1的表达降低至比较siRNA的至少25%、50%、75%：400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、70℃，所述比较siRNA在反义链或反义段和靶序列之间具有完美互补性。

[0265] 长度：使用包含几十个或几百个碱基对的长核酸分子观察到RNA干扰，尽管一般优选较短的RNAi分子。

[0266] 在一个实施方案中，siRNA双链体区域的长度选自约16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个碱基对。在一个实施方案中，siRNA双链体区域的长度选自约16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个邻接碱基对。在另一个实施方案中，siRNA双链体区域的长度选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个碱基对。在另一个实施方案中，siRNA双链体区域的长度选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个邻接碱基对。

[0267] 在一个实施方案中，反义链的长度选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中，反义链的长度选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0268] 在一个实施方案中，反义段的长度选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中，反义段的长度选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0269] 在一个实施方案中，有义链的长度选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中，有义链的长度选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0270] 在一个实施方案中，有义段的长度选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中，有义段的长度选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0271] 在一个实施方案中，反义链的长度和有义链的长度独立地选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中，反义链的长度和有义链的长度独立地选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。在一个实施方案中，反义链和有义链在长度中是相等的。在另一个

实施方案中,反义链和有义链在长度中是相等的,其中所述长度选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0272] 在一个实施方案中,反义段的长度和有义段的长度独立地选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸。在一个实施方案中,反义段的长度和有义段的长度独立地选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。在一个实施方案中,反义段和有义段在长度中是相等的。在另一个实施方案中,反义段和有义段在长度中是相等的,其中所述长度选自13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸。

[0273] 在一个实施方案中,反义链或反义段的长度选自约17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸,其中所述反义链或反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列。

[0274] 在一个实施方案中,反义链或反义段的长度选自约17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中所述反义链或反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列。

[0275] 在一个实施方案中,有义链或有义段的长度选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸,其中所述有义链或有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0276] 在一个实施方案中,有义链或有义段的长度选自约17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中所述有义链或有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0277] 在一个实施方案中,反义链或反义段的长度和有义链或有义段的长度独立地选自约13至35、16至35、16至30、17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸,其中反义链或反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义链或有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0278] 在一个实施方案中,反义链的长度和有义链的长度独立地选自17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中反义链包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义链包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0279] 在一个实施方案中,反义段的长度和有义段的长度独立地选自17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0280] 在一个实施方案中,反义链和有义链在长度中是相等的,其中反义链包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义链包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0281] 在一个实施方案中,反义段和有义段在长度中是相等的,其中反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0282] 在一个实施方案中,反义链和有义链在长度中是相等的,其中所述长度选自17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至

25、20至24、21至25和21至24个核苷酸,其中反义链包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义链包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0283] 在一个实施方案中,反义段和有义段在长度中是相等的,其中所述长度选自17至35、17至30、17至25、17至24、18至29、18至25、18至24、18至23、19至25、19至24、19至23、20至25、20至24、21至25和21至24个核苷酸,其中反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0284] 在一个实施方案中,反义链和有义链在长度中是相等的,其中所述长度选自17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中反义链包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义链包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0285] 在一个实施方案中,反义段和有义段在长度中是相等的,其中所述长度选自17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35个核苷酸,其中反义段包含SEQ ID NO:8或1的核苷酸序列,并且其中有义段包含SEQ ID NO:9或3的核苷酸序列。

[0286] 某些实施方案提供了反义链和有义链组合(由SEQ ID NO:识别):8和9;1和3;4和5;6和7;以及10和11。

[0287] 某些实施方案提供了反义段和有义段组合(由SEQ ID NO:识别):8和9;1和3;4和5;6和7;以及10和11。

[0288] 末端(突出端和平端):本发明的siRNA可以包含突出端或是平端。如本文使用的,“突出端”具有其在本领域中的正常和惯常的含义,即延伸超出双链核酸中的互补链或段的末端核苷酸的核酸单链部分。术语“平端”包括双链核酸,由此两条链或两个段在相同位置处终止,与末端核苷酸是否碱基配对无关。在一个实施方案中,在平端处的反义链或反义段和有义链或有义段的末端核苷酸是碱基配对的。在另一个实施方案中,在平端处的反义链或反义段和有义链或有义段的末端核苷酸不碱基配对的。在另一个实施方案中,在平端处的反义链或反义段和有义链或有义段的末端两个核苷酸是碱基配对的。在另一个实施方案中,在平端处的反义链或反义段和有义链或有义段的末端两个核苷酸不碱基配对的。

[0289] 在一个实施方案中,siRNA在其一个末端处具有突出端并且在另一个末端处具有平端。在另一个实施方案中,siRNA在两个末端处具有突出端。在另一个实施方案中,siRNA在两个末端处是平端。在一个实施方案中,siRNA在一个末端处是平端。在另一个实施方案中,siRNA在末端处是平端,所述末端具有反义链或反义段的5'末端以及有义链或有义段的3'末端。在另一个实施方案中,siRNA在末端处是平端,所述末端具有反义链或反义段的3'末端以及有义链或有义段的5'末端。在另一个实施方案中,siRNA在两个末端处是平端。

[0290] 在另一个实施方案中,siRNA包含在3'或5'末端处的突出端。在一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的3'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在有义链或有义段上的3'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的5'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在有义链或有义段上的5'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段的5'末端和3'末端两者处的突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在有义链或有义段的5'末端和3'末端两者处的突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的5'突出端以及在有义链或有义段上的3'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的3'突出端以及在有义链或有义段上的5'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的3'突出端以及在有义链或有义链或



有义段上的3'突出端。在另一个实施方案中,siRNA具有在反义链或反义段上的5'突出端以及在有义链或有义段上的5'突出端。

[0291] 在一个实施方案中,在反义链或反义段的3'末端处的突出端具有选自1、2、3、4和5个核苷酸的长度。在一个实施方案中,在有义链或有义段的3'末端处的突出端具有选自1、2、3、4和5个核苷酸的长度。在一个实施方案中,在反义链或反义段的5'末端处的突出端具有选自1、2、3、4和5个核苷酸的长度。在一个实施方案中,在有义链或有义段的5'末端处的突出端具有选自1、2、3、4和5个核苷酸的长度。

[0292] 修饰:另一个方面涉及siRNA的修饰,并且与之一致,本发明的核酸分子可如下文概述的进行修饰。在本发明内的是本文公开的每个和任何修饰和模式,以及与此类修饰和模式相关,特别是涉及siRNA的本文的任何公开内容还可以应用于本发明的核酸分子,并且因此与核酸分子结合且在核酸分子上实现。在本发明内的还是在提及反义链和/或有义链的程度上,特别是谈及反义链和/或有义链以及构成此类反义链和/或有义链的核苷酸的修饰时,此类公开内容同样应用于反义段和/或有义段,特别是谈及反义段和/或有义段以及构成此类反义段和/或有义段的核苷酸的修饰时。

[0293] 根据本发明的siRNA是核糖核酸或经修饰的核糖核酸。本发明的siRNA的化学修饰提供了克服潜在局限性中的有力工具,所述潜在局限性包括但不限于天然RNA分子固有的体外和体内稳定性以及生物利用度。化学修饰的siRNA还可以使在人中活化干扰素活性的可能性降到最低。化学修饰可以进一步增强siRNA对靶细胞的功能递送。本发明的经修饰的siRNA可以包含反义链或有义链中任一或两者中的一个或多个化学修饰的核糖核苷酸。核糖核苷酸可以包含碱基、糖或磷酸盐部分的化学修饰。

[0294] 对碱基部分的修饰:次要方面涉及对碱基部分的修饰。本发明的siRNA的一个或多个核苷酸可以包含经修饰的碱基。“经修饰的碱基”意指在1'位置处,除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶外的核苷酸碱基。

[0295] 在一个方面,siRNA包括包含经修饰的碱基的至少一个核苷酸。在一个实施方案中,经修饰的碱基在反义链上。在另一个实施方案中,经修饰的碱基在有义链上。在另一个实施方案中,经修饰的碱基在双链体区域中。在另一个实施方案中,经修饰的碱基在双链体区域外,即在单链区域中。在另一个实施方案中,经修饰的碱基在反义链上,并且在双链体区域外。在另一个实施方案中,经修饰的碱基在有义链上,并且在双链体区域外。在另一个实施方案中,反义链的3'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一个实施方案中,有义链的3'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一个实施方案中,有义链的5'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。

[0296] 在一个实施方案中,siRNA具有1个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约2-4个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约4-6个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约6-8个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约8-10个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约10-12个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约12-14个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约14-16个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约16-18个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约18-20个经修饰的碱基。在另一个实施方案中,siRNA具有约20-22个经修饰

的碱基。在另一个实施方案中，siRNA具有约22-24个经修饰的碱基。在另一个实施方案中，siRNA具有约24-26个经修饰的碱基。在另一个实施方案中，siRNA具有约26-28个经修饰的碱基。在每种情况下，与相同但不含所述经修饰的碱基的siRNA相比较，包含所述经修饰的碱基的siRNA保留其活性的至少50%。

[0297] 在一个实施方案中，经修饰的碱基是嘌呤。在另一个实施方案中，经修饰的碱基是嘧啶。在另一个实施方案中，嘌呤中的至少一半是经修饰的。在另一个实施方案中，嘧啶中的至少一半是经修饰的。在另一个实施方案中，嘌呤全部是经修饰的。在另一个实施方案中，嘧啶全部是经修饰的。

[0298] 在另一个实施方案中，siRNA包括包含经修饰的碱基的核苷酸，其中所述碱基选自2-氨基腺苷、2,6-二氨基嘌呤、肌苷、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、蔡基、氨基苯基、5-烷基胞苷（例如5-甲基胞苷）、5-烷基尿苷（例如核糖胸苷）、5-卤代尿苷（例如5-溴尿苷）、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶（例如6-甲基尿苷）、丙炔、quesosine、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、怀丁苷（wybutosine）、怀丁氧苷（wybutoxosine）、4-乙酰胞苷、5-（羧基羟甲基）尿苷、5'-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、 $\beta$ -D-galactosylqueosine、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲氧羰基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-甲基-N6-异戊烯腺苷、 $\beta$ -D-mannosylqueosine、尿苷-5-氧乙酸和2-硫代胞苷。

[0299] 在另一个方面，本发明的siRNA包含脱碱基核苷酸。如本文使用的，术语“脱碱基的”指缺乏碱基或具有其他化学基团代替在1'位置处的碱基的部分，例如3',3'-连接的或5',5'-连接的脱氧脱碱基核糖衍生物。如本文使用的，具有经修饰的碱基的核苷酸不包括脱碱基核苷酸。在一个方面，siRNA包含至少一个脱碱基核苷酸。在一个实施方案中，脱碱基核苷酸在反义链上。在另一个实施方案中，脱碱基核苷酸在有义链上。在另一个实施方案中，脱碱基核苷酸在双链体区域中。在另一个实施方案中，脱碱基核苷酸在双链体区域外。在另一个实施方案中，脱碱基核苷酸在反义链上，并且在双链体区域外。在另一个实施方案中，脱碱基核苷酸在有义链上，并且在双链体区域外。在另一个实施方案中，反义链的3'末端核苷酸是脱碱基核苷酸。在另一个实施方案中，有义链的3'末端核苷酸是脱碱基核苷酸。在另一个实施方案中，反义链的5'末端核苷酸是脱碱基核苷酸。在另一个实施方案中，有义链的5'末端核苷酸是脱碱基核苷酸。在另一个实施方案中，siRNA具有选自1、2、3、4、5和6的脱碱基核苷酸数目。

[0300] 对糖部分的修饰：另一个次要方面涉及对糖部分的修饰。本发明的siRNA的一个或多个核苷酸可以包含经修饰的核糖部分。

[0301] 其中2'-OH是取代的在2'-位置处的修饰包括选自下述的非限制性例子：烷基、取代烷基、烷芳基、芳烷基、-F、-Cl、-Br、-CN、-CF<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-OCN、-O-烷基、-S-烷基、HS-烷基、-O-、-O-烯基、-S-烯基、-N-烯基、-SO-烷基、-烷基-OSH、-烷基-OH、-O-烷基-OH、-O-烷基-SH、-S-烷基-OH、-S-烷基-SH、-烷基-S-烷基、-烷基-O-烷基、-ON<sub>2</sub>、-N<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、烷基氨基、二烷基氨基、-氨基烷基、-氨基烷氧基、氨基酸、氨酰基、-ONH<sub>2</sub>、-O-氨基烷基、-O-氨基酸、-O-氨酰基、杂环烷基、杂环烷芳基、-氨基烷基氨基、-聚烷基氨基、-取代的甲硅烷基、-甲氧乙基（MOE）、烯基和炔基。进一步包括其中2'羟基例如通过亚甲基桥连接至相同核糖

部分的4'碳的“锁”核酸(LNA)作为本发明的2'修饰。优选取代基是2'-甲氧乙基、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基和2'-氟。

[0302] 在一个实施方案中, siRNA包含1-5个2'-修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含5-10个2'-修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含15-20个2'-修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含20-25个2'-修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含25-30个2'-修饰的核苷酸。

[0303] 在一个实施方案中, 反义链包含1-2个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约2-4个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约4-6个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约6-8个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约8-10个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约10-12个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约12-14个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约14-16个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约16-18个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约18-20个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约22-24个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约24-26个2'-修饰核苷酸。

[0304] 在一个实施方案中, 有义链包含1-2个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约2-4个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约4-6个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约6-8个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约8-10个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约10-12个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约12-14个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约14-16个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约16-18个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约18-20个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约22-24个2'-修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约24-26个2'-修饰核苷酸。

[0305] 在一个实施方案中, siRNA包含1-5个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含5-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含15-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含20-25个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中, siRNA包含25-30个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0306] 在一个实施方案中, 反义链包含1-2个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约2-4个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约4-6个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约6-8个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约8-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约10-12个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约12-14个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约14-16个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约16-18个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约18-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约22-24个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 反义链包含约24-26个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0307] 在一个实施方案中, 有义链包含1-2个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约2-4个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中, 有义链包含约4-6个2'-

OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约6-8个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约8-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约10-12个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约12-14个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约14-16个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约16-18个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约18-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约22-24个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,有义链包含约24-26个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0308] 在一个实施方案中,siRNA双链体区域包含1-5个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,siRNA双链体区域包含5-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,siRNA双链体区域包含15-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,siRNA双链体区域包含20-25个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,siRNA双链体区域包含25-30个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0309] 在一个实施方案中,反义双链体区域包含1-2个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约2-4个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约4-6个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约6-8个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约8-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约10-12个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约12-14个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约14-16个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约16-18个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约18-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约22-24个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在一个实施方案中,反义双链体区域包含约24-26个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0310] 在一个实施方案中,有义双链体区域包含1-2个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约2-4个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约4-6个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约6-8个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约8-10个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约10-12个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约12-14个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约14-16个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约16-18个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约18-20个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约22-24个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含约24-26个2'-OCH<sub>3</sub>修饰的核苷酸。

[0311] 在一个实施方案中,siRNA包含长度19个核苷酸的反义链和长度19个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸1、3、5、7、9、11、13、15、17和19处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸2、4、6、8、10、12、14、16和18处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度20个核苷酸的反义链和长度20个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸1、3、5、7、9、11、13、15、17和19处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸2、4、6、8、10、12、

14、16、18和20处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度21个核苷酸的反义链和长度21个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸2、4、6、8、10、12、14、16、18和20处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度22个核苷酸的反义链和长度22个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸2、4、6、8、10、12、14、16、18、20和22处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度23个核苷酸的反义链和长度23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸2、4、6、8、10、12、14、16、18、20和22处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。

[0312] 在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸3、5、7、9、11、13、15和17处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸4、6、8、10、12、14和16处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸5、7、9、11、13和15处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸6、8、10、12和14处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸7、9、11、13处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸8、10和12处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸7、9和11处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸8、10和12处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸7和9处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸8和10处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。在另一个实施方案中,siRNA包含长度18-23个核苷酸的反义链和长度18-23个核苷酸的有义链,其中所述反义链包含在核苷酸9和11处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,并且其中所述有义链包含在核苷酸8和10处的2'-OCH<sub>3</sub>修饰,其中所述反义链从5'-3'编号,并且所述有义链从3'-5'编号。

[0313] 在进一步的实施方案中,siRNA包含下述核苷酸序列,其中所述序列包含在由大写字母指示的核苷酸上的2'-OCH<sub>3</sub>修饰:

[0314] 在另一个实施方案中,反义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个2'-脱氧核苷酸。

[0315] 在另一个实施方案中,有义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个2'-脱氧核苷酸。

[0316] 在另一个实施方案中,反义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个2'-氟核苷酸。

- [0317] 在另一个实施方案中,有义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个2'-氟核苷酸。
- [0318] 在另一个实施方案中,反义链中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0319] 在另一个实施方案中,反义链中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0320] 在另一个实施方案中,反义链中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。
- [0321] 在另一个实施方案中,反义链中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。
- [0322] 在另一个实施方案中,反义链中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。
- [0323] 在另一个实施方案中,反义链中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。
- [0324] 在另一个实施方案中,有义链中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0325] 在另一个实施方案中,有义链中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0326] 在另一个实施方案中,有义链中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。
- [0327] 在另一个实施方案中,有义链中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。
- [0328] 在另一个实施方案中,有义链中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。
- [0329] 在另一个实施方案中,有义链中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。
- [0330] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0331] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0332] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。
- [0333] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。
- [0334] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。
- [0335] 在另一个实施方案中,反义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。
- [0336] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0337] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0338] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。
- [0339] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。
- [0340] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。
- [0341] 在另一个实施方案中,有义双链体区域中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。
- [0342] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0343] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0344] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。
- [0345] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。
- [0346] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。
- [0347] 在另一个实施方案中,反义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。
- [0348] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-O-甲基嘧啶核苷酸。
- [0349] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。
- [0350] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧嘧啶核苷酸。

[0351] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸。

[0352] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘧啶核苷酸是2'-氟嘧啶核苷酸。

[0353] 在另一个实施方案中,有义双链体侧翼区中的嘌呤核苷酸是2'-氟嘌呤核苷酸。

[0354] 模式:在本发明内的是涉及本文具体提及反义链提供的模式的任何公开内容同样应用于反义段,并且涉及本文具体提及有义链提供的模式的任何公开内容同样应用于有义段。

[0355] 在一个实施方案中,反义双链体区域包含多个组的经修饰的核苷酸,在本文中被称作“修饰组”,其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成,其中每个修饰组在一个或两个侧面上由第二组核苷酸(在本文中被称作“侧翼组”)侧接,其中每个所述侧翼组由未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行修饰的一个或多个核苷酸组成。在一个实施方案中,反义双链体区域中的每个修饰组是等同的,即每个修饰组由相等数目的相同修饰的核苷酸组成。在另一个实施方案中,每个侧翼组具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中,每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中,反义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中,所述修饰组的核苷酸包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中,所述修饰组的核苷酸包含经修饰的2'位置。

[0356] 在另一个方面,有义双链体区域包含多个组的修饰组,其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成,其中每个修饰组在一个或两个侧面上由侧翼组侧接,其中每个所述侧翼组由一个或多个核苷酸组成,所述一个或多个核苷酸是未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行修饰的。在一个实施方案中,有义双链体区域中的每个修饰组是等同的。在另一个实施方案中,每个侧翼组具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中,每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中,有义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中,所述修饰组的核苷酸包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中,所述修饰组的核苷酸包含经修饰的2'位置。

[0357] 在另一个方面,反义双链体区域和有义双链体区域各自包含多个修饰组,其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成,其中每个修饰组在一个或两个侧面上由侧翼组侧接,其中每个所述侧翼组由一个或多个核苷酸组成,所述一个或多个核苷酸是未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行修饰的。在一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的每个修饰组是等同的。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的每个侧翼组具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸各自包含相同的修饰组和相同的侧翼组。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中,反义双链体区域和有义双链体区域中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的2'位置。

[0358] 在一个方面,反义链包含多个组的经修饰的核苷酸,在本文中被称作“修饰组”,其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成,其中每个修饰组在一个或两个侧面上由第二组核苷酸(在本文中被称作“侧翼组”)侧接,其中每个所述侧翼组由一个或多个核苷酸组成,所述一个或多个核苷酸是未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行

修饰的。在一个实施方案中，反义链中的每个修饰组是等同的，即每个修饰组由相等数目的相同修饰的核苷酸组成。在另一个实施方案中，每个侧翼组具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中，每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中，反义链中的所述修饰组的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中，所述修饰组的核苷酸包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中，所述修饰组的核苷酸包含经修饰的2'位置。

[0359] 在另一个方面，有义链包含多个组的修饰组，其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成，其中每个修饰组在一个或两个侧面上由侧翼组侧接，其中每个所述侧翼组由一个或多个核苷酸组成，所述一个或多个核苷酸是未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行修饰的。在一个实施方案中，有义链中的每个修饰组是等同的。在另一个实施方案中，每个侧翼组具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中，每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中，有义链中的所述修饰组的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中，所述修饰组的核苷酸包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中，所述修饰组的核苷酸包含经修饰的2'位置。

[0360] 在另一个方面，反义链和有义链各自包含多个修饰组，其中每个修饰组由一个或多个等同修饰的核苷酸组成，其中每个修饰组在一个或两个侧面上由侧翼组侧接，其中每个所述侧翼组由一个或多个核苷酸组成，所述一个或多个核苷酸是未经修饰的或以与所述修饰组的核苷酸不同的方式进行修饰的。在一个实施方案中，反义链和有义链中的每个修饰组是等同的。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的每个侧翼组各自具有相等数目的核苷酸。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的每个侧翼组是等同的。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的所述修饰组的核苷酸各自包含相同的修饰组和相同的侧翼组。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的碱基。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的磷酸盐主链。在另一个实施方案中，反义链和有义链中的所述修饰组的核苷酸各自包含经修饰的2'位置。

[0361] 在另一个方面，修饰组和侧翼组在反义链上形成规律模式。在另一个方面，修饰组和侧翼组在有义链上形成规律模式。在一个实施方案中，修饰组和侧翼组在反义链和有义链两者上形成规律模式。在另一个实施方案中，修饰组和侧翼组在反义双链体区域上形成规律模式。在另一个方面，修饰组和侧翼组在有义双链体区域上形成规律模式。在一个实施方案中，修饰组和侧翼组在反义双链体区域和有义双链体区域两者上形成规律模式。

[0362] 在另一个方面，模式是空间或位置模式。空间或位置模式意指(a)核苷酸取决于其在双链部分的核苷酸序列内的位置进行修饰。相应地，待修饰的核苷酸是嘧啶还是嘌呤并不重要。相反，经修饰的位置取决于：(a)它在核酸链上的编号位置，其中核苷酸从5'末端到3'末端进行编号，其中链的5'末端核苷酸是位置一(反义链和有义链两者均从其各自的5'末端核苷酸开始编号)，或(b)修饰组相对于侧翼组的位置。因此，根据该实施方案，修饰模式始终是相同的，与待修饰的序列无关。

[0363] 在另一个实施方案中，在反义链上的修饰组数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在有义链上的修饰组数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在核酸的反义链上的侧翼组数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在核酸的有义链上的侧翼组数目选自1、2、



3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在一个实施方案中，在反义链和有义链中任一或两者上的修饰组数目和侧翼组数目是相同的。

[0364] 在另一个实施方案中，在反义双链体区域上的修饰组数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在有义双链体区域上的修饰组数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在核酸的反义双链体区域上的侧翼组数目是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，在核酸的有义双链体区域上的侧翼组数目是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在一个实施方案中，在反义双链体区域和有义双链体区域中任一或两者上的修饰组数目和侧翼组数目是相同的。

[0365] 在一个实施方案中，在链或双链体区域上的修饰组数目和侧翼组数目是相同的。在另一个实施方案中，在链或双链体区域上的修饰组数目和侧翼组数目是相同的，其中所述数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。

[0366] 在另一个实施方案中，修饰组中的核苷酸数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。在另一个实施方案中，侧翼组中的核苷酸数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。

[0367] 在一个实施方案中，在反义链和有义链两者上的每个修饰组是等同的。在一个实施方案中，在反义双链体区域和有义双链体区域两者上的每个修饰组是等同的。在另一个实施方案中，在反义链和有义链两者上的每个修饰组和每个侧翼组是等同的。在一个实施方案中，在反义双链体区域和有义双链体区域两者上的每个修饰组和每个侧翼组是等同的。

[0368] 在一个实施方案中，在反义链和有义链两者上的每个修饰组、每个修饰组位置、每个侧翼组和每个侧翼组位置是等同的。在一个实施方案中，在反义双链体区域和有义双链体区域两者上的每个修饰组、每个修饰组位置、每个侧翼组和每个侧翼组位置是等同的。在另一个实施方案中，反义链上的修饰组与有义链上的修饰组互补（反义链和有义链上的修饰组在彼此对面完美对齐）。在另一个实施方案中，在修饰组中不存在错配，使得反义链上的每个修饰组与有义链上的每个修饰组碱基配对。在另一个实施方案中，有义链上的每个修饰组相对于反义链上的修饰组移动1、2、3、4或5个核苷酸。例如，如果有义链上的每个修饰组移动一个核苷酸，并且修饰组在反义链上的位置一处起始，则有义链上的修饰组将在位置二处开始。在另一个实施方案中，反义链上的修饰组不重叠有义链的修饰组，即反义链上的修饰组的核苷酸不与有义链上的修饰组的核苷酸碱基配对。

[0369] 在一个实施方案中，当确定修饰组的位置时，不考虑在核酸链的末端处的脱氧核糖核苷酸，即位置编号以第一个核糖核苷酸或经修饰的核糖核苷酸开始。在另一个实施方案中，当确定修饰组的位置时，不考虑在核酸链的末端处的脱碱基核苷酸。

[0370] 在一个方面，修饰组包含反义链和有义链中任一或两者的5'末端核苷酸。在另一个实施方案中，侧翼组包含反义链和有义链中任一或两者的5'末端核苷酸。在另一个实施方案中，反义链和有义链中任一或两者的5'末端核苷酸是未经修饰的。在另一个实施方案中，修饰组包含反义双链体区域和有义双链体区域中任一或两者的最5'核苷酸。在另一个实施方案中，侧翼组包含反义双链体区域和有义双链体区域中任一或两者的最5'核苷酸。在另一个实施方案中，反义双链体区域和有义双链体区域中任一或两者的最5'核苷酸是未经修饰的。在另一个实施方案中，在反义链的位置10处的核苷酸是未经修饰的。在另一个实

施方案中,在有义链的位置10处的核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,修饰组包含在有义链的位置10处的核苷酸。

[0371] 在一个实施方案中,在2'位置处的修饰选自氨基、氟、甲氧基、烷氧基和C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-烷基。在另一个实施方案中,修饰是2'-O-甲基。

[0372] 在另一个方面,每个修饰组由一个核苷酸组成,并且每个侧翼组由一个核苷酸组成。在一个实施方案中,反义链上的每个修饰组与有义链上的侧翼组对齐。

[0373] 在另一个方面,每个修饰组由一个2'-O-甲基修饰的核苷酸组成,并且每个侧翼组由一个核苷酸组成。在一个实施方案中,每个侧翼组由一个未经修饰的核苷酸组成。在一个实施方案中,每个侧翼组由一个2'-O-甲基修饰的核苷酸组成。在另一个实施方案中,在反义链和有义链两者上的每个修饰组由一个2'-O-甲基修饰的核苷酸组成,并且在反义链和有义链两者上每个侧翼组由一个核苷酸组成,其中一条链上的修饰组与另一条链上的另一个修饰组不对齐或对齐且碱基配对,并且一条链上的侧翼组与另一条链上的侧翼组不对齐或对齐且碱基配对。在另一个实施方案中,排除任何任选的突出端,每条链上的每个修饰组与另一条链上的侧翼组不对齐或对齐且碱基配对。在一个实施方案中,侧翼组是未经修饰的。在另一个实施方案中,反义链上的位置一的核苷酸是2'-O-甲基修饰的。在另一个实施方案中,反义双链体区域的最5'核苷酸是2'-O-甲基修饰的。

[0374] 位置修饰方案在通过引用全文并入的国际专利申请中W02004/015107中描述。

[0375] 对磷酸盐主链的修饰:

[0376] 在本发明内的是涉及本文具体提及反义链或构成此类反义链的核苷酸提供的对磷酸盐主链的修饰的任何公开内容同样应用于反义段或构成此类反义段的核苷酸,并且涉及本文具体提及有义链或构成此类有义链的核苷酸提供的对磷酸盐主链的修饰的任何公开内容同样应用于有义段或构成此类有义段的核苷酸。

[0377] 在一个实施方案中,本发明的核酸分子和本发明的siRNA特别具有、含有或展示对磷酸盐主链的一种或几种修饰,由此此类修饰优选是本文描述的那种。

[0378] 本发明的siRNA的核苷酸的全部或一部分可以通过磷酸二酯键连接,如在未经修饰的核酸中发现的。然而,本发明的siRNA可以包含经修饰的磷酸二酯键。反义链或有义链的磷酸二酯键可以进行修饰,以独立地包括选自氮和硫的至少一个杂原子。在一个实施方案中,将核糖核苷酸与相邻核糖核苷酸连接的磷酸酯基团替换为经修饰的基团。在一个实施方案中,替换磷酸酯基团的经修饰的基团选自硫代磷酸酯、甲基磷酸酯或氨基磷酸酯基团。

[0379] 在一个实施方案中,反义链的核苷酸全部通过磷酸二酯键连接。在另一个实施方案中,反义双链体区域的核苷酸全部通过磷酸二酯键连接。在另一个实施方案中,有义链的核苷酸全部通过磷酸二酯键连接。在另一个实施方案中,有义双链体区域的核苷酸全部通过磷酸二酯键连接。在另一个实施方案中,反义链包含选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的经修饰的磷酸二酯基团数目。在另一个实施方案中,反义双链体区域包含选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的经修饰的磷酸二酯基团数目。在另一个实施方案中,有义链包含选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的经修饰的磷酸二酯基团数目。在另一个实施方案中,有义双链体区域包含选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的经修饰的磷酸二酯基团数目。

[0380] 在另一个实施方案中,构成反义双链体区域、有义双链体区域或突出端的一个或

多个核苷酸通过硫代磷酸酯键连接。在一个优选实施方案中,构成突出端的核苷酸通过一个或多个硫代磷酸酯键彼此连接。

[0381] 5'和3'末端修饰:

[0382] 在本发明内的是涉及本文具体提及反义链或构成此类反义链的核苷酸提供的对5'和3'末端的修饰的任何公开内容同样应用于反义段或构成此类反义段的核苷酸,并且涉及本文具体提及有义链或构成此类有义链的核苷酸提供的对5'和3'末端的修饰的任何公开内容同样应用于有义段或构成此类有义段的核苷酸。

[0383] 在一个实施方案中,本发明的核酸分子和本发明的siRNA特别具有、含有或展示5'和/或3'修饰,由此此类修饰优选是本文描述的那种。

[0384] 本发明的siRNA可以包括核酸分子,其包含在有义链或反义链中任一或两者上的末端5'或3'末端处的一个或多个经修饰的核苷酸、脱碱基核苷酸、无环或脱氧核糖核苷酸。在一个实施方案中,有义链和反义链两者的5'和3'末端核苷酸是未经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,有义链的5'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的3'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,有义链的3'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸和有义链的5'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的3'末端核苷酸和有义链的3'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸和有义链的3'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的3'末端核苷酸和有义链的5'末端核苷酸是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的3'末端核苷酸以及有义链的5'和3'末端核苷酸两者是经修饰的。在另一个实施方案中,反义链的5'和3'末端核苷酸两者是经修饰的。在一个实施方案中,有义链的5'和3'末端核苷酸两者是经修饰的。

[0385] 在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是磷酸化的。在另一个实施方案中,有义链的5'末端核苷酸是磷酸化的。在另一个实施方案中,反义链和有义链两者的5'末端核苷酸是磷酸化的。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是磷酸化的,并且有义链的5'末端核苷酸具有游离羟基(5'-OH)。在另一个实施方案中,反义链的5'末端核苷酸是磷酸化的,并且有义链的5'末端核苷酸是经修饰的。

[0386] 对5'和3'末端核苷酸的修饰并不限于在这些末端核苷酸上的5'和3'位置。对末端核苷酸的修饰的例子包括但不限于生物素、反转(脱氧)脱碱基、氨基、氟、氯、溴、CN、CF、甲氧基、咪唑、羧酸酯(carboxylate)、硫醇盐(thioate)、C1至C10低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基、OCF<sub>3</sub>、OCN、O-、S-、或N-烷基;O-、S-、或N-烯基;SOCH<sub>3</sub>;SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;ON<sub>2</sub>;N<sub>2</sub>;N<sub>3</sub>;杂环烷基(heterozycloalkyl);杂环烷芳基(heterozycloalkaryl);氨基烷基氨基;聚烷基氨基或取代的甲硅烷基,如尤其是例如通过引用全文并入的PCT专利申请W0 99/54459、欧洲专利EP 0 586 520B1或EP 0 618925B1中描述的。如本文使用的,“烷基”意指C1-C12-烷基,并且“低级烷基”意指C1-C6-烷基,包括C1-、C2-、C3-、C4-、C5-和C6-烷基。

[0387] 在另一个方面,反义链的5'末端、有义链的5'末端、反义链的3'末端或有义链的3'末端与前体药物部分共价连接。在一个实施方案中,该部分在胞内体中被切割。在另一个实施方案中,该部分在细胞质中被切割。

[0388] 具有不同种类的末端修饰的本发明siRNA的各种可能的非限制性实施方案在下表中呈现。

[0389] 根据本发明的干扰核糖核酸的各个实施方案

[0390]

根据本发明的干扰核糖核酸的各个实施方案

	反义链	有义链
1.) 5'末端	游离 OH	游离 OH
3'末端	游离 OH	游离 OH
2.) 5'末端	游离 OH	游离 OH
3'末端	末端修饰	末端修饰
3.) 5'末端	游离 OH	游离 OH
3'末端	游离 OH	末端修饰
4.) 5'末端	游离 OH	游离 OH
3'末端	末端修饰	游离 OH
5.) 5'末端	游离 OH	末端修饰
3'末端	游离 OH	游离 OH
6.) 5'末端	游离 OH	末端修饰
3'末端	末端修饰	游离 OH
7.) 5'末端	游离 OH	末端修饰
3'末端	游离 OH	末端修饰
8.) 5'末端	游离 OH	末端修饰
3'末端	末端修饰	末端修饰

[0391] 在另一个实施方案中,在反义链或有义链中任一或两者上的末端3'核苷酸或两个末端3'核苷酸是2'-脱氧核苷酸。在另一个实施方案中,2'-脱氧核苷酸是2'-脱氧嘧啶。在另一个实施方案中,2'-脱氧核苷酸是2'-脱氧胸苷。

[0392] shRNA和连接的siRNA:

[0393] 在本发明内的是涉及本文具体提及反义链或构成此类反义链的核苷酸提供的shRNA和连接的siRNA的任何公开内容同样应用于反义段或构成此类反义段的核苷酸,并且涉及本文具体提及有义链或构成此类有义链的核苷酸提供的对5'和3'末端的修饰的任何公开内容同样应用于有义段或构成此类有义段的核苷酸。

[0394] 在一个实施方案中,本发明的核酸分子和本发明的siRNA特别是shRNA和/或连接的siRNA,由此此类shRNA和/或连接的siRNA优选是本文描述的那种。

[0395] 在本发明内的是双链结构由两条分开的链即反义链和有义链形成。然而,还在本发明内的是反义链和有义链彼此共价连接。此类连接可以分别在构成反义链和有义链的核苷酸中任一之间发生。此类连接可以通过共价或非共价键形成。共价连接可以通过优选选自亚甲蓝和双功能基团的化合物,通过分别将两条链在一个或几个位置处连接一次或几次来形成。此类双功能基团优选选自双(2-氯乙基)胺、N-乙酰基-N'-(乙二醛苯甲酰(glyoxylbenzoyl))肼胺、4-硫尿嘧啶和补骨脂。

[0396] 在一个实施方案中,反义链和有义链通过环结构连接。在另一个实施方案中,环结构由非核酸聚合物组成。在另一个实施方案中,非核酸聚合物是聚乙二醇。在另一个实施方案中,反义链的5'末端连接至有义链的3'末端。在另一个实施方案中,反义链的3'末端连接至有义链的5'末端。

[0397] 在另一个实施方案中,环由核酸组成。如本文使用的,锁核酸(LNA)(Elayadi和Corey(2001)Curr Opin Investig Drugs.2(4):558-61)和肽核酸(PNA)(在Faseb J.(2000)14:1041-1060中综述)视为核酸,并且还可以用作环形成聚合物。在一个实施方案中,核酸是核糖核酸。在一个实施方案中,反义链的5'末端连接至有义链的3'末端。在另一个实施方案中,反义链的3'末端连接至有义链的5'末端。环由最低长度的四个核苷酸或核苷酸类似物组成。在一个实施方案中,环由选自4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15的核苷酸或核苷酸类似物长度组成。在一个实施方案中,环的长度足以将两条链以这样的方式共价连接,使得折回可以通过环结构或相似结构发生。核糖核酸构建体可以掺入合适的载体系统内。优选地,载体包含用于表达RNAi的启动子。优选地,分别的启动子是pol III,并且更优选地,启动子是如Good等人(1997)Gene Ther.4,45-54中描述的U6、H1、7SK启动子。

[0398] 在另一个实施方案中,根据本发明的核酸包含硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方案中,硫代磷酸酯核苷酸间键在距离反义链和有义链中任一或两者的3'末端或5'末端的5个核苷酸内。反义链可以包含约一至约五个硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0399] 实施方案的组合

[0400] 在本发明内的是涉及本文具体提及反义链或构成此类反义链的核苷酸提供的实施方案组合的任何公开内容同样应用于反义段或构成此类反义段的核苷酸,并且涉及本文具体提及有义链或构成此类有义链的核苷酸提供的对5'和3'末端的修饰的任何公开内容同样应用于有义段或构成此类有义段的核苷酸。

[0401] 在一个实施方案中,在有义链的3'末端处的突出端选自长度1、2、3、4和5个核苷酸。在一个实施方案中,在反义链的5'末端处的突出端选自长度1、2、3、4和5个核苷酸。在一个实施方案中,在有义链的5'末端处的突出端选自长度1、2、3、4和5个核苷酸。

[0402] 在一个实施方案中,siRNA分子在两个末端处均为平端,并且具有选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个邻接核苷酸的长度。

[0403] 在一个实施方案中, siRNA分子在一个末端上是平端, 并且siRNA分子的双链部分具有选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个邻接核苷酸的长度。

[0404] 在一个实施方案中, siRNA分子在两个末端上均具有突出端, 并且siRNA分子的双链部分具有选自16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个邻接核苷酸的长度。

[0405] 在一个实施方案中, siRNA分子包含突出端, 所述突出端包含至少一个脱氧核糖核苷酸。在一个实施方案中, siRNA分子包含突出端, 所述突出端包含两个脱氧核糖核苷酸。

[0406] 在一个实施方案中, siRNA分子具有在反义链的3'末端上和在有义链的3'末端处的突出端, 所述突出端包含至少一个脱氧核糖核苷酸。在一个实施方案中, siRNA分子具有在反义链的3'末端上和在有义链的3'末端处的突出端, 所述突出端包含两个脱氧核糖核苷酸。

[0407] 构成突出端的核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其组合。在一个实施方案中, 反义链和/或有义链包含在3'末端处的TT二核苷酸。

[0408] 在一个优选实施方案中, 如本文使用的, dT指示分子中的脱氧核糖核苷酸, 即T, 所述分子在其他方面是RNA或由核糖核苷酸组成, 所述核糖核苷酸可以例如如本文指示进行修饰。

[0409] 制备过程: 本发明的核酸可以使用本领域的常规方法产生, 包括化学合成或者在体外(例如失控转录(run off transcription))或体内表达核酸。在一个实施方案中, siRNA使用固相化学合成产生。在另一个实施方案中, 核酸使用表达载体产生。在一个实施方案中, 表达载体在靶细胞中产生本发明的核酸。相应地, 此类载体可以用于药物制备。用于本文描述的核酸分子合成的方法是本领域技术人员已知的。此类方法尤其在下述中描述: Caruthers等人, 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19, Thompson等人, 国际PCT公开号W0 99/54459, Wincott等人, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684, Wincott等人, 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, Brennan等人, 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45和Brennan, 美国专利号6,001,311(各自通过引用全文并入本文)。

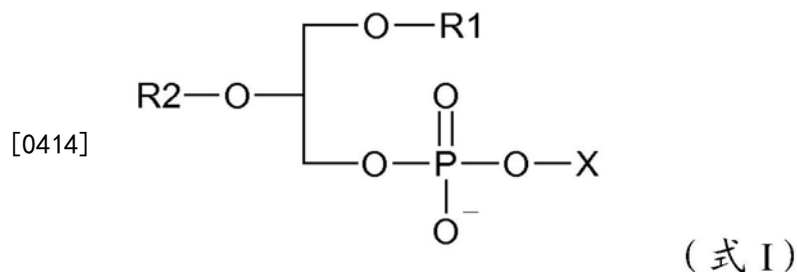
[0410] 如本文与本发明的任何方面结合使用的, 限定长度范围限制的措辞例如“从13到35”意指从13到35的任何整数, 即13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35。换言之, 由明确提及的两个整数限定的任何范围意欲包含且公开限定所述限制的任何整数以及在所述范围内包含的任何整数。

[0411] 递送/配制:

[0412] siRNA可以通过本领域技术人员已知的各种方法在体外和体内递送至细胞, 包括与细胞直接接触(“裸露”siRNA)或通过与促进靶向或递送到细胞内的一种或多种试剂组合。此类试剂和方法包括纳米乳剂(WO 2009/141257A1)、脂复合物、脂质体、离子电渗疗法、水凝胶、环糊精、纳米胶囊、微球体和纳米球以及蛋白质载体(例如Bioconjugate Chem. (1999) 10:1068-1074和WO 00/53722)。核酸/媒介物组合可以通过直接注射或通过使用输液泵在体内局部递送。本发明的siRNA可以通过各种手段包括静脉内、皮下、肌肉或皮内注射或吸入在体内递送。本发明的分子可以用作药学试剂。优选地, 药学试剂预防受试者中的疾病状态, 调节受试者中的疾病状态的发生, 或治疗(使症状减轻至一定程度, 优选症状的全部)受试者中的疾病状态。相应地, 本发明在一个进一步方面涉及包含本发明的核酸分子和此类试剂之一的组合物; 优选地, 此类组合物用于在本文描述的方法的任一种中递送本

发明的核酸分子。

[0413] 如国际专利申请W0 2009/141257A1中描述的纳米乳剂是具有吞噬作用增强表面的稳定的全氟化碳纳米乳剂,由此纳米乳剂具有不连续的全氟化碳相和缓冲的连续水相,并且包括(a)包含至少一种全氟化碳化合物的全氟化碳组分;(b)乳化组分;和(c)包含经由内吞作用诱导纳米乳剂的细胞摄取的至少一种化合物的内吞作用增强组分。纳米乳剂可以具有低于100nm的粒度,优选地纳米乳剂由具有约50nm的平均尺寸的粒子组成。用于测量粒度的方法是本领域已知的,例如在Murdock RC等人(R.C.Murdock等人,"Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique,"Toxicol.Sci.101(2),239(2008))或Bootz等人(A.Bootz,V.Vogel,D.Schubert和J.Kreuter,"Comparison of scanning electron microscopy,dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles,"Eur.J.Pharm.Biopharm.57(2),369(2004).)中描述。通常,缓冲的水相代表25至60重量%的纳米乳剂。在一个实施方案中,经由吞噬作用诱导细胞摄取的至少一种化合物选自转铁蛋白、载脂蛋白A1、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白、巨蛋白结合蛋白、触角蛋白、所述化合物的片段和衍生物以及具有类似效应的化合物,最优选地所述化合物是转铁蛋白或者其片段或衍生物。在另一个实施方案中,至少一种全氟化碳化合物选自 $C_mF_{2m+1}X$ 、 $XC_nF_{2n}X$ 、 $XC_nF_{2n}OC_oF_{2o}X$ 、 $N(C_oF_{2o}X)_3$ 和 $N(C_oF_{2o+1})_3$ (其中m是从3到10的整数,n和o是从1到5的整数,并且X独立地从Cl、Br和I中选择进一步发生),优选地全氟化碳选自全氟辛基溴化物和全氟三丁胺及其混合物。乳化组分可以包含至少一种磷脂作为基础的乳化组分和一种或多种辅助脂质。至少一种脂质选自由下式I表示的化合物:



[0415] 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自H和 $C_{16-24}$ 酰基残基,其可以是饱和的或不饱和的,并且可以携带1至3个残基 $R^3$ ,并且其中C原子中的一个或多个可以由O或 $NR^4$ 取代,并且X选自H、 $-(CH_2)_p-N(R^4)_3^+$ 、 $-(CH_2)_p-CH(N(R^4)_3^+)-COO^-$ 、 $-(CH_2)_p-CH(OH)-CH_2OH$ 和 $-CH_2(CHOH)_p-CH_2OH$ (其中p是从1到5的整数; $R^3$ 独立地选自H、低级烷基、F、Cl、CN和OH;并且 $R^4$ 独立地选自H、 $CH_3$ 和 $CH_2CH_3$ )或其药学可接受的盐,优选地 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自H和未被取代的 $C_{16-24}$ 酰基残基,其可以是饱和的或不饱和的,并且X选自胆碱、丝氨酸、乙醇胺和肌醇残基、最优选地磷脂组分选自磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺及其混合物。辅助脂质可以选自脂肪酸、甾类、维生素及其混合物。在一个优选实施方案中,纳米乳剂包含全氟辛基溴化物作为全氟化碳组分(a),包含磷脂酰胆碱、鞘磷脂、胆固醇和溶血磷脂酰胆碱作为磷脂的乳化组分(b)以及转铁蛋白作为吞噬作用增强组分(c)

[0416] 也可以用于本发明的核酸分子的配制和递送中的包含磷脂酰胆碱的脂质纳米颗粒例如在下述中描述:Torchilin VP(V.P.Torchilin,"Recent advances with liposomes

as pharmaceutical carriers,"Nat.Rev.Drug Discov.4(2),145(2005)),Ozpolat B等人(B.Ozpolat,A.K.Sood和G.Lopez-Berestein,"Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer,"J.Intern.Med.267(1),44(2010))或Abbasalipourkabir R等人(R.Abbasalipourkabir,A.Salehzadeh和R.Abdullah,"Characterization and stability of nanostructured lipid carriers as drug delivery system,"Pak.J.Biol.Sci.15(3),141(2012))。

[0417] 可以用于本发明的核酸分子的配制和/或递送的另一种手段是含有聚(乙二醇)脂质的表面修饰的脂质体(PEG修饰的或长循环脂质体或隐形脂质体)。这些制剂通过阻止脂质体或脂复合物溶液聚集和融合提供用于增加其稳定性的方法。制剂还具有在体内抵抗调理素作用和通过单核巨噬细胞系统(MPS或RES)消除的附加利益,从而允许对于封装药物更长的血液循环时间和增强的组织暴露。此类脂质体已显示在肿瘤中选择性累积,推测是通过在新形成血管的靶组织中的外渗和捕获(Lasic等人,Science 1995,267,1275-1276;Oku等人,1995,Biochim.Biophys.Acta,1238,86-90)。长循环脂质体增强DNA和RNA的药物代谢动力学和药效学,特别是与已知在MPS的组织中累积的常规阳离子脂质体相比较(Liu等人,J.Biol.Chem.1995,42,24864-24780;Choi等人,国际PCT公开号W0 96/10391;Ansell等人,国际PCT公开号W0 96/10390;Holland等人,国际PCT公开号W0 96/10392)。长循环脂质体也使siRNA免于核酸酶降解。

[0418] 可以用于本发明的核酸分子的配制和/或递送中的进一步手段是脂复合物,如例如W0 2005/105152中描述的。在一个优选实施方案中,此类脂复合物是由下述组成的带正电的脂质体:

[0419] (a) 约50摩尔% $\beta$ -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈酰-N-油酰-酰胺三盐酸盐,优选 $\beta$ -(L-精氨酸)-2,3-L-二氨基丙酸-N-棕榈酰-N-油酰-酰胺三盐酸盐,(b) 约48至49摩尔%1,2-二植酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPhyPE),和(c) 约1至2摩尔%1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇,优选N-(碳酰-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺钠盐。

[0420] 药物组合物

[0421] 本发明的核酸分子可以配制为药物组合物。药物组合物可以单独或与其他试剂组合用作药物或诊断试剂。药物组合物可以用于本发明的任何方法中。

[0422] 例如,本发明的一种或多种核酸分子和/或一种或多种siRNA可以与递送媒介物(例如纳米乳剂或脂质体)和赋形剂,例如载体、稀释剂组合。在一个优选实施方案中,药物组合物是如本文节段“递送/配制”中描述的组合物。

[0423] 还可以添加其他试剂例如防腐剂和稳定剂。用于递送核酸分子的方法是本领域已知的,并且例如在Akhtar等人,1992,Trends Cell Bio.,2,139;Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics,ed.Akhtar,1995,Maurer等人,1999,Mol.Memb.Biol.,16,129-140;Hofland和Huang,1999,Handb.Exp.Pharmacol.,137,165-192;和Lee等人,2000,ACS Symp.Ser.,752,184-192,美国专利号6,395,713和PCT W0 94/02595(其各自通过引用全文并入本文)中描述。本发明的siRNA还可以与其他治疗化合物组合施用,分开或同时例如作为组合的单位剂量施用。在一个实施方案中,本发明包括包含在生理学/药学可接受的赋形剂中的根据本发明的一种或多种siRNA的药物组合物,所述赋形



剂例如稳定剂、防腐剂、稀释剂、缓冲剂等等。

[0424] 用于本发明的药物和药物组合物的剂量水平可以由本领域技术人员通过例行实验进行测定。在一个实施方案中,单位剂量含有约0.01mg/kg至约100mg/kg体重的siRNA。在一个实施方案中,siRNA的剂量为约10mg/kg至约25mg/kg体重。在一个实施方案中,siRNA的剂量为约1mg/kg至约10mg/kg体重。在一个实施方案中,siRNA的剂量为约0.05mg/kg至约5mg/kg体重。在另一个实施方案中,siRNA的剂量为约0.1mg/kg至约5mg/kg体重。在另一个实施方案中,siRNA的剂量为约0.1mg/kg至约1mg/kg体重。在另一个实施方案中,siRNA的剂量为约0.1mg/kg至约0.5mg/kg体重。在另一个实施方案中,siRNA的剂量为约0.5mg/kg至约1mg/kg体重。

[0425] 在一个方面,药物组合物是无菌可注射水性悬浮液或溶液。在一个方面,药物组合物采取冻干形式。在一个实施方案中,药物组合物包括包含本发明的siRNA分子的纳米乳剂。在一个实施方案中,药物组合物包含冻干的脂复合物,其中所述脂复合物包含本发明的siRNA。在另一个实施方案中,药物组合物包含脂复合物的水性悬浮液,其中所述脂复合物包含本发明的siRNA。

[0426] 本发明的药物组合物和药物可以在所公开的治疗方法中施用于受试者(哺乳动物)。在一个实施方案中,哺乳动物选自人、犬、猫、马、牛、猪、山羊、绵羊、小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠。在一个实施方案中,哺乳动物是人。在另一个实施方案中,哺乳动物是非人哺乳动物。

[0427] 试剂盒

[0428] 在一个进一步方面,本发明涉及试剂盒。试剂盒包含本发明的核酸分子,优选本发明的siRNA,以及选自下述的至少一种:容器、说明手册、缓冲液、阳性对照、阴性对照、一种或多种递送试剂(由此递送试剂优选是本文公开的那种)和反应混合物。试剂盒可用于/适合于本发明的任何方法的实践。在一个实施方案中,试剂盒用于本发明的任何方法中。

[0429] 治疗方法

[0430] 本发明的核酸分子有用于且可以用于疾病的治疗和/或预防中。在一个实施方案中,该方法包括给受试者施用核酸。优选地,受试者患有疾病或处于患有疾病的危险中。优选地,受试者是哺乳动物。如本文优选使用的,哺乳动物是选自人类、猿、猴、小鼠、大鼠、兔、猫、犬、牛、马、驯养动物、工作动物和伴侣动物的动物。更优选地,受试者是人类。

[0431] 本发明的核酸分子以有效量施用于受试者。优选地,此有效量是药理学有效量或治疗有效量。

[0432] 本发明的核酸分子原则上可以以本领域技术人员已知的任何形式施用。优选施用途径是全身施用,更优选通过肠胃外施用,优选通过注射。备选地,药物可以局部施用。其他施用途径包含肌内、腹膜内、和皮下、per orum、鼻内、气管内或肺,其中优先给予最小侵袭性同时确保功效的施途径。

[0433] 肠胃外施用一般用于皮下、肌内或静脉内注射和输注。另外,用于肠胃外施用的一种方法采用缓慢释放或持续释放系统的植入,其确保维持恒定的剂量水平,这是本领域普通技术人员众所周知的。

[0434] 此外,本发明的优选药物可以经由合适的鼻内媒介物、植入剂的局部使用以鼻内形式施用,或经由经皮途径使用本领域普通技术人员众所周知的那些形式的经皮皮肤贴剂施用。为了以经皮递送系统的形式施用,剂量施用当然在剂量方案自始至终是连续的而不

是间断的。其他优选局部制剂包括乳膏、软膏、洗剂、气溶胶喷雾和凝胶。

[0435] 在一个优选实施方案中,本发明的核酸分子是本发明的siRNA。

[0436] 在一个实施方案中,用于疾病治疗和/或预防的方法是这样的疾病,所述疾病可以通过减少Notch 1基因的表达,并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA翻译进行治疗。落入该组疾病内的具体疾病和医学状况是本领域技术人员已知的。此外,用于确定这类疾病的方法同样是本领域技术人员已知的。优选疾病是癌症,优选是那些形式的癌症:其中Notch 1是上调的,与非疾病组织或非患病组织相比较,Notch 1以改变的方式表达,和/或其中疗效可以通过减少Notch1基因的表达,并且更具体而言通过减少编码Notch 1的mRNA的翻译来实现。

[0437] 在一个实施方案中,疾病是下述组之一,其中Notch 1的牵涉已得到证实,并且分别地Notch 1已鉴定为成药靶:食管癌(参见Streppel,E.A.Montgomery和A.Maitra,"New Advances in the Pathogenesis and Progression of Barrett's Esophagus," Curr.Mol.Med.(2013))、口腔鳞状细胞癌(参见R.Yoshida等人,"The pathological significance of Notchlin oral squamous cell carcinoma,"Lab Invest(2013))、头颈癌(参见J.T.Lin等人,"Association of high levels of Jagged-land Notchlexpression with poor prognosis in head and neck cancer,"Ann.Surg.Oncol.17(11),2976(2010))、舌癌(参见Y.H.Joo,C.K.Jung,M.S.Kim和D.I.Sun,"Relationship between vascular endothelial growth factor and Notchlexpression and lymphatic metastasis in tongue cancer,"Otolaryngol.Head Neck Surg.140(4),512(2009))、白血病(参见E.Kanamori等人,"Flow cytometric analysis of Notchland Jaggedlexpression in normal blood cells and leukemia cells,"Exp.Ther.Med.4(3),397(2012);和Zhang J等人(J.Zhang等人,"Prognostic impact of delta-like ligand 4and Notchlin acute myeloid leukemia,"Oncol.Rep.28(4),1503(2012))、肾细胞癌(参见Q.Ai等人,"High-level expression of Notchlincreased the risk of metastasis in T1stage clear cell renal cell carcinoma,"PLoS.One.7(4),e35022(2012)和J.Sjolund等人,"The notch and TGF-beta signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma,"PLoS.One.6(8),e23057(2011))、胃癌(参见T.S.Yeh等人,"The activated Notchlsignal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2,"Cancer Res.69(12),5039(2009)和Y.Sun等人,"Differential Notchland Notch2expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers,"Arch.Pathol.Lab Med.135(4),451(2011))、结肠腺癌(参见M.Reedijk等人,"Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma,"Int J.Oncol.33(6),1223(2008)和M.Reedijk等人,"Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma,"Int J.Oncol.33(6),1223(2008))、子宫内膜癌/子宫体(参见Y.Mitsushashi等人,"Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells,"Histopathology 60(5),826(2012))、宫颈癌/子宫颈(参见L.Santos等人,"Identification of differential expressed transcripts in cervical cancer of Mexican patients,"Tumour.Biol.32

(3), 561 (2011))、肝内胆管癌(参见Q.Zhou等人, "The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma," *BMC.Cancer* 13, 244 (2013) 和 S.Zender等人, "A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas," *Cancer Cell* 23 (6), 784 (2013))、肝细胞癌(参见 A.Villanueva等人, "Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice," *Gastroenterology* 143 (6), 1660 (2012) 和 R.Fan等人, "Cooperation of deregulated Notch signaling and Ras pathway in human hepatocarcinogenesis," *J.Mol.Histol.* 42 (5), 473 (2011))、骨肉瘤(参见 J.Yang和W.Zhang, "New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy," *Curr.Opin.Oncol.* 25 (4), 398 (2013))、膀胱癌(参见 A.G.Abdou等人, "Immunohistochemical analysis of the role and relationship between Notch-1 and Oct-4 expression in urinary bladder carcinoma," *APMIS* (2013))、恶性黑色素瘤(参见 C.S.Muller, "Notch signaling and malignant melanoma," *Adv.Exp.Med.Biol.* 727, 258 (2012))、甲状腺癌(参见 H.S.Park等人, "Notch1 receptor as a marker of lymph node metastases in papillary thyroid cancer," *Cancer Sci.* 103 (2), 305 (2012))、肺腺癌(参见 K.A.Hassan等人, "Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma," *Clin.Cancer Res.* 19 (8), 1972 (2013) 和 B.Westhoff等人, "Alterations of the Notch pathway in lung cancer," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106 (52), 22293 (2009))、前列腺癌(参见 H.Zhu等人, "Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers," *Am.J.Transl.Res.* 5 (3), 368 (2013)) 和 M.Kashat等人, "Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness," *Am.J.Transl.Res.* 4 (4), 432 (2012))、乳腺癌(参见 J.Speiser等人, "Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer," *Int J.Surg.Pathol.* 20 (2), 139 (2012) 和 S.Mittal等人, "Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis," *Mol.Cancer* 8, 128 (2009))、卵巢癌(参见 S.L.Rose, M.Kunnimalaiyaan, J.Drenzek 和 N.Seiler, "Notch 1 signaling is active in ovarian cancer," *Gynecol.Oncol.* 117 (1), 130 (2010))、胰腺癌(参见 F.H.Sarkar, S.Banerjee 和 Y.Li, "Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment," *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 224 (3), 326 (2007), O.JP De La等人, "Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105 (48), 18907 (2008),

[0438] E.Ristorcelli 和 D.Lombardo, "Targeting Notch signaling in pancreatic cancer," *Expert.Opin.Ther.Targets.* 14 (5), 541 (2010), Z.Wang 等人, "Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells," *Cancer* 106 (11), 2503 (2006), P.Buchler 等人, "The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer," *Ann.Surg.* 242 (6), 791, discussion (2005), Z.Wang

等人,"Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells,"Mol.Cancer Ther.5(3),483(2006),Z.Wang等人,"Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells,"Cancer Res.66(5),2778(2006))、和神经胶质瘤(参见X.Zhang等人,"Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation,"Cancer Sci.103(2),181(2012),L.Jiang等人,"Notch1 expression is upregulated in glioma and is associated with tumor progression,"J.Clin.Neurosci.18(3),387(2011),J.Li等人,"Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma,"J.Surg.Oncol.103(8),813(2011)和S.Puget等人,"Candidate genes on chromosome 9q33-34 involved in the progression of childhood ependymomas,"J.Clin.Oncol.27(11),1884(2009))。

[0439] 在本发明内的是除本发明的核酸分子之外,至少一种进一步的治疗或药学活性剂(在本文中也称为“次级或进一步试剂”)也用于治疗方法中。此类治疗方法也被称为组合疗法。

[0440] “组合疗法”(或“共同疗法”)包括施用本发明的核酸分子和至少次级或进一步试剂作为具体治疗方案的部分,所述具体治疗方案预期提供来自这些治疗试剂(即本发明的药物和所述次级或进一步试剂)的共同作用的有利效应。组合的有利效应包括但不限于起因于治疗试剂组合的药物代谢动力学或药效学共同作用。以组合的这些治疗试剂的施用通常在限定时间段(取决于所选择的组合,通常为数分钟、数小时、数天或数周)上进行。

[0441] “组合疗法”可以但一般不预期涵盖施用这些治疗试剂中的两种或更多种作为分开的单一疗法方案的部分。“组合疗法”预期包含这些治疗试剂以顺序方式的施用,即其中每种治疗试剂在不同时间施用,以及这些治疗试剂或治疗试剂中的至少两种以基本上同时的方式施用。基本上同时的施用可以例如通过给受试者施用具有每种治疗试剂的固定比率的单一胶囊或者对于治疗试剂各自以多重单一胶囊来完成。

[0442] 每种治疗试剂的顺序或基本上同时的施用可以通过任何适当的途径来实现,所述途径包括但不限于局部途径、经口途径、静脉内途径、肌内途径和通过粘膜组织的直接吸收。治疗试剂可以通过相同途径或不同途径进行施用。例如,所选择的组合中的第一治疗试剂可以通过注射进行施用,而组合的其他治疗试剂可以局部施用。备选地,例如,所有治疗试剂均可局部施用或所有治疗试剂均可通过注射进行施用。除非另有说明,否则其中治疗试剂施用的顺序不是很关键。“组合疗法”还可以包含与其他生物学活性成分进一步组合的如上所述的治疗试剂的施用。当组合疗法进一步包含非药物治疗时,非药物治疗可以在任何合适的时间进行,只要达到来自治疗试剂和非药物治疗的组合的共同作用的有利效应。例如,在适当情况下,当非药物治疗从治疗试剂的施用中暂时去除可能数天或甚至数周时,仍达到有利效应。

[0443] 与此一致,此类进一步的治疗或药学活性剂也施用于受试者。在一个实施方案中,进一步的治疗或药学活性剂在本发明的核酸分子之前、一起或之后施用。在一个实施方案中,进一步的治疗或药学活性剂是选自下述的一种:紫杉烷衍生物例如多西他赛、紫杉

醇(参见Q.F.Ye等人,"siRNA-mediated silencing of Notch-1enhances docetaxel induced mitotic arrest and apoptosis in prostate cancer cells,"Asian Pac.J.Cancer Prev.13(6),2485(2012),C.C.Zhang等人,"Synergistic effect of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014and docetaxel in breast cancer models,"Stem Cells Transl.Med.2(3),233(2013),K.A.Hassan等人,"Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma,"Clin.Cancer Res.19(8),1972(2013),Y.P.Liu等人,"Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling,"Cancer Res.73(1),406(2013)和S.Zang等人,"RNAi-mediated knockdown of Notch-1leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer,"Oncol.Rep.23(4),893(2010))、铂衍生物例如顺铂和奥沙利铂(参见K.A.Hassan等人,"Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma,"Clin.Cancer Res.19(8),1972(2013)和Z.P.Zhang等人,"Correlation of Notch1expression and activation to cisplatin-sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma,"Ai.Zheng.28(2),100(2009))、核苷类似物例如5-氟尿嘧啶(参见R.D.Meng等人,"gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity,"Cancer Res.69(2),573(2009))、拓扑异构酶I抑制剂例如伊立替康(参见R.D.Meng等人,"gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity,"Cancer Res.69(2),573(2009))、嵌入物质例如多柔比星(参见Y.P.Liu等人,"Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling,"Cancer Res.73(1),406(2013))、核苷类似物例如吉西他滨(参见X.Du等人,"Notch1contributes to chemoresistance to gemcitabine and serves as an unfavorable prognostic indicator in pancreatic cancer,"World J.Surg.37(7),1688(2013),S.Yabuuchi等人,"Notch signaling pathway targeted therapy suppresses tumor progression and metastatic spread in pancreatic cancer,"Cancer Lett.335(1),41(2013)和S.Richter等人,"A phase I study of the oral gamma secretase inhibitor R04929097in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors(PHL-078/CTEP 8575),"Invest New Drugs(2013))、合成糖皮质激素例如地塞米松(参见Q.Zhou等人,"The roles of Notch1expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma,"BMC.Cancer 13,244(2013))和烷化剂例如替莫唑胺(参见C.A.Gilbert,M.C.Daou,R.P.Moser和A.H.Ross,"Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence,"Cancer Res.70(17),6870(2010))。

[0444] 由此治疗方法是组合疗法的本发明方法的一个实施方案是其中不是施用至少一

种进一步的药学或治疗活性剂,受试者接受放射疗法的组合疗法。

[0445] 放射疗法(也被称为X射线疗法或照射)是使用电离辐射以杀死癌细胞。放射疗法在医学领域中用于治疗几乎每一个类型的实体瘤。照射也用于治疗白血病和淋巴瘤。放射疗法通过损坏其遗传物质来损害或破坏待治疗区域中的细胞,使得这些细胞不能继续生长和分裂。放射疗法的效应也局限于且限制于待治疗的区域。对每个部位的辐射剂量取决于众多因素,包括每个癌症类型的放射敏感性和附近是否存在可以被放射所损坏的组织和器官。放射疗法的目标是损坏尽可能多的癌细胞,同时限制对附近健康组织的伤害。

[0446] 在用于疾病治疗和/或预防的本发明方法的一个进一步的实施方案中,包括给受试者施用本发明的核酸分子优选本发明的siRNA,由此疾病优选是癌症且更优选如本文公开的癌症,该方法实际上是辅助治疗的辅助疗法。此类辅助疗法的目的是帮助主要治疗,优选主要的癌症治疗。

[0447] 本发明的核酸分子有用于且可以用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法中。在一个实施方案中,该方法包括将本发明的核酸施用于受试者(由此受试者患有疾病优选癌症),以及涉及疾病的癌细胞和/或在疾病的治疗中待通过给受试者供应的任何疗法或者通过给受试者施用任何药学或治疗活性剂解决、损坏和/或破坏的细胞,所述细胞对此类疗法和/或此类药学或治疗活性剂不敏感或不再敏感。通常,在施用本发明的核酸分子后,所述细胞再次变得对此类疗法和/或药学或治疗活性剂,至少对治疗和/或药学相关水平敏感。此类疗法优选是癌症疗法,包括但不限于基于细胞生长抑制剂的疗法和放射疗法,并且此类药学或治疗活性剂是在癌症疗法中使用的那种。优选地,本发明的核酸分子是本发明的siRNA。

[0448] 在这个范围内,用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法是用于使癌细胞再致敏的方法,所述癌细胞对癌症疗法和/或癌症疗法中使用的药学或治疗活性剂不敏感或不再敏感。还应认识到用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法是用于癌症治疗的方法的辅助疗法。

[0449] 应认识到本文与用于疾病治疗和/或预防的方法结合而公开的内容同样可应用于用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法。这特别应用于此类方法涉及方法的受试者、本发明的核酸分子的施用和施用途径等等的方面。在这个范围内,用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法是用于疾病治疗和/或预防的方法的一个实施方案。可以建立对疗法(所述疗法通常应用于患有此类癌症形式的受试者)的抗性的优选癌症形式是下述:

[0450] 食管癌(参见Streppel,E.A.Montgomery和A.Maitra,"New Advances in the Pathogenesis and Progression of Barrett's Esophagus,"Curr.Mol.Med.(2013))、口腔鳞状细胞癌(参见R.Yoshida等人,"The pathological significance of Notchlin oral squamous cell carcinoma,"Lab Invest(2013))、头颈癌(参见J.T.Lin等人,"Association of high levels of Jagged-land Notch-lexpression with poor prognosis in head and neck cancer,"Ann.Surg.Oncol.17(11),2976(2010))、舌癌(参见Y.H.Joo,C.K.Jung,M.S.Kim和D.I.Sun,"Relationship between vascular endothelial growth factor and Notchlexpression and lymphatic metastasis in tongue cancer,"Otolaryngol.Head Neck Surg.140(4),512(2009))、白血病(参见E.Kanamori等人,"Flow cytometric analysis of Notchland Jaggedlexpression in normal blood cells and leukemia cells,"Exp.Ther.Med.4(3),397(2012);和Zhang J

等人(J.Zhang等人,"Prognostic impact of delta-like ligand 4 and Notch1 in acute myeloid leukemia,"*Oncol.Rep.*28(4),1503(2012))、肾细胞癌(参见Q.Ai等人,"High-level expression of Notch1 increased the risk of metastasis in T1 stage clear cell renal cell carcinoma,"*PLoS.One.*7(4),e35022(2012)和J.Sjolund等人,"The notch and TGF-beta signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma,"*PLoS.One.*6(8),e23057(2011))、胃癌(参见T.S.Yeh等人,"The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2,"*Cancer Res.*69(12),5039(2009)和Y.Sun等人,"Differential Notch1 and Notch2 expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers,"*Arch.Pathol.Lab Med.*135(4),451(2011))、结肠腺癌(参见M.Reedijk等人,"Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma,"*Int J.Oncol.*33(6),1223(2008)和M.Reedijk等人,"Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma,"*Int J.Oncol.*33(6),1223(2008))、子宫内膜癌/子宫体(参见Y.Mitsunashi等人,"Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells,"*Histopathology* 60(5),826(2012))、宫颈癌/子宫颈(参见L.Santos等人,"Identification of differentially expressed transcripts in cervical cancer of Mexican patients,"*Tumour.Biol.*32(3),561(2011))、肝内胆管癌(参见Q.Zhou等人,"The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma,"*BMC.Cancer* 13,244(2013)和S.Zender等人,"A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas,"*Cancer Cell* 23(6),784(2013))、肝细胞癌(参见A.Villanueva等人,"Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice,"*Gastroenterology* 143(6),1660(2012)和R.Fan等人,"Cooperation of deregulated Notch signaling and Ras pathway in human hepatocarcinogenesis,"*J.Mol.Histol.*42(5),473(2011))、骨肉瘤(参见J.Yang和W.Zhang,"New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy,"*Curr.Opin.Oncol.*25(4),398(2013))、膀胱癌(参见A.G.Abdou等人,"Immunohistochemical analysis of the role and relationship between Notch-1 and Oct-4 expression in urinary bladder carcinoma,"*APMIS*(2013))、恶性黑色素瘤(参见C.S.Muller,"Notch signaling and malignant melanoma,"*Adv.Exp.Med.Biol.*727,258(2012))、甲状腺癌(参见H.S.Park等人,"Notch1 receptor as a marker of lymph node metastases in papillary thyroid cancer,"*Cancer Sci.*103(2),305(2012))、肺腺癌(参见K.A.Hassan等人,"Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma,"*Clin.Cancer Res.*19(8),1972(2013)和B.Westhoff等人,"Alterations of the Notch pathway in lung cancer,"*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106(52),22293(2009))、前列腺癌(参见H.Zhu等人,"Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers,"*Am.J.Transl.Res.*5(3),368(2013))和M.Kashat等人,"Inactivation of AR

and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness," Am.J.Transl.Res.4 (4), 432 (2012))、乳腺癌(参见J.Speiser等人,"Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer," Int J.Surg.Pathol.20 (2), 139 (2012) 和S.Mittal等人,"Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis," Mol.Cancer 8, 128 (2009))、卵巢癌(参见S.L.Rose, M.Kunnimalaiyaan, J.Drenzek和N.Seiler,"Notch 1 signaling is active in ovarian cancer," Gynecol.Oncol.117 (1), 130 (2010))、胰腺癌(参见F.H.Sarkar, S.Banerjee和Y.Li,"Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment," Toxicol.Appl.Pharmacol.224 (3), 326 (2007), O.JP De La等人,"Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia," Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 105 (48), 18907 (2008), E.Ristorcelli和D.Lombardo,"Targeting Notch signaling in pancreatic cancer," Expert.Opin.Ther.Targets.14 (5), 541 (2010), Z.Wang等人,"Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells," Cancer 106 (11), 2503 (2006), P.Buchler等人,"The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer," Ann.Surg.242 (6), 791, discussion (2005), Z.Wang等人,"Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells," Mol.Cancer Ther.5 (3), 483 (2006), Z.Wang等人,"Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells," Cancer Res.66 (5), 2778 (2006))、和神经胶质瘤(参见X.Zhang等人,"Notch 1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation," Cancer Sci.103 (2), 181 (2012), L.Jiang等人,"Notch 1 expression is upregulated in glioma and is associated with tumor progression," J.Clin.Neurosci.18 (3), 387 (2011), J.Li等人,"Notch 1 is an independent prognostic factor for patients with glioma," J.Surg.Oncol.103 (8), 813 (2011) 和S.Puget等人,"Candidate genes on chromosome 9q33-34 involved in the progression of childhood ependymomas," J.Clin.Oncol.27 (11), 1884 (2009))。

[0451] 可以通过用于恢复药物敏感性的方法克服的癌细胞的抗性是不受Notch 1诱导的抗性且特别是Notch 1诱导的化学抗性。在这个范围内,用于恢复癌细胞的药物敏感性的方法是用于逆转Notch 1诱导的抗性且特别是Notch 1诱导的化学抗性的方法。细胞且特别是癌细胞是否对化学疗法抗性可以通过本领域技术人员已知的常规测试进行测定,例如MMT (3-(4,5)-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)测定法和流式细胞术。

[0452] MMT (3-(4,5)-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)测定法测量通过细胞酶对MTT的还原。通过经由NAD(P)H依赖性酶测量这种代谢活性,能够估计活细胞数目。四唑染料测定法允许测量化学治疗剂的细胞毒性和细胞抑制活性两者。

[0453] 在流式细胞术中,将细胞悬浮于流体流中且经过检测器。使用激光技术,允许测定细胞数目且鉴定生物标记物。大量颗粒可以同时就生物物理学和化学参数进行分析。使用



这种技术,能够区分活细胞与细胞凋亡细胞,以测量药学试剂的效应。

[0454] Notch 1诱导的化学抗性例如在K.M.Capaccione和S.R.Pine (K.M.Capaccione和S.R.Pine, "The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival," *Carcinogenesis* 34 (7), 1420 (2013)) 中描述。根据这个及其他参考文献,合理的是通过抑制Notch 1的表达且因此通过使用本发明的核酸分子,Notch 1诱导的化学抗性可以被克服。此类其他参考文献包括但不限于:关于前列腺癌的Ye, QF等人 (Q.F.Ye等人, "siRNA-mediated silencing of Notch-1enhances docetaxel induced mitotic arrest and apoptosis in prostate cancer cells," *Asian Pac.J.Cancer Prev.* 13 (6), 2485 (2012))、关于乳腺癌的Zhang CC等人 (C.C.Zhang等人, "Synergistic effect of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014and docetaxel in breast cancer models," *Stem Cells Transl.Med.* 2 (3), 233 (2013)) 或Zang S等人 (S.Zang等人, "RNAi-mediated knockdown of Notch-1leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer," *Oncol.Rep.* 23 (4), 893 (2010))、关于肺癌的Hassan KA等人 (K.A.Hassan等人, "Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma," *Clin.Cancer Res.* 19 (8), 1972 (2013))、关于鳞状细胞癌的Zhang ZP等人 (Z.P.Zhang等人, "Correlation of Notch1expression and activation to cisplatin-sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma," *Ai.Zheng.* 28 (2), 100 (2009))、关于结肠癌的Meng RD等人 (R.D.Meng等人, "gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity," *Cancer Res.* 69 (2), 573 (2009))、关于非小细胞肺癌的Liu YP等人 (Y.P.Liu等人, "Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling," *Cancer Res.* 73 (1), 406 (2013))、关于胰腺癌的Du X等人 (X.Du等人, "Notch1contributes to chemoresistance to gemcitabine and serves as an unfavorable prognostic indicator in pancreatic cancer," *World J.Surg.* 37 (7), 1688 (2013)) 或Yabuuchi S等人 (S.Yabuuchi等人, "Notch signaling pathway targeted therapy suppresses tumor progression and metastatic spread in pancreatic cancer," *Cancer Lett.* 335 (1), 41 (2013))、关于白血病且特别是T细胞急性淋巴细胞性白血病Zhou Q等人 (Q.Zhou等人, "The roles of Notch1expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma," *BMC.Cancer* 13, 244 (2013))、以及关于神经胶质瘤的Gilbert CA等人 (C.A.Gilbert, M.C.Daou, R.P.Moser和A.H.Ross, "Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and xenograft recurrence," *Cancer Res.* 70 (17), 6870 (2010))。

[0455] 除去克服Notch 1诱导的抗性,本发明的核酸分子还适合于克服对辐射的抗性,如由Hovinga KE (K.E.Hovinga等人, "Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate," *Stem Cells* 28 (6), 1019 (2010)) 和Wang J等人 (J.Wang等人, "Notch promotes radioresistance of

glioma stem cells,"Stem Cells 28(1),17(2010))证明的。

[0456] 本发明进一步通过由其可以获取进一步特点、实施方案和优点的附图、实施例和序列列表举例说明,其中

[0457] 图1是指示在使用各种siRNA转染C4-2细胞后,Notch 1的相对表达的图解;

[0458] 图2是关于各种siRNA的图解,指示剩余相对Notch 1mRNA表达为个别siRNA浓度的函数,允许测定关于每种siRNA的IC50值;

[0459] 图3A和3B是显示在C4-2细胞暴露于siRNA XD-00404(图3A)或XD-00409(图3B)后的相对Notch 1mRNA表达的图解,所述siRNA以10nM、1nM和0.1nM浓度,以其未经修饰的、中间修饰的或完全修饰的形式。

[0460] 图4是显示在使用PANC-1细胞的异种移植小鼠模型中的肿瘤体积(指示为%±SEM)中的相对增加的图解;和

[0461] 图5是显示在用对照、吉西他滨或吉西他滨和包含本发明的siRNA的纳米载体的组合处理后,不含转移灶、具有几个转移灶和具有单个转移灶的PANC-1原位肿瘤模型中的动物数目的图解。

[0462] 实施例1:材料与方法

[0463] siRNA

[0464] 表1中表示的siRNA使用标准化学合成进行制备:

[0465] 表1

双链体 ID	SS ID	合成的有义链序列 (5'-3')	AS ID	合成的反义链序列 (5'-3')
XD-00388	X01324	GCGCUCGCCGACGAGGCCdTdT	X01325	GGCCUCGUGCGGCGAGCGCdTdT
XD-00389	X01326	CUUCGUGGGCCCGCAUGCdTdT	X01327	GCAUCGCGGGCCCGCAAGdTdT
XD-00390	X01328	AAGAACGCCGGGACAUGCCdTdT	X01329	GGCAUGUCCCGGCUUCUdTdT
XD-00391	X01330	CAUGCCACGUGGUGGACCGdTdT	X01331	CGGUCCACCACGUGGCAUGdTdT
XD-00392	X01332	CGGAGUACAAGUGCCGUGdTdT	X01333	CAGCGGCACUUGUACUCCGdTdT
XD-00393	X01334	UGCCGGCAGGAUGUCAACGdTdT	X01335	CGUUGACAUCUGCCGGCAdTdT
XD-00394	X01336	GAGGGUGUGCACUGCGAGGdTdT	X01337	CCUCGCAGUGCACACCCUCdTdT
XD-00395	X01338	GGACCCAACACUACACCUdTdT	X01339	AGGUGUAAGUGUUGGGUCCdTdT
XD-00396	X01340	CUGCAAGGACGGCGUCGCCdTdT	X01341	GGCGACGCCGUCCUUGCAGdTdT
XD-00397	X01342	GCACGUGUAUUGACGACGdTdT	X01343	ACGUCGUCAAUACACGUGCdTdT
XD-00398	X01344	CACGUGUAUUGACGACGUdTdT	X01345	AACGUCGUCAAUACACGUGdTdT
XD-00399	X01346	ACGUGUAUUGACGACGUdTdT	X01347	CAACGUCGUCAAUACACGUdTdT
XD-00400	X01348	GGACGAGUGCUCACCCAGCdTdT	X01349	GCUGGGUGAGCACUCGUCCdTdT
XD-00401	X01350	CCAUCAAGCGUGCCGCCAdTdT	X01351	UCGGCGGCACGCUUGAUGGdTdT
XD-00402	X01352	CCGGUUCGAGGAGCCCGUGdTdT	X01353	CACGGGCUCUCGAAACCGGdTdT
XD-00403	X01354	CCGGGACAUCACGGAUCAUdTdT	X01355	AUGAUCCGUGAUGUCCCGGdTdT
XD-00404	X01356	GACAUCGCACAGGAGCGCdTdT	X01357	UGCGCUCCUGUGCGAUGUCdTdT
XD-00405	X01358	CAGAGCGGCAUGGUGCCGAdTdT	X01359	UCGGCACCAUGCCGUCUGdTdT
XD-00406	X01360	CAUGGUGCCGAACCAAUACdTdT	X01361	GUAUUGGUUCGGCACCAUGdTdT
XD-00407	X01362	UGGUGCCGAACCAAUACAAdTdT	X01363	UUGUAUUGGUUCGGCACCAAdTdT
XD-00408	X01364	CUCGCCUGUGGACAACACCdTdT	X01365	GGUGUUGUCCACAGGCGAGdTdT
XD-00409	X01366	GACCAGUGGUCCAGCUCGUdTdT	X01367	ACGAGCUGGACCACUGGUCdTdT
XD-00410	X01368	CAUUCCAACGUCUCCGACUdTdT	X01369	AGUCGGAGACGUUGGAAUGdTdT
XD-00411	X01370	AUUCCAACGUCUCCGACUGdTdT	X01371	CAGUCGGAGACGUUGGAAUdTdT
XD-00412	X01372	UUCCAACGUCUCCGACUGGdTdT	X01373	CCAGUCGGAGACGUUGGAAAdTdT
XD-00413	X01374	CAACGUCUCCGACUGGUCCdTdT	X01375	GGACCAGUCGGAGACGUUGdTdT
XD-00414	X01376	ACGUCUCCGACUGGUCCGAdTdT	X01377	UCGGACCAGUCGGAGACGUdTdT

[0466]

[0467] 上表1再次表示为包括所有序列标识符的表1a。

[0468] 表1a

双链体 ID	SS ID	合成的有义链序列 (5'-3')	AS ID	合成的反义链序列 (5'-3')
XD-00388	X01324	GCGCUCGCCGCACGAGGC CdTdT (SEQ ID NO: 73)	X01325	GGCCUCGUGCGGCGAGC GCdTdT (SEQ ID NO: 74)
XD-00389	X01326	CUUCGUGGGCCCGCGAU GCdTdT (SEQ ID NO: 75)	X01327	GCAUCGCGGGCCCGACGA AGdTdT (SEQ ID NO: 76)
XD-00390	X01328	AAGAACGCCGGGACAUG CCdTdT (SEQ ID NO: 77)	X01329	GGCAUGUCCCGGCGUUC UUdTdT (SEQ ID NO: 78)
XD-00391	X01330	CAUGCCACGUGGUGGAC CGdTdT (SEQ ID NO: 79)	X01331	CGGUCCACCACGUGGCA UGdTdT (SEQ ID NO: 80)
XD-00392	X01332	CGGAGUACAAGUGCCGC UGdTdT (SEQ ID NO: 81)	X01333	CAGCGGCACUUGUACUC CGdTdT (SEQ ID NO: 82)
XD-00393	X01334	UGCCGGCAGGAUGUCAA CGdTdT (SEQ ID NO: 83)	X01335	CGUUGACAUCCUGCCGG CA dTdT (SEQ ID NO: 84)
XD-00394	X01336	GAGGGUGUGCACUGCGA GGdTdT (SEQ ID NO: 85)	X01337	CCUCGCAGUGCACACCC UCdTdT (SEQ ID NO: 86)
XD-00395	X01338	GGACCCAACACUUACACC UdTdT (SEQ ID NO: 87)	X01339	AGGUGUAAGUGUUGGGU CCdTdT (SEQ ID NO: 88)
XD-00396	X01340	CUGCAAGGACGGCGUCG CCdTdT (SEQ ID NO: 89)	X01341	GGCGACGCCGUCCUUGC AGdTdT (SEQ ID NO: 90)
XD-00397	X01342	GCACGUGUAUUGACGAC GUdTdT (SEQ ID NO: 91)	X01343	ACGUCGUCAAUACACGU GCdTdT (SEQ ID NO: 92)
XD-00398	X01344	CACGUGUAUUGACGACG UUdTdT (SEQ ID NO: 93)	X01345	AACGUCGUCAAUACACG UGdTdT (SEQ ID NO: 94)
XD-00399	X01346	ACGUGUAUUGACGACGU UGdTdT (SEQ ID NO: 95)	X01347	CAACGUCGUCAAUACAC GUdTdT (SEQ ID NO: 96)
XD-00400	X01348	GGACGAGUGCUCACCCA GCdTdT (SEQ ID NO: 97)	X01349	GCUGGGUGAGCACUCGU CCdTdT (SEQ ID NO: 98)
XD-00401	X01350	CCAUCAAGCGUGCCGCCG AdTdT (SEQ ID NO: 99)	X01351	UCGGCGGCACGCUUGAU GGdTdT (SEQ ID NO: 100)
XD-00402	X01352	CCGGUUCGAGGAGCCCG UGdTdT (SEQ ID NO: 101)	X01353	CACGGGCUCCUCGAACC GGdTdT (SEQ ID NO: 102)
XD-00403	X01354	CCGGGACAUCACGGAUC AUdTdT (SEQ ID NO: 103)	X01355	AUGAUCCGUGAUGUCCC GGdTdT (SEQ ID NO: 104)
XD-00404	X01356	GACAUCGCACAGGAGCG CA dTdT (SEQ ID NO: 105)	X01357	UGCGCUCCUGUGCGAUG UCdTdT (SEQ ID NO: 106)
XD-00405	X01358	CAGAGCGGCAUGGUGCC	X01359	UCGGCACCAUGCCGCUC

[0469]

[0470]

		GAdTdT (SEQ ID NO: 107)		UGdTdT (SEQ ID NO: 108)
XD-00406	X01360	CAUGGUGCCGAACCAAU ACdTdT (SEQ ID NO: 109)	X01361	GUAUUGGUUCGGCACCA UGdTdT (SEQ ID NO: 110)
XD-00407	X01362	UGGUGCCGAACCAAUAC AAdTdT (SEQ ID NO: 111)	X01363	UUGUAUUGGUUCGGCAC CAdTdT (SEQ ID NO: 112)
XD-00408	X01364	CUCGCCUGUGGACAACA CCdTdT (SEQ ID NO: 113)	X01365	GGUGUUGUCCACAGGCG AGdTdT (SEQ ID NO: 114)
XD-00409	X01366	GACCAGUGGUCCAGCUC GUdTdT (SEQ ID NO: 115)	X01367	ACGAGCUGGACCACUGG UCdTdT (SEQ ID NO: 116)
XD-00410	X01368	CAUCCAACGUCUCCGAC UdTdT (SEQ ID NO: 117)	X01369	AGUCGGAGACGUUGGAA UGdTdT (SEQ ID NO: 118)
XD-00411	X01370	AUCCAACGUCUCCGAC UGdTdT (SEQ ID NO: 119)	X01371	CAGUCGGAGACGUUGGA AUdTdT (SEQ ID NO: 120)
XD-00412	X01372	UCCAACGUCUCCGACU GGdTdT (SEQ ID NO: 121)	X01373	CCAGUCGGAGACGUUGG AAdTdT (SEQ ID NO: 122)
XD-00413	X01374	CAACGUCUCCGACUGGU CCdTdT (SEQ ID NO: 123)	X01375	GGACCAGUCGGAGACGU UGdTdT (SEQ ID NO: 124)
XD-00414	X01376	ACGUCUCCGACUGGUCC GAdTdT (SEQ ID NO: 125)	X01377	UCGGACCAGUCGGAGAC GUdTdT (SEQ ID NO: 126)

[0471] 在这个组中修饰下述一些siRNA。经修饰的siRNA在表2中指示。

[0472] 表2:

[0473] a) XD-00395

[0474] 有义链:5' GGACCCAACACUUACACCUdTdT 3' (SEQ ID NO:87)

[0475] 反义链:5' AGGUGUAAGUGUUGGGUCCdTdT 3' (SEQ ID NO:88)

[0476] b) XD-00404

[0477] 有义链:5' GACAUCGCACAGGAGCGCAdTdT 3' (SEQ ID NO:105)

[0478] 反义链:5' UGCGCUCCUGUGCGAUGUCdTdT 3' (SEQ ID NO:106)

[0479] c) XD-00406

[0480] 有义链:5' CAUGGUGCCGAACCAAUACdTdT 3' (SEQ ID NO:109)

[0481] 反义链:5' GUAUUGGUUCGGCACCAUGdTdT 3' (SEQ ID NO:110)

[0482] d) XD-00407

[0483] 有义链:5' UGGUGCCGAACCAAUACAAdTdT 3' (SEQ ID NO:111)

[0484] 反义链:5' UUGUAUUGGUUCGGCACCAAdTdT 3' (SEQ ID NO:112)

[0485] e) XD-00409

[0486] 有义链:5' GACCAGUGGUCCAGCUCGUdTdT 3' (SEQ ID NO:115)

[0487] 反义链:5' ACGAGCUGGACCACUGGUCdTdT 3' (SEQ ID NO:116)

[0488] f) XD-00410

[0489] 有义链:5' CAUCCAACGUCUCCGACUdTdT 3' (SEQ ID NO:117)

[0490] 反义链:5' AGUCGGAGACGUUGGAAUGdTdT 3' (SEQ ID NO:118)

[0491] 完全稳定化的siRNA

[0492] 使表2的siRNA XD-00404和XD-00409经历完全稳定化。因此完全稳定化的siRNA如下。

[0493] a) XD-00409

[0494] 有义链:5' GAcCaGuGuCaGcUcGudTsdT 3' (SEQ ID NO:70)

[0495] 反义链:5' acGaGcUgaCcAcUgGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:69)

[0496] b) XD-00404

[0497] 有义链:5' GAcAuCgCaCaGgAgCgCadTsdT 3' (SEQ ID NO:128)

[0498] 反义链:5' ugCgCuCcUgUgCgAuGuCdTsdT 3' (SEQ ID NO:127),

[0499] 其中小写核苷酸指示核苷酸是2'-F修饰的,并且加下划线的核苷酸指示该核苷酸是2'-O-甲基修饰的,和

[0500] 其中dTsdT指示在3'末端处附着由两个dT组成的二核苷酸,其中所述两个dT通过硫代磷酸酯键共价连接。

[0501] 中间稳定化的siRNA

[0502] 中间稳定化的siRNA不同于完全稳定化的siRNA,使得它缺乏dTsdT突出端且不显示出任何2'-F修饰。

[0503] C4-2细胞的培养

[0504] C4-2细胞使用RPMI 1640培养基根据对于该细胞系描述的标准程序进行培养。

[0505] C4-2细胞的转染

[0506] 使用Lipofectamine 2000用各种浓度的siRNA对C4-2细胞进行转染。siRNA的浓度在转染实验中是50nM、10nM、1nM或0.1nM。温育时间为24小时。在其他方面使用标准方案。转染效率通过测量看家siRNA进行测定;转染功效在所有情况下均为至少93%。

[0507] 测定siRNA的IC<sub>50</sub>

[0508] 使用标准程序对IC<sub>50</sub>值进行测定。更具体而言,使用所示的各种siRNA,使用如所述转染的C4-2细胞,测定在Notch 1mRNA的表达减少至50%时的siRNA浓度。

[0509] 纳米载体

[0510] 对于其为全氟化碳纳米载体的纳米载体的制备,全氟辛基溴化物(全氟溴烷)用磷脂的混合物进行乳化。一克混合物含有在蒸馏水和75mM磷酸二氢钠(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)缓冲液中的磷脂酰胆碱(980mg)、鞘磷脂(10mg)、胆固醇(5mg)、溶血磷脂酰胆碱(5mg)。为了获得1000μl的全氟化碳纳米载体,使用475μl的全氟辛基溴化物、36mg的磷脂、200μl 75mM以pH 7.4的NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和325μl的蒸馏水。

[0511] 首先,将磷脂、磷酸二氢钠缓冲液和蒸馏水混合,并且随后加入全氟化碳(PFC)溶液。在40秒内,复合物必须通过振荡器混合60秒,并且没有任何中断,通过超声波装置以1100kHz的频率匀浆化两次共120秒,具有30秒的间隔。超声处理单元保持在4℃的温度下。对于另外不溶性的PFC的最终乳状液,将混合物放入高压匀浆器内。在以2500巴的六次匀浆化经过内,乳状复合物变成透明的淡蓝色乳状液。这种变成透明性是全氟化碳粒度低于可见波长的转变的肉眼标志。当混合物变成透明的时, $\lambda=400\text{nm}$ 的最低可见波长(蓝色/紫色)限定粒度为 $\lambda/2$ 。在这个点,加入四个另外的匀浆化循环。粒度在电子显微镜检查中测量为50nm(平均值),其中所有颗粒低于100nm。为了获得功能纳米载体,使4mg全铁转铁蛋白溶解于60μl的无菌0.9%NaCl中。其后直接地,使转铁蛋白通过冷却的超声波装置匀浆化2秒。将



溶解的转铁蛋白加入1000 $\mu$ l的全氟化碳乳状液中,以获得4mg/ml的最终浓度。再次,化合物直接置于振荡器上共30秒。

[0512] 这种纳米载体也被称为未装载的载体或NCf4。

[0513] Notch siRNA装载的纳米载体

[0514] 基于上文描述的纳米载体制备Notch siRNA装载的纳米载体。为了装载目的,将所需siRNA种类加入纳米载体中,并且使因此获得的混合物经历通过使用500W的超声波的匀浆化共15秒。

[0515] 动物研究-异种移植物模型

[0516] 荷有来自皮下接种的PANC-1人胰腺肿瘤的肿瘤的六十只雌性无胸腺裸Foxn1<sup>nu</sup>鼠选自112只的库。该动物模型是使用PANC-1细胞系分别对于胰腺癌和胰腺肿瘤建立的动物模型,所述PANC-1细胞系首先通过Lieber M等人(M.Lieber等人,"Establishment of a continuous tumor-cell line(panc-1)from a human carcinoma of the exocrine pancreas,"Int J.Cancer 15(5),741(1975))进行描述,并且通过Madden ME和Sarras MP(M.E.Madden和M.P.Sarras,Jr., "Morphological and biochemical characterization of a human pancreatic ductal cell line(PANC-1),"Pancreas 3(5),512(1988))进行生物化学以及形态学表征。此类细胞系和使用此类细胞系建立的动物模型已用于抗癌剂的评估中,Schultz RM等人(R.M.Schultz等人,"Evaluation of new anticancer agents against the MIA PaCa-2and PANC-1human pancreatic carcinoma xenografts,"Oncol.Res.5(6-7),223(1993))。

[0517] 接种后三十三天,小鼠根据肿瘤尺寸随机化到六组内,每组十只(第0天)。

[0518] 每组中的小鼠用媒介物对照(未装载的纳米载体,NCf4)或吉西他滨经由腹膜内注射60mg/kg、或各自以所述方式的Notch/吉西他滨的组合每周处理两次,由此Notch是经由静脉内注射处理的Notch siRNA装载的纳米载体(如实施例1中所述制备,使用完全稳定的XD-00409)。

[0519] 处理在第0天时开始,并且施用七个剂量。每天作出临床观察。对于研究的持续时间,体重和肿瘤尺寸测量每周作出三次。

[0520] 在研究结束时(第24天),从所有治疗组中的所有小鼠中收获肿瘤,称重且切成两半。一个部分保存在RNAlater溶液中用于RNA分离和qRT-PCR分析。剩余部分保存在福尔马林中用于石蜡包埋和坏死的显微镜评价。

[0521] 动物研究-原位模型

[0522] 六十六只雌性无胸腺裸Foxn1<sup>nu</sup>鼠用PANC-1人胰腺肿瘤细胞进行原位接种。接受率在接种后第20和27天时在三只小鼠中各自进行评价。接种后三十二天,剩余60只小鼠根据体重随机化到六组,每组十只(第0天)。

[0523] 每组中的小鼠用媒介物对照(未装载的纳米载体,NCf4)吉西他滨经由腹膜内注射60mg/kg、或各自以所述方式的Notch/吉西他滨的组合每周处理两次,由此Notch是经由静脉内注射处理的Notch siRNA装载的纳米载体(如实施例1中所述制备,使用完全稳定的XD-00409)。

[0524] 处理在第0天时开始,并且施用五个剂量。

[0525] 每天作出临床观察。对于研究的持续时间,体重测量每周作出三次。

[0526] 在研究结束时(第18天),从所有治疗组中的所有小鼠中收获完整肿瘤+胰腺且称重。从胰腺中取出肿瘤且切成两半。一个部分保存在RNAlater溶液中用于任选的RNA分离和qRT-PCR分析(未执行)。剩余部分保存在福尔马林中用于石蜡包埋和坏死的显微镜评价。在结束时从所有小鼠中收获肺和肝。将两者称重且评价表面转移灶。将肺和肝保存在福尔马林中用于石蜡包埋。肝就微小转移灶的存在进行评价。

[0527] 实施例2:未经修饰的siRNA靶向人Notch 1的功效

[0528] C4-2细胞如实施例1中所述进行培养,且用表1中所示的各种siRNA进行转染,由此siRNA浓度为50nM。结果显示于图1中。图1是指示在使用各种siRNA转染C4-2细胞后,Notch 1的相对表达的图解。表达针对使用对照的C4-2细胞中的Notch 1表达进行标准化。对照是不靶向编码蛋白质的任何已知mRNA的siRNA。

[0529] 如图1可见的,最佳siRNA显示Notch 1mRNA几乎80%的敲低。由图1还显而易见的是在各种siRNA的功效中存在显著差异。

[0530] 显示最佳敲低的6种siRNA是表2的那些。这些siRNA就其IC<sub>50</sub>而言进行进一步表征。结果显示于图2中。

[0531] 图2是关于表2的每种siRNA的图解,指示剩余相对Notch 1mRNA表示为每种siRNA浓度的函数。根据所述图解,计算关于所述siRNA各自的IC<sub>50</sub>。关于所述siRNA分子的IC<sub>50</sub>值概括于表3中。

[0532] 表3:

siRNA	IC <sub>50</sub>
XD-00409	0.0043
XD-00404	0.042
XD-00410	0.061
XD-00407	0.073
XD-00395	0.111
XD-00406	0.545

[0534] 如由图2和表3两者可见的,就IC<sub>50</sub>而言的最佳siRNA分子是具有4.3pM的IC<sub>50</sub>的XD-00409。

[0535] 实施例3:经修饰的siRNA靶向人Notch 1的功效

[0536] 还如实施例1中所述,使表1和2的siRNA分子XD00404和XD-00409经历中间稳定化和完全稳定化。相应的经修饰的siRNA分子如下:

[0537] a) 具有中间稳定化的XD-00404(也称为XD-00751):

[0538] b) 具有完全稳定化的XD-00404(也称为XD-00752):

[0539] c) 具有中间稳定化的XD-00409(也称为XD-00753):

[0540] d) 具有完全稳定化的XD-00409(也称为XD-00754):

[0541] 在如实施例1中所述转染所述C4-2细胞后,这些siRNA分子关于其在C4-2细胞中的功效进行测试,由此siRNA的浓度在转染实验中是10nM、1nM或0.1nM。

[0542] 关于以其未经修饰的、中间修饰的或完全修饰形式的siRNA XD-00404,以及以其未经修饰的、中间修饰的或完全修饰形式的siRNA XD-00409,此类实验的结果显示于图3A中,并且在图3B中显示为使用对照的相对mRNA表达。对照是不靶向编码蛋白质的任何已知

mRNA的siRNA。

[0543] 如由图3可见的,尽管siRNA分子的修饰就稳定性而言是有利的,但显而易见的是两种siRNA (XD-00404和XD-00409) 的修饰降低其敲低Notch 1mRNA的表达的功效。然而,惊讶地发现修饰对XD-00409的影响较不显著,并且与修饰对XD-00404的影响相比较,事实上不存在。在这个范围内,siRNA DX-00409显示令人惊讶的和出乎意料的效应。

[0544] 实施例4:在异种移植胰腺肿瘤模型中siRNA靶向人Notch 1的效应

[0545] 进行如实施例1中所述的使用PANC-1人胰腺肿瘤的动物研究。所使用的siRNA种类是完全稳定化的XD-00409。

[0546] 研究的结果可以概括如下:

[0547] -体重减轻并不明显。小肿块存在于研究中的总共10只小鼠中的前腿下。

[0548] -通过肿瘤生长和肿瘤重量百分比的测量指示的,轻度肿瘤抑制在用吉西他滨单一疗法、和Notch/吉西他滨的组合处理后是显而易见的,但仅Notch/吉西他滨组合疗法关于肿瘤重量是显著不同于媒介物。通过组合疗法Notch/吉西他滨显示出通过肿瘤生长百分比测量的在肿瘤抑制中的协同应答。

[0549] -用吉西他滨单一疗法和Notch/吉西他滨组合疗法处理的小鼠具有肿瘤坏死的最低发生。

[0550] 所述动物研究的结果也显示于图4中。图4是显示使用对照(“媒介物(NCF4)”)、吉西他滨(“吉西他滨”)以及吉西他滨和Notch siRNA装载的纳米载体的组合(“Notch/吉西他滨”),随着时间过去在肿瘤体积(指示为 $\% \pm \text{SEM}$ )中的相对增加的图解。试剂或组合试剂各自每周施用2x。

[0551] 实施例5:在原位胰腺肿瘤模型中siRNA靶向人Notch 1的效应

[0552] 进行如实施例1中所述的使用PANC-1人胰腺肿瘤的动物研究。所使用的siRNA种类是完全稳定化的XD-00409。

[0553] 研究的结果可以概括如下:

[0554] 与接受对照或仅吉西他滨的动物相比较,在接受吉西他滨和Notch siRNA装载的纳米载体的组合的动物的情况下,如图5中所示,不含基于PANC-1细胞的转移灶的动物数目显著降低。更具体而言,在用单独的媒介物处理十只动物后,三只动物具有几个转移灶,三只动物具有单个转移灶,并且四只动物不含转移灶;在用单独的吉西他滨处理十只动物后,两只动物具有几个转移灶,四只动物具有单个转移灶,并且四只动物不含转移灶;并且在用吉西他滨和使用完全修饰的XD-00409的siRNA装载的纳米载体两者处理十只动物后,一只动物具有几个转移灶,一只动物具有单个转移灶,并且八只动物不含转移灶。

[0555] 此外,用与Notch 1特异性siRNA(完全稳定化的XD-00409)组合的吉西他滨处理与两只小鼠中显著的平均体重减轻和身体状况损失相关。

[0556] 本文叙述的各种参考文献的内容和公开内容通过引用全文并入本文。

[0557] 说明书、权利要求和/或附图中公开的本发明的特点分开且以其任何组合可以是以其各种形式用于实现本发明的材料。



## 序列表

&lt;110&gt; Soluventis GmbH

&lt;120&gt; Notch 1特异性siRNA分子

&lt;130&gt; S 10086 PCT

&lt;140&gt; PCT/EP2014/002655

&lt;141&gt; 2014-09-30

&lt;150&gt; EP 13 004 722.8

&lt;151&gt; 2013-09-30

&lt;160&gt; 128

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 1

acgagcugga ccacugguc

19

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9309

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; 人Notch 1的cDNA

[0001]

&lt;400&gt; 2

```

atgccgcgcg tcttggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga    60
ggcccgcgat gctcccagcc cggtagagacc tgcctgaatg gcggaagtg tgaagcggcc    120
aatggcacgg aggcctcgct ctgtggcggg gccttcgtgg gcccgcatg ccaggacccc    180
aaccggtgcc tcagcacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga    240
ggcgtggcag actatgcctg cagctgtgcc ctggccttct ctgggccctt ctgcctgaca    300
ccctggaca atgcctgcct caccaccccc tgcgcgaacg ggggcacctg cgacctgctc    360
acgctgacgg agtacaagtg ccgctgcccg cccggtggtt cagggaatec gtgccagcag    420
gctgaccctg gcgcctccaa cccctgcgcc aacggtggcc agtgctgcc cttcgaggcc    480
tctacatctt gccactgccc acccagcttc catggcccca cctgcccgca ggatgtcaac    540
gagtgtggcc agaagcccg gctttgcgcg caggaggcca cctgccacaa cgaggtcggc    600
tctaccgctt gcgtctgccg cgccacccac actggcccca actgcgagcg gccctacgtg    660
ccctgcagcc cctcgccctg ccagaacggg ggcacctgcc gcccacggg cgacgtcacc    720
cacgagtgtg cctgcctgcc aggtttcacc ggccagaact gtgaggaaaa tatcgacgat    780
tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt gctgtgtggt acggcgtgaa cacctacaac    840
tgccgctgcc cgccagagtg gacaggtcag tactgtaccg aggatgtgga cgagtgccag    900
ctgatgcaaa atgcctgcca gaacggcggg acctgccaca acaccacggg tggctacaac    960
tgcggtgtgt tcaacgctg gactggtgag gactgcagcg agaacattga tgaactgtgc    1020
agcgccgcct gcttccacgg cgccacctgc catgacctg tggcctcctt ctactgcgag    1080
tgtcccatg ggcgcacagg tctgctgtgc cactcaacg acgcatgcat cagcaacccc    1140
tgtaacgagg gctccaactg cgacaccaac cctgtcaatg gcaaggccat ctgcacctgc    1200
ccctcggggt acacgggccc ggctgacg caggacgtgg atgagtgtc gctgggtgcc    1260
aaccctgcg agcatgcggg caagtgcac aacacgtgg gctccttcga gtgccagtgt    1320
ctgcagggtt acacgggccc ccgatgcgag atcgacgtca acgagtgcgt ctggaacccc    1380
tgccagaacg acgccacctg cctggaccag attggggagt tccagtgcac ctgcatgccc    1440
ggctacgagg gtgtgcactg cgaggtcaac acagacgagt gtgccagcag ccctgcctg    1500
cacaatggcc gctgcctgga caagatcaat gacttccagt gcgagtcccc caccggcttc    1560
actgggcac tgtgccagta cgatgtggac gactgtgcca gcacccctg caagaatggt    1620
gccaaagtgc tggacggacc caacacttac acctgtgtgt gcacggaagg gtacacgggg    1680
acgcactgag aggtggacat cgatgagtgc gaccccgacc cctgccacta cggctcctgc    1740
aggacggggt tcgccacctt cactgcctc tgcgcgccag gctacacggg ccaccactgc    1800
gagaccaaca tcaacgagtg ctccagccag cctgcccgcc acgggggcac ctgccaggac    1860
cgcgacaacg cctacctctg cttctgcctg aaggggacca caggacccaa ctgcgagatc    1920
aacctggatg actgtgccag cagccccctg gactcgggca cctgtctgga caagatcgat    1980
ggctacgagt gtgcctgtga gccgggctac acaggaggca tgtgtaacat caacatcgat    2040
gagtgtgcgg gcaacccctg ccacaacggg ggcacctgcg aggacggcat caatggcttc    2100
acctgccgct gccccagggt ctaccacgac cccacctgcc tgtctgaggt caatgagtgc    2160
aacagcaacc cctgcgtcca cggggcctgc cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac    2220

```

[0002]

tgtgacctg	ggtggagtg	gaccaactgt	gacatcaaca	acaatgagtg	tgaatccaac	2280
ccttgtgtca	acggcgccac	ctgcaaagac	atgaccagtg	gctacgtgtg	cacctgccgg	2340
gagggcttca	gcggtcccaa	ctgccagacc	aacatcaacg	agtgtgcgtc	caacccatgt	2400
ctgaaccagg	gcacgtgtat	tgacgacgtt	gccgggtaca	agtgaactg	cctgtgtccc	2460
tacacaggtg	ccacgtgtga	ggttgtgtctg	gccccgtgtg	ccccagccc	ctgcagaaac	2520
ggcggggagt	gcaggcaatc	cgaggactat	gagagcttct	cctgtgtctg	ccccacgggc	2580
tggcaagggc	agacctgtga	ggtcgacatc	aacgagtgcg	tctgtagccc	gtgccggcac	2640
ggcgcatcct	gccagaacac	ccacggcggc	taccgtgcc	actgccaggc	cggctacagt	2700
ggcgcaact	gcgagaccga	catcgacgac	tgccggccca	acccgtgtca	caacgggggc	2760
tctgtcacag	acggcatcaa	cacggccttc	tgcgactgcc	tgccggcctt	ccggggcact	2820
ttctgtgagg	aggacatcaa	cgagtgtgcc	agtgacctt	gccgaacagg	ggccaactgc	2880
acggactgcg	tggacagcta	cacgtgcacc	tgccccgcag	gcttcagcgg	gatccactgt	2940
gagaacaaca	cgctgactg	cacagagagc	tctgtcttca	acgggtggcac	ctgcgtggac	3000
ggcatcaact	cgttcacctg	cctgtgtcca	cccggcttca	cgggcagcta	ctgccagcac	3060
gatgtcaatg	agtgcgactc	acagccctgc	ctgcatggcg	gcacctgtca	ggacggctgc	3120
ggctcctaca	ggtgcacctg	ccccagggc	tacactggcc	ccaactgcca	gaaccttgtg	3180
actgtgtgtg	actcctgcgc	ctgcaagaac	ggcggaacat	gctggcagac	ccacaccag	3240
taccgtgcg	agtgtcccag	cgctgtgacc	ggcctttact	gcgactgtcc	cagcgtgtcc	3300
tgtgagtg	ctgcgcagcg	acaagtggtt	gacgttgccc	gcctgtgtcca	gcatggaggg	3360
ctctgtgtgg	acggggcaca	cacgcaccac	tgccgtgcc	aggcgggcta	cacaggcagc	3420
tactgtgagg	acctggttga	cgagtgtcca	cccagcccc	gccagaacgg	ggccacctgc	3480
acggactacc	tggcggtcta	ctcctgcaag	tgctgtggcg	gtaccacgg	ggtgaactgc	3540
tctgaggaga	tcgacgagtg	cctctcccac	ccctgccaga	acgggggcac	ctgcctcgac	3600
ctccccaaac	cctacaagtg	ctcctgccca	cggggcactc	agggtgtgca	ctgtgagatc	3660
aactgtgacg	actgcaatcc	ccccgttgac	cccgtgtccc	ggagcccaaa	gtgctttaac	3720
aacggcacct	gcgtggacca	ggtggcgccg	tacagctgca	cctgcccgc	ggccttcgtg	3780
ggtgagcgct	gtgaggggga	tgtaacgag	tgctgtgtcca	atccctgcga	cgcccggtgc	3840
accagaaact	gcgtgcagcg	cgtcaatgac	ttccactgcg	agtgcctgtc	tggtcacacc	3900
ggcgcccgct	gcgagtcctg	catcaatggc	tgcaaaaggca	agccctgcaa	gaatgggggc	3960
acctgcgcgc	tgccctccaa	caccgcccgc	gggttcactc	gcaagtgcgc	tgccggcttc	4020
gagggcgcca	cgctgtgaga	tgacgctcgt	acctgcggca	gcctgcgctg	cctcaacggc	4080
ggcacatgca	tctccggccc	gcgcagcccc	acctgcctgt	gcctggggcc	cttcacgggc	4140
cccgaatgcc	agttcccggc	cagcagcccc	tgccgtggcg	gcaaccctgc	ctacaaccag	4200
gggacctgtg	agccacatc	cgagagcccc	ttctaccgtt	gcctgtgccc	cgccaaattc	4260
aacgggctct	tgtgccacat	cctggactac	agcttcgggg	gtggggccgg	gcgcgacatc	4320
ccccgcgcgc	tgatcgagga	ggcgtgcgag	ctgcccagtg	gccaggagga	cgcgggcaac	4380
aaggtctgca	gcctgcagtg	caacaaccac	gcgtgcggct	gggacggcgg	tgactgtccc	4440
ctcaacttca	atgaccctgt	gaagaactgc	acgcagcttc	tgcatgtgct	gaagtacttc	4500
agtgcaggcg	actgtgacag	ccagtgcaac	tcagccggct	gcctcttcga	cggctttgac	4560
tgccagcgctg	cgggaaggcca	gtgcaacccc	ctgtacgacc	agtactgcaa	ggaccacttc	4620
agcgacgggc	actgcaacca	gggctgcaac	agcgcgagtg	gcgagtgagg	cgggctggac	4680
tgtgcggagc	atgtacccca	gaggtgtggc	gccggcacgc	tggtgtgtgt	ggtgtgtatg	4740
ccgcccggagc	agctgcgcaa	cagctccttc	cacttctgc	gggagctcag	ccgctgtctg	4800
cacaccaaacg	tggctcttcaa	gcgtgacgca	cacggccagc	agatgatctt	cccctactac	4860
ggccgcgagc	aggagctgcg	caagcacccc	atcaagcgtg	ccgccgaggg	ctgggccgca	4920
cctgacgccc	tgtgtggcca	ggtgaaggcc	tcgctgctcc	ctggtggcag	caggggtggg	4980
cggcgccgga	gggagctgga	ccccatggac	gtccgcggct	ccatcgtcta	cctggagatt	5040
gacaaccggc	agtgtgtgca	ggcctcctcg	cagtgtctcc	agagtgcacc	cgactgtggc	5100
gcattccttg	gagcgctcgc	ctcgttgggc	agcctcaaca	tccccataca	gatcgaggcc	5160
gtcgagatgt	agaccgttga	gccgcccccg	ccggcgagc	tgcaactcat	gtactgtggc	5220
gcggcccgct	ttgtgtctct	gttcttctgt	ggctgcgggg	tgctgtgtgc	ccgcaagcgc	5280
cggcgcgagc	atggccagct	ctggttcctt	gagggcttca	aagtgtctga	ggccagcaag	5340
aagaagcggc	gggagccctt	cgcgaggagc	tcggtgggcc	tcaagccctt	gaagaacgct	5400
tcagacgggt	ccctcatgga	cgacaaccag	aatgagtggt	gggacgagga	cctggagacc	5460
aagaagtctc	ggttcgagga	gcccggtggt	ctgcctgacc	tggaacacca	gacagaccac	5520
cgccagtggt	ctcagcagca	cctggatgcc	gctgacctgc	gcattgtctg	catggccccc	5580
acaccgcccc	agggtaggtt	tgacgcccgc	tgcatggagc	tcaatgtccg	cgggcctgat	5640
ggcttcaccc	cgtcatgat	cgctcctgc	agcgggggcg	gcctggagac	gggcaacagc	5700
gaggaagagg	aggacgcgc	ggccgtcctc	tcgacttca	tctaccaggg	cgccagcctg	5760
cacaaccaga	cagaccgcac	ggcgagagac	gccttgaccc	tgcccgcccg	ctactcacgc	5820
tctgatgcgc	ccaagcgctt	gctggaggcc	agcgagatg	ccaacatcca	ggacaacatg	5880
ggccgcaccc	cgtgcgatgc	ggctgtgtct	gccgacgcac	aaggtgtctt	ccagatcctg	5940
atcccggaacc	gagccacaga	cctggatgcc	cgcatgcatg	atggcacgac	gccactgatc	6000
ctggctgccc	gcctggccgt	ggaggggcatg	ctggaggacc	tcatcaactc	acacgccgac	6060
gtcaacgccg	tagatgacct	gggcaagtc	gccttgact	gggccgccc	cgtgaacaat	6120
gtgatgccg	cagttgtgtc	cctgaagaac	ggggctaaca	aagatatgca	gaacaacagg	6180
gaggagacac	ccctgttct	ggcgcccgcc	gagggcagct	acgagaccgc	caaggtgtctg	6240
ctggaccact	ttgccaaccc	ggacatcacg	gatcatatgg	accgctgcc	gcgcgacatc	6300
gcacaggagc	gcattgatca	cgacatcgtg	aggctgtgtg	acgagtacaa	cctggtgcgc	6360
agccccgagc	tgacggagc	cccgtgggg	ggcacgcccc	ccctgtgcgc	cccgtctgc	6420
tcgccaacg	gctacctggg	cagcctcaag	cccggcgtgc	agggcaagaa	ggtccgcaag	6480
ccagcagca	aaggcctggc	ctgtggaagc	aaggaggcca	aggacctcaa	ggcacggagg	6540
aagaagtccc	aggacggcaa	gggctgcctg	ctggacagct	ccggcatgct	ctcgcccgtg	6600
gactccctgg	agtcacccca	tggtactctg	tcagacgtgg	cctcgccgcc	actgctgccc	6660
tccccgttcc	agcagctctc	gtccgtgccc	ctcaaccacc	tgcttgggat	gcccacacc	6720
caactgggca	tcgggcacct	gaacgtggcg	gccaagcccc	agatggcgcg	gctgggtggg	6780

	ggcgccgcgcg	tgccctttga	gactggccca	cctcgtctct	cccacctgcc	tgtggcctct	6840
	ggcaccagca	ccgtcctggg	ctccagcagc	ggagggggccc	tgaatttcac	tgtgggcggg	6900
	tcaccagtt	tgaatggtea	atcgagtggt	ctgtcccggc	tgacagcgcg	catgggtccc	6960
	aaccaatata	accctctgcg	ggggagtgtg	gcaccaggcc	ccctgagcac	acaggccccc	7020
	tccttgacgc	atggcatgg	aggccccgtg	cacagtagcc	ttgttgccag	cgccctgtcc	7080
	cagatgatga	gtaccagggt	cctgcccagc	accgggctgg	ccaccagccc	tcacctggtg	7140
	cagaccagc	aggtgcagcc	acaaaactta	cagatgcagc	agcagaacct	gcagccagca	7200
	aacatccagc	agcagcaaa	cctgcagccg	ccaccaccac	caccacagcc	gcaccttggc	7260
	gtgagctcag	cagccagcgg	ccacctgggc	cggagcttcc	tgagtggaga	gccgagccag	7320
	gcagacgtgc	agccactggg	cccagcagc	ctggcggtgc	acactattct	gcccaggag	7380
	agccccgcgc	tgcccacgtc	gtgcccaccc	tcgttggtcc	caccctgtac	cgcagccag	7440
	ttcttgacgc	ccccctgcga	gcacagctac	tcctgcctcg	tggacaacac	ccccagccac	7500
	cagctacagg	tgcttgagca	ccccttctct	accccgtccc	ctgagtcctc	tgaccagtgg	7560
	tcagctcgt	ccccgcattc	caacgtctcc	gactggtccg	agggcgctct	cagccctccc	7620
	accagcatgc	agtcccagat	cgcccgcatt	ccggaggcct	tcaagtaaac	ggcgcgcccc	7680
	acgagacccc	ggcttccctt	cccaagcctt	cgggcgctct	tgtgcgctct	gtggatgcca	7740
	gggcccagca	gaggagcctt	tttaaaacac	atgtttttat	acaaaataag	aacgaggatt	7800
	tttaattttt	ttagtattta	tttatgtact	tttattttac	acagaaaacac	tgccctttta	7860
	tttatatgta	ctgtttttat	tgccccaggg	tagaaacttt	tatctattct	gagaaaaaca	7920
	gcaagtctct	agagccaggg	ttttctctac	taggatgaaa	agattcttct	gtgtttataa	7980
	aatataaaca	aagattcatg	atttataaat	gccatttatt	tattgattcc	ttttttcaaa	8040
	atccaaaaag	aaatgatgtt	ggagaaggga	agttgaacga	gcatagtcca	aaaagctcct	8100
	ggggcgctcca	ggccgcgcgc	tttccccgac	gcccacccaa	ccccaagcca	gcccggccgc	8160
	tcaccagca	tcacctgcct	gttaggagaa	gtgcaccca	gaggcaaacg	gaggcaaacg	8220
	tggtctaccc	tcgcacgcgc	gattaatgtt	catctgaaat	aggaaacaag	tgaaagcata	8280
	tggtttagat	gttgccatgt	gttttagatg	gtttcttgca	agcatgcttg	tgaaatgtg	8340
	ttctcgaggt	gtgtatgcca	agagtgcacc	catggtagca	atcatgaatc	ttgttttcag	8400
	gttcagttat	atgtagtgtg	tcgttggtta	tacaagttct	tggtccctcc	agaaccaccc	8460
	cgccccctcg	cccgctcttg	aaatgtaggc	atcatgcatg	tcaaacaatga	gatgtgtgga	8520
	ctgtggcact	tgcttggtgc	acacacggag	gcacccctacc	ctttcttggt	gaaagacact	8580
	gcctgggctg	accccgggtg	cgccccagc	acctcagcct	gcacagtgtc	ccccagggtc	8640
	cgaagaagat	gtccagcaaa	cacagcctgg	gccccagctc	gcgggacccg	acccccgtg	8700
	ggctcccggt	ttttgttaga	gacttgccag	agccgggcac	attgagctgt	gcaacgccgt	8760
	gggctgcgtc	ctttgttctc	gtcccccgag	ccctggcagg	gggcatgcgg	tcgggcaggg	8820
	gctggaggga	ggcgggggct	gcccttgggc	caccctctct	agtttgggag	gagcagattt	8880
	ttgcaatacc	aagtatatgc	tatggcagaa	aaaatgtctg	taaatatgtt	tttaaagggt	8940
	gattttgttt	aaaaaatctt	aatgaatgag	tctgttgtgt	gtcatgccag	tgaggacgt	9000
	cagacttggc	tcagctcggg	gagccttagc	cgcccatgca	ctggggacgc	tccgctgccg	9060
	tgccgcctgc	actcctcagg	gcagcctccc	ccggctctac	gggggcgcgc	tggtgccatc	9120
	cccagggggc	atgaccagat	gcgtcccaag	atgttgattt	ttactgtgtt	ttataaaata	9180
	gagtgtagtt	tacagaaaaa	gactttaaaa	gtgatctaca	tgaggaaactg	tagatgatgt	9240
	atttttttca	tcttttttgt	taactgattt	gcaataaaaa	tgatactgat	ggtgaaaaaa	9300
	aaaaaaaaaa						9309
	<210>	3					
	<211>	19					
	<212>	RNA					
	<213>	人工的					
	<220>						
	<223>	合成的					
	<400>	3					
		gaccaguggu ccagcucgu					19
	<210>	4					
	<211>	21					
	<212>	DNA					
	<213>	人工的					
	<220>						
	<223>	合成的					
	<400>	4					
		acgagcugga ccacugguct t					21
	<210>	5					
	<211>	21					
	<212>	DNA					
	<213>	人工的					
	<220>						
	<223>	合成的					
	<400>	5					
		gaccaguggu ccagcucgut t					21

[0004]

<210> 6  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 合成的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(10)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature

	<222> (14).. (14)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15).. (15)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16).. (16)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17).. (17)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18).. (18)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19).. (19)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<400> 6	
	acgagcugga ccacugguc	19
	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工的	
[0005]	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1).. (1)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2).. (2)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3).. (3)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4).. (4)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5).. (5)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6).. (6)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7).. (7)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222> (8)..(8)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(9)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
[0006]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)..(17)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19)..(19)	
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的	
	<400> 7	
	gaccaguggu ccagcucgu	19
	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> RNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 8	
	cgagcuggac cacuggu	17
	<210> 9	
	<211> 17	
	<212> RNA	
	<213> 人工的	

63

[0008]

ugugaccug	gguggagug	gaccaacugu	gacaucaaca	acaugagug	ugaauccaac	2280
ccuuguguca	acggcgccac	cugcaaagac	augaccagug	gcuacugug	caccugccgg	2340
gagggcuuca	gcggucccaa	cugccagacc	aacaucaacg	agugugcguc	caaccucaug	2400
cugaaccagg	gcacguguau	ugacgacguu	gccggguaca	agugcaacug	ccugugccc	2460
uacacaggug	ccacguguga	gguggugcug	gccccgugug	ccccagccc	cugcagaaac	2520
ggcgggagug	gcaggcaauc	cgaggacuau	gagagcuucu	ccugugucug	ccccacgggc	2580
uggcaaggcg	agaccuguga	ggucgacauc	aacgagugcg	uucugagccc	gugccggcac	2640
ggcgcauccc	gccagaacac	ccacggcggc	uaccgucgce	acugccaggc	cgguacagu	2700
ggcgcaacu	gcgagaccga	caucgacgac	ugccggccca	acccguguca	caacgggggc	2760
uccugcacag	acggcaucaa	cacggccuuc	ugcgacugcc	ugccggcuu	ccggggcacu	2820
uucugugagg	aggacaucua	cgagugugcc	agugaccccu	gccgaacgg	ggccaacugc	2880
acggacugcg	uggacagcua	cacgugcacc	ugccccgcag	gcuucagcgg	gauccacugu	2940
gagaacaaca	cgcugacug	cacagagagc	uccugcuuca	acgguggcac	cugcguggac	3000
ggcaucaacu	cguuaccug	ccugugucca	cccggcuuca	cgggcagcua	cugccagcac	3060
gaugucaau	agugcgacuc	acagcccugc	cugcaugggcg	gcaccuguca	ggacggcugc	3120
ggcuuccuaca	ggugcaccug	ccccagggc	uacacuggcc	ccaacugcca	gaaccuugug	3180
cacuggugug	acuccucgcc	cugcaagaac	ggcggaauu	gcuugcagac	ccacaccag	3240
uaccgucgcg	agugccccag	cgcguggacc	ggccuuuacu	gcgacuggcc	cagcgugucc	3300
ugugaggug	ugcgcgagcg	acaagguuu	gacguugccc	gccugugcca	gcaugggagg	3360
cucugugugg	acgcgggcaa	cacgcaccac	ugccgucgce	aggcgggcua	cacaggcagc	3420
uacugugagg	accuggugga	cgagugcuca	cccagccccc	gccagaacgg	ggccaccugc	3480
acggacuauc	agugcgccua	cuccugcaag	ugcgugggcg	gcuaccagcg	ggugaacugc	3540
ucugaggaga	ucgacgagug	ccucucccac	cccugccaga	acgggggcac	cugccucgac	3600
ucccccaaca	ccuacaagug	cuccugccca	cggggcacuc	aggguuguca	cugugagauc	3660
aacguggac	acugcaaucc	cccguugac	ccguguccc	ggagcccaa	gugcuuuaac	3720
aacgggaccu	gcguggacca	ggugggcgcc	uacagcugca	ccugcccgc	gggcuucgug	3780
ggugagcgcu	gugaggggga	ugucaacgag	ugccugucca	auccucgca	cgcccugggc	3840
accagaaacu	gcgugcagcg	cgucaauagc	uuccacugcg	agugccgugc	ugguacacc	3900
ggcgcccgcu	gcgaguccgu	caucaauagg	ugcaaaaggca	agccucgcaa	gaaugggggc	3960
accugcgccg	uggccuccaa	caccgcccgc	ggguucaucu	gcaagugccc	ugcgggcuuc	4020
gagggcgcca	cugugagaga	ugacgucugu	accugcgcca	gccugcgug	ccucaaccgg	4080
ggcacaugca	ucccgggccc	gcgcagcccc	accugccugu	gccugggccc	cuuacggggc	4140
cccgaaugcc	aguucccgcc	cagcagcccc	ugccugggcg	gcaaccccc	cuacaaccag	4200
gggaccugug	agcccacauc	cgagagcccc	uucuaccguu	gccugugccc	cgccaaauuc	4260
aacgggcucu	ugugccacau	ccugacuac	agcuucgggg	guggggccgg	gcgcgacauc	4320
cccccgccgc	ugaucgagga	ggcgugcgag	cugcccagag	gccaggagga	cgcgggcaac	4380
aaggucugca	gccugcagug	caacaaccac	gcgugcggu	gggacggcgg	ugacugcucc	4440
cucaacuua	augaccuccg	gaagaacugc	acgcagucuc	ugcagugcug	gaaguacuuc	4500
agucagggcg	acugugacag	ccagugcaac	ucagccggcu	gccucuucga	cggcuuugac	4560
ugccagcgug	cgggaaggcca	gugcaacccc	cuguacgacc	aguacugcaa	ggaccacuuc	4620
agcgacgggc	acugcgacca	ggcgugcaac	agcgcgagag	gcgaguggga	cgggcuggac	4680
ugugcgagc	auguaccgga	gagcgugcg	gccggcacgc	uggugguggu	ggugcugaug	4740
cgcccgagc	agaccgugga	cagcuuccuuc	cacuuccugc	gggagcucag	cccgugcug	4800
cacaccaacg	ugguucucaa	gcgugacgca	cacggccagc	agaugaucuu	ccccuacuac	4860
ggcccgagcg	aggagcugcg	caagcaccac	aucaagcgug	ccgccgaggg	cuggggccgca	4920
ccugagcccc	ugcugggcca	ggugaaggcc	ucgucgucce	cugguggcag	cgaagguggg	4980
cgccggcgga	gggagcugga	ccccauggac	guccgcggcu	ccaucgucua	ccuggagauu	5040
gacaaccggc	agugugugca	ggccuccucg	cagugcuucc	agagugccac	cgacugggcc	5100
gcauuccugg	gagcgucgce	cucgucgggc	agccucaaca	ucccuacaa	gaucgaggcc	5160
gugcagagug	agaccgugga	gccgcccccg	ccggcgagcg	ugcacuucua	guacgugggc	5220
gcggccgccc	uugugcuucu	guucuucgug	ggcugcgggg	ugcugcuguc	ccgcaagcgc	5280
cggcgcgagc	augggcagcu	cugguucccu	gagggcuuca	aagugucuga	ggccagcaag	5340
aagaagcgcg	gggagccccc	cgcgagggac	uccgugggcc	ucaagccccc	gaagaacgcu	5400
ucagacggug	cccucaugga	cgacaaccag	aaugaguggg	gggacgagga	ccuggagacc	5460
aagaaguuuc	gguuucgagga	gcccuggguu	cugccugacc	uggacgacca	gacagaccac	5520
cgcgaguggg	cucagcagca	ccuggaugcc	gcugaccugc	gcaugucugc	cauggccccc	5580
acaccgcccc	agggugaggu	ugacgccgac	ugcauggagc	ucaauguccg	cggccugau	5640
ggcuuacccc	cgcucaugau	cgccuccugc	agcgggggcg	gccuggagac	gggcaacagc	5700
gaggaagagg	aggacgcgcc	ggccgucauc	uccgacuuca	ucuaccaggg	cgccagccug	5760
cacaaccaga	cagaccgcac	ggcgagagcc	gccuugcacc	uggccgccc	cuacucacgc	5820
ucugaugccg	caaagcgccu	gcuggaggcc	agcgagaug	ccaacaacca	ggacaacaug	5880
ggccgcaccc	cgcucaugc	ggcugugucu	gccgacgcac	aaggugucuu	ccagauccug	5940
ucccggaacc	gagccacaga	ccuggaugcc	cgcaugcaug	auggcacgac	gccacugauc	6000
cuggcugccc	gccuggccgu	ggaggggcaug	cuggaggacc	ucaucaacuc	acacgccgac	6060
gucaacggcg	uagaugaccu	gggcaagucc	gccugcacu	ggggccgccc	cgugaacaau	6120
guggaugccg	caguugugcu	ccugaagaac	ggggcuuaca	aagauaugca	gaacaacagg	6180
gaggagacac	cccuuuuuu	ggcgcccgcc	gagggcagcu	acgagaccgc	caaggugcug	6240
cuggaccacu	uugccaaccg	ggacaucacg	gaucuaugg	accgccugcc	gcgcgacauc	6300
gcacaggagc	gcaugcauca	cgacaucgug	aggcugcug	acgaguacaa	ccugugcgcc	6360
agccccgagc	ugcagggagc	cccgugggg	ggcacgccc	ccugucgccc	cccgucgccc	6420
ucggccaacg	gcuaccuggg	cagccucaag	cccggcgugc	agggcaagaa	gguccgcaag	6480
cccagcagca	aaggccuggc	cuguggaagc	aaggaggcca	aggaccucaa	ggcagggagg	6540
aagaaguccc	aggacggcaa	ggcgugccug	cuggacagcu	ccggcaugcu	cugcccgug	6600
gacucccug	agucacccca	uggcuaccug	ucagacgug	ccucgccgccc	acugcugccc	6660
uccccguucc	agcagucucc	guccgugccc	cucaaccacc	ugccugggau	gcccagacc	6720
caccugggca	ucgggaccu	gaacguggcg	gccaagcccc	agauggcgcc	gcuuggggg	6780



	ggcggccggc	uggccuuuga	gacuggccca	ccucgucucu	cccaccugcc	uguggccucu	6840
	ggcaccagca	ccguccuggg	cuccagcagc	ggagggggccc	ugaauuuac	ugugggcggg	6900
	uccaccaguu	ugaauuggua	augcgagugg	cugucccggc	ugcagagcgg	cauggugccg	6960
	aaccaauaca	acccucugcg	ggggagugug	gcaccaggcc	cccuagcac	acaggccccc	7020
	ucccugcagc	auggcauggu	agggccgcug	cacaguagcc	uugcugccag	cggccugucc	7080
	cagaugauga	guaccaggg	ccugcccagc	acccggcugg	ccaccagcc	ucaccuggug	7140
	cagaccagc	aggugcagcc	acaaaacuua	cagaugcagc	agcagaaccu	gcagccagca	7200
	aacauccagc	agcagcaaa	ccugcagccg	ccaccaccac	caccacagcc	gcaccuaggc	7260
	gugagcucag	cagccagcgg	ccaccugggc	cggagcuucc	ugaguggaga	gccgagccag	7320
	gcagacugc	agccacuggg	cccagcagc	cuggcggugc	acacuaauuc	gcccaggag	7380
	agccccgcc	ugcccacguc	gcugccaucc	ucgucggucc	cacccgugac	cgcagccag	7440
	uuccugacgc	ccccucgca	gcacagcuac	uccucgccug	uggacaacac	ccccagccac	7500
	cagcuacagg	ugccugagca	cccuuccuc	accccgucc	cugagucucc	ugaccagugg	7560
	uccagcucgu	ccccgcuuuc	caacgucucc	gacugguccg	agggcgucuc	cagccucccc	7620
	accagcaguc	agucccagau	cgcccgcuu	ccggaggccu	ucaaguaaac	ggcgcgccc	7680
	acgagacccc	ggcuuccuuu	cccaagccuu	cgggcgucug	ugugcgucuc	guggaugcca	7740
	gggcccagca	gaggagccuu	uuuaaaacac	auguuuuau	acaaaauaag	aacgaggauu	7800
	uuauuuuuu	uuaguuuuu	uuuauguacu	uuuaauuuac	acagaaacac	ugccuuuuu	7860
	uuuaugua	cuguuuuau	uggccccagg	uagaaacuuu	uaucuaauuc	gagaaaacaa	7920
	gcaaguuucg	agagccaggg	uuuuccuac	uaggaugaaa	agauucuuuc	guguuuauaa	7980
	aaauuaaaca	aagauucaug	auuuauaaau	gccauuuauu	uaugauuucc	uuuuuacaa	8040
	auccaaaaag	aaaugauguu	ggagaaggga	aguugaacga	gcauagucca	aaaagcuccu	8100
	ggggcgucca	ggccgcgccc	uuuccccgac	gcccacccaa	ccccagcca	gcccggccgc	8160
	uccaccagca	ucaccugccu	guuaggagaa	gcugcaucca	gaggcaaacg	gaggcaaacg	8220
	uggcucacuc	uccgcacgcg	gauuaauuug	caucugaaau	aggaaacaag	ugaaagcaua	8280
	uggguuagau	guugccaugu	guuuuagau	guuucuuuca	agcaugcuug	ugaaaaugug	8340
	uucucggagu	guguauagca	agagugcacc	caugguacca	aucaugaauc	uuuguuucag	8400
	guucaguuu	auguaguugu	ucguugguua	uacaaguuc	ugguccucc	agaaccacc	8460
	cggccccug	cccgucuuug	aaauguaggc	aucaugcaug	ucaaaacuga	gaugugugga	8520
	cuguggcacu	ugccuggguc	acacacggag	gcauccuacc	uuuuucuggg	gaaagacacu	8580
	gccugggcug	accccgugug	cgccccagc	accucagccu	gcacaguguc	ccccagguuc	8640
	cgaagaagau	gcuccagcaa	cacagccugg	gccccagcuc	gcgggacccg	acccccgug	8700
	ggcucccgug	uuuuguagga	gacuugccag	agccgggcac	auugagcugu	gcaacgccgu	8760
	gggcugcguc	cuuugguccu	guccccgcag	ccugggcagg	gggcaugcgg	ucgggcaggg	8820
	gcuggagggg	ggcgggggcu	gccccuuggc	cacccuccu	aguugggag	gagcagauuu	8880
	uugcaauacc	aaguauagcc	uauggcagaa	aaaauuguc	uaauauuguu	uuuaaaggug	8940
	gauuuuguuu	aaaaaaucuu	aaugaauag	ucuguugugu	gucaugccag	ugagggacgu	9000
	cagacuuggc	ucagcucggg	gagccuuagc	cgcccaugca	cuggggacgc	uccgcugccg	9060
	ugccgcgucg	acuccucagg	gcagccuccc	ccggcucuc	gggggcccgc	uggugccauc	9120
	cccagggggc	augaccagau	gcgucccaag	auguugauuu	uuacuguguu	uuauaaaaua	9180
	gaguguagu	uacagaaaaa	gacuuuaaaa	gugaucuaa	ugaggaacug	uagaugaugu	9240
	auuuuuuua	ucuuuuuugu	uaacugauuu	gcaauaaaaa	ugauacugau	ggugaaaaaa	9300
	aaaaaaaaa						9309
	<210>	13					
	<211>	17					
	<212>	RNA					
	<213>	人工的					
	<220>						
	<223>	合成的					
	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(1)..(1)					
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的					
	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(2)..(2)					
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的					
	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(3)..(3)					
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的					
	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(4)..(4)					
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的					
	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(5)..(5)					
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的					

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 [0010] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
  
 <400> 13  
 cgagcuggac cacuggu  
  
 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> RNA  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 合成的  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

17

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(2)..(2)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(3)..(3)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(4)..(4)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(5)..(5)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(6)..(6)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(8)..(8)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
[0011]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(9)..(9)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(10)..(10)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(11)..(11)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(12)..(12)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(13)..(13)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(14)..(14)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(15)..(15)
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(16)..(16)
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17)..(17)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<400>	14	
		accagugguc cagcucg	17
	<210>	15	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	15	
		gcgcucgccg cacgagcct t	21
	<210>	16	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	16	
		ggccucgugc ggcgagcgct t	21
	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
[0012]	<400>	17	
		cuucgugggc ccgcgaugct t	21
	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	18	
		gcaucgcggg ccacgaagt t	21
	<210>	19	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	19	
		aagaacgccg ggacaucct t	21
	<210>	20	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	20	
		ggcauguccc ggcuucuut t	21
	<210>	21	
	<211>	21	

	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 21	
	caugccacgu gguggaccgt t	21
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 22	
	cgguccacca cgugcaugt t	21
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 23	
	cggaguacaa gugccgcugt t	21
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
[0013]	<223> 合成的	
	<400> 24	
	cagcggcacu uguacuccgt t	21
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 25	
	ugccggcagg augucaacgt t	21
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 26	
	cguugacauc cugccgcat t	21
	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 27	
	gaggugugc acugcgaggt t	21
	<210> 28	

	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 28	
	ccucgcagug cacaccuct t	21
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 29	
	ggaccaaca cuuacacut t	21
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 30	
	agguguaagu guuggucct t	21
	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0014]	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 31	
	cugcaaggac ggcgucgct t	21
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 32	
	ggcgagccg uccuugcagt t	21
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 33	
	gcacguguau ugacgacut t	21
	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 34	
	acgucgucaa uacacugct t	21

[0015]	<210> 35		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 35		
	cacguguauu gacgacguut t	21	
	<210> 36		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 36		
	aacgucguca auacacgugt t	21	
	<210> 37		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 37		
	acguguauug acgacguugt t	21	
	<210> 38		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 38		
	caacgucguc aaucacgutt t	21	
	<210> 39		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 39		
	ggacgagugc ucacccagct t	21	
	<210> 40		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 40		
	gcugggugag cacucgucct t	21	
	<210> 41		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 41		
	ccaucagcg ugccgccgat t	21	

[0016]	<210> 42		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 42		
	ucggcggcac gcuugauggt t	21	
	<210> 43		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 43		
	ccgguucgag gagcccugt t	21	
	<210> 44		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 44		
	cacgggcucc ucgaaccggt t	21	
	<210> 45		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 45		
	ccgggacauc acggaucaut t	21	
	<210> 46		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 46		
	augauccgug auguuccggt t	21	
	<210> 47		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 47		
	gacaucgcac aggagcgcat t	21	
	<210> 48		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 48		



	ugcgcuuccug ugcgauugct t	21
	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 49	
	cagagcggca uggugccgat t	21
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 50	
	ucggcaccau gccgcucugt t	21
	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 51	
	caugugccg aaccaauact t	21
[0017]	<210> 52	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 52	
	guauugguuc ggcaccaugt t	21
	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 53	
	uggugccgaa ccaauacaat t	21
	<210> 54	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 54	
	uuguauuggu ucggcaccat t	21
	<210> 55	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	

[0018]	<400> 55 cucgccugug gacaacacct t	21
	<210> 56	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 56 gguguugucc acaggcgagt t	21
	<210> 57	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 57 gaccaguggu ccagcucgut t	21
	<210> 58	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 58 acgagcugga ccacugguct t	21
	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 59 cauuccaacg ucuccgacut t	21
	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 60 agucggagac guuggaaugt t	21
	<210> 61	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 61 auuccaacgu cuccgacugt t	21
	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	

[0019]	<400> 62 cagucggaga cguuggaaut t	21
	<210> 63	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 63 uuccaacguc uccgacuggt t	21
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 64 ccagucggag acguugaat t	21
	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 65 caacgucucc gacugucct t	21
	<210> 66	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 66 ggaccagucg gagacguugt t	21
	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 67 acgucuccga cugguccgat t	21
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 68 ucggaccagu cggagacgut t	21
	<210> 69	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	

	<223> 合成的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (3)..(3)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5)..(5)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (6)..(6)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
[0020]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(8)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (9)..(9)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(11)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (13)..(13)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (14)..(14)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (15)..(15)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(16).. (16)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17).. (17)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(18).. (18)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(19).. (19)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(20).. (21)	
	<223>	通过硫代磷酸酯连接的核苷酸	
	<400>	69	
		acgagcugga ccacugguct t	21
	<210>	70	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
[0021]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1).. (1)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2).. (2)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(3).. (3)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(4).. (4)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(5).. (5)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6).. (6)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(7).. (7)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(8).. (8)	

<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 核苷酸是2'-F甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 [0022] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(21)  
 <223> 通过硫代磷酸酯连接的核苷酸  
 <400> 70  
 gaccaguggu ccagcucgut t  
 <210> 71  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)

21

<223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 [0023] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 核苷酸是2'-F 甲基修饰的

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17).. (17)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(18).. (18)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(19).. (19)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<400>	71	
		cgagcuggac cacuggutt	19
	<210>	72	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1).. (1)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2).. (2)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
[0024]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(3).. (3)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(4).. (4)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(5).. (5)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6).. (6)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(7).. (7)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(8).. (8)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(9).. (9)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(10).. (10)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	



	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(12)..(12)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(14)..(14)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(15)..(15)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(16)..(16)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17)..(17)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
[0025]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(18)..(19)	
	<223>	通过硫代磷酸酯连接的核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(18)..(18)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(19)..(19)	
	<223>	核苷酸是2'-F 甲基修饰的	
	<400>	72	
		accagugguc cagcucgtt	19
	<210>	73	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	73	
		gcgcucgccg cagagcgct t	21
	<210>	74	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	74	
		ggccucgugc ggcgagcgct t	21

	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 75	
	cuucgugggc ccgcgaugct t	21
	<210> 76	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 76	
	gcaucgcggg cccacgaagt t	21
	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 77	
	aagaacgccg ggacaucct t	21
	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0026]	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 78	
	ggcauguccc ggcuucuut t	21
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 79	
	caugccacgu ggugaccgt t	21
	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 80	
	cgguccacca cgugcaugt t	21
	<210> 81	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 81	
	cggaguacaa gugccgcugt t	21

[0027]	<210> 82		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 82		
	cagcggcacu uguacuccgt t	21	
	<210> 83		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 83		
	ugccggcagg augucaacgt t	21	
	<210> 84		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 84		
	cguugacauc cugccggcat t	21	
	<210> 85		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 85		
	gagggugugc acugcgaggt t	21	
	<210> 86		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 86		
	ccucgcagug cacaccuct t	21	
	<210> 87		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 87		
	ggaccaaca cuuacacut t	21	
	<210> 88		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 88		

	agguguaagu guuggucct t	21
	<210> 89	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 89	
	cugcaaggac ggcgucgcct t	21
	<210> 90	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 90	
	ggcgacgccg uccuugcagt t	21
	<210> 91	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 91	
	gcacguguau ugacgacgut t	21
[0028]	<210> 92	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 92	
	acgucgucaa uacacugct t	21
	<210> 93	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 93	
	cacguguauu gacgacguut t	21
	<210> 94	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 94	
	aacgucguca auacacgugt t	21
	<210> 95	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	

[0029]

<400> 95 acguguauug acgacguugt t	21
<210> 96 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 96 caacgucguc aaucacagut t	21
<210> 97 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 97 ggacgagugc ucacccagct t	21
<210> 98 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 98 gcugggugag cacucgucct t	21
<210> 99 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 99 ccaucaagcg ugccgccgat t	21
<210> 100 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 100 ucggcggcac gcuugauggt t	21
<210> 101 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 101 ccgguucgag gagcccgugt t	21
<210> 102 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	

[0030]

<400> 102 cacgggcucc ucgaaccggt t	21
<210> 103 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 103 ccgggacauc acggaucaut t	21
<210> 104 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 104 augauccgug auguuccggt t	21
<210> 105 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 105 gacaucgcac aggagcgcat t	21
<210> 106 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 106 ugcgcuccug ugcauguct t	21
<210> 107 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 107 cagagcggca uggugccgat t	21
<210> 108 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 合成的	
<400> 108 ucggcaccau gccgcucugt t	21
<210> 109 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220>	

[0031]	<223> 合成的	
	<400> 109	
	cauggugccg aaccaauact t	21
	<210> 110	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 110	
	guauugguuc ggcaccaugt t	21
	<210> 111	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 111	
	uggugccgaa ccaauacaat t	21
	<210> 112	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 112	
	uuguauuggu ucggcaccat t	21
	<210> 113	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 113	
	cucgccugug gacaacacct t	21
	<210> 114	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 114	
	gguguugucc acaggcgagt t	21
	<210> 115	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 115	
	gaccaguggu ccagcucgut t	21
	<210> 116	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	

	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	116	
		acgagcugga ccacugguct t	21
	<210>	117	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	117	
		cauuccaacg ucuccgacut t	21
	<210>	118	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	118	
		agucggagac guuggaaut t	21
	<210>	119	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
[0032]	<400>	119	
		auuccaacgu cuccgacugt t	21
	<210>	120	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	120	
		cagucggaga cguuggaaut t	21
	<210>	121	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	121	
		uuccaacguc uccgacuggd tdt	23
	<210>	122	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	122	
		ccagucggag acguuggaat t	21
	<210>	123	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	



	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	123	
		caacgucucc gacuggucc t	21
	<210>	124	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	124	
		ggaccagucg gagacguugt t	21
	<210>	125	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	125	
		acgucuccga cugguccgat t	21
	<210>	126	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
[0033]	<400>	126	
		ucggaccagu cggagacgut t	21
	<210>	127	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(2)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(3)..(3)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(4)..(4)	
	<223>	核苷酸是2'-F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(5)..(5)	
	<223>	核苷酸是2'-O-甲基修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6)..(6)	

<223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 [0034] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 核苷酸是2'-F修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(21)  
 <223> 通过硫代磷酸酯连接的核苷酸  
 <400> 127  
 ugcguccug ugcgauuct t  
 <210> 128

21

	<211> 21
	<212> DNA
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 合成的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (3)..(3)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(4)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (5)..(5)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (6)..(6)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
[0035]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(8)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (9)..(9)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(11)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (13)..(13)
	<223> 核苷酸是2'-F修饰的
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (14)..(14)
	<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(16)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(17)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

[0036] <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> 核苷酸是2'-O-甲基修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(19)  
<223> 核苷酸是2'-F修饰的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (20)..(21)  
<223> 通过硫代磷酸酯连接的核苷酸

<400> 128  
gacaucgcac aggagcgcac t

21

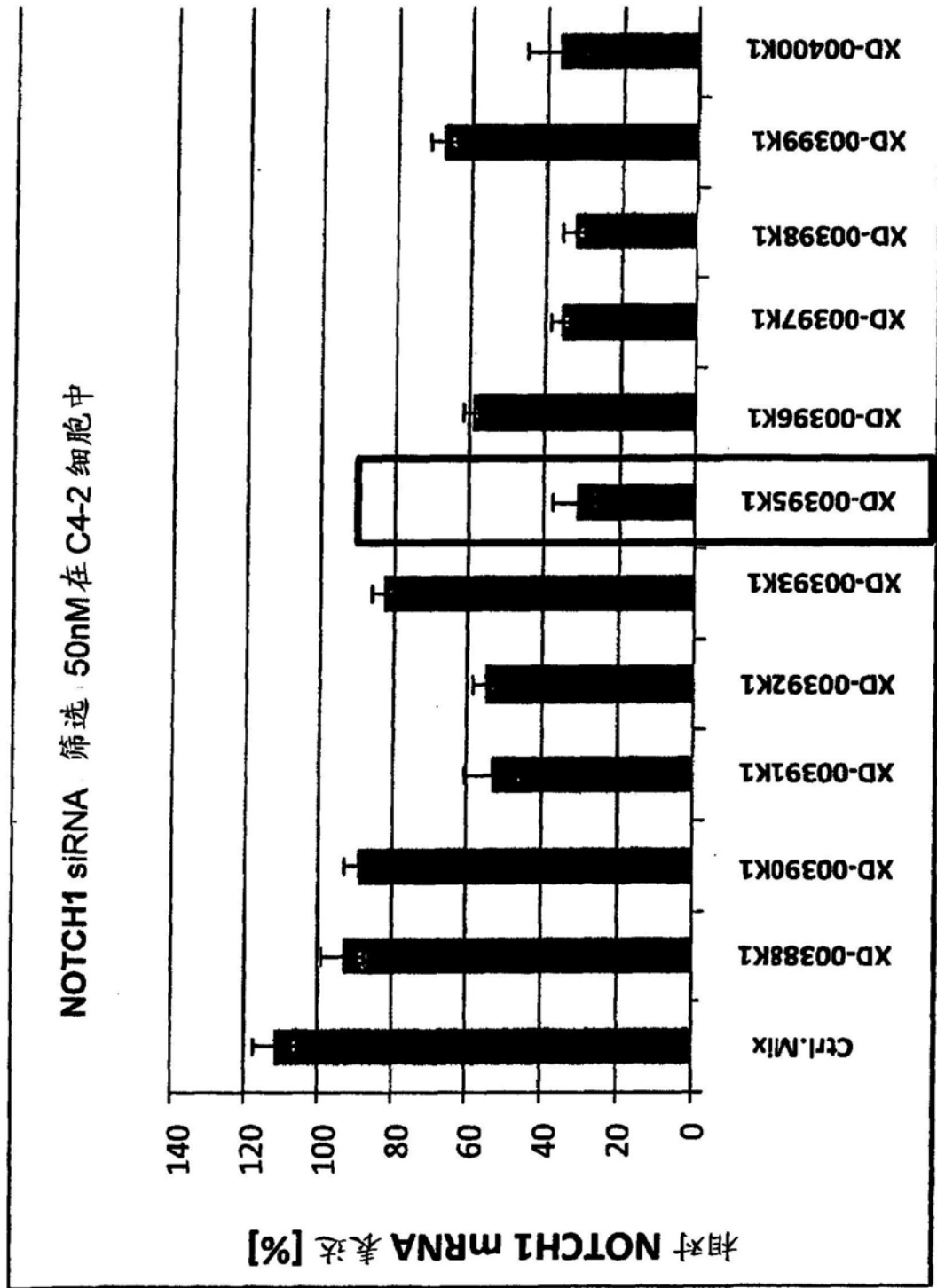


图1A

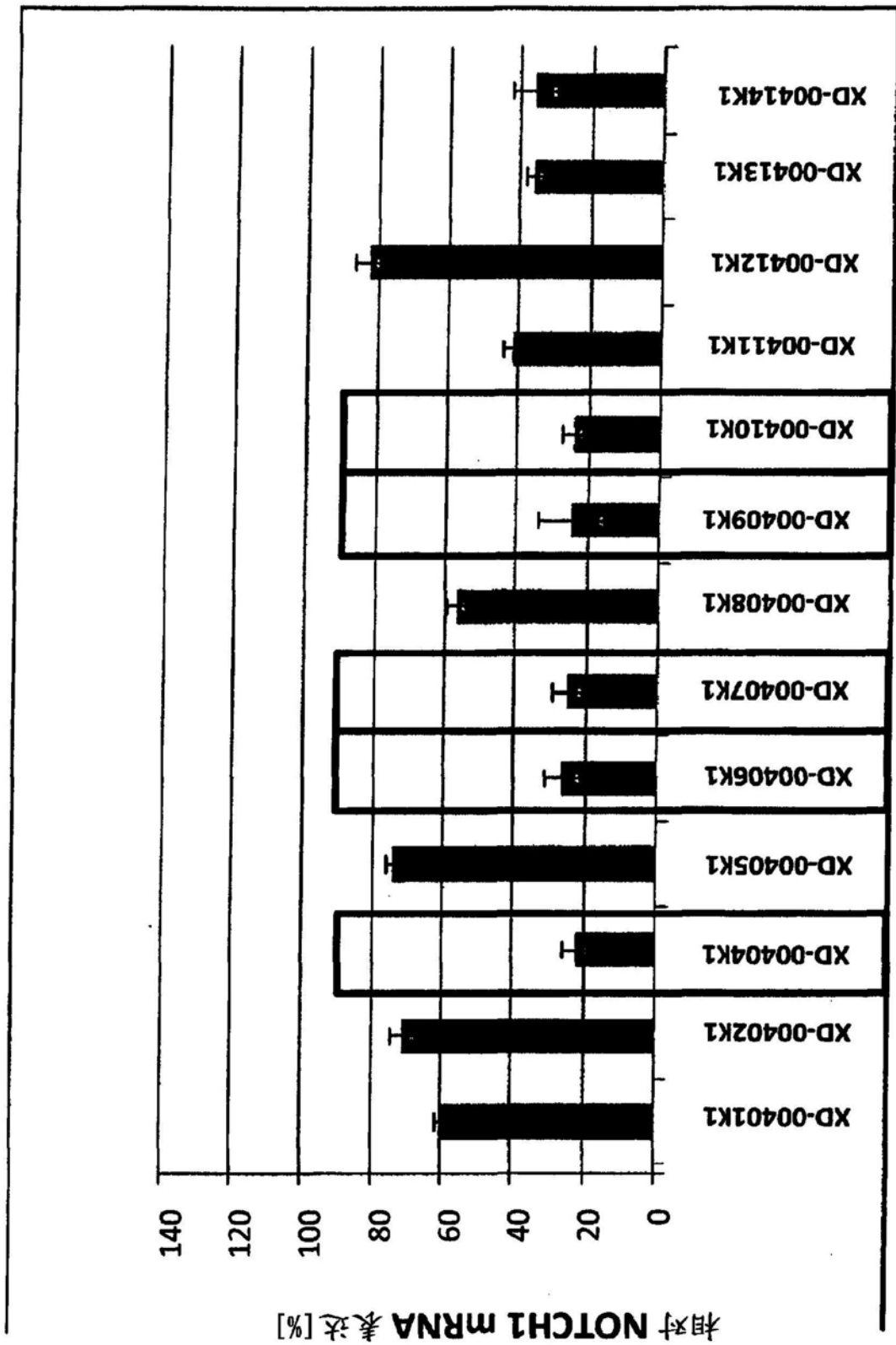


图1B

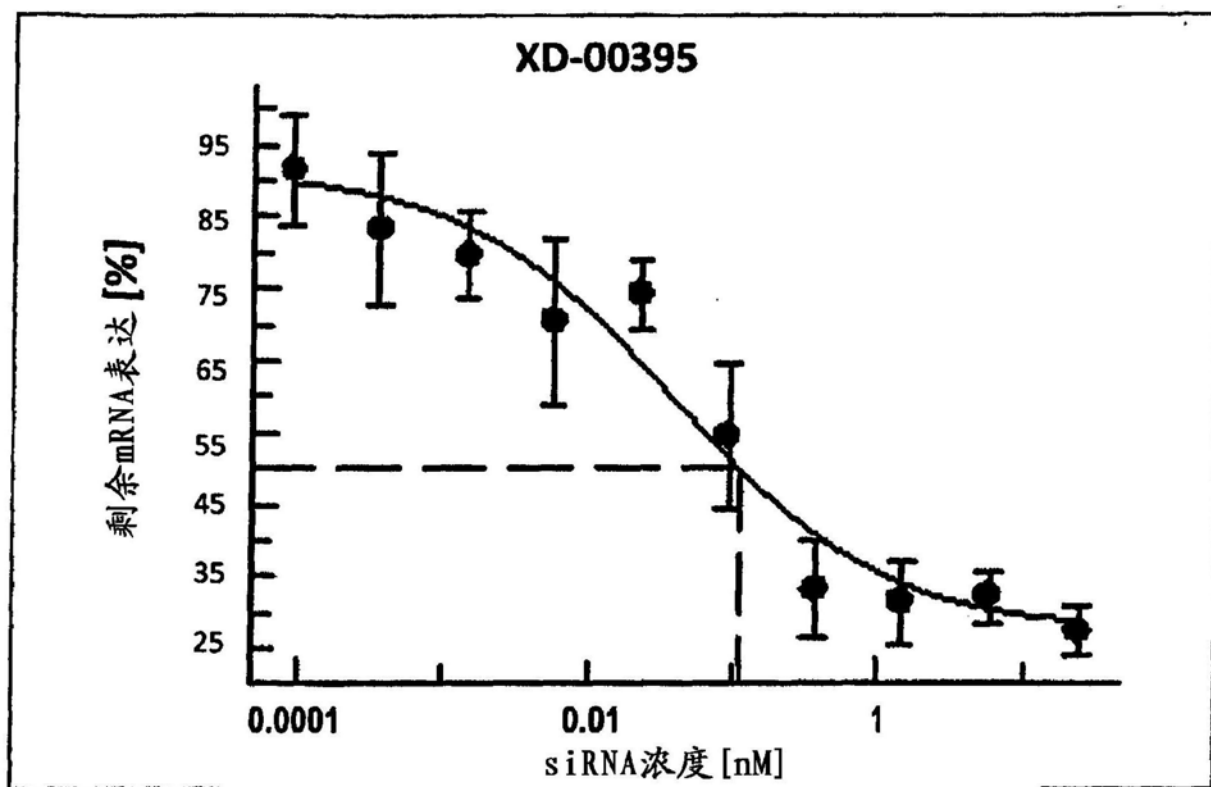


图2A

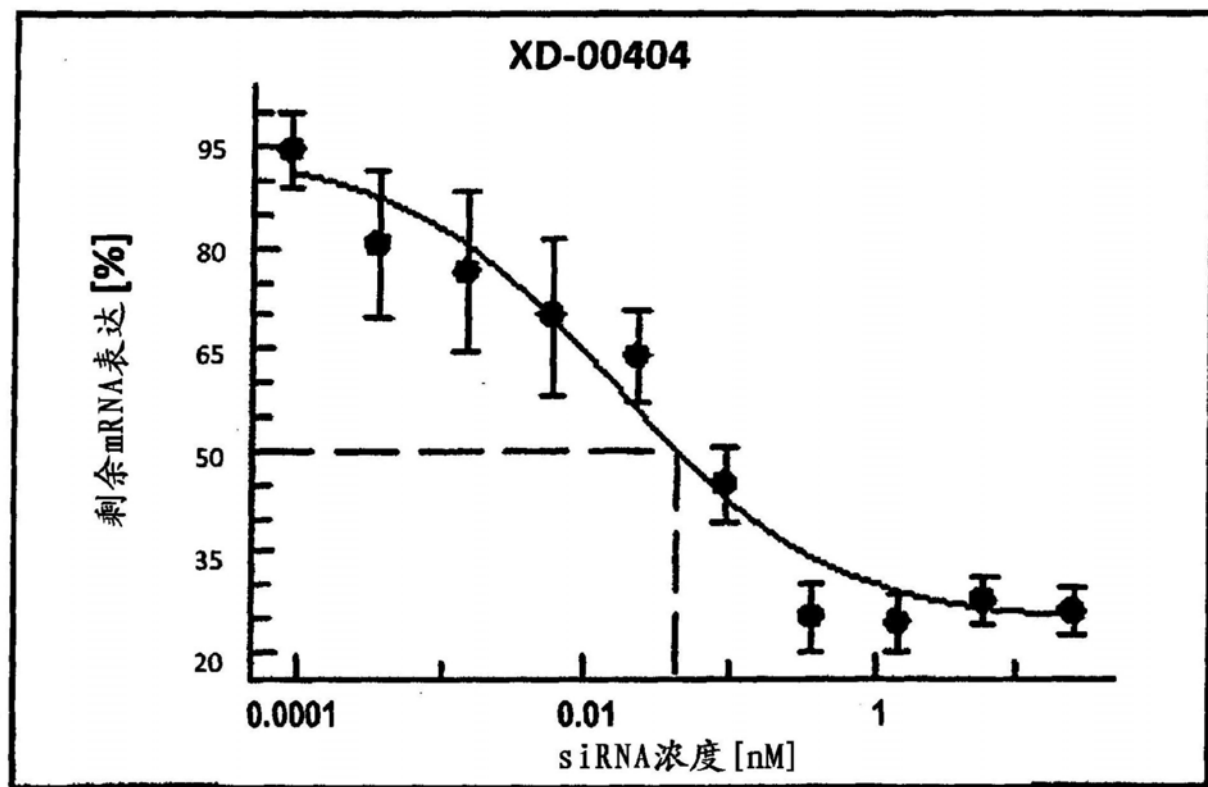


图2B



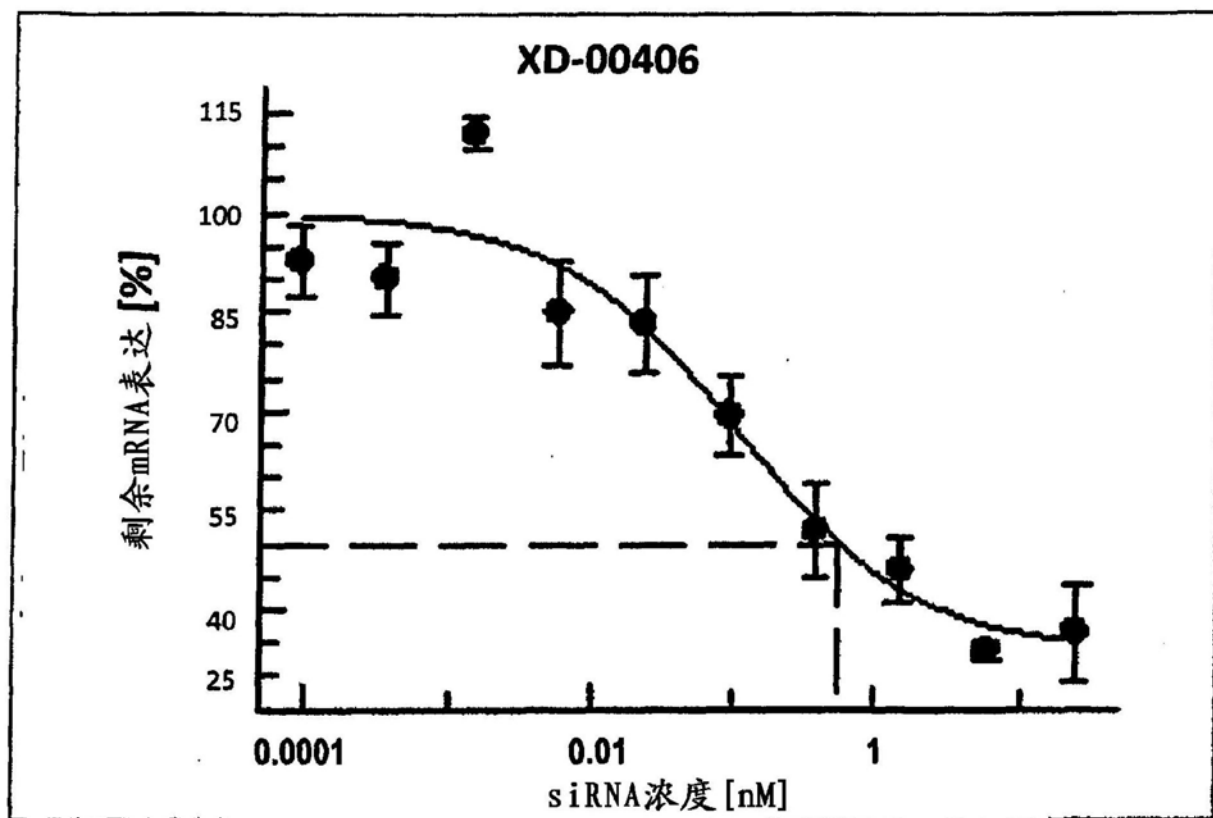


图2C

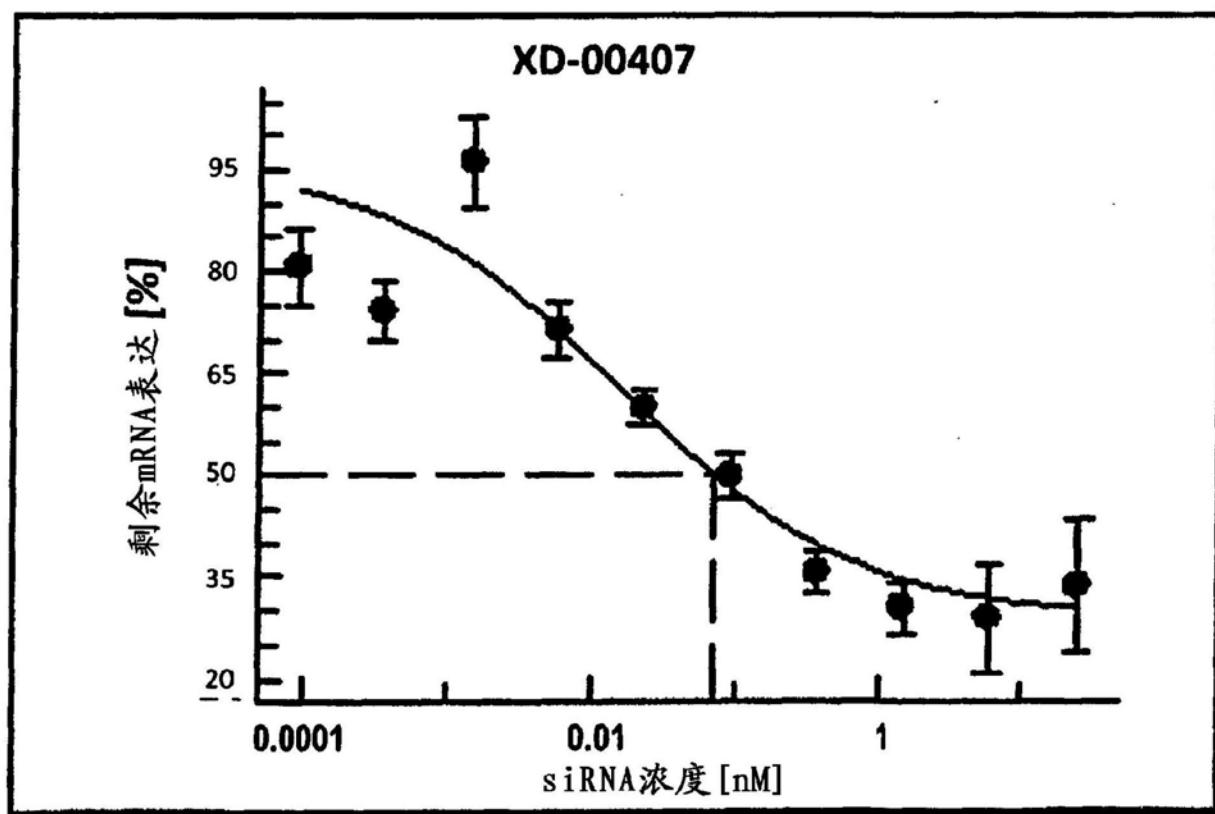


图2D

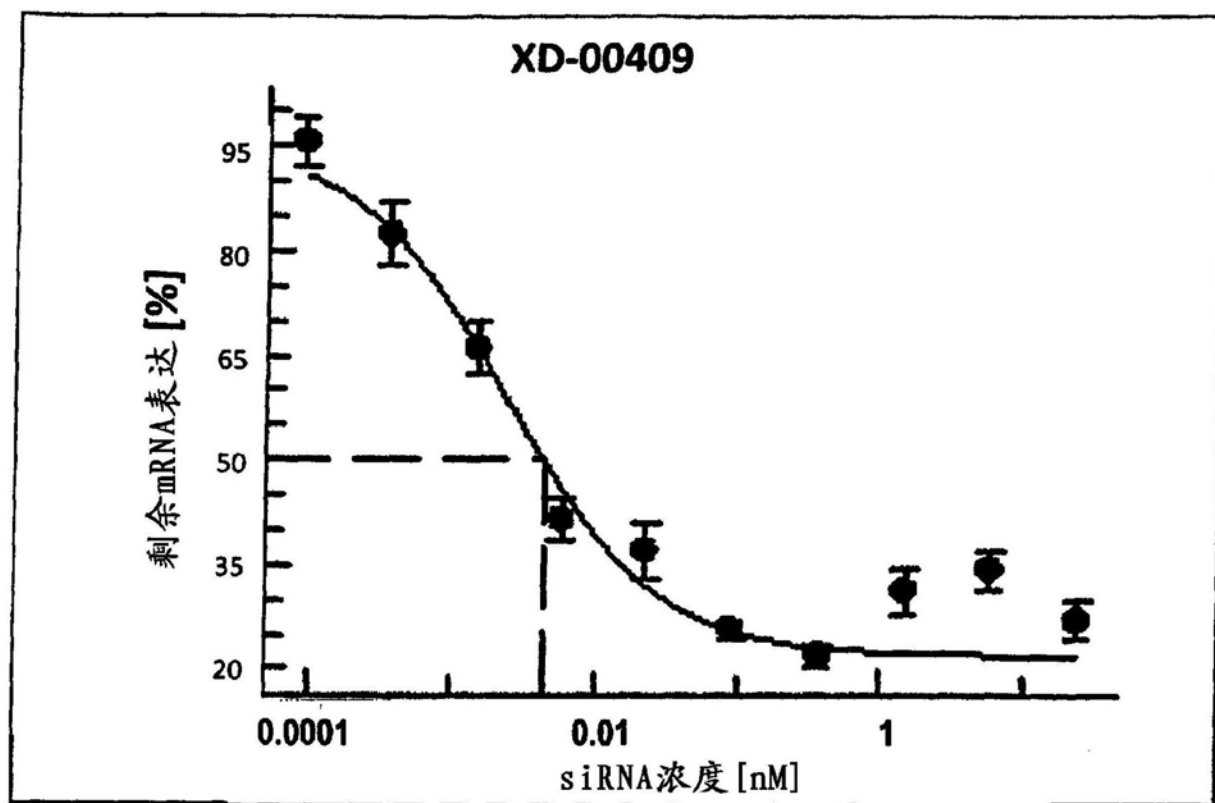


图2E

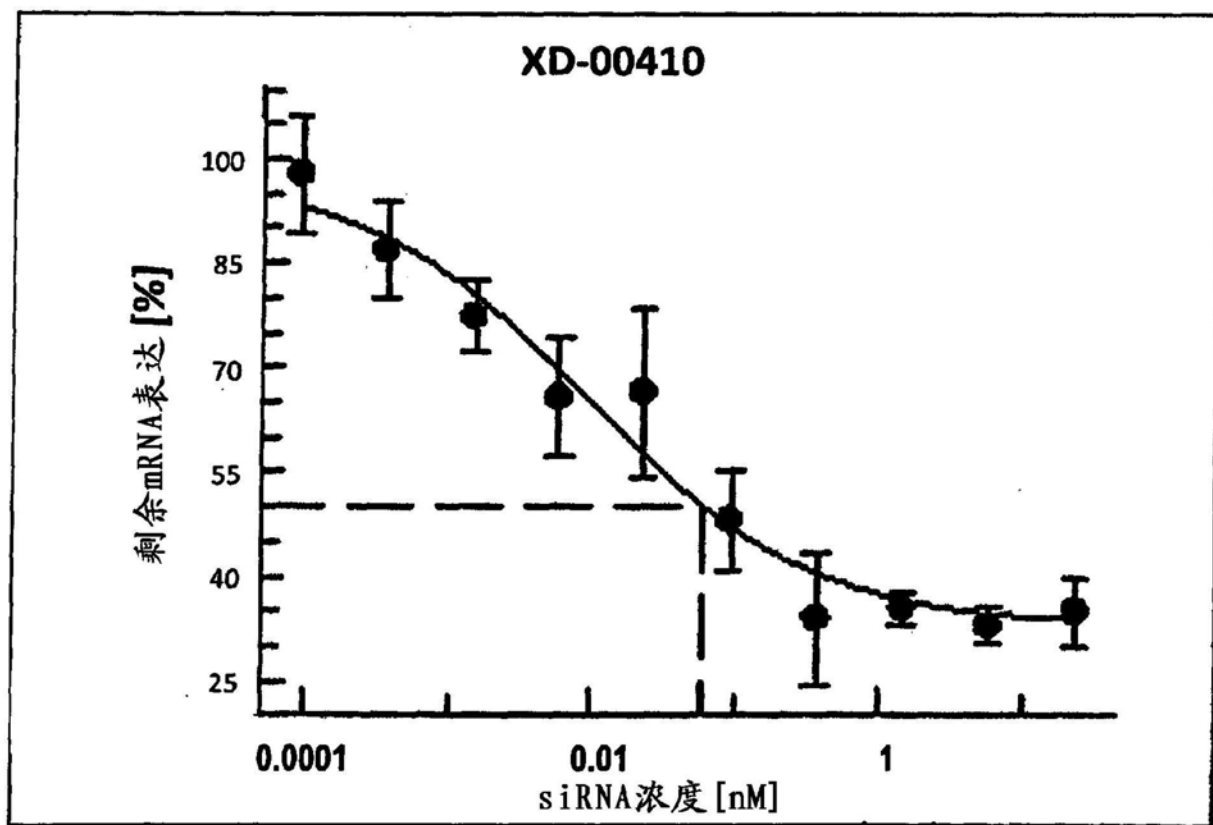
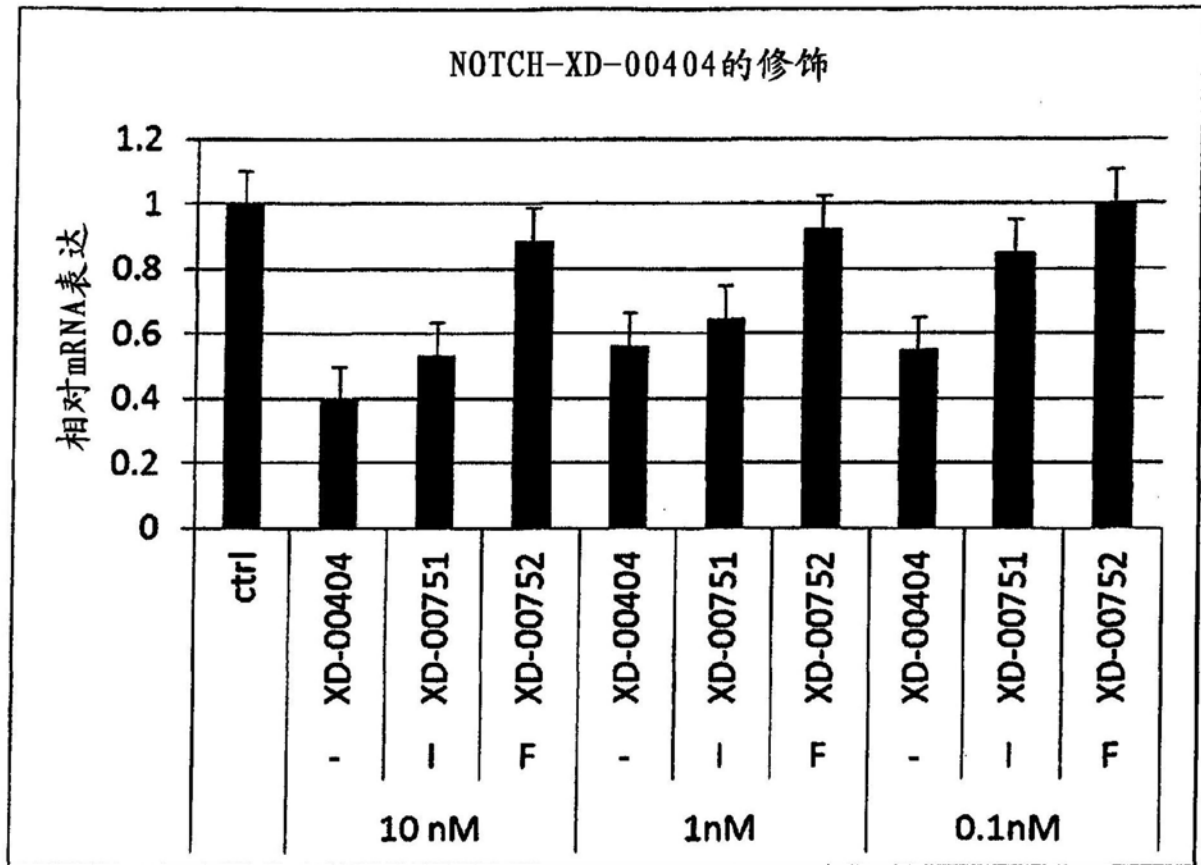


图2F



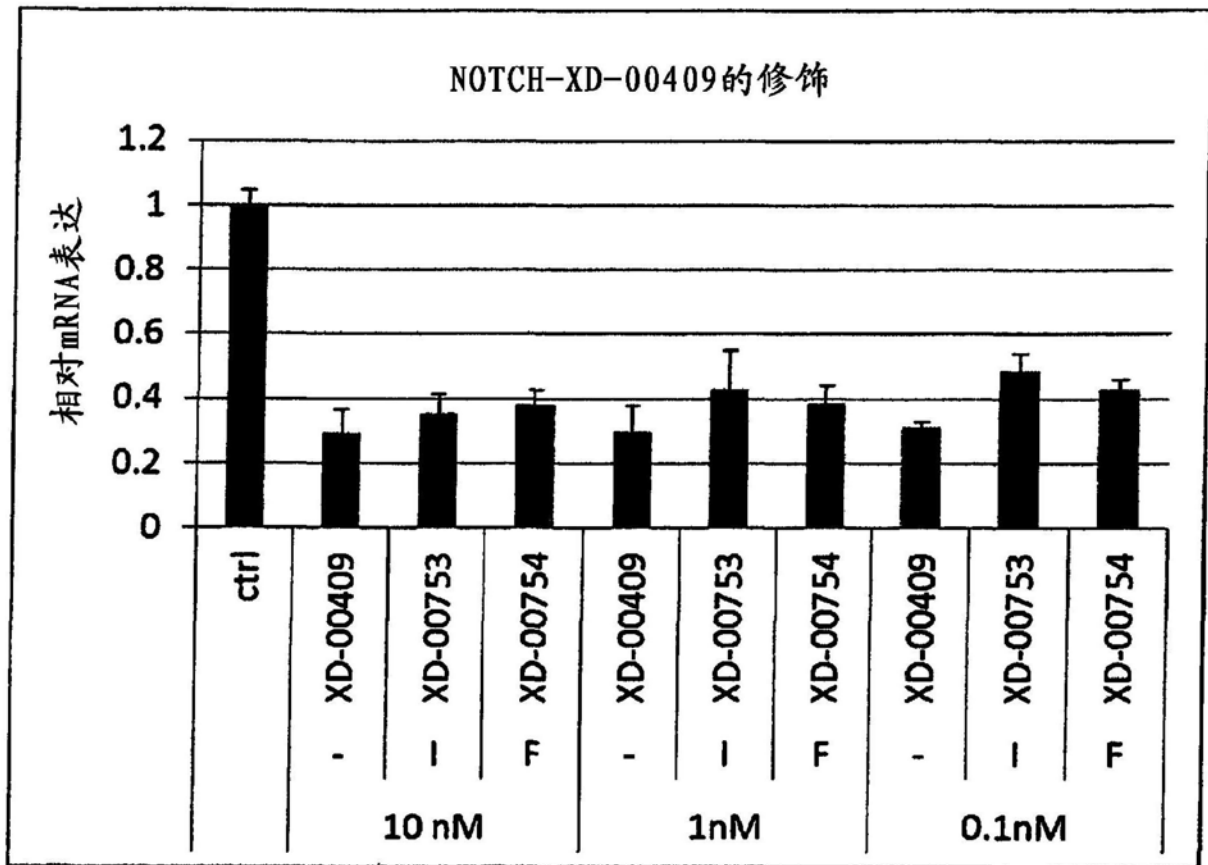
修饰模式:

-: 亲本序列 (未修饰的)

I: 中间稳定化的

F: 完全稳定化的

图3A



修饰模式:

-: 亲本序列 (未修饰的)

I: 中间稳定化的

F: 完全稳定化的

图3B

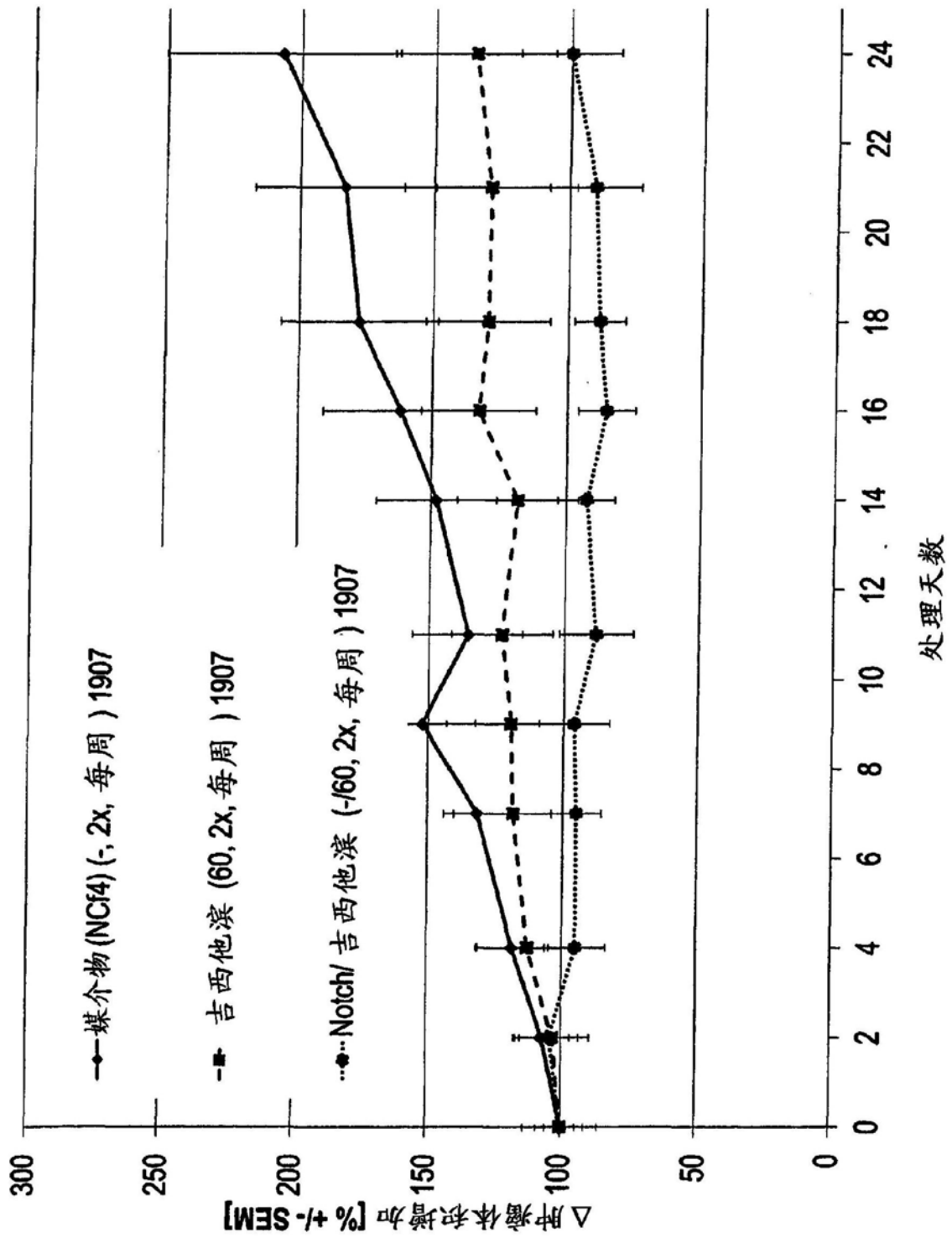


图4

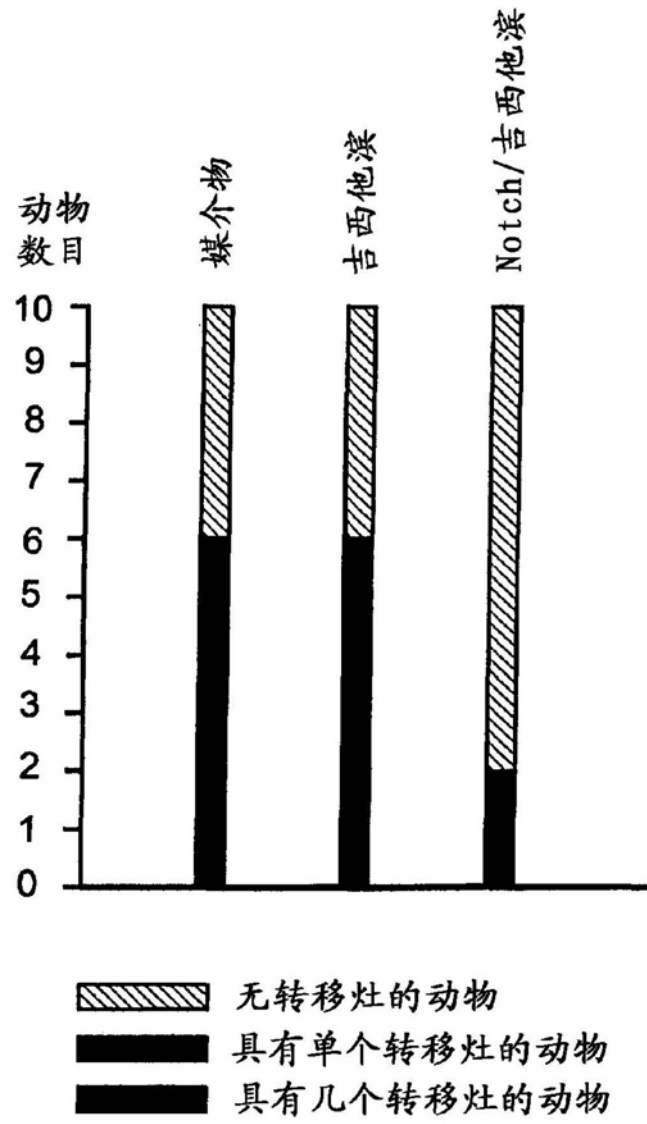


图5