



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104619844 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201380047225. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 09. 12

C12N 15/113(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/713(2006. 01)

61/699, 884 2012. 09. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 03. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/059349 2013. 09. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/043292 EN 2014. 03. 20

(71) 申请人 夸克制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 埃琳娜·费因斯坦

莎伦·阿夫金-纳祖姆

夏甲·卡林斯基 伊戈·迈特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 李平 郑霞

权利要求书11页 说明书103页

序列表23页

(54) 发明名称

靶向 P53 的双链寡核苷酸分子及其使用方法

(57) 摘要

本申请涉及核酸化合物、包含所述核酸化合物的组合物以及其用于治疗各种疾病、病症和病状的方法。所述化合物优选地是下调 p53 基因的表达的化学合成的和修饰的双链核酸分子。

1. 一种双链核酸分子,其包含有义链和反义链,其中所述有义链和所述反义链包含选自以下各项组成的组的寡核苷酸序列对:有义链 SEQ ID NO:16 和反义链 SEQ ID NO:29;有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:32;以及有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:28。

2. 如权利要求 1 所述的分子,其中所述有义链是 SEQ ID NO:16 并且所述反义链是 SEQ ID NO:29。

3. 如权利要求 1 所述的分子,其中所述有义链是 SEQ ID NO:19 并且所述反义链是 SEQ ID NO:32。

4. 权利要求 1 所述的分子,其中所述有义链是 SEQ ID NO:19 并且所述反义链是 SEQ ID NO:28。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的分子,其具有以下结构:

(A) 5' NNNNNNNNNN NNNNN-Z 3' (反义链)

||||||||||||||||

3' Z' NNNNNNNNNNNNNNNNN-z 5' (有义链)

其中各 N 独立地是 A、C、G、U 中的任一个并且独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸、未修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸或非常规部分;

其中各“|”表示在所述反义链的各 N 与所述有义链的对应 N 之间的碱基配对;

其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地是在它所存在于其中的所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分;

其中 z”可存在或不存在,但如果存在,那么是在所述有义链的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分;以及

其中所述有义链的所述序列与所述反义链的所述序列互补;条件是不是 N 和 N' 各自均是脱氧核糖核酸;或

所述分子的药学上可接受的盐。

6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的分子,其具有以下结构 (A1):

(A1) 5' (N)_x-Z 3' (反义链)

3' Z'-(N')_y-z 5' (有义链)

其中 N 和 N' 各自独立地是可为未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分的核糖核苷酸;

其中 (N)_x 和 (N')_y 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸;

其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地包含在它所存在于其中的所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分;

其中 z”可存在或不存在,但如果存在,那么是在 (N')_y 的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分;

其中 x 和 y 各自独立地是在 18 与 40 之间的整数;

其中 (N')_y 的所述序列与 (N)_x 的所述序列互补;以及

其中 (N)_x 包含反义序列并且 (N')_y 包含有义序列 ; 条件是不是 N 和 N' 各自均是非常规部分 ; 或

所述分子的药学上可接受的盐。

7. 如权利要求 6 所述的分子, 其中 $x = y = 19$ 。

8. 如权利要求 1-4 中任一项所述的分子, 其具有以下结构 (A2) :

(A2) 5' N1-(N)_x-Z 3' (反义链)

3' Z'-N2-(N')_y-z" 5' (有义链)

其中 N1、N2、N 和 N' 各自独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分 ;

其中 (N)_x 和 (N')_y 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸 ;

其中 x 和 y 各自独立地是在 17 与 39 之间的整数 ;

其中 N2 共价结合于 (N')_y ;

其中 N1 共价结合于 (N)_x 并且与所述靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 错配或是与所述靶 RNA 互补的互补 DNA 部分 ;

其中 N1 是选自由以下各项组成的组的部分 : 天然尿苷、修饰的尿苷、脱氧核糖尿苷、核糖胸苷、脱氧核糖胸苷、天然腺苷、修饰的腺苷、脱氧腺苷、腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、脱氧腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、无碱基核糖部分以及无碱基脱氧核糖部分 ;

其中 z" 可存在或不存在, 但如果存在, 那么是在 N2-(N')_y 的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分、维生素或药物部分 ;

其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在, 但如果存在, 那么独立地是在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物、1-5 个连续非核苷酸部分或其组合、缀合物部分 ;

其中 (N')_y 的所述序列与 (N)_x 的所述序列互补 ;

其中 (N)_x 的所述序列的至少一部分与所述靶 RNA 中的连续序列互补 ; 以及

其中 N1-(N)_x 的所述序列包含反义序列并且 N2-(N')_y 包含有义序列 ; 条件是不是 N 和 N' 各自均是非常规部分 ; 或

所述分子的药学上可接受的盐。

9. 如权利要求 8 所述的分子, 其中 $x = y = 18$ 。

10. 如权利要求 5-9 中任一项所述的分子, 其中所述修饰的核糖核苷酸包含在所述糖部分的所述 2' 位置处的修饰。

11. 如权利要求 5-9 中任一项所述的分子, 其中所述修饰的核糖核苷酸是 2' -O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸。

12. 如权利要求 5-11 中任一项所述的分子, 其中所述非常规部分选自由以下各项组成的组 : 镜像核苷酸、未修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、苏糖核酸 (TNA)、吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物以及通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸的核糖核苷酸。

13. 如权利要求 5-12 中任一项所述的分子, 其中 Z 或 Z' 中的至少一个存在。

14. 如权利要求 5-12 中任一项所述的分子, 其中 Z 和 Z' 两者均存在。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的分子,其中 Z 和 Z' 各自是 1-2 个连续非核苷酸部分。

16. 如权利要求 15 所述的分子,其中每个非核苷酸部分是 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3),其可以被磷酸化或未磷酸化。

17. 如权利要求 16 所述的分子,其中 Z 是一个 C3 非核苷酸部分(C3),其可以被磷酸化或未磷酸化;并且其中 Z' 是两个连续 C3 非核苷酸部分(C3-C3),其可以被磷酸化或未磷酸化。

18. 如权利要求 5-17 中任一项所述的分子,其中 z" 存在并且选自由以下各项组成的组:无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向无碱基核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分(idAb)、氨基-C6 部分(AM-c6)、C6-氨基-Pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5,6,7,8-四氢-2-萘丁酸磷酸二酯(THNB)、维生素以及药物部分。

19. 如权利要求 18 所述的分子,其中所述非核苷酸部分是 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)。

20. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' 帽 GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' AAGAAugUCAAGUCUGAGuC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 u、g 和 c 各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或

所述分子的药学上可接受的盐。

21. 如权利要求 20 所述的分子,其中在所述有义链的所述 5' 末端处共价连接的所述 5' 帽是 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3);以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化(-C3-C3-pi);或

所述分子的药学上可接受的盐。

22. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' 帽 GACUCAGACUGACAuCUuC-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' AAGAAugUCAAGUCUGAGuC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 u、g 和 c 各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）（C3）非核苷酸突出端；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化（pi）；或

所述分子的药学上可接受的盐。

23. 如权利要求 2 所述的分子，其具有有义链和反义链：

5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:16）

5' AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:29）

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸（5' > 3'）的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）（C3）非核苷酸突出端；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化（pi）；或

所述分子的药学上可接受的盐。

24. 如权利要求 2 所述的分子，其具有有义链和反义链：

5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:16）

5' AAGAAuGUCAGUCUGAGAGUC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:29）

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸（5' > 3'）的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）（C3）非核苷酸突出端；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以

及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
所述分子的药学上可接受的盐。

25. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷 (dTdT) 突出端;以及

其中所述有义链和所述反义链的所述 3' 末端未磷酸化;或
所述分子的药学上可接受的盐。

26. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' phos-AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi);

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3' 帽;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端 (-C3-C3-pi);以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos);或
所述分子的药学上可接受的盐。

27. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' C3-GACUCAGACUGACAuucuuu-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' phos-AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二

氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C35' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi)；以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)；或所述分子的药学上可接受的盐。

28. 如权利要求 2 所述的分子,其具有有义链和反义链：

5' C3-GACUCAGACUGACUUCU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C35' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi)；以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)；或所述分子的药学上可接受的盐。

29. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链：

5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi)；或所述分子的药学上可接受的盐。

30. 如权利要求 29 所述的分子,其中在所述有义链的所述 5' 末端处共价连接的所述

5' 帽是 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) ;以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi) ;或

所述分子的药学上可接受的盐。

31. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链 :

5' 帽 -GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链 ;SEQ ID NO :19)

5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链 ;SEQ ID NO :32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5'>3') 的核糖核苷酸 ;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端 ;

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ;以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

所述分子的药学上可接受的盐。

32. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链 :

5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链 ;SEQ ID NO :19)

5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链 ;SEQ ID NO :32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5'>3') 的核糖核苷酸 ;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端 ;

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ;以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

所述分子的药学上可接受的盐。

33. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链 :

5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链 ;SEQ ID NO :19)

5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链 ;SEQ ID NO :32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

所述分子的药学上可接受的盐。

34. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链：

5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi)；

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C35' 帽；

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端 (-C3-C3-pi)；以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos)；或

所述分子的药学上可接受的盐。

35. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链：

5' C3-GGGCCUGACUCAFAcugau-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

其中 C是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi);

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C35' 帽;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi);以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos);或

所述分子的药学上可接受的盐。

36. 如权利要求 3 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 U和 C各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi);

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C35' 帽;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi);以及

其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化(-C3-C3-pi);或

所述分子的药学上可接受的盐。

37. 如权利要求 4 所述的分子,其具有有义链和反义链:

5' 帽 GGGCCUGACUCAFACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

5' UUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

其中 U和 C各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸;

其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
所述分子的药学上可接受的盐。

38. 如权利要求 20、22-24、29、31-33 或 37 中任一项所述的分子,其中在所述反义链中,在所述链的所述 3' 末端处共价连接的所述 C3-C3 非核苷酸突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。

39. 如权利要求 20-38 中任一项所述的分子,其中所述 5' 帽选自以下各项组成的组: 无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB)、缀合物部分。

40. 如权利要求 20-39 中任一项所述的分子,其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos)。

41. 如权利要求 20-39 中任一项所述的分子,其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸未磷酸化 (\$)。

42. 一种核酸分子,其具有选自表 1 中列出的序列 SEQ ID NO:8-33 中的任一个的寡核苷酸序列 ;或所述分子的药学上可接受的盐。

43. 如权利要求 42 所述的分子,其中所述分子具有双链结构 ;其中所述链中的一条的所述寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:8-20 中的一个,并且其中所述另一条链的所述寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:21-33 中的一个 ;或所述分子的药学上可接受的盐。

44. 一种组合物,其包含如权利要求 1-43 中任一项所述的分子或其药学上可接受的盐 ;以及药学上可接受的载体。

45. 如权利要求 1-43 中任一项所述的分子,或所述分子的药学上可接受的盐,或包含所述分子的组合物,或包含所述分子的所述药学上可接受的盐的组合物,用于治疗或预防与受试者中 p53 的表达相关的疾病或病症。

46. 一种用于治疗患有与 p53 表达相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括以足以下调 p53 的表达的量向所述受试者施用如权利要求 1-43 中任一项所述的分子或其药学上可接受的盐。

47. 如权利要求 46 所述的方法,其中所述疾病或病症选自以下各项组成的组:局部缺血 - 再灌注损伤、听力受损、听力障碍、平衡受损、听力丧失、化学疗法诱导的秃头症、放射疗法诱导的秃头症、急性肾衰竭、急性肾损伤、慢性肾病 (CKD)、与抗癌疗法相关的副作用、肾移植患者的移植物功能延迟恢复 (DGF)、脊髓损伤、脑损伤、癫痫、中风、神经退行性疾病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肿瘤、烧伤、伤口、高热、缺氧、局部缺血、器官移植、骨髓移植 (BMT)、心肌梗塞 / 心脏病发作、心脏毒性、p53 阳性癌症以及急性肝衰竭。

48. 如权利要求 1-42 中任一项所述的分子或所述分子的药学上可接受的盐,或包含所述分子的组合物,或包含所述分子的所述药学上可接受的盐的组合物,用于治疗受试者中的 p53 阳性癌症,其中以下调 p53 基因的表达的量施用所述分子,或所述分子的所述药学上可接受的盐,或包含所述分子的所述组合物,或包含所述分子的所述药学上可接受的盐的所述组合物,并且从而使所述 p53 阳性癌症对所述受试者中的化学疗法敏感。

49. 如权利要求 1-43 中任一项所述的分子,或所述分子的药学上可接受的盐,或包含所述分子的组合物,或包含所述分子的所述药学上可接受的盐的组合物,用于造血祖细胞扩增或刺激血细胞生成。

50. 如权利要求 1-43 中任一项所述的分子,或所述分子的药学上可接受的盐,或包含所述分子的组合物,或包含所述分子的所述药学上可接受的盐的组合物,用于 p53-null 造血干细胞 (HSC) 的归巢。

靶向 P53 的双链寡核苷酸分子及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 09 月 12 日提交的名称为“针对 p53 的双链寡核苷酸分子及其使用方法 (Double-stranded Oligonucleotide Molecules to p53 and Methods of Use Thereof)”的美国临时申请序列号 61/699,885 的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文并用于所有的目的。

[0003] 序列表

[0004] 本申请以引用的方式并入存在于名为“247_PCT1_ST25.txt”的文件中的核苷酸和 / 或氨基酸序列,所述文件大小为 29 千字节且于 2013 年 9 月 3 日以与 MS-Windows 具有操作系统相容性的 IBM PC 机器格式创建,并且与本申请一起递交。

发明领域

[0005] 本公开涉及核酸分子、包含所述核酸分子的药物组合物以及其用于下调 p53 基因的使用方法。本文公开的化合物和组合物适用于治疗患有与 p53 基因表达相关的疾病或病症或处于发展与 p53 基因表达相关的疾病或病症的风险的受试者。这类疾病 / 病症的实例包括但不限于局部缺血 - 再灌注损伤、听力受损、听力障碍、平衡受损、听力丧失、化学疗法诱导的秃头症 (脱发)、放射疗法诱导的秃头症、急性肾衰竭、急性肾损伤、慢性肾病 (CKD)、与抗癌疗法相关的副作用、肾移植患者的移植物功能延迟恢复 (DGF)、脊髓损伤、脑损伤、癫痫、中风、神经退行性病症、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肿瘤、烧伤、伤口、高热、缺氧、局部缺血、器官移植、心肌梗塞 / 心脏病发作、心脏毒性以及急性肝衰竭。

[0006] 发明背景

[0007] siRNA 和 RNA 干扰

[0008] RNA 干扰 (RNAi) 是涉及双链 (ds)RNA 依赖性基因特异性转录后沉默的现象。

[0009] 美国专利申请序列号 13/508,493、美国专利申请公布号 20060069056、20100029746、20100222409、20110142917、20120184597、20120141378 和美国专利号 7,825,099、7,842,674、7,910,566、8,148,342 (全部为本申请的受让人的) 涉及适用于下调 p53 基因的双链 RNA 化合物和组合物并且涉及这类化合物和组合物用于治疗患有与 p53 基因表达相关的疾病或病症或处于发展与 p53 基因表达相关的疾病或病症的风险的患者的用途。

[0010] 美国专利号 6,982,277、7,008,956、7,012,087 (转让给伊利诺伊大学的董事会) 涉及一种可逆地抑制 p53 持续足够的时间以便允许宿主中的正常细胞从影响细胞的应激诱导事件恢复的方法,涉及一种减少与癌症疗法相关的脱发的方法,所述方法包括与所述癌症疗法结合向有需要的哺乳动物施用治疗有效剂量的可逆 p53 抑制剂;并且涉及一种减少哺乳动物中可归因于中枢神经系统中影响细胞的应激诱导事件的细胞死亡的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的暂时 p53 抑制剂以便可逆地抑制 p53 活性。

[0011] 本发明的受让人的并且特此以引用的方式整体并入的美国申请公布号 2010/0292301 和 2011/0112168 以及 PCT 专利公布号 WO 2011/066475、WO 2011/084193、WO

2011/085056 和 WO 2012/078536 公开了适用于产生 dsRNA 分子的核酸序列和修饰。

[0012] 本发明的受让人的并且特此以引用的方式整体并入的美国申请公布号 2011/0142917、2011/0229557 和 2012/0141378 公开了组合物和使用靶向 p53 基因的双链 RNA 化合物的方法。

[0013] 需要适用于治疗或减弱与 p53 基因的表达相关的病状、疾病或病症的分子、组合物、方法和试剂盒,并且所述分子、组合物、方法和试剂盒当与未修饰的 dsRNA 对应物相比时表现出以下中的至少一种:增加的生物利用度、改善的生物分布、增加的血清循环时间、增加的血清稳定性、降低的血清清除率、改善的细胞摄取、降低的脱靶活性、降低的免疫原性、改善的核内体释放、向靶组织或细胞改善的特异性递送以及增加的敲低活性。

[0014] 发明概述

[0015] 本文提供用于下调 p53 基因的表达的核酸分子、包含所述核酸分子的组合物和试剂盒以及其使用方法。所述组合物、方法和试剂盒可涉及使用结合编码 p53 的核苷酸序列(如 mRNA 序列)或其部分(例如人 p53 的 mRNA 编码序列(图 1-7 中的 SEQ ID NO:1-7))、编码一个或多个蛋白质或蛋白质亚单位的核苷酸序列或其部分的核酸分子(例如,短干扰核酸(siNA)、短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微小 RNA(miRNA) 或短发夹 RNA(shRNA))。在某些优选的实施方案中,本文公开的分子、组合物、方法和试剂盒下调或抑制 p53 基因的表达。在各个实施方案中,核酸分子选自自由下调 p53 基因的表达的未修饰的或化学修饰的 dsRNA 化合物如 siRNA 或 shRNA 组成的组。

[0016] 在一些实施方案中,核酸分子是下调 p53 表达的合成、未修饰的双链 RNA(dsRNA) 化合物。

[0017] 在一些优选的实施方案中,核酸分子是下调 p53 表达的合成、化学修饰的双链 RNA(dsRNA) 化合物。在某些优选的实施方案中,“p53”是指人 p53 基因。在某些优选的实施方案中,“靶基因”是指人 p53 基因。

[0018] 本文提供的化学修饰的核酸分子和组合物当与对应未修饰的核酸分子相比时表现出有益的特性,所述有益特性包括以下中的至少一种:增加的血清稳定性、改善的细胞摄取、降低的脱靶活性、降低的免疫原性、改善的核内体释放、向靶组织或细胞改善的特异性递送以及增加的敲低/下调活性。

[0019] 本文进一步公开用于治疗或预防有需要的受试者中的病症、疾病、损伤或病状的发生或严重性的方法,其中所述疾病或病状和/或与其相关的症状或病理学与 p53 基因的表达相关。在一些实施方案中,这种病症、疾病、损伤、病状或病理学选自包括以下的组:内耳的病症、疾病、损伤、病状或病理学;肾的病症、疾病、损伤、病状或病理学;中枢神经系统(CNS)的病症、疾病、损伤、病状或病理学;心脏的病症、疾病、损伤、病状或病理学;肝脏的病症、疾病、损伤、病状或病理学;心脏的病症、疾病、损伤、病状或病理学;影响器官移植患者的病症、疾病、损伤、病状或病理学;由经受抗癌治疗的患者经历的病症、疾病、损伤、病状或病理学。在一些实施方案中,这种病症、疾病、损伤、病状或病理学选自包括以下的组:局部缺血-再灌注损伤、听力受损、听力障碍、平衡受损、听力丧失、化学疗法诱导的秃头症、放射疗法诱导的秃头症、急性肾衰竭、急性肾损伤、慢性肾病(CKD)、与抗癌疗法相关的副作用、肾移植患者的移植物功能延迟恢复(DGF)、脊髓损伤、脑损伤、癫痫、中风、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肿瘤、烧伤、伤口、高热、缺氧、局部缺血、器官移植、心肌梗塞/心脏病发

作、心脏毒性以及急性肝衰竭。

[0020] 在具体实施方案中,本文提供靶向 p53 的化学修饰的 dsRNA 化合物、包含所述化合物的组合物和试剂盒以及其在治疗涉及细胞凋亡(即细胞的凋亡性(程序性)死亡)的病状或病理学中的使用方法。待治疗的其它病状包括其中 p53 表达为有害并且用本文提供的化合物和组合物治疗的任何病状。

[0021] 一方面,本文提供适用于产生靶向和下调 p53 基因的核酸化合物的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:8-33)。

[0022] 另一方面,提供靶向和下调 p53 基因的核酸化合物或这类化合物的药学上可接受的盐。在一些优选的实施方案中,本文公开的核酸分子具有双链结构。在一些实施方案中,核酸化合物具有双链结构并且所述链各自包含选自以下表 1 中列出的序列 (SEQ ID NO: 8-33) 的寡核苷酸序列。在具有双链结构的核酸化合物的一些实施方案中,所述链中的一条的寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:8-20 中的一个并且另一条链的寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:21-33 中的一个。

[0023] 在一些实施方案中,提供具有双链结构的核酸分子或这类分子的药学上可接受的盐,其中 (a) 所述核酸分子是包括有义链和互补反义链的双链体;(b) 所述核酸分子各链的长度是 19 个核苷酸;(c) 反义链的 19 个核苷酸的序列与编码哺乳动物 p53 的 mRNA 的连续序列(例如,SEQ ID NO:1-7)或其部分互补;并且 (d) 有义链和反义链选自以下表 1 中列出的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:8-33)。

[0024] 表 1. 靶向 p53 的核酸化合物的选定有义链和反义链寡核苷酸序列

[0025]

SEQ ID NO	有义链 (5' > 3')	SEQ ID NO	反义链 (5' > 3')
8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAAGGUCUG 3'
9	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCAAACAUC 3'
10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
11	5' GGGUUGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
12	5' GGAUGUUUGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCAAACAUC 3'
13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3'
14	5' GAGGAUGUUUGGAGAU 3'	27	5' UAUCUCCAAACAUC 3'
15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
16	5' GACUCAGACUGACAUUCU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAAAGC 3'

[0026]

18	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
34	5' CCGAGUGGAAGGAAAUUG 3'	35	5' CAAAUUCCUCCACUCGG 3'
36	5' GAGAAUUAUUCACCCUUA 3'	37	5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3'

[0027] 表 1 中给出的所有位置是有义链和反义链上 5' > 3'。

[0028] 在另一个实施方案中,提供核酸化合物(例如,dsRNA 分子)或这类化合物的药学上可接受的盐,其中(a)所述核酸分子是包括有义链和互补反义链的双链体;(b)所述核酸分子的各链的长度是 19 个核苷酸;(c)反义链的 19 个核苷酸的序列与编码哺乳动物 p53 的 mRNA 的连续序列(例如,SEQ ID NO:1-7)或其部分互补;并且(d)有义链和反义链包含以下表 2 中列出的序列对。

[0029] 表 2. 用于产生靶向 p53 的双链核酸化合物的选定有义链和反义链对

[0030]

对名称	SEQ ID NO	有义链(5'>3')	SEQ ID NO	反义链(5'>3')
p53_13	8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
p53_34	9	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	9	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_35	10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_36	11	5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
p53_37	12	5' GGGAUGUUUGGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_38	13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUCC 3'
p53_39	14	5' GAGGGAUGUUUGGGAGAU 3'	27	5' UAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_40	15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
p53_41	16	5' GACUCAGACUGACAUUCUU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_42	17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAAUUGC 3'
p53_43	18	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	18	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_44	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
p53_45	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'

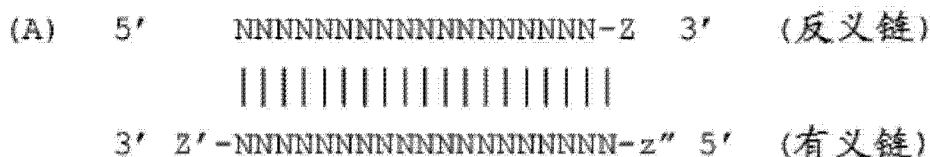
[0031] 表 2 中给出的所有位置是有义链和反义链上 5' > 3'。

[0032] 在本文公开的双链核酸分子的优选实施方案中,有义链和反义链选自由以下各项组成的组:有义链 SEQ ID NO:16 和反义链 SEQ ID NO:29、有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:32 以及有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:28。

[0033] 本文提供的核酸分子优选地是具有修饰的双链核酸分子,当与对应未修饰的 dsRNA 化合物相比时所述修饰可增加活性、增加稳定性和 / 或最小化毒性。当与实现核酸递送至靶器官的药物媒介物混合时,这些分子提供适用于治疗与 p53 基因相关的多种病症的有效、安全和患者依从的治疗性化合物。所述核酸化合物被设计成下调 p53 基因表达并且减弱 p53 基因功能。在各个实施方案中,p53 基因是转录成 SE ID NO:1-7 中列出的 mRNA 多核苷酸中的任一个的人 p53 基因。

[0034] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A) 的修饰的核酸分子:

[0035]



[0036] 其中各 N 独立地是 A、C、G、U 中的任一个并且独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分;

[0037] 其中各“|”表示在所述反义链的各 N 与所述有义链的对应 N 之间的碱基配对;

[0038] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地是在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分;

[0039] 其中 z'' 可存在或不存在,但如果存在,那么是在所述有义链的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分;以及

[0040] 其中有义链的序列与反义链的序列互补;条件是不是 N 和 N' 各自均是非常规部分。

[0041] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A1) 的修饰的核酸分子:

[0042] (A1) $5' \quad (N)_x - Z \quad 3' \quad \text{(反义链)}$

[0043] $3' \quad Z' - (N')_y - z'' \quad 5' \quad \text{(有义链)}$

[0044] 其中 N 和 N' 各自独立地是可为未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分的核糖核苷酸;

[0045] 其中 $(N)_x$ 和 $(N')_y$ 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸;

[0046] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地包含在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分;

[0047] 其中 z'' 可存在或不存在,但如果存在,那么是在 $(N')_y$ 的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分;

[0048] 其中 x 和 y 各自独立地是在 18 与 40 之间的整数;

[0049] 其中 $(N')_y$ 的所述序列与 $(N)_x$ 的所述序列互补;以及

[0050] 其中 $(N)_x$ 包含反义序列并且 $(N')_y$ 包含有义序列;条件是不是 N 和 N' 各自均是非常规部分。

[0051] 在结构 (A1) 的各个实施方案中, $x = y$ 。在结构 (A1) 的优选实施方案中, $x = y$

= 19。

[0052] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A2) 的修饰的核酸分子:

[0053] (A2) 5' N1-(N)_x-Z 3' (反义链)

[0054] 3' Z'-N2-(N')_y-z" 5' (有义链)

[0055] 其中 N1、N2、N 和 N' 各自独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分;

[0056] 其中 (N)_x 和 (N')_y 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸;

[0057] 其中 x 和 y 各自独立地是在 17 与 39 之间的整数;

[0058] 其中 N2 共价结合于 (N')_y;

[0059] 其中 N1 共价结合于 (N)_x 并且与靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 错配或是与所述靶 RNA 互补的互补 DNA 部分;

[0060] 其中 N1 是选自由以下各项组成的组的部分:天然尿苷、修饰的尿苷、脱氧核糖尿苷、核糖胸苷、脱氧核糖胸苷、天然腺苷、修饰的腺苷、脱氧腺苷、腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、脱氧腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、无碱基核糖部分以及无碱基脱氧核糖部分;

[0061] 其中 z" 可存在或不存在,但如果存在,那么是在 N2-(N')_y 的 5' 末端处共价连接的加帽部分、维生素或药物部分;

[0062] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地是在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物、1-5 个连续非核苷酸部分或其组合、缀合物部分;

[0063] 其中 (N')_y 的所述序列与 (N)_x 的所述序列互补;

[0064] 其中 (N)_x 的所述序列的至少一部分与所述靶 RNA 中的连续序列互补;以及

[0065] 其中 N1-(N)_x 的序列包含反义序列并且 N2-(N')_y 包含有义序列;条件是不是 N 和 N' 各自均是常规部分。

[0066] 在结构 (A2) 的各个实施方案中, x = y。在结构 (A2) 的优选实施方案中, x = y = 18。

[0067] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的优选实施方案中,有义链和反义链选自由以下各项组成的组:有义链 SEQ ID NO:16 和反义链 SEQ ID NO:29、有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:32 以及有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:28。

[0068] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中,修饰的核糖核苷酸包含在糖部分的 2' 位置处的修饰。在一些优选的实施方案中,修饰的核糖核苷酸是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[0069] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中,非常规部分选自由以下各项组成的组:镜像核苷酸、未修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、苏糖核酸 (TNA)、核苷酸类似物以及通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键 (5' > 3') 连接于相邻核糖核苷酸的核糖核苷酸。在一些优选的实施方案中,核苷酸类似物是吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物。在一些优选的实施方案中,非常规部分是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键 (5' > 3') 连接于相邻核糖核苷酸的核糖核苷酸。

[0070] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中, Z 或 Z' 不存在。在一些实施方案

中, Z 或 Z' 中的至少一个存在。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在并且是 1-5 个连续核苷酸。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在并且是 2 个连续核苷酸。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在, Z 和 Z' 两者均是 2 个连续核苷酸, 每个核苷酸是 dT, 并且 Z 和 Z' 各自包含两个连续核苷酸 (dTdT)。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在并且 Z 和 Z' 各自是 1-5 个连续非核苷酸部分。在一些实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在并且 Z 和 Z' 各自是 1-2 个连续非核苷酸部分。在一些优选的实施方案中, 每个非核苷酸部分是 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) [CAS RN:13507-42-1]。在一些优选的实施方案中, Z 和 Z' 两者均存在, Z 是一个 C3 非核苷酸部分 (C3) 并且 Z' 是两个连续 C3 非核苷酸部分 (C3-C3)。

[0071] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, z" 不存在。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, z" 存在。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中, z" 存在并且选自由以下各项组成的组: 无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向无碱基核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -Pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB)、维生素以及药物部分。在一些实施方案中, z" 存在并且是 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸部分。

[0072] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, 在反义链和有义链中的每个中在 3' 末端和 5' 末端处的核苷酸被磷酸化。在一些实施方案中, 在反义链和有义链中的每个中在 3' 末端和 5' 末端处的核苷酸未磷酸化。在一些实施方案中, 在反义链和有义链中的每个中, 在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化并且在 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化。在一些实施方案中, 有义链在 3' 末端和 5' 末端两者处被磷酸化或未磷酸化。在一些实施方案中, 反义链在 3' 末端和 5' 末端两者处被磷酸化或未磷酸化。

[0073] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (1):

[0074] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (有义链; SEQ ID NO:16)

[0075] 5' AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (反义链; SEQ ID NO:29)

[0076] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0077] 其中 U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0078] 其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;

[0079] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0080] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端;

[0081] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0082] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端; 以及

[0083] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi); 或

[0084] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0085] 根据化合物 (1) 的一个实施方案, 在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是

1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3),在反义链的5'末端处的核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在反义链的3'末端处的突出端被磷酸化(-C3-C3-pi)。

[0086] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物(2):

[0087] 5'帽-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0088] 5' AAGAAUgUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0089] 其中A、U、G和C各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0090] 其中U、G和 C各自是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0091] 其中g是通过2'-5'核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

[0092] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0093] 其中所述有义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端;

[0094] 其中所述有义链包含在所述链的所述5'末端处共价连接的5'帽;

[0095] 其中所述反义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的C3-C3非核苷酸突出端;以及

[0096] 其中所述有义链的所述3'末端被磷酸化(pi);或

[0097] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0098] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物(3):

[0099] 5'帽-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0100] 5' AAGAAUgUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0101] 其中A、U、G和C各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0102] 其中U、G和 C各自是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0103] 其中g是通过2'-5'核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

[0104] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0105] 其中所述有义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端;

[0106] 其中所述有义链包含在所述链的所述5'末端处共价连接的5'帽;

[0107] 其中所述反义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的C3-C3非核苷酸突出端;以及

[0108] 其中所述有义链的所述3'末端被磷酸化(pi);或

[0109] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0110] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物(4):

[0111] 5'帽-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

- [0112] 5' AAGAAuGUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)
- [0113] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0114] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0115] 其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0116] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0117] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0118] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0119] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0120] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi);或
- [0121] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0122] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (5):
- [0123] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:16)
- [0124] 5' AAGAAUGUCAGUCGAGUC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:29)
- [0125] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0126] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0127] 其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷 (dTdT) 突出端;以及
- [0128] 其中所述有义链和所述反义链的 3' 末端未磷酸化;或
- [0129] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0130] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (6):
- [0131] 5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)
- [0132] 5' phos-AAGAAugUCAGUCGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)
- [0133] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0134] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0135] 其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0136] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0137] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi);
- [0138] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽;
- [0139] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核

苷酸突出端 (-C3-C3-pi) ;以及

[0140] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) ;或

[0141] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0142] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (7) :

[0143] 5' C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0144] 5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0145] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0146] 其中 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0147] 其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;

[0148] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0149] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi) ;

[0150] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽;

[0151] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端 (-C3-C3-pi) ;以及

[0152] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) ;或

[0153] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0154] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (8) :

[0155] 5' C3-GACUCAGACUGACAUUCU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0156] 5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0157] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0158] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0159] 其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;

[0160] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0161] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi) ;

[0162] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽;

[0163] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端 (-C3-C3-pi) ;以及

[0164] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) ;或

[0165] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0166] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (9) :

- [0167] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0168] 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0169] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0170] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0171] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0172] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0173] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0174] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0175] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0176] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi);或
- [0177] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0178] 根据修饰的核酸化合物 (9) 的一个实施方案,在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3);在反义链的 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 并且在反义链的 3' 末端处的突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)
- [0179] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (10):
- [0180] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0181] 5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0182] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0183] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0184] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0185] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0186] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0187] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0188] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0189] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi);或
- [0190] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0191] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (11):
- [0192] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0193] 5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

- [0194] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；
- [0195] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；
- [0196] 其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；
- [0197] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；
- [0198] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端；
- [0199] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；
- [0200] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及
- [0201] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或
- [0202] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0203] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (12)：
- [0204] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链; SEQ ID NO:19)
- [0205] 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链; SEQ ID NO:32)
- [0206] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；
- [0207] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；
- [0208] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；
- [0209] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；
- [0210] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端；
- [0211] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；
- [0212] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及
- [0213] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或
- [0214] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0215] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (13)：
- [0216] 5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链; SEQ ID NO:19)
- [0217] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链; SEQ ID NO:32)
- [0218] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；
- [0219] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；
- [0220] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；
- [0221] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接

于下一个核糖核苷酸；

[0222] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

[0223] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽；

[0224] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi)；以及

[0225] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)；或

[0226] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0227] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物(14)：

[0228] 5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:19)

[0229] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (反义链；SEQ ID NO:32)

[0230] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0231] 其中 c 是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0232] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸；

[0233] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0234] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

[0235] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽；

[0236] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核苷酸突出端(-C3-C3-pi)；以及

[0237] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)；或

[0238] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0239] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物(15)：

[0240] 5' C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:19)

[0241] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (反义链；SEQ ID NO:32)

[0242] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0243] 其中 U 和 c 各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0244] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3')的核糖核苷酸；

[0245] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0246] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

[0247] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽；

[0248] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的磷酸化的 C3-C3 非核

核苷酸突出端 (-C3-C3-pi) ;以及

[0249] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) ;或

[0250] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0251] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 (16) :

[0252] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

[0253] 5' UUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0254] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0255] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0256] 其中 u 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;

[0257] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0258] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端;

[0259] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0260] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0261] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

[0262] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0263] 根据修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(9)、(10)、(11)、(12) 和 (16) 的各个实施方案,在所述反义链的 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。

[0264] 根据修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 和 (17) 的各个实施方案,5' 帽选自自由以下各项组成的组:无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5,6,7,8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB) 以及缀合物部分。在修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 和 (17) 的各个实施方案中,5' 帽是非核苷酸部分。在修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 和 (17) 的一些实施方案中,5' 帽非核苷酸部分是 1,3- 丙二醇,单 (磷酸二氢盐) (C3)。

[0265] 根据修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 和 (17) 的各个实施方案,在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (phos)。

[0266] 根据修饰的核酸化合物 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 和 (17) 的各个实施方案,在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化 (\$)。

[0267] 另一方面,提供包含如本文所述的核酸分子 (例如, siNA 分子) 或所述分子的药

学上可接受的盐在药学上可接受的载体中的药物组合物。在某些实施方案中,药物制剂包括或涉及适合用于将核酸分子(例如, siNA 分子)递送至个体如患者的递送系统;例如在下文更详细地描述的递送系统。在某些实施方案中,如本文所述的核酸分子,或所述化合物的药学上可接受的盐,或包含所述化合物的组合物,或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物用于治疗或预防与受试者中 p53 的表达相关的疾病或病症。

[0268] 另一方面,提供用于治疗(包括预防)病症、疾病、损伤、病状或病理学的发病或严重性的方法,其中 p53 基因的表达与所述病症、疾病、损伤、病状或病理学的病因学或进展相关。在另一个实施方案中,所述病症、疾病、损伤、病状或病理学涉及凋亡性(程序性)细胞死亡。在一些实施方案中,提供一种用于治疗患有选自但不限于以下的疾病或病症的受试者的方法:局部缺血-再灌注损伤、听力受损、听力障碍、平衡受损、听力丧失、化学疗法诱导的秃头症(脱发)、放射疗法诱导的秃头症、急性肾衰竭、急性肾损伤、慢性肾病(CKD)、与抗癌疗法相关的副作用、肾移植患者的移植物功能延迟恢复(DGF)、脊髓损伤、脑损伤、癫痫、中风、神经退行性病症、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肿瘤、烧伤、伤口、高热、缺氧、局部缺血、器官移植、心肌梗塞/心脏病发作、心脏毒性、p53 阳性癌症以及急性肝衰竭。在各个实施方案中,所述方法包括以足以下调 p53 的表达的量向所述受试者施用本文所述的核酸化合物或其药学上可接受的盐。在各个实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所公开的核酸分子或所述分子的药学上可接受的盐,从而治疗所述疾病或病症。

[0269] 在一些实施方案中,所述受试者患有受试者中的 p53 阳性癌症并且以有效于下调 p53 基因的表达的量施用所述核酸化合物,或所述化合物的药学上可接受的盐,或包含所述化合物的组合物,或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物,并且从而使 p53 阳性癌症对化学疗法敏感。

[0270] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸化合物,或所述化合物的药学上可接受的盐,或包含所述化合物的组合物,或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物用于造血祖细胞扩增或刺激血细胞生成。

[0271] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸化合物,或所述化合物的药学上可接受的盐,或包含所述化合物的组合物,或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物用于 p53-null 造血干细胞(HSC)的归巢。

[0272] 现将描述的优选的方法、材料和实施例仅是说明性的且不意图具有限制性;与本文所述的材料和方法类似或等效的材料和方法可用于实践或测试本发明。本发明的其它特征和优势将根据以下附图、详细描述以及根据权利要求而显而易见。

[0273] 发明详述

[0274] 本文提供下调人 p53 基因的表达的分子和组合物。抑制 p53 基因的表达显示在治疗和/或预防各种疾病和病症中是有益的。本申请具体地涉及下调 p53 基因的表达的双链核酸分子,并且涉及这些分子在治疗和/或预防各种疾病和病症中的用途。这类疾病/病症的非限制性列表在本文中提供。适用于产生双链核酸分子的有义链和互补反义链在上文表 1 中列出。某些双链核酸化合物在以下表 A、B 和 E 中列出。

[0275] 用于抑制 p53 的化合物、组合物和方法在本文详细地讨论,并且所述化合物、所述化合物的药学上可接受的盐或组合物中的任一种可有益地用于治疗患有与升高的 p53 基

因表达相关的疾病 / 病症的患者。

[0276] 因此,一方面,本公开总体上涉及下调 p53 基因表达的核酸化合物,并且涉及这些新型化合物在治疗患有与 p53 基因的表达相关的疾病、病症或损伤(如但不限于本文所述的疾病和病症)的受试者中的用途。

[0277] 本文所公开的核酸化合物具有可例如增加活性、增加稳定性和或最小化化合物的毒性的结构和修饰。

[0278] 根据一方面,本公开提供包含未修饰的和修饰的核苷酸和或非常规部分的抑制性寡核苷酸化合物。

[0279] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸化合物包括至少一种选自糖修饰、碱基修饰和核苷酸间键联修饰组成的组的修饰的核苷酸;并且可进一步包括 DNA 和修饰的核苷酸或非常规部分,包括 LNA(锁核酸)、ENA(亚乙基桥接的核酸)、PNA(肽核酸)、阿拉伯糖苷、PACE、镜像核苷酸、通过 2' -5' 核苷酸间键或具有 6 碳糖的核苷酸连接于相邻核苷酸的核苷酸。

[0280] 在如本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)的各个实施方案中,反义链的长度可以是 18-40 个核苷酸。在如本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)的一些实施方案中,反义链的长度可以是 19 个核苷酸。类似地,如本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)的有义链的长度可以是 18-40 个核苷酸。在如本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)的一些优选的实施方案中,有义链的长度是 19 个核苷酸。在如本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)的一些实施方案中,反义链和有义链各自的长度是 19 个核苷酸。在如本文公开的核酸化合物(例如,dsRNA 分子)的各个实施方案中,所述化合物的双链体区的长度是 19 个核苷酸。

[0281] 在某些实施方案中,如本文提供的核酸化合物(例如,dsRNA 核酸分子)的有义链和反义链是单独的寡核苷酸链。在一些实施方案中,单独的有义链和反义链经由氢键合例如沃森-克里克碱基配对形成双链结构,还被称为双链体。在一些实施方案中,一个或多个核苷酸对形成非沃森-克里克碱基配对。在一些实施方案中,有义链和反义链是共价连接至彼此的两条单独的链。在其它实施方案中,有义链和反义链是具有有义和反义区两者的单个寡核苷酸的一部分;在一些优选的实施方案中,所述寡核苷酸具有发夹结构。

[0282] 在某些实施方案中,核酸分子是关于突出端对称的双链核酸(dsRNA)分子并且在两端具有平末端。在其它实施方案中,核酸分子是关于突出端对称的 dsRNA 分子,并且在所述 dsRNA 分子的两端具有核苷酸或非核苷酸或核苷酸与非核苷酸突出端的组合。在一些实施方案中,对称的 dsRNA 分子具有在有义链上出现、在双链体的一侧上的 3' 突出端;和在反义链的 3' 末端上出现、在分子的另一侧上的 3' 突出端。在某些优选的实施方案中,核酸分子是关于突出端不对称的 dsRNA 分子,并且具有在所述 dsRNA 分子的一端上的平末端和在所述 dsRNA 分子的另一端上的突出端。在一些实施方案中,不对称的 dsRNA 分子具有在有义链上出现、在双链体的一侧上的 3' 突出端,在反义有义链的 5' 末端上出现的平末端以及在有义链的 5' 末端和反义链的 3' 末端两者上出现、在所述分子的另一侧上的平末端。在一些实施方案中,所述突出端是核苷酸突出端,在其它实施方案中所述突出端是非核苷酸突出端。

[0283] 在各个实施方案中,核酸分子进一步包括在有义链的 5' 末端处共价连接的加帽部

分。在一些实施方案中,所述 dsRNA 分子具有在有义链上出现、在双链体的一侧上的 3' 突出端;在反义链的 3' 末端上出现、在所述分子的另一侧上的 3' 突出端以及在有义链的 5' 末端处共价连接的加帽部分。在一些实施方案中,所述 dsRNA 分子具有在有义链上出现的 3' 突出端、在有义链的 5' 末端处共价连接的加帽部分、在反义有义链的 5' 末端上出现的平末端以及在反义链的 3' 末端上出现的平末端。在一些实施方案中,所述突出端是核苷酸突出端,在其它实施方案中所述突出端是非核苷酸突出端。在各个实施方案中,加帽部分选自无碱基核糖部分;无碱基脱氧核糖部分;反向无碱基核糖部分;反向无碱基脱氧核糖部分;C6- 亚氨基 -Pi;镜像核苷酸,包括 L-DNA 和 L-RNA;5'OMe 核苷酸;核苷酸类似物,如但不限于 4', 5'- 亚甲基核苷酸;1-(β -D- 赤型呋喃糖基)核苷酸;4'- 硫代核苷酸、碳环核苷酸、 α - 核苷酸;苏式- 戊呋喃糖基核苷酸;无环 3', 4'- 开环核苷酸;3, 4- 二羟基丁基核苷酸;3, 5- 二羟基戊基核苷酸;5'- 氨基- 烷基磷酸酯;1, 3- 二氨基-2- 丙基磷酸酯、3- 氨基丙基磷酸酯;6- 氨基己基磷酸酯;12- 氨基十二基磷酸酯;羟基丙基磷酸酯;1, 5- 脱水己糖醇核苷酸;5'-5'- 反向无碱基部分;1, 4- 丁二醇磷酸酯;5'- 氨基;桥接或非桥接甲基磷酸酯和 5'- 巯基部分。在一些优选的实施方案中,共价连接至有义链的 5' 末端的加帽部分选自反向无碱基脱氧核糖部分、AM-c6、C3 非核苷酸部分和 THNB。

[0284] 在一些实施方案中,所述核酸分子具有发夹结构(在一个寡核苷酸上具有有义链和反义链),其中在一端上具有环结构并且在另一端上具有平末端。在一些实施方案中,所述核酸分子具有发夹结构,其中在一端上具有环结构并且在另一端上具有突出端;在某些实施方案中,所述突出端是 3' 突出端;在某些实施方案中所述突出端是 5' 突出端;在某些实施方案中所述突出端在有义链上;在某些实施方案中所述突出端在反义链上。

[0285] 在各个实施方案中,本文公开的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可包括一个或多个修饰或修饰的核苷酸,如本文所述。例如,如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可包括具有修饰的糖的修饰的核苷酸;具有修饰的核碱基的修饰的核苷酸;或具有修饰的磷酸基团的修饰的核苷酸。类似地,如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可包括修饰的磷酸二酯骨架和/或可包括修饰的末端磷酸基团。

[0286] 如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可具有包括修饰的糖部分的一个或多个核苷酸,例如如本文所述。在一些实施方案中,修饰的糖部分选自由以下各项组成的组:2'-O- 甲基、2'- 甲氧基乙氧基、2'- 脱氧、2'- 氟、2'- 烯丙基、2'-O-[2-(甲基氨基)-2- 氧代乙基]、4'- 硫代、4'-(CH₂)₂-O-2'- 桥、2'- 锁核酸以及 2'-O-(N- 甲基氨基甲酸酯)。在一些优选的实施方案中,所述核酸包含至少一个 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[0287] 如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可具有一个或多个修饰的核碱基,例如如本文所述。

[0288] 如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可具有对磷酸二酯骨架的一个或多个修饰,例如如本文所述。

[0289] 如本文所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可具有一个或多个修饰的磷酸基团,例如如本文所述。

[0290] 如本文所提供的核酸分子可包含未修饰的核碱基、没有对磷酸二酯骨架的修饰以及未修饰的磷酸基团,例如如本文所述。

[0291] 在各个实施方案中,所提供的核酸分子(例如,dsRNA 分子)可包括未修饰的反义

链和具有一个或多个修饰的有义链。在一些实施方案中,所提供的核酸分子(例如, dsRNA 分子)可包括未修饰的有义链和具有一个或多个修饰的反义链。在优选的实施方案中,所提供的核酸分子(例如, dsRNA 分子)可包括有义链和反义链两者中的一个或多个修饰的核苷酸。

[0292] 如本文所提供的核酸分子(例如, dsRNA 分子)可包括在有义和 / 或反义链的 5' 末端处的磷酸基团(即 5' 末端磷酸基团)。在一些实施方案中,本文所公开的 dsRNA 分子可包括在反义链的 5' 末端处的磷酸基团。

[0293] 如本文所提供的核酸分子(例如, dsRNA 分子)可包括在有义和 / 或反义链的 3' 末端处的磷酸基团(即 3' 末端磷酸基团)。在一些实施方案中,本文所公开的 dsRNA 分子可包括在反义链的 3' 末端处的磷酸基团。

[0294] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸分子(例如, dsRNA 分子)可包括在反义链的 3' 末端处和在有义链的 3' 末端处的磷酸基团。

[0295] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸分子(例如, dsRNA 分子)包括在反义链的 3' 末端处和在有义链的 3' 末端处的磷酸基团,并且在反义链的 5' 末端处和在有义链的 5' 末端处未磷酸化。

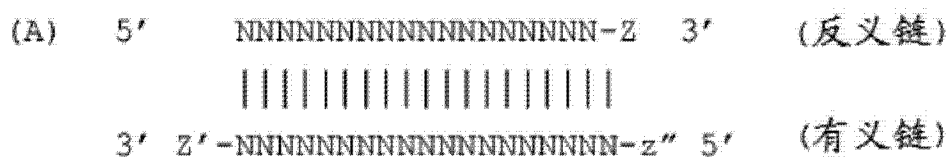
[0296] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸分子(例如, dsRNA 分子)包括在反义链的 3' 末端处、在有义链的 3' 末端处和在反义链的 5' 末端处的磷酸基团,并且在有义链的 5' 末端处未磷酸化。基团

[0297] 在一些实施方案中,本文所公开的核酸分子(例如, dsRNA 分子)包括在有义链的 3' 末端处和在反义链的 5' 末端处的磷酸基团,并且在有义链的 5' 末端处和在反义链的 3' 末端处未磷酸化。

[0298] 在本文所公开的核酸分子(例如, dsRNA 分子)的一些实施方案中,所述核酸分子的反义链和有义链在 3' 末端和 5' 末端两者处均未磷酸化

[0299] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A) 的修饰的核酸分子:

[0300]



[0301] 其中 N 各自独立地是 A、C、G、U 中的任一个并且独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分;

[0302] 其中各“|”表示在所述反义链的各 N 与所述有义链的对应 N 之间的碱基配对;

[0303] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地是在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分;

[0304] 其中 z'' 可存在或不存在,但如果存在,那么是在所述有义链的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分;以及

[0305] 其中有义链的序列与反义链的序列互补;条件是不是 N 和 N' 各自均是常规部分。

[0306] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A1) 的修饰的核酸分子:

[0307] (A1) 5' (N)_x-Z 3' (反义链)

[0308] 3' Z'-(N')_y-z'' 5' (有义链)

[0309] 其中 N 和 N' 各自独立地是可为未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分的核糖核苷酸；

[0310] 其中 (N)_x 和 (N')_y 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸；

[0311] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地包含在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分；

[0312] 其中 z'' 可存在或不存在,但如果存在,那么是在 (N')_y 的所述 5' 末端处共价连接的加帽部分或缀合物部分；

[0313] 其中 x 和 y 各自独立地是在 18 与 40 之间的整数；

[0314] 其中 (N')_y 的所述序列与 (N)_x 的所述序列互补；以及

[0315] 其中 (N)_x 包含反义序列并且 (N')_y 包含有义序列；条件是不是 N 和 N' 各自均是常规部分。

[0316] 根据一个实施方案,提供具有以下列出的结构 (A2) 的修饰的核酸分子：

[0317] (A2) 5' N1-(N)_x-Z 3' (反义链)

[0318] 3' Z'-N2-(N')_y-z'' 5' (有义链)

[0319] 其中 N1、N2、N 和 N' 各自独立地是未修饰的核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或非常规部分；

[0320] 其中 (N)_x 和 (N')_y 各自是其中各连续 N 或 N' 通过共价键连接于相邻 N 或 N' 的寡核苷酸；

[0321] 其中 x 和 y 各自独立地是在 17 与 39 之间的整数；

[0322] 其中 N2 共价结合于 (N')_y；

[0323] 其中 N1 共价结合于 (N)_x 并且与靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 错配或是与所述靶 RNA 互补的互补 DNA 部分；

[0324] 其中 N1 是选自由以下各项组成的组的部分：天然尿苷、修饰的尿苷、脱氧核糖尿苷、核糖胸苷、脱氧核糖胸苷、天然腺苷、修饰的腺苷、脱氧腺苷、腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、脱氧腺苷吡唑并三嗪核酸类似物、无碱基核糖部分以及无碱基脱氧核糖部分；

[0325] 其中 z'' 可存在或不存在,但如果存在,那么是在 N2-(N')_y 的 5' 末端处共价连接的加帽部分、维生素或药物部分；

[0326] 其中 Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地是在它所存在于其中的链的所述 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物、1-5 个连续非核苷酸部分或其组合、缀合物部分；

[0327] 其中 (N')_y 的所述序列与 (N)_x 的所述序列互补；

[0328] 其中 (N)_x 的所述序列的至少一部分与所述靶 RNA 中的连续序列互补；以及

[0329] 其中 N1-(N)_x 的序列包含反义序列并且 N2-(N')_y 包含有义序列；条件是不是 N 和 N' 各自均是常规部分。

[0330] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中,有义链和反义链选自 SEQ ID

NO:8-33。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的优选实施方案中,有义链和反义链选自以下各项组成的组:有义链 SEQ ID NO:16 和反义链 SEQ ID NO:29、有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:32 以及有义链 SEQ ID NO:19 和反义链 SEQ ID NO:28。

[0331] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 和 N2 形成沃森-克里克碱基对。在其它实施方案中,N1 和 N2 形成非沃森-克里克碱基对。在一些实施方案中,碱基对在核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸之间形成。在结构 (A2) 的一些实施方案中, $x = y = 18$ 、 $x = y = 19$ 或 $x = y = 20$ 。在优选的实施方案中, $x = y = 18$ 。当在 $N1-(N)_x$ 中 $x = 18$ 时,N1 是指位置 1 并且位置 2-19 包括于 $(N)_{18}$ 中。当在 $N2-(N')_y$ 中 $y = 18$ 时,N2 是指位置 19 并且位置 1-18 包括于 $(N')_{18}$ 中。

[0332] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 共价结合于 $(N)_x$ 并且与 SEQ ID NO:1-7 中列出的靶 mRNA 错配。在各个实施方案中,N1 共价结合于 $(N)_x$ 并且是与 SEQ ID NO:1-7 中列出的靶 mRNA 互补的 DNA 部分。

[0333] 在结构 (A2) 的一些实施方案中, $N2-(N')_y$ 的序列与 $N1-(N)_x$ 的序列完全互补,并且 $(N)_x$ 的序列与靶 RNA 中的连续序列 (SEQ ID NO:1-7) 具有互补性。

[0334] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 共价结合于 $(N)_x$ 并且与靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 错配或是与所述靶 RNA 互补的 DNA 部分。

[0335] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,当靶 RNA 序列中的对应核苷酸是腺苷时,N1 选自自由腺苷和脱氧腺苷组成的组。在结构 (A2) 的一些实施方案中,当靶 RNA 序列中的对应核苷酸是胞苷时,N1 选自自由腺苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷和脱氧尿苷组成的组。在结构 (A2) 的一些实施方案中,当靶 RNA 序列中的对应核苷酸是鸟苷时,N1 选自自由腺苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、尿苷和脱氧尿苷组成的组。在结构 (A2) 的一些实施方案中,当靶 RNA 序列中的对应核苷酸是尿苷时,N1 选自自由尿苷和脱氧尿苷组成的组。在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 和 N2 在天然或修饰的尿苷或脱氧尿苷与腺苷或脱氧腺苷之间形成碱基对。在其它实施方案中,N1 和 N2 在天然或修饰的脱氧尿苷与腺苷之间形成碱基对。

[0336] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,双链核酸分子是 siRNA、siNA 或 miRNA。如本文所提供的双链核酸分子还被称为“双链体”。在根据如本文所公开的结构 (A2) 的核酸分子的一些实施方案中,所述双链核酸分子是化学修饰的 dsRNA。

[0337] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 选自天然尿苷和修饰的尿苷。在一些实施方案中,N1 是天然尿苷。

[0338] 在结构 (A2) 的一些实施方案中, $x = y = 18$ 并且 $N1-(N)_x$ 包含反义寡核苷酸,并且 $N2-(N')_y$ 包含存在于表 1 中列出的序列对 SEQ ID NO:8-33 中的有义寡核苷酸。

[0339] 在结构 (A2) 的一些实施方案中, $x = y = 18$ 并且 N1 选自天然或修饰的尿苷、天然或修饰的腺嘌呤以及天然或修饰的胸苷。

[0340] 在结构 (A2) 的一些实施方案中,N1 是 2' OMe 糖修饰的尿苷或 2' OMe 糖修饰的腺苷。在结构 (A2) 的某些实施方案中,N2 是 2' OMe 糖修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。

[0341] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,各 N 由未修饰的核糖核苷酸组成。在结构 (A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,各 N' 由未修饰的核糖核苷酸组成。在一些优选的实施方案中,N 和 / 或 N' 中的至少一个包含化学修饰的核糖核苷酸、未修饰的脱氧核糖核苷酸、化学修饰的脱氧核糖核苷酸或非常规部分,条件是不是 N 和 N' 各自均是脱氧核糖核

苷酸。在一些实施方案中,非常规部分选自镜像核苷酸、无碱基核糖部分和无碱基脱氧核糖部分。在一些实施方案中,非常规部分是镜像核苷酸,优选是 L-DNA 部分。在一些实施方案中,N 或 N' 中的至少一个包含 2' OMe 糖修饰的核糖核苷酸。

[0342] 在结构 (A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,(N')_y 的序列与 (N)_x 的序列完全互补。在结构 (A1) 和 (A2) 的其它实施方案中,(N')_y 的序列与 (N)_x 的序列大致上互补。

[0343] 在结构 (A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,(N)_x 包括与 SEQ ID NO:1-7 中的任一个中列出的靶 mRNA 中的约 17 至约 39 个连续核苷酸完全互补的反义序列。在结构 (A1) 和 (A2) 的其它实施方案中,(N)_x 包括与 SEQ ID NO:1-7 中的任一个中列出的靶 mRNA 中的约 17 至约 39 个连续核苷酸大致上互补的反义序列。在结构 (A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,双链核酸化合物是平末端的,例如,其中 z''、Z 和 Z' 中的每个均不存在。在一个替代实施方案中,z''、Z 或 Z' 中的至少一个存在。

[0344] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中,Z 和 Z' 各自独立地存在或不存在,但如果存在,那么独立地包含在它所存在于其中的链的 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、1-5 个连续核苷酸类似物或 1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的各个实施方案中,Z 和 Z' 独立地包括一个或多个共价连接的修饰的和或未修饰的核苷酸,包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸,或一个或多个(优选地 1-5 个,最优选地 1-2 个)非常规部分,例如反向无碱基脱氧核糖部分或无碱基核糖部分或镜像核苷酸;一个或多个(优选地 1-5 个,最优选地 1-2 个)非核苷酸 C3 部分或其衍生物、非核苷酸 C4 部分或其衍生物或非核苷酸 C5 部分或其衍生物、非核苷酸氨基-C6 部分或其衍生物(如本文所定义)等。

[0345] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,Z' 不存在并且 Z 存在并且包括一个或多个(优选地 1-5 个,最优选地 1-2 个)非核苷酸 C3 部分。在一些实施方案中,Z 不存在并且 Z' 存在并且包括一个或多个(优选地 1-5 个,最优选地 1-2 个)非核苷酸 C3 部分。在一些实施方案中,Z 和 Z' 各自独立地包含一个或多个(优选地 1-5 个,最优选地 1-2 个)非核苷酸 C3 部分或一个或多个非核苷酸氨基-C6 部分。

[0346] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,Z 和 Z' 各自包括无碱基部分,例如脱氧核糖无碱基部分(在本文中称为“dAb”)或核糖无碱基部分(在本文中称为“rAb”)。在一些实施方案中,Z 和 / 或 Z' 各自包含两个共价连接的非碱基部分并且是例如 dAb-dAb 或 rAb-rAb 或 dAb-rAb 或 rAb-dAb,其中每个部分共价连接至相邻部分,优选地经由基于磷酸的键。在一些实施方案中,基于磷酸的键包括硫代磷酸酯、磷酸基乙酸酯或磷酸二酯键。在优选的实施方案中,基于磷酸的键是磷酸二酯键。

[0347] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,Z 和 / 或 Z' 各自独立地包括烷基部分,任选地丙烷[(CH₂)₃]部分(C3)或其衍生物,包括丙醇(C3OH)和丙二醇的磷酸衍生物(“C3Pi”)。在一些实施方案中,Z 和 / 或 Z' 各自包括两个烷基部分并且在一些实例中是 C3Pi-C3OH。在 C3Pi-C3OH 的实例中,反义链的 3' 末端和 / 或有义链的 3' 末端经由基于磷酸的键共价连接至 C3 部分,并且所述 C3 部分经由基于磷酸的键共价结合至 C3OH 部分。在一些实施方案中,基于磷酸的键包括硫代磷酸酯、磷酸基乙酸酯或磷酸二酯键。在优选的实施方案中,基于磷酸的键是磷酸二酯键。

[0348] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中,Z 包含 C3Pi-C3OH。在结构 (A)、(A1)

和 (A2) 的具体实施方案中, Z' 包含 C3Pi 或 C3OH。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, 双链核酸分子包括共价连接于反义链的 3' 末端的 C3Pi-C3OH 部分和共价连接于有义链的 3' 末端的 C3Pi 或 C3OH 部分。

[0349] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, z'' 存在并且选自由以下各项组成的组: 无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向无碱基核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -Pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB) 以及缀合物部分。在一些实施方案中, 缀合物部分是维生素或药物部分。在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, z'' 存在并且选自镜像核苷酸、无碱基部分和反向无碱基部分。

[0350] 在 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, 各 N 由未修饰的核糖核苷酸组成。在结构 (A1)、(A2) 的一些实施方案中, 各 N' 由未修饰的核糖核苷酸组成。在优选的实施方案中, N 和 / 或 N' 中的至少一个是化学修饰的核糖核苷酸、未修饰的脱氧核糖核苷酸、化学修饰的脱氧核糖核苷酸或非常规部分, 条件是不是 N 和 N' 各自均是脱氧核糖核苷酸。

[0351] 在一些实施方案中, 结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的核酸化合物包括在其糖残基中修饰的至少一个核糖核苷酸。在一些实施方案中, 所述化合物包含在糖残基的 2' 位置处的修饰。在一些实施方案中, 所述 2' 位置中的修饰包含存在氨基、氟、烷氧基或烷基部分。在某些实施方案中, 所述 2' 修饰包括烷氧基部分。在优选的实施方案中, 烷氧基部分是甲氧基部分 (还被称为 2' -O- 甲基; 2' OMe; 2' OMe; 2' -OCH₃)。在一些实施方案中, 核酸化合物包括在反义链和有义链中的一者或两者中的 2' O 甲基糖修饰的替代核糖核苷酸。在其它实施方案中, 化合物包括仅在反义链 (N)_x 或 N1-(N)_x 中的 2' OMe 糖修饰的核糖核苷酸。在一些实施方案中, 所述 2' O 甲基糖修饰的核糖核苷酸与未修饰的核苷酸交替。在某些实施方案中, 反义链的中间核糖核苷酸, 例如在 19 聚体链中的位置 10 中的核糖核苷酸是未修饰的。在各个实施方案中, 核酸化合物包括至少 5 个交替的 2' OMe 糖修饰的核糖核苷酸和未修饰的核糖核苷酸。在另外的实施方案中, 结构 (A1) 和 / 或 (A2) 的化合物包括在交替位置中的修饰的核糖核苷酸, 其中在 (N)_x 或 N1-(N)_x 的 5' 末端处和 3' 末端处的每个核糖核苷酸是在其糖残基中修饰的, 并且在 (N')_y 或 N2-(N)_y 的 5' 末端处和 3' 末端处的每个核糖核苷酸是在其糖残基中未修饰的。在各个实施方案中, 在交替位置中的核糖核苷酸是在糖残基的 2' 位置处修饰的。

[0352] 在结构 (A)、(A1) 和 (A2) 的一些实施方案中, 有义链和反义链均未在 3' 末端和 5' 末端处磷酸化。在其它实施方案中, 有义链和 / 或反义链中的一者或两者在 3' 末端处磷酸化。在其它实施方案中, 有义链和 / 或反义链中的一者或两者在 5' 末端处磷酸化。

[0353] 在结构 (A1) 和 / 或 (A2) 的一些实施方案中, (N)_x 和 / 或 (N')_y 包含选自以下的至少一个非常规部分: 镜像核苷酸以及通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸的核苷酸。在一些优选的实施方案中, 非常规部分是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸 (5' > 3') 的核苷酸。在一些实施方案中, 非常规部分是镜像核苷酸。在各个实施方案中, 镜像核苷酸选自 L- 核糖核苷酸 (L-RNA) 和 L- 脱氧核糖核苷酸 (L-DNA)。在一些实施方案中, 镜像核苷酸是 L-DNA。

[0354] 在结构 (A1) 和 / 或 (A2) 的其它实施方案中, (N')_y 包含 1-8 个修饰的核糖核苷酸, 其中所述修饰的核糖核苷酸是脱氧核糖 (DNA) 核苷酸。在某些实施方案中, (N')_y 包含

1、2、3、4、5、6、7 或多至 8 个 DNA 部分。

[0355] 在本发明优选的实施方案中,本文提供的抑制剂是下调 p53 表达并且包括选自表 1SEQ ID NO:8-33 的寡核苷酸对的合成、化学修饰的双链核酸化合物。

[0356] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_13 鉴别的反义链 5' AGUAGUUUCCAUAAGGUCUG 3' (SEQ ID NO:21) 和有义链 5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' (SEQ ID NO:8)。

[0357] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_34 鉴别的反义链 5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3' (SEQ ID NO:22) 和有义链 5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3' (SEQ ID NO:9)。

[0358] 在一些实施方案中,核酸化合物包括反义链 5'UUACAUCUCC CAAACAUC 3' (SEQ ID NO:22) 和有义链 5' GGAUGUUUGG AGAUGUAU 3' (SEQ ID NO:18)。

[0359] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_35 鉴别的反义链 5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' (SEQ ID NO:23) 和有义链 5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3' (SEQ ID NO:10)。

[0360] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_36 鉴别的反义链 5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3' (SEQ ID NO:24) 和有义链 5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3' (SEQ ID NO:11)。

[0361] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_37 鉴别的反义链 5' UACAUCUCCCAAACAUC 3' (SEQ ID NO:25) 和有义链 5' GGAUGUUUGGAGAUGUA 3' (SEQ ID NO:12)。

[0362] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_38 鉴别的反义链 5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3' (SEQ ID NO:26) 和有义链 5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3' (SEQ ID NO:13)。

[0363] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_39 鉴别的反义链 5' UAUCUCCCAAACAUC 3' (SEQ ID NO:27) 和有义链 5' GAGGAUGUUUGGAGAUA 3' (SEQ ID NO:14)。

[0364] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_40 鉴别的反义链 5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' (SEQ ID NO:28) 和有义链 5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3' (SEQ ID NO:15)。

[0365] 在一些实施方案中,核酸化合物包括反义链 5'UUCAGUCUGAG UCAGGCC 3' (SEQ ID NO:28) 和有义链 5' GGGCCUGACUCAG ACUGAU 3' (SEQ ID NO:19)。

[0366] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_41 鉴别的反义链 5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' (SEQ ID NO:29) 和有义链 5' GACUCAGACUGACAUUCUU 3' (SEQ ID NO:16)。

[0367] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_42 鉴别的反义链 5' UUGAGGUAGGUGCAAAUGC 3' (SEQ ID NO:30) 和有义链 5' GCAUUUGCACCACCUCAA 3' (SEQ ID NO:17)。

[0368] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_43 鉴别的反义链 5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3' (SEQ ID NO:31) 和有义链 5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU 3' (SEQ

ID NO:18)。

[0369] 在一些实施方案中,核酸化合物包括反义链 5'AUACAUCUCCC AAACAUCC 3'(SEQ ID NO:31) 和有义链 5'GGAUGUUUGGGAG AUGUAA 3'(SEQ ID NO:9)。

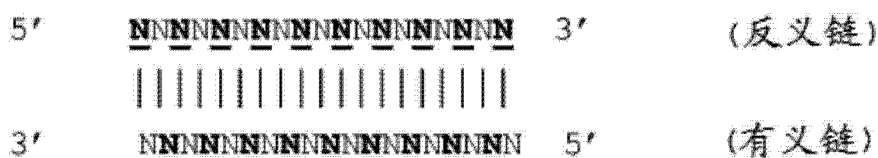
[0370] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_44 鉴别的反义链 5' AUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'(SEQ ID NO:32) 和有义链 5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'(SEQ ID NO:19)。

[0371] 在一些实施方案中,核酸化合物包括在表 1 中通过对名称 p53_45 鉴别的反义链 5' UGUAGUUUCCA UAGGUCUG 3'(SEQ ID NO:33) 和有义链 5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'(SEQ ID NO:20)。

[0372] 在一些实施方案中,核酸化合物包括反义链 5'AGUAGUUUCCA UAGGUCUG 3'(SEQ ID NO:21) 和有义链 5' CAGACCUAUGGAA ACUACA 3'(SEQ ID NO:20)。

[0373] 在结构 (A) 的一些实施方案中,每个 A、C、G、U 是根据以下图案交替的未修饰的核糖核苷酸或 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸:

[0374]



[0375] 其中各 N 是未修饰的核糖核苷酸。

[0376] 其中各 N 是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸,

[0377] 其中各“|”表示 N 与 N 之间的碱基配对;

[0378] 其中在反义链中,每个连续的 N 或 N 连接于相邻的 N 或 N 共价键;

[0379] 其中在有义链中,每个连续的 N 或 N 连接于相邻的 N 或 N 共价键;

[0380] 其中有义链的序列与反义链的序列互补;并且

[0381] 其中反义链序列和有义链序列在 SEQ ID NO:8-33 中列出;或所述化合物的药学上可接受的盐。

[0382] 根据结构 (A) 的这个实施方案的某些优选的双链体在本文中在以下表 A 中列出。

[0383] 表 A.

[0384]

双链体名称	有义链(5'→3')	反义链(5'→3')
p53_34	<u>GGAUGUUUGGGAGAUGUAA</u>	<u>UUACAUCUCCCAAACAUC</u>
p53_35	<u>GACUCAGACUGACA<u>UUCUA</u></u>	<u>UAGAAUGUCAGUCUGAGUC</u>
p53_36	<u>GGGUUGGUAGUUUCUACAA</u>	<u>UUGUAGAAACUACCAACCC</u>
p53_37	<u>GGGAUGUUUGGGAGAUGUA</u>	<u>UACAUCUCCCAAACAUC</u>
p53_38	<u>GGAUCCACCAAGACUUGUA</u>	<u>UACAAGUCUUGGUGGAUCC</u>
p53_39	<u>GAGGGAUGUUUGGGAGAU<u>A</u></u>	<u>UAUCUCCCAAACAUC<u>CCUC</u></u>
p53_40	<u>GGGCCUGACUCAGACUGAA</u>	<u>UUCAGUCUGAGUCAGGCC</u>
p53_41	<u>GACUCAGACUGACA<u>UUCUU</u></u>	<u>AAGAAUGUCAGUCUGAGUC</u>
p53_42	<u>GCAUUUGCACC<u>UACC</u>CAA</u>	<u>UUGAGGUAGGUGCAA<u>U</u>GC</u>
p53_43	<u>GGAUGUUUGGGAGAUGUAU</u>	<u>AUACAUCUCCCAAACAUC</u>
p53_44	<u>GGGCCUGACUCAGACUGAU</u>	<u>AUCAGUCUGAGUCAGGCC</u>
p53_45	<u>CAGACCUAUGGAAACUACA</u>	<u>UGUAGUUCCA<u>UAGG</u>UCUG</u>

[0385] 在所有以上和以下表中，双链体名称通过可互换使用的前缀“p53”和“TP53”鉴别。

[0386] 对于表 A 中的所有 dsRNA 化合物：

[0387] A、U、G、C - 指代未修饰的核糖核苷酸；

[0388] A, U, G, C - 指代 2-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0389] 在表 A 中的核酸化合物的各个实施方案中，在反义链和有义链中的每个中在 3' 末端和 5' 末端处的核糖核苷酸可以被磷酸化或未磷酸化。在表 A 中的核酸化合物的一些实施方案中，在反义链和有义链中的每个中，在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化并且在 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化。在一些实施方案中，在表 A 中的核酸化合物中的每个中，反义链和有义链在 3' 末端和 5' 末端两者处均未磷酸化。

[0390] 用于产生用以下调 p53 基因的双链核酸化合物的某些优选的双链体在本文中在以下表 B 中列出。其它优选的双链体提供于以下实施例部分中。

[0391] 表 B. 某些优选的双链体。

[0392]

双链体 名称	有义(N') y 5->3	反义(N) x 5->3
p53_13	帽-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -C3-pi	AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3-C3
	帽-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3-C3
	帽-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -pi	AGUAGU <u>UU</u> CC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -pi
	帽-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	UGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3-C3
	帽-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACA</u> -C3-pi	UGUAGU <u>UU</u> CC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -pi
	帽-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACA</u> -pi	UGUAGUUUCCAUAGGUCUG
	帽-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACA</u>	UGUAGUUUCCAUAGGUCUG
p53_34	帽-GGAUGUUUGGGAGAUGUAA-C3-pi	<u>UU</u> ACAU <u>e</u> UCCCAAAC <u>AU</u> CC-C3-C3
	帽-GGAUGUUUGGGAGAuguaa-C3-pi	<u>UU</u> ACAU <u>e</u> UCCCAAAC <u>AU</u> CC-C3-C3
	帽-GGAUGUUUGGGAGAuguaa-C3-pi	AU <u>AC</u> AU <u>e</u> UCCCAAAC <u>AU</u> CC-C3-C3

[0393]

双链体 名称	有义(N') y 5->3	反义(N) x 5->3
	帽-GGAUGUUUGGGAGA <u>UGUAU</u> -C3-pi	<u>UUACA</u> UcUCCCAA <u>CAUCC</u> -C3-C3
	帽-GGAUGUUUGGGAGAA <u>guau</u> -C3-pi	<u>AUA</u> CAUcUCCCAA <u>CAUCC</u> -C3-C3
	GGAUGUUUGGGAGAUGUAUzdTzdTS	AUACAUCUCCCAAACAUCcZdTzdTS
p53_35	帽-GACUCAGACUGACA <u>uuua</u> -C3-pi	<u>UAGAA</u> UgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUA</u> -C3-pi	<u>UAGAA</u> UgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUA</u> -C3-pi	<u>UAGAA</u> uGU <u>CAGUCUGAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUA</u> -C3-pi	<u>UAGAA</u> UgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	GACUCAGACUGACA <u>UAUCUA</u> zdTzdTS	UAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdTS
p53_40	帽-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAA</u> -C3-pi	<u>UUCAGU</u> c <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACUCAGAA <u>ugaa</u> -C3-pi	<u>UUCAGU</u> c <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi	<u>UUCAGU</u> c <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACUCAGAA <u>ugau</u> -C3-pi	AUCAGu <u>CUGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACU <u>CAGACUGAA</u> -C3-pi	<u>UUCAGU</u> c <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACU <u>CAGACUGAU</u> -C3-pi	AUCAGUc <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACU <u>CAGACUGAA</u> -C3-pi	<u>UUCAGU</u> c <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	GGGCCUGACUCAGACUGAAzdTzdTS	UUCAGUCUGAGUCAGGCCCzdTzdTS
p53_41	帽-GACUCAGACUGACA <u>uuuu</u> -C3-pi	AAGAAUgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUU</u> -C3-pi	AAGAAUgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUU</u> -C3-pi	AAGAAUgUCAGUCU <u>GAGUC</u> -C3-C3
	帽-GACUCAGACUGACA <u>UAUCUU</u> -C3-pi	AAGAAuGU <u>CAGUCUGAGUC</u> -C3-C3
	GACUCAGACUGACA <u>UAUCUU</u> zdTzdTS	AAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdTS
p53_43	帽-GGAUGUUUGGGAGAA <u>guau</u> -C3-pi	AU <u>A</u> CAUcUCCCAA <u>CAUCC</u> -C3-C3
	帽-GGAUGUUUGGGAGA <u>UGUAU</u> -C3-pi	A <u>UA</u> CAUcUCCCAA <u>CAUCC</u> -C3-C3
p53_44	帽-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi	AUCAGUc <u>UGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3
	帽-GGGCCUGACUCAGAA <u>ugau</u> -C3-pi	AUCAGu <u>CUGAGUCAGGCCC</u> -C3-C3

[0394]

双链体 名称	有义(N') y 5->3	反义(N) x 5->3
	帽-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>U</u> GAU-C3-pi	AU <u>C</u> AG <u>u</u> <u>C</u> UGAGU <u>C</u> AGGCCC-C3-C3
	帽-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>U</u> GAU-C3-pi	AU <u>C</u> AG <u>U</u> <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGG <u>CCC</u> -C3-C3
p53_45	帽- <u>C</u> AGACCUAUGGAA <u>A</u> <u>c</u> uaca-C3-pi	<u>U</u> G <u>U</u> AG <u>U</u> <u>u</u> UCCA <u>A</u> UAGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	帽- <u>C</u> AGACCUAUGGAA <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> ACA-C3-pi	<u>U</u> G <u>U</u> AG <u>U</u> <u>U</u> UCCA <u>A</u> UAGGUC <u>U</u> G-pi
	帽- <u>C</u> AG <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> U <u>A</u> UGG <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> ACA-pi	UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG

[0395] 对于表 B 中的所有双链核酸化合物来说：

[0396] A、U、G、C - 指代未修饰的核糖核苷酸；

[0397] A, U, G, C - 指代 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0398] a、u、c、g - 指代通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸的核苷酸 (5' > 3')；

[0399] 帽 - 指代加帽部分。在一些优选的实施方案中,所述加帽部分是由以下各项组成的组:无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB) 以及缀合物部分。

[0400] pi - 指代 3'- 磷酸。

[0401] z- 指代加帽部分

[0402] \$- 指代无末端磷酸

[0403] dT\$- 指代胸苷 (无磷酸)

[0404] C3- - 指代 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) [CAS RN:13507-42-1]。

[0405] C3-C3 - 指代两个连续 C3 分子。

[0406] 在上文表 B 中所描述的核酸化合物的各个实施方案中,在反义链的 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。

[0407] 在上文表 B 中所描述的核酸化合物的一些实施方案中,在所述核酸化合物中的每个中,在反义链中的 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化。在上文表 B 中所描述的核酸化合物的一些实施方案中,在所述核酸化合物中的每个中,在反义链中的 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化。

[0408] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0409] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACUACU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:8)

[0410] 5' AAUAGUuUCCAAUAGGUCUG-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:21)

[0411] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0412] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0413] 其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0414] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0415] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0416] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0417] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0418] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或

[0419] 所述化合物的药学上可接受的盐。根据所述化合物的一个实施方案,在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3);并且在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化且在 3' 末端处的突出端被磷酸化(-C3-C3-pi)。

[0420] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0421] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAAcuacu-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:8)

[0422] 5' AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:21)

[0423] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0424] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0425] 其中 a、u 和 c 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' >3') 的核糖核苷酸;

[0426] 其中在反义链中和有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0427] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0428] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0429] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0430] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或

[0431] 所述化合物的药学上可接受的盐。根据所述化合物的一个实施方案,在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3);并且在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化且在 3' 末端处的突出端被磷酸化(-C3-C3-pi)。

[0432] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0433] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACUACU-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:8)

[0434] 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:21)

[0435] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0436] 其中 A、U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0437] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0438] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽;并且

- [0439] 其中在有义链中和在反义链中,在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (pi) ;或
- [0440] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0441] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0442] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAAcuaca-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:20)
- [0443] 5' UGUAGUuUCCAAUAGGUCbG-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:33)
- [0444] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0445] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0446] 其中 a、u 和 c 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0447] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0448] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0449] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0450] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0451] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0452] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0453] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0454] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACACA-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:20)
- [0455] 5' UGUAGUUUCCAAUAGGUCUG-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:33)
- [0456] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0457] 其中 A、U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0458] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0459] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0460] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0461] 其中在有义链中,在 3' 末端处的突出端被磷酸化 (C3-pi) ;并且
- [0462] 其中在反义链中,在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (pi) ;或
- [0463] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0464] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0465] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACACA-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:20)
- [0466] 5' UGUAGUUUCCAAUAGGUCUG 3' (反义链;SEQ ID NO:33)
- [0467] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0468] 其中 A、U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0469] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0470] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽;并且

[0471] 其中在有义链中,在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化;或

[0472] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0473] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0474] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACUACA 3' (有义链;SEQ ID NO:20)

[0475] 5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' (反义链;SEQ ID NO:33)

[0476] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0477] 其中 A、U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0478] 其中在反义链中和有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;并且

[0479] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽;或

[0480] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0481] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0482] 5' C3-CAGACCUAUGGAAACUACU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:8)

[0483] 5' phos-AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:21)

[0484] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0485] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0486] 其中 u 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;

[0487] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0488] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0489] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' C3 帽;

[0490] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0491] 其中有义链和反义链两者的 3' 末端均被磷酸化 (pi);并且

[0492] 其中反义链的 5' 末端被磷酸化 (phos);或

[0493] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0494] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0495] 5' C3-CAGACCUAUGGAAAcuaca-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:20)

[0496] 5' phos-AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:21)

[0497] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0498] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0499] 其中 a、u 和 c 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0500] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0501] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0502] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' C3 帽；

[0503] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0504] 其中有义链和反义链两者的 3' 末端均被磷酸化 (pi)；并且

[0505] 其中反义链的 5' 末端被磷酸化 (phos)；或

[0506] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0507] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0508] 5' 帽 -GGAUGUUUGGGAGAUGUAA-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:9）

[0509] 5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:22）

[0510] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0511] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0512] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0513] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0514] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0515] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0516] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0517] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0518] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0519] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0520] 5' 帽 -GGAUGUUUGGGAGAUguaa-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:9）

[0521] 5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:22）

[0522] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0523] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0524] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0525] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0526] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇, 单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0527] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0528] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端; 以及

[0529] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi); 或

[0530] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0531] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0532] 5' 帽 -GGAUGUUUGGAGAUgaa-C3-pi 3' (有义链; SEQ ID NO:9)

[0533] 5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C33' (反义链; SEQ ID NO:31) 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0534] 其中 A、U 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0535] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3') 的核糖核苷酸;

[0536] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0537] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇, 单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0538] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0539] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端; 以及

[0540] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi); 或

[0541] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0542] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0543] 5' 帽 -GGAUGUUUGGAGAUGUAU-C3-pi 3' (有义链; SEQ ID NO:18)

[0544] 5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (反义链; SEQ ID NO:22)

[0545] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0546] 其中 U 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0547] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' > 3') 的核糖核苷酸;

[0548] 其中在反义链中和有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0549] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇, 单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0550] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0551] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端; 以及

- [0552] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0553] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0554] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0555] 5' 帽 -GGAUGUUUGGAGAUguau-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:18)
- [0556] 5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:31)
- [0557] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0558] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0559] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0560] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0561] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0562] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0563] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0564] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0565] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0566] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0567] 5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:18)
- [0568] 5' AUACAUCUCCCAAACAUCC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:31)
- [0569] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0570] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0571] 其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷 (dTdT) 突出端;以及
- [0572] 其中所述有义链和所述反义链的 3' 末端未磷酸化;或
- [0573] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0574] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0575] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAuucua-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:10)
- [0576] 5' UAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:23)
- [0577] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0578] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0579] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0580] 其中在反义链中和有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个

核糖核苷酸；

[0581] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0582] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0583] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0584] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0585] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0586] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0587] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:10）

[0588] 5' UAGAAuGUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:23）

[0589] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0590] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0591] 其中 g 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸；

[0592] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0593] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0594] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0595] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0596] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0597] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0598] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0599] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:10）

[0600] 5' UAGAAuGUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' （反义链；SEQ ID NO:23）

[0601] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0602] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0603] 其中 u 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸；

[0604] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0605] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0606] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0607] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出

端 ;以及

[0608] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

[0609] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0610] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0611] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:10)

[0612] 5' UAGAAUgUCAGUCgAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:23)

[0613] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0614] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0615] 其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;

[0616] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0617] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0618] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0619] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0620] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

[0621] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0622] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0623] 5' GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:10)

[0624] 5' UAGAAUGUCAGUCGAGUC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:23)

[0625] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0626] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0627] 其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷 (dTdT) 突出端;以及

[0628] 其中所述有义链和所述反义链的 3' 末端未磷酸化;或

[0629] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0630] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0631] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:15)

[0632] 5' UUCAGUcUGAGUcAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0633] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0634] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0635] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;

[0636] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0637] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0638] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0639] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0640] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或

[0641] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0642] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0643] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGAcugaa-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:15)

[0644] 5' UUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0645] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0646] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0647] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' >3') 的核糖核苷酸;

[0648] 其中在反义链中和有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0649] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0650] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0651] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0652] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或

[0653] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0654] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0655] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

[0656] 5' UUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0657] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0658] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0659] 其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5' >3') 的核糖核苷酸;

[0660] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0661] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;

[0662] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;

[0663] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ; 以及

[0664] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ; 或

[0665] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0666] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0667] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链 ; SEQ ID NO : 19)

[0668] 5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链 ; SEQ ID NO : 32)

[0669] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0670] 其中 U 和 C 各自是 2' -O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0671] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸 ;

[0672] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0673] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端 ;

[0674] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ;

[0675] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ; 以及

[0676] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ; 或

[0677] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0678] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0679] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACCUGAA-C3-pi 3' (有义链 ; SEQ ID NO : 15)

[0680] 5' UUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链 ; SEQ ID NO : 28)

[0681] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0682] 其中 U 和 C 各自是 2' -O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0683] 其中 c 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸 ;

[0684] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0685] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端 ;

[0686] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ;

[0687] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ; 以及

[0688] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ; 或

[0689] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0690] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物

物：

[0691] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)

[0692] 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)

[0693] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0694] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0695] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0696] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0697] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0698] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0699] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0700] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0701] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0702] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0703] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:15)

[0704] 5' UUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0705] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0706] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0707] 其中 u 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0708] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0709] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0710] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0711] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0712] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0713] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0714] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0715] 5' GGGCCUGACUCAGACUGAA-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:15)

[0716] 5' UUCAGUCUGAGUCAGGCCC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:28)

[0717] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0718] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接

于下一个核糖核苷酸；

[0719] 其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷 (dTdT) 突出端；以及

[0720] 其中所述有义链和所述反义链的 3' 末端未磷酸化；或

[0721] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0722] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0723] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAuuu-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:16)

[0724] 5' AAGAAgUCAGUCGAGC-C3-C3 3' (反义链；SEQ ID NO:29)

[0725] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0726] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0727] 其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0728] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0729] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端；

[0730] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0731] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0732] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0733] 所述化合物的药学上可接受的盐。根据所述化合物的一个实施方案，在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是 1,3- 丙二醇，单 (磷酸二氢盐) (C3)；并且在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 且在 3' 末端处的突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。

[0734] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0735] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUU-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:16)

[0736] 5' AAGAAgUCAGUCGAGC-C3-C3 3' (反义链；SEQ ID NO:29)

[0737] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0738] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0739] 其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸；

[0740] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0741] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端；

[0742] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0743] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

- [0744] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0745] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0746] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0747] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)
- [0748] 5' AAGAAUgUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)
- [0749] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0750] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0751] 其中 g 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;
- [0752] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0753] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0754] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0755] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0756] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0757] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0758] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0759] 5' 帽 -GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)
- [0760] 5' AAGAAuGUCAGUCGAGUC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:29)
- [0761] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0762] 其中 U、G和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0763] 其中 u 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸;
- [0764] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0765] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0766] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0767] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0768] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或
- [0769] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0770] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0771] 5' GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0772] 5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0773] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0774] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0775] 其中所述有义链和所述反义链各自包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的两个核苷酸的胸苷-胸苷(dTdT)突出端;以及

[0776] 其中所述有义链和所述反义链的 3' 末端未磷酸化;或

[0777] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0778] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0779] 5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0780] 5' phos-AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0781] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0782] 其中 U、G 和 C 各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0783] 其中 g 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

[0784] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0785] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi);

[0786] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽;

[0787] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及

[0788] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化(-C3-C3-pi);或

[0789] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0790] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

[0791] 5' C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:16)

[0792] 5' phos-AAGAAgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链;SEQ ID NO:29)

[0793] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;

[0794] 其中 C 各自是 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0795] 其中 u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸;

[0796] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;

[0797] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi);

[0798] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽;

[0799] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ;以及

[0800] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi) ;或

[0801] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0802] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0803] 5' C3-GACUCAGACUGACCAUUCUU-C3-pi 3' (有义链 ;SEQ ID NO :16)

[0804] 5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (反义链 ;SEQ ID NO :29)

[0805] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0806] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0807] 其中 g 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸 ;

[0808] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0809] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇 ,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi) ;

[0810] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽 ;

[0811] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ;以及

[0812] 其中在所述反义链中,在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi) ;或

[0813] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0814] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0815] 5' 帽 -GGAUGUUUGGGAGAuguau-C3-pi 3' (有义链 ;SEQ ID NO :18)

[0816] 5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (反义链 ;SEQ ID NO :31)

[0817] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0818] 其中 A、U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0819] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸 ;

[0820] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0821] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇 ,单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端 ;

[0822] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ;

[0823] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端 ;以及

[0824] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ;或

- [0825] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0826] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0827] 5' 帽 -GGAUGUUUGGAGAUGUAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:18)
- [0828] 5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:31)
- [0829] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0830] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0831] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0832] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0833] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0834] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0835] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0836] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi);或
- [0837] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0838] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0839] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0840] 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0841] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0842] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0843] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0844] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0845] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0846] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0847] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0848] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi);或
- [0849] 所述化合物的药学上可接受的盐。根据所述化合物的一个实施方案,在有义链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽是 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3);并且在反义链中在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 且在 3' 末端处的突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。
- [0850] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:

- [0851] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0852] 5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0853] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0854] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0855] 其中 a、u、c 和 g 各自是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0856] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0857] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0858] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0859] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0860] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或
- [0861] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0862] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0863] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACCUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0864] 5' AUCAGuCUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0865] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0866] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0867] 其中 u 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖核苷酸;
- [0868] 其中在所述反义链中和所述有义链中,每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸;
- [0869] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3) 非核苷酸突出端;
- [0870] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽;
- [0871] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端;以及
- [0872] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化(pi);或
- [0873] 所述化合物的药学上可接受的盐。
- [0874] 根据一个实施方案,提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物:
- [0875] 5' 帽 -GGGCCUGACUCAGACCUGAU-C3-pi 3' (有义链;SEQ ID NO:19)
- [0876] 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (反义链;SEQ ID NO:32)
- [0877] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸;
- [0878] 其中 U和 C各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;
- [0879] 其中 c 是通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' > 3') 的核糖

核苷酸；

[0880] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0881] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端；

[0882] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 5' 帽；

[0883] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0884] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi)；或

[0885] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0886] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0887] 5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:19）

[0888] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3-pi 3' （反义链；SEQ ID NO:32）

[0889] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0890] 其中 U 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0891] 其中 c 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸；

[0892] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0893] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）(C3) 非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化 (C3-pi)；

[0894] 其中所述有义链包含在所述链的所述 5' 末端处共价连接的 C3 5' 帽；

[0895] 其中所述反义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端；以及

[0896] 其中在所述反义链中，在所述 5' 末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化 (phos) 并且在所述 3' 末端处的所述突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)；或

[0897] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0898] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0899] 5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' （有义链；SEQ ID NO:19）

[0900] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3-pi 3' （反义链；SEQ ID NO:32）

[0901] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0902] 其中 C 是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0903] 其中 c 是通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸 (5' >3') 的核糖核苷酸；

[0904] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0905] 其中所述有义链包含在所述链的所述 3' 末端处共价连接的 1,3- 丙二醇，单（磷

酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

[0906] 其中所述有义链包含在所述链的所述5'末端处共价连接的C3 5'帽；

[0907] 其中所述反义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的C3-C3非核苷酸突出端；以及

[0908] 其中在反义链中，在5'末端处的核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在3'末端处的突出端被磷酸化(-C3-C3-pi)；或

[0909] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0910] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0911] 5' C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:19)

[0912] 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (反义链；SEQ ID NO:32)

[0913] 其中A、U、G和C各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0914] 其中U和c各自是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0915] 其中c是通过2'-5'核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸；

[0916] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0917] 其中所述有义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的1,3-丙二醇，单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端并且其中所述突出端被磷酸化(C3-pi)；

[0918] 其中所述有义链包含在所述链的所述5'末端处共价连接的C3 5'帽；

[0919] 其中所述反义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的C3-C3非核苷酸突出端；以及

[0920] 其中在所述反义链中，在所述5'末端处的所述核糖核苷酸被磷酸化(phos)并且在所述3'末端处的所述突出端被磷酸化(-C3-C3-pi)；或

[0921] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0922] 根据一个实施方案，提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物：

[0923] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAAcuaca-C3-pi 3' (有义链；SEQ ID NO:20)

[0924] 5' UGUAGUuUCCAAUAGGUCUG-C3-C3 3' (反义链；SEQ ID NO:19)

[0925] 其中A、U、G和C各自是未修饰的核糖核苷酸；

[0926] 其中A、U和C各自是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0927] 其中a、u和c各自是通过2'-5'核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸(5'>3')的核糖核苷酸；

[0928] 其中在所述反义链中和所述有义链中，每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸；

[0929] 其中所述有义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的1,3-丙二醇，单(磷酸二氢盐)(C3)非核苷酸突出端；

[0930] 其中所述有义链包含在所述链的所述5'末端处共价连接的5'帽；

[0931] 其中所述反义链包含在所述链的所述3'末端处共价连接的C3-C3非核苷酸突出

端 ; 以及

[0932] 其中所述有义链的所述 3' 末端被磷酸化 (pi) ; 或

[0933] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0934] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0935] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACUACA-C3-pi 3' (有义链 ; SEQ ID NO : 20)

[0936] 5' UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG-pi 3' (反义链 ; SEQ ID NO : 33)

[0937] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0938] 其中 A、U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0939] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0940] 其中有义链包含在所述链的 3' 末端处共价连接的 1, 3- 丙二醇, 单 (磷酸二氢盐) (C3) 非核苷酸突出端并且其中所述有义链的 3' 末端被磷酸化 (pi) ; ;

[0941] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ; 并且

[0942] 其中在反义链中, 在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (pi) ; 或

[0943] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0944] 根据一个实施方案, 提供具有以下所列出的有义链和反义链的修饰的核酸化合物 :

[0945] 5' 帽 -CAGACCUAUGGAAACUACA-pi 3' (有义链 ; SEQ ID NO : 20)

[0946] 5' UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG-pi 3' (反义链 ; SEQ ID NO : 33)

[0947] 其中 A、U、G 和 C 各自是未修饰的核糖核苷酸 ;

[0948] 其中 A、U、G 和 C 各自是 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸 ;

[0949] 其中在所述反义链中和所述有义链中, 每个连续核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接于下一个核糖核苷酸 ;

[0950] 其中有义链包含在所述链的 5' 末端处共价连接的 5' 帽 ; 并且

[0951] 其中在有义链中, 在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (pi) ; 或

[0952] 所述化合物的药学上可接受的盐。

[0953] 在以上本文所描述的核酸化合物的各个实施方案中, 反义链包含在所述链的 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端。在以上本文所描述的核酸化合物的一些优选的实施方案中, 在反义链的 3' 末端处共价连接的 C3-C3 非核苷酸突出端被磷酸化 (-C3-C3-pi)。

[0954] 在本文所描述的核酸化合物的各个实施方案中, 所述 5' 帽选自以下各项组成的组 : 无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分 (idAb)、氨基 -C6 部分 (AM-c6)、C6- 氨基 -pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷酸二酯 (THNB)、维生素以及药物部分。

[0955] 在本文所描述的核酸化合物的各个实施方案中, 在反义链中, 在 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化 (phos)。在本文所描述的化合物核酸的各个实施方案中, 在反义链中, 在 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化 (\$)。

[0956] 在另一方面, 提供包含一种或多种本文所公开的这类核酸化合物以及药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。在一些实施方案中, 所述 dsRNA 分子是作为裸 dsRNA 施用。

在其它实施方案中,所述 dsRNA 分子与药学上可接受的载体混合。在其它实施方案中,所述 dsRNA 封装在药物载体中。

[0957] 在另一方面,提供本文所公开的分子在治疗患有疾病或病症的受试者中的用途,所述疾病或病症选自但不限于:与抗癌治疗相关的脱发;肾损伤/肾衰竭,包括急性肾损伤,特别是缺血性急性肾衰竭和慢性肾损伤;内耳和中耳的疾病或病症,如听力障碍、平衡障碍;眼睛的疾病或病症;器官移植患者中的移植物功能延迟恢复,特别是肾移植患者中的移植物功能延迟恢复;中风、脑损伤、脊髓损伤、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、心脏毒性、心肌梗塞/心力衰竭。本文提供用于治疗或预防有需要的受试者中这类疾病或病症的发病或严重性的方法,其中所述疾病或病症与 p53 基因的表达相关。所述方法涉及向需要所述治疗的哺乳动物施用防治或治疗有效量的一种或多种抑制或降低 p53 基因的表达或活性的本文所提供的化合物。

[0958] 在一些实施方案中,所述至少两种 dsRNA 药剂是联合施用的,例如同时或按序施用。在其它实施方案中,所述至少两种 dsRNA 药剂以包含其组合的药物组合物来施用。

[0959] 本文提供包含如本文所公开的不同修饰的功能性核酸,其用于制造包含这类修饰的功能性核酸的药剂、药物组合物的用途,以及用于治疗患有或易感如本文所公开的疾病或病症的患者方法。

[0960] 定义

[0961] 出于方便,本说明书、实施例和权利要求书中采用的某些术语在本文中进行描述。

[0962] 应注意的是,除非内容另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数形式。

[0963] 当方面或实施方案以马库什(Markush)群组或其它替代性分组描述时,本领域技术人员将认识到本公开也由此以所述群组的任何个别成员或成员子组进行描述。

[0964] “抑制剂”是能够在足以实现所需生物或生理作用的程度上降低(部分或完全地)基因的表达或所述基因的产物的活性的化合物。如本文所用的术语“抑制剂”是指寡核苷酸抑制剂,包括但不限于 siRNA、shRNA、合成 shRNA、miRNA、反义 RNA 和 DNA 以及核酶中的一者或多者。

[0965] “双链核酸化合物”或“dsRNA 分子”或“dsRNA 抑制剂”是能够在足以实现所需生物或生理作用的程度上下调或降低基因的表达或所述基因的产物的活性的化合物,并且包括 dsRNA、siRNA、shRNA、合成 shRNA、miRNA 中的一者或多者。抑制也可称为下调,或对于 RNAi 而言,称为沉默。

[0966] 如本文所用的术语“抑制”是指在足以实现所需生物或生理作用的程度上下调或降低基因的表达或所述基因的产物的活性。抑制是完全的或部分的。

[0967] 如本文所用,术语靶基因的“下调”或“抑制”意指抑制基因表达(转录或翻译)或靶基因的多肽活性,其中将所述靶基因 p53 转录成 SEQ ID NO:1-7 中的任一个中列出的 mRNA 或 SNP(单核苷酸多态性)或其其它变体。人 p53 基因的转录变体各自的 mRNA 的 gi 数目在 SEQ ID NO:1-7 中列出。靶 mRNA 序列的多核苷酸序列或转录变体是指 SEQ ID NO:1-7 中列出的 mRNA 序列或其任何同源序列,所述同源序列与 SEQ ID NO:1-7 中列出的 mRNA 中的任一个优选具有至少 70% 同一性、更优选 80% 同一性、甚至更优选 90% 或 95% 同一性。因此,本公开涵盖源自 SEQ ID NO:1-7 中的任一个的已经受如本文所述的突变、改变或修饰

的多核苷酸序列。术语“mRNA 多核苷酸序列”、“mRNA 序列”和“mRNA”可互换使用。

[0968] 如本文所用,术语“寡核苷酸”和“核酸”可互换使用并且是指包含脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的核苷酸序列。所述术语应理解成包括 RNA 或 DNA 的由核苷酸类似物制得的类似物作为等效物。

[0969] “寡核苷酸”或“寡聚物”是指约 2 个至约 50 个核苷酸的脱氧核糖核苷酸序列或核糖核苷酸序列。每个 DNA 或 RNA 核苷酸可以独立地为天然的或合成的、并且或修饰的或未修饰的。修饰包括寡核苷酸中的糖部分、碱基部分和或核苷酸之间的键联的变化。本文公开的核酸化合物涵盖包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸、非常规部分及其组合的分子,条件是不是每个核苷酸均为脱氧核糖核苷酸。

[0970] 如本文所用的术语“非常规部分”包括无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、未修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、镜像核苷酸(L-DNA 和 L-RNA)、非碱基配对核苷酸类似物和通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸的核苷酸;C3、C4、C5 和 C6 部分;苏糖核酸(TNA)、吡唑并三嗪(PT) 碱基修饰的核酸类似物;吗啉代;桥接的核酸,包括 LNA 和亚乙基桥接的核酸(ENA)。

[0971] “大致上互补”是指与另一序列的互补性大于约 84%。例如,在由 19 个碱基对组成的双链体区域中,一个错配导致 94.7% 互补性,两个错配导致约 89.5% 互补性且 3 个错配导致约 84.2% 互补性,从而致使所述双链体区域是大致上互补的。因此,“大致上相同的”是指与另一序列的同一性大于约 84%。

[0972] “核苷酸”意指涵盖可为天然的或合成的和或修饰的或未修饰的脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。修饰包括寡核苷酸中的糖部分、碱基部分和或核苷酸之间的键联的变化。

[0973] 所述核苷酸可选自天然存在的或合成修饰的碱基。天然存在的碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核苷酸的修饰的碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤和其它烷基腺嘌呤、5- 卤代尿嘧啶、5- 卤代胞嘧啶、6- 氮杂胞嘧啶和 6- 氮杂胸腺嘧啶、假尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、8- 卤代腺嘌呤、8- 氨基腺嘌呤、8- 硫醇腺嘌呤、8- 硫代烷基腺嘌呤、8- 羟基腺嘌呤和其它 8- 取代的腺嘌呤、8- 卤代鸟嘌呤、8- 氨基鸟嘌呤、8- 硫醇鸟嘌呤、8- 硫代烷基鸟嘌呤、8- 羟基鸟嘌呤和其它取代的鸟嘌呤、其它氮杂和脱氮腺嘌呤、其它氮杂和脱氮鸟嘌呤、5- 三氟甲基尿嘧啶和 5- 三氟胞嘧啶。在一些实施方案中,寡核苷酸中的一个或多个核苷酸被肌苷取代。

[0974] 根据一些实施方案,本公开提供包含未修饰的和修饰的核苷酸和或非常规部分的抑制性寡核苷酸化合物。所述化合物包含至少一个选自由糖修饰、碱基修饰和核苷酸间键联修饰组成的组的修饰的核苷酸,并且可含有非常规部分,如但不限于 DNA、LNA(锁核酸)、ENA(亚乙基桥接的核酸)、PNA(肽核酸)、阿拉伯糖苷、磷酸基羧酸酯或磷酸基羧酸酯核苷酸(PACE 核苷酸)、镜像核苷酸或具有 6 碳糖的核苷酸。

[0975] 核苷酸/寡核苷酸的所有类似物或修饰均与本文所公开的核酸化合物一起采用,条件是所述类似物或修饰不会实质上不利地影响所述核酸化合物的功能。

[0976] 糖修饰包括糖残基的 2' 部分上的修饰并且涵盖氨基、氟、烷氧基(例如甲氧基)、烷基、氨基、氟、氯、溴、CN、CF、咪唑、羧酸酯、硫代酸酯、C₁至 C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基、OCF₃、OCN、O- 烷基、S- 烷基或 N- 烷基;O- 烯基、S- 烯基或 N- 烯基;SOCH₃; SO₂CH₃;ONO₂;NO₂;N₃;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷基氨基;聚烷基氨基或取代的甲硅烷

基,如尤其在欧洲专利 EP 0 586520 B1 或 EP 0 618 925 B1 中所述。

[0977] 在一个实施方案中,本文所公开的核酸分子包含至少一个在糖部分上包含 2' 修饰 (“2' 糖修饰”) 的核糖核苷酸。在某些实施方案中,所述化合物包含任选地在交替位置上的 2' O- 烷基或 2' - 氟或 2' O- 烯丙基或任何其它 2' 修饰。其它稳定化修饰也是可能的 (例如末端修饰)。在一些实施方案中,优选的 2' O- 烷基是 2'-O- 甲基 (甲氧基) 糖修饰。

[0978] 在一些实施方案中,寡核苷酸的骨架被修饰并且包含磷酸酯-D- 核糖实体,但也可含有硫代磷酸酯-D- 核糖实体、三酯、硫代酸酯、2'-5' 桥接的骨架 (也可被称为 5'-2')、PACE 等。

[0979] 如本文所用,术语“非配对核苷酸类似物”意指核苷酸类似物,其包含包括但不限于以下的非碱基配对部分:6 脱氨基腺苷 (水粉覃素 (Nebularine))、4-Me- 吡啶、3- 硝基吡咯、5- 硝基吡啶、Ds、Pa、N3-Me 核糖 U、N3-Me 核糖 T、N3-Me dC、N3-Me-dT、N1-Me-dG、N1-Me-dA、N3- 乙基 -dC、N3-Me dC。在一些实施方案中,非碱基配对核苷酸类似物是核糖核苷酸。在其它实施方案中,非碱基配对核苷酸是脱氧核糖核苷酸。核苷酸类似物的实例是肽核酸 (PNA),其中 DNA (或 RNA) 中的脱氧核糖 (或核糖) 磷酸骨架被类似于肽中所见的骨架的聚酰胺骨架替换。已显示 PNA 类似物对酶促降解具有抗性且具有增强的体内和体外稳定性。可对寡核苷酸进行的其它修饰包括聚合物骨架、环状骨架、无环骨架、硫代磷酸酯-D- 核糖骨架、三酯骨架、硫代酸酯骨架、2'-5' 桥接的骨架、人工核酸、吗啉代核酸、二醇核酸 (GNA)、苏糖核酸 (TNA)、阿拉伯糖苷和镜像核苷 (例如,替代 β -D- 脱氧核糖核苷的 β -L- 脱氧核糖核苷)。包含 LNA 核苷酸的 dsRNA 分子的实例公开于 Elmen 等, (NAR 2005, 33(1):439-447) 中。

[0980] 本公开的化合物可使用一个或多个反向核苷酸,例如反向胸苷或反向腺苷合成 (参见例如,Takei, 等, 2002, JBC 277(26):23800-06)。

[0981] “镜像”核苷酸是与天然存在或通常采用的核苷酸具有反向手性的核苷酸,即是天然存在的 (D- 核苷酸) 的镜像 (L- 核苷酸),也被称为 L-RNA (在镜像核糖核苷酸的情况下) 和“镜像异构体”。核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸并且可进一步包含至少一个糖、碱基和或骨架修饰。镜像核苷酸的实例公开于美国专利号 6,586,238 中。美国专利号 6,602,858 公开了包含至少一个 L- 核苷酸取代的核酸催化剂。

[0982] 其它修饰包括在寡核苷酸的 5' 和 / 或 3' 部分上的末端修饰并且也被称为加帽部分。所述末端修饰选自核苷酸、修饰的核苷酸、脂质、肽、糖和反向无碱基部分。

[0983] 在本文公开的核酸化合物的各个实施方案中,优选的修饰包括在有义链和或反义链中并入 TNA 部分。包含 TNA 部分的 dsRNA 的实例公开于本发明的受让人的 PCT/US11/063365 中。在一些实施方案中,有义链中的 1 至 19 个核糖核苷酸可以被 TNA 取代。

[0984] 在本文公开的核酸化合物的各个实施方案中,优选的修饰包括在有义链和或反义链中并入吡唑并三嗪碱基修饰的核苷酸部分。吡唑并三嗪部分和包含吡唑并三嗪部分的 dsRNA 的实例公开于共同转让给本发明的受让人的 PCT/IL2013/050465 中。吡唑并三嗪 DNA 或 RNA 类似物优选地在位置 1、5、6 或 7 (5' > 3') 中并入 19 聚体反义链中。在一些实施方案中,吡唑并三嗪 RNA 类似物是优选的。吡唑并三嗪 DNA 或 RNA 类似物还可共价连接至有义链或反义链的 3' 末端作为 3' 末端突出端。

[0985] 如本文所用的术语“缀合物部分”是指包括能够优选地在 5' 末端或 3' 末端中的

一个或多个处共价连接至核酸分子的肽、脂质、药物、维生素、矿物质、荧光团的部分。不希望受理论约束,所述缀合物部分改变分子的生物分布、核内体逸出、细胞摄取、血浆保留、靶向而不会不利地影响核酸分子的活性。例如,优选的维生素是维生素 D、维生素 A 或维生素 E 部分;优选的脂质是鞘脂或胆固醇或胆固醇衍生物。“烷基部分或其衍生物”是指直链或支链碳部分和部分本身或进一步包含官能团,包括醇、磷酸二酯、硫代磷酸酯、磷酰基乙酸酯并且还包括胺、羧酸、酯、酰胺、醛、酮、醚基团。

[0986] “末端官能团”包括卤素、醇、胺、羧酸、酯、酰胺、醛、酮、醚基团。

[0987] 本文提供适用于产生靶向从 p53 基因转录的 mRNA 的核酸化合物的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:8-33)。

[0988] 本文提供用于在体外和体内抑制 p53 基因的表达的方法和组合物。一般而言,体内方法包括以有效于体内下调 p53 基因表达的量施用寡核苷酸化合物,特别是本文公开的靶向从 p53 基因转录的 mRNA 的双链核酸化合物,或所述化合物的药学上可接受的盐,或包含所述化合物的药物组合物,或包含所述化合物的药学上可接受的盐的药物组合物。具体地说,本文所公开的体内方法适用于治疗与 p53 基因的表达相关的疾病或病症。

[0989] 具体地说,所述主题方法可用于抑制 p53 基因的表达以用于治疗疾病或病症或病状,如但不限于本文所公开的疾病或病症或病状。

[0990] 本文公开下调转录成具有 SEQ ID NO:1-7 中的任一个中列出的多核苷酸序列的 mRNA 的 p53 基因的表达的化学修饰的 dsRNA 化合物或所述化合物的药学上可接受的盐,以及包含一种或多种所述化合物的药物组合物或包含一种或多种所述化合物的药学上可接受的盐的药物组合物。

[0991] 根据本文所公开的核酸化合物的一些实施方案,所述核酸化合物是双链体寡核苷酸,其中有义链与 p53 基因的 mRNA 多核苷酸序列的 18-40 个连续核苷酸区段大致上互补,并且反义链与所述有义链大致上互补。一般来说,容许与靶 mRNA 序列的某一偏差而不损害 si RNA 活性(如描述于例如 Czauderna 等, *Nuc. Acids Res.* 2003, 31(11):2705-2716 中)。在一些实施方案中,本文所公开的核酸化合物在转录后水平上在破坏或不破坏 mRNA 的情况下下调 p53 基因表达。不受理论束缚,本文所公开的核酸化合物可靶向 mRNA 以达成特异性裂解和降解和/或可抑制自靶向的信息的翻译。

[0992] 在一些实施方案中,所述双链核酸化合物在一端或两端上是平末端的。更具体地说,双链核酸化合物可在由第一链的 5' 末端和第二链的 3' 末端限定的端或由第一链的 3' 末端和第二链的 5' 末端限定的端上是平末端的。

[0993] 在其它实施方案中,两条链中的至少一条可具有在它所存在于其中的链的 3' 末端处共价连接的突出端。每个突出端可独立地由 1-5 个连续核苷酸、1-5 个吡啶并三嗪 (PT) 核苷酸类似物、1-5 个连续非核苷酸部分或其组合或缀合物部分组成。

[0994] 双链核酸化合物双链体的长度是约 18 至约 40 个核苷酸,优选地 19 至 23 个核苷酸。此外,各链(寡聚物)可独立地具有选自以下各项组成的组的长度:约 18 至约 40 个碱基、优选 18 至 23 个碱基、并且更优选 19、20 或 21 个核苷酸。

[0995] 另外,在某些优选的实施方案中,所述核酸化合物是具有双链结构;其中所述链中的一个的寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:8-20 中的一个,并且其中另一条链的寡核苷酸序列选自 SEQ ID NO:21-33 中的一个;或所述化合物的药学上可接受的盐。在一些实施方案中,

所述核酸化合物的链中的一条与靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 之间的互补性是完美的。在一些实施方案中,所述核酸化合物的链中的一条与靶 RNA (SEQ ID NO:1-7) 大致上互补,即在所述链与所述靶 RNA 之间具有一个、两个或多达三个错配。在一些实施方案中,所述双链核酸化合物的链之间的互补性是完美的。在一些实施方案中,所述双链核酸化合物的链是大致上互补的,即在所述链之间具有一个、两个或多达三个错配。

[0996] 此外,所述双链核酸化合物的第一链的 5' 末端可连接至第二链的 3' 末端,或所述第一链的 3' 末端可连接至所述第二链的 5' 末端,所述键联是经由通常具有 3-100 个核苷酸、优选地约 3 至约 10 个核苷酸之间的长度的核酸接头。

[0997] 本文所公开的双链核酸化合物具有赋予增加的活性、增加的稳定性、降低的毒性、降低的脱靶效应和 / 或降低的免疫应答中的一个或多个的结构和修饰。在优选的实施方案中,本文所公开的双链核酸化合物具有赋予增加的活性的结构和修饰。本文所公开的双链核酸结构有益地应用于适用于预防或减弱靶基因、特别是 p53 基因表达的双链 RNA 化合物。

[0998] 在各个实施方案中,本文所公开的核酸化合物包含至少一个选自以下各项组成的组的修饰的核苷酸:糖修饰、碱基修饰和核苷酸间键联修饰。因此,本文所公开的化学修饰的寡核苷酸化合物可含有修饰的核苷酸,如 DNA、LNA (锁核酸)、ENA (亚乙基桥接的核酸)、PNA (肽核酸)、阿拉伯糖苷、PACE、镜像核苷酸或具有 6 碳糖的核苷酸。PACE 核苷酸和类似物的实例公开于美国专利号 6,693,187 和 7,067,641 中,所述专利均以引用的方式并入本文。所述寡核苷酸可进一步包含任选地在交替位置上的 2' -O- 甲基或 2' - 氟或 2' O- 烯丙基或任何其它 2' 修饰。不会显著地降低活性的其它稳定化修饰也是可能的 (例如末端修饰)。寡核苷酸的活性部分的骨架可包含磷酸酯 -D- 核糖实体,但也可含有硫代磷酸酯 -D- 核糖实体、三酯、硫代酸酯、2' -5' 桥接的骨架 (也可被称为 5' -2')、PACE 或任何其它类型的修饰。在寡核苷酸的 5' 和 / 或 3' 部分上的末端修饰可存在或不存在。这类末端修饰可以是脂质、肽、糖、反向无碱基部分或其它分子。

[0999] 本公开涉及适用于产生下调 p53 基因的表达的核酸化合物,如本文所述的新型修饰的双链核酸化合物的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:8-33)。本发明的寡核苷酸序列有益地应用于适用于预防或减弱 p53 基因的表达式的双链核酸化合物。21- 或 23- 聚体寡核苷酸序列也可通过本文所公开的 19- 聚体序列的 5' 和 / 或 3' 延伸来产生。所述延伸优选地与对应的 p53mRNA 序列互补。

[1000] 此外,本文公开核酸化合物在治疗各种疾病和医学病状中的用途。

[1001] 下调 p53 基因的表达式的方法、分子和组合物在本文中公开并且在本文中详细地讨论,并且任何所述分子和 / 或组合物有益地用于治疗患有的一种或多种所述病状的受试者。待治疗的具体疾病和医学病状在本文中公开。

[1002] dsRNA 和 RNA 干扰

[1003] RNA 干扰 (RNAi) 是涉及双链 (ds)RNA 依赖性基因特异性转录后沉默的现象。研究这种现象并实验性地处理哺乳动物细胞的初始尝试受到主动的、非特异性的抗病毒防御机制的阻止,所述抗病毒防御机制响应于长的 dsRNA 分子而被激活 (Gil 等, Apoptosis, 2000, 5:107-114)。之后,据发现合成的 21 个核苷酸 RNA 双链体可介导哺乳动物细胞中的基因特异性 RNAi,而不刺激遗传抗病毒防御机制 (Elbashir 等 Nature 2001, 411:494-498 和 Caplen 等 PNAS 2001, 98:9742-9747)。因此,为短双链 RNA 的小干扰

RNA(siRNA) 已被广泛地用于抑制基因表达和理解基因功能。

[1004] RNA 干扰 (RNAi) 由小干扰 RNA(siRNA) (Fire 等, Nature 1998, 391:806) 或微 RNA(miRNA) (Ambros V. Nature 2004, 431:350-355); 和 Bartel DP. Cell. 2004;116(2):281-97) 介导。对应过程在植物中观察到时通常被称为特异性转录后基因沉默并且在真菌中观察到时被称为压制 (quelling)。

[1005] siRNA 化合物是下调或沉默 (即完全地或部分地抑制) 内源性或外源性基因 / mRNA 的表达的双链 RNA。RNA 干扰基于某些 dsRNA 种类进入特定蛋白质复合物中的能力, 在所述蛋白质复合物中它们然后被靶向至互补细胞 RNA 并且特异性地降解它们。因此, RNA 干扰反应以通常被称为 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 的含有 siRNA 的核酸内切酶复合物为特征, 所述复合物介导与所述 siRNA 双链体的反义链具有序列互补性的单链 RNA 的裂解。靶 RNA 的裂解可发生在互补于 siRNA 双链体的反义链的区域中间 (Elbashir 等, Genes Dev., 2001, 15, 188)。更详细地, 较长 dsRNA 被 III 型 RNA 酶 (DICER、DROSHA 等) 消化成短 (17-29bp) dsRNA 片段 (还被称为短抑制性 RNA 或“siRNA”) (参见 Bernstein 等, Nature, 2001, 409:363-6 和 Lee 等, Nature, 2003, 425:415-9)。RISC 蛋白复合物识别这些片段和互补的 mRNA。整个过程通过靶 mRNA 的核酸内切酶裂解达到顶点 (McManus 和 Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3:737-47; Paddison 和 Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5(3):217-24)。(关于这些术语和建议的机制的另外信息, 参见例如, Bernstein, 等, RNA. 2001, 7(11):1509-21; Nishikura, Cell. 2001, 107(4):415-8 和 PCT 公布号 WO 01/36646)。

[1006] 已广泛地报道了对应于已知基因的 dsRNA 化合物的选择和合成; 参见例如 Ui-Tei 等, J Biomed Biotechnol. 2006;65052; Chalk 等, BBRC. 2004, 319(1):264-74; Sioud 和 Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova 等, Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei 等, NAR 2004, 32(3):936-48。对于使用和产生修饰的 siRNA 的实例, 参见 Braasch 等, Biochem. 2003, 42(26):7967-75; Chiu 等, RNA, 2003, 9(9):1034-48; PCT 公布 WO 2004/015107(atugen); WO 02/44321(Tuschl 等), 和美国专利号 5,898,031 和 6,107,094。

[1007] 一些组已描述了能够在细胞内产生 siRNA 的基于 DNA 的载体发展。所述方法总体上涉及被有效地加工以便在细胞内形成 siRNA 的短发夹 RNA 的转录 (Paddison 等 PNAS USA 2002, 99:1443-1448; Paddison 等 Genes&Dev 2002, 16:948-958; Sui 等 PNAS USA 2002, 8:5515-5520; 和 Brummelkamp 等 Science 2002, 296:550-553)。这些报道描述产生能够特异性地靶向许多内源性和外源性表达的基因的 siRNA 的方法。

[1008] 研究已揭示 siRNA 可在哺乳动物和人两者中在体内有效。具体地说, Bitko 等显示当鼻内施用, 针对呼吸道合胞病毒 (RSV) 核壳 N 基因的特异性 siRNA 有效治疗小鼠 (Nat. Med. 2005, 11(1):50-55)。关于 siRNA 的治疗性应用的综述, 参见例如 Barik (Mol. Med 2005, 83:764-773) 和 Chakraborty (Current Drug Targets 2007;8(3):469-82)。此外, 已在人患者中进行了靶向 VEGFR1 受体以便治疗年龄相关的黄斑变性 (AMD) 的短 siRNA 的临床研究 (Kaiser, Am J Ophthalmol. 2006;142(4):660-8)。关于使用 siRNA 作为治疗剂的其它信息可在 Durcan, 2008. Mol. Pharma. 5(4):559-566; Kim 和 Rossi, 2008. BioTechniques 44:613-616; Grimm 和 Kay, 2007, JCI, 117(12):3633-41 中找到。

[1009] 化学合成

[1010] 本发明的化合物可通过本领域中熟知的用于合成核糖核酸（或脱氧核糖核酸）寡核苷酸的任何方法来合成。这种合成尤其描述于 Beaucage 和 Iyer, *Tetrahedron* 1992 ; 48:2223-2311 ;Beaucage 和 Iyer, *Tetrahedron* 1993 ;49:6123-6194 以及 Caruthers, 等, *Methods Enzymol.* 1987 ;154:287-313 中 ;硫代酸酯的合成尤其描述于 Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 1985 ;54:367-402 中, RNA 分子的合成描述于 Sproat, *Humana Press* 2005 中, 由 Herdewijn P. 编 ;Kap. 2:17-31, 并且相应的下游过程尤其描述于 Pingoud 等, *IRL Press* 1989 中, 由 Oliver R. W. A. 编 ;Kap. Kap. 7:183-208。

[1011] 其它合成程序是本领域中已知的, 例如如描述于 Usman 等, 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845 ;Scaringe 等, 1990, *NAR.*, 18, 5433 ;Wincott 等, 1995, *NAR.* 23, 2677-2684 ;以及 Wincott 等, 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59 中的程序, 并且这些程序可利用常见的核酸保护基和偶联基, 如 5' 端处的二甲氧基三苯甲基和 3' 端处的亚磷酰胺。根据需要并入修饰的（例如 2' -O- 甲基化的）核苷酸和未修饰的核苷酸。

[1012] 本发明的寡核苷酸可单独地合成且例如通过连接 (Moore 等, 1992, *Science* 256, 9923 ;Draper 等, 国际专利公布号 WO 93/23569 ;Shabarova 等, 1991, *NAR* 19, 4247 ;Bellon 等, 1997, *Nucleosides&Nucleotides*, 16, 951 ;Bellon 等, 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204), 或通过合成和 / 或脱保护之后杂交来在合成后连接在一起。

[1013] 应注意可使用可商购的机器（尤其是可从 Applied Biosystems 获得的）；所述寡核苷酸是根据本文所公开的序列制备的。可使用本领域中熟知的方法（例如参见美国专利号 6, 121, 426）连接化学合成片段的重叠对。所述链是单独合成且接着在管中彼此退火。接着, 通过 HPLC 使双链 siRNA 与未退火的单链寡核苷酸（例如由于它们中的一者过量）分离。关于本发明的 siRNA 或 siRNA 片段, 可合成两个或更多个所述序列且连接在一起以用于本发明中。

[1014] 本发明的化合物还可经由串联合成技术合成, 如描述于例如美国专利公布号 US 2004/0019001 (McSwiggen) 中, 其中两条 siRNA 链均合成为通过可裂解接头分开的单一连续寡核苷酸片段或链, 所述可裂解接头随后裂解以提供杂交并且允许纯化 siRNA 双链体的分开的 siRNA 片段或链。接头可为多核苷酸接头或非核苷酸接头。

[1015] 本发明进一步提供一种包含两个或更多个核酸分子的药物组合物以用于治疗本文所述的任何疾病和病状, 其中所述两个分子可以产生相等或另外有益活性的量物理地一起混合在所述药物组合物中, 或可共价或非共价结合, 或通过长度范围为 2-100、优选 2-50 或 2-30 个核苷酸的核酸接头连接在一起。在一个实施方案中, 所述核酸分子包含如本文所述的双链核酸结构, 其中所述两个核酸分子选自本文所述的寡核苷酸。因此, 所述核酸分子可共价地或非共价地结合或通过接头连接以形成串联 siRNA 化合物。包含两个 siRNA 序列的这类串联 dsRNA 分子的长度通常为 38-150 个核苷酸, 更优选地长度为 38 或 40-60 个核苷酸, 并且如果多于两个 siRNA 序列包括于串联分子中则相应地更长。还设想包含编码经由内部细胞加工产生的 siRNA 的两个或更多个更长序列的更长串联化合物, 例如长 dsRNA, 如编码两个或更多个 shRNA 的串联分子也是如此。这类串联分子也被考虑为本公开的一部分。设想包含本文所公开的两个（串联）或更多个 (RNAi 星形) dsRNA 序列的化合物。这类“串联”或“星形”分子的实例提供于 PCT 专利公布号 WO 2007/091269 中, 其转让给本申

请的受让人并且以引用的方式整体并入本文。

[1016] 靶向 p53 的核酸分子可以是药物组合物中的主要活性组分,或可以是含有两种或更多种核酸(或编码或内源地产生两种或更多种核酸的分子,如果其是编码两种或更多种核酸化合物的分子或一个或多个串联分子的混合物)的药物组合物的一种活性成分,所述药物组合物进一步包含靶向一种或多种另外基因的一种或多种另外的核酸分子。同时抑制所述其它基因将可能具有用于治疗本文公开的疾病的累加或协同作用。

[1017] 另外,本文公开的核酸或包含或编码这种核酸的任何核酸分子可连接或结合(共价或非共价)至针对靶细胞上表达的细胞表面可内化分子的抗体(包括适体分子),以便实现增强的靶向以用于治疗本文所公开的疾病。例如,抗 -Fas 抗体(优选地中和抗体)可与任何 dsRNA 组合(共价地或非共价地)。在另一个实例中,可用作配体/抗体的适体可与任何核酸化合物组合(共价地或非共价地)。

[1018] 本文公开的核酸分子可直接或与病毒或非病毒载体一起递送。当直接递送时,所述序列通常被赋予核酸酶抗性。可替代地,所述序列可并入到表达盒或构建体中以使得所述序列在细胞中表达,如本文中以下所讨论。通常,所述构建体包含适当的调控序列或启动子以使序列在靶细胞中表达。任选地用于递送本发明的化合物的载体是可商购的,并且可出于递送本发明的化合物的目的通过本领域技术人员已知的方法进行修饰。

[1019] 化学修饰

[1020] 核苷酸/寡核苷酸的所有类似物或修饰均可与本发明一起采用,条件是所述类似物或修饰不会实质上影响所述核苷酸/寡核苷酸的功能。所述核苷酸可选自天然存在的或合成修饰的碱基。天然存在的碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核苷酸的修饰的碱基在本文中描述。

[1021] 此外,可制备多核苷酸的类似物,其中一个或多个核苷酸的结构被根本上改变且更好地适合作为治疗或实验试剂。核苷酸类似物的实例是肽核酸(PNA),其中 DNA(或 RNA)中的脱氧核糖(或核糖)磷酸骨架被类似于肽中所见的骨架的聚酰胺骨架替换。已显示 PNA 类似物对酶促降解具有抗性且具有增强的体内和体外稳定性。可对寡核苷酸进行的其它修饰包括聚合物骨架、环状骨架、无环骨架、硫代磷酸酯 -D- 核糖骨架、三酯骨架、硫代酸酯骨架、2'-5' 桥接的骨架、人工核酸、吗啉代核酸、锁核酸(LNA)、二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、阿拉伯糖苷和镜像核苷(例如,替代 β -D- 脱氧核糖核苷的 β -L- 脱氧核糖核苷)。包含 LNA 核苷酸的 dsRNA 分子的实例公开于 Elmen 等, (NAR 2005, 33(1):439-447) 中。

[1022] 本发明的核酸化合物可使用一个或多个反向核苷酸,例如反向胸苷或反向腺苷合成(参见例如 Takei, 等, 2002, JBC 277(26):23800-06)。

[1023] 如本文所用的术语“非常规部分”是指无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、镜像核苷酸、苏糖核酸(TNA)、吡唑并三嗪(PT)核苷酸类似物、非碱基配对核苷酸类似物和通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸的核苷酸;C3、C4、C5 和 C6 部分;桥接的核酸,包括 LNA 和亚乙基桥接的核酸。

[1024] 如本文所用的术语“帽”或“加帽部分”包括无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、包括 2' O 烷基修饰的无碱基核糖和无碱基脱氧核糖部分的修饰;反向无碱基核糖、反向无碱基脱氧核糖部分(idAb)及其修饰;氨基 -C6 部分(AM-c6)、C6- 亚氨基 -Pi;非核苷酸部分、镜像核苷酸,包括 L-DNA 和 L-RNA;5' OMe 核苷酸;5, 6, 7, 8- 四氢 -2- 萘丁酸磷

酸二酯 (THNB)、维生素、药物部分和核苷酸类似物,包括但不限于 4', 5'-亚甲基核苷酸; 1-(β -D-赤型呋喃糖基)核苷酸; 4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸; 5'-氨基-烷基磷酸酯; 1, 3-二氨基-2-丙基磷酸酯、3-氨基丙基磷酸酯; 6-氨基己基磷酸酯; 12-氨基十二基磷酸酯; 羟基丙基磷酸酯; 1, 5-脱水己糖醇核苷酸; α -核苷酸; 苏式-戊呋喃糖基核苷酸; 无环 3', 4'-开环核苷酸; 3, 4-二羟基丁基核苷酸; 3, 5-二羟基戊基核苷酸; 5'-5'-反向无碱基部分; 1, 4-丁二醇磷酸酯; 5'-氨基; 以及桥接或非桥接甲基磷酸酯和 5'-巯基部分。

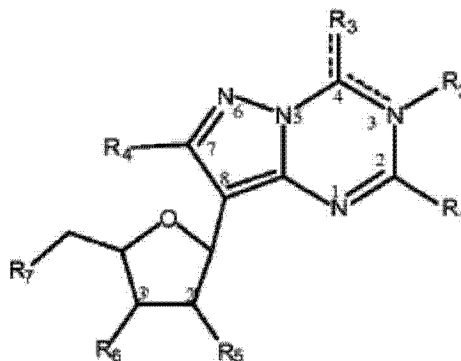
[1025] 无碱基脱氧核糖部分包括例如无碱基脱氧核糖-3'-磷酸; 1, 2-二脱氧-D-呋喃核糖-3-磷酸; 1, 4-脱水-2-脱氧-D-核糖醇-3-磷酸。反向无碱基脱氧核糖部分包括反向脱氧核糖无碱基; 3', 5'反向脱氧无碱基 5'-磷酸。

[1026] “镜像”核苷酸是与天然存在或通常采用的核苷酸具有逆转手性的核苷酸,即是天然存在的 (D-核苷酸) 的镜像 (L-核苷酸)。核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸并且可进一步包含至少一个糖、碱基和或骨架修饰。美国专利号 6, 602, 858 公开了包含至少一个 L-核苷酸取代的核酸催化剂。镜像核苷酸包括例如 L-DNA (L-脱氧核糖腺苷-3'-磷酸 (镜像 dA); L-脱氧核糖胞苷-3'-磷酸 (镜像 dC); L-脱氧核糖鸟苷-3'-磷酸 (镜像 dG); L-脱氧核糖胸苷-3'-磷酸 (镜像 dT)) 和 L-RNA (L-核糖腺苷-3'-磷酸 (镜像 rA); L-核糖胞苷-3'-磷酸 (镜像 rC); L-核糖鸟苷-3'-磷酸 (镜像 rG); L-核糖尿嘧啶-3'-磷酸 (镜像 dU))。

[1027] 有用的吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物由通式 I 描述:

[1028]

(I)



[1029] 其中

[1030] R_1 和 R_4 各自独立地选自 H、卤素、-CN、-SCN、-NO₂、-O-烃基、-S-烃基、-CO-H、-CO-烃基、-NR₈R₉、杂芳基、或任选被一个或多个各自独立地是卤素、-CN、-SCN 或 -NO₂ 的基团取代的烃基, 其中 R_8 和 R_9 各自独立地是 H、烃基或胺保护基; 或 R_8 和 R_9 连同它们所连接的氮原子一起形成任选含有 1-2 个选自氧、氮或硫的其它杂原子的杂原子的饱和或不饱和杂环;

[1031] R_2 是 H 或不存在;

[1032] R_3 是 O 或 -NR₁₀R_{10'}, 其中 R_{10} 和 $R_{10'}$ 各自独立地是 H、烃基、-CO-烃基或胺保护基; 并且

[1033] R_5 是 H、卤素、-O⁻ 或 -OR₁₁;

[1034] R_6 是 $-O^-$ 或 $-OR_{11}$;

[1035] R_7 是 $-OR_{11}$ 或磷酸酯部分;

[1036] R_{11} 各自独立地是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-OR_{12}$ 、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-SR_{12}$ 、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-NR_{12}R_{13}$ 、羟基保护基、或具有式 $-P(OR_{14})NR_{15}R_{16}$ 的亚磷酸酯部分, 其中 R_{14} 是 H 或氰基 $-(C_1-C_8)$ 烷基, 优选是氰基乙基, 且 R_{15} 和 R_{16} 各自独立地是 H 或 (C_1-C_8) 烷基, 优选是异丙基;

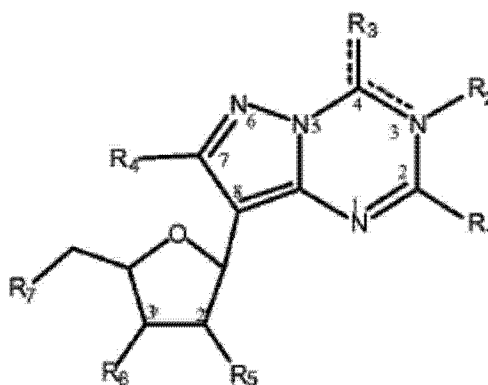
[1037] R_{12} 和 R_{13} 各自独立地是 H 或 (C_1-C_8) 烷基; 且

[1038] 虚线代表位置 4 碳原子与位置 3 氮原子或残基 R_3 之间的潜在双键, 条件是当 R_2 是 H 时, 在位置 4 碳原子与 R_3 之间存在双键, 并且当 R_2 不存在时, 在位置 4 碳原子与位置 3 氮原子之间存在双键, 但排除其中 R_5 和 R_6 各自独立地是 $-OH$ 或 $-O^-$ 的类似物和其中 R_5 是 H 且 R_1 是羟基的类似物。

[1039] 在各个实施方案中, 本文提供一种包含通式 II 的 PT 核苷酸类似物的双链核酸分子;

[1040]

(II)



[1041] 其中

[1042] R_1 和 R_4 各自独立地选自 H、卤素、 $-CN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO_2$ 、 $-O$ -烷基、 $-S$ -烷基、 $-CO-H$ 、 $-CO$ -烷基、 $-NR_8R_9$ 、杂芳基、或任选被一个或多个各自独立地是卤素、 $-CN$ 、 $-SCN$ 或 $-NO_2$ 的基团取代的烷基, 其中 R_8 和 R_9 各自独立地是 H 或烷基, 或 R_8 和 R_9 连同它们所连接的氮原子一起形成任选含有 1-2 个选自氧、氮或硫的其它杂原子的饱和或不饱和杂环;

[1043] R_2 是 H 或不存在;

[1044] R_3 是 O 或 $-N R_{10}R_{10'}$, 其中 R_{10} 和 $R_{10'}$ 各自独立地是 H、烷基或 $-CO$ -烷基;

[1045] R_5 是 H、卤素、 $-O^-$ 或 $-OR_{11}$;

[1046] R_6 是 $-O^-$ 或 $-OR_{11}$,

[1047] R_7 是 OR_{11} 、单磷酸酯部分或磷酸酯连接部分; 且

[1048] R_{11} 各自独立地是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-OR_{12}$ 、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-SR_{12}$ 或 (C_1-C_8) 亚烷基 $-NR_{12}R_{13}$, 其中 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地是 H 或 (C_1-C_8) 烷基; 且

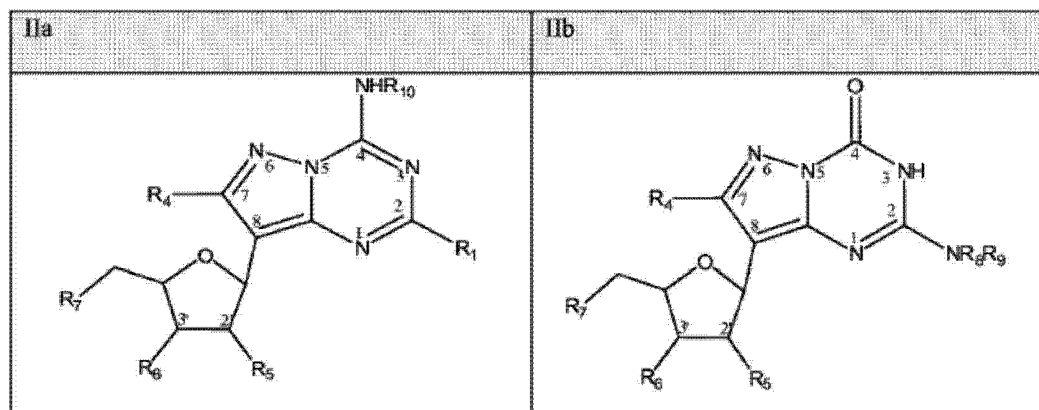
[1049] 虚线表示位置 4 碳原子与位置 3 氮原子或基团 R_3 之间的潜在双键, 条件是当 R_2 是 H 时, 在位置 4 碳原子与 R_3 之间存在双键, 并且当 R_2 不存在时, 在位置 4 碳原子与位置 3 氮

原子之间存在双键。

[1050] 在一些实施方案中, PT 核苷酸类似物包括如下在表 I 中的式 IIa 的腺嘌呤 PT 核苷酸类似物或式 IIb 的鸟嘌呤 PT 核苷酸类似物:

[1051] 表 I: 式 IIa 和 IIb 的腺嘌呤和鸟嘌呤 PT 核苷酸类似物:

[1052]



[1053] 在一些优选的实施方案中, 吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物是式 IIa 的腺嘌呤 PT 核苷酸类似物 (即 R_2 不存在且 R_3 是 NHR_{10}), 其中 R_1 是 H, R_{10} 是 H; R_4 是 H; R_5 是 H、卤素或 $-\text{OR}_{11}$, 其中 R_{11} 是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{OR}_{12}$ 、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{SR}_{12}$ 或 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{NR}_{12}\text{R}_{13}$, 其中 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地是 H 或 (C_1-C_8) 烷基; R_6 是 $-\text{O}^-$ 或 $-\text{OH}$; 并且 R_7 是 OH 或磷酸酯连接部分。在一些实施方案中, R_{11} 是 H、 CH_3 或 $(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 。在一些实施方案中, R_{11} 是 H (即 R_5 是羟基; 2' OH)。在一些实施方案中, R_{11} 是 CH_3 (即 R_5 是甲氧基, 2' OMe)。在一些实施方案中, R_{11} 是 $(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ (即 R_5 是甲氧基乙氧基; 2' MOE)。

[1054] 在一些优选实施方案中, 吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物是式 IIa 的脱氧腺苷 PT 核苷酸类似物, 其中 R_1 是 H, R_{10} 是 H; R_4 是 H; R_5 是 H 或卤素; R_6 是 $-\text{O}^-$ 或 $-\text{OH}$; 且 R_7 是 OH 或磷酸酯部分。在一些实施方案中, R_5 是 H。在一些实施方案中, R_5 是卤素, 优选是氟基 (F)。

[1055] 在一些优选实施方案中, 吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物是式 IIb 的鸟苷 PT 核苷酸类似物, 其中 R_4 、 R_8 和 R_9 各自是 H, R_5 是 $-\text{OR}_{11}$, 其中 R_{11} 是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{OR}_{12}$ 、 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{SR}_{12}$ 或 (C_1-C_8) 亚烷基 $-\text{NR}_{12}\text{R}_{13}$, 其中 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地是 H 或 (C_1-C_8) 烷基; R_6 是 $-\text{O}^-$ 或 $-\text{OH}$; 且 R_7 是 OH 或磷酸酯部分。在一些实施方案中, R_{11} 是 H、 CH_3 或 $(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 。在一些实施方案中, R_{11} 是 H (即 R_5 是羟基; 2' OH)。在一些实施方案中, R_{11} 是 CH_3 (即 R_5 是甲氧基, 2' -O 甲基)。在一些实施方案中, R_{11} 是 $(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ (即 R_5 是甲氧基乙氧基; 2' MOE)。

[1056] 在一些优选实施方案中, 吡唑并三嗪 (PT) 核苷酸类似物是式 IIb 的脱氧鸟苷 PT 核苷酸类似物 (即 R_2 是 H 且 R_3 是 O), 其中 R_4 、 R_8 和 R_9 各自是 H, R_5 是 H、卤素或 $-\text{OR}_{11}$; R_6 是 $-\text{O}^-$ 或 $-\text{OH}$; 且 R_7 是 OH 或磷酸酯连接部分。在一些实施方案中, R_5 是 H。在一些实施方案中, R_5 是卤素, 优选是氟基 (F)。

[1057] 在本文所公开的核酸化合物的一些实施方案中, 寡核苷酸的骨架被修饰且包含磷酸酯-D-核糖实体, 但也可含有硫代磷酸酯-D-核糖实体、三酯、硫代酸酯、2'-5' 桥接的骨架 (也可被称为 2' 5' 连接的核苷酸或 5' -2')、PACE 等。另外修饰包括可逆的或不稳定的磷酸三酯键联, 如分别在 US20090093425 和 US20110294869 中公开的那些。

[1058] 在本文所公开的核酸化合物（结构 A1 和 A2）的各个实施方案中，将各连续 N 或 N' 连接至相邻 N 或 N' 的共价键是磷酸二酯键。

[1059] 在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，有义链在 3' 末端和 5' 末端两者处均被磷酸化或未磷酸化。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，反义链在 3' 末端和 5' 末端两者处均被磷酸化或未磷酸化。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，在反义链和有义链中的每个中在 3' 末端和 5' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，在反义链和有义链中的每个中在 3' 末端和 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，在反义链和有义链中的每个中，在 3' 末端处的核糖核苷酸被磷酸化并且在 5' 末端处的核糖核苷酸未磷酸化。

[1060] 在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，修饰的核糖核苷酸包含在糖部分的 2' 位置处的修饰。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，修饰的核糖核苷酸是 2' -O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[1061] 在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，非常规部分选自：镜像核苷酸、苏糖核酸（TNA）、吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物和通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核糖核苷酸的核糖核苷酸。

[1062] 在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，非常规部分是核苷酸类似物。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些实施方案中，非常规部分是吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些优选的实施方案中，存在吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物。在本文所公开的核酸化合物（结构 A、A1 和 A2）的一些优选的实施方案中，仅在反义链中存在吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物。在本文所公开的核酸化合物的一些优选的实施方案中，吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物仅在位置 4-7 (5' > 3') 中的一个中在反义链中存在一次。在本文所公开的核酸化合物的一些优选的实施方案中，吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物在反义链中存在两次：在位置 1 (5' > 3') 和位置 4、5、6 或 7 (5' > 3') 中的一个。在本文所公开的核酸化合物的各个实施方案中，吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物在反义链中存在并且存在于在其中存在突出端的链的 3' 末端处共价连接的突出端（Z 和 / 或 Z'）中的一个或两个中。

[1063] 在本文所述的核酸化合物的各个实施方案中，突出端（Z 或 Z'）独立地存在或不存在，但如果存在那么在它所存在于其中的链的 3' 末端处共价连接。在各个实施方案中，突出端（Z 或 Z'）独立地包含在它所存在于其中的链的 3' 末端处共价连接的 1-5 个连续核苷酸、吡唑并三嗪（PT）核苷酸类似物或连续非核苷酸部分或其组合、或维生素或药物部分。在本文所公开的核酸化合物的一些实施方案中，两个突出端（Z 和 Z'）都不存在。在其它实施方案中，Z 或 Z' 存在。

[1064] 在本文所公开的核酸化合物的一些实施方案中，Z 和 / 或 Z' 是 1-5 个连续核苷酸。在一些实施方案中，各核苷酸是 dT，并且 Z 和 Z' 各自是 2 个连续核苷酸（dTdT）。

[1065] 在本文所公开的核酸化合物的一些实施方案中，Z 和 / 或 Z' 是 1-5 个连续非核苷酸部分。在一些实施方案中，Z 和 / 或 Z' 各自独立地包括非核苷酸部分，如 C2、C3、C4、C5 或 C6 烷基部分，任选地包括 C31, 3- 丙二醇，单（磷酸二氢盐）（C3）[CAS RN: 13507-42-1] 或其

衍生物,包括丙醇(C3-OH/C3OH)、丙二醇和丙二醇的磷酸二酯衍生物(“C3Pi”)。在一些实施方案中,Z和/或Z'各自包括两个烃部分并且在一些实例中,是C3Pi-C3OH或C3Pi-C3Pi。各C3是通过共价键,优选基于磷酸的键共价缀合于相邻C3。在一些实施方案中,基于磷酸的键是硫代磷酸酯、膦酰基乙酸酯或磷酸二酯键。

[1066] 在本文所公开的核酸化合物的一些实施方案中,Z和Z'各自是1-2个连续非核苷酸部分。在一些优选的实施方案中,每个非核苷酸部分是1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)。在本文所公开的核酸化合物的一些优选的实施方案中,Z是一个C3非核苷酸部分(C3)并且Z'是两个连续C3非核苷酸部分(C3-C3)。

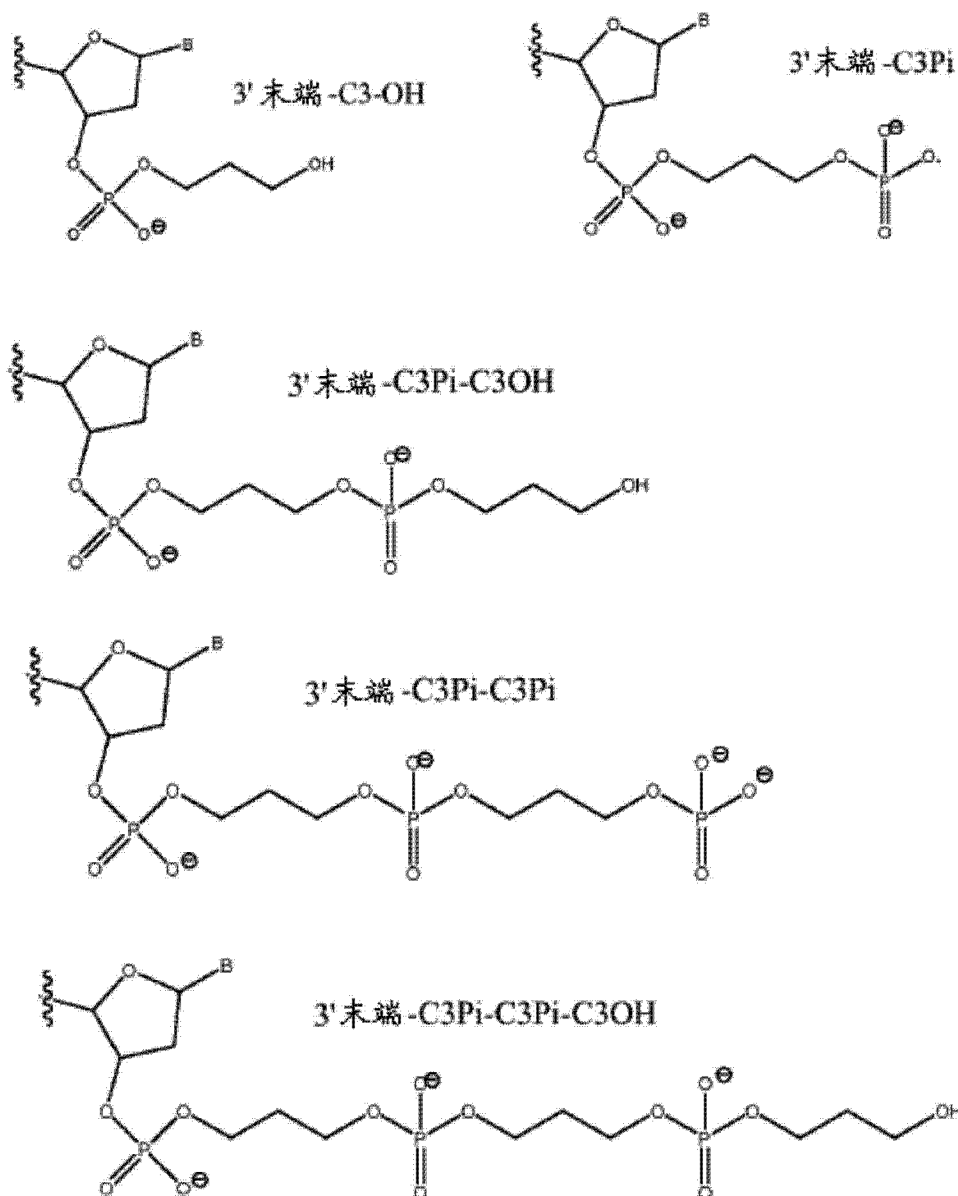
[1067] 在本文所公开的核酸化合物(结构A、A1和A2)的一些实施方案中,帽(z”)不存在。

[1068] 在本文所公开的核酸化合物(结构A、A1和A2)的一些实施方案中,帽,其中z”存在。在本文所公开的核酸化合物(结构A、A1和A2)的一些实施方案中,帽z”选自由以下各项组成的组:无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、反向无碱基核糖部分、反向脱氧核糖部分、反向脱氧无碱基部分(idAb)、氨基-C6部分(AM-c6)、C6-氨基-Pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5,6,7,8-四氢-2-萘丁酸磷酸二酯(THNB)、维生素以及药物部分。在本文所公开的核酸化合物(结构A、A1和A2)的一些实施方案中,帽z”是1,3-丙二醇,单(磷酸二氢盐)(C3)。在本文所公开的核酸化合物(结构A、A1和A2)的一些实施方案中,N、N'、N1和N2各自是未修饰的核糖核苷酸,z”不存在,Z和Z'存在并且由dTdT突出端组成。在结构A1的一些实施方案中, $x = y = 19$ 并且Z包含至少一个C3烷基突出端。在结构A2的具体实施方案中, $x = y = 18$ 并且Z包含至少一个C3烷基突出端。在一些实施方案中,C3-C3突出端是通过共价键联,优选磷酸二酯键联共价连接于(N) x 或(N') y 的3'末端。在一些实施方案中,第一C3与第二C3之间的键联是磷酸二酯键联。在一些实施方案中,3'非核苷酸突出端是C3Pi-C3Pi。在一些实施方案中,3'非核苷酸悬突是C3Pi-C3Ps。在一些实施方案中,3'非核苷酸突出端是C3Pi-C3OH(OH是羟基)。在一些实施方案中,3'非核苷酸突出端是C3Pi-C3OH。

[1069] 在各个实施方案中,烷基部分包括烷基衍生物,包括包含末端羟基、末端氨基或末端磷酸基团的C3烷基、C4烷基、C5烷基或C6烷基部分。在一些实施方案中,烷基部分是C3烷基或C3烷基衍生物部分。在一些实施方案中,C3烷基部分包括丙醇、丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯或其组合。C3烷基部分是通过磷酸二酯键共价连接于(N') y 的3'末端和/或(N) x 的3'末端。在一些实施方案中,烷基部分包括丙醇、丙基磷酸酯或丙基硫代磷酸酯。在一些实施方案中,Z和Z'各自独立地选自丙醇、丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯、其组合或其多者,具体来说2或3个共价连接的丙醇、丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯或其组合。在一些实施方案中,Z和Z'各自独立地选自丙基磷酸酯、丙基硫代磷酸酯、丙基磷酸-丙醇;丙基磷酸-丙基硫代磷酸酯;丙基磷酸-丙基磷酸酯;(丙基磷酸酯) 3 、(丙基磷酸酯) 2 -丙醇、(丙基磷酸酯) 2 -丙基硫代磷酸酯。任何丙烷或丙醇缀合的部分可包括在Z或Z'中。

[1070] 示例性3'末端非核苷酸部分的结构如下:

[1071]

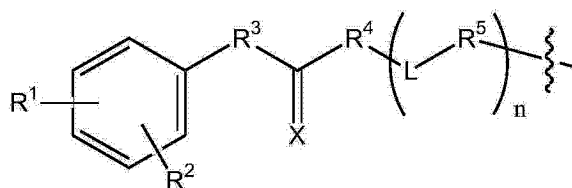


[1072] 苯基烃基缀合物

[1073] 在一些实施方案中,提供共价结合于苯基烃基部分 (PHM) 的核酸分子。在一些实施方案中,提供包含有义和反义链的核酸分子,其中至少一条链共价结合于苯基烃基部分 (PHM)。

[1074] 在一些实施方案中,本文所公开的双链核酸包含有义链和反义链,其中所述有义链、反义链或两者直接地或经由接头共价结合于包含苯基烃基基团的部分,所述部分由通式 III 表示:

[1075]



III

[1076] 其中

[1077] R^1 和 R^2 各自独立地选自由以下各项组成的组: H、卤素、C1-C10 烷基、 OR^6 、 $OCOR^6$ 、 $COOR^6$ 、 CH_2OR^6 、CHO、 COR^6 、 NR^6R^7 和 SR^6 ; 或 R^1 和 R^2 形成任选地被选自氧、氮或硫的至多 2 个杂原子中断并且任选地被独立地选自由卤素、C1-C3 烷基、 OR^6 、 $OCOR^6$ 、 $COOR^6$ 、 CH_2OR^6 、CHO、 COR^6 、 NR^6R^7 、 SR^6 、 $=O$ 、 $=S$ 和 $=NH$ 组成的组的至多 3 个基团取代的饱和或不饱和的环状 C1-C7 烷基环;

[1078] R^3 是任选地被选自氧、氮或硫的至多 2 个杂原子中断的 C1-C8 烷基;

[1079] R^4 是 NH、O、S 或 CR^6R^7 ;

[1080] R^6 和 R^7 各自独立地选自由 H 和 C1-C4 烷基组成的组;

[1081] X 是 O 或 S;

[1082] L 选自由以下各项组成的组: 至多 12 个氨基酸残基的肽基链、 $-[CH_2-CH_2-O]_m-$ 、任选地由至多 2 个选自 O、N 或 S 的杂原子中断的 C1-C12 烷基以及 R^8O- ;

[1083] R^8 是任选地被选自 O、N 或 S 的至多 2 个杂原子中断的 C1-C12 烷基;

[1084] n 是 0 至 10 的整数。

[1085] m 是 1 至 10 的整数;

[1086] R^5 选自由以下各项组成的组: $-P(O)(R^9)-O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NHCS-$ 、 $-NHCO-$ 和单键;

[1087] R^9 选自由 O^- 、 S^- 、 BH_3^- 、 NR^6R^7 或 CH_3 组成的组;

[1088] 或其药学上可接受的盐;

[1089] 其中有义链与对应于 p53 基因的 mRNA (SEQ ID NO:1-7) 的区段具有序列同一性。

[1090] 适应症

[1091] 抑制 p53 基因的表达显示在治疗和 / 或预防各种疾病和病症中是有益的。本申请具体地涉及下调 p53 基因的表达的双链核酸分子, 并且涉及这些分子在治疗和 / 或预防各种疾病和病症中的用途。这类疾病 / 病症的实例包括但不限于局部缺血 - 再灌注损伤、听力受损、听力障碍、平衡受损、听力丧失、化学疗法诱导的脱发、放射疗法诱导的脱发、急性肾衰竭、急性肾损伤、慢性肾病 (CKD)、与抗癌疗法相关的副作用、肾移植患者的移植物功能延迟恢复 (DGF)、脊髓损伤、脑损伤、癫痫、中风、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肿瘤、烧伤、伤口、高热、缺氧、局部缺血、器官移植、骨髓移植 (BMT)、心肌梗塞 / 心脏病发作、心脏毒性以及急性肝衰竭。

[1092] 在一个实施方案中, 所述病症是与抗癌疗法相关的副作用, 并且以有效于治疗或改善所述副作用的量施用本文所公开的核酸化合物或所述化合物的药学上可接受的盐或包含所述化合物的组合物或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物。所述抗癌疗法可包括放射疗法、化学疗法、分子靶向和生物抗癌疗法。在各个实施方案中, 与这类抗癌疗法相关的副作用选自脱发 (秃头症)、睾丸细胞损伤、肠上皮细胞损伤、淋巴系统损伤或造血系统受损中的一种或多种。

[1093] 在一个实施方案中, 所述疾病是 p53 阳性癌症并且以有效于下调 p53 基因表达的量施用本文公开的核酸化合物或所述化合物的药学上可接受的盐或包含所述化合物的组合物或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物, 并且从而使所述 p53 阳性癌症对受试者中的化学疗法敏感。

[1094] 在一个实施方案中,本文所公开的核酸化合物或所述化合物的药学上可接受的盐或包含所述化合物的组合物或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物用于造血祖细胞扩增或刺激血细胞生成。

[1095] 在一个实施方案中,本文所公开的核酸化合物或所述化合物的药学上可接受的盐或包含所述化合物的组合物或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物用于 p53-null 造血干细胞 (HSC) 的归巢。

[1096] 药物组合物

[1097] 提供用于通过使用核酸分子来下调 p53 表达的组合物和方法,所述核酸分子如能够介导 p53 基因表达的下调或介导针对 p53 基因表达的 RNA 干扰的短干扰核酸 (siNA)、干扰 RNA (RNAi)、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微 RNA (miRNA) 以及短发夹 RNA (shRNA) 分子。

[1098] 虽然本文公开的分子有可能作为粗化学品或其药学上可接受的盐施用,但优选地是将它们作为药物组合物呈现。因此,提供一种包含本文公开的核酸分子;或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体中的一种或多种的药物组合物。这种药物组合物可包含两种或更多种不同核酸化合物的混合物。

[1099] 本文提供的组合物、方法和试剂盒可包括独立地或组合调节(例如,下调)p53 蛋白和/或编码 p53 蛋白的基因的表达的一种或多种核酸分子和方法。关于 p53 基因,提供了各个方面和实施方案的描述。然而,各个方面和实施方案还针对其它相关基因,如同源基因和转录变体、以及与某些 p53 基因相关的多态性(例如,单核苷酸多态性, (SNP))。因此,各个方面和实施方案还针对参与涉及例如本文所述的疾病、性状或病状的维持或发展的 p53 介导的信号转导或基因表达路径的其它基因。使用本文中针对 p53 基因所述的方法可分析这些另外的基因的靶位点。因此,可如本文所述进行、测定和测量对其它基因的下调和对其它基因的这种调节的作用。

[1100] 进一步提供一种包含有效下调 p53 表达的量的至少一种共价或非共价结合于一种或多种本文公开的核酸化合物的本文公开的核酸化合物;以及药学上可接受的载体的药物组合物。所述化合物可通过内源性细胞复合物在细胞内加工以便产生一种或多种本文公开的寡核糖核苷酸。

[1101] 还提供一种包含药学上可接受的载体和有效下调细胞中人 p53 的表达的一种或多种本文公开的化合物的药物组合物,所述化合物包含 SEQIDNO:8-33 中列出的序列。

[1102] 在一个实施方案中,本文公开的寡核糖核苷酸化合物、组合物和方法抑制/下调 p53 基因,由此所述抑制/下调选自包括以下各项的组:抑制/下调基因功能、抑制/下调多肽和抑制/下调 mRNA 表达。

[1103] 在一个实施方案中,本文所公开的核酸可用于抑制 p53 基因家族的表达,其中所述基因或基因家族序列共享序列同源性。这类同源序列可如本领域中所已知,例如使用序列比对进行鉴定。可将核酸分子设计为靶向这类同源序列,例如使用完全互补的序列或者通过并入可提供另外的靶序列的非标准的碱基对(例如错配和/或摆动碱基对)。在鉴定出错配的情况下,非标准的碱基对(例如,错配和/或摆动碱基)可用于产生靶向一个以上基因序列的核酸分子。在非限制性实例中,非标准的碱基对如 UU 和 CC 碱基对用于产生能够靶向区别共享序列同源性的 p53 靶标的序列的核酸分子。因此,使用本文所公开的核酸

化合物的一个优势是单一核酸可被设计为包含与在同源基因之间保守的核苷酸序列互补的核酸序列。以这种方法,可使用单一核酸来抑制一个以上基因的表达,而不是使用一个以上核酸分子靶向不同基因。

[1104] 核酸分子可用于靶向对应于一个基因家族或多个基因家族如 p53 家族基因的保守序列。因此,靶向多个 p53 靶标的核酸分子可提供增强的治疗作用。此外,核酸可用于表征多种应用中基因功能的路径。例如,在基因功能分析、mRNA 功能分析或翻译分析中,核酸分子可用于抑制路径中的靶基因的活性以确定未表征的基因的功能。核酸分子可用于确定针对药物开发的涉及各种疾病和病状中的潜在靶基因路径。核酸分子可用于理解涉及各种疾病和病状中的基因表达路径。

[1105] 在一个实施方案中,本文提供的核酸化合物、组合物和方法抑制 p53 多肽,由此抑制选自包括以下的组:抑制功能(此尤其可通过用天然基因/多肽的已知相互作用物进行酶促测定或结合测定来考查)、下调蛋白质或抑制蛋白质(此尤其可通过蛋白质印迹、ELISA 或免疫沉淀来考查)和抑制 mRNA 表达(此尤其可通过 RNA 印迹、定量 RT-PCR、原位杂交或微阵列杂交来考查)。

[1106] 在一个实施例中,本文所提供的组合物和方法包括具有针对 p53RNA 的 RNAi 活性的核酸分子,其中所述核酸分子包括与具有 p53 编码序列的任何 RNA 互补的序列,如 SEQ ID NO:1-7 中所列出的序列。在另一个实施方案中,核酸分子可具有针对 p53RNA 的 RNAi 活性,其中所述核酸分子包括与具有变体 p53 编码序列的 RNA 互补的序列,例如未在 SEQ ID NO:1-7 中示出但本领域中已知与如本文所述的疾病/病症/病状的发作和/或维持和/或发展相关的其它突变 p53 基因。如本文所述的化学修饰可应用于本文所公开的任何核酸构建体。在另一个实施方案中,本文所公开的核酸分子包括可与 p53 基因的核苷酸序列相互作用并由此介导 p53 基因表达的下调或沉默的核苷酸序列,例如,其中所述核酸分子通过调节所述基因的染色质结构或甲基化模式并阻止所述基因转录的细胞过程来介导 p53 基因表达的调节。

[1107] 更具体地,提供具有表 1 中列出的有义链和反义链序列(SEQ ID NO:8-33)或其同源物的双链核酸分子,其中每个末端区域中的一至两个核糖核苷酸被改变。

[1108] 递送和制剂

[1109] 本发明的核酸分子可通过直接应用与载体或稀释剂一起制备的裸分子来递送至靶组织中。

[1110] 术语“裸核酸”或“裸 dsRNA”或“裸 siRNA”是指不含任何用于协助、促进或有助于进入细胞中的递送媒介物(包括病毒序列、病毒粒子、脂质体制剂、脂质转染剂(lipofectin)或沉淀剂等)的核酸分子。例如,PBS 中的 dsRNA 是“裸 dsRNA”。

[1111] 本文公开的核酸分子或其药学上可接受的盐可直接与用于协助、促进或有助于进入细胞中的载体或稀释剂(包括病毒载体、病毒粒子、脂质体制剂、脂质转染剂或沉淀剂等)一起递送或施用。

[1112] 核酸分子可包括用于向受试者施用的递送媒介物(包括脂质体)、载体和稀释剂及其盐,和/或可存在于药学上可接受的制剂中。在一些实施方案中,本发明的 dsRNA 分子是以脂质体制剂和脂质转染剂制剂等形式递送且可通过为本领域技术人员所熟知的方法来制备。这类方法描述于例如美国专利号 5,593,972、5,589,466 和 5,580,859 中,所述专

利以引用的方式并入本文。

[1113] 已开发了特别旨在增强和改进 siRNA 向哺乳动物细胞中的递送的递送系统（参见例如，Shen 等 *FEBS Let.* 539:111-114(2003)；Xia 等，*Nat. Biotech.* 2002, 20:1006-1010；Reich 等，*Mol. Vision* 2003, 9:210-216；Sorensen 等，*J. Mol. Biol.* 2003. 327:761-766；Lewis 等，*Nat. Gen.* 2002, 32:107-108 和 Simeoni 等，*NAR* 2003, 31, 11:2717-2724）。siRNA 最近已成功用于抑制灵长类动物中的基因表达（参见，例如 Tolentino 等人，*Retina* 24(4):660）。

[1114] 裸或配制的 RNA 分子递送至耳朵（任选地内耳）尤其是通过经鼓膜注射或通过施用配制为滴耳剂的所需化合物来实现。包含 dsRNA 的耳用组合物公开于本申请的受让人的并且以引用的方式整体并入本文的美国公布号 20110142917 中。

[1115] 有助于将核酸引入到所需受试者体内的多肽是本领域中已知的，例如像描述于美国申请公布号 20070155658 中的那些（例如，三聚氰胺衍生物如 2, 4, 6-三胍基三嗪和 2, 4, 6-Tramidosarcocyl 三聚氰胺、聚精氨酸多肽以及包括交替的谷氨酰胺和天冬酰胺残基的多肽）。

[1116] 药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物以及植入载体通常是指不与本发明的活性成分反应的惰性无毒固体或液体填充剂、稀释剂或封装材料并且它们包括脂质体和微球体。适用于本发明的递送系统的实例包括美国专利号 5, 225, 182；5, 169, 383；5, 167, 616；4, 959, 217；4, 925, 678；4, 487, 603；4, 486, 194；4, 447, 233；4, 447, 224；4, 439, 196；以及 4, 475, 196。许多其它的这种植入物、递送系统和模块为本领域技术人员所熟知。

[1117] 在一个具体实施方案中，施用包括全身性施用。在另一个实施方案中，施用包括局部 (topical 或 local) 施用。化合物的植入物也是有用的。制备了液体形式。液体组合物包括具有和不具有有机共溶剂的水溶液、水性或油性混悬液、具有可食用油的乳液以及类似药物媒介物。组合物还可经鼓膜或玻璃体内注射。组合物还可作为滴眼剂或滴耳液施用。

[1118] 用于递送核酸分子的方法描述于以下文献中：Akhtar 等，*Trends Cell Bio.*, 2:139(1992)；*Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, Akhtar 编，(1995)，Maurer 等，*Mol. Membr. Biol.*, 16:129-140(1999)；Hofland 和 Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137:165-192(1999)；以及 Lee 等，*ACS Symp. Ser.*, 752:184-192(2000)；美国专利号 6, 395, 713；6, 235, 310；5, 225, 182；5, 169, 383；5, 167, 616；4, 959, 217；4, 925, 678；4, 487, 603；以及 4, 486, 194 和 Sullivan 等，PCT WO 94/02595；PCT WO 00/03683 和 PCT WO 02/08754；以及美国专利申请公布号 2003077829。这些方案可用于递送几乎任何核酸分子。通过本领域技术人员已知的多种方法可将核酸分子施用到细胞中，所述方法包括但不限于封装于脂质体中、通过离子导入法或通过并入到其它媒介物中，所述媒介物如生物可降解的聚合物、水凝胶、环糊精（参见例如，Gonzalez 等，*Bioconjugate Chem.*, 10:1068-1074(1999)；Wang 等，国际 PCT 公布号 WO 03/47518 和 WO 03/46185）、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 和 PLGA 微球（参见例如美国专利号 6, 447, 796 和美国申请公布号 2002130430）、生物可降解的纳米胶囊以及生物粘附微球）或者通过蛋白质载体 (O'Hare 和 Normand, 国际 PCT 公布号 WO 00/53722)。或者，通过直接注射或通过使用输液泵来局部递送核酸 / 媒介物组合。直接注射本发明的核酸分子，无论是

玻璃体内、皮下、经鼓膜、肌肉内或皮肤内,都可使用标准针头和注射器方法或通过无针技术来进行,所述无针技术如在 Conry 等, Clin. Cancer Res., 5:2330-2337(1999) 和 Barry 等, 国际 PCT 公布号 W099/31262 中所述的那些。本发明的分子可用作药剂。药剂预防受试者的疾病病况、调节疾病病况的发生或治疗疾病病况或将症状减轻至一定程度(优选为全部症状)。在本发明的一个具体实施方案中,可选择局部和经皮制剂。

[1119] 本文公开的核酸化合物、或所述化合物的药学上可接受的盐或包含所述化合物的组合物或包含所述化合物的药学上可接受的盐的组合物是根据良好医学规范,在考虑个别受试者的临床病状、待治疗的疾病、施用部位和方法、施用时程、患者年龄、性别、体重和医学从业者已知的其它因素下来施用和给药。

[1120] 核酸分子可与阳离子脂质复合、包装在脂质体中或者以其它方式递送至靶细胞或组织。在有或没有并入到生物聚合物中的情况下,通过直接真皮应用、经皮应用或注射,可将核酸或核酸复合物离体或体内局部施用到相关组织中。

[1121] 递送系统可包括含有聚(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)。这些制剂提供了一种用于增加药物在靶组织中的积累的方法。此类药物载体耐受由单核吞噬细胞系统(MPS 或 RES)进行的调理作用和消除,借此使封装药物的血液循环时间能够更长并且增强其组织暴露(Lasic 等 Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata 等, Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。

[1122] 核酸分子可与聚乙烯亚胺(例如直链或支链 PEI)和/或聚乙烯亚胺衍生物,包括例如聚乙烯亚胺-聚乙二醇-N-乙酰半乳糖胺(PEI-PEG-GAL)或聚乙烯亚胺-聚乙二醇-三-N-乙酰半乳糖胺(PEI-PEG-triGAL)衍生物、接枝 PEI 如半乳糖 PEI、胆固醇 PEI、抗体衍生的 PEI 以及其聚乙二醇 PEI(PEG-PEI)衍生物一起配制或复合(参见例如 Ogris 等, 2001, AAPS PharmSci, 3, 1-11; Furgeson 等, 2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847; Kunath 等, 2002, Pharmaceutical Research, 19, 810-817; Choi 等, 2001, Bull. Korean Chem. Soc., 22, 46-52; Bettinger 等, 1999, Bioconjugate Chem., 10, 558-561; Peterson 等, 2002, Bioconjugate Chem., 13, 845-854; Erbacher 等 1999, Journal of Gene Medicine Preprint, 1, 1-18; Godbey 等, 1999, PNAS USA, 96, 5177-5181; Godbey 等, 1999, Journal of Controlled Release, 60, 149-160; Diebold 等, 1999, Journal of Biological Chemistry, 274, 19087-19094; Thomas 和 Klibanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-14645; Sagara, 美国专利号 6,586,524 和美国专利申请公布号 20030077829)。

[1123] 核酸分子可与膜破裂试剂复合,所述试剂如美国专利申请公布号 20010007666 中所述的那些。一种或多种膜破裂试剂和核酸分子还可与阳离子脂质或辅助脂质分子复合,所述脂质分子如美国专利号 6,235,310 中所述的那些脂质。

[1124] 本文公开的核酸分子可施用至中枢神经系统(CNS)或外周神经系统(PNS)。实验已证明了通过神经元对核酸的有效体内摄取。参见例如, Sommer 等, 1998, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75; Epa 等, 2000, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 10, 469; Broaddus 等, 1998, J. Neurosurg., 88(4), 734; Karle 等, 1997, Eur. J. Pharmacol., 340(2/3), 153; Bannai 等, 1998, Brain Research, 784(1, 2), 304; Rajakumar 等, 1997, Synapse, 26(3), 199; Wu-pong 等, 1999, BioPharm, 12(1), 32; Bannai 等, 1998, Brain Res. Protoc., 3(1), 83; 以及 Simantov 等, 1996, Neuroscience, 74(1), 39。

核酸分子因此可用于递送至 CNS 和 / 或 PNS 中的细胞并且由 CNS 和 / 或 PNS 中的细胞摄取, 例如神经元、巨噬细胞、白质轴突和内皮细胞。

[1125] 递送系统可包括例如水性和非水性凝胶剂、乳膏剂、多种乳液、微乳液、脂质体、软膏剂、水性和非水性溶液、洗剂、气雾剂、烃基质以及散剂, 并且可含有赋形剂如增溶剂、渗透促进剂 (例如, 脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇以及氨基酸) 以及亲水聚合物 (例如, 聚卡波非和聚乙烯吡咯烷酮)。在一个实施方案中, 药学上可接受的载体是脂质体或透皮促进剂。可与本发明的化合物一起使用的脂质体的非限制性实例包括以下: (1) CellFectin, 阳离子脂质 N, NI, NII, NIII- 四甲基 -N, NI, NII, NIII- 四软脂酰 -y- 精胺和二油酰基磷脂酰 - 乙醇胺 (DOPE) (GIBCO BRL) 的 1:1.5 (M/M) 脂质体制剂; (2) Cytofectin GSV, 阳离子脂质和 DOPE (Glen Research) 的 2:1 (M/M) 脂质体制剂; (3) DOTAP (N-[1-(2, 3- 二油酰氧基) -N, N, N- 三 - 甲基 - 甲基硫酸铵] (Boehringer Mannheim); 以及 (4) Lipofectamine, 聚阳离子脂质 DOSPA、中性脂质 DOPE (GIBCO BRL) 和二烷基化氨基酸 (DiLA2) 的 3:1 (M/M) 脂质体制剂。

[1126] 递送系统可包括贴剂、片剂、栓剂、阴道栓剂、凝胶、水性和非水性溶液、洗剂和乳膏剂, 并且可包含赋形剂如增溶剂和促进剂 (例如, 丙二醇、胆汁盐和氨基酸), 以及其它媒介物 (例如, 聚乙二醇、甘油、脂肪酸酯和衍生物, 以及亲水性聚合物如羟丙基甲基纤维素和透明质酸)。

[1127] 核酸分子可包含生物缀合物, 例如如在 Vargeese 等, 美国序列号 10/427, 160; 美国专利号 6, 528, 631; 美国专利号 6, 335, 434; 美国专利号 6, 235, 886; 美国专利号 6, 153, 737; 美国专利号 5, 214, 136; 美国专利号 5, 138, 045 中所述的核酸缀合物。

[1128] 本文所公开的组合物、方法和试剂盒可包括表达载体, 所述载体包含以允许核酸分子表达的方式编码本发明的至少一种核酸分子的核酸序列。将核酸分子或能够表达双链寡核苷酸化合物的链的一种或多种载体引入到细胞环境中的方法将取决于细胞的类型及其环境的组成。可将核酸分子或载体构建体直接引入到细胞中 (即, 细胞内); 或者细胞外引入到腔、间隙空间中、到生物体循环中, 口服引入, 或者可通过在含有核酸化合物的溶液中洗涤生物体或细胞而引入。所述细胞优选地是哺乳动物细胞; 更优选人细胞。表达载体的核酸分子可包含有义区和反义区。反义区可包含与编码 p53 基因的 RNA 或 DNA 序列互补的序列; 并且有义区可包含与所述反义区互补的序列。核酸分子可包含具有互补的有义区和反义区的两条不同的链。核酸分子可包含具有互补的有义区和反义区的单链。

[1129] 与靶 RNA 分子相互作用并下调编码靶 RNA 分子 (例如, mRNA, SEQ ID NO: 1-7) 的 p53 基因的核酸分子可由插入到 DNA 或 RNA 载体中的转录单元来表达。重组载体可以是 DNA 质粒或病毒载体。表达病毒载体的核酸分子可基于但不限于腺相关病毒、逆转录病毒、腺病毒或甲病毒来构建。能够表达核酸分子的重组载体可如本文所述进行递送并存留于靶细胞中。或者, 可使用提供核酸分子的瞬时表达的病毒载体。必要时, 这类载体可重复施用。一旦表达, 则核酸分子经由例如 RNA 干扰 (RNAi) 结合和下调基因功能或表达。核酸分子表达载体的递送可以是全身性的, 如通过静脉内或肌肉内施用、通过局部施用、通过施用到从受试者中取出的靶细胞之后再次引入到所述受试者体内、或者通过允许引入到所需靶细胞中的任何其它方式。

[1130] 表达载体可包含以允许核酸分子表达的方式编码本文所公开的至少一种核酸分

子的核酸序列。例如,所述载体可包含编码包括双链体的核酸分子的两条链的序列。所述载体也可包含编码自身互补的单一核酸分子的序列并且因此形成核酸分子。这类表达载体的非限制性实例描述在以下文献中:Paul 等,2002,Nature Biotechnology,19,505; Miyagishi 和 Taira,2002,Nature Biotechnology,19,497;Lee 等,2002,Nature Biotechnology,19,500;以及 Novina 等,2002,Nature Medicine,advance online publication doi:10.1038/nm725。表达载体也可包含在哺乳动物(例如,人)细胞中。

[1131] 表达载体可编码核酸双链体的一条链或两条连或自身杂交成核酸双链体的单一自身互补的链。编码核酸分子的核酸序列可以允许所述核酸分子表达的方式可操作地连接(参见例如 Paul 等,2002,Nature Biotechnology,19,505; Miyagishi 和 Taira,2002,Nature Biotechnology,19,497;Lee 等,2002,Nature Biotechnology,19,500;以及 Novina 等,2002,Nature Medicine,advance online publication doi:10.1038/nm725)。

[1132] 表达载体可包含以下中的一种或多种:a) 转录起始区(例如,真核 pol I、II 或 III 起始区);b) 转录终止区(例如,真核 pol I、II 或 III 终止区);c) 内含子以及 d) 编码所述核酸分子中的至少一种的核酸序列,其中所述序列以允许所述核酸分子的表达和/或递送的方式可操作地连接至起始区和终止区。所述载体可任选地包含用于蛋白质的可操作地连接在编码核酸分子的序列的 5' 侧或 3' 侧上的开放阅读框(ORF);和/或内含子(插入序列)。

[1133] 核酸分子序列的转录可由真核 RNA 聚合酶 I(pol I)、RNA 聚合酶 II(pol II) 或 RNA 聚合酶 III(pol III) 的启动子来驱动。来自 pol II 或 pol III 启动子的转录物在所有细胞中以高水平进行表达;在给定的细胞类型中给定的 pol II 启动子的水平取决于附近所存在的基因调控序列(增强子、沉默子等)的性质。也使用原核 RNA 聚合酶启动子,条件是原核 RNA 聚合酶在适当细胞中表达(Elroy-Stein 和 Moss,1990,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7;Gao 和 Huang 1993,Nucleic Acids Res., 21, 2867-72;Lieber 等,1993,Methods Enzymol., 217, 47-66;Zhou 等,1990,Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37)。若干研究者已证明由这类启动子表达的核酸分子可在哺乳动物细胞中起作用(例如,Kashani-Sabet 等,1992,Antisense Res. Dev., 2, 3-15;Ojwang 等,1992,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6;Chen 等,1992,Nucleic Acids Res., 20, 4581-9;Yu 等,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4;L' Huillier 等,1992,EMBO J., 11, 4411-8;Lisziewicz 等,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 90, 8000-4;Thompson 等,1995,Nucleic Acids Res., 23, 2259;Sullenger&Cech,1993,Science, 262, 1566)。更具体地说,转录单元如来源于编码 U6 小核(snRNA)、转运 RNA(tRNA) 和腺病毒 VA RNA 的基因的转录单元适用于在细胞中产生高浓度的所需 RNA 分子如 siNA(Thompson 等,见上文;Couture 和 Stinchcomb,1996,见上文;Noonberg 等,1994,Nucleic Acid Res., 22, 2830;Noonberg 等,美国专利号 5,624,803;Good 等,1997,Gene Ther., 4, 45;Beigelman 等,国际 PCT 公布号 WO 96/18736)。上述核酸转录单元可并入到多种载体中以用于引入到哺乳动物细胞中,所述载体包括但不限于质粒 DNA 载体、病毒 DNA 载体(如腺病毒或腺相关病毒载体)或者病毒 RNA 载体(如逆转录病毒或甲病毒载体)(参见 Couture 和 Stinchcomb,1996 见上文)。

[1134] 核酸分子可在细胞内由真核启动子表达(例如 Izant 和

Weintraub, 1985, *Science*, 229, 345 ; McGarry 和 Lindquist, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 83, 399 ; Scanlon 等 , 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10591-5 ; Kashani-Sabet 等 , 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15 ; Dropulic 等 , 1992, *J. Virol.*, 66, 1432-41 ; Weerasinghe 等 , 1991, *J. Virol.*, 65, 5531-4 ; Ojwang 等 , 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-6 ; Chen 等 , 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 4581-9 ; Sarver 等 , 1990 *Science*, 247, 1222-1225 ; Thompson 等 , 1995, *Nucleic Acids Res.*, 23, 2259 ; Good 等 , 1997, *Gene Therapy*, 4, 45。本领域的技术人员认识到任意核酸可在真核细胞中由适当 DNA/RNA 载体来表达。可通过经由酶性核酸使其从初级转录物中释放来增强这类核酸的活性 (Draper 等, PCT W093/23569 和 Sullivan 等, PCT WO 94/02595 ; Ohkawa 等 , 1992, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 27, 15-6 ; Taira 等 , 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19, 5125-30 ; Ventura 等 , 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 3249-55 ; Chowrira 等 , 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 25856)。

[1135] 包装到病毒粒子中的病毒构建体会同时实现表达构建体到细胞中的有效引入和由表达构建体编码的 dsRNA 构建体的转录。

[1136] 用于口服引入的方法包括直接混合 RNA 和生物体的食物以及其中将用作食物的物质进行工程改造来表达 RNA、然后饲喂给欲受影响的生物体的工程改造方法。可使用物理方法将核酸分子溶液引入到细胞中。引入核酸的物理方法包括注射含有核酸分子的溶液、利用由核酸分子覆盖的粒子进行轰击、在 RNA 溶液中浸泡细胞或生物体或者在核酸分子存在下对细胞膜进行电穿孔。在一个实施方案中, 本文提供包含本文所公开的核酸分子的细胞。

[1137] 可使用本领域已知的用于将核酸引入到细胞中的其它方法, 如化学介导的转运如磷酸钙等。因此, 核酸分子可连同执行以下活性中的一种或多种的组分一起引入 : 增强细胞的 RNA 摄取、促进双链体链的退火、使退火的链稳定或以其它方式增强靶基因的抑制 / 下调。

[1138] 聚合纳米胶囊或微胶囊有助于将封装或结合的 dsRNA 运输并释放到细胞中。其包括聚合和单体材料, 尤其包括聚氰基丙烯酸丁酯。材料和制备方法的概述已被公布 (参见 Kreuter, 1991)。由单体和 / 或寡聚体前体在聚合作用 / 纳米粒子产生步骤中形成的聚合材料根据现有技术本身是已知的, 聚合材料的分子量和分子量分布也是已知的, 制造纳米粒子领域中的技术人员可根据常见技术对其进行适当选择。

[1139] 可将核酸分子配制成微乳液。微乳液是水、油和两亲分子的系统, 它是单一光学各向同性和热力学稳定的液体溶液。通常通过首先在水性表面活性剂溶液中分散油并且然后添加足够量的第 4 个组分 (通常为中等链长度的醇) 以形成透明的系统来制备微乳液。

[1140] 可在微乳液的制备中使用的表面活性剂包括但不限于单独或与共表面活性剂组合的离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂、Brij96、聚氧乙烯油烯醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油单月桂酸酯 (ML310)、四甘油单油酸酯 (M0310)、六甘油单油酸酯 (P0310)、六甘油五油酸酯 (P0500)、十甘油单癸酸酯 (MCA750)、十甘油单油酸酯 (M0750)、十甘油倍半油酸酯 (S0750)、十甘油十油酸酯 (DA0750)。所述共表面活性剂, 通常为短链醇如乙醇、1-丙醇以及 1-丁醇, 用于通过渗入表面活性剂薄膜并随后由于表面活性剂分子间产生的孔隙空间而形成无序薄膜来增加界面流动性。

[1141] 递送制剂可包含水溶性可降解交联聚合物,所述交联聚合物可包含一个或多个可降解的交联脂质部分、一个或多个 PEI 部分和 / 或一个或多个 mPEG (PEG (甲氧基聚 (乙二醇) 的甲基醚衍生物))。

[1142] 剂量

[1143] 适用于施用的剂量和施用的具体模式将根据以下这类因素而变化 :如细胞类型或用于体内使用、年龄、体重和具体动物及其待治疗的区域、所使用的具体核酸和递送方法、所涵盖的治疗或诊断用途以及制剂形式 (例如,悬浮液、乳液、胶束或脂质体),如对于本领域技术人员而言将是显示易见的。通常,以较低水平施用剂量,并且增加剂量直到实现所需的作用。

[1144] 出于本文的目的“治疗有效剂量”因此由如本领域中已知的这类考虑确定。剂量必须有效实现改善,包括但不限于存活率改善或更快速康复、或症状改善或消除和如由本领域技术人员选作适当量度的其它指标。

[1145] 可引入适量核酸分子,且这些量可使用标准方法凭经验确定。细胞环境中的个别核酸分子物质的有效浓度可以是约 1 飞摩尔、约 50 飞摩尔、100 飞摩尔、1 皮摩尔、1.5 皮摩尔、2.5 皮摩尔、5 皮摩尔、10 皮摩尔、25 皮摩尔、50 皮摩尔、100 皮摩尔、500 皮摩尔、1 纳摩尔、2.5 纳摩尔、5 纳摩尔、10 纳摩尔、25 纳摩尔、50 纳摩尔、100 纳摩尔、500 纳摩尔、1 微摩尔、2.5 微摩尔、5 微摩尔、10 微摩尔、100 微摩尔或更高。

[1146] 一般来说,在单次剂量、每天一次剂量或每天两次或三次或更多次持续 1-4 周或更长的一段时间的方案中,用于人的核酸化合物的活性剂量是在 1ng/kg 至约 20-100 毫克 / 千克 (mg/kg) 受体体重 / 天,优选约 0.01mg 至约 2-10mg/kg 受体体重 / 天的范围内。核酸分子的适合剂量单位可在每天每千克受体体重 0.001 至 0.25 毫克的范围内、或在每天每千克体重 0.01 至 20 微克的范围内、或在每天每千克体重 0.01 至 10 微克的范围内、或在每天每千克体重 0.10 至 5 微克的范围内、或在每天每千克体重 0.1 至 2.5 微克的范围内。剂量可以是每 kg 体重 0.01ug 至 1g (例如,每 kg 体重 0.1ug、0.25ug、0.5ug、0.75ug、1ug、2.5ug、5ug、10ug、25ug、50ug、100ug、250ug、500ug、1mg、2.5mg、5mg、10mg、25mg、50mg、100mg、250mg 或 500mg)。

[1147] 数量级为每天每千克体重约 0.1mg 至约 140mg 的剂量水平适用于治疗以上指示的病症 (每天每名受试者约 0.5mg 至约 7g)。可与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量视所治疗宿主和特定施用模式而变化。剂量单位形式通常含有约 1mg 至约 500mg 之间的活性成分。

[1148] 应了解的是用于任何特定受试者的具体剂量水平取决于多种因素,包括所用具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、膳食、施用时间、施用途径以及排泄速率、药物组合和经受疗法的特定疾病的严重性。

[1149] 包含本文所公开的核酸分子的药物组合物可每天一次 (QD)、每天两次 (bid)、每天三次 (tid)、每天四次 (qid) 或以任意时间间隔施用并持续在医学上适当的任意一段持续时间。然而,治疗剂也可以含有以适当间隔整天施用的两次、三次、四次、五次、六次或更多亚剂量的剂量单位来给药。在所述情况下,各亚剂量中含有的核酸分子可相应地较少以实现总体每日剂量单位。剂量单位也可被混配成历经数天的单次剂量,例如使用历经数天时期提供持续和一致 dsRNA 释放的常规持续释放制剂。持续释放制剂在本领域中是众所周

知的。所述剂量单位可含有对应的多个每日剂量。组合物可以使得多个单位的核酸一起的总和含有足够剂量的方式混配。

[1150] 药物组合物、试剂盒和容器

[1151] 也提供包括如本文提供的用于下调 p53 基因表达以用于向患者施用或分配核酸分子的核酸分子（例如，siNA 分子）的组合物、试剂盒、容器和制剂。试剂盒可包括至少一个容器和至少一个标签。适合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可由如玻璃、金属或塑料的多种材料形成。所述容器可容纳核酸序列，和 / 或出于相关的实验室、预测、诊断、预防和治疗目的所需的任何其它组分。用于这类用途的指示和 / 或方向可包括在这种容器上或与这种容器一起包括，如可用于这些目的的试剂和其它组合物或工具。

[1152] 容器可或者容纳有效治疗、诊断、预测或防治病状的组合物且可具有无菌入口（例如容器可以是具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶）。组合物中的活性剂优选地包含能够特异性地结合 p53mRNA 和 / 或下调 p53 基因的功能的核酸分子。

[1153] 试剂盒可进一步包括第二容器，所述第二容器包含药学上可接受的缓冲剂，如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和 / 或右旋糖溶液。它可进一步包含从商业或使用者的立场来看合乎需要的其它材料，包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、搅拌器、针、注射器和 / 或具有关于使用的指示和 / 或说明的包装说明书。

[1154] 联邦法律规定药物组合物在人的疗法中的使用应获得联邦政府机构的批准。在美国，强制执行是食品和药品管理局的责任，所述机构颁布了用于保护这种批准的适当法规，详见 21 U.S.C. § 301-392。根据 42 U.S.C. § 262 提供了生物材料的法规，所述生物材料包括由动物组织所制成的产品。大多数外国国家要求相似的批准。法规随着国家不同而变化，但是个别程序对于本领域技术人员而言已熟知，并且因此本文所提供的组合物和方法优选遵循。

[1155] 本文公开的核酸分子可单独或其它疗法组合用于治疗与 p53 相关的疾病、病状或病症，如耳、前庭感觉系统中的疾病、损伤、病状或病理学，以及涉及或将响应于细胞或组织中的 p53 水平的任何其它疾病或病状。如此，本文所公开的组合物、试剂盒和方法可包括包装本文所公开的核酸分子，其包含标签或包装说明书。所述标签可包括使用核酸分子如用于治疗或预防疾病、病症、损伤和病状，包括但不限于本文公开的任何疾病或病状的指示。所述标签可包括使用核酸分子如用于治疗或预防或减弱所述疾病、损伤或病状的指示。所述标签可包括使用核酸分子，如单独或其它疗法组合用于治疗或预防涉及或将响应于细胞或组织中的 p53 水平的任何其它疾病或病状的指示。标签可包括用于减少和 / 或下调 p53 表达的指示。“包装说明书”是用于表示通常包含在治疗产品的商业包装中的说明，其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与包装的产品组合的其它治疗产品和 / 或涉及使用这些治疗产品的提醒等信息。

[1156] 本领域技术人员将认识到本领域已知的其它治疗、药物和疗法可容易地与本文的核酸分子（例如 dsNA 分子）组合并因此涵盖在本文中。

[1157] 治疗方法

[1158] 另一方面，本发明涉及一种用于治疗需要治疗与 p53 基因的异常表达相关的疾病或病症的受试者的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的抑制剂，所述抑制剂降低或抑制 p53 基因的表达。

[1159] 在一个实施方案中,核酸分子可用于下调或抑制与疾病或病状(例如,局部缺血)相关的 p53 基因和 / 或 p53 蛋白的表达和 / 或单倍型多态性。对 p53 基因和 / 或蛋白质或 RNA 水平的分析可用于鉴别具有这类多态性的受试者或处于发展本文所述的性状、病状或疾病的风险的那些受试者。这些受试者适合治疗,例如用本文所公开的核酸分子和适用于治疗与 p53 基因表达有关的疾病的任何其它组合物进行治疗。因此,对 p53 基因和 / 或蛋白质或 RNA 水平的分析可用于确定治疗受试者的治疗类型和疗程。对蛋白质或 RNA 水平的监测可用于预测治疗结果和确定调节与性状、病状或疾病相关的某些基因和 / 或蛋白质的水平和 / 或活性的化合物和组合物的功效。

[1160] 在一些实施方案中,本文公开的核酸化合物用于在使转录成 SEQ ID NO:1-7 中任一个中列出的 mRNA 的 p53 基因的表达相较于对照下调至少 40%、优选 50%、60% 或 70%,更优选 75%、80% 或 90% 的方法,所述方法包括使 p53 基因的 mRNA 转录物与一种或多种所述化合物接触。

[1161] 在各个实施方案中,本文公开的核酸化合物抑制 p53 基因,由此抑制选自包括以下的组:抑制基因功能、抑制多肽和抑制 mRNA 表达。

[1162] 在一个实施方案中,本文公开的核酸化合物抑制 p53 多肽,由此抑制选自包括以下的组:抑制功能(此例如尤其通过用天然基因 / 多肽的已知相互作用物进行酶促测定或结合测定来考查)、抑制蛋白质(此尤其例如通过蛋白质印迹、ELISA 或免疫沉淀来考查)和抑制 mRNA 表达(此尤其例如通过 RNA 印迹、定量 RT-PCR、原位杂交或微阵列杂交来考查)。

[1163] 在一个实施方案中,本文公开的核酸化合物下调哺乳动物 p53 多肽,由此下调选自包括以下的组:下调功能(此例如尤其通过用天然基因 / 多肽的已知相互作用物进行酶促测定或结合测定来考查)、下调蛋白质(此尤其例如通过蛋白质印迹、ELISA 或免疫沉淀来考查)和下调 mRNA 表达(此尤其例如通过 RNA 印迹、定量 RT-PCR、原位杂交或微阵列杂交来考查)。

[1164] 抑制 p53 基因或多肽的方法、分子和组合物在本文中详细地讨论,并且任何所述分子和 / 或组合物有益地用于治疗患有任何所述病状的患者。应明确理解的是,已知化合物不包括在本公开中。使用已知化合物和组合物的新型治疗方法在本公开的范围。所述方法包括施用治疗有效量的一种或多种本文所公开的下调 p53 基因的表达的核酸化合物。在所述方法的一些实施方案中,本文公开的核酸化合物用于治疗与暴露于毒性剂相关的疾病、病症或病状,“暴露于毒性剂”是指使毒性剂可用于哺乳动物或与哺乳动物接触。毒性剂可对神经系统有毒。暴露于毒性剂可通过直接施用,例如通过摄取或施用食物、药品或治疗剂(例如化学治疗剂),通过偶然性污染或通过环境暴露(例如,空气或水性暴露)来发生。

[1165] 还提供一种制备药物组合物的方法,所述方法包括:

[1166] 提供本文所公开的一种或多种核酸分子,或其药学上可接受的盐;以及

[1167] 将所述分子或所述其盐与药学上可接受的载体混合。

[1168] 在一个优选实施方案中,将用于制备药物组合物的分子以药学上有效剂量与载体混合。在一个具体实施方案中,将本文所公开的核酸化合物缀合于类固醇或脂质或另一适合分子,例如缀合于胆固醇。

[1169] 提供用于通过使用如本文所提供的核酸分子来下调 p53 表达的组合物和方法,所述核酸分子如但不限于能够下调 p53 基因表达或能够介导针对 p53 基因表达的 RNA 干扰的短干扰核酸 (siNA)、干扰 RNA (RNAi)、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微 RNA (miRNA) 以及短发夹 RNA (shRNA) 分子。

[1170] 本文所公开的组合物和方法也适用于治疗各种病状或疾病,例如像本文所述的病症、疾病和损伤。

[1171] 本文所公开的核酸分子可个别地或与其它药物组合或结合用于预防或治疗与 p53 相关的疾病、性状、病状和 / 或病症,如但不限于本文所述的疾病、病症和损伤。

[1172] 本文所公开的核酸分子能够以序列特异性方式下调 p53 基因的表达。核酸分子可包含有义链和反义链,所述链包含至少部分与 p53mRNA (例如 SEQ ID NO:1-7) 的一部分互补 (反义) 的连续核苷酸。

[1173] 在一些实施方案中,对 p53 特异的核酸化合物可与对其它分子靶标特异的其它治疗剂和 / 或核酸化合物如但不限于各种促凋亡基因结合使用。

[1174] 用于治疗或预防与受试者或生物体中的 p53 表达相关的疾病或病状的方法可包括在适合下调所述受试者或生物体中的 p53 基因的表达的条件下使所述受试者或所述生物体与本文所提供的核酸分子接触。

[1175] 在优选实施方案中,所治疗的受试者是温血动物,且具体来说是包括人的哺乳动物。

[1176] 本文所公开的方法包括以治疗上有效剂量向所述受试者施用一种或多种下调 p53 基因的表达的抑制性化合物;并且具体地说本文所述的核酸化合物以便由此治疗所述受试者。

[1177] 本文所公开的分子,特别是新型的双链核酸化合物下调 p53 的表达并且适用于治疗其中下调 p53 的表达为有益的疾病或病状。下调 p53 的方法、分子和组合物在本文中详细地讨论,并且任何所述分子和 / 或组合物可有益地用于治疗患有任何所述病状的受试者。适用于产生核酸化合物的有义链和反义链寡核苷酸序列在表 1 中列出 (SEQ ID NO:8-33)。具体寡核苷酸化合物在表 A、B 和 E 中列出。在优选的实施方案中,所治疗的受试者是温血动物并且具体来说是包括人的哺乳动物。

[1178] 术语“治疗”是指治疗性处理和防治性或预防性措施两者,其中目标是预防病症或减轻病症的症状,如听力障碍或受损 (或平衡受损),或预防或减少与如本文所列出听力损失相关的疾病相关的细胞死亡。需要治疗者包括已经受疾病或病状者、倾向于患有疾病或病状者和其中疾病或病状待预防者。本文所公开的核酸化合物是在疾病或病状发作之前、期间或之后施用。

[1179] 在一些实施方案中,本文提供的分子和组合物与耳毒素 (ototoxin) 共同施用。例如,提供用于通过施用氨基糖苷抗生素来治疗哺乳动物感染的改进的方法,所述改进包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的一种或多种下调 p53 的表达的化合物 (特别是新型的 siRNA) 以减少或预防耳毒素诱导的与抗生素相关的听力受损。下调 p53 的表达的化合物、特别是新型的 dsRNA 优选地局部施用在内耳中。

[1180] 在另一个实施方案中,提供一种用于通过施用化疗化合物来治疗哺乳动物的癌症的改进的方法,其中所述改进包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的本发明的组合

物以减少或预防耳毒素诱导的与化疗药物相关的听力受损。减少或预防耳毒素诱导的听力受损的化合物,例如本文公开的 dsRNA 分子尤其优选作为媒介物如 PBS 或其它生理溶液中的裸 dsRNA 直接施用至例如耳蜗,但可或者与如上述的递送媒介物一起施用。

[1181] 在一些实施方案中,组合疗法是优选的。组合疗法通过施用两种或更多种药剂(即两种或更多种 dsRNA 或至少一种 dsRNA 和至少一种另外治疗剂)来实现,其中每种单独地配制和施用,或通过在一个制剂中施用两种或更多种药剂来实现。组合疗法还涵盖其它组合。例如,两种药剂可以一起配制并且与含有第三药剂的单独制剂结合施用。虽然在组合疗法中的两种或更多种药剂可同时施用,但是没有必要。例如,第一药剂(或药剂的组合)的施用可先于第二药剂(或药剂的组合)的施用几分钟、几小时、几天或几周。因此,所述两种或更多种药剂可在彼此的几分钟内或在彼此的一个或几个小时内或在彼此的一天或几天内或在彼此的几周内施用。在一些情况下甚至更长的间隔是可能的。用于组合疗法的两种或更多种药剂可以或可以不同时存在于患者体内。组合疗法包括两次或更多次施用用于组合中的一种或多种药剂。例如,如果 dsRNA1 和 dsRNA2 用于组合中,可以任何组合一次或多次顺序地施用它们,例如,按以下顺序: dsRNA1-ds RNA2、dsRNA2-dsRNA1、dsRNA1-dsRNA2-dsRNA1、dsRNA2-dsRNA1-dsRNA2、dsRNA1-dsRNA1-dsRNA2、dsRNA1-dsRNA2-dsRNA2 等。

[1182] 其中本文所公开的化合物适用作治疗剂的某些适应症的细节在本文中描述。

[1183] 本发明已以说明性方式描述了实施方案,且应了解的是所使用的术语意图具有描述而非限制的用词性质。

[1184] 贯穿本申请,通过作者和年份以及专利号引用各种出版物,包括美国专利。这些出版物和专利以及专利申请的公开内容特此以引用方式整体并入本申请以便更全面地描述本公开所属领域的状态。

[1185] 现在将通过参考以下非限制性实施例来更加详细地描述本文所提供的组合物和方法。

实施例

[1186] 在不进一步详细描述下,据信本领域技术人员可在先前描述下在本发明的最大程度上利用本发明。因此,以下优选的具体实施方案应解释为仅具有说明性,而不以任何方式限制所要求保护的本发明。

[1187] 本文未具体描述的本领域中已知的标准分子生物学方案基本上如以下之中加以大体上遵循: Sambrook 等, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York(1989,1992); 以及 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland(1988); 以及 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland(1989); 以及 Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York(1988); 以及 Watson 等, Recombinant DNA, Scientific American Books, New York; 以及 Birren 等(编) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, 第 1-4 卷 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(1998) 以及如美国专利号 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659

和 5,272,057 中阐述的方法,且所述文献和专利以引用的方式并入本文。如标准 PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications,Academic Press,San Diego,CA(1990) 中进行聚合酶链式反应 (PCR)。原位 PCR 与流式细胞术 (FACS) 组合可用于检测含有特定 DNA 和 mRNA 序列的细胞 (Testoni 等,Blood 1996,87:3822.)。进行 RT-PCR 的方法也是在本领域中熟知的。

[1188] 实施例 1:活性 dsRNA 化合物的新型序列的产生

[1189] 使用专有算法和 p53 基因的已知 mRNA 序列 (SEQ ID NO:1-7),产生许多潜在 dsRNA 的序列。

[1190] 所述寡核苷酸序列基于其在专有算法中的分数而优先作为用于靶向人基因表达的最佳预测序列。

[1191] 实施例 2:活性核酸化合物的优选新型序列的鉴别和新型双链核酸化合物的产生

[1192] 最佳评分寡核苷酸序列进一步基于其体外活性而区分优先次序。为此目的,合成具有以下修饰模式的 dsRNA 化合物:

[1193] 通过结尾“_S709”鉴别的 dsRNA 化合物具有在反义链中和有义链中的未修饰的核糖核苷酸,以及在反义链和有义链两者中的 dTdT\$3' 末端突出端,其中 dT 指代胸苷并且 dT\$ 指代无末端磷酸酯的胸苷。

[1194] 通过结尾 _S500 鉴别的 dsRNA 化合物具有以下修饰模式:交替的 2'-O-甲基 (Me) 糖修饰的核糖核苷酸存在于反义链的第一、第三、第五、第七、第九、第十一、第十三、第十五、第十七和第十九位,由此非常相同的修饰,即 2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸存在于有义链的第二、第四、第六、第八、第十、第十二、第十四、第十六和第十八位。

[1195] 通过前缀“p53_3”、“p53_QMON1”和“p53_1”鉴别的 dsRNA 化合物用作对照,这些对照化合物的反义链和有义链的序列提供在表 C 中。

[1196] 表 C

[1197]

dsRNA 名称	有义链 (5' > 3')	反义链 (5' > 3')
p53_3	5' CCGAGUGGAAGGAAAUUG 3'	5' CAAAUUCCUCCACUCGG 3'
A53_13	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	5' AGUAGUUCCAAGGUCUG 3'
p53_1	5' GAGAAUAUUCACCCUUC 3'	5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3'

[1198] 在所有以上和以下表中,双链体名称通过可互换使用的前缀“p53”和“TP53”鉴别。

[1199] 以下测定用于体外活性研究。

[1200] 活性测定

[1201] 将内源性表达 p53 基因的约 $1.5-2 \times 10^5$ 个测试人或大鼠细胞 (人 HCT116 细胞或大鼠 REF52 细胞) 在 6 孔平板中在 1.5ml 生长培养基中生长约 24 小时至 30% -50% 汇合。

[1202] 然后使用 Liopofectamine 2000 试剂,将细胞用测试 dsRNA 化合物以所需最终浓度 0.001-100nM/孔进行转染。

[1203] 为了确定所述研究的转染效率,将 5 个孔用 Lipofectamine 2000 试剂独立地处理

并且定义为“阴性对照样品”，并且将 5 个孔用活性 dsRNA 以 5nM 最终浓度独立地转染并且定义为“对照活性样品”（阳性对照）。Cy3 标记的 siRNA 转染的细胞用作转染效率的阳性对照。

[1204] 然后在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 孵育器中孵育细胞 48–72 小时。收获 dsRNA 转染的细胞并且使用 EZ-RNA 试剂盒 [Biological Industries(#20-410-100)] 分离 RNA。如下进行逆转录：合成 cDNA 并且相应地通过实时 qPCR 测定人和 / 或大鼠 p53mRNA 水平，并且标准化至各样品的亲环蛋白 A (CYNA, PPIA)mRNA 的水平。基于 siRNA 处理的样品中相对于非转染对照样品的 mRNA 量的比率测定 dsRNA 活性。

[1205] 作为活性研究的结果，鉴别了用于下调 p53 基因的新型 dsRNA 化合物的优选序列。这些序列在如上表 1 中列出 (SEQ ID NO:8–33)。(用具有这些序列和具有通过结尾“_S709”鉴别的修饰模式的化合物获得的活性结果呈现在表 D 中。通过结尾“_S709”鉴别的 dsRNA 化合物具有在反义链中和有义链中的未修饰的核糖核苷酸，以及在反义链和有义链两者中的 dTdT\$3' 末端突出端，其中 dT 指代胸苷并且 dT\$ 指代无末端磷酸的胸苷。

[1206] 表 D：

[1207]

样品描述 (所使用的dsRNA 化合物):	dsRNA 化合物的浓度	对照的p53残余 mRNA %
p53_34_S709	80nM	36
p53_34_S709	40nM	44
p53_34_S709	20nM	40
p53_34_S709	4nM	70
p53_35_S709	80nM	49
p53_35_S709	40nM	40
p53_35_S709	20nM	94
p53_35_S709	4nM	119
p53_36_S709	80nM	105
p53_36_S709	40nM	126
p53_36_S709	20nM	144
p53_36_S709	4nM	150
p53_37_S709	80nM	73
p53_37_S709	40nM	58
p53_37_S709	20nM	119

[1208]

样品描述 (所使用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA %
p53_37_S709	4nM	84
p53_38_S709	80nM	65
p53_38_S709	40nM	55
p53_38_S709	20nM	53
p53_38_S709	4nM	122
p53_39_S709	80nM	73
p53_39_S709	40nM	48
p53_39_S709	20nM	67
p53_39_S709	4nM	106
p53_40_S709	80nM	43
p53_40_S709	40nM	58
p53_40_S709	20nM	62
p53_40_S709	4nM	67
p53_41_S709	80nM	35
p53_41_S709	40nM	26
p53_41_S709	20nM	49

[1209]

样品描述 (所使用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA %
p53_41_S709	4nM	67
p53_42_S709	80nM	
p53_42_S709	40nM	84
p53_42_S709	20nM	96
p53_42_S709	4nM	82

[1210] 如表 D 中所示,发现双链核酸化合物 p53_34_S709、p53_35_S709、p53_37_S709、p53_38_S709、p53_39_S709、p53_40_S709、p53_41_S709 和 p53_42_S709 针对靶人 p53 mRNA 具有活性,其中 p53_41_S709 是活性最高的化合物。

[1211] 实施例 3:新型的修饰的双链核酸化合物的产生和测试

[1212] 优选的序列 (SEQ ID NO: 8-33) 用于产生新型的修饰的双链核酸化合物。使用优选的反义链和有义链序列产生的新型的修饰的双链核酸化合物在同上表 A 和 B 中列出。以下表 E 示出使用优选的反义链和有义链序列 (SEQ ID NO: 8-33) 产生的一些优选的新型的修饰的双链核酸化合物。

[1213] 表 E

[1214]

dsRNA 化合物	有义 (N')y 5'→3'	反义 (N)x 5'→3'
TP53_13_S2275	C3-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -C3-pi	5' phos-AGU <u>AGU</u> uUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S2276	C3-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -C3-pi	5' phos-AGU <u>AGU</u> uUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S2277	C3-CAGACCUAUGGAAA <u>euactn</u> -C3-pi	5' phos-AGU <u>AGU</u> uUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S2278	C3-CAGACCUAUGGAAA <u>euactn</u> -C3-pi	5' phos-AGU <u>AGU</u> uUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi

[1215]

dsRNA 化合物	有义(N')y 5'→3'	反义(N)x 5'→3'
TP53_41_S709	GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT ₅	AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT ₅
TP53_41_S2279	C3-GACUCAGACUGACA <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAU <u>g</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2298	C3-GACUCAGACUGACA <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>u</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAU <u>g</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2299	C3-GACUCAGACUGACA <u>u</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>u</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAU <u>g</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2300	C3-GACUCAGACUGACA <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAU <u>g</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_44_S2301	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>u</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>u</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2302	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>u</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>u</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2303	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2304	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3;C3-pi

[1216] 在所有以上和以下表中,双链体名称通过可互换使用的前缀“p53”和“TP53”鉴别。因此,例如通过前缀“p53_13”和“TP53_13”鉴别的化合物指代具有有义链序列 5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' (SEQ ID NO:8) 和反义链序列 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' (SEQ ID NO:21) 的双链核酸化合物。

[1217] 对于表 E 中的所有 dsRNA 化合物:

[1218] A、U、G、C - 指代未修饰的核糖核苷酸;

[1219] A、U、G、C - 指代 2'-O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[1220] a、u、c、g - 指代通过 2' -5' 核苷酸间磷酸酯键连接于相邻核苷酸 (5' >3') 的核苷酸;

[1221] C3 - 指代 1,3- 丙二醇,单(磷酸二氢盐),其还被鉴别为 3- 羟基丙烷 -1- 磷酸酯加帽部分 [CAS RN:13507-42-1]。

[1222] C3C3 - 指代由两个连续 C3 分子组成的加帽部分

[1223] pi - 指代 3' - 磷酸。

[1224] 5' -phos - 指代 5' - 磷酸

[1225] 在人 HCT116 细胞和大鼠 REF52 细胞中研究新型的修饰的双链核酸化合物的活性。

[1226] 表 F1 总结在人 HCT116 细胞系中获得的一些新型的双链核酸分子的体外活性结果。所有的新型 dsRNA 化合物描述于同上表 E 中。p53_13_S500 是出于对比目的使用的已知化合物。p53_13_S500 化合物具有同上表 C 中所述的有义链和反义链序列。

[1227] p53_13_S500 化合物具有以下修饰模式:交替的 2' -O- 甲基 (Me) 糖修饰的核糖核苷酸存在于反义链的第一、第三、第五、第七、第九、第十一、第十三、第十五、第十七和第十九位,由此非常相同的修饰,即 2' -O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸存在于有义链的第二、第四、第六、第八、第十、第十二、第十四、第十六和第十八位。

[1228] 表 F1 中的体外活性被展示为相对于对照的残余靶 mRNA %。

[1229] 表 F1

[1230]

样品描述 (所使用的dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的p53残余 mRNA %
无(对照)		100
p53_13_S500	50nM	25
p53_13_S500	25nM	14
p53_13_S500	5nM	33
p53_13_S500	1nM	55
p53_1_S500	50nM	22
p53_1_S500	25nM	16
p53_1_S500	5nM	52
p53_1_S500	1nM	107
p53_13_S2275	50nM	19
p53_13_S2275	25nM	14
p53_13_S2275	5nM	25
p53_13_S2275	1nM	60

[1231]

样品描述 (所使用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的p53残余 mRNA %
p53_13_S2276	50nM	19
p53_13_S2276	25nM	19
p53_13_S2276	5nM	44
p53_13_S2276	1nM	112
p53_13_S2277	50nM	22
p53_13_S2277	25nM	14
p53_13_S2277	5nM	38
p53_13_S2277	1nM	112
p53_13_S2278	50nM	41
p53_13_S2278	25nM	25
p53_13_S2278	5nM	49
p53_13_S2278	1nM	99
p53_41_S709	50nM	5
p53_41_S709	25nM	8
p53_41_S709	5nM	14
p53_41_S709	1nM	30
p53_41_S2279	50nM	3
p53_41_S2279	25nM	8
p53_41_S2279	5nM	3
p53_41_S2279	1nM	5
p53_41_S2298	50nM	5
p53_41_S2298	25nM	8
p53_41_S2298	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	

[1232]

样品描述 (所使用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA %
p53_41_S2299	50nM	3
p53_41_S2299	25nM	3
p53_41_S2299	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	5
p53_41_S2300	50nM	3
p53_41_S2300	25nM	3
p53_41_S2300	5nM	2
p53_41_S2300	1nM	3
p53_44_S2301	50nM	5
p53_44_S2301	25nM	5
p53_44_S2301	5nM	3
p53_44_S2301	1nM	14
p53_44_S2302	50nM	3
p53_44_S2302	25nM	3
p53_44_S2302	5nM	5
p53_44_S2302	1nM	8
p53_44_S2303	50nM	3
p53_44_S2303	25nM	5
p53_44_S2303	5nM	3
p53_44_S2303	1nM	3
p53_44_S2304	50nM	5
p53_44_S2304	25nM	5
p53_44_S2304	5nM	11
p53_44_S2304	1nM	19

[1233] 在人 HCT116 细胞中进行的体外活性研究的结果显示发现被鉴别为 p53_41_S709、p53_41_S2279、p53_41_S2298、p53_41_S2299、p53_44_S2301、p53_44_S2302、p53_44_S2303

和 p53_44_S2304 的化合物（全部描述于同上表 E 中）在下调人 p53mRNA 方面是活性最高的。

[1234] 表 F2 总结在大鼠 REF52 细胞系中获得的一些新型的双链核酸分子的体外活性结果。

[1235] 表 F2 中的体外活性被展示为相对于对照的残余靶 mRNA %。

[1236] 表 F2

[1237]

样品描述 (所使用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA %
REF52 对照	无	100
p53_13_S500	50nM	26
	25nM	30
	5nM	63
	1nM	68
p53_41_S709	50nM	40
	25nM	87
	5nM	96
	1nM	211
p53_41_S2279	50nM	38
	25nM	20
	5nM	21
	1nM	60
p53_41_S2298	50nM	137
	25nM	81

[1238]

	5nM	71
	1nM	113
p53_41_S2299	50nM	116
	25nM	122
	5nM	107
	1nM	153
p53_41_S2300	50nM	102
	25nM	81
	5nM	112
	1nM	149
p53_44_S2301	50nM	12
	25nM	14
	5nM	25
	1nM	55
p53_44_S2302	50nM	14
	25nM	9
	5nM	18
	1nM	59
p53_44_S2303	50nM	20
	25nM	12
	5nM	12
	1nM	38
p53_44_S2304	50nM	22
	25nM	33
	5nM	
	1nM	

[1239] 在大鼠 REF52 细胞中进行的这一体外活性研究的结果显示发现被鉴别为 p53_44_S2301、p53_44_S2302、p53_44_S2303 和 p53_44_S2304 的化合物（全部描述于同上表 E 中）

在下调大鼠 p53mRNA 方面在本研究中所测试的化合物之中是活性最高的。

[1240] 实施例 4:使用 psiCHECK™-2 - 系统评估新型的双链 RNA 分子的潜在活性

[1241] 制备三个基于 psiCHECK™-2 (Promega) 的构建体以评估潜在活性。psiCHECK 构建体包含匹配的互补指导的单个拷贝 (AS-CM)。将 $1.3-1.5 \times 10^6$ 个人 HeLa 细胞接种于 10cm 培养皿中。然后在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 孵育器中孵育细胞 24 小时。在接种后一天用 8ml 新鲜生长培养基替换生长培养基,并且根据制造商方案使用 lipofectamine™2000 试剂用一种以上提及的质粒转染各板并且在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 5% CO_2 下孵育 5 小时。在孵育之后,将细胞于 $80 \mu\text{l}$ 生长培养基中在每孔 5×10^3 个细胞的最终浓度下再涂铺于 96 孔板中。在 16 小时后,使用 Lipofectamine 2000 试剂,在于 $100 \mu\text{l}$ 最终体积中 0.01nM 至 100nM 范围内的最终浓度下用转染 RNA 化合物转染细胞。然后在如以下所述评估海肾和萤火虫荧光素酶活性之后,在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下孵育细胞 48 小时。

[1242] 在用双链 RNA 化合物转染之后 48 小时,根据制造商工序,使用 Dual-Luciferase® 测定试剂盒 (Promega, 目录号 E1960) 测量各 siRNA 转染的样品中的海肾和萤火虫荧光素酶活性。海肾荧光素酶活性值除以各样品的萤火虫荧光素酶活性值 (标准化)。海肾荧光素酶活性最终表示为相对于在仅用相应 psiCHECK™-2 质粒但无双链 RNA 转染的细胞中获得的标准化值,测试样品中的标准化活性值的百分比。

[1243] 表 G、H 和 I 总结了使用 AS-CM 序列上的 psiCHECK 系统,所获得的一些新型的双链核酸分子的结果 (残余 mRNA%)。所有的新型双链核酸化合物描述于同上表 E 中。

[1244] 表 G、H 和 I 总结了使用 AS-CM 序列上的 psiCHECK 系统,所获得的一些新型的双链核酸分子的结果 (残余 mRNA%)。所有的新型 dsRNA 化合物描述于同上表 E 中。

[1245] 表 G

[1246]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
无(对照)		100
TP53_41_S709	100nM	6
TP53_41_S709	33.3nM	5
TP53_41_S709	11.1nM	7
TP53_41_S709	5nM	9
TP53_41_S709	3.7nM	9
TP53_41_S709	1.23nM	11
TP53_41_S709	0.41nM	13
TP53_41_S709	0.137nM	22
TP53_41_S709	0.045nM	26
TP53_41_S709	0.015nM	33
TP53_41_S709	0.005nM	28
TP53_41_S2279	100nM	3
TP53_41_S2279	33.3nM	3
TP53_41_S2279	11.1nM	3
TP53_41_S2279	3.7nM	4
TP53_41_S2279	1.23nM	5
TP53_41_S2279	0.41nM	5
TP53_41_S2279	0.137nM	9
TP53_41_S2279	0.045nM	12
TP53_41_S2279	0.015nM	29
TP53_41_S2279	0.005nM	34

[1247]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
TP53_41_S2298	100nM	4
TP53_41_S2298	33.3nM	4
TP53_41_S2298	11.1nM	5
TP53_41_S2298	3.7nM	5
TP53_41_S2298	1.23nM	7
TP53_41_S2298	0.41nM	11
TP53_41_S2298	0.137nM	18
TP53_41_S2298	0.045nM	36
TP53_41_S2298	0.015nM	50
TP53_41_S2298	0.005nM	57
TP53_41_S2299	100nM	3
TP53_41_S2299	33.3nM	3
TP53_41_S2299	11.1nM	4
TP53_41_S2299	3.7nM	5
TP53_41_S2299	1.23nM	6
TP53_41_S2299	0.41nM	8
TP53_41_S2299	0.137nM	15
TP53_41_S2299	0.045nM	27
TP53_41_S2299	0.015nM	36
TP53_41_S2299	0.005nM	47
TP53_41_S2300	100nM	9
TP53_41_S2300	33.3nM	9
TP53_41_S2300	11.1nM	10

[1248]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
TP53_41_S2300	3.7nM	12
TP53_41_S2300	1.23nM	11
TP53_41_S2300	0.41nM	18
TP53_41_S2300	0.137nM	24
TP53_41_S2300	0.045nM	39
TP53_41_S2300	0.015nM	53
TP53_41_S2300	0.005nM	65

[1249] 表 H

[1250]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
无(对照)		100
p53_13_S500	100nM	6
p53_13_S500	33.3nM	5
p53_13_S500	11.1nM	6
p53_13_S500	3.7nM	8
p53_13_S500	5 nM	5
QHMonI	1.23nM	9
p53_13_S500	0.41nM	11
p53_13_S500	0.137nM	22
p53_13_S500	0.045nM	34
p53_13_S500	0.015nM	38

[1251]

p53_13_S500	0.005nM	48
TP53_13_S2275	100nM	3
TP53_13_S2275	33.3nM	3
TP53_13_S2275	11.1nM	4
TP53_13_S2275	3.7nM	4
TP53_13_S2275	1.23nM	6
TP53_13_S2275	0.41nM	6
TP53_13_S2275	0.137nM	8
TP53_13_S2275	0.045nM	14
TP53_13_S2275	0.015nM	18
TP53_13_S2275	0.005nM	30
TP53_13_S2276	100nM	2
TP53_13_S2276	33.3nM	2
TP53_13_S2276	11.1nM	2
TP53_13_S2276	3.7nM	3
TP53_13_S2276	1.23nM	3
TP53_13_S2276	0.41nM	4
TP53_13_S2276	0.137nM	6
TP53_13_S2276	0.045nM	14
TP53_13_S2276	0.015nM	22
TP53_13_S2276	0.005nM	25
TP53_13_S2277	100nM	3
TP53_13_S2277	33.3nM	3
TP53_13_S2277	11.1nM	3
TP53_13_S2277	3.7nM	3
TP53_13_S2277	1.23nM	4

[1252]

TP53_13_S2277	0.41nM	5
TP53_13_S2277	0.137nM	7
TP53_13_S2277	0.045nM	14
TP53_13_S2277	0.015nM	24
TP53_13_S2277	0.005nM	32
TP53_13_S2278	100nM	2
TP53_13_S2278	33.3nM	2
TP53_13_S2278	11.1nM	3
TP53_13_S2278	3.7nM	2
TP53_13_S2278	1.23nM	3
TP53_13_S2278	0.41nM	3
TP53_13_S2278	0.137nM	7
TP53_13_S2278	0.045nM	14
TP53_13_S2278	0.015nM	18
TP53_13_S2278	0.005nM	27

[1253] 表 I

[1254]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
无(对照)		100
TP53_44_S2301	100nM	5
TP53_44_S2301	33.3nM	5
TP53_44_S2301	11.1nM	6
TP53_44_S2301	3.7nM	7
TP53_44_S2301	1.23nM	9

[1255]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
TP53_44_S2301	0.41nM	15
TP53_44_S2301	0.137nM	27
TP53_44_S2301	0.045nM	40
TP53_44_S2301	0.015nM	47
TP53_44_S2301	0.005nM	49
TP53_44_S2302	100nM	3
TP53_44_S2302	33.3nM	4
TP53_44_S2302	11.1nM	4
TP53_44_S2302	3.7nM	6
TP53_44_S2302	1.23nM	6
TP53_44_S2302	0.41nM	9
TP53_44_S2302	0.137nM	19
TP53_44_S2302	0.045nM	28
TP53_44_S2302	0.015nM	34
TP53_44_S2302	0.005nM	39
TP53_44_S2303	100nM	6
TP53_44_S2303	33.3nM	6
TP53_44_S2303	11.1nM	6
TP53_44_S2303	3.7nM	7
TP53_44_S2303	1.23nM	7
TP53_44_S2303	0.41nM	13
TP53_44_S2303	0.137nM	24
TP53_44_S2303	0.045nM	46

[1256]

样品描述 (所使用的dsRNA化合物)	dsRNA 化合物的 浓度	AS_CM 对照的p53 残余 mRNA %
TP53_44_S2303	0.015nM	47
TP53_44_S2303	0.005nM	73
TP53_44_S2304	100nM	4
TP53_44_S2304	33.3nM	4
TP53_44_S2304	11.1nM	4
TP53_44_S2304	3.7nM	5
TP53_44_S2304	1.23nM	6
TP53_44_S2304	0.41nM	11
TP53_44_S2304	0.137nM	24
TP53_44_S2304	0.045nM	
TP53_44_S2304	0.015nM	37
TP53_44_S2304	0.005nM	31

[1257] psiCHECK™-2 - 系统中的活性研究的结果表明,发现基于 TP53_41 序列、TP53_13 序列和 TP53_44 序列的所有双链核酸化合物是高度活性的。

[1258] 实施例 5 :动物模型

[1259] 测试本发明的活性 siRNA 可在预测动物模型中进行。

[1260] 急性肾衰竭 (ARF) 的模型系统

[1261] 测试本文所公开的用于治疗急性肾衰竭 (ARF) 的活性核酸化合物可使用脓毒症诱导的 ARF 或局部缺血 - 再灌注诱导的 ARF 来进行。

[1262] 1. 脓毒症诱导的 ARF

[1263] 脓毒症诱导的 ARF 的两个预测动物模型由 Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, Kidney Int. Nov; 64(5):1620-31 描述。这两个模型是小鼠中、优选老年小鼠中的脂多糖施用和盲肠结扎穿刺。

[1264] 2. 局部缺血 - 再灌注诱导的 ARF

[1265] 这一预测动物模型由 Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 年 1 月描述。P53 介导在肾局部缺血 - 再灌注后对 GTP 消减的凋亡响应: protective role of a p53 inhibitor, J Am Soc Nephrol. ;14(1):128-38。

[1266] 在 45 分钟两侧肾动脉钳紧并且随后释放所述夹具以允许 24 小时再灌注之后在大鼠中诱导局部缺血 - 再灌注损伤。在钳紧之前 2 小时和之后 30 分钟将 250 μ g 的测试核酸化合物注射到颈静脉中。在钳紧之后 4 和 8 小时时经由尾静脉给予另外 250 μ g 测试核酸化合物。针对 GFP 的核酸化合物用作阴性对照。在外科手术之前和之后 24 小时通过测量血清肌酸酐水平监测 ARF 进展。在实验结束时, 将大鼠通过留置股骨线用温热 PBS、接着用 4% 多聚甲醛进行灌注。将左肾去除并且储存在 4% 多聚甲醛中以用于随后的组织学分析。急性肾衰竭经常被定义为与基线相比, 血清肌酸酐水平的急性增加。血清肌酸酐的至少 0.5mg/dL 或 44.2 μ mol/L 的增加被认为是急性肾衰竭的指征。在外科手术之前时间零时和在 ARF 手术后 24 小时时测量血清肌酸酐。

[1267] 为了研究核酸化合物在大鼠肾中的分布, 将 Cy3- 标记的核酸化合物分子 (2mg/kg) 静脉内施用 3-5 分钟, 在其之后使用双光子共聚焦显微镜进行体内成像。

[1268] 通过分析肾组织中肾小管坏死的程度来进一步确定核酸化合物对肾局部缺血 - 再灌注损伤的作用。肾小管坏死可被计分为: 无损伤 (损伤计分 0), 单细胞、片状分离坏死 (损伤计分 1)、少于 25% 的组织中的肾小管坏死 (损伤计分 2)、在 25% 与 50% 之间的组织中的肾小管坏死 (损伤计分 3) 和大于 50% 的组织中的肾小管坏死 (损伤计分 4)。

[1269] 在这些急性肾衰竭 (ARF) 模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物, 其中发现它们可有效治疗 ARF。

[1270] 化学疗法诱导的内耳毛细胞死亡的模型系统

[1271] 1. 卡铂诱导的内毛细胞损失的模型系统

[1272] 通过将盐水中的测试核酸化合物 (1、10 和 30 μ g) 直接施用至每只动物的左耳来预处理八只灰鼠。将盐水给予至每只动物的右耳作为安慰剂。在施用核酸化合物之后两天, 将动物用卡铂 (75mg/kg 腹膜内) 进行处理。在处死灰鼠之后 (卡铂治疗之后两周), 计算左耳 (核酸化合物处理的) 和右耳 (盐水处理的) 中的内毛细胞 (IHC) 和外毛细胞 (OHC) 的死亡细胞%。

[1273] 2. 顺铂诱导的内毛细胞损失的模型系统

[1274] 在顺铂处理之前, 针对滴答信号 8、16 和 32kHz 测试雄性 Wistar 大鼠的基底听觉脑干响应 (ABR) 阈值。在基底听觉脑干响应测试之后, 将顺铂作为 13mg/kg 的腹膜内输注施用 30 分钟。处理的耳朵接受于 PBS 中的 15ug/4 微升的测试核酸化合物。将对照耳朵用不相关的 GFP 核酸化合物或 PBS 进行处理。在顺铂施用之前施用 3-5 天之间的核酸化合物, 以便允许对耳蜗的保护作用。

[1275] 在顺铂施用之后重复听觉脑干响应 (ABR) 测试 3 天。在处理前和处理后之间比较听觉脑干响应阈值并且记录阈值的偏移。顺铂处理后阈值的较高偏移指示耳蜗中更严重的毛细胞损失。在重复听觉脑干响应测试之后, 将动物处死且将耳蜗去除并处理以进行扫描电子显微镜术 (SEM) 来量化钩状区域 (高频区域) 中的外毛细胞 (OHC) 损失。通过将缺失或严重损伤的细胞的数目除以照片的视野中外毛细胞的总数目来计算外毛细胞损失%。

[1276] 在这些化学疗法诱导的耳蜗中的内毛细胞损失模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可有效地显著减少耳蜗中的毛细胞损失并治疗化疗诱导的听力损失。

[1277] 耳蜗中声学诱导的毛细胞死亡的模型系统

[1278] 在灰鼠中研究测试核酸化合物在声创伤模型中的活性。一组 7 只动物经历声创伤。将动物在 105dB 下暴露于集中在 4kHz 下的噪声倍频带 2.5 小时。将噪声暴露的灰鼠的左耳用于约 10 μ L 盐水中的 30 μ g 核酸化合物预处理(在声创伤之前 48 小时);将右耳用媒介物(盐水)预处理。复合动作电位(CAP)是用于测量自耳蜗传递的神经活动的方便和可靠的电生理方法。通过将电极放置在耳蜗的基底附近以便检测在声音刺激如滴答或猝发音突然接通时产生的局部场电位来记录 CAP。在声创伤之后 2.5 周评定每个耳朵的功能状态。具体地说,在声创伤之后 2.5 周测定从圆窗记录的复合动作电位的平均阈值,以便确定核酸处理的耳朵中的阈值是否低于(好于)未处理的(盐水)耳朵。另外,测定核酸处理的和对照耳朵中的内和外毛细胞损失的量。这些结果指示施用至耳蜗的圆窗的 p53siRNA 能够减少由声创伤引起的损伤。

[1279] 在这一声创伤诱导的听力损失模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可有效地减少由声创伤引起的损伤和治疗声创伤诱导的听力损失。

[1280] 另外的听力损失模型

[1281] A) 豚鼠中的听力再生(可塑性)模型

[1282] 通过用单次皮内注射卡那霉素(450–500mg/kg)、接着单次静脉(颈静脉)注射依他尼酸(EA) 全身治疗白化病豚鼠来诱导变聋。这种药理学变聋大约在 1–2 天之后消除了两侧所有毛细胞并且使支持细胞分化。将治疗性核酸通过经鼓膜注射(TT)施加至中耳或通过滴耳剂(ErD)进入外耳道或鼓膜。

[1283] 如下检查测试核酸化合物的功效:

[1284] 1) 将耳蜗在形态学上分析为针对肌球蛋白 VIIa(毛细胞标记物)和毒伞素染色的整装切片(whole-mount)。

[1285] 2) 将 BrdU 并入测量为毛细胞的增殖速率的指示。

[1286] B) 豚鼠中的噪声诱导的急性听力损失模型

[1287] 噪声可引起听力损伤,具有暂时或永久感觉神经性听力损失(SNHL)和耳鸣。SNHL 和耳鸣可单独或组合发生。在人中,噪声诱导的听力损失(NIHL)由纯音听力图中、募集中、阈上听力测试的病理结果中和耳声发射的振幅下降中的阈值偏移证明。通过暴露于连续噪声或脉冲噪声来诱导听力损伤。此外,脉冲噪声创伤或爆炸创伤的可能性应予以考虑。暴露于脉冲噪声可导致比暴露于连续噪声更严重的内耳损伤。发展噪声损伤的重要标准是声压级(SPL)、水平增长速度、暴露时间以及个体易感性(“易受伤害的内耳”)。噪声暴露通常导致阈值上升,其可稍后部分解析,以使得暂时性分量被称为“暂时性阈值偏移”(TTS)。如果在 TTS 后不存在恢复期的完整复,这可能导致永久性内耳损伤(永久性阈值偏移=PTS)。非常高的声音强度可导致内耳和 PTS 中的直接细胞死亡和结构的机械破裂。

[1288] 在这种模型中,用噪声暴露诱导两侧病变;将豚鼠暴露于 117dB SPL 宽频噪声 6 小时。

[1289] 在这一模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可有效预防或治疗听力损失。

[1290] 压疮或压迫性溃疡的模型系统

[1291] 包括糖尿病性溃疡的压疮或压迫性溃疡是当持续压力（通常来自床或轮椅）切断至身体的易受伤害的部分，特别是臀部、髌部和跟部上的皮肤的循环时产生的损伤的皮肤和组织的区域。足够血液流动的缺乏导致受影响的组织的缺血性坏死和溃疡。压迫性溃疡最常发生在感觉减弱或缺乏或衰弱、消瘦、瘫痪、或长期卧床不起的患者中。骶骨、坐骨、大转子、外踝以及跟部上的组织尤其易感；其它部位可取决于患者的情况而涉及。

[1292] 测试用于治疗压疮、溃疡和类似伤口的活性核酸化合物在 Reid 等, (J Surgical Research. 116:172-180, 2004) 中描述的小鼠模型中进行。

[1293] 另外的兔模型（由 Mustoe 等, (JCI, 1991. 87(2):694-703 ;Ahn 和 Mustoe, Ann Pl Surg, 1991. 24(1):17-23 描述）用于测试在动物模型中测试的核酸化合物，在所述动物模型中显示这些 siRNA 化合物治疗并预防压疮和溃疡。

[1294] 在这些模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物，其中发现它们可有效治疗压疮、溃疡和类似的伤口。

[1295] 肾移植患者中的移植物功能延迟恢复 (DGF) 的模型系统

[1296] 热局部缺血 - 进行左肾切除术，接着进行自体移植，所述自体移植产生 45 分钟的热肾移植物保存时期。在自体移植后，在同一动物上进行右肾切除术。在收获肾移植物（模拟供体处理）之前（“前”）或在肾自体移植之后（模拟受体处理）或在收获之前和移植之后两者（组合的供体和受体处理）（“前 - 后”）通过股静脉内施用测试核酸化合物。

[1297] 冷局部缺血 - 在供体动物上进行左肾切除术，接着冷保存所收获的肾（于冰上）持续 5 小时的时期。在这段时期结束时，受体大鼠经历两侧肾切除术，接着移植冷保存的肾移植物。总热局部缺血时间（包括外科手术）是 30 分钟。将测试核酸化合物在肾收获之前（“前”）通过股静脉内施用至供体动物或在移植后 15 分钟（“后 15 分钟”）或 4 小时（后 4 小时）通过股静脉内施用至受体动物。

[1298] 为了评定核酸化合物在改善移植后肾功能的功效，在热和冷局部缺血模型两者中在移植后第 1、2 和 7 天测量血清肌酐水平。

[1299] 在这一 DGF（移植物功能延迟恢复）模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物，其中发现它们可有效地保护肾免于与冷和热局部缺血和随后的再灌注相关的 DGF（移植物功能延迟恢复）。

[1300] 慢性肾病 (CKD) 的模型系统

[1301] 测试本文公开的用于治疗慢性肾病 (CKD) 的活性核酸化合物可使用以下模型进行：

[1302] 这一动物模型适用于评定测试化合物用于预防 CKD 或减弱由重复 AKI/ARF 损害引起的 CKD 进展。

[1303] 重复 AKI/ARF 损害经常导致慢性肾病 (CKD) 的恶化、CKD 的进展或 CKD 的发展。ARF 是一种临床综合征，其特征是在数天内发生的肾功能快速衰退。不受理论限制，急性肾损伤可能是肾局部缺血 - 再灌注损伤如经历大手术如大心脏手术患者中的肾局部缺血 - 再灌注损伤的结果。ARF 的主要特征是肾小球滤过率 (GFR) 的突然下降，从而导致血液中的含氮废物（尿素、肌酐）的保留。最近的研究支持在大多数人 ARF 病例中肾组织中的细胞凋亡是显著的。凋亡性细胞死亡的主要部位是远端肾单位。在局部缺血性损伤的初始阶段，

肌动蛋白细胞骨架的完整性损失导致上皮的平坦,与刷状缘损失、局灶性细胞接触的丢失以及来自下层基质的细胞的随后分离。

[1304] 用于 CKD 的大鼠模型包括如下的重复 (5 次) 局部缺血 - 再灌注诱导的 ARF: 在 45 分钟双侧肾动脉钳紧并且随后释放所述钳紧以允许 24 小时再灌注之后在大鼠中诱导局部缺血 - 再灌注损伤。在钳紧后 4 小时将 PBS 或测试核酸化合物 (12mg/kg) 静脉内注射到个体实验动物。在外科手术之前 (基线) 和之后 24 小时、2 天和 7 天通过测量血清肌酸酐 (SCr) 水平监测 ARF 进展。以 30 天间隔重复所述处理 (I/R 损伤, 测试核酸化合物, SCr 测量) 四个更多循环, 总计五个循环。在第 5 个循环后 7 天时, 测量 24 小时肌酸酐清除率 (CrCl) 代谢笼和尿蛋白。在代谢笼之后 2 天 (在第 5 个循环后第 10 天) 手术切除右肾, 并且针对 CKD 对肾进行组织学分析。在右肾切除术之后 3 周, 将左肾取出并且使用活体双光子显微镜术 (用于 Cy3-siRNA 摄取和保留) 进行体内研究。

[1305] 在这一 CKD 模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物, 其中发现它们可有效治疗 CKD。

[1306] 脊髓损伤 (SCI) 的模型系统

[1307] 动物和脊髓损伤: 使用 125 Sprague-Dawley 雌性大鼠 (10-11 周龄) 进行实验 (Taconic, Germantown, NY)。对于 SCI 外科手术, 将大鼠用 2% 异氟烷 (IsoFlo, Abbott Lab, North Chicago, IL) 麻醉, 并且将脊髓通过椎板切除术暴露在 T9 - 10 下, 并且然后如所描述 (Constantini 和 Young, 1994; Hasegawa 等, 2005) 通过将 10.0g 棒从 12.5 或 25mm 的高度落下到暴露的 T11 索上来挫伤。在挫伤和注射之后, 当进行时, 肌肉和皮肤分开闭合。将头孢唑啉 (25mg/kg) 施用至所有大鼠。

[1308] 测试核酸化合物的注射: 在损伤之前 30 分钟内进行损伤部位处的注射; 将 1 μ l 核酸化合物中的 1 μ g 注射在三点 (包括损伤中心和至中心的 2mm 头端和尾部) 中的每个处 (总计 3 μ l) (Hasegawa 等, 2005)。每次注射使用无菌 5- μ l Hamilton 注射器在约 1mm 的深度处在约 10 分钟的时间期间缓慢地进行。对于腰椎穿刺, 将麻醉的大鼠放置在操作表面上, 所述表面使大鼠的背部弯曲并且使腰部区域凸起。在 L3 - 5 脊突上切开约 1cm 纵向切口, 并且使皮肤收缩。使用 100 μ l Hamilton 注射器将 30 号针在 L3 - 4 或 L4 - 5 处推进到椎管中以便将 40 μ l 施用到鞘内空间中。腰部鞘内空间中针的正确放置由在进入和甩尾时“给予”的感觉指示 (Lepore 等, 2005)。为了确定这种方法是否逆转脑脊液 (CSF) 向上流动至损伤部位的区域, 将 40 μ l Evans Blue 染料注射在腰部隆起中并且在注射之后数秒内暴露的 T9-10 脊柱椎板切除的大鼠中染料的外观证实了流过损伤部位。

[1309] 总细胞 RNA 制备和 Q-RT-PCR: 为了分离 RNA, 将动物注射 100mg/kg 戊巴比妥并且然后用冷 PBS 灌注。将脊柱快速去除并且在干冰粉末上冷冻。切除集中在损伤 (I) 中心处的 5-mm 脊髓区段, 连同相邻的 5-mm 近端和远端区段以及在胸水平 1 (T1) 处的区段 (Chang 等, 2009)。在一些实验中, 将 I 区段在中线处二等分, 从而产生表示脊髓的同一区域的两片组织并且 RNA 和蛋白质的分离的抽出物能够实现来自成对的组织的结果的比较。对于 RNA, 将组织用 polytron 匀浆器 (Kinematica Inc.) 均化并且按照 Qiagen RNeasy Plus Mini 方案 (Qiagen, Valencia, CA) 制备 RNA。使用 Nanodrop 分光光度计 (Thermo Scientific Inc.) 定量 RNA 并且 1 μ g 的总 RNA 用于第一链 cDNA, 其中通过随机六聚体引发 SuperScript II 逆转录酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。使用 Applied Biosystems 7500Fast 机器使用于 20 μ l 反应中的 1mM 引物和 SYBR Green 主混合物 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

对 40ng 的 cDNA 进行 PCR 反应。将各基因的表达值标准化为 GAPDH cDNA 的量以便计算各样品中存在的 RNA 的相对量。

[1310] 组织处理和染色:将麻醉的动物用盐水溶液、接着 4%多聚甲醛心内灌注。将脊髓去除,标记损伤中心并在相同固定剂中后固定 4-5 小时,经低温保护、包埋以用于冷冻切片并在低温恒温器(Hacker-Bright)上以 20 μ m 切割。用 Zeiss Stemi SV11 显微镜在新鲜分离的脊髓中检测 Cy3.5 标记的核酸化合物以便确定总体分布。然后将脊髓固定在 4%多聚甲醛中并且进行冰冻切片。如所描述的(Hasegawa 等, 2005)进行 LFB 染色或其它程序。对于免疫染色,将切片用于 PBS 中的 10%正常山羊血清/0.3% Triton X-100 封闭 2 小时并且在 4°C 下用与一抗孵育过夜。用兔蛋白激酶 C- γ (PKC γ) (1:200) 染色并且在 25°C 下用蛋白酶 K (Dako) 抗原修复 4 分钟后对相同切片进行小鼠 ED1 (1:300) (Serotec, Raleigh, NC)。将切片用 PBS 洗涤,并且与二抗兔 Alexa 488 或抗小鼠 Alexa 568 一起以 1:400 在室温下孵育 1 小时。在洗涤之后,用 Aqua-Mount (Lerner Lab) 固定切片。在于同一时间染色的多组切片上使用 Axiovert 200M 的 Zeiss 510 共聚焦激光扫描显微镜 (LSM) 或 Zeiss 自动细胞扫描系统捕获图像。在无抗原修复并且具有抗兔 Alexa 568 (1:200) 作为二抗的情况下使用相同程序进行用 5-羟色胺兔 5-HT (1:1000) (ImmunoStar) 染色。

[1311] 组织学的定量:LFB 染色的定量用于分析组织防护效果。将用于分析的所有冠状切片同时针对 LFB 染色以确保均匀的显色,并且然后用 Film Scanner LS-8000ED (Nikon, Japan) 以 4000dpi 分辨率进行扫描。将彩色图像转换成灰度并且将单独切片在 Photoshop 中描画轮廓,且 NIH 图像 J 用于获得每个切片的总面积像素。恒定阈值用于获得 LFB 染色的阈上像素并测量所得到的面积。防护的组织被定义为阈上面积除以在每个切片中描画轮廓的总面积。在集中在损伤中心的 10mm 脊髓上以 1mm 间隔测量来自每个脊髓的图像。在几乎所有情况下,具有最小防护组织的位置对应于指定损伤中心并且当其未对应于指定损伤中心时,它被重新定义为 0 位置。然后计算防护组织的平均值并将其作为位置的函数。对于 ED1 染色,以 1mm 间隔的 11 个冠状切片选自每只动物以用于定量。包括在每个位置处的完整冠状切片的平铺图像是用 Axiovert 200M 荧光显微镜 (Zeiss) 上的 20x 物镜 (N. A. = 0.75) 取得并且用 Zeiss LSM 直方图软件进行分析。将恒定阈值施加至所有切片并且将每个切片的阈上面积除以所描画轮廓的总面积以获得百分比 ED1+。CST 位于中心管上方的中线处并且对这一区域中的 PKC γ 染色描画轮廓并提取以用于定量。在排除由于巨噬细胞所致的自身荧光面积之后获得每个 CST 提取区域的阈上面积并且然后标准化。由不知道处理组的研究者进行所有定量分析。

[1312] 在这一 SCI 模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可有效治疗 SCI。

[1313] 大鼠中肺移植后局部缺血再灌注损伤的模型系统

[1314] 在如描述于 Mizobuchi 等, The Journal of Heart and Lung Transplantation, 第 23 卷第 7 期 (2004) 和 Kazuhiro Yasufuku 等, Am. J. Respir. Cell Mol Biol, 第 25 卷, 第 26-34 页 (2001) 中的大鼠动物模型中实现肺局部缺血 / 再灌注损伤。

[1315] 具体地说,在用异氟烷诱导麻醉之后,将气管用 14 号 Teflon 导管套管并且将大鼠用啮齿动物呼吸器使用 100% 氧气在每分钟 70 次呼吸的速率和 2cm H₂O 的呼气末正压通气下机械呼吸。将左肺动脉、静脉和主干支气管用 Castaneda 夹具闭塞。在操作期间,将肺用盐水保持潮湿,并且将切口覆盖以使蒸发损失最小化。局部缺血的时期是 60 分钟。在局

部缺血期结束时,将夹具移除并在诱导肺局部缺血后允许对肺进行通气和再灌注另外 4 小时、24 小时和 5 天。在实验结束时,轻轻收获肺并进行冷冻以用于 RNA 提取或固定在戊二醛混合物中以用于随后的组织学分析。

[1316] 在这一模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可在肺移植后有效治疗局部缺血再灌注损伤。

[1317] 骨髓移植 (BMT) 的模型系统。

[1318] 可使用描述于 Kelly RM 等 Blood. 2010 年 2 月 4 日 ;115(5):1088 - 1097 中的以下 BMT 模型系统:

[1319] 动物:使用回交超过 10 代至 B6 背景上的 C57BL/6(H-2^b;称为 B6), [C57BL/6×Ba1b/c]F₁(H-2^{d/b};称为 CB6F1) 雌性小鼠, BALB/c(H-2^d) 或 C57BL/6. Ly5. 1 小鼠和 Bim^{-/-}小鼠。在辐射前 30 至 45 分钟腹膜内施用于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的测试核酸化合物。测试核酸化合物施用的选定剂量/定时在最小毒性的情况下提供最佳的 p53 功能抑制。

[1320] BMT:将来自 B6. Ly5. 1(同类系)或 BALB/c(同种异体)供体的 BM 细胞的单细胞悬浮液的 T 细胞消减至大于 98% 纯度。将 CD4/8 消减的 BM 细胞 (10⁷[同种异体]或 5×10⁶[同类系]) 静脉内施用至已在 24 小时之前接受来自 x 射线源的 9Gy (C57BL/6) 或 10Gy (CB6F1) TBI 的受体。

[1321] 通过荧光活化的细胞分选进行淋巴细胞分析:通过温和解离、洗涤、过滤、重悬浮于 2% 胎牛血清 /PBS 中并在 4℃ 下与荧光素缀合的单克隆抗体一起孵育 30 分钟来制备胸腺细胞、脾细胞和 LN 的单细胞悬浮液。所使用的抗体针对 CD4、CD8、CD3、T 细胞受体 β)、CD11c、B220、CD45. 1、CD62L 和 CD44(eBioscience)。在 BD FACSCanto 上获取实况事件 (≥ 105) 并且用 FlowJo 软件 (TreeStar) 进行分析。

[1322] 通过荧光活化的细胞分选进行胸腺上皮细胞 (TEC) 分析:将 TEC 分离。将单独胸腺在 37℃ 下在胶原酶-D/DNA 酶-I 中孵育两次并且在胶原酶/分散酶/DNA 酶-I (Roche) 中孵育两次。将汇集的消化用抗 - CD45-PerCp-Cy5. 5、抗 - EpCAM-PE、抗 - Ly51/CDR1- 生物素加链霉亲和素缀合的 PE/Cy7、抗 - MHC-II-Pacific Blue(eBioscience) 以及 FITC-缀合的 Ulex-europaeus 凝集素 -1 (UEA-1 ;Vector Laboratories) 染色。用小鼠抗大鼠 IgG2c-Cy5 检测小鼠 AIRE 特异性大鼠 mAb (5H12)。每个样品获取总计 3×10⁶ 个实况事件。

[1323] 最近胸腺迁出 (emigrant) 检测:将麻醉的小鼠在一个胸腺叶中用于 10 μ L PBS 中的 50 μ g 磺基 -NHS- 生物素 (Pierce) 注射。在 24 小时后,将胸腺和脾用链霉亲和素缀合的 PE/Cy7、CD4、CD8、CD3、CD45. 1、CD44 和 CD62L 染色,并且通过流式细胞术进行分析。

[1324] 免疫荧光显微术:将组织包埋在 OCT 中,在液氮中迅速冷冻。将丙酮固定的 8-μ m 胸腺切片用 10% 正常马血清 /PBS 封闭并且用 Ly51/CDR1-FITC 和多克隆兔抗小鼠 CK5 (Covance Research Products) 加 Cy5- 缀合的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG ; Invitrogen) 染色。对于 LN/脾分析,将 6-μ m 冷冻切片进行丙酮固定并且针对糖蛋白 -38(gp38 ;纯化的克隆 8. 1. 1 ;ATCC) 或 CCL21(R&D Systems) 连同 B220-FITC(克隆 RA3-6B2 ;BD) 在室温下染色 3 小时。根据制造商的说明书 (Invitrogen) 用 Tyramide 信号放大试剂盒放大 CCL21 和 gp38 信号。将载玻片用 VECTASHIELD (Vector Laboratories) 安装并且通过 10×/0. 400lympus UPlanApo 或 40×/0. 800lympus UPlanApo 油透镜和 Olympus

FV500 照相机获取图像,用Fluoview软件(v. 4. 3) 编译,然后在Adobe Photoshop CS2 中分析和修剪。

[1325] 器官中的 Lm 感染和 CFU 的测定:使用表达全长鸡卵白蛋白(OVA) 的重组 Lm 菌株 Lm-OVA 和 $\Delta actA$ -Lm-OVA(减毒)。在 37℃ 下将小鼠用生长在脑心浸液(BHI) 肉汤中的早期对数期细菌接种。使同类系 BM 移植受体感染 10^6 个菌落形成单位(CFU) 的 $\Delta actA$ -Lm-OVA 并且用 10^5 CFU 的 Lm-OVA 再激发。对于同种异体 BMT 研究,将小鼠用 5×10^4 CFU 静脉内免疫并且用 2×10^6 CFU 的 Lm 2C 再激发。在二次感染之后三天,将肝/脾在 0.05% Triton X-100/PBS 中均化,接种到 BHI 平板上,并且在 37℃ 下在 24 小时后计数 Lm 菌落。

[1326] Lm-OVA 特异性 CD8T 细胞的定量:根据制造商的说明书混合 MHC-I-二聚体 X: 小鼠-Ig-PE(BD PharMingen) 和纯化的 OVA257-64(SIINFEKL) 肽(Anaspec) 以形成 MHC-I-二聚体 X: 小鼠-Ig:OVA257-64-PE 缀合物,并且在 4℃ 下与红细胞溶解的外周血一起孵育 1 小时、洗涤、并且然后与针对表面标志物的抗体一起孵育。每个样品收集超过 104 个供体 CD8T 细胞。

[1327] 在这一模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可在 BMT 之后有效恢复胸腺功能。

[1328] 刺激血细胞生成的模型系统

[1329] 可使用描述于 Leonova KI 等 Cell Cycle 9:7, 1434-1443 ;2010 年 4 月 1 日中的以下模型:

[1330] 使用野生型小鼠 C57Bl/6 和 Balb/c 的两种菌株。在即将暴露于致死剂量的全身 γ 辐射(TBI,对于 C57Bl/6 来说 9Gy 并且对于 Balb/c 来说 8Gy) 之前对小鼠给予单次腹腔内(i. p.) 注射测试核酸化合物或媒介物。记录小鼠存活率。用于这一实验中的 TBI 的剂量已知与引起胃肠道和脑血管损伤以及 HP 损伤的更高剂量相比,主要通过对造血(HP) 系统的损伤来引起死亡。因此,测试核酸化合物对本实验中的辐射小鼠的存活的作用指示所述化合物用作 HP 系统的辐射防护剂。

[1331] 在这一模型中测试表 A、B 和 E 的核酸化合物,其中发现它们可有效保护能够完全重新定植 HP 系统以用于长期功能的造血干细胞(HSC) 和早期祖细胞(HPC)。

[1332] 尽管以上实施例已说明执行本发明的实施方案的具体方式,但实际上本领域技术人员将了解执行本发明的实施方案的未在本文中明确显示的替代性方式。应了解的是本公开应被视为本发明的原理的例示而不意图将本发明限于所说明的实施方案。

[1333] 本领域技术人员将仅使用常规实验就会认识到或能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的等效物。所述等效物意图由以下权利要求涵盖。

[0001]

序列表

<110> 夸克制药公司

埃琳娜·费因斯坦

莎伦·阿夫金-纳祖姆

夏甲·卡林斯基

伊戈·迈特

<120>针对 P53 的双链寡核苷酸分子及其使用方法

<130> 247/PCT1

<150> US 61/699885

<151> 2012-09-12

<160> 33

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 2586

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

gauggggguu uuccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucuaa 60

aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuceggggac acuuugcguu 120

cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc agccagacug 180

ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcgucgag cccccucga 240

gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cuguecccu 300

ugccguccca agcaauggau gauuugaugc ugucuccgga cgauauugaa caaugguuca 360

cugaagacc ccaggucagau gaagcuccca gaugccaga ggcugcuccc cccguggccc 420

cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuuccugg cccugucau 480

cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuuuugc 540

auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacuccc ugcccucaac aagauguuuu 600

[0002]

gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uuccacacc ccgcccggca	660
cccgcguccg cgccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc	720
gcugceccca ccaugagcgc ugcucagaua gcgauggucu ggccccuccu cagcaucuua	780
uccgagugga aggaaauug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuucgacaua	840
gugugguggu gcccuauag ccgcccugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca	900
acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccacuc cucaccauca	960
ucacacugga agacuccagu gguaauacuac ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu	1020
gugccugucc ugggagagac cggcgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc	1080
cucaccacga gcugceccca gggagcacua agegagcacu gcccacaac accaguccu	1140
cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauuuu caccuucag auccgugggc	1200
gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg	1260
cugggaagga gccagggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaagucc aaaaaggugc	1320
agucuaccuc ccgccauaaa aaacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac	1380
auucuccacu ucuuguucc cacugacagc cuccacccc caucucucc ucccugcca	1440
uuuuggguuu ugggucuuug aaccuugcu ugcaauaggu gugcgucaga agcaccagg	1500
acuuccauuu gcuuugucc ggggcuccac ugaacaagu ggccugcacu gguguuuugu	1560
uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagcuuga uuuuagggu uuucuguga	1620
gggauguuug ggagauguua gaauguucu ugcaguuaag gguuaguua caaucagcca	1680
cauucuaggu aggggccac uucaccguac uaaccaggga agcuguccu cacuguuga	1740
uuuucucuaa cuucaaggcc cauucugug aaugcuggc auuugcaccu accucacaga	1800
gugcauugug aggguaaug aaauaangua caucuggccu ugaaccacc uuuuuuaca	1860
uggggucuaag aacuugacc ccuugagggu gcuuguucc ucuccuguu ggucgguggg	1920

[0003]

uugguaguuu cuacaguugg gcagcugguu agguagaggg aguugucaag ucucugcugg	1980
cccagccaaa ccugucuga caaccucung gugaaccuua guaccuaaaa ggaaaucuca	2040
ccccauccca caccucggag gauuucucu cuuguauaug angaucugga uccaccaaga	2100
cuuguuuuau gcucaggguc aaauucuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu	2160
ugagacuggg ucucgcuuug uugcccaggc uggaguggag uggcgugauc uggcguuacu	2220
gcagccuung ccuccccggc ucgagcaguc cugccucagc cuccggagua gcugggacca	2280
cagguucaug ccaccauggc cagccaacuu uugcauguuu uguagagaug gggucucaca	2340
guguugccca ggcuggucuc aaacuccugg gcucaggcga uccaccuguc ucagccuccc	2400
agagugcugg gauuacaauu gugagccacc acguccagcu ggaaggguca acaucuuuuu	2460
cauucugcaa gcacaucugc auuuucacc caccuuccc cuccuucucc cuuuuuauu	2520
cccauuuuua uaucgaucuc uuauuuuaca auaaaacuuu gcugccaccu gugugucuga	2580
ggggug	2586
<210> 2	
<211> 2583	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 2	
gauugggguu uucccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucuaa	60
aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu	120
cgggcuggga gegugcuuc cagcagggug acacgcuucc cuggauuggc cagacugccu	180
uccgggucac ugccauggag gagccgcagu cagaucnuag cgucgagccc ccucugaguc	240
aggaaacauu uucagaccua uggaaacuac uuccugaaaa caacguucug ucccccugc	300
cgucccaagc aauggaugau uugaugcugu ccccggacga uauugaacaa ugguucacug	360

[0004]

aagacccagg uccagaugaa gcucccagaa ugccagaggc ugcucCCCCC guggccccug	420
caccagcagc uccuacaccg gcggccccug caccagcccc cuccuggccc cugucaucuu	480
cugucccuuc ccagaaaacc uaccagggca gcuacgguuu ccgucugggc uucuugcauu	540
cugggacagc caagucugug acuugcacgu acuccccugc ccucaacaag auguuuugcc	600
aacuggccaa gaccugcccu gugcagcugu ggguuugauuc cacacccccg cccggcaccc	660
gcguccgcgc cauggccauc uacaagcagu cacagcacau gacggagguu gugaggcgcu	720
gccccacca ugagcgcugc ucagauagcg auggucuggc cccuccucag caucuuaucc	780
gaguggaagg aaauuugcgu guggaguuuu uggaugacag aaacacuuuu cgacauagug	840
ugguggugcc cuaugagccg ccugagguug gcucugacug uaccaccauc cacuacaacu	900
acauguguaa caguuccugc augggcggca ugaaccggag gcccuccuc accaucauca	960
cacuggaaga cuccaguggu aaucucugg gacggaacag cuuugaggug cguguuugug	1020
ccuguccugg gagagaccgg cgcacagagg aagagaauu ccgcaagaaa ggggagccuc	1080
accacgagcu gccccaggg agcacuaagc gagcacugcc caacaacacc agcuccucuc	1140
cccagccaaa gaagaaacca cuggauggag aaauuuuac ccuucagau cuggggcgug	1200
agcgcuuca gauguuccga gacugaaug aggccuugga acucaaggau gccaggcug	1260
ggaaggagcc aggggggagc agggcucacu ccagccaccu gaaguccaaa aagggucagu	1320
cuaccucccg ccuaaaaaa cucauguuca agacagaagg gccugacuca gacugacauu	1380
cuccacuucu uguuccccac ugacagccuc ccaccccau cucuccucc ccugccauuu	1440
uggguuuugg gucuuugaac ccuugcuugc aaugaggug cgucagaagc acccaggacu	1500
uccauuugcu uugucccggg gcuccacuga acaaguugc cugcacuggu guuuuguugu	1560
ggggaggagg auggggagua ggacauacca gcuuagauuu uaagguuuuu acugugaggg	1620
auguuuggga gauguaagaa auguucuugc aguuaagggu uaguuuacaa ucagccacau	1680

[0005]

ucuagguagg gggccacuuc accguacuaa ccagggaagc ugucccucac uguugaauuu	1740
ucucuaacuu caaggcccau aucugugaaa ugcuggcauu ugcaccuacc ucacagagug	1800
cauugugagg guuaauggaa uaauguacau cuggccuuga aaccaccuuu uauuacauug	1860
ggucuagaac uugacccccc ugaggguugu uguuuccucu cccuguuggu cgguggguug	1920
guaguuuua caguugggca gcugguuagg uagagggagu ugucaagucu cugcuggccc	1980
agccaaaccc ugucugacaa ccucuuggug aaccuuagua ccuaaaagga aaucacacc	2040
caucccacac ccuggaggau uucaucucu guauaugaug aucuggaucc accaagacuu	2100
guuuuauucu cagggucaau uucuuuuuc uuuuuuuuu uuuuuuuucu uuucuuuga	2160
gacuggguu cgcuuuug cccaggcugg aguggagugg cgugaucuug gcuuacugca	2220
gccuuugccu ccccggcucg agcaguccug ccucagccuc cggaguagcu gggaccacag	2280
guucaugcca ccauggccag ccaacuuug cauguuuugu agagaugggg ucucacagug	2340
uugcccaggc uggucucaaa cuccugggcu caggcgaucc accugucua gccuccaga	2400
gugcugggau uacaaugug agccaccag uccagcugga agggucaaca ucuuuacau	2460
ucugaagca caucugauu uucacccac ccuucccuc cuucuccuu uuuaauccc	2520
auuuuuauu cgauucuaa uuuaacaau aaacuugcu gccaccugug ugucugagg	2580
gug	2583

<210> 3
 <211> 2719
 <212> RNA
 <213> 智人

<400> 3
 gauugggguu uccccuccc augugcuaa gacuggcgu aaaaguuuug agcuucuaa 60
 aagucuagag ccaccguca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcgu 120
 cgggcuggga gcgugcuuc cacgacggug acacguucc cuggauuggc agccagacug 180

[0006]

ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcgucgag cccccucuga	240
gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cugucceccu	300
ugccguccca agcaauggau gauuugaugc uguccccgga cgauauugaa caaugguuca	360
cugaagaccc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccguggccc	420
cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuccugg cccugucan	480
cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuucuuugc	540
auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacueccc ugcccuaac aagauguuuu	600
gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguugguuga uuccacacc cggccggca	660
cccgcuuccg cgccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc	720
gcugccccc ccaugagcgc ugcucagaua gcgaugguu ggccccuccu cagcaucua	780
uccgagugga aggaaauug cguguggagu auuuggauga cagaacacu uuucgacua	840
gugugguggu gcccuagag ccgcugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca	900
acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gagggccauc cucaccauca	960
ucacacugga agacuccagu gguaauacu ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu	1020
gugccugucc ugggagagac cggcgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc	1080
cucaccacga gcugccccc gggagcacua agcgagcacu gcccacaac accaguccu	1140
cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauuuu caccuucag gaccagacca	1200
gcuuucaaaa agaaaaugu uaaagagagc augaaaaug uucuaugacu uugccugaua	1260
cagaugcuac uugacuacg augguuuac uuccugauaa acugcugua aguugaaaau	1320
auuauccgug ggcgugagcg cuucgagaug uuccgagagc ugaauaggc cuuggaacuc	1380
aaggauccc aggcugggaa ggagccagg gggagcagg cucacuccag ccaccugaag	1440
uccaaaaagg gucagucuac cucccgccau aaaaaacua uguucaagac agaagggccu	1500

[0007]

gacucagacu gacauucucc acuuuuguu cccacugac agccuccac cccaucucu	1560
cccucccug ccauuuuggg uuuuggguu uugaaccuu gcuugcaua ggugugcug	1620
agaagcacc aggacuucca uuugcuugu cccggggcuc cacugaaca guuggccug	1680
acugguguuu uguuguggg aggaggagg ggaguaggac auaccagcuu agauuuuag	1740
guuuuacug ugagggaug uugggagau uaagaaugu ucuugcagu aaggguuagu	1800
uuacaucag ccacauucua gguaggggcc cacuucacc uacuaaccag ggaagcug	1860
ccucacuguu gaauuuuc uacuucag gcccauuc uugaaugcu ggcauuugca	1920
ccuaccucac agagugcau uugagggua augaaaua guacaucug ccuugaaac	1980
accuuuuuu acaugggguc uagaacuuga ccccuugag ggugcuugu cccucccu	2040
guuggucggg ggguugguag uuucacagu ugggcagcug guuagguaga gggaguugc	2100
aagucucugc ugcccagcc aaaccuguc ugacaaccuc uuggugaacc uuaguaccu	2160
aaaggaauc ucacccauc ccacaccug gaggaauuca ucucuuguau augaugacu	2220
ggauccacca agacuuguu uaugcucagg gucaauucu uuuuuuuuu uuuuuuuuu	2280
uuuuuuuu cuuugagacu ggugucgcu uugugccca ggcuggagug gaguggcug	2340
aucuuggcuu acugcagccu uugccuccc ggucgagca guccugcuc agccuccga	2400
guagcuggga ccacagguu augccaccu ggcagccaa cuuugcaug uuuguagag	2460
augggguc acaguguug ccaggcuggu cucaaacucc ugggcucagg cgauccacu	2520
gucucagccu cccagagugc ugggaauaca auugagacc accacgucca gcuggaagg	2580
ucaacauuu uuacauucg caagcacauc ugcauuuca cccaccuu cccuccuc	2640
uccuuuuuu uaucccauu uuauucgcu cuuuuuuu acauuuuu uugcugcca	2700
ccugugugc ugaggggug	2719

[0008]

<210>	4	
<211>	2646	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	4	
gaugggguu uucccuccc augugcuca	gacuggcgu aaaaguuug agcuucuaa	60
aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu	agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu	120
cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug	acacgcuucc cuggauuggc agccagacug	180
ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc	agucagauc uagcgucgag ccccccuga	240
gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac	uacuuccuga aaacaacguu cuguccccu	300
ugccguccca agcaauggau gauuugauc	uguccccgga cgauauugaa caaugguua	360
cugaagacc agguccagau gaagcuccca	gaaugccaga ggcugcucc cccguggccc	420
cugcaccagc agcuccuaca ccggcgccc	cugcaccagc cccuccugg cccugucau	480
cuucugucc uucccagaaa accuaccagg	gcagcuacgg uuuccgucug ggcuuncug	540
auucugggac agccaagucu gugacuugca	cguacuccc ugcccuaac aagauguuu	600
gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc	uguggguuga uuccacacc cggccggca	660
cccgcuucc cgccauggcc aucuacaagc	agucacagca caugacggag guugugaggc	720
gcugccccc ccaugagcgc ugcucagaua	gcgauggucu ggccccuccu cagcaucua	780
uccgagugga aggaaauug cguguggagu	auuuggauga cagaaacac uuucgacua	840
gugugguggu gccuauagag ccgcugagg	uuggcucuga cuguaccacc auccacuac	900
acuacaugug uaacaguucc ugaugggcg	gcaugaaccg gaggeccauc cucaccau	960
ucacacugga agacuccagu gguaaucuac	ugggacggaa cagcuuugag gucguguuu	1020
gugccugucc ugggagagac cggcgcacag	aggagagaa ucuccgcaag aaaggggagc	1080
cucaccagc gcugccccc gggagcacua	agcgagcacu gccaacaac accaguccu	1140

[0009]

cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauuuu caccuucag augcuacuug	1200
acuuacgaug guguuacuuc cugauaaacu cgucguaagu ugaaaauuu auccgugggc	1260
gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg	1320
cugggaagga gccagggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaagucc aaaaaggguc	1380
agucuaccuc ccgccauaaa aaacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac	1440
auuccacau ucuuguuccc cacugacagc cuccacccc caucucucc ucccugcca	1500
uuuuggguuu ugggucuuug aaccuugcu ugcaauaggu gugcgucaga agcaccagg	1560
acuuccauuu gcuuuguccc ggggcuccac ugaacaagu ggccugcacu gguguuuugu	1620
uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagcuuga uuuuaagguu uuucuguga	1680
gggauguuug ggagauguua gaauguucu ugcaguuag gguuaguua caaucagcca	1740
cauucuaggu agggggccac uucaccguac uaaccaggga agcuguccu cacuguugaa	1800
uuuucucuaa cuucaaggcc cauucugug aaugcuggc auuugaccu accucacaga	1860
gugcauugug aggguuuau aaauaangua caucuggccu ugaaaccacc uuuuuuaca	1920
uggggucuaa aacuugacc ccuugagggu gcuuugucc ucuccuguu ggucggugg	1980
uugguaguuu cuacaguug gcagcugguu agguagagg aguuucaag ucucugcug	2040
cccagccaaa ccugucuga caaccuug gugaaccua guaccuaaaa ggaaucua	2100
ccccuucca caccuggag gauuucacu cuuguauug augaucugga uccaccaaga	2160
cuuuuuuu gcuaggguc aaauuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuu	2220
ugagacuggg ucucgcuuug uggccaggc uggaguggag uggcgugauc uggcuuacu	2280
gcagccuuug ccuccccgc ucgagcagc cugccucagc cuccggagua gcugggacca	2340
cagguucaug ccaccauggc cagecaacu uugcauguu uguagagaug gggucucaca	2400
guguugccca ggcuggucuc aaacuccugg gcucaggcga uccaccuguc ucagccucc	2460

[0010]

agagugcugg gauuacaauu gugagccacc acguccagcu ggaaggguca acaucuuaa	2520
cauucugcaa gcacaucugc auuuucaccc caccuuccc cuccuucucc cuuuuuauau	2580
cccauuuuua uaucgaucuc uuauuuuaca auaaaacuuu gcugccaccu gugugucuga	2640
ggggug	2646
<210> 5	
<211> 2271	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 5	
ugagggcagg agauggaggc ugagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag	60
ugacagagca agaccuauc ucaaaaaaa aaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag	120
acgccaacuc ucucuagcuc gcuauguggu ugagagggu gcuaacgcau guuuguuucu	180
uugcugccgu cuuccaguuu cuuuauucgu ucacuuguc ccugacuuc aacucugcu	240
ccuuccucuu ccuacaguac ucccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga	300
ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcaccgc guccgcgcca	360
uggccaucua caagcaguc cagcacaga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug	420
agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa	480
auuugcgugu ggaguuuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugccu	540
augagccgce ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaa	600
guuccugcau gggcggcag aaccggaggc ccauccucac caucaucaca cuggaagacu	660
ccagugguaa ucuacugga cggaaacagcu uugaggugcg uguuugucc uguccugga	720
gagaccggcg cacagaggaa gagaauucc gcaagaaagg ggagccucac cagagcugc	780
ccccaggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccuuccc cagccaaaga	840
agaaaccacu ggauggagaa uauuucaccc uncagaucg ugggcgugag cgcuucgaga	900

[0011]

uguuccgaga gcugaaugag gccuuggaac ucaaggaucc ccaggcuggg aaggagccag	960
gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accucccgcc	1020
auaaaaacu cauguucaag acagaagggc cugacucaga cugacauucu ccacuucung	1080
uucccacug acagccuccc acccccacuc cucccuccc ugccauuuug gguuuugggu	1140
cuugaaccc uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuc cauugcuuu	1200
guccggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuguuggg ggaggaggau	1260
ggggaguagg acauaccagc uuagauuuu agguuuuuac ugugaggga guuugggaga	1320
uguaagaaau guucuuagc uuaagggua guuuacaauc agccacauuc uagguagggg	1380
cccacuucac cguacuaacc agggagcug ucccucacug uugaauuuuc ucuacuua	1440
aggcccauu cugugaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uugugagggu	1500
uaaugaaua auguacauu gccuugaaa ccaccuuuuu uuacauggg ucuagaacu	1560
gaacccuug agggugcuug uucccuccc cuguuggucg guggguuggu aguuuaca	1620
guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcuggccag ccaaacccug	1680
ucugacaacc ucuuggugaa ccuuaguacc uaaaaggaaa ucucaccca ucccacacc	1740
uggaggauuu caucucuugu auaugauu cuggauccac caagacuugu uuuaugcu	1800
gggucauuu cuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuu ucuuugaga cugggucug	1860
cuuugugcc caggcuggag uggagugcg ugaucuuugc uuacugcagc cuuugccucc	1920
ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc	1980
auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agauggguc ucacagugu gccagggcug	2040
gucuaaaacu ccugggcua ggcgauccac cugucucagc cucccagagu gcugggaaua	2100
caauugugag ccaccaguc cagcuggaag ggucaacauc uuuaacauuc ugcaagcaca	2160
ucugcauuu caccacacc uucccuccu ucuccuuuu uauauccau uuuaauucg	2220

[0012]

aucucuuaau uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g	2271
<210> 6	
<211> 2404	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 6	
ugaggccagg agauggaggc ugagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag	60
ugacagagca agaccuauuc ucaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag	120
acgccaacuc ucucuagcuc gcuagugggu ugagggaggu gcuuacgcau guuuguuucu	180
uugcugccgu cuuccaguug cuuuaucugu ucacuugugc ccugacuuc aacucugucu	240
ccuuccucuu ccuacaguac ucccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga	300
ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcacccgc guccgcgcca	360
uggccaucua caagcaguca cagcacauga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug	420
agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa	480
auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugcccu	540
augagccgcc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaaca	600
guuccugcau gggcggaug aaccggaggc ccauccucac caucaucaca cuggaagacu	660
ccagugguaa ucuacuggga cggaaacagcu uugaggugcg uguuugugcc uguccugga	720
gagaccggcg cacagaggaa gagaauucc gcaagaaagg ggagccucac cacgagcugc	780
ccccagggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucucc cagccaaaga	840
agaaaccacu ggauggagaa uauuucacc uucaggacca gaccagcuu caaaaagaaa	900
auuguuaaag agagcaugaa aaugguucua ugacuugcc ugauacagau gcuacuugac	960
uuacgauggu guacuuccu gauaaacucg ucguaaguug aaaauuuau ccgugggcgu	1020

[0013]

gagcgcuucg agaauuuccg agagcugaau gaggccuugg aacucaagga ugcccaggcu	1080
gggaaggagc caggggggag cagggcucac uccagccacc ugaaguccaa aaaggguacag	1140
ucuaccuccc gccauaaaa acucauguuc aagacagaag gggcugacuc agacugacau	1200
ucuccacuuc uuguucccca cugacagecu cccaccccca ucucucccuc cccugccauu	1260
uuggguuuug ggucuuugaa cccuugcuug caauaggugu gcgucagaag caccaggac	1320
uuccauuugc uuugucccg ggucuccacug aacaaguugg ccugcacugg uguuuuugug	1380
uggggaggag gauggggagu aggacauacc agcuuagauu uuaagguuuu uacugugagg	1440
gauguuuugg agauguuaga aauguucuug caguuaaggg uuaguuuaca aucagccaca	1500
uucuagguag gggcccacuu caccguacua accagggaag cuguccuca cuguugaauu	1560
uucucuaacu ucaaggccca uaucugugaa augcuggcau uugcaccuac cucacagagu	1620
gcuuugugag gguaauugaa auaauguaca ucuggccuug aaaccaccuu uuauuacaug	1680
gggucuaaga cuugaccccc uugaggguugc uuuguuccuc ucccuugugg ucgguggguu	1740
gguaguuuuc acaguugggc agcugguuag guagaggag uuugucaaguc ucugcuggcc	1800
cagccaaacc cugucugaca accucuuggu gaaccuuagu accuaaaagg aaauucacac	1860
ccaucccaca cccuggagga uuucaucucu uguuuuugau gaucuggauc caccaagacu	1920
uuguuuuugc ucagggucaa uuucuuuuuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uuuuuuuug	1980
agacuggguc ucgcuuuguu gcccaggcug gaguggagug gcgugaucuu ggcuuacugc	2040
agccuuugcc uccccggcuc gagcaguccu gccucagccu cgggaguagc ugggaccaca	2100
gguucaugcc accauggcca gccaacuuuu gcauguuuug uagagauggg gucucacagu	2160
guugcccagg cuggucuaa acuccugggc ucaggcgauc caccugucuc agccuccag	2220
agugcuggga uuacaaugu gagccaccac guccagcugg aagggucaac aucuuuuaca	2280
uucugcaagc acaucugcau uuucacccca cccuuccccu ccuucuccu uuuuuauacc	2340

[0014]

cauuuuuaua ucgaucucuu auuuuacaau aaaacuugc ugccaccugu gugucugagg	2400
ggug	2404
<210> 7	
<211> 2331	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 7	
ugaggccagg agauggaggc ugacagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag	60
ugacagagca agaccuauuc ucaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag	120
acgccaauc ucucuagcuc gcuagugggu ugacaggaggu gcuuacgcau guuuguuuc	180
uugcugccgu cuuccaguug cuuuauucgu ucacuugugc ccugacuuc aacucugcu	240
ccuuccucuu ccuacaguac ucccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga	300
ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcacccgc guccgcgcca	360
uggccaucua caagcaguc cagcacuga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug	420
agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa	480
auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugcccu	540
augagccgcc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaaca	600
guuccugcau gggcggcag aaccggaggc cauccucac caucauca cuggaagacu	660
ccagugguaa ucuacugga cggaaacagcu uugaggugcg uguuugugcc uguccugga	720
gagaccggcg cacagaggaa gagaauucc gcaagaaagg ggagccucac cagagcugc	780
ccccaggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucucc cagccaaaga	840
agaaaccacu ggauggagaa uauuucacc uucagaugcu acuugacuua cgaugguguu	900
acuuccugau aaacucgucg uaaguugaaa auauuauccg ugggcgugag cgcuucgaga	960
uguuccgaga gcugaaugag gccuuggaac ucaaggaugc ccaggcuggg aaggagccag	1020

[0015]

gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accucccgcc	1080
auaaaaaacu cauguucaag acagaagggc cugacucaga cugacauucu ccacuucuug	1140
uuccccacug acagccuccc accccaucu cuccuccccc ugccaauuug gguuuugggu	1200
cuuugaacct uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuc cauuugcuuu	1260
gucccggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuguugugg ggaggaggau	1320
ggggaguagg acauaccagc uuagauuuua agguuuuuac ugugagggau guuugggaga	1380
uguaagaaau guucucgag uuaaggguua guuuacauuc agccacauuc uagguagggg	1440
cccacuucac cguacuaacc aggggaagcug ucccucacug uugaauuuuc ucuacuucā	1500
aggcccauau cugugaaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uuugagggu	1560
uaaugaaaua auguacauu gcccuugaaa ccaccuuuuu uuacaugggg ucuagaauu	1620
gacccccuug agggugcuug uucccucucc cuguuggucg guggguuggu aguuucuaca	1680
guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcugggccag ccaaaccug	1740
ucugacaacc ucuuggugaa ccuuaguacc uaaaaggaaa ucucaccca ucccacacc	1800
uggaggauuu caucucuugu auaugaugau cuggauccac caagacuugu uuuaugcuca	1860
gggucaauuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu ucuuugaga cugggucug	1920
cuuuguugcc caggcuggag uggaguggcg ugaucuuagg uuacugcagc cuuugccucc	1980
ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc	2040
auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agauggguc ucacaguguu gccaggcug	2100
guucuaaaau ccugggcua ggcgauccac cugucucagc cuccagagu gcugggauua	2160
caauugugag ccaccacguc cagcuggaag ggucaacauu uuuuacauuc ugcaagcaca	2220
ucugcauuuu caccacacc uuccccuccu ucuccuuuu uauaucceau uuuuauaucg	2280
aucucuauuu uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g	2331

[0016]

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 8

cagaccuau gaaacuacu

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 9

ggauuuugg gagauguaa

19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 10

gacucagacu gacauucua

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

[0017]

<223> 化学合成的

<400> 11

ggguugguag uuucuacaa

19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 12

gggauguuug ggagaugua

19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 13

ggauccacca agacuugua

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 14

gagggauuu ugggagaua

19

<210> 15

<211> 19

[0018]

<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	15	
	gggccugacu cagacugaa	19
<210>	16	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	16	
	gacucagacu gacauucuu	19
<210>	17	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	17	
	gcuuuugcac cuaccucaa	19
<210>	18	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	18	
	ggauguuugg gagauguau	19

[0019]

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 19

gggccugacu cagacugau

19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 20

cagaccuaug gaaacuaca

19

<210> 21

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 21

aguaguuuucc auaggucug

19

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

[0020]

<223> 化学合成的

<400> 22

uuacauccucc caaacaucc

19

<210> 23

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 23

uagaauguca gucugaguc

19

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 24

uuguagaaac uaccaaccc

19

<210> 25

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 25

uacauccucc aaacauccc

19

<210> 26

<211> 19

[0021]

<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	26	
	uacaagucuu gguggaucc	19
<210>	27	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	27	
	uauccuccaa acaucccuc	19
<210>	28	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	28	
	uucagucuga gucaggccc	19
<210>	29	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	29	
	aagaauguca gucugaguc	19

[0022]

<210>	30	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	30	
uugagguagg ugcaaaugc		19
<210>	31	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	31	
auacaucucc caaacaucc		19
<210>	32	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	化学合成的	
<400>	32	
aucagucuga gucaggccc		19
<210>	33	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

[0023]

<223> 化学合成的

<400> 33

uguaguuuucc auaggucug

19