(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 1 月 23 日 (23.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/014948 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 21/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/096397

(22) 国际申请日: 2018 年 7 月 20 日 (20.07.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 广州市锐博生物科技有限公司 (GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省广州市广州开发区科学大道182号创新大厦C3栋13层, Guangdong 510663 (CN)。

(72) 发明人: 张必良 (ZHANG, Biliang); 中国广东省广州市广州开发区科学大道182号创新大厦C3栋13层, Guangdong 510663 (CN)。 杨秀群 (YANG, Xiuqun); 中国广东省广州市广州开发区科学大道182号创新大厦C3栋13层, Guangdong 510663 (CN)。 萨玛斯基·丹米其 (SAMARSKY, Dmitry); 中国广东省广州市广州市广州开发区科学大道182号创新大厦C3栋13层, Guangdong 510663 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI&PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** NUCLEIC ACID UNIT, POLYMERIC NUCLEIC ACID AND USE THEREOF

(54) **发明名称**: 核酸单元及其聚合核酸与应用

(57) **Abstract:** Disclosed are a new type of nucleic acid unit for the construction of a polymeric nucleic acid and a polymeric nucleic acid for interfering with target gene expression. In the present invention, by means of the design and construction of the new type of nucleic acid unit and the self-assembled polymeric nucleic acid thereof, multiple target interference can be realized, wherein same can be used for inhibiting multiple gene expression in the signaling pathway of disease occurrence or development, or simultaneously inhibiting multiple disease target gene expressions, possessing broad application prospects in multiple subject areas such as biology and chemistry, etc. The polymeric nucleic acid can target multiple sequences simultaneously, wherein the sequences may be located in one or more genes. The advantages of the present invention comprise: 1) a high RNAi performance; 2) good stability; 3) reduction of the off-target rate; 4) enhanced ability to be introduced into cells; and 5) a modular design.

(57) **摘要**: 本发明公开了新型的可用于构建聚合核酸的核酸单元及可用于干扰目的基因表达的聚合核酸。本发明通过设计和构建新型的核酸单元及其自组装聚合核酸，实现了多靶标干扰，可用于抑制疾病发生或发展的信号通路中的多个基因表达，或同时抑制多个疾病靶基因表达，在生物学、化学等多个学科领域具有广阔的应用前景。该聚合核酸可实现同时靶向多个序列，所述序列可在一个基因中，或位于多个基因中。本发明优势在于：1)RNAi效能高；2)稳定性好；3)降低脱靶率；4)导入细胞能力增强；5)可模块化设计。

WO 2020/014948 A1

核酸单元及其聚合核酸与应用

技术领域

本发明属于核酸技术领域，具体涉及新型结构的核酸单元与其自组装聚合核酸，所述聚合核酸可干扰一个或多个目的基因的表达。

背景技术

CON（互补寡核苷酸）技术使得人工合成的寡核苷酸分子能够通过序列互补作用与靶向分子结合，并改变靶向分子的生物特性。CON 技术包括 RNAi（RNA 干扰）技术和 ASO（反义寡核苷酸）技术两大类，目前已广泛应用于功能基因组学研究，并有望成为除小分子化合物和生物制剂以外的第三大治疗手段。如用于治疗纯合子型家族性高胆固醇血症（homozygous familial hypercholesterolemia，FoFH）的米泊美生（mipomersen），其是 Genzyme 研发的一种合成的硫代磷酸寡核苷酸，通过与 Apo B-100 蛋白 mRNA 的编码区互补配对，抑制 Apo B-100 蛋白（LDL 和 VLDL 的主要载脂蛋白）的翻译合成，从而有效降低 FoFH 患者的 LDL-C、TC、Non-HDL-C 水平。尽管 CON 技术已经取得了一定成功，但这项技术仍有待完善之处。如传统的 RNAi 试剂有下述不足：1）繁琐的合成步骤及相对高的生产成本；2）对内切酶和外切酶高度敏感，稳定性不高；3）抑制有效率不够高，不能保证单个分子一定能抑制靶基因表达；4）非特异活性导致的副作用，该非特异性的作用主要源自正义链；5）难以导入细胞尤其是动物体内。

纳米技术研究的是直径在 1～100nm 纳米范围内物质的性质和应用。纳米结构物质所具有的小尺寸效应、表面效应、高扩散率等特性为科学研究和技术应用开拓了新领域。寡核苷酸结构灵活，如 RNA 结构，能够自我组装形成纳米结构。以 DNA 和 RNA 为代表的核酸纳米技术，是纳米技术领域发展的一个新方向。

发明公开

本发明要解决的技术问题是如何抑制或降低或干扰靶基因的表达。

为了解决上述技术问题，本发明首先提供了一种用于抑制或降低或干扰靶基因表达的聚合核酸分子。

本发明提供的用于抑制或干扰靶基因表达的聚合核酸分子由n条X型核酸分子组成；

每条所述X型核酸分子自5’端起依次由靶向片段一、靶向片段二和接头片段三组成。每条所述X型核酸分子的靶向片段一与其相邻的X型核酸分子的接头片段三互补配对。具体的，将n条X型核酸分子分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元；所述X1单元的接头片段三与所述X2单元

的靶向片段一互补配对（完全互补），所述X2单元的接头片段三与所述X3单元的靶向片段一互补配对（完全互补），依次类推，所述Xn-1单元的接头片段三与所述Xn单元的靶向片段一互补配对（完全互补），所述Xn单元的接头片段三与所述X1单元的靶向片段一互补配对（完全互补）。每条所述X型核酸分子的靶向片段一与其他X型核酸分子序列均不互补。

每条所述聚合核酸分子的靶向片段一和靶向片段二均与靶基因互补配对；每条所述聚合核酸分子通过靶向片段一和靶向片段二与靶基因的特定序列结合，实现抑制或降低或干扰靶基因的表达。在某些特定的情况下，与靶基因序列互补的区域可以延长至接头片段三的部分序列。同一条X型核酸分子中的靶向片段一和靶向片段二可以相同，也可不同。两条不同的X型核酸分子中的靶向片段一或靶向片段二可以相同，也可不同。

每条所述X型核酸分子的长度相同（结构也相同）。

所述n为大于或等于3的整数。

在本发明的具体实施例中，所述n条X型核酸分子依次首尾相接（通过前一条X型核酸分子的接头片段三与下一条相邻的X型核酸分子的靶向片段一互补实现），最终形成具有环状二级结构的聚合核酸分子。

上述聚合核酸分子中，所述n条X型核酸分子还可形成具有线性结构的聚合核酸分子，所述具有线性结构的聚合核酸分子还包括H型核酸分子；所述H型核酸分子由H1型核酸分子和Hn型核酸分子组成。

将n条X型核酸分子分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元；所述X1单元的接头片段三与所述X2单元的靶向片段一互补配对，所述X2单元的接头片段三与所述X3单元的靶向片段一互补配对，依次类推，所述Xn-1单元的接头片段三与所述Xn单元的靶向片段一互补配对；所述H1型核酸分子与所述X1单元的靶向片段一互补配对；所述Hn型核酸分子与所述Xn单元的接头片段三互补配对。

进一步的，所述H型核酸分子的5’端或3’端还包括Hy片段；所述H型核酸分子由Hx片段和Hy片段组成。

所述H1型核酸分子与所述X1单元的互补区可延伸至所述X1单元的靶向片段二的部分或全部序列；所述Hn型核酸分子与所述Xn单元的互补区可延伸至所述Xn单元的靶向片段二的部分或全部序列。

所述H1型核酸分子的Hx片段与所述X1单元的靶向片段一互补配对；所述Hn型核酸分子的Hx片段与所述Xn单元的接头片段三互补配对；所述Hy片段与所述X1单元或所述Xn单元的靶向片段二自5’端或3’端起1个、2个或多个连续的核酸分子互补配对。

上述聚合核酸分子中，具有环状结构的聚合核酸分子还包括C型核酸分子；所述C型核酸分子由n个片段依次连接而成，n个片段分别为n条所述X型核酸分子中的靶向片段二的反向互补序列。具体的，所述C型核酸分子自3’端起依次由帽

端片段1、帽端片段2、帽端片段3，依次类推，帽端片段Cn-1、帽端片段n组成；将n条X型核酸分子分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元；

所述X1单元的接头片段三与所述X2单元的靶向片段一互补配对，所述X2单元的接头片段三与所述X3单元的靶向片段一互补配对，依次类推，所述Xn-1单元的接头片段三与所述Xn单元的靶向片段一互补配对，所述Xn单元的接头片段三与所述X1单元的靶向片段一互补配对；所述帽端片段1与所述X1单元的靶向片段二互补配对，所述帽端片段2与所述X2单元的靶向片段二互补配对，依次类推，所述帽端片段Cn-1与所述Xn-1单元的靶向片段二互补配对，所述帽端片段n与所述Xn单元的靶向片段二互补配对。

上述聚合核酸分子中，所述核酸分子（X型核酸分子、H型核酸分子或C型核酸分子）可为DNA或RNA或由DNA和RNA组成的寡核苷酸。

进一步的，所述核酸分子（X型核酸分子、H型核酸分子或C型核酸分子）为单链RNA分子。

上述聚合核酸分子中，所述X型核酸分子的长度为15-50 nt，优选为24-36 nt；

所述靶向片段一的长度为5-24 nt；

所述靶向片段二的长度为1-20 nt；

所述接头片段三的长度为5-24 nt；

所述靶向片段一和所述靶向片段二的长度总和至少为14-16 nt；

所述Hy片段的长度为2-6 nt或更长。

进一步的，所述X型核酸分子的长度为24-36 nt。

上述聚合核酸分子中，所述聚合核酸分子至少包括一个修饰的核苷酸。

进一步的，所述修饰为磷酸骨架修饰、碱基修饰和/或核糖修饰。所述核糖修饰为核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。所述烷基为甲基、乙基、丙基或甲乙基。

更进一步的，所述X型核酸分子的接头片段三自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

所述H型核酸分子的Hx片段自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

所述H型核酸分子自3’端第一位核苷酸起连续的8-30个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；优选的，所述H型核酸分子自3’端第一位核苷酸起连续的14-18个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

所述C型核酸分子中每个帽端片段自5’端第一位核苷酸起连续的2-6个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

上述聚合核酸分子中，所述n为3或4或5或6或7或8。

进一步的，所述n为4或5或6。

上述聚合核酸分子中，所述靶基因的个数为一个或两个或多个，且所述靶

基因的个数不超过n个；每条X型核酸分子对应一个靶基因，或者多条X型核酸分子对应同一个靶基因的不同区域。

进一步的，所述靶基因的个数为1个或4个或6个。

所述靶基因为如下基因中至少一种：PPIB基因、p65基因、BIRC5基因、CTNNB基因、COPS5基因、CLU基因、EIF4E基因、HIF1A基因、TP53基因、VEGFA基因和SOD1基因。

更进一步的，用于干扰靶基因PPIB表达的聚合核酸分子为如下a1）-a5）：

a1）由序列1、序列2、序列3和序列4所示的单链RNA分子组成；

a2）由序列1、序列2、序列3、序列4、序列20和序列21所示的单链RNA分子组成；

a3）由序列1、序列2、序列3、序列4和序列8所示的单链RNA分子组成；

a4）由序列2、序列3、序列9、序列10、序列11和序列12所示的单链RNA分子组成；

a5）由序列2、序列3、序列6、序列9、序列10、序列11、序列13和序列14所示的所示的单链RNA分子组成；

用于干扰靶基因P65表达的聚合核酸分子为如下b1）-b5）：

b1）由序列15、序列16、序列17和序列18所示的单链RNA分子组成；

b2）由序列6、序列7、序列15、序列16、序列17和序列19所示的单链RNA分子组成；

b3）由序列15、序列16、序列17、序列18和序列22所示的单链RNA分子组成；

b4）由序列15、序列16、序列17、序列23、序列24和序列25所示的单链RNA分子组成；

b5）由序列15、序列16、序列17、序列20、序列23、序列24、序列26和序列27所示的所示的单链RNA分子组成；

用于同时干扰靶基因BIRC5、CTNNB、COPS5和CLU表达的聚合核酸分子为由序列28、序列29、序列30和序列31所示的单链RNA分子组成；

用于同时干扰靶基因BIRC5、CTNNB、COPS5、CLU、EIF4E和HIF1A表达的聚合核酸分子为由序列28、序列29、序列30、序列32、序列33和序列34所示的单链RNA分子组成；

用于同时干扰靶基因SOD1、PPIB、P65和VEGFA表达的聚合核酸分子为如下c1）-c3）：

c1）由序列35、序列36、序列37和序列38所示的单链RNA分子组成；

c2）由序列35、序列36、序列37、序列38、序列39和序列40所示的单链RNA分子组成；

c3）由序列35、序列36、序列37、序列38和序列41所示的单链RNA分子组成；

用于干扰靶基因VEGFA表达的聚合核酸分子为如下d1）-d11）：

d1）由序列42、序列43、序列44、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d2）由序列48、序列49、序列50、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d3）由序列54、序列55、序列56、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d4）由序列42、序列43、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d5）由序列48、序列49、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d6）由序列54、序列55、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d7）由序列42、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d8）由序列48、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d9）由序列54、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d10）由序列60、序列61、序列62、序列63、序列64和序列65所示的单链RNA分子组成；

d11）由序列66、序列67、序列68、序列69、序列70和序列71所示的单链RNA分子组成；

用于干扰靶基因TP53表达的聚合核酸分子为如下e1）-e11）：

e1）由序列72、序列73、序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e2）由序列78、序列79、序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e3）由序列84、序列85、序列86、序列87、序列88和序列89所示的单链RNA分子组成；

e4）由序列73、序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e5）由序列79、序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e6）由序列54、序列55、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

e7）由序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e8）由序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e9）由序列序列86、序列87、序列88和序列89所示的单链RNA分子组成；

e10）由序列90、序列91、序列92、序列93、序列94和序列95所示的单链RNA

分子组成；

e11）由序列96、序列97、序列98、序列99、序列100和序列101所示的单链RNA分子组成。

为了解决上述技术问题，本发明又提供了上述聚合核酸分子的衍生物。

本发明提供的上述聚合核酸分子的衍生物为如下（m1）-（m5）中任一种：

（m1）将上述聚合核酸分子删除或增加一个或几个核苷酸，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m2）将上述聚合核酸分子进行核苷酸取代或修饰，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m3）将上述聚合核酸分子的骨架改造为硫代磷酸脂骨架，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m4）由上述聚合核酸分子编码的肽核酸、锁核酸或解锁核酸，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m5）将上述聚合核酸分子的一端或中间接上信号分子和／或活性分子和／或功能基团，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物。

为了解决上述技术问题，本发明还提供了上述聚合核酸分子的制备方法。

本发明提供的上述聚合核酸分子的制备方法包括如下步骤：

M1）合成上述X型核酸分子和/或H型核酸分子和/或C型核酸分子；

M2）将所述X型核酸分子和/或所述H型核酸分子和/或所述C型核酸分子退火，得到所述聚合核酸。

上述方法中，所述退火的反应体系为将等摩尔量的各单链RNA分子、RNA退火buffer和水混匀得到的体系。所述退火的反应条件为PCR仪中90℃，2min使其充分变性，随后PCR 仪中降温至25℃使其退火。

n为4时，退火体系如下（总体积为100μL）：各单链RNA分子溶液（浓度为100μM）20μL、RNA退火buffer(5X)15μL、DEPC水 5μL。

n为5时，退火体系如下（总体积为150μL）：各单链RNA分子溶液（浓度为150μM）20μL、RNA退火buffer(5X)30μL、DEPC水 20μL。

n为6时，退火体系如下（总体积为200μL）：各单链RNA分子溶液（浓度为200μM）20μL、RNA退火buffer(5X)40μL、DEPC水 40μL。

为了解决上述技术问题，本发明还提供了上述聚合核酸分子或衍生物的新用途。

本发明提供了上述聚合核酸分子或衍生物在如下A1）或A2）中的应用；

A1）调控细胞中靶基因表达水平；

A2）制备预防和/或缓解和/或治疗由靶基因表达引起的疾病的产品。

上述应用中，所述调控为抑制或降低或干扰。

上述应用中，所述细胞为肿瘤细胞。

上述应用中，所述靶基因为疾病相关基因；所述疾病相关基因具体为肿瘤相关基因；所述肿瘤相关基因具体为如下基因中至少一种：PPIB基因、p65基因、BIRC5基因、CTNNB基因、COPS5基因、CLU基因、EIF4E基因、HIF1A基因、TP53基因、VEGFA基因和SOD1基因。

为了解决上述技术问题，本发明还提供了一种抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的试剂或试剂盒或药物。

本发明提供的抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的试剂或试剂盒或药物包括上述聚合核酸分子或上述衍生物。

为了解决上述技术问题，本发明最后提供了一种抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的方法。

本发明提供的抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的方法包括如下步骤：将上述聚合核酸分子或衍生物导入所述细胞，实现抑制或降低所述细胞中靶基因的表达水平。

上述方法中，所述导入的方法为将所述聚合核酸分子、转染试剂和缓冲液混匀后加入细胞培养基中，得到反应体系；所述聚合核酸分子在所述反应体系中的终浓度为1-300 nM。

上述方法中，所述细胞为肿瘤细胞。

上述方法中，所述靶基因为疾病相关基因；所述疾病相关基因具体为肿瘤相关基因；所述肿瘤相关基因具体为如下基因中至少一种：PPIB基因、p65基因、BIRC5基因、CTNNB基因、COPS5基因、CLU基因、EIF4E基因、HIF1A基因、TP53基因、VEGFA基因和SOD1基因。

本发明优势在于：

1）RNAi 效能提高；

2）结构更稳定，化学稳定性好，抗核酸酶降解能力增强，尤其是血液中的稳定性增强，半衰期延长；

3）降低脱靶率；

4）能形成纳米颗粒结构，导入细胞能力增强；

5）可模块化设计核酸分子。

6）一些结构的聚合核酸发挥 RNAi 作用不需要 Dicer 酶的参与，因此对化学修饰的耐受程度更高，可以部分修饰或完全修饰。

本发明将 CON 技术与纳米技术结合，通过构建具有可准确设计的，且具有自我组装能力的核酸结构，从而实现多靶标干扰作用，可用于抑制疾病发生或发展的信号通路中的多个基因表达，或同时抑制多个疾病靶基因表达，在生物学、化学等多个学科领域具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为靶向核酸单元-X 型示意图。

图 2 为侧翼核酸单元-H 型示意图。

图 3 为帽端核酸单元-C 型示意图。

图4为R结构聚合核酸平面和成环示意图。上图为R结构聚合核酸平面示意图。下图为R结构聚合核酸成环示意图（左：R=（Xi）4；右：R=（Xi）6）。

图 5 为 L 结构聚合核酸平面示意图。

图 6 为 Cr 结构聚合核酸平面示意图。

图 7 为单基因相对表达水平。

图 8 为多基因相对表达水平。

图 9 为多基因相对表达水平（n=4）。

实施发明的最佳方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例1、核酸单元、聚合核酸的设计与合成

一、核酸单元的设计

本发明设计了3种型态的核酸单元，分别命名为X型靶向核酸单元、H型侧翼核酸单元、C型帽端核酸单元。这些核酸单元可以自由组合为多种结构的聚合核酸。

1、靶向核酸单元：X型

X型靶向核酸单元的结构如下：5’-T1-T2-A3-3’。其中T1为靶向片段一，T2为靶向片段二，A3为接头片段三，T1和T2组成一段与靶基因序列互补的序列。在某些特定的情况下，与靶基因序列互补的区域可以延长至A3的部分序列。X型靶向核酸单元的长度为15-50 nt，优选为24-36 nt。其中T1长度为5-24 nt；T2长度为1-20 nt，A3长度为5-24 nt。X型靶向核酸单元示意图见图1。

2、侧翼核酸单元：H型

H型侧翼核酸单元的结构如下：3’-Hx-Hy-5’或3’-Hy-Hx-5’。其中Hx为侧翼主体片段，Hy为侧翼延伸片段（Hy可以不存在）。Hx与Hy通过磷酸二酯键连接。Hy位于Hx的5’端或3’端。Hx与X单元的T1片段或A3片段互补配对；Hy与X单元的T2片段自5’端或3’端起1个、2个或多个连续的核苷酸互补配对。Hy的长度可为2-6 nt或更长。H型侧翼核酸单元示意图见图2。

3、帽端核酸单元：C型

C型帽端核酸单元的结构如下：3’-C1-C2-……Cn-5’。其中C1为帽端片段1，与X1单元的T2片段反向互补；C2为帽端片段2，与X2单元的T2片段反向互补，依次类推，Cn为帽端片段n，与Xn单元的T2片段反向互补。C型帽端核酸单元示意图见图3。

二、聚合核酸分子的设计

本发明根据步骤一的三种核酸单元设计了3种结构的聚合核酸，分别命名为

R结构聚合核酸、L结构聚合核酸、Cr结构聚合核酸。这些结构能够同时靶向同一个基因的不同位点，也能够同时靶向不同基因的不同位点，实现干扰靶基因的表达。

1、聚合核酸结构一：R结构

R结构聚合核酸的结构如下：（Xi）n。其中Xi为靶向核酸单元。n为大于或等于3的整数，优选为3-8的整数，更优选为4、5、6。

将n个X型靶向核酸单元分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元；

本发明的R结构聚合核酸中，每个靶向核酸单元均通过序列互补作用与聚合核酸中除自身外的另外两个靶向核酸单元形成双链区域，即相邻X单元通过T1片段和A3片段互补配对连接，具体的，X1单元的A3片段与X2单元的T1片段互补配对，X2单元的A3片段与X3单元的T1片段互补配对，依次类推，Xn单元的A3片段与X1单元的T1片段互补配对（每个靶向核酸单元的T1片段与其相邻的靶向核酸单元的A3片段互补配对，且每个靶向核酸单元的T1片段与其他靶向核酸单元序列均不互补配对），从而形成环状二级结构。在这个环状结构中，每个靶向核酸单元的结构和长度相同。

每个靶向核酸单元能通过其T1和T2与靶基因的特定序列结合，从而调控靶基因的表达。

R结构聚合核酸的平面和成环示意图见图4。

2、聚合核酸结构二：L结构

L结构聚合核酸的结构如下：H1-（Xi）n-Hn。其中H1、Hn均为侧翼核酸单元，Xi为靶向核酸单元。n为大于或等于3的整数，优选为3-8的整数，更优选为4、5、6。

将n个X型靶向核酸单元分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元。

本发明的L结构聚合核酸中，X1单元的A3片段与X2单元的T1片段互补配对，X2单元的A3片段与X3单元的T1片段互补配对，依次类推，Xn-1单元的A3片段与Xn单元的T1片段互补配对；H1单元与X1单元的T1片段互补配对。H1单元与X1单元的互补区还可延伸至X1单元的T2片段的部分或全部；Hn单元与Xn单元的A3片段互补配对，Hn单元与Xn单元的互补区还可延伸至Xn单元的T2片段的部分或全部。H1单元的5’端或Hn单元的3’端还包括Hy片段，Hy片段与所述X1单元或所述Xn单元的靶向片段二自5’端或3’端起1个、2个或多个连续的核酸分子互补配对。

L结构聚合核酸的平面示意图见图5。

3、聚合核酸结构三：Cr结构

Cr结构聚合核酸的结构如下：（Xi）n-C。其中Xi为靶向核酸单元，C为帽端核酸单元。n为大于或等于3的整数，优选为3-8的整数，更优选为4、5、6。

将n个X型靶向核酸单元分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元。

本发明的Cr结构聚合核酸中，X1单元的A3片段与X2单元的T1片段互补配对，X2单元的A3片段与X3单元的T1片段互补配对，依次类推，Xn-1单元的A3片段与Xn单元的T1片段互补配对；帽端核酸单元C由帽端片段1、帽端片段2，依次类推，帽端片段n组成，帽端片段1与X1单元的T2片段互补配对，帽端片段2与X2单元的T2片段互补配对，依次类推，帽端片段n与Xn单元的T2片段互补配对，帽端片段1、帽端片段2、……和帽端片段n均通过磷酸二酯键连接为一条单链核酸。

Cr结构聚合核酸的平面示意图见图6。

三、聚合核酸的合成方法及核酸单元的修饰方法

1、聚合核酸的合成方法

本发明的核酸单元以序列特异性方式彼此退火，其互补性促进此聚合核酸的自装配，形成具有二级结构的聚合核酸分子。具体合成方法如下：

1）合成聚合核酸结构所需的核酸单元；

2）将核酸单元置于退火条件中，使其相互退火，自组装形成二级结构体。

退火反应体系为将等摩尔量的各核酸单元、RNA退火buffer（5X）（碧云天Annealing Buffer for RNA oligos（5X），R0051）和水（DEPC水）混匀得到的体系。

退火反应条件为PCR仪中90℃，2min使其充分变性，随后PCR仪中降温至25℃使其退火。

2、核酸单元的修饰方法

为了增加核酸酶稳定性和生物学活性可在核酸中引入适当的核苷酸糖、碱基和磷酸部分的修饰，包括对核糖进行化学修饰，如2’核糖羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代，烷基包括甲基、乙基、丙基或甲乙基等，该类核酸修饰不会降低聚合核酸的干扰活性。本发明设计的核酸单元包括如下修饰：

1）靶向核酸单元中的A3接头片段自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

2）侧翼核酸单元的侧翼主体片段自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；或侧翼核酸单元自3’端第一位核苷酸起连续的8-30个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。优选的，侧翼核酸单元自3’端第一位核苷酸起连续的14-18个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

3）帽端核酸单元的每个帽端核酸片段从5’端到3’端的2-6个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

实施例2、聚合核酸的制备及其在干扰靶基因表达中的应用

（一）R结构聚合核酸：靶向同一基因的不同区域的抑制实验

1、聚合核酸

制备如下结构的聚合核酸，每个结构的靶向核酸单元分别靶向VEGFA、TP53基因的4个、5个或6个不同区域。

A表示靶向核酸单元的T1和A3片段为12nt，T2片段为6nt。

B表示靶向核酸单元的T1和A3片段为12nt，T2片段为5nt。

C表示靶向核酸单元的T1和A3片段为12nt，T2片段为3nt。

D表示靶向核酸单元的T1和A3片段为11nt，T2片段为6nt。

E表示靶向核酸单元的T1和A3片段为10nt，T2片段为6nt。

n为4时，退火体系如下（总体积为100μL）：各核酸单元溶液（浓度为100μM）20μL、RNA退火buffer(5X)15μL、DEPC水 5μL。

n为5时，退火体系如下（总体积为150μL）：各核酸单元溶液（浓度为150μM）20μL、RNA退火buffer(5X)30μL、DEPC水 20μL。

n为6时，退火体系如下（总体积为200μL）：各核酸单元溶液（浓度为200μM）20μL、RNA退火buffer(5X)40μL、DEPC水 40μL。

靶基因为VEGFA的聚合核酸为如下1）-11）：

1）VEGFA-R6-A（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表1的序列42-47。

2）VEGFA-R6-B（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表1的序列48-53。

3）VEGFA-R6-C（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表1的序列54-59。

4）VEGFA-R5-A（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表1的序列42、43、45、46、47。

5）VEGFA-R5-B（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表1的序列48、49、51、52、53。

6）VEGFA-R5-C（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表1的序列54、55、57、58、59。

7）VEGFA-R4-A（R结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表1的序列42、45、46、47。

8）VEGFA-R4-B（R结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表1的序列48、51、52、53。

9）VEGFA-R4-C（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X4依次为表1的序列54、57、58、59。

10）VEGFA-R6-D（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表1的60-65。

11）VEGFA-R6-E（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表1的序列66-71。

靶基因为TP53的聚合核酸为如下1）-11）：

1）TP53-R6-A（R结构，n=4）：其X单元序列从X1-X6依次为表2的序列72-77。
2）TP53-R6-B（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表2的序列78-83。
3）TP53-R6-C（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表2的序列84-89。
4）TP53-R5-A（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表2的序列73-77。
5）TP53-R5-B（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表2的序列79-83。
6）TP53-R5-C（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X5依次为表2的序列85-89。
7）TP53-R4-A（R结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表2的序列74-77。
8）TP53-R4-B（R结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表2的序列80-83。
9）TP53-R4-C（R结构，n=5）：其X单元序列从X1-X4依次为表2的序列86-89。
10）TP53-R6-D（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表2的序列90-95。
11）TP53-R6-E（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表2的序列96-101。

表 1、核酸单元的序列

靶基因	序列 (5'-3')	序列编号
VEGFA	AGCAGAAAGUUCAUGGUUUCUUGggugcau	42
VEGFA	AUGCACCCAAGACAGCAGAGAUCgaguaca	43
VEGFA	UGUACUCGAUCUCAUCAGGGUGGacaucuu	44
VEGFA	AAGAUGUCCACCAGGGUCAUGCGgaucaaa	45
VEGFA	UUUGAUCCGCAUAAUCUGGGCCAgcacaua	46
VEGFA	UAUGUGCUGGCCUUGGUGGAACUuucugcu	47
VEGFA	AGCAGAAAGUUCAUGGUUCUUGggugcau	48
VEGFA	AUGCACCCAAGACAGCAAGAUCgaguaca	49
VEGFA	UGUACUCGAUCUCAUCAGGUGGacaucuu	50
VEGFA	AAGAUGUCCACCAGGGUAUGCGgaucaaa	51
VEGFA	UUUGAUCCGCAUAAUCUGGCCAgcacaua	52
VEGFA	UAUGUGCUGGCCUUGGUGAACUuucugcu	53
VEGFA	AGCAGAAAGUUCAUGUCUUGggugcau	54
VEGFA	AUGCACCCAAGACAGAGAUCgaguaca	55
VEGFA	UGUACUCGAUCUCAUGGUGGacaucuu	56
VEGFA	AAGAUGUCCACCAGGAUGCGgaucaaa	57
VEGFA	UUUGAUCCGCAUAAUGGCCAgcacaua	58
VEGFA	UAUGUGCUGGCCUUGGAACUuucugcu	59
VEGFA	AGCAGAAAGUUCAUGGUCUUGggugcau	60
VEGFA	AUGCACCCAAGACAGCAGAUCgaguaca	61

VEGFA	UGUACUCGAUCUCAUCAGUGGacaucuu	62
VEGFA	AAGAUGUCCACCAGGGUUGCGgaucaaa	63
VEGFA	UUUGAUCCGCAUAAUCUGCCAgcacaua	64
VEGFA	UAUGUGCUGGCCUUGGUAACUuucugcu	65
VEGFA	AGCAGAAAGUUCAUGGUUGggugcau	66
VEGFA	AUGCACCCAAGACAGCAUCgaguaca	67
VEGFA	UGUACUCGAUCUCAUCUGGacaucuu	68
VEGFA	AAGAUGUCCACCAGGGGCGgaucaaa	69
VEGFA	UUUGAUCCGCAUAAUCCCAgcacaua	70
VEGFA	UAUGUGCUGGCCUUGGACUuucugcu	71

表 2、核酸单元序列

靶基因	序列 (5'-3')	序列编号
TP53	UGUGGAAUCAACCCACAGUUUGCgugugga	72
TP53	UCCACACGCAAAUUUCCUACAGAaacacuu	73
TP53	AAGUGUUUCUGUCAUCCAACUACaugugua	74
TP53	UACACAUGUAGUUGUAGUUGGUAaucuacu	75
TP53	AGUAGAUUACCACUGGAGUCUCCgcaagaa	76
TP53	UUCUUGCGGAGAUUCUCUGUUGAuuccaca	77
TP53	UGUGGAAUCAACCCACAUUUGCgugugga	78
TP53	UCCACACGCAAAUUUCCACAGAaacacuu	79
TP53	AAGUGUUUCUGUCAUCCACUACaugugua	80
TP53	UACACAUGUAGUUGUAGUGGUAaucuacu	81
TP53	AGUAGAUUACCACUGGAUCUCCgcaagaa	82
TP53	UUCUUGCGGAGAUUCUCGUUGAuuccaca	83
TP53	UGUGGAAUCAACCCAUUUGCgugugga	84
TP53	UCCACACGCAAAUUUACAGAaacacuu	85
TP53	AAGUGUUUCUGUCAUACUACaugugua	86
TP53	UACACAUGUAGUUGUUGGUAaucuacu	87
TP53	AGUAGAUUACCACUGUCUCCgcaagaa	88
TP53	UUCUUGCGGAGAUUCGUUGAuuccaca	89
TP53	UGUGGAAUCAACCCACAUUGCgugugga	90
TP53	UCCACACGCAAAUUUCCCAGAaacacuu	91

TP53	AAGUGUUUCUGUCAUCCCUACaugugua	92
TP53	UACACAUGUAGUUGUAGGGUAaucuacu	93
TP53	AGUAGAUUACCACUGGACUCCgcaagaa	94
TP53	UUCUUGCGGAGAUUCUCUUGAuuccaca	95
TP53	UGUGGAAUCAACCCACUGCgugugga	96
TP53	UCCACACGCAAAUUUCAGAaacacuu	97
TP53	AAGUGUUUCUGUCAUCUACaugugua	98
TP53	UACACAUGUAGUUGUAGUAaucuacu	99
TP53	AGUAGAUUACCACUGGUCCgcaagaa	100
TP53	UCUUGCGGAGAUUCUUGAuuccaca	101

注：小写字母表示该核苷酸核糖经过 2'-O-甲基核糖修饰。下划线标记的序列为靶序列。

2、抑制实验

将5×10^5个HeLa细胞（ATCC编号为CRL-1958）接种于含10％胎牛血清的DMEM培养基的12孔培养板中，分别将步骤1制备的聚合核酸转染HeLa细胞：将聚合核酸与转染试剂、缓冲液（广州市锐博生物科技有限公司，名称riboFECT™ CP Buffer，货号C10511-1）混合后加入细胞培养基中，每孔体积1mL，使聚合核酸的转染终浓度为50nM，将培养板置于5％CO_2、37℃恒温培养箱中培养48h。转染试剂及转染具体步骤参照ribo*Fect*™（广州市锐博生物科技有限公司）中的方法。

每次细胞铺板除了试验组，还设置阴性对照组（NC）和未处理对照组（NT）。试验组和对照组均有3个重复。NC组的对照序列为siRNA，为如下两条单链RNA分子互补结合得到的双链RNA分子：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'和5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'。

37℃、5％CO_2孵育 48h 后收集转染后细胞，rizol 法提取转染后细胞的 RNA 进行实时定量 PCR，检测靶基因 mRNA 表达水平，q-PCR 重复 3 次，结果均用平均值±SD 表示。检测靶基因的实时定量 PCR 引物序列如附表所示。

检测结果见表 3。实验结果表明，以上不同结构的聚合分子均可高效抑制靶基因的表达。

表3、mRNA相对表达水平

	VEGFA	TP53
R6-A	0.05	0.10
R6-B	0.02	0.06
R6-C	0.13	0.21
R5-A	0.06	0.06
R5-B	0.03	0.02
R5-C	0.12	0.12

R4-A	0.04	0.04
R4-B	0.06	0.01
R4-C	0.23	0.13
R6-D	0.06	0.22
R6-E	0.06	0.07

注：阴性对照表达水平为 1。

（二）R 结构聚合核酸：低浓度抑制实验

1、聚合核酸

制备VEGFA-R6-A聚合核酸的X单元序列和聚合核酸TP53-R6-A的X单元序列同步骤（一）；制备P65-R6-A聚合核酸的X单元序列从X1-X6依次为表5中的序列15、16、17、23、24、25。

2、抑制实验

仅将步骤（一）中的抑制实验的聚合核酸的转染终浓度变为1nM，其他步骤保持不变。

检测结果见表4。实验结果表明，低浓度的本发明的聚合核酸也可实现降低靶基因表达水平的目的。

表4、mRNA相对表达水平

	VEGFA	TP53	P65
R6-A（1nM)	0.53	0.64	0.51

注：阴性对照表达水平为 1。

（三）三种结构聚合核酸：靶向同一基因的不同区域的抑制实验

1、聚合核酸

制备如下结构的聚合核酸，每个结构的靶向核酸单元分别靶向PPIB或P65基因的4个或6个不同区域。

靶基因为PPIB的聚合核酸为如下1）-5）：

1）PPIB-R4（R结构，n=4)：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列1-4。

2）PPIB-L4（L结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列1-3和序列5，其H1单元序列为序列20，其H4单元序列为序列21。

3）PPIB-Cr4（Cr结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列1-4，其C单元序列为序列8。

4）PPIB-R6（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表5中的序列2、3、9、10、11、12。

5）PPIB-L6（L结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表5中的序列2、3、9、10、11、13，其H1单元序列为序列6，其H6单元序列为序列14。

靶基因为P65的聚合核酸为如下1）-5）：

1）P65-R4（R结构，n=4)：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列15-18。

2）P65-L4（L结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列15-17

和序列19，其H1单元序列为序列6，其H4单元序列为序列7。

3）P65-Cr4（Cr结构，n=4）：其X单元序列从X1-X4依次为表5中的序列15-18，其C单元序列为序列22。

4）P65-R6（R结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表5中的序列15、16、17、23、24、25。

5）P65-L6（L结构，n=6）：其X单元序列从X1-X6依次为表5中的序列15、16、17、23、24、26，其H1单元序列为序列20，其H6单元序列为序列27。

表 5、核酸单元的序列

靶基因	序列 (5'-3')	序列编号
PPIB	AGAUGCUCUUUCCUCCUGCAAGGuguauuu	1
PPIB	AAAUACACCUUGACGGUGGAUGAagaugua	2
PPIB	UACAUCUUCAUCUCCAAUUCUCUucggaaa	3
PPIB	UUUCCGAAGAGACCAAAGGAAAGagcaucu	4
PPIB	UUUCCGAAGAGACCAAAGUCUACgagaaag	5
PPIB	GGAGGAAAGagcaucu	6
PPIB	cuuucucguagacuuu	7
PPIB	cuuuGGauugGAcaccGUcaggAG	8
PPIB	AGAUGCUCUUUCCUCCUGCAUGAaggugcu	9
PPIB	AGCACCUUCAUGUUGCGUCAAGGuguauuu	10
PPIB	UUUCCGAAGAGACCAAAGCGUGUaaucaag	11
PPIB	CUUGAUUACACGAUGGAAGAAAGagcaucu	12
PPIB	CUUGAUUACACGAUGGAAUCUACgagaaag	13
PPIB	cuuucucguagauucc	14
P65	UGUGUAGCCAUUGAUCUUGCAUCaugaaga	15
P65	UCUUCAUGAUGCUCUUGAAUACCaccaaga	16
P65	UCUUGGUGGUAUCUGUGCUCGUCaccggau	17
P65	AUCCGGUGACGAUCGUCUAAUGGcuacaca	18
P65	AUCCGGUGACGAUCGUCUACACAucgguaa	19
P65	GAUCAAUGGcuacaca	20
P65	uuaccgauguguagac	21
P65	agacGAgcacAGucaaGAaagaUC	22
P65	AUCCGGUGACGAUCGUCUUCAGGagaugaa	23
P65	UUCAUCUCCUGAAAGGAGAUCAGcuccuaa	24
P65	UUAGGAGCUGAUCUGACUAAUGGcuacaca	25
P65	UUAGGAGCUGAUCUGACUACACAucgguaa	26

P65	uuaccgauguguaguc	27

注：小写字母表示该核苷酸核糖经过 2-O-甲基核糖修饰。下划线标记的序列为靶序列。X 单元：第 1-12 位为 T1；第 13-18 位为 T2；第 19-30 为 A3。H1 单元：第 1-4 位为 Hy；第 5-16 位为 Hx。H4 单元：第 1-12 位为 Hx；第 13-16 位为 Hy。C 单元：第 1-6 位为 C4，第 7-12 位为 C3，第 13-18 位为 C2，第 19-24 位为 C1。

2、抑制实验

抑制实验步骤同步骤（一）。

抑制结果见图 7。结果表明，5 种结构的聚合核酸均有效抑制了靶基因的表达。针对靶基因 PPIB 的抑制水平均在 80%以上，针对靶基因 P65 的抑制水平均在 75%以上。

（四）R结构聚合核酸靶向不同基因的抑制实验（n=4和6）

1、聚合核酸

制备如下R结构的聚合核酸，该聚合核酸靶向4个或6个不同的靶基因。

BCCC-R4：靶基因为BIRC5、CTNNB、COPS5、CLU，其X单元序列从X1-X4依次为表3中的序列28-31。

BCCCEH-R6：靶基因为BIRC5、CTNNB、COPS5、CLU、EIF4E、HIF1A，其X单元序列从X1-X6依次为表6中的序列32、33、28、29、30、34。

2、抑制实验

抑制实验步骤同步骤（一）。

表 6、核酸单元的序列

靶基因	序列 (5'-3')	序列编号
BIRC5	AGAAGAAACACUGGGCCAACUGCugaucuu	28
CTNNB1	AAGAUCAGCAGUCUCAUUUGGUCaggucuu	29
COPS5	AAGACCUGACCAGUGGUAUUUGAcucugau	30
CLU	AUCAGAGUCAAAGAGCUUAGUGUuucuucu	31
HIF1A	UCAAGUUGCUGGUCAUCAGGAGGuugcuaa	32
EIF4E	UUAGCAACCUCCUGAUUAAGUGUuucuucu	33
CLU	AUCAGAGUCAAAGAGCUUCCAGCaacuuga	34

注：小写字母表示该核苷酸核糖经过 2-O-甲基核糖修饰。下划线标记的序列为靶序列。X 单元：第 1-12 位为 T1；第 13-18 位为 T2；第 19-30 为 A3。

抑制实验结果见图 8。结果表明，2 种结构的聚合核酸均有效抑制了 4 个或 6 靶基因的表达。R4 结构的聚合核酸靶向的 4 种基因的表达水平均降低至 0.2 以下。

（五）R结构、L结构和Cr结构聚合核酸靶向不同基因的抑制实验（n=4）

1、聚合核酸

制备如下各结构的聚合核酸，该聚合核酸靶向4个不同的靶基因。

SPPV-R4：靶基因为SOD1、PPIB、P65、VEGFA，其X单元序列从X1-X4依次为表7中的序列35-38。

SPPV-L4：靶基因为SOD1、PPIB、P65、VEGFA，其X单元序列从X1-X4依次为表7中的序列35-38，其H1单元序列为序列39，其H4单元序列为序列40。

SPPV-Cr4：靶基因为SOD1、PPIB、P65、VEGFA，其X单元序列从X1-X4依次为表7中的序列35-38，其C单单元序列为序列41。

2、抑制实验

同步骤（一）中的抑制实验。

抑制实验结果见图9。结果表明，3种结构的聚合核酸均有效抑制了4种靶基因的表达。并发现，在三种聚合结构中，Cr4结构的聚合核酸的抑制效果最好，其每个靶基因的表达水平均为最低。

表7、核酸单元的序列

靶基因	序列（5'-3'）	序列编号
SOD1	UACUUUCUUCAUUUCCACCUGUUccaaaaa	35
PPIB	UUUUUGGAACAGUCUUUCUGAGAccuucaa	36
P65	UUGAAGGUCUCAUAUGUCCAUGCagauuau	37
VEGFA	AUAAUCUGCAUGGUGAUGAUGAAgaaagua	38
H	GGAAAUGAAgaaagua	39
H4	uacuuucuucaucauc	40
C	caucACgacaUAgaaaGAguggAA	41

注：小写字母表示该核苷酸核糖经过2-O-甲基核糖修饰。下划线标记的序列为靶序列。 X单元：第1-12位为T1；第13-18位为T2；第19-30为A3。H1单元：第1-4位为Hy；第5-16位为Hx。H4单元：第1-12位为Hx；第13-16位为Hy。C单元：第1-6位为C4，第7-12位为C3，第13-18位为C2，第19-24位为C1。

上述各实验中检测靶基因的实时定量PCR引物序列如表8所示。

表8、检测靶基因的实时定量PCR引物序列

引物名称	引物序列（5'-3'）
H-TP53-qPCR-F	TTGTGCCTGTCCTGGGAGAG
H-TP53-qPCR-R	GGAGAGGAGCTGGTGTTGTTG
H-HIF1A-qPCR-F	GCCCTAACGTGTTATCTGTC
H-HIF1A-qPCR-R	CGCTTTCTCTGAGCATTCTG
h-EIF4E-qPCR-F	GGAGGTTGCTAACCCAGAACAC
h-EIF4E-qPCR-R	GGAGATCAGCCGCAGGTTTG
h-VEGFA-qPCR-F	GAGGGCAGAATCATCACGAAG
h-VEGFA-qPCR-R	ACTCGATCTCATCAGGGTACTC
h-PPIB-qPCR-F	GGCAAGCATGTGGTGTTTGG

h-PPIB-qPCR-R	GGTTTATCCCGGCTGTCTGTC
h-p65-qPCR-F	GGGAAGGAACGCTGTCAGAG
h-p65-qPCR-R	TAGCCTCAGGGTACTCCATCA
h-SOD1-qPCR-F	GCAGGGCATCATCAATTTCG
h-SOD1-qPCR-R	GAATCCATGCAGGCCTTCAG
H-BIRC5-qPCR-F	AGAACTGGCCCTTCTTGGAG
H-BIRC5-qPCR-R	GAAACACTGGGCCAAGTCTG
H-CTNNB1-qPCR-F	GCTCGGGATGTTCACAACC
H-CTNNB1-qPCR-R	CCCTGCAGCTACTCTTTGG
H-COPS5-qPCR-F	TGGAATAAATACTGGGTGAATACG
H-COPS5-qPCR-R	GGCTTCTGACTGCTCTAAC
H-CLU-qPCR-F	CAAGGCGAAGACCAGTACTATC
H-CLU-qPCR-R	CAGTGACACCGGAAGGAAC

工业应用

本发明提供了新型的可用于构建聚合核酸的核酸单元及可用于干扰目的基因表达的聚合核酸。本发明通过设计和构建新型的核酸单元及其自组装聚合核酸，实现了多靶标干扰，可用于抑制疾病发生或发展的信号通路中的多个基因表达，或同时抑制多个疾病靶基因表达，在生物学、化学等多个学科领域具有广阔的应用前景。该聚合核酸可实现同时靶向多个序列，所述序列可在一个基因中，或位于多个基因中。本发明优势在于：1）RNAi 效能高；2）稳定性好；3）降低脱靶率；4）导入细胞能力增强；5）可模块化设计。

权利要求

1、一种用于干扰靶基因表达的聚合核酸分子，所述聚合核酸分子由n条X型核酸分子组成；

每条所述X型核酸分子自5’端起依次由靶向片段一、靶向片段二和接头片段三组成；

每条所述X型核酸分子的靶向片段一与其相邻的X型核酸分子的接头片段三互补配对；

每条所述聚合核酸分子的靶向片段一和靶向片段二均与靶基因互补配对；

每条所述X型核酸分子的长度相同；

所述n为大于或等于3的整数。

2、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述聚合核酸分子还包括H型核酸分子；所述H型核酸分子由H1型核酸分子和Hn型核酸分子组成；

将n条X型核酸分子分别命名为X1单元、X2单元、X3单元，依次类推，Xn-1单元、Xn单元；

所述X1单元的接头片段三与所述X2单元的靶向片段一互补配对，所述X2单元的接头片段三与所述X3单元的靶向片段一互补配对，依次类推，所述Xn-1单元的接头片段三与所述Xn单元的靶向片段一互补配对；

所述H1型核酸分子与所述X1单元的靶向片段一互补配对，所述Hn型核酸分子与所述Xn单元的接头片段三互补配对。

3、根据权利要求2所述的聚合核酸分子，其特征在于：

所述H型核酸分子的5’端或3’端还包括Hy片段；所述H型核酸分子由Hx片段和Hy片段组成；

所述H1型核酸分子的Hx片段与所述X1单元的靶向片段一互补配对；所述Hn型核酸分子的Hx片段与所述Xn单元的接头片段三互补配对；

所述Hy片段与所述X1单元或所述Xn单元的靶向片段二自5’端或3’端起1个、2个或多个连续的核酸分子互补配对。

4、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述聚合核酸分子还包括C型核酸分子；

所述C型核酸分子由n个片段依次连接而成，n个片段分别为n条所述X型核酸分子中的靶向片段二的反向互补序列。

5、根据权利要求1-4任一所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述X型核酸分子、所述H型核酸分子和所述C型核酸分子均为单链RNA分子。

6、根据权利要求1或3所述的聚合核酸分子，其特征在于：

所述X型核酸分子的长度为15-50 nt；

所述靶向片段一的长度为5-24 nt；

所述靶向片段二的长度为1-20 nt；

所述接头片段三的长度为5-24 nt；

所述靶向片段一和所述靶向片段二的长度总和至少为14-16 nt。

7、根据权利要求6所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述X型核酸分子的长度为24-36 nt。

8、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述聚合核酸分子至少包括一个修饰的核苷酸。

9、根据权利要求8所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述修饰为磷酸骨架修饰、碱基修饰和/或核糖修饰。

10、根据权利要求9所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述核糖修饰为核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

11、根据权利要求10所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述烷基为甲基、乙基、丙基或甲乙基。

12、根据权利要求10所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述X型核酸分子的接头片段三自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

或，所述H型核酸分子的Hx片段自3’端第一位核苷酸起连续的5-9个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

或，所述H型核酸分子自3’端第一位核苷酸起连续的8-30个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代；

或，所述C型核酸分子中与X型核酸分子的靶向片段二互补配对的每个片段自5’端第一位核苷酸起连续的2-6个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

13、根据权利要求12所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述H型核酸分子自3’端第一位核苷酸起连续的14-18个核苷酸的核糖2位羟基基团被卤素基团或O-烷基基团取代。

14、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述n为3或4或5或6或7或8。

15、根据权利要求14所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述n为4或5或6。

16、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述靶基因的个数为一个或两个或多个，且所述靶基因的个数不超过n个；

或，所述靶基因的个数为1个或4个或6个。

17、根据权利要求1所述的聚合核酸分子，其特征在于：所述靶基因为如下基因中至少一种：PPIB基因、p65基因、BIRC5基因、CTNNB基因、COPS5基因、CLU基因、EIF4E基因、HIF1A基因、TP53基因、VEGFA基因和SOD1基因。

18、根据权利要求17所述的聚合核酸分子，其特征在于：

用于干扰靶基因PPIB表达的聚合核酸分子为如下a1）-a5）：

a1）由序列1、序列2、序列3和序列4所示的单链RNA分子组成；

a2）由序列1、序列2、序列3、序列4、序列20和序列21所示的单链RNA分子组成；

a3）由序列1、序列2、序列3、序列4和序列8所示的单链RNA分子组成；

a4）由序列2、序列3、序列9、序列10、序列11和序列12所示的单链RNA分子组成；

a5）由序列2、序列3、序列6、序列9、序列10、序列11、序列13和序列14所示的所示的单链RNA分子组成；

或，用于干扰靶基因P65表达的聚合核酸分子为如下b1）-b5）：

b1）由序列15、序列16、序列17和序列18所示的单链RNA分子组成；

b2）由序列6、序列7、序列15、序列16、序列17和序列19所示的单链RNA分子组成；

b3）由序列15、序列16、序列17、序列18和序列22所示的单链RNA分子组成；

b4）由序列15、序列16、序列17、序列23、序列24和序列25所示的单链RNA分子组成；

b5）由序列15、序列16、序列17、序列20、序列23、序列24、序列26和序列27所示的所示的单链RNA分子组成；

或，用于同时干扰靶基因BIRC5、CTNNB、COPS5和CLU表达的聚合核酸分子为由序列28、序列29、序列30和序列31所示的单链RNA分子组成；

或，用于同时干扰靶基因BIRC5、CTNNB、COPS5、CLU、EIF4E和HIF1A表达的聚合核酸分子为由序列28、序列29、序列30、序列32、序列33和序列34所示的单链RNA分子组成；

或，用于同时干扰靶基因SOD1、PPIB、P65和VEGFA表达的聚合核酸分子为如下c1）-c3）：

c1）由序列35、序列36、序列37和序列38所示的单链RNA分子组成；

c2）由序列35、序列36、序列37、序列38、序列39和序列40所示的单链RNA分子组成；

c3）由序列35、序列36、序列37、序列38和序列41所示的单链RNA分子组成；

或，用于干扰靶基因VEGFA表达的聚合核酸分子为如下d1）-d11）：

d1）由序列42、序列43、序列44、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d2）由序列48、序列49、序列50、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d3）由序列54、序列55、序列56、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d4）由序列42、序列43、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d5）由序列48、序列49、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d6）由序列54、序列55、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d7）由序列42、序列45、序列46和序列47所示的单链RNA分子组成；

d8）由序列48、序列51、序列52和序列53所示的单链RNA分子组成；

d9）由序列54、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

d10）由序列60、序列61、序列62、序列63、序列64和序列65所示的单链RNA分子组成；

d11）由序列66、序列67、序列68、序列69、序列70和序列71所示的单链RNA分子组成；

或，用于干扰靶基因TP53表达的聚合核酸分子为如下e1）-e11）：

e1）由序列72、序列73、序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e2）由序列78、序列79、序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e3）由序列84、序列85、序列86、序列87、序列88和序列89所示的单链RNA分子组成；

e4）由序列73、序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e5）由序列79、序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e6）由序列54、序列55、序列57、序列58和序列59所示的单链RNA分子组成；

e7）由序列74、序列75、序列76和序列77所示的单链RNA分子组成；

e8）由序列80、序列81、序列82和序列83所示的单链RNA分子组成；

e9）由序列序列86、序列87、序列88和序列89所示的单链RNA分子组成；

e10）由序列90、序列91、序列92、序列93、序列94和序列95所示的单链RNA分子组成；

e11）由序列96、序列97、序列98、序列99、序列100和序列101所示的单链RNA分子组成。

19、权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子的衍生物，为如下（m1）-（m5）中任一种：

（m1）将权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子删除或增加一个或几个核苷酸，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m2）将权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子进行核苷酸取代或修饰，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m3）将权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子的骨架改造为硫代磷酸脂骨架，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m4）由权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子编码的肽核酸、锁核酸或解锁核酸，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物；

（m5）将权利要求1-18任一所述的聚合核酸分子的一端或中间接上信号分子和／或活性分子和／或功能基团，得到与所述聚合核酸分子具有相同功能的聚合核酸分子的衍生物。

20、权利要求1-18任一所述的聚合核酸分子的制备方法，包括如下步骤：

M1）合成权利要求1-18中任一所述的X型核酸分子和/或H型核酸分子和/或C型核酸分子；

M2）将所述X型核酸分子和/或所述H型核酸分子和/或所述C型核酸分子退火，得到所述聚合核酸分子。

21、权利要求1-18任一所述的聚合核酸分子或权利要求19所述的衍生物在如下A1）或A2）中的应用；

A1）调控细胞中靶基因表达水平；

A2）制备预防或缓解或治疗由靶基因表达引起的疾病的产品。

22、根据权利要求21所述的应用，其特征在于：所述调控为抑制或降低或干扰。

23、根据权利要求21所述的应用，其特征在于：所述细胞为肿瘤细胞。

24、根据权利要求21所述的应用，其特征在于：所述靶基因为疾病相关基因；

或，所述疾病相关基因为肿瘤相关基因；

或，所述肿瘤相关基因为如下基因中至少一种：PPIB基因、p65基因、BIRC5基因、CTNNB基因、COPS5基因、CLU基因、EIF4E基因、HIF1A基因、TP53基因、VEGFA基因和SOD1基因。

25、一种抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的试剂或试剂盒或药物，包括权利要求 1-18 任一所述的聚合核酸分子或权利要求 19 所述的衍生物。

26、一种抑制或降低或干扰细胞中靶基因表达水平的方法，包括如下步骤：将权利要求1-18任一所述的聚合核酸分子或权利要求19所述的衍生物导入所述细胞，实现抑制或降低所述细胞中靶基因的表达水平。

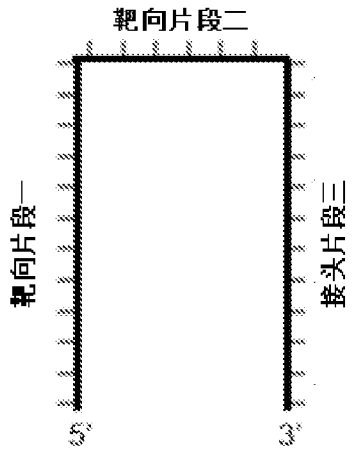


图 1



图 2

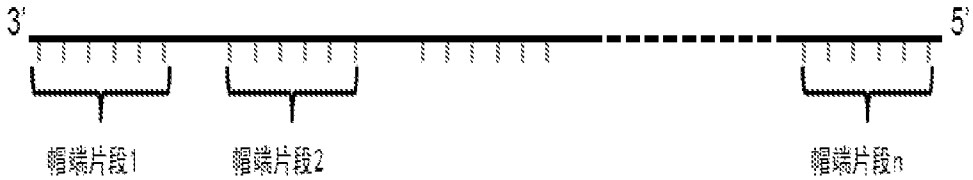


图 3

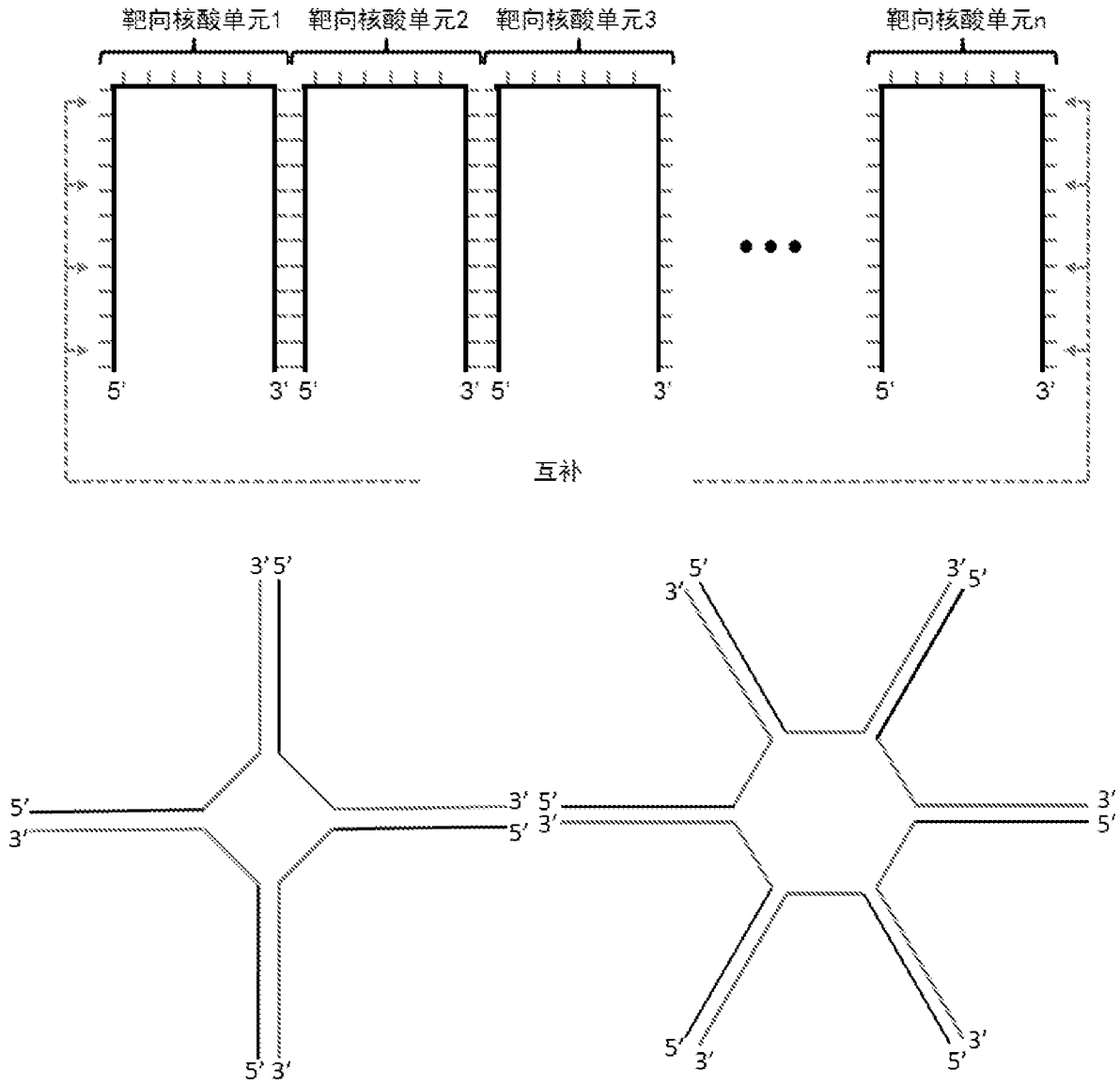


图 4

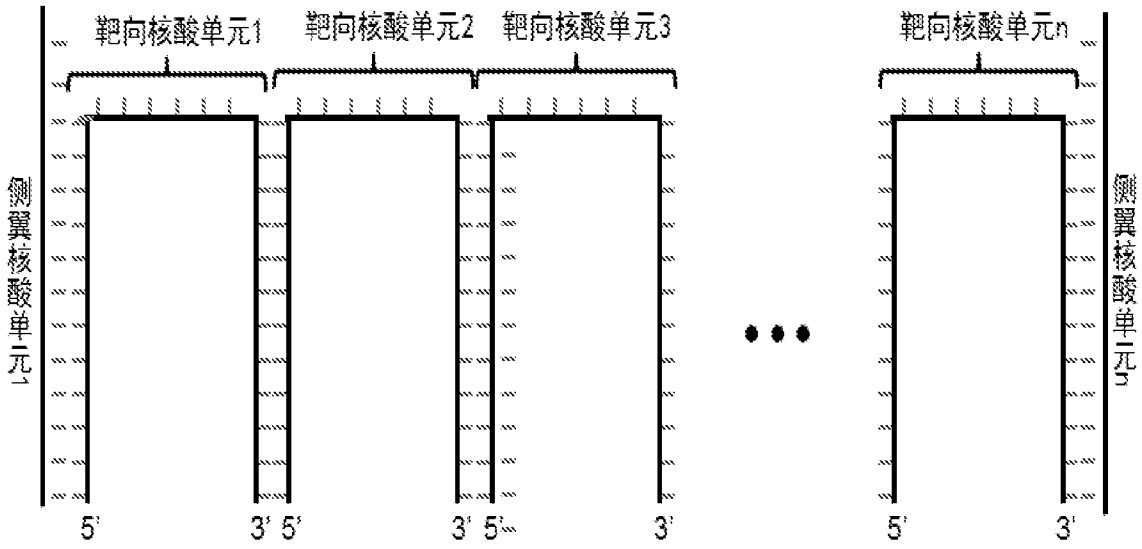

靶向核酸单元1
靶向核酸单元2
靶向核酸单元3
靶向核酸单元n
侧翼核酸单元1
侧翼核酸单元n
5'
3'
5'
3'
5'
3'
5'
3'

图 5

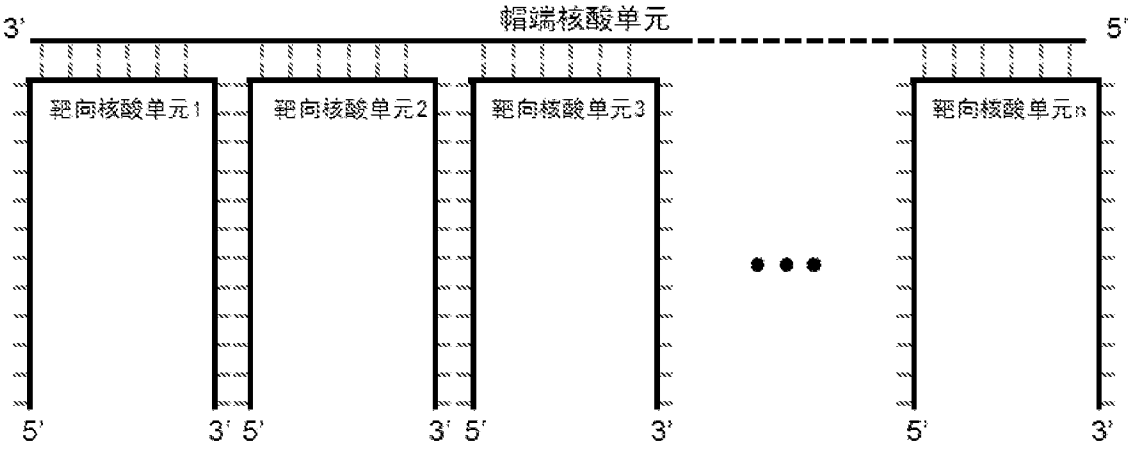

3'
帽端核酸单元
5'
靶向核酸单元1
靶向核酸单元2
靶向核酸单元3
靶向核酸单元n
5'
3'
5'
3'
5'
3'
5'
3'

图 6

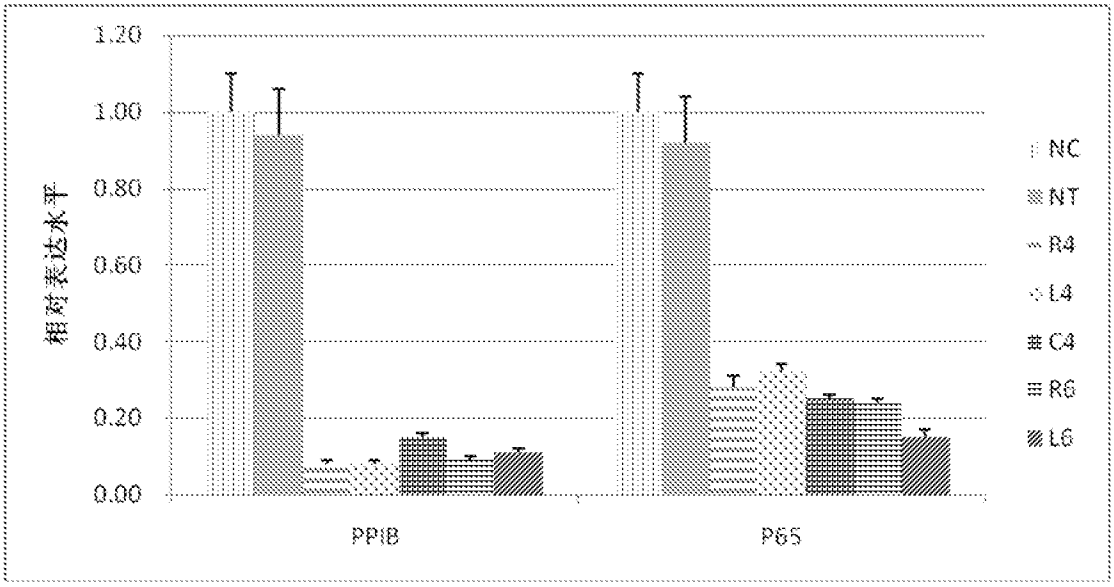

1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
相对表达水平
NC
NT
R4
L4
C4
R6
L6
PPIB
P65

图 7

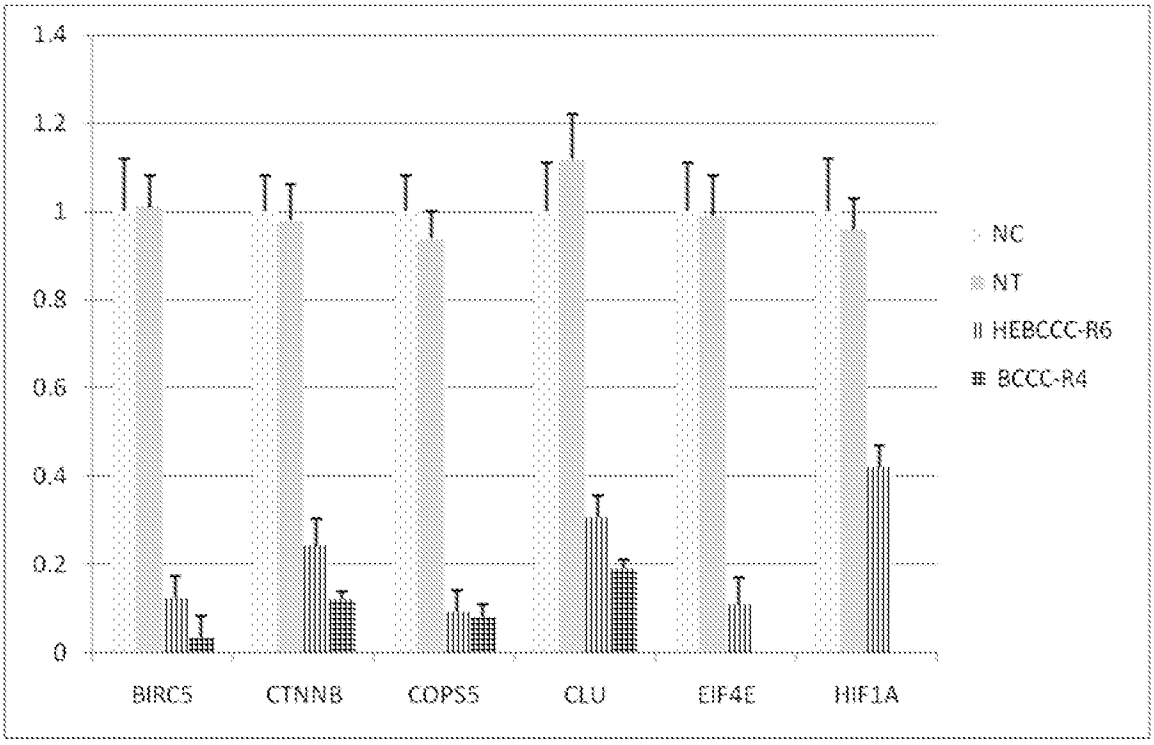

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NC
NT
NEBCCC-R6
BCCC-R4
BIRC5
CTNNB
COPS5
CLU
EIF4E
HIF1A

图 8

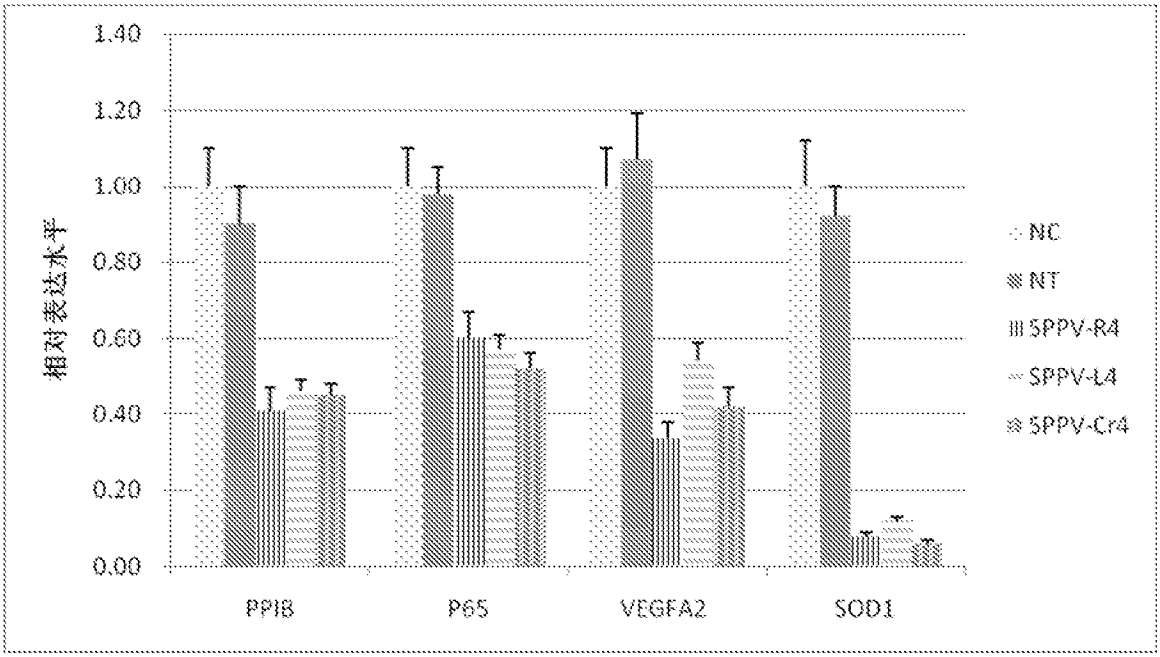

1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
相对表达水平
PPIB
P65
VEGFA2
SOD1
NC
NT
SPPV-R4
SPPV-L4
SPPV-Cr4

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/096397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 21/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, DWPI, Genebank: x型核酸, PPIB, p65, BIRC5, CTNNB, COPS5, CLU, EIF4E, HIF1A, TP53, VEGFA, SOD1, X型, rnai, siRNA, RNA干扰, RNAi, h型, RNAi, RNA interfere

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102191246 A (BIOMICS BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) 21 September 2011 (2011-09-21) claims	1-17, 19-26
E	CN 108342386 A (GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD.) 31 July 2018 (2018-07-31) claims, and embodiment	1-26
A	CN 101917846 A (SIRNAOMICS INC.) 15 December 2010 (2010-12-15) entire document	1-26
A	CN 106244590 A (GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD.) 21 December 2016 (2016-12-21) entire document	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 April 2019	**25 April 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/096397

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **21-24,26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 21-24 and 26 relate to a treatment method performed on a human body or an animal body (PCT rule 39.1(iv)). Nevertheless, the search was still performed on the basis of the technical subject matter of the use of the nucleic acid molecules or derivatives in the preparation of medicine.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/096397

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102191246	A	21 September 2011	CN	102191246	B	27 August 2014
CN	101917846	A	15 December 2010	US	RE46873	E	29 May 2018
				EP	2217062	B1	27 May 2015
				US	8735567	B2	27 May 2014
				ES	2545963	T3	17 September 2015
				EP	2217062	A1	18 August 2010
				CN	101917846	B	25 June 2014
				JP	2011504170	A	03 February 2011
				EP	2217062	A4	09 November 2011
				DK	2217062	T3	24 August 2015
				WO	2009061417	A1	14 May 2009
				US	2010319074	A1	16 December 2010
CN	106244590	A	21 December 2016	None			

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/096397

A. 主题的分类

C07H 21/00(2006.01)i；A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H，A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS，CNTXT，DWPI，Genebank：x型核酸,PPIB， p65,BIRC5， CTNNB,COPS5,CLU,EIF4E,HIF1A,TP53,VEGFA,SOD1,X型，rnai，siRNA，RNA干扰，RNAi，h型，RNAi，RNA interfere

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102191246 A (百奥迈科生物技术有限公司) 2011年 9月 21日 (2011-09-21) 权利要求书	1-17，19-26
E	CN 108342386 A (广州市锐博生物科技有限公司) 2018年 7月 31日 (2018-07-31) 权利要求书，实施例	1-26
A	CN 101917846 A (圣诺制药公司) 2010年 12月 15日 (2010-12-15) 全文	1-26
A	CN 106244590 A (广州市锐博生物科技有限公司) 2016年 12月 21日 (2016-12-21) 全文	1-26

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 17日	2019年 4月 25日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王少华 电话号码 62086353

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/096397

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 21-24,26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求21-24,26涉及对人体或动物体实施的治疗方法（PCT细则39.1(iv)）。尽管如此，仍基于所述核酸分子或衍生物在制备药物中的用途的技术主题进行了检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/096397

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	102191246	A	2011年 9月 21日	CN	102191246	B	2014年 8月 27日
CN	101917846	A	2010年 12月 15日	US	RE46873	E	2018年 5月 29日
				EP	2217062	B1	2015年 5月 27日
				US	8735567	B2	2014年 5月 27日
				ES	2545963	T3	2015年 9月 17日
				EP	2217062	A1	2010年 8月 18日
				CN	101917846	B	2014年 6月 25日
				JP	2011504170	A	2011年 2月 3日
				EP	2217062	A4	2011年 11月 9日
				DK	2217062	T3	2015年 8月 24日
				WO	2009061417	A1	2009年 5月 14日
				US	2010319074	A1	2010年 12月 16日
CN	106244590	A	2016年 12月 21日		无		