



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103492569 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201180064239.X

(22)申请日 2011.11.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103492569 A

(43)申请公布日 2014.01.01

(30)优先权数据
61/410,672 2010.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.07.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/059588 2011.11.07

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/061810 EN 2012.05.10

(73)专利权人 米拉根医疗公司
地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 K.瓦格勒 C.达尔比 W.S.马歇尔

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010091204 A1,2010.08.12,
Jonathan D. Vaught et al..Expanding
the Chemistry of DNA for in Vitro
Selection.《American Chemical Society》
.2010,第132卷4141-4151.

审查员 王婷

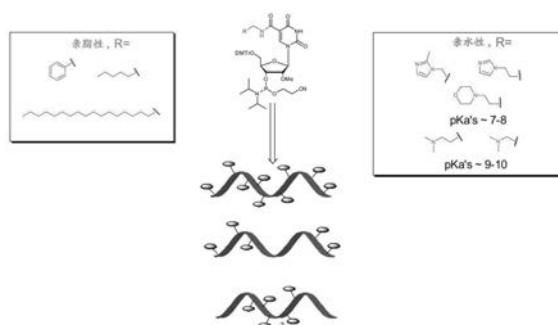
权利要求书3页 说明书23页
序列表24页 附图12页

(54)发明名称

碱基经修饰的寡核苷酸

(57)摘要

本发明涉及用于增强结合亲和力的具有碱基经修饰的核苷的寡核苷酸。



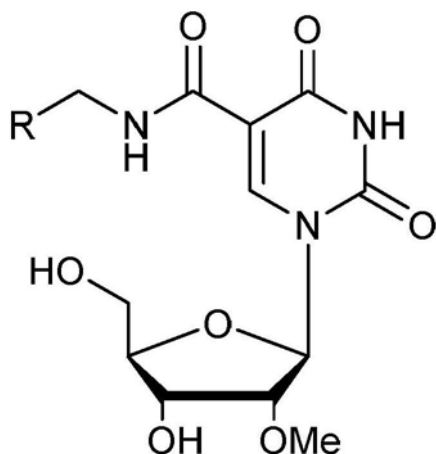
1. 碱基经修饰的反义寡核苷酸,其包含:至少一个具有如下的核苷酸:

a) 2' 修饰;和

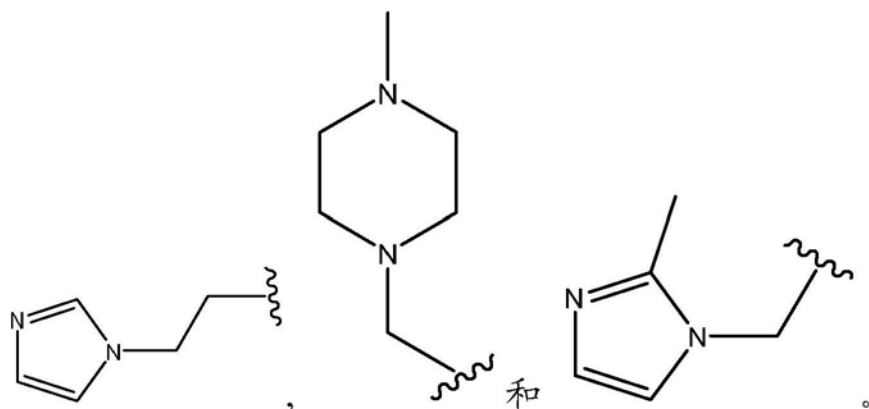
b) 嘧啶碱基的C-5位的氨基羰基碱基修饰,

其中所述寡核苷酸的长度为6至22个核苷酸并含有一个或者多个硫代磷酸酯连接物,且

其中所述2' 修饰为2' -OMe,且所述氨基羰基碱基修饰具有以下结构:



其中R为选自以下的至少一员:



2. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸以高亲和力与人微RNA杂交。

3. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的长度为10至18个核苷酸。

4. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其包含:2个或者更多个具有以下的核苷酸:

a) 所述2' 修饰;和

b) 所述氨基羰基修饰的碱基。

5. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其具有2个至10个既具有所述2' 修饰又具有所述氨基羰基修饰的碱基的核苷酸。

6. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸具有一个或者多个2' 脱氧核苷酸。

7. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其具有5' 和/或3' 帽结构。

8. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸全部是硫代磷酸酯连接的。

9. 权利要求1或2的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述核苷酸序列与miR-208a、miR-208b、miR-15b或者miR-21的序列互补。

10. 权利要求1或2的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述核苷酸序列与选自序列ID号1至63的人miRNA的序列互补。

11. 药物组合物,其包含:

- a) 有效量的权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸或者其药学上可接受的盐;和
- b) 药学上可接受的载体或者稀释剂。

12. 权利要求1-10中的任一项的碱基经修饰的反义寡核苷酸或者权利要求11的组合物在制备用于降低或者抑制细胞中的微RNA活性的药物中的用途。

13. 权利要求12的用途,其中所述细胞为哺乳动物细胞。

14. 权利要求13的用途,其中所述细胞为心脏细胞。

15. 权利要求12的用途,其中所述细胞在体内或者在体外。

16. 权利要求11的药物组合物在制备用于预防或者治疗受试者中与微RNA的表达相关或者由微RNA的表达介导的病症的药物中的用途。

17. 权利要求16的用途,其中所述病症为心脏病症或者心血管病症。

18. 权利要求17的用途,其中所述心脏病症为病理性心脏肥大、心肌梗塞或者心力衰竭,以及所述miRNA为miR-208a或者miR-208b。

19. 权利要求16-18中的任一项的用途,其中所述药物组合物通过肠胃外给药。

20. 权利要求19的用途,其中所述肠胃外给药为静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药或者肌内给药。

21. 权利要求19的用途,其中所述药物组合物通过直接注射至心脏组织中来给药。

22. 权利要求16-18中的任一项的用途,其中所述药物组合物通过以下方式给药:口服给药、透皮给药、持续释放给药、受控释放给药、延迟释放给药、栓剂给药、导管给药或者舌下给药。

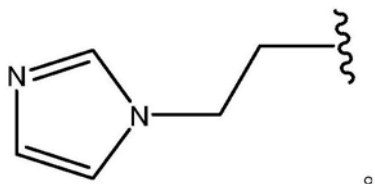
23. 权利要求16-18中的任一项的用途,其中所述受试者为人类。

24. 权利要求1-10中的任一项的碱基经修饰的反义寡核苷酸在制备用于降低或抑制细胞中微RNA活性或用于预防或治疗受试者中与微RNA的表达相关或者由微RNA的表达介导的病症的药物中的用途。

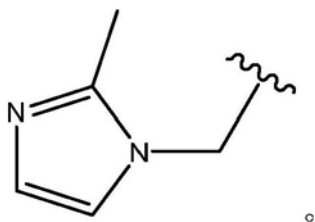
25. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述氨基羰基碱基修饰为在C-5位经氨基羰基修饰的尿嘧啶或胸腺嘧啶碱基。

26. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中所述氨基羰基碱基修饰为在C-5位经氨基羰基修饰的尿嘧啶。

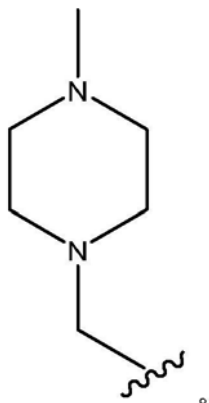
27. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中R为:



28. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中R为:



29. 权利要求1的碱基经修饰的反义寡核苷酸,其中R为



碱基经修饰的寡核苷酸

[0001] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时申请61/410,672的优先权,将其全部内容并入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及与互补的多核苷酸具有增强的结合亲和力的经修饰的寡核苷酸。

背景技术

[0003] 微RNA(miR)牵涉在包括心脏功能的调节和维持在内的多种生物学过程中(Van Rooij et al.,“MicroRNAs:Powerful New Regulators of Heart Disease and Proactive Therapeutic Targets,”J.Clin.Invest.117(9):2369-2376(2007); Chien KR,“Molecular Medicine:MicroRNAs and the Tell-tale Heart,”Nature 447:389-390(2007))。因此,miR代表用于病症包括如心脏肥大、心肌梗塞、心力衰竭、血管损伤和病理性心脏纤维化等的一类相对新型的治疗靶标。miR是长度为约18至约25个核苷酸的小的、非蛋白质编码RNA,并通过促进它们的降解而充当靶标mRNA的阻抑物(此时它们的序列完全互补),或者通过抑制翻译而充当靶标mRNA的阻抑物(此时它们的序列含有错配)。机制包括将成熟miRNA链结合至RNA诱导性沉默复合物(RISC)中,在那里它通过碱基对互补性与它的靶标RNA联合。

[0004] miRNA功能可通过反义多核苷酸或者通过模拟miRNA功能(“miRNA 模拟”)的多核苷酸而进行治疗靶向。然而,在治疗上用基于寡核苷酸的药物靶向miRNA遇到数个挑战,包括RNA-结合亲和力和特异性、细胞摄取的效力和核酸酶抗性。例如,当将多核苷酸引入完整细胞中时,它们被核酸酶攻击并降解,导致活性损失。尽管已经制备了多核苷酸类似物以试图避免它们的降解(例如,通过2'取代)(Sproat et al.,Nucleic Acids Research 17:3373-3386(1989)),但是所述修饰经常影响多核苷酸的预期生物作用的效力。这种降低的效力在各种情况中可能是由于经修饰的多核苷酸不能与靶标RNA形成稳定双链体和/或由于与细胞机构(cellular machinery)的相互作用的损失。其它修饰包括使用锁定的核酸,其具有改善RNA-结合亲和力的潜力(Veedu et al.,“Locked Nucleic Acid as a Novel Class of Therapeutic Agent,”RNA Biology6:3,321-323(2009))。

[0005] 用于miRNA抑制剂的寡核苷酸化学模式或者修饰具有改善抑制剂的递送、稳定性、效力、特异性,和/或毒性分布的潜力,并因此在治疗背景中为有效靶向miRNA功能所需要的。

发明内容

[0006] 本发明涉及寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个具有2'修饰的核苷酸和至少一个具有氨基羰基修饰的碱基的核苷酸,以及涉及包含所述经修饰的寡核苷酸的药物组合物,和使用和合成这些寡核苷酸的方法。

[0007] 在一个方面,本发明提供寡核苷酸,其包含至少一个具有2'修饰的核苷酸和至少

一个具有氨基羰基修饰的碱基的核苷酸。在多个实施方案中,所述寡核苷酸提供的优点中包括在双链体结合亲和力方面的优点,例如在 RNA 敲低中的效力。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含与人 miRNA 的核苷酸序列至少基本互补的核苷酸序列。在其它实施方案中,所述寡核苷酸至少基本上与非 miRNA 的哺乳动物转录体 (transcript) 互补,并因此可用于基因表达的反义抑制。在其它实施方案中,所述寡核苷酸包含人 miRNA 序列,并因此模拟 miRNA 功能。在其它实施方案中,所述寡核苷酸是使用任何常规平台体外检测或者量化样品中的核酸的检测探针。

[0008] 碱基修饰为氨基羰基,例如甲酰氨基 (carboxamino)、氨基甲酰基 (carbamoyl) 或者碳酰胺 (carbamide) 基团。在各个实施方案中的修饰位于嘧啶碱基的 C-5 位或者嘌呤碱基的 C-8 位。本发明寡核苷酸的修饰用氨基羰基含有基团或者取代基,非限制性地,所述基团或者取代基可为 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基,和 -(CH₂)_n-NR₁R₂, 其中 n 为 1-6 的整数以及 R₁ 和 R₂ 独立地为 H 或者 C₁-C₆ 烷基。示例性部分包括哌啶、哌嗪、吗啉代、或者咪唑,所述示例性部分中的每个可为取代的或者未取代的。在其它实施方案中,所述取代基为 C₄-C₂₀ 烷基或者烯基、苯基,或者胺基团。

[0009] 所述寡核苷酸还包含至少一个具有 2' 修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述 2' 修饰可独立地选自 C₁-6 烷基、2' O-烷基 (C₁-C₆)、F、Cl、NH₂、CN, 或者 SH。其它潜在的 2' 修饰描述在本申请的其它部分中。示例性 2' 修饰为 2' O-Me, 其可与碱基修饰一起提供寡核苷酸的 T_m 的协同增加。在其它实施方案中,至少一个核苷酸具有 2' 修饰,其为将糖锁定为 C3 内向构型的 2' -4' 桥。未经修饰的 2' 位置可为氢。

[0010] 具有经修饰的碱基的核苷酸的数目可发生变化,但是在某些实施方案中为至少 25% 的核苷酸,或者至少 50% 的核苷酸,或者至少 75% 的核苷酸或者 100% 的核苷酸。在一些实施方案中,所述 T_m 的增加可用相对少的碱基经修饰的核苷酸如少于 50% 的核苷酸或者少于 25% 的核苷酸来实现。在一些实施方案中,所述寡核苷酸仅含有 1、2、3 或者 4 个碱基经修饰的核苷酸。在这些实施方案中,碱基经修饰的核苷酸可为嘧啶碱基如尿苷或者胸腺嘧啶,和/或可含有 2' 修饰如 2' O' Me。即,寡核苷酸 (例如,具有约 16 个核苷酸) 可单一结合具有碱基修饰和 2' OMe 修饰的核苷酸,未修饰的 2' 位置为氢,或者可选择地,独立选自 LNA。

[0011] 在某些实施方案中,所述寡核苷酸还包含骨架化学如帽修饰 (cap modifications) 和硫代磷酸酯连接物 (phosphorothioate linkages)。

[0012] 本发明包括以下发现:当结合至反义寡核苷酸中时,新的碱基经修饰的 2' -OMe-嘧啶显示出与它们互补序列的双链体增强的结合亲和力。另外,这些具有硫代磷酸酯骨架修饰的嘧啶碱基经修饰的 2' -OMe 核苷酸在细胞培养中显示出抗它们的微 RNA 靶标序列的生物学活性,甚至在不使用转染试剂的情况下也是如此。本申请通过使用在心脏组织中显示靶标 miRNA 敲低的体内系统模型也证实了体内活性。

[0013] 在另一方面中,本发明提供了减少或者抑制细胞中 RNA 表达或者活性的方法、预防或者治疗受试者中的与 RNA 或者其表达相关或者由 RNA 或者其表达介导的病症的方法、使用本申请所述的碱基经修饰的寡核苷酸的方法。

附图说明

[0014] 图 1 是表,所述表显示针对 2' -OMe-尿苷寡核苷酸的各种碱基修饰物的 T_m 增强量。

碱基修饰是在C5处的甲酰氨基连接物。

[0015] 图2显示出用于结合至寡核苷酸中的经修饰的单体核苷和相应的亚磷酸胺的合成。

[0016] 图3说明通过图2中的方案合成的亲水和疏水核苷修饰物,并显示在寡核苷酸中的一些示例性结合模式。

[0017] 图4将数个碱基修饰的 T_m 测量值相对于LNA/DNA、2'-OMe硫代磷酸酯和DNA寡核苷酸进行比较。所显示的为碱基修饰模式。

[0018] 图5是当与未修饰的miR-208a RNA形成双链时,经修饰的抗-miR-208a 的实验 T_m 测量值的表。所有寡核苷酸含有硫代磷酸酯连接物;+U代表具有 2' OMe的碱基修饰的核苷酸;m代表2' OMe,yU代表C18碱基修饰和2' OMe 核糖;l代表LNA修饰;d代表DNA。

[0019] 图6示出在不使用脂质转染试剂的情况下,在原代新生大鼠心肌细胞中由经修饰的抗miR-208a引起的miR-208a敲低。

[0020] 图7示出叠加在bMHC水平上的图6中的miR-208a敲低数据。

[0021] 图8是在C57BL/6小鼠中碱基修饰的寡核苷酸的体内效力图。该图示出一些经修饰的寡核苷酸相对于盐水注射的倍数变化。

[0022] 图9示出对于磷酸酯和硫代磷酸酯骨架,碱基修饰和糖修饰的累积效应。

[0023] 图10是 ΔT_m 对碱基修饰和2' 修饰的数目的图,并显示协同效果。

[0024] 图11是就修饰数目和骨架化学而言,选择的碱基修饰的 T_m 效果图。

具体实施方式

[0025] 本发明涉及寡核苷酸,其包含至少一个具有2' 修饰的核苷酸和至少一个具有氨基羰基修饰的碱基的核苷酸。本发明还涉及这些寡核苷酸的使用方法和合成方法。

[0026] 核苷碱基修饰的研究在很大程度上限于对于基因表达的影响的研究。某些核碱基衍生物(尤其是C-5丙炔化嘧啶)仅呈现针对DNA/RNA双链体的亲和力/双链体稳定性的小幅提高(Znosko et al., J. Am. Chem. Soc., 125 (20) :6090-6097(2003))。由于疏水性或者位阻效应的潜在竞争性影响,更复杂的侧链官能团(除了已知的嵌入剂)被认为不太可能提高寡核苷酸亲和力(Hashimoto et al., J. Am. Chem. Soc., 115 (16) :7128-7134 (1993))。类似于糖替代物(sugar alteration),碱基修饰可潜在地改变携带所述修饰的寡核苷酸的总体疏水性和氢键特性,并甚至可导致非规范碱基配对相互作用(Vaught et al., J. Am. Chem. Soc., 132 (12) :4141-4151 (2010)),这是一种对于序列特异性 RNA抑制而言不希望的作用。

[0027] 在一个方面,本发明提供寡核苷酸,其包含至少一个具有2' 修饰的核苷酸和至少一个具有氨基羰基修饰的碱基的核苷酸。在不同实施方案中,所述寡核苷酸提供的优点包括在双链体结合亲和力中的优点,例如在RNA敲低中的效力。

[0028] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含至少基本上与人miRNA的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在其它实施方案中,所述寡核苷酸与非miRNA 的哺乳动物转录体基本互补或者完全互补,并因此可用于基因表达的反义抑制。在其它实施方案中,所述寡核苷酸包含足以模拟miRNA功能的人miRNA 的序列。在其它实施方案中,所述寡核苷酸是使用任何常规平台如微阵列或者其它基于杂交的平台体,用于外检测或者量化样品中的核酸的检测探

针。

[0029] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸在长度上为约6至约22个核苷酸。本申请披露的具有碱基、糖和/或骨架修饰中的一个或者多个的寡核苷酸可为,例如,长度上为8-18个核苷酸,或者长度上为12-16个核苷酸。在某些实施方案中,所述寡核苷酸在长度上为约8个核苷酸,在长度上为约9个核苷酸,在长度上为约10个核苷酸,在长度上为约11个核苷酸,在长度上为约12个核苷酸,在长度上为约13个核苷酸,在长度上为约14个核苷酸,在长度上为约15个核苷酸,或者在长度上为约16个核苷酸。例如,在寡核苷酸靶向miR-208a的情况下,寡核苷酸可具有序列 CTTTTTGCTCGTCTTA (序列号:64)。

[0030] 所述碱基修饰通常为氨基羰基,例如甲酰氨基、氨基甲酰基,或者碳酰胺基团。在各个实施方案中,所述修饰位于一个或者多个嘧啶碱基的C-5位,和/或一个或者多个嘌呤碱基的C-8位。本发明的寡核苷酸的修饰用氨基羰基含有基团或者取代基,非限制性地,所述基团或者取代基可为C₁-C₁₈烷基、C₁-C₁₈烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基,和-(CH₂)_n-NR₁R₂,其中n为1-6的整数以及R₁和R₂独立地为H或者C₁-C₆烷基。

[0031] 例如,在一些实施方案中,所述基团或者取代基为含氮的杂环,例如,哌啶、哌嗪、吗啉代,或者咪唑,其中的每个可为未取代的或者取代有1个、2个,或者3个烷基或者烯基取代基(例如,C₁-8或者C₁-4)。实例包括2-乙基、1-甲基-咪唑、3-丙基咪唑,和丙基吗啉代,其示于图1中。在其它实施方案中,所述基团或者取代基为碳环基,例如环烷基(例如,C₅-C₈)或者苯基,其可任选取代有一个或者多个(例如,1,2,或者3)烷基或者烯基取代基(例如,C₁-8或者C₁-4)。实例包括图6中所示的苄基。在其它实施方案中,所述基团或者取代基为例如具有1个或者2个烷基或者烯基取代基(例如,C₁-8,或者C₁-4)的仲胺或者叔胺。实例包括丙基二甲基氨基和乙基二甲基氨基,如图1中所示。在一些实施方案中,所述修饰用氨基羰基含有亲脂或者亲水性取代基,以及在一些实施方案中,所述取代基为阳离子取代基。实例包括图1中所示的C₆和C₁₈烷基。在一些实施方案中,所述基团或者取代基通过任选具有1-4个碳单元的连接基团的甲酰氨基连接物(carboxamino linkage)与嘧啶碱基的C5位结合。所述基团或者取代基可如本申请其它部分所述。

[0032] 在一些实施方案中,所述碱基修饰含有在生理条件下带正电荷,并任选具有多个正电荷的基团,例如哌嗪。也可使用伯、仲和季胺作为适合的碱基修饰。在多个实施方案中,所述碱基修饰含有肽连接物,其更有可能被代谢成较小毒性的核碱基(nucleobase)。

[0033] 在一些实施方案中,将所述碱基修饰的核苷酸结合在序列中间。例如,在一些实施方案中,所述经修饰的核苷酸不结合在5'和3'端的最后1、2,或者3个核苷酸处。在生理条件下为阳离子的部分可使T_m大量提高。特别地,pKa为6.5-7.5的咪唑和吗啉衍生物提供大量的结合和生物学活性。三烷基胺也被证实在本申请中是有效的。其它感兴趣的阳离子种类包括胍型衍生物和胍或者羟胺。还值得注意的是取代的哌嗪,取代的哌嗪部分由于相似的pKa,经常在药理学上起类似于吗啉的作用,但是所述取代的哌嗪部分具有2个阳离子中心。疏水取代如苄基和烷基部分也可增加T_m、提供核酸酶抗性和/或帮助细胞溶质递送。

[0034] 根据本发明,生物学活性和T_m的增加可部分地由于焓结合(enthalpic binding)增加,经修饰的寡核苷酸因此具有提高错配辨别力的潜力,并由此可作为探针用于诊断应用。

[0035] 寡核苷酸还包含至少一个具有2'修饰的核苷酸。本申请使用的术语“2'修饰”包括

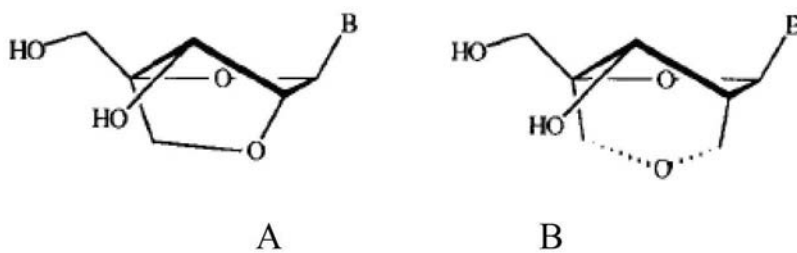
非H或者OH的任何2'基团。例如,2'修饰可独立选自C1-6烷基、2' O-烷基(C1-C6)、F、Cl、NH₂、CN或者SH。其它潜在的2'修饰描述在本申请的其它部分。示例性2'修饰为2' O-Me,其可与碱基修饰一起(例如,当结合在相同核苷酸中时)使寡核苷酸的T_m协同增加。在其它实施方案中,至少一个核苷酸具有2'修饰,该2'修饰为2'-4'桥,将糖锁定为C3内向构型。

[0036] 在这些或者其它实施方案中,寡核苷酸含有选自烷基、烯基、炔基,和烷氧基烷基的2'修饰,其中所述烷基(包括烷氧基的烷基部分)、烯基和炔基可为取代的或者未取代的。所述烷基、烯基,和炔基可为C1-C10烷基、烯基或者炔基,例如C1、C2,或者C3。烃取代基可包含1个或者2个或者3个非碳原子,其可独立选自N、O,和/或S。2'修饰还可包含O-烷基、O-烯基,和O-炔基形式的烷基、烯基,和炔基。

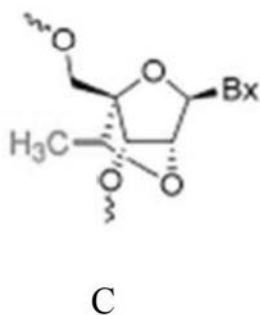
[0037] 根据本发明,其它示例性2'修饰包括2'-O-烷基(C1-3烷基,例如2' OMe 或者2' OEt)、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE),或者2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)取代。

[0038] 寡核苷酸可具有数个具有所述碱基修饰的核苷酸,例如1至约10个,或者约2至约9个核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核苷酸含有(准确地)1、2或者3个具有经修饰的碱基的核苷酸。所述寡核苷酸也可独立地具有数个在2'位被修饰的核苷酸。即,碱基修饰的核苷酸也可含有所述的2'修饰,例如2' OMe修饰。在一些实施方案中,至少一个或者两个核苷酸具有经修饰的碱基和经修饰的2'位,所述经修饰的碱基和经修饰的2'位各自如上所述。在某些实施方案中,所述寡核苷酸包含具有图1中所示的碱基修饰并具有2' OMe修饰的核苷酸。所述寡核苷酸在某些实施方案中准确地具有1个、2个,或者3个这种经修饰的核苷酸。

[0039] 在2'修饰为2'-4'桥的情况下,2'修饰可为锁定的核酸(LNA)。LNA例如描述在美国临时申请61/495,224、美国专利6,268,490、美国专利6,316,198、美国专利6,403,566、美国专利6,770,748、美国专利6,998,484、美国专利6,670,461,和美国专利7,034,133中,将所有这些文献的全部内容并入本文作为参考。LNA为经修饰的核苷酸或者核糖核苷酸,其在核糖的糖部分的2'和4'碳之间含有额外的导致"锁定的"构型的桥,和/或二环结构。在一个实施方案中,所述寡核苷酸含有一个或者多个具有下面结构A所示的结构的LNA。替代地或者另外地,所述寡核苷酸可含有一个或者多个具有下面结构B所示的结构的LNA。替代地或者另外地,所述寡核苷酸含有一个或者多个具有下面结构C所示的结构的LNA。



[0040]



[0041] 可结合在本发明的寡核苷酸中的其它适合的锁定的核苷酸包括描述在美国专利6,403,566和美国专利6,833,361中的那些,将两个专利的全部内容并入本文作为参考。

[0042] 所述寡核苷酸可含有至少3个,至少5个,或者至少7个锁定的核苷酸,以及在多个实施方案中不全部由锁定的核苷酸构成。在一些实施方案中,锁定的核苷酸的数目和位置可如61/495,224中所述,将其并入本文作为参考,并特别用于miR-208家族抑制剂。

[0043] 所述寡核苷酸可具有一个或者多个2'-脱氧核苷酸,以及在一些实施方案中,含有2至约10个2'-脱氧核苷酸。在一些实施方案中,至少一个或者全部碱基修饰的核苷酸为2'脱氧。

[0044] 具有修饰的碱基的核苷酸的数目可发生改变,但是在某实施方案中为至少25%的核苷酸,或者至少50%的核苷酸,或者至少75%的核苷酸,或者100%的核苷酸。如本申请所示,在一些实施方案中, T_m 的增加可用相对少的碱基经修饰的核苷酸实现,例如少于50%核苷酸或者少于25%核苷酸。然而,在一些实施方案中,所述寡核苷酸仅含有1、2、3,或者4个碱基经修饰的核苷酸(例如,如图1中所示),并且这种碱基经修饰的核苷酸也可含有2'修饰如2'-OMe。在这些实施方案中的碱基经修饰的核苷酸可为嘧啶碱基,例如在一些实施方案中为尿苷或者胸腺嘧啶。在一些实施方案中,所述寡核苷酸含有具有2'-OMe的碱基经修饰的寡核苷酸的单一结合。

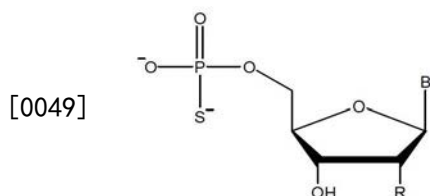
[0045] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸含有至少6个,或者至少9个具有2'-OMe的核苷酸。可选择地,所有核苷酸(或者在一些实施方案中,所有嘌呤或者所有嘧啶)可为2'-OMe。

[0046] 除了2'-OMe-尿苷的C-5位的一些亲脂性增强之外,阳离子类别的C-5经修饰的碱基呈现出 T_m 的大量增加(如本申请所示)。除了与关注的miRNA简单的沃森-克里克碱基配对之外,含有亲脂性和阳离子部分的修饰的混合物可对已经与调节miRNA活性的细胞内的酶和蛋白质相关的miRNA具有较大影响。这些嵌合核苷酸可不仅与它们的互补靶序列缔合,而且与miRNA缔合的蛋白质的疏水性或者亲水性区域相互作用。

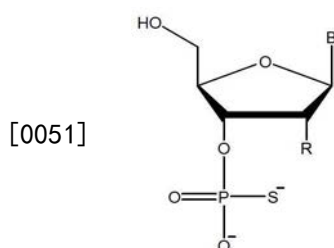
[0047] 在某些实施方案中,所述寡核苷酸还包含至少一个末端修饰或者“帽”。所述帽可为5'和/或3'-帽结构。术语“帽”或者“端帽”包括在所述寡核苷酸的任一末端(关于末端核糖核苷酸)的化学修饰,并且包括在5'端的最后两个核苷酸之间的连接物处和3'端的最后

两个核苷酸之间的连接物处的修饰。本申请所述的帽结构可增加所述寡核苷酸对于外切核酸酶的抗性,同时不会损害与 RNA 靶标或者细胞机构的分子相互作用。这种修饰可基于它们提高的体外或者体内效力来选择。所述帽可存在于5'-端(5'-帽)或者3'-端(3'-帽)或者可在两端都存在。在某些实施方案中,所述5'-和/或3'-帽独立选自硫代磷酸单磷酸酯(phosphorothioate monophosphate)、脱碱基残基(abasic residue)(部分(moiety))、硫代磷酸酯连接物、4'-硫代核苷酸(4'-thio nucleotide)、碳环核苷酸、二硫代磷酸酯连接物(phosphorodithioate linkage)、反转核苷酸(inverted nucleotide)或者反转脱碱基部分(inverted abasic moiety)(2'-3' 或者3'-3')、二硫代磷酸单磷酸酯(phosphorodithioate monophosphate),和甲基磷酸酯部分(methylphosphonate moiety)。当所述一个或多个硫代磷酸酯或者二硫代磷酸酯连接物(一个或多个)为帽结构的一部分时,它们通常位于5' 端的两个末端核苷酸和3' 端的两个末端核苷酸之间。

[0048] 在某些实施方案中,所述寡核苷酸具有至少一个末端硫代磷酸单磷酸酯。所述硫代磷酸单磷酸酯可位于所述寡核苷酸的5' 和/或3' 端。所述硫代磷酸单磷酸酯通过以下结构定义,其中B为碱基,以及R为如上所述的2' 修饰:

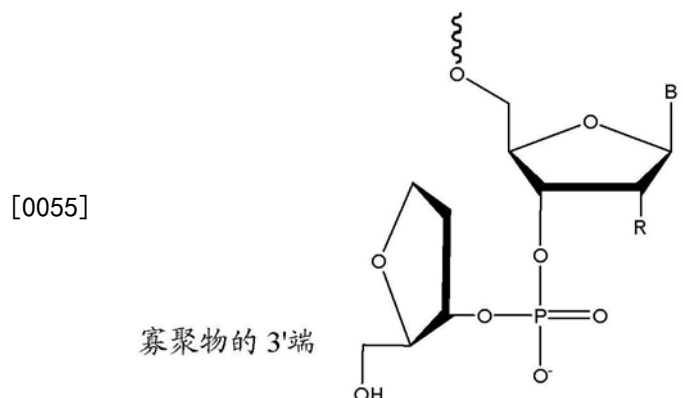
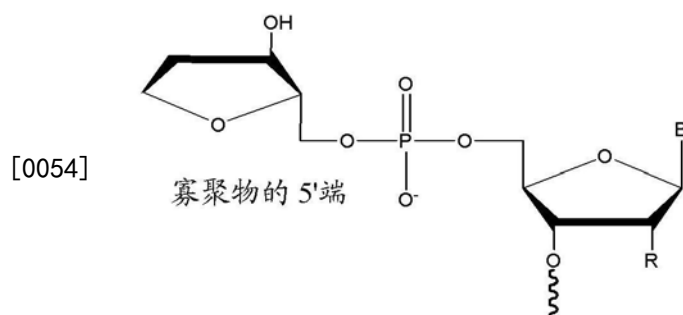


[0050] 5' 硫代磷酸单磷酸酯



[0052] 3' 硫代磷酸单磷酸酯

[0053] 在一些实施方案中可存在硫代磷酸酯连接物,例如在5' 端的最后两个核苷酸之间和3' 端的最后两个核苷酸之间(例如,作为帽结构的一部分),或者与磷酸二酯键交替。在这些或者其它实施方案中,所述寡核苷酸可在5' 端和3' 端中的任一个或者两个都含有至少一个末端脱碱基残基。脱碱基部分不含公认的嘌呤或者嘧啶核苷酸碱基,例如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或者胸腺嘧啶。因此,这种脱碱基部分缺乏核苷酸碱基或者在1' 位具有其它非核苷酸碱基化学基团。例如,所述脱碱基核苷酸可为反转脱碱基核苷酸,例如,其中反转脱碱基亚磷酸酰胺通过5' 亚酰胺(amidite)(而不是3' 亚酰胺)偶合,得到5'-5' 磷酸酯键。多核苷酸的5' 和3' 端的反转脱碱基核苷的结构在下面示出。



[0056] 所述寡核苷酸可含有一个或者多个硫代磷酸酯连接物。硫代磷酸酯连接物用于使得所述寡核苷酸更加耐受核酸酶裂解。例如,所述多核苷酸可部分地为硫代磷酸酯连接的,例如,硫代磷酸酯连接物可与磷酸二酯连接物交替。然而,在某些实施方案中,所述寡核苷酸完全是硫代磷酸酯连接的。在其它实施方案中,所述寡核苷酸具有1-5个或者1-3个磷酸酯连接物。

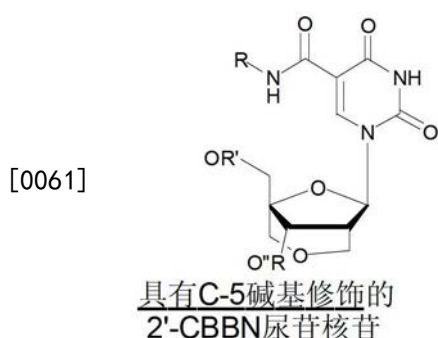
[0057] 通过固相合成法合成寡核苷酸(包括经修饰的多核苷酸)是公知的,并由 Caruthers et al., "New Chemical Methods for Synthesizing Polynucleotides," Nucleic Acids Symp. Ser., (7):215-23 (1980) 综述,将该文献的全部内容并入本文作为参考。

[0058] 本发明包括以下发现:当结合至2'-OMe核苷酸中时,新的碱基经修饰的2'-OMe-嘧啶显示出与它们的互补序列的双链体结合亲和力的增强(见图1)。另外,这些具有硫代磷酸酯骨架修饰的嘧啶碱基经修饰的2'-OMe核苷酸在细胞培养中在甚至不使用转染试剂的情况下显示抗它们的微RNA靶标序列的生物活性,这是一种未缀合的2'-OMe硫代磷酸酯核苷酸在不使用特异性3'和5'-缀合物的情况下不呈现的特征。此外,如本申请所示,具有硫代磷酸酯骨架修饰的嘧啶碱基经修饰的2'-OMe核苷酸在注射盐水后的心脏组织中呈现靶标miRNA的敲低(图8)。

[0059] 合成了一系列模型化合物,其中在C-5碱基位置上的侧链修饰为疏水的或者亲水的。结构包含在图1-3中。在所有2'-OMe-尿苷核苷仅具有C-5疏水性修饰的情况下,含有这样的核苷的抗-miRNA寡核苷酸与具有未经修饰的2'-OMe-尿苷的核苷酸相比小幅度增加双链体的 T_m 。在细胞培养实验中,这些核苷酸在miRNA抑制方面不提供大量益处,在使用和不使用脂质转染试剂的情况下都是如此(图6和7)。相反,在所有尿苷的C-5上单独含有亲水性含胺(阳离子的)侧基的抗-miRNA核苷酸显示 T_m 的大量增加(图4-6)。而且,用含有这些修饰的核苷酸进行的细胞培养实验显示独特的生物性质,例如抑制miRNA靶标的能力,甚至在不

存在脂质转染试剂或者缀合物的情况下。还应该注意的是,组合具有疏水性和阳离子碱基修饰的一些核苷酸显示良好的抗-miRNA活性。

[0060] 不被理论所束缚,这些嘧啶碱基修饰被认为通过与所得RNA双链体的极性大沟(major groove)相互作用而增强结合亲和力。本申请所述的核苷为经修饰的,例如通过甲酰氨基修饰物(carboxamido modifications)修饰,所述甲酰氨基修饰物与嘧啶碱基交叉缀合,并向另一个核碱基或者向极性大沟提供另外的氢键键合位点。这是与常用的糖修饰如桥接核苷和2'-修饰不同的双链体稳定模式,其倾向于所述核碱基的增强与RNA结合的A-型构象。因此,这些C-5甲酰氨基修饰的核碱基被认为对由糖修饰提供的结合增强至少起加和性作用。也可使用也含有2'-4'-桥接糖的C-5甲酰氨基修饰的核苷来增强所述寡核苷酸与它们的靶标的结合,包括下面所示的桥结构。结合 2'-CBBN核苷的寡核苷酸描述于美国临时申请61/532,738中,将其并入本文作为参考。如下面的结构中所示,R表示本申请所述的甲酰氨基修饰,以及 R'和R''表示5'端和3'端。



[0062] 尿苷的C-5位的甲酰氨基修饰以及化学和稳定特征可扩展至胞苷碱基。类似的修饰可通过本申请所述的甲酰氨基型修饰用于嘌呤碱基。

[0063] 结合本申请所述的结合经修饰的核碱基的核苷酸显示出与它们的互补核苷酸增强的结合亲和力。 T_m 的增加经测量高达5°C/结合(图5),与二环 LNA单体相当,所述二环LNA单体目前为止是所观察到的最有效和广泛使用的亲和力增强修饰。在创造更有活性和更有效微RNA抑制剂中,增加 T_m 可为特别有效的。另外,这些新的核碱基修饰中的一些很可能通过以下方式增强细胞摄取:在阳离子部分的情况下通过掩蔽一些带负电荷的磷酸酯,或者在亲脂性修饰的情况下通过使骨架防御核酸酶和形成两亲性核苷酸(图6、7,和8)。

[0064] 所述修饰可用在被设计成模拟miRNA序列的寡核苷酸中,并可包含下表1中的成熟miRNA序列中的任何序列。例如,可将这种反义和有义序列结合至含有茎和环部分的shRNA或者其它RNA结构中。除了别的以外,这种序列在包括以下的方面中是有用的:模拟或者靶向miRNA功能以治疗或者改善心脏肥大、心肌梗塞、心力衰竭(例如,充血性心力衰竭)、血管损伤和/或病理性心脏纤维化等。miRNA的示例性治疗用途披露于下表1中列举的美国和PCT专利文献中,将每篇文献的全部内容并入本文作为参考。miRNA的成熟和加工前形式披露于下面列举的专利文献中,并将这样的描述也并入本文作为参考。

[0065] 表1

[0066]

miRNA	miRNA 序列	参考文献
1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU(序列 ID 号 1)	WO 2009/012468
100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG(序列 ID 号 2)	WO 2009/012468
10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG(序列 ID 号 3)	WO 2009/012468
125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA(序列 ID 号 4)	WO 2009/012468
128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU(序列 ID 号 5)	WO 2007/070483
133a	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG(序列 ID 号 6)	WO 2009/012468
133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA(序列 ID 号 7)	WO 2009/012468
139	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG(序列 ID 号 8)	WO 2009/012468
143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC(序列 ID 号 9)	WO 2007/070483
145	GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCU(序列 ID 号 10)	WO 2007/070483
150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG(序列 ID 号 11)	WO 2009/012468
15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG(序列 ID 号 12)	WO 2009/062169
15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA(序列 ID 号 13)	WO 2009/062169
16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG(序列 ID 号 14)	WO 2009/062169
181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU(序列 ID 号 15)	WO 2009/012468
195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC(序列 ID 号 16)	WO 2009/012468
197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC(序列 ID 号 17)	WO 2009/012468
199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC(序列 ID 号 18)	WO 2009/012468

[0067]

miRNA	miRNA 序列	参考文献
199b	miR-199b-5p CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC(序列 ID 号 19) miR-199b-3p ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA(序列 ID 号 20)	US 61/047,005
206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG(序列 ID 号 21)	WO 2007/070483
208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU(序列 ID 号 22)	WO 2008/016924
208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU(序列 ID 号 23)	WO 2009/018492
20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG(序列 ID 号 24)	US 60/950,565
21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA(序列 ID 号 25)	WO 2009/058818
214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU(序列 ID 号 26)	US 61/047,005
22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU(序列 ID 号 27)	WO 2009/012468
221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC(序列 ID 号 28)	WO 2009/012468
222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU(序列 ID 号 29)	WO 2009/012468
224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU(序列 ID 号 30)	WO 2009/012468
23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC(序列 ID 号 31)	WO 2009/012468
26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU(序列 ID 号 32)	WO 2007/070483
26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU(序列 ID 号 33)	WO 2009/012468
28	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG(序列 ID 号 34)	WO 2009/012468
29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA(序列 ID 号 35)	WO 2009/018493
29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU(序列 ID 号 36)	WO 2009/018493
29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA(序列 ID 号 37)	WO 2009/018493
30a	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG(序列 ID 号 38)	PCT/US2010/031147
30b	UGUAAACAUCUACACUCAGCU(序列 ID 号 39)	PCT/US2010/031147
30c	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC(序列 ID 号 40)	WO 2009/012468
30d	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG(序列 ID 号 41)	PCT/US2010/031147
30e	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG(序列 ID 号 42)	PCT/US2010/031147
342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU(序列 ID 号 43)	WO 2009/012468
382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG(序列 ID 号 44)	WO 2009/012468

[0068]

miRNA	miRNA 序列	参考文献
422a	ACUGGACUUAGGGUCAGAAGGC(序列 ID 号 45)	US 2009/0226375
378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG(序列 ID 号 46)	WO 2009/012468
424	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA(序列 ID 号 47)	WO 2009/062169
483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU(序列 ID 号 48)	WO 2009/012468
484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU(序列 ID 号 49)	WO 2009/012468
486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG(序列 ID 号 50)	WO 2009/012468
497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU(序列 ID 号 51)	WO 2009/062169
499	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU(序列 ID 号 52)	WO 2009/018492
542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA(序列 ID 号 53)	WO 2009/012468
92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU(序列 ID 号 54)	WO 2009/012468
92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC(序列 ID 号 55)	WO 2009/012468
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU(序列 ID 号 56)	WO 2009/012468
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU(序列 ID 号 57)	WO 2009/012468
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU(序列 ID 号 58)	WO 2009/012468
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU(序列 ID 号 59)	WO 2009/012468
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU(序列 ID 号 60)	WO 2009/012468
let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU(序列 ID 号 61)	WO 2009/012468
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU(序列 ID 号 62)	WO 2009/012468
451	AAACCGUUAACCAUACUGAGUU(序列 ID 号 63)	PCT/US2010/034227

[0069] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸靶向miR-208家族miRNA,例如 miR-208a或者miR-208b,或者可选择地,miR-15b或者miR-21。在一些实施方案中,所述寡核苷酸具有图5中所示的序列和结构。“m”表示2' OMe修饰,以及“+”表示具有2' OMe的碱基经修饰的核苷酸。缩写的描述参见图1 和图5。

[0070] 可将所述寡核苷酸结合在多种大分子装配物(assembly)或者组合物中。为了递送,这种复合物可包含多种脂质体、纳米粒子和胶束,它们经配制以递送至患者。所述复合物可包含一种或者多种促融或者亲脂分子以引发细胞膜渗透。这种分子描述于例如美国专利7,404,969和美国专利7,202,227中,将这两篇专利的全部内容并入本文作为参考。可选择地,所述寡核苷酸还可包含侧链亲脂基团(pendant lipophilic group)以帮助细胞递送,例如在WO 2010/129672中描述的那些,将WO2010/129672并入本文作为参考。

[0071] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,其包含有效量的本发明的寡核苷酸或其药理学上可接受的和药学上可接受的载体或者稀释剂。

[0072] 所述组合物或者制剂可使用包括至少一种本申请所述的寡核苷酸在内的多种治疗性寡核苷酸。例如,所述组合物或者制剂可使用至少2、3、4或者5种本申请所述的miRNA抑制剂。

[0073] 可将本发明寡核苷酸配制为多种药物组合物。药物组合物将以适于预期应用的形式制备。通常,这将要求制备基本不含热原以及基本不含可有害于人或者动物的其它杂质的组合物。示例性递送/制剂系统包括胶态分散系统、大分子复合物、纳米囊、微球、珠粒,和基于脂质的系统,所述基于脂质的系统包括水包油乳液、胶束、混合胶束,和脂质体。适于将本发明的核酸递送至心脏和骨骼肌组织的可商购脂肪乳剂包括Intralipid®、Liposyn®、Liposyn® II、Liposyn® III、Nutrilipid和其它类似的脂质乳液。用作体内递送媒介物的优选的胶态系统为脂质体(即,人工膜囊)。这种系统的制备和用途是本领域公知的。示例性制剂也披露于US5,981,505;US6,217,900;US 6,383,512;US5,783,565;US7,202,227;US6,379,965;US6,127,170;US 5,837,533;US6,747,014;和W003/093449中,将这些文献的全部内容并入本文作为参考。

[0074] 药物组合物和制剂可使用适当的盐和缓冲剂,以使得递送媒介物稳定和允许被靶细胞摄取。本发明的含水组合物包含溶解或者分散在药学上可接受的载体或者含水介质中的有效量的包含抑制剂寡核苷酸的递送媒介物(例如脂质体或者其它复合物)。短语“药学上可接受”或者“药理学上可接受”是指当给药于动物或者人时,不产生不利的、变应性或者其它不良反应的分子实体(molecular entities)和组合物。本申请使用的“药学上可接受的载体”可包括对于配制药物如适于给药于人的药物中的使用而言为可接受的一种或者多种溶剂、缓冲剂、溶液、分散介质、包衣料、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。针对药物活性物质使用这种介质和试剂是本领域公知的。也可将补充活性成分结合至所述组合物中。

[0075] 本发明药物组合物的给药或者递送可通过任何途径,只要通过这种途径可到达目标组织即可。例如,给药可通过皮内、皮下、肌内、腹膜内或者静脉内注射,或者通过直接注射至目标组织(例如,心脏组织)中进行。本申请披露的寡核苷酸的稳定性和/或效力允许常规给药途径,包括皮下、皮内和肌内。包含miRNA抑制剂的药物组合物也可通过用于将治疗药物递送至心脏的导管系统或者隔离冠脉循环的系统给药。用于将治疗药物递送至心脏和冠状脉管系统的各种导管系统是本领域公知的。适用于本发明的基于导管的递送方法或者冠脉隔离方法的一些非限制性实例披露于美国专利 6,416,510;美国专利6,716,196;美国专利6,953,466,W02005/082440,W0 2006/089340,美国专利公开文本2007/0203445,美国专利公开文本 2006/0148742,和美国专利公开文本2007/0060907中,将这些文献的全部内容并入本文作为参考。

[0076] 所述组合物或者制剂也可肠胃外或者腹膜内给药。例如,游离碱或者药理学上可接受的盐形式的缀合物的溶液可在适当地混合有表面活性剂如羟丙基纤维素的水中制备。分散体也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备。在普通的贮存和使用条件下,这些制剂通常含有防腐剂以防止微生物生长。

[0077] 适于可注射使用或者导管递送的药物剂型包括,例如,无菌水溶液剂或者分散剂和用于即时制备无菌可注射溶液剂或者分散剂的无菌粉末。通常,这些制剂是无菌的和流动的,流动的程度为使得容易注射。制剂应当在制备和贮存条件下稳定,并应进行防腐以防

止微生物如细菌和真菌的污染作用。可含有适当的溶剂或者分散介质,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们适合的混合物和植物油。适当的流动性可例如通过使用包衣料如卵磷脂、通过在分散体的情况中维持希望的粒度和通过使用表面活性剂来维持。防止微生物的作用可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂来实现,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况中,优选包含等渗剂,例如,糖或者氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如,单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0078] 无菌可注射溶液可通过以下方法制备:将适当量的缀合物与按需要任何其它成分(例如上面所列举的)一起结合至溶剂中。通常,分散剂通过以下方法制备:将各种无菌活性成分结合至含有基础分散介质和希望的其它成分(例如上面所列举的)的无菌媒介物中。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前经无菌过滤的溶液得到粉末,所述粉末含有一种或多种活性成分加上任何另外的希望的成分。

[0079] 在配制后,溶液优选以与剂型相容的方式和以治疗有效量给药。所述制剂可容易地以多种剂型如可注射溶液、药物释放胶囊等给药。例如,对于以水溶液形式进行的肠胃外给药,通常将所述溶液适合地缓冲并首先使液体稀释剂等渗例如用足够的盐水或者葡萄糖。这种水溶液可用于例如静脉内、肌内、皮下和腹膜内给药。优选地,可按本领域技术人员已知的方式使用无菌含水介质,特别是根据本申请公开的内容。例如,可将单次剂量溶解在1ml 等渗NaCl溶液中,并添加至1000ml皮下输液流体中或者在推荐的输注位置注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”15th版,第1035-1038 和1570-1580页)。根据待被治疗的受试者的病症,将有必要进行一些剂量上的改变。无论如何,负责给药的人将针对个体受试者决定适当的剂量。而且,对于人类给药,制剂应当符合FDA生物制剂标准办公室(FDA Office of Biologics standards)要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0080] 在另一方面,本发明提供降低或者抑制细胞中的RNA表达或者活性的方法。在这种实施方案中,所述方法包括使所述细胞与具有本申请所述的化学模式的经修饰的寡核苷酸(或其药物组合物)接触,其中所述寡核苷酸与细胞表达的RNA转录体杂交(例如,至少基本上与其互补)。在一些实施方案中,所述RNA为miRNA。

[0081] 在另一方面,本发明提供预防或者治疗受试者与RNA或者其表达相关或者由RNA或者其表达介导的病症的方法。在一些实施方案中,所述RNA 为miRNA。本发明的所述预防或者治疗方法包括向所述受试者给药药物组合物,所述药物组合物包含有效量的碱基修饰的寡核苷酸或者其药学上可接受的组合物。

[0082] 本发明提供将经修饰的寡核苷酸递送至哺乳动物细胞的方法(例如,作为本申请所述的组合物或者制剂的一部分),和治疗、改善或者预防哺乳动物患者中的病症进展的方法。可使所述寡核苷酸或者药物组合物与靶细胞(例如,哺乳动物细胞)在体外或者体内接触。所述细胞可为心脏细胞。

[0083] 大体上,所述方法包括将寡核苷酸或者包含所述寡核苷酸的组合物给药于哺乳动物患者或者靶细胞群。如所述那样,所述寡核苷酸可为miRNA抑制剂(例如,具有被设计成抑制miRNA的表达或者活性的核苷酸序列)。例如,在miRNA抑制剂为miR-208家族miRNA的抑制

剂的情况下,所述患者可患有与miR-208家族表达相关的、由miR-208家族表达介导的或者由 miR-208家族表达导致的病症。这种病症包括,例如,心脏肥大、心肌梗塞、心力衰竭(例如,充血性心力衰竭)、血管损伤、再狭窄或者病理性心脏纤维化、癌症或者其它miRNA相关障碍,包括表1中列出的专利公开文本中描述的那些障碍。因此,本发明提供本发明的经修饰的寡核苷酸和组合物用于治疗所述病症的用途,和用于制备用于这种治疗的药物的用途。

[0084] 在某些实施方案中,所述患者(例如,人类患者)具有一个或者多个危险因素,包括,例如,长期未控制的高血压、未矫正的心瓣膜病、慢性咽喉炎、近期发生的心肌梗塞(recent myocardial infarction)、充血性心力衰竭、先天性心脏病倾向和病理肥大。可选择地或者另外地,所述患者可被诊断为具有例如心脏肥大的遗传倾向,或者可具有例如心脏肥大的家族史。

[0085] 在此方面,本发明可在患有心力衰竭或者心脏肥大的患者中提供改善的运动耐力、减少的入院、较好的生活质量、降低的发病率和/或降低的死亡率。

[0086] 在某些实施方案中,在心脏组织中,或者如所测定的在患者血清中, microRNA活性降低或者被抑制。

[0087] 在多个实施方案中,所述药物组合物通过肠胃外给药或者通过直接注射至心脏组织中来给药。肠胃外给药可为静脉内、皮下,或者肌内给药。在一些实施方案中,所述组合物通过以下方法给药:口服、透皮、持续释放、受控释放、延迟释放、栓剂、导管或者舌下给药。在某些实施方案中,所述寡核苷酸以25mg/kg或者较少剂量给药,或者以10mg/kg或者较少剂量给药,或者以5mg/kg或者较少剂量给药。在这些实施方案中,所述寡核苷酸或者组合物可通过肌内或者皮下注射给药,或者静脉内给药。

[0088] 在一些实施方案中,所述方法还包括在治疗后清除或者除去miRNA抑制剂。例如,可在治疗后给药具有与所述抑制剂互补的核苷酸序列的寡核苷酸,以减弱或者终止所述抑制剂的功能。

[0089] 出于所有目的,将本申请引用的所有参考文献(包括表1中的那些)并入本文作为参考。

[0090] 具体实施方式

[0091] 实施例

[0092] 实施例1:制备5'-位-经修饰的2'-O-甲基尿苷核苷亚磷酰胺的一般操作

[0093] 5-碘-2'-O-甲基尿苷已经容易地通过已知方法合成,并且也可商购。核苷的5'-和3'-羟基分别通过标准的4,4'-二甲氧基三苯甲基化和乙酰化方法来保护。然后将这种经双重保护的核苷通过以下方法进行甲酰胺化:在50mL 硼硅酸盐波士顿圆瓶(borosilicate boston round bottle)中,将核苷溶解在无水 THF和N,N-二甲基乙酰胺的1:1混合物中。将5当量TEA和3当量伯胺或者胺盐酸盐添加至混合物中,然后添加0.1当量四(三苯基膦)钨(0)。将瓶子置于配有可密封入口和压力计的300mL帕尔瓶(Parr Bomb)中。将所述装置用一氧化碳通过以下方法吹洗:用一氧化碳充至60psi,然后将压力释放至 10psi,并重复两次。然后将装置充至60psi,密封并置于70°C油浴中,保持17小时。真空除去溶剂,将残留物重新溶解在MeOH中并在Zemplen或者类似条件下在55°C脱乙酰化。将所得核苷使用单氯化物(monochloridite)方法转化至核苷亚磷酰胺。

[0094] 2'-脱氧核苷可按与Vaught et al., J. Am. Chem. Soc., 132 (12):4141-4151 (2010) 中所述类似的方式来合成, 将该文献的全部内容并入本文作为参考。

[0095] 实施例2: 制备5'-O-DMTr-3'-O-Ac-5- (2- (N4-甲基哌嗪基乙基) 氨基甲酰基) -2'-O-甲基尿苷 (2c)

[0096] 在50mL波士顿圆瓶中添加在THF (体积: 10ml) 和DMA (体积: 10ml) 中的5'-O-DMTr-3'-O-Ac-5-碘尿苷 (1g, 1.373mmol), 得到无色溶液。称取四 (三苯基膦) 钯 (0) (0.159g, 0.137mmol) 并添加至所述瓶中, 然后添加三乙胺 (0.694g, 6.86mmol) 和2- (4-甲基哌嗪-1-基) 乙胺 (0.413g, 2.88mmol)。将所述瓶子置于250mL帕尔瓶中, 将其密封并通过针阀排空。然后将所述帕尔瓶用一氧化碳加压至60psi。然后将所述帕尔瓶在高真空下排空并重新充有一氧化碳 (60psi)。将所述帕尔瓶重新密封并置于加热至70°C的油浴中, 保持17小时。将所述帕尔瓶冷却至室温并缓慢释放压力。将瓶子从所述帕尔瓶中移出并真空除去溶剂 (Vaught et al., J. Am. Chem. Soc., 132 (12):4141-4151 (2010), 将其全部内容并入本文作为参考)。

[0097] 将干燥的产物重新溶解在MeOH (10mL) 中, 并添加1粒NaOH (~40mg) 和小搅拌子。给瓶子装配隔膜, 并将混合物在50°C搅拌过夜。TLC (3%TEA/ 己烷处理板, 5%MeOH/DCM展开剂, 通过UV和Hannessian's着色剂w/炭化显影) 揭示携带三苯甲基的单一产物。将反应混合物浓缩至干并施用至用 DCM和1%TEA平衡的80g ISCO硅胶柱上。用0-10%MeOH/DCM (1%TEA) 溶剂梯度, 历时2L (以60ml/min) 从所述柱上洗脱产物。收集纯级份, 合并并且浓缩至干, 得到5'-O-DMTr-3'-O-Ac-5- (2- (N4-甲基哌嗪基乙基) 甲酰氨基尿苷 (0.93g, 1.274mmol, 93%收率), 其为白色泡沫状物。¹H NMR δ 2.33 (s, 3H), 2.50-2.65 (m, 10H); 3.44-3.52 (m, 4H); 3.54 (s, 3H); 3.79 (s, 6H); 3.87-3.92 (m, 1H); 4.00-4.08 (m, 1H); 4.10-4.17 (m, 1H); 5.90 (d, J=3.2Hz, 1H); 6.85 (dd, J=9.0, 1.3Hz, 4H); 7.27-7.49 (m, 9H); 8.52 (s, 1H); 8.77 (t, J=5.4Hz, 1H)。MS (ESI) M+1=730, 计算值, 729。

[0098] 下面是图2中示出的所选择的5-甲酰氨基碱基修饰的实验细节。每个化合物使用适当的伯胺以相同的方式合成。所有化合物给出60-95%的收率。

[0099] 化合物2a, 丙基-咪唑衍生物

[0100] 使用3当量1- (3-氨基丙基) 咪唑作为伯胺, 以64%收率得到希望的产物, 其为灰白色泡沫状物。¹H NMR (300MHz) δ 2.00-2.10 (m, 2H); 3.21-3.37 (m, 2H), 3.46 (d, J=4.2Hz, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.92 (dd, J=5.6, 3.2Hz, 1H), 3.95-4.10 (m, 4H), 4.15-4.22 (m, 1H), 5.92 (d, J=3.2Hz, 1H), 6.08 (bs, 1H), 6.84 (dd, J=9.0, 1.4Hz, 4H), 6.93-7.50 (m, 10H), 7.63 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.74 (t, J=6.0Hz, 1H)。MS (ESI+) 计算值 711.76, 实测值 712.6。

[0101] 化合物2b, 丙基-吗啉衍生物

[0102] 使用3当量3-吗啉代丙胺作为伯胺, 以64%收率得到希望的产物, 其为白色泡沫状物。¹H NMR (300MHz) δ 1.76 (五重峰, J=7.0Hz, 2H), 2.41-2.50 (m, 4H), 3.40-3.47 (m, 4H), 3.53 (s, 3H), 3.70-3.75 (m, 8H), 3.79 (s, 6H), 3.89 (dd, J=5.7, 3.2Hz, 1H), 3.98-4.15 (m, 2H), 5.90 (d, J=3.2Hz, 1H), 6.84 (dd, J=9.0, 0.9Hz, 4H), 7.15-7.48 (m, 9H), 8.48 (s, 1H), 8.75 (t, J=5.8Hz, 1H)。MS (ESI+) 计算值 730.8, 实测值 731.5。

[0103] 化合物2e, 苄基衍生物

[0104] 使用3当量苄胺作为伯胺,以87%收率得到希望的产物,其为白色泡沫状物。¹H NMR (300MHz) δ 3.45–3.49 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.89 (dd, J=5.6, 3.1Hz, 1H), 4.03–4.17 (m, 2H), 4.58 (dd, J=5.7, 4.6Hz, 2H), 5.90 (d, J=3.1Hz, 1H), 6.85 (dd, J=9.0, 1.3Hz, 4H), 7.15–7.60 (m, 15 H), 8.59 (s, 1H), 8.87 (t, J=5.9Hz, 1H)。

[0105] 化合物2h, 2-乙基-N,N-二甲基胺衍生物

[0106] 使用3当量N,N-二甲基乙二胺作为伯胺,以91%收率得到希望的产物,其为白色泡沫状物。¹H NMR (300MHz) δ 2.31 (s, 6H), 2.54 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.40–3.50 (m, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.79 (s, 6H), 3.88 (dd, J=5.6, 3.1Hz), 3.95–4.10 (m, 4H), 5.86 (d, J=3.1Hz, 1H), 6.84 (dd, J=9.0, 1.4Hz, 4H), 7.17–7.49 (m, 9H), 8.46 (s, 1H), 8.79 (t, J=5.6Hz, 1H)。

[0107] 实施例3:制备5'-O-DMTr-5-((2-(N4-甲基哌嗪基乙基)氨基甲酰基)-2'-O-甲基尿苷亚酰胺(3c)

[0108] 在100mL圆底烧瓶中添加DIEA (0.364ml, 2.084mmol) 和溶解在 DCM (体积:15ml) 中的5-(3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙-1-甲酰氨基)-5'-O-DMTr-3'-O-Ac-2'-O-Me-尿苷 (1.55g, 2.084mmol), 得到无色溶液。将烧瓶用氩气吹洗并设置为搅拌。滴加3-((氯(二异丙基氨基)膦)氧基)丙腈 (或者“单氯化物”) (0.451g, 2.084mmol), 并将反应混合物搅拌3小时。

[0109] TLC揭示反应完成。将反应混合物用饱和NaHCO₃ (100mL) 稀释,并用 DCM (3x50mL) 萃取水相。将有机相合并,并通过以下方法干燥:盐洗 (1x50 mL) 并添加Na₂SO₄。将有机相过滤并浓缩。

[0110] 纯化通过柱色谱法在用3%TEA/己烷预处理的40g硅胶柱上进行。产物用0–5%MeOH/DCM (历经1L, 以40mL/min) 稀释。将纯的级份合并,并浓缩,得到白色无定形泡沫状物。将产物与DCM (3x30mL) 一起共蒸发,并在高真空下干燥过夜,然后用在自动化寡核苷酸合成中。5'-O-DMTr-5-((2-(N4-甲基哌嗪基乙基)氨基甲酰基)-2'-O-甲基尿苷亚酰胺 (1.47g, 1.557mmol, 74.7%收率)。¹H NMR δ 1.15–1.25 (m, 12H); 2.31 (s, 3H); 2.36 (t, J=6.5Hz, 2H); 2.41–2.69 (m, 12H); 3.34–3.72 (m, 9H); 3.76–4.06 (m, 8H); 4.18–4.36 (m, 1H); 5.90 (dd, J=5.4, 5.0Hz, 1H); 6.80–6.92 (m, J=9.0, 4H); 7.15–7.51 (m, 9H); 8.51 (ds, 1H); 8.78–8.90 (m, 1H)。MS (ESI) M+1=931, 计算值, 930。

[0111] 图2中的所选择的5-甲酰氨基碱基修饰的实验细节。每个化合物使用1.00当量3-(((二异丙基氨基)(甲基)膦基)氧基)丙腈以相同的方式合成。所有化合物得到75–95%的收率。

[0112] 化合物3b, 丙基-吗啉衍生物的亚磷酰胺

[0113] 在柱色谱法 (DCM/MeOH/TEA) 后,以82%收率得到白色泡沫状物。通过NMR测量非对映异构体的1:1混合物 (通过¹H NMR测定)。可分辨的质子描述在列表显示的结果之前并通过星号表示。³¹P NMR (121.5MHz) δ 150.15*, 150.89*。在质谱中,混合物产生以下可分辨的非对映异构体峰:在3.45ppm*和3.47ppm*的对应于2'-O-甲基的3H的单峰;在3.80ppm*和在3.81ppm*的两个单峰,对应于三苯甲基上的甲氧基的6H;在5.92ppm*和在5.96ppm*的两个二重峰,偶合常数分别为5.0Hz和5.4Hz,并对应于在 C1' 位的1H;在8.49ppm*和8.56ppm*的两个单峰,对应于碱基C-6位的1H。剩余的峰如下:¹H-NMR (300MHz) δ 1.04–1.22 (m, 12H), 1.69–1.82 (m, 2H), 2.41–2.49 (m, 6H), 2.58–2.67 (m, 2H), 3.33–3.44 (m, 4H), 3.51–3.65 (m, 3H), 3.70–3.76 (m, 4H), 3.83–3.95 (m, 1H), 3.95–4.07 (m, 1H), 4.17–4.36 (m, 2H), 6.82–

6.89 (m, 4H), 7.15–7.51 (m, 9H), 8.63–8.76 (m, 1H)。MS (ESI+) 计算值 931.0, 实测值931.8。

[0114] 化合物3a, 丙基-咪唑衍生物的亚磷酰胺

[0115] 在柱色谱法 (DCM/MeOH/TEA) 后以80%收率得到白色无定形泡沫状物。通过NMR测量非对映异构体的55:45混合物 (通过¹H NMR测定)。可分辨的质子描述在列表显示的结果之前并通过星号表示。³¹P NMR (121.5 MHz) δ 150.26*, 150.81*。在质谱中, 混合物产生以下可分辨的非对映异构体峰: 对应于2H的两个双三重峰, 其中主要非对映异构体在2.63ppm* (J=6.1, 1.3Hz) 以及次要信号在2.37 (J=6.3, 1.4Hz); 对应于2'-O-甲基的3H的两个单峰, 均在3.49ppm*; 在5.92ppm* (次要, J=4.5Hz) 和5.99ppm* (主要, J=5.2Hz) 的两个二重峰, 对应于C1'-位的1H; 在8.55ppm* (主要) 和8.63ppm* (次要) 的两个单峰, 对应于碱基的C-6位的1H。剩余的峰如下: ¹H-NMR (300MHz) δ 1.04–1.22 (m, 12H), 1.97–2.10 (m, 2H), 2.80–2.94 (m, 1H), 3.23–3.47 (m, 4H), 3.52–3.74 (m, 3H), 3.75–3.95 (m, 7H), 3.96–4.13 (m, 3H), 4.22–4.41 (m, 2H), 6.79–6.89 (m, 4H), 6.96 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.15–7.53 (m, 9H), 7.59 (s, 1H), 8.69–8.80 (m, 1H)。MS (ESI+) 计算值912.0, 实测值912.3。

[0116] 化合物3h, 2-乙基-N,N-二甲基胺衍生物的亚磷酰胺

[0117] 在柱色谱法 (DCM/MeOH/TEA) 后以87%收率得到白色无定形泡沫状物。通过NMR测量非对映异构体的55:45混合物 (通过¹H NMR测定)。可分辨的质子描述在列表所示结果之前并通过星号表示。³¹P NMR (121.5MHz) δ 150.12*, 150.71*。在质谱中, 混合物产生以下可分辨的非对映异构体峰: 在5.90ppm* (次要, J=4.8Hz) 和5.93ppm* (主要, J=5.2Hz) 的两个二重峰, 对应于C1'-位的1H; 在8.46ppm* (主要) 和8.53ppm* (次要) 的两个单峰, 对应于碱基C-6位的1H。剩余的峰如下: ¹H-NMR (300MHz) δ 1.04–1.22 (m, 12H), 2.31 (s, 6H), 2.52–3.06 (m, 4H), 3.33–3.49 (m, 5H), 3.52–3.74 (m, 4H), 3.75–3.94 (m, 7H), 3.95–4.07 (m, 1H), 4.16–4.34 (m, 2H), 6.80–6.90 (m, 4H), 7.15–7.53 (m, 10H), 8.68–8.82 (m, 1H)。

[0118] 化合物3e, 苄基衍生物的亚磷酰胺

[0119] 在柱色谱法 (EtOAc/己烷) 后以89%收率得到的白色无定形泡沫状物。通过NMR测量非对映异构体的55:45混合物 (通过¹H NMR测定)。可分辨的质子描述在列表所示结果之前并通过星号表示。³¹P NMR (121.5MHz) δ 150.26*, 150.81*。在质谱中, 混合物产生以下可分辨的非对映异构体峰: 对应于2H的两个双三重峰, 其中主要非对映异构体在2.64ppm* (J=6.5, 2.1Hz) 以及次要信号在2.38 (J=6.5, 1.5Hz); 在5.93ppm* (次要, J=4.7Hz) 和5.98ppm* (主要, J=5.3Hz) 的两个二重峰, 对应于C1'-位的1H; 在8.57ppm* (主要) 和8.64ppm* (次要) 的两个单峰, 对应于碱基C-6位的1H。剩余的峰如下: ¹H-NMR (300MHz) δ 1.04–1.22 (m, 12H), 3.36–3.46 (m, 2H), 3.50–3.76 (m, 4H), 3.77–3.93 (m, 7H), 3.95–4.10 (m, 1H), 4.17–4.36 (m, 2H), 4.45–4.67 (m, 2H), 6.82–6.90 (m, 4H), 7.15–7.54 (m, 14H), 8.83–8.95 (m, 1H)。MS (ESI+) 计算值 912.0, 实测值912.3。

[0120] 实施例4: 截短的核苷酸的一般合成方法学

[0121] 用于修饰的甲酰氨基取代基选自亲水和疏水基团。优选选择亲水基团, 这是因为: 它们与其它核碱基形成新的氢键相互作用的能力; 在标准寡核苷酸合成下缺乏可交换质子或者需要额外保护基团的敏感官能团; 这些基团在生理pH条件下的阳离子性质。选择疏水基团以试图利用在核碱基之间的 π -堆叠相互作用和在核苷酸中形成新的疏水区域。在核

苷酸上形成新的疏水和阳离子/亲水区域也可增强与提高细胞通透性的血清蛋白的结合。侧链疏水基团(例如甾醇类和直链脂质类)以及具有2'-疏水修饰(例如烷基、芳基和2'-4'-连接物)的核苷酸可通过提高与血清脂蛋白粒子的相互作用来增强细胞摄取。同样,用具有大量正电荷的物质中和具有大量负电荷的核苷酸骨架也增强细胞摄取。

[0122] 在合成经修饰的核苷并且将游离的5'和3'-羟基用适当的反应性基团掩蔽以变成核苷酸单体后,可制备携带糖和碱基修饰的短链寡核苷酸。寡核苷酸合成的现有技术情况是使用亚磷酰胺化学的自动化固相合成,其具体地基于McBride et al., *Tetrahedron Letters* 24:245-248 (1983) 和 Sinha et al., *Tetrahedron Letters* 24:5843-5846 (1983) 的发展。Beaucage et al., *Tetrahedron* 48:2223-2311 (1992) 广泛地评述了亚磷酰胺化学以及相关方法如氢磷酸酯化学在寡核苷酸化学中的使用。在固相寡核苷酸合成过程中,将一系列核苷酸单体通过它们的亚磷酰胺衍生物,根据链延伸方向以预定顺序相继连接至正在生长的寡核苷酸链的5'-官能团或者3'-官能团。

[0123] 将所述寡核苷酸链锚定至不溶部分如可控孔度玻璃(controlled pore glass)或者聚苯乙烯树脂珠粒。每个单体的连接方法通常包括以下步骤1-5。步骤1包括保护反应性官能团。常见的反应性官能团是末端核苷的5'-羟基。这种官能团通常用4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)部分保护,可通过酸处理除去所述保护。DMT部分的有吸引力的特征之一是,它在酸脱保护过程中形成亮橙色DMT阳离子。这种阳离子有效地用作可在480-500nm的波长容易地监测的报告基团(reporter group),目的是用于判断前面的偶合步骤的完成度。大部分市售自动化合成仪具有监测释放的DMT阳离子的能力。这种数据给予操作者合成在任何给定步骤是否失败的即时指示。步骤2包括通过添加亚磷酰胺衍生物和活化剂来偶合。所述亚磷酰胺衍生物通常为核苷亚磷酰胺,然而,它也可用不同的有机部分衍生的亚磷酰胺。步骤3包括封端未反应的末端官能团。该步骤引入防止进一步偶合成无效序列的惰性保护基团。步骤4包括将新形成的含磷的核苷酸骨架连接物从三价亚磷酸酯氧化成稳定的五价状态。这种氧化步骤可用得到磷酸酯核苷酸的基于氧的氧化剂或者得到硫代磷酸酯核苷酸的硫化氧化剂实施。步骤5包括在洗涤步骤之后重复所述方法。

[0124] 与人miR-208a的核苷酸序列互补的截短的16个核苷酸的序列在ABI Expedite 8909自动化核酸合成系统上以1μmol规模合成。合成仪使用本领域技术人员已知的标准脱三苯甲基和封端溶液来操作,每个碱基单一偶合420秒和在每个偶合周期后用0.2M PADS氧化溶液氧化。未经修饰的抗208a RNA序列结合9个尿苷残基,将这9个尿苷残基用9个经修饰的核碱基完全替代。剩余的核苷酸包括2'-O-甲基-核苷酸。一个例外是结合油烯基-甲酰氨基衍生物,其中在16个碱基位置中的碱基位置15上具有单一结合,核苷亚磷酰胺在此通过各420秒的双重偶合结合。

[0125] 实施例5:制备寡核苷酸miRNA抑制剂

[0126] 制备化合物 10941 (mCs; ppTs; ppTs; ppTs; ppTs; ppTs; mGs; mCs; ppTs; mCs; mGs; ppTs; mCs; ppTs; ppTs; mA)。在合成碱基修饰的寡核苷酸中使用亚磷酰胺试剂(3c)。寡脱氧核苷酸使用ABI Expedite (型号8909) DNA/RNA合成仪合成。所述合成根据制造商的推荐,以DMT-ON模式使用市售合成试剂实施,用0.2M PADS/1:1 吡啶/ACN替换氧化溶液。在适当的偶合周期中,将亚磷酰胺试剂作为0.1M 乙腈溶液添加。所述寡核苷酸从载体的断裂通过美国专利5,750,672(将其全部内容并入本文作为参考)中描述的方法或者通过将CPG结合的

寡核苷酸与 40%甲胺水溶液一起在55°C加热30分钟来实现。所得的寡核苷酸水溶液通过以下方法进一步纯化:将粗制DMT-ON寡核苷酸溶液加载在Waters Sep-Pak®Vac C18柱上,并使用本领域技术人员已知的标准DMT-ON寡核苷酸脱盐操作洗脱。产物的表征通过MALDI-TOF质谱法,利用3-羟基皮考啉酸作为基质和本领域技术人员已知的标准方法实施:计算值6922.4,实测值6920.7。

[0127] 化合物M-10708(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3e来合成。产物的表征通过ESI质谱法,在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液(buffer gradient)中实施:计算值6597.6,实测值6599.1。

[0128] 化合物M-10713(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3f来合成。产物的表征通过ESI质谱法,在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6543.9,实测值6543.9。

[0129] 化合物M-10711(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3a来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6759.8,实测值6759.6。

[0130] 化合物M-10712(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3d来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6759.8,实测值6760.6。

[0131] 化合物M-10768(图5)按与上述相同的方式在它的亚酰胺位置用2'-O-甲基尿苷和在辅助亚酰胺位置用亚酰胺3d来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6003.9,实测值6005.2。

[0132] 化合物M-10772(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3i来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6552.8,实测值6553.4。

[0133] 化合物M-10774(图5)按与上述相同的方式在它的亚酰胺位置用2'-O-甲基尿苷和在辅助亚酰胺位置用亚酰胺3i来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值5912.0,实测值5912.8。

[0134] 化合物M-10876(图5)按与上述相同的方式在尿苷位置用亚酰胺3b来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6931.2,实测值6931.9。

[0135] 化合物M-10877(图5)在尿苷位置用亚酰胺3b和在辅助亚酰胺位置用亚酰胺3g,在ABI Expedite(Model8909)DNA/RNA合成仪上合成。将所述寡核苷酸按与上述相同的方式处理,不同的是,首先将亚酰胺3g与2'-O-Me-腺苷官能化的CPG偶合。3g的结合通过图5中的前体“y”表示。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值7056.0,实测值7056.5。

[0136] 化合物M-10878(图5)按与上述相同的方式在它的亚酰胺位置用2'-O-甲基尿苷和在辅助亚酰胺位置用亚酰胺3b来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15mM TEA梯度缓冲液中实施:计算

值6080.1,实测值6081。

[0137] 化合物M-10881(图5)按与上述相同的方式在亚酰胺位置用2'-O-甲基尿苷和在辅助亚酰胺位置用亚酰胺3b来合成。产物的表征通过ESI质谱法(负离子模式),在Waters SQD质量检测器上,在含有MeOH的200mM HFIP/8.15 mM TEA梯度缓冲液中实施:计算值6250.3,实测值6251.5。

[0138] 实施例6:测定熔融温度

[0139] 基于每一结合,通过测定经修饰的链的熔融温度和利用硫代磷酸酯 DNA核苷酸或者硫代磷酸酯2'-O-甲基RNA核苷酸的相同序列的熔融温度之间的差异来测定熔融温度(T_m)的增加。

[0140] 例如,使经修饰的抗-208a寡核苷酸与包含RNA核苷和磷酸酯骨架的长度为22个核苷酸的互补序列退火。互补序列与内源性miRNA相同。测量热变性温度(T_m),其为解链曲线(A260对(vs.)温度)的一阶导数图的最大值。双链体在0.9%NaCl缓冲液中以1 μ M配制。温度以4°C/min从25°C逐渐升至95°C,并每分钟一次读取在260nm的OD。 T_m 值是至少两个测量值的平均值。

[0141] 与人miR-208a的核苷酸序列互补的16个核苷酸序列的各种修饰的双链体熔融温度。修饰包括混合的9LNA/7DNA硫代磷酸酯、全取代的2'-O-甲基-核苷酸硫代磷酸酯、全2'-脱氧核苷酸硫代磷酸酯和具有5-甲酰胺取代基的全2'-O-甲基-核苷酸的各种取代模式。尽管疏水取代相对于未修饰的2'-O-甲基母体化合物不提供亲和力增强的可观收益,但是相对于未修饰的2'-OMe核苷酸,所有阳离子物质就约2-3°C/修饰提供显著的双链体稳定性。双链体以1 μ M在0.9%NaCl中配制。温度以4°C/min从25°C逐渐升至95°C,并在Cary100Bio UV可见分光光度计上每分钟一次读取在260nm的OD。参见图4和图5。

[0142] 实施例7:心肌细胞数据

[0143] 用原代新生大鼠心肌细胞进行的细胞培养实验证明,许多5-甲酰氨基-碱基修饰的寡核苷酸不仅与miR-208a结合,而且以有效的细胞内miR-208a抑制剂预期所具有的方式影响bMHC的下游调节。如图6和7中所示,含有核苷酸的LNA/DNA或者LNA/2'-O-Me混合物的两种已知阳性对照显示对miR-208a的抑制和对bMHC的剂量依赖性调节。将所有寡核苷酸被动(无转染试剂)置于在含有2%血清的介质中的细胞上。在37°C孵育72小时后,将细胞使用Cells to Ct(Ambion)缓冲液溶解。将MiR-208a和mRNA bMHC通过基于Taqman的RT-PCR(Applied Biosystems)来分析。所有实验一式三份地实施并显示为平均值+/-标准偏差。特征在于具有范围为7-8的pKa值的侧链阳离子物质(最有可能在生理pH大部分被质子化的那些)的碱基修饰更有可能显示miR-208a抑制和bMHC之间的正相关。这种相关性暗示,miR-208a抑制发生于原代心肌细胞溶解之前。还应注意的是,核苷酸取代模式可影响具有相同序列的抑制剂的效力。5-(2-(2-甲基-1H-咪唑-1-基)-乙基甲酰氨基)-2'-O-甲基尿苷核苷酸变体当结合在16个核苷酸的2'-O-甲基硫代磷酸酯抗-208a核苷酸序列中时显示出miR-208a抑制,其中总共9个天然尿苷核苷酸位置中的4个或者9个被取代。仅具有4个取代的寡核苷酸显示有效的bMHC mRNA调节。

[0144] 实施例8:体内测试

[0145] 在C57BL/6小鼠中体内研究三种碱基修饰的寡核苷酸(10941,10876,10711)。也注射含有每一寡聚物的相同碱基的乱序对照(11091,11087,11086)。在第1天,将所述寡核

苷酸以25mg/kg通过皮下注射递送给药。在给药4天之后收集心脏组织,并通过实时PCR测定miR-208a水平。在从小鼠中除掉(take down)之后,既没有注射部位反应,也没有任何可见的器官损害。如图8中所示,所有目标低聚物显示一些miR-208a抑制,并且与盐水相比,10711寡核苷酸能够以统计学上显著的方式抑制心脏组织中的miR-208a。没有一个对照在统计学上不同于盐水。这证明系统给药的碱基修饰的寡核苷酸在不使用缀合物或者药物递送系统的情况下用作心脏特异性 miRNA的有效抑制剂的能力。

[0146] 实施例9:在2'-脱氧和2'-O-Me碱基修饰之间的 T_m 差别

[0147] 当在从最少修饰至最多修饰的规模上观察时,碱基和糖修饰的 T_m 影响。单独的碱基修饰预计对于具有磷酸酯骨架的2'-脱氧核糖核苷仅具有适度影响(参见Ahmadian et al., Nucleic Acids Res., 1998, 26 (13):3127-3135 (1998); Znosko et al., J. Am. Chem. Soc., 125 (20):6090-6097 (2003) 的实例,将其全部内容并入本文作为参考),但即使这样,大于C3-炔炔的取代基倾向于动摇 DNA:DNA双链体的稳定性。甚至,多重结合具有非甲酰氨基连接的己基胺的基于尿苷的核苷(在生理pH下质子化)未显示净DNA:DNA双链体稳定性(参见Hashimoto et al., J. Am. Chem. Soc., 115 (16):7128-7134 (1993),将其全部内容并入本文作为参考)。在糖修饰这种情况中,我们已经证明2'-O-甲基化核糖核苷以约1°C/修饰稳定这种具有miR-208a RNA的特定双链体。当全部结合(对于尿苷而言,9个取代)在具有硫代磷酸酯骨架的16-聚物抗-208a 寡核苷酸中时,具有本发明教导的碱基修饰的2'-脱氧核苷给予稍微提高的抗miR-208a RNA的双链体稳定性。参见图9。然而,当将碱基修饰的2'-脱氧核苷结合至除了尿苷之外的所有碱基也含有2'-O-甲基化核苷的核苷酸中时,碱基修饰的稳定性变得明显。即使具有较少的9个糖修饰,所述双链体与具有16个2'-O-甲基糖修饰的寡核苷酸具有相同的 T_m 。与仅具有糖修饰的寡核苷酸相比,用具有5-甲酰氨基-碱基修饰和2'-O-甲基糖修饰的基于尿苷的核苷代替每个尿苷的2'-O-甲基化抗-208a显示超过2°C/修饰的出人意料的 T_m 增加。

[0148] 当与具有3'-内糖折叠的A-型核苷偶合时,这些增强的亲和力很可能是最大的。当5-甲酰氨基修饰的碱基与将核糖锁定在具有显著3'-内糖折叠的 A-型的2'-4'-桥接二环核苷糖组合时,这种影响可更加显著。

[0149] 实施例10:在核苷酸中5-甲酰氨基-和2'-O-甲基修饰的协同作用。

[0150] 图10显示来自图9的作为 ΔT_m /每个修饰的数据(将糖修饰和碱基修饰都算在内)。与单独的碱基或者糖相比,5-甲酰氨基-2'-O-甲基尿苷核苷的多重结合出乎意料地给予更大的经糖修饰和碱基修饰导致的稳定化。该证据表明,5-甲酰氨基与有利于核苷的3'-内糖折叠的修饰的联用超过加和性。它们协同地起作用,得到比单独的任一种修饰更大的双链体稳定性。对于某些基于寡核苷酸的治疗如微RNA抑制剂,在一定限度内的提高的双链体稳定性很可能是希望的。而且,这些类型的修饰也可保护防止酶促降解,静电荷减少所导致的细胞递送和增强的药代动力学和/或药效性质。

[0151] 实施例11:在寡核苷酸中多重结合碱基修饰的核苷酸的影响

[0152] 对于硫代磷酸酯和磷酸酯骨架的16-聚物寡核苷酸,多重结合(即,总共 16个碱基中的9个碱基)阳离子5-甲酰氨基修饰的脱氧尿苷似乎使双链体稳定性增加的最少。参见图11。这可能是由于对与碱基水合的干扰或者取代基的空间位阻。不过,令人惊讶地注意到,单一结合可提高具有硫代磷酸酯或者磷酸酯骨架的16-聚物抗-208a脱氧寡核苷酸与它的

靶物miR-208a RNA的双链体稳定性,分别提高超过10°C和17°C。本发明披露的修饰可作为单一或者多重结合单独使用,或者作为单一或者多重结合与其它糖修饰联用,从而得到具有希望的双链形成(duplexing)性质、双链体-蛋白质结合性质或者连同希望的药代动力学和/或药效性质的治疗用寡核苷酸。

[0153] 尽管本申请已经详细地示出和描述了优选实施方案,但是对于相关领域技术人员而言明显的是,可在不脱离本发明主旨的情况下做出各种修饰、添加、替代等,因此,这些修饰、添加、替代等被认为在所附权利要求限定的本发明范围。

序列表

	<110> 米拉根医疗公司 Vagle, Kurt Dalby, Christina Marshall, William S.	
	<120> 碱基经修饰的寡核苷酸	
	<130> MIRG-024/01WO 308934-2179	
	<140> PCT/US2011/059588	
	<141> 2011-11-07	
	<150> US 61/410,672	
	<151> 2010-11-05	
	<160> 81	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 1 uggaauguaa agaaguaugu au	22
	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
[0001]	<400> 2 aaccguaga uccgaacuug ug	22
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 3 uaccguag aaccgaauuu gug	23
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 4 uccugagac ccuaacuugu ga	22
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 5 ucacagugaa ccgucucuu u	21
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 6 uuugucccc uucaaccagc ug	22

[0002]	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 7	
	uuuggucccc uucaaccagc ua	22
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 8	
	ucuacagugc acgugucucc ag	22
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 9	
	ugagaugaag cacuguagcu c	21
[0002]	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 10	
	guccaguuuu cccaggauc ccu	23
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 11	
	ucucccaacc cuuguaccag ug	22
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 12	
	uagcagcaca uaaugguuug ug	22
[0002]	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 13	
	uagcagcaca ucaugguuua ca	22
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 14	
	uagcagcacg uaaauauugg cg	22

[0003]	<210> 15		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 15		
	aacauucauu gcugucggug ggu		23
	<210> 16		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 16		
	uagcagcaca gaaauauugg c		21
	<210> 17		
	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 17		
	uucaccaccu ucuccacca gc		22
	<210> 18		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 18		
	cccaguguuc agacuaccug uuc		23
	<210> 19		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 19		
	cccaguguuu agacuaucug uuc		23
	<210> 20		
	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 20		
	acaguagucu gcacauuggu ua		22
	<210> 21		
	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 21		
	uggaauguaa ggaagugugu gg		22
	<210> 22		
	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 22		
	auaagacgag caaaaagcuu gu		22

	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 23	
	auaagacgaa caaaagguuu gu	22
	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 24	
	uaaagugcuu auagugcagg uag	23
	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 25	
	uagcuuauca gacugauguu ga	22
	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 26	
	acagcaggca cagacaggca gu	22
[0004]	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 27	
	aagcugccag uugaagaacu gu	22
	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 28	
	agcuacauug ucugcugggu uuc	23
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 29	
	agcuacauu ggcucuggg u	21
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 30	
	caagucacua gugguuccgu u	21
	<210> 31	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 31	
	aucacauugc caggauuuc c	21
	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 32	
	uucaaguaau ccaggauagg cu	22
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 33	
	uucaaguaau ucaggauagg u	21
	<210> 34	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 34	
	aaggagcuca cagucuuug ag	22
[0005]	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 35	
	uagcaccauc ugaaauuggu ua	22
	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 36	
	uagcaccauu ugaaucagu guu	23
	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 37	
	uagcaccauu ugaaauuggu ua	22
	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 38	
	uguaaacauc cucgacugga ag	22
	<210> 39	
	<211> 22	

	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 39	
	uguaaacauc cuacacucag cu	22
	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 40	
	uguaaacauc cuacacucuc agc	23
	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 41	
	uguaaacauc cccgacugga ag	22
	<210> 42	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 42	
	uguaaacauc cuugacugga ag	22
[0006]	<210> 43	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 43	
	ucucacacag aaaucgcacc cgu	23
	<210> 44	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 44	
	gaaguuguuc gugguggauu cg	22
	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 45	
	acuggacuua gggucagaag gc	22
	<210> 46	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 46	
	acuggacuug gagucagaag g	21
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> RNA	

[0007]	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 47	
	cagcagcaau ucauguuuug aa	22
	<210> 48	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 48	
	ucacuccucu ccuccgucu u	21
	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 49	
	ucaggcucag uccccuccg au	22
	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 50	
	uccuguacug agcugccccg ag	22
	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 51	
	cagcagcaca cuguguuuug u	21
	<210> 52	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 52	
	uuaagacuug cagugauuu u	21
	<210> 53	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 53	
	ucggggauca ucaugucacg aga	23
	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 54	
	uauugcacuu gucccggccu gu	22
	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	

[0008]	<400> 55 uauugcacuc gucccgccu cc	22
	<210> 56 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 56 ugagguagua gguuguauag uu	22
	<210> 57 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 57 ugagguagua gguugugugg uu	22
	<210> 58 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 58 ugagguagua gguuguaugg uu	22
	<210> 59 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 59 agagguagua gguugcauag uu	22
	<210> 60 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 60 ugagguagga gguuguauag uu	22
	<210> 61 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 61 ugagguagua gauuguauag uu	22
	<210> 62 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 62 ugagguagua guuuguacag uu	22
	<210> 63 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	

	<400> 63 aaaccguuac cauuacugag uu	22
	<210> 64 <211> 16 <212> DNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 64 ctttttgctc gtctta	16
	<210> 65 <211> 16 <212> DNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<220> <221> (1)..(16) <222> misc_feature <223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(6) <223> 可为嘧啶修饰的胸苷	
[0009]	<220> <221> misc_feature <222> (7)..(7) <223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (9)..(9) <223> 可为嘧啶修饰的胸苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(10) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (11)..(11) <223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(12) <223> 可为嘧啶修饰的胸苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> 可为嘧啶修饰的胸苷	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(16)..(16)	
	<223>	可为 2' OMe 腺苷	
	<400>	65	
		ctttttgctc gtctta	16
	<210>	66	
	<211>	16	
	<212>	RNA	
	<213>	人(Homo sapiens)	
	<220>		
	<221>	(1)..(16)	
	<222>	misc_feature	
	<223>	可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	可为 2' OMe 胞苷	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(6)	
	<223>	可为 2' OMe 和碱基经修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(7)..(7)	
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷	
[0010]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(8)..(8)	
	<223>	可为 2' OMe 胞苷	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(9)..(9)	
	<223>	可为 2' OMe 和碱基经修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(10)..(10)	
	<223>	可为 2' OMe 胞苷	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(12)..(12)	
	<223>	可为 2' OMe 和碱基经修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	可为 2' OMe 胞苷	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(14)..(15)	
	<223>	可为 2' OMe 和碱基经修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(16)..(16)	

	<223> 可为 2' OMe 腺苷	
	<400> 66 cuuuuugcuc gucuua	16
	<210> 67 <211> 16 <212> DNA <213> 人 (Homo sapiens)	
	<220> <221> (1).. (16) <222> misc_feature <223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<400> 67 ctttttgctc gtctta	16
	<210> 68 <211> 16 <212> RNA <213> 人 (Homo sapiens)	
	<220> <221> (1).. (16) <222> misc_feature <223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220> <221> misc_feature <222> (1).. (1) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
[0011]	<220> <221> misc_feature <222> (2).. (6) <223> 可为 2' OMe 尿苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (7).. (7) <223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (8).. (8) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (9).. (9) <223> 可为 2' OMe 尿苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (10).. (10) <223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (11).. (11) <223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220> <221> misc_feature <222> (12).. (12) <223> 可为 2' OMe 尿苷	
	<220> <221> misc_feature	

	<222> (13)..(13)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> 可为 2' OMe 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 可为 2' OMe 腺苷	
	<400> 68	
	cuuuuugcuc gucuua	16
	<210> 69	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> (1)..(16)	
	<222> misc_feature	
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 可为锁定的核苷酸鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 可为锁定的核苷酸腺苷	
	<400> 69	
	ctttttgctc gtctta	16
	<210> 70	

	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> (1)..(16)	
	<222> misc_feature	
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(6)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(9)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
[0013]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> 可为锁定的核苷酸胸苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 可为 2' OMe 腺苷	
	<400> 70	
	ctttttgctc gtctta	16
	<210> 71	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	

<220>
<221> (1)..(16)
<222> misc_feature
<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(6)
<223> 可为 苄基-2'-OMe-尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可为 苄基-2'-OMe-尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

[0014] <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可为 苄基-2'-OMe-尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可为 苄基-2'-OMe-尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可为 2' OMe 腺苷

<400> 71
cuuuuugcuc gucuua

<210> 72
<211> 16
<212> RNA
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> (1)..(16)

16

<222> misc_feature
<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(6)
<223> 可为 C-6 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可为 C-6 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

[0015] <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可为 C-6 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可为 C-6 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可为 2' OMe 腺苷

<400> 72
cuuuuugcuc gucuua

<210> 73
<211> 16
<212> RNA
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> (1)..(16)
<222> misc_feature
<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接

16

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(2)..(6)
	<223>	可为 3-丙基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(8)..(8)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(9)..(9)
	<223>	可为 3-丙基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(10)..(10)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(11)..(11)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
[0016]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(12)..(12)
	<223>	可为 3-丙基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(13)..(13)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(14)..(15)
	<223>	可为 3-丙基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(16)..(16)
	<223>	可为 2' OMe 腺苷
	<400>	73
		cuuuuugcuc gucuua
	<210>	74
	<211>	16
	<212>	RNA
	<213>	人(Homo sapiens)
	<220>	
	<221>	(1)..(16)
	<222>	misc_feature
	<223>	可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)

16

	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(6)	
	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(9)	
	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
[0017]	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 可为 2' OMe 腺苷	
	<400> 74	
	cuuuuugcuc gucuua	16
	<210> 75	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> (1)..(16)	
	<222> misc_feature	
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	

	<221> misc_feature
	<222> (2)..(3)
	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(6)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(8)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (9)..(9)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(11)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
[0018]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (13)..(13)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (14)..(15)
	<223> 可为 2-乙基-2-甲基-咪唑-2' OMe-尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (16)..(16)
	<223> 可为 2' OMe 腺苷
	<400> 75
	cuuuuugcuc gucuua
	<210> 76
	<211> 16
	<212> RNA
	<213> 人(Homo sapiens)
	<220>
	<221> (1)..(16)
	<222> misc_feature
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷

16

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(2)..(6)
	<223>	可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(8)..(8)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(9)..(9)
	<223>	可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(10)..(10)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(11)..(11)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(12)..(12)
	<223>	可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
[0019]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(13)..(13)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(14)..(15)
	<223>	可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(16)..(16)
	<223>	可为 2' OMe 腺苷
	<400>	76
		cuuuuugcuc gucuua
		16
	<210>	77
	<211>	16
	<212>	RNA
	<213>	人(Homo sapiens)
	<220>	
	<221>	(1)..(16)
	<222>	misc_feature
	<223>	可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature

	<222> (2)..(3)
	<223> 可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(6)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(8)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (9)..(9)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(11)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
[0020]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (13)..(13)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (14)..(15)
	<223> 可为丙基二甲基氨基 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (16)..(16)
	<223> 可为 2' OMe 腺苷
	<400> 77
	cuuuuugcuc gucuua
	<210> 78
	<211> 16
	<212> RNA
	<213> 人(Homo sapiens)
	<220>
	<221> (1)..(16)
	<222> misc_feature
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷

16

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(2)..(6)
	<223>	可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(8)..(8)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(9)..(9)
	<223>	可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(10)..(10)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(11)..(11)
	<223>	可为 2' OMe 鸟苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(12)..(12)
	<223>	可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
[0021]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(13)..(13)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(14)..(15)
	<223>	可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(16)..(16)
	<223>	可为 2' OMe 腺苷
	<400>	78
		cuuuuugcuc gucuua
	<210>	79
	<211>	16
	<212>	RNA
	<213>	人(Homo sapiens)
	<220>	
	<221>	(1)..(16)
	<222>	misc_feature
	<223>	可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	可为 2' OMe 胞苷
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(2)..(6)

16

	<223> 可为 C-18 2' OMe 尿苷或丙基吗啉代 2' OMe 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(9)	
	<223> 可为 C-18 2' OMe 尿苷或丙基吗啉代 2' OMe 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> 可为 C-18 2' OMe 尿苷或丙基吗啉代 2' OMe 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
[0022]	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> 可为 C-18 2' OMe 尿苷或丙基吗啉代 2' OMe 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 可为 C-18 尿苷	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 可为 2' OMe 腺苷	
	<400> 79	
	cuuuuugcuc gucuua	16
	<210> 80	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> (1)..(16)	
	<222> misc_feature	
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 可为 2' OMe 胞苷	
	<220>	

	<221> misc_feature
	<222> (2)..(3)
	<223> 可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (4)..(6)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(8)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (9)..(9)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(11)
	<223> 可为 2' OMe 鸟苷
[0023]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> 可为 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (13)..(13)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (14)..(15)
	<223> 可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (16)..(16)
	<223> 可为 2' OMe 腺苷
	<400> 80
	cuuuuugcuc gucuua
	<210> 81
	<211> 16
	<212> RNA
	<213> 人(Homo sapiens)
	<220>
	<221> (1)..(16)
	<222> misc_feature
	<223> 可通过硫代磷酸酯连接物连接
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> 可为 2' OMe 胞苷

16

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 可为 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(6)
<223> 可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷

[0024] <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可为 2' OMe 鸟苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可为丙基吗啉代 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可为 2' OMe 胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可为 2' OMe 尿苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可为 2' OMe 腺苷

<400> 81
cuuuuugcuc gucuua








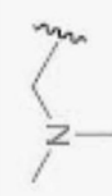
RNA-U 修饰	结构	T _m 增加 (°C/ 残基) 相对 于 DNA 中的 dT	RNA-U 修饰	结构	T _m 增加 (°C/ 残基)
苄基 (+ 2'-OMe)		+2.5 (±0.5)	3- 丙基 - 咪唑 (+ 2'-OMe)		+4.5 (±1)
C-6 (+ 2'-OMe)		+2 (±0.5)	丙基吗啉代 (+ 2'-OMe)		+5.3 (±1)
C-18 (+ 2'-OMe)		无变化 (在 3' 端)	丙基二甲 基氨基 (+ 2'-OMe)		+5 (±1)
2- 乙基 -2- 甲基 -咪唑 (+ 2'-OMe)		+5 (±1)			未测量

图1

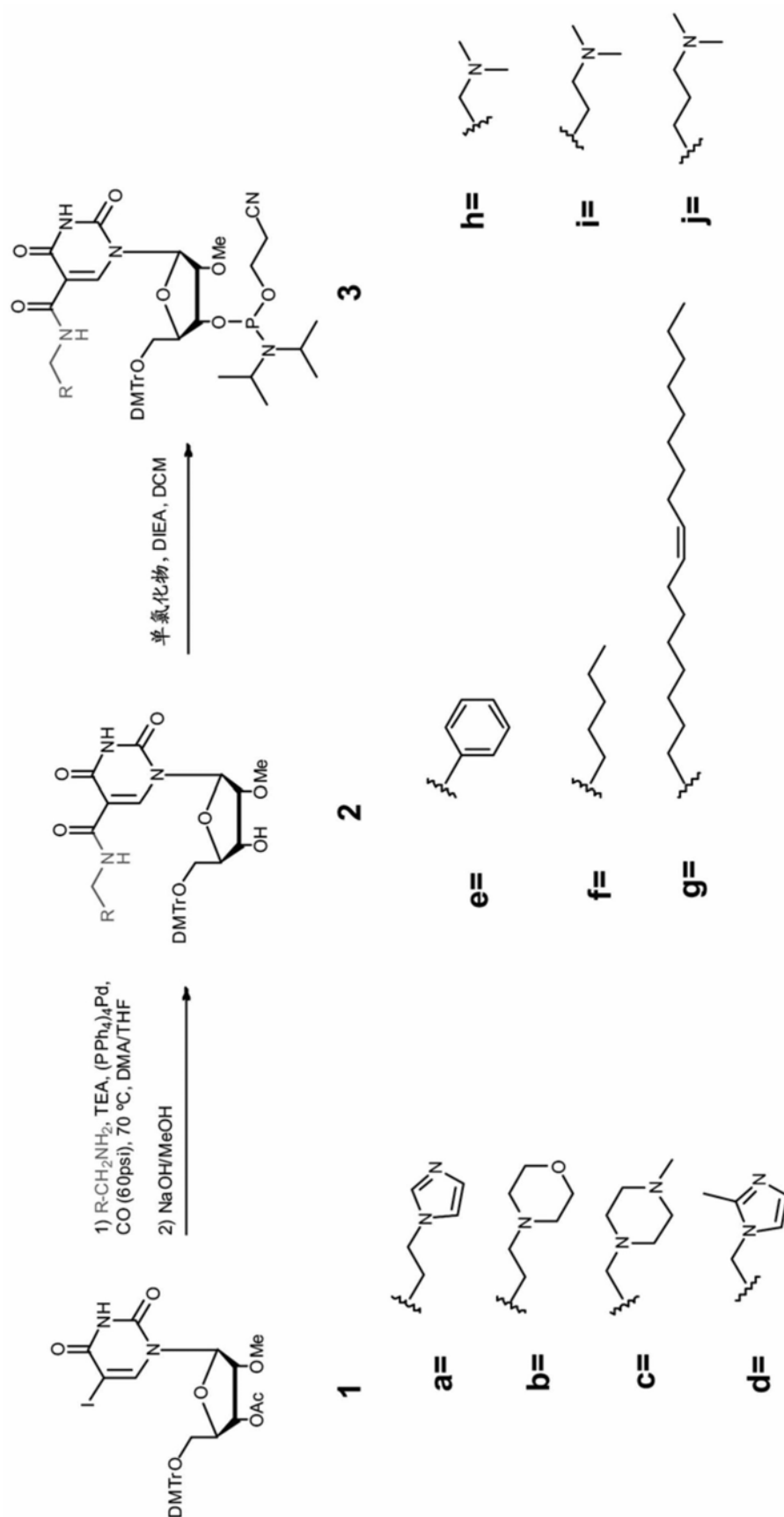


图2

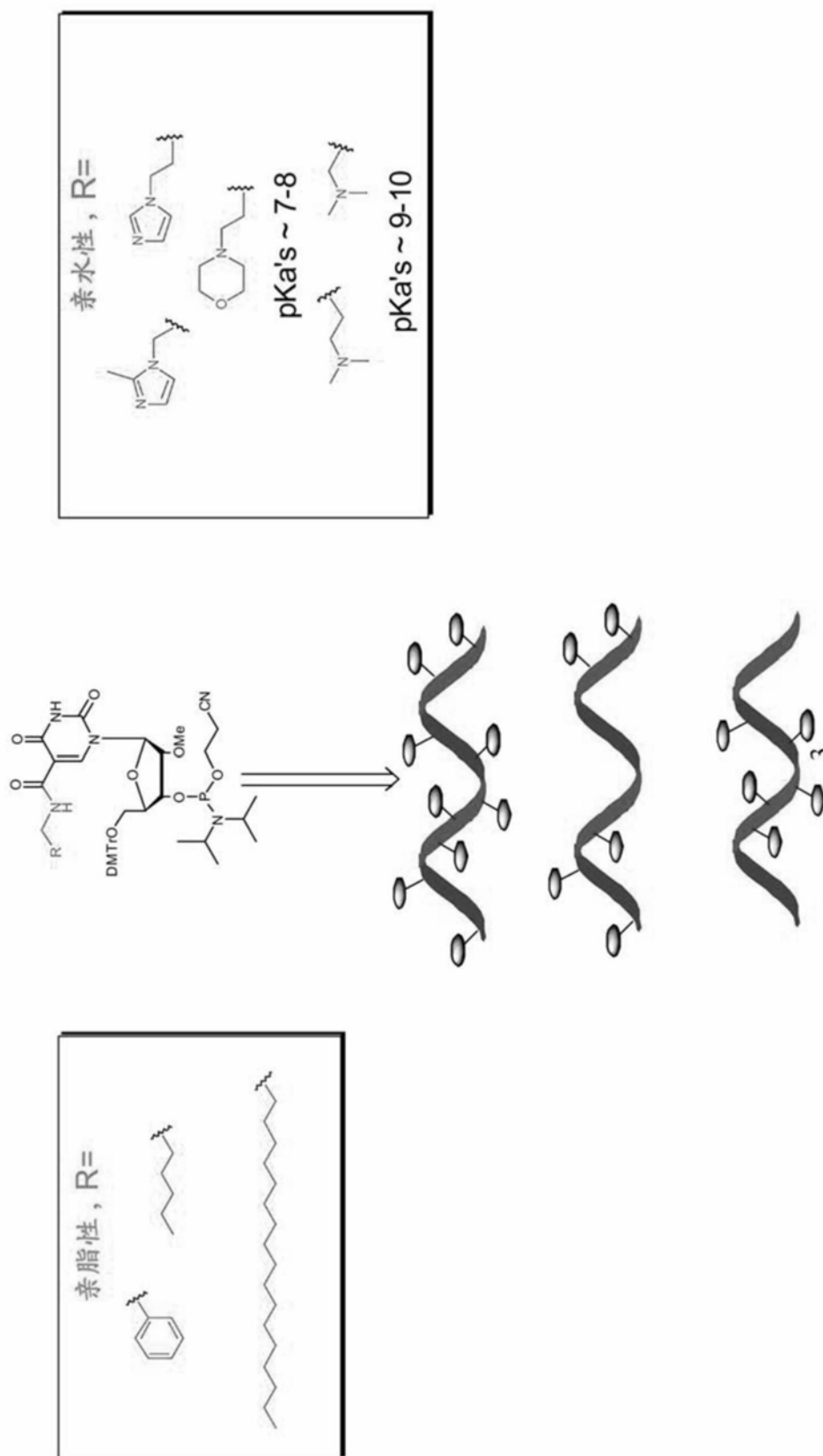
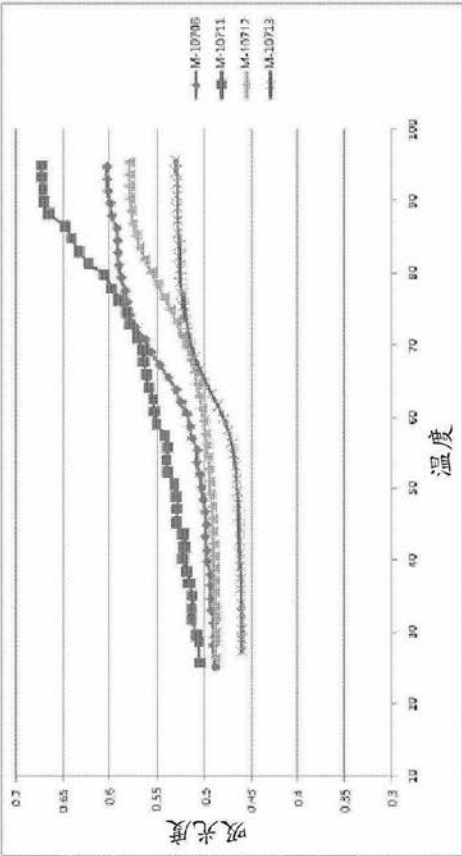


图3

T_m测量: 与 miR-208a RNA 形成双链体

碱基修饰模式	修饰编号	2'OMe #
mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	9	7

化合物	修饰	T _m
M-10678	DNA	46.2
M-10158	2'OMe/PS	64.1
M-10101	LNA/DNA 9/7 (Current)	86.7
M-10708	Bn-U	68.0
M-10711	3-Pr-Im-U	81.7
M-10712	2-Et-2Me-Im-U	77.2
M-10713	C-6-U	63.1



所有 PS 连接
+U= 碱基修饰
m=2' OMe 碱基

图4

化合物	修饰	碱基修饰模式	T _m
M-10678	DNA	dCdTdTdTdTdGdCdTdCdGdTdCdTdTdA	46.2
M-10158	2'OMe	mCmUmUmUmUmUmGmCmUmCmGmUmCmUmUmA	64.1
M-10101	LNA/DNA (9)	ICdTdTdTTTTTGICdTdTGdTTTAA	86.7
M-10883	LNA T (9)	mCITTTTTTmGmCITmCmGTTmCITTTmA	87.1
亲脂性修饰			
M-10708	Bn-U (9)	mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	68.0
M-10713	C-6-U (9)	mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	63.1
咪唑修饰			
M-10711	3-Pr-Im-U (9)	mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	81.7
M-10712	2-Et-2Me-Im-U (9)	mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	77.2
M-10768	2-Et-2Me-Im-U (4)	mC+U+UmUmUmUmGmCmUmCmGmUmC+U+UmA	71.9
二甲基氨基修饰			
M-10772	PrDMA-U (9)	mC+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA	80.0
M-10774	PrDMA-U (4)	mC+U+UmUmUmUmGmCmUmCmGmUmC+U+UmA	73.1

图5

吗啉修饰				
M-10876	PrMorph-U (9)	mC+U+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+U+UmA		76.5
M-10877	1 C18, 8 PrMorph-U	mC+U+U+U+U+U+UmGmC+UmCmG+UmC+UyUmA		76.2
M-10878	PrMorph-U (4)	mC+U+UmUmUmUmGmCmUmCmGmUmC+U+UmA		71.9
M-10881	PrMorph-U (5)	mCmUmU+U+U+UmGmC+UmCmG+UmCmUmUmA		77.8

图5续

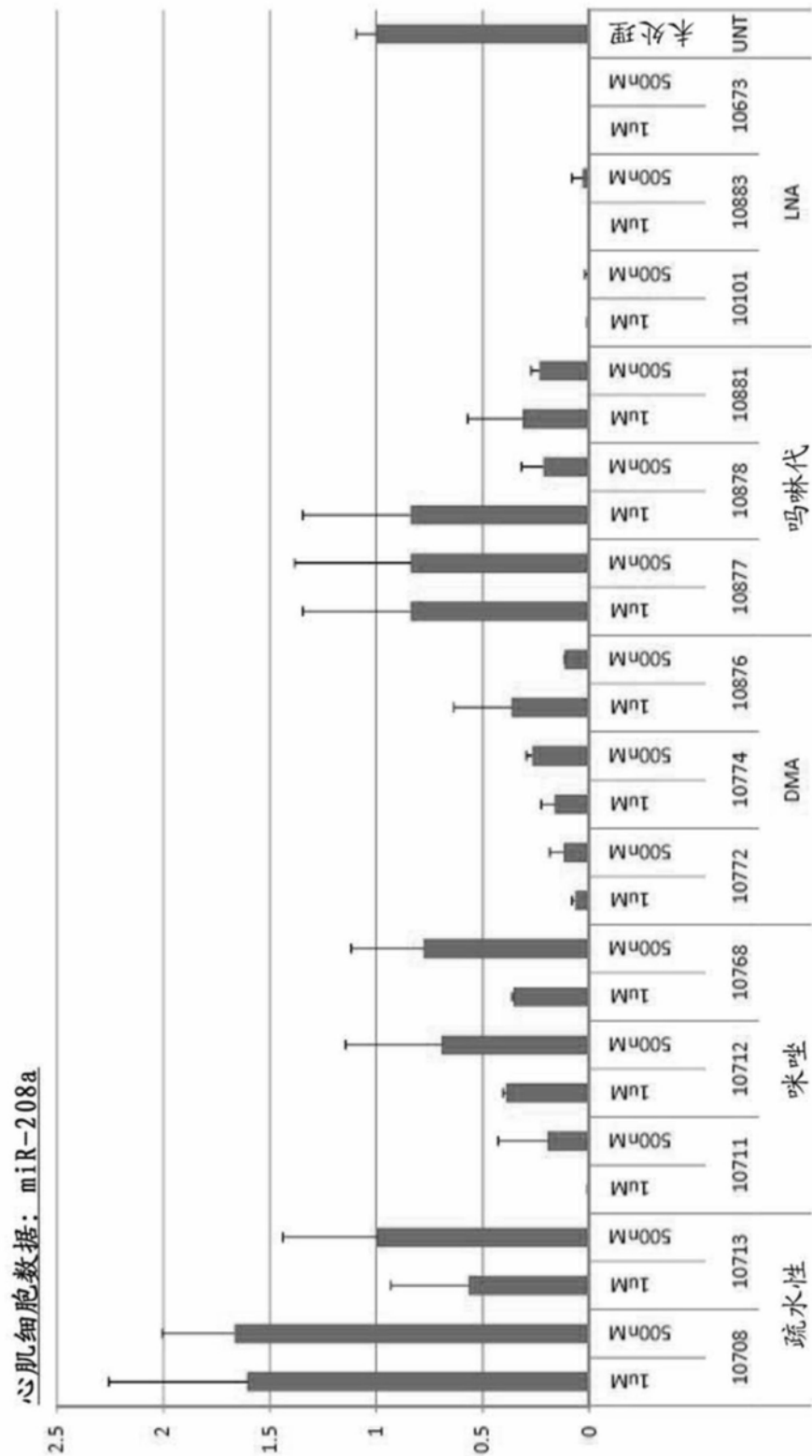


图6

心肌细胞数据: miR-208a 和 bMHC

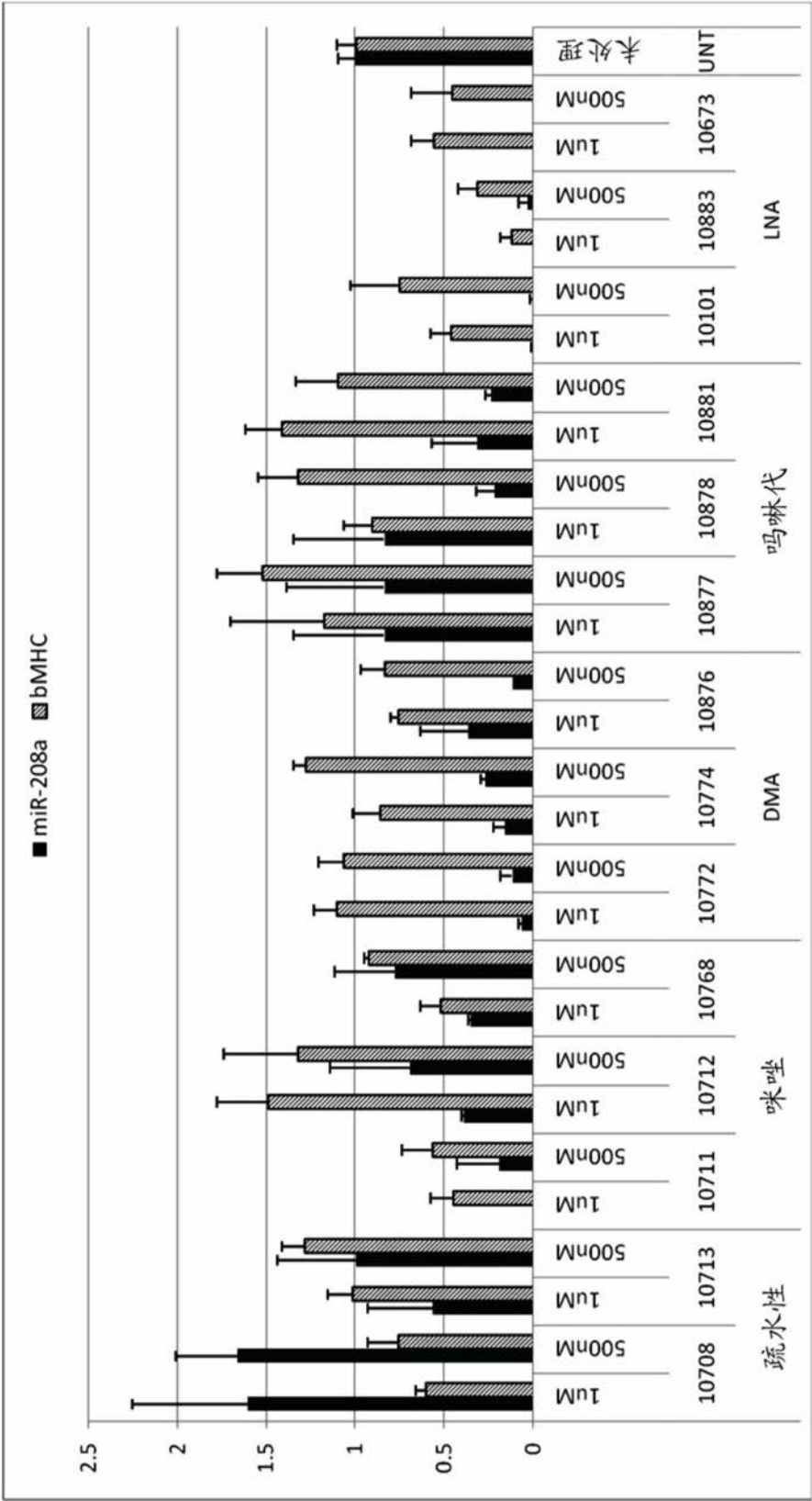


图7

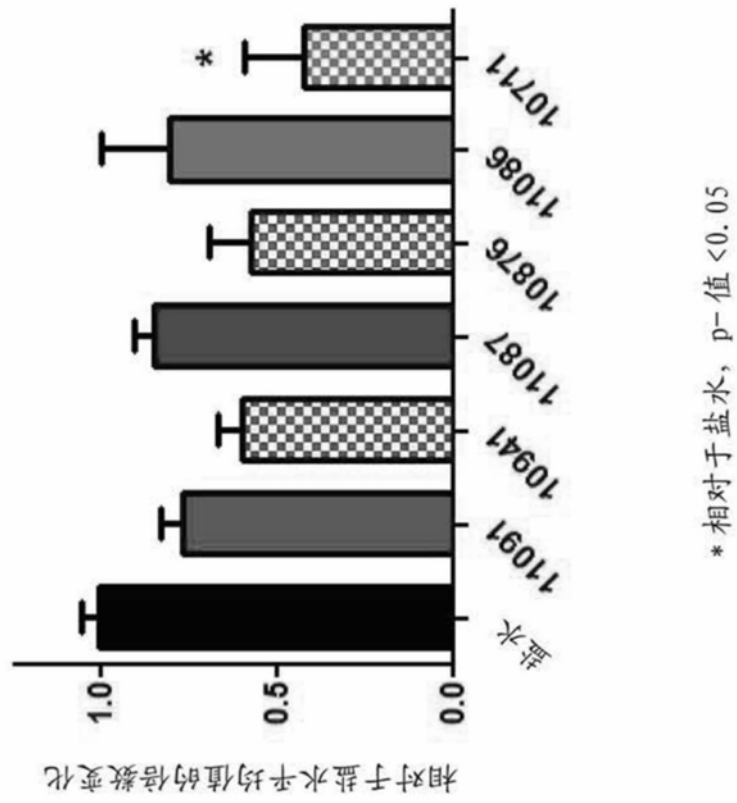


图8

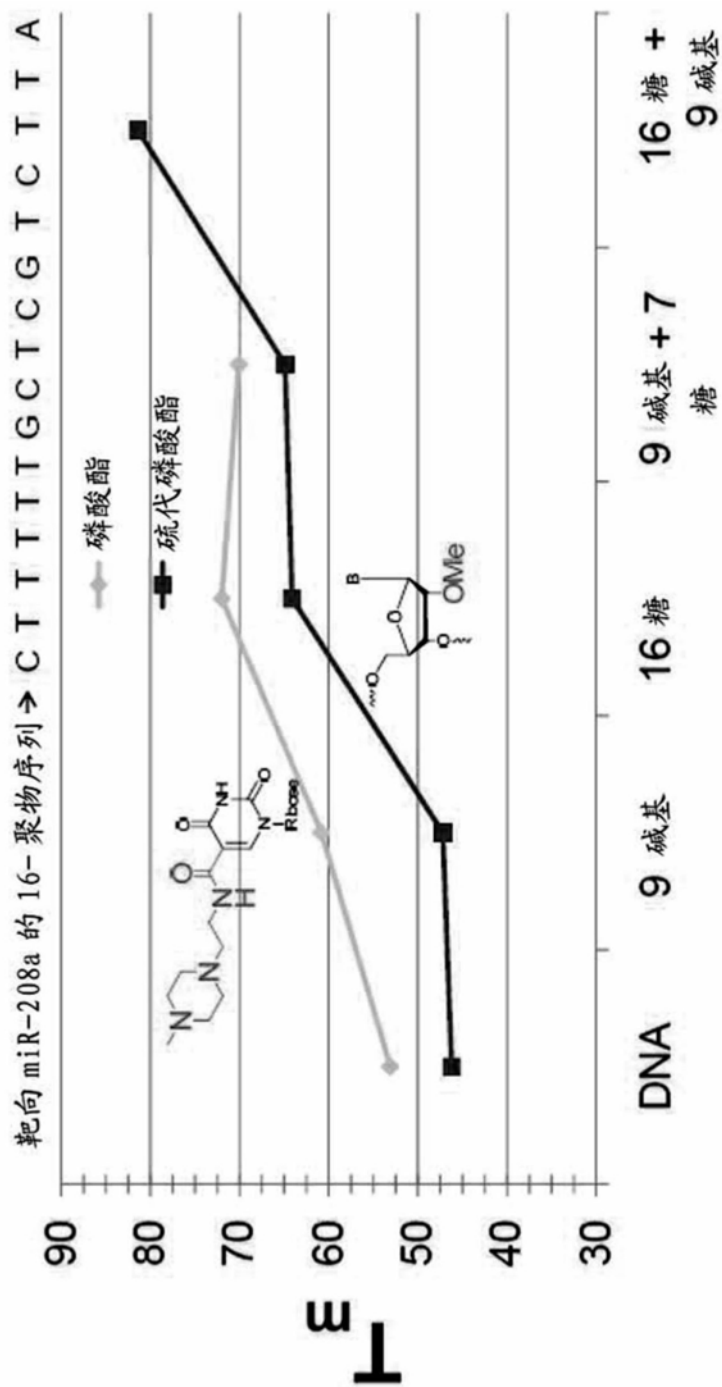


图9

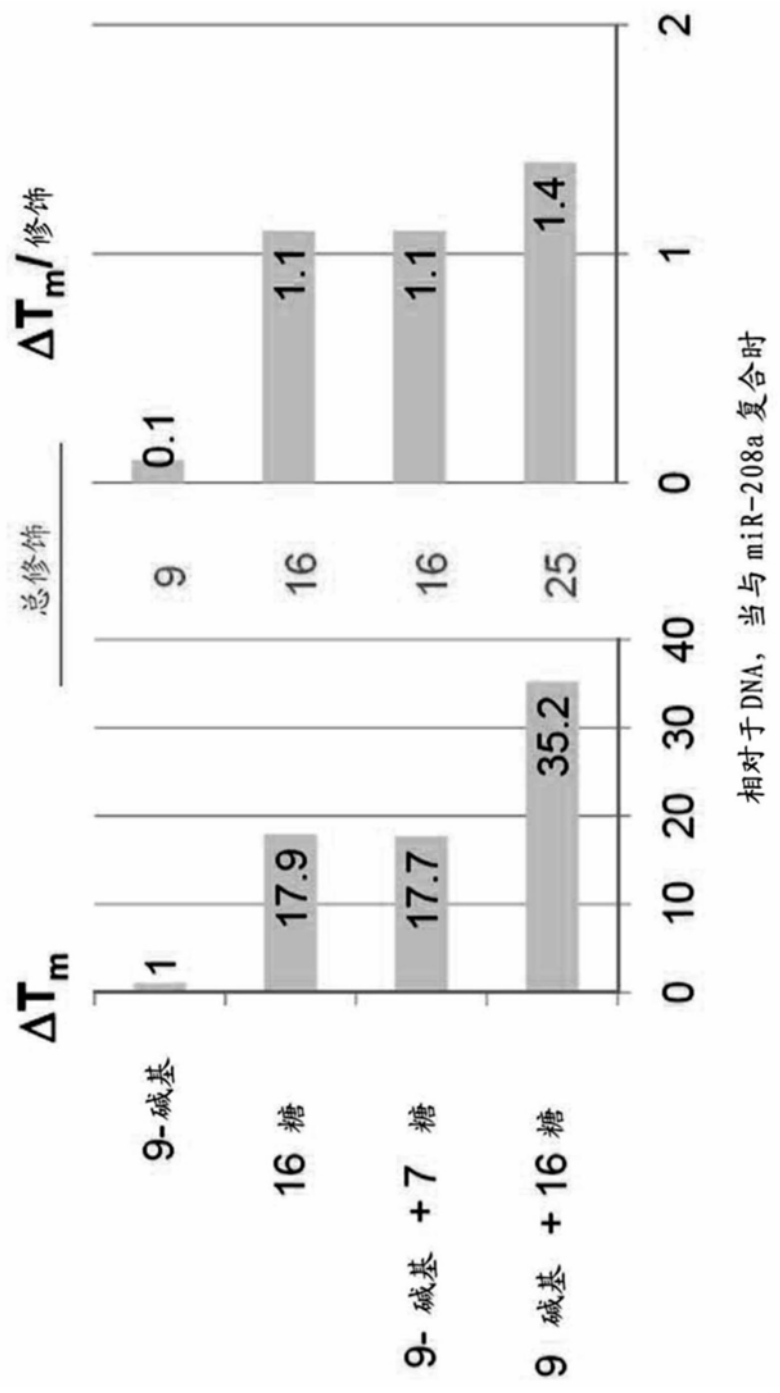


图10

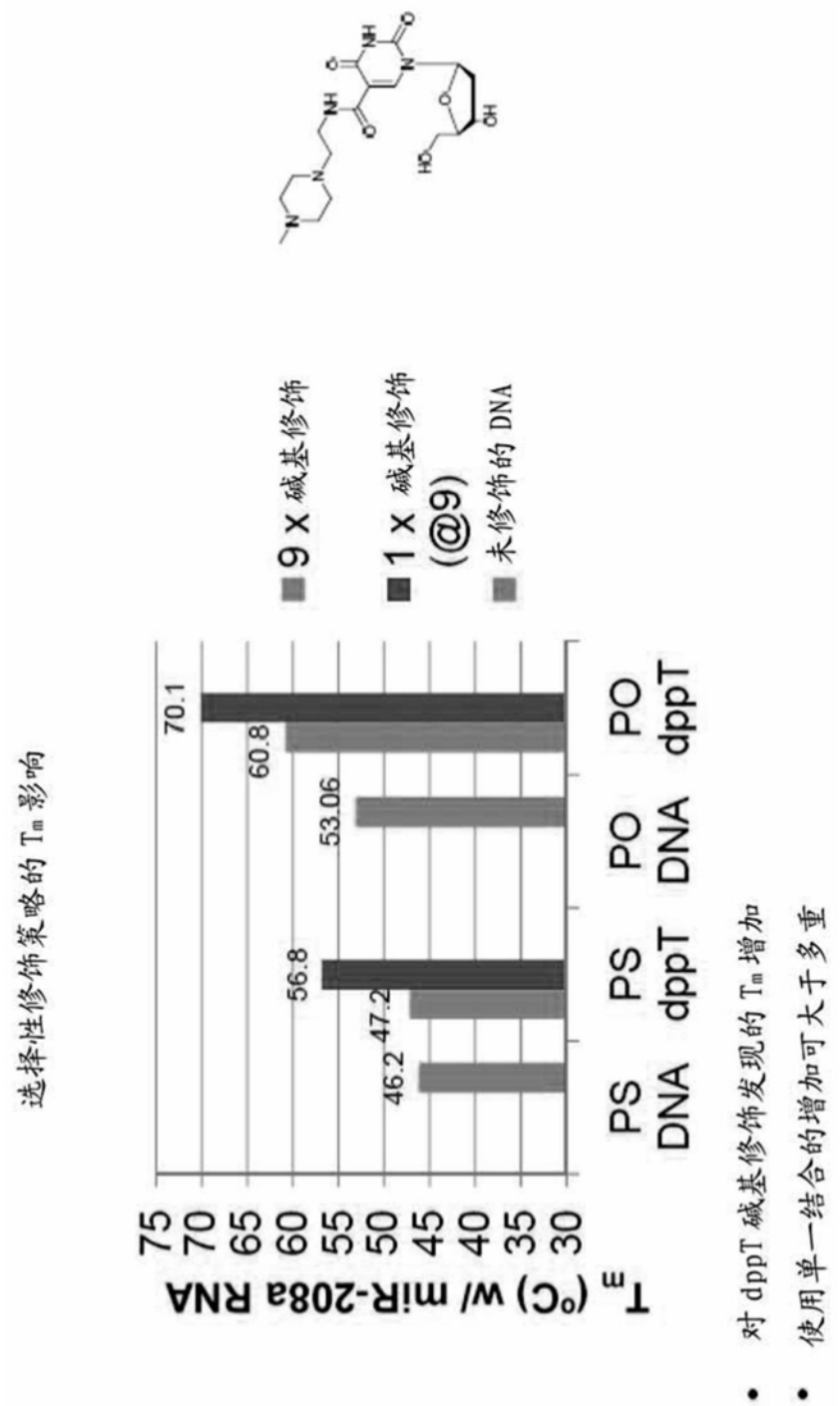


图11

- 对 dppT 碱基修饰发现的 T_m 增加
- 使用单一结合的增加可大于多重