



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115103911 A

(43) 申请公布日 2022. 09. 23

(21) 申请号 202080084535.5

内田章夫 富田直辉

(22) 申请日 2020.10.09

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30) 优先权数据

专利代理师 封新琴

2019-188042 2019.10.11 JP

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/113 (2006.01)

2022.06.06

A61K 31/713 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/038380 2020.10.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/070959 JA 2021.04.15

(71) 申请人 国立大学法人东京医科齿科大学

地址 日本东京

申请人 武田药品工业株式会社

(72) 发明人 横田隆德 永田哲也 山田大贵

权利要求书2页 说明书39页

古川英纪 余郷能纪 宫田健一

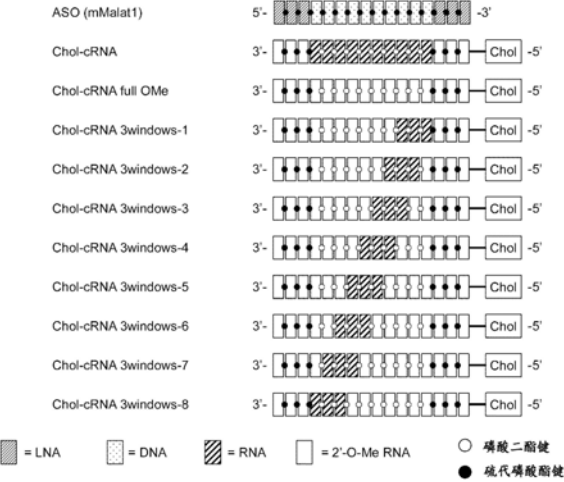
序列表40页 附图25页

(54) 发明名称

修饰的异源核酸

(57) 摘要

在一个实施方案中,本发明的课题在于提供一种具有新结构的双链核酸复合物。在一个实施方案中,本发明涉及包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复合物,其中,所述第1核酸链(1)能够与目标转录产物的至少一部分杂交,(2)对目标转录产物具有反义效果,并且(3)是包括中央区域、以及5'翼区域和3'翼区域的间隙体(gapmer);所述第2核酸链包括至少1个糖未修饰中央区域(第1露出区域),其由与所述第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成,并且所述第1核酸链退火至所述第2核酸链。



1. 一种核酸复合物,所述核酸复合物是包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复合物,所述第1核酸链

(1) 能够与目标转录产物的至少一部分杂交,

(2) 对目标转录产物具有反义效果,并且

(3) 是包括包含至少4个连续的脱氧核糖核苷的中央区域、以及分别在所述中央区域的5'末端侧和3'末端侧的分别包含非天然核苷的5'翼区域和3'翼区域的间隙体(gapmer);

所述第2核酸链包括:至少1个第1露出区域和至少1个防御区域:

所述第1露出区域由与所述第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成;

所述防御区域由1个或通过核苷间键连接的2个及以上的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成,并且

所述第1核酸链退火至所述第2核酸链。

2. 根据权利要求1所述的核酸复合物,其中,所述第1核酸链为10~26碱基长。

3. 根据权利要求1或2所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域由通过核苷间键连接的3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域包含含有修饰或未修饰的嘌呤碱基的核苷。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链仅包括1个所述第1露出区域。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链包括至少2个第1露出区域。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域中的糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的核酸复合物,所述核酸复合物进一步包括由与所述第1核酸链的一部分互补的、通过核苷间键连接的4个及以上连续的糖未修饰核糖核苷组成的第2露出区域,所述第2露出区域中的糖未修饰核糖核苷含有修饰或未修饰的嘌呤碱基。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的至少1个包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

10. 根据权利要求9所述的核酸复合物,其中,所有所述防御区域都包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的至少1个由含有1个或通过核苷间键连接的2个及以上的修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的糖修饰核苷是2'-O-甲基修饰核苷,和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷是在3'侧具有硫代磷酸酯键的核苷。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第1露出区域和/或第2露出区域包含至少1个修饰核苷间键。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链除第1露出区域和第2露出区域以外不包括糖未修饰区域。

15. 根据权利要求1至13中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷的糖修饰末端区域。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的第1露出区域和/或第2露出区域包含: 至少1个Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键和/或包含环状胍部分的核苷间键。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的防御区域包含: 至少1个Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键和/或包含环状胍部分的核苷间键。

18. 根据权利要求15至17中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链除第1露出区域和第2露出区域以外不包括糖未修饰区域。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链与具有选自标记功能、纯化功能和向目标的递送功能的功能的功能性部分结合。

20. 一种药物组合物, 所述药物组合物含有权利要求1至19中任一项所述的核酸复合物作为有效成分。

修饰的异源核酸

技术领域

[0001] 本发明涉及双链核酸复合物、及含有该双链核酸复合物的组合物等。

背景技术

[0002] 近年来,在正在进行的被称为核酸药物的药物产品的开发中,寡核苷酸受到关注,另外特别是从目标基因的高选择性和低毒性这一点考虑,利用反义法的核酸药物的开发正在积极推进。反义法是指包括以从目标基因转录的mRNA或miRNA的部分序列作为目标正义链,通过将与其互补的寡核苷酸(反义寡核苷酸:本说明书中常常表述为“ASO (AntiSense Oligonucleotide)”)导入细胞,从而选择性地改变或阻碍由目标基因编码的蛋白质的表达或miRNA的活性的方法。

[0003] 作为利用反义法的核酸,本发明者们开发了使反义寡核苷酸和针对其的互补链退火而得的双链核酸复合物(heteroduplexoligonucleotide (HD0)) (专利文献1、非专利文献1和2)。

[0004] 上述双链核酸复合物的作用机制没有限定,但部分如下。即,导入细胞内后,互补链中与反义寡核苷酸的一部分互补的RNA区域被RNase H切割,释放出反义寡核苷酸,然后该反义寡核苷酸可以例如起到改变转录产物的活性或功能的作用(参见例如专利文献2)。这被称为“RNase H依赖性途径”,期望核酸部分没有修饰以被RNase H切割。另一方面,在核酸部分没有修饰的情况下,会被体内的核酸酶分解,有不能充分发挥活性的可能性。

现有技术文献

专利文献

[0005] 专利文献1:国际公开第2013/089283号

专利文献2:国际公开第2014/192310号

非专利文献

[0006] 非专利文献1:Nishina K,等人,“DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing”,Nature Communication,2015,6:7969。

非专利文献2:Asami Y,等人,“Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides”,Drug Discoveries&Therapeutics.2016;10 (5) :256-262。

发明内容

发明所要解决的课题

[0007] 对于应如何修饰核酸以抑制被体内的核酸酶分解同时维持双链核酸复合物的活性的知识不能说是充分的。

[0008] 本发明的课题在于提供一种可以维持活性和/或抑制在体内的分解的双链核酸复合物。

解决课题的手段

[0009] 本发明者们发现以下复合物可以维持活性和/或抑制在体内的分解,该复合物是

包含第1核酸链和第2核酸链的复合物,其中,该第1核酸链是间隙体(gapmer),该第2核酸链包括糖未修饰中央区域(本说明书中也表述为“第1露出区域”),其由与该第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。

此外,本发明者们发现,通过第2核酸链包括含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的防御区域,上述复合物的功能可以进一步提高,从而完成本发明。

[0010] 本发明基于上述知识,包含以下实施方案。

[1] 一种核酸复合物,所述核酸复合物是包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复合物,

所述第1核酸链

(1) 能够与目标转录产物的至少一部分杂交,

(2) 对目标转录产物具有反义效果,并且

(3) 是包括包含至少4个连续的脱氧核糖核苷的中央区域、以及分别在所述中央区域的5'末端侧和3'末端侧的分别包含非天然核苷的5'翼区域和3'翼区域的间隙体(gapmer);

所述第2核酸链包括至少1个糖未修饰中央区域(第1露出区域),其由与所述第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成,并且

所述第1核酸链退火至所述第2核酸链。

[2] 根据[1]所述的核酸复合物,其中,所述第1核酸链为13~20碱基长。

[3] 根据[1]或[2]所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链包括通过修饰或未修饰的核苷间键连接的

(1) 所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)、以及

(2) (a) 脱氧核糖核苷和/或(b) 糖修饰核苷。

[4] 根据[3]所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链包括糖修饰核糖核苷。

[5] 根据[1]至[4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)由通过核苷间键连接的3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。

[6] 根据[1]至[5]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链仅包括1个糖未修饰中央区域(第1露出区域)。

[7] 根据[1]至[6]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)中的糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[8] 根据[1]至[7]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)包含至少1个修饰核苷间键。

[9] 根据[1]至[8]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个糖未修饰核糖核苷的糖未修饰末端区域。

[10] 根据[9]所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰末端区域中的糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[11] 根据[1]至[10]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链的糖未修饰中央区域(第1露出区域)包含至少1个Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键。

[12] 根据[11]所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链除糖未修饰末端区域和糖

未修饰中央区域(第1露出区域)以外不包括糖未修饰区域。

[13]根据[1]至[12]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)中的碱基是嘌呤碱基。

[14]根据[1]至[13]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链与具有选自标记功能、纯化功能和向目标的递送功能的功能的功能性部分结合。

[15]根据[1]至[14]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰中央区域(第1露出区域)相较于所述第2核酸链的中央位于3'侧。

[0011] 本发明进一步包含以下实施方案。

[1A]一种核酸复合物,所述核酸复合物是包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复合物,

所述第1核酸链

(1)能够与目标转录产物的至少一部分杂交,

(2)对目标转录产物具有反义效果,并且

(3)是包括包含至少4个连续的脱氧核糖核苷的中央区域、以及分别在所述中央区域的5'末端侧和3'末端侧的分别包含非天然核苷的5'翼区域和3'翼区域的间隙体(gapmer);

所述第2核酸链包括:至少1个第1露出区域和至少1个防御区域:

所述第1露出区域由与所述第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成;

所述防御区域由1个或通过核苷间键连接的2个及以上的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成,并且

所述第1核酸链退火至所述第2核酸链。

[2A]根据[1A]所述的核酸复合物,其中,所述第1核酸链为13~22碱基长。

[3A]根据[1A]或[2A]所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域由通过核苷间键连接的3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。

[4A]根据[1A]至[3A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域包含含有修饰或未修饰的嘌呤碱基的核苷。

[5A]根据[1A]至[4A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链仅包括1个所述第1露出区域。

[6A]根据[1A]至[4A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链包括至少2个第1露出区域。

[7A]根据[1A]至[6A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链包括至少2个防御区域。

[8A]根据[1A]至[7A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域中的糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[9A]根据[1A]至[8A]中任一项所述的核酸复合物,所述核酸复合物进一步包括由与所述第1核酸链的一部分互补的、通过核苷间键连接的4个及以上连续的糖未修饰核糖核苷组成的第2露出区域,所述第2露出区域中的糖未修饰核糖核苷含有修饰或未修饰的嘌呤碱基。

[10A]根据[1A]至[9A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的至少1个包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

[11A]根据[10A]所述的核酸复合物,其中,所有所述防御区域都包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

[12A]根据[1A]至[11A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的至少1个由含有1个或通过核苷间键连接的2个及以上的修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成。

[13A-1]根据[1A]至[12A]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的糖修饰核苷是2'-糖修饰核苷和/或交联核苷。

[13A-2]根据[1A]至[12A]或[13A-1]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的糖修饰核苷是2'-糖修饰核苷。

[13A-3]根据[1A]至[12A]或[13A-1]、[13A-2]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的在3'侧具有修饰核苷间键的核苷是在3'侧具有硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键和/或包含环状胍部分的核苷间键的核苷。

[13A-4]根据[1A]至[12A]或[13A-1]至[13A-3]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的在3'侧具有修饰核苷间键的核苷是在3'侧具有硫代磷酸酯键的核苷。

[13A]根据[1A]至[12A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述防御区域中的糖修饰核苷是2'-O-甲基修饰核苷,和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷是在3'侧具有硫代磷酸酯键的核苷。

[14A]根据[1A]至[13A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第1露出区域和/或第2露出区域包含至少1个修饰核苷间键。

[15A]根据[1A]至[14A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个糖未修饰核糖核苷的糖未修饰末端区域。

[16A]根据[15A]所述的核酸复合物,其中,所述糖未修饰末端区域中的糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[17A]根据[1A]至[16A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链的至少1个防御区域在5'末端和3'末端通过核苷间键与所述第1露出区域和/或所述第2露出区域连接。

[18A]根据[1A]至[17A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链除第1露出区域和第2露出区域以外不包括糖未修饰区域。

[19A]根据[1A]至[17A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷的糖修饰末端区域。

[20A]根据[1A]至[19A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物,其中,所述第2核酸链由通过核苷间键连接的(1)至少1个所述第1露出区域和/或至少1个所述第2

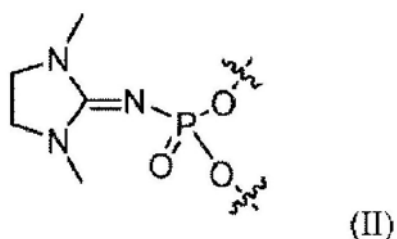
露出区域、(2) 至少1个所述防御区域、以及 (3) 5' 末端和3' 末端的所述糖修饰末端区域组成。

[21A] 根据[1A]至[20A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的第1露出区域和/或第2露出区域包含: 至少1个Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键和/或包含环状胍部分的核苷间键。

[22A] 根据[1A]至[21A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的防御区域包含: 至少1个Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键和/或包含环状胍部分的核苷间键。

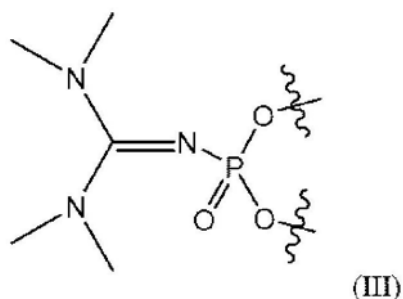
[23A] 根据[21A]或[22A]所述的核酸复合物, 其中, 所述包含环状胍部分的核苷间键是由下式 (II) 所表示的部分结构表示的核苷间键。

【化1】



[24A] 根据[21A]至[23A]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分的核苷间键, 是由下式 (III) 所表示的部分结构表示的核苷间键。

【化2】



[25A] 根据[17A]或[19A]至[24A]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链除第1露出区域、第2露出区域和糖未修饰末端区域以外不包括糖未修饰区域。

[26A] 根据[17A]至[25A]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的至少1个第1露出区域、第2露出区域和/或防御区域包含1个及以上错配碱基。

[27A] 根据[17A]至[25A]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域和/或防御区域不包含错配碱基。

[28A] 根据[1A]至[27A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物, 其中, 所述第2核酸链与具有选自标记功能、纯化功能和向目标的递送功能的功能的功能性部分结合。

[29A] 一种药物组合物, 所述药物组合物含有[1A]至[28A]或[13A-1]至[13A-4]中任一项所述的核酸复合物作为有效成分。

[30A] 一种核酸复合物, 所述核酸复合物是包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复

合物，

所述第1核酸链

(1) 能够与目标转录产物的至少一部分杂交，

(2) 对目标转录产物具有反义效果，并且

(3) 是包括包含至少4个连续的脱氧核糖核苷的中央区域、以及分别在所述中央区域的5'末端侧和3'末端侧的分别包含非天然核苷的5'翼区域和3'翼区域的间隙体(gapmer)；

所述第2核酸链包括：至少1个第2露出区域和至少1个防御区域：

所述第2露出区域由与所述第1核酸链的一部分互补的通过核苷间键连接的4个及以上连续的糖未修饰核糖核苷组成；

所述防御区域由1个或通过核苷间键连接的2个及以上的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成，并且

所述第1核酸链退火至所述第2核酸链。

[31A]根据[30A]所述的核酸复合物，其中，所述第1核酸链为13~22碱基长。

[32A]根据[30A]或[31A]所述的核酸复合物，其中，所述第2核酸链仅包括1个所述第2露出区域。

[33A]根据[30A]至[32A]中任一项所述的核酸复合物，其中，所述第2核酸链包括至少2个第2露出区域。

[34A]根据[30A]至[33A]中任一项所述的核酸复合物，所述核酸复合物进一步包括由与所述第1核酸链的一部分互补的1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成的第1露出区域。

本说明书包含作为本申请优先权的基础的日本专利申请第2019-188042号的公开内容。

发明效果

[0012] 本发明提供一种具有新结构的双链核酸复合物。本发明的核酸复合物可以是活性高和/或在体内的分解被抑制的核酸复合物。

附图说明

[0013] 图1A和图1B是示出在本发明的核酸复合物的特定实施方案中，第2核酸链包含脂质的示例的示意图。

图2A至图2C是示出在本发明的核酸复合物的特定实施方案中，第2核酸链包含脂质且包括互补区域和突出区域的示例的示意图。

图3是示出反义法的一般机制的一个示例的图。

图4是示出各种交联核酸的结构图。

图5是示出各种天然核苷酸或非天然核苷酸的结构图。

图6是实施例1中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。

图7示出了ASO单独、ASO与Chol-cRNA(mMalat1)的双链复合物(Chol-HDO)，ASO与Chol-cRNA(mMalat1) full OMe的双链复合物(Chol-HDO with full OMe cRNA)的被RNase H和/或RNase A切割后的电泳结果。还示出了在RNase H处理区中，“+”是指对于核酸10 μ M 5

μL ,使10U Ribonuclease H与之反应时的结果,“++”是指对于核酸 $20\mu\text{M}$ $5\mu\text{L}$,使10U Ribonuclease H与之反应时的结果。

图8是示出了基于图7的电泳结果的未分解条带的浓度相对于未处理的相对强度水平(%)的图表。

图9是关于含有与第1核酸链的间隙区域的一部分互补的3个连续的糖未修饰核糖核苷的双链核酸剂,改变3个连续的糖未修饰核糖核苷的位置,并进行由RNase H和/或RNase A进行的切割试验,与图8同样,以相对强度水平(%)表示未分解条带的浓度的图表。

图10示出了在细胞用各种双链核酸复合物处理的情况下的PBS处理中的Malat1/Actb(β -肌动蛋白)表达量设为1时的相对RNA表达水平。

图11是实施例3中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。

图12是实施例3中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。

图13是示出关于含有与第1核酸链的间隙区域的一部分互补的1个或2个连续的糖未修饰核糖核苷的双链核酸剂,改变糖未修饰核糖核苷的位置,并进行被RNase A切割之后的电泳结果。

图14是关于含有与第1核酸链的间隙区域的一部分互补的1个或2个连续的RNA的双链核酸剂,进行由RNase A进行的切割之后,与图8同样,以相对强度水平(%)表示未分解条带的浓度的图表。

图15是示出实施例4中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。图15A示出了含有ASO(mDMPK)和Chol-cRNA(Default)的双链核酸复合物Chol-HDO(Default)。图15B示出了含有ASO(mDMPK)和Chol-cRNA(CU OMe)的双链核酸复合物Chol-HDO(CU OMe)。

图16是示出双链核酸复合物Chol-HDO(Default)和Chol-cRNA(CU OMe)以及用于阴性对照的PBS对腓肠肌(gastrocnemius:GC)、肱三头肌(triceps brachii:TB)、胫骨前肌(tibialis anterior:TA)、背部肌肉(Back)、股四头肌(Quadriceps)和心肌(Heart)中的Dmpk基因的表达抑制效果的图。示出了Dmpk/Actb(β -肌动蛋白)表达量设为1时的相对RNA表达水平。

图17是示出双链核酸复合物Chol-HDO(Default)和Chol-cRNA(CU OMe)以及用于阴性对照的PBS对肾脏和肝脏中的Dmpk基因的表达抑制效果的图。示出了Dmpk/Actb(β -肌动蛋白)表达量设为1时的相对RNA表达水平。

图18是示出实施例5中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。图18A示出了含有ASO(hSOD1)和Chol-cRNA(Default)的双链核酸复合物Chol-HDO(Default)。图18B示出了含有ASO(hSOD1)和Chol-cRNA(CU OMe)的双链核酸复合物Chol-HDO(CU OMe)。

图19是示出双链核酸复合物Chol-HDO(Default)和Chol-cRNA(CU OMe)以及用于阴性对照的PBS对背部肌肉(Back)、股四头肌(Quadriceps)、心肌(Heart)以及横膈膜(Diaphragm)中的SOD1基因的表达抑制效果的图。示出了SOD1/Actb(β -肌动蛋白)表达量设为1时的相对RNA表达水平。

图20是示出实施例6中使用的核酸的结构示意图。Chol表示胆固醇。图20A示出了含有ASO(Malat1)和Chol-cRNA(Default)的双链核酸复合物Chol-HDO(Default)。图20B示出了含有ASO(Malat1)和Chol-cRNA(CT DNA)的双链核酸复合物Chol-HDO(CT DNA)。

图21是示出双链核酸复合物Chol-HDO(Default)和Chol-cRNA(CU OMe)以及用于

阴性对照的PBS对颈脊髓 (Cervical spinal cord) 中的Malat1基因的表达抑制效果的图。示出了Malat1/Actb (β -肌动蛋白) 表达量设为1时的相对RNA表达水平。

图22A示出了实施例7中使用的寡核苷酸的序列、化学修饰和结构。

图22B示出了实施例7中使用的寡核苷酸的序列、化学修饰和结构。

图23是将包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和含有修饰核糖核苷的互补链 (第2核酸链) 的双链核酸复合物与小鼠血清混合记载时间 (0h、24h) 并通过电泳研究了稳定性的结果。

图24是示出了基于图23的电泳结果的24h后的双链条带的浓度相对于0h后的双链条带的相对强度水平 (%) 的图表。

图25是将包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和含有修饰核糖核苷的互补链 (第2核酸链) 的双链核酸复合物与人血清混合记载时间 (0h、2h) 并通过电泳研究了稳定性的结果。

图26是示出了基于图25的电泳结果的2h后的双链条带的浓度相对于0h后的双链条带的相对强度水平 (%) 的图表。

具体实施方式

[0014] <核酸复合物>

一方式中, 本发明涉及包含第1核酸链和第2核酸链的核酸复合物, 其中, 该第1核酸链退火至该第2核酸链。该第1核酸链: (1) 能够与目标转录产物的至少一部分杂交, (2) 对目标转录产物具有反义效果, 并且 (3) 是间隙体 (gapmer)。下面将详细说明本发明的核酸复合物及构成该核酸复合物的核酸链。

[0015] 第1核酸链可以是包括相对于目标转录产物的反义寡核苷酸区域或由其组成的核苷酸链。“反义寡核苷酸”或“反义核酸”是指单链寡核苷酸, 其包含能够与目标转录产物 (主要是目标基因的转录产物) 的至少一部分杂交的 (即互补的) 碱基序列, 并且能够对目标转录产物产生反义效果。在本发明中, 第1核酸链中的反义寡核苷酸区域能够对目标转录产物产生反义效果。目标转录产物的目标区域可以为至少8碱基长, 例如, 10~35碱基长、12~25碱基长、13~20碱基长、14~19碱基长或15~18碱基长、或者13~22碱基长、16~22碱基长或16~20碱基长。

[0016] “反义效果”意指目标转录产物的表达调节, 其由于目标转录产物 (RNA正义链) 与被设计与转录产物等的部分序列互补的且成旨在引起反义效果的链 (例如DNA链) 的杂交的结果而产生。目标转录产物的表达调节包括抑制或降低目标基因的表达或目标转录产物的水平 (表达量), 或者, 在特定的示例中包括翻译的阻碍或剪接功能改变效果, 例如外显子跳读或转录产物的分解 (参见图3)。例如, 在翻译的阻碍中, 当将含有RNA的寡核苷酸作为反义寡核苷酸 (ASO) 导入细胞时, ASO与目标基因的转录产物 (mRNA) 结合以形成部分双链。该部分双链作为用于妨碍利用核糖体的翻译的覆盖物发挥作用, 由此目标基因所编码的蛋白质的表达在翻译水平上被阻碍 (图3虚线外×标记)。另一方面, 当将含有DNA的寡核苷酸作为ASO导入细胞时, 会形成部分DNA-RNA异源双链。这种异源双链结构被RNase H识别, 结果目标基因的mRNA被降解, 从而目标基因所编码的蛋白质的表达在表达水平上被阻碍 (图3虚线框内)。这被称为“RNase H依赖性途径”。此外, 在特定的示例中, 可以通过靶向mRNA前体

的内含子来产生反义效果。也可以通过靶向miRNA来产生反义效果,在这种情况下,该miRNA的功能会受到阻碍,并且由该miRNA正常调节表达的基因的表达可能会增加。在一个实施方案中,目标转录产物的表达调节可以是目标转录产物量的减少。

[0017] 第1核酸链中的反义寡核苷酸区域包含可以与目标转录产物的至少一部分(例如,任意目标区域)杂交的碱基序列。目标区域可以包括3'UTR、5'UTR、外显子、内含子、编码区域、翻译起始区域、翻译终止区域或其他核酸区域。

[0018] 其表达通过反义效果被调节(例如,抑制、变更或改变)的“目标基因”没有特别限定,可以举出例如,其表达在各种疾病中增加的基因。此外,目标转录产物包括从编码目标基因的基因组DNA转录的mRNA,还包括未受到碱基修饰的mRNA、未加工的mRNA前体等。“目标转录产物”可以不仅包括mRNA,还可以包括miRNA等非编码RNA(non-coding RNA、ncRNA)。更一般地,“转录产物”可以是由DNA依赖性RNA聚合酶合成的任何RNA。在一个实施方案中,“目标转录产物”可以是例如,清道夫受体B1(scavenger receptor B1:本说明书中常常表述为“SR-B1”)、强直性肌营养不良蛋白激酶(myotonic dystrophy protein kinase,本说明书中常常表述为“DMPK”)、甲状腺素转运蛋白(transthyretin:本说明书中常常表述为“TTR”)、载脂蛋白B(Apolipoprotein B:本说明书中常常表述为“ApoB”)、肺腺癌转移相关转录产物1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1:本说明书中常常表述为“Malat1”)的基因,例如其非编码RNA或mRNA。序列编号1示出了小鼠Malat1非编码RNA的碱基序列,序列编号2示出了人Malat1非编码RNA的碱基序列。此外,序列编号39示出了小鼠SR-B1 mRNA的碱基序列,序列编号40示出了人SR-B1 mRNA的碱基序列。并且,序列编号41示出了小鼠DMPK mRNA的碱基序列,序列编号42示出了人DMPK mRNA的碱基序列。另外,序列编号1~2以及39~42均将mRNA的碱基序列置换成了DNA的碱基序列。这些基因和转录产物的碱基序列信息可从例如NCBI(美国国家生物技术信息中心)数据库(例如,GenBank、Trace Archive、Sequence Read Archive、BioSample、BioProject)等公知的数据库获得。例如,在小鼠Malat-1非编码RNA的情况下,目标转录产物的目标区域可以包括序列编号1的1317~1332位的碱基序列。

[0019] 本说明书中使用的术语“核酸”或“核酸分子”可以是指为单体的核苷酸或核苷,或可以意指由多个单体组成的寡核苷酸。本文也使用术语“核酸链”或“链”来指代寡核苷酸。核酸链可以通过化学合成法(例如,使用自动合成装置)或通过酶的工序(例如,但不限于,聚合酶、连接酶或限制反应)制作全长链或部分链。

[0020] 本说明书中使用的术语“核酸碱基”或“碱基”是构成核酸的碱基成分(杂环部分),并且主要已知有腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

[0021] 本说明书中使用的术语“互补的”意指核酸碱基能够介由氢键而形成所谓的沃森-克里克碱基对(天然型碱基对)或非沃森-克里克碱基对(Hoogsteen型碱基对等)的关系。在本发明中,第1核酸链中的反义寡核苷酸区域不一定必须与目标转录产物(例如,目标基因的转录产物)的至少一部分完全互补,只要碱基序列具有至少70%、优选为至少80%、更优选为至少90%(例如,95%、96%、97%、98%、或99%及以上)的互补性就可以接受。当碱基序列是互补的(典型地,当碱基序列是与目标转录产物的至少一部分的碱基序列互补的)时,第1核酸链中的反义寡核苷酸区域能够与目标转录产物杂交。同样地,第2核酸链中的互补区域也不一定必须与第1核酸链的至少一部分完全互补,只要碱基序列具有至少70%、优

选为至少80%、更优选为至少90% (例如,95%、96%、97%、98%、或99%及以上) 的互补性就可以接受。当第2核酸链中的互补区域其碱基序列与第1核酸链的至少一部分互补时,则该互补区域可以退火。碱基序列的互补性可以通过使用BLAST程序等来确定。考虑到链之间的互补度,只要是本领域技术人员就能够容易地确定两条链可以退火或杂交的条件(温度、盐浓度等)。此外,进一步地,只要是本领域技术人员就能够基于例如目标基因的碱基序列的信息容易地设计与目标转录产物互补的反义核酸。

[0022] 杂交条件可以是例如,低严格条件和高严格条件等各种严格条件。低严格条件可以是相对低温且高盐浓度的条件,例如,30℃、2×SSC、0.1%SDS。高严格条件可以是相对高温且低盐浓度的条件,例如,65℃、0.1×SSC、0.1%SDS。通过改变温度和盐浓度等条件,能够调整杂交的严格性。这里,1×SSC包含150mM氯化钠和15mM柠檬酸钠。

[0023] 第1核酸链中的反义寡核苷酸区域通常可以为至少8碱基长、至少9碱基长、至少10碱基长、至少11碱基长、至少12碱基长或至少13碱基长,但没有特别限定。第1核酸链中的反义寡核苷酸区域可以为35碱基长及以下、30碱基长及以下、25碱基长及以下、24碱基长及以下、23碱基长及以下、22碱基长及以下、21碱基长及以下、20碱基长及以下、19碱基长及以下、18碱基长及以下、17碱基长及以下或16碱基长及以下。第1核酸链中的反义寡核苷酸区域可以为例如8~35碱基长、9~30碱基长、10~25碱基长、10~20碱基长、11~18碱基长或12~16碱基长、或者13~22碱基长、16~22碱基长或16~20碱基长。

[0024] 第1核酸链没有特别限定,但可以为至少9碱基长、至少10碱基长、至少11碱基长、至少12碱基长或至少13碱基长。第1核酸链可以为50碱基长及以下、45碱基长及以下、40碱基长及以下、35碱基长及以下、30碱基长及以下、28碱基长及以下、26碱基长及以下、24碱基长及以下、22碱基长及以下、20碱基长及以下、18碱基长及以下或16碱基长及以下。第1核酸链可以为例如,9~50碱基长、10~40碱基、11~35碱基长、12~30碱基长或13~20碱基长、或者13~22碱基长、16~22碱基长或16~20碱基长。

[0025] 第2核酸链中的互补区域通常可以为至少8碱基长、至少9碱基长、至少10碱基长、至少11碱基长、至少12碱基长或至少13碱基长,但没有特别限定。第2核酸链中的互补区域可以为35碱基长及以下、30碱基长及以下、25碱基长及以下、24碱基长及以下、23碱基长及以下、22碱基长及以下、21碱基长及以下、20碱基长及以下、19碱基长及以下、18碱基长及以下、17碱基长及以下或16碱基长及以下。在一个实施方案中,第2核酸链中的互补区域为9~35碱基长、9~30碱基长、10~25碱基长、10~20碱基长、11~18碱基长或12~16碱基长。在一个实施方案中,第2核酸链中的互补区域为13~22碱基长、16~22碱基长或16~20碱基长。在一个实施方案中,第2核酸链中的互补区域为8~35碱基长、8~30碱基长、8~25碱基长、8~20碱基长、8~16碱基长、8~12碱基长、8~10碱基长。

[0026] 第2核酸链没有特别限定,但可以为至少5碱基长、至少6碱基长、至少7碱基长、至少8碱基长、至少9碱基长、至少10碱基长、至少11碱基长、至少12碱基长或至少13碱基长。第2核酸链可以为50碱基长及以下、45碱基长及以下、40碱基长及以下、35碱基长及以下、30碱基长及以下、28碱基长及以下、26碱基长及以下、24碱基长及以下、22碱基长及以下、20碱基长及以下、18碱基长及以下、16碱基长及以下、14碱基长及以下、12碱基长及以下、10碱基长及以下、9碱基长及以下。第2核酸链可以为例如,9~50碱基长、10~40碱基、11~35碱基长、12~30碱基长、或13~20碱基长、13~22碱基长、16~22碱基长或16~20碱基长、或者5

~14碱基长、6~12碱基长、6~10碱基长、7~10碱基长、8~10碱基长、8~9碱基长或7~9碱基长。除了例如费用、合成产率等其他因素之外，长度的选择一般可以根据特别是反义效果的强度与核酸链相对于目标的特异性之间平衡来确定。

[0027] 第2核酸链包括与第1核酸链的至少一部分互补的互补区域或由其组成。

[0028] 在一个实施方案中，第2核酸链中的互补区域可以与第1核酸链中的反义寡核苷酸区域的至少一部分互补。第2核酸链中的互补区域可以与第1核酸链中的整个反义寡核苷酸区域互补。除第1核酸链中的反义寡核苷酸区域以外，第2核酸链中的互补区域可以与其他部分互补。该实施方案的示例是国际公开第2013/089283号，Nishina K, 等人, Nature Communication, 2015, 6:7969, 以及 Asami Y, 等人, Drug Discoveries & Therapeutics. 2016; 10 (5) :256-262 中公开的异源双链寡核苷酸 (heteroduplex oligonucleotide, HD0) (图1A和1B)。

[0029] 在进一步的实施方案中，第2核酸链还可包括至少1个位于互补区域的5'末端侧和3'末端侧之一或两者上的突出区域。国际公开第2018/062510号中描述了该实施方案的示例。“突出区域”是指与互补区域相邻的区域，当第1核酸链与第2核酸链退火形成双链结构时，在该区域第2核酸链的5'末端延伸超出了第1核酸链的3'末端和/或第2核酸链的3'末端延伸超出了第1核酸链的5'末端，即从双链结构突出的第2核酸链中的核苷酸区域。第2核酸链中的突出区域可以位于互补区域的5'末端侧(图2A)或3'末端侧(图2B)。第2核酸链中的突出区域可以位于互补区域的5'末端侧及3'末端侧(图2C)。

[0030] 通常，“核苷”为碱基和糖的组合。核苷的核酸碱基(也称为碱基)部分通常是杂环碱基部分。“核苷酸”还包含共价结合至核苷的糖部分的磷酸基团。对于包含呋喃戊糖基糖的核苷，磷酸基团可以连接至糖的2'、3'或5'羟基部分。寡核苷酸由彼此相邻发核苷的共价键形成，从而形成了直链聚合物寡核苷酸。在寡核苷酸结构的内部，磷酸基团通常被视作形成寡核苷酸的核苷间键。

[0031] 核酸链可以包括天然核苷酸和/或非天然核苷酸。“天然核苷酸”包括在DNA中发现的脱氧核糖核苷酸和在RNA中发现的核糖核苷酸。“脱氧核糖核苷酸”和“核糖核苷酸”也可以分别称为“DNA核苷酸”和“RNA核苷酸”。

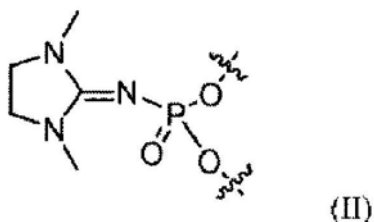
[0032] 同样地，“天然核苷”包括在DNA中发现的脱氧核糖核苷和在RNA中发现的核糖核苷。“脱氧核糖核苷”和“核糖核苷”也可以分别称为“DNA核苷”和“RNA核苷”。

[0033] “非天然核苷酸”是指除天然核苷酸以外的任何核苷酸，包括修饰核苷酸和核苷酸模拟物。同样地，“非天然核苷”是指除天然核苷以外的任何核苷，包括修饰核苷和核苷模拟物。“修饰核苷酸”意指具有修饰糖部分、修饰核苷间键和修饰核酸碱基中的任何一种或多种的核苷酸。“修饰核苷”意指具有修饰糖部分和/或修饰核酸碱基的核苷。包含非天然寡核苷酸的核酸链在多数情况下，由于例如细胞摄取的强化，对核酸目标的亲和性的强化，核酸酶存在下的稳定性的增加、或阻碍活性增加等期望的特性，而比天然型更优选。

[0034] “修饰核苷间键”是指与天然存在的核苷间键(即，磷酸二酯键)相比具有取代或任意变化的核苷间键。修饰核苷间键包括：含有磷原子的核苷间键和不含磷原子的核苷间键。代表性的含磷核苷间键可以举出磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键(美国专利登记编号5,955,599中描述的甲基磷酸三酯键和乙基磷酸三酯键)、烷基磷酸酯键(例如，美国专利登记编号5,264,423和5,286,717中描述的甲基磷酸酯键、国际公开第

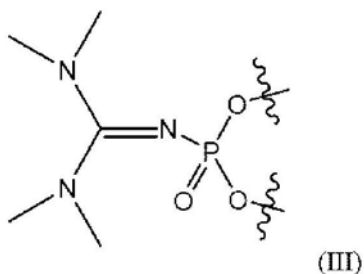
2015/168172号中描述的甲氧基丙基磷酸酯键)、烷基硫代磷酸酯键、甲基硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键、包含环状胍部分的核苷间键(例如,下式(II)所表示的部分结构:

【化3】



)、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分(例如,四甲基胍(TMG)部分)的核苷间键(例如,下式(III)所表示的部分结构:

【化4】



)、国际公开第2016/081600号中描述的自中和核酸(ZON)中使用的核苷间键和氨基磷酸酯键,但不限于这些。硫代磷酸酯键是指磷酸二酯键的非交联氧原子被硫原子取代的核苷间键。含磷和不含磷键的制备方法是周知的。修饰核苷间键优选核酸酶抗性高于天然存在的核苷间键的键。

[0035] 在核苷间键具有手性中心的情况下,则核苷间键可以是手性控制的。“手性控制的”意指于关于手性中心例如手性键联磷以单一非对映体存在。手性控制的核苷间键可以是完全手性纯的或手性纯度高的,例如,90%de、95%de、98%de、99%de、99.5%de、99.8%de、99.9%de或具有更高的手性纯度的。本说明书中的“手性纯度”是指一种非对映体在非对映体混合物中的比例,并表示为非对映体过量率(%de),被定义为(目的非对映体-其他非对映体)/(总非对映体)×100(%)。

[0036] 例如,核苷间键可以是Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分(例如,四甲基胍(TMG)部分;例如参照Alexander A.Lomzov等人,Biochem Biophys Res Commun.,2019,513(4),807-811)的核苷间键(例如,式(III)所表示的部分结构)、和/或包含环状胍部分的核苷间键(式(II)所表示的部分结构)。手性控制的核苷间键的制备方法是公知的,例如,Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键可以根据Naoki Iwamoto等人,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.2009,48(3),496-9、Natsuhisa Oka等人,J.Am.Chem.Soc.2003,125,8307-8317、Natsuhisa Oka等人,J.Am.Chem.Soc.2008,130,16031-16037、Yohei Nukaga等人,J.Org.Chem.2016,81,2753-2762、Yohei Nukaga等人,J.Org.Chem.2012,77,7913-7922中描述的方法合成。Rp构型或Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键也是公知的,已知发挥例如Naoki Iwamoto等人,Nat.Biotechnol.,2017,35(9),845-851、Anastasia Khvorova等人,Nat.Biotechnol.,2017,35(3),238-248中描述的效果。例如,在一个实施方案中,Sp构型的手性控制的硫代磷酸酯键比Rp构型的更稳定,和/

或Sp构型的手性控制的ASO促进由RNase H1进行的目标RNA切割,在体内产生更持久的反应。包含被1~4个C_{1~6}的烷基取代的胍部分(例如,四甲基胍(TMG)部分)的核苷间键的制备方法是公知的,可以根据例如Alexander A.Lomzov等人,Biochem Biophys Res Commun., 2019,513(4),807-811中描述的方法合成。

[0037] 本说明书中的“核酸碱基”或“碱基”,除非另有说明,包括任何修饰或未修饰的核酸碱基(碱基)。因此,除非另有说明,嘌呤碱基可以是任何修饰或未修饰的嘌呤碱基。此外,除非另有说明,嘧啶碱基可以是任何修饰或未修饰的嘧啶碱基。

[0038] “修饰核酸碱基”或“修饰碱基”意指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶以外的任何核酸碱基。“未修饰核酸碱基”或“未修饰碱基”(天然核酸碱基)意指作为嘌呤碱基的腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、以及作为嘧啶碱基的胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰核酸碱基的示例可以举出5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶或N4-甲基胞嘧啶;N6-甲基腺嘌呤或8-溴腺嘌呤;2-硫代胸腺嘧啶;以及N2-甲基鸟嘌呤或8-溴鸟嘌呤,但不限于这些。修饰核酸碱基优选为5-甲基胞嘧啶。

[0039] “修饰糖”是指与天然糖部分(即,DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中观察到的糖部分)相比具有取代和/或任意变化的糖,“糖修饰”是指与天然糖部分相比替代和/或任意变化。核酸链可以根据情况包含一种及以上含有修饰糖的修饰核苷。“糖修饰核苷”是指具有修饰糖部分的核苷。这种糖修饰核苷可以赋予核酸链以核酸酶稳定性的强化、结合亲和性的增加或一些其他有益的生物学特性。在特定实施方案中,核苷包含化学修饰呋喃核糖环部分。化学修饰呋喃核糖环的示例可以举出但不限于取代基(包括5'和2'取代基)的添加、通过非偕环原子的交联形成而实现的双环核酸(交联核酸、BNA)的形成、核糖基环氧原子的用S、N(R)或C(R1)(R2)(R,R1和R2独立表示H、C₁-C₁₂烷基或保护基)的取代及其组合。

[0040] 糖修饰核苷的示例可以举出但不限于包含5'-乙烷基、5'-甲基(R或S)、5'-烯丙基(R或S)、4'-S、2'-F(2'-氟基)、2'-OCH₃(2'-OMe基或2'-O-甲基)及2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核苷。2'位的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、-O-烯丙基、-O-C₁-C₁₀烷基、-OCF₃、-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)及O-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn),各Rm和Rn独立地为H或取代或未取代的C₁-C₁₀烷基。“2'-修饰糖”意指在2'位被修饰的呋喃基糖。含有2'-修饰糖的核苷可以称为“2'-糖修饰核苷”。

[0041] “双环核苷”是指包含双环糖部分的修饰核苷。包含双环糖部分的核酸一般被称为交联核酸(bridged nucleic acid、BNA)。包含双环糖部分的核苷也有时称为“交联核苷”或“BNA核苷”。图4中部分例示交联核酸。

[0042] 双环糖可以是2'位的碳原子和4'位的碳原子通过2个及以上原子交联的糖。双环糖的示例是本领域技术人员公知的。包含双环糖的核酸(BNA)或BNA核苷的1个亚组可以说明为具有通过4'-(CH₂)_p-O-2'、4'-(CH₂)_p-CH₂-2'、4'-(CH₂)_p-S-2'、4'-(CH₂)_p-OCO-2'、4'-(CH₂)_n-N(R₃)-O-(CH₂)_m-2' [式中,p,m和n分别表示1~4的整数、0~2的整数和1~3的整数;另外R₃表示氢原子、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基和单元取代基(荧光或化学发光标记分子、具有核酸切割活性的功能性基团、细胞内或核内定位信号肽等)]交联的2'位的碳原子和4'位的碳原子。进一步地,关于特定实施方案的BNA或BNA核苷,3'位的碳原子上的OR₂取代基和5'位的碳原子上的OR₁取代基中,R₁和R₂典型地为氢原子,但彼此可以相同也可以不同,进一步地,另外,可以是用于核酸合成的羟基的保护基、烷基、烯基、环烷

基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、甲硅烷基、磷酸基、被用于核酸合成的保护基保护的磷酸基、或 $P(R_4)R_5$ [这里, R_4 和 R_5 彼此可以相同也可以不同, 分别表示羟基、被用于核酸合成的保护基保护的羟基、巯基、被用于核酸合成的保护基保护的巯基、氨基、具有1~5个碳原子的烷氧基、具有1~5个碳原子的烷硫基、具有1~6个碳原子的氰基烷氧基、或被具有1~5个碳原子的烷基取代的氨基]。这样的BNA的非限定的示例可以举出亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA (LNA (Locked Nucleic Acid (注册商标)、也作为2', 4'-BNA已知) (例如, α -L-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA或 β -D-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA、亚乙氧基(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA (也作为ENA已知)、 β -D-硫代(4'-CH₂-S-2') BNA、氨基氧基(4'-CH₂-O-N(R₃)-2') BNA、氧基氨基(4'-CH₂-N(R₃)-O-2') BNA (也作2', 4'-BNA^{NC}已知; R=H为2', 4'-BNA^{NC}[N-H], R=Me为2', 4'-BNA^{NC}[N-Me])、2', 4'-BNA^{coc}、3'-氨基-2', 4'-BNA、5'-甲基BNA、(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (也作为cEt BNA已知)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2') BNA (也作为cMOE BNA已知)、酰胺基BNA、(4'-C(O)-N(R)-2') BNA (R=H、Me) (也作为AmNA已知; R=H为AmNA[N-H], R=Me为AmNA[N-Me])、胍BNA (也作为GuNA (例如、图4的R=H为GuNA[N-H], R=Me为GuNA[N-Me]) 已知)、胺BNA (也作为2'-Amino-LNA已知) (例如, 3-(Bis(3-氨基丙基)氨基)丙酰基取代物)、2'-O, 4'-C-螺环丙烯交联型核酸 (也作为scpBNA已知) 和本领域技术人员公知的其他BNA。这样的BNA核苷的非限定的示例可以举出亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA核苷 (LNA核苷、也作为2', 4'-BNA核苷已知) (例如, α -L-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA核苷、 β -D-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA核苷、亚乙氧基(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA核苷 (也作为ENA核苷已知)、 β -D-硫代(4'-CH₂-S-2') BNA核苷、氨基氧基(4'-CH₂-O-N(R₃)-2') BNA核苷、氧基氨基(4'-CH₂-N(R₃)-O-2') BNA核苷 (也作2', 4'-BNA^{NC}核苷已知; R=H为2', 4'-BNA^{NC}[N-H]核苷, R=Me为2', 4'-BNA^{NC}[N-Me]核苷)、2', 4'-BNA^{coc}核苷、3'-氨基-2', 4'-BNA核苷、5'-甲基BNA核苷、(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA核苷 (也作为cEt核苷已知)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2') BNA (也作为cMOE核苷已知)、酰胺基BNA核苷、(4'-C(O)-N(R)-2') BNA核苷 (R=H、Me) (也作为AmNA核苷已知; R=H为AmNA[N-H]核苷, R=Me为AmNA[N-Me]核苷)、胍BNA核苷 (也作为GuNA核苷 (例如、图4的R=H为GuNA[N-H]核苷, R=Me为GuNA[N-Me]核苷) 已知)、胺BNA核苷 (也作为2'-Amino-LNA核苷已知) (例如, 3-(Bis(3-氨基丙基)氨基)丙酰基取代核苷)、2'-O, 4'-C-螺环丙烯交联核苷 (也作为scpBNA核苷已知) 和本领域技术人员公知的其他BNA核苷。

[0043] 本说明书中, “阳离子核苷” 在某个pH (例如, 人的生理学的pH (约7.4)、递送部位 (例如, 细胞器、细胞、组织、器官、生物体等) 的pH等) 下, 与中性形式 (核糖核苷的中性形式) 相比, 是以阳离子形式存在的修饰核苷。阳离子核苷可以在核苷的任何位置包含1个及以上阳离子修饰基团。在一个实施方案中, 阳离子核苷是2'-Amino-LNA核苷 (例如, 3-(Bis(3-氨基丙基)氨基)丙酰基取代核苷)、氨基烷基修饰核苷 (例如, 2'-O-甲基及4'-CH₂CH₂CH₂NH₂取代核苷)、GuNA核苷 (例如, 图3的R=H为GuNA[NH]核苷, R=Me为GuNA[N-Me]核苷) 等。

[0044] 具有亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') 交联的双环核苷有时也称为LNA核苷。

[0045] 修饰糖的制备方法是本领域技术人员公知的。在具有修饰糖部分的核苷酸中, 核酸碱基部分 (天然的、修饰的或其组合) 可被维持用于与合适的核酸目标杂交。

[0046] “核苷模拟物” 包含在寡聚物化合物的1个及以上位置为了取代糖、或糖和碱基、以及并不是必须的键而使用的结构体。“寡聚物化合物” 意指可与核酸分子的至少某个区域杂交的连接了的单体亚单元的聚合物。核苷模拟物可以举出例如具有吗啉代、环己烯基、环己

基、四氢吡喃基、双环或三环糖模拟物例如非呋喃糖糖单元的核苷模拟物。“核苷酸模拟物”包含在寡聚物化合物的1个及以上位置为了取代核苷和键而使用的结构体。核苷酸模拟物可以举出例如肽核酸或吗啉代核酸(-N(H)-C(=O)-O-或其他通过非磷酸二酯键结合的吗啉代)。肽核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)是代替糖而具有N-(2-氨基乙基)甘氨酸通过酰胺键结合的主链的核苷酸模拟物。吗啉代核酸的结构的一个示例示于图5。“模拟物”是指取代糖、核酸碱基和核苷间键中的1个及以上的基团。通常,模拟物代替糖、或糖与核苷间键的组合而使用,维持核酸碱基以与所选目标杂交。

[0047] 一般地,修饰可以以使同一链中的核苷酸能够独立地受到不同的修饰的方式实施。此外,为了赋予对酶的切割的抗性,同一核苷酸可以具有修饰核苷间键(例如,硫代磷酸酯键),进一步地,具有修饰糖(例如,2'-O-甲基修饰糖或双环糖)。同一核苷酸还可以具有修饰核酸碱基(例如,5-甲基胞嘧啶),进一步地,具有修饰糖(例如,2'-O-甲基修饰糖或双环糖)。

[0048] 核酸链中的非天然核苷酸的数量、种类和位置会影响由核酸复合物提供的反义效果。修饰的选择可以根据目标基因等的序列而不同,但只要是本领域技术人员,就能够通过参照与反义法相关的文献(例如,WO 2007/143315、WO 2008/043753、以及WO 2008/049085)的说明而确定合适的实施方案。进一步地,在测定修饰后的核酸复合物所具有的反义效果时,在这样得到的测定值不明显低于修饰前的核酸复合物的测定值的情况(例如,修饰后所得到的测定值为修饰前的核酸复合物的测定值的70%及以上、80%及以上或90%及以上的情况)下,可以评价相关修饰。

[0049] 反义效果的测定,例如,可以通过将测试核酸化合物施用于受试者(例如,小鼠),并且例如在几天后(例如,2~7天后),测定通过由测试核酸化合物提供的反义效果来调节表达的目标基因的表达量或目标转录产物的水平(量)(例如,mRNA量或微小RNA等RNA量、cDNA量、蛋白质量等)来实施。

[0050] 例如,与阴性对照(例如,赋形剂(vehicle)施用)相比,在经测定的目标基因的表达量或目标转录产物的水平减少了至少10%、至少20%、至少25%、至少30%或至少40%的情况下,表明测试核酸化合物可以产生反义效果(例如,目标转录产物量的减少)。

[0051] 本说明书中,第1核酸链是间隙体(gapmer)。即,第1核酸链中的反义寡核苷酸区域是间隙体型的反义寡核苷酸区域(间隙体型反义寡核苷酸区域)。“间隙体(gapmer)型”是指由包含至少4个连续的脱氧核糖核苷的中央区域(DNA间隙区域)和包含配置于其5'末端侧和3'末端侧的非天然核苷的区域(5'翼区域和3'翼区域)组成的核苷组成。非天然核苷由交联核苷构成的间隙体特别称为“BNA/DNA间隙体”。DNA间隙区域的长度可以为13~22碱基长、16~22碱基或16~20碱基长、或者4~20碱基长、5~18碱基长、6~16碱基长、7~14碱基长或8~12碱基长。此外,间隙体中的中央区域可以含有天然核苷、核酸的糖部分未经修饰的未修饰糖(及修饰或未修饰核苷间键)或可以由其组成,例如13~22碱基长、16~22碱基或16~20碱基长、或者4~20碱基长、5~18碱基长、6~16碱基长、7~14碱基长或8~12碱基长是天然核苷、或含有未修饰糖。中央区域例如可以含有通过硫代磷酸酯键等修饰核苷间键连接的天然核苷或可以由其组成。

[0052] 5'翼区域和3'翼区域的长度独立地通常可以为1~10碱基长、1~7碱基长、2~5碱基长或2~3碱基长。5'翼区域和3'翼区域包含至少1种非天然核苷即可,也可以进一步包含

天然核苷。间隙体型反义寡核苷酸区域可以具有包括包含2或3个交联核苷的5'翼区域、包含2或3个交联核苷的3'翼区域、以及它们之间的DNA间隙区域的BNA/DNA间隙体型的核苷组成。交联核苷可以含有修饰核酸碱基(例如,5-甲基胞嘧啶)。此外,间隙体可以是“LNA/DNA间隙体”,其中交联核苷由LNA核苷构成。5'翼区域和3'翼区域可以是例如通过硫代磷酸酯键等修饰核苷间键连接的非天然核苷,例如2'-O-甲基修饰核苷。在一个实施方案中,第1核酸链的核苷包含脱氧核糖核苷或由其组成,例如,第1核酸链的核苷的70%及以上、80%及以上、90%及以上、或95%及以上是脱氧核糖核苷。

[0053] 第1核酸链中的核苷间键可以是天然存在的核苷间键和/或修饰核苷间键。

[0054] 从第1核酸链的5'末端起至少1个、至少2个或至少3个核苷间键可以是修饰核苷间键。从第1核酸链的3'末端起至少1个、至少2个或至少3个核苷间键可以是修饰核苷间键。例如,从核酸链的末端起2个核苷间键是指最接近核酸链的末端的核苷间键和与其相邻且位于与核酸链的末端的相反方向上的核苷间键。核酸链的末端区域中的修饰核苷间键因其能够抑制或阻碍核酸链的不期望的分解而优选。

[0055] 修饰核苷间键可以是第1核酸链中的反义寡核苷酸区域的核苷间键的至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少93%、至少95%、至少98%或100%。此外,修饰核苷间键可以是硫代磷酸酯键。

[0056] 第1核酸链中的核苷可以是天然核苷(包括脱氧核糖核苷、核糖核苷或两者)和/或非天然核苷。

[0057] 第2核酸链包括与第1核酸链的一部分(例如,第1核酸链的中央区域的一部分)互补的至少1个(例如,1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个)或至少2个糖未修饰中央区域(第1露出区域)。另外,在本说明书中,糖未修饰中央区域主要表述为“第1露出区域”。

[0058] 第1露出区域,相对于第1核酸链的一部分,可以完全互补,或者可以具有1个及以上错配碱基。例如,第1露出区域,相对于第1核酸链的一部分,可以具有1~3个、1~2个或1个错配碱基(非互补碱基)。

[0059] 第1露出区域由1个或通过核苷间键连接的2~3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。本说明书中,“糖未修饰核糖核苷”意指天然核糖核苷的糖部分不含糖修饰例如2'位的取代和/或任意变化的核糖核苷。第1露出区域可以包含至少1个修饰碱基和/或修饰核苷间键。

[0060] 在一个实施方案中,第1露出区域中的糖未修饰核糖核苷包含天然核糖核苷,例如所有糖未修饰核糖核苷都是天然核糖核苷,或其一部分例如1个或2个糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[0061] 在一个实施方案中,第2核酸链包括至少1个,例如1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个、或者至少2个,例如2~10个、2~5个、3~4个、2~3个或2个、或者至少3个,例如3~10个、3~5个、3~4个或3个第1露出区域。

[0062] 在一个实施方案中,第1露出区域由通过核苷间键连接的2个或3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。在一个实施方案中,第1露出区域由通过核苷间键连接的3个连续的糖未修饰核糖核苷组成。相比于由1个或2个连续的糖未修饰核糖核苷组成的第1露出区域,本实施方案可以具有将RNase H的切割活性维持在较高水平的效果。相比于由糖未修饰核糖核苷组成的中央区域,本实施方案可以具有维持/提高RNase H依赖和/或非依赖途径中的活性的效果。

[0063] 在一个实施方案中,第1露出区域包含含有修饰或未修饰的嘌呤碱基的核苷。相比于不包含含有嘌呤碱基的核苷(例如,由含有嘧啶碱基的核苷组成)的第1露出区域,本实施方案可以具有在维持由RNase H的切割活性的同时,将RNase A的切割活性抑制在较低水平的效果。相比于不包含含有嘌呤碱基的核苷(例如,由含有嘧啶碱基的核苷组成)的第1露出区域,本实施方案可以具有维持/提高RNase H依赖和/或非依赖途径中的活性的效果。

[0064] 在一个实施方案中,第2核酸链包括至少1个,例如1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个、或者至少2个,例如2~10个、2~5个、3~4个、2~3个或2个、或者至少3个,例如3~10个、3~5个、3~4个或3个防御区域。

[0065] 本说明书中的“防御区域”是指对由核酸酶的切割具有抗性的区域。这里,核酸酶没有限定。核酸酶的示例可以举出RNase A、RNase H。防御区域可以是例如对RNase A具有抗性的区域、对RNase H具有抗性的区域或对RNase A和RNase H中的任何一种具有抗性的区域。此外,对由核酸酶的切割的抗性不必是完全抗性,只要它具有同一碱基序列并且与含有未修饰核糖核苷的区域相比抗性增大即可。

[0066] 防御区域由1个或通过核苷间键连接的2个及以上的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷组成。防御区域可以包含至少1个修饰碱基和/或修饰核苷间键。防御区域的脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷优选为脱氧核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)、交联核苷(例如,LNA核苷)和/或阳离子核苷,更优选为脱氧核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)和/或交联核苷(例如,LNA核苷),进一步优选为脱氧核糖核苷和/或2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷),特别优选为脱氧核糖核苷和/或含有2'-O-甲基的核苷。防御区域的在3'侧具有修饰核苷间键的核苷的核苷优选为脱氧核糖核苷、核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)、交联核苷(例如,LNA核苷)和/或阳离子核苷,更优选为脱氧核糖核苷、核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)和/或交联核苷(例如,LNA核苷),进一步优选为脱氧核糖核苷,核糖核苷和/或2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷),还进一步优选为脱氧核糖核苷、核糖核苷和/或含有2'-O-甲基的核苷,特别优选为核糖核苷。防御区域的在3'侧具有修饰核苷间键的核苷优选为在3'侧具有硫代磷酸酯键、硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分(优选TMG部分)的核苷间键(优选式(III)所表示的部分结构)和/或包含环状胍部分的核苷间键(优选式(II)所表示的部分结构)的核苷,进一步优选在3'侧具有硫代磷酸酯键的核苷。3'侧的修饰核苷间键可以是Rp构型或Sp构型的手性控制的。另外,本说明书中,在3'侧具有修饰核苷间键的核苷意指至少在3'侧具有修饰核苷间键的核苷,在5'侧也可以具有修饰核苷间键。

[0067] 防御区域,相对于第1核酸链的一部分(例如,第1核酸链的中央区域的一部分),可以完全互补,或者可以具有1个及以上错配碱基。例如,防御区域,相对于第1核酸链的一部分,可以具有1~3个、1~2个或1个错配碱基(非互补碱基)。

[0068] 在一个实施方案中,防御区域包含含有嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。这里,嘧啶碱基可以是修饰或未修饰的。例如,防御区域中的至少1个或所有防御区域都可以包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。相比于含有嘧啶碱基的核苷包含在糖未修饰区域(例如,第1露出区域、第2露出区域)的情况,本实施方案可

以具有将RNase A对第2核酸链的切割活性抑制在较低水平的效果。相比于含有嘧啶碱基的核苷包含在糖未修饰区域(例如,第1露出区域、第2露出区域)的情况,本实施方案可以具有维持/提高RNase H依赖和/或非依赖途径中的活性的效果。

[0069] 在一个实施方案中,防御区域中的糖修饰核苷是糖修饰核糖核苷。

[0070] 在一个实施方案中,第2核酸链由第1露出区域和防御区域组成。在进一步的一个实施方案中,第2核酸链由第1露出区域与防御区域交替配置组成。在进一步的一个实施方案中,防御区域中的至少1个或所有防御区域都包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

[0071] 一方式中,第2核酸链包括与第1核酸链的一部分互补的至少1个(例如,1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个)或至少2个第2露出区域。

[0072] 第2露出区域由通过核苷间键连接的4个及以上连续的糖未修饰核糖核苷组成,第2露出区域中的糖未修饰核糖核苷含的碱基含有嘌呤碱基。这里,嘌呤碱基可以是修饰或未修饰的。构成第2露出区域的糖未修饰核糖核苷的数量例如可以是4~10个、4~9个、4~8个、4~7个、4~6个、4~5个或4个。第2露出区域可以包含至少1个修饰碱基和/或修饰核苷间键。

[0073] 第2露出区域,相对于第1核酸链的一部分(例如,第1核酸链的中央区域的一部分),可以完全互补,或者可以具有1个及以上错配碱基。例如,第2露出区域,相对于第1核酸链的一部分,可以具有1~3个、1~2个或1个错配碱基(非互补碱基)。

[0074] 在一个实施方案中,第2露出区域中的糖未修饰核糖核苷包含天然核糖核苷,例如所有糖未修饰核糖核苷都是天然核糖核苷,或其一部分例如1个或2个糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。

[0075] 在一个实施方案中,第2核酸链包括至少1个,例如1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个、或者至少2个,例如2~10个、2~5个、3~4个、2~3个或2个、或者至少3个,例如3~10个、3~5个、3~4个或3个第2露出区域。

[0076] 在一个实施方案中,第2核酸链包括第1露出区域和/或第2露出区域合计至少1个,例如1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个、或者至少2个,例如2~10个、2~5个、3~4个、2~3个或2个、或者至少3个,例如3~10个、3~5个、3~4个或3个。

[0077] 在一个实施方案中,第2核酸链由第1露出区域、第2露出区域和防御区域组成。在进一步的一个实施方案中,第2核酸链由第1露出区域或第2露出区域与防御区域交替配置组成。在进一步的一个实施方案中,防御区域中的至少1个或所有防御区域都包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

[0078] 在一个实施方案中,第2核酸链由第2露出区域和防御区域组成。在进一步的一个实施方案中,第2核酸链由第2露出区域与防御区域交替配置组成。在进一步的一个实施方案中,防御区域中的至少1个或所有防御区域都包含含有修饰或未修饰的嘧啶碱基的(a)脱氧核糖核苷、(b)糖修饰核苷和/或(c)在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。

[0079] 在一个实施方案中,第2核酸链的至少1个防御区域在5'末端和3'末端通过核苷间键与第1露出区域和/或第2露出区域连接。

[0080] 在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域包含:至少1个(例如1个或2

个)修饰核苷间键,例如硫代磷酸酯键,例如R_p构型或S_p构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个C_{1~6}的烷基取代的胍部分(例如,TMG部分)的核苷间键(例如,式(III)所表示的部分结构)和/或包含环状胍部分的核苷间键(例如,式(II)所表示的部分结构)。

[0081] 在一个实施方案中,第2核酸链包括通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)所述第1露出区域和/或(2)所述第2露出区域、以及(3)(a)脱氧核糖核苷和/或(b)糖修饰核苷,例如糖修饰核糖核苷,或由其组成。

[0082] 在一个实施方案中,第2核酸链在5'末端和/或3'末端进一步包括以下糖未修饰末端区域。在一个实施方案中,5'末端和/或3'末端的糖未修饰末端区域的长度独立地通常为1~10碱基长、1~7碱基长、2~5碱基长或2~3碱基长。在一个实施方案中,第2核酸链包括通过修饰或未修饰的核苷间键连接的所述第1露出区域和/或第2露出区域、以及糖修饰核糖核苷(和任意糖未修饰末端区域),或由其组成。

[0083] 在一个实施方案中,第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个(例如,1~6个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个)或至少2个糖未修饰核糖核苷的糖未修饰末端区域。由于糖修饰量越大,核酸复合物的毒性就越高,因此通过使末端区域成为糖未修饰,可以减少第2核酸链中的糖修饰核酸的数量,从而降低毒性。糖未修饰末端区域可以包含修饰碱基和/或修饰核苷间键。在一个实施方案中,糖未修饰末端区域与第1核酸链的一部分(例如,第1核酸链的5'翼区域、中央区域、3'翼区域或其中任何一部分)互补。糖未修饰末端区域,相对于第1核酸链的一部分,可以完全互补,或者可以具有1个及以上错配碱基。例如,第2露出区域,相对于第1核酸链的一部分,可以具有1~3个、1~2个或1个错配碱基(非互补碱基)。在一个实施方案中,糖未修饰末端区域中的糖未修饰核糖核苷包含天然核糖核苷,例如所有糖未修饰核糖核苷都是天然核糖核苷,或其一部分例如1~5个、1~4个、1~3个、或者1个或2个糖未修饰核糖核苷是天然核糖核苷。在一个实施方案中,糖未修饰末端区域包含含有修饰或未修饰的嘌呤碱基和/或修饰或未修饰的嘧啶碱基的核苷。在一个实施方案中,糖未修饰末端区域包含含有修饰或未修饰的嘌呤碱基的核苷。

[0084] 在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)至少1个第1露出区域和/或至少1个第2露出区域、(2)至少1个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~10个第1露出区域和/或1~10个第2露出区域、(2)1~10个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~5个第1露出区域和/或1~5个第2露出区域、(2)1~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~3个第1露出区域和/或1~3个第2露出区域、(2)1~3个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~10个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~10个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~6个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~6个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~5个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区

域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 2~4个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 2~4个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 2~3个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 2~3个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~10个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~10个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~6个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~6个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~5个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~5个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~4个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~4个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在本实施方案中,在第2核酸链交替配置有(a)第1露出区域或第2露出区域和(b)防御区域。

[0085] 在一个实施方案中,第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷的糖修饰末端区域。在一个实施方案中,第2核酸链在5'末端和/或3'末端包括包含至少1个脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷的糖修饰末端区域。

在一个实施方案中,糖修饰末端区域与第1核酸链的一部分(例如,第1核酸链的5'翼区域、中央区域、3'翼区域或其中任何一部分)互补。糖修饰末端区域,相对于第1核酸链的一部分,可以完全互补,或者可以具有1个及以上错配碱基。例如,第2露出区域,相对于第1核酸链的一部分,可以具有1~3个、1~2个或1个错配碱基(非互补碱基)。在一个实施方案中,糖修饰末端区域包含含有嘧啶碱基的脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。这里,嘧啶碱基可以是修饰或未修饰的。在一个实施方案中,糖修饰末端区域包含含有嘌呤碱基的脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷。在一个实施方案中,糖修饰末端区域包含含有嘌呤碱基的脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷。

这里,嘌呤碱基可以是修饰或未修饰的。

[0086] 在一个实施方案中,第2核酸链包括通过修饰或未修饰的核苷间键连接的所述第1露出区域、第2露出区域、防御区域和/或糖修饰末端区域,或由其组成。在一个实施方案中,5'末端和/或3'末端的糖修饰末端区域的长度独立地通常为1~10碱基长、1~7碱基长、2~5碱基长或2~3碱基长。

[0087] 在一个实施方案中,糖修饰末端区域,所有核苷都是脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷(优选所有核苷都是脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷)、或其一部分例如1个、1~2个、1~3个、1~4个、1~5个、1~6个或1~7个是脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷(优选所有核苷都是脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷)。在一个实施方案中,糖修饰末端区域中的核苷中,以任意比例包含脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷(优选所有核苷都是脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷)。例如,10%及以上、30%及以上、50%及以上、70%及以上、80%及

以上、90%及以上是脱氧核糖核苷、糖修饰核苷和/或在3'侧具有修饰核苷间键的核苷(优选所有核苷都是脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷)。脱氧核糖核苷和/或糖修饰核苷优选为脱氧核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)、交联核苷(例如,LNA核苷)和/或阳离子核苷,更优选为脱氧核糖核苷、2'-糖修饰核苷(例如,含有2'-O-甲基的核苷)和/或交联核苷(例如,LNA核苷),进一步优选为脱氧核糖核苷、含有2'-O-甲基的核苷和/或LNA核苷,还进一步优选为脱氧核糖核苷和/或LNA核苷,特别优选为LNA核苷。在3'侧具有修饰核苷间键的核苷优选是在3'侧具有硫代磷酸酯键的核苷。

[0088] 在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)至少1个第1露出区域和/或至少1个第2露出区域、(2)至少1个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~10个第1露出区域和/或1~10个第2露出区域、(2)1~10个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~5个第1露出区域和/或1~5个第2露出区域、(2)1~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~4个第1露出区域和/或1~4个第2露出区域、(2)1~4个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)1~3个第1露出区域和/或1~3个第2露出区域、(2)1~3个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~5个第1露出区域和/或1~5个第2露出区域、(2)2~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~4个第1露出区域和/或1~4个第2露出区域、(2)2~4个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~3个第1露出区域和/或1~3个第2露出区域、(2)2~3个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)3~5个第1露出区域和/或1~5个第2露出区域、(2)3~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)3~4个第1露出区域和/或1~4个第2露出区域、(2)3~4个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~10个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~10个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~6个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~6个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~5个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~5个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~4个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~4个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1)2~3个第1露出区域和/或第2露出区域、(2)2~3个防御区域、以及(3)5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个

实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~10个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~10个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~6个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~6个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~5个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~5个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在一个实施方案中,第2核酸链由通过修饰或未修饰的核苷间键连接的(1) 3~4个第1露出区域和/或第2露出区域、(2) 3~4个防御区域、以及(3) 5'末端和3'末端的糖未修饰末端区域组成。在本实施方案中,在第2核酸链交替配置有(a)第1露出区域或第2露出区域和(b)防御区域。

[0089] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链的修饰核苷间键在某个pH(例如,人的生理学的pH(约7.4)、递送部位(例如,细胞器、细胞、组织、器官、生物体等)的pH等)下,该修饰核苷间键,与阴离子形式(例如, $-O-P(0)(O^-)-O-$ (天然磷酸键的阴离子形式)、 $-O-P(0)(S^-)-O-$ (硫代磷酸酯键的阴离子形式)等)相比,包括以中性形式或阳离子形式存在的不带负电荷的(分别是中性或阳离子性的)核苷间键。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链的修饰核苷间键包含中性的核苷间键。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链的修饰核苷间键包含阳离子性的核苷间键。在一个实施方案中,不带负电荷的核苷间键(例如,中性的核苷间键)在呈中性形式时,没有 pK_a 小于8、小于9、小于10、小于11、小于12、小于13或小于14的部分。在一个实施方案中,不带负电荷的核苷间键是例如,美国专利登记编号5,264,423和5,286,717中描述的甲基膦酸酯键、美国专利登记编号5,955,599中描述的甲基磷酸三酯键、乙基磷酸三酯键、国际公开第2015/168172号中描述的甲氧基丙基膦酸酯键、国际公开第2016/081600号中描述的自中和核酸(ZON)中使用的核苷间键等。在一个实施方案中,不带负电荷的核苷间键包含三唑部分或炔部分。在一个实施方案中,不带负电荷的核苷间键包含环状胍部分和/或被1~4个 C_{1-6} 的烷基取代的胍部分(优选TMG部分)。在一个实施方案中,包含环状胍部分的修饰核苷间键具有式(II)所表示的部分结构。在一个实施方案中,被1~4个 C_{1-6} 的烷基取代的胍部分具有式(III)所表示的部分结构。在一个实施方案中,包含环状胍部分和/或被1~4个 C_{1-6} 的烷基取代的胍部分的中性的核苷间键是手性控制的。在一个实施方案中,本公开涉及一种组合物,该组合物包含含有至少1个中性的核苷间键以及至少1个硫代磷酸酯核苷间键的寡核苷酸。尽管不希望受到任何特定理论的束缚,但在至少一些情况下,中性的核苷酸间键,与不包含中性的核苷酸间键的同等的核酸相比,能够改善特性和/或活性,例如,改善递送、改善对核酸外切酶和内切酶的抗性、改善细胞摄取、改善核内体逸出和/或改善核摄取等。

[0090] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个修饰核苷间键。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多修饰核苷间键。

[0091] 在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰

末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含1个、1~2个、1~3个、1~4个、1~5个、1~6个、1~7个、1~8个、1~9个、1~10个、1~11个、1~12个、1~13个、1~14个、1~15个、1~16个、1~17个、1~18个、1~19个、1~20个、1~21个、1~22个修饰核苷间键。在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多修饰核苷间键。

[0092] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个手性控制的核苷间键。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多手性控制的核苷间键。

[0093] 在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含1个、1~2个、1~3个、1~4个、1~5个、1~6个、1~7个、1~8个、1~9个、1~10个、1~11个、1~12个、1~13个、1~14个、1~15个、1~16个、1~17个、1~18个、1~19个、1~20个、1~21个、1~22个手性控制的核苷间键。在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多手性控制的核苷间键。

[0094] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个不带负电荷的核苷间键(优选中性的核苷间键)。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多不带负电荷的核苷间键。

[0095] 在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含1个、1~2个、1~3个、1~4个、1~5个、1~6个、1~7个、1~8个、1~9个、1~10个、1~11个、1~12个、1~13个、1~14个、1~15个、1~16个、1~17个、1~18个、1~19个、1~20个、1~21个、1~22个不带负电荷的核苷间键(优选中性的核苷间键)。在一个实施方案中,第2核酸链的第1露出区域、第2露出区域、防御区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域可以分别包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多不带负电荷的核苷间键。

[0096] 在一个实施方案中,第2核酸链中的任何上述区域(第1露出区域、防御区域、第2露出区域、糖未修饰末端区域和/或糖修饰末端区域),在该区域内部或相邻的2个区域之间,包含:至少1个(例如1个或2个)修饰核苷间键,例如硫代磷酸酯键, R_p 构型或 S_p 构型的手性控制的硫代磷酸酯键、包含被1~4个 C_{1-6} 的烷基取代的胍部分(例如, TMG部分)的核苷间键(例如, 式 (III) 所表示的部分结构)、包含 R_p 构型或 S_p 构型的手性控制的被1~4个 C_{1-6} 的烷基取代的胍部分(例如, TMG部分)的核苷间键(例如, 式 (III) 所表示的部分结构)、包含环状

胍部分的核苷间键(例如,式(II)所表示的部分结构)和/或包含Rp构型或Sp构型的手性控制的环状胍部分的核苷间键(例如,式(II)所表示的部分结构)。

[0097] 从第2核酸链的5'末端起至少1个、至少2个或至少3个核苷间键可以是修饰核苷间键。从第2核酸链的3'末端起至少1个、至少2个或至少3个核苷间键可以是修饰核苷间键,可以是修饰核苷间键,例如硫代磷酸酯键、包含被1~4个C₁₋₆的烷基取代的胍部分(例如,TMG部分)的核苷间键(例如,式(III)所表示的部分结构)和/或包含环状胍部分的核苷间键(例如,式(II)所表示的部分结构)。修饰核苷间键可以是Rp构型或Sp构型的手性控制的。

[0098] 第2核酸链可以不包括除第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)以外的糖未修饰区域。即,第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)以外的区域中的核酸的糖是修饰糖,例如2'-修饰糖。

[0099] 在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)以外的区域中的碱基包括修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基,或其一部分例如1~20个、1~15个、1~10个、1~5个、1~2个或1个是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。修饰和/或未修饰的嘧啶碱基优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶和/或2-硫代胸腺嘧啶,进一步优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶和/或5-甲基胞嘧啶,特别优选为胞嘧啶。

[0100] 在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)以外的区域中的碱基中,以任意比例包含修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。例如,10%及以上、30%及以上、50%及以上、70%及以上、80%及以上、90%及以上是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。修饰和/或未修饰的嘧啶碱基优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶和/或2-硫代胸腺嘧啶,进一步优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶和/或5-甲基胞嘧啶,特别优选为胞嘧啶。

[0101] 在一个实施方案中,第1露出区域中的碱基包括嘌呤碱基,例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基,或其一部分例如1个或2个碱基是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。这是由于RNase A切割了修饰和/或未修饰的嘧啶碱基的3'侧的磷酸二酯键,因此如果第1露出区域中的碱基是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基,则该部分可以被RNase A切割。因此,第1露出区域中的碱基可以通过包含修饰和/或未修饰的嘌呤碱基来减少由RNase A的不期望的分解。第1露出区域中的碱基不包括例如作为修饰和/或未修饰的嘧啶碱基的C、UC和UU中的任何一个,例如3个序列中的任何一个。

[0102] 在一个实施方案中,第1露出区域中的碱基包括修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基,或其一部分例如1~3个、1~2个或1个是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。在一个实施方案中,第2露出区域中的碱基包括修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基,或其一部分例如1~7个、1~6个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个是修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域中的碱基中,以任意比例包含修饰和/或未修饰的嘌呤碱基。例如,10%及以上、30%及以上、50%及以上、70%及以上、80%及以上、90%及以上是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。修饰和/或未修饰的嘌呤碱基优选为腺嘌呤、鸟嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、N2-甲基鸟嘌呤和/或8-溴鸟嘌呤,进一步优选为腺嘌呤。

呤和/或鸟嘌呤。

[0103] 在一个实施方案中,第2核酸链包含含有修饰和/或未修饰的嘧啶碱基的糖修饰核苷和/或脱氧核糖核苷。例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基,或其一部分例如1~20个、1~15个、1~10个、1~5个、1~2个或1个是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。在一个实施方案中,第2核酸链以任意比例包含含有修饰和/或未修饰的嘧啶碱基的糖修饰核苷和/或脱氧核糖核苷。例如,第2核酸链的10%及以上、30%及以上、50%及以上、70%及以上、80%及以上、90%及以上是嘧啶碱基。经糖修饰的嘧啶碱基优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶和/或2-硫代胸腺嘧啶,进一步优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶和/或5-甲基胞嘧啶,特别优选为胞嘧啶。

[0104] 在一个实施方案中,第2核酸链的防御区域包含修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。例如,所有碱基都是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基,或其一部分例如1~20个、1~15个、1~10个、1~5个、1~2个或1个是修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。在一个实施方案中,第2核酸链的防御区域包含修饰和/或未修饰的嘧啶碱基。例如,第2核酸链的10%及以上、30%及以上、50%及以上、70%及以上、80%及以上、90%及以上是嘧啶碱基。经糖修饰的嘧啶碱基优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶和/或2-硫代胸腺嘧啶,进一步优选为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶和/或5-甲基胞嘧啶,特别优选为胞嘧啶。

[0105] 第2核酸链中的第1露出区域和/或第2露出区域的位置没有限定。在一个实施方案中,至少1个,例如所有第1露出区域和/或第2露出区域都相较于第2核酸链的中央位于3'侧。这里,“第1露出区域和/或第2露出区域都相较于第2核酸链的中央位于3'侧”包括第1露出区域和/或第2露出区域的中央、5'末端或3'末端相较于第2核酸链的中央位于3'侧。

[0106] 在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)可以被RNase H切割。关于是否被RNase H切割,例如可以通过使核酸链与RNase H反应并进行电泳以测定未分解条带的浓度来确定,其细节如实施例所述。如果考虑到RNase H的切割活性需要至少4个连续的天然核糖核苷的现有技术常识(例如,请参照FEBS J 2008;276(6):1494-505的图3),由1个或通过核苷间键连接的2个或3个连续的糖未修饰核糖核苷组成的第1露出区域可以被RNase H切割是令人惊讶的。在一个实施方案中,第1露出区域和/或第2露出区域(以及糖未修饰末端区域,如果存在的话)可以在RNase H依赖和/或非依赖途径中具有活性。

[0107] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链可以全部或部分含有阳离子核苷。在一个实施方案中,阳离子核苷是包含2'-Amino-LNA核苷(例如,3-(Bis(3-氨基丙基)氨基)丙酰基取代核苷)、氨基烷基修饰核苷(例如,2'-O-甲基及4'-CH₂CH₂CH₂NH₂取代核苷)、GuNA核苷(例如,图4的R=H为GuNA[NH]核苷,R=Me为GuNA[N-Me]核苷)等的核苷。

[0108] 在一个实施方案中,第2核酸链可以与功能性部分结合。第2核酸链与功能性部分的结合可以是直接结合,也可以是介由其他物质的间接结合,但在某些实施方案中,优选第2核酸链与功能性部分通过共价键、离子键、氢键等直接结合,从获得更稳定的结合的观点来看,更优选共价键。

[0109] 在某些实施方案中,“功能性部分”的结构没有特别限制,并且其所结合的双链核酸复合物被赋予所期望的功能。所期望的功能可以举出标记功能、纯化功能和向目标的递

送功能。赋予标记功能的部分的示例可以举出荧光蛋白质、荧光素酶等化合物。赋予纯化功能的部分的示例可以举出生物素、抗生物素蛋白、His标签肽、GST标签肽、FLAG标签肽等化合物。此外,在一个实施方案中,从将第1核酸链高特异性效率地递送至目标部位,并且该核酸非常有效地抑制目标基因的表达的观点来看,与第2核酸链结合的功能性部分,优选具有使某些实施方案中的双链核酸复合物递送到目标部位的活性的分子。赋予向目标的递送功能的部分的示例可以举出脂质、抗体、适体、特定受体的配体等。在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)与功能性部分结合。

[0110] 在一个实施方案中,第1核酸链和/或第2核酸链与脂质结合。脂质可以举出生育酚、胆固醇、脂肪酸、磷脂及其类似物;叶酸、维生素C、维生素B1、维生素B2;雌二醇、雄甾烷及其类似物;类固醇及其类似物;LDLR、SRBI或LRP1/2的配体;FK-506、环孢素;PCT/JP2019/12077、PCT/JP2019/10392和PCT/JP2020/035117中描述的脂质等,但不限于这些。

[0111] 本说明书中的“类似物(analog)”是指具有基本骨格或类似的基本骨架、具有类似的结构和性质的化合物。类似物包括例如生物合成中间体、代谢产物、具有取代基的化合物等。只要是本领域技术人员,就能够判定一种化合物是否是另一种化合物的类似物。

[0112] 生育酚可选自 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚组成的组。生育酚的类似物的可以举出生育酚的各种不饱和类似物,例如 α -三烯生育酚、 β -三烯生育酚、 γ -三烯生育酚和 δ -三烯生育酚等。优选生育酚为 α -生育酚。

[0113] 胆固醇的类似物是指作为具有固醇骨架的醇的各种胆固醇代谢产物和类似物等,虽然没有限定,但包括胆甾醇、羊毛固醇、脑甾醇、脱氢胆固醇、和粪固醇等。

[0114] 脂质可连接至第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的5'末端或3'末端或两端。或者,脂质可连接至第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的内部的核苷酸。第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)含有2种及以上脂质,其可连接至第2核酸链的多个位置和/或作为一组连接至第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的1个位置。脂质可分别一个一个地连接至第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的5'末端或3'末端(优选连接至5'末端)。

[0115] 第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)与脂质的之间的结合可以是直接结合,也可以是介由其他物质的间接结合。然而,在特定实施方案中,脂质优选介由共价键、离子键、氢键等直接结合于第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链),并且从能够获得更稳定的结合这点来看,更优选共价键。

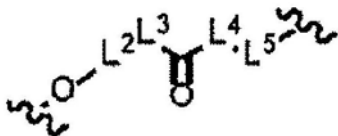
[0116] 脂质还可以介由可切割的连接基(接头)结合于第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)。“可切割的连接基(接头)”意指在生理学的条件下例如在细胞内或动物体内(例如,人体内)被切割的连接基。在特定实施方案中,可切割的接头被核酸酶等内源性酶选择性地切割。可切割的接头可以举出酰胺、酯、磷酸二酯的一方或者两方的酯、磷酸酯、氨基甲酸酯和二硫键、以及天然DNA接头。

[0117] 脂质可介由不可切割(uncleavable)的接头结合于第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)。“不可切割的接头”意指在生理学的条件下例如在细胞内或动物体内(例如,人体内)不被切割的连接基。不可切割的接头可以举出由硫代磷酸酯键和通过硫代磷酸酯键连接的修饰或未修饰的脱氧核糖核苷或者修饰或未修饰的核糖核苷组成的接头等。在接头是DNA等核酸或寡核苷酸的情况下,链长没有限定,通常可以为2~20碱基长、3~10碱基

长或4~6碱基长。

[0118] 作为接头的具体示例,可以举出下式(I)所表示的接头。

[0119] 【化5】



(I)

(式中, L^2 表示被取代或未被取代的 $C_1 \sim C_{12}$ 的烷基(例如,丙烯、己烯、十二碳烯)、被取代或未被取代的 $C_3 \sim C_8$ 的亚环烷基(例如,亚环己基)、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 或 $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$; L^3 表示-NH-或键; L^4 表示被取代或未被取代的 $C_1 \sim C_{12}$ 的烷基(例如,乙烯、戊二烯、庚烯、十二碳烯)、被取代或未被取代的 $C_3 \sim C_8$ 的亚环烷基(例如,亚环己基)、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 或键、这里,m表示1~25的整数; L^5 表示-NH- $(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 或键(这里,该取代优选卤素原子进行取代)。

[0120] 在一个实施方案中,式(I)所表示的接头,其中 L^2 是被取代或未被取代的 $C_3 \sim C_6$ 的烷基(例如,丙烯、己烯)、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 或 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$; L^3 是-NH-; L^4 和 L^5 是键。

[0121] 功能性部分的第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的结合位置和结合的种类如关于脂质与第1核酸链和/或第2核酸链(优选第2核酸链)的结合在上面所描述的那样。

[0122] 只要是本领域技术人员,就能够适当选择公知的方法来制造构成核酸复合物的第1核酸链和第2核酸链。例如,核酸可以通过以下方法来制造:基于目标转录产物的碱基序列(或者,在一些示例中,目标基因的碱基序列)的信息设计核酸的各个碱基序列,通过使用市售的自动核酸合成装置(应用生物系统公司(Applied Biosystems, Inc.)的产品、贝克曼库尔特有限公司(Beckman Coulter, Inc.)的产品等)来合成核酸,然后,使用反相柱等对所得的寡核苷酸进行纯化。将通过该方法制造的核酸在适当的缓冲溶液中混合,在约 $90^\circ\text{C} \sim 98^\circ\text{C}$ 使其变性数分钟(例如5分钟),然后使核酸在约 $30^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ 退火约1~8小时,如此可以制造核酸复合物。退火的核酸复合物的制作不限于这样的时间和温度方案。适合的促进链的退火的条件在本领域中是众所周知的。结合功能性部分的核酸复合物可以使用预先结合了功能性部分的核酸种,通过实施上述的合成、纯化及退火来制造,也可以使功能性部分随后与核酸结合。用于将功能性部分连接至核酸的多种方法在本领域中是周知的。或者,可以通过指定碱基序列和修饰部位或种类向制造商(例如, GeneDesign Inc.)订购、获得核酸链。

[0123] <组合物>

一方式中,本发明涉及包含上述核酸复合物的、用于通过反义效果抑制目标基因的表达或目标转录产物的组合物。本组合物可以是药物组合物。本组合物,在受试者中,可以治疗、预防神经疾病、中枢神经系统疾病、代谢性疾病、肿瘤、感染等目标基因的表达亢进伴随的疾病。

[0124] 受试者可以是动物,包括人。但对除人以外的动物没有特别限定,各种各样的家畜、家禽、宠物、实验动物等都可以成为受试者。

本组合物可以通过公知的药理学方法来配制。例如,本组合物可以以胶囊、片剂、丸剂、液体制剂、散剂、颗粒剂、细颗粒剂、薄膜包衣剂、小丸剂(pellet)、锭剂、舌下剂、胶溶剂(peptizer)、含服制剂、糊剂、糖浆剂、悬浮剂、酏剂、乳剂、包衣剂、软膏、硬膏剂(plaster)、泥罨剂(cataplasma)、透皮制剂、洗剂、吸入剂、气雾剂、滴眼剂、注射剂和栓剂的形式经口或胃肠外使用。

[0125] 关于这些制剂的配制,可适当地掺入药学上可接受的载体或溶剂或作为食品和饮料的可接受载体或溶剂。这样的载体或溶剂具体地可以举出无菌水、生理盐水、植物性油、基剂、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、pH调节剂、稳定剂、香味料、香料、赋形剂(excipient)、赋形剂(vehicle)、防腐剂、粘结剂、稀释剂、等渗剂、镇静剂、增量剂、崩解剂、缓冲剂、涂抹剂、润滑剂、着色剂、甜味剂、增稠剂、矫味剂、助溶剂和其他添加剂。

[0126] 可以根据受试者的年龄,体重,症状和健康状况、剂型等适当地选择本组合物的施用量。然而,本组合物的用量可以是核酸复合物0.0000001mg/kg/天~1000000mg/kg/天、0.00001mg/kg/天~10000mg/kg/天或0.001mg/kg/天~500mg/kg/天。组合物可以单次施用,也可以多次施用。在多次施用的情况下,可以每天或者以适当的时间间隔(例如以1天、2天、3天、1周、2周、1个月的间隔)施用例如2~20次等。上述的核酸复合物的1次的施用量可以为例如,0.001mg/kg及以上、0.005mg/kg及以上、0.01mg/kg及以上、0.025mg/kg及以上、0.1mg/kg及以上、0.5mg/kg及以上、1mg/kg及以上、2.5mg/kg及以上、0.5mg/kg及以上、1.0mg/kg及以上、2.0mg/kg及以上、3.0mg/kg及以上、4.0mg/kg及以上、5mg/kg及以上、10mg/kg及以上、20mg/kg及以上、30mg/kg及以上、40mg/kg及以上、50mg/kg及以上、75mg/kg及以上、100mg/kg及以上、150mg/kg及以上、200mg/kg及以上、300mg/kg及以上、400mg/kg及以上或500mg/kg及以上,例如,可以适当选择0.001mg/kg~500mg/kg的范围所包含的任意的量(例如,0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg或200mg/kg)。

[0127] 本发明的核酸复合物可以以0.01~10mg/kg(例如约6.25mg/kg)的用量以每周2次的频率施用4次。此外,核酸复合物可以以0.05~30mg/kg(例如约25mg/kg)的用量以每周1至2次的频率施用2~4次,例如每周2次的频率施用2次。通过采用这样的施用方案(分次施用),与更高用量的单次施用相比,可以降低毒性,减轻受试者的负担。在一个实施方案中,本发明的核酸复合物通过皮下施用,与静脉内施用相比,可以降低毒性,减轻受试者的负担。

[0128] 在特定实施方案中,本发明的核酸复合物对水、日本药典溶出试验第2液或日本药典崩解试验第2液的溶解性优异、体内动态(例如,血中药物半衰期、脑内迁移、代谢稳定性、CYP阻害)优异、毒性低(例如,从急性毒性、慢性毒性、遗传毒性、生殖毒性、心毒性、药物相互作用、癌源性、光毒性等方面来看,更适合作为药物),且还具有副作用少(例如,抑制过静,避免层状坏死)等作为药物产品的出色性能。

[0129] 本说明书中,对组合物的优选施用形式没有特别限定。例如,可以经口施用或胃肠外施用。胃肠外施用的具体例可以举出静脉内施用、动脉内施用、腹腔内施用、皮下施用、皮内施用、气管/支气管施用、直肠施用、鞘内施用、脑室内施用、经鼻施用和肌肉施用、以及通过输血施用。也可以通过肌肉内注射施用、静脉内滴注施用或埋入型持续皮下施用来进行施用。皮下施用可由患者自己自行注射,因此是合适的。此外,在静脉内施用的情况下,组合

物1次的施用量中所包含的核酸复合物的量,即核酸复合物的单次施用量可以是例如,0.001mg/kg及以上、0.005mg/kg及以上、0.01mg/kg及以上、0.025mg/kg及以上、0.1mg/kg及以上、0.5mg/kg及以上、1mg/kg及以上、2.5mg/kg及以上、5mg/kg及以上、10mg/kg及以上、20mg/kg及以上、30mg/kg及以上、40mg/kg及以上、50mg/kg及以上、75mg/kg及以上、100mg/kg及以上、150mg/kg及以上、200mg/kg及以上、300mg/kg及以上、400mg/kg及以上或500mg/kg及以上。例如,可以适当选择0.001mg/kg~500mg/kg的范围所包含的任意的量(例如,0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg或200mg/kg)。

[0130] 一方式中,提供了一种疾病的治疗和/或预防方法,该方法包括向受试者施用上述核酸复合物或组合物。

实施例

[0131] 以下,使用实施例进一步对本发明进行具体说明。然而,本发明的技术范围不限于这些实施例。

[0132] [实施例1:RNase H/A对包含含有连续3糖未修饰核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物的切割活性]

用RNase A或RNase H对包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和与胆固醇结合的、含有连续3糖未修饰核糖核苷的互补链(第2核酸链)的双链核酸复合物进行处理,研究了其切割效率。另外,第2核酸链与胆固醇通过与国际公开第2018/056442号中所示的chol#1-cRNA (DNA) (mMalat1) 相同的5'末端结构结合。

[0133] (核酸剂的制备)

制备了以malat1非编码RNA作为目标的16mer的单链LNA/DNA间隙体(ASO (mMalat1) 1) (第1核酸链)。该LNA/DNA间隙体是含有5'末端的3个和3'末端的3个LNA核苷以及它们之间的10个DNA核苷的16碱基长的寡核苷酸。该LNA/DNA间隙体具有与小鼠的malat1非编码RNA(序列编号1)的1317~1332位互补的碱基序列。

[0134] 准备了具有与该ASO互补的碱基序列并在5'末端与胆固醇共价结合的互补的RNA链(Chol-cRNA (mMalat1)) (第2核酸链)。第2链是含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷、它们之间的7个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及改变了位置的3个连续的糖未修饰核糖核苷的16碱基长的寡核苷酸。预备了含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及它们之间的10个糖未修饰核糖核苷的互补链(Chol-cRNA)、以及16个核酸部分都是2'-O-甲基修饰核糖核苷的互补链(Chol-cRNA full OMe)作为对照。

[0135] 通过使上述ASO与第2核酸链退火制备双链核酸剂。具体地,将其溶解于PBS后,以等摩尔量混合,将溶液在98℃加热5分钟,然后冷却至37℃并保持1小时,由此对核酸链进行退火,制备上述双链核酸剂。

[0136] 实施例1中使用的寡核苷酸的序列、化学修饰和结构在表1和图6中示出。所有寡核苷酸均由GeneDesign Inc. (日本,大阪)制造。

[0137] 【表1】

寡核苷酸名	序列(5'-3')	序列编号
ASO (mMalat1)	5 (L) *T (L) *A (L) *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a*T (L) *G (L) *5 (L)	3
Chol-cRNA full OMe	Chol-G*C*A*UUCAGUGAAC*U*A*G	4

Chol-cRNA	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	5
Chol-cRNA 3windows-1	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	6
Chol-cRNA 3windows-2	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	7
Chol-cRNA 3windows-3	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	8
Chol-cRNA 3windows-4	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	9
Chol-cRNA 3windows-5	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	10
Chol-cRNA 3windows-6	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	11
Chol-cRNA 3windows-7	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	12
Chol-cRNA 3windows-8	Chol-G* <u>C</u> *A*UUCAGUGAAC* <u>U</u> * <u>A</u> * <u>G</u>	13

大写字母(L):LNA (5 (L) 表示5-甲基胞嘧啶LNA) 小写字母:DNA 大写字母:RNA

大写字母(下划线):2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键

Chol:胆固醇

[0138] (切割实验)

准备根据上述退火的双链核酸10μM5μL。

还预备下述酶。

Ribonuclease H(RNase H) (60U/μl:TAKARA BIO INC)

RNase A (7000U/ml (100mg/ml):Qiagen)

为RNase H预备了下述Buffer(均为最终浓度)。

60mMTris-HCl (pH7.8)

60mMKCl

2.5mMMgCl₂

2mMTCEP

Buffer制备后,对于核酸10μM 5μL,使5U或10U Ribonuclease H与之反应。

[0139] 关于RNase A,使用了Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(不含Ca、Mg) (Nacalai Tesque)。

Buffer中,对于核酸10μM 5μL,使0.035U RNase A与之反应。

[0140] 在上述反应条件下,在PCR设备(LifeECO:热循环仪)中,用37℃20分钟PCR使酶反应。然后,在液氮中停止酶促反应。

[0141] (电泳/分析)

预备、制作20%丙烯酰胺凝胶(1×TBE)。使酶促反应产物中6X Gel Loading Dye, Purple(New England Biolab)混合,在上述凝胶上以150V进行电泳2小时。作为对照的ASO单独同时进行电泳。然后,用1×TBE将GelRed(×10000)水溶液(Biotium)稀释至1/10000的浓度来制作溶液。凝胶用该溶液渗透10分钟。然后,用ChemiDoc Touch成像系统(BioRad公司)对凝胶进行拍照。在Image Lab Version 5.2 build 14(BioRad公司)中分析条带的浓度。

[0142] (结果)

ASO单独、ASO与Chol-cRNA (mMalat1)的双链复合物(Chol-HDO),ASO与Chol-cRNA (mMalat1) full OMe的双链复合物(Chol-HDO with full OMe cRNA)的被RNase H和/或RNase A切割后的电泳结果在图7中示出。此外,示出了基于电泳结果的未分解条带的浓度相对于未处理的相对强度水平(%)的图表在图8中示出。如图7和图8所示,第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是糖未修饰核糖核苷的这一者(Chol-HDO),即使

在使用RNase H/A的任何一种的情况下,互补链也被切割。与此相对,第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是2'-O-甲基修饰核糖核苷的这一者(Chol-HDO with full OMe cRNA),即使在使用RNase H/A的任何一种的情况下,互补链也没有被切割。这些结果表明,Chol-HDO可以由于在体内的分解而降低活性,而Chol-HDO with full OMe cRNA的分解抗性太高,从而可以减少基于RNase H依赖性途径的活性。

[0143] 关于含有与第1核酸链的间隙区域的一部分互补的3个连续的糖未修饰核糖核苷的双链核酸剂,改变3个连续的糖未修饰核糖核苷的位置,并进行同样的试验,同样地以相对于未处理的相对强度水平(%)表示未分解条带的浓度的图表在图9中示出。另外,3windows-1~8表示表1所示的Chol-cRNA 3windows-1~8的每一个与ASO的复合物的结果。在包含含有3个连续的糖未修饰核糖核苷的第2核酸链的复合物中,在第2核酸链中,在C/U少的3'侧有3连续糖未修饰核糖核苷的情况(3windows 4-8)下,RNase A抗性强,在C/U多的5'侧有3连续糖未修饰核糖核苷的情况(3windows 1-3)下,RNase A抗性低。从这些结果来看,RNase A抗性被认为与3连续糖未修饰核糖核苷是否包括C/U相关联,其结果也符合RNase A切割作为嘧啶碱基的C/U的3'侧的PO键的事实。与此相对,RNase H的情况为当在第2核酸链的3'侧有3连续糖未修饰核糖核苷的情况下(3windows 4-8),很容易被切割。这些结果表明,可以进行在减少由RNase A的分解的同时维持RNase H依赖性途径的活性这样的核酸设计。

[0144] [实施例2:细胞中的基因抑制效果]

将包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和胆固醇结合型互补链(第2核酸链)的双链核酸复合物导入细胞,研究其基因抑制效果。

[0145] (核酸剂的制备)

预备、制备与实施例1同样的核酸。

[0146] (细胞实验)

使用的细胞Neuro2a购自American Type Culture Collection(ATC)。Neuro2a在24孔板中预备,并使Neuro2a增殖到60-80%confluency。增殖后,根据制造商的方案,使用1.5μL RNAimax(Thermo Fisher Scientific)每孔,以5/10/20nM导入核酸,并在24小时后回收细胞。然后,根据制造商的方案用ISOGEN(Nippon Gene)提取RNA。根据制造商的方案,使用RNA,使用PrimeScript RT Master Mix(TAKARA-Bio),合成cDNA。根据常规方法使用LightCycler 480Probes Master(Roche Life Science)实施定量RT-PCR。定量RT-PCR中使用的引物和探针如下。

[0147] 【表2】

探针名、或引物名	序列(5'-3')	序列编号
mMalat1-Probe	FAM-TGTTGGCACGACACCTTCAGGGACT-TAMRA	14
mMalat1-Forward	TGGGTTAGAGAAGGCGTGTACTG	15
mMalat1-Reverse	TCAGCGGCAACTGGGAAA	16
mActb-Probe	FAM-CACACCCGCCACCACTTCGCCATG-TAMRA	17
mActb-Forward	CGCGAGCACAGCTTCTTTG	18
mActb-Reverse	ATGCCGGAGCCGTTGTC	19

[0148] 将Probes Master、cDNA、引物和探针混合,实施95℃10分钟1个循环、95℃10秒/60

℃30秒/72℃1秒45个循环、40℃30秒1个循环的PCR。

[0149] (结果)

在细胞用各种双链核酸复合物处理的情况下的PBS处理中的Malat1/Actb(β -肌动蛋白)表达量设为1时的相对RNA表达水平在图10中示出。与上述同样,Chol-HD0是AS0与Chol-cRNA(mMalat1)的双链复合物,Chol-HD0 with full OMe cRNA是AS0与Chol-cRNA(mMalat1)full OMe的双链复合物,3windows 1-8表示表1所示的Chol-cRNA 3windows-1~8的每一个与AS0的双链复合物的结果。

[0150] 作为对照的第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是糖未修饰核糖核苷的这一者(Chol-HD0)反义效果高,而第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是2'-O-甲基修饰核糖核苷的这一者(Chol-HD0 with full OMe cRNA)反义效果低。此外,在包含含有3个连续的糖未修饰核糖核苷的第2核酸链的复合物中,相比于第2核酸链的3'侧有3连续糖未修饰核糖核苷的情况(3windows 3-8),在第2核酸链的5'侧有3连续糖未修饰核糖核苷的情况(3windows 1-2)下,基因抑制效果低。这些结果总体对应于实施例1的RNase A/H的切割活性的结果。

[0151] 另外,在Chol-HD0 with full OMe cRNA中观察到的反义效果是切割非依赖性的效果,而3windows 1-2和3windows 3-8反义效果的差异被认为是来自依赖于RNase H切割的活性。

[0152] [实施例3:RNase H/A对包含含有1或连续2糖未修饰核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物的切割活性]

用RNase A或RNase H对包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和与胆固醇结合的、含有1或连续2糖未修饰核糖核苷的互补链(第2核酸链)的双链核酸复合物进行处理,研究了其切割效率。

[0153] (核酸剂的制备)

基于实施例1预备AS0和含有1或连续2糖未修饰核糖核苷的互补链。将其溶解于PBS后,以等摩尔量混合,将溶液在98℃加热5分钟,然后冷却至37℃并保持1小时,由此对核酸链进行退火,制备上述双链核酸剂。预备了含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及它们之间的10个糖未修饰核糖核苷的互补链(Chol-cRNA)、以及16个核酸部分都是2'-O-甲基修饰核糖核苷的互补链(Chol-cRNA full OMe)作为对照。

[0154] AS0、Chol-cRNA、Chol-cRNA full OMe的序列如表1所示,本实施例中使用的其他第2链的名称和序列如下所示。

[0155] 【表3】

寡核苷酸名	序列(5'-3')	序列编号
Chol-cRNA 2windows-1	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	20
Chol-cRNA 2windows-2	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	21
Chol-cRNA 2windows-3	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	22
Chol-cRNA 2windows-4	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	23
Chol-cRNA 2windows-5	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	24
Chol-cRNA 2windows-6	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	25
Chol-cRNA 2windows-7	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	26
Chol-cRNA 2windows-8	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	27
Chol-cRNA 2windows-9	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	28
Chol-cRNA 1window-1	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	29
Chol-cRNA 1window-2	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	30
Chol-cRNA 1window-3	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	31
Chol-cRNA 1window-4	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	32
Chol-cRNA 1window-5	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	33
Chol-cRNA 1window-6	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	34
Chol-cRNA 1window-7	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	35
Chol-cRNA 1window-8	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	36
Chol-cRNA 1window-9	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	37
Chol-cRNA 1window-10	Chol-G[*]C[*]A[*]UUCAGUGAAC[*]U[*]A[*]G[*]	38

大写字母:RNA 大写字母(下划线):2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键Chol:胆固醇

[0156] 用RNase A或H切割、以及随后的电泳和分析遵循实施例1。

[0157] (结果)

被RNase A切割后的电泳结果在图13中示出,此外,示出基于电泳结果的未分解条带的浓度相对于Chol-HD0 with full OMe cRNA的相对强度水平(%)的图表在图14中示出。

[0158] 如图13和图14所示,第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是糖未修饰核糖核苷的这一者(Chol-HD0),使用RNase A,互补链被切割。与此相对,第2核酸链中与第1核酸链的间隙区域互补的10个核酸都是2'-O-甲基修饰核糖核苷的这一者(Chol-HD0 with full OMe cRNA),使用RNase A,互补链没有被切割。

[0159] 如图13和图14所示,在含有1个糖未修饰核糖核苷的情况下,被RNase A切割的仅是在第2核酸链中糖未修饰核糖核苷存在于C的位置的情况(1window-3),在糖未修饰核糖核苷存在于U的位置的情况(1window 1、2、6)下,没有被切割。另一方面,当含有2连续糖未修饰核糖核苷时,被RNase A切割的是糖未修饰核糖核苷存在于CA(2window-3)、UC(2window-2)或UU(2window-1)的位置的情况。这些结果表明RNase A切割C或UC/UU连续序列。

[0160] [实施例4:包含在C/U的位置具有糖修饰核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物对DmpkmRNA表达的体内(in vivo)阻碍效果]

验证关于包含含有以Dmpk基因作为目标的反义寡核苷酸的第1核酸链和与胆固醇结合的、在C/U的位置具有糖修饰核糖核苷的互补链(第2核酸链)的双链核酸复合物对组织内mRNA表达的in vivo阻碍效果。

[0161] (核酸剂的制备)

预备以Dmpk基因作为目标的反义寡核苷酸ASO (DMPK)、与胆固醇结合的、在C/U的位置具有2'-O-甲基修饰的互补链Chol-cRNA (CU OMe)、以及作为对照的互补链Chol-cRNA (Default)。ASO (mDMPK)、Chol-cRNA (Default)、Chol-cRNA (CU OMe)的序列如下所示。

[0162] 【表4】

寡核苷酸名	序列 (5'-3')	序列编号
ASO (mDMPK)	A (L) *5 (L) *A (L) *a*t*a*a*a*t*a*c*c*g*A (L) *G (L) *G (L)	43
Chol-cRNA (Default)	Chol-C*C*U*CGGUAUUUAU*U*G*U	44
Chol-cRNA (CU OMe)	Chol-C*C*U*CGGUAUUUAU*U*G*U	45

大写字母 (L) :LNA (5 (L) 表示5-甲基胞嘧啶LNA) 小写字母:DNA 大写字母:RNA

大写字母 (下划线) :2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键

Chol:胆固醇

[0163] 上述ASO (mDMPK) 以小鼠的DMPK基因作为目标、由以作为其转录产物的DMPK mRNA (GenBank登记编号NM_032418、序列编号:46) 为目标、具有与2682~2697位互补的碱基序列的16mer的单链LNA/DNA间隙体构成。更具体地,该LNA/DNA间隙体由5'末端和3'末端起各3个LNA核苷构成,它们之间的10个由DNA核苷组成 (图15)。

[0164] 上述Chol-cRNA (Default) 具有与ASO (mDMPK) 互补的序列,含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及它们之间的10个糖未修饰核糖核苷,且在其5'末端结合了胆固醇 (图15A)。

[0165] 上述Chol-cRNA (CU OMe) 在位于上述Chol-cRNA (Default) 的中央的10个糖未修饰核糖核苷中,除了位于3'侧的U的位置以外,所有C和U的位置都具有2'-O-甲基修饰 (图15B)。

[0166] 与实施例1同样地,将ASO (mDMPK) 和Chol-cRNA (Default)、或ASO (mDMPK) 和Chol-cRNA (CU OMe) 溶解于PBS后,以等摩尔量混合,将溶液在98℃加热5分钟,然后冷却至37℃并保持1小时,由此对核酸链进行退火,制备双链核酸复合物。将制备后的双链核酸复合物称为“Chol-HDO (Default)”或“Chol-HDO (CU OMe)”。

[0167] (in vivo实验)

作为施用双链核酸复合物的小鼠,使用体重20g、4~5周龄的雄性C57BL/6小鼠。关于各条件使用4只小鼠。

将双链核酸复合物剂通过单次施用经由尾静脉对各小鼠以12.5mg/kg的量进行静脉内注射。此外,还制作了仅以单次施用注射PBS的小鼠作为阴性对照组。

[0168] (表达分析)

在施用后72小时的时间点对小鼠灌注PBS,然后将小鼠解剖摘取心肌 (Heart)、股四头肌 (Quadriceps)、背部肌肉 (Back)、胫骨前肌 (tibialis anterior:TA)、腓肠肌 (gastrocnemius:GC)、和肱三头肌 (triceps brachii:TB)、肾脏和肝脏。接着,使用高通量全自动核酸提取装置MagNA Pure 96 (Roche Life Science) 根据方案从各组织中提取mRNA。根据Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Life Science) 的操作指南合成cDNA。定量RT-PCR通过TaqMan (Roche Life Science) 实施。定量RT-PCR中使用的引物,使用基于各种基因数通过赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 设计和制造的制品。PCR条件 (温度和时间) 是将95℃15秒、60℃30秒、和72℃1秒作为1个循环,重复40个循

环。将所得的扩增产物通过定量RT-PCR进行定量,基于其结果分别计算mRNA (DMPK) 的表达量/mRNA (ACTB:内标基因) 的表达量,获得相对表达水平。计算出相对表达水平的平均值和标准误差。

[0169] (结果)

图16和图17中示出结果。图16示出了双链核酸复合物Chol-HD0 (Default)、Chol-HD0 (CU OMe) 对腓肠肌 (gastrocnemius:GC)、肱三头肌 (triceps brachii:TB)、胫骨前肌 (tibialis anterior:TA)、背部肌肉 (Back)、股四头肌 (Quadriceps) 和心肌 (Heart) 中的目标mDMPK基因的表达抑制效果。图17示出了双链核酸复合物Chol-HD0 (Default)、Chol-HD0 (CU OMe) 对肾脏和肝脏中的目标mDMPK基因的表达抑制效果。误差条表示各个标准误差。

[0170] Chol-HD0 (CU OMe) 在腓肠肌、肱三头肌、胫骨前肌、背部肌肉、股四头肌和心肌中均表现出比Chol-HD0 (Default) 更强的表达抑制效果。从该结果来看,表明了通过在第2核酸链的C/U的位置对核糖核苷加糖修饰,获得对RNase A切割的抗性,从而能够更有效地抑制目标基因的表达。

[0171] 此外,Chol-HD0 (CU OMe) 在肾脏和肝脏中表现出与Chol-HD0 (Default) 同等的表达抑制效果。

[0172] [实施例5:包含在C/U的位置具有糖修饰核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物对人SOD1 mRNA表达的体内 (in vivo) 阻碍效果]

验证关于包含含有以人SOD1基因作为目标的反义寡核苷酸的第1核酸链和与胆固醇结合的、在C/U的位置具有糖修饰核糖核苷的互补链 (第2核酸链) 的双链核酸复合物对组织内mRNA表达的in vivo阻碍效果。

[0173] (核酸剂的制备)

预备以SOD1基因作为目标的反义寡核苷酸ASO (SOD1)、与胆固醇结合的、在C/U的位置具有2'-O-甲基修饰的互补链Chol-cRNA (CU OMe)、以及作为对照的互补链Chol-cRNA (Default)。ASO (mDMPK)、Chol-cRNA (Default)、Chol-cRNA (CU OMe) 的序列如下所示。

[0174] 【表5】

寡核苷酸名	序列 (5'-3')	序列编号
ASO (hSOD1)	T (L) *T (L) *A (L) *a*t*g*t*t*t*a*t*c*a*g*G (L) *A (L) *T (L)	67
Chol-cRNA (Default)	Chol-A*U*C* <u>CUGAUAAACAU</u> *U* <u>A</u> * <u>A</u>	47
Chol-cRNA (CU OMe)	Chol-A*U*C* <u>CUGAUAAACAU</u> *U* <u>A</u> * <u>A</u>	48

大写字母 (L):LNA (5 (L) 表示5-甲基胞嘧啶LNA) 小写字母:DNA 大写字母:RNA

大写字母 (下划线):2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键

Chol:胆固醇

[0175] 上述ASO (hSOD1) 以人的SOD1基因作为目标、由以作为其转录产物的hSOD1mRNA (GenBank登记编号NM_000454.4) 为目标、具有与679~695位互补的碱基序列的17mer的单链LNA/DNA间隙体 (序列编号67) 构成。更具体地,该LNA/DNA间隙体由5'末端和3'末端起各3个LNA核苷构成,它们之间的10个由DNA核苷组成 (图18)。

[0176] 上述Chol-cRNA (Default) 具有与ASO (hSOD1) 互补的序列,含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及它们之间的10个糖未修饰核糖核苷,且在其5'末端结合了胆固醇 (图18A)。

[0177] 上述Chol-cRNA (CU 0Me) 在位于上述Chol-cRNA (Default) 的中央的10个糖未修饰核糖核苷中,所有C和U的位置都具有2'-O-甲基修饰(图18B)。

[0178] 与实施例1同样地,将ASO (hSOD1) 和Chol-cRNA (Default)、或ASO (hSOD1) 和Chol-cRNA (CU 0Me) 溶解于PBS后,以等摩尔量混合,将溶液在98℃加热5分钟,然后冷却至37℃并保持1小时,由此对核酸链进行退火,制备双链核酸复合物。将制备后的双链核酸复合物称为“Chol-HD0 (Default)”或“Chol-HD0 (CU 0Me)”。

[0179] (in vivo实验)

作为施用双链核酸复合物的小鼠,使用体重20g、4~5周龄的雄性SOD1G93A转基因小鼠 (G93A Tg mice)。关于各条件使用2-4只小鼠。

将双链核酸复合物剂通过单次施用对各小鼠以50mg/kg的量进行皮下注射。此外,还制作了仅以单次施用注射PBS的小鼠作为阴性对照组。

[0180] (表达分析)

在施用后72小时的时间点对小鼠灌注PBS,然后将小鼠解剖摘取心肌 (Heart)、股四头肌 (Quadriceps)、横膈膜 (Diaphragm)、背部肌肉 (Back)。接着,使用高通量全自动核酸提取装置Magna Pure 96 (Roche Life Science) 根据方案从各组织中提取mRNA。根据Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Life Science) 的操作指南合成cDNA。定量RT-PCR通过TaqMan (Roche Life Science) 实施。定量RT-PCR中使用的引物,使用基于各种基因数通过赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 设计和制造的制品。PCR条件 (温度和时间) 是将95℃15秒、60℃30秒、和72℃1秒作为1个循环,重复40个循环。将所得的扩增产物通过定量RT-PCR进行定量,基于其结果分别计算mRNA (SOD1) 的表达量/mRNA (ACTB: 内标基因) 的表达量,获得相对表达水平。计算出相对表达水平的平均值和标准误差。

[0181] (结果)

图19中示出结果。图19示出了双链核酸复合物Chol-HD0 (Default)、Chol-HD0 (CU 0Me) 对背部肌肉 (Back)、股四头肌 (Quadriceps)、横膈膜 (Diaphragm) 和心肌 (Heart) 中的目标hSOD1基因的表达抑制效果。误差条表示各个标准误差。

[0182] Chol-HD0 (CU 0Me) 在背部肌肉、股四头肌、横膈膜和心肌中均表现出比Chol-HD0 (Default) 更强的表达抑制效果。从该结果来看,表明了通过在第2核酸链的C/U的位置对核糖核苷加糖修饰,获得对RNase A切割的抗性,从而能够更有效地抑制目标基因的表达。

[0183] [实施例6: 包含在C/U的位置具有脱氧核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物对小鼠Malat1 RNA表达的体内 (in vivo) 阻碍效果]

验证关于包含含有以小鼠Malat1基因作为目标的反义寡核苷酸的第1核酸链和与胆固醇结合的、在C/U的位置具有脱氧核糖核苷的互补链 (第2核酸链) 的双链核酸复合物对组织内mRNA表达的in vivo阻碍效果。

[0184] (核酸剂的制备)

预备以小鼠Malat1基因作为目标的反义寡核苷酸ASO (mMalat1)、与胆固醇结合的、在C/U的位置具有DNA的互补链Chol-cRNA (CT DNA)、以及作为对照的互补链Chol-cRNA (Default)。ASO (mMalat1)、Chol-cRNA (Default)、Chol-cRNA (CT DNA) 的序列如下所示。

[0185] 【表6】

寡核苷酸名	序列 (5'-3')	序列编号
ASO (mMalat1)	G (L) *5 (L) *A (L) *t*t*c*t*a*a*t*a*g*c*A (L) *G (L) *5 (L)	49
Chol-cRNA (Default)	Chol-G*C*U*GCUAUUAGAA*U*G*C	50
Chol-cRNA (CT DNA)	Chol-G*C*U*GctAttAGAA*U*G*C	51

大写字母 (L) :LNA (5 (L) 表示5-甲基胞嘧啶LNA) 小写字母:DNA 大写字母:RNA

大写字母 (下划线) :2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键

Chol:胆固醇

[0186] 上述ASO (mMalat1) 以小鼠的mMalat1基因作为目标、由以作为其转录产物的Malat1 ncRNA (GenBank登记编号NR_002847.3) 为目标、具有与5032~5047位互补的碱基序列的16mer的单链LNA/DNA间隙体 (序列编号49) 构成。更具体地,该LNA/DNA间隙体由5'末端和3'末端起各3个LNA核苷构成,它们之间的10个由DNA核苷组成 (图20)。

[0187] 上述Chol-cRNA (Default) 具有与ASO (mMalat1) 互补的序列,含有两末端上3个2'-O-甲基修饰核糖核苷以及它们之间的10个糖未修饰核糖核苷,且在其5'末端结合了胆固醇 (图20A)。

[0188] 上述Chol-cRNA (CT DNA) 在位于上述Chol-cRNA (Default) 的中央的10个糖未修饰核糖核苷中,所有C和U的位置都具有脱氧核糖核苷 (图20B)。

[0189] 与实施例1同样地,将ASO (mMalat1) 和Chol-cRNA (Default)、或ASO (mMalat1) 和Chol-cRNA (CT DNA) 溶解于PBS后,以等摩尔量混合,将溶液在98℃加热5分钟,然后冷却至37℃并保持1小时,由此对核酸链进行退火,制备双链核酸复合物。将制备后的双链核酸复合物称为“Chol-HD0 (Default)”或“Chol-HD0 (CT DNA)”。

[0190] (in vivo实验)

作为施用双链核酸复合物的小鼠,使用体重20g、4~5周龄的雄性C57BL/6小鼠。关于各条件使用3只小鼠。

将双链核酸复合物剂通过单次施用从尾静脉对各小鼠以40mg/kg的量进行静脉内注射。此外,还制作了仅以单次施用注射PBS的小鼠作为阴性对照组。

[0191] (表达分析)

在施用后72小时的时间点对小鼠灌注PBS,然后将小鼠解剖摘取颈脊髓 (Cervical spinal cord)。接着,使用高通量全自动核酸提取装置MagNA Pure 96 (Roche Life Science) 根据方案从各组织中提取mRNA。根据Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Life Science) 的操作指南合成cDNA。定量RT-PCR通过TaqMan (Roche Life Science) 实施。定量RT-PCR中使用的引物,使用基于各种基因数通过赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 设计和制造的制品。PCR条件 (温度和时间) 是将95℃15秒、60℃30秒、和72℃1秒作为1个循环,重复40个循环。将所得的扩增产物通过定量RT-PCR进行定量,基于其结果分别计算RNA (mMalat1) 的表达量/mRNA (ACTB:内标基因) 的表达量,获得相对表达水平。计算出相对表达水平的平均值和标准误差。

[0192] (结果)

图21中示出结果。图21示出了双链核酸复合物 (Chol-HD0 (Default)、Chol-HD0 (CT DNA) 对颈脊髓中的目标mMalat1基因的表达抑制效果。误差条表示各个标准误差。

[0193] Chol-HD0 (CT DNA) 在颈脊髓中也表现出比Chol-HD0 (Default) 更强的表达抑制效

果。从该结果来看,表明了通过在第2核酸链的C/U的位置用脱氧核糖核苷取代核糖核苷,获得对RNase A切割的抗性,从而能够更有效地抑制目标基因的表达。

[0194] [实施例7:包含含有修饰核糖核苷的第2核酸链的双链核酸复合物在小鼠和人血清中的稳定性]

将包含含有反义寡核苷酸的第1核酸链和含有修饰核糖核苷的互补链(第2核酸链)的双链核酸复合物与小鼠或人血清混合,并评价了血清中的双链稳定性。

[0195] (核酸剂的制备)

预备、制备与实施例1同样的核酸。

实施例1中使用的寡核苷酸的序列、化学修饰和结构在表7以及图22A和图22B中示出。所有寡核苷酸均由GeneDesign Inc.(日本,大阪)制造。

【表7】

寡核苷酸名	序列(5'-3')	序列编号
ASO (mDmpk)	A(L)*5(L)*A(L)*a*t*a*a*a*t*a*c*c*g*A(L)*G(L)*G(L)	43
cRNA default	C* <u>C</u> * <u>U</u> *CGGUAUUUAU* <u>U</u> * <u>G</u> * <u>U</u>	52
cRNA CU OMe	C* <u>C</u> * <u>U</u> *CGGUAUUUAU* <u>U</u> * <u>G</u> * <u>U</u>	54
cRNA AG OMe	C* <u>C</u> * <u>U</u> *CGGUAUUUAU* <u>U</u> * <u>G</u> * <u>U</u>	55
cRNA CT DNA	C* <u>C</u> * <u>U</u> *cGGtAtttAt* <u>U</u> * <u>G</u> * <u>U</u>	60
cRNA CU PS	C* <u>C</u> * <u>U</u> *C*GGU*AU*U*U*AU* <u>U</u> * <u>G</u> * <u>U</u>	66

大写字母(L):LNA(5(L)表示5-甲基胞嘧啶LNA) 小写字母:DNA 大写字母:RNA

大写字母(下划线):2'-O-Me RNA *:硫代磷酸酯键

[0196] (血清中稳定性评价实验)

准备根据上述退火的双链核酸10μM10μL。另外,血清是从Cr1:CD1(ICR)小鼠身上提取的血液和人血液中准备的。对于核酸10μM10μL,将30μL小鼠血清或人血清与之混合,并在37℃培养箱(incubator)中培养(incubation)。培养0h、2h、或24h后,加入Reaction Stop Buffer(50mM Tris-HCl,pH7.5,48.5mM Borate,20mM EDTA,10%SDS,最终volume 60μL),投入液氮中,使反应停止。

[0197] (提取)

将解冻的样品与60μL phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)(nacalaitesque)混合,涡旋(vortex)后,在37℃培养箱(incubator)中培养(incubation)20分钟。然后,35℃、12000g离心30分钟。将上清液再次与60μL phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)混合,同样的步骤共重复三次。回收最终的上清液并与7.5%Sucrose溶液混合作为电泳样品。

[0198] (电泳/分析)

预备、制作20%丙烯酰胺凝胶(1×TBE)。将上述电泳样品在凝胶上以100V进行电泳80分钟。作为对照的ASO单独同时进行电泳。然后,用1×TBE将GelRed(×10000)水溶液(Biotium)稀释至1/10000的浓度来制作溶液。凝胶用该溶液渗透10分钟。然后,用ChemIDoc Touch成像系统(BioRad公司)对凝胶进行拍照。在Image J software中分析条带的浓度。

[0199] (结果)

ASO(mDmpk)单独、ASO(mDmpk)和cRNA(default,CU OMe,AG OMe,CU PS)的双链复合物的与小鼠血清混合培养后的电泳结果在图23中示出。ASO(mDmpk)单独、ASO(mDmpk)和

cRNA (default, CU OMe, CT DNA) 的双链复合物的与人血清混合培养后的电泳结果在图25中示出。此外,示出了24h培养后的双链条带的浓度相对于0h培养后的双链条带的相对强度水平(%)的图表在图24和图26中示出。如图23和图24所示,第2核酸链中的C和U是2'-O-甲基修饰核糖核苷的那些提高了小鼠血清中的稳定性。另外,通过将第2核酸链中的核糖核苷C和U的3'侧的磷酸二酯键(P0)变更为硫代磷酸酯键(PS),也提高了小鼠血清中的稳定性。此外,如图25和图26所示,第2核酸链中的C和U或T是2'-O-甲基修饰核糖核苷或DNA的那些提高了人血清中的稳定性。

[0200] 在本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请直接通过引用整体并入本说明书。

序列表

<110> 国立大学法人东京医科齿科大学

武田药品工业株式会社

<120> 修饰的异源核酸

<130> PH-8549-PCT

<150> JP 2019-188042

<151> 2019-10-11

<160> 67

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 6983

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 1

```

caggcattca ggcagcgaga gcagagcagc gtagagcagc acagctgagc tcgtgaggca 60
ggagactcag cccgaggaaa tcgcagataa gtttttaatt aaaaagattg agcagtaaaa 120
agaattagaa ctctaaactt aagctaatag agtagcttat cgaaatatta cttagtctta 180
ataatctaag aagatcttaa gagataacat gaaggcttat ttaaacagtt tgaaaaagga 240
aatgaggaga aaagtatttg tactgtataa tggaggctga ccagagcagt ttaggagatt 300
gtaaagggag gttttgtgaa gttctaaaag gttctagttt gaaggtcggc cttgtagatt 360
aaaacgaagg ttacctaaat agaatactaa tggcatttaa aacagtaaag ttgtagagaa 420
tagtttgaaa atgagggtga gttttaaaag attgagaaaa gtaggttaag ttgacggccg 480
ttataaaaaat ccttcgactg gcgcagtgtac gtttgaaggc atgagttgga aacagggaag 540
atggaagtgt taggctagcc gggcgatggg ggcgacgcc ttaataccta gcacttgga 600
ggcagaggca ggcggatttc tgagttcgag gccagcctgg tctacagagt gagttccagg 660
acagccaggg ctacacagag aaaccctgtc ttgaaaaaac aaaaaggtta ggctagtatt 720
tggagaaaaga agattagaaa atggaagtga aagacgaaga agacatacag gaaggtgaag 780
aaaaagctgt tagagaagat aggaaaatag aagacaaagc atcttttaga gacagaaaag 840
gtacttaaaag gcacaggtag taggaagccg aagaatagaa gatagaaaga agcaagatag 900
aaaaacaaaa tggaagttaa gacaactttg gatgccagca ttcaagatag gcaaagaaga 960
taagattgag gccaaaaggt tggataagat ataaagtcag aaggaaatta tctttaaagc 1020
cataagttca aattttctgat ggagcgagca gtttagaaga gtcttttagac agccacatac 1080
aagattgaag ctagcaatca aagctactag gactgaagta aaaagttaag gcagaatgcc 1140
tttgaagagt tagaagaata ttaaaagcct taactttagat ctttaattttg cttgatgaca 1200
aaaggacttt tgataacagt ttcaagattg tcagcatttt gcattggact tgagctgagg 1260
tgcttttaaa atcctaacga ctagcattgg cagctgaccc aggtctacac agaagtgcac 1320
tcagtgaact aggaagacag gagcggcaga caggagtccc gaagccagtt tggatgaagct 1380
aggaaggact gaggagccag cagcagcagt gcatggtgaa gatagcccag gaaagagtgc 1440

```

```

ggttcgggtgg aggaagctag gaagaaggag ccatacggat gtggtggtga agctgggaaa 1500
gggttccagg atggtggagc gagagcgagt tggatgatga gctagctggc ggcttggctt 1560
gtcaactgcg cggaggaggc gagcaggcat tgtggagagg atagatagcg gctcctagac 1620
cagcatgcca gtgtgcaaga aaggctgcag ggagagcatg cggtgcggtg acattccttg 1680
aggtcggcaa catggtggtg gttttctgta acttggatgg taacttgttt actttgtctt 1740
aatagttatg ggggagttgt aggcttctgt gtaaagagat atatctgggg ctgtatgtag 1800
gcctttgcgg gtgtttagg tttttctttt tcagggttat gtcctcttgc atcttgtcag 1860
aagcttttga gggctgactg ccaaggccca gaaagaagaa tggtagatgg caagtgtgtt 1920
ttaaccgctc agaggggaat gaatggtaga gccagcacia cctcccagtt ttgtaagacg 1980
ttgtagtttg aacagatgac ctaccacaag ctcactcct gtgtagggga ggtaattggg 2040
caaagtgcct ttgggggaat gggggcaaaa tatattttga gttcttttcc ctttaggtct 2100
gtctagaatc ctaaaggcag atgactcaag ggaaccagaa aaaaggaaat ccactctcag 2160
gataagcaga gctcgccagg tttacagttt gtaggaagta gaggatggat gctagctttc 2220
acactgagtg tggaggagct ggccatggcg gaattgctgg tagtttactc tttccccctc 2280
ccttaatgag atttgtaaaa tcctaaacac ttttacttga aatatttggg agtgggtctta 2340
acagggagga gtgggtgggg gaaacgtttt ttttctaaga ttttccacag atgctatagt 2400
tgtgttgaca cactgggtta gagaaggcgt gtactgctat gctgttggca cgacaccttc 2460
agggactgga gctgcctttt gtccttgga gagttttccc agttgccgct gaagtcagca 2520
cagtgcggct ttggttcaca gtcacctcag gagaacctca ggagcttggc taggccagag 2580
gttgaagtta agttttacag caccgtgatt taaaatattt cattaaaggg gaggggtaaa 2640
acttagttgg ctgtggcctt gtgtttgggt ggggtgggggt gttaggtaat tgttttagttt 2700
atgatttcag ataatacatc cagagaactt aaatatttgg aaaaacagga aatctcagct 2760
ttcaagttag caagtaactc ccaatccagt ttttgcttct tttttccttt ttcttttttt 2820
gaggcgggca gctaaggaag gttggttcct ctgccggtcc ctcgaaagcg tagggcttgg 2880
gggttggtct ggtccactgg gatgatgtga tgctacagtg gggactcttc tgaagctgtt 2940
ggatgaatat agattgtagt gtgtggttct cttttgaaat ttttttcagg tgacttaatg 3000
tatcttaata actactatag gaacaaagga agtggcttta atgacctga aggaatttct 3060
tctggtgata gcttttatat tatcaagtaa gagatactat ctgagttttg tataagcaag 3120
tctttttcct agttaggag aaatgatttt cttgtgact aaacaagatg taaaggtatg 3180
ctttttttct tcttgtgcat tgtatacttg tgtttatttg taacttataa tttaagaatt 3240
atgataattc agcctgaatg tcttttagag ggtgggcttt tgttgatgag ggaggggaaa 3300
cctttttttt tctgtagacc tttttcagat aacaccatct gagtcataac cagcctggca 3360
gtgtgatgac gtagatgcag agggagcagc tccttggtga atgagtata agtaaaggca 3420
gaaaaaataa tgtcatgtct ccatggggaa tgagcatgag ccagagattg ttctactga 3480
tgaaaagctg catatgcaaa aatttaagca aatgaaagca accagtataa agttatggca 3540
atacctttta aagttagggc ttatctacca agctttatcc acaaaagtaa agaattgatg 3600
aaaaacagtg aagatcaaat gttcatctca aaactgcttt tacaaaagca gaatagaaat 3660
gaagtgaana tgctgcatta agcctggagt aaaaagaagc tgagcttggt gagatgagt 3720
ggatcgagcg gctgcgaggc ggtgcagtgt gccaatgttt cgtttgcctc agacaggttt 3780

```

ctcttcataa gcagaagagt tgcttcattc catctcggag caggaaacag cagactgctg 3840
 ttgacagata agtgtaactt ggatctgcag tattgcatgt tagggataga taagtgcctt 3900
 ttttctcttt ttccaaaaag acctgtagag ctgttgaatg tttgcagctg gccctctta 3960
 ggcagttcag aattttgagt agttttccca tccagcctct taaaaattcc taagccttgc 4020
 accgatgggc tttcatgatg ggatagctaa taggcttttg catcgtaaac ttcaacacaa 4080
 aagcctacat gattaatgcc tactttaatt acattgctta caagattaag gaatctttat 4140
 cttgaagacc ccatgaaagg gatcattatg tgctgaaaat tagatgttca tattgctaaa 4200
 atttaaatgt gctccaatgt acttgtgctt aaaatcatta aattatacaa attaataaaa 4260
 tactttacta gagaatgtat gtatttagaa ggctgtctcc ttatttaaatt aaagtcttgt 4320
 ttgttgtctg tagttagtgt gggcaatttt ggggggatgt tcttctctaa tcttttcaga 4380
 aacttgactt cgaacactta agtggaccag atcaggattt gagccagaag accgaaatta 4440
 actttaaggc aggaaagaca aattttattc tccatgcagt gatgagcatt taataattgc 4500
 aggctggca tagaggccgt ctaactaagg actaagtacc ttaggcaggt gggagatgat 4560
 ggtcagagta aaaggtaact acatatattg tttccagaaa gtcaggggtc taatttgacc 4620
 atggctaaac atctagggta agacactttt cccccacatt tccaaatatg catgttgagt 4680
 ttaaattgctt acgatcatct catccacttt agccttttgt cacctcactt gagccacgag 4740
 tggggtcagg catgtgggtt taaagagttt tcctttgcag agcctcattt catccttcat 4800
 ggagctgctc aggactttgc atataagcgc ttgcctctgt cttctgttct gctagtgagt 4860
 gtgtgatgtg agaccttgca gtgagtttgt ttttctgga atgtggaggg agggggggat 4920
 ggggcttact tgttctagct ttttttttac agaccacaca gaatgcaggt gtcttgactt 4980
 caggctcatgt ctgttctttg gcaagtaata tgtgcagtac tgttccaatc tgctgctatt 5040
 agaatgcatt gtgacgcgac tggagtatga ttaaagaaag ttgtgtttcc ccaagtgttt 5100
 ggagtagtgg ttgttgaggg aaaagccatg agtaacaggc tgagtgttga ggaaatggct 5160
 ctctgcagct ttaagtaacc cgtgtttgtg attggagccg agtccctttg ctgtgctgcc 5220
 ttaggtaaat gtttttgttc atttctggtg aggggggttg ggagcactga agcctttagt 5280
 ctcttccaga ttcaacttaa aatctgacaa gaaataaatc agacaagcaa cattcttgaa 5340
 gaaattttta ctggcaagtg gaaatgtttt gaacagttcc gtggtcttta gtgcattatc 5400
 tttgtgtagg tgttctctct cccctccctt ggtcttaatt cttacatgca ggaacattga 5460
 caacagcaga catctatcta ttcaaggggc cagagaatcc agaccagta aggaaaaata 5520
 gccattttac tttaaatcga taagtgaagc agacatgcca ttttcagtgt ggggattggg 5580
 aagccctagt tctttcagat gtacttcaga ctgtagaagg agcttccagt tgaattgaaa 5640
 ttcaccagtg gacaaaatga ggacaacagg tgaacgagcc ttttcttggt taagattagc 5700
 tactggtaat ctagtgttga atcctctcca gttcatgct ggagcagcta gcatgtgatg 5760
 taatgttggc cttgggggtg aggggtgagg tgggcgctaa gccttttttt aagatttttc 5820
 aggtaccctt cactaaaggc actgaaggct taatgtagga cagcggagcc ttctgtgtgt 5880
 gcaagaatca agcaagcagt attgtatcga gaccaaagtg gtatcatggt cggttttgat 5940
 tagcagtggg gactacccta ccgtaacacc ttgttggaat tgaagcatcc aaagaaaata 6000
 cttgagaggc cctgggcttg ttttaacatc tggaaaaaag gctgttttta tagcagcgg 6060
 taccagccca aacctcaagt tgtgcttgca ggggagggaa aagggggaaa gcgggcaacc 6120

agtttcccca gcttttccag aatcctgtta caaggtctcc ccacaagtga tttctctgcc 6180
 acatcgccac catgggcctt tggcctaatac acagaccctt caccctcac ctgatgcag 6240
 ccagtagctg gatccttgag gtcacgttgc atatcggtt caagtaacc atggtgccaa 6300
 ggtcctgtgg gttgcaccag aaaaggccat caattttccc ctgacctgta atttaacatt 6360
 aaaaccatag ctaagatgtt ttatacatag cacctatgca gagtaaaca accagtatgg 6420
 gtatagtatg tttgatacca gtgctgggtg ggaatgtagg aagtcggatg aaaagcaagc 6480
 cttttagtaga agttgttggg gtgggattgc aaaaattctc tgctaagact ttttcaggtg 6540
 gacataacag acttggccaa gctagcatct tagtggaagc agattcgtca gtagggttgt 6600
 aaagggtttt cttttcctga gaaaacaacc ttttgttttc tcaggttttg ctttttggcc 6660
 tttccctagc tttaaaaaaa aaaaagcaaa agacgctggt ggctggcact cctggtttcc 6720
 aggacggggt tcaagtccct gcggtgtctt tgcttgactc ttatatcatg aggccattac 6780
 atttttcttg gagggttcta aaggtctctg gtatggtagc tgatatcact ggaacactcc 6840
 ccagcctcag tgttgaactc ttgataatta actgcattgt ctttcaggtt atgccaatt 6900
 cgtcttatta cctctgagtc gacacacctc ctactattta ttgaatactt tgattttatg 6960
 aaataaaaac taaatatctc tca 6983

<210> 2

<211> 8779

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

cgcagcctgc agcccagac ttctgtaaag gactggggcc ccgcaactgg cctctcctgc 60
 cctcttaagc gcagcgccat ttagcaacg cagaagcccg gcgccgggaa gcctcagctc 120
 gcctgaaggc aggtccccctc tgacgcctcc gggagcccag gtttcccaga gtccttgga 180
 cgcagcgacg agttgtgctg ctatcttagc tgccttata ggctggccat tccaggtggt 240
 ggtatttaga taaaaccact caaactctgc agtttggtct tggggtttgg aggaaagctt 300
 ttatttttct tcctgctccg gttcagaagg tctgaagctc atacctaacc aggcataaca 360
 cagaatctgc aaaacaaaaa cccctaaaaa agcagaccca gagcagtgtg aacacttctg 420
 ggtgtgtccc tgactggctg cccaaggtct ctgtgtcttc ggagacaaag ccattcgctt 480
 agttgggtcta ctttaaaaagg ccacttgaac tcgctttcca tggcgatttg cttgtgagc 540
 actttcagga gagcctggaa gctgaaaaac ggtagaaaaa tttccgtgcg ggccgtgggg 600
 ggctggcggc aactgggggg ccgcagatca gaggggcca ctggcagcca acggcccccg 660
 gggctcaggc ggggagcagc tctgtggtgt gggattgagg cgttttccaa gagggggtt 720
 tcacgtttct aagatttccc aagcagacag cccgtgctgc tccgatttct cgaacaaaaa 780
 agcaaaacgt gtggctgtct tgggagcaag tcgcaggact gcaagcagtt gggggagaaa 840
 gtccgccatt ttgccactc tcaaccgtcc ctgcaaggct ggggctcagt tgcgtaatgg 900
 aaagtaaagc cctgaactat cacactttaa tcttccttca aaagtggtgta aactatacct 960
 actgtccctc aagagaacac aagaagtgtt ttaagaggt ttttaaaagt tccgggggtt 1020
 ttgtgagggtg tttgatgacc cgtttaaaat atgatttcca tgtttctttt gtctaaagtt 1080
 tgcagctcaa atctttccac acgctagtaa ttaagtatt tctgcatgtg tagtttgcatt 1140

```

tcaagttcca taagctgtta agaaaaatct agaaaagtaa aactagaacc tatttttaac 1200
cgaagaacta ctttttgcct ccctcacaaa ggcggcggaa ggtgatcgaa ttccggtgat 1260
gcgagttgtt ctccgtctat aaatacgctt cgcccagact gtgcggtagg cattgaggca 1320
gccagcgtag gggcttctgc tgagggggca ggcgagactt gaggaaccg cagataagtt 1380
tttttctctt tgaaagatag agattaatac aactacttaa aaaatatagt caataggtta 1440
ctaagatatt gcttagcggt aagtttttaa cgtaatttta atagcttaag attttaagag 1500
aaaatatgaa gacttagaag agtagcatga ggaaggaaaa gataaaaggt ttctaaaaca 1560
tgacggagggt tgagatgaag cttcttcatg gagtaaaaaa tgtattttaa agaaaattga 1620
gagaaaaggac tacagagccc cgaattaata ccaatagaag ggcaatgctt ttagattaaa 1680
atgaagggtga cttaaacagc ttaaagttaa gtttaaaagt ttaggtgat taaaataatt 1740
tgaaggcgat cttttaaaaa gagattaaac cgaagggtat taaaagacct tgaaatccat 1800
gacgcaggga gaattgcgtc atttaaagcc tagttaacgc atttactaaa cgcagacgaa 1860
aatggaaaga ttaattggga gtggtaggat gaaacaattt ggagaagata gaagtttgaa 1920
gtggaaaact ggaagacaga agtacgggaa ggcaagaaa agaatagaga agatagggaa 1980
attagaagat aaaaacatac ttttagaaga aaaaagataa atttaaacct gaaaagtagg 2040
aagcagaaga aaaaagacaa gctaggaaac aaaaagctaa gggcaaatg tacaaactta 2100
gaagaaaatt ggaagataga aacaagatag aaatgaaaa tattgtcaag agtttcagat 2160
agaaaatgaa aaacaagcta agacaagtat tggagaagta tagaagatag aaaaatataa 2220
agccaaaaat tggataaaat agcactgaaa aaatgaggaa attatttgta accaatttat 2280
tttaaaagcc catcaattta atttctggtg gtgcagaagt tagaaggtaa agcttgagaa 2340
gatgagggtg tttacgtaga ccagaaccaa tttagaagaa tacttgaagc tagaagggga 2400
agttggttaa aaatcacatc aaaaagctac taaaaggact ggtgtaattt aaaaaaact 2460
aaggcagaag gcttttgtaa gagttagaag aatttggaag gccttaaata tagtagctta 2520
gtttgaaaaa tgtgaaggac tttcgtaacg gaagtaattc aagatcaaga gtaattacca 2580
acttaattgt tttgcattgg actttgagtt aagattatit tttaaatcct gaggactagc 2640
attaattgac agctgaccca ggtgctacac agaagtggat tcagtgaatc taggaagaca 2700
gcagcagaca ggattccagg aaccagtgtt tgatgaagct aggactgagg agcaagcgag 2760
caagcagcag ttcgtggtga agataggaaa agagtccagg agccagtgcg atttggtgaa 2820
ggaagctagg aagaaggaag gagcgctaac gatttggtgg tgaagctagg aaaaaggatt 2880
ccaggaagga gcgagtgcaa tttggtgatg aaggtagcag gcggcttggc ttggcaacca 2940
cacggaggag gcgagcaggc gttgtgcgta gaggatccta gaccagcatg ccagtgtgcc 3000
aaggccacag ggaaagcgag tggttggtta aaatccgtga ggtcggcaat atgttgtttt 3060
tctggaactt acttatggta accttttatt tattttctaa tataatgggg gagtttcgta 3120
ctgaggtgta aagggtttta tatggggacg taggccgatt tccgggtgtt gtaggtttct 3180
ctttttcagg ctataactca tgaatcttgt ctgaagcttt tgagggcaga ctgccaagtc 3240
ctggagaaat agtagatggc aagtttgtgg gttttttttt tttacacgaa tttaggaaa 3300
accaaataaa tttgatagcc aaattgagac aatttcagca aatctgtaag cagtttgtat 3360
gttttagttg ggtaataaag ttttcagtt ttgtgaatag atgacctgtt tttacttcct 3420
caccctgaat tcgttttgta aatgtagagt ttgatgtgt aactgaggcg ggggggagtt 3480

```

```

ttcagtatTT ttttttTgtgg gggTgggggc aaaatatgtt ttcagttctt tttcccttag 3540
gtctgtctag aatcctaaag gcaaatgact caaggtgtaa cagaaaacaa gaaaatccaa 3600
tatcaggata atcagaccac cacaggttta cagtttatag aaactagagc agttctcacg 3660
ttgaggTctg tggaagagat gtccattgga gaaatggctg gtagttactc ttttttcccc 3720
ccacccccctt aatcagactt taaaagtgct taaccacctt aacttgttat tttttacttg 3780
aagcatTTTtG ggatggtctt aacaggggaag agagagggTg ggggagaaaa tgTTTTTTtC 3840
taagatTTTtC cacagatgct atagtactat tgacaaactg ggtagagaa ggagtgtacc 3900
gctgtgctgt tggcacgaac accttcaggg actggagctg cttttatcct tggaagagta 3960
ttcccagttg aagctgaaaa gtacagcaca gtgcagcttt ggTtcatatt cagTcatctc 4020
aggagaactt cagaagagct tgagtaggcc aatgttgaa gTtaagTTTt ccaataatgt 4080
gacttcttaa aagTTTTatt aaaggggagg ggcaaatatt ggcaattagt tggcagTggc 4140
ctgttacggT tgggattggT ggggtgggtt taggtaattg tttagTTTat gattgcagat 4200
aaactcatgc cagagaactt aaagtcttag aatggaaaa gtaaagaaat atcaacttcc 4260
aagttggcaa gtaactccca atgatttagt ttttttcccc ccagTTtgaa ttgggaagct 4320
gggggaagtt aaatatgagc cactgggtgt accagtgcTt taatttgggc aaggaaagtg 4380
tcataatttg atactgtatc tgttttcctt caaagtatag agcttttggg gaaggaaagt 4440
attgaactgg gggttggTct ggctactgg gctgacatta actacaatta tgggaaatgc 4500
aaaagtTgtt tggatatggT agtgtgtggT tctcttttgg aatttttttC aggtgattta 4560
ataataattt aaaactacta tagaaactgc agagcaaagg aagtggctta atgatcctga 4620
agggatttct tctgatggta gcttttgtat tatcaagtaa gattctattt tcagttgtgt 4680
gtaagcaagt ttttttttag ttaggagaa atacttttcc attgtttaac tgcaaaacaa 4740
gatgttaagg tatgcttcaa aaattttgta aattgtttat tttaaactta tctgtttgta 4800
aattgtact gattaagaat tgtatagtt cagcttgaat gtctcttaga gggTgggctt 4860
ttgttgatga gggaggggaa actttttttt tttctataga cttttttcag ataacatctt 4920
ctgagtcata accagcctgg cagtatgatg gcctagatgc agagaaaaca gtccttggt 4980
gaattgataa gtaaaggcag aaaagattat atgtcatacc tccattgggg aataagcata 5040
accctgagat tcttactact gatgagaaca ttatctgcTt atgccaaaaa attttaagca 5100
aatgaaagct accaatttaa agttacggaa tctaccattt taaagttaat tgcttgtcaa 5160
gctataacca caaaaaataat gaattgatga gaaatacaat gaaggaggcaa tgtccatctc 5220
aaaatactgc ttttacaaaa gcagaataaa agcgaaaaga aatgaaaatg ttacactaca 5280
ttaatcctgg aataaaaagaa gccgaaataa atgagagatg agttgggatc aagtggattg 5340
aggaggctgt gctgtgtgcc aatgtttcgt ttgcctcaga caggtatctc ttcgttatca 5400
gaagagttgc ttcatttcat ctgggagcag aaaacagcag gcagctgtta acagataagt 5460
ttaacttgca tctgcagtat tgcagttag ggataagtgc ttatttttaa gagctgtgga 5520
gttcttaaat atcaaccatg gcactttctc ctgacccctt ccctagggga tttcaggatt 5580
gagaaatttt tccatcgagc ctttttaaaa ttgtaggact tgttctgtg ggcttcagtg 5640
atgggatagt acacttcact cagaggcatt tgcacttta aataatttct taaaagcctc 5700
taaagtgatc agtgcttga tgccaactaa ggaaatttgt ttagcattga atctctgaag 5760
gctctatgaa aggaatagca tgatgtgctg ttagaatcag atgttactgc taaaatttac 5820

```

atgttgtgat gtaaattgtg tagaaaacca ttaaatcatt caaaataata aactatTTTT 5880
 attagagaat gtatactttt agaaagctgt ctccttattt aaataaaata gtgtttgtct 5940
 gtagttcagt gttggggcaa tcttgggggg gattcttctc taatctttca gaaactttgt 6000
 ctgcgaacac tctttaatgg accagatcag gatttgagcg gaagaacgaa tgtaacttta 6060
 aggcaggaaa gacaaatTTT attcttcata aagtgatgag catataataa ttccaggcac 6120
 atggcaatag aggccctcta aataaggaat aaataacctc ttagacaggt gggagattat 6180
 gatcagagta aaaggttaatt acacatttta tttccagaaa gtcaggggtc tataaattga 6240
 cagtgattag agtaatactt tttcacattt ccaaagtttg catgttaact ttaaattgctt 6300
 acaatcttag agtggttaggc aatgtttttac actattgacc ttatataggg aaggaggagg 6360
 gtgcctgtgg ggttttaaaag aattttcctt tgcagaggca tttcatcctt catgaagcca 6420
 ttcaggattt tgaattgcat atgagtgtt ggctcttctt tctgttctag tgagtgtatg 6480
 agaccttgca gtgagtttat cagcatactc aaaatTTTT tcttggattt tggagggatg 6540
 ggaggagggg gtggggctta cttgtttag cttttttttt ttttacagac ttcacagaga 6600
 atgcagttgt cttgacttca ggtctgtctg ttctgttggc aagtaaatgc agtactgttc 6660
 tgatcccgtc gctattagaa tgcattgtga aacgactgga gtatgattaa aagttgtgtt 6720
 cccaatgct tggagtagtg attgttgaag gaaaaaatcc agctgagtga taaaggctga 6780
 gtgttgagga aatttctgca gttttaagca gtcgtatttg tgattgaagc tgagtacatt 6840
 ttgctgggtg attttttagt aaaatgcttt ttgttcattt ctggtggtgg gaggggactg 6900
 aagcctttag tcttttccag atgcaacctt aaaatcagtg acaagaaaca ttccaaacaa 6960
 gcaacagtct tcaagaaatt aaactggcaa gtggaaatgt ttaaacagtt cagtgatctt 7020
 tagtgcattg tttatgtgtg ggtttctctc tccctcctt tggtcttaatt tcttacatgc 7080
 aggaacactc agcagacaca cgtatgcgaa gggccagaga agccagacc agtaagaaaa 7140
 aatagcctat ttactttaaa taaaccaaac attccatttt aaatgtgggg attgggaacc 7200
 actagtctt tcagatggta ttcttcagac tatagaagga gcttcagtt gaattcacca 7260
 gtggacaaaa tgaggaaaac aggtgaacaa gctttttctg tatttacata caaagtcaga 7320
 tcagttatgg gacaatagta ttgaatagat ttcagcttta tgctggagta actggcatgt 7380
 gagcaaaactg tgttggcgtg ggggtggagg ggtgaggtgg gcgctaagcc tttttttaag 7440
 atttttcagg taccctcac taaaggcacc gaaggcttaa agtaggacaa ccatggagcc 7500
 ttcctgtggc aggagagaca acaaagcgt attatcctaa ggtcaagaga agtgtcagcc 7560
 tcacctgatt tttattagta atgaggactt gcctcaactc cctctttctg gagtgaagca 7620
 tccgaaggaa tgcttgaagt accctgggc ttctcttaac atttaagcaa gctgttttta 7680
 tagcagctct taataataaaa gcccaaactt caagcgtgc ttgaagggga gggaaagggg 7740
 gaaagcgggc aaccactttt ccctagcttt tccagaagcc tgttaaaagc aaggtctccc 7800
 cacaagcaac ttctctgcca catcgccacc ccgtgccttt tgatctagca cagacccttc 7860
 acccctcacc tcgatgcagc cagtagcttg gatccttgtg ggcatgatcc ataatcggtt 7920
 tcaaggtaac gatggtgtcg aggtcttttg tgggttgaac tatgttagaa aaggccatta 7980
 atttgctgc aaattgttaa cagaagggtt ttaaaaccac agctaagtag ctctattata 8040
 atacttatcc agtgactaaa accaacttaa accagtaagt ggagaaataa catgttcaag 8100
 aactgtaatg ctgggtggga acatgtaact tgtagactgg agaagatagg catttgagt 8160

gctgagaggg cttttgggtg ggaatgcaaa aattctctgc taagactttt tcaggtgaac 8220
ataacagact tggccaagct agcatcttag cggaagctga tctccaatgc tcttcagtag 8280
ggatcatgaag gtttttcttt tcctgagaaa acaacacgta ttgttttctc aggttttgct 8340
ttttggcctt tttctagctt aaaaaaaaaa aaagcaaaag atgctggtgg ttggcactcc 8400
tggtttccag gacgggggtc aaatccctgc ggcgtctttg ctttgactac taatctgtct 8460
tcaggactct ttctgtatct ctccttttct ctgcaggctgc tagttcttgg agttttgggg 8520
aggtgggagg taacagcaca atatctttga actatataca tccttgatgt ataatttgct 8580
aggagcttga cttgattgta tattcatatt tacacgagaa cctaataata ctgccttgct 8640
tttttcaggt aatagcctgc agctggtgtt ttgagaagcc ctactgctga aaacttaaca 8700
attttgtgta ataaaaatgg agaagctcta aattgttgtg gttcttttgt gaataaaaaa 8760
atcttgattg gggaaaaaa 8779

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (3)

<223> LNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (14) .. (16)

<223> LNA

<400> 3

ctagttcact gaatgc 16

<210> 4

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (16)

<223> 2'-O-Me RNA

<400> 4

gc auucagug aac uag 16

<210> 5
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 5
gcauucagug aacuag 16
<210> 6
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 6
gcauucagug aacuag 16
<210> 7
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>

<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (4)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 7
gcauucagug aacuag 16
<210> 8
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (5)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 8
gcauucagug aacuag 16
<210> 9
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (6)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA

<400> 9
gcauucagug aacuag 16
<210> 10
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (7)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (11) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 10
gcauucagug aacuag 16
<210> 11
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (8)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 11
gcauucagug aacuag 16
<210> 12
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>

<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (9)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 12
gcauucagug aacuag 16
<210> 13
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (10)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 13
gcauucagug aacuag 16
<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 探针
<400> 14
tgttggcacg acaccttcag ggact 25
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物
<400> 15
tgggttagag aaggcgtgta ctg 23
<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 16
tcagcggcaa ctgggaaa 18
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 探针
<400> 17
cacacccgcc accagttcgc catg 24
<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 18
cgcgagcaca gcttctttg 19
<210> 19
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 19
atgccggagc cgttgtc 17
<210> 20
<211> 16
<212> RNA

<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (6) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 20
gcauucagug aacuaag 16
<210> 21
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (4)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 21
gcauucagug aacuaag 16
<210> 22
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (5)
<223> 2'-O-Me RNA

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 22
gcauucagug aacuag 16
<210> 23
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (6)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 23
gcauucagug aacuag 16
<210> 24
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (7)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 24
gcauucagug aacuag 16
<210> 25

<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (8)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (11) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 25
gcauucagug aacuag 16
<210> 26
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (9)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 26
gcauucagug aacuag 16
<210> 27
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (10)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 27
gcauucagug aacuag 16
<210> 28
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (11)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 28
gcauucagug aacuag 16
<210> 29
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 29

gcauucagug aacuag 16

<210> 30

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (4)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (6) .. (16)

<223> 2'-O-Me RNA

<400> 30

gcauucagug aacuag 16

<210> 31

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (5)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (7) .. (16)

<223> 2'-O-Me RNA

<400> 31

gcauucagug aacuag 16

<210> 32

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (6)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 32
gcauucagug aacuag 16
<210> 33
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (7)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 33
gcauucagug aacuag 16
<210> 34
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (8)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (16)

<223> 2'-O-Me RNA
<400> 34
gcauucagug aacuag 16
<210> 35
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (9)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (11) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 35
gcauucagug aacuag 16
<210> 36
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (10)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 36
gcauucagug aacuag 16
<210> 37
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (11)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 37
gcauucagug aacuag 16
<210> 38
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (12)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 38
gcauucagug aacuag 16
<210> 39
<211> 2534
<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)
<220>
<223> SR-B1 mRNA
<400> 39
ggaatcccg cccgaactcg ggggcgggct gcccgggcca tggcgcataa agcctctggc 60
cacctgcagg gctactgctg ctccggccac cgccaggcac acaccttgct gctgaggag 120
tctcggttc tgtcatctct gtggcctccg tcacctctgt ctccgtctcc ttcaggtcct 180
gagccccgag agccccctcc gcgcacgcgg acatgggcgg cagctccagg gcgcgctggg 240

```

tggccttggg gttgggcgcc ctggggctgc tgtttgctgc gctcggcggt gtcattgatcc 300
tcatgggtgcc ctccctcatc aagcagcagg tgctcaagaa tgtccgcata gacccgagca 360
gcctgtcctt cgggatgtgg aaggagatcc ccgtcccttt ctacttgtct gtctacttct 420
tcgaagtggg caacccaaac gaggtcctca acggccagaa gccagtagtc cgggagcgtg 480
gaccttatgt ctacaggagg ttcagacaaa aggtcaacat caccttcaat gacaacgaca 540
ccgtgtcctt cgtggagaac cgcagcctcc atttccagcc tgacaagtcg catggctcag 600
agagtgacta cattgtactg cctaacatct tggctcctggg gggctcgata ttgatggaga 660
gcaagcctgt gagcctgaag ctgatgatga ctttggcgct ggtcaccatg ggccagcgtg 720
cttttatgaa ccgcacagtt ggtgagatcc tgtggggcta tgacgatccc ttcgtgcatt 780
ttctcaacac gtacctccca gacatgcttc ccataaaggg caaatttggc ctgtttgttg 840
ggatgaacaa ctggaattct ggggtcttca ctgtcttcaac gggcgtccag aatttcagca 900
ggatccatct ggtggacaaa tggaacggac tcagcaagat cgattattgg cattcagagc 960
agtgtaacat gatcaatggg acttccgggc agatgtgggc acccttcatg acacccgaat 1020
cctcgttggg attcttcagc ccggaggcat gcaggtccat gaagctgacc tacaacgaat 1080
caagggtgtt tgaaggcatt cccacgtatc gtttcacggc ccccgatact ctgtttgcc 1140
acgggtccgt ctaccacccc aacgaaggct tctgccccatg ccgagagtct ggcattcaga 1200
atgtcagcac ctgcaggttt ggtgcgcctc tgtttctctc ccacccccac ttttacaacg 1260
ccgacctgtg gttgtcagaa gctgttcttg gtctgaacce taacccaaag gagcattcct 1320
tgttcctaga catccatccg gtcactggga tccccatgaa ctgttctgtg aagatgcagc 1380
tgagcctcta catcaaactc gtcaagggca tcgggcaaac aggaagatc gagccagtag 1440
ttctgccgtt gctgtgggtc gaacagagcg gagcaatggg tggcaagccc ctgagcacgt 1500
tctacacgca gctgggtgctg atgccccagg ttcttacta cgcgcagtat gtgctgctgg 1560
ggcttggagg cctcctgttg ctggtgcccc tcatctgcc  actgcgcagc caggagaaat 1620
gctttttgtt ttggagtggg agtaaaaagg gctcccagga taaggaggcc attcaggcct 1680
actctgagtc cctgatgtca ccagctgcca agggcacggt gctgcaagaa gccaaagctat 1740
agggtcctga agacactata agcccccaa acctgatagc ttggtcagac cagccaccca 1800
gtccctacac cccgcttctt gaggactctc tcagcggaca gccaccagt gccatggcct 1860
gagccccagc atgtcacacc tgtccgcacg cacggcacat ggatgcccac gcatgtgcaa 1920
aaacaactca gggaccaggg acagacctgc tgccaagtga gcctgatggg ccacaggtgt 1980
gctcttctaa atggcctgtg agccaggctg tgggaactct agctgctgtc agccccctct 2040
gtaggagctg gccctgcccc ggctcctgac ttccctcagg aagtctttct gtctttctcc 2100
atcagtctga aagccttagt tcccacagag gacggatctg tcaactcctag gggctgggca 2160
tatgtcggcc tcttgtgcca aggccaggca agcagctcca ggtcctgacc agtttgcaca 2220
cacactctgg agctgtatct ggcgtttttt ctatcgtctc tgctatgtca ctgaattaac 2280
cactgtacgt ggcagagggt gcaggcccc cagggtcctt atttttcagg catggggtca 2340
aagctagagg tatgggccgt ctacaccccc ccgcccccg gcactagtgt tacctacca 2400
gagggtattc ggaggcccag catcctgcaa ccgacctt ttttctactg gaagagaaat 2460
tttatcatct ttgaaagga agtcatgact gaagcaataa accttttcac tgattcaaca 2520
aaaaaaaaa aaaa 2534

```

<210> 40

<211> 2759

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> SR-B1 mRNA

<400> 40

```

gctcaggccc cgcccctgcc gccggaatcc tgaagcccaa ggctgcccgg gggcggtccg 60
gcggcgccgg cgatggggca taaaaccact ggccacctgc cgggctgctc ctgcgtgcgc 120
tgccgtcccc gatccaccgt gcctctgcgg cctgcgtgcc cggagtcccc gcctgtgtcg 180
tctctgtcgc cgtccccgtc tcttgccagg cgcggagccc tgcgagccgc gggtagggccc 240
caggcgcgca gacatgggct gctccgccaa agcgcgctgg gctgccgggg cgctgggcgt 300
cgcggggcta ctgtgcgtg tgctgggcgc tgtcatgata gtgatggtgc cgtcgtcat 360
caagcagcag gtccttaaga acgtgcgcat cgaccccagt agcctgtcct tcaacatgtg 420
gaaggagatc cctatcccct tctatctctc cgtctacttc tttagctca tgaacccag 480
cgagatcctg aagggcgaga agccgcaggt gcgggagcgc gggccctacg tgtacaggga 540
gttcaggcac aaaagcaaca tcaccttcaa caacaacgac accgtgtcct tctcagagta 600
ccgcaccttc cagttccagc cctccaagtc ccacggctcg gagagcgact acatcgtcat 660
gccaacatc ctggtcttgg gtgcggcggt gatgatggag aataagccca tgaccctgaa 720
gctcatcatg accttggcat tcaccaccct cggcgaacgt gccttcatga accgcactgt 780
gggtgagatc atgtggggct acaaggacc ccttgtgaat ctcatcaaca agtactttcc 840
aggcatgttc cccttcaagg acaagttcgg attatttgcg gagctcaaca actccgactc 900
tggtgtcttc acggtgttca cgggggtcca gaacatcagc aggatccacc tcgtggacaa 960
gtggaacggg ctgagcaagg ttgacttctg gcattccgat cagtgaaca tgatcaatgg 1020
aacttctggg caaatgtggc cgcccttcat gactcctgag tcctcgctgg agttctacag 1080
cccggaggcc tgccgatcca tgaagctaata gtacaaggag tcagggtgtg ttgaaggcat 1140
ccccacctat cgcttcgtgg ctcccaaaac cctgtttgcc aacgggtcca tctaccacc 1200
caacgaaggc ttctgcccgt gcctggagtc tggaattcag aacgtcagca cctgcaggtt 1260
cagtgcctcc ttgtttctct cccatcctca ctctctcaac gctgaccggg ttctggcaga 1320
agcggtgact ggctgcacc ctaaccagga ggcacactcc ttgttctgga acatccacc 1380
ggtcacggga atcccatga actgctctgt gaaactgcag ctgagcctct acatgaaatc 1440
tgtcgcaggc attggacaaa ctgggaagat tgagcctgtg gtctgcccgc tgctctggtt 1500
tgcagagagc ggggccatgg agggggagac tcttcacaca ttctacactc agctggtgtt 1560
gatgccaag gtgatgcaat atgcccagta cgtcctctg gcgctgggct gcgtcctgct 1620
gctggtccct gtcatctgcc aaatccggag ccaagagaaa tgctatttat tttaggagtag 1680
tagtaaaaag ggctcaaagg ataaggaggc cattcaggcc tattctgaat ccctgatgac 1740
atcagctccc aagggtctg tgctgcagga agcaaaactg tagggtcctg aggacaccgt 1800
gagccagcca ggctggccg ctgggcctga ccggccccc agccctaca cccgcttct 1860
cccggactct ccagcggac agccccccag cccacagcc tgagcctccc agctgcatg 1920

```

tgccctgttgc acacctgcac acacgccctg gcacacatac acacatgcgt gcaggcttgt 1980
 gcagacactc agggatggag ctgctgctga agggacttgt agggagaggc tcgtcaacaa 2040
 gcaactgttct ggaaccttct ctccacgtgg ccacacaggc tgaccacagg ggctgtgggt 2100
 cctgcgtccc ctccctcggg tgagcctggc ctgtcccgtt cagccgttgg gccaggcctt 2160
 cctccccctcc aaggtgaaac actgcagtcc cgggtgtggg gctccccatg caggacgggc 2220
 caggctggga gtgccgcctt cctgtgccaa attcagtggg gactcagtgc ccaggccctg 2280
 gccacgagct ttggccttgg tctacctgcc aggccaggca aagcgccttt acacaggcct 2340
 cgaaaaacaa tggagtgagc acaagatgcc ctgtgcagct gcccgagggt ctccgcccac 2400
 cccggccgga ctttgatccc cccgaagtct tcacaggcac tgcacgggt tgtctggcgc 2460
 ccttttcctc cagcctaaac tgacatcatc ctatggactg agccggccac tctctggccg 2520
 aagtggccgc aggtgtgcc cccgagctgc cccaccccc tcacagggtc cctcagatta 2580
 taggtgcccc ggctgagggt aagaggcctg ggggcctgc cttccgggcg ctcttgacc 2640
 ctggggcaaa cctgtgaccc ttttctactg gaatagaaat gagttttatc atctttgaaa 2700
 aataattcac tcttgaagta ataaacgttt aaaaaaatgg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2759

<210> 41

<211> 2761

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<223> DMPK mRNA

<400> 41

gaactggcca gagagacca agggatagtc agggacgggc agacatgcag ctagggttct 60
 ggggcctgga caggggcagc caggccctgt gacgggaaga ccccgagctc cggcccgggg 120
 aggggccatg gtgttgctg cccaacatgt cagccgaagt gcggctgagg cagctccagc 180
 agctgggtgct ggaccaggc ttcctgggac tggagccct gctcgacctt ctctgggcg 240
 tccaccagga gctgggtgcc tctcacctag ccaggacaa gtatgtggcc gacttcttgc 300
 agtgggtgga gcccattgca gcaaggctta aggaggtccg actgcagagg gatgattttg 360
 agattttgaa ggtgatcggg cgtggggcgt tcagcgaggt agcgggtgtg aagatgaaac 420
 agacgggcca agtgatgcc atgaagatta tgaataagt ggacatgctg aagagaggcg 480
 aggtgtcgtg cttccgggaa gaaagggatg tattagttaa aggggaccgg cgctggatca 540
 cacagctgca ctttgccctc caggatgaga actacctgta cctgggtcatg gaatactacg 600
 tgggcgggga cctgctaacc ctgctgagca agtttgggga gcggatcccc gccgagatgg 660
 ctcgcttcta cctggccgag attgtcatgg ccatagactc cgtgcaccgg ctgggctacg 720
 tgcacaggga catcaaacca gataacattc tgctggaccg atgtgggcac attcgcttgg 780
 cagacttcgg ctctgcctc aaactgcagc ctgatggaat ggtgaggtcg ctggtggctg 840
 tgggcacccc ggactacctg tctcctgaga ttctgcaggc cgttggtgga gggcctgggg 900
 caggcagcta cgggccagag tgtgactggg gggcactggg cgtgttcgcc tatgagatgt 960
 tctatgggca gaccccttc tacgcggact ccacagccga gacatatgcc aagattgtgc 1020
 actacaggga acacttgtcg ctgccgctgg cagacacagt tgtccccgag gaagctcagg 1080

acctcattcg tgggctgctg tgtcctgctg agataaggct aggtcgaggt ggggcaggtg 1140
 atttccagaa acatcctttc ttctttggcc ttgattggga gggctctcca gacagtgtac 1200
 cccccctttac accagacttc gagggtgcca cggacacatg caatttcgat gtggtggagg 1260
 accggctcac tgccatgggtg agcgggggcg gggagacgct gtcagacatg caggaagaca 1320
 tgcccccttgg ggtgcgcctg cccttcgtgg gctactccta ctgctgcatg gccttcagag 1380
 acaatcaggt cccggacccc acccctatgg aactagaggc cctgcagttg cctgtgtcag 1440
 acttgcaagg gcttgacttg cagccccag tgtccccacc ggatcaagtg gctgaagagg 1500
 ctgacctagt ggctgtccct gccctgtgg ctgaggcaga gaccacggta acgctgcagc 1560
 agctccagga agccctggaa gaagaggttc tcaccggca gacctgagc cgcgagctgg 1620
 aggccatccg gaccgccaac cagaacttct ccagccaact acaggaggcc gaggtccgaa 1680
 accgagacct ggaggcgcat gttcggcagc tacaggaacg gatggagatg ctgcaggccc 1740
 caggagccgc agccatcacg ggggtcccca gtccccgggc cacggatcca ccttcccatc 1800
 tagatggccc cccggccgtg gctgtgggccc agtggccgct ggtggggcca ggccccatgc 1860
 accgccgtca cctgctgctc cctgccagga tccttaggcc tggcctatcc gaggcgcgtt 1920
 gcctgtcctt gttcgccgtg gctctggctg ctgccgccac actgggctgc actgggttgg 1980
 tggcctatac cggcggtctc accccagtct ggtgtttccc gggagccacc ttgccccct 2040
 gaaccctaag actccaagcc atctttcatt taggcctcct aggaaggtcg agcgaccagg 2100
 gagcgaccca aagcgtctct gtgcccacg cgccccccc cccccccac cgctccgctc 2160
 cacacttctg tgagcctggg tccccacca gctccgctcc tgtgatccag gcctgccacc 2220
 tggcggccgg ggaggaggga acagggtcg tgcccagcac ccctggttcc tgcagagctg 2280
 gtagccaccg ctgctgcagc agctgggcat tcgccgacct tgctttactc agccccgacg 2340
 tggatgggca aactgctcag ctcatccgat ttacttttt cactctccca gccatcagtt 2400
 acaagccata agcatgagcc ccctatttcc aggacatcc cattcccata gtgatggatc 2460
 agcaagacct ctgccagcac acacggagtc tttggcttcg gacagcctca ctctggggg 2520
 ttgctgcaac tccttccccg tgtacacgtc tgcaactctaa caacggagcc acagctgcac 2580
 tccccctcc cccaaagcag tgtgggtatt tattgatctt gttatctgac tcaactgacag 2640
 actccgggac ccacgtttta gatgcattga gactcgacat tcctcggtat ttattgtctg 2700
 tccccaccta cgacctccac tcccgacct tgcaataaa atacttctgg tctgcctaa 2760

a 2761

<210> 42

<211> 3243

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> DMPK mRNA

<400> 42

gccacaagcc tccaccccag ctggtcccc acccaggctg cccagtttaa cattcctagt 60
 cataggacct tgacttctga gaggcctgat tgtcatctgt aaataagggg taggactaaa 120
 gcactcctcc tggaggactg agagatgggc tggaccggag cacttgagtc tgggatatgt 180

```

gaccatgcta cctttgtctc cctgtcctgt tccttcccc agccccaat ccagggtttt 240
ccaaagtgtg gttcaagaac cacctgcac tgaatctaga ggtactggat acaacccac 300
gtctgggccg ttaccagga cattctacat gagaacgtgg ggggtgggcc ctggctgcac 360
ctgaactgtc acctggagtc aggggtggaag gtggaagaac tgggtcttat ttccttctcc 420
ccttgttctt tagggctctgt ccttctgcag actccgttac cccaccctaa ccatcctgca 480
cacccttgga gccctctggg ccaatgccct gtcccgc aaa gggcttctca ggcattctcac 540
ctctatggga gggcattttt ggccccaga accttacacg gtgtttatgt ggggaagccc 600
ctgggaagca gacagtccta ggggtgaagct gagaggcaga gagaagggga gacagacaga 660
gggtggggct ttcccccttg tctccagtgc ctttctgtgt gaccctcggg tcttttcccc 720
caccaccccc ccagcggagc ccatcgtggg gaggtttaag gaggtccgac tgcagaggga 780
cgacttcgag attctgaagg tgatcggacg cggggcggtt agcgaggtag cggtagtgaa 840
gatgaagcag acgggccagg tgtatgccat gaagatcatg aacaagtggg acatgctgaa 900
gagggcgag gtgtcgtgct tccgtgagga gagggacgtg ttggtgaatg gggaccggcg 960
gtggatcacg cagctgcact tcgccttcca ggatgagaac tacctgtacc tggatcatgga 1020
gtattacgtg ggccggggacc tgctgacact gctgagcaag tttggggagc ggattccggc 1080
cgagatggcg cgcttctacc tggcggagat tgtcatggcc atagactcgg tgcaccggct 1140
tggctacgtg cacagggaca tcaaaccga caacatcctg ctggaccgct gtggccacat 1200
ccgcctggcc gacttcggct cttgcctcaa gctgcgggca gatggaacgg tgcggtcgct 1260
gggtggctgtg ggcacccag actacctgtc ccccgagatc ctgcaggctg tggcggttg 1320
gcctgggaca ggcagctacg ggcccgagtg tgactggtgg gcgctgggtg tattgccta 1380
tgaaatgttc tatgggcaga cgcccttcta cgcgattcc acggcggaga cctatggcaa 1440
gatcgtccac tacaaggagc acctctctt gccgctggtg gacgaagggg tccctgagga 1500
ggctcgagac ttcatcagc ggttgctgtg tccccggag acacggctgg gccgggttg 1560
agcaggcgac ttccggacac atcccttctt ctttggcctc gactgggatg gtctccggga 1620
cagcgtgccc ccctttacac cggatttca aggtgccacc gacacatgca acttcgactt 1680
gggtggaggac gggctcactg ccatggtgag cggggcgagg gagacactgt cggacattcg 1740
ggaaggtgcg ccgctagggg tccacctgcc ttttgtgggc tactcctact cctgcatggc 1800
cctcagggac agtgaggctc caggccccac acccatggaa ctggaggccg agcagctgct 1860
tgagccacac gtgcaagcgc ccagcctgga gccctcgggtg tccccacagg atgaaacagc 1920
tgaagtggca gttccagcgg ctgtccctgc ggcagaggct gaggccgagg tgacgctgcg 1980
ggagctccag gaagccctgg aggaggaggt gtcacccgg cagagcctga gccgggagat 2040
ggaggccatc cgcacggaca accagaactt cgccagtcaa ctacgcgagg cagaggctcg 2100
gaaccgggac ctagaggcac acgtccggca gttgcaggag cggatggagt tgctgcaggc 2160
agagggagcc acagctgtca cgggggtccc cagtccccg gccacggatc caccttccca 2220
tctagatggc ccccgggccg tggtgtggg ccagtcccc ctggtggggc caggcccat 2280
gcaccgccgc cacctgctgc tcctgccag ggtccctagg cctggcctat cggagcgct 2340
ttccctgctc ctgttcgcc ttgttctgtc tcgtgccgc gccctgggtg gcattgggtt 2400
gggtggccac gccggccaac tcaccgcagt ctggcgccgc ccaggagccg cccgcgtcc 2460
ctgaacccta gaactgtctt cgactccggg gcccgttg aagactgagt gcccggggca 2520

```

cggcacagaa gccgcgcca ccgcctgcca gttcacaacc gctccgagcg tgggtctccg 2580
 cccagctcca gtcctgtgat ccggggccgc cccctagcgg ccggggaggg aggggccggg 2640
 tccgcggccg gcgaacgggg ctccaagggt cctttagacc gggaatgctg ctgctgctgc 2700
 tgctgctgct gctgctgctg ctgctgctgc tgctgctgct gctgctgggg ggatcacaga 2760
 ccatttcttt ctttcggcca ggctgaggcc ctgacgtgga tgggcaaact gcaggcctgg 2820
 gaaggcagca agccgggccc tccgtgttcc atcctccacg cacccccacc tatcgttggt 2880
 tcgcaaagtg caaagctttc ttgtgcatga cgccctgctc tggggagcgt ctggcgcgat 2940
 ctctgcctgc ttactcgga aatttgcttt tgccaaaccc gctttttcgg ggatcccgcg 3000
 cccccctcct cacttgcgct gctctcgga cccagccgg ctccgcccgc ttggcggtt 3060
 tggatatatta ttgacctcgt cctccgactc gctgacagge tacaggacc ccaacaaccc 3120
 caatccacgt tttggatgca ctgagacccc gacattctc ggtatttatt gtctgtcccc 3180
 acctaggacc cccacccccg accctcgca ataaaaggcc ctccatctgc ccaaagctct 3240
 gga 3243

<210> 43

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (3)

<223> LNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (14) .. (16)

<223> LNA

<400> 43

acaataaata ccgagg 16

<210> 44

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (3)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 44
ccucgguauu uauugu 16
<210> 45
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (4)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (7)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (11)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 45
ccucgguauu uauugu 16
<210> 46
<211> 2761
<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)
<220>
<223> DMPK mRNA
<400> 46
gaactggcca gagagacca agggatagtc agggacgggc agacatgcag ctagggttct 60
ggggcctgga caggggcagc caggccctgt gacgggaaga ccccgagctc cggcccgggg 120

```

aggggccatg gtgttgccctg cccaacatgt cagccgaagt gcggctgagg cagctccagc 180
agctgggtgct ggaccacaggc ttcctgggac tggagcccct gctcgacctt ctcctgggcg 240
tccaccagga gctgggtgcc tctcacctag cccaggacaa gtatgtggcc gacttcttgc 300
agtgggtgga gcccattgca gcaaggctta aggaggtccg actgcagagg gatgattttg 360
agattttgaa ggtgatcggg cgtggggcgt tcagcgaggt agcggtggtg aagatgaaac 420
agacgggcca agtgatatgcc atgaagatta tgaataagt ggacatgctg aagagaggcg 480
aggtgtcgtg cttccgggaa gaaagggatg tattagtgaaggggaccgg cgctggatca 540
cacagctgca ctttgcccttc caggatgaga actacctgta cctggtcatg gaatactacg 600
tgggcgggga cctgctaacg ctgctgagca agtttgggga gcggatcccc gccgagatgg 660
ctcgcttcta cctggccgag attgtcatgg ccatagactc cgtgcaccgg ctgggctacg 720
tgcacaggga catcaaacca gataacattc tgctggaccg atgtgggcac attgccttg 780
cagacttcgg ctcctgcctc aaactgcagc ctgatggaat ggtgaggctg ctggtggctg 840
tgggcacccc ggactacctg tctcctgaga ttctgcaggc cgttggtgga gggcctgggg 900
caggcagcta cgggccagag tgtgactggt gggcactggg cgtgttcgcc tatgagatgt 960
tctatgggca gaccccttc tacgcggact ccacagccga gacatatgcc aagattgtgc 1020
actacaggga acacttgtcg ctgccgttg cagacacagt tgtccccgag gaagctcagg 1080
acctcattcg tgggctgctg tgtcctgctg agataaggct aggtcgaggt ggggcaggtg 1140
atttccagaa acatcctttc ttctttggcc ttgattggga gggctctccga gacagtgtac 1200
ccccctttac accagacttc gagggtgcca cggacacatg caatttcgat gtggtggagg 1260
accggctcac tgccatggtg agcggggcg gggagacgct gtcagacatg caggaagaca 1320
tgcccccttg ggtgcgcctg cccttcgtgg gctactccta ctgctgcatg gccttcagag 1380
acaatcaggc cccggacccc acccctatgg aactagaggc cctgcagttg cctgtgtcag 1440
acttgcaagg gcttgacttg cagcccccag tgtccccacc ggatcaagtg gctgaagagg 1500
ctgacctagt ggctgtccct gcccctgtgg ctgaggcaga gaccacgta acgctgcagc 1560
agctccagga agccctggaa gaagaggttc tcaccggca gagcctgagc cgcgagctgg 1620
aggccatccg gaccgccaac cagaacttct ccagccaact acaggaggcc gaggtccgaa 1680
accgagacct ggaggcgcat gttcggcagc tacaggaacg gatggagatg ctgcaggccc 1740
caggagccgc agccatcacg ggggtcccca gtccccgggc cacggatcca cttcccatc 1800
tagatggccc cccggccgtg gctgtgggcc agtgcccgtt ggtggggcca ggccccatgc 1860
accgccgtca cctgctgctc cctgccagga tccttaggcc tggcctatcc gaggcgctt 1920
gcctgtctct gttcgccgtt gctctggctg ctgccgccac actgggctgc actgggttg 1980
tggcctatac cggcggtctc acccagttt ggtgtttccc gggagccacc ttgccccct 2040
gaaccctaag actccaagcc atctttcatt taggcctctt aggaaggctg agcgaccagg 2100
gagcgacca aagcgtctct gtgccatcg ccccccccc cccccccac cgctccgctc 2160
cacacttctg tgagcctggg tccccacca gctccgctcc tgtgatccag gcctgccacc 2220
tggcgccgg ggaggaggga acagggtcgt tgcccagcac ccctggttcc tgcagagctg 2280
gtagccaccg ctgctgcagc agctgggcat tcgccacct tgctttactc agccccgacg 2340
tggtatgggca aactgctcag ctcatccgat ttacttttt cactctccca gccatcagtt 2400
acaagccata agcatgagcc ccctatttcc aggacatcc cattcccata gtgatggatc 2460

```

agcaagacct ctgccagcac acacggagtc tttggcttcg gacagcctca ctcctggggg 2520
ttgctgcaac tccttccccg tgtacacgtc tgcactctaa caacggagcc acagctgcac 2580
tccccctcc cccaaagcag tgtgggtatt tattgatctt gttatctgac tcaactgacag 2640
actccgggac ccacgtttta gatgcattga gactcgacat tcctcggtat ttattgtctg 2700
tccccacctc cgacctccac tcccgaccct tgcgaataaa atacttctgg tctgccctaa 2760
a 2761

<210> 47

<211> 17

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (3)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (15) .. (17)

<223> 2'-O-Me RNA

<400> 47

auccugauaa acauuaa 17

<210> 48

<211> 17

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (5)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (8) .. (8)

<223> 2'-O-Me RNA

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12) .. (12)

<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (17)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 48
auccugauaa acauuuaa 17
<210> 49
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> LNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> LNA
<400> 49
gcattctaata agcagc 16
<210> 50
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 50
gcugcuauua gaaugc 16

<210> 51
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<223> 组合DNA/RNA分子：合成寡核苷酸
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4) .. (4)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5) .. (6)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (7)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (9)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (13)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 51
gcugctatta gaaugc 16
<210> 52

<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 52
ccucgguauu uauugu 16
<210> 53
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 53
ccucgguauu uauugu 16
<210> 54
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (4)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (7)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (11)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 54
ccucgguauu uauugu 16
<210> 55
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5) .. (6)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (8)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (12)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>

<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 55
ccucgguauu uauugu 16
<210> 56
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 56
ccucgguauu uauugu 16
<210> 57
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 57
ccucgguauu uauugu 16
<210> 58
<211> 16

<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 58
ccucgguauu uauugu 16
<210> 59
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 59
ccucgguauu uauugu 16
<210> 60
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<223> 组合DNA/RNA分子: 合成寡核苷酸
<220>

<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4) .. (4)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5) .. (6)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7) .. (7)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (8) .. (8)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (9) .. (11)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (12)
<223> RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (13)
<223> DNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 60
ccucggtatt tatugu 16
<210> 61
<211> 16

<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 61
ccucgguauu uauugu 16
<210> 62
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 62
ccucgguauu uauugu 16
<210> 63
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)

<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 63
ccucgguauu uauugu 16
<210> 64
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 64
ccucgguauu uauugu 16
<210> 65
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 65
ccucgguauu uauugu 16

<210> 66
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> 2'-O-Me RNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (14) .. (16)
<223> 2'-O-Me RNA
<400> 66
ccucgguauu uauugu 16
<210> 67
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (3)
<223> LNA
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (15) .. (17)
<223> LNA
<400> 67
ttaatgttta tcaggat 17

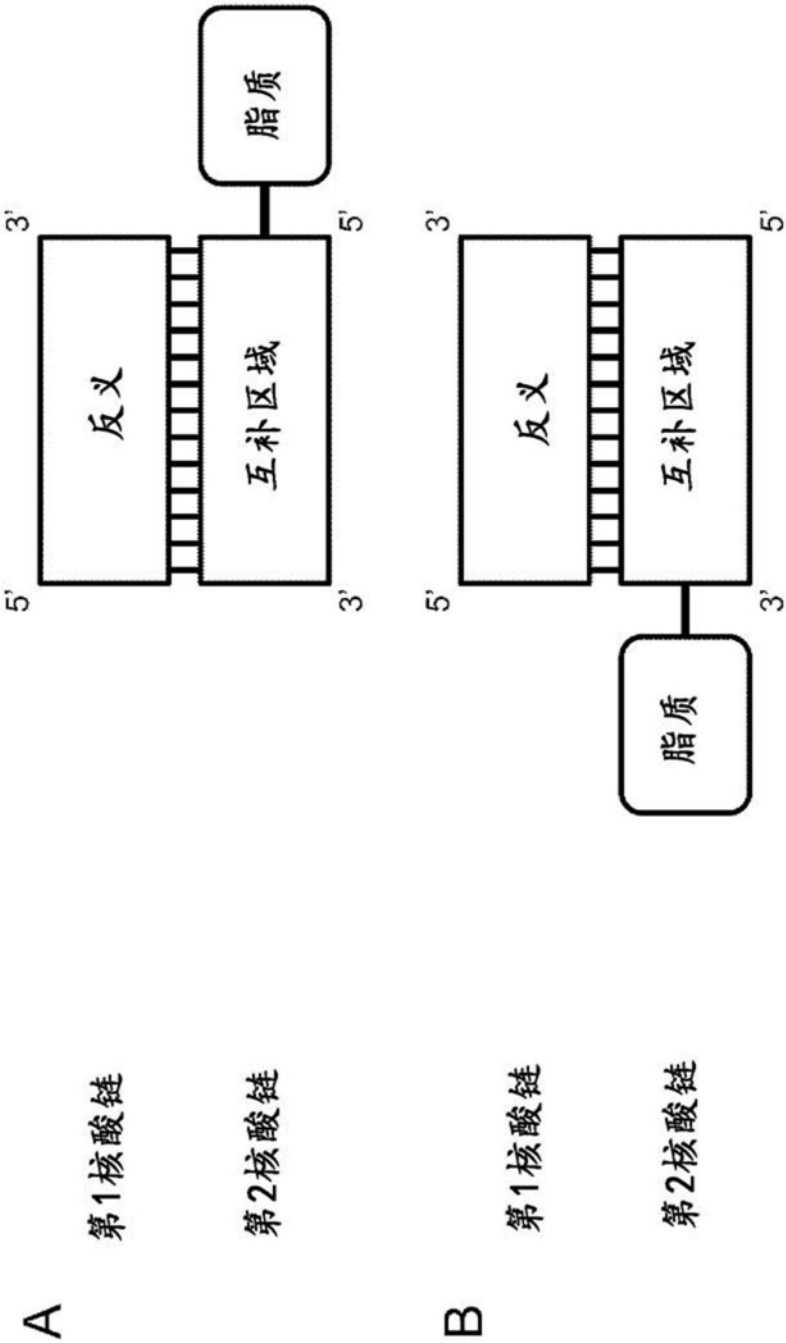


图1

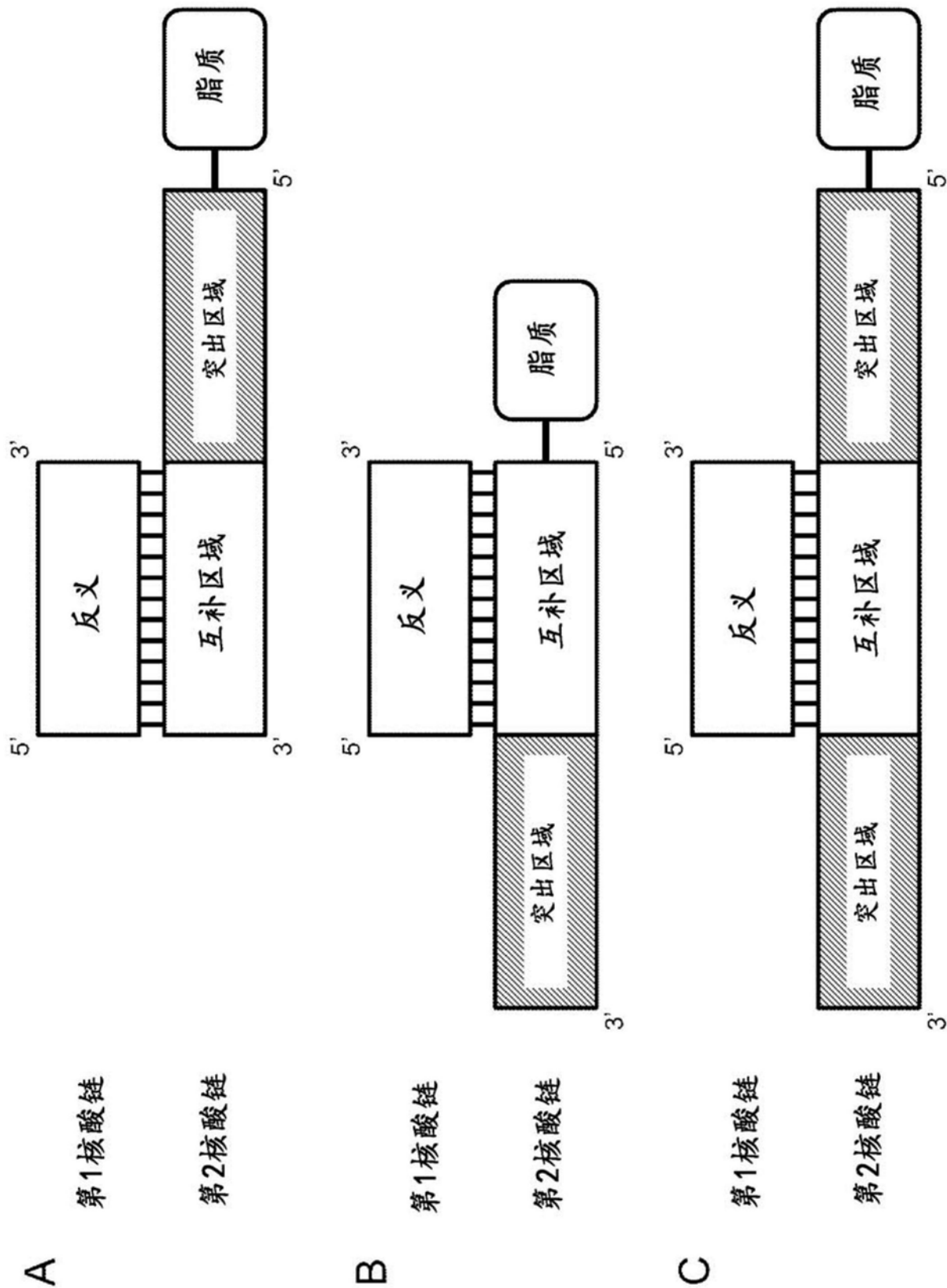


图2

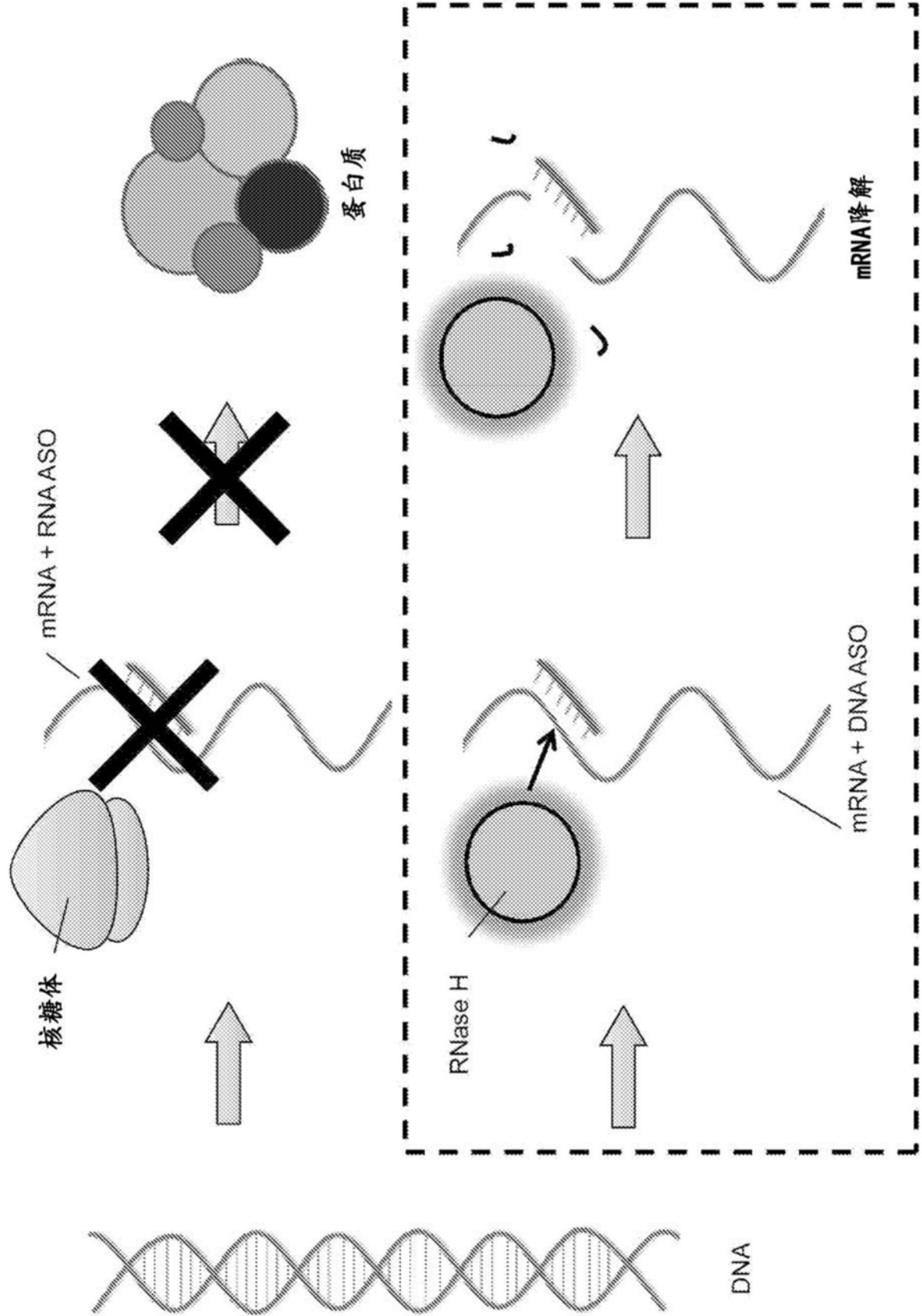


图3

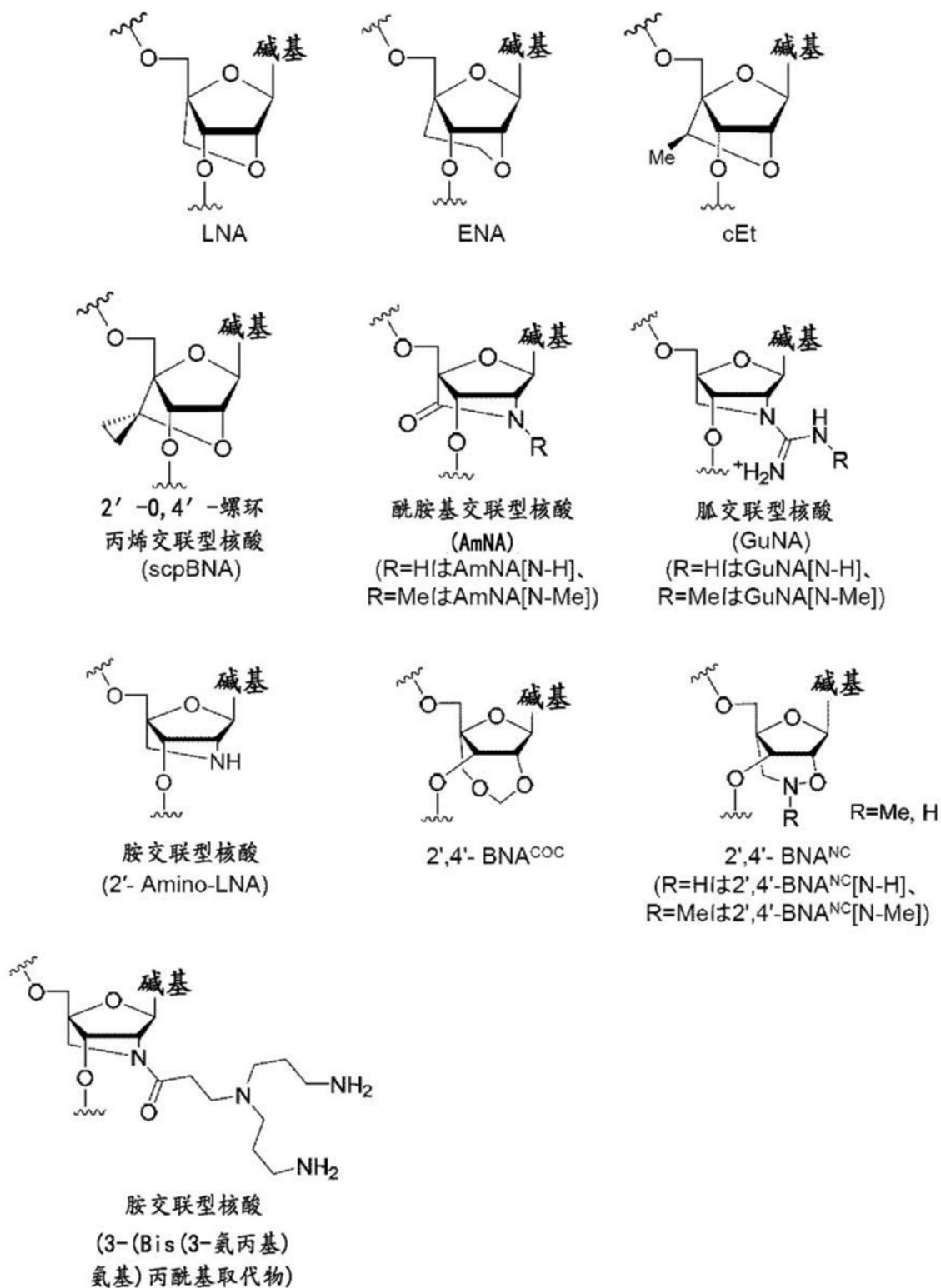


图4

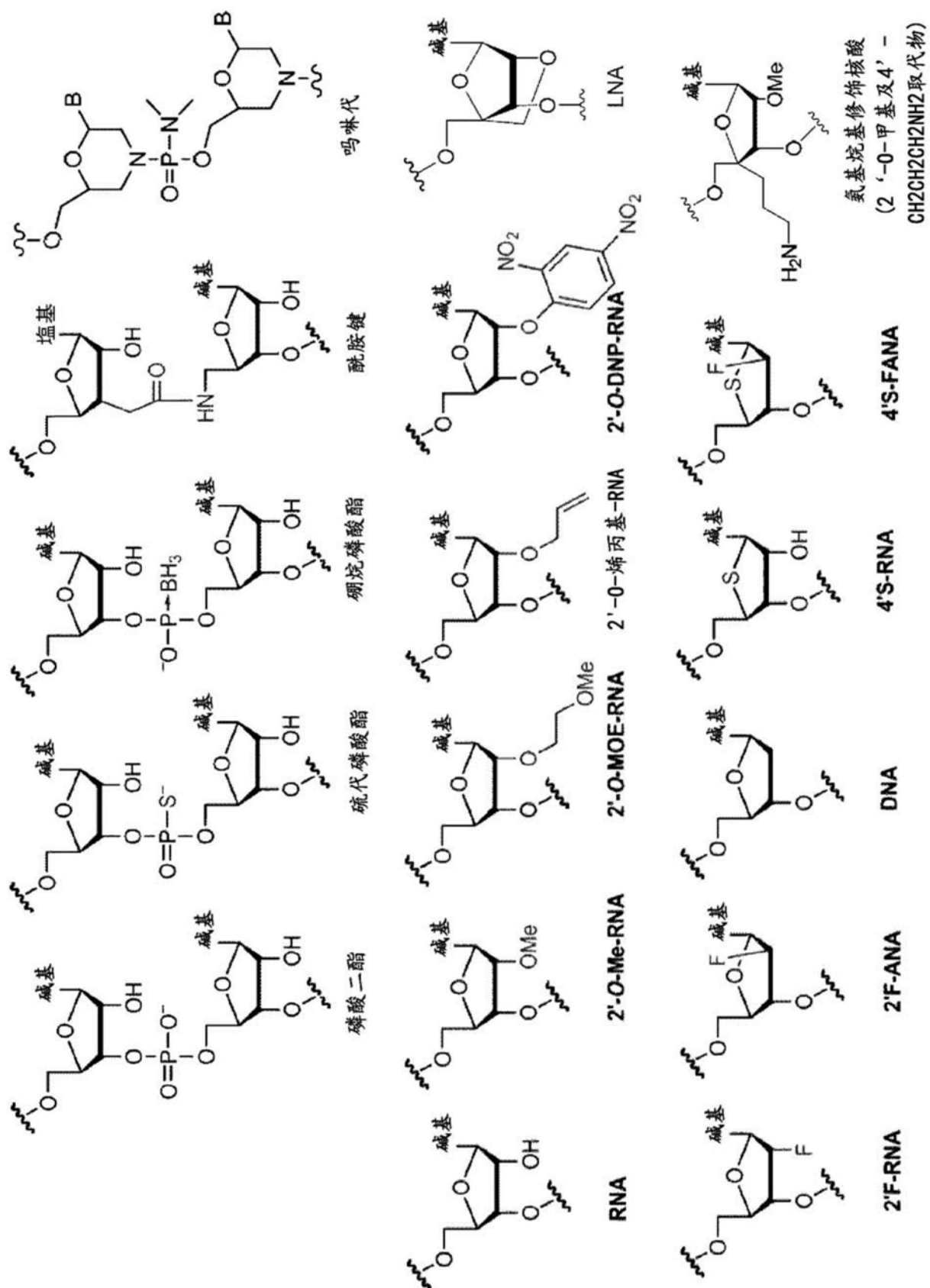


图5

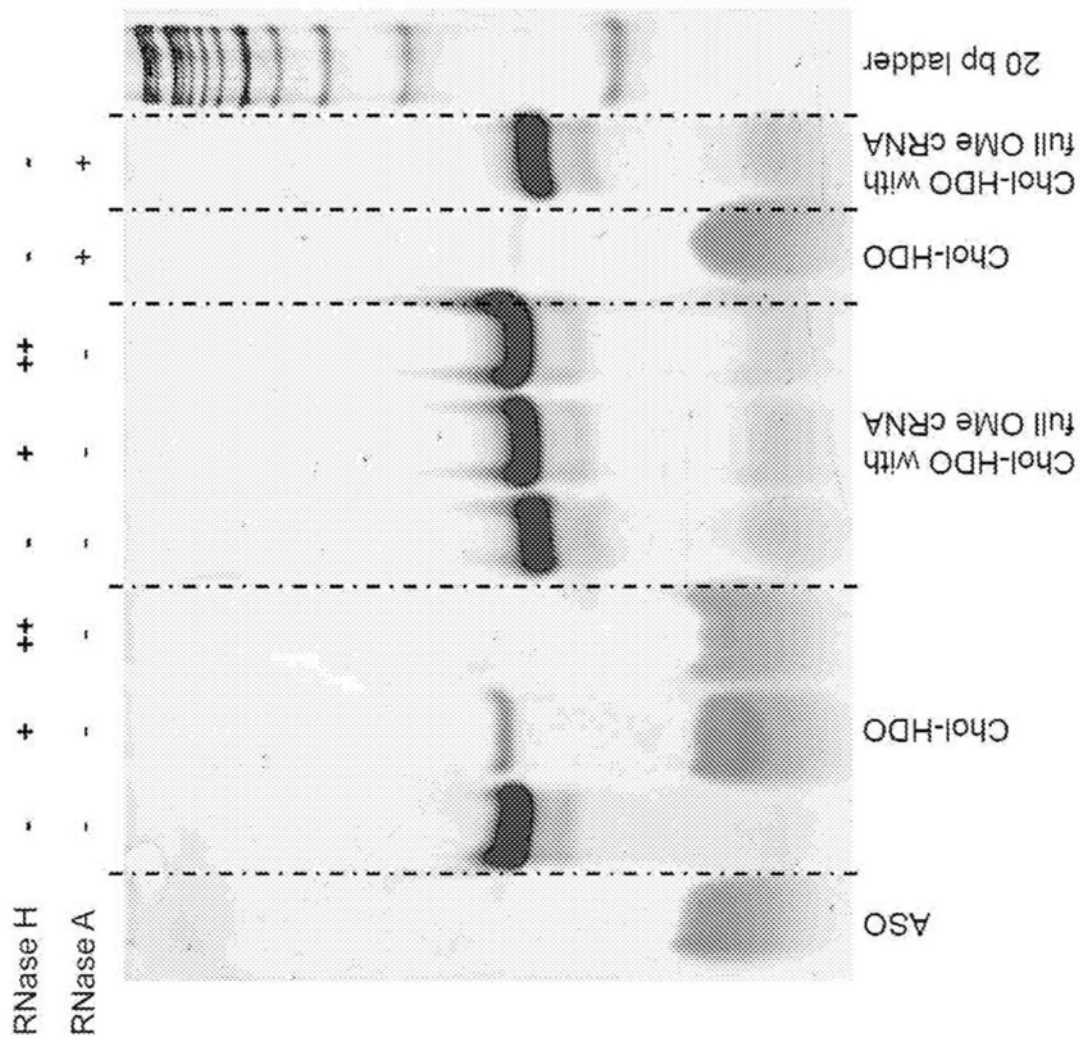


图7

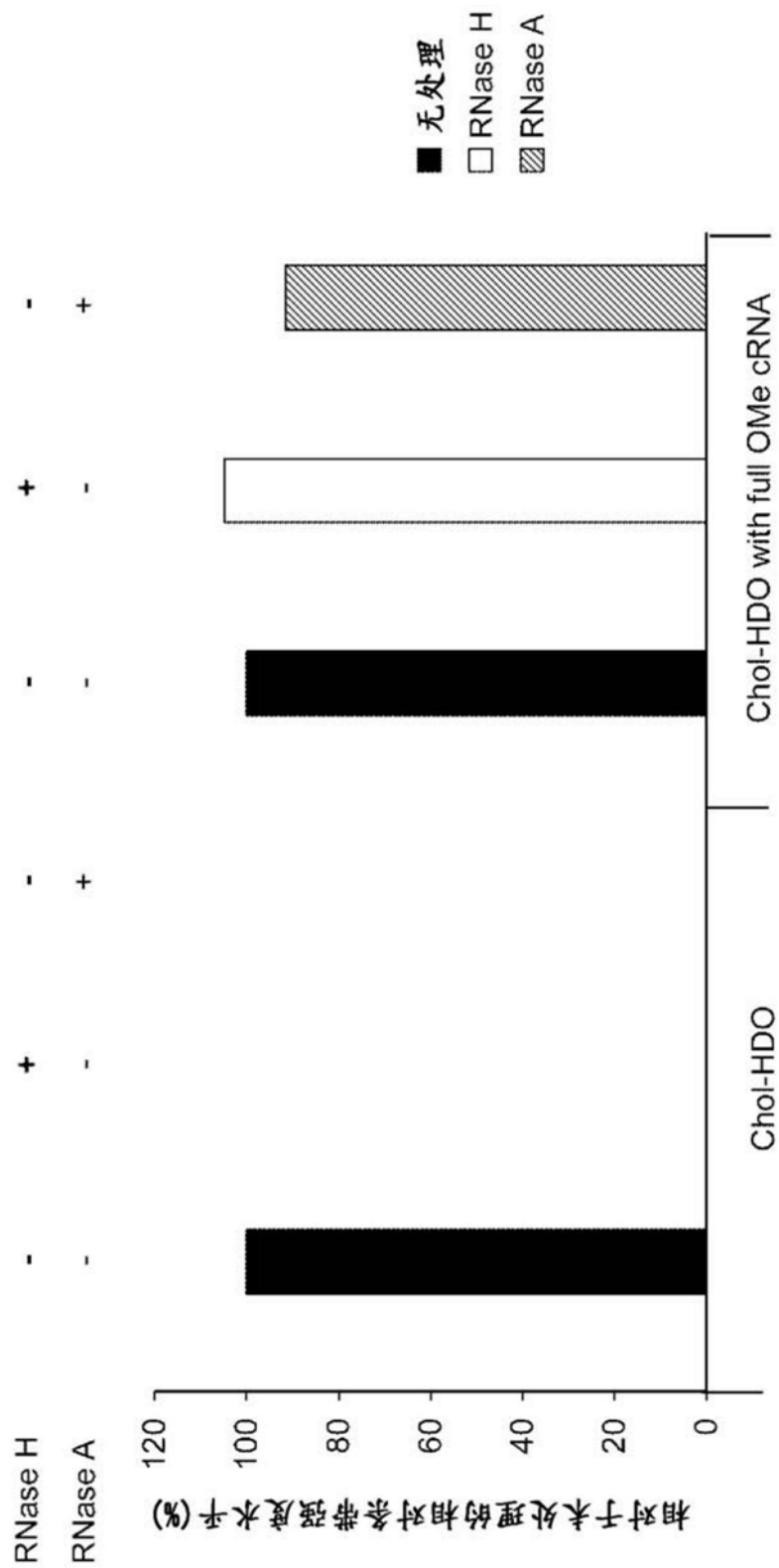


图8

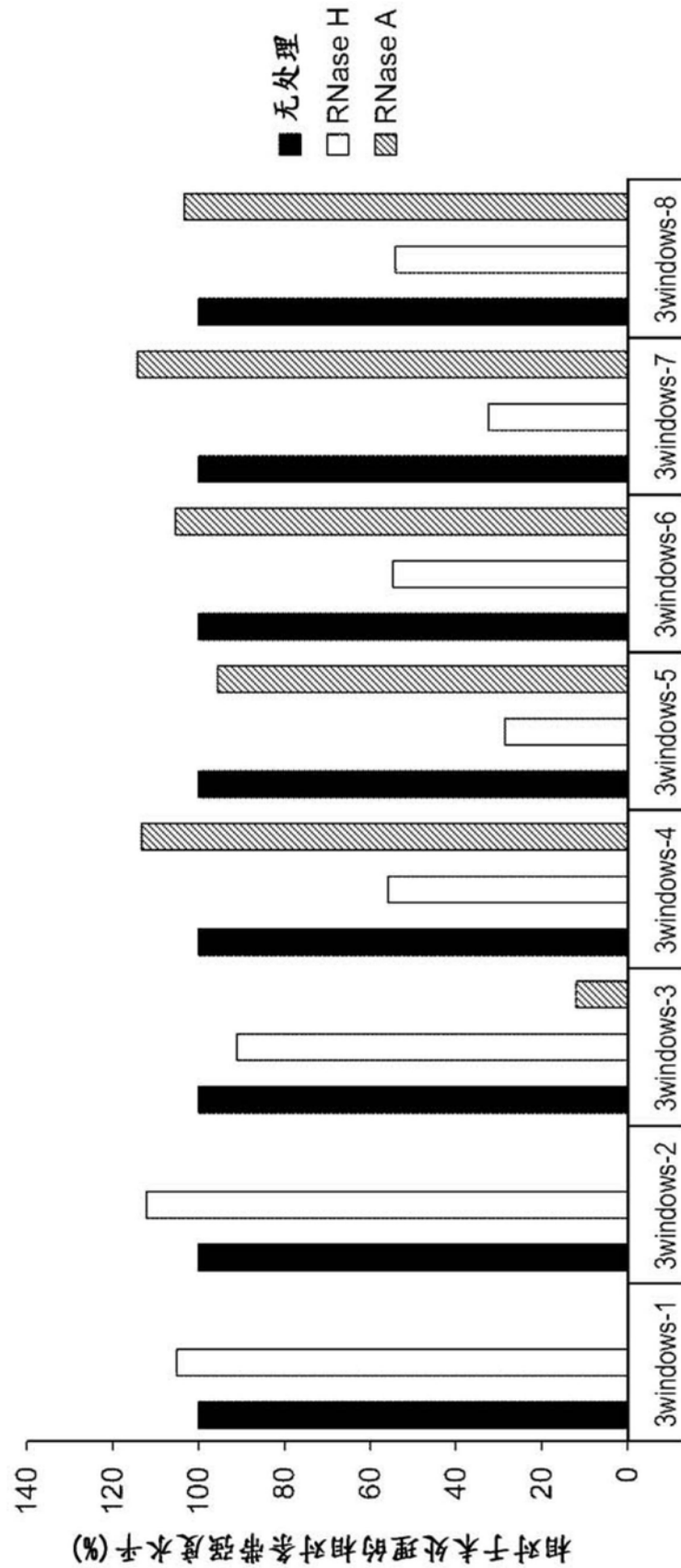


图9

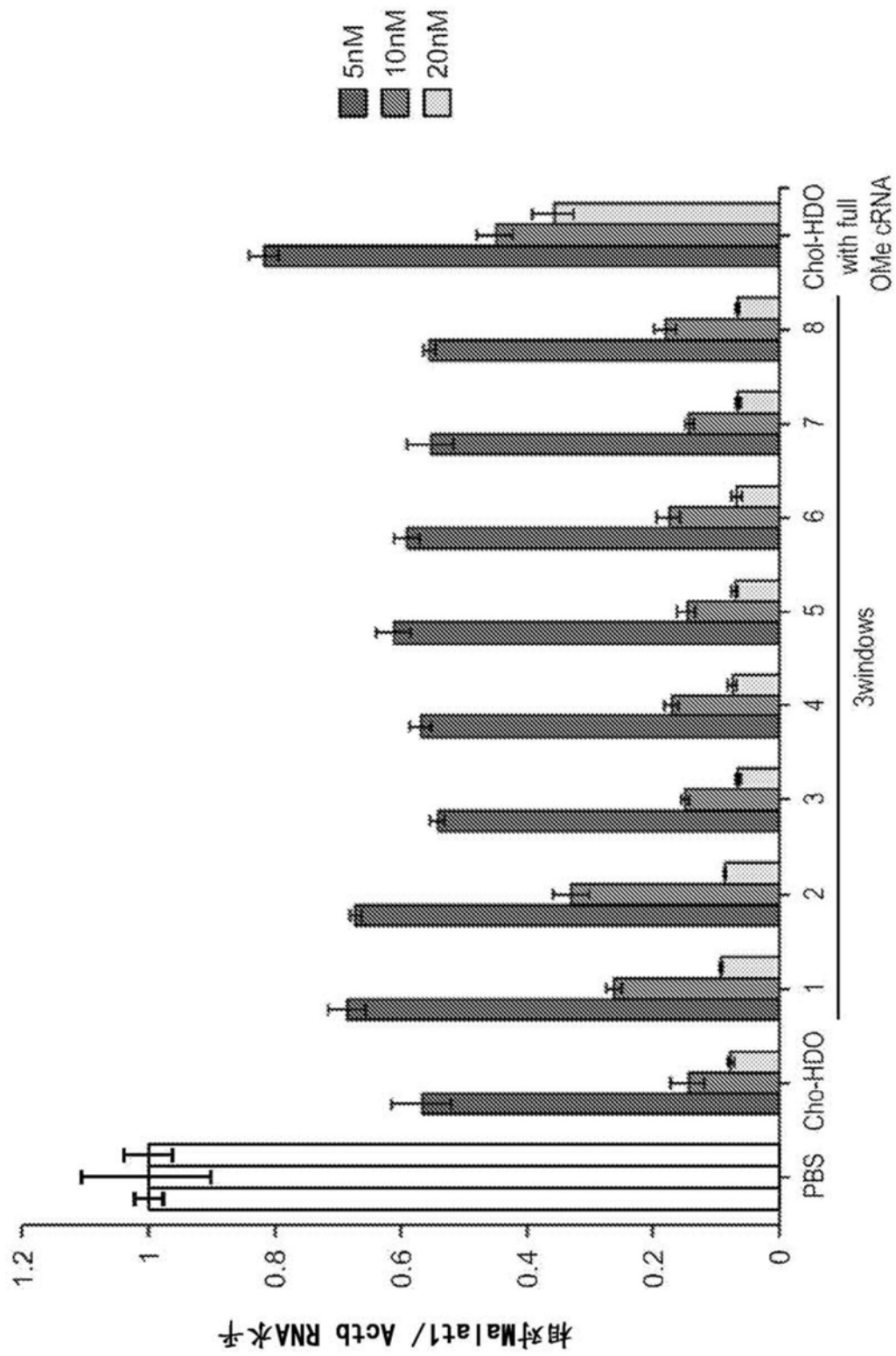


图10

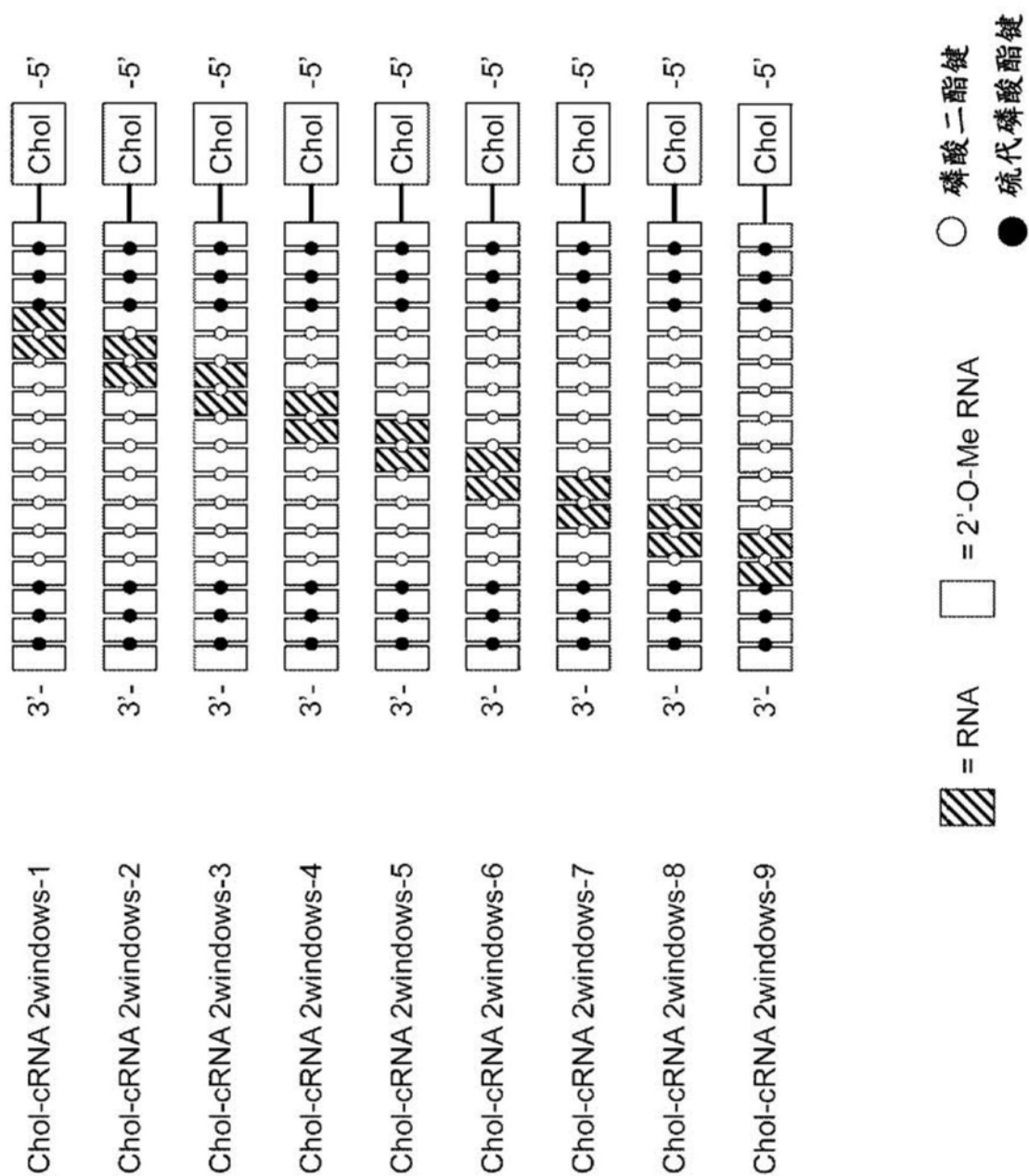


图11

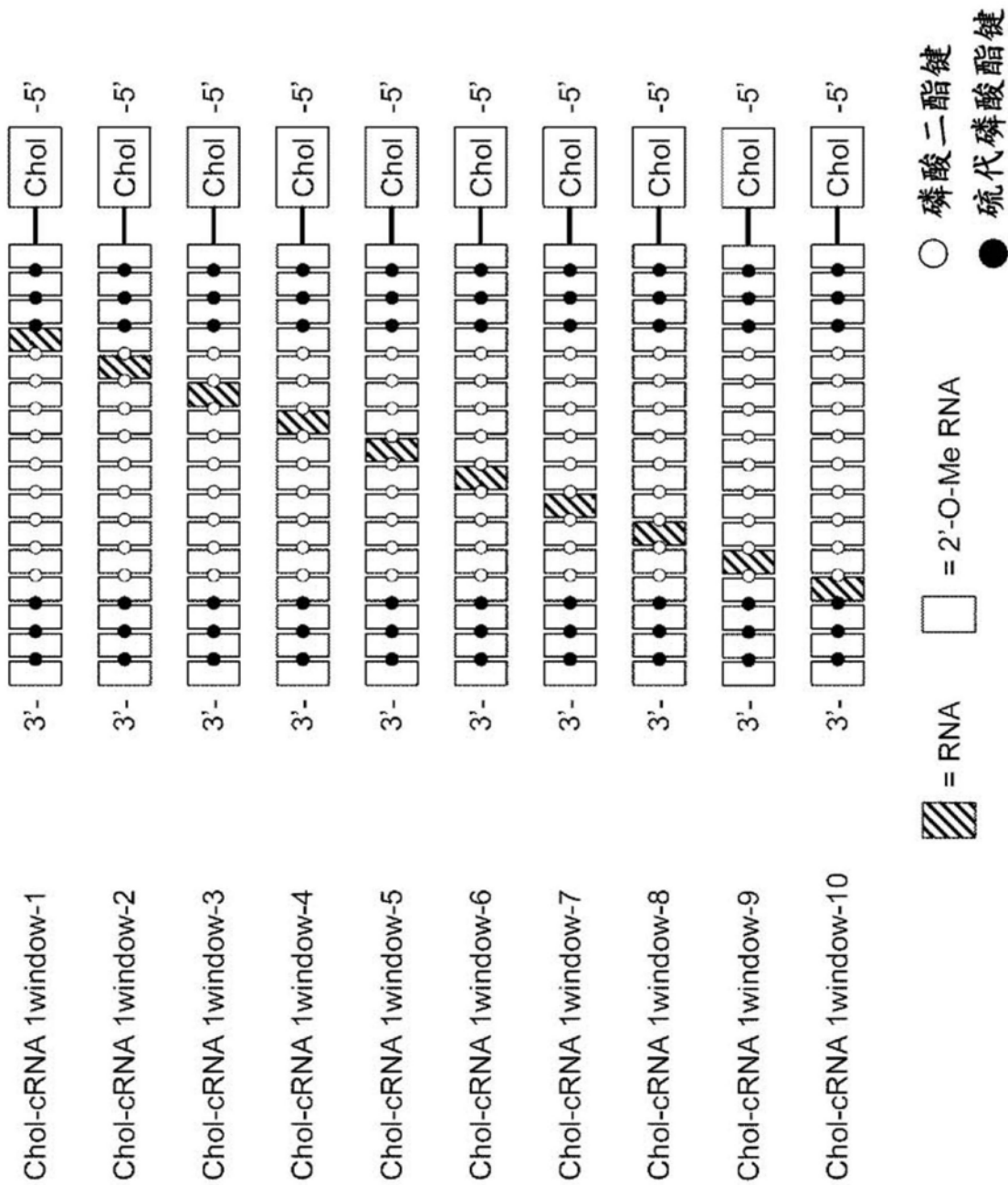


图12

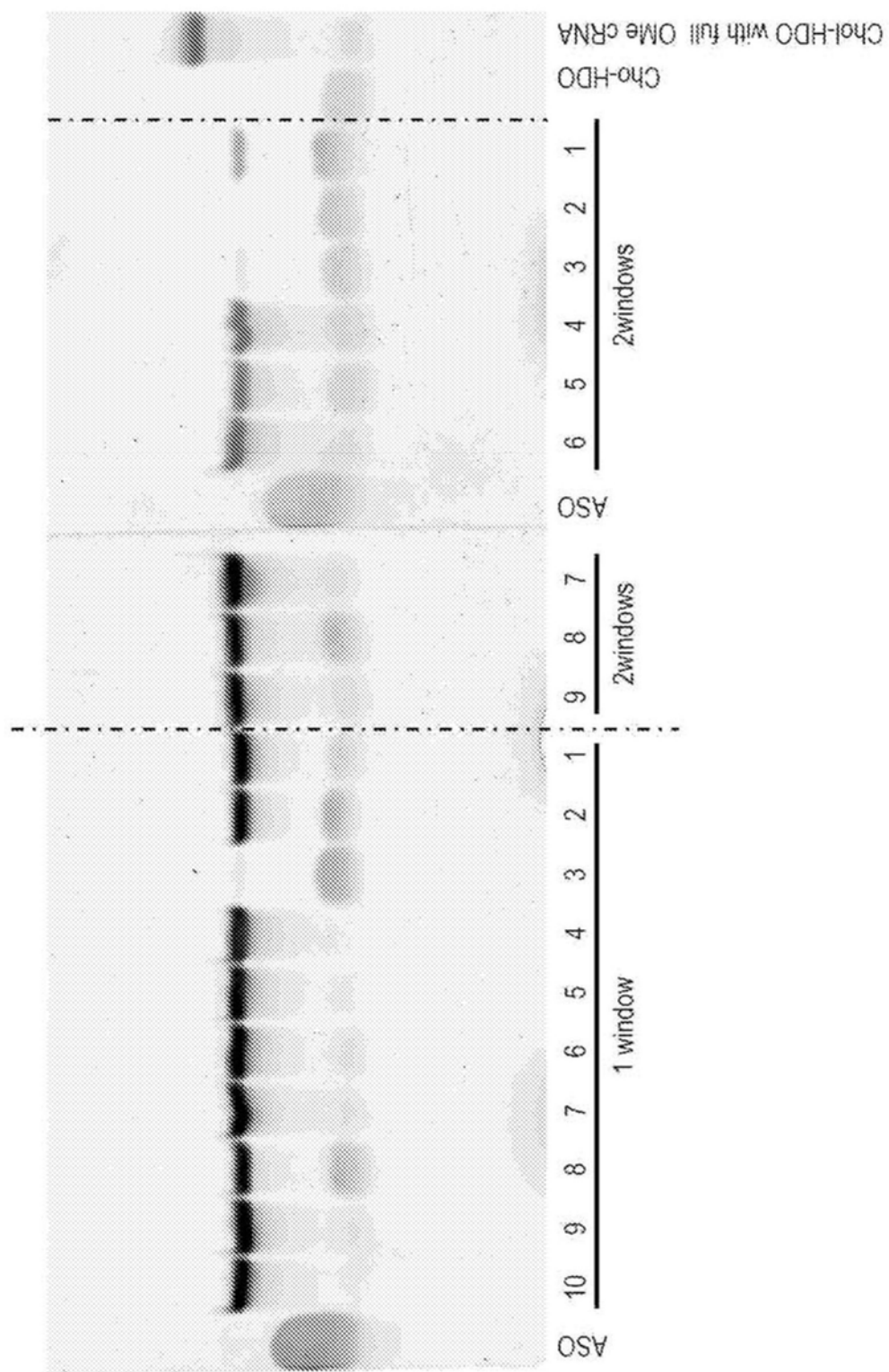


图13

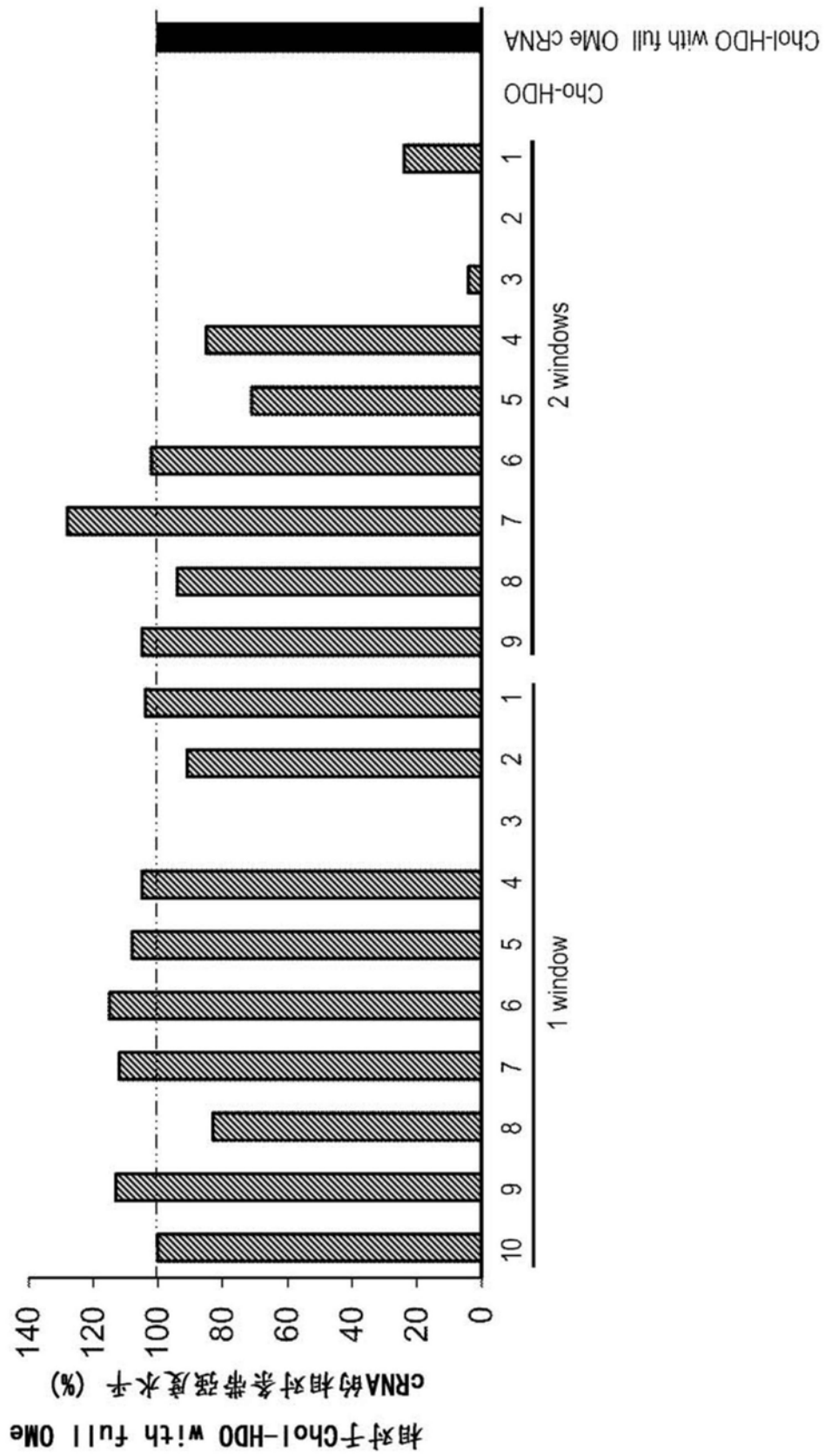


图14

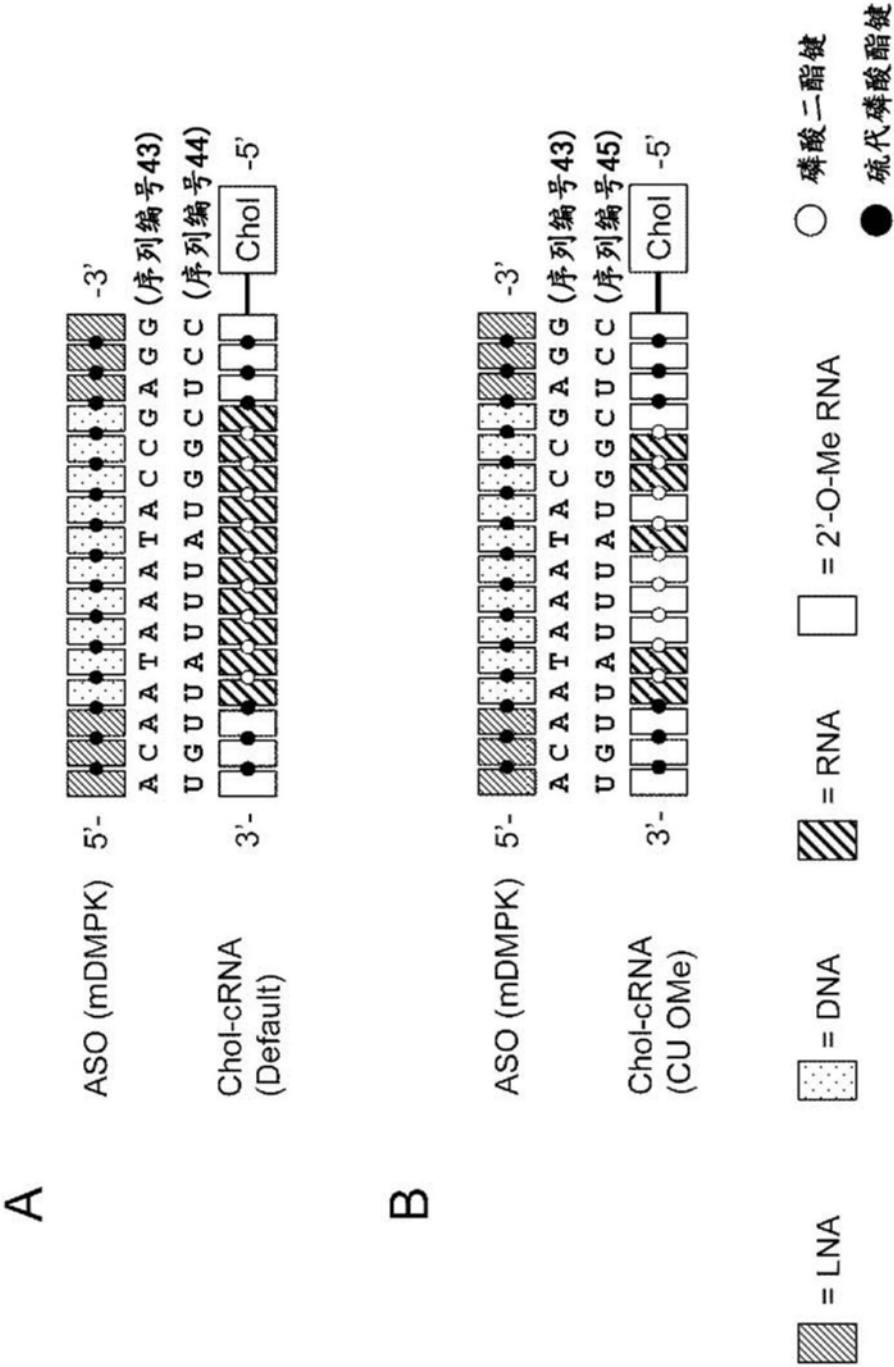


图15

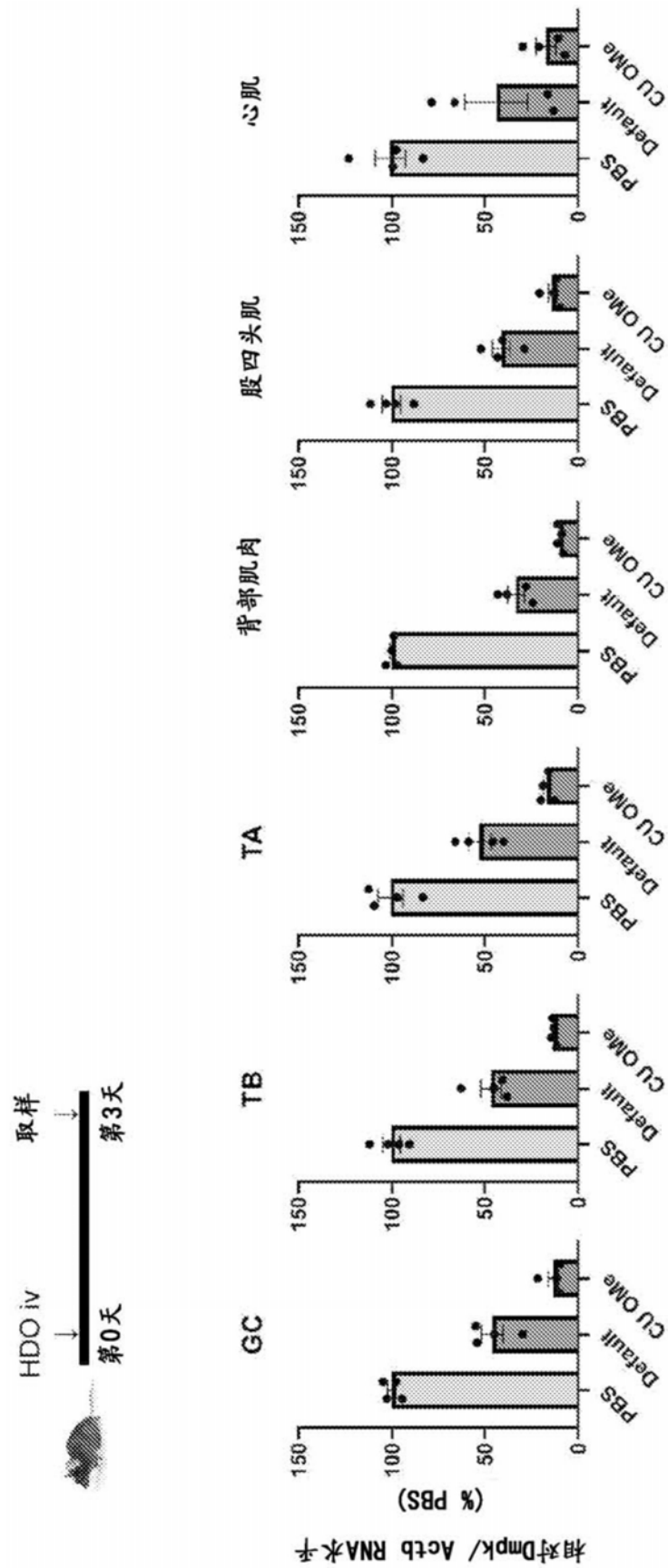


图16

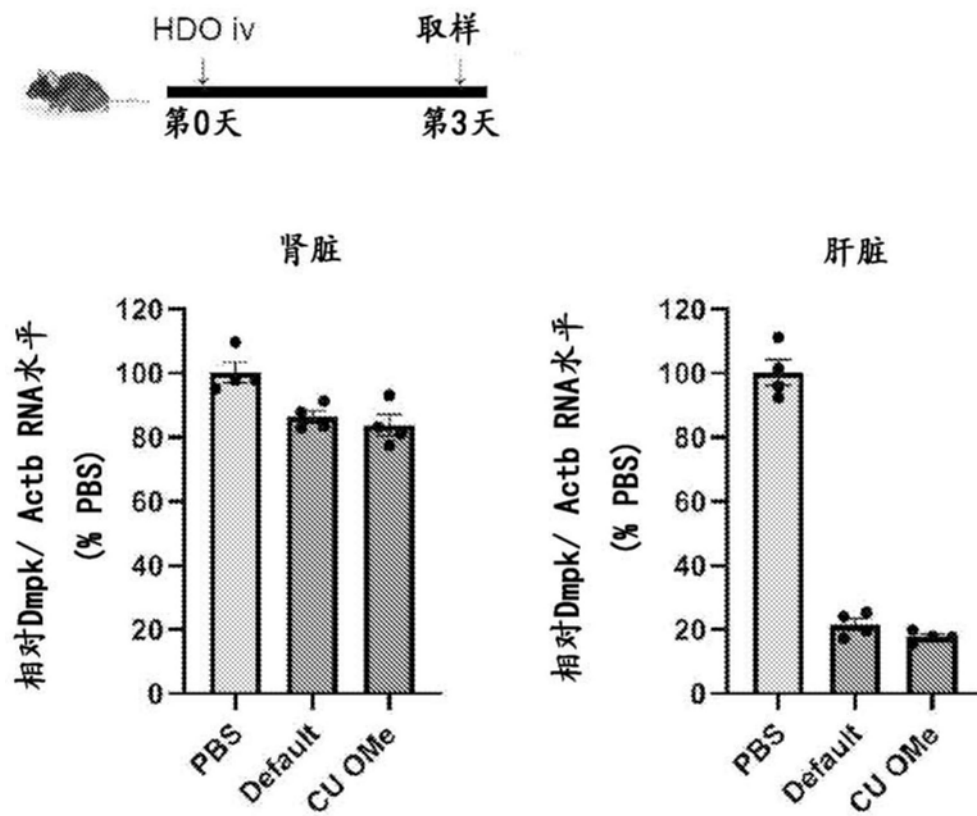


图17

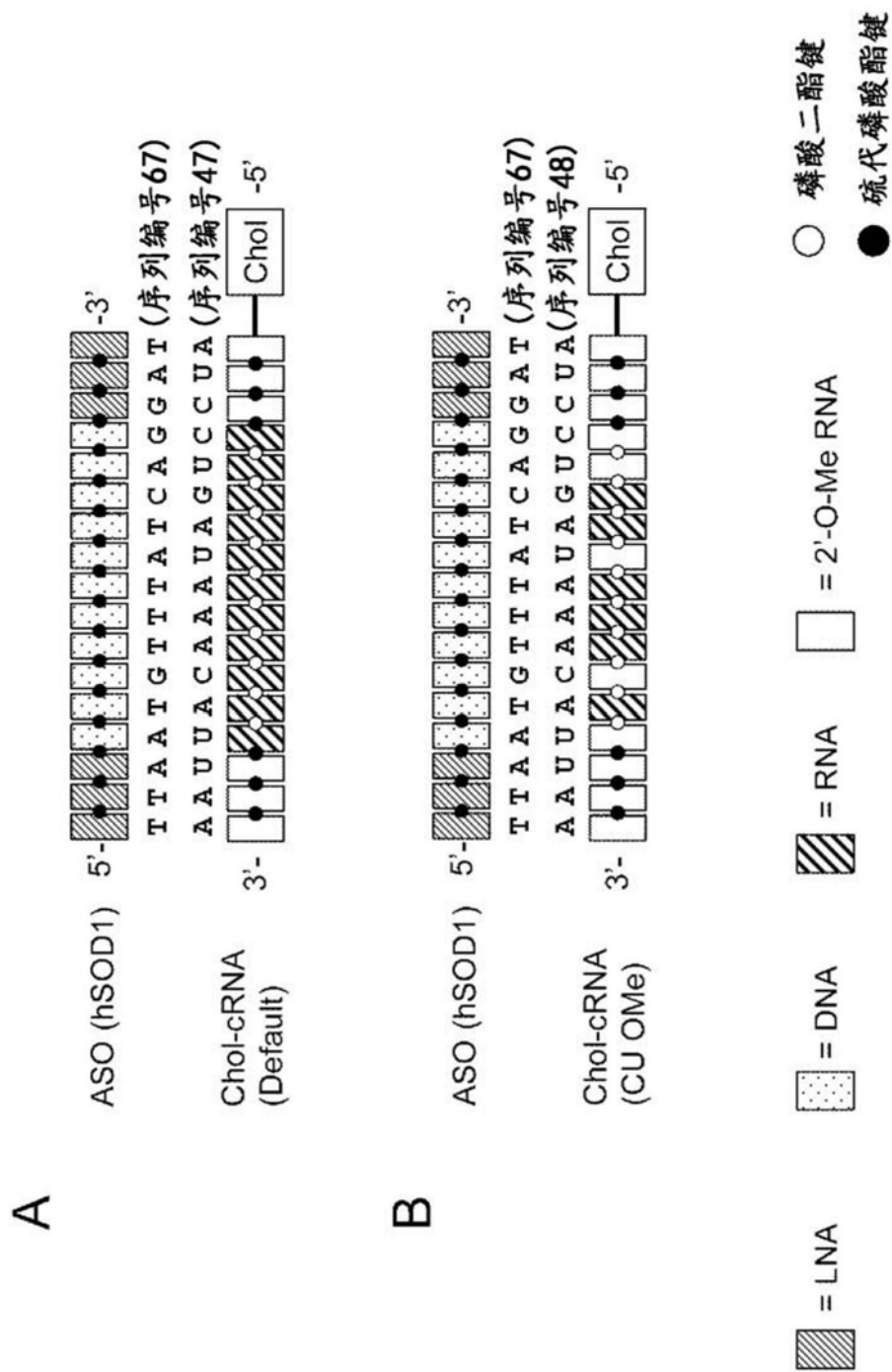


图18

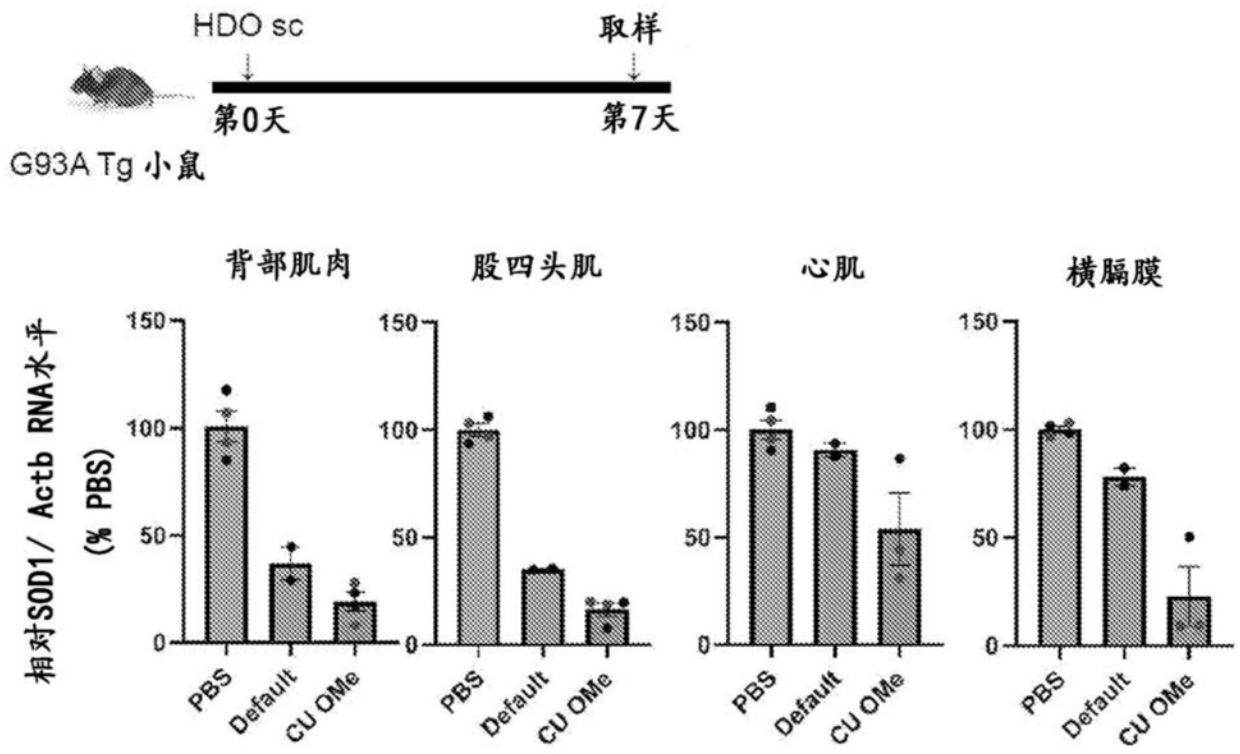


图19

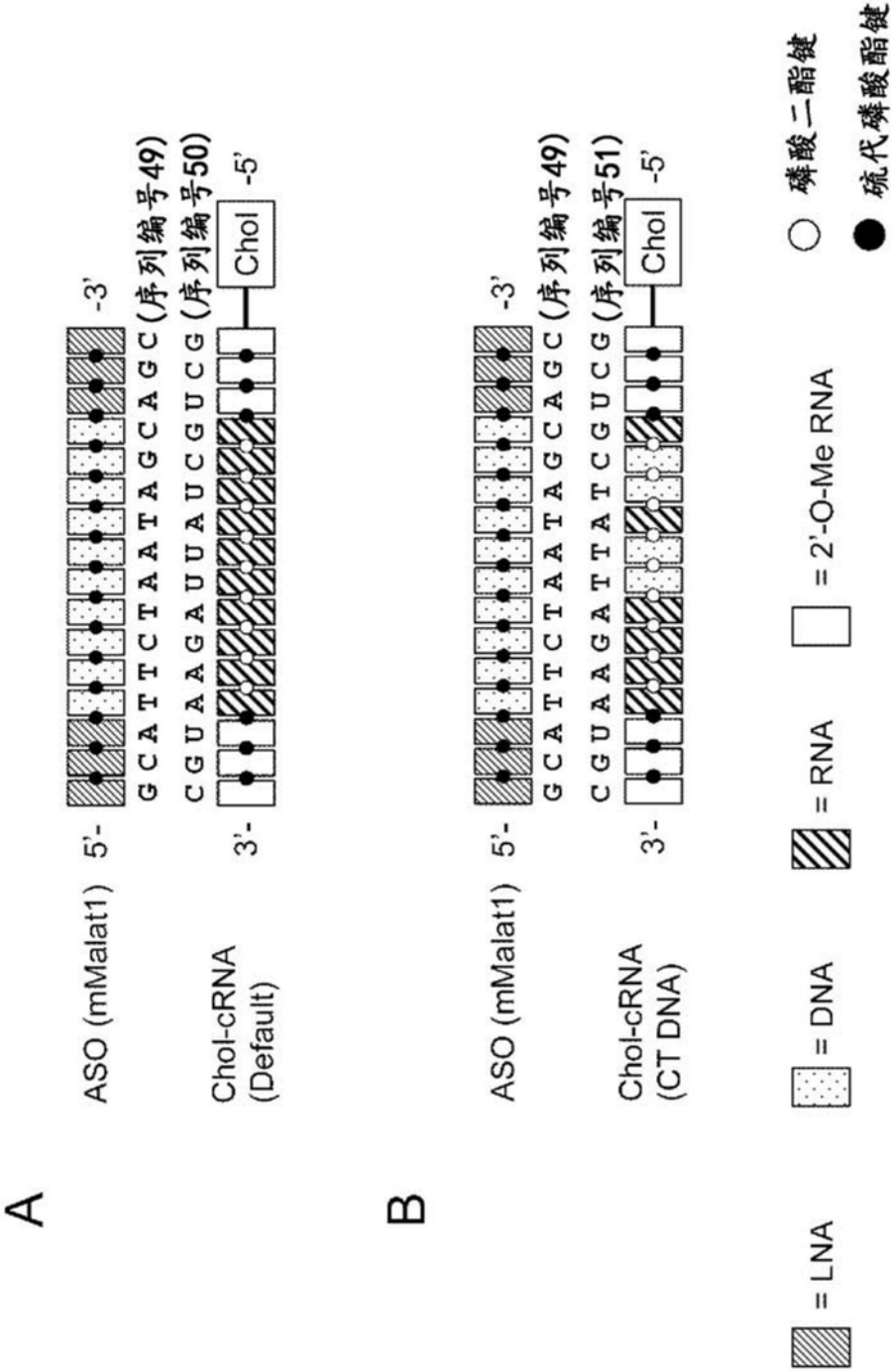


图20

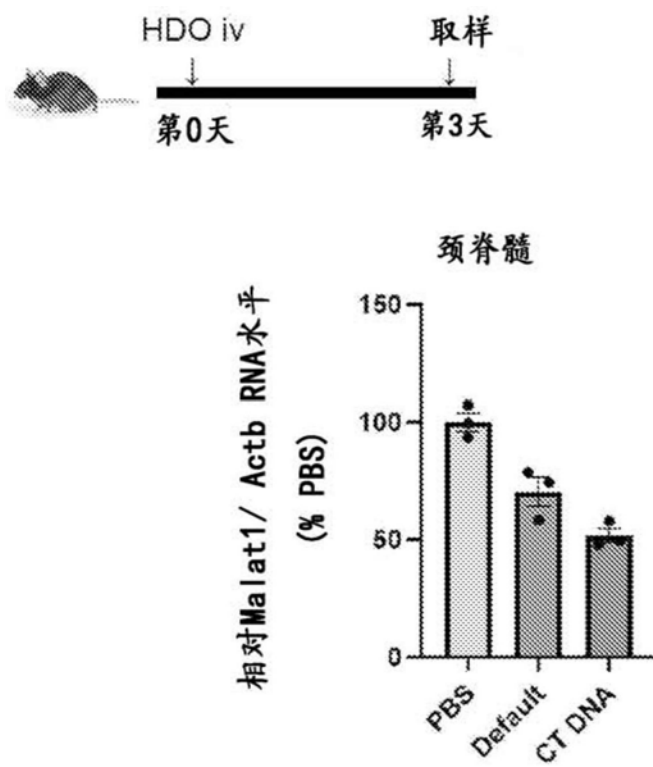


图21

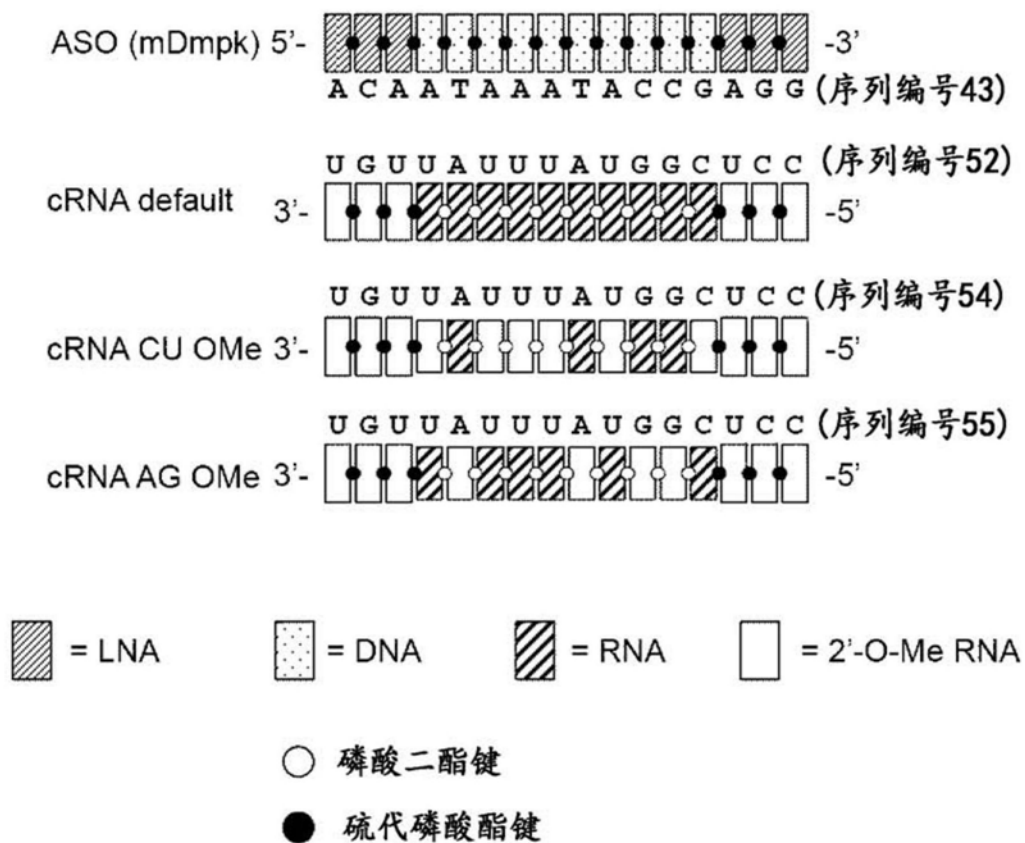


图22A

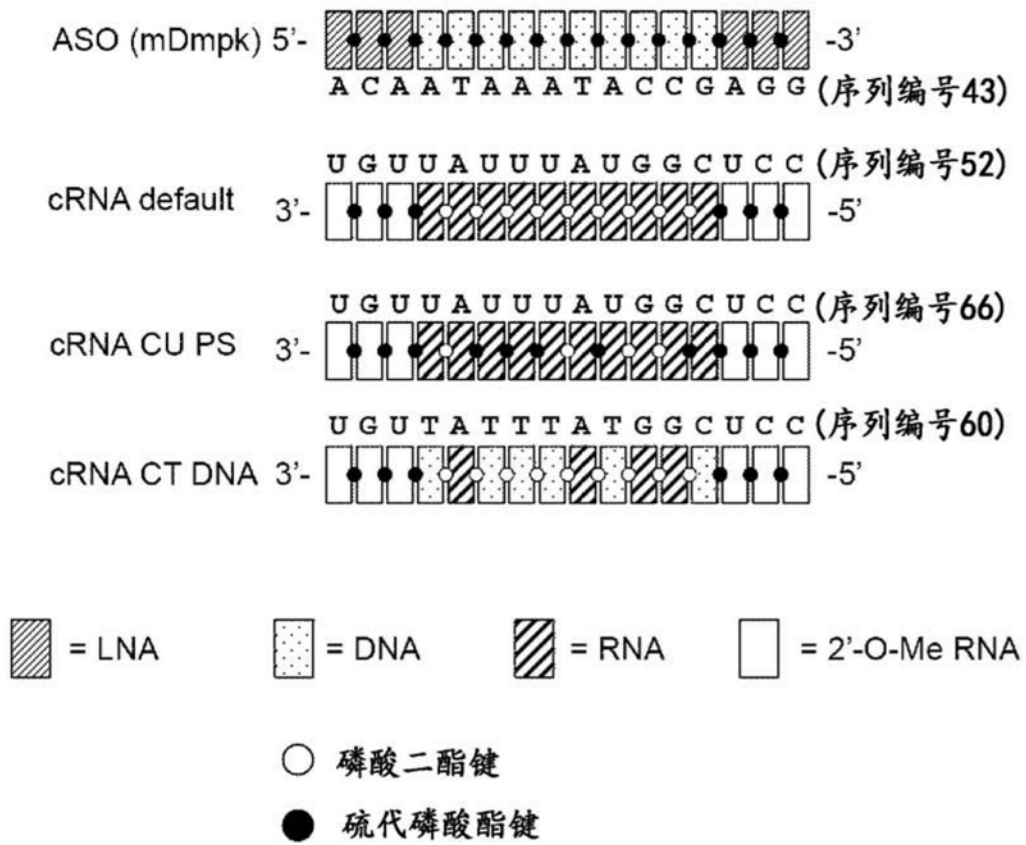


图22B

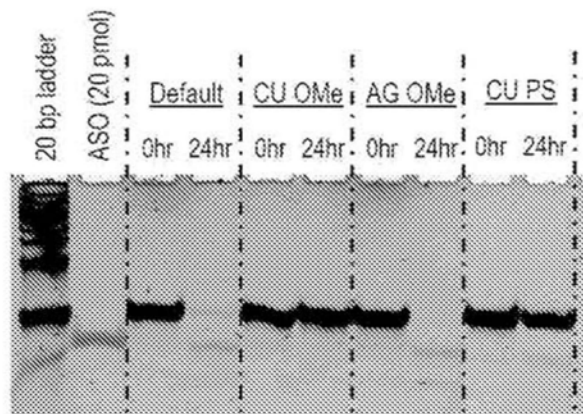


图23

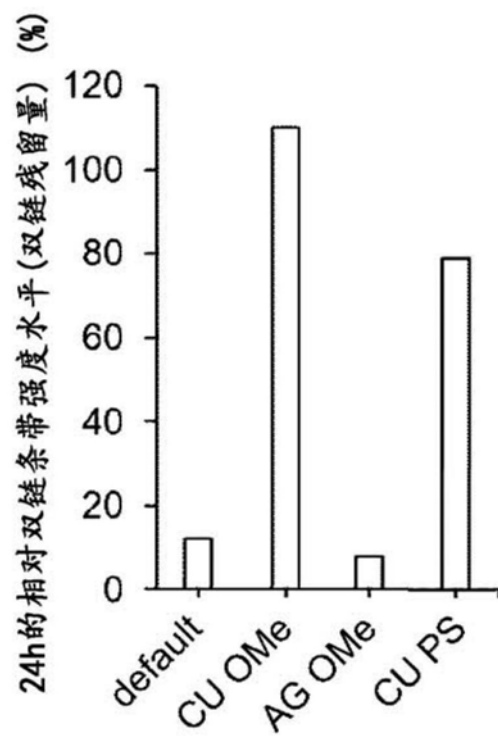


图24

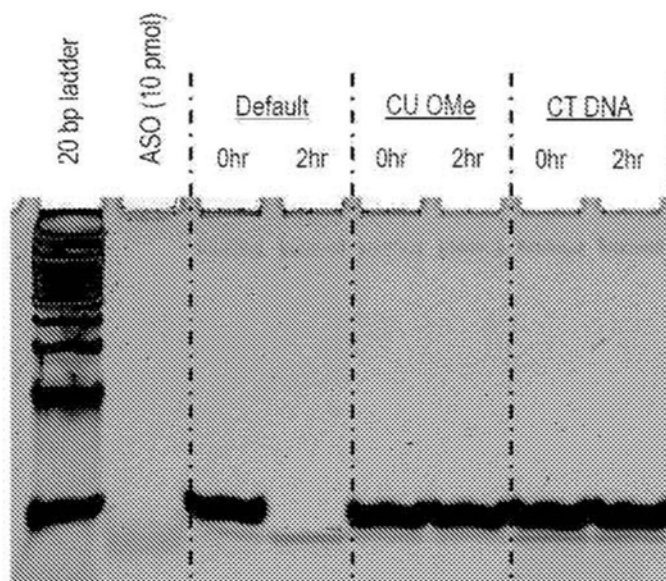


图25

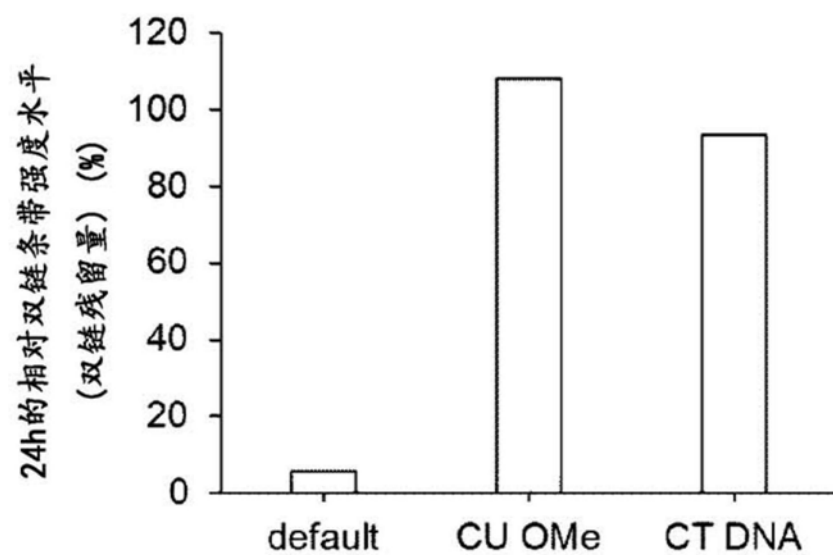


图26