



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118829728 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202380018216.8

(22) 申请日 2023.01.13

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/072958 2022.01.20 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/072076 2023.01.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/138502 EN 2023.07.27

(71) 申请人 中美瑞康核酸技术(南通)研究院有
限公司

地址 226400 江苏省南通市如东县掘港街
道珠江路888号生命健康产业园

(72) 发明人 姜武林 罗伯特·普雷斯 李龙承

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

专利代理师 钱文字

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

权利要求书6页 说明书52页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

活化抗肌萎缩蛋白相关蛋白表达的寡核苷
酸调节剂

(57) 摘要

本公开涉及一种寡核苷酸调节剂,用于预防
或治疗抗肌萎缩蛋白缺乏相关病症(DDD),包括
杜氏肌营养不良症(DMD)和贝克尔肌营养不良症
(BMD)。所述寡核苷酸调节剂包括正义核酸链和
反义核酸链,其中正义核酸链和反义核酸链独立
地是长度为16至35个核苷酸的寡核苷酸链,其中
一条核苷酸链与从靶基因UTRN的启动子区域中
选择的靶标具有至少75%的碱基同源性或互补
性。

1. 一种小活化RNA (saRNA), 其包含长度范围为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列, 其中所述寡核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1200的等长部分具有至少75%、至少80%、至少85%或至少90%同源性或互补性的连续核苷酸序列, 其中所述saRNA使UTRN基因的表达相比UTRN基因的基线表达上调至少10%。

2. 如权利要求1所述的saRNA, 其中, SEQ ID NO:1200的等长部分位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496 (SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294 (SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187 (SEQ ID NO:1209) 或区域-101至-65 (SEQ ID NO:1210)。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的saRNA, 其中, 所述saRNA (1) 具有35%至70%的GC含量; (2) 具有少于5个连续相同核苷酸; (3) 具有3个或更少的二核苷酸重复序列; 和 (4) 具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的saRNA, 其中, 所述saRNA包含正义链和反义链。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的saRNA, 其中, 所述寡核苷酸序列为所述saRNA的正义链或反义链。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的saRNA, 其中正义链和反义链各自包含互补区域, 其中正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。

7. 如权利要求4-6中任一项所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链具有至少90%的互补性。

8. 如权利要求4所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链位于两条不同的核酸链上。

9. 如权利要求4所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链位于连续的核酸链上, 任选地为发夹式单链核酸分子, 其中所述正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。

10. 如权利要求4所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链至少之一包括长度为0至6个核苷酸的3'突出端。

11. 如权利要求10所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链包含长度为2至3个核苷酸的3'突出端。

12. 如权利要求10所述的saRNA, 其中, 所述突出端的核苷酸中至少一个是选自或互补于UTRN基因上的相应核苷酸的核苷酸。

13. 如权利要求4-12中任一项所述的saRNA, 其中, 所述正义链和反义链独立地包含约16至约35、约17至约30、约18至约25、或约19至约22个连续核苷酸的长度。

14. 如权利要求4-12中任一项所述的saRNA, 其中, 所述正义链与选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性, 并且所述反义链与选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。

15. 如权利要求14所述的saRNA, 其中, 所述正义链包含选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列, 而所述反义链包含选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列。

16. 如权利要求1所述的saRNA, 其中, 所述寡核苷酸序列与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性或互补性。

17. 如权利要求4所述的saRNA, 其中, 所述正义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。

18. 如权利要求4所述的saRNA, 其中, 所述反义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列互补性。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的saRNA, 其中, 所述saRNA的至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。

20. 如权利要求19所述的saRNA, 其中, 所述saRNA的反义链和/或正义链的至少一个核苷酸经化学修饰。

21. 如权利要求19所述的saRNA, 其中, 经化学修饰的核苷酸是具有以下至少一种修饰的核苷酸:

g) 对于连接saRNA核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰;

h) 对于saRNA的核苷酸序列中核糖的2'-OH的修饰; 和

i) 对于saRNA的核苷酸序列中的碱基的修饰。

22. 如权利要求19所述的saRNA, 其中, 所述saRNA的至少一个核苷酸是锁核酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉基核苷酸、亚磷酰胺或包含非天然碱基的核苷酸。

23. 如权利要求19所述的saRNA, 其中, 至少一个经化学修饰的核苷酸的化学修饰是在正义链或反义链的5'端添加(E)-乙烯基磷酸酯部分。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的saRNA, 其中, saRNA的正义链或反义链与选自脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体的一种或多种偶联部分偶联。

25. 如权利要求24所述的saRNA, 其中, 所述saRNA的正义链或反义链与选自细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺及其任意组合的一种或多种偶联部分偶联。

26. 一种寡核苷酸调节剂, 其包含如权利要求1-25中任一项所述的一种或多种saRNA。

27. 如权利要求26所述的寡核苷酸调节剂, 其还包含与所述saRNA偶联、组合或键合的一个或多个部分或组分。

28. 如权利要求27所述的寡核苷酸调节剂, 其中, 所述saRNA的正义链和/或反义链与选自下组的一种或多种偶联部分偶联: 脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体。

29. 如权利要求27所述的寡核苷酸调节剂, 其中, 所述偶联部分各自独立地选自脂质、细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖、N-乙酰半乳糖胺及其任何组合。

30. 如权利要求26所述的寡核苷酸调节剂, 其中, 所述寡核苷酸调节剂还包含与一个或多个其它活性部分偶联或结合的saRNA, 以用于UTRN相关疾病或病症治疗, 其中所述一个或多个其它活性部分各自独立地选自saRNA、单链寡核苷酸、化学部分、多肽和抗体。

31. 一种分离的多核苷酸, 其中, 所述分离的多核苷酸包括权利要求1所述的连续核苷酸序列。

32. 如权利要求31所述的分离的多核苷酸, 其中, 所述分离的多核苷酸是选自SEQID NO: 1-398的核酸序列。

33. 一种分离的寡核苷酸复合物, 其包含权利要求1-25中任一项所述的saRNA的反义链和权利要求31-32中任一项所述的分离的多核苷酸。

34. 如权利要求33所述的分离的寡核苷酸复合物, 其中, 所述分离的寡核苷酸复合物使UTRN基因的表达相对于UTRN基因的基线表达活化至少10%。

35. 一种分离的核酸序列, 其位于UTRN基因转录起始位点上游, 其中所述分离的核酸序

列选自SEQ ID NO:1207-1210。

36. 如权利要求35所述的分离的核酸序列,其中,所述分离的核酸序列包含权利要求31-32中任一项所述的分离的多核苷酸。

37. 如权利要求35所述的分离的核酸序列,其中,靶向分离的核酸序列的设计的saRNA中至少25%能使UTRN基因的表达活化至少10%,其中所述设计的saRNA(1)具有35%至70%的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

38. 一种分离的核酸复合物,其包含权利要求1-25中任一项所述的saRNA的反义链和权利要求35-37中任一项所述的分离的核酸序列的正义链。

39. 如权利要求38所述的分离的核酸复合物,其中,所述分离的核酸复合物使UTRN基因的表达相对于UTRN基因的基线表达活化至少10%。

40. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-25中任一项所述的saRNA。

41. 如权利要求40所述的分离的多核苷酸,其中,所述分离的多核苷酸是DNA。

42. 包含权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸的载体。

43. 一种宿主细胞,其包含权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸,或权利要求42所述的载体。

44. 一种组合物,其包含权利要求1-25中任一项所述的saRNA,或权利要求40或权利要求41所述的分离的多核苷酸,以及任选地,药学上可接受的运载体。

45. 如权利要求44所述的组合物,其中,所述药学上可接受的运载体选自下组:水性运载体、脂质体、高分子聚合物、多肽和抗体。

46. 如权利要求44或45所述的组合物,其中,所述组合物包含0.001-200nM的saRNA。

47. 如权利要求46所述的组合物,其中,所述组合物包含1-200nM的saRNA。

48. 一种saRNA,其包含长度范围为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列,用于活化/上调细胞中UTRN基因的表达,其中所述寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1200的等长部分具有至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%的序列同源性或互补性,其中所述saRNA使UTRN基因的表达与其基线表达相比活化至少10%。

49. 如权利要求48所述的saRNA,其中,SEQ ID NO:1200的等长区域位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。

50. 如权利要求49所述的saRNA,其中所述saRNA包含正义链和反义链,其中所述正义链包含选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列,而所述反义链包含选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列。

51. 一种用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品,其中所述产品使UTRN基因的表达与所述UTRN基因的基线表达相比活化至少10%,并且其中所述产品包含活性物质,所述活性物质选自以下的一种或多种:权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体,或权利要求44-47中任一项所述的组合物。

52. 用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品,其中,所述活性物质被直接引入细胞;和/或

其中所述细胞是体外、离体或体内细胞;和/或

其中所述细胞是哺乳动物细胞。

53. 如权利要求52所述的产品,其中,所述活性物质通过以下方式直接引入细胞:

1) 使所述活性物质与生理学上可接受的或药学上可接受的运载体组合,所述生理学上可接受的或药学上可接受的运载体例如选自下组中的一种或多种:水性运载体、脂质体、高分子聚合物、多肽和抗体,和/或

2) 将所述活性物质偶联至一个或多个偶联部分,所述一个或多个偶联部分例如选自以下的一种或多种:脂质、细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺,及其任何组合(例如两个偶联部分,其中一个为脂质,另一个是N-乙酰半乳糖胺)。

54. 如权利要求53所述的产品,其中,所述偶联部分独立地衍生自荧光团、配体、糖类、肽和抗体。

55. 用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品,其中,所述细胞来自患有由UTRN蛋白表达不足、UTRN基因突变和/或功能性UTRN低水平引起的疾病或病症或有患上此疾病或病症的风险的患者,其中所述活性物质以足以预防或治疗所述疾病或病症,例如,杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)的量给予。

56. 一种预防或治疗由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的疾病或病症的方法,其包括:给予所述个体有效量的权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体,或权利要求44-46中任一项所述的组合物。

57. 如权利要求56所述的方法,其中,所述疾病或病症是抗肌萎缩蛋白缺乏症(DDD)。

58. 如权利要求56所述的方法,其中,所述疾病或病症是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

59. 如权利要求56所述的方法,其中,所述个体是哺乳动物,任选地其中所述个体是人。

60. 如权利要求56所述的方法,其中,所述个体具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的症状。

61. 如权利要求56所述的方法,其中,向个体给予权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸,权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物,所述给予通过选自以下的一种或多种给予途径进行:肠胃外输注,经口给予,鼻内给予,吸入给予,阴道给予和直肠给予。

62. 如权利要求61所述的方法,其中,给予途径选自以下的一种或多种:鞘内、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内和皮下给予。

63. 如权利要求56所述的方法,其中,所述方法使UTRN基因mRNA在个体中的表达相比UTRN基因的基线表达活化/上调至少10%。

64. 如权利要求56所述的方法,其中,所述方法使个体中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平与UTRN基因的基线表达相比增加至少10%。

65. 一种用于检测权利要求43所述的宿主细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)的方法。

66. 一种用于进行权利要求56所述的方法的试剂盒,其包含a) 权利要求1-25所述的

saRNA。

67. 如权利要求66所述的试剂盒,其中,所述试剂盒包含:b)使用说明,和c)任选地,用于向个体给予权利要求1-25中任一项所述的saRNA的器具。

68. 一种试剂盒,其在带标签的包装件中包含权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物,并且所述包装件上的标签指示所述saRNA、所述分离的多核苷酸、所述载体或所述组合物能用于预防或治疗由抗肌萎缩蛋白表达不足诱导的疾病或病症,或针对杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

69. 一种用于检测权利要求43所述的宿主细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)的试剂盒。

70. 如权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物在制备用于预防或治疗由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的疾病或病症的药物中的用途。

71. 如权利要求70所述的用途,其中,所述疾病或病症是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

72. 如权利要求70所述的用途,其中,所述个体是哺乳动物,任选地其中所述哺乳动物是人。

73. 如权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物在制备用于活化/上调细胞中UTRN基因的表达的制剂中的用途。

74. 如权利要求73所述的用途,其中,权利要求1-25中任一项所述的saRNA,或权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物被直接引入细胞中。

75. 如权利要求74所述的用途,其中,所述saRNA在将编码所述saRNA的核苷酸序列引入所述细胞之后在所述细胞中产生。

76. 如权利要求73-75中任一项所述的用途,其中,所述细胞是哺乳动物细胞,任选地其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

77. 如权利要求76所述的用途,其中,所述细胞在人体中。

78. 如权利要求77所述的用途,其中,所述人体是具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的症状的对象,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物以足以治疗所述症状的量给予。

79. 如权利要求78所述的用途,其中由抗肌萎缩蛋白表达不足诱导的症状是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

80. 一种用于活化/上调UTRN基因在细胞中的表达的方法,其包括:向所述细胞给予有效量的权利要求1-25中任一项所述的saRNA,权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸,权利要求42所述的载体,或权利要求44-47中任一项所述的组合物。

81. 如权利要求80所述的方法,其中,权利要求1-25中任一项所述的saRNA,权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项

所述的组合物被直接引入细胞中。

82. 如权利要求81所述的方法,其中所述方法用于向细胞中直接引入,所述方法包括:

1) 将权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物中的saRNA与选自下组的药学上可接受的运载体组合:水性运载体、脂质体、高分子聚合物,多肽和抗体,和

2) 使权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物中的saRNA偶联至选自以下的一种或多种偶联部分:细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺。

83. 如权利要求80-82中任一项所述的方法,其中,所述细胞是哺乳动物细胞,例如来自人体的细胞。

84. 如权利要求83所述的方法,其中,所述人体是具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的症状的对象,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物以足以治疗所述症状的量给予。

85. 如权利要求84所述的方法,其中由抗肌萎缩蛋白表达不足造成的症状是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

86. 一种用于提高细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平的方法,其包括向所述细胞引入有效量的权利要求1-25中任一项所述的saRNA、权利要求40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、权利要求42所述的载体或权利要求44-47中任一项所述的组合物中的saRNA,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物使UTRN基因的表达相比UTRN基因的基线表达活化至少10%。

活化抗肌萎缩蛋白相关蛋白表达的寡核苷酸调节剂

技术领域

[0001] 本公开涉及核酸的技术领域,具体涉及与基因活化相关联的寡核苷酸调节剂及其药物应用。

背景技术

[0002] 杜氏肌营养不良症(DMD)是一种隐性、X连锁遗传疾病,其发生频率为约3500至5000名男性新生儿之一。全球每年约有20000名儿童被诊断患有DMD。DMD导致患者在生命的第2-4个十年过早死亡。这种疾病是由编码抗肌萎缩蛋白(dystrophin)的DMD基因突变引起的,该蛋白质在肌肉纤维中很重要,它的缺失会导致肌肉无力,其随着时间的推移会变得更糟,因为肌肉细胞会崩解并逐渐丢失。约1/3的儿童由于抗肌萎缩蛋白基因的自发突变而罹患DMD,并且没有该疾病家族史。

[0003] 抗肌萎缩蛋白是抗肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物(DGC)的部分,它桥接了内部细胞骨架(F-肌动蛋白)和细胞外基质。以这种方式,它在收缩期间使肌肉纤维具有稳定性。贝克尔肌营养不良症(BMD)是一种较温和,进展性较低的疾病形式,也是由同一DMD基因的变化引起的。

[0004] 一般而言,DMD患者携带的突变会产生不完全的抗肌萎缩蛋白(无义或移码突变),这是无功能的,而在BMD中,表达分子量较低的内部缺失蛋白(衍生自框内缺失),其具有部分功能性。

[0005] DMD基因高度复杂,包含至少七个独立的组织特异性启动子和两个聚腺苷酸化位点。此外,抗肌萎缩蛋白转录本是交替剪接的,产生一系列不同的转录本,编码大量蛋白质同种型。抗肌萎缩蛋白也在脑中表达,其在脑中的功能尚不为人知。然而,脑部抗肌萎缩蛋白的缺乏可能是许多DMD患者经历的认知问题的因素。

[0006] 抗肌萎缩蛋白相关蛋白(utrophin)基因(UTRN)编码抗肌萎缩蛋白相关蛋白,其与抗肌萎缩蛋白共有结构和功能相似性。抗肌萎缩蛋白相关蛋白包含肌动蛋白结合性N末端,三卷曲螺旋重复中心区域和由蛋白质-蛋白质相互作用基序组成的C末端,该基序能与肌养蛋白聚糖(dystroglycan)蛋白质组分相互作用。抗肌萎缩蛋白相关蛋白位于神经肌肉突触和肌腱接合处,它在那里参与突触后膜维持和乙酰胆碱受体聚簇。

[0007] 在早期人类肌肉发育中,抗肌萎缩蛋白相关蛋白出现于肌膜处,并逐渐被抗肌萎缩蛋白取代至出生。在成人组织中,抗肌萎缩蛋白相关蛋白在肺、肾、肝、脾等多种组织中表达,不仅局限于肌肉中的神经肌肉和肌腱接合处,还出现于再生肌纤维和血管的肌膜中。据报道,两种抗肌萎缩蛋白相关蛋白启动子A和B受差异性调节以驱动两种不同的mRNA同种型翻译成具有独特N末端和不同表达模式的全长抗肌萎缩蛋白相关蛋白。

[0008] 与抗肌萎缩蛋白组织特异性启动子不同,驱动编码全长蛋白的基因的抗肌萎缩蛋白相关蛋白A启动子与基因5'端的CpG岛相关联。在许多组织中表达的抗肌萎缩蛋白相关蛋白A是在神经肌肉和肌腱连接处、脉络丛、软脑膜和肾小球的肌肉中表达的同种型,并且出现于再生肌纤维的肌膜中。与抗肌萎缩蛋白相关蛋白A的区别在于N末端作用结合位点略有

不同的抗肌萎缩蛋白相关蛋白B,仅限于内皮细胞和血管。抗肌萎缩蛋白和抗肌萎缩蛋白相关蛋白都有由类似的内部启动子(Dp71,Dp140,Up71,Up140)驱动的较小的转录本。

[0009] 抗肌萎缩蛋白相关蛋白是抗肌萎缩蛋白的常染色体和功能类似物,且能够补偿抗肌萎缩蛋白在DMD和BMD中的原发性缺陷。小鼠研究表明,抗肌萎缩蛋白相关蛋白基因可作为抗肌萎缩蛋白基因的功能替代物,因此可作为抗肌萎缩蛋白缺乏引起的肌肉萎缩症的潜在治疗靶标。因此,基于抗肌萎缩蛋白相关蛋白的策略有可能为所有DMD/BMD患者(无论其遗传缺陷如何)提供治疗。

[0010] 利用寡核苷酸诱导抗肌萎缩蛋白相关蛋白的转录和转录后水平表达,对于开发DMD和BMD(无论DMD基因中突变的位置)的新疗法而言,都是一种有吸引力的方法。然而,这种方法受到基因上调工具的限制[US20120122953A1和W02019183005A1]。

发明内容

[0011] 为了解决上述问题,本公开提供了一种寡核苷酸调节剂,例如小活化RNA(saRNA)分子,用于通过靶向UTRN基因启动子并随后活化UTRN基因转录并提高抗肌萎缩蛋白相关蛋白的表达水平以通过RNA活化(RNAa)机制补偿抗肌萎缩蛋白缺陷,来治疗由缺乏抗肌萎缩蛋白或抗肌萎缩蛋白水平不足引起的疾病或病症(如DMD和BMD)。

[0012] 具体地,发明人发现,这种能够活化/上调UTRN mRNA表达的saRNA不随机分布在启动子上,而是簇集在某些特定的热点区域。只有UTRN基因的启动子上的一些区域有利于saRNA的基因活化,例如UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496、-351至-294、-236至-187和-101至-65。发明人还发现,UTRN启动子区域内saRNA的最佳靶序列/正义链包括具有以下标准的序列:(1)GC含量在35%至70%之间;(2)少于5个连续相同核苷酸;(3)3个或更少二核苷酸重复;和(4)3个或更少三核苷酸重复。作为该标准的有益结果,靶序列(例如,包含靶序列的分离的核酸序列)在与saRNA相互作用时,与UTRN mRNA的基线水平相比,能使UTRN mRNA的表达活化/上调至少10%。至少部分基于这些发现,本公开内容的特征是saRNA、组合物和药物组合物,其用于使UTRN mRNA的表达活化/上调至少10%(与UTRN基因的基线水平相比)。本文还提供了用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或低功能性抗肌萎缩蛋白水平引起的疾病或病症的方法,包括给予本文所述的saRNA、组合物和/或药物组合物之任一者。

[0013] 在本公开内容的一个方面,提供了一种能够活化/上调细胞中UTRN基因表达的寡核苷酸调节剂(例如saRNA分子),该寡核苷酸调节剂(例如saRNA)包含长度为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列,其中所述连续寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1200的等长区域具有至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%的序列同源性或互补性,由此与UTRN基因的基线表达相比使基因的表达活化或上调至少10%。在一些实施方式中,SEQ ID NO:1200的等长区域位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。

[0014] 在某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA包括正义链和反义链,其中正义链和反义链各自包含互补区域,其中正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链和反义链具有至少90%的互补性。在某些实施方式中,

本公开内容公开的正义链和反义链位于两条不同的核酸链上。而在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链和反义链位于连续的核酸链(任选地为发夹式单链核酸分子)上,其中正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链和反义链包括长度为0至6个核苷酸,或者长度为2至3个核苷酸的3'突出端。在某些实施方式中,突出端的核苷酸中至少一个是胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸。在某些实施方式中,突出端是天然的突出端,它们是选自或互补于DNA靶标上相应位置的核苷酸。在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链和反义链独立地包含约16至约35、约17至约30、约18至约25、或约19至约22个连续核苷酸的长度。

[0015] 在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链与选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性,并且本公开内容公开的反义链与选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。在某些实施方式中,本公开内容公开的正义链包括选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列,而本公开内容公开的反义链包括选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列。

[0016] 在某些实施方式中,本公开内容公开的寡核苷酸序列与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性或互补性。在某些实施方式中,本公开内容公开的寡核苷酸序列的正义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。在某些实施方式中,本公开内容公开的寡核苷酸序列的反义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列互补性。

[0017] 在某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA的至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。在某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA的反义和/或正义链的至少一个核苷酸经化学修饰。在某些实施方式中,本公开内容公开的经化学修饰核苷酸是具有至少一种以下修饰的核苷酸:

[0018] a) 对于连接saRNA核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰;

[0019] b) 对于saRNA的核苷酸序列中核糖的2'-OH的修饰;和

[0020] c) 对于saRNA的核苷酸序列中的碱基的修饰。

[0021] 在某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA的至少一个核苷酸是锁核酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉基核苷酸、亚磷酰胺或包含非天然碱基的核苷酸。

[0022] 在某些实施方式中,本公开内容公开的至少一个经化学修饰的核苷酸的化学修饰是在正义链或反义链的5'端添加(E)-乙烯基膦酸酯部分。

[0023] 在某些实施方式中,本公开内容提供了寡核苷酸调节剂,其中,本公开内容公开的saRNA的正义链和/或反义链与选自脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体的一种或多种偶联部分偶联。

[0024] 在某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA的正义链或反义链与选自细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺的一种或多种偶联部分偶联。

[0025] 在所述寡核苷酸调节剂的某些实施方式中,本公开内容公开的saRNA的正义链或反义链与选自细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺的一种或多种偶联部分偶联。

[0026] 在本公开内容的另一方面,提供了一种saRNA的分离的多核苷酸,其中所述分离的多核苷酸是具有SEQ ID NO:1200中16至35个核苷酸的长度的连续核苷酸序列。具体地,分离的多核苷酸是选自SEQ ID NO:1-398的核酸序列。在本公开内容的另一方面,提供了使用saRNA的分离的多核苷酸的方法。

[0027] 在本公开内容的另一方面,提供了一种分离的寡核苷酸复合物,其中所述分离的寡核苷酸复合物包含本文公开的saRNA的反义链和本文公开的分离的多核苷酸的正义链。在某些实施方式中,与UTRN基因的基线水平相比,分离的寡核苷酸复合物使该基因的表达活化至少10%。

[0028] 本公开内容的另一方面提供了编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸。在一个实施方式中,本文公开的saRNA是小活化RNA(saRNA)分子。在一个实施方式中,多核苷酸是DNA分子。本公开内容的另一方面提供了包含本文公开的分离的多核苷酸的载体。

[0029] 在本公开内容的另一方面,提供了一种分离的核酸复合物,其中所述分离的核酸复合物包含本文公开的saRNA的反义链和本文公开的分离的多核苷酸的正义链。在某些实施方式中,与UTRN基因在细胞中的基线表达相比,分离的核酸复合物使UTRN基因的表达活化至少10%。

[0030] 本公开还涉及编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸。还公开了包含本文公开的分离的多核苷酸的载体。

[0031] 本公开内容的另一方面提供了一种细胞,包括本文公开的saRNA、编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸或本文公开的载体。在一个实施方式中,细胞是哺乳动物细胞,任选地人细胞。在一些实施方式中,细胞是宿主细胞。前述细胞可以是体外的,例如细胞系或细胞株,或者可以存在于哺乳动物体内,例如人体。在某些实施方式中,分离的多核苷酸是DNA。在某些实施方式中,载体是AAV。

[0032] 本公开内容的另一方面提供了一种组合物,例如药物组合物,其包含前述saRNA或编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸,和任选的药学上可接受的运载体。在一些实施方式中,药学上可接受的运载体包括水性运载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。在一些实施方式中,药学上可接受的运载体选自水性运载体、脂质体、高分子聚合物和多肽。在某些实施方式中,水性运载体可以是例如无RNA酶的水或不含RNA酶的缓冲液。在一些实施方式中,组合物可包含0.001-200nM(例如,0.001-200nM、0.001-100nM、0.001-50nM、0.001-20nM、10-100nM、10-50nM、20-50nM、20-100nM或50-150nM),或任选地1~150nM的上述saRNA或编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸。

[0033] 本公开内容的另一方面涉及前述saRNA、编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸或包含前述saRNA或本文公开的分离的多核苷酸的组合物在制备用于活化/上调UTRN基因在细胞中的表达的制剂中的用途。

[0034] 本公开内容还涉及一种在细胞中活化/上调UTRN基因表达的方法,其中所述方法包括向细胞给予前述saRNA、本文公开的分离的多核苷酸,或包含前述saRNA或本文公开的分离的多核苷酸的组合物。同时,还提供了用于增加细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平或肌肉中功能性抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平的方法,包括将有效量的本文公开的saRNA、核酸或组合物引入细胞。

[0035] 前述的saRNA、本文公开的分离的多核苷酸或包含上述saRNA或本文公开的分离的

多核苷酸的组合物可直接引入细胞,也可在将编码saRNA的核苷酸序列引入细胞后在细胞中产生。所述细胞是例如哺乳动物细胞,例如人类细胞。前述细胞可以是体外的,例如细胞系或细胞株,或者可以存在于哺乳动物体内,例如人体。人体可以是患有由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或抗肌萎缩蛋白水平低引起的疾病或症状的对象,并且本文公开的saRNA、分离的多核苷酸或包含上述saRNA或本文公开的分离的多核苷酸的组合物以足够的量给予,以治疗所述疾病或症状。具体地,由抗肌萎缩蛋白基因突变所致的抗肌萎缩蛋白缺乏和/或功能性抗肌萎缩蛋白表达不足引起的症状包括例如DMD和BMD。在一个实施方式中,由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的疾病是DMD。在另一个实施方式中,由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的疾病是BMD。

[0036] 本公开内容的另一方面涉及用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白水平不足引起的病症的方法,所述方法包括向个体给予治疗有效剂量的本文公开的saRNA,编码本文公开的saRNA的分离的多核苷酸、本文公开的载体或包含本文公开的saRNA的组合物。在某些实施方式中,疾病或病症是DMD。在某些实施方式中,疾病或病症是BMD。个体可以是哺乳动物,例如人类。在一个实施方式中,个体患有由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或肌肉中低功能性抗肌萎缩蛋白水平引起的症状,其可包括例如BMD。在一个实施方式中,由抗肌萎缩蛋白基因突变所致的功能性抗肌萎缩蛋白肌肉水平不足引起的疾病是DMD或BMD。在一个实施方式中,本文描述的疾病包括DMD和BMD。在某些实施方式中,本文公开的saRNA、本文公开的分离的多核苷酸、本文公开的载体或本文公开的组合物通过选自以下的一种或多种给予途径给予个体:肠胃外输注、口服给予、鼻内给予、吸入给予、阴道给予和直肠给予。在某些实施方式中,给予途径选自以下的一种或多种:鞘内、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内和皮下给予。在某些实施方式中,本文公开的方法使UTRN基因或UTRN mRNA在个体中的表达与该基因的基线水平相比活化/上调至少10% (例如,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少35%,至少40%,至少45%或至少50%)。在某些实施方式中,本文公开的方法使个体中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平与该基因的基线水平相比增加至少10%。

[0037] 本公开内容的另一方面涉及本文公开的saRNA、本文公开的分离的多核苷酸或包含本文公开的saRNA或本文公开的分离的多核苷酸的组合物在制备用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白水平低引起的病症或病症的药物中的用途。个体可以是哺乳动物,例如人类。在一个实施方式中,疾病或病症可包括例如DMD或BMD。在一个实施方式中,由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的疾病是DMD。在一个实施方式中,本文描述的疾病包括DMD和BMD。

[0038] 此外,本公开还提供了用于进行本文公开的预防或治疗的方法的试剂盒,其中该试剂盒包括:a) saRNA, b) 使用说明,和c) 任选地,用于向个体给予所述saRNA的器具。具体地,试剂盒可包装在带标签的包装件中,并且所述包装件上的标签表明所述分子或组合物可用于预防或治疗由抗肌萎缩蛋白表达不足引起的病症或病症,或针对DMD或BMD进行预防或治疗。

[0039] 本公开提供了用于进行本文公开的方法的试剂盒,其中所述试剂盒包含a) 本文公

开的saRNA,和b)使用说明。在某些实施方式中,使用说明包括用于向个体给予本文公开的saRNA的器具或方法。

[0040] 本公开内容的多个方面包括试剂盒,所述试剂盒包含本文公开的saRNA、本文公开的分离的多核苷酸、本文公开的载体或本文公开的组合物于带标签的包装件中,并且所述包装件上的标签表明所述saRNA、分离的多核苷酸、载体或组合物可用于预防或治疗由抗肌萎缩蛋白表达不足引起的疾病或病症,或针对DMD或BMD进行预防或治疗。

[0041] 本公开内容还提供用于检测肌肉或血浆中,或本文公开的已转染上述saRNA、或上述核酸或上述组合物的细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白、或抗肌萎缩蛋白相关蛋白相关蛋白(例如肌养蛋白聚糖(dystroglycan))的试剂盒。

[0042] 本文提供的使UTRN基因的活化/上调的saRNA(如saRNA分子)能以低毒性和不良反应来高效且特异性地上调UTRN基因的表达并提高UTRN mRNA的表达水平,且可用于制备用于预防或治疗与抗肌萎缩蛋白表达不足相关联的病症以及由抗肌萎缩蛋白基因突变引起的疾病或病症的药物。

[0043] 附图简要说明

[0044] 图1显示由saRNA介导的人UTRN mRNA表达水平的变化。398个人UTRN启动子靶向性saRNA以25nM的浓度向人恶性胚胎横纹肌瘤细胞系(RD)单独转染持续3天。saRNA链的序列和双链组成如表1所示。模拟(mock)在没有寡核苷酸的情况下转染(未显示)。dsCon2双链体用作非特异性双链体对照(未显示)。DS18-si8是靶向UTRN基因的双链体siRNA,并转染作为沉默dsRNA对照(未显示)。在各PCR反应中使用基因特异性引物集(如表3所示)通过一步RT-qPCR定量第3天的UTRN的mRNA水平。TBP和B2M的mRNA水平的几何平均值用作内参。该值(y轴,log2倍变化)显示在对TBP和B2M进行标准化之后,相对于模拟处理的398个saRNA各自对UTRN mRNA表达水平造成的相对倍数变化(两个重复转染孔的平均值 $\pm$ SEM)。saRNA根据其诱导UTRN mRNA表达(log2)的活性在x轴上按降序分选。

[0045] 图2显示了saRNA按其人在UTRN启动子上的靶位置和热点区域的分选。398个人UTRN启动子靶向性saRNA以25nM被单独转染进入RD细胞3天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染(未显示)。dsCon2双链体用作非特异性双链体对照(未显示)。DS18-si8是靶向UTRN基因的双链体siRNA,并转染作为沉默dsRNA对照(未显示)。在各个PCR反应中使用基因特异性引物集(如表3所示)通过一步RT-qPCR定量第3天的UTRN mRNA水平。TBP和B2M的mRNA水平的几何平均值用作内参。该值(y轴,log2倍变化)显示在对B2M和TBP进行标准化之后,相对于模拟处理的saRNA各自对UTRN mRNA表达水平造成的相对倍数变化(两个重复转染孔的平均值 $\pm$ SEM)。saRNA按其人在启动子上的位置从UTRN转录起始位点(TSS)上游-666bp至下游334bp于x轴上分选。4个saRNA热点区域的位置在矩形虚线框中标记为H1至H4。方框上方的数字表示相对于UTRN TSS(+1位置)的热点区域的边界,其跨越各热点区域内第一个saRNA靶标的最5'端和最后一个saRNA靶标的最3'端。

[0046] 图3显示了前导saRNA对人UTRN基因RD细胞表达的活化作用。细胞以25nM的saRNA浓度处理3天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染。dsCon2作为非特异性双链体对照转染。DS18-si8是靶向UTRN基因的双链体siRNA,并转染作为沉默dsRNA对照。图3显示了第3天使用基因特异性引物集(如表3所示)通过两步RT-qPCR定量RD细胞中UTRN的mRNA水平。TBP和B2M的mRNA水平的几何平均值用作内参。这些值(y轴)表示为在对TBP和B2M进行标准化之后

的相对于模拟处理的UTRN mRNA表达水平(两个重复转染孔的平均值 $\pm$ SEM)。

[0047] 图4显示了前导saRNA对RD细胞中UTRN的蛋白质表达的活化作用。细胞用指示的saRNA(见表1)以25nM处理5天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染。dsCon2作为非特异性双链体对照转染。DS18-si8是靶向UTRN基因的双链体siRNA,并转染作为沉默dsRNA对照。通过使用针对人抗肌萎缩蛋白相关蛋白的一抗进行Western印迹,测定第5天RD细胞中的抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经印迹以用作蛋白质加载的对照。图4显示通过量化条带强度得出的抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是抗肌萎缩蛋白相关蛋白对 α/β -微管蛋白标准化后的相对条带强度。所有saRNA均按其诱导抗肌萎缩蛋白相关蛋白表达(倍数变化)的活性在x轴上按降序分选。

[0048] 图5显示了saRNA对RD细胞中人UTRN mRNA表达的活化作用。指示的saRNA(见表10)以25nM转染至RD细胞中3天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染。dsCon2作为非特异性双链体对照转染。DS18-si8是靶向UTRN基因的双链体siRNA,并转染作为沉默dsRNA对照。UTRN的mRNA水平使用基因特异性引物集(如表3所示)通过两步RT-qPCR定量。TBP和HPRT1的mRNA水平的几何平均值用作内参。这些值(y轴)表示为在对TBP和HPRT1进行标准化之后的相对于模拟处理的UTRN mRNA表达水平(两个重复转染孔的平均值 $\pm$ SEM)。

[0049] 图6A-6B显示saRNA对RD细胞中人抗肌萎缩蛋白相关蛋白的表达的活化作用。指示的saRNA(见表10)以25nM转染至RD细胞中3天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染。dsCon2作为非特异性双链体对照转染。抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平使用针对人抗肌萎缩蛋白相关蛋白的一抗通过JESS测定。针对 α/β -微管蛋白的抗体也经检测以用作蛋白质加载的对照。图6A显示抗肌萎缩蛋白相关蛋白和 α/β -微管蛋白的蛋白质条带。图6B显示通过量化图6A的条带强度得出的抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的相对倍数变化。值(y轴)是对 α/β -微管蛋白进行标准化之后的抗肌萎缩蛋白相关蛋白的相对条带强度(两个重复转染孔的平均 $\pm$ SEM)。

具体实施方式

[0050] 已证明靶向基因调控序列(包括启动子)的双链RNA(dsRNA)通过称为RNA活化(RNAa)的机制在转录水平上以序列特异性方式上调靶基因(Li,L.C.,等.小dsRNA在人细胞中诱导转录激活(Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells).PNAS(2006))。这类dsRNA称为小激活RNA(saRNA)。

[0051] 本公开内容的实施方式部分基于以下惊人发现:寡核苷酸调节剂(例如saRNA,本文中也称为“UTRN基因saRNA”或“UTRN saRNA”)能够活化或上调UTRN基因在细胞中的表达。给予本公开内容的saRNA后的功能性UTRN基因mRNA的产量增加可以实现UTRN mRNA和抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的显著增加或上调。

[0052] 具体地,发明人发现,能够活化/上调UTRN mRNA表达的功能性saRNA不随机分布在启动子上,而是簇集在某些特定的热点区域。只有UTRN基因的启动子上的一些区域有利于saRNA的基因活化,例如UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496、-351至-294、-236至-187和-101至-65。由本公开内容鉴定的这些特定启动子区域(本文中称为“热点区域”)的长度任选地为至少37nt,或者具有约37至约200nt的长度范围。

[0053] 发明人还发现,UTRN启动子区域内saRNA的最佳靶序列/正义链包括具有以下标准

的序列：(1)GC含量在35%至70%之间；(2)少于5个连续相同核苷酸；(3)3个或更少个二核苷酸重复；和(4)3个或更少个三核苷酸重复。作为该标准的有益结果，靶序列（例如，包含靶序列的分离的核酸序列）在与saRNA相互作用时，与UTRN mRNA的基线水平相比，能使UTRN mRNA的表达活化/上调至少10%或1.1倍。

[0054] 本文中，“热点区域”定义为跨各热点中首个saRNA的靶标的最5'端和末个saRNA的靶标的最3'端的saRNA的靶基因的核酸区域，其中按上文所列标准(1)、(2)、(3)和(4)设计以靶向该区域的saRNA的至少25%显示为具有功能性，也即，能够诱导1.1倍或更大的靶基因mRNA表达变化（相对于mRNA表达基线水平）。在某些实施方式中，至少28%、至少30%、约35%、约40%或超过50%的saRNA被设计为具有功能性，也即，能够诱导靶基因mRNA转录或蛋白质表达水平的1.1倍或更大变化（相对于该基因的基线水平）。

[0055] 至少部分基于这些发现，本公开的特征是saRNA、组合物和药物组合物，其用于使UTRN mRNA的表达活化/上调至少10%（与UTRN mRNA的基线水平相比）。本文还提供了用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或低功能性抗肌萎缩蛋白水平引起的疾病或病症的方法，包括给予个体本文所述的saRNA、组合物和/或药物组合物之任一者。

[0056] 本公开内容的实施方式也部分基于以下惊人发现，即能够活化或上调细胞中UTRN基因表达的saRNA簇集在特定的UTRN基因启动子区域中，如图2所示。发明人鉴定了这些UTRN基因启动子区域的簇，其被认为是所开发的功能性saRNA（参见例如，表9）的靶位点富集的“热点”启动子区域。例如，检测到人UTRN启动子的4个热点区域，其分别位于距离启动子TSS的区域-636至-496(H1)，-351至-294(H2)，-236至-187(H3)和-101至-65(H4)，并且发现这些热点区域是通过RNA活化机制活化UTRN基因表达的saRNA的最佳靶位点。

[0057] 这种saRNA-UTRN mRNA-抗肌萎缩蛋白相关蛋白通路能够提供不同于对抗肌萎缩蛋白缺乏相关病症(DDD)，例如杜氏肌营养不良症(DMD)和贝克尔肌营养不良症(BMD)患者的当前治疗的替代性治疗方法。

[0058] 在本公开内容中，相关术语定义如下：

[0059] 本文中使用的术语“互补”是指在两条寡核苷酸链之间形成碱基对的能力。碱基对通常通过反平行寡核苷酸链中核苷酸之间的氢键形成。互补性寡核苷酸链的碱基可以Watson-Crick方式配对（例如A与T，A与U和C与G）或以允许双链体形成的任何其它方式（例如Hoogsteen或反向Hoogsteen碱基配对法）配对。

[0060] 互补性包括完全互补性和不完全互补性。“完全互补性”或“100%互补性”是指来自第一寡核苷酸链的各核苷酸都能与第二寡核苷酸链中的相应位置处的核苷酸在双链寡核苷酸分子的双链区域中形成氢键，而无碱基对“错配”。“不完全互补性”意味着并非两条链的所有核苷酸单元都通过氢键相互结合。例如，对于双链区长度为20个核苷酸的两条寡核苷酸链，如果该双链区中只有两个碱基对能通过氢键形成，则寡核苷酸链具有10%的互补性。在同一示例中，如果该双链区域中有18个碱基对能通过氢键形成，则该寡核苷酸链具有90%的互补性。实质互补性（实质上互补）是指至少约75%、约79%、约80%、约85%、约90%、约95%或99%的互补性。

[0061] 术语“寡核苷酸”或“多核苷酸”可互换使用，且指核苷酸的聚合物，其包括但不限于DNA、RNA或DNA/RNA杂合体的单链或双链核酸分子，含有规则和不规则交替脱氧核糖基部

分和核糖基部分的寡核苷酸链,以及经修饰和对于此类寡核苷酸天然或非天然存在的框架的寡核苷酸链。本文所述的用于活靶基因转录的寡核苷酸是小活化核酸分子(saRNA)。

[0062] 本文中使用的术语“寡核苷酸链”、“链”和“寡核苷酸序列”可互换使用,指的是具有少于35个碱基(包括脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)中的核苷酸)的短核苷酸序列的通用术语。在一个非限制性示例中,链的长度可以是16到35个核苷酸的任何长度。

[0063] 本文中使用的术语“靶基因”可指天然存在于生物体中和/或可以瞬时或稳定地转染或纳入细胞和/或其染色质中的核酸序列、转基因、病毒或细菌序列、染色体或染色体外基因。靶基因可以是蛋白质编码基因或非蛋白质编码基因(如微小RNA基因和长非编码RNA基因)。靶基因一般含有启动子序列,且靶基因的正向调控可通过设计与启动子序列具有序列相同性(也称同源性)的saRNA来实现,其特征不在于靶基因的表达的上调。本文中可互换使用的“靶序列”或“靶位点”是指靶基因序列的序列中的序列区段,例如靶基因启动子,其与根据本公开内容的saRNA的正义链或反义链同源或互补。靶基因还可以包括一个或多个调控元件,其中一个或多个saRNA被设计以具有与调控元件的序列相同性。一种或多种调控元件的非限制性示例包括:启动子、增强子、沉默子、绝缘子、TATA盒、GC盒、CAAT盒、转录起始位点、转录因子或调节转录的其它蛋白质的DNA结合基序,以及5'非翻译区。

[0064] 本文所用的术语saRNA的“正义链”是指与saRNA双链体中的靶基因启动子的序列的编码链的区段具有序列同源性或序列相同性的链。

[0065] 本文所用的术语saRNA的“反义链”是指与saRNA双链体或靶基因序列区域中的正义链互补的链。

[0066] 本文中使用的术语“编码链”是指靶基因中不能用于转录的DNA链,并且该链的核苷酸序列与转录产生的RNA的序列相同(在RNA中,DNA中的T被U替代)。本文所述的靶基因启动子的双链DNA序列的编码链指与靶基因DNA编码链位于同一DNA链的启动子序列。

[0067] 本文中使用的术语“模板链”是指与靶基因的双链DNA中的编码链(即,作为模板的能被转录成RNA的链)互补的另一链,并且该链与转录的RNA(A至U,G至C)互补。在转录过程中,RNA聚合酶与模板链结合,沿模板链的3'→5'方向移动,并沿5'→3'方向催化RNA的合成。本文所述的靶基因启动子的双链DNA序列的模板链指与靶基因的DNA模板链位于同一DNA链的启动子序列。

[0068] 本文所用的术语“LNA”是指锁核酸,其中2'-氧原子和4'-碳原子通过额外桥接合。如本文所用,术语“BNA”是指2'-O和4'-氨基乙烯桥接的核酸,其可含有具有N-O连接的五元或六元桥接结构。本文所用的术语“PNA”是指具有假肽骨架的核酸模拟物,该假肽骨架包含N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元,其中核碱基通过羰基亚甲基接头连接至甘氨酸氮。

[0069] 本文中使用的术语“启动子”是指在空间上与蛋白质编码或RNA编码核酸序列相关联的序列,并且对蛋白质编码或RNA编码核酸序列的转录起调节作用。通常,真核基因启动子包含100至5000个碱基对,但该长度范围并不旨在限制本文所用的术语“启动子”。虽然启动子序列通常位于蛋白质编码序列或RNA编码序列的5'末端,但其也可存在于外显子和内含子序列中。

[0070] 本文所用的术语“转录起始位点”是指在基因的模板链上标记转录起始点的核苷酸。转录起始位点可以出现于启动子区域的模板链上。基因可以有多个转录起始位点。

[0071] 本文中使用的术语“相同性”或“同源性”是指saRNA的一条寡核苷酸链(正义或反

义链)与靶基因区域中的编码链或模板链具有序列相似性。如本文所用,“相同性”或“同源性”可以是至少约75%、约79%、约80%、约85%、约90%、约95%或99%。

[0072] 术语“等长部分”是指与目标序列(例如,与saRNA的连续寡核苷酸序列)进行比较并且与目标序列具有相等长度(相等碱基数)的序列的部分。

[0073] 本文中使用的术语“序列特异性模式”是指两个核酸片段根据其核苷酸序列的结合或杂交方式,例如,Watson-Crick方式(例如A与T,A与U和C与G)或允许形成双链体的任何其他方式(例如Hoogsteen或反向Hoogsteen碱基配对)。

[0074] 本文中使用的术语“突出端”是指寡核苷酸链的末端(5'或3')处的非碱基配对的核苷酸,其由双链寡核苷酸中的一条链延伸超出另一条链而形成。从双链体的3'末端和/或5'末端延伸出来的单链区域称为突出端。本文中使用的术语“自然突出端”是指由与DNA靶标上的相应位置相同或互补的一个或多个核苷酸组成的突出端。正义链上的自然突出端由与DNA靶标上相应位置相同的一个或多个核苷酸组成。反义链上的自然突出端由与DNA靶标上相应位置互补的一个或多个核苷酸组成。

[0075] 如本文所用,术语“基因活化”或“活化基因表达”和“基因上调”或“上调基因表达”可互换使用,并且表示通过测量转录水平、mRNA水平、蛋白质水平、酶活性、甲基化状态、染色质状态或构型、基因在细胞或生物系统中的活性或状态或翻译水平,与某核酸的基线水平相比,该核酸的转录、翻译、表达或活性的增加。可以直接或间接确定这些活动或状态。此外,“基因活化”、“活化基因表达”、“基因上调”或“上调基因表达”是指与核酸序列相关联的活性的增加,无论这类活化的机制如何。例如,基因活化发生在转录水平以增加向RNA的转录,而RNA被翻译成蛋白质,从而增加蛋白质的表达。

[0076] 术语核酸或基因的“基线表达”或“基线水平”是指在没有任何人工调控的情况下(例如,在给予根据本公开内容的saRNA之前或在不给予根据本公开内容的saRNA的情况下)的核酸或基因的表达水平。

[0077] 如本文所用,术语“寡核苷酸调节剂”、“小活化RNA”、“saRNA”和“小活化核酸分子”可以互换使用,并且指的是这样的核酸分子,该核酸分子能上调靶基因表达,并且可包含第一核酸片段(正义链)和第二核酸片段(反义链),该第一核酸片段含有与靶基因的非编码核酸序列(例如,启动子或增强子)具有序列相同性的核苷酸序列,该第二核酸片段含有与第一核酸片段互补的核苷酸序列,其中第一核酸片段和第二核酸片段形成双链体。saRNA也可以包含合成或载体表达的单链RNA分子,该分子能通过分子内的两个互补区域(第一和第二区域)形成发夹结构,其中第一区域包含与基因启动子的靶序列具有序列相同性的核苷酸序列,并且第二区域包含与第一区域互补的核苷酸序列。saRNA的双链体区域的长度通常为约10至约50、约12至约48、约14至约46、约16至约44、约18至约42、约20至约40、约22至约38、约24至约36、约26至约34和约28至约32个碱基对,并且通常为约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45或约50个碱基对。此外,术语“寡核苷酸调节剂”、“saRNA”、“小活化RNA”和“小活化核酸分子”也含有核糖核苷酸以外的核酸,包括但不限于经修饰的核苷酸或类似物。

[0078] 本文所用的术语“功能性saRNA”是指与其预期靶基因的基线水平相比,使该基因的表达活化至少10%(或至少1.1倍)的saRNA。术语“非功能性saRNA”是指与UTRN基因的基线水平相比,使UTRN基因的表达调节小于10%(或小于1.1倍)的saRNA。

[0079] 本文所用的术语“热点区域”是指这样的基因启动子区域,其包含热点和跨越热点内首个saRNA的最5'端和末个saRNA的3'端的连续靶序列。

[0080] 如本文所用,术语“分离的靶位点”和“分离的多核苷酸”可互换使用,并且在本文中是指与saRNA具有互补性或杂交的靶位点。例如,靶位点的分离的核酸序列可包括与saRNA区域具有互补性或杂交的核酸序列。本文所用的术语“分离的多核苷酸”是指编码saRNA的多核苷酸。

[0081] 本文所用的术语“合成”是指用于合成寡核苷酸的方法,包括允许RNA合成,例如化学合成、体外转录和/或基于载体的表达的任何方法。

[0082] 如本文所用,术语“疾病”、“病症”和“紊乱”在指抗肌萎缩蛋白缺乏相关的病症时可互换使用。

[0083] 本文所用的大写“UTRN”或“UTRN基因”是指一种人类基因。

[0084] 本文所用的术语“UTRN mRNA”是指由UTRN基因的表达或UTRN基因的转录产生的信使RNA(mRNA)。

[0085] 如本文所用,术语“UTRN蛋白”和“抗肌萎缩蛋白相关蛋白”可互换使用,并且指由UTRN基因的表达或UTRN mRNA的翻译产生的蛋白质。

[0086] saRNA

[0087] 在本公开内容中,UTRN基因的表达通过RNA活化上调,并且通过增加抗肌萎缩蛋白相关蛋白的表达水平来治疗相关疾病(例如DMD)。当UTRN基因编码抗肌萎缩蛋白相关蛋白时,UTRN mRNA表达的增加导致抗肌萎缩蛋白相关蛋白表达的增加,从而治疗疾病(例如DMD)。因此,在某些情况下,UTRN基因是本公开内容中的靶基因。

[0088] 本公开内容的多个方面包括寡核苷酸调节剂(例如saRNA),其包含长度范围为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列,其中连续寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1200的等长部分具有至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%的序列同源性或互补性,并且其中所述saRNA使UTRN基因的表达与其基线表达相比活化/上调至少10%。

[0089] 在一些实施方式中,本文公开的SEQ ID NO:1200的等长部分位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。

[0090] 在某些实施方式中,所述saRNA的连续寡核苷酸序列相对于SEQ ID NO:1200的等长部分具有5个或更少的核苷酸差异或错配,即5、4、3、2、1或0个核苷酸差异或错配。在某些实施方式中,差异或错配位于saRNA的寡核苷酸序列的中间或3'末端。saRNA分子设计的方法和原理为本领域技术人员所熟知,并且详述于例如Place等,Molecular Therapy-Nucleic Acids(2012)1,e15;和Li等,PNAS,2006,第103卷,第46期,17337-17342,其通过引用其全文方式纳入本文。

[0091] 在某些实施方式中,本文公开的saRNA包括正义链和反义链。正义链和反义链包括能够形成双链核酸结构的互补区域,所述双链核酸结构通过RNAa机制活化细胞中UTRN基因的表达。本文中使用的RNAa机制(也称为RNA活化)是指双链核酸结构能够在转录水平上以序列特异性方式上调靶基因的机制。saRNA的正义链和反义链可存在于两条不同的核酸链上,也可存在于一条核酸链上(例如,连续的核酸序列)。当正义链和反义链位于两条不同的链上时,至少一条saRNA链具有长度为0至6个核苷酸的3'突出端,从而使得突出端长度为0,

1,2,3,4,5或6个核苷酸,在某些情况下,两条链都具有长度为2或3个核苷酸的3'突出端。在一些情况下,突出端的核苷酸是胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸(dT),或者在一些情况下是天然突出端,它们是选自或互补于DNA靶标上相应位置的核苷酸。当正义链和反义链位于一条核酸链上时,在一些情况下,saRNA是发夹式单链核酸分子,其中正义链和反义链的互补区域彼此形成双链核酸结构。在上述saRNA中,在一些实施方式中,正义链和反义链的长度分别为16至35个核苷酸。例如,在一些实施方式中,正义链和反义链独立地包括16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸的长度。

[0092] 在某些实施方式中,saRNA的一条链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75% (例如,至少约79%、约80%、约85%、约95%或约99%) 的序列同源性或互补性。具体地,本文所公开的saRNA的正义链与选自SEQ ID NO:400-797的任何核苷酸序列具有至少75% (例如,至少约79%、约80%、约85%、约95%或约99%) 的序列同源性,并且本文所述公开的saRNA的反义链与选自SEQ ID NO:800-1197的任何核苷酸序列具有至少75% (例如,至少约79%、约80%、约85%、约90%或约99%) 的序列同源性。更具体地,本文公开的saRNA的正义链包含或由选自SEQ ID NO:400-797的任何核苷酸序列组成;并且本文公开的saRNA的反义链包含或由选自SEQ ID NO:800-1197的任何核苷酸序列组成,或是选自SEQ ID NO:800-1197的任何核苷酸序列。

[0093] 在某些实施方式中,saRNA的一条链相对于选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列可具有五个或更少个(即,5、4、3、2、1或0个)核苷酸差异或错配。具体地,本文公开的saRNA的正义链相对于选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列可具有5个或更少个(即,5、4、3、2、1或0个)核苷酸差异,而本文公开的saRNA的反义链相对于选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列可具有5个或更少个(即,5、4、3、2、1或0个)核苷酸差异。在某些实施方式中,差异或错配位于saRNA的正义链或反义链的中间或3'末端。

[0094] 在某些实施方式中,本文公开的反义链能够以序列特异性方式与基因的启动子的靶核酸序列相互作用,这意味着该反义链能够通过氢键键合与靶核酸杂交。在某些实施方式中,反义链具有这样的核苷酸序列,该核苷酸序列当以5'至3'方向写入时包含其所靶向的靶核酸的目标部分的反向互补物。在某些这样的实施方式中,反义链具有这样的核苷酸序列,该核苷酸序列当以5'至3'方向写入时包含SEQ ID NO:1200中目标部分的反向互补物;具体地,所述目标部分是选自SEQ ID NO:1-398的核酸序列。

[0095] 在本文公开的saRNA中,所有核苷酸可以是天然的或非化学修饰的核苷酸,或者至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。化学修饰的非限制性示例包括以下一种或多种的组合:

[0096] (1) 对于saRNA核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰;

[0097] (2) 对于saRNA的核苷酸序列中核糖的2'-OH的修饰;

[0098] (3) 对于saRNA的核苷酸中的碱基的修饰;和

[0099] (4) 小活化核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸是锁核酸。

[0100] 本文所述的化学修饰是本领域技术人员公知的,磷酸二酯键的修饰是指磷酸二酯键中氧的修饰,包括硫代磷酸酯修饰和硼代磷酸盐修饰。本文公开的修饰能稳定saRNA结构,保持高特异性和碱基配对的高亲和力。

[0101] 在一些实施方式中,本公开内容的saRNA包括至少一个经化学修饰的核苷酸,其在

核苷酸的戊糖中的2'-OH处被修饰,即在核糖的羟基位置处引入某些取代基,如2'-氟修饰、2'-氧甲基修饰、2'-氧亚乙基甲氧基修饰、2,4'-二硝基苯酚修饰、锁核酸(LNA)、2'-氨基修饰或2'-脱氧修饰,例如2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸。

[0102] 在一些实施方式中,本公开内容的saRNA包括至少一种经化学修饰的核苷酸,其在核苷酸的碱基处被修饰,例如,5'-溴尿嘧啶修饰、5'-碘尿嘧啶修饰、N-甲基尿嘧啶修饰或2,6-二氨基嘌呤修饰。

[0103] 在一些实施方式中,saRNA的化学修饰是在正义或反义序列的5'端添加(E)-乙烯基磷酸酯部分。在某些实施方式中,至少一个经化学修饰的核苷酸的化学修饰是在正义或反义序列的5'端添加5'-甲基胞嘧啶部分。

[0104] 在一些实施方式中,本公开内容的saRNA包括小活化核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸为经化学修饰的核酸,例如,锁核苷酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉基核苷酸、亚磷酰胺和包含非天然碱基的核苷酸。在一些实施方式中,本文公开的saRNA包括具有2'-O-甲基修饰的核苷酸的和含5'-硫代磷酸基团的核苷酸的“内光(endo-light)”修饰。

[0105] 在一些实施方式中,对本公开内容的saRNA进行化学修饰以增强稳定性或其它有益特性。具有本公开特征的核酸可通过常规方法合成和/或修饰,例如下述文献中描述的那些:《现代核酸化学方案》(Current protocols in nucleic acid chemistry),Beaucage, S.L.等(编),约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons, Inc.),美国纽约州纽约,其通过引用方式纳入本文。修饰包括,例如,(a)末端修饰,例如,5'末端修饰(磷酸化,偶联,反向连接等),3'末端修饰(偶联,DNA核苷酸,反向链接等),(b)碱基修饰,例如,用稳定化碱基,去稳定化碱基或与扩展的伴侣库配对的碱基做替换,去除碱基(无碱基核苷酸)或偶联的碱基,(c)糖修饰(例如,在2'位置或4'位置),或糖的替换,以及(d)骨架修饰,包括磷酸二酯连接的修饰或替换。可用于本公开内容的saRNA分子的具体示例包括但不限于含有经修饰骨架或无天然核苷键的RNA。在一些实施方式中,具有经修饰骨架的RNA包括在骨架中没有磷原子的那些RNA等。在一些实施方式中,核苷间骨架中没有磷原子的经修饰RNA也可以被认为是寡核苷酸。在某些实施方式中,修饰的寡核苷酸在其核苷间主链中将具有磷原子。

[0106] 修饰的寡核苷酸主链包括,例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯、次磷酸酯、亚磷酰胺类,包括3'-氨基亚磷酰胺和氨基烷基磷酸酯、硫代磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯和硼磷酸酯(具有正常的3'-5'键,它们的2'-5'类似物等),具有相反极性的那些,其中相邻的核苷单元对连接3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0107] 制备含磷连接的非限制性示例包括但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利

RE39464,其通过引用其全文方式纳入本文。

[0108] 在某些实施方式中,小活化核酸分子是RNA,DNA,BNA,LNA或肽核酸(PNA)。

[0109] 此外,为了促进saRNA进入细胞,可在上述修饰的基础上在saRNA的正义或反义链的末端引入化学偶联部分,以促进作用通过含脂质双层的细胞膜和核膜及核内的基因启动子区域。

[0110] 在某些实施方式中,本公开内容中公开的saRNA共价连接至一个或多个偶联基团。在某些实施方式中,偶联基团改变附连的寡核苷酸的一种或多种性质,包括但不限于药效学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、组织分布、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除。在某些实施方式中,偶联基团使附连的寡核苷酸具有新的性质,例如,允许检测寡核苷酸的荧光团或报告基团。某些偶联基团和偶联部分之前已经描述过,例如:胆固醇部分(Letsinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556),胆酸(Manoharan等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060),硫醚,例如己基-S-三苯硫醇(Manoharan等, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770),硫代胆固醇(Oberhauser等, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538),脂肪链,例如多癸烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等, *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov等, *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等, *Biochimie*, 1993, 75, 49-54),磷脂,例如,二-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-丙三基-3-H-磷酸三乙铵盐(Manoharan等, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea等, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973),或金刚烷乙酸,棕榈基部分(Mishra等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237),十八胺或己基氨基-羰基-氧胆固醇部分(Crooke等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937),生育酚基团(Nishina等, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2015, 4, e220; 和Nishina等, *Molecular Therapy*, 2008, 16, 734-740),或GalNAc簇(例如,WO2014/179620)。

[0111] 在某些实施方式中,本公开内容的saRNA涉及与选自以下的一个或多个偶联部分偶联的saRNA的正义链或反义链:嵌入剂、报告分子、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、维生素部分、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲、蒽醌、金刚烷、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素、荧光团和染料。

[0112] 在一些实施方式中,偶联部分包括活性药物物质,例如,阿司匹林、华法林、保泰松、布洛芬、舒洛芬、芬-布芬、酮洛芬、(S) - (+) - 普拉洛芬、卡洛芬、丹磺基肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、芬戈莫德、氟芬那酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂卓、茚甲新、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺类药物、抗糖尿病药、抗菌剂或抗生素。

[0113] 在一些实施方式中,本公开内容的saRNA与选自以下的一种或多种偶联部分偶联:脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体。

[0114] 在某些实施方式中,本公开内容的saRNA涉及与选自以下的一种或多种偶联部分偶联的saRNA的正义链或反义链:细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺。

[0115] 在一些实施方式中,与实施方式中公开的一种或多种偶联部分偶联的saRNA被直接接触、转移、递送或给予至细胞或对象。本文中可互换使用的“患者”、“个体”或“对象”可

以指非人类(例如,哺乳动物)对象或人类对象。

[0116] 在一些实施方式中,所述saRNA的正义链和反义链独立地具有至少约10%,至少约20%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,或约100%的核苷酸为经化学修饰的核苷酸。

[0117] 在一些实施方式中,saRNA的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或约100%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸。

[0118] 这些修饰可以提高saRNA的生物利用度,提高对靶序列的亲合力,并增强细胞中对核酸酶水解的抗性。

[0119] 在某些实施方式中,本公开内容的saRNA在与细胞接触时可使细胞中一个或多个基因的表达式有效活化或上调,例如至少10%(例如,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少100%,至少150%,至少200%,至少300%,至少500%,至少800%,至少1000%,至少2000%,或至少5000%)。

[0120] 在非限制性示例中,saRNA的设计至少部分基于以下标准:(1)GC含量在35%至70%之间;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。在某些实施方式中,saRNA的设计/选择至少部分基于能够生产功能性saRNA的标准。例如,在某些情况下,位于TSS上游的序列可能包括尽管位于热点区域但不利于saRNA的合成的序列。

[0121] 在一些实施方式中,saRNA的设计/选择至少部分基于以下标准,该标准包括具有特定GC含量(例如,GC含量在25%和75%之间)且缺乏连续相同核苷酸,连续二核苷酸或连续三核苷酸的序列。在一些实施方式中,saRNA序列包括这样的序列,该序列(1)具有35%至70%之间的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

[0122] 在一些实施方式中,saRNA序列包括GC含量在25%至75%,30%至70%,35%至70%,40%至60%或45%至55%的序列。在一些实施方式中,saRNA包含GC含量在35%至70%的序列。

[0123] 在一些实施方式中,saRNA序列包括具有少于7个连续相同核苷酸、少于6个连续相同核苷酸、少于5个连续相同核苷酸、少于4个连续相同核苷酸或少于3个连续相同核苷酸的序列。在一些实施方式中,saRNA包含具有少于5个连续相同核苷酸的序列。

[0124] 在一些实施方式中,saRNA序列包括具有5个或更少的二核苷酸重复序列、4个或更少的二核苷酸重复序列、3个或更少的二核苷酸重复序列或2个或更少的二核苷酸重复序列的序列。在一些实施方式中,saRNA包含具有3个或更少的二核苷酸重复序列的序列。

[0125] 在一些实施方式中,saRNA序列包括具有5个或更少的三核苷酸重复序列、4个或更少的三核苷酸重复序列、3个或更少的三核苷酸重复序列或2个或更少的三核苷酸重复序列的序列。在一些实施方式中,saRNA包含具有3个或更少的三核苷酸重复序列的序列。

[0126] 靶序列

[0127] 在一些实施方式中,本公开内容涉及本公开内容的saRNA的分离的靶位点,具体而言,分离的靶位点是SEQ ID NO:1200的核苷酸序列中的长度范围为16至35个核苷酸的核苷酸序列。在一些实施方式中,分离的靶位点是选自SEQ ID NO:1-398的核酸序列。分离的靶位点能够与本公开内容公开的saRNA的反义链相互作用,并且因此能够活化UTRN基因的表

达(例如,mRNA表达、蛋白质表达、UTRN表达)。在一些实施方式中,靶位点的选择至少部分基于基因序列。在一些实施方式中,靶位点的选择至少部分基于接近基因转录起始位点(TSS)的序列。在一些实施方式中,靶位点的选择至少部分基于TSS上游的启动子序列。在一些实施方式中,靶位点的选择至少部分基于TSS上游-5000bp、-4000bp、-3000bp、-2000bp、-1000bp或-500bp的序列。在一些实施方式中,靶位点的选择至少部分基于以下方式:每次向TSS移动1bp并产生靶序列,然后重复此步骤并通过附加的碱基对(例如,n+1)向TSS递增。在一些实施方式中,靶位点的长度为约8至约35个核苷酸。在一些实施方式中,靶位点的长度为约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。

[0128] 在一些实施方式中,本公开涉及一种分离的寡核苷酸复合物,其包含本文公开的saRNA和本公开中公开的分离的靶位点。在一些实施方式中,分离的寡核苷酸复合物使UTRN基因的表达活化至少10%(例如,与基线UTRN表达水平相比,使UTRN基因的表达活化/上调)。

[0129] 热点

[0130] 在一些实施方式中,本公开涉及位于UTRN基因转录起始位点上游的分离的核酸序列或即“热点区域”。在一些实施方式中,本文公开的分离的核酸序列是长度为至少37个连续核苷酸的寡核苷酸序列,并且其与SEQ ID NO:1200的核苷酸序列中的等长区域具有至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%的序列同源性。在一些实施方式中,经设计以靶向热点内序列的至少25%(例如,28%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或100%)的saRNA是功能性的,即,能够诱导靶基因的mRNA表达的至少1.1倍的变化。在非限制性示例中,经设计以靶向热点的至少50%的saRNA是功能性的,即,能够诱导靶基因的mRNA表达的至少1.1倍的变化。在非限制性示例中,saRNA的设计至少部分基于以下标准:(1)GC含量在35%至70%之间;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。在一些实施方式中,使用相同或相似的标准来选择分离的核酸序列和/或靶序列。在非限制性示例中,UTRN基因的TSS上游的分离的核酸序列至少基于以下标准选择:(1)具有35%至70%的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。在一些实施方式中,分离的核酸具有约19至约250个(例如,约27至约200个,约30至约200个,约33至约200个,约36至约150个,约39至约100个,约42至约75个,约45至约70个,或约48至约55个)核苷酸的长度。在一些实施方式中,热点区域是选自下组的多核苷酸序列:SEQ ID NO:1207-1210。在一些实施方式中,热点区域是选自下组的核酸序列:UTRN基因的转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。本公开内容还提供一种设计saRNA的方法,所述方法提供靶向本公开的所述分离的核酸序列的saRNA。

[0131] 在一些实施方式中,靶序列的设计/选择至少部分基于能够生产功能性saRNA的标准。例如,在一些情况下,位于TSS上游的序列可能包括尽管位于热点区域但不利于靶序列的合成的序列。

[0132] 在一些实施方式中,热点区域中的靶序列的选择至少部分基于以下标准,该标准

包括具有特定GC含量(例如,GC含量在25%和75%之间)且缺乏连续相同核苷酸,连续二核苷酸或连续三核苷酸的序列。在一些实施方式中,热点区域中的靶序列包括这样的序列,该序列(1)具有35%至70%之间的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

[0133] 在一些实施方式中,靶序列包括GC含量在25%至75%,30%至70%,35%至70%,40%至60%或45%至55%的序列。在一些实施方式中,saRNA包含GC含量在35%至70%的序列。

[0134] 在一些实施方式中,靶序列包括具有少于7个连续相同核苷酸、少于6个连续相同核苷酸、少于5个连续相同核苷酸、少于4个连续相同核苷酸或少于3个连续相同核苷酸的序列。在一些实施方式中,saRNA包含具有少于5个连续相同核苷酸的序列。

[0135] 在一些实施方式中,靶序列包括具有5个或更少的二核苷酸重复序列、4个或更少的二核苷酸重复序列、3个或更少的二核苷酸重复序列或2个或更少的二核苷酸重复序列的序列。在一些实施方式中,靶序列包含具有3个或更少的二核苷酸重复序列的序列。

[0136] 在一些实施方式中,靶序列包括具有5个或更少的三核苷酸重复序列、4个或更少的三核苷酸重复序列、3个或更少的三核苷酸重复序列或2个或更少的三核苷酸重复序列的序列。在一些实施方式中,靶序列包含具有3个或更少的三核苷酸重复序列的序列。

[0137] 各个设计的saRNA的RNAa活性取决于复杂的种种因素,例如染色质环境,靶标本身和附近区域的序列特征,转录因子结合等。该核心潜在决定因素可能是DNA靶标的可及性。在可及性较高的区域,dsRNA可显示出更高的RNAa活性。而经设计以靶向启动子的其它区域的dsRNA可显示非功能性或甚至转录沉默作用。这可以解释其中功能性saRNA簇集在一起的热点区域的存在。例如,至少部分基于以下标准设计的靶序列:(1)具有35%至70%的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列,可能不使UTRN基因的表达活化/上调至少10%(与UTRN基因的基线表达相比),因为saRNA结合的靶序列不在热点区域(例如,本文描述的任何热点区域内)。

[0138] 在某些实施方式中,本公开内容涉及一种分离的核酸复合物,其包含本公开内容中公开的saRNA和本文公开的分离的核酸序列。在某些实施方式中,与UTRN基因的基线表达相比,分离的核酸复合物使UTRN基因的表达活化至少10%。

[0139] 在一些方面,还提供了利用UTRN基因的转录靶位点上游的分离的核酸的方法。

[0140] 编码saRNA的DNA

[0141] 在某些实施方式中,本公开内容涉及编码saRNA的核酸或多核苷酸,所述saRNA能使UTRN基因在细胞中的表达活化或上调至少10%(例如,与UTRN基因的基线表达相比)。在某些实施方式中,核酸是编码saRNA的DNA。在某些实施方式中,核酸是重组载体,具体地是重组AAV载体。本文公开的载体包含编码本公开内容的saRNA的DNA的片段。

[0142] 含有saRNA的细胞

[0143] 在接触细胞后,本文公开的saRNA能有效地活化或上调UTRN基因在细胞中的表达,例如使表达上调至少10%(例如,与UTRN基因的基线表达相比)。

[0144] 在某些实施方式中,本公开涉及包含本文公开的saRNA的细胞。在一些实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中,所述细胞是人细胞,例如人恶性胚胎横

纹肌细胞(例如, RD细胞)。本文公开的细胞可以是体外的, 或离体的, 例如细胞系或细胞株, 或者可以存在于哺乳动物体内, 例如人体内。本文公开的人体是患有由UTRN基因突变、抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平低和/或肌肉中功能性抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平不足引起的疾病或症状的对象。在一些实施方式中, 细胞来自患有DMD的对象。

[0145] 含有saRNA的组合物

[0146] 在某些实施方式中, 本公开内容涉及包含本公开内容的saRNA或核酸的组合物或药物组合物。在一些实施方式中, 组合物包含至少一种药学上可接受的运载体。在一些实施方式中, 组合物包含至少一种药学上可接受的运载体, 其选自水性运载体、脂质体或LNP、聚合物、胶束、胶体、金属纳米颗粒、非金属纳米颗粒、生物偶联物(例如GalNAc)、多肽、抗体及其任何组合。在一个实施方式中, 水性运载体可以是例如无RNA酶水或无RNA酶缓冲液。在一些实施方式中, 组合物可含有0.001-200nM(例如, 0.01-100nM, 0.1-50nM, 1-150nM, 1-200nM, 1-20nM, 0.001-1nM, 1-10nM, 10-100nM, 10-50nM, 20-50nM, 20-100nM)的本文所述的saRNA或分离的多核苷酸。在一些实施方式中, 所述组合物包含25nM的本文所述的saRNA或分离的多核苷酸。

[0147] 使用saRNA的方法

[0148] 本公开内容的另一方面涉及用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的saRNA。saRNA包括长度为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列。在一些实施方式中, 寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1200的等长区域具有至少75%, 或至少80%, 或至少85%, 或至少90%的同源性或互补性, 具体地, 所述saRNA使UTRN基因的表达活化/上调至少10%(例如, 与UTRN基因的基线水平相比, 活化/上调至少20%, 至少30%, 至少40%, 至少50%, 至少60%, 至少70%, 至少80%, 至少90%, 至少100%, 至少150%, 至少200%, 至少300%, 至少500%, 至少800%, 至少1000%, 至少2000%, 或至少5000%)。在一些实施方式中, 在(例如, 对细胞或对象)给予实施方式中公开的saRNA时, UTRN基因的表达被活化/上调至少1.1倍(例如, 与UTRN基因的基线表达相比, 活化/上调至少1.2倍, 至少1.5倍, 至少1.8倍, 至少2.0倍或至少2.2倍)。在一些实施方式中, saRNA使UTRN基因的表达活化或上调约2.2倍。在一些实施方式中, 通过以至少0.01nM(例如, 0.02nM, 0.05nM, 0.08nM, 0.1nM, 0.2nM, 0.3nM, 0.4nM, 0.5nM, 0.6nM, 0.8nM, 1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 75nM, 100nM, 150nM或200nM)的浓度向细胞给予实施方式中公开的saRNA, 来使UTRN基因的表达活化/上调。在一些实施方式中, 通过(例如, 向细胞或对象)给予实施方式中公开的saRNA来诱导UTRN基因编码蛋白(抗肌萎缩蛋白相关蛋白)的活化/上调, 所述UTRN基因编码蛋白(抗肌萎缩蛋白相关蛋白)的表达活化/上调至少1.1倍(例如, 至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍或至少8倍, 与抗肌萎缩蛋白相关蛋白的基线表达相比)。在一些实施方式中, saRNA使抗肌萎缩蛋白相关蛋白的表达活化或上调约8.0倍。在一些实施方式中, 通过以至少0.01nM(例如, 0.02nM, 0.05nM, 0.08nM, 0.1nM, 0.2nM, 0.3nM, 0.4nM, 0.5nM, 0.6nM, 0.8nM, 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 75nM, 100nM, 150nM或200nM)的浓度向细胞给予实施方式中公开的saRNA, 来使UTRN基因编码蛋白(抗肌萎缩蛋白相关蛋白)的诱导活化/上调。

[0149] 本公开内容的另一方面涉及一种用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的疾病或病症的方法, 包括: 给予所述个体有效量的本文公开的saRNA、编码所述saRNA的核酸或分离的多核苷酸, 或

包含所述saRNA的组合物。在某些实施方式中,本文公开的saRNA的有效量可以是0.01nM至50nM的浓度,例如,0.01nM,0.02nM,0.05nM,0.08nM,0.1nM,0.2nM,0.3nM,0.4nM,0.5nM,0.6nM,0.8nM,1nM,5nM,10nM,25nM,50nM,75nM,100nM,150nM或200nM。在一些实施方式中,疾病或病症是DMD。在一些实施方式中,个体是哺乳动物。在一些实施方式中,个体是人。

[0150] 在本文提供的任何实施方式中,所述saRNA,编码本公开内容的saRNA的核酸,或包含本公开内容的所述saRNA的组合物可被直接引入细胞,或者可在将编码saRNA的核苷酸序列引入细胞后在细胞内产生,所述细胞例如哺乳动物细胞,包括但不限于RD细胞或人细胞。这类细胞可以是离体的,例如细胞系等,或者可以存在于哺乳动物中,例如人。在一些实施方式中,人是患有抗肌萎缩蛋白缺乏症或DMD或BMD的对象或个体。在一些实施方式中,编码saRNA的核酸或分离的多核苷酸或包含本文所述的前述saRNA的组合物的各自的量足以治疗DMD或BMD。

[0151] 本公开内容的另一方面涉及利用本文所述的给予途径向个体给予有效量的saRNA或组合物。在一些实施方式中,给予途径选自以下一种或多种:肠胃外输注、口服给予、鼻内给予、吸入给予、阴道给予和直肠给予。在一些实施方式中,给予途径选自以下的一种或多种:鞘内、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内和皮下给予。

[0152] 剂量方案和给予途径

[0153] 本公开内容的多个方面涉及包含本公开内容的saRNA的药物组合物。在一些实施方式中,药物组合物包含本公开内容的saRNA和药学上可接受的运载体、治疗惰性载体、稀释剂或药学上可接受的赋形剂。本文公开的药物组合物待被开发成预防或治疗抗肌萎缩蛋白缺乏症或DMD或BMD的药物。

[0154] 本公开内容的多个方面还涉及使用本公开内容的saRNA制备此类组合物的方法。

[0155] 本公开内容的另一方面涉及本公开内容的saRNA用于制造本文公开的药物组合物的用途。

[0156] 本公开内容的另一方面涉及根据本文所述的任一实施方式的saRNA或分离的多核苷酸,或根据本文所述的任一实施方式的组合物,在制备用于预防或治疗个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或低功能性抗肌萎缩蛋白水平诱导的基因或蛋白质相关症状的药物中的用途。对于根据某些实施方式的用途,所述病症可包括抗肌萎缩蛋白突变相关疾病或病症,包括DMD。对于根据某些实施方式的用途,抗肌萎缩蛋白相关蛋白表达不足引起的症状为BMD或DMD。本文还涉及根据某些实施方式的用途,其中个体是哺乳动物,例如人类。

[0157] 可以给予的本公开内容的saRNA或组合物的剂量可以在宽范围内变化并且将适合各种情况下的个体需求。在某些实施方式中,在对象小于1周龄、小于1月龄、小于3月龄、小于6月龄、小于1岁、小于2岁、小于15岁或大于15岁时给予根据本公开的药物组合物的第一剂。

[0158] 所述saRNA的单剂量可以是范围为0.01mg/kg至1000mg/kg的单剂量,例如,约0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1,2,2.5,5,7.5,10,12.5,15,17.5,20,25,30,40,50,75,100,120,150,200,250,300,400,500,750或1000mg/kg。本文描述的剂量可含有两种或更多种本文所述的任何saRNA序列。

[0159] 在一些实施方式中,建议的剂量频率是近似的。例如,在某些实施方式中,如果建

议的剂量频率是第1天一剂和第29天第二剂,那么DMD患者可以在接受第一剂后的25、26、27、28、29、30、31、32、33或34天后接受第二剂。在某些实施方式中,如果建议的剂量频率是第1天一剂和第15天第二剂,那么DMD患者可以在接受第一剂后的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天后接受第二剂。在某些实施方式中,如果建议的剂量频率是第1天一剂和第85天第二剂,那么DMD患者可以在接受第一剂后的80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90天后接受第二剂。

[0160] 在某些实施方式中,注射的剂量和/或体积将根据对象的年龄、对象的体重和/或其它可能需要调整注射参数的因素进行调整。

[0161] 在某些实施方式中,药物组合物包含助溶剂体系。某些这样的助溶剂体系包括例如苯甲醇、非极性表面活性剂、水混溶性有机聚合物和水相。在一些实施方式中,这种助溶剂体系用于疏水性化合物。这种助溶剂体系的非限制性示例是VPD助溶剂体系,它是包含3%w/v苯甲醇、8%w/v非极性表面活性剂聚山梨醇酯80TM和65%w/v聚乙二醇300的无水乙醇的溶液。这种助溶剂体系的比例可以有很大差异,而不会显著改变其溶解度和毒性特性。此外,助溶剂组分的特性可以是可变的:例如,可以使用其它表面活性剂代替聚山梨酯80TM;聚乙二醇的馏分大小可以变化;其它生物相容性聚合物可以代替聚乙二醇,例如聚乙烯吡咯烷酮;并且其它糖或多糖可以代替右旋糖。

[0162] 与本文所述的saRNA、组合物、药物组合物和方法相关联的其它组合物或组分(组件)的示例包括但不限于:稀释剂、盐、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、干燥剂、抗菌剂、针头、注射器、包装材料、管、瓶、培养瓶、杯等,例如,用于使用、调整、组装、储存、包装、制备、混合、稀释和/或保存供特定用途所用的组分。在其中使用任何所述组分的液体形式的实施方式中,该液体形式可以是浓缩的或即用式的。

[0163] 在一些实施方式中,用于核酸治疗的脂质部分可应用于本公开内容中以用于递送本文公开的saRNA分子。在这样的方法中,核酸(例如,本文描述的一种或多种saRNA)被引入到由阳离子脂质和中性脂质的混合物制成的预制脂质体或脂质复合物中。在某些方法中,与单阳离子或多阳离子脂质的saRNA复合物在没有中性脂质存在的情况下形成。在一些实施方式中,脂质部分经选择以增加药剂对特定细胞或组织的分布。在一些实施方式中,脂质部分经选择以增加药剂在脂肪组织中的分布。在一些实施方式中,脂质部分经选择以增加药剂在肌肉组织中的分布。

[0164] 在一些实施方式中,药物组合物包括递送系统。递送系统的示例包括但不限于脂质体和乳液。某些递送系统可用于制备某些药物组合物,包括含有疏水性化合物的那些。在某些实施方式中,使用某些有机溶剂,例如二甲基亚砜。

[0165] 在一些实施方式中,药物组合物包含一种或多种组织特异性递送分子,其经设计以将本公开内容的一种或多种药剂递送至特定的组织或细胞类型。例如,在某些实施方式中,药物组合物包含被覆有组织特异性抗体的脂质体。

[0166] 在一些实施方式中,saRNA可通过载体递送或给予。可以使用可用于基因递送的任何载体。在一些实施方式中,可以使用病毒载体。可用于本公开内容的病毒载体的非限制性示例包括但不限于人类免疫缺陷病毒;HSV,单纯疱疹病毒;MMSV,莫洛尼鼠肉瘤病毒;MSCV,鼠干细胞病毒;SFV,塞姆利基森林病毒;SIN,辛德比斯病毒;VEE,委内瑞拉马脑炎病毒;VSV,水疱性口炎病毒;VV,牛痘病毒;AAV,腺相关病毒;腺病毒;慢病毒;和逆转录病毒。

[0167] 在一些实施方式中,载体是重组AAV载体(rAAV)。AAV载体是相对较小的DNA病毒,其可以稳定和位点特异性的方式整合至它们感染的细胞的基因组中。它们能够感染广泛的细胞,而不会对细胞生长、形态或分化产生任何影响,并且它们似乎不参与人类病理学。AAV基因组已被克隆,测序和表征。它包含约4700个碱基,并在每端包含约145个碱基的倒置末端重复(ITR)区域,其作为病毒复制的起点。基因组的其余部分分为携带衣壳功能的两个基本区域:基因组的左侧部分,其包含参与病毒复制和病毒基因表达的rep基因;以及基因组的右侧部分,其包含编码病毒衣壳蛋白的cap基因。

[0168] AAV载体可使用本领域的标准方法制备。任何血清型的腺相关病毒都是合适的(参见例如,Blacklow,“细小病毒和人类疾病”(“Parvoviruses and Human Disease”)第165-174页,J.R.Pattison编.(1988);Rose,Comprehensive Virology3:1,1974;P.Tattersall,“细小病毒分类学的进化”(“The Evolution of Parvovirus Taxonomy”)刊于“细小病毒”(“Parvoviruses”)(J R Kerr,S F Cotmore.M E Bloom,R M Linden,C R Parrish编)第5-14页,Hudder Arnold,英国伦敦(2006);和D E Bowles,J E Rabinowitz,R J Samulski“依赖性细小病毒属”(“The Genus Dependovirus”)(J R Kerr,S F Cotmore.M E Bloom,R M Linden,C R Parrish编)第15-23页,Hudder Arnold,英国伦敦(2006),其公开内容通过引用其全文方式纳入本文)。载体纯化方法可见于,例如美国专利号6,566,118、6,989,264和6,995,006以及WO/1999/011764题为“生成重组AAV载体的高滴度无辅助制备方法(Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors)”,其公开内容以引用其全文方式纳入本文。杂合载体的制备在例如PCT申请号PCT/US2005/027091中进行了描述,其公开内容通过引用其全文方式纳入本文。衍生自AAV的载体在体外和体内转移基因的用途已经描述(参见例如,国际专利申请公开号91/18088和WO 93/09239;美国专利号4,797,368,6,596,535和5,139,941;以及欧洲专利号0488528,其均通过引用其全文方式纳入本文)。这些公开文本描述了其中rep和/或cap基因被去除并被目的基因替换的各种AAV衍生的构建体,以及这些构建体在体外(进入培养细胞)或体内(直接进入生物体)转移目的基因的用途。根据公开内容,复制缺陷重组AAV(rAAV)可通过将含有目的核酸序列的质粒(两侧是两个AAV倒置末端重复序列(ITR)区域)和携带AAV封装基因(rep和cap基因)的质粒共同转染到感染了人类辅助病毒(例如腺病毒)的细胞系中来制备。然后,通过标准技术纯化产生的AAV重组体。

[0169] 在一些实施方式中,用于本公开方法的载体被封装到病毒颗粒中(例如,AAV病毒颗粒,包括但不限于AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAV12,AAV13,AAV14,AAV15和AAV16)。因此,公开内容可包括包含本文描述的任何载体的重组病毒颗粒(重组,因为它含有重组多核苷酸)。生产这种颗粒的方法在本领域是已知的,并且在美国专利号6,596,535中描述。

[0170] 本公开内容的制剂、药物组合物或药物以符合良好医疗实践的方式配制、给药和给予。就此而言的考量因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体对象的临床状况、病因、试剂递送部位、给药方法、给药安排,以及医务人员所知的其它因素。

[0171] 对于本公开内容的制剂、药物组合物或药物,所述递送可任选地通过肠胃外输注,包括鞘内、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内或皮下给予;或通过口服给予、鼻内给予、吸入给予、阴道给予或直肠给予来进行。

[0172] 在本公开内容中,寡核苷酸调节剂的典型制剂通过混合本公开内容的saRNA和运载体或赋形剂来制备。合适的运载体和赋形剂为本领域技术人员所周知并且详述于例如 Ansel H.C.等,《安塞尔药物剂型和药物输送系统(2004)》((Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(2004))LWW出版社(Lippincott,Williams&Wilkins),费城;Gennaro A.R.等,《雷明顿:科学与药学实践(2000)》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy(2000))LWW出版社,费城;和Rowe R.C,《药学赋形剂手册(2005)》(Handbook of Pharmaceutical Excipients(2005))医药出版社(Pharmaceutical Press),芝加哥中。制剂还可以包括一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、芳香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂,以提供药物(即,本公开内容的saRNA或其药物组合物)的精良呈递或有助于药物产品(即,药剂)的制造。

[0173] 诊断方法

[0174] 本公开内容的另一方面涉及用于检测细胞中抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)的方法。在某些实施方式中,该方法包括在转染有本公开内容中公开于本文的saRNA、分离的多核苷酸或含有所述saRNA的组合物的细胞中检测抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)。在一些实施方式中,本文公开的方法可用于检测患有个体中由抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或低功能性抗肌萎缩蛋白水平引起的疾病或病症的对象的特定亚组。作为本文公开的方法的替代性实施方式,所述方法可用于由本公开内容的所述saRNA、编码所述saRNA的核酸或分离的多核苷酸、组合物或药物治疗的前述对象的功效或安全性监测。

[0175] 在某些实施方式中,基线测量值获自生物样品,如本文定义,获自给予本文所述疗法之前的个体。在一些实施方式中,抗肌萎缩蛋白或DMD基因的基线表达是在给予本文所述的saRNA之前从生物样品中获得的抗肌萎缩蛋白或DMD基因的表达。在一些实施方式中,抗肌萎缩蛋白相关蛋白或UTRN基因的基线表达是在给予本文所述的saRNA之前从生物样品中获得的抗肌萎缩蛋白相关蛋白或UTRN基因的表达。在某些实施方式中,生物样品是外周血细胞、血浆、肌肉细胞、血清、皮肤组织、脑脊液(CSF)。

[0176] 在一些实施方式中,本文提供的saRNA使细胞中功能性抗肌萎缩蛋白相关蛋白的量(与上述基线测量相比)活化至少10%(例如,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少100%,至少150%、至少200%、至少300%、至少500%、至少800%、至少1000%、至少2000%或至少5000%)。

[0177] 在一些实施方式中,saRNA在治疗,预防,延缓由抗肌萎缩蛋白基因突变引起的疾病的进展和/或改善方面显示出大于加和效应或协同效应。在一些实施方式中,saRNA在保护与疾病病理生理学有关的细胞方面显示出大于加和效应或协同效应,特别就治疗,预防,延缓进展和/或改善DDD(例如DMD或BMD)方面而言。

[0178] 本公开内容的另一方面涉及一种在细胞中活化/上调UTRN基因表达的方法,包括:给予本文公开的实施方式的saRNA,或分离的多核苷酸,或组合物。在一些实施方式中,saRNA或分离的多核苷酸或组合物被直接引入细胞。一些实施方式中,本文公开的实施方式的saRNA在将编码saRNA的核苷酸序列引入细胞后于细胞中产生。在一些实施方式中,本文

公开的细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0179] 本公开内容的另一方面涉及一种用于增加细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平或对对象肌肉中功能性抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平的方法,包括将有效量的本文公开的实施方式的saRNA、编码saRNA的核酸或多核苷酸或组合物引入细胞或对象中。

[0180] 试剂盒

[0181] 本公开内容的另一方面涉及一种用于进行使细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平增加或使肌肉中功能性抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平升高的方法的试剂盒,其包含本文公开的saRNA。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含用于向个体给予所述saRNA的器具。在一些实施方式中,试剂盒装在带标签的包装件中,并且所述包装件上的标签表明saRNA或组合物可用于预防或治疗由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足,抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的疾病或病症,或针对DDD,例如DMD或BMD。

[0182] 本文中使用的“试剂盒”通常定义包括本公开内容实施方式的一种或多种组分(组件)和/或与本公开内容相关联的(例如,先前所述的)其它组分(组件)的包装件、组装件或容器(例如隔热容器)。试剂盒的任何试剂或组分可以以液体形式(例如,溶液)或固体形式(例如,干燥的粉末、冷冻剂等)提供。

[0183] 在其它实现方式中,试剂盒可包括由网站或任何形式的其它来源提供的用于使用试剂盒以及本文所述的组分和/或方法的指令或说明书。例如,说明书可包括有关使用、修改、混合、稀释、保存、组装、储存、包装和/或制备与试剂盒相关的组分和/或其它组分的说明。在某些情况下,说明书还可包括用于递送组分的说明,例如,用于在室温、零下温度、低温等进行运输或储存。说明书可以对试剂盒用户有用的任何形式提供,例如书面或口头(例如电话形式)、数字、光学、视觉(例如录像带、DVD等)和/或电子通信(包括互联网或网络类通信),以任何方式提供。

[0184] 本公开内容的另一方面涉及用于检测细胞中抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)的试剂盒。在一些实施方式中,所述试剂盒用于检测用本文公开的任何一种或多种saRNA,或分离的多核苷酸,或组合物转染的细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)。本文还提供了用于增加细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的试剂盒。

[0185] 具体实施方式

[0186] 本公开内容提供了以下具体的实施方式:

[0187] 实施方式1是一种小活化RNA(saRNA),其包含长度范围为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列,其中所述寡核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1200的等长部分具有至少75%、至少80%、至少85%或至少90%同源性或互补性的连续核苷酸序列,其中所述saRNA使UTRN基因的表达相比UTRN基因的基线表达上调至少10%。

[0188] 实施方式2是实施方式1的saRNA,其中,SEQ ID NO:1200的等长部分位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。

[0189] 实施方式3是实施方式1-2中任一项所述的saRNA,其中,所述saRNA(1)具有35%至70%的GC含量;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

[0190] 实施方式4是实施方式1-3中任一项所述的saRNA,其中,所述saRNA包括正义链和反义链。

[0191] 实施方式5是实施方式1-4中任一项所述的saRNA,其中,所述寡核苷酸序列是所述saRNA的正义链或反义链。

[0192] 实施方式6是实施方式1-5中任一项所述的saRNA,其中所述正义链和反义链各自包含互补区域,其中正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。

[0193] 实施方式7是实施方式4-6中任一项所述的saRNA,其中,所述正义链和反义链具有至少90%的互补性。

[0194] 实施方式8是实施方式4的saRNA,其中,所述正义链和反义链位于两条不同的核酸链上。

[0195] 实施方式9是实施方式4的saRNA,其中,所述正义链和反义链位于连续的核酸链上,任选地为发夹式单链核酸分子,其中所述正义链和反义链的互补区域形成双链核酸结构。

[0196] 实施方式10是实施方式4的saRNA,其中,所述正义链和反义链至少之一包括长度为0至6个核苷酸的3'突出端。

[0197] 实施方式11是实施方式10的saRNA,其中,所述正义链和反义链包含长度为2至3个核苷酸的3'突出端。

[0198] 实施方式12是实施方式10的saRNA,其中,所述突出端的核苷酸中至少一个是选自或互补于UTRN基因上的相应核苷酸的核苷酸。

[0199] 实施方式13是实施方式4-12中任一项所述的saRNA,其中,所述正义链和反义链独立地包含约16至约35、约17至约30、约18至约25、或约19至约22个连续核苷酸的长度。

[0200] 实施方式14是实施方式4-12中任一项所述的saRNA,其中,所述正义链与选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性,并且所述反义链与选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。

[0201] 实施方式15是实施方式14的saRNA,其中,所述正义链包含选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列,而所述反义链包含选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列。

[0202] 实施方式16是实施方式1的saRNA,其中,所述寡核苷酸序列与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性或互补性。

[0203] 实施方式17是实施方式4的saRNA,其中,所述正义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列同源性。

[0204] 实施方式18是实施方式4的saRNA,其中,所述反义链与选自SEQ ID NO:1-398的核苷酸序列具有至少75%的序列互补性。

[0205] 实施方式19是实施方式1-18中任一项所述的saRNA,其中,所述saRNA的至少一个核苷酸是经化学修饰的核苷酸。

[0206] 实施方式20是实施方式19的saRNA,其中,所述saRNA的反义链和/或正义链的至少一个核苷酸经化学修饰。

[0207] 实施方式21是实施方式19的saRNA,其中,经化学修饰的核苷酸是具有以下至少一种修饰的核苷酸:

[0208] d) 对于连接saRNA核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰;

[0209] e) 对于saRNA的核苷酸序列中核糖的2'-OH的修饰;和

[0210] f) 对于saRNA的核苷酸序列中的碱基的修饰。

[0211] 实施方式22是实施方式19的saRNA,其中,所述saRNA的至少一个核苷酸是锁核酸、无碱基核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉基核苷酸、亚磷酰胺或包含非天然碱基的核苷酸。

[0212] 实施方式23是实施方式19的saRNA,其中,至少一个经化学修饰的核苷酸的化学修饰是在正义链或反义链的5'端添加(E)-乙烯基磷酸酯部分。

[0213] 实施方式24是实施方式1-23中任一项所述的saRNA,其中,saRNA的正义链或反义链与选自脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体的一种或多种偶联部分偶联。

[0214] 实施方式25是实施方式24的saRNA,其中,所述saRNA的正义链或反义链与选自细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺及其任意组合的一种或多种偶联部分偶联。

[0215] 实施方式26是一种寡核苷酸调节剂,其包含根据实施方式1-25中任一项所述的一种或多种saRNA。

[0216] 实施方式27是实施方式26的寡核苷酸调节剂,其还包含与所述saRNA偶联、组合或键合的一个或多个部分或组分。

[0217] 实施方式28是实施方式27的寡核苷酸调节剂,其中,所述saRNA的正义链和/或反义链与选自下组的一种或多种偶联部分偶联:脂质、脂肪酸、荧光团、配体、糖、肽和抗体。

[0218] 实施方式29是实施方式27的寡核苷酸调节剂,其中,所述偶联部分各自独立地选自脂质、细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖、N-乙酰半乳糖胺及其任何组合。

[0219] 实施方式30是实施方式26的寡核苷酸调节剂,其中,所述寡核苷酸调节剂还包含与一个或多个其它活性部分偶联或结合的saRNA,以用于UTRN相关疾病或病症治疗,其中所述一个或多个其它活性部分各自独立地选自saRNA、单链寡核苷酸、化学部分、多肽和抗体。

[0220] 实施方式31是分离的多核苷酸,其中,所述分离的多核苷酸包括实施方式1的连续核苷酸序列。

[0221] 实施方式32是实施方式31的分离的多核苷酸,其中,所述分离的多核苷酸是选自SEQ ID NO:1-398的核酸序列。

[0222] 实施方式33是一种分离的寡核苷酸复合物,其包含实施方式1-25中任一项所述的saRNA的反义链和实施方式31-32中任一项所述的分离的多核苷酸。

[0223] 实施方式34是实施方式33的分离的寡核苷酸复合物,其中,所述分离的寡核苷酸复合物使UTRN基因的表达相对于UTRN基因的基线表达活化至少10%。

[0224] 实施方式35是一种分离的核酸序列,其位于UTRN基因转录起始位点上游,其中所述分离的核酸序列选自SEQ ID NO:1207-1210。

[0225] 实施方式36是实施方式35的分离的核酸序列,其中,所述分离的核酸序列包含实施方式31-32中任一项所述的分离的多核苷酸。

[0226] 实施方式37是实施方式35的分离的核酸序列,其中,靶向分离的核酸序列的设计的saRNA中至少25%能使UTRN基因的表达活化至少10%,其中所述设计的saRNA (1) 具有35%至70%的GC含量;(2) 具有少于5个连续相同核苷酸;(3) 具有3个或更少的二核苷酸重

复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。

[0227] 实施方式38是一种分离的核酸复合物,其包含实施方式1-25中任一项所述的saRNA的反义链和实施方式35-37中任一项所述的分离的核酸序列的正义链。

[0228] 实施方式39是实施方式38的分离的核酸复合物,其中,所述分离的核酸复合物使UTRN基因的表达相对于UTRN基因的基线表达活化至少10%。

[0229] 实施方式40是一种分离的多核苷酸,其编码实施方式1-25中任一项所述的saRNA。

[0230] 实施方式41是实施方式40的分离的多核苷酸,其中,所述分离的多核苷酸是DNA。

[0231] 实施方式42是包含实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸的载体。

[0232] 实施方式43是一种宿主细胞,其包含实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸,或实施方式42的载体。

[0233] 实施方式44是一种组合物,其包含实施方式1-25中任一项所述的saRNA,或实施方式40或实施方式41的分离的多核苷酸,以及任选地,药学上可接受的运载体。

[0234] 实施方式45是实施方式44的组合物,其中,所述药学上可接受的运载体选自下组:水性运载体、脂质体、高分子聚合物、多肽和抗体。

[0235] 实施方式46是实施方式44或45的组合物,其中,所述组合物包含0.001-200nM的saRNA。

[0236] 实施方式47是实施方式46的组合物,其中,所述组合物包含1-200nM的saRNA。

[0237] 实施方式48是一种saRNA,其包含长度范围为16至35个连续核苷酸的寡核苷酸序列,用于活化/上调细胞中UTRN基因的表达,其中所述寡核苷酸序列与SEQ ID NO:1200的等长部分具有至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%的序列同源性或互补性,其中所述saRNA使UTRN基因的表达与其基线表达相比活化至少10%。

[0238] 实施方式49是实施方式48的saRNA,其中,SEQ ID NO:1200的等长区域位于UTRN基因转录起始位点上游的区域-636至-496(SEQ ID NO:1207)、区域-351至-294(SEQ ID NO:1208)、区域-236至-187(SEQ ID NO:1209)或区域-101至-65(SEQ ID NO:1210)。

[0239] 实施方式50是实施方式49的saRNA,其中所述saRNA包含正义链和反义链,其中所述正义链包含选自SEQ ID NO:400-797的核苷酸序列,而所述反义链包含选自SEQ ID NO:800-1197的核苷酸序列。

[0240] 实施方式51是一种用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品,其中所述产品使UTRN基因的表达与所述UTRN基因的基线表达相比活化至少10%,并且其中所述产品包含活性物质,所述活性物质选自以下的一种或多种:实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42所述的载体,或实施方式44-47中任一项所述的组合物。

[0241] 实施方式52是用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品,其中所述活性物质被直接引入细胞;和/或

[0242] 其中所述细胞是体外、离体或体内细胞;和/或

[0243] 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0244] 实施方式53是实施方式52的产品,其中所述活性物质通过以下方式直接引入细胞:

[0245] 1) 使所述活性物质与生理学上可接受的或药学上可接受的运载体组合,所述生理

学上可接受的或药学上可接受的运载体例如选自下组中的一种或多种：水性运载体、脂质体、高分子聚合物、多肽和抗体，和/或

[0246] 2) 将所述活性物质偶联至一个或多个偶联部分，所述一个或多个偶联部分例如选自以下的一种或多种：脂质、细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺，及其任何组合（例如两个偶联部分，其中一个是脂质，另一个是N-乙酰半乳糖胺）。

[0247] 实施方式54是实施方式53的产品，其中，所述偶联部分各自独立地衍生自荧光团、配体、糖类、肽和抗体。

[0248] 实施方式55是用于活化/上调细胞中UTRN基因表达的产品，其中，所述细胞来自患有由UTRN蛋白表达不足、UTRN基因突变和/或功能性UTRN低水平引起的疾病或病症或有患上此疾病或病症的风险的患者，其中所述活性物质以足以预防或治疗所述疾病或病症，例如，杜氏肌营养不良症（DMD）或贝克尔肌营养不良症（BMD）的量给予。

[0249] 实施方式56是一种预防或治疗由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的疾病或病症的方法，其包括：给予所述个体有效量的实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42所述的载体，或实施方式44-46中任一项所述的组合物。

[0250] 实施方式57是实施方式56的方法，其中，所述疾病或病症是抗肌萎缩蛋白缺乏症（DDD）。

[0251] 实施方式58是实施方式56的方法，其中，所述疾病或病症是杜氏肌营养不良症（DMD）或贝克尔肌营养不良症（BMD）。

[0252] 实施方式59是实施方式56的方法，其中，所述个体是哺乳动物，任选地其中所述个体是人。

[0253] 实施方式60是实施方式56的方法，其中，所述个体具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平引起的症状。

[0254] 实施方式61是实施方式56的方法，其中，向个体给予实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物，所述给予通过选自以下的一种或多种给予途径进行：肠胃外输注，经口给予，鼻内给予，吸入给予，阴道给予和直肠给予。

[0255] 实施方式62是实施方式61的方法，其中，给予途径选自以下的一种或多种：鞘内、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、膀胱内、脑室内、玻璃体内和皮下给予。

[0256] 实施方式63是实施方式56的方法，其中，所述方法使UTRN基因mRNA在个体中的表达相比UTRN基因的基线表达活化/上调至少10%。

[0257] 实施方式64是实施方式56的方法，其中，所述方法使个体中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平与UTRN基因的基线表达相比增加至少10%。

[0258] 实施方式65是一种用于检测实施方式43的宿主细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质（例如肌萎缩聚糖）的方法。

[0259] 实施方式66是用于进行实施方式56的方法的试剂盒，其包含a) 实施方式1-25中任一项所述的saRNA。

[0260] 实施方式67是实施方式66的试剂盒，其中，所述试剂盒包含：b) 使用说明，和c) 任

选地,用于向个体给予实施方式1-25中任一项所述的saRNA的器具。

[0261] 实施方式68是一种试剂盒,其在带标签的包装件中包含实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物,并且所述包装件上的标签指示所述saRNA、所述分离的多核苷酸、所述载体或所述组合物能用于预防或治疗由抗肌萎缩蛋白表达不足诱导的疾病或病症,或针对杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

[0262] 实施方式69是一种用于检测实施方式43的宿主细胞中的抗肌萎缩蛋白、抗肌萎缩蛋白相关蛋白或抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质(例如肌萎缩聚糖)的试剂盒。

[0263] 实施方式70是实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物在制备用于预防或治疗由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的疾病或病症的药物中的用途。

[0264] 实施方式71是实施方式70的用途,其中,所述疾病或病症是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

[0265] 实施方式72是实施方式70的用途,其中,所述个体是哺乳动物,任选地其中所述哺乳动物是人。

[0266] 实施方式73是实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物在制备用于活化/上调细胞中UTRN基因的表达的制剂中的用途。

[0267] 实施方式74是实施方式73的用途,其中,实施方式1-25中任一项所述的saRNA,或实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物被直接引入细胞中。

[0268] 实施方式75是实施方式74的用途,其中,所述saRNA在将编码所述saRNA的核苷酸序列引入所述细胞之后在所述细胞中产生。

[0269] 实施方式76是实施方式73-75中任一项所述的用途,其中,所述细胞是哺乳动物细胞,任选地其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

[0270] 实施方式77是实施方式76的用途,其中,所述细胞在人体中。

[0271] 实施方式78是实施方式77的用途,其中,所述人体是具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的症状的对象,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物以足以治疗所述症状的量给予。

[0272] 实施方式79是实施方式78的用途,其中由抗肌萎缩蛋白表达不足诱导的症状是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

[0273] 实施方式80是一种用于活化/上调UTRN基因在细胞中的表达的方法,其包括:向所述细胞给予有效量的实施方式1-25中任一项所述的saRNA,实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸,实施方式42的载体,或实施方式44-47中任一项所述的组合物。

[0274] 实施方式81是实施方式80的方法,其中,实施方式1-25中任一项所述的saRNA,或实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物被直接引入细胞中。

[0275] 实施方式81是实施方式80的方法,其中所述方法用于向细胞中直接引入,所述方

法包括:

[0276] 1) 将实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物中的saRNA与选自下组的药学上可接受的运载体组合:水性运载体、脂质体、高分子聚合物,多肽和抗体,和

[0277] 2) 使实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41中任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物中的saRNA偶联至选自以下的一种或多种偶联部分:细胞穿透肽、聚乙二醇、生物碱、色胺、苯并咪唑、喹诺酮、氨基酸、胆固醇、葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺。

[0278] 实施方式83是实施方式80-82中任一项所述的方法,其中,所述细胞是哺乳动物细胞,例如来自人体的细胞。

[0279] 实施方式84是实施方式83的方法,其中,所述人体是具有由个体中抗肌萎缩蛋白表达不足、抗肌萎缩蛋白基因突变和/或功能性抗肌萎缩蛋白低水平诱导的症状的对象,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物以足以治疗所述症状的量给予。

[0280] 实施方式85是实施方式84的方法,其中由抗肌萎缩蛋白表达不足造成的症状是杜氏肌营养不良症(DMD)或贝克尔肌营养不良症(BMD)。

[0281] 实施方式86是用于提高细胞中抗肌萎缩蛋白相关蛋白的水平的方法,其包括向所述细胞引入有效量的实施方式1-25中任一项所述的saRNA、实施方式40-41任一项所述的分离的多核苷酸、实施方式42的载体或实施方式44-47中任一项所述的组合物中的saRNA,其中所述saRNA、分离的多核苷酸或组合物使UTRN基因的表达相比UTRN基因的基线表达活化至少10%。

[0282] 实施例

[0283] 下文将参照具体实施例和附图进一步说明本公开内容。应理解,这些实施例仅仅是为了说明本公开内容而不是限制本公开内容的范围。在下文实施例中,在非特定条件下进行的研究方法一般按常规条件进行,例如Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:Laboratory Manual)(纽约:冷泉港实验室出版社,1989)中描述的条件,或由制造商建议的条件。

[0284] 材料和方法

[0285] dsRNA合成

[0286] 本公开内容提供一种用于制备寡核苷酸调节剂(dsRNA)的方法,其包括序列设计和合成。

[0287] dsRNA可以化学合成,也可以从专门从事核酸合成的生物技术公司获得。一般而言,核酸的化学合成包括以下四个步骤:a)合成寡聚核糖核苷酸;b)去保护;c)纯化和分离;d)脱盐和退火。例如,所述的化学合成dsRNA的具体步骤如下:

[0288] a) 寡聚核糖核苷酸的合成

[0289] 1 μ M RNA的合成设置于自动DNA/RNA合成器(例如,Applied Biosystems EXPEDITE8909)中,并且各循环的耦合时间(coupling time)设置为10至15分钟。采用固相键合的5'-O-对二甲氧基三苯基甲基胸苷基材为引发剂,在第一循环中将一个碱基键合至固相基材,然后在第n($19 \geq n \geq 2$)循环中,将一个碱基键合至第n-1循环键合的碱基。重复此过程,直到整个核酸序列的合成完成。

[0290] b) 去保护

[0291] 将与dsRNA键合的固相基材放入试管,并向试管中添加1mL乙醇和氢氧化铵混合物(体积比:1:3)的溶液。然后将试管密封并置于培养箱中,并将混合物在25-70℃孵育2至30小时。过滤含有与dsRNA键合的固相基材的溶液,并收集滤液。固相基材用双蒸水冲洗两次(每次1mL),收集滤液。将收集的洗脱液合并并在真空下干燥1至12小时。然后向溶液添加1mL四丁基氟化铵在四氢呋喃中的溶液(1M),在室温静置4至12小时,然后添加2mL正丁醇。收集沉淀,经高速离心得到dsRNA单链粗产物。

[0292] c) 纯化和分离

[0293] 将所得dsRNA粗产物溶于2mL的浓度为1mol/mL的乙酸铵水性溶液中,用高压液相色谱反相C18柱分离溶液,得到纯化的dsRNA单链产物。

[0294] d) 脱盐和退火

[0295] 通过凝胶过滤(尺寸排阻色谱)除盐。将单一正义寡聚核糖核酸链和单一反义寡聚核糖核酸链以1:1的摩尔比混合进入1至2mL缓冲液(10mM Tris,pH=7.5-8.0,50mM NaCl)。将溶液加热至95℃,然后缓慢冷却至室温,以得到含有dsRNA的溶液。

[0296] 细胞培养和处理

[0297] 人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(RD)(TCHu 45,中国科学院分子细胞科学卓越中心)在37℃、5% CO₂条件下于补充有10%小牛血清(Sigma-Aldrich)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的改良DMEM培养基(Gibco,Thermo Fisher Scientific,加利福尼亚州卡尔斯巴德)中培养。RD细胞以4000个细胞/孔接种到96孔板中。按照反向转染方案,将saRNA以25nM或任何其他浓度与0.3μL RNAiMAX(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德)分别转染到各孔中的RD细胞中,转染持续时间为3或5天。模拟在没有寡核苷酸的情况下转染(空白对照)。dsCon2(SEQ ID NO:799和1199)作为非特异性双链体对照转染。DS18-si8(SEQ ID NO:399、798和1198)是靶向UTRN基因的双链体siRNA,且作为沉默dsRNA对照转染。

[0298] RNA分离和逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

[0299] (1) RNA分离和一步法RT-qPCR

[0300] 在转染结束时,弃培养基,每孔用150μL PBS洗涤细胞一次。弃PBS后,将100μL细胞裂解缓冲液(Power SYBR® Green Cells-to-Ct™试剂盒,Life Technologies)添加至各孔中,并室温孵育5分钟。从各孔取出0.5μL细胞裂解液,并使用One Step TB Green® PrimeScrip™ RT-PCR试剂盒II(Takara,RR086A,日本志贺)于Roche Lightcycler 480实时PCR仪中通过RT-qPCR分析。PCR反应使用Bravo自动液体处理平台(Agilent,美国)制备。各转染样品在3个重复孔中扩增。PCR反应条件如表2所示。

[0301] 表2. PCR反应

	试剂	体积(μ L)
[0302]	2 $\times$ One Step TB Green RT-PCR 缓冲液 4	2.5
	PrimeScript TM 1 步酶混物 2	0.2
	正向和反向引物混合物(5 μ M)	0.4
	dH ₂ O 无 RNA 酶	1.6
	粗裂解物(RNA)	0.4
总体积		5.1

[0303] 反应条件如下:逆转录反应(第1阶段):42℃持续5分钟,95℃持续10秒;PCR反应(第2阶段):95℃持续5秒,59℃持续20秒,72℃持续10秒;40个扩增循环;和,解链曲线(第3阶段)。人UTRN基因作为靶基因扩增。TBP和B2M的mRNA水平的几何平均值用作RNA加载的内参。引物序列列于表3。

[0304] 表3.用于RT-qPCR试验的引物序列

	引物	基因	SEQ ID NO	序列(5'-3')	产物大小(bp)
[0305]	UTRN F	人 <i>UTRN</i>	1201	GCCGTGGCAAAGATCCATTT	126
	UTRN R		1202	ACATTATTCAGGTCAGCAAGGG	
	TBP F	人 <i>TBP</i>	1203	TGCTCACCCACCAACAATTAG	139
	TBP R		1204	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG	
	B2M F	人 <i>B2M</i>	1205	GATAGTTAAGTGGGATCGAGACAT	95
	B2M R		1206	AGCAAGCAAGCAGAATTTGGA	
	HPRT1 F	人 <i>HPRT1</i>	1211	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG	120
	HPRT1 R		1212	TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC	

[0306] (2)RNA分离和两步RT-qPCR

[0307] 为了量化细胞中的mRNA表达,总细胞RNA采用RNeasy Plus Mini试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)根据其使用手册从处理的细胞分离所得RNA(约1 μ g)使用带gDNA Eraser的PrimeScriptTM RT试剂盒(Takara, RR047A, 日本志贺)逆转录为cDNA。所得cDNA在Roche LightCycler 480多孔板384 (Roche, ref:4729749001, 美国)中使用TBGreen®Premix Ex TaqTMII (Takara, RR820A, 日本志贺)试剂和引物(其特异性扩增感兴趣的靶基因)扩增。反应条件如下:逆转录反应(第1阶段):42℃持续5分钟,95℃持续10秒;PCR反应(第2阶段):95℃持续5秒,60℃持续30秒,72℃持续10秒;40个扩增循环;和,解链曲线(第3阶段)。引物序列列于表3。PCR反应条件如表4和表5所示。

[0308] 表4:RT反应

[0309]	反应-1 (Takara, RR047A)	体积(μL)
	5 × gDNA Eraser 缓冲液	2
	gDNA Eraser	1
	总 RNA (1 μg) + 无 RNA 酶 dH ₂ O	7
	总体积	10
	42°C 5 分钟, 储存于 4°C	
	反应-2 (Takara, RR047A)	体积(μL)
	5 × PrimeScript 缓冲液 2	4
	PrimeScript RT 酶混合物 I	1
	RT PrimeMix	1
[0310]	无 RNA 酶 dH ₂ O	4
	反应-1	10
	总体积	20
	37°C 15 分钟, 85°C 5 秒, 储存于 4°C	
	表5:RT-qPCR反应	

[0311]	试剂(Takara, RR820A)	体积(μL)
	SYBR Premix Ex Taq II (2 ×)	5
	PCR 引物(正向+反向) 5 μM	1
	cDNA (RT 产物)	4
	总计	10

[0312] 为计算saRNA转染样品中UTRN基因相对于对照处理 (Mock) 的相对表达水平 (E_{rel}), 将靶基因和两个内参基因的Ct值代入式I,

$$[0313] \quad E_{rel} = 2^{(CtT_m - CtT_s)} / ((2^{(CtR1_m - CtR1_s)} * 2^{(CtR2_m - CtR2_s)})^{(1/2)}) \quad (\text{式I})$$

[0314] 其中CtT_m是模拟处理样品中靶基因的Ct值;CtT_s是来自saRNA处理样品的靶基因的Ct值;CtR1_m是模拟处理样品中内参基因1的Ct值;CtR1_s是来自saRNA处理样品的内参基因1的Ct值;CtR2_m是来自模拟处理样品的内参基因2的Ct值;而CtR2_s是来自saRNA处理样品的内参基因2的Ct值。

[0315] Western印迹

[0316] 使用1 × RIPA缓冲液 (包括蛋白酶抑制剂) 从转染的细胞收获蛋白质。蛋白质浓度由BCA蛋白质测定试剂盒 (Beyotime, P0010, 中国上海) 测定。使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶进行蛋白质电泳 (10ug蛋白质/孔), 然后将其转移到聚偏二氟乙烯 (0.45μm PVDF) 膜。用一抗抗UTRN (Santa Cruz, sc-33700, 美国) 或抗α/β-微管蛋白 (CST, 2148s, 美国) 抗体在4°C对膜进行印迹过夜。用TBST缓冲液洗涤3次后, 膜与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗 (CST, 7076s, 美国) 在室温 (RT) 孵育1小时。用TBST缓冲液将膜洗涤3次, 每次10分钟, 并通过Image Lab (BIO-RAD, Chemistry Doctm MP成像系统) 进行分析。使用ImageJ软件量化UTRN蛋白和α/β-微管蛋白的条带密度。

[0317] 数字Western印迹

[0318] 使用包括蛋白酶抑制剂的变性细胞裂解缓冲液 (Invent, SD-001, 美国) 从转染细胞收获蛋白质。蛋白质浓度由BCA蛋白质测定试剂盒测定。使用Simple Western Automated Western印迹系统 (ProteinSimple, 004-600, 美国) 检测和分析蛋白质。在JESS中使用分离模块 (ProteinSimple, SW004&SW008, 美国) 进行蛋白质电泳 (每孔0.1 μ g/ μ l)。毛细管用一抗抗肌萎缩蛋白相关蛋白 (全长) (Leica biosystems, NCL-DRP2, 德国) 或抗 α / β -微管蛋白 (CST, 2148S, 美国) 抗体印迹。之后, 毛细管用HRP偶联的二抗印迹, 并通过检测试剂盒 (ProteinSimple, DM001&DM002, 美国) 检测信号。根据峰面积计算定量相对表达水平。

[0319] 在本公开内容中已经发现, 在引入细胞后, 上述saRNA能有效地提高UTRN mRNA和抗肌萎缩蛋白相关蛋白的表达水平。

[0320] 实施例1. 针对人UTRN启动子的dsRNA的设计与合成

[0321] 从ENSEMBL基因组数据库 (www.ensembl.org) 检索到人UTRN基因启动子序列 (SEQ ID NO: 1200) 的1000-nt编码链。该序列紧接位于UTRN的第一个外显子 (ENST00000433557.1) 的第一个核苷酸 (按ENSEMBL注释) 的上游。然而, 该序列的3'部分还包含NCBI注释的UTRN RefSeq mRNA序列 (NM_007124.3) 的第一个外显子。因此, NM_007124.3的第一个核苷酸被认为是真正的TSS (+1位), 而下游序列被认为是5'非翻译区 (UTR) (表6)。

[0322] 表6. 推定的人UTRN启动子序列 (5'-3') (SEQ ID NO: 1200)

```
-666 atttatctct taaaaaata tcaccctaac tagagacctg ttttgcctaa
-616 ggggacgtga ctacatttt cggataatct gaataagggg aattgtgtct
-566 gctcgaggca tccattctgg ttcggtctcc ggaactccgg ctccggcac
-516 gcacggttca ctctggagcg cgcgccccag gccagccaag cgccgagccg
-466 ggctgctgcg ggctgggagg gcgcgcaggg ccggcgctga ttgacggggc
-416 gcgcagtcag gtgacttggg gcgccaagtt cccgacgcgg tggccgcggt
-366 gaccgccgag gcccggcaga cgctgacccg ggaacgtagt ggggctgac
-316 ttccggaaca agttgctgg gccggcgggc gcggggcgag agcgccgag
-266 gggagccgga gcgctgcaga ggcgcgggcc ggagggttg cgctgatctg
-216 cacccttctc atctggagag cggaccctg gctgcccga ggcgagcccc
-166 ttcccgggg gtgggggagg caacgcgcga ccagcggtc ctgcgcccc
-116 cctccctcc tccgcctcca gcgctcggt ccaacaaagg ggcaggcccg
-66 cagcggggag gaggaggagg agccgccgaa ggagcgagcc tctctcgcg
```

└─→ +1

```
-16 acaaagttgt ggagtcgttt ttctcggag cagggaagcg ggcagcagca
35 gccggccgcg ggctttctcc cgccgagggg cgaggaggag cctctggctc
85 cagaagccga ttggggaatc acggggagcg gcgccccct tcttttgggt
135 catttctgca aacggaaaac tctgtagcgt ttggcaaagt tggcgctgc
185 gcgccccttc cagggttgcg ctttgactgt tttgttttg gcggaactac
235 caggcaggaa gattgcacaa gtaaggggag ttttcagtcg ggtgtcaatt
285 tctctttctt tctttctttt tttaaaattt cggttcgtgt ctgcttctcc
```

[0324]

[0325] 注意:弯曲的箭头和粗体字母表示RefSeq NM_007124.3的转录起始(TSS)。

[0326] 为了鉴定能够活化UTRN基因表达的功能性dsRN,在1000bp UTRN启动子序列上选择一系列21nt的dsRNA靶标,从TSS上游的-666bp开始,每次向TSS移动1bp,从而产生985个靶序列。然后,筛选靶序列以保留符合以下标准的那些:(1)GC含量在35%至70%之间;(2)具有少于5个连续相同核苷酸;(3)具有3个或更少的二核苷酸重复序列;和(4)具有3个或更少的三核苷酸重复序列。筛选后保留398个靶序列,用于确定候选saRNA的正义链序列,其中启动子上212个靶标,5'UTR上186个靶标。表1列出了各dsRNA双链体的链组成和序列,包括UTRN启动子中的同源靶位点。

[0327] 实施例2.靶向人UTRN启动子的dsRNA的高通量筛选

[0328] 为了鉴定能够活化UTRN转录的dsRNA,向RD细胞转染上述398个dsRNA中的每一个,转染浓度为25nM,持续72小时,然后通过一步RT-qPCR进行UTRN基因表达分析。

[0329] 在筛选的398个dsRNA中,108个(27.1%)诱导UTRN表达,其中23个(5.8%)、56个(14.1%)和29个(7.3%)dsRNA分别显示出UTRN mRNA表达的高活化(≥ 1.5 倍)、中度活化(1.2~1.5倍)和轻度活化(1.1~1.2倍)(表7)。

[0330] 在位于真启动子上的212个dsRNA中,99个(46.7%)诱导UTRN表达,其中20个(9.5%)、52个(24.5%)和27个(12.7%)分别显示UTRN mRNA表达的高活化(≥ 1.5 倍)、中度活化(1.2~1.5倍)和轻度活化(1.1~1.2倍)(表8)。

[0331] 在靶向5'UTR区域的186个dsRNA中,大多数抑制UTRN mRNA表达(图2)。

[0332] 具有活化活性(≥ 1.1 倍)的dsRNA在本公开内容中被例举称为“功能性saRNA”。表1还总结了由saRNA处理引起的UTRN mRNA表达的相对变化,而按基因诱导组织的表达数据则绘制在图1中。

[0333] 表7.全部筛选的dsRNA的活性汇总

	dsRNA 活性	UTRN mRNA 变化的 $\log_2$ 值(fold)	dsRNA 的数量	百分比 (%)
[0334]	高活化	≥ 0.49 (1.50) $\sim \leq 1.13$ (2.19)	23	5.8
	中度活化	≥ 0.26 (1.20) $\sim < 0.49$ (1.50)	56	14.1
	轻度活化	≥ 0.13 (1.10) $\sim < 0.26$ (1.20)	29	7.3
	下调/无活化作用	< 0.13 (1.10)	290	72.8
	总计		398	100

[0335] 表8.仅位于启动子上的筛选的dsRNA的活性汇总

	dsRNA 活性	UTRN mRNA 变化的 $\log_2$ 值(fold)	dsRNA 的数量	百分比 (%)
[0336]	高活化	≥ 0.49 (1.50) $\sim \leq 1.13$ (2.19)	20	9.5
	中度活化	≥ 0.26 (1.20) $\sim < 0.49$ (1.50)	52	24.5
	轻度活化	≥ 0.13 (1.10) $\sim < 0.26$ (1.20)	27	12.7
	下调/无活化作用	< 0.13 (1.10)	113	53.3
	总计		212	100

[0337] 当dsRNA按其人在UTRN启动子和5'UTR上的位置进行分选时(图2),可以清楚地看到,靶向真UTRN启动子(-666~-1)的几乎一半的dsRNA诱导UTRN mRNA表达。

[0338] 按在人类UTRN启动子中的靶位点位置分选的表达数据揭示了dsRNA活性富集四个“热点区域”,包括相对于TSS的区域-636至-496(H1),-351至-294(H2),-236至-187(H3)

和-101至-65 (H4) (图2)。近55%的功能性dsRNA靶向序列位于指示的“热点区域”。表9列出了对应于启动子序列的各“热点区域”。

[0339] 通过遵循以下设计标准：(i) GC含量在35-65%之间；(ii) 具有少于5个连续相同核苷酸；(iii) 3个或更少的总计二核苷酸重复序列；和(iv) 3个或更少的总计三核苷酸重复，在本实施例中显示，针对所提供的热点区域序列的至少25%的设计的saRNA能使UTRN基因的表达活化至少10%。

[0340] 能够在“热点区域”H1 (-636至-496) 中使人UTRN表达上调1.1倍或更高的dsRNA双链体如下：

[0341] DS18-0384、DS18-0383、DS18-0382、DS18-0380、DS18-0379、DS18-0378、DS18-0377、DS18-0376、DS18-0375、DS18-0374、DS18-0373、DS18-0372、DS18-0371、DS18-0370、DS18-0368、DS18-0363、DS18-0362、DS18-0358、DS18-0357、DS18-0355、DS18-0354、DS18-0352、DS18-0350、DS18-0349、DS18-0348、DS18-0347、DS18-0345、DS18-0344、DS18-0343、DS18-0335、DS18-0334、DS18-0333、DS18-0332、DS18-0329、DS18-0328、DS18-0327、DS18-0325、DS18-0324、DS18-0323、DS18-0321、DS18-0320、DS18-0315、DS18-0314、DS18-0313、DS18-0312、DS18-0311、DS18-0310、DS18-0308、DS18-0305、DS18-0304、DS18-0301、DS18-0298。

[0342] 能够在“热点区域”H2 (-351至-294) 中使人UTRN表达上调1.1倍或更高的dsRNA双链体如下：

[0343] DS18-0277、DS18-0272、DS18-0271、DS18-0264、DS18-0255、DS18-0253、DS18-0252、DS18-0251、DS18-0248、DS18-0243。

[0344] 能够在“热点区域”H3 (-236至-187) 中使人UTRN表达上调1.1倍或更高的dsRNA双链体如下：

[0345] DS18-0237、DS18-0236、DS18-0234、DS18-0233、DS18-0232、DS18-0231、DS18-0230、DS18-0229、DS18-0228、DS18-0225、DS18-0223、DS18-0222、DS18-0221、DS18-0216、DS18-0211、DS18-0209、DS18-0208、DS18-0207、DS18-0206。

[0346] 能够在“热点区域”H4 (-101至-65) 中使人UTRN表达上调1.1倍或更高的dsRNA双链体如下：

[0347] DS18-0205、DS18-0204、DS18-0202、DS18-0200、DS18-0199、DS18-0198、DS18-0197、DS18-0194、DS18-0193、DS18-0192、DS18-0191、DS18-0189、DS18-0188、DS18-0187。

[0348] 这些结果表明，功能性dsRNA不是随机分布在启动子上，而是簇集在特定热点区域。它们对应的DNA序列列于表9中。

[0349] 表9. 人UTRN dsRNA热点区域及其序列

热点区域	UTRN 启动子上的热点区域序列(5'-3')	SEQ ID NO	大小 (nt)
H1 (-636 至-496)	tagagacctgttttgcctaaggggacgtgactcacatttcggataatctgaataagggga attgtgtctgctcgaggcatccattctggttcggtctccggactcccggctccggcacgc acggttcactctggagcgc	1207	141
H2 (-351 至-294)	gcagacgctgaccgggaacgtagtggggctgatctccggaacaaagtgtgtgggcc	1208	58
H3 (-236 至-187)	ggagggtgtggcgtgatctgcaccccttctcatctggagagcggaccctg	1209	50
H4 (-101 至-65)	ctccagcgtcggctccaacaaggggcaggcccgc	1210	37

[0351] 实施例3. saRNA处理增加RD细胞中的UTRN mRNA水平

[0352] 基于UTRN诱导的筛选结果,将表现最好的38种saRNA(见表1)以25nM的个体saRNA转染至RD细胞3天。然后,通过RT-qPCR分析转染的RD细胞的UTRN mRNA表达。dsCon2和DS18-si8分别作为基因活化的非特异性双链对照和沉默dsRNA对照。个体saRNA的UTRN mRNA表达如图3所示。

[0353] 实施例4. saRNA处理增加RD细胞中的抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平

[0354] 将表现最佳者(18个saRNA)子集以25nM浓度转染到RD细胞中,以在5天后通过Western印迹定量抗肌萎缩蛋白相关蛋白。dsCon2和DS18-si8分别作为基因活化的非特异性双链对照和沉默dsRNA对照。图4汇总了通过量化条带强度得出的抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的相对倍数变化。

[0355] 实施例5. saRNA结构和序列对体外saRNA活性的作用

[0356] 为了评估双链体结构和序列特异性对saRNA活性的作用,基于三个表现最佳者(即DS18-0198,DS18-0305和DS18-0324)合成了一系列saRNA变体,用于活化人UTRN mRNA(图5)和抗肌萎缩蛋白相关蛋白(图6A-B)。表10列出了各saRNA变体的序列组成和设计。将各双链体以25nM浓度转染到RD细胞中3天。通过两步RT-qPCR分析UTRN mRNA水平,并通过JESS检测抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平。采用dsCon2和DS18-si8的处理分别作为基因活化的非特异性双链体对照和沉默dsRNA对照。 α/β -微管蛋白作为蛋白质上样的对照。UTRN的mRNA水平如图5所示。抗肌萎缩蛋白相关蛋白条带示于图6A,抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平示于图6B。

[0357]

表 10. UTRN saRNA 变体设计的寡核苷酸序列和双链体组成

saRNA	设计	链	SEQ ID NO	序列(5'-3')	大小 (nt)
RD-12031 (DS18-0198)	来自筛选的原始命中	正义	597	GCUCGGCUCCAACAAAGGGgc	21
		反义	997	CCCUUUGUUGGAGCCGAGCgc	21
RD-14864	16-bp, 带 TT 突出端	正义	1213	GCUCGGCUCCAACAAATT	18
		反义	1214	UUUGUUGGAGCCGAGCTT	18
RD-14865	18-bp, 带钝端	正义	1215	GCUCGGCUCCAACAAAGG	18
		反义	1216	CCUUUGUUGGAGCCGAGC	18
RD-14866	22-nt 的正义链和 20-nt 的反义链	正义	1217	GCUCGGCUCCAACAAAGGGGCA	22
		反义	1218	CCCUUUGUUGGAGCCGAGC	20
RD-14867	30-nt 的正义链和 28-nt 的反义链	正义	1219	GCUCGGCUCCAACAAAGGGGCAGGCCGCA	30
		反义	1220	CGGCCUCCCCUUUGUUGGAGCCGAGC	28
RD-14868	对正义链的 5 nt "种子"序列突变	正义	1221	GCUCGGCUCCAACAAAGGGGC	21
		反义	1222	CCCUUUGUUGGACCGGUGGGG	21
RD-14870	1 nt 突出端	正义	1223	GCUCGGCUCCAACAAAGGGG	20
		反义	1224	CCCUUUGUUGGAGCCGAGC	19
RD-14871	3 nt 突出端	正义	1225	GCUCGGCUCCAACAAAGGGGCA	22
		反义	1224	CCCUUUGUUGGAGCCGAGC	19
RD-14872	5 nt 突出端	正义	1226	GCUCGGCUCCAACAAAGGGGCGAGG	24
		反义	1224	CCCUUUGUUGGAGCCGAGC	19
RD-12027 (DS18-0305)	来自筛选的原始命中	正义	704	GGCACGCACGGUUCACUCUgg	21
		反义	1104	AGAGUGAACCGUGCGUGCCggg	21
RD-14874	19-bp, 带钝端	正义	1227	GGCACGCACGGUUCACUCU	19
		反义	1228	AGAGUGAACCGUGCGUGCC	19
RD-14875	23-nt 的正义链和 25-nt 的反义链	正义	1229	UCCCGGCACGCACGGUUCACUCU	23
		反义	1230	AGAGUGAACCGUGCGUGCCGGGAGC	25
RD-14876	33-nt 的正义链和 35-nt 的反义链	正义	1231	GACUCCCGGCUCCCGGCACGCACGGUUCACUCU	33
		反义	1232	AGAGUGAACCGUGCGUGCCGGGAGCCGGAGUCCG	35

[0358]

RD-14878	对反义链的 5 nt "种子"序列突变	正义	1233	GGCACGCACGGUACUCACAGC	21
		反义	1234	AGAGUGAACCGUGCGUGCCGG	21
RD-14879	4 nt 突出端	正义	1235	GGCACGCACGGUUCACUCU	19
		反义	1236	AGAGUGAACCGUGCGUGCCGGGA	23
RD-14880	6 nt 突出端	正义	1235	GGCACGCACGGUUCACUCU	19
		反义	1237	AGAGUGAACCGUGCGUGCCGGGAGC	25
RD-12034 (DS18-0324)	来自筛选的原始命中	正义	723	CUCGAGGCAUCCAUCUUGG <u>uu</u>	21
		反义	1123	CCAGAAUGGAUGCCUCGAG <u>ca</u>	21
RD-14883	16-bp, 带 TT 突出端	正义	1238	GAGGCAUCCAUCUUGGTT	18
		反义	1239	CCAGAAUGGAUGCCUCTT	18
RD-14884	29-nt 的正义链和 35-nt 的反义链	正义	1240	AUUGUGUCUCUGGAGGCAUCCAUCUGG	29
		反义	1241	CCAGAAUGGAUGCCUCGAGCAGACACAAUCCCCCU	35

注：大写，RNA。粗体的核苷酸是突出端。粗斜体的核苷酸是错配的。

[0359] 总而言之，高通量筛选数据揭示了人类UTRN基因启动子中saRNA活性的多个“热点区域”。示例性saRNA增加了UTRN mRNA和抗肌萎缩蛋白相关蛋白水平的表达。这些结果提供

了证据,证明UTRN表达的靶向活化是治疗DDD(例如DMD和BMD)的一种有前景的策略。

[0360]

表 1. 人 UTRN saRNA 的 dsRNA 靶标、序列和活性

dsRNA	SEQ ID NO	靶序列(5'-3')	SEQ ID NO	正义(5'-3')	SEQ ID NO	反义(5'-3')	相对 UTRN mRNA(倍数变化)	相对 UTRN mRNA(log ₂ 倍数变化)
DS18-0001	1	gggttcgtgctgcttctcc	400	GGUUCGUGUCUGCUUUCUCCaa	800	GGAGAAAGCAGACACGAAACCGa	0.38	-1.391
DS18-0002	2	cgggttcgtgctgctctc	401	CGGUUCGUGUCUGCUUUCUCCa	801	GAGAAAGCAGACACGAAACCGGaa	0.30	-1.754
DS18-0003	3	tcgggttcgtgctgctctt	402	UCGGUUCGUGUCUGCUUUCUcc	802	AGAAGCAGACACGAAACCGAaa	0.27	-1.915
DS18-0004	4	ttcgggttcgtgctgcttc	403	UUCGGUUCGUGUCUGCUUUCuc	803	GAAAGCAGACACGAAACCGAAau	0.42	-1.248
DS18-0005	5	tttcgggttcgtgctgctt	404	UUUCGGUUCGUGUCUGCUUUCeu	804	AAGCAGACACGAAACCGAAAUu	0.39	-1.370
DS18-0006	6	atttcgggttcgtgctgct	405	AUUUCGGUUCGUGUCUGCUUuc	805	AGCAGACACGAAACCGAAAUuu	0.72	-0.468
DS18-0007	7	aatttcgggttcgtgctgc	406	AAUUUCGGUUCGUGUCUGCUuu	806	GCAGACACGAAACCGAAAUuuu	0.83	-0.262
DS18-0008	8	aaatttcgggttcgtgctgc	407	AAAUUCGGUUCGUGUCUGCUuu	807	CAGACACGAAACCGAAAUUUua	0.39	-1.342
DS18-0009	9	aaaatttcgggttcgtgctc	408	AAAUUCGGUUCGUGUCUGCUgc	808	AGACACGAAACCGAAAUUUUaa	0.86	-0.221
DS18-0010	10	taaaatttcgggttcgtgctc	409	UAAAUUCGGUUCGUGUCUGCug	809	GACACGAAACCGAAAUUUUAaa	1.07	0.095
DS18-0011	11	gggttcgaatttccttctt	410	GGUGUCAAUUUCUCUUUCUuu	810	AGAAAGAGAAAUUGACACCCcg	0.38	-1.406
DS18-0012	12	gggttcgaatttccttctt	411	GGGUGUCAAUUUCUCUUUCuu	811	GAAAGAGAAAUUGACACCCGga	0.34	-1.553
DS18-0013	13	cgggttcgaatttccttctt	412	CGGGUGUCAAUUUCUCUUUCu	812	AAAGAGAAAUUGACACCCGac	0.56	-0.829
DS18-0014	14	tcgggttcgaatttccttctt	413	UCGGGUGUCAAUUUCUCUUuc	813	AAGAGAAAUUGACACCCGACu	0.41	-1.287
DS18-0015	15	gttcgggttcgaatttcctt	414	GUCGGGUGUCAAUUUCUCUUu	814	AGAGAAAUUGACACCCGACUg	0.49	-1.036
DS18-0016	16	agtcgggttcgaatttcctt	415	AGUCGGGUGUCAAUUUCUCUu	815	GAGAAAUUGACACCCGACUga	0.24	-2.034
DS18-0017	17	cagtcgggttcgaatttcctt	416	CAGUCGGGUGUCAAUUUCUCu	816	AGAAAUUGACACCCGACUGaa	0.28	-1.854
DS18-0018	18	tcagtcgggttcgaatttc	417	UCAGUCGGGUGUCAAUUUCuc	817	GAAAUUGACACCCGACUGAaa	0.65	-0.625
DS18-0019	19	ttcagtcgggttcgaatttc	418	UUACAGUCGGGUGUCAAUUUCu	818	AAAUUGACACCCGACUGAaa	0.60	-0.727
DS18-0020	20	tttcagtcgggttcgaatttc	419	UUUCAGUCGGGUGUCAAUUuc	819	AAUUGACACCCGACUGAaaac	0.48	-1.057
DS18-0021	21	ttttcagtcgggttcgaatttc	420	UUUUCAGUCGGGUGUCAAUuu	820	AUUGACACCCGACUGAAAAacg	0.30	-1.735
DS18-0022	22	gttttcagtcgggttcgaatttc	421	GUUUUCAGUCGGGUGUCAAUu	821	UUGACACCCGACUGAAAAgc	0.35	-1.530
DS18-0023	23	cgttttcagtcgggttcgaatttc	422	CGUUUCAGUCGGGUGUCAau	822	UGACACCCGACUGAAAAcgc	0.35	-1.499
DS18-0024	24	gcgttttcagtcgggttcgaatttc	423	GCGUUUCAGUCGGGUGUCAa	823	GACACCCGACUGAAAAcgc	0.25	-1.994
DS18-0025	25	ggcgttttcagtcgggttcgaatttc	424	GCGUUUCAGUCGGGUGUGUca	824	ACACCCGACUGAAAAcgc	0.23	-2.114
DS18-0026	26	ggggcgttttcagtcgggttcgaatttc	425	GGGCGUUUUCAGUCGGGUGUguc	825	CACCCGACUGAAAAcgc	0.22	-2.159

[0361]

DS18-0027	27	ggggcgttttcagtcgggt	426	GGGGCGUUUUCAGUCGGGUgu	826	ACCGACUGAAAAACGCCCCuu	0.30	-1.754
DS18-0028	28	agggcgttttcagtcggg	427	AGGGCGUUUUCAGUCGGGUg	827	CCCGACUGAAAAACGCCCCUua	0.41	-1.287
DS18-0029	29	aagggcgttttcagtcgg	428	AAGGGCGUUUUCAGUCGGgu	828	CCGACUGAAAAACGCCCCUuac	0.61	-0.713
DS18-0030	30	taaggcgttttcagtcg	429	UAAGGGCGUUUUCAGUCgg	829	CGACUGAAAAACGCCCCUUAcu	0.64	-0.644
DS18-0031	31	gtaaggcgttttcagtc	430	GUAAAGGGCGUUUUCAGUCgg	830	GACUGAAAAACGCCCCUUAcu	0.61	-0.703
DS18-0032	32	agtaaggcgttttcagt	431	AGUAAGGGCGUUUUCAGUcg	831	ACUGAAAAACGCCCCUUAACUg	0.60	-0.738
DS18-0033	33	aagtaaggcgttttcag	432	AAGUAAGGGCGUUUUCAGuc	832	CUGAAAAACGCCCCUUAACUgu	0.52	-0.957
DS18-0034	34	caagtaaggcgttttca	433	CAAGUAAGGGCGUUUUCAGu	833	UGAAAAACGCCCCUUAACUUGg	0.33	-1.596
DS18-0035	35	acaagtaaggcgttttc	434	ACAAGUAAGGGCGUUUUCag	834	GAAAAACGCCCCUUAACUUGgc	0.53	-0.909
DS18-0036	36	cacaagtaaggcgtttt	435	CACAAGUAAGGGCGUUUuca	835	AAAAACGCCCCUUAACUUGGca	0.47	-1.092
DS18-0037	37	gcacaagtaaggcgttt	436	GCACAAGUAAGGGCGUUUuc	836	AAACGCCCCUUAACUUGUGCaa	0.33	-1.597
DS18-0038	38	tgcacaagtaaggcgtt	437	UGCACAAGUAAGGGCGUUuu	837	AACGCCCCUUAACUUGUGCAau	0.43	-1.203
DS18-0039	39	tgcacaagtaaggcgt	438	UUGCACAAGUAAGGGCGGUuu	838	ACGCCCCUUAACUUGUGCAAuc	0.69	-0.527
DS18-0040	40	attgcacaagtaaggcgc	439	AUUGCACAAGUAAGGGCGuu	839	CGCCCCUUAACUUGUGCAAUcu	1.26	0.334
DS18-0041	41	gattgcacaagtaaggcgc	440	GAUUGCACAAGUAAGGGCGgu	840	GCCCCUUAACUUGUGCAAUCuu	0.49	-1.028
DS18-0042	42	agattgcacaagtaaggcgc	441	AGAUUGCACAAGUAAGGGGcg	841	CCCCUUAACUUGUGCAAUCUuc	0.86	-0.214
DS18-0043	43	aagattgcacaagtaaggc	442	AAGAUUGCACAAGUAAGGGgc	842	CCCUUAACUUGUGCAAUCUUcc	0.81	-0.310
DS18-0044	44	gaagattgcacaagtaagg	443	GAAGAUUGCACAAGUAAGGgg	843	CCUUAACUUGUGCAAUCUUUcu	0.63	-0.666
DS18-0045	45	ggaaattgcacaagtaag	444	GGAAGAUAUUGCACAAGUAAGgg	844	CUUAACUUGUGCAAUCUUCCug	0.36	-1.459
DS18-0046	46	agaaattgcacaagtaa	445	AGGAAGAUAUUGCACAAGUAagg	845	UUUAACUUGUGCAAUCUUCCUgc	0.63	-0.670
DS18-0047	47	caggaaattgcacaagta	446	CAGGAAGAUAUUGCACAAGUAag	846	UACUUGUGCAAUCUUCCUGcc	0.37	-1.435
DS18-0048	48	gcaggaaattgcacaagt	447	GCAGGAAGAUAUUGCACAAGUaa	847	ACUUGUGCAAUCUUCCUGCcu	0.30	-1.742
DS18-0049	49	ggcaggaaattgcacaag	448	GGCAGGAAGAUAUUGCACAAGua	848	CUUGUGCAAUCUUCCUGCCug	0.34	-1.553
DS18-0050	50	agcaggaaattgcacaa	449	AGGCAGGAAGAUAUUGCACAAGu	849	UUGUGCAAUCUUCCUGCCUgg	0.38	-1.396
DS18-0051	51	cagcaggaaattgcaca	450	CAGGCAGGAAGAUAUUGCACAag	850	UGUGCAAUCUUCCUGCCUGgu	0.28	-1.849
DS18-0052	52	ccaggcaggaaattgcac	451	CCAGGCAGGAAGAUAUUGCACaa	851	GUGCAAUCUUCCUGCCUGGua	0.43	-1.201
DS18-0053	53	accaggcaggaaattgca	452	ACCAAGGCAGGAAGAUAUUGCaca	852	UGCAAUCUUCCUGCCUGGUag	0.29	-1.788
DS18-0054	54	taccaggcaggaaattgc	453	UACCAAGGCAGGAAGAUAUUGCac	853	GCAAUCUUCCUGCCUGGUAGu	0.75	-0.408
DS18-0055	55	ctaccaggcaggaaattg	454	CUACCAAGGCAGGAAGAUAUUGca	854	CAAUUUCCUGCCUGGUAGuu	0.54	-0.882
DS18-0056	56	actaccaggcaggaaatt	455	ACUACCAAGGCAGGAAGAUAUgc	855	AAUCUCCUGCCUGGUAGUuc	0.45	-1.158
DS18-0057	57	aactaccaggcaggaaatt	456	AACUACCAAGGCAGGAAGAUAug	856	AUCUCCUGCCUGGUAGUUcc	0.52	-0.957

[0362]

DS18-0058	58	gaactaccaggcagggaaga	457	GAACUACCAGGCAGGAAGauu	857	UCUUCUUGCCUGGUAGUUUCg	0.32	-1.632
DS18-0059	59	ggaactaccaggcagggaag	458	GGAAUACCAAGGCAGGAAGau	858	CUUCCUGCCUGGUAGUUUCCgc	0.38	-1.410
DS18-0060	60	cggactaccaggcaggga	459	CGGAACUACCAAGGCAGGAAG	859	UUCUUGCCUGGUAGUUUCCGcc	0.49	-1.018
DS18-0061	61	gcggaactaccaggcaggga	460	GCGBAACUACCAAGGCAGGAAG	860	UCCUGCCUGGUAGUUCCGCca	1.05	0.077
DS18-0062	62	ggcgggaactaccaggcagg	461	GGCGGAACUACCAAGGCAGGaa	861	CCUGCCUGGUAGUUCCGCCaa	0.46	-1.131
DS18-0063	63	tggcgggaactaccaggcagg	462	UGGCGGAACUACCAAGGCAGga	862	CUGCCUGGUAGUUCCGCCAaa	0.44	-1.178
DS18-0064	64	tfggcgggaactaccaggca	463	UUUGGCGGAACUACCAAGGCagg	863	UGCCUGGUAGUUCCGCCAaaa	0.45	-1.142
DS18-0065	65	tttggcgggaactaccaggc	464	UUUGGCGGAACUACCAAGGCag	864	GCCUGGUAGUUCCGCCAaaa	1.02	0.025
DS18-0066	66	ttttggcgggaactaccagg	465	UUUGGCGGAACUACCAAGGCga	865	CCUGGUAGUUCCGCCAaaaac	1.16	0.216
DS18-0067	67	cgtttgactgttttgtt	466	CGCUUGACUGUUUUUGUUuu	866	AAACAAAACAGUCAAAAGCGca	0.34	-1.553
DS18-0068	68	gctgtttgactgttttgtt	467	CGCUUUGACUGUUUUUGUUuu	867	AACAAAACAGUCAAAAGCGca	0.29	-1.777
DS18-0069	69	tgcgtttgactgttttgtt	468	UGCGCUUUGACUGUUUUUGUUuu	868	ACAAAACAGUCAAAAGCGCAaa	0.37	-1.442
DS18-0070	70	ttgcgtttgactgttttgt	469	UUUGCGCUUUGACUGUUUUUGuu	869	CAAAAACAGUCAAAAGCGCAaac	0.40	-1.317
DS18-0071	71	ttttgcgtttgactgtttt	470	UUUGCGCUUUGACUGUUUUUGu	870	AAAACAGUCAAAAGCGCAaaac	0.33	-1.594
DS18-0072	72	gtttgcgtttgactgttt	471	GUUUGCGCUUUGACUGUUUG	871	AAACAGUCAAAAGCGCAAAcu	0.26	-1.934
DS18-0073	73	gggtttgcgtttgactgtt	472	GGUUGCGCUUUGACUGUUuu	872	AACAGUCAAAAGCGCAAAcuug	0.34	-1.548
DS18-0074	74	aggtttgcgtttgactgt	473	AGUUUUGCGCUUUGACUGUUuu	873	ACAGUCAAAAGCGCAAAACCUgg	0.44	-1.190
DS18-0075	75	cagggtttgcgtttgactg	474	CAGGUUUGCGCUUUGACUGuu	874	CAGUCAAAAGCGCAAAACCUgga	0.27	-1.864
DS18-0076	76	ccagggtttgcgtttgact	475	CCAGGUUUGCGCUUUGACUgu	875	AGUCAAAAGCGCAAAACCUGgaa	0.26	-1.952
DS18-0077	77	tccagggtttgcgtttgac	476	UCCAGGUUUGCGCUUUGACuug	876	GUCAAAAGCGCAAAACCUUGGaa	0.62	-0.695
DS18-0078	78	ttccagggtttgcgtttga	477	UUCAGGUUUGCGCUUUGAcu	877	UCAAGCGCAAAACCUUGGAagg	0.44	-1.182
DS18-0079	79	cttccagggtttgcgtttg	478	CUUCCAGGUUUGCGCUUUGac	878	CAAGCGCAAAACCUUGGAAGgg	0.31	-1.673
DS18-0080	80	ccttccagggtttgcgttt	479	CCUUCAGGUUUGCGCUUUGa	879	AAAGCGCAAAACCUUGGAAGggg	0.32	-1.651
DS18-0081	81	cccttccagggtttgcgtt	480	CCCUCCAGGUUUGCGCUUUG	880	AAGCGCAAAACCUUGGAAGGgc	0.38	-1.403
DS18-0082	82	cccttccagggtttgcgt	481	CCCCUCCAGGUUUGCGCUuu	881	AGCGCAAAACCUUGGAAGGGgcg	0.19	-2.392
DS18-0083	83	ggcccttccagggtttgcgc	482	GCCCCUCCAGGUUUGCGCuu	882	GCGBAAACCUUGGAAGGGGCgc	0.34	-1.550
DS18-0084	84	cggcccttccagggtttgcg	483	CGCCCCUCCAGGUUUGCGGcu	883	CGCAAAACCUUGGAAGGGGCgcg	0.61	-0.719
DS18-0085	85	ggcgccttccagggtttgc	484	CGGCCCCUCCAGGUUUUGCgc	884	GCAAAACCUUGGAAGGGGCgcgc	0.54	-0.898
DS18-0086	86	cgcgccttccagggtttg	485	CGGCCCCUCCAGGUUUUGcg	885	CAAAACCUUGGAAGGGGCgcga	0.40	-1.306
DS18-0087	87	caaaagtgtgtgcctgcgcg	486	CAAGUUUGGUGCCUGCGCGcc	886	CGCGAGGCACCAACUUUGcc	0.71	-0.493
DS18-0088	88	gcaaaagtgtgtgcctgcgc	487	GCAAGUUUGGUGCCUGCGCGcc	887	GCGCAGGCACCAACUUUGCca	0.62	-0.689

[0363]

DS18-0089	89	ggcaaaagtgtgtgcttgcg	488	GGCAAAAGUUGGUGCCUGCGcg	888	CGCAGGCACCAACUUUUGCCaa	0.52	-0.933
DS18-0090	90	tggcaaaagtgtgtgcttgc	489	UGGCAAAAGUUGGUGCCUGCGcg	889	GCAGGCACCAACUUUUGCCAAa	0.51	-0.985
DS18-0091	91	tgtgcaaaagtgtgtgcttgc	490	UUGGCAAAAGUUGGUGCCUGCGcg	890	CAGGCACCAACUUUUGCCAAac	0.88	-0.181
DS18-0092	92	tgttgcacaaagtgtgtgcttgc	491	UUUGGCAAAAGUUGGUGCCUGCGcg	891	AGGCACCAACUUUUGCCAAacg	0.98	-0.027
DS18-0093	93	gtttgcaaaagtgtgtgcttgc	492	GUUUGGCAAAAGUUGGUGCCUGcg	892	GGCACCACUUUUGCCAAACgc	0.44	-1.200
DS18-0094	94	cgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	493	CGUUUGGCAAAAGUUGGUGCGcu	893	GCACCAACUUUUGCCAAACGcu	0.60	-0.747
DS18-0095	95	gctgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	494	GCGUUUGGCAAAAGUUGGUGGcc	894	CACCAACUUUUGCCAAACGCua	0.43	-1.215
DS18-0096	96	agcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	495	AGCGUUUGGCAAAAGUUGGUGgc	895	ACCAACUUUUGCCAAACGCUac	0.30	-1.755
DS18-0097	97	tagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	496	UAGCGUUUGGCAAAAGUUGGug	896	CCAACUUUGCCAAACGCUAca	0.81	-0.308
DS18-0098	98	gttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	497	GUAGCGUUUGGCAAAAGUUGGgu	897	CAACUUUGCCAAACGCUACag	0.61	-0.720
DS18-0099	99	tgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	498	UGUAGCGUUUGGCAAAAGUUGgg	898	AACUUUGCCAAACGCUACAGa	0.35	-1.507
DS18-0100	100	c'tgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	499	CUGUAGCGUUUGGCAAAAGUug	899	ACUUUGCCAAACGCUACAGag	0.36	-1.477
DS18-0101	101	tctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	500	UCUGUAGCGUUUGGCAAAAGuu	900	CUUUGCCAAACGCUACAGAGu	0.50	-1.012
DS18-0102	102	ctctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	501	CUCUGUAGCGUUUGGCAAAAGuu	901	UUUGCCAAACGCUACAGAGuu	0.53	-0.908
DS18-0103	103	actctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	502	ACUCUGUAGCGUUUGGCAAAAGuu	902	UUGCCAAACGCUACAGAGUuu	0.76	-0.404
DS18-0104	104	aaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	503	AACUCUGUAGCGUUUGGCAAAAGuu	903	UGCCAAACGCUACAGAGUuu	0.98	-0.025
DS18-0105	105	aaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	504	AAACUCUGUAGCGUUUGGCAAAAGuu	904	GCCAAACGCUACAGAGUUuc	0.89	-0.175
DS18-0106	106	aaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	505	AAACUCUCUGUAGCGUUUGGCa	905	CCAAACGCUACAGAGUUUcc	0.44	-1.184
DS18-0107	107	gaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	506	GAAACUCUCUGUAGCGUUUGGca	906	CAAACGCUACAGAGUUUUccg	0.42	-1.242
DS18-0108	108	ggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	507	GGAAACUCUCUGUAGCGUUUGgg	907	AAACGCUACAGAGUUUUCCgu	0.45	-1.165
DS18-0109	109	cggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	508	CGGAAACUCUCUGUAGCGUUug	908	AACGCUACAGAGUUUUCCGgu	0.41	-1.277
DS18-0110	110	acggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	509	ACGGAAACUCUCUGUAGCGUuu	909	ACGCUACAGAGUUUUCCCGuu	0.36	-1.476
DS18-0111	111	aacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	510	AACGGAAACUCUCUGUAGCGuu	910	CGCUACAGAGUUUUCCCGUUug	0.57	-0.815
DS18-0112	112	aaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	511	AAACGGAAACUCUCUGUAGCGuu	911	GUACAGAGUUUUCCCGUUUgc	0.92	-0.125
DS18-0113	113	caaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	512	CAACGGAAACUCUCUGUAGcg	912	CUACAGAGUUUUCCCGUUUGca	0.74	-0.440
DS18-0114	114	gcaaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	513	GCAACGGAAACUCUCUGUAgc	913	UACAGAGUUUUCCCGUUUUGCag	0.81	-0.311
DS18-0115	115	tgcacaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	514	UGCACCGGAAACUCUCUGUag	914	ACAGAGUUUUCCCGUUUUGCaga	0.47	-1.094
DS18-0116	116	ctgcacaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	515	CUGCAACCGGAAACUCUCUGua	915	CAGAGUUUUCCCGUUUUGCAGaa	0.69	-0.538
DS18-0117	117	tctgcacaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	516	UCUGCAACCGGAAACUCUCUgu	916	AGAGUUUUCCCGUUUUGCAGAAa	0.51	-0.972
DS18-0118	118	ttctgcacaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	517	UUCUGCAACCGGAAACUCUCug	917	GAGUUUUCCCGUUUUGCAGAAau	1.63	0.702
DS18-0119	119	tttctgcacaacggaaaactctgttagcgttttgcaaaagtgtgtgcttgc	518	UUUCUGCAACCGGAAACUCUeu	918	AGUUUUCCCGUUUUGCAGAAAug	1.62	0.698

[0364]

DS18-0120	120	atttctgcaaacggaaac	519	AUUUCUGCAACGGAAACuc	919	GUUUUCCGUUUUGCAGAAAUga	0.96	-0.060
DS18-0121	121	catttctgcaaacggaaa	520	CAUUUCUGCAACGGAAACu	920	UUUUCCGUUUUGCAGAAAUgac	0.32	-1.638
DS18-0122	122	tcatttctgcaaacggaaa	521	UCAUUUCUGCAACGGAAAc	921	UUUCCGUUUUGCAGAAAUgAcc	0.23	-2.150
DS18-0123	123	gtcatttctgcaaacggaa	522	GUCAUUUCUGCAACGGAAaa	922	UUCGCUUUUGCAGAAAUgACcc	0.28	-1.811
DS18-0124	124	ggcatttctgcaaacggga	523	GGUCAUUUCUGCAACGGGaa	923	UCCGUUUUGCAGAAAUgACCCca	0.29	-1.783
DS18-0125	125	gggctatttctgcaaacggg	524	GGGUCAUUUCUGCAACCGGaa	924	CCGUUUUGCAGAAAUgACCCaa	0.56	-0.846
DS18-0126	126	tgggctatttctgcaaacg	525	UGGUCAUUUCUGCAACCGga	925	CGUUUGCAGAAAUgACCCAAa	0.97	-0.051
DS18-0127	127	tgggctatttctgcaaac	526	UUGGGUCAUUUCUGCAACCGg	926	GUUUGCAGAAAUgACCCAAaa	0.75	-0.408
DS18-0128	128	tttggctatttctgcaaaa	527	UUUGGUCAUUUCUGCAACcg	927	UUUGCAGAAAUgACCCAAag	0.49	-1.023
DS18-0129	129	ttttggctatttctgcaaa	528	UUUUGGUCAUUUCUGCAaac	928	UUGCAGAAAUgACCCAAaaga	0.74	-0.428
DS18-0130	130	cttttgggctatttctgca	529	CUUUGGGUCAUUUCUGCAaa	929	UGCAGAAAUgACCCAAaGaa	0.48	-1.056
DS18-0131	131	tcttttgggctatttctgc	530	UCUUUUGGUCAUUUCUGCaa	930	GCAGAAAUgACCCAAaAGaa	0.60	-0.748
DS18-0132	132	tcttttgggctatttctg	531	UUCUUUUGGUCAUUUCUGGca	931	CAGAAAUgACCCAAaAGAAgg	0.47	-1.103
DS18-0133	133	cttcttttgggctatttct	532	CUUCUUUUGGUCAUUUCUgc	932	AGAAAUgACCCAAaAGAAggg	0.38	-1.392
DS18-0134	134	cccttcttttgggctattt	533	CCUUCUUUUGGUCAUUUCug	933	GAAAUgACCCAAaAGAAAGggg	0.32	-1.624
DS18-0135	135	cccttcttttgggctattt	534	CCCUCUUUUGGUCAUUUCeu	934	AAAUgACCCAAaAGAAAGGGgg	0.39	-1.371
DS18-0136	136	cccttcttttgggctattt	535	CCCCUCUUUUGGUCAUUUC	935	AAUGACCCAAaAGAAAGGGggg	0.32	-1.641
DS18-0137	137	tggggaatcacaggaggagcg	536	UGGGGAUUCACGGGGAGCGgc	936	CGUCCCCGUGAUUCCCCAAu	0.82	-0.283
DS18-0138	138	tggggaatcacaggaggagc	537	UUGGGGAUUCACGGGGAGCGgg	937	GCUCCCCGUGAUUCCCCAAuc	0.74	-0.436
DS18-0139	139	attggggaatcacaggaggag	538	AUUGGGGAUUCACGGGGAGcg	938	CUCCCCGUGAUUCCCCAAUcg	0.67	-0.588
DS18-0140	140	gattggggaatcacaggaggga	539	GAUUGGGGAUUCACGGGGGAgc	939	UCCCCGUGAUUCCCCCAAUcgg	0.44	-1.185
DS18-0141	141	cgaattggggaatcacaggagg	540	CGAUUGGGGAUUCACGGGGGag	940	CCCCGUGAUUCCCCCAAUcGgc	0.41	-1.276
DS18-0142	142	ccgaattggggaatcacaggagg	541	CCGAUUGGGGAUUCACGGGGga	941	CCCGUGAUUCCCCCAAUcGGcu	0.36	-1.491
DS18-0143	143	ggcgaattggggaatcacagg	542	GCCGAUUGGGGAUUCACGGgg	942	CCGUGAUUCCCCCAAUcGGCuu	0.42	-1.248
DS18-0144	144	agccgaattggggaatcacg	543	AGCCGAUUGGGGAUUCACGgg	943	CGUGAUUCCCCCAAUcGGCUuc	0.37	-1.443
DS18-0145	145	aagccgaattggggaatcac	544	AAGCCGAUUGGGGAUUCACg	944	GUGAUUCCCCCAAUcGGCUUcu	0.34	-1.544
DS18-0146	146	gaagccgaattggggaatca	545	GAAGCCGAUUGGGGAUUCAcg	945	UGAUUCCCCCAAUcGGCUUCug	0.26	-1.920
DS18-0147	147	agaagccgaattggggaatc	546	AGAAAGCCGAUUGGGGAUUCac	946	GAUUCCCCCAAUcGGCUUCUgg	0.30	-1.739
DS18-0148	148	cagaagccgaattggggaat	547	CAGAAGCCGAUUGGGGAUuca	947	AUUCCCCCAAUcGGCUUCUGga	0.48	-1.047
DS18-0149	149	ccagaagccgaattgggga	548	CCAGAAGCCGAUUGGGGAauc	948	UUCCCCCAAUcGGCUUCUGGag	0.29	-1.771
DS18-0150	150	tecaagaagccgaattgggga	549	UCCAGAAGCCGAUUGGGGAau	949	UCCCCCAAUcGGCUUCUGGAgc	0.45	-1.155

[0365]

DS18-0151	151	ctccagaagccgattgggg	550	CUCCAGAAAGCCGAUUGGGGaa	950	CCCCAAUCGGCUUUCUGGAGcc	0.44	-1.183
DS18-0152	152	gctccagaagccgattgggg	551	GCUCCAGAAAGCCGAUUGGGga	951	CCCAAUUCGGCUUUCUGGAGCca	0.37	-1.442
DS18-0153	153	ggctccagaagccgattgg	552	GGCUCCAGAAAGCCGAUUGGgg	952	CCAAUCGGCUUUCUGGAGCCag	0.41	-1.272
DS18-0154	154	tggctccagaagccgattg	553	UGGCUCCAGAAAGCCGAUUGgg	953	CAAUUCGGCUUUCUGGAGCCa	0.41	-1.275
DS18-0155	155	ctggctccagaagccgatt	554	CUGGCUCCAGAAAGCCGAUUGg	954	AAUCGGCUUUCUGGAGCCAGag	0.43	-1.226
DS18-0156	156	tctggctccagaagccgat	555	UCUGGCUCCAGAAAGCCGAUug	955	AUCGGCUUUCUGGAGCCAGAgg	0.66	-0.608
DS18-0157	157	ctctggctccagaagccga	556	CUCUGGCUCCAGAAAGCCGAuu	956	UCGGCUUUCUGGAGCCAGAGgc	0.43	-1.203
DS18-0158	158	ccctggctccagaagccg	557	CCUCUGGCUCCAGAAAGCCGau	957	CGGCUUUCUGGAGCCAGAGGcu	0.44	-1.175
DS18-0159	159	ggctctggctccagaagcc	558	GCCUCUGGCUCCAGAAAGCCga	958	GGCUUUCUGGAGCCAGAGGCuc	0.63	-0.666
DS18-0160	160	agcctctggctccagaagcc	559	AGCCUCUGGCUCCAGAAAGCcg	959	GUUCUGGAGCCAGAGGCUCcc	1.04	0.054
DS18-0161	161	ggagcctctggctccagaag	560	GAGCCUCUGGCUCCAGAAAGcc	960	CUUCUGGAGCCAGAGGCUCcu	0.94	-0.096
DS18-0162	162	ggagcctctggctccagaag	561	GGAGCCUCUGGCUCCAGAAAgc	961	UUCUGGAGCCAGAGGCUCUcc	0.81	-0.310
DS18-0163	163	aggagcctctggctccaga	562	AGGAGCCUCUGGCUCCAGAAag	962	UCUGGAGCCAGAGGCUCUcc	0.89	-0.175
DS18-0164	164	ggagagcctctggctccag	563	GAGGAGCCUCUGGCUCCAGaa	963	CUGGAGCCAGAGGCUCUCCcu	1.03	0.040
DS18-0165	165	ggagagagcctctggctcca	564	GGAGGAGCCUCUGGCUCCAGa	964	UGGAGCCAGAGGCUCUCCUcc	1.01	0.007
DS18-0166	166	aggagagagcctctggctcc	565	AGGAGGAGCCUCUGGCUCCAg	965	GGAGCCAGAGGCUCUCCUccg	1.39	0.479
DS18-0167	167	aggagagagagcgggagca	566	AGCAGGGAAGCGGGCAGCAGc	966	UGCUGCCCGCUUCCUCCUCCcc	0.68	-0.556
DS18-0168	168	tccctggagcaggggaagcg	567	UCCUCGGAGCAGGGAAGCGgg	967	CGCUUCCCGCUCUCCGAGGAaa	1.28	0.361
DS18-0169	169	tccctggagcaggggaagcg	568	UUCUCGGAGCAGGGAAGCGgg	968	GCUUCCCGCUCUCCGAGGAaaa	0.85	-0.227
DS18-0170	170	tctcctggagcaggggaag	569	UUUCCUGGAGCAGGGAAGGcg	969	CUUCCCGCUCUCCGAGGAaaa	1.08	0.111
DS18-0171	171	tctcctggagcaggggaag	570	UUUCCUGGAGCAGGGAAGc	970	UUCUCCUGCUCUCCGAGGAaaac	0.81	-0.302
DS18-0172	172	aaagtgtggagtcgtttt	571	AAAGUUGGAGUCGUUUUuc	971	AAAAAGACUCCACAAACUUUgu	0.83	-0.265
DS18-0173	173	caaaagtgtggagtcgttt	572	CAAGUUGGAGUCGUUUuu	972	AAACGACUCCACAAACUUUGug	0.69	-0.534
DS18-0174	174	acaaagtgtggagtcgttt	573	ACAAAGUUGGAGUCGUUUuu	973	AACGACUCCACAAACUUUGUgc	0.67	-0.570
DS18-0175	175	cacaaagtgtggagtcgt	574	CACAAAGUUGGAGUCGUuu	974	ACGACUCCACAAACUUUGUGcg	0.71	-0.484
DS18-0176	176	gcacaaagtgtggagtcg	575	GCACAAAGUUGGAGUCGuu	975	CGACUCCACAAACUUUGUGCgc	0.64	-0.634
DS18-0177	177	cgcacaaagtgtggagtc	576	CGCACAAAGUUGGAGUCgu	976	GACUCCACAAACUUUGUGCGcg	0.29	-1.802
DS18-0178	178	ggcgcacaaagtgtggagt	577	GCGCACAAAGUUGGAGUGcg	977	ACUCCACAAACUUUGUGCGCga	0.75	-0.413
DS18-0179	179	cgcgcacaaagtgtggag	578	CGCGCACAAAGUUGGAGuc	978	CUCCACAAACUUUGUGCGCGag	0.87	-0.208
DS18-0180	180	tcgcgcacaaagtgtggga	579	UCGCGCACAAAGUUGGAGu	979	UCCACAAACUUUGUGCGCGa	0.82	-0.293
DS18-0181	181	ctcgcgcacaaagtgtggg	580	CUCGCGCACAAAGUUGGAgg	980	CCACAAACUUUGUGCGCGAGag	1.14	0.184

[0366]

DS18-0182	182	tctcgcgcacaaagtgtgtg	581	UCUCGCGCACAAAGUUUGGga	981	CACAAUUUGUGCGCGGAGaga	0.96	-0.065
DS18-0183	183	ctctcgcgcacaaagtgtgt	582	CUCUCGCGCACAAAGUUUGgg	982	ACAACUUUGUGCGCGGAGAGag	1.01	0.017
DS18-0184	184	ccgaagagcgcgcctctc	583	CCGAAGGAGCGAGCCUCUCuc	983	GAGAGCUCGCUCCUUCGCGcg	1.27	0.341
DS18-0185	185	gcgcgaagcgcgcctctc	584	GCCGAAGGAGCGAGCCUCUcu	984	AGAGCUCGCUCCUUCGCGcg	1.51	0.598
DS18-0186	186	aggaagcgcgcgcgaagga	585	AGGAGGAGCCGCCGAAGGAgc	985	UCCUUCGGCGGCUCCUCCUcc	0.85	-0.232
DS18-0187	187	acaaagcgcgcgcgcgcga	586	ACAAGGGGCGAGGCCCGCAgc	986	UGCGGCCUGCCCCUUUGUug	1.18	0.242
DS18-0188	188	aacaaagcgcgcgcgcgcgc	587	AACAAGGGGCGAGGCCCGCag	987	GCGGCCUGCCCCUUUGUUGgg	1.29	0.363
DS18-0189	189	caacaaagcgcgcgcgcgcgc	588	CAACAAGGGGCGAGGCCCGca	988	CGGGCCUGCCCCUUUGUUGga	1.17	0.228
DS18-0190	190	ccaacaaagcgcgcgcgcgc	589	CCAACAAGGGGCGAGGCCCGc	989	GGGCCUGCCCCUUUGUUGGag	1.04	0.054
DS18-0191	191	tccaacaaagcgcgcgcgcgc	590	UCCAACAAGGGGCGAGGCCcg	990	GGCCUGCCCCUUUGUUGGAgc	1.14	0.192
DS18-0192	192	ctccaacaaagcgcgcgcgcgc	591	CUCCAACAAGGGGCGAGGCCcc	991	GCCUGCCCCUUUGUUGGAGcc	1.17	0.225
DS18-0193	193	gctccaacaaagcgcgcgcgcgc	592	GCUCCAACAAGGGGCGAGGCC	992	CCUGCCCCUUUGUUGGAGCGcg	1.42	0.502
DS18-0194	194	ggctccaacaaagcgcgcgcgcgc	593	GGCUCCAACAAGGGGCGAGgc	993	CUGCCCCUUUGUUGGAGCCga	1.25	0.327
DS18-0195	195	cggctccaacaaagcgcgcgcgc	594	CGGCUCCAACAAGGGGCGAgg	994	UGCCCCUUUGUUGGAGCCGag	1.05	0.064
DS18-0196	196	tcggctccaacaaagcgcgcgcgc	595	UCGGCUCCAACAAGGGGCGAg	995	GCCCCUUUGUUGGAGCCGAgc	0.88	-0.181
DS18-0197	197	ctcggctccaacaaagcgcgcgcgc	596	CUCGGCUCCAACAAGGGGGea	996	CCCCUUUGUUGGAGCCGAGcg	1.93	0.946
DS18-0198	198	gctcggctccaacaaagcgcgcgcgc	597	GCUCGGCUCCAACAAGGGGgc	997	CCCUUUGUUGGAGCCGAGCGgc	1.77	0.821
DS18-0199	199	cgtcggctccaacaaagcgcgcgcgc	598	CGCUCGGCUCCAACAAGGGgg	998	CCUUUGUUGGAGCCGAGCGGcu	1.33	0.410
DS18-0200	200	gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	599	GCUCUCGGCUCCAACAAGggg	999	CUUUGUUGGAGCCGAGCGCug	1.59	0.668
DS18-0201	201	agcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	600	AGCGCUCGGCUCCAACAAGgg	1000	UUUGUUGGAGCCGAGCGCUGg	0.79	-0.347
DS18-0202	202	cagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	601	CAGCGCUCGGCUCCAACAAGg	1001	UUGUUGGAGCCGAGCGCUGga	1.10	0.140
DS18-0203	203	ccagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	602	CCAGCGCUCGGCUCCAACAAGa	1002	UGUUGGAGCCGAGCGCUGGag	0.96	-0.052
DS18-0204	204	tccagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	603	UCCAGCGCUCGGCUCCAACAAGaa	1003	GUUGGAGCCGAGCGCUGGAgg	1.23	0.297
DS18-0205	205	ctccagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	604	CUCCAGCGCUCGGCUCCAACAAGa	1004	UUGGAGCCGAGCGCUGGAGgc	1.73	0.789
DS18-0206	206	tctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	605	UCUGGAGAGCGGACCCCUg	1005	CAGGGUCCGCUCCUCCAGAug	1.38	0.460
DS18-0207	207	atctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	606	AUCUGGAGAGCGGACCCCUgg	1006	AGGGUCCGCUCCUCCAGAUga	1.48	0.567
DS18-0208	208	catctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	607	CAUCUGGAGAGCGGACCCCUg	1007	GGGUCCGCUCCUCCAGAUgag	1.30	0.378
DS18-0209	209	tcatctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	608	UCAUCUGGAGAGCGGACCCCu	1008	GGGUCCGCUCCUCCAGAUgag	1.45	0.540
DS18-0210	210	ctcatctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	609	CUCaucUGGAGAGCGGACCCcc	1009	GGUCCGCUCCUCCAGAUgagaa	0.99	-0.019
DS18-0211	211	tctcatctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	610	UCUCAUCUGGAGAGCGGACcc	1010	GUCCGCUCCUCCAGAUgagaa	1.15	0.197
DS18-0212	212	ttctcatctggagagcgcgcgcgcgcgcgcgc	611	UUUCAUCUGGAGAGCGGAGcc	1011	UCCGCUCCUCCAGAUgagaaagg	1.09	0.124

[0367]

DS18-0213	213	cttctcatctggagagcgg	612	CUUUCUAUCUGGAGAGCGGac	1012	CCGCUCUCCAGAUAGAGAAAGgg	0.94	-0.096
DS18-0214	214	ccttctcatctggagagcg	613	CCUUCUAUCUGGAGAGCGGga	1013	CGCUCUCCAGAUAGAGAAAGGgu	0.86	-0.221
DS18-0215	215	cccttctcatctggagagc	614	CCCUCUAUCUGGAGAGCGgg	1014	GCUCUCCAGAUAGAGAAAGGGu	0.90	-0.153
DS18-0216	216	acccttctcatctggagag	615	ACCCUUCUAUCUGGAGAGGg	1015	CUCUCCAGAUAGAGAAAGGGu	1.12	0.157
DS18-0217	217	caaccttctcatctggaga	616	CACCCUUCUAUCUGGAGAGc	1016	UCUCCAGAUAGAGAAAGGGuGca	0.84	-0.253
DS18-0218	218	gcaccttctcatctggag	617	GCACCCUUCUAUCUGGAGAg	1017	CUCCAGAUAGAGAAAGGUGCag	0.87	-0.199
DS18-0219	219	tgcaccttctcatctggga	618	UGCACCCUUCUAUCUGGAGga	1018	UCCAGAUAGAGAAAGGUGCAga	0.99	-0.019
DS18-0220	220	ctgcaccttctcatctgg	619	CUGCACCCUUCUAUCUGGAg	1019	CCAGAUAGAGAAAGGUGCAGau	0.95	-0.078
DS18-0221	221	tctgcaccttctcatctg	620	UCUGCACCCUUCUAUCUGga	1020	CAGAUAGAGAAAGGUGCAGauc	1.31	0.386
DS18-0222	222	atctgcaccttctcatct	621	AUCUGCACCCUUCUAUCUgg	1021	AGAUAGAGAAAGGUGCAGAUca	1.57	0.655
DS18-0223	223	gcatctgcaccttctcatc	622	GAUCUGCACCCUUCUAUCUg	1022	GAUGAGAGAAAGGUGCAGAUcag	1.25	0.322
DS18-0224	224	tgatctgcaccttctcat	623	UGAUCUGCACCCUUCUAUCu	1023	AUGAGAGAAAGGUGCAGAUCAgc	1.00	-0.004
DS18-0225	225	ctgatctgcaccttctca	624	CUGAUCUGCACCCUUCUAUC	1024	UGAGAAAGGUGCAGAUCAAGcg	1.59	0.674
DS18-0226	226	gctgatctgcaccttctc	625	GCUGAUCUGCACCCUUCUAu	1025	GAGAAAGGUGCAGAUCAAGCgc	0.65	-0.624
DS18-0227	227	cgtgatctgcaccttct	626	CGCUGAUCUGCACCCUUCUca	1026	AGAAAGGUGCAGAUCAAGCGcc	0.60	-0.747
DS18-0228	228	gctgatctgcaccttctc	627	GCGCUGAUCUGCACCCUUCuc	1027	GAAGGUGCAGAUCAAGCGCca	1.12	0.158
DS18-0229	229	ggcgctgatctgcacctt	628	GGCGCUGAUCUGCACCCUUCu	1028	AAGGUGCAGAUCAAGCGCCag	1.21	0.276
DS18-0230	230	tggcgctgatctgcacct	629	UGGCGCUGAUCUGCACCCUuc	1029	AGGGUGCAGAUCAAGCGCCAGc	1.40	0.483
DS18-0231	231	ctggcgctgatctgcaccc	630	CUGGCGCUGAUCUGCACCCuu	1030	GGGUGCAGAUCAAGCGCCAGcc	1.26	0.338
DS18-0232	232	gctggcgctgatctgcacc	631	GCUGGCGCUGAUCUGCACCCcu	1031	GGUGCAGAUCAAGCGCCAGCcc	1.29	0.368
DS18-0233	233	ggctggcgctgatctgcac	632	GGCUGGCGCUGAUCUGCACcc	1032	GUGCAGAUCAAGCGCCAGCCcu	1.33	0.410
DS18-0234	234	gggctggcgctgatctgca	633	GGGUGGCGCUGAUCUGCACcc	1033	UGCAGAUCAAGCGCCAGCCCu	1.29	0.367
DS18-0235	235	agggctggcgctgatctgc	634	AGGGCUGGCGCUGAUCUGCac	1034	GCAGAUCAAGCGCCAGCCCUcc	0.76	-0.399
DS18-0236	236	gaggcgctggcgctgatctg	635	GAGGGCUGGCGCUGAUCUGca	1035	CAGAUCAAGCGCCAGCCCUCCg	1.39	0.470
DS18-0237	237	ggaggcgctggcgctgatct	636	GGAGGGCUGGCGCUGAUCUgc	1036	AGAUCAAGCGCCAGCCCUCCgg	1.13	0.173
DS18-0238	238	aaagtctggcgctggcgcg	637	AAAGUUGCUGGGCGCGCGGcg	1037	CCGCCGCCAGCAACUUUgu	1.05	0.069
DS18-0239	239	caaaagtctggcgctggcg	638	CAAGUUGCUGGGCGCGCGGgc	1038	CGCCGCCCGAGCAACUUUGuu	1.09	0.126
DS18-0240	240	acaaaagtctggcgctggc	639	ACAAAGUUGCUGGGCGCGGcg	1039	GCCGGCCCGAGCAACUUUGUuc	1.04	0.052
DS18-0241	241	aacaaaagtctggcgccgg	640	AACAAAGUUGCUGGGCGCGGcg	1040	CCGGCCCGAGCAACUUUGUUcc	1.06	0.078
DS18-0242	242	gaacaaaagtctggcgccg	641	GAACAAAGUUGCUGGGCGCGgc	1041	CGGGCCCGAGCAACUUUGUUCcg	1.06	0.090
DS18-0243	243	ggaaacaaaagtctggcgcc	642	GGAACAAAGUUGCUGGGCGCGgg	1042	GGCCCCAGCAACUUUGUUCCGgg	1.23	0.294

[0368]

DS18-0244	244	cgggaacaaagtgtctgggc	643	CGGAACAAAGUUGCUGGGCcg	1043	GCCAGCAACUUUUGUUCCGga	1.08	0.113
DS18-0245	245	ccgggaacaaagtgtctggg	644	CCGGAACAAAGUUGCUGGGcc	1044	CCCAGCAACUUUUGUUCCGGaa	0.72	-0.468
DS18-0246	246	tccgggaacaaagtgtctgg	645	UCCGGAACAAAGUUGCUGGgc	1045	CCAGCAACUUUUGUUCCGGAag	0.75	-0.418
DS18-0247	247	ticcgggaacaaagtgtctg	646	UUCGGAACAAAGUUGCUGgg	1046	CAGCAACUUUUGUUCCGGAaga	0.81	-0.295
DS18-0248	248	ctccgggaacaaagtgtct	647	CUUCCGGAACAAAGUUGCUGg	1047	AGCAACUUUUGUUCCGGAAGau	1.30	0.381
DS18-0249	249	tctccgggaacaaagtgtc	648	UCUCCGGAACAAAGUUGCug	1048	GCAACUUUUGUUCCGGAAGauc	0.99	-0.017
DS18-0250	250	atctccgggaacaaagtgt	649	AUCUCCGGAACAAAGUUGeu	1049	CAACUUUUGUUCCGGAAGAUca	0.63	-0.657
DS18-0251	251	gactctccgggaacaaagti	650	GAUCUCCGGAACAAAGUUGc	1050	AACUUUGUUCCGGAAGAUcag	1.24	0.307
DS18-0252	252	tgactctccgggaacaaagt	651	UGAUCUCCGGAACAAAGUug	1051	ACUUUGUUCCGGAAGAUcAgc	1.27	0.340
DS18-0253	253	ctgactctccgggaacaaag	652	CUGAUCUCCGGAACAAAGuu	1052	CUUUGUUCCGGAAGAUcAGcc	1.50	0.585
DS18-0254	254	gctgactctccgggaacaaa	653	GCUGAUCUCCGGAACAAAGu	1053	UUUGUUCCGGAAGAUcAGCcc	1.09	0.120
DS18-0255	255	ggctgactctccgggaacaa	654	GGCUGAUCUCCGGAACAAaag	1054	UUGUUCCGGAAGAUcAGGCCcc	1.15	0.203
DS18-0256	256	gggctgactctccgggaaca	655	GGCUGAUCUCCGGAACAAaa	1055	UGUUCCGGAAGAUcAGCCCca	0.78	-0.365
DS18-0257	257	ggggctgactctccgggaac	656	GGGCGUGAUCUCCGGAACaa	1056	GUUCCGGAAGAUcAGCCCCac	0.77	-0.374
DS18-0258	258	tggggctgactctccgggaa	657	UGGGCGUGAUCUCCGGGAa	1057	UUCGGAAGAUcAGCCCCAcu	0.65	-0.617
DS18-0259	259	gtggggctgactctccggga	658	GUGGGCGUGAUCUCCGGGAac	1058	UCCGGAAGAUcAGCCCCACua	0.70	-0.509
DS18-0260	260	agtggggctgactctccggg	659	AGUGGGCGUGAUCUCCGGGaa	1059	CCGGAAGAUcAGCCCCACUac	0.76	-0.393
DS18-0261	261	tagtggggctgactctccg	660	UAGUGGGCGUGAUCUCCGGa	1060	CGGAAGAUcAGCCCCACUAcg	0.70	-0.513
DS18-0262	262	gtagtgggctgactctcc	661	GUAGUGGGCGUGAUCUCCgg	1061	GGAAGAUcAGCCCCACUACgu	0.64	-0.641
DS18-0263	263	cgtagtgggctgactcttc	662	CGUAGUGGGCGUGAUCUcgg	1062	GAAGAUcAGCCCCACUACGuu	0.94	-0.092
DS18-0264	264	acgtagtgggctgactctt	663	ACGUAGUGGGCGUGAUCUucc	1063	AAGAUcAGCCCCACUACGUuc	1.25	0.325
DS18-0265	265	aacgtagtgggctgactct	664	AACGUAGUGGGCGUGAUCUuc	1064	AGAUcAGCCCCACUACGUUcc	0.76	-0.405
DS18-0266	266	gaacgtagtgggctgactc	665	GAACGUAGUGGGCGUGAUCuu	1065	GAUCAGCCCCACUACGUUCcc	0.99	-0.014
DS18-0267	267	gggaacgtagtgggctgact	666	GGAACGUAGUGGGCGUGAUcu	1066	AUCAGCCCCACUACGUUCCcg	0.93	-0.099
DS18-0268	268	gggaacgtagtgggctgactga	667	GGGAACGUAGUGGGCGUGauc	1067	UCAGCCCCACUACGUUCCCGg	1.01	0.020
DS18-0269	269	cgggaacgtagtgggctgactg	668	CGGAACGUAGUGGGCGUGau	1068	CAGCCCCACUACGUUCCCGgg	0.95	-0.081
DS18-0270	270	ccgggaacgtagtgggctgact	669	CCGGAACGUAGUGGGCGUGa	1069	AGCCCCACUACGUUCCCGGgu	0.89	-0.169
DS18-0271	271	acccgggaacgtagtgggctg	670	ACCCGGGAACGUAGUGGGGeu	1070	CCCCACUACGUUCCCGGGUca	1.15	0.207
DS18-0272	272	gacccgggaacgtagtggctg	671	GACCCGGGAACGUAGUGGGgc	1071	CCCACUACGUUCCCGGGUCag	1.26	0.336
DS18-0273	273	tgacccgggaacgtagtgtg	672	UGACCCGGGAACGUAGUGGGg	1072	CCACUACGUUCCCGGGUCAgc	0.86	-0.220
DS18-0274	274	ctgacccgggaacgtagtgtg	673	CUGACCCGGGAACGUAGUGgg	1073	CACUACGUUCCCGGGGUCAgcg	0.88	-0.185

[0369]

DS18-0275	275	gctgacccgggaacgtagt	674	GCUGACCCGGGAACGUAGUgg	1074	ACUACGUUCCCGGUCAGCgu	0.84	-0.251
DS18-0276	276	cagacgctgaccgggaac	675	CAGACGUCGACCCGGGAACgu	1075	GUUCCCGGUCAGCGUCUGcc	1.05	0.065
DS18-0277	277	gcagacgctgaccgggaa	676	GCAGACGUCGACCCGGGAACg	1076	UUCGCGGUCAGCGUCUGCcg	1.21	0.281
DS18-0278	278	tggcgcccaagtcccgga	677	UGGGGCGCCAAGUUCGCGAg	1077	UCGGGAACUUUGCGCCCCAag	0.91	-0.135
DS18-0279	279	ttggggcgcccaagttcccg	678	UUGGGCGCCAAGUUCGCGac	1078	CGGGAACUUUGCGCCCCAagu	1.04	0.051
DS18-0280	280	cttggggcgcccaagttccc	679	CUUGGGGCGCCAAGUUCGCGa	1079	GGGAACUUUGGGCGCCCCAAGuc	1.14	0.189
DS18-0281	281	acttggggcgcccaagtccc	680	ACUUGGGGCGCCAAGUUCGcg	1080	GGAAACUUUGGGCGCCCCAAGUca	0.89	-0.165
DS18-0282	282	gacttggggcgcccaagtcc	681	GACUUGGGGCGCCAAGUUCcc	1081	GAACUUGGGCGCCCCAAGUCac	0.97	-0.049
DS18-0283	283	tgacttggggcgcccaagtt	682	UGACUUGGGGCGCCAAGUUCc	1082	AACUUGGGCGCCCCAAGUCacc	1.00	0.004
DS18-0284	284	gtgacttggggcgcccaagtt	683	GUACUUGGGGCGCCAAGUuc	1083	ACUUGGGCGCCCCAAGUCACcu	1.16	0.218
DS18-0285	285	gggacttggggcgcccaag	684	GGUACUUGGGGCGCCAAGuu	1084	CUUGGGCGCCCCAAGUCACCug	1.15	0.202
DS18-0286	286	agggtgacttggggcgcccaa	685	AGGUGACUUGGGGCGCCAAgu	1085	UUGGGCGCCCCAAGUCACCUga	0.91	-0.138
DS18-0287	287	cagggtgacttggggcgcccaa	686	CAGGUGACUUGGGGCGCCAAg	1086	UGGCGCCCCAAGUCACCUGac	1.09	0.123
DS18-0288	288	tcagggtgacttggggcgccc	687	UCAGGUGACUUGGGGCGCCaa	1087	GGCGCCCCAAGUCACCUGAcu	1.05	0.064
DS18-0289	289	gtcagggtgacttggggcgccc	688	GUCAGGUGACUUGGGGCGCCea	1088	GCGCCCAAGUCACCUGACug	1.03	0.049
DS18-0290	290	agtcagggtgacttggggcgccc	689	AGUCAGGUGACUUGGGGCGcc	1089	CGCCCCAAGUCACCUGACUgc	0.58	-0.777
DS18-0291	291	cagtcagggtgacttggggcgccc	690	CAGUCAGGUGACUUGGGGCGgc	1090	GCCCCAAGUCACCUGACUGcg	0.96	-0.066
DS18-0292	292	gcagtcagggtgacttggggcgccc	691	GCAGUCAGGUGACUUGGGGcg	1091	CCCCAAGUCACCUGACUGCgc	0.92	-0.118
DS18-0293	293	cgcagtcagggtgacttggggcgccc	692	CGCAGUCAGGUGACUUGGGcg	1092	CCCAAGUCACCUGACUGCGcg	0.93	-0.104
DS18-0294	294	ggcagtcagggtgacttggggcgccc	693	CGCAGUCAGGUGACUUGGGgg	1093	CCAAGUCACCUGACUGCGCgc	0.93	-0.100
DS18-0295	295	cggcagtcagggtgacttggggcgccc	694	CGCGCAGUCAGGUGACUUGgg	1094	CAAGUCACCUGACUGCGCGcc	1.01	0.007
DS18-0296	296	aggcgccggcgctgattggac	695	AGGGCCGGCGCUGAUUGACgg	1095	GUCAAUACGCGCGCGCCCCUgc	1.01	0.021
DS18-0297	297	caggcgccggcgctgattggac	696	CAGGGCCGGCGCUGAUUGACg	1096	UCAAUACGCGCGCGCCCCUgc	1.30	0.379
DS18-0298	298	acgggtcactctgggagcgcc	697	ACGGUUCACUCUGGAGCGcg	1097	GCGCUCCAGAGUGAACCGUgc	1.25	0.322
DS18-0299	299	cacgggtcactctgggagcgcc	698	CACGGUUCACUCUGGAGCGcg	1098	CGUCCAGAGUGAACCGUGcg	0.74	-0.441
DS18-0300	300	ggcagggttcactctgggagcgcc	699	GCACGGUUCACUCUGGAGCGc	1099	GUCCAGAGUGAACCGUGCgu	1.06	0.084
DS18-0301	301	cggcagggttcactctgggagcgcc	700	CGCACGGUUCACUCUGGAGcg	1100	CUCCAGAGUGAACCGUGCGug	1.58	0.658
DS18-0302	302	acggcagggttcactctgggagcgcc	701	ACGCACGGUUCACUCUGGAGc	1101	UCCAGAGUGAACCGUGCGUgc	1.07	0.092
DS18-0303	303	cacggcagggttcactctgggagcgcc	702	CACGCACGGUUCACUCUGGag	1102	CCAGAGUGAACCGUGCGUgcc	1.08	0.111
DS18-0304	304	ggcagcgacgggttactctgggagcgcc	703	GCACGCACGGUUCACUCUGga	1103	CAGAGUGAACCGUGCGUGcg	1.42	0.510
DS18-0305	305	ggcagcgacgggttactctgggagcgcc	704	GGCACGCACGGUUCACUCUgg	1104	AGAGUGAACCGUGCGUGCCgg	2.08	1.059

[0370]

DS18-0306	306	gttcggtctccggactcc	705	GUUCGGUUCUCCGGACUCCCGg	1105	GGGAGUCCGGAGACCGAACca	1.02	0.024
DS18-0307	307	gggttcggtctccggactcc	706	GGUUCGGUUCUCCGGACUCCcg	1106	GGAGUCCGGAGACCGAACcag	1.03	0.037
DS18-0308	308	tgggttcggtctccggactc	707	UGGUUCGGUUCUCCGGACUCCc	1107	GAGUCCGGAGACCGAACcAga	1.23	0.299
DS18-0309	309	cgtgttcggtctccggactc	708	CUGGUUCGGUUCUCCGGACUcc	1108	AGUCCGGAGACCGAACcAGaa	0.90	-0.145
DS18-0310	310	tctgttcggtctccggactc	709	UCUGGUUCGGUUCUCCGGACuc	1109	GUCCGGAGACCGAACcAGAU	1.14	0.190
DS18-0311	311	tctgttcggtctccggactc	710	UUUGGUUCGGUUCUCCGGACu	1110	UCCGGAGACCGAACcAGAAug	1.12	0.162
DS18-0312	312	attctgttcggtctccggactc	711	AUUCUGGUUCGGUUCUCCGGac	1111	CCGGAGACCGAACcAGAAUgg	1.33	0.408
DS18-0313	313	cattctgttcggtctccggactc	712	CAUUCUGGUUCGGUUCUCCGga	1112	CGGAGACCGAACcAGAAUGga	1.75	0.808
DS18-0314	314	ccattctgttcggtctccggactc	713	CCAUCUGGUUCGGUUCUCCGgg	1113	GGAGACCGAACcAGAAUGGau	1.28	0.355
DS18-0315	315	tccattctgttcggtctccggactc	714	UCCAUCUGGUUCGGUUCUCCcg	1114	GAGACCGAACcAGAAUGGAug	1.33	0.414
DS18-0316	316	atccattctgttcggtctccggactc	715	AUCCAUCUGGUUCGGUUCUcc	1115	AGACCGAACcAGAAUGGAUgc	0.97	-0.038
DS18-0317	317	catccattctgttcggtctccggactc	716	CAUCCAUCUGGUUCGGUUCuc	1116	GACCGAACcAGAAUGGAUGcc	1.04	0.051
DS18-0318	318	gcatccattctgttcggtctccggactc	717	GCAUCCAUCUGGUUCGGUUCu	1117	ACCGAACcAGAAUGGAUGCcu	1.04	0.055
DS18-0319	319	ggcatccattctgttcggtctccggactc	718	GGCAUCCAUCUGGUUCGGUuc	1118	CCGAACcAGAAUGGAUGCCuc	0.95	-0.079
DS18-0320	320	aggcatccattctgttcggtctccggactc	719	AGGCAUCCAUCUGGUUCGGu	1119	CGAACcAGAAUGGAUGCCUcg	1.14	0.187
DS18-0321	321	gaggcatccattctgttcggtctccggactc	720	GAGGCAUCCAUCUGGUUCGg	1120	GAACcAGAAUGGAUGCCUCga	1.42	0.510
DS18-0322	322	caggaggcatccattctgttcggtctccggactc	721	CGAGGCAUCCAUCUGGUUCg	1121	AACcAGAAUGGAUGCCUCGag	1.08	0.108
DS18-0323	323	tcgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	722	UCGAGGCAUCCAUCUGGUUc	1122	ACCAGAAUGGAUGCCUCGAgc	1.64	0.710
DS18-0324	324	cicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	723	CUCGAGGCAUCCAUCUGGUu	1123	CCAGAAUGGAUGCCUCGAGca	1.72	0.783
DS18-0325	325	gcicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	724	GCUCGAGGCAUCCAUCUGGu	1124	CAGAAUGGAUGCCUCGAGCag	1.25	0.325
DS18-0326	326	tgcicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	725	UGCUCGAGGCAUCCAUCUg	1125	AGAAUGGAUGCCUCGAGCAga	1.00	-0.004
DS18-0327	327	c'igcicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	726	CUCUCGAGGCAUCCAUCUc	1126	GAAUGGAUGCCUCGAGCAGac	1.14	0.191
DS18-0328	328	tctgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	727	UCUGCUCGAGGCAUCCAUCu	1127	AAUGGAUGCCUCGAGCAGACA	1.29	0.363
DS18-0329	329	gtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	728	GUCUGCUCGAGGCAUCCAUnc	1128	AUGGAUGCCUCGAGCAGACac	1.51	0.591
DS18-0330	330	tgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	729	UGUCUGCUCGAGGCAUCCAU	1129	UGGAUGCCUCGAGCAGACACA	0.79	-0.347
DS18-0331	331	gtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	730	GUGUCUGCUCGAGGCAUCCau	1130	GGAUGCCUCGAGCAGACACaa	1.08	0.116
DS18-0332	332	tgtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	731	UGUGUCUGCUCGAGGCAUCea	1131	GAUGCCUCGAGCAGACACAAu	1.59	0.670
DS18-0333	333	tgtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	732	UUUGUCUGCUCGAGGCAUcc	1132	AUGCCUCGAGCAGACACAAuu	1.94	0.955
DS18-0334	334	attgtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	733	AUUGUCUGCUCGAGGCAuc	1133	UGCCUCGAGCAGACACAAUuc	1.31	0.392
DS18-0335	335	aattgtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	734	AAUUGUCUGCUCGAGGCAu	1134	GCCUCGAGCAGACACAAUucc	1.24	0.306
DS18-0336	336	gaattgtgtcicgicgaggaggcatccattctgttcggtctccggactc	735	GAAUUGUCUGCUCGAGGGea	1135	CCUCGAGCAGACACAAUucc	0.73	-0.454

[0371]

DS18-0337	337	gggaattgtgtctgtctcgag	736	GGAAUUGUGUCUGUCGAGgc	1136	CUCGAGCAGACACAAUUCc	0.58	-0.775
DS18-0338	338	gggaattgtgtctgtctcga	737	GGGAUUUGUGUCUCGAGgg	1137	UCGAGCAGACACAAUUCcCcu	1.01	0.010
DS18-0339	339	gggggaattgtgtctgtctcg	738	GGGGAUUUGUGUCUCGAGg	1138	CGAGCAGACACAAUUCcCcuuu	1.09	0.122
DS18-0340	340	aggggaattgtgtctgtctc	739	AGGGGAUUUGUGUCUCGga	1139	GAGCAGACACAAUUCcCcuua	0.83	-0.271
DS18-0341	341	aaggggaattgtgtctgtct	740	AAGGGGAUUUGUGUCUCg	1140	AGCAGACACAAUUCcCcuUau	0.77	-0.386
DS18-0342	342	taaggggaattgtgtctgtc	741	UAAAGGGGAUUUGUCUCGuc	1141	GCAGACACAAUUCcCcuUAuu	0.91	-0.139
DS18-0343	343	ataaggggaattgtgtctgt	742	AUAAGGGGAUUUGUCUCGcu	1142	CAGACACAAUUCcCcuUAUuc	1.48	0.567
DS18-0344	344	aataaggggaattgtgtct	743	AAUAAGGGGAUUUGUCUCgc	1143	AGACACAAUUCcCcuUAUuca	1.62	0.699
DS18-0345	345	gaataaggggaattgtgtct	744	GAAUAAGGGGAUUUGUCUG	1144	GACACAAUUCcCcuUAUUCag	1.34	0.419
DS18-0346	346	tgaataaggggaattgtgt	745	UGAAUAAGGGGAUUUGUGUcu	1145	ACACAAUUCcCcuUAUUCAGa	1.07	0.094
DS18-0347	347	ctgaataaggggaattgtgt	746	CUGAAUAAGGGGAUUUGUGuc	1146	CACAAUUCcCcuUAUUCAGau	1.44	0.526
DS18-0348	348	tctgaataaggggaattgt	747	UCUGAAUAAGGGGAUUUGUGu	1147	ACAAUUCcCcuUAUUCAGAu	1.16	0.211
DS18-0349	349	atctgaataaggggaattgt	748	AUCUGAAUAAGGGGAUUUGug	1148	CAAUUCcCcuUAUUCAGAUua	1.27	0.340
DS18-0350	350	gataatctgaataagggga	749	GAUAUCUGAAUAAGGGGAuu	1149	UCCCUUAUUCAGAUUAUUCcg	1.18	0.234
DS18-0351	351	ggataatctgaataaggggg	750	GGAAUAUCUGAAUAAGGGGaa	1150	CCCUUAUUCAGAUUAUUCGga	1.08	0.104
DS18-0352	352	cggataatctgaataagggg	751	CGGAUAUCUGAAUAAGGGGga	1151	CCCUUAUUCAGAUUAUUCGgaa	1.13	0.180
DS18-0353	353	tcggataatctgaataaggg	752	UCGGAUAUCUGAAUAAGGGgg	1152	CCUUAUUCAGAUUAUUCGGAaa	1.09	0.124
DS18-0354	354	cacatttctgaataatctgt	753	CACAUUUUCGGAUUAUUCUGaa	1153	CAGAUUAUUCGGAUUAUUGGag	1.52	0.604
DS18-0355	355	ctcacatttctgaataatc	754	CUCACAUUUUCGGAUUAUUCug	1154	GAUUAUUCGGAUUAUUGUGAGuc	1.46	0.544
DS18-0356	356	gactcacatttctggataa	755	GACUCACAUUUUCGGAUUAuc	1155	UUAUUCGGAUUAUUGUGAGUCac	0.83	-0.275
DS18-0357	357	tgaactcacatttctggata	756	UGACUCACAUUUUCGGAUUAu	1156	UAUCCGGAUUAUUGUGAGUCAg	1.17	0.233
DS18-0358	358	gfgactcacatttctggat	757	GUGACUCACAUUUUCGGAUaa	1157	AUCCGGAUUAUUGUGAGUCAGu	1.13	0.177
DS18-0359	359	cggactcacatttctggga	758	CGUGACUCACAUUUUCGGAua	1158	UCCGGAUUAUUGUGAGUCACGuc	0.87	-0.203
DS18-0360	360	acgfgactcacatttctgg	759	ACGUGACUCACAUUUUCGGau	1159	CCGAAAUUGUGAGUCACGUcc	0.63	-0.664
DS18-0361	361	gacgfgactcacatttctg	760	GACGUGACUCACAUUUUCGga	1160	CGAAAUUGUGAGUCACGUCCc	0.90	-0.148
DS18-0362	362	ggacgfgactcacatttct	761	GGACGUGACUCACAUUUUCgg	1161	GAAAUUGUGAGUCACGUCCc	1.36	0.448
DS18-0363	363	ggggacgfgactcacattt	762	GGGACGUGACUCACAUUUUeg	1162	AAAAUGUGAGUCACGUCCcCu	1.36	0.439
DS18-0364	364	ggggacgfgactcacattt	763	GGGACGUGACUCACAUUUuc	1163	AAAUUGUGAGUCACGUCCcCuu	0.91	-0.132
DS18-0365	365	aggggacgfgactcacatt	764	AGGGACGUGACUCACAUUuu	1164	AAUGUGAGUCACGUCCcCuuua	0.73	-0.463
DS18-0366	366	aaggggacgfgactcacat	765	AAGGGACGUGACUCACAUuu	1165	AUGUGAGUCACGUCCcCuuag	0.18	-2.438
DS18-0367	367	taaggggacgfgactcaca	766	UAAGGGGACGUGACUCACAu	1166	UGUGAGUCACGUCCcCuuAagg	0.80	-0.326

[0372]

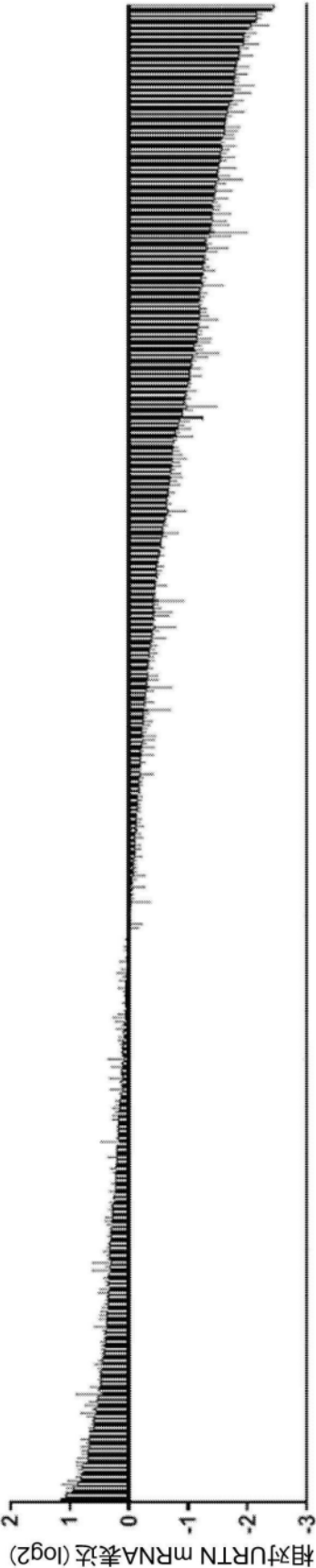
DS18-0368	368	ctaaggagacgtgactcac	767	CUAAGGGGACGUGACUCACau	1167	GUGAGUCACGUCCCCUUAAGgc	1.26	0.339
DS18-0369	369	cctaaggagacgtgactca	768	CCUAAGGGGACGUGACUCa	1168	UGAGUCACGUCCCCUUAAGGca	0.85	-0.226
DS18-0370	370	gcciaaggagacgtgacac	769	GCCUAAGGGGACGUGACUCac	1169	GAGUCACGUCCCCUUAAGGCa	1.19	0.251
DS18-0371	371	tgcciaaggagacgtgact	770	UGCCUAAGGGGACGUGACUca	1170	AGUCACGUCCCCUUAAGGCAaa	1.18	0.234
DS18-0372	372	ttgcciaaggagacgtgac	771	UUGCCUAAGGGGACGUGACuc	1171	GUCACGUCCCCUUAAGGCAAAa	1.27	0.350
DS18-0373	373	tttgcciaaggagacgtg	772	UUUGCCUAAGGGGACGUGA	1172	UCACGUCCCCUUAAGGCAAAac	1.72	0.784
DS18-0374	374	ttttgcciaaggagacgtg	773	UUUUGCCUAAGGGGACGUGac	1173	CACGUCCCCUUAAGGCAAAa	2.19	1.130
DS18-0375	375	gttttgcciaaggagacgt	774	GUUUUGCCUAAGGGGACGUGa	1174	ACGUCCCCUUAAGGCAAAACag	1.39	0.473
DS18-0376	376	tgttttgcciaaggagacg	775	UGUUUUGCCUAAGGGGACGug	1175	CGUCCCCUUAAGGCAAAACAGg	1.86	0.892
DS18-0377	377	ctgttttgcciaaggagac	776	CUGUUUUGCCUAAGGGGACGu	1176	GUCUCCCCUUAAGGCAAAACAGgu	1.21	0.277
DS18-0378	378	ccgttttgcciaaggag	777	CCUGUUUUGCCUAAGGGGACg	1177	UCCUCCCCUUAAGGCAAAACAGGuc	1.13	0.177
DS18-0379	379	acctgttttgcciaaggag	778	ACCUUUUUUGCCUAAGGGGac	1178	CCCCUUAAGGCAAAACAGGUcu	1.32	0.398
DS18-0380	380	gacctgttttgcciaagg	779	GACCUUUUUUGCCUAAGGGga	1179	CCCUUAAGGCAAAACAGGUcuc	1.21	0.274
DS18-0381	381	agacctgttttgcciaagg	780	AGACCUUUUUUGCCUAAGGGg	1180	CCUUAAGGCAAAACAGGUcUcu	0.90	-0.151
DS18-0382	382	gagacctgttttgcciaag	781	GAGACCUUUUUUGCCUAAGGg	1181	CUUAAGGCAAAACAGGUcUCua	1.27	0.341
DS18-0383	383	agagacctgttttgcciaa	782	AGAGACCUUUUUUGCCUAAGg	1182	UUAGGCAAAACAGGUcUCUag	1.22	0.292
DS18-0384	384	tagagacctgttttgccia	783	UAGAGACCUUUUUUGCCUAag	1183	UAGGCAAAACAGGUcUCUAgu	1.19	0.248
DS18-0385	385	ctagagacctgttttgcc	784	CUAGAGACCUUUUUUGCCUaa	1184	AGGCAAAACAGGUcUCUAguu	0.79	-0.331
DS18-0386	386	actagagacctgttttgcc	785	ACUAGAGACCUUUUUUGCCua	1185	GGCAAAACAGGUcUCUAguua	0.79	-0.338
DS18-0387	387	aactagagacctgttttgc	786	AACUAGAGACCUUUUUUGCeu	1186	GCAAAACAGGUcUCUAguUag	0.75	-0.411
DS18-0388	388	taactagagacctgttttgc	787	UAACUAGAGACCUUUUUUGcc	1187	CAAAACAGGUcUCUAguUAgg	0.88	-0.187
DS18-0389	389	ctaactagagacctgtttt	788	CUAACUAGAGACCUUUUUUgc	1188	AAACAGGUcUCUAguUUAagg	1.10	0.133
DS18-0390	390	cctaactagagacctgttt	789	CCUAACUAGAGACCUUUUUug	1189	AAACAGGUcUCUAguUAAGgu	0.94	-0.094
DS18-0391	391	ccctaactagagacctgtt	790	CCCUAACUAGAGACCUUUuuu	1190	AACAGGUcUCUAguUAAGGgu	0.68	-0.555
DS18-0392	392	accctaactagagacctgt	791	ACCUAACUAGAGACCUUUuu	1191	ACAGGUcUCUAguUAAGGUga	0.84	-0.247
DS18-0393	393	caccttaactagagacctgc	792	CACCUAACUAGAGACCUGuu	1192	CAGGUcUCUAguUAAGGUgAu	0.87	-0.201
DS18-0394	394	tcaccttaactagagacct	793	UCACCUAACUAGAGACCUgu	1193	AGGUcUCUAguUAAGGUgAua	1.01	0.008
DS18-0395	395	atcacctaactagagacct	794	AUCACCUAACUAGAGACCUg	1194	GGUcUCUAguUAAGGUgAUau	0.76	-0.404
DS18-0396	396	taacaccttaactagagac	795	UAUCACCUAACUAGAGACcu	1195	GUCUcUAguUAAGGUgAUuu	0.74	-0.433
DS18-0397	397	atacacctaactagagaga	796	AUAUCACCUAACUAGAGAcc	1196	UCUcUAguUAAGGUgAUUuu	0.99	-0.018
DS18-0398	398	aatacacctaactagagag	797	AAUAUCACCUAACUAGAGac	1197	CUCUcUAguUAAGGUgAUUuu	1.09	0.125

[0373]

RAG18-si8	399	actactgagtacagtaga	798	GGUUGCUGAUGUCCUUAGATT	1198	UCUAAGGACAUCAGCAACCTT	0.09	-3.511
dsCon2		非特异性双链体对照	799	ACUACUGAGUGACAGUAGATT	1199	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT	1.04	0.057

注：靶序列与鉴定的正义序列相同，但核苷酸“U”转换为“T”，不包括选自或互补于 DNA 靶标上的相应核苷酸的 2-nt 核苷酸自然突出端。DS18-si8 是沉默 dsRNA 对照。

RD细胞中筛选dsDNA活性
(第3天)



dsRNA (25 nM, n=398, 通过活性分选)

图1

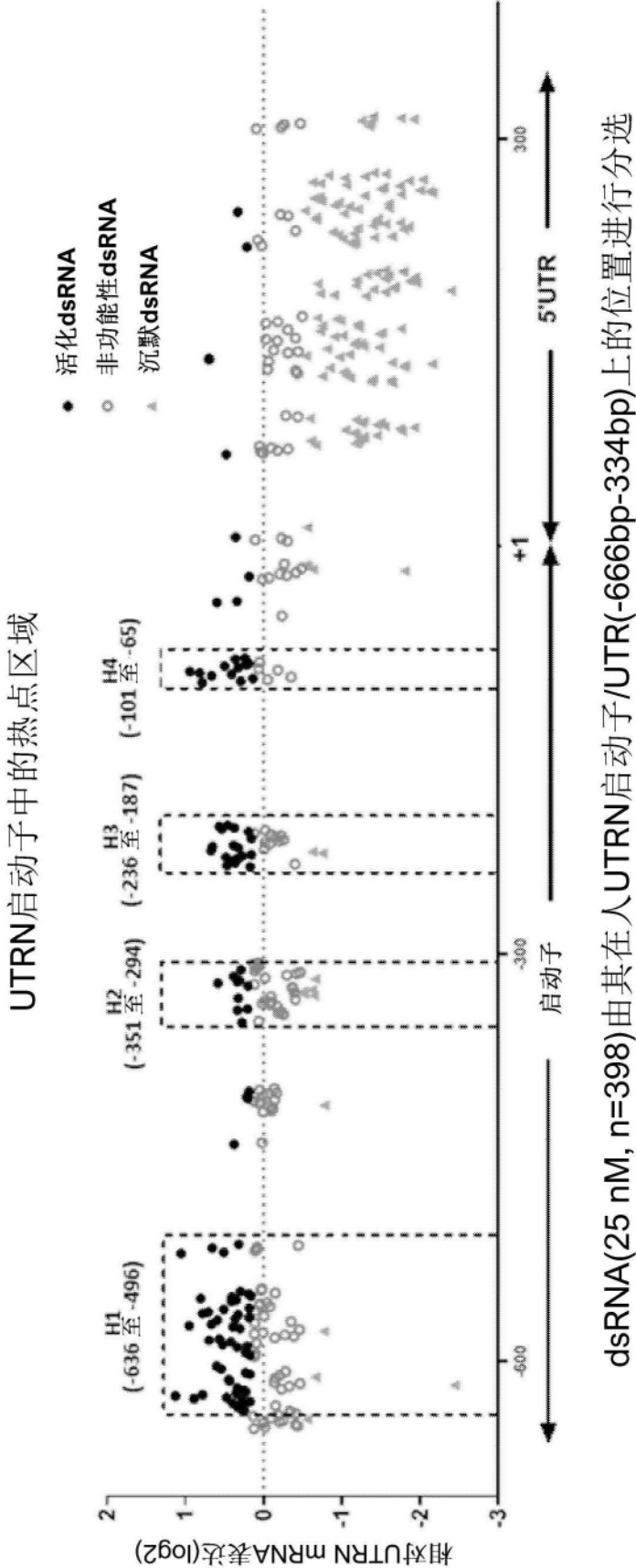


图2

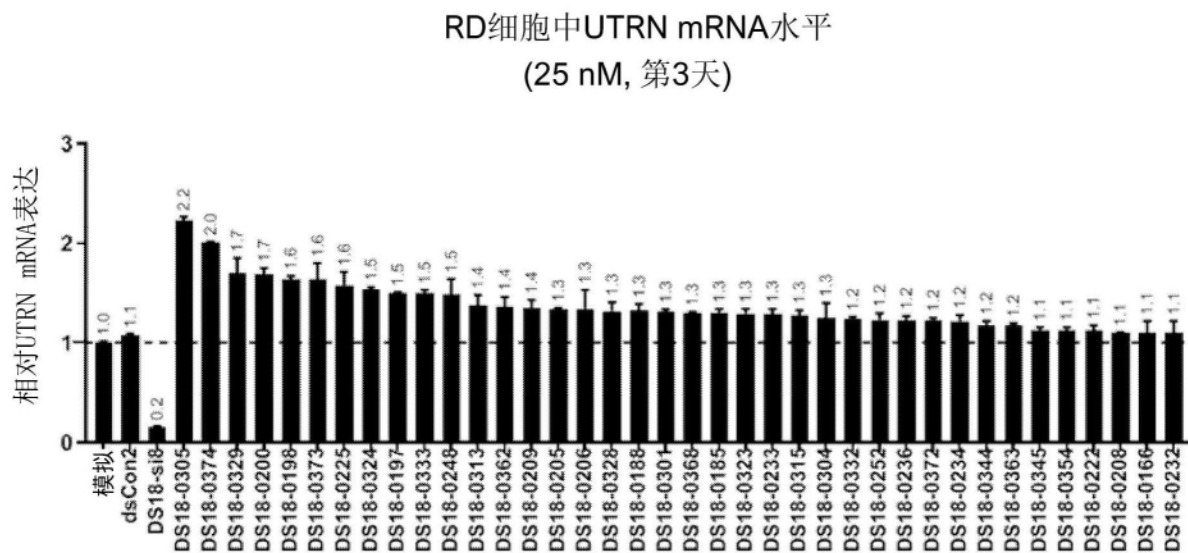


图3

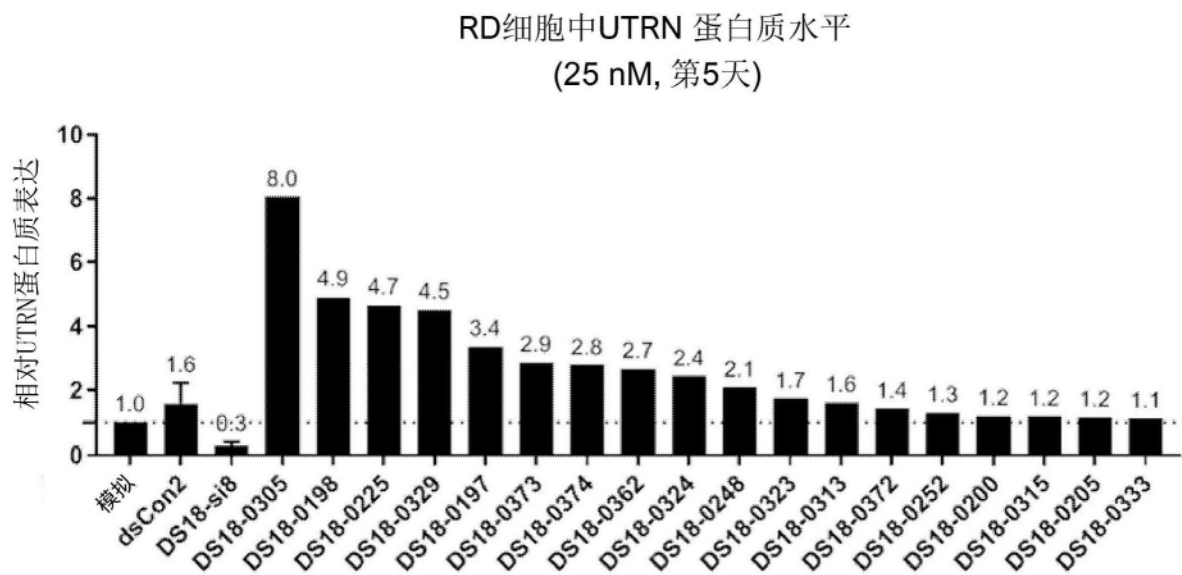


图4

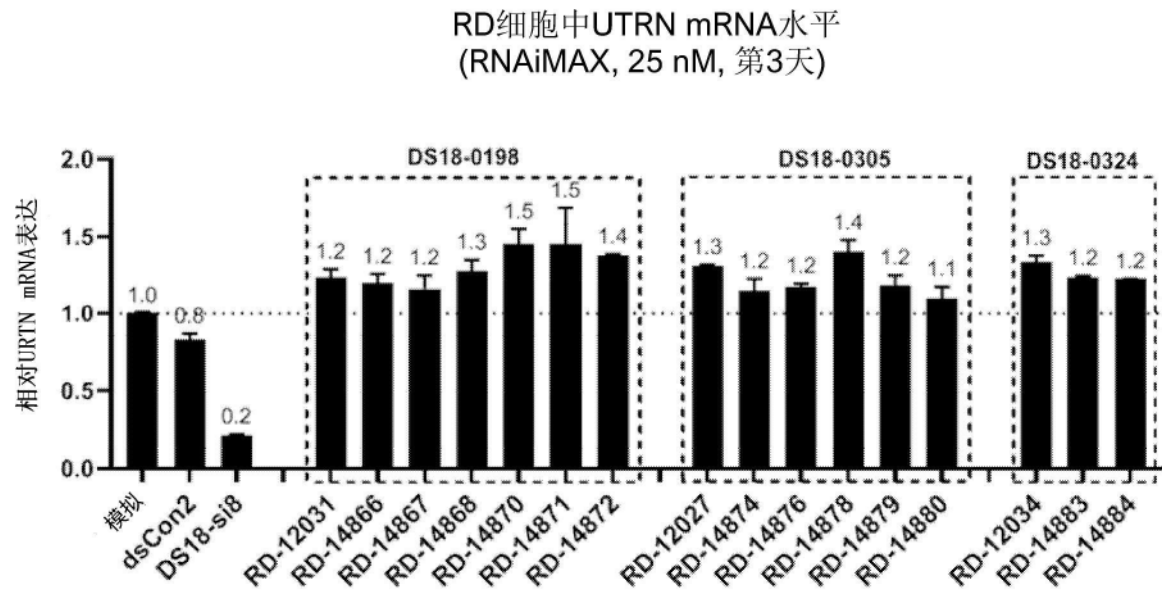


图5

图 6A

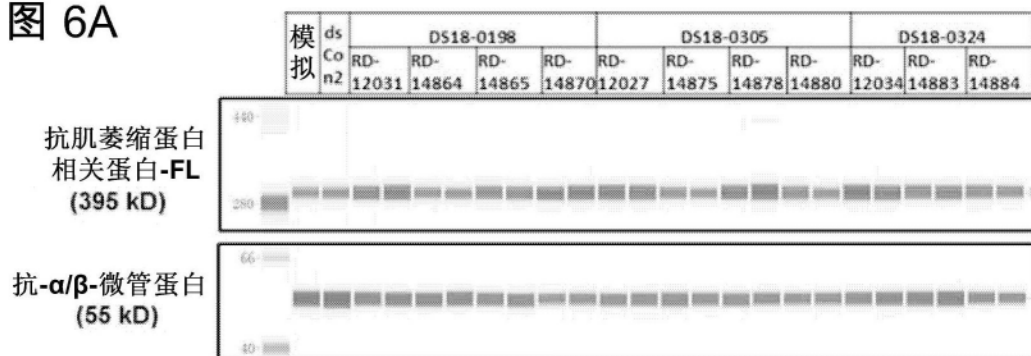


图 6B

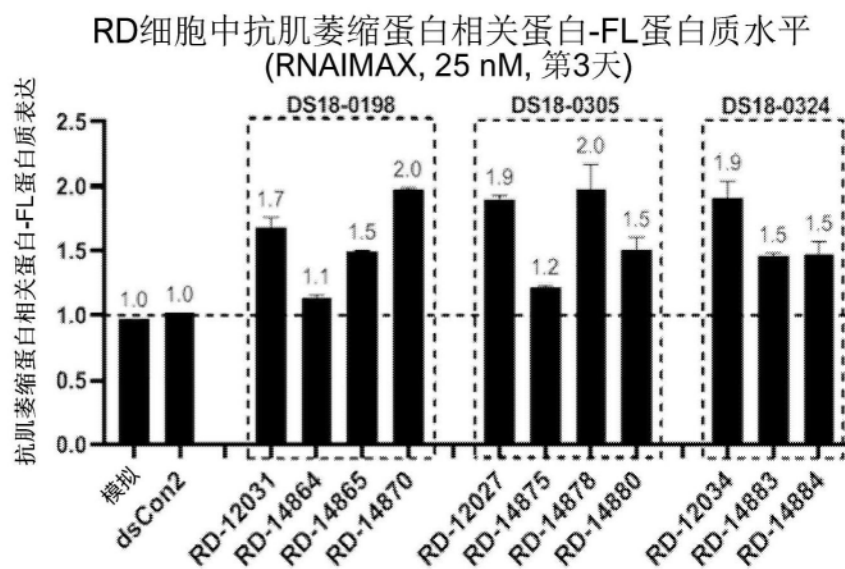


图6