



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110832077 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 03

(21) 申请号 201880045293.1

(22) 申请日 2018.07.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110832077 A

(43) 申请公布日 2020.02.21

(30) 优先权数据
62/529132 2017.07.06 US
62/631683 2018.02.17 US
62/679549 2018.06.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/040874 2018.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/010274 EN 2019.01.10

(73) 专利权人 箭头药业股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李珍 朱锐 裴涛 A.尼古拉斯
E.W.布什

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
专利代理师 初明明 彭昶

(51) Int.Cl.
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2006.01)

(56) 对比文件
Kenneth L Clark 等.Pharmacological
Characterization of a Novel ENaC α siRNA
(GSK2225745) With Potential for the
Treatment of Cystic Fibrosis.Molecular
Therapy-Nucleic Acids.2013,第2卷全文.

审查员 蒙洋

权利要求书9页 说明书76页
序列表58页 附图35页

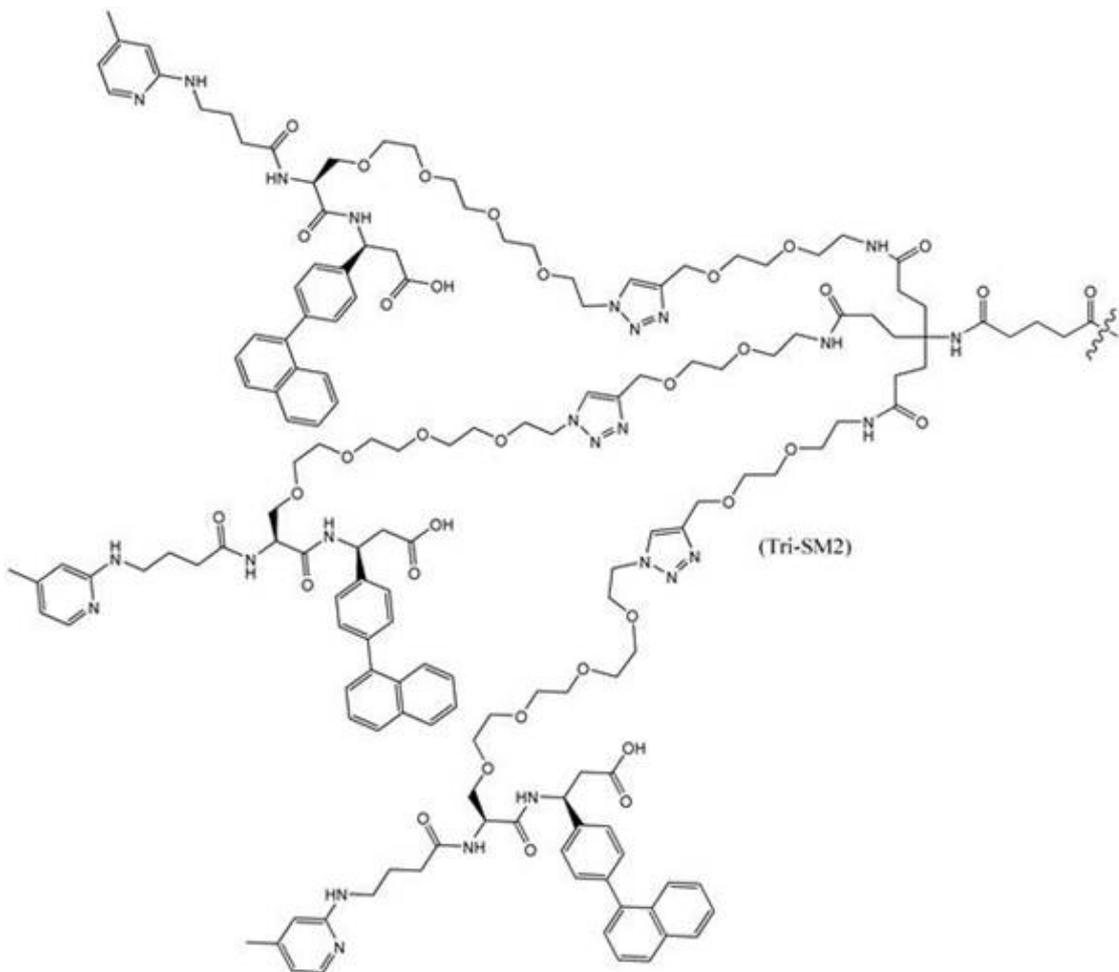
(54) 发明名称

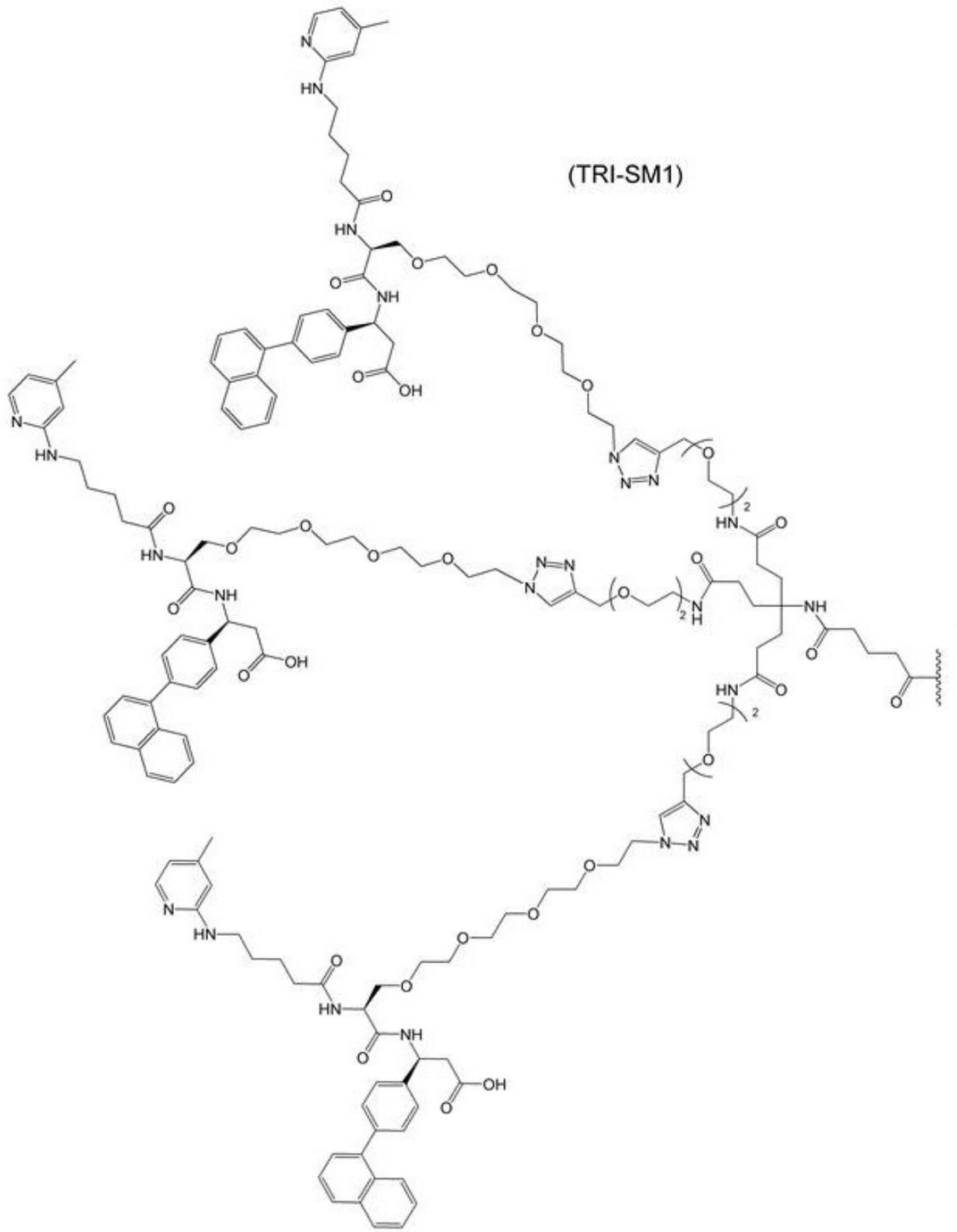
用于抑制 α -ENaC表达的RNAi剂及使用方法

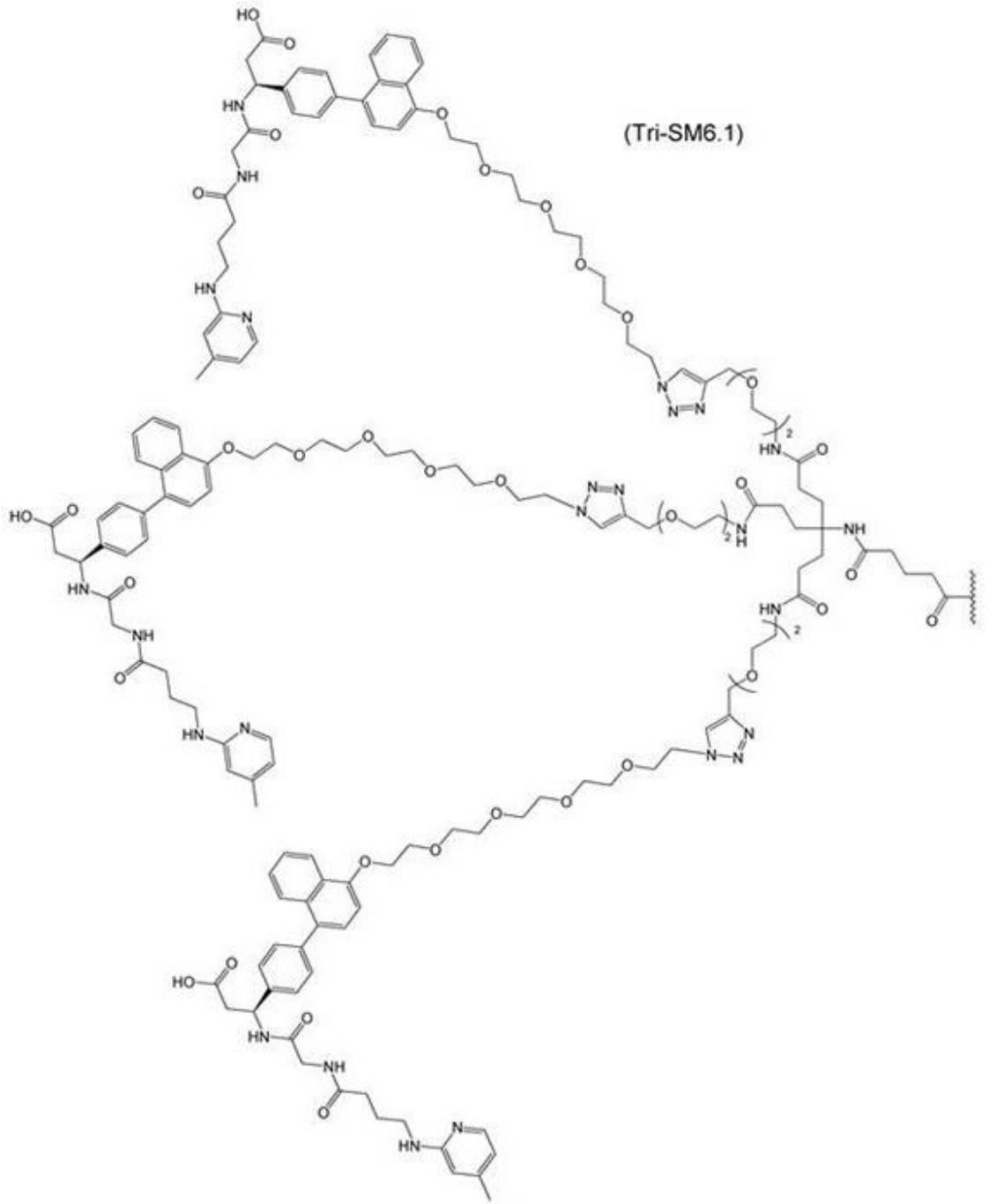
(57) 摘要

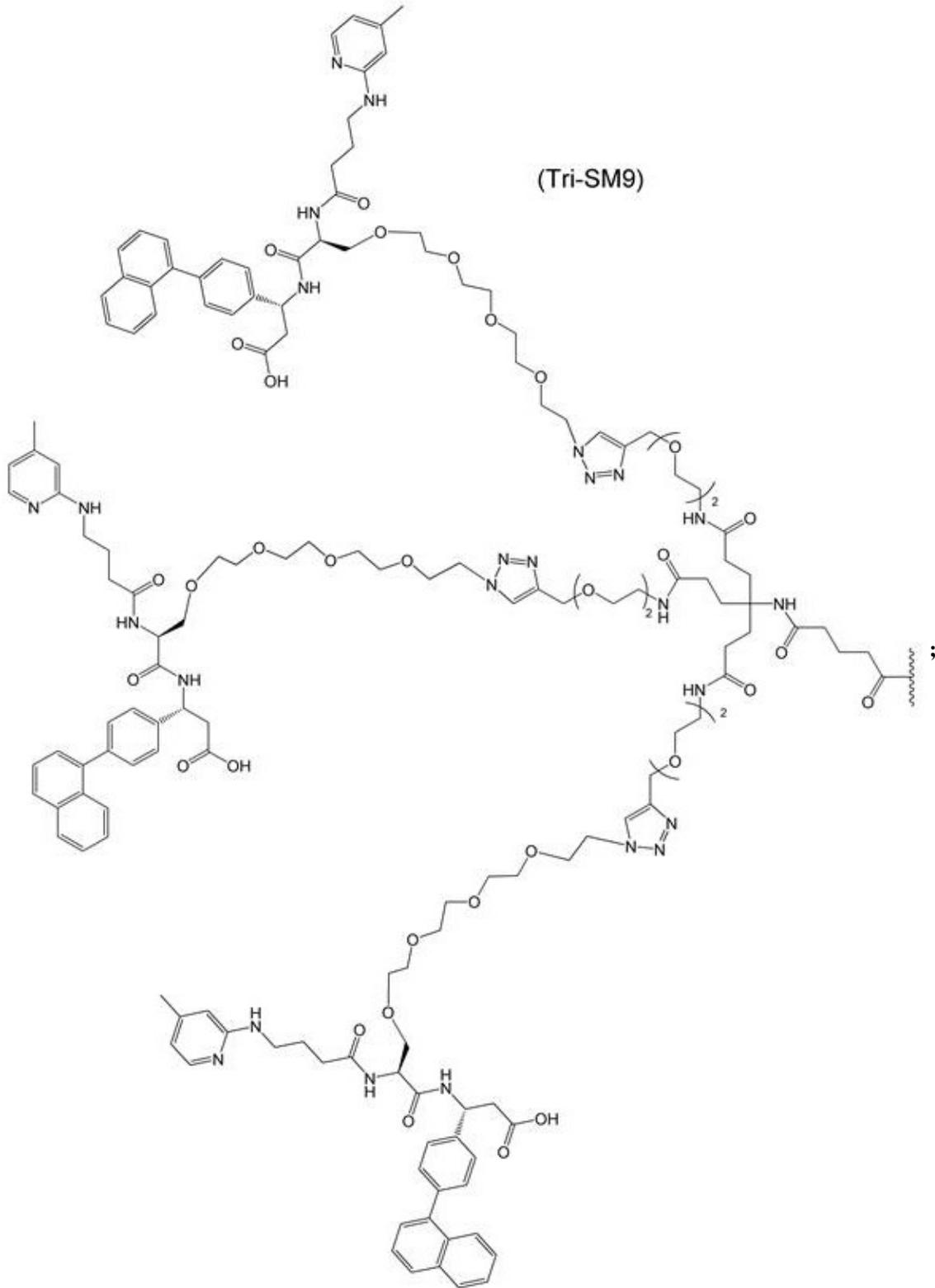
描述了RNAi剂、包含RNAi剂的组合物以及用于抑制 α -ENaC (SCNN1A) 基因的方法。本文公开的 α -ENaC RNAi剂和RNAi剂缀合物抑制 α -ENaC 基因的表达。还描述了包含任选地与一种或多种另外的治疗剂一起的一种或多种 α -ENaC RNAi剂的药用组合物。将所述 α -ENaC RNAi剂体内递送至上皮细胞(比如肺上皮细胞)提供对 α -ENaC 基因表达的抑制和ENaC活性的降低,这可对受试者(包括人类受试者)提供治疗益处。

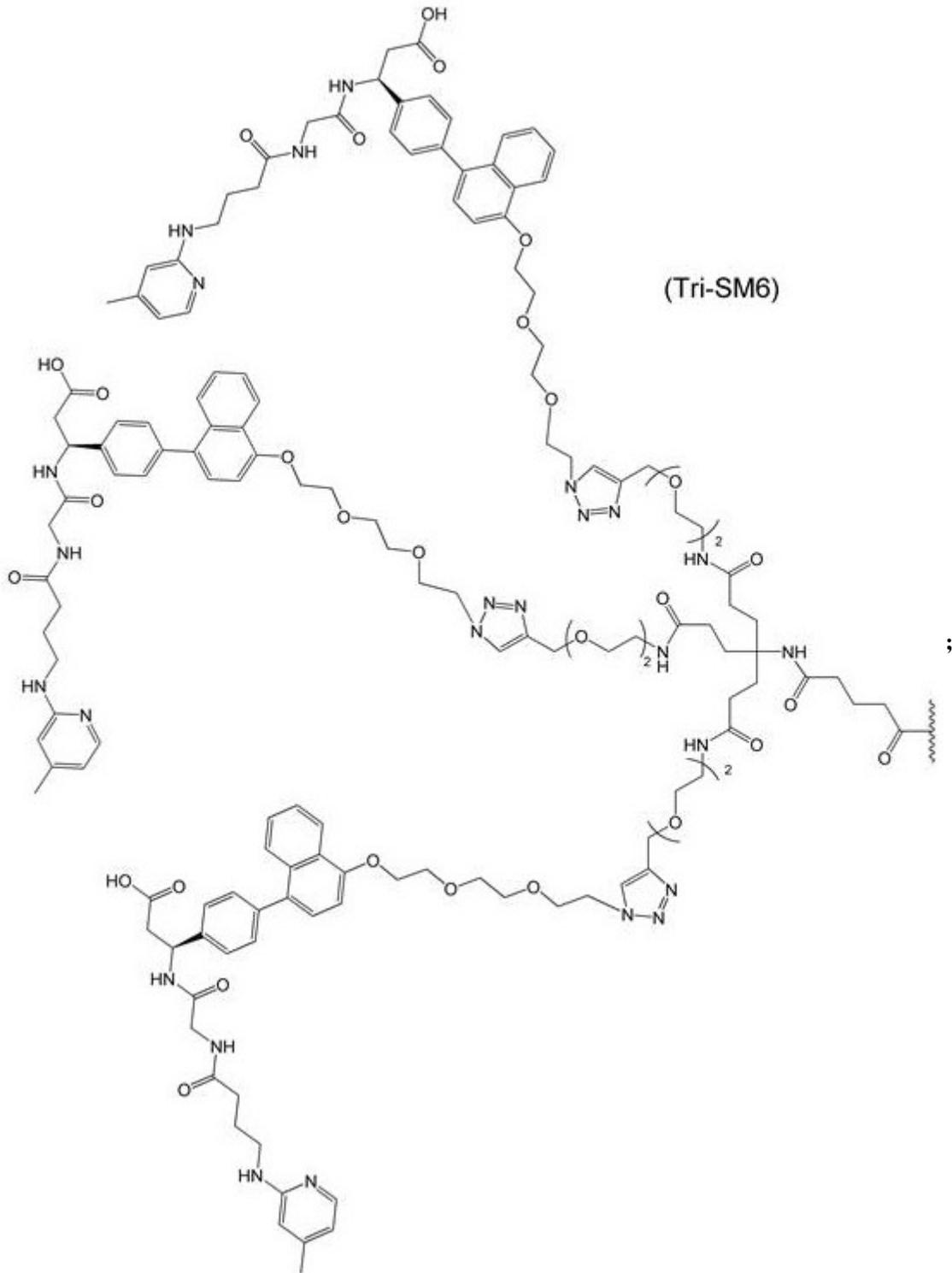
1. 一种用于抑制 α -ENaC基因表达的RNAi剂,其包含:
反义链,其由核苷酸序列UAAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3) 或UAAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 组成;和
有义链,其包含与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列,
其中所述 α -ENaC RNAi剂的至少一个核苷酸为修饰核苷酸或包含修饰的核苷间连接,
其中所述修饰核苷酸选自:2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2',3'-裂环核苷酸模拟物、锁定核苷酸、2'-F-阿糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、核糖醇、倒置的核苷酸、倒置的2'-O-甲基核苷酸、倒置的2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉代核苷酸、乙烯基磷酸酯脱氧核糖核苷酸和3'-O-甲基核苷酸。
2. 权利要求1的RNAi剂,其中所述RNAi剂连接于靶向配体。
3. 权利要求2的RNAi剂,其中所述靶向配体是整联蛋白靶向配体。
4. 权利要求3的RNAi剂,其中所述整联蛋白靶向配体为 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体。
5. 权利要求4的RNAi剂,其中所述 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体具有以下任何一个结构表示的结构:

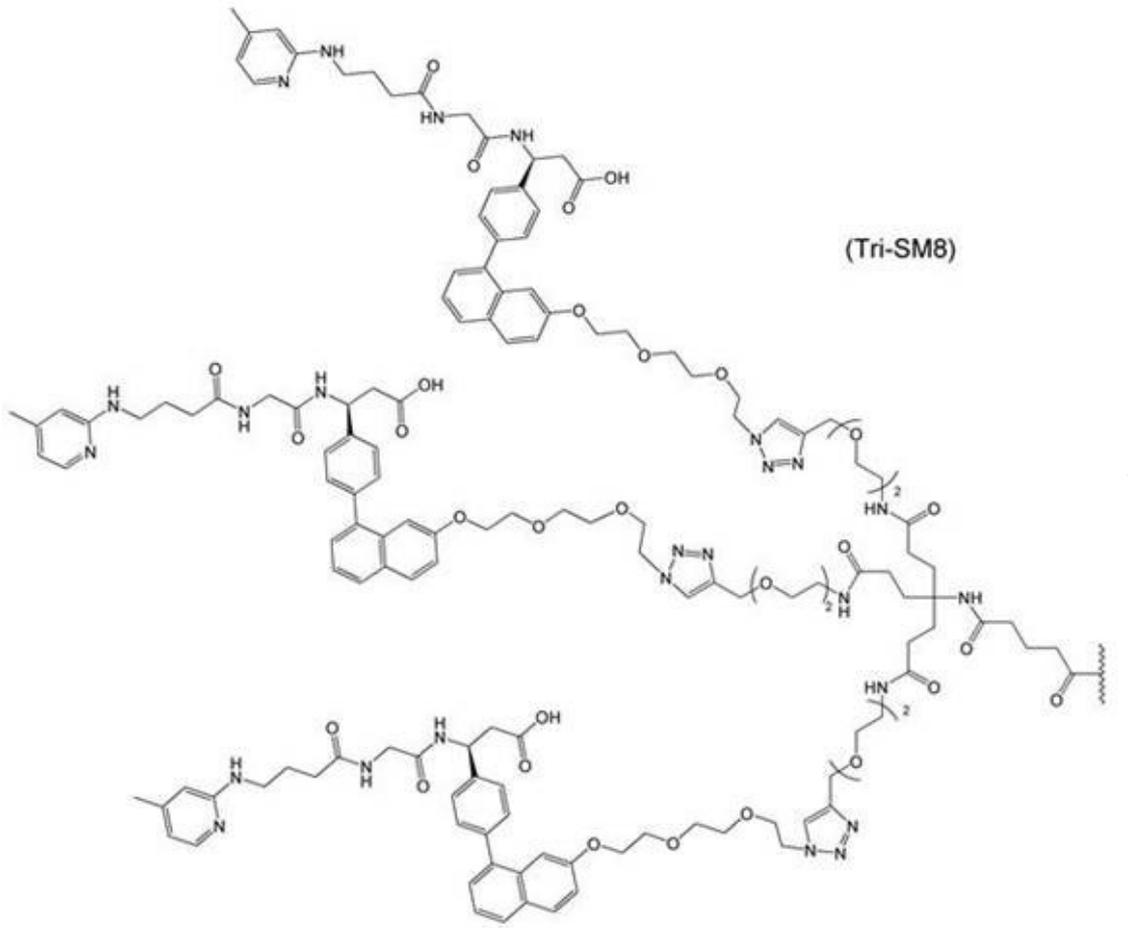




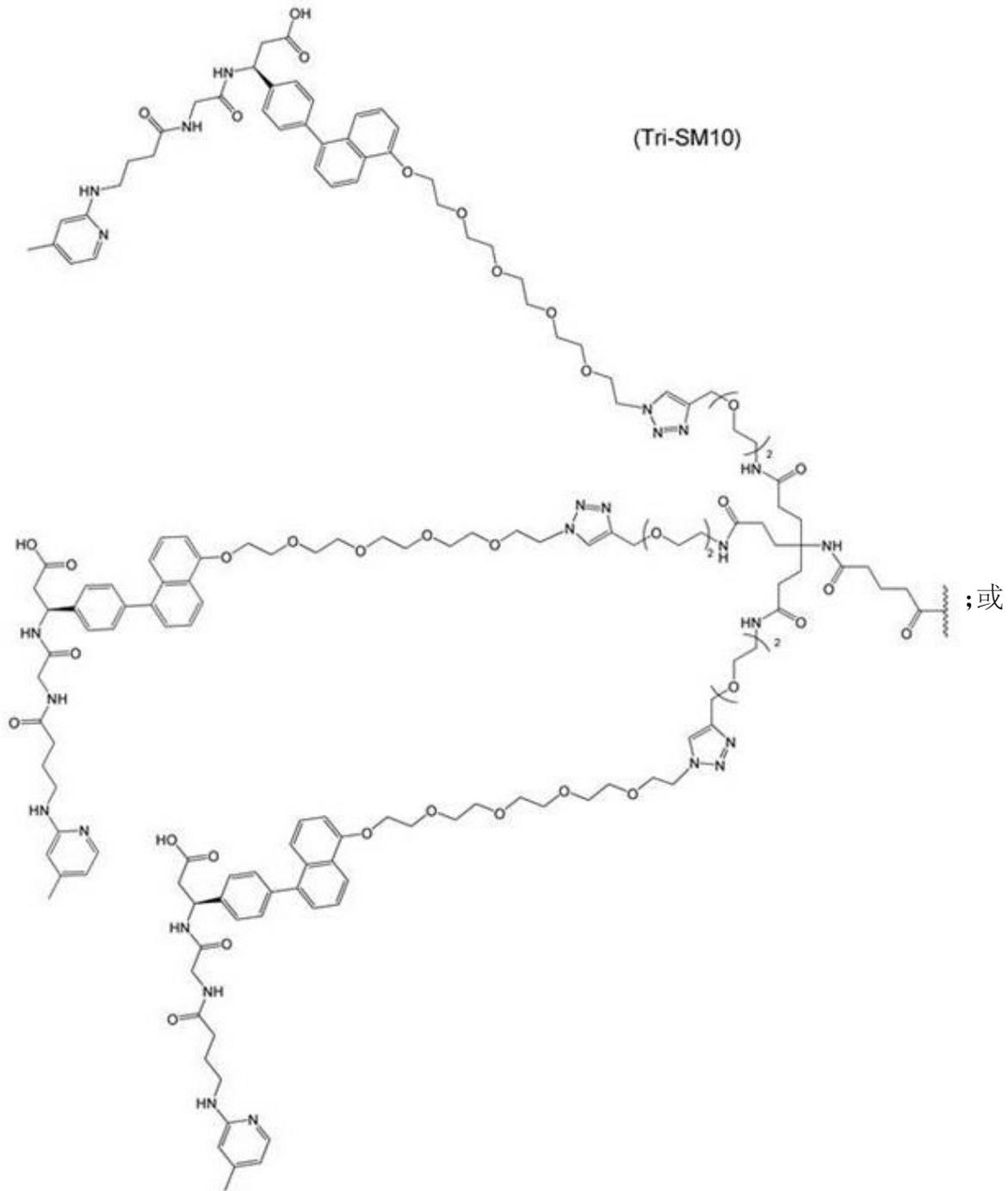


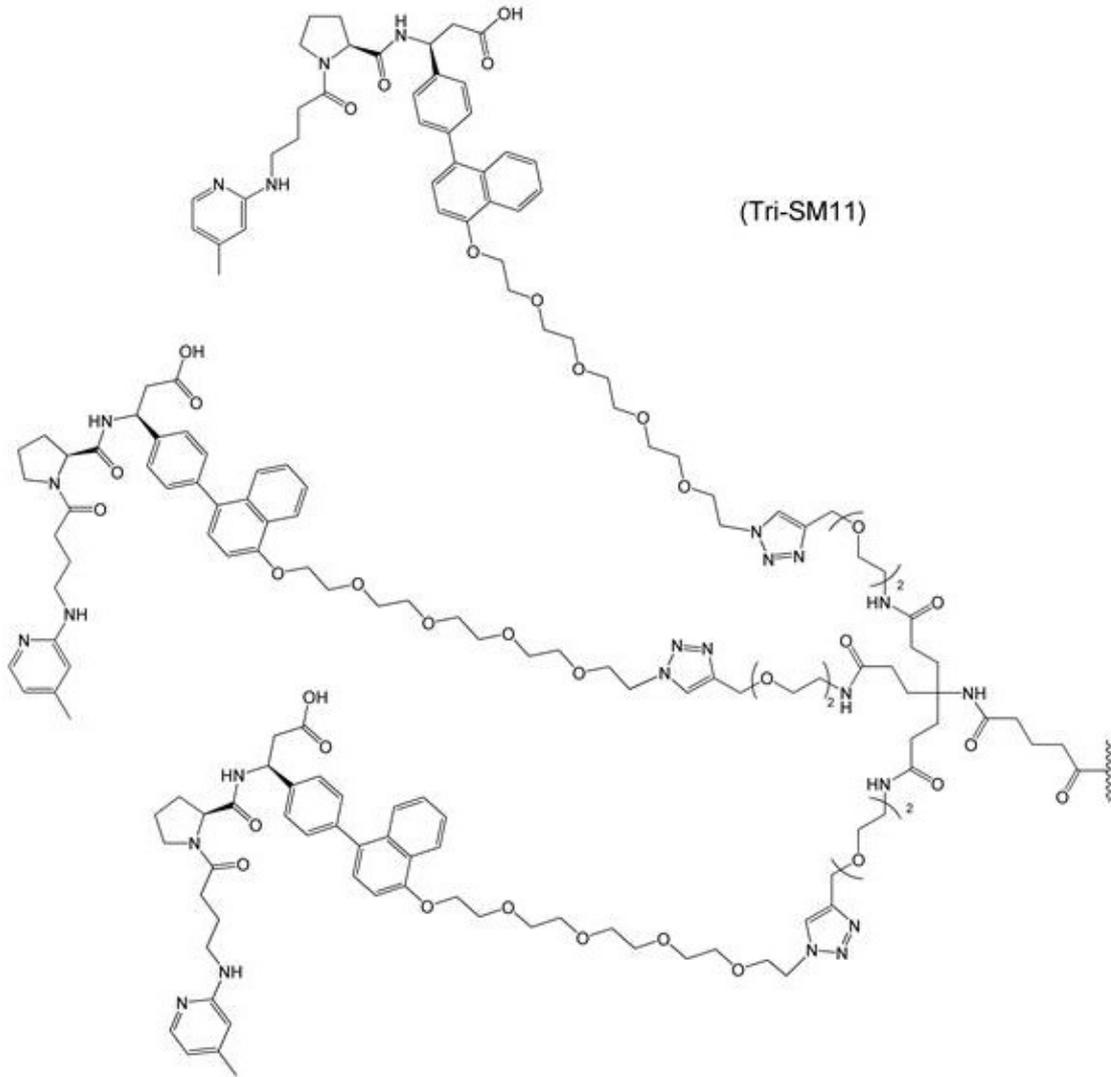






;





6. 权利要求2-5中任何一项的RNAi剂,其中所述靶向配体缀合于有义链。
7. 权利要求6的RNAi剂,其中所述靶向配体缀合于所述有义链的5'末端。
8. 权利要求1-7中任何一项的RNAi剂,其中所述有义链的长度在18-30个核苷酸之间。
9. 权利要求8的RNAi剂,其中所述有义链的长度在18-27个核苷酸之间。
10. 权利要求9的RNAi剂,其中所述有义链的长度在18-24个核苷酸之间。
11. 权利要求10的RNAi剂,其中所述有义链的长度为21个核苷酸。
12. 权利要求11的RNAi剂,其中所述RNAi剂具有两个平末端。
13. 权利要求1-12中任何一项的RNAi剂,其中所述有义链具有一个或两个末端帽。
14. 权利要求1-13中任何一项的RNAi剂,其中所述有义链具有一个或两个倒置的脱碱基残基。
15. 权利要求1的RNAi剂,其中所述反义链是来自以下核苷酸序列(5' → 3')之一的修饰核苷酸序列:

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2);

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6);或

cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10);

其中a代表2'-O-甲基腺苷,c代表2'-O-甲基胞苷,g代表2'-O-甲基鸟苷和u代表2'-O-

甲基尿苷;Af代表2'-氟腺苷,Cf代表2'-氟胞苷,Gf代表2'-氟鸟苷和Uf代表2'-氟尿苷;s代表硫代磷酸酯连接,cPrpu代表5'-环丙基膦酸酯-2'-0-甲基尿苷;和其中所述有义链上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸。

16. 权利要求15的RNAi剂,其中所述有义链在3'末端进一步包含脱碱基残基。

17. 权利要求1的RNAi剂,其中所述RNAi剂包含反义链和有义链,其中所述反义链和所述有义链是选自以下的核苷酸序列对:SEQ ID NO: 2和4;SEQ ID NO: 3和5;SEQ ID NO: 6和8;SEQ ID NO: 7和9;以及SEQ ID NO: 10和4。

18. 权利要求1的RNAi剂,其中所述RNAi剂具有选自以下的双链体结构:AD05453 (SEQ ID NOs: 2/178)、AD05625 (SEQ ID NOs: 6/156)、AD05347 (SEQ ID NOs: 10/178)、AD048355 (SEQ ID NOs: 121/154)和AD05924 (SEQ ID NOs: 2/223)。

19. 权利要求1的RNAi剂,其中所述反义链和有义链由以下核苷酸序列(5' → 3')对之一组成、基本上由以下核苷酸序列(5' → 3')对之一组成或包含以下核苷酸序列(5' → 3')对之一:

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3)和CCUGUGCAACCAGAACAAUA (SEQ ID NO:5);
或

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7)和GCUGUGCAACCAGAACAAUA (SEQ ID NO:9)。

20. 权利要求19的RNAi剂,其中所有或基本上所有所述核苷酸为修饰核苷酸。

21. 权利要求15-20中任何一项的RNAi剂,其中所述RNAi剂的有义链连接于靶向配体。

22. 权利要求21的RNAi剂,其中所述靶向配体对在上皮细胞上表达的细胞受体具有亲和力和。

23. 权利要求21-22中任何一项的RNAi剂,其中所述靶向配体为 α v β 6整联蛋白靶向配体。

24. 一种包含权利要求1-23中任何一项的RNAi剂的组合物,其中所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

25. 权利要求24的组合物,其进一步包含用于抑制 α -ENaC表达的第二RNAi剂。

26. 权利要求24-25中任何一项的组合物,其进一步包含一种或多种另外的治疗剂。

27. 权利要求26的组合物,其中所述组合物被配制用于通过吸入给予。

28. 权利要求27的组合物,其中所述组合物通过计量吸入器、喷射喷雾器、振动网孔喷雾器或软雾吸入器递送。

29. 权利要求1-23中任何一项的RNAi剂或权利要求24-28中任何一项的组合物在制备用于抑制 α -ENaC基因在细胞中表达的药物中的用途。

30. 权利要求24-28中任何一项的组合物在制备用于治疗与ENaC活性水平增强或升高相关的一种或多种症状或疾病的药物中的用途。

31. 权利要求30的用途,其中所述疾病为呼吸道疾病。

32. 权利要求31的用途,其中所述呼吸道疾病为囊性纤维化、慢性支气管炎、非囊性纤维化支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、呼吸道感染、原发性纤毛运动障碍或肺癌囊性纤维化。

33. 权利要求30的用途,其中所述疾病为眼病。

34. 权利要求33的用途,其中所述疾病为干眼综合征。

用于抑制 α -ENaC表达的RNAi剂及使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2018年6月1日提交的美国临时专利申请序列号62/679549、2018年2月17日提交的美国临时专利申请序列号62/631683和2017年7月6日提交的美国临时专利申请序列号62/529132的优先权,其每一个的内容通过参考以其全部结合至本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式提交,并且特此通过参考以其全部结合。ASCII副本名为30656_SequenceListing,大小为74kb。

发明领域

[0005] 本公开涉及用于抑制 α -ENaC基因表达的RNA干扰(RNAi)剂,例如双链RNAi剂,包含 α -ENaC RNAi剂的组合物及其使用方法。

[0006] 背景

[0007] 脊椎动物阿米洛利敏感的上皮钠通道(“ENaC”或“阿米洛利敏感的钠通道”)为退化蛋白/ENaC通道超家族的成员,其特征为两个跨膜结构域,即胞内N-和C-末端及大胞外环,其为弗林蛋白酶的底物。该通道为异源三聚体复合物,由通过3个单独基因SCNN1A(α)、SCNN1B(β)和SCNN1G(γ)编码的3个同源亚基(α 、 β 和 γ)组成。所有3个亚基为完整通道活性所需要的。由SCNN1D编码的第4个亚基(δ)在睾丸和卵巢中表达,并可能在功能上替代这些组织中的 α 亚基。

[0008] ENaC在上皮细胞(特别是在肺、肾远曲小管、胃肠(GI)道、生殖道和眼睛的眼表上皮中)的顶膜上表达。在这些上皮中,ENaC通道介导胞外钠离子的流入,然后通过基底外侧钠/钾ATP酶从细胞主动转运钠离子,建立渗透梯度并导致上皮管腔水分吸收到间质中。在肾脏,ENaC介导电解质平衡和血压,并且为全身性小分子利尿剂(比如阿米洛利)的靶标。在肺部,气道上皮ENaC在调节肺水合作用和粘液纤毛清除方面起关键作用。

[0009] 在SCNN1A、SCNN1B或SCNN1G中携带功能丧失突变的1型假性醛固酮减少症(PHA)患者产生过多的气道表面液体,并具有显著更高的粘液纤毛清除率。相反,在所有基因型的囊性纤维化(CF)患者中,气道上皮ENaC活性均显著升高。ENaC活性增强以及囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)氯离子通道活性降低,是成为CF肺病患者气道脱水和粘液纤毛淤积的基础的主要致病机制。

[0010] 吸入的小分子ENaC抑制剂在CF的治疗中已显示出初步前景,但其临床发展受到在肺部作用持续时间短和与抑制肾ENaC相关的靶上毒性(高血钾症)的限制。(参见例如O’ Riordan et al., 27J. Aerosol Med. & Pulmonary Drug Dev., 200-208 (2014))。

[0011] 先前已经鉴定出某些能够抑制 α -ENaC基因(即SCNN1A)表达的RNAi剂,比如在例如美国专利第7718632号中公开的那些。然而,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的序列和修饰不同于先前公开或本领域已知的那些。本文公开的 α -ENaC RNAi剂提供了对 α -ENaC基因表达的高效和有效抑制作用。

[0012] 概述

[0013] 需要新的RNA干扰 (RNAi) 剂 (称为RNAi剂、RNAi触发剂或触发剂), 例如双链RNAi剂, 其能够选择性和有效地抑制 α -ENaC基因 (即SCNN1A) 的表达。进一步地, 需要用于治疗与ENaC活性增强相关的疾病的新的 α -ENaC特异性RNAi剂的组合物。

[0014] 一般而言, 本公开的特征在于 α -ENaC基因特异性RNAi剂、包含 α -ENaC RNAi剂的组合物和使用 α -ENaC RNAi剂以及包含本文所述的 α -ENaC RNAi剂的组合物在体外和/或体内抑制 α -ENaC基因表达的方法。本文所述的 α -ENaC RNAi剂能够选择性和有效地降低 α -ENaC基因的表达, 从而降低受试者的ENaC水平, 降低受试者的ENaC活性或降低受试者 (例如人类或动物受试者) 的ENaC水平和ENaC活性两者。

[0015] 所述 α -ENaC RNAi剂可用于与ENaC活性水平增强或升高相关的症状和疾病的治疗性治疗 (包括预防性或预防性治疗) 方法, 包括 (但不限于) 各种呼吸道疾病, 比如囊性纤维化、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、哮喘、呼吸道感染、原发性纤毛运动障碍和肺癌囊性纤维化。例如, 在患有囊性纤维化 (CF) 的受试者, 已知ENaC活性增强有助于干燥气道中的粘液和降低肺部清除毒素和感染因子的能力。进一步地, 还已知遗传获得了功能差的ENaC基因的CF受试者表现出较轻的肺部疾病, 提供了进一步的证据表明抑制ENaC水平可能对某些患者人群有益。所述 α -ENaC RNAi剂还可用于例如与眼表上皮细胞 (比如结膜上皮细胞) 的ENaC活性水平增强或升高相关的症状和疾病的治疗性治疗 (包括预防性或预防性治疗), 包括用于治疗眼病和障碍 (比如干眼综合征)。本文公开的 α -ENaC RNAi剂可选择性降低 α -ENaC表达, 这可导致ENaC活性降低。本文公开的方法包括通过本领域已知的任何合适方式 (比如气雾剂吸入或干粉吸入、鼻内给予、气管内给予或口咽抽吸给予) 给予受试者 (例如人类或动物受试者) 一种或多种 α -ENaC RNAi剂。

[0016] 一方面, 本公开的特征在于用于抑制 α -ENaC基因表达的RNAi剂, 其中RNAi剂包含有义链和反义链。本文还描述了包含能够抑制 α -ENaC基因表达的RNAi剂或由其组成的组合物, 其中RNAi剂包含有义链和反义链或由其组成, 并且组合物进一步包含至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0017] 在另一方面, 本公开的特征在于包含一种或多种所公开的 α -ENaC RNAi剂的组合物, 其能够选择性和有效地降低 α -ENaC基因的表达。可将包含一种或多种本文所述的 α -ENaC RNAi剂的组合物给予受试者 (比如人类或动物受试者), 以治疗 (包括预防性治疗或抑制) 与ENaC活性增强或升高 (本文也称为ENaC通道活性水平增强或ENaC通道活性水平升高) 相关的症状和疾病。

[0018] 本文公开的每种 α -ENaC RNAi剂包含有义链和反义链。有义链和反义链可以彼此部分、基本上或完全互补。本文所述的RNAi剂有义和反义链的长度各自可为16-30个核苷酸。在一些实施方案中, 有义和反义链的长度独立地为17-26个核苷酸。有义和反义链可为相同长度或不同长度。在一些实施方案中, 有义和反义链的长度独立地为21-26个核苷酸。在一些实施方案中, 有义和反义链的长度独立地为21-24个核苷酸。在一些实施方案中, 有义链和反义链两者的长度均为21个核苷酸。在一些实施方案中, 有义和/或反义链的长度独立地为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。当递送至表达 α -ENaC的细胞时, 本文所述的RNAi剂在体内或体外抑制一种或多种 α -ENaC基因的表达。

[0019] 本文所述的 α -ENaC RNAi剂包含至少16个连续核苷酸, 其与 α -ENaC mRNA中相同数目核苷酸的核心区段序列 (本文也称为“核心区段”或“核心序列”) 具有至少85%的同一性。

在一些实施方案中,该有义链核心区段的长度为16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸。在一些实施方案中,该有义链核心区段的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,该有义链核心区段的长度为19个核苷酸。

[0020] 本文所述的 α -ENaC RNAi剂的反义链包含至少16个连续核苷酸,其与 α -ENaC mRNA中相同数目核苷酸的核心区段和与相应的有义链具有至少85%的互补性。在一些实施方案中,该反义链核心区段的长度为16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂靶向具有表1中公开的任何序列的序列的 α -ENaC基因的一部分。

[0022] 表3和4中提供了可用于 α -ENaC RNAi剂的 α -ENaC RNAi剂有义链和反义链的实例。表5中提供了 α -ENaC RNAi剂双链体的实例。表2中提供了可由本文公开的某些 α -ENaC RNAi剂的有义链和反义链组成或可包含其中的19-核苷酸核心区段序列的实例。

[0023] 在另一方面,本公开的特征在于用于在体内将 α -ENaC RNAi剂递送至受试者(比如哺乳动物)的上皮细胞的方法。本文还描述了用于这种方法组合物。在一些实施方案中,本文公开了用于将 α -ENaC RNAi剂体内递送至受试者的肺上皮细胞的方法。在一些实施方案中,本文公开了用于在体内将 α -ENaC RNAi剂递送至人类受试者的肺上皮细胞的方法。可使用本领域已知的任何寡核苷酸递送技术将一种或多种 α -ENaC RNAi剂递送至靶细胞或组织。核酸递送方法包括(但不限于)通过封装在脂质体中、通过离子电渗疗法或通过掺入其他媒介物(比如水凝胶、环糊精、可生物降解纳米胶囊和生物粘附微球、蛋白质载体或Dynamic PolyconjugatesTM(DPC))中(参见例如WO 2000/053722、WO 2008/022309、WO 2011/104169和WO 2012/083185,其每一个通过参考结合至本文中)。

[0024] 在一些实施方案中,通过将RNAi剂共价连接于靶向基团,将 α -ENaC RNAi剂递送至细胞或组织。在一些实施方案中,靶向基团可包括细胞受体配体,比如整联蛋白靶向配体。整联蛋白为促进细胞-胞外基质(ECM)粘附的跨膜受体家族。特别是,整联蛋白 α -v- β -6(α v β 6)为上皮特异性整联蛋白,已知其为ECM蛋白和TGF- β 潜在相关肽(LAP)的受体,并且在各种细胞和组织中表达。已知整联蛋白 α v β 6在损伤的肺上皮细胞高度上调。在一些实施方案中,本文所述的 α -ENaC RNAi剂连接于对整联蛋白 α v β 6具有亲和力的整联蛋白靶向配体。本文所指的“ α v β 6整联蛋白靶向配体”为对整联蛋白 α v β 6具有亲和力的化合物,其可用作配体以促进其连接的RNAi剂的靶向和递送至期望的细胞和/或组织(即表达整联蛋白 α v β 6的细胞)。在一些实施方案中,多个 α v β 6整联蛋白靶向配体或 α v β 6整联蛋白靶向配体簇连接于 α -ENaC RNAi剂。在一些实施方案中,通过受体介导的内吞作用或通过其他方式,通过肺上皮细胞选择性地内化 α -ENaC RNAi剂- α v β 6整联蛋白靶向配体缀合物。

[0025] 例如,在国际专利申请公开号WO 2018/085415和美国临时专利申请号62/580398和62/646739中公开了可用于递送 α -ENaC RNAi剂的包含 α v β 6整联蛋白靶向配体的靶向基团的实例,其每一个的内容通过参考以其全部结合至本文中。

[0026] 靶向基团可连接于 α -ENaC RNAi剂的有义链或反义链的3'或5'末端。在一些实施方案中,靶向基团连接于有义链的3'或5'末端。在一些实施方案中,靶向基团连接于有义链的5'末端。在一些实施方案中,靶向基团在内部连接于RNAi剂的有义链和/或反义链上的核苷酸。在一些实施方案中,靶向基团经接头连接于RNAi剂。

[0027] 可将具有或不具有接头的靶向基团连接于表2、3和4中公开的任何有义和/或反义

链的5'或3'末端。可将具有或不具有靶向基团的接头连接于表2、3和4中公开的任何有义和/或反义链的5'或3'末端。

[0028] 在另一方面,本公开的特征在于包含一种或多种具有表5中公开的双链体结构的 α -ENaC RNAi剂的组合物。

[0029] 在一些实施方案中,本文描述了包含至少两种具有不同序列的 α -ENaC RNAi剂的组合或混合物的组合物。在一些实施方案中,两种或更多种 α -ENaC RNAi剂各自分别和独立地连接于靶向基团。在一些实施方案中,两种或更多种 α -ENaC RNAi剂各自连接于靶向基团,靶向基团包含整联蛋白靶向配体或由其组成。在一些实施方案中,两种或更多种 α -ENaC RNAi剂各自连接于包含 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体或由其组成的靶向基团。

[0030] 在另一方面,本公开的特征在于用于在受试者抑制 α -ENaC基因表达的方法,方法包括给予受试者一定量的能够抑制 α -ENaC基因表达的 α -ENaC RNAi剂,其中 α -ENaC RNAi剂包含有义链和反义链。本文还描述了用于这种方法的组合物。

[0031] 在另一方面,本公开的特征在于治疗(包括预防性或预防性治疗)由ENaC活性增强或升高引起的疾病或症状的方法,方法包括给予需要它的受试者包含含有表2或表3中任何序列的序列的反义链的 α -ENaC RNAi剂。本文还描述了用于这种方法的组合物。

[0032] 在一些实施方案中,将所述 α -ENaC RNAi剂任选地与一种或多种另外的(即第二、第三等)治疗剂组合。第二治疗剂可为另一种 α -ENaC RNAi剂(例如靶向 α -ENaC基因不同序列的 α -ENaC RNAi剂)。另外的治疗剂也可小分子药物、抗体、抗体片段和/或适体。可将与或不与一种或多种另外的治疗剂一起的 α -ENaC RNAi剂与一种或多种赋形剂组合以形成药用组合物。

[0033] 在一些实施方案中,描述了用于在体内将 α -ENaC RNAi剂递送至上皮细胞的组合物。在一些实施方案中,在没有缀合于靶向配体或药代动力学(PK)调节剂(称为“裸”或“裸RNAi剂”)的情况下递送 α -ENaC RNAi剂。在一些实施方案中,将 α -ENaC RNAi剂缀合于靶向基团、连接基团、PK调节剂和/或另一种非核苷酸基团。在一些实施方案中,将 α -ENaC RNAi剂缀合于靶向基团,其中靶向基团包含整联蛋白靶向配体。在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体为 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体。在一些实施方案中,靶向基团包含一种或多种 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体。

[0034] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂连接于一个或多个连接基团或其他非核苷酸基团或化合物,比如药代动力学调节剂。在一些实施方案中,将 α -ENaC RNAi剂缀合于聚乙二醇(PEG)部分,或缀合于具有12或更多个碳原子的疏水基团,比如胆固醇或棕榈酰基。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂连接于选自胆固醇或胆固醇基衍生物、烷基、链烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基或芳炔基(其每一种可为线性、分支、环状和/或取代或未取代的)的一种或多种药代动力学调节剂。在一些实施方案中,这些部分的连接位置在有义链的5'或3'末端、在有义链的任何给定核苷酸的核糖环的2'位,和/或连接于有义链的任何位置的磷酸酯或硫代磷酸酯骨架。

[0035] 在一些实施方案中,将一种或多种所述 α -ENaC RNAi剂在药学上可接受的载体或稀释剂中给予哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物为人类。

[0036] α -ENaC RNAi剂的使用提供了用于治疗性(包括预防性)治疗与ENaC活性增强或升高相关的疾病或障碍的方法。所述 α -ENaC RNAi剂能够抑制(例如抑制) α -ENaC的表达。 α -

ENaC RNAi剂还可用于治疗各种呼吸道疾病,包括囊性纤维化、慢性支气管炎、非囊性纤维化支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、呼吸道感染、原发性纤毛运动障碍和肺癌囊性纤维化。 α -ENaC RNAi剂可进一步用于治疗例如各种眼病和障碍(比如干眼)。这种治疗方法包括给予ENaC活性水平升高或增强的人或动物 α -ENaC RNAi剂。本文描述了用于将 α -ENaC RNAi剂递送至肺上皮细胞的组合物。此外,本文总体上描述了用于体内将 α -ENaC RNAi剂递送至细胞(包括肾上皮细胞和/或GI或生殖道中的上皮细胞和/或眼睛的眼表上皮细胞的组合物)。

[0037] 包含一种或多种 α -ENaC RNAi剂的药用组合物可根据期望局部还是全身治疗以多种方式给予。给予可为(但不限于)例如静脉内、动脉内、皮下(subcutaneous)、腹膜内、皮下(subdermal)(例如经植入装置)和实质内给予。在一些实施方案中,本文所述的药用组合物通过吸入(比如干粉或气雾剂吸入)、鼻内给予、气管内给予或口咽抽吸给予来给予。

[0038] 所述 α -ENaC RNAi剂和/或包含 α -ENaC RNAi剂的组合物可用于治疗性治疗由ENaC活性水平增强或升高引起的疾病或病症的方法。这种方法包括将本文所述的 α -ENaC RNAi剂给予受试者(例如人类或动物受试者)。

[0039] 在另一方面,本公开提供了用于治疗(包括预防性治疗)至少部分地由 α -ENaC表达介导的病理状态(比如病症或疾病)的方法,其中方法包括给予受试者治疗有效量的包含含有表2或表3中任何序列的序列的反义链的RNAi剂。

[0040] 在一些实施方案中,本文公开了用于抑制 α -ENaC基因表达的方法,其中方法包括给予细胞包含含有表2或表3中任何序列的序列的反义链的RNAi剂。

[0041] 在一些实施方案中,本文公开了用于治疗(包括预防性治疗)至少部分地由 α -ENaC表达介导的病理状态的方法,其中方法包括给予受试者治疗有效量的包含含有表2或表4中任何序列的序列的有义链的RNAi剂。

[0042] 在一些实施方案中,本文公开了用于抑制 α -ENaC基因表达的方法,其中方法包括给予细胞包含含有表2或表4中任何序列的序列的有义链的RNAi剂。

[0043] 在一些实施方案中,本公开公开了用于治疗(包括预防性治疗)至少部分地由 α -ENaC表达介导的病理状态的方法,其中方法包括给予受试者治疗有效量的包含含有表4中任何序列的序列的有义链和含有表3中任何序列的序列的反义链的RNAi剂。

[0044] 在一些实施方案中,本文公开了用于抑制 α -ENaC基因表达的方法,其中方法包括给予细胞包含含有表4中任何序列的序列的有义链和含有表3中任何序列的序列的反义链的RNAi剂。

[0045] 在一些实施方案中,本文公开了抑制 α -ENaC基因表达的方法,其中方法包括给予受试者包含由表4中任何序列的核碱基序列组成的有义链和由表3中任何序列的核碱基序列组成的反义链的 α -ENaC RNAi剂。在其他实施方案中,本文公开了抑制 α -ENaC基因表达的方法,其中方法包括给予受试者包含由表4中任何修饰序列的修饰序列组成的有义链和由表3中任何修饰序列的修饰序列组成的反义链的 α -ENaC RNAi剂。

[0046] 在一些实施方案中,本文公开了用于抑制 α -ENaC基因在细胞中表达的方法,其中方法包括给予具有表5所述双链体之一的双链体结构的一种或多种 α -ENaC RNAi剂。

[0047] 本文公开的 α -ENaC RNAi剂被设计成靶向 α -ENaC基因(SEQ ID NO:1)上的特定位置。当与基因碱基配对时,当反义链的5'末端核碱基与距基因上的下游位置19个核苷酸(朝

向3'末端)的位置比对时,本文定义的反义链序列被设计成靶向基因上给定位置处的 α -ENaC基因。例如,如本文表1和2所示,被设计成在972位靶向 α -ENaC基因的反义链序列需要在与基因进行碱基配对时,反义链的5'末端核碱基与 α -ENaC基因的990位对齐。

[0048] 本文提供的 α -ENaC RNAi剂不需要反义链的1位(5'→3')处的核碱基与基因互补,条件是反义链和基因在至少16个连续核苷酸的核心区段序列存在至少85%的互补性(例如至少85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%互补性)。例如,对于本文公开的被设计成靶向 α -ENaC基因的972位的 α -ENaC RNAi剂, α -ENaC RNAi剂的反义链的5'末端核碱基必须与基因的990位对齐;然而,反义链的5'末端核碱基可以(但不需要)与 α -ENaC基因的990位互补,条件是反义链和基因在至少16个连续核苷酸的核心区段序列存在至少85%的互补性(例如至少85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%互补性)。如本文公开的各种实例所示,其中,基因被 α -ENaC RNAi剂的反义链结合的特定位置(例如是否将 α -ENaC RNAi剂设计成在972位、1291位、1000位或某个其他位置靶向 α -ENaC基因)为 α -ENaC RNAi剂获得抑制水平的重要因素。

[0049] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG(SEQ ID NO:3)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG(SEQ ID NO:3)相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG(SEQ ID NO:3)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列,其中SEQ ID NO:3位于反义链的1-21位(5'→3')。

[0050] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg(SEQ ID NO:2)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接,和其中有义链与反义链至少基本上互补。如本领域普通技术人员将清楚理解的,如本文公开的修饰核苷酸序列所示,包含硫代磷酸酯连接取代寡核苷酸中一般地存在的磷酸二酯连接(参见例如显示所有核苷间连接的图12A-12G)。

[0051] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由核苷酸序列(5'→3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg(SEQ ID NO:2)组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接,和其中有义链与反义链至少基本上互补。

[0052] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')CCUGUGCAACCAGAACAAAUA(SEQ ID NO:5)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由与核苷酸序列(5'→3')CCUGUGCAACCAGAACAAAUA(SEQ ID NO:5)相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所

有核苷酸为修饰核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' → 3')CCUGUGCAACCAGAACAAAUA(SEQ ID NO:5)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列,其中SEQ ID NO:5位于反义链的1-21位(5' → 3')。

[0053] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由与核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua(SEQ ID NO:4)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2'-0-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接,和其中反义链与有义链至少基本上互补。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由修饰核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua(SEQ ID NO:4)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2'-0-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接,和其中反义链与有义链至少基本上互补。在一些实施方案中,将一个或多个倒置的脱碱基残基添加至SEQ ID NO:4的有义链的5'末端、有义链的3'末端或有义链的5'和3'两端。在一些实施方案中,靶向配体(比如 $\alpha v \beta 6$ 整联蛋白靶向配体)可共价连接于SEQ ID NO:4的有义链的5'末端、有义链的3'末端或有义链的5'和3'两端。

[0054] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' → 3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG(SEQ ID NO:3)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列)和有义链(由与核苷酸序列(5' → 3')CCUGUGCAACCAGAACAAAUA(SEQ ID NO:5)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列)。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' → 3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG(SEQ ID NO:3)相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸)和有义链(由与核苷酸序列(5' → 3')CCUGUGCAACCAGAACAAAUA(SEQ ID NO:5)相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸)。

[0055] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg(SEQ ID NO:2)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua(SEQ ID NO:4)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),其中a、c、g和u分别代表2'-0-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg(SEQ ID NO:2)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua(SEQ ID NO:4)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),和其中有义链进一步包含3'末端倒置的脱碱基残基和共价连接于5'末端的 $\alpha v \beta 6$ 整联蛋白靶向配体。

[0056] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' → 3')UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC(SEQ ID NO:7)相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基

本上由其组成或包含该核碱基序列。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列,其中SEQ ID NO:7位于反义链的1-21位(5' \rightarrow 3')。

[0057] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) 相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2' -O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; Af、Cf、Gf和Uf分别代表2' -氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; 和s代表硫代磷酸酯连接,和其中有义链与反义链至少基本上互补。

[0058] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) 相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3')

[0059] GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) 相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) 相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列,其中SEQ ID NO:9位于反义链的1-21位(5' \rightarrow 3')。

[0060] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含有义链,后者由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') gscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:8) 相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2' -O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; Af、Cf、Gf和Uf分别代表2' -氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; 和s代表硫代磷酸酯连接,和其中反义链与有义链至少基本上互补。在一些实施方案中,将一个或多个倒置的脱碱基残基添加至SEQ ID NO:8的有义链的5' 末端、有义链的3' 末端或有义链的5' 和3' 两端。在一些实施方案中,靶向配体(比如 α v β 6整联蛋白靶向配体)可共价连接于SEQ ID NO:4的有义链的5' 端、有义链的3' 端或有义链的5' 和3' 两端。在一些实施方案中,靶向配体(比如 α v β 6整联蛋白靶向配体)可共价连接于SEQ ID NO:8的有义链的5' 末端、有义链的3' 末端或有义链的5' 和3' 两端。

[0061] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列)和有义链(由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) 相差0或1个核碱基的核碱基序列组成、基本上由其组成或包含该核碱基序列)。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸)和有义链(由与核苷酸序列(5' \rightarrow 3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) 相

差不超过1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列,其中所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸)。

[0062] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' → 3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由与核苷酸序列(5' → 3')gscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:8)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;和s代表硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')gscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:8)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),和其中有义链进一步包含3'末端的倒置的脱碱基残基和共价连接于5'末端的 α v β 6整联蛋白靶向配体。

[0063] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与核苷酸序列(5' → 3')cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列,其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;s代表硫代磷酸酯连接,cPrpu代表5'-环丙基膦酸酯-2'-O-甲基尿苷(参见表6),和其中有义链与反义链至少基本上互补。

[0064] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由与核苷酸序列(5' → 3')cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由与核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4)相差不超过1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;s代表硫代磷酸酯连接,和cPrpu代表5'-环丙基膦酸酯-2'-O-甲基尿苷(参见表6)。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列)和有义链(由修饰核苷酸序列(5' → 3')cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4)组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列),和其中有义链进一步包含3'末端倒置的脱碱基残基和共价连接于5'末端的 α v β 6整联蛋白靶向配体。

[0065] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与以下核苷酸序列(5' → 3')之一相差0或1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列:

[0066] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

[0067] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

[0068] UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230);或

[0069] AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

[0070] 其中 α -ENaC RNAi剂进一步包含与反义链至少部分互补的有义链;和其中反义链和有义链两者上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸。

[0071] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与以下核苷酸序列(5'→3')之一相差0或1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列:

[0072] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

[0073] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

[0074] UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230);或

[0075] AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

[0076] 其中 α -ENaC RNAi剂进一步包含与反义链至少部分互补的有义链;其中反义链和有义链两者上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸;其中有义链包含3'末端倒置的脱碱基残;和其中 α v β 6整联蛋白靶向配体连接于有义链的5'末端。

[0077] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链,后者由与以下核苷酸序列(5'→3')之一相差0或1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列:

[0078] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

[0079] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

[0080] UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230);或

[0081] AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

[0082] 其中 α -ENaC RNAi剂进一步包含与反义链至少部分互补的有义链;其中反义链和有义链两者上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸;其中有义链包含3'末端倒置的脱碱基残基;其中 α v β 6整联蛋白靶向配体连接于有义链的5'末端;和其中各反义链序列位于反义链的1-21位。

[0083] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链和有义链,其中反义链和有义链由与以下核苷酸序列(5'→3')对之一相差0或1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列:

[0084] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3) 和 CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:5);

[0085] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 和 GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9);

[0086] UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230) 和 CUGUGCAACCAGAACAAAUCA (SEQ ID NO:259);或

[0087] AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254) 和 GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU (SEQ ID NO:289);

[0088] 其中反义链和有义链两者上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸。

[0089] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链和有义链,其中反义链和有义链由与以下核苷酸序列(5'→3')对之一相差0或1个核苷酸的核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列:

[0090] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3) 和 CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:

5) ;

[0091] UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) 和GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9) ;

[0092] UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230) 和CUGUGCAACCAGAACAAAUCA (SEQ ID NO:259) ;或

[0093] AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254) 和GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU (SEQ ID NO:289) ;

[0094] 其中反义链和有义链两者上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸;其中有义链包含3' 末端倒置的脱碱基残基;和其中 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体连接于有义链的5' 末端。

[0095] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi 剂包含反义链,后者由与以下核苷酸序列(5' →3') 之一相差0或1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列:

[0096] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) ;

[0097] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) ;

[0098] cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) ;

[0099] usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfs (SEQ ID NO:107) ;或

[0100] asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) ;

[0101] 其中a、c、g和u分别代表2' -O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别代表2' -氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;s代表硫代磷酸酯连接,cPrpu代表5' -环丙基膦酸酯-2' -O-甲基尿苷(参见表6);其中 α -ENaC RNAi 剂进一步包含与反义链至少部分互补的有义链;和其中有义链上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi 剂包含反义链,后者由与以下核苷酸序列(5' →3') 之一相差0或1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列:

[0103] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) ;

[0104] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) ;

[0105] cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) ;

[0106] usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfs (SEQ ID NO:107) ;或

[0107] asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) ;

[0108] 其中 α -ENaC RNAi 剂进一步包含与反义链至少部分互补的有义链;其中有义链上的所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸;其中有义链包含3' 末端倒置的脱碱基残基;和其中 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体连接于有义链的5' 末端。

[0109] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi 剂包含反义链和有义链,其由与以下核苷酸序列对(5' →3') 之一相差0或1个核苷酸的修饰核苷酸序列组成、基本上由其组成或包含该修饰核苷酸序列:

[0110] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) 和cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4) ;

[0111] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) 和

gscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:8);

[0112] cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) 和 cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4);

[0113] usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfs (SEQ ID NO:107) 和 csugugcaaCfCfAfgaacaauucas (SEQ ID NO:293); 或

[0114] asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) 和 gscagagCfAfGfaaugacuucuuu (SEQ ID NO:294);

[0115] 其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; s代表硫代磷酸酯连接, 和cPrpu代表5'-环丙基磷酸酯-2'-O-甲基尿苷(参见表6)。

[0116] 在一些实施方案中, 本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链和有义链, 其由以下核苷酸序列对(5'→3')之一组成、基本上由其组成或包含该核苷酸序列对:

[0117] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) 和 cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4);

[0118] usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) 和 gscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:8);

[0119] cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) 和 cscugugcaAfCfCfagaacaaaua (SEQ ID NO:4);

[0120] usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfs (SEQ ID NO:107) 和 csugugcaaCfCfAfgaacaauucas (SEQ ID NO:293); 或

[0121] asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) 和 gscagagCfAfGfaaugacuucuuu (SEQ ID NO:294);

[0122] 其中a、c、g和u分别代表2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; Af、Cf、Gf和Uf分别代表2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷; s代表硫代磷酸酯连接, 和cPrpu代表5'-环丙基磷酸酯-2'-O-甲基尿苷(参见表6); 其中有义链包含3'末端倒置的脱碱基残基; 和其中 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体连接于有义链的5'末端。

[0123] 在一些实施方案中, 本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链, 后者包含与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO:21) 相差0或1个核碱基的核碱基序列。在一些实施方案中, 本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链, 后者包含与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO:21) 相差不超过1个核苷酸的核苷酸序列, 其中所有或基本上所有核苷酸均为修饰核苷酸。在一些实施方案中, 本文公开的 α -ENaC RNAi剂包含反义链, 后者包含与核苷酸序列(5'→3')UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO:21) 相差0或1个核碱基的核碱基序列, 其中SEQ ID NO:21位于反义链的1-19位(5'→3')。

[0124] 本文使用的术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”意指连接的核苷的聚合物, 其每一个可独立地为修饰或未修饰的。

[0125] 本文使用的“RNAi剂”(也称为“RNAi触发剂”)意指含有能够以序列特异性方式降解或抑制(例如在适当的条件下降解或抑制)靶mRNA的信使RNA(mRNA)转录物的翻译的RNA或RNA样(例如化学修饰RNA)寡核苷酸分子的组合物。本文使用的RNAi剂可通过RNA干扰机制(即通过与哺乳动物细胞的RNA干扰途径机构(RNA诱导的沉默复合物或RISC)相互作用诱

导RNA干扰)或通过任何备选机制或途径起作用。尽管认为本文使用的术语RNAi剂主要通过RNA干扰机制起作用,但所公开的RNAi剂不受任何特定作用途径或机制的束缚或限制。本文公开的RNAi剂由有义链和反义链组成,并且包括(但不限于):短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)和dicer底物。本文所述的RNAi剂的反义链与所靶向的mRNA(即 α -ENaC mRNA)至少部分互补。RNAi剂可包含一个或多个修饰核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯连接。

[0126] 当提及给定基因的表达时,本文使用的术语“沉默”、“降低”、“抑制”、“下调”或“敲低”意指与未经如此处理的第二细胞、细胞群、组织、器官或受试者相比较,当用本文所述的RNAi剂处理细胞、细胞群、组织、器官或受试者时,如通过在其中转录基因的细胞、细胞群、组织、器官或受试者中从基因转录的RNA水平或从mRNA翻译的多肽、蛋白或蛋白亚基水平测量的基因表达降低。

[0127] 本文使用的术语“序列”和“核苷酸序列”意指核碱基或核苷酸的顺序或次序,使用标准命名法用字母顺序来描述。

[0128] 本文使用的“碱基”、“核苷酸碱基”或“核碱基”为作为核苷酸组分的杂环嘧啶或嘌呤化合物,并且包括初级嘌呤碱基腺嘌呤和鸟嘌呤以及初级嘧啶碱基胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核碱基可进一步修饰为非限制性地包括普适碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩大的碱基和氟化碱基(参见例如Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008)。这种修饰核碱基(包括包含修饰核碱基的亚磷酰胺化合物)的合成为本领域已知的。

[0129] 如本文使用的,并且除非另外说明,否则术语“互补的”当用于描述第一核碱基或核苷酸序列(例如RNAi剂有义链或靶向的mRNA)相对于第二核碱基或核苷酸序列(例如RNAi剂反义链或单链反义寡核苷酸)时,意指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交(在哺乳动物生理条件(或类似的体外条件)下形成碱基对氢键)和在某些标准条件下形成双链体或双螺旋结构的能力。互补序列包含沃森-克里克碱基对或非沃森-克里克碱基对,并且至少在满足以上杂交要求的程度上包含天然或修饰核苷酸或核苷酸模拟物。序列同一性或互补性与修饰无关。例如,为了确定同一性或互补性,本文定义的a和Af与U(或T)互补并且与A相同。

[0130] 本文使用的“完美互补”或“完全互补”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对,第一寡核苷酸连续序列中的所有(100%)碱基将与第二寡核苷酸连续序列中相同数目的碱基杂交。连续序列可包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。

[0131] 本文使用的“部分互补”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对,第一寡核苷酸连续序列中的至少70%(但不是全部)碱基将与第二寡核苷酸连续序列中相同数目的碱基杂交。连续序列可包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。

[0132] 本文使用的“基本上互补”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对,第一寡核苷酸连续序列中的至少85%(但不是全部)的碱基将与第二寡核苷酸连续序列中相同数目的碱基杂交。连续序列可包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。

[0133] 关于RNAi剂的有义链和反义链之间或RNAi剂的反义链和 α -ENaC mRNA序列之间的核碱基或核苷酸匹配使用本文使用的术语“互补”、“完全互补”,“部分互补”和“基本上互补”。

[0134] 本文使用的如应用于核酸序列的术语“基本上相同”或“基本上具有同一性”意指与参考序列相比较,核苷酸序列(或核苷酸序列的一部分)具有至少约85%的序列同一性或更高,例如具有至少90%、至少95%或至少99%的同一性。序列同一性的百分比通过在比较窗口比较两个最佳比对的序列来确定。通过确定两个序列中出现相同类型核酸碱基的位置数以得出匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并将结果乘以100以得出序列同一性的百分比来计算百分比。本文公开的发明包括与本文公开的那些基本上相同的核苷酸序列。

[0135] 本文使用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”等意指用来在受试者减轻或缓解疾病的一种或多种症状的数目、严重性和/或频率的方法或步骤。本文使用的“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”可包括在受试者预防性(preventative)治疗、管理、预防性(prophylactic)治疗和/或抑制或减少疾病的一种或多种症状的数目、严重性和/或频率。

[0136] 当提及RNAi剂时,本文使用的短语“引入到细胞中”意指将RNAi剂功能性地递送至细胞中。短语“功能性递送”意指以使RNAi剂具有预期的生物学活性(例如基因表达的序列特异性抑制)的方式将RNAi剂递送至细胞。

[0137] 除非另外说明,否则本文使用的符号的使用意指根据本文所述发明范围的任何一个或多个基团可连接其上。

[0138] 本文使用的术语“异构体”是指具有相同分子式,但其原子的键合性质或顺序或其原子的空间排列不同的化合物。其原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。不是彼此镜像的立体异构体称为“非对映异构体”,和为不可重叠镜像的立体异构体称为“对映异构体”或有时称为光学异构体。与4个不同取代基键合的碳原子称为“手性中心”。

[0139] 如本文使用的,除非结构中特别鉴定为具有特定构象,否则对于其中存在不对称中心并因此产生对映异构体、非对映异构体或其他立体异构构型的每种结构,本文公开的每个结构旨在表示所有这种可能的异构体,包括其光学纯的和外消旋形式。例如,本文公开的结构旨在涵盖非对映异构体的混合物以及单一立体异构体。

[0140] 本文的权利要求中使用的短语“由...组成”不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文的权利要求中使用时,短语“基本上由...组成”将权利要求的范围限于指定的材料或步骤以及不会实质性影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的那些材料或步骤。

[0141] 本领域的普通技术人员将易于理解和意识到,根据化合物或组合物所处的环境,本文公开的化合物和组合物可具有处于质子化或去质子化状态的某些原子(例如N、O或S原子)。因此,如本文使用的本文公开的结构设想某些官能团(比如OH、SH或NH)可被质子化或去质子化。如本领域的普通技术人员易于理解的,本文的公开旨在涵盖所公开的化合物和组合物,而不考虑其基于环境(比如pH)的质子化状态如何。

[0142] 当提及两个化合物或分子之间的连接时,本文使用的术语“连接的”或“缀合的”意指两个化合物或分子通过共价键连接。除非另外说明,否则本文使用的术语“连接的”和“缀合的”可指具有或不具有任何居于中间的原子或原子团的第一化合物和第二化合物之间的连接。

[0143] 本文使用的术语“包括”本文用于意指短语“包括(但不限于)”,并且可与该短语互换使用。除非上下文另外明确说明,否则术语“或”本文用于意指术语“和/或”,并且可与该

术语互换使用。

[0144] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域的普通技术人员通常理解相同含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但以下描述合适的方法和材料。本文提及的所有公开、专利申请、专利和其他参考文献通过参考以其全部结合。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实施例仅为说明性的,并且不旨在为限制性的。

[0145] 根据以下详述、附图以及根据权利要求,本发明的其他目的、特征、方面和优点将显而易见。

[0146] 附图简述

[0147] 图1.显示与媒介物对照相比较,在给予各种 α -ENaC RNAi剂之后小鼠全肺 α -ENaC表达的相对表达的直方图。

[0148] 图2.显示与媒介物对照相比较,在给予 α -ENaC RNAi剂AD04025和AD04858之后小鼠全肺 α -ENaC表达的相对表达的直方图。

[0149] 图3.显示 α -ENaC RNAi剂AD04025和AD04025-缀合物(即与基于肽的 α v β 6上皮细胞靶向配体缀合的AD04025)的大鼠全肺 α -ENaC表达的相对表达的图表。

[0150] 图4.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM2。

[0151] 图5.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM1。

[0152] 图6.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM6.1。

[0153] 图7.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM9。

[0154] 图8.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM6。

[0155] 图9.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM8。

[0156] 图10.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM10。

[0157] 图11.三齿 α v β 6上皮细胞靶向配体的化学结构表示,本文称为Tri-SM11。

[0158] 图12A. α -ENaC RNAi剂AD05453的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端带有一个氨基以促进与靶向配体的连接。

[0159] 在图12A-12G中使用以下缩写:a、c、g和u为2'-O-甲基修饰核苷酸;Af、Cf、Gf和Uf为2'-氟修饰核苷酸;p为磷酸二酯连接;s为硫代磷酸酯连接;invAb为倒置的脱碱基残基;cPrp为5'末端环丙基磷酸酯基(参见表6);NH₂-C6为C₆氨基(参见表6);和TriAlk14为具有本文所述结构的三炔接头(参见表6)。

[0160] 图12B. α -ENaC RNAi剂AD05924的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端用三炔基官能化,以促进与靶向配体的连接。本文所述的AD05453和AD05924具有相同的修饰核苷酸序列,并且代表合成本文公开的 α -ENaC RNAi剂缀合物的备选方法。

[0161] 图12C. α -ENaC RNAi剂AD05625的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端用氨基官能化,以促进与靶向配体的连接。

[0162] 图12D. α -ENaC RNAi剂AD05347的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端用氨基官能化,以促进与靶向配体的连接。

[0163] 图12E. α -ENaC RNAi剂AD05831的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端用氨基官能化,以促进与靶向配体的连接。

[0164] 图12F. α -ENaC RNAi剂AD05833的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),显示在有义链的5'末端用氨基官能化,以促进与靶向配体的连接。

[0165] 图12G. α -ENaC RNAi剂AD05453和 α -ENaC RNAi剂AD05924的修饰的有义和反义链的示意图(参见表3-5),其中X代表三齿 α v β 6整联蛋白靶向配体(包含任何接头)。

[0166] 图12H. 本文所述的实例三齿 α v β 6整联蛋白靶向配体-RNAi剂缀合物的示意图,其中三齿 α v β 6整联蛋白靶向配体缀合于有义链的5'末端。如其中所示,每个 α v β 6代表 α v β 6整联蛋白靶向化合物。

[0167] 图13A-13D. α -ENaC RNAi剂AD05453的化学结构表示,其包含NH₂-C6末端氨基,显示为钠盐。

[0168] 图14A-14D. α -ENaC RNAi剂AD05924的化学结构表示,包含三炔官能化的接头基团(TriAlk14),显示为钠盐。

[0169] 图15A-15E. α -ENaC RNAi剂AD05453的化学结构表示,显示为与Tri-SM6.1缀合的钠盐。如本文所述,相同的化学结构可使用三炔官能化的接头基团(TriAlk14)合成,该基团可通过亚磷酰胺合成来添加,如针对 α -ENaC RNAi剂AD05924的修饰的有义链核苷酸序列所述(即表4中的AM07807-SS)。

[0170] 图16A-16D. α -ENaC RNAi剂AD05453的化学结构表示,包含NH₂-C6末端官能化的氨基,显示为游离酸。

[0171] 详述

[0172] RNAi剂

[0173] 本文描述了用于抑制 α -ENaC(即SCNN1A)基因表达的RNAi剂(本文称为 α -ENaC RNAi剂或 α -ENaC RNAi触发剂)。每个 α -ENaC RNAi剂均包含有义链和反义链。有义链和反义链的长度各自可为16-30个核苷酸。在一些实施方案中,有义和反义链的长度各自可为17-26个核苷酸。有义和反义链可为相同长度,或者其可为不同长度。在一些实施方案中,有义和反义链的长度各自独立地为17-26个核苷酸。在一些实施方案中,有义和反义链的长度各自独立地为17-21个核苷酸。在一些实施方案中,有义和反义链两者的长度各自均为21-26个核苷酸。在一些实施方案中,有义和反义链的长度各自均为21-24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为约19个核苷酸,而反义链的长度为约21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为约21个核苷酸,而反义链的长度为约23个核苷酸。在一些实施方案中,有义和反义链两者的长度各自均为21个核苷酸。在一些实施方案中,RNAi剂有义和反义链的长度各自独立地为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸。在一些实施方案中,双链RNAi剂具有约16、17、18、19、20、21、22、23或24个核苷酸的双链体长度。

[0174] 在一些实施方案中,有义链和反义链之间完全、基本或部分互补区域的长度为16-26(例如16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26)个核苷酸,并且出现在反义链的5'末端处或附近(例如该区域可与反义链的5'末端隔开0、1、2、3或4个不是完全、基本上或部分互补的核苷酸)。

[0175] 有义链和反义链各自含有长度为16-23个核苷酸的核心区段(本文也称为“核心序列”或“核心区段序列”)。反义链核心区段与 α -ENaC靶标中存在的核苷酸序列(有时称为例如靶序列)100%(完全)互补或至少85%(基本上)互补。有义链核心区段与反义链中的核心区段100%(完全)互补或至少85%(基本上)互补,并且因此有义链核心区段一般地与 α -

ENaC mRNA靶标中存在的核苷酸序列(靶序列)完全相同或至少85%相同。有义链核心区段可与相应的反义核心区段为相同长度,或者可为不同长度。在一些实施方案中,反义链核心区段的长度为16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链核心区段的长度为16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸。

[0176] 表2、3和4中提供了用于形成 α -ENaC RNAi剂的核苷酸序列的实例。RNAi剂双链体的实例(包含表2、3和4中的有义链和反义链核苷酸序列)如表5所示。

[0177] α -ENaC RNAi剂有义和反义链退火形成双链体。 α -ENaC RNAi剂的有义链和反义链可以彼此部分、基本上或完全互补。在互补双链体区域内,有义链核心区段序列与反义核心区段序列至少85%互补或100%互补。在一些实施方案中,有义链核心区段序列含有与反义链核心区段序列的相应16、17、18、19、20、21、22或23个核苷酸序列至少85%或100%互补的至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22或至少23个核苷酸的序列(即 α -ENaC RNAi剂的有义和反义核心区段序列具有至少85%碱基配对或100%碱基配对的至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22或至少23个核苷酸的区域)。

[0178] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的反义链与表2或表3中的任何反义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的有义链与表2或表4中的任何有义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0179] 有义链和/或反义链可任选和独立地在核心区段序列的3'末端、5'末端或3'和5'两端含有另外的1、2、3、4、5或6个核苷酸(延伸)。反义链的另外核苷酸(如果存在)可与 α -ENaC mRNA中的相应序列互补或不互补。有义链的另外核苷酸(如果存在)可与 α -ENaC mRNA中的相应序列相同或不同。反义链的另外核苷酸(如果存在)可与或不与相应有义链的另外核苷酸(如果存在)互补。

[0180] 本文使用的延伸在有义链核心区段序列和/或反义链核心区段序列的5'和/或3'末端包含1、2、3、4、5或6个核苷酸。有义链上的延伸核苷酸可与相应反义链中的核苷酸(核心区段序列核苷酸或延伸核苷酸)互补或不互补。相反,反义链上的延伸核苷酸可与相应有义链中的核苷酸(核心区段核苷酸或延伸核苷酸)互补或不互补。在一些实施方案中,RNAi剂的有义链和反义链两者均含有3'和5'延伸。在一些实施方案中,一条链的一个或多个3'延伸核苷酸的与另一条链的一个或多个5'延伸核苷酸碱基配对。在其他实施方案中,一条链的一个或多个3'延伸核苷酸不与另一条链的一个或多个5'延伸核苷酸碱基配对。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂具有反义链(具有3'延伸)和有义链(具有5'延伸)。在一些实施方案中,延伸核苷酸未配对并形成突出端。本文使用的“突出端”是指位于有义链或反义链末端的一段一个或多个未配对核苷酸,其不形成本文公开的RNAi剂的杂交或双链体的一部分。

[0181] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含3'延伸长度为1、2、3、4、5或6个核苷酸的反义链。在其他实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含3'延伸长度为1、2或3个核苷酸的反义链。在一些实施方案中,一个或多个反义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或胸苷核苷酸或者与相应的 α -ENaC mRNA序列互补的核苷酸。

[0182] 在一些实施方案中,反义链的3'末端可包含另外的脱碱基残基(Ab)。“脱碱基残基”或“脱碱基位点”为在糖部分的1'位缺少核碱基的核苷酸或核苷(参见例如美国专利第5998203号)。在一些实施方案中,可将Ab或AbAb添加至反义链的3'末端。在一些实施方案

中,脱碱基残基可作为倒置的脱碱基残基(invAb)添加(参见表6)(参见例如F.Czauderna, *Nucleic Acids Res.*,2003,31(11),2705-16)。

[0183] 在一些实施方案中,有义链或反义链可包含“末端帽”,其如本文所用为可掺入本文公开的RNAi剂的链的一个或多个末端的非核苷酸化合物或其他部分,并且在一些情况下可为RNAi剂提供某些有益特性,比如防止核酸外切酶降解。末端帽为本领域通常已知的,并且包含倒置的脱碱基残基以及碳链(比如端基C₃、C₆或C₁₂)。在一些实施方案中,在有义链的5'末端、3'末端或5'和3'两个末端处均存在末端帽。

[0184] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含3'延伸长度为1、2、3、4或5个核苷酸的有义链。在一些实施方案中,一个或多个有义链延伸核苷酸包含腺苷、尿嘧啶或胸苷核苷酸、AT二核苷酸或对应于 α -ENaC mRNA序列中的核苷酸的核苷酸。在一些实施方案中,3'有义链延伸包含(但不限于)以下序列之一或由其组成:T、UT、TT、UU、UUT、TTT或TTTT(各自列出为5'至3')。

[0185] 在一些实施方案中,有义链的3'末端可包含另外的脱碱基残基。在一些实施方案中,将UUA₃、UA₃或A₃添加至有义链的3'末端。

[0186] 在一些实施方案中,将一个或多个倒置的脱碱基残基添加至有义链的3'末端。在一些实施方案中,将一个或多个倒置的脱碱基残基或倒置的脱碱基位点插入在靶向配体和RNAi剂的有义链的核碱基序列之间。在一些实施方案中,在RNAi剂的有义链的一个或多个末端处或附近包含一个或多个倒置的脱碱基残基或倒置的脱碱基位点使得能够增强RNAi剂的活性或其他期望的特性。

[0187] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含5'延伸长度为1、2、3、4、5或6个核苷酸的有义链。在一些实施方案中,一个或多个有义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或腺苷核苷酸或对应于 α -ENaC mRNA序列中的核苷酸的核苷酸。在一些实施方案中,有义链5'延伸为(但不限于)以下序列之一:CA、AUAGGC、AUAGG、AUAG、AUA、A、AA、AC、GCA、GGCA、GGC、UAUCA、UAUC、UCA、UAU、U、UU(各自列出为5'至3')。有义链可具有3'延伸和/或5'延伸。

[0188] 在一些实施方案中,有义链的5'末端可包含一个或多个另外的脱碱基残基(例如(Ab)或(AbAb))。在一些实施方案中,将一个或多个倒置的脱碱基残基(invAb)添加至有义链的5'末端。在一些实施方案中,可将一个或多个倒置的脱碱基残基插入在靶向配体和RNAi剂的有义链的核碱基序列之间。在一些实施方案中,在RNAi剂的有义链的一个或多个末端处或附近包含一个或多个倒置的脱碱基残基可使得能够增强RNAi剂的活性或其他期望的特性。在一些实施方案中,脱碱基(脱氧核糖)残基可被核糖醇(脱碱基核糖)残基取代。

[0189] 在一些实施方案中,反义链核心区段序列的3'末端或反义链序列的3'末端可包含倒置的脱碱基残基(invAb(参见表6))。

[0190] 表2、3和4中提供了用于形成 α -ENaC RNAi剂的序列的实例。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或3中任何序列的序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17、2-15、2-17、1-18、2-18、1-19、2-19、1-20、2-20、1-21、2-21、1-22、2-22、1-23、2-23、1-24或2-24的序列。在某些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表3中任何一种修饰序列的修饰序列或由其组成。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂有义链包含表2或4中任何序列的序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂有义链包含表2或4中任何序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-18、1-19、1-

20、1-21、1-22、1-23、1-24、2-19、2-20、2-21、2-22、2-23、2-24、3-20、3-21、3-22、3-23、3-24、4-21、4-22、4-23、4-24、5-22、5-23或5-24的序列。在某些实施方案中， α -ENaC RNAi剂有义链包含表4中任何一种修饰序列的修饰序列或由其组成。

[0191] 在一些实施方案中，本文所述的RNAi剂的有义和反义链含有相同数目的核苷酸。在一些实施方案中，本文所述的RNAi剂的有义和反义链含有不同数目的核苷酸。在一些实施方案中，RNAi剂的有义链5'末端和反义链3'末端形成平末端。在一些实施方案中，RNAi剂的有义链3'末端和反义链5'末端形成平末端。在一些实施方案中，RNAi剂的两个末端形成平末端。在一些实施方案中，RNAi剂的两个末端均不是平末端。本文使用的“平末端”是指其中两条退火链的末端核苷酸互补(形成互补碱基对)的双链RNAi剂的末端。

[0192] 在一些实施方案中，RNAi剂的有义链5'末端和反义链3'末端形成散损末端。在一些实施方案中，RNAi剂的有义链3'末端和反义链5'末端形成散损末端。在一些实施方案中，RNAi剂的两个末端形成散损末端。在一些实施方案中，RNAi剂的两个末端均不是散损末端。本文使用的散损末端是指双链RNAi剂的末端，其中来自一对的两条退火链的末端核苷酸(即不形成突出端)不互补(即形成非互补对)。在一些实施方案中，在双链RNAi剂的一条链的末端处一个或多个未配对的核苷酸形成突出端。未配对的核苷酸可在有义链或反义链上，产生3'或5'突出端。在一些实施方案中，RNAi剂含有：平末端和散损末端、平末端和5'突出末端、平末端和3'突出末端、散损末端和5'突出末端、散损末端和3'突出末端、两个5'突出末端、两个3'突出末端、5'突出末端和3'突出末端、两个散损末端或两个平末端。一般地，当存在时，突出端位于有义链、反义链或者有义链和反义链两者的3'末端。

[0193] 修饰核苷酸当用于各种多核苷酸或寡核苷酸构建体时，可保留化合物在细胞中的活性，同时增加这些化合物的血清稳定性，并且还可最小化给予多核苷酸或寡核苷酸构建体后在人体内激活干扰素活性的可能性。

[0194] 在一些实施方案中，将 α -ENaC RNAi剂制备或提供为盐、混合盐或游离酸。在一些实施方案中，将 α -ENaC RNAi剂制备为钠盐。本领域众所周知的这种形式处于本文公开的发明范围内。

[0195] 修饰核苷酸

[0196] 在一些实施方案中， α -ENaC RNAi剂含有一个或多个修饰核苷酸。本文使用的“修饰核苷酸”为除核糖核苷酸以外的核苷酸(2'-羟基核苷酸)。在一些实施方案中，至少50%(例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸为修饰核苷酸。本文使用的修饰核苷酸可包括(但不限于)脱氧核糖核苷酸、核苷酸模拟物、脱碱基核苷酸(本文表示为Ab)、2'-修饰核苷酸、3'至3'连接(倒置的)核苷酸(本文表示为invdN、invN、invn)、包含修饰核碱基的核苷酸、桥接核苷酸、肽核酸(PNA)、2',3'-裂环核苷酸模拟物未锁核碱基类似物，本文表示为N_{UNA}或NUNA)、锁定核苷酸(本文表示为N_{LNA}或NLNA)、3'-O-甲氧基(2'核苷间连接的)核苷酸(本文表示为3'-OMen)、2'-F-阿糖核苷酸(本文表示为NfANA或Nf_{ANA})、5'-Me、2'-氟核苷酸(本文表示为5Me-Nf)、吗啉代核苷酸、乙烯基膦酸酯脱氧核糖核苷酸(本文表示为vpdN)、含乙烯基膦酸酯的核苷酸和含环丙基膦酸酯的核苷酸(cPrpN)。2'-修饰核苷酸(即在五元糖环的2'位具有除羟基以外的基团的核苷酸)包括(但不限于)2'-O-甲基核苷酸(本文在核苷酸序列中表示为小写字母'n')、2'-脱氧-2'-氟核苷酸(本文也称为2'-氟核苷酸，和本文表示为Nf)、2'-脱氧核苷

酸(本文表示为dN)、2'-甲氧基乙基(2'-O-2-甲氧基乙基)核苷酸(本文也称为2'-MOE,和本文表示为NM)、2'-氨基核苷酸和2'-烷基核苷酸。对于给定化合物中的所有位置不必一律修饰。相反,可在单个 α -ENaC RNAi剂中或者甚至在其单个核苷酸中掺入一个以上修饰。可通过本领域已知的方法合成和/或修饰 α -ENaC RNAi剂有义链和反义链。一个核苷酸处的修饰独立于另一核苷酸处的修饰。

[0197] 修饰核碱基包括合成和天然核碱基,比如5-取代嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2,N-6和O-6取代嘌呤(例如2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶或5-丙炔基胞嘧啶)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-烷基(例如6-甲基、6-乙基、6-异丙基或6-正丁基)衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-烷基(例如2-甲基、2-乙基、2-异丙基或2-正丁基)和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶、胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(例如5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0198] 在一些实施方案中, RNAi剂的所有或基本上所有核苷酸为修饰核苷酸。本文使用的其中基本上所有存在的核苷酸均为修饰核苷酸的RNAi剂为在有义链和反义链两者中4个或更少个(即0、1、2、3或4个)核苷酸为核糖核苷酸(即未修饰)的RNAi剂。本文使用的其中基本上所有存在的核苷酸均为修饰核苷酸的有义链为在有义链中两个或更少个(即0、1或2个)核苷酸为未修饰核糖核苷酸的有义链。本文使用的其中基本上所有存在的核苷酸均为修饰核苷酸的反义链为在反义链中两个或更少个(即0、1或2个)核苷酸为未修饰核糖核苷酸的有义链。在一些实施方案中, RNAi剂的一个或多个核苷酸为未修饰核糖核苷酸。

[0199] 修饰的核苷间连接

[0200] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂的一个或多个核苷酸通过非标准连接或骨架(即修饰的核苷间连接或修饰的骨架)连接。修饰的核苷间连接或骨架包括(但不限于)硫代磷酸酯基团(本文表示为小写字母“s”)、手性硫代磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基-磷酸三酯、烷基磷酸酯(例如甲基磷酸酯或3'-亚烷基磷酸酯)、手性磷酸酯、次磷酸酯、氨基磷酸酯(例如3'-氨基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯或硫代氨基磷酸酯)、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯、吗啉代连接、具有正常3'-5'连接的硼代磷酸酯、硼代磷酸酯的2'-5'连接的类似物或具有倒置极性的硼代磷酸酯,其中相邻的核苷单元对连接3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接或骨架缺少磷原子。缺少磷原子的修饰的核苷间连接包括(但不限于)短链烷基或环烷基糖间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基糖间连接或者一个或多个短链杂原子或杂环糖间连接。在一些实施方案中,修饰的核苷间骨架包括(但不限于)硅氧烷骨架、硫化物骨架、亚砷骨架、砷骨架、甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架、亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架、含烯烃的骨架、氨基磺酸酯骨架、亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架、磺酸酯和磺酰胺骨架、酰胺骨架和其他具有混合的N、O、S和CH₂组分的骨架。

[0201] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂的有义链可含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯连接, α -ENaC RNAi剂的反义链可含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯连接, 或者有义链和反义

链两者均可独立地含有1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂的有义链可含有1、2、3或4个硫代磷酸酯连接, α -ENaC RNAi 剂的反义链可含有1、2、3或4个硫代磷酸酯连接,或者有义链和反义链两者均可独立地含有1、2、3或4个硫代磷酸酯连接。

[0202] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂有义链含有至少两个硫代磷酸酯核苷间连接。在一些实施方案中,至少两个硫代磷酸酯核苷间连接位于从有义链的3' 末端开始1-3位的核苷酸之间。在一些实施方案中,一个硫代磷酸酯核苷间连接位于有义链的5' 末端,和另一个硫代磷酸酯连接位于有义链的3' 末端。在一些实施方案中,至少两个硫代磷酸酯核苷间连接位于从有义链的5' 末端开始1-3、2-4、3-5、4-6、4-5或6-8位的核苷酸之间。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂反义链含有4个硫代磷酸酯核苷间连接。在一些实施方案中,4个硫代磷酸酯核苷间连接位于从反义链的5' 末端开始1-3位的核苷酸之间和从5' 末端开始19-21、20-22、21-23、22-24、23-25或24-26位的核苷酸之间。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂在有义链中含有至少两个硫代磷酸酯核苷间连接和在反义链中含有3或4个硫代磷酸酯核苷间连接。

[0203] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂含有一个或多个修饰核苷酸和一个或多个修饰的核苷间连接。在一些实施方案中,将2' -修饰核苷与修饰的核苷间连接相结合。

[0204] α -ENaC RNAi 剂

[0205] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi 剂在表1所示的 α -ENaC序列的位置处或附近靶向的 α -ENaC基因。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi 剂的反义链包含与表1公开的靶 α -ENaC19聚体序列完全、基本上或至少部分地互补的核心区段序列。

[0206] 表1. α -ENaC 19聚体mRNA靶序列(取自智人(homo sapiens)钠通道上皮1 α 亚基(SCNN1A),转录变体1,GenBank NM_001038.5(SEQ ID NO:1))

SEQ ID No.	α -ENaC 19 聚体靶序列 (5' \rightarrow 3')	SEQ ID NO: 1 上的相应位置
11	UGUGCAACCAGAACAAAUC	972-990
12	GUGCAACCAGAACAAAUCG	973-991
13	GCAGAGCAGAAUGACUUCA	1289-1307
14	AGAGCAGAAUGACUUCAU	1291-1309
[0207] 15	CUACCAGACAUACUCAUCA	1000-1018
16	UCUACCAGACAUACUCAUC	999-1017
17	CUUUGACCUGUACAAAUC	763-781
18	UGGAAGGACUGGAAGAUCG	944-962
19	GGAAGGACUGGAAGAUCGG	945-963
20	CUGUGCCUACAUCUUCUAU	1579-1597

[0208] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi 剂包含反义链,其中反义链(5' \rightarrow 3')的19位能够与表1中公开的19聚体靶序列的1位形成碱基对。在一些实施方案中, α -ENaC剂包含反义链,其中反义链(5' \rightarrow 3')的1位能够与表1中公开的19聚体靶序列的19位形成碱基对。

[0209] 在一些实施方案中, α -ENaC剂包含反义链,其中反义链(5' \rightarrow 3')的2位能够与表1中公开的19聚体靶序列的18位形成碱基对。在一些实施方案中, α -ENaC剂包含反义链,其中反义链(5' \rightarrow 3')的2-18位能够与位于表1中公开的19聚体靶序列的18-2位的每个相应互补碱基形成碱基对。

[0210] 对于本文公开的RNAi 剂,反义链1位的核苷酸(从5' 末端 \rightarrow 3' 末端)可与 α -ENaC基

因完全互补,或者可与 α -ENaC基因非互补。在一些实施方案中,反义链1位的核苷酸(从5'末端→3'末端)为U、A或dT。在一些实施方案中,反义链1位的核苷酸(从5'末端→3'末端)与有义链形成A:U或U:A碱基对。

[0211] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何反义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)2-18或2-19的序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi有义链包含表2或表4中任何有义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17、1-18或2-18的序列。

[0212] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂由以下组成:(i)反义链,其包含表2或表3中任何反义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)2-18或2-19的序列,和(ii)有义链,其包含表2或表4中任何有义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17或1-18的序列。

[0213] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含以下表2所示的核心19聚体核苷酸序列。

[0214] 表2. α -ENaC RNAi剂反义链和有义链核心区段碱基序列(N=任何核碱基)

[0215]

SEQ ID NO:	反义链碱基序列 (5' → 3') (显示为未修饰核苷酸序列)	SEQ ID NO:	有义链碱基序列 (5' → 3') (显示为未修饰核苷酸序列)	SEQ ID NO: 1 上的相 应位置
21	UAUUUGUUCUGGUUGCACA	60	UGUGCAACCAGAACAAUA	972-990
22	AAUUUGUUCUGGUUGCACA	61	UGUGCAACCAGAACAAUU	972-990
23	GAUUUGUUCUGGUUGCACA	62	UGUGCAACCAGAACAAUUC	972-990
24	NAUUUGUUCUGGUUGCACA	63	UGUGCAACCAGAACAAUUN	972-990
25	NAUUUGUUCUGGUUGCACN	64	NGUGCAACCAGAACAAUUN	972-990
26	AAUGAAGUCAUUCUGUCUCU	65	AGAGCAGAAUGACUUCAUU	1291-1309
27	UAUGAAGUCAUUCUGUCUCU	66	AGAGCAGAAUGACUUCAUU	1291-1309
28	NAUGAAGUCAUUCUGUCUCU	67	AGAGCAGAAUGACUUCAUUN	1291-1309
29	NAUGAAGUCAUUCUGUCUCN	68	NGAGCAGAAUGACUUCAUUN	1291-1309
30	UGAUGAGUAUGUCUGGUAG	69	CUACCAGACAUACUCA	1000-1018
31	NGAUGAGUAUGUCUGGUAG	70	CUACCAGACAUACUCAUCN	1000-1018
32	NGAUGAGUAUGUCUGGUAGN	71	NUACCAGACAUACUCAUCN	1000-1018
33	GAUGAGUAUGUCUGGUAGA	72	UCUACCAGACAUACUCAUC	999-1017
34	UAUGAGUAUGUCUGGUAGA	73	UCUACCAGACAUACUCAUA	999-1017
35	NAUGAGUAUGUCUGGUAGA	74	UCUACCAGACAUACUCAUN	999-1017
36	NAUGAGUAUGUCUGGUAGN	75	NCUACCAGACAUACUCAUN	999-1017
37	CGAUUUGUUCUGGUUGCAC	76	GUGCAACCAGAACAAUCG	973-991
38	UGAUUUGUUCUGGUUGCAC	77	GUGCAACCAGAACAAUCA	973-991
39	NGAUUUGUUCUGGUUGCAC	78	GUGCAACCAGAACAAUCN	973-991
40	NGAUUUGUUCUGGUUGCAN	79	NUGCAACCAGAACAAUCN	973-991
41	GUUUUUGUACAGGUCAAAG	80	CUUUGACCUGUACAAUAC	763-781
42	UUUUUUGUACAGGUCAAAG	81	CUUUGACCUGUACAAUAA	763-781
43	NUUUUUGUACAGGUCAAAG	82	CUUUGACCUGUACAAUAN	763-781
44	NUUUUUGUACAGGUCAAAN	83	NUUUGACCUGUACAAUAN	763-781

[0216]

SEQ ID NO:	反义链碱基序列 (5' → 3') (显示为未修饰核苷酸序列)	SEQ ID NO:	有义链碱基序列 (5' → 3') (显示为未修饰核苷酸序列)	SEQ ID NO: 1 上的相 应位置
45	CGAUCUCCAGUCCUCCA	84	UGGAAGGACUGGAAAGAUCCG	944-962
46	UGAUCUCCAGUCCUCCA	85	UGGAAGGACUGGAAAGAUCA	944-962
47	NGAUCUCCAGUCCUCCA	86	UGGAAGGACUGGAAAGAUCCN	944-962
48	NGAUCUCCAGUCCUCCN	87	NGGAAGGACUGGAAAGAUCCN	944-962
49	CCGAUCUCCAGUCCUCC	88	GGAAAGGACUGGAAAGAUCCG	945-963
50	UCGAUCUCCAGUCCUCC	89	GGAAAGGACUGGAAAGAUCCA	945-963
51	NCGAUCUCCAGUCCUCC	90	GGAAAGGACUGGAAAGAUCCN	945-963
52	NCGAUCUCCAGUCCUCCN	91	NGAAAGGACUGGAAAGAUCCN	945-963
53	UGAAGUCAUUCUGCUCUGC	92	GCAGAGCAGAAUGACUCCA	1289-1307
54	NGAAGUCAUUCUGCUCUGC	93	GCAGAGCAGAAUGACUCCN	1289-1307
55	NGAAGUCAUUCUGCUCUGN	94	NCAGAGCAGAAUGACUCCN	1289-1307
56	AUAGAAUGUAGGCACAG	95	CUGUGCCUACAUCUUCUAU	1579-1597
57	UUAGAAUGUAGGCACAG	96	CUGUGCCUACAUCUUCUAA	1579-1597
58	NUAGAAUGUAGGCACAG	97	CUGUGCCUACAUCUUCUAN	1579-1597
59	NUAGAAUGUAGGCACAN	98	NUGUGCCUACAUCUUCUAN	1579-1597

[0217] 包含或由表2中的核苷酸序列组成的 α -ENaC RNAi剂有义链和反义链可为修饰核苷酸或未修饰核苷酸。在一些实施方案中,具有包含或由表2中的任何核苷酸序列组成的有

义和反义链序列的 α -ENaC RNAi剂全部或基本上全部为修饰核苷酸。

[0218] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的反义链与表2中的任何反义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的有义链与表2中的任何有义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0219] 如本文使用的,表2中公开的序列中列出的每个N可独立地选自任何和所有核碱基(包括在修饰和未修饰核苷酸两者上发现的那些)。在一些实施方案中,表2中公开的序列中列出的N核苷酸具有与另一条链的相应位置的N核苷酸互补的核碱基。在一些实施方案中,表2中公开的序列中列出的N核苷酸具有不与另一条链的相应位置的N核苷酸互补的核碱基。在一些实施方案中,表2中公开的序列中列出的N核苷酸具有与另一条链的相应位置的N核苷酸相同的核碱基。在一些实施方案中,表2中公开的序列中列出的N核苷酸具有与另一条链的相应位置的N核苷酸不同的核碱基。

[0220] 表3和表4中提供了某些修饰的 α -ENaC RNAi剂有义和反义链。表3中提供了修饰的 α -ENaC RNAi剂反义链及其潜在的未修饰的核碱基序列。表4中提供了修饰的 α -ENaC RNAi剂有义链及其潜在的未修饰的核碱基序列。在形成 α -ENaC RNAi剂中,以上表3和表4以及表2中列出的每个潜在的碱基序列中的每个核苷酸均可作为修饰核苷酸。

[0221] 本文所述的 α -ENaC RNAi剂通过使反义链与有义链退火而形成。含有表2或表4中列出的序列的有义链可与含有表2或表3中列出的序列的任何反义链杂交,前提是两个序列在连续的16、17、18、19、20或21个核苷酸序列上具有至少85%互补性的区域。

[0222] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何序列的核苷酸序列。

[0223] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表2、表3或表4中任何序列的有义链和反义链的核碱基序列的双链体或由其组成。

[0224] 表3中提供了含有修饰核苷酸的反义链的实例。表4中提供了含有修饰核苷酸的有义链的实例。

[0225] 如表3和4所用的,以下符号用于表示修饰核苷酸、靶向基团和连接基团:

[0226] A=腺苷-3'-磷酸酯

[0227] C=胞苷-3'-磷酸酯

[0228] G=鸟苷-3'-磷酸酯

[0229] U=尿苷-3'-磷酸酯

[0230] I=肌苷-3'-磷酸酯

[0231] a=2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯

[0232] as=2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯

[0233] c=2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯

[0234] cs=2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯

[0235] g=2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯

[0236] gs=2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯

[0237] i=2'-O-甲基肌苷-3'-磷酸酯

[0238] is=2'-O-甲基肌苷-3'-硫代磷酸酯

[0239] t=2'-O-甲基-5-甲基尿苷-3'-磷酸酯

- [0240] $t_s=2'$ -0-甲基-5-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
- [0241] $u=2'$ -0-甲基尿苷-3'-磷酸酯
- [0242] $u_s=2'$ -0-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
- [0243] Nf=任何2'-氟修饰核苷酸
- [0244] Af= $2'$ -氟腺苷-3'-磷酸酯
- [0245] Afs= $2'$ -氟腺苷-3'-硫代磷酸酯
- [0246] Cf= $2'$ -氟胞苷-3'-磷酸酯
- [0247] Cfs= $2'$ -氟胞苷-3'-硫代磷酸酯
- [0248] Gf= $2'$ -氟鸟苷-3'-磷酸酯
- [0249] Gfs= $2'$ -氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯
- [0250] Tf= $2'$ -氟-5'-甲基尿苷-3'-磷酸酯
- [0251] Tfs= $2'$ -氟-5'-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯
- [0252] Uf= $2'$ -氟尿苷-3'-磷酸酯
- [0253] Ufs= $2'$ -氟尿苷-3'-硫代磷酸酯
- [0254] dN=任何2'-脱氧核糖核苷酸
- [0255] dT= $2'$ -脱氧胸苷-3'-磷酸酯
- [0256] $N_{UNA}=2',3'$ -裂环核苷酸模拟物(未锁核碱基类似物)-3'-磷酸酯
- [0257] $N_{UNAs}=2',3'$ -裂环核苷酸模拟物(未锁核碱基类似物)-3'-硫代磷酸酯
- [0258] $A_{UNA}=2',3'$ -裂环-腺苷-3'-磷酸酯
- [0259] $A_{UNAs}=2',3'$ -裂环-腺苷-3'-硫代磷酸酯
- [0260] $C_{UNA}=2',3'$ -裂环-胞苷-3'-磷酸酯
- [0261] $C_{UNAs}=2',3'$ -裂环-胞苷-3'-硫代磷酸酯
- [0262] $G_{UNA}=2',3'$ -裂环-鸟苷-3'-磷酸酯
- [0263] $G_{UNAs}=2',3'$ -裂环-鸟苷-3'-硫代磷酸酯
- [0264] $U_{UNA}=2',3'$ -裂环-尿苷-3'-磷酸酯
- [0265] $U_{UNAs}=2',3'$ -裂环-尿苷-3'-硫代磷酸酯
- [0266] a_{2N}=参见表7
- [0267] a_{2Ns}=参见表7
- [0268] pu_{2N}=参见表7
- [0269] pu_{2Ns}=参见表7
- [0270] D2us=参见表7
- [0271] Npu=参见表7
- [0272] Nus=参见表7
- [0273] N_{LNA} =锁定核苷酸
- [0274] $Nf_{ANA}=2'$ -F-阿糖核苷酸
- [0275] NM= $2'$ -0-(2-甲氧基乙基)核苷酸
- [0276] AM= $2'$ -0-(2-甲氧基乙基)腺苷-3'-磷酸酯
- [0277] AMs= $2'$ -0-(2-甲氧基乙基)腺苷-3'-硫代磷酸酯
- [0278] TM= $2'$ -0-(2-甲氧基乙基)胸苷-3'-磷酸酯

- [0279] TMs=2'-O-(2-甲氧基乙基)胸苷-3'-硫代磷酸酯
- [0280] R=核糖醇
- [0281] (invdN)=任何倒置的脱氧核糖核苷酸(3'-3'连接的核苷酸)
- [0282] (invAb)=倒置的(3'-3'连接的)脱碱基脱氧核糖核苷酸-5'-磷酸酯,参见表7
- [0283] (invAb)s=倒置的(3'-3'连接的)脱碱基脱氧核糖核苷酸-5'-硫代磷酸酯,参见表7
- [0284] (invn)=任何倒置的2'-OMe核苷酸(3'-3'连接的核苷酸)
- [0285] s=硫代磷酸酯连接
- [0286] vpdN=乙烯基膦酸酯脱氧核糖核苷酸
- [0287] (5Me-Nf)=5'-Me,2'-氟核苷酸
- [0288] cPrp=环丙基膦酸酯,参见表7
- [0289] epTcPr=参见表7
- [0290] epTM=参见表7
- [0291] spus=参见表7
- [0292] (Chol-TEG)=参见表7
- [0293] (TEG-Biotin)=参见表7
- [0294] (PEG-C3-SS)=参见表7
- [0295] (Alk-SS-C6)=参见表7
- [0296] (C6-SS-Alk)=参见表7
- [0297] (C6-SS-C6)=参见表7
- [0298] (6-SS-6)=参见表7
- [0299] (C6-SS-Alk-Me)=参见表7
- [0300] (NH₂-C6)=参见表7
- [0301] (TriAlk#)=参见表7
- [0302] (TriAlk#)s=参见表7
- [0303] 如本领域的普通技术人员将易于理解的,除非通过序列(比如通过硫代磷酸酯连接“s”)另外说明,否则当存在于寡核苷酸中时,核苷酸单体通过5'-3'-磷酸二酯键相互连接。进一步地,本领域的普通技术人员将易于理解,在给定寡核苷酸序列的3'末端的末端核苷酸一般地会在给定单体的相应3'位具有羟基(-OH)而不是离体的磷酸酯部分。此外,如普通技术人员将容易理解和意识到的,尽管本文所述的硫代磷酸酯化学结构一般地在硫原子上显示阴离子,但是本文公开的发明包括所有硫代磷酸酯互变异构体和/或非对映异构体(例如其中硫原子具有双键并且阴离子在氧原子上)。除非本文另外明确说明,否则在描述本文公开的 α -ENaC RNAi剂和 α -ENaC RNAi剂的组合物时,使用本领域的普通技术人员的这种理解。
- [0304] 与本文公开的 α -ENaC RNAi剂一起使用的靶向基团和连接基团的某些实例包括在以下表6中提供的化学结构中。每个有义链和/或反义链可具有本文列出的任何靶向基团或连接基团,以及其他靶向或连接基团,其缀合于序列的5'和/或3'末端。

[0305]

表 3. α -ENaC RNAi 剂反义链序列

AS 链 ID	修饰的反义链(5' → 3')	SEQ ID NO.	潜在的碱基序列(5' → 3') (显示为未修饰的核苷酸序列)	SEQ ID NO.
AM04730-AS	usAfsusuuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfcusg	99	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCUG	224
AM05080-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfcusg	100	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCUG	224
AM05081-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	6	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05082-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfagsc	101	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05083-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaus	102	UAUUUGUUCUGGUUGCACAUU	226
AM05084-AS	vpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	103	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05085-AS	asAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfagsc	104	AAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	227
AM05772-AS	usAfsusGfaAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfsc	105	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUGC	228
AM05773-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfgUfcUfgGfuAfgAfsa	106	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGAA	229
AM05774-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfuUfcUfgGfcAfcAfs	107	UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG	230
AM05775-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfaAfs	108	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAAG	231
AM05776-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgAfs	109	UUUUUUGUACAGGUCAAAAGAG	232
AM05777-AS	usAfsusGfaAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfsc	110	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUGC	228
AM05778-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfgUfcUfgGfuAfgAfsa	111	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGAA	229
AM05779-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfuUfcUfgGfcAfcAfs	112	UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG	230
AM05780-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfaAfs	113	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAAG	231
AM05781-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgAfs	114	UUUUUUGUACAGGUCAAAAGAG	232
AM05782-AS	usAfsusGfaAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuus	115	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUUU	233
AM05783-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfgUfcUfgGfuAfgus	116	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGUU	234
AM05784-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfuUfcUfgGfcAfcus	117	UGAUUUGUUCUGGUUGCACUU	235
AM05785-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfaus	118	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAUAU	236
AM05786-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgus	119	UUUUUUGUACAGGUCAAAAGUU	237
AM05916-AS	cPrpusAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	120	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7

[0306]

AM05917-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	121	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06240-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfc	122	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06460-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfc(invAb)	123	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06461-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	124	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06462-AS	cPrpusAfsuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	125	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06691-AS	usGfsasUfcUfuCfcAfgUfcCfuUfcCfaGfsu	126	UGAUCUUCACAGUCCUUCACAGU	238
AM06693-AS	usCfsgsAfuCfuUfcCfaGfuCfcUfuCfcAfsG	127	UCGAUCUUCACAGUCCUUCACAG	239
AM06695-AS	usGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcGfsc	128	UGAAGUCAUUCUCUCUCUCGCGC	240
AM06697-AS	asUfsasGfaAfgAfuGfuAfgGfcAfcAfgCfsc	129	AUAGAAGAUGUAGGCACACAGCC	241
AM06699-AS	usAfsusCfgUfgAfcAfgAfgAfgAfgAfcUfsc	130	UAUCGUGACACAGAGGGAGACUC	242
AM06701-AS	usUfsgsAfcCfaUfcGfuGfaCfaGfaGfgGfisa	131	UUGACCAUCGUGACAGAGGGGA	243
AM06765-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaG _{UNA} C _{UNA}	132	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGC	7
AM06766-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfC _{UNA} U _{UNA}	133	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGCU	244
AM06767-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfcU _{UNA} U _{UNA}	134	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGCUU	245
AM07066-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	10	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07170-AS	cPrpusAfsusUfuG _{UNA} UfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	135	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07174-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsu	136	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGU	247
AM07200-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	2	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07204-AS	usAfsusUfuGfU _{UNA} UfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	137	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07206-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	138	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	248
AM07208-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsu	139	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGGU	249
AM07333-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	140	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGU	250
AM07335-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfisa	141	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGU	247
AM07340-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfisa	142	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGA	251
AM07409-AS	pusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	143	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07410-AS	D2usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	144	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3
AM07411-AS	spusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	145	UAUUUGUUUCUGGUUGCACCAGG	3

[0307]

AM07412-AS	epusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	146	UAUUUUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07484-AS	U _{UNAS} AfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	147	UAUUUUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07485-AS	isAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	148	IAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	252
AM07496-AS	usAfsusUfugucugGfuUfgCfaCfaGfsu	149	UAUUUUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07497-AS	usAfsusUfuguuucUfgGfuUfgcaCfaGfsu	150	UAUUUUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07605-AS	TMsAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfisc	151	TAUUUUUCUGGUUGCACAGC	253
AM07669-AS	asGfisasAfgUfcAfuUfcUfgCfuGfcusu	152	AGAAAGUCAUUCUGCUCUGCUU	254

表 4. α-ENaC 剂有义链序列

链 ID	修饰的有义链(5' → 3')	SEQ ID NO.	潜在的碱基序列(5' → 3') (显示为未修饰的核苷酸序列)	SEQ ID NO.
AM05073-SS	gscugCfaAfcCfaGfaacaaauas(invAb)	153	GCUGGCAACCCAGAACAAAUA	255
AM05074-SS	gscugcaAfCfCfagaacaaauas(invAb)	154	GCUGGCAACCCAGAACAAAUA	255
AM05075-SS	asaugcaAfCfCfagaacaaauas(invAb)	295	AAUGUGCAACCCAGAACAAAUA	296
AM05077-SS	gscugcaAfCfCfagaacaaauas(invAb)	155	GCUGGCAACCCAGAACAAAUU	256
AM05487-SS	(NH2-C6)sgscugcaAfCfCfagaacaaauas(invAb)	156	GCUGGCAACCCAGAACAAAUA	255
AM05787-SS	gscagagcaGfAfAfugacuucauas(invAb)	157	GCAGAGCAGAAUGACUUCAUUA	257
AM05788-SS	usucuaccaGfAfCfauacuucauas(invAb)	158	UUCUACCAGACAUUCUCAUCA	258
AM05789-SS	csugugcaAfCfAfagaacaaauas(invAb)	159	CUGUGCAACCCAGAACAAAUA	259
AM05790-SS	csuuuaccAfGfAfcuacuucauas(invAb)	160	CUUCUACCAGACAUUCUCAUA	260
AM05791-SS	csuuuugaCfCfUfguacaaauas(invAb)	161	CUCUUUGACCCUGUACAAAUA	261
AM05792-SS	(invAb)AfgCfaGfAfAfufGfCfuUfcauasu(invAb)	162	AGAGCAGAAUGACUUCAUUUU	262
AM05793-SS	(invAb)CfuAfcCfaGfAfCfaUfaCfuCfaucausu(invAb)	163	CUACCAGACAUUCUCAUUU	263
AM05794-SS	(invAb)GfuGfcAfaCfCfAfGfAfaCfaAfaucausu(invAb)	164	GUGCAACCCAGAACAAAUAUU	264
AM05795-SS	(invAb)UfcUfaCfCfAfGfAfCfAfuAfcUfcauasu(invAb)	165	UCUACCAGACAUUCUCAUUU	265
AM05796-SS	(invAb)CfuUfuGfCfCfUfgUfaCfaAfaucausu(invAb)	166	CUUUGACCCUGUACAAAUAUU	266
AM06162-SS	(invAb)gscugcaAfCfCfagaacaaaua(invAb)	167	GCUGGCAACCCAGAACAAAUA	255

[0308]

链 ID	修饰的有义链(5' → 3')	SEQ ID NO.	潜在的碱基序列(5' → 3') (显示为未修饰的核苷酸序列)	SEQ ID NO.
AM06246-SS	gcugugcaAfcTcfagaacaaau(invA)	168	GCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	255
AM06459-SS	gcugugcaAfcTcfagaacaaau(invAb)	169	GCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	255
AM06690-SS	(NH2-C6)ssascggaagGfAfcfuggaagaucaas(invAb)	170	ACUGGAAGGACUGGGAAGAUCGA	267
AM06692-SS	(NH2-C6)scsuggaaggAfcTfuggaagaucaas(invAb)	171	CUGGAAGGACUGGGAAGAUCGA	268
AM06694-SS	(NH2-C6)sgscgagagCfAfcfaungacucaas(invAb)	172	GCGCAGAGCAGAAUGACUUCA	269
AM06696-SS	(NH2-C6)sgsgcugugcTfJfAfaucuucaus(invAb)	173	GGCUGGCCUACAUUUUCUAU	270
AM06698-SS	(NH2-C6)sgsagucuccTfTcfugucagauas(invAb)	174	GAGUCUCCUCUCUGACGUA	271
AM06700-SS	(NH2-C6)susccucugUfcFafegaugaucaas(invAb)	175	UCCUCUCUGCACGUAUGGUCAA	272
AM07064-SS	(NH2-C6)jgscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	176	GCGUGUCAACCAGAACAAAAUA	255
AM07065-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	177	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07067-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	178	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07169-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	179	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07171-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	180	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	274
AM07172-SS	(NH2-C6)scscugugcaAfcTcfagaacaa_2Nauas(invAb)	181	CCUGUGCAACCAGAACAA(A ^{2h})AUA	275
AM07173-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	182	ACUGUGCAACCAGAACAAAAUA	276
AM07201-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	183	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07202-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	184	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	274
AM07203-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	185	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	277
AM07205-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	186	CCCUGCAACCAGAACAAAAUA	278
AM07207-SS	(NH2-C6)asccegugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	187	ACCGUGCAACCAGAACAAAAUA	279
AM07217-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)s(C6-SS-C6)	188	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07218-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)(C6-SS-C6)	189	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07276-SS	(TriAlk1)sgscugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)	190	GCGUGCAACCAGAACAAAAUA	255
AM07280-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)s(6-SS-6)	191	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273
AM07281-SS	(NH2-C6)escugugcaAfcTcfagaacaaauas(invAb)(6-SS-6)	192	CCUGUGCAACCAGAACAAAAUA	273

[0309]

链 ID	修饰的有义链(5' → 3')	SEQ ID NO.	潜在的碱基序列(5' → 3') (显示为未修饰的核苷酸序列)	SEQ ID NO.
AM07329-SS	(TriAlk1)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	193	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07330-SS	(TriAlk2)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	194	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07331-SS	(TriAlk3)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	195	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07332-SS	(NH2-C6)ascggugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	196	ACGGUGCAACCAGAACAAAUA	280
AM07334-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	197	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07336-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	198	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	281
AM07337-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	199	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	282
AM07338-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	200	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	283
AM07339-SS	(NH2-C6)uscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	201	UCUGUGCAACCAGAACAAAUA	284
AM07341-SS	(NH2-C6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	202	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	285
AM07342-SS	(NH2-C6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	203	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	275
AM07343-SS	(NH2-C6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	204	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	286
AM07344-SS	(NH2-C6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	205	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	287
AM07400-SS	(TriAlk4)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	206	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07401-SS	(TriAlk5)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	207	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07402-SS	(TriAlk6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	208	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07486-SS	(NH2-C6)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	209	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	288
AM07495-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	210	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07498-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	211	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07499-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	212	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	282
AM07594-SS	(TriAlk7)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	213	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07595-SS	(TriAlk8)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	214	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07606-SS	(NH2-C6)sgscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)(C6-SS-C6)(invAb)	215	GCUGUGCAACCAGAACAAAUA	255
AM07611-SS	(TriAlk9)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	216	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07612-SS	(TriAlk10)escugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	217	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273

[0310]

链 ID	修饰的有义链(5' → 3')	SEQ ID NO.	潜在的碱基序列(5' → 3') (显示为未修饰的核苷酸序列)	SEQ ID NO.
AM07665-SS	(NH2-C6)ascuggaagGfAfCfuggaagaucas(invAb)	218	ACUGGAAAGGACUCUGGAAGAUCA	267
AM07666-SS	(NH2-C6)scsugugcaaCfCfAfgaacaauucas(invAb)	219	CUGUGCAAACCAGAACAAAUCA	259
AM07667-SS	(NH2-C6)csugugcaaCfCfAfgaacaauucas(invAb)	220	CUGUGCAAACCAGAACAAAUCA	259
AM07668-SS	(NH2-C6)sgscagagCfAfGfaungacuncuuus(invAb)	221	GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU	289
AM07670-SS	(NH2-C6)gscagagCfAfGfaungacuncuuus(invAb)	222	GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU	289
AM07807-SS	(TriAlk14)cscugugcaAfCfCfagaacaauuas(invAb)	223	CCUUGUCAACCAGAACAAAUCA	273

(A^{2N}) = 2-氨基腺嘌呤核苷酸

[0311] 本文公开的 α -ENaC RNAi剂通过使反义链与有义链退火而形成。可使含有表2或表4中列出的序列的有义链与含有表2或表3中列出的序列的任何反义链杂交,前提是两个序

列在连续16、17、18、19、20或21个核苷酸的序列上具有至少85%互补的区域。

[0312] 在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的反义链与表3中的任何反义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。在一些实施方案中,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的有义链与表4中的任何有义链序列相差0、1、2或3个核苷酸。

[0313] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何序列的核苷酸序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17、2-17、1-18、2-18、1-19、2-19、1-20、2-20、1-21、2-21、1-22、2-22、1-23、2-23、1-24或2-24的序列。在某些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表3中任何一个修饰序列的修饰序列或由其组成。

[0314] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂有义链包含表2或表4中任何序列的核苷酸序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂有义链包含表2或表4中任何序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17、2-17、3-17、4-17、1-18、2-18、3-18、4-18、1-19、2-19、3-19、4-19、1-20、2-20、3-20、4-20、1-21、2-21、3-21、4-21、1-22、2-22、3-22、4-22、1-23、2-23、3-23、4-23、1-24、2-24、3-24或4-24的序列。在某些实施方案中, α -ENaC RNAi剂有义链包含表3中任何一个修饰序列的修饰序列或由其组成。

[0315] 对于本文公开的RNAi剂,反义链1位的核苷酸(从5'末端→3'末端)可与 α -ENaC基因完全互补,或者可与 α -ENaC基因非互补。在一些实施方案中,反义链1位的核苷酸(从5'末端→3'末端)为U、A或dT(或者U、A或dT的修饰形式)。在一些实施方案中,反义链1位的核苷酸(从5'末端→3'末端)与有义链形成A:U或U:A碱基对。

[0316] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂反义链包含表2或表3中任何反义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)2-18或2-19的序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi有义链包含表2或表4中任何有义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17或1-18的序列。

[0317] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含:(i)反义链,其包含表2或表3中任何反义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)2-18或2-19的序列,和(ii)有义链,其包含表2或表4中任何有义链序列的核苷酸(从5'末端→3'末端)1-17或1-18的序列。

[0318] 可使含有表2或表4中列出的序列的有义链与含有表2或表3中列出的序列的任何反义链杂交,前提是两个序列在连续16、17、18、19、20或21个核苷酸的序列上具有至少85%互补性的区域。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂具有由表4中任何修饰序列的修饰序列组成的有义链和由表3中任何修饰序列的修饰序列组成的反义链。某些代表性的序列配对以表5所示的双链体ID号为例。

[0319] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含、由本文呈现的任何一个双链体ID号表示的双链体组成或基本上由其组成。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂由本文呈现的任何双链体ID号组成。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含本文呈现的任何双链体ID号的有义链和反义链核苷酸序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含本文呈现的任何双链体ID号的有义链和反义链核苷酸序列以及靶向基团、连接基团和/或其他非核苷酸基团,其中靶向基团、连接基团和/或其他非核苷酸基团共价连接(即缀合)于有义链或反义链。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含本文呈现的任何双链体ID号的有义链和反义链修饰核苷酸序列。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含本文呈现的任何双链体ID号的有义链和反义链修饰核苷酸序列以及靶向基团、连接基团和/或其他非核苷酸基团,其中靶向基团、连接

基团和/或其他非核苷酸基团共价连接于有义链或反义链。

[0320] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表2或表5的任何反义链/有义链双链体的核苷酸序列的反义链和有义链,并且进一步包含靶向基团。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表2或表5的任何反义链/有义链双链体的核苷酸序列的反义链和有义链,并且进一步包含一个或多个 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体。

[0321] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表2或表5的任何反义链/有义链双链体的核苷酸序列的反义链和有义链,并且进一步包含为整联蛋白靶向配体的靶向基团。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表2或表5的任何反义链/有义链双链体的核苷酸序列的反义链和有义链,并且进一步包含一个或多个 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体或 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体簇(例如三齿 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白靶向配体)。

[0322] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表5的任何反义链/有义链双链体的修饰核苷酸序列的反义链和有义链。

[0323] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含具有表5的任何反义链/有义链双链体的修饰核苷酸序列的反义链和有义链,并且进一步包含整联蛋白靶向配体。

[0324] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂包含、由表5的任何双链体组成或基本上由其组成。

[0325] 表5.具有相应有义和反义链ID号的 α -ENaC RNAi剂双链体

[0326]

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD04019	AM04730-AS	AM05073-SS
AD04020	AM04730-AS	AM05074-SS
AD04021	AM05080-AS	AM05074-SS
AD04022	AM05081-AS	AM05074-SS
AD04023	AM05082-AS	AM05074-SS
AD04024	AM05083-AS	AM05075-SS
AD04025	AM05084-AS	AM05074-SS
AD04026	AM05085-AS	AM05077-SS
AD04526	AM05772-AS	AM05787-SS
AD04527	AM05773-AS	AM05788-SS
AD04528	AM05774-AS	AM05789-SS
AD04529	AM05775-AS	AM05790-SS
AD04530	AM05776-AS	AM05791-SS
AD04531	AM05777-AS	AM05792-SS
AD04532	AM05778-AS	AM05793-SS
AD04533	AM05779-AS	AM05794-SS
AD04534	AM05780-AS	AM05795-SS
AD04535	AM05781-AS	AM05796-SS
AD04536	AM05782-AS	AM05792-SS
AD04537	AM05783-AS	AM05793-SS
AD04538	AM05784-AS	AM05794-SS
AD04539	AM05785-AS	AM05795-SS

[0327]

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD04540	AM05786-AS	AM05796-SS
AD04835	AM05917-AS	AM05487-SS
AD04858	AM05917-AS	AM05074-SS
AD04859	AM06240-AS	AM06162-SS
AD04976	AM06460-AS	AM06459-SS
AD04977	AM06461-AS	AM06459-SS
AD04978	AM05916-AS	AM06459-SS
AD04979	AM06462-AS	AM06459-SS
AD04980	AM06462-AS	AM06246-SS
AD05116	AM06691-AS	AM06690-SS
AD05117	AM06693-AS	AM06692-SS
AD05118	AM06695-AS	AM06694-SS
AD05119	AM06697-AS	AM06696-SS
AD05120	AM06699-AS	AM06698-SS
AD05121	AM06701-AS	AM06700-SS
AD05160	AM06240-AS	AM06459-SS
AD05161	AM06765-AS	AM06459-SS
AD05162	AM06766-AS	AM06459-SS
AD05163	AM06767-AS	AM06459-SS
AD05345	AM05917-AS	AM07064-SS
AD05346	AM07066-AS	AM07065-SS
AD05347	AM07066-AS	AM07067-SS
AD05426	AM07066-AS	AM07169-SS
AD05427	AM07170-AS	AM07065-SS
AD05428	AM07066-AS	AM07171-SS
AD05429	AM07066-AS	AM07172-SS
AD05430	AM07174-AS	AM07173-SS
AD05453	AM07200-AS	AM07067-SS
AD05454	AM07200-AS	AM07201-SS
AD05455	AM07200-AS	AM07202-SS
AD05456	AM07200-AS	AM07203-SS
AD05457	AM07204-AS	AM07067-SS
AD05458	AM07206-AS	AM07205-SS
AD05459	AM07208-AS	AM07207-SS
AD05471	AM07066-AS	AM07217-SS
AD05472	AM07066-AS	AM07218-SS
AD05473	AM07200-AS	AM07217-SS
AD05474	AM07200-AS	AM07218-SS
AD05515	AM05081-AS	AM07276-SS
AD05548	AM07200-AS	AM07280-SS
AD05549	AM07200-AS	AM07281-SS
AD05558	AM07200-AS	AM07329-SS
AD05559	AM07200-AS	AM07330-SS
AD05560	AM07200-AS	AM07331-SS
AD05561	AM07333-AS	AM07332-SS
AD05562	AM07335-AS	AM07334-SS
AD05563	AM07335-AS	AM07336-SS
AD05564	AM07335-AS	AM07337-SS
AD05565	AM07335-AS	AM07338-SS
AD05566	AM07340-AS	AM07339-SS
AD05567	AM07200-AS	AM07341-SS
AD05568	AM07200-AS	AM07172-SS

双链体 ID	反义链 ID	有义链 ID
AD05569	AM07200-AS	AM07342-SS
AD05570	AM07200-AS	AM07343-SS
AD05571	AM07200-AS	AM07344-SS
AD05611	AM07200-AS	AM07400-SS
AD05612	AM07200-AS	AM07401-SS
AD05613	AM07200-AS	AM07402-SS
AD05618	AM07409-AS	AM07067-SS
AD05619	AM07410-AS	AM07067-SS
AD05622	AM07411-AS	AM07067-SS
AD05623	AM07412-AS	AM07067-SS
AD05625	AM05081-AS	AM05487-SS
AD05671	AM07484-AS	AM07067-SS
AD05672	AM07485-AS	AM07067-SS
AD05673	AM07485-AS	AM07486-SS
AD05683	AM07174-AS	AM07334-SS
AD05684	AM07335-AS	AM07495-SS
AD05685	AM07496-AS	AM07495-SS
AD05686	AM07497-AS	AM07334-SS
AD05687	AM07496-AS	AM07498-SS
AD05688	AM07174-AS	AM07337-SS
AD05689	AM07335-AS	AM07499-SS
AD05690	AM07496-AS	AM07499-SS
AD05691	AM07497-AS	AM07337-SS
AD05757	AM07200-AS	AM07594-SS
AD05758	AM07200-AS	AM07595-SS
AD05772	AM07605-AS	AM05487-SS
AD05773	AM05081-AS	AM07606-SS
AD05778	AM07200-AS	AM07611-SS
AD05779	AM07200-AS	AM07612-SS
AD05829	AM06691-AS	AM07665-SS
AD05830	AM05774-AS	AM07666-SS
AD05831	AM05774-AS	AM07667-SS
AD05832	AM07669-AS	AM07668-SS
AD05833	AM07669-AS	AM07670-SS
AD05924	AM07200-AS	AM07807-SS

[0328] 在一些实施方案中,将 α -ENaC RNAi剂制备或提供为盐、混合盐或游离酸。递送至表达 α -ENaC基因的细胞后,本文所述的RNAi剂在体内和/或体外抑制或敲低一个或多个 α -ENaC基因的表达。

[0329] 靶向基团、连接基团、药代动力学(PK)调节剂和递送媒介物

[0330] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂含有或缀合于一个或多个包括(但不限于)以下的非核苷酸基团:靶向基团、连接基团、药代动力学(PK)调节剂、递送聚合物或递送媒介物。非核苷酸基团可增强RNAi剂的靶向、递送或连接。表6中提供了靶向基团和连接基团的实例。非核苷酸基团可共价连接于有义链和/或反义链的3'和/或5'末端。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂含有连接于有义链的3'和/或5'末端的非核苷酸基团。在一些实施方案中,非核苷酸基团连接于 α -ENaC RNAi剂有义链的5'末端。非核苷酸基团可经接头/连接基团直接或间接连接于RNAi剂。在一些实施方案中,非核苷酸基团经不稳定的、可裂解的或可逆的键或接头连接于RNAi剂。

[0331] 在一些实施方案中,非核苷酸基团增强其连接的RNAi剂或缀合物的药代动力学或生物分布特性,以改善缀合物的细胞或组织特异性分布和细胞特异性摄取。在一些实施方

案中,非核苷酸基团增强RNAi剂的内吞作用。

[0333] 靶向基团或靶向部分增强其连接的缀合物或RNAi剂的药代动力学或生物分布特性,以改善缀合物或RNAi剂的细胞特异性(在一些情况下包括器官特异性)分布和细胞特异性(或器官特异性)摄取。靶向基团可为单价、二价、三价、四价,或者对于其针对的靶标具有更高价。代表性的靶向基团非限制性地包括对细胞表面分子具有亲和力的化合物、细胞受体配体、半抗原、抗体、单克隆抗体、抗体片段和对细胞表面分子具有亲和力的抗体模拟物。在一些实施方案中,使用接头,比如PEG接头或一个、两个或三个脱碱基和/或核糖醇(脱碱基核糖)残基(其在一些情况下可用作接头),将靶向基团连接于RNAi剂。在一些实施方案中,靶向基团包含整联蛋白靶向配体。

[0334] 可合成本文所述的 α -ENaC RNAi剂,其在5' -末端和/或3' -末端具有反应性基团,比如氨基(本文也称为胺)。随后可使用本领域典型的方法,使用反应性基团连接靶向部分。

[0335] 例如,在一些实施方案中,合成本文公开的 α -ENaC RNAi剂,其在RNAi剂有义链的5' -末端具有 $\text{NH}_2\text{-C}_6$ 基团。随后可使末端氨基与例如包含 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白靶向配体的基因反应形成缀合物。在一些实施方案中,合成本文公开的 α -ENaC RNAi剂,其在RNAi剂有义链的5' -末端具有一个或多个炔基。随后可使末端炔基与例如包含 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白靶向配体的基因反应形成缀合物。

[0336] 在一些实施方案中,靶向基团包含整联蛋白靶向配体。在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体为 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白靶向配体。 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白靶向配体的使用促进了对在其各自表面具有 $\alpha\text{v}\beta 6$ 的细胞的细胞特异性靶向,并且整联蛋白靶向配体的结合可促进其连接的治疗剂(比如RNAi剂)进入细胞(比如上皮细胞,包括肺上皮细胞和肾上皮细胞)。整联蛋白靶向配体可为单体或单价的(例如具有单个整联蛋白靶向部分)或多聚体或多价的(例如具有多个整联蛋白靶向部分)。可使用本领域已知的方法将靶向基团连接于RNAi寡核苷酸的3' 和/或5' 末端。靶向基团(比如 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白靶向配体)的制备描述于例如国际专利申请公开号WO 2018/085415和美国临时专利申请号62/580398和62/646739中,其每一个的内容以其全部结合至本文中。

[0337] 本公开的实施方案包括用于在体内将 α -ENaC RNAi剂递送至肺上皮细胞的药用组合物。这种药用组合物可包含例如缀合于包含整联蛋白靶向配体的靶向基团的 α -ENaCRNAi剂。在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体由 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白配体组成。

[0338] 在一些实施方案中,连接基团缀合于RNAi剂。连接基团促进RNAi剂与靶向基团、药代动力学调节剂、递送聚合物或递送媒介物的共价连接。连接基团可连接于RNAi剂有义链或反义链的3' 和/或5' 末端。在一些实施方案中,连接基团连接于RNAi剂有义链。在一些实施方案中,连接基团缀合于RNAi剂有义链的5' 或3' 末端。在一些实施方案中,连接基团缀合于RNAi剂有义链的5' 末端。连接基团的实例包括(但不限于):A1k-SMPT-C6、A1k-SS-C6、DBC0-TEG、Me-A1k-SS-C6和C6-SS-A1k-Me、反应性基团(比如伯胺和炔烃)、烷基、脱碱基残基/核苷酸、氨基酸、三炔官能化基团、核糖醇和/或PEG基团。

[0339] 接头或连接基团为两个原子之间的连接,其经一个或多个共价键将一个目标化学基团(比如RNAi剂)或片段连接于另一目标化学基团(比如靶向基团、药代动力学调节剂或递送聚合物)片段。不稳定连接含有不稳定键。连接可任选地包括间隔基,其增加两个所连接原子之间的距离。间隔基可进一步增加连接的柔韧性和/或长度。间隔基包括(但不限于)

烷基、链烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基和芳炔基；其每一个均可含有一个或多个杂原子、杂环、氨基酸、核苷酸和糖类。间隔基为本领域众所周知的，并且前面的列表并不意味着限制描述的范围。

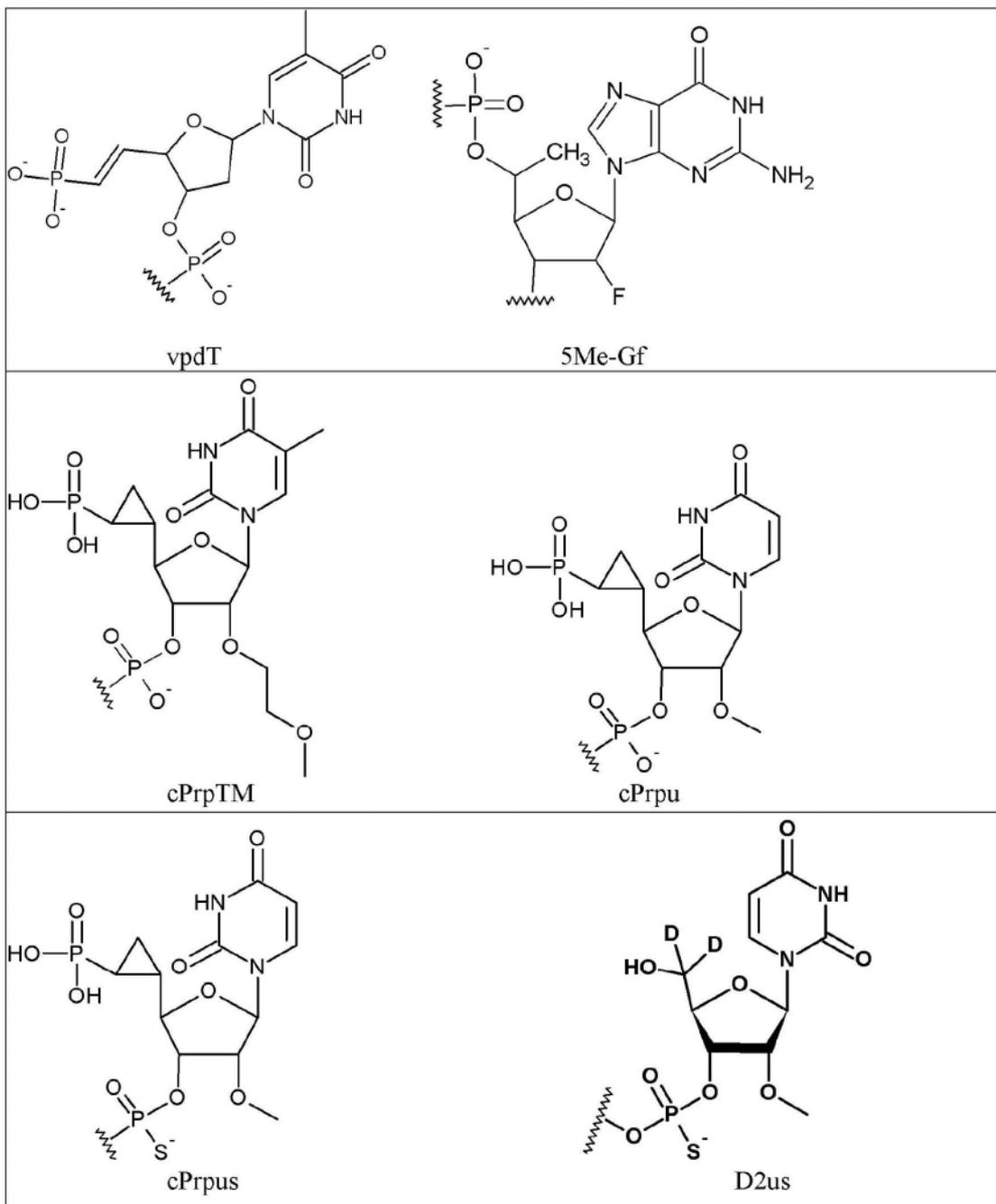
[0340] 在一些实施方案中，靶向基团在没有使用另外接头的情况下连接于 α -ENaC RNAi剂。在一些实施方案中，靶向基团被设计具有易于存在的接头以促进与 α -ENaC RNAi剂的连接。在一些实施方案中，当组合物中包含两种或更多种RNAi剂时，可使用相同接头将两种或更多种RNAi剂连接于其各自的靶向基团。在一些实施方案中，当组合物中包含两种或更多种RNAi剂时，使用不同接头将两种或更多种RNAi剂连接于其各自的靶向基团。

[0341] 表2、3和4中列出的任何 α -ENaC RNAi剂核苷酸序列，无论是修饰还是未修饰，均可含有3' 和/或5' 靶向基团、连接基团和/或药代动力学调节剂。含有3' 或5' 靶向基团、连接基团或药代动力学调节剂的表3和4中列出的或本文别处描述的任何 α -ENaC RNAi剂序列，或者可不含3' 或5' 靶向基团、连接基团或药代动力学调节剂，或者可含有不同的3' 或5' 靶向基团、连接基团或药代动力学调节剂（包括（但不限于）表6所示的那些）。表5中列出的任何 α -ENaC RNAi剂双链体，无论是修饰还是未修饰，均可进一步包含靶向基团或连接基团（包括（但不限于）表6所示的那些），并且靶向基团或连接基团可连接于 α -ENaC RNAi剂双链体的有义链或反义链的3' 或5' 末端。

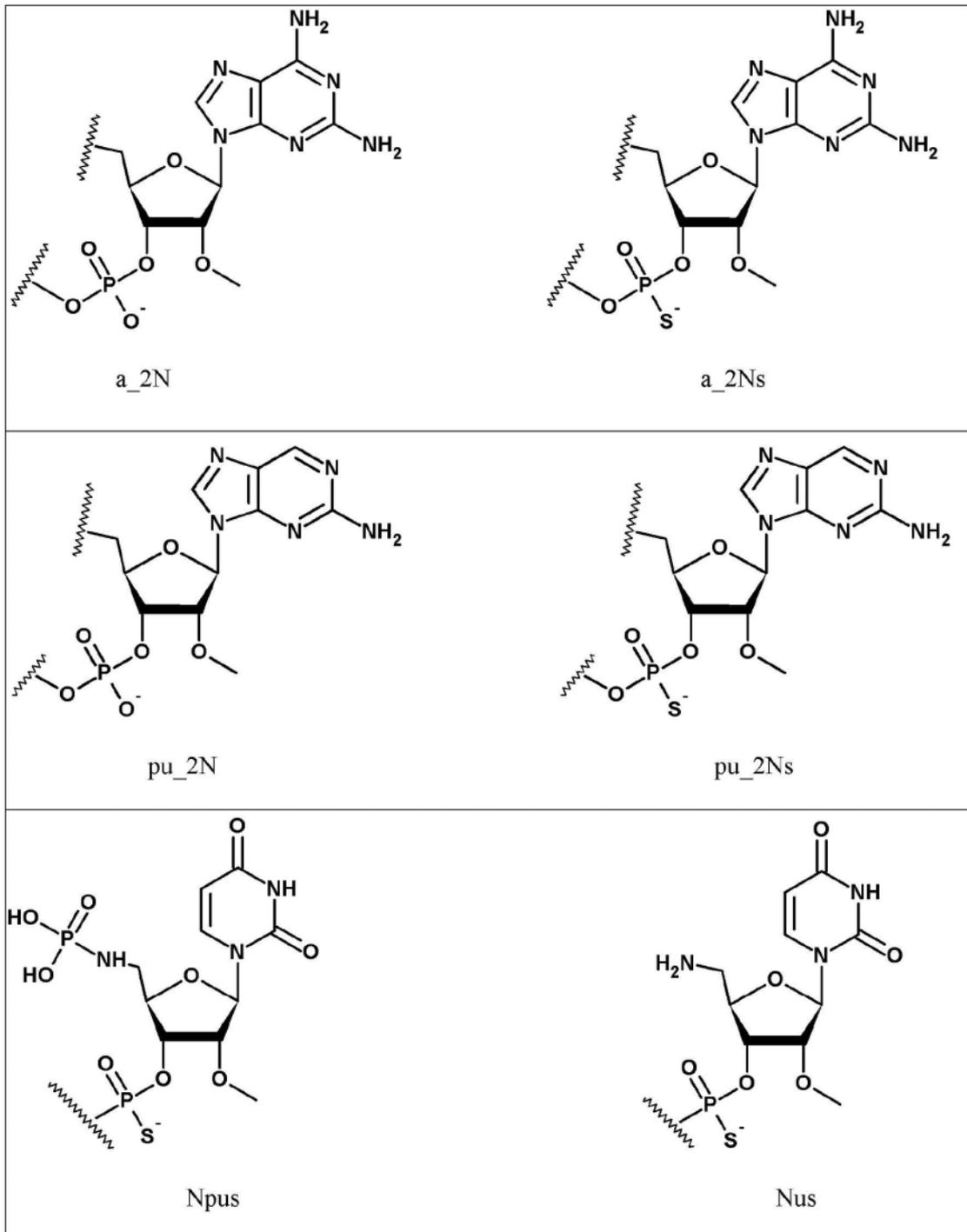
[0342] 表6中提供了某些靶向基团和连接基团的实例。

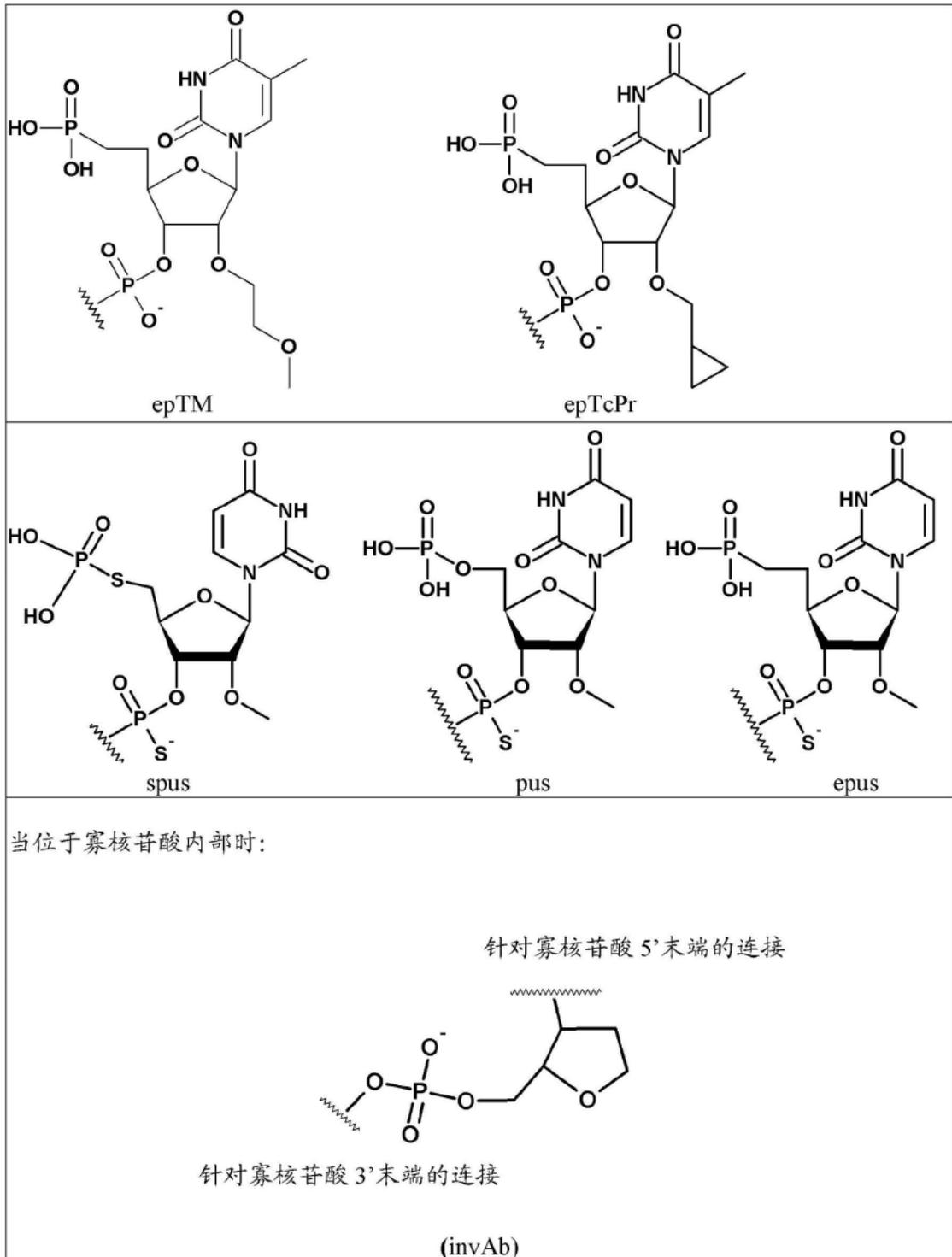
[0343] 表6. 代表各种修饰核苷酸、靶向基团和连接基团的结构

[0344]



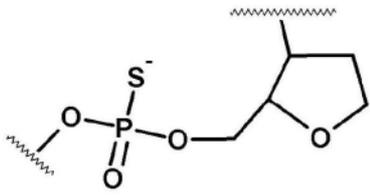
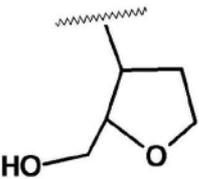
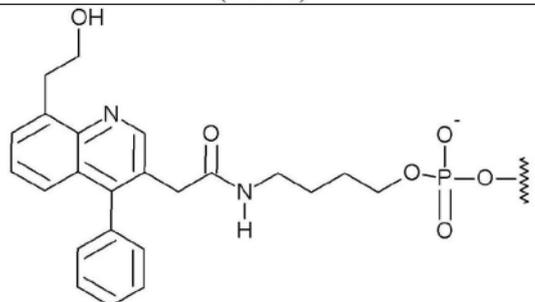
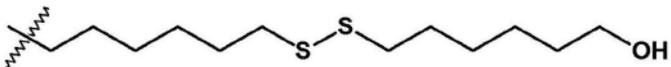
[0345]

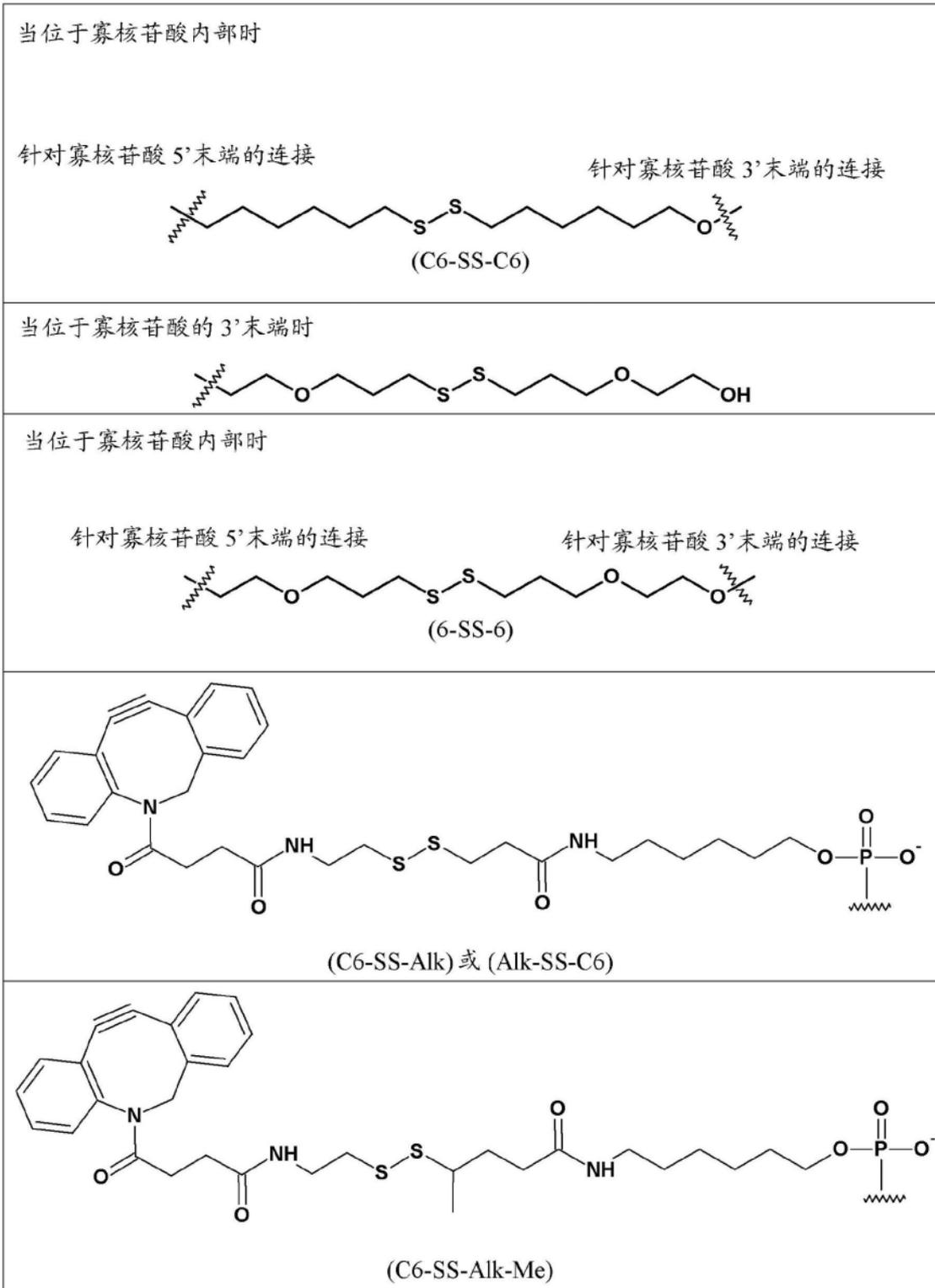




[0346]

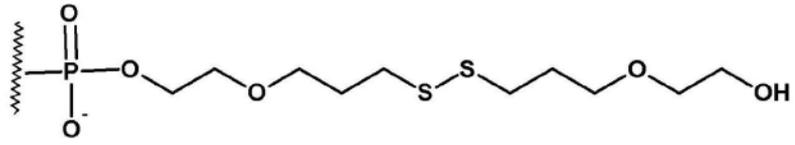
[0347]

<p>当位于寡核苷酸内部时</p> <p style="text-align: right;">针对寡核苷酸 5'末端的连接</p>  <p style="text-align: center;">针对寡核苷酸 3'末端的连接</p> <p style="text-align: center;">(invAb)s</p>
<p>当位于寡核苷酸的 3'末端时</p> <p style="text-align: center;">针对寡核苷酸 5'末端的连接</p>  <p style="text-align: center;">(invAb)</p>
 <p style="text-align: center;">(PAZ)</p>
<p>当位于寡核苷酸的 3'末端时</p>  <p style="text-align: center;">(C6-SS-C6)</p>

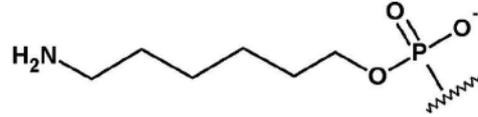


[0348]

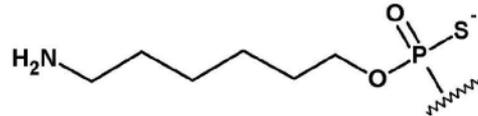
[0349]



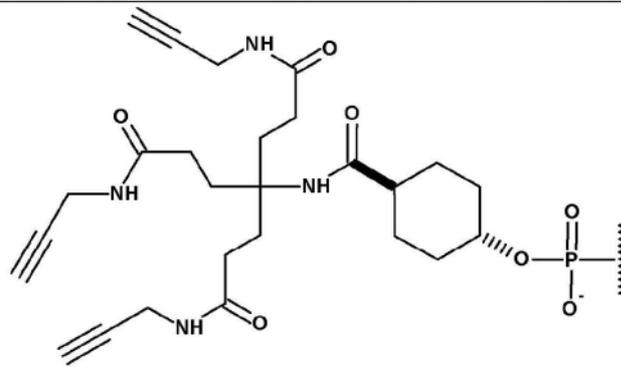
(PEG-C3-SS)



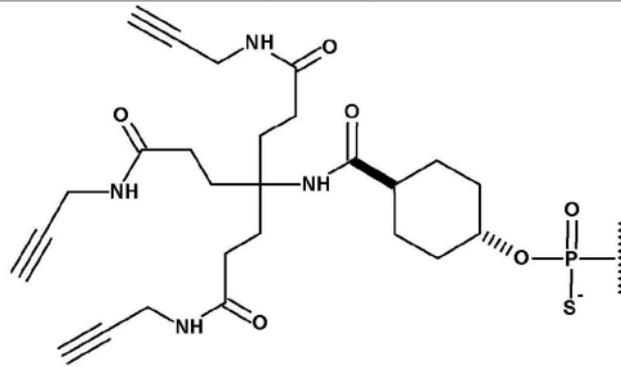
(NH₂-C₆)



(NH₂-C₆)_s

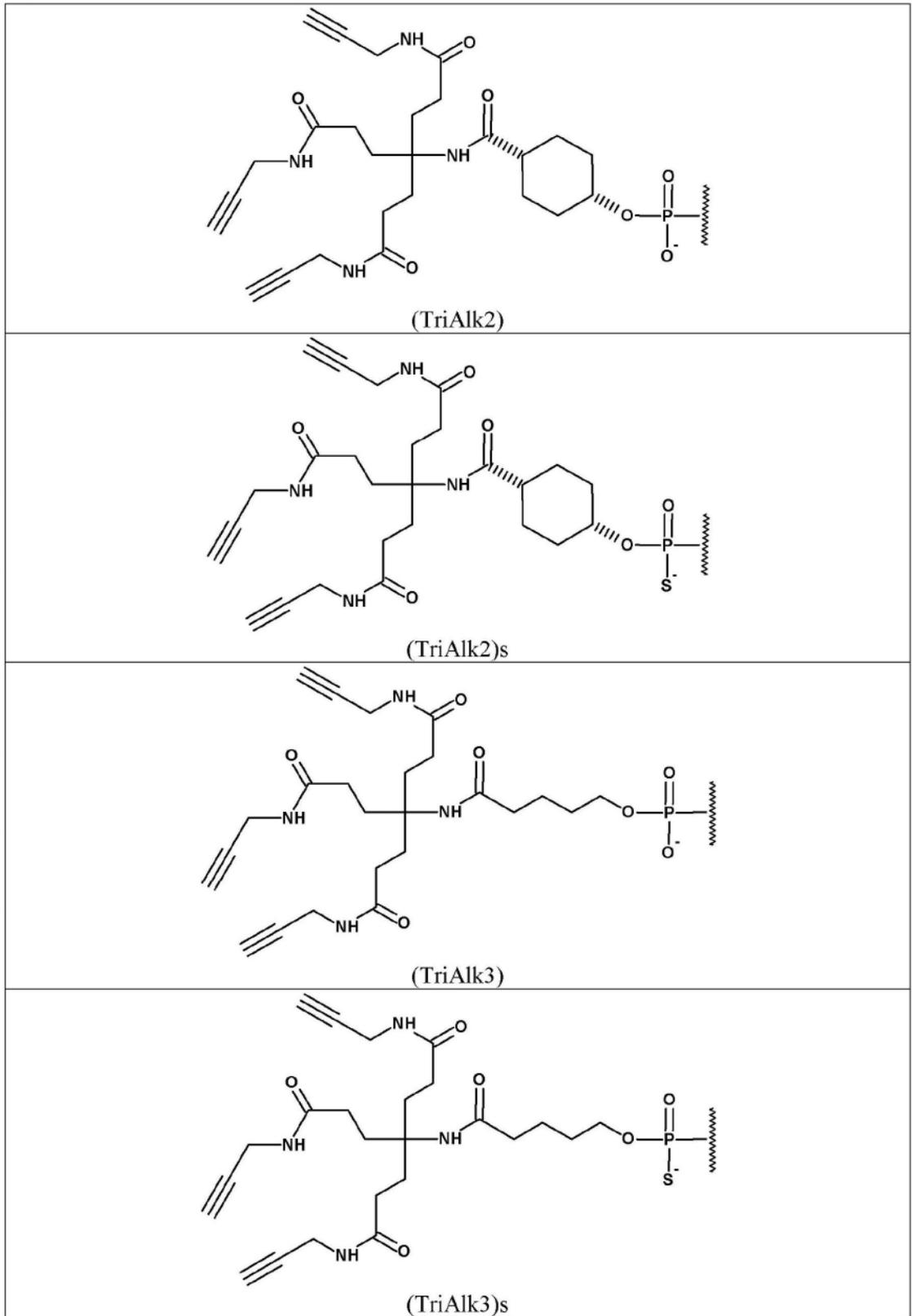


(TriAlk₁)

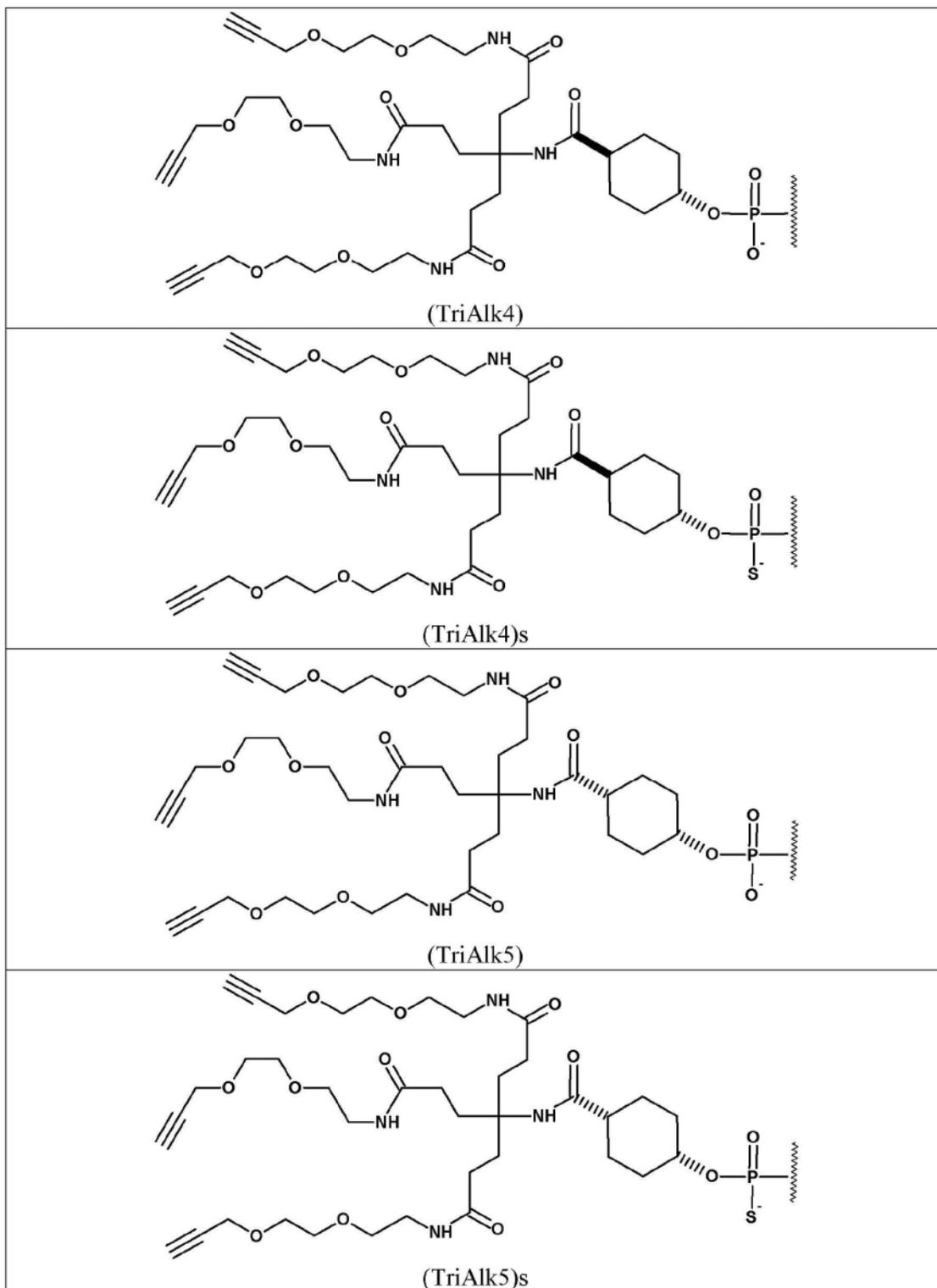


(TriAlk₁)_s

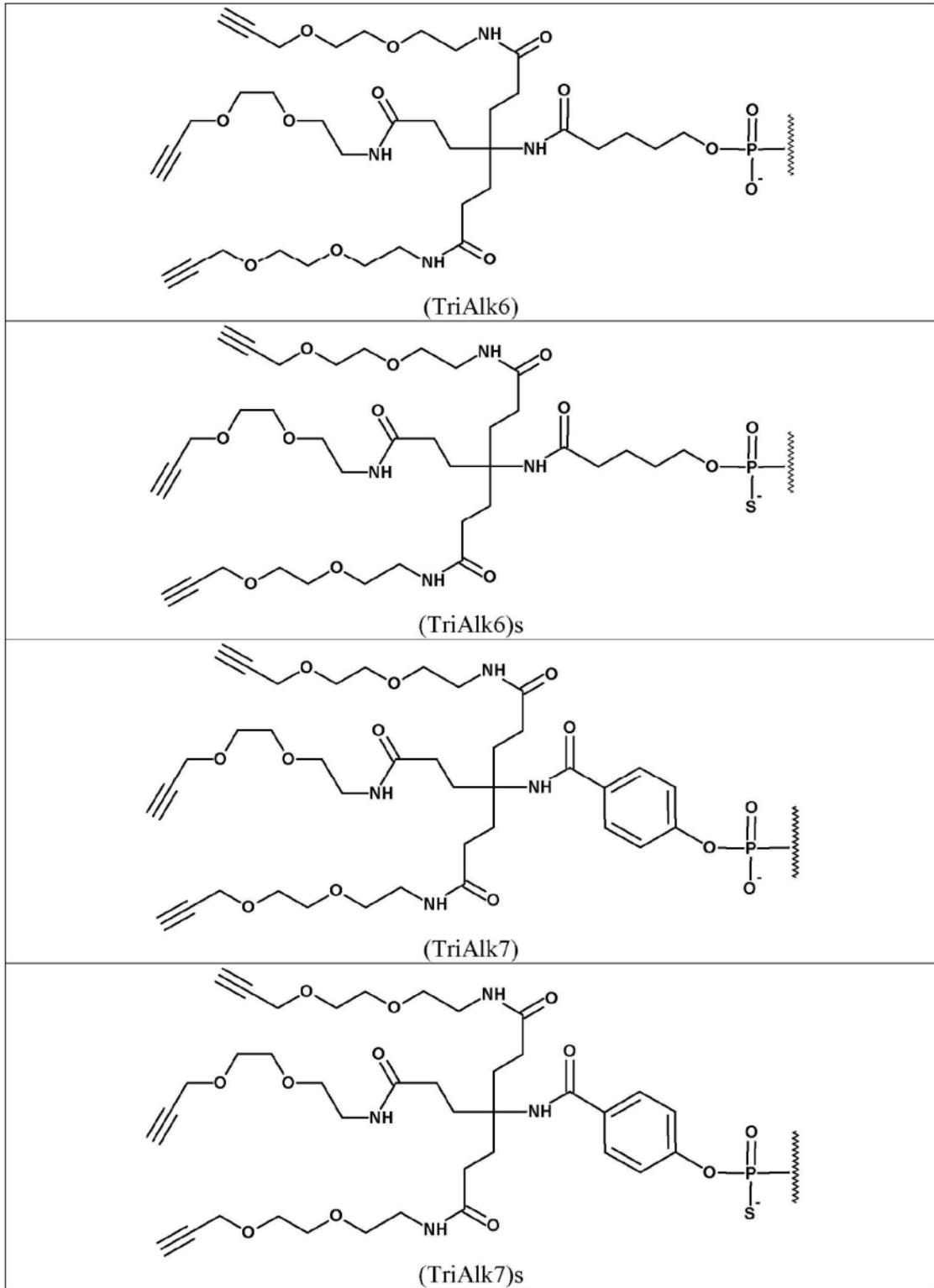
[0350]



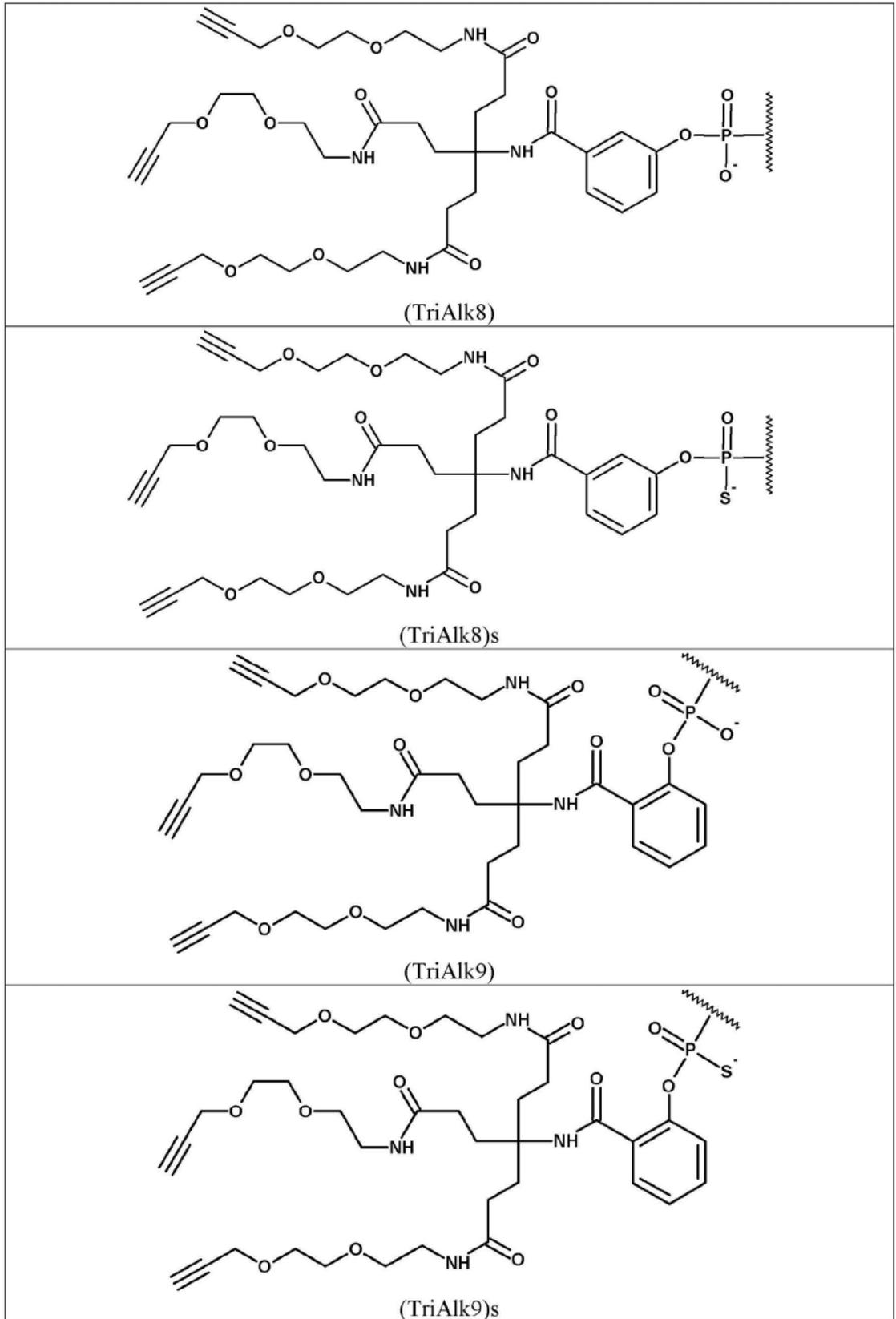
[0351]



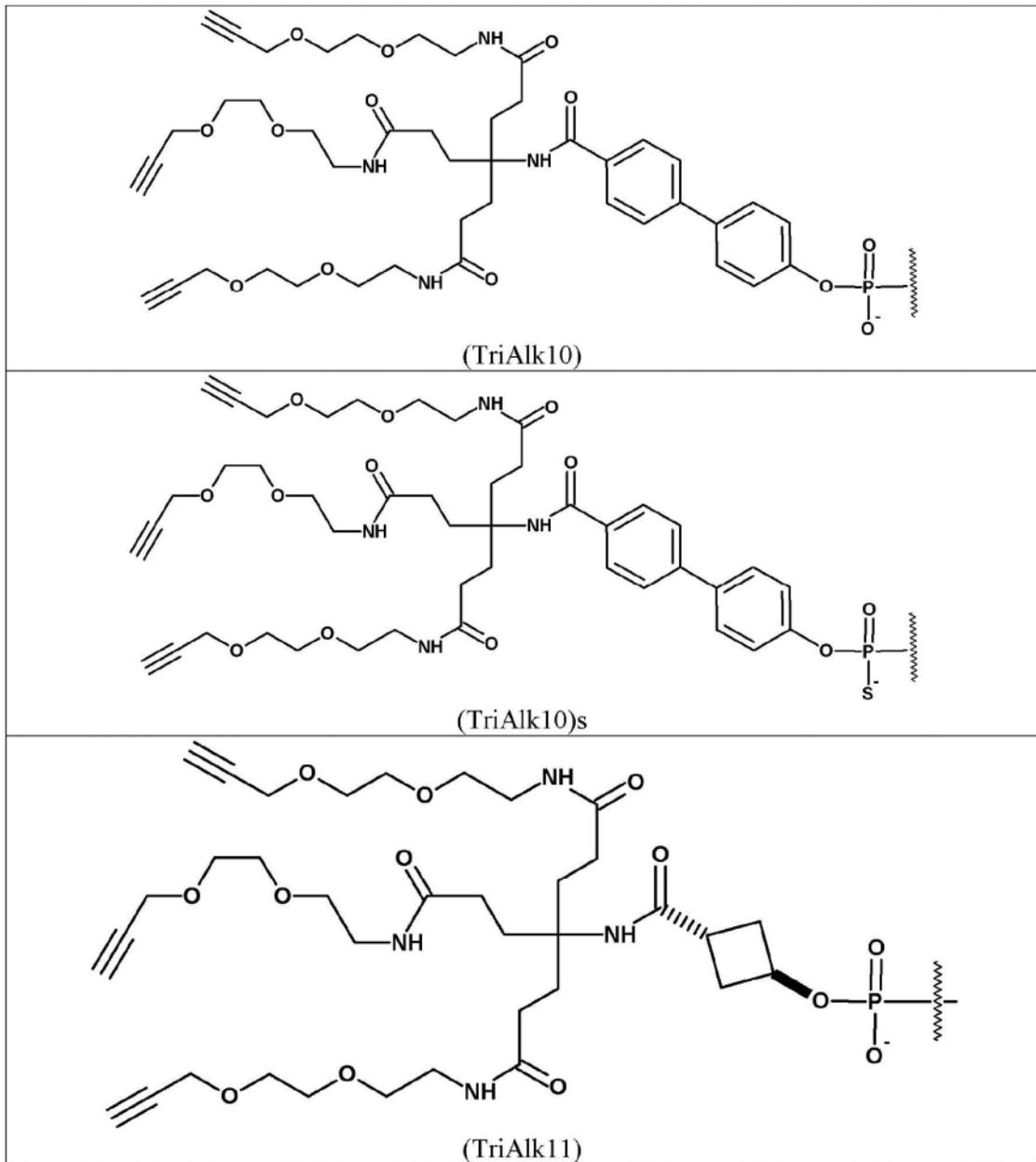
[0352]



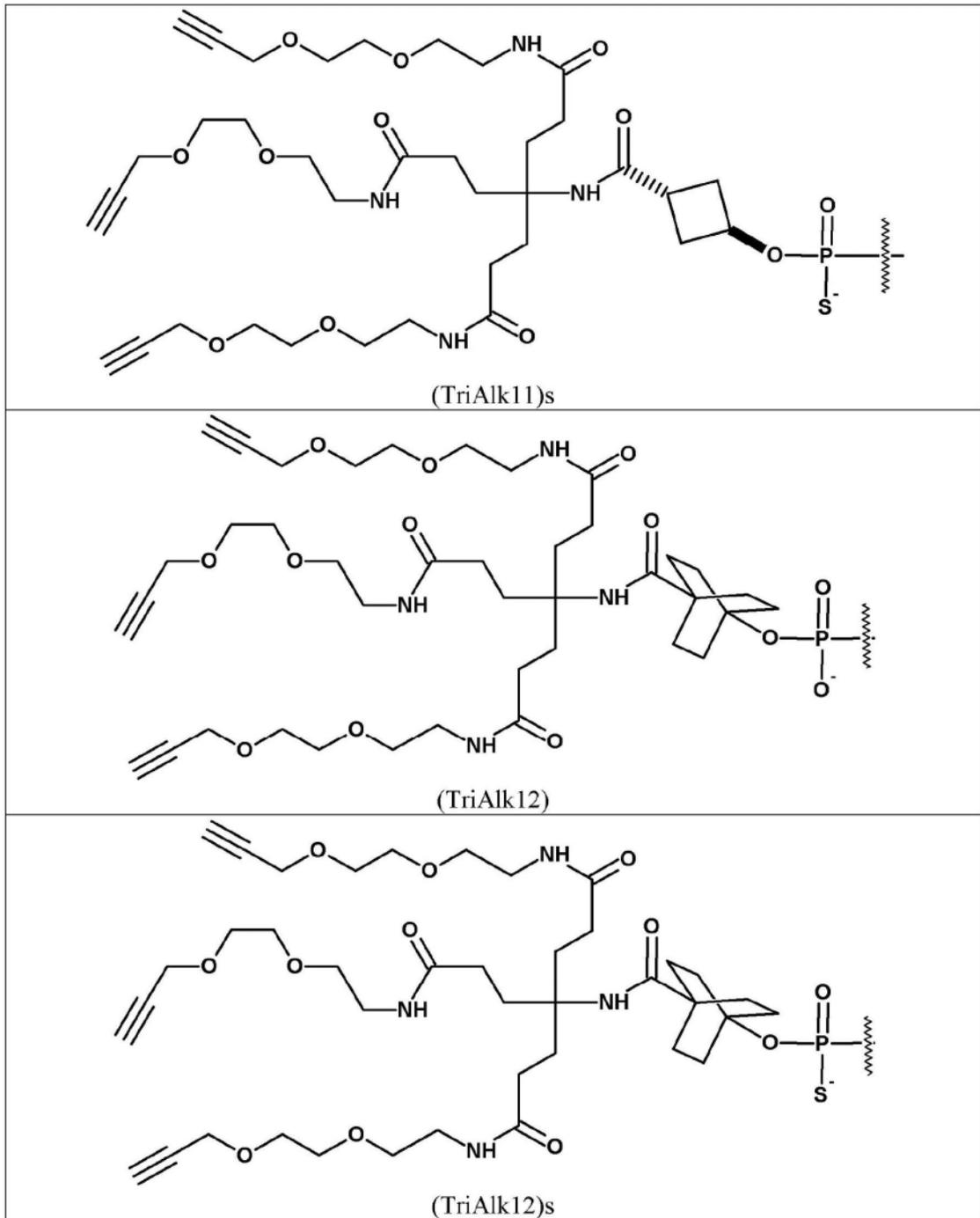
[0353]

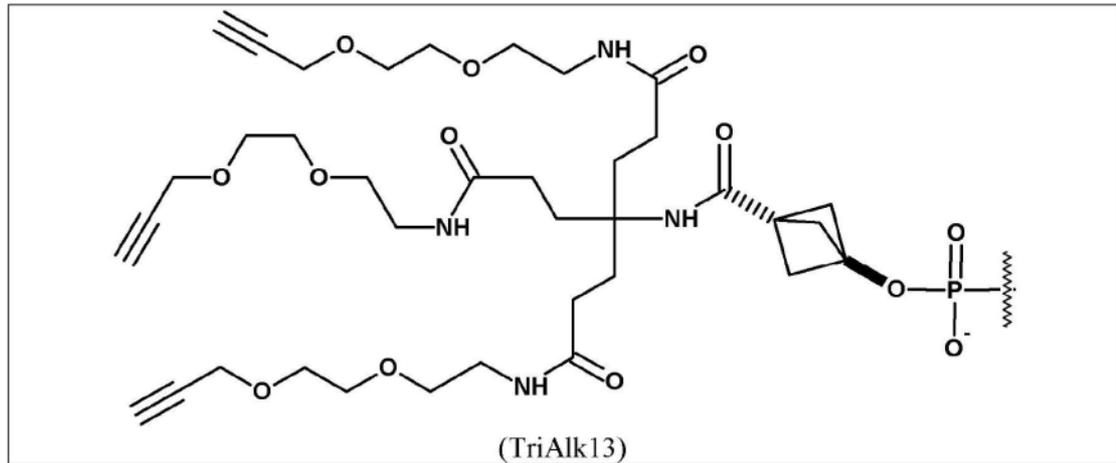


[0354]

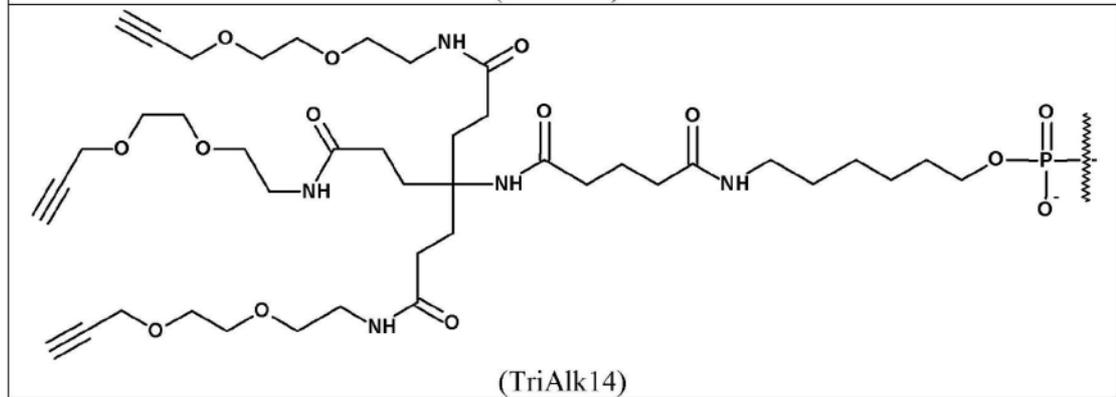
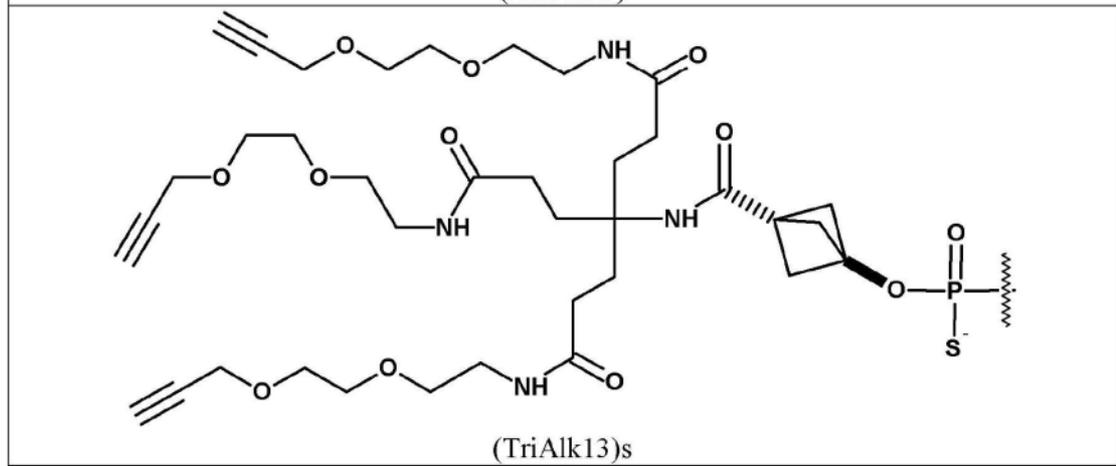


[0355]

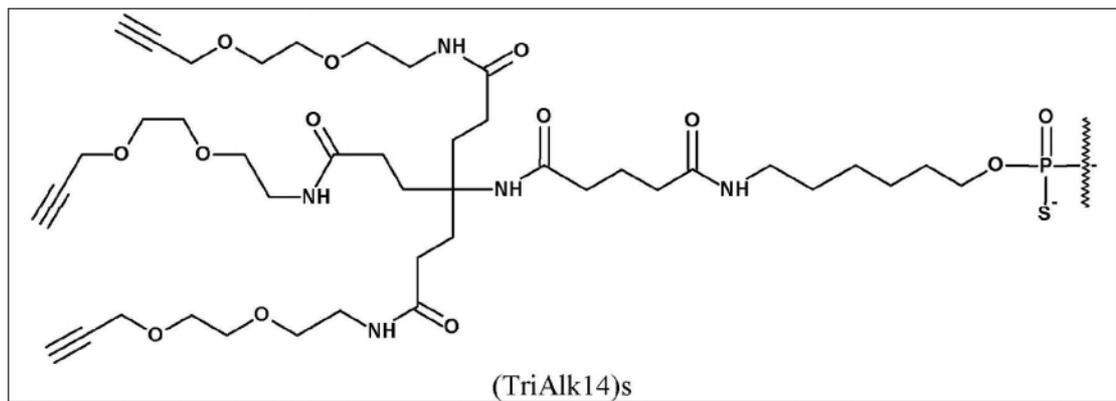




[0356]



[0357]



[0358] 或者,可使用本领域已知的其他连接基团。

[0359] 在一些实施方案中,递送媒介物可用于将RNAi剂递送至细胞或组织。递送媒介物

为改善RNAi剂向细胞或组织的递送的化合物。递送媒介物可包括或由(但不限于)以下组成:聚合物(比如两亲性聚合物、膜活性聚合物)、肽、蜂毒肽、蜂毒肽样肽(MLP)、脂质、可逆修饰聚合物或肽或者可逆修饰膜活性多胺。

[0360] 在一些实施方案中, RNAi剂可与脂质、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、DPC或本领域可用的其他递送系统组合。RNAi剂也可化学缀合于靶向基团、脂质(包括(但不限于)胆固醇和胆固醇基衍生物)、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、DPC(参见例如WO 2000/053722、WO 2008/022309、WO 2011/104169和WO 2012/083185、WO 2013/032829、WO 2013/158141,其每一个通过参考结合至本文中)或本领域可用的其他递送系统。

[0361] 药用组合物和制剂

[0362] 本文公开的 α -ENaC RNAi剂可制备为药用组合物或制剂(本文也称为“药物”)。在一些实施方案中,药用组合物包含至少一种 α -ENaC RNAi剂。这些药用组合物在抑制靶细胞、细胞群、组织或生物体中 α -ENaC mRNA表达方面特别有用。药用组合物可用于治疗患有得益于靶mRNA水平降低或靶基因表达抑制的疾病、障碍或病症的受试者。药用组合物可用于治疗处于罹患得益于靶mRNA水平降低或靶基因表达抑制的疾病或障碍的风险下的受试者。在一个实施方案中,方法包括将连接于本文所述的靶向配体的 α -ENaC RNAi剂给予待治疗的受试者。在一些实施方案中,将一种或多种药学上可接受的赋形剂(包括媒介物、载体、稀释剂和/或递送聚合物)添加至包含 α -ENaC RNAi剂的药用组合物中,从而形成适合于体内递送至受试者(包括人类)的药用制剂或药物。

[0363] 包含 α -ENaC RNAi剂的药用组合物和本文公开的方法降低细胞、细胞群、细胞群、组织、器官或受试者中的靶mRNA水平,包括通过给予受试者治疗有效量的本文所述的 α -ENaC RNAi剂从而在受试者抑制 α -ENaC RNAi的表达。在一些实施方案中,受试者先前已被鉴定或诊断为患有至少部分地由ENaC表达介导的疾病或障碍。在一些实施方案中,受试者先前已被鉴定或诊断为在一种或多种细胞或组织的ENaC活性增强。在一些实施方案中,受试者先前已被诊断患有的一种或多种呼吸道疾病,比如囊性纤维化、慢性支气管炎、非囊性纤维化支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、呼吸道感染、原发性纤毛运动障碍和肺癌囊性纤维化。在一些实施方案中,受试者先前已被诊断患有的一种或多种眼病(比如干眼)。在一些实施方案中,受试者患有与一种或多种与ENaC活性增强相关或由其引起的呼吸道疾病相关的症状。

[0364] 在一些实施方案中,包含 α -ENaC RNAi剂的所述药用组合物用于在受试者治疗或管理得益于ENaC表达抑制的临床表现。在一些实施方案中,将治疗或预防有效量的一种或多种药用组合物给予需要这种治疗的受试者。在一些实施方案中,任何公开的 α -ENaC RNAi剂的给予可用于在受试者减少疾病症状的数目、严重性和/或频率。

[0365] 所述包含 α -ENaC RNAi剂的药用组合物可用于在患有疾病或障碍的受试者中治疗得益于 α -ENaC RNAi表达的降低或抑制的至少一种症状。在一些实施方案中,受试者被给予治疗有效量的一种或多种包含 α -ENaC RNAi剂的药用组合物,从而治疗症状。在其他实施方案中,受试者被给予预防有效量的一种或多种 α -ENaC RNAi剂,从而预防或抑制至少一种症状。

[0366] 给予途径为使 α -ENaC RNAi剂与身体接触的途径。通常,用于治疗哺乳动物的给予药物、寡核苷酸和核酸的方法为本领域众所周知的,并且可应用于给予本文所述的组合物。

本文公开的 α -ENaC RNAi剂可以适合于特定途径的制剂经任何合适的途径给予。因此,在一些实施方案中,本文所述的药用组合物经吸入、鼻内给予、气管内给予或口咽抽吸给予来给予。在一些实施方案中,药用组合物可通过例如静脉内、肌内、皮内、皮下、关节内或腹膜内或局部注射来给予。

[0367] 可使用本领域已知的寡核苷酸递送技术将包含本文所述的 α -ENaC RNAi剂的药用组合物递送至细胞、细胞群、组织或受试者。通常,本领域公认的用于递送核酸分子(体外或体内)的任何合适的方法可适合于与本文所述的组合物一起使用。例如,可通过局部给予(例如直接注射、植入或局部给予)、全身给予,或者皮下、静脉内、腹膜内或非肠道途径,包括颅内(例如脑室内、实质内和鞘内)、肌内、经皮、气道(气雾剂)、鼻、口服、直肠或局部(包括颊和舌下)给予来递送。在一些实施方案中,组合物经吸入、鼻内给予、口咽抽吸给予或气管内给予来给予。例如,在一些实施方案中,期望本文所述的 α -ENaC RNAi剂抑制肺上皮细胞中 α -ENaC基因的表达,为此经吸入(例如通过吸入器装置,比如计量吸入器或喷雾器,比如喷射或振动网孔喷雾器或者软雾吸入器)给予为特别合适和有利的。

[0368] 在一些实施方案中,本文所述的药用组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。本文所述的药用组合物被配制用于给予受试者。

[0369] 本文使用的药用组合物或药物包含药理学有效量的至少一种所述治疗化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂(赋形剂)为除活性药用成分(API,治疗性产物,例如 α -ENaC RNAi剂)以外有意包含在药物递送系统中的物质。赋形剂不以或不旨在以预期剂量发挥治疗作用。赋形剂可起以下作用:a) 助于药物递送系统在制备期间的处理,b) 保护、支持或增强API的稳定性、生物利用度或患者可接受性;c) 助于产物鉴定;和/或d) 增强API在储存或使用期间的整体安全性、有效性或递送方面的任何其他属性。

[0370] 赋形剂包括(但不限于):吸收增强剂、抗粘剂、消泡剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载体、包衣剂、着色剂、递送增强剂、递送聚合物、去污剂、右旋糖酐、右旋糖、稀释剂、崩解剂、乳化剂、膨胀剂、填充剂、调味剂、助流剂、湿润剂、润滑剂、油类、聚合物、防腐剂、盐水、盐类、溶剂、糖类、表面活性剂、悬浮剂、持续释放基质、甜味剂、增稠剂、张度剂、媒介物、防水剂和润湿剂。

[0371] 适合于可注射使用的药用组合物包括无菌水溶液剂(当水溶性时)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液剂或分散体的无菌粉剂。对于静脉内给予,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、**Cremophor**[®]ELTM(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。其在制备和储存条件下应为稳定的,并且应保存起来以防微生物比如细菌和真菌的污染作用。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(比如卵磷脂),通过在分散体的情况下维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选的是在组合物中包含等渗剂,例如糖类、多元醇(比如甘露醇、山梨醇)和氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶),可实现可注射组合物的延长吸收。

[0372] 可通过将所需量的活性化合物与所需的上述一种成分或组合一起掺入适当的溶剂中,随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液剂。通常,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和所需的来自上述那些的其他成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液剂的无菌粉剂的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,从其先前无菌过滤

的溶液中产生活性成分加上任何另外期望成分的粉剂。

[0373] 适合于关节内给予的制剂可以药物的无菌水性制剂的形式存在,其可以微晶形式,例如以水性微晶混悬剂的形式存在。脂质体制剂或可生物降解聚合物系统也可用于呈现用于关节内和眼科给予的药物。

[0374] 适合于吸入给予的制剂可通过将所需量的活性化合物掺入适当的溶剂中,随后进行无菌过滤来制备。通常,用于吸入给予的制剂为在生理pH下的无菌溶液剂,并且具有低粘度($<5\text{cP}$)。可将盐添加至制剂中以平衡张力。在一些情况下,可加入表面活性剂或助溶剂以增加活性化合物的溶解度并改善气雾剂特性。在一些情况下,可加入赋形剂以控制粘度,以确保雾化液滴的大小和分布。

[0375] 活性化合物可与载体一起制备,载体将保护化合物免于从体内快速消除,比如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用可生物降解生物相容性聚合物,比如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。这种制剂的制备方法为本领域的技术人员显而易见的。脂质体混悬剂也可用作药理学上可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如如美国专利第4522811号所述。

[0376] 可将 α -ENaC RNAi剂配制成剂量单位形式的组合物,以易于给予和剂量均匀。剂量单位形式是指适合作为用于待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位,每个单位含有经计算与所需的药用载体一起产生期望的治疗作用的预定量的活性化合物。本公开的剂量单位形式的规格由活性化合物的独特特征和要达到的治疗效果,以及为治疗个体而配制这种活性化合物的领域所固有的局限性决定或直接取决于此。

[0377] 药用组合物可含有药用组合物中通常存在的其他另外组分。这种另外组分包括(但不限于):止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂(例如抗组胺药,苯海拉明等)。还设想表达或包含本文定义的RNAi剂的细胞、组织或离体器官可用作“药用组合物”。本文使用的“药理学有效量”、“治疗有效量”或简单地“有效量”是指产生药理学、治疗或预防结果的RNAi剂的量。

[0378] 在一些实施方案中,本文公开的方法除给予本文公开的RNAi剂之外进一步包括给予第二治疗剂或治疗的步骤。在一些实施方案中,第二治疗剂为另一种 α -ENaC RNAi剂(例如靶向 α -ENaC靶标内不同序列的 α -ENaC RNAi剂)。在其他实施方案中,第二治疗剂可为小分子药物、抗体、抗体片段和/或适体。

[0379] 通常,本文公开的 α -ENaC RNAi剂的有效量将在约0.0001-约20mg/kg体重/天,例如约0.001-约3mg/kg体重/天的范围内。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂的有效量将在每剂量约0.001-约0.500

[0380] mg/kg体重的范围内。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂的有效量将在每剂量约0.001-约0.100mg/kg体重的范围内。在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂的有效量将在每剂量约0.001-约0.050mg/kg体重的范围内。给予的量也可能取决于变量比如患者的整体健康状况、所递送化合物的相对生物学功效、药物制剂、制剂中赋形剂的存在和类型以及给予途径。而且,应当理解,可将给予的初始剂量增加到超出以上上限水平,以快速达到期望的血液水平或组织水平,或者初始剂量可小于最佳剂量。

[0381] 为了治疗疾病或形成用于治疗疾病的药物或组合物,本文所述的包含 α -ENaC RNAi剂的药用组合物可与赋形剂或与包括(但不限于)以下的第二治疗剂或治疗组合:第二

或其他RNAi剂、小分子药物、抗体、抗体片段、肽和/或适体。

[0382] 当将所述 α -ENaC RNAi剂添加至药学上可接受的赋形剂或佐剂中时,其可包装成试剂盒、容器、包装或分配器。本文所述的药用组合物可以干粉或气雾剂吸入器、其他计量吸入器、喷雾器、预填充注射器或小瓶包装。

[0383] 治疗和抑制表达的方法

[0384] 本文公开的 α -ENaC RNAi剂可用于治疗患有将得益于给予RNAi剂的疾病或障碍的受试者(例如人类或其他哺乳动物)。在一些实施方案中,本文公开的RNAi剂可用于治疗将得益于 α -ENaC RNAi表达的降低和/或抑制的受试者(例如人类)。

[0385] 在一些实施方案中,本文公开的RNAi剂可用于治疗患有包括(但不限于)以下的疾病或障碍的受试者(将得益于ENaC通道活性的降低)的受试者(例如人类:例如囊性纤维化、慢性支气管炎、非囊性纤维化支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、呼吸道感染、原发性纤毛运动障碍和肺癌囊性纤维化和/或干眼。受试者的治疗可包括治疗性和/或预防性治疗。受试者被给予治疗有效量的任何一种或多种本文所述的 α -ENaC RNAi剂。受试者可为人类、患者或人类患者。受试者可为成人、青少年、儿童或婴儿。本文所述的药用组合物的给予可为人或动物。

[0386] 已知ENaC活性增加可促进气道表面液体脱水和损害粘液纤毛清除。在一些实施方案中,所述 α -ENaC RNAi剂用于在受试者治疗至少部分地由ENaC活性水平介导的至少一种症状。受试者被给予治疗有效量的任何一种或多种所述 α -ENaC RNAi剂。在一些实施方案中,受试者被给予预防有效量的任何一种或多种所述RNAi剂,从而通过预防或抑制至少一种症状来治疗受试者。

[0387] 在某些实施方案中,本公开提供用于在需要它的患者治疗至少部分地由 α -ENaC基因表达介导的疾病、障碍、病症或病理状态的方法,其中方法包括给予患者任何一种本文所述的 α -ENaC RNAi剂。

[0388] 在一些实施方案中, α -ENaC RNAi剂用于在受试者治疗或管理的临床表现或病理状态,其中临床表现或病理状态至少部分地由ENaC表达介导。受试者被给予治疗有效量的一种或多种本文所述的 α -ENaC RNAi剂或含有 α -ENaC RNAi剂的组合物。在一些实施方案中,方法包括给予待治疗的受试者包含本文所述的 α -ENaC RNAi剂的组合物。

[0389] 在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的某些上皮细胞中, α -ENaC基因的基因表达水平和/或mRNA水平降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%。在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的某些上皮细胞中,ENaC水平或ENaC通道活性水平降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%。在受试者的细胞、细胞群和/或组织,受试者的基因表达水平、蛋白水平和/或mRNA水平可以降低。在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在已给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的某些上皮细胞中, α -ENaC RNAi水平降低了至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%、95%或98%。在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在已给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的某些上皮细胞中,ENaC异源三聚体蛋白复合物的水平降低了至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在受试者的细胞、细胞群、组织、血液和/或其他液体中,受试者的ENaC水平可以降低。例如,在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在已给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的肺上皮细胞中, α -ENaC mRNA和/或ENaC异源三聚体蛋白复合物的水平降低了至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。在一些实施方案中,相对于给予 α -ENaC RNAi剂之前的受试者或相对于未接受 α -ENaC RNAi剂的受试者,在已给予所述 α -ENaC RNAi剂的受试者的肺上皮细胞的子集(比如气道上皮细胞)中, α -ENaC mRNA和/或ENaC异源三聚体蛋白复合物和/或ENaC通道活性水平降低了至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。

[0390] 基因表达、mRNA和蛋白水平的降低可通过本领域已知的任何方法来评价。 α -ENaC mRNA水平、ENaC通道活性水平和/或ENaC异源三聚体蛋白复合物水平的降低或减少本文统称为 α -ENaC的降低或减少或者 α -ENaC基因表达的抑制或降低。本文所述的实施例说明用于评价 α -ENaC基因表达抑制的已知方法。

[0391] 细胞、组织、器官和非人类生物体

[0392] 考虑包含本文所述的至少一种 α -ENaC RNAi剂的细胞、组织、器官和非人类生物体。细胞、组织、器官或非人类生物体通过将RNAi剂递送至细胞、组织、器官或非人类生物体制成。

[0393] 现通过以下非限制性实施例来说明以上提供的实施方案和条目。

实施例

[0394] 实施例1. α -ENaC RNAi剂的合成。

[0395] 表5所示的 α -ENaC RNAi剂双链体按照以下方法合成:

[0396] A.合成。根据亚磷酰胺技术,在用于寡核苷酸合成的固相上合成了 α -ENaC RNAi剂的有义和反义链。根据规模,使用MerMade96E® (Bioautomation)、MerMade12® (Bioautomation)或OP Pilot 100(GE Healthcare)。合成在由可控孔度玻璃(CPG, 500 Å或600Å,得自Prime Synthesis,Aston,PA,USA)制成的固体支持物上进行。所有RNA和2'-修饰RNA亚磷酰胺均购自Thermo Fisher Scientific(Milwaukee,WI,USA)。具体地讲,使用的2'-O-甲基亚磷酰胺包括以下:(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N⁶-(苯甲酰基)-2'-O-甲-腺苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺、5'-O-二甲氧基-三苯甲基-N⁴-(乙酰基)-2'-O-甲基-胞苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺、(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N²-(异丁酰基)-2'-O-甲基-鸟苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺和5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O-甲基-尿苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺。2'-脱氧-2'-氟亚磷酰胺具有与2'-O-甲基RNA亚磷酰胺相同的保护基。5'-二甲氧基三苯甲基-2'-O-甲基-肌苷-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺购自Glen

Research(Virginia)。倒置的脱碱基(3'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧核糖-5'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺购自ChemGenes(Wilmington,MA,USA)。使用了以下UNA亚磷酰胺:5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N6-(苯甲酰基)-2',3'-裂环-腺苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-乙酰基-2',3'-裂环-胞嘧啶、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-异丁酰基-2',3'-裂环-鸟苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2',3'-裂环-尿苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。TFA氨基连接臂亚磷酰胺也可商业购买(ThermoFisher)。

[0397] 将含有三炔的亚磷酰胺溶解于无水二氯甲烷或无水乙腈(50mM)中,同时将所有其他亚酰胺溶解于无水乙腈(50mM)中,并加入分子筛(3Å)。5-苄硫基-1H-四唑(BTT,在乙腈中250mM)或5-乙硫基-1H-四唑(ETT,在乙腈中250mM)用作活化剂溶液。偶联时间为10分钟(RNA)、90秒(2' O-Me)和60秒(2' F)。为了引入硫代磷酸酯连接,采用了3-苯基1,2,4-二噻唑啉-5-酮(POS,得自PolyOrg,Inc.,Leominster,MA,USA)在无水乙腈中的100mM溶液。

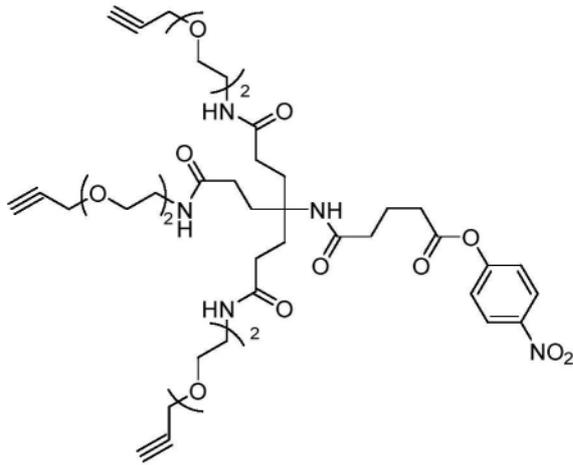
[0398] 或者,合成后引入三炔部分(参见以下部分E)。对于该途径,有义链被含有伯胺的5'和/或3'末端核苷酸官能化。将TFA氨基连接臂亚磷酰胺溶解于无水乙腈(50mM)中,并加入分子筛(3Å)。5-苄硫基-1H-四唑(BTT,在乙腈中250mM)或5-乙硫基-1H-四唑(ETT,在乙腈中250mM)用作活化剂溶液。偶联时间为10分钟(RNA)、90秒(2' O-Me)和60秒(2' F)。为了引入硫代磷酸酯连接,采用了3-苯基1,2,4-二噻唑啉-5-酮(POS,得自PolyOrg,Inc.,Leominster,MA,USA)在无水乙腈中的100mM溶液。

[0399] B.支持物结合的寡聚物的裂解和脱保护。固相合成完成之后,将干燥的固体支持物用水中的40wt.%甲胺和28%-31%氢氧化铵溶液(Aldrich)的1:1体积溶液在30°C下处理1.5小时。蒸发溶液,并将固体残留物以水重构(参见以下)。

[0400] C.纯化。使用TSKgel SuperQ-5PW 13μm柱和Shimadzu LC-8系统,通过阴离子交换HPLC纯化粗品寡聚物。缓冲液A为20mM Tris,5mM EDTA,pH 9.0,并含有20%乙腈,和缓冲液B与缓冲液A相同(添加1.5M氯化钠)。记录260nm下的UV迹线。合并适当的级分,然后使用装有Sephadex G-25细粉的GE Healthcare XK 16/40柱,用100mM碳酸氢铵(pH 6.7)和20%乙腈或或过滤水的运行缓冲液在尺寸排阻HPLC上运行。或者,将合并的级分脱盐,并经切向流过滤更换为适当的缓冲液或溶剂系统。

[0401] D.退火。通过在1×PBS(磷酸盐缓冲盐水,1×,Corning,Cellgro)中合并等摩尔RNA溶液(有义和反义)来混合互补链,以形成RNAi剂。将一些RNAi剂冻干并储存于-15至-25°C下。通过在1×PBS中于UV-Vis光谱仪上测量溶液吸光度来确定双链体浓度。然后将溶液在260nm下的吸光度乘以转换因子和稀释因子,以确定双链体浓度。除非另外说明,否则所用的转换因子为0.037mg/(mL·cm)。

[0402] E.三炔接头的缀合。在退火之前或之后,使5'或3'胺官能化的有义链缀合于三炔接头。可用于形成本文公开的构建体的实例三炔接头结构如下:



以下描述三炔接头与退火的双链体的缀合:将

胺官能化的双链体以 $\sim 50-70\text{mg/mL}$ 溶解于 $90\% \text{DMSO}/10\% \text{H}_2\text{O}$ 中。加入 40 当量三乙胺, 随后加入 3 当量三炔-PNP。一旦完成, 将缀合物以 $1\times$ 磷酸盐缓冲盐水/乙腈 (1:14 比率) 的溶剂系统沉淀两次, 并干燥。

[0403] F. 靶向配体的缀合。在退火之前或之后, 使 $5'$ 或 $3'$ 三炔官能化的有义链缀合于靶向配体。以下实例描述靶向配体与退火的双链体的缀合: 在去离子水中制备 0.5M 三(3-羟丙基三唑基甲基)胺 (THPTA)、 0.5M 五水硫酸铜 (II) ($\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 和 2M 抗坏血酸钠溶液的储备溶液。制备靶向配体在 DMSO 中的 75mg/mL 溶液。在含有三炔官能化的双链体 (在去离子水中 3mg , $75\mu\text{L}$, 40mg/mL , $\sim 15000\text{g/mol}$) 的 1.5mL 离心管中加入 $25\mu\text{L}$ 1M HEPES pH 8.5 缓冲液。涡旋之后, 添加 $35\mu\text{L}$ DMSO 并将溶液涡旋。将靶向配体添加至反应中 (6 当量/双链体, 2 当量/炔, $\sim 15\mu\text{L}$) 并将溶液涡旋。使用 pH 纸检查 pH 并确认为 $\text{pH} \sim 8$ 。在单独的 1.5mL 离心管中, 将 $50\mu\text{L}$ 0.5M THPTA 与 $10\mu\text{L}$ 0.5M $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 混合, 涡旋并在室温下温育 5 分钟。5 分钟之后, 将 THPTA/Cu 溶液 ($7.2\mu\text{L}$, 6 当量 5:1 THPTA:Cu) 加入到反应小瓶中并涡旋。之后立即将 2M 抗坏血酸盐 ($5\mu\text{L}$, 每双链体 50 当量, 每炔炔 16.7) 加入到反应小瓶中并涡旋。一旦反应完成 (一般地在 $0.5-1$ 小时内完成), 立即通过非变性阴离子交换色谱法纯化反应物。

[0404] 实施例 2. 在小鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi 剂

[0405] 为了评价 α -ENaC RNAi 剂的体内活性, 在研究的第 1 和第 2 天, 经适合于气管内 (IT) 给予的微型喷雾器装置 (Penn Century, Philadelphia, PA), 给予雄性 ICR 小鼠 $50\mu\text{L}$ 等渗盐水媒介物 (用作对照) 或 5mg/kg 以等渗盐水配制的含有缀合配体的以下 α -ENaC RNAi 剂 (即“裸 RNAi 剂”) 之一: AD04019、AD04020、AD04021、AD04022、AD04023、AD04024、AD04025 或 AD04026。(关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表 3-6)。

[0406] 每组给药 4 或 5 只小鼠。在研究的第 9 天处死小鼠, 并在收集和匀浆后从两个肺分离总 RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA 表达通过基于探针的定量 PCR 进行定量, 标准化为 GAPDH 表达, 并表示为媒介物对照组的分数 (几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0407] 图 1 显示已鉴定的 α -ENaC RNAi 剂组合物 (AD04019、AD04020、AD04021、AD04022、AD04023、AD04024、AD04025 和 AD04026) 的相对表达, 与媒介物对照相比较, 每种 RNAi 剂均显示出肺 α -ENaC 表达显著降低。

[0408] 实施例 3. 在小鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi 剂

[0409] 在研究的第 1 和第 2 天, 经适合于气管内 (IT) 给予的微型喷雾器装置 (Penn Century, Philadelphia, PA), 给予雄性 ICR 小鼠 $50\mu\text{L}$ 等渗盐水媒介物 (用作对照) 或 $3\text{mg}/$

kg以等渗盐水配制的 α -ENaC RNAi剂(即AD04025或AD04858(关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。每组给药4或5只小鼠。在研究的第9天处死小鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/-95%置信区间)。

[0410] 图2显示 α -ENaC RNAi剂AD04025和AD04858的相对表达,与对照相比较,两种RNAi剂均显示出肺 α -ENaC表达显著降低。

[0411] 实施例4.在大鼠中体内气管内给予与上皮细胞靶向配体缀合和未缀合的 α -ENaC RNAi剂

[0412] 在研究的第1和第2天,经适合于气管内(IT)给予的微型喷雾器装置(Penn Century, Philadelphia, PA),给予雄性Sprague Dawley大鼠200微升0.5mg/kg、1.5mg/kg或5mg/kg以等渗盐水配制的 α -ENaC RNAi剂。每组给药5(5)只大鼠。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/-95%置信区间)。

[0413] 图3显示 α -ENaC RNAi剂AD04025和AD04025-缀合物的相对表达。AD04025-缀合物通过以下方法合成:合成后经掩蔽的聚-L-赖氨酸(PLL)支架将对 α v β 6整联蛋白具有亲和力的基于肽的整联蛋白靶向配体连接于添加至RNAi剂有义链5'末端的氨基。(关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。尽管与基线测量相比较,裸RNAi剂和RNAi剂-缀合物两者均显示出肺 α -ENaC表达显著降低,但AD04025-缀合物在所测量的3个剂量水平(0.5mg/kg、1.5mg/kg和5mg/kg)的每一个均显示出敲低水平的数值改善,在1.5mg/kg的剂量下改善特别显著(含有配体时敲低为78%相对于不含配体时敲低为47%)。

[0414] 实施例5.在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂

[0415] 在研究的第1天,根据表7所述的以下给药组,使用吸管经口咽("OP")抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0416] 表7. 实施例5中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
[0417] 4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05454	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05455	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05456	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 α v β 6 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05457	第 1 天单次 OP 给药

[0418] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0419] 第2-7组中称为Tri-SM2的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图4所示的结构,其经有义链5'末端的末端胺(即通过与末端 $\text{NH}_2\text{-C}_6$ 基团形成共价键)缀合于RNAi剂。

[0420] 每组给药五(5)只大鼠($n=5$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 $\alpha\text{-ENaC}$ (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0421] 表8. 实施例5中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达 (每组 n=5)	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.161	0.192
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347)	0.411	0.039	0.042
[0422] 第 3 组(0.5 mg/kg AD05453)	0.678	0.092	0.106
第 4 组(0.5 mg/kg AD05454)	0.728	0.127	0.154
第 5 组(0.5 mg/kg AD05455)	0.663	0.075	0.084
第 6 组(0.5 mg/kg AD05456)	0.633	0.101	0.120
第 7 组(0.5 mg/kg AD05457)	0.726	0.174	0.228

[0423] 如以上表8所示,与对照相比较,每种 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。例如,AD05347包含位于反义链5'末端的环丙基-磷酸酯基团,与对照组相比较,其mRNA的平均降低为约59% (0.411)。进一步地,与对照相比较,每种其他 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂均显示rENaC mRNA降低至少约27%。

[0424] 实施例6. 在大鼠中体内气管内给予与上皮细胞靶向配体缀合的 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂

[0425] 在研究的第1天,经适合于气管内(IT)给予的微型喷雾器装置(Penn Century, Philadelphia, PA),根据表9所述的以下给药组,给予雄性Sprague Dawley大鼠200微升等渗盐水媒介物(用作对照)或以下 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂之一:

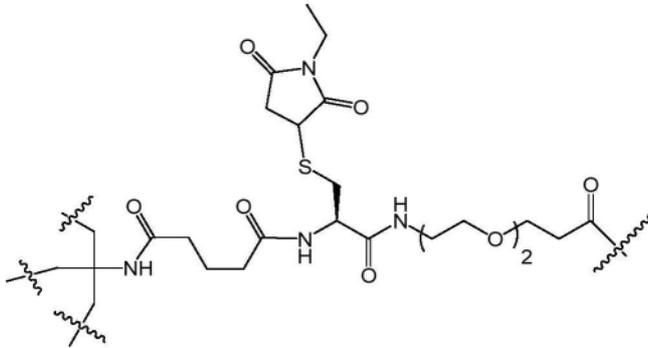
[0426] 表9. 实施例6中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 IT 给药
2	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM1)的 AD04835	第 1 天单次 IT 给药
[0427] 3	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM1) (进一步包含半胱氨酸-PEG ₂ 连接)的 AD04835	第 1 天单次 IT 给药
4	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM1)的 AD05346	第 1 天单次 IT 给药
5	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM1)的 AD05345	第 1 天单次 IT 给药
6	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM1)的 AD05347	第 1 天单次 IT 给药
[0428] 7	1.5 mg/kg 以等渗盐水配制的缀合于基于单齿肽的 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体的 AD04835, 该配体进一步包含 PEG ₂₀ 接头, 随后是肽接头(PheCitPhePro (SEQ ID NO: 290)), 20 千道尔顿(KDa) PEG 基团和半胱氨酸接头, 然后在有义链的 5'末端缀合	第 1 天单次 IT 给药

[0429] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0430] 第2、5和6组中称为Tri-SM1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图5所示的结构,其经有义链5'末端的末端胺(即通过与末端 $\text{NH}_2\text{-C}_6$ 基团形成共价键)缀合于RNAi剂。对于第3和第4组,第3和第4组中的三齿小分子配体用如下所示包含半胱氨酸-PEG₂连接的接头取代图5所示的戊二酸接头:

[0431]



[0432] 在第1、2、3、4、5和7组的每组中给药五(5)只大鼠($n=5$),并在第6组给药四(4)只大鼠。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 $\alpha\text{-ENaC}$ (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0433] 表10. 实施例6中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

[0434]

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.082	0.089
第 2 组(1.5 mg/kg AD04835-Tri-SM1)	0.453	0.098	0.126
第 3 组(1.5 mg/kg AD04835-PEG ₂ -Cys-Tri-SM1)	0.365	0.076	0.095
第 4 组(1.5 mg/kg AD07065-PEG ₂ -Cys-Tri-SM1)	0.412	0.136	0.204
第 5 组(1.5 mg/kg AD05345-Tri-SM1)	0.404	0.097	0.128
第 6 组(1.5 mg/kg AD05347-Tri-SM1)	0.311	0.048	0.057
第 7 组(1.5 mg/kg AD05453-Cys-PEG20kDa-肽接头-PEG ₂₀ -三肽配体)	0.354	0.078	0.101

[0435] 如以上表10所示,与对照相比较,每种 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。另外,当与进一步包含20kDa PEG PK修饰剂的基于肽的 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体相比较,三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体的使用显示出mRNA表达的类似降低。

[0436] 实施例7. 在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂

[0437] 在研究的第1天,根据表11所述的以下给药组,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0438] 表11. 实施例7中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05348	第 1 天单次 OP 给药
4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05349	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05562	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05563	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05564, 该配体进一步包含半胱氨酸连接基团	第 1 天单次 OP 给药
8	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05565	第 1 天单次 OP 给药
9	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05567	第 1 天单次 OP 给药
10	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05570	第 1 天单次 OP 给药

[0440] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0441] 第2-6和8-10组的每一个中称为Tri-SM2的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图4所示的结构,其经有义链5'末端的末端胺(即通过与末端 $\text{NH}_2\text{-C}_6$ 基团形成共价键)缀合于RNAi剂。第7组的配体包含半胱氨酸连接基团(参见例如实施例6)。

[0442] 在第1、2、3、4、5、6、7和9组给药四(4)只大鼠($n=4$),和第8和10组给药三(3)只大鼠($n=3$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 $\alpha\text{-ENaC}$ (SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0443] 表12. 实施例7中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	大鼠数目 (n=)	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	4	1.000	0.041	0.043
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347)	4	0.457	0.088	0.109
第 3 组(0.5 mg/kg AD05458)	4	0.708	0.055	0.059
第 4 组(0.5 mg/kg AD05459)	4	0.753	0.174	0.227
第 5 组(0.5 mg/kg AD05562)	4	0.608	0.056	0.062
第 6 组(0.5 mg/kg AD05563)	4	0.621	0.048	0.053
第 7 组(0.5 mg/kg AD05564)	4	0.569	0.095	0.114
第 8 组(0.5 mg/kg AD05565)	3	0.627	0.066	0.073
第 9 组(0.5 mg/kg AD05567)	4	0.638	0.087	0.100
第 10 组(0.5 mg/kg AD05570)	3	0.645	0.123	0.151

[0445] 如以上表12所示,与对照相比较,每种 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。例如,与对照相比较,AD05347显示出平均rENaC mRNA表达降低约54% (0.457)。

[0446] 实施例8. 在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 $\alpha\text{-ENaC}$ RNAi剂

[0447] 在研究的第1天,根据表13所述的以下给药组,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0448] 表13. 实施例8中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
[0449] 2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM2)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM9)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
[0450] 6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM8)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
8	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
9	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM10)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
10	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM11)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
11	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于基于三齿肽的 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药

[0451] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0452] 第2组和第4组中称为Tri-SM2的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图4所示的结构;第3和8组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构;第5组中称为Tri-SM9的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图7所示的结构;第6组中称为Tri-SM6的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图8所示的结构;第7组中称为Tri-SM8的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图9所示的结构;第9组中称为Tri-SM10的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图10所示的结构;和第10组中称为Tri-SM11的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图11所示的结构。通过经各 α -ENaC RNAi剂的5'末端上的氨基缀合,添加每种各三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体。

[0453] 每组给药四(4)只大鼠($n=4$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/- 95%置信区间)。

[0454] 表14. 实施例8中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
[0455] 第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.162	0.193
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347-Tri-SM2)	0.469	0.101	0.129
第 3 组(0.5 mg/kg AD05347-Tri-SM6.1)	0.358	0.078	0.100

[0456]	第 4 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM2)	0.562	0.086	0.102
	第 5 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM9)	0.620	0.168	0.230
	第 6 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6)	0.559	0.099	0.120
	第 7 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM8)	0.691	0.072	0.081
	第 8 组 (0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.454	0.055	0.063
	第 9 组 (0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM10)	0.454	0.080	0.097
	第 10 组 (0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM11)	0.577	0.113	0.140
	第 11 组(0.5 mg/kg AD05453-三齿肽配体)	0.558	0.057	0.064

[0457] 如以上表14所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。例如,与对照相比较,AD05347-Tri-SM6.1(第3组)显示出平均rENaC mRNA表达降低约64%(0.358),和与对照相比较,AD05453-Tri-SM6.1(第8组)显示出平均rENaC mRNA表达降低55%(0.454)。进一步地,在反义链上没有使用5'末端环丙基-磷酸酯修饰的情况下,第8和第9组平均rENaC mRNA表达降低约55%(0.454),和在具有5'反义环丙基-磷酸酯修饰的情况下显示出与第2组类似的抑制效果,其平均rENaC mRNA表达降低约53%(0.469)。此外,如在第4、6、8、9和10组观察到的那样,三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体类似或在一些情况下数字上优于第11组(例如包含Tri-SM6.1和Tri-SM10的第8和9组),其利用了已知对整合蛋白 $\alpha v\beta 6$ 具有亲和力的基于三齿肽的 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(关于化学结构信息参见国际专利申请公开号W0 2018/085415图11)。

[0458] 实施例9.在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂

[0459] 在研究的第1天,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升,其包括表15所述的以下给药组:

[0460] 表15.实施例9中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
[0461] 2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的不含任何靶向配体的 AD05453 (即“裸 RNAi 试剂”)	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药

[0462] 4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM7)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05618	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05562	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05564	第 1 天单次 OP 给药
8	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05567	第 1 天单次 OP 给药

[0463] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0464] 第3和5-8组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0465] 每组给药四(4)只大鼠(n=4)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两

个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/- 95%置信区间)。

[0466] 表16. 实施例9中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.00	0.180	0.219
第 2 组(0.5 mg/kg AD05453)	0.713	0.139	0.173
[0467] 第 3 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.562	0.082	0.096
第 4 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM7)	0.768	0.059	0.064
第 5 组(0.5 mg/kg AD05618-Tri-SM6.1)	0.524	0.074	0.086
第 6 组(0.5 mg/kg AD05562-Tri-SM6.1)	0.784	0.07	0.077
第 7 组(0.5 mg/kg AD05564-Tri-SM6.1)	0.921	0.104	0.117
第 8 组(0.5 mg/kg AD05567-Tri-SM6.1)	0.707	0.084	0.096

[0468] 如以上表16所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。进一步地,当给予裸药时,AD05453仅显示出约29%的抑制作用(0.713),而当缀合于Tri-SM6.1整联蛋白靶向配体时,其显示出平均rENaC mRNA表达降低44%(0.562)。

[0469] 实施例10. 在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂

[0470] 在研究的第1天,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升,其包括表17所述的以下给药组:

[0471] 表17. 实施例10中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05671	第 1 天单次 OP 给药
[0472] 5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05672	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05673	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05558	第 1 天单次 OP 给药
8	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05560	第 1 天单次 OP 给药
9	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05611	第 1 天单次 OP 给药
10	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05613	第 1 天单次 OP 给药

[0473] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0474] 第2-10组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0475] 每组给药四 (4) 只大鼠 (n=4)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/- 95%置信区间)。

[0476] 表18. 实施例10中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
[0477] 第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.084	0.092
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347-Tri-SM6.1)	0.375	0.128	0.194
第 3 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.597	0.163	0.224
第 4 组(0.5 mg/kg AD05671-Tri-SM6.1)	0.663	0.062	0.068
[0478] 第 5 组(0.5 mg/kg AD05672-Tri-SM6.1)	0.808	0.114	0.133
第 6 组(0.5 mg/kg AD05673-Tri-SM6.1)	0.623	0.100	0.119
第 7 组(0.5 mg/kg AD05558-Tri-SM6.1)	0.533	0.043	0.047
第 8 组(0.5 mg/kg AD05560-Tri-SM6.1)	0.647	0.122	0.150
第 9 组(0.5 mg/kg AD05611-Tri-SM6.1)	0.477	0.067	0.078
第 10 组(0.5 mg/kg AD05613-Tri-SM6.1)	0.640	0.165	0.223

[0479] 如以上表18所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi 剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。

[0480] 实施例11. 在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi 剂

[0481] 在研究的第1天,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升,其包括表19所述的以下给药组:

[0482] 表19. 实施例11中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
[0483] 4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05618	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05619	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05622	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05623	第 1 天单次 OP 给药

[0484] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0485] 第2-7组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0486] 每组给药五 (5) 只大鼠 (n=5)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/- 95%置信区间)。

[0487] 表20. 实施例11中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.195	0.242
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347-Tri-SM6.1)	0.383	0.041	0.046
第 3 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.489	0.168	0.257
第 4 组(0.5 mg/kg AD05618-Tri-SM6.1)	0.770	0.185	0.244
第 5 组(0.5 mg/kg AD05619-Tri-SM6.1)	0.719	0.080	0.090
第 6 组(0.5 mg/kg AD05622-Tri-SM6.1)	0.564	0.168	0.239
第 7 组(0.5 mg/kg AD05623-Tri-SM6.1)	0.575	0.115	0.144

[0488] 如以上表20所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。

[0490] 实施例12. 在大鼠中体内口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂

[0491] 在研究的第1天,根据表21所述的以下给药组,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0492] 表21. 实施例12中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP 给药
2	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05347	第 1 天单次 OP 给药
3	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
4	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05683	第 1 天单次 OP 给药
5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05684	第 1 天单次 OP 给药
6	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05685	第 1 天单次 OP 给药
7	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05686	第 1 天单次 OP 给药
8	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05687	第 1 天单次 OP 给药
9	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05564	第 1 天单次 OP 给药
10	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05688	第 1 天单次 OP 给药
11	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05689	第 1 天单次 OP 给药
12	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05690	第 1 天单次 OP 给药
13	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05691	第 1 天单次 OP 给药

[0493] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0494] 第2-13组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\beta6$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的

结构。

[0497] 每组给药四(4)只大鼠(n=4)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值,+/-95%置信区间)。

[0498] 表22. 实施例12中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.157	0.186
第 2 组(0.5 mg/kg AD05347-Tri-SM6.1)	0.534	0.066	0.075
第 3 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.573	0.086	0.101
第 4 组(0.5 mg/kg AD05683-Tri-SM6.1)	0.547	0.052	0.057
第 5 组(0.5 mg/kg AD05684-Tri-SM6.1)	0.755	0.158	0.200
[0499] 第 6 组(0.5 mg/kg AD05685-Tri-SM6.1)	0.609	0.077	0.089
第 7 组(0.5 mg/kg AD05686-Tri-SM6.1)	0.591	0.077	0.089
第 8 组(0.5 mg/kg AD05687-Tri-SM6.1)	0.624	0.099	0.118
第 9 组(0.5 mg/kg AD05564-Tri-SM6.1)	0.787	0.172	0.221
第 10 组(0.5 mg/kg AD05688-Tri-SM6.1)	0.563	0.072	0.082
第 11 组(0.5 mg/kg AD05689-Tri-SM6.1)	0.693	0.136	0.169
第 12 组(0.5 mg/kg AD05590-Tri-SM6.1)	0.651	0.159	0.211
第 13 组(0.5 mg/kg AD05691-Tri-SM6.1)	0.870	0.132	0.155

[0500] 如以上表22所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi 剂在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。

[0501] 实施例13. 在大鼠中口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi 剂的剂量范围研究

[0502] 在研究的第1天,根据表23所述的以下给药组,使用吸管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0503] 表23. 实施例13中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
[0504] 1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天单次 OP
		给药
2	0.0625 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
3	0.125 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
4	0.25 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
[0505] 5	0.5 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
6	0.75 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
7	1.0 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药
8	3.0 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天单次 OP 给药

[0506] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0507] 第2-8组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0508] 在第1、2、3、4、7和8组的每一组给药六(6)只大鼠($n=5$)。在第5和6组给药4只大鼠($n=4$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC(SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0509] 表24. 实施例13中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.111	0.125
第 2 组(0.0625 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.695	0.083	0.095
第 3 组(0.125 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.747	0.139	0.171
第 4 组(0.25 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.631	0.080	0.092
第 5 组(0.5 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.492	0.034	0.037
第 6 组(0.75 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.485	0.113	0.147
第 7 组(1.0 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.433	0.077	0.094
第 8 组(3.0 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.324	0.052	0.062

[0511] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0512] 如以上表24所示,与对照相比较,在给予的每种剂量水平下, α -ENaC RNAi剂AD05453在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。

[0513] 实施例14. 在小鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi剂

[0514] 在研究的第1和第2天,经微型喷雾器装置(Penn Century, Philadelphia, PA),给予雄性ICR小鼠50微升等渗盐水媒介物(用作对照)或5mg/kg以等渗盐水配制的不含缀合肥体的以下 α -ENaC RNAi剂(即“裸RNAi剂”)之一:AD04025、AD04526、AD04527、AD04528、AD04529、AD04530、AD04531、AD04536或AD04537。每组给药4只小鼠($n=4$)。在研究的第9天处死小鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC(SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0515] 表25. 实施例14中处死(第9天)时mENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	mENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.117	0.132
第 2 组(0.5 mg/kg AD04025)	0.451	0.097	0.123
第 3 组(0.5 mg/kg AD04526)	0.585	0.108	0.132
第 4 组(0.5 mg/kg AD04527)	0.403	0.101	0.134
第 5 组(0.5 mg/kg AD04528)	0.498	0.117	0.153
第 6 组(0.5 mg/kg AD04529)	0.480	0.042	0.047
第 7 组(0.5 mg/kg AD04530)	0.670	0.006	0.006
第 8 组(0.5 mg/kg AD04531)	0.662	0.103	0.122
第 9 组(0.5 mg/kg AD04536)	0.746	0.101	0.117
第 10 组(0.5 mg/kg AD04537)	0.409	0.021	0.022

[0517] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0518] 如以上表25所示,与对照相比较,每种 α -ENaC RNAi剂在大鼠中均显示出mRNA表达

的降低。

[0519] 实施例15. 在小鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi剂

[0520] 在研究的第1和第2天,经微型喷雾器装置(Penn Century,Philadelphia,PA),给予雄性ICR小鼠50微升等渗盐水媒介物(用作对照)或5mg/kg以等渗盐水配制的不含缀合配体的以下 α -ENaC RNAi剂(即“裸RNAi剂”)之一:AD04025、AD04538、AD04539、AD04532、AD04533、AD04534、AD04535或AD04540。(关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0521] 每组给药四(4)只小鼠($n=4$)。在研究的第9天处死小鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, +/- 95%置信区间)。

[0522] 表26. 实施例15中处死(第9天)时mENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	mENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.081	0.088
第 2 组(0.5 mg/kg AD04025)	0.448	0.097	0.125
第 3 组(0.5 mg/kg AD04538)	0.855	0.101	0.115
[0523] 第 4 组(0.5 mg/kg AD04539)	0.833	0.076	0.083
第 5 组(0.5 mg/kg AD04532)	0.581	0.127	0.162
第 6 组(0.5 mg/kg AD04533)	0.743	0.041	0.044
第 7 组(0.5 mg/kg AD04534)	1.006	0.127	0.146
第 8 组(0.5 mg/kg AD04535)	1.042	0.119	0.134
第 9 组(0.5 mg/kg AD04540)	0.982	0.111	0.125

[0524] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0525] 如以上表26所示,各 α -ENaC RNAi剂的基础序列影响所达到的ENaC基因抑制水平。例如, α -ENaC RNAi剂AD04025包含被设计成靶向 α -ENaC基因的第972位的反义链序列(即反义链的核苷酸1-19被设计成在972-990位与 α -ENaC基因(SEQ ID NO:1)至少部分互补)。在该实施例中,AD04525达到了所测试的RNAi剂的最高抑制水平,并且与对照相比较显示出基因表达敲低约55% (0.448)。其余的 α -ENaC RNAi剂被设计成靶向基因的不同位置,包括 α -ENaC RNAi剂AD04538(靶向基因973位)、AD04539(靶向基因999位)、AD04532(靶向基因1000位)、AD04533(也靶向基因973位)、AD04534(也靶向基因999位)、AD04535(靶向基因1291位)和AD04540(靶向基因763位)。如上所示,被设计成靶向基因不同位置的 α -ENaC RNAi剂可具有不同抑制活性(例如比较AD04025(972位)与AD04538(973位)和AD04533(973位)的 α -ENaC RNAi敲低水平)。此外,当比较同一位置的 α -ENaC RNAi剂(例如AD04539和AD04534)时,尽管两个序列均具有被设计成在同一位置(例如基因999位)抑制基因的基础核碱基,但是基础核碱基序列的轻微修饰和/或包含不同的修饰核苷酸可导致至少在数值上具有不同抑制活性。

[0526] 实施例16. 在大鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi剂

[0527] 在研究的第1和第2天,经微型喷雾器装置(Penn Century,Philadelphia,PA),给予雄性Sprague Dawley大鼠200微升等渗盐水媒介物(用作对照)或约3mg/kg以等渗盐水配制的不含缀合配体的以下 α -ENaC RNAi剂(即“裸RNAi剂”)之一:AD04835、AD04022、AD05116、AD05117、AD05118或AD05119。(关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结

构信息参见例如表3-6)。

[0528] 每组给药五(5)只大鼠(n=5)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值,+/-95%置信区间)。

[0529] 表27. 实施例16中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.171	0.207
第 2 组(0.5 mg/kg AD04835)	0.281	0.043	0.050
[0530] 第 3 组(0.5 mg/kg AD04022)	0.297	0.055	0.067
第 4 组(0.5 mg/kg AD05116)	0.554	0.095	0.115
第 5 组(0.5 mg/kg AD05117)	0.532	0.097	0.119
第 6 组(0.5 mg/kg AD05118)	0.300	0.034	0.038
第 7 组(0.5 mg/kg AD05119)	0.496	0.075	0.089

[0531] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0532] 以上表27提供了另外数据,表明各 α -ENaC RNAi剂的基础序列会影响所达到的ENaC基因抑制水平。例如, α -ENaC RNAi剂AD04025和AD04835各自包含被设计成靶向 α -ENaC基因的972位的反义链序列(即反义链的核苷酸1-19被设计成在972-990位与 α -ENaC基因(SEQ ID NO:1)至少部分互补)。在该实施例中测试的 α -ENaC RNAi剂中,这两种RNAi剂显示出最大敲低水平超过70%。其余的 α -ENaC RNAi剂被设计成靶向基因的不同位置,包括 α -ENaC RNAi剂AD05116(靶向基因944位)、AD05117(靶向基因945位)、AD05118(靶向基因1289位)和AD05119(靶向基因1579位)。

[0533] 实施例17. 在大鼠中口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂的多剂量、剂量范围研究

[0534] 在研究的第1天、研究的第2天和研究的第3天,根据表28所述的以下给药组,使用吸经管经口咽(“OP”)抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升:

[0535] 表28. 实施例17中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
2	0.005 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
3	0.01 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
[0536] 4	0.025 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
5	0.05 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
6	0.10 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)
7	0.50 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天、第 2 天和第 3 天 OP 给药(共 3 次给药)

[0537] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。如本文所述,该实施例中的相同RNAi剂-三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体缀合结构(即Tri-SM6.1-AD05453)或者可通过使用三炔官能化的连接基团(TriAlk14)(如AD05924所示)来合成,而不是在合成后添加至末端氨基(如AD05453所示)。(也请参见实施例1)。

[0538] 第2-7组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha\text{v}\beta 6$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0539] 在第1、2、3、4、5和6组的每一组给药七(7)只大鼠($n=7$)和在第7组给药六(6)只大鼠($n=6$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC(SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0540] 表29. 实施例17中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.127	0.146
第 2 组(0.005 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.852	0.097	0.109
[0541] 第 3 组(0.01 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.663	0.103	0.121
第 4 组(0.025 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.589	0.131	0.168
第 5 组(0.05 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.480	0.058	0.066
第 6 组(0.10 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.432	0.056	0.064
第 7 组(0.50 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.279	0.034	0.039

[0542] 如以上表29所示,与对照相比较,在给予的每种剂量水平下, α -ENaC RNAi剂AD05453在大鼠中均显示出mRNA表达的降低。进一步地,当使用相同 α -ENaC RNAi剂时,与单次给药相比较,多次OP给药显示出rENaC mRNA表达进一步敲低的迹象(例如比较实施例17的第7组与实施例13的第5组)。

[0543] 实施例18. 在小鼠中体内气管内给予 α -ENaC RNAi剂和人类COPD痰液稳定性评价

[0544] 为了评价和比较已有的现有技术双链体与本文公开的RNAi剂的活性和稳定性,如Novartis等的国际专利申请公开号WO 2008/152131所公开的那样(参见其中的表1C,ND-9201),合成具有以下修饰结构的双链体:

[0545] 反义链序列(5' → 3'): GAUUUGUUCUGGUUGcAcAdTsdT (SEQ ID NO:291)

[0546] 有义链序列(5' → 3'): uGuGcAAccAGAAcAAAucdTsdT (SEQ ID NO:292)

[0547] (下文称为ND-9201)。根据WO 2008/152131,ND-9201在体外显示出对 α -ENaC基因表达的相对有效抑制作用。

[0548] 首先,进行研究以评价体内 α -ENaC抑制活性。在研究的第1和第2天,经微型喷雾器装置(Penn Century,Philadelphia,PA),给予雄性ICR小鼠等渗葡萄糖(D5W)媒介物(用作对照)或约10mg/kg以D5W配制的ND-9201。在第9天处死小鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数。为了比较,在研究的第1天和第2天,经微型喷雾器装置(Penn Century,Philadelphia,PA),给予雄性ICR小鼠D5W媒介物(用作对照)或约5mg/kg以D5W配制的本文公开的RNAi剂AD04025。(关于AD04025的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。在第9天类似地处死小鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC (SCNN1A) mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数。

[0549] 对于ND-9201,在第1和第2天以10mg/kg给药时,在小鼠体内实现了对mENaC mRNA表达的约25%抑制作用。

[0550] 对于AD04025,在第1和第2天仅以5mg/kg给药时,在小鼠体内实现了对mENaC mRNA表达的约65%抑制作用,因此显示出超过已有的现有技术双链体ND-9201的抑制活性的实质性改善。

[0551] 另外,用ND-9201和AD04858对取自诊断为COPD患者的人类痰液进行了稳定性研究(关于AD04858的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。将含有50 μ L痰液和350 μ L裂解缓冲液的溶液涡旋,并加入12.5 μ L ND-9201或AD04858且每小时短暂涡旋。对样品进行LCMS以确定每个分子的有义链和反义链两者随着时间推移的剩余全长产物。6小时之后,AD04858显示出稳定性改善,因为对于有义链和反义链两者而言,其存在的全长产物增加了约20-30%。

[0552] 实施例19. 在大鼠中口咽抽吸给予与上皮细胞靶向配体缀合的 α -ENaC RNAi剂的体内研究

[0553] 在研究的第1天和研究的第2天,使用吸管经口咽("OP")抽吸给予,将雄性Sprague Dawley大鼠给药200微升,其包括表30所述的以下给药组:

[0554] 表30. 实施例19中的大鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗盐水(无 RNAi 剂)	第 1 天和第 2 天 OP 给药
2	0.025 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05625	第 1 天和第 2 天 OP 给药
3	0.50 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05453	第 1 天和第 2 天 OP 给药
4	0.50 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05829	第 1 天和第 2 天 OP 给药
5	0.50 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05831	第 1 天和第 2 天 OP 给药
6	0.50 mg/kg 以等渗盐水配制的在有义链的 5'末端缀合于三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体(Tri-SM6.1)的 AD05833	第 1 天和第 2 天 OP 给药

[0555] (关于该实施例中使用的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。

[0557] 第2-7组中称为Tri-SM6.1的三齿小分子 $\alpha v\beta 6$ 上皮细胞靶向配体具有图6所示的结构。

[0558] 每组给药四(4)只大鼠($n=7$)。在研究的第9天处死大鼠,并在收集和匀浆后从两个肺分离总RNA。 α -ENaC(SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间)。

[0559] 表31. 实施例19中处死(第9天)时rENaC mRNA的平均相对表达

组 ID	rENaC mRNA 的平均相对表达	低 (误差)	高 (误差)
第 1 组(等渗盐水)	1.000	0.196	0.243
第 2 组(0.25 mg/kg AD05625-Tri-SM6.1)	0.663	0.107	0.127
第 3 组(0.50 mg/kg AD05453-Tri-SM6.1)	0.490	0.091	0.111
第 4 组(0.50 mg/kg AD05829-Tri-SM6.1)	0.767	0.163	0.207
第 5 组(0.50 mg/kg AD05831-Tri-SM6.1)	0.542	0.113	0.142
第 6 组(0.50 mg/kg AD05833-Tri-SM6.1)	0.599	0.025	0.026

[0560] 在以上表31中, α -ENaC RNAi剂AD05625和AD05453各自包含被设计成在972位(参见SEQ ID NO:1)开始靶向 α -ENaC基因反义链;AD05829包含被设计成在944位开始靶向 α -ENaC基因的反义链;AD05831包含被设计成在973位开始靶向 α -ENaC基因的反义链;和AD01289包含被设计成在1289位开始靶向 α -ENaC基因的反义链。每种 α -ENaC RNAi剂均显示出对基因表达的抑制作用,而RNAi剂AD05453显示出对 α -ENaC的相对有效抑制作用。

[0562] 实施例20. 在小鼠中体内局部眼部给予 α -ENaC RNAi剂

[0563] 为了评估 α -ENaC RNAi剂抑制眼表上皮中 α -ENaC RNAi表达的能力,CB57B1/6小鼠($n=3$ /组)两只眼睛接受每天两次局部眼部滴注盐水媒介物或400微克AD04858(以两微升体积)持续5天。(关于AD04858的化学修饰双链体的化学结构信息参见例如表3-6)。在研究的第5天处死小鼠,收集结膜上皮样品并从组织匀浆分离总RNA。 α -ENaC(SCNN1A)mRNA表达通过基于探针的定量PCR进行定量,标准化为GAPDH表达,并表示为媒介物对照组的分数。

[0564] 在每天两次局部给药AD04858持续5天之后,与来自经媒介物处理的对照的样品相比,来自经治疗小鼠的结膜样品表达显著更少(约24%)的 α -ENaC mRNA。

[0565] 其他实施方案

[0566] 应当理解,尽管本发明已连同其详述进行了描述,但是前述描述旨在说明而不是

限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改处于随附权利要求的范围内。

序列表

- <110> ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> 用于抑制 α -ENaC 表达的 RNAi 剂及使用方法
- <130> 30656-W01
- <150> 62/529, 132
- <151> 2017-07-06
- <150> 62/631, 683
- <151> 2018-02-17
- <150> 62/679, 549
- <151> 2018-06-01
- <160> 296
- <210> 1
- <211> 3345
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <223> 钠通道上皮 1 α 亚基(SCNN1A), 转录变体 1, GenBank NM_001038.5
- <400> 1

[0001]

```

cttgcctgtc tgcgtctaaa gccctgcc agagtccgcc ttctcaggtc cagtactccc      60
agttcacctg ccctcgggag cctccttcc ttcgaaaac tcccggctct gactcctcct      120
cagccccctc ccccgccctg ctcacctta attgagatgc taatgagatt cctgtcgtt      180
ccatccctgg ccggccagcg ggcgggctcc ccagccaggc cgctgcacct gtcaggggaa      240
caagctggag gagcaggacc ctagacctct gcagcccata ccaggtctca tggaggggaa      300
caagctggag gagcaggact ctagccctcc acagtccact ccagggctca tgaaggggaa      360
caagcgtgag gagcaggggc tgggccccga acctgcggcg cccagcagc ccacggcgga      420
ggaggaggcc ctgatcagat tccaccgctc ctaccgagag ctcttcgagt tcttctgcaa      480
caacaccacc atccacggcg ccattccgct ggtgtgctcc cagcacaacc gcatgaagac      540
ggccttctg gcaagtctgt ggctctgcac ctttggcatg atgtactggc aattcgccct      600
gcttttcgga gactacttca gctaccccgt cagcctcaac atcaacctca actcggacaa      660
gctcgtcttc cccgcagtga ccattctgac cctcaatccc tacaggtacc cggaaattaa      720
agaggagctg gaggagctgg accgcatcac agagcagacg ctctttgacc tgtacaaata      780
cagctccttc accactctcg tggccggctc ccgagccgt cgcgacctgc gggggactct      840
gccgcacccc ttgcagcgc tgagggtccc gcccccgct cagggggccc gtcgagcccg      900
tagcgtggcc tccagcttgc gggacaacaa cccccagggt gactggaagg actggaagat      960
cgcttccag ctgtgcaacc agaacaaatc ggactgcttc taccagacat actcatcagg      1020
ggtggatgcg gtgaggagat ggtaccgctt cactacatc aacatcctgt cgaggctgcc      1080
agagactctg ccatecctgg aggaggacac gctgggcaac ttcatcttcg cctgccgctt      1140
caaccaggtc tcctgcaacc aggcgaatta ctctacttc caccaccga tgtatgaaa      1200
ctgctatact ttcaatgaca agaacaactc caacctctgg atgtcttcca tgcttggaa      1260
caacaacggt ctgtccctga tgcctcgcgc agagcagaat gacttcattc cctgctgtc      1320
cacagtact ggggccggg taatgggtga cggcaggat gaacctgcct ttatggatga      1380
tggtggcttt aacttgcggc ctggcgtgga gacctccatc agcatgagga aggaaccct      1440
ggacagactt gggggcgatt atggcgactg caccaagaat ggcagtgatg ttctgttga      1500
gaacctttac cttcaaagt acacacagca ggtgtgtatt cactcctgct tccaggagag      1560
catgatcaag gagtgtggct gtgcctacat cttctatccg cggccccaga acgtggagta      1620
ctgtgactac agaaagcaca gttcctgggg gtactgtac tataagctcc aggttgactt      1680
ctctcagac cacctgggct gtttcaccaa gtgccggaag ccatgcagcg tgaccagct      1740
    
```

ccagctctct gctggttact cacgatggcc ctccggtgaca tcccaggaat gggctctcca	1800
gatgctatcg cgacagaaca attacaccgt caacaacaag agaaatggag tggccaaagt	1860
caacatcttc ttcaaggagc tgaactacaa aaccaattct gagtctccct ctgtcacgat	1920
ggtcaccctc ctgtccaacc tgggcagcca gtggagcctg tggttcggct cctcgggttt	1980
gtctgtggtg gagatggctg agctcgtctt tgacctgctg gtcacatgt tcctcatgct	2040
gtccgaagg ttccgaagcc gatactggtc tccaggecca gggggcaggg gtgctcagga	2100
ggtagcctcc accctggcat cctcccctcc ttcccacttc tgccccacc ccatgtctct	2160
gtccttgtec cagccaggcc ctgctcccctc tccagccttg acagcccctc cccctgccta	2220
tgccaccctg ggccccgcc catctccagg gggtctgca ggggccagtt cctccacctg	2280
tcctctgggg gggccctgag agggaaggag aggtttctca caccaaggca gatgtcctc	2340
tggctgggagg gtgctggccc tggcaagatt gaaggatgtg cagggcttcc tctcagagcc	2400
gccccaaactg ccgttgatgt gtggagggga agcaagatgg gtaagggtc aggaagttgc	2460
tccaagaaca gtagctgatg aagctgcccc gaagtgcctt ggctccagcc ctgtaccctt	2520
tggtagtcc tctgaacct ctggtttccc cacccaactg cggctaagtc tcttttccc	2580
ttggatcagc caagcgaaac ttggagcttt gacaaggaac tttcctaaga aaccgctgat	2640
aaccaggaca aaacacaacc aagggtacac gcaggcatgc acgggtttcc tgcccagcga	2700
cggttaagc cagccccga ctggcctggc cacactgctc tccagtagca cagatgtctg	2760
ctcctctct tgaacttggg tgggaaacce caccctttgt tacttaggca	2820
attccccttc cctgactccc gagggctagg gctagagcag acccgggtaa gtaaaggcag	2880
accagggtct cctctagcct catacccgct ccctcacaga gccatgcccc ggcacctctg	2940
ccctgtgtct ttcatactc tacatgtctg cttgagatat ttctcagcc tgaagtttc	3000
cccaaccate tgccagagaa ctctatgca tcccttagaa cctgtctcag acaccattac	3060
ttttgtgaac gcttttgcct catctgtct tccccaaaat tgactactcc gccttctct	3120
[0002] gggctcccgt agcacactat aacatctgct ggagtgttgc tgttgacca tactttctg	3180
tacatttctg tctcccctcc caactagact gtaagtgcct tgcggtcagg gactgaatct	3240
tgcccgttta tgtatgctcc atgtctagcc catcatcctg cttggagcaa gtaggcagga	3300
gtcaataaaa tgtttgttgc atgaaggaaa aaaaaaaaa aaaaa	3345
<210> 2	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
<400> 2	
uauuuguucu gguugcacag g	21
<210> 3	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
<400> 3	
uauuuguucu gguugcacag g	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列		
	<400> 4		
	ccugugcaac cagaacaaau a		21
	<210> 5		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列		
	<400> 5		
	ccugugcaac cagaacaaau a		21
	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 6		
	uauuuguucu gguugcacag c		21
	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> RNA		
[0003]	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列		
	<400> 7		
	uauuuguucu gguugcacag c		21
	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列		
	<400> 8		
	gcugugcaac cagaacaaau a		21
	<210> 9		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列		
	<400> 9		
	gcugugcaac cagaacaaau a		21
	<210> 10		
	<211> 21		
	<212> RNA		

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 10	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物(mRNA)靶序列	
	<400> 11	
	ugugcaacca gaacaaauc	19
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物(mRNA)靶序列	
	<400> 12	
	gugcaaccag aacaaaucg	19
	<210> 13	
	<211> 19	
[0004]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物(mRNA)靶序列	
	<400> 13	
	gcagagcaga augacuuca	19
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物(mRNA)靶序列	
	<400> 14	
	agagcagaau gacuucauu	19
	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物(mRNA)靶序列	
	<400> 15	
	cuaccagaca uacucauca	19
	<210> 16	
	<211> 19	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物 (mRNA) 靶序列	
	<400> 16	
	ucuaccagac auacucauc	19
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物 (mRNA) 靶序列	
	<400> 17	
	cuuugaccug uacaaauc	19
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物 (mRNA) 靶序列	
	<400> 18	
	uggaaggacu ggaagaucg	19
	<210> 19	
[0005]	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物 (mRNA) 靶序列	
	<400> 19	
	ggaagcacug gaagaucgg	19
	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Alpha-ENaC 基因转录物 (mRNA) 靶序列	
	<400> 20	
	cugugccuac aucuucua	19
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 21	
	uauuuguucu gguugcaca	19
	<210> 22	

	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 22	
	aauuuguuucu gguugcaca	19
	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 23	
	gauuuguuucu gguugcaca	19
	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
[0006]	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 24	
	nauuuguuucu gguugcaca	19
	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 25	
	nauuuguuucu gguugcacn	19
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 26	
	aaugaaguca uucugcucu	19

	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 27	
	uaugaaguca uucugcucu	19
	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 28	
	naugaaguca uucugcucu	19
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> RNA	
[0007]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 29	
	naugaaguca uucugcucn	19
	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 30	
	ugaugaguau gucugguag	19
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	

	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 31	
	ngaugaguau gucugguag	19
	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 32	
	ngaugaguau gucugguan	19
	<210> 33	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
[0008]	<400> 33	
	gaugaguau ucugguaga	19
	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 34	
	uauagaguau ucugguaga	19
	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 35	
	naugaguau ucugguaga	19
	<210> 36	
	<211> 19	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 36	
	naugaguaug ucugguagn	19
	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 37	
	cgauuuguuc ugguugcac	19
	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0009]	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 38	
	ugauuuguuc ugguugcac	19
	<210> 39	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 39	
	ngauuuguuc ugguugcac	19
	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	

	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 40	
	ngauuuuguuc uggugcan	19
	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 41	
	guauuuuguac aggucaaag	19
	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 42	
	uuauuuuguac aggucaaag	19
	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0010]	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 43	
	nuauuuuguac aggucaaag	19
	<210> 44	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 44	
	nuauuuuguac aggucaaan	19
	<210> 45	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 45	
	cgaucuucca guccuucca	19
	<210> 46	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 46	
	ugaucuucca guccuucca	19
	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 47	
[0011]	ngaucuucca guccuucca	19
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 48	
	ngaucuucca guccuuccn	19
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 49	
	ccgaucuucc aguccuucc	19
	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 50	
	ucgaucuuucc aguccuuucc	19
	<210> 51	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 51	
	ncgaucuuucc aguccuuucc	19
	<210> 52	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
[0012]	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 52	
	ncgaucuuucc aguccuucn	19
	<210> 53	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 53	
	ugaagucuuu cugcucugc	19
	<210> 54	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	

	<400> 54	
	ngaagucuu cugcucugc	19
	<210> 55	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 55	
	ngaagucuu cugcucugn	19
	<210> 56	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 56	
	auagaaug uaggcacag	19
[0013]	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 57	
	uuagaaug uaggcacag	19
	<210> 58	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 58	
	nuagaaug uaggcacag	19
	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> RNAi 剂反义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 59	
	nuagaaug uaggcacan	19
	<210> 60	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 60	
	ugugcaacca gaacaaaua	19
	<210> 61	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 61	
	ugugcaacca gaacaaauu	19
[0014]	<210> 62	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 62	
	ugugcaacca gaacaaauc	19
	<210> 63	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 63	
	ugugcaacca gaacaaaun	19
	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 64	
	ngugcaacca gaacaaaun	19
	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 65	
	agagcagaau gacuucauu	19
	<210> 66	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 66	
[0015]	agagcagaau gacuucaua	19
	<210> 67	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 67	
	agagcagaau gacuucaun	19
	<210> 68	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 68	

	ngagcagaau gacuucaun	19
	<210> 69	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 69	
	cuaccagaca uacucauca	19
	<210> 70	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 70	
	cuaccagaca uacucaucn	19
	<210> 71	
	<211> 19	
[0016]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 71	
	nuaccagaca uacucaucn	19
	<210> 72	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 72	
	ucuaccagac auacucauc	19
	<210> 73	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	

	<400> 73	
	ucuaccagac auacucaua	19
	<210> 74	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 74	
	ucuaccagac auacucaun	19
	<210> 75	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
[0017]	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 75	
	ncuaccagac auacucaun	19
	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 76	
	gugcaaccag aacaaaucg	19
	<210> 77	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 77	
	gugcaaccag aacaaauca	19
	<210> 78	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 78	
	gugcaaccag aacaaaucn	19
	<210> 79	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 79	
	nugcaaccag aacaaaucn	19
	<210> 80	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0018]	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 80	
	cuuugaccug uacaaaauac	19
	<210> 81	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 81	
	cuuugaccug uacaaaauaa	19
	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 82	
	cuuugaccug uacaaaauan	19

	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 83	
	nuuugaccug uacaaauan	19
	<210> 84	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 84	
	uggaaggacu ggaagaucg	19
	<210> 85	
	<211> 19	
	<212> RNA	
[0019]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 85	
	uggaaggacu ggaagauca	19
	<210> 86	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 86	
	uggaaggacu ggaagaucn	19
	<210> 87	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	

	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 87	
	nggaaggacu ggaagaucn	19
	<210> 88	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 88	
	ggaagacug gaagaucgg	19
	<210> 89	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 89	
	ggaagacug gaagaucga	19
	<210> 90	
	<211> 19	
[0020]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 90	
	ggaagacug gaagaucgn	19
	<210> 91	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 91	
	ngaagacug gaagaucgn	19
	<210> 92	
	<211> 19	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 92	
	gcagagcaga augacuuca	19
	<210> 93	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 93	
	gcagagcaga augacuucn	19
	<210> 94	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0021]	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 94	
	ncagagcaga augacuucn	19
	<210> 95	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 95	
	cugugccuac aucuucuau	19
	<210> 96	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<400> 96	
	cugugccuac aucuucuaa	19
	<210> 97	

	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 97	
	cugugccuac aucuucuan	19
	<210> 98	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链核心 19-聚体碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 1, 19	
	<223> n = 任何核苷酸	
	<400> 98	
	nugugccuac aucuucuan	19
[0022]	<210> 99	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 99	
	uauuuguucu gguugcacag cug	23
	<210> 100	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 100	
	uauuuguucu gguugcacag cug	23
	<210> 101	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 101	
	uauuuguucu gguugcacag c	21

	<210> 102	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 102	
	uauuuguuucu gguugcacau u	21
	<210> 103	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 103	
	uauuuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 104	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 104	
[0023]	aauuuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 105	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 105	
	uaugaaguca uucugcucug c	21
	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 106	
	ugaugaguau gucugguaga a	21
	<210> 107	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 107	

	ugauuuguuc ugguugcaca g	21
	<210> 108	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 108	
	uaugaguau ucugguagaa g	21
	<210> 109	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 109	
	uuauuuguac aggucaaaga g	21
	<210> 110	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
[0024]	<400> 110	
	uaugaaguca uucugcucug c	21
	<210> 111	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 111	
	ugaugaguau gucugguaga a	21
	<210> 112	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 112	
	ugauuuguuc ugguugcaca g	21
	<210> 113	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	

	<400> 113	
	uaugaguaug ucugguagaa g	21
	<210> 114	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 114	
	uuauuuguac aggucaaaga g	21
	<210> 115	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 115	
	uaugaaguca uucugcucuu u	21
	<210> 116	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0025]	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 116	
	ugaugaguau gucugguagu u	21
	<210> 117	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 117	
	ugauuuguuc ugguugcacu u	21
	<210> 118	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 118	
	uaugaguaug ucugguagau u	21
	<210> 119	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 119	
	uuuuuuuuac aggucaaagu u	21
	<210> 120	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 120	
	uauuuuuucu gguugcacag c	21
	<210> 121	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 121	
	uauuuuuucu gguugcacag c	21
	<210> 122	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0026]	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 122	
	uauuuuuucu gguugcacag c	21
	<210> 123	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 123	
	uauuuuuucu gguugcacag c	21
	<210> 124	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 124	
	uauuuuuucu gguugcacag c	21
	<210> 125	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 125		
	uauuuguucu gguugcacag c	21	
	<210> 126		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 126		
	ugaucuucca guccuuccag u	21	
	<210> 127		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 127		
	ucgaucuucc aguccuucca g	21	
	<210> 128		
	<211> 21		
	<212> RNA		
[0027]	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 128		
	ugaagucuuu cugcucugcg c	21	
	<210> 129		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 129		
	auagaaug uaggcacag c	21	
	<210> 130		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列		
	<400> 130		
	uaucgugaca gagggagacu c	21	
	<210> 131		
	<211> 21		
	<212> RNA		

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 131	
	uugaccaucg ugacagaggg a	21
	<210> 132	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 132	
	uauuuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 133	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 133	
	uauuuguuucu gguugcacag cu	22
	<210> 134	
	<211> 23	
[0028]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 134	
	uauuuguuucu gguugcacag cuu	23
	<210> 135	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 135	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 136	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 136	
	uauuuguuucu gguugcacag u	21
	<210> 137	
	<211> 21	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 137	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 138	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 138	
	uauuuguuucu gguugcacgg g	21
	<210> 139	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 139	
	uauuuguuucu gguugcacgg u	21
	<210> 140	
[0029]	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 140	
	uauuuguuucu gguugcaccg u	21
	<210> 141	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 141	
	uauuuguuucu gguugcacag u	21
	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 142	
	uauuuguuucu gguugcacag a	21
	<210> 143	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 143	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 144	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 144	
	uauuuguuuc uggugcacag g	21
	<210> 145	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 145	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
[0030]	<210> 146	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 146	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 147	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 147	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 148	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	

	<222> 1	
	<223> n = 2'-O-甲基肌苷-3'-磷酸酯	
	<400> 148	
	nauuuguucu gguugcacag g	21
	<210> 149	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 149	
	uauuuguucu gguugcacag u	21
	<210> 150	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 150	
	uauuuguucu gguugcacag u	21
	<210> 151	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0031]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 151	
	tauuuguucu gguugcacag c	21
	<210> 152	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400> 152	
	agaagucuu cugcucugcu u	21
	<210> 153	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 153	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 154	
	<211> 21	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 154	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 155	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 155	
	gcugugcaac cagaacaaau u	21
	<210> 156	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 156	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 157	
	<211> 21	
[0032]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 157	
	gcagagcaga augacucau a	21
	<210> 158	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 158	
	uucuaccaga cauacucau a	21
	<210> 159	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 159	
	cugugcaacc agaacaaau a	21
	<210> 160	
	<211> 21	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 160	
	cuucuaccag acauacucau a	21
	<210> 161	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 161	
	cucuuugacc uguacaaau a	21
	<210> 162	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 162	
	agagcagaau gacuucauu u	21
	<210> 163	
[0033]	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 163	
	cuaccagaca uacucaucau u	21
	<210> 164	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 164	
	gugcaaccag aacaaucou u	21
	<210> 165	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 165	
	ucuaccagac auacucauau u	21
	<210> 166	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 166	
	cuuugaccug uacaaauau u	21
	<210> 167	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 167	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 168	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 168	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
[0034]	<210> 169	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 169	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 170	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 170	
	acuggaagga cuggaagauc a	21
	<210> 171	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 171	
	cuggaaggac uggaagaucg a	21

	<210> 172	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 172	
	gcgcagagca gaaugacuuc a	21
	<210> 173	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 173	
	ggcugugccu acaucuucua u	21
	<210> 174	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 174	
[0035]	gagucuccu cugucacgau a	21
	<210> 175	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 175	
	ucccucuguc acgaugguca a	21
	<210> 176	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 176	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 177	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 177	

	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 178	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 178	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 179	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 179	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 180	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
[0036]	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 13	
	<223> n = 2'-O-甲基肌苷-3'-磷酸酯	
	<400> 180	
	ccugugcaac canaacaaau a	21
	<210> 181	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 18	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 181	
	ccugugcaac cagaacanau a	21
	<210> 182	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	

	<400> 182	
	acugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 183	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 183	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 184	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 13	
	<223> n = 2'-O-甲基肌苷-3'-磷酸酯	
	<400> 184	
	ccugugcaac canaacaaa a	21
	<210> 185	
[0037]	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 185	
	ccugugcaac uagaacaaa a	21
	<210> 186	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 186	
	cccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 187	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 187	
	accgugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 188	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 188	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 189	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 189	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 190	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 190	
	gcugugcaac cagaacaaa a	21
[0038]	<210> 191	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 191	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 192	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 192	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 193	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 193	
	ccugugcaac cagaacaaa a	21

	<210> 194	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 194	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 195	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 195	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 196	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 196	
[0039]	acggugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 197	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 197	
	acugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 198	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 198	
	acugugcaac cagaacaanu a	21
	<210> 199	
	<211> 21	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 18	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 199	
	acugugcaac cagaacanau a	21
	<210> 200	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 17	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 200	
	acugugcaac cagaacnaau a	21
	<210> 201	
	<211> 21	
[0040]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 201	
	ucugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 202	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 18	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 202	
	ccugugcaac cagaacanau a	21
	<210> 203	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	

<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	18	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	203	
ccugugcaac cagaacanau a		21
<210>	204	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	19	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	204	
ccugugcaac cagaacaanu a		21
<210>	205	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
[0041] <223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	17	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	205	
ccugugcaac cagaacnaau a		21
<210>	206	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
<400>	206	
ccugugcaac cagaacaaau a		21
<210>	207	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
<400>	207	
ccugugcaac cagaacaaau a		21
<210>	208	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 208	
	ccugugcaac cagaacaaaau a	21
	<210> 209	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 209	
	ccugugcaac cagaacaaaau c	21
	<210> 210	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 210	
	acugugcaac cagaacaaaau a	21
[0042]	<210> 211	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 211	
	acugugcaac cagaacaaaau a	21
	<210> 212	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 18	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 212	
	acugugcaac cagaacanau a	21
	<210> 213	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 213	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 214	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 214	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 215	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 215	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 216	
	<211> 21	
	<212> RNA	
[0043]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 216	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 217	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 217	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 218	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 218	
	acuggaagga cuggaagauc a	21
	<210> 219	
	<211> 21	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 219	
	cugugcaacc agaacaaauc a	21
	<210> 220	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 220	
	cugugcaacc agaacaaauc a	21
	<210> 221	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 221	
	gcagagcaga augacuucuu u	21
	<210> 222	
	<211> 21	
[0044]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 222	
	gcagagcaga augacuucuu u	21
	<210> 223	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 223	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 224	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 224	
	uauuuguucu gguugcacag cug	23
	<210> 225	
	<211> 21	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 225	
	uauuuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 226	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 226	
	uauuuguuucu gguugcacau u	21
	<210> 227	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 227	
	aaauuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 228	
[0045]	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 228	
	uaugaaguca uucugcucug c	21
	<210> 229	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 229	
	ugaugaguau gucugguaga a	21
	<210> 230	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 230	
	ugauuuguuc uggugcaca g	21
	<210> 231	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 231	
	uaugaguaug ucugguagaa g	21
	<210> 232	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 232	
	uuauuuguac aggucaaaga g	21
	<210> 233	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 233	
	uaugaaguca uucugcucu u	21
[0046]	<210> 234	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 234	
	ugaugaguau gucugguagu u	21
	<210> 235	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 235	
	ugauuuguuc uggugcacu u	21
	<210> 236	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 236	
	uaugaguaug ucugguagau u	21

	<210> 237	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 237	
	uuauuuguac aggucaaagu u	21
	<210> 238	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 238	
	ugaucuucca guccuuccag u	21
	<210> 239	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 239	
[0047]	ucgaucuucc aguccuucca g	21
	<210> 240	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 240	
	ugaagucauu cugcucugcg c	21
	<210> 241	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 241	
	auagaagaug uaggcacagc c	21
	<210> 242	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 242	

	uauugugaca gagggagacu c	21
	<210> 243	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 243	
	uugaccaucg ugacagaggg a	21
	<210> 244	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 244	
	uauuuguuucu gguugcacag cu	22
	<210> 245	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
[0048]	<400> 245	
	uauuuguuucu gguugcacag cuu	23
	<210> 246	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 246	
	uauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 247	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 247	
	uauuuguuucu gguugcacag u	21
	<210> 248	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	

	<400> 248	
	uauuuguuucu gguugcacgg g	21
	<210> 249	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 249	
	uauuuguuucu gguugcacgg u	21
	<210> 250	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 250	
	uauuuguuucu gguugcacgg u	21
	<210> 251	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0049]	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 251	
	uauuuguuucu gguugcacag a	21
	<210> 252	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 13	
	<223> n = 肌昔(次黄嘌呤)	
	<400> 252	
	nauuuguuucu gguugcacag g	21
	<210> 253	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 253	
	tauuuguuucu gguugcacag c	21
	<210> 254	

	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400> 254	
	agaagucuuu cugcucugcu u	21
	<210> 255	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 255	
	gcugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 256	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 256	
	gcugugcaac cagaacaaau u	21
[0050]	<210> 257	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 257	
	gcagagcaga augacuucau a	21
	<210> 258	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 258	
	uuuaccaga cauacucauc a	21
	<210> 259	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 259	
	cugugcaacc agaacaaau a	21

	<210> 260	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 260	
	cuucuaccag acauacucau a	21
	<210> 261	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 261	
	cucuuugacc uguacaaaua a	21
	<210> 262	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 262	
[0051]	agagcagaau gacuucauau u	21
	<210> 263	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 263	
	cuaccagaca uacucaucau u	21
	<210> 264	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 264	
	gugcaaccag aacaaaucou u	21
	<210> 265	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 265	

	ucuaccagac auacucauau u	21
	<210> 266	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 266	
	cuuugaccug uacaaauau u	21
	<210> 267	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 267	
	acuggaagga cuggaagauc a	21
	<210> 268	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
[0052]	<400> 268	
	cuggaaggac uggaagaucg a	21
	<210> 269	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 269	
	gcgcagagca gaaugacuuc a	21
	<210> 270	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 270	
	ggcugugccu acaucuucua u	21
	<210> 271	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	

	<400> 271	
	gagucuccu cugucacgau a	21
	<210> 272	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 272	
	uccucuguc acgaugguca a	21
	<210> 273	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 273	
	ccugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 274	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0053]	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 13	
	<223> n = 2'-O-甲基肌苷-3'-磷酸酯	
	<400> 274	
	ccugugcaac canaacaaau a	21
	<210> 275	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 18	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 275	
	ccugugcaac cagaacanau a	21
	<210> 276	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 276	
	acugugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 277	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 277	
	ccugugcaac uagaacaaa a	21
	<210> 278	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 278	
	cccgugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 279	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0054]	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 279	
	accgugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 280	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 280	
	acggugcaac cagaacaaa a	21
	<210> 281	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 281	
	acugugcaac cagaacaanu a	21

<210>	282	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链基础碱基序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	18	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	282	
acugugcaac cagaacanau a		21
<210>	283	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链基础碱基序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	17	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	283	
[0055] acugugcaac cagaacnaau a		21
<210>	284	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链基础碱基序列	
<400>	284	
ucugugcaac cagaacaaau a		21
<210>	285	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNAi 剂有义链基础碱基序列	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	18	
<223>	n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
<400>	285	
ccugugcaac cagaacanaua		21
<210>	286	
<211>	21	
<212>	RNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 19	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 286	
	ccugugcaac cagaacaanu a	21
	<210> 287	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> 17	
	<223> n = 2'-O-甲基-2-氨基腺苷-3'-磷酸酯	
	<400> 287	
	ccugugcaac cagaacnaau a	21
	<210> 288	
	<211> 21	
[0056]	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 288	
	ccugugcaac cagaacaaau c	21
	<210> 289	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链基础碱基序列	
	<400> 289	
	gcagagcaga augacuucuu u	21
	<210> 290	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 四肽接头	
	<220>	
	<221> 其它特征	
	<222> (2).. (2)	
	<223> Xaa = 瓜氨酸	

	<400> 290	
	Phe Xaa Phe Pro	
	1	
	<210> 291	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ND-9201 修饰的反义链序列	
	<400> 291	
	gauuuguucu gguugcacat t	21
	<210> 292	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ND-9201 修饰的反义链序列	
	<400> 292	
	ugugcaacca gaacaaauct t	21
	<210> 293	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0057]	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 293	
	cugugcaacc agaacaaauc a	21
	<210> 294	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 294	
	gcagagcaga augacuucuu u	21
	<210> 295	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400> 295	
	aaugugcaac cagaacaaau a	21
	<210> 296	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
[0058]	<223>	RNAi 剂反义链基础碱基序列	
	<400>	296	
	aaugugcaac	cagaacaaau a	21

小鼠全肺 α -ENaC 表达
第 1、2 天: 5 mg/kg IT 剂量; 第 9 天处死

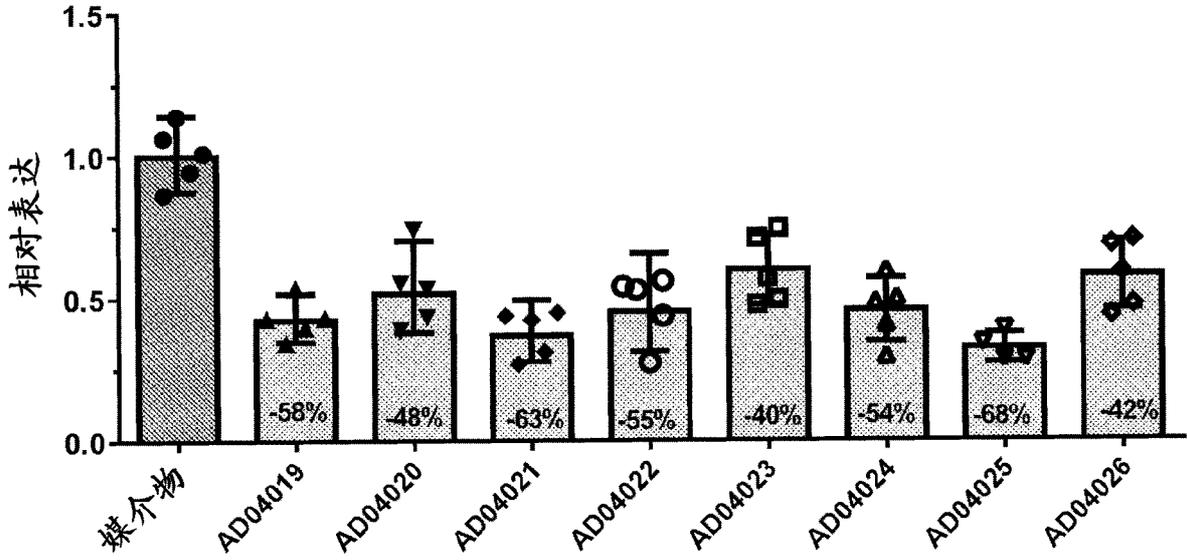


图 1

小鼠全肺 α -ENaC 表达
第 1、2 天: 3 mg/kg IT 剂量; 第 9 天处死

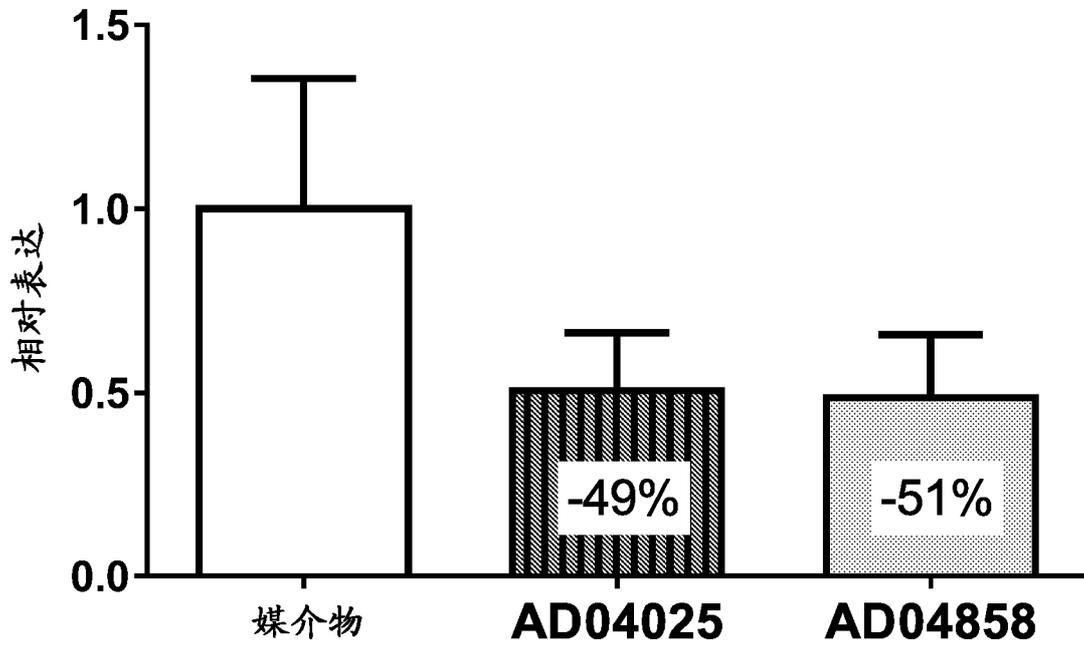


图 2

大鼠全肺 α -ENaC 表达
第 1、2 天: IT 剂量; 第 9 天处死

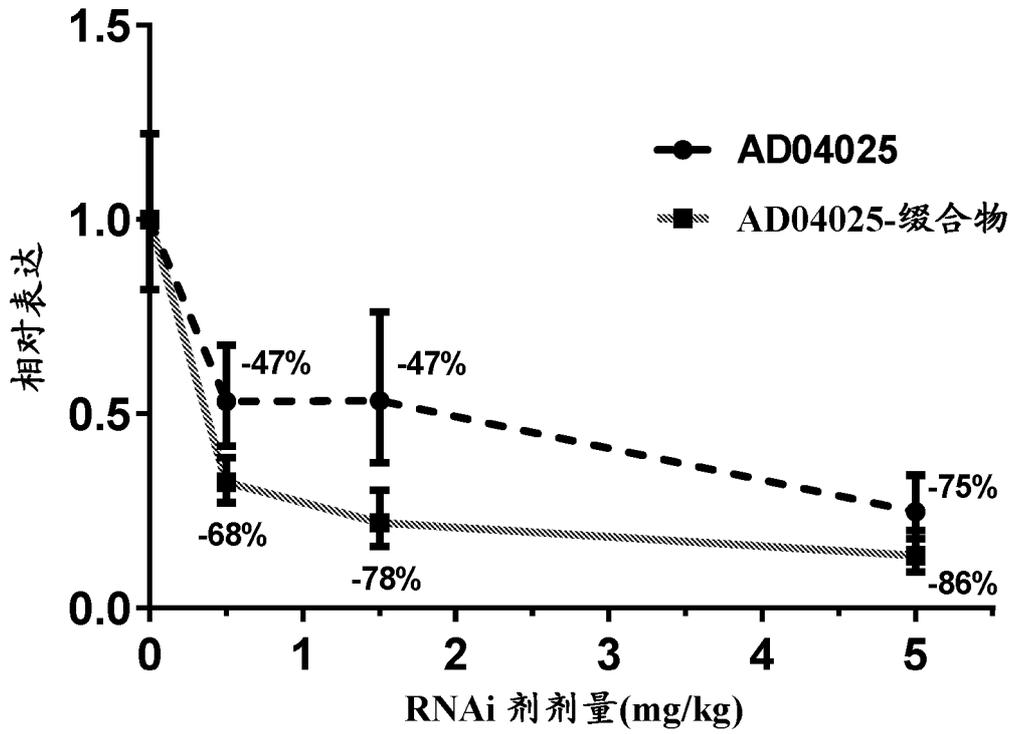


图 3

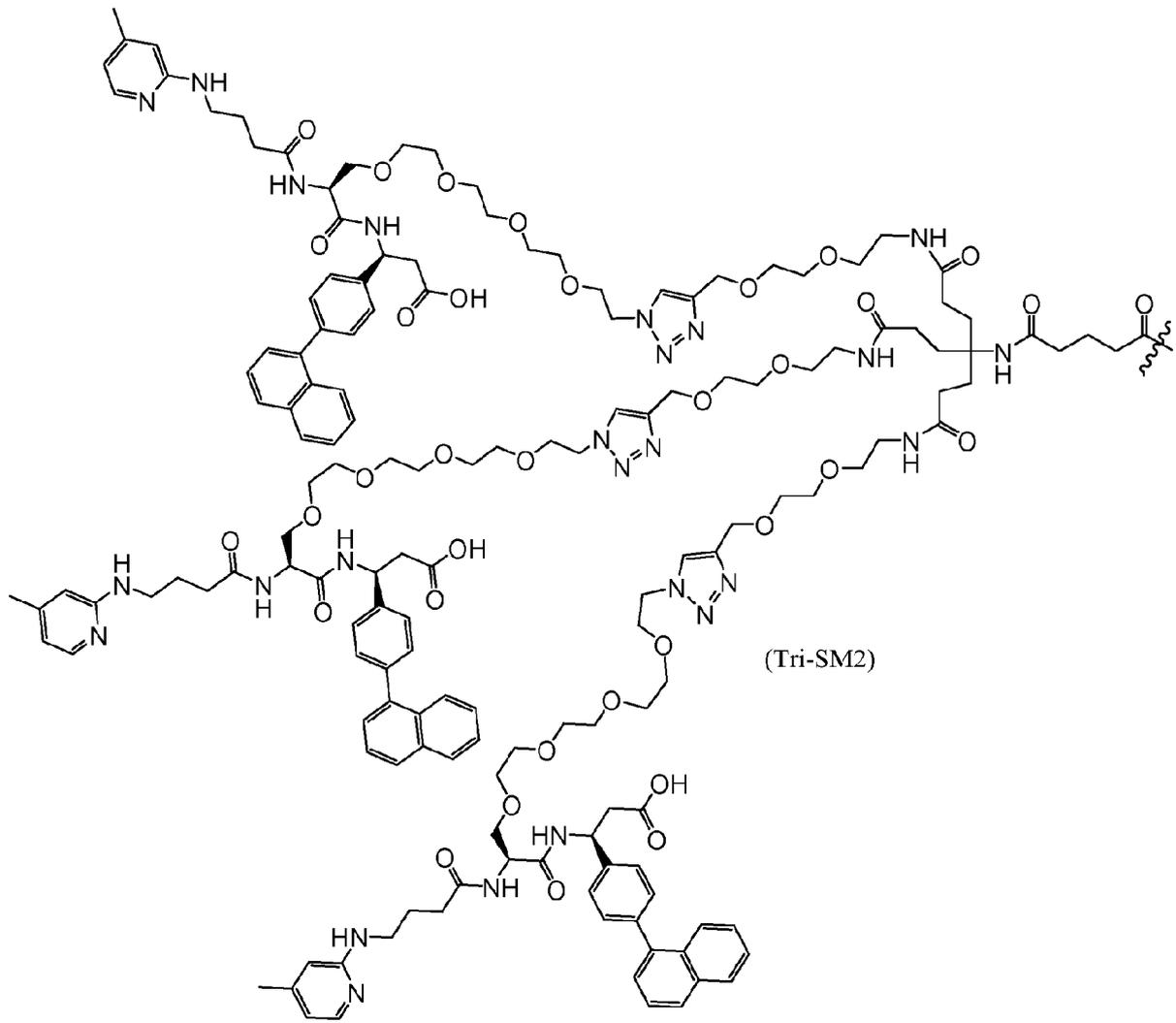


图 4

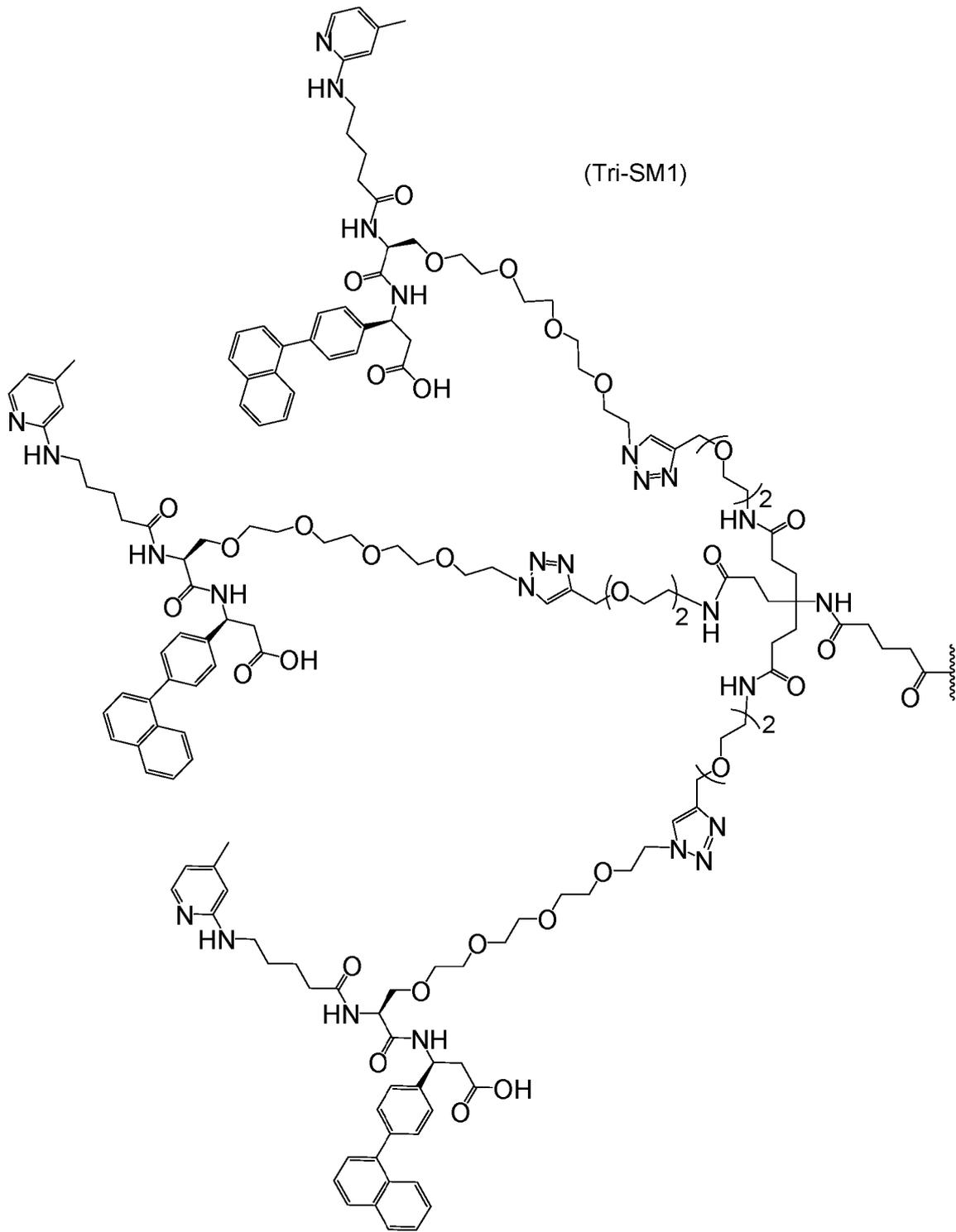


图 5

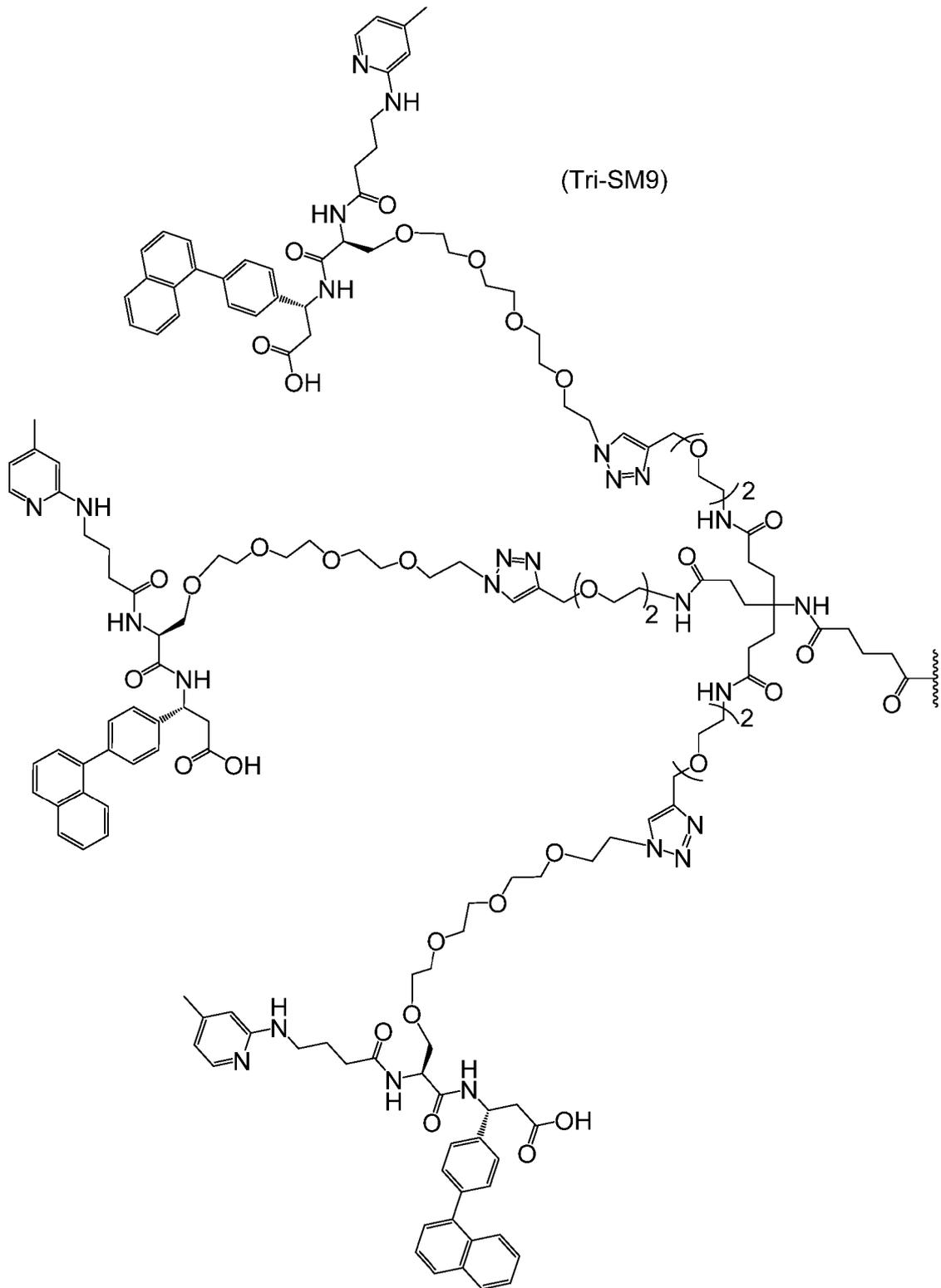


图 7

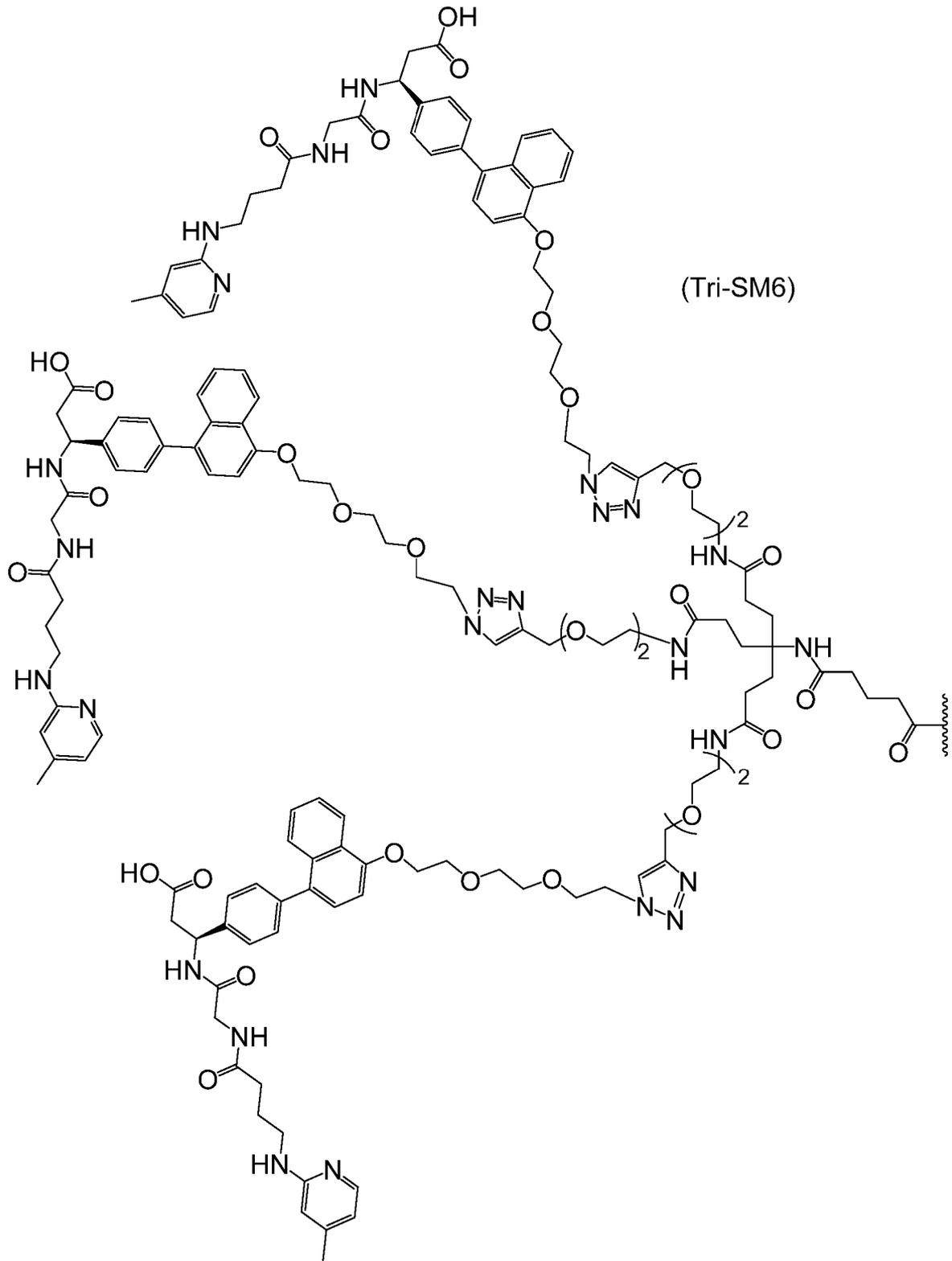


图 8

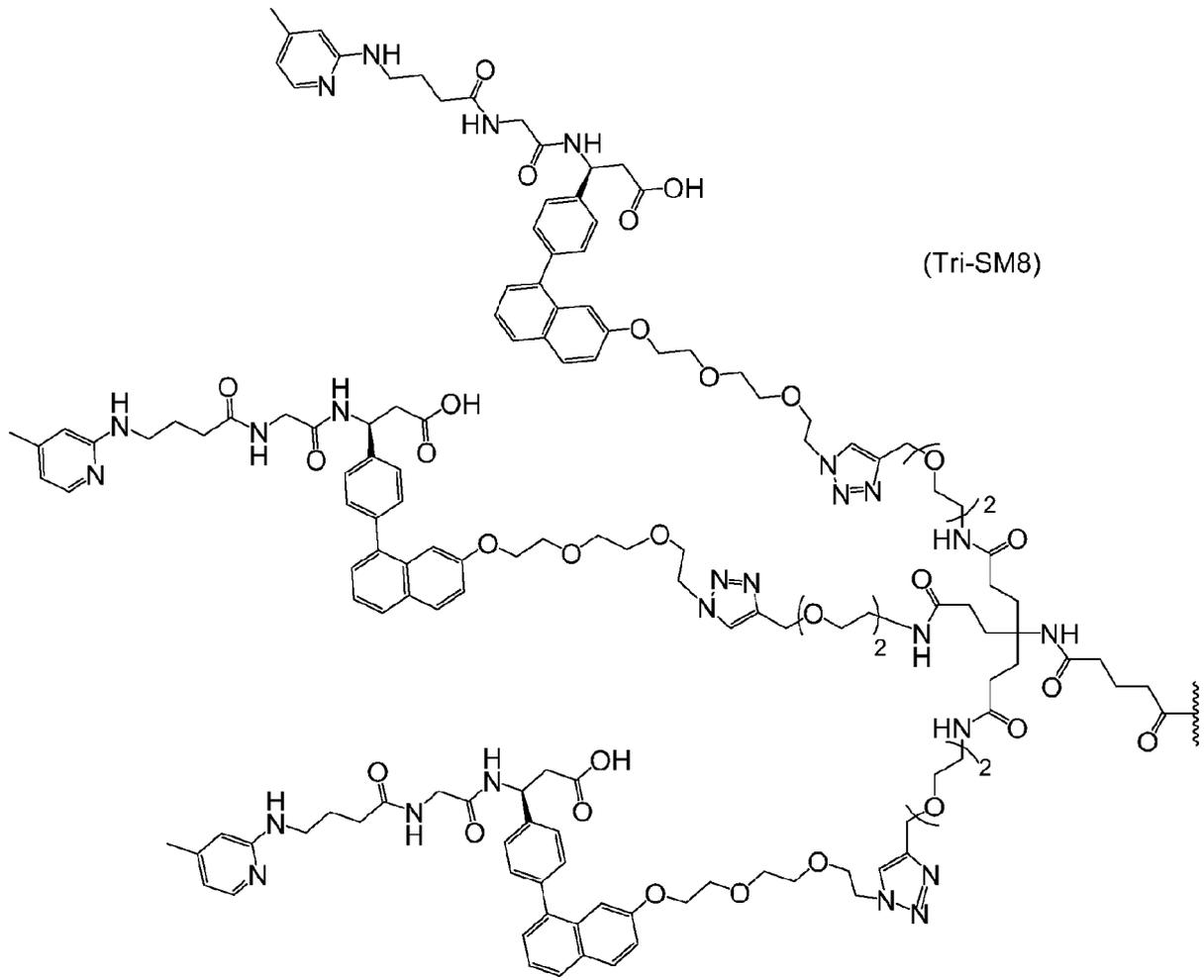


图 9

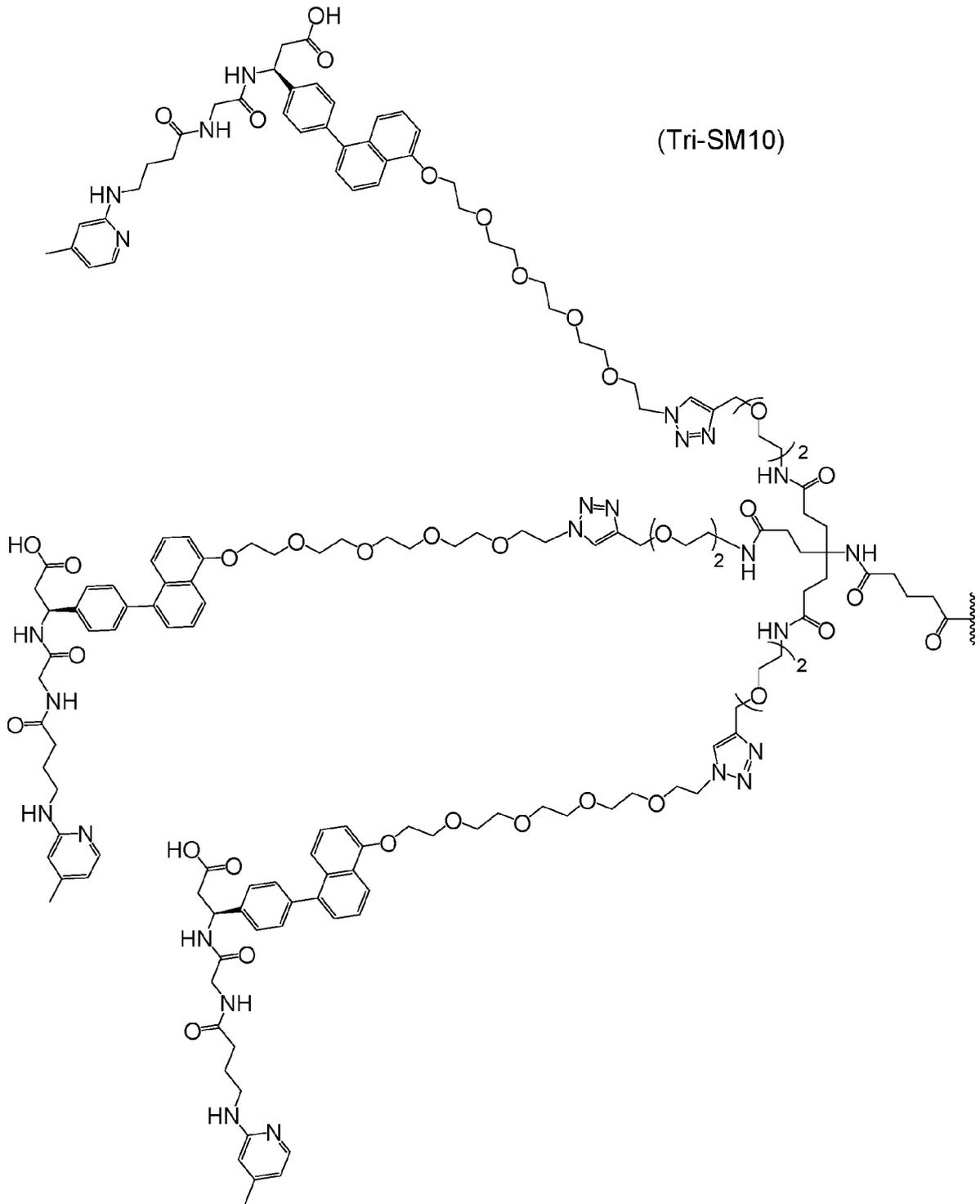


图 10

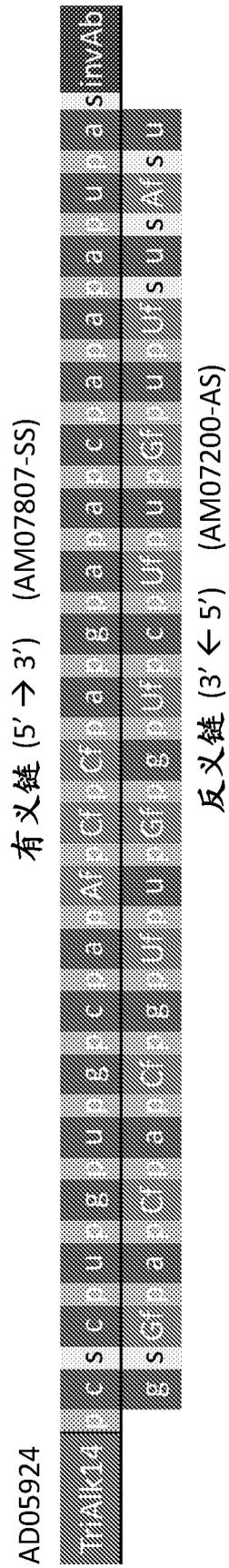


图 12B

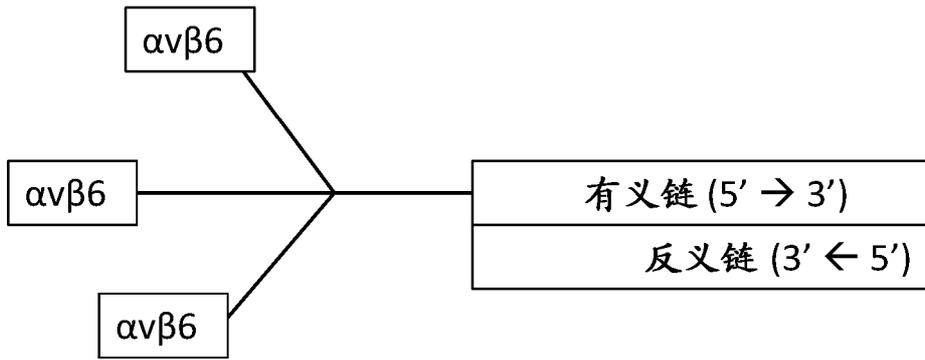


图 12H

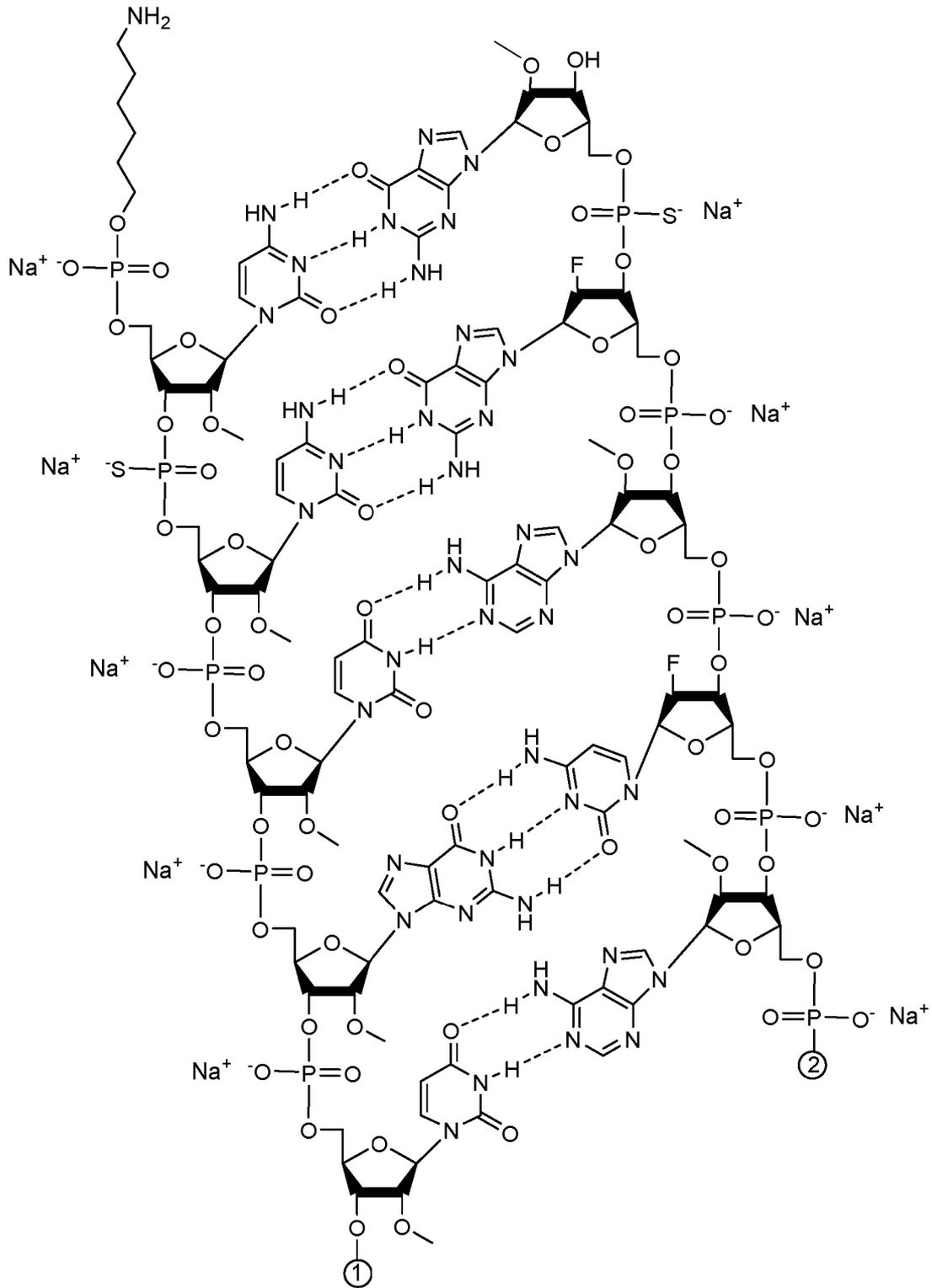


图 13A

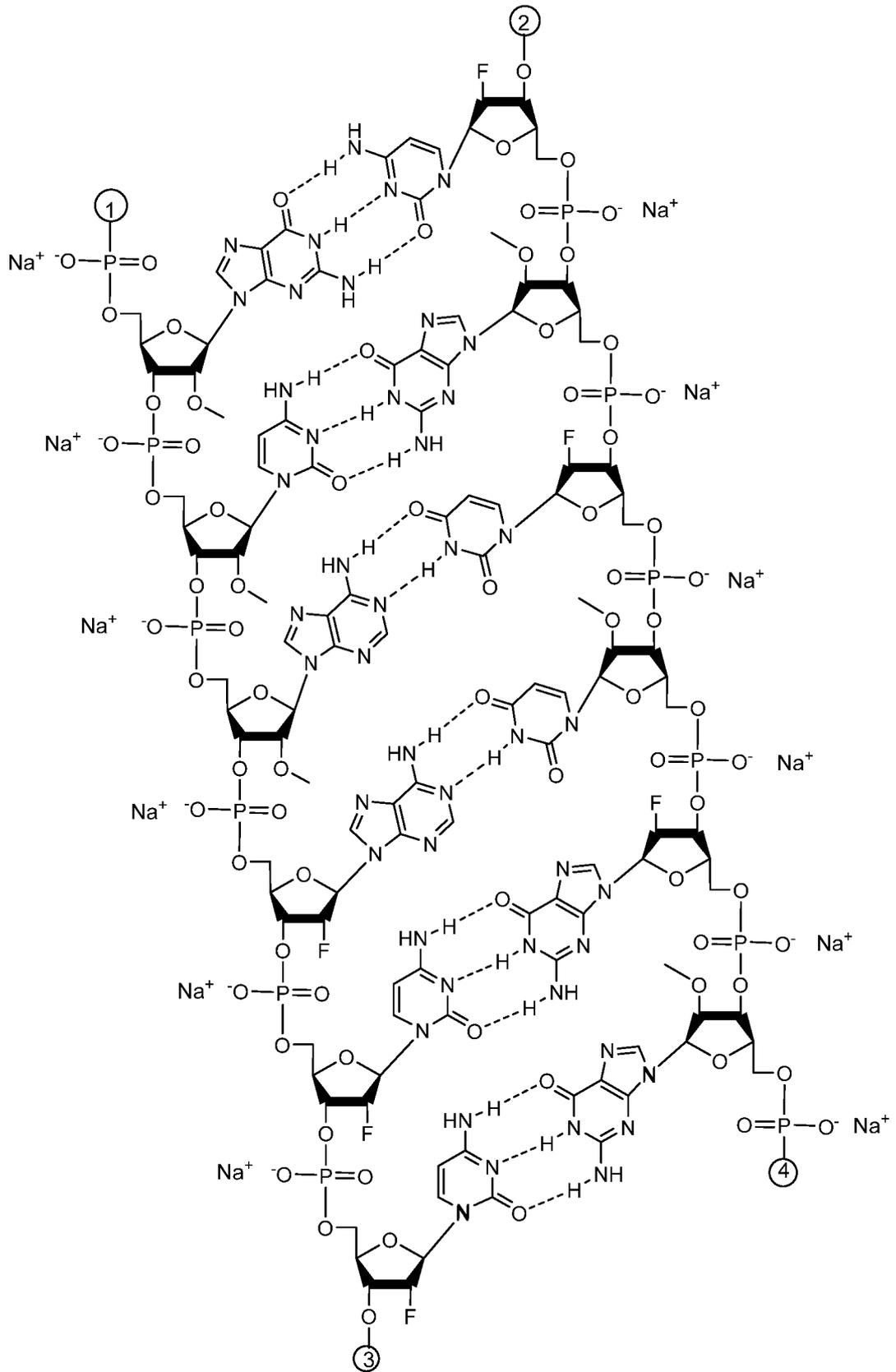


图 13B

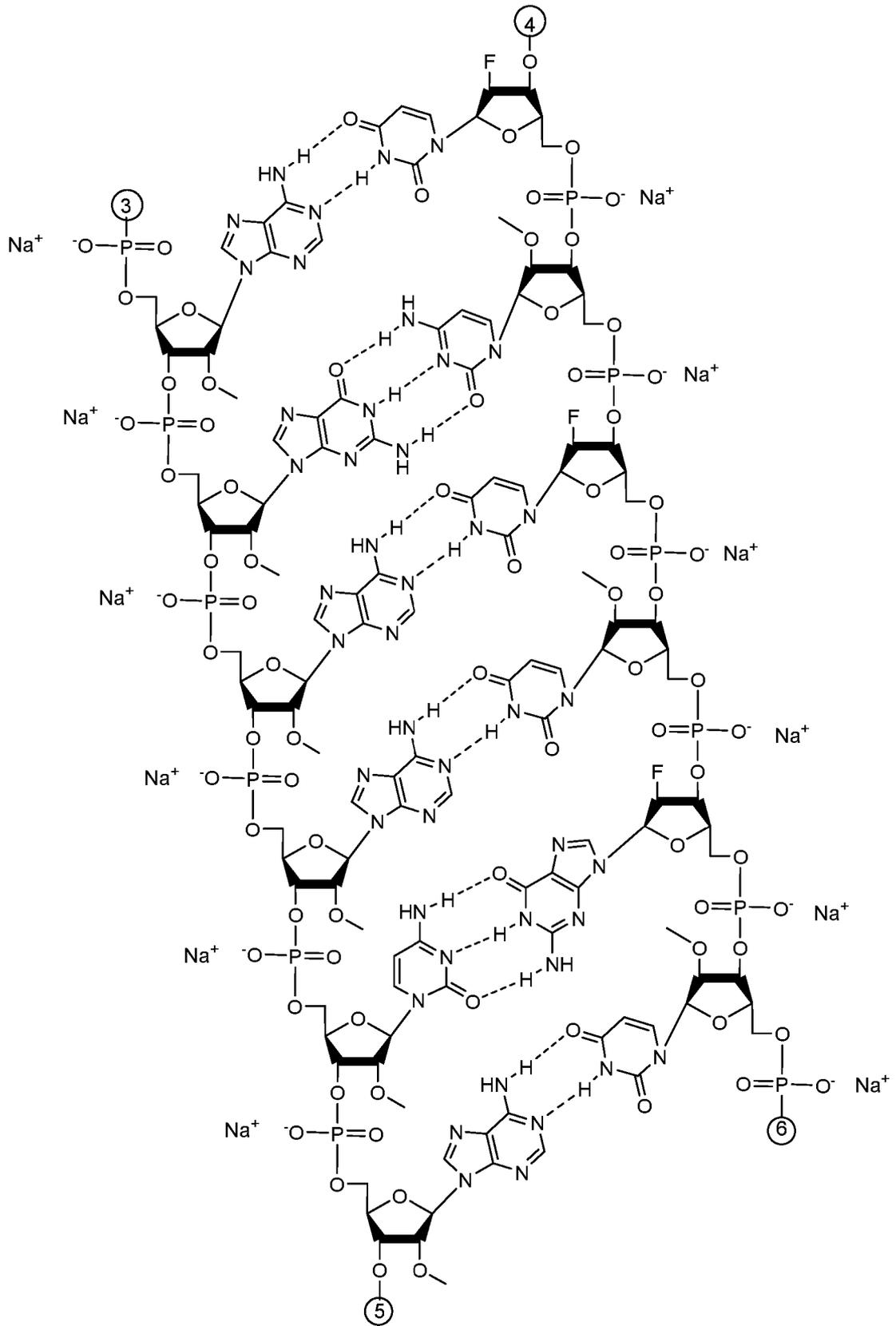


图 13C

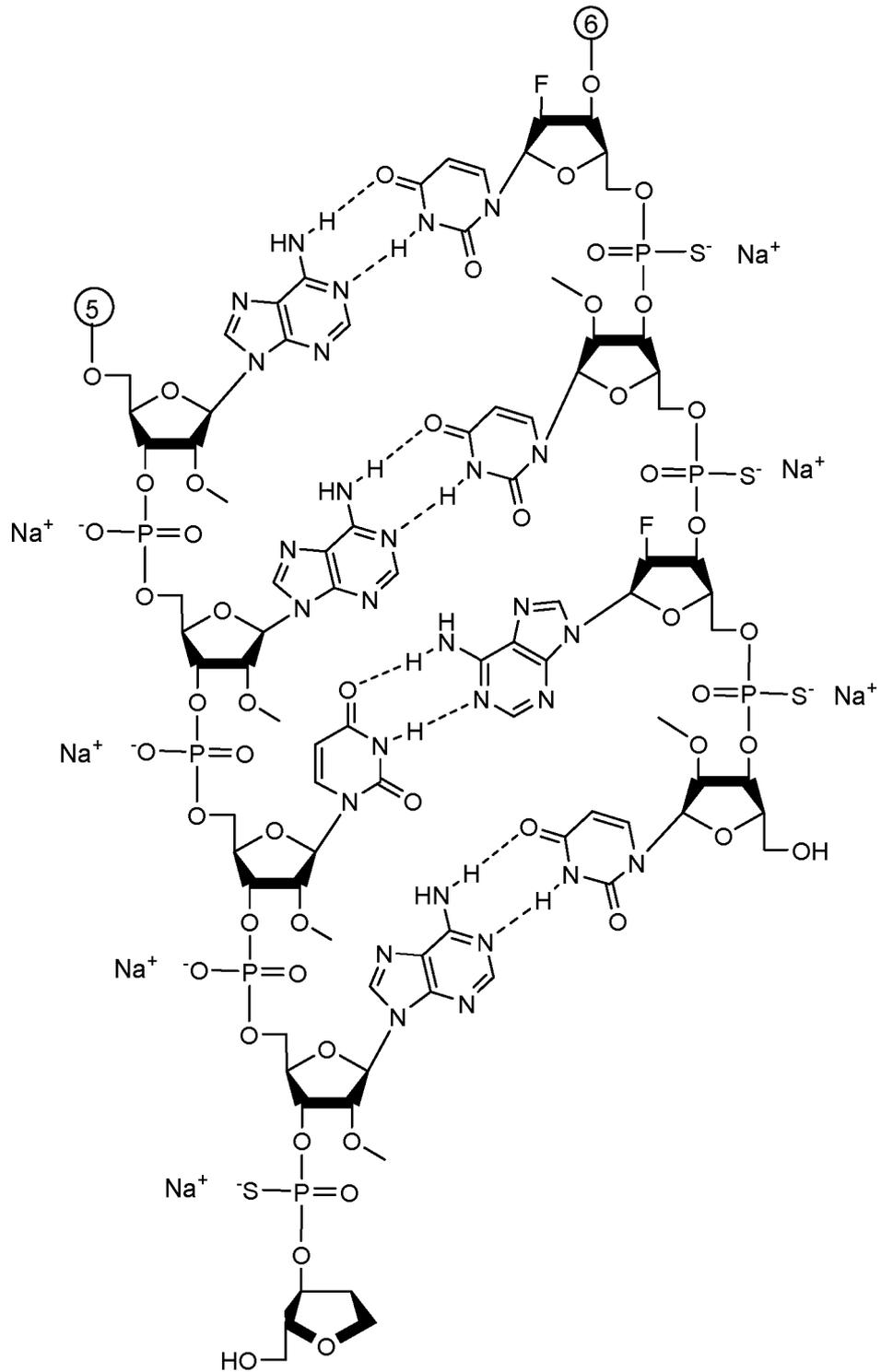


图 13D

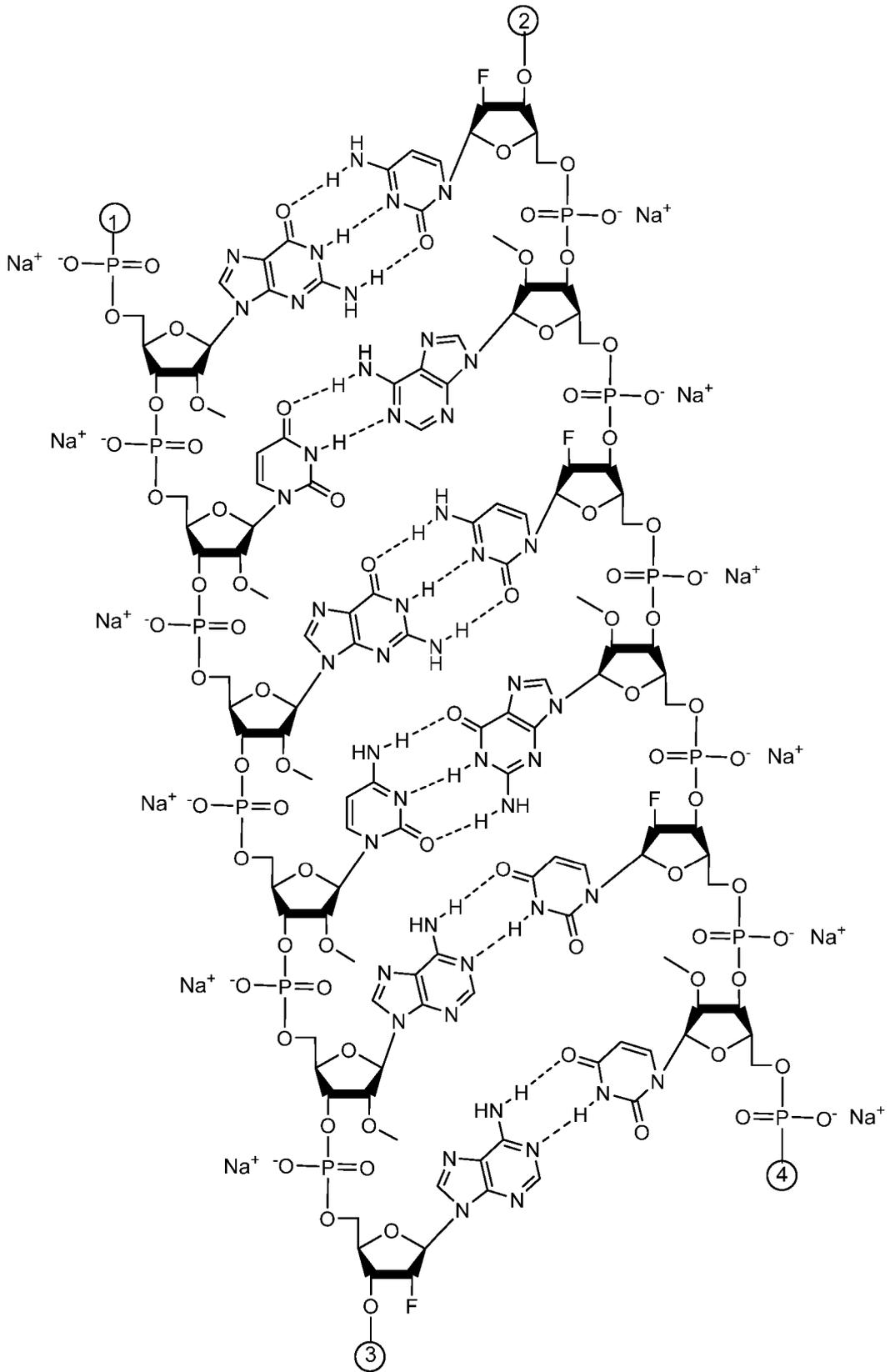


图 14B

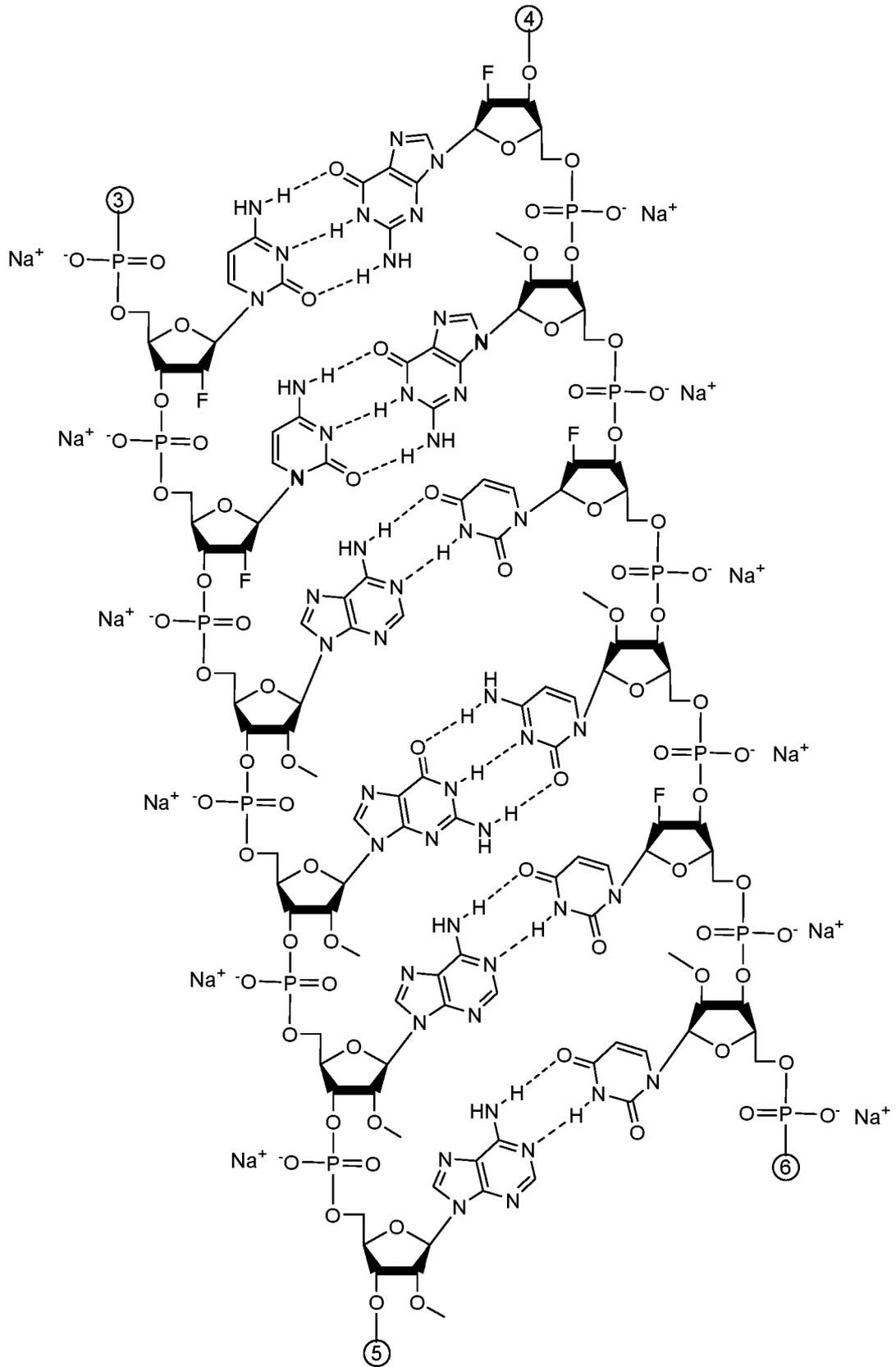


图 14C

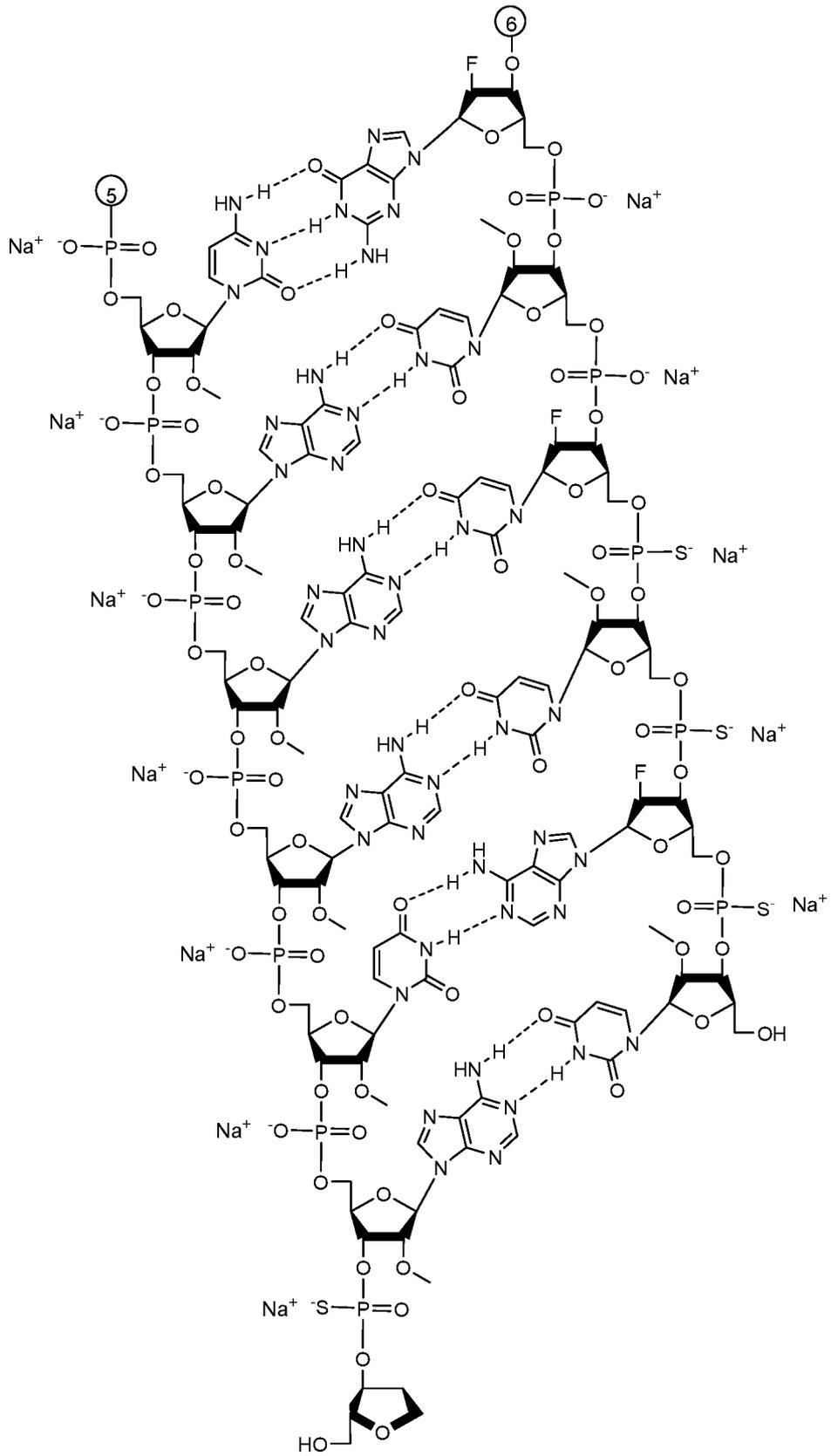


图 14D

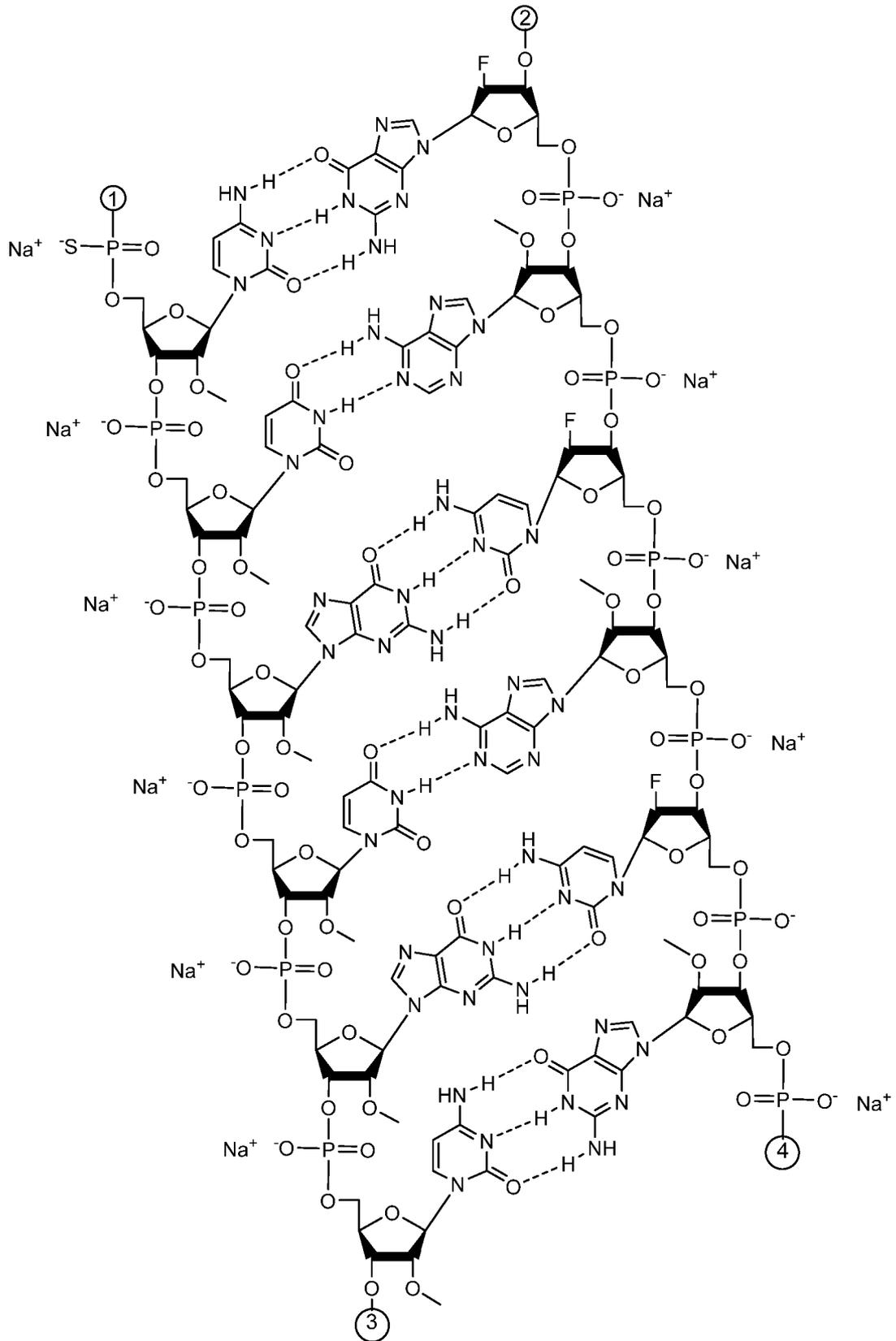


图 15B

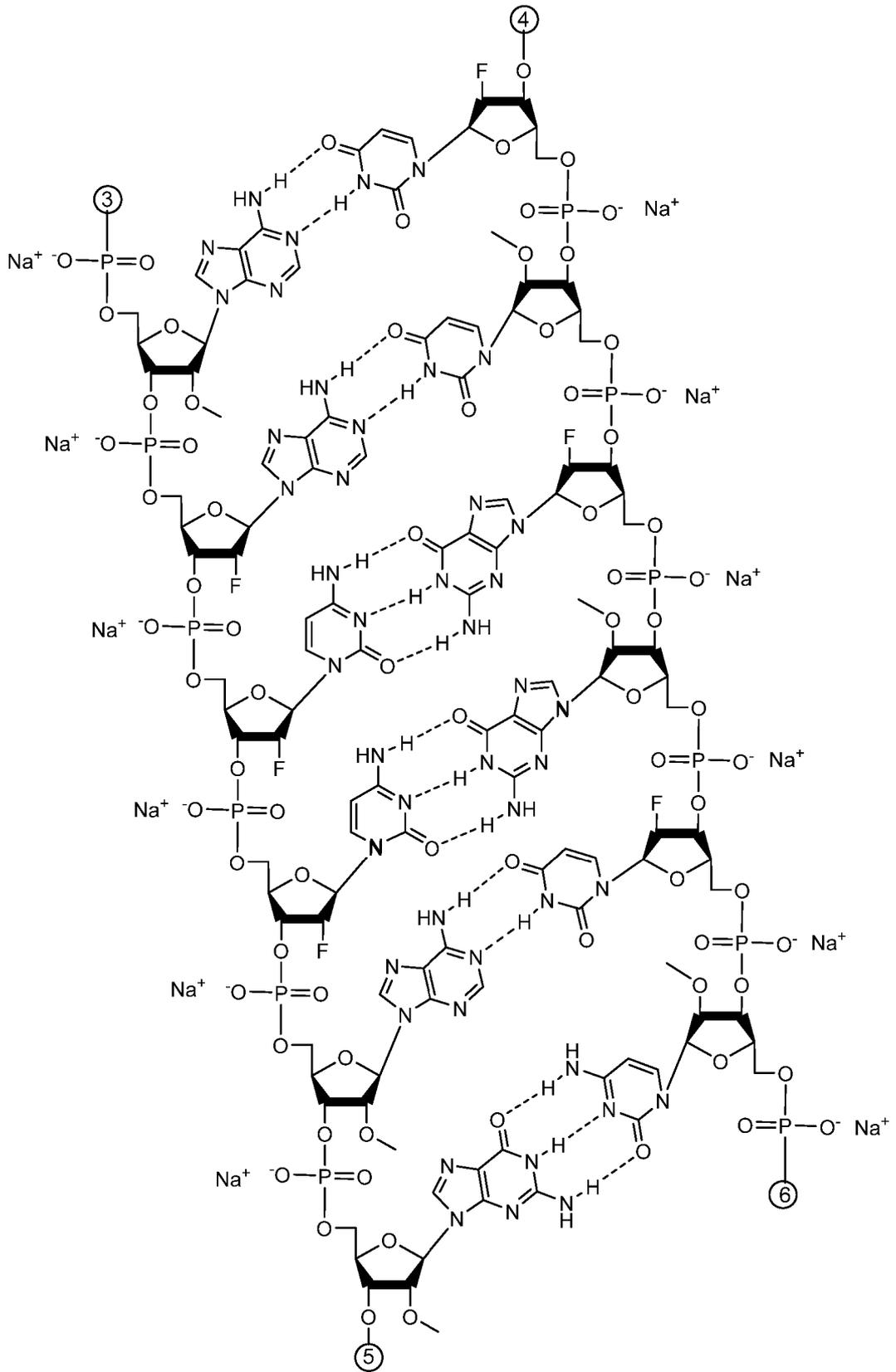


图 15C

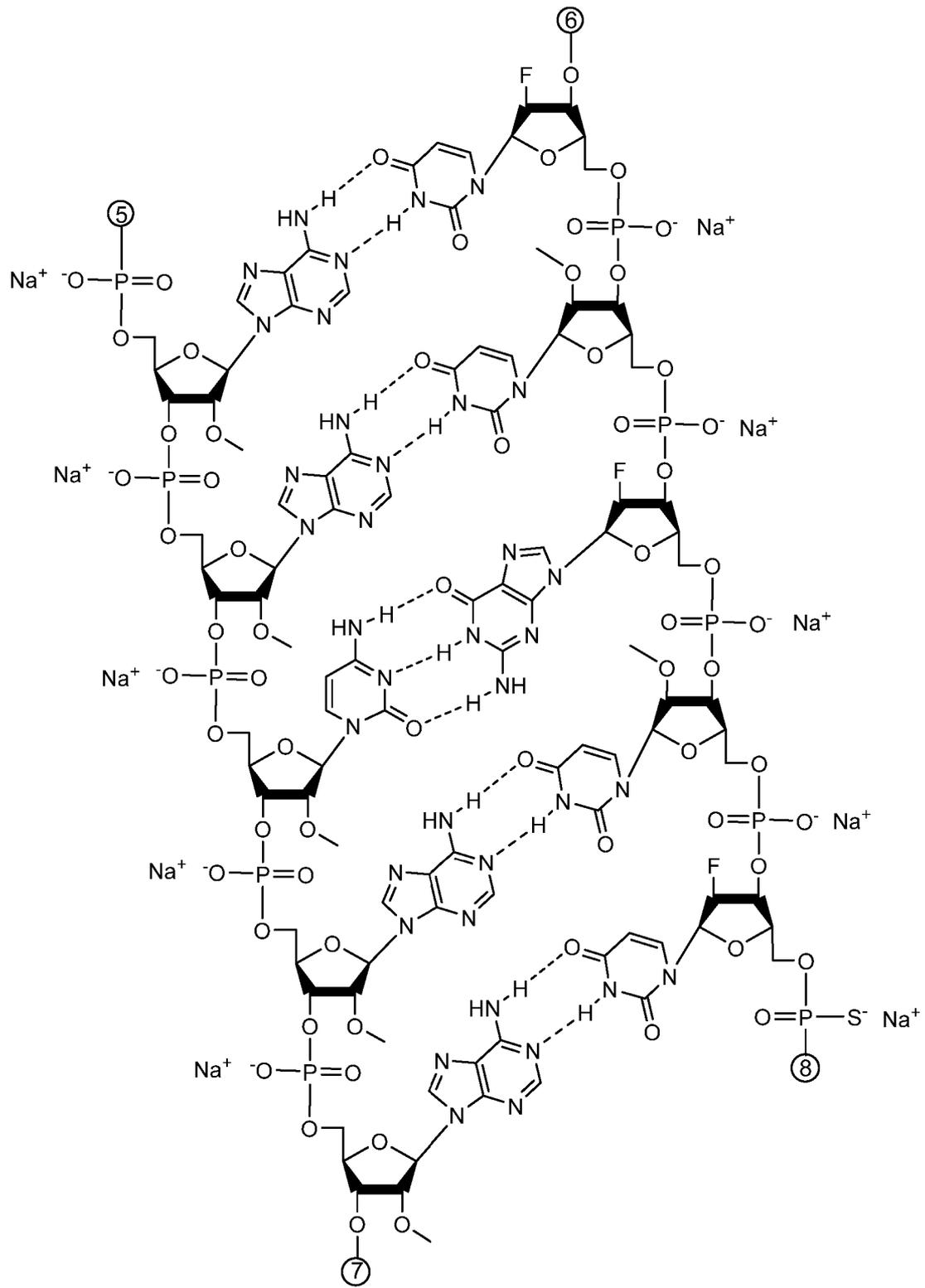


图 15D

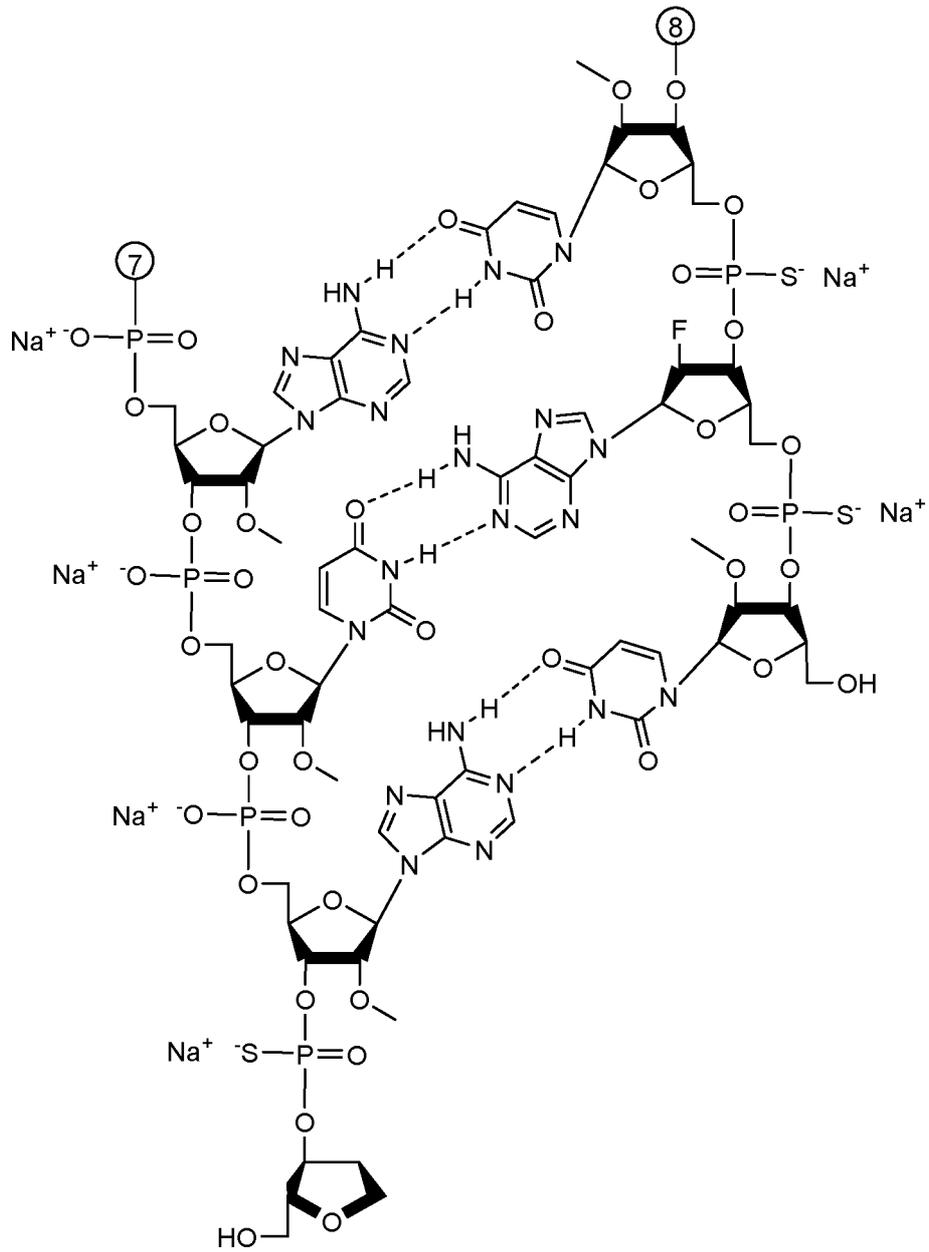


图 15E

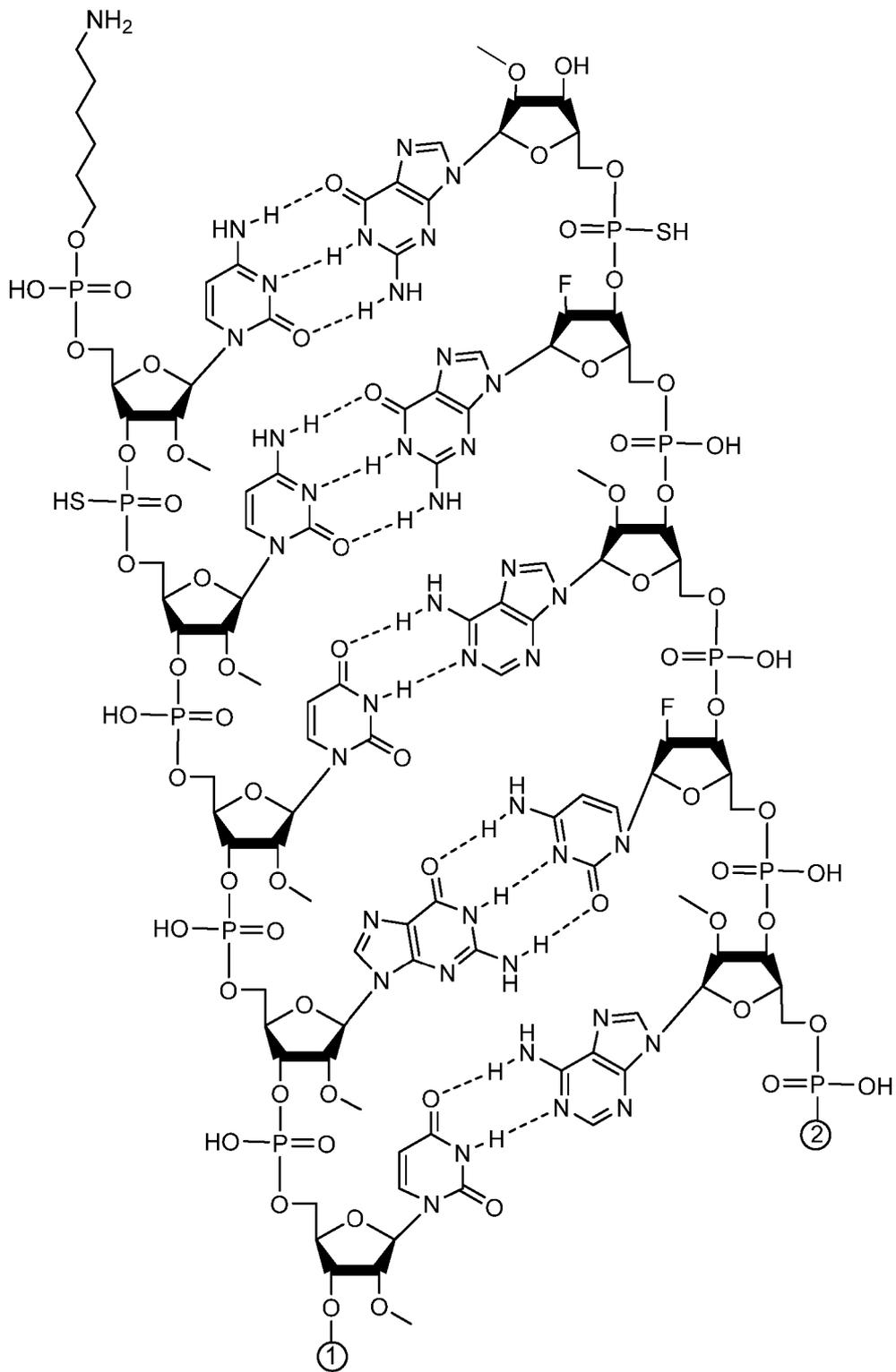


图 16A

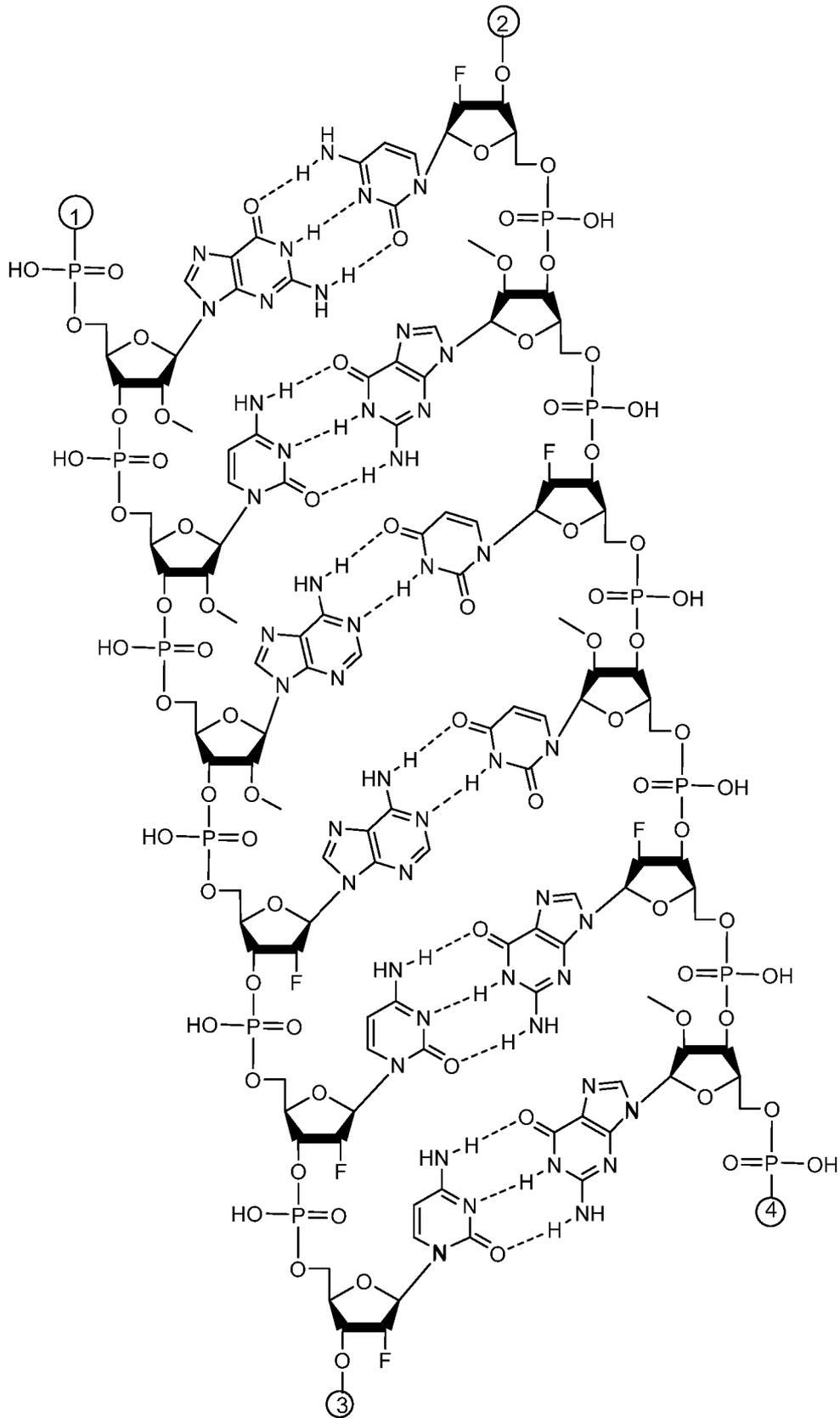


图 16B

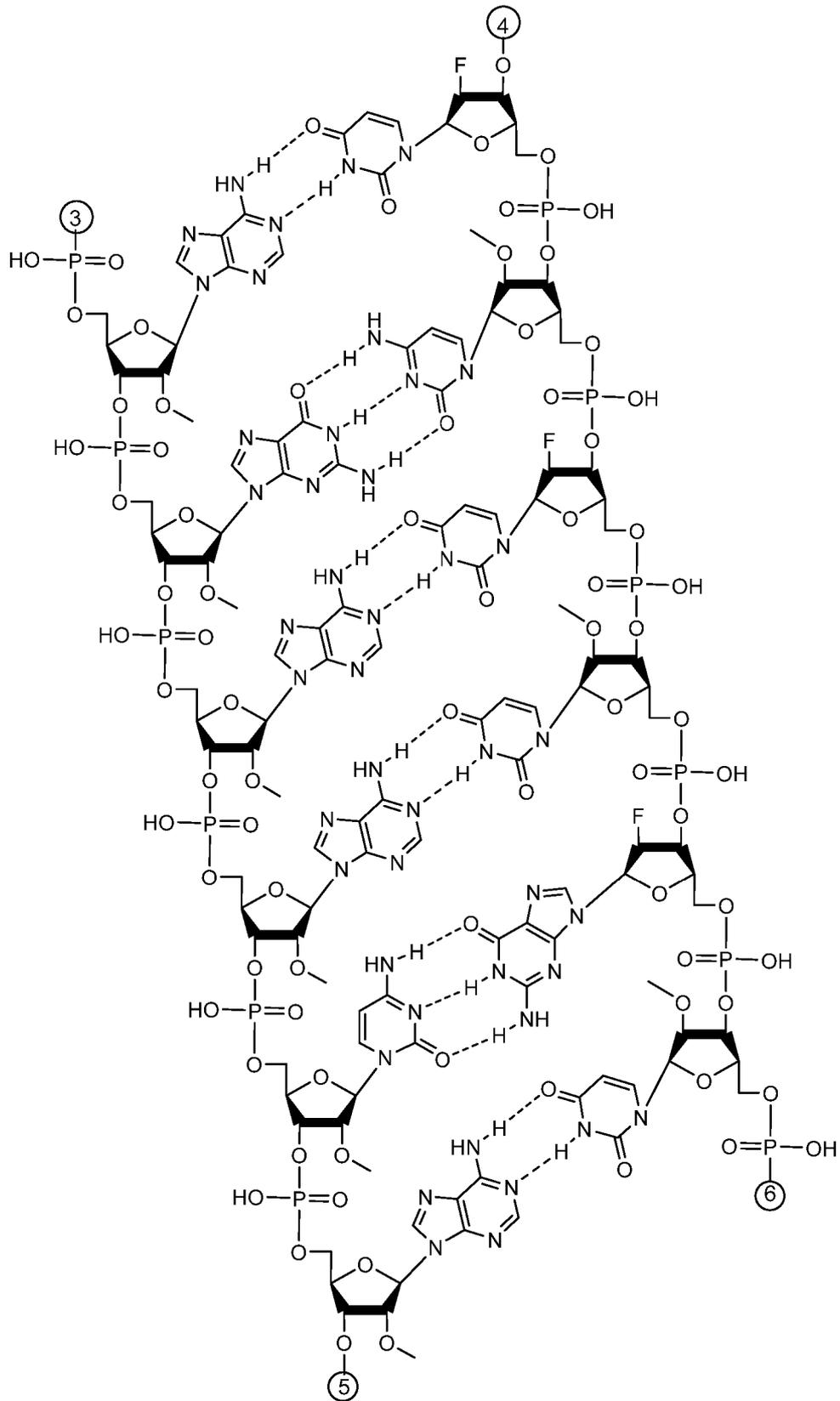


图 16C

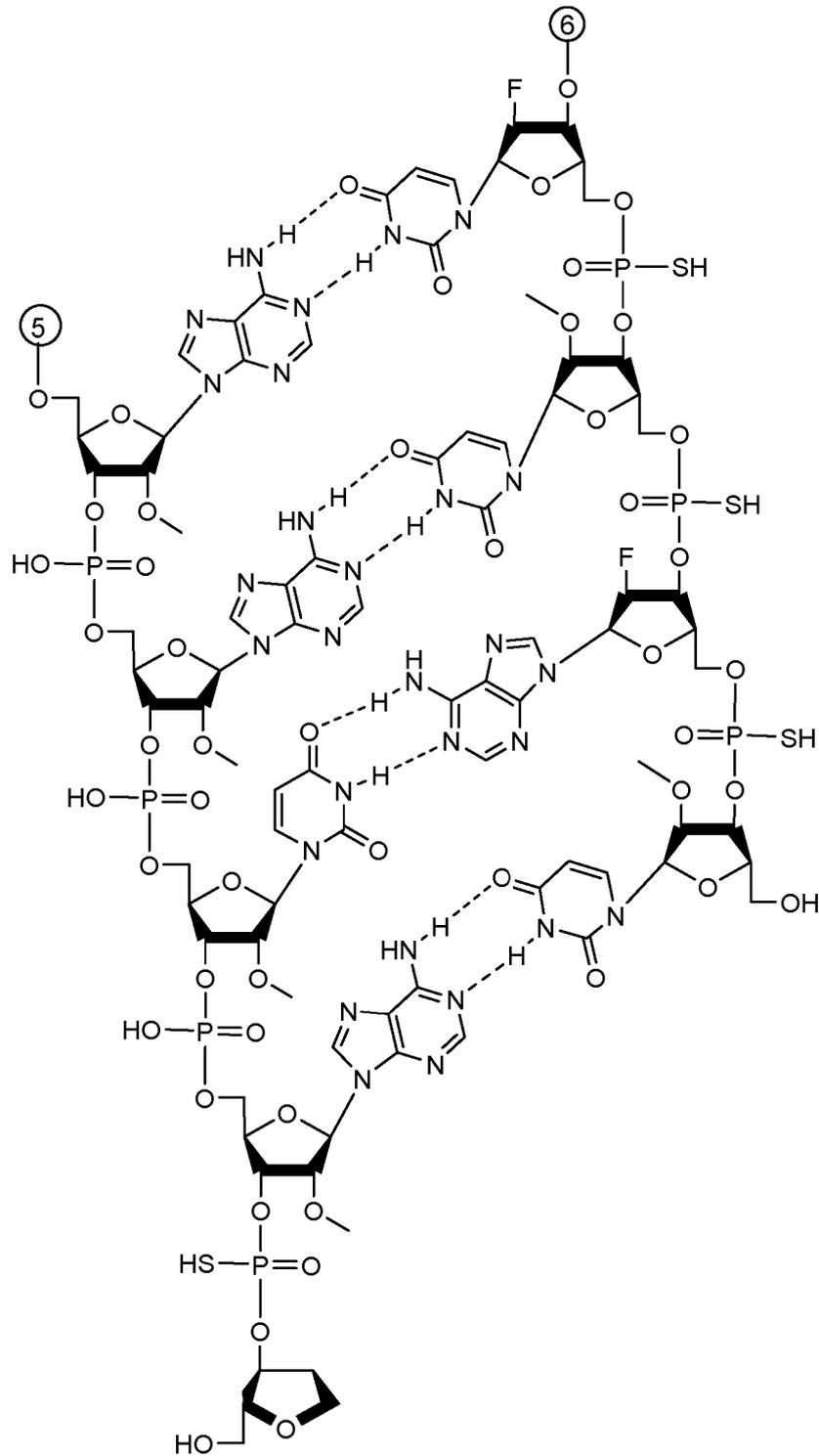


图 16D