



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118434860 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202280084309.6

H • 克里斯蒂安森 H • 尼马克

(22) 申请日 2022.12.16

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(30) 优先权数据

11247

21215919.8 2021.12.20 EP

专利代理师 黄革生 隋晓平

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.06.19

C12N 15/113 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/086286 2022.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/117738 EN 2023.06.29

(71) 申请人 豪夫迈 • 罗氏有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 K • 布莱谢尔 A • 朔伊布林

S • 施密特 李美玲 E • 科勒

J • M • A • 巴斯蒂安

权利要求书3页 说明书82页

序列表 (电子公布)

(54) 发明名称

苏糖核酸反义寡核苷酸及其方法

(57) 摘要

本发明描述了包含一个或多个 α -L-苏呋喃糖基 (TNA) 核苷的反义寡核苷酸以及通过引入 TNA 核苷来调节反义寡核苷酸的特性的方法。这些特别适用于反义间隔聚体寡核苷酸。

1. 一种反义间隔聚体寡核苷酸,其包含能够募集核糖核酸酶 (RNA酶) H的式5'-F-G-F'-3' (I) 的连续核苷酸序列,其中

G为最多18个连接的核苷的间隔区域,所述间隔区域包含至少3个连续DNA核苷,

F和F'中的每一个为最多15个连接的核苷的侧翼区域,所述侧翼区域独立地包含1至15个糖修饰的核苷或由其组成,并且

F、F'和G中的至少一个包含其是 α -L-苏呋喃糖基 (TNA) 核苷的糖修饰的核苷。

2. 根据权利要求1所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F包含至少一个TNA核苷。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三或十四个TNA核苷。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F的所有核苷都是TNA核苷。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F'包含至少一个TNA核苷。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F'包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三或十四个TNA核苷。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F'的所有核苷都是TNA核苷。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含至少一个包含选自以下项组成的组的修饰的糖部分糖修饰的核苷:

2'-甲氧基-核糖 (2'-OMe),

2'-O-甲氧基乙基-核糖 (2'-O-MOE),

5'-甲基-2'-O-甲氧基乙基核糖 (5'-Me-2'-O-MOE),

2'-O-[2-(甲硫基)乙基]-核糖 (2'-O-MTE),

2-(N-甲基氨基甲酰基)-乙基]-核糖 (2'-O-MCE),

2'-O-[2-(甲基氨基)-2-氧代乙基]-核糖 (2'-O-NMA),

2'-脱氧-2'-氟-核糖 (如2'-脱氧-2'-氟核糖-核酸;2'-F-RNA中),

2'-氟-2'-阿糖 (如2'-氟-2'-阿糖核酸;2'-F-ANA中),

2'-O-苄基-核糖,

氧基、氨基或硫代 β -D-锁核糖 (如 β -D-LNA中),

氧基、氨基或硫代 α -L-锁核糖 (如 α -L-LNA中),

2',4'-约束性2'-O-乙基核糖 (如约束性乙基锁核酸;cEt中),三环-脱氧核糖 (如三环-脱氧核糖DNA;TcDNA中),

3'-脱氧-核糖 (如3'-脱氧-核糖DNA;3'-DNA中),

非锁核糖 (如非锁核酸;UNA中),

乙二醇 (如乙二醇核酸;GNA中),

己糖醇 (如己糖醇核酸;HNA中),

3'-氟己糖醇 (如3'-氟己糖醇核酸;FHNA中),

3'-阿拉伯-氟己糖醇 (如3'-阿拉伯-氟己糖醇核酸;Ara-FHNA中),环己烯 (如环己烯核

酸;CeNA中),以及

氟-环己烯基(如2'-氟-环己烯基核酸;F-CeNA中)。

9.根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F、F'或者F和F'两者的所述糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-甲氧基乙基-RNA(2'-O-MOE)核苷。

10.根据权利要求9所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'和F中的所有核苷都是2'-O-MOE核苷。

11.根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G包含至少一个TNA核苷,诸如至少一个、两个或三个TNA核苷。

12.根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G中的至少最接近5'的核苷和最接近3'的核苷为DNA核苷。

13.根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中,除了任何至少一个TNA核苷之外,G的所有核苷都是DNA核苷。

14.根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式5'-F-G-F'-3'(I)的所述连续核苷酸序列具有12至32个核苷的长度,诸如12至28个核苷、诸如12至26个核苷、诸如14至26个核苷、诸如14至24个核苷、诸如14至22个核苷、诸如16至22个核苷、诸如16至20个核苷。

15.根据权利要求14所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中所述连续核苷酸序列具有式 $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IV),诸如 $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (IVa)或 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IVb);
 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (V),诸如 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-9}$ (Va)或 $F_{1-9}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (Vb);
 $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VI),诸如 $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-9}$ (VIa)或 $F_{1-9}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VIb);或
 $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VII),诸如 $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-9}$ (VIIa)或 $F_{3-9}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VIIb),其中数值范围分别代表F、G和F'中的连接的核苷的数量。

16.根据权利要求15所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式IVa的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

- (a)F中的最接近5'的核苷和F中的核苷独立地为3、4或5个高亲和力、糖修饰的核苷,
- (b)F中的其余核苷为TNA核苷,并且
- (c)G中的所有核苷都是DNA核苷。

17.根据权利要求16所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G包含至多10个连续DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个连续DNA核苷。

18.根据权利要求15所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

- (a)F和F'各自独立地由3、4或5个核苷组成,
- (b)F和F'中的所有核苷都是TNA核苷,
- (c)G中的所有核苷都是DNA核苷。

19.根据权利要求15所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

- (a)F和F'各自独立地包含3、4或5个连接的高亲和力、糖修饰的核苷或由其组成,且不包含任何TNA核苷,并且
- (b)G中的第二个、第三个、第四个或第五个最接近5'的核苷为TNA核苷,且G中的其余核

苷为DNA核苷。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸为单链反义寡核苷酸。

21. 一种缀合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸以及任选地经由接头共价连接至所述寡核苷酸的至少一个缀合物部分。

22. 一种根据权利要求1至20中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸或根据权利要求21所述的缀合物的药用盐。

23. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至20中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸、根据权利要求21所述的缀合物或根据权利要求22所述的药用盐,以及药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂。

24. 根据权利要求1至20中任一项所述的反义寡核苷酸、根据权利要求21所述的缀合物、根据权利要求22所述的药用盐或根据权利要求23所述的药物组合物,其用作药物。

苏糖核酸反义寡核苷酸及其方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含一个或多个 α -L-苏呋喃糖基(TNA)核苷的反义寡核苷酸以及通过引入TNA核苷来调节反义寡核苷酸的特性的方法。本发明特别适用于反义间隔聚体寡核苷酸。

背景技术

[0002] 近年来,合成寡核苷酸作为治疗剂已取得了显著进展,产生了广泛的经临床验证的分子(包括反义寡核苷酸(诸如核糖核酸酶H(RNA酶H)活化间隔聚体)、剪接转换寡核苷酸、微小RNA抑制剂、小干扰RNA(siRNA)和适体)组合,这些分子通过不同机制发挥作用(S.T.Crooke, Antisense drug technology: principles, strategies, and applications, 第2版 Boca Raton, FL: CRC Press, 2008)。

[0003] 可论证地,最成功的修饰之一是引入硫代磷酸酯键合,其中非桥接的磷酸氧原子中的一个被硫原子替换(Eckstein, Antisense and Nucleic Acid Drug Development 2009; 10: 117-121)。与未经修饰的磷酸二酯类似物相比,硫代磷酸寡脱氧核苷酸表现出增加的蛋白质结合以及明显更高的核溶降解稳定性,并因此在血浆、组织和细胞中的半衰期更高。这些关键特征已经使得开发了第一代寡核苷酸疗法,并通过诸如锁核酸(LNA)等后代修饰为寡核苷酸疗法的进一步发展打开了大门。其他修饰包括锁核酸(LNA)以及各种其他经修饰的核苷。例如,TNA已用于例如双链siRNA分子中并以低聚物的形式使用(Matsuda等人, XXIII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids; 2018; Liu等人, ACS Appl. Mater. Interfaces 2018; 10: 9736-9743; WO 2012/078536; WO 2012/118911; 和 WO 2013/179292)。

[0004] 然而,仍然需要稳定、安全且有效的基于反义寡核苷酸的治疗剂。

发明内容

[0005] 本发明人已经发现,可以将一个或多个 α -L-苏呋喃糖基(TNA)核苷引入至反义寡核苷酸中,特别是引入至反义间隔聚体寡核苷酸中,以调节反义寡核苷酸的特性。令人惊奇的是,当将TNA修饰引入至如本文所述的间隔聚体设计中时,这些修饰可以产生具有对于治疗用途来说有利的特性的有效分子。

[0006] 因此,本发明涉及包含至少一个TNA核苷的反义寡核苷酸,特别涉及包含至少一个TNA核苷的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0007] 本发明还涉及一种反义间隔聚体寡核苷酸,其包含能够募集核糖核酸酶(RNA酶)H的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列,其中该连续核苷酸序列包含至少一个TNA核苷。

[0008] 本发明还涉及一种反义间隔聚体寡核苷酸,其包含能够募集RNA酶H的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列,其中

[0009] G为最多18个连接的核苷的间隔区域,该间隔区域包含至少3个连续DNA核苷,

[0010] F和F'中的每一个为最多15个连接的核苷的侧翼区域,该侧翼区域独立地包含1至

15个糖修饰的核苷或由其组成,并且

[0011] F、F'和G中的至少一个包含其是 α -L-苏呋喃糖基(TNA)核苷的糖修饰的核苷。

[0012] 本发明还涉及一种缀合物,其包含根据本发明的反义间隔聚体寡核苷酸以及任选地经由接头共价连接至反义间隔聚体寡核苷酸的至少一个缀合物部分。

[0013] 本发明还涉及一种根据本发明的反义间隔聚体寡核苷酸或缀合物的药用盐。

[0014] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的反义间隔聚体寡核苷酸、缀合物或药用盐,以及药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂。

[0015] 本发明还涉及根据本发明的反义寡核苷酸、缀合物、药用盐或药物组合物,其用作药物。

[0016] 本发明还涉及一种制备亲本反义间隔聚体寡核苷酸的修饰形式的方法,其中亲本反义间隔聚体包含能够募集RNA酶H的式5'F-G-F'3' (I)的连续核苷酸序列,其中G为5至18个连接的DNA核苷的间隔区域,并且F和F'中的每一个为最多8个连接的核苷的侧翼区域,该侧翼区域独立地包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷或由其组成,并且其中,在该修饰形式中,亲本反义间隔聚体寡核苷酸的F、F'和/或G中的至少一个核苷已被TNA核苷替换,

[0017] 该方法包括通过使核苷酸单元反应形成寡核苷酸中所包含的共价连接的连续核苷酸单元来制造修饰的反义间隔聚体寡核苷酸的步骤,其中核苷酸单元中的至少一个包含TNA核苷,并且,

[0018] 任选地纯化或分离修饰的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0019] 本发明还涉及一种通过本发明的方法获得或可通过本发明的方法获得的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0020] 本发明还涉及TNA核苷酸在制备根据本发明的反义间隔聚体寡核苷酸中的用途。

[0021] 在以下具体实施方式和权利要求书中提供了本发明的这些和其他方面以及实施方案的进一步细节。

具体实施方式

[0022] 定义

[0023] 为了可以更容易地理解本发明,以下定义并描述了某些术语。

[0024] 在整个说明书中,词语“包括(comprise)”或变体诸如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”应理解为暗示包括所陈述的整数(或组分)或者整数(或组分)组,但不排除任何其他整数(或组分)或者整数(或组分)组。

[0025] 寡核苷酸

[0026] 如本文所用,术语“寡核苷酸”如本领域技术人员通常理解的那样被定义为包含两个或更多个共价连接的核苷(包括经修饰的核苷或核苷酸)的分子。此类共价结合的核苷也可被称为核酸分子或寡聚物。寡核苷酸通常在实验室中通过固相化学合成、之后进行纯化来制备。当提及寡核苷酸序列时,提及的是共价连接的核苷酸或核苷的核碱基部分或其修饰的序列或顺序。本发明的寡核苷酸是人造的、化学合成的,且通常是纯化或分离的。核苷可以通过磷酸二酯(PO)键合或通过修饰的核苷间键合连接。

[0027] 反义寡核苷酸

[0028] 如本文所用,术语“反义寡核苷酸”定义为能够通过靶核酸特别是与靶核酸上的

连续序列杂交来调节靶基因表达的寡核苷酸。预期的反义寡核苷酸基本上不为双链的,并因此不为siRNA或短发夹RNA(shRNA)。优选地,本发明的反义寡核苷酸为单链的。应理解的是,如果分子内或分子间自身互补的程度大于跨寡核苷酸全长度的50%,那么本发明的单链寡核苷酸可形成发夹或分子间双链体结构(同一寡核苷酸的两个分子之间的双链体)。

[0029] 连续核苷酸序列

[0030] 术语“连续核苷酸序列”是指与靶核酸互补的寡核苷酸区域。该术语在本文中与技术“连续核碱基序列”和术语“寡核苷酸基序序列”可互换使用。例如,寡核苷酸的所有核苷酸可以构成连续核苷酸序列。可替代地,寡核苷酸可包含连续核苷酸序列,诸如F-G-F'间隔聚体区域,并且可以任选地包含其他核苷酸,例如可以用于将官能团附接至连续核苷酸序列的核苷酸接头区域。核苷酸接头区域可与靶核酸互补或不互补。有利地,连续核苷酸序列与靶核酸100%互补。

[0031] 核苷酸

[0032] 核苷酸为寡核苷酸和多核苷酸的结构单元,并且出于本发明的目的,包括天然存在的和非天然存在的核苷酸。在自然界中,核苷酸,诸如DNA和RNA核苷酸,包含核糖糖部分、核碱基部分和一个或多个磷酸酯基团(其不存在于核苷中)。核苷和核苷酸也可以可互换地称为“单元”或“单体”。

[0033] 核碱基

[0034] 术语核碱基包括存在于核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)部分,其在核酸杂交中形成氢键。在本发明的上下文中,术语核碱基还涵盖经修饰的核碱基,其可以不同于天然存在的核碱基,但在核酸杂交期间具有功能性。在此上下文中,“核碱基”是指天然存在的核碱基,诸如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤,以及非天然存在的变体。此类变体例如描述于Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research第45卷第2055页以及Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry增刊37,1.4.1中。

[0035] 可以任选地通过以下方式修饰核碱基部分:将嘌呤或嘧啶改变为修饰的嘌呤或嘧啶,诸如取代的嘌呤或取代的嘧啶,诸如选自异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、2'-硫代-胸腺嘧啶、肌苷、二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤的核碱基。

[0036] 核碱基部分可以由每个相应核碱基的字母代码来指示,例如A、T、G、C或U,其中每个字母可以任选地包括具有同等功能的修饰的核碱基。例如,在一些寡核苷酸中,核碱基部分选自A、T、G、C和5-甲基胞嘧啶(™C)。

[0037] 修饰的核苷

[0038] 如本文所用,术语“修饰的核苷”或“核苷修饰”是指与等同的DNA或RNA核苷相比,通过引入糖部分或(核)碱基部分的一种或多种修饰而被修饰的核苷。优选地,修饰的核苷包含修饰的糖部分。术语“修饰的核苷”在本文中还可与术语“核苷类似物”或修饰的“单元”或修饰的“单体”互换使用。具有未修饰的DNA或RNA糖部分的核苷在本文中被称作DNA或RNA核苷。在DNA或RNA核苷的碱基区域中具有修饰的核苷如果允许沃森克里克(Watson-Crick)碱基配对,那么通常仍称为DNA或RNA。

[0039] 糖修饰的核苷

[0040] 与DNA和RNA中发现的核糖部分相比时,本发明的反义寡核苷酸可包含一个或多个具有修饰的糖部分(即糖部分的修饰)的核苷。

[0041] 已经制备了许多具有核糖糖部分的修饰的核苷,主要目的为改善寡核苷酸的某些特性,诸如亲和力和/或核酸酶抗性。

[0042] 此类修饰包括其中核糖环结构被修饰的那些修饰,例如,通过用己糖环(HNA)或双环(其通常在核糖环的C2碳原子与C4碳原子之间具有桥)(LNA)或未连接的核糖环(其通常在C2碳与C3碳之间缺乏键)(例如UNA)替换核糖环结构来修饰。其他糖修饰的核苷包括,例如,双环己糖核酸(W02011/017521)或三环核酸(W02013/154798)。修饰的核苷还包括其中糖部分被非糖部分替换的核苷,例如在肽核酸(PNA)或吗啉代核酸的情况下。

[0043] 糖修饰还包括经由将核糖环上的取代基改变为除氢以外的基团或DNA和RNA核苷中天然存在的2'-OH基团而进行的修饰。例如,可以在2'、3'、4'或5'位置引入取代基。

[0044] 修饰的糖部分的非限制性实例包括以下:

[0045] α -L-苏呋喃糖基(如苏糖核酸;TNA中),

[0046] 2'-甲氧基-核糖(2'-OMe),

[0047] 2'-O-甲氧基乙基-核糖(2'-O-MOE),

[0048] 5'-甲基-2'-O-甲氧基乙基核糖(5'-Me-2'-O-MOE),

[0049] 2'-O-[2-(甲硫基)乙基]-核糖(2'-O-MTE),

[0050] 2-(N-甲基氨基甲酰基)-乙基]-核糖(2'-O-MCE),

[0051] 2'-O-[2-(甲基氨基)-2-氧代乙基]-核糖(2'-O-NMA),

[0052] 2'-脱氧-2'-氟-核糖(如2'-脱氧-2'-氟核糖-核酸;2'-F-RNA中),

[0053] 2'-氟-2'-阿糖(如2'-氟-2'-阿糖核酸;2'-F-ANA中),

[0054] 2'-O-苄基-核糖,

[0055] 氧基、氨基或硫代 β -D-锁核糖(如 β -D-LNA中),

[0056] 氧基、氨基或硫代 α -L-锁核糖(如 α -L-LNA中),

[0057] 2',4'-约束性2'-O-乙基核糖(如约束性乙基锁核酸;cEt中),

[0058] 三环-脱氧核糖(如三环-脱氧核糖DNA;TcDNA中),

[0059] 3'-脱氧-核糖(如3'-脱氧-核糖DNA;3'-DNA中),

[0060] 非锁核糖(如非锁核酸;UNA中),

[0061] 乙二醇(如乙二醇核酸;GNA中),

[0062] 己糖醇(如己糖醇核酸;HNA中),

[0063] 3'-氟己糖醇(如3'-氟己糖醇核酸;FHNA中),

[0064] 3'-阿拉伯-氟己糖醇(如3'-阿拉伯-氟己糖醇核酸;Ara-FHNA中),环己烯(如环己烯核酸;CeNA中),以及

[0065] 氟-环己烯基(如2'-氟-环己烯基核酸;F-CeNA中)。

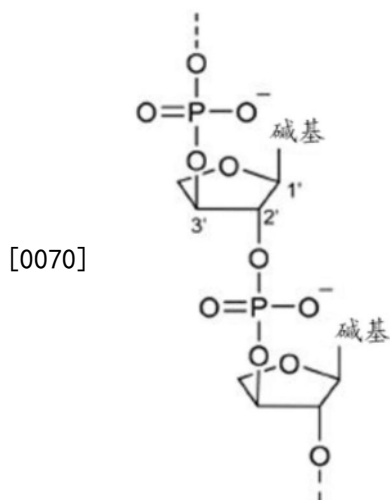
[0066] 除非另有说明或与上下文矛盾,否则术语“MOE”在本文中可以指在核糖环的2'位置处包含O-甲氧基乙基基团的任何核苷,包括但不限于2'-O-MOE和5'-Me-2'-O-MOE。

[0067] 苏糖核酸(TNA)

[0068] 如本文所用,“ α -L-苏呋喃糖基核苷”、“ α -L-苏糖核酸核苷”、“TNA核苷”、“TNA修饰

的核苷”、“TNA单元”、“TNA部分”等是指包含 α -L-苏呋喃糖基部分的糖修饰的核苷。

[0069] TNA核苷通过(2'->3')核苷间键合,例如磷酸二酯(PO)或修饰的核苷间键合连接至相邻的核苷,如下文针对两个相邻的TNA核苷所示。



[0071] 当核碱基(B)为胞嘧啶时,TNA核苷有利地为5-甲基-胞嘧啶(^mC)TNA核苷。

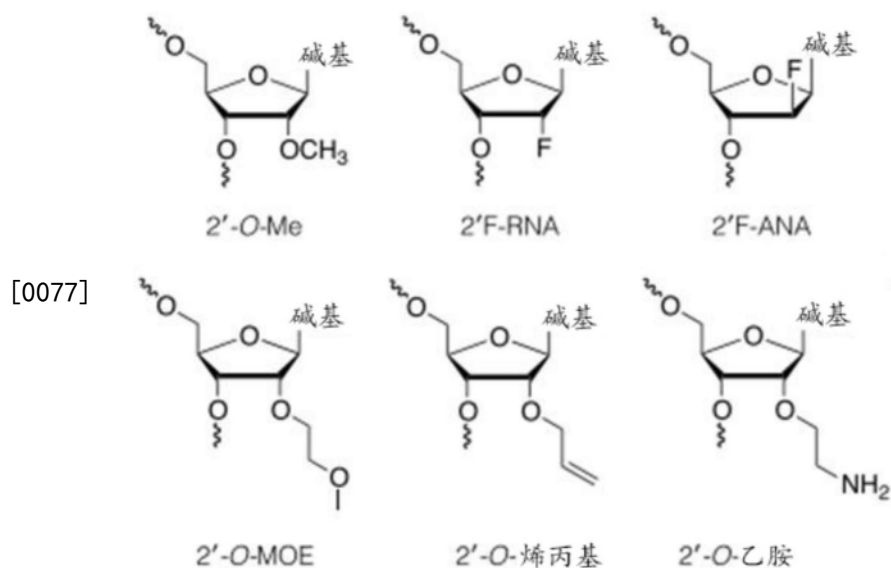
[0072] 2'-糖修饰的核苷

[0073] 2'-糖修饰的核苷为在2'-位置处具有除H或-OH外的取代基的核苷(2'-取代的核苷)。这包括包含能够在核糖环中的2'-碳与第二个碳之间形成桥的2'-连接的双基的核苷,诸如LNA(2'-4'桥接)核苷。

[0074] 出于本公开的目的,TNA核苷不为2'-取代的核苷。

[0075] 已发现,许多2'取代的核苷在并入寡核苷酸时会具有有益的特性。例如,2'-修饰的糖可提供对寡核苷酸的增强的结合亲和力和/或增加的核酸酶抗性。2'-取代的修饰的核苷的实例为2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(2'-O-MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-RNA、2'-F-ANA和2'-桥接分子(如LNA)。有关进一步的实例,参见例如Freier和Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443,以及Uhlmann;Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213,以及Deleavey和Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937。以下方案1显示一些2'取代的修饰的核苷的示意图。

[0076] 方案1:



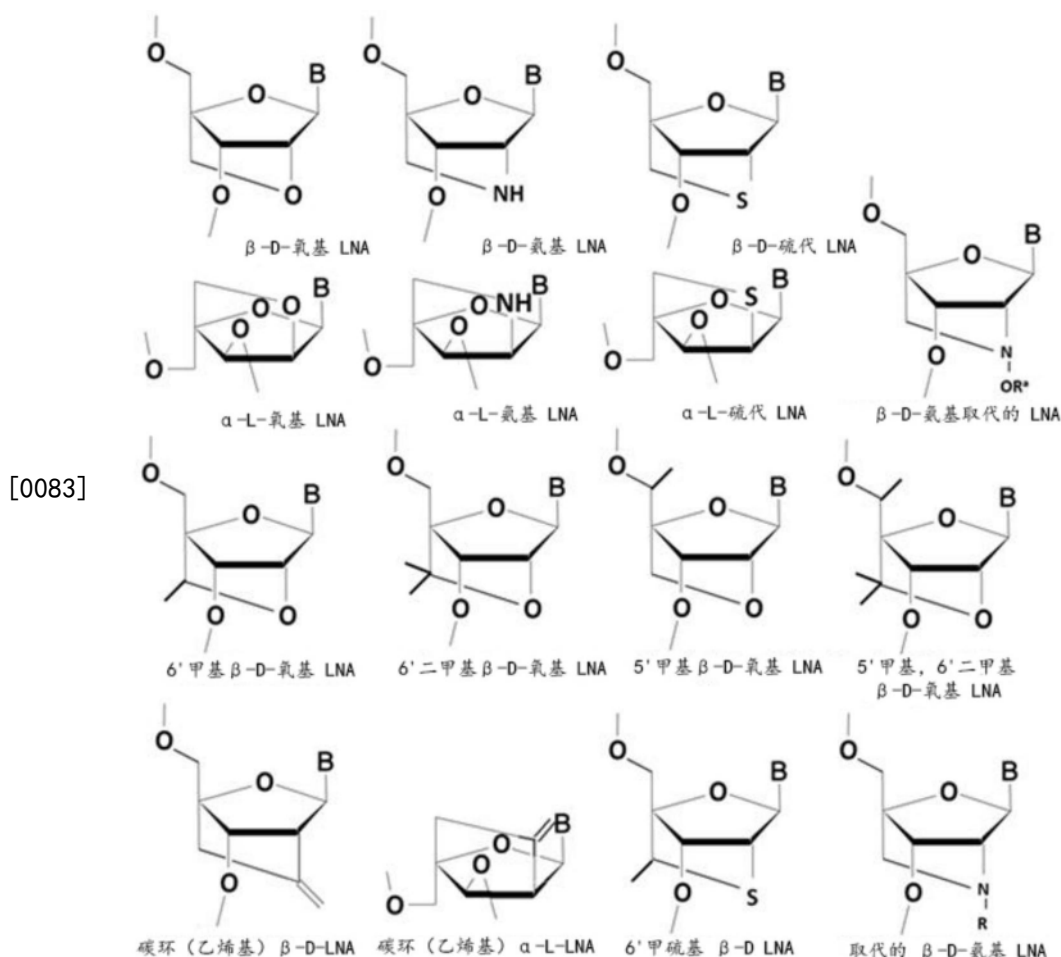
[0078] 锁定核酸 (LNA)

[0079] “LNA核苷”为2'-修饰的核苷,其包含连接所述核苷的核糖糖环的C2'和C4'的双基(也称为“2'-4'桥”),其限制或锁定核糖环的构象。这些核苷在文献中也被称为桥连核酸或双环核酸(BNA)。当将LNA掺入互补RNA或DNA分子的寡核苷酸中时,核糖构象的锁定与杂交亲和力的增强(双链体稳定化)相关。这可通过测量寡核苷酸/互补双链体的解链温度来常规确定。

[0080] 非限制性的例示性LNA核苷公开于WO 99/014226、WO 00/66604、WO 98/039352、WO 2004/046160、WO 00/047599、WO 2007/134181、WO 2010/077578、WO 2010/036698、WO 2007/090071、WO 2009/006478、WO 2011/156202、WO 2008/154401、WO 2009/067647、WO 2008/150729;Morita等人,Bioorganic&Med.Chem.Lett.2002,12,73-76;Seth等人J.Org.Chem.2010,第75卷(5)第1569-81页;以及Mitsuoka等人,Nucleic Acids Research 2009,37(4),1225-1238;以及Wan和Seth,J.Medical Chemistry 2016,59,9645-9667中。

[0081] 其他非限制性的例示性LNA核苷公开于方案2中。

[0082] 方案2:



[0084] 特定的LNA核苷是β-D-氧基-LNA、6'-甲基-β-D-氧基LNA诸如(S)-6'-甲基-β-D-氧基-LNA (ScET) 和ENA。一种特别有利的LNA是β-D-氧基-LNA。

[0085] 核苷间键合

[0086] 如技术人员通常所理解,术语“核苷间键合”定义为将两个核苷共价偶联在一起的键合。在如本文所述的反义寡核苷酸中,核苷间键合将相邻的核苷共价偶联在一起,使得通常在相邻的核苷的糖部分之间形成键。核苷间键合的非限制性实例包括磷酸二酯 (PO) 键合和修饰的核苷间键合。

[0087] 修饰的核苷间键合

[0088] 如技术人员通常所理解,术语“修饰的核苷间键合”定义为除磷酸二酯 (PO) 键合外的键合,其将两个核苷共价偶联在一起。与磷酸二酯键合相比,修饰的核苷间键合可以增加寡核苷酸的核酸酶抗性。修饰的核苷间键合特别可用于稳定寡核苷酸供体内使用,并且可以在寡核苷酸中的DNA核苷或RNA核苷区域 (例如在间隔聚体寡核苷酸的间隔区域内部) 以及在修饰的核苷区域 (诸如区域F和区域F') 中起到保护免受核酸酶裂解的作用。

[0089] 核酸酶抗性可以通过在血清中孵育寡核苷酸或通过使用核酸酶抗性测定 (例如蛇毒磷酸二酯酶 (SVPD)) 来确定,两者均是本领域中众所周知的。在一些寡核苷酸中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间键合可以为核酸酶抗性核苷间键合。预期将寡核苷酸连接至非核苷酸官能团 (诸如缀合物) 的核苷可以为磷酸二酯。

[0090] 硫代磷酸酯核苷间键合

[0091] 优选的修饰的核苷间键合为硫代磷酸酯 (PS)。硫代磷酸酯核苷间键合由于核酸酶

抗性、有益的药代动力学和易于制造而特别有用。在一些寡核苷酸中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间键合都是硫代磷酸酯键合。

[0092] 抗核酸酶键合,诸如硫代磷酸酯键合,在与靶核酸形成双链体时能够募集核酸酶的寡核苷酸区域中特别有用,诸如间隔聚体的区域G。然而,硫代磷酸酯键合也可用于非RNA酶H募集区域和/或亲和力增强区域,诸如间隔聚体的区域F和区域F'。

[0093] 互补性

[0094] 术语“互补性”描述了核苷/核苷酸的沃森克里克碱基配对的能力。沃森克里克碱基对为鸟嘌呤(G)-胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)-胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U)。应当理解,寡核苷酸可以包含具有修饰的核碱基的核苷,例如经常使用5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶,并且因此,术语互补性涵盖未修饰的核碱基与修饰的核碱基之间的沃森克里克碱基配对(参见例如Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research第45卷,第2055页,以及Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry增刊37 1.4.1)。

[0095] 如本文所用,术语“互补性%”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列内呈百分比的核苷酸的数目,这些核苷酸在给定位置处与不同的核酸分子(例如靶核酸或靶序列)在给定位置处的连续核苷酸序列互补(即与之形成沃森克里克碱基对)。通过对在两个序列之间形成配对的比对碱基的数目(当与靶序列5'-3'和寡核苷酸序列从3'-5'比对应)进行计数,使其除以寡核苷酸中的核苷酸总数并乘以100来计算百分比。在这种比较中,未对齐(形成碱基对)的核碱基/核苷酸被称为错配。优选地,计算连续核苷酸序列的互补性%时不允许插入和缺失。

[0096] 术语“完全互补”是指100%互补性。

[0097] 同一性

[0098] 如本文所用,术语“同一性”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如序列基序)相同的核苷酸比例(以百分比表示),该核酸分子跨连续核苷酸序列。因此,通过对两个序列(例如在本发明的化合物的连续核苷酸序列中和在参考序列中)之间的相同(匹配)的比对碱基数进行计数,使该数除以比对区域中的核苷酸总数并乘以100来计算同一性百分比。因此,同一性百分比=(匹配数×100)/比对区域(例如,连续核苷酸序列)的长度。在计算连续核苷酸序列的同一性百分比时,不允许插入和删除。应当理解的是,在确定同一性时,只要保留了形成沃森克里克碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,为了计算同一性%,将5-甲基胞嘧啶视为与胞嘧啶相同)。

[0099] 杂交

[0100] 如本文所用,术语“杂交(hybridizing或hybridizes)”应当理解为两条核酸链(例如寡核苷酸和靶核酸)在相反链上的碱基对之间形成氢键,从而形成双链体。两条核酸链之间结合的亲和力为杂交的强度。它通常根据解链温度(T_m)来描述,该解链温度被定义为一半寡核苷酸与靶核酸形成双链体的温度。在生理条件下, T_m 并非确实与亲和力严格成比例(Mergny与Lacroix,2003年,Oligonucleotides 13:515-537)。标准状态Gibbs自由能 ΔG° 为结合亲和力的更精确表示,并且通过 $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_d)$ 与反应的解离常数(K_d)相关,其中R为气体常数并且T为绝对温度。因此,寡核苷酸和靶核酸之间反应的非常低的 ΔG° 反映了寡核苷酸和靶核酸之间的强杂交。 ΔG° 为与反应相关的能量,其中水性浓度为1M,pH为7并且温度为37°C。寡核苷酸与靶核酸的杂交为自发反应,并且对于自发反应, ΔG° 小于零。 ΔG°

可以例如通过使用如Hansen等人,1965,Chem.Comm.36-38和Holdgate等人,2005,Drug Discov Today中所述的等温滴定量热法 (ITC) 的方法通过实验测量。本领域的技术人员将知道商业设备可用于测量 ΔG° 。也可以通过使用如SantaLucia,1998,Proc Natl Acad Sci USA.95:1460-1465所述的最近邻模型,适当使用Sugimoto等人,1995,Biochemistry 34:11211-11216和McTigue等人,2004,Biochemistry 43:5388-5405描述的推导的热力学参数来估计 ΔG° 。为了具有通过杂交调节其预期的核酸靶标的可能性,对于长度为10-30个核苷酸的寡核苷酸,本发明的寡核苷酸与靶核酸以低于-10kcal的估计 ΔG° 杂交。例如,杂交的程度或强度可以由标准状态Gibbs自由能 ΔG° 测量。对于长度为8-30个核苷酸的寡核苷酸,寡核苷酸可与靶核酸以低于-10kcal,诸如低于-15kcal、诸如低于-20kcal和诸如低于-25kcal的 ΔG° 估值杂交。寡核苷酸可以例如以-10至-60kcal,诸如-12至-40、诸如-15至-30kcal或-16至-27kcal,诸如-18至-25kcal的 ΔG° 估值与靶核酸杂交。

[0101] 靶核酸

[0102] 靶核酸为反义寡核苷酸可以与之杂交,并且从而调节靶基因的表达的核酸。靶核酸可以例如为基因、RNA、mRNA、前体mRNA、长非编码RNA(lncRNA)、成熟mRNA或cDNA序列或者源自DNA或RNA的合成核酸。作为RNA的靶核酸可以被称为“RNA靶序列”、“靶RNA序列”等。

[0103] 靶序列

[0104] 如本文所用,术语“靶序列”是指存在于靶核酸中的核苷酸的序列,其包含与如本文所述的反义寡核苷酸互补的核碱基序列。靶序列可以例如由靶核酸上的区域组成,该区域与本发明的寡核苷酸的连续核苷酸序列互补。

[0105] 靶细胞

[0106] 如本文所用,术语“靶细胞”是指表达靶核酸的细胞。适当地,靶细胞在其基因组中包含至少一个靶基因拷贝。靶细胞可以为体内或体外的。靶细胞可以例如为哺乳动物细胞,诸如啮齿动物细胞,诸如小鼠细胞或大鼠细胞;或者灵长类动物细胞,诸如猴细胞(例如食蟹猴细胞)或人细胞。

[0107] 表达的调节

[0108] 如本文所用,术语“表达的调节”应理解为,寡核苷酸改变由靶基因表达的蛋白质或由靶基因转录的RNA的量的能力的总称。可以通过参考对照实验来确定表达的调节。对照可以为以盐水组合物处理的个别或靶细胞,或以非靶向寡核苷酸(模拟品)处理的个别或靶细胞。

[0109] 高亲和力修饰的核苷

[0110] 高亲和力修饰的核苷为修饰的核苷酸,其在并入到寡核苷酸中时会增强寡核苷酸对其互补靶的亲合力,例如如由解链温度(T_m)所测量。高亲和力修饰的核苷优选地使每一修饰的核苷的解链温度增加介于+0.5°C至+12°C之间,更优选地介于+1.5°C至+10°C之间并且最优选地介于+3°C至+8°C之间。许多高亲和力修饰的核苷是本领域已知的,并且包括例如许多2'-糖取代的核苷,诸如2'-O-MOE、2'-F-RNA和LNA及其类似物(参见例如,Freier和Altmann;Nucl. Acid Res.,1997,25,4429-4443,以及Uhlmann;Curr.Opinion in Drug Development,2000,3(2),293-213)。

[0111] RNA酶H活性和募集

[0112] 反义寡核苷酸的核糖核酸酶(RNA酶)H活性是指其与互补RNA分子形成双链体时募

集RNA酶H的能力。WO 01/23613提供了用于确定RNA酶H活性的体外方法,其可以用于确定募集RNA酶H的能力。重组人RNA酶H1可以从Lucerne, Switzerland的Lubio Science GmbH获得。通常,如果寡核苷酸在与互补靶核酸序列一起提供时具有靶RNA分子的初始裂解速率时,则认为该寡核苷酸能够募集RNA酶H,该初始裂解速率如以pmol/1/min为单位进行测量,为当使用具有与所测试反义寡核苷酸相同的碱基序列但仅含有在寡核苷酸中所有单体之间均具有硫代磷酸酯键合的DNA单体的寡核苷酸并使用WO 01/23613 (通过引用并入本文)的实例91至95所提供的方法时所测定的初始裂解速率的至少5%,诸如至少10%或超过20%。

[0113] 间隔聚体

[0114] 反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可以是或包含间隔聚体。间隔聚体通常用于经由RNA酶H介导的降解来抑制靶核酸。间隔聚体在‘5-→3’方向上包含至少三个不同的结构区域,即5’-侧翼、间隔和3’-侧翼,在本文中表示为5’-F-G-F’-3’ (式I)。“间隔”区域(G)包含一段使寡核苷酸能够募集RNA酶H的连续DNA核苷酸。该间隔区域侧接有包含一个或多个糖修饰的核苷的5’侧翼区域(F),以及侧接有包含一个或多个糖修饰的核苷的3’侧翼区域(F’)。区域F和区域F’中的一个或多个糖修饰的核苷可增强寡核苷酸对靶核酸的亲合力(即,为亲合力增强的糖修饰的核苷,诸如高亲合力修饰的核苷)或可调节所期望的其他特性。

[0115] 在间隔聚体设计中,间隔区域的最接近5’的核苷和最接近3’的核苷通常为DNA核苷,并且分别位于5’(F)或3’(F’)区域的糖修饰的核苷附近。侧翼可进一步定义为在距间隔区域最远的末端处,即在5’侧翼的5’端处和在3’侧翼的3’端处,具有至少一个糖修饰的核苷。

[0116] 区域F-G-F’形成连续核苷酸序列。反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可以包含式I (即F-G-F’)的间隔聚体或由其组成。

[0117] 间隔聚体设计F-G-F’的总长度通常为12至32个核苷,诸如12至28个、诸如12至26个、诸如14至26个、诸如14至24个、诸如14至22个、诸如16至22个核苷、诸如16至20个核苷。

[0118] 不包含TNA核苷的传统间隔聚体设计包括例如 $F_{1-8}-G_{5-18}-F'_{1-8}$ (II), 诸如 $F_{1-8}-G_{7-16}-F'_{2-8}$ (III), 通常其条件为间隔聚体区域F-G-F’的总长度为至少12个, 诸如至少14个核苷酸的长度。

[0119] 适合于根据本发明的TNA间隔聚体的设计包括例如, $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IV), 通常其条件为间隔聚体区域F-G-F’的总长度为至少12个, 诸如至少14个核苷酸的长度。此类间隔聚体的另外的设计 (例如, 式IV至式VII) 在本文别处更详细地描述。

[0120] 区域F、区域G和区域F’进一步在下文描述, 并且可以并入到F-G-F’式中的任一者中。

[0121] 间隔聚体-区域G

[0122] 间隔聚体的区域G (间隔区域) 为核苷的区域, 其使得寡核苷酸能够募集RNA酶H, 诸如人RNA酶H1, 通常为DNA核苷。RNA酶H为识别DNA与RNA之间的双链体并酶促裂解RNA分子的细胞酶。

[0123] 不包含TNA核苷的传统间隔聚体包括例如长度为至少5或6个连续DNA核苷, 诸如5至16个连续DNA核苷、诸如6至15个连续DNA核苷、诸如7至14个连续DNA核苷、诸如8至12个连

续DNA核苷酸、诸如8至12个连续DNA核苷酸的间隔区域(G)。

[0124] 根据本发明的合适的间隔聚体,特别是包含一个或多个如本文所述的TNA核苷的间隔聚体,可以具有包含至少3个连续DNA核苷的间隔区域(G)。间隔区域G可以例如包含3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个连续DNA核苷或由其组成。优选地,间隔区域G包含至少4个、至少5个或至少6个连续DNA核苷。

[0125] 包含一个或多个如本文所述的TNA核苷的间隔区域(G)在间隔的5'端(邻近区域F的3'核苷)处具有DNA核苷,并且在间隔的3'端(邻近区域F'的5'核苷)处具有DNA核苷,通常在间隔区域的5'端、3'端或两者处保留至少3或4个连续DNA核苷的区域。

[0126] 间隔区域G的总长度通常为最多18个连续核苷。例如,间隔区域G的总长度可以为3至18个连续核苷,诸如3至16个连续核苷,诸如4至18个、4至16个、4至14个、4至12个或4至10个连续核苷,诸如5至18个、5至16个、5至14个、5至12个或5至10个连续核苷,诸如6至18个、6至16个、6至14个、6至12个或6至10个连续核苷。还考虑了更短的间隔区域,诸如包含4、5、6、7、8或9个连续核苷(例如连续DNA核苷)或由其组成的区域G。

[0127] 在一些情况下,间隔区域中的一个或多个胞嘧啶(C) DNA核苷可能会被甲基化(例如,当C DNA核苷后接鸟嘌呤(G) DNA核苷时)并且被注释为5-甲基-胞嘧啶(^mC或^mC)。

[0128] 所考虑的寡核苷酸包括其中间隔中的所有经修饰的核苷间键合都是硫代磷酸酯键合的寡核苷酸,或其中间隔中的所有核苷间键合都是硫代磷酸酯键合的寡核苷酸。

[0129] 尽管传统的间隔聚体具有DNA间隔区域,但是存在经修饰的核苷的许多实例,当这些核苷在间隔区域内使用时,这些核苷允许RNA酶H募集。已经报道当包括在间隔区域内时能够募集RNA酶H的经修饰的核苷包括例如, α -L-LNA、C4'烷基化的DNA(如PCT/EP2009/050349以及Vester等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.18(2008)2296-2300(两者均通过引用并入本文)所述)、阿糖衍生的核苷如ANA和2'F-ANA(Mangos等人,2003J.AM.CHEM.SOC.125,654-661)、UNA(非锁核酸)(如Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039(其通过引用并入本文)中所述)。UNA或“非锁核酸”通常是在其中,核糖的C2与C3之间的键已经被去除,从而形成非锁“糖”残基。用于间隔聚体中的经修饰的核苷可以为当被引入间隔区域时采用2'-内切(类DNA)结构的核苷,从而允许RNA酶H募集。本文所述的DNA间隔区域(G)可以例如任选地含有1个或多个(例如,1至3个)糖修饰的核苷。间隔中的任何两个或更多个糖修饰的核苷可以为连续的,或被一个或多个DNA核苷间隔开。

[0130] 如本文所述,可用于间隔区域的经修饰的核苷包括TNA核苷。

[0131] 区域G-“间隔破坏者”

[0132] 还存在向间隔聚体的间隔区域插入赋予3'内切构象的经修饰的核苷,同时保留一定RNA酶H活性的众多报告。具有以下间隔区域的间隔聚体被称为“间隔破坏者(gap-breaker)”或“间隔中断的(gap-disrupted)”间隔聚体,该间隔区域包含一个或多个3'内切修饰的核苷,参见例如W02013/022984。间隔破坏者寡核苷酸在间隔区域内部保留足够的DNA核苷区域以允许募集RNA酶H。间隔破坏者寡核苷酸设计用以募集RNA酶H的能力通常具有序列特异性或甚至化合物特异性-参见Rukov等人2015Nucl.Acids Res.第43卷第8476-8487页,该文献公开了在一些情况下提供更特异性的靶RNA裂解作用的募集RNA酶H的“间隔破坏者”寡核苷酸。在间隔破坏者寡核苷酸的间隔区域内使用的经修饰的核苷可以例如为赋予3'-内切构形的经修饰的核苷,诸如2'-O-甲基(OMe)或2'-O-MOE(MOE)核苷,或 β -D LNA

核苷(核苷的核糖糖环的C2'与C4'之间的桥呈 β 构象),诸如 β -D-氧基LNA或ScET核苷。

[0133] 也可考虑TNA核苷作为间隔破坏者。

[0134] 与含有上述区域G的间隔聚体一样,间隔破坏者间隔聚体或间隔中断间隔聚体的间隔区域在间隔的5'末端具有DNA核苷(与区域F的3'核苷相邻)并且在间隔的3'末端具有DNA核苷(与区域F'的5'核苷相邻)。包含中断的间隔的间隔聚体通常在间隔区域的5'端、3'端或两者处保留至少3或4个连续DNA核苷的区域。

[0135] 如本文所述的间隔破坏间隔聚体的例示性设计包括

[0136] $F_{1-15} - [D_{3-4} - E_1 - D_{3-4}] - F'_{1-15}$

[0137] $F_{1-15} - [D_{1-4} - E_1 - D_{3-4}] - F'_{1-15}$

[0138] $F_{1-15} - [D_{3-4} - E_1 - D_{1-4}] - F'_{1-15}$

[0139] 其中区域G在括号 $[D_n - E_r - D_m]$ 内,D为DNA核苷的连续序列,E为经修饰的核苷(间隔破坏者或间隔中断核苷),并且F和F'为如本文所定义的侧翼区域,并且其条件为间隔聚体区域F-G-F'的总长度为至少12个,诸如至少14个核苷酸的长度。

[0140] 如本文所述的间隔中断的间隔聚体的区域G可以包含至少4个DNA核苷,诸如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个DNA核苷。如上文所述,DNA核苷可以为连续的,或可以任选地散布有一个或多个经修饰的核苷,其条件为间隔区域G能够介导RNA酶H募集。

[0141] 间隔聚体-侧翼区域,F和F'

[0142] 区域F紧邻区域G的5' DNA核苷定位。区域F的最接近3'的核苷为糖修饰的核苷。有利地,区域F的一个或两个最接近5'的核苷也为糖修饰的核苷。在如本文所述的间隔聚体中,特别是包含一个或多个TNA核苷的间隔聚体中,区域F的长度为至少一个,诸如至少2个、诸如至少3个连续核苷酸。通常,区域F的长度为最多15个连续核苷酸。例如,区域F的长度可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续核苷酸,诸如长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个连续核苷酸。

[0143] 区域F'紧邻区域G的3' DNA核苷定位。区域F'的最接近5'的核苷为糖修饰的核苷。有利地,区域F'的一个或两个最接近3'的核苷也为糖修饰的核苷。在如本文所述的间隔聚体中,特别是包含一个或多个TNA核苷的间隔聚体中,区域F'的长度为至少一个,诸如至少2个、诸如至少3个连续核苷酸。通常,区域F'的长度为最多15个连续核苷酸。例如,区域F'的长度可以为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续核苷酸,诸如长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个连续核苷酸。

[0144] 任何糖修饰的核苷酸都可以用于如本文所述的反义寡核苷酸的区域F和/或区域F'中,其条件为反义寡核苷酸保留募集RNA酶H的能力和任何其他所需特性。用于F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷的实例在本文中描述并且包括但不限于名称为“糖修饰的核苷”的章节中所公开的那些,包括在名称为“苏糖核酸(TNA)”、“2'-糖修饰的核苷”和“锁核酸”的章节中更具体地描述的那些。如本文所述的TNA间隔聚体可以例如包含一个或多个TNA核苷、LNA核苷、MOE核苷或其混合物。

[0145] LNA间隔聚体

[0146] LNA间隔聚体为其中区域F和区域F'中的一者或两者包含LNA核苷或由其组成的间隔聚体。 β -D-氧基间隔聚体是其中区域F和F'中的一者或两者包含 β -D-氧基LNA核苷或由其组成的间隔聚体。LNA间隔聚体可以例如具有式: $[LNA]_{1-5} - [\text{区域G}] - [LNA]_{1-5}$,其中区域G如

名称为“间隔聚体-区域G”的章节中所述。特定LNA间隔聚体设计的一实例为3-10-3 (LNA-DNA-LNA)。

[0147] MOE间隔聚体

[0148] MOE间隔聚体为其中区域F和区域F'中的一者或两者包含MOE核苷(例如,2'-O-MOE核苷)或由其组成的间隔聚体。MOE间隔聚体可以例如具有式[MOE]₁₋₈-[区域G]-[MOE]₁₋₈,诸如[MOE]₂₋₇-[区域G]₅₋₁₆-[MOE]₂₋₇、诸如[MOE]₃₋₆-[区域G]-[MOE]₃₋₆,其中区域G如名称为“间隔聚体-区域G”的章节中所述。具有5-10-5设计的MOE间隔聚体(MOE-DNA-MOE)已经在本领域中广泛使用。

[0149] TNA间隔聚体

[0150] “TNA间隔聚体”或“TNA修饰的间隔聚体”是这样的间隔聚体,其中区域F、区域F'和区域G中的一者或多者的连接的核苷包含至少一个TNA核苷。

[0151] TNA间隔聚体可以例如具有这样的式,其中F、F'或者F和F'两者的核苷由TNA核苷组成。TNA间隔聚体的具体设计的实例在本文别处描述。

[0152] 混合型翼间隔聚体

[0153] 混合型翼间隔聚体是这样的间隔聚体,其中区域F和区域F'中的一者或两者包含多于一种类型的糖修饰的核苷。许多糖修饰的核苷是本领域已知的并且考虑用于此目的。侧翼区域中的两个或更多个不同的糖修饰的核苷可以例如选自名称为“糖修饰的核苷”的章节中所公开的那些,包括但不限于名称为“苏糖核酸(TNA)”、“2'-糖修饰的核苷”和“锁核酸”的章节中所公开的那些。

[0154] 所考虑的混合型翼间隔聚体包括例如其中区域F和区域F'中的至少一者包含TNA核苷的那些。然后,其他的糖修饰的核苷可以选自例如2'取代的核苷,诸如独立地选自由以下项组成的组的2'取代核苷:2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、阿糖核酸(ANA)单元和2'-氟-ANA单元,诸如MOE核苷。

[0155] 还考虑了这样的混合型翼间隔聚体,其中,当区域F和区域F'中的至少一者或者区域F和区域F'两者包含至少一个TNA核苷时,区域F和区域F'的其余核苷独立地选自由以下项组成的组:MOE和LNA。当区域F和区域F'中的至少一者或者区域F和区域F'两者包含至少两个LNA核苷时,区域F和区域F'的其余核苷可以例如独立地选自由以下项组成的组:MOE和LNA。在一些混合型翼间隔聚体中,区域F和区域F'中的一者或两者可以进一步包含一个或多个DNA核苷。

[0156] 混合型翼间隔聚体设计已公开于W02008/049085和W02012/109395,该两者在此以引用方式并入。

[0157] 交替性侧翼间隔聚体

[0158] 具有交替侧翼的寡核苷酸为这样的间隔聚体寡核苷酸,其中侧翼(F或F')中的至少一者除了糖修饰的核苷之外还包含DNA,例如糖修饰的核苷选自本文在名称为“糖修饰的核苷”的章节中所描述的那些,包括但不限于在名称为“苏糖核酸”、“2'-糖修饰的核苷”和“锁核酸”的章节中所描述的那些。例如,除了DNA之外,交替性侧翼间隔聚体还可以包含TNA、LNA和/或MOE核苷。

[0159] 例如,区域F或区域F'中的至少一者或者区域F和区域F'两者可以包含糖修饰的核

苷和DNA核苷两者。然后,侧翼区域F或侧翼区域F'或者F和F'两者通常包含至少三个核苷,其中F区域和/或F'区域的最接近5'的核苷和最接近3'的核苷为糖修饰的核苷。

[0160] 区域D'或区域D"

[0161] 如本文所述的反义寡核苷酸可以包含其他不与靶核酸完全互补的5'核苷和/或3'核苷。其他5'核苷和/或3'核苷本文中可称为区域D'和区域D"

[0162] 出于将连续核苷酸序列(诸如间隔聚体)与缀合物部分或另一个官能团接合的目的,可以使用添加区域D'或D"。当该区域用于将连续核苷酸序列与缀合物部分接合时,该区域可充当可裂解接头。该区域还可以或替代地用于提供核酸外切酶保护或使合成或制造变得容易。

[0163] 可以将区域D'和D"分别连接至区域F的5'端或区域F'的3'端,以生成下式:D'-F-G-F'、F-G-F'-D"或D'-F-G-F'-D"。在这种情况下,F-G-F'是寡核苷酸的间隔聚体部分,而区域D'或D"构成寡核苷酸的单独部分。

[0164] 区域D'或D"可以独立地包含1个、2个、3个、4个或5个另外的核苷酸或由其组成,它们可以与靶核酸互补或不互补。与F或F'区域相邻的核苷酸不是糖修饰的核苷酸,诸如DNA或RNA或这些的碱基修饰形式。D'或D"区域可以充当核酸酶敏感性可生物裂解的接头。例如,另外的5'和/或3'端核苷酸可以为DNA或RNA核苷酸并且可以通过磷酸二酯键合连接。

[0165] W02014/076195中公开了适合用作区域D'或区域D"的基于核苷酸的可生物裂解的接头,其包括例如磷酸二酯连接的DNA二核苷酸。W02015/113922中公开了在聚寡核苷酸构建体中可生物裂解的接头的用途,其中这些接头被用于在单个寡核苷酸内连接多个反义构建体(例如,间隔聚体区域)。

[0166] 缀合

[0167] 如本文所用,术语“缀合物”是指与非核苷酸部分(缀合物部分或区域C或第三区域)共价连接的寡核苷酸。

[0168] 本文所述的反义寡核苷酸与一个或多个非核苷酸部分的缀合可以改善寡核苷酸的药理学,例如,通过影响寡核苷酸的活性、细胞分布、细胞吸收或稳定性来实现。缀合可以例如通过改善寡核苷酸的细胞分布、生物利用度、代谢、排泄、渗透性和/或细胞吸收来修饰或增强寡核苷酸的药代动力学特性。特别地,缀合物可将寡核苷酸靶向特定的器官、组织或细胞类型,并且从而增强寡核苷酸在该器官、组织或细胞类型中的有效性。同时,缀合物可以用于降低寡核苷酸在非靶细胞类型、组织或器官中的活性,例如,脱靶活性或在非靶细胞类型、组织或器官中的活性。

[0169] 非核苷酸部分(缀合物部分)可以例如选自由以下项组成的组:碳水化合物、细胞表面受体配体、原料药、激素、亲脂性物质、聚合物、蛋白质、肽、毒素(例如细菌毒素)、维生素、病毒蛋白(例如衣壳)或其组合。

[0170] 接头

[0171] 键或接头是两个原子之间的连接,其经由一个或多个共价键将一个目标化学基团或区段与另一个目标化学基团或区段连接。缀合物部分可以直接或通过连接部分(例如接头或系链)连接至寡核苷酸。接头用于将第三区域(例如缀合物部分(区域C))共价连接至第一区域,该第一区域例如寡核苷酸或连续核苷酸序列或间隔聚体区域F-G-F'(区域A)。

[0172] 缀合物或寡核苷酸缀合物可以任选地包含位于与靶核酸互补的寡核苷酸或连续

核苷酸序列(区域A或第一区域)与缀合物部分(区域C或第三区域)之间的接头区域(第二区域或区域B和/或区域Y)。

[0173] 区域B是指包含生理上不稳定的键或由其组成的可生物裂解的接头,该键在哺乳动物体内通常遇到的条件下或所遇到的与之相似的条件可裂解。生理上不稳定的接头经历化学转化(例如裂解)的条件包括化学条件,诸如pH、温度、氧化或还原条件或试剂,以及在哺乳动物细胞中遇到的盐浓度或与之相似的盐浓度。哺乳动物细胞内条件还包括通常存在于哺乳动物细胞中的酶活性,诸如来自蛋白水解酶或水解酶或核酸酶的酶活性。可生物裂解的接头可能例如对S1核酸酶裂解敏感。含有DNA磷酸二酯的可生物裂解的接头更详细地描述于W0 2014/076195(通过引用并入本文)中,也参见本文中的区域D'或区域D''。

[0174] 区域Y是指不一定是可生物裂解的但主要用于将缀合物部分(区域C或第三区域)共价连接至寡核苷酸(区域A或第一区域)的接头。区域Y接头可以包含重复单元诸如乙二醇、氨基酸单元或氨基烷基的链结构或寡聚物。寡核苷酸缀合物可以由以下区域性元件A-C、A-B-C、A-B-Y-C、A-Y-B-C或A-Y-C构成。接头(区域Y)可以例如为氨基烷基,诸如C₂至C₃₆氨基烷基基团,包括例如C₆至C₁₂氨基烷基基团。优选地,接头(区域Y)为C₆氨基烷基基团。

[0175] 治疗

[0176] 如本文所用,术语‘治疗’是指对既存疾病(例如如本文所指的疾病或疾患)的治疗或对疾病的防范(即预防)两者。因此将认识到,如本文所指的治疗可以是预防性的。

[0177] TNA修饰的反义寡核苷酸

[0178] 尽管苏糖核酸(TNA)是非天然的,但苏糖核酸能够形成稳定的沃森克里克双链体,并对互补RNA靶标表现出强亲和力和特异性。如本文所示,TNA修饰的间隔聚体为反义寡核苷酸应用提供了新的设计策略。使用胰天蛋白酶3/7活化、体外靶标敲低和热解链测定,证明TNA修饰可用于减轻毒性,同时仍维持靶标敲低功效和对靶核酸的亲和力。例如,在现有技术设计的间隔聚体(诸如LNA或MOE间隔聚体)中,TNA单元可以替换侧翼区域中的一个或多个或所有LNA或MOE单元。TNA单元还可以替换现有技术设计的间隔聚体的间隔区域中的一个或多个或最多所有(除了三个或四个之外)连续DNA单元,并且可以例如,此可有效地产生延长的5'或3'侧翼和缩小的间隔。此外,TNA很难被核酸酶识别。因此,当TNA单元设计成反义寡核苷酸序列时,这些TNA单元可以导致代谢稳定性提高、作用持续时间延长或两者。因此,与经典的间隔聚体设计相比,TNA修饰的间隔聚体可以产生具有增加的治疗指数的长效治疗剂。

[0179] 因此,本发明提供了包含一个或多个TNA核苷的反义寡核苷酸,特别是包含一个或多个TNA核苷的反义间隔聚体寡核苷酸。反义间隔聚体寡核苷酸可以尤其包含能够募集核糖核酸酶(RNA酶)H的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列。包含至少一个TNA残基的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列在本文中可称为“TNA间隔聚体”。考虑的TNA间隔聚体设计包括那些,其中

[0180] G为最多18个连接的核苷的间隔区域,该间隔区域包含至少3个连续DNA核苷,

[0181] F和F'中的每一个为最多15个连接的核苷的侧翼区域,该侧翼区域独立地包含1至15个糖修饰的核苷或由其组成,并且

[0182] F、F'和G中的至少一个包含其是TNA核苷的糖修饰的核苷。

[0183] 虽然以下章节提供了关于根据本发明的TNA间隔聚体的更多细节,但应当理解,除

非另外指示或上下文矛盾,否则它们同样适用于反义间隔聚体寡核苷酸或其缀合物,其包含TNA间隔聚体或由其组成。

[0184] 有利地,TNA间隔聚体可以通过减少或抑制靶基因表达为mRNA和/或蛋白质来调节靶基因的表达,通常通过与靶核酸杂交来实现。当靶核酸为RNA(例如前体mRNA、mRNA、病毒RNA、微小RNA或lncRNA靶核酸)时,TNA间隔聚体能够减少或抑制靶RNA的表达。这是通过TNA间隔聚体与靶RNA之间的互补性以及适当地募集细胞RNA酶(诸如RNA酶H)来实现的。TNA间隔聚体还能够通过非RNA酶H介导的机制,诸如空间阻断机制(引起微小RNA抑制、减少的前体mRNA的剪接调节或lncRNA与染色质之间的相互作用的阻断)来减少或抑制靶RNA的表达。

[0185] 优选地,与标靶的正常表达量相比,TNA间隔聚体可以使标靶的表达量降低至少约20%,更优选地与标靶的正常表达量相比降低至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。与标靶的正常表达量相比,TNA间隔聚体还可以优选地或可替代地抑制标靶的表达至少约20%,更优选地与标靶的正常表达量相比,抑制至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0186] 用于评估特定标靶的表达量的降低或表达的抑制的测定是技术人员已知的。合适的测定包括使用靶细胞的体外测定,这些靶细胞在基因组中包含至少一个靶基因拷贝并表达标靶,例如靶RNA。例如,在其中靶细胞与约25 μ M TNA间隔聚体一起孵育的体外测定中,与RNA标靶的正常表达量相比,TNA间隔聚体可以能够将RNA标靶的表达量降低至少约50%,诸如至少约60%。在此类测定中,与RNA标靶的正常表达相比,TNA间隔聚体还可以或可替代地能够将RNA标靶的表达抑制至少约50%,诸如至少约60%。在约25 μ M的浓度下,与标靶的正常表达量相比,TNA间隔聚体还可以能够将RNA标靶的表达量降低或抑制至少约70%,诸如至少约80%、诸如至少约90%。

[0187] RNA标靶的正常表达量可以使用对照来确定,其中靶细胞在没有TNA间隔聚体的情况下(例如,仅在媒剂的存在下)或与不相关的对照寡核苷酸一起孵育。用于体外测定的靶细胞可以从商业来源获得(例如,以细胞系的形式)或从人或实验动物的血液或其他组织中分离。可以例如将靶细胞与TNA间隔聚体或对照一起孵育约1至5天,诸如约2、3或4天,诸如约3天。然后可以提取RNA,并通过基因表达分析来测定测试和对照样品中其余标靶RNA的量。可替代地,可以在测试和对照样品中测定源自靶RNA的RNA种类(例如,mRNA)或蛋白质的量,而不是测定其余靶RNA。实例2中提供了典型测定的实例,该典型测定用于评估TNA间隔聚体对靶RNA的表达量的降低或表达的抑制,该典型测定可适用于其他标靶和靶细胞。

[0188] TNA间隔聚体降低标靶的表达量或抑制标靶的表达的能力也可以通过测定IC₅₀值(即,靶核酸的表达量减半时TNA间隔聚体的浓度)来评估。在使用在基因组中包含至少一个靶基因拷贝并表达标靶(例如靶RNA)的靶细胞的体外测定中,IC₅₀优选地不超过约20 μ M,诸如不超过约10 μ M、诸如不超过约5 μ M。通常,在与已经描述的测定类似的细胞测定中对IC₅₀值进行测定,不同之处在于将靶细胞与跨越IC₅₀值的TNA间隔聚体的稀释系列一起孵育。实例3中提供了典型测定的实例,该典型测定用于评估TNA间隔聚体对靶RNA的表达量的IC₅₀降低或表达的抑制,该典型测定可适用于其他标靶和靶细胞。

[0189] TNA间隔聚体的能力还可以相对于对照或“亲本”间隔聚体进行评估,TNA间隔聚体由该对照或“亲本”间隔聚体衍生,并且该对照或“亲本”间隔聚体不包含任何TNA核苷。TNA

间隔聚体的IC50值优选地为对照或“亲本”间隔聚体的不超过约10倍、不超过约8倍、不超过约6倍、不超过约4倍或不超过约2倍。

[0190] 如本文所述的TNA间隔聚体的特征还可在于具有低毒性。例如，TNA间隔聚体可以比相应的对照间隔聚体具有更低的毒性，该相应的对照间隔聚体诸如现有技术的参考间隔聚体或“亲本”间隔聚体，其与TNA间隔聚体的不同之处在于该参考间隔聚体或“亲本”间隔聚体的核苷不包括任何TNA核苷。用于评估间隔聚体或反义核苷酸的毒性的合适的测定是本领域已知的并且包括例如体外测定，诸如胱天蛋白酶3/7测定。胱天蛋白酶3/7测定反映了化合物诱导的细胞凋亡的水平，并且适用于例如基于对肝细胞或细胞系的测试来评估化合物的肝毒性风险。简单说来，来自商业来源的HepG2细胞可以在合适的媒剂中用100nM TNA或对照间隔聚体转染，并在转染后约24小时测定胱天蛋白酶3/7活化。优选地，用TNA间隔聚体转染所致的胱天蛋白酶3/7活化为相应的对照间隔聚体的至多约70%，诸如至多约60%、诸如至多约50%、诸如至多约40%、诸如至多约30%、诸如至多约20%。可替代地，使用实例4中描述的胱天蛋白酶3/7测定，针对TNA间隔聚体测定的百分比（测定窗%，反映凋亡细胞对于总细胞占比）优选地为至多约200%，更优选地至多约150%、至多约100%、至多约80%、至多约60%、至多约50%、至多约40%、至多约30%、至多约20%或至多约10%。优选地，使用实例4中描述的胱天蛋白酶3/7测定，针对TNA间隔聚体测定的百分比（测定窗%）为至多约60%。

[0191] 如本文所述的TNA间隔聚体能够与靶核酸（例如靶RNA）杂交，特别是与其核碱基序列互补的靶序列杂交。TNA间隔聚体与其靶核酸杂交的能力可以根据本领域已知的任何测定来评估。有利地，可以使用热解链（Tm）分析，从而确定TNA间隔聚体与其RNA靶序列之间的双链体在哪个温度下变性，此可以指示解链温度或简称为Tm。实例5中描述了用于确定TNA间隔聚体（即，呈与互补RNA靶序列的双链体的形式）的Tm的典型测定。简单说来，可以将TNA间隔聚体和RNA靶序列添加至20mM磷酸二钠缓冲液、200mM NaCl和0.2mM EDTA（pH 7），产生1.5μM的最终浓度。可以将样品加热至95℃持续5min，并且然后历经1小时时间段使其缓慢冷却至室温，并使用温度梯度在260nm处记录热解链曲线，该温度梯度例如按5℃/min从25℃增加至95℃，并且然后降至25℃。根据两条曲线的导数，可以确定解链温度（Tm）。优选地，TNA间隔聚体具有至少约50℃，诸如至少约52℃、诸如至少约54℃、诸如至少约56℃、诸如至少约58℃、诸如至少约60℃、诸如至少约65℃、诸如至少约70℃的Tm。

[0192] 在一些情况下，寡核苷酸与靶核酸之间可能存在错配，诸如1或2个错配。尽管错配，与靶核酸的杂交仍可足以表现出调节标靶的所需能力。

[0193] 优选地，根据本发明的TNA间隔聚体

[0194] (a) 可以将靶核酸的表达量降低至少约50%，诸如至少约60%、诸如至少约70%、诸如至少约80%、诸如至少约90%，如与标靶的正常表达量相比；

[0195] (b) 具有不超过约20μM，诸如不超过约10μM、诸如不超过约5μM的IC50，以用于降低靶核酸的表达量；

[0196] (c) 使用实例4中描述的胱天蛋白酶3/7测定，测定窗百分比（AW%）优选地为至多约60%，诸如至多约40%、诸如至多约20%、诸如至多约10%；

[0197] (d) 呈反义间隔聚体寡核苷酸与RNA靶序列的双链体的形式，具有至少约50℃，诸如至少约52℃、诸如至少约54℃、诸如至少约56℃、诸如至少约58℃、诸如至少约60℃的解

链温度(T_m) ;或者

[0198] (e) (a) 至 (d) 中的任两个或更多的组合。

[0199] 例如, 在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a) 和(b) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a) 和(c) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a) 和(d) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(b) 和(c) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(b) 和(d) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(c) 和(d) 两者表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a)、(b) 和(c) 表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a)、(b) 和(d) 表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a)、(c) 和(c) 表征。在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(b)、(c) 和(d) 表征。此外, 在一些实施方案中, 优选的TNA间隔聚体可以由特征(a) 至(d) 中的所有表征。

[0200] 优选地, (a) 和(b) 中的靶核酸为RNA, 并且(c) 中的RNA靶序列具有与TNA间隔聚体的连续核苷酸序列互补的核碱基序列。(a) 和(b) 的表达水平的降低可以例如在表达靶核酸并与约25 μ M浓度的反义间隔聚体寡核苷酸一起孵育约3天的靶细胞中测定, 正如上文已经描述的。

[0201] 在根据本发明的一些TNA间隔聚体中, 区域F包含至少一个TNA核苷。TNA间隔聚体的区域F可以例如包含最多15个TNA核苷。

[0202] 在一些TNA间隔聚体中, F的核苷可以包含至少一个TNA核苷。F的核苷还可以包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或至少十二个TNA核苷, 诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个TNA核苷。还考虑了这样的TNA间隔聚体, 其中F的核苷包含一个TNA核苷或由其组成。

[0203] 在一些TNA间隔聚体中, F的核苷包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个相邻的TNA核苷, 诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷。F的核苷还可以由两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷组成。

[0204] 在一些TNA间隔聚体中, F中的至少最接近3'的核苷为TNA核苷。适当地, F中的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或至少十二个最接近3'的核苷可以为TNA核苷。例如, F中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷可以为TNA核苷。

[0205] 在一些TNA间隔聚体中, F中的至少最接近5'的核苷为TNA核苷。适当地, F中的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或至少十二个最接近5'的核苷可以为TNA核苷。例如, F中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近5'的核苷可以为TNA核苷。

[0206] 在一些TNA间隔聚体中, F中的最接近3'的核苷和最接近5'的核苷两者均为TNA核

核苷。例如，F中的最接近3'的核苷和/或最接近5'的核苷可以独立地选自一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷。

[0207] F中的任何其余核苷可以作为一个或多个除TNA核苷外的其他的糖修饰的核苷(例如，呈混合型翼间隔聚体的形式)或者一个或多个DNA核苷(例如，呈交替性侧翼间隔聚体的形式)。例如，F可以进一步包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷，诸如两个、三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷。糖修饰的核苷的非限制性实例包括在名称为“糖修饰的核苷”的章节中所描述的那些。

[0208] 还考虑了这样的TNA间隔聚体，其中F的所有糖修饰的核苷都是TNA核苷。TNA间隔聚体可以例如为交替性侧翼间隔聚体，其中F的核苷由DNA和TNA组成，具有例如1、2或3个DNA核苷。适当地，然后F的至少最接近5'的核苷和最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0209] F的核苷也可以由TNA核苷组成。可替代地，F的核苷可以由多于一个TNA核苷(诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷)组成。还考虑了其中F的核苷由十三个、十四个或十五个TNA核苷组成的TNA核苷。通常，当F的核苷由两个或更多个TNA核苷组成时，F为连接的TNA核苷的连续序列。

[0210] 在一些TNA间隔聚体中，F不包含任何TNA核苷。

[0211] 在根据本发明的一些TNA间隔聚体中，区域F'包含至少一个TNA核苷。TNA间隔聚体的区域F'可以例如包含最多15个TNA核苷。

[0212] 在一些TNA间隔聚体中，F'中的核苷可以包含至少一个TNA核苷。F'中的核苷还可以包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、十三个、十四个或十五个TNA核苷。还考虑了这样的TNA间隔聚体，其中F'中的核苷包含一个TNA核苷或由其组成。

[0213] 在一些TNA间隔聚体中，F'中的核苷包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个相邻的TNA核苷，诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷。F'中的核苷还可以由两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷组成。

[0214] 在一些TNA间隔聚体中，F'的核苷包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷，诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷。F'的核苷还可以由两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个相邻的TNA核苷组成。

[0215] 在一些TNA间隔聚体中，F'中的至少最接近5'的核苷为TNA核苷。适当地，F'中的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或至少十二个最接近5'的核苷可以为TNA核苷。例如，F'中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近5'的核苷可以为TNA核苷。

[0216] 在一些TNA间隔聚体中，F'中的至少最接近3'的核苷为TNA核苷。适当地，F'中的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或至少十二个最接近3'的核苷可以为TNA核苷。例如，F'中的两个、三个、四

个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷可以为TNA核苷。

[0217] 在一些TNA间隔聚体中,F'中的最接近3'的核苷和最接近5'的核苷两者均为TNA核苷。例如,F'中的最接近3'的核苷和/或最接近5'的核苷可以独立地选自一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷。

[0218] F'中的任何其余核苷可以为一个或多个除TNA核苷外的其他的糖修饰的核苷(例如,呈混合型翼间隔聚体的形式)或者一个或多个DNA核苷(例如,呈交替性侧翼间隔聚体的形式)。例如,F'可以进一步包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷,诸如两个、三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷。糖修饰的核苷的非限制性实例包括在名称为“糖修饰的核苷”的章节中所描述的那些。

[0219] 还考虑了这样的TNA间隔聚体,其中F'的所有糖修饰的核苷都是TNA核苷。TNA间隔聚体可以例如为交替性侧翼间隔聚体,其中F'的核苷由DNA和TNA组成,具有例如1、2或3个DNA核苷。适当地,然后F'的至少最接近5'的核苷和最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0220] F'的核苷也可以由TNA核苷组成。可替代地,F'的核苷可以由多于一个TNA核苷(诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷)组成。还考虑了其中F'的核苷由十三个、十四个或十五个TNA核苷组成的TNA核苷。通常,当F'的核苷由两个或更多个TNA核苷组成时,F'为连接的TNA核苷的连续序列。

[0221] 在一些TNA间隔聚体中,F'不包含任何TNA核苷。

[0222] G包含一段连续的DNA核苷,其使得反义寡核苷酸能够募集RNA酶H。适当地,G可以包含最多十八个核苷,诸如DNA核苷。通常,至少G中的最接近5'的核苷和G中的最接近3'的核苷为DNA核苷。

[0223] 在根据本发明的一些TNA间隔聚体中,G不包含任何TNA核苷。例如,G可以包含至少四个DNA核苷,诸如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续DNA核苷。

[0224] 在根据本发明的一些TNA间隔聚体中,G包含至少一个TNA核苷。例如,取决于区域G的总长度,G中的第二个、第三个、第四个、第五个、第六个、第七个或第八个最接近5'的核苷可以为TNA核苷。可替代地,取决于区域G的总长度,G中的第二个、第三个、第四个、第五个、第六个、第七个或第八个最接近3'的核苷可以为TNA核苷。

[0225] 还考虑了这样的TNA间隔聚体,其中G包含两个或三个TNA核苷。两个或三个TNA核苷可以为连续的或不连续的。

[0226] 还考虑了这样的TNA间隔聚体,其中G包含至少两个或至少三个TNA核苷。至少两个或至少三个TNA核苷可以为连续的或不连续的。区域G可以例如包含任选地连续的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷。

[0227] 此外,如本文所述,其他经修饰的核苷已被报道为当包括在间隔区域内时能够募集RNA酶H,并且也可以或替代地包括在TNA间隔聚体的间隔区域中。优选地,在包含至少一个(诸如一个、两个或三个)TNA核苷或其他修饰的核苷的TNA间隔聚体中,例如在间隔区域G中,间隔区域G仍包含至少三个连续DNA核苷,诸如至少四个连续DNA核苷,诸如至少5个连续DNA核苷,诸如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续DNA核苷。在一些TNA间隔聚体中,除了任何一个、两个或三个TNA核苷之外,G的所有核苷都是DNA核苷。在一些TNA间隔聚体中,所有核苷都是DNA核苷。

[0228] 在一些TNA中,任何1、2或3个TNA核苷(特别是两个或更多个TNA核苷的任何连续段)的位置更靠近区域G的5'端而非区域G的3'端。区域G中的两个或更多个TNA核苷的任何连续段可以例如位于邻近区域G中的最接近5'的核苷(通常为DNA核苷)处。

[0229] 如本文所示,TNA间隔聚体可以包含一段仅三个或四个连续DNA核苷,同时仍然使得能够募集RNA酶H。在不受限于理论的情况下,预期与传统的间隔聚体设计相比,具有比传统间隔聚体设计更短的间隔区域和/或在间隔区域中具有一个或多个TNA残基的TNA间隔聚体可以提供增加的对核酸内切酶介导的降解的抗性和/或减少脱靶结合。因此,在根据本发明的一些TNA间隔聚体中,G包含至多10个DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个DNA核苷。任选地,G包含至多10个连续DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个连续DNA核苷。此外,如下文进一步更详细地描述,当TNA间隔聚体中的G包含9、8、7、6、5或4个连续DNA核苷时,F'和F可以任选地具有不同长度,例如使得F包含比F'更多的连接的核苷。

[0230] 关于每个相应区域F、G和/或F'中的至少一个TNA核苷的数量和布置的细节已在上文阐述并且可以并入通用间隔聚体式5'-F-G-F'-3'(I)中。具体考虑的TNA间隔聚体包括那些,其中

[0231] (i) 区域F包含至少一个TNA核苷,但区域F'和区域G并不包含;

[0232] (ii) 区域F'包含至少一个TNA核苷,但区域F和区域G并不包含;

[0233] (iii) 区域G包含至少一个TNA核苷,但区域F和区域F'并不包含;

[0234] (iv) 区域F和区域F'各自包含至少一个TNA核苷,但区域G并不包含;

[0235] (v) 区域F和区域G各自包含至少一个TNA核苷,但区域F'并不包含;

[0236] (vi) 区域G和区域F'各自包含至少一个TNA核苷,但区域F并不包含;并且

[0237] (vii) 区域F、区域G和区域F'各自包含至少一个TNA核苷。

[0238] 例如,在根据项(iv)或(vii)的TNA间隔聚体中,F和F'可以各自包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个TNA核苷或由其组成。

[0239] 在根据项(iv)或(vii)的TNA间隔聚体中,例如,F和F'可以各自独立地包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个TNA核苷。还考虑了根据项(iv)或(vii)的TNA间隔聚体,其中F和F'各自独立地包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个连续的TNA核苷。

[0240] 可替代地,在根据除(iii)之外的任一项的TNA间隔聚体中,F和F'可以一起包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个、至少十六个、至少十七个、至少十八个、至少十九个或至少二十个TNA核苷,诸如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个、二十三个、二十四、二十五、二十六、二十七、二十八、二十九或三十个TNA核苷。例如,在根据项(iv)的TNA间隔聚体中,F和F'可以一起包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个TNA核苷。

[0241] 在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'中的每一个可以独立地包含连接的糖修饰的核苷的连续序列或由其组成。

[0242] 在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'中的至少一个可以仅由一种类型的糖修饰

的核苷组成。例如,糖修饰的核苷可以为高亲和力核苷或TNA核苷。

[0243] 在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'两者可以均仅由一种类型的糖修饰的核苷组成(均匀侧翼或均匀间隔聚体设计)。例如,糖修饰的核苷可以为高亲和力核苷或TNA核苷。在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'中的所有核苷都是TNA核苷。在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'中的所有核苷都是除TNA核苷外的糖修饰的核苷。

[0244] 在一些TNA间隔聚体中,区域F和区域F'中的一者或两者可以独立地包含两个不同的糖修饰的核苷(混合型翼设计)。两个不同的糖修饰的核苷中的一者可以为TNA核苷,而另一个糖修饰的核苷可以为例如高亲和力核苷。

[0245] 在一些TNA间隔聚体中,区域F中的所有核苷都可以为TNA核苷。然后,区域F'的核苷可以例如包含除TNA核苷外的糖修饰的核苷(诸如2'-糖修饰的核苷,诸如高亲和力核苷)或由其组成。任选地,区域F'可以包含两个不同的糖修饰的核苷,其中的一者可以为TNA。例如,F'可以包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷,诸如三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷。可替代地,F'可以由1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷(诸如三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷)组成。

[0246] 在一些TNA间隔聚体中,区域F'中的所有核苷都可以为TNA核苷。然后,区域F的核苷可以例如包含除TNA核苷外的糖修饰的核苷(诸如2'-糖修饰的核苷,诸如高亲和力核苷)或由其组成。任选地,区域F可以包含两个不同的糖修饰的核苷,其中的一者可以为TNA。例如,F可以包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷,诸如三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷。可替代地,F可以由1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷(诸如三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷)组成。

[0247] 在其中F、F'或者F和F'两者包含一个或多个除TNA核苷外的糖修饰的核苷或由其组成的TNA间隔聚体中,糖修饰的核苷的非限制性实例包括具有修饰的糖部分的那些,该修饰的糖部分选自自由以下项组成的组:

[0248] 2'-甲氧基-核糖(2'-OMe),

[0249] 2'-O-甲氧基乙基-核糖(2'-O-MOE),

[0250] 5'-甲基-2'-O-甲氧基乙基核糖(5'-Me-2'-O-MOE),

[0251] 2'-O-[2-(甲硫基)乙基]-核糖(2'-O-MTE),

[0252] 2-(N-甲基氨基甲酰基)-乙基]-核糖(2'-O-MCE),

[0253] 2'-O-[2-(甲基氨基)-2-氧代乙基]-核糖(2'-O-NMA),

[0254] 2'-脱氧-2'-氟-核糖(如2'-脱氧-2'-氟核糖-核酸;2'-F-RNA中),

[0255] 2'-氟-2'-阿糖(如2'-氟-2'-阿糖核酸;2'-F-ANA中),

[0256] 2'-O-苄基-核糖,

[0257] 氧基、氨基或硫代 β -D-锁核糖(如 β -D-LNA中),

[0258] 氧基、氨基或硫代 α -L-锁核糖(如 α -L-LNA中),

[0259] 2',4'-约束性2'-O-乙基核糖(如约束性乙基锁核酸;cEt中),

[0260] 三环-脱氧核糖(如三环-脱氧核糖DNA;TcDNA中),

[0261] 3'-脱氧-核糖(如3'-脱氧-核糖DNA;3'-DNA中),

[0262] 非锁核糖(如非锁核酸;UNA中),

[0263] 乙二醇(如乙二醇核酸;GNA中),

[0264] 己糖醇(如己糖醇核酸;HNA中),

[0265] 3'-氟己糖醇(如3'-氟己糖醇核酸;FHNA中),

[0266] 3'-阿拉伯-氟己糖醇(如3'-阿拉伯-氟己糖醇核酸;Ara-FHNA中),环己烯(如环己烯核酸;CeNA中),以及

[0267] 氟-环己烯基(如2'-氟-环己烯基核酸;F-CeNA中)。

[0268] 特别考虑的是这样的TNA间隔聚体,其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-糖修饰的核苷(诸如高亲和力、2'-糖修饰的核苷)或其组成。

[0269] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个LNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为LNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个LNA核苷(诸如3、4或5个LNA核苷)或由其组成。合适的LNA核苷包括具有修饰的糖部分的那些,该修饰的糖部分选自氧基、氨基或硫代 β -D-锁核糖(β -D-LNA)或选自氧基、氨基或硫代 α -L-锁核糖(α -L-LNA),诸如 β -D-氧基-LNA、6'-甲基- β -D-氧基LNA,诸如(S)-6'-甲基- β -D-氧基-LNA(ScET)和ENA以及公开于方案2中的LNA核苷。特别考虑的LNA核苷为 β -D-氧基-LNA。

[0270] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个MOE核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为MOE核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个MOE核苷(诸如3、4或5个MOE核苷)或由其组成。合适的MOE核苷包括2'-O-MOE和5'-Me-2'-O-MOE。特别考虑的MOE核苷为2'-O-MOE。

[0271] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-OMe核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-OMe核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-OMe核苷(诸如3、4或5个2'-OMe核苷)或由其组成。

[0272] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-MTE核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-O-MTE核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-O-MTE核苷(诸如3、4或5个2'-O-MTE核苷)或由其组成。

[0273] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-MCE核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-O-MCE核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-O-MCE核苷(诸如3、4或5个2'-O-MCE核苷)或由其组成。

[0274] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-NMA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-O-NMA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-O-NMA核苷(诸如3、4或5个2'-

O-NMA核苷)或由其组成。

[0275] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-脱氧-2'-氟-核糖核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-脱氧-2'-氟-核糖核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-脱氧-2'-氟-核糖核苷(诸如3、4或5个2'-脱氧-2'-氟-核糖核苷)或由其组成。

[0276] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-氟-2'-阿糖核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-氟-2'-阿糖核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-氟-2'-阿糖核苷(诸如3、4或5个2'-氟-2'-阿糖核苷)或由其组成。

[0277] 在一些TNA间隔聚体中,F'、F或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-苄基-核糖核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为2'-O-苄基-核糖核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个2'-O-苄基-核糖核苷(诸如3、4或5个2'-O-苄基-核糖核苷)或由其组成。

[0278] 在一些TNA间隔聚体中,F'、F或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个cEt核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为cEt核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个cEt核苷(诸如3、4或5个cEt核苷)或由其组成。

[0279] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个TcDNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为TcDNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个TcDNA核苷(诸如3、4或5个TcDNA核苷)或由其组成。

[0280] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个3'-DNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为3'-DNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个3'-DNA核苷(诸如3、4或5个3'-DNA核苷)或由其组成。

[0281] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个UNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为UNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个UNA核苷(诸如3、4或5个UNA核苷)或由其组成。

[0282] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个GNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为GNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和

区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个GNA核苷(诸如3、4或5个GNA核苷)或由其组成。

[0283] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个HNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个或所有核苷可以为HNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个HNA核苷(诸如3、4或5个HNA核苷)或由其组成。合适的HNA核苷包括HNA、FHNA和Ara-FHNA。

[0284] 在一些TNA间隔聚体中,F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个CeNA核苷。例如,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'、F'或者F和F'两者中的1、2、3、4、5、6、7、8个核苷或所有核苷都可以是CeNA核苷。在仅区域G包含一个或多个TNA核苷的TNA间隔聚体中,区域F和区域F'可以例如各自包含1、2、3、4、5、6、7、8个CeNA核苷(诸如3、4或5个CeNA核苷)或由其组成。合适的CeNA核苷包括CeNA和F-CeNA。

[0285] 特别考虑的是这样的TNA间隔聚体,其中式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列具有12至32个核苷的长度,诸如12至28个核苷、诸如12至26个核苷,诸如14至26个核苷、诸如14至24个核苷、诸如14至22个核苷、诸如16至22个核苷、诸如16至20个核苷。然而,任何合适的长度可用于F-G-F'设计,包括但不限于12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31和32个连接的核苷。

[0286] 举例来说,根据本发明的TNA间隔聚体可以由区域F-G-F'(式I)的一个或多个下式表示,其条件是区域F-G-F'的总长度为至少12个,诸如至少14个核苷酸的长度:

[0287] $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IV), 诸如 $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (IVa) 或 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IVb);

[0288] $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (V), 诸如 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-9}$ (Va) 或 $F_{1-9}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (Vb);

[0289] $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VI), 诸如 $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-9}$ (VIa) 或 $F_{1-9}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VIb); 以及

[0290] $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VII), 诸如 $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-9}$ (VIIa) 或 $F_{3-9}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VIIb)。

[0291] 如本文所述的区域F、区域G和区域F'中的每一个可以并入到F-G-F'式中的任一者中。

[0292] 在一些TNA间隔聚体中,式IVa的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0293] (a) F中的最接近5'的核苷和F'中的核苷独立地为3、4或5个高亲和力、糖修饰的核苷,

[0294] (b) F中的其余核苷为TNA核苷,并且

[0295] (c) G中的所有核苷都是DNA核苷。

[0296] 例如,G可以包含至多10个连续DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个连续DNA核苷,诸如4、5或6个连续DNA核苷。F可以例如包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个连续TNA核苷。

[0297] 在一些TNA间隔聚体中,式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0298] (a) F和F'各自独立地由3、4或5个核苷组成,其中F和F'中的至少一个核苷为TNA核苷,且其余核苷为高亲和力、糖修饰的核苷,并且

[0299] (b) G中的所有核苷都是DNA核苷。

[0300] 例如,F和F'中的所有核苷都可以是TNA核苷。

[0301] 在一些TNA间隔聚体中,式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0302] (a) F和F'各自独立地包含3、4或5个连接的高亲和力、糖修饰的核苷或由其组成,

且不包含任何TNA核苷,并且

[0303] (b)G中的第二个、第三个、第四个或第五个最接近5'的核苷为TNA核苷,且G中的其余核苷为DNA核苷。

[0304] 例如,TNA核苷的位置可能更靠近区域G的5'端而非G的3'端。

[0305] 特别考虑的TNA间隔聚体设计如下:

[0306] TTTTTdddddTTTTT(设计A),其中T为TNA,并且d为DNA。

[0307] MMMMTTTTTTdddMMMM(设计B),其中M为MOE(例如,2'-O-MOE),T为TNA,并且d为DNA。

[0308] TTTTTTTTTTdddMMMM(设计C),其中M为2'-O-MOE,T为TNA,并且d为DNA。

[0309] 包含TNA间隔聚体,即式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列的反义间隔聚体寡核苷酸可以在TNA间隔聚体的3'端和/或5'端处包含另外的连接的核苷,例如1至100、1至40、40、1至30、1至20、1至10或1至5个连接的核苷。另外的连接的核苷可以例如促进反义间隔聚体寡核苷酸递送至预期位点或靶向第二分子。反义间隔聚体寡核苷酸还可以是较长核酸构建体或者可以是较长核酸构建体的一部分。然而,还考虑反义间隔聚体寡核苷酸可以由TNA间隔聚体组成。

[0310] 本发明特别考虑的是TNA间隔聚体和反义间隔聚体寡核苷酸,其为单链反义寡核苷酸。在根据本发明的TNA间隔聚体或反义间隔聚体寡核苷酸的制剂中,TNA间隔聚体或反义间隔聚体寡核苷酸基本上为单链的,使得大多数TNA间隔聚体分子或反义间隔聚体寡核苷酸分子呈单链形式。

[0311] 制造方法

[0312] 还提供了用于制造本发明的寡核苷酸的方法,其包括使核苷酸单元反应并由此形成寡核苷酸中所包含的共价连接的连续核苷酸单元。优选地,该方法使用亚磷酰胺化学方法(参见例如,Caruthers等人,1987,Methods in Enzymology第154卷,第287-313页)。

[0313] TNA单体的合成及TNA单体并入寡核苷酸中公开于例如Zhang和Chaput,"Synthesis of Threose Nucleic Acid(TNA)Phosphoramidite Monomers and Oligonucleotide Polymers,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,4.51.1-4.51.26,2012",WO 2012/078536、WO 2012/118911和WO 2013/179292A1中。

[0314] 特别提供的是制备亲本反义间隔聚体寡核苷酸的修饰形式的方法,其中亲本反义间隔聚体包含能够募集RNA酶H的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列,其中G为5至18个连接的DNA核苷的间隔区域,并且F和F'中的每一个为最多8个连接的核苷的侧翼区域,该侧翼区域独立地包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷或由其组成,并且其中,在该修饰形式中,亲本反义间隔聚体寡核苷酸的F、F'和/或G中的至少一个核苷已被TNA核苷替换,

[0315] 该方法包括通过使核苷酸单元反应形成寡核苷酸中所包含的共价连接的连续核苷酸单元来制造修饰的反义间隔聚体寡核苷酸的步骤,其中核苷酸单元中的至少一个包含TNA核苷,并且,

[0316] 任选地纯化或分离修饰的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0317] 在一个实施方案中,与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比,修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有降低的毒性,任选地肝毒性。在一个实施方案中,修饰的反义间隔聚体寡核苷酸对HepG2细胞的毒性低于亲本反义间隔聚体寡核苷酸,任选地如通过胱天蛋白酶3/7测定所

确定。在一个实施方案中,与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比,修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有增加的核酸外切酶抗性。在一个实施方案中,与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比,修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有增加的核酸内切酶抗性。

[0318] 任选地,亲本反义间隔聚体寡核苷酸可以为LNA间隔聚体或MOE间隔聚体,诸如其中所有核苷间键合都是硫代磷酸酯键合的LNA间隔聚体或MOE间隔聚体。此外,制造步骤中所采用的核苷酸单元有利地为核苷亚磷酰胺。

[0319] 修饰的反义间隔聚体寡核苷酸可以包含本文所述的任何TNA间隔聚体的特征,例如关于区域F、区域G和区域F'以及F-G-F'设计的特征。

[0320] 本发明还提供了通过该方法获得的或可通过该方法获得的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0321] 该方法可以进一步包括使连续核苷酸序列与缀合物部分(配体)反应以将缀合物部分共价连接至寡核苷酸。

[0322] 在另一方面,提供了一种用于制造组合物的方法,其包括将寡核苷酸或缀合的寡核苷酸与药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂混合。

[0323] 药物组合物

[0324] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含任何前述寡核苷酸和/或寡核苷酸缀合物或其盐以及药用的稀释剂、载体、盐和/或佐剂。

[0325] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含任何前述寡核苷酸和/或寡核苷酸缀合物或其盐以及药用稀释剂、载体、盐或佐剂。

[0326] 药用稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS),而药用盐包括但不限于钠盐和钾盐。在一些实施例中,药用稀释剂是无菌磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方案中,寡核苷酸以50-300 μ M溶液的浓度在药用稀释剂中使用。

[0327] 根据本发明的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物可以以其药用盐的形式存在。术语“药用盐”是指保留本发明化合物的生物有效性和特性并由合适的无毒有机或无机酸或者有机或无机碱形成的常规酸加成盐或碱加成盐。酸加成盐包括例如衍生自无机酸的盐,这些无机酸诸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸和硝酸;以及衍生自有机酸的盐,这些有机酸诸如对甲苯磺酸、水杨酸、甲磺酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸等。碱加成盐包括那些衍生自铵、钾、钠和季铵氢氧化物(诸如例如氢氧化四甲基铵)的盐。为了获得改善的化合物的物理和化学稳定性、吸湿性、流动性和溶解性而将药物化合物化学修饰成盐是药物化学家众所周知的技术。例如,Bastin在《有机工艺研究与发展》(Organic Process Research&Development)2000年第4期,第427-435页或Ansel在以下文章中对此进行了描述:《药物剂型和药物递送系统(第六版)》(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,6th ed.(1995))第196和1456-1457页。例如,本文提供的化合物的药用盐可以是钠盐。

[0328] 用于本发明的合适的制剂可见于《雷明顿药物科学(第十七版)》(Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Philadelphia,Pa.,17th ed.,1985)中。对于药物递送方法的简要综述,参见例如Langer(Science 249:1527-1533,1990)。WO 2007/031091(通过引用并入本文)提供了药用的稀释剂、载体和佐剂的其他合适的和优选的实例。WO2007/031091中也提供了合适的剂量、制剂、施用途径、组合物、剂型、与

其他治疗剂的组合、前药制剂。

[0329] 本发明的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物可与药用活性或惰性物质混合,用以制备药物组合物或制剂。药物组合物的组成和配制方法取决于许多标准,包括但不限于施用途、疾病程度或施用剂量。

[0330] 这些组合物可以通过常规的灭菌技术进行灭菌或者可以进行无菌过滤。所得的水溶液可以包装后直接使用或冻干,在施用前将冻干的制剂与无菌水性运载体混合。制剂的pH通常为介于3至11之间,更优选地介于5和9之间或介于6和8之间,并且最优选地介于7和8之间,诸如7至7.5。可以将固体形式的所得组合物包装在多个单剂量单元中,每一个单元包含固定量的一种或多种上述试剂,诸如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的组合物也可以灵活的量包装在容器中,诸如在设计用于局部适用的乳膏或软膏的可挤压管中。

[0331] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物是前药。特别是关于寡核苷酸缀合物,一旦前药被递送至作用位点(例如靶细胞),缀合物部分就会从寡核苷酸中裂解出来。

[0332] 应用

[0333] 本文所述的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物可用作研究试剂或用作诊断剂、治疗剂和预防剂。

[0334] 在研究中,可以使用寡核苷酸或寡核苷酸缀合物特别调节靶核酸在细胞(例如,在体外细胞培养物)和实验动物中的表达,从而促进标靶的功能分析,或评估其作为治疗介入标靶的实用性。通常,通过降解或抑制产生蛋白质的mRNA从而防止蛋白质形成,或通过降解或抑制产生蛋白质的基因或mRNA来实现靶标调节。

[0335] 如果在研究或诊断中采用寡核苷酸或寡核苷酸缀合物,则靶核酸可以为cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0336] 还提供了用于调节靶细胞中的靶基因的表达的体内或体外方法,该靶细胞包含靶核酸,该方法包括向所述细胞施用有效量的本发明的寡核苷酸或寡核苷酸缀合物。

[0337] 在一些实施例中,靶细胞是哺乳动物细胞,特别是人细胞。靶细胞可以为形成哺乳动物(诸如人)中的组织的一部分的体外细胞培养物或体内细胞。

[0338] 还提供了诊断应用,其中寡核苷酸或寡核苷酸缀合物可用于通过northern印迹、原位杂交或类似技术来检测和定量细胞和组织中的靶基因的表达。

[0339] 还提供了如本文所述的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物,其用作药物。

[0340] 使用寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物的疾病或疾患通常与靶基因的表达相关。优选地,该疾病或疾患为可以通过调节靶基因的表达来治疗的疾病或疾患。

[0341] 寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物可以例如用于治疗或预防由靶基因或来自靶基因的表达产物(例如,RNA或蛋白质)的异常水平和/或活性引起的疾病或疾患。该疾病或疾患还可以或可替代地与靶基因中的突变相关。因此,在一些实施方案中,靶核酸为靶基因的突变形式。靶基因的非限制性实例包括与一种或多种癌症、传染病、神经疾病或疾患、眼科疾病或疾患或者心血管疾病或疾患相关的基因。

[0342] 依据本发明的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物通常是以有效量施用。

[0343] 还提供了治疗应用,其中寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物用于治疗或预防罹患或疑似患有疾病或疾患的动物或人的该疾病或疾患。通常,该疾病或疾患为可以通

过调节靶基因的表达来治疗的疾病或疾患。

[0344] 还提供了寡核苷酸或寡核苷酸缀合物在制造药物中的用途,该药物用于治疗或预防罹患或疑似患有疾病或疾患的动物或人的该疾病或疾患。通常,该疾病或疾患为可以通过调节靶基因的表达来治疗的疾病或疾患。

[0345] 还提供了用于治疗或预防疾病或疾患的方法,其包括向罹患或疑似患有该疾病或疾患的受试者施用治疗或预防有效量的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物。

[0346] 施用

[0347] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸或药物组合物可以经口服施用。在其他实施方案中,本发明的寡核苷酸或药物组合物可以局部或肠内或肠胃外(诸如静脉内、皮下、肌肉内、脑内、脑室内或鞘内)施用。

[0348] 在一优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸或药物组合物通过肠胃外途径施用,诸如例如通过静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注,或者鞘内或颅内施用,例如脑内或脑室内施用,或者玻璃体内施用。在一个实施例中,活性寡核苷酸或寡核苷酸缀合物通过静脉内施用。在另一实施方案中,将活性寡核苷酸或寡核苷酸缀合物经皮下施用。

[0349] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物以0.1-15mg/kg,诸如0.2-10mg/kg、诸如0.25-5mg/kg的剂量施用。施用可以是一周一次、每二周一次、每三周一次或甚至一月一次。

[0350] 组合疗法

[0351] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物是用以与另一治疗剂进行结合治疗。治疗剂可以例如为待用本发明的寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或药物组合物治疗的疾病或疾患的标准护理。

[0352] 实施方案

[0353] 特别考虑以下经编号的实施方案。

[0354] 1.一种反义间隔聚体寡核苷酸,其包含能够募集核糖核酸酶(RNA酶)H的式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列,其中

[0355] G为最多18个连接的核苷的间隔区域,该间隔区域包含至少3个连续DNA核苷,

[0356] F和F'中的每一个为最多15个连接的核苷的侧翼区域,该侧翼区域独立地包含1至15个糖修饰的核苷或由其组成,并且

[0357] F、F'和G中的至少一个包含其是 α -L-苏呋喃糖基(TNA)核苷的糖修饰的核苷。

[0358] 2.根据实施方案1所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F包含至少一个TNA核苷。

[0359] 3.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷。

[0360] 4.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷或由其组成。

[0361] 5.根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸,其中F中的至少最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0362] 6.根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸,其中F中的至少两个、三个、

四个、五个、六个、七个、八个、九个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0363] 7. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0364] 8. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F中的至少最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0365] 9. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F中的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十三个或十四个最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0366] 10. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0367] 11. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F的所有糖修饰的核苷都是TNA核苷。

[0368] 12. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F的所有核苷都是TNA核苷。

[0369] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'不包含任何TNA核苷。

[0370] 14. 根据实施方案1至12中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'包含至少一个TNA核苷。

[0371] 15. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷。

[0372] 16. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷或由其组成。

[0373] 17. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的至少最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0374] 18. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0375] 19. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近5'的核苷为TNA核苷。

[0376] 20. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的至少最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0377] 21. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0378] 22. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中F'中的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个最接近3'的核苷为TNA核苷。

[0379] 23. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'的所有糖修饰的核苷都是TNA核苷。

[0380] 24. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F'的所有核苷都是TNA核苷。

[0381] 25. 根据实施方案1和14至24中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F不包含任何TNA核苷。

[0382] 26. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F和F'中的每一个独立地包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个TNA核苷或由其组成。

[0383] 27. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F和F'一起包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个TNA核苷。

[0384] 28. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F、F'或者F和F'两者进一步包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷, 诸如三个、四个或五个除TNA核苷外的糖修饰的核苷核苷。

[0385] 29. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含至少一个包含选自由以下项组成的组的修饰的糖部分糖修饰的核苷或由其组成:

[0386] 2'-甲氧基-核糖(2'-OMe),

[0387] 2'-O-甲氧基乙基-核糖(2'-O-MOE),

[0388] 5'-甲基-2'-O-甲氧基乙基核糖(5'-Me-2'-O-MOE),

[0389] 2'-O-[2-(甲硫基)乙基]-核糖(2'-O-MTE),

[0390] 2-(N-甲基氨基甲酰基)-乙基]-核糖(2'-O-MCE),

[0391] 2'-O-[2-(甲基氨基)-2-氧代乙基]-核糖(2'-O-NMA),

[0392] 2'-脱氧-2'-氟-核糖(如2'-脱氧-2'-氟核糖-核酸; 2'-F-RNA中),

[0393] 2'-氟-2'-阿糖(如2'-氟-2'-阿糖核酸; 2'-F-ANA中),

[0394] 2'-O-苄基-核糖,

[0395] 氧基、氨基或硫代 β -D-锁核糖(如 β -D-LNA中),

[0396] 氧基、氨基或硫代 α -L-锁核糖(如 α -L-LNA中),

[0397] 2', 4'-约束性2'-O-乙基核糖(如约束性乙基锁核酸; cEt中),

[0398] 三环-脱氧核糖(如三环-脱氧核糖DNA; TcDNA中),

[0399] 3'-脱氧-核糖(如3'-脱氧-核糖DNA; 3'-DNA中),

[0400] 非锁核糖(如非锁核酸; UNA中),

[0401] 乙二醇(如乙二醇核酸; GNA中),

[0402] 己糖醇(如己糖醇核酸; HNA中),

[0403] 3'-氟己糖醇(如3'-氟己糖醇核酸; FHNA中),

- [0404] 3'-阿拉伯-氟己糖醇(如3'-阿拉伯-氟己糖醇核酸;Ara-FHNA中),
- [0405] 环己烯(如环己烯核酸;CeNA中),以及
- [0406] 氟-环己烯基(如2'-氟-环己烯基核酸;F-CeNA中)。
- [0407] 30.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-糖修饰的核苷(诸如高亲和力、2'-糖修饰的核苷)或由其组成。
- [0408] 31.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个LNA核苷。
- [0409] 32.根据实施方案31所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'和F中的所有核苷都是LNA核苷。
- [0410] 33.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F、F'或者F和F'两者的糖修饰的核苷包含一个或多个2'-O-甲氧基乙基-RNA(2'-O-MOE)核苷。
- [0411] 34.根据实施方案33所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中,除了任何至少一个TNA核苷之外,F'和F中的所有核苷都是2'-O-MOE核苷。
- [0412] 35.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G不包含任何TNA核苷。
- [0413] 36.根据实施方案1至34中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G包含至少一个TNA核苷,诸如至少一个、两个或三个TNA核苷。
- [0414] 37.根据实施方案36所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G中的第二个、第三个、第四个、第五个、第六个、第七个或第八个最接近5'的核苷为TNA核苷。
- [0415] 38.根据实施方案36或37所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G中的第二个、第三个、第四个、第五个、第六个、第七个或第八个最接近3'的核苷为TNA核苷。
- [0416] 39.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G中的至少最接近5'的核苷和最接近3'的核苷为DNA核苷。
- [0417] 40.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中除了任何至少一个TNA核苷之外,G的所有核苷都是DNA核苷。
- [0418] 41.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中间隔区域G包含至少四个DNA核苷,诸如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续的DNA核苷。
- [0419] 42.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体,其中G包含至多10个DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个DNA核苷。
- [0420] 43.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其包含至少一个修饰的核苷间键合。
- [0421] 44.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其包含抗核酸酶抗性、修饰的核苷间键合。
- [0422] 45.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中所有核苷间键合都是硫代磷酸酯核苷间键合。
- [0423] 46.根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式5'-F-G-F'-3'(I)的连续核苷酸序列具有12至32个核苷的长度,诸如12至28个核苷、诸如12至26个核苷、诸如14至26个核苷、诸如14至24个核苷、诸如14至22个核苷、诸如16至22个核苷、诸如

16至20个核苷。

[0424] 47. 根据实施方案46所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中该连续核苷酸序列具有式

[0425] $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IV), 诸如 $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (IVa) 或 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IVb);

[0426] $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (V), 诸如 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-9}$ (Va) 或 $F_{1-9}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (Vb);

[0427] $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VI), 诸如 $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-9}$ (VIa) 或 $F_{1-9}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VIb); 或

[0428] $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VII), 诸如 $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-9}$ (VIIa) 或 $F_{3-9}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VIIb), 其中数值范围分别代表F、G和F'中的连接的核苷的数量。

[0429] 48. 根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中该反义间隔聚体寡核苷酸

[0430] (a) 可以将靶核酸的表达量降低至少约50%, 诸如至少约60%、诸如至少约70%、诸如至少约80%、诸如至少约90%, 如与标靶的正常表达量相比;

[0431] (b) 具有不超过约20 μ M, 诸如不超过约10 μ M、诸如不超过约5 μ M的IC₅₀, 以用于降低靶核酸的表达量;

[0432] (c) 使用实例4中描述的脱天蛋白酶3/7测定, 测定窗百分比 (AW%) 优选地为至多约60%, 诸如至多约40%、诸如至多约20%、诸如至多约10%;

[0433] (d) 呈反义间隔聚体寡核苷酸与RNA靶序列的双链体的形式, 具有至少约50°C, 诸如至少约52°C、诸如至少约54°C、诸如至少约56°C、诸如至少约58°C、诸如至少约60°C的解链温度 (T_m); 或者

[0434] (e) 以下项的组合: (a) 和 (b); (a) 和 (c); (a) 和 (d); (b) 和 (c); (b) 和 (d); (a)、(b) 和 (c); (a)、(b) 和 (d); (a)、(c) 和 (d); (b)、(c) 和 (d), 或 (a) 至 (d) 中的所有。

[0435] 49. 根据实施方案48所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中靶核酸为RNA靶序列, 并且该RNA靶序列具有与式I的连续核苷酸序列互补的核碱基序列, 任选地其中 (a) 和 (b) 在表达靶核酸并与约25 μ M浓度的反义间隔聚体寡核苷酸一起孵育约3天的靶细胞中测定。

[0436] 50. 一种反义间隔聚体寡核苷酸, 其包含能够募集核糖核酸酶 (RNA酶) H的式5'-F-G-F'-3' (I) 的连续核苷酸序列, 其中该连续核苷酸序列包含至少一个TNA核苷。

[0437] 51. 根据实施方案50所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中式5'-F-G-F'-3' (I) 的连续核苷酸序列具有12至32个核苷的长度, 诸如12至28个核苷、诸如12至26个核苷、诸如14至26个核苷、诸如14至24个核苷、诸如14至22个核苷、诸如16至22个核苷、诸如16至20个核苷。

[0438] 52. 根据实施方案50和51中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中该连续核苷酸序列具有式

[0439] $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IV), 诸如 $F_{1-15}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (IVa) 或 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-15}$ (IVb);

[0440] $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (V), 诸如 $F_{1-12}-G_{3-18}-F'_{1-9}$ (Va) 或 $F_{1-9}-G_{3-18}-F'_{1-12}$ (Vb);

[0441] $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VI), 诸如 $F_{1-12}-G_{4-16}-F'_{1-9}$ (VIa) 或 $F_{1-9}-G_{4-16}-F'_{1-12}$ (VIb); 或

[0442] $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VII), 诸如 $F_{3-12}-G_{4-10}-F'_{3-9}$ (VIIa) 或 $F_{3-9}-G_{4-10}-F'_{3-12}$ (VIIb), 其中数值范围分别代表F、G和F'中的连接的核苷的数量。

[0443] 53. 根据实施方案50至52中任一项所述的反义间隔聚体, 其进一步包含根据实施方案2至49中任一项所述的特征。

[0444] 54. 根据实施方案47至53中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸, 其中式IVa的连

续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0445] (a) F中的最接近5'的核苷和F中的核苷独立地为3、4或5个高亲和力、糖修饰的核苷,

[0446] (b) F中的其余核苷为TNA核苷,并且

[0447] (c) G中的所有核苷都是DNA核苷。

[0448] 55. 根据实施方案54所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中G包含至多10个连续DNA核苷,诸如9、8、7、6、5或4个连续DNA核苷。

[0449] 56. 根据实施方案47至53中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0450] (a) F和F'各自独立地由3、4或5个核苷组成,

[0451] (b) 其中F和F'中的至少一个核苷为TNA核苷,并且其余核苷为高亲和力、糖修饰的核苷,

[0452] (c) G中的所有核苷都是DNA核苷。

[0453] 57. 根据实施方案56所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中F和F'中的所有核苷都是TNA核苷。

[0454] 58. 根据实施方案47至53中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中式IV的连续核苷酸序列具有至少16个核苷的长度,并且

[0455] (a) F和F'各自独立地包含3、4或5个连接的高亲和力、糖修饰的核苷或由其组成,且不包含任何TNA核苷,并且

[0456] (b) G中的第二个、第三个、第四个或第五个最接近5'的核苷为TNA核苷,且G中的其余核苷为DNA核苷。

[0457] 59. 根据实施方案54至58中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸,其中高亲和力、糖修饰的核苷选自实施方案29中的糖修饰的核苷。

[0458] 60. 根据前述实施方案中任一项所述的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸为单链反义寡核苷酸。

[0459] 61. 一种缀合物,其包含根据前述实施方案中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸以及任选地经由接头共价连接至所述寡核苷酸的至少一个缀合物部分。

[0460] 62. 根据实施方案61所述的缀合物,其中该缀合物部分选自碳水化合物、细胞表面受体配体、原料药、激素、亲脂性物质、聚合物、蛋白质、肽、毒素、维生素、病毒蛋白和它们的组合。

[0461] 63. 根据实施方案61或62所述的缀合物,其中该缀合物部分有助于跨血脑屏障递送。

[0462] 64. 一种根据实施方案1至60中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸或根据实施方案61至63中任一项所述的缀合物的药用盐。

[0463] 65. 一种药物组合物,其包含根据实施方案1至60中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸、根据实施方案61至63中任一项所述的缀合物或根据实施方案64所述的药用盐;以及药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂。

[0464] 66. 根据实施方案1至60中任一项所述的反义寡核苷酸、根据实施方案61至63中任一项所述的缀合物、根据实施方案64所述的药用盐或根据实施方案65所述的药物组合物,

其用作药物。

[0465] 67. 一种制备亲本反义间隔聚体寡核苷酸的修饰形式的方法, 其中亲本反义间隔聚体包含能够募集RNA酶H的式5'F-G-F'3' (I) 的连续核苷酸序列, 其中G为5至18个连接的DNA核苷的间隔区域, 并且F和F'中的每一个为最多8个连接的核苷的侧翼区域, 该侧翼区域独立地包含1至8个除TNA核苷外的糖修饰的核苷或由其组成, 并且其中, 在该修饰形式中, 亲本反义间隔聚体寡核苷酸的F、F'和/或G中的至少一个核苷已被TNA核苷替换,

[0466] 该方法包括通过使核苷酸单元反应形成寡核苷酸中所包含的共价连接的连续核苷酸单元来制造修饰的反义间隔聚体寡核苷酸的步骤, 其中核苷酸单元中的至少一个包含TNA核苷, 并且,

[0467] 任选地纯化或分离修饰的反义间隔聚体寡核苷酸。

[0468] 68. 根据实施方案67所述的方法, 其中与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比, 修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有降低的毒性, 任选地肝毒性。

[0469] 69. 根据实施方案67和68中任一项所述的方法, 其中修饰的反义间隔聚体寡核苷酸对HepG2细胞的毒性低于亲本反义间隔聚体寡核苷酸, 任选地如通过胱天蛋白酶3/7测定所确定。

[0470] 70. 根据实施方案67至69中任一项所述的方法, 其中与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比, 修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有增加的核酸外切酶抗性。

[0471] 71. 根据实施方案67至70中任一项所述的方法, 其中与亲本反义间隔聚体寡核苷酸相比, 修饰的反义间隔聚体寡核苷酸具有增加的核酸内切酶抗性。

[0472] 72. 根据实施方案67至71中任一项所述的方法, 其中亲本反义间隔聚体寡核苷酸为LNA间隔聚体或MOE间隔聚体, 任选地其中所有核苷间键合为硫代磷酸酯键合。

[0473] 73. 根据实施方案67至72中任一项所述的方法, 其中核苷酸单元为核苷亚磷酰胺。

[0474] 74. 根据实施方案67至73中任一项所述的方法, 其中修饰的反义间隔聚体寡核苷酸包含根据实施方案1至60中任一项所述的特征。

[0475] 75. 一种反义间隔聚体寡核苷酸, 其通过根据实施方案67至74中任一项所述的方法获得或可通过根据实施方案67至74中任一项所述的方法获得。

[0476] 76. TNA核苷酸在制备根据实施方案1至60中任一项所述的反义间隔聚体寡核苷酸或根据实施方案61至63中任一项所述的缀合物中的用途。

[0477] 实例

[0478] 实例1: 使用TNA修饰的寡核苷酸合成

[0479] 使用Bioautomation的MerMade 12自动化DNA合成仪来合成寡核苷酸。使用带有通用接头的可控孔径玻璃支持物(500Å)以1μmol的规模进行合成。

[0480] 在DNA、MOE和LNA亚磷酰胺偶联的标准循环程序中, 使用CH₂Cl₂中的3% (w/v) 三氯乙酸进行4,4-二甲氧基三苯甲基 (DMT) 脱保护, 应用八次, 每次230μL, 持续70秒。用95μL的0.1M乙腈溶液(或乙腈/CH₂Cl₂ 1:1, 用于LNA-¹³C结构单元) 和110μL的5-苄硫基-1-H-四唑于无水乙腈中的0.3M溶液作为活化剂, 使各自的亚磷酰胺偶联三次, 并且偶联时间为180秒。

[0481] 用95μL的0.1M乙腈溶液和110μL的5-苄硫基-1-H-四唑于无水乙腈中的0.3M溶液作为活化剂, 使新鲜制备的α-L-苏呋喃糖基 (TNA) 亚磷酰胺偶联三次, 并且偶联时间为360秒。使用0.1M的3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮于乙腈/吡啶:1/1中的溶液进行硫化, 应用两

次,每次200 μ L,持续80秒。使用0.02M的于THF/pyr/H₂O:88/10/2中的I₂进行氧化,应用两次,每次80秒。使用THF/二甲基吡啶/Ac₂O 8:1:1 (CapA,125 μ L) 和吡啶中的0.625% DMAP (CapB,125 μ L) 进行封端两次,每次85秒。合成后,然后将可控孔径玻璃 (CPG) 小心地转移至4mL小瓶中,其中添加1mL的25% NH₄OH,并在55°C下静置24小时。将粗制的DMT-on寡核苷酸通过使用C18柱的RP-HPLC纯化之后用80%乙酸水溶液去除DMT进行纯化,或者通过滤芯纯化进行纯化。通过反相超高效液相色谱联用高分辨率电喷雾质谱对寡核苷酸进行表征。

[0482] TNA亚磷酰胺如Zhang和Chaput,“Synthesis of Threose Nucleic Acid (TNA) Phosphoramidite Monomers and Oligonucleotide Polymers,CurrentProtocols in Nucleic Acid Chemistry,4.51.1-4.51.26,2012”中所述进行合成。所有其他试剂均购自Sigma Aldrich。

[0483] 根据上述程序制备表1中所示的分子。

[0484] 表1:含有TNA部分的合成分子(靶向转移相关的肺腺癌转录物1 (Malat-1))。CMP ID NO=化合物ID编号。

[0485]

CMP ID NO	序列	计算质量	测得质量
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	5279.24	5279.7
#1	GAGttacttgccaA^mCT	5195.17	5195.1
#2	GAGttacttgccaA ^m CT	5195.17	5195.7
#3	GAGttacttgccaA ^m CT	5153.13	5153.1
#4	GAGttacttgccaA^mCT	5195.17	5195.4
#5	GAGttacttgccaA^mCT	5153.13	5153.4
#6	GAGttacttgccaA^mCT	5153.13	5152.8
#7	GAGttacttgccaA^mCT	5153.13	5153.7
#8	GAGttacttgccaA^mCT	5111.1	5111.1
#9	GAGttacttgccaA^mCT	5153.13	5153.4
#10	GAGttacttgccaA^mCT	5111.1	5111.7
#11	GAGttacttgccaA^mCT	5069.06	5069.1
#12	GAGttacttgccaA^mCT	5027.02	5028.3
#13	GAGttacttgccaA^mCT	5069.06	5069.4
对照 2	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	7235.11	7235.6
#14	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	7058.9	7060
#15	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6970.8	6970.4
#16	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6882.69	6883.6
#17	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6794.59	6794.4
#18	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6706.48	6706.4
#19	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6618.38	6618.4
#20	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6530.27	6531.2
#21	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6442.16	6441.6
#22	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6354.06	6354.4
#23	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6794.59	6796
#24	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	6794.59	6795.6
对照 3	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	7230.09	7230
#25	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	7053.88	7055.6
#26	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6965.78	6966.8
#27	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6877.67	6876.8
#28	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6789.57	6790.4
#29	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6701.46	6700.8
#30	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6613.36	6614
#31	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	6525.25	6526.4

[0486]

CMP ID NO	序列	计算质量	测得质量
#32	GG^mCA^TatgcagataaTGTT^mC	6437.15	6438.8
#33	GG^mCA^TatgcagataaTGTT^mC	6349.04	6350.4
#34	GG^mCA^TatgcagataaTGTT^mC	6789.57	6789.2
#35	GG^mCA^TatgcagataaTGTT^mC	6789.57	6789.2
对照 4	AGAatctcagggtTAT	5329.3	5328.6
#36	AGAatctcagggtTAT	5161.1	5160.5
#37	AGAatctcagggtTAT	5119.1	5118.4
对照 5	AT ^m CgccttcaaTAT	5238.2	5237.6
#38	AT^mCgccttcaaTAT	5070.1	5069.5
#39	AT^mCgccttcaaTAT	5028.1	5027.6
对照 6	^m CA ^m CcaaattgcacT ^m CG	5261.3	5260.6
#40	^mCA^mCcaaattgcacT^mCG	5093.1	5092.4
#41	^mCA^mCcaaattgcacT^mCG	5051.1	5050.4
#42	^mCA^mCcaaattgcacT^mCG	5009.1	5008.5
对照 7	^m C ^m CGtcattgttttGAA	5308.3	5307.6
#43	^mC^mCGtcattgttttGAA	5140.1	5139.7
对照 8	^m C ^m CTtagttggcat ^m CAA	5307.3	5306.8
#44	^mC^mCTtagttggcat^mCAA	5139.2	5138.5
#45	^mC^mCTtagttggcat^mCAA	5097.1	5096.6
对照 9	^m CG ^m Cttgtgtct ^m CT ^m C	5270.3	5269.7
#46	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	5102.1	5101.5
#47	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	5060.1	5059.5
#48	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	5018.0	5017.5
对照 10	^m CT ^m Cagttacacat ^m C ^m CA	5250.3	5249.6
#49	^mCT^mCagttacacat^mC^mCA	5082.1	5081.6
#50	^mCT^mCagttacacat^mC^mCA	5040.1	5039.5
对照 11	GGTagattccgtaA ^m CT	5319.3	5318.6
#51	GGTagattccgtaA^mCT	5151.1	5150.6
#52	GGTagattccgtaA^mCT	5109.1	5108.5
#53	GGTagattccgtaA^mCT	5067.1	5066.5
对照 12	GGTtatagcttga ^m CAA	5343.3	5342.7
#54	GGTtatagcttga^mCAA	5175.2	5174.6
#55	GGTtatagcttga^mCAA	5133.1	5132.5
对照 13	T ^m C ^m CgtcatgttttAGA	5299.3	5298.6
#56	T^mC^mCgtcatgttttAGA	5131.1	5130.5
#57	T^mC^mCgtcatgttttAGA	5089.1	5088.4
对照 14	T ^m C ^m CttagtggcaT ^m CA	5298.3	5297.7
#58	T^mC^mCttagtggcaT^mCA	5130.1	5129.6
#59	T^mC^mCttagtggcaT^mCA	5088.1	5087.7
对照 15	TTGgcatcaaggcA ^m CT	5304.3	5303.6
#60	TTGgcatcaaggcA^mCT	5136.1	5135.6
#61	TTGgcatcaaggcA^mCT	5094.1	5093.6
#62	TTGgcatcaaggcA^mCT	5052.0	5051.4

[0487]

CMP ID NO	序列	计算质量	测得质量
对照 1	GAGTtacttgccaA ^m CT	5279.24	5280.9
#63	GAGTta ^m CTTG ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.8
#64	GAGTtacTTG ^m C ^m CAA ^m CT	5209.11	5211.6
#65	GAGTTactTG ^m C ^m CAA ^m CT	5209.11	5209.8
#66	GAGTTActtG ^m C ^m CAA ^m CT	5209.11	5210.9
#67	GAGTTA ^m Cttg ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.8
#68	GAGTTA ^m CTtgc ^m CAA ^m CT	5209.11	5211
#69	GAGTTA ^m CTTgccAA ^m CT	5195.08	5196.5
#70	GAGTTA ^m CTTGccaA ^m CT	5195.08	5196.6
#71	GAGTtacTTG ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.8
#72	GAGTtactTG ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.8
#73	GAGTTacttG ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5225.1
#74	GAGTTActtg ^m C ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.8
#75	GAGTTA ^m Cttgc ^m CAA ^m CT	5223.14	5223.9
#76	GAGTTA ^m CTtgccAA ^m CT	5209.11	5209.8
#77	GAGTTA ^m CTTgccA ^m CT	5209.11	5209.8
#78	GAGTtactTG ^m C ^m CAA ^m CT	5237.16	5237.7
#79	GAGTtacttG ^m C ^m CAA ^m CT	5237.16	5237.1
#80	GAGTTacttg ^m C ^m CAA ^m CT	5237.16	5238.2
#81	GAGTTActtgc ^m CAA ^m CT	5223.14	5224.5
#82	GAGTTA ^m CttgccAA ^m CT	5223.14	5224.2
#83	GAGTTA ^m CTtgccaA ^m CT	5223.14	5223.6
#84	GAGTtacttG ^m C ^m CAA ^m CT	5251.19	5253
#85	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	5251.19	5253
#86	GAGTTacttgc ^m CAA ^m CT	5237.16	5238.3
#87	GAGTTActtgccAA ^m CT	5223.14	5223
#88	GAGTTA ^m CttgccA ^m CT	5237.16	5238.6
#89	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	5265.22	5266.2
#90	GAGTtacttgc ^m CAA ^m CT	5251.19	5252.1
#91	GAGTTacttgccAA ^m CT	5237.16	5238.3
#92	GAGTTActtgccaA ^m CT	5237.16	5238.3
#93	GAGTtacttgc ^m CAA ^m CT	5265.22	5266.5
#94	GAGTtacttgccAA ^m CT	5251.19	5252.4
#95	GAGTTacttgccaA ^m CT	5251.19	5253
#96	GAGTtacttgccAA ^m CT	5265.22	5266.8
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	5265.22	5265.9
对照 2	G ^m C ^m CAGgctggttatGA ^m CT ^m CA	7235.11	7235.6
#98	G ^m C ^m CAGgctGGTTATGA ^m CT ^m CA	7136.92	7138
#99	G ^m C ^m CAGGctgGTTATGA ^m CT ^m CA	7136.92	7138.8
#100	G ^m C ^m CAGG ^m CtggTTATGA ^m CT ^m CA	7150.95	7152.4
#101	G ^m C ^m CAGG ^m CTggtTATGA ^m CT ^m CA	7150.95	7152.8
#102	G ^m C ^m CAGG ^m CTGgttATGA ^m CT ^m CA	7150.95	7152.8
#103	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGttaTGA ^m CT ^m CA	7150.95	7153.6
#104	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatGA ^m CT ^m CA	7150.95	7151.2

[0488]

CMP ID NO	序列	计算质量	测得质量
#105	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGTTatgA^mCT^mCA</u>	7150.95	7150.4
#106	<u>G^mC^mCAGgctgGTTATGA^mCT^mCA</u>	7150.95	7150.8
#107	<u>G^mC^mCAGGctggTTATGA^mCT^mCA</u>	7150.95	7152.8
#108	<u>G^mC^mCAGG^mCtggTATGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7164.4
#109	<u>G^mC^mCAGG^mCTggttATGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7166.4
#110	<u>G^mC^mCAGG^mCTGgttaTGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7166.4
#111	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGttatGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7166.8
#112	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGTtatgA^mCT^mCA</u>	7164.98	7166.8
#113	<u>G^mC^mCAGgctggTTATGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7165.6
#114	<u>G^mC^mCAGGctggtTATGA^mCT^mCA</u>	7164.98	7165
#115	<u>G^mC^mCAGG^mCtggttATGA^mCT^mCA</u>	7179	7181.6
#116	<u>G^mC^mCAGG^mCTggttaTGA^mCT^mCA</u>	7179	7180.4
#117	<u>G^mC^mCAGG^mCTGgttatGA^mCT^mCA</u>	7179	7181.6
#118	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGttatgA^mCT^mCA</u>	7179	7181.6
#119	<u>G^mC^mCAGgctggTATGA^mCT^mCA</u>	7179	7181.2
#120	<u>G^mC^mCAGGctggttATGA^mCT^mCA</u>	7179	7179.2
#121	<u>G^mC^mCAGG^mCtggttaTGA^mCT^mCA</u>	7193.03	7193.6
#122	<u>G^mC^mCAGG^mCTggttatGA^mCT^mCA</u>	7193.03	7192.8
#123	<u>G^mC^mCAGG^mCTGgttatgA^mCT^mCA</u>	7193.03	7195.2
#124	<u>G^mC^mCAGgctggttATGA^mCT^mCA</u>	7193.03	7195.6
#125	<u>G^mC^mCAGGctggttaTGA^mCT^mCA</u>	7193.03	7194.8
#126	<u>G^mC^mCAGG^mCtggttatGA^mCT^mCA</u>	7207.06	7207.6
#127	<u>G^mC^mCAGG^mCTggttatgA^mCT^mCA</u>	7207.06	7210.4
#128	<u>G^mC^mCAGgctggttaTGA^mCT^mCA</u>	7207.06	7207.2
#129	<u>G^mC^mCAGGctggttatGA^mCT^mCA</u>	7207.06	7209.8
#130	<u>G^mC^mCAGG^mCtggttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7222.8
#131	<u>G^mC^mCAGgctggttatGA^mCT^mCA</u>	7221.08	7223.6
#132	<u>G^mC^mCAGGctggttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7223.2
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	5279.24	5280.9
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	5265.22	5265.3
#133	GAGttacttgc ^m CaA ^m CT	5279.24	5279.7
#134	GAGttacttg ^m CcaA ^m CT	5279.24	5280.6
#135	GAGttacttGccaA ^m CT	5265.22	5265.3
#136	GAGttactTgccaA ^m CT	5265.22	5265.6
#137	GAGttacTtgccaA ^m CT	5265.22	5265.3
#138	GAGtta ^m CttgccaA ^m CT	5279.24	5280
#139	GAGttActtgccaA ^m CT	5265.22	5265.3
#140	GAGtTacttgccaA ^m CT	5265.22	5265.3
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	5265.22	5264.7
对照 2	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	7235.11	7235.6
#131	<u>G^mC^mCAGgctggttatGA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.6
#141	<u>G^mC^mCAGgctggttaTgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7222.8
#142	<u>G^mC^mCAGgctggttAtgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.2
#143	<u>G^mC^mCAGgctggTatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7222
#144	<u>G^mC^mCAGgctggTtatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.6

CMP ID NO	序列	计算质量	测得质量
#145	<u>G^mC^mCAGgctgGttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.6
#146	<u>G^mC^mCAGgctGgttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7220.8
#147	<u>G^mC^mCAGgcTggttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.6
#148	<u>G^mC^mCAGg^mCtggttatgA^mCT^mCA</u>	7235.11	7236
[0489] #132	<u>G^mC^mCAGGctggttatgA^mCT^mCA</u>	7221.08	7221.2
对照 3	<u>GG^mCATatgcagataaTGTT^mC</u>	7230.09	7230
#149	<u>GG^mCATatgcagataATGTT^mC</u>	7216.07	7216
#150	<u>GG^mCATatgcagatAaTGTT^mC</u>	7216.07	7217.2
#151	<u>GG^mCATatgcagaTaaTGTT^mC</u>	7216.07	7217.6
#152	<u>GG^mCATatGcagataaTGTT^mC</u>	7216.07	7217.2
#153	<u>GG^mCATaTgcagataaTGTT^mC</u>	7216.07	7216
#154	<u>GG^mCATAtgcagataaTGTT^mC</u>	7216.07	7216

[0490] 在表1至表6中的序列中：

[0491] **A、G、^mC和T** (粗体) 表示 α -L-苏呋喃糖基 (TNA) 核苷，

[0492] A、G、^mC和T (加下划线) 表示2'-O-MOE核苷，

[0493] A、G、^mC和T表示 β -D-氧基-LNA核苷，并且

[0494] a、g、c和t表示DNA核苷。

[0495] 所有键合均制备为硫代磷酸酯键合。

[0496] 表2中列出了关于表1中的分子的进一步的细节，其中每个合成分子的结构由大分子分层编辑语言 (HELM) 定义 (关于细节，请参见Zhang等人, Chem. Inf. Model. 2012, 52, 10, 2796-2806)。此外，还指示了每个相应合成分子所基于的核碱基序列的SEQ ID NO。使用以下HELM注释图例：

[0497] [LR] (G) 为 β -D-氧基-LNA鸟嘌呤核苷，

[0498] [LR] (T) 为 β -D-氧基-LNA胸腺嘧啶核苷，

[0499] [LR] (A) 为 β -D-氧基-LNA腺嘌呤核苷，

[0500] [LR] ([5meC]) 是 β -D-氧基-LNA 5-甲基胞嘧啶核苷，

[0501] [dR] (G) 为DNA鸟嘌呤核苷，

[0502] [dR] (T) 为DNA胸腺嘧啶核苷，

[0503] [dR] (A) 为DNA腺嘌呤核苷，

[0504] [dR] ([C]) 为DNA胞嘧啶核苷，

[0505] [MOE] ([5meC]) 为2'-O-MOE[2'-O-(2-甲氧基乙基)]5-甲基胞苷核苷

[0506] [MOE] (A) 为2'-O-MOE[2'-O-(2-甲氧基乙基)]腺嘌呤核苷

[0507] [MOE] (T) 为2'-O-MOE[2'-O-(2-甲氧基乙基)]胸腺嘧啶核苷 [MOE] (G) 为2'-O-MOE[2'-O-(2-甲氧基乙基)]鸟嘌呤核苷 [TNA] ([5meC]) 为TNA 5-甲基胞嘧啶核苷 [TNA] (A) 为TNA腺嘌呤核苷 [TNA] (T) 为TNA胸腺嘧啶核苷 [TNA] (G) 为TNA鸟嘌呤核苷 [sP] 是硫代磷酸酯核苷间键合。

[0508] 表2:HELM注释中的合成分子

[0509]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
对照 1	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#1	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[TNA](T)
#2	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#3	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#4	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#5	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#6	1	GAGTTACTTGC	[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)

[0510]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
		CAACT	T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#7	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](T)
#8	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#9	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](T)
#10	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#11	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](T)
#12	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#13	1	GAGTTACTTGC CAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
对照 2	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([

[0511]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			5meC)][sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#14	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[TNA](A)
#15	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#16	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#17	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#18	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5

[0512]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			meC)][sP].[TNA](A)
#19	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#20	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#21	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#22	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#23	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#24	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP]

[0513]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
对照 3	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#25	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA]([5meC])
#26	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#27	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#28	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#29	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP]

[0514]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			[.dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#30	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#31	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#32	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#33	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#34	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])

[0515]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#35	3	GGCATATGCAG ATAATGTTTC	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
对照 4	4	AGAATCTCAGG GTTAT	[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)
#36	4	AGAATCTCAGG GTTAT	[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)
#37	4	AGAATCTCAGG GTTAT	[TNA](A)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)
对照 5	5	ATCGCCTTCAA ATTAT	[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)
#38	5	ATCGCCTTCAA ATTAT	[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)
#39	5	ATCGCCTTCAA ATTAT	[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)
对照 6	6	CACCAAATTGC ACTCG	[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP]

[0516]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			.[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](G)
#40	6	CACCAAATTGC ACTCG	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)
#41	6	CACCAAATTGC ACTCG	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)
#42	6	CACCAAATTGC ACTCG	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)
对照 7	7	CCGTCATGTTTT AGAA	[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)
#43	7	CCGTCATGTTTT AGAA	[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](A)
对照 8	8	CCTTAGTTGGC ATCAA	[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)
#44	8	CCTTAGTTGGC ATCAA	[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](A)
#45	8	CCTTAGTTGGC ATCAA	[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP]

[0517]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](A)
对照 9	9	CGCTTTGTTGTC TCTC	[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])
#46	9	CGCTTTGTTGTC TCTC	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#47	9	CGCTTTGTTGTC TCTC	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
#48	9	CGCTTTGTTGTC TCTC	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])
对照 10	10	CTCAGTTACAC ATCCA	[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)
#49	10	CTCAGTTACAC ATCCA	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#50	10	CTCAGTTACAC ATCCA	[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)

[0518]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
对照 11	11	GGTAGATTCCG TAACT	[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#51	11	GGTAGATTCCG TAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#52	11	GGTAGATTCCG TAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#53	11	GGTAGATTCCG TAACT	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
对照 12	12	GGTTATAGCTT GACAA	[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)
#54	12	GGTTATAGCTT GACAA	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](A)
#55	12	GGTTATAGCTT GACAA	[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](A)
对照 13	13	TCCGTCATGTTT TAGA	[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](A)

[0519]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#56	13	TCCGTCATGTTT TAGA	[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](A)
#57	13	TCCGTCATGTTT TAGA	[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TN A](A)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](A)
对照 14	14	TCCTTAGTTGG CATCA	[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)
#58	14	TCCTTAGTTGG CATCA	[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
#59	14	TCCTTAGTTGG CATCA	[TNA](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[TN A](T)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)
对照 15	15	TTGGCATCAAG GCACT	[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#60	15	TTGGCATCAAG GCACT	[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
#61	15	TTGGCATCAAG GCACT	[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)

[0520]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#62	15	TTGGCATCAAG GCACT	[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)
对照 1	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#63	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#64	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#65	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#66	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#67	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)

[0521]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#68	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#69	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#70	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#71	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#72	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#73	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#74	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)

[0522]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#75	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#76	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#77	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#78	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#79	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#80	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#81	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#82	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[L

[0523]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			R](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#83	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#84	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T))[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[d R](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[s P].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#85	1	GAGTTACTGCC AACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5 meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP] .[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#86	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP]].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR] (A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#87	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR] (C)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[s P].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#88	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR] (A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#89	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T))[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[d R](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5 meC])[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP] .[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#90	1	GAGTTACTGCC AACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[s P].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A

[0524]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#91	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP]].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C))[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP]. [LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#92	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR] (C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP]. [LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#93	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T))[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[d R](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[s P].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A))[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#94	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[s P].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[L R]([5meC])[sP].[LR](T)
#95	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP]].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C))[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[L R]([5meC])[sP].[LR](T)
#96	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T))[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[d R](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[s P].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[L R]([5meC])[sP].[LR](T)
#97	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA] (T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[s P].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR] ([5meC])[sP].[LR](T)
对照 2	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[s P].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](

[0525]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#98	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#99	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#100	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#101	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#102	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#103	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[T

[0526]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			NA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#104	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#105	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#106	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#107	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#108	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)

[0527]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
#109	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#110	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#111	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#112	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#113	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#114	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[M

[0528]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			OE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#115	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#116	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#117	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#118	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#119	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#120	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP]

[0529]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#121	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#122	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#123	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#124	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#125	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#126	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)

[0530]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			5meC)][sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#127	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#128	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#129	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#130	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#131	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]

[0531]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			]([5meC])[sP].[MOE](A)
#132	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
对照 1	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#96	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#133	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#134	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#135	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#136	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#137	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[T

[0532]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			NA)(T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#138	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#139	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#140	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
#97	1	GAGTTACTTGC CAACT	[LR](G)[sP].[LR](A)[sP].[LR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)
对照 2	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#131	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#141	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP]

[0533]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			P].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#142	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#143	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#144	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#145	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#146	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#147	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)

[0534]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			5meC)][sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#148	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[dR](G)[sP].[TNA]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
#132	2	GCCAGGCTGGT TATGACTCA	[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](G)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[MOE](A)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)
对照 3	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#149	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#150	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[M

[0535]

CMP ID NO	SEQ ID NO	碱基序列 5'-3'	HELM
			OE]([5meC])
#151	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#152	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[TNA](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#153	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[dR](A)[sP].[TNA](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])
#154	3	GGCATATGCAG ATAATGTTC	[MOE](G)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE]([5meC])[sP].[MOE](A)[sP].[MOE](T)[sP].[TNA](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](G)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE](T)[sP].[MOE]([5meC])

[0536] 关于HELM的进一步信息以及开源工具可以在互联网地址www.pistoiaalliance.org/helm-tools/和www.pistoiaalliance.org/membership/(两者均于2022年12月2日访问)处找到。

[0537] 实例2:在A549细胞中靶向Malat1 RNA的寡核苷酸在两种不同浓度(5 μ M和25 μ M)下的体外功效

[0538] A549细胞系购自ATCC,并按照供应商的建议保持在37°C和5% CO₂的加湿培育箱中。对于测定,将每孔3000个细胞接种在96多孔板中的完全培养基中。将细胞培育24小时,然后添加溶解在PBS中的寡核苷酸,达所指定的最终浓度。添加寡核苷酸后3天,收获细胞。根据制造商的说明,使用RNeasy 96RNA纯化试剂盒(Qiagen)提取RNA,并在50 μ l水中洗脱。随后将RNA用无DNA酶/RNA酶的水稀释10倍,并加热至90°C持续一分钟。

[0539] 对于基因表达分析,使用qScript™XLT一步法RT-qPCR ToughMix®,Low ROX™(Quantabio)在双工设置中进行一步法RT-qPCR。将以下TaqMan引物测定用于qRT-PCR: MALAT1, Hs00273907_s1 [FAM-MGB]; 和内源性对照GAPDH, Hs99999905_m1 [VIC-MGB-PL]。所

有引物组均购自Thermo Fisher Scientific。相对MALAT1 RNA表达量,也称为敲低(KD)值,计算为相对于对照(PBS处理的细胞)的百分比。

[0540] 结果如表3所示。由“/”分隔的值指示在多于一个测试小瓶中测试化合物或对照时的个别结果。

[0541] 表3-体外功效结果(KD)

[0542]

CMP ID NO	序列	KD (25 μ M) (%)	SD (%)	KD (5 μ M) (%)	SD (%)
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	2012/08/14	0/2/1	21/19/24	1/0/3
#1	GAGttacttgccaA ^m CT	3	0	7	0
#2	GAGttacttgccaA ^m CT	2	0	3	0
#3	GAGttacttgccaA ^m CT	2	0	4	0
#4	GAGttacttgccaA ^m CT	6	1	13	1
#5	GAGttacttgccaA ^m CT	6	0	18	2
#6	GAGttacttgccaA ^m CT	4	0	9	0
#7	GAGttacttgccaA ^m CT	3	0	8	2
#8	GAGttacttgccaA ^m CT	4	0	10	0
#9	GAGttacttgccaA ^m CT	4	0	10	0
#10	GAGttacttgccaA ^m CT	7	0	17	1
#11	GAGttacttgccaA ^m CT	24	1	43	0
#12	GAGttacttgccaA ^m CT	52	1	78	4
#13	GAGttacttgccaA ^m CT	11	1	24	1
对照 2	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	7/7/7	2/0/1	15/13/13	3/2/1
#14	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	8	1	11	0
#15	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	10	0	14	0
#16	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	10	0	15	0
#17	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	14	0	24	1
#18	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	25	3	31	0
#19	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	40	3	39	1
#20	G ^m C ^m CAGgctgggtatgA ^m CT ^m CA	31	2	40	2

[0543]

CMP ID NO	序列	KD (25μM) (%)	SD (%)	KD (5μM) (%)	SD (%)
#21	G^mC^mCAGgctgggtatgA^mCT^mCA	31	1	36	3
#22	G^mC^mCAGgctgggtatgA^mCT^mCA	25	1	36	3
#23	G^mC^mCAGgctgggtatgA^mCT^mCA	21	2	30	1
#24	G^mC^mCAGgctgggtatgA^mCT^mCA	8	1	16	2
对照 3	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	6/7/7	0/0/1	2014/09/ 12	0/1/2
#25	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	7	0	8	0
#26	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	5	0	7	0
#27	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	4	0	5	0
#28	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	5	0	8	1
#29	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	11	0	20	1
#30	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	37	1	68	19
#31	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	40	1	65	2
#32	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	34	4	52	6
#33	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	35	3	55	0
#34	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	6	0	10	1
#35	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	4	0	7	0
对照 4	AGAatctcagggtTAT	4	0	6	1
#36	AGAatctcagggtTAT	11	1	19	4
#37	AGAatctcagggtTAT	28	1	45	2
对照 5	AT^mCgccttcaaTAT	7	0	15	1
#38	AT^mCgccttcaaTAT	26	0	64	5
#39	AT^mCgccttcaaTAT	33	2	55	2
对照 6	^mCA^mCaaattgcacT^mCG	8	3	8	0
#40	^mCA^mCaaattgcacT^mCG	15	3	24	1
#41	^mCA^mCaaattgcacT^mCG	52	6	75	3
#42	^mCA^mCaaattgcacT^mCG	12	1	18	3
对照 7	^mC^mCGtcatgttttaGAA	6	0	5	1
#43	^mC^mCGtcatgttttaGAA	24	1	38	2
对照 8	^mC^mCTagttagcat^mCAA	4	0	6	0
#44	^mC^mCTagttagcat^mCAA	6	0	8	0
#45	^mC^mCTagttagcat^mCAA	12	0	15	1
对照 9	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	8	0	7	0
#46	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	6	0	8	0
#47	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	12	0	15	1
#48	^mCG^mCttgtgtct^mCT^mC	41	1	56	0
对照 10	^mCT^mCagttacacat^mC^mCA	5	0	7	0
#49	^mCT^mCagttacacat^mC^mCA	8	1	23	1
#50	^mCT^mCagttacacat^mC^mCA	30	2	54	2
对照 11	GGTagattccgtaA^mCT	5	1	8	1
#51	GGTagattccgtaA^mCT	3	0	13	6
#52	GGTagattccgtaA^mCT	4	0	8	0
#53	GGTagattccgtaA^mCT	22	0	43	3

[0544]

CMP ID NO	序列	KD (25 μ M) (%)	SD (%)	KD (5 μ M) (%)	SD (%)
对照 12	GGTtatagcttga ^m CAA	3	0	3	0
#54	GGT tatagcttga ^m CAA	6	1	7	1
#55	GGT tatagcttga ^m CAA	23	1	22	2
对照 13	T ^m C ^m CgtcatgttttAGA	5	1	6	2
#56	T^mC^mCgtcatgttttAGA	12	0	20	1
#57	T^mC^mCgtcatgttttAGA	28	2	43	0
对照 14	T ^m C ^m CttagtggcaT ^m CA	4	1	5	0
#58	T^mC^mCttagtggcaT^mCA	19	0	28	3
#59	T^mC^mCttagtggcaT^mCA	47	1	61	74
对照 15	TTGgcatcaaggcA ^m CT	3	0	5	0
#60	TTGgcatcaaggcA^mCT	14	3	23	3
#61	TTGgcatcaaggcA^mCT	22	2	38	0
#62	TTGgcatcaaggcA^mCT	37	5	69	1
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	6	0	15	0
#63	GAGtta ^m CTTG^mC^mCAA^mCT	89	11	98	6
#64	GAGTtac TTG^mC^mCAA^mCT	81	0	101	16
#65	GAGTTact TG^mC^mCAA^mCT	99	2	110	1
#66	GAGTTActt G^mC^mCAA^mCT	90	11	98	2
#67	GAGTTA ^m Cttg^mC^mCAA^mCT	72	1	83	3
#68	GAGTTA ^m CTtgc^mCAA^mCT	65	10	77	1
#69	GAGTTA ^m CTTgccAA^mCT	45	2	69	2
#70	GAGTTA ^m CTTGccaA^mCT	82	3	88	5
#71	GAGttac TTG^mC^mCAA^mCT	103	10	115	11
#72	GAGTtact TG^mC^mCAA^mCT	69	11	92	0
#73	GAGTTactt G^mC^mCAA^mCT	90	10	95	2
#74	GAGTTActtg ^m C^mCAA^mCT	59	11	67	1
#75	GAGTTA ^m Cttgc^mCAA^mCT	42	8	56	5
#76	GAGTTA ^m CTtgccAA^mCT	13	0	23	1
#77	GAGTTA ^m CTTgccaA^mCT	12	0	26	1
#78	GAGttact TG^mC^mCAA^mCT	70	2	92	10
#79	GAGTtactt G^mC^mCAA^mCT	54	0	92	3
#80	GAGTTacttg ^m C^mCAA^mCT	56	14	61	4
#81	GAGTTActtgc ^m CAA^mCT	35	5	54	13
#82	GAGTTA ^m CttgccAA^mCT	10	2	26	2
#83	GAGTTA ^m CTtgccA^mCT	6	1	15	2
#84	GAGttactt G^mC^mCAA^mCT	80	10	91	8
#85	GAGTtacttg ^m C^mCAA^mCT	51	6	68	4
#86	GAGTTacttgc ^m CAA^mCT	26	1	56	1
#87	GAGTTActtgccaA ^m CT	13	2	24	1
#88	GAGTTA ^m CttgccA^mCT	4	0	6	0
#89	GAGttacttg ^m C^mCAA^mCT	56	2	90	8
#90	GAGTtacttg ^m CAA^mCT	22	0	50	8
#91	GAGTTacttgccaA ^m CT	9	1	22	6

[0545]

CMP ID NO	序列	KD (25 μ M) (%)	SD (%)	KD (5 μ M) (%)	SD (%)
#92	GAGTTActtgccaA ^m CT	3	0	6	1
#93	GAGttacttgc ^m CAA ^m CT	35	2	55	4
#94	GAGTtacttgccAA ^m CT	7	0	15	1
#95	GAGTTacttgccaA ^m CT	5	1	7	1
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	12	1	25	6
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	4	0	17	3
对照 2	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	7	1	15	0
#98	G ^m C ^m CAGgctGGTTATGA ^m CT ^m CA	117	5	99	4
#99	G ^m C ^m CAGGctgGTTATGA ^m CT ^m CA	113	2	107	0
#100	G ^m C ^m CAGG ^m CtggTTATGA ^m CT ^m CA	111	1	95	3
#101	G ^m C ^m CAGG ^m CTggtTATGA ^m CT ^m CA	110	8	101	0
#102	G ^m C ^m CAGG ^m CTGggtATGA ^m CT ^m CA	75	10	79	0
#103	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatTGA ^m CT ^m CA	62	4	65	1
#104	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatGA ^m CT ^m CA	118	6	97	14
#105	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTTatgA ^m CT ^m CA	51	2	50	4
#106	G ^m C ^m CAGgctgGTTATGA ^m CT ^m CA	80	3	102	3
#107	G ^m C ^m CAGGctggTTATGA ^m CT ^m CA	66	10	78	4
#108	G ^m C ^m CAGG ^m CtgggtTATGA ^m CT ^m CA	45	0	57	5
#109	G ^m C ^m CAGG ^m CTggttATGA ^m CT ^m CA	47	3	58	2
#110	G ^m C ^m CAGG ^m CTGggttTGA ^m CT ^m CA	35	1	57	4
#111	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatGA ^m CT ^m CA	32	0	50	2
#112	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatgA ^m CT ^m CA	25	0	46	1
#113	G ^m C ^m CAGgctggTTATGA ^m CT ^m CA	77	2	85	6
#114	G ^m C ^m CAGGctgggtTATGA ^m CT ^m CA	54	3	63	5
#115	G ^m C ^m CAGG ^m CtgggttATGA ^m CT ^m CA	41	1	47	0
#116	G ^m C ^m CAGG ^m CTggttTGA ^m CT ^m CA	42	1	51	1
#117	G ^m C ^m CAGG ^m CTGgttatGA ^m CT ^m CA	32	0	38	1
#118	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatgA ^m CT ^m CA	17	1	18	0
#119	G ^m C ^m CAGgctgggtTATGA ^m CT ^m CA	74	7	65	0
#120	G ^m C ^m CAGGctgggttATGA ^m CT ^m CA	44	0	56	0
#121	G ^m C ^m CAGG ^m CtgggttTGA ^m CT ^m CA	26	2	38	5
#122	G ^m C ^m CAGG ^m CTggttatGA ^m CT ^m CA	17	1	27	2
#123	G ^m C ^m CAGG ^m CTGgttatgA ^m CT ^m CA	10	0	14	1
#124	G ^m C ^m CAGgctgggttATGA ^m CT ^m CA	43	8	39	3
#125	G ^m C ^m CAGGctgggttTGA ^m CT ^m CA	27	1	39	6
#126	G ^m C ^m CAGG ^m CtgggttatGA ^m CT ^m CA	14	2	22	4
#127	G ^m C ^m CAGG ^m CTggttatgA ^m CT ^m CA	10	3	19	1
#128	G ^m C ^m CAGgctgggttTGA ^m CT ^m CA	25	2	37	3
#129	G ^m C ^m CAGGctgggttatGA ^m CT ^m CA	12	1	21	0
#130	G ^m C ^m CAGG ^m CtgggttatgA ^m CT ^m CA	5	0	10	0
#131	G ^m C ^m CAGgctgggttatGA ^m CT ^m CA	15	6	16	0
#132	G ^m C ^m CAGGctgggttatgA ^m CT ^m CA	7	0	15	6
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	9	1	20	2
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	12	0	22	0

CMP ID NO	序列	KD (25μM) (%)	SD (%)	KD (5μM) (%)	SD (%)
#133	GAGttacttgc ^m CaA ^m CT	31	0	52	0
#134	GAGttacttg ^m CcaA ^m CT	43	4	58	3
#135	GAGttacttGccaA ^m CT	29	3	34	6
#136	GAGttactTgccaA ^m CT	14	3	31	0
#137	GAGttacTtgccaA ^m CT	18	1	38	3
#138	GAGtta ^m CttgccaA ^m CT	19	0	31	1
#139	GAGttActtgccaA ^m CT	11	1	16	2
#140	GAGtTacttgccaA ^m CT	11	1	24	1
#97	GAGTacttgccaA ^m CT	7	1	13	1
对照 2	G ^m C ^m CAGgctggttatG ^m CT ^m CA	7	1	14	2
#131	G ^m C ^m CAGgctggttatG ^m CT ^m CA	15	3	18	3
#141	G ^m C ^m CAGgctggttaTgA ^m CT ^m CA	17	2	28	2
#142	G ^m C ^m CAGgctggttAtgA ^m CT ^m CA	17	2	23	1
#143	G ^m C ^m CAGgctggtTatgA ^m CT ^m CA	21	4	26	1
#144	G ^m C ^m CAGgctggTtatgA ^m CT ^m CA	11	1	19	0
#145	G ^m C ^m CAGgctgGttatgA ^m CT ^m CA	10	1	14	1
#146	G ^m C ^m CAGgctGgttatgA ^m CT ^m CA	10	0	14	1
#147	G ^m C ^m CAGgcTggttatgA ^m CT ^m CA	14	2	17	1
#148	G ^m C ^m CAGg ^m CtggttatgA ^m CT ^m CA	8	0	16	3
#132	G ^m C ^m CAGGctggttatgA ^m CT ^m CA	8	0	16	1
对照 3	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	7	1	12	1
#149	GG ^m CATatgcagataATGTT ^m C	13	0	17	0
#150	GG ^m CATatgcagatAaTGTT ^m C	16	0	24	0
#151	GG ^m CATatgcagaTaaTGTT ^m C	18	0	23	0
#152	GG ^m CATatGcagataaTGTT ^m C	19	2	27	2
#153	GG ^m CATaTgcagataaTGTT ^m C	8	0	11	0
#154	GG ^m CATAtgcagataaTGTT ^m C	8	1	12	1

[0547] 实例3:在A549细胞中靶向MALAT1 mRNA的寡核苷酸在剂量反应曲线的不同浓度下的体外效力

[0548] A549细胞系购自ATCC,并按照供应商的建议保持在37°C和5% CO₂的加湿培育箱中。对于测定,将每孔3500个细胞(A549)接种在96多孔板中的培养基中。将细胞培养24小时,然后添加溶解在PBS中的寡核苷酸。寡核苷酸的浓度范围:最高浓度25μM,分8步进行1:1稀释。添加寡核苷酸后三天,收获细胞。根据制造商的说明,使用PureLink Pro 96RNA纯化试剂盒(Thermo Fisher Scientific)提取RNA,并在50μl水中洗脱。随后将RNA用无DNA酶/RNA酶的水(Gibco)稀释10倍,并加热至90°C持续一分钟。

[0549] 对于基因表达分析,使用qScriptTMXLT一步法RT-qPCR ToughMix®,Low ROXTM(Quantabio)在双工设置中进行一步法RT-qPCR。将以下TaqMan引物测定用于qPCR: MALAT1、Hs00273907_s1 (FAM-MGB) 与内源对照GAPDH。所有引物组均购自Thermo Fisher Scientific。IC₅₀值已使用GraphPad Prism8基于来自n=2个生物学重复的数据确定。结果如表4所示。

[0550] 表4-体外效力结果(IC₅₀)

[0551]

CMP ID NO	核苷酸序列	IC ₅₀ (N=2) [uM]
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	1.99
#1	G AGttacttgccaA ^m CT	0.55
#2	GAG T tacttgccaA ^m CT	0.17
#3	GAGTtact g ccaA ^m CT	0.28
#4	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.93
#5	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.58
#6	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.26
#7	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.46
#8	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.48
#9	G AGTtacttgccaA ^m CT	0.55
#10	G AGTtacttgccaA ^m CT	1.21
#11	G AGTtacttgccaA ^m CT	4.91
#12	G AGTtacttgccaA ^m CT	9.71
#13	G AGTtacttgccaA ^m CT	1.25
对照 2	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	0.44
#14	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	0.42
#15	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	0.44
#16	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	1.22
#17	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	1.39
#18	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	3.59
#19	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	3.61
#20	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	5.58

[0552]

CMP ID NO	核苷酸序列	IC ₅₀ (N=2) [uM]
#21	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	2.62
#22	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	2.02
#23	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	0.62
#24	G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA	0.21
对照 3	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.29
#25	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.47
#26	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.21
#27	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.18
#28	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.69
#29	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	1.82
#30	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	1.61
#31	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	3.95
#32	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	1.50
#33	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	1.80
#34	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.28
#35	GG^mCATatgcagataaTGTT^mC	0.32
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	1.23
#77	GAGTTA ^m CTTgccaA ^m CT	1.14
#83	GAGTTA ^m CTtgccaA ^m CT	0.64
#88	GAGTTA ^m CttgccaA ^m CT	0.54
#92	GAGTTActtgccaA ^m CT	0.62
#95	GAGTTacttgccaA ^m CT	0.68
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	0.69
#76	GAGTTA ^m CTtgccAA ^m CT	2.39
#82	GAGTTA ^m CttgccAA ^m CT	2.11
#87	GAGTTActtgccAA ^m CT	2.05
#91	GAGTTacttgccAA ^m CT	1.60
#94	GAGTtacttgccAA ^m CT	1.61
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	2.24

[0553]

CMP ID NO	核苷酸序列	IC ₅₀ (N=2) [uM]
对照 2	<u>G^mC^mCAGgctggttatgA^mCT^mCA</u>	0.46
#112	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGTtatgA^mCT^mCA</u>	1.46
#118	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGttatgA^mCT^mCA</u>	0.36
#123	<u>G^mC^mCAGG^mCTGggttatgA^mCT^mCA</u>	0.66
#127	<u>G^mC^mCAGG^mCTggttatgA^mCT^mCA</u>	0.53
#130	<u>G^mC^mCAGG^mCtgggttatgA^mCT^mCA</u>	0.30
#132	<u>G^mC^mCAGGctggttatgA^mCT^mCA</u>	0.54
#131	<u>G^mC^mCAGgctggttatGA^mCT^mCA</u>	0.99

[0554] 实例4:胱天蛋白酶3/7活化

[0555] 将HepG2细胞在含有GlutaMax (Gibco#41090)、补充有10%热灭活胎牛血清的MEM培养基中以约70%汇合度进行培养。使用0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液 (Gibco#25200056) 分离细胞,并以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种到黑色、透明96孔板 (Corning#3904, NY, USA) 中。接种后24h,使用溶解在Opti-MEM (Gibco#31985) 中的100nM寡核苷酸,用Lipofectamine 2000 (Life Technologies#11668019) 瞬时转染HepG2细胞。使用Caspase-Glo®3/7测定 (美国威斯康星州麦迪逊Promega Corporation) 确定Caspase-3/7活性。转染后24小时将重构的Caspase-Glo®3/7试剂添加到细胞中,孵育60分钟,将细胞裂解物转移至不透明96孔板 (美国纽约Corning#3600) 中,然后根据制造商的说明在Enspire多模式读板器 (Perkin Elmer) 上确定发光。结果示于表5中,其中百分比 (测定窗%) 指示基于媒剂 (仅用PBS处理的细胞) 的细胞凋亡程度。该值越高,细胞凋亡活性越高,并且从而体外细胞毒性越高。

[0556] 表5-体外细胞毒性结果

[0557] ASO=反义寡核苷酸

[0558]

CMP ID NO	序列	HepG2 细胞在 100nM ASO 下在 24 h 后的胱天蛋白酶 3/7 活化 (测定窗 %)
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	294
#1	GAG ttacttgccaA ^m CT	5
#2	GAGTtacttgccaA ^m CT	23
#3	GAGTtacttgccaA ^m CT	56
#4	GAG TtacttgccaA ^m CT	1
#5	GAG TtacttgccaA ^m CT	0
#6	GAG TtacttgccaA ^m CT	10
#7	GAG TtacttgccaA ^m CT	23
#8	GAG TtacttgccaA ^m CT	34
#9	GAG TtacttgccaA ^m CT	3
#10	GAG TtacttgccaA ^m CT	7
#11	GAG TtacttgccaA ^m CT	0
#13	GAG TtacttgccaA ^m CT	18
#76	GAGTTA ^m CTtgccAA ^m CT	50
#77	GAGTTA ^m CTTgccaA ^m CT	48
#81	GAGTTActtgc ^m CAA ^m CT	17
#82	GAGTTA ^m CttgccAA ^m CT	12
#83	GAGTTA ^m CTtgccaA ^m CT	30
#86	GAGTTacttgc ^m CAA ^m CT	9
#87	GAGTTActtgccAA ^m CT	6
#88	GAGTTA ^m CttgccaA ^m CT	15
#90	GAGTtacttgc ^m CAA ^m CT	15
#91	GAGTTacttgccAA ^m CT	8

[0559]

CMP ID NO	序列	HepG2 细胞在 100nM ASO 下在 24 h 后的胱天蛋白酶 3/7 活化 (测定窗 %)
#92	GAGTTActtgccaA ^m CT	8
#93	GAGttacttg ^m CAA ^m CT	32
#94	GAGTtacttgccAA ^m CT	6
#95	GAGTTacttgccaA ^m CT	4
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	35
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	12
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	97
#133	GAGttacttg ^m CaA ^m CT	86
#134	GAGttactg ^m CcA ^m CT	105
#135	GAGttacttGccaA ^m CT	138
#136	GAGttactTgccaA ^m CT	73
#137	GAGttacTtgccaA ^m CT	81
#138	GAGtta ^m CttgccaA ^m CT	102
#139	GAGttActtgccaA ^m CT	34
#140	GAGtTacttgccaA ^m CT	34
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	15

[0560] 实例5: 与RNA杂交的含有TNA修饰的寡核苷酸的热解链温度 (T_m)

[0561] 变性点 (热解链温度 = T_m) 根据以下程序来测量:

[0562] 将间隔聚体ASO和互补RNA添加至20mM磷酸二钠缓冲液、200mM NaCl和0.2mM EDTA (pH 7), 产生1.5μM的最终浓度。将样品加热至95℃持续5min, 并且然后历经1小时时间段使其缓慢冷却至室温。使用按5℃/min从25℃增加至95℃, 并且然后降至25℃的温度梯度, 在配备有Peltier温度编程器的Agilent Cary 3500上在260nm处记录热解链曲线。使用两条曲线的一阶导数来确定解链温度 (T_m)。这些值是跨三条加热与冷却曲线的平均值 (报告为值±标准差)。结果如表6所示。

[0563] 表6-热解链温度 (T_m) 结果

[0564]

CMP ID NO	序列	Tm (°C)
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	62.3
#1	GAGttacttgccaA ^m CT	57.2
#2	GAGttacttgccaA ^m CT	55.3
#3	GAGttacttgccaA ^m CT	55.9
#4	GAGttacttgccaA ^m CT	57.9
#5	GAGttacttgccaA ^m CT	54.8
#6	GAGttacttgccaA ^m CT	53.4
#7	GAGttacttgccaA ^m CT	56.0
#8	GAGttacttgccaA ^m CT	52.8
#9	GAGttacttgccaA ^m CT	54.1
#10	GAGttacttgccaA ^m CT	52.8
#11	GAGttacttgccaA ^m CT	49.3
#12	GAGttacttgccaA ^m CT	46.3
#13	GAGttacttgccaA ^m CT	51.5
对照 2	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	71.1
#14	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	67.9
#15	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	66.5
#16	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	65.0
#17	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	63.3
#18	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	62.2
#19	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	59
#20	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	58.3
#21	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	61.3
#22	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	61.8
#23	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	66.7
#24	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	67.8
对照 3	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	59.3
#25	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	55.3
#26	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	52.5
#27	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	51.8
#28	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	49
#29	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	47.7
#30	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	46.9
#31	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	44.3
#32	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	45.7
#33	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	46.0
#34	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	50.5
#35	GG ^m CATatgcagataaTGTT ^m C	56.1
对照 1	GAGttacttgccaA ^m CT	62.3
#63	GAGtta ^m CTTG ^m C ^m CAA ^m CT	62.6
#64	GAGTtacTTG ^m C ^m CAA ^m CT	58.2
#65	GAGTTactTG ^m C ^m CAA ^m CT	60.7
#66	GAGTTActtG ^m C ^m CAA ^m CT	62.3
#67	GAGTTA ^m Cttg ^m C ^m CAA ^m CT	61.6

[0565]

CMP ID NO	序列	Tm (°C)
#68	GAGTTA ^m CTtgc ^m CAA ^m CT	59.5
#69	GAGTTA ^m CTTgccAA ^m CT	59.8
#70	GAGTTA ^m CTTGccaA ^m CT	61.8
#71	GAGTtacTTG ^m C ^m CAA ^m CT	61.8
#72	GAGTtactTG ^m C ^m CAA ^m CT	60.3
#73	GAGTTacttG ^m C ^m CAA ^m CT	60.3
#74	GAGTTActtg ^m C ^m CAA ^m CT	61.0
#75	GAGTTA ^m Cttgc ^m CAA ^m CT	60.1
#76	GAGTTA ^m CTtgccAA ^m CT	59.6
#77	GAGTTA ^m CTTgccA ^m CT	61.1
#78	GAGTtactTG ^m C ^m CAA ^m CT	64.3
#79	GAGTtacttG ^m C ^m CAA ^m CT	59.1
#80	GAGTTacttg ^m C ^m CAA ^m CT	60.0
#81	GAGTTActtg ^m C ^m CAA ^m CT	58.9
#82	GAGTTA ^m CttgccAA ^m CT	58.5
#83	GAGTTA ^m CTtgccaA ^m CT	59.7
#84	GAGTtacttG ^m C ^m CAA ^m CT	62.0
#85	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	58.9
#86	GAGTTacttg ^m C ^m CAA ^m CT	58.4
#87	GAGTTActtgccaAA ^m CT	59.6
#88	GAGTTA ^m CttgccaA ^m CT	60.8
#89	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	61.7
#90	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	56.9
#91	GAGTTacttgccaAA ^m CT	58.0
#92	GAGTTActtgccaA ^m CT	59.5
#93	GAGTtacttg ^m C ^m CAA ^m CT	60.1
#94	GAGTtacttgccaAA ^m CT	57.2
#95	GAGTTacttgccaA ^m CT	58.9
#96	GAGTtacttgccaAA ^m CT	60.9
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	57.6
对照 2	G ^m C ^m CAGgctggttatgA ^m CT ^m CA	71.1
#98	G ^m C ^m CAGgctGGTTATGA ^m CT ^m CA	74.7
#99	G ^m C ^m CAGGctgGTTATGA ^m CT ^m CA	70.3
#100	G ^m C ^m CAGG ^m CtggTTATGA ^m CT ^m CA	71.6
#101	G ^m C ^m CAGG ^m CTggtTATGA ^m CT ^m CA	71.4
#102	G ^m C ^m CAGG ^m CTGgttATGA ^m CT ^m CA	72.8
#103	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGttaTGA ^m CT ^m CA	73.2
#104	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatGA ^m CT ^m CA	71.7
#105	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTTatgA ^m CT ^m CA	70.9
#106	G ^m C ^m CAGgctgGTTATGA ^m CT ^m CA	72.8
#107	G ^m C ^m CAGGctggTTATGA ^m CT ^m CA	70.6
#108	G ^m C ^m CAGG ^m CtggTATGA ^m CT ^m CA	72.6
#109	G ^m C ^m CAGG ^m CTggttATGA ^m CT ^m CA	72.2
#110	G ^m C ^m CAGG ^m CTGgttaTGA ^m CT ^m CA	72.5
#111	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGttatGA ^m CT ^m CA	72.0
#112	G ^m C ^m CAGG ^m CTGGTtatgA ^m CT ^m CA	71.1

CMP ID NO	序列	Tm (°C)
#113	<u>G^mC^mCAGgctggTTATGA^mCT^mCA</u>	72.3
#114	<u>G^mC^mCAGGctgggtTATGA^mCT^mCA</u>	71.3
#115	<u>G^mC^mCAGG^mCtgggttATGA^mCT^mCA</u>	71.1
#116	<u>G^mC^mCAGG^mCTgggttaTGA^mCT^mCA</u>	71.3
#117	<u>G^mC^mCAGG^mCTGgttatGA^mCT^mCA</u>	71.8
#118	<u>G^mC^mCAGG^mCTGGttatgA^mCT^mCA</u>	71.1
#119	<u>G^mC^mCAGgctgggtTATGA^mCT^mCA</u>	73.3
#120	<u>G^mC^mCAGGctgggttATGA^mCT^mCA</u>	69.3
#121	<u>G^mC^mCAGG^mCtgggttaTGA^mCT^mCA</u>	70.9
#122	<u>G^mC^mCAGG^mCTgggttatGA^mCT^mCA</u>	70.6
#123	<u>G^mC^mCAGG^mCTGgttatgA^mCT^mCA</u>	70.4
#124	<u>G^mC^mCAGgctgggttATGA^mCT^mCA</u>	72.4
#125	<u>G^mC^mCAGGctgggttaTGA^mCT^mCA</u>	69.8
#126	<u>G^mC^mCAGG^mCtgggttatGA^mCT^mCA</u>	70.3
[0566] #127	<u>G^mC^mCAGG^mCTgggttatgA^mCT^mCA</u>	68.8
#128	<u>G^mC^mCAGgctgggttaTGA^mCT^mCA</u>	72.3
#129	<u>G^mC^mCAGGctgggttatGA^mCT^mCA</u>	68.9
#130	<u>G^mC^mCAGG^mCtgggttatgA^mCT^mCA</u>	69.2
#131	<u>G^mC^mCAGgctgggttatGA^mCT^mCA</u>	71.4
#132	<u>G^mC^mCAGGctgggttatgA^mCT^mCA</u>	68.5
#96	GAGttacttgccAA ^m CT	60.8
#133	GAGttacttgc ^m CaA ^m CT	60.6
#134	GAGttacttg ^m CcaA ^m CT	60.3
#135	GAGttacttGccaA ^m CT	61.7
#136	GAGttactTgccaA ^m CT	60.3
#137	GAGttacTtgccaA ^m CT	59.1
#138	GAGtta ^m CttgccaA ^m CT	60.3
#139	GAGttActtgccaA ^m CT	62.0
#140	GAGtTacttgccaA ^m CT	59.4
#97	GAGTtacttgccaA ^m CT	57.6

[0567] 参考文献列表

[0568] Crooke等人,Nucleic Acids Research 2020;48(10):5235-5253.DOI:10.1093/nar/gkaa299

[0569] Eckstein,Antisense and Nucleic Acid Drug Development 2009;10:117-121。DOI:10.1089/oli.1.2000.10.117.

[0570] Liu等人,ACS Appl.Mater.Interfaces 2018;10:9736-9743.DOI:10.1021/acsami.8b01180

[0571] Matsuda等人,Poster;XXIII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids;2018年8月.DOI:10.13140/RG.2.2.10627.45605

[0572] WO 2012/078536(Quark Pharmaceuticals,Inc.)

[0573] WO 2012/118911(Quark Pharmaceuticals,Inc.)

[0574] WO 2013/179292 A1(QBI Enterprises Ltd.和Bio-Lab Ltd.)

[0575] Zhang和Chaput,“Synthesis of Threose Nucleic Acid(TNA)Phosphoramidite

Monomers and Oligonucleotide Polymers, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 4.51.1-4.51.26, 2012”。