



(21) 申请号 201780015898.1

(22) 申请日 2017.02.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108779463 A

(43) 申请公布日 2018.11.09

(30) 优先权数据
62/290,298 2016.02.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2017/000166 2017.02.01

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/134525 EN 2017.08.10

(73) 专利权人 奥利克斯医药有限公司
地址 韩国京畿道

(72) 发明人 D·K·李 S·W·弘 H·李
D·于 J·严

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理
事务所(普通合伙) 11269
专利代理师 甘玲 缪策

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101970660 A, 2011.02.09

US 2015184163 A1, 2015.07.02

Chang Chanil等.《The design, preparation, and evaluation of asymmetric small interfering RNA for specific gene silencing in mammalian cells》.《Methods in molecular biology》.2013,第942卷第135-52页.

Chang Chan Il等.《Asymmetric Shorter-duplex siRNA Structures Trigger Efficient Gene Silencing With Reduced Nonspecific Effects》.《MOLECULAR THERAPY》.2009,第17卷(第4期),第725-732页.

Lee Sang Eun等.《Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis》.《YONSEI MEDICAL JOURNAL》.2010,第51卷(第6期),第808-822页.

Liu Chunyi等.《Human airway trypsin-like protease induces mucin5AC hypersecretion via a protease-activated receptor 2-mediated pathway in human airway epithelial cells》.《ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS》.2013,第535卷(第2期),第234-240页.

审查员 王斯奇

权利要求书4页 说明书41页 附图39页

(54) 发明名称

使用靶向IL4R α 、TRPA1或F2RL1的RNA复合物治疗特应性皮炎和哮喘

(57) 摘要

在某些方面,本文提供RNA复合物(例如,不对称RNA复合物,如asiRNA或细胞穿透asiRNA),所述RNA复合物抑制IL4R α 、TRPA1和/或F2RL1表达,并且因此对于治疗特应性皮炎或哮喘是有用的。

1. 一种RNA复合物,所述RNA复合物包括与F2RL1 mRNA序列互补的长度为19至21个核苷酸(nt)的反义链和与所述反义链的序列互补的长度为16或17nt的有义链,其中所述反义链和所述有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端和所述有义链的3'端形成平端,并且其中所述有义链包括SEQ ID NO:420的序列:

SEQ ID NO:420 (序列(5' → 3')) :CUGACCUCCU CUCUGU。

2. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链的长度为19nt。

3. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链的长度为20nt。

4. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链的长度为21nt。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的RNA复合物,其中所述有义链的长度为16nt。

6. 如权利要求1至4中任一项所述的RNA复合物,其中所述有义链的长度为17nt。

7. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述有义链是选自下表中列出的有义链序列的序列:

编号	序列(5' → 3')
1	mCUmGAmCCmUCmCmCmC*U*mG*U*胆甾醇
2	mCUmGAmCCmUCmCmCmCmC*U*mG*U*胆甾醇

其中m代表2'-O-甲基RNA,并且*代表硫代磷酸酯键。

8. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链是选自下表中列出的反义链序列的序列:

编号	序列(5' → 3')
1	ACAGAGAGGAGGUCmAmGC*C*A*A*G
2	ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*A*A*G
3	ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*mA*mA*mG
4	ACAGAGAGGAGGUCmA*mG*mC*mC*A

其中m代表2'-O-甲基RNA,并且*代表硫代磷酸酯键。

9. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物能够抑制细胞F2RL1表达。

10. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述细胞是上皮细胞。

11. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述细胞是角质形成细胞。

12. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述细胞是肺泡细胞。

13. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述细胞是A549细胞。

14. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链是SEQ ID NO:421的序列:

SEQ ID NO:421 (序列(5' → 3')) :ACAGAGAGGA GGUCAGCCAA G。

15. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括化学修饰。

16. 如权利要求15所述的RNA复合物,其中所述化学修饰为2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或疏水部分。

17. 如权利要求16所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括疏水部分。

18. 如权利要求17所述的RNA复合物,其中所述疏水部分为胆甾醇部分。

19. 如权利要求18所述的RNA复合物,其中所述胆甾醇部分被附连至所述有义链的3'末端。

20. 如权利要求15所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括2'-O-甲基化核苷。

21. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述2'-O-甲基化核苷被定位于所述有义链的3'末端。

22. 如权利要求21所述的RNA复合物,其中所述有义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷。

23. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述2'-O-甲基化核苷被定位于所述反义链的3'末端。

24. 如权利要求23所述的RNA复合物,其中所述反义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷。

25. 如权利要求24所述的RNA复合物,其中2'-O-甲基化核苷被定位于所述有义链的所述3'末端和所述反义链的3'末端。

26. 如权利要求25所述的RNA复合物,其中所述有义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷,并且所述反义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷。

27. 如权利要求15所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括硫代磷酸酯键。

28. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%为硫代磷酸酯键。

29. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少50%为硫代磷酸酯键。

30. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少75%为硫代磷酸酯键。

31. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键全部都为硫代磷酸酯键。

32. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%为硫代磷酸酯键。

33. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少50%为硫代磷酸酯键。

34. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少75%为硫代磷酸酯键。

35. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的核糖核苷酸之间的键全部都为硫代磷酸酯键。

36. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述有义链和所述反义链选自下表:

编号	序列 (5'→3')
1	mCUmGAmCCmUCmCUmCUmC*U*mG*U*胆甾醇
2	mCUmGAmCCmUCmCUmCUmCU*mG*U*胆甾醇
3	ACAGAGAGGAGGUCmAmGC*C*A*A*G
4	ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*A*A*G
5	ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*mA*mA*mG

6	ACAGAGAGGAGGUCmA*mG*mC*mC*A
其中 m 代表 2'-O-甲基 RNA, 并且*代表硫代磷酸酯键;	

并且所述有义链和所述反义链的组合选自:编号1的有义链和编号3至6的反义链的组合、或者编号2的有义链和编号4或编号6的反义链的组合。

37. 如权利要求27所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物能够在不存在递送运载体的情况下穿透细胞的细胞膜。

38. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物不是细胞毒性的。

39. 如权利要求1至38中任一项所述的RNA复合物在制造用于抑制细胞F2RL1表达的药物中的应用,所述抑制包括使所述细胞与如权利要求1至38中任一项所述的RNA复合物接触。

40. 如权利要求39所述的应用,其中所述细胞是A549、上皮细胞或角质形成细胞。

41. 如权利要求39所述的应用,其中所述细胞存在于人受试者的皮肤或呼吸道中。

42. 如权利要求1至38中任一项所述的RNA复合物在制造用于在受试者中治疗特应性皮炎或哮喘的药物中的应用,所述治疗包括向所述受试者施用如权利要求1至41中任一项所述的RNA复合物。

43. 如权利要求42所述的应用,所述治疗包括向所述受试者的皮肤施用所述RNA复合物。

44. 如权利要求42所述的应用,所述治疗包括向所述受试者的呼吸道施用所述RNA复合物。

45. 如权利要求42所述的应用,其中所述RNA复合物被静脉内施用。

46. 如权利要求42所述的应用,其中所述RNA复合物被肠胃外施用。

47. 如权利要求42所述的应用,其中所述RNA复合物被局部施用。

48. 如权利要求42所述的应用,其中所述RNA复合物通过吸入被施用。

49. 一种药物组合物,所述药物组合物包括如权利要求1至38中任一项所述的RNA复合物和药学上可接受的载体。

50. 如权利要求49所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于吸入。

51. 如权利要求49所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于吸入剂。

52. 如权利要求49所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于局部施用。

53. 如权利要求49所述的药物组合物,其中所述药物组合物是乳膏或洗剂。

54. 如权利要求49所述的药物组合物在制造用于在受试者中治疗特应性皮炎或哮喘的药物中的应用,所述治疗包括向所述受试者施用如权利要求49所述的药物组合物。

55. 如权利要求54所述的应用,其中所述受试者患有特应性皮炎。

56. 如权利要求54所述的应用,其中所述受试者患有哮喘。

57. 如权利要求54所述的应用,所述治疗包括向所述受试者的呼吸道施用所述药物组合物。

58. 如权利要求57所述的应用,其中所述药物组合物在吸入剂中。

59. 如权利要求54所述的应用,所述治疗包括向所述受试者的皮肤施用所述药物组合物。

60. 如权利要求59所述的应用,其中所述药物组合物是乳膏或洗剂。
61. 如权利要求54所述的应用,所述治疗包括肠胃外或静脉内施用所述药物组合物。
62. 如权利要求54所述的应用,所述治疗包括口服施用所述药物组合物。
63. 如权利要求54所述的应用,其中所述受试者自我施用所述药物组合物。
64. 如权利要求54所述的应用,所述治疗还包括施用用于治疗特应性皮炎的第二药剂。
65. 如权利要求54所述的应用,所述治疗还包括施用用于治疗哮喘的第二药剂。
66. 如权利要求64所述的应用,其中所述第二药剂是类固醇或免疫调节剂。

使用靶向IL4R α 、TRPA1或F2RL1的RNA复合物治疗特应性皮炎和哮喘

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2016年2月2日提交的美国临时专利申请序列号62/290,298的优先权权益,其通过引用被整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 免疫系统的调节异常可以造成自身免疫疾病,如特应性皮炎和哮喘。特应性皮炎(也称为湿疹)是一种炎性疾病,其特征存在于存在发痒的且敏感的皮肤、水肿和红斑。尽管特应性皮炎可以在任何年龄发生,但该疾病常见于儿童和婴儿中。

[0005] 约70%的特应性皮炎患者通过“特应性进程(atopic march)”发展哮喘,其特征在于特应性皮炎至哮喘和过敏性鼻炎的进展。哮喘是一种呼吸障碍,其也与免疫系统的调节异常有关。更具体地,它是一种慢性呼吸疾病,其特点是因支气管的过敏性炎症而产生的呼吸痉挛和呼吸阻塞,引起反复性呼吸短促、喘气和咳嗽。全世界哮喘患病率被估计为高达3亿个体,并且约8%的主要发达国家的人口患有哮喘。

[0006] IL4R α 、F2RL1和TRPA1基因在特应性皮炎和/或哮喘的症状的发作和进展中发挥关键作用。当暴露于外来抗原时,特应性皮炎患者中的树突细胞激活Th2细胞,导致激活的Th2细胞分泌细胞因子(例如,IL-4、IL-5、IL-10和IL-13)。在细胞因子中,已知IL-4和IL-13在特应性皮炎的发作中发挥重要作用,而IL-4和IL-13已经被报道通过抑制人 β 防卫素-3和丝聚蛋白(两者都维持皮肤屏障)使特应性皮炎症状恶化。IL-4和IL-13的受体是异二聚体,并且含有IL4R α (白介素4受体, α ,也称为IL4R α)。因此,IL4R α 的下调可以阻断IL-4和IL-13的信号。

[0007] 特应性皮炎患者所经历的瘙痒症状的主要原因是角质形成细胞中胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)的过度表达,其提高了TRP离子通道(包含TRPV1和TRPA1)的瞬时受体电位(TRP)。因此,特应性皮炎的症状可以通过抑制TRPA1被治疗。

[0008] 凝血因子II(凝血酶)受体样1(F2RL1,也称为蛋白酶激活受体2,PAR2)由皮肤中的角质形成细胞、激活的内皮细胞和感觉神经表达,并且参与各种各样的炎症反应、色素沉着产生和皮肤屏障功能。F2RL1在蛋白酶的激活中发挥关键性作用,其诱导特应性皮炎患者中可见的炎症反应和加重的皮肤病况。

[0009] 因此,存在对于用于治疗特应性皮炎或哮喘的靶向IL4R α 、TRPA1和F2RL1的新的和改进的治疗剂的需要。

[0010] 概述

[0011] 在某些方面,本文提供RNA复合物,所述RNA复合物靶向IL4R α 、TRPA1或F2RL1,并且对于治疗和/或预防特应性皮炎和/或哮喘是有用的。在某些方面,本文提供包括这样的RNA复合物的药物组合物和使用这样的RNA复合物和药物组合物的方法。

[0012] 在某些方面,本文提供RNA复合物,所述RNA复合物包括反义链和有义链,所述反义链具有与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列的序列互补性,所述有义链具有与反义链的序列互补性。在一些实施方案中,RNA复合物能够抑制细胞(例如,角质形成细胞)IL4R α 、TRPA1或

F2RL1表达。在一些实施方案中, RNA复合物是不对称较短双链体小干扰RNA (asymmetric shorter-duplex small interfering RNA) (asiRNA)。在一些实施方案中, RNA复合物是表1、表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9或表10中列出的RNA复合物。在一些实施方案中, RNA复合物包括IL4RA#5的反义链和有义链。在一些实施方案中, RNA复合物包括TRPA1#81的反义链和有义链。在一些实施方案中, RNA复合物包括F2RL1#22的反义链和有义链。

[0013] 在一些实施方案中, 本文提供的RNA复合物包括化学修饰, 其中在不存在递送运载体的情况下, 修饰便利穿透细胞膜。在一些实施方案中, 修饰是2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或疏水部分。在一些实施方案中, 本文提供的RNA复合物包括疏水部分。在一些实施方案中, 疏水部分可以是具有疏水特性的任何化学结构。例如, 在一些实施方案中, 疏水部分是脂类、亲脂性肽和/或亲脂性蛋白质。在一些实施方案中, 疏水部分是脂类, 如胆甾醇、生育酚、或具有10个或更多个碳原子的长链脂肪酸(例如, 硬脂酸或棕榈酸)。在一些实施方案中, 疏水部分是胆甾醇。在一些实施方案中, RNA复合物是表2、表3、表5、表6、表8、表9或表10中列出的经修饰的RNA复合物。在某些实施方案中, RNA复合物不是细胞毒性的。

[0014] 在某些方面, 本文提供包括本文提供的RNA复合物和药学上可接受的载体的药物组合物。在某些实施方案中, 药物组合物被配制用于局部递送。在一些实施方案中, 药物组合物是乳膏或洗剂。在一些实施方案中, 药物组合物被配制用于肠胃外递送、静脉内递送或口服递送。在其他实施方案中, 药物组合物被配制用于吸入。

[0015] 在某些方面, 本文提供抑制细胞IL4R α 、TRPA1或F2RL1表达的方法, 所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。

[0016] 在某些方面, 本文提供在人受试者中抑制基因表达IL4R α 、TRPA1或F2RL1的方法, 所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。在某些方面, 本文提供治疗人受试者的特应性皮炎和/或哮喘的方法, 所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。

[0017] 附图的简要说明

[0018] 图1示出靶向IL4R α 的73种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0019] 图2示出靶向IL4R α 的15种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0020] 图3示出靶向IL4R α 的2种示例性asiRNA的基因沉默效应。

[0021] 图4示出示例性IL4R α -靶向细胞穿透asiRNA (IL4R α cp-asiRNA) 的基因沉默效率, 各种各样的化学修饰已经被应用于所述IL4R α -靶向细胞穿透asiRNA。

[0022] 图5示出示例性cp-asiRNA的IL4R α 蛋白表达的抑制。

[0023] 图6示出不同反义链长度(19或21个核苷酸)的4种cp-asiRNA的基因沉默效率。

[0024] 图7示出4种示例性cp-asiRNA的IL4R α 蛋白表达的抑制。

[0025] 图8提供人IL4R α mRNA序列。

[0026] 图9示出靶向TRPA1的102种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0027] 图10示出靶向TRPA1的14种示例性asiRNA的基因沉默效应。

[0028] 图11示出靶向TRPA1的14种示例性asiRNA的TRPA1蛋白表达的抑制。

[0029] 图12示出示例性TRPA1-靶向细胞穿透asiRNA (TRPA1cp-asiRNA) 的基因沉默效率, 各种各样的化学修饰已经被应用于所述TRPA1-靶向细胞穿透asiRNA。

[0030] 图13示出示例性cp-asiRNA的TRPA1蛋白表达的抑制。

[0031] 图14示出不同反义链长度(19或21个核苷酸)和不同有义链化学修饰(3或4个硫代磷酸酯键)的8种cp-asiRNA的基因沉默效率。

[0032] 图15示出8种示例性cp-asiRNA的TRPA1蛋白表达的抑制。

[0033] 图16示出4种示例性cp-asiRNA的TRPA1蛋白表达的抑制。在不存在转染试剂的情况下,将A549细胞与1 μ M和3 μ M的cp-asiRNA孵育。

[0034] 图17提供人TRPA1 mRNA序列。

[0035] 图18示出靶向F2RL1的100种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0036] 图19示出靶向F2RL1的29种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0037] 图20示出含有2'-O-甲基化修饰的32种示例性asiRNA的基因沉默效率。

[0038] 图21示出靶向F2RL1的12种示例性asiRNA的基因沉默效应。

[0039] 图22示出靶向F2RL1的12种示例性asiRNA的F2RL1蛋白表达的抑制。

[0040] 图23示出示例性F2RL1-靶向细胞穿透asiRNA(cp-asiRNA或cp-asiF2RL1)的基因沉默效率,各种各样的化学修饰已经被应用于所述F2RL1-靶向细胞穿透asiRNA。

[0041] 图24示出示例性cp-asiRNA的F2RL1 mRNA表达的抑制。

[0042] 图25示出示例性cp-asiRNA的F2RL1蛋白表达的抑制。

[0043] 图26示出不同反义链长度(19或21个核苷酸)的8种cp-asiRNA的基因沉默效率。

[0044] 图27示出8种示例性cp-asiRNA的F2RL1蛋白表达的抑制。

[0045] 图28示出人F2RL1的mRNA序列。

[0046] 图29示出特应性皮炎的诱导模型中cp-asiRNA治疗的实验时间线。

[0047] 图30示出在粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)体提取物(Df)乳膏处理的样品中观察到的搔抓时间。

[0048] 图31示出在特应性皮炎的啮齿动物中皮内注射与乳膏cp-asiRNA应用的比较。

[0049] 图32示出特应性皮炎的啮齿动物模型的皮肤切片的H&E染色和通过分析皮肤切片图像的定量的表皮面积。

[0050] 图33示出经处理的皮肤区的肥大细胞浸润分析。

[0051] 详细说明

[0052] 综述

[0053] 在某些方面,本文提供不对称RNA复合物(例如,asiRNA或cp-asiRNA),所述不对称RNA复合物抑制IL4R α 、TRPA1和/或F2RL1表达,并且因此对于特应性皮炎和/或哮喘的治疗是有用的。在一些实施方案中,RNA复合物被化学修饰以能够在不需要转染运载体的情况下穿透细胞。在一些实施方案中,RNA复合物为表1、表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9或表10中列出的RNA复合物。在某些方面,本文提供包括这样的RNA复合物的药物组合物,和使用这样的RNA复合物和药物组合物的方法。

[0054] 在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物是asiRNA或cp-asiRNA。如本文所使用的,术语asiRNA指双链不对称短干扰RNA分子,所述双链不对称短干扰RNA分子具有19-21nt的反义链和13-17nt的有义链。asiRNA上的附加的信息可以在美国专利公布号2012/0238017和Chang et al.,*Mol. Ther.* 17:725-732(2009)中找到,其中的每个以引用的方式被整体并入本文。

[0055] 在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物使用递送运载体(如脂质体、阳离子

聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)被递送至细胞。在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物被化学修饰以便不需要使用这样的递送运载体介导细胞中的IL4R α 、TRPA1和/或F2RL1抑制。这样的RNA复合物在本文中被称为细胞穿透asiRNA(cp-asiRNA)。

[0056] 定义

[0057] 为了方便起见,此处收集了说明书、实施例和所附权利要求中采用的某些术语。

[0058] 本文中使用的冠词“一(a)”和“一(an)”指所述冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法对象。举例来说,“一要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0059] 如本文所使用的,术语“施用”意指向受试者提供药剂或药物组合物,并且包含,但不限于由医疗技术人员施用和自我施用。

[0060] 如本文所使用的,术语“免疫调节剂”指弱化、刺激或以另外的方式调节免疫系统的化合物或组合物。实例包含但不限于白三烯受体激动剂、免疫抑制剂(例如,FK-506)或细胞因子。

[0061] 如本文所使用的,术语“干扰核酸”和“抑制核酸”可互换地被使用。干扰核酸通常包含环状亚基的序列,每个具有碱基配对部分,通过亚基间连锁连接,所述亚基间连锁允许碱基配对部分与核酸(通常RNA)中的靶标序列通过Watson-Crick碱基配对杂交,以形成核酸:靶标序列内的寡聚体异源双链体。干扰RNA分子包含,但不限于,反义分子、siRNA分子、asiRNA分子、cp-asiRNA分子、单链siRNA分子、miRNA分子和shRNA分子。这样的干扰核酸可以被设计以阻断或抑制mRNA的翻译或抑制天然前体mRNA拼接加工,或诱导被靶向的mRNA的降解,并且可以被称作“被指向”或“被靶向针对”靶标序列,所述干扰核酸与所述靶标序列杂交。干扰核酸可以包含,例如,肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、2'-O-甲基寡核苷酸和RNA干扰剂(siRNA剂)。RNAi分子通常通过与靶标分子形成异源双链体起作用,所述靶标分子被选择性地降解或“解体”,由此使靶标RNA失活。在一些情况下,干扰RNA分子也可以通过抑制转录本翻译和/或抑制转录本的转录使靶标转录本失活。当干扰核酸以上文所描述的方式靶向针对靶标的核酸时,干扰核酸更普遍地被称作“被靶向针对”生物学相关的靶标(如蛋白质)。

[0062] 术语“多核苷酸”和“核酸”可互换地被使用。它们指核苷酸的聚合体形式,不论任何组合和任何长度的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码区或非编码区、由连锁分析确定的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、支化多核苷酸、质粒、载体(vector)、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,对核苷酸结构的修饰可以在聚合物的组装之前或之后被赋予。多核苷酸可以被进一步修饰,如通过与标记组件偶联。在本文提供的全部核酸序列中,U核碱基与T核碱基是可互换的。

[0063] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的材料、组合物或运载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂封装材料。

[0064] 如果寡聚体在生理条件下与靶标杂交,则寡核苷酸与靶标多核苷酸“特异性杂交”,并且T_m大幅度大于45℃,或至少50℃,或至少60℃-80℃或更高。这样的杂交对应于严

格的杂交条件。在给定的离子强度和pH, T_m 是温度, 在所述温度下, 50%的靶标序列与互补多核苷酸杂交。此外, 这样的杂交可以以反义寡聚物与靶标序列的“近似的”或“大体上的”互补以及精确的互补发生。

[0065] 如本文所使用的, 术语“受试者”意为被选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0066] 如本文所使用的, 短语“治疗有效的量”和“有效量”意为对于以适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比率在受试者中的至少亚群体的细胞中产生期望的治疗效果是有效的药剂的量。

[0067] “治疗”受试者中的疾病或“治疗”患有疾病的受试者指使受试者经受药物治疗(例如, 药物的施用), 使得疾病的至少一种症状被减轻或防止恶化。

[0068] 如本文所使用的, “预防”紊乱或病况的治疗剂指化合物, 当在紊乱或病况发作之前被施用至统计样品时, 相对于未经处理的对照样品, 所述化合物降低经处理的样品中的紊乱或病况的发生, 或相对于未经处理的对照样品, 所述化合物延迟紊乱或病况的一种或更多种症状的发作或降低紊乱或病况的一种或更多种症状的严重度。

[0069] RNA复合物

[0070] 在某些方面, 本文提供RNA复合物, 所述RNA复合物分别靶向IL4R α 、TRPA1和/或F2RL1 mRNA并且分别抑制细胞IL4R α 、TRPA1和/或F2RL1表达。人IL4R α 、TRPA1和F2RL1 mRNA的核酸序列分别在图8、图17和图28中被提供。

[0071] 在某些方面, 本文提供一种包括反义链和有义链的RNA复合物, 所述反义链具有与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列(例如, 人IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列)的序列互补性, 所述有义链具有与反义链的序列互补性。在一些实施方案中, RNA复合物能够抑制细胞IL4R α 、TRPA1或F2RL1表达。在一些实施方案中, RNA复合物是不对称较短双链体小干扰RNA(asRNA)。在一些实施方案中, RNA复合物是表1、表2、表3、表4、表5、表6、表8或表10中列出的RNA复合物。本文所描述的RNA复合物可以含有RNA碱基、非RNA碱基或RNA碱基和非RNA碱基的混合物。例如, 本文提供的某些RNA复合物可以主要由RNA碱基组成, 但是也含有DNA碱基或非天然存在的核苷酸。

[0072] 在一些实施方案中, 反义链的长度为至少19个核苷酸(nt)。在一些实施方案中, 反义链的长度为19至21nt(即, 长度为19、20或21nt)。在一些实施方案中, 反义链的至少13、14、15、16、17、18、19、20或21nt与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列互补。完美的互补性不是必需的。在一些实施方案中, 反义链与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列完美地互补。

[0073] 在一些实施方案中, 反义链的长度为至少24nt(例如, 长度为至少25nt、长度为至少26nt、长度为至少27nt、长度为至少28nt、长度为至少29nt、长度为至少30nt或长度为至少31nt)。在一些实施方案中, 反义链的长度不大于124nt(例如, 长度不大于100nt、长度不大于90nt、长度不大于80nt、长度不大于70nt、长度不大于60nt、长度不大于50nt或长度不大于40nt)。在一些实施方案中, 反义链的长度为31nt。在一些实施方案中, 反义链的至少16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、29、30或31nt与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列互补。完美的互补性不是必需的。在一些实施方案中, 反义链与IL4R α 、TRPA1或F2RL1 mRNA序列完美地互补。

[0074] 在一些实施方案中, 有义链的长度为15至17nt(即, 长度为15nt、长度为16nt或长度为17nt)。在一些实施方案中, 有义链的至少15nt、至少16nt或至少17nt与反义链的序列

互补。在一些实施方案中,有义链与反义链的序列完美地互补。

[0075] 在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端和所述有义链的3'端形成平端。在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端悬突于所述有义链的3'端(例如,通过1、2、3、4、或5nt)。在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述有义链的5'端悬突于所述反义链的3'端(例如,通过1、2、3、4、或5nt)。

[0076] 在一些实施方案中,RNA复合物的反义链和/或有义链具有选自表1、表2、表3、表4、表5、表6、表8或表10中列出的序列的有义链序列和/或反义链序列。

[0077] 在一些实施方案中,本文提供的RNA复合物包括化学修饰,其中所述修饰便利在不存在递送运载体的情况下穿透细胞膜。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或疏水部分。在一些实施方案中,化学修饰是疏水部分。在一些实施方案中,疏水部分是胆甾醇部分。在一些实施方案中,RNA复合物是表2、表3、表5、表6、表8、表9或表10中列出的经修饰的RNA复合物。在某些实施方案中,RNA复合物不是细胞毒性的。

[0078] 本文所描述的RNA复合物可以采用各种各样的寡核苷酸化学成分。寡核苷酸化学成分的实例包含(不限于)肽核酸(PNA)、联核酸(LNA)、硫代磷酸酯、2'-O-Me-修饰的寡核苷酸和吗啉代化学成分,包含前述中任何的组合。通常,由于相对于2'-O-Me寡核苷酸,PNA化学成分的相对高的靶标结合强度,其可以利用较短的靶标序列。硫代磷酸酯和2'-O-Me-修饰的化学成分经常被结合以生成2'-O-Me-修饰的寡核苷酸,所述2'-O-Me-修饰的寡核苷酸具有硫代磷酸酯主链。参见,例如,PCT公布号W0/2013/112053和W0/2009/008725,其中的每个以引用方式被整体并入本文。

[0079] 肽核酸(PNA)是DNA的类似物,其中主链与脱氧核糖主链在结构上是同形的,由N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元组成,嘧啶或嘌呤碱基被附连到所述N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元。含有天然嘧啶和嘌呤碱基的PNA遵从Watson-Crick碱基配对规则与互补寡核苷酸杂交,并且根据碱基对识别模拟DNA。PNA的主链由肽键而不是硫代磷酸酯键形成,使其非常适合反义应用(参见以下结构)。主链是不带电荷的,引起PNA/DNA或PNA/RNA双链体显示出大于正常的热稳定性。PNA不能被核酸酶或蛋白酶识别。

[0080] 尽管天然结构发生彻底的结构变化,但是PNA能够以螺旋形式与DNA或RNA序列特异性结合。PNA的特性包含对互补DNA或RNA的高的结合亲和力、由单碱基错配引起的失稳作用、对核酸酶和蛋白酶的耐受性、不依赖于盐浓度与DNA或RNA的杂交以及与同型嘌呤DNA形成三股螺旋。PANAGENE.TM.已经开发了其专利的Bts PNA单体(Bts;苯并噻唑-2-磺酰基团)和专利的寡聚工艺。使用Bts PNA单体的PNA寡聚由脱保护、偶联和加帽的重复循环组成。PNA可以使用任何本领域已知的技术被合成生产。参见,例如,美国专利号6,969,766、7,211,668、7,022,851、7,125,994、7,145,006和7,179,896。也参见用于PNA制备的美国专利号5,539,082;5,714,331;以及5,719,262。PNA化合物的进一步教导可以在Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991中找到。前述中的每个通过引用被整体并入本文。

[0081] 干扰核酸也可以含有“锁核酸”亚基(LNAs)。“LNAs”是被称为桥接核酸(BNA)的一类修饰的成员。BNA的特征在于共价键,所述共价键锁定了C3'-内(北)糖折叠中的核糖环的构象。对于LNA,桥由2'-O和4'-C位置之间的亚甲基组成。LNA增强主链预组织和碱基堆积以增加杂交和热稳定性。

[0082] LNA的结构可以在例如Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607和Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401以及Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230中找到。本文提供的化合物可以并入一种或更多种LNA; 在一些情况下, 化合物可以完全由LNA组成。用于个体LNA核苷亚基的合成及其并入寡核苷酸的方法在例如美国专利号7,572,582、7,569,575、7,084,125、7,060,809、7,053,207、7,034,133、6,794,499和6,670,461中被描述, 其中的每个通过引用被整体并入本文。典型的亚基间连接体包含磷酸二酯和硫代磷酸酯部分; 可替代地, 可以采用不含磷的连接体。一个实施方案是含LNA化合物, 其中每个LNA亚基被DNA亚基分开。某些化合物由交替的LNA和DNA亚基组成, 其中亚基间连接体是硫代磷酸酯。

[0083] 在某些实施方案中, RNA复合物被连接至胆甾醇部分。在一些实施方案中, 胆甾醇部分被附连至有义链的3' 末端。在一些实施方案中, 胆甾醇部分被附连至反义链的3' 末端。在一些实施方案中, 胆甾醇部分被附连至有义链的5' 末端。在一些实施方案中, 胆甾醇部分被附连至反义链的5' 末端。

[0084] 在一些实施方案中, RNA复合物包括2' -O-甲基化核苷。2' -O-甲基化核苷在核糖分子的2' -OH残基处带有甲基。2' -O-Me-RNA显示出与RNA相同的(或类似的) 行为, 但被保护免受核酸酶降解。也可以将2' -O-Me-RNA与硫代磷酸寡核苷酸(PTO) 组合用于进一步稳定化。可以根据本领域的常规技术合成2' -O-Me-RNA(磷酸二酯或硫代磷酸)(参见, 例如, Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, 其以引用方式被并入本文)。

[0085] 在一些实施方案中, 2' -O-甲基核苷被定位于有义链的3' 末端。在一些实施方案中, 有义链的3' 末端区包括多个2' -O-甲基化核苷(例如, 3' 末端的6个核苷内的2、3、4、5或6个2' -O-甲基化核苷)。在一些实施方案中, 2' -O-甲基核苷被定位于反义链的3' 末端。在一些实施方案中, 反义链的3' 末端区包括多个2' -O-甲基化核苷(例如, 3' 末端的6个核苷内的2、3、4、5或6个2' -O-甲基化核苷)。在一些实施方案中, 有义链的3' 末端区和反义链的3' 末端区两者都包括多个2' -O-甲基化核苷。在一些实施方案中, 有义链包括2' -O-甲基化核苷, 所述2' -O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中, 有义链包括2、3、4、5、6、7或8个2' -O-甲基化核苷的连续序列, 所述2' -O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中, 反义链包括2' -O-甲基化核苷, 所述2' -O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中, 反义链包括2、3、4、5、6、7或8个2' -O-甲基化核苷的连续序列, 所述2' -O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。

[0086] 在一些实施方案中, RNA复合物包括硫代磷酸酯键。“硫代磷酸酯”(或S-oligos) 是正常DNA的变体, 其中非桥接氧中的一个被硫代替。核苷酸间键的硫化减少核酸内切酶和核酸外切酶的作用, 所述核酸内切酶和核酸外切酶包含5' 至3' 和3' 至5' DNA POL 1核酸外切酶、核酸酶S1和P1、RNA酶、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶。硫代磷酸酯通过两个主要途径被制造: 通过二硫化碳中的元素硫的溶液对氢磷酸酯的作用, 或通过用二硫化四乙基秋兰姆(TETD) 或3H-1, 2-苯并二硫醇-3-酮1, 1-二氧化物(BDTD) 硫化亚磷酸三酯的方法(参见, 例如, Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990)。后面的方法避免了元素硫在大多数有机溶剂中的不溶性和二硫化碳的毒性问题。TETD和BDTD方法也产生较高纯度的硫代磷酸酯。

[0087] 在一些实施方案中, RNA复合物的有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%为硫代磷酸酯键。在一些实施方案中, RNA复合物的有义链中的核糖核苷酸之间的键全部为硫代磷酸酯键。

[0088] 在一些实施方案中, RNA复合物的反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%为硫代磷酸酯键。在一些实施方案中, RNA复合物的反义链中的核糖核苷酸之间的键全部为硫代磷酸酯键。

[0089] 可以将本文所描述的RNA复合物与细胞接触或者施用至有机体(例如, 人)。可替代地, 可以将编码RNA复合物的构建体和/或载体(vector)与细胞或有机体接触或引入细胞或有机体。在某些实施方案中, 使用病毒、逆转录病毒或慢病毒载体(vector)。

[0090] 本文所描述的RNA复合物可以通过本领域中已知的任何合适的方法制备。例如, 在一些实施方案中, 本文所描述的RNA复合物通过化学合成或体外转录被制备。

[0091] 在某些方面, 本文提供一种药物组合物, 所述药物组合物包括本文提供的RNA复合物和药学上可接受的载体。在某些实施方案中, 药物组合物被配制用于递送至皮肤(例如, 作为乳膏或洗剂)。在某些实施方案中, 药物组合物被配制用于递送至肺(例如, 作为吸入剂)。在一些实施方案中, 药物组合物被配制用于口服递送或肠胃外递送。在一些实施方案中, 药物组合物还包括用于治疗特应性皮炎或哮喘的第二药剂。在一些实施方案中, 第二药剂是类固醇(例如, 皮质类固醇)、长效 β 激动剂(例如, 沙美特罗(salmeterol)或福莫特罗)、或免疫调节剂。类固醇的实例包含氢化可的松、氟替卡松、布地奈德(budesonide)、莫米松、倍氯米松、环索奈德(ciclesonide)或氟尼缩松。免疫调节剂的实例包含孟鲁司特、扎鲁司特或齐留通。两种或更多种类固醇、长效 β 激动剂和免疫调节剂可以与药物组合物一起服用。

[0092] 在一些实施方案中, 药物组合物被配制用于递送至皮肤。在一些实施方案中, 组合物是乳剂、乳膏、洗剂、凝胶、油、软膏、气雾喷雾剂或半固体制剂。在一些实施方案中, 局部制剂包括载体, 所述载体选自海藻糖、麦芽糊精、米粉、微晶纤维素、硬脂酸镁、肌醇、低聚果糖、低聚葡萄糖、右旋糖、蔗糖、滑石、水、生理盐溶液、尿素、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、乙二醇、丙二醇、白凡士林、肉豆蔻酸异丙酯、羊毛脂、羊毛脂醇、矿物油、薰衣草油、旱金莲提取物油、脱水山梨糖醇单油酸酯、鲸蜡硬脂醇、羟丙基纤维素、去垢剂、蔗糖硬脂酸酯、蔗糖椰油酸酯、蔗糖二硬脂酸酯、2-乙基-1,3-己二醇、聚氧丙烯-15-硬脂醇醚、硬脂酸甘油酯、甘油、合成鲸蜡、鲸蜡醇、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸甲酯。

[0093] 在某些实施方案中, 药物组合物不包括转染运载体。在一些实施方案中, 药物组合物包括递送运载体(例如, 脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)。在一些实施方案中, 组合物包含本文所描述的多种(例如, 两种或更多种)RNA复合物的组合。

[0094] 制备这些剂型或组合物的方法包含使本文所描述的RNA复合物与载体以及, 可选地, 一种或更多种辅助成分结合的步骤。通常, 剂型通过使本文所描述的药剂与液体载体均匀地且紧密地结合来制备。

[0095] 治疗方法

[0096] 在某些方面,本文提供一种抑制细胞IL4R α 、TRPA1或F2RL1表达的方法,所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。在一些实施方案中,RNA复合物是经修饰的RNA复合物,并且细胞在不存在转染运载体的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞在存在递送运载体(例如,脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞存在于人受试者的呼吸道中。在一些实施方案中,细胞存在于人受试者的皮肤中。在一些实施方案中,受试者患有特应性皮炎。在一些实施方案中,受试者患有哮喘。在一些实施方案中,受试者是雌性。在一些实施方案中,受试者是雄性。

[0097] 在某些方面,本文提供治疗人受试者的特应性皮炎和/或哮喘的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。在某些实施方案中,RNA复合物或药物组合物被施用至受试者的呼吸道。在某些实施方案中,RNA复合物或药物组合物被施用至受试者的皮肤。在一些实施方案中,RNA复合物或药物组合物由受试者自我施用。

[0098] 在本发明的方法中,本文所描述的RNA复合物可以被施用至受试者,例如,作为无递送运载体情况下的核酸(例如,对于cp-asiRNA)、与递送试剂组合、和/或作为包括表达本文所描述的RNA复合物的序列的核酸。在一些实施方案中,任何本领域已知的核酸递送方法可以被用于本文所描述的方法中。适合的递送试剂包含,但不限于,例如,Mirus Transit TKO亲脂性试剂;转化脂(lipofectin);阳离子脂质体(lipofectamine);细胞转染剂(cellfectin);聚阳离子(例如,聚赖氨酸)、缺端胶原、nanoplexe和脂质体。Minakuchi et al. *Nucleic Acids Res.*, 32(13):e109(2004); Hanai et al. *Ann NY Acad Sci.*, 1082:9-17(2006); 和Kawata et al. *Mol Cancer Ther.*, 7(9):2904-12(2008)中描述了将缺端胶原用作核酸分子的递送运载体,其中的每个被整体并入本文。美国专利号8,283,461、8,313,772、8,501,930、8,426,554、8,268,798和8,324,366中提供了示例性的干扰核酸递送系统,其中的每个以引用方式被整体并入本文。

[0099] 在本文所描述方法的一些实施方案中,脂质体被用于将本文所描述的RNA复合物递送至受试者。适用于本文所描述的方法的脂质体可以由标准囊泡形成脂类形成,所述标准囊泡形成脂类通常包含中性的或带负电的磷脂和甾醇(如胆甾醇)。通常由考虑因素(如期望的脂质体尺寸和脂质体在血流中的半衰期)来指导脂类的选择。已知用于制备脂质体的各种各样的方法,例如,如Szoka et al. (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; 和美国专利号4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中所描述的,其的全部公开内容通过引用被并入本文。

[0100] 用于本发明方法的脂质体也可以被修饰以便避免被单核巨噬细胞系统("MMS")和网状内皮系统("RES")清除。这样的经修饰的脂质体具有在表面上的或被并入到脂质体结构中的调理素作用抑制部分。

[0101] 用于制备本文所描述的脂质体的调理素作用抑制部分通常是被结合至脂质体膜的大亲水性聚合物。如本文所使用的,当调理素作用抑制部分以化学方法或以物理方法被附连至膜(例如,通过将脂溶性锚定物嵌入膜自身,或通过直接与膜脂的活性基团结合)时,调理素作用抑制部分与脂质体膜"结合"。这些调理素作用抑制亲水性聚合物形成保护表面层,所述保护表面层通过MMS和RES显著降低脂质体的摄取;例如,如美国专利号4,920,016中所描述的,其全部公开内容通过引用被并入本文。

[0102] 在一些实施方案中,适于修饰脂质体的调理素作用抑制部分是水溶性聚合物,所述水溶性聚合物具有从约500至约40000道尔顿,或从约2000至约20000道尔顿的数均分子量。这样的聚合物包含聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG) 衍生物;例如,甲氧基PEG或PPG,以及PEG或PPG硬脂酸酯;合成聚合物 (如聚丙烯酰胺或聚N-乙烯基吡咯烷酮);线性的、支化的或树枝状的聚酰胺胺;聚丙烯酸;多元醇 (例如,聚乙烯醇和聚木糖醇,羧基基团或氨基基团以化学方法被连接至聚乙烯醇和聚木糖醇),以及神经节苷脂 (如神经节苷脂GM1)。PEG、甲氧基PEG或甲氧基PPG或其衍生物的共聚物也是合适的。此外,调理素作用抑制聚合物可以是PEG和聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚乙烯胺或多核苷酸的嵌段共聚物。调理素作用抑制聚合物也可以是含有氨基酸或羧酸的天然多糖,例如,半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、藻酸、角叉菜胶;胺化多糖或寡糖 (线性的或支化的);或羧基化多糖或寡糖,例如,与碳酸的衍生物反应,生成羧基基团连接。在一些实施方案中,调理素作用抑制部分是PEG、PPG或其衍生物。用PEG或PEG-衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG化脂质体”。

[0103] 本文公开的药物组合物可以通过任何合适的施用途径被递送,所述施用途径包含局部、通过吸入、口服和肠胃外。在某些实施方案中,药物组合物被全身性地递送 (例如,经由口服或肠胃外施用)。在某些其他实施方案中,药物组合物通过吸入到肺中被局部递送或被局部递送至皮肤。在一些实施方案中,药物组合物经由皮内注射被施用。

[0104] 药物组合物中RNA复合物的实际剂量水平可以变化,以便获得RNA复合物的量,所述RNA复合物的量对实现特定患者、组合物和施用模式的期望的治疗响应是有效的,而对患者没有毒性。

[0105] 所选择的剂量水平将取决于各种各样的因素,所述因素包含所采用的特定药剂的活性、施用途径、施用时间,正在被采用的特定化合物的排泄或代谢的速率、治疗的持续时间、与所采用的特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、正在被治疗的患者的年龄、性别、体重、病情、总体健康状况和先前的病史,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0106] 具有本领域普通技术的医师可以容易地确定和开出所需要的药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以以低于为了实现期望的治疗效果所需的水平开出和/或施用药物组合物中采用的药剂的剂量,并且逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。

[0107] 通常,本文所描述的RNA复合物的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的RNA复合物的量。这样的有效剂量将通常取决于上述因素。

[0108] 示例

[0109] 实施例1:筛选IL4Rα-特异性不对称较短双链体小干扰RNA

[0110] 为了鉴定高效抑制IL4Rα的不对称较短双链体小干扰RNA (asiRNA),合成并且筛选了73种的asiRNA。筛选的asiRNA的核酸序列提供在表1中。

[0111] 表1:示例性IL4Rα-靶向asiRNA的核酸序列。

	序列
[0112]	IL4Rα #1(S): 5' AUCACCAAGAUUAAGA 3'
	IL4Rα #1(AS): 5' UCUUAAUCUUGGUGAUGCUGA 3'

[0113]

IL4R α #2(S) : 5' UCACCAAGAUUAAGAA 3'
IL4R α #2(AS) : 5' UUCUUAUCUUGGUGAUGCUG 3'
IL4R α #3(S) : 5' GCCUUCUCAAGCCUGC 3'
IL4R α #3(AS) : 5' GCAGGCUUGAGAAGGCCUUGU 3'
IL4R α #4(S) : 5' CCUUCUCAAGCCUGCU 3'
IL4R α #4(AS) : 5' AGCAGGCUUGAGAAGGCCUUG 3'
IL4R α #5(S) : 5' UGCGUCUCCGACUACA 3'
IL4R α #5(AS) : 5' UGUAGUCGGAGACGCAGGUGG 3'
IL4R α #6(S) : 5' GCGUCUCCGACUACAU 3'
IL4R α #6(AS) : 5' AUGUAGUCGGAGACGCAGGUG 3'
IL4R α #7(S) : 5' GUGGAAGGGCUCCUUC 3'
IL4R α #7(AS) : 5' GAAGGAGCCCUUCCACAGCAG 3'
IL4R α #8(S) : 5' UGGAAGGGCUCCUUCA 3'
IL4R α #8(AS) : 5' UGAAGGAGCCCUUCCACAGCA 3'
IL4R α #9(S) : 5' CAUCACCAAGAUUAAG 3'
IL4R α #9(AS) : 5' CUUAAUCUUGGUGAUGCUGAC 3'
IL4R α #10(S) : 5' CACCAAGAUUAAGAAA 3'
IL4R α #10(AS) : 5' UUUCUUAUCUUGGUGAUGCUGU 3'
IL4R α #11(S) : 5' UGGGAUCAGAUUCCCA 3'
IL4R α #11(AS) : 5' UGGGAAUCUGAUCCCACCAU 3'
IL4R α #12(S) : 5' GGGAUCAGAUUCCCAA 3'
IL4R α #12(AS) : 5' UUGGGAAUCUGAUCCCACCAU 3'
IL4R α #13(S) : 5' AAGACAGUCCUCUGGC 3'
IL4R α #13(AS) : 5' GCCAGAGGACUGUCUUGCUGA 3'
IL4R α #14(S) : 5' AGACAGUCCUCUGGCC 3'
IL4R α #14(AS) : 5' GGCCAGAGGACUGUCUUGCUG 3'
IL4R α #15(S) : 5' GACAGUCCUCUGGCCA 3'
IL4R α #15(AS) : 5' UGGCCAGAGGACUGUCUUGCUG 3'
IL4R α #16(S) : 5' ACAGUCCUCUGGCCAG 3'
IL4R α #16(AS) : 5' CUGGCCAGAGGACUGUCUUGC 3'
IL4R α #17(S) : 5' CAGUCCUCUGGCCAGA 3'
IL4R α #17(AS) : 5' UCUGGCCAGAGGACUGUCUUG 3'
IL4R α #18(S) : 5' AGUCCUCUGGCCAGAG 3'
IL4R α #18(AS) : 5' CUCUGGCCAGAGGACUGUCUU 3'
IL4R α #19(S) : 5' GUCCUCUGGCCAGAGA 3'
IL4R α #19(AS) : 5' UCUCUGGCCAGAGGACUGUCU 3'
IL4R α #20(S) : 5' CUCCAGCAUGGGGCAG 3'
IL4R α #20(AS) : 5' CUGCCCCAUGCUGGAGGACAU 3'

[0114]

IL4R α #21(S) : 5' GGCUAUCAGGAGUUUG 3'
IL4R α #21(AS) : 5' CAAACUCCUGAUAGCCACUGG 3'
IL4R α #22(S) : 5' GCUAUCAGGAGUUUGU 3'
IL4R α #22(AS) : 5' ACAAACUCCUGAUAGCCACUG 3'
IL4R α #23(S) : 5' CUUCUCAAGCCUGCUU 3'
IL4R α #23(AS) : 5' AAGCAGGCUUGAGAAGGCCUU 3'
IL4R α #24(S) : 5' AAUGGGGUGGCUUUGC 3'
IL4R α #24(AS) : 5' GCAAAGCCACCCCAUUGGGAG 3'
IL4R α #25(S) : 5' AUGGGGUGGCUUUGCU 3'
IL4R α #25(AS) : 5' AGCAAAGCCACCCCAUUGGGA 3'
IL4R α #26(S) : 5' CGUCUCCGACUACAUG 3'
IL4R α #26(AS) : 5' CAUGUAGUCGGAGACGCAGGU 3'
IL4R α #27(S) : 5' GACAGUUCACACCAAU 3'
IL4R α #27(AS) : 5' AUUGGUGUGAACUGUCAGGUU 3'
IL4R α #28(S) : 5' ACAGUUCACACCAAUG 3'
IL4R α #28(AS) : 5' CAUUGGUGUGAACUGUCAGGU 3'
IL4R α #29(S) : 5' CAGUUCACACCAAUGU 3'
IL4R α #29(AS) : 5' ACAUUGGUGUGAACUGUCAGG 3'
IL4R α #30(S) : 5' AGUUCACACCAAUGUC 3'
IL4R α #30(AS) : 5' GACAUUGGUGUGAACUGUCAG 3'
IL4R α #31(S) : 5' CUGGAGUGAGUGGAGC 3'
IL4R α #31(AS) : 5' GCUCCACUCACUCCAGGUGGU 3'
IL4R α #32(S) : 5' CAGCAUCACCAAGAUU 3'
IL4R α #32(AS) : 5' AAUCUUGGUGAUGCUGACAUA 3'
IL4R α #33(S) : 5' AGCAUCACCAAGAUUA 3'
IL4R α #33(AS) : 5' UAAUCUUGGUGAUGCUGACAU 3'
IL4R α #34(S) : 5' GCAUCACCAAGAUUAA 3'
IL4R α #34(AS) : 5' UAAUCUUGGUGAUGCUGACA 3'
IL4R α #35(S) : 5' UAAGAAAGAAUGGUGG 3'
IL4R α #35(AS) : 5' CCACCAUUCUUUCUAAUUCU 3'
IL4R α #36(S) : 5' AAGAAAGAAUGGUGGG 3'
IL4R α #36(AS) : 5' CCCACCAUUCUUUCUAAUUCU 3'
IL4R α #37(S) : 5' AGAAAGAAUGGUGGGA 3'
IL4R α #37(AS) : 5' UCCCACCAUUCUUUCUAAUUC 3'
IL4R α #38(S) : 5' GAUCCCCAACCCAGCC 3'
IL4R α #38(AS) : 5' GGCUGGGUUGGGAAUCUGAUC 3'
IL4R α #39(S) : 5' AGCAAGACAGUCCUCU 3'
IL4R α #39(AS) : 5' AGAGGACUGUCUUGCUGAUCU 3'

[0115]

IL4R α #40(S) : 5' GCAAGACAGUCCUCUG 3'
IL4R α #40(AS) : 5' CAGAGGACUGUCUUGCUGAUC 3'
IL4R α #41(S) : 5' CAAGACAGUCCUCUGG 3'
IL4R α #41(AS) : 5' CCAGAGGACUGUCUUGCUGAU 3'
IL4R α #42(S) : 5' GUUGUUUGAGGCCCCG 3'
IL4R α #42(AS) : 5' CGGGGCCUCAAACAACUCCAC 3'
IL4R α #43(S) : 5' AACAGAGAGCCUGUUC 3'
IL4R α #43(AS) : 5' GAACAGGCUCUCUGUUAGCCG 3'
IL4R α #44(S) : 5' CUGGGAGCAGAUCCUC 3'
IL4R α #44(AS) : 5' GAGGAUCUGCUCCCAGGUUUC 3'
IL4R α #45(S) : 5' CUAUCAGGAGUUUGUA 3'
IL4R α #45(AS) : 5' UACAAACUCCUGAUAGCCACU 3'
IL4R α #46(S) : 5' GGCUGGUUACAAGGCC 3'
IL4R α #46(AS) : 5' GGCCUUGUAACCAGCCUCUCC 3'
IL4R α #47(S) : 5' GCUGGUUACAAGGCCU 3'
IL4R α #47(AS) : 5' AGGCCUUGUAACCAGCCUCUC 3'
IL4R α #48(S) : 5' CUGGUUACAAGGCCUU 3'
IL4R α #48(AS) : 5' AAGGCCUUGUAACCAGCCUCU 3'
IL4R α #49(S) : 5' UGGUUACAAGGCCUUC 3'
IL4R α #49(AS) : 5' GAAGGCCUUGUAACCAGCCUC 3'
IL4R α #50(S) : 5' GGUUACAAGGCCUUCU 3'
IL4R α #50(AS) : 5' AGAAGGCCUUGUAACCAGCCU 3'
IL4R α #51(S) : 5' GUUACAAGGCCUUCUC 3'
IL4R α #51(AS) : 5' GAGAAGGCCUUGUAACCAGCC 3'
IL4R α #52(S) : 5' UUACAAGGCCUUCUCA 3'
IL4R α #52(AS) : 5' UGAGAAGGCCUUGUAACCAGC 3'
IL4R α #53(S) : 5' GUGCGGCCACCUGAAA 3'
IL4R α #53(AS) : 5' UUUCAGGUGGCCGCACAGGUG 3'
IL4R α #54(S) : 5' GCUGUGGCUGCUGCUG 3'
IL4R α #54(AS) : 5' CAGCAGCAGCCACAGCAAGGA 3'
IL4R α #55(S) : 5' AGCCGAGCCUAGAAAC 3'
IL4R α #55(AS) : 5' GUUUCUAGGCUCGGCUUCUAG 3'
IL4R α #56(S) : 5' GGGAACAUGAAGGUCU 3'
IL4R α #56(AS) : 5' AGACCUUCAUGUUCCCAGAGC 3'
IL4R α #57(S) : 5' CUUGCAGGAGCCCACC 3'
IL4R α #57(AS) : 5' GGUGGGCUCCUGCAAGACCUU 3'
IL4R α #58(S) : 5' UUGCAGGAGCCCACCU 3'
IL4R α #58(AS) : 5' AGGUGGGCUCCUGCAAGACCU 3'

[0116]

IL4R α #59(S) : 5' AGUUCACACCAAUGUC 3'
IL4R α #59(AS) : 5' GACAUUGGUGUGAACUGUCAG 3'
IL4R α #60(S) : 5' UUUCAGAAUCUAUAAC 3'
IL4R α #60(AS) : 5' GUUAUAGAUUCUGAAAUCUGC 3'
IL4R α #61(S) : 5' UAUAACGUGACCUACC 3'
IL4R α #61(AS) : 5' GGUAGGUCACGUUAUAGAUUC 3'
IL4R α #62(S) : 5' CACCUGGAGUGAGUGG 3'
IL4R α #62(AS) : 5' CCACUCACUCCAGGUGGUGUU 3'
IL4R α #63(S) : 5' ACCUGGAGUGAGUGGA 3'
IL4R α #63(AS) : 5' UCCACUCACUCCAGGUGGUGU 3'
IL4R α #64(S) : 5' UGUGCUAUGUCAGCAU 3'
IL4R α #64(AS) : 5' AUGCUGACAUAGCACAACAGG 3'
IL4R α #65(S) : 5' GUCAGCAUCACCAAGA 3'
IL4R α #65(AS) : 5' UCUUGGUGAUGCUGACAUAGC 3'
IL4R α #66(S) : 5' UCAGCAUCACCAAGAU 3'
IL4R α #66(AS) : 5' AUCUUGGUGAUGCUGACAUAG 3'
IL4R α #67(S) : 5' UGGUGGGAUCAGAUUC 3'
IL4R α #67(AS) : 5' GAAUCUGAUCCACCAUUCUU 3'
IL4R α #68(S) : 5' GGUGGGAUCAGAUUCC 3'
IL4R α #68(AS) : 5' GGAAUCUGAUCCACCAUUCU 3'
IL4R α #69(S) : 5' GUGCCCACACUGGAAG 3'
IL4R α #69(AS) : 5' CUUCCAGUGUGGGCACUUGGC 3'
IL4R α #70(S) : 5' CUGGAAGAAUUGUCUU 3'
IL4R α #70(AS) : 5' AAGACAAUUCUCCAGUGUGG 3'
IL4R α #71(S) : 5' GUCCUCCAGCAUGGGG 3'
IL4R α #71(AS) : 5' CCCAUGCUGGAGGACAUUUC 3'
IL4R α #72(S) : 5' AGUGGCUAUCAGGAGU 3'
IL4R α #72(AS) : 5' ACUCCUGAUAGCCACUGGUGG 3'
IL4R α #73(S) : 5' GUGGCUAUCAGGAGUU 3'
IL4R α #73(AS) : 5' AACUCCUGAUAGCCACUGGUG 3'

[0117] 将表1中列出的asiRNA在退火缓冲液(Bioneer Inc.Korea)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)含有10%胎牛血清(FBS,Gibco)、100单位/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。在转染前一天,将 5×10^3 个A549细胞接种在96孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen Inc.)用0.1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0118] 转染后24小时,使用qRT-PCR测量经转染的细胞中的IL4R α mRNA水平。具体地,根据制造商的说明,使用Super Prep Cell Lysis&RT kit for qPCR (TOYOBO)提取全部RNA,并且合成为cDNA。使用IL4R α TaqMan®探针(Hs00166237_m1)检测IL4R α 基因的扩增。使用18S

TaqMan®探针 (Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0119] 图1中描绘了73种的asiRNA中每种IL4Rα抑制的水平。asiRNA序列中的15种(#5、#6、#20、#32、#38、#40、#41、#44、#48、#56、#58、#59、#64、#67和#72) 被选择用于后续研究。

[0120] 实施例2:使用IL4Rα-靶向asiRNA抑制IL4RαmRNA表达

[0121] 测试实施例1中选择的asiRNA序列抑制IL4RαmRNA表达的能力。

[0122] 将asiRNA在退火缓冲液(Bioneer Inc.Korea) 中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC) 已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 含有10%胎牛血清(Gibco) 以及100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen Inc.) 用asiRNA转染A549细胞。

[0123] asiRNA转染后24小时,使用qRT-PCR测定A549细胞中的IL4RαmRNA水平。具体地,根据制造商的说明,使用RNAiPlus® (TaKaRa) 提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用IL4Rα TaqMan®探针 (Hs00166237_m1) 检测IL4Rα的扩增。使用18S TaqMan®探针 (Hs03928985_g1) 将18S RNA扩增为内部对照。

[0124] 图2中提供了15种的asiRNA的IL4Rα抑制的水平。asiRNA#5和asiRNA#6被选择用于后续研究,所述asiRNA#5和asiRNA#6展现出40-50%的IL4RαmRNA的抑制。

[0125] 实施例3:使用IL4Rα-靶向asiRNA抑制IL4Rα蛋白表达

[0126] 测试实施例2中选择的两种asiRNA抑制IL4Rα蛋白表达的能力。

[0127] 将asiRNA在退火缓冲液(Bioneer Inc.Korea) 中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC) 已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 含有10%胎牛血清(Gibco)、100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen Inc.) 用1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0128] asiRNA转染后48小时,经由免疫印迹测定IL4Rα蛋白水平。简单地说,用1%SDS裂解缓冲液(1%SDS,100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。15μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad) 已经被甲醇(Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用3%BSA(Bioworld) 封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-IL4Rα抗体(Acris) 和抗-GAPDH抗体(Santa Cruz) 的3%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL底物(Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad) 对IL4Rα和GAPDH条带成像。图3中描绘了免疫印迹的结果。

[0129] 实施例4:用于自我递送的asiRNA的化学修饰

[0130] 将化学修饰应用于asiRNA,并且在不存在其他递送试剂的情况下测试经修饰的asiRNA的细胞递送。如下所述,某些修饰改进asiRNA的内吞作用和稳定性。这样的细胞穿透

asiRNA (cp-asiRNA) 能够在不存在递送试剂的情况下被递送到细胞中。

[0131] 筛选了潜在的cp-asiRNA (表2), 用于A549细胞中的IL4Rα mRNA抑制和蛋白质抑制。将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1μM和3μM与A549细胞孵育, 并且通过qRT-PCR和免疫印迹测量IL4Rα表达水平。

[0132] 表2. 被测试自我递送和IL4Rα抑制的经修饰的asiRNA序列。

[0133] (m=2' -O-甲基RNA。*=硫代磷酸酯键。)

名称	序列
IL4Rαcp-asiRNA#5 (s)	5' mUGmCGmUCmUCmCGmACmUA*mC*A*胆甾醇3'
IL4Rαcp-asiRNA#5 21 (2,4) (AS)	5' UGUAGUCGGAGACGmCmAG*G*U*G*G 3'
IL4Rαcp-asiRNA#6 (s)	5' mGCmGUmCUmCCmGAmCUmAC*mA*U*胆甾醇3'
IL4Rαcp-asiRNA#6 21 (2,4) (AS)	5' AUGUAGUCGGAGACmGmCA*G*G*U*G 3'
IL4Rαcp-asiRNA#6 21 (7,4) (AS)	5' AUGUAGUCGGAGACmGmCmA*mG*mG*mU*mG 3'

[0135] A549细胞 (ATCC) 已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 中被培养, 所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 含有10%胎牛血清 (FBS, Gibco) 以及100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。

[0136] 将表2中列出的潜在的cp-asiRNA在Opti-MEM (Gibco) 中在95℃孵育5分钟, 并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0137] 在转染前一天, 将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前, 用达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 洗涤A549细胞, 然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时, 在每个点处, 用含有血清的培养基代替含有cp-asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0138] 根据制造商的说明, cp-asiRNA处理后48小时, 使用RNAiPlus® (TaKaRa) 提取全部RNA, 并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems), 将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用IL4Rα TaqMan® 探针 (Hs00166237_m1) 检测IL4Rα的扩增。使用18S TaqMan® 探针 (Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0139] cp-asiRNA处理后72小时, 经由免疫印迹测定IL4Rα蛋白水平。简单地说, 用1% SDS裂解缓冲液 (1% SDS, 100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。A549细胞的15μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后, 将蛋白质转移至PVDF膜 (Bio-rad), 所述PVDF膜 (Bio-rad) 已经被甲醇 (Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用3% BSA (Bioworld) 封闭1小时, 并且然后在4℃在含有抗-IL4Rα抗体 (Acris) 和抗-GAPDH抗体 (Santa Cruz) 的3% BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次, 并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟, 并且用1×ECL底物 (Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器 (Bio-rad) 对IL4Rα和GAPDH条带成像。

[0140] 图4和图5中提供了三种潜在的cp-asiRNA的IL4Rα抑制的水平。作为结果, cp-asiRNA#5_21 (2,4) 和cp-asiRNA#6_21 (2,4) 被选择用于进一步研究。

[0141] 实施例5: cp-asiRNA结构的附加的化学修饰

[0142] 合成具有不同链长度的其他潜在的IL4Rαcp-asiRNA结构, 并且测试其抑制IL4Rα

表达的能力(表3)。

[0143] 表3:附加的cp-asiRNA序列。

[0144] (m=2'-O-甲基RNA.*=硫代磷酸酯键。)

名称	序列
IL4Rαcp-asiRNA#5 (s)	5' mUGmCGmUCmUCmCGmACmUA*mC*A*胆甾醇3'
IL4Rαcp-asiRNA#519 (2,4) (AS)	5' UGUAGUCGGAGACGmC*mA*G*G*U 3'
IL4Rαcp-asiRNA#521 (2,4) (AS)	5' UGUAGUCGGAGACGmCmAG*G*U*G*G 3'
IL4Rαcp-asiRNA#6 (s)	5' mGCmGUmCmCCmGAmCmUmAC*mA*U*胆甾醇3'
IL4Rαcp-asiRNA#619 (2,4) (AS)	5' AUGUAGUCGGAGACGmG*mC*A*G*G 3'
IL4Rαcp-asiRNA#621 (2,4) (AS)	5' AUGUAGUCGGAGACGmCA*G*G*U*G 3'

[0146] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)含有10%胎牛血清(FBS,Gibco)以及100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。

[0147] 将表3中列出的潜在的cp-asiRNA在Opti-MEM(Gibco)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0148] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,在每个点处,用含有血清的培养基代替含有cp-asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0149] 根据制造商的说明,cp-asiRNA处理后48小时,使用RNAiPlus®(TaKaRa)提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用IL4Rα TaqMan®探针(Hs00166237_m1)检测IL4Rα的扩增。使用18S TaqMan®探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0150] cp-asiRNA处理后72小时,经由免疫印迹测定IL4Rα蛋白水平。简单地说,用1%SDS裂解缓冲液(1%SDS,100mM Tris pH 8.0)裂解经转染的A549细胞。A549细胞的15μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA活化1小时。将膜在室温用3%BSA(Bioworld)封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-IL4Rα抗体(Acris)和抗-GAPDH抗体(Santa Cruz)的3%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL底物(Thermo scientific)处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对IL4Rα和GAPDH条带成像。

[0151] 如图6和图7所示,具有不同反义链长度(21或19个核苷酸)的cp-asiRNA展现出相似mRNA水平的IL4Rα抑制。

[0152] 实施例6:筛选TRPA1-特异性不对称较短双链体小干扰RNA

[0153] 为了鉴定高效地抑制TRPA1的不对称较短双链体小干扰RNA(asiRNA),合成并且筛选了102种的asiRNA。筛选的asiRNA的核酸序列提供在表4中。

[0154] 表4:示例性TRPA1-靶向asiRNA的核酸序列

[0155]

序列
TRPA1#1(S) : 5' UGAAGGACGCUCUCCA 3'
TRPA1#1(AS) : 5' UGGAGAGCGUCCUUCAGAAUC 3'
TRPA1#2(S) : 5' GAAGGACGCUCUCCAC 3'
TRPA1#2(AS) : 5' GUGGAGAGCGUCCUUCAGAAU 3'
TRPA1#3(S) : 5' UGAAGGACGCUCUCCA 3'
TRPA1#3(AS) : 5' UGGAGAGCGUCCUUCAGAAUC 3'
TRPA1#4(S) : 5' AGGACGCUCUCCACUU 3'
TRPA1#4(AS) : 5' AAGUGGAGAGCGUCCUUCAGA 3'
TRPA1#5(S) : 5' GGACGCUCUCCACUUA 3'
TRPA1#5(AS) : 5' UAAGUGGAGAGCGUCCUUCAG 3'
TRPA1#6(S) : 5' GACGCUCUCCACUUAU 3'
TRPA1#6(AS) : 5' AUAAGUGGAGAGCGUCCUUA 3'
TRPA1#7(S) : 5' UUUUGCAGCCAGUUAU 3'
TRPA1#7(AS) : 5' AUAACUGGCUGCAAAAUGCAG 3'
TRPA1#8(S) : 5' UUUGCAGCCAGUUAUG 3'
TRPA1#8(AS) : 5' CAUAACUGGCUGCAAAAUGCA 3'
TRPA1#9(S) : 5' UUGCAGCCAGUUAUGG 3'
TRPA1#9(AS) : 5' CCAUAACUGGCUGCAAAAUGC 3'
TRPA1#10(S) : 5' UGCAGCCAGUUAUGGG 3'
TRPA1#10(AS) : 5' CCCAUAACUGGCUGCAAAAUG 3'
TRPA1#11(S) : 5' GCAGCCAGUUAUGGGC 3'
TRPA1#11(AS) : 5' GCCCAUAACUGGCUGCAAAAU 3'
TRPA1#12(S) : 5' CAGCCAGUUAUGGGCG 3'
TRPA1#12(AS) : 5' CGCCCAUAACUGGCUGCAAAA 3'
TRPA1#13(S) : 5' CAUAAGUGAUACGAGG 3'
TRPA1#13(AS) : 5' CCUCGUAUCACUUAUGUCUUG 3'
TRPA1#14(S) : 5' AUAAGUGAUACGAGGC 3'
TRPA1#14(AS) : 5' AAGACAUAAUGUGAUACGAGGC 3'
TRPA1#15(S) : 5' UAAGUGAUACGAGGCU 3'
TRPA1#15(AS) : 5' AGCCUCGUAUCACUUAUGUCU 3'
TRPA1#16(S) : 5' AAGUGAUACGAGGCUU 3'
TRPA1#16(AS) : 5' AAGCCUCGUAUCACUUAUGUC 3'
TRPA1#17(S) : 5' CAGUGACCACAAUGGC 3'
TRPA1#17(AS) : 5' GCCAUUGUGGUCACUGAGAAA 3'
TRPA1#18(S) : 5' AGUGACCACAAUGGCU 3'
TRPA1#18(AS) : 5' AGCCAUUGUGGUCACUGAGAA 3'
TRPA1#19(S) : 5' GUGACCACAAUGGCUG 3'
TRPA1#19(AS) : 5' CAGCCAUUGUGGUCACUGAGA 3'
TRPA1#20(S) : 5' UGACCACAAUGGCUGG 3'

[0156]

[0157]

TRPA1#20(AS) : 5' CCAGCCAUUGUGGUCACUGAG 3'
TRPA1#21(S) : 5' GACCACAAUGGCUGGA 3'
TRPA1#21(AS) : 5' UCCAGCCAUUGUGGUCACUGA 3'
TRPA1#22(S) : 5' ACCACAAUGGCUGGAC 3'
TRPA1#22(AS) : 5' GUCCAGCCAUUGUGGUCACUG 3'
TRPA1#23(S) : 5' CACUCAGACCAUGAAG 3'
TRPA1#23(AS) : 5' CUUCAUGGUCUGAGUGUACCC 3'
TRPA1#24(S) : 5' ACUCAGACCAUGAAGG 3'
TRPA1#24(AS) : 5' CCUUCAUGGUCUGAGUGUACC 3'
TRPA1#25(S) : 5' CUCAGACCAUGAAGGU 3'
TRPA1#25(AS) : 5' ACCUUCAUGGUCUGAGUGUAC 3'
TRPA1#26(S) : 5' UCAGACCAUGAAGGUC 3'
TRPA1#26(AS) : 5' GACCUUCAUGGUCUGAGUGUA 3'
TRPA1#27(S) : 5' CAGACCAUGAAGGUCA 3'
TRPA1#27(AS) : 5' UGACCUUCAUGGUCUGAGUGU 3'
TRPA1#28(S) : 5' AGACCAUGAAGGUCAU 3'
TRPA1#28(AS) : 5' AUGACCUUCAUGGUCUGAGUG 3'
TRPA1#29(S) : 5' GACCAUGAAGGUCAUU 3'
TRPA1#29(AS) : 5' AAUGACCUUCAUGGUCUGAGU 3'
TRPA1#30(S) : 5' ACCAUGAAGGUCAUUC 3'
TRPA1#30(AS) : 5' GAAUGACCUUCAUGGUCUGAG 3'
TRPA1#31(S) : 5' CCAUGAAGGUCAUUCU 3'
TRPA1#31(AS) : 5' AGAAUGACCUUCAUGGUCUGA 3'
TRPA1#32(S) : 5' CAUGAAGGUCAUUCUU 3'
TRPA1#32(AS) : 5' AAGAAUGACCUUCAUGGUCUG 3'
TRPA1#33(S) : 5' AUGAAGGUCAUUCUUG 3'
TRPA1#33(AS) : 5' CAAGAAUGACCUUCAUGGUCU 3'
TRPA1#34(S) : 5' UGAAGGUCAUUCUUGA 3'
TRPA1#34(AS) : 5' UCAAGAAUGACCUUCAUGGUC 3'
TRPA1#35(S) : 5' GAAGGUCAUUCUUGAU 3'
TRPA1#35(AS) : 5' AUCAAGAAUGACCUUCAUGGU 3'
TRPA1#36(S) : 5' AAGGUCAUUCUUGAUA 3'
TRPA1#36(AS) : 5' UAUCAAGAAUGACCUUCAUGG 3'
TRPA1#37(S) : 5' AGGUCAUUCUUGAUAC 3'
TRPA1#37(AS) : 5' GUAUCAAGAAUGACCUUCAUG 3'
TRPA1#38(S) : 5' GGUCAUUCUUGAUACU 3'
TRPA1#38(AS) : 5' AGUAUCAAGAAUGACCUUCAU 3'
TRPA1#39(S) : 5' GUCAUUCUUGAUACUA 3'

[0158]

TRPA1#39(AS) : 5' UAGUAUCAAGAAUGACCUUCA 3'
TRPA1#40(S) : 5' UCAUUCUUGAUACUAA 3'
TRPA1#40(AS) : 5' UUAGUAUCAAGAAUGACCUUC 3'
TRPA1#41(S) : 5' CAGAAGACAAGUCCUG 3'
TRPA1#41(AS) : 5' CAGGACUUGUCUUCUGUGGAA 3'
TRPA1#42(S) : 5' UUUCCAACAGAAAAGG 3'
TRPA1#42(AS) : 5' CCUUUUCUGUUGGAAAAUUUG 3'
TRPA1#43(S) : 5' GGCAAUGUGGAGCAAU 3'
TRPA1#43(AS) : 5' AUUGCUCACAUUGCCACUGC 3'
TRPA1#44(S) : 5' GCAGGUGGAACUUCAU 3'
TRPA1#44(AS) : 5' AUGAAGUCCACCUGCAUAGC 3'
TRPA1#45(S) : 5' CAGGUGGAACUUCAUA 3'
TRPA1#45(AS) : 5' UAUGAAGUCCACCUGCAUAG 3'
TRPA1#46(S) : 5' AGGUGGAACUUCAUAC 3'
TRPA1#46(AS) : 5' GUAUGAAGUCCACCUGCAUA 3'
TRPA1#47(S) : 5' GGUGGAACUUCAUACC 3'
TRPA1#47(AS) : 5' GGUAUGAAGUCCACCUGCAU 3'
TRPA1#48(S) : 5' GUGGAACUUCAUACCA 3'
TRPA1#48(AS) : 5' UGGUAUGAAGUCCACCUGCA 3'
TRPA1#49(S) : 5' UGAUUAUGGAAAUACC 3'
TRPA1#49(AS) : 5' GGUAUUUCCAUAUAUCAUCCA 3'
TRPA1#50(S) : 5' AAUACCCUCUGCAUU 3'
TRPA1#50(AS) : 5' AAUGCAGAGGGGUAUUUCCA 3'
TRPA1#51(S) : 5' UACCCUCUGCAUUGU 3'
TRPA1#51(AS) : 5' ACAAUGCAGAGGGGUAUUUCC 3'
TRPA1#52(S) : 5' ACCCCUCUGCAUUGUG 3'
TRPA1#52(AS) : 5' CACAAUGCAGAGGGGUAUUUC 3'
TRPA1#53(S) : 5' UUGUGCUGUAGAAAAA 3'
TRPA1#53(AS) : 5' UUUUUCUACAGCACAAUGCAG 3'
TRPA1#54(S) : 5' ACGCUCUCCACUUAUA 3'
TRPA1#54(AS) : 5' UAUAAGUGGAGAGCGUCCUUC 3'
TRPA1#55(S) : 5' CCACUUAUAUUAGCAA 3'
TRPA1#55(AS) : 5' UUGCUAUAUAAGUGGAGAGC 3'
TRPA1#56(S) : 5' GUGCCCAAGUAGACAU 3'
TRPA1#56(AS) : 5' AUGUCUACUUGGGCACC UUUA 3'
TRPA1#57(S) : 5' UGCCCAAGUAGACAU 3'
TRPA1#57(AS) : 5' UAUGUCUACUUGGGCACC UUU 3'
TRPA1#58(S) : 5' GCCCAAGUAGACAUAA 3'

[0159]

TRPA1#58(AS) : 5' UUAUGUCUACUUGGGCACCUU 3'
TRPA1#59(S) : 5' CCCAAGUAGACAUAAA 3'
TRPA1#59(AS) : 5' UUAUGUCUACUUGGGCACCU 3'
TRPA1#60(S) : 5' CAAGUAGACAUAAAAG 3'
TRPA1#60(AS) : 5' CUUUUAUGUCUACUUGGGCAC 3'
TRPA1#61(S) : 5' AAGUAGACAUAAAAGA 3'
TRPA1#61(AS) : 5' UCUUUUAUGUCUACUUGGGCA 3'
TRPA1#62(S) : 5' AGUAGACAUAAAAGAU 3'
TRPA1#62(AS) : 5' AUCUUUUAUGUCUACUUGGGC 3'
TRPA1#63(S) : 5' AUUUAUGCAGAUGCAA 3'
TRPA1#63(AS) : 5' UUGCAUCUGCAUAAAUUCAGG 3'
TRPA1#64(S) : 5' UAUGGGCGUAUCAUA 3'
TRPA1#64(AS) : 5' UAUUGAUACGCCCAUAACUGG 3'
TRPA1#65(S) : 5' AUGGGCGUAUCAAUAC 3'
TRPA1#65(AS) : 5' GUAUUGAUACGCCCAUAACUG 3'
TRPA1#66(S) : 5' CGAGGCUUCUGAAUGA 3'
TRPA1#66(AS) : 5' UCAUUCAGAAGCCUCGUAUCA 3'
TRPA1#67(S) : 5' GAGGCUUCUGAAUGAA 3'
TRPA1#67(AS) : 5' UUCAUUCAGAAGCCUCGUAUC 3'
TRPA1#68(S) : 5' AGGCUUCUGAAUGAAG 3'
TRPA1#68(AS) : 5' CUUCAUUCAGAAGCCUCGUAU 3'
TRPA1#69(S) : 5' UCUCAGUGACCACAAU 3'
TRPA1#69(AS) : 5' AUUGUGGUCACUGAGAAACAA 3'
TRPA1#70(S) : 5' CUCAGUGACCACAAUG 3'
TRPA1#70(AS) : 5' CAUUGUGGUCACUGAGAAACA 3'
TRPA1#71(S) : 5' ACACUCAGACCAUGAA 3'
TRPA1#71(AS) : 5' UUCAUGGUCUGAGUGUACCCG 3'
TRPA1#72(S) : 5' ACUGUCUUGGUCUCAU 3'
TRPA1#72(AS) : 5' AUGAGACCAAGACAGUAAGAU 3'
TRPA1#73(S) : 5' CUGUCUUGGUCUCAUA 3'
TRPA1#73(AS) : 5' UAUGAGACCAAGACAGUAAGA 3'
TRPA1#74(S) : 5' UGUCUUGGUCUCAUAC 3'
TRPA1#74(AS) : 5' GUAUGAGACCAAGACAGUAAG 3'
TRPA1#75(S) : 5' AUAUUUGGGUAUUGCA 3'
TRPA1#75(AS) : 5' UGCAAUACCCAAAUACUUG 3'
TRPA1#76(S) : 5' GGGUAUUGCAAAGAAG 3'
TRPA1#76(AS) : 5' CUUCUUUGCAAUACCCAAUA 3'
TRPA1#77(S) : 5' UUUUCCAACAGAAAAG 3'

[0160]

TRPA1#77(AS) : 5' CUUUUCUGUUGGAAAAUUUGC 3'
TRPA1#78(S) : 5' GCAAUGUGGAGCAAUU 3'
TRPA1#78(AS) : 5' AAUUGCUCACAUUGCCACUG 3'
TRPA1#79(S) : 5' UUUUGGACUCAGCUUU 3'
TRPA1#79(AS) : 5' AAAGCUGAGUCCAAAAGCCAG 3'
TRPA1#80(S) : 5' UUUGGACUCAGCUUUU 3'
TRPA1#80(AS) : 5' AAAAGCUGAGUCCAAAAGCCA 3'
TRPA1#81(S) : 5' UUGGACUCAGCUUUUA 3'
TRPA1#81(AS) : 5' UAAAAGCUGAGUCCAAAAGCC 3'
TRPA1#82(S) : 5' CUAGGAGAUUAUCAAUU 3'
TRPA1#82(AS) : 5' AAUUGAUUAUCUCCUAGCAUCA 3'
TRPA1#83(S) : 5' UAGGAGAUUAUCAAUUA 3'
TRPA1#83(AS) : 5' UAAUUGAUUAUCUCCUAGCAUC 3'
TRPA1#84(S) : 5' GGAGAUUAUCAAUUAUC 3'
TRPA1#84(AS) : 5' GAUAAUUGAUUAUCUCCUAGCA 3'
TRPA1#85(S) : 5' GAGAUUAUCAAUUAUCG 3'
TRPA1#85(AS) : 5' CGAUAAUUGAUUAUCUCCUAGC 3'
TRPA1#86(S) : 5' AGAUUAUCAAUUAUCGA 3'
TRPA1#86(AS) : 5' UCGAUAAUUGAUUAUCUCCUAG 3'
TRPA1#87(S) : 5' AUUUUGUCCCAAUUG 3'
TRPA1#87(AS) : 5' CAAUUGGGACAAAUUUGUGA 3'
TRPA1#88(S) : 5' UAUUUUGUCCCAAUUGU 3'
TRPA1#88(AS) : 5' ACAAUUGGGACAAAUUUGUG 3'
TRPA1#89(S) : 5' CCAAUUGUCCUCAUGA 3'
TRPA1#89(AS) : 5' UCAUGAGGACAAUUGGGACAA 3'
TRPA1#90(S) : 5' CAAUUGUCCUCAUGAA 3'
TRPA1#90(AS) : 5' UUCAUGAGGACAAUUGGGACA 3'
TRPA1#91(S) : 5' UGCUGAGGUCCAGAAA 3'
TRPA1#91(AS) : 5' UUUCUGGACCUCAGCAAUGUC 3'
TRPA1#92(S) : 5' AGAGGAUAGCUAUGCA 3'
TRPA1#92(AS) : 5' UGCAUAGCUAUCCUCUCAAU 3'
TRPA1#93(S) : 5' GAGGAUAGCUAUGCAG 3'
TRPA1#93(AS) : 5' CUGCAUAGCUAUCCUCUCAA 3'
TRPA1#94(S) : 5' UAUGCAGGUGGAACUU 3'
TRPA1#94(AS) : 5' AAGUCCACCUGCAUAGCUAU 3'
TRPA1#95(S) : 5' AUGCAGGUGGAACUUC 3'
TRPA1#95(AS) : 5' GAAGUCCACCUGCAUAGCUA 3'
TRPA1#96(S) : 5' UGCAGGUGGAACUUA 3'

[0161]

TRPA1#96(AS) : 5' UGAAGUUCCACCUGCAUAGCU 3'
TRPA1#97(S) : 5' AACAGCAUGAGCUCAU 3'
TRPA1#97(AS) : 5' AUGAGCUCAUGCUGUUUUUCC 3'
TRPA1#98(S) : 5' CAGAAGAUGGAGAUA 3'
TRPA1#98(AS) : 5' UGAUCUCCAUCUUCUGAAUGA 3'
TRPA1#99(S) : 5' AGAAGAUGGAGAUAU 3'
TRPA1#99(AS) : 5' AUGAUCUCCAUCUUCUGAAUG 3'
TRPA1#100(S) : 5' GAAGAUGGAGAUAUC 3'
TRPA1#100(AS) : 5' GAUGAUCUCCAUCUUCUGAAU 3'
TRPA1#101(S) : 5' AAGAUGGAGAUAUCU 3'
TRPA1#101(AS) : 5' AGAUGAUCUCCAUCUUCUGAA 3'
TRPA1#102(S) : 5' GAUGGAGAUAUCUCU 3'
TRPA1#102(AS) : 5' AGAGAUGAUCUCCAUCUUCUG 3'

[0162] 将表4中列出的asiRNA在退火缓冲液(Bioneer Inc.Korea)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,将 5.0×10^3 个A549细胞(ATCC)接种到96孔板中,所述A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM,Gibco)含有10%胎牛血清(FBS,Gibco)以及100单位/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen Inc.)用0.1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0163] 转染后24小时,使用qRT-PCR测量经转染的细胞中的TRPA1 mRNA水平。具体地,根据制造商的说明,使用SuperPrep Cell Lysis&RT kit for qPCR(TOYOBO)提取全部RNA,并且合成cDNA。根据制造商的说明,使用THUNDERBIRD®探针qPCR Mix(TOYOBO)进行qRT-PCR。使用TRPA1 TaqMan®探针(Hs00175798_m1)检测TRPA1的扩增。使用18S TaqMan®探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0164] 图9中提供了102种的asiRNA中每种TRPA1抑制的水平。asiRNA序列中的14种(asiRNA(#32)、asiRNA(#34)、asiRNA(#35)、asiRNA(#38)、asiRNA(#40)、asiRNA(#41)、asiRNA(#50)、asiRNA(#64)、asiRNA(#66)、asiRNA(#69)、asiRNA(#71)、asiRNA(#72)、asiRNA(#78)和asiRNA(#81))被选择用于后续研究。

[0165] 实施例7:使用TRPA1-靶向asiRNA抑制TRPA1 mRNA和蛋白质表达

[0166] 测试实施例6中选择的asiRNA(asiRNA(#32)、asiRNA(#34)、asiRNA(#35)、asiRNA(#38)、asiRNA(#40)、asiRNA(#41)、asiRNA(#50)、asiRNA(#64)、asiRNA(#66)、asiRNA(#69)、asiRNA(#71)、asiRNA(#72)、asiRNA(#78)和asiRNA(#81))抑制TRPA1 mRNA和蛋白质表达的能力。

[0167] 将asiRNA在退火缓冲液(Bioneer Inc.Korea)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)以及100单位/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen Inc.)用1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0168] 根据制造商的说明,asiRNA转染后24小时,使用RNAiPlus® (TaKaRa) 提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用TRPA1 TaqMan® 探针 (Hs00175798_m1) 检测TRPA1的扩增。使用18S TaqMan® 探针 (Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0169] asiRNA转染后48小时,经由免疫印迹测定TRPA1蛋白水平。简单地说,用1%SDS裂解缓冲液 (1%SDS,100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。A549细胞的30μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜 (Bio-rad),所述PVDF膜 (Bio-rad) 已经被甲醇 (Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用5%脱脂乳 (Seoul Milk) 和1%BSA (Bioworld) 封闭1小时,并且然后在4°C在含有抗-TRPA1抗体 (Novus) 和抗-β-肌动蛋白抗体 (Santa Cruz) 的5%脱脂乳和1%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL底物 (Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器 (Bio-rad) 对TRPA1和β-肌动蛋白条带成像。

[0170] 图10中提供了14种的asiRNA的TRPA1抑制的水平。图11中描绘了免疫印迹的结果。asiRNA (#71) 和asiRNA (#81) 被选择用于后续研究。

[0171] 实施例8:用于自我递送的asiRNA的化学修饰

[0172] 将化学修饰应用于asiRNA,并且在不存在其他递送试剂的情况下测试经修饰的asiRNA的细胞递送。如下所述,某些修饰改进asiRNA的内吞作用和稳定性。这样的细胞穿透asiRNA (cp-asiRNA) 能够不存在递送试剂的情况下被递送到细胞中。

[0173] 筛选潜在的cp-asiRNA (表5),用于在A549细胞中TRPA1 mRNA和蛋白质抑制。将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1μM和3μM与A549细胞孵育,并且通过qRT-PCR和免疫印迹测量TRPA1表达水平。

[0174] 表5. 被测试自我递送和TRPA1抑制的经修饰的asiRNA序列。

[0175] (m=2' -O-甲基RNA。*=硫代磷酸酯键。)

[0176]

名称	序列
TRPA1cp-asiRNA#71PS4 (s)	5' mACmACmUCmAGmACmCAmU*G*mA*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#71 21 (2,4) (AS)	5' UUCAUGGUCUGAGUmGmUA*C*C*C*G 3'
TRPA1cp-asiRNA#71 21 (4,4) (AS)	5' UUCAUGGUCUGAGUmGmUmA*mC*mC*C*G 3'
TRPA1cp-asiRNA#71 21 (7,4) (AS)	5' UUCAUGGUCUGAGUmGmUmA*mC*mC*mC*mG 3'
TRPA1cp-asiRNA#81PS4 (s)	5' mUUmGGmACmUCmAGmCUmU*U*mU*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#81 21 (2,4) (AS)	5' UAAAAGCUGAGUCCmAmAA*A*G*C*C 3'
TRPA1cp-asiRNA#81 21 (4,4) (AS)	5' UAAAAGCUGAGUCCmAmAmA*mA*G*C*C 3'
TRPA1cp-asiRNA#81 21 (7,4) (AS)	5' UAAAAGCUGAGUCCmAmAmA*mA*mG*mC*mC 3'

[0177] A549细胞 (ATCC) 已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM,Gibco) 中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM,Gibco) 含有10%胎牛血清 (FBS,Gibco)、100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。

[0178] 将表2中列出的潜在的cp-asiRNA在Opti-MEM (Gibco) 中在95°C孵育5分钟,并且在37°C孵育1小时。使用UV透照器通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0179] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯

克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 洗涤A549细胞, 然后在OPTI-MEM缓冲液中在存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时, 在每个点处, 用含有血清的培养基代替含有cp-asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0180] 根据制造商的说明, asiRNA转染后48小时, 使用RNAiPlus® (TaKaRa) 提取全部RNA, 并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems), 将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用TRPA1 TaqMan®探针 (Hs00175798_m1) 检测TRPA1的扩增。使用18S TaqMan®探针 (Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0181] asiRNA转染后72小时, 经由免疫印迹测定TRPA1蛋白水平。简单地说, 用1% SDS裂解缓冲液 (1% SDS, 100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。A549细胞的30μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后, 将蛋白质转移至PVDF膜 (Bio-rad), 所述PVDF膜 (Bio-rad) 已经被甲醇 (Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用5%脱脂乳 (Seoul Milk) 和1% BSA (Bioworld) 封闭1小时, 并且然后在4°C在含有抗-TRPA1抗体 (Novus) 和抗-β-肌动蛋白抗体 (Santa Cruz) 的5%脱脂乳和1% BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次, 并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟, 并且用1×ECL底物 (Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器 (Bio-rad) 对TRPA1和β-肌动蛋白条带成像。

[0182] 图12和图13中提供了6种的潜在的cp-asiRNA的TRPA1抑制的水平。cp-asiRNA#71_21 (4, 4) 和cp-asiRNA#81_21 (4, 4) 被选择用于进一步研究。

[0183] 实施例9: cp-asiRNA结构的附加的化学修饰

[0184] 合成具有不同链长度以及硫代磷酸酯键和2'-O-甲基化修饰的数量的各种各样的潜在的TRPA1cp-asiRNA结构, 并且测试其抑制TRPA1表达的能力 (表6)。

[0185] 表6: 附加的cp-asiRNA序列。

[0186] (m=2'-O-甲基RNA。*=硫代磷酸酯键。)

[0187]

名称	序列
TRPA1cp-asiRNA#71_PS3 (s)	5' mACmACmUCmAGmACmCmUG*mA*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#71_PS4 (s)	5' mACmACmUCmAGmACmCmU*G*mA*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#71_19 (4, 4) (AS)	5' UUCAUGGUCUGAGUmG*mU*mA*mC*C 3'
TRPA1cp-asiRNA#71_21 (4, 4) (AS)	5' UUCAUGGUCUGAGUmGmUmA*mC*C*C*G 3'
TRPA1cp-asiRNA#81_PS3 (s)	5' mUUmGGmACmUCmAGmCUmUU*mU*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#81_PS4 (s)	5' mUUmGGmACmUCmAGmCUmU*U*mU*A*胆甾醇3'
TRPA1cp-asiRNA#81_19 (4, 4) (AS)	5' UAAAAGCUGAGUCCmA*mA*mA*mA*G 3'
TRPA1cp-asiRNA#81_21 (4, 4) (AS)	5' UAAAAGCUGAGUCCmAmAmA*mA*G*C*C 3'

[0188] 测试表6中列出的1μM或3μM的潜在的cp-asiRNA中的每种抑制A549细胞中的TRPA1 mRNA和蛋白质表达的能力。

[0189] A549细胞 (ATCC) 已经在达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 中被培养, 所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Gibco) 含有10%胎牛血清 (FBS, Gibco)、100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。将表3中列出的潜在的cp-asiRNA在Opti-MEM (Gibco) 中在95°C孵育5分钟, 并且在37°C孵育1小时。使用UV透照器通过凝胶电泳确认适当的链退火。

[0190] 在处理前一天, 将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前, 用DMEM

(Gibco) 洗涤A549细胞,然后在Opti-MEM培养基中在存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有cp-asiRNA的Opti-MEM培养基。

[0191] 根据制造商的说明,asiRNA转染后48小时,使用RNAiPlus® (TaKaRa) 提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用TRPA1 TaqMan®探针 (Hs00175798_m1) 检测TRPA1的扩增。使用18S TaqMan®探针 (Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0192] asiRNA转染后72小时,经由免疫印迹测定TRPA1蛋白水平。简单地说,用1%SDS裂解缓冲液 (1%SDS,100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。A549细胞的30μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜 (Bio-rad),所述PVDF膜 (Bio-rad) 已经被甲醇 (Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用5%脱脂乳 (Seoul Milk) 和1%BSA (Bioworld) 封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-TRPA1抗体 (Novus) 和抗-β-肌动蛋白抗体 (Santa Cruz) 的5%脱脂乳和1%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL底物 (Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器 (Bio-rad) 对TRPA1和β-肌动蛋白条带成像。

[0193] 如图14和图15所示,指定的TRPA1cp-asiRNA展现出相似mRNA水平的TRPA1抑制。

[0194] 实施例10:使用TRPA1-特异性cp-asiRNA抑制TRPA1蛋白表达

[0195] 检测cp-asiRNA对TRPA1蛋白水平的抑制的效力。

[0196] 将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1μM和3μM与A549细胞孵育,并且通过免疫印迹测量TRPA1蛋白水平。

[0197] A549细胞 (ATCC) 已经在达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM,Gibco) 中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM,Gibco) 含有10%胎牛血清 (FBS,Gibco) 以及100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。将潜在的cp-asiRNA在Opti-MEM (Gibco) 中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。使用UV透照器通过凝胶电泳确认适当的链退火。

[0198] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用DMEM (Gibco) 洗涤A549细胞,然后在Opti-MEM培养基中在存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有cp-asiRNA的Opti-MEM培养基。

[0199] asiRNA转染后72小时,经由免疫印迹测定TRPA1蛋白水平。简单地说,用1%SDS裂解缓冲液 (1%SDS,100mM Tris pH 8.0) 裂解经转染的A549细胞。A549细胞的30μg的总蛋白质提取物被装载到8%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜 (Bio-rad),所述PVDF膜 (Bio-rad) 已经被甲醇 (Merck) 在300mA活化1小时。将膜在室温用5%脱脂乳 (Seoul Milk) 和1%BSA (Bioworld) 封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-TRPA1抗体 (Novus) 和抗-GAPDH抗体 (Santa Cruz) 的5%脱脂乳和1%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL底物 (Thermo scientific) 处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器 (Bio-rad) 对TRPA1和GAPDH条带成像。

[0200] 图16中描绘了免疫印迹测定的结果。作为结果,在有义链上含有3个硫代磷酸酯键和具有4个硫代磷酸酯键和四个2'-O-甲基化的19个核苷酸的反义链的TRPA1cp-asiRNA#81 (TRPA1cp-asiRNA#81_PS3/19 (4,4)) 展现出最高水平的TRPA1抑制。

[0201] 实施例11:筛选F2RL1-靶向不对称较短双链体小干扰RNA

[0202] 为了鉴定高效抑制F2RL1的不对称较短双链体小干扰RNA (asiRNA), 合成并且筛选了100种的asiRNA。筛选的asiRNA的核酸序列提供在表7中。

[0203] 表7: 示例性F2RL1-靶向asiRNA的核酸序列。

[0204]

序列
F2RL1#1(S) : 5'CCUCUCUGUCAUCUGG 3'
F2RL1#1(AS) : 5'CCAGAUGACAGAGAGGAGGUC 3'
F2RL1#2(S) : 5'CUCUCUGUCAUCUGGU 3'
F2RL1#2(AS) : 5'ACCAGAUGACAGAGAGGAGGU 3'
F2RL1#3(S) : 5'UCUCUGUCAUCUGGUU 3'
F2RL1#3(AS) : 5'AACCAGAUGACAGAGAGGAGG 3'
F2RL1#4(S) : 5'CUCUGUCAUCUGGUUC 3'
F2RL1#4(AS) : 5'GAACCAGAUGACAGAGAGGAG 3'
F2RL1#5(S) : 5'UCUGUCAUCUGGUUCC 3'
F2RL1#5(AS) : 5'GGAACCAGAUGACAGAGAGGA 3'
F2RL1#6(S) : 5'CUGUCAUCUGGUUCCC 3'
F2RL1#6(AS) : 5'GGGAACCAGAUGACAGAGAGG 3'
F2RL1#7(S) : 5'UGUCAUCUGGUUCCCC 3'
F2RL1#7(AS) : 5'GGGGAACCAGAUGACAGAGAG 3'
F2RL1#8(S) : 5'CACCAUCCCUUUGUAU 3'
F2RL1#8(AS) : 5'AUACAAAGGGAUGGUGACCAG 3'
F2RL1#9(S) : 5'ACCAUCCCUUUGUAUG 3'
F2RL1#9(AS) : 5'CAUACAAAGGGAUGGUGACCA 3'
F2RL1#10(S) : 5'CCAUCCCUUUGUAUGU 3'
F2RL1#10(AS) : 5'ACAUACAAAGGGAUGGUGACC 3'
F2RL1#11(S) : 5'CAUCCCUUUGUAUGUC 3'
F2RL1#11(AS) : 5'GACAUACAAAGGGAUGGUGAC 3'
F2RL1#12(S) : 5'ACAAAGGGAUGGUGAC 3'
F2RL1#12(AS) : 5'GUCACCAUCCCUUUGUAUGUC 3'
F2RL1#13(S) : 5'UUCAAUUACUCCUCU 3'

[0205]

F2RL1#13(AS) : 5'AGAGGAAGUAAUUGAACAUGU 3'
F2RL1#14(S) : 5'UCAAUACUCCUCUC 3'
F2RL1#14(AS) : 5'GAGAGGAAGUAAUUGAACAUG 3'
F2RL1#15(S) : 5'CUUUGUCUAUUACUUU 3'
F2RL1#15(AS) : 5'AAAGUAAUAGACAAAGGGGUC 3'
F2RL1#16(S) : 5'UUUGUCUAUUACUUUG 3'
F2RL1#16(AS) : 5'CAAAGUAAUAGACAAAGGGGU 3'
F2RL1#17(S) : 5'UUGUCUAUUACUUUGU 3'
F2RL1#17(AS) : 5'ACAAAGUAAUAGACAAAGGGG 3'
F2RL1#18(S) : 5'AUGGCCAAUCUGGCCU 3'
F2RL1#18(AS) : 5'AGGCCAGAUUGGCCAUGUAAA 3'
F2RL1#19(S) : 5'UUGGCUGACCUCCUCU 3'
F2RL1#19(AS) : 5'AGAGGAGGUCAGCCAAGGCCA 3'
F2RL1#20(S) : 5'GGCUGACCUCCUCUCU 3'
F2RL1#20(AS) : 5'AGAGAGGAGGUCAGCCAAGGC 3'
F2RL1#21(S) : 5'GCUGACCUCCUCUCUG 3'
F2RL1#21(AS) : 5'CAGAGAGGAGGUCAGCCAAGG 3'
F2RL1#22(S) : 5'CUGACCUCCUCUCUGU 3'
F2RL1#22(AS) : 5'ACAGAGAGGAGGUCAGCCAAG 3'
F2RL1#23(S) : 5'UGACCUCCUCUCUGUC 3'
F2RL1#23(AS) : 5'GACAGAGAGGAGGUCAGCCAA 3'
F2RL1#24(S) : 5'GACCUCCUCUCUGUCA 3'
F2RL1#24(AS) : 5'UGACAGAGAGGAGGUCAGCCA 3'
F2RL1#25(S) : 5'ACCUCCUCUCUGUCAU 3'
F2RL1#25(AS) : 5'AUGACAGAGAGGAGGUCAGCC 3'
F2RL1#26(S) : 5'CCUCCUCUCUGUCAUC 3'
F2RL1#26(AS) : 5'GAUGACAGAGAGGAGGUCAGC 3'
F2RL1#27(S) : 5'CUCCUCUCUGUCAUCU 3'
F2RL1#27(AS) : 5'AGAUGACAGAGAGGAGGUCAG 3'
F2RL1#28(S) : 5'UCCUCUCUGUCAUCUG 3'
F2RL1#28(AS) : 5'CAGAUGACAGAGAGGAGGUCA 3'
F2RL1#29(S) : 5'GUCAUCUGGUUCCCCU 3'
F2RL1#29(AS) : 5'AGGGGAACCAGAUGACAGAGA 3'
F2RL1#30(S) : 5'ACAUGGCAACAACUGG 3'
F2RL1#30(AS) : 5'CCAGUUGUUGCCAUGUAUGUG 3'
F2RL1#31(S) : 5'UAUUGGCUUUUUCUAU 3'
F2RL1#31(AS) : 5'AUAGAAAAAGCCAAUAAGCAC 3'
F2RL1#32(S) : 5'AUUGGCUUUUUCUAUG 3'

[0206]

F2RL1#32(AS) : 5'CAUAGAAAAAGCCAAUAAGCA 3'
F2RL1#33(S) : 5'UUGGCUUUUUCUAUGG 3'
F2RL1#33(AS) : 5'CCAUAGAAAAAGCCAAUAAGC 3'
F2RL1#34(S) : 5'UUCUAUGGCAACAUGU 3'
F2RL1#34(AS) : 5'ACAUGUUGCCAUAGAAAAAGC 3'
F2RL1#35(S) : 5'UCUAUGGCAACAUGUA 3'
F2RL1#35(AS) : 5'UACAUGUUGCCAUAGAAAAAG 3'
F2RL1#36(S) : 5'CUCUUCAUGACCUGCC 3'
F2RL1#36(AS) : 5'GGCAGGUCAUGAAGAGAAUGG 3'
F2RL1#37(S) : 5'UCUUCAUGACCUGCCU 3'
F2RL1#37(AS) : 5'AGGCAGGUCAUGAAGAGAAUG 3'
F2RL1#38(S) : 5'CUUCAUGACCUGCCUC 3'
F2RL1#38(AS) : 5'GAGGCAGGUCAUGAAGAGAAU 3'
F2RL1#39(S) : 5'UUCAUGACCUGCCUCA 3'
F2RL1#39(AS) : 5'UGAGGCAGGUCAUGAAGAGAA 3'
F2RL1#40(S) : 5'UCAUGACCUGCCUCAG 3'
F2RL1#40(AS) : 5'CUGAGGCAGGUCAUGAAGAGA 3'
F2RL1#41(S) : 5'CAUGACCUGCCUCAGU 3'
F2RL1#41(AS) : 5'ACUGAGGCAGGUCAUGAAGAG 3'
F2RL1#42(S) : 5'UGCCUCAGUGUGCAGA 3'
F2RL1#42(AS) : 5'UCUGCACACUGAGGCAGGUCA 3'
F2RL1#43(S) : 5'GCCUCAGUGUGCAGAG 3'
F2RL1#43(AS) : 5'CUCUGCACACUGAGGCAGGUC 3'
F2RL1#44(S) : 5'CUCAGUGUGCAGAGGU 3'
F2RL1#44(AS) : 5'ACCUCUGCACACUGAGGCAGG 3'
F2RL1#45(S) : 5'UCAGUGUGCAGAGGUA 3'
F2RL1#45(AS) : 5'UACCUCUGCACACUGAGGCAG 3'
F2RL1#46(S) : 5'CAUCGUGAACCCCAUG 3'
F2RL1#46(AS) : 5'CAUGGGGUUCACGAUGACCCA 3'
F2RL1#47(S) : 5'AUCGUGAACCCCAUGG 3'
F2RL1#47(AS) : 5'CCAUGGGGUUCACGAUGACCC 3'
F2RL1#48(S) : 5'UCGUGAACCCCAUGGG 3'
F2RL1#48(AS) : 5'CCCAUGGGGUUCACGAUGACC 3'
F2RL1#49(S) : 5'CAGGAAGAAGGCAAAC 3'
F2RL1#49(AS) : 5'GUUUGCCUUCUCCUGGAGUG 3'
F2RL1#50(S) : 5'AGGAAGAAGGCAAACA 3'
F2RL1#50(AS) : 5'UGUUUGCCUUCUCCUGGAGU 3'
F2RL1#51(S) : 5'GGAAGAAGGCAAACAU 3'

[0207]

F2RL1#51(AS) : 5'AUGUUUGCCUUCUCCUGGAG 3'
F2RL1#52(S) : 5'GUCACCAUCCCUUUGU 3'
F2RL1#52(AS) : 5'ACAAAGGGAUGGUGACCAGCA 3'
F2RL1#53(S) : 5'UCACCAUCCCUUUGUA 3'
F2RL1#53(AS) : 5'UACAAAGGGAUGGUGACCAGC 3'
F2RL1#54(S) : 5'AUCCCUUUGUAUGUCG 3'
F2RL1#54(AS) : 5'CGACAUACAAAGGGAUGGUGA 3'
F2RL1#55(S) : 5'UGUAUGUCGUGAAGCA 3'
F2RL1#55(AS) : 5'UGCUCACGACAUACAAAGGG 3'
F2RL1#56(S) : 5'GUAUGUCGUGAAGCAG 3'
F2RL1#56(AS) : 5'CUGCUUCACGACAUACAAAGG 3'
F2RL1#57(S) : 5'UAUGUCGUGAAGCAGA 3'
F2RL1#57(AS) : 5'UCUGCUUCACGACAUACAAAG 3'
F2RL1#58(S) : 5'GUCGUGAAGCAGACCA 3'
F2RL1#58(AS) : 5'UGGUCUGCUUCACGACAUACA 3'
F2RL1#59(S) : 5'UCGUGAAGCAGACCAU 3'
F2RL1#59(AS) : 5'AUGGUCUGCUUCACGACAUAC 3'
F2RL1#60(S) : 5'CGUGAAGCAGACCAUC 3'
F2RL1#60(AS) : 5'GAUGGUCUGCUUCACGACAU 3'
F2RL1#61(S) : 5'GUGAAGCAGACCAUCU 3'
F2RL1#61(AS) : 5'AGAUGGUCUGCUUCACGACAU 3'
F2RL1#62(S) : 5'GGGAGACAUGUCAAU 3'
F2RL1#62(AS) : 5'AUUGAACAUGUCUCCACCAA 3'
F2RL1#63(S) : 5'GGAGACAUGUCAAUU 3'
F2RL1#63(AS) : 5'AAUUGAACAUGUCUCCACCA 3'
F2RL1#64(S) : 5'GAGACAUGUCAAUUA 3'
F2RL1#64(AS) : 5'UAAUUGAACAUGUCUCCACC 3'
F2RL1#65(S) : 5'AGACAUGUCAAUUAC 3'
F2RL1#65(AS) : 5'GUAAUUGAACAUGUCUCCAC 3'
F2RL1#66(S) : 5'GACAUGUCAAUUACU 3'
F2RL1#66(AS) : 5'AGUAAUUGAACAUGUCUCCCA 3'
F2RL1#67(S) : 5'ACAUGUCAAUUACUU 3'
F2RL1#67(AS) : 5'AAGUAAUUGAACAUGUCUCCC 3'
F2RL1#68(S) : 5'CAUGUCAAUUACUUC 3'
F2RL1#68(AS) : 5'GAAGUAAUUGAACAUGUCUCC 3'
F2RL1#69(S) : 5'AUGUCAAUUACUUC 3'
F2RL1#69(AS) : 5'GGAAGUAAUUGAACAUGUCUC 3'
F2RL1#70(S) : 5'UGUCAAUUACUCCU 3'

[0208]

F2RL1#70(AS) : 5'AGGAAGUAAUUGAACAU 3'
F2RL1#71(S) : 5'CAAUUACUCCUCUCU 3'
F2RL1#71(AS) : 5'AGAGAGGAAGUAAUUGAACAU 3'
F2RL1#72(S) : 5'UCCUCUCUCUGGCCA 3'
F2RL1#72(AS) : 5'UGGCCAGAGAGAGGAAGUAAU 3'
F2RL1#73(S) : 5'CCUCUCUCUGGCCAUU 3'
F2RL1#73(AS) : 5'AAUGGCCAGAGAGAGGAAGUA 3'
F2RL1#74(S) : 5'CUCUCUCUGGCCAUUG 3'
F2RL1#74(AS) : 5'CAAUGGCCAGAGAGAGGAAGU 3'
F2RL1#75(S) : 5'UCUCUCUGGCCAUUGG 3'
F2RL1#75(AS) : 5'CCAAUGGCCAGAGAGAGGAAG 3'
F2RL1#76(S) : 5'UGAAAACUCAGAGAAG 3'
F2RL1#76(AS) : 5'CUUCUCUGAGUUUUAUCCA 3'
F2RL1#77(S) : 5'GAAAACUCAGAGAAGA 3'
F2RL1#77(AS) : 5'UCUUCUCUGAGUUUUAUCCA 3'
F2RL1#78(S) : 5'AAAACUCAGAGAAGAA 3'
F2RL1#78(AS) : 5'UUCUUCUCUGAGUUUUAUCC 3'
F2RL1#79(S) : 5'AAACUCAGAGAAGAAA 3'
F2RL1#79(AS) : 5'UUUCUUCUCUGAGUUUUAUC 3'
F2RL1#80(S) : 5'ACUCAGAGAAGAAAAG 3'
F2RL1#80(AS) : 5'CUUUUCUUCUCUGAGUUUUA 3'
F2RL1#81(S) : 5'CUCAGAGAAGAAAAGG 3'
F2RL1#81(AS) : 5'CCUUUUCUUCUCUGAGUUUUC 3'
F2RL1#82(S) : 5'CUGCAUCGACCCCUU 3'
F2RL1#82(AS) : 5'AAAGGGGUCGAUGCAGCUGU 3'
F2RL1#83(S) : 5'UGCAUCGACCCCUUUG 3'
F2RL1#83(AS) : 5'CAAAGGGGUCGAUGCAGCUGU 3'
F2RL1#84(S) : 5'GCAUCGACCCCUUUGU 3'
F2RL1#84(AS) : 5'ACAAAGGGGUCGAUGCAGCUG 3'
F2RL1#85(S) : 5'CAUCGACCCCUUUGUC 3'
F2RL1#85(AS) : 5'GACAAAGGGGUCGAUGCAGCU 3'
F2RL1#86(S) : 5'AUCGACCCCUUUGUCU 3'
F2RL1#86(AS) : 5'AGACAAAGGGGUCGAUGCAGC 3'
F2RL1#87(S) : 5'UCGACCCCUUUGUCUA 3'
F2RL1#87(AS) : 5'UAGACAAAGGGGUCGAUGCAG 3'
F2RL1#88(S) : 5'CGACCCCUUUGUCUAU 3'
F2RL1#88(AS) : 5'AUAGACAAAGGGGUCGAUGCA 3'
F2RL1#89(S) : 5'GACCCCUUUGUCUAU 3'

[0209]

F2RL1#89(AS) : 5'AAUAGACAAAGGGGUCGAUGC 3'
F2RL1#90(S) : 5'ACCCCUUUGUCUAUUA 3'
F2RL1#90(AS) : 5'UAAUAGACAAAGGGGUCGAUGC 3'
F2RL1#91(S) : 5'CCCCUUUGUCUAUUAC 3'
F2RL1#91(AS) : 5'GUAAUAGACAAAGGGGUCGAU 3'
F2RL1#92(S) : 5'CCCUUUGUCUAUUACU 3'
F2RL1#92(AS) : 5'AGUAAUAGACAAAGGGGUCGA 3'
F2RL1#93(S) : 5'CCUUUGUCUAUUACUU 3'
F2RL1#93(AS) : 5'AAGUAAUAGACAAAGGGGUCG 3'
F2RL1#94(S) : 5'UGUCUAUUACUUUGUU 3'
F2RL1#94(AS) : 5'AACAAAGUAAUAGACAAAGGG 3'
F2RL1#95(S) : 5'UGCCGAAGUGUCCGCA 3'
F2RL1#95(AS) : 5'UGCGGACACUUCGGCAAAGGA 3'
F2RL1#96(S) : 5'GCCGAAGUGUCCGCAC 3'
F2RL1#96(AS) : 5'GUGCGGACACUUCGGCAAAGG 3'
F2RL1#97(S) : 5'CCGAAGUGUCCGCACU 3'
F2RL1#97(AS) : 5'AGUGCGGACACUUCGGCAAAG 3'
F2RL1#98(S) : 5'CGAAGUGUCCGCACUG 3'
F2RL1#98(AS) : 5'CAGUGCGGACACUUCGGCAAA 3'
F2RL1#99(S) : 5'GAAGUGUCCGCACUGU 3'
F2RL1#99(AS) : 5'ACAGUGCGGACACUUCGGCAA 3'
F2RL1#100(S) : 5'AAGUGUCCGCACUGUA 3'
F2RL1#100(AS) : 5'UACAGUGCGGACACUUCGGCA 3'

[0210] 将表7中列出的asiRNA在1×siRNA双链体缓冲液(Bioneer) 中在95℃孵育5分钟, 并且在37℃孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0211] 对于筛选, A549细胞(ATCC) 已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 中被培养, 所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco) 含有10%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素。在转染前一天, 将 5×10^3 个A549细胞接种在96孔板中。根据制造商的说明, 使用RNAiMAX(Invitrogen) 用0.1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0212] 转染后24小时, 使用实时PCR测量经转染的细胞中的F2RL1 mRNA水平。具体地, 根据制造商的说明, 使用SuperPrep Cell Lysis&RT kit for qPCR(TOYOBO) 提取全部RNA, 并且合成cDNA。根据制造商的说明, 使用THUNDERBIRD®探针qPCR Mix(TOYOBO) 进行实时PCR。使用F2RL1 TaqMan®探针(Hs00608346_m1) 检测F2RL1的扩增。使用18S TaqMan®探针(Hs03928985_g1) 将18S扩增为内部对照。

[0213] 图18中提供了100种的asiRNA中每种F2RL1抑制的水平。asiRNA序列中的29种(asiF2RL1#1、#22、#25、#26、#28、#29、#31、#34、#35、#45、#50、#51、#55、#57、#59、#64、#65、#67、#69、#73、#76、#77、#81、#84、#86、#87、#88、#92和#100) 被选择用于后续研究。

[0214] 实施例12: 使用F2RL1-靶向asiRNA抑制F2RL1 mRNA表达

[0215] 测试实施例12中选择的29种的asiRNA(asiF2RL1#1、#22、#25、#26、#28、#29、#31、#

34、#35、#45、#50、#51、#55、#57、#59、#64、#65、#67、#69、#73、#76、#77、#81、#84、#86、#87、#88、#92和#100)抑制F2RL1表达的能力。

[0216] 将asiRNA在1×siRNA双链体缓冲液(Bioneer)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen)用asiRNA转染A549细胞。

[0217] 具体地,根据制造商的说明,使用RNAiso Plus(TaKaRa)提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用F2RL1 TaqMan®探针(Hs00608346_m1)检测F2RL1的扩增。使用18S TaqMan®探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0218] 图19中提供了29种的asiRNA的F2RL1抑制的水平。十二种的asiRNA;asiF2RL1#1、#22、#29、#50、#64、#67、#76、#77、#87、#88、#92和#100被选择用于后续研究。

[0219] 实施例13:asiRNA的化学修饰

[0220] 将化学修饰应用于32种的asiRNA。如下所述,某些修饰改进asiRNA的内吞作用和稳定性。

[0221] 在A549细胞中测试了32种的asiRNA(表2)的F2RL1 mRNA抑制。

[0222] 表8.经修饰的asiRNA序列。 $m=2'$ -O-甲基RNA

[0223]

F2RL1#29-1 : (S) 5' mGUmCAmUCmUGmGUmUCmCCmCU 3'
F2RL1#29-1 : (AS) 5' AGGGGAACCAGAUACAGAGA 3'
F2RL1#29-2 : (S) 5' mGUmCAmUCmUGmGUmUCmCCmCU 3'
F2RL1#29-2 : (AS) 5' AGGGGAACCAGAUmAmCAGAGA 3'

[0224]

F2RL1#29-3 : (S) 5' mGUmCAmUCmUGmGUmUCmCCmCU 3'
F2RL1#29-3 : (AS) 5' AGGGGAACCAGAUmAmCmAmGAGA 3'
F2RL1#29-4 : (S) 5' mGUmCAmUCmUGmGUmUCmCCmCU 3'
F2RL1#29-4 : (AS) 5' AGGGGAACCAGAUmAmCmAmGmAmGmA 3'
F2RL1#50-1 : (S) 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCmAAmCA 3'
F2RL1#50-1 : (AS) 5' UGUUUGCCUUCUUCUGGAGU 3'
F2RL1#50-2 : (S) 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCmAAmCA 3'
F2RL1#50-2 : (AS) 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUGGAGU 3'
F2RL1#50-3 : (S) 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCmAAmCA 3'
F2RL1#50-3 : (AS) 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUmGmGAGU 3'
F2RL1#50-4 : (S) 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCmAAmCA 3'
F2RL1#50-4 : (AS) 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUmGmGmAmGmU 3'
F2RL1#57-1 : (S) 5' mUAmUGmUCmGUmGAmAGmCmGA 3'
F2RL1#57-1 : (AS) 5' UCUGCUUCACGACAUACAAAG 3'
F2RL1#57-2 : (S) 5' mUAmUGmUCmGUmGAmAGmCmGA 3'
F2RL1#57-2 : (AS) 5' UCUGCUUCACGACAmUmACAAAG 3'
F2RL1#57-3 : (S) 5' mUAmUGmUCmGUmGAmAGmCmGA 3'
F2RL1#57-3 : (AS) 5' UCUGCUUCACGACAmUmAmCmAAAG 3'
F2RL1#57-4 : (S) 5' mUAmUGmUCmGUmGAmAGmCmGA 3'
F2RL1#57-4 : (AS) 5' UCUGCUUCACGACAmUmAmCmAmAmAmG 3'
F2RL1#64-1 : (S) 5' mGAmGAmCmUGmUUmCmAmUmUA 3'
F2RL1#64-1 : (AS) 5' UAAUUGAACAUGUCUCCCACC 3'
F2RL1#64-2 : (S) 5' mGAmGAmCmUGmUUmCmAmUmUA 3'
F2RL1#64-2 : (AS) 5' UAAUUGAACAUGUCmUmCCCACC 3'
F2RL1#64-3 : (S) 5' mGAmGAmCmUGmUUmCmAmUmUA 3'
F2RL1#64-3 : (AS) 5' UAAUUGAACAUGUCmUmCmCmCACC 3'
F2RL1#64-4 : (S) 5' mGAmGAmCmUGmUUmCmAmUmUA 3'
F2RL1#64-4 : (AS) 5' UAAUUGAACAUGUCmUmCmCmCmAmCmC 3'
F2RL1#67-1 : (S) 5' mACmAUmGUmUCmAAmUUmACmUU 3'
F2RL1#67-1 : (AS) 5' AAGUAAUUGAACAUGUCUCCC 3'
F2RL1#67-2 : (S) 5' mACmAUmGUmUCmAAmUUmACmUU 3'
F2RL1#67-2 : (AS) 5' AAGUAAUUGAACAUmGmUCUCCC 3'
F2RL1#67-3 : (S) 5' mACmAUmGUmUCmAAmUUmACmUU 3'
F2RL1#67-3 : (AS) 5' AAGUAAUUGAACAUmGmUmCmUCCC 3'
F2RL1#67-4 : (S) 5' mACmAUmGUmUCmAAmUUmACmUU 3'
F2RL1#67-4 : (AS) 5' AAGUAAUUGAACAUmGmUmCmUmCmCmC 3'
F2RL1#76-1 : (S) 5' mUGmAAmAAmCmCmGAmGAmAG 3'
F2RL1#76-1 : (AS) 5' CUUCUCUGAGUUUCAUCCA 3'

[0225]

F2RL1#76-2 : (S) 5' mUGmAaAmAaCmCmGAmGAmAG 3'
F2RL1#76-2 : (AS) 5' CUUCUCUGAGUUUUmCmAUCCAU 3'
F2RL1#76-3 : (S) 5' mUGmAaAmAaCmCmGAmGAmAG 3'
F2RL1#76-3 : (AS) 5' CUUCUCUGAGUUUUmCmAaUmCCA 3'
F2RL1#76-4 : (S) 5' mUGmAaAmAaCmCmGAmGAmAG 3'
F2RL1#76-4 : (AS) 5' CUUCUCUGAGUUUUmCmAaUmCmCmAaU 3'
F2RL1#77-1 : (S) 5' mGmAaAmAaCmUCmAGmAGmAaGA 3'
F2RL1#77-1 : (AS) 5' UCUUCUCUGAGUUUCAUCCA 3'
F2RL1#77-2 : (S) 5' mGmAaAmAaCmUCmAGmAGmAaGA 3'
F2RL1#77-2 : (AS) 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCAUCCA 3'
F2RL1#77-3 : (S) 5' mGmAaAmAaCmUCmAGmAGmAaGA 3'
F2RL1#77-3 : (AS) 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCmAaUCCA 3'
F2RL1#77-4 : (S) 5' mGmAaAmAaCmUCmAGmAGmAaGA 3'
F2RL1#77-4 : (AS) 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCmAaUmCmCmA 3'
F2RL1#100-1 : (S) 5' mAaAmGUmGUmCCmGCmACmUGmUA 3'
F2RL1#100-1 : (AS) 5' UACAGUGCGGACACUUCGGCA 3'
F2RL1#100-2 : (S) 5' mAaAmGUmGUmCCmGCmACmUGmUA 3'
F2RL1#100-2 : (AS) 5' UACAGUGCGGACACmUmUCGGCA 3'
F2RL1#100-3 : (S) 5' mAaAmGUmGUmCCmGCmACmUGmUA 3'
F2RL1#100-3 : (AS) 5' UACAGUGCGGACACmUmUmCmGGCA 3'
F2RL1#100-4 : (S) 5' mAaAmGUmGUmCCmGCmACmUGmUA 3'
F2RL1#100-4 : (AS) 5' UACAGUGCGGACACmUmUmCmGmGmCmA 3'

[0226] 将表8中列出的asiRNA在1×siRNA双链体缓冲液(Bioneer)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen)用0.3nM的asiRNA转染A549细胞。

[0227] 转染后24小时,使用实时PCR测量经转染的细胞中的F2RL1 mRNA水平。具体地,根据制造商的说明,使用RNAiso Plus(TaKaRa)提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。根据制造商的说明,将合成的cDNA稀释,并且然后使用THUNDERBIRD®探针qPCR Mix(TOYOBO)进行实时PCR。使用F2RL1 TaqMan®探针(Hs00608346_m1)检测F2RL1的扩增。使用18S TaqMan®探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0228] 图20中提供了32种的asiRNA的F2RL1抑制的水平。

[0229] 实施例14:使用F2RL1-靶向asiRNA抑制F2RL1 mRNA表达

[0230] 测试实施例12中选择的12种的asiRNA(asiF2RL1#1、#22、#29、#50、#64、#67、#76、#77、#87、#88、#92和#100)抑制F2RL1表达的能力。

[0231] 将asiRNA在1×siRNA双链体缓冲液(Bioneer)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵

育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选,A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen)用1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0232] 具体地,根据制造商的说明,使用RNAiso Plus (TaKaRa) 提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用F2RL1 TaqMan® 探针(Hs00608346_m1)检测F2RL1的扩增。使用18S TaqMan® 探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0233] 图21中提供了12种的asiRNA的F2RL1抑制的水平。

[0234] 实施例15:使用F2RL1-靶向asiRNA抑制F2RL1蛋白表达

[0235] 检测asiF2RL1对F2RL1蛋白的抑制的效力。

[0236] 将asiRNA在1 \times siRNA双链体缓冲液(Bioneer)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0237] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。在转染前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen)用1nM的asiRNA转染A549细胞。

[0238] asiRNA转染之后72小时,经由免疫印迹测定F2RL1蛋白表达的水平。简单地说,用TX-100裂解缓冲液(1%TX-100,150mM NaCl,100mM Tris(pH 8.8))裂解经转染的A549细胞。A549细胞的10 μ g的总蛋白质提取物被装载到10%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA活化1小时。将膜在室温用3%BSA(Bioworld)封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-F2RL1抗体(Abcam)和抗-GAPDH抗体(Santa Cruz)的3%BSA中孵育过夜。然后膜被用1 \times TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在1 \times TBST中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1 \times TBST洗涤10分钟,并且用1 \times ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对F2RL1和GAPDH条带成像。

[0239] 图22中描绘了免疫印迹测定的结果。asiF2RL1#22、#50、#77和#92被选择用于化学修饰。

[0240] 实施例16:用于自我递送的asiRNA的化学修饰

[0241] 将化学修饰应用于实施例15中选择的12种的asiRNA,并且在不存在其他递送试剂的情况下测试经修饰的asiRNA的细胞递送。如下所述,某些修饰改进asiRNA的内吞作用和稳定性。这样的细胞穿透asiRNA(cp-asiRNA)能够不存在递送试剂的情况下被递送到细胞中。

[0242] 筛选了12种的潜在的cp-asiRNA(表9),用于A549细胞中的F2RL1 mRNA抑制。将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1 μ M和3 μ M与A549细胞孵育,并且通过实时PCR测量F2RL1 mRNA水平。

[0243] 表9. 被测试自我递送和F2RL1抑制的经修饰的asiRNA序列。m=2' -O-甲基RNA,*=硫代磷酸酯键。

[0244]

F2RL1#22-PS4/21(2,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmC*U*mG*U*胆甾醇 3'
F2RL1#22-PS4/21(2,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmAmGC*C*A*A*G 3'
F2RL1#22-PS4/21(4,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmC*U*mG*U*胆甾醇 3'
F2RL1#22-PS4/21(4,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*A*A*G 3'
F2RL1#22-PS4/21(7,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmC*U*mG*U*胆甾醇 3'
F2RL1#22-PS4/21(7,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmAmGmC*mC*mA*mA*mG 3'
F2RL1#50-PS4/21(2,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmA*A*mC*A*胆甾醇 3'
F2RL1#50-PS4/21(2,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUG*G*A*G*U 3'
F2RL1#50-PS4/21(4,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmA*A*mC*A*胆甾醇 3'
F2RL1#50-PS4/21(4,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUmG*mG*A*G*U 3'
F2RL1#50-PS4/21(7,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmA*A*mC*A*胆甾醇 3'
F2RL1#50-PS4/21(7,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUmG*mG*mA*mG*mU 3'
F2RL1#77-PS4/21(2,4) (S) : 5' mGAmAAmACmUCmAGmAGmA*A*mG*A*胆甾醇 3'
F2RL1#77-PS4/21(2,4) (AS) : 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCA*U*C*C*A 3'
F2RL1#77-PS4/21(4,4) (S) : 5' mGAmAAmACmUCmAGmAGmA*A*mG*A*胆甾醇 3'
F2RL1#77-PS4/21(4,4) (AS) : 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCmA*mU*C*C*A 3'
F2RL1#77-PS4/21(7,4) (S) : 5' mGAmAAmACmUCmAGmAGmA*A*mG*A*胆甾醇 3'
F2RL1#77-PS4/21(7,4) (AS) : 5' UCUUCUCUGAGUUUmUmCmA*mU*mC*mC*mA 3'
F2RL1#92-PS4/21(2,4) (S) : 5' mCCmCUmUUmGUmCUmAUmU*A*mC*U*胆甾醇 3'

[0245]

F2RL1#92-PS4/21(2,4) (AS) : 5' AGUAAUAGACAAAGmGmGG*U*C*G*A 3'
F2RL1#92-PS4/21(4,4) (S) : 5' mCCmCUmUUmGUmCUmAUmU*A*mC*U*胆甾醇 3'
F2RL1#92-PS4/21(4,4) (AS) : 5' AGUAAUAGACAAAGmGmGmG*mU*C*G*A 3'
F2RL1#92-PS4/21(7,4) (S) : 5' mCCmCUmUUmGUmCUmAUmU*A*mC*U*胆甾醇 3'
F2RL1#92-PS4/21(7,4) (AS) : 5' AGUAAUAGACAAAGmGmGmG*mU*mC*mG*mA 3'

[0246] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素。

[0247] 将表9中列出的潜在的cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95℃孵育5分钟,并且在37℃孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0248] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养8小时和24小时,在每个点处,用含有血清的培养基代替含有asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0249] asiRNA处理后48小时,使用实时PCR测定F2RL1 mRNA表达的水平。图23中提供了cp-asiRNA的F2RL1抑制的水平。

[0250] 实施例17:使用F2RL1-靶向cp-asiRNA抑制F2RL1 mRNA表达

[0251] 测试cp-asiRNA对F2RL1RNA的抑制的效力。

[0252] 将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1μM和3μM与A549细胞孵育,并

且使用实时PCR测量F2RL1 mRNA水平。

[0253] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。

[0254] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0255] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0256] asiRNA处理后48小时,通过实时PCR测定F2RL1 mRNA表达的水平。根据制造商的说明,使用RNAiso Plus (TaKaRa)提取全部RNA,并且然后使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),将500ng提取的RNA用于cDNA合成。使用F2RL1 TaqMan[®]探针(Hs00608346_m1)检测F2RL1的扩增。使用18S TaqMan[®]探针(Hs03928985_g1)将18S扩增为内部对照。

[0257] 图24中提供了cp-asiRNA的F2RL1抑制的水平。

[0258] 实施例18:使用F2RL1-靶向cp-asiRNA抑制F2RL1蛋白

[0259] 测试cp-asiRNA对F2RL1蛋白的抑制的效力。

[0260] 将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1 μ M和3 μ M与A549细胞孵育,并且通过免疫印迹检测F2RL1蛋白水平。

[0261] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。

[0262] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0263] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0264] asiRNA转染后72小时,经由免疫印迹测定F2RL1蛋白表达的水平。简单地说,用TX-100裂解缓冲液(1%TX-100,150mM NaCl,100mM Tris(pH 8.8))裂解经处理的A549细胞。10 μ g的总蛋白质提取物被装载到10%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA活化1小时。将膜在室温用3%BSA(Bioworld)封闭1小时,并且然后在4 $^{\circ}$ C在含有抗-F2RL1抗体(Abcam)和抗-GAPDH抗体(Santa Cruz)的3%BSA中孵育过夜。然后膜被用1 \times TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在1 \times TBST中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1 \times TBST洗涤10分钟,并且用1 \times ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对F2RL1和GAPDH条带成像。

[0265] 图25中描绘了免疫印迹测定的结果。

[0266] 实施例19:使用附加的F2RL1-靶向cp-asiRNA抑制F2RL1 mRNA表达

[0267] 合成具有不同链长度以及2'-O-甲基化修饰和硫代磷酸酯键的数量的各种各样的潜在的cp-asiF2RL1#22和#50结构,并且测试其抑制F2RL1表达的能力(表10)。

[0268] 表10:附加的cp-asiRNA序列。 $m=2'$ -O-甲基RNA,

[0269] *=硫代磷酸酯键。

[0270]	F2RL1#50-PS3/19 (5,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmAA*mC*A*胆甾醇3'
	F2RL1#50-PS3/19 (5,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmC*mU*mG*mG*mA 3'
	F2RL1#50-PS3/21 (7,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmAA*mC*A*胆甾醇3'
	F2RL1#50-PS3/21 (7,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmCmUmG*mG*mA*mG*mU 3'
	F2RL1#50-PS4/19 (5,4) (S) : 5' mAGmGAmAGmAAmGGmCAmAA*mC*A*胆甾醇3'
	F2RL1#50-PS4/19 (5,4) (AS) : 5' UGUUUGCCUUCUUCmC*mU*mG*mG*mA 3'
	F2RL1#22-PS3/19 (4,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmCU*mG*U*胆甾醇3'
	F2RL1#22-PS4/19 (4,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmA*mG*mC*mC*A3'
	F2RL1#22-PS3/21 (4,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmCU*mG*U*胆甾醇3'
	F2RL1#22-PS4/21 (4,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmA mGmC*mC*A*A*G 3'
	F2RL1#22-PS4/19 (4,4) (S) : 5' mCUmGAmCCmUCmCUmCUmCU*U*mG*U*胆甾醇3'
	F2RL1#22-PS4/19 (4,4) (AS) : 5' ACAGAGAGGAGGUCmA*mG*mC*mC*A3'

[0271] 测试表10中列出的1 μ M和3 μ M的潜在的cp-asiRNA中的每种抑制A549细胞中的F2RL1 mRNA的能力。

[0272] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。

[0273] 将表4中列出的潜在的cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0274] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0275] asiRNA处理后48小时,测定F2RL1 mRNA表达的水平。

[0276] 图26中提供了8种的cp-asiRNA的F2RL1抑制的水平。

[0277] 实施例20:使用附加的F2RL1-靶向cp-asiRNA抑制F2RL1蛋白表达

[0278] 测试cp-asiRNA对F2RL1蛋白的抑制的效力。

[0279] 将每种潜在的cp-asiRNA在无递送试剂的情况下以1 μ M和3 μ M与A549细胞孵育,并且通过免疫印迹测量F2RL1蛋白水平。

[0280] A549细胞(ATCC)已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)中被培养,所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)含有10%胎牛血清(Gibco)、100 μ g/ml青霉素/链霉素。

[0281] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。

[0282] 在处理前一天,将 2.5×10^4 个A549细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Gibco)洗涤A549细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替含有asiRNA的OPTI-MEM培养基。

[0283] asiRNA处理后72小时,经由免疫印迹测定F2RL1蛋白表达的水平。简单地说,用TX-100裂解缓冲液(1%TX-100,150mM NaCl,100mM Tris (pH 8.8))裂解经处理的A549细胞。10 μ g的总蛋白质提取物被装载到10%的SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA活化1小时。将膜在室温用3%BSA(Bioworld)封闭1小时,并且然后在4℃在含有抗-F2RL1抗体(Abcam)和抗-GAPDH抗体(Santa Cruz)的3%BSA中孵育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温在1×TBST中用HRP缀合的二级抗体孵育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对F2RL1和GAPDH条带成像。

[0284] 图27中描绘了免疫印迹测定的结果。

[0285] 实施例21:体内效力研究

[0286] 在剃刮NC/Nga小鼠的背部区之后,将粉尘螨体提取物(Df)乳膏按照所呈现的时间表涂覆用于诱导特应性皮炎。在第11、14和18天,在 Biostir[®] AD软膏应用之前,通过皮内注射或涂抹乳膏乳化的cp-asiRNA来施用cp-asiRNA(图29)。皮内注射的剂量为80 μ g/50 μ l*4位点/头,并且乳膏乳化的cp-asiRNA的剂量为800 μ g/头。记录小鼠行为并且分析480秒的搔抓行为。在粉尘螨体提取物(Df)乳膏处理的样品(1×PBS+Df)中观察到增加的搔抓时间。在皮内注射(图30,A部分)和乳膏乳化的cp-asiRNA应用(图30,B部分)条件下,相比于空白对照(1×PBS+Df),IL4RA#5-PS3/19(4,4)、TRPA1#81-PS3/19(4,4)、F2RL1#22-PS4/19(4,4)处理的样品显示降低的搔抓时间。结果在图30中呈现为条形图(平均值±S.D)。通过学生t检验方法对结果进行统计学分析(n=5)。

[0287] 使用手持式蒸发仪(VapoMeter,Delfin Technologies Ltd,Kuopio,Finland)测量经表皮水分丢失(TEWL)。在粉尘螨体提取物(Df)乳膏处理的样品(1×PBS+Df)中观察到增加的TEWL。在皮内注射(图31,A部分)和乳膏乳化的cp-asiRNA应用(图31,B部分)条件下,相比于空白对照(1×PBS+Df),IL4RA#5-PS3/19(4,4)、TRPA1#81-PS3/19(4,4)、F2RL1#22-PS4/19(4,4)处理的样品显示降低的TEWL。数据表示为平均值±S.E.M。通过学生t检验方法对结果进行统计学分析(n=5)。

[0288] 进行经处理的皮肤区的组织学分析。上部图片显示皮肤切片的H&E染色,并且下部图片显示通过分析皮肤切片图像的定量表皮面积。在粉尘螨体提取物(Df)乳膏处理的样品(+Df)中观察到增加的表皮区厚度、角化过度和棘层肥厚。在皮内注射(图32,A部分)和乳膏乳化的cp-asiRNA应用(图32,B部分)条件下,相比于空白对照(+Df),IL4RA#5-PS3/19(4,4)、TRPA1#81-PS3/19(4,4)、F2RL1#22-PS4/19(4,4)处理的样品显示由Df处理引起的减轻的症状。在皮内注射(图32,A部分)和乳膏乳化的cp-asiRNA应用(图32,B部分)条件下,相比于空白对照(1×PBS+Df),IL4RA#5-PS3/19(4,4)、TRPA1#81-PS3/19(4,4)、F2RL1#22-PS4/19(4,4)处理的样品显示降低水平的表皮厚度。数据表示为平均值±S.E.M。通过学生t检验方法对结果进行统计学分析(n=5)。

[0289] 进行经处理的皮肤区的肥大细胞浸润分析。图33显示皮肤切片的甲苯胺蓝染色和

经染色的皮肤切片图像的定量结果。在粉尘螨体提取物 (Df) 乳膏处理的样品 (+Df) 中观察到增加的肥大细胞浸润。在皮内注射 (图33,A部分) 和乳膏乳化的cp-asiRNA应用 (图33,B部分) 两者的情况中,相比于空白对照 (+Df), IL4RA#5-PS3/19 (4,4)、TRPA1#81-PS3/19 (4,4)、F2RL1#22-PS4/19 (4,4) 处理的样品显示降低的肥大细胞浸润。在皮内注射和乳膏乳化的cp-asiRNA应用条件下,相比于空白对照 (1×PBS+Df), IL4RA#5-PS3/19 (4,4)、TRPA1#81-PS3/19 (4,4)、F2RL1#22-PS4/19 (4,4) 处理的样品显示降低水平的肥大细胞浸润面积。数据表示为平均值±S.E.M。通过学生t检验方法对结果进行统计学分析 (n=5)。

[0290] 通过引用并入

[0291] 本文提到的所有出版物、专利和专利申请全部以引用方式被整体并入本文,犹如每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地表明通过引用被并入。在冲突的情况下,本申请 (包含本文中的任何定义) 将受约束。

[0292] 等同物

[0293] 本领域技术人员将认识到或能够使用仅仅常规实验来确定本文中描述的本发明的具体的实施方案的许多等同物。这样的等同物旨在由以下权利要求涵盖。

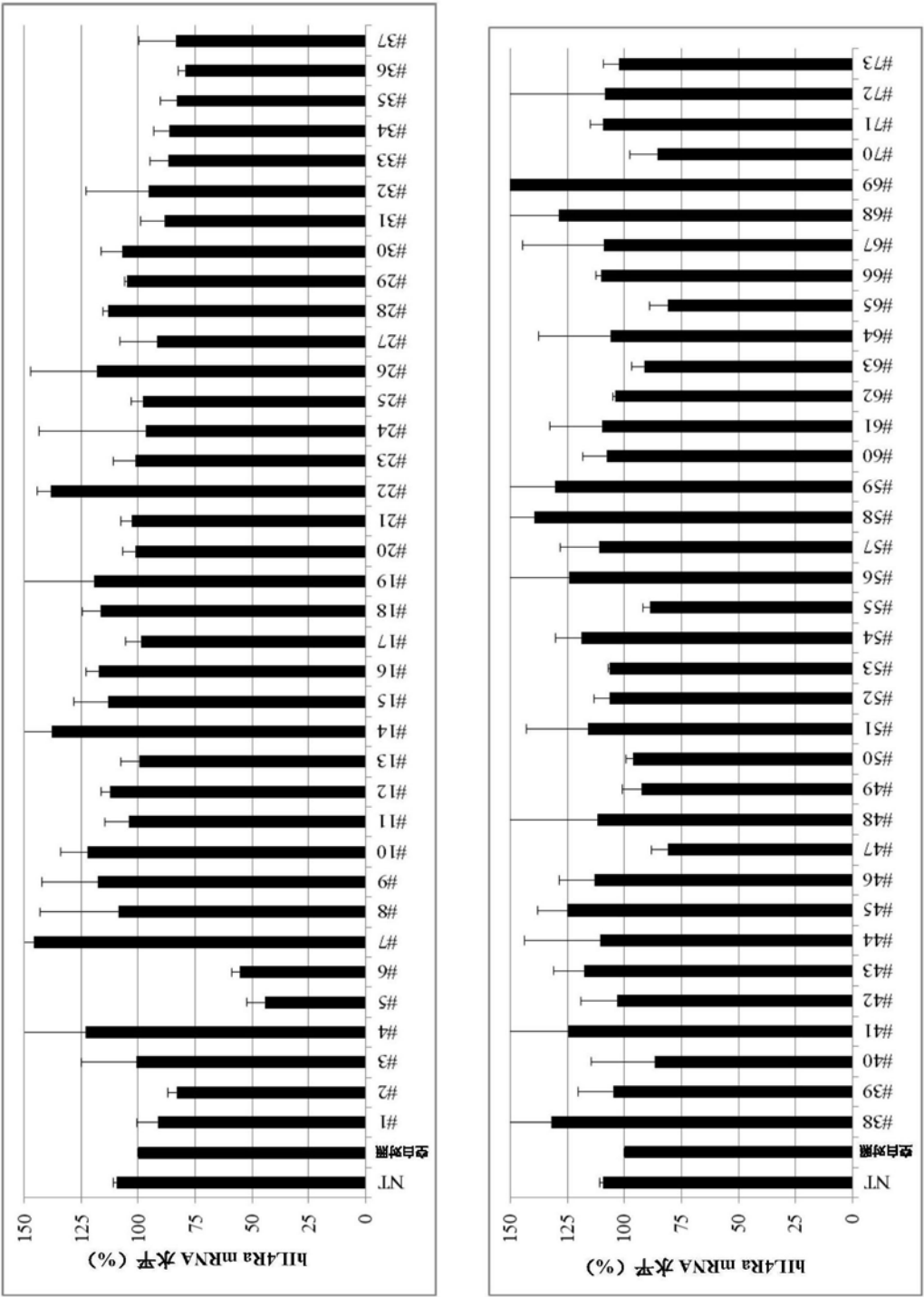


图1

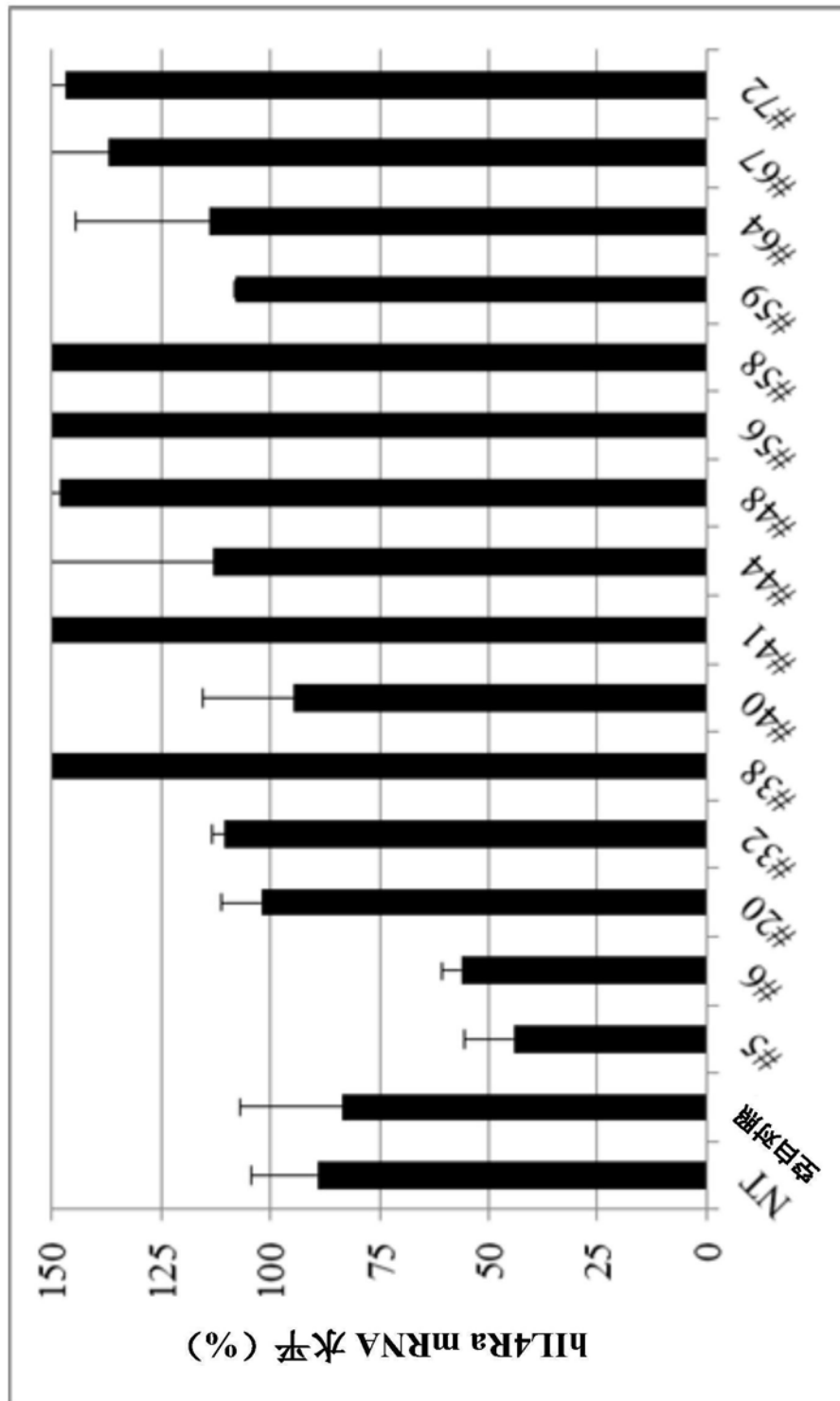


图2

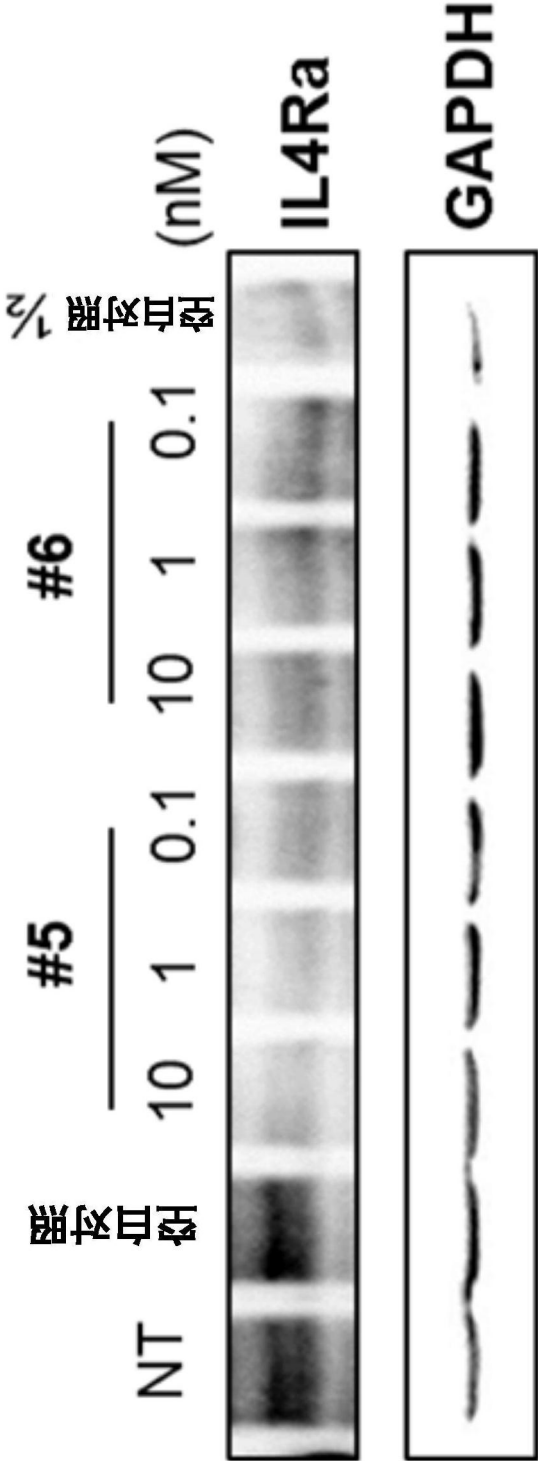


图3

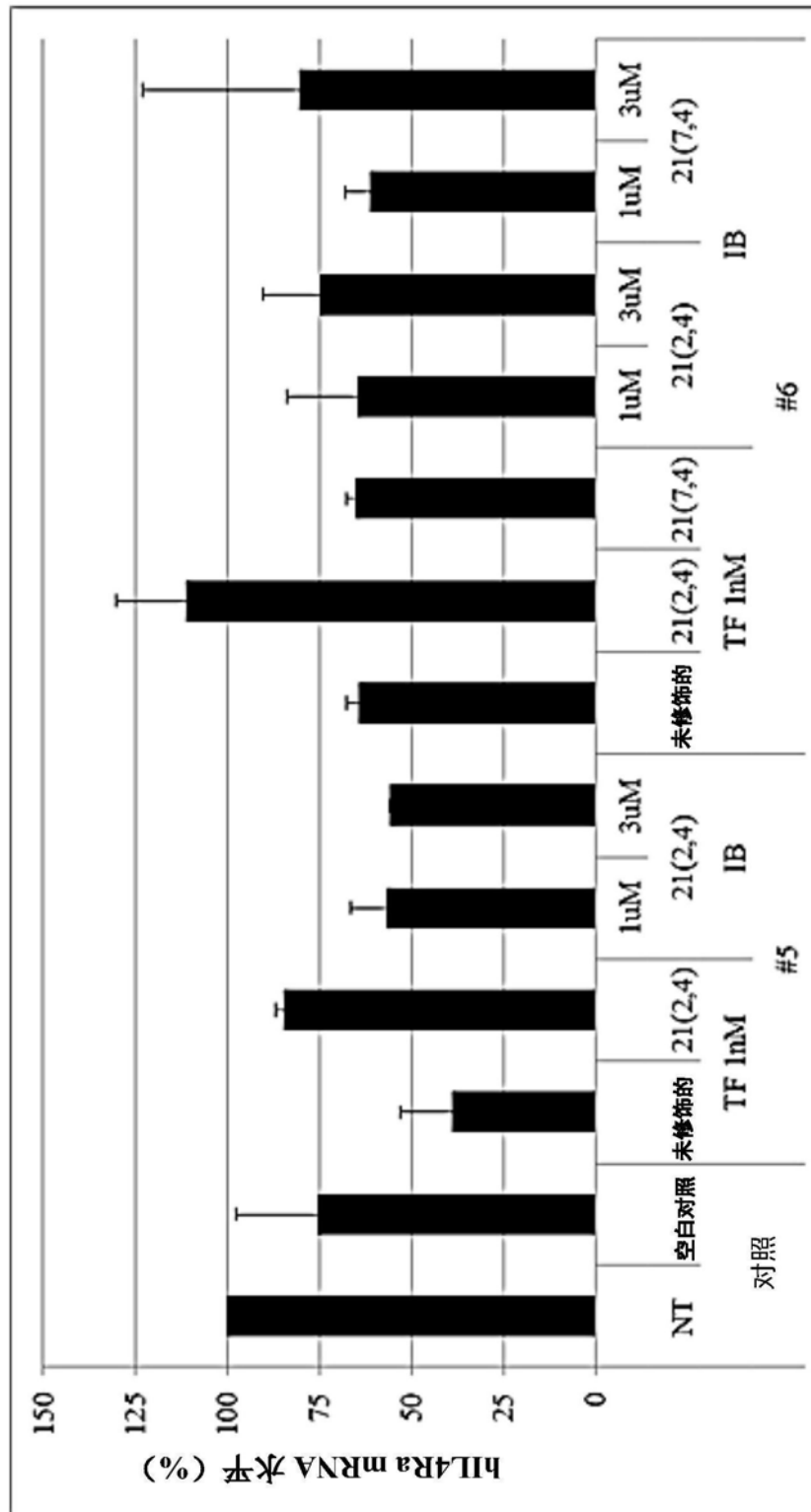


图4

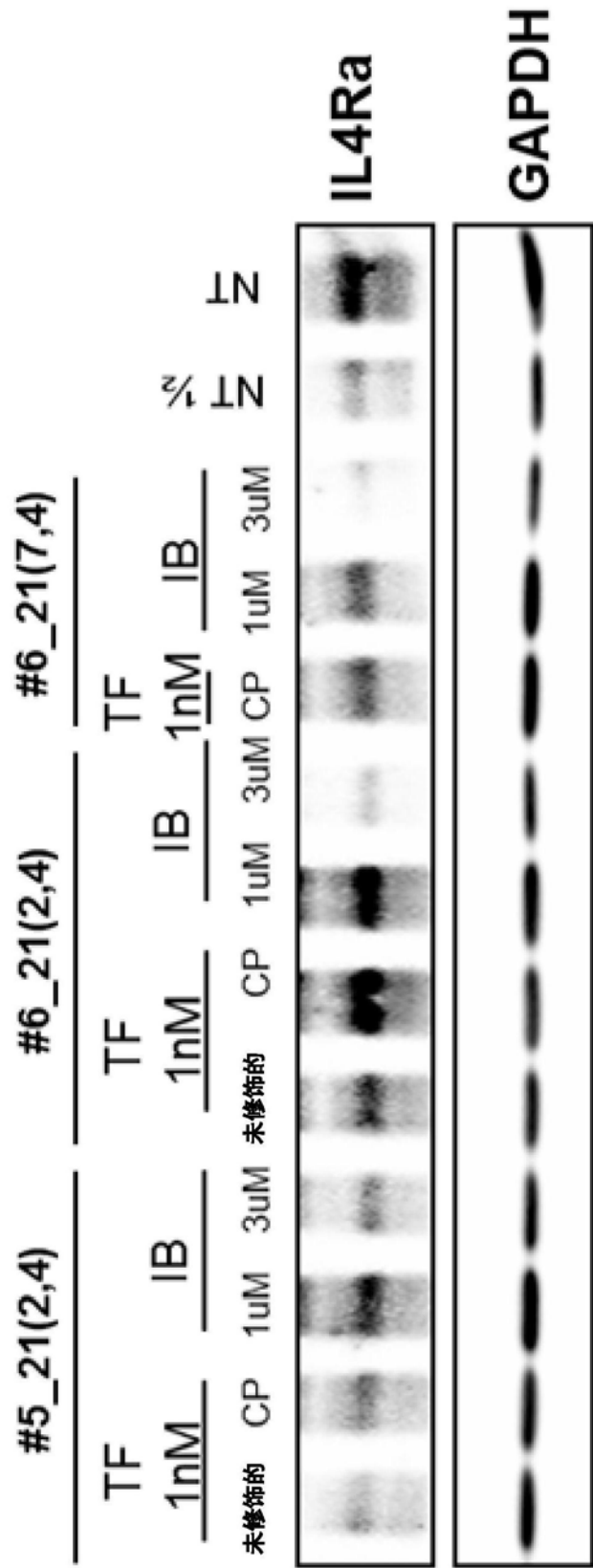


图5

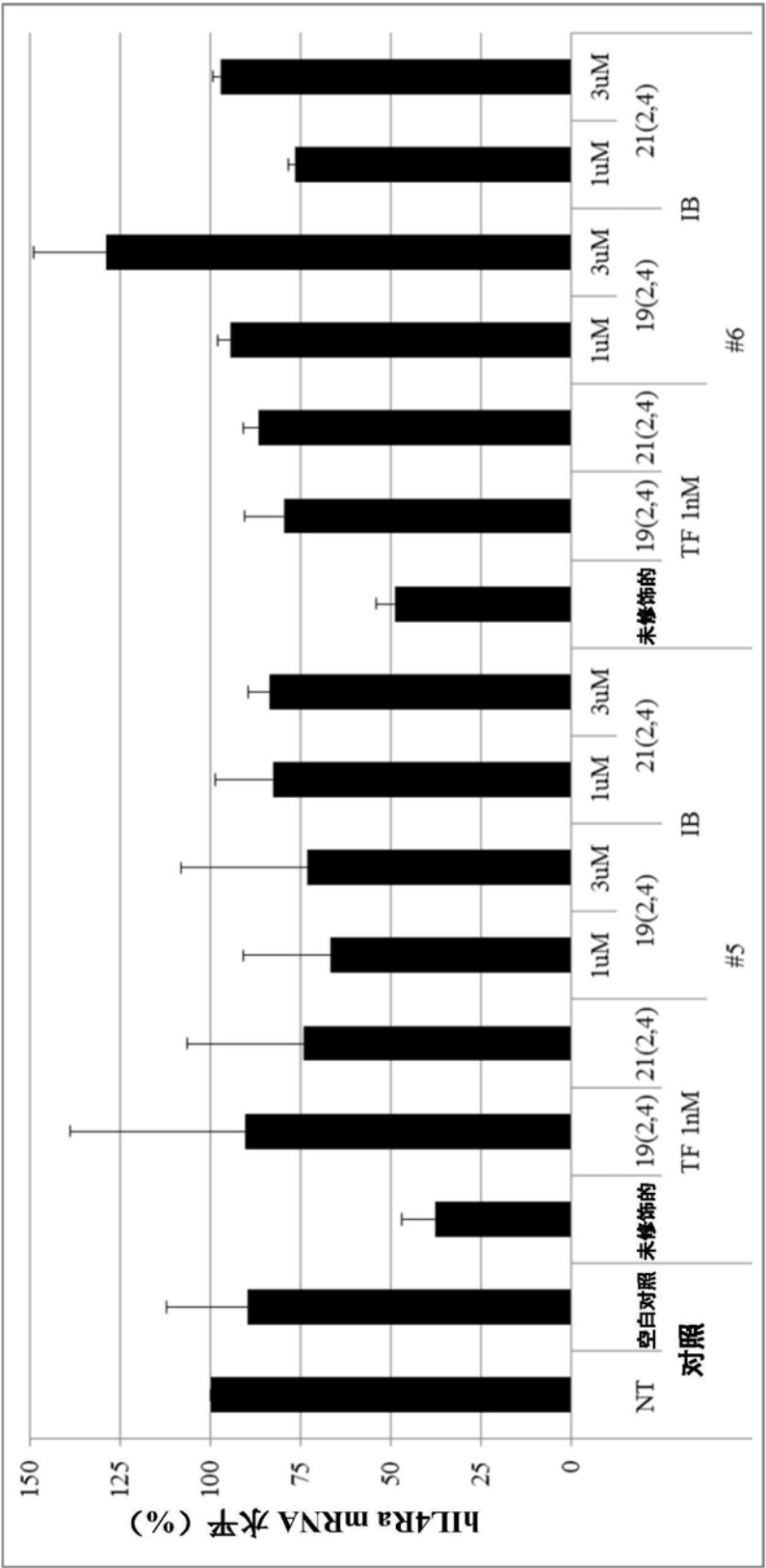


图6

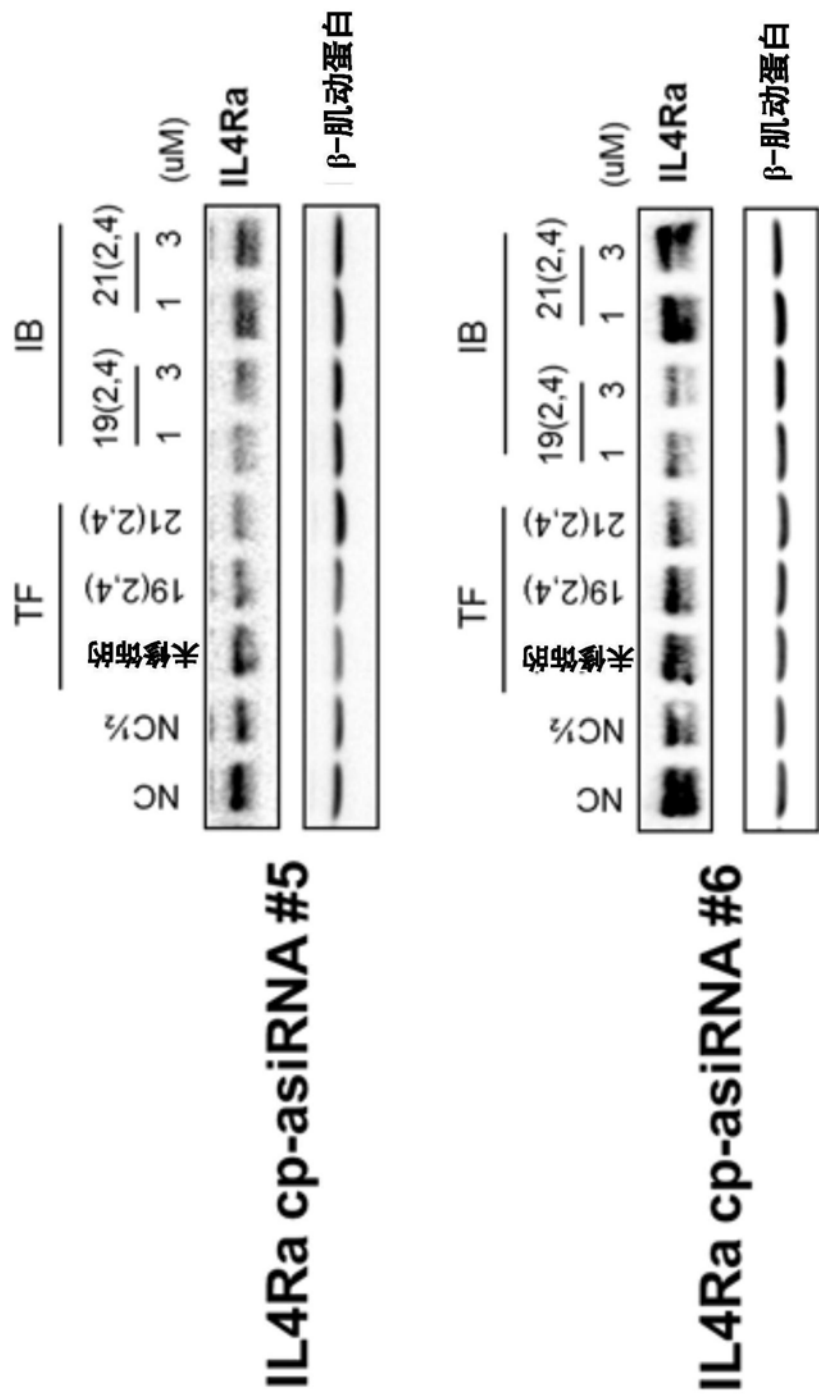


图7

人 IL4Ra mRNA 序列 (NM_000418.3)。

1 ggggtctccgc gccccaggaaa gccccgcgcg gcgcggggcca gggaagggcc acccaggggt
61 cccccacttc ccgcttgggc gccccggacgg cgaatggagc aggggcgcgc agataattaa
121 agatttacac acagctggaa gaaatcatag agaagccggg cgtggtggct catgcctata
181 atcccagcac ttttgaggc tgaggcgggc agatcacttg agatcaggag ttcgagacca
241 gcttggtgcc ttggcatctc ccaatggggt ggctttgctc tgggctcctg ttcctgtga
301 gtgcctggt cctgctgcag gtggcaagct ctgggaacat gaaggcttg caggagccca
361 cctgcgtctc cgactacatg agcatctcta ctgcgagtg gaagatgaat ggtcccacca
421 attgcagcac cgagctccgc ctgttgatc agctggttt tctgctctcc gaagcccaca
481 cgtgtatccc tgagaacaac ggaggcgcgg ggtgcgtgtg ccactgctc atggatgacg
541 tggtcagtgc ggataactat aactggacc tgtgggctgg gcagcagctg ctgtggaagg
601 gtctctcaa gccccagcag catgtgaaac ccaggggccc aggaaacctg acagttcaca
661 ccaatgtctc cgacactctg ctgctgacct ggagcaacce gtatccccct gacaattacc
721 tgtataatca tctcacctat gcagtcaaca ttggagtga aaacgaccgg gcagattca
781 gaattataa cgtgacctac ctagaacct cctccgcct cgcagccagc acctgaagt
841 ctgggatttc ctacaggga cgggtgaggg cctgggctca gtgctataac accacctgga
901 gtgagtggag cccagcacc aagtggcaca actctacag ggagccctc gagcagcacc
961 tctgctggg cgtcagcgtt tctgcattg tcactctggc cgtctgctg ttgtgctatg
1021 tcagcatcac caagattaag aaagaatggt gggatcagat tcccaacca gcccgagcc
1081 gctcgtggc tataataatc caggatgctc aggggtcaca gtgggagaag cggctccgag
1141 gccaggaacc agccaagtgc ccactgga agaattgtct taccaagctc ttgccctgtt
1201 ttctggagca caacatgaaa agggatgaag atctcaca ggctgcaaaa gagatgcctt
1261 tccagggtc tggaataca gcatggtgcc cagtggagat cagcaagaca gtcctctggc
1321 cagagagcat cagcgtggtg cgatgtgtgg agttgtttga ggccccggtg gagtgtgagg
1381 aggaggagga ggtagaggaa gaaaaggga gcttctgtgc atgcctgag agcagcaggg
1441 atgacttcca ggagggaagg gagggcattg tggcccggct aacagagagc ctgttctgg
1501 acctgctcgg agaggagaat gggggcttt gccagcagga catgggggag tcatgcctc
1561 ttccacctc gggaagtacg agtgctcaca tgccctggga tgagtcca agtcagggc
1621 ccaaggagge acctccctgg ggcaaggagc agccttcca cctggagcca agtcctctg
1681 ccagcccgac ccagagtcca gacaacctga ctgcacaga gacgccctc gtcacgcag
1741 gcaacctgc ttaccgcagc ttacgaact cctgagcca gtcacctgt cccagagagc

图8

1801 tgggtccaga cccactgctg gccagacacc tggaggaagt agaaccgag atgccctgtg
1861 tccccagct ctctgagcca accactgtgc cccaacctga gccagaaacc tgggagcaga
1921 tctccgccg aaatgtctc cagcatgggg cagctgcagc ccccgctcgc gccccacca
1981 gtggctatca ggagtttga catgcggtgg agcagggtgg caccaggcc agtgcggtgg
2041 tgggcttggg tccccagga gaggtgggtt acaaggcctt ctaagcctg cttgccagca
2101 gtgctgtgc cccagagaaa tgtgggttg gggctagcag tggggaagag gggataaagc
2161 cttccaaga cctcattcct ggctgccctg gggaccctgc ccagtcctt gtccccctgt
2221 tcaccttgg actggacagg gagccacctc gcagtcgca gagtcacat ctccaagca
2281 gctccccaga gcactgggt ctggagccgg gggaaaagg agaggacatg ccaaagcccc
2341 cacttccca ggagcaggcc acagaccccc ttgtggacag cctgggcagt ggcattgtct
2401 actcagccct tacctgccac ctgtgcggcc acctgaaaca gtgtcatggc caggaggatg
2461 gtggccagac ccctgtcatg gccagtcctt gctgtggctg ctgctgtgga gacaggtcct
2521 cgeccccac aacccccctg agggccccag accctctcc aggtgggggt cactggagg
2581 ccagtctgtg tccggcctcc ctggcaccct cgggcacatc agagaagagt aaatcctcat
2641 catcttcca tctgccccct ggcaatgctc agagctcaag ccagaccccc aaaatcgtga
2701 actttgtctc cgtgggaccc acatacatga gggctctta ggtgcatgct ctcttgttgc
2761 tgagtctgca gatgaggact agggcttate catgcctggg aaatgccacc tcttgaagg
2821 cagccaggtt ggcagatttc caaaagactt gaagaacctt ggtatgaagg tgattggccc
2881 cactgacgtt ggcctaacac tgggtgcag agactggacc cggcccagca ttgggtggg
2941 ctgcccacat cccatgagag tagagggcac tgggtcgccg tgcccacgg caggccccctg
3001 caggaaaact gaggccttg ggcacctga cttgtgaacg agttgttggc tctccctcc
3061 acagcttctg cagcagactg tccctgttgt aactgcccc ggcattgtt gccaccaga
3121 tcatggcca cgtggaggcc cactgcctc tgtctactg aactagaagc cgagcctaga
3181 aactaacaca gccatcaagg gaatgacttg ggcggccttg ggaaatgat gagaaattga
3241 acttcaggga ggggtggtcat tgcctagagg tgctcattca tttaacagag ctctcttagg
3301 ttgatgctgg aggcagaatc cgggtgtca aggggtgttc agttaagggg agcaacagag
3361 gacatgaaa attgctatga ctaaagcagg gacaatttgc tgccaaacac ccatgccag
3421 ctgtatggtt gggggctcct cgtatgatg gaacccccag aataaatatg ctacagccc
3481 ctgtgggccc ggcaatccag acagcaggca taaggacca gttaccctgc atgttggccc
3541 agacctcagg tgctagggaa ggcgggaacc ttgggtttag taatgctcgt ctgtgtgtt
3601 tagtttcatc acctgttate tgtgttctg gaggagagt gaacagaagg ggtggagttt
3661 tgtataaata aagtttctt gtctctttaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa

图8(续)

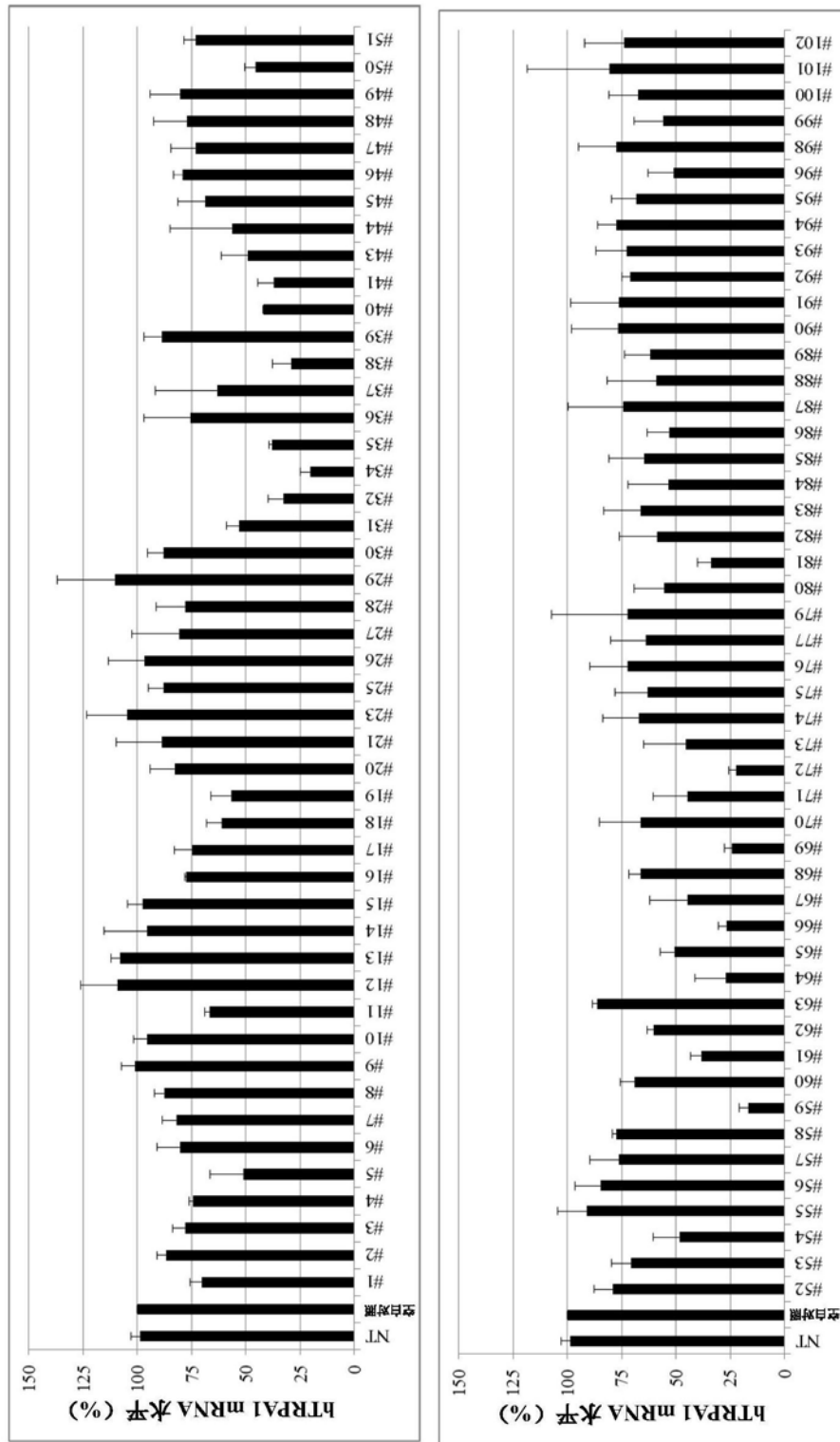


图9

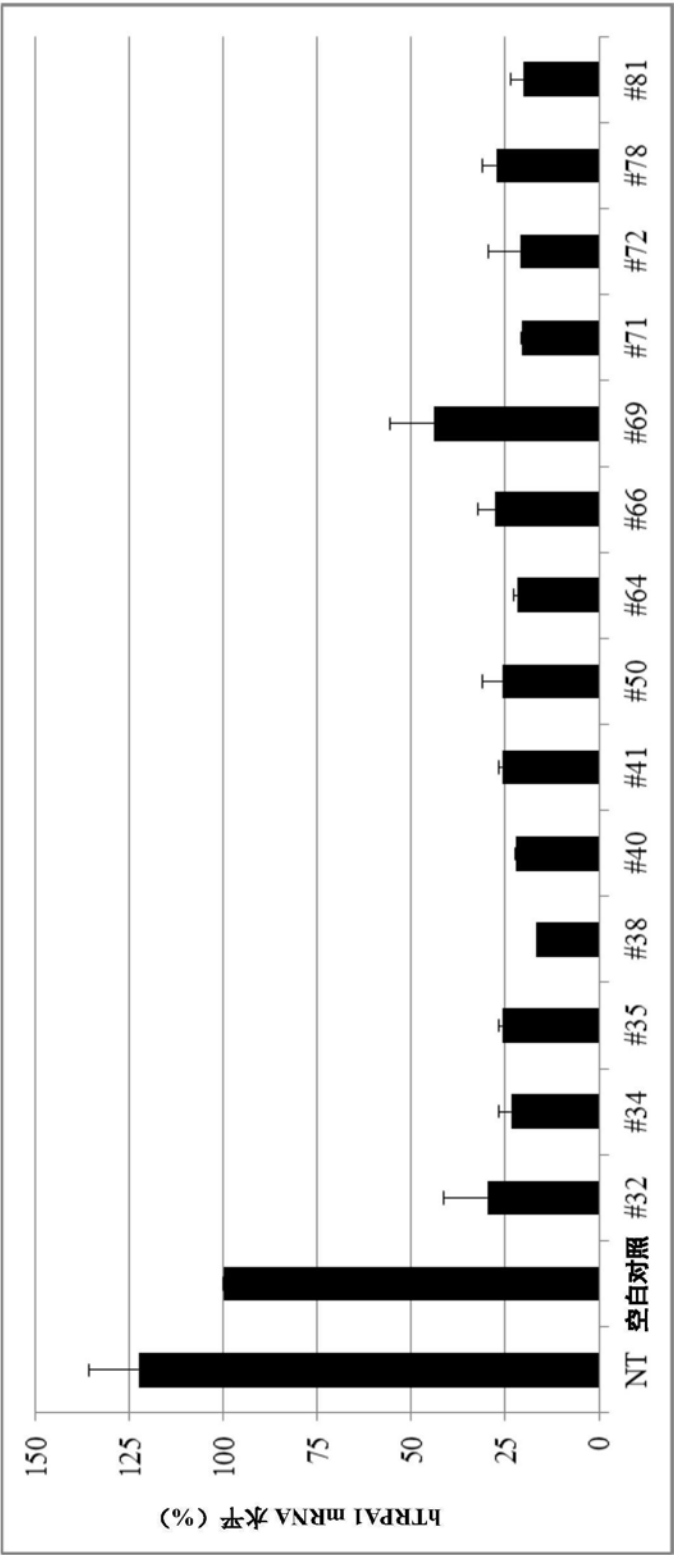


图10

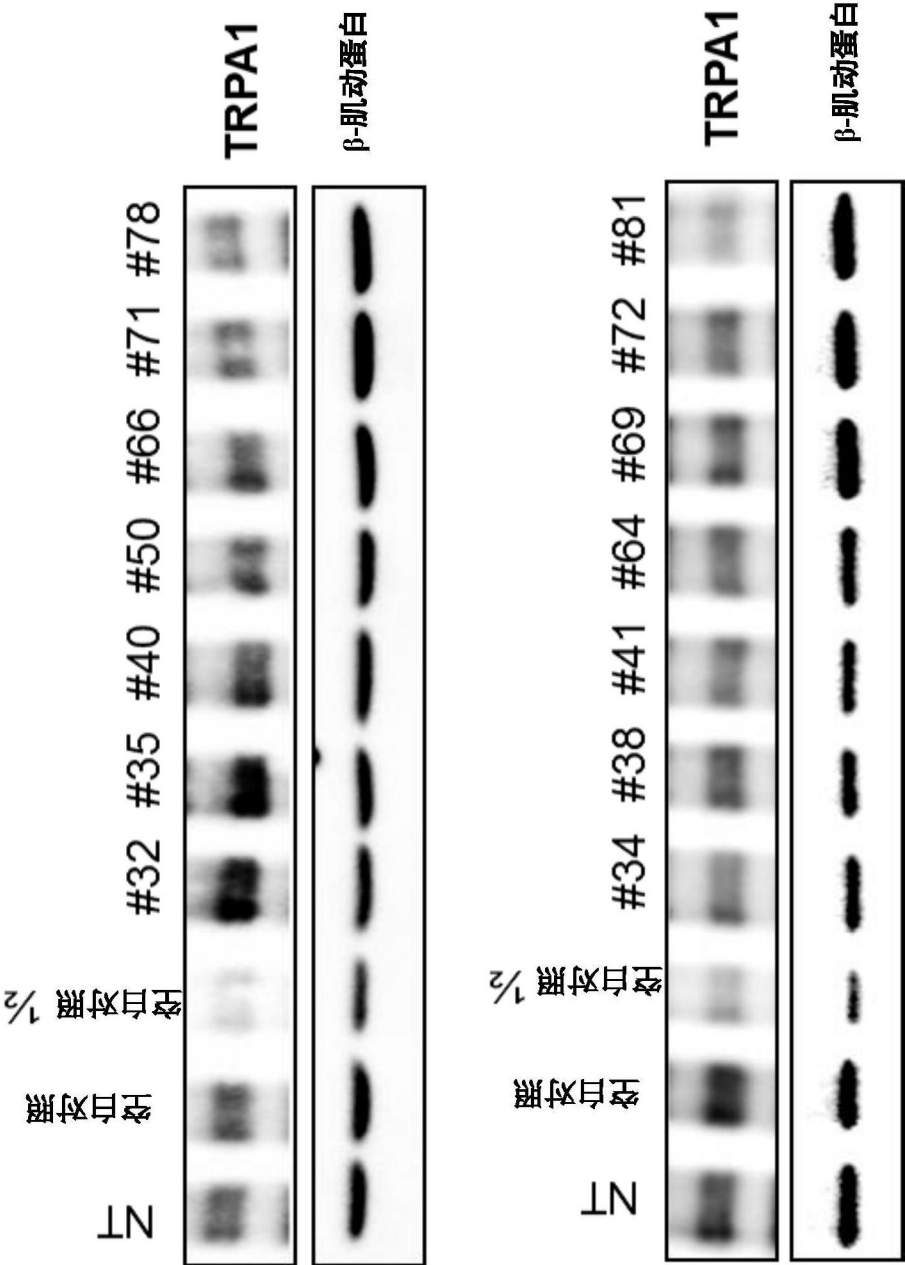


图11

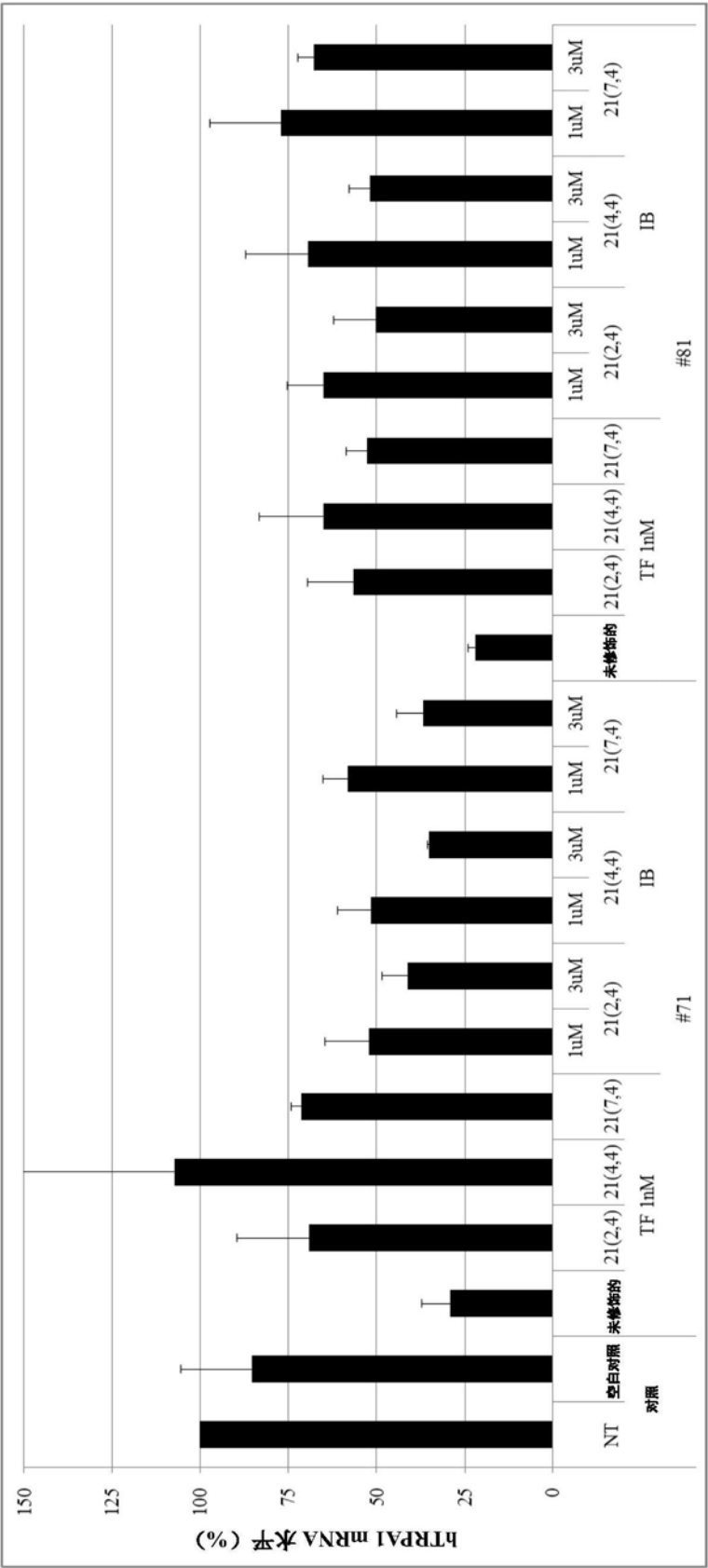


图12

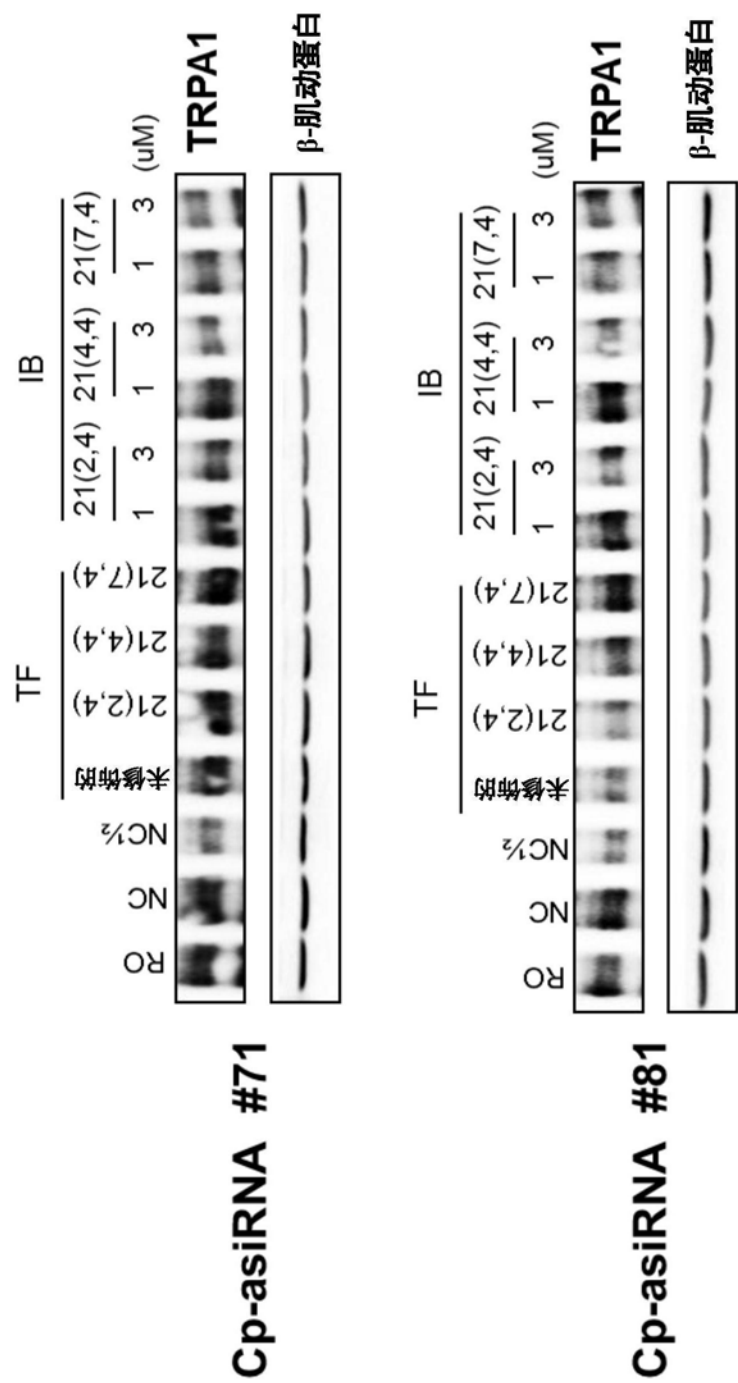


图13

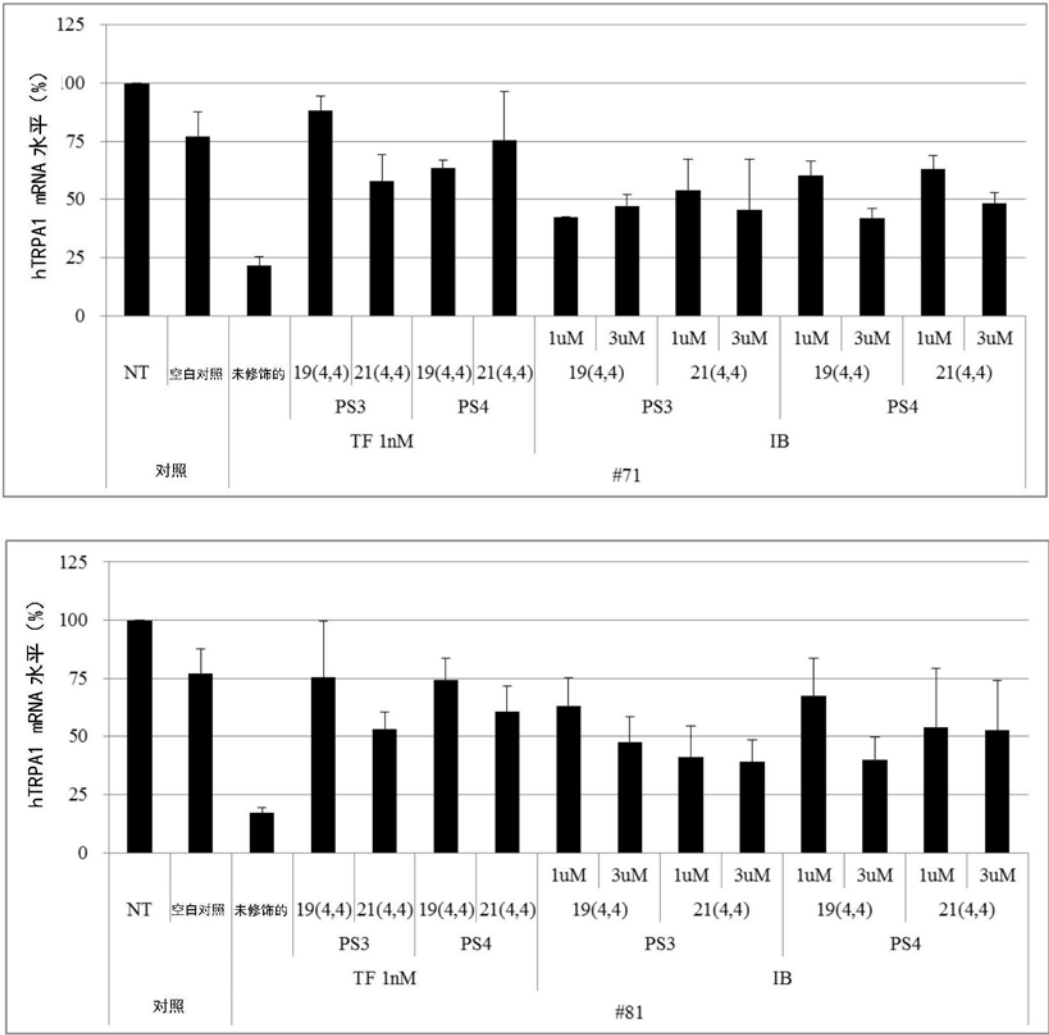


图14

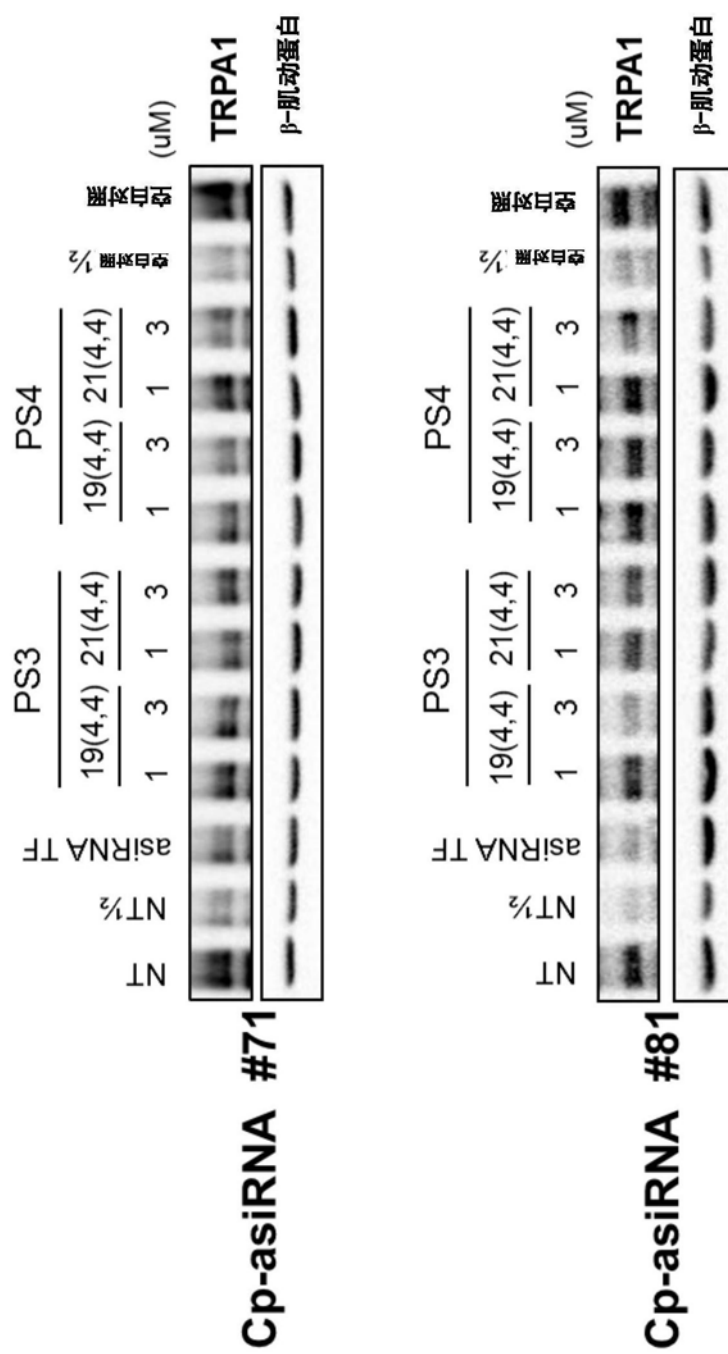


图15

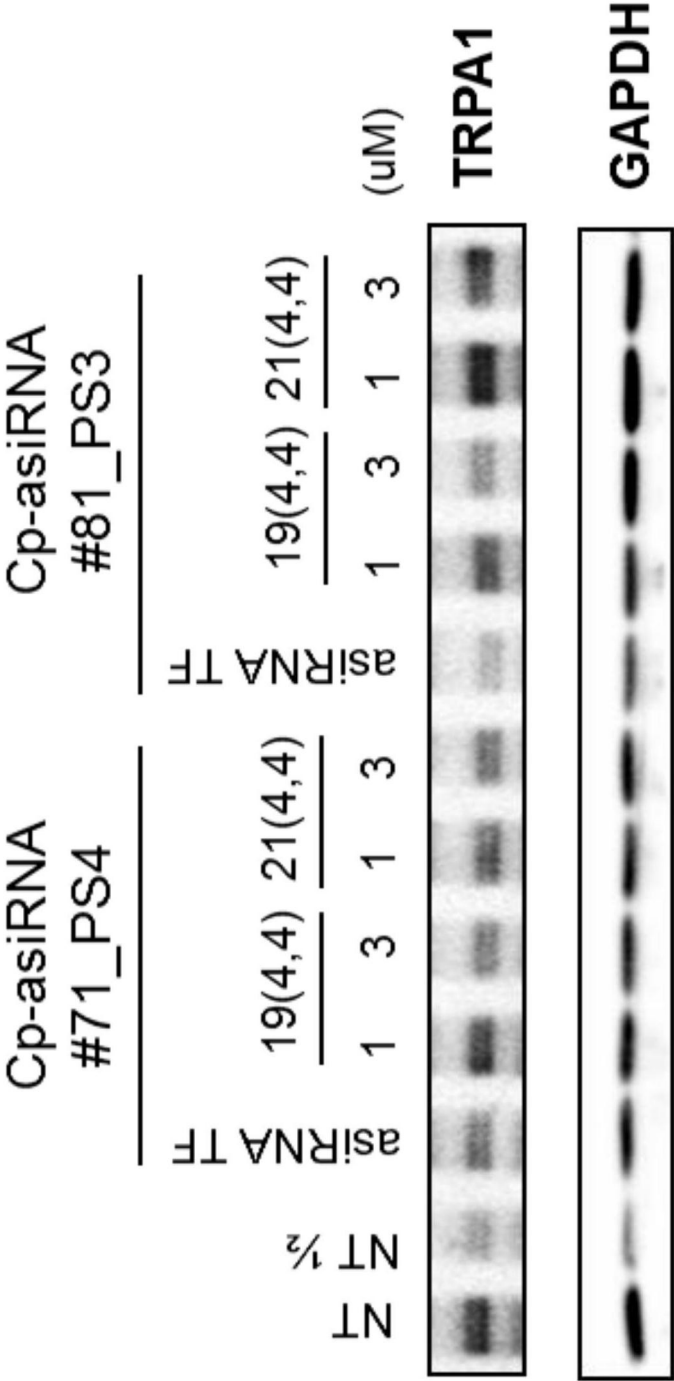


图16

人 TRPA1 mRNA 序列 (NM_007332)

1 ccagaagttc tccagggctt ccgcagagcg actttttcgc tgccctgtgag ctgcagcgcg
61 ggagagctcg ggctcgcgcg gaccccagcg cctggcaggc tgacagegct ctctcgcccc
121 aggtgcccgc gcgcgtggcg agcagctgca ccaggtggcg tccgggggtgg ggtcaatgaa
181 gcgcagcctg aggaagatgt ggcgccttgg agaaaagaag gagccccagg gcgttgtcta
241 tgaggatgtg ccggacgaca cggaggattt caaggaatcg cttaagggtg ttttgaagg
301 aagtgcataa ggattacaaa actttaataa gcaaaagaaa ttaaaaagat gtgacgatat
361 ggacaccttc ttcttgcaat atgtctgcgc agaaggccaa attgagctaa tggagaagat
421 caccagagat tctcttttgg aagtgtgca tgaatggat gattatggaa atacccctct
481 gcattgtgct gtagaaaaaa accaaattga aagcgttaag ttcttctca gcagaggagc
541 aaacccaaat ctccgaaact tcaacatgat ggctcctctc cacatagctg tgcagggcatt
601 gaataatgag gtgatgaagg tcttgcttga gcatagaact attgatgtta atttgaagg
661 agaaaatgga aacacagctg tgatcattgc gtgcaccaca aataatagcg aagcattgca
721 gattttgctt aaaaaggag ctaagccatg taaatcaaat aaatggggat gtttccctat
781 tcaccaagct gcattttcag gtcccaaaga atgcattgaa ataatactaa ggtttggtga
841 agagcatggg tacagtagac agttgcacat taactttatg aataatggga aagccacccc
901 tctccacctg gctgtgcaaa atggtgactt ggaaatgac aaaatgtgcc tggacaatgg
961 tgcacaaata gaccagtgga agaagggaag gtgcacagcc attcattttg ctgccacca
1021 gggagccact gagattgtta aactgatgat atcgtcctat tctggtagcg tggatattgt
1081 taacacaacc gatggatgac atgagacat gcttcacaga gcttcattgt ttgatcacca
1141 tgagctagca gactatttaa ttccagtggg agcagatatt aataagatcg attctgaagg
1201 acgtctctca cttatattag caactgttc tgcattttgg aatttgttaa atttgcact
1261 ctctaaaggt gcccagtag acataaaaga taattttgga cgtaatttc tgcatttaac
1321 tgtacagcaa cttatggat taaaaaatc gcgacctgaa ttatgcaga tgcaacagat
1381 caaagagctg gtaatggatg aagacaacga tgggtgtact cctctacatt atgcattgat
1441 acaggggggc cctggttctg taaataacct acttggtttt aatgtgtcca ttattccaa
1501 aagcaaagat aagaaatcac ctctgcattt tgcagccagt tatgggcgta tcaataacctg

图17

1561 tcagaggtc ctacaagaca taagtatac gaggtcttg aatgaagggt accctcatg
1621 aatgactcct ctccatctgg cagcaaagaa tggacatgat aaagtagttc agcttctct
1681 gaaaaaaggt gcattgttc tcagtacca caatggctgg acagctttgc atcatgcgc
1741 catggcgagg tacactcaga ccatgaaggt cattcttgat actaattga agtgcacaga
1801 tcgcctggat gaagacggga acactgcact tcactttgct gcaagggaag gccacgcaa
1861 agccgttgcg cttctctga gccacaatgc tgacatagtc ctgaacaagc agcaggcctc
1921 cttttgcac cttgcactc acaataagag gaaggagggt gttcttaca tcacaggag
1981 caaagatgg gatgaatgc ttaagatttt cagtcataat tctccagga ataatgtcc
2041 aattacagaa atgataaat accctcctga atgcatgaag gtacttttag atttctgat
2101 gttgcattcc acagaagaca agtctgccg agactattat atcgagtata attcaata
2161 tctcaatgt ccattagaat tcacaaaaa aacacctaca caggatgta tatatgaacc
2221 gcttacagcc ctcaacgcaa tggtaaaaa taaccgata gagcttctca atcatcctg
2281 gtgtaaagaa tatttactca tgaatgggt ggcttatgga tttagagtc atatgatga
2341 tttaggatct tactgtctg gtctcacc tatgaccatt ctggtgtca atataaac
2401 aggaatggct ttcaactcaa ctggcatcat caatgaaact agtgatcatt cagaatact
2461 agataccagc aattcatac taataaaaac ttgtatgatt ttagtgttt tatcaagat
2521 atttgggtat tgcaaagaag cggggcaaat ttccaacag aaaaggaatt atttatgga
2581 tataagcaat gttcttgaat ggattatcta cagcaggggc atcattttg tctgccctt
2641 gttgttgaa ataccagtc atctgcagt gcaatgtgga gcaattgtg ttacttcta
2701 ttgatgaat ttctattgt atctcaaag atttgaat tgtggaatt ttattgtat
2761 gttggaggt attttgaaa cttgttgag gtctacagt gtattatct tcttctct
2821 ggcttttga ctacgtttt acatctctc gaattacag gatccctca gctctcatt
2881 gcttctata atccagacct tcagcatgat gctaggagat atcaattac gagagctct
2941 cctagaacca tatctgagaa atgaattggc acatccagtt ctgtccttg cacaactgt
3001 ttcttcaca atattgtcc caattgctc catgaattt ctattgggt tggcagttg
3061 cgacattgct gaggtccaga aacatgcac attgaagagg atagctatgc aggtggaact
3121 tcataccagc tttagagaag agctgccact ttggttcta cgcaaagtgg atcagaaac

图17 (续)

3181 caccatcgtg tateccaaca aaccagatc tgggggatg ttattccata tattctgttt
3241 tttattttgc actggggaaa taagacaaga aataccaaat gctgataaat ctftagaaat
3301 ggaaatatta aagcagaaat accggctgaa ggatcttact ttctcctgg aaaaacagca
3361 tgagctcatt aaactgatca ttcagaagat ggagatcacc tctgagacag aggatgatga
3421 tagccattgt tctttcaag acaggttta gaaagagcag atggaacaaa ggaatagcag
3481 atggaatact gtgttgagag cagtcaaggc aaaaacacac catcttgage cttagctcct
3541 cagaccttca gtgaggcttc taatgggggg tgcattgact gctgggtcta actttcaatt
3601 taaaagagt gaggaagaag cagaatgatt cttttgctg cgtgtgaaat catggttcct
3661 gcatgctgta taaaagtaaa ccattttta tctctattc atattttcta ccaatcacta
3721 tgtattgggg atatctttgc agatatgttc aaattggact ggactttgat gagatataat
3781 ctcatatttt gaatgggtag aaaatgaatt tgctagaaca cacattttta atgaaaagaa
3841 gtaataaatg taactattaa gctaaaatgc aaatgtcagt actgaattcc tgcgtgttaa
3901 ttacataata tgtgatgctc tagaaaatag tcacaagtat taataatgcc ttgatgata
3961 gtcttaataa ttaggttgag gtctacctaa cctaagctgc ttctggaaa gcttcatgtt
4021 gaaagaacct atgggtggca ccattgtggc tttctgtcc ctactgtgat gaatagcccc
4081 accctcttgc ctgtcccaaa cacacctgat gtcactttga gccatatagt tgaagtacaa
4141 attaatagcc ctatgatata gcacgaattt tactatagat aatatatgtt gtttctgggt
4201 ttgtttgcca atgagcataa taaatgtaaa acctatatag taccctgtg attattgtat
4261 gagcctttgt ttgagatttg aaaacaacat ggtccatca catattccct ttttctttt
4321 gatgtctact caaatcatga attaatcaca tacctcatca ttaattttt caaggctctt
4381 ctattgtttt gtctgatttt ctccatcacc ctgattagca tgtttattcc ctactaccc
4441 ccaggagata ttactgttaa tgaatatgtc ttggctatg tatgtgtcct tgtgttatgt
4501 tgtacagtgt tgttttgagt ctgttattat ttacacagat gttattatgc tatagcttct
4561 atttctgttt ttgtcttta ttctcttat aattctcact tatttctat ttttctact
4621 catttctatt tgttactcct tttaactgga catgatgttt acaagataca actgtgttac
4681 tgtattccat ctagtacggg gcccttgggt tggcttacta tttaattgtg tgcaccaccc
4741 caccaccac actggacttt tctagagatg gacagcttgg ttacctccac ctctctgcac

图17 (续)

4801 tcattctcaa acatactgat gttcatacaa accagcagag tgctgaggga cgatatgtac
4861 tattacaaaa ccagacactt ttacattcat ggtccaacag atcacatggc ctagaggcaa
4921 tgttgcatat accttaatct ttgatatgaa taatatcttt gttctttata ttcttaaaa
4981 cagaaagggt ggaaaatcac tatacagaag caatatccaa agatctcctg atcataaaga
5041 caaggggtct ttacagtctt ccctctctc aaaccttgtagcattgca caatatagat
5101 ctcaagtcaac attcactgag tgccaagaat gtgagaaaca ctgtaccatg cctgtcatgc
5161 gaaatattta aataaacaga ttgtcttaca

图17 (续)

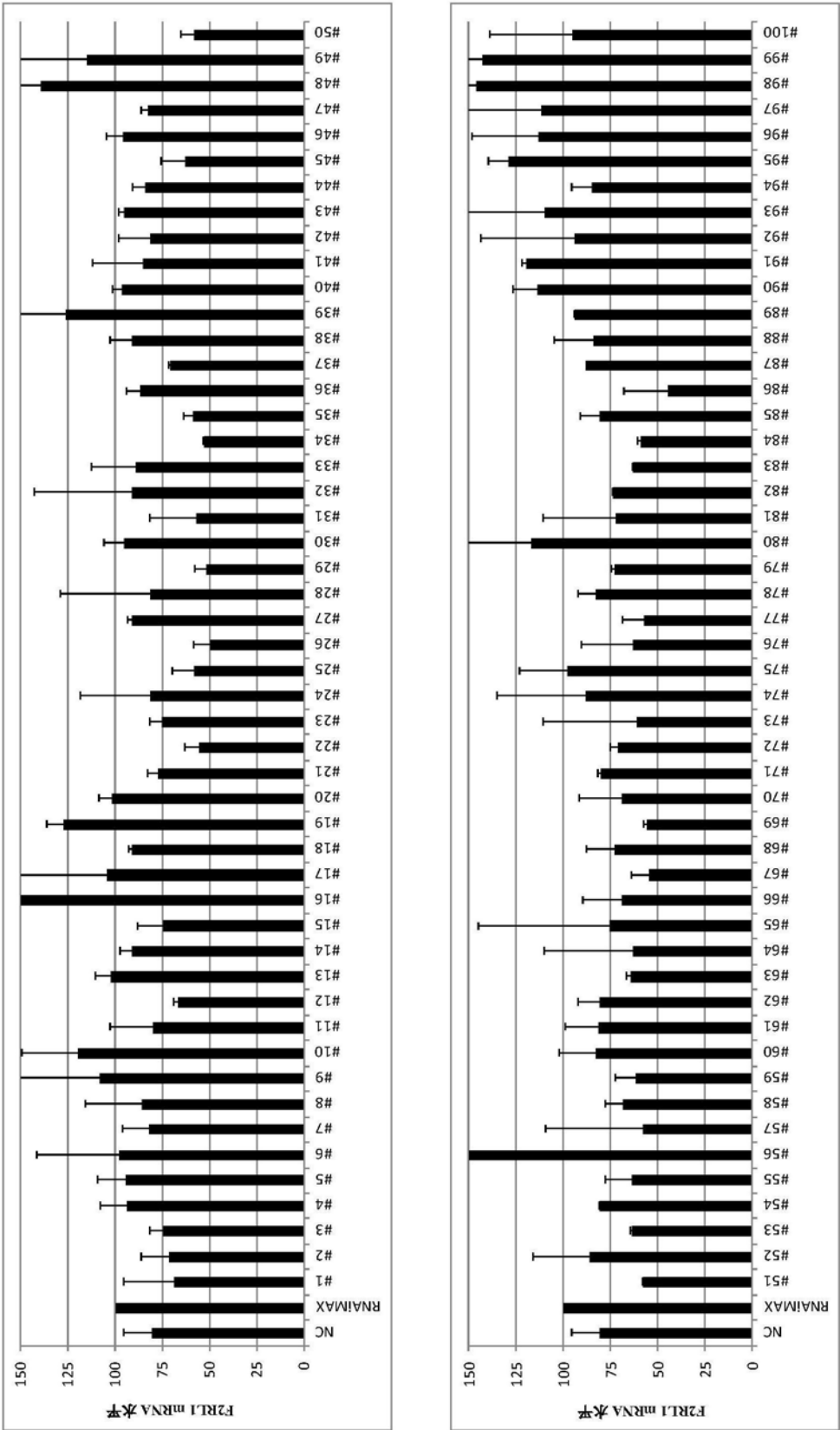


图18

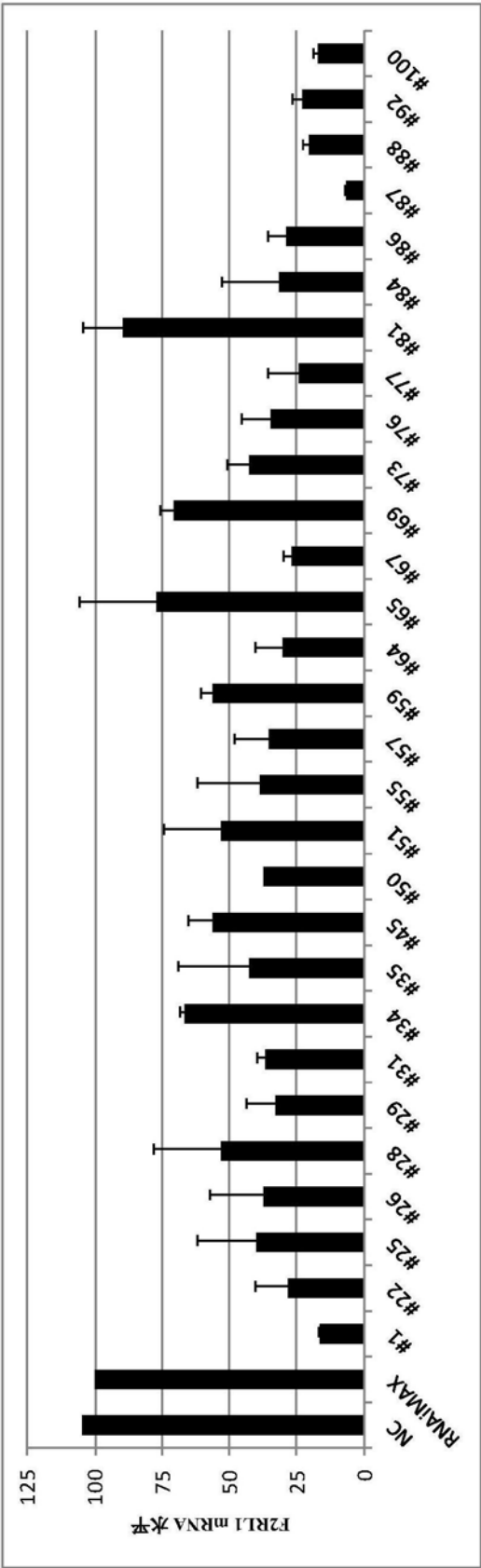


图19

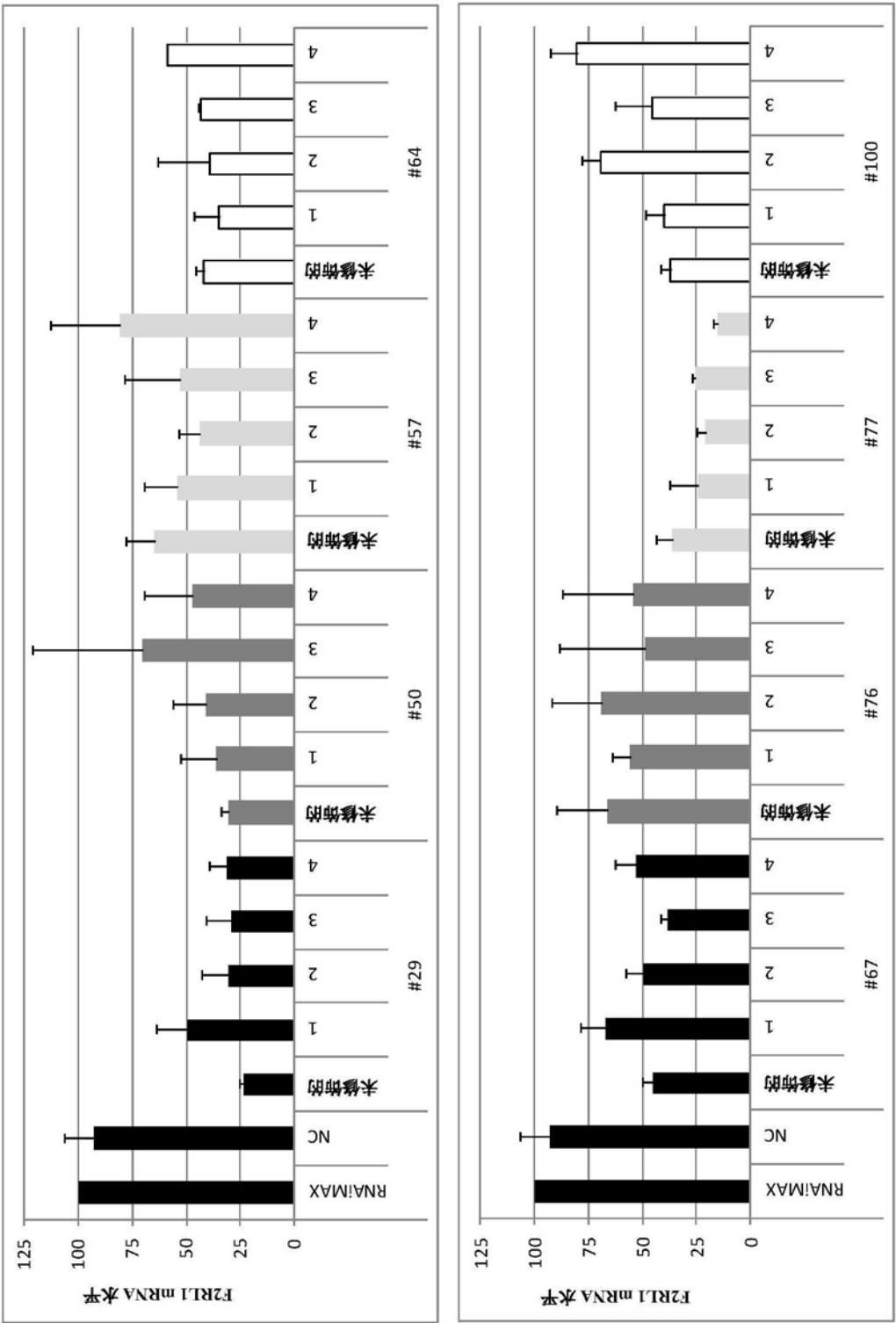


图20

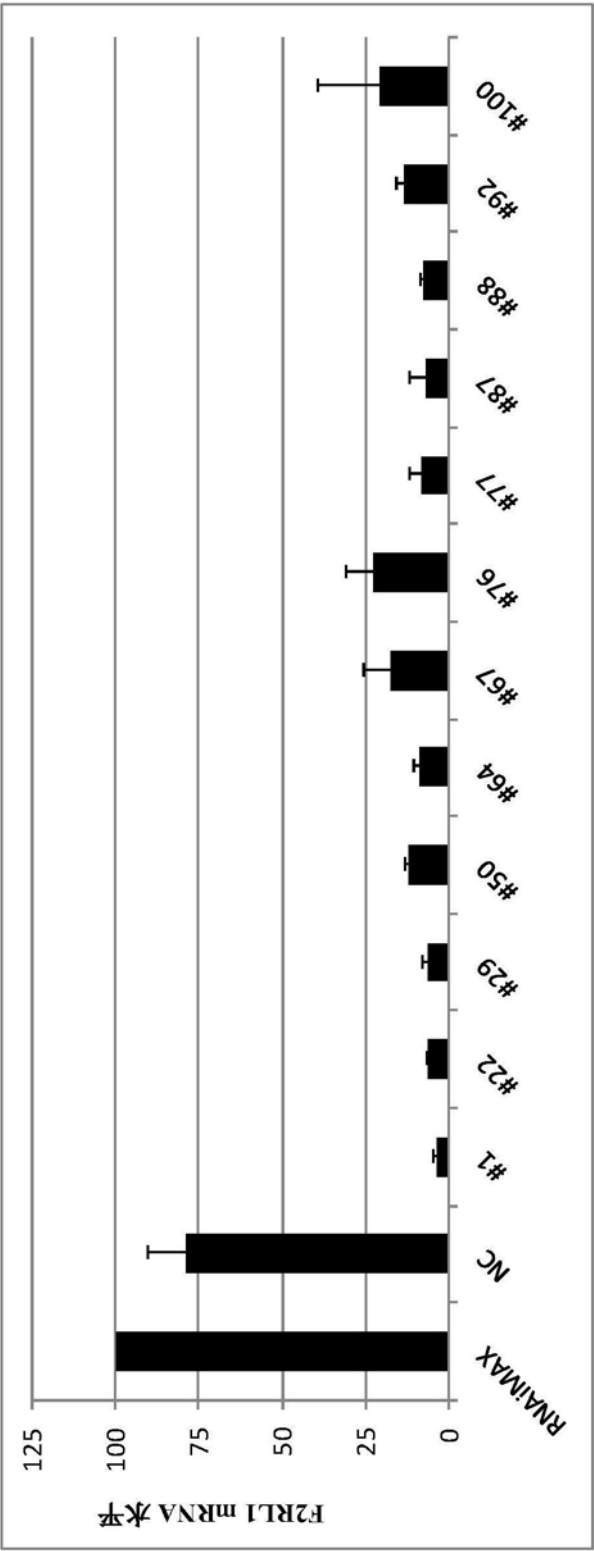


图21

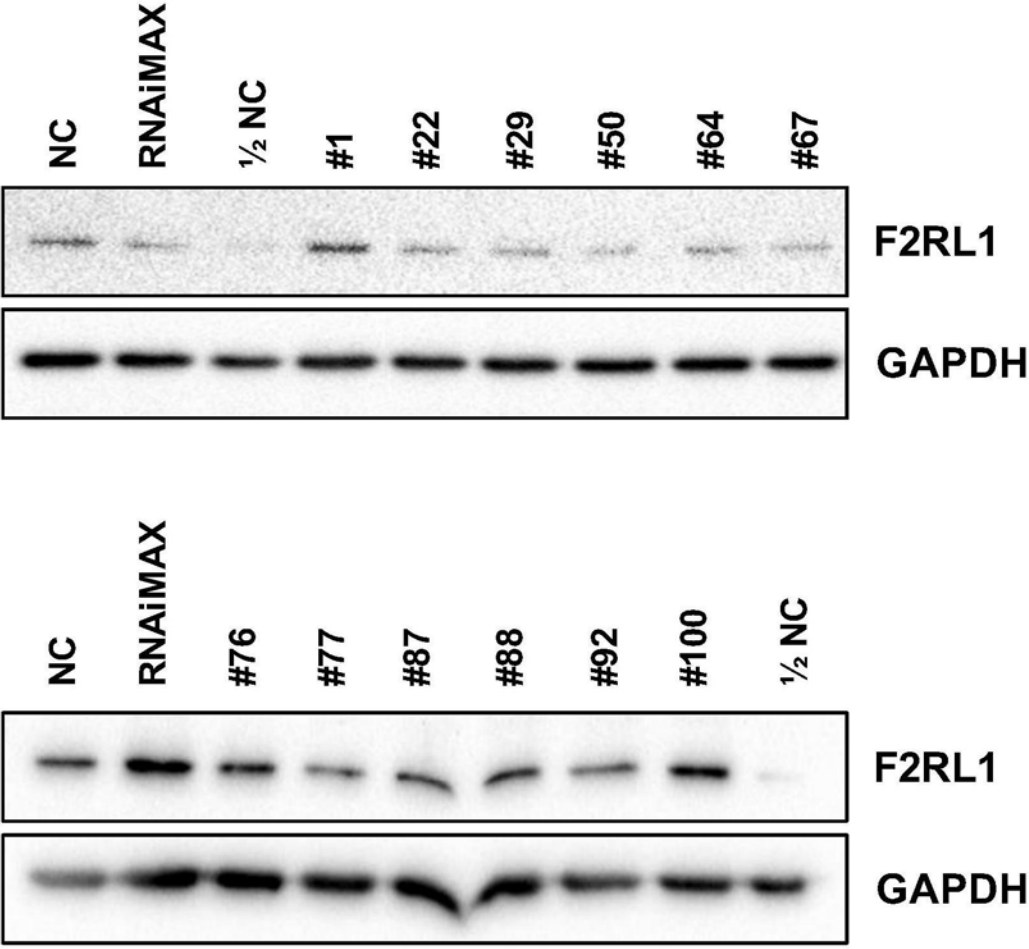


图22

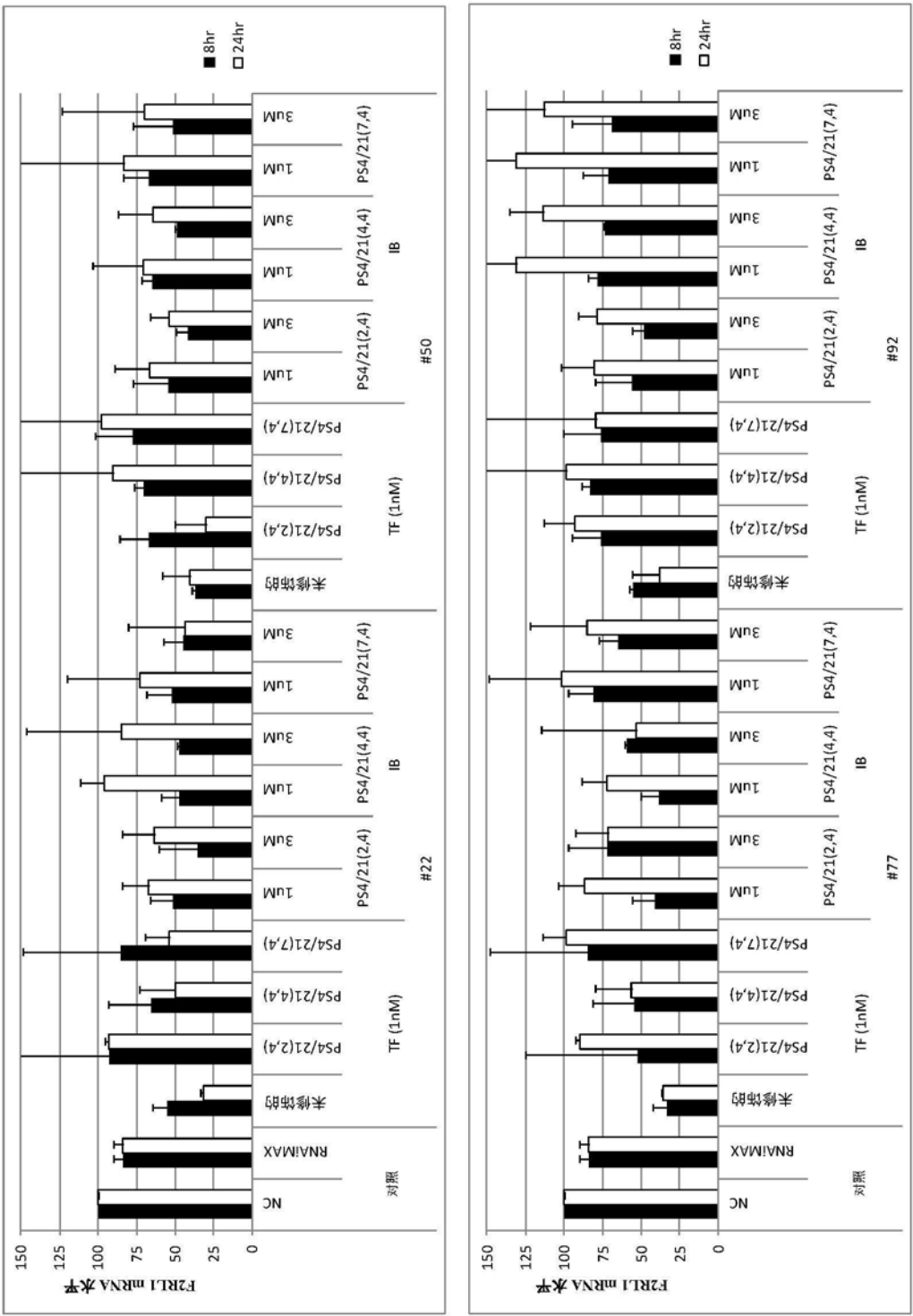


图23

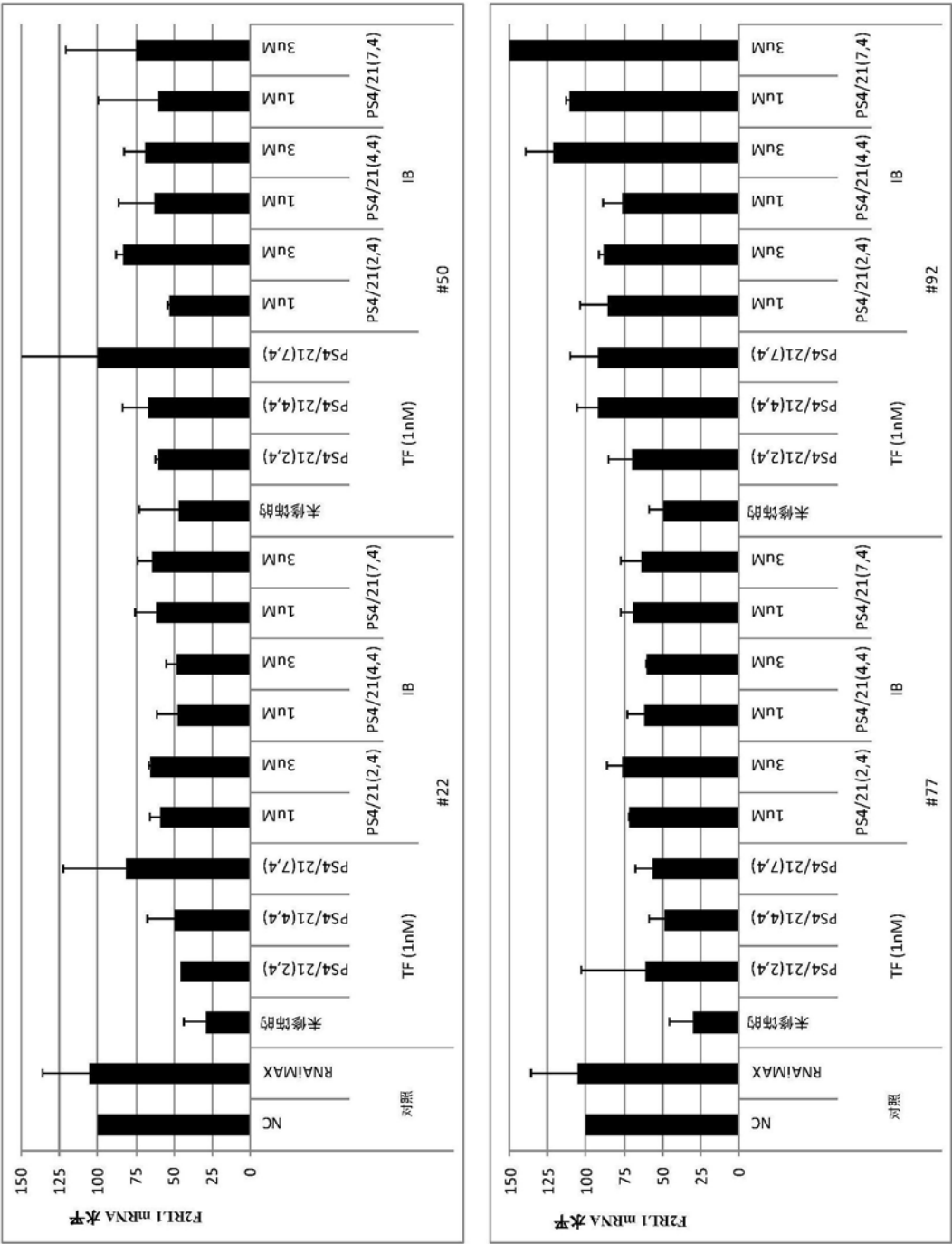


图24

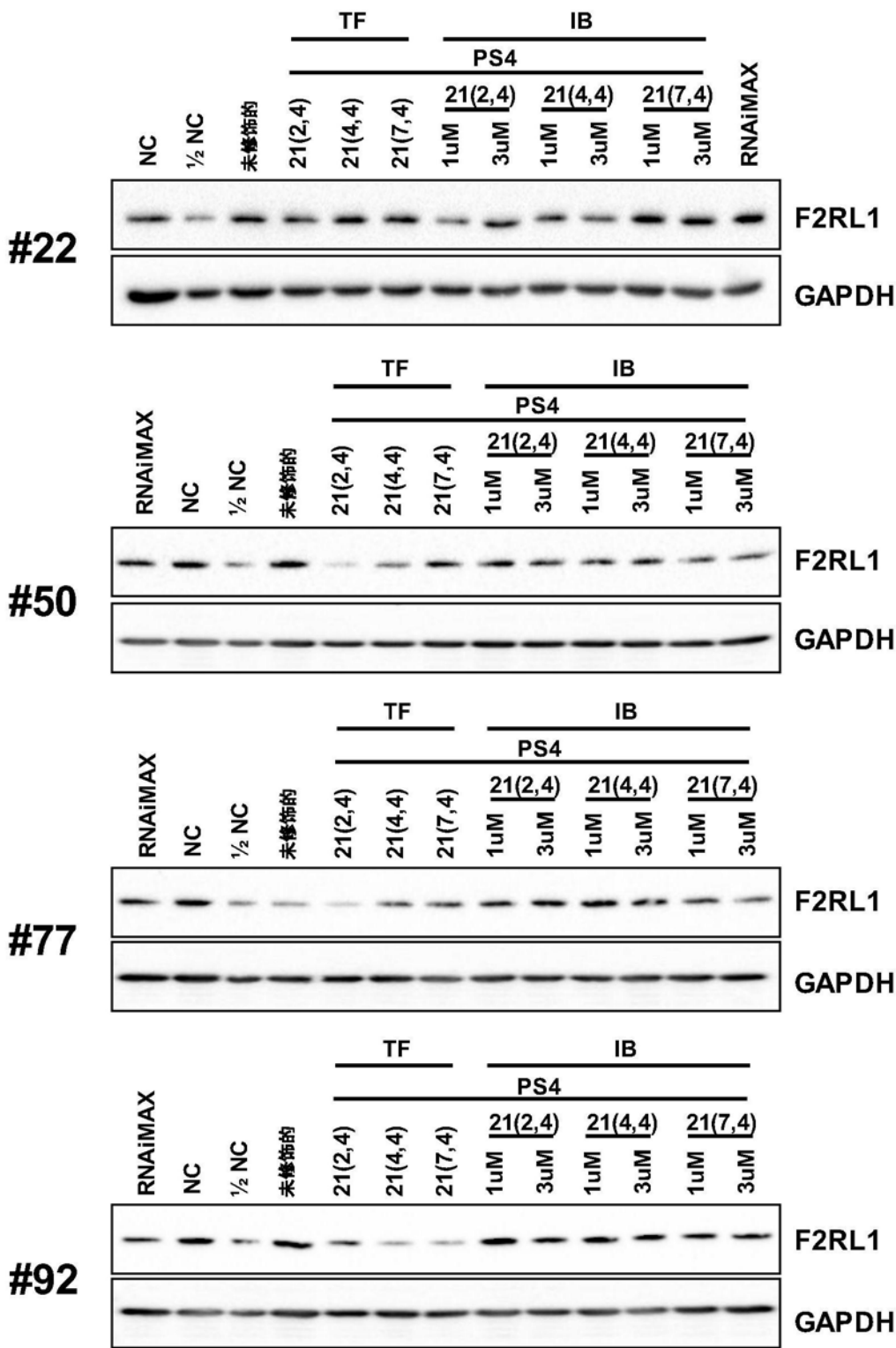


图25

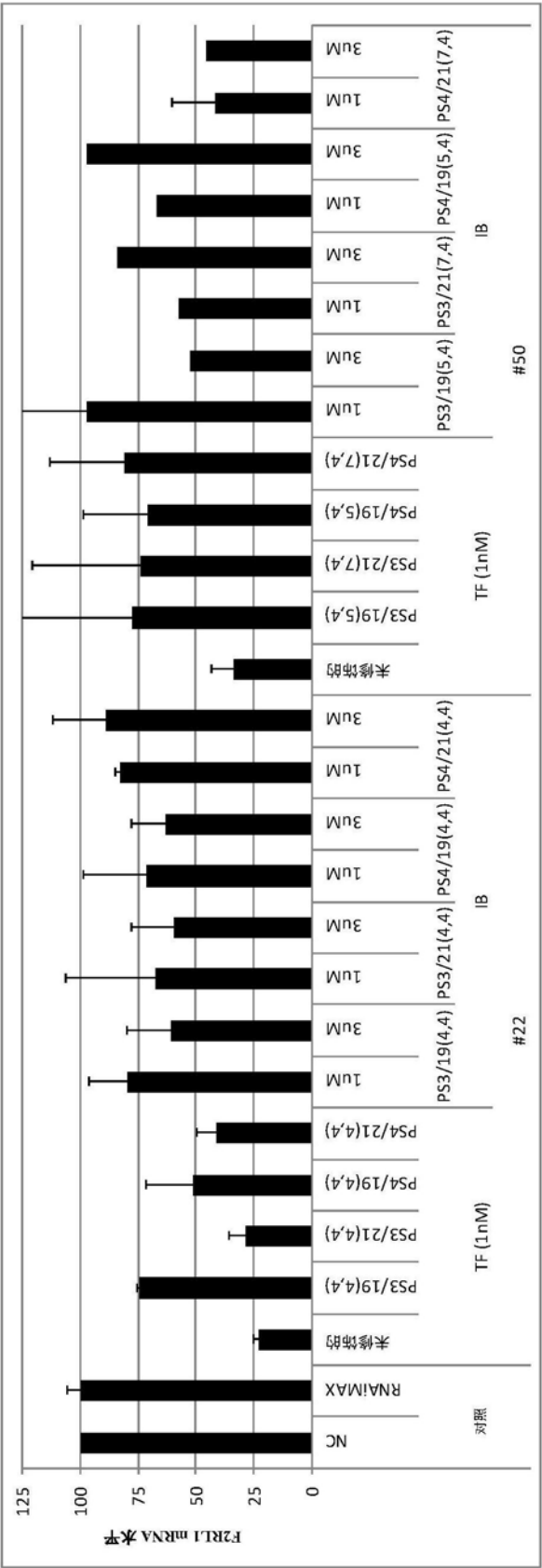


图26

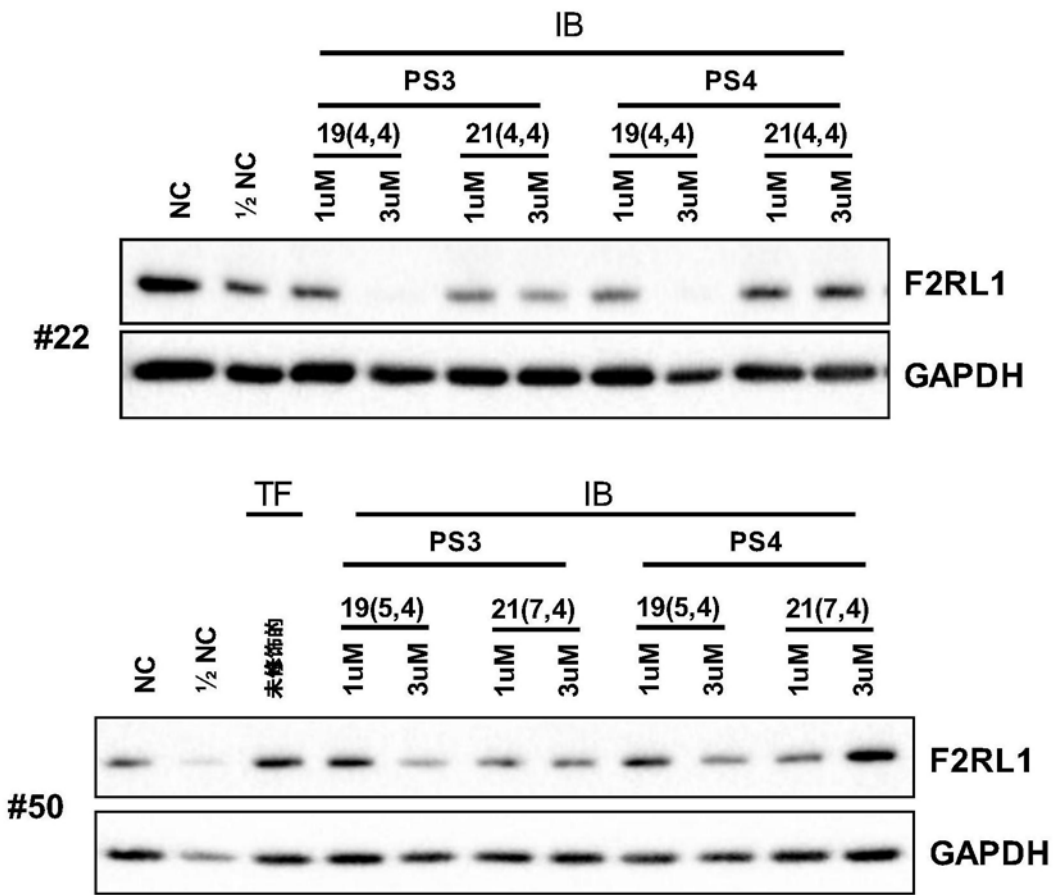


图27

人 F2RL1 mRNA 序列。(NM 005242)

1 acgtctctcc ttgggtttcc ctgaaacctc acccgccctg gggaggcgcg cagcagagge
61 tccgattcgg ggcaggtgag aggctgactt tctctcgtg cgtccagtgg agctctgagt
121 ttgaatcgg cggcgggcgga tccccgcgc gcccgggcgc ggggcttcca ggaggatgag
181 gagccccagc gggcggtggc tctggggggc cgccatctg ctagcagcct ctctctctg
241 cagtggcacc atccaaggaa ccaatagatc ctctaaagga agaagcctta ttgtaaggat
301 tgatggcaca tcccacgta ctggaaaagg agttacagtt gaaacagtct tttctgtgga
361 tgagttttct gcactgtcc tcactggaaa actgaccact gtcttcttc caattgtcta
421 cacaattgtg ttgtggtgg gtttgccaag taacggcatg gccctgtggg tctttcttt
481 ccgaactaag aagaagcacc ctgctgtgat ttacatggcc aatctggcct tggtgacct
541 cctctctgtc atctgggtcc ccttgaagat tgcctatcac atacatggca acaactggat
601 ttatggggaa gctctttgta atgtcttat tggttttct tatggcaaca tgtactgtc
661 cattctcttc atgacctgcc tcaagtgtga gaggtattgg gtcacgtga accccatggg
721 gcactccagg aagaaggcaa acattgcat tggeatctcc ctggcaatat ggctgtgat
781 tctgtgtgac accatccctt tctatgtct gaagcagacc atcttcttc ctgcccgtga
841 catcacgacc tctcatgatg tttgctga gcagctctg gtgggagaca tgttcaatta
901 ctctctctct ctggccattg gggctttct gtcccagcc ttctcacag cctctgcta
961 tctgtgatg atcagaatgc tgcgacttc tgccatggat gaaaactcag agaagaaaag
1021 gaagagggcc atcaaaacta ttgtactgt cctggccatg tacctgatct gtttactcc
1081 tagtaacctt ctgctgtgg tgcattatt tctgattaag agccagggcc agagccatgt
1141 ctatgccctg tacattgtag cctctgctt ctctaccctt aacagctgca tgcacctt
1201 tgtctattac ttgtttcac atgattcag ggatcatgca aagaacgctc tctttgccg
1261 aagtgtccgc actgtaaaag agatgcaagt atccctcacc tcaaagaaac actccaggaa
1321 atccagctct tactcttcaa gttaaccac tgtaagacc tctattgag tttccaggt
1381 cctcagatgg gaattgcaca gtaggatgtg gaacctgtt aatgttatga ggacgtgtc
1441 gttatttctt aatcaaaaag gtctcaccac ataccatgtg gatgcagcac ctctcaggat
1501 tgctaggagc tcccctgtt gcatgagaaa agtagtccc caaattaaca tcaagtctg
1561 ttccagaatc tctctactca gatgacccca gaaactgaac caacagaage agactttca
1621 gaagatggtg aagacagaaa cccagtaact tgcaaaaagt agacttggg tgaagactca
1681 ctctcagct gaaattatat atatacat atatatatt tacatctggg atcatgatg
1741 acttgtagg gttcaaggc cctcagagat gatcagcca actgaacgac cttaacaatg

图28

1801 aggaaaccaa gataatgag ctgccagaat caggttcca atcaacagca gtgagttggg
 1861 attggacagt agaattcaa tgcacgtga gtgaggttct tgtaccactt catcaaaatc
 1921 atggatcttg gctgggtgcg gtgcctcatg cctgtaatcc tagcacttgg ggaggtgag
 1981 gcaggcaatc acttgaggtc aggagttega gaccagcctg gccatcatgg cgaaacctca
 2041 tctctactaa aaatacaaaa gtaaccagg tgtgtggtgc acgtttgtaa tcccagttac
 2101 tcaggaggct gaggcacaag aattgagtat cactttaact caggaggcag aggttgcaat
 2161 gagecgagat tgcaccactg cactccagct tgggtgataa aataaaataa aatagtcgtg
 2221 aatcttggtc aaaatgcaga ttctcagat tcaataatga gagtcagac tgggaacagg
 2281 gccaggaat ctgtgtggtg caaacctgca tgggtttat gcacacagag atttgagaac
 2341 cattgtctg aatgctgctt ccattgaca aagtgcctg ataattttg aaaagagaag
 2401 caaacaatgg tgtctctttt atgtcagct tataatgaaa tctgtttgtt gacttattag
 2461 gacttgaat tattcttta ttaacctct gagttttgt atgtattatt attaaagaaa
 2521 aatgcaatca ggattttaa catgtaaata caaattttgt ataactttg atgacttcag
 2581 tgaaatttgc aggtagtctg agtaatagat tgtttgcca cttagaatag catttgccac
 2641 ttagtatttt aaaaaataat tgttgagta ttattgtca gttttgtca ctgttatct
 2701 aatacaaaat tataaagcct tcagagggtt tggaccacat ctctttggaa aatagtttgc
 2761 aacatattta agagatactt gatgccaaa tgactttata caacgattgt atttgtgact
 2821 tttaaaaata attattttat tgtgtaattg atttataaat aacaaaattt ttttacaac
 2881 tta

图28 (续)

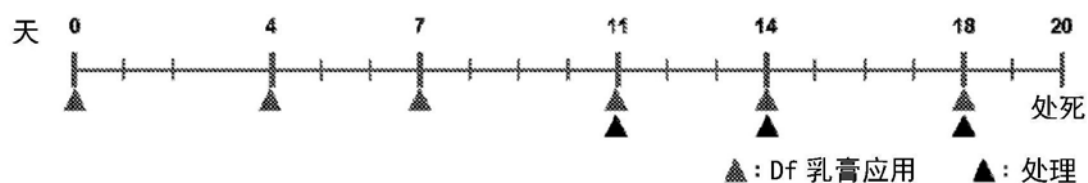
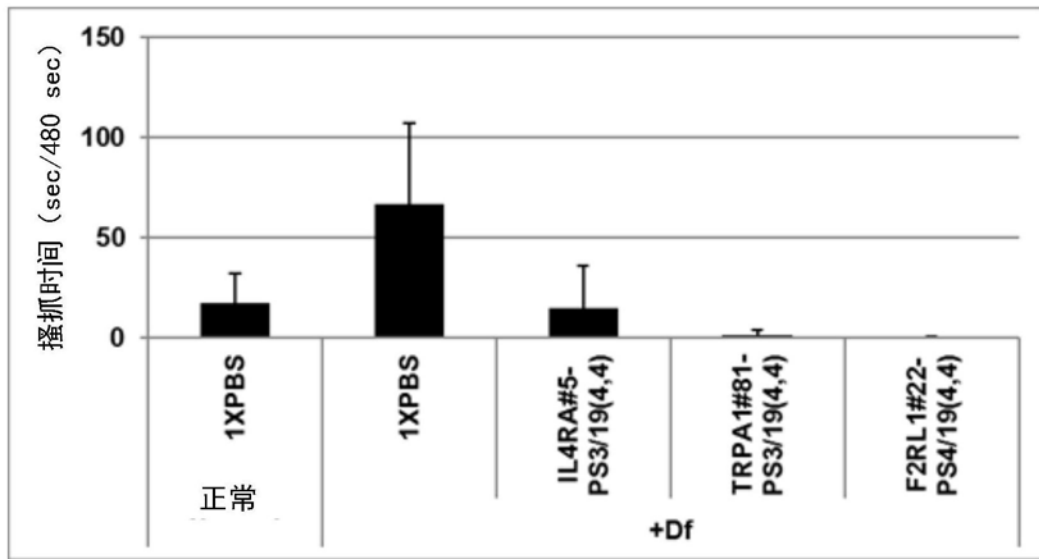


图29

A. 皮内注射



B. 乳膏乳化的 cp-asiRNA 应用

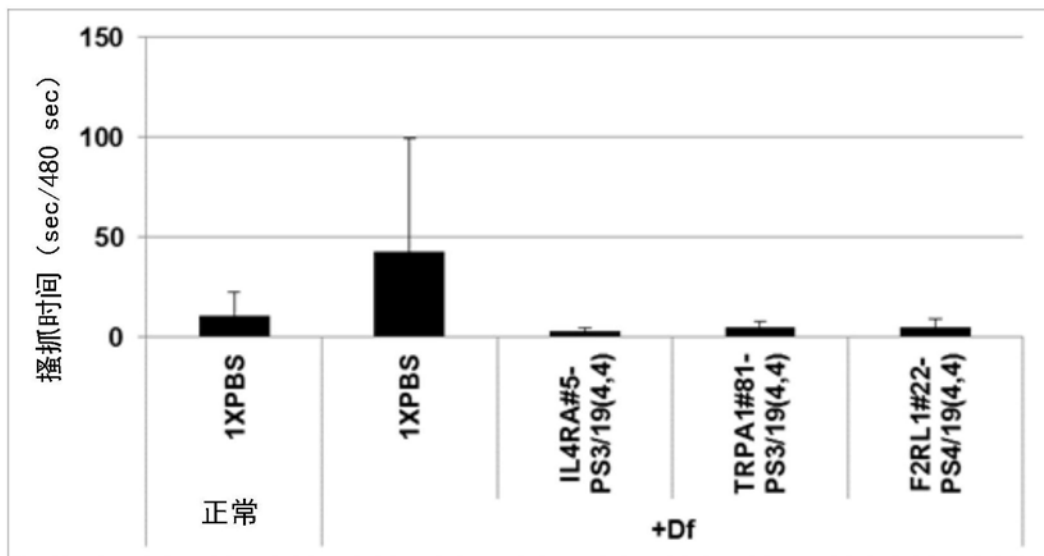
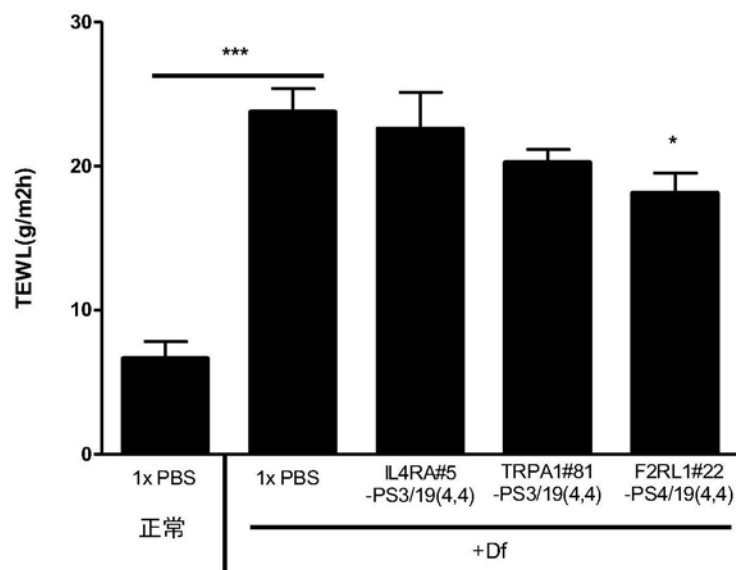


图30

A. 皮内注射



B. 乳膏乳化的 cp-asiRNA 应用

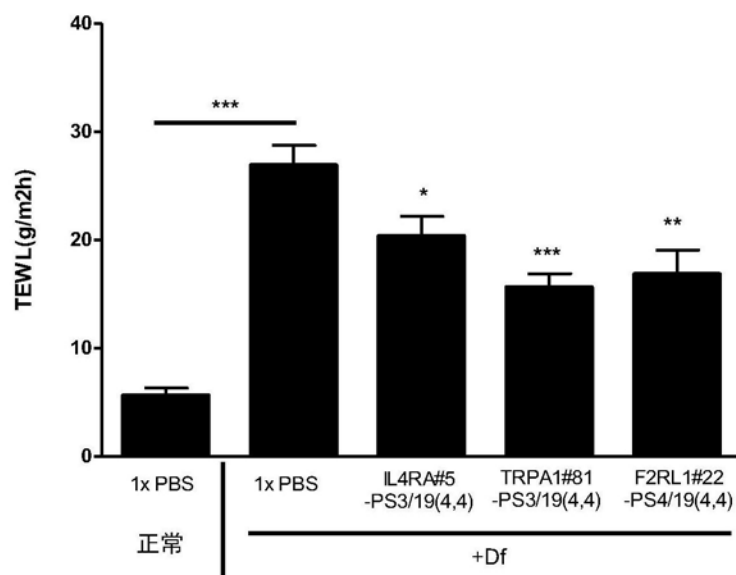


图31

A. 皮内注射

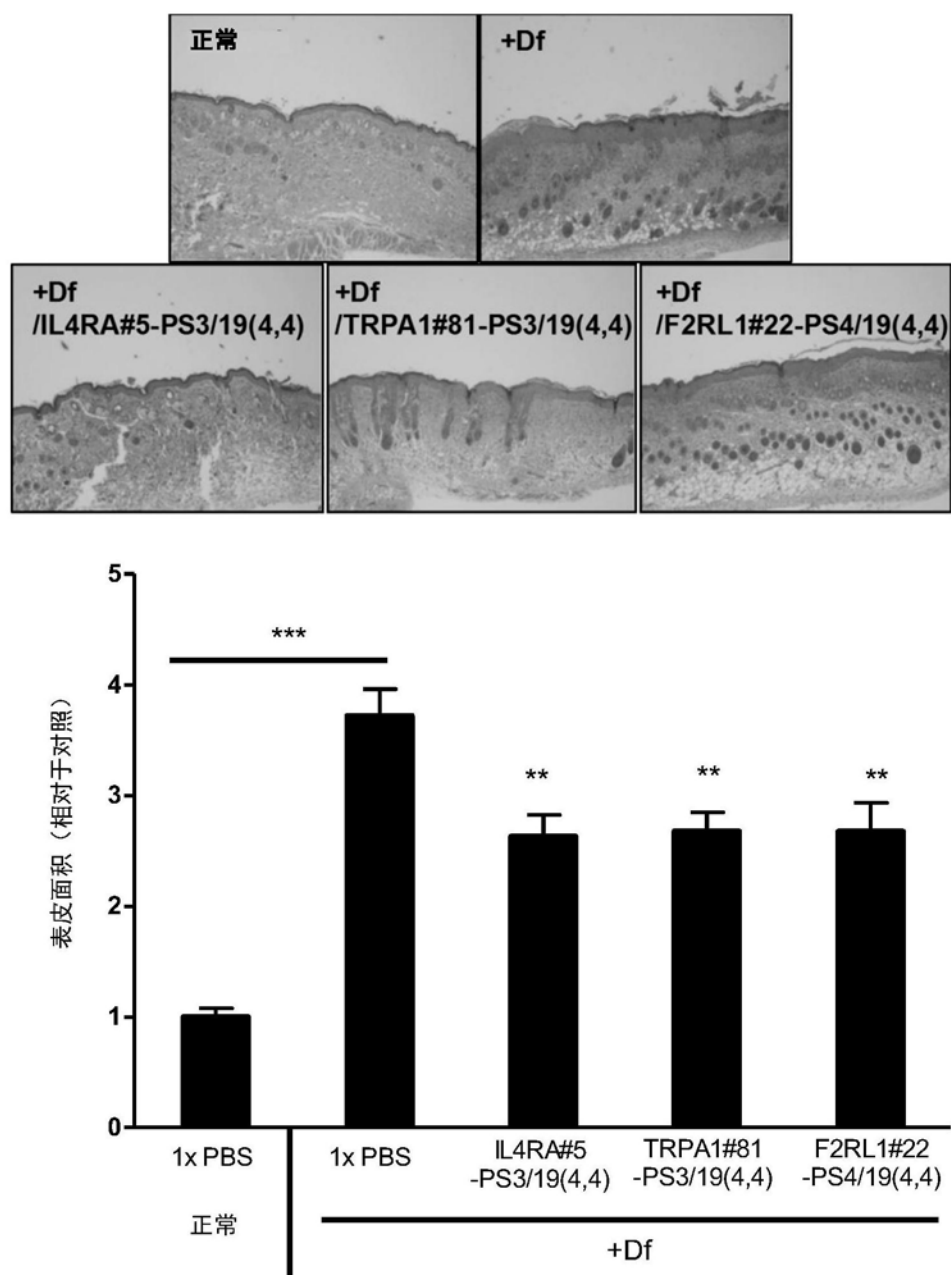


图32

B. 乳膏乳化的 cp-asiRNA 应用

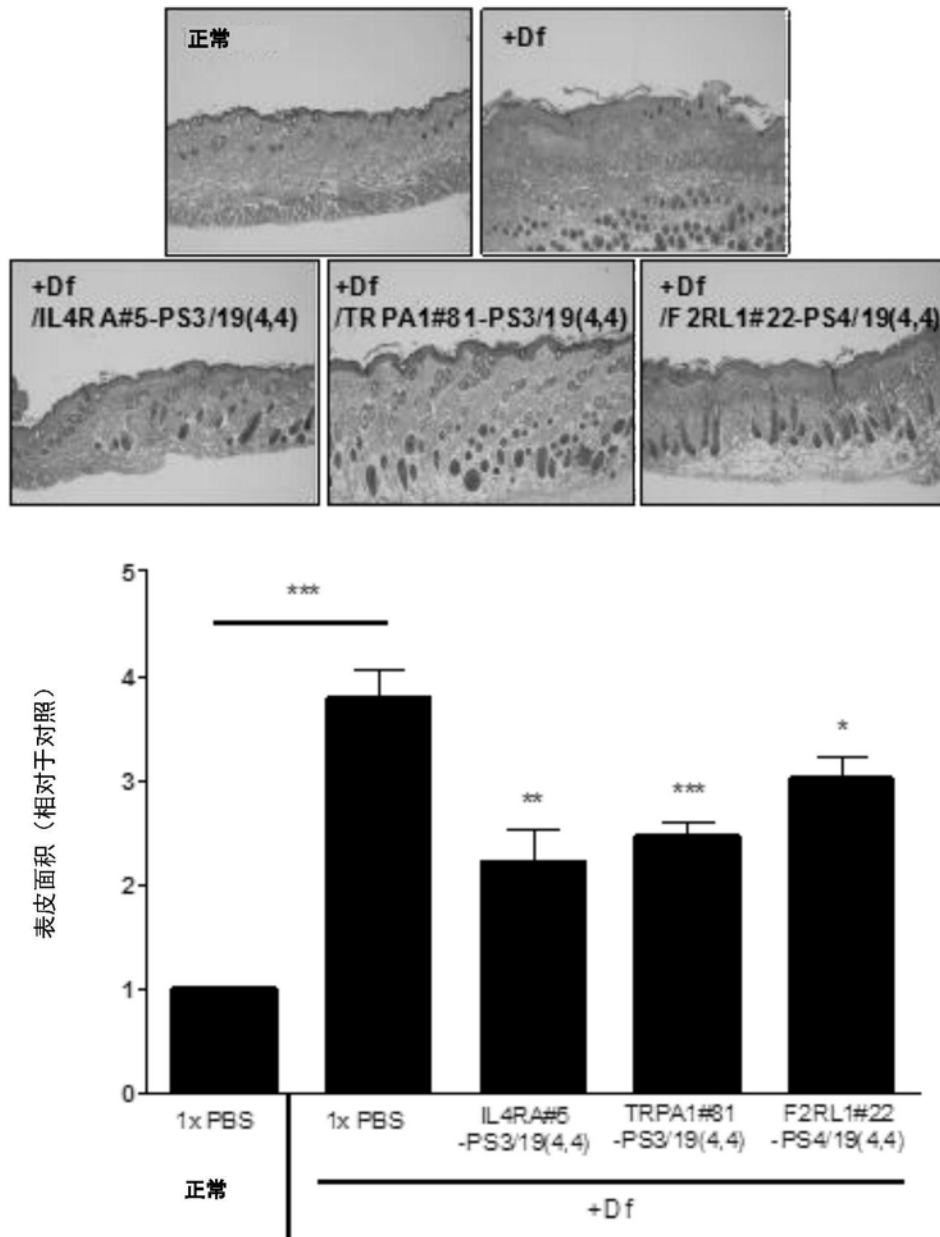


图32(续)

A. 皮内注射

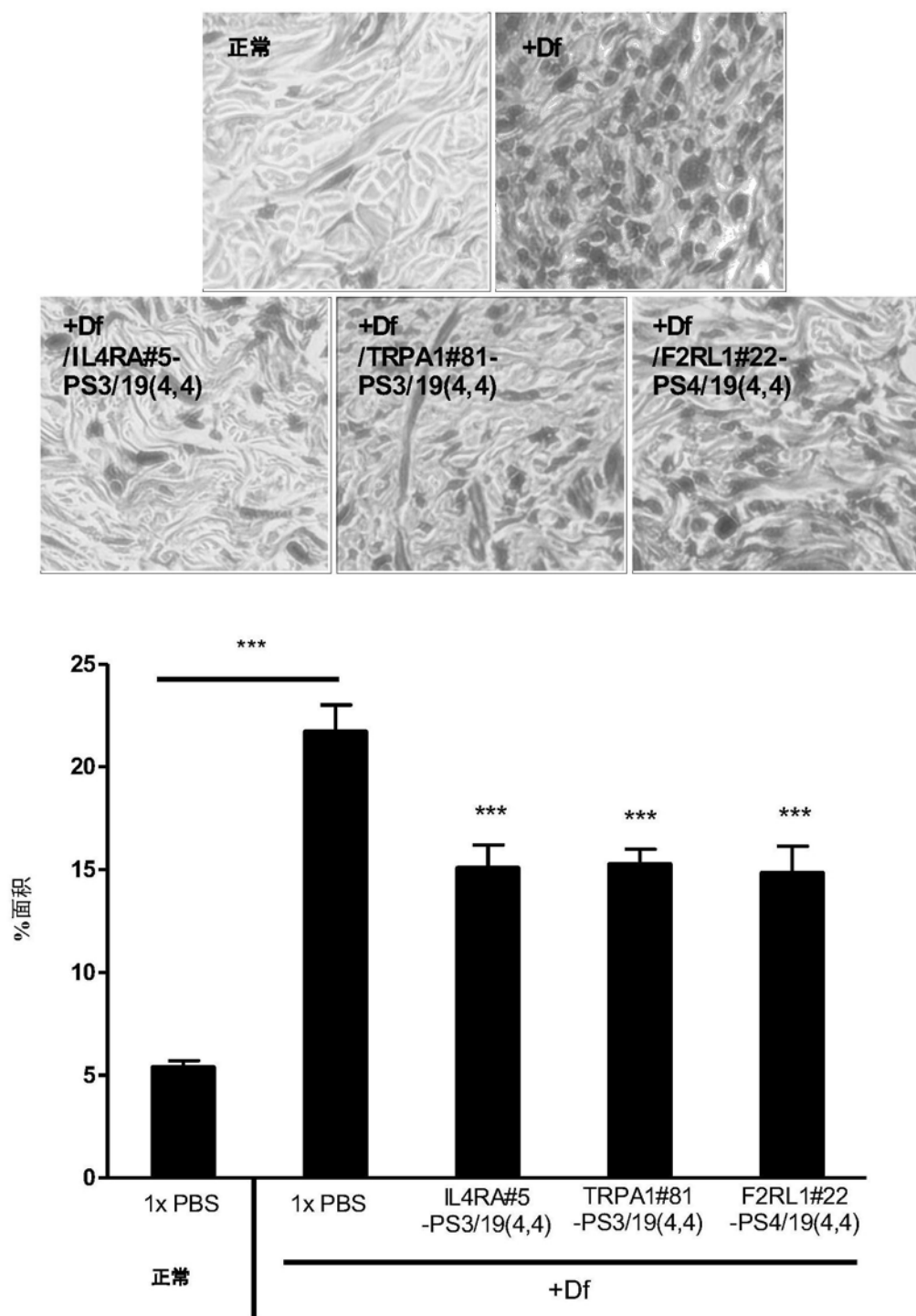


图33

B. 乳膏乳化的 cp-asiRNA 应用

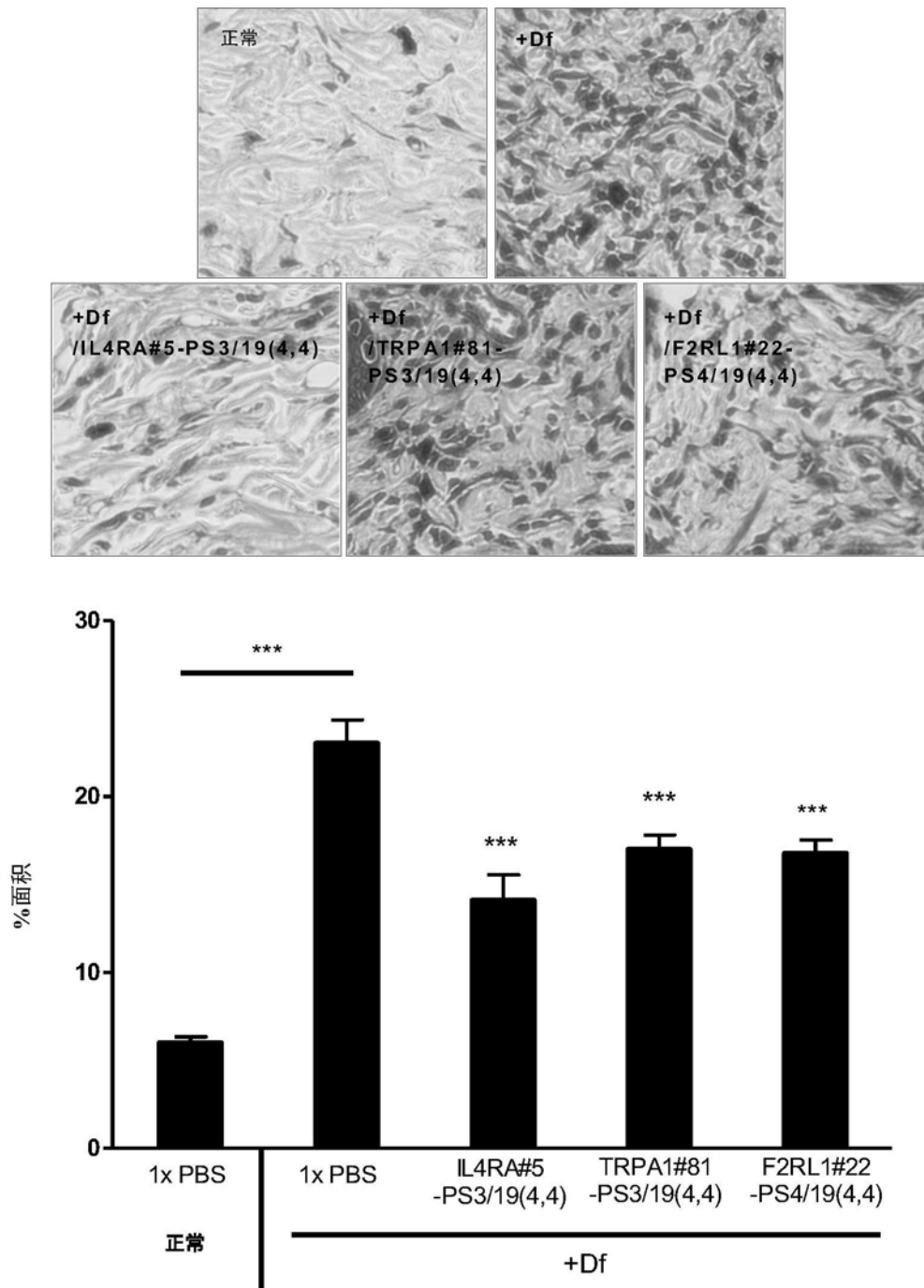


图33 (续)