202409283

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202409283 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：112117809 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 05 月 12 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/64 (2006.01)* *C12N15/85 (2006.01)*
C12N15/11 (2006.01) *A61K31/7115 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/05/13 美國 63/341,960

(71)申請人：美商旗艦先鋒創新有限責任（ＶＩＩ）公司 (美國) FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC (US)
美國

(72)發明人：施耐德 亞利珊卓 瑞秋 SNEIDER, ALEXANDRA RACHAEL (US)；魯本斯 雅各 羅森布朗 RUBENS, JACOB ROSENBLUM (US)；布列頓 卡米洛 阿亞拉 BRETON, CAMILO AYALA (MX)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹；黃裕煦

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：17 共 319 頁

(54)名稱

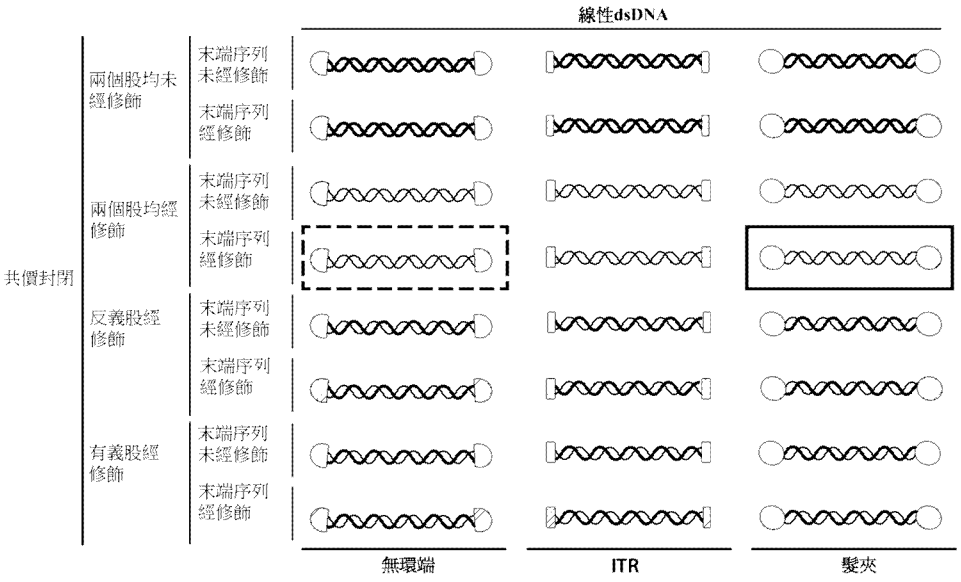
雙股ＤＮＡ組合物及相關方法

(57)摘要

本發明提供例如治療性雙股構築體(therapeutic double stranded construct；TDSC)。在一些實施例中，該等 TDSC 包含雙股 DNA 區、上游封閉端及下游封閉端。在一些實施例中，該 TDSC 包含經化學修飾之核苷酸。在一些實施例中，該 TDSC 對核酸內切酶消化具有抗性及/或對免疫感測器識別具有抗性，且支持該 TDSC 中編碼之異源負載的表現。

The disclosure provides, for example, therapeutic double stranded constructs (TDSCs). In some embodiments, the TDSCs comprise a double stranded DNA region, an upstream closed end, and a downstream closed end. In some embodiments, the TDSC comprises chemically modified nucleotides. In some embodiments, the TDSC is resistant to endonuclease digestion and/or resistant to immune sensor recognition, and supports expression of a heterologous payload encoded in the TDSC.

指定代表圖：


線性dsDNA
共價封閉
兩個股均未經修飾
兩個股均經修飾
反義股經修飾
有義股經修飾
末端序列未經修飾
末端序列經修飾
無環端
ITR
髮夾

【圖1A】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

雙股DNA組合物及相關方法

【英文發明名稱】

DOUBLE STRANDED DNA COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

【中文】

本發明提供例如治療性雙股構築體(therapeutic double stranded construct；TDSC)。在一些實施例中，該等TDSC包含雙股DNA區、上游封閉端及下游封閉端。在一些實施例中，該TDSC包含經化學修飾之核苷酸。在一些實施例中，該TDSC對核酸內切酶消化具有抗性及/或對免疫感測器識別具有抗性，且支持該TDSC中編碼之異源負載的表現。

【英文】

The disclosure provides, for example, therapeutic double stranded constructs (TDSCs). In some embodiments, the TDSCs comprise a double stranded DNA region, an upstream closed end, and a downstream closed end. In some embodiments, the TDSC comprises chemically modified nucleotides. In some embodiments, the TDSC is resistant to endonuclease digestion and/or resistant to immune sensor recognition, and supports expression of a heterologous payload encoded in the TDSC.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

雙股DNA組合物及相關方法

【英文發明名稱】

DOUBLE STRANDED DNA COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 需要新治療模態來解決未滿足的醫療需求。

【發明內容】

【0002】 本文中描述醫藥DNA組合物、構築體、製劑；使用此類組合物、構築體及製劑之方法；及其製備方法。

【0003】 在一個態樣中，本發明之特徵在於治療性雙股構築體(「TDSC」)。

【0004】

列舉的實施例

1.一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；及

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

2.一種TDSC，其包含：

a)上游DNA末端形式，其為封閉端；

b)雙股區；

c)下游DNA末端形式，其為封閉端，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

3.如實施例1之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為開放端。

4.一種TDSC，其包含：

a)上游DNA末端形式(例如上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其包含Y轉接子組態；

b)雙股區；及

c)下游DNA末端形式(例如下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其包含Y轉接子組態，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

5.如實施例1或3之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為平端或黏端。

6.一種TDSC，其包含：

a)上游雙股、平端DNA末端形式(例如呈雙股及平端之上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其在各股上包含硫代磷酸酯修飾；

b)雙股區；及

c)下游雙股、平端DNA末端形式(例如呈雙股及平端之下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其在各股上包含硫代磷酸酯修飾，

其中視情況該TDSC進一步包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

7.如實施例1之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為封閉端。

8.如實施例1至3、5或7中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含環。

9.一種TDSC，其包含：

a)上游DNA末端形式(例如上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其為封閉端；

b)雙股區；

c)下游DNA末端形式(例如下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其為封閉端，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

10.如實施例1至9中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式(例如上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

11.如實施例1至10中任一項之TDSC，其中該下游DNA末端形式(例如下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

12.如實施例1至11中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者在主鏈、糖或鹼基中包含修飾。

13.如實施例1至12中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者與肽或蛋白質結合。

14.如實施例1至13中任一項之TDSC，其中一或多個經化學修飾之核苷酸包含經化學修飾之胞嘧啶核苷酸及/或硫代磷酸酯鍵。

15.如實施例1至14中任一項之TDSC，其中一或多個經化學修飾之核苷酸包含經化學修飾之胞嘧啶核苷酸。

16.如實施例15之TDSC，其中該經化學修飾之胞嘧啶核苷酸在胞嘧啶之碳5處具有除氫以外之取代。

17.如實施例1至16中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者包含硫代磷酸酯鍵。

18.如實施例1至17中任一項之TDSC，其中該TDSC之第一股及第二股中之各者包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

19.如實施例1至18中任一項之TDSC，其中該TDSC之第一股及第二股中之各者包含一或多個硫代磷酸酯鍵。

20.如實施例1至19中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

21.如實施例1至20中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少3個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

22.如實施例1至20中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少6個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

23.如實施例1至22中任一項之TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯鍵

(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

24.如實施例1至23中任一項之TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少3個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

25.如實施例1至23中任一項之TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少6個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

26.如實施例1至20或23中任一項之TDSC，其中該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

27.如實施例1至21、23、24或26中任一項之TDSC，其中該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少3個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

28.如實施例1至20、22、23、25或26中任一項之TDSC，其中該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少6個硫代磷酸酯鍵

(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游及下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

29.如實施例1至28中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者包含甲基。

30.一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含Y-轉接子組態。

31.如實施例30之TDSC，其中該Y-轉接子係藉由用尿嘧啶DNA醣苷酶(uracil DNA glycosylase；UDG)及DNA醣苷酶裂解酶核酸內切酶VIII(例如USER酶混合物)裂解而形成。

32.如實施例30或31之TDSC，其中該Y-轉接子包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

33.如實施例30至32中任一項之TDSC，其中該Y-轉接子中之每個核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

34.一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含以下中之一或多者：核靶向序列、維持序列或結合目標細胞中之內源性多肽的序列。

35.一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者具有以下特徵中之一或多者：

i)不包含核酸序列TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC (SEQ ID NO: 55)及GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 56)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之核酸序列；及/或核酸序列TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC (SEQ ID NO: 57)及GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 58)；

ii)該TDSC中之每個核苷酸結合該TDSC中之另一核苷酸；

iii)該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有長度小於約28或56個核苷酸或長度大於約28或56個核苷酸之環尺寸；或

iv)該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有長度小於約28或56個核苷酸或長度大於約28或56個核苷酸之環尺寸。

36.如前述實施例中任一項之TDSC，其包含以下中之一或多者：

i)啟動子序列(其中視情況該啟動子序列在該雙股區中)；

ii)負載序列(例如治療性負載序列)，其可操作地連接於該啟動子序列(其中視情況該負載序列在該雙股區中)；

iii)異源功能序列，例如核靶向序列或調節序列；

iv)維持序列；及/或

v)複製起點。

37.如實施例36之TDSC，其包含：

i、ii及iii；

i、ii及iv；

i、ii及v；

i、ii、iii及iv；

i、ii、iii及v；

i、ii、iv及v；或

i、ii、iii、iv及v。

38.如實施例36或37之TDSC，其中該核靶向序列包含CT3序列(例如AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA (SEQ ID NO: 59)之序列)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

39.如實施例36至38中任一項之TDSC，其中該核靶向序列與hnRNPK蛋白(例如人類hnRNPK蛋白)結合。

40.如實施例2、7至29或36至39中任一項之TDSC，其中該等封閉端中之一者或兩者包含環，其中該等環中之一者或兩者包含如表3中所列之

核靶向序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的核酸序列。

41.如實施例2、7至29或36至40中任一項之TDSC，其中該等封閉端中之一者或兩者包含環，其中該等環中之一者或兩者包含與如表3中所列之核輸入蛋白質結合的核靶向序列。

42.如實施例36至41中任一項之TDSC，其中該負載序列編碼多肽(例如蛋白質)。

43.如實施例36至42中任一項之TDSC，其中該負載序列編碼功能性RNA (例如miRNA、siRNA或tRNA)。

44.如實施例36至43中任一項之TDSC，其中該負載序列對目標細胞而言為異源性。

45.如實施例1至44中任一項之TDSC，其中該雙股區包含有義股及反義股。

46.如實施例45之TDSC，其中該反義股包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

47.如實施例45或46之TDSC，其中該有義股不包含任何經化學修飾之核苷酸。

48.如實施例45或46之TDSC，其中該有義股包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

49.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC對核酸內切酶消化具有抗性及/或對免疫感測器識別具有抗性。

50.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式對核酸內切酶消化具有抗性。

51.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶DNA抗性端形式對免疫感測器識別具有抗性。

52.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式對核酸內切酶消化具有抗性。

53.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式對免疫感測器識別具有抗性。

54.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該雙股區對核酸內切酶消化具有抗性。

55.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該雙股區對免疫感測器識別具有抗性。

56.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式具有相同核苷酸序列。

57.如實施例1至55中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式具有不同核苷酸序列。

58.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有相同結構。

59.如實施例1至57中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有不同結構。

60.如實施例1、7、8或10至59中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為開放端(例如平端、黏端或Y-轉接子)。

61.如實施例1至3、5或7至60中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者

或兩者為封閉端(例如髮夾)。

62.如實施例61之TDSC，其中該封閉端包含一或多個(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50個)未雜交(例如，不為雙股區之一部分)的核苷酸。

63.如實施例61之TDSC，其中該封閉端不包含任何未雜交之核苷酸(例如其中該封閉端之所有核苷酸與另一核苷酸雜交)。

64.如實施例30至63中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者包含至少一個經化學修飾之核苷酸。

65.如實施例30至64中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式兩者均在有義股上包含至少一個經化學修飾之核苷酸及在反義股上包含至少一個經化學修飾之核苷酸。

66.如實施例30至65中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式兩者均在每個有義股位置及每個反義股位置包含經化學修飾之核苷酸。

67.如實施例30、31、34至45、47或49至63中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者包含反向末端重複序列(inverted terminal repeat；ITR)，其中視情況該dsDNA不包含經化學修飾之核苷酸。

68.如實施例1至67中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者不包含原核端粒酶(protelomerase)序列。

69.如實施例30、31、34至45、47、49至63或67中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者包含原核端粒酶序列，其中視情況該dsDNA不包含經化學修飾之核苷酸。

70.如實施例69之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者包含（例如在5'- 至 -3' 順序上）核酸序列 TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC (SEQ ID NO: 55) 及 GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 56)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

71.如實施例69或70之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者包含（例如在5'- 至 -3' 順序上）核酸序列 TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC (SEQ ID NO: 57) 及 GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 58)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

72.如實施例69至71中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者包含（例如在5'- 至 -3' 順序上）核酸序列 ACCTATTTCAGCATACTACGC (SEQ ID NO: 60) 及 GCGTAGTATGCTGAAATAGGT (SEQ ID NO: 61)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

73.如實施例69至72中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者包含（例如在5'- 至 -3' 順序上）核酸序列 CACACAATTGCCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTG (SEQ ID NO: 62)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

74.如實施例69至73中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者包含(例如在5'-至-3'順序上)核酸序列：

(i) TAAATATAATTTAA (SEQ ID NO: 63) 及TTAAATTATATTTA (SEQ ID NO: 64)，

(ii) AATATATAATCTAA (SEQ ID NO: 65) 及TTAGATTATATATT (SEQ ID NO: 66)，

(iii) TATTTATTATCTTT (SEQ ID NO: 67) 及AAAGATAATAAATA (SEQ ID NO: 68)，

(iv) ATATAATTTTTAATTAGTATAGAATATGTTAA (SEQ ID NO: 69)及TTAACATACTCTATACTAATTAAAAATTATAT (SEQ ID NO: 70)，

(v) TATAATTTGATATTAGTACAAATCCC (SEQ ID NO: 71)及GGGATTTGTACTAATATCAAATTATA (SEQ ID NO: 72)，

(vi) ATATAATATTTATTTAGTACAAAGTTC (SEQ ID NO: 73)及GAACTTTGTACTAAATAAATATTATAT (SEQ ID NO: 74)，

(vii) ATATAATTTTTTATTAGTATAGAGTAT (SEQ ID NO: 75)及ATACTCTATACTAATAAAAAATTATAT (SEQ ID NO: 76)，

(viii) TAAATATAATTTAA (SEQ ID NO: 63) 及TTAAATTATATTTA (SEQ ID NO: 64)；或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

75.如實施例69至74中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列中之一或多者進一步包含(例如在5'-至-3'順序上)核酸序列：

(i) TAGTATAAAAAACTGT (SEQ ID NO: 77) 及

ACAGTTTTTTATACTA (SEQ ID NO: 78)，

(ii) TAGTATACAAAAGATT (SEQ ID NO: 79)及AATCTTTTGTATACTA (SEQ ID NO: 80)，

(iii) TAGTATATATATCTCT (SEQ ID NO: 81)及AGAGATATATATACTA (SEQ ID NO: 82)，或

(viii) TAGTATAAAAAAAATT (SEQ ID NO: 83)及AATTTTTTTTATACTA (SEQ ID NO: 84)；

或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。

76.如實施例69至75中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列係由TelN原核端粒酶、ResT原核端粒酶、Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶消化產生。

77.如實施例69至75中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列不係藉由TelN原核端粒酶消化產生。

78.如實施例69至75或77中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列不係藉由Tel PY54原核端粒酶消化產生。

79.如實施例69至75、77或78中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列不係藉由TelK原核端粒酶消化產生。

80.如實施例69至75或77至79中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列不係藉由ResT原核端粒酶消化產生。

81.如實施例69至80中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列之長度為約28或56個核苷酸。

82.如實施例69至81中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列之

長度小於28個(例如小於15、20、25、26、27或28個)核苷酸。

83.如實施例69至82中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列之長度在約28個(例如25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35個)核苷酸至約56個(例如50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60個)核苷酸之間。

84.如實施例69至83中任一項之TDSC，其中該等原核端粒酶序列之長度大於約56個(例如大於50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75、80、90或100個)核苷酸。

85.如實施例30至94中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者包含Y-轉接子。

86.如實施例85之TDSC，其中視情況該dsDNA不包含經化學修飾之核苷酸。

87.如實施例69之TDSC，其中該原核端粒酶序列係自被TelN原核端粒酶或ResT原核端粒酶識別之第一原核端粒酶識別序列(protelomerase recognition sequence；PRS)及第二PRS產生。

88.如實施例69之TDSC，其中該原核端粒酶序列係自被Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶識別之第一原核端粒酶識別序列(PRS)及第二PRS產生。

89.如實施例1至85、87或88中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含至少一個經化學修飾之核苷酸(例如在每個有義股核苷酸及每個反義股核苷酸上包含化學修飾)。

90.如實施例1至85或87至89中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切

酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

91.如實施例1至85或87至90中任一項之TDSC，其中該雙股區包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

92.如實施例1至85或87至91中任一項之TDSC，其中該雙股區編碼負載序列，且其中該負載序列之反義股包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

93.如實施例1至92中任一項之TDSC，其中該雙股區編碼負載序列，且其中該負載序列之有義股包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

94.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC之80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的糖為去氧核糖。

95.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC包含編碼RNA (例如mRNA、siRNA或miRNA)之序列。

96.如實施例1至94中任一項之TDSC，其中該TDSC不包含編碼RNA之序列。

97.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC可以複製(例如藉

由對於包含該TDSC之細胞而言為原生的DNA聚合酶)。

98.如實施例1至96中任一項之TDSC，其中該TDSC無法複製。

99.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC為線性且可環化。

100.如實施例1至98中任一項之TDSC，其中該TDSC為線性且不能環化。

101.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC或其一部分可整合至該基因體中。

102.如實施例1至100中任一項之TDSC，其中該TDSC或其一部分無法整合至該基因體中。

103.如前述實施例中任一項之TDSC，其中該TDSC可以串聯。

104.如實施例1至102中任一項之TDSC，其中該TDSC無法串聯。

105.一種醫藥組合物，其包含含有效應物序列之雙股DNA (dsDNA)，其中：

a.該dsDNA缺乏載體主鏈或缺乏載體主鏈之材料部分，或不包含非人類(例如細菌)複製起點；

b.該dsDNA為去殼體的，基本上不含病毒蛋白，不包含病毒封裝訊號，或不包含病毒ITR；

c.該dsDNA包含核酸外切酶抗性端；及

d.該dsDNA包含至少一個經化學修飾之核苷酸。

106.一種醫藥組合物，其包含如前述實施例中任一項之TDSC。

107.如實施例105或106之醫藥組合物，其中該dsDNA或該TDSC包含於脂質奈米粒子(lipid nanoparticle；LNP)中。

108.如實施例105至107中任一項之醫藥組合物，其進一步包含電穿

孔緩衝液。

109.如實施例105至108中任一項之醫藥組合物，其進一步包含轉染試劑。

110.一種原TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該原TDSC包含一或多個(例如1或2個)尿嘧啶核苷酸。

111.如實施例110之原TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一或多個(例如1或2個)尿嘧啶核苷酸。

112.如實施例110或111之原TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一或多個(例如1或2個)尿嘧啶核苷酸。

113.如實施例110至112中任一項之原TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含環結構。

114.如實施例110至113中任一項之原TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含環結構。

115.如實施例110至114中任一項之原TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

116.如實施例110至115中任一項之原TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之每個核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷

酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

117.如實施例110至116中任一項之原TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

118.如實施例110至117中任一項之原TDSC，其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之每個核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸、硼代磷酸酯修飾之核苷酸、5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸、7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸及/或甲基化核苷酸)。

119.一種原TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA端形式包含黏端，及/或其中該下游核酸外切酶抗性DNA端形式包含黏端。

120.一種在目標細胞中表現異源負載之方法，該方法包含：

(i)將如前述實施例中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載的條件下；

從而在該目標細胞中表現該異源負載。

121.一種在目標細胞中表現異源負載之方法，該方法包含：

(i)提供包含如實施例1至119中任一項之TDSC或組合物之目標細

胞，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載的條件下；

從而在該目標細胞中表現該異源負載。

122.如實施例120或121之方法，其係在離體或活體內進行。

123.一種向目標細胞遞送異源負載之方法，該方法包含：

將如實施例1至119中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；

從而將該異源負載遞送至該目標細胞。

124.一種調節(例如增加或降低)目標細胞中之生物活性之方法，該方法包含：

(i)將如實施例1至119中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼調節該目標細胞中之生物活性的異源負載的序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載的條件下；

從而調節該目標細胞中之該生物活性。

125.一種調節(例如增加或降低)目標細胞中之生物活性之方法，該方法包含：

(i)提供包含如實施例1至119中任一項之TDSC或組合物之目標細胞，其中該TDSC之該雙股區包含編碼調節該目標細胞中之生物活性的異源負載的序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載

的條件下；

從而調節該目標細胞中之該生物活性。

126.如實施例124或125之方法，其中該異源負載增加該目標細胞中之該生物活性。

127.如實施例124或125之方法，其中該異源負載降低該目標細胞中之該生物活性。

128.如實施例124至127中任一項之方法，其中該生物活性包含細胞生長、細胞代謝、細胞傳訊、細胞運動、特化、相互作用、分裂、輸送、內穩定、滲透或擴散。

129.如實施例120至128中任一項之方法，其中該細胞為動物細胞，例如哺乳動物細胞，例如人類細胞。

130.一種治療有需要之細胞、組織或個體之方法，該方法包含：

向該細胞、組織或個體投與如實施例1至119中任一項之TDSC或組合物，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；

從而治療該細胞、組織或個體。

131.一種製備TDSC之方法，該方法包含：

(i)接合：

雙股DNA分子與

髮夾DNA分子，其包含：環區及包含一或多個經化學修飾之核苷酸的雙股區；

從而產生接合的dsDNA；及

(ii)將該接合的dsDNA與自該接合的dsDNA裂解該環區的酶一起培育；

從而製備TDSC。

132.如實施例131之方法，其進一步包含將該dsDNA (例如，在步驟ii)之後)與平端產生酶(例如綠豆(Mung bean)核酸酶)一起培育。

133.如實施例131或132之方法，其中自該接合的dsDNA裂解該環區之該酶為尿嘧啶DNA醣苷酶(UDG)及DNA醣苷酶裂解酶核酸內切酶VIII (例如USER酶混合物)。

134.一種製備TDSC之方法，該方法包含：

(i)接合：

雙股DNA分子與

髮夾DNA分子，其包含：

環區，及

雙股區，

其中該髮夾DNA分子例如在該環區中包含一或多個經化學修飾之核苷酸；

從而產生接合的dsDNA；及

(ii)將該接合的dsDNA與打開或裂解該環區的酶一起培育；

從而製備TDSC。

135.如實施例134之方法，其中該環區包含尿嘧啶核苷酸。

136.如實施例134或135之方法，其中打開或裂解該環區之該酶為尿嘧啶DNA醣苷酶(UDG)及DNA醣苷酶裂解酶核酸內切酶VIII (例如USER酶混合物)。

137.一種製備TDSC之方法，該方法包含接合：

雙股DNA分子與

包含第一區域及第二區域之自黏著DNA分子，其中該第一區域與該第二區域雜交；

從而產生TDSC。

138.如實施例137之方法，其中該自黏著DNA分子在該第一區域與該第二區域之間進一步包含環。

139.如實施例138之方法，其中該環包含異源功能序列，例如核靶向序列(例如CT3序列)；或調節序列。

140.如實施例138或139之方法，其中該環包含如表3中所列之核靶向序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核酸序列。

141.如實施例138至140中任一項之方法，其中該環包含與如表3中所列之核輸入蛋白質結合的核靶向序列。

142.如實施例137至141中任一項之方法，其中該自黏著DNA分子不包含任何未雜交的核苷酸(例如其中該自黏著DNA分子之所有核苷酸與另一核苷酸雜交)。

143.如實施例131至142中任一項之方法，其進一步包含將第二髮夾DNA分子與該雙股DNA分子接合，其中該第二髮夾DNA分子包含環區及雙股區，其中視情況該第二髮夾DNA分子在該環區或該雙股區中之一者或兩者中包含一或多種經化學修飾之核苷酸。

144.一種製備或製造TDSC之方法，該方法包含：

a)提供包含封閉端之TDSC，例如本文所描述之TDSC；

b)將該TDSC與雙股DNA核酸外切酶(例如核酸外切酶III，例如1 μL核酸外切酶III/5 μg DNA)以50 μL在37℃下一起培育1小時，例如如實例

10中所描述；

c)視情況，例如藉由矽膠膜管柱純化步驟b)中處理的TDSC，例如如實例10中所描述，

從而製備或製造該TDSC。

145.一種製備或製造TDSC之方法，該方法包含：

a)提供原TDSC (例如已用核酸外切酶III處理之原TDSC)，其中該原TDSC包含各自包含尿嘧啶的封閉DNA末端形式；

b)將該原TDSC與尿嘧啶切除酶(例如USER酶，例如3 μL USER酶/5 μg DNA)以100 μL在37℃下一起培育例如1小時，例如如實例12中所描述；

c)視情況，將該TDSC與單股DNA核酸酶(例如綠豆核酸酶，例如10 U綠豆核酸酶/5 μg DNA)以約100 μL在30℃下一起培育例如30 min，例如如實例12中所描述；

d)視情況，例如藉由矽膠膜管柱純化在步驟c)中處理之該TDSC，例如如實例12中所描述，

從而製備或製造該TDSC。

146.如實施例144或145之方法，其進一步包含分析該TDSC之降解，例如藉由瓊脂糖凝膠，例如如實例10中所描述。

147.如實施例146之方法，其進一步包含回應於該降解分析(例如，回應於降解低於預定值之判定)，進行以下中之一或多者：釋放該TDSC，將該TDSC置放於容器中，調配該TDSC，或添加一或多種賦形劑至該TDSC。

148.一種製備或製造TDSC之方法，該方法包含：

a)提供TDSC，例如如實施例1至119中任一項之TDSC；

b)測定該TDSC之結構是否匹配參考結構；

從而製備或製造該TDSC。

149.如實施例148之方法，其中(b)之測定包含對該TDSC進行定序。

150.如實施例148或149之方法，其中(b)之測定包含用限制酶消化該TDSC。

151.如實施例148至150中任一項之方法，其中該TDSC中匹配該參考結構之結構與該參考結構相同。

152.如實施例148至151中任一項之方法，其中該TDSC中匹配該參考結構之結構具有與該參考結構相同的序列。

153.如實施例148至152中任一項之方法，其中該TDSC中匹配該參考結構之結構的長度與該參考結構相同。

【0005】 在一實施例中，TDSC具有至少15個核苷酸、至少30個核苷酸、至少50個核苷酸、至少75個核苷酸、100個核苷酸、至少200個核苷酸、至少300個核苷酸、至少500個核苷酸、至少750個核苷酸、至少1,000個核苷酸、至少2,000個核苷酸、至少3,000個核苷酸、至少4,000個核苷酸、至少5,000個核苷酸、至少10,000個核苷酸、至少15,000個核苷酸、至少20,000個核苷酸、至少25,000個核苷酸、至少30,000個核苷酸、至少35,000個核苷酸、至少40,000個核苷酸至少45,000個核苷酸、至少50,000個核苷酸、至少60,000個核苷酸或更多。

【0006】 在一實施例中，TDSC具有20至1000個之間的核苷酸、20至50個之間的核苷酸、100至500個之間的核苷酸、500至50,000個之間的核苷酸、1,000至50,000個之間的核苷酸、2,000至40,000個之間的核苷

酸、5,000至50,000個之間的核苷酸、500至50,000個之間的核苷酸、500至25,000個之間的核苷酸、1,000至20,000個之間的核苷酸、1,000至10,000個之間的核苷酸、10,000至60,000個之間的核苷酸、1,000至20,000個之間的核苷酸、1,000至40,000個之間的核苷酸。

【0007】 在一實施例中，TDSC包含至少一個核苷酸修飾，例如共價核苷酸修飾，例如選自：N6-甲基腺苷(m6A，6mA)；5-甲醯基胞嘧啶(5-甲醯基-2'-脫氧胞嘧啶，5fC，f5C)；5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine) (5-羧基-2'-脫氧胞嘧啶，5-羧基胞嘧啶(5-carboxycytosine)，ca5C，5caC)；5-羥甲基胞嘧啶(5-羥甲基-2'-脫氧胞嘧啶，5hmC，hm5C)；5-甲基脫氧胞嘧啶(5-甲基胞嘧啶；5-甲基-2'-脫氧胞嘧啶；m5dC；5mC、m5C)；5'-甲基胞嘧啶；3-甲基胞嘧啶(m3C)；5-甲基嘧啶；8-氧代鳥嘌呤(8-oxoG)；硫代磷酸酯；S及R硫代磷酸酯鍵聯；甲基胸腺嘧啶；N3'-P5'胺基磷酸酯(NP)。在一些實施例中，核苷酸修飾為鹼基修飾。在一些實施例中，核苷酸修飾為主鏈修飾。在一些實施例中，核苷酸修飾為糖修飾。在一些實施例中，核苷酸修飾包含肽結合物。在一些實施例中，核苷酸修飾包含蛋白質結合物。

【0008】 在一實施例中，效應物序列為可操作地連接於啟動子之編碼治療性RNA (例如mRNA或調節RNA)的DNA序列。在一實施例中，RNA可為例如mRNA、tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、微小RNA、siRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、Y RNA或hnRNA。

【0009】 在一實施例中，效應物序列為可操作地連接於啟動子之編碼治療性肽或多肽的DNA序列。治療性肽或多肽可為例如DNA結合蛋

白；RNA結合蛋白；運輸蛋白；轉錄因子；轉譯因子；核糖體蛋白；染色質重塑因子；表觀遺傳修飾因子；抗原；激素；酶(諸如核酸酶，例如核酸內切酶，例如CRISPR系統之核酸酶元件，例如Cas9、dCas9、Cas9切口酶、Cpf/Cas12a)；連接Crispr的酶，例如鹼基編輯器或主編輯器(prime editor)；移動式遺傳元件蛋白質(例如轉位酶、逆轉錄轉位酶、重組酶、整合酶)；基因撰寫器多肽(Gene Writer polypeptide)；聚合酶；甲基化酶；去甲基酶；乙醯基酶；去乙醯酶；激酶；磷酸酶；連接酶；去泛素化酶；蛋白酶；整合酶；重組酶；拓樸異構酶；回旋酶；解螺旋酶；溶酶體酸性水解酶)；抗體(例如完整抗體、其片段或奈米抗體)；傳訊肽；受體配體；受體；凝血因子(clotting factor)；凝血因子(coagulation factor)；結構蛋白；凋亡蛋白酶；膜蛋白；粒線體蛋白；核蛋白；或經工程改造之結合劑，諸如生替林(centyrin)、達爾平(darpin)或阿德奈汀(adnectin)。在一實施例中，效應物序列為編碼報導蛋白之DNA序列。

【0010】 在實施例中，TDSC可包括複數個效應物序列。該複數個可為相同或不同類型，例如TDSC可包括呈結構性DNA的效應物序列及呈編碼功能性RNA或多肽之DNA序列的第二效應物序列。TDSC可包括呈編碼功能性RNA之DNA序列的效應物序列及呈編碼功能性多肽之DNA序列的第二效應物序列。該複數個效應物序列可為相同類型之相同或不同序列。

【0011】 在實施例中，TDSC不置於載劑中，例如其經調配用於裸投與。

【0012】 在實施例中，TDSC用載劑(例如基於脂質之載劑，例如LNP)調配。

【0013】 在實施例中，TDSC用醫藥賦形劑調配。

【0014】 在實施例中，TDSC經調配用於非經腸投與。

【0015】 在實施例中，醫藥組合物經調配用於局部投與。

【0016】 在實施例中，醫藥組合物實質上不含例如選自由以下組成之群的雜質或製程副產物：內毒素、單核苷酸、經化學修飾之單核苷酸、DNA片段或截短物、及蛋白質(例如酶，例如連接酶、限制酶)。在一些實施例中，醫藥組合物實質上不含環狀DNA。

【0017】 在另一態樣中，本發明包括一種向個體(例如有需要之個體)遞送效應物之方法。該方法包括向個體投與本文所描述之組合物，例如上文任何實施例中所描述。在一實施例中，個體患有或已診斷患有可用該效應物治療之病狀。

【0018】 在另一態樣中，本發明包括一種調節(例如增加或降低)細胞、組織或個體中之生物參數之方法。該方法包括向個體投與本文所描述之組合物，例如上文任何實施例中所描述。在實施例中，生物參數為目標細胞、組織或個體中主題基因之基因表現增加或降低，該增加或降低藉由本文所描述之效應物序列來實現。在一實施例中，個體患有或已診斷患有可用該效應物治療之病狀。

【0019】 在另一態樣中，本發明包括一種治療細胞、組織或個體之方法。該方法包括向有需要之細胞、組織或個體投與本文所描述之TDSC或構築體，例如上文任何實施例中所描述。在一實施例中，個體患有或已診斷患有可用該效應物治療之病狀。

【0020】 本發明亦提供製備本文所描述之TDSC及dsDNA組合物之方法。在一實施例中，該方法包含進行金門組裝(golden gate assembly)。

【0021】 在一實施例中，該方法進一步包含富集或純化TDSC。

【0022】 在一實施例中，富集或純化包括自TDSC實質上移除一或多種選自以下之雜質：內毒素、單核苷酸、經化學修飾之單核苷酸、單股DNA、DNA片段或截短物、及蛋白質(例如酶，例如連接酶、限制酶)。

【0023】 在一實施例中，該方法進一步包含調配經富集或經純化TDSC用於醫藥用途，例如用醫藥學上可接受之賦形劑及/或用載劑(例如LNP)調配TDSC。

【0024】

定義

如本文所用，術語「抗體」係指如下分子：與特定抗原特異性結合或與其具有免疫學反應性，且至少包括免疫球蛋白之重鏈之可變域，且通常至少包括重鏈及輕鏈之可變域。抗體及其抗原結合片段、變體或衍生物包括但不限於多株、單株、多特異性、人類、人源化、靈長類化或嵌合抗體；異結合抗體(例如雙、三及四特異性抗體；雙功能抗體；三功能抗體；及四功能抗體)；單域抗體(sdAb)；抗原決定基結合片段，例如Fab、Fab'及F(ab').sub.2；Fd；Fv；單鏈Fv (scFv)；rIgG；單鏈抗體；二硫鍵鍵聯的Fv (sdFv)；奈米抗體；片段(包括VL或VH域)；藉由Fab表現庫產生之片段；及抗個體基因型(抗Id)抗體。本文所描述之抗體可具有任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類別之免疫球蛋白分子。此外，除非另有指示，否則術語「單株抗體」 (mAb)意在包括能夠與目標蛋白特異性結合之完整分子以及抗體片段(諸如Fab及F(ab')2片段)兩者。Fab及F(ab')2片段缺乏完整抗體之Fc片段。

【0025】 如本文所用，術語「載劑」意謂有助於或促進將組合物(例如本文所描述之編碼dsDNA之TDSC或核酸)運輸或遞送至細胞中之化合物、組合物、試劑或分子。舉例而言，載劑部分或完全可為囊封劑。

【0026】 如本文所用，如本文關於DNA所用之術語「經化學修飾之核苷酸」係指相對於典型去氧核糖核苷酸(亦即G、T、C及A)包含一或多個結構性差異的核苷酸。經化學修飾之核苷酸可具有(相對於典型核苷酸)經化學修飾之核鹼基、經化學修飾之糖、經化學修飾之磷酸二酯鍵聯，或其組合。未暗示特定製備方法；舉例而言，經化學修飾之核苷酸可藉由化學合成，或藉由共價修飾典型核苷酸直接製造。

【0027】 如本文所用，如本文關於DNA所用之術語「經化學修飾之胞嘧啶核苷酸」係指如下經化學修飾之核苷酸：其中核鹼基包含單環6員環，其中碳4共價結合於不為環之六個成員之一的氮，其中經化學修飾之胞嘧啶核苷酸之核鹼基相對於典型胞嘧啶核鹼基包含一或多個結構性差異。在一些實施例中，核鹼基之C-5位置可具有除H外之取代。未暗示特定製備方法。

【0028】 如本文所用，術語「封閉端」係指DNA分子中位於雙股區之一端的部分，其中該DNA分子部分內之所有核苷酸均與任一側上之相鄰核苷酸共價連接。在一些實施例中，封閉端可包括含有一或多個未與另一核苷酸雜交之核苷酸的環。在一些實施例中，封閉端之每個核苷酸與另一核苷酸雜交。在一些實施例中，TDSC包含第一封閉端(例如異源對象序列上游)及第二封閉端(例如異源對象序列下游)。

【0029】 如本文所用，術語「開放端」係指DNA分子中位於雙股區之一端的部分，其中至少一個核苷酸(「末端核苷酸」)與恰好一個其他核

苷酸共價連接。在一些實施例中，末端核苷酸包含一個游離5'磷酸酯。在一些實施例中，端核苷酸包含一個游離3' OH。在一些實施例中，在包含第一DNA股及第二DNA股之TDSC中，開放端在第一DNA股上包含第一末端核苷酸且在第二DNA股上包含第二末端核苷酸。在一些實施例中，TDSC包含第一開放端(例如異源對象序列上游)及第二開放端(例如異源對象序列下游)。在一些實施例中，開放端包含平端、黏端或Y-轉接子。

【0030】 如本文所用，術語「DNA」係指包含至少兩個(例如至少10個、至少20個、至少50個、至少100個)共價連接之去氧核糖核苷酸的任何化合物及/或物質。在一些實施例中，DNA為單個寡核苷酸鏈；而在其他實施例中，DNA包含複數個寡核苷酸鏈；而在又其他實施例中，DNA為寡核苷酸鏈之一部分。在一些實施例中，DNA為作為寡核苷酸鏈或可經由磷酸二酯鍵聯併入寡核苷酸鏈中之化合物及/或物質。在一些實施例中，DNA僅包含典型核苷酸。在一些實施例中，DNA包含一或多個經化學修飾之核苷酸。在一些實施例中，DNA之至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%之糖為去氧核糖。在一些實施例中，藉由以下中之一或多者製備DNA：自天然來源分離，基於互補模板藉由聚合作用酶促合成(活體內或活體外)，在重組細胞或系統中複製，及化學合成。

【0031】 如本文所用，術語「DNA末端形式」係指包含位於TDSC之一端之DNA的結構。在一些實施例中，DNA末端形式包含封閉端。在其他實施例中，DNA末端形式包含開放端。在一些實施例中，DNA末端形式包含髮夾、環、Y-轉接子、平端或黏端。DNA末端形式可包含單股區及雙股區中之一者或兩者。DNA末端形式可包含典型核苷酸、經化學

修飾之核苷酸或其組合。在一些實施例中，DNA末端形式包含3-100個之間的核苷酸。在一些實施例中，TDSC在第一端包含第一DNA末端形式且在第二端包含第二DNA末端形式。在一些實施例中，TDSC之第一DNA末端形式及第二DNA末端形式為相同類型。在一些實施例中，TDSC之第一DNA末端形式及第二DNA末端形式為不同類型。

【0032】 如本文所用，當用於描述DNA時，術語「核酸外切酶抗性」意指當其包含封閉端時，DNA對實例10中描述核酸外切酶分析具有抗性；且當其包含開放端(例如兩個開放端)時，DNA對實例11中描述之核酸外切酶分析具有抗性。

【0033】 如本文所用，當用於參考第二要素描述第一要素時，術語「異源」意謂第一要素及第二要素在自然界中不會如所描述安置的存在。舉例而言，異源多肽、核酸分子、構築體或序列係指(a)對於表現其之細胞為非天然的多肽、核酸分子或多肽或核酸分子序列之部分，(b)相對於其天然狀態已改變或突變的多肽或核酸分子或多肽或核酸分子之部分，或(c)在類似條件下相較於天然表現量表現改變之多肽或核酸分子。舉例而言，異源調節序列(例如啟動子、強化子)可用於以不同於基因或核酸分子在自然界中正常表現的方式來調節基因或核酸分子之表現。在另一實例中，多肽或核酸序列之異源域(例如，多肽之DNA結合域或編碼多肽之DNA結合域之核酸)可相對於其他域安置，或相對於多肽或其編碼核酸之其他域或部分可為不同序列或來自不同來源。在某些實施例中，異源核酸分子可存在於天然宿主細胞基因體中，但可具有改變之表現量或具有不同序列或兩者。在其他實施例中，異源核酸分子對於宿主細胞或宿主基因體而言可能不為內源性的，但實際上可藉由轉型(例如轉染、電穿孔)引入宿

主細胞中，其中所添加之分子可整合至宿主基因體中，或可作為染色體外遺傳物質的形式短暫(例如mRNA)存在或半穩定地存在超過一個世代(例如游離型病毒載體、質體或其他自我複製載體)。

【0034】 如本文所用，術語「異源功能序列」係指對於相鄰(例如直接相鄰)核酸序列而言異源具有一或多個生物功能的核酸序列。在一些實施例中，生物功能包含靶向胞器，例如核靶向。在一些實施例中，異源功能序列包含核靶向序列或調節序列。

【0035】 如本文所用，術語「增加」及「降低」係指分別導致量度相對於參考更高或更小量之功能、表現或活性的調節。舉例而言，相對於投與前標記之量，或相對於投與對照TDSC (諸如相較於未經修飾之TDSC包含經化學修飾之核苷酸的TDSC)，在以本文所描述之方法投與TDSC之後，個體之本文所描述之量度(例如基因表現量或先天性免疫之標記)的量可增加或降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多。一般而言，在投與之後在投與已具有所敍述作用時，例如開始治療方案後至少一天、一週、一個月、3個月或6個月，量測該量度。

【0036】 如本文所用，關於包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸的術語「線性」意謂核酸包含兩個彼此雜交之DNA股或股部分(從而形成雙股區)，其中該結構包含兩個端。一端可為封閉端或開放端。彼此雜交之兩股可部分或完全互補。在一些實施例中，線性TDSC由在變性條件下呈環狀之單股DNA組成，其中在生理條件下該股之第一部分與該股之第二部分雜交(從而形成雙股區)，且該線性TDSC包含含有第一環的第一封閉端及含有第二環的第二封閉端。

【0037】 如本文所用，術語「環」係指呈單股之核酸序列。環藉由稱為「莖」之雙股區連接於兩端，以形成「莖-環」。

【0038】 如本文所用，術語「維持序列」為使得細胞核中之DNA分子在細胞分裂期間能夠保持或促進該保持的DNA序列或模體。維持序列通常使得細胞核中之DNA能夠藉由與促進染色質成環之蛋白質相互作用進行複製及/或轉錄。維持序列之實例為支架/基質連接區域(scaffold/matrix attached region；S/MAR元件)。

【0039】 如本文所用，「核靶向序列」為使得DNA能夠進入目標細胞核或促進此之DNA序列。在一些實施例中，核靶向序列為表3之DNA序列。

【0040】 如本文所用，「醫藥組合物」或「醫藥製劑」為指示用於動物。例如人類或獸醫學醫藥用途，例如非人類動物或人類預防、診斷或治療用途之組合物或製劑。醫藥製劑包含對於個體之細胞或組織具有生物效應，例如在減輕、治療或預防疾病中具有藥理活性或作用之活性劑，以及醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑。醫藥組合物亦意謂預防、診斷或治療性組合物之成品劑型或調配物。

【0041】 如本文所用，術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換地使用且係指包含藉由肽鍵或藉由除肽鍵外之手段共價連接之胺基酸殘基的化合物。蛋白質或肽必須含有至少兩個胺基酸，且對可構成蛋白質或肽序列之胺基酸的最大數目無限制。多肽包括包含兩個或更多個胺基酸的任何肽或蛋白質，該等胺基酸藉由肽鍵或藉由除肽鍵外的方式彼此連接。如本文所用，該術語係指短鏈(其在此項技術中通常亦稱為例如肽、寡肽及寡聚物)及長鏈(其在此項技術中一般稱為蛋白質，其存在多種類型)。在

一些實施例中，多肽包含非典型胺基酸殘基。如本文所用，術語「原核端粒酶序列(protelomerase sequence)」係指能夠由原核端粒酶產生之將第一原核端粒酶識別序列(PRS)與第二PRS連接的核苷酸序列。在一些實施例中，原核端粒酶序列係藉由涉及原核端粒酶之方法產生，且在其他實施例中，原核端粒酶序列係藉由不涉及原核端粒酶之方法(例如藉由固相合成)產生。

【0042】 如本文所用，dsDNA之「有義股」為具有與編碼功能蛋白之mRNA或pre-mRNA相同的序列且不充當轉錄模板的股。dsDNA之「反義股」為具有與編碼功能蛋白之mRNA或pre-mRNA互補之序列且/或可充當轉錄模板的股。

【0043】 如本文所用，術語「雙股DNA」或dsDNA意謂包含兩個彼此鹼基配對之互補去氧核糖核苷酸鏈的DNA組合物。兩個互補股可具有完美互補性或可具有一或多個錯配，例如形成隆起。在一些實施例中，兩股中之任一者可具有自身互補的配對區域，其形成呈摺疊組態之分子內/股內雙股模體，例如可形成髮夾環、連接、隆起或內部環。在一些實施例中，dsDNA包含一或兩個封閉端。在一些實施例中，dsDNA分子為環狀或線性。在一些實施例中(例如在具有封閉端之dsDNA分子中)，兩個去氧核糖核苷酸互補鏈為共價連接的。

【0044】 如本文所用，術語「治療性雙股構築體」(「TDSC」)係指包含DNA之線性構築體，其中該構築體至少部分地為雙股。TDSC不包含質體主鏈序列(例如不包含細菌複製起點)。TDSC不包含病毒殼體或病毒套膜。在一些實施例中，TDSC包含封閉端或開放端(例如平端或黏端)。在一些實施例中，TDSC適合於向人類個體投與。

【0045】 如本文所用，術語「原TDSC (proto-TDSC)」係指可轉化為TDSC之構築體。在一些實施例中，原TDSC為可經歷一或多個步驟(例如裂解步驟)以轉化為TDSC的製造中間物。在一些實施例中，原TDSC屬於TDSC之定義內，例如原TDSC為第一TDSC，且可經歷一或多個步驟轉化為第二TDSC。

【0046】 如本文所用，術語「末端核苷酸」係指與恰好一個其他核苷酸共價連接之核苷酸。在一些實施例中，末端核苷酸包含一個游離5'磷酸酯。在一些實施例中，端核苷酸包含一個游離3' OH。

【0047】 如本文所用，「治療(treatment)」及「治療(treating)」係指對個體之醫學管理意欲以改良、改善、穩定(亦即，不惡化)、預防或治癒疾病、病理性病狀或病症。此術語包括主動性治療(針對改善疾病、病理性病狀或病症之治療)、病因性治療(針對相關疾病、病理性病狀或病症之病因的治療)、緩解性治療(針對症狀緩解而設計之治療)、預防性治療(針對最小化或部分或完全地抑制相關疾病、病理性病狀或病症之發展的治療)及支持性治療(用於補充另一療法之治療)。治療亦包括減輕疾病或病狀之程度；預防疾病或病狀擴散；延遲或減緩疾病或病狀之進展；改善或緩和疾病或病狀；及緩解(無論部分或總體)，無論係可偵測抑或不可偵測的。「改善」或「緩和」疾病或病狀意謂相比於不存在治療下的程度或時程而言，疾病、病症或病狀之程度及/或不合需要的臨床表現減輕及/或進展之時程減緩或拉長。「治療」亦可意謂與未接受治療時之預期存活期相比延長的存活期。需要治療之彼等者包括已患有病狀或病症之彼等者，以及易於患該病狀或病症之彼等者，或待預防該病狀或病症之彼等者。

【0048】 如本文所用，術語「Y-轉接子」係指包含彼此互補(例如

完美互補)之第一核酸區域及第二核酸區域的核酸結構；第一及第二區域可雜交以形成雙股區。第一核酸區域與第三核酸區域共價連接，且第二核酸區域與第四核酸區域共價連接，且第三及第四核酸區域彼此不實質上互補；第三及第四核酸區域可為單股。第一核酸區域在第三核酸區域之3'，且第二核酸區域在第四核酸區域之5'。因此，第三及第四區域可位於雙股區之同一側上。Y-轉接子可為TDSC之一部分。

【圖式簡單說明】

【0049】

圖1A至圖1B為顯示如本文所描述之治療性雙股構築體(TDSC)中(例如在TDSC之一或兩端)可包括之例示性共價封閉DNA末端形式的一系列圖。圖1A中顯示例示性TDSC，其在末端包含無環端(例如原核端粒酶序列)、反向末端重複序列(ITR)或髮夾，其可由未經修飾之核苷酸(白色符號)構成或可包含經化學修飾之核苷酸(灰色符號)。經化學修飾之核苷酸可包括例如主鏈、糖或鹼基中經修飾之核苷酸，或與肽或蛋白質結合之核苷酸。在一些情況下，兩個DNA股均未經修飾。在一些情況下，兩個DNA股均經化學修飾。在一些情況下，反義股經化學修飾。在一些情況下，有義股經化學修飾。圖1A中之實線框指示在末端用髮夾共價封閉之dsDNA分子，例如具有包含硫代磷酸酯修飾之末端形式的線性共價封閉dsDNA分子。圖1A中之虛線框指示用無環端共價封閉之dsDNA分子，例如具有TelN端形式的線性共價封閉dsDNA分子。

圖2為顯示雙股DNA構築體之一系列圖，其包括含有未共價封閉之例示性DNA末端形式(例如在一或兩端)的例示性TDSC。此類例示性TDSC可包含Y端(例如Y轉接子，例如如本文所描述)。在一些情況下，DNA末

端形式可由未經修飾之核苷酸(白色符號)構成。在一些情況下，DNA末端形式包含經化學修飾之核苷酸(灰色符號)。經化學修飾之核苷酸可包括例如主鏈、糖或鹼基中經修飾之核苷酸，或與肽或蛋白質結合之核苷酸。在一些情況下，兩個DNA股均未經修飾。在一些情況下，兩個DNA股均經化學修飾。在一些情況下，反義股經化學修飾。在一些情況下，有義股經化學修飾。右上方亦顯示缺乏DNA末端形式或化學修飾之例示性DNA構築體(亦即未經修飾之雙股DNA分子)。

圖3為顯示產生包含在各股之末端核苷酸之間包括三個硫代磷酸酯修飾之平端DNA末端形式之例示性TDSC的一系列圖。簡言之，在莖之末端包含硫代磷酸酯修飾之核苷酸的髮夾結構接合於加A尾雙股DNA。髮夾包括一對尿嘧啶核苷酸(箭頭)。隨後用USER酶處理導致尿嘧啶位置處裂解，從而產生懸垂物，接著使用核酸酶(例如單股特異性核酸酶，例如綠豆核酸酶)將該懸垂物修整回硫代磷酸酯修飾之核苷酸。按出現之次序，圖3分別揭示SEQ ID NO 85及86。

圖4為顯示產生包含在各股之末端核苷酸之間包括六個硫代磷酸酯修飾之平端DNA末端形式之例示性TDSC的一系列圖。簡言之，在莖之末端包含硫代磷酸酯修飾之核苷酸的髮夾結構接合於加A尾雙股DNA。髮夾包括一對尿嘧啶核苷酸(箭頭)。隨後用USER酶處理導致尿嘧啶位置處裂解，從而產生懸垂物，接著使用核酸酶(例如單股特異性核酸酶，例如綠豆核酸酶)將該懸垂物修整回硫代磷酸酯修飾之核苷酸。按出現之次序，圖4分別揭示SEQ ID NO 87及88。

圖5為顯示產生在各端包含Y轉接子DNA末端形式之例示性TDSC的一系列圖。簡言之，環區中包含尿嘧啶核苷酸之髮夾結構接合於加A尾雙

股DNA。在一實施例中，環區在各核苷酸之間包含硫代磷酸酯修飾。隨後用USER酶處理導致環中之尿嘧啶裂解，從而產生在dsDNA末端形成Y轉接子結構之兩個未雜交股。按出現之次序，圖5分別揭示SEQ ID NO 89-92、92及91。

圖6為顯示如本文所描述之TDSC中可包括之例示性共價封閉DNA末端形式的一系列圖。DNA形式包括例如包含髮夾之小環轉接子、大環轉接子(例如包含在其單股環區中包含一或多個功能元件，諸如CT3 ssDNA序列之髮夾)及無環轉接子，其中DNA末端形式之每個核苷酸與另一核苷酸雜交，且其中末端為共價封閉的。此等例示性末端形式中之各者可例如接合於雙股DNA以形成如本文所描述之TDSC的一端。按出現之次序，圖6分別揭示SEQ ID NO 93-95。

圖7A描繪顯示在核酸外切酶處理後之TDSC的瓊脂糖凝膠。圖7B顯示稱為6a之TDSC，對應於瓊脂糖凝膠之泳道3及4。圖7C顯示稱為3a之TDSC，對應於瓊脂糖凝膠之泳道5及6。圖7D顯示稱為Ya之TDSC之一端，對應於瓊脂糖凝膠之泳道7及8。按出現之次序，圖7D分別揭示SEQ ID NO 96及97。

圖8為描繪產生具有包含六個硫代磷酸酯修飾(P6形式)之末端形式之共價封閉TDSC的圖。按出現之次序，圖8分別揭示SEQ ID NO 98及99。

圖9為描繪產生具有TelN端形式之共價封閉TDSC之圖。按出現之次序，圖9分別揭示SEQ ID NO 100、100及101。

圖10為描繪產生環狀dsDNA分子之例示性方法之圖。可使線性dsDNA分子與產生相容性黏端之限制酶(例如KpnI)接觸，該等黏端接著可藉由接合而彼此連接，從而產生環狀dsDNA。按出現之次序，圖10分別

揭示SEQ ID NO 102-105。

圖11顯示使用25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生之環狀dsDNA的片段分析儀跡線。

圖12顯示使用25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生之具有包含硫代磷酸酯修飾之末端形式的共價封閉TDSC的片段分析儀跡線。

圖13顯示使用25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生之具有TelN端形式之共價封閉TDSC的片段分析儀跡線。

圖14A及圖14B為顯示用包含TelN端形式的共價封閉TDSC (TelN形式)、包含在各端形式中具有六個硫代磷酸酯修飾之末端形式的共價封閉TDSC (P6形式)、或環狀dsDNA分子(cdsDNA形式)進行脂質體轉染之HEKa細胞中報導蛋白mCherry的表現的圖。在使用未經修飾之胞嘧啶或25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生TDSC及環狀dsDNA分子。圖14A顯示mCherry表現細胞之百分比，且圖14B顯示總螢光，定義為表現細胞百分比乘以平均螢光強度。

圖15A至圖15C為顯示在用包含TelN端形式之共價封閉TDSC (TelN形式)脂質體、包含在各端形式中具有六個硫代磷酸酯修飾之末端形式的共價封閉TDSC (P6形式)、或環狀dsDNA分子(cdsDNA形式)轉染後，HEKa細胞中IFNβ (圖15A)、CXCL10 (圖15B)及IL6 (圖15C)之mRNA含量的一系列圖。在使用未經修飾之胞嘧啶或25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生TDSC及環狀dsDNA分子。將RNA表現標準化為GAPDH，且表述為相對於方法對照(無DNA轉染)之倍數變化。

圖16A至圖16C為顯示在用包含TelN端形式之共價封閉TDSC (TelN形式)脂質體、包含在各端形式中具有六個硫代磷酸酯修飾之末端形式的

共價封閉TDSC (P6形式)、或環狀dsDNA分子(cdsDNA形式)轉染後，THP1細胞中IFNβ (圖16A)、CXCL10 (圖16B)及IL6 (圖16C)之mRNA含量的一系列圖。在使用未經修飾之胞嘧啶或25% 5-甲醯基-dCTP之反應中產生TDSC及環狀dsDNA分子。將RNA表現標準化為GAPDH，且表述為相對於方法對照(無DNA轉染)之倍數變化。

圖17為顯示HEKa細胞對於包含硫代磷酸化末端轉接子及在胞嘧啶之C-5位置包含指示修飾(亦即5-甲醯基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶或5-羥甲基胞嘧啶)之TDSC的先天性免疫反應的散佈圖。X軸表示干擾素傳訊之降低，定義為相對於使用未經修飾之胞嘧啶產生之TDSC，標記IFNB及CXCL10之平均降低倍數變化。Y軸表示發炎性細胞介素傳訊之降低，定義為相對於使用未經修飾之胞嘧啶產生之TDSC，標記IL6及TNFa之平均降低倍數變化。

【實施方式】

【0050】

相關申請案

本申請案主張2022年5月13日申請之美國第63/341,960號之優先權，其全部內容以引用之方式併入本文中。

【0051】 本發明係關於用於例如活體內或活體外向細胞、組織或個體提供效應物(例如治療性效應物)之組合物及方法。效應物可為DNA序列、多肽(例如治療性蛋白質)或RNA (例如調節RNA或mRNA)。

【0052】

DNA構築體之元件

包含本文所描述之dsDNA的TDSC或核酸含有足夠將效應物序列遞送

至目標細胞、組織或個體之元件。在一些實施例中，效應物序列為DNA序列。在一些實施例中，TDSC驅動效應物之表現，例如包含啟動子及編碼RNA或多肽(例如治療性RNA或多肽)之序列。在一些實施例中，本文所描述之DNA構築體進一步含有以下中之一者或兩者：核靶向序列及維持序列。儘管本文中之許多實施例係關於TDSC，但應理解，若適用，關於TDSC之實施例亦可適用於包含dsDNA之核酸。

【0053】

核酸外切酶抗性DNA末端形式

包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸在雙股DNA分子之各端包含DNA末端形式。在一些情況下，本文所描述之DNA末端形式可包含封閉端，其中DNA末端形式之每個核苷酸與DNA末端形式之兩個其他核苷酸共價連接。在其他情況下，本文所描述之DNA末端形式包含含有僅與DNA末端形式之一個其他核苷酸共價連接之至少一個核苷酸的開放端。DNA末端形式一般為核酸外切酶抗性的。在一些情況下，包含封閉端(例如共價封閉端)之DNA末端形式對實例10中描述之核酸外切酶分析具有抗性。在一些情況下，包含開放端(例如，諸如Y轉接子、平端或黏端，例如如本文所描述)之DNA末端形式對實例11中描述之核酸外切酶分析具有抗性。

【0054】

封閉端，例如髮夾

在一些實施例中，核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA髮夾。髮夾一般包含共價連接於雙股莖區之5'及3'端兩者之單股環區。在某些實施例中，單股環區包含一或多個未與另一核苷酸雜交之核苷酸(例如1-2、2-

5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35或35-40個核苷酸)。例示性髮夾結構及包含髮夾之例示性TDSC顯示於圖1A中。

【0055】 在某些實施例中，單股環區包含一或多個功能元件(例如核輸入序列(例如CT3 ssDNA序列)或調節序列)。在實施例中，單股環區中所包含之功能元件對於DNA末端形式及/或包含DNA末端形式之TDSC之一或多個其他元件而言為異源性。在某些實施例中，髮夾環之單股環區之長度小於約5、10、15、20、25、26、27、28、29或30個核苷酸。

【0056】 在實施例中，髮夾係包含於具有狗骨頭(doggybone)構形之TDSC中。在實施例中，髮夾包含原核端粒酶序列(例如如本文所描述)。在實施例中，原核端粒酶序列係藉由TelN原核端粒酶、ResT原核端粒酶、Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶消化產生。在實施例中，原核端粒酶序列之長度小於約15、20、25、26、27、28、29或30個核苷酸。在實施例中，原核端粒酶序列之長度在約28個(例如25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35個)核苷酸至約56個(例如50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60個)核苷酸之間。在實施例中，原核端粒酶序列之長度大於約56個(例如大於50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75、80、90或100個)核苷酸。

【0057】 髮夾可例如藉由接合(例如如本文所描述)與雙股DNA分子(例如如本文所描述之原TDSC)之一或兩端連接。在一些實施例中，如本文所描述之TDSC在一或兩端包含DNA髮夾環。在一些實施例中，如本文所描述之TDSC之上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA髮夾環。在一些實施例中，如本文所描述之TDSC之下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA髮夾環。

【0058】 在某些實施例中，DNA髮夾環包含一或多個未經修飾之核苷酸。在實施例中，DNA髮夾環完全由未經修飾之核苷酸組成。在某些實施例中，DNA髮夾環包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，DNA髮夾環完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成。

【0059】 在某些實施例中，DNA髮夾環之單股環區包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，單股環區中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，DNA髮夾環之單股環區完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成。在某些實施例中，DNA髮夾環之單股環區包含一或多個未經修飾之核苷酸。在實施例中，DNA髮夾環之單股環區完全由未經修飾之核苷酸組成。

【0060】 在某些實施例中，DNA髮夾環之雙股莖區包含一或多個未經修飾之核苷酸。在實施例中，DNA髮夾環之雙股莖區完全由未經修飾之核苷酸組成。在某些實施例中，DNA髮夾環之雙股莖區包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，雙股莖區中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，DNA髮夾環之雙股莖區完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，

例如如本文所描述)組成。

【0061】 在實施例中，DNA髮夾環之單股環區包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)，且雙股莖區包含一或多個未經修飾之核苷酸。在實施例中，單股環區中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，DNA髮夾環之單股環區完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成，且雙股莖區完全由未經修飾之核苷酸組成。

【0062】

Y-轉接子

在一些實施例中，如本文所描述之核酸外切酶抗性DNA末端形式包含Y-轉接子。如本文所描述，Y-轉接子一般包含一對單股DNA區，各自連接於雙股DNA區之一股之一端，從而形成「Y」形狀(其中「Y」之底部表示雙股DNA區，且「Y」之上部叉中之各者表示兩個單股DNA區)。例示性Y銜接子結構及包含Y轉接子之例示性TDSC顯示於圖2中。

【0063】 在一些實施例中，藉由將包含含有可裂解部分(例如尿嘧啶核苷酸)之單股區之髮夾環連接於雙股DNA區之末端(例如經由接合)來產生Y-轉接子。可裂解部分接著可裂解(例如藉由用能夠裂解可裂解部分之酶，例如USER酶處理)，以產生Y-轉接子之兩個單股DNA區。

【0064】 在某些實施例中，Y-轉接子之單股DNA區(例如一或兩個單股DNA區)包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，單股DNA區中至少50%、

60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，Y-轉接子之單股DNA區(例如一或兩個單股DNA區)完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成。在某些實施例中，Y-轉接子之單股DNA區(例如一或兩個單股DNA區)包含一或多個未經修飾之核苷酸。

【0065】 在實施例中，Y-轉接子之單股DNA區(例如一或兩個單股DNA區)包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)，且Y-轉接子之雙股DNA區包含一或多個未經修飾之核苷酸。在實施例中，一或多個單股DNA區中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，Y-轉接子之單股DNA區(例如一或兩個單股DNA區)完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成，且Y-轉接子之雙股DNA區完全由未經修飾之核苷酸組成。

【0066】

無環封閉DNA末端形式

在一些實施例中，如本文所描述之TDSC包含共價封閉但不包括髮夾環之核酸外切酶抗性DNA末端形式。舉例而言，在某些實施例中，共價封閉DNA末端形式之每個核苷酸與另一核苷酸雜交(例如如圖6之例示性「無環轉接子」中所示)。在某些實施例中，共價封閉DNA末端形式包含第一區域及第二區域，其中第一區域能夠全部與第二區域雜交(例如其中第一區域與第二區域互補)，且其中第一區域之3'端與第二區域之5'端共價

連接。在實施例中，如本文所描述之共價封閉DNA末端形式可例如藉由接合與如本文所描述之原TDSC之一端連接。

【0067】

開放DNA末端形式

在一些實施例中，如本文所描述之TDSC包含未共價封閉之核酸外切酶抗性DNA末端形式。在某些實施例中，DNA末端形式包含平端(例如包含一或多個如本文所描述之化學修飾之平端)或黏端(例如包含一或多個如本文所描述之化學修飾之黏端)。

【0068】 在某些實施例中，藉由核酸酶消化共價封閉DNA末端形式(諸如DNA髮夾)來產生開放DNA末端形式。在實施例中，DNA髮夾包含在各股上含有可裂解部分(例如尿嘧啶核苷酸)之雙股莖區，且接著DNA髮夾與能夠裂解可裂解部分之酶(例如USER酶)接觸。在實施例中，此導致形成包含懸垂物之黏端。在實施例中，懸垂物用酶(例如單股特異性核酸酶，例如綠豆核酸酶)消化以形成平端。

【0069】 在某些實施例中，包含平端之DNA末端形式包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，包含平端之DNA末端形式中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，包含平端之DNA末端形式完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成。在實施例中，包含平端之DNA末端形式之末端鹼基對包含經化學修飾之核苷酸(例如鹼基對之一或兩個核苷酸經化學修飾)，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所

描述。在實施例中，DNA末端形式末端之複數個鹼基對(例如2、3、4、5或6個鹼基對)包含經化學修飾之核苷酸(例如鹼基對之一或兩個核苷酸經化學修飾)，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述。在一實施例中，DNA末端形式末端之三個鹼基對包含經化學修飾之核苷酸(例如鹼基對之一或兩個核苷酸經化學修飾)，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述。在一實施例中，DNA末端形式末端之六個鹼基對包含經化學修飾之核苷酸(例如鹼基對之一或兩個核苷酸經化學修飾)，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述。

【0070】 在某些實施例中，包含黏端之DNA末端形式包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，包含黏端之DNA末端形式中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%之核苷酸為經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)。在實施例中，包含黏端之DNA末端形式完全由經化學修飾之核苷酸(例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述)組成。在實施例中，包含黏端之DNA末端形式之末端核苷酸包含經化學修飾之核苷酸(例如鹼基對之一或兩個核苷酸經化學修飾)，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述。在實施例中，DNA末端形式之黏端之懸垂區包含一或多個經化學修飾之核苷酸，例如硫代磷酸酯修飾之核苷酸，例如如本文所描述。

【0071】

反向末端重複序列(ITR)

在一些實施例中，如本文所描述之TDSC包含含有反向末端重複序列(ITR)之核酸外切酶抗性DNA末端形式。在一些實施例中，ITR為來自病

毒，例如腺病毒或腺相關病毒(AAV)之ITR。在一些實施例中，ITR包含與來自病毒，例如腺病毒或腺相關病毒(AAV)之ITR序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在某些實施例中，ITR包含複製起點(例如病毒複製起點)。在實施例中，如本文所描述之TDSC包含在各端含有ITR (例如如本文所描述)之核酸外切酶抗性DNA末端形式。在一些實施例中，TDSC不包含ITR。

【0072】

啟動子及其他調節序列

包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸可含有可操作地連接於效應物序列之啟動子(在該處直接地或間接地與RNA聚合酶及轉錄因子結合以起始轉錄的DNA序列)。可發現啟動子在自然界中可操作地連接於效應物序列，或對於效應物序列而言可為異源的。本文所描述之啟動子對於目標細胞或組織而言可為原生的，或對於目標細胞或組織而言可為異源的。啟動子可為組成性、誘導性及/或組織特異性的。

【0073】組成性啟動子之實例包括逆轉錄勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus；RSV) LTR啟動子(視情況具有RSV強化子)、巨細胞病毒(CMV)啟動子(視情況具有CMV強化子) (參見例如Boshart等人, Cell, 41:521-530 (1985))、SV40啟動子、二氫葉酸還原酶啟動子、β-肌動蛋白啟動子、磷酸甘油激酶(PGK)啟動子及EF1α啟動子。

【0074】誘導性啟動子允許調節表現且可藉由以下調節：外源供應之化合物；環境因素，諸如溫度；或特定生理狀態(例如急性期，細胞之特定分化狀態)之存在，或僅存在於複製細胞中。誘導性啟動子及誘導性

系統可獲自各種來源。由外源供應之啟動子調節之誘導性啟動子之實例包括鋅誘導性綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子、地塞米松(dexamethasone)(Dex)誘導性小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啟動子、T7聚合酶啟動子系統(WO 98/10088)；蛻皮激素昆蟲啟動子(No等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996))、四環素可抑制系統(Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))、四環素誘導性系統(Gossen等人, Science, 268:1766-1769 (1995)，亦參見Harvey等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998))、RU486誘導性系統(Wang等人, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)及Wang等人, Gene Ther., 4:432-441 (1997))及雷帕黴素誘導性系統(Magari等人, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))。

【0075】 在一些實施例中，可使用編碼效應物之序列的原生啟動子。

【0076】 在一些實施例中，調節序列賦予組織特異性基因表現能力。在一些情況下，組織特異性調節序列結合以組織特異性方式誘導轉錄之組織特異性轉錄因子。此類組織特異性調節序列(例如啟動子、強化子等)為此項技術中已知的。例示性組織特異性調節序列包括但不限於以下組織特異性啟動子：肝特異性甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子、胰島素啟動子、升糖素啟動子、生長抑制素啟動子、胰臟多肽(PPY)啟動子、突觸蛋白-1(Syn)啟動子、肌酸激酶(MCK)啟動子、哺乳動物肌間線蛋白(DES)啟動子、α-肌凝蛋白重鏈(a-MHC)啟動子或肌鈣蛋白T (cTnT)啟動子。其他例示性啟動子包括β-肌動蛋白啟動子；B型肝炎病毒核心啟動子，Sandig等人, Gene Ther., 3:1002-9 (1996)；α-胎兒蛋白(AFP)啟動子，Arbuthnot等人, Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996))；骨骼骨鈣化素

啟動子(Stein等人，Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997))；骨骼唾液蛋白啟動子(Chen等人，J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996))；CD2啟動子(Hansal等人，J. Immunol., 161:1063-8 (1998)；免疫球蛋白重鏈啟動子；T細胞受體α鏈啟動子；神經元，諸如神經元特異性烯醇酶(NSE)啟動子(Andersen等人，Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993))；神經絲輕鏈基因啟動子(Piccioli等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991))；及神經元特異性vgf基因啟動子(Piccioli等人，Neuron, 15:373-84 (1995))等熟習此項技術者已知之其他啟動子。

[0077] 組織/細胞特異性啟動子之實例列於表1中：

表1：組織或細胞特異性啟動子

組織/細胞	啟動子	存取編號；人類基因體座標(hg38)
骨骼肌	ACTA1	NM_001100; chr1:229,439,090-229,432,090
黑色素瘤	TYR	NM_000372; chr11:89,300,750-89,293,750
肝癌	α胎兒蛋白	NM_001354717; chr4:73,461,175-73,454,175
乳腺癌	黏蛋白1	NM_001371720; chr1:155,197,900-155,190,900
前列腺癌	KLK3	NM_001648; chr19: 50,865,760-50,858,760
神經元細胞	ENO2	NM_001975; chr12:6,928,700-6,921,700
對低氧反應	HIF-1α	NM_001530; chr14:61,753,200-61,746,200
視網膜母細胞瘤	E2F1	NM_005225; chr20: 33,691,380-33,684,380
游離鏈對	EGR-1	NM_001964; chr5:138,474,303-138,467,303
致癌基因	ErbB2	NM_004448; chr17:39,735,530-39,728,530
內皮細胞	vWF	NM_000552; chr12:6,129,670-6,122,670
內皮細胞	ELF-1	NM_002019; chr13:28,500,100-28,493,100
內皮細胞	ICAM-2	NM_001099786; chr17:64,025,630-64,018,630
視網膜色素上皮	VMD2	NM_004183; chr11:61,972,630-61,965,630
視桿細胞	RHO	NM_000539; chr3:129,540,350-129,533,350
視錐細胞	紅色/綠色視蛋白(OPN1LW)	NM_020061; chrX:154,164,030-154,157,030
神經節細胞	胸腺細胞抗原(Thy1)	NM_006288; chr11:119,428,150-119,421,150
T細胞	TIM3	NM_032782; chr5:157,114,050-157,107,050
T細胞	FOXP3	NM_014009; chrX:49,269,700-49,262,700
PBMC	Vβ6.7	ENST00000390373.2; chr7:142,493,295-142,486,295
細胞週期	Cdk1	NM_001786; chr10:60,799,850-60,792,850

【0078】 本文所描述之構築體亦可包括其他原生或異源表現控制元件，諸如強化子元件、聚腺苷酸化位點或Kozak共通序列。

【0079】

效應物序列

【0080】 包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸之效應物序列可為例如功能性DNA序列，例如治療功能性DNA序列；編碼治療性肽、多肽或蛋白質之DNA序列；或編碼治療性RNA (例如非編碼RNA)之DNA序列。

【0081】

DNA效應物：

治療功能性DNA序列可為形成功能結構之DNA序列，例如包含DNA適體、DNA酶或等位基因特異性寡核苷酸(DNA ASO)之DNA序列。治療功能性DNA序列可能不具有可操作地連接之啟動子。在實施例中，包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸可包括一個或複數個功能性DNA序列，例如2、3、4、5、6或更多個序列，該等序列可相同或不同。

【0082】

多肽效應物：

編碼治療性多肽之DNA序列可為編碼一或多個效應物之DNA序列，該一或多個效應物為肽、蛋白質或其組合。舉例而言，DNA序列編碼mRNA。肽或蛋白質可為：DNA結合蛋白；RNA結合蛋白；運輸蛋白；轉錄因子；轉譯因子；核糖體蛋白；染色質重塑因子；表觀遺傳修飾因子；抗原；激素；酶(諸如核酸酶，例如核酸內切酶，例如CRISPR系統之核酸酶元件，例如Cas9、dCas9、aCas9切口酶、Cpf/Cas12a)；連接

Crispr之酶，例如鹼基編輯器或主編輯器；移動式遺傳元件蛋白質(例如轉位酶、逆轉錄轉位酶、重組酶、整合酶)；基因撰寫器；聚合酶；甲基化酶；去甲基酶；乙醯基酶；去乙醯酶；激酶；磷酸酶；連接酶；去泛素化酶；蛋白酶；整合酶；重組酶；拓樸異構酶；回旋酶；解螺旋酶；溶酶體酸性水解酶)；抗體(例如完整抗體、其片段或奈米抗體)；傳訊肽；受體配體；受體；凝血因子(clotting factor)；凝血因子(coagulation factor)；結構蛋白；凋亡蛋白酶；膜蛋白；粒線體蛋白；核蛋白；經工程改造之結合劑，諸如生替林、達爾平或阿德奈汀。參見例如Gebauer及Skerra. 2020. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 60:1, 391-415。

【0083】在實施例中，包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸可包括一個或複數個編碼多肽之序列，例如2、3、4、5、6或更多個編碼多肽之序列。複數個中之各者可編碼相同或不同蛋白質。舉例而言，本文所描述之TDSC或序列可包括多個編碼多種蛋白質(例如生物學路徑中之複數種蛋白質)之序列。

【0084】在一些實施例中，本文所描述之TDSC或序列可包括複數個編碼多肽之序列，例如2、3、4、5、6或更多個編碼多肽之序列，其藉由自裂解肽(例如P2A、T2A、E2A或F2A)分隔開。自裂解肽為18-22個胺基酸長，且可在蛋白質轉譯期間誘導核糖體跳躍以使得可在同一轉錄本中編碼兩個多肽。多肽中之各者可編碼相同或不同蛋白質。在一個實施例中，本文所描述之TDSC或序列可包括啟動子，之後為編碼第一所關注多肽的序列、編碼2A自裂解肽的序列、編碼第二所關注多肽的序列及聚A位點。在另一實施例中，本文所描述之TDSC或序列可包括啟動子，之後為編碼第一所關注多肽的序列、第一2A自裂解肽、第二所關注多肽、編碼

第二2A自裂解肽的序列、編碼第三所關注多肽的序列及聚A位點。

【0085】 在一些實施例中，效應物包含細胞穿透多肽。在一些實施例中，效應物為包含細胞穿透多肽及第二胺基酸序列之融合蛋白。

【0086】

RNA效應物：

效應物序列可為編碼非編碼RNA之DNA序列，例如以下中之一或多者：短干擾RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA)、長非編碼RNA、piwi相互作用RNA (piRNA)、小核仁RNA (snoRNA)、小Cajal體特異性RNA (scaRNA)、轉移RNA (tRNA)、核糖體RNA (rRNA)、RNA適體及小核RNA (snRNA)。

【0087】 在一些實施例中，包含本文揭示之dsDNA之TDSC或核酸包含一或多個編碼調節RNA (例如修飾內源基因及/或外源基因之表現之RNA)之表現序列。在一些實施例中，本文揭示之TDSC或序列可包含與調節核酸(如非編碼RNA，諸如但不限於tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、微小RNA、siRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、Y RNA及hnRNA)反義的序列。在一個實施例中，調節核酸靶向宿主基因。調節核酸可包括但不限於：與內源基因雜交之核酸，例如反義RNA、引導RNA；與外源核酸(諸如病毒DNA或RNA)雜交之核酸；與RNA雜交之核酸；干擾基因轉錄之核酸；干擾RNA轉譯之核酸；諸如經由靶向降解而使RNA穩定或使RNA不穩定之核酸；及調節DNA或RNA結合因子之核酸。在一個實施例中，序列為miRNA。在一些實施例中，調節核酸靶向宿主基因之有義股。在一些實施例中，調節核酸靶向宿主基因之反義股。

【0088】在一些實施例中，本文揭示之TDSC或序列編碼引導RNA。引導RNA序列一般設計成具有長度在15-30個核苷酸之間(例如17、19、20、21、24個核苷酸)、與靶向核酸序列互補的序列，及促進複合物形成(例如用tracrRNA或核酸酶)的區域。用於設計有效引導RNA之定製gRNA產生器及演算法為可商購的。亦已使用嵌合「單引導RNA」(「sgRNA」)達成基因編輯，該單引導RNA為經工程改造(合成)之單一RNA分子，其模擬天然存在之crRNA-tracrRNA複合物且含有tracrRNA(用於結合核酸酶)及至少一個crRNA (以將核酸酶導引至靶向編輯的序列)。亦已證明經化學修飾之sgRNA在基因體編輯中有效；參見例如Hendel等人(2015) Nature Biotechnol., 985-991。gRNA可識別特定DNA序列(例如與基因之啟動子、強化子、緘默子或抑制子相鄰或在其內之序列)。在一個實施例中，gRNA用作用於基因編輯之CRISPR系統之一部分。出於基因編輯之目的，本文揭示之TDSC或序列可設計成包括一或多個編碼對應於所需目標DNA序列之引導RNA序列的序列；參見例如Cong等人(2013) Science, 339:819-823；Ran等人(2013) Nature Protocols, 8:2281-2308。

【0089】所揭示之TDSC或序列可編碼某些可經由RNA干擾(RNAi)之生物過程抑制基因表現的調節核酸。RNAi分子包含RNA或RNA樣結構，該等結構通常含有15-50個鹼基對(諸如約18-25個鹼基對)且具有與細胞內所表現之目標基因中之編碼序列一致(互補)或幾乎一致(實質上互補)的核鹼基序列。此類RNAi分子包括但不限於：短干擾RNA (siRNA)、雙股RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、半雙螺旋(meroduplex)、及dicer受質(美國專利第8,084,599號、第8,349,809號及第

8,513,207)、RNA反義寡核苷酸(RNA ASO)。

【0090】 在一個實施例中，本文揭示之TDSC或序列包含含有lncRNA之有義股之序列。在一個實施例中，本文揭示之TDSC或序列包含編碼lncRNA之反義股之序列。

【0091】 本文揭示之TDSC或序列可編碼與內源基因或基因產物(例如mRNA)之片段實質上互補或完全互補之調節核酸。調節核酸可在內含子與外顯子之間的邊界、外顯子之間或鄰近外顯子處的互補序列，以防止特定基因之新產生之核RNA轉錄本成熟成mRNA以用於轉錄。與特定基因互補之調節核酸可與該基因之mRNA雜交且防止其轉譯。反義調節核酸可為DNA、RNA或其衍生物或雜交體。在一些實施例中，調節核酸包含可與參與調節內源基因或外源基因之表現之蛋白質結合的蛋白質結合位點。

【0092】 可編碼與所關注之轉錄本雜交之調節核酸的本文所揭示之TDSC或序列之長度可例如在約5至30個核苷酸之間、在約10至30個核苷酸之間，或約11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多個核苷酸。調節核酸與所靶向轉錄本之一致性程度應為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

【0093】 本文揭示之TDSC或序列可編碼與目標基因之約5至約30個連續核苷酸相同的微小RNA (miRNA)分子。在一些實施例中，miRNA序列靶向mRNA且以二核苷酸AA開始，包含約30-70% (約30-60%、約40-60%或約45-55%)之GC含量，且與欲引入之哺乳動物基因體中除目標以外之任何核苷酸序列不具有高百分比一致性，例如藉由標準BLAST搜尋所

測定。在一些實施例中，本文所揭示之TDSC或序列編碼至少一個miRNA，例如2、3、4、5、6或更多個。在一些實施例中，本文揭示之TDSC或序列包含編碼與核苷酸序列或同目標序列互補之序列中之任一者具有至少約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核苷酸序列一致性之miRNA的序列。已知miRNA序列之清單可見於研究組織所維護之資料庫中，尤其諸如Wellcome Trust Sanger Institute、Penn Center for Bioinformatics、Memorial Sloan Kettering Cancer Center及European Molecule Biology Laboratory。已知的有效siRNA序列及同源結合位點亦充分呈現於相關文獻中。RNAi分子容易藉由此項技術中已知的技術設計。此外，有計算工具增加發現有效及特定序列模體之機會(參見例如Lagana等人, Methods Mol. Bio., 2015, 1269:393-412)。

【0094】本文揭示之TDSC或序列可調節由基因編碼之RNA之表現。因為多個基因可彼此具有一定程度之序列同源性，所以在一些實施例中，本文所揭示之TDSC或序列可設計成靶向具有足夠序列同源性的一類基因。在一些實施例中，本文揭示之TDSC或序列可含有與不同基因目標間共有或特定基因目標所獨有之序列具有互補性的序列。在一些實施例中，本文揭示之TDSC或序列為設計成靶向在若干基因之間具有同源性之RNA序列的保守區，從而靶向基因家族中之若干基因(例如不同基因同功異型物、剪接變體、突變基因等)。在一些實施例中，本文所揭示之TDSC或序列可設計成靶向單一基因之特定RNA序列所獨有的序列。

【0095】在實施例中，編碼調節RNA之效應物序列之長度小於5000 bp (例如小於約5000 bp、4000 bp、3000 bp、2000 bp、1000 bp、900 bp、800 bp、700 bp、600 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、100

bp、50 bp、40 bp、30 bp、20 bp、10 bp或更小)。在一些實施例中，效應物序列之長度獨立地或另外為大於10 bp (例如至少約10 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、60 bp、70 bp、80 bp、90 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1000 kb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.6 kb、1.7 kb、1.8 kb、1.9 kb、2 kb、2.1 kb、2.2 kb、2.3 kb、2.4 kb、2.5 kb、2.6 kb、2.7 kb、2.8 kb、2.9 kb、3 kb、3.1 kb、3.2 kb、3.3 kb、3.4 kb、3.5 kb、3.6 kb、3.7 kb、3.8 kb、3.9 kb、4 kb、4.1 kb、4.2 kb、4.3 kb、4.4 kb、4.5 kb、4.6 kb、4.7 kb、4.8 kb、4.9 kb、5 kb或更大)。

【0096】 在一些實施例中，本文所揭示之TDSC或序列包含上文所描述之特徵中之一或多者，例如一或多個結構性DNA序列、編碼一或多個肽或蛋白質之序列、編碼一或多個調節元件之序列、編碼一或多個調節核酸(例如一或多個非編碼RNA)之序列、其他表現序列及前述之任何組合。本文所描述之構築體可具有一個或複數個效應物序列，例如2、3、4、5或更多個效應物序列。在複數個效應物序列於單一構築體中之情況下，效應物序列可相同或不同。

【0097】 在一個實施例中，TDSC包括治療性功能性、結構性DNA序列。在一個實施例中，TDSC包括啟動子及編碼本文所描述之治療性肽、多肽或蛋白質之序列。在一個實施例中，TDSC包括啟動子及編碼本文所描述之調節RNA之序列。

【0098】 在一些實施例中，編碼多肽或蛋白質之效應物序列經密碼子最佳化，例如針對在哺乳動物(例如人類)中之表現進行密碼子最佳化。一般而言，密碼子最佳化意謂修飾核酸序列以藉由用宿主細胞基因中更頻

繁或最頻繁使用之密碼子置換原生序列之至少一個(例如一或多個，例如1、2、3、4、5、10、15、20、25、50或更多個密碼子；例如至少1%、5%、10%、20%、25%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)密碼子同時維持原生胺基酸序列而增強所關注宿主細胞中的表現。密碼子使用表為可獲得的，例如可在http://www.kazusa.or.jp/codon/處獲得之「密碼子使用資料庫(Codon Usage Database)」獲得。此等表可以多種方式調適，參見例如Nakamura等人, 2000, Nucl. Acids Res. 28:292。針對特定宿主細胞中之表現密碼子最佳化特定序列之電腦演算法亦為可獲得的，諸如Gene Forge。

【0099】

核靶向序列(NTS)

包含dsDNA (例如如本文所揭示)之TDSC或核酸可包括促進自細胞之細胞質將DNA運輸至細胞核中的核靶向序列(NTS)。NTS包括與蛋白質(例如轉錄因子、伴隨蛋白等)之結合位點，該等蛋白質與經由核孔複合物將運載物運輸至細胞核中之內輸蛋白結合。在實施例中，NTS可一般地起作用(例如SV40強化子NTS)。在其他實施例中，NTS可為細胞或組織特異性的，例如含有獨特細胞類型中表現之轉錄因子的結合位點，該等結合位點可以細胞特異性方式使本文所描述之TDSC靶向細胞核(例如SRF、Nkx3)。NTS可在本文所描述之TDSC中之多個位置中具有功能性，例如在啟動子之前及/或在效應物序列之後。

【0100】 NTS可為病毒或非病毒源性的。NTS例如描述於Le Guen等人2021. Nucleic Acids第24卷: 477-486中。NTS'之實例揭示於表2中：

表2：例示性核靶向序列

病毒/非病毒	名稱	序列
病毒	SV40	5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3' (SEQ ID NO: 1)
非病毒	3NF	5'-ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg-3' (SEQ ID NO: 106)

【0101】 在一些實施例中，NTS具有根據表2之序列，或與其具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之功能序列。

【0102】

核輸入蛋白質

在一些實施例中，包含dsDNA (例如如本文所描述)之TDSC或核酸能夠例如藉由核輸入蛋白質(例如如表3中所列之核輸入蛋白質)輸入細胞核中。在一些實施例中，包含dsDNA (例如如本文所描述)之TDSC或核酸可被核輸入蛋白質(例如如表3中所列之核輸入蛋白質)結合。在一些實施例中，包含dsDNA (例如如本文所描述)之TDSC或核酸包含核輸入蛋白質(例如如表3之任何單個列中所列)之識別序列。在一些實施例中，包含dsDNA (例如如本文所描述)之TDSC或核酸包含如表3中所列之識別序列，或與其具有至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核酸序列。在一些實施例中，核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如包含例如如本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸中所包含的)包含如表3中所列之識別序列，或與其具有至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核酸序列。

【0103】 例示性輸入蛋白質包括例如鹼性螺旋-環-螺旋(basic helix-loop-helix；bHLH)蛋白、異質性核核糖核蛋白(hnRNP)同功異型物、核因子I (NFI)蛋白，例如表3中列舉之彼等者。在一些實施例中，bHLH蛋白包含乙醯膽鹼受體次單元，例如α次單元，例如CHRNA1、CHRNA2、

CHRNA3、CHRNA4、CHRNA5或CHRNA7。在一些實施例中，乙醯膽鹼受體次單元包含γ或ε次單元。在一些實施例中，輸入蛋白質包含肌間線蛋白。在一些實施例中，輸入蛋白質包含hnRNP，例如hnRNP A1、hnRNP C、hnRNP K、hnRNP U。在一些實施例中，輸入蛋白質包含內輸蛋白。在一些實施例中，輸入蛋白質包含肌凝蛋白輕鏈。在一些實施例中，輸入蛋白質包含NFI。在一些實施例中，輸入蛋白質包含NFKB。在一些實施例中，輸入蛋白質包含核苷二磷酸激酶，例如NM23-H2。在一些實施例中，輸入蛋白質包含Oct1。在一些實施例中，輸入蛋白質包含Oct2。

【0104】在一些實施例中，輸入蛋白質包含SRF。在一些實施例中，輸入蛋白質包含TEF-1。在一些實施例中，輸入蛋白質包含AP2。在一些實施例中，輸入蛋白質包含肌鈣蛋白，例如肌鈣蛋白I，例如肌鈣蛋白I 2。在一些實施例中，輸入蛋白質包含TTF-1。在一些實施例中，輸入蛋白質包含Ran結合蛋白，例如RanBP3或RanBP1。在一些實施例中，輸入蛋白質包含同源匣轉錄因子，例如Chx10。

【0105】在一些實施例中，輸入因子特異性結合E-盒、DTS (例如SV40 DTS或SMGA DTS)、啟動子(例如SP-C啟動子或htk啟動子)、端粒、ATTT模體、細胞週期調節單元(CCRU)、CT3序列、S/MAR、拓樸異構酶II共通序列、ARS共通序列、3NF、病毒起點(例如EBV oriP位點)。

表3：例示性核輸入蛋白質及其對應識別序列

促進核進入之蛋白質	蛋白質基因ID	蛋白質之基因庫存取編號	被蛋白質識別之序列之名稱	對應DNA識別序列
心臟α-肌動蛋白	70	NP_005150.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA1同功異型物b	1134	NP_000070.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA1同功異型物a	1134	NP_001034612.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物1	1135	NP_000733.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物2	1135	NP_001269384.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物3	1135	NP_001334634.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物3	1135	NP_001334635.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物4	1135	NP_001334636.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2同功異型物4	1135	NP_001334637.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA3同功異型物1	1136	NP_000734.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA3同功異型物2	1136	NP_001160166.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA4同功異型物1	1137	NP_000735.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA4同功異型物2	1137	NP_001243502.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物1	1138	NP_000736.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物	1138	NP_001294874.1	E-盒	5'-CANNTG-3'

2				
CHRNA5同功異型物3	1138	NP_001382100.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物4	1138	NP_001382101.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物5	1138	NP_001382102.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物6	1138	NP_001382103.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5同功異型物7	1138	NP_001382104.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA7同功異型物1	1139	NP_000737.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA7同功異型物2	1139	NP_001177384.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNE	1145	NP_000071.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNG	1146	NP_005190.4	E-盒	5'-CANNTG-3'
M-肌酸激酶(MCK)	1158	NP_001815.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物2	1674	NP_001369637.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物3	1674	NP_001369638.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物4	1674	NP_001369639.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物5	1674	NP_001369640.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物6	1674	NP_001369641.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌間線蛋白同功異型物7	1674	NP_001369642.1	E-盒	5'-CANNTG-3'

肌間線蛋白同功異型物1	1674	NP_001918.3	E-盒	5'-CANNTG-3'
AP1 (Fos)	2353	NP_005243.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
GATA-6	2627	NP_005248.2	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGAGAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
hnRNP A1同功異型物a	3178	NP_002127.1	來自人類染色體帶11q13之dsDNA序列(存取編號AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG(A/G) GCTCA (A/G)GTGATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 109)
hnRNP A1同功異型	3178	NP_112420.1	來自人類染色體帶11q13之	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG(A/G) GCTCA (A/G)

物b			dsDNA序列(存取編號AC000353)	GTGATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 109)
hnRNP A1同功異型物a	3178	NP_002127.1	端粒(與端粒重複序列結合)	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1同功異型物b	3178	NP_112420.1	端粒(與端粒重複序列結合)	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1同功異型物a	3178	NP_002127.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(cell cycle regulatory unit；CCRU)內所含之ATTT序列模體	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP A1同功異型物b	3178	NP_112420.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP A1同功異型物a	3178	NP_002127.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP A1同功異型物b	3178	NP_112420.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C同功異型物a	3183	NP_001070910.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C同功異型物b	3183	NP_001070911.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C同功異型物b	3183	NP_004491.2	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C同功異型物	3183	NP_112604.2	人類胸苷激酶(htk)啟動子，	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCA

a			細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	GGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C同功異型物a	3183	NP_001070910.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C同功異型物b	3183	NP_001070911.1	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C同功異型物b	3183	NP_004491.2	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C同功異型物a	3183	NP_112604.2	人類胸苷激酶(htk)啟動子，細胞週期調節單元(CCRU)內所含之ATTT序列模體	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP K同功異型物c	3190	NP_001305115.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K同功異型物d	3190	NP_001305116.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K同功異型物b	3190	NP_001305117.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K同功異型物a	3190	NP_002131.2	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K同功異型物	3190	NP_112552.1	CT3	5'-

b				AATTCTCCTCCCCACCTTCCC CACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K同功異型物a	3190	NP_112553.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCC CACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3' (SEQ ID NO: 113)
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3' (SEQ ID NO: 113)
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3' (SEQ ID NO: 114)
hnRNP U (aka SAF-A)同功異型物a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3' (SEQ ID NO: 114)
AP1 (Jun)	3725	NP_002219.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
內輸蛋白β1	3837	XP_548162.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT

				ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
肌凝蛋白輕鏈(MLC)1/3同功異型物1f	4632	NP_524144.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌凝蛋白輕鏈(MLC)1/3同功異型物3f	4632	NP_524146.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
NFI同功異型物1	4782	NP_001231931.1	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGT GCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCAT GGTGAGAAGTGCAGATGGC CCGAGGGCAAGTTTGCTCAA CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG

				GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI同功異型物3	4782	NP_001231933.1	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGT GCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCAT GGTGAGAAGTGCAGATGGC CCGAGGGCAAGTTTGCTCAA CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI同功異型物4	4782	NP_001231934.1	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGT GCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCAT GGTGAGAAGTGCAGATGGC CCGAGGGCAAGTTTGCTCAA

				CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI同功異型物5	4782	NP_005588.2	SP-C啟動子	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGT GCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCAT GGTGAGAAGTGCAGATGGC CCGAGGGCAAGTTTGCTCAA CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI同功異型物2	4782	NP_995315.1	SP-C啟動子	5'-

				CAGGGCAGCAGGGGCAGGT GCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCAT GGTGAGAAGTGCAGATGGC CCGAGGGCAAGTTTGCTCAA CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001158884.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGG GGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001306155.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGG GGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369554.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGG GGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369555.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGG GGACTTTCCAGCTGGGACTT

				TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001369556.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物3	4790	NP_001369557.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物1	4790	NP_003989.2	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001158884.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001306155.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369554.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369555.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC

				TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001369556.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物3	4790	NP_001369557.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物1	4790	NP_003989.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001158884.1	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTT CCGGGGACTTTCCGGGGACT TTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001306155.1	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTT CCGGGGACTTTCCGGGGACT TTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369554.1	由 Igκ κB 模體 5'-	5'-

			GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物1	4790	NP_001369555.1	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物2	4790	NP_001369556.1	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物3	4790	NP_001369557.1	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NFKB同功異型物1	4790	NP_003989.2	由 Igκ κB 模體 5'-GGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 117)之五個串聯重複序列組成之片段	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (SEQ ID NO: 118)
NM23-H2 同功異型物a	4831	NP_001018147.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同功異型物a	4831	NP_001018148.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT

				GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同功異型物a	4831	NP_001018149.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同功異型物b	4831	NP_001185611.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同功異型物a	4831	NP_002503.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物1	5452	NP_001193954.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物3	5452	NP_001193955.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)

Oct2 (POU2F2) 同功異型物4	5452	NP_001234923.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物5	5452	NP_001380863.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物6	5452	NP_001380864.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物7	5452	NP_001380865.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物8	5452	NP_001381305.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物9	5452	NP_001381306.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT

				GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物10	5452	NP_001381307.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2 (POU2F2) 同功異型物2	5452	NP_002689.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
RanBP1	5902	XP_514990.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT

				AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
Oct1 (POU2F1) 同功異型物2	5451	NP_001185712.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1 (POU2F1) 同功異型物3	5451	NP_001185715.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1 (POU2F1) 同功異型物4	5451	NP_001352777.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1 (POU2F1) 同功異型物4	5451	NP_001352778.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1 (POU2F1) 同功異型物1	5451	NP_002688.3	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID

				NO: 107)
SRF同功異型物2	6722	NP_001278930.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
SRF同功異型物1	6722	NP_003122.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
TEF-1同功異型物2	7008	NP_001138870.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
TEF-1同功異型物1	7008	NP_003207.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT

				AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2 (TFAP2A) 同功異型物b	7020	NP_001027451.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2 (TFAP2A) 同功異型物c	7020	NP_001035890.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2 (TFAP2A) 同功異型物a	7020	NP_001358995.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2 (TFAP2B)	7021	NP_003212.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2 (TFAP2C)	7022	NP_003213.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
肌鈣蛋白I 1	7135	NP_003272.3	E-盒	5'-CANNTG-3'

肌鈣蛋白I 2 -同功異型物1	7136	NP_001139301.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌鈣蛋白I 2 -同功異型物2	7136	NP_001139313.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌鈣蛋白I 2 -同功異型物1	7136	NP_003273.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌鈣蛋白I 3	7137	NP_000354.4	E-盒	5'-CANNTG-3'
TTF-1同功異型物2	7270	NP_001192225.1	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGAGAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
TTF-1同功異型物1	7270	NP_031370.2	SP-C啟動子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTCAA

				CTCACCCAGGTTTGCTCTTG CTGGGGCCAAGAGGACTCAT GTGCCAGGGCCAAGGGCCCT TGGGGGCTCTCACAGGGGGC TTATCTGGGCTTCGGTTCTG GAGGGCCAGGAACAAACAG GCTTCAAAGCCAAGGGCTTG GCTGGCACACAGGGGGCTTG GTCCTTCACCTCTGTCCCCTC TCCCTACGGACACATATAAG ACCCTGGTCACACCTGGGAG AGGAGGAGAGGAGAGCATA G-3' (SEQ ID NO: 108)
H2B	8349	NP_003519.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
RanBP3同功異型物4	8498	NP_001287794.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC

				CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物a	8498	NP_003615.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物b	8498	NP_015559.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA

				GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物d	8498	NP_015561.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC

				CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物X1	8498	XP_006722991.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物X1	8498	XP_006722992.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA

				GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物 X1	8498	XP_011526695.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC

				CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物X1	8498	XP_011526694.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物X1	8498	XP_011526696.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA

				GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3同功異型物 X1	8498	XP_024307517.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC

				CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
內輸蛋白7	10527	NP_006382.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGC ATGCAGCAGGGCCTGAGGA GGGAGGTGTGGACGGAGGA GGCCCGCTGCCATTCTTGGT ATGGTTCTCACTCCAGGAGC ACAGCTGCATCTGGTCTCAC TCTGGGCAGCTTATAAGGCC TGGTGTGAGTTTTGTTTATGC AAGTGCAGCATAAAAGGAA CAAATCTACCAGCACCGGGG CTGTTGCCACTGAGTCCTTTT GCATACATTTTTCAAATGAT AACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGA TTTATTGAAAAAACCACCTT ATATGGTAATATTGCTAACA CACCGTCAGCTGGCCTTTTT AGGGACTTTGTTTAAAGAAG ATCCGCCTCTGGGGTTTTAT ATTGCTCTGGTATTCATGCC AAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
Chx10	338917	NP_878314.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTAT

				GCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
EBNA-1	3783774	YP_401677.1	EBV oriP位點	5'- CATGCAGGAAAAGGACAAG CAGCGAAAATTCACGCCCCC TTGGGAGGTGGCGGCATATG CAAAGGATAGCACTCCCACT CTACTACTGGGTATCATATG CTGACTGTATATGCATGAGG ATAGCATATGCTACCCGGAT ACAGATTAGGATAGCATATA CTACCCAGATATAGATTAGG ATAGCATATGCTACCCAGAT ATAGATTAGGATAGCCTATG CTACCCAGATATAAATTAGG ATAGCATATACTACCCAGAT ATAGATTAGGATAGCATATG CTACCCAGATATAGATTAGG ATAGCCTATGCTACCCAGAT ATAGATTAGGATAGCATATG CTACCCAGATATAGATTAGG ATAGCATATGCTATCCAGAT ATTTGGGTAGTATATGCTAC CCAGATATAAATTAGGATAG CATATACTACCCTAATCTCT ATTAGGATAGCATATGCTAC CCGGATACAGATTAGGATAG CATATACTACCCAGATATAG ATTAGGATAGCATATGCTAC CCAGATATAGATTAGGATAG CCTATGCTACCCAGATATAA ATTAGGATAGCATATACTAC

				CCAGATATAGATTAGGATAG CATATGCTACCCAGATATAG ATTAGGATAGCCTATGCTAC CCAGATATAGATTAGGATAG CATATGCTATCCAGATATTT GGGTAGTATATGCTACCCAT GGCAACATTAGCCCACCGTG CTCTCAGCGACCTCGTGAAT ATGAGGACCAACAACCCTGT GCTTGGCGCTCAGGCGCAAG TGTGTGTAATTTGTCCTCCA GATCGCAGCAATCGCGCCCC TATCTTGGCCCGCCCACCTA CTTATGCAGGTATTCCCCGG GGTGCCATTAGTGGTTTTGT GGGCAAGTGGTTTGACCGCA GTGGTTAGCGGGGTTACAAT CAGCCAAGTTATTACACCCT TATTTTACAGTCCAAAACCG CAGGGCGGCGTGTGGGGGCT GACGCGTGCCCCCACTCCAC AATTTCAAAAAAAAGAGTG GCCACTTGTCTTTGTTTATGG GCCCCATTGGCGTGGAGCCC CGTTTAATTTTCGGGGGTGT TAGAGACAACCAGTGGAGTC CGCTGCTGTCGGCGTCCACT CTCTTTCCCCTTGTTACAAAT AGAGTGTAACAACATGGTTC ACCTGTCTTGGTCCCTGCCT GGGACACATCTTAATAACCC CAGTATCATATTGCACTAGG ATTATGTGTTGCCCATAGCC

				ATAAATTCGTGTGAGATGGA CATCCAGTCTTTACGGCTTG TCCCCACCCCATGGATTTCT ATTGTTAAAGATATTCAGAA TGTTTCATTCCTACACTAGTA TTTATTGCCCAAGGGGTTTG TGAGGGTTATATTGGTGTCA TAGCACAATGCCACCACTGA ACCCCCCGTCCAAATTTTAT TCTGGGGGCGTCACCTGAAA CCTTGTTTTCGAGCACCTCA CATACACCTTACTGTTCACA ACTCAGCAGTTATTCTATTA GCTAAACGAAGGAGAATGA AGAAGCAGGCGAAGATTCA GGAGAGTTCACTGCCCGCTC CTTGATCTTCAGCCACTGCC CTTGTGACTAAAATGGTTCA CTACCCTCGTGGAATCCTGA CCCCATGTAAATAAAACCGT GACAGCTCATGGGGTGGGA GATATCGCTGTTCCTTAGGA CCCTTTTACTAACCCTAATTC GATAGCATATGCTTCCCGTT GGGTAACATATGCTATTGAA TTAGGGTTAGTCTGGATAGT ATATACTACTACCCGGGAAG CATATGCTACCCGTTTAGGG TTAACAAGGGGGCCTTATAA ACACTATTGCTAATGCCCTC TTGAGGGTCCGCTTATCGGT AGCTACACAGGCCCCTCTGA TTGACGTTGGTGTAGCCTCC

				CGTAGTCTTCCTGGGCCCCT GGGAGGTACATGTCCCCCAG CATTGGTGTAAGAGCTTCAG CCAAGAGTTACACATAAAGG CAATGTTGTGTTGCAGTCCA CAGACTGCAAAGTCTGCTCC AGGATGAAAGCCACTCAGTG TTGGCAAATGTGCACATCCA TTTATAAGGATGTCAACTAC AGTCAGAGAACCCCTTTGTG TTTGGTCCCCCCCCGTGTCA CATGTGGAACAGGGCCCAGT TGGCAAGTTGTACCAACCAA CTGAAGGGATTACATGCACT GCCCCGC-3' (SEQ ID NO: 120)
NKX3-1/3-2同功異型物2	4824	NP_001243268.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACC CCCAAGGCGATTTATTGAAA AAACCACCTTATATGGTAAT ATTGCTAACACACCGTCAGC TGGCCTTTTTAGGGACTTTGT TTAAAGAAGATCCGCCTCTG GGGTTTTATATTGCTCTGGT ATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
NKX3-1/3-2同功異型物1	4824	NP_006158.2	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACC CCCAAGGCGATTTATTGAAA AAACCACCTTATATGGTAAT ATTGCTAACACACCGTCAGC TGGCCTTTTTAGGGACTTTGT

				TTAAAGAAGATCCGCCTCTG GGGTTTTATATTGCTCTGGT ATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)

【0106】

維持序列

包含本文揭示之dsDNA之TDSC或核酸可包括支持或實現本發明之TDSC之宿主細胞中經由連續輪細胞分裂及/或前驅細胞分化進行之持續基因表現的維持序列。在實施例中，維持序列為核支架/基質連接區域(S/MAR)。S/MAR元件多種多樣的富含AT之序列，其在60-500 bp範圍內，在物種間為保守的，認為在間期(interphase)期間將染色質錨定於核基質蛋白(Bode等人*2003*. Chromosome Res 11, 435-445)。可將S/MAR併入本文所描述之TDSC中以有助於長期轉殖基因表現及染色體外維持。在一個實施例中，維持序列為人類干擾素-β MAR (5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttttatttttacatataaatatattttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggtcacttacata-3' (SEQ ID NO: 39))，或與其具有至少80%、90%、95%或98%一致性之功能序列。在實施例中，適用於本文所描述之構築體中之S/MAR可藉由在http://bioinfo.net.in/MARome搜尋MARome發現，亦由Narwade等人2019. Nucleic Acids Research. 第47卷, 第14期: 7247-7261描述。

【0107】 在實施例中，本文所描述之TDSC能夠在哺乳動物細胞(例如人類細胞)中複製。在一些實施例中，經由至少一次細胞分裂，將本文所描述之TDSC維持於宿主細胞、組織或個體中。舉例而言，經由至少2、3、4、5、6、7、8、10、15、20、40、50或更多次細胞分裂，將本文所描述之TDSC維持於宿主細胞、組織或個體中。在活體外，細胞分裂可藉由流式細胞分析技術或顯微術追蹤。在活體內，細胞分裂可藉由活體內顯微術追蹤。

【0108】

其他元件

包含本文揭示之dsDNA之TDSC或核酸亦可包括以允許其在目標細胞中運輸、定位、轉錄、轉譯及/或表現，或促進其在非目標細胞中降解或抑制其中之表現的方式可操作地連接於效應物序列(例如編碼效應物之序列)之其他控制元件。如本文所用，「可操作地連接」之序列包括與編碼效應物之序列相鄰的表現控制序列，以及反式起作用或在一定距離起作用以控制編碼效應物之序列的表現控制序列兩者。宿主細胞中基因表現所需之調節序列之精確性質可在物種、組織或細胞類型之間變化，但大體而言可視需要包括分別涉及轉錄及轉譯之起始的5'非轉錄及5'非轉譯序列，諸如TATA盒、加帽序列、CAAT序列、強化子元件及其類似者。調節序列亦可視需要包括強化子序列或上游活化子序列。本文所描述之構築體可視情況包括5'前導或訊號序列。

【0109】

經化學修飾之核苷酸

本文所描述之包含dsDNA之TDSC或核酸以及組合物可具有核鹼基、糖及/或磷酸酯主鏈之化學修飾(例如如圖1A至圖2中所示)。儘管不希望受理論所束縛，但此類修飾可適用於保護DNA免於降解(例如來自核酸外切酶)或免於宿主組織或個體之免疫系統影響。一般而言，經化學修飾之核苷酸具有與未經修飾之核苷酸相同的鹼基配對特異性，例如經化學修飾之腺嘌呤「A」可與胸腺嘧啶「T」鹼基配對。嘧啶核鹼基之一或多個原子可經視情況經取代之胺基、視情況經取代之硫醇、視情況經取代之烷基(例如甲基或乙基)或鹵基(例如氯或氟)置換或取代。在某些實施例中，化

學修飾(例如一或多個修飾)存在於糖及核苷間鍵聯中之各者中。

【0110】在一些實施例中，TDSC包含至少一個化學修飾。合適的修飾由Sood等人2019. DNAmod: the DNA modification database. J Cheminform 11, 30描述。DNAmod為編錄經化學修飾之核苷酸且提供單一來源以瞭解其特性之開源資料庫(https://dnamod.hoffmanlab.org)。DNAmod提供容易瀏覽且搜尋此等修飾之網頁介面。該資料庫註解所有管理之經化學修飾之DNA鹼基的化學特性及結構，以及大許多的候選物化學實體清單。DNAmod包括對可用的定序方法之手動註解、對於在自然界中之出現之描述，且提供現有及建議命名。適用於本文所描述之方法之DNA之化學修飾之實例包括例如N6-甲基腺苷(m6A，6mA)；5-甲醯基胞嘧啶(5-甲醯基-2'-脫氧胞嘧啶，5fC，f5C)；5-羧基胞嘧啶(5-羧基-2'-脫氧胞嘧啶，5-羧基胞嘧啶，ca5C，5caC)；5-羥甲基胞嘧啶(5-羥甲基-2'-脫氧胞嘧啶，5hmC，hm5C)；5-甲基脫氧胞嘧啶(5-甲基胞嘧啶；5-甲基-2'-脫氧胞嘧啶；m5dC；5mC，m5C)；5'-甲基胞嘧啶；3-甲基胞嘧啶(m3C)；2'-氟-2'脫氧核苷；5-葡糖基甲基胞嘧啶；5-甲基嘧啶；8-側氧基鳥嘌呤(8-oxoG)；硫代磷酸酯；S及R硫代磷酸酯鍵聯；甲基胸腺嘧啶；N3'-P5'胺基磷酸酯(NP)；環己烷核酸(CeNA)；三環DNA (tcDNA)。參見例如*Pu等人2020. An in-vitro DNA phosphorothioate modification reaction. Mol Microbiol. 113: 452- 463；Zheng及Sheng. 2021. Synthesis of N4-methylcytidine (m4C) and N4,N4-dimethylcytidine (m42C) modified RNA. Current Protocols, 1, e248；Ohkubo等人2021. Chemical synthesis of modified oligonucleotides containing 5'-amino-5'-deoxy-5'-hydroxymethylthymidine residues. Current Protocols, 1, e70；Bao及Xu.*

2021. Observation of Z-DNA structure via the synthesis of oligonucleotide DNA containing 8-trifluoromethyl-2-deoxyguanosine. Current Protocols, 1, e28；Skakujet al. 2020. Automated synthesis and purification of guanidine-backbone oligonucleotides. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 81, e110。

【0111】在一些實施例中，如本文所描述之TDSC可包含硫代磷酸酯修飾之核苷酸。在一些實施例中，如本文所描述之DNA末端形式(例如核酸外切酶抗性DNA末端形式)可包含硫代磷酸酯修飾之核苷酸。在一些實施例中，本文所描述之TDSC可包括S及R硫代磷酸酯修飾之核苷酸鍵聯。在一個實施例中，硫代磷酸酯鍵聯係根據Iwamoto等人, 2017, Nature Biotechnology, 第35卷:845-851製備。簡言之，核苷3'-噁唑磷烷衍生物之單體在反覆加帽及硫化以產生立體控制的硫代磷酸酯鍵聯之情況下進行立體控制的寡核苷酸合成。最終樣本藉由逆相高效液相層析(RP-HPLC)及超效液相層析質譜(UPLC/MS)分析以測定修飾之立體化學。含有硫代磷酸酯鍵聯之核酸亦為可商購的。

【0112】在一些實施例中，本文所描述之TDSC可包括硼代磷酸酯修飾之核苷酸，例如按照Sergueev及Shaw, 1998, J Am Chem Soc, 第120卷, 第37期:9417-9427中之方法。簡言之，H-膦酸酯鏈伸長之後進行硼化以用硼基取代磷酸酯主鏈中之非橋聯氧。藉由RP-HPLC將最終樣本純化且進行分析以測定該修飾之立體化學。硼代磷酸酯修飾之核苷酸亦為可商購的。

【0113】在一些實施例中，本文所描述之TDSC可包括5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸，例如按照Lin等人, 2002, Mol Cell Biol, 第22卷, 第3

期:704-723中之方法製備。簡言之，使用未經標記之S-腺苷甲硫胺酸(AdoMet)，將胞嘧啶或含有胞嘧啶之序列與野生型Dnmt3a蛋白之麩胱甘肽S-轉移酶融合物(GST-3a)一起培育。藉由HPLC純化及分析核苷酸以確定核苷酸在正確位置甲基化。5-甲基胞嘧啶修飾之核苷酸亦為可商購的。

【0114】在一些實施例中，本文所描述之TDSC可包括7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸。在一個實施例中，7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸係按照Jones及Robins, 1963, Purine nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides, J Am Chem Soc, 第85卷:193中之方法製備。簡言之，含2'-脫氧鳥苷之二甲亞碸用碘甲烷處理。藉由HPLC純化及分析核苷酸以確定核苷酸在正確位置甲基化。在另一實施例中，7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸係根據Hendler等人, 1970, 第9卷, 第21期:4141:4153，以及Kore及Parmar, 2006, Biochemistry, 第25卷, 第3期:337-340中之方法製備。簡言之，將含鳥嘌呤5'-二磷酸酯而非鳥苷5'-二磷酸酯之水添加至硫酸二甲酯中，得到7-甲基GDP。藉由HPLC純化及分析核苷酸以確定核苷酸在正確位置甲基化。7-甲基鳥嘌呤修飾之核苷酸亦為可商購的。

【0115】在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含在一或多個CpG或GpC二核苷酸處甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由AluI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由BamHI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由CpG甲基轉移酶(M.Sssl)引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由*dam*甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由EcoGII甲基轉移酶引入之

甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由EcoRI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由GpC甲基轉移酶(M.CviPI)引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由HaeIII甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由HhaI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由HpaII甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由MspI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含藉由TaqI甲基轉移酶引入之甲基化。在一些實施例中，本文所描述之方法包含使dsDNA與以下接觸：AluI甲基轉移酶；BamHI甲基轉移酶，M.Sssl；*dam*甲基轉移酶；EcoGII甲基轉移酶；EcoRI甲基轉移酶，M.CviPI；HaeIII甲基轉移酶；HhaI甲基轉移酶；HpaII甲基轉移酶；MspI甲基轉移酶；或TaqI甲基轉移酶。

【0116】 在一些實施例中，本文所描述之TDSC包含羧基修飾或甲醯基修飾。

【0117】 在實施例中，本文所描述之TDSC或TDSC之一股(例如有義股或反義股)包含1-100%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-90%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-80%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-70%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-60%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-50%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-40%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-30%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-20%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-15%之間的經化學修飾之核苷酸、1%-10%之間的經化學修飾之核苷酸、20%-90%之間的經化學修飾之核苷酸、20%-80%之間的經化學修飾之核苷酸。在實施例中，本文所描述之TDSC或TDSC之一股(例如有

義股或反義股)包含至少1%經化學修飾之核苷酸；至少5%經化學修飾之核苷酸；至少10%經化學修飾之核苷酸；至少15%經化學修飾之核苷酸；至少20%經化學修飾之核苷酸；至少25%經化學修飾之核苷酸；至少30%經化學修飾之核苷酸；至少40%經化學修飾之核苷酸；至少50%經化學修飾之核苷酸；至少60%經化學修飾之核苷酸；至少70%經化學修飾之核苷酸；至少80%經化學修飾之核苷酸；至少85%經化學修飾之核苷酸；至少90%經化學修飾之核苷酸；至少92%經化學修飾之核苷酸；至少95%經化學修飾之核苷酸；至少97%經化學修飾之核苷酸。在實施例中，對於各構築體而言，本文所描述之TDSC或TDSC之一股(例如有義股或反義股)在0%-100%之間的各不同核苷酸處包含經化學修飾之核苷酸，例如0%-100%經化學修飾之T核苷酸、0%-100%經化學修飾之A核苷酸、0%-100%經化學修飾之C核苷酸、及0%-100%經化學修飾之G核苷酸。在實施例中，本文所描述之TDSC或TDSC之一股(例如有義股或反義股)在0-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%之間的各不同核苷酸處包含經化學修飾之核苷酸，例如0-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%之間的經化學修飾之T核苷酸；0-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%之間的經化學修飾之A核苷酸；0-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%之間的經化學修飾之C核苷酸；或0-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%之間的經化學修飾之G核苷酸。舉例而言，TDSC可含有100%經化學修飾之

T核苷酸、50%經化學修飾之A核苷酸、0%經化學修飾之C核苷酸、及25%經化學修飾之G核苷酸。

【0118】 在實施例中，可將經化學修飾之核苷酸，例如本文所描述之修飾，引入本文所描述之TDSC之整個序列中；序列之元件(例如本文所描述之元件)內；5'或3'端；及/或5'或3'端之最後10、8、6、5、4、3或2個核苷酸之間。

【0119】 在一些實施例中，如本文所描述之TDSC在僅一股上包含經化學修飾之核苷酸(例如如圖1A中所示)。在一些實施例中，如本文所描述之TDSC在反義股上包含經化學修飾之核苷酸。在一些實施例中，如本文所描述之TDSC在有義股上包含經化學修飾之核苷酸。

【0120】 在一些實施例中，如本文所描述之TDSC在兩股上包含經化學修飾之核苷酸(例如，如圖1A及圖2中所示)。在某些實施例中，兩股在相同位置處包含化學修飾(例如，一股上之經化學修飾之核苷酸與相對股上之經化學修飾之核苷酸鹼基配對，及/或一股上之未經化學修飾之核苷酸與相對股上之未經化學修飾之核苷酸鹼基配對)。在實施例中，兩股全部由經化學修飾之核苷酸構成。在其他實施例中，如本文所描述之TDSC之兩股包含不同化學修飾模式(例如一股上之一或多個經化學修飾之核苷酸與另一股上之未經化學修飾之核苷酸鹼基配對)。在實施例中，如本文所描述之TDSC包含一或多個兩股均經化學修飾之雙股區，及/或一或多個無一股經化學修飾之雙股區。在實施例中，如本文所描述之TDSC包含一或多個一股經化學修飾且另一股未經化學修飾之雙股區。

【0121】 在實施例中，如本文所描述之TDSC包含一或多個DNA末端形式(例如核酸外切酶抗性DNA末端形式，例如共價封閉DNA末端形式

或非共價封閉DNA末端形式，例如如本文所描述)，該一或多個DNA末端形式各自包含一或多個經化學修飾之核苷酸(例如在DNA末端形式之一股或兩股上)。在實施例中，TDSC包含側接含有經化學修飾之核苷酸之非共價封閉核酸外切酶抗性DNA末端形式的雙股區，例如如本文所描述(例如圖2中)。

【0122】 在實施例中，本文所描述之TDSC具有一或多個干擾TDSC之一部分形成雙股結構之能力的化學修飾，例如本文所描述之TDSC存在具有分子內互補之區域的中存在之核苷酸上具有一或多個化學修飾。在實施例中，本文所描述之TDSC相對於TDSC之未經修飾之序列具有一或多個干擾具分子內互補性之區域的鹼基配對的化學修飾。在一些實施例中，相較於未經修飾之核苷酸與未經修飾之核苷酸鹼基配對之傾向，本文所用之經化學修飾之核苷酸與經化學修飾之核苷酸鹼基配對之傾向降低。在一些實施例中，相較於經修飾之核苷酸，本文所用之經化學修飾之核苷酸與未經修飾之核苷酸鹼基配對之傾向增加。

【0123】 亦考慮其他修飾。舉例而言，本文所描述之線性DNA之末端可經化學修飾例如以保護其免於核酸外切酶影響。舉例而言，可將一或多個雙去氧核苷酸殘基添加至線性分子之3'端，且/或將自互補寡核苷酸與一個或兩個端接合。參見例如Chang等人(1987) Proc. Nail. Acad. Sci. USA 84:4959- 4963；Nehls等人(1996) Science 272:886-889。

【0124】 在一些實施例中，相較於具有相同序列之未經修飾之TDSC，本文所描述之經化學修飾之TDSC在宿主組織或個體中展現被DNA感測器識別降低，例如相較於具有相同序列之未經修飾之TDSC，在宿主組織或個體中被DNA感測器識別降低至少10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些實施例中，相較於具有相同序列之未經修飾之TDSC，本文所描述之經化學修飾之TDSC展現被DNA核酸酶降解降低，例如相較於未經修飾之TDSC，宿主組織或個體中被DNA核酸酶降解降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些實施例中，相較於具有相同序列之未經修飾之TDSC，本文所描述之經化學修飾之TDSC在目標/宿主組織或個體中顯示先天性免疫系統之活化降低，例如相較於具有相同序列之未經修飾之TDSC，目標/宿主組織或個體中先天性免疫系統之活化降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

【0125】在一些實施例中，相較於具有相同序列之不包含經化學修飾之核苷酸的dsDNA(未經修飾之dsDNA)，本文所描述之包含經化學修飾之核苷酸的TDSC在目標/宿主組織或個體中展現以下特性中之任一者：外源性構築體整合於目標細胞基因體中增加；經由複製在目標細胞中之保留增加；二級或三級結構形成減少；與先天性免疫感測器之相互作用降低；與核酸酶之相互作用降低；穩定性增強；壽命增強；毒性降低；遞送增強；表現增加；跨膜輸送增加；與DNA結合部分(諸如核DNA結合蛋白)、轉錄因子、伴隨蛋白、DNA聚合酶之結合增加。在實施例中，相較於具有相同序列之未經修飾之dsDNA，目標/宿主組織或個體中上文所列之特性中之任一者調節至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

【0126】

DNA構築體之結構

在一些實施例中，包含本文揭示之dsDNA之TDSC或核酸之長度為至

少約20個核苷酸、至少約30個核苷酸、至少約40個核苷酸、至少約50個核苷酸、至少約75個核苷酸、至少約100個核苷酸、至少約200個核苷酸、至少約300個核苷酸、至少約500個核苷酸、至少約1000個核苷酸、至少約2000個核苷酸、至少約3000個核苷酸、至少約4000個核苷酸、至少約5000個核苷酸、至少約6000個核苷酸、至少約7000個核苷酸、至少約8000個核苷酸、至少約9000個核苷酸、至少約10,000個核苷酸、至少約20,000個核苷酸、至少約30,000個核苷酸、至少約40,000個核苷酸或至少約50,000個核苷酸。在一些實施例中，包含本文揭示之dsDNA之TDSC或核酸之長度在20-30、30-40、40-50、50-75、75-100、100-200、200-300、300-500、500-1000、1000-2000、2000-3000、3000-4000、4000-5000、5000-6000、6000-7000、7000-8000、8000-9000、9000-10,000、10,000-20,000、20,000-30,000、30,000-40,000 或 40,000-50,000個核苷酸之間。在一些實施例中，本文所揭示之TDSC之大小為足夠編碼適用多肽或RNA之長度。

【0127】 在一些實施例中，包含dsDNA之TDSC或核酸包含核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如如本文所描述)。在一些實施例中，DNA末端形式之長度為至少2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100個核苷酸。在一些實施例中，DNA末端形式之長度為小於10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100個核苷酸。在一些實施例中，DNA末端形式之長度為2-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-70、70-80、80-90或90-100個核苷酸。

【0128】 在一些實施例中，包含dsDNA之TDSC或核酸包含例如位

於兩個核酸外切酶抗性DNA末端形式之間的編碼效應物(例如多肽或RNA，例如如本文所描述)之雙股區。在一些實施例中，雙股區之長度為至少10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、20,000、30,000、40,000或50,000個核苷酸。在一些實施例中，雙股區形式之長度為小於50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、20,000、30,000、40,000或50,000個核苷酸。在一些實施例中，雙股區之長度為10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-2000、2000-3000、3000-4000、4000-5000、5000-6000、6000-7000、7000-8000、8000-9000、9000-10,000、10,000-20,000、20,000-30,000、30,000-40,000或40,000至50,000個核苷酸。

【0129】本文所描述之TDSC可具有低於臨限水平之單股結構。在一個實施例中，TDSC不包含超過20、18、16、14、12、10、8、7、5、4、3、2或1個長於100、80、70、60、50、40、30、20或10個鹼基之單股區，例如不包含長於100、80、70、60、50、40、30、20或10個鹼基之單股區。在一個實施例中，藉由本文所描述之TDSC形成之雙股區係如藉由以下所描述測定：Xayaphoummine等人2005. *Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots*. Nucleic Acids Research, 第33卷:W605-610。在一個實施例

中，使用Kinefold網站(http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl)，使用以下參數來預測本文所描述之構築體之雙股區：

- 欲摺疊之序列：輸入且選擇「DNA序列」
- 隨機模擬：共轉錄摺疊，3毫秒
- 模擬分子時間：預設
- 假結：不允許
- 纏結：非交叉
- 隨機種子：11453

【0130】

製造

在一些實施例中，包含如本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸係由經組裝以含有本文所描述之所需元件的質體產生。質體模板可例如藉由使用一鍋式組裝程序金門選殖呈限定線性順序之多個DNA片段之組裝件於接受體載體中來組裝。金門選殖描述於Marillonnet及Grützner, 2020, *Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline*, Current Protocols in Molecular Biology, 130:e115中。在一些實施例中，例如藉由用核酸酶(例如限制性核酸內切酶)消化或藉由自質體模板PCR擴增線性核酸序列(例如如實例2中所描述)將質體模板線性化。在某些實施例中，質體模板之線性化產生如本文所描述之原TDSC(例如包含在一或兩個端不包含核酸外切酶抗性DNA末端形式之dsDNA的線性核酸)。

【0131】在一些實施例中，在一股上包含化學修飾之TDSC或原TDSC係藉由使用包含一或多個經化學修飾之核苷酸的dNTP混合物及可

擴增TDSC或原TDSC序列之一股的引子擴增一股(例如自質體模板)來產生(例如如實例3中所描述)。在某些實施例中，相對股(例如未經修飾之股或經不同化學修飾之股，例如如本文所描述，例如圖1A至圖2中)係在單獨的擴增反應中，例如使用包含未經修飾之核苷酸或不同組經化學修飾之核苷酸的dNTP混合物，及可擴增TDSC或原TDSC序列之相對股的引子來產生(例如如實例3中所描述)。

【0132】 在一些實施例中，在兩個股上包含相同化學修飾之TDSC或原TDSC係藉由使用包含一或多個經化學修飾之核苷酸的dNTP混合物，及可擴增TDSC或原TDSC序列之兩股的引子擴增TDSC或原TDSC股(例如自質體模板)來產生(例如如實例4中所描述)。

【0133】 在一些實施例中，將核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如如本文所描述)引入(例如連接)原TDSC之一或兩個端。在某些實施例中，DNA末端形式藉由接合連接於原TDSC之一端(例如如實例5或6中所描述)。在實施例中，DNA末端形式(例如共價封閉DNA末端形式)與原TDSC之連接(例如接合)產生最終TDSC。在某些實施例中，例如藉由在核酸外切酶(例如核酸外切酶III、USER酶及/或綠豆核酸酶)存在下培育TDSC來確認連接之DNA末端形式的核酸外切酶抗性，例如如實例10及11中所描述。在實施例中，例如藉由在核酸外切酶III存在下培育TDSC來確認連接之DNA末端形式的核酸外切酶抗性。在實施例中，DNA末端形式包含平端、黏端或Y-轉接子(例如如本文所描述)，且藉由在核酸外切酶III及(例如在其之後、之前或同時)綠豆核酸酶及/或USER酶存在下培育TDSC來確認連接之DNA末端形式的核酸外切酶抗性。

【0134】 在某些實施例中，DNA末端形式連接於新生形式之原

TDSC之末端(例如非共價封閉DNA末端形式可連接於原TDSC作為髮夾，例如如實例5及圖3至圖4中所描述)。在後續步驟中，新生形式之DNA末端形式可進一步經修飾(例如裂解)以產生最終DNA末端形式。舉例而言，非共價封閉DNA末端形式可藉由新生形式之裂解(例如藉由核酸酶)產生。在實施例中，新生形式包含一或多個尿嘧啶核苷酸。在實施例中，使用USER酶，新生形式在一或多個尿嘧啶核苷酸處裂解。在一些實施例中，包含懸垂物或黏端之新生形式(例如藉由USER酶裂解產生之新生形式，如圖3至圖4中所示)可藉由用單股特異性核酸酶(例如綠豆核酸酶)消化轉化為平端(例如如實例5中所描述)。在一些實施例中，包含其單股環區中含有可裂解部分(例如尿嘧啶核苷酸)之髮夾的新生形式藉由可裂解部分之裂解(例如藉由USER酶)轉化為Y-轉接子，例如如實例7中所描述。

【0135】 TDSC可自選自由以下組成之群之雜質或副產物富集或純化：內毒素、單核苷酸、經化學修飾之單核苷酸、單股DNA、環狀DNA、蛋白質(例如酶，例如連接酶、限制酶)、DNA片段或截短物。在一些實施例中，純化的TDSC實質上不含過程副產物及雜質，例如本文所描述之過程副產物或雜質。

【0136】 在一些實施例中，TDSC用基於脂質之載劑(例如脂質奈米粒子(LNP))調配，例如如實例8中所描述。

【0137】 TDSC可進行定序以確認所需的設計之序列。在實施例中，可對TDSC進行其他結構分析(例如限制酶分析)以確認或驗證其序列。

【0138】

醫藥組合物

本發明包括包含dsDNA之TDSC或核酸，以及與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑及/或載劑組合之相關組合物。

【0139】 醫藥組合物可視情況包含一或多種額外活性物質，例如治療性及/或預防性活性物質。本發明之醫藥組合物一般為無菌及/或無熱原的。

【0140】 本文所描述之TDSC可在無載劑之情況下調配，例如本文所描述之TDSC可以「裸」的向宿主細胞、組織或個體投與。裸調配物可包括醫藥賦形劑或稀釋劑但缺乏載劑。

【0141】 醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑可包含用作本文所描述之組合物之媒劑或介質之非活性物質，諸如經美國食品與藥物管理局(United States Food and Drug Administration；FDA)批准及非活性成分資料庫(Inactive Ingredient Database)中列舉之非活性成分中之任一者，其以引用之方式併入本文中。醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水性溶劑、張力劑、分散介質、低溫保護劑、稀釋劑、懸浮助劑、界面活性劑、等張劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、玻尿酸酶、分散劑、潤滑劑、成粒劑、崩解劑、黏合劑、抗氧化劑、緩衝劑(例如磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline；PBS))、潤滑劑、油及其混合物。

【0142】 調配及/或製造醫藥劑時的一般考慮因素可見於例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy第21版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (以引用之方式併入本文中)。

【0143】

載劑

包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸亦可用載劑調配或包括載劑。醫藥劑之載劑及遞送之一般考慮因素可例如見於Delivery Technologies for Biopharmaceuticals: Peptides, Proteins, Nucleic Acids and Vaccines (Lene Jorgensen及Hanne Morck Nielson編) Wiley;第1版(2009年12月21日)；及Vargason等人2021. Nat Biomed Eng 5, 951-967中。

【0144】 載劑之非限制性實例包括碳水化合物載劑(例如酸酐修飾之植物糖原或肝醣型材料，GalNAc)、奈米粒子(例如囊封TDSC或與其共價連接之奈米粒子；金奈米粒子；二氧化矽奈米粒子)、脂質粒子(例如脂質體、脂質奈米粒子)、陽離子載劑(例如陽離子脂質聚合物或轉染試劑)、融質體、無核細胞(例如離體分化之網狀紅血球)、有核細胞、胞泌體、蛋白質載劑(例如與TDSC共價連接之蛋白質)、肽(例如細胞穿透肽)、材料(例如氧化石墨烯)、單一純脂質(例如膽固醇)、DNA摺疊物(例如DNA四面體)。

【0145】 在一個實施例中，本文所描述之TDSC組合物、構築體及系統可調配於脂質體或其他類似囊泡中。脂質體為由圍繞內部水性區室之單層或多層脂質雙層及相對不可滲透之外部親脂性磷脂雙層構成的球狀囊泡結構。脂質體可為陰離子、中性或陽離子型。脂質體為生物相容性的，無毒性，可遞送親水性與親脂性藥物分子，保護其運載物免被血漿酶降解，且跨生物膜及血腦障壁(blood brain barrier；BBB)輸送其負載物(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery, 第2011卷, Article ID 469679, 第 12 頁 , 2011. 數位物件識別碼:10.1155/2011/469679)。

【0146】 囊泡可由數種不同類型的脂質製成；然而，磷脂最常用於產生脂質體作為藥物載劑。用於製備多層囊泡脂質之方法為此項技術中已知的(參見例如美國專利第6,693,086號，其關於多層囊泡脂質製備之教示內容以引用的方式併入本文中)。雖然當脂質膜與水溶液混合時，囊泡形成可為自發的，但其亦可藉由使用均質器、超音波發生器或擠出設備以振盪形式施加力來加速(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery, 第2011卷, 文章ID 469679, 第12頁, 2011.數位物件識別碼:10.1155/2011/469679)。擠出之脂質可藉由經大小減小之過濾器擠出來製備，如Templeton等人, Nature Biotech, 15:647-652, 1997中所描述，該文獻中關於擠出脂質製備之教示內容以引用的方式併入本文中。

【0147】 胞泌體亦可用作本文所描述之組合物及系統的藥物遞送媒劑。關於綜述，參見Ha等人2016年7月. Acta Pharmaceutica Sinica B. 第6卷, 第4期, 第287-296頁；https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

【0148】 離體分化之紅血球亦可用作本文所描述之藥劑(例如TDSC)之載劑。參見例如WO2015073587；WO2017123646；WO2017123644；WO2018102740；WO2016183482；WO2015153102；WO2018151829；WO2018009838；Shi等人, 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136；美國專利9,644,180；Huang等人, 2017. Nature Communications 8: 423。

【0149】 例如如WO2018208728中所描述之融質體組合物亦可用作遞送本文所描述之TDSC的載劑。

【0150】

脂質奈米粒子：

脂質奈米粒子(LNP)為由可離子化脂質製成之載劑。LNP經由胞吞作用被細胞攝入，且其特性允許胞內體逃逸，此允許將運載物釋放至目標細胞之細胞質中。除可離子化脂質以外，LNP可含有輔助脂質以促進細胞結合；含有膽固醇以填充脂質之間的間隙；及/或含有聚乙二醇(PEG)以降低血清蛋白之調理作用及網狀內皮清除。在一些實施例中，脂質奈米粒子包含一或多種離子脂質，諸如非陽離子脂質(例如中性或陰離子或兩性離子脂質)；一或多種結合的脂質(諸如PEG結合的脂質或與WO2019217941之表5中所描述之聚合物結合的脂質；該專利以全文引用之方式併入本文中)；一或多種固醇(例如膽固醇)；及視情況，一或多種靶向分子(例如結合受體、受體配體、抗體)；或前述之組合。

【0151】 可用於奈米粒子形成(例如脂質奈米粒子)之脂質包括例如WO2019217941 (其以引用之方式併入)之表4中所描述之彼等脂質，例如含有脂質之奈米粒子可包含WO2019217941之表4中之一或多種脂質。脂質奈米粒子可包括另外的要素，諸如聚合物，諸如WO2019217941 (其以引用之方式併入)之表5中所描述之聚合物。

【0152】 在一些實施例中，結合的脂質(若存在)可包括以下中之一或多者：PEG-二醯基甘油(DAG) (諸如1-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯基甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-腦醯胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二醯基甘油(PEGS-DAG) (諸如4-O-(2',3'-二(十四醯氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺鈉鹽及WO2019051289 (其以引用之方式併入)之表2中所描述之彼等

脂質，及前述之組合。

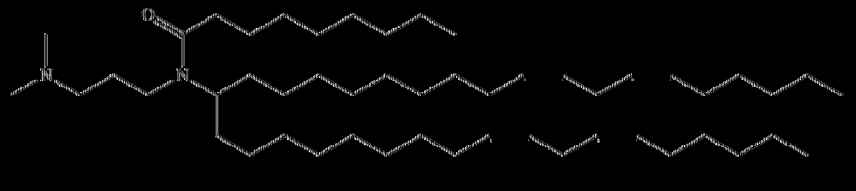
【0153】在一些實施例中，可併入脂質奈米粒子中之固醇包括膽固醇或膽固醇衍生物中之一或多者，諸如WO2009/127060或US2010/0130588 (其以引用之方式併入)中之彼等者。額外例示性固醇包括植物固醇，包括以引用之方式併入本文中的Eygeris等人(2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中所描述之彼等者。

【0154】在一些實施例中，脂質粒子包含可離子化脂質、非陽離子脂質、抑制粒子聚集之結合的脂質及固醇。此等組分之量可獨立地變化且以達成所需特性。舉例而言，在一些實施例中，脂質奈米粒子包含：可離子化脂質，其量為總脂質之約20 mol%至約90 mol% (在其他實施例中，其可為20-70% (mol)、30-60% (mol)或40-50% (mol)；脂質奈米粒子中存在之總脂質的約50 mol%至約90 mol%)；非陽離子脂質，其量為總脂質之約5 mol%至約30 mol%；結合的脂質，其量為總脂質之約0.5 mol%至約20 mol%；及固醇，其量為總脂質之約20 mol%至約50 mol%。總脂質與核酸之比率可視需要變化。舉例而言，總脂質與核酸之(質量或重量)比率可為約10:1至約30:1。

【0155】在一些實施例中，脂質與核酸比率(質量/質量比；w/w比率)可在以下之範圍內：約1:1至約25:1、約10:1至約14:1、約3:1至約15:1、約4:1至約10:1、約5:1至約9:1、或約6:1至約9:1。脂質及核酸之量可經調整以提供所需N/P比率，例如3、4、5、6、7、8、9、10或更高之N/P比率。一般而言，脂質奈米粒子調配物之總脂質含量可在約5 mg/ml至約30 mg/ml之範圍內。

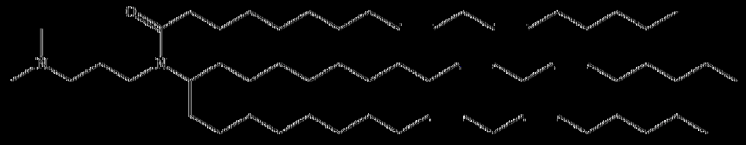
【0156】可用於(例如與其他脂質組分組合)形成用以遞送本文所描

述之組合物(例如，本文所描述之核酸)的脂質奈米粒子的脂質化合物之一。典非限制性實例包括



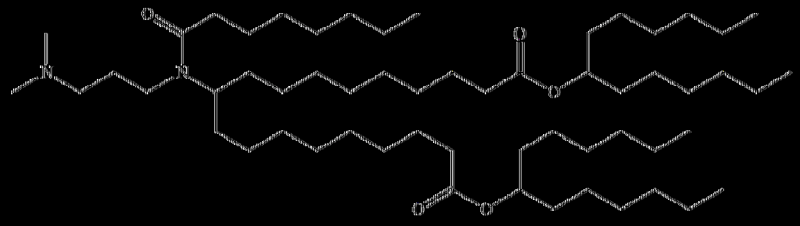
(i)

[0157] 在一典實施例中，包含式(i)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



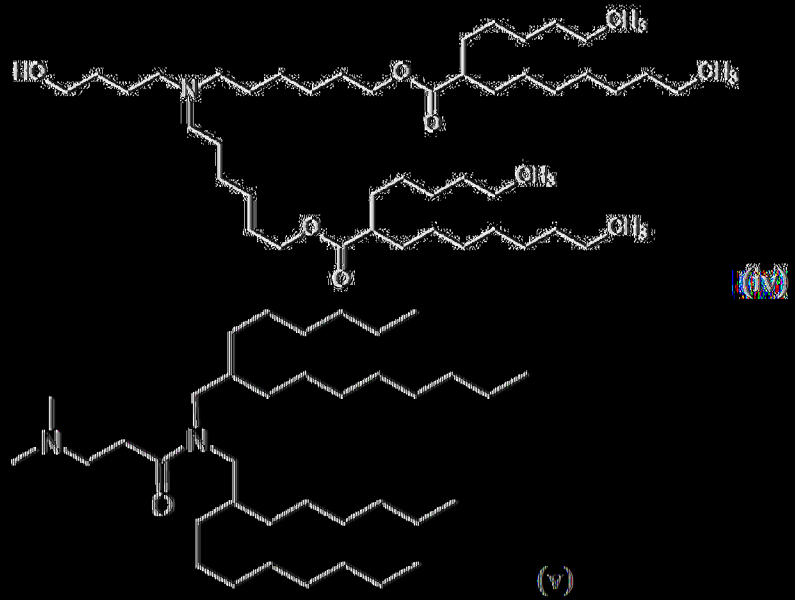
(ii)

[0158] 在一典實施例中，包含式(ii)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



(iii)

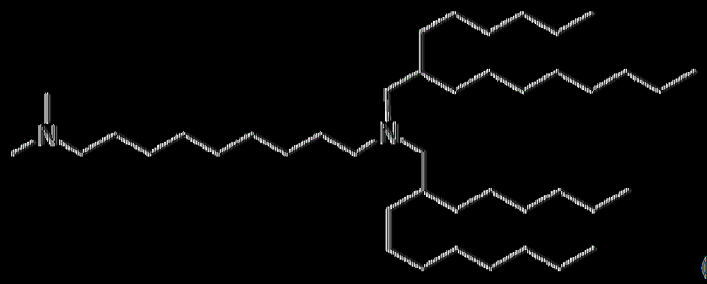
[0159] 在一典實施例中，包含式(iii)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



(v)

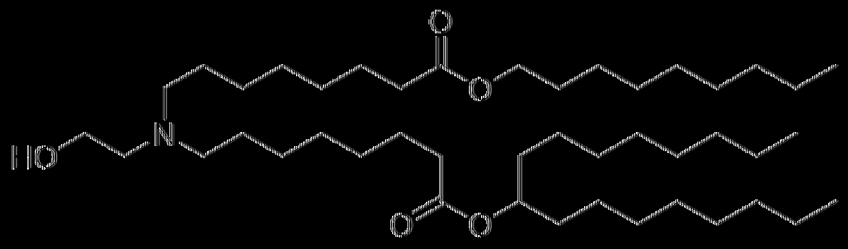
[0160] 在一典實施例中，包含式(v)之LNP用於將本文所描述之

DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



(vi)

[0161] 在一典實施例中，包含式(vi)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。

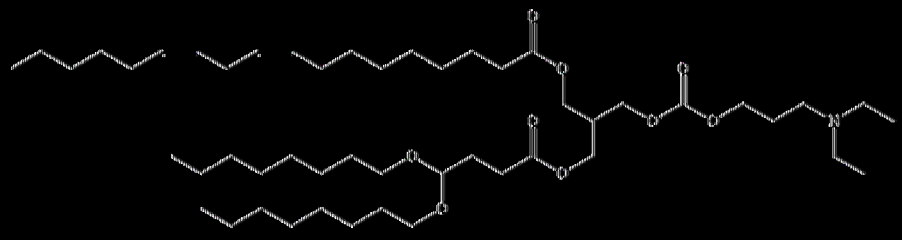


(vii)



(viii)

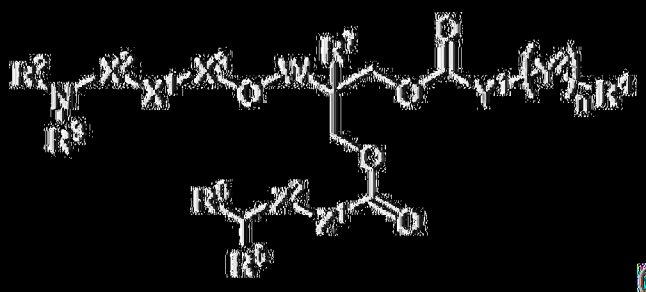
[0162] 在一典實施例中，包含式(vii)或(viii)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



(ix)

[0163] 在一典實施例中，包含式(ix)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。

[0164] 在一典實施例中，包含式(x)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞：



(X)

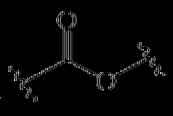
其中

其中X^1為O、NR^1或直接鍵，X^2為C_{2-5}伸烷基，X^3為C(=O)或直接鍵，R^1為H或Me，R^3為C_{1-3}烷基，R^2為C_{1-3}烷基，或R^2與其所連接之氮原子及X^2之1至3個碳原子一起形成4員、5員或6員環，或X^1為NR^1，R^1及R^2與其所連接之氮原子一起形成5員或6員環，或R^2與R^3及其所連接之氮原子一起形成5員、6員或7員環，Y^1為C_{2-12}伸烷基，Y^2選自



(在任一取向上)，(在任一取向上)，(在任一取向上)，

n為0至3，R^4為C_{1-15}烷基，Z^1為C_{1-6}伸烷基或直接鍵，

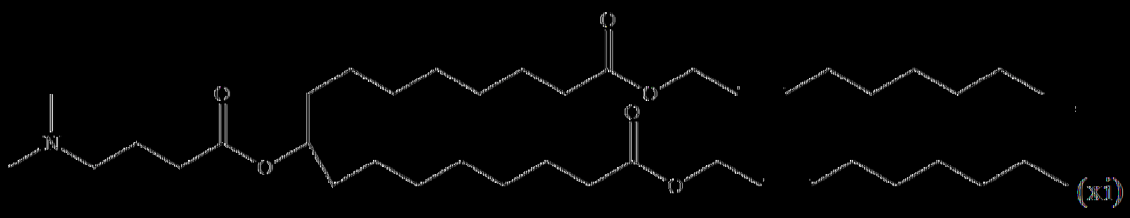
Z^2為

(在任一取向上)或不存在，其限制條件為若Z^1為直接鍵，則Z^2不存在；

R^5為C_{5-9}烷基或C_{6-10}烷氧基，R^6為C_{5-9}烷基或C_{6-10}烷氧基，W為胺甲基或直接鍵，且R^7為H或Me或其鹽，其限制條件為若R^3及R^2為C_2烷基，X^1為O，X^2為直鏈C_3伸烷基，X^3為C(=O)，Y^1為直鏈C6伸烷基，$(Y^2)_n$-R^4為



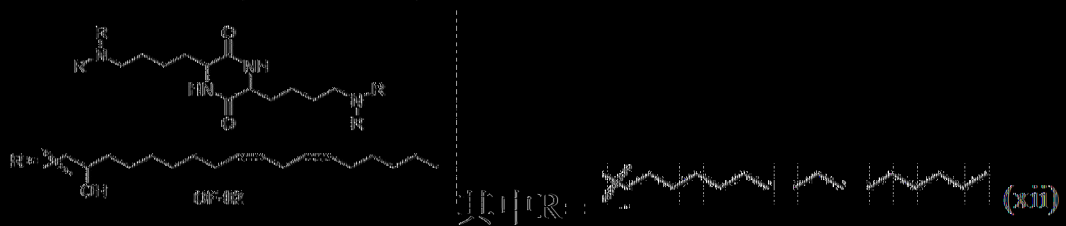
，R^4為直鏈C_5烷基，Z^1為C_2伸烷基，Z^2不存在，W為胺甲基，且R^7為H，則R^5及R^6不為Cx烷氧基。



(xi)

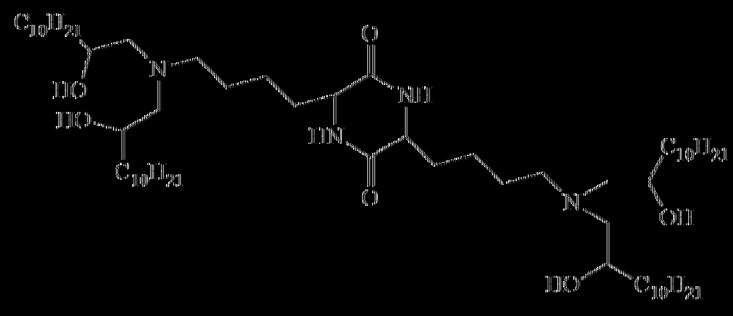
[0165] 在一典實施例中，包含式(xi)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。

[0166] 在一典實施例中，包含式(xii)之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。

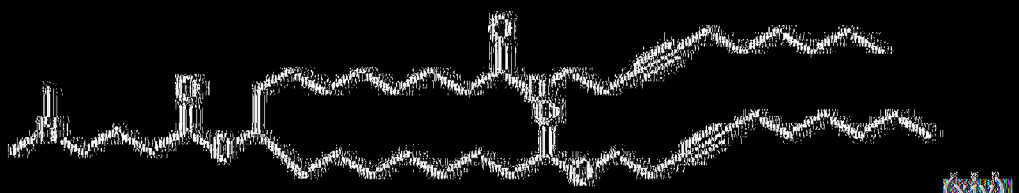


其中R=

(xii)

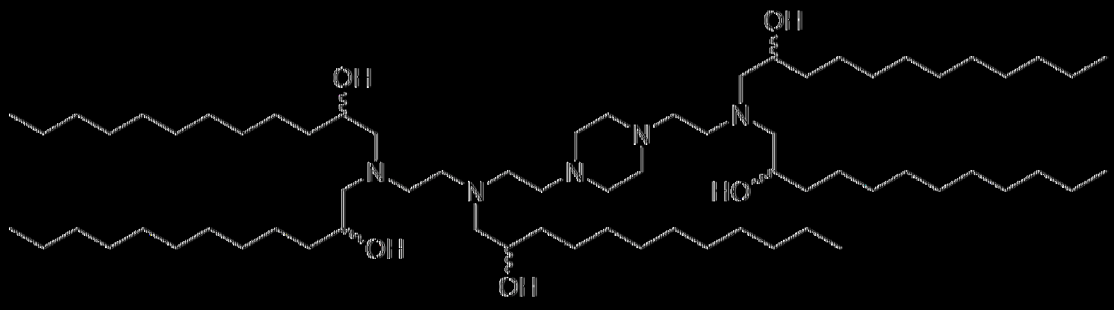


(xiii)



(xiv)

[0167] 在一典實施例中，LNP包含式(xiii)之化合物及式(xiv)之化合物。



(xv)

[0168] 在一典實施例中，包含式(xv)之LNP用於將本文所描述之

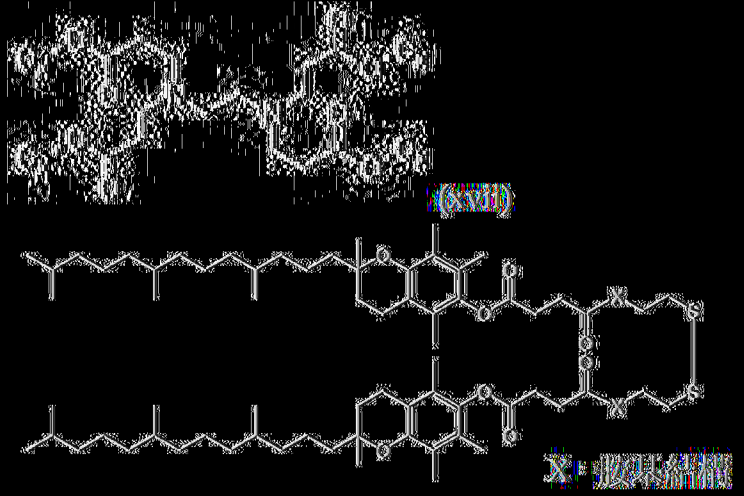
DNA組合物遞送至肝臟及/或肝細胞。



(xxvi)

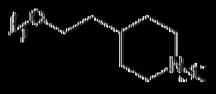
[0169] 在一些實施例中，包含式(xvi)之調配物的LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肺內皮細胞。

[0170] 在一些實施例中，包含式(xvii)、(xviii)或(xix)之調配物之LNP用於將本文所描述之DNA組合物遞送至肺內皮細胞。

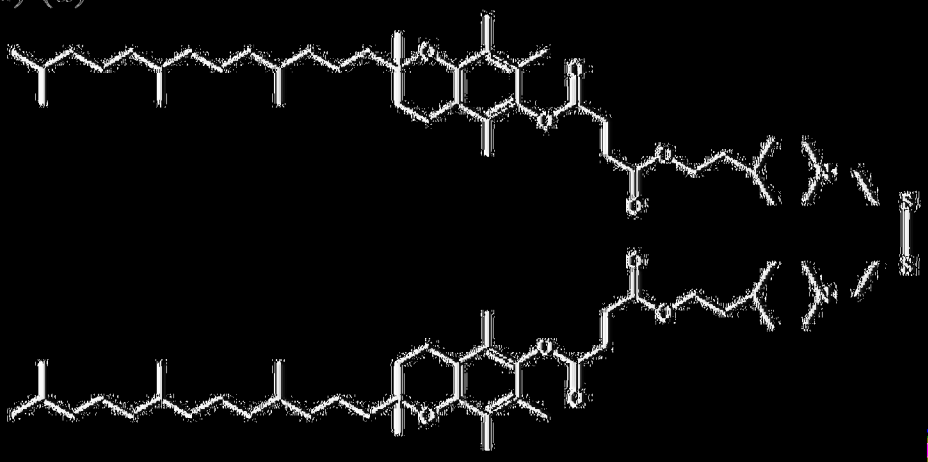


(xxvii)

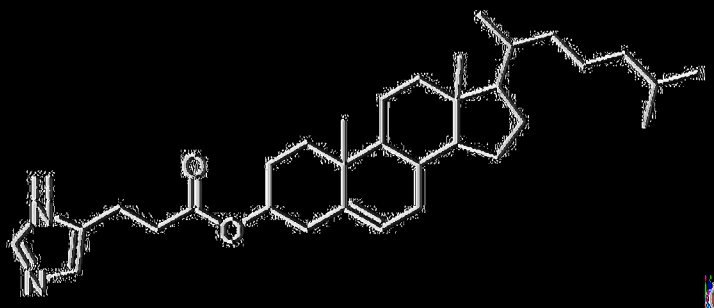
其中X1為



(xviii) (a)

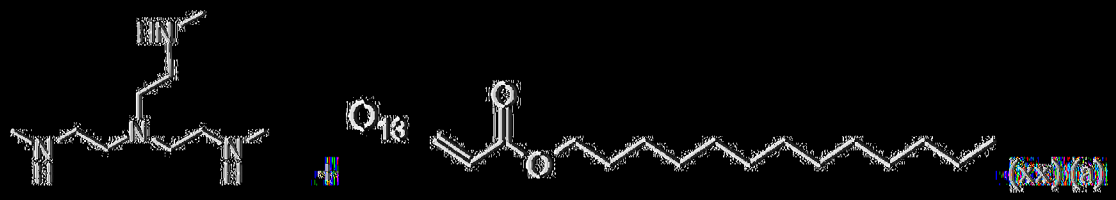


(xviii)(b)



(xxix)

[0171] 在一些實施例中，用於形成用於遞送本文所描述之組合物(例如本文所描述之核酸)之脂質奈米粒子之脂質化合物藉由以下反應中之一者製備：



(xxx)(a)



(xxx)(b)

[0172] 在一些實施例中，本文所描述之組合物(例如核酸或蛋白質)提供於包含可離子化脂質之LNP中。在一些實施例中，可離子化脂質為8-((2-羥乙基)(6-側氧基-6-(十一烷氧基)己基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯(SM-102)；例如，如US9,867,888 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例1中所描述。在一些實施例中，可離子化脂質為十八碳-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯(LP01)，例如，如WO2015/095340 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例13中所合成。在一些實施例中，可離子化脂質為9-((4-(二甲胺基)丁醯基)氧基)十七烷二酸二((Z)-十二-2-烯-1-基)酯(L319)，例如如US2012/0027803 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例7、8或9中所合成。在一些實施例中，可離子化脂質為1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)氮二基)雙

(十二烷-2-醇) (C12-200)，例如如WO2010/053572 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例14及16中所合成。在一些實施例中，可離子化脂質為咪唑膽固醇酯(ICE)脂質3-(1H-咪唑-4-基)丙酸(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氫-1H-環戊[a]菲-3-基酯，例如來自WO2020/106946 (其以全文引用之方式併入本文中)之結構(I)。

【0173】 在一些實施例中，可離子化脂質可為陽離子脂質、可離子化陽離子脂質(例如，可視pH而以帶正電或中性形式存在之陽離子脂質)或可易於質子化之含胺脂質。在一些實施例中，陽離子脂質為能夠例如在生理條件下帶正電之脂質。例示性陽離子脂質包括攜帶正電荷的一或多個胺基。在一些實施例中，脂質粒子包含陽離子脂質與以下中之一或多者之調配物：中性脂質、可離子化含胺脂質、可生物降解的炔烴脂質、類固醇、包括多元不飽和脂質之磷脂、結構性脂質(例如固醇)、PEG、膽固醇及聚合物結合脂質。在一些實施例中，陽離子脂質可為可離子化陽離子脂質。如本文所揭示之例示性陽離子脂質可具有超過6.0之有效pKa。在實施例中，脂質奈米粒子可包含有效pKa與第一陽離子脂質不同(例如大於第一有效pKa)的第二陽離子脂質。脂質奈米粒子可包含40至60莫耳%之間的陽離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物結合脂質及治療劑(例如本文所描述之核酸)囊封在脂質奈米粒子內或與其結合。在一些實施例中，核酸與陽離子脂質共調配。核酸可吸附至LNP (例如包含陽離子脂質之LNP)的表面。在一些實施例中，核酸可囊封在LNP (例如包含陽離子脂質之LNP)中。在一些實施例中，脂質奈米粒子可包含例如塗覆有靶向劑之靶向部分。在實施例中，LNP調配物為可生物降解的。在一些實施例中，包含一

或多種本文所描述之脂質(例如式(i)、(ii)、(ii)、(vii)及/或(ix))之脂質奈米粒子囊封至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%或100%之分子TDSC。

【0174】 可用於脂質奈米粒子調配物中的例示性可離子化脂質包括但不限於WO2019051289之表1中列出的彼等者，該文獻以引用之方式併入本文中。額外例示性脂質包括但不限於以下式中之一或多者：US2016/0311759之X；US20150376115或US2016/0376224中之I；US20160151284之I、II或III；US20170210967之I、IA、II或IIA；US20150140070之I-c；US2013/0178541之A；US2013/0303587或US2013/0123338之I；US2015/0141678之I；US2015/0239926之II、III、IV或V；US2017/0119904之I；WO2017/117528之I或II；US2012/0149894之A；US2015/0057373之A；WO2013/116126之A；US2013/0090372之A；US2013/0274523之A；US2013/0274504之A；US2013/0053572之A；WO2013/016058之A；WO2012/162210之A；US2008/042973之I；US2012/01287670之I、II、III或IV；US2014/0200257之I或II；US2015/0203446之I、II或III；US2015/0005363之I或III；US2014/0308304之I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV；US2013/0338210之；WO2009/132131之I、II、III或IV；US2012/01011478之A；US2012/0027796之I或XXXV；US2012/0058144之XIV或XVII；US2013/0323269之；US2011/0117125之I；US2011/0256175之I、II或III；US2012/0202871之I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII；

US2011/0076335之I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI；US2006/008378之I或II；US2013/0123338之I；US2015/0064242之I或X-A-Y-Z；US2013/0022649之XVI、XVII或XVIII；US2013/0116307之I、II或III；US2013/0116307之I、II或III；US2010/0062967之I或II；US2013/0189351之I-X；US2014/0039032之I；US2018/0028664之V；US2016/0317458之I；US2013/0195920之I；US10,221,127之5、6或10；WO2018/081480之III-3；WO2020/081938之I-5或I-8；US9,867,888之18或25；US2019/0136231之A；WO2020/219876之II；US2012/0027803之1；US2019/0240349之OF-02；US10,086,013之23；Miao等人(2020)之cKK-E12/A6；WO2010/053572之C12-200；Dahlman等人(2017)之7C1；Whitehead等人之304-O13或503-O13；US9,708,628之TS-P4C2；WO2020/106946之I；WO2020/106946之I。

【0175】在一些實施例中，可離子化脂質為MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基胺基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)，例如如WO2019051289A9 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例9中所描述。在一些實施例中，可離子化脂質為脂質ATX-002，例如如WO2019051289A9 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例10中所描述。在一些實施例中，可離子化脂質為(13Z,16Z)-A,A-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32)，例如如WO2019051289A9 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例11中所描述。在一些實施例中，可離子化脂質為化合物6或化合物22，例如如WO2019051289A9 (其以全文引用之方式併入本文中)之實例12中所描述。

【0176】例示性非陽離子脂質包括但不限於二硬脂醯基-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯基-乙醇胺(DSPE)、單甲基磷脂醯乙醇胺(諸如16-O-單甲基PE)、二甲基磷脂醯乙醇胺(諸如16-O-二甲基PE)、18-1-反PE、1-十八醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、經氫化之大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、蛋磷脂醯膽鹼(EPC)、二油醯基磷脂醯絲胺酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二芥醯基磷脂醯膽鹼(DEPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯甘油(POPG)、二反油醯基磷脂醯乙醇胺(DEPE)、卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、蛋鞘磷脂(ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、二鯨蠟基磷酸酯、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼或其混合物。應理解，亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。此等脂質中之醯基較佳為衍生自具有C10-C24碳鏈之脂肪酸之醯基，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。在某些實施例中，額外例示性脂質包括但不限於Kim等人(2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386 (以引用之方式併入本文中)中所描述之彼等者。在一些實施例中，此類脂質包括發現改良mRNA (例如

DGTS)之肝臟轉染的植物脂質。

【0177】 適合用於脂質奈米粒子之非陽離子脂質之其他實例包括但不限於非磷脂質，諸如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、棕櫚酸乙醯酯、甘油蓖麻油酸酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、硫酸三乙醇胺-月桂基酯、硫酸烷基-芳基酯聚乙氧基化脂肪酸醯胺、溴化二(十八烷基)二甲基銨、腦醯胺、鞘磷脂及其類似者。其他非陽離子脂質描述於WO2017/099823或美國專利公開案US2018/0028664中，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0178】 在一些實施例中，非陽離子脂質為油酸或US2018/0028664之式I、II或IV之化合物，該文獻以全文引用之方式併入本文中。非陽離子脂質可佔例如脂質奈米粒子中存在的總脂質之0-30% (mol)。在一些實施例中，非陽離子脂質含量為脂質奈米粒子中存在的總脂質之5-20% (mol)或10-15% (mol)。在實施例中，可離子化脂質與中性脂質之莫耳比在約2:1至約8:1之範圍內(例如約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1或8:1)。

【0179】 在一些實施例中，脂質奈米粒子不包含任何磷脂。

【0180】 在一些態樣中，脂質奈米粒子可進一步包含提供膜完整性之組分，諸如固醇。可用於脂質奈米粒子中的一種例示性固醇為膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，諸如5a-膽甾烷醇、53-糞甾醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙基醚、膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚及6-酮膽甾烷醇；非極性類似物，諸如5a-膽甾烷、膽甾烯酮、5a-膽甾烷酮、5p-膽甾烷酮及癸酸膽固醇酯；及其混合物。在一些實施例中，膽固醇衍生物為極性類似物，例如膽固醇基-(4'-羥基)-丁基醚。例示性膽固

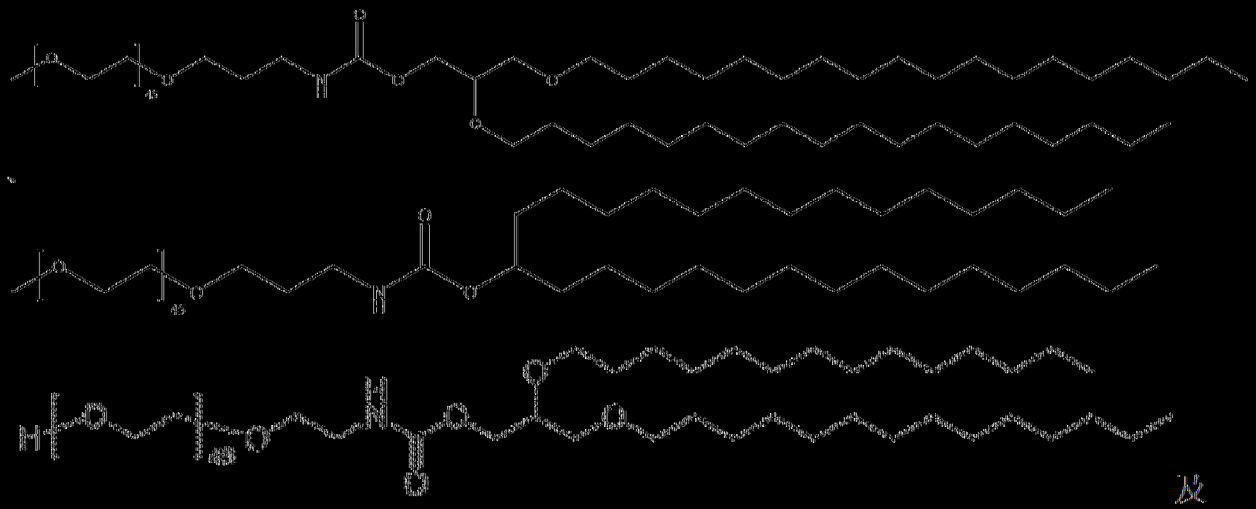
醇衍生物描述於PCT公開案WO2009/127060及美國專利公開案US2010/0130588中，其各自以全文引用之方式併入本文中。

【0181】在一些實施例中，提供膜完整性之組分(諸如固醇)可佔脂質奈米粒子中存在的總脂質之0-50% (mol) (例如0-10%、10-20%、20-30%、30-40%或40-50%)。在一些實施例中，此類組分為脂質奈米粒子之總脂質含量的20-50% (mol)、30-40% (mol)。

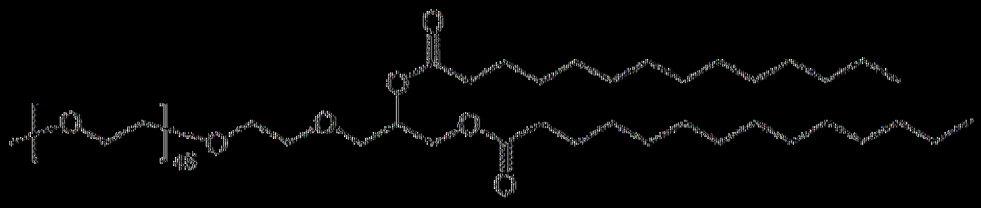
【0182】在一些實施例中，脂質奈米粒子可包含聚乙二醇(PEG)或結合脂質分子。一般而言，此等物質用於抑制脂質奈米粒子之聚集及/或提供空間穩定化。例示性結合脂質包括但不限於PEG-脂質結合物、聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物、聚醯胺-脂質結合物(諸如ATTA-脂質結合物)、陽離子聚合物脂質(CPL)結合物及其混合物。在一些實施例中，結合脂質分子為PEG-脂質結合物，例如(甲氧基聚乙二醇)-結合脂質。

【0183】例示性PEG-脂質結合物包括但不限於PEG-二醯基甘油(DAG) (諸如1-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯基甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-腦醯胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二醯基甘油(PEGS-DAG) (諸如4-O-(2',3'-二(十四醯氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺鈉鹽或其混合物。額外例示性PEG-脂質結合物描述於例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224、US2017/0119904及US/099823

中，其全部之內容以全文引用之方式併入本文中。在一典實施例中，PEG-脂質為US2018/0028664之式III、III-a-1、III-a-2、III-b-1、III-b-2或V之化合物，其內容以全文引用之方式併入本文中。在一典實施例中，PEG-脂質具有US20150376115或US2016/0376224之式II，該兩者之內容以其全文引用之方式併入本文中。在一典實施例中，PEG-DAA結合物可為例如PEG-二月桂基氧基丙基、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基、PEG-二棕櫚基氧基丙基或PEG-二硬脂基氧基丙基。PEG-脂質可為以下中之一或多者：PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕櫚醯基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油醯胺、PEG-二肉豆蔻基甘油醯胺、PEG-二棕櫚醯基甘油醯胺、PEG-二硬脂基甘油醯胺、PEG-膽固醇(1-[8'-(膽甾-5-烯-3[β]-氧基)甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺甲醯基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB (3,4-二十四烷氧基苯甲基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)乙醚)及1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一典實施例中，PEG-脂質包含PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一典實施例中，PEG-脂質包含選自以下之結構：



及



。

[0184] 在一些實施例中，亦可使用與除PEG外之分子結合的脂質代替PEG-脂質。舉例而言，代替PEG-脂質或除PEG-脂質以外，可使用聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物、聚醯胺-脂質結合物(諸如ATTA-脂質結合物)及陽離子聚合物脂質(GPL)結合物。

[0185] 例示性結合脂質，亦即PEG-脂質、(POZ)-脂質結合物、ATTA-脂質結合物及陽離子聚合物脂質描述於WO2019051289A9之表2中所列出之PCT及US專利申請案中，其全部之內容以全文引用之方式併入本文中。

[0186] 在一些實施例中，PEG或結合脂質可佔脂質奈米粒子中存在的總脂質之0-20% (mol)。在一些實施例中，PEG或結合脂質含量為脂質奈米粒子中存在的總脂質之0.5-10%或2.5% (mol)。可離子化脂質、非陽離子脂質、固醇及PEG/結合脂質之莫耳比可視需要變化。舉例而言，脂質粒子可包含：按組合物之莫耳或總重量計30-70%之可離子化脂質；按組合物之莫耳或總重量計0-60%之膽固醇；按組合物之莫耳或總重量計0-30%之非陽離子脂質；及按組合物之莫耳或總重量計1-10%之結合脂質。較佳地，組合物包含：按組合物之莫耳或總重量計30-40%之可離子化脂質；按組合物之莫耳或總重量計40-50%之膽固醇；及按組合物之莫耳或總重量計10-20%之非陽離子脂質。在一些其他實施例中，組合物為：按組合物之莫耳或總重量計50-75%之可離子化脂質；按組合物之莫耳或總重量計20-40%之膽固醇；及按組合物之莫耳或總重量計5至10%之非陽離子脂質；及按組合物之莫耳或總重量計1-10%之結合脂質。組合物

可含有：按組合物之莫耳或總重量計60-70%之可離子化脂質；按組合物之莫耳或總重量計25-35%之膽固醇；及按組合物之莫耳或總重量計5-10%之非陽離子脂質。組合物亦可含有按組合物之莫耳或總重量計至多90%之可離子化脂質及按組合物之莫耳或總重量計2至15%之非陽離子脂質。調配物亦可為例如包含以下之脂質奈米粒子調配物：按組合物之莫耳或總重量計8-30%之可離子化脂質、按組合物之莫耳或總重量計5-30%之非陽離子脂質及按組合物之莫耳或總重量計0-20%之膽固醇；按組合物之莫耳或總重量計4-25%之可離子化脂質、按組合物之莫耳或總重量計4-25%之非陽離子脂質、按組合物之莫耳或總重量計2至25%之膽固醇、按組合物之莫耳或總重量計10至35%之結合脂質及按組合物之莫耳或總重量計5%之膽固醇；或按組合物之莫耳或總重量計2-30%之可離子化脂質、按組合物之莫耳或總重量計2-30%之非陽離子脂質、按組合物之莫耳或總重量計1至15%之膽固醇、按組合物之莫耳或總重量計2至35%之結合脂質及按組合物之莫耳或總重量計1-20%之膽固醇；或甚至按組合物之莫耳或總重量計至多90%之可離子化脂質及按組合物之莫耳或總重量計2-10%之非陽離子脂質；或甚至按組合物之莫耳或總重量計100%之陽離子脂質。在一些實施例中，脂質粒子調配物包含莫耳比為50:10:38.5:1.5之可離子化脂質、磷脂、膽固醇及PEG化脂質。在一些其他實施例中，脂質粒子調配物包含莫耳比為60:38.5:1.5之可離子化脂質、膽固醇及PEG化脂質。

【0187】 在一些實施例中，脂質粒子包含可離子化脂質、非陽離子脂質(例如磷脂)、固醇(例如膽固醇)及PEG化脂質，其中可離子化脂質之脂質莫耳比在20至70莫耳%範圍內，其中目標為40-60；非陽離子脂質之莫耳百分比在0至30範圍內，其中目標為0至15；固醇之莫耳百分比在20

至70範圍內，其中目標為30至50；且PEG化脂質之莫耳百分比在1至6範圍內，其中目標為2至5。

【0188】 在一些實施例中，脂質粒子包含莫耳比為50:10:38.5:1.5之可離子化脂質/非陽離子脂質/固醇/結合脂質。

【0189】 在一態樣中，本發明提供包含磷脂、卵磷脂、磷脂醯膽鹼及磷脂醯乙醇胺之脂質奈米粒子調配物。

【0190】 在一些實施例中，亦可包括一或多種額外化合物。彼等化合物可分開投與，或該等額外化合物可包括在本發明之脂質奈米粒子中。換言之，脂質奈米粒子除核酸外亦可含有其他化合物，或至少含有不同於第一核酸之第二核酸。在不受限制之情況下，其他額外化合物可選自由以下組成之群：小或大有機或無機分子、單醣、雙醣、三醣、寡醣、多醣、肽、蛋白質、肽類似物及其衍生物、肽模擬物、核酸、核酸類似物及衍生物、由生物材料製成之萃取物或其任何組合。

【0191】 在一些實施例中，LNP係藉由添加靶向域而導引至特定組織。舉例而言，生物配體可呈現於LNP表面上以增強與呈現同源受體之細胞的相互作用，由此驅動與其中細胞表現受體之組織的結合及向組織遞送運載物。在一些實施例中，生物配體可為驅動遞送至肝臟的配體，例如呈現GalNAc之LNP引起將核酸運載物遞送至呈現去唾液酸糖蛋白受體(ASGPR)之肝細胞。Akinc等人*Mol Ther* 18(7):1357-1364 (2010)之工作教示三價GalNAc配體與PEG-脂質結合(GalNAc-PEG-DSG)以產生依賴於用於可觀測的LNP運載物作用之ASGPR的LNP(參見例如Akinc等人2010之圖6，同前文獻)。其他呈現配體之LNP調配物，例如併入葉酸、運鐵蛋白或抗體，在以下中論述：WO2017223135 (其以全文引用的方式併入本

文中)，以及其中使用之參考文獻，即Kolhatkar等人, Curr Drug Discov Technol. 2011 8:197-206；Musacchio及Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412；Yu等人, Mol Membr Biol. 2010 27:286-298；Patil等人, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25:1-61 ；Benoit等人, Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714；Zhao等人, Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:309-319；Akinc等人, Mol Ther. 2010 18:1357-1364；Srinivasan等人, Methods Mol Biol. 2012 820:105-116；Ben-Arie等人, Methods Mol Biol. 2012 757:497-507；Peer 2010 J Control Release. 20:63-68；Peer等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:4095-4100；Kim等人, Methods Mol Biol. 2011 721:339-353；Subramanya等人, Mol Ther. 2010 18:2028-2037；Song等人, Nat Biotechnol. 2005 23:709-717；Peer等人, Science. 2008 319:627-630；及Peer及Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133。

【0192】 在一些實施例中，藉由向包含傳統組分(諸如可離子化陽離子脂質、兩親媒性磷脂、膽固醇及聚(乙二醇) (PEG)脂質)之調配物中添加選擇性器官靶向(Selective ORgan Targeting；SORT)分子來選擇LNP之組織特異性活性。Cheng等人Nat Nanotechnol 15(4):313-320 (2020)之教示內容表明，添加補充性「SORT」組分隨著SORT分子之百分比及生理特性變化而精確地改變活體內RNA遞送概況且介導組織特異性(例如，肺、肝臟、脾臟)基因遞送及編輯。

【0193】 在一些實施例中，LNP包含可生物降解之可離子化脂質。在一些實施例中，LNP包含(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱

為(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)，或另一可離子化脂質。參見例如WO2019/067992、WO/2017/173054、WO2015/095340及WO2014/136086以及其中所提供之參考文獻之脂質。在一些實施例中，在LNP脂質之情形下，術語陽離子及可離子化可互換，例如其中可離子化脂質視pH而定為陽離子型的。

【0194】在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可在數十奈米與數百奈米之間，例如藉由動態光散射(DLS)所量測。在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可為約40 nm至約150 nm，諸如約40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm。在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可為約50 nm至約100 nm、約50 nm至約90 nm、約50 nm至約80 nm、約50 nm至約70 nm、約50 nm至約60 nm、約60 nm至約100 nm、約60 nm至約90 nm、約60 nm至約80 nm、約60 nm至約70 nm、約70 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、約80 nm至約100 nm、約80 nm至約90 nm、或約90 nm至約100 nm。在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可為約70 nm至約100 nm。在一特定實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可為約80 nm。在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑可為約100 nm。在一些實施例中，LNP調配物之平均LNP直徑在約1 mm至約500 mm、約5 mm至約200 mm、約10 mm至約100 mm、約20 mm至約80 mm、約25 mm至約60 mm、約30 mm至約55 mm、約35 mm至約50 mm、或約38 mm至約42 mm

之範圍內。

【0195】 在一些情況下，LNP可為相對均質的。多分散性指數可用於指示LNP之均質性，例如脂質奈米粒子之粒徑分佈。小(例如小於0.3)多分散性指數一般指示窄粒徑分佈。LNP之多分散性指數可為約0至約0.25，諸如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些實施例中，LNP之多分散性指數可為約0.10至約0.20。

【0196】 LNP之ζ電位可用於指示組合物之動電位。在一些實施例中，ζ電位可描述LNP之表面電荷。具有相對較低電荷(正或負)之脂質奈米粒子通常為合乎需要的，因為帶更高電荷之物種可能不合需要地與細胞、組織及體內之其他要素相互作用。在一些實施例中，LNP之ζ電位可為約-10 mV至約+20 mV、約-10 mV至約+15 mV、約-10 mV至約+10 mV、約-10 mV至約+5 mV、約-10 mV至約0 mV、約-10 mV至約-5 mV、約-5 mV至約+20 mV、約-5 mV至約+15 mV、約-5 mV至約+10 mV、約-5 mV至約+5 mV、約-5 mV至約0 mV、約0 mV至約+20 mV、約0 mV至約+15 mV、約0 mV至約+10 mV、約0 mV至約+5 mV、約+5 mV至約+20 mV、約+5 mV至約+15 mV、或約+5 mV至約+10 mV。

【0197】 蛋白質及/或核酸之囊封效率描述在製備後囊封或以其他方式與LNP結合之蛋白質及/或核酸相對於提供之初始量的量。囊封效率宜較高(例如接近100%)。囊封效率可例如藉由比較在用一或多種有機溶劑或清潔劑使脂質奈米粒子破裂之前及之後，含有脂質奈米粒子之溶液中蛋白質或核酸的量來量測。陰離子交換樹脂可用於量測溶液中游離蛋白質或

核酸之量。螢光可用於量測溶液中游離蛋白質及/或核酸之量。對於本文所描述之脂質奈米粒子，蛋白質及/或核酸之囊封效率可為至少50%，例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，囊封效率可為至少80%。在一些實施例中，囊封效率可為至少90%。在一些實施例中，囊封效率可為至少95%。

【0198】 LNP可視情況包含一或多種包衣。在一些實施例中，LNP可調配成具有包衣之膠囊、膜或錠劑。包括本文所描述之組合物的膠囊、膜或錠劑可具有任何適用的大小、抗張強度、硬度或密度。

【0199】 LNP之額外例示性脂質、調配物、方法及表徵由WO2020061457教示，該文獻以其全文引用之方式併入本文中。亦參見：Hou等人Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021). https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0。

【0200】 在一些實施例中，使用脂染胺MessengerMax (Thermo Fisher)或TransIT-mRNA轉染試劑(Mirus Bio)進行活體外或離體細胞脂質體轉染。在某些實施例中，使用GenVoy_ILM可離子化脂質混合物(Precision NanoSystems)調配LNP。在某些實施例中，使用2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-KC2-DMA)或二亞油基甲基-4-二甲基胺基丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)調配LNP，其調配物及活體內用途教示於Jayaraman等人Angew Chem Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012)中，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0201】 針對遞送CRISPR-Cas系統(例如Cas9-gRNA RNP、gRNA、Cas9 mRNA之LNP調配物)最佳化之LNP調配物描述於

WO2019067992及WO2019067910中，該兩個文獻以引用之方式併入。

[0202] 適用於遞送核酸之額外特異性LNP調配物描述於US8158601及US8168775中，該兩個文獻以引用之方式併入，該等調配物包括用於以名稱ONPATTRO出售的帕替斯喃(patisiran)中的調配物。

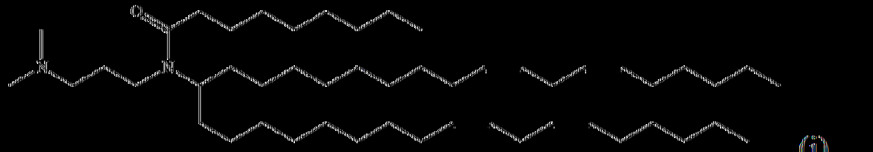
[0203] 本文所描述之DNA與LNP之例示性給藥可包括約0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10或100 mg/kg (DNA)。

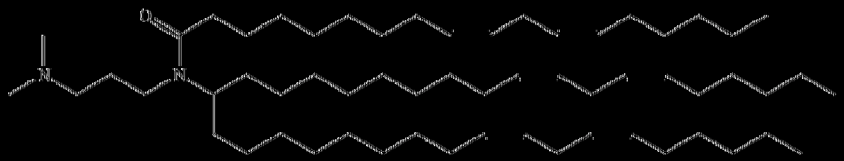
[0204] 涵蓋以下實施例：

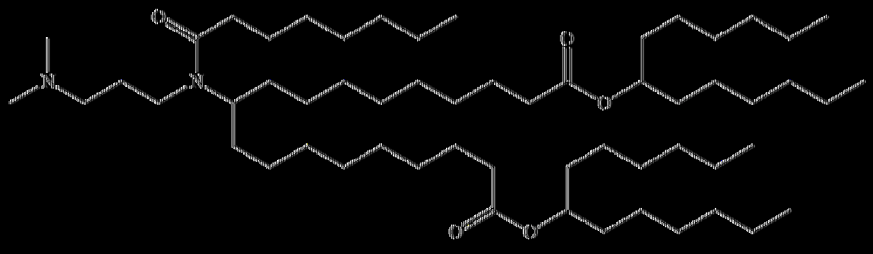
A.一種脂質奈米粒子(LNP)，其包含本文所描述之TDSC構築體、序列或組合物。

B.如實施例A之LNP，其包含陽離子脂質。

C.如實施例B之LNP，其中該陽離子脂質具有根據以下之結構：


(i)、


(ii)或


(iii)。

D.如實施例A至C中任一項之LNP，其進一步包含：一或多種中性脂質，例如DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE、SM、類固醇，例如膽固醇；及/或一或多種聚合物結合脂質，例如聚乙二醇化脂質，例如PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer或PEG二烷氧基

丙基胺基甲酸酯。

【0205】 在實施例中，包含本文所描述之TDSC之LNP製劑可藉由具有靶向效應物之表面裝飾靶向所需細胞類型。此類靶向效應物包括例如結合目標細胞之細胞特異性受體配體；針對目標細胞之抗體或其他結合劑；中心蛋白(centryin)；細胞穿透肽；實現胞內體逃逸之肽(例如GALA、KALA)。關於綜述，參見例如Tai及Gao. 2017. Adv Drug Deliv Rev. 110-111:157-168之表1及2。

【0206】 在實施例中，包含本文所描述之TDSC之LNP製劑可與佐劑一起共投與，例如與佐劑一起在相同製劑中共同遞送。

【0207】

投與途徑

藉由任何適合途徑將包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸引入細胞、組織或個體中。

【0208】 向目標細胞或組織(例如離體)投與可藉由此項技術中已知之方法進行，諸如轉染，例如使用試劑(例如脂質體、磷酸鈣)或物理手段(例如電穿孔、基因槍、顯微注射、微流體流體剪切、細胞擠壓)暫時性或穩定轉染。其他方法例如描述於Rad等人2021. Adv. Mater. 33:2005363中，該文獻以引用的方式併入本文中。

【0209】 向個體(例如哺乳動物，例如人類個體)投與可藉由以下來進行：非經腸(例如靜脈內、肌肉內、腹膜內、皮下或顱內)途徑；藉由局部投與、透皮投與或經皮投與。其他合適途徑包括經口、經直腸、經黏膜、鼻內、吸入(例如經由氣溶膠)、經頰(例如舌下)、經陰道、鞘內、眼內、透皮、內皮內、子宮內(或卵中)、胸膜內、腦內、關節內、局部、淋

巴內。亦包括直接組織或器官注射(例如至肝、眼睛、骨骼肌、心肌、隔膜、肌肉或腦)。

【0210】

應用

包含本文所描述之dsDNA之TDSC或核酸可用於針對個體(例如人類或非人類動物)之治療性或健康應用中。儘管本文提供之醫藥組合物的描述大體上針對適合於向人類投與之醫藥組合物，但熟習此項技術者應瞭解，此類組合物一般適合於向任何其他動物投與。個體可為任何動物，例如哺乳動物，例如人類或非人類哺乳動物。在實施例中，個體為脊椎動物(例如哺乳動物、鳥類、魚類、爬蟲動物或兩棲動物)。在實施例中，個體為人類。在實施例中，該個體為非人類哺乳動物。在實施例中，個體為非人類哺乳動物，諸如非人類靈長類動物(例如猴、猿)、有蹄類動物(例如牛、水牛、綿羊、山羊、豬、駱駝、駱馬、羊駝、鹿、馬、驢)、肉食動物(例如狗、貓)、嚙齒動物(例如大鼠、小鼠)或兔類動物(例如兔)。在實施例中，個體為鳥類，諸如禽類分類雞形目(例如雞、火雞、雉雞、鵪鶉)、雁形目(例如鴨、鵝)、古頜總目(例如鴕鳥、鴯鶓)、鴿形目(例如鴿子(pigeon)、白鴿(dove))或鸚形目(例如鸚鵡)。在實施例中，個體為無脊椎動物，諸如節肢動物(例如昆蟲、蛛形綱動物、甲殼動物)、線蟲、環節動物、蠕蟲或軟體動物。

【0211】在一些實施例中，本文所描述之DNA係以約0.1-100 mg/kg DNA之劑量提供。

【0212】在一些實施例中，本文所描述之TDSC賦予效應物之生物效應，例如在宿主細胞、組織或個體上表現治療性多肽超過以下時段：至

少2、3、4、5、6天或一週；至少8、9、10、12、14天或兩週；至少16、18、20天或3週；至少22、24、25、27、28天或一個月；至少2個月、3個月、4個月、5個月、6個月或更久；一週至6個月之間、1個月至6個月之間、3個月至6個月之間。

【0213】 在一些實施例中，本文所描述之TDSC賦予效應物之生物效應，例如在宿主細胞、組織或個體上表現治療性多肽超過宿主細胞之至少1次細胞分裂之時段。

【0214】 在實施例中，本文所描述之TDSC可用於將效應物(例如本文所描述之效應物)遞送至細胞、組織或個體。

【0215】 在實施例中，本文所描述之TDSC可用於調節(例如增加或降低)細胞、組織或個體中之生物參數。目標細胞、組織或個體中個體基因之基因表現的生物參數可增加或降低。

【0216】 在實施例中，本文所描述之TDSC可用於藉由向此類細胞、組織或個體投與本文所描述之TDSC來治療有需要之細胞、組織或個體。

【0217】 在實施例中，TDSC將效應物遞送至選自以下之細胞中：淋巴球(例如T細胞或單核球)、癌細胞(例如骨肉瘤細胞)、HEK293細胞、肝細胞或表皮細胞(例如角質細胞)。

【0218】

實例

【0219】

實例1：線性TDSC之質體模板之設計及組裝

此實例描述如何產生經化學修飾之線性TDSC構築體之質體模板。在

此實例中，設計具有以下特定序列組分之構築體模板：

- 啟動子Ef1a：

5'ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggg
ggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcg
tgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgt
tctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctc
tttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgag
cttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttga
gttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgc
tgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtc
ttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggccc
gtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacggg
ggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgg
gcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctg
cagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaagg
aaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggca
cctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtt
tccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttg
ccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcagg
tgtcgtga-3' (SEQ ID NO: 37)

- 編碼模型/標記蛋白(mCherry)之效應物序列：

5'atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggt
gcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccta

cgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccctgcccttcgcctgggacatc
ctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttg
aagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgac
cgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaact
tcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgta
ccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccact
acgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgt
caacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccg
agggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3' (SEQ ID NO: 38)

【0220】 視情況，構築體亦可包括NTS或維持序列中之一者或兩者，例如：

- NTS：SV40強化子：5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3' (SEQ ID NO: 1)
- 維持序列：人類干擾素-β MAR

5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttattttttacatataaa
tatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggt
cacttacata3' (SEQ ID NO: 121)

- 聚A位點：

5'ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaa
ggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattct
attctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgct
ggggatgcggtgggctctatgg3' (SEQ ID NO: 122)

【0221】 使用標準DNA設計操縱軟體，設計具有此等元件之質體模

板。經由金門組裝，按照公開之方案及可商購的套組進行組裝(Marillonnet及Grützner. 2020. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. Current Protocols in Molecular Biology.130:e115; Golden Gate Assembly Protocol for Using NEB Golden Gate Assembly Mix (E1600) (New England Biolabs)。使用一系列引子進行設計的構築體之金門組裝，該等引子長度為120 bp，其中前30 bp匹配相關相鄰片段，接著60 bp編碼新的序列，且最後30 bp與目標序列黏著。將片段組裝成最終構築體設計(NEB Golden Gate Assembly Kit)，且根據製造商方案，藉由桑格定序(Sanger Sequencing) (Sigma Aldrich)確認序列。

【0222】

***實例2：質體DNA轉化為未經修飾之*TDSC**

此實例描述產生包含不具有經化學修飾之核苷酸之線性dsDNA的TDSC。在此實例中，線性dsDNA由實例1中之質體，使用PrimeSTAR® Max DNA聚合酶根據製造商方案(Takara, R045Q)製成。dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0223】

***實例3：質體DNA轉化為僅有義股或反義股經化學修飾之*TDSC**

此實例描述產生包含僅有義股或反義股具有化學修飾之線性dsDNA的TDSC。實例1中之質體構築體按照Minev等人, 2019, *Rapid in vitro production of single stranded DNA*, Nucleic Acids Research, 第47卷, 第

22期:11956-11962 (其以引用的方式併入本文中)中之方法轉化為線性ssDNA。簡言之，將經化學修飾之核苷酸5-甲基胞嘧啶(5mC)與標準腺嘌呤(dATP)、鳥嘌呤(dGTP)及胸腺嘧啶(dTTP)混合，產生dNTP混合物用於PCR以產生經化學修飾之股。用攜帶甲醇反應性聚合物之正向引子之PCR產生使得能夠在變性條件下選擇性沈澱經化學修飾之股的加標籤的擴增子。線性ssDNA (有義股或反義股)之濃度藉由Qubit™ ssDNA分析套組，根據製造商方案(Thermo Fisher, Q10212)來測定。

【0224】 藉由將具有對應引子之ssDNA及具有未經修飾之核苷酸之PCR混合物一起培育來產生互補股。dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0225】

***實例4：質體DNA轉化為有義股及反義股兩者經化學修飾之*TDSC**

此實例描述產生包含在有義股及反義股兩者中含有經化學修飾之核苷酸之線性dsDNA的TDSC。藉由將5-甲基胞嘧啶(5mC)與dATP、dGTP及dTTP混合產生dNTP混合物用於PCR，將實例1中之質體構築體轉化為經化學修飾之線性dsDNA。dNTP混合物與PrimeSTAR® Max DNA聚合酶根據製造商方案(Takara, R045Q)一起使用。dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0226】

實例5：將包含經化學修飾之核苷酸之核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC之末端

此實例描述產生包含在構築體兩端含有經化學修飾之核苷酸之實例2-4中之線性dsDNA的TDSC。

【0227】 具有以下序列之定製轉接子設計成包括經化學修飾之核苷酸：5'-**C*C*C*GAGGCGGUACGAGC**CACACGTACTAC**GCTCGTACCGCCUC*G*G*GT**-3' (SEQ ID NO: 85) (*指示硫代磷酸酯鍵，**粗體**核苷酸為互補的)。來自實例2-4中之任一者之線性dsDNA用NEBNext® Ultra™ II末端修復/加dA尾模組，根據製造商方案(New England Biolabs, E7546)處理。此套組用於將非模板化腺嘌呤添加至線性dsDNA中有義股及反義股兩者之3'端。接下來，使用NEBNext® Ultra™ II接合模組根據製造商方案(New England Biolabs, E7595)，將定製轉接子與加A尾dsDNA接合。為了移除在各端不具有轉接子分子之dsDNA構築體，dsDNA根據製造商方案(New England Biolabs, M0545S)用核酸外切酶VIII處理，截短。為了移除不含硫代磷酸酯鍵之剩餘轉接子碎片，根據製造商方案將dsDNA與USER®酶一起培育以移除轉接子中之尿嘧啶核苷酸(New England Biolabs, M5505)。接著，dsDNA用綠豆核酸酶處理以自轉接子移除單股DNA懸垂物，且產生包含在末端具有硫代磷酸酯修飾之平端dsDNA的TDSC(New England Biolabs, M0250)。

【0228】 dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0229】

實例6：將包含環結構之核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC之末端

此實例描述產生包含在構築體之各端具有環結構之實例2-4中之線性dsDNA的TDSC。

【0230】 具有以下序列之定製轉接子設計成包括經化學修飾之核苷酸：5'-**CCCGGGCGGAAGAGC**CACACGTACTAC**GCTCTTCCGCCCGGG**T-3' (SEQ ID NO: 93) (**粗體**核苷酸為互補的)。來自實例2-4中之任一者之線性dsDNA用NEBNext® Ultra™ II末端修復/加dA尾模組，根據製造商方案(New England Biolabs, E7546)處理。此套組用於將非模板化腺嘌呤添加至線性dsDNA中有義股及反義股兩者之3'端。接下來，使用NEBNext® Ultra™ II接合模組根據製造商方案(New England Biolabs, E7595)，將定製轉接子與加A尾dsDNA接合。為了移除在各端不具有轉接子分子之dsDNA構築體，dsDNA根據製造商方案(New England Biolabs, M0545S)用核酸外切酶VIII處理，截短。

【0231】 dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0232】

實例7：將包含Y-轉接子之核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC之末端

此實例描述產生包含在構築體之各端具有Y-轉接子之實例2-4中之任一者中之線性dsDNA的TDSC。

【0233】 具有以下序列之定製轉接子設計成包括經化學修飾之核苷酸：5'-**CCCGGGCGGA***C*A*G*C*A*CUC*A*C*G*A*C*TCCGCCCGGGT**-3' (SEQ ID NO: 89) (*指示硫代磷酸酯鍵，**粗體**核苷酸為互補的)。來自實例2-4中之任一者之線性dsDNA用NEBNext® Ultra™ II末端修復/加dA尾模組，根據製造商方案(New England Biolabs, E7546)處理。此套組用於將非模板化腺嘌呤添加至線性dsDNA中有義股及反義股兩者之3'端。接下來，使用NEBNext® Ultra™ II接合模組根據製造商方案(New England Biolabs, E7595)，將定製轉接子與加A尾dsDNA接合。為了移除在各端不具有轉接子分子之dsDNA構築體，dsDNA根據製造商方案(New England Biolabs, M0545S)用核酸外切酶VIII處理，截短。為了將環轉化為線性ssDNA股，根據製造商方案將dsDNA與USER®酶一起培育以移除轉接子中之尿嘧啶核苷酸(New England Biolabs, M5505)。

【0234】 dsDNA使用NucleoSpin® Gel及PCR清除，根據製造商方案(Takara, 740609)純化，且dsDNA之濃度藉由寬廣範圍Qubit™ 1X dsDNA根據製造商方案(Thermo Fisher, Q33265)來測定。

【0235】

實例8：用LNP調配TDSC

此實例描述如何用脂質奈米粒子(LNP)調配如先前實例中所描述製備之構築體。

【0236】 經由微流體裝置，根據Chen等人2012. J Am Chem Soc.第134卷, 第16期:6948-6951之方法，將核酸構築體與脂質組分合併。簡言之，根據標準微影程序(McDonald及Whitesides. 2002. Accounts Chem Res第35卷, 第7期:491-499)在聚二甲基矽氧烷(PDMS)中製造微流體裝

置。將通常含有陽離子脂質、膽固醇、輔助脂質、聚乙二醇修飾之脂質的脂質組分以及促進靶向部分結合的脂質(視情況選用)合併且溶解於90%乙醇中。將核酸構築體溶解於緩衝液中。將核酸溶液、脂質溶液及磷酸鹽緩衝液鹽水(PBS)注射至微流體裝置中。使用MWCO為3.5kD之膜，將新鮮製備之LNP相對於PBS緩衝液進行透析，以移除乙醇且交換緩衝液。

【0237】 就有效直徑、多分散性及ζ電位而言，使用動態光散射(DLS) (ZetaPALS, Brookhaven Instruments, NY, 15-mW雷射，入射光束676 nm)表徵LNP；且藉由溶解粒子及使用高靈敏度(HS)及寬廣範圍(BR) Quant-iT™ 1X dsDNA分析套組，根據製造商方案(ThermoFisher Scientific, Q33232)來測定總核酸濃度。

【0238】

實例9：評定活體外細胞中之表現及先天性免疫反應

此實例描述如何測試基因表現，以及如何測定TDSC對於培養細胞之先天性免疫反應的作用。

【0239】 如上文實例2-7製備實驗TDSC構築體。經由電穿孔將多個濃度下之構築體及對照投與至選自HEK、角質細胞、巨噬細胞、T細胞及上皮細胞之細胞。可平行運行未處理對照樣本。在電穿孔之後，將細胞移至最終培養容器中。將用LNP調配之構築體直接投與至孔盤中之細胞中。

【0240】 為了測定編碼螢光報導子mCherry之構築體之表現，在流動式細胞量測分析之前，細胞首先用PBS洗滌。所有流動式細胞測量術均在MACSQuant VYB上藉由Miltenyi進行。為了偵測mCherry訊號，使用黃色雷射(波長561 nm)用於激發，且使用615/620 nm發射過濾器。各樣本記錄20,000個事件，且使用Flowjo V.9.0軟體分析資料。首先在FSC-A及

SSC-A圖上對細胞進行閘控以移除細胞碎片。將群體進一步繪製在FSC-A及FSC-H圖上以限制單一細胞群體。最後，使用螢光訊號表現與非表現細胞之間的二變量圖來測定表現細胞之百分比。使用表現細胞之分佈來測定各細胞內之表現量。在多個時間點進行表現分析。

【0241】 對細胞進行qPCR以測定測試細胞中IFN-b之RNA含量，如Jakobsen等人2013. Proc Natl Acad Sci USA第110卷, 第48期:E4571-80中所描述。簡言之，qPCR中使用之探針-引子組為人類IFN-b (ThermoFisher, Hs01077958_s1)及b-肌動蛋白(ThermoFisher, Hs00357333_g1)。使用預製備Taqman分析及RNA-至-Ct一步驟套組(Applied Biosystems)進行分析。在MX3005系統(Stratagene)上進行qPCR。將RNA表現標準化為b-肌動蛋白及相關未處理對照組。資料陳述為來自生物重複之平均值±SEM。

【0242】 根據製造商方案對於細胞上清液進行ELISA以測定IFN-b之分泌含量。

【0243】

實例10.測定包含封閉端之TDSC之核酸外切酶抗性

此實例描述如何測試包含封閉端之TDSC(例如接合轉接子的線性dsDNA構築體)是否為核酸外切酶III (M0206，New England Biolabs Inc.)抗性。TDSC緊鄰非核酸酶對照進行測試。非核酸酶對照含有與所關注TDSC具有相同序列之DNA，不同之處在於其進行用於將核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC，但未向混合物中添加轉接子寡核苷酸之轉接子接合方案。在50 µL中，每5 µg DNA添加1 µL核酸外切酶III (在100單位/uL之起始濃度下)。將管充分混合且短暫離心。使管在熱循環儀上在

37℃下運行1小時，且在70℃下熱滅活30分鐘。

【0244】 經由Nucleospin® Gel及PCR清除套組(目錄號740609，Macherey-Nagel)，使用真空歧管，根據製造商方案純化樣本。簡言之，將溶離緩衝液溫熱至70℃。將2×體積之NTI結合緩衝液添加至1×體積之Exo III處理的DNA中。將樣本混合，直至均勻分佈，且靜置於室溫下5分鐘。將真空歧管上之管柱固定，打開閥門，且打開真空。將375 µL DNA-NTI混合物添加至2×管柱中且允許完全穿過各管柱。添加700 µL NTC洗滌緩衝液，兩次。自真空歧管移出管柱且置放於收集管中。在11,000 xg下離心組裝件1分鐘。將管柱置放於新的低結合微型離心管中，添加25 µL預溫熱緩衝液，且在70℃下培育組裝件5 min。在11,000 xg下離心組裝件1 min。重複培育及溶離步驟第二次。收集的DNA藉由Qubit 4螢光計(Q33226, Thermo Fisher Scientific)上之dsDNA BR Qubit (Q32850, Thermo Fisher Scientific)，根據製造商方案定量。

【0245】 以每孔16 ng DNA之量，將樣本負載至個別孔中之E-Gel EX, 1%瓊脂糖凝膠(G402021, Thermo Fisher Scientific)中。將2 µl梯(10488090, Thermo Fisher Scientific)負載至凝膠之最左側泳道中。根據製造商方案(G8100，G8200，Thermo Fisher Scientific)，使凝膠穿過E-Gel Power Snap電泳系統。在運行凝膠之後，在對應於全長DNA加封閉轉接子序列之分子量下，核酸外切酶抗性TDSC為可見的。若凝膠中之彼泳道中存在之至少95%之產物對應於全長TDSC，則TDSC在此分析中將視為核酸外切酶抗性。

【0246】

實例11.測定包含開放端(例如兩個開放端)之TDSC之核酸外切酶抗性

此實例描述如何測試包含開放端之TDSC(例如接合轉接子的線性dsDNA構築體)是否為核酸外切酶III (M0206，New England Biolabs Inc.)抗性。TDSC緊鄰非核酸酶對照進行測試。非核酸酶對照含有與所關注TDSC具有相同序列之DNA，不同之處在於其進行用於將核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC，但未向混合物中添加轉接子寡核苷酸之轉接子接合方案。在20 µl反應中，每200 ng DNA (在10 ng/µl)下添加2單位核酸外切酶III。將管充分混合且短暫離心。在熱循環儀上在37℃下運行管30 min。

【0247】 以每孔20 ng DNA之量，將樣本負載至個別孔中之E-Gel EX, 1%瓊脂糖凝膠(G402021, Thermo Fisher Scientific)中。將2 µl梯(10488090, Thermo Fisher Scientific)負載至凝膠之最左側泳道中。根據製造商方案(G8100，G8200，Thermo Fisher Scientific)，使凝膠穿過E-Gel Power Snap電泳系統。在運行凝膠之後，在對應於全長DNA加封閉轉接子序列之分子量下，核酸外切酶抗性TDSC為可見的。若凝膠中之彼泳道中存在之至少95%之產物對應於全長TDSC，則TDSC在此分析中將視為核酸外切酶抗性。

【0248】 對於四個樣本進行此實例中之核酸外切酶III消化方案：對照(未經修飾) TDSC，稱為「Ct」；在各股中之各自5'及3'端包含6個硫代磷酸酯鍵之TDSC，稱為「6a」(圖7B中所繪示)；在各股中之各自5'及3'端包含3個硫代磷酸酯鍵之TDSC，稱為「3a」(圖7C中所繪示)；及在各端包含相同Y-轉接子，各Y-轉接子在各股末端包含6個硫代磷酸酯鍵之TDSC，稱為「Ya」(圖7D中所繪示)。如圖7A中所顯示，對照DNA「Ct」被消化，而三個硫代磷酸酯修飾之TDSC對核酸外切酶III消化具有

抗性。

【0249】

實例12：製造包含開放端之TDSC

此實例描述如何使用USER (M5505, New England BioLabs)及綠豆核酸酶(M0250, New England BioLabs)處理步驟產生包含開放端(例如包含硫代磷酸酯鍵聯)之TDSC。此方法以包含封閉端之原TDSC開始。原TDSC緊鄰非核酸酶對照進行處理。非核酸酶對照含有與TDSC具有相同序列之DNA，不同之處在於其進行用於將核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC，但未向混合物中添加轉接子寡核苷酸之轉接子接合方案。

【0250】 此等原TDSC樣本首先經由如實例10中所描述之用於確認核酸外切酶III抗性之步驟進行處理。在100 μL中，將3 μL USER酶添加至來自實例10之純化樣本之5 μg DNA中。藉由移除位於環中之尿嘧啶，USER處理打開封閉端以形成Y-轉接子樣結構。在37℃下培育樣本1小時。將1 μL綠豆核酸酶(10 U/μL)添加至各管中。在30℃下培育樣本30 min。綠豆核酸酶降解單股DNA，得到平端TDSC。

【0251】 經由Nucleospin® Gel及PCR清除套組(740609, Macherey-Nagel)，使用真空歧管，根據製造商方案純化樣本。簡言之，將溶離緩衝液溫熱至70℃。將2×體積之NTI結合緩衝液添加至1×體積之USER/MBN處理的DNA中。將樣本混合，直至均勻分佈，且靜置於室溫下5分鐘。將真空歧管上之管柱固定，打開閥門，且打開真空。將DNA-NTI混合物添加至管柱中且允許完全穿過各管柱。添加700 μL NTC洗滌緩衝液，兩次。自真空歧管移出管柱且置放於收集管中。在11,000 xg下離心組裝件1分鐘。將管柱置放於新的低結合管中，添加25 μL預溫熱緩衝液，且在

70℃下培育組裝件5 min。在11,000 xg下離心組裝件1 min。重複培育及溶離步驟第二次。收集的DNA藉由Qubit 4螢光計(Q33226, Thermo Fisher Scientific)上之dsDNA BR Qubit (Q32850, Thermo Fisher Scientific)，根據製造商方案定量。

【0252】 為了確認TDSC之產生，以每孔16 ng DNA之量，將樣本負載至個別孔之E-Gel EX, 1%瓊脂糖凝膠(G402021, Thermo Fisher Scientific)中。將2 μl梯(10488090, Thermo Fisher Scientific)負載至凝膠之最左側泳道中。根據製造商方案(G8100，G8200，Thermo Fisher Scientific)，使凝膠穿過E-Gel Power Snap電泳系統。在運行凝膠之後，在對應於全長DNA加轉接子序列之分子量下，TDSC為可見的。

【0253】

實例13：製造包含Y-轉接子之TDSC

此實例描述如何使用USER (M5505, New England BioLabs)產生開放端形式，以製造包含Y-轉接子端修飾之線性dsDNA構築體之TDSC。此方法以包含封閉端之原TDSC開始。原TDSC緊鄰非核酸酶對照進行測試。非核酸酶對照含有與TDSC具有相同序列之DNA，不同之處在於其進行用於將核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC，但未向混合物中添加轉接子寡核苷酸之轉接子接合方案。

【0254】 此等原TDSC樣本首先經由如實例10中所描述之用於確認核酸外切酶III抗性之步驟進行處理。在100 μL中，將3 μL USER酶添加至來自實例10之純化樣本之5 μg DNA中。在37℃下培育樣本1小時。藉由移除位於環中之尿嘧啶，USER處理打開封閉端以形成Y-轉接子，從而產生包含Y-轉接子末端形式之TDSC。

【0255】 經由Nucleospin® Gel及PCR清除套組(740609, Macherey-Nagel)，使用真空歧管，根據製造商方案純化樣本。簡言之，將溶離緩衝液溫熱至70℃。將2×體積之NTI結合緩衝液添加至1×體積之USER/MBN處理的DNA中。將樣本混合，直至均勻分佈，且靜置於室溫下5分鐘。將真空歧管上之管柱固定，打開閥門，且打開真空。將DNA-NTI混合物添加至管柱中且允許完全穿過各管柱。添加700 µL NTC洗滌緩衝液，兩次。自真空歧管移出管柱且置放於收集管中。在11,000 xg下離心組裝件1分鐘。將管柱置放於新的低結合管中，添加25 µL預溫熱緩衝液，且在70℃下培育組裝件5 min。在11,000 xg下離心組裝件1 min。重複培育及溶離步驟第二次。收集的DNA藉由Qubit 4螢光計(Q33226, Thermo Fisher Scientific)上之dsDNA BR Qubit (Q32850, Thermo Fisher Scientific)，根據製造商方案定量。

【0256】 為了證明產生最終末端形式，在50 µL反應中，每5 µg DNA，小等分試樣之USER處理的DNA用1 µL核酸外切酶III處理。若成功產生最終末端形式，則核酸外切酶III將降解該等分試樣之TDSC。

【0257】 以每孔16 ng DNA之量，將樣本負載至個別孔中之E-Gel EX, 1%瓊脂糖凝膠(G402021, Thermo Fisher Scientific)中。將2 µl梯(10488090, Thermo Fisher Scientific)負載至凝膠之最左側泳道中。根據製造商方案(G8100，G8200，Thermo Fisher Scientific)，使凝膠穿過E-Gel Power Snap電泳系統。在運行凝膠之後，Y調適的TDSC處於對應於全長DNA加轉接子序列之分子量下，而核酸外切酶III處理的Y調適之DNA形式在凝膠上不可見。

【0258】

實例14：用於產生雙股DNA (dsDNA)分子之質體模板之設計及組裝

此實例描述產生dsDNA分子(例如TDSC)之質體模板。在此實例中，設計具有以下特定序列組分之構築體模板。

- 啟動子Ef1a：

5'ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggg ggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcg tgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgt tcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctc tttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgag cttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttga gttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgc tgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtc ttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggccc gtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacggg ggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgg gcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctg cagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaagg aaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggca cctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtt tccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttg ccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcagg tgtcgtga-3' (SEQ ID NO: 37)

- 編碼模型/標記蛋白(mCherry)之效應物序列：

5'atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggt gcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgccccta cgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccctgcccttcgcctgggacatc ctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttg aagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgac cgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaact tcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgta ccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccact acgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgt caacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccg agggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3' (SEQ ID NO: 38)

視情況選用的：

- NTS：SV40強化子：5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3' (SEQ ID NO: 1)
- 維持序列：人類干擾素-β MAR

5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttattttttacatataaa tatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcatttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggt cacttacata3' (SEQ ID NO: 39)

- 第二股模體：AAV2野生型ITR

5'aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc gggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcg cagctgcctgcagg-3' (SEQ ID NO: 26)

【0259】使用標準DNA設計操縱軟體，設計具有此等元件之質體模

板。一旦設計，則自市售供應商(GenScript)訂購質體用作PCR擴增中之模板。

【0260】

實例15：產生具有化學修飾之TDSC

此實例證實製備雙股DNA (dsDNA)分子，例如含有具有化學修飾之胞嘧啶，諸如5-甲醯基-2'-脫氧胞嘧啶(5-甲醯基胞嘧啶)的TDSC。

【0261】 質體DNA (10 ng/50 μl PCR反應)用作使用KOD聚合酶(710864, Sigma Aldrich)或KOD Xtreme (KODX)聚合酶(719753, Sigma Aldrich)之PCR擴增的模板。亦可使用其他可商購的聚合酶。將使用之產物型式分離成其組成性組分，而非呈主混合物格式，以確保精確比率之經修飾之核苷酸與標準dNTP。各酶之PCR反應條件包括：

a. 對於KOD酶而言，最終濃度為2 mM之$MgSO_4$。

b. 100 mM dNTP溶液組(N0446, New England Biolabs)，最終濃度為200 μM。

c. 以各種比率添加經修飾之去氧核苷三磷酸(例如5-甲醯基-dCTP，N-2064，Trilink Biotechnologies)與其同源dNTP，總計為總共200 μM (亦即，200 μM dATP、200 μM dCTP、200 μM dTTP及200 μM dGTP)。因此，針對25%併入設計之反應將為50 μM經修飾之核苷酸及150 μM未經修飾之核苷酸。

d. 正向及反向引子，最終濃度為300 μM。

【0262】 對於共價封閉TDSC之合成而言，引子含有用於改良接合效率之磷酸酯基或TelN識別序列。

【0263】 對於環狀雙股DNA形式之合成而言，除含有與質體互補之

序列以外，引子含有適用於下游方法之額外序列：

a. 切口酶識別序列；

b. 限制酶識別序列(例如BsaI、KpnI或NheI)，用於在限制酶消化之後在DNA中產生黏端且促進DNA環化；及

c. 額外鹼基(例如5'-CCGTGGTCCTTC-3') (SEQ ID NO: 40)以增加限制酶消化效率。

【0264】 對於所有形式而言，PCR產物均使用標準DNA純化管柱純化。

【0265】 圖8描繪具有包含硫代磷酸酯修飾之末端形式之共價封閉TDSC的產生。對於具有包含硫代磷酸酯修飾之末端形式之TDSC(硫代磷酸酯末端形式)而言，將每反應至多10 μg/50 μL PCR DNA添加至NEBNext Ultra II末端修復/加dA尾緩衝液(8 μL)及酶(3 μL)混合物(E7546L)中，首先在20℃下30 min，接著在65℃下30 min。在冰上短暫冷卻之後，添加NEBNext Ultra II接合模組組分，包括接合混合物(30 μL)、接合增強劑(1 μL)及3 μL含有待接合之DNA轉接子之100 μM溶液。培育此反應物>1小時，但通常過夜。接著，接合的PCR-轉接子溶液藉由Nucleospin Midi管柱純化，藉由Nanodrop定量，且任何未接合的PCR用ExoIII (NEB M0206)在37℃下清除一小時。

【0266】 圖9描繪具有TelN端形式之共價封閉TDSC之產生。對於具有TelN端形式之TDSC而言，在30℃下在含有4 μL 10× ThermoPol緩衝液、2 μL TelN原核端粒酶(M0651, New England Biolabs)之40 μL反應物中培育1 μg PCR DNA 1小時。接著，TelN修飾之DNA藉由Zymo DCC-100管柱純化，藉由Nanodrop定量，且任何未經修飾之PCR在37℃下用

ExoIII (NEB M0206)清除一小時。

【0267】 圖10描繪環狀dsDNA分子之產生。對於環狀dsDNA分子之合成而言，在過夜反應物中，使用對應於限制酶識別序列之限制酶，例如KpnI-HF-V2 (R3142, New England Biolabs)，消化DNA。接著，使用DNA純化管柱純化DNA。消化的DNA使用T3 DNA連接酶(M0317, New England Biolabs)在26℃下環化一小時。非環化的DNA藉由將DNA與T5核酸外切酶(M0663L, New England Biolabs)在37℃下一起培育一小時降解。使用T5核酸外切酶來消化線性dsDNA而非環狀dsDNA。使用DNA純化管柱純化DNA。亦可使用其他類似方法，例如瓊脂糖凝膠純化。

【0268】 使用CRISPR發現套組(DNF-930-K1000CP)，在Agilent 5300片段分析儀上進行所得雙股DNA形式之組成及純度之分析。每天新鮮製備dsDNA入口緩衝液及具有嵌入染料之運行凝膠，同時各月新鮮製備具有礦物油重疊及毛細管調節溶液之標記托盤(marker tray)。根據製造商之說明書製備緩衝液。將環狀雙股DNA樣本稀釋於水中至100 pg/μL之最終濃度。對於各樣本孔而言，將2 μL DNA樣本添加至22 μL稀釋緩衝液(0.1× TE)中，且運行各樣本，具有2-4個重複，其中一個孔用於MDK DNA梯。經由儀器控制器軟體，使用CRISPR發現方法(CRP-910-33)之預設環境運行樣本。

【0269】 使用ProSize資料分析軟體v4.0.2.7分析樣本跡線。dsDNA之峰分析條件設定為如下標準條件：5之『峰寬度(秒)』及50之『最小峰高度(RFU)』、3之額外谷點數，及『谷至谷基線？』打開。手動基線設定為自較低標記-2 min及自較高標記+2 min。在此等條件下藉由軟體自動地偵測峰，且藉由軟體選擇峰寬度，除了其中由於寬廣峰、峰肩或狹窄大

小範圍內之多個峰而需要調整之情況以外。

【0270】 圖11至圖13顯示具有5'胞嘧啶修飾之dsDNA形式之片段分析儀跡線。圖11顯示如上文所描述在使用25% 5-甲醯基胞嘧啶之反應中產生且純化之環狀dsDNA構築體。圖12至圖13顯示如上文所描述在使用25% 5-甲醯基胞嘧啶之反應中產生且純化之具有硫代磷酸酯末端形式(圖12)及TelN端形式(圖13)的線性共價封閉dsDNA構築體。在各跡線中，單峰(用箭頭指示)清楚可見。此等結果指示，可產生且純化多種TDSC形式，包括包含經化學修飾之核苷酸(例如5-甲醯基胞嘧啶)之彼等者。

【0271】

實例16：活體外TDSC基因表現之評定

此實例證明在培養細胞中使用經化學修飾之TDSC，基因表現之偵測及定量。

【0272】 經由脂質轉染(脂質體轉染)投與實驗構築體及對照。根據製造商說明書，在HEKa細胞中使用脂染胺3000轉染試劑(# L3000001, ThermoFisher)，進行DNA之脂質體轉染。1:2:3比率之DNA:P3000:脂染胺3000用於所有DNA構築體及對照。在轉染之前一天，將10,000個細胞預接種於96孔盤之各孔中。當細胞達到大約80至90%匯合時進行轉染。對於96孔盤之各孔而言，首先將3×脂染胺3000稀釋於5 μL Opti-MEM™ I還原血清培養基(#31985070, ThermoFisher)中。將DNA稀釋於5 μL具有2×P3000試劑之Opti-MEM™ I還原血清培養基中。接著，將DNA添加至含有脂染胺3000之Opti-MEM™ I還原血清培養基中，且藉由移液輕輕地混合。在室溫下培育15分鐘之後，將DNA-脂染胺3000複合物以逐滴方式添加至孔之不同區域的目標細胞與完全培養基中。將培養盤前後左右輕輕地

搖動以均勻分佈DNA-脂染胺3000複合物。在轉染之後，在CO_2組織培養培育箱中培育細胞，且在轉染後6至8小時更換培養基。

【0273】 為了測定編碼螢光報導子mCherry之構築體之表現，在流動式細胞量測分析之前，細胞首先用PBS洗滌。所有流式細胞分析技術均在MACSQuant VYB上藉由Miltenyi進行。為了偵測mCherry訊號，使用黃色雷射(波長561 nm)用於激發，且使用615/620 nm發射過濾器。各樣本記錄20,000個事件，且使用Flowjo V.9.0軟體分析資料。首先在FSC-A及SSC-A圖上對細胞進行閘控以移除細胞碎片。將群體進一步繪製在FSC-A及FSC-H圖上以限制單一細胞群體。最後，使用螢光訊號表現與非表現細胞之間的二變量圖來測定表現細胞之百分比。表現細胞之分佈用於測定各細胞內之表現量。在多個時間點進行表現分析。

【0274】 圖14A至圖14B顯示，製造之具有及不具有化學修飾之多種TDSC構築體使得能夠表現報導基因。在HEKa細胞中，具有三個不同結構(具有硫代磷酸酯末端形式之環狀雙股共價封閉TDSC，及具有TelN端形式之共價封閉TDSC)之dsDNA產生可偵測表現之報導蛋白mCherry。其中如實例15中所描述脫氧胞嘧啶至少部分地經5-甲醯基胞嘧啶置換之DNA分子亦保留功能，如藉由類似比例之表現mCherry之細胞所定義。此等結果證實，具有不同末端形式之TDSC可轉錄且產生蛋白質產物，即使在經化學修飾時。

【0275】

實例17：TDSC對於活體外細胞中先天性免疫反應之作用之評定。

此實例描述經化學修飾之dsDNA構築體(例如TDSC)對於培養細胞之先天性免疫反應之作用。

【0276】 如上文實例15中製備實驗構築體，接著如上文實例16中投與至細胞。對細胞進行qPCR以測定一組發炎性細胞介素之RNA含量，該組發炎性細胞介素包括人類IFNL1、CXCL8、TNF、IL17B、IL6、IFNB1、CCL2、IL23、IL17E、CXCL10、CXCL1、CCL5、IL1B、IL5、IL33、IL1A、CXCL2、IL17C及IL18。人類GAPDH用作分析之內源性對照。引子序列可見於隨附表4中。簡言之，根據製造商說明書，使用PicoPure RNA分離套組(ThermoFisher #KIT0204)自細胞萃取mRNA。按照製造商說明書，使用RNA至cDNA EcoDry™預混物(寡dT) (Takara #639542)套組合成cDNA。使用具有來自Life Technologies Corporation之SYBR選擇主混合物之QuantStudio7 Flex即時PCR系統進行分析。將RNA表現標準化為GAPDH，且表述為相對於該方法對照(不具有DNA之脂質體轉染試劑)之倍數變化。

表4.免疫標記之qPCR定量中使用之引子序列。

基因名稱	5'-序列-3'	SEQ ID NO:
h-GAPDH-F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	41
h-GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	42
h-IL6-F	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	43
h-IL6-R	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	44
h-CXCL10-F	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC	45
h-CXCL10-R	GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA	46
h-IL33-F	GCCTGTCAACAGCAGTCTACTG	47
h-IL33-R	TGTGCTTAGAGAAGCAAGATACTC	48
h-IFNL1-F	AACTGGGAAGGGCTGCCACATT	49
h-IFNL1-R	GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT	50
h-IFNB1-F	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC	51
h-IFNB1-R	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA	52
h-CXCL1-F	AGCTTGCCTCAATCCTGCATCC	53
h-CXCL1-R	TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT	54
h-IL1A-F	TGTATGTGACTGCCCAAGATGAAG	123
h-IL1A-R	AGAGGAGGTTGGTCTCACTACC	124
h-CXCL8-F	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	125
h-CXCL8-R	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT	126
h-CCL2-F	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTCC	127
h-CCL2-R	TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG	128
h-CCL5-F	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	129

h-CCL5-R	ACACACTTGGCGGTTCTTTCGG	130
h-CXCL2-F	GGCAGAAAGCTTGTCTCAACCC	131
h-CXCL2-R	CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA	132
h-TNF-F	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	133
h-TNF-R	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC	134
h-IL23A-F	GAGCCTTCTCTGCTCCCTGATA	135
h-IL23A-R	GACTGAGGCTTGGAATCTGCTG	136
h-IL1B-F	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	137
h-IL1B-R	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG	138
h-IL17C-F	GCCCTCAGCTACGACCCAGTG	139
h-IL17C-R	AGCTTCTGTGGATAGCGGTCCT	140
h-IL17B-F	GCTGTGGATGTCCAACAAGAGG	141
h-IL17B-R	TCCTGCATGGTGAAGGGGTTCA	142
h-IL17E-F	AACCGCCACCCAGAGTCCTGT	143
h-IL17E-R	ACAGGCAACGGGCGTGGTACA	144
h-IL5-F	GGAATAGGCACACTGGAGAGTC	145
h-IL5-R	CTCTCCGTCTTTCTTCTCCACAC	146
h-IL18-F	GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG	147
h-IL18-R	CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA	148

【0277】 圖15A至圖15C及圖16A至圖16C顯示HEKa (圖15A至圖15C)及THP1細胞(圖16A至圖16C)對於製造之具有或不具有5-甲醯基胞嘧啶之TDSC的先天性免疫反應。在HEKa及THP1細胞兩者中，具有三種不同結構(具有硫代磷酸酯末端形式之環狀雙股線性TDSC、及具有TelN端之線性TDSC)之dsDNA產生可量測的先天性免疫反應，如藉由可偵測表現之細胞介素IFNB、CXCL10及IL6所定義。對於共價封閉TDSC而言，用5-甲醯基胞嘧啶部分取代胞嘧啶降低HEKa及THP1細胞兩者中之免疫反應，如藉由IFNB、CXCL10及IL6表現降低所定義。此等結果證實，TDSC之兩種末端形式結構及化學修飾(例如5-甲醯基胞嘧啶)之存在可影響對於雙股DNA之先天性免疫反應，同時保留編碼功能蛋白產物之能力。

【0278】 圖17顯示HEKa細胞對於具有硫代磷酸化末端轉接子且在胞嘧啶之碳5 (C-5)位置包含各種修飾之共價封閉TDSC的先天性免疫反應。對於各不同的經化學修飾之dsDNA分子而言，先天性免疫反應可視

化為散佈圖，其中X軸表示干擾素傳訊的降低，定義為標記IFNB及CXCL10相對於包含未經修飾之胞嘧啶之TDSC的平均降低倍數變化，且其中Y軸表示發炎性細胞介素傳訊的降低，定義為標記IL6及TNFa相對於包含未經修飾之胞嘧啶之TDSC的平均降低倍數變化。此等結果證實，在TDSC之胞嘧啶之C-5位置併入特定化學修飾可降低免疫勝任細胞株中對於dsDNA之先天性免疫反應。

【0279】 本文中所引用之所有公開案、專利及專利申請案均以全文引用之方式併入本文中，其引用之程度如同各個別公開案、專利或專利申請案經特定且個別地指示以引用之方式併入一般。若本文中之術語與併入之參考文獻中之術語之間有衝突，則以本文中之術語為準。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="C256154SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-08-
24">
 <ApplicantFileReference>F2128-7002WO</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/341,960</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-05-13</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">美商旗艦先鋒創新有限責任(VII)公司(FLAGSHIP
PIONEERING INNOVATIONS VII, LLC)</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VII,
LLC</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">雙股DNA組合物及相關方法</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>148</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Simian virus 40</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>cccaagaagaagaggaaagtc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
```

```
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
```

```
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="26">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q2">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
gggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg<
/INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>

```
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
```

```
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1179</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1179</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q3">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggg
aggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcc
ttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgcc
agaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattac
ttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgctt
aaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcacctt
cgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggca
agatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccgtg
cgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggc
cggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagt
tgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggg
cgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcg
ccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatgga
gtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttt
ttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtga</I
NSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>711</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..711</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q4">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggt
gcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccaga
ccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctcc
aaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgt
gatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtga
agctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcgg
atgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccactacgacgctga
ggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacct
cccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctg
tacaagtaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q5">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttttatttttta
catataaatatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcatttcccattgtaaaatgccatatttttttcat
aggtcacttacata</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="40">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ccgtggtccttc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q7">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>gtctcctctgacttcaacagcg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="42">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q8">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>accaccctgttgctgtagccaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q9">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agacagccactcacctcttcag</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ttctgccagtgcctctttgctg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q11">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggtgagaagagatgtctgaatcc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="46">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gtccatccttggaagcactgca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q13">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gcctgtcaacagcagtctactg</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="48">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q14">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tgtgcttagagaagcaagatactc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="49">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
```

```
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q15">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aactgggaagggctgccacatt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q16">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggaagacaggagagctgcaact</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="51">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q17">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cttggattcctacaaagaagcagc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tcctccttctggaactgctgca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q19">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agcttgcctcaatcctgcatcc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tccttcaggaacagccaccagt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q21">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>tatcagcacacaattgcccattatacgc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gcgtataatgggcaattgtgtgctgata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q23">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tatcagcacacaatagtccattatacgc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gcgtataatggactattgtgtgctgata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q25">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aattctcctccccaccttccccaccctcccca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="60">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q26">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>acctatttcagcatactacgc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="61">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q27">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gcgtagtatgctgaaataggt</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="62">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>44</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..44</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cacacaattgcccattatacgcgcgtataatgggcaattgtgtg</INSDSeq_sequence
>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="63">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q29">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>taaatataatttaa</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="64">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q30">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ttaaattatattta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q31">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aatatataatctaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q32">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ttagattatatatt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tatttattatcttt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaagataataaata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="69">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q35">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atataatttttaattagtatagaatatgttaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ttaacatactctatactaattaaaaattatat</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q37">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tataatttgatattagtacaaatccc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q38">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gggatttgtactaatatcaaattata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q39">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>atataatatttatttagtacaaagttc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="74">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q40">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gaactttgtactaaataaatattatat</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q41">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atataatttttattagtatagagtat</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q42">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atactctatactaataaaaaattatat</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q43">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagtataaaaaactgt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q44">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>acagtttttatacta</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="79">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q45">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagtatacaaaagatt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="80">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q46">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aatcttttgtatacta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="81">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q47">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagtatatatatctct</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="82">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q48">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agagatatatatacta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="83">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q49">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagtataaaaaaaatt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q50">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aatttttttatacta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="85">
 <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>47</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..47</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q51">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q52">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q53">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q54">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q55">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>42</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q56">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q57">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q59">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgaggcggtacgagccacacgtactacgctcgtaccgcctcgggt</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="86">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q60">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q61">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q63">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q64">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q65">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q66">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q67">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>46</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q68">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acccgaggcggtacgagccacacgtactacgctcgtaccgcctcgggt</INSDSeq_sequ
ence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="87">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>47</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..47</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q69">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q70">
```

```
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q71">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q72">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q73">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q74">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q75">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>
   <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q76">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>39</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>
   <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q77">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>40</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>
   <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q78">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>41</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q79">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>42</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q80">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q81">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q82">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q83">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgagcaggatcgagccacacgtactacgctcgatcctgctcgggt</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="88">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q84">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q85">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q86">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q87">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q88">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q89">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q90">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q91">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>40</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q92">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>41</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q93">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>42</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q94">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q95">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q96">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q97">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>46</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q98">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acccgagcaggatcgagccacacgtactacgctcgatcctgctcgggt</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="89">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>34</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..34</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q99">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q100">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q101">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q102">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q103">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q104">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q105">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q106">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>18</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q107">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>19</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q108">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q109">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q110">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q111">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>23</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q112">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cccgggcggacagcactcacgactccgcccgggt</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="90">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>35</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..35</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q113">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q114">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q115">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q116">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q117">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q118">
```

```
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>16</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q119">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>18</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q120">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Uracil</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>19</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q121">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q122">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q123">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q124">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>23</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q125">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>24</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q126">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>acccgggcggacagcactcacgactccgcccgggt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="91">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q127">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q128">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q129">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q130">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q131">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q132">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q133">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cacgactccgcccgggt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="92">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q134">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q135">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q136">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q137">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q138">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q139">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>16</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q140">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>acccgggcggacagcac</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="93">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>43</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..43</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q141">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgggcggaagagccacacgtactacgctcttccgcccgggt</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="94">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q142">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cccgggcggatccgcccgggt</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="95">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>53</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..53</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q143">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgggcggaaattctcctccccaccttccccaccctccccatccgcccgggt</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="96">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q144">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q145">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q146">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q147">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q148">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q149">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q150">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cacgactccgcccggg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="97">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q151">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q152">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q153">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>12</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q154">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q155">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>14</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q156">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q157">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cccgggcggacagcac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="98">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>47</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..47</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q158">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q159">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q160">
```

```
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q161">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q162">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q163">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q164">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>40</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q165">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>41</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q166">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>42</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q167">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q168">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q169">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q170">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccgagcaggatcgagccacacgtactacgctcgatcctgctcgggt</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="99">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q171">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q172">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q173">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q174">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q175">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q176">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q177">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>41</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q178">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>42</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q179">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>43</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q180">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>44</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q181">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>45</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q182">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>46</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q183">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide with phosphorothioate
linkage</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acccgagcaggatcgagccacacgtactacgctcgatcctgctcgggt</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="100">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>56</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..56</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q184">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tatcagcacacaattgcccattatacgcgcgtataatggactattgtgtgctgata</INSD
Seq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

```
 <SequenceData sequenceIDNumber="101">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>56</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..56</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q185">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tatcagcacacaatagtccattatacgcgcgtataatggactattgtgtgctgata</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="102">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q186">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ccgtggtccttcggtacc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="103">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q187">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggtaccgccttccaccgg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="104">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q188">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggtaccgaaggaccacgg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="105">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q189">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ccggtggaaggcggtacc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="106">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>46</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..46</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q190">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="107">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>72</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..72</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q191">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattag
tcagcaacca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="108">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>336</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q192">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cagggcagcaggggcaggtgccagcaaggaaggcaggcacgccaggaagacacccatggtga
gaagtgcagatggcccgagggcaagtttgctcaactcacccaggtttgctcttgctggggccaagaggactcatgtgcca
gggccaagggcccttgggggctctcacaggggcttatctgggcttcggttctggagggccaggaacaaacaggcttcaa
agccaagggcttggctggcacacaggggcttggtccttcacctctgtcccctctccctacggacacatataagaccctg
```

```
gtcacacctgggagaggaggagaggagagcatag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="109">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>36</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q193">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ggctggtcttgaactcctgrgctcargtgatcctcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="110">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q194">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tgcggccaaatctcccgccaggtcagc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="111">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q195">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gctgacctggcgggagatttggccgca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="112">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q196">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aattctcctccccaccttccccaccctcccca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="113">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q197">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q198">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q199">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q200">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q201">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
```

```
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q202">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q203">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q204">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
   <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
 </INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier id="q205">
   <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>a, c, t, g, unknown or other</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>rnynncnngyngktnyny</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="114">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q206">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>wtttatrtttw</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="115">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>404</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..404</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q207">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggcagacccaggggccgcatgcagcagggcctgaggagggaggtgtggacggaggaggccc
gctgccattcttggtatggttctcactccaggagcacagctgcatctggtctcactctgggcagcttataaggcctggtg
tgagttttgtttatgcaagtgcagcataaaaggaacaaatctaccagcaccggggctgttgccactgagtccttttgcat
acatttttcaaatgataactcactctacccacccccttccctacccccaaggcgatttattgaaaaaaccaccttatat
ggtaatattgctaacacaccgtcagctggccttttagggactttgtttaaagaagatccgcctctggggttttatattg
ctctggtattcatgccaaagac</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="116">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>46</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..46</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q208">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg</INSDSeq_sequen
ce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="117">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q209">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ggggactttcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="118">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>55</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..55</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q210">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggggactttccggggactttccggggactttccggggactttccggggactttcc</INSDS
eq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="119">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>176</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..176</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q211">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>ttcaaatgataactcactctacccacccccttccctacccccaaggcgatttattgaaaaa
accaccttatatggtaatattgctaacacaccgtcagctggccttttagggactttgtttaaagaagatccgcctctgg
ggttttatattgctctggtattcatgccaaagac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="120">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>2186</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..2186</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q212">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>catgcaggaaaaggacaagcagcgaaaattcacgccccttgggaggtggcggcatatgcaa
aggatagcactcccactctactactgggtatcatatgctgactgtatatgcatgaggatagcatatgctacccggataca
gattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcctatgcta
cccagatataaattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggata
gcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatt
tgggtagtatatgctacccagatataaattaggatagcatatactaccctaatctctattaggatagcatatgctacccg
gatacagattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagattaggatagcct
atgctacccagatataaattaggatagcatatactacccagatatagattaggatagcatatgctacccagatatagatt
aggatagcctatgctacccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgctacccatggc
aacattagcccaccgtgctctcagcgacctcgtgaatatgaggaccaacaaccctgtgcttggcgctcaggcgcaagtgt
gtgtaatttgtcctccagatcgcagcaatcgcgcccctatcttggcccgcccacctacttatgcaggtattccccggggt
gccattagtggttttgtgggcaagtggtttgaccgcagtggttagcggggttacaatcagccaagttattacacccttat
tttacagtccaaaaccgcagggcggcgtgtgggggctgacgcgtgcccccactccacaatttcaaaaaaaagagtggcca
cttgtctttgtttatgggccccattggcgtggagccccgtttaattttcgggggtgttagagacaaccagtggagtccgc

tgctgtcggcgtccactctctttccccttgttacaaatagagtgtaacaacatggttcacctgtcttggtccctgcctgg
gacacatcttaataaccccagtatcatattgcactaggattatgtgttgcccatagccataaattcgtgtgagatggaca
tccagtctttacggcttgtccccaccccatggatttctattgttaaagatattcagaatgtttcattcctacactagtat
ttattgcccaaggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcacaatgccaccactgaaccccccgtccaaattttatt
ctgggggcgtcacctgaaaccttgttttcgagcacctcacatacaccttactgttcacaactcagcagttattctattag
ctaaacgaaggagaatgaagaagcaggcgaagattcaggagagttcactgcccgctccttgatcttcagccactgcctt
gtgactaaaatggttcactaccctcgtggaatcctgaccccatgtaaataaaaccgtgacagctcatggggtgggagata
tcgctgttccttaggacccttttactaaccctaattcgatagcatatgcttcccgttgggtaacatatgctattgaatta
gggttagtctggatagtatatactactacccgggaagcatatgctacccgtttagggttaacaaggggcccttataaaca
ctattgctaatgccctcttgagggtccgcttatcggtagctacacaggcccctctgattgacgttggtgtagcctcccgt
agtcttcctgggcccctgggaggtacatgtcccccagcattggtgtaagagcttcagccaagagttacacataaaggcaa
tgttgtgttgcagtccacagactgcaaagtctgctccaggatgaaagccactcagtgttggcaaatgtgcacatccattt
ataaggatgtcaactacagtcagagaaccccttttgtgtttggtcccccccccgtgtcacatgtggaacagggcccagttgg
caagttgtaccaaccaactgaagggattacatgcactgccccgc
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="121">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q213">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttttatttttta
catataaatatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcatttcccattgtaaaatgccatatttttttcat
aggtcacttacata</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="122">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>225</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..225</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q214">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctg
gaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattct
ggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctcta
tgg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="123">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q215">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tgtatgtgactgcccaagatgaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="124">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q216">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agaggaggttggtctcactacc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="125">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q217">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gagagtgattgagagtggaccac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="126">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q218">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cacaaccctctgcacccagttt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="127">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q219">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agaatcaccagcagcaagtgtcc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="128">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q220">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tcctgaacccacttctgcttgg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="129">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q221">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cctgctgctttgcctacattgc</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="130">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q222">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>acacacttggcggttctttcgg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="131">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q223">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ggcagaaagcttgtctcaaccc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="132">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q224">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctccttcaggaacagccaccaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="133">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q225">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctcttctgcctgctgcactttg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="134">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q226">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>atgggctacaggcttgtcactc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="135">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q227">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gagccttctctgctccctgata</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="136">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q228">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>gactgaggcttggaatctgctg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="137">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q229">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ccacagaccttccaggagaatg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="138">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q230">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gtgcagttcagtgatcgtacagg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="139">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q231">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gccctcagctacgacccagtg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="140">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q232">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agcttctgtggatagcggtcct</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="141">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q233">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gctgtggatgtccaacaagagg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="142">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q234">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tcctgcatggtgaaggggttca</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="143">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q235">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaccgccacccagagtcctgt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="144">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q236">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>acaggcaacgggcgtggtaca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="145">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q237">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggaataggcacactggagagtc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="146">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q238">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctctccgtctttcttctccacac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="147">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q239">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>gatagccagcctagaggtatgg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="148">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q240">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ccttgatgttatcaggaggattca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種TDSC，其包含：

a)上游DNA末端形式，其為封閉端；

b)雙股區；

c)下游DNA末端形式，其為封閉端，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸，

其中一或多個經化學修飾之核苷酸包含經化學修飾之胞嘧啶核苷酸及/或硫代磷酸酯鍵。

【請求項2】

如請求項1之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式中之一者或兩者包含環。

【請求項3】

如請求項1或2之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式及/或該雙股區包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者與肽或蛋白質結合。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之TDSC，其中該等經化學修飾之核苷酸中之一或多者包含硫代磷酸酯鍵。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之TDSC，其中該TDSC之第一股及第二股中

之各者包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之TDSC，其中該TDSC之第一股及第二股中之各者包含一或多個硫代磷酸酯鍵。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之TDSC，其中該上游及/或該下游DNA末端形式各自包含至少1、2、3、4、5或6個硫代磷酸酯鍵(例如，在例如第一股、第二股、或第一及第二股兩者上之該上游及該下游DNA端形成之1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個末端核苷酸之間)。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之TDSC，其中一或多個經化學修飾之核苷酸包含經化學修飾之胞嘧啶核苷酸。

【請求項10】

如請求項9之TDSC，其中該經化學修飾之胞嘧啶核苷酸在胞嘧啶之碳5處具有除氫以外之取代。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之TDSC，其包含以下中之一或多者：

i)啟動子序列(其中視情況該啟動子序列在該雙股區中)；

ii)負載序列(例如治療性負載序列)，其可操作地連接於該啟動子序列(其中視情況該負載序列在該雙股區中)；

iii)異源功能序列，例如核靶向序列或調節序列；

iv)維持序列；及/或

v)複製起點。

【請求項12】

如請求項11之TDSC，其中該負載序列編碼多肽(例如蛋白質)。

【請求項13】

如請求項11或12之TDSC，其中該負載序列編碼功能性RNA (例如miRNA、siRNA或tRNA)。

【請求項14】

如請求項11至13中任一項之TDSC，其中該負載序列對目標細胞而言為異源性。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之TDSC，其中該TDSC對核酸內切酶消化具有抗性及/或對免疫感測器識別具有抗性。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式具有相同核苷酸序列。

【請求項17】

如請求項1至15中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式及該下游DNA末端形式具有不同核苷酸序列。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含髮夾。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之TDSC，其中該封閉端包含一或多個(例如

至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50個)未雜交(例如不為雙股區之一部分)的核苷酸。

【請求項20】

如請求項1至17中任一項之TDSC，其中該封閉端不包含任何未雜交之核苷酸(例如其中該封閉端之所有核苷酸與另一核苷酸雜交)。

【請求項21】

如請求項1至20中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者包含原核端粒酶序列。

【請求項22】

如請求項1至20中任一項之TDSC，其中該上游DNA末端形式、該下游DNA末端形式或兩者不包含原核端粒酶序列。

【請求項23】

如請求項1至22中任一項之TDSC，其中該TDSC之80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的糖為去氧核糖。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之TDSC，其中該TDSC可以複製(例如藉由對於包含該TDSC之細胞而言為原生的DNA聚合酶)。

【請求項25】

如請求項1至23中任一項之TDSC，其中該TDSC無法複製。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之TDSC，其中該TDSC為線性且可環化。

【請求項27】

如請求項1至25中任一項之TDSC，其中該TDSC為線性且無法環

化。

【請求項28】

如請求項1至27中任一項之TDSC，其中該TDSC或其一部分可整合至基因體中。

【請求項29】

如請求項1至27中任一項之TDSC，其中該TDSC或其一部分無法整合至基因體中。

【請求項30】

如請求項1至29中任一項之TDSC，其中該TDSC可以串聯。

【請求項31】

如請求項1至29中任一項之TDSC，其中該TDSC無法串聯。

【請求項32】

一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；及

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

【請求項33】

如請求項32之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為開放端。

【請求項34】

如請求項32或33之TDSC，其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者為平端或黏

端。

【請求項35】

一種TDSC，其包含：

a)上游雙股、平端DNA末端形式(例如呈雙股及平端之上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其在各股上包含硫代磷酸酯修飾；

b)雙股區；及

c)下游雙股、平端DNA末端形式(例如呈雙股及平端之下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)，其在各股上包含硫代磷酸酯修飾。

【請求項36】

一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含Y-轉接子組態，

視情況其中該TDSC包含一或多個經化學修飾之核苷酸。

【請求項37】

一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者包含以下中之一或多者：核靶向序列、維

持序列或結合目標細胞中之內源性多肽的序列。

【請求項38】

一種TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式及該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中之一者或兩者具有以下特徵中之一或多者：

i)不包含核酸序列TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC (SEQ ID NO: 55)及GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 56)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之核酸序列；及/或核酸序列TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC (SEQ ID NO: 57)及GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 58)；

ii)該TDSC中之每個核苷酸結合該TDSC中之另一核苷酸；

iii)該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有長度小於約28或56個核苷酸或長度大於約28或56個核苷酸之環尺寸；或

iv)該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有長度小於約28或56個核苷酸或長度大於約28或56個核苷酸之環尺寸。

【請求項39】

一種醫藥組合物，其包含含有效應物序列之雙股DNA (dsDNA)，其中：

a)該dsDNA缺乏載體主鏈或缺乏載體主鏈之材料部分，或不包含非

人類(例如細菌)複製起點；

b)該dsDNA為去殼體的，基本上不含病毒蛋白，不包含病毒封裝訊號，或不包含病毒ITR；

c)該dsDNA包含核酸外切酶抗性端；及

d)該dsDNA包含至少一個經化學修飾之核苷酸。

【請求項40】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至38中任一項之TDSC。

【請求項41】

如請求項39或40之醫藥組合物，其中該dsDNA或該TDSC包含於脂質奈米粒子(lipid nanoparticle；LNP)中。

【請求項42】

一種原TDSC，其包含：

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式；

b)雙股區；

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式，

其中：

(i)該原TDSC包含一或多個(例如1或2個)尿嘧啶核苷酸，或

(ii)該上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含黏端，及/或其中該下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含黏端。

【請求項43】

一種在目標細胞中表現異源負載之方法，該方法包含：

(i)將如請求項1至41中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載的條件下；

從而在該目標細胞中表現該異源負載。

【請求項44】

一種向目標細胞遞送異源負載之方法，該方法包含：

將如請求項1至41中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；

從而將該異源負載遞送至該目標細胞。

【請求項45】

一種調節(例如增加或降低)目標細胞中之生物活性之方法，該方法包含：

(i)將如請求項1至41中任一項之TDSC或組合物引入目標細胞中，其中該TDSC之該雙股區包含編碼調節該目標細胞中之生物活性的異源負載的序列；及

(ii)將該細胞維持(例如培育)在適合於表現來自該TDSC之該異源負載的條件下；

從而調節該目標細胞中之該生物活性。

【請求項46】

一種治療有需要之細胞、組織或個體之方法，該方法包含：

向該細胞、組織或個體投與如請求項1至41中任一項之TDSC或組合物，其中該TDSC之該雙股區包含編碼異源負載之序列；

從而治療該細胞、組織或個體。

【請求項47】

一種製備TDSC之方法，該方法包含接合：

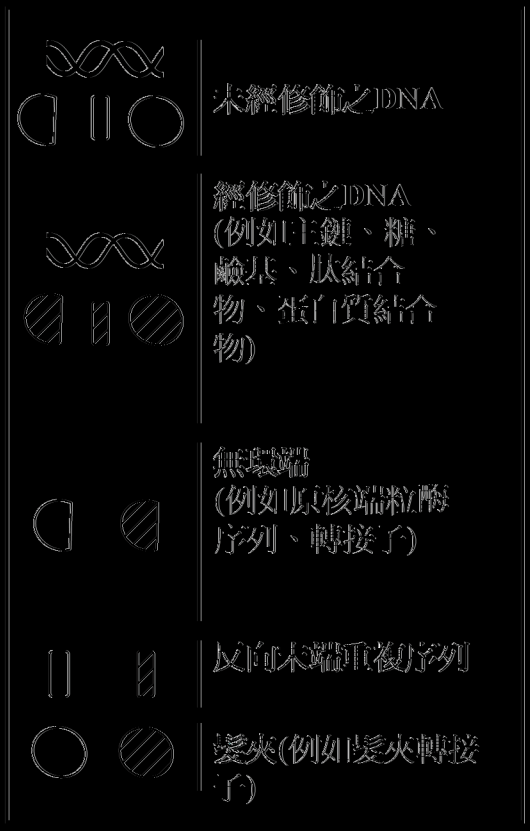
雙股DNA分子與

包含第一區域及第二區域之自黏著DNA分子，其中該第一區域與該第二區域雜交；

從而製備TDSC，

視情況其中該自黏著DNA分子在該第一區域與該第二區域之間進一步包含環。

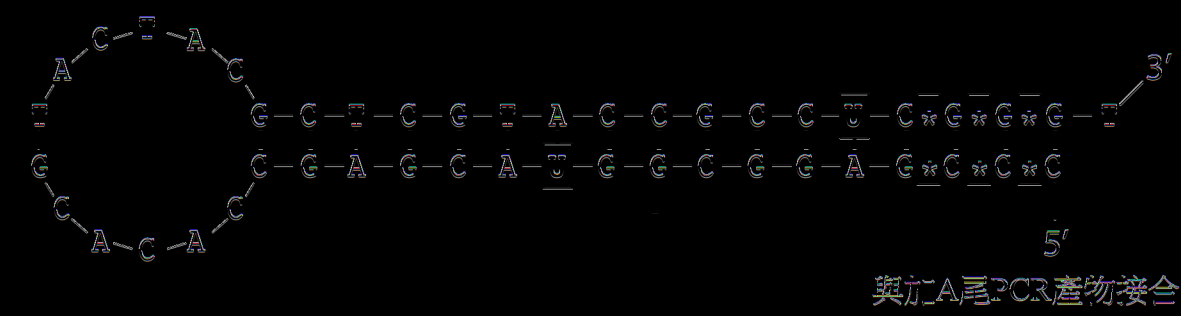
【發明圖式】


未經修飾之DNA
經修飾之DNA
(例如主鏈、糖、
鹼基、肽結合
物、蛋白質結合
物)
無基端
(例如原核端粒酶
序列、轉接子)
反向末端重複序列
髮夾(例如髮夾轉接
子)

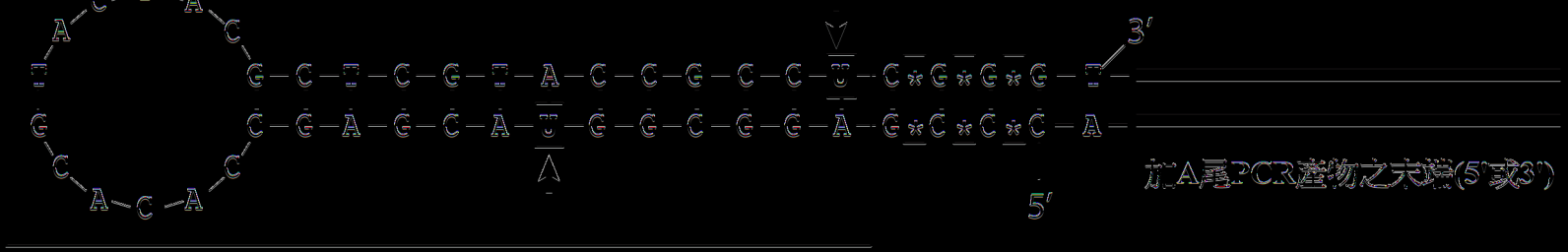
(圖1B)

未感染者のDNA
感染者のDNA
(男女、幼児、成人、高齢者、白人、黒人、黄色人種、混血)
ウイルス(男女一人ずつ)
被害者のDNA
(男女、幼児、成人、高齢者、白人、黒人、黄色人種、混血)
(2)
図
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
未感染者
感染者
感染者
感染者
感染者
感染者
未感染者

C256154DA.pdf
11/211/809
2074097 A2020
第411，共1911(發明專利)
11/211/809



與加A尾PCR產物接合



加A尾PCR產物之末端(5′或3′)

AUSER酶處理

線豆核酸酶處理

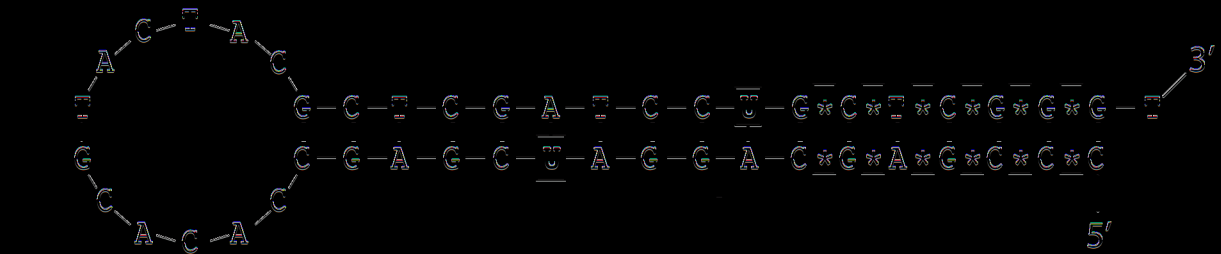


經修飾之起始端　　dsDNA構築體　　經修飾之末端

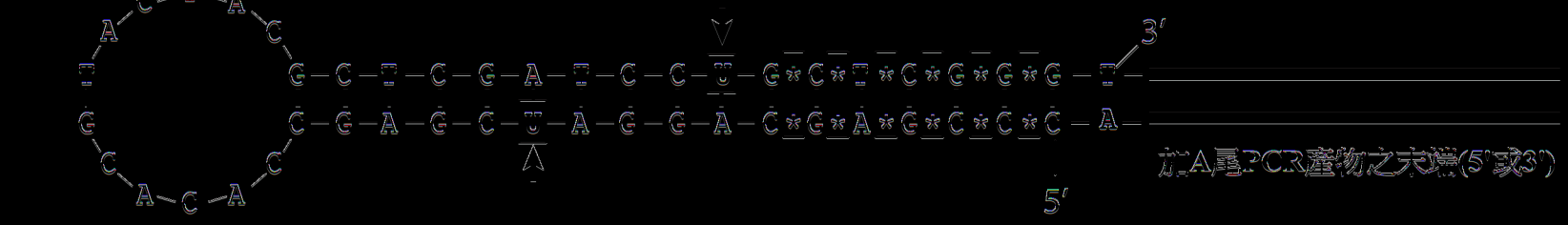
【圖3】

11/211/809

C256154DA.pdf
11/11/809
2074097.83
發明說明 A0202
第 5I 頁，共 191 頁(發明)TW-Q
1123233184-0



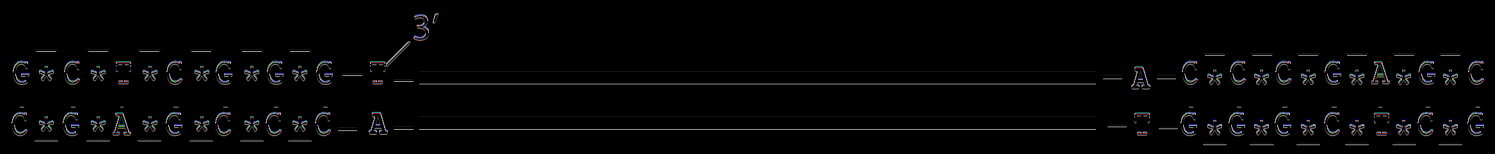
與加A尾PCR產物接合



加A尾PCR產物之末端(5'或3')

USER酶處理

線豆核酸酶處理



經修飾之起始端　　dsDNA構築體　　經修飾之末端

【圖4】

3'
5'
第1A圖 PCR產物接合
3'
5'
第1A圖 PCR產物
5'
3'
cDNA產物
5'
3'
經修飾之末端
5'
3'
經修飾之末端
cDNA產物
第1B圖
5'
3'
PCR產物
第1A圖

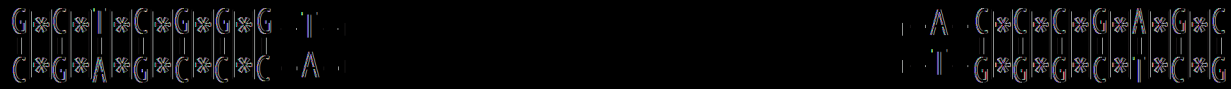
3'
5'
第一模板核酸
第二模板核酸
第一次PCR產物接合
第一次PCR產物之延伸(5'至3')
3'
5'
3'
5'
CP3 ssDNA產物(以上起始核酸)
(1/6)

泳道	M	1	2	3	4	5	6	7	8
樣本		Ct	Ct	6a	6a	3a	3a	Va	Va
核酸外切酶III									



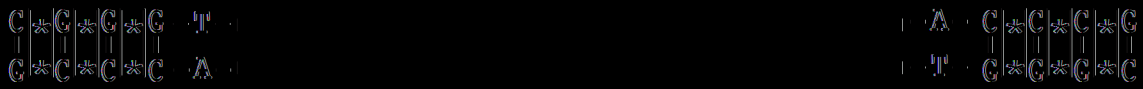
圖7A

6a



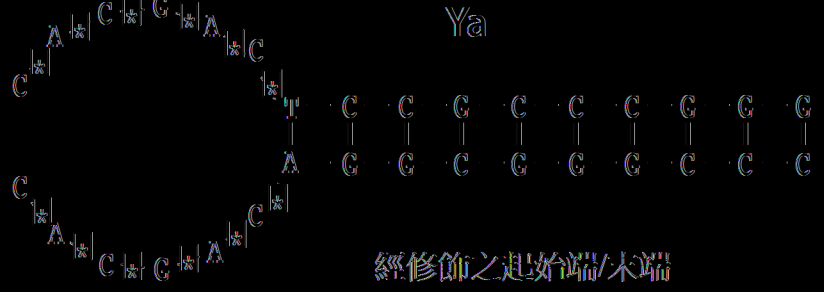
|(圖7B)|

3a



|(圖7C)|

Ya



|(圖7D)|

3'
5'
第一A基PCR產物
3'
5'
第一A基PCR產物之雙鏈(5'突出)
5'
3'
環狀cssDNA
(8)

PCR產物之3'端(5'至3')
PCR產物之5'端(5'至3')
用Tet1氧化酶處理PCR產物
非修飾之經純化cfDNA (Tet)

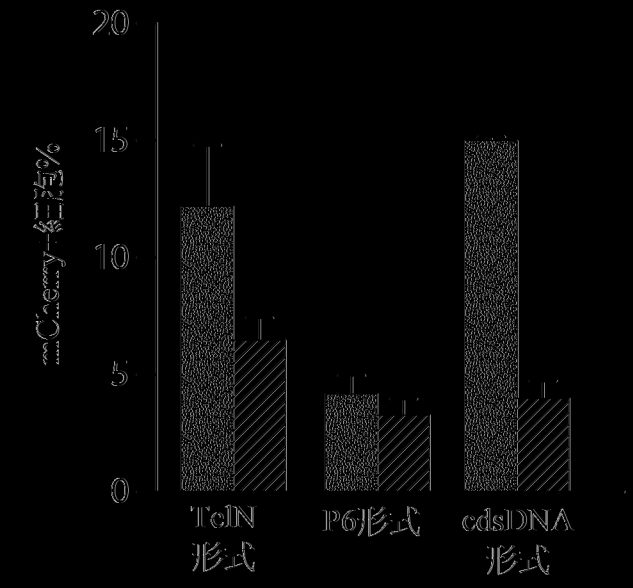
圖 1

Xcm I限制酶识别序列
5' CCGCGGCCGCGGACC
3' GGCACCAGGAAGCCATGG
Xcm I限制酶识别序列
CGGACCGCCGCGGACC
CCATGGCGGAAGGCGGCC
PCR扩增
Xcm I处理
CGGAC
C
CATGG
G
C
C
G
G
C
C
G
G
A
C
C
G
C
G
G
C
C
A
T
G
G
C
A
T
G
G
C
C
G
C
C
G

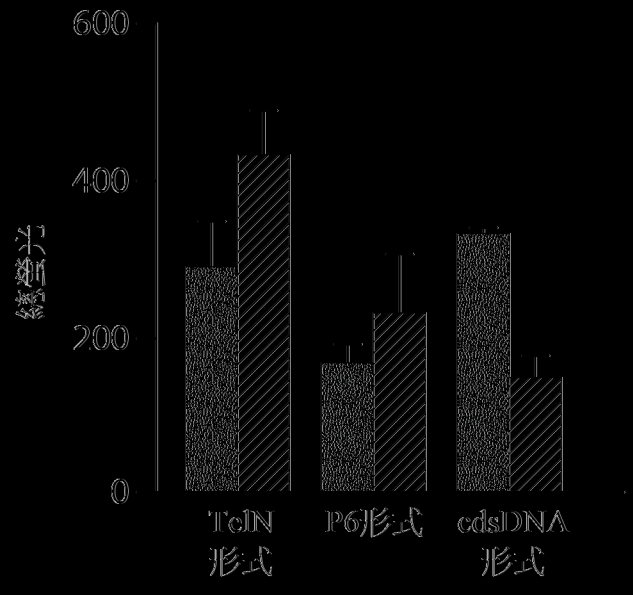
A2: Sans A2
M:
M:
6000
3000
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
1

A7: SampA7
W:
W:
6000
3000
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
1
399
1AA2
734
0722
(3:2)
(3:2)

RIU
A2: SampA2
M:
M:
2156
1612
14.5
604
86
103
6000
3000
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
1
27
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500
6000
6500
7000
7500
8000
8500
9000
9500
10000
10639
波長(nm)
吸光度(AU)


20
15
10
5
0
mCherry+ 細胞%
TcIN 形式
P6形式
cdsDNA 形式

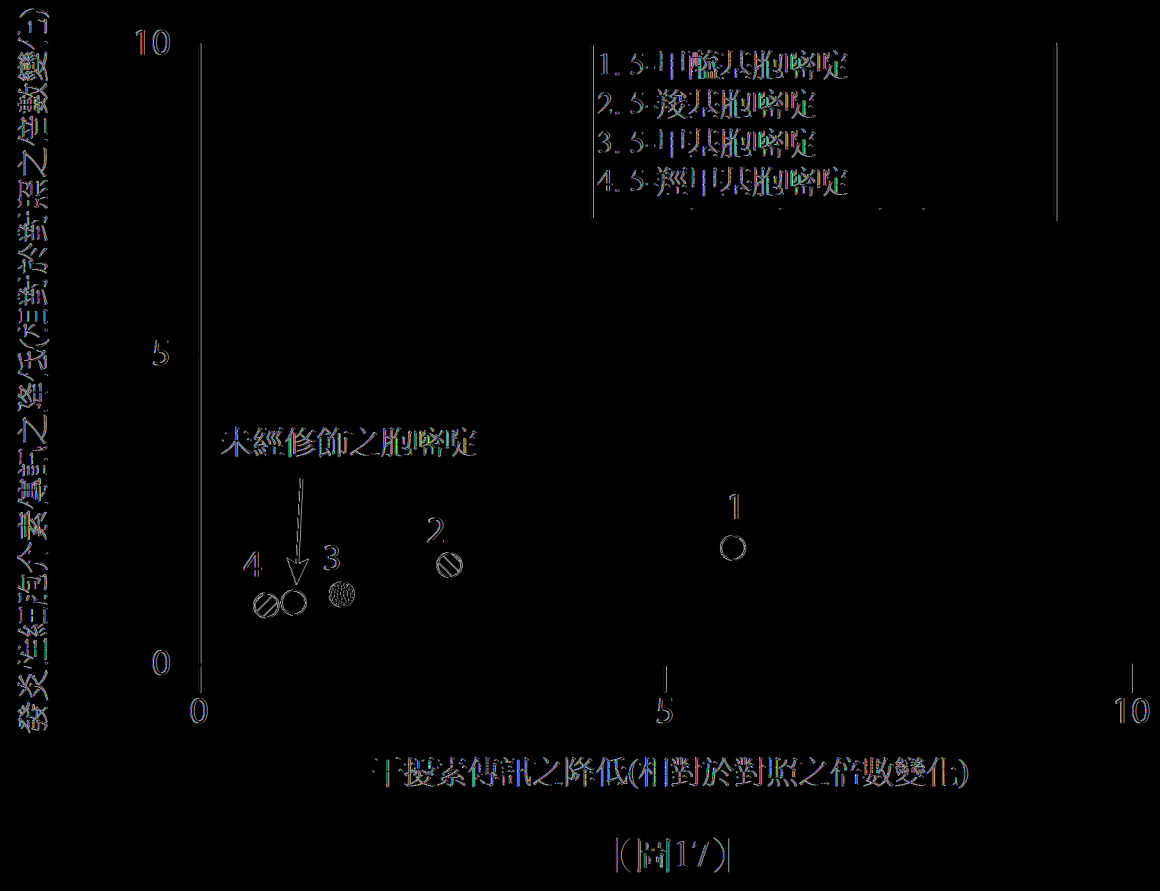
(圖14A)


600
400
200
0
細胞數目
TcIN 形式
P6形式
cdsDNA 形式
未經修飾之胞嘧啶
5fC25

(圖14B)

未經修飾之活體蛋白
5'C25
方法新穎
CXC-10
IFN-β
相對螢光單位
6,000
4,000
2,000
0
RIG-I
2'5'寡腺苷酸
ccsDNA
對照
（圖5A）
（圖5B）
（圖5C）

未經修飾之活體內
方法無效
CXC
TeN
26形式
ccsDNA
形式
（圖6C）
（圖6B）
（圖6A）


1. 5-甲醯基胞嘧啶
2. 5-羧基胞嘧啶
3. 5-甲基胞嘧啶
4. 5-羥甲基胞嘧啶
未經修飾之胞嘧啶
1
2
3
4
0
5
10
0
5
10
轉錄活性(相對於未經修飾之胞嘧啶之轉錄活性)
甲羥素傳訊之降低(相對於對照之倍數變化)

[圖17]