



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108064153 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201580071210.2

J·哈波尔斯 高桥博一

(22)申请日 2015.12.28

寺田绘里加 张隼 M·阿玛笛安

(30)优先权数据

2014-266198 2014.12.26 JP

62/184,239 2015.06.24 US

62/266,664 2015.12.13 US

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 牛蔚然

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.26

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/067561 2015.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/106406 EN 2016.06.30

(71)申请人 日东电工株式会社

地址 日本大阪府

权利要求书2页 说明书37页

(72)发明人 应文斌 味吞宪二郎

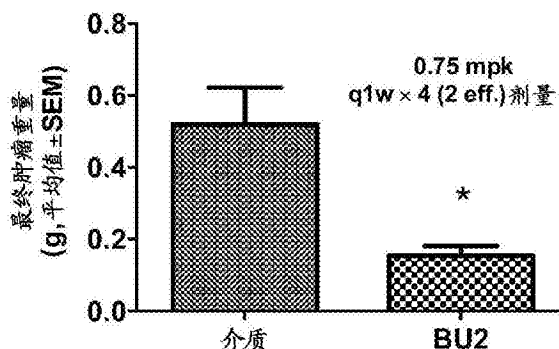
序列表(电子公布) 附图2页

(54)发明名称

用于调节GST-PI基因的RNA剂

(57)摘要

本发明提供利用RNA干扰来调节人GST- π 表达的化合物、组合物和方法。所述RNA干扰分子可用于预防或治疗例如恶性肿瘤等疾病的方法。核酸分子具有以下特征:a)多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;b)所述分子的每条链长度为15~30个核苷酸;c)反义链中,由15~30个核苷酸构成的连续区域与编码GST- π 的mRNA序列互补;及d)有义链的至少一部分与反义链的至少一部分互补,并且,所述分子具有长度为15~30个核苷酸的双链区。



1. 核酸分子, 其中:
 - a) 所述分子具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;
 - b) 所述分子的每条链长度为15~30个核苷酸;
 - c) 所述反义链中的15~30个核苷酸的连续区域与编码GST- π 的mRNA序列互补;
 - d) 所述有义链的至少一部分与所述反义链的至少一部分互补, 并且, 所述分子具有长度为15~30个核苷酸的双链区。
2. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述反义链为序列号1341, 所述有义链为序列号1276, 或是它们的经化学修饰的链。
3. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述反义链为序列号1305, 所述有义链为序列号1240, 或是它们的经化学修饰的链。
4. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述与编码GST- π 的mRNA序列互补的反义链的15~30个核苷酸的连续区域位于所述分子的双链区。
5. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 与编码GST- π 的mRNA序列互补的反义链的15~30个核苷酸的连续区域选自人GSTP1序列, 并且, 人GSTP1 mRNA为序列号1。
6. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述编码GST- π 的mRNA序列选自由序列号1的5' UTR第1~249位、序列号1的CDS第250~882位、序列号1的3' UTR第883~986位组成的组。
7. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述反义链含有选自序列号609~1215中的任一序列。
8. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述反义链含有选自序列号1281~1345中的任一序列。
9. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子由选自由序列号1240和1305、序列号1265和1330、序列号1267和1332、序列号1269和1334、及序列号1276和341组成的组中的反义链和有义链的对构成。
10. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子的每条链长度为18~22个核苷酸。
11. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述双链区的长度为19个核苷酸。
12. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述多核苷酸有义链和所述多核苷酸反义链以单链形式连接, 并且形成一端以环连接的双链区。
13. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子具有平末端。
14. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子具有一个或多个3' 悬挂。
15. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子为具有基因沉默活性的RNAi分子。
16. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子为具有基因沉默活性的dsRNA、siRNA、micro-RNA、或shRNA。
17. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子具有GST- π 表达抑制活性。
18. 如权利要求1所述的核酸分子, 其中, 所述分子的GST- π 敲低的IC₅₀小于100pM。
19. 组合物, 其含有一种或多种权利要求1~18中任一项所述的核酸分子、和药学上允许的担体。
20. 如权利要求19所述的组合物, 其中, 所述担体为脂质分子或脂质体。
21. 治疗GST- π 表达相关疾病的方法, 其中, 所述方法包括向有需要的受试者施予权利要求19所述的组合物。

22. 如权利要求21所述的方法,其中,所述疾病为恶性肿瘤。

23. 如权利要求22所述的方法,其中,所述恶性肿呈现为选自由下述疾病组成的组中的疾病:与GST- π 表达相关的癌症、由表达KRAS突变的细胞导致的癌症、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维性组织细胞瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、癌、脑瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌、十二指肠癌、结肠直肠癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、阴茎癌、子宫癌、卵巢癌、皮肤癌、骨癌、白血病、恶性淋巴瘤、上皮性恶性肿瘤、和非上皮性恶性肿瘤。

用于调节GST-PI基因的RNA剂

技术领域

[0001] 本发明涉及由基于核酸的分子构成的生物药物和治疗剂的领域。具体而言,本发明涉及利用RNA干扰(RNAi)来调节人GST- π 表达的化合物和组合物。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包括以电子版形式提交的序列表ASCII文件,该文件创建于2015年12月23日,文件名为ND5123202WO_SL.txt,大小为442,955字节,其全部内容通过参考并入本说明书中。

背景技术

[0004] 已经发现,各种人癌组织与呈现KRAS基因突变有关。某些情况下,所述组织还呈现升高的谷胱甘肽S-转移酶- π (GST- π) 表达水平 (Miyanishi et al., Gastroenterology, 2001, Vol. 121: 865-874, 摘要) 例如,在患有各种胃肠道恶性肿瘤的患者中,观察到了升高的血清GST- π 水平 (Niitsu et al., Cancer, 1989, Vol. 63, No. 2, pp. 317-323, 摘要)。

[0005] GST- π 是隶属GST家族的酶之一,其通过催化疏水性和亲电子性的化合物与还原型谷胱甘肽缀合而参与解毒。利用siRNA可在体外使GST- π 表达降低 (Niitsu et al., US 2014/0315975 A1)。

[0006] 用于抑制GST- π 表达的治疗剂要求高效的siRNA序列和结构。

[0007] 因此,需要用于抑制GST- π 表达的siRNA序列、化合物和结构。

发明内容

[0008] 本发明涉及利用RNA干扰来调节人GST- π 表达的化合物、组合物和方法。

[0009] 在一些实施方式中,本发明提供用于GST- π 的RNA干扰基因沉默的分子。

[0010] 在另一些实施方式中,本发明的结构、分子和组合物可用于预防或治疗与GST- π 相关的疾病、或改善恶性肿瘤等与GST- π 相关的病症或紊乱的症状的方法。

[0011] 本发明包括以下实施方式:

[0012] 核酸分子,其中:

[0013] a) 所述分子具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;

[0014] b) 所述分子的每条链长度为15~30个核苷酸;

[0015] c) 所述反义链中的15~30个核苷酸的连续区域与编码GST- π 的mRNA序列互补;

[0016] d) 所述有义链的至少一部分与所述反义链的至少一部分互补,并且,所述分子具有长度为15~30个核苷酸的双链区。

[0017] 在一些实施方式中,核酸分子可在反义链具有15~30个核苷酸的连续区域,所述区域与编码GST- π 的mRNA序列互补,并且,所述区域位于分子的双链区。

[0018] 在其他实施方式中,核酸分子可在反义链具有由15~30个核苷酸构成的连续区域,所述区域与编码GST- π 的mRNA序列互补。

[0019] 本发明的化合物可含有编码GST- π 的mRNA序列,所述序列选自由序列号1的5' UTR

第1~249位、序列号1的CDS第250~882位、序列号1的3' UTR第883~986位组成的组。

[0020] 在某些实施方式中,核酸分子的每条链的长度可以为18~22个核苷酸。核酸分子的双链区长度可以为19个核苷酸。

[0021] 在一些替代形式中,核酸分子可具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链,所述有义链和反义链以单链形式连接,并且形成一端以环(loop)连接的双链区。

[0022] 一些实施方式中,本申请公开的核酸分子可具有平末端。在某些实施方式中,核酸分子可具有一个或多个3' 悬挂。

[0023] 本发明提供一系列核酸分子,其是具有基因沉默活性的RNAi分子。本发明的核酸分子可以是dsRNA、siRNA、micro-RNA、或具有基因沉默活性的shRNA、及DNA指导的RNA(ddRNA)、Piwi-相互作用RNA(piRNA)、或重复相关siRNA(rasiRNA)。核酸分子可具有GST- π 表达抑制活性。

[0024] 本发明的实施方式还提供GST- π 敲低的IC50小于100pM的核酸分子。

[0025] 本发明还包括含有一种或多种本发明的核酸分子、和药学上允许的担体(carrier)的组合物。在某些实施方式中,所述担体可以是脂质分子或脂质体。

[0026] 对于本发明的化合物和组合物而言,通过将其施予至有需要的受试者,所述化合物或组合物对于预防或治疗GST- π 相关疾病的方法有用。

[0027] 本发明的方法可使用本发明的化合物来对恶性肿瘤进行预防或治疗。该恶性肿瘤呈现于各种疾病,例如,与GST- π 表达相关的癌症、由表达KRAS突变的细胞导致的癌症、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维性组织细胞瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、癌、脑瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌、十二指肠癌、阑尾癌、结肠直肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肛门癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、卵巢癌、皮肤癌、骨癌、白血病、恶性淋巴瘤、上皮性恶性肿瘤、和非上皮性恶性肿瘤。

附图说明

[0028] 图1显示了序列号1(其为作为靶标的人谷胱甘肽S-转移酶- π (GST- π) mRNA的核酸序列),其被公开于GenBank登录号NM000852.3(hGSTP1),长度为986个核苷酸。

[0029] 图2显示了GST- π siRNA的体内敲低效果。如图2所示,在体内观察到了以GST- π 作为靶标的siRNA对于GST- π 的剂量依赖性敲低。

[0030] 图3显示了GST- π siRNA对于增殖的抑制。如图3所示,在A549细胞系(体外)中,观察到了以GST- π 作为靶标的siRNA对于增殖的剂量依赖性抑制。

[0031] 图4显示了GST- π siRNA的抑制效果。利用的胰腺癌异种移植模型被施予了相对较低的量的以GST- π 作为靶标的siRNA(0.75mg/kg)。GST- π siRNA展示出显著的肿瘤抑制效果。

具体实施方式

[0032] 本发明涉及用于基于核酸的治疗剂的化合物、组合物和方法,所述治疗对GST- π 的表达进行调节。

[0033] 在一些实施方式中,本发明提供具有RNA干扰活性的分子,以及能够使GST- π 表达沉默的结构和组合物

[0034] 本申请公开的结构和组合物可用于预防或治疗各种疾病,例如恶性肿瘤。

[0035] 在另一些实施方式中,本发明提供用于递送或摄取一种或多种本发明的治疗性RNAi分子的组合物,以及使用所述组合物的方法。本发明的基于RNA的组合物可用于预防或治疗例如癌症等恶性肿瘤的方法。

[0036] 本发明的治疗性组合物包括具有RNA干扰活性的核酸分子。所述治疗性核酸分子可以GSTP1 (GST- π) 作为靶标,实现基因沉默。

[0037] 在各种实施方式中,本发明提供一系列能够作为小干扰RNA (siRNA) 发挥作用的分子,并且,这些分子能够对GST- π 基因表达加以调节或使其沉默。

[0038] 本发明的siRNA可用于预防或治疗恶性肿瘤。

[0039] 本发明的实施方式还提供用于将本发明的siRNA递送至需要预防或治疗恶性肿瘤的受试者的介质(vehicle)、制剂(formulation)、或脂质纳米粒制剂。本发明还包括向哺乳动物施予作为治疗剂的siRNA的方法。

[0040] 对于本发明的治疗性分子和组合物而言,通过将其施予至有需要的受试者,所述分子和组合物可用于RNA干扰介导的GST- π 相关疾病的预防或治疗。

[0041] 本发明的方法可使用本发明的化合物来对恶性肿瘤进行预防或治疗。该恶性肿瘤呈现于各种疾病,例如:高水平表达GST- π 的癌症、由表达KRAS突变的细胞导致的癌症、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维性组织细胞瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、癌、脑瘤、头颈癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌、十二指肠癌、结肠直肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、卵巢癌、皮肤癌、白血病、恶性淋巴瘤、上皮性恶性肿瘤、和非上皮性恶性肿瘤。

[0042] 在某些实施方式中,本发明的治疗性分子的组合可用于GST- π 基因表达的沉默或抑制。

[0043] 本发明提供一系列核酸分子,所述分子具有多核苷酸有义链和多核苷酸反义链;所述分子的每条链长度为15~30个核苷酸;反义链中的15~30个核苷酸的连续区域与编码GST- π 的mRNA序列互补;有义链的至少一部分与反义链的至少一部分互补,并且,分子具有长度为15~30个核苷酸的双链区。

[0044] 本发明的RNAi分子可在反义链具有15~30个核苷酸的、与编码GST- π 的mRNA序列互补的连续区域,所述区域位于分子的双链区。

[0045] 在一些实施方式中,RNAi分子可在反义链具有15~30个核苷酸的连续区域,所述区域与序列编码GST- π 的mRNA序列互补。

[0046] 本发明的实施方式还可提供下述方法:在有需要的哺乳动物中,预防、治疗或改善恶性肿瘤的一种或多种症状的方法、或降低发展恶性肿瘤的风险的方法、或延迟恶性肿瘤发病的方法。

[0047] GST- π 和RNAi分子

[0048] 图1显示了作为靶标的人谷胱甘肽S-转移酶- π (GST- π) mRNA的核酸序列的一个例子,其公开于GenBank登录号NM 000852.3 (hGSTP1),长度为986个核苷酸。

[0049] 本领域技术人员可以理解,已提交的序列可随时间而变更,以引入核酸分子中任何需要的改变。

[0050] 本发明的实施方式可提供使用小核酸分子的组合物和方法,其用于GST- π 基因表达沉默。核酸分子的例子包括具有RNA干扰活性的分子(RNAi分子)、短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、micro-RNA(miRNA)、和短发夹RNA(shRNA)分子、以及DNA指导的RNA(ddRNA)、Piwi-相互作用RNA(piRNA),和重复相关siRNA(rasiRNA)。这些分子能够介导对于GST- π 基因表达的RNA干扰。

[0051] 本申请公开的组合物和方法也可用于治疗受试者的各种恶性肿瘤。

[0052] 本发明的核酸分子和方法可用于下调GST- π 编码基因的表达。

[0053] 本发明的组合物和方法可包含一种或多种核酸分子,所述核酸分子能够单独或通过组合来调节或调控GST- π 蛋白及/或GST- π 蛋白编码基因的表达、和与恶性肿瘤等GST- π 相关疾病、病症或紊乱的维持及/或发展相关的蛋白及/或GST- π 蛋白编码基因的表达。

[0054] 参考GST- π 的示例性序列,对本发明的组合物和方法进行说明。本领域技术人员可以理解,本发明的各方面和实施方式可对应任何相关的GST- π 基因、序列、或变体(例如,同源基因和转录变体)、以及多态性、例如与任何GST- π 基因相关的单核苷酸多态性(SNP)。

[0055] 在一些实施方式中,本发明的组合物和方法可提供下调GST- π 基因(例如,人GST- π)表达的双链短干扰核酸(siRNA)分子。

[0056] 本发明的RNAi分子以GST- π 和任何能够提供其他靶序列的同源序列作为靶标,例如使用互补序列或通过并入非典型(canonical)碱基对例如错配和/或摆动(wobble)碱基对(其可提供额外的靶序列)。

[0057] 在鉴定错配的情况下,可以使用非典型碱基对,例如错配和/或摆动碱基来产生靶向多于一个基因序列的核酸分子。例如,UU和CC碱基对等非常规碱基对可用于生成能以具有序列同源性的不同的GST- π 靶序列作为靶标的核酸分子。由此,RNAi分子可将同源基因的保守核苷酸序列作为靶标,从而可使用1种RNAi分子来抑制多个基因的表达。

[0058] 在一些方面,本发明的组合物和方法包含对于GST- π mRNA具有活性的RNAi分子,所述RNAi分子含有与任意的编码GST- π 的mRNA互补的序列。

[0059] 在一些实施方式中,本申请公开的RNAi分子可具有对于GST- π mRNA的活性,所述RNAi分子含有与具有GST- π 变体编码序列(例如,本领域已知的与恶性肿瘤相关的GST- π 基因突变)的RNA互补的序列。

[0060] 在另一些实施方式中,本发明的RNAi分子可含有能够与GST- π 基因的核苷酸序列相互作用、且能够介导GST- π 基因表达沉默的核苷酸序列。

[0061] 本发明的以GST- π mRNA作为靶标的RNAi分子的例子示于表1和表2。

[0062] 表1:GST- π RNAi分子序列

[0063]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
232	2	GCCGCAGUCUUCGCCACCAAtt	609	UGGUGGCCGAAGACUGCGGCgg
233	3	CCGCAGUCUUCGCCACCAUtt	610	AUGGUGGCCGAAGACUGCGGcg
234	4	CGCAGUCUUCGCCACCAUGtt	611	CAUGGJGGCGAAGACUGCGgc
235	5	GCAGUCUUCGCCACCAUGCtt	612	GCAUGGUGGCCGAAGACJGCgg
236	6	CAGUCUUCGCCACCAUGCCtt	613	GGCAUGGUGGCCGAAGACUGcg
237	7	AGUCUUCGCCACCAUGCCGtt	614	CGGCAJGGUGGCCGAAGACUgc
238	8	GUCUUCGCCACCAUGCCGctt	615	GCGGCAUGGUGGCCGAAGACtg

[0064]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
239	9	UCUUCGCCACCAUGCCGCCctt	616	GGCGGCAUGGUGGCGAAGAct
240	10	CUUCGCCACCAUGCCGCCctt	617	GGGCGGCAUGGUGGCGAAGac
241	11	UUCGCCACCAUGCCGCCUtt	618	AGGGCGGCAUGGUGGCGAAGa
242	12	UCGCCACCAUGCCGCCUAtt	619	UAGGGCGGCAUGGUGGCGAag
243	13	CGCCACCAUGCCGCCUACtt	620	GUAGGGCGGCAUGGUGGCGaa
244	14	GCCACCAUGCCGCCUACAtt	621	UGUAGGGCGGCAUGGUGGCGa
245	15	CCACCAUGCCGCCUACACtt	622	GUGUAGGGCGGCAUGGUGGcg
246	16	CACCAUGCCGCCUACACctt	623	GGUGUAGGGCGGCAUGGUGgc
247	17	ACCAUGCCGCCUACACGtt	624	CGGUGUAGGGCGGCAUGGUgg
248	18	CCAUGCCGCCUACACCGUtt	625	ACGGUGUAGGGCGGCAUGGtg
249	19	CAUGCCGCCUACACCGUGtt	626	CACGGUGUAGGGCGGCAUGgt
250	20	AUGCCGCCUACACCGUGGtt	627	CCACGGUGUAGGGCGGCAUgg
251	21	UGCCGCCUACACCGUGGUtt	628	ACCACGGUGUAGGGCGGCAtg
252	22	GCCGCCUACACCGUGGUctt	629	GACCACGGUGUAGGGCGGCat
253	23	CCGCCUACACCGUGGUCUtt	630	AGACCACGGUGUAGGGCGGca
254	24	CGCCUACACCGUGGUCUAtt	631	UAGACCACGGUGUAGGGCGgc
255	25	GCCUACACCGUGGUCUAUtt	632	AUAGACCACGGUGUAGGGCGg
256	26	CCCUACACCGUGGUCUAUUtt	633	AAUAGACCACGGUGUAGGGcg
257	27	CCUACACCGUGGUCUAUUUtt	634	AAAUAGACCACGGUGUAGGgc
258	28	CUACACCGUGGUCUAUUUCtt	635	GAAAUAGACCACGGUGUAGgg
259	29	UACACCGUGGUCUAUUUCCtt	636	GGAAAUAGACCACGGUGUAgg
260	30	ACACCGUGGUCUAUUUCCctt	637	GGGAAAUAGACCACGGUGUag
261	31	CACCGUGGUCUAUUUCCAtt	638	UGGGAAAUAGACCACGGUGta
262	32	ACCGUGGUCUAUUUCCAGtt	639	CUGGGAAAUAGACCACGGUgt
263	33	CCGUGGUCUAUUUCCAGUtt	640	ACUGGGAAAUAGACCACGGtg
264	34	CGUGGUCUAUUUCCAGUUtt	641	AACUGGGAAAUAGACCACGgt
265	35	GUGGUCUAUUUCCAGUUCtt	642	GAACUGGGAAAUAGACCACgg
266	36	UGGUCUAUUUCCAGUUCGtt	643	CGAACUGGGAAAUAGACCACg
267	37	GGUCUAUUUCCAGUUCGAtt	644	UCGAACUGGGAAAUAGACCac
268	38	GUCUAUUUCCAGUUCGAGtt	645	CUCGAACUGGGAAAUAGACca

[0065]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
269	39	UCUAAUUCCCAGUUCGAGGttt	646	CCUCGAACUGGGAAAUAAGacc
270	40	CUAAUUCCCAGUUCGAGGctt	647	GCCUCGAACUGGGAAAUAGac
271	41	UAUUUCCCAGUUCGAGGcctt	648	GGCCUCGAACUGGGAAAUAga
272	42	AUUUCCCAGUUCGAGGccgtt	649	CGGCCUCGAACUGGGAAAUag
273	43	UUUCCCAGUUCGAGGCCGctt	650	GCGGCCUCGAACUGGGAAAta
274	44	UUCCCAGUUCGAGGCCGcutt	651	AGCGGCCUCGAACUGGGAAat
275	45	UCCCAGUUCGAGGCCGCUGttt	652	CAGCGGCCUCGAACUGGGAAaa
276	46	CCCAGUUCGAGGCCGCUGctt	653	GCAGCGGCCUCGAACUGGGaa
277	47	CCAGUUCGAGGCCGCUGcgtt	654	CGCAGCGGCCUCGAACUGGga
278	48	CAGUUCGAGGCCGCUGCGctt	655	GCGCAGCGGCCUCGAACUGgg
279	49	AGUUCGAGGCCGCUGCGcgtt	656	CGCGCAGCGGCCUCGAACUgg
280	50	GUUCGAGGCCGCUGCGCGgtt	657	CCGCGCAGCGGCCUCGAACtg
281	51	UUCGAGGCCGCUGCGCGGctt	658	GCCGCGCAGCGGCCUCGAAct
282	52	UCGAGGCCGCUGCGCGGCCctt	659	GGCCGCGCAGCGGCCUCGAac
283	53	CGAGGCCGCUGCGCGGCCctt	660	GGGCGCGCAGCGGCCUCGaa
284	54	GAGGCCGCUGCGCGGCCcutt	661	AGGGCCGCGCAGCGGCCUCga
285	55	AGGCCGCUGCGCGGCCcugtt	662	CAGGGCCGCGCAGCGGCCUcg
286	56	GGCCGCUGCGCGGCCcugctt	663	GCAGGGCCGCGCAGCGGCCtc
287	57	GCCGCUGCGCGGCCcugcgtt	664	CGCAGGGCCGCGCAGCGGCct
288	58	CCGCUGCGCGGCCcugcgtt	665	GCGCAGGGCCGCGCAGCGGcc
289	59	CGCUGCGCGGCCcugCGAtt	666	UGCAGAGGGCCGCGCAGCGgc
290	60	GCUGCGCGGCCcugCGAUtt	667	AUGCGCAGGGCCGCGCAGCgg
291	61	CUGCGCGGCCcugCGCAUgtt	668	CAUGCGCAGGGCCGCGCAGcg
292	62	UGCGCGGCCcugCGCAUGctt	669	GCAUGCGCAGGGCCGCGCAgc
293	63	GCGCGGCCcugCGCAUGCutt	670	AGCAUGCGCAGGGCCGCGCag
294	64	CGCGGCCcugCGCAUGCUGttt	671	CAGCAUGCGCAGGGCCGCGca
295	65	GCGGCCcugCGCAUGCUGctt	672	GCAGCAUGCGCAGGGCCGCGgc
296	66	CGGCCcugCGCAUGCUGcutt	673	AGCAGCAUGCGCAGGGCCGcg
297	67	GGCCCcugCGCAUGCUGGttt	674	CAGCAGCAUGCGCAGGGCCgc
298	68	GCCCUGCGCAUGCUGCUGgtt	675	CCAGCAGCAUGCAGGGCCcg

[0066]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
299	69	CCCUGCGCAUGCUGCUGGctt	676	GCCAGCAGCAUGCUGCAGGGcc
300	70	CCUGCGCAUGCUGCUGGCatt	677	UGCCAGCAGCAUGCUGCAGGgc
301	71	CUGCGCAUGCUGCUGGCAGtt	678	CUGCCAGCAGCAUGCUGCAGgg
302	72	UGC GCAUGCUGCUGGCAGatt	679	UCUGCCAGCAGCAUGCUGCagg
303	73	GCGCAUGCUGCUGGCAGAUtt	680	AUCUGCCAGCAGCAUGCUGCag
304	74	CGCAUGCUGCUGGCAGAUctt	681	GAUCUGCCAGCAGCAUGCUGCaa
305	75	GCAUGCUGCUGGCAGAUcatt	682	UGAUCUGCCAGCAGCAUGCUGCac
306	76	CAUGCUGCUGGCAGAUcagtt	683	CUGAUCUGCCAGCAGCAUGCUGCag
307	77	AUGCUGCUGGCAGAUcaggtt	684	CCUGAUCUGCCAGCAGCAUGCUGCac
308	78	UGCUGCUGGCAGAUcagggtt	685	CCCUGAUCUGCCAGCAGCActg
309	79	GCUGCUGGCAGAUcagggctt	686	GCCCUGAUCUGCCAGCAGCAat
310	80	CUGCUGGCAGAUcagggcctt	687	GGCCCUGAUCUGCCAGCAGCa
311	81	UGCUGGCAGAUcagggccatt	688	UGGCCUGAUCUGCCAGCAGgc
312	82	GCUGGCAGAUcagggccagtt	689	CUGGCCUGAUCUGCCAGCag
313	83	CUGGCAGAUcagggccagatt	690	UCUGGCCUGAUCUGCCAGcaa
314	84	UGGCAGAUcagggccagagtt	691	CUCUGGCCUGAUCUGCCAGgc
315	85	GGCAGAUcagggccagagctt	692	GCUCUGGCCUGAUCUGCCag
316	86	GCAGAUcagggccagagcuatt	693	AGCUCUGGCCUGAUCUGCcaa
317	87	CAGAUcagggccagagcugtt	694	CAGCUCUGGCCUGAUCUGccc
318	88	AGAUCAGGGCCAGAGCUGgtt	695	CCAGCUCUGGCCUGAUCUgc
319	89	GAUCAGGGCCAGAGCUGGatt	696	UCCAGCUCUGGCCUGAUCtg
320	90	AUCAGGGCCAGAGCUGGAatt	697	UCCAGCUCUGGCCUGAUct
321	91	UCAGGGCCAGAGCUGGAAGtt	698	CUUCCAGCUCUGGCCUGatc
322	92	CAGGGCCAGAGCUGGAAGgtt	699	CCUCCAGCUCUGGCCUGat
323	93	AGGGCCAGAGCUGGAAGGatt	700	UCCUCCAGCUCUGGCCUGa
324	94	GGGCCAGAGCUGGAAGGAGtt	701	CUCCUCCAGCUCUGGCCctg
325	95	GGCCAGAGCUGGAAGGAGgtt	702	CCUCCUCCAGCUCUGGCCct
326	96	GCCAGAGCUGGAAGGAGGatt	703	UCCUCCUCCAGCUCUGGCCcc
327	97	CCAGAGCUGGAAGGAGGAGtt	704	CUCCUCCUCCAGCUCUGGCCc
328	98	CAGAGCUGGAAGGAGGAGgtt	705	CCUCCUCCUCCAGCUCUGGgc

[0067]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
329	99	AGAGCUGGAAGGAGGAGGUttt	706	ACCUCCUCCUCCUCCAGCUCUgg
330	100	GAGCUGGAAGGAGGAGGUGttt	707	CACCUCUCCUCCUCCAGCUCtg
330	101	GAGCUGGAAGGAGGAGGUAtt	708	UACCUCUCCUCCUCCAGCUCtg
331	102	AGCUGGAAGGAGGAGGUGGttt	709	CCACCUCUCCUCCUCCAGCUCet
332	103	GCUGGAAGGAGGAGGUGGUttt	710	ACCACCUCUCCUCCUCCAGCtcc
333	104	CUGGAAGGAGGAGGUGGUGttt	711	CACCACCUCUCCUCCUCCAGet
334	105	UGGAAGGAGGAGGUGGUGAtt	712	UCACCACCUCUCCUCCUCCAgc
335	106	GGAAGGAGGAGGUGGUGACttt	713	GUCACCACCUCUCCUCCUCCag
336	107	GAAGGAGGAGGUGGUGACttt	714	GGUCACCACCUCUCCUCCUCCa
337	108	AAGGAGGAGGUGGUGACCGttt	715	CGGUCACCACCUCUCCUCCUcc
338	109	AGGAGGAGGUGGUGACCGUttt	716	ACGGUCACCACCUCUCCUCCtcc
339	110	GGAGGAGGUGGUGACCGUGttt	717	CACGGUCACCACCUCUCCUCCtt
340	111	GAGGAGGUGGUGACCGUGGttt	718	CCACGGUCACCACCUCUCCUCet
341	112	AGGAGGUGGUGACCGUGGAtt	719	UCCACGGUCACCACCUCUCCtcc
342	113	GGAGGUGGUGACCGUGGAGttt	720	CUCCACGGUCACCACCUCUCCtcc
343	114	GAGGUGGUGACCGUGGAGAtt	721	UCUCCACGGUCACCACCUCUcet
344	115	AGGUGGUGACCGUGGAGACttt	722	GUCUCCACGGUCACCACCUCUcc
345	116	GGUGGUGACCGUGGAGACGttt	723	CGUCUCCACGGUCACCACCtcc
346	117	GUGGUGACCGUGGAGACGUttt	724	ACGUCUCCACGGUCACCACet
347	118	UGGUGACCGUGGAGACGUGttt	725	CACGUCUCCACGGUCACCAcc
348	119	GGUGACCGUGGAGACGUGGttt	726	CCACGUCUCCACGGUCACCac
349	120	GUGACCGUGGAGACGUGGctt	727	GCCACGUCUCCACGGUCACca
350	121	UGACCGUGGAGACGUGGCAtt	728	UGCCACGUCUCCACGGUCAcc
351	122	GACCGUGGAGACGUGGCAGttt	729	CUGCCACGUCUCCACGGUCac
352	123	ACCGUGGAGACGUGGCAGGttt	730	CCUGCCACGUCUCCACGGUca
353	124	CCGUGGAGACGUGGCAGGAtt	731	UCCUGCCACGUCUCCACGGtcc
354	125	CGUGGAGACGUGGCAGGAGttt	732	CUCCUGCCACGUCUCCACGgt
355	126	GUGGAGACGUGGCAGGAGGttt	733	CCUCCUGCCACGUCUCCACgg
356	127	UGGAGACGUGGCAGGAGGGttt	734	CCCUGCCACGUCUCCACg
357	128	GGAGACGUGGCAGGAGGGctt	735	GCCCUGCCACGUCUCCac

[0068]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
358	129	GAGACGUGGCAGGAGGGCUCttt	736	AGCCCUCCUGCCACGUCUCca
359	130	AGACGUGGCAGGAGGGCUCttt	737	GAGCCCUCCUGCCACGUCUcc
360	131	GACGUGGCAGGAGGGCUCAtt	738	UGAGCCCUCCUGCCACGUCtc
361	132	ACGUGGCAGGAGGGCUCACttt	739	GUGAGCCCUCCUGCCACGUct
362	133	CGUGGCAGGAGGGCUCACUttt	740	AGUGAGCCCUCCUGCCACGtc
363	134	GUGGCAGGAGGGCUCACUCttt	741	GAGUGAGCCCUCCUGCCACgt
364	135	UGGCAGGAGGGCUCACUCAttt	742	UGAGUGAGCCCUCCUGCCAag
365	136	GGCAGGAGGGCUCACUCAAtt	743	UUGAGUGAGCCCUCCUGCCac
366	137	GCAGGAGGGCUCACUCAAAttt	744	UUUGAGUGAGCCCUCCUGCca
367	138	CAGGAGGGCUCACUCAAAAGttt	745	CUUUGAGUGAGCCCUCCUGcc
368	139	AGGAGGGCUCACUCAAAAGCttt	746	GCUUUGAGUGAGCCCUCCUgc
369	140	GGAGGGCUCACUCAAAAGCctt	747	GGCUUUGAGUGAGCCCUCCtg
370	141	GAGGGCUCACUCAAAAGCCUttt	748	AGGCUUUGAGUGAGCCCUCCt
371	142	AGGGCUCACUCAAAAGCCUCttt	749	GAGGCUUUGAGUGAGCCCUcc
372	143	GGGCUCACUCAAAAGCCUCctt	750	GGAGGCUUUGAGUGAGCCctc
373	144	GGCUCACUCAAAAGCCUCCUttt	751	AGGAGGCUUUGAGUGAGCCct
374	145	GCUCACUCAAAAGCCUCCUGttt	752	CAGGAGGCUUUGAGUGAGccc
375	146	CUCACUCAAAAGCCUCCUGCttt	753	GCAGGAGGCUUUGAGUGAGcc
376	147	UCACUCAAAAGCCUCCUGCctt	754	GGCAGGAGGCUUUGAGUGAgc
377	148	CACUCAAAAGCCUCCUGCCUttt	755	AGGCAGGAGGCUUUGAGUGag
378	149	ACUCAAAAGCCUCCUGCCUAAtt	756	UAGGCAGGAGGCUUUGAGUga
379	150	CUCAAAAGCCUCCUGCCUAUttt	757	AUAGGCAGGAGGCUUUGAGtg
380	151	UCAAAAGCCUCCUGCCUAUAAtt	758	UAUAGGCAGGAGGCUUUGAgt
381	152	CAAAGCCUCCUGCCUAUACttt	759	GUUAAGGCAGGAGGCUUUGag
382	153	AAAGCCUCCUGCCUAUACGttt	760	CGUAUAGGCAGGAGGCUUUGa
383	154	AAGCCUCCUGCCUAUACGGttt	761	CCGUUAUAGGCAGGAGGCUUtg
384	155	AGCCUCCUGCCUAUACGGGttt	762	CCCGUAUAGGCAGGAGGCUttt
385	156	GCCUCCUGCCUAUACGGGctt	763	GCCCGUAUAGGCAGGAGGCttt
386	157	CCUCCUGCCUAUACGGGCAtt	764	UGCCCGUAUAGGCAGGAGGct
387	158	CUCCUGCCUAUACGGGCAGttt	765	CUGCCCGUAUAGGCAGGAGgc

[0069]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
388	159	UCCUGCCUAUACGGGCAGCttt	766	GCUGCCCGUAUAGGCAGGAgg
389	160	CCUGCCUAUACGGGCAGCutt	767	AGCUGCCCGUAUAGGCAGGag
390	161	CUGCCUAUACGGGCAGCUCttt	768	GAGCUGCCCGUAUAGGCAGga
391	162	UGCCUAUACGGGCAGCUCctt	769	GGAGCUGCCCGUAUAGGCAGg
392	163	GCCUAUACGGGCAGCUCctt	770	GGGAGCUGCCCGUAUAGGCag
409	164	CCCAAGUUC CAGGACGGAGttt	771	CUCCGUCCUGGAACUUGGGga
410	165	CCAAGUUC CAGGACGGAGatt	772	UCUCCGUCCUGGAACUUGGgg
411	166	CAAGUUC CAGGACGGAGactt	773	GUCUCCGUCCUGGAACUUGgg
412	167	AAGUUC CAGGACGGAGACctt	774	GGUCUCCGUCCUGGAACUUGg
413	168	AGUUC CAGGACGGAGACCUtt	775	AGGUCUCCGUCCUGGAACUtg
414	169	GUUC CAGGACGGAGACCUctt	776	GAGGUCUCCGUCCUGGAACtt
415	170	UUC CAGGACGGAGACCUcat	777	UGAGGUCUCCGUCCUGGAAct
416	171	UCCAGGACGGAGACCUCActt	778	GUGAGGUCUCCGUCCUGGAac
417	172	CCAGGACGGAGACCUCAcctt	779	GGUGAGGUCUCCGUCCUGGaa
418	173	CAGGACGGAGACCUCAccctt	780	GGGUGAGGUCUCCGUCCUGga
419	174	AGGACGGAGACCUCAccCUtt	781	AGGGUGAGGUCUCCGUCCUgg
420	175	GGACGGAGACCUCAccCUGtt	782	CAGGGUGAGGUCUCCGUCCtg
421	176	GACGGAGACCUCAccCUGutt	783	ACAGGGUGAGGUCUCCGUcct
422	177	ACGGAGACCUCAccCUGUatt	784	UACAGGGUGAGGUCUCCGUccc
423	178	CGGAGACCUCAccCUGUactt	785	GUACAGGGUGAGGUCUCCGtc
424	179	GGAGACCUCAccCUGUACctt	786	GGUACAGGGUGAGGUCUCCgt
425	180	GAGACCUCAccCUGUACcat	787	UGGUACAGGGUGAGGUCUCcg
426	181	AGACCUCAccCUGUACcagtt	788	CUGGUACAGGGUGAGGUCUccc
427	182	GACCUCAccCUGUACcAGutt	789	ACUGGUACAGGGUGAGGUctc
428	183	ACCUCAccCUGUACcAGUctt	790	GACUGGUACAGGGUGAGGUct
429	184	CCUCAccCUGUACcAGUCctt	791	GGACUGGUACAGGGUGAGGtc
430	185	CUCAccCUGUACcAGUCCatt	792	UGGACUGGUACAGGGUGAGgt
431	186	UCACCCUGUACcAGUCCAAtt	793	UUGGACUGGUACAGGGUGAgg
432	187	CACCCUGUACcAGUCCAAUtt	794	AUUGGACUGGUACAGGGUGag
433	188	ACCCUGUACcAGUCCAAUatt	795	UAUUGGACUGGUACAGGGUGa

[0070]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
434	189	CCCUGUACCAGUCCAAUACt	796	GUAUUGGACUGGUACAGGGtg
435	190	CCUGUACCAGUCCAAUACct	797	GGUAUUGGACUGGUACAGGgt
436	191	CUGUACCAGUCCAAUACCAtt	798	UGGUAUUGGACUGGUACAGgg
437	192	UGUACCAGUCCAAUACCAUtt	799	AUGGUAUUGGACUGGUACAgg
438	193	GUACCAGUCCAAUACCAUct	800	GAUGGUAUUGGACUGGUACag
439	194	UACCAGUCCAAUACCAUCCtt	801	GGAUGGUAUUGGACUGGUACa
440	195	ACCAGUCCAAUACCAUCCUtt	802	AGGAUGGUAUUGGACUGGUac
441	196	CCAGUCCAAUACCAUCCUGtt	803	CAGGAUGGUAUUGGACUGGta
442	197	CAGUCCAAUACCAUCCUGct	804	GCAGGAUGGUAUUGGACUGgt
443	198	AGUCCAAUACCAUCCUGCGtt	805	CGCAGGAUGGUAUUGGACUgg
444	199	GUCCAAUACCAUCCUGCGUtt	806	ACGCAGGAUGGUAUUGGACtg
445	200	UCCAAUACCAUCCUGCGUCtt	807	GACGCAGGAUGGUAUUGGAct
446	201	CCAAUACCAUCCUGCGUCAtt	808	UGACGCAGGAUGGUAUUGGac
447	202	CAAUACCAUCCUGCGUCACtt	809	GUGACGCAGGAUGGUAUUGGa
448	203	AAUACCAUCCUGCGUCACct	810	GGUGACGCAGGAUGGUAUUGgg
449	204	AUACCAUCCUGCGUCACCUtt	811	AGGUGACGCAGGAUGGUAUtg
450	205	UACCAUCCUGCGUCACCUGtt	812	CAGGUGACGCAGGAUGGUAtt
451	206	ACCAUCCUGCGUCACCUGGtt	813	CCAGGUGACGCAGGAUGGUat
452	207	CCAUCCUGCGUCACCUGGGtt	814	CCCAGGUGACGCAGGAUGGta
453	208	CAUCCUGCGUCACCUGGGct	815	GCCCAGGUGACGCAGGAUGgt
454	209	AUCCUGCGUCACCUGGGCCtt	816	GGCCCAGGUGACGCAGGAUgg
455	210	UCCUGCGUCACCUGGGCCGtt	817	CGGCCCAGGUGACGCAGGAtg
456	211	CCUGCGUCACCUGGGCCCGtt	818	GCGGCCCAGGUGACGCAGGat
457	212	CUGCGUCACCUGGGCCGCAtt	819	UGCGGCCCAGGUGACGCAGga
458	213	UGCUCACCUGGGCCGCACtt	820	GUGCGGCCCAGGUGACGCAGg
459	214	GCGUCACCUGGGCCGCACct	821	GGUGCGGCCCAGGUGACGCag
460	215	CGUCACCUGGGCCGCACCCtt	822	GGGUGCGGCCCAGGUGACGca
461	216	GUCACCUGGGCCGCACCCUtt	823	AGGGUGCGGCCCAGGUGACgc
462	217	UCACCUGGGCCGCACCCUtt	824	AAGGGUGCGGCCCAGGUGAcg
463	218	CACCUGGGCCGCACCCUUGtt	825	CAAGGGUGCGGCCCAGGUGac

[0071]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
464	219	ACCUGGGCCGCACCCUUGGttt	826	CCAAGGGUGCGGCCCAGGUga
465	220	CCUGGGCCGCACCCUUGGGttt	827	CCCAAGGGUGCGGCCCAGGtg
466	221	CUGGGCCGCACCCUUGGGctt	828	GCCCAAGGGUGCGGCCCAGgt
467	222	UGGGCCGCACCCUUGGGCUttt	829	AGCCCAAGGGUGCGGCCCAgg
468	223	GGGCCGCACCCUUGGGCUCttt	830	GAGCCCAAGGGUGCGGCCCag
469	224	GGCCGCACCCUUGGGCUCUttt	831	AGAGCCCAAGGGUGCGGCCca
470	225	GCCGCACCCUUGGGCUCUAttt	832	UAGAGCCCAAGGGUGCGGCCcc
471	226	CCGCACCCUUGGGCUCUAUttt	833	AUAGAGCCCAAGGGUGCGGCCc
472	227	CGCACCCUUGGGCUCUAUGttt	834	CAUAGAGCCCAAGGGUGCGGgc
473	228	GCACCCUUGGGCUCUAUGGttt	835	CCAUAGAGCCCAAGGGUGCgg
474	229	CACCCUUGGGCUCUAUGGGttt	836	CCCAUAGAGCCCAAGGGUGcg
475	230	ACCCUUGGGCUCUAUGGGAtt	837	UCCCAUAGAGCCCAAGGGUgc
476	231	CCCUUGGGCUCUAUGGGAAtt	838	UUCCCAUAGAGCCCAAGGGtg
477	232	CCUUGGGCUCUAUGGGAAGtt	839	CUUCCCAUAGAGCCCAAGGgt
478	233	CUUGGGCUCUAUGGGAAGGttt	840	CCUCCCAUAGAGCCCAAGgg
479	234	UUGGGCUCUAUGGGAAGGAtt	841	UCCUCCCAUAGAGCCCAAgg
480	235	UGGGCUCUAUGGGAAGGACttt	842	GUCCUCCCAUAGAGCCCAag
481	236	GGGCUCUAUGGGAAGGACctt	843	GGUCCUCCCAUAGAGCCCa
482	237	GGCUCUAUGGGAAGGACCAttt	844	UGGUCCUCCCAUAGAGCCca
483	238	GCUCUAUGGGAAGGACCAGttt	845	CUGGUCCUCCCAUAGAGCcc
484	239	CUCUAUGGGAAGGACCAGctt	846	GCUGGUCCUCCCAUAGAGcc
485	240	UCUAUGGGAAGGACCAGCAttt	847	UGCUGGUCCUCCCAUAGAgc
486	241	CUAUGGGAAGGACCAGCAGttt	848	CUGCUGGUCCUCCCAUAGag
487	242	UAUGGGAAGGACCAGCAGGttt	849	CCUGCUGGUCCUCCCAUAga
488	243	AUGGGAAGGACCAGCAGGAtt	850	UCCUGCUGGUCCUCCCAUag
489	244	UGGGAAGGACCAGCAGGAGttt	851	CUCCUGCUGGUCCUCCCAta
490	245	GGGAAGGACCAGCAGGAGGttt	852	CCUCCUGCUGGUCCUCCCAat
491	246	GGAAGGACCAGCAGGAGGctt	853	GCCUCCUGCUGGUCCUCCca
492	247	GAAGGACCAGCAGGAGGCAtt	854	UGCCUCCUGCUGGUCCUUCcc
493	248	AAGGACCAGCAGGAGGCAGttt	855	CUGCCUCCUGCUGGUCCUUCc

[0072]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
494	249	AGGACCAGCAGGAGGCAGCttt	856	GCUGCCUCCUGCUGGUCCUttc
495	250	GGACCAGCAGGAGGCAGCttt	857	GGCUGCCUCCUGCUGGUCCttt
496	251	GACCAGCAGGAGGCAGCttt	858	GGGCUGCCUCCUGCUGGUCCtt
497	252	ACCAGCAGGAGGCAGCCCUttt	859	AGGGCUGCCUCCUGCUGGUccc
498	253	CCAGCAGGAGGCAGCCCUgtt	860	CAGGGCUGCCUCCUGCUGGtcc
499	254	CAGCAGGAGGCAGCCCUgtt	861	CCAGGGCUGCCUCCUGCUGgtt
500	255	AGCAGGAGGCAGCCCUgtt	862	ACCAGGGCUGCCUCCUGCUggg
501	256	GCAGGAGGCAGCCCUggugt	863	CACCAGGGCUGCCUCCUGCttg
502	257	CAGGAGGCAGCCCUggugt	864	CCACCAGGGCUGCCUCCUGctt
503	258	AGGAGGCAGCCCUggUGAtt	865	UCCACCAGGGCUGCCUCCUgc
504	259	GGAGGCAGCCCUggUGACtt	866	GUCCACCAGGGCUGCCUCCtg
505	260	GAGGCAGCCCUggUGGACAtt	867	UGUCCACCAGGGCUGCCUCctt
506	261	AGGCAGCCCUggUGGACAUtt	868	AUGUCCACCAGGGCUGCCUccc
507	262	GGCAGCCCUggUGGACAUGtt	869	CAUGUCCACCAGGGCUGCCtcc
508	263	GCAGCCCUggUGGACAUGGtt	870	CCAUGUCCACCAGGGCUGCctt
509	264	CAGCCCUggUGGACAUGGUtt	871	ACCAUGUCCACCAGGGCUGccc
510	265	AGCCCUggUGGACAUGGUGtt	872	CACCAUGUCCACCAGGGCUgc
511	266	GCCCUggUGGACAUGGUGAtt	873	UCACCAUGUCCACCAGGGCtg
512	267	CCCUggUGGACAUGGUGAAtt	874	UUCACCAUGUCCACCAGGGctt
513	268	CCUGGUGGACAUGGUGAAUtt	875	AUUCACCAUGUCCACCAGGgc
514	269	CUGGUGGACAUGGUGAAUGtt	876	CAUUCACCAUGUCCACCAGgg
515	270	UGGUGGACAUGGUGAAUGAtt	877	UCAUUCACCAUGUCCACCagg
516	271	GGUGGACAUGGUGAAUGACtt	878	GUCAUUCACCAUGUCCACCag
517	272	GUGGACAUGGUGAAUGACGtt	879	CGUCAUUCACCAUGUCCACca
518	273	UGGACAUGGUGAAUGACGGtt	880	CCGUCAUUCACCAUGUCCAccc
519	274	GGACAUGGUGAAUGACGGCtt	881	GCCGUCAUUCACCAUGUCCacc
520	275	GACAUGGUGAAUGACGGCGtt	882	CGCCGUCAUUCACCAUGUCca
521	276	ACAUGGUGAAUGACGGCGUtt	883	ACGCCGUCAUUCACCAUGUccc
522	277	CAUGGUGAAUGACGGCGUGtt	884	CACGCCGUCAUUCACCAUGtcc
523	278	AUGGUGAAUGACGGCGUGGtt	885	CCACGCCGUCAUUCACCAUgtt

[0073]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
524	279	UGGUGAAUGACGGCGUGGAtt	886	UCCACGCCGUGAUUCACCAtg
525	280	GGUGAAUGACGGCGUGGAGtt	887	CUCCACGCCGUGAUUCACCat
526	281	GUGAAUGACGGCGUGGAGGtt	888	CCUCCACGCCGUGAUUCACca
527	282	UGAAUGACGGCGUGGAGGAtt	889	UCCUCCACGCCGUGAUUCAcc
528	283	GAAUGACGGCGUGGAGGACtt	890	GUCCUCCACGCCGUGAUUCac
529	284	AAUGACGGCGUGGAGGACtt	891	GGUCCUCCACGCCGUGAUUca
530	285	AUGACGGCGUGGAGGACCUtt	892	AGGUCCUCCACGCCGUGAUtc
531	286	UGACGGCGUGGAGGACCUCtt	893	GAGGUCCUCCACGCCGUCAtt
532	287	GACGGCGUGGAGGACCUCtt	894	GGAGGUCCUCCACGCCGUCat
533	288	ACGGCGUGGAGGACCUCCGtt	895	CGGAGGUCCUCCACGCCGUca
534	289	CGGCGUGGAGGACCUCCGtt	896	GCGGAGGUCCUCCACGCCGtc
535	290	GGCGUGGAGGACCUCCGCUtt	897	AGCGGAGGUCCUCCACGCCgt
536	291	GCGUGGAGGACCUCCGCUGtt	898	CAGCGGAGGUCCUCCACGCcg
537	292	CGUGGAGGACCUCCGCUGtt	899	GCAGCGGAGGUCCUCCACGcc
538	293	GUGGAGGACCUCCGCUGCAtt	900	UGCAGCGGAGGUCCUCCACgc
539	294	UGGAGGACCUCCGCUGCAAtt	901	UUGCAGCGGAGGUCCUCCAcg
540	295	GGAGGACCUCCGCUGCAAAtt	902	UUUGCAGCGGAGGUCCUCCac
541	296	GAGGACCUCCGCUGCAAUtt	903	AUUUGCAGCGGAGGUCCUCca
542	297	AGGACCUCCGCUGCAAUAtt	904	UAUUUGCAGCGGAGGUCCUcc
543	298	GGACCUCCGCUGCAAUACtt	905	GUUUUGCAGCGGAGGUCCtc
544	299	GACCUCCGCUGCAAUACAtt	906	UGUAUUUGCAGCGGAGGUCet
545	300	ACCUCCGCUGCAAUACAUtt	907	AUGUAUUUGCAGCGGAGGUcc
546	301	CCUCCGCUGCAAUACAUCtt	908	GAUGUAUUUGCAGCGGAGGtc
547	302	CUCCGCUGCAAUACAUCUtt	909	AGAUGUAUUUGCAGCGGAGgt
548	303	UCCGCUGCAAUACAUCUCtt	910	GAGAUGUAUUUGCAGCGGAgg
549	304	CCGCUGCAAUACAUCUCtt	911	GGAGAUGUAUUUGCAGCGGag
550	305	CGCUGCAAUACAUCUCCtt	912	GGGAGAUGUAUUUGCAGCGga
551	306	GCUGCAAUACAUCUCCCUtt	913	AGGGAGAUGUAUUUGCAGCgg
552	307	CUGCAAUACAUCUCCUCtt	914	GAGGGAGAUGUAUUUGCAGcg
553	308	UGCAAUACAUCUCCCUCAtt	915	UGAGGGAGAUGUAUUUGCAGc

[0074]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
554	309	GCAAAUACAUCUCCCUCAUttt	916	AUGAGGGGAGAUGUAUUUGCag
555	310	CAAAUACAUCUCCCUCAUctt	917	GAUGAGGGGAGAUGUAUUUGca
556	311	AAAUACAUCUCCCUCAUCUttt	918	AGAUGAGGGGAGAUGUAUUUGc
557	312	AAUACAUCUCCCUCAUCUAtt	919	UAGAUGAGGGGAGAUGUAUUtg
558	313	AUACAUCUCCCUCAUCUAcct	920	GUAGAUGAGGGGAGAUGUAUtt
559	314	UACAUCUCCCUCAUCUACAtt	921	UGUAGAUGAGGGGAGAUGUAAtt
560	315	ACAUCUCCCUCAUCUACAcct	922	GUGUAGAUGAGGGGAGAUGUat
561	316	CAUCUCCCUCAUCUACACctt	923	GGUGUAGAUGAGGGGAGAUGta
562	317	AUCUCCCUCAUCUACACCAAtt	924	UGGUGUAGAUGAGGGGAGUgt
563	318	UCUCCCUCAUCUACACCAAtt	925	UUGGUGUAGAUGAGGGGAGAtg
563	319	GCUCCCUCAUCUACACCAAtt	926	UUGGUGUAGAUGAGGGGAGCtg
564	320	CUCCCUCAUCUACACCAACctt	927	GUUGGUGUAGAUGAGGGGAGat
565	321	UCCCUCAUCUACACCAACUttt	928	AGUUGGUGUAGAUGAGGGGAg
565	322	CUCCCUCAUCUACACCAAAAtt	929	UUUGGUGUAGAUGAGGGGAGat
566	323	CCCUCUACUACACCAACUAAtt	930	UAGUUGGUGUAGAUGAGGGGag
567	324	CCUCAUCUACACCAACUAUttt	931	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
567	325	CCUCAUCUACACCAACUAAtt	932	UUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
568	326	CUCAUCUACACCAACUAUGttt	933	CAUAGUUGGUGUAGAUGAGgg
569	327	UCAUCUACACCAACUAUGAtt	934	UCAAGUUGGUGUAGAUGAgg
570	328	CAUCUACACCAACUAUGAGttt	935	CUCAUAGUUGGUGUAGAUGag
571	329	AUCUACACCAACUAUGAGGttt	936	CCUCAUAGUUGGUGUAGUga
572	330	UCUACACCAACUAUGAGGctt	937	GCCUCAUAGUUGGUGUAGAtg
573	331	CUACACCAACUAUGAGGCGttt	938	CGCCUCAUAGUUGGUGUAGat
574	332	UACACCAACUAUGAGGCGGttt	939	CCGCCUCAUAGUUGGUGUAGa
575	333	ACACCAACUAUGAGGCGGGttt	940	CCCGCCUCAUAGUUGGUGUag
576	334	CACCAACUAUGAGGCGGGctt	941	GCCCGCCUCAUAGUUGGUGta
577	335	ACCAACUAUGAGGCGGGCAttt	942	UGCCCGCCUCAUAGUUGGUGt
578	336	CCAACUAUGAGGCGGGCAAtt	943	UUGCCCGCCUCAUAGUUGGtg
579	337	CAACUAUGAGGCGGGCAAGttt	944	CUUGCCCGCCUCAUAGUUGgt
580	338	AACUAUGAGGCGGGCAAGttt	945	CCUUGCCCGCCUCAUAGUUGg

[0075]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
581	339	ACUAUGAGGCGGGCAAGGAtt	946	UCCUUGCCCCGCCUCAUAGUt
582	340	CUAUGAGGCGGGCAAGGAUtt	947	AUCCUUGCCCCGCCUCAUAGtt
583	341	UAUGAGGCGGGCAAGGAUGtt	948	CAUCCUUGCCCCGCCUCAUAgt
584	342	AUGAGGCGGGCAAGGAUGAtt	949	UCAUCCUUGCCCCGCCUCAUag
585	343	UGAGGCGGGCAAGGAUGACtt	950	GUCAUCCUUGCCCCGCCUCAta
586	344	GAGGCGGGCAAGGAUGACUtt	951	AGUCAUCCUUGCCCCGCCUCAt
587	345	AGGCGGGCAAGGAUGACUAtt	952	UAGUCAUCCUUGCCCCGCCUca
588	346	GCGGGCAAGGAUGACUAUtt	953	AUAGUCAUCCUUGCCCCGCCtc
589	347	GCGGGCAAGGAUGACUAUGtt	954	CAUAGUCAUCCUUGCCCCGCt
590	348	CGGGCAAGGAUGACUAUGUtt	955	ACAUAGUCAUCCUUGCCCCGcc
591	349	GGGCAAGGAUGACUAUGUGtt	956	CACAUAGUCAUCCUUGCCCCgc
592	350	GGCAAGGAUGACUAUGUGAtt	957	UCACAUAGUCAUCCUUGCCcg
593	351	GCAAGGAUGACUAUGUGAAtt	958	UUCACAUAGUCAUCCUUGCcc
594	352	CAAGGAUGACUAUGUGAAGtt	959	CUUCACAUAGUCAUCCUUGccc
595	353	AAGGAUGACUAUGUGAAGGtt	960	CCUUCACAUAGUCAUCCUUGc
596	354	AGGAUGACUAUGUGAAGGCtt	961	GCCUUCACAUAGUCAUCCUtg
597	355	GGAUGACUAUGUGAAGGCAtt	962	UGCCUUCACAUAGUCAUCCtt
598	356	GAUGACUAUGUGAAGGCACtt	963	GUGCCUUCACAUAGUCAUCt
599	357	AUGACUAUGUGAAGGCACUtt	964	AGUGCCUUCACAUAGUCAUcc
600	358	UGACUAUGUGAAGGCACUGtt	965	CAGUGCCUUCACAUAGUCAtc
601	359	GACUAUGUGAAGGCACUGCtt	966	GCAGUGCCUUCACAUAGUCat
602	360	ACUAUGUGAAGGCACUGCCtt	967	GGCAGUGCCUUCACAUAGUca
603	361	CUAUGUGAAGGCACUGCCct	968	GGGCAGUGCCUUCACAUAGtc
604	362	UAUGUGAAGGCACUGCCCGtt	969	CGGGCAGUGCCUUCACAUAg
605	363	AUGUGAAGGCACUGCCCGGtt	970	CCGGGCAGUGCCUUCACAUag
606	364	UGUGAAGGCACUGCCCGGGtt	971	CCCGGGCAGUGCCUUCACAta
607	365	GUGAAGGCACUGCCCGGGct	972	GCCCGGGCAGUGCCUUCACat
608	366	UGAAGGCACUGCCCGGGCAtt	973	UGCCCGGGCAGUGCCUUCAc
609	367	GAAGGCACUGCCCGGGCAAtt	974	UUGCCCGGGCAGUGCCUUCac
610	368	AAGGCACUGCCCGGGCAACtt	975	GUUGCCCGGGCAGUGCCUUCa

[0076]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
611	369	AGGCACUGCCCGGGCAACUttt	976	AGUUGCCCGGGCAGUGCCUtc
612	370	GGCACUGCCCGGGCAACUGttt	977	CAGUUGCCCGGGCAGUGCCttt
613	371	GCACUGCCCGGGCAACUGAtt	978	UCAGUUGCCCGGGCAGUGCct
614	372	CACUGCCCGGGCAACUGAAtt	979	UUCAGUUGCCCGGGCAGUGcc
615	373	ACUGCCCGGGCAACUGAAGtt	980	CUUCAGUUGCCCGGGCAGUgc
616	374	CUGCCCGGGCAACUGAAGCtt	981	GCUUCAGUUGCCCGGGCAGtg
617	375	UGCCCGGGCAACUGAAGCctt	982	GGCUUCAGUUGCCCGGGCAgt
618	376	GCCCGGGCAACUGAAGCCUttt	983	AGGCUUCAGUUGCCCGGGCag
619	377	CCCGGGCAACUGAAGCCUUttt	984	AAGGCUUCAGUUGCCCGGGca
620	378	CCGGGCAACUGAAGCCUUUttt	985	AAAGGCUUCAGUUGCCCGGgc
621	379	CGGGCAACUGAAGCCUUUttt	986	AAAAGGCUUCAGUUGCCCGgg
622	380	GGGCAACUGAAGCCUUUUGttt	987	CAAAAGGCUUCAGUUGCCcg
623	381	GGCAACUGAAGCCUUUUGAtt	988	UCAAAAGGCUUCAGUUGCCcg
624	382	GCAACUGAAGCCUUUUGAGttt	989	CUCAAAAGGCUUCAGUUGCcc
625	383	CAACUGAAGCCUUUUGAGAtt	990	UCUCAAAAGGCUUCAGUUGcc
626	384	AACUGAAGCCUUUUGAGACttt	991	GUCUCAAAAGGCUUCAGUUGgc
627	385	ACUGAAGCCUUUUGAGACCttt	992	GGUCUCAAAAGGCUUCAGUtg
627	386	ACUGAAGCCUUUUGAGACAtt	993	UGUCUCAAAAGGCUUCAGUtg
628	387	CUGAAGCCUUUUGAGACCCttt	994	GGGUCUCAAAAGGCUUCAGttt
629	388	UGAAGCCUUUUGAGACCCUttt	995	AGGGUCUCAAAAGGCUUCAg
630	389	GAAGCCUUUUGAGACCCUGttt	996	CAGGGUCUCAAAAGGCUUCag
631	390	AAGCCUUUUGAGACCCUGCttt	997	GCAGGGUCUCAAAAGGCUUca
631	391	GAAGCCUUUUGAGACCCUAtt	998	UAGGGUCUCAAAAGGCUUCag
632	392	AGCCUUUUGAGACCCUGCUttt	999	AGCAGGGUCUCAAAAGGCUtc
632	393	CGCCUUUUGAGACCCUGCAtt	1000	UGCAGGGUCUCAAAAGGCGtc
632	394	AGCCUUUUGAGACCCUGCAtt	1001	UGCAGGGUCUCAAAAGGCUtc
633	395	GCCUUUUGAGACCCUGCUGttt	1002	CAGCAGGGUCUCAAAAGGCTtt
634	396	CCUUUUGAGACCCUGCUGUttt	1003	ACAGCAGGGUCUCAAAAGGct
634	397	CCUUUUGAGACCCUGCUGAtt	1004	UCAGCAGGGUCUCAAAAGGct
635	398	CUUUUGAGACCCUGCUGUCttt	1005	GACAGCAGGGUCUCAAAAGgc

[0077]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
635	399	CUUUUGAGACCCUGCUGUAAtt	1006	UACAGCAGGGUCUCAAAGgc
636	400	UUUUGAGACCCUGCUGUCctt	1007	GGACAGCAGGGUCUCAAAGg
637	401	UUUGAGACCCUGCUGUCCctt	1008	GGGACAGCAGGGUCUCAAag
638	402	UUGAGACCCUGCUGUCCCAAtt	1009	UGGGACAGCAGGGUCUCAAaa
639	403	UGAGACCCUGCUGUCCCAgctt	1010	CUGGGACAGCAGGGUCUCAaa
640	404	GAGACCCUGCUGUCCCAgAtt	1011	UCUGGGACAGCAGGGUCUCaa
641	405	AGACCCUGCUGUCCCAgAAAtt	1012	UUCUGGGACAGCAGGGUCUca
642	406	GACCCUGCUGUCCCAgAActt	1013	GUUCUGGGACAGCAGGGUCtc
643	407	ACCCUGCUGUCCCAgAACctt	1014	GGUUCUGGGACAGCAGGGUct
643	408	ACCCUGCUGUCCCAgAACAtt	1015	UGUUCUGGGACAGCAGGGUct
644	409	CCCUGCUGUCCCAgAACctt	1016	UGGUUCUGGGACAGCAGGGtc
645	410	CCUGCUGUCCCAgAACCAgctt	1017	CUGGUUCUGGGACAGCAGGgt
646	411	CUGCUGUCCCAgAACCAgGctt	1018	CCUGGUUCUGGGACAGCAGgg
647	412	UGCUGUCCCAgAACCAgGGctt	1019	CCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
648	413	UGCUGUCCCAgAACCAgGAAtt	1020	UCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
648	414	GCUGUCCCAgAACCAgGGAtt	1021	UCCCUGGUUCUGGGACAGCag
649	415	CUGUCCCAgAACCAgGGAGctt	1022	CUCCCUGGUUCUGGGACAGca
650	416	UGUCCCAgAACCAgGGAGGctt	1023	CCUCCCUGGUUCUGGGACAgc
651	417	GUCCCAgAACCAgGGAGGctt	1024	GCCUCCCUGGUUCUGGGACag
652	418	UCCCAgAACCAgGGAGGCActt	1025	UGCCUCCCUGGUUCUGGGAca
653	419	CCCAGAACCAgGGAGGCAAtt	1026	UUGCCUCCCUGGUUCUGGGac
654	420	CCAGAACCAgGGAGGCAAGctt	1027	CUUGCCUCCCUGGUUCUGGga
655	421	CAGAACCAgGGAGGCAAGAtt	1028	UCUUGCCUCCCUGGUUCUGgg
656	422	AGAACCAgGGAGGCAAGACctt	1029	GUCUUGCCUCCCUGGUUCUgg
657	423	GAACCAgGGAGGCAAGACctt	1030	GGUCUUGCCUCCCUGGUUCtg
658	424	AACCAgGGAGGCAAGACCUctt	1031	AGGUCUUGCCUCCCUGGUUct
659	425	ACCAGGGAGGCAAGACCUUctt	1032	AAGGUCUUGCCUCCCUGGUtc
660	426	CCAGGGAGGCAAGACCUUCctt	1033	GAAGGUCUUGCCUCCCUGGtt
661	427	CAGGGAGGCAAGACCUUCActt	1034	UGAAGGUCUUGCCUCCCUGgt
662	428	AGGGAGGCAAGACCUUCAUctt	1035	AUGAAGGUCUUGCCUCCCUGg

[0078]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
663	429	GGGAGGCAAGACCUUCAUUt	1036	AAUGAAGGUCUUGCCUCCctg
664	430	GGAGGCAAGACCUUCAUUGt	1037	CAAUGAAGGUCUUGCCUCCct
665	431	GAGGCAAGACCUUCAUUGUt	1038	ACAAUGAAGGUCUUGCCUCcc
666	432	AGGCAAGACCUUCAUUGUGt	1039	CACAAUGAAGGUCUUGCCUcc
667	433	GGCAAGACCUUCAUUGUGGt	1040	CCACAAUGAAGGUCUUGCCtc
668	434	GCAAGACCUUCAUUGUGGGt	1041	CCCACAAUGAAGGUCUUGCct
669	435	CAAGACCUUCAUUGUGGGAt	1042	UCCCACAAUGAAGGUCUUGcc
670	436	AAGACCUUCAUUGUGGGAGt	1043	CUCCCACAAUGAAGGUCUUGc
671	437	AGACCUUCAUUGUGGGAGAt	1044	UCUCCCACAAUGAAGGUCUt
672	438	GACCUUCAUUGUGGGAGACt	1045	GUCUCCCACAAUGAAGGUCtt
673	439	ACCUUCAUUGUGGGAGACct	1046	GGUCUCCCACAAUGAAGGUct
674	440	CCUUCAUUGUGGGAGACAtt	1047	UGGUCUCCCACAAUGAAGGtc
675	441	CUUCAUUGUGGGAGACCAGt	1048	CUGGUCUCCCACAAUGAAGgt
676	442	UUCAUUGUGGGAGACCAGAt	1049	UCUGGUCUCCCACAAUGAAGg
677	443	UCAUUGUGGGAGACCAGAUt	1050	AUCUGGUCUCCCACAAUGAag
678	444	CAUUGUGGGAGACCAGAUct	1051	GAUCUGGUCUCCCACAAUGaa
679	445	AUUGUGGGAGACCAGAUcUt	1052	AGAUCUGGUCUCCCACAAUGa
680	446	UUGUGGGAGACCAGAUcUct	1053	GAGAUCUGGUCUCCCACAAtg
681	447	UGUGGGAGACCAGAUcUcct	1054	GGAGAUCUGGUCUCCCACAat
682	448	GUGGGAGACCAGAUcUccUt	1055	AGGAGAUCUGGUCUCCCACaa
683	449	UGGGAGACCAGAUcUccUUt	1056	AAGGAGAUCUGGUCUCCCACAa
684	450	GGGAGACCAGAUcUccUUCt	1057	GAAGGAGAUCUGGUCUCCCac
685	451	GGAGACCAGAUcUccUUCGt	1058	CGAAGGAGAUCUGGUCUCCca
686	452	GAGACCAGAUcUccUUCGct	1059	GCGAAGGAGAUCUGGUCUCcc
687	453	AGACCAGAUcUccUUCGCUt	1060	AGCGAAGGAGAUCUGGUCUcc
688	454	GACCAGAUcUccUUCGUGt	1061	CAGCGAAGGAGAUCUGGUCtc
689	455	ACCAGAUcUccUUCGUGAt	1062	UCAGCGAAGGAGAUCUGGUct
690	456	CCAGAUcUccUUCGUGACt	1063	GUCAGCGAAGGAGAUCUGGtc
691	457	CAGAUcUccUUCGUGACUct	1064	AGUCAGCGAAGGAGAUCUGgt
692	458	AGAUCUccUUCGUGACUAAt	1065	UAGUCAGCGAAGGAGAUCUgg

[0079]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
693	459	GAUCUCCUUCGCUGACUACttt	1066	GUAGUCAGCGAAGGAGAUctg
694	460	AUCUCCUUCGCUGACUACattt	1067	UGUAGUCAGCGAAGGAGAUctt
695	461	UCUCCUUCGCUGACUACAattt	1068	UUGUAGUCAGCGAAGGAGAtc
696	462	CUCCUUCGCUGACUACAACttt	1069	GUUGUAGUCAGCGAAGGAGat
697	463	UCCUUCGCUGACUACAACctt	1070	GGUUGUAGUCAGCGAAGGAg
698	464	CCUUCGCUGACUACAACCUttt	1071	AGGUUGUAGUCAGCGAAGGag
699	465	CUUCGCUGACUACAACCUGttt	1072	CAGGUUGUAGUCAGCGAAGga
700	466	UUCGCUGACUACAACCUGctt	1073	GCAGGUUGUAGUCAGCGAAgg
701	467	UCGCUGACUACAACCUGCUttt	1074	AGCAGGUUGUAGUCAGCGAag
702	468	CGCUGACUACAACCUGCUGttt	1075	CAGCAGGUUGUAGUCAGCGaa
703	469	GCUGACUACAACCUGCUGgtt	1076	CCAGCAGGUUGUAGUCAGCga
704	470	CUGACUACAACCUGCUGGattt	1077	UCCAGCAGGUUGUAGUCAGcg
705	471	UGACUACAACCUGCUGGACTtt	1078	GUCCAGCAGGUUGUAGUCagc
706	472	GACUACAACCUGCUGGACUttt	1079	AGUCCAGCAGGUUGUAGUCag
707	473	ACUACAACCUGCUGGACUUt	1080	AAGUCCAGCAGGUUGUAGUca
708	474	CUACAACCUGCUGGACUUGttt	1081	CAAGUCCAGCAGGUUGUAGtc
709	475	UACAACCUGCUGGACUUGctt	1082	GCAAGUCCAGCAGGUUGUAg
710	476	ACAACCUGCUGGACUUGCUttt	1083	AGCAAGUCCAGCAGGUUGUag
711	477	CAACCUGCUGGACUUGCUGttt	1084	CAGCAAGUCCAGCAGGUUGta
712	478	AACCUGCUGGACUUGCUGctt	1085	GCAGCAAGUCCAGCAGGUgt
713	479	ACCUGCUGGACUUGCUGCUttt	1086	AGCAGCAAGUCCAGCAGGUtg
714	480	CCUGCUGGACUUGCUGCUGttt	1087	CAGCAGCAAGUCCAGCAGGtt
715	481	CUGCUGGACUUGCUGCUGattt	1088	UCAGCAGCAAGUCCAGCAGgt
716	482	UGCUGGACUUGCUGCUGAUttt	1089	AUCAGCAGCAAGUCCAGCagg
717	483	GCUGGACUUGCUGCUGAUCttt	1090	GAUCAGCAGCAAGUCCAGCag
718	484	CUGGACUUGCUGCUGAUCCttt	1091	GGAUCAGCAGCAAGUCCAGca
719	485	UGGACUUGCUGCUGAUCCattt	1092	UGGAUCAGCAGCAAGUCCAgc
720	486	GGACUUGCUGCUGAUCCAUttt	1093	AUGGAUCAGCAGCAAGUCCag
721	487	GACUUGCUGCUGAUCCAUGttt	1094	CAUGGAUCAGCAGCAAGUCca
722	488	ACUUGCUGCUGAUCCAUGattt	1095	UCAUGGAUCAGCAGCAAGUcc

[0080]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
723	489	CUUGCUGCUGAUCCAUGAGt _{tt}	1096	CUCAUGGAUCAGCAGCAAGt _c
724	490	UUGCUGCUGAUCCAUGAGGt _{tt}	1097	CCUCAUGGAUCAGCAGCAAg _t
725	491	UGCUGCUGAUCCAUGAGGUt _{tt}	1098	ACCUCAUGGAUCAGCAGCAa _g
726	492	GCUGCUGAUCCAUGAGGUc _{tt}	1099	GACCUCAUGGAUCAGCAGCa _a
727	493	CUGCUGAUCCAUGAGGUCCt _{tt}	1100	GGACCUCAUGGAUCAGCAGc _a
728	494	UGCUGAUCCAUGAGGUCCU _{tt}	1101	AGGACCUCAUGGAUCAGCAg _c
729	495	GCUGAUCCAUGAGGUCCUA _{tt}	1102	UAGGACCUCAUGGAUCAGCa _g
730	496	CUGAUCCAUGAGGUCCUAGt _{tt}	1103	CUAGGACCUCAUGGAUCAGc _a
731	497	UGAUCCAUGAGGUCCUAGc _{tt}	1104	GCUAGGACCUCAUGGAUCAg _c
732	498	GAUCCAUGAGGUCCUAGCCt _{tt}	1105	GGCUAGGACCUCAUGGAUCa _g
733	499	AUCCAUGAGGUCCUAGCCc _{tt}	1106	GGGCUAGGACCUCAUGGAUc _a
750	500	CCCUGGCUGCCUGGAUGCGt _{tt}	1107	CGCAUCCAGGCAGCCAGGGg _c
751	501	CCUGGCUGCCUGGAUGCGU _{tt}	1108	ACGCAUCCAGGCAGCCAGGg _g
752	502	CUGGCUGCCUGGAUGCGUU _{tt}	1109	AACGCAUCCAGGCAGCCAGg _g
753	503	UGGCUGCCUGGAUGCGUUC _{tt}	1110	GAACGCAUCCAGGCAGCCAg _g
754	504	GGCUGCCUGGAUGCGUUCc _{tt}	1111	GGAACGCAUCCAGGCAGCCa _g
755	505	GCUGCCUGGAUGCGUUCc _{tt}	1112	GGGAACGCAUCCAGGCAGCc _a
773	506	CCCUGCUCUCAGCAUAUGU _{tt}	1113	ACAUAUGCUGAGAGCAGGGg _g
774	507	CCUGCUCUCAGCAUAUGUg _{tt}	1114	CACAUAUGCUGAGAGCAGGg _g
775	508	CUGCUCUCAGCAUAUGUGg _{tt}	1115	CCACAUAUGCUGAGAGCAGg _g
776	509	UGCUCUCAGCAUAUGUGGg _{tt}	1116	CCCACAUAUGCUGAGAGCAg _g
793	510	GGGCGCCUCAGUGCCCGGc _{tt}	1117	GCCGGGCACUGAGGCGCCc _a
794	511	GGCGCCUCAGUGCCCGGCc _{tt}	1118	GGCCGGGCACUGAGGCGCc _c
795	512	GCGCCUCAGUGCCCGGCCc _{tt}	1119	GGGCGGGGCACUGAGGCGCc _c
796	513	CGCCUCAGUGCCCGGCCA _{tt}	1120	UGGGCCGGGCACUGAGGCGc _c
797	514	GCCUCAGUGCCCGGCCAA _{tt}	1121	UUGGGCCGGGCACUGAGGCg _c
798	515	CCUCAGUGCCCGGCCCAAG _{tt}	1122	CUUGGGCCGGGCACUGAGGcg _g
799	516	CUCAGUGCCCGGCCCAAGc _{tt}	1123	GCUUGGGCCGGGCACUGAGgc _c
800	517	UCAGUGCCCGGCCCAAGCU _{tt}	1124	AGCUUGGGCCGGGCACUGA _g g
801	518	CAGUGCCCGGCCCAAGCUC _{tt}	1125	GAGCUUGGGCCGGGCACUGa _g

[0081]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
802	519	AGUGCCCGGCCCAAGCUCAtt	1126	UGAGCUUGGGCCGGGCACUga
803	520	GUGCCCGGCCCAAGCUCAAtt	1127	UUGAGCUUGGGCCGGGCACtg
804	521	UGCCCGGCCCAAGCUCAAGtt	1128	CUUGAGCUUGGGCCGGGCAct
805	522	GCCCGGCCCAAGCUCAAAGtt	1129	CCUUGAGCUUGGGCCGGGCac
806	523	CCCGGCCCAAGCUCAAAGGctt	1130	GCCUUGAGCUUGGGCCGGGca
807	524	CCGGGCCAAGCUCAAAGGCCtt	1131	GGCCUUGAGCUUGGGCCGGgc
808	525	CGGCCCAAGCUCAAAGGCCUtt	1132	AGGCCUUGAGCUUGGGCCGgg
809	526	GGGCCAAGCUCAAAGGCCUUtt	1133	AAGGCCUUGAGCUUGGGCCg
810	527	GCCCAAGCUCAAAGGCCUUCtt	1134	GAAGGCCUUGAGCUUGGGCcg
811	528	CCCAAGCUCAAAGGCCUUCctt	1135	GGAAGGCCUUGAGCUUGGGcc
812	529	CCAAGCUCAAAGGCCUUCUtt	1136	AGGAAGGCCUUGAGCUUGGgc
813	530	CAAGCUCAAAGGCCUUCUGtt	1137	CAGGAAGGCCUUGAGCUUGgg
814	531	AAGCUCAAAGGCCUUCUGGtt	1138	CCAGGAAGGCCUUGAGCUUgg
815	532	AGCUCAAAGGCCUUCUGGctt	1139	GCCAGGAAGGCCUUGAGCUtg
816	533	GCUCAAAGGCCUUCUGGCCtt	1140	GGCCAGGAAGGCCUUGAGCtt
817	534	CUCAAAGGCCUUCUGGCCUtt	1141	AGGCCAGGAAGGCCUUGAGct
818	535	UCAAGGCCUUCUGGCCUCtt	1142	GAGGCCAGGAAGGCCUUGAgc
819	536	CAAGGCCUUCUGGCCUCCtt	1143	GGAGGCCAGGAAGGCCUUGag
820	537	AAGGCCUUCUGGCCUCCctt	1144	GGGAGGCCAGGAAGGCCUUGa
837	538	CCCUGAGUACGUGAACCUCtt	1145	GAGGUUCACGUACUCAGGGga
838	539	CCUGAGUACGUGAACCUCctt	1146	GGAGGUUCACGUACUCAGGgg
839	540	CUGAGUACGUGAACCUCctt	1147	GGGAGGUUCACGUACUCAGgg
856	541	CCCAUCAAUGGCAACGGGAAtt	1148	UCCCGUUGCCAUUGAUGGGga
857	542	CCAUCAAUGGCAACGGGAAtt	1149	UUCCCGUUGCCAUUGAUGGgg
858	543	CAUCAAUGGCAACGGGAAAtt	1150	UUUCCCGUUGCCAUUGAUGgg
859	544	AUCAUUGGCAACGGGAAACtt	1151	GUUUCCCGUUGCCAUUGAUgg
860	545	UCAUUGGCAACGGGAAACAtt	1152	UGUUUCCCGUUGCCAUUGAtg
861	546	CAAUGGCAACGGGAAACAGtt	1153	CUGUUUCCCGUUGCCAUUGat
862	547	AAUGGCAACGGGAAACAGUtt	1154	ACUGUUUCCCGUUGCCAUUGa
863	548	AUGGCAACGGGAAACAGUGtt	1155	CACUGUUUCCCGUUGCCAUtg

[0082]

参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
864	549	UGGCAACGGGAAACAGUGAtt	1156	UCACUGUUUCCCGUUGCCAtt
865	550	GGCAACGGGAAACAGUGAGt	1157	CUCACUGUUUCCCGUUGCCat
866	551	GCAACGGGAAACAGUGAGGt	1158	CCUCACUGUUUCCCGUUGCca
867	552	CAACGGGAAACAGUGAGGGt	1159	CCCUCACUGUUUCCCGUUGcc
868	553	AACGGGAAACAGUGAGGGUtt	1160	ACCCUCACUGUUUCCCGUUGc
869	554	ACGGGAAACAGUGAGGGUUt	1161	AACCCUCACUGUUUCCCGUtg
870	555	CGGGAAACAGUGAGGGUUGt	1162	CAACCCUCACUGUUUCCCGtt
871	556	GGGAAACAGUGAGGGUUGGt	1163	CCAACCCUCACUGUUUCCCGt
872	557	GGAAACAGUGAGGGUUGGt	1164	CCCAACCCUCACUGUUUCCcg
891	558	GGGACUCUGAGCGGGAGGCtt	1165	GCCUCCCGCUCAGAGUCCcc
892	559	GGACUCUGAGCGGGAGGCAtt	1166	UGCCUCCCGCUCAGAGUCCcc
894	560	ACUCUGAGCGGGAGGCAGAtt	1167	UCUGCCUCCCGCUCAGAGUcc
896	561	UCUGAGCGGGAGGCAGAGUtt	1168	ACUCUGCCUCCCGCUCAGAg
897	562	CUGAGCGGGAGGCAGAGUUt	1169	AACUCUGCCUCCCGCUCAGag
898	563	UGAGCGGGAGGCAGAGUUtt	1170	AAACUCUGCCUCCCGCUCAg
899	564	GAGCGGGAGGCAGAGUUUGt	1171	CAAACUCUGCCUCCCGCUCag
900	565	AGCGGGAGGCAGAGUUUGCtt	1172	GCAAACUCUGCCUCCCGCUca
901	566	GCGGGAGGCAGAGUUUGCCtt	1173	GGCAAACUCUGCCUCCCGCtc
902	567	CGGGAGGCAGAGUUUGCCUtt	1174	AGGCAAACUCUGCCUCCCGct
903	568	GGGAGGCAGAGUUUGCCUUt	1175	AAGGCAAACUCUGCCUCCGc
904	569	GGAGGCAGAGUUUGCCUUCtt	1176	GAAGGCAAACUCUGCCUCCcg
905	570	GAGGCAGAGUUUGCCUUCtt	1177	GGAAGGCAAACUCUGCCUCCc
906	571	AGGCAGAGUUUGCCUUCUtt	1178	AGGAAGGCAAACUCUGCCUcc
907	572	GGCAGAGUUUGCCUUCUUtt	1179	AAGGAAGGCAAACUCUGCCtc
908	573	GCAGAGUUUGCCUUCUUUtt	1180	AAAGGAAGGCAAACUCUGCct
909	574	CAGAGUUUGCCUUCUUUCtt	1181	GAAAGGAAGGCAAACUCUGcc
910	575	AGAGUUUGCCUUCUUUCUtt	1182	AGAAAGGAAGGCAAACUCUgc
911	576	GAGUUUGCCUUCUUUCUCtt	1183	GAGAAAGGAAGGCAAACUCtg
912	577	AGUUUGCCUUCUUUCUCCtt	1184	GGAGAAAGGAAGGCAAACUct
913	578	GUUUGCCUUCUUUCUCCAtt	1185	UGGAGAAAGGAAGGCAAACtc

[0083]

参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 2~608	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 609~1215
914	579	UUUGCCUCCUUUCUCCAGttt	1186	CUGGAGAAAGGAAGGCAAAct
915	580	UUGCCUCCUUUCUCCAGGttt	1187	CCUGGAGAAAGGAAGGCAAac
916	581	UGCCUCCUUCUCCAGGAtt	1188	UCCUGGAGAAAGGAAGGCAaa
917	582	GCCUCCUUCUCCAGGACttt	1189	GUCCUGGAGAAAGGAAGGCaa
918	583	CCUCCUUCUCCAGGACctt	1190	GGUCCUGGAGAAAGGAAGGca
919	584	CUUCCUUCUCCAGGACCAttt	1191	UGGUCCUGGAGAAAGGAAGgc
920	585	UUCUUCUCCAGGACCAAtt	1192	UUGGUCCUGGAGAAAGGAagg
921	586	UCCUUCUCCAGGACCAAUttt	1193	AUUGGUCCUGGAGAAAGGAag
922	587	CCUUCUCCAGGACCAAUAtt	1194	UAUUGGUCCUGGAGAAAGGaa
923	588	CUUUCUCCAGGACCAUAAtt	1195	UUAUUGGUCCUGGAGAAAGga
924	589	UUUCUCCAGGACCAUAAAtt	1196	UUUAUUGGUCCUGGAGAAagg
925	590	UUCUCCAGGACCAUAAAAttt	1197	UUUUAUUGGUCCUGGAGAAag
926	591	UCUCCAGGACCAUAAAAUttt	1198	AUUUUAUUGGUCCUGGAGAAa
927	592	CUCCAGGACCAUAAAAUttt	1199	AAUUUUAUUGGUCCUGGAGaa
928	593	UCCAGGACCAUAAAAUUttt	1200	AAAUUUUAUUGGUCCUGGAg
929	594	CCAGGACCAUAAAAUUUCttt	1201	GAAAUUUUAUUGGUCCUGGag
930	595	CAGGACCAUAAAAUUUCUttt	1202	AGAAAUUUUAUUGGUCCUGga
931	596	AGGACCAUAAAAUUUCUAtt	1203	UAGAAAUUUUAUUGGUCCUgg
932	597	GGACCAUAAAAUUUCUAAtt	1204	UUAGAAAUUUUAUUGGUCCtg
933	598	GACCAUAAAAUUUCUAAGttt	1205	CUUAGAAAUUUUAUUGGUCct
934	599	ACCAUAAAAUUUCUAAGAAtt	1206	UCUAGAAAUUUUAUUGGUcc
935	600	CCAAUAAAAUUUCUAAGAGttt	1207	CUCUAGAAAUUUUAUUGGtc
936	601	CAAUAAAAUUUCUAAGAGAtt	1208	UCUCUAGAAAUUUUAUUGgt
937	602	AAUAAAAUUUCUAAGAGAGttt	1209	CUCUCUAGAAAUUUUAUUGg
938	603	AUAAAAUUUCUAAGAGAGctt	1210	GCUCUCUAGAAAUUUUAUtg
939	604	UAAAAUUUCUAAGAGAGCUttt	1211	AGCUCUCUAGAAAUUUUAAtt
940	605	AAAAUUUCUAAGAGAGCUAtt	1212	UAGCUCUCUAGAAAUUUUAat
941	606	AAAUUCUAAGAGAGCUAAtt	1213	UUAGCUCUCUAGAAAUUUta
942	607	AAUUUCUAAGAGAGCUAAAtt	1214	UUUAGCUCUCUAGAAAUUtt
943	608	AUUUCUAAGAGAGCUAAAAttt	1215	UUUAGCUCUCUAGAAAUttt

[0084] 表1备注:大写字母A、G、C、U分别表示ribo-A、ribo-G、ribo-C和ribo-U。小写字母

a、g、c、t分别表示2'-脱氧-A、2'-脱氧-G、2'-脱氧-C和脱氧胸苷。

[0085] 表2:GST- π RNAi分子序列

[0086]

ID	参 考 位 置	序 列 号	有义链 (5'→3') 序列号 1216~1280	序 列 号	反义链 (5'→3') 序列号 1281~1345
A1	652	1216	UCCCAGAACCAGGGAGGCAtt	1281	UGCCUCCCUGGUUCUGGGACa
A10	635	1217	CUUUJGAGACCCUGCUGUCtt	1282	GACAGCAGGGUCUCAAAAGgc
A11	649	1218	CUGUCCCAGAACCAGGGAGtt	1283	CUCCCUGGUUCUGGGACAGca
A12	650	1219	UGUCCCAGAACCAGGGAGGtt	1284	CCUCCCUGGUUCUGGGACAgc
A13	631	1220	AAGCCUUUUGAGACCCUGCtt	1285	GCAGGGUCUCAAAAGGCUUca
A14	638	1221	UUGAGACCCUGCUGUCCCAtt	1286	UGGGACAGCAGGGUCUCAAAa
A15	636	1222	UUUUGAGACCCUGCUGUCctt	1287	GGACAGCAGGGUCUCAAAAgg
A16	640	1223	GAGACCCUGCUGUCCCAgatt	1288	UCUGGGACAGCAGGGUCUCaa
A17	332	1224	GCUGGAAGGAGGAGGUGGUtt	1289	ACCACCUCUCCUCCAGCtc
A18	333	1225	CUGGAAGGAGGAGGUGGUGtt	1290	CACCACCJCCUCCUCCAGet
A19	321	1226	UCAGGGCCAGAGCUGGAAGtt	1291	CUUCCAGCUCUGGCCUGAtc
A2	639	1227	UGAGACCCUGCUGUCCCAgtt	1292	CUGGGACAGCAGGGUCUCAaa
A20	323	1228	AGGGCCAGAGCUGGAAGGat	1293	UCCUCCAGCUCUGGCCUGa
A21	331	1229	AGCUGGAAGGAGGAGGUGGtt	1294	CCACCUCUCCUCCAGCUct
A22	641	1230	AGACCCUGCUGUCCCAAGtt	1295	UUCUGGGACAGCAGGGUCUca
A23	330	1231	GAGCUGGAAGGAGGAGGUGtt	1296	CACCUCUCCUCCAGCUCtg
A25	647	1232	UGCUGUCCCAGAACCAGGGtt	1297	CCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
A26	653	1233	CCCAGAACCAGGGAGGCAAtt	1298	UUGCCUCCCUGGUUCUGGGac
A3	654	1234	CCAGAACCAGGGAGGCAAGtt	1299	CUUGCCUCCCUGGUUCUGGga
A4	637	1235	UUUGAGACCCUGCUGJCCctt	1300	GGGACAGCAGGGUCUCAAAag
A5	642	1236	GACCCUGCUGUCCCAAGtt	1301	GUUCUGGGACAGCAGGGUCtc
A6	319	1237	GAUCAGGGCCAGAGCUGGAtt	1302	UCCAGCUCUGGCCUGAUCtg
A7	632	1238	AGCCUUUUGAGACCCUGCUtt	1303	AGCAGGGJCUCAAAGGCUtc
A8	633	1239	GCCUUUUGAGACCCUGCUGtt	1304	CAGCAGGGUCUCAAAAGGctt
A9	634	1240	CCUUJUGAGACCCUGCUGUtt	1305	ACAGCAGGGUCUCAAAAGGct
AG7	632	1241	CGCCUUUUGAGACCCJGCAtt	1306	UGCAGGGJCUCAAAGGCGtc
AK1	257	1242	CCUACACCGUGGUCUAUUUtt	1307	AAAUAGACCACGGUGUAGGgc

[0087]

ID	参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 1216~1280	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 1281~1345
AK10	681	1243	UGUGGGAGACCAGAUUCUCCtt	1308	GGAGAUUCUGGUCUCCCACAAt
AK11	901	1244	GCGGGAGGCAGAGUUJGCctt	1309	GGCAAACUCUGCCUCCCGCtc
AK12	922	1245	CCUUUCUCCAGGACCAAUAtt	1310	UAUUGGUCCUGGAGAAAGGaa
AK13 /A24	643	1246	ACCCUGCUGUCCCAGAACctt	1311	GGUUCUGGGACAGCAGGGUct
AK2	267	1247	GGUCUAUUUCCCAGUJCGAtt	1312	UCGAACUGGGAAAUAGACCac
AK3	512	1248	CCCUGGUGGACAUGGJGAAtt	1313	UUCACCAUGUCCACCAGGGct
AK4	560	1249	ACAUCUCCCUCAUUACActt	1314	GUGUAGAUGAGGGAGAUGUat
AK5	593	1250	GCAAGGAUGACUAUGJGAAtt	1315	UUCACAUAGUCAUCCUUGCcc
AK6	698	1251	CCUUCGCGUGACUACAACCUtt	1316	AGGUUGUAGUCAGCGAAGGag
AK7	313	1252	CUGGCAGAUCAAGGCCAGAtt	1317	UCUGGCCCCUGAUCUGCCAGca
AK8	421	1253	GACGGAGACCUCACCCUGUtt	1318	ACAGGGUGAGGUCUCCGUCct
AK9	590	1254	CGGGCAAGGAUGACUAUGUtt	1319	ACAUAGUCAUCCUUGCCCGcc
AU10	635	1255	CUUUUGAGACCCUGCJGUAtt	1320	UACAGCAGGGUCUCAAAGGgc
AU23	330	1256	GAGCUGGAAGGAGGAGGUAtt	1321	UACCUCUCCUCCAGCUCtg
AU24	643	1257	ACCCUGCUGUCCCAGAACAtt	1322	UGUUCUGGGACAGCAGGGUct
AU25	648	1258	UGCUGUCCCAGAACCCAGGAtt	1323	UCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
AU7	632	1259	AGCCUUUUGAGACCCJGCAtt	1324	UGCAGGGUCUCAAAGGCUtc
AU9	634	1260	CCUUUUGAGACCCUGCUGAtt	1325	UCAGCAGGGUCUCAAAGGct
B1	629	1261	UGAAGCCUUUUGAGACCCUtt	1326	AGGGUCUCAAAGGCCUUCAGt
B10	627	1262	ACUGAAGCCUUUUGAGACCtt	1327	GGUCUCAAAGGCCUUCAGUtg
B11	596	1263	AGGAUGACUAUGUGAAGGctt	1328	GCCUUCACAUAGUCAUCCUtg
B12	597	1264	GGAUGACUAUGUGAAGGCAtt	1329	UGCCUUCACAUAGUCAUCCtt
B13	598	1265	GAUGACUAUGUGAAGGCActt	1330	GUGCCUUCACAUAGUCAUCct
B14	564	1266	CUCCCUCAUCUACACCAActt	1331	GUUGGUGUAGAUGAGGCAGat
B2	630	1267	GAAGCCUUUUGAGACCCUGtt	1332	CAGGGUCUCAAAGGCCUUCag
B3	563	1268	UCUCCCUCAUCUACACCAAtt	1333	UUGGUGUAGAUGAGGGAGatg
B4	567	1269	CCUCAUCUACACCAACUAUtt	1334	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGga
B5	566	1270	CCCUCAUCUACACCAACUAtt	1335	UAGUUGGUGUAGAUGAGGGag
B6	625	1271	CAACUGAAGCCUUUUGAGAtt	1336	UCUCAAAAGGCCUUCAGUUGcc
B7	626	1272	AACUGAAGCCUUUUGAGActt	1337	GUCUCAAAAGGCCUUCAGUUGc
B8	628	1273	CUGAAGCCUUUUGAGACCCtt	1338	GGGUCUCAAAAGGCCUUCAGtt
B9	565	1274	UCCCUCAUCUACACCAACUtt	1339	AGUUGGUGUAGAUGAGGGaga
BG3	563	1275	GCUCCCUCAUCUACACCAAtt	1340	UUGGUGUAGAUGAGGGAGctg

[0088]

ID	参考位置	序列号	有义链 (5'→3') 序列号 1216~1280	序列号	反义链 (5'→3') 序列号 1281~1345
BU02	631	1276	GAAGCCUUUUGAGACCCUAtt	1341	UAGGGUCUCAAAGGCUUCag
BU10	627	1277	ACUGAAGCCUUUUGAGACAtt	1342	UGUCUCAAAGGCUUCAGUtg
BU14	565	1278	CUCCCUCAUCUACACCAAAtt	1343	UUUGGUGUAGAUGAGGGAGat
BU4	567	1279	CCUCAUCUACACCAACUAAAtt	1344	UUAGUUGGUGUAGAUGAGGga
C1-93 4	934	1280	ACCAAUAAAAUUUCUAAGAtt	1345	UCUUAGAAAUUUUAUUGGUcc

[0089] 表2备注：大写字母A、G、C、U分别表示ribo-A、ribo-G、ribo-C和ribo-U。小写字母a、g、c、t分别表示2'-脱氧-A、2'-脱氧-G、2'-脱氧-C和脱氧胸苷。

[0090] 例如，本发明的siRNA可具有序列号1341的反义链、和序列号1276的有义链，或经过化学修饰的上述链。

[0091] 例如，本发明的siRNA可具有反义链序列号1305的反义链、和序列号1240的有义链，或经过化学修饰的上述链。

[0092] 对于化学修饰而言，可在链中任意位置的任意氨基酸含有2'-OMe取代基，以及本领域已知的其他修饰。

[0093] 调节GST- π 和治疗恶性肿瘤的方法

[0094] 本发明的实施方式可提供用于下调或抑制GST- π 及/或GST- π 蛋白的表达的RNAi分子。

[0095] 在一些实施方式中，本发明的RNAi分子可用于下调或抑制GST- π 及/或GST- π 蛋白的表达，所述GST- π 及/或GST- π 蛋白源于可能与例如恶性肿瘤等疾病或病症相关的GST- π 单倍型多态性。

[0096] 对于GST- π 的蛋白或mRNA的水平监控可用于表征基因沉默，以及测定本发明的化合物和组合物的效果。

[0097] 本申请公开的RNAi分子可单独使用，也可与其他siRNA组合使用来调节一个或多个基因的表达。

[0098] 本申请公开的RNAi分子可单独使用，也可与其他已知的药物组合或缀合使用，由此预防或治疗与GST- π 相关的疾病、或改善例如恶性肿瘤等与GST- π 相关的病症或紊乱的症状。

[0099] 本发明的RNAi分子可用于以序列特异性方式调节或抑制GST- π 表达。

[0100] 本申请公开的RNAi分子可包含引导链(guide strand)，其是一系列连续的核苷酸，且至少部分与GST- π mRNA互补。

[0101] 在特定的方面，可使用本发明的RNAi分子通过RNA干扰对恶性肿瘤进行治疗。

[0102] 对于恶性肿瘤的治疗而言，可利用合适的以细胞为基础的模型、动物模型(体外或体内)进行表征。

[0103] 对于恶性肿瘤的治疗而言，可通过测定受影响组织的细胞中的GST- π mRNA水平或GST- π 蛋白水平进行表征。

[0104] 对于恶性肿瘤的治疗而言,可通过对受影响的器官或组织进行非侵入性的医学扫描进行表征。

[0105] 本发明的实施方式可包括对有需要的受试者的GST- π 相关疾病或病症的症状进行预防、治疗、或改善的方法。

[0106] 在一些实施方式中,对受试者的恶性肿瘤的症状进行预防、治疗、或改善的方法可包括向受试者施予本发明的RNAi分子,由此调节受试者或生物体中的GST- π 基因的表达。

[0107] 在一些实施方式中,本发明包括通过使细胞或生物体与本发明的RNAi分子接触来下调细胞或生物体中的GST- π 基因表达的方法。

[0108] RNA干扰

[0109] RNA干扰(RNAi)是指由短干扰RNA(siRNA)介导的动物中的序列特异性转录后基因沉默。例如,参见Zamore et al.,Cell,2000,Vol.101,pp.25-33;Fire et al.,Nature,1998,Vol.391,pp.806811;Sharp,Genes&Development,1999,Vol.13,pp.139-141。

[0110] 细胞中的RNAi反应可以由双链RNA(dsRNA)引发,但其机理尚未彻底研明。在细胞中,作为RNase III酶的Dicer酶可作用于特定的dsRNA。例如,参见Zamore et al.,Cell,2000,Vol.101,pp.25-33;Hammond et al.,Nature,2000,Vol.404,pp.293-296。Dicer可将dsRNA加工成更短的dsRNA片段,即siRNA。

[0111] 一般而言,siRNA的长度可以为21~约23个核苷酸,并且包含长度为约19个核苷酸的碱基对双链区。

[0112] RNAi涉及被称为RNA诱导沉默复合物(RISC)的核酸内切酶复合物。siRNA具有的反义链或引导链进入RISC复合物,并介导单链靶RNA的切割,所述单链靶RNA含有与siRNA双链体的反义链互补的序列。siRNA的另一条链为随从链(passenger strand)。靶RNA的切割在与siRNA双链体的反义链互补的区域中部发生。例如,参见Elbashir et al.,Genes&Development,2001,Vol.15,pp.188-200。

[0113] 本文中,用语“有义链”表示siRNA分子的下述核苷酸序列,所述序列与该siRNA分子的反义链的至少一部分完全互补或部分互补。siRNA分子的有义链可含有与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0114] 本文中,用语“反义链”表示与靶核酸序列的至少一部分完全互补或部分互补的siRNA分子的核苷酸序列。siRNA分子的反义链可含有与该siRNA分子的有义链的至少一部分互补的核酸序列。

[0115] RNAi分子可通过以序列特异性方式介导RNA干扰来下调或敲低基因表达。例如,参见Zamore et al.,Cell,2000,Vol.101,pp.25-33;Elbashir et al.,Nature,2001,Vol.411,pp.494-498;Kreutzer et al.,WO2000/044895;Zernicka-Goetz et al.,WO2001/36646;Fire et al.,WO1999/032619;Plaetinck et al.,WO2000/01846;Mello et al.,WO2001/029058。

[0116] 本文中,基因表达方面的用语“抑制”、“下调”或“降低”是指,观察到基因表达、或编码一种或多种蛋白的mRNA分子的水平、或一种或多种编码蛋白的活性低于不存在本发明的RNAi分子或siRNA的情况。例如,可观察到较之不存在本发明的RNAi分子或siRNA的情况而言,表达水平、mRNA水平、或编码蛋白的活性水平降低至少1%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少>90%、或更多。

[0117] RNAi分子还可用于敲低病毒基因表达,从而能够影响病毒复制。

[0118] RNAi分子可以由独立的多核苷酸链制得:有义链或随从链、和反义链或引导链。引导链与随从链至少部分互补。引导链和随从链可形成具有约15~49个碱基对的双链区。

[0119] 在一些实施方式中,siRNA双链区可具有碱基对。

[0120] 在某些实施方式中,RNAi分子的长度包括具有RISC活性的双链区,由此可在RISC复合物中发挥作用。

[0121] 在另一些实施方式中,RNAi分子可以作为Dicer底物发挥作用,由此被转换为能够在RISC复合物中发挥作用的RNAi分子。

[0122] 在一些方面,RNAi分子可在长链分子相反的两端具有互补的引导序列部分和随从序列部分,由此,分子能够介由互补的序列部分而形成双链区,在双链区的一端介由核苷酸接头或非核苷酸接头将链彼此连接。例如,发夹结构或茎环结构。接头与链的相互作用可以是共价键或非共价相互作用。

[0123] 本申请公开的RNAi分子可包含将核酸的有义区域与反义区域接合的核苷酸接头、非核苷酸接头、或核苷酸/非核苷酸混合接头。核苷酸接头的长度可以为 ≥ 2 个核苷酸,例如约3、4、5、6、7、8、9、或10个核苷酸。核苷酸接头可以是核酸适体。本文中,用语“适体”或“核酸适体”表示与靶分子特异性结合的核酸分子,所述核酸分子的序列中包含天然能够被靶分子识别的序列。或者,适体也可以是天然不会与核酸结合的靶分子结合的核酸分子。例如,适体可用于与蛋白质的配体结合区域结合,由此阻碍天然存在的配体与蛋白的相互作用。例如,参见Gold et al., *Annu Rev Biochem*, 1995, Vol. 64, pp. 763-797; Brody et al., *J. Biotechnol.*, 2000, Vol. 74, pp. 5-13; Hermann et al., *Science*, 2000, Vol. 287, pp. 820-825。

[0124] 非核苷酸接头的例子包括脱碱基核苷酸、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、聚炔、或其他聚合物,例如,具有例如2~100个乙二醇单元的聚乙二醇。一些例子记载于Seela et al., *Nucleic Acids Research*, 1987, Vol. 15, pp. 3113-3129; Cload et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, Vol. 113, pp. 6324-6326; Jaeschke et al., *Tetrahedron Lett.*, 1993, Vol. 34, pp. 301; Arnold et al., WO 1989/002439; Usman et al., WO 1995/006731; Dudycz et al., WO 1995/011910, and Ferentz et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, Vol. 113, pp. 4000-4002。

[0125] RNAi分子可在双链区具有一个或多个悬挂。悬挂是碱基未配对的单链区,长度可为1~8个核苷酸或更长。悬挂可以是3' 悬挂,其中,链的3' 端具有长度为1~8个核苷酸的单链区。悬挂可以是5' 悬挂,其中,链的5' 端具有长度为1~8个核苷酸的单链区。

[0126] RNAi分子的悬挂的长度可以相同,也可以不同。

[0127] RNAi分子可具有一个或多个平末端,即,双链区的末端没有悬挂,两条链的碱基配对直到双链区的末端。

[0128] 本申请公开的RNAi分子可具有一个或多个平末端,也可具有一个或多个悬挂,或者具有平末端和悬挂的组合。

[0129] RNAi分子链的5' 端可以是平末端,或者也可以是悬挂。RNAi分子链的3' 端可以是平末端,或者也可以是悬挂。

[0130] RNAi分子链的3' 端为悬挂时,5' 端可以是平末端。RNAi分子链的5' 端为悬挂时,3'

端可以是平末端。

[0131] 在一些实施方式中, RNAi分子的两端均为平末端。

[0132] 在另一些实施方式中, RNAi分子的两端可具有悬挂。

[0133] 5'端和3'端的悬挂的长度可以不同。

[0134] 在某些实施方式中, RNAi分子可具有平末端, 即, 在反义链的5'端和有义链的3'端不具有任何悬挂的核苷酸。

[0135] 在另一些实施方式中, RNAi分子可具有平末端, 即, 在反义链的3'端和有义链的5'端不具有任何悬挂的核苷酸。

[0136] RNAi分子可在双链区具有碱基错配。

[0137] RNAi分子的悬挂中的任意的核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸, 也可以是核糖核苷酸。

[0138] RNAi分子可在5'端具有一个或多个脱氧核糖核苷酸, 另一条链的3'端可不具有悬挂, 或不具有脱氧核糖核苷酸悬挂。

[0139] RNAi分子可在3'端具有一个或多个脱氧核糖核苷酸, 另一条链的5'端可不具有悬挂, 或不具有脱氧核糖核苷酸悬挂。

[0140] 在一些实施方式中, RNAi分子的一个或多个、或者全部悬挂的核苷酸可以为2'-脱氧核糖核苷酸。

[0141] Dicer底物RNAi分子

[0142] 在一些方面, RNAi分子可具有适合作为Dicer底物的长度, 其能够被加工成具有RISC活性的RNAi分子。例如, 参见Rossi et al., US2005/0244858。

[0143] 作为Dicer底物的双链RNA (dsRNA) 具有充分的长度, 使其能够被Dicer加工成活性RNAi分子, 并且, 具有以下一种或多种性质: (i) 作为Dicer底物的dsRNA可以是不对称的, 例如, 可在反义链具有3'悬挂; 及(ii) Dicer底物dsRNA可在有义链的3'末端具有修饰, 由此引导Dicer结合和加工的方向, 将dsRNA加工成活性RNAi分子。

[0144] 在某些实施方式中, 作为Dicer底物的dsRNA中最长的链可以24~30个核苷酸。

[0145] Dicer底物dsRNA可以是对称的或不对称的。

[0146] 在一些实施方式中, Dicer底物dsRNA可具有长度为22~28个核苷酸的有义链、和长度为24~30个核苷酸的反义链。

[0147] 在某些实施方式中, Dicer底物dsRNA可在反义链的3'端具有悬挂。

[0148] 在另一些实施方式中, Dicer底物dsRNA可含有长度为25个核苷酸的有义链、和长度为27个核苷酸的反义链, 所述反义链具有2个碱基的3'悬挂。悬挂的长度可以为1、2或3个核苷酸。有义链也可具有5'磷酸基团 (phosphate)。

[0149] 不对称的Dicer底物dsRNA可在有义链的3'端代替2个核糖核苷酸而含有2个脱氧核糖核苷酸。

[0150] Dicer底物dsRNA的有义链的长度可以为约22~约30; 或约22~约28; 或约24~约30; 或约25~约30; 或约26~约30; 或约26~29; 或约27~约28个核苷酸。

[0151] Dicer底物dsRNA的有义链的长度可以为22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0152] 在某些实施方式中, Dicer底物dsRNA可具有有义链和反义链, 它们的长度至少为

25个核苷酸,且不多于约30个核苷酸。

[0153] 在某些实施方式中,Dicer底物dsRNA可具有长度为26~29个核苷酸的有义链和反义链。

[0154] 在某些实施方式中,Dicer底物dsRNA可具有长度为27个核苷酸的有义链和反义链。

[0155] Dicer底物dsRNA的有义链和反义链的长度可以相同(例如,具有平末端的情况),也可以不同(例如,具有悬挂的情况),或者可含有1个平末端和1个悬挂。

[0156] Dicer底物dsRNA可具有长度为19、20、21、22、23、24、25、26或27个核苷酸的双链区。

[0157] Dicer底物的反义链dsRNA可含有在生物环境中(真核细胞的细胞质中)与有义链序列的至少一部分退火(anneal)的任意序列。

[0158] 具有有义链和反义链的Dicer底物可被其他的结构连接,例如接头基团或接头寡核苷酸。例如,接头将dsRNA的两条链连接,由此通过退火形成发夹结构。

[0159] Dicer底物的有义链和反义链通常是互补的,但可含有碱基对错配。

[0160] 在一些实施方式中,Dicer底物dsRNA可以是不对称的,例如,有义链具有22~28个核苷酸,反义链具有24~30个核苷酸。

[0161] Dicer底物dsRNA链、尤其是反义链中的区域的序列长度可以为至少19个核苷酸,这些核苷酸位于接近反义链3'端的长度为21个核苷酸的区域,并且与由靶基因产生的RNA的核苷酸序列充分互补。

[0162] Dicer底物dsRNA的反义链可在5'端具有1~9个核糖核苷酸,从而使其长度成为22~28个核苷酸。若反义链的长度为21个核苷酸,则可在3'端添加1~7个核糖核苷酸、或2~5个核糖核苷酸、或4个核糖核苷酸。添加的核糖核苷酸可以为任意的序列。

[0163] Dicer底物dsRNA的有义链可含有24~30个核苷酸。为了在生物环境下与反义链结合,有义链可实质上与反义链互补。

[0164] RNAi分子的使用方法

[0165] 本发明的核酸分子和RNAi分子可通过直接应用而递送至细胞或组织,也可与担体或稀释剂组合。

[0166] 对于本发明的核酸分子和RNAi分子而言,可使用担体或稀释剂、或任何其他发挥辅助、促进或加快进入细胞的作用的递送介质(vehicle)(例如,病毒序列、病毒物质、或者脂质或脂质体制剂),由此将分子直接用于递送或施予至细胞、组织、器官、或受试者。

[0167] 本发明的核酸分子和RNAi分子可以与阳离子性脂质形成复合物、被脂质体包封、或以其它方式递送至靶细胞或靶组织。核酸或核酸复合物可通过直接经皮施用、透皮施用、或注射而局部施予至体外或体内的有关组织。

[0168] 递送体系可包括:例如,水性和非水性的凝胶、乳霜(cream)、乳剂(emulsion)、微乳剂、脂质体、软膏、水性和非水性的溶液、乳液(lotion)、气溶胶(aerosols)、烃类基剂和粉末,并且可含有例如助溶剂、渗透促进剂等赋形剂。

[0169] 本申请公开的组合物和方法可包含表达载体,所述载体以能够使核酸分子表达的方式而含有编码至少1种本发明的RNAi分子的核酸序列。

[0170] 本发明的核酸分子和RNAi分子可利用插入DNA或RNA载体的转录单元表达。重组载

体可以是DNA质粒或病毒载体。病毒载体可用于使核酸分子短暂表达。

[0171] 例如,载体可含有编码RNAi分子双链体的2条链、或自身互补从而能形成RNAi分子的单个核酸分子的序列。表达载体可含有编码2个或更多核酸分子的核酸序列。

[0172] 核酸分子可利用真核生物启动子在细胞中表达。本领域技术人员熟知,核酸可利用合适的DNA/RNA载体而在真核细胞中表达。

[0173] 在一些方面,病毒构建体可用于将表达构建体导入细胞,由此转录该表达构建体编码的dsRNA构建体。

[0174] 脂质制剂可通过静脉注射、肌肉内注射、腹腔内注射、口服、吸入或本领域已知的其他方法施予至动物。

[0175] 可使用已知能够用于施予寡核苷酸的药学上允许的制剂。

[0176] 实施例

[0177] 实施例1:为了测定siRNA敲低效果,利用A549细胞系实施了体外转染。如表3所示,观察到了siRNA对于GST- π mRNA的剂量依赖性敲低。

[0178] 表3:A549细胞系中GST- π mRNA的剂量依赖性敲低

[0179]

siRNA	IC50 (pM)
A9	27、29
B2	121
B3	235
B4	229
B13	23、34
BU02	21、25、34

[0180] 实施例2:体外敲低的方案

[0181] 在转染前1天,向96孔板中注入细胞(2×10^3 细胞/孔,100 μ l含有10%FBS的DMEM (HyClone Cat.#SH30243.01)),在37℃的孵育器(湿润气氛,空气中CO₂浓度为5%)中培养。转染前,将培养基置换为90 μ l含有2%FBS的Opti-MEM I减血清培养基(Life Technologies Cat.#31985-070)。将0.2 μ l的Lipofectamine RNAiMax(Life Technologies Cat.#13778-100)与4.8 μ l的Opti-MEM I于室温混合5分钟。将1 μ l的siRNA与4 μ l的Opti-MEM I混合,进而加入LF2000溶液,轻轻混合,无需振荡(vortex)。于室温等待5分钟。将混合物于室温孵育10分钟,形成RNA-RNAiMax复合物。向孔中加入10 μ l的RNA-RNAiMax复合物,用手轻轻摇动平板。将细胞在37℃的孵育器(湿润气氛,空气中CO₂浓度为5%)中孵育2小时。将培养基置换为新鲜的含有2%FBS的Opti-MEM I减血清培养基(Life Technologies Cat.#31985-070)。转染24小时后,用冰冷的PBS洗涤1次细胞。用50 μ l的Cell-to-Ct裂解液(Life Technologies Cat.#4391851C)裂解细胞,于室温处理5~30分钟。加入5 μ l的终止溶液,并于室温孵育2分钟。立刻使用TAQMAN通过RT-qPCR测定mRNA水平。或者,也可将试样于-80℃冷冻,在稍后进行分析。

[0182] 实施例3:图2显示了GST- π siRNA的体内敲低效果。如图2所示,在体内观察到了以GST- π 作为靶标的BU02siRNA对于GST- π 的剂量依赖性敲低。

[0183] 实施例4:图3显示了以GST- π 作为靶标的siRNA对于细胞增殖的抑制。如图3所示,

在体外A549细胞系中观察到了以GST- π 作为靶标的siRNA对于增殖的剂量依赖性抑制。

[0184] 实施例5:图4显示了GST- π siRNA (BU02)的肿瘤抑制效果。利用的胰腺癌异种移植模型被施予了相对较低的量的以GST- π 作为靶标的siRNA (0.75mg/kg)。在第28天,GST- π siRNA展示出显著且出乎意料的有利的肿瘤抑制效果。

[0185] 该实验中,从ATCC获得了A549细胞系和PANC-1细胞系。将细胞悬浮液与冰上融化的BD matrigel以1:1的比例充分混合,用于注射。使用25G注射针和针筒,在每只小鼠(雌性无胸腺裸鼠,6~8周,Charles River)的右侧腹皮下接种0.1ml含有 2.5×10^6 个(A549)或 2.5×10^6 个(PANC-1)细胞的接种液(每只小鼠接种1剂接种液)。小鼠在接种时被麻醉。在培养的肿瘤达到约250~350mm³(A549)或约150~250mm³(PANC-1)当天,经由动物的尾部血管进行弹丸注射(bolus injection)。在给药后不同的时间点利用高浓度CO₂杀死动物并切除肿瘤。先称取肿瘤的湿重,然后将其分成3部分,用于测量GST- π 敲低、siRNA生物分布、和生物标志物分析。用液氮快速冷冻试样,并保存于-80℃,直到准备进行生物分析为止。

[0186] 实施例6:原位A549肺癌小鼠模型。本发明的GST- π siRNA能够导致原位肺癌肿瘤在体内显著缩小。该实施例中,在以脂质体制剂的形式施予至无胸腺裸鼠的原位肺癌肿瘤的情况下,GST- π siRNA在体内发挥了基因敲低效能。

[0187] 一般而言,原位肿瘤模型可呈现药物效果、效能和提高的预估性能的直观临床意义。原位肿瘤模型中,肿瘤细胞被直接植入与细胞来源种类相同的器官。

[0188] 将处理组和介质对照组剖检时的最终原发瘤重量进行比较,由此对siRNA制剂对于人A549肺癌的抗肿瘤效果进行评价。

[0189] 在体内观察到了由基于BU2结构的GST- π siRNA(序列号1276、1341)对于原位肺癌肿瘤的抑制。利用的原位A549肺癌小鼠模型被施予了相对较低的量(2mg/kg)的以GST- π 作为靶标的siRNA。

[0190] 在为期6周的该研究中,GST- π siRNA呈现了显著且出乎意料的有利的肿瘤抑制效果。43天后,GST- π siRNA呈现了明显有利的肿瘤抑制,较之对照而言,肿瘤的平均体积显著缩小2.8倍。

[0191] 该研究中,使用了5~6周龄的雄性NCR nu/nu小鼠。在实验期间,将实验动物饲育在经过HEPA过滤的环境中。siRNA制剂在使用前于4℃保存,并在注射进小鼠10分钟前使其升温至室温。

[0192] 对于该A549人肺癌原位模型而言,在外科原位移植(SOI)当天,从接受A549肿瘤异种移植的动物皮下部位采集备份肿瘤(stock tumor),置于RPMI-1640培养基中。摘除坏死组织,将活体组织切割成1.5~2mm³的小片。通过异氟烷吸入将动物麻醉,用碘酒和酒精消毒手术区。使用一对手术剪在小鼠左胸壁切开约1.5cm长的横向切口。切开第三、四肋骨之间,暴露左肺。使用8-0外科缝线(尼龙),将一片A549肿瘤移植至肺表面。使用6-0缝线(丝)将胸壁缝合。使用装有25G X 1¹/₂针头的3cc注射器进行胸内穿刺,使肺重新膨胀,由此排出胸腔中残余的空气。使用6-0缝线(丝)将胸壁缝合。上述所有手术步骤均在HEPA过滤层流操作台上使用7x放大倍数的显微镜实施。

[0193] 肿瘤移植3天后,将荷瘤模型小鼠随机分组,每组10只小鼠。对于处理组而言,在肿瘤移植3天后开始对10只小鼠进行处理。

[0194] 对于处理组而言,制剂为脂质体组合物(可离子化脂质:胆固醇:DOPE:DOPC:DPPE-

PEG-2K:DSPE-PEG-2K)。脂质体包封GST- π siRNA。

[0195] 对于研究终点而言,在处理开始42天后杀死实验小鼠。切除原发瘤,并用电子天平称重,用于后续分析。

[0196] 对于化合物毒性的估测而言,在整个实验期间,处理组和对照组的小鼠的平均体重维持在正常范围内。在小鼠中未观察到其他毒性症状。

[0197] 实施例7:以GST- π 作为靶标的小干扰RNA (siRNA) 对于小鼠中A549细胞生长和绒毛尿囊膜 (CAM) 上血管形成的效果的分析。构建3对GST- π siRNA质粒和非沉默质粒 (non-silencing-plasmid), 利用LIPOFECTAMINE 2000将它们分别转染至A549细胞。通过ELISA和实时RT-PCR选出最有效的一对GST- π siRNA质粒。将使用选出的GST- π siRNA质粒转染的A549细胞、使用非沉默质粒转染的A549细胞、和未经过转染的A549细胞分别接种至裸鼠。将雏鸡胚胎随机地分成4组,用不同的溶液处理CAM 48小时:以DMEM培养基作为阴性对照组,以未经转染的A549细胞培养上清液作为阳性对照组,以GST- π siRNA A549细胞培养上清液作为GST- π siRNA组,以非沉默siRNA A549细胞培养上清液作为非沉默siRNA组。在第12天收集CAM,供于显微镜分析。

[0198] 较之对照组而言,GST- π siRNA质粒在使GST- π mRNA降低的同时诱导了由A549细胞分泌的GST- π 的减少。较之非沉默siRNA组而言,GST- π siRNA组中,小鼠异种移植肿瘤的平均体积减小;异种移植瘤生长至50mm³的时间被延迟。异种移植瘤中的GST- π 成分减少。CAM分析中,阴性对照组的GST- π 成分为0,而GST- π siRNA组的GST- π 成分较之非沉默siRNA组或阳性对照组而言降低了20~70%;较之阴性对照组而言,GST- π siRNA组或非沉默siRNA组或阳性对照组中,CAM的血管分支点增加;较之阴性对照组而言,GST- π siRNA组中CAM的总血管长度增加,而在非沉默siRNA组或阳性对照组中也增加。向GST- π siRNA组添加含有GST- π 的细胞培养上清液时,较之阴性对照组而言,微血管的增生增加,而在非沉默siRNA组或阳性对照组中,观察到了明显增生的血管。

[0199] 实施例8:细胞培养。在添加有10%FBS (FBS, Invitrogen) 的F-12K培养基 (ATCC) 中培养人非小细胞肺癌细胞系A549 (37℃, 湿润气氛, 空气中CO₂浓度为5%)。使用各种慢病毒转导颗粒,按照各制造商 (Sigma-Aldrich) 的说明分别转导A549TR细胞,制备稳定表达对照、或GST siRNA的细胞。

[0200] 使用2.5μg/mL嘌呤霉素 (Invivogen) 进行筛选,12天后,用克隆量筒分离具有抗性的克隆,然后利用含有嘌呤霉素的培养基进行扩增和维持。

[0201] 实施例9:以GST- π 作为靶标的siRNA导致体内肿瘤体积的显著缩小。

[0202] 使用了脂质制剂,由此将siRNA包封在纳米粒子中,并递送至严重联合免疫缺陷小鼠中的人A549肺癌细胞异种移植瘤。对异种移植瘤进行了检测,由此鉴定KRAS突变的存在、或较之正常细胞而言的异常表达水平。成功培育肿瘤 (>100mm³) 后,用以GST- π 作为靶标的siRNA或对照 (非特异性) siRNA对小鼠进行处理,每天2次,持续2周。在必须将对照组安乐死时终止实验。

[0203] 结果:利用以GST- π 作为靶标的siRNA的处理可防止肿瘤增大,并导致肿瘤体积急剧减小。

[0204] 将回收的肿瘤切割,利用TUNEL染色使其直观化。经过以GST- π 作为靶标的siRNA处理的肿瘤呈现了明显更高的细胞凋亡水平。从肿瘤中提取RNA,并实施实时PCR,对GST- π 的

特异性敲低进行检测。

[0205] 结果:利用以GST- π 作为靶标的siRNA的处理使GST- π 的体内表达急剧降低。

[0206] 实施例10:本发明的GST- π siRNA呈现出提高的血清稳定性。

[0207] 在人血清中孵育GST- π siRNA,在各时间点利用HPLS/LCMS检测残留的siRNA。GST- π siRNA(序列号1276、1341)的有义链和反义链在血清中的半衰期($t_{1/2}$)均为约100分钟。

[0208] 实施例11:本发明的GST- π siRNA的制剂在血浆中呈现了提高的稳定性。

[0209] 在血浆中孵育制剂形式的GST- π siRNA,在各时间点检测残留的siRNA。GST- π siRNA(序列号1276、1341)制剂在血浆中的半衰期($t_{1/2}$)明显长于100小时。

[0210] 将GST- π siRNA制成包含组合物(电离脂质:胆固醇:DOPE:DOPC:DPPE-PEG-2K)(25:30:20:20:5)的脂质体制剂。脂质体纳米粒子的Z均大小为40.0nm,并且包封有91%的siRNA。

[0211] 将制剂在含有50%人血清的PBS中孵育40分钟、1.5小时、3小时、24小时、和96小时。利用基于ELISA的分析测定GST- π siRNA的量。

[0212] 实施例12:本发明的GST- π siRNA能够使癌异种移植肿瘤在体内显著减小。以脂质体制剂的形式施予至癌异种移植肿瘤的情况下,GST- π siRNA能够在体内发挥基因敲低效能。

[0213] 观察到了GST- π siRNA(序列号1276、1341)的肿瘤抑制效果。在体内观察到了以GST- π 作为靶标的siRNA对于GST- π mRNA的剂量依赖性敲低。利用的癌异种移植模型使用了以GST- π 作为靶标的siRNA。

[0214] GST- π 的siRNA制剂在施予后数天内呈现了显著且出乎意料的有利的肿瘤抑制效果。在以脂质制剂的形式注射4天后,利用GST- π siRNA的处理导致GST- π mRNA表达显著降低。以更高的剂量即4mg/kg注射,24小时后,观测到GST- π mRNA表达显著下降约40%。

[0215] 以包含组合物(可离子化脂质:胆固醇:DOPE:DOPC:DPPE-PEG-2K)(25:30:20:20:5)的脂质体制剂的形式单次注射施予GST- π siRNA,施予量为10mL/kg。

[0216] 对于癌异种移植模型而言,从ATCC获得了A549细胞系。在添加有10%胎牛血清、100U/ml盘尼西林和100 μ g/ml链霉素的RPMI-1640中维持细胞。在接种前48小时稀释(split)细胞,从而使细胞在被收集时处于对数生长期。使用胰蛋白酶-EDTA轻度消化细胞后,从组织培养物中收集细胞。在台盼蓝的存在下,用血细胞计数器计数并测定活细胞的数量(仅计数活细胞)。在无血清RPMI培养基中重新悬浮细胞,使浓度为 4×10^7 /ml。然后将细胞悬浮液与冰上融化的BD matrigel以1:1的比例充分混合,用于注射。

[0217] 小鼠为Charles River Laboratory的雌性无胸腺裸鼠(nu/nu),经过免疫妥协,6~8周龄,每组3只小鼠。

[0218] 对于肿瘤模型的制备而言,使用25G注射针和针筒,在每只小鼠的右侧腹皮下接种0.1ml含有 2×10^6 个A549细胞的接种液,每只小鼠接种1剂接种液。小鼠在接种时未被麻醉。

[0219] 对于肿瘤体积的测量和随机化而言,肿瘤大小的测量结果取至0.1mm。肿瘤体积利用下式算出:肿瘤体积=长 $\times$ 宽²/2。每周检测2次肿瘤体积。当培养的肿瘤生长至约350~600mm³时,将小鼠按照各时间点分组。按照给药方案,在同一天施予试验制剂。

[0220] 对于施予量而言,在培养的肿瘤生长至约350~600mm³当天,从4℃冰箱中取出试验制剂。为了形成均质的溶液,在装入注射器之前,手动将装在瓶中的制剂颠倒数次。

[0221] 对于体重而言,小鼠称重至0.1g。在接下来的数周,每周检测并记录体重2次,包括研究结束当天。

[0222] 对于肿瘤的采集而言,在给药后0、24、48、72、96(可选)、168小时利用高浓度CO₂杀死动物,并切除肿瘤。先称取肿瘤的湿重,然后将其分成3部分,用于分析KD、分配和生物标志物。用液氮快速冷冻试样,并保存于-80℃,直到供于处理为止。

[0223] 本文描述的实施方案不是限制性的,并且本领域技术人员可以容易地理解,可以不进行过度实验而测试本文所述修饰的特定组合以鉴定具有改进的RNAi活性的核酸分子。

[0224] 出于所有目的,本文特别提及的所有出版物、专利和文献通过引用整体并入本文。

[0225] 应当理解,本发明不限于所述特定方法、方案、材料和试剂,因为它们可能变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围。对于本领域技术人员将显而易见的是,在不背离本说明书的范围和宗旨的情况下,可以对本文所公开的描述进行各种替换和修改,并且这些实施方案在本说明书和所附权利要求的范围内。

[0226] 必须指出,本文和所附权利要求中所使用的单数形式包括复数指称,上下文另有明确说明除外。同样地,术语“一个”(或“一种”)、“一个或更多个(一种或更多种)”和“至少一个/种”在本文可以互换使用。另外要注意,术语“包括”、“包含”、“含有”、“含”和“具有”可以互换使用,并且应该被广义、无限制地解释。

[0227] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的记载仅仅意在作为对单独提到落入该范围的每个单独的值的速记法,每个单独的值均被并入说明书中,如同它们被单独记载于本文中一样。对于马库什组,本领域技术人员将认识到,该描述包括个体成员以及马库什组成员的亚组。

[0228] 即使没有进一步的阐述,本领域技术人员亦可基于上述描述最大程度地利用本发明。因此,所附的具体实施方案应被解释为仅是说明性的,而不是以任何方式限制本公开的其余部分。

[0229] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合而联用。本说明书中公开的每个特征可以由服务于相同、等同或相似目的的替代特征来代替。

序列号1

TGGGAAAGAGGGAAAGGCTTCCCCGGCCAGCTGCGCGGCGACTCCGGGGACTCCAGGGCGCCCCCTCTGCG
GCCGACGCCCCGGGGTGCAGCGGCCCGGGGGCTGGGGCCGGCGGGAGTCCGCGGGACCTCCAGAAGAGC
GGCCGGCGCCGTGACTCAGCACTGGGGCGGAGCGGGCGGGACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGCCCGCA
GGCCTTCGCTGGAGTTTCGCCGCCGAGTCTTCGCCACCATGCCGCCCTACACCGTGGTCTATTTCCCAG
TTCGAGGCCGCTGCGCGGCCCTGCGCATGCTGCTGGCAGATCAGGGCCAGAGCTGGAAGGAGGAGGTGGT
GACCGTGGAGACGTGGCAGGAGGGCTCACTCAAAGCCTCCTGCCTATACGGGCAGCTCCCCAAGTTCCAG
GACGGAGACCTCACCTGTACCACTCCAATACCATCCTGCGTCACCTGGGCCGCACCTTGGGCTCTATG
GGAAGGACCAGCAGGAGGCAGCCCTGGTGGACATGGTGAATGACGGCGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATA
CATCTCCCTCATCTACACCAACTATGAGGCGGGCAAGGATGACTATGTGAAGGCACTGCCCGGGCAACTG
AAGCCTTTTGAGACCTGCTGTCCAGAACAGGGAGGCAAGACCTTCATTGTGGGAGACCAGATCTCCT
TCGCTGACTACAACCTGCTGGACTTGCTGCTGATCCATGAGGTCCTAGCCCCCTGGCTGCCTGGATGCGTT
CCCCCTGCTCTCAGCATATGTGGGGCGCCTCAGTGCCCGGCCCAAGCTCAAGGCCTTCTTGGCCTCCCCT
GAGTACGTGAACCTCCCCATCAATGGCAACGGGAAACAGTGAGGTTGGGGGGACTCTGAGCGGGAGGCA
GAGTTTGCCTTCCTTTCTCCAGGACCAATAAAATTTCTAAGAGAGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA

图1

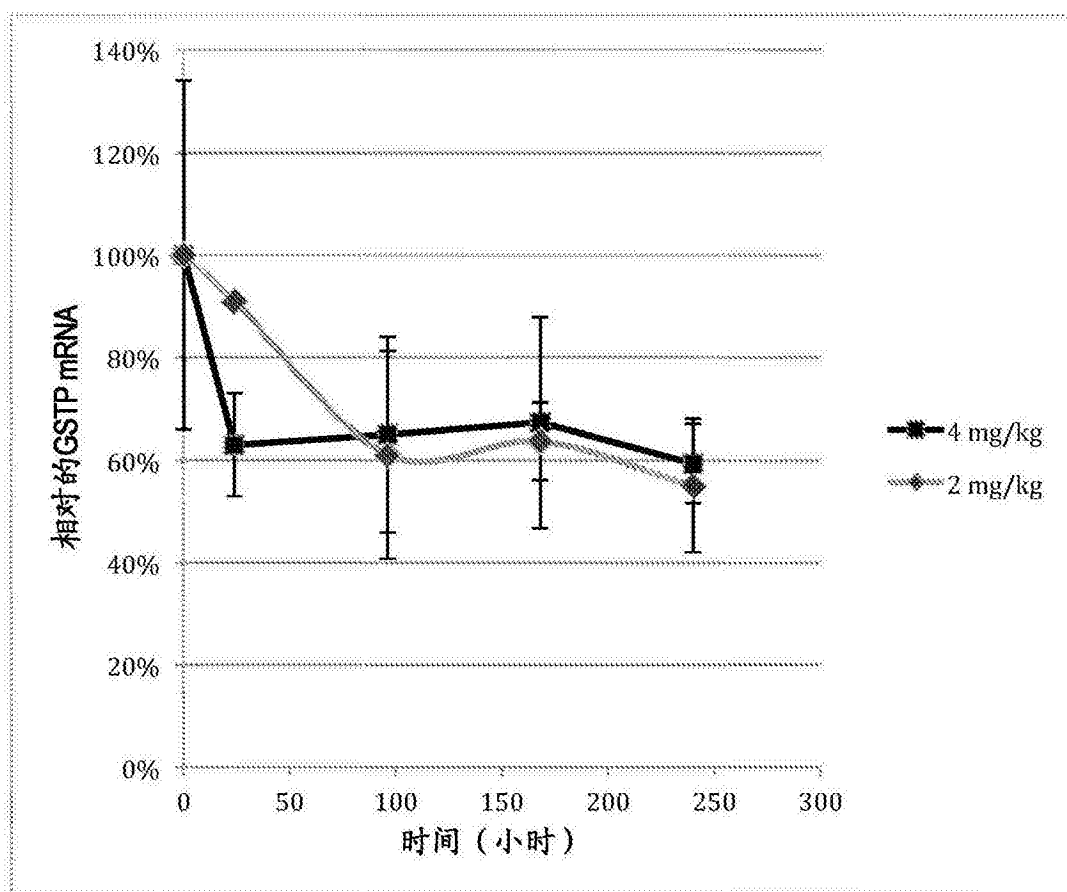


图2

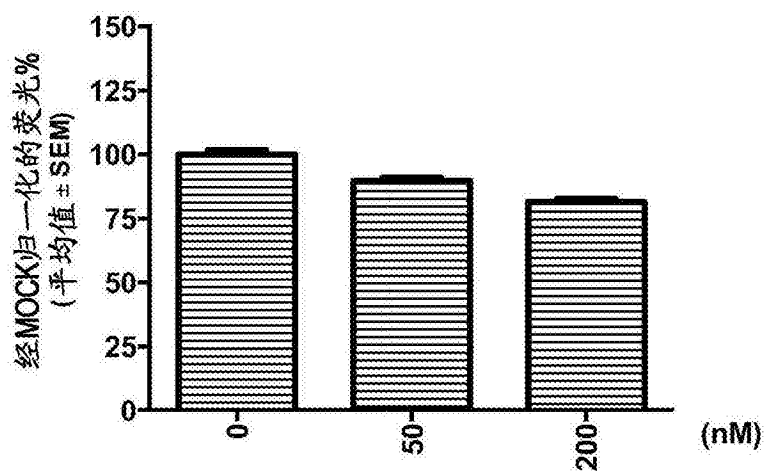


图3

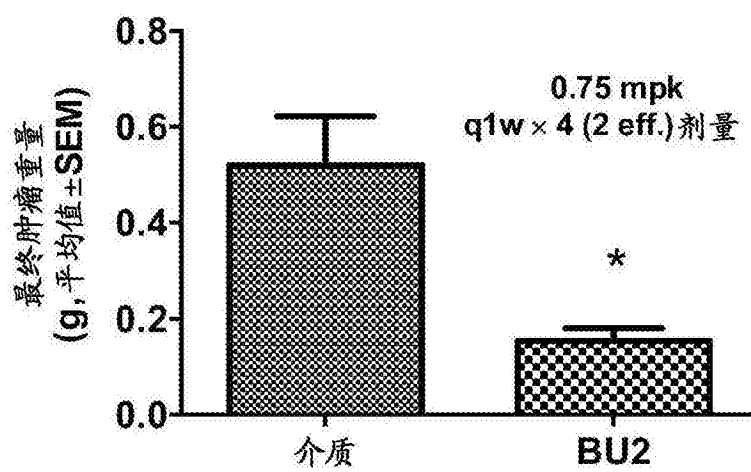


图4