



(12) 发明专利申请

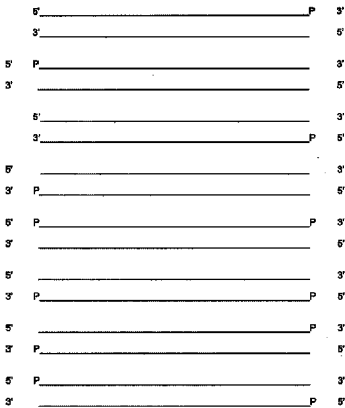
(10) 申请公布号 CN 102497870 A
(43) 申请公布日 2012. 06. 13

(21) 申请号 201080034355. 2 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2010. 06. 03 A61K 31/713(2006. 01)
C07H 21/00(2006. 01)
(30) 优先权数据
61/183, 818 2009. 06. 03 US
61/183, 815 2009. 06. 03 US
(85) PCT申请进入国家阶段日
2012. 02. 02
(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2010/037263 2010. 06. 03
(87) PCT申请的公布数据
W02010/141724 EN 2010. 12. 09
(71) 申请人 戴瑟纳制药公司
地址 美国马萨诸塞州
(72) 发明人 苏杰特·库马尔·巴苏
鲍勃·戴尔·布朗
(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224
代理人 何冲 万志香

权利要求书 5 页 说明书 174 页 附图 25 页

(54) 发明名称
肽-DICER底物试剂及其特异性抑制基因表达的方法

(57) 摘要
本发明涉及通过使用Dicer底物siRNA(DsirNA)-肽缀合物而用于降低靶RNA和蛋白质水平的化合物、组合物和方法。



1. 一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 其包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +5 或更少的净电荷, 且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

2. 一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 其包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中所述肽不带净电荷, 且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

3. 一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 其包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +5 或更少的净电荷, 且其中所述肽具有至少一个阴离子氨基酸残基, 并且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

4. 如权利要求 3 所述的分离的组合物, 其中所述阴离子氨基酸是谷氨酸或天冬氨酸。

5. 一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 其包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 6 个和至多 19 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +4 或更少的净电荷, 且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

6. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 25 个和至多 35 个核苷酸、至少 19 个和至多 35 个核苷酸、至少 19 个和至多 24 个核苷酸、至少 25 个和至多 30 个核苷酸、至少 26 个和至多 30 个核苷酸或至少 21 个和至多 23 个核苷酸。

7. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物, 其中所述第二链在 3' 端包含突出。

8. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物, 其中所述第一链在 3' 端包含突出。

9. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物, 其中所述第二链和所述第一链中的至少一个在 3' 端包含突出。

10. 如权利要求 9 所述的分离的组合物, 其中所述第一链和 / 或第二链的所述 3' 突出的所述核苷酸包括经过修饰的核苷酸。

11. 如权利要求 9 所述的分离的组合物, 其中所述 3' 突出的长度为 1 至 5 个核苷酸。

12. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物, 其中所述第一链和所述第二链中的每一条链由相同数目的核苷酸残基组成。

13. 如权利要求 12 所述的分离的组合物, 其中所述第一链的所述 5' 端的最后一个残基与所述第二链的所述 3' 端的最后一个残基形成错配碱基对。

14. 如权利要求 12 所述的分离的组合物, 其中所述第一链的所述 3' 端的所述最后一个残基与所述第二链的所述 5' 端的所述最后一个残基形成错配碱基对。

15. 如权利要求 12 所述的分离的组合物, 其中所述第一链的所述 5' 端的所述最后一个残基和倒数第二个残基与所述第二链的所述 3' 端的所述最后一个残基和倒数第二个残基形成两个错配碱基对。

16. 如权利要求 12 所述的分离的组合物, 其中所述第一链的所述 3' 端的所述最后一个残基和倒数第二个残基与所述第二链的所述 5' 端的所述最后一个残基和倒数第二个残

基形成两个错配碱基对。

17. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含 6-50 个氨基酸。
18. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含 10-50 个氨基酸。
19. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含 15-30 个氨基酸。
20. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含多达 10 个氨基酸。
21. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽带有约 +2 或更少的净电荷。
22. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽带有约 +1 或更少的净电荷。
23. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含一个或多个脯氨酸残基。
24. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含一个或多个疏水氨基酸残基。
25. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含五个或更多个阳离子氨基酸残基。
26. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含四个阳离子氨基酸残基。
27. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含三个阳离子氨基酸残基。
28. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含两个阳离子氨基酸残基。
29. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含一个阳离子氨基酸残基。
30. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽不具有阳离子氨基酸残基。
31. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中用稳定的连接子将所述肽与所述 dsRNA 缀合。
32. 如权利要求 31 所述的分离的组合物,其中所述稳定的连接子包括同型双功能交联剂。
33. 如权利要求 31 所述的分离的组合物,其中所述稳定的连接子包括异型双功能交联剂。
34. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中用可裂解的连接子将所述肽与所述 dsRNA 缀合。
35. 如权利要求 34 所述的分离的组合物,其中所述可裂解的连接子包括二硫化物连接子。
36. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中用碳连接子将所述肽与所述 dsRNA 缀合。
37. 如权利要求 36 所述的分离的组合物,其中所述碳连接子包含至多十八个碳。
38. 如权利要求 36 所述的分离的组合物,其中所述碳连接子包含 6 个碳。

39. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中在无连接子的情况下将所述肽与所述 dsRNA 缀合。

40. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 3' 端缀合。

41. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第二链的所述 3' 端缀合。

42. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 5' 端缀合。

43. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第二链的所述 5' 端缀合。

44. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 5' 端和所述第二链的所述 5' 端缀合。

45. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 5' 端和所述第二链的所述 3' 端缀合。

46. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 3' 端和所述第二链的所述 3' 端缀合。

47. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将所述肽与所述 dsRNA 的所述第一链的所述 3' 端和所述第二链的所述 5' 端缀合。

48. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第一链内部缀合。

49. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第二链内部缀合。

50. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将至少一个肽与所述第一链内部缀合且其中将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第二链内部缀合。

51. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中将至少两个肽与所述 dsRNA 缀合。

52. 如权利要求 51 所述的分离的组合物,其中所述至少两个肽是相同的。

53. 如权利要求 51 所述的分离的组合物,其中所述至少两个肽是不相同的。

54. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其还包含至少一个染料分子,且其中所述染料分子与所述 dsRNA 和所述肽中的至少一个缀合。

55. 如权利要求 54 所述的分离的组合物,其中所述染料分子为聚芳烃。

56. 如权利要求 54 所述的分离的组合物,其中所述染料为荧光染料。

57. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其还包含治疗剂。

58. 如权利要求 57 所述的分离的组合物,其中所述治疗剂为抗癌药物。

59. 如权利要求 58 所述的分离的组合物,其中所述抗癌药物选自紫杉醇、三苯氧胺、顺铂、阿霉素和长春碱。

60. 如权利要求 58 所述的组合物,其中所述治疗剂为用于治疗代谢疾病或病症的药物。

61. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其进一步包含至少一个靶向肽。

62. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述肽包含毒素的转位结构域的一部分。

63. 如权利要求 62 所述的分离的组合物,其中所述神经毒素为梭菌神经毒素。

64. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中从所述 dsRNA 的所述第一寡核苷酸链的所述 3' 端的所述第一个核苷酸(位置 1)开始,用经过修饰的核苷酸取代位置 1、2 和 / 或 3。

65. 如权利要求 64 所述的分离的 dsRNA,其中所述经过修饰的核苷酸为脱氧核糖核苷酸。

66. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的 dsRNA,其中所述第一寡核苷酸链和所述第二寡核苷酸链中的一个或两个包含 5' 磷酸。

67. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述第一链或所述第二链的至少一个核苷酸是经过修饰的。

68. 如权利要求 67 所述的分离的组合物,其中所述经过修饰的核苷酸残基选自 2' -O- 甲基、2' - 甲氧基乙氧基、2' - 氟、2' - 烯丙基、2' -O-[2-(甲基氨基)-2- 氧代乙基]、4' - 硫代、4' -CH₂-O-2' - 桥、4' -(CH₂)₂-O-2' - 桥、2' -LNA、2' - 氨基和 2' -O-(N- 甲基氨基甲酸酯)。

69. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述 dsRNA 在所述细胞中由 Dicer 内源性裂解。

70. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中在所述细胞环境中,足以降低所述靶基因表达的所述分离的双链核酸的量选自 1 纳摩尔或更少、200 皮摩尔或更少、100 皮摩尔或更少、50 皮摩尔或更少、20 皮摩尔或更少和 10 皮摩尔或更少。

71. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述第一链与所述第二链通过化学连接子连结。

72. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中所述第一链的所述 3' 端与所述第二链的所述 5' 端通过化学连接子连结。

73. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其中用引导 Dicer 裂解定向的经过修饰的核苷酸取代所述第二链或所述第一链的核苷酸。

74. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其包含经过修饰的核苷酸,所述经过修饰的核苷酸选自脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸、3' - 脱氧腺苷(虫草素)、3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)、2' , 3' - 双脱氧肌苷(ddI)、2' , 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)、2' , 3' - 双脱氢-2' , 3' - 双脱氧胸苷(d4T)、3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)的单磷酸核苷酸、2' , 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)和 2' , 3' - 双脱氢-2' , 3' - 双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸、4- 硫尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、5-(3- 氨基烯丙基)- 尿嘧啶、2' -O- 烷基核糖核苷酸、2' -O- 甲基核糖核苷酸、2' - 氨基核糖核苷酸、2' - 氟核糖核苷酸和锁核酸。

75. 如权利要求 1、2、3 或 5 所述的分离的组合物,其包含磷酸骨架修饰,所述磷酸骨架修饰选自磷酸酯、硫代磷酸酯和磷酸三酯。

76. 如权利要求 64 所述的分离的组合物,其中所述第一链的所述 3' 端的所述经过修饰的核苷酸残基选自脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸和荧光分子。

77. 如权利要求1、2、3或5所述的分离的组合物,其中所述第一链的至少一个核苷酸与所述第二链的至少一个核苷酸形成错配碱基对。

78. 如权利要求1、2、3或5所述的分离的组合物,其中所述肽具有选自SEQ ID NO:1-89的氨基酸序列。

79. 一种用于降低细胞中的靶基因表达的方法,其包括:

以与参照 dsRNA 相比可有效降低细胞中的靶基因表达的量,使细胞与权利要求1、2、3或5中所要求的所述分离的组合物接触。

80. 一种用于选择性地抑制细胞生长的方法,其包括使细胞与足以抑制所述细胞的生长的一定量的如权利要求1、2、3或5所述的分离的组合物接触。

81. 一种用于降低动物中的靶基因表达的方法,其包括以与参照 dsRNA 相比可有效降低动物细胞中的靶基因表达的量,用权利要求1、2、3或5中所要求的所述分离的组合物治疗动物。

82. 如权利要求81所述的方法,其中当与合适的对照 dsRNA 相比时,所述分离的组合物具有增强的药代动力学。

83. 如权利要求81所述的方法,其中当与合适的对照 dsRNA 相比时,所述 dsRNA 具有增强的药效学。

84. 如权利要求81所述的方法,其中当与合适的对照 dsRNA 相比时,所述 dsRNA 具有降低的毒性。

85. 如权利要求81所述的方法,其中当与合适的对照 dsRNA 相比时,所述 dsRNA 具有增强的细胞内摄取。

86. 一种用于降低受治疗者细胞中的靶基因表达的药物组合物,其包含与参照 dsRNA 相比可有效降低细胞中的靶基因表达的量的如权利要求1、2、3或5所述的所述分离的组合物和药学上可接受的载体。

87. 一种合成如权利要求1-78中的任一项所要求的 dsRNA-肽缀合物的方法,其包括通过化学法或酶法合成所述 dsRNA。

88. 一种试剂盒,所其包含如权利要求1-74中的任一项所述的所述 dsRNA-肽缀合物及其使用说明。

肽-DICER 底物试剂及其特异性抑制基因表达的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请涉及且根据 35U.S.C. § 119(e) 要求 2009 年 6 月 3 日提交的美国临时专利申请第 61/183,815 号和 2009 年 6 月 3 日提交的美国临时专利申请第 61/183,818 号的优先权。这些申请的全部教导以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及肽-dicer 底物缀合物及其使用方法。

[0004] 发明背景

[0005] 由于需要安全、有效地递送治疗性分子,所以肽适体的鉴定很重要。已经描述了肽适体(在 Beldhoe 2008 Int. J. Mol. Sci. 9:1276-1320; Moschos 等, 2007 Biochemical Society Transaction, 第 35 卷, 第 4 部分:807-810 中综述)。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明涉及含有与肽缀合的双链 RNA (“dsRNA”) 的组合物和用于制备所述组合物的方法。本发明的 dsRNA 为具有通过与肽缀合而优化的结构的双链 RNA、小干扰 RNA (siRNA) 和 Dicer 底物 siRNA (“DsiRNA”), 用于有效递送和靶向且作为有效和高效的抑制剂起作用, 任选地所述 dsRNA 具有延长的抑制作用持续时间。

[0008] 在一个实施方案中, 本发明提供一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 该组合物包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +5 或更少的净电荷, 并且其中肽与所述 dsRNA 缀合。

[0009] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 该组合物包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中肽不带有净电荷, 并且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

[0010] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 该组合物包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +4 或更少的净电荷及其中所述肽具有至少一个阴离子氨基酸残基, 并且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

[0011] 在一个方面, 阴离子氨基酸为谷氨酸或天冬氨酸。

[0012] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种分离的双链核糖核酸 (dsRNA) 组合物, 该组合物包含具有 5' 端和 3' 端的第一寡核苷酸链和具有 5' 端和 3' 端的第二寡核苷酸链以及肽, 其中所述第一链和所述第二链的长度为具有至少 6 个和至多 19 个核苷酸, 其中所述肽带有约 +4 或更少的净电荷, 并且其中所述肽与所述 dsRNA 缀合。

[0013] 在另一个方面, 所述第一链和所述第二链的长度为至少 25 个和至多 35 个核苷酸、至少 19 个和至多 35 个核苷酸、至少 19 个和至多 24 个核苷酸、至少 25 个和至多 30 个核苷酸、

酸、至少 26 个和至多 30 个核苷酸或至少 21 个和至多 23 个核苷酸。

[0014] 在另一个方面,第二链在 3' 端包含突出。

[0015] 在另一个方面,第一链在 3' 端包含突出。

[0016] 在另一个方面,所述第二链和所述第一链中的至少一个在 3' 端包含突出。

[0017] 在另一个方面,所述第一链和 / 或所述第二链的所述 3' 突出的核苷酸包括经过修饰的核苷酸。

[0018] 在另一个方面,3' 突出的长度为 1-5 个核苷酸。

[0019] 在另一个方面,所述第一链和所述第二链中的每一条链由相同数目的核苷酸残基组成。

[0020] 在另一个方面,所述第一链的所述 5' 端的最后一个残基与所述第二链的所述 3' 端的最后一个残基形成错配碱基对。

[0021] 在另一个方面,所述第一链的所述 3' 端的最后一个残基与所述第二链的所述 5' 端的最后一个残基形成错配碱基对。

[0022] 在另一个方面,所述第一链的所述 5' 端的最后一个残基和倒数第二个残基与所述第二链的所述 3' 端的最后一个残基和倒数第二个残基形成两个错配碱基对。

[0023] 在另一个方面,所述第一链的所述 3' 端的最后一个残基和倒数第二个残基与所述第二链的所述 5' 端的最后一个残基和倒数第二个残基形成两个错配碱基对。

[0024] 在另一个方面,肽包含 6-50 个氨基酸。

[0025] 在另一个方面,肽包含 10-50 个氨基酸。

[0026] 在另一个方面,肽包含 15-30 个氨基酸。

[0027] 在另一个方面,肽包含多达 10 个氨基酸。

[0028] 在另一个方面,肽带有约 +2 或更少的净电荷。

[0029] 在另一个方面,肽带有约 +1 或更少的净电荷。

[0030] 在另一个方面,肽包含一个或多个脯氨酸残基。

[0031] 在另一个方面,肽包含一个或多个疏水氨基酸残基。

[0032] 在另一个方面,肽包含五个或更多个阳离子氨基酸残基。

[0033] 在另一个方面,肽包含四个阳离子氨基酸残基。

[0034] 在另一个方面,肽包含三个阳离子氨基酸残基。

[0035] 在另一个方面,肽包含两个阳离子氨基酸残基。

[0036] 在另一个方面,肽包含一个阳离子氨基酸残基。

[0037] 在另一个方面,肽不具有阳离子氨基酸残基。

[0038] 在另一个方面,用稳定的连接子将肽与所述 dsRNA 缀合。

[0039] 在另一个方面,稳定的连接子包括同型双功能交联剂。

[0040] 在另一个方面,稳定的连接子包括异型双功能交联剂。

[0041] 在另一个方面,用可裂解的连接子将肽与所述 dsRNA 缀合。

[0042] 在另一个方面,可裂解的连接子包括二硫化物连接子。

[0043] 在另一个方面,用碳连接子将肽与所述 dsRNA 缀合。

[0044] 在另一个方面,碳连接子包含至多十八个碳。

[0045] 在另一个方面,碳连接子包含 6 个碳。

- [0046] 在另一个方面,在无连接子的情况下将肽与所述 dsRNA 缀合。
- [0047] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的第一链的 3' 端缀合。
- [0048] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的所述第二链的 3' 端缀合。
- [0049] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的第一链的 5' 端缀合。
- [0050] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的所述第二链的 5' 端缀合。
- [0051] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的第一链的 5' 端和所述第二链的 5' 端缀合。
- [0052] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的所述第一链的 5' 端和所述第二链的所述 3' 端缀合。
- [0053] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的第一链的 3' 端和所述第二链的 3' 端缀合。
- [0054] 在另一个方面,将肽与所述 dsRNA 的所述第一链的 3' 端和所述第二链的所述 5' 端缀合。
- [0055] 在另一个方面,将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第一链内部缀合。
- [0056] 在另一个方面,将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第二链内部缀合。
- [0057] 在另一个方面,将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第一链内部缀合且将至少一个肽与所述 dsRNA 的所述第二链内部缀合。
- [0058] 在另一个方面,将至少两个肽与所述 dsRNA 缀合。
- [0059] 在另一个方面,至少两个肽是相同的。
- [0060] 在另一个方面,至少两个肽是不相同的。
- [0061] 在另一个方面,分离的组合物还包含至少一个染料分子,且其中所述染料分子与所述 dsRNA 和所述肽中的至少一个缀合。
- [0062] 在另一个方面,染料分子为聚芳烃。
- [0063] 在另一个方面,染料为荧光染料。
- [0064] 在另一个方面,分离的组合物还包含治疗剂。
- [0065] 在另一个方面,治疗剂为抗癌药物。
- [0066] 在另一个方面,抗癌药物选自紫杉醇、三苯氧胺、顺铂、阿霉素和长春碱。
- [0067] 在另一个方面,治疗剂为用于治疗代谢疾病或病症的药物。
- [0068] 在另一个方面,分离的组合物还包含至少一个靶向肽。
- [0069] 在另一个方面,肽包含毒素的转位结构域的一部分。
- [0070] 在另一个方面,神经毒素为梭菌神经毒素。
- [0071] 在另一个方面,其中从所述 dsRNA 的第一寡核苷酸链的 3' 端的第一个核苷酸(位置 1)开始,用经过修饰的核苷酸取代位置 1、2 和 / 或 3。
- [0072] 在另一个方面,经过修饰的核苷酸为脱氧核糖核苷酸。
- [0073] 在另一个方面,第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链中的一个或两个包含 5' 磷酸。
- [0074] 在另一个方面,所述第一链或所述第二链的至少一个核苷酸是经过修饰的。
- [0075] 在另一个方面,经过修饰的核苷酸残基选自 2' -O- 甲基、2' - 甲氧基乙氧基、2' - 氟、2' - 烯丙基、2' -O-[2-(甲基氨基)-2- 氧代乙基]、4' - 硫代、4' -CH₂-O-2' - 桥、4' -(CH₂)₂-O-2' - 桥、2' -LNA、2' - 氨基和 2' -O-(N- 甲基氨基甲酸酯)。
- [0076] 在另一个方面,所述 dsRNA 在所述细胞中由 Dicer 内源性裂解。

[0077] 在另一个方面,在所述细胞环境中,足以降低靶基因表达的所述分离的双链核酸的量选自 1 纳摩尔或更少、200 皮摩尔或更少、100 皮摩尔或更少、50 皮摩尔或更少、20 皮摩尔或更少和 10 皮摩尔或更少。

[0078] 在另一个方面,第一链与第二链通过化学连接子连结。

[0079] 在另一个方面,所述第一链的 3' 端与所述第二链的所述 5' 端通过化学连接子连结。

[0080] 在另一个方面,用引导 Dicer 裂解定向的经过修饰的核苷酸取代所述第二链或第一链的核苷酸。

[0081] 在另一个方面,分离的组合物包含经过修饰的核苷酸,该经过修饰的核苷酸选自脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸、3' - 脱氧腺苷(虫草素)、3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)、2', 3' - 双脱氧肌苷(ddI)、2', 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)、2', 3' - 双脱氢-2', 3' - 双脱氧胸苷(d4T)、3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)的单磷酸核苷酸、2', 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)和 2', 3' - 双脱氢-2', 3' - 双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸、4- 硫尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、5-(3- 氨基烯丙基)- 尿嘧啶、2' -O- 烷基核糖核苷酸、2' -O- 甲基核糖核苷酸、2' - 氨基核糖核苷酸、2' - 氟核糖核苷酸和锁核酸。

[0082] 在另一个方面,分离的组合物包含磷酸骨架修饰,该磷酸骨架修饰选自磷酸酯、硫代磷酸酯和磷酸三酯。

[0083] 在另一个方面,所述第一链的所述 3' 端的经过修饰的核苷酸残基选自脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸和荧光分子。

[0084] 在另一个方面,所述第一链的至少一个核苷酸与所述第二链的至少一个核苷酸形成错配碱基对。

[0085] 在另一个方面,肽具有选自 SEQ ID NO:1-89 的氨基酸序列。

[0086] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低细胞中的靶基因表达的方法,该方法包括:以与参照 dsRNA 相比可有效降低细胞中的靶基因表达的量,使细胞与本发明的分离的组合物接触。

[0087] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于选择性地抑制细胞生长的方法,该方法包括使细胞与足以抑制细胞生长的本发明的一定量的所述分离的组合物接触。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低动物中的靶基因表达的方法,该方法包括:以与参照 dsRNA 相比可有效降低动物细胞中的靶基因表达的量,用本发明的分离的组合物治疗动物。

[0089] 在一个方面,当与合适的对照 dsRNA 相比时,分离的组合物具有增强的药代动力学。

[0090] 在另一个方面,当与合适的对照 dsRNA 相比时,dsRNA 具有增强的药效学。

[0091] 在另一个方面,当与合适的对照 dsRNA 相比时,dsRNA 具有降低的毒性。

[0092] 在另一个方面,当与合适的对照 dsRNA 相比时,dsRNA 具有增强的细胞内摄取。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低受治疗者细胞中的靶基因表达的药物组合物,该药物组合物包含与参照 dsRNA 相比可有效降低细胞中的靶基因表达的量的本发明的分离的组合物和药学上可接受的载体。

[0094] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于合成本发明的 dsRNA-肽缀合物的方法,该方法包括通过化学法或酶法合成所述 dsRNA。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明提供一种试剂盒,所述试剂盒包含本发明的 dsRNA-肽缀合物及其使用说明。

[0096] 附图简述

[0097] 图 1(A-H) 呈现根据本发明的有用的 dsRNA-肽缀合物的示例性结构。“P”=根据本发明的肽(A-平端-平端)、(B和C-平端-突出端)、(D和E-不对称端)和(F和G-错配端)。

[0098] 图 2 示出本发明的 HPRT1 靶向 dsRNA 和 KRAS 靶向 dsRNA 的示例性序列。加下划线的残基指示 2'-O-甲基修饰的位置。箭头指示 dsRNA 内 dicer 酶裂解的预计位点,而虚线指示对应靶 RNA 序列内 Argonaute2 介导的裂解的预计位置。

[0099] 图 3 示出本发明的肽缀合 dsRNA 的示例性肽序列。还列出了每一个肽的净电荷。

[0100] 图 4 示意性描绘了本发明的示例性 DsiRNA-肽缀合物,以及编号为 2、3 和 5 的相应 DsiRNA-肽缀合物的示于泳道 2、3 和 5 中的适当缀合分子的大小改变。示意图中的箭头指示 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物内预计的 dicer 酶裂解位点。

[0101] 图 5 示意性描绘了本发明的另外的示例性 DsiRNA-肽缀合物,以及编号为 2、3、5 和 6 的相应 DsiRNA-肽缀合物的示于泳道 2、3、5 和 6 中的适当缀合分子的大小改变。示意图中的箭头指示 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物内预计的 dicer 酶裂解位点。

[0102] 图 6 示意性描绘了本发明的其它示例性 DsiRNA-肽缀合物,以及指示编号为 2 和 3 的 DsiRNA-肽缀合物的示于泳道 2 和 3 中的适当缀合分子的大小改变。示意图中的箭头指示 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物内预计的 dicer 酶裂解位点。

[0103] 图 7 示意性描绘了示例性 DsiRNA-肽缀合物(包括本发明的可裂解肽缀合物),以及编号为 2、3、4 和 5 的相应 DsiRNA-肽缀合物的示于泳道 2、3、4 和 5 中的适当缀合分子的大小改变。示意图中的箭头指示 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物内预计的 dicer 酶裂解位点。

[0104] 图 8 示意性描绘了本发明的示例性 DsiRNA-环肽缀合物,以及指示编号为 2 的 DsiRNA-肽缀合物的示于泳道 2 中的适当缀合分子的大小改变。示意图中的箭头指示 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物内预计的 dicer 酶裂解位点。

[0105] 图 9 和图 10 示意性描绘了本发明的示例性 DsiRNA-肽缀合物,其中每一个图示出 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物的 Dicer 加工分析的结果。

[0106] 图 11 和图 12 示出柱状图数据,这些数据表明转染的 DsiRNA-肽缀合物是保持体外效力的有效的基因沉默剂。在 HeLa 细胞中进行转染测定。

[0107] 图 13 和图 14 展示了示例性 DsiRNA-肽缀合物的血清稳定性,且指示了半衰期。

[0108] 图 15、图 16 和图 17 示出柱状图数据,这些数据表明示例性 DsiRNA-肽缀合物在不存在转染媒介物的情况下显示体外靶基因沉默功效,且随着 DsiRNA-肽缀合物浓度不断增加观察到提高的递送。在 HeLa 细胞中进行测定。

[0109] 图 18 示出柱状图数据,这些数据表明在不存在转染媒介物的情况下示例性 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物体外敲低 HepG2 细胞中的靶基因。DsiRNA、DsiRNA-肽和肽以浓度为 5 μ M 施用。

[0110] 图 19 示出 IC₅₀ 曲线数据,这些数据说明在不存在转染媒介物的情况下示例性

DsiRNA 和 DsiRNA- 肽缀合物体外敲低 HepG2 细胞中的靶基因。还示出了测试试剂的示意图。

[0111] 发明详述

[0112] 本发明涉及含有包含肽的双链 RNA (" dsRNA ") 的组合物, 与不含如本文所述的肽的 dsRNA 分子相比, 所述肽能够增强 dsRNA 的递送和 / 或生物分布或针对靶标的靶向并且能够增加其它功能和 / 或增强这种试剂的 (例如) 药代动力学或药效学。本发明还涉及制备包含肽的 dsRNA 的方法, 所述包含肽的 dsRNA 能够在体内或体外降低基因的水平或表达。

[0113] 本发明提供新型 dsRNA 肽缀合物。

[0114] 本发明还提供用于使 dsRNA 靶向特定组织的新型 dsRNA- 肽缀合物。通过使靶向肽与目标组织或肿瘤上的表面标记高度特异性结合而进行本文所述的基于肽的靶向。这种肽结合特异性为本发明的 dsRNA- 肽缀合物提供使 dsRNA 以高度特异性、选择性且有效的方式靶向靶标的提高的能力, 所述高度特异性、选择性且有效的方式有利于本领域已知的 dsRNA 靶向方法或试剂。

[0115] 本发明提供以下优点。本发明提供增强本发明的 dsRNA 递送的递送肽。本发明提供接近中性或为中性的递送肽。例如, 核酸与阳离子肽缀合。TAT (Tat⁴⁸⁻⁶⁰)、穿膜肽 (Antp⁴³⁻⁵⁸, 寡聚精氨酸 (R8, R9) 等) 为本领域已知的。不同于本发明的中性或接近中性的肽, 由于核酸的聚阴离子性质, 阳离子肽缀合物特别不利于 dsRNA 缀合。

[0116] 本发明的肽还优于本领域已知的肽, 因为本文所述的肽不需要通过可裂解的连接子与 dsRNA 连接而是可通过稳定的连接子与 dsRNA 缀合, 因为 dicer 酶将加工本发明的 dsRNA- 肽以产生适于在 RISC 途径中加工的 siRNA 分子。这对药物组合物特别有利, 因为稳定的连接子具有改进的稳定性 (可裂解的连接子在制造和 / 或存储期间可裂解, 由此丧失其功能)。

[0117] 定义

[0118] 本发明提供用于降低细胞中的靶基因表达的改进的组合物和方法, 涉及以有效降低细胞中的靶基因表达的量使靶标与分离的 dsRNA 接触。本发明的 dsRNA 分子包含如本文中所定义的肽以提供 dsRNA- 肽缀合物。与不含有经过修饰的核苷酸模式的对应长度的 dsRNA 试剂相比, 所述肽增强 dsRNA 的递送和 / 或生物分布或针对靶 RNA 的靶向并且增加其它功能, 例如药代动力学或药效学。

[0119] 除非另外定义, 否则本文中所使用的所有科技术语都具有本发明所属技术领域的专业人员通常所理解的含义。以下参考文献为技术人员提供本发明中所使用的许多术语的一般定义: Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第 2 版, 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker 编, 1988); The Glossary of Genetics, 第 5 版, R. Rieger 等 (编), Springer Verlag (1991); 以及 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。如本文所用, 除非另外指明, 否则以下术语具有下文对其所归结的含义。

[0120] 本发明的特征在于与根据本发明的一个或多个肽缀合的一个或多个 dsRNA 分子, 和使用这些 dsRNA 分子来调节目标 RNA 或所编码蛋白质的水平的方法。

[0121] 本发明的 dsRNA- 肽可由 dicer 酶裂解并且可抑制靶 RNA 的表达。

[0122] 如本文所使用,“肽”包括“递送肽”和“靶向肽”。

[0123] 如本文所使用,“肽”是指直链肽、支链肽或环肽。

[0124] 本发明进一步涉及使用肽将 dsRNA 运输至所需靶标,例如,细胞或细胞上或细胞内的受体、所需靶组织或所需靶细胞。

[0125] 根据本发明,所需位点可为,例如但不限于脑、肾上腺或脑外部的其它位点(例如,颅外位点),例如,肾脏、肝脏、胰腺、心脏、脾脏、肠胃(GI)道(例如,胃、肠、结肠)、眼、肺、皮肤、脂肪、肌肉、淋巴结、骨髓、泌尿和生殖系统(卵巢、乳房、睾丸、前列腺)、胎盘、血细胞及其组合。因此,所需靶标位点可为选自以下的一个或多个位点:脑、肾上腺或脑外部的其它位点(例如,颅外位点),例如,肾脏、肝脏、胰腺、心脏、脾脏、肠胃(GI)道(例如,胃、肠、结肠)、眼、肺、皮肤、脂肪、肌肉、淋巴结、骨髓、泌尿和生殖系统(卵巢、乳房、睾丸、前列腺)、胎盘、血细胞及其组合。

[0126] “靶细胞”是指如本文中所定义的任何细胞,例如来源于或存在于任何器官中的细胞,所述器官包括但不限于脑、肾上腺或脑外部的其它位点(例如,颅外位点),例如,肾脏、肝脏、胰腺、心脏、脾脏、肠胃(GI)道(例如,胃、肠、结肠)、眼、肺、皮肤、脂肪、肌肉、淋巴结、骨髓、泌尿和生殖系统(卵巢、乳房、睾丸、前列腺)、胎盘、血细胞及其组合。

[0127] 如本文所使用,“递送肽”是指中性或基本上中性的肽。“基本上中性”是指带有 +5 或更少(例如, +5、+4、+3、+2、+1 或 0) 的净电荷。

[0128] 根据本发明的“净电荷”由根据本领域已知的方法确定。例如,如本文中所定义的净电荷由获得阳离子氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)的总数的净电荷和阴离子氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)的总数的净电荷的来确定。

[0129] 如本文所使用,“递送肽”是指至少 6 个氨基酸,其中肽带有约 +5 或更少(例如, +5、+4、+3、+2、+1 或 0) 的净电荷。在一个方面,肽为 6-100 个氨基酸(例如,6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100),且肽带有约 +5 或更少的净电荷。在另一个实施方案中,肽为 10-50 个氨基酸(例如,10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个氨基酸)且带有约 +5 或更少的净电荷。在另一个实施方案中,肽为 15-30 个氨基酸(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸)且带有约 +5 或更少的净电荷。

[0130] 根据本发明的“递送肽”包括为至少 6 个氨基酸且为中性的肽。在一个方面,肽为 6-100 个氨基酸(例如,6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100) 且不带有净电荷。在另一个实施方案中,肽为 10-50 个氨基酸(例如,10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个氨基酸)且肽不带有净电荷。在另一个实施方案中,肽为 15-30 个氨基酸(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸)且不带有净电荷。

[0131] 根据本发明的“递送肽”还指至少 6 个氨基酸且至多 19 个氨基酸的肽,其中肽带有约 +5 或更少(例如, +5、+4、+3、+2、+1 或 0) 的净电荷。

[0132] 如本文所使用,“递送肽”是指至少 6 个氨基酸,其中肽带有约 +5 或更少(例如, +5、+4、+3、+3、+2、+1 或 0) 的净电荷,且其中肽具有至少一个阴离子氨基酸。在一个方面,肽为 6-100 个氨基酸(例如,6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100) 且带有约 +4 更少的净电荷。在另一个实施方案中,肽为 10-50 个氨基酸

(例如, 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个氨基酸) 且带有约 +5 或更少的净电荷。在另一个实施方案中, 肽为 15-30 个氨基酸 (例如, 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸) 且带有约 +5 或更少的净电荷。

[0133] 如本文所使用, “至少一个阴离子氨基酸”是指谷氨酸 (E) 或天冬氨酸 (D) 中的至少一个。例如, XXXEXX 或 XXXDXX 或 XXDXEXX 或 XXXEDXX, 其中 X 为任何氨基酸, 其中肽带有 +5 或更少的净电荷。

[0134] 不带有净电荷的肽是指“中性肽”。

[0135] 如本文所使用, “中性肽”在中性 pH (例如, pH 6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4 或 8.5) 下带有大约为 0 的净电荷。

[0136] “中性肽”还包括在中性 pH 下带有大约为 0 的净电荷和 / 或在约 pH 7 (例如, pH 6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4 或 8.5) 下具有等电点 (pI) 的肽。

[0137] 带正电荷的氨基酸为赖氨酸 (Lys, K)、精氨酸 (Arg, R) 和组氨酸 (His, H)。带负电荷的氨基酸为天冬氨酸或天冬氨酸根 (Asp, D)、谷氨酸或谷氨酸根 (Glu, E)。(参考: Lehninger Principles of Biochemistry, 第 3 版, 2000 年, 由 David L. Nelson 和 Michael M. 编, Cox, Worth Publisher, New York, NY)。

[0138] 根据本发明的“递送肽”为当与本发明的 dsRNA 缀合时可将 dsRNA 递送至合适的靶 RNA 的氨基酸序列。

[0139] “递送肽”还指当 dsRNA 与肽缀合时可跨越细胞膜运输 dsRNA 的氨基酸序列。

[0140] 与未与肽缀合的 dsRNA 相比, 在肽与 dsRNA 缀合时, 根据本发明有用的“递送肽”提高 dsRNA 向靶细胞的内化。

[0141] 与未与肽缀合的 dsRNA 相比, 在肽与 dsRNA 缀合时, 根据本发明有用的“递送肽”提高 dsRNA 向靶 RNA 的递送。

[0142] 如本文所使用, “提高”是指肽-dsRNA 向靶 RNA 的递送是未与肽缀合的 dsRNA 的递送的 1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000 或 10,000 倍或更多。

[0143] 如本文所使用, “提高”是指肽-dsRNA 向靶标的递送比未与肽缀合的 dsRNA 的递送多 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100%。

[0144] 由下文中所描述的内化分析或摄取分析来评估 dsRNA、肽或 dsRNA-肽缀合物的“递送”。

[0145] 在另一个实施方案中, 如本文所使用的“肽”是指 6-100 个氨基酸 (例如, 6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100) 且与靶细胞结合的“靶向肽”。

[0146] 当与如本文中所定义 dsRNA 缀合时, 根据本发明的“靶向肽”与靶标或结合位点特异性地结合。

[0147] 如本文所使用, “特异性地结合”是指与目标受体的氢键结合或静电吸引。

[0148] 在一个方面, 靶标为受体或受体结合蛋白。

[0149] 在一个方面, 靶标或结合位点或者受体位于细胞表面上。

[0150] 在另一个方面,靶标或结合位点或者受体位于例如细胞中(例如,位于细胞质中、细胞核中或细胞核表面上)。

[0151] 在另一个方面,靶标或结合位点或受体裸露于溶液中。

[0152] “特异性结合”是通过本领域已知且如本文中所定义的结合测定来确定(例如,参见 US20080064092 和 US2009004174)。在一个实施方案中,特异性结合是通过比较 dsRNA 递送肽与所述的对应受体的结合和 dsRNA-肽与其它受体的结合来确定,其中所有受体皆以混合物存在。如本文中所定义,与其它受体相比,与所述受体结合的提高指示特异性结合。

[0153] 在一个实施方案中,特异性结合是通过比较 dsRNA 递送肽与所述细胞的结合与 dsRNA-肽与其它细胞的结合来确定,其中所有细胞皆以混合物存在。如本文中所定义的,与其它细胞相比,与所述细胞结合的提高指示特异性结合。

[0154] “特异性结合”是通过测定 dsRNA-肽与溶液中裸露受体的结合而在体外确定或通过测定 dsRNA-肽与细胞的结合而在体内确定。

[0155] 如本文所使用,“受体”包括细胞表面受体、溶液中的裸露受体和位于细胞内部(例如,位于细胞质中、细胞核中或细胞核表面上)的受体。

[0156] 如本文所使用,“受体结合蛋白”是指

[0157] 如本文所使用的“靶向肽”可以进行以下中的至少一个:当与 dsRNA 缀合时跨越细胞膜、当与根据本发明的 dsRNA 缀合时跨越细胞膜运输 dsRNA 和当与 dsRNA 缀合时结合配体的受体(例如,细胞表面受体)。

[0158] 在一个方面,使“靶向肽”与转位结构域或转位结构域的一部分(例如,神经毒素的转位结构域)缀合。

[0159] 如本文所使用,转位结构域是指有助于蛋白质的穿透和/或内化的氨基酸序列。

[0160] 如本文所使用,转位结构域的一部分是指足以维持功能的氨基酸序列,所述功能例如引导细胞进入或有助于细胞表面结合,例如,如本文中所定义的细胞表面受体结合。“转位结构域的一部分”还指完整氨基酸序列的 1%或更多,例如 1%、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%。

[0161] 在一个方面,靶向肽能够内化(例如,通过直接穿透或通过需要核内体形成的胞吞途径进行内化,并且也称为受体介导的胞吞作用)。

[0162] dsRNA、肽或 dsRNA-肽缀合物的“结合”是通过配体结合测定来评估。

[0163] 在一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 100 μ M。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 1 μ M。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 100nM。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 10nM。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 5nM。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 1nM。在另一个实施方案中,对应受体的肽或 dsRNA-肽缀合物的结合亲合力为约 0.1nM 或更小。(Gauguin 等, J Biol Chem. 2008 ;283 : 2604-2613 ;Gruppig 等, Endocrinology 1997 ;138(10) :4064-4068 ;以及 Stone, Chervin 和 Kranz, Immunology. 2009 年 ;126(2) :165-76)。

[0164] 在一个实施方案中,“靶向肽”是指与靶细胞结合的 6-100 个氨基酸(例如,6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个氨基酸),且包含

目标氨基酸序列的至少一部分,例如,靶肽的氨基酸序列。

[0165] 与未与肽缀合的 dsRNA 相比,在肽与 dsRNA 缀合时,根据本发明有用的肽提高 dsRNA 向细胞的靶向。

[0166] 如本文所使用,“提高”是指肽-dsRNA 缀合物向细胞的靶向是未与肽缀合的 dsRNA 的靶向的 1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000 或 10,000 倍或更多。

[0167] 如本文所使用,“提高”是指肽-dsRNA 缀合物向细胞的靶向比未与肽缀合的 dsRNA 的靶向多 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100%。

[0168] 如本文所使用,“提高”是指与未与肽缀合且为实现相当水平的结合、缔合或内化所需的相同 dsRNA 的量或剂量相比,肽-dsRNA 缀合物向细胞的靶向(如下文所定义)需要更少 dsRNA(较低剂量的 dsRNA),这由下文所述分析中的 IC_{50} 来确定。例如,如体内或体外所测量,与未与肽缀合的相同 dsRNA 的 IC_{50} 相比,实现 RNA/基因表达的 50% 降低所需的 dsRNA-肽缀合物的 IC_{50} 有所下降(例如,参见 Hefner 等, *J Biomol Tech.* 2008 年 9 月: 19(4) 231-237; Zimmermann 等, *Nature*. 2006 年 5 月 4 日: 441(7089): 111-114; Durcan 等, *Mol Pharm.* 2008 年 7-8 月: 5(4): 559-566; Heidel 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 年 4 月 3 日: 104(14): 5715-5721)。

[0169] 如本文所使用,“下降”是指 dsRNA-肽缀合物的 IC_{50} 为未与肽缀合的相同 dsRNA 的 IC_{50} 的 1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/15、1/20、1/25、1/40、1/35、1/40、1/45、1/50、1/100、1/1000 或 1/10,000 或更小。

[0170] 如本文所使用,“下降”是指 dsRNA-肽缀合物的 IC_{50} 比未与肽缀合的相同 dsRNA 的 IC_{50} 小 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100%。

[0171] 在一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物增加的靶向由结合系数 K_d 表示,其为约 25%。在另一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物的增加靶向为约 100%,即,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在结合亲和力方面显示出约 1 倍的增加(即,下降的 K_d)。在另一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在结合亲和力方面显示出约 4 倍的增加。在另一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在结合亲和力方面显示出约 9 倍的增加。在另一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在结合亲和力方面显示出约 99 倍的增加。在另一个实施方案中,与单独的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在结合亲和力方面显示出约 999 倍或更多倍的增加。

[0172] “结合”是通过本领域已知且如本文中所定义的结合测定来确定。在一个实施方案中,结合是通过测定 dsRNA 递送肽与所述受体的结合来确定。

[0173] 在另一个实施方案中,结合是通过测定 dsRNA 递送肽与所述细胞的结合来确定,其中所有细胞皆以混合物存在。

[0174] “结合”是通过测定 dsRNA-肽与溶液中裸露受体的结合而在体外确定或通过测定 dsRNA-肽与细胞的结合而在体内确定。

[0175] 如本文所使用,“靶向”是指与受体混合物中的另一个受体相比,dsRNA 肽缀合物与目标受体的优先或特异性结合或缔合或内化。如本文所使用,“靶向”涵盖与细胞混合物中

细胞上的另一个受体相比, dsRNA 肽缀合物与细胞上的目标受体的优先或特异性结合或缔合或内化。如本文所使用,“靶向”涵盖与细胞混合物中的另一个细胞相比, dsRNA 肽缀合物与细胞的优先或特异性结合或缔合或内化。也就是说,根据本发明的“靶向”是在体外和体内确定或测量。

[0176] “靶向”还指本发明的“肽”向细胞上合适的结合位点的运输或递送,例如,如果肽为配体,那么靶向是指肽向配体的合适受体、结合蛋白或粘附蛋白的递送。

[0177] 根据本发明的肽可以连接到本发明的 dsRNA 的第一链的 5' 或 3' 端或第二链的 5' 或 3' 端,或者连接到第一链的 5' 端和第二链的 5' 端,连接到第一链的 5' 端和第二链的 3' 端,连接到第一链的 3' 端和第二链的 5' 端或连接到第一链的 3' 端和第二链的 3' 端。

[0178] 根据本发明的肽还可以例如通过氨基酸残基上的特定官能团(例如, Cys 上的 -SH 基或 Lys 的氨基)在内部连接到第一链和 / 或第二链。

[0179] 在一个方面,一个以上的肽(例如,二聚体、三聚体或多聚体)连接到 dsRNA。

[0180] 如本文所使用,“二聚体”是指两个彼此缀合的肽,且其中两个肽中的一个与 dsRNA 缀合。二聚体还指其中每一个肽与 dsRNA 上的唯一位点缀合的两个肽。

[0181] 如本文所使用,“三聚体”是指三个彼此缀合的肽,且其中三个肽中的一个与 dsRNA 缀合。三聚体还指其中每一个肽与 dsRNA 上的唯一位点缀合的三个肽。三聚体还指其中三个肽中的两个肽彼此缀合且其中两个肽中的一个肽还与 dsRNA 缀合且第三个肽与 dsRNA 上的唯一位点缀合的三个肽。

[0182] 如本文所使用,“多聚体”是指多于 1 个肽,例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或多个。本发明提供与多个肽缀合的 dsRNA,其中肽具有相同的或不同的序列。在一个实施方案中,多个肽是指一个或多个递送肽和一个或多个靶向肽。

[0183] 术语“肽”包含有限数量的连续氨基酸,所述氨基酸是结合在一起的肽;并且所述术语“肽”包含如本文中所定义的靶向肽或递送肽,不管所述肽是天然的分子还是合成的(即,天然的分子,或其经化学 / 物理修饰的变体),所述靶向肽或递送肽能够递送 dsRNA 和 / 或与肽靶标(例如,细胞或细胞上的受体)结合。

[0184] 如本文所使用的“肽”可以源自天然的蛋白质。

[0185] 如本文所使用的“肽”可以包含不同的蛋白质结构域(例如,嵌合肽)。

[0186] 如本文所使用的“肽”可以是基于特定氨基酸序列的结构功能关系而设计的合成肽,且不必与天然序列具有同源性。

[0187] 本发明的肽与本发明的 dsRNA 缀合。

[0188] 如本文所使用,缀合是指通过本领域已知的任何共价或非共价缔合进行连接。

[0189] 可以通过肽中的任何氨基酸残基将本发明的肽与本发明的 dsRNA 缀合,例如,通过 C 端氨基酸的羧基与 C 端的 C 端氨基酸缀合、或通过 N 端氨基酸的 α -氨基与 N 端的 N 端氨基酸缀合或者与氨基酸残基上的特定官能团(例如, Cys 上的 -SH 基或 Lys 的氨基)缀合。

[0190] 可以通过肽序列中的任何氨基酸残基(例如,通过肽序列中间的赖氨酸残基的氨基)将本发明的肽与本发明的 dsRNA 缀合。

[0191] 可以通过稳定的共价键(包括但不限于零长度连接子、同型双功能连接子、异

型双功能连接子或三功能连接子), 将根据本发明的肽与本发明的 dsRNA 缀合(参考: Bioconjugate Techniques, 1996, Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA.; Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, 1991, Shan S. Wong, CRC Press, Boca Raton, FL)。

[0192] 如本文所使用, “零长度连接子”是指通过反应进行缀合, 其中在无连接子的情况下使反应物(例如, dsRNA 上的反应基团和肽上的官能团, 例如氨基酸侧链上的活性基团、端氨基酸残基的自由氨基和自由羧基等)缩合以形成缀合分子。例如, 通过将肽的端反应物与 dsRNA 的端反应物反应, 形成“零长度连接子”。零长度连接的实例包括但不限于二硫化物、酰胺、酯、硫酯等。

[0193] 如本文所使用, “同型双功能连接子”是指与具有两个类似官能团的连接子的缀合。同型双功能连接子的实例包括但不限于氨基定向的、羧基定向的、巯基定向的等。

[0194] 如本文所使用, “异型双功能连接子”是指与具有两个不同特异性的不同官能团的连接子缀合。异型双功能连接子的实例包括但不限于氨基和巯基定向的、氨基和羧基定向的、羧基和巯基定向的组合等。

[0195] 如本文所使用, “三功能连接子”是指与具有三个反应官能团的连接子的缀合。三功能连接子的实例包括但不限于 4-叠氮基-2-硝基苯基生物胞素-4-硝基苯酯(ABNP)、磺酰琥珀酰亚胺基-2-[6-(生物素胺)-2-(p-叠氮苯甲酰氨基)己酰氨基]乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sulfo-SBED), 其它基于生物胞素的分子等。

[0196] 还可以通过可裂解的连接子(包括但不限于二硫化物、酯、乙二醇、重氮和砷连接子)使根据本发明的肽与 dsRNA 缀合。

[0197] 通过碳连接子使根据本发明的肽可以与 dsRNA 缀合, 所述碳连接子是例如一个或多个碳(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 个或更多个碳)的碳连接子。

[0198] 可以使用辅基使根据本发明的肽与 dsRNA 缀合。辅基包括但不限于金属离子、卟啉基、辅酶和其它非肽基部分, 例如, 碳水化合物或寡聚糖(Wong, S. S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press)。

[0199] 在一个实施方案中, 通过表达为融合构建体使肽与 dsRNA 缀合。

[0200] 可通过为本领域技术人员所熟知的任何常规化学缀合技术, 将“肽”连接到 dsRNA。在这点上, 参考 Hermanson, G. T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press, 和参考 Wong, S. S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press。

[0201] 可通过离子相互作用使“肽”与 dsRNA 非共价缀合。

[0202] 如本文所使用, “肽-dsRNA 缀合物”是指通过某种方法(包括但不限于本文所述的连接/缀合方法)与 dsRNA 缀合的肽。

[0203] 在一个方面, 肽-dsRNA 缀合物还包含一个或多个染料分子。

[0204] 如本文所使用, “染料分子”包括但不限于聚芳烃染料或荧光染料, 例如 Cy3、Cy5、Cy5.5、Alexa Fluor®(例如, Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 647 等)。

[0205] 在一个方面, 如本文中所定义, 肽-dsRNA 缀合物还包含递送肽。

[0206] 在一个方面, 肽-dsRNA 缀合物还包含治疗剂, 例如抗癌剂或治疗代谢疾病或病症

的试剂。抗癌剂包括但不限于抗病毒剂 (Fiume 等, FEBS Lett. 1983 ;153(1) :6-10)、顺铂 (Mukhopadhyay S 等, Bioconjug Chem. 2008 ;19(1) :39-49)、阿霉素 (Guan H 等, Bioconjug Chem. 2008 ;19(9) :1813-21)、紫杉醇 (Dubikovskaya EA 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ;105(34) :12128-33, Régina A 等, Br J Pharmacol. 2008 ;155(2) :185-97)、三苯氧胺 (Rickert 等, Biomacromolecules. 2007 ;8(11) :3608-3612) 和长春碱 (DeFeo-Jones D 等, Mol Cancer Ther. 2002 ;1(7) :451-459)。

[0207] “肽-dsRNA 缀合物”是指其中所述肽和所述 dsRNA 保持它们功能的分子。

[0208] 如本文所使用,“下降”(例如, dsRNA-肽缀合物的起效时间减少或 dsRNA-肽缀合物的递送速率下降)是指 dsRNA-肽缀合物的起效时间或递送速率为未与肽缀合的相同 dsRNA 的起效时间或递送速率的 1/1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/15、1/20、1/25、1/40、1/35、1/40、1/45、1/50、1/100、1/1000 或 1/10,000 或更低。

[0209] 如本文所使用,“下降”(例如, dsRNA-肽缀合物的起效时间减少或 dsRNA-肽缀合物的递送速率下降)是指 dsRNA-肽缀合物的起效时间或递送速率比未与肽缀合的相同 dsRNA 的起效时间或递送速率降低 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 100%。

[0210] 如本文所使用,“起效时间”是指体外(例如,向细胞或向组织培养基)或体内(例如,向人或动物(例如,小鼠或大鼠)受治疗者)施用 dsRNA 与 dsRNA 到达靶 RNA 之间的时间段。

[0211] 如本文所使用,“递送速率”是指在施用 dsRNA 之后 dsRNA 到达靶 RNA 所需的时间。

[0212] 如本文所使用,“作用持续时间”是指 dsRNA 抑制靶 RNA 表达的时间段。

[0213] 如本文所使用,“对照”或“参照”(例如,对照 dsRNA)是指在长度上与对特定靶 RNA(测试 dsRNA)特异的 dsRNA 相当但对特定靶 RNA 非特异的 dsRNA。对照 RNA 具有与对目标靶标特异的 dsRNA 不相同的核苷酸序列。对照(例如,对照肽)是指长度和电荷中的一个或多个与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽(测试肽)相当,但具有与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽(测试肽)的氨基酸序列不同的氨基酸序列。对照(例如,对照 dsRNA-肽缀合物)是指其中 dsRNA 在长度上与对特定靶 RNA 特异的 dsRNA 相当,但对特定靶 RNA 非特异的 dsRNA 的 dsRNA-肽缀合物。对照 dsRNA-肽缀合物还指其中所述肽在长度和电荷中的一个或多个上与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽相当但具有与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列的 dsRNA-肽缀合物。对照 dsRNA-肽缀合物还指其中所述肽在长度和电荷中的一个或多个上与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽相当但具有与和对靶 RNA 特异的 dsRNA 缀合的肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列,且其中 dsRNA 在长度上与对特定靶 RNA 特异的 dsRNA 相当但对特定靶 RNA 非特异的 dsRNA 的 dsRNA-肽缀合物。

[0214] 如本文所使用,测试肽或测试 dsRNA 是指包含降低根据本发明的靶 RNA 表达的缀合物的肽或 dsRNA。测试 dsRNA 是指降低根据本发明的靶 RNA 的表达的 dsRNA。“测试”dsRNA-肽缀合物包含与测试肽缀合的测试 dsRNA。

[0215] 如本文所使用,术语“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或经过修饰的核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或经过修饰的骨架残基或键联的核酸,这些核酸为合成的、天然的和非天然的,具有与参照核酸类似的结合特

性,而且按照与参照核苷酸类似的方式代谢。这些类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0- 甲基核糖核苷酸、肽核苷酸 (PNA)。

[0216] 如本领域中所公认的,如本文所使用的“核苷酸”用于包括具有本领域熟知的天然碱基(标准)和经过修饰的碱基的那些核苷酸。这些碱基通常位于核苷酸糖部分的 1' 位。核苷酸通常包含碱基、糖和磷酸基。核苷酸可以在糖、磷酸和 / 或碱基部分处未经修饰或经过修饰,(还可替换地称为核苷酸类似物、经过修饰的核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸等;例如参见 Usman 和 McSwiggen, 同上文;Eckstein 等,国际 PCT 公开第 WO 92/07065 号;Usman 等,国际 PCT 公开第 WO 93/15187 号;Uhlman&Peyman, 同上文,全部在此以引用的方式并入本文)。存在本领域已知的经过修饰的核酸碱基的若干个实例,如 Limbach 等于 *Nucleic Acids Res.* 22:2183, 1994 中所概述。可被引入核酸分子的碱基修饰的一些非限制性实例包括:次黄嘌呤、嘌呤、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例如,5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如,胸腺嘧啶核糖核苷)、5-卤代尿苷(例如,5-溴尿苷)或 6-氮杂嘧啶或 6-烷基嘧啶(例如,6-甲基尿苷)、丙炔等(Burgin 等, *Biochemistry* 35:14090, 1996;Uhlman 和 Peyman, 同上文)。在这方面,“经过修饰的碱基”是指位于 1' 位除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶外的核苷酸碱基或其等效物。

[0217] 如本文所使用,“经过修饰的核苷酸”是指对核苷、核苷碱基、戊糖环或磷酸基进行一种或多种修饰的核苷酸。例如,经过修饰的核苷酸不包括含有单磷酸腺苷、单磷酸鸟苷、单磷酸尿苷和单磷酸胞苷的核糖核苷酸以及含有单磷酸脱氧腺苷、单磷酸脱氧鸟苷、单磷酸脱氧胸苷和单磷酸脱氧胞苷的脱氧核糖核苷酸。修饰包括由修饰核苷酸的酶(诸如,甲基转移酶)修饰产生的天然修饰。经过修饰的核苷酸还包括合成的核苷酸或非天然的核苷酸。核苷酸中合成修饰或非天然的修饰包括具有 2' 修饰的那些修饰或包含碱基类似物的那些修饰,所述 2' 修饰例如 2' -0- 甲基、2' - 甲氧基乙氧基、2' - 氟、2' - 烯丙基、2' -0-[2-(甲氨基)-2-氧代乙基]、4' - 硫代、4' -CH₂-0-2' - 桥、4' -(CH₂)₂-0-2' - 桥、2' -LNA 和 2' -0-(N-甲基氨基甲酸酯)。关于本公开所描述的与 2' 修饰核苷酸,“氨基”是指可经修饰或未经修饰的 2' -NH₂ 或 2' -0-NH₂。这类经过修饰的基团描述于例如 Eckstein 等美国专利第 5,672,695 号和 Matulic-Adamic 等美国专利第 6,248,878 号中。

[0218] 关于本公开的核酸分子,修饰可根据这些试剂的模式而存在于 dsRNA 的一条链或两条链上。如本文所使用,“交替位置”是指其中每隔一个核苷酸有一个经过修饰的核苷酸或在确定长度的 dsRNA 链上的每个经过修饰的核苷酸之间存在未经修饰的核苷酸(例如,未经修饰的核糖核苷酸)的模式(例如,5' -MNMN-3' ;3' -MNMN-5' ;其中 M 为经过修饰的核苷酸而 N 为未经修饰的核苷酸)。在某些实施方案中,根据本文所述的任何位置编号规定,修饰模式从位于 5' 或 3' 端处的第一核苷酸开始,(在某些实施方案中,参照本发明的 DsiRNA 试剂预计的 Dicer 裂解事件之后链的末端残基指定位置 1,因此,位置 1 并不总是构成本发明的预加工试剂的 3' 端或 5' 端残基)。在其它实施方案中,参照与相反链的 5' 或 3' 端互补的第一或第二链的核苷酸残基指定位置 1。例如,在某些实施方案中,位置 1 为与第一寡核苷酸链的 5' 端核苷酸残基互补的第二链的核苷酸残基。本发明涵盖其中修饰模式从 5' 或 3' 端(根据本文所述的任何位置编号规定)开始于位置 1、2、3、

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 中的任何一个位置的 dsRNA。本发明还涵盖其中修饰模式从 5' 或 3' 端残基开始于为至少一个核苷酸的任何位置的 dsRNA。

[0219] 处于交替位置的经过修饰的核苷酸的模式可贯穿链的全长,但是在某些实施方案中,所述模式分别包括含有至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 个或更多个经过修饰的核苷酸的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 个或更多个核苷酸。

[0220] 如本文所使用,“交替位置对”是指其中在确定长度的 dsRNA 链上两个连续的经过修饰的核苷酸由两个连续的未经修饰核苷酸分隔开的模式(例如,5' -MMNNMMNNMMNN-3' ; 3' -MMNNMMNNMMNN-5' ;其中 M 为经过修饰的核苷酸并且 N 为未经修饰的核苷酸)。在一个实施方案中,根据本文所述的任何位置编号规定,修饰模式从 5' 端或 3' 端的第一核苷酸位置开始。处于交替位置的经过修饰的核苷酸的模式可能贯穿链的全长,但优选地,所述模式分别包括含有至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 个经过修饰的核苷酸的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 个核苷酸。应强调的是,上述修饰模式为示例性的而不打算限制本发明的范围。

[0221] 如本文所使用,“碱基类似物”是指位于可并入核酸双链体的经过修饰的核苷酸中的核苷酸糖部分的位置 1' (或可并入核酸双链体的核苷酸糖部分取代中的等效位置)的杂环部分。在本发明的 dsRNA 中,碱基类似物通常为嘌呤或者嘧啶碱基,不包括常见碱基鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。碱基类似物可与 dsRNA 中的其它碱基或碱基类似物形成双链体。碱基类似物包括可用于本发明的化合物和方法的碱基类似物,例如在 Benner 的美国专利第 5,432,272 号和第 6,001,983 号和 Manoharan 的美国专利公开第 20080213891 号中所公开的碱基类似物,其以引用的方式并入本文。碱基的非限制性实例包括:次黄嘌呤(I)、黄嘌呤(X)、3-β-D-呋喃核糖基-(2,6-二氨基嘧啶)(K)、3-β-D-呋喃核糖基-(1-甲基-吡唑并[4,3-d]嘧啶-5,7(4H,6H)-二酮)(P)、异胞嘧啶(iso-C)、异鸟嘌呤(iso-G)、1-β-D-呋喃核糖基-(5-硝基吡咯)、1-β-D-呋喃核糖基-(3-硝基吡咯)、5-溴尿嘧啶、2-氨基嘌呤、4-硫代-dT、7-(2-噻吩基)-咪唑并[4,5-b]吡啶(Ds)和吡咯-2-甲醛(Pa)、2-氨基-6-(2-噻吩基)嘌呤(S)、2-氧代吡啶(Y)、二氟甲基苯基、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑、3-甲基异喹诺酮基、5-甲基异喹诺酮基和 3-甲基-7-丙炔基异喹诺酮基、7-氮杂吡咯基、6-甲基-7-氮杂吡咯基、咪唑并吡啶基、9-甲基-咪唑并吡啶基、吡咯并吡嗪基、异喹诺酮基、7-丙炔基异喹诺酮基、丙炔基-7-氮杂吡咯基、2,4,5-三甲苯基、4-甲基吡咯基、4,6-二甲基吡咯基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、芪基、并四苯基、并五苯基及其结构衍生物(Schweitzer 等, J. Org. Chem., 59:7238-7242(1994);Bergerr 等, Nucleic Acids Research, 28(15):2911-2914(2000);Moran 等, J. Am. Chem. Soc., 119:2056-2057(1997);Morales 等, J. Am. Chem. Soc., 121:2323-2324(1999);Guckian 等, J. Am. Chem. Soc., 118:8182-8183(1996);Morales 等, J. Am. Chem. Soc., 122(6):1001-1007(2000);McMinn 等, J. Am. Chem. Soc., 121:11585-11586(1999);Guckian 等, J. Org. Chem., 63:9652-9656(1998);Moran 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:10506-10511(1997);Das 等, J. Chem. Soc., Perkin Trans.,

1:197-206(2002) Shibata 等, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1:1605-1611(2001); Wu 等, J. Am. Chem. Soc., 122(32):7621-7632(2000); O'Neill 等, J. Org. Chem., 67:5869-5875(2002); Chaudhuri 等, J. Am. Chem. Soc., 117:10434-10442(1995); 以及美国专利第 6,218,108 号)。碱基类似物还可为通用碱基。

[0222] 如本文所使用,“通用碱基”是指位于经过修饰的核苷酸中的核苷酸糖部分的位置 1' 或位于核苷酸糖部分取代中的等效位置的杂环部分,当存在于核酸双链体中时,所述杂环部分可在不改变双螺旋结构(例如,磷酸骨架的结构)的情况下与一种以上碱基相对定位。另外,通用碱基不会破坏其所位于的单链核酸与靶核酸形成双链体的能力。可通过本领域技术人员来说显而易见的方法(例如,紫外吸光度法、圆二色谱法、凝胶迁移法、单链核酸酶敏感性法等)测定含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成双链体的能力。另外,可改变能观察双链体形成的条件(例如,温度)以确定双链体稳定性或形成,因为解链温度(T_m)与核酸双链体的稳定性相关。相较于与靶核酸精确互补的参照单链核酸,含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成的双链体的 T_m 低于与互补核酸形成的双链体的 T_m 。然而,与其中通用碱基被碱基置换而产生单一错配的参照单链核酸相比较,含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成的双链体的 T_m 高于与具有错配碱基的核酸形成的双链体的 T_m 。

[0223] 一些通用碱基能够通过碱基对形成条件下在通用碱基与全部碱基鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)之间形成氢键来进行碱基配对。通用碱基不是仅与单一的互补碱基形成碱基对的碱基。在双链体中,通用碱基可与双链体的相对链上与所述通用碱基相对的 G、C、A、T 和 U 中的每一个不形成氢键、形成一个氢键或多于一个氢键。优选地,通用碱基不会与双链体的相对链上与所述通用碱基相对的碱基相互作用。在双链体中,在通用碱基之间进行碱基配对而不改变磷酸骨架的双螺旋结构。通用碱基还可通过堆积相互作用与相同核酸链上的相邻核苷酸中的碱基相互作用。这种堆积相互作用使双链体稳定,特别是在通用碱基不会与双链体的相对链上位于与所述通用碱基相对的碱基形成任何氢键的情况下。通用结合核苷酸的非限制性实例包括:肌苷、1- β -D-呋喃核糖基-5-硝基咪唑和/或 1- β -D-呋喃核糖基-3-硝基吡咯(Quay 等的美国专利申请公开第 20070254362 号;Van Aerschot 等, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Acids Res. 1995 年 11 月 11 日;23(21):4363-70;Loakes 等, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Acids Res. 1995 年 7 月 11 日;23(13):2361-6;Loakes 和 Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. Nucleic Acids Res. 1994 年 10 月 11 日;22(20):4039-43)。

[0224] 如本文所使用,“环”是指由核酸的单一链形成的结构,其中位于特定单链核苷酸区侧面的互补区以互补区之间的单链核苷酸区不能进行双链体形成或 Watson-Crick 碱基配对的方式杂交。环为任何长度的单链核苷酸区。环的实例包括存在于诸如发夹结构、茎环或延伸环等结构中的未配对核苷酸。

[0225] 如本文所使用,在 dsRNA 的情况下“延伸环”是指单链环以及位于环侧面的另外 1、2、3、4、5、6 或多达 20 个碱基对或双链体。在延伸环中,位于 5' 侧上的环侧面的核苷酸与位于 3' 侧上的环侧面的核苷酸形成双链体。延伸环可形成发夹或茎环。

[0226] 如本文所使用,在 dsRNA 的情况下“四核苷酸环”是指由四个核苷酸组成的环

(单链区),所述环形成稳定的二级结构,所述二级结构有助于邻接的 Watson-Crick 杂交核苷酸的稳定性。在不受理论束缚的情况下,四核苷酸环可通过堆积相互作用使邻接的 Watson-Crick 碱基对稳定。另外,在四核苷酸环中的四个核苷酸间的相互作用包括但不限于非 Watson-Crick 碱基配对、堆积相互作用、氢键和接触相互作用 (Cheong 等, Nature 1990 年 8 月 16 日 ;346(6285) :680-2 ;Heus 和 Pardi, Science 1991 年 7 月 12 日 ;253(5016) :191-4)。四核苷酸环使邻接双链体的解链温度 (T_m) 升高,其高于根据由四个随机碱基组成的简单模型环序列所预期的解链温度 (T_m)。例如,四核苷酸环可赋予包含长度至少为 2 个碱基对的双链体的发夹结构在 10mM NaHPO_4 中至少 55°C 的解链温度。四核苷酸环可含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸及其组合。RNA 四核苷酸环的实例包括 :UNCG 家族四核苷酸环 (例如, UUCG)、GNRA 家族四核苷酸环 (例如, GAAA) 和 CUUG 四核苷酸环。(Woese 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 年 11 月 ;87(21) :8467-71 ;Antao 等, Nucleic Acids Res. 1990 年 11 月 11 日 ;19(21) :5901-5)。DNA 四核苷酸环的实例包括 d(GNNA) 家族四核苷酸环 (例如, d(GTTA))、d(GNNA) 家族四核苷酸环、d(GNAB) 家族四核苷酸环、d(CNNG) 家族的四核苷酸环、d(TNCG) 家族的四核苷酸环 (例如, d(TTCG))。(Nakano 等, Biochemistry, 41(48), 14281-14292, 2002 ;SHINJI 等, Nippon Kagakkai Koen Yokoshu, 第 78 卷 ;第 2 期 ;第 731 页 (2000))。

[0227] 本发明的 dsRNA 组合物由于它们经塑造像 Dicer 酶的底物那样进入 RNAi 路径,至少部分地归因于此类组合物的链长度,所以本文中也称为 Dicer 底物 siRNA (“DsiRNA”) 试剂。本发明的 “DsiRNA 试剂” 组合物包含作为用于 Dicer 酶加工的前体分子的 dsRNA,即,在体内加工本发明的 DsiRNA 以产生活性 siRNA。具体来说,通过 Dicer 将 DsiRNA 加工成并入 RISC 中的活性 siRNA。在本文中主要称为 “DsiRNA 试剂” 或 “DsiRNA 分子” 的这个前体分子在本文中还可以被称为前体 RNAi 分子。如本文所使用,术语 “活性 siRNA” 指双链核酸,其中每一条链包含 RNA、RNA 类似物或 RNA 和 DNA。siRNA 包含 19 至 23 个核苷酸或包含 21 个核苷酸。活性 siRNA 通常在每一条链的 3' 端上具有 2bp 突出,以便 siRNA 中的双链体区包含 17 至 21 个核苷酸,或 19 个核苷酸。

[0228] 在某些实施方案中,本发明的 dsRNA 包括但不限于包含第一链和第二链的 dsRNA,所述第一链和所述第二链在长度上包含 16 至 50、19 至 35、19 至 24、25 至 30、25 至 35、26 至 30、21 至 23 个核苷酸。

[0229] 本发明的 DsiRNA 试剂具有足够长度以便 DsiRNA 试剂通过 Dicer 加工来产生 siRNA。因此,合适的 DsiRNA 试剂含有一个寡核苷酸序列 (第一序列),所述寡核苷酸序列的长度为至少 25 个核苷酸且不超过约 35 个核苷酸。RNA 的此序列的长度可以为约 26 至 35、26 至 34、26 至 33、26 至 32、26 至 31、26 至 30 和 26 至 29 个核苷酸。此序列的长度可以为约 27 或 28 个核苷酸或者为 27 个核苷酸。DsiRNA 试剂的第二序列可以为在生物条件下 (例如,在真核细胞的细胞质内) 与第一序列退火的任何序列。通常,第二寡核苷酸序列将具有至少 19 个与第一寡核苷酸序列互补的碱基对,更通常地,第二寡核苷酸序列将具有约 21 个或更多个、或约 25 个或更多个与第一寡核苷酸序列互补的碱基对。在一个实施方案中,第二序列与第一序列长度相同,且 DsiRNA 试剂为平端。在另一个实施方案中,DsiRNA 试剂的末端具有一个或多个突出。在某些实施方案中,其中第二序列与第一序列长度相同,所述第一链的所述 3' 端的最后一个残基与所述第二链的所述 5' 端的最后一个残基形成

错配碱基对。在其它实施方案中,其中第二序列与第一序列长度相同,所述第一链的 5' 端的最后一个残基与第二链的 3' 端的最后一个残基形成错配碱基对。在其它实施方案中,其中第二序列与第一序列长度相同,第一链的 3' 端的最后一个残基和倒数第二个残基与第二链的 5' 端的最后一个残基和倒数第二个残基形成两个错配碱基对。在其它实施方案中,其中第二序列与第一序列长度相同,第一链的 5' 端的最后一个残基和倒数第二个残基与第二链的 3' 端的最后一个残基和倒数第二个残基形成两个错配碱基对。

[0230] 在某些实施方案中,DsiRNA 试剂的第一寡核苷酸序列和第二寡核苷酸序列存在于单独的寡核苷酸链上,所述单独的寡核苷酸链可以是且通常是化学合成的。在一些实施方案中,两条链的长度为 26 至 35 个核苷酸。在其它实施方案中,两条链的长度为 25 至 30 个或 26 至 30 个核苷酸。在一个实施方案中,两条链的长度为 27 个核苷酸,完全互补且具有平端。在一个实施方案中,一条或两条寡核苷酸链能够用作 Dicer 的底物。在其它实施方案中,存在至少一种修饰,其促进 Dicer 按照使双链 RNA 结构抑制基因表达的功效最大的定向结合于双链 RNA 结构。在本发明的某些实施方案中,DsiRNA 试剂由两条不同长度的寡核苷酸链组成,其中 DsiRNA 在第一链(有义链)的 3' 端处具有平端且在第二链(反义链)的 3' 端处具有 3' 突出。DsiRNA 还可以含有一个或多个脱氧核糖核酸(DNA)碱基取代。

[0231] 含有两个单独寡核苷酸的合适 DsiRNA 组合物可以通过化学连接基团以化学方式在它们的退火区的外部连接。本领域已知且可使用许多合适的化学连接基团。合适的基团将不会阻断 Dicer 对 DsiRNA 的活性并且不会干扰由靶基因转录的 RNA 的定向破坏。或者,两个单独的寡核苷酸可以通过第三个寡核苷酸连接,以便在组成 DsiRNA 组合物的两个寡核苷酸退火之后产生发夹结构。发夹结构将不会阻断 Dicer 对 DsiRNA 的活性且将不会干扰靶 RNA 的定向破坏。

[0232] 如本文所使用,具有与靶 RNA 或 cDNA 序列“充分互补”的序列的 dsRNA(例如,DsiRNA 或 siRNA)是指具有足以通过 RNAi 机构(例如,RISC 复合物)或过程引起的靶 RNA(其中已叙述了 cDNA 序列,RNA 序列对应于所述 cDNA 序列)破坏的序列的 dsRNA。可设计 dsRNA 分子以便使反义链中的每个残基与靶分子中的残基互补。或者,可在分子内进行取代以增加所述分子的稳定性和/或增强所述分子的加工活性。可在链内进行取代,或可对链的末端残基进行取代。在某些实施方案中,在 DsiRNA 试剂内的特定残基处进行取代和/或修饰。这类取代和/或修饰可包括,例如,当从 DsiRNA 试剂的有义链的 3' 端位置编号时,在位置 1、2 和 3 的一个或多个残基处进行的脱氧修饰;当从 DsiRNA 试剂的反义链的 5' 端位置编号时在位置 1、2、3 或 4 的一个或多个残基处进行的脱氧修饰;以及在 DsiRNA 试剂的反义链的 3' 端残基处进行引入 2' -O-烷基(例如,2' -O-甲基)修饰,其中这类修饰同样地或可选地存在于反义链的 3' 部分的突出位置处和/或存在于 DsiRNA 试剂各处,例如,存在于 DsiRNA 试剂的加工形成活性 siRNA 试剂的区内包括的 DsiRNA 反义链的交替残基或成对残基处。前面的修饰是作为示例而提供的,而不打算以任何方式加以限制。在下文中可发现有关优选的 DsiRNA 试剂的结构为进一步考虑,包括可对本发明的 DsiRNA 试剂实施的修饰和取代的进一步描述。

[0233] 所谓“互补”是指核酸可与另一个核酸序列通过传统的 Watson-Crick 或其它非传统形式形成氢键。关于本发明的核酸分子,核酸分子与其互补序列的结合自由能足以使核酸履行相关功能,例如,RNAi 活性。测定核酸分子的结合自由能是本领域熟知的(例如,参

见 Turner 等, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII, 第 123-133 页; Frier 等, 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83 :9373-9377; Turner 等, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109 :3783-3785)。互补百分比指示某一核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如, Watson-Crick 碱基配对)的连续残基的百分率(例如, 第一寡核苷酸中总共 10 个核苷酸之中有 5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸与具有 10 个核苷酸的第二核酸序列碱基配对分别代表 50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 互补)。“完全互补”是指某一核酸序列中的所有连续残基将与第二核酸序列中相同数目的连续残基形成氢键。在一个实施方案中, 本发明的 DsiRNA 分子包含与一个或多个靶核酸分子或其一部分互补的约 19 至约 30 个(例如, 约 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个或者更多个)核苷酸。

[0234] 短语“双链体区”是指两个互补或者基本上互补的寡核苷酸中的区, 所述寡核苷酸通过 Watson-Crick 碱基配对或允许互补或基本上互补的寡核苷酸链之间的形成双链体的任何其它方式彼此形成碱基对。例如, 具有 21 个核苷酸单位的寡核苷酸链可以与具有 21 个核苷酸单位的另一个寡核苷酸碱基配对, 但每一个链上仅 19 个碱基互补或基本上互补, 以使“双链体区”由 19 个碱基对组成。剩余碱基对可例如作为 5' 和 3' 突出存在。此外, 在双链体区内, 不需要 100% 互补; 在双链体区内容许基本上互补。

[0235] 基本上互补是指链之间的互补以使其能够在生物条件下退火。凭经验确定两个链是否能够在生物条件下退火的技术是本领域熟知的。或者, 可以在生物条件下将两个链合成且加在一起, 以确定两个链是否彼此退火。

[0236] 单链核酸在若干碱基进行碱基配对被称为“杂交”。杂交通常在生理学上或生物学上相关的条件(例如, 细胞内: pH 7.2, 140mM 钾离子; 细胞外: pH 7.4, 145mM 钠离子)下确定。杂交条件通常含有一价阳离子和生物学上可接受的缓冲液, 且所述杂交条件可以含有或可以不含有二价阳离子、络合阴离子(例如, 来自葡糖酸钾的葡糖酸根)、不带电的物质(诸如, 蔗糖)和降低样品水的活性的惰性聚合物(例如, PEG)中。这类条件包括可以形成碱基对的条件。

[0237] 通过解离形成双链体的单链核酸所需的温度(即解链温度; T_m)度量杂交。杂交条件也是可以形成碱基对的条件。可使用各种严格条件以测定杂交(例如, 参见 Wahl, G. M. 和 S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152 :399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152 :507)。严格的温度条件通常将包括至少约 30°C, 更优选地至少约 37°C, 且最优选地至少约 42°C 的温度。长度预期为小于 50 个碱基对的杂交物的杂交温度应比该杂交物的解链温度 (T_m) 低 5 至 10°C, 其中根据以下等式确定 T_m 。对长度小于 18 个碱基对的杂交物来说, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(A+T \text{ 碱基的数量}) + 4(G+C \text{ 碱基的数量})$ 。对长度为 18 至 49 个碱基对的杂交物来说, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% G+C) - (600/N)$, 其中 N 是杂交体中的碱基数目, 且 $[\text{Na}^+]$ 是杂交缓冲液中钠离子的浓度(对于 $1\times\text{SSC}[\text{Na}^+]$ 为 0.165M)。例如, 在表 1 中示出杂交测定缓冲液。

[0238] 表 1.

[0239]

	最终浓度	供应商	Cat#	Lot#	分子量/ 储备液	用于制备 50 mL 溶液
NaCl	100 mM	Sigma	S-5150	41K8934	5M	1 mL
KCl	80 mM	Sigma	P-9541	70K0002	74.55	0.298 g
MgCl ₂	8 mM	Sigma	M-1028	120K8933	1M	0.4 mL
蔗糖	2% w/v	Fisher	BP220-212	907105	342.3	1 g
Tris-HCl	16 mM	Fisher	BP1757-500	12419	1M	0.8 mL
NaH ₂ PO ₄	1 mM	Sigma	S-3193	52H-029515	120.0	0.006 g
EDTA	0.02 mM	Sigma	E-7889	110K89271	0.5M	2 μL
H ₂ O		Sigma	W-4502	51K2359		至 50 mL
pH = 7.0 20°C	用 HCl 调节					

[0240] 杂交条件的有用变化对本领域技术人员将是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员所熟知的,且描述于(例如)Benton 和 Davis(Science 196:180,1977);Grunstein 和 Hogness(Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961,1975);Ausubel 等(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001);Berger 和 Kimmel(Antisense to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York);以及 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York。

[0241] 如本文所使用,“寡核苷酸链”是单链核酸分子。寡核苷酸可包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸(例如,具有 2' 修饰的核苷酸、合成的碱基类似物等)或其组合。这类经过修饰的寡核苷酸可以优于天然形式,因为其具有例如增强的细胞摄取和存在核酸酶的情况下增加的稳定性的特性。

[0242] 本发明的某些 dsRNA 可以为嵌合的双链核糖核酸(dsRNA)。在本发明的情况下“嵌合 dsRNA”或“嵌合体”为含有两个或更多个化学上不同的区(每个区由至少一个核苷酸组成)的 dsRNA。这些 dsRNA 通常含有至少一个主要包含核糖核苷酸(任选地,包括经过修饰的核糖核苷酸)的区,所述核糖核苷酸形成 Dicer 底物 siRNA(“DsiRNA”)分子。此 DsiRNA 区可以共价连接到包含位于核糖核苷酸双链体区中的任一侧面上的碱基配对脱氧核糖核苷酸(“dsDNA 区”)第二区,这可以赋予一个或多个有益特性(例如,提高功效例如,提高 DsiRNA 活性的效力和/或持续时间、作为使嵌合 dsNA 靶向特异性位置(例如,当向培养物中的细胞或向受治疗者施用时的)的识别结构域或方法、作为改进官能团、有效负载、检测/可探测部分连接的延长区、作为提供更理想的修饰和/或这类修饰的改进间隔的延长区等)。此第二区(例如,包含碱基配对脱氧核糖核苷酸)还可包括修饰或合成的核苷酸和/或修饰或合成的脱氧核糖核苷酸。

[0243] 如本文所使用,术语“核糖核苷酸”涵盖天然和合成的、未经修饰和经过修饰的核糖核苷酸。修饰包括对寡核苷酸中糖部分、碱基部分和/或核糖核苷酸之间的键合的改变。如本文所使用,术语“核糖核苷酸”尤其不包括脱氧核糖核苷酸,其为在 2' 核糖环位置具有单个质子基团的核苷酸。

[0244] 如本文所使用,术语“脱氧核糖核苷酸”涵盖天然和合成的、未经修饰和经过修饰的脱氧核糖核苷酸。修饰包括对寡核苷酸中糖部分、对碱基部分和/或对脱氧核糖核苷酸之间键合的改变。如本文所使用,术语“脱氧核糖核苷酸”还包括经过修饰的核糖核苷酸,

该经过修饰的核糖核苷酸不允许 dsRNA 试剂（例如，2'-O-甲基核糖核苷酸、硫代磷酸修饰的核糖核苷酸残基等）的 Dicer 裂解，所述经过修饰的核糖核苷酸不允许 Dicer 裂解出现于这种残基的键合处。

[0245] 如本文所使用，术语“PS-NA”是指硫代磷酸修饰的核苷酸残基。因此，术语“PS-NA”涵盖硫代磷酸修饰的核糖核苷酸（“PS-RNA”）和硫代磷酸修饰的脱氧核糖核苷酸（“PS-DNA”）。

[0246] 如本文所使用，“Dicer”是指核糖核酸酶 III 家族中的内切核糖核酸酶，该内切核糖核酸酶将 dsRNA 或含 dsRNA 分子（例如，双链 RNA(dsRNA) 或微小 RNA 前体(miRNA)）裂解成长度为约 19-25 个核苷酸通常在 3' 端上具有两个碱基突出的双链核酸片段。就本发明的 dsRNA 而言，由本发明的 dsRNA 的 dsRNA 区形成的双链体通过 Dicer 识别，且在双链体的至少一个链上为 Dicer 底物。Dicer 催化 RNA 干扰途径中的第一步，从而导致靶 RNA 的降解。人 Dicer 的蛋白质序列提供于登陆号 NP_085124 下的 NCBI 数据库中，该 NCBI 数据库在此以引用的方式并入。

[0247] 按如下所述测定 Dicer“裂解”（例如，参见 Collingwood 等，Oligonucleotides 18: 187-200 (2008)）。在 Dicer 裂解测定中，在存在或不存在 1 单位的重组人 Dicer(Stratagene, La Jolla, CA) 的情况下在 37°C 下将 RNA 双链体 (100pmol) 在 20 μ L 的 20mM Tris(pH 8.0)、200mM NaCl、2.5mM MgCl₂ 中孵育 18 至 24 个小时。使用 Performa SR 96 孔板 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) 将样品脱盐。使用 Oligo HTCS 系统 (Novatia, Princeton, NJ; Hail 等, 2004) 在 Dicer 处理前和处理后对双链体 RNA 进行电喷雾电离液相色谱质谱分析 (ESI-LCMS)，所述 Oligo HTCS 系统由 ThermoFinnigan TSQ7000、Xcalibur 数据系统、ProMass 数据处理软件和 Paradigm MS4 HPLC (Michrom BioResources, Auburn, CA) 组成。在此测定中发生 Dicer 裂解，其中至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或甚至 100% 的 Dicer 底物 dsRNA（即，25-30bp dsRNA，优选地，26-30bp dsRNA）被裂解成较短 dsRNA（例如，19-23bp dsRNA，优选地，21-23bp dsRNA）。

[0248] 如本文所使用，“Dicer 裂解位点”是指 Dicer 裂解 dsRNA 的位点（例如，本发明的 dsRNA 的 dsRNA 区）。Dicer 含有通常裂解 dsRNA 的有义链和反义链的两个核糖核酸酶 III 结构域。核糖核酸酶 III 结构域与 PAZ 结构域之间的平均距离决定所述它所产生的短双链核酸片段的长度，且此距离可以改变 (Macrae I 等, (2006). " Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer" . Science 311(5758) :195-8)。预计 Dicer 裂解本发明的某些双链核酸，这些双链核酸具有的反义链为在远离反义链的 3' 末端的第 21 位与第 22 位核苷酸之间的位点以及在远离有义链 5' 末端的第 21 位与第 22 位核苷酸之间的相应位点具有 2 个核苷酸的 3' 突出。dsRNA 分子预计和 / 或普遍的 Dicer 裂解位点与本领域已知的 Dicer 裂解位点不同，或类似地可通过本领域公认的方法（包括 Macrae 等中所描述的那些方法）识别。dsRNA 的 Dicer 裂解（例如，DsiRNA）可导致产生长度为 19 至 23 个核苷酸的经 Dicer 加工的 siRNA 长度。实际上，在下文更详细描述的本发明的一个方面中，双链 DNA 区包括在 dsRNA 内，以指导通常 Dicer 普遍切除非优选的 19mer siRNA。

[0249] 如本文所使用，“突出”是指在 dsRNA 的 5' 端或 3' 端处具有一个、两个、三个、四个或五个自由端的双链体的情况下未配对的核苷酸。在某些实施方案中，突出为反义链或有义链上的 3' 或 5' 突出。

[0250] 如本文所使用,术语“DmiRNA”是指一种在 DmiRNA 试剂的反义(引导)链内(尤其在反义链的区内)具有至少一个错配核苷酸的 Dicer 底物 siRNA(“DsiRNA”),所述 Dicer 底物 siRNA 作为 RNA 干扰剂起作用且被认为与靶 RNA 的序列杂交。就有义(过客)链而言、就靶 RNA 序列(DmiRNA 的反义链被认为与所述靶 RNA 序列杂交)而言或就以上两者而言可存在这种错配核苷酸。

[0251] 如本文所使用,术语“RNA 加工”是指由 siRNA、miRNA 或核糖核酸酶 H 途径的组分(例如, Drosha、Dicer、Argonaute2 或其它 RISC 内切核糖核酸酶和核糖核酸酶 H)所进行的加工活动,这在下文中作了更详细的描述(参见下文“RNA 加工”部分)。所述术语明确不同于通过非 RISC 介导的加工或非核糖核酸酶 H 介导的加工进行的 RNA 的 5' 加帽和 RNA 降解的转录后加工。RNA 的这种“降解”可采用若干形式,例如脱腺苷化(去除 3' 聚腺苷酸尾)和/或通过若干核酸内切酶或核酸外切酶(例如,核糖核酸酶 III、核糖核酸酶 P、核糖核酸酶 T1、核糖核酸酶 A(1、2、3、4/5)、寡核苷酸酶等)中的任何一种将 RNA 主体中的部分或全部进行核酸酶消化。

[0252] “同源序列”是指由一个或多个多核苷酸序列(诸如,基因、基因转录物和/或非编码多核苷酸)共有的核苷酸序列。例如,同源序列可为由两个或更多个为相关但不同的蛋白质(诸如,基因家族中的不同成员、不同蛋白质表位、不同蛋白质同种型或完全不同的基因(诸如,细胞因子和它对应的受体))编码的基因所共有的核苷酸序列。同源序列可为由两个或更多个非编码多核苷酸(诸如,非编码 DNA 或 RNA、调控序列、内含子和转录控制或调控位点)所共有的核苷酸序列。同源序列还可以包括由一个以上多核苷酸序列所共有的保守序列区。同源性不必是完全同源(例如,100%),因为本发明还涵盖部分同源的序列(例如,99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%等)。事实上,本发明的 DsiRNA 试剂的设计和使用涵盖使用这种 DsiRNA 试剂的可能性,所述 DsiRNA 试剂不仅针对与目前所述 DsiRNA 试剂完全互补的目标靶 RNA,而且还针对具有与所述 DsiRNA 试剂仅(例如)99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%等互补的序列的目标靶 RNA。类似地,预期技术人员可容易地改变本发明目前所述的 DsiRNA 试剂,以增强所述 DsiRNA 试剂与所目标靶 RNA(例如,特异性等位基因变体(例如,具有增强治疗益处的等位基因)之间的互补程度。事实上,相对于目标靶序列具有插入、缺失和单点突变的 DsiRNA 试剂序列还可以有效地进行抑制(可能被认为是通过靶转录物的微小 RNA 样翻译抑制而不是破坏来起作用;因此,这种 DsiRNA 试剂可称为“DmiRNA”)。或者,具有核苷酸类似物取代或插入的 DsiRNA 试剂序列可以有效地进行抑制。

[0253] 可通过本领域已知的序列比较和比对算法来测定序列同一性。为了测定两个核酸序列(或两个氨基酸序列)的同一性百分比,为了最优的比较目的(例如,可以将空位引入第一序列或第二序列以供最优比对)比对序列。随后,比较对应核苷酸(或氨基酸)位置处的核苷酸(或氨基酸残基)。当占据第一序列某一位置的残基与第二序列相应位置的残基相同时,则分子在该位置相同。两个序列之间的同一性百分比为序列所共有的相同位置数的函数(即, %同源性=相同位置数量/位置总数乘以 100),任选地针对引入空位的数量和/或引入空位的长度进行罚分。

[0254] 可使用数学算法完成序列比较和两个序列之间同一性百分比的测定。在一个实施

方案中,在具有足够同一性的比对序列的某一部分内进行比对,而不在具有较低程度的同一性的部分内进行比对(即,局部比对)。用于序列比较的局部比对算法的优选、非限制性实例为 Karlin 和 Altschul 的算法(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68,所述算法在 Karlin 和 Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 中进行了修改。这种算法并入 Altschul 等(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10 的 BLAST 程序(2.0 版本)中。

[0255] 在另一个实施方案中,通过引入合适的空位使比对优化,且测定比对序列的长度内的同一性百分比(即,空位比对)。为了获得用于比较目的的空位比对,可使用如 Altschul 等,(1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中所述的 Gapped BLAST。在另一个实施方案中,通过引入合适的空位使比对优化,且测定比对序列的整个长度内的同一性百分比(即,整体比对)。用于序列的整体比较的数学算法的优选的非限制性实例为 Myers 和 Miller 的算法,CABIOS(1989)。这种算法并入 ALIGN 程序(2.0 版本)中,该 ALIGN 程序为 GCG 序列比对软件包的一部分。当使用 ALIGN 程序来比较氨基酸序列时,可使用 PAM120 重量残基表、空位长度罚分 12 和空位罚分 4。

[0256] 优选 DsiRNA 反义链与目标 RNA 序列中的一部分之间的序列同一性大于 80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至 100%的序列同一性。或者,可将 DsiRNA 在功能上定义为能够与目标 RNA 的一部分杂交(例如,400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA,在 50℃或 70℃下杂交 12 至 16 小时;随后进行洗涤)的核苷酸序列(或寡核苷酸序列)。另外的优选的杂交条件包括:在 1×SSC 中在 70℃下或在 1×SSC、50%甲酰胺中在 50℃下杂交,随后在 0.3×SSC 中在 70℃下洗涤,或者在 4×SSC 中在 70℃下或在 4×SSC、50%甲酰胺中在 50℃下杂交,随后在 1×SSC 中在 67℃下洗涤。预期长度小于 50 个碱基对的杂交物的杂交温度应比杂交物的解链温度(T_m)低 5 至 10℃,其中根据以下等式确定 T_m 。对长度小于 18 个碱基对的杂交物来说, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{A}+\text{T 碱基的数量})+4(\text{G}+\text{C 碱基的数量})$ 。对长度为 18 至 49 个碱基对的杂交物来说, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5+16.6(\log_{10}[\text{Na}^+])+0.41(\% \text{G}+\text{C})-(600/\text{N})$,其中 N 是杂交物中的碱基数目,且 $[\text{Na}^+]$ 是杂交缓冲液中钠离子的浓度(对于 1×SSC $[\text{Na}^+]$ 为 0.165M)。用于多核苷酸杂交的严格条件的另外的实例提供于 Sambrook, J., E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N. Y., 第 9 章和第 11 章,和 Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel 等编, John Wiley & Sons, Inc., 章节 2.10 和 6.3-6.4 中。相同核苷酸序列的长度可为至少约 10、12、15、17、20、22、25、27 或 30 个碱基。

[0257] “保守序列区”是指多核苷酸中一个或多个区的核苷酸序列在世代之间或从一个生物体系、受治疗者或生物体到另一个生物体系、受治疗者或生物体没有显著改变。多核苷酸可包括编码和非编码的 DNA 和 RNA。

[0258] “有义区”是指与 DsiRNA 分子的反义区具有互补性的 DsiRNA 分子的核苷酸序列。另外, DsiRNA 分子的反义区可包含与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0259] “反义区”是指与靶核酸序列具有互补性的 DsiRNA 分子的核苷酸序列。另外, DsiRNA 分子的反义区包含与 DsiRNA 分子的反义区具有互补性的核酸序列。

[0260] 如本文所使用,“反义链”是指具有与靶 RNA 序列互补的序列的单链核酸分子。当反义链含有具有碱基类似物的经过修饰的核苷酸时,所述反义链在整个长度未必互补,但

必须至少与靶 RNA 杂交。

[0261] 如本文所使用,“有义链”是指具有与反义链序列互补的序列的单链核酸分子。当反义链含有具有碱基类似物的经过修饰的核苷酸时,有义链在所述反义链的整个长度未必互补,但必须至少与反义链形成双链体。

[0262] 如本文所使用,“引导链”是指 dsRNA 或含有 dsRNA 分子的单链核酸分子,该单链核酸分子具有与靶 RNA 序列充分互补以产生 RNA 干扰。在通过 Dicer 使 dsRNA 或含有 dsRNA 分子裂解之后,引导链片段保持与 RISC 连接、结合作为 RISC 复合物的组分的靶 RNA、且促进靶 RNA 通过 RISC 裂解。如本文所使用,引导链未必指连续的单链核酸,且所述引导链可包含不连续性,优选地在由 Dicer 裂解的位点处。引导链为反义链。

[0263] 如本文所使用,“过客链”是指 dsRNA 或含有 dsRNA 分子的寡核苷酸链,该寡核苷酸链具有与引导链序列互补的序列。如本文所使用,过客链未必指连续的单链核酸,且可包含不连续性,优选地在由 Dicer 裂解的位点处。过客链为有义链。

[0264] “靶核酸”是指其表达、水平或活性有待调节的任何核酸序列。靶核酸可以为 DNA 或 RNA。还可通过靶向目标靶的上游效应子来靶向表达水平,或还可通过靶向(例如)目标靶标的信号转导途径的下游的分子来调节经过调节或错误调节的靶标的作用。

[0265] 已知, RNAi 方法适用于多种的生物体中的多种的基因,且所公开的组合物和方法可用于这些情况中的每一种。可通过所公开的组合物和方法靶向的基因的实例包括内源基因,所述内源基因为细胞的原生基因或通常不是细胞的原生基因。非限定地,这些基因包括癌基因、细胞因子基因、个体基因型 (Id) 蛋白基因、肌蛋白基因、表达诱导血管生成的分子的基因、粘附分子的基因、细胞表面受体基因、涉及转移的蛋白基因、蛋白酶基因、细胞凋亡基因、细胞周期控制基因、表达 EGF 和 EGF 受体的基因、多药耐受基因(诸如,MDR1 基因)。

[0266] 更具体地说,本发明的靶 mRNA 指定细胞蛋白质(例如,细胞核、细胞质、跨膜或膜相关蛋白)的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的靶 mRNA 指定细胞外蛋白(例如,细胞外基质蛋白或分泌蛋白)的氨基酸序列。如本文所使用,短语“指定蛋白质的氨基酸序列”是指依据遗传密码的规则将 mRNA 序列翻译为氨基酸序列。列出以下蛋白质类别用于说明的目的:发育蛋白(例如,粘附分子、细胞周期蛋白激酶抑制剂、Wnt 家族成员、Pax 家族成员、翼状螺旋家族成员、Hox 家族成员、细胞因子/淋巴因子和它们的受体、生长/分化因子和它们的受体、神经递质和它们的受体);癌基因编码的蛋白质(例如,ABL1、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETSI、ETSI、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIMI、PML、RET、SRC、TALI、TCL3 和 YES);肿瘤抑制蛋白(例如,BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NFI、NF2、RBI、TP53 和 WTI)以及酶(例如,ACC 合酶和氧化酶、ACP 脱饱和酶和羟化酶、ADP 葡萄糖磷酸化酶、ATP 酶、乙醇脱氢酶、淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、过氧化氢酶、纤维素酶、查尔酮合酶、壳多糖酶、环氧合酶、脱羧酶、糊精酶、DNA 和 RNA 聚合酶、半乳糖苷酶、葡聚糖酶、葡萄糖氧化酶、颗粒结合淀粉合酶、GTP 酶、解旋酶、半纤维素酶、整合酶、菊粉酶、转化酶、异构酶、激酶、乳糖酶、脂肪酶、脂肪氧合酶、溶菌酶、胭脂碱合酶、章鱼碱合酶、果胶甲酯酶、过氧化物酶、磷酸酶、磷脂酶、磷酸化酶、植酸酶、植物生长调节剂合酶、聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶和肽酶、普鲁兰酶、重组酶、逆转录酶、核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶、拓扑异构酶和木聚糖酶)、ApoB100 和 HPRT1。

[0267] 在一个方面,本发明的靶 mRNA 分子指定与病理状态有关的蛋白质的氨基酸序列。例如,蛋白质可为与病原体相关的蛋白质(例如,涉及宿主的免疫抑制、病原体的复制、病原体的传播或感染的维持的病毒蛋白)或有助于病原体进入宿主、通过病原体或宿主进行药物代谢、病原体基因组的复制或整合、感染在宿主中的建立或扩散,或者下一代病原体的组装的宿主蛋白。病原体包括 RNA 病毒,诸如黄病毒、小核糖核酸病毒、弹状病毒、线状病毒、逆转录酶病毒(包括慢病毒属)或 DNA 病毒,诸如,腺病毒、痘病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、嗜肝 DNA 病毒或其它病毒。另外的病原体包括细菌、真菌、蠕虫、血吸虫和锥体虫。其它种类的病原体可包括哺乳动物转座元件。或者,蛋白质可为肿瘤相关蛋白或与自身免疫疾病相关蛋白。

[0268] 靶基因可源自或包含于任何生物体。生物体可为植物、动物、原生动物、细菌、病毒或真菌。例如参见美国专利第 6,506,559 号,其以引用的方式并入本文。

[0269] 在本发明的一个实施方案中,本发明的 DsiRNA 分子的每个序列的长度独立地为约 25 至约 35 个核苷酸,在特定实施方案中在长度上为 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个核苷酸。在另一个实施方案中,本发明的 DsiRNA 双链体独立地包含约 25 至约 30 个碱基对(例如,约 25、26、27、28、29 或 30 个)。在另一个实施方案中,本发明的 DsiRNA 分子的一条或多条链独立地包含与目标靶核酸分子互补的约 19 至约 35 个核苷酸(例如,约 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个)。在图 1 和下文中示出本发明的示例性 DsiRNA 分子。

[0270] 如本文所使用,“细胞”以它的普通生物意义来使用,且不是指整个多细胞生物体,例如,具体说不是指人。细胞可存在于生物体中,例如鸟类、植物和哺乳动物,诸如,人、牛、羊、猿、猴、猪、狗和猫。细胞可为原核的(例如,细菌细胞)或真核的(例如,哺乳动物细胞或植物细胞)。细胞可为体细胞系源的或生殖系源的、全能的或多能的、分裂的或未分裂的。细胞还可以源自或可包含配子或胚胎、干细胞或完全分化的细胞。在某些方面内,术语“细胞”具体指含有一个或多个本公开的分离 dsRNA 分子的哺乳动物细胞,诸如,人细胞。在特定方面中,细胞加工 dsRNA 或含有 dsRNA 分子导致靶核酸的 RNA 干扰,且所述细胞含有 RNAi 所需的蛋白质和蛋白质复合物,例如 Dicer 和 RISC。

[0271] 将本发明的 DsiRNA 分子直接加入靶细胞或组织,或可将本发明的 DsiRNA 分子与阳离子脂质复合,包裹于脂质体内,或者以其它方式递送至靶细胞或组织。可在体外或体内通过直接皮肤应用、经皮应用或注射将核酸或核酸复合物局部施用于相关组织,其中核酸或核酸复合物并入生物聚合物或不并入生物聚合物。在本发明的某些方面,根据以下所描述的 DsiRNA 试剂的修饰模式,对图 1 呈现的 dsRNA 肽的示例性结构的 dsRNA 进行修饰。图 1 中所述化学修饰形式的构建体和以下示例性结构可用于针对本文所述的 DsiRNA 试剂所描述的任何和所有用途中。

[0272] 在另一个方面,本发明提供含有本发明的一个或多个 DsiRNA 分子的哺乳动物细胞。可将一个或多个 DsiRNA 分子可独立地靶向相同位点或不同位点。

[0273] 所谓“RNA”是指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。所述“核糖核苷酸”是指在 β -D-呋喃核糖部分的 2' 位置具有羟基的核苷酸。所述术语包括双链 RNA、单链 RNA、分离 RNA,诸如,部分纯化 RNA、基本上纯化 RNA、合成 RNA、重组产生的 RNA,以及通过一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代和 / 或改变而形成的不同于天然的 RNA 的改变 RNA。此类改变

可包括例如向 DsiRNA 末端或内部,例如在 RNA 的一个或多个核苷酸处加入非核苷酸物质。本发明的 RNA 分子中的核苷酸还可以包括非标准核苷酸,诸如非天然的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 可以被认为是类似物或天然的 RNA 的类似物。

[0274] 所述“受治疗者”是指作为外植细胞的供体或受体的生物体或者细胞本身。“受治疗者”还指可向其施用本发明的 DsiRNA 试剂的生物体。受治疗者可为哺乳动物或哺乳动物细胞,包括人或人细胞。

[0275] 短语“药学上可接受的载体”是指用于施用治疗剂的载体。示例性载体包括盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。对口服施用的药物来说,药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的赋形剂,诸如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙和乳糖,而玉米淀粉和藻酸为合适的崩解剂。粘合剂可以包括淀粉和明胶,而润滑剂(如果存在的话)通常将为硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。如果需要,片剂可涂有诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯等材料,以延迟在肠胃道中的吸收。公开的 dsRNA 组合物的药学上可接受的载体可为胶束结构,诸如脂质体、衣壳、病毒壳粒(capsoid)、聚合纳米胶囊或聚合微胶囊。

[0276] 聚合纳米胶囊或微胶囊有助于将封装的或结合的 dsRNA 运输且释放至细胞中。它们包括聚合材料和单体材料,尤其包括聚氰基丙烯酸丁酯。已发表了材料和制造方法的概述(参见 Kreuter, 1991)。在聚合/纳米颗粒产生步骤中由单体和/或寡聚前体形成的聚合材料本身是现有技术已知的,制造纳米颗粒领域的技术人员可根据常用技术适当地选择聚合材料的分子量和分子量分布。

[0277] 本发明的各种方法包括涉及将数值、水平、特点、特征、特性等与“合适的对照”(在本文中可替换地称为“适当的对照”)进行比较的步骤。“合适的对照”或“适当的对照”为可用于比较目的为本领域的普通技术人员所熟知的任何对照或标准。在一个实施方案中,“合适的对照”或“适当的对照”为如本文所述在进行 RNAi 方法之前所测定的数值、水平、特点、特征、特性等。例如,在将本发明的 RNA 沉默剂(例如,DsiRNA)引入细胞或生物体之前可确定的转录速率、mRNA 水平、翻译速率、蛋白质水平、生物活性、细胞特征或特性、基因型、表型等。在另一个实施方案中,“合适的对照”或“适当的对照”为在表现例如正常特征的细胞或生物体(例如,对照或正常细胞或生物体)中所测定的数值、水平、特点、特征、特性等。在又一个实施方案中,“合适的对照”或“适当的对照”为预先确定的数值、水平、特点、特征、特性等。

[0278] 术语“体外”具有其本领域公认的含义,例如涉及纯化试剂或提取物,例如,细胞提取物。术语“体内”还具有其领域公认的含义,例如涉及生物体中的活细胞,例如,永生细胞、原代细胞、细胞系和/或细胞。

[0279] 如本文所使用的“治疗”定义对向患者应用或施用治疗剂(例如,DsiRNA 试剂或载体或编码其的转基因)、或向来自患有疾病的患者的分离组织或细胞系应用或施用治疗剂,以达到治疗、治愈、缓解、减轻、改变、矫正、改善、改进或影响疾病或病症或者疾病或病症的症状的目的。术语“治疗”在本文中还可用于预防性地施用试剂的情况。术语“有效剂量(effective dose)”或“有效剂量(effective dosage)”定义为足以达到或至少部分地达到所要作用的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治疗或至少部分地阻止已患病的患者的疾病和它的并发症的量。术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其它哺乳动

物受治疗者。

[0280] dsRNA-肽的设计 / 合成

[0281] 已凭经验发现与 19 至 23mer siRNA 试剂相比, 25 至约 35 个核苷酸 (DsiRNA) 且尤其为 25 至约 30 个核苷酸的较长 dsRNA 种类就效力和作用的持续时间而言给出了出人意料的有效结果。在不希望受 dsRNA 加工机制的潜在理论束缚的情况下, 认为较长 dsRNA 种类在细胞的细胞质中用作 Dicer 酶的底物。Dicer 除了将本发明的 dsRNA 裂解成为较短片段之外, 还认为 Dicer 有助于将来源于裂解 dsRNA 的单链裂解产物并入负责破坏目标靶 RNA 的 RISC 复合物中。现有研究 (Rossi 等, 美国专利申请第 2007/0265220 号) 已显示 dsRNA 种类 (具体来说, DsiRNA 试剂) 通过 Dicer 的可裂解性与 dsRNA 种类的提高效力和作用持续时间一致。

[0282] 本发明涵盖包含双链 RNA 的 dsRNA, 所述双链 RNA 包含第一链和第二链, 其中第一链和第二链的长度为至少 16 个和至多 50 个核苷酸 (例如, 长度为 16 至 50 个核苷酸、19 至 35 个核苷酸、19 至 24 个核苷酸、25 至 30 个核苷酸、25 个、35 个、19 至 23 个核苷酸和 21 至 23 个核苷酸)。

[0283] A. dsRNA

[0284] dsRNA (包括 DsiRNA) 的设计可任选地涉及使用预测评分算法, 该预测评分算法进行计算机模拟评定跨越序列区的数个可能的 DsiRNA 试剂的预计活性 / 功效。例如, 可在 Gong 等 (BMC Bioinformatics 2006, 7 : 516) 中发现有关此类评分算法的设计信息, 但是相对于本领域以前使用的 siRNA 评分算法来说, 更新的 “v3” 算法表示理论上改进的算法。 (“v3” 评分算法为不依赖任何人序列偏差的机器学习算法。另外, “v3” 算法衍生出的数据集是以前 “v2” 算法 (诸如 Gong 等中所描述的那个算法) 衍生出的数据集的大约三倍。)

[0285] 本发明的 DsiRNA 试剂的第一和第二寡核苷酸不需要完全互补。事实上, 在一个实施方案中, 有义链的 3' 端含有一个或多个错配。在一个方面, 在有义链的 3' 端处并入约两个错配。在另一个实施方案中, 本发明的 DsiRNA 为含有两个 RNA 寡核苷酸的双链 RNA 分子, 每个所述 RNA 寡核苷酸的长度为 27 个核苷酸, 并且当彼此退火时具有平端且两个核苷酸在有义链的 3' 端 (反义链的 5' 端) 上错配。已建议使用错配或降低的热力学稳定性 (尤其在有义链 3' / 反义链 5' 位置处), 以大概通过影响一些限制速率的解旋步骤 (所述步骤随着 siRNA 进入 RISC 而出现) 来促进或有利于反义链进入 RISC (Schwarz 等, 2003, Cell 115 : 199-208 ; Khvorova 等, 2003, Cell 115 : 209-216)。因此, 末端碱基组合物已经包括于设计算法中, 以选择活性 21mer siRNA 双链体 (Ui-Tei 等, 2004, Nucleic Acids Res 32 : 936-948 ; Reynolds 等, 2004, Nat Biotechnol 22 : 326-330)。由于这个实施方案的 dsRNA 发生 Dicer 裂解, 含有错配的小端 - 末端序列将保持与反义链不配对 (变为 3' 突出中的一部分) 或完全裂解而离开最终 21mer siRNA。因此, 这些 “错配” 不会作为错配继续保留在 RISC 的最终 RNA 组分中。发现在 Dicer 底物的有义链的 3' 端处片段的碱基错配或去稳定作用据推测通过由 Dicer 促进加工来提高 RNAi 中合成双链体的效力, 这个发现是描述设计和使用 25 至 30mer dsRNA (本文中又称为 “DsiRNA”; Rossi 等, 美国专利申请第 2005/0277610 号、第 2005/0244858 号和第 2007/0265220 号) 的过去工作的意外发现。

[0286] B. 肽

[0287] 本发明提供包含与肽缀合的本发明的 dsRNA 的组合物。

[0288] 递送肽

[0289] 在某些实施方案中,目标肽是上文所定义的递送肽。

[0290] 根据本发明的有用的递送肽序列

[0291] 与未缀合的 dsRNA 相比,根据本发明的有用的递送肽增加了 dsRNA 的起效时间、递送的 dsRNA 的作用持续时间或本发明的 dsRNA 的递送速率中的至少一个。如本文中所定义的本发明的肽减少起效时间,使得与未缀合的 dsRNA 相比,目标 dsRNA 到达靶 RNA 之前的滞后时间减少。如本文中所定义,根据本发明的有用的递送肽增加作用持续时间,使得与未缀合的 dsRNA 相比,dsRNA-肽缀合物在更长的时段内抑制靶 RNA。如本文中所定义,根据本发明的有用的递送肽提高 dsRNA 的递送速率,使得 dsRNA-肽缀合物比未缀合的 dsRNA 更快到达靶 RNA。

[0292] 根据本发明,测定递送肽的氨基酸序列并使其优化以用于待递送的 dsRNA。根据本发明对递送肽有用的肽序列描述于文献中。

[0293] 在一个实施方案中,根据本发明的递送肽包含脯氨酸残基,例如,序列 x1-P-x2-P-x3,其中 x1 和 x3 是包含 2 至 50 个氨基酸的任何氨基酸或肽片段,并且 x2 是 0 或 1 个氨基酸或含有 2 至 20 个氨基酸的肽片段。在另一个实施方案中,x1 = 包含 5 个氨基酸残基的肽;x2 = 包含 7 个氨基酸残基的肽且 x3 = 包含 4 个氨基酸残基的肽。在另一个实施方案中,x1 = 包含 8 个氨基酸残基的肽;x2 = 包含 7 个氨基酸残基的肽且 x3 = 包含 4 个氨基酸残基的肽。在又一个实施方案中,x1 = 包含 8 个氨基酸残基的肽;x2 = 包含 8 个氨基酸残基的肽且 x3 = 包含 4 个氨基酸残基的肽 (Deber 等, Arch Biochem Biophys. 1986 ; 251 (1) :68-76 ;和 Du 等, J Pept Res. 1998 ;51 (3) :235-43)。

[0294] 用于本发明的递送肽序列包括但不限于:

[0295] VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL (SEQ ID NO :1)

[0296] VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL (SEQ ID NO :2)

[0297] KSVKAPGI (SEQ ID NO :3)

[0298] HKAIIDGRSLYNKTLTD (SEQ ID NO :4)

[0299] LRLTKNSRDDST (SEQ ID NO :5)

[0300] KNIVSVKGIRKSI (SEQ ID NO :6)

[0301] KSVIPRKGTKAPPRL (SEQ ID NO :7)

[0302] KPVMYKNTGKSEQ (SEQ ID NO :8)

[0303] EFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :9)

[0304] EFVMNPANAQGH TAGTRL (SEQ ID NO :10)

[0305] EFVMNAANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :11)

[0306] EFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :12)

[0307] NPKEFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :13)

[0308] NPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :14)

[0309] KKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGEL (SEQ ID NO :15)

[0310] CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL (SEQ ID NO :16)

[0311] CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL (SEQ ID NO :17)

[0312] CKSVKAPGI (SEQ ID NO :18)

- [0313] CHKAIDGRSLYNKTL D (SEQ ID NO :19)
- [0314] CLRLTKNSRDDST (SEQ ID NO :20)
- [0315] CKNIVSVKGIRKSI (SEQ ID NO :21)
- [0316] CKSVIPRKGTKAPRL (SEQ ID NO :22)
- [0317] CKPVMYKNTGKSEQ (SEQ ID NO :23)
- [0318] CEFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :24)
- [0319] CEFVMNPANAQGHTAGTRL (SEQ ID NO :25)
- [0320] CEFVMNAANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :26)
- [0321] CEFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :27)
- [0322] CNPKEFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :28)
- [0323] CNPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :29)
- [0324] CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLG GEL (SEQ ID NO :30)
- [0325] GVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL (SEQ ID NO :31)
- [0326] GVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL (SEQ ID NO :32)
- [0327] GKSVKAPGI (SEQ ID NO :33)
- [0328] GHKAIDGRSLYNKTL D (SEQ ID NO :34)
- [0329] GLRLTKNSRDDST (SEQ ID NO :35)
- [0330] GKNIVSVKGIRKSI (SEQ ID NO :36)
- [0331] GKSVIPRKGTKAPRL (SEQ ID NO :37)
- [0332] GKPVMYKNTGKSEQ (SEQ ID NO :38)
- [0333] GEFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :39)
- [0334] GEFVMNPANAQGHTAGTRL (SEQ ID NO :40)
- [0335] GEFVMNAANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :41)
- [0336] GEFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :42)
- [0337] GNPKEFVMNPANAQGHTPGTRL (SEQ ID NO :43)
- [0338] GNPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL (SEQ ID NO :44)
- [0339] GKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLG GEL (SEQ ID NO :45)
- [0340] VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC (SEQ ID NO :46)
- [0341] VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC (SEQ ID NO :47)
- [0342] KSVKAPGIC (SEQ ID NO :48)
- [0343] HKAIDGRSLYNKTLDC (SEQ ID NO :49)
- [0344] LRLTKNSRDDSTC (SEQ ID NO :50)
- [0345] KNIVSVKGIRKSIC (SEQ ID NO :51)
- [0346] KSVIPRKGTKAPRLC (SEQ ID NO :52)
- [0347] KPVMYKNTGKSEQC (SEQ ID NO :53)
- [0348] EFVMNPANAQGHTPGTRLC (SEQ ID NO :54)
- [0349] EFVMNPANAQGHTAGTRLC (SEQ ID NO :55)
- [0350] EFVMNAANAQGHTPGTRLC (SEQ ID NO :56)
- [0351] EFVMNPANAQGRHTPGTRLC (SEQ ID NO :57)

- [0352] NPKEFVMNPANAQGHTPGTRLC (SEQ ID NO :58)
- [0353] NPKEFVMNPANAQGRHTPGTRLC (SEQ ID NO :59)
- [0354] KKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGELC (SEQ ID NO :60)
- [0355] KSVKAPGIGGKSVKAPGI (SEQ ID NO :61)
- [0356] KSVKAPGIGGKSVKAPGIGGKSVKAPGI (SEQ ID NO :62)
- [0357] KSVKAPGIGG (KSVKAPGI)₂ (SEQ ID NO :63)
- [0358] CKSVKAPGIGGKSVKAPGI (SEQ ID NO :64)
- [0359] CKSVKAPGIGGKSVKAPGIGGKSVKAPGI (SEQ ID NO :65)
- [0360] GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (SEQ ID NO :66)
- [0361] CGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (SEQ ID NO :67)
- [0362] GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGC (SEQ ID NO :68)
- [0363] GRGDGG (SEQ ID NO :69)
- [0364] CRGDGG (SEQ ID NO :70)
- [0365] GRGDGC (SEQ ID NO :71)
- [0366] THALWHT (SEQ ID NO :72)
- [0367] GTHALWHT (SEQ ID NO :73)
- [0368] THALWHTG (SEQ ID NO :74)
- [0369] CTHALWHT (SEQ ID NO :75)
- [0370] THALWHTC (SEQ ID NO :76)
- [0371] QPFMQCLCLIYDASC (SEQ ID NO :77)
- [0372] GQPFMQCLCLIYDASC (SEQ ID NO :78)
- [0373] QPFMQCLCLIYDASCG (SEQ ID NO :79)
- [0374] RNVPPIFNDVYWIAF (SEQ ID NO :80)
- [0375] GRNVPPIFNDVYWIAF (SEQ ID NO :81)
- [0376] RNVPPIFNDVYWIAFG (SEQ ID NO :82)
- [0377] CRNVPPIFNDVYWIAF (SEQ ID NO :83)
- [0378] RNVPPIFNDVYWIAFC (SEQ ID NO :84)
- [0379] VFRVRPWYQSTSQS (SEQ ID NO :85)
- [0380] GVFRVRPWYQSTSQS (SEQ ID NO :86)
- [0381] VFRVRPWYQSTSQSG (SEQ ID NO :87)
- [0382] CVFRVRPWYQSTSQS (SEQ ID NO :88)
- [0383] VFRVRPWYQSTSQSC (SEQ ID NO :89)
- [0384] GEFVMNAANAQGHTAGTRL (SEQ ID NO :149)
- [0385] TQIENLKEKG (SEQ ID NO :150)
- [0386] H2N-c [D (Cys-Ser-Lys-Cys)] Gly-Peg12-Lys (SEQ ID NO :151)
- [0387] H2N-c [Cys-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-Cys]-Peg12-Lys (SEQ ID NO :152)
- [0388] H2N-Thr-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-D-Phe-Peg12-Lys (SEQ ID NO :153)
- [0389] 或其部分。
- [0390] 靶向肽

[0391] 在其它实施方案中,目标肽是上文所定义的靶向肽。

[0392] 根据本发明,针对,测定靶向肽的氨基酸序列且使其优化以用于与肽缀合用来递送的 dsRNA。根据本发明对靶向肽有用的肽序列描述于文献中。

[0393] 对每个配体家族来说,不同的肽序列模式是适当的。在一个实施方案中,根据本发明对靶向 LDL-受体有用的肽可含有序列 x1-F-x2-YGG-x3,其中 x1 和 x3 是任何氨基酸或包含 2 至 40 个氨基酸的肽片段,并且 x2 是任何氨基酸。Hussain、Strickland 和 Bakillah, Annu Rev Nutr. 1999 ;19 :141-172. Hussain, Front Biosci. 2001 年 ;6 :D417-D428。

[0394] 根据本发明的有用的靶向肽

[0395] 根据本发明的有用的靶向肽包括但不限于来自任一以下配体的氨基酸序列:

[0396] 1. 甲状旁腺激素 (PTH) 和 PTH 相关蛋白

[0397] P01270 ;PTHY_HUMAN

[0398] P22858 ;PTHR_MOUSE

[0399] Q811S6 ;Q811S6_MOUSE

[0400] P01270 ;PTHY_HUMAN

[0401] MIPAKDMAKV MIVMLAICFL TKSDGKSVKK RSVSEIQLMH NLGKHLNSME RVEWLRKKLQ

[0402] DVHNFVALGA PLAPRDAGSQ RPRKKEDNVL VESHEKSLGE ADKADVNVL KAKSQ (SEQ ID NO :90)

[0403] 2. 促甲状腺激素 (TSH)

[0404] P01222 ;TSHB_HUMAN

[0405] P12656 ;TSHB_MOUSE

[0406] P01222 ;TSHB_HUMAN

[0407] MTALFLMSML FGLACGQAMS FCIPTEYTMH IERRECAAYCL TINTTICAGY CMTRDINGKL

[0408] FLPKYALSQD VCTYRDFIYR TVEIPGCPLH VAPYFSYPVA LSCKCGKCNT DYSDCIHEAI

[0409] KTNCTKPQK SYLVGFSV (SEQ ID NO :91)

[0410] 3. TSH 释放激素

[0411] B2R8R1 ;B2R8R1_HUMAN

[0412] B2R8R1 ;B2R8R1_HUMAN

[0413] MPGPWLLLAL ALTLNLTGVP GGRAQPEAAQ QEAVTAAEHP GLDDFLRQVE RLLFLRENIQ

[0414] RLQGDQGEHS ASQIFQSDWL SKRQHPGKRE EEEEEGVEEE EEEEGGAVGP HKRQHPGRRE

[0415] DEASWSVDVT QHKRQHPGRR SPWLAYAVPK RQHPGRRAD PKAQRSWEEE EEEEEEREEDL

[0416] MPEKRQHPGK RALGGPCGPQ GAYGQAGLLL GLDDLSRSQ GAEEKRQHPG RRAAWVREPL EE

[0417] (SEQ ID NO :92)

[0418] 4. FSH/LH 释放激素

[0419] P01148 ;GON1_HUMAN

[0420] 043555 ;GON2_HUMAN

[0421] P13562 ;GON1_MOUSE

[0422] P01148 ;GON1_HUMAN

[0423] MKPIQKLLAG LILLTWCVEG CSSQHWSYGL RPKGKRDAEN LIDSFQEIVK

[0424] EVGQLAETQR FECTTHQPRS PLRDLKGALE SLIEETGQK KI (SEQ ID NO :93)

- [0425] 043555 ;GON2_HUMAN
- [0426] MASSRRGLLL LLLTAHLGP SEAQHWSHGW YPGGKRALSS AQDPQNALRP
- [0427] PGRALDTAAG SPVQTAHGLP SDALAPLDDS MPWEGRTTAQ WSLHRKRHLA
- [0428] RTLLTAAREP RPAPPSSNKV (SEQ ID NO :94)
- [0429] 5. 促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)
- [0430] P06850 ;CRF_HUMAN
- [0431] Q8CITO ;CRF_MOUSE
- [0432] P06850 ;CRF_HUMAN
- [0433] MRLPLLVSAG VLLVALLPCP PCRALLSRGP VPGARQAPQH PQPLDFFQPP PQSEQPQQPQ
- [0434] ARPVLLRMGE EYFLRLGNLN KSPAAPLSPA SLLAGSGS RPSPEQATAN FFRVLLQQLL
- [0435] LPRRSLDSPA ALAERGARN LGGHQEAPER ERRSEEPPIS LDLTFHLLRE VLEMARAEQL
- [0436] AQQAHSNRKL MEIIGK
- [0437] (SEQ ID NO :95)
- [0438] 6. 促肾上腺皮质激素 (ACTH)
- [0439] P01189 ;COLI_HUMAN
- [0440] P01193 ;COLI_MOUSE
- [0441] P01189 ;COLI_HUMAN
- [0442] MPRSCCSRSG ALLLALLLQA SMEVRGWCLE SSQCQDLTTE SNLLECIRAC
- [0443] KPDLSAETPM FPGNGDEQPL TENPRKYVMG HFRWDRFGRR NSSSSGSSGA
- [0444] GQKREDVSAG EDCGPLPEGG PEPRSDGAKP GPREGKRSYS MEHFRWGKPV
- [0445] GKKRRPVKVY PNGAEDESAE AFPLEFKREL TGQRLREGDG PDGPADDGAG
- [0446] AQADLEHSL VAAEKKDEGP YRMEHFRWGS PPKDKRYGGF MTSEKSQTPL
- [0447] VTLFKNAIIK NAYKKGE (SEQ ID NO :96)
- [0448] 7. 蛋白酶激活受体 (PAR) 配体和凝血酶受体激动剂
- [0449] P00734 ;THRB_HUMAN
- [0450] P19221 ;THRB_MOUSE
- [0451] P00734 ;THRB_HUMAN
- [0452] MAHVRGLQLP GCLALAALCS LVHSQHVFLLA PQQARSLLR VRRANTFLEE
- [0453] VRKGNLEREC VEETCSYEEA FEALSSSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL
- [0454] AACLEGNAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSPYHPK EINSTTHPGA
- [0455] DLQENFCRNP DSSTTGWCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE
- [0456] GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YQGR LAVTTH GLPCLAWASA QAKALSKHQD
- [0457] FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GVWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG
- [0458] DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK
- [0459] TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW
- [0460] VLTAACHLLY PPWDKNFTEN DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH
- [0461] PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSYIHP VCLPDRETAA SLLQAGYKGR
- [0462] VTGWGNLKET WTANVGKGQP SVLQVVNLPI VERPVCKDST RIRITDNMFC
- [0463] AGYKPDEGKR GDACEGDSGG PFVMKSPFNN RYQMGIVSW GEGCDRDGKY

[0464] GFYTHVFRLK KWIQKVIDQF GE (SEQ ID NO :97)

[0465] 8. 补体受体配体

[0466] P01024 ;C03_HUMAN

[0467] P01027 ;C03_MOUSE

[0468] P01024 ;C03_HUMAN

[0469] MGPTSGPSLL LLLLTHLPLA LGSPMYSIIT PNILRLESEE TMVLEAHDAQ

[0470] GDVPVTVTVH DFPGKKLVLS SEKTVLTPAT NHMGNVTFTI PANREFKSEK

[0471] GRNKFVTVQA TFGTQVVEKV VLVSLQSGYL FIQTDKTIYT PGSTVLYRIF

[0472] TVNHKLLPVG RTVMVNIENP EGIPVKQDSL SSQNQLGVLP LSWDIPELVN

[0473] MGQWKIRAYY ENSPQQVFST EFEVKEYVLP SFEVIVEPTE KFYIYNEKG

[0474] LEVTITARFL YGKKVEGTAF VIFGIQDGEQ RISLPESLKR IPIEDGSGEV

[0475] VLSRKVLLDG VQNPRAEDLV GKSLYVSATV ILHSGSDMVQ AERSGPIVIT

[0476] SPYQIHFTKT PKYFKPGMPF DLMVFVTNPD GSPAYRVPVA VQGEDTVQSL

[0477] TQGDGVAKLS INTHPSQKPL SITVRTKKQE LSEAEQATRT MQALPYSTVG

[0478] NSNNYLHLSV LRTELRPGET LNVNLLRMD RAHEAKIRYY TYLIMNKGR

[0479] LKAGRQVREP GQDLVVLPLS ITTDFIPSFR LVAYYTLIGA SGQREVVADS

[0480] VWVDVKDSCV GSLVVKSGQS EDRQPVPQQ MTLKIEGDHG ARVVLVAVDK

[0481] GVFLVNLKKNK LTQSKIWDVV EKADIGCTPG SGKDYAGVFS DAGLTFTSSS

[0482] GQQTAAQRAEL QCPQPAARRR RSVQLTEKRM DKVGKYPKEL RKCCEDGMRE

[0483] NPMRFSCQRR TRFISLGEAC KKVFLDCCNY ITELRRQHAR ASHLGLARSN

[0484] LDEIIIAEEN IVSRSEFPES WLWNVEDLKE PPKNGISTKL MNIFLKDSIT

[0485] TWEILAVSMS DKKGICVADP FEVTVMQDFF IDLRLPYSVV RNEQVEIRAV

[0486] LYNRQVQEL KVRVELLHNP AFCSLATTKR RHQQTVTIPP KSSLSVPYVI

[0487] VPLKTGLQEV EVKAAVYHHF ISDGVKSLK VVPEGIRMNK TVAVRTLDP

[0488] RLGREGVQKE DIPPADLSDQ VPDTESETRI LLQGTTPVAM TEDAVDAERL

[0489] KHLIVTPSGC GEQNMIGMTP TVIAVHYLDE TEQWEKFGLE KRQGALELIK

[0490] KGYTQQLAFR QPSSAFAAFV KRAPSTWLTA YVVKVFS LAV NLIAIDSQVL

[0491] CGAVKWLILE KQKPDGVFQE DAPVIHQEMI GGLRNNNEKD MALTAFLVIS

[0492] LQEAKDICEE QVNSLPGSIT KAGDFLEANY MNLQRSYTVA IAGYALQMG

[0493] RLKGPLLNF LTTAKDKNRW EDPGKQLYNV EATSYALLAL LQLKDFDFVP

[0494] PVVRWLNEQR YGGGGYGSTQ ATFMVFQALA QYQKDAPDHQ ELNLDVSLQL

[0495] PSRSSKITHR IHWESASLLR SEETKENEGF TVTAEGKGQG TLSVVTMYHA

[0496] KAKDQLTCNK FDLKVTIKPA PETEKRPQDA KNTMILEICT RYRGDQDATM

[0497] SILDISMMTG FAPDTDDLKQ LANGVDRIY KYELDKAFSD RNTLIYLDK

[0498] VSHSEDDCLA FKVHQYFNVE LIQPGAVKVY AYYNLEESCT RFYHPEKEDG

[0499] KLNKLCRDEL CRCAEENCFI QKSDDKVTLE ERLDKACEPG VDYVYKTRLV

[0500] KVQLSNDFDE YIMAIEQTIK SGSDEVQVGQ QRTFISPIKC REALKLEKK

[0501] HYLMWGLSSD FWGEKPNLSY IIGKDTWVEH WPEEDECQDE ENQKQCQDLG

[0502] AFTESMVVFG CPN (SEQ ID NO :98)

[0503] P0C0L5 ;C04B_HUMAN

[0504] MRLLWGLIWA SSFRTLQK PRLLLFSPSV VHLGVPLSVG VQLQDVPRGQ VVKGSVFLRN

[0505] PSRNNVPCSP KVDFTLSSER DFALLSLQVP LKDAKSCGLH QLLRGPEVQL VAHSPWLKDS

[0506] LSRTTNIQGI NLLFSSRRGH LFLQTDQPIY NPGQVRVRYRV FALDQKMRPS TDTITVMVEN

[0507] SHGLRVRKKE VYMPSSIFQD DFVIPDISEP GTWKISARFS DGLESNSSTQ FEVKKYVLPN

[0508] FEVKITPGKP YILTVPGHLD EMQLDIQARY IYGPVQGV YVRFGLLDED GKKTFFRGLE

[0509] SQTCLVNGQS HISLSKAEFQ DALEKLNMG I TDLQGLRLYV AAAIESPGG EMEEAELTSW

[0510] YFVSSPFLD LSKTKRHLVP GAPFLQALV REMSGSPASG IPVKVSATVS SPGSVPEVQD

[0511] IQQNTDGSQ VSIPIIIPQT ISELQLSVSA GSPHPAIARL TVAAPPSGGP GFLSIERPDS

[0512] RPPRVGDTLN LNLRAVGSGA TFSHYYMIL SRGQIVFMNR EPKRTLTSSVS VFVDHHLAPS

[0513] FYFVAFYYHG DHPVANSLRV DVQAGACEGK LELSVDGAKQ YRNGESVKLH LETDSLALVA

[0514] LGALDTALYA AGSKSHKPLN MGKVFEAMNS YDLGCGPGG DSALQVFQAA GLAFSDGDQW

[0515] TLSRKRLSCP KEKTTRKKRN VNFQKAIN EK LGQYASPTAK RCCQDGVTRL PMMRSCQRA

[0516] ARVQQPDCRE PFLSCCQFAE SLRKKS RDKG QAGLQRALEI LQEEDLIDED DIPVRSFFPE

[0517] NWLWRVETVD RFQILTLWLP DSLTTWEIHG LSLSKTKGLC VATPVQLRVF REFHLHLRLP

[0518] MSVRRFEQLE LRPVLYNYLD KNLTVS VHS PVEGLCLAGG GGLAQQLVP AGSARPVAFS

[0519] VVPTAAAVS LKVVARGSFE FPVGDAVSKV LQIEKEGAIH REELVYELNP LDHRGRTLEI

[0520] PGNSDPNMIP DGDFNSYVRV TASDPLDTLG SEGALSPGGV ASLLRLPRGC GEQTMIYLAP

[0521] TLAASRYLDK TEQWSTLPPE TKDHAVDLIQ KGYMRIQQFR KADGSYAAWL SRDSSTWLTA

[0522] FVLKVLSLAQ EQVGG SPEKL QETSNWLLSQ QQADGSFQDL SPVIHRSMQG GLVGNDETVA

[0523] LTAFVTIALH HGLAVFQDEG AEPLKQ RVEA SISKANSFLG EKASAGLLGA HAAAITAYAL

[0524] SLTKAPVDLL GVAHNNLMAM AQETGDNLYW GSVTGSQSNA VSPTPAPRNP SDPMPQAPAL

[0525] WIETTAYALL HLLLHEGKAE MADQASAWLT RQGSFQGGFR STQDVTIALD ALSAYWIASH

[0526] TTEERGLNVT LSSTGRNGFK SHALQLNNRQ IRGLEEELQF SLGSKINVKV GGNSKGT LKV

[0527] LRTYNVLD MK NTTCDLQIE VTVKGHVEYT MEANEDYEDY EYDELPKDD PDAPLQPVTP

[0528] LQLFEGRRNR RRREAPKVVE EQESRVHYTV CIWRNGKVGL SGMAIADVT L LSGFHALRAD

[0529] LEKLTSLSDR YVSHFETEGP HVLLYFDSVP TSRECVGFEA VQEV PVGLVQ PASATLYDYY

[0530] NPERRCSVFY GAPSKSRLLA TLCSAEVCQC AEGKCPQRRL ALERGLQDED GYRMKFACY

[0531] PRVEYGFQVK VLREDSRAAF RLFETKITQV LHFTKDV KAA ANQMRNFLVR ASCRLRLPEP

[0532] KEYLIMGLDG ATYDLEGHPQ YLLDSNSWIE EMPSERLCRS TRQRAACAQL NDFLQEYGTQ

[0533] GCQV

[0534] (SEQ ID NO :99)

[0535] 9. LDL 受体家族的配体

[0536] P05067 ;A4_HUMAN

[0537] P12023 ;A4_MOUSE

[0538] P05067 ;A4_HUMAN

[0539] MLPGLALLLL AAWTARALEV PTDGNAGLLA EPQIAMFCGR LNMHMNVQNG KWSDSPSGTK

[0540] TCIDTKEGIL QYCQEVPEL QITNVVEANQ PVTIQNWCKR GRKQCKTHPH FVIPYRCLVG

[0541] EFVSDALLVP DKCKFLHQR MDVCETHLHW HTVAKETCSE KSTNLHDYGM LLPCGIDKFR

- [0542] GVEFVCCPLA EESDNVDSAD AEEDSDVWW GGADTDYADG SEDKVVEVAE EEEVAEVEEEE
[0543] EADDDDEDDED GDEVEEEAEE PYEEATERTT SIATTTTTTTT ESVEEVVREV CSEQAETGPC
[0544] RAMISRWFYD VTEGKCAPFF YGGCGGNRNN FDTEEYCMAY CGSAMSQSL KTTQEPLARD
[0545] PVKLPTTAAS TPDAVDKYLE TPGDENEHAH FQKAKERLEA KHRERMSQVM REWEEAERQA
[0546] KNLPKADKKA VIQHFQEKVE SLEQEAAANER QQLVETHMAR VEAMLNDRRR LALENYITAL
[0547] QAVPPRPRHV FNMLKKYVRA EQKDRQHTLK HFEHVRMVDK KAAQIRSQV MTHLRVIYER
[0548] MNQSLSLLYN VPAVAEEIQD EVDELLQKEQ NYSDDVLNMI ISEPRISYGN DALMPSLTET
[0549] KTTVELLPVN GEFSLDDLQP WHSFGADSV ANTENEVEPV DARPAADRGL TTRPGSGLTN
[0550] IKTEEISEVK MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIATVIVITL
[0551] VMLKKKQYTS IHGVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN
[0552] (SEQ ID NO :100)
[0553] 10. 内分泌和外分泌受体配体
[0554] P01241 ;SOMA_HUMAN
[0555] P06880 ;SOMA_MOUSE
[0556] Q9UBU3 ;GHRL_HUMAN
[0557] Q9EQX0 ;GHRL_MOUSE
[0558] P01241 ;SOMA_HUMAN
[0559] MATGSRTSL LAFGLLCLPW LQEGSAFPTI PLSRLFDNAM LRAHRLHQLA FDTYQEFEEA
[0560] YIPKEQKYSF LQNPQTSLCF SESIPTPSNR EETQQKSNLE LLRISLLLIQ SWLEPVQFLR
[0561] SVFANSLVYG ASDSNVYDLL KDLEEGIQTL MGRLEDGSPR TGQIFKQYTS KFDTNSHNDD
[0562] ALLKNYGLLY CFRKMDMKVE TFLRIVQCRS VEGSCGF
[0563] (SEQ ID NO :101)
[0564] Q9UBU3 ;GHRL_HUMAN
[0565] MPSPGTVC SL LLLGMLWLDL AMAGSSFLSP EHQRVQQRKE SKKPPAKLQP RALAGWLRPE
[0566] DGGQAEGAED ELEVRFNAPF DVGIKLSGVQ YQQHSQALGK FLQDILWEEA KEAPADK (SEQ ID NO :102)
[0567] 11. 转化生长因子配体
[0568] P01137 ;TGFB1_HUMAN
[0569] P04202 ;TGFB1_MOUSE
[0570] P01137 ;TGFB1_HUMAN
[0571] MPSSGLRLLL LLLPLLWLLV LTPGRPAAGL STCKTIDMEL VKRKRIEAIR GQILSKLRLA
[0572] SPSSQGEVPP GPLPEAVLAL YNSTRDRVAG ESAEPEPEPE ADYYAKEVTR VLMVETHNEI
[0573] YDKFKQSTHS IYMFNTSEL REAVPEPVLL SRAELRLLRL KLKVEQHVEL YQKYSNNSWR
[0574] YLSNRL LAPS DSPEWLSFDV TGVVRQWLSR GGEIEGFRLS AHCSCDSRDN TLQVDINGFT
[0575] TGRRGDLATI HGMNRPFLLL MATPLERAQH LQSSRHRRAL DTNYCFSSTE KNCCVRQLYI
[0576] DFRKDLGWKW IHEPKGYHAN FCLGPCPYIW SLDTQYSKVL ALYNQHNPQA SAAPCCVPQA
[0577] LEPLPIVYV GRKPKVEQLS NMIVRSCKCS
[0578] (SEQ ID NO :103)
[0579] 12. 趋化因子受体配体

- [0580] P13500 ;CCL2_HUMAN
- [0581] P10148 ;CCL2_MOUSE
- [0582] P13500 ;CCL2_HUMAN
- [0583] MKVSAALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP
- [0584] KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT (SEQ ID NO :104)
- [0585] 13. 整联蛋白
- [0586] P05556 ;ITB1_HUMAN
- [0587] P09055 ;ITB1_MOUSE
- [0588] P05556 ;ITB1_HUMAN
- [0589] MNLQPIFWIG LISSVCCVFA QTDENRCLKA NAKSCGECIQ AGPNCGWCTN STFLQEGMPT
- [0590] SARCDLEAL KKGKCPPDDI ENPRGSKDIK KNKNVTNRSK GTAEKLPED ITQIQPQQLV
- [0591] LRLRSGEPT FTLKFKRAED YPIDLYYLM LSYSMKDDLE NVKSLGTDLM NEMRRITSDF
- [0592] RIGFGSFVEK TVMPYISTTP AKLRNPCTSE QNCTSPFSYK NVLSLTNKGE VFNELVGKQR
- [0593] ISGNLDSPEG GFDAIMQVAV CGSLIGWRNV TRLLVFSTDA GFHFAGDGKL GGIVLPNDGQ
- [0594] CHLENNMYTM SHYYDYPSIA HLVQKLENN IQTIFAVTEE FQPVYKELKN LIPKSAVGTL
- [0595] SANSSNVIQL IIDAYNSLSS EVILENGKLS EGVITISYKSY CKNGVNGTGE NGRKCSNISI
- [0596] GDEVQFEISI TSNKCPKKDS DSFKIRPLGF TEEVEVILQY ICECECQSEG IPESPKCHEG
- [0597] NGTFECGACR CNEGRVGRHC ECSTDEVNSE DMDAYCRKEN SSEICSNNGE CVCQGQVCRK
- [0598] RDNTNEIYSG KFCECDNFNC DRSNGLICGG NGVCKCRVCE CNPNYTGSA CDSLDTSTCE
- [0599] ASNGQICNGR GICECGVCKC TDPKFQGGTC EMCQTCLGVC AEHKECVQCR AFNKGEKKDT
- [0600] CTQECSYFNI TKVESRDKLP QPVQPDVSH CKEKDVDDCW FYFTYSVNGN NEVMVHVVEN
- [0601] PECPTGPDII PIVAGVVAGI VLI GLALLLI WKLLMIHDR REFAKFEKEK MNAKWDGTEN
- [0602] PIYKSAVTTV VNPKEYEGK (SEQ ID NO :105)
- [0603] 14. 白细胞介素
- [0604] Q13169 ;Q13169_HUMAN
- [0605] Q0PGS4 ;Q0PGS4_MOUSE
- [0606] Q13169 ;Q13169_HUMAN
- [0607] MYRMQLLSCL ALILALVTNS APTSSSTKKT KKTQLQLEHL LLDLQMILNG INNYKNPKLT
- [0608] RMLTFKFYMP KKATELKQLQ CLEELKPLE EVLNLAQSKN FHLRPRDLIS NINVIVLELK
- [0609] GSETTFMCEY ADETATIVEF LNRWITFCQS IISTLT
- [0610] (SEQ ID NO :106)
- [0611] 15. 分化因子样骨分化因子
- [0612] P13497 ;BMP1_HUMAN
- [0613] P98063 ;BMP1_MOUSE
- [0614] P13497 ;BMP1_HUMAN
- [0615] MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE
- [0616] EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPQRGACG RWRGRSRSR
- [0617] AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY
- [0618] RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFKGI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN

- [0619] IQPGQEYNFL KMEPQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG
[0620] QRRLSKGDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW RISVTPGEKI
[0621] ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS
[0622] NWVGKGFFAV YEAI CGGDVK KDYGHIQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF
[0623] EIERHDSCAY DYLEV RDGHS ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKFV SDGSINKAGF
[0624] AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLTKLNG
[0625] SITSPGWPKE YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS LQFDF FETEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK
[0626] LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF FSDKDECSKD NGGCQQDCVN
[0627] TFGSYECQCR SGFVLHDNKH DCKEAGCDHK VTSTSGTITS PNWPDKYPSK KECTWAISST
[0628] PGHRVKLTFM EMDIESQPEC AYDHLEVPDG RDAKAPVLGR FCGSKKPEPV LATGSRMFLR
[0629] FYSDNSVQRK GFQASHATEC GGQVRADVKT KDLYSHAQFG DNNYPGGVDC EWVIVAEEGY
[0630] GVELVFQTFE VEEETDCGYD YME LFDGYDS TAPRLGRYCG SGPPEEVYSA GDSVLVKFHS
[0631] DDTITKKG FH LRYTSTKFQD TLHSRK (SEQ ID NO :107)
[0632] 16. 胃泌素释放肽
[0633] P07492 ;GRP_HUMAN
[0634] Q8R1I2 ;GRP_MOUSE
[0635] P07492 ;GRP_HUMAN
[0636] MRGSELPLVL LALVLCLAPR GRAVPLPAGG GTVLTKMYPR GNHWAVGHLM GKKSTGESSS
[0637] VSERGSLKQQ LREYIRWEEA ARNLLGLIEA KENRNHQPPQ PKALGNQQPS WDSSEDSSNFK
[0638] DVGSKGKVGR LSAPGSQREG RNPQLNQQ (SEQ ID NO :108)
[0639] 17. 血管活性肠肽 (VIP)
[0640] P01282 ;VIP_HUMAN
[0641] P32648 ;VIP_MOUSE
[0642] P01282 ;VIP_HUMAN
[0643] MDTRNKAQLL VLLTLLSVLF SQTSAWPLYR APSALRLGDR IPFEGANEPD QVSLKEDIDM
[0644] LQNALAENDT PYYDVSRNAR HADGVFTSDF SKLLGQLSAK KYLES LMGR VSSNISED PV
[0645] PVKRHS DAVF TDNYTRLRKQ MAVKKYLSI LNGKRSSEGE SPDFPEELEK (SEQ ID NO :109)
[0646] 18. 胰岛素和胰岛素样生长因子
[0647] P01308 ;INS_HUMAN
[0648] P01343 ;IGF1A_HUMAN
[0649] P05019 ;IGF1B_HUMAN
[0650] P05017 ;IGF1_MOUSE
[0651] P01308 ;INS_HUMAN
[0652] MALWMRLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED
[0653] LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN (SEQ ID NO :110)
[0654] P01343 ;IGF1A_HUMAN
[0655] MGKISSLPTQ LFKCCFCDFL KVKMHTMSSS HLFYLALCLL TFTSSATAGP ETLCGAELVD
[0656] ALQFVCGDRG FYFNKPTGYG SSSRRAPQTG IVDECCFRSC DLRRLEMYCA PLKPAKSARS
[0657] VRAQRHTDMP KTQKEVHLKN ASRGSAGNKN YRM (SEQ ID NO :111)

- [0658] P05019 ;IGF1B_HUMAN
- [0659] MGKISSSLPTQ LFKCCFCDFL KVKMHTMSSS HLFYLALCLL TFTSSATAGP ETLCGAELVD
- [0660] ALQFVCGDRG FYFNKPTGYG SSSRRAPQTG IVDECCFRSC DLRRLEMYCA PLKPAKSARS
- [0661] VRAQRHTDMP KTQKYQPPST NKNTKSQRRK GWPKTHPGGE QKEGTEASLQ IRGKKKEQRR
- [0662] EIGSRNAECR GKKGK
- [0663] (SEQ ID NO :112)
- [0664] 19. 降血钙素和降血钙素基因相关肽
- [0665] P01258 ;CALC_HUMAN
- [0666] P70160 ;CALC_MOUSE
- [0667] P01258 ;CALC_HUMAN
- [0668] MGFQKFSPFL ALSILVLLQA GSLHAAPFRS ALESSPADPA TLSEDEARLL LAALVQDYVQ
- [0669] MKASELEQEQ EREGSSLDSP RSKRCGNLST CMLGTYTQDF NKFHTFPQTA IGVGAPGKKR
- [0670] DMSSDLERDH RPHVSMPQNA N(SEQ ID NO :113)
- [0671] 20. 炎性细胞样肥大细胞、嗜曙红细胞、巨噬细胞、单核细胞和嗜中性白细胞的配体
- [0672] P09603 ;CSF1_HUMAN
- [0673] P07141 ;CSF1_MOUSE
- [0674] P0C0L5 ;C04B_HUMAN
- [0675] P01029 ;C04B_MOUSE
- [0676] P09603 ;CSF1_HUMAN
- [0677] MTAPGAAGRC PPTTWLGSLL LLVCLLASRS ITEEVSEYCS HMIGSGHLQS LQRLIDSQME
- [0678] TSCQITFEFV DQEQLKDPVC YLKKAFLLVQ DIMEDTMRFR DNTPNIAIV QLQELSLRLK
- [0679] SCFTKDYEELH DKACVRTFYE TPLQLLEKVK NVFNETKNLL DKDWNIFSKN CNNSFAECSS
- [0680] QDVVTKPDCN CLYPKAIPSS DPASVSPHQP LAPSMAPVAG LTWEDSEGTE GSSLLPGEQP
- [0681] LHTVDPGSAK QRPPRSTCQS FEPPETPVVK DSTIGGSPQP RPSVGAFNPG MEDILDSAMG
- [0682] TNWVPEEASG EASEIPVPQG TELSPSRPGG GSMQTEPARP SNFLSASSPL PASAKGQQPA
- [0683] DVTGTALPRV GPVRPTGQDW NHTPQKTDHP SALLRDPPEP GSPRISSLRP QGLSNPSTLS
- [0684] AQPQLSRSHS SGSVLPLGEL EGRRSTRDRR SPAEPEGGPA SEGAARPLPR FNSVPLTDTG
- [0685] HERQSEGSSS PQLQESVFHL LVPSVILVLL AVGGLLFYRW RRRSHQEPQR ADSPLEQPEG
- [0686] SPLTQDDRQV ELPV(SEQ ID NO :114)
- [0687] 根据本发明的有用的另外的靶向肽包括但不限于以下：
- [0688] GTFFYGGCRAKRNNFKSAED(SEQ ID NO :115)
- [0689] GPFFYGGCGNRNNFDTEEY(SEQ ID NO :116)
- [0690] GTFFYGGCRGKRNNFKTEEY(SEQ ID NO :117)
- [0691] GTFFYGGSRGKRNNFKTEEY(SEQ ID NO :118)
- [0692] GRFFYGGSRGKRNNFRTEEY(SEQ ID NO :119)
- [0693] GTFFYGGSRGRRNNFRTEEY(SEQ ID NO :120)
- [0694] CTFVYGGCRAKRNNFKSAED(SEQ ID NO :121)
- [0695] CPFFYGGCGNRNNFDTEEY(SEQ ID NO :122)

- [0696] CTFFYGGCRGRNNFKTEEY (SEQ ID NO :123)
 [0697] CTFFYGGSRGRNNFKTEEY (SEQ ID NO :124)
 [0698] CRFFYGGSRGRNNFRTEEY (SEQ ID NO :125)
 [0699] CTFFYGGSRGRNNFRTEEY (SEQ ID NO :126)
 [0700] TFVYGGCRAKRNNFKSAEDG (SEQ ID NO :127)
 [0701] PFFYGGCGGNRNNFDTEEYG (SEQ ID NO :128)
 [0702] TFFYGGCRGRNNFKTEEYG (SEQ ID NO :129)
 [0703] TFFYGGSRGRNNFKTEEYG (SEQ ID NO :130)
 [0704] RFFYGGSRGRNNFRTEEYG (SEQ ID NO :131)
 [0705] TFFYGGSRGRNNFRTEEYG (SEQ ID NO :132)
 [0706] TFVYGGCRAKRNNFKSAEDC (SEQ ID NO :133)
 [0707] PFFYGGCGGNRNNFDTEEYC (SEQ ID NO :134)
 [0708] TFFYGGCRGRNNFKTEEYC (SEQ ID NO :135)
 [0709] TFFYGGSRGRNNFKTEEYC (SEQ ID NO :136)
 [0710] RFFYGGSRGRNNFRTEEYC (SEQ ID NO :137)
 [0711] TFFYGGSRGRNNFRTEEYC (SEQ ID NO :138)

[0712] 在一个实施方案中,本发明的肽与转位结构域(例如,神经毒素的转位结构域)缀合。根据本发明的有用的神经毒素转位结构域肽序列包括但不限于以下。肽序列选自序列内的任何亚单位。基于符合本发明规定的序列,选择肽片段。

- [0713] 1. A 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/A) (EC 3.4.24.69) (Bontoxilysin-A)
 [0714] P10845 ;BXA1_CLOB0
 [0715] MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNVGQM QP1VKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEGDLN
 [0716] PPPEAKQVPV SYDSTYLST DNEKDNYLKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG
 [0717] STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFSGH EVLNLTRNGY
 [0718] GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA GKFATDPAVT LAHELIHAGH RLYGIAINPN
 [0719] RVFKVNTNAY YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIASLTNKA
 [0720] KSIVGTTASL QYMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT EDNFVKFFKV
 [0721] LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNITYDGF NLRNTNLAAN FNGQNTTEINN MNFTKLKNFT
 [0722] GLFEFYKLLC VRGIITSKTK SLDKGYNKAL NDLCKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE
 [0723] ITSDTNIEAA EENISLDLIQ QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG
 [0724] KKYELDKYTM FHYLRAQEFH HGKSRIALTN SVNEALLNPS RVYTFSSDY VKKVNKATEA
 [0725] AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIIPYIGPA LNIGNMLYKD DFVGALIFSG
 [0726] AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK
 [0727] VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ YNQYTEEEKN NINFNIDDL SSKLNESINKA
 [0728] MININKFLNQ CSVSYLMNSM IPYGVKRLD FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRDKDK
 [0729] VNNTLSTDIP FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSRYSKINI
 [0730] GSKVNFDPID KNQIQLFNLE SSKIEVILKN AIVYNSMYEN FSTSFWRIP KYFNSISLNN
 [0731] EYTIINCMEY NSGWKVSLNY GEIIWTLQDT QEIKQRVVFY YSQMINISDY INRWIFVTIT
 [0732] NNRLNNSKIY INGRLLDQKP ISNLGNIHAS NNIMFKLDGC RDTHRYIWIW YFNLFDKELN

- [0733] EKEIKDLYDN QNSNGILKDF WGDYLQYDKP YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGPR
- [0734] GSVMTTNIYL NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNE YRLATNASQA
- [0735] GVEKILSALE IPDVGNLSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI GFHQFNNAK
- [0736] LVASNWNRRQ IERSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL (SEQ ID NO :139)
- [0737] 2. B 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/B) (EC 3. 4. 24. 69) (Bontoxilysin-B)
- [0738] B1INP5 ;BXB_CLOBK
- [0739] MPVTINNFNY NDPIDNNII MMEPPFARGT GRYYKAFKIT DRIWIIPERY TFGYKPEDFN
- [0740] KSSGIFNRDV CEYYDPDYL NDKKNIFLQ TMIKLFNRIK SKPLGEKLE MIINGIPYLG
- [0741] DRRVPLEEFN TNIA SVTVNK LISNPGEVER KKGIFANLII FGP GPVLNEN ETIDIGIQNH
- [0742] FASREGFGGI MQMKFCPEYV SVFNNVQENK GASIFNRRGY FSDPALILMH ELIHVLHGLY
- [0743] GIKVDDLPIV PNEKKFFMQS TDAIQAEELY TFGGQDPSII TPSTDKSIYD KVLQNFRGIV
- [0744] DRLNKVLVCI SDPNININII KKNFKDKYKF VEDSEGKYSI DVESFDKLYK SLMFGFTETN
- [0745] IAENYKIKTR ASYFSDSLPP VKIKNLLDNE IYTIIEGFNI SDKDMEKEYR GQNKAINKQA
- [0746] YEEISKEHLA VYKIQMCKSV KAPGICIDVD NEDLFFIADK NSFSDLSKN ERIEYNTQSN
- [0747] YIENDFPINE LILDTDLISK IELPSENTES LTDFNVDVPV YEKQPAIKKI FTDENTIFQY
- [0748] LYSQTFPLDI RDISLTSSFD DALLFSNKVY SFFSMDYIKT ANKVVEAGLF AGWVKQIVND
- [0749] FVIEANKSNT MDKIADISLI VPIGLALNV GNETAKGNFE NAFEIAGASI LLEFIPELLI
- [0750] PVVGAFLLS YIDNKNKIIK TIDNALTNRN EKWSDMYGLI VAQWLSTVNT QFYTIKEGMY
- [0751] KALNYQAQAL EEIIKYRYNI YEKEKSNIN IDFNDSKLN NEGINQAIDN INNFINGCSV
- [0752] SYLMKKMIPL AVEKLLDFDN TLKKNLLNYI DENKLYLIGS AEYEKSKVKN YLKTIMPFDL
- [0753] SIYTDNTILI EMFNKYNSEI LNNIILNRY KDNNDLDSG YGAKVEVYDG VELNDKNQFK
- [0754] LTSSANSKIR VTQNNIIFN SVFLDFSVSF WIRIPKYKND GIQNYIHNEY TIINCMKNNS
- [0755] GWKISIRGNR IIWTLIDING KTKSVFFEYN IREDISEYIN RWWFVTITNN LNNAKIYING
- [0756] KLESNTDIKD IREVIANGEI IFKLDGDIDR TQFIWMKYFS IFNTELSQSN IEERYKIQSY
- [0757] SEYLKDFWGN PLMYNKEYYM FNAGNKNSYI KLKSDSPVGE ILTRSKYNQN SKYINRYDLY
- [0758] IGEKFIIRRK SNSQSINDDI VRKEDIYLD FFNLNQEWV YTYKYFKKEE EKLFLAPISD
- [0759] SDEFYNTIQI KEYDEQPTYS CQLLFKKDEE STDEIGLIGI HRFYESGIVF EBYKDYFCIS
- [0760] KWYLKEVKRK PYNLKLGNCW QFIPKDEGWT E (SEQ ID NO :140)
- [0761] 3. C1 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/C1) (EC 3. 4. 24. 69) (Bontoxilysin-C1)
- [0762] P18640 ;BXC1_CLOB0
- [0763] MPITINNFNY SDPVDNKNIL YLDTHLNTLA NEPEKAFRIT GNIWVIPDRF SRNSNPNLNK
- [0764] PPRVTSPKSG YYDPNYLSTD SDKDPFLKEI IKLFKRINSR EIGEELIYRL STDIPFPGNN
- [0765] NTPINTDFDF VDFNSVDVKT RQGNNWVKTG SINPSVIITG PRENIIDPET STFKLTNNTF
- [0766] AAQEGFGALS IISISPRFML TYSNATNDVG EGRFSKSEFC MDPIILILMHE LNHAMHNLG
- [0767] IAIPNDQTIS SVTSNIFYSQ YNVKLEYAEI YAFGGPTIDL IPKSARKYFE EKALDYRSI
- [0768] AKRLNSITTA NPSSFNKYIG EYKQKLIRKY RFVVESSGEV TVNRNKFVEL YNELTQIFTE
- [0769] FNYAKIYNVQ NRKIYLSNVY TPVTANILDD NVYDIQNGFN IPKSNLNVLF MGQNLNRNPA
- [0770] LRKVNPNML YLFTKFCHKA IDGRSLYNKT LDCRELLVKN TDLPIFGDIS DVKTDIFLRK
- [0771] DINEETEVIY YPDNVSDQV ILSKNTSEHG QLDLLYPSID SESEILPGEN QVFYDNRTQN

- [0772] VDYLNSYYYL ESQKLSDNVE DFTFTRSIEE ALDNSAKVYT YFPTLANKVN AGVQGGFLFM
- [0773] WANDVVEDFT TNILRKDTLD KISDVSAIIP YIGPALNISN SVRRGNFTEA FAVTGVITILL
- [0774] EAFPEFTIPA LGAFVIYSKV QERNEIIKTI DNCLEQRIKR WKDSYEWMMG TWLSRIITQF
- [0775] NNISYQMYDS LNYQAGAIKA KIDLEYKKYS GSDKENIKSQ VENLKNSLDV KISEAMNNIN
- [0776] KFIRESVITY LFKNMLPKVI DELNEFDRNT KAKLINLIDS HNIILVGEVD KLKAKVNSNF
- [0777] QNTIPFNIFS YTNSLLKDI INEYFNNIND SKILSLQNRK NTLVDTSGYN AEVSEEGDVQ
- [0778] LNPIFPDFDK LGSSGEDRGK VIVTQENIV YNSMYESFSI SFWIRINKWV SNLPGYTIID
- [0779] SVKNSGWSI GIISNLFVFT LKQNEDEQS INFSYDISN APGYNKWFFV TVTNMMGMN
- [0780] KIYINGKLID TIKVKELTGI NFSKTITFEI NKIPDTGLIT SDSDNINMWI RDFYIFAKEL
- [0781] DGKDINILFN SLQYTNVVKD YWGNDLRYNK EYMYVNIDYL NRYMYANSRQ IVFNTRRRNN
- [0782] DFNEGKIII KRIRGNTNDT RVRGGDILYF DMTINNKAYN LFMKNETMYA DNHSTEDIYA
- [0783] IGLREQTKDI NDNIIFQIQP MNNTYYYASQ IFKSNFNGEN ISGICSIGTY RFRLGGDWYR
- [0784] HNYLVPTVKQ GNYASLLEST STHWGFVPVS E (SEQ ID NO :141)
- [0785] 4. D 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/D) (EC 3. 4. 24. 69) (Bontoxilysin-D)
- [0786] P19321 ;BXD_CLOB0
- [0787] MTWPVKDFNY SDPVNDNDIL YLRIPQNKLI TTPVKAFMIT QNIWVIPERF SSDTNPSLSK
- [0788] PPRPTSKYQS YYDPSYSTD EQKDTFLKGI IKLFKRINER DIGKKLINYL VVGSPFMGDS
- [0789] STPEDTFDFT RHTTNIAVEK FENGSWKVTN IITPSVLIFG PLPNILDYTA SLTLQGQQSN
- [0790] PSFEGFGTSL ILKVAPEFLI TFSDVTSNQS SAVLGKSIFC MDPVIALMHE LTHSLHQLYG
- [0791] INIPSDKRIR PQVSEGFFSQ DGPVNQFEEL YTFGGLDVEI IPQIERSQLR EKALGHYKDI
- [0792] AKRLNNINKT IPSSWISNID KYKKIFSEKY NFDKNTGNF VVNIDKFNSL YSDLTNMSE
- [0793] VVYSSQYNVK NRTHYFSRHY LPVFANILDD NIYTIRDGFN LTNKGFNIEN SGQNIERNPA
- [0794] LQKLSSSESVV DLFTKVCLRL TKNSRDDSTC IKVKNRPLPY VADKDSISQE IFENKIITDE
- [0795] TNVQNYSDKF SLDESILDGQ VPINPEIVDP LLPNVNMEPL NLPGEEIVFY DDITKYVDYL
- [0796] NSYYYLESQK LSNNVENITL TTSVEEALGY SNKIYTFPLS LAEKNVKGQV AGLFLNWANE
- [0797] VVEDFTTNIM KKDTLDKISD VSVIIPYIGP ALNIGNSALR GNFNQAFATA GVAFLLEGFP
- [0798] EFTIPALGVF TFYSSIQERE KIIKTIENCL EQRVKRWKDS YQWMVSNWLS RITTQFNHIN
- [0799] YQMYDSL SYQ ADAIKAKIDL EYKKYSGSDK ENIKSQVENL KNSLDVKISE AMNNINKFIR
- [0800] ECSVTYLFKN MLPKVIDELN KFDLRTKTEL INLIDSHNII LVGEVDRLKA KVNESFENTM
- [0801] PFNIFSYTNN SLLKDIINEY FNSINDSKIL SLQNKKNALV DTSGYNAEVR VGDNVQLNTI
- [0802] YTNDFKLSSS GDKIIVNLNN NILYSAIYEN SSVSFWIKIS KDLTNSHNEY TIINSIEQNS
- [0803] GWKLCIRNGN IEWILQDVNR KYKSLIFDYS ESLSHTGYTN KWFFVTITNN IMGYMKLYIN
- [0804] GELKQSQKIE DLDEVKLDKT IVFGIDENID ENQMLWIRDF NIFSKELSNE DINIVYEGQI
- [0805] LRNVIKDYWG NPLKFDTEYY IINDNYIDRY IAPESNVVLV VQYPDRSKLY TGNPITIKSV
- [0806] SDKNPYSRIL NGDNIIHML YNSRKYMIIR DTDTIYATQG GECSQNCVYA LKLQSNLGN
- [0807] GIGIFSINKI VSKNKYCSQI FSSFRENTML LADIYKPWRF SFKNAYTPVA VTNYETKLLS
- [0808] TSSFWKFISR DPGWVE (SEQ ID NO :142)
- [0809] 5. E 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/E) (EC 3. 4. 24. 69) (Bontoxilysin-E)
- [0810] Q00496 ;BXE_CLOB0

[0811] MPKINSFNYN DPVNDRTILY IKPGGCQEFY KSFNIMKNIW IIPERNVIGT TPQDFHPPTS
[0812] LKNGDSSYYD PNYLQSDEEK DRFLKIVTKI FNRINNLSG GILLEELSKA NPYLGNDNTP
[0813] DNQFHIGDAS AVEIKFSNGS QDILLPNVII MGAEPDLFET NSSNISLRNN YMPSNHRFGS
[0814] IAIVTF SPEY SFRFNDNCMN EFIQDPALTL MHELIHSLHG LYGAKGITT K YTITQKQNPL
[0815] ITNIRGTNIE EFLTFGGTDL NIITSAQSND IYTNLLADYK KIASKLSKVQ VSNPLLNPYK
[0816] DVFEAKYGLD KDASGIYSVN INKFNDIFKK LYSFTEFDLR TKFQVKCRQT YIGQYKYFKL
[0817] SNLLNDSIYN ISEGYNINNL KVNFRGQAN LNPRIITPIT GRGLVKKIIR FCKNIVSVKG
[0818] IRKSICIEIN NGELFFVASE NSYNDNINT PKEIDDTVTS NNNYENDLDQ VILNFNSESA
[0819] PGLSDEKLN L TIQNDAYIPK YDSNGTSDIE QHDVNELNVF FYLDAQKVPE GENNVNLTSS
[0820] IDTALLEQPK IYTFFSSEFI NNVNKPVQAA LFSVWIQQVL VDFTEANQK STVDKIADIS
[0821] IVVPYIGLAL NIGNEAQKGN FKDALELLGA GILLEFEPEL LIPTILVFTI KSFLGSSDNK
[0822] NKVIKAINNA LKERDEKWKE VYSFIVSNWM TKINTQFNKR KEQMYQALQN QVNAIKTIIE
[0823] SKYNSYTL EE KNELTNKYDI KQIENELNQK VSIAMNNIDR FLTESSISYL MKIINEVKIN
[0824] KLREYDENVK TYLLNYIIQH GSILGESQQE LNSMVTDTLN NSIPFKLSSY TDDKILISYF
[0825] NKFFKRIKSS SVLNMRYKND KYVDTSGYDS NININGDVYK YPTNKNQFGI YNDKLSEVNI
[0826] SQNDYIIYDN KYKNFSISFW VRIPNYDNKI VNVNNEYTII NCMRDNNSGW KVSLNHNEII
[0827] WTFEDNRGIN QKLAFNYGNA NGISDYINKW IFVTITNDRL GDSKLYINGN LIDQKSILNL
[0828] GNIHVSDNIL FKIVNCSYTR YIGIRYFNIF DKELDETEIQ TLYSNPNTN ILKDFWGNYL
[0829] LYDKEYYLLN VLKPNNFIDR RKDSTLSINN IRSTILLANR LYSGIKVKIQ RVNNSSTNDN
[0830] LVRKNDQVYI NFVASKTHLF PLYADTATTN KEKTIKISSS GNRFNQVVVM NSVGNC TMNF
[0831] KNNNGNIGL LGFKADTVVA STWYYTHMRD HTNSNGCFWN FISEEHGWQE K (SEQ ID NO :
143)

[0832] 6. F 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/F) (EC 3.4.24.69) (Bontoxilysin-F)

[0833] P30996 ;BXF_CLOB0

[0834] MPVAINSFNY NDPVNDDTIL YMQIPYEES KKYKAFEIM RNVWIIPERN TIGTNPSDFD
[0835] PPASLKNSS AYYDPNYLTT DAEKDRYLKT TIKLFKRINS NPAGKVLLQE ISYAKPYLGN
[0836] DHTPIDEFSP VTRTTSVNIK LSTNVESSML LNLVLGAGP DIFESCCYPV RKLIDPDVVY
[0837] DPSNYGFGSI NIVTF SPEYE YTFNDISGGH NSSTESFIAD PAISLAHELI HALHGLYGAR
[0838] GVTYEETIEV KQAPLMIAEK PIRLEEFLTF GGQDLNIITS AMKEKIYNL LANYEKIATR
[0839] LSEVNSAPPE YDINEYKDYF QWKYGLDKNA DGSYTVNENK FNEIYKKLYS FTESDLANKF
[0840] KVKCRNTYFI KYEFLKVPNL LDDDIYTVSE GFNIGNLAVN NRGQSIKLN KIIDSIDPKG
[0841] LVEKIVKFCCK SVIPRKGTKA PPRLCIRVNN SELFFVASES SYNENDINTP KEIDDTTNLN
[0842] NNYRNNLDEV ILDYNSTIP QISNRTLNTL VQDNSYVPRY DSNGTSEIEE YDVVDNFVFF
[0843] YLHAQKVPEG ETNISLTSSI DTALLEESKD IFFSSEFIDT INKPVNAALF IDWISKVIRD
[0844] FTTEATQKST VDKIADISLI VPYVGLALNI IIEAEKGNFE EAFELLGVGI LLEFVPELTI
[0845] PVILVFTIKS YIDSYENKNK AIKAINNSLI EREAKWKEIY SWIVSNWLTR INTQFNKRKE
[0846] QMYQALQNQV DAIKTAIEYK YNNYTSDEKN RLESEYNINN IEEELNKKVS LAMKNIERFM
[0847] TESSISYLMK LINEAKVGKL KKYDNHVKSD LLNYILDHRS ILGEQTNELS DLVTSTLNSS
[0848] IPFELSSYTN DKILIIYFNR LYKKIKDSSI LDMRYENNKF IDISGYGSNI SINGNVYIYS

- [0849] TNRNQFGIYN SRLSEVNIAQ NNDIIYNSRY QNFSISFWVR IPKHYKPMNH NREYTIINCM
- [0850] GNNNSGWKIS LRTVRDCEII WTLQDTSNGK ENLIFRYEEL NRISNYINKW IFVTITNNRL
- [0851] GNSRIYINGN LIVEKSISNL GDIHVSDNIL FKIVGCDDDET YVGIRYFKVF NTELDKTEIE
- [0852] TLYSNEPDPS ILKNYWGNYL LYNKKYYLFN LLRKDKYITL NSGILNINQQ RGVTEGSSVFL
- [0853] NYKLYEGVEV IIRKNGPIDI SNTDNFVRKN DLAYINVVDR GVEYRLYADT KSEKEKIIRT
- [0854] SNLNDSLGQI IVMDSIGNNC TMNFQNNNGS NIGLLGFHSN NLVASSWYYN NIRRNTSSNG
- [0855] CFWSSISKEN GWKE (SEQ ID NO :144)
- [0856] 7. G 型肉毒杆菌神经毒素 (BoNT/G) (EC 3. 4. 24. 69) (Bontoxilysin-G)
- [0857] Q60393 ;BXG_CLOBO
- [0858] MPVNIKXFNY NDPINDDII MMEPFNDPGP GTYYKAFRII DRIWIVPERF TYGFQPDQFN
- [0859] ASTGVFSKDV YEYDPTYLK TDAEKDKFLK TMIKLFNRIN SKPSGQRLLD MIVDAIPYLG
- [0860] NASTPPDKFA ANVANVSINK KIIQPGAEDQ IKGLMTNLII FGP GPVLSN FTDSMIMNGH
- [0861] SPISEGFGAR MMIRFCPSCL NVFNQENK DTSIFSRRAY FADPALTLMH ELIHLVHLGLY
- [0862] GIKISNLPIT PNTKEFFMQH SDPVQAEELY TFGGHDPSVI SPSTDMNIYN KALQNFQDIA
- [0863] NRLNIVSSAQ GSGIDISLYK QIYKNKYDFV EDPNGKYSVD KDKFDKLYKA LMFSGFTETNL
- [0864] AGEYGIKTRY SYFSEYLPPI KTEKLLDNTI YTQNEGFNIA SKNLKTEFNG QNKAVNKEAY
- [0865] EEISLEHLVI YRIAMCKPVM YKNTGKSEQC IIVNEDLFF IANKDSFSKD LAKAETIAYN
- [0866] TQNNTIENNF SIDQLILDND LSSGIDLNE NTEPFTNFDD IDIPVYIKQS ALKKIFVDGD
- [0867] SLFEYLHAQT FPSNIENLQL TNSLNDALRN NKNVYTFST NLVEKANTVV GASLFWNVVK
- [0868] GVIDDFTSES TQKSTIDKVS DVSIIIPYIG PALNVGNETA KENFKNAFEI GGAAILMEFI
- [0869] PELIVPIVGF FTLESYVGNK GHIIMTISNA LKKRDQKQWD MYGLIVSQWL STVNTQFYTI
- [0870] KERMYNALNN QSQAIEKIE DQYNRYSEED KMNINIDFND IDFKLNQSIN LAINNIDDFI
- [0871] NQCSISYLMN RMIPLAVKKL KDFDDNLKRD LLEYIDTNEL YLLDEVNLIK SKVNRHLKDS
- [0872] IPFDLSLYTK DTILIQVFNN YISNISSNAI LSLSYRGGRL IDSSGYGATM NVGSDVIFND
- [0873] IGNGQFKLNN SENSNIHAHQ SKFVVYDSMF DNFSINFWVR TPKYNNNDIQ TYLQNEYTII
- [0874] SCIKNDSGWK VSIKGNRIIW TLIDVNAKSK SIFFEYSIKD NISDYINKWF SITITNDRLG
- [0875] NANIYINGSL KKSEKILNLD RINSSNDIDF KLINCTDTK FVWIKDFNIF GRELNATEVS
- [0876] SLYWISSTN TLKDFWGNPL RYDTQYYLFN QGMQNIYIKY FSKASMGETA PRTNFNNAAI
- [0877] NYQNLYLGLR FIIKKASNSR NINNDNIVRE GDYIYLNIDN ISDESRYVYV LVNSKEIQTQ
- [0878] LFLAPINDDP TFYDVLQIKK YYEKTYYNCQ ILCEKDTKTF GLFGIGKFKV DYGYVWDTYD
- [0879] NYFCISQWYL RRISENINKL RLGCNWQFIP VDEGWTE (SEQ ID NO :145)
- [0880] 8. 破伤风毒素 (EC 3. 4. 24. 68) (Tentoxylisin)
- [0881] P04958 ;TETX_CLOTE
- [0882] MPITINNFY SDPVNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIWIVPERY EFGTKPEDFN
- [0883] PPSSLIEGAS EYDPPNYLRT DSDKDRFLQT MVKLFNRIN NVAGEALLDK IINAIPYLG
- [0884] SYSLLDKFD TNSNSVFNLL EQDPSGATTK SAMLTNLIIF GPGPVLNKNE VRGIVLRVDN
- [0885] KNYFPCRDGF GSIQMAFCP EYVPTFDNVI ENITSLTIGK SKYFQDPALL LMHELIHVLH
- [0886] GLYGMQVSSH EIIPSKQEIY MQHTYPIAE ELFTFGGQDA NLISIDIKND LYEKTLDYK
- [0887] AIANKLSQVT SCNDPNIDID SYKQIYQQKY QFDKDSNGQY IVNEDKFQIL YNSIMYGTE

[0888] IELGKKFNIK TRLSYFSMNH DPVKIPNLLD DTIYNDTEGF NIESKDLKSE YKGQNM RVNT
 [0889] NAFRNV DSG LVSKLIGLCK KIIPPTNIRE NLYNRTASLT DLGGELCIKI KNEDLTFIAE
 [0890] KNSFSEEPFQ DEIVSYNTKN KPLNFNYS LD KIIVDYNLQS KITLPNDRTT PVTKGIPYAP
 [0891] EYKSNAASTI EIHNIDDNTI YQYLYAQKSP TTLQRITMTN SVDDALINST KIYSYFPSVI
 [0892] SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK TTIDKISDVS TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN
 [0893] FIGALETTGV VLLLEYIPEI TLPVIAALSI AESSTQKEKI IKTIDNFLEK RYEKWIEVYK
 [0894] LVKAKWLGTV NTQFQKRSYQ MYRSLEYQVD AIKKIIDY EY KIYSGPDKEQ IADEINN LKN
 [0895] KLEEKANKAM ININIFMRES SRSFLVNQMI NEAKKQLLEF DTQSKN ILMQ YIKAN SKFIG
 [0896] ITELKKLESK INKVFSTPIP FSYSKNLDCW VDNEEDIDVI LKKSTILNLD INNDIISDIS
 [0897] GFNSSVITYP DAQLVPGING KATHLVNNE S EVIVHKAMD IEYNDMFNNF TVSFWL RVPK
 [0898] VSASHLEQYG TNEYSISSM KKHSLSIGSG WSVSLKGNNL IWT LKDSAGE VRQITFRDLP
 [0899] DKFNAYLAN K WVFITITNDR LSSANLYING VLMGSAEITG LGAIREDNNI TLKLDR C NNN
 [0900] NQYVSIDKFR IFCKALNPKE IEKLYTSYLS ITFLRDFWGN PLRYDTEYYL IPVASSSKDV
 [0901] QLKNITD YMY LTNAPS YTN KLNIIYRRLY NGLKFIIKRY TPNNEIDSFV KSGDFIKLYV
 [0902] SYNNEHIVG YPKDGN AFNN LDRILRVGYN APGIPLYKKM EAVKLRLD LKT YSVQLKLYDD
 [0903] KNASLGLVGT HNGQIGNDPN RDILIASNWY FNHLKDKILG CDWYFVPTDE GWTND (SEQ ID NO :146)

[0904] 9. 白喉毒素 (DT) (NAD(+)-白喉酰胺 ADP 核糖基转移酶) (EC 2.4.2.36)

[0905] P00588 ;DTX_CORBE

[0906] MLVRGYV VSR KLFASILIGA LLGIGAPPSA HAGADDV VDS SKSFVMENFS SYHG TKPGYV
 [0907] DSIQKGIQKP KSGTQGN YDD DWKGFYSTDN KYDAAGYSVD NENPLSGKAG GVVKVTYPGL
 [0908] TKVLALKVDN AETIKKELGL SLTEPLMEQV GTEEFIKRFG DGASRVVLSL PFAEGSSSVE
 [0909] YINNWEQAKA LSVELEINFE TRGKRQDAM YEYMAQACAG NRVRRSVGSS LSCINLDWDV
 [0910] IRDKTKTKIE SLKEHGPIKN KMSESPNKT V SEEKAKQYLE EFHQTALEHP ELSELKTVTG
 [0911] TNPVFAGANY AAWAVNVAQV IDSETADNLE KTTAALSILP GIGSVMGIAD GAVHHNTEEI
 [0912] VAQSIALSSL MVAQAIPLVG ELVDIGFAAY NFVESIINLF QVVHNSYNRP AYSPGHKTQP
 [0913] FLHDGYAVSW NTVEDSIIRT GFQGESGHI KITAENTPLP IAGVLLPTIP GKLDVNKSKT
 [0914] HISVNGRKIR MRCRAIDGDV TFCRPKSPVY VGNGVHANLH VAFHRSSSEK IHSNEISSDS
 [0915] IGV LGYQKTVDHTKVNSKLS LFFEIKS (SEQ ID NO :147)

[0916] 10. 假单胞杆菌属外毒素

[0917] P11439 ;TOXA_PSEAE

[0918] MHLTPHWIPL VASLG LLAGG SFASAAEEAF DLWNECAKAC VL DLKDG VRS SRMSVDPAIA
 [0919] DTNGQGVLHY SMVLEGGNDA LKLAIDNALS ITSDGLTIRL EGGVEPNKPV RYSYTRQARG
 [0920] SWSLNLVPI GHEKPSNIKV FIHEL NAGNQ LSHMSPIYTI EMGDELLAKL ARDATFFVRA
 [0921] HESNEMQPTL AISHAGVS VV MAQAQPRREK RWSEWASGKV LCLLDPLDGV YNYLAQQRCN
 [0922] LDDTWEGKIY RVLAGNPAKH DLDIKPTVIS HRLHFPEGGS LAALTAHQAC HLPLETFTRH
 [0923] RQPRGWEQLE QCGYPVQRLV ALYLAARLSW NQVDQVIRNA LASPGSGGDL GEAIREQPEQ
 [0924] ARLALT LAAA ESERFVRQGT GNDEAGAASA DVVSLTCPVA AGE CAGPADS GDALLERNYP
 [0925] TGAEFLGDGG DISFSTRGTQ NWTVERLLQA HRQLEERGYV FVG YHGT FLE AAQSIVFGGV

[0926] RARSQDLDAI WRGFYIAGDP ALAYGYAQDQ EPDARGRIRN GALLRVYVPR SSLPGFYRTG

[0927] LTAAPEAAG EVERLIGHPL PLRLDAITGP EEEGGRLETI LGWPLAERTV VIPSAIPTDP

[0928] RNVGGDLDPs SIPDKEQAIS ALPDYASQPG KPPREDLK (SEQ ID NO :148)

[0929] 肽合成

[0930] 至少存在四种获得肽的方式:(1) 从生物体系(例如,组织、血清、尿等)纯化;(Donini P 等, *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1966 ;52(2) :169-85 和 Donini P 等, *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1966 ;52(2) :186-98);(2) 在蛋白质消化之后纯化肽片段;(Schulz-Knappe P 等, *Eur J Med Res*. 1996 ;1(5) :223-36 以及 Kilara A. 和 Panyam D. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003 ;43(6) :607-33);(3) 本领域熟知的基因工程和重组技术 (Martial JA 等, *Science*. 1979 ;205(4406) :602-7);以及(4) 直接化学合成 (Peptide Synthesis and Applications, 1984, 由 John Howl 编 (Methods in Molecular Biology, 第 298 卷), Humana Press, Totowa, NJ. Chemistry of Peptide Synthesis, 2005, N. Leo Benoiton, CRC 出版社, Boca Raton, FL)。

[0931] 由于缺乏对肽序列的控制,所以前两个方法通常不可行。由于生物样品中肽的浓度较低,需要在纯化之前相当数量的浓缩步骤,所以第一个方法也是有问题的。因此,通常对较短的肽来说直接化学合成是有吸引力的选择,而对较大的肽来说重组技术是优选的。

[0932] 鉴于氨基酸和肽的复杂度,传统的有机化学合成方法对具有多于四个或五个氨基酸残基的肽来说通常是不可行的。问题包括在肽中存在多个反应基团,所述多个反应基团导致肽上多个缀合位点,从而导致肽混合物相对于目标肽来说是不纯的,因此在每个步骤之后需要进行纯化。(参考:Lehninger Principles of Biochemistry, 第 3 版, 2000, 由 David L. Nelson 和 Michael M. Cox 编, Worth Publishers, New York, NY)。

[0933] 固相肽合成 (Merrifield, 1962) 的出现在肽的直接化学合成方面提供了重大突破,其中在所述固相肽合成中,在合成肽的同时将所述肽固定于固体载体的一端。当今,大多数固相肽合成涉及 Fmoc 化学作用。简单地说,化学合成从羧基端 (C 端) 进行到氨基端 (N 端)。固相载体是不可溶的聚合物或树脂。9- 芴基 - 甲酯 (Fmoc) 基团阻止在氨基酸残基的 α -氨基处发生不需要的反应。在重复周期中使用一套标准的反应在树脂载体上每次一个氨基酸构建肽。首先,将具有由 Fmoc 基团保护的 α -氨基的 C 端氨基酸连接到树脂上的反应基团上。通常使用温和的有机碱,将连接到树脂的氨基酸的 α -氨基上的保护基去除。现在,具有 C 端氨基酸的树脂准备接收肽的第二个氨基酸。接收每一个氨基酸,同时使用不同的化学作用在 α -氨基 (Fmoc) 和羧基 (通常为二环己基碳二亚胺 (DCC)) 处保护所述氨基酸。通过去除 DCC 来激活第二个氨基酸的羧基,且使所述第二个氨基酸的羧基与固体载体上第一个氨基酸的去保护的 α -氨基反应以形成肽键 (Peptide Synthesis and Applications, 1984, 由 John Howl 编 (Methods in Molecular Biology, 第 298 卷), Humana Press, Totowa, NJ. Chemistry of Peptide Synthesis, 2005, N. Leo Benoiton, CRC Press, Boca Raton, FL)。(参考:Lehninger Principles of Biochemistry, 第 3 版, 2000, 由 David L. Nelson 和 Michael M. Cox 编, Worth Publishers, New York, NY)。

[0934] 在循环中的每个连续步骤中,保护化学基团阻断不需要的反应和按照以下顺序:(i) 对新生肽上的 α -氨基去保护;(ii) 激活下一个氨基酸上的羧基;以及 (iii) 继续形成肽键的反应,直到合成整个肽序列。当肽合成完成时,裂解树脂与肽之间的键联以获得最终

肽。最先进的固相肽合成技术是自动的,且现在可获得并在本领域熟知若干种商品化仪器。(Peptide Synthesis and Applications,1984,由 John Howl 编 (Methods in Molecular Biology,第 298 卷),Humana Press,Totowa,NJ.Chemistry of Peptide Synthesis,2005,N.Leo Benoiton,CRC Press,Boca Raton,FL;Lehninger Principles of Biochemistry,第 3 版,2000,由 David L.Nelson 和 Michael M.Cox 编,Worth Publishers,New York,NY)。

[0935] 由于固相合成是用于较长肽的逐步加工,所以它具有降低总产率并因而增加成本的重要限制。例如,在 96%的逐步产率的情况下,21mer、51mer 和 100mer 的总产率分别为 44%、13%和 1.7%。类似地,在 99.8%的逐步产率的情况下,21mer、51mer 和 100mer 的总产率分别为 96%、90%和 82%。因此,对较长肽来说,使表达盒中的 A 序列基因工程化以及表达适当的表达系统(例如,微生物表达系统,例如大肠杆菌或酵母)或哺乳动物表达系统(细胞培养物)中的序列是更加成本有效的且时间有效的。然而,对较小肽来说,与固相肽合成相比,使序列基因工程化以及表达和纯化肽的成本通常为成本有效的且时间有效的。

[0936] 使用上述方法或本领域已知的其它合成、表达或纯化方法来合成、表达或纯化可用于本发明的肽。

[0937] dsRNA-肽缀合物的形成

[0938] 至少一个肽与 dsRNA 在第一链上或在第二链上或两者及在 3' 端或在 5' 端或两者或内部缀合。可以通过肽中的任何氨基酸残基将本发明的肽与本发明的 dsRNA 缀合,例如,通过 C 端氨基酸的羧基与 C 端的 C 端氨基酸缀合,或通过 N 端氨基酸的 α -氨基与 N 端的 N 端氨基酸缀合或者与氨基酸残基上的特定官能团(例如,Cys 上的 -SH 基或 Lys 的氨基)缀合。

[0939] 使用本领域已知的用于肽或蛋白质的任何缀合化学作用,将 dsRNA 与本发明的肽缀合(参考:Bioconjugate Techniques,1996,Greg T.Hermanson,Academic Press, San Diego,CA.;Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking,1991,Shan S.Wong,CRC Press,Boca Raton,FL)。

[0940] 在一个实施方案中,用 $(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$ 连接子合成第一链或第二链的 5' 端,且使用顺丁烯二酰亚胺化学作用将所述第一链或第二链的 5' 端与肽的 Cys 的 -SH 基团缀合,以形成稳定的缀合物。

[0941] 在另一个实施方案中,用 $(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$ 连接子合成第一链或第二链的 3' 端,且通过二硫化物交换将所述第一链或第二链的 3' 端与 Cys 的 -SH 基团或肽缀合,以形成可裂解的缀合物。

[0942] 在缀合之后,通过本领域熟知的方法纯化 dsRNA-肽缀合物(Oehlke J 等, Eur J Biochem. 2002 ;269(16) :4025-32, Hama T 和 Miller PS. Bioconjug Chem. 2003 ;14(2) : 320-30, Zatspein TS 等, Bioconjug Chem. 2005 ;16(3) :471-89, Ferenc G 等, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2005 ;24(5-7) :1059-61), 且使用标准的分析方法表征 dsRNA-肽缀合物的同一性和纯度。

[0943] 确定 dsRNA 递送肽缀合物的功能

[0944] 分析本发明的 dsRNA-肽缀合物以确定将 dsRNA 递送至适当的靶标和介导 RNAi 裂解的能力(如下文中标题名称为“RNAi In Vitro Assay to Assess DsiRNA Activity”的章节中所描述)。还分析本发明的 dsRNA 肽缀合物以确定将肽递送至适当靶标的能力。

[0945] 在一个实施方案中,将 dsRNA-肽或单独的肽连接到细胞表面,或者使 dsRNA 肽或单独的肽与细胞表面相互作用。通过直接穿透细胞膜、通过内吞途径、通过以上两种方法或通过本领域已知的其它方法,由细胞吸收 dsRNA-肽缀合物或单独的肽。

[0946] 可根据以下方法通过定量 dsRNA 寡核苷酸来确定本发明的 dsRNA-肽缀合物的功能。

[0947] 用于定量来自血浆或组织样品的 DsiRNA 寡核苷酸的技术包括用于分离分析物与基体的固相提取,随后通过电喷射离子化串联质谱分析法 (ESI-MS/MS) 进行反相离子配对超高效液相色谱 (UPLC) 分离和检测。分析测试设备包括具有光电二极管阵列检测器的 Waters Acquity UPLC 色谱仪,该 Waters Acquity UPLC 色谱仪与 Waters Quattro Premiere 三级四极质谱仪串联连接。

[0948] 使用 Phenomenex' s Clarity 提取介质和方案来完成固相提取。将“负载/溶解”缓冲液添加到含有寡核苷酸的血浆样品以去除任何结合的蛋白质。优选地,将寡核苷酸吸附到固相介质上。随后,用一系列缓冲液洗涤寡核苷酸以去除将抑制分离和离子化的杂质和盐。最终,将寡核苷酸从介质中洗脱、浓缩且再悬浮于缓冲液中,这受下游分析的检验。

[0949] 使用六氟异丙醇 (HFIP) 和三乙胺 (TEA) 的流动相以及 C₁₈ 静止相来完成层析分离。使用电喷射离子化完成质谱检测,随后进行串联 MS (MS/MS) 分析。开发 LC/MS 系统以确定特定寡核苷酸分子的特征转变。在变化的浓度下通过将样品的 MS 响应与测试样品中相同 DsiRNA 的标准曲线进行比较来完成样品中的 DsiRNA 含量的定量 (Lin 等, J Pharm Biomed Anal. 2007 年 6 月 28 日 ;44 (2) :330-341)。最终数据表示为每单位体积样品的 DsiRNA 寡核苷酸质量浓度 (例如, ng/mL)。

[0950] DsiRNA 的修饰

[0951] 将 dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物体外转染于细胞培养物模型中以建立 dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的比较摄取或递送。使用适当的细胞培养物模型,且终点测量包括但不限于以下中的一个或多个:(i) 使用 qPCR 的 mRNA 定量;(ii) 使用蛋白质印迹的蛋白质定量;(iii) dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的标记细胞内化。针对递送 dsRNA 的量、dsRNA 的递送速率和递送 dsRNA 的稳定性,例如使用上述终点测量,来评估 dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的比较摄取或递送。

[0952] 在一个实例中,在用于将 dsRNA 或 dsRNA-肽缀合物转染至 HeLa 细胞中的 24 孔板或 48 孔板中进行转染。在应用之前,将 dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物稀释到细胞培养基中,且在室温下孵育约 30min。对剂量反应实验来说,所应用的 dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的最终浓度在 0 至 50nM 的范围内变化。对时间-过程实验来说,为了确定如本文所定义的递送 dsRNA 所使用的速度,在各种孵育时间 (例如,30 分钟至 7 天) 内研究根据剂量反应实验所确定的 dsRNA-肽缀合物的最佳浓度。

[0953] 还通过用荧光标签差别标记肽和 dsRNA 和进行荧光共定位研究,来测试肽、dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的功能。用绿色荧光染料标记肽,而用红色荧光染料标记 dsRNA。使用这个方法且与游离 (即,未缀合的) dsRNA 的定位作比较来证实肽使单独的肽和 dsRNA-肽缀合物内化的能力。以下参考文献描述了如何进行荧光定位和细胞运输研究-Moschos 等, Bioconjug Chem. 2007 ;18 (5) :1450-1459; Moschos 等, Biochemical Society Transactions 2007 ;35 (4) :807-810; Lord-Fontaine 等, J. Neurotrauma 2008 ;

25:1309-1322;Winton 等, J. Biol. Chem. 2002;36(6):32820-32829;Lu, Langer 和 Chen. Mol. Pharm. 2009 年 3 月 30 日 [在出版前发表于网络上];McNaughton 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009 年 4 月 14 日;106(15):6111-6116。

[0954] dsRNA 的修饰

[0955] 抑制双链 RNA (“dsRNA”) 作用的一个主要因素为 dsRNA (例如, 双链 RNA、siRNA 和 DsiRNA) 通过核酸酶降解。3' 核酸外切酶为存在于血清中的主要核酸酶活性, 且反义链 DNA 寡核苷酸的 3' 端的修饰对防止降解至关重要。(Eder 等, 1991, Antisense Res. Dev. 1:141-151)。核糖核酸酶 T 家族的核酸酶已经识别为所谓的 ERI-1, 该 ERI-1 具有参与 siRNA 的调节和降解的 3' 至 5' 核酸外切酶活性 (Kennedy 等, 2004, Nature 427:645-649;Hong 等, 2005, Biochem. J. 390:675-679)。这个基因还在小鼠中称为 Thex1 (NM_02067) 或在人中称为 THEX1 (NM_153332), 且所述基因参与组蛋白 mRNA 的降解;所述基因还介导 siRNA 中 3' 突出的降解但是不降解双链体 RNA (Yang 等, 2006, J. Biol. Chem. 281:30447-30454)。因此, 期望 dsRNA (包括本发明的 DsiRNA) 的 3' 端稳定化将提高稳定性是合理的。

[0956] XRN1 (NM_019001) 为存在于处理小体 (P-body) 中 5' 至 3' 核酸外切酶且和涉及 miRNA 靶向的 mRNA 的降解 (Rehwinkel 等, 2005, RNA 11:1640-1647), 并且所述 XRN1 (NM_019001) 还能负责完成由 siRNA 引导由内部裂解引发的降解。XRN2 (NM_012255) 为参与核 RNA 加工的 5' 至 3' 核酸外切酶。虽然当前没有参与 siRNA 和 miRNA 的降解或加工, 但是两者皆为可降解 RNA 的已知核酸酶并且这也可重点考虑。

[0957] 核糖核酸酶 A 为降解 RNA 的哺乳动物中的主要核酸内切酶活性。它对 ssRNA 有特异性和在嘧啶碱基的 3' 端处裂解。在血清中孵育之后可通过质谱分析法检测与核糖核酸酶 A 裂解相符的 siRNA 降解产物 (Turner 等, 2007, Mol. Biosyst. 3:43-50)。3' 突出增强 siRNA 对核糖核酸酶降解的易感性。耗尽来自血清的核糖核酸酶 A 的降低了 siRNA 的降解;这种降解确实显示一些序列偏好且对在末端上具有聚 A/U 序列的序列来说不利 (Haupenthal 等, 2006, Biochem. Pharmacol. 71:702-710)。这表明了以下可能性: 双链体的较低稳定区可“呼吸”且提供可供核糖核酸酶 A 降解的瞬变单链种类。核糖核酸酶 A 抑制剂可添加到血清中且提高 siRNA 的寿命和效力 (Haupenthal 等, 2007, Int. J. Cancer 121:206-210)。

[0958] 在 21mer 中, 硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯修饰直接使核苷间磷酸键稳定。硼烷磷酸酯修饰的 RNA 高度抗核酸酶, 作为沉默剂为有效的且相对无毒的。不能使用标准学合成方法制备硼烷磷酸酯修饰的 RNA, 而是通过体外转录 (IVT) 来制备 (Hall 等, 2004, Nucleic Acids Res. 32:5991-6000;Hall 等, 2006, Nucleic Acids Res. 34:2773-2781)。硫代磷酸酯 (PS) 修饰可易于放置在 RNA 双链体中的任何所需的位置, 且可使用标准学合成方法制备。PS 修饰显示出依赖剂量的毒性, 所以大多数研究者推荐有限地并入 siRNA, 赞同在 3' 端防止受到核酸酶影响是最重要的 (Harborth 等, 2003, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 13:83-105;Chiu 和 Rana, 2003, Mol. Cell. 10:549-561;Braasch 等, 2003, Biochemistry 42:7967-7975;Amarzguiou 等, 2003, Nucleic Acids Research 31:589-595)。更广泛的 PS 修饰可与有效的 RNAi 活性相容;然而, 使用糖修饰 (诸如, 2' -O- 甲基 RNA) 可能更优 (Choung 等, 2006, Biochem. Biophys. Res. Commun. 342:919-927)。

[0959] 各种取代可位于核糖的 2' 位置, 这通常提高双链体稳定性 (T_m) 且可以极大地提

高核酸酶抗性。2'-O-甲基 RNA 为发现于哺乳动物核糖体 RNA 和转运 RNA 中的天然修饰。siRNA 中的 2'-O-甲基修饰为已知的,但是双链体内修饰碱基的精确位置对保持效力很重要,并且 2'-O-甲基 RNA 完全取代 RNA 将使 siRNA 失活。例如,采用交替 2'-O-甲基碱基的模式效力可与未经修饰 RNA 的效力相当,且所述模式在血清中十分稳定 (Choung 等,2006,Biochem Biophys Res Commun 342:919-927;Czauderna 等,2003,Nucleic Acids Research 31:2705-2716)。

[0960] 2'-氟 (2'-F) 修饰也与 dsRNA (例如, siRNA 和 DsiRNA) 功能相容;最普遍的是 2'-氟 (2'-F) 修饰位于嘧啶位点 (这是因为试剂成本和可用性的缘故),且 2'-氟 (2'-F) 修饰可以与在嘌呤位置的 2'-O-甲基修饰组合;2'-F 嘌呤可得到且也可使用。这类大量修饰的双链体可以为体外 RNAi 的有效触发剂, (Allerson 等,2005, J Med Chem 48:901-904;Prakash 等,2005, J Med Chem 48:4247-4253;Kraynack 和 Baker,2006, RNA 12:163-176),且当在体内使用时可以提高效能且延长作用的持续时间 (Morrissey 等,2005, Hepatology 41:1349-1356;Morrissey 等,2005, Nat Biotechnol 23:1002-1007)。Allerson 教导了含有替代性 2'-F 和 2'-O-Me 碱基的高效的、核酸酶稳定的平端 19mer 双链体。在这个设计中,以与 Czauderna 所采用的模式相同的模式定位交替的 2'-O-Me 残基,然而剩余 RNA 残基转换为 2'-F 修饰碱基。由 Morrissey 所采用的高效的核酸酶抗性 siRNA 在体内采用高效的核酸酶抗性 siRNA。除了 2'-O-Me RNA 和 2'-FRNA 之外,这个双链体还包括 DNA、RNA、倒转无碱基残基和 3' 端 PS 核苷间键合。虽然广泛修饰具有某些益处,但是双链体的有限修饰也可以提高在体内的效能并且更简单且更低成本地制备。Soutschek 等 (2004, Nature 432:173-178) 在体内采用双链体,而且主要是具有两个 2'-O-Me RNA 碱基和限制性 3' 端 PS 核苷间键合的 RNA。

[0961] 锁核酸 (LNA) 为可用于稳定 dsRNA (例如, siRNA 和 DsiRNA) 的不同类别的 2'-修饰。保持效力的 LNA 并入模式比 2'-O-甲基或 2'-F 碱基更受限制,所以优选有限修饰 (Braasch 等,2003, Biochemistry 42:7967-7975;Grunweller 等,2003, Nucleic Acids Res 31:3185-3193;Elmen 等,2005, Nucleic Acids Res 33:439-447)。即使在有限并入的情况下,使用 LNA 修饰也可以提高 dsRNA 在体内的效能且还可以改变或改善脱靶效应图谱 (Mook 等,2007, Mol Cancer Ther 6:833-843)。

[0962] 被引入细胞或活动物中的合成核苷酸可以被认为是“外来的”且触发免疫反应。免疫刺激构成主要类别的脱靶效应,所述脱靶效应可显著地改变实验结果甚至导致细胞死亡。天然免疫系统包括与介导这些反应的 DNA 和 RNA 特异性相互作用的受体分子的集合,它们当中的一些位于细胞质中且它们当中的一些存在于核内体中 (Marques 和 Williams, 2005, Nat Biotechnol 23:1399-1405;Schlee 等,2006, Mol Ther 14:463-470)。通过阳离子脂质或脂质体递送 siRNA 使 siRNA 暴露于细胞质和内体区室,从而使在体外和体内触发 I 型干扰 (IFN) 反应的风险最大。 (Morrissey 等,2005, Nat Biotechnol 23:1002-1007;Sioud 和 Sorensen,2003, Biochem Biophys Res Commun 312:1220-1225;Sioud,2005, J Mol Biol 348:1079-1090;Ma 等,2005, Biochem Biophys Res Commun 330:755-759)。细胞内的转录 RNA 免疫性较低 (Robbins 等,2006, Nat Biotechnol 24:566-571) 并且当通过机械法引入到细胞上 (甚至体内) 时,在使用基于脂质方法递送时免疫源性的合成 RNA 可避免免疫刺激 (Heidel 等,2004, Nat Biotechnol 22:1579-1582)。然而,基于脂质递送的

方法是方便、有效且广泛使用的。尤其对体内应用（其中存在所有细胞类型且产生免疫反应的风险最高）来说，需要一些防止免疫反应的一般策略。使用化学修饰的 RNA 可解决大部分乃至所有这些问题。

[0963] 虽然某些序列基序显然比其它序列基序产生更多的免疫性，似乎是天然免疫系统的受体一般可区分与在原核 RNA 中相比在哺乳动物 RNA 中更常发现的某些碱基修饰的存在或不存在。例如，假尿苷、N6-甲基-A 和 2'-O-甲基修饰的碱基被认为是“自身的”且在合成 RNA 中包含这些残基可协助避免免疫检测 (Kariko 等, 2005, *Immunity* 23:165-175)。当向小鼠静脉内施用，作为未经修饰 RNA 的强免疫刺激性序列的广泛 2'-修饰可阻断免疫反应 (Morrissey 等, 2005, *Nat Biotechnol* 23:1002-1007)。然而，广泛修饰是为避免免疫检测所不需要的，且在 siRNA 双链体的单链中至少两个 2'-O-甲基碱基的取代可足以阻断体外和体内 1 型 IFN 反应；经过修饰的 U 碱基和 G 碱基是最有效的 (Judge 等, 2006, *Mol Ther* 13:494-505)。作为增加的益处，选择性并入 2'-O-甲基碱基可降低脱靶效应的幅度 (Jackson 等, 2006, *RNA* 12:1197-1205)。因此，对用于体内应用的所有 dsRNA 来说，应将 2'-O-甲基碱基的使用视作阻断免疫反应的方法，且具有提高核酸酶稳定性和降低脱靶效应的几率的增加的益处。

[0964] 虽然细胞死亡可能是由免疫刺激产生，但是评估细胞活力不是足以监测诱导 IFN 反应的方法。IFN 反应可在没有细胞死亡的情况下存在，且细胞死亡可能是在缺少 IFN 触发的情况下（例如，在靶基因对细胞活力必不可少的情况下）由靶标敲低产生的。可在培养基中直接测量相关细胞因子，且存在进行此类常规分析的多种商品化试剂盒。虽然可测量许多不同的免疫效应子分子，但是在转染 4 小时和 24 小时后 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 的测试水平通常足够实现筛选目的。包括“转染试剂唯一对照”很重要，因为阳离子脂质可触发某些无任何核酸负荷的细胞中的免疫反应。针对细胞培养工作，应考虑包括 IFN 途径诱导的对照。无论何时在体内施用核酸（在这种情况下，触发 IFN 反应的风险是最高的），测试免疫刺激是必不可少的。

[0965] 只要修饰不能阻止 DsiRNA 试剂用作 Dicer 底物，则可以将修饰包括在本发明的 DsiRNA 试剂之内。在一个实施方案中，进行一种或多种修饰以增进 DsiRNA 试剂的 Dicer 加工。在第二实施方案中，进行一种或多种修饰可导致更有效的 RNAi 产生。在第三实施方案中，进行一种或多种修饰以支持更强的 RNAi 作用。在第四实施方案中，进行一种或多种修饰可在待递送至细胞的每个 DsiRNA 试剂分子中产生更大效力。可以将修饰并入 3' 端区、5' 端区、3' 端区和 5' 端区两者或者（在一些实例中）序列内的各个位置中。鉴于上述限制，可以将任何数目和任何组合的修饰并入 DsiRNA 试剂中。在存在多种修饰的情况下，它们可能是相同的或不同的。涵盖对碱基、糖部分、磷酸骨架和它们的组合的修饰。可以使任一 5' 端磷酸化。

[0966] 对磷酸骨架所预期的修饰的实例包括磷酸酯，包括甲基磷酸酯、硫代磷酸酯和磷酸三酯修饰（诸如，烷基磷酸三酯）等。对糖部分所预期的修饰的实例包括 2'-烷基嘧啶，诸如 2'-O-甲基、2'-氟、氨基和脱氧修饰等（例如，参见 Amarzguioui 等, 2003, *Nucleic Acids Research* 31:589-595）。对碱基所预期的修饰的实例包括无碱基糖、2'-O-烷基修饰的嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶和 5-(3-氨基烯丙基)-尿嘧啶等。还可以并入锁核酸或 LNA。许多其它修饰是已知的，并且只要满足上述标准也可

以使用所述其它修饰。还在美国专利第 5,684,143 号、第 5,858,988 号和第 6,291,438 号以及美国公开专利申请第 2004/0203145A1 号中公开了修饰的实例。在 Herdewijn(2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:297-310)、Eckstein(2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:117-21)、Rusckowski 等 (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:333-345)、Stein 等 (2001, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:317-25); Vorobjev 等 (2001, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:77-85) 中公开了其它修饰。

[0967] 可以将所预期的一种或多种修饰并入任一链中。使将修饰位于 DsiRNA 试剂中可极大地影响 DsiRNA 试剂的特征,包括赋予更多效力和稳定性、降低毒性、增强 Dicer 加工且使免疫反应减到最小。在一个实施方案中,反义链或有义链或者反义链和有义链具有一个或多个 2' -O- 甲基修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,反义链含有 2' -O- 甲基修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,反义链含有包含 2' -O- 甲基修饰的核苷酸的 3' 突出。反义链还可以包含另外的 2' -O- 甲基修饰的核苷酸。

[0968] 在本发明的某些实施方案中,DsiRNA 试剂具有一种或多种增强其由通过 Dicer 加工的特性。根据这些实施方案,DsiRNA 试剂具有足够长度,以使其通过 Dicer 加工以生成活性 siRNA 及以下特性中的至少一个:(i) DsiRNA 试剂是不对称的,例如,在反义链上具有 3' 突出,和 (ii) DsiRNA 试剂在有义链上具有修饰的 3' 端,以引导 dsRNA 的 Dicer 结合和加工成为活性 siRNA 的定向。根据这个实施方案,dsRNA 中最长的链包含 25 至 35 个核苷酸。在一个实施方案中,DsiRNA 试剂是不对称的,使得有义链包含 25 至 28 个核苷酸,且反义链包含 25 至 30 个核苷酸。因此,所得的 dsRNA 在反义链的 3' 端上具有突出。突出是 1 至 4 个核苷酸,例如 2 个核苷酸。有义链还可具有 5' 磷酸。

[0969] 在其它实施方案中,通过位于有义链的 3' 端的合适修饰剂,将 DsiRNA 试剂的有义链修饰以供 Dicer 加工,即,设计 DsiRNA 试剂以引导 Dicer 结合和加工的定向。合适的修饰剂包括核苷酸(诸如,脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸等)和位阻分子(诸如,荧光分子等)。无环核苷酸用 2- 羟基乙氧基甲基取代通常存在于 dNMP 中的 2' - 脱氧呋喃核糖基糖。其它核苷酸修饰剂可包括 3' - 脱氧腺苷(虫草素)、3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)、2', 3' - 双脱氧肌苷(ddI)、2', 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)、2', 3' - 双脱氢-2', 3' - 双脱氧胸苷(d4T)以及 3' - 叠氮基-3' - 脱氧胸苷(AZT)、2', 3' - 双脱氧-3' - 硫代胞苷(3TC)和 2', 3' - 双脱氢-2', 3' - 双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸。在一个实施方案中,将脱氧核苷酸用作修饰剂。当使用核苷酸修饰剂时,用 1 至 3 个核苷酸修饰剂或 2 个核苷酸修饰剂取代有义链 3' 端上的核糖核苷酸。当使用位阻分子时,将位阻分子连接到反义链的 3' 端处的核糖核苷酸。因此,链长不会随着修饰剂的并入而改变。在另一个实施方案中,本发明涵盖取代 DsiRNA 试剂中的两个 DNA 碱基以引导反义链的 Dicer 加工的定向。在本发明的另一个实施方案中,用两个末端 DNA 碱基取代有义链的 3' 端上两个核糖核苷酸,从而在有义链的 3' 端和反义链的 5' 端上形成双链体的平端,并且两个核苷酸 RNA 突出位于反义链的 3' 端上。这是在平端上具有 DNA 且在突出端上具有 RNA 碱基的不对称组合物。

[0970] 在生物条件(诸如,在细胞的细胞质中发现的条件)下将本发明的 DsiRNA 试剂的有义链和反义链退火。另外,DsiRNA 试剂的序列(尤其,反义链)中的一个序列区的序列长度为至少 19 个核苷酸,其中这些核苷酸在邻近反义链的 3' 端的 21 个核苷酸区中且与由

靶基因中所产生的 RNA 的核苷酸序列充分互补。

[0971] DsiRNA 试剂还可具有以下一种或多种另外的特性：(a) 反义链具有相对于典型 21mer 的右移，(b) 链可能不会完全互补，即，链可能含有简单的错配配对，和 (c) 碱基修饰（诸如，锁核酸）可能包括于有义链的 5' 端中。使用传统技术设计“典型”21mer siRNA。在一种技术中，在希望试剂中的一个试剂将有效的情况下，通常平行测试多个位点或含有对相同靶标具有特异性的若干个不同 siRNA 双链体的库，以期发现一种试剂是有效的 (Ji 等, 2003, FEBS Lett 552 :247-252)。其它技术使用设计规则和算法以增加获得活性 RNAi 效应子分子的几率 (Schwarz 等, 2003, Cell 115 :199-208 ;Khvorova 等, 2003, Cell 115 :209-216 ;Ui-Tei 等, 2004, Nucleic Acids Res 32 :936-948 ;Reynolds 等, 2004, Nat Biotechnol 22 :326-330 ;Krol 等, 2004, J Biol Chem 279 :42230-42239 ;Yuan 等, 2004, Nucl Acids Res 32 (网页服务器发行) :W130-134 ;Boese 等, 2005, Methods Enzymol 392 :73-96)。还开发了 siRNA 的高通量选择 (美国公开专利申请第 2005/0042641A1 号)。还可以通过二级结构预测分析潜在的靶位点 (Heale 等, 2005, Nucleic Acids Res 33 (3) :e30)。随后, 将这个 21mer 用于设计右移以在 21mer 的 5' 端上包含 3 至 9 个另外的核苷酸。这些另外的核苷酸的序列可能具有任何序列。在一个实施方案中, 添加的核糖核苷酸是基于靶基因的序列。甚至在这个实施方案中, 靶序列与反义链 siRNA 之间也不需要完全互补。

[0972] 本发明的 DsiRNA 试剂的第一寡核苷酸和第二寡核苷酸不需要完全互补。它们仅需要基本上互补以在生物条件下退火和为 Dicer 提供底物, 从而产生与靶序列充分互补的 siRNA。锁核酸或 LNA 是本领域技术人员所熟知的 (Elmen 等, 2005, Nucleic Acids Res 33 :439-447 ;Kurreck 等, 2002, Nucleic Acids Res 30 :1911-1918 ;Crinelli 等, 2002, Nucleic Acids Res 30 :2435-2443 ;Braasch 和 Corey, 2001, Chem Biol 8 :1-7 ;Bondensgaard 等, 2000, Chemistry 6 :2687-2695 ;Wahlestedt 等, 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97 :5633-5638)。在一个实施方案中, 在有义链的 5' 端处并入 LNA。在另一个实施方案中, 在经设计以在反义链上包含 3' 突出的双链体的有义链的 5' 端处并入 LNA。

[0973] 在某些实施方案中, 本发明的 DsiRNA 试剂具有不对称结构, 其中有义链的长度为 25 个碱基对且反义链的长度为 27 个碱基对并具有含 2 个碱基的 3' 突出。在其它实施方案中, 具有不对称结构的这种 DsiRNA 试剂在有义链的 3' 端还含有 2 个脱氧核苷酸, 来替代两个核糖核苷酸。

[0974] 可通过第三结构连接含有两个单独寡核苷酸的某些 DsiRNA 试剂组合物。第三结构将不会阻断 Dicer 对 DsiRNA 试剂的活性, 且所述第三结构将不会干扰由靶基因转录的 RNA 的定向破坏。在一个实施方案中, 第三结构可能是化学连接基团。许多合适的化学连接基团为本领域已知的且可以使用。或者, 第三结构可以是以某种方式连接 DsiRNA 试剂的两个寡核苷酸的寡核苷酸, 使得在组成 DsiRNA 组合物的两个寡核苷酸退火之后产生发夹结构。发夹结构将不会阻断 Dicer 对 DsiRNA 试剂的活性, 且将不会干扰靶 RNA 的定向破坏。

[0975] 在某些实施方案中, 本发明的 DsiRNA 试剂具有增强 Dicer 对其加工的若干特性。根据这些实施方案, DsiRNA 试剂具有足够长度, 以使其通过 Dicer 加工以产生 siRNA 及以下至少一种特性：(i) DsiRNA 试剂是不对称的, 例如, 在有义链上具有 3' 突出, 和 (ii) DsiRNA 试剂在反义链上具有经过修饰的 3' 端, 以引导 dsRNA 的 Dicer 结合和加工成活性 siRNA 的定向。根据这些实施方案, DsiRNA 试剂中最长的链包含 25 至 30 个核苷酸。在一个实施

方案中,有义链包含 25 至 30 个核苷酸并且反义链包含 25 至 28 个核苷酸。因此,所得 dsRNA 在有义链的 3' 端上具有突出。突出是 1 至 4 个核苷酸,诸如 2 个核苷酸。反义链还可具有 5' 磷酸。

[0976] 在某些实施方案中,通过位于有义链的 3' 端处的合适修饰剂将 DsiRNA 试剂的有义链修饰以供 Dicer 加工,即,设计 DsiRNA 试剂以引导 Dicer 结合和加工的定向。合适的修饰剂包括核苷酸(诸如,脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸等)和位阻分子(诸如,荧光分子等)。无环核苷酸用 2-羟基乙氧基甲基取代通常存在于 dNMP 中的 2'-脱氧呋喃核糖基糖。其它核苷酸修饰剂可包括:3'-脱氧腺苷(虫草素)、3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)、2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)以及 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)和 2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸。在一个实施方案中,将脱氧核苷酸用作修饰剂。当使用核苷酸修饰剂时,1 至 3 个核苷酸修饰剂或 2 个核苷酸修饰剂取代有义链的 3' 端上的核糖核苷酸。当使用位阻分子时,将位阻分子连接到反义链的 3' 端的核糖核苷酸。因此,链长不会随着修饰剂的并入而改变。在另一个实施方案中,本发明预期取代 dsRNA 中的两个 DNA 碱基以引导 Dicer 加工的定向。在另一个发明中,两个末端 DNA 碱基(代替两个核糖核苷酸)位于有义链的 3' 端上,从而在反义链的 5' 端和有义链的 3' 端上形成双链体的平端,并且两个核苷酸 RNA 突出位于反义链的 3' 端上。这是在平端上具有 DNA 且在突出端上具有 RNA 碱基的不对称组合物。

[0977] 在某些其它实施方案中,通过位于反义链的 3' 端处的合适修饰剂,将 DsiRNA 试剂的反义链修饰以供 Dicer 加工,即,设计 DsiRNA 试剂以引导 Dicer 结合和加工的定向。合适的修饰剂包括核苷酸(诸如,脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸、无环核苷酸等)和位阻分子(诸如,荧光分子等)。无环核苷酸用 2-羟基乙氧基甲基代替通常存在于 dNMP 中的 2'-脱氧呋喃核糖基糖。其它核苷酸修饰剂可包括:3'-脱氧腺苷(虫草素)、3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)、2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)以及 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧-3'-硫代胞苷(3TC)和 2',3'-双脱氢-2',3'-双脱氧胸苷(d4T)的单磷酸核苷酸。在一个实施方案中,将脱氧核苷酸用作修饰剂。当使用核苷酸修饰剂时,1 至 3 个核苷酸修饰剂或 2 个核苷酸修饰剂取代反义链的 3' 端上的核糖核苷酸。当使用位阻分子时,将位阻分子连接到反义链的 3' 端的核糖核苷酸。因此,链长不会随着修饰剂的并入而改变。在另一个实施方案中,本发明预期取代 dsRNA 中的两个 DNA 碱基以引导 Dicer 加工的定向。在另一个发明中,两个末端 DNA 碱基(代替两个核糖核苷酸)位于反义链的 3' 端上,从而在有义链的 5' 端和反义链的 3' 端上形成双链体的平端,并且两个核苷酸 RNA 突出位于有义链的 3' 端上。这也是在平端上具有 DNA 且在突出端上具有 RNA 碱基的不对称组合物。

[0978] 在生物条件(诸如,在细胞的细胞质中发现的条件)下,将有义链和反义链退火。另外,dsRNA 的序列(尤其,反义链)中的一个序列区的长度为至少 19 个核苷酸,其中这些核苷酸邻近反义链的 3' 端且与靶 RNA 的核苷酸序列充分互补。

[0979] 另外,可以使 DsiRNA 试剂结构优化,以确保从 Dicer 裂解产生的寡核苷酸片段将

成为最有效抑制基因表达中寡核苷酸的一部分。例如,在本发明的一个实施方案中,合成 DsiRNA 试剂结构的 27-bp 寡核苷酸,其中将抑制基因表达的预期 21-bp 至 22-bp 片段位于反义链的 3' 端上。位于反义链的 5' 端上的剩余碱基将由 Dicer 裂解且将被丢弃。这个被裂解的部分可能是同源的(即,基于靶标序列的序列)或非同源,并且添加这个被裂解的部分以延伸核酸链。

[0980] US 2007/0265220 公开了 27mer DsiRNA 在血清中显示出与类似的 21mersiRNA 组合物相比提高的稳定性,即使不存在化学修饰。当与 5' 磷酸的添加相结合时,DsiRNA 试剂的修饰(诸如,如以上所述的模式将 2' -O- 甲基 RNA 包括于反义链中)可提高 DsiRNA 试剂的稳定性。将 5' 磷酸添加至合成 RNA 双链体的所有链中可能是廉价的生理学方法且可能是赋予某种有限程度的核酸酶稳定性。将本发明的 DsiRNA 试剂的化学修饰模式设计为增强此类试剂的功效。因此,将此类修饰设计为避免降低 DsiRNA 试剂的效力;避免干扰 DsiRNA 试剂的 Dicer 加工;提高 DsiRNA 试剂的生物流体中的稳定性(降低核酸酶敏感性);或阻断或避开由固有免疫系统检测。还将此类修饰设计为不是有毒的,且避免增加成本或影响本发明的这些 DsiRNA 试剂的简单生产。

[0981] RNAi 体外测定以评估 DsiRNA 活性

[0982] 将 RNAi 再现于无细胞体系中的体外测定可用于评估靶向目标个 RNA 序列的 DsiRNA 构建体。该测定包括由 Tuschl 等,1999 年,Genes and Development,13,3191-3197 和 Zamore 等,2000 年,Cell,101,25-33 所描述的系统,该系统适合于与针对靶 RNA 的 DsiRNA 试剂一起使用。来源于合胞体胚盘的果蝇提取物用于在体外重建 RNAi 活性。通过使用 T7RNA 聚合酶从适当的靶 RNA 表达质粒进行体外转录或通过化学合成产生靶 RNA。通过在 90°C 下在缓冲液(诸如,100mM 乙酸钾、30mM HEPES-KOH, pH 7.4、2mM 乙酸镁)中孵育 1 分钟,随后在 37°C 下在缓冲液中培养 1 小时,来使有义 DsiRNA 链和反义 DsiRNA 链退火(例如,每个 20uM),随后在溶解缓冲液(例如,100mM 乙酸钾、30mM HEPES-KOH, pH 7.4、2mM 乙酸镁)中稀释所述有义 DsiRNA 链和反义 DsiRNA 链。可通过在 TBE 缓冲液中的琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳且使用溴化乙锭染色,来监测退火。使用于已发酵的糖蜜琼脂上收集的来自 Oregon R 蝇的零至两个小时龄的胚胎(该胚胎经去绒毛膜且溶解),来制备果蝇溶解产物。使溶解产物离心,且使上清液分离。测定包括反应混合物,该反应混合物含有 50% 溶解产物[体积/体积]、RNA(10 至 50pM 最终浓度)和含有 DsiRNA(10nM 最终浓度)的 10% [体积/体积] 溶解缓冲液。反应混合物还含有 10mM 肌酸磷酸、10ug/ml 肌酸磷酸激酶、100uM GTP、100uM UTP、100uM CTP、500uMATP、5mM DTT、0.1U/ μ L RNAin(Promega) 和 100uM 的每种氨基酸。将乙酸钾的最终浓度调节为 100mM。在添加 RNA 之前在冰上预先组合各反应物且在 25°C 下预先孵育 10 分钟,随后在 25°C 下再孵育另外 60 分钟。使用 4 体积的 1.25 $\times$ 被动裂解缓冲液(Promega) 使反应停止。借助 RT-PCR 分析或本领域中已知的其它方法测定靶 RNA 裂解,并与反应中不包括 DsiRNA 的对照反应相比较。

[0983] 或者,通过在存在 [α -³²P]CTP 的情况下进行体外转录,来制备用于测定的内部标记的靶 RNA,使所述靶 RNA 通过 G50Sephadex 柱通过旋转色谱法分离,且在不经进一步纯化的情况下将所述靶 RNA 用作靶 RNA。任选地,使用 T4 多核苷酸激酶在靶 RNA 5' 端标记 ³²P。如上所述进行测定,并且使由 RNAi 所产生的靶 RNA 和特定 RNA 裂解产物在凝胶的放射自显影图上看得到。裂解百分比由表示完整对照 RNA 或来自对照反应(不含由测定所产生的

DsiRNA 和裂解产物) 的 RNA 的带的 PHOSPHOR IMAGER® (放射自显影术) 定量确定。

[0984] 在一个实施方案中, 这个测定用于为 DsiRNA 介导 RNAi 裂解确定目标 RNA 靶标中的靶位点, 例如通过由标记靶 RNA 的电泳来分析测定反应, 或通过 RNA 印迹, 以及通过本领域熟知的其它方法对数个 DsiRNA 构建体筛选目标 RNA 靶标的 RNAi 介导的裂解。

[0985] DsiRNA- 肽试剂的结构

[0986] 在某些实施方案中, 本发明的 dsRNA 试剂可具有以下任何结构:

[0987] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[0988] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

[0989] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[0990] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[0991] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[0992] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[0993] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[0994] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[0995] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[0996] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[0997] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[0998] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[0999] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1000] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[1001] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[1002] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1003] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1004] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[1005] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[1006] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1007] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1008] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

[1009] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[1010] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1011] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1012] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[1013] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[1014] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1015] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1016] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

[1017] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[1018] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1019] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1020] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

[1021] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[1022] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1023] 在另一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[1024] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

[1025] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[1026] 其中, "X" = RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[1027] 在其它实施方案中, DsiRNA 包含:

[1028] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

[1029] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[1030] 或

[1031] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[1032] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[1033] 或

[1034] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[1035] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[1036] 或

[1037] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[1038] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1039] 或
[1040] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1041] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1042] 或
[1043] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1044] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1045] 或
[1046] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1047] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1048] 或
[1049] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1050] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1051] 或
[1052] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1053] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1054] 或
[1055] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1056] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1057] 或
[1058] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1059] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1060] 或
[1061] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1062] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1063] 或
[1064] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1065] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1066] 或
[1067] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1068] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1069] 或
[1070] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1071] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1072] 或
[1073] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1074] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1075] 或
[1076] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1077] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

64

- [1117] 或
[1118] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1119] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1120] 或
[1121] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1122] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1123] 或
[1124] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1125] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1126] 或
[1127] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1128] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1129] 或
[1130] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1131] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1132] 或
[1133] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1134] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1135] 或
[1136] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1137] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1138] 或
[1139] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1140] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1141] 或
[1142] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1143] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1144] 或
[1145] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1146] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1147] 或
[1148] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1149] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1150] 或
[1151] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1152] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1153] 或
[1154] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1155] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1156] 或
[1157] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1158] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1159] 或
[1160] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1161] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1162] 或
[1163] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1164] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1165] 或
[1166] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1167] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1168] 或
[1169] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1170] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1171] 或
[1172] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1173] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1174] 或
[1175] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1176] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1177] 或
[1178] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1179] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1180] 或
[1181] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1182] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1183] 或
[1184] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1185] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1186] 或
[1187] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1188] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1189] 或
[1190] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1191] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1192] 或
[1193] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1194] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1195] 或
[1196] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1197] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1198] 或
[1199] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1200] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1201] 或
[1202] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1203] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1204] 或
[1205] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1206] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1207] 或
[1208] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1209] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1210] 或
[1211] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1212] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1213] 或
[1214] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1215] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1216] 或
[1217] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1218] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1219] 或
[1220] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1221] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1222] 或
[1223] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1224] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1225] 或
[1226] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1227] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1228] 或
[1229] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1230] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1231] 或
[1232] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1233] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1234] 或
[1235] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1236] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1237] 或
[1238] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1239] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1240] 或
[1241] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1242] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1243] 或
[1244] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1245] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1246] 或
[1247] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1248] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1249] 或
[1250] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1251] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1252] 或
[1253] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1254] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1255] 或
[1256] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1257] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1258] 或
[1259] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1260] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1261] 或
[1262] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1263] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1264] 或
[1265] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1266] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1267] 或
[1268] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1269] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1270] 或
[1271] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1272] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1273] 或
[1274] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1275] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1276] 或
[1277] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1278] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1279] 或
[1280] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1281] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1282] 或
[1283] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1284] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1285] 或
[1286] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1287] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1288] 或
[1289] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1290] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1291] 或
[1292] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1293] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1294] 或
[1295] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1296] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1297] 或
[1298] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1299] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1300] 或
[1301] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1302] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1303] 或
[1304] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1305] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1306] 或
[1307] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1308] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1309] 或
[1310] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1311] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1312] 或
- [1313] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1314] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1315] 或
- [1316] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1317] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1318] 或
- [1319] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1320] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1321] 或
- [1322] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1323] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1324] 或
- [1325] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1326] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1327] 或
- [1328] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1329] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1330] 或
- [1331] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1332] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1333] 或
- [1334] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1335] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1336] 或
- [1337] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1338] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1339] 或
- [1340] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1341] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1342] 或
- [1343] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1344] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1345] 或
- [1346] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1347] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1348] 或
- [1349] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1350] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1351] 或
- [1352] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1353] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1354] 或
- [1355] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1356] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1357] 或
- [1358] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1359] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1360] 或
- [1361] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1362] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1363] 或
- [1364] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1365] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1366] 或
- [1367] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1368] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1369] 或
- [1370] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1371] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1372] 或
- [1373] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1374] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1375] 或
- [1376] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1377] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1378] 或
- [1379] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1380] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1381] 或
- [1382] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1383] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1384] 或
- [1385] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1386] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1387] 或
- [1388] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1389] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1390] 或
[1391] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1392] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1393] 或
[1394] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1395] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1396] 或
[1397] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1398] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1399] 或
[1400] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1401] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1402] 或
[1403] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1404] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1405] 或
[1406] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1407] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1408] 或
[1409] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1410] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1411] 或
[1412] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1413] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1414] 或
[1415] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1416] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1417] 或
[1418] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1419] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1420] 或
[1421] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1422] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1423] 或
[1424] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1425] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1426] 或
[1427] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1428] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1429] 或
[1430] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1431] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1432] 或
[1433] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1434] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1435] 或
[1436] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1437] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1438] 或
[1439] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1440] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1441] 或
[1442] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1443] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1444] 或
[1445] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1446] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1447] 或
[1448] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1449] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1450] 或
[1451] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1452] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1453] 或
[1454] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1455] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1456] 或
[1457] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1458] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1459] 或
[1460] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1461] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1462] 或
[1463] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1464] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1465] 或
[1466] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1467] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1468] 或
[1469] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1470] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1471] 或
[1472] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1473] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1474] 或
[1475] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1476] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1477] 或
[1478] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1479] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1480] 或
[1481] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1482] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1483] 或
[1484] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1485] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1486] 或
[1487] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1488] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1489] 或
[1490] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1491] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1492] 或
[1493] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1494] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1495] 或
[1496] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1497] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1498] 或
[1499] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1500] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1501] 或
[1502] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1503] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1504] 或
[1505] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1506] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1507] 或
[1508] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1509] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1510] 或
[1511] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1512] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1513] 或
[1514] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1515] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1516] 或
[1517] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1518] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1519] 或
[1520] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1521] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1522] 或
[1523] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1524] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1525] 或
[1526] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1527] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1528] 或
[1529] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1530] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1531] 或
[1532] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1533] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1534] 或
[1535] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1536] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1537] 或
[1538] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1539] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1540] 或
[1541] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1542] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1543] 或
[1544] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1545] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1546] 或
[1547] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1548] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1549] 或
[1550] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1551] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1552] 或
[1553] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1554] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1555] 或
[1556] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1557] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1558] 或
[1559] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1560] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1561] 或
[1562] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1563] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1564] 或
[1565] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1566] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1567] 或
[1568] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1569] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1570] 或
[1571] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1572] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1573] 或
[1574] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1575] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1576] 或
[1577] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1578] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1579] 或
[1580] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1581] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1582] 或
[1583] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1584] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1585] 或
[1586] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1587] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1588] 或
[1589] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1590] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1591] 或
[1592] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1593] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1594] 或
[1595] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1596] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1597] 或
[1598] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1599] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1600] 或
[1601] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1602] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1603] 或
[1604] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1605] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1606] 或
[1607] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1608] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1609] 或
[1610] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1611] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1612] 或
[1613] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1614] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1615] 或
[1616] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1617] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1618] 或
[1619] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1620] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1621] 或
[1622] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1623] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1624] 或
- [1625] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1626] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1627] 或
- [1628] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1629] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1630] 或
- [1631] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1632] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1633] 或
- [1634] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1635] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1636] 或
- [1637] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1638] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1639] 或
- [1640] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1641] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1642] 或
- [1643] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1644] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1645] 或
- [1646] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1647] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1648] 或
- [1649] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1650] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1651] 或
- [1652] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1653] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1654] 或
- [1655] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1656] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1657] 或
- [1658] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1659] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1660] 或
- [1661] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1662] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1663] 或
[1664] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1665] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1666] 或
[1667] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1668] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1669] 或
[1670] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1671] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1672] 或
[1673] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1674] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1675] 或
[1676] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1677] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1678] 或
[1679] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1680] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1681] 或
[1682] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1683] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1684] 或
[1685] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1686] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1687] 或
[1688] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1689] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1690] 或
[1691] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1692] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1693] 或
[1694] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1695] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1696] 或
[1697] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1698] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1699] 或
[1700] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1701] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1702] 或
[1703] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1704] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1705] 或
[1706] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1707] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1708] 或
[1709] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1710] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1711] 或
[1712] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1713] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1714] 或
[1715] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1716] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1717] 或
[1718] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1719] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1720] 或
[1721] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1722] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1723] 或
[1724] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1725] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1726] 或
[1727] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1728] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1729] 或
[1730] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1731] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1732] 或
[1733] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1734] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1735] 或
[1736] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1737] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1738] 或
[1739] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1740] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1741] 或
[1742] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1743] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1744] 或
[1745] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1746] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1747] 或
[1748] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1749] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1750] 或
[1751] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1752] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1753] 或
[1754] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1755] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1756] 或
[1757] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1758] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1759] 或
[1760] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1761] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1762] 或
[1763] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1764] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1765] 或
[1766] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1767] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1768] 或
[1769] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1770] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1771] 或
[1772] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1773] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1774] 或
[1775] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1776] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1777] 或
[1778] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1779] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1780] 或
[1781] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1782] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1783] 或
[1784] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1785] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1786] 或
[1787] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1788] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1789] 或
[1790] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1791] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1792] 或
[1793] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1794] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1795] 或
[1796] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1797] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1798] 或
[1799] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1800] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1801] 或
[1802] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1803] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1804] 或
[1805] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1806] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1807] 或
[1808] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1809] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1810] 或
[1811] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1812] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1813] 或
[1814] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1815] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1816] 或
[1817] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1818] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1819] 或
[1820] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1821] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1822] 或
[1823] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1824] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1825] 或
[1826] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1827] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1828] 或
[1829] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1830] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1831] 或
[1832] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1833] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1834] 或
[1835] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1836] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1837] 或
[1838] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1839] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1840] 或
[1841] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1842] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1843] 或
[1844] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1845] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1846] 或
[1847] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1848] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1849] 或
[1850] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1851] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1852] 或
[1853] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1854] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1855] 或
[1856] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1857] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [1858] 或
- [1859] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1860] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1861] 或
- [1862] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1863] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1864] 或
- [1865] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1866] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1867] 或
- [1868] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1869] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1870] 或
- [1871] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1872] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1873] 或
- [1874] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1875] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1876] 或
- [1877] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1878] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1879] 或
- [1880] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1881] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1882] 或
- [1883] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1884] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1885] 或
- [1886] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1887] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1888] 或
- [1889] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1890] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1891] 或
- [1892] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1893] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1894] 或
- [1895] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1896] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1897] 或
[1898] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1899] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1900] 或
[1901] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1902] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1903] 或
[1904] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1905] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1906] 或
[1907] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1908] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1909] 或
[1910] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1911] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1912] 或
[1913] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1914] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1915] 或
[1916] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1917] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1918] 或
[1919] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1920] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1921] 或
[1922] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1923] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1924] 或
[1925] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1926] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1927] 或
[1928] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1929] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1930] 或
[1931] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[1932] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1933] 或
[1934] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[1935] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1936] 或
- [1937] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1938] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1939] 或
- [1940] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1941] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1942] 或
- [1943] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1944] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1945] 或
- [1946] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1947] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1948] 或
- [1949] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1950] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1951] 或
- [1952] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1953] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1954] 或
- [1955] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1956] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1957] 或
- [1958] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [1959] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1960] 或
- [1961] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [1962] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1963] 或
- [1964] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [1965] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1966] 或
- [1967] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1968] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [1969] 或
- [1970] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1971] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [1972] 或
- [1973] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [1974] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [1975] 或
[1976] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1977] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1978] 或
[1979] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1980] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1981] 或
[1982] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1983] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1984] 或
[1985] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1986] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1987] 或
[1988] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1989] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1990] 或
[1991] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1992] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[1993] 或
[1994] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[1995] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1996] 或
[1997] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[1998] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[1999] 或
[2000] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2001] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2002] 或
[2003] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2004] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2005] 或
[2006] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2007] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2008] 或
[2009] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2010] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2011] 或
[2012] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2013] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2014] 或
- [2015] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2016] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2017] 或
- [2018] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2019] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2020] 或
- [2021] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2022] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2023] 或
- [2024] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2025] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2026] 或
- [2027] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2028] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2029] 或
- [2030] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2031] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2032] 或
- [2033] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2034] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2035] 或
- [2036] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2037] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2038] 或
- [2039] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2040] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2041] 或
- [2042] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2043] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2044] 或
- [2045] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2046] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2047] 或
- [2048] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2049] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2050] 或
- [2051] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2052] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2053] 或
- [2054] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2055] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2056] 或
- [2057] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2058] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2059] 或
- [2060] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2061] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2062] 或
- [2063] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2064] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2065] 或
- [2066] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2067] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2068] 或
- [2069] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2070] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2071] 或
- [2072] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2073] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2074] 或
- [2075] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2076] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2077] 或
- [2078] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2079] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2080] 或
- [2081] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2082] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2083] 或
- [2084] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2085] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2086] 或
- [2087] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2088] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2089] 或
- [2090] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2091] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2092] 或
- [2093] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2094] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2095] 或
- [2096] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2097] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2098] 或
- [2099] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2100] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2101] 或
- [2102] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2103] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2104] 或
- [2105] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2106] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2107] 或
- [2108] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2109] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2110] 或
- [2111] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2112] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2113] 或
- [2114] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2115] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2116] 或
- [2117] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2118] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2119] 或
- [2120] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2121] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2122] 或
- [2123] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2124] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2125] 或
- [2126] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2127] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2128] 或
- [2129] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2130] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2131] 或
- [2132] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2133] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2134] 或
- [2135] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2136] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2137] 或
- [2138] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2139] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2140] 或
- [2141] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2142] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2143] 或
- [2144] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2145] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2146] 或
- [2147] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2148] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2149] 或
- [2150] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2151] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2152] 或
- [2153] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2154] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2155] 或
- [2156] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2157] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2158] 或
- [2159] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2160] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2161] 或
- [2162] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2163] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2164] 或
- [2165] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2166] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2167] 或
- [2168] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2169] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2170] 或
- [2171] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2172] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2173] 或
- [2174] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2175] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2176] 或
- [2177] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2178] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2179] 或
- [2180] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2181] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2182] 或
- [2183] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2184] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2185] 或
- [2186] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2187] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2188] 或
- [2189] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2190] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2191] 或
- [2192] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2193] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2194] 或
- [2195] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2196] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2197] 或
- [2198] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2199] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2200] 或
- [2201] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2202] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2203] 或
- [2204] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2205] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2206] 或
- [2207] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2208] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2209] 或
- [2210] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2211] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2212] 或
- [2213] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2214] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2215] 或
- [2216] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2217] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2218] 或
- [2219] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2220] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2221] 或
- [2222] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2223] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2224] 或
- [2225] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2226] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2227] 或
- [2228] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2229] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2230] 或
- [2231] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2232] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2233] 或
- [2234] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2235] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2236] 或
- [2237] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2238] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2239] 或
- [2240] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2241] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2242] 或
- [2243] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2244] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2245] 或
- [2246] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2247] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2248] 或
- [2249] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2250] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2251] 或
- [2252] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2253] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2254] 或
- [2255] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2256] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2257] 或
- [2258] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2259] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2260] 或
- [2261] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2262] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2263] 或
- [2264] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2265] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2266] 或
- [2267] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2268] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2269] 或
- [2270] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2271] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2272] 或
- [2273] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2274] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2275] 或
- [2276] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2277] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2278] 或
- [2279] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2280] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2281] 或
- [2282] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2283] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2284] 或
- [2285] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2286] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2287] 或
- [2288] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2289] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2290] 或
- [2291] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2292] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2293] 或
- [2294] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2295] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2296] 或
- [2297] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2298] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2299] 或
- [2300] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2301] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2302] 或
- [2303] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2304] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2305] 或
- [2306] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2307] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2308] 或
- [2309] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2310] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2311] 或
- [2312] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2313] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2314] 或
- [2315] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2316] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2317] 或
- [2318] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2319] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2320] 或
- [2321] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2322] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2323] 或
- [2324] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2325] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2326] 或
- [2327] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2328] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2329] 或
- [2330] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2331] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2332] 或
- [2333] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2334] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2335] 或
- [2336] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2337] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2338] 或
- [2339] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2340] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2341] 或
- [2342] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2343] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2344] 或
- [2345] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2346] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2347] 或
- [2348] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2349] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2350] 或
- [2351] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2352] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2353] 或
- [2354] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2355] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2356] 或
- [2357] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2358] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2359] 或
- [2360] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2361] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2362] 或
- [2363] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2364] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2365] 或
- [2366] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2367] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2368] 或
- [2369] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2370] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2371] 或
- [2372] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2373] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2374] 或
- [2375] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2376] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2377] 或
- [2378] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2379] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2380] 或
- [2381] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2382] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2383] 或
- [2384] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2385] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2386] 或
- [2387] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2388] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2389] 或
- [2390] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2391] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2392] 或
- [2393] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2394] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2395] 或
- [2396] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2397] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2398] 或
- [2399] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2400] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2401] 或
- [2402] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2403] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2404] 或
- [2405] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2406] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2407] 或
- [2408] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2409] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2410] 或
- [2411] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2412] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2413] 或
- [2414] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2415] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2416] 或
- [2417] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2418] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2419] 或
- [2420] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2421] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2422] 或
- [2423] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2424] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2425] 或
- [2426] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2427] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2428] 或
- [2429] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2430] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2431] 或
- [2432] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2433] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2434] 或
- [2435] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2436] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2437] 或
- [2438] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2439] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2440] 或
- [2441] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2442] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2443] 或
[2444] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2445] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2446] 或
[2447] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2448] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2449] 或
[2450] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2451] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2452] 或
[2453] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2454] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2455] 或
[2456] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2457] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2458] 或
[2459] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2460] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2461] 或
[2462] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2463] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2464] 或
[2465] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2466] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2467] 或
[2468] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2469] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2470] 或
[2471] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2472] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2473] 或
[2474] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2475] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2476] 或
[2477] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2478] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2479] 或
[2480] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2481] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2482] 或
- [2483] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2484] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2485] 或
- [2486] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2487] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2488] 或
- [2489] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2490] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2491] 或
- [2492] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2493] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2494] 或
- [2495] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2496] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2497] 或
- [2498] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2499] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2500] 或
- [2501] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2502] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2503] 或
- [2504] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2505] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2506] 或
- [2507] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2508] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2509] 或
- [2510] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2511] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2512] 或
- [2513] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2514] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2515] 或
- [2516] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2517] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2518] 或
- [2519] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2520] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2521] 或
[2522] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2523] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2524] 或
[2525] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2526] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2527] 或
[2528] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2529] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2530] 或
[2531] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2532] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2533] 或
[2534] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2535] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2536] 或
[2537] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2538] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2539] 或
[2540] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2541] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2542] 或
[2543] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2544] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2545] 或
[2546] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2547] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2548] 或
[2549] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2550] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2551] 或
[2552] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2553] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2554] 或
[2555] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2556] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2557] 或
[2558] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2559] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2560] 或
- [2561] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2562] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2563] 或
- [2564] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2565] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2566] 或
- [2567] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2568] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2569] 或
- [2570] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2571] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2572] 或
- [2573] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2574] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2575] 或
- [2576] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2577] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2578] 或
- [2579] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2580] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2581] 或
- [2582] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2583] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2584] 或
- [2585] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2586] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2587] 或
- [2588] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2589] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2590] 或
- [2591] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2592] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2593] 或
- [2594] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2595] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2596] 或
- [2597] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2598] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2599] 或
- [2600] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2601] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2602] 或
- [2603] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2604] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2605] 或
- [2606] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2607] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2608] 或
- [2609] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2610] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2611] 或
- [2612] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2613] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2614] 或
- [2615] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2616] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2617] 或
- [2618] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2619] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2620] 或
- [2621] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2622] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2623] 或
- [2624] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2625] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2626] 或
- [2627] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2628] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2629] 或
- [2630] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2631] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2632] 或
- [2633] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2634] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2635] 或
- [2636] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2637] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2638] 或
- [2639] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2640] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2641] 或
- [2642] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2643] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2644] 或
- [2645] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2646] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2647] 或
- [2648] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2649] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2650] 或
- [2651] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2652] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2653] 或
- [2654] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2655] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2656] 或
- [2657] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2658] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2659] 或
- [2660] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2661] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2662] 或
- [2663] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2664] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2665] 或
- [2666] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2667] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2668] 或
- [2669] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2670] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2671] 或
- [2672] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2673] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2674] 或
- [2675] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2676] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2677] 或
[2678] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2679] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2680] 或
[2681] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2682] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2683] 或
[2684] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2685] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2686] 或
[2687] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2688] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2689] 或
[2690] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2691] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2692] 或
[2693] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2694] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2695] 或
[2696] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2697] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2698] 或
[2699] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2700] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2701] 或
[2702] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2703] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2704] 或
[2705] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2706] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2707] 或
[2708] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2709] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2710] 或
[2711] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2712] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2713] 或
[2714] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2715] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2716] 或
[2717] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2718] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2719] 或
[2720] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2721] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2722] 或
[2723] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2724] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2725] 或
[2726] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2727] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2728] 或
[2729] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2730] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2731] 或
[2732] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2733] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2734] 或
[2735] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2736] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2737] 或
[2738] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2739] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2740] 或
[2741] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2742] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2743] 或
[2744] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2745] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2746] 或
[2747] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2748] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2749] 或
[2750] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2751] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2752] 或
[2753] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2754] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2755] 或
[2756] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2757] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2758] 或
[2759] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2760] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2761] 或
[2762] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2763] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2764] 或
[2765] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2766] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2767] 或
[2768] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2769] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2770] 或
[2771] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2772] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2773] 或
[2774] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2775] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2776] 或
[2777] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2778] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2779] 或
[2780] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2781] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2782] 或
[2783] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2784] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2785] 或
[2786] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2787] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2788] 或
[2789] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2790] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2791] 或
[2792] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2793] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2794] 或
- [2795] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2796] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2797] 或
- [2798] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2799] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2800] 或
- [2801] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2802] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2803] 或
- [2804] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2805] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2806] 或
- [2807] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2808] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2809] 或
- [2810] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2811] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2812] 或
- [2813] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2814] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2815] 或
- [2816] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2817] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2818] 或
- [2819] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2820] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2821] 或
- [2822] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2823] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2824] 或
- [2825] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2826] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2827] 或
- [2828] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2829] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2830] 或
- [2831] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2832] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2833] 或
- [2834] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2835] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2836] 或
- [2837] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2838] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2839] 或
- [2840] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2841] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2842] 或
- [2843] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2844] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2845] 或
- [2846] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2847] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2848] 或
- [2849] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2850] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2851] 或
- [2852] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2853] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2854] 或
- [2855] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2856] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2857] 或
- [2858] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2859] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2860] 或
- [2861] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2862] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2863] 或
- [2864] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2865] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2866] 或
- [2867] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2868] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2869] 或
- [2870] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2871] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2872] 或
- [2873] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2874] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2875] 或
- [2876] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2877] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2878] 或
- [2879] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2880] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2881] 或
- [2882] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2883] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2884] 或
- [2885] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2886] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2887] 或
- [2888] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2889] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2890] 或
- [2891] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2892] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2893] 或
- [2894] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2895] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2896] 或
- [2897] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2898] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2899] 或
- [2900] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2901] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2902] 或
- [2903] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2904] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2905] 或
- [2906] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2907] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2908] 或
- [2909] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2910] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2911] 或
- [2912] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2913] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2914] 或
- [2915] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2916] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2917] 或
- [2918] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2919] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2920] 或
- [2921] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2922] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2923] 或
- [2924] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2925] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2926] 或
- [2927] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2928] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2929] 或
- [2930] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2931] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2932] 或
- [2933] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2934] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2935] 或
- [2936] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2937] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2938] 或
- [2939] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2940] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2941] 或
- [2942] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2943] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [2944] 或
- [2945] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [2946] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2947] 或
- [2948] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [2949] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [2950] 或
[2951] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2952] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2953] 或
[2954] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2955] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2956] 或
[2957] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2958] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2959] 或
[2960] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2961] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2962] 或
[2963] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2964] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2965] 或
[2966] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[2967] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2968] 或
[2969] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[2970] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2971] 或
[2972] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2973] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2974] 或
[2975] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2976] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2977] 或
[2978] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2979] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[2980] 或
[2981] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2982] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2983] 或
[2984] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[2985] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[2986] 或
[2987] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[2988] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [2989] 或
- [2990] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2991] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2992] 或
- [2993] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [2994] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2995] 或
- [2996] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [2997] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [2998] 或
- [2999] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3000] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3001] 或
- [3002] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3003] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3004] 或
- [3005] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3006] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3007] 或
- [3008] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3009] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3010] 或
- [3011] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3012] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3013] 或
- [3014] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3015] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3016] 或
- [3017] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3018] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3019] 或
- [3020] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3021] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3022] 或
- [3023] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3024] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3025] 或
- [3026] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3027] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3028] 或
- [3029] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3030] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3031] 或
- [3032] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3033] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3034] 或
- [3035] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
- [3036] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3037] 或
- [3038] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3039] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3040] 或
- [3041] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
- [3042] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3043] 或
- [3044] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3045] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3046] 或
- [3047] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3048] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3049] 或
- [3050] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3051] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3052] 或
- [3053] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3054] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3055] 或
- [3056] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3057] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3058] 或
- [3059] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3060] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3061] 或
- [3062] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3063] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3064] 或
- [3065] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3066] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3067] 或
[3068] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3069] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3070] 或
[3071] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3072] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3073] 或
[3074] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3075] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3076] 或
[3077] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3078] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3079] 或
[3080] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3081] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3082] 或
[3083] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3084] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3085] 或
[3086] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3087] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3088] 或
[3089] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3090] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3091] 或
[3092] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3093] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3094] 或
[3095] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3096] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3097] 或
[3098] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3099] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3100] 或
[3101] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3102] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3103] 或
[3104] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3105] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3106] 或
[3107] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3108] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3109] 或
[3110] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3111] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3112] 或
[3113] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3114] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3115] 或
[3116] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3117] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3118] 或
[3119] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3120] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3121] 或
[3122] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3123] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3124] 或
[3125] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3126] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3127] 或
[3128] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3129] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3130] 或
[3131] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3132] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3133] 或
[3134] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3135] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3136] 或
[3137] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD-3'
[3138] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3139] 或
[3140] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3141] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3142] 或
[3143] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3144] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3145] 或
[3146] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3147] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3148] 或
[3149] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3150] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3151] 或
[3152] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3153] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3154] 或
[3155] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3156] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3157] 或
[3158] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3159] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3160] 或
[3161] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3162] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3163] 或
[3164] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3165] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3166] 或
[3167] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3168] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3169] 或
[3170] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3171] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3172] 或
[3173] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3174] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3175] 或
[3176] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3177] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3178] 或
[3179] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3180] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3181] 或
[3182] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3183] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3184] 或
- [3185] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3186] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3187] 或
- [3188] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3189] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3190] 或
- [3191] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3192] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3193] 或
- [3194] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3195] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3196] 或
- [3197] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3198] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3199] 或
- [3200] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3201] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3202] 或
- [3203] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3204] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3205] 或
- [3206] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3207] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3208] 或
- [3209] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3210] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3211] 或
- [3212] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3213] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3214] 或
- [3215] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3216] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3217] 或
- [3218] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3219] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3220] 或
- [3221] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3222] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3223] 或
- [3224] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3225] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3226] 或
- [3227] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3228] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3229] 或
- [3230] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3231] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3232] 或
- [3233] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3234] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3235] 或
- [3236] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3237] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3238] 或
- [3239] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3240] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3241] 或
- [3242] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3243] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3244] 或
- [3245] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3246] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3247] 或
- [3248] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3249] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3250] 或
- [3251] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3252] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3253] 或
- [3254] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3255] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3256] 或
- [3257] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3258] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3259] 或
- [3260] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
- [3261] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3262] 或
[3263] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3264] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3265] 或
[3266] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3267] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3268] 或
[3269] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3270] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3271] 或
[3272] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3273] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3274] 或
[3275] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3276] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3277] 或
[3278] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3279] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3280] 或
[3281] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3282] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3283] 或
[3284] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3285] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3286] 或
[3287] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3288] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3289] 或
[3290] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3291] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3292] 或
[3293] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3294] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3295] 或
[3296] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3297] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3298] 或
[3299] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3300] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3301] 或
[3302] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3303] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3304] 或
[3305] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3306] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3307] 或
[3308] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3309] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3310] 或
[3311] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3312] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3313] 或
[3314] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3315] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3316] 或
[3317] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3318] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3319] 或
[3320] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3321] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3322] 或
[3323] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3324] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3325] 或
[3326] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3327] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3328] 或
[3329] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3330] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3331] 或
[3332] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3333] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3334] 或
[3335] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3336] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3337] 或
[3338] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3339] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3340] 或
- [3341] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3342] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3343] 或
- [3344] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3345] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3346] 或
- [3347] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3348] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3349] 或
- [3350] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3351] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3352] 或
- [3353] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3354] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3355] 或
- [3356] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3357] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3358] 或
- [3359] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3360] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3361] 或
- [3362] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3363] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3364] 或
- [3365] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3366] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3367] 或
- [3368] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3369] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3370] 或
- [3371] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3372] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3373] 或
- [3374] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3375] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3376] 或
- [3377] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3378] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3379] 或
- [3380] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3381] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3382] 或
- [3383] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3384] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3385] 或
- [3386] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3387] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3388] 或
- [3389] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3390] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3391] 或
- [3392] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3393] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3394] 或
- [3395] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3396] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3397] 或
- [3398] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3399] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3400] 或
- [3401] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3402] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3403] 或
- [3404] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3405] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3406] 或
- [3407] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3408] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3409] 或
- [3410] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3411] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3412] 或
- [3413] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3414] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3415] 或
- [3416] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3417] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3418] 或
[3419] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3420] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3421] 或
[3422] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3423] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3424] 或
[3425] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3426] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3427] 或
[3428] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3429] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3430] 或
[3431] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3432] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3433] 或
[3434] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3435] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3436] 或
[3437] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3438] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3439] 或
[3440] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3441] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3442] 或
[3443] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3444] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3445] 或
[3446] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3447] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3448] 或
[3449] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3450] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3451] 或
[3452] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3453] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3454] 或
[3455] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3456] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3457] 或
[3458] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3459] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3460] 或
[3461] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3462] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3463] 或
[3464] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3465] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3466] 或
[3467] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3468] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3469] 或
[3470] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3471] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3472] 或
[3473] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3474] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3475] 或
[3476] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3477] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3478] 或
[3479] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3480] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3481] 或
[3482] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3483] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3484] 或
[3485] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3486] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3487] 或
[3488] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3489] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3490] 或
[3491] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3492] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3493] 或
[3494] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3495] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3496] 或
[3497] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3498] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3499] 或
[3500] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3501] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3502] 或
[3503] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3504] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3505] 或
[3506] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3507] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3508] 或
[3509] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3510] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3511] 或
[3512] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3513] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3514] 或
[3515] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3516] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3517] 或
[3518] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3519] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3520] 或
[3521] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3522] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3523] 或
[3524] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3525] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3526] 或
[3527] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3528] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3529] 或
[3530] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3531] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3532] 或
[3533] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3534] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3535] 或
[3536] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3537] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3538] 或
[3539] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3540] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3541] 或
[3542] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3543] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3544] 或
[3545] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3546] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3547] 或
[3548] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3549] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3550] 或
[3551] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3552] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3553] 或
[3554] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3555] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3556] 或
[3557] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3558] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3559] 或
[3560] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3561] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3562] 或
[3563] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3564] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3565] 或
[3566] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3567] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3568] 或
[3569] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3570] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3571] 或
[3572] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3573] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3574] 或
- [3575] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3576] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3577] 或
- [3578] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3579] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3580] 或
- [3581] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3582] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3583] 或
- [3584] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3585] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3586] 或
- [3587] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3588] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3589] 或
- [3590] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3591] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3592] 或
- [3593] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3594] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3595] 或
- [3596] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3597] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3598] 或
- [3599] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3600] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3601] 或
- [3602] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3603] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3604] 或
- [3605] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3606] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3607] 或
- [3608] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3609] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3610] 或
- [3611] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3612] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3613] 或
- [3614] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3615] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3616] 或
- [3617] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3618] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3619] 或
- [3620] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3621] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3622] 或
- [3623] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3624] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3625] 或
- [3626] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3627] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3628] 或
- [3629] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3630] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3631] 或
- [3632] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3633] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3634] 或
- [3635] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3636] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3637] 或
- [3638] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3639] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3640] 或
- [3641] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3642] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3643] 或
- [3644] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3645] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3646] 或
- [3647] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3648] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3649] 或
- [3650] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3651] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3652] 或
- [3653] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3654] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3655] 或
- [3656] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3657] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3658] 或
- [3659] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3660] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3661] 或
- [3662] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3663] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3664] 或
- [3665] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3666] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3667] 或
- [3668] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3669] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3670] 或
- [3671] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3672] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3673] 或
- [3674] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3675] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3676] 或
- [3677] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3678] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3679] 或
- [3680] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3681] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3682] 或
- [3683] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3684] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3685] 或
- [3686] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3687] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3688] 或
- [3689] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3690] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3691] 或
[3692] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3693] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3694] 或
[3695] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3696] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3697] 或
[3698] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3699] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3700] 或
[3701] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3702] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3703] 或
[3704] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3705] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3706] 或
[3707] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3708] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3709] 或
[3710] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3711] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3712] 或
[3713] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3714] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3715] 或
[3716] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3717] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3718] 或
[3719] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3720] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3721] 或
[3722] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3723] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3724] 或
[3725] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3726] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3727] 或
[3728] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3729] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3730] 或
- [3731] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3732] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3733] 或
- [3734] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3735] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3736] 或
- [3737] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3738] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3739] 或
- [3740] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3741] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3742] 或
- [3743] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3744] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3745] 或
- [3746] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3747] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3748] 或
- [3749] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3750] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3751] 或
- [3752] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3753] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3754] 或
- [3755] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3756] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3757] 或
- [3758] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3759] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3760] 或
- [3761] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3762] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3763] 或
- [3764] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3765] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3766] 或
- [3767] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3768] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3769] 或
[3770] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3771] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3772] 或
[3773] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3774] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3775] 或
[3776] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3777] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3778] 或
[3779] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3780] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3781] 或
[3782] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3783] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3784] 或
[3785] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3786] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3787] 或
[3788] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3789] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3790] 或
[3791] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3792] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3793] 或
[3794] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3795] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3796] 或
[3797] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3798] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3799] 或
[3800] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3801] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3802] 或
[3803] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3804] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3805] 或
[3806] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3807] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3808] 或
[3809] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3810] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3811] 或
[3812] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3813] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3814] 或
[3815] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3816] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3817] 或
[3818] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3819] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3820] 或
[3821] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3822] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3823] 或
[3824] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3825] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3826] 或
[3827] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3828] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3829] 或
[3830] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3831] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3832] 或
[3833] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3834] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3835] 或
[3836] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3837] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3838] 或
[3839] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3840] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3841] 或
[3842] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3843] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3844] 或
[3845] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3846] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3847] 或
- [3848] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3849] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3850] 或
- [3851] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3852] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3853] 或
- [3854] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3855] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3856] 或
- [3857] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3858] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3859] 或
- [3860] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3861] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3862] 或
- [3863] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3864] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3865] 或
- [3866] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3867] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3868] 或
- [3869] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3870] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3871] 或
- [3872] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3873] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3874] 或
- [3875] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3876] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3877] 或
- [3878] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3879] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3880] 或
- [3881] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
- [3882] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3883] 或
- [3884] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
- [3885] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [3886] 或
[3887] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3888] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3889] 或
[3890] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3891] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3892] 或
[3893] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3894] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3895] 或
[3896] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3897] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3898] 或
[3899] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3900] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3901] 或
[3902] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3903] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3904] 或
[3905] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3906] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3907] 或
[3908] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3909] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3910] 或
[3911] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3912] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3913] 或
[3914] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3915] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3916] 或
[3917] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3918] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3919] 或
[3920] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3921] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3922] 或
[3923] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3924] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3925] 或
- [3926] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3927] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3928] 或
- [3929] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3930] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3931] 或
- [3932] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3933] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3934] 或
- [3935] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3936] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3937] 或
- [3938] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3939] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3940] 或
- [3941] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3942] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3943] 或
- [3944] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3945] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3946] 或
- [3947] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3948] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3949] 或
- [3950] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3951] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3952] 或
- [3953] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3954] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3955] 或
- [3956] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3957] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [3958] 或
- [3959] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [3960] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [3961] 或
- [3962] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [3963] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [3964] 或
[3965] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3966] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3967] 或
[3968] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3969] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3970] 或
[3971] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3972] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3973] 或
[3974] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[3975] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3976] 或
[3977] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[3978] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3979] 或
[3980] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3981] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3982] 或
[3983] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3984] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3985] 或
[3986] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3987] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[3988] 或
[3989] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3990] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3991] 或
[3992] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3993] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3994] 或
[3995] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[3996] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[3997] 或
[3998] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[3999] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4000] 或
[4001] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4002] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [4003] 或
[4004] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4005] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4006] 或
[4007] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4008] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4009] 或
[4010] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4011] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4012] 或
[4013] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4014] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4015] 或
[4016] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4017] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4018] 或
[4019] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4020] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4021] 或
[4022] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4023] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4024] 或
[4025] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4026] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4027] 或
[4028] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4029] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4030] 或
[4031] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4032] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4033] 或
[4034] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4035] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4036] 或
[4037] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4038] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4039] 或
[4040] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4041] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [4042] 或
[4043] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4044] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4045] 或
[4046] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4047] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4048] 或
[4049] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4050] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4051] 或
[4052] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4053] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4054] 或
[4055] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4056] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4057] 或
[4058] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4059] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4060] 或
[4061] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4062] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4063] 或
[4064] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4065] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4066] 或
[4067] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4068] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4069] 或
[4070] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4071] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4072] 或
[4073] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4074] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4075] 或
[4076] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4077] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4078] 或
[4079] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4080] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [4081] 或
[4082] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4083] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4084] 或
[4085] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4086] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4087] 或
[4088] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4089] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4090] 或
[4091] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4092] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4093] 或
[4094] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4095] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4096] 或
[4097] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4098] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4099] 或
[4100] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4101] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4102] 或
[4103] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4104] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4105] 或
[4106] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4107] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4108] 或
[4109] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4110] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4111] 或
[4112] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4113] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4114] 或
[4115] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4116] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4117] 或
[4118] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4119] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [4120] 或
[4121] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4122] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4123] 或
[4124] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4125] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4126] 或
[4127] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4128] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4129] 或
[4130] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4131] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4132] 或
[4133] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4134] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4135] 或
[4136] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4137] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4138] 或
[4139] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4140] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4141] 或
[4142] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4143] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4144] 或
[4145] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4146] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4147] 或
[4148] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4149] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4150] 或
[4151] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4152] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4153] 或
[4154] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4155] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4156] 或
[4157] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4158] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [4159] 或
[4160] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4161] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4162] 或
[4163] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4164] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4165] 或
[4166] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4167] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4168] 或
[4169] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4170] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4171] 或
[4172] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4173] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4174] 或
[4175] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4176] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4177] 或
[4178] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4179] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4180] 或
[4181] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4182] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4183] 或
[4184] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4185] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4186] 或
[4187] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4188] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4189] 或
[4190] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4191] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4192] 或
[4193] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4194] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4195] 或
[4196] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4197] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [4198] 或
[4199] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4200] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4201] 或
[4202] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4203] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4204] 或
[4205] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4206] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4207] 或
[4208] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4209] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4210] 或
[4211] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4212] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4213] 或
[4214] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4215] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4216] 或
[4217] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4218] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4219] 或
[4220] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4221] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4222] 或
[4223] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4224] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4225] 或
[4226] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4227] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4228] 或
[4229] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4230] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4231] 或
[4232] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4233] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4234] 或
[4235] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4236] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [4237] 或
[4238] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4239] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4240] 或
[4241] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4242] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4243] 或
[4244] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4245] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4246] 或
[4247] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4248] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4249] 或
[4250] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4251] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4252] 或
[4253] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4254] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4255] 或
[4256] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4257] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4258] 或
[4259] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4260] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4261] 或
[4262] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4263] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4264] 或
[4265] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4266] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4267] 或
[4268] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4269] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4270] 或
[4271] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4272] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4273] 或
[4274] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4275] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [4276] 或
[4277] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4278] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4279] 或
[4280] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4281] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4282] 或
[4283] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4284] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4285] 或
[4286] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4287] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4288] 或
[4289] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4290] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4291] 或
[4292] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4293] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4294] 或
[4295] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4296] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4297] 或
[4298] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4299] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4300] 或
[4301] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4302] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4303] 或
[4304] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4305] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4306] 或
[4307] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4308] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4309] 或
[4310] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4311] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4312] 或
[4313] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4314] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

- [4315] 或
[4316] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4317] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4318] 或
[4319] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4320] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4321] 或
[4322] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4323] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4324] 或
[4325] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4326] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4327] 或
[4328] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4329] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4330] 或
[4331] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4332] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4333] 或
[4334] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
[4335] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4336] 或
[4337] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
[4338] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4339] 或
[4340] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
[4341] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4342] 或
[4343] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4344] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4345] 或
[4346] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4347] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
[4348] 或
[4349] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4350] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
[4351] 或
[4352] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
[4353] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

- [4354] 或
- [4355] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4356] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [4357] 或
- [4358] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4359] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4360] 或
- [4361] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4362] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4363] 或
- [4364] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4365] 3' -PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4366] 或
- [4367] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4368] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4369] 或
- [4370] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4371] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [4372] 或
- [4373] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4374] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [4375] 或
- [4376] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4377] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4378] 或
- [4379] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4380] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [4381] 或
- [4382] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4383] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
- [4384] 或
- [4385] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
- [4386] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4387] 或
- [4388] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4389] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
- [4390] 或
- [4391] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
- [4392] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[4393] 或

[4394] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[4395] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[4396] 或

[4397] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[4398] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[4399] 或

[4400] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[4401] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[4402] 或

[4403] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

[4404] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

[4405] 或

[4406] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

[4407] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[4408] 或

[4409] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

[4410] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

[4411] 其中, "X" = RNA, "X" = 2' -O- 甲基 RNA, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, 带下划线的残基是 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA 且 "P" = 肽。上链是有义链, 且下链是反义链。

[4412] 在另一个实施方案中, dsRNA 包含具有相同长度的链。

[4413] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4414] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

[4415] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

[4416] 其中, "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4417] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4418] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

[4419] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

[4420] 其中, "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4421] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4422] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

[4423] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

[4424] 其中, "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4425] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4426] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

[4427] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

[4428] 其中, "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4429] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4430] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

[4431] 3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

[4432] 其中 "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4433] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4434] 5' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

[4435] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

[4436] 其中 "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4437] 在一个此类实施方案中, dsRNA 包含:

[4438] 5' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

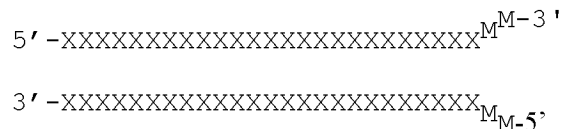
[4439] 3' -PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

[4440] 其中 "X" = RNA, "M" 是核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸) 且 "P" = 肽。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述平端 - 平端 dsRNA 试剂中。

[4441] 本发明还涵盖任何以下所述的示例性结构, 其中本发明的至少一个肽与第一链或第二链中的至少一条链的至少一个末端缀合, 或者与本发明的 dsRNA 的第一链或第二链中的至少一个链内部缀合。

[4442] 在另一个实施方案中, DsiRNA 包含具有相同长度具有 1 至 3 个用作定向 Dicer 裂解的错配残基的链 (具体来说, 当第一链和第二链彼此退火时, DsiRNA 的第一链上的位置 1、2 或 3 (当从 3' 端残基编号时) 中的一个或多个与第二链上的 5' 端区的对应残基错配)。具有两个末端错配残基的示例性 27mer DsiRNA 试剂显示为:

[4443]



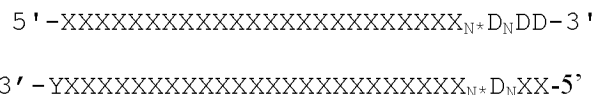
[4444] 其中“X”=RNA, “M”=当链退火时不与以其它方式互补的链的对应“M”残基碱基配对(氢键)的核酸残基(RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸)。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2'-O-甲基 RNA 单体-如以上不对称试剂所示从底部(第二)链的 3' 端残基开始的 2'-O-甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述“平端/散损末端(fray)”dsRNA 试剂中。上链(第一链)是有义链,并且下链(第二链)是反义链。

[4445] 在某些另外的实施方案中,本发明提供 RNA 干扰(RNAi)组合物,所述 RNA 干扰(RNAi)组合物在双链核酸(dsNA)的区内具有一个或多个碱基配对的脱氧核糖核苷酸,所述双链核酸位于预计的有义链 Dicer 裂解位点的 3' 端及预计的反义链 Dicer 裂解位点的相应 5' 端。本发明的组合物包含是前体分子的 dsNA,即,本发明的 dsNA 经体内加工以生成活性小干扰核酸(siRNA)。通过 Dicer 将 dsNA 加工成并入 RISC 中的活性 siRNA。

[4446] 在某些实施方案中,本发明的 DsiRNA 试剂可具有任何以下示例性结构:

[4447] 在一个此类实施方案中,DsiRNA 包含:

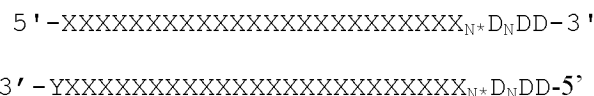
[4448]



[4449] 其中,“X”=RNA,“Y”是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2'-O-甲基 RNA 单体,在某些实施方案中,“Y”是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2'-O-甲基 RNA 单体,“D”=DNA,且“N”=1 至 50 或更多,但是任选地为 1 至 8。“N*”=0 至 15 或更多,但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中,上链是有义链,且下链是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。

[4450] 在相关实施方案中,DsiRNA 包含:

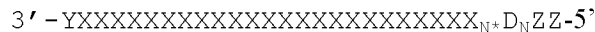
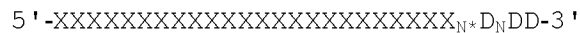
[4451]



[4452] 其中,“X”=RNA,“Y”是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2'-O-甲基 RNA 单体,在某些实施方案中,“Y”是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2'-O-甲基 RNA 单体,“D”=DNA,且“N”=1 至 50 或更多,但是任选地为 1 至 8。“N*”=0 至 15 或更多,但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中,上链是有义链,且下链是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。

[4453] 在另一个此类实施方案中,DsiRNA 包含:

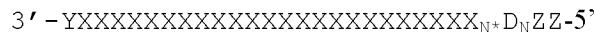
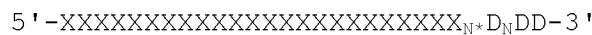
[4454]



[4455] 其中, "X" = RNA, "X" = 2' -O- 甲基 RNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任意的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, 在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4456] 在另一个此类实施方案中, DsiRNA 包含:

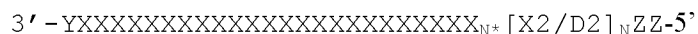
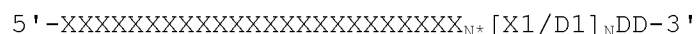
[4457]



[4458] 其中, "X" = RNA, "X" = 2' -O- 甲基 RNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任意的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, 在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4459] 在另一个实施方案中, DsiRNA 包含:

[4460]



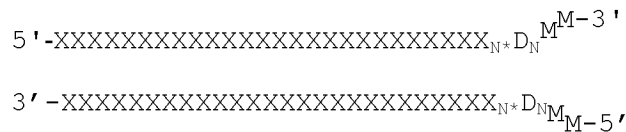
[4461] 其中, "X" = RNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任意的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, 在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8, 其中至少一个 D_{1N} 存在于上链中且与下链中的对应 D_{2N} 碱基配对。任选地, D_{1N} 和 D_{1_{N+1}} 与对应的 D_{2N} 和 D_{2_{N+1}} 碱基配对; D_{1N}、D_{1_{N+1}} 和 D_{1_{N+2}} 与对应的 D_{2N}、D_{1_{N+1}} 和 D_{1_{N+2}} 碱基配对等。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4462] 在上述绘示的结构中的任何结构中, 有义链或反义链的 5' 端任选地包含磷酸基团。

[4463] 在另一个实施方案中, DNA:DNA- 延长 DsiRNA 包含具有相同长度具有 1 至 3 个用作定向 Dicer 裂解的错配残基 (具体来说, 当第一链和第二链彼此退火时, DsiRNA 的第一链

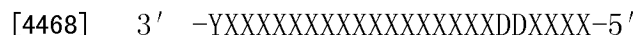
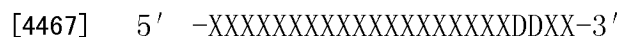
上的位置 1、2、3(当从 3' 端残基编号时)中的一个或多个位置与第二链上的 5' 端区的对应残基错配)的链。具有两个末端错配残基的示例性 DNA:DNA- 延长 DsiRNA 试剂显示为:

[4464]



[4465] 其中, "X" = RNA, "M" = 当链退火时不与另外互补链的对应 "M" 残基碱基配对(氢键)的核酸残基(RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸), "D" = DNA 且 "N" = 1 至 50 或更多,但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多,但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2' -O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部(第二)链的 3' 端残基开始的 2' -O- 甲基 RNA 单体的交替定位也可以用于上述“平端 / 散损末端”DsiRNA 试剂中。在一个实施方案中,上链(第一链)是有义链,并且下链(第二链)是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。平行于以上所示的不对称 / 突出试剂的那些模式的修饰和 DNA:DNA 延伸模式也可以并入此类“平端 / 散损末端”试剂中。

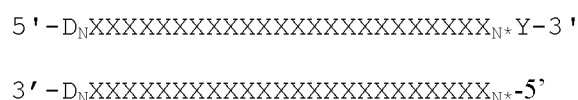
[4466] 在一个实施方案中,假设长度延伸 DsiRNA 试剂包含脱氧核糖核苷酸,所述脱氧核糖核苷酸定位于塑造为通过 Dicer 裂解的特定定向而起作用的位点,但是所述脱氧核糖核苷酸不需要在 dsNA 结构中存在碱基配对脱氧核糖核苷酸。这种分子的示例性结构显示为:



[4469] 其中, "X" = RNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体,在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体,且 "D" = DNA。在一个实施方案中,上链是有义链,且下链是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。上述结构经塑造为迫使 Dicer 裂解成最小 21mer 双链体,作为 Dicer 加工后的主要形式。在其中上述结构的下链为反义链的实施方案中,将两个脱氧核糖核苷酸残基定位于反义链 5' 端的最后一个残基和倒数第二个残基处可能减小脱靶效应(如现有研究显示至少来自反义链 5' 端的倒数第二个位置的 2' -O- 甲基修饰减小脱靶效应;例如,参见 US2007/0223427)。

[4470] 在一个实施方案中,DsiRNA 包含:

[4471]



[4472] 其中, "X" = RNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体,在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多,但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多,但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中,上链是有义链,且下链是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。

[4473] 在相关实施方案中, DsiRNA 包含:

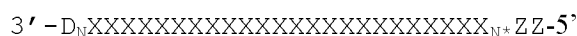
[4474]



[4475] 其中, "X" = RNA, 任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链。

[4476] 在另一个此类实施方案中, DsiRNA 包含:

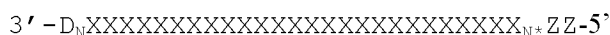
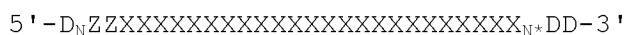
[4477]



[4478] 其中, "X" = RNA, 任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, "D" = DNA, "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。"Z" = DNA 或 RNA。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 并且 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4479] 在另一个此类实施方案中, DsiRNA 包含:

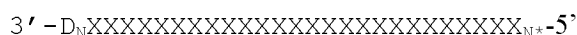
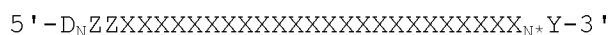
[4480]



[4481] 其中, "X" = RNA, "X" = 2' -O- 甲基 RNA, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4482] 在另一个此类实施方案中, DsiRNA 包含:

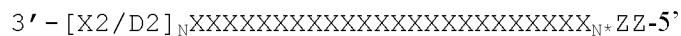
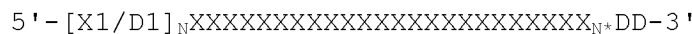
[4483]



[4484] 其中, "X" = RNA, "X" = 2' -O- 甲基 RNA, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 或 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。"Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体, 在某些实施方案中, "Y" 由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2' -O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4485] 在另一个实施方案中, DsiRNA 包含:

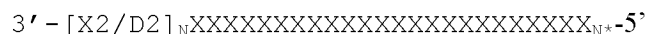
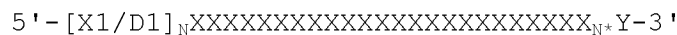
[4486]



[4487] 其中, "X" = RNA, "D" = DNA, "Z" = DNA 或 RNA, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8, 其中至少一个 D_{1N} 存在于上链中且与下链中的对应 D_{2N} 碱基配对。任选地, D_{1N} 和 D_{1_{N+1}} 与对应的 D_{2N} 和 D_{2_{N+1}} 碱基配对; D_{1N}、D_{1_{N+1}} 和 D_{1_{N+2}} 与对应的 D_{2N}、D_{2_{N+1}} 和 D_{2_{N+2}} 碱基配对等。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 其中 2'-O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4488] 在相关实施方案中, DsiRNA 包含:

[4489]

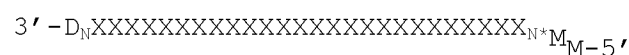


[4490] 其中, "X" = RNA, "D" = DNA, "Y" 是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2'-O- 甲基 RNA 单体, 在某些实施方案中, "Y" 是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域, 所述 RNA 单体任选地为 2'-O- 甲基 RNA 单体, 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8, 其中至少一个 D_{1N} 存在于上链中且与下链中的对应 D_{2N} 碱基配对。任选地, D_{1N} 和 D_{1_{N+1}} 与对应的 D_{2N} 和 D_{2_{N+1}} 碱基配对; D_{1N}、D_{1_{N+1}} 和 D_{1_{N+2}} 与对应的 D_{2N}、D_{2_{N+1}} 和 D_{2_{N+2}} 碱基配对等。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中, 上链是有义链, 且下链是反义链。或者, 下链是有义链, 且上链是反义链, 并且 2'-O- 甲基 RNA 单体沿上链 (而不是上述示意图中目前所绘示的下链) 定位于交替的残基处。

[4491] 在任何上述绘示的结构中, 有义链或反义链的 5' 端任选地包含磷酸基。

[4492] 在另一个实施方案中, DNA:DNA- 延伸的 DsiRNA 包含具有相同长度具有 1 至 3 个用作定向 Dicer 裂解的错配残基 (具体来说, 当第一链和第二链彼此退火时, DsiRNA 的第一链上的位置 1、2、3 (当从 3' 端残基编号时) 中的一个或多个与第二链上的 5' 端区的对应残基错配) 的链。具有两个末端错配残基的示例性 DNA:DNA- 延伸 DsiRNA 试剂显示为:

[4493]

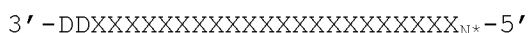
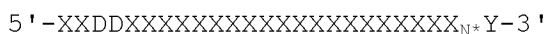


[4494] 其中, "X" = RNA, "M" 当链退火时不以其它方式与另外互补链的对应 "M" 残基碱基配对 (氢键) 的核酸残基 (RNA、DNA 或非天然的或经过修饰的核酸), "D" = DNA 且 "N" = 1 至 50 或更多, 但是任选地为 1 至 8。"N*" = 0 至 15 或更多, 但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。此类试剂的任何此类残基可任选地是 2'-O- 甲基 RNA 单体 - 如以上不对称试剂所示从底部 (第二) 链的 3' 端残基开始的 2'-O- 甲基 RNA 单体的交替定位也

可以用于上述“平端 / 散损末端”DsiRNA 试剂中。在一个实施方案中,上链(第一链)是有义链,并且下链(第二链)是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。平行于以上所示的不对称 / 突出剂的那些的修饰和 DNA:DNA 延伸模式也可以并入此类“平端 / 散损末端”试剂中。

[4495] 在另一个实施方案中,假设长度延伸的 DsiRNA 试剂包含脱氧核糖核苷酸,所述脱氧核糖核苷酸定位于塑造为通过 Dicer 裂解的特定定向而起作用的位点,但是所述脱氧核糖核苷酸不需要在 dsNA 结构中存在碱基配对的脱氧核糖核苷酸。这种分子的示例性结构显示为:

[4496]



[4497] 其中,“X”=RNA,“Y”是由 0 至 10 个 RNA 单体组成的任选的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体,在某些实施方案中,“Y”是由 1 至 4 个 RNA 单体组成的突出结构域,所述 RNA 单体任选地为 2' -O- 甲基 RNA 单体,且“D”=DNA。“N*”=0 至 15 或更多,但是任选地为 0、1、2、3、4、5 或 6。在一个实施方案中,上链是有义链,且下链是反义链。或者,下链是有义链,且上链是反义链。上述结构经塑造为使 Dicer 裂解成最小 21mer 双链体作为 Dicer 加工后的主要形式。在其中上述结构的下链为反义链的实施方案中,将两个脱氧核糖核苷酸残基定位于反义链 5' 端的最后一个和倒数第二个残基处可能减小脱靶效应(如现有研究显示:来自反义链 5' 端的至少倒数第二个位置的 2' -O- 甲基修饰减小脱靶效应;例如,参见 US 2007/0223427)。

[4498] 在某些实施方案中,任何上述结构中的“D”残基包括至少一个 PS-DNA 或 PS-RNA。任选地,任何上述结构中的“D”残基包括至少一个抑制 Dicer 裂解的经过修饰的核苷酸。

[4499] 虽然上述“DNA 延伸的”DsiRNA 试剂可分类为“左侧延伸”或“右侧延伸”,但也可以按本文关于“右侧延伸的”和“左侧延伸的”试剂所述类似的方式,产生和使用在单个试剂内同时包含左侧延伸和右侧延伸的含 DNA 序列的 DsiRNA 试剂(例如,在核心 dsRNA 结构周围的两侧为 dsDNA 延伸)。

[4500] 在一些实施方案中,本发明的 DsiRNA 进一步包含连接 DNA:DNA- 延伸的 DsiRNA 试剂的有义链和反义链的连接部分或结构域。任选地,这种连接部分结构域连接有义链的 3' 端和反义链的 5' 端。连接部分可能为化学(非核苷酸)连接子,诸如寡聚亚甲基二醇连接子、寡聚乙二醇连接子或其它本领域公认的连接子部分。或者,连接子可以为核苷酸连接子,任选地包括延伸环和 / 或四核苷酸环。

[4501] 在一个实施方案中,DsiRNA 试剂具有不对称结构,并且有义链具有 25 个碱基对长度,且反义链具有长度为 27 个碱基对并具有 1 至 4 个碱基的 3' 突出(例如,一个碱基的 3' 突出、两个碱基的 3' 突出、三个碱基的 3' 突出或四个碱基的 3' 突出)。在另一个实施方案中,这种 DsiRNA 试剂具有不对称结构,其在有义链的 3' 端处进一步含有 2 个脱氧核苷酸。

[4502] 在另一个实施方案中,DsiRNA 试剂具有不对称结构,并且反义链的长度为 25 个碱基对,且有义链的长度为 27 个碱基对并具有 1 至 4 个碱基的 3' 突出(例如,一个碱基的

3' 突出、两个碱基的 3' 突出、三个碱基的 3' 突出或四个碱基的 3' 突出)。在另一个实施方案中,这种 DsiRNA 试剂具有不对称结构,其在反义链的 3' 端处进一步含有 2 个脱氧核苷酸。

[4503] 对本发明的上述平端 / 散损末端试剂来说,认为散损末端结构的精确序列对功效来说并非至关重要,例如第一链的 3' 端残基中的一个或两个残基仅需要与第二链的对应 5' 端残基不互补。在某些实施方案中,本发明的 DsiRNA 试剂需要(例如)第一链的至少 19 个、至少 20 个、至少 21 个、至少 22 个、至少 23 个、至少 24 个、至少 25 个或至少 26 个残基与第二链的对应残基互补。在某些相关实施方案中,这些与第二链的对应残基互补的第一链残基任选地为连续残基。另外地和 / 或可选地,某些错配残基还可以定位于(例如)有义链的一半 5' 内,这意味着在某些实施方案中,第一链与第二链之间的完全互补不会在整个第一链和第二链内保持,即使不包括第一链 3' 端 / 第二链 5' 端处的散损结构 - 在此类实施方案中,第一链可以是有效的第一链,而第一链与第二链之间(任选地,不包括散损试剂的第一链的两个 3' 端残基 / 第二链的两个 5' 端残基)的互补程度为残基的至少 80%、残基的至少 85%、残基的至少 90%、残基的至少 90%、残基的至少 96%。在某些实施方案中,本发明的 DsiRNA 的第二链相对于第一链或相对于靶 RNA 序列的互补程度可以为与第一链或与等同于上述这种 DsiRNA 的第一链的靶 RNA 序列的互补水平。

[4504] RNA 加工

[4505] siRNA

[4506] 通过存在于细胞中的长 dsRNA 分子来触发 siRNA 介导 RNAi 的过程。在 RNAi 的开始步骤期间,通过 Dicer(含有两个核糖核酸酶 III 样结构域的酶的保守家族),将这些 dsRNA 分子裂解成为 21 至 23 个核苷酸(nt)的小干扰 RNA 双链体(siRNA)(Bernstein 等,2001;Elbashir 等,2001)。siRNA 的特征在于在每条链上存在 19 至 21 个碱基对的双链体区和 2 个核苷酸的 3' 突出。在 RNAi 的效应子步骤期间,siRNA 开始并入称为 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)的多聚体蛋白复合物,其中它们用作选择用于降解的完全互补的 mRNA 底物的引导物。通过 mRNA 在与 siRNA 互补的区内进行内切核苷酸裂解来发起降解。更精确地说,在来自引导 siRNA 5' 端的位置 10 核苷酸处将 mRNA 裂解(Elbashir 等,2001 Genes&Dev. 15:188-200;Nykanen 等,2001 Cell 107:309-321;Martinez 等,2002 Cell 110:563-574)。将负责此裂解的核酸内切酶识别为 Argonaute2(Ago2;Liu 等,Science,305:1437-41)。

[4507] miRNA

[4508] 大多数人 miRNA(70%)(和大概其它哺乳动物的大多数 miRNA)是由内含子和 / 或外显子转录而成的,且大约 30% 位于基因间区(Rodriguez 等,Genome Res. 2004,14(10A),1902-1910)。在人和动物中,通常由 RNA 聚合酶 II 转录 miRNA(Farh 等,Science 2005,310(5755),1817-1821),和在一些情况下由聚合酶 III 转录 miRNA(Borchert 等,Nat. Struct. Mol. Biol. 2006,13(12),1097-1101)。由 RNA 聚合酶 III 转录某些病毒编码 miRNA(Pfeffer 等,Nat. Methods 2005,2(4),269-276;Andersson 等,J. Virol. 2005,79(15),9556-9565),并且一些病毒编码 miRNA 位于病毒基因的开放阅读框内(Pfeffer 等,Nat. Methods 2005,2(4),269-276;Samols 等,J. Virol. 2005,79(14),9301-9305)。miRNA 转录会导致产生大的单顺反子、双顺反子或多顺反子主要转录物(pri-miRNA)。单个 pri-miRNA 的长度范围可能为大约 200 个核苷酸(nt)至数千个碱基(kb)且具有 5' 7-甲

基鸟苷 (m7) 帽和 3' 聚 (A) 尾部。典型地,成熟 miRNA 序列定位于 pri-miRNA 内不完全的茎环序列的区 (Cullen, Mol. Cell 2004, 16 (6), 861-865)。

[4509] 细胞核中 miRNA 成熟的第一个步骤是通过核糖核酸酶 III Drosha-DGCR8 核微处理器复合物识别和裂解 pri-miRNA,从而释放称为前体 miRNA 的含有 ~ 70nt 发夹的前体分子,其中在 5' 端处具有单磷酸和在 3' 端处具有带有羟基的 2-Bt 突出 (Cai 等, RNA 2004, 10 (12), 1957-1966; Lee 等, Nature 2003, 425 (6956), 415-419; Kim Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2005, 6 (5), 376-385)。下一个步骤为通过 Exportin-5 (载体蛋白) 将前体 miRNA 运出细胞核而运输至细胞质中 (Yi 等, Genes. Dev. 2003, 17 (24), 3011-3016, Bohnsack 等, RNA 2004, 10 (2), 185-191)。Exportin-5 和 Exportin-5 的辅因子 Ran 的 GTP 结合形式一起识别 2 个核苷酸的 3' 突出并将其与具有前体 miRNA 特征的相邻茎结合 (Basyuk 等, Nucl. Acids Res. 2003, 31 (22), 6593-6597, Zamore Mol. Cell. 2001, 8 (6), 1158-1160)。在细胞质中, GTP 水解导致释放前体 miRNA,随后由细胞核内切酶 III 酶 Dicer 加工所述前体 miRNA (Bohnsack 等)。Dicer 首先因它在产生介导 RNA 干扰 (RNAi) 的 siRNA 中的作用而得到识别。Dicer 和它的辅因子 TRBP 配合作用 (Transactivating region binding protein; Chendrimata 等, Nature 2005, 436 (7051), 740-744) 和 PACT (interferon-inducible double strand-RNA-dependant protein kinase activator; Lee 等, EMBO J. 2006, 25 (3), 522-532)。这些酶在位于前体 miRNA 发夹结构基部的 3' 端的 2 个核苷酸突出处结合,且去除末端环,从而产生两端均具有 5' 单磷酸、3' 2 个核苷酸的突出和 3' 羟基的大约 21-nt miRNA 双链体中间物。随后,选择将 miRNA 引导链 (该 miRNA 引导链的 5' 端在能量上较不稳定) 并入 RISC (RNA 诱导的沉默复合物) 中,同时释放且降解“过客”链 (Maniataki 等, Genes. Dev. 2005, 19 (24), 2979-2990; Hammond 等, Nature 2000, 404 (6775), 293-296)。RISC 的组合物仍保持不完全地确定,但是关键组分为 Argonaute (Ago) 蛋白质家族的成员 (Maniataki 等; Meister 等, Mol. Cell. 2004, 15 (2), 185-197)。

[4510] 随后,成熟 miRNA 将 RISC 引导至互补的 mRNA 种类。如果靶 mRNA 与带有 miRNA 的 RISC 具有完全互补性,那么将使 mRNA 裂解且降解 (Zeng 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100 (17), 9779-9784; Hutvagner 等, Science 2002, 297 (5589), 2056-2060)。但是作为在哺乳动物细胞中最常见的情况,miRNA 靶向具有不完全互补性的 mRNA 且抑制它们的翻译,这造成相应蛋白质的降低表达 (Yekta 等, Science 2004, 304 (5670), 594-596; Olsen 等, Dev. Biol. 1999, 216 (2), 671-680)。miRNA 的 5' 区 (称为种子区 (seed region)), 尤其是在 miRNA 的核苷酸 2 至 7 或 8 处 miRNA 与靶标序列之间的匹配 (从 5' 端处的位置 1 开始) 实质上对 miRNA 靶向来说很重要,且此种子匹配还成为广泛用于计算机预测 miRNA 靶向中的关键原理 (Lewis 等, Cell 2005, 120 (1), 15-20; Brennecke 等, PLoS Biol. 2005, 3 (3), e85)。主要通过 3' UTR 中的多个互补位点介导 miRNA-mRNA 双链体的 miRNA 调节,但是存在许多例外情况。miRNA 还可结合 5' UTR 和 / 或 mRNA 的编码区,这导致类似的结果 (Lytle 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104 (23), 9667-9672)。

[4511] 核糖核酸酶 H

[4512] 核糖核酸酶 H 为将 DNA/RNA 双链体中 RNA 的 3' -O-P 键裂解以生成 3' -羟基和 5' -磷酸末端产物的核糖核酸酶。核糖核酸酶 H 为非特异性的核酸内切酶且通过水解机制由结合酶的二价金属离子辅助催化 RNA 的裂解。几乎在所有的生物体中 (从古细菌和原

核生物到真核生物)都发现了核糖核酸酶 H 家族的成员。在 DNA 复制期间,认为核糖核酸酶 H 切割负责引发冈崎片段的产生的 RNA 引物;然而,核糖核酸酶 H 酶可能更常用于裂解足够长度的任何 DNA:RNA 杂交序列(例如,通常为在哺乳动物中长度为 4 个或更多个碱基对的 DNA:RNA 杂交序列)。

[4513] 微小 RNA 和微小 RNA 样治疗

[4514] 已经将微小 RNA(miRNA)描述为通过与模板转录物的 3' UTR 结合来起作用,由此通过与典型 RNA 干扰相关但不同的机制抑制由模板转录物编码的蛋白质的表达。具体来说,认为 miRNA 是通过降低靶转录物的翻译而不是通过降低其稳定性来起作用。天然的 miRNA 的长度通常为大约 22nt。据信,它们源自大约 70nt 长的被称为小时序 RNA 的较大前体。

[4515] 诸如 siRNA(且更具体地说,诸如 miRNA)的干扰剂可容忍 siRNA/模板(miRNA/模板)双链体中较大数目的错配,且尤其可容忍双链体中心区内的错配,所述干扰剂结合在 3' UTR 内(或在靶转录物中的其它地方,例如在 Notch 和 / 或 Notch 家族的转录物的重复元件中)。事实上,有证据证明,一些错配可能是期望的或所需的,诸如天然的 stRNA 频繁地表现此类错配,而且已经显示出抑制体外翻译 miRNA 也是如此(Zeng 等, Molecular Cell, 9:1-20)。例如,当与靶转录物杂交时,此类 miRNA 通常包含由错配区分离的完全互补的两个延伸物。此种杂交复合物通常包含含有核苷酸对的完全互补的两个区(双链体部分)和至少单个错配碱基对,该碱基对可能是(例如)G:A、G:U、G:G、A:A、A:C、U:U、U:C、C:C、G:-、A:-、U:-、C:-等。此类错配核苷酸,尤其是如果串联存在(例如,两个、三个或四个核苷酸错配区)可以形成凸出,该凸出将位于此种凸出的任一侧面上的双链体部分分离。多种结构是可能的。例如,miRNA 可以包含多个非同一性(错配)区。在靶标和 miRNA 皆包含未配对核苷酸的意义上,非同一性(错配)区不必是对称的。例如,已描述了其中仅一个链包含未配对核苷酸的结构(Zeng 等,图 14)。通常,miRNA 内完全互补的延伸物的长度至少是 5 个核苷酸,例如长度是 6 个、7 个或更多个核苷酸,而错配区的长度可能是(例如)1 个、2 个、3 个或 4 个核苷酸。

[4516] 通常,任何特定的 siRNA 可通过以下途径起到抑制基因表达的作用:(i)“典型的”siRNA 途径,其中靶转录物的稳定性降低和其中通常优选 siRNA 与靶标之间完全互补,和(ii)“替代的”途径(通常表征为动物中的 miRNA 途径),其中靶转录物的翻译被抑制。通常,通过机制(i)由特定 siRNA 所靶向的转录物将与通过机制(ii)所靶向的转录物不同,尽管单个转录物可含有可用作典型途径和替代途径的靶标的区是可能的。(注意,术语“典型”和“替代”仅为了方便起见而使用,且通常被认为是反映了在动物细胞中发现此类机制的历史计时,但并不反映任一机制的重要性、有效性或其它特征)。siRNA 设计的一个共同目标是通过机制(i)靶向具有高度特异性的单个转录物,同时使脱靶效应(包括可能通过机制(ii)引起的那些效应)最小化。然而,具体来说,本发明的目的是提供有意具有错配残基的 RNA 干扰剂,为了模拟天然的 miRNA 的活性或为了产生针对靶 RNA(目前未知针对其的对应 miRNA)的试剂,所述 RNA 干扰剂具有能够容忍此类错配(且当然有可能由此类错配增强)的此类“DmiRNA”剂的抑制和 / 或治疗功效 / 效力。

[4517] miRNA 剂对错配核苷酸的耐受性(并且实际上是细胞中以上机制(ii)的存在和自然使用)建议应以有利的和 / 或基于完全互补的 siRNA(该 siRNA 通过机制(i)起作用)的

“典型”使用所扩展的方式使用 miRNA。因为 miRNA 是天然的分子,所以在应用 miRNA 作为治疗剂时很可能会有不同的优点。miRNA 得益于数亿年来它们功能的进化“微调”。因此,序列特异性的“脱靶”效应不应该是在天然的 miRNA 的情况下存在的问题,推而广之也不应该是在本发明的经设计用于直接模拟天然 miRNA 的合成 DmiRNA 的情况下存在的问题。另外,miRNA 已进化为调节基因的组的表达,从而驱动上调和下调(在某些情况中,在单个 miRNA 对多个靶 RNA 混杂作用的细胞内同时进行两种功能),结果是可以精确地调节复杂的细胞功能。天然的 miRNA 的此种替换可涉及将合成的 miRNA 或 miRNA 模拟物(例如,DmiRNA)引入病变组织中,试图恢复已受一个或多个 miRNA 的下调影响的正常增殖、凋亡、细胞周期和其它细胞功能。在某些情况中,这些 miRNA 调节途径的再激活已产生了显著的治疗响应(例如,在对心脏肥大的一项研究中,由 miRNA 表达盒的腺病毒介导的递送产生的 miR-133 过表达保护动物免受激动剂诱导的心脏肥大,然而相反地由 antagomir 产生的野生型小鼠中 miR-133 的降低引起肥大标记物物的增加(Care 等, Nat. Med. 13 :613-618))。

[4518] 迄今为止,多于 600 个 miRNA 已经被鉴定为在人基因组内编码,其中通过将细胞核和细胞质中的蛋白质进行组合来表达且加工此类 miRNA。miRNA 在脊椎动物中高度保守且包含所有哺乳动物基因的大约 2%。由于每个 miRNA 似乎要调节多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个乃至几十个至几百个)不同基因的表达,所以 miRNA 可起到“主控开关”的作用,从而有效地调节和协调多个细胞途径和过程。通过协调多个基因的表达,miRNA 在胚胎发育、免疫、炎症以及细胞生长和增殖中起主要作用。

[4519] 表达和功能研究表明特定 miRNA 表达的变化对各种人疾病来说是关键性的。越来越多证据显示将特定 miRNA 引入疾病细胞和组织中可诱导有利的治疗响应(Pappas 等, Expert Opin Ther Targets. 12 :115-27)。由于某些 miRNA 作为肿瘤抑制剂的明显作用,可能 miRNA 疗法未来最有希望用于癌症中。通过以下观察,可至少部分支持用于(例如)癌症的基于 miRNA 疗法的基本原理:

[4520] (1) 当与普通组织相比时,miRNA 通常在病变组织中以改变的水平错误调控和表达。数个研究已显示(目对于癌组织的相应普通组织来说)癌组织中改变水平的 miRNA。通常,改变的表达是基因突变的结果,所述基因突变导致特定 miRNA 增加表达或降低表达。具有独特 miRNA 表达特征的疾病可用作诊断标记物和预后标记物,且可用本发明的 DsiRNA(DmiRNA)试剂进行靶向。

[4521] (2) 错误调控 miRNA 通过起致癌基因或肿瘤抑制剂的作用来促使癌症发展。致癌基因定义为其过度表达或不当激活导致肿瘤形成的基因。肿瘤抑制剂是为防止细胞变为癌性细胞所需的基因;肿瘤抑制剂的下调或失效是癌症的常见诱导物。两种类型的基因皆代表优选的药物靶标,因为这种靶向尤其可根据特定癌症的分子基础起作用。致癌 miRNA 的实例是 miR-155 和 miR-17-92;let-7 是肿瘤抑制 miRNA 的实例。

[4522] (3) 在临床前动物研究中,施用 miRNA 通过阻断或降低肿瘤的生长来诱导治疗响应。科学文献提供了概念验证研究,该研究证明恢复 miRNA 功能可阻止或降低在体外以及动物模型中癌细胞的生长。良好表征的实例是针对乳腺癌和肺癌的模型中 let-7 的抗肿瘤活性。经设计为模拟 let-7 的本发明的 DsiRNA(DmiRNA)可用于靶向此类癌症,并且还可能使用本文所述的 DsiRNA 设计参数来产生针对靶 RNA 的新 DsiRNA(DmiRNA)试剂以筛选治疗性先导化合物,对于所述靶 RNA 目前没有已知的对应天然的 miRNA(例如,Notch 或其它转

录物内的重复),所述新 DsiRNA 试剂为例如能够减小临床前动物模型中肿瘤负荷的试剂。

[4523] (4) 给定的 miRNA 控制多个细胞途径,并因此可能具有优良的治疗活性。基于它们的生物学,miRNA 可起基因组的“主控开关”的作用,从而调节多个基因产物且协调多个途径。由 miRNA 调节的基因包括编码传统致癌基因和肿瘤抑制剂的基因,他们当中许多被制药业单独地选作药物靶标。因此,通过靶向多个与疾病和 / 或癌症相关的基因,miRNA 疗法可具有优于 siRNA 和其它形式的先导化合物的活性。如果观察到 miRNA 的错误调控通常是肿瘤发生过程中的早期事件,那么替换缺失 miRNA 的 miRNA 疗法可能是最适当的疗法。

[4524] (5) miRNA 是天然分子,并因此不易于诱导非特异性副作用。数百万年来的进化有助于发展 miRNA 的调节网络,从而微调 miRNA 与靶信使 RNA 的相互作用。因此,当在适当环境内进行应用时,miRNA 和 miRNA 衍生物(例如,经设计模拟天然的 miRNA 的 DmiRNA)将几乎不具有任何序列特异性“脱靶”效应。

[4525] siRNA 和 miRNA 的物理性质是类似的。因此,有效地用于递送 siRNA(例如,本发明的 DsiRNA)的技术可同样有效地递送合成的 miRNA(例如,本发明的 DmiRNA)。

[4526] DsiRNA 试剂的缀合和递送

[4527] 在某些实施方案中,本发明涉及用于治疗患有疾病或病症或者处于发展疾病或病症风险的受治疗者的方法。在此类实施方案中,DsiRNA 可作为用于控制疾病或病症的新型治疗剂。本方法包含向患者(例如,人)施用本发明的药物组合物,以降低靶 RNA 的表达、水平和 / 或活性。即使在所述 DsiRNA 针对转录物的非编码区(例如,靶标 5' UTR 或 3' UTR 序列)的情况下,也可通过本发明的 DsiRNA 降低由目标 RNA 编码的多肽的表达、水平和 / 或活性。鉴于它们的高度特异性,本发明的 DsiRNA 可特异性地靶向细胞和组织的目标序列,任选地以等位基因特异性的方式,其中多态性等位基因存在于个体和 / 或群体内。

[4528] 在治疗疾病或病症时,可以使 DsiRNA 接触受治疗者的细胞或组织,例如,表现蛋白质错误调控和 / 或以其它方式被靶向以降低蛋白质水平的受治疗者的细胞或组织。例如,可以使和目标 RNA 序列中的所有或部分基本上同一的 DsiRNA 在体内或体外与此种细胞接触,或将所述 DsiRNA 引入此种细胞中。类似地,可以向患有疾病或病症或者处于发展疾病或病症风险的受治疗者直接施用和目标 RNA 序列中的所有或部分基本上同一的 DsiRNA。

[4529] 本发明的 DsiRNA 试剂的治疗用途涉及使用 DsiRNA 试剂的制剂,所述 DsiRNA 试剂包含多个不同的 DsiRNA 试剂序列。例如,可以将当前所述试剂中的两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个等组合用于产生制剂,例如靶向靶 RNA 的多个不同区的制剂或不仅靶向目标 RNA 而且靶向(例如)与疾病或病症(与目标靶 RNA 有关)有关的细胞靶基因的制剂。还可构建本发明的 DsiRNA 试剂,以使 DsiRNA 试剂的任一条链独立地靶向 RNA 靶标的两个或多个区,或者使 DsiRNA 试剂的一条链靶向本领域已知的靶 mRNA 的细胞靶基因。

[4530] 使用靶向靶核酸分子的大于一个区的多功能 DsiRNA 分子还可以提供 RNA 水平和表达的有效抑制。例如,本发明的单个多功能的 DsiRNA 构建体可以靶向以上两者。

[4531] 因此,本发明的 DsiRNA 试剂可单独地或者与其它药物组合或结合用于治疗、抑制、减轻或预防与靶 RNA 有关的疾病或病症。例如,在适于治疗的条件下,可以向受治疗者或者向对本领域技术人员显而易见的其它适当细胞施用(单独地或与一种或多种药物组合)所述 DsiRNA 分子。

[4532] DsiRNA 分子还可以与其它已知治疗物组合用于治疗、抑制、减轻或预防与受治疗者或生物体中的靶 RNA 有关的疾病或病症。例如,所述 DsiRNA 分子可以与一种或多种已知化合物、治疗或方法组合用于治疗、抑制、减轻或预防本领域已知的受治疗者或生物体中与靶 RNA 有关的疾病或病症。

[4533] 本发明的 DsiRNA 试剂可以与另一个部分(例如,非核酸部分,诸如肽)、有机化合物(例如,染料、胆固醇等)(例如,在 DsiRNA 试剂的有义链或反义链的 5' 端或 3' 端处)缀合或不缀合。与相应的未缀合的 DsiRNA 试剂相比,以此方式修饰 DsiRNA 试剂可以提高细胞摄取或增强 DsiRNA 试剂衍生物的细胞靶向活性、具有追踪细胞中的 DsiRNA 试剂衍生物的用途、或与相应的未缀合的 DsiRNA 试剂相比提高 DsiRNA 试剂衍生物的稳定性。

[4534] 本发明还涵盖与治疗剂进一步缀合的 dsRNA-肽缀合物,所述治疗剂为例如治疗或改善疾病(例如,癌症)的症状和/或进展的试剂。

[4535] 引入核酸、载体和宿主细胞的方法

[4536] 可将本发明的 DsiRNA 试剂直接(即,细胞内地)引入细胞中;或者将所述 DsiRNA 试剂细胞外地引入生物体腔体中、胞间隙、循环中,口服引入所述 DsiRNA 试剂,或可通过使细胞或生物体浸入含有核酸的溶液中来引入所述 DsiRNA 试剂。血管或血管外循环、血液或淋巴系统和脑脊液是可将核酸引入其中的位点。

[4537] 可使用本领域中已知的核酸递送方法来引入本发明的 DsiRNA 试剂,所述核酸递送方法包括注入含有核酸的溶液、通过由核酸包裹的微粒进行轰击、将细胞或生物体浸泡于核酸溶液中、或在存在核酸的情况下进行细胞膜的电穿孔。也可使用用于将核酸引入细胞的本领域已知的其它方法,诸如脂质介导的载体运输、化学制品介导的运输和阳离子脂质体转染(诸如,磷酸钙)等。可将核酸和其它发挥以下一种或多种活性的其它组分一起引入:增强细胞或对核酸的摄取或以其它方式提高对靶 RNA 的抑制。

[4538] 具有靶 RNA 的细胞可来自生殖细胞系或体细胞、全能的或多能的、分裂或未分裂的、实质或上皮、永生的或转化的细胞等。细胞可以是干细胞或分化的细胞。分化的细胞类型包括脂肪细胞、成纤维细胞、肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、神经元、神经胶质、血细胞、巨核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、白细胞、粒细胞、角化细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、肝细胞和内分泌腺或外分泌腺的细胞。

[4539] 根据特定靶 RNA 序列和所递送的 DsiRNA 试剂材料的剂量,这种方法可引起 RNA 功能部分或完全丧失。至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 或以上的靶细胞中的 RNA 水平或表达(RNA 表达或已编码的多肽表达)的降低或丧失是示例性的。抑制 RNA 水平或表达指 RNA 或 RNA 编码的蛋白水平不存在(或可观察到的降低)。特异性指能够抑制 RNA 而对细胞中其它基因无明显影响的能力。抑制结果可通过检验细胞或生物体的外在特性或通过生化技术来确定,所述生化技术诸如 RNA 溶液杂交、核酸酶保护、Northern 杂交、逆转录、使用微阵列进行基因表达监测、抗体结合、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹法、放射免疫测定(RIA)、其它免疫测定和荧光激活的细胞分析(FACS)。还可基于施用此种 DsiRNA 试剂对疾病或病症的发生/进展的作用(不管是体内还是体外)测量本发明的 DsiRNA 试剂对靶 RNA 序列的抑制,所述疾病或病症与目标靶 RNA 有关,例如肿瘤形成、生长、转移等。治疗和/或降低肿瘤或癌细胞水平可包括停止肿瘤或癌细胞的生长或者降低肿

瘤或癌细胞水平,或使肿瘤或癌细胞水平降低(例如)10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或者以上,并且还可以以对数术语度量,例如可通过向细胞、组织或受治疗者施用本发明的 DsiRNA 试剂来实现癌细胞水平降低至 1/10、1/100、1/1000、1/10⁵、1/10⁶、1/10⁷。

[4540] 对细胞系或整个生物体中的 RNA 介导的抑制来说,可测量蛋白质产物易于测定的报告基因或药物抗性基因的表达式。此种报告基因包括:乙酰羟酸合酶(AHAS)、碱性磷酸酶(AP)、 β 半乳糖苷酶(LacZ)、 β 葡萄糖醛酸酶(glucoronidase)(GUS)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿荧光蛋白(GFP)、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素酶(Luc)、胭脂碱合酶(NOS)、章鱼碱合酶(OCS)及其衍生物。可使用可赋予对氨基青霉素、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、氨基蝶呤、草丁膦、嘌呤霉素和四环素抗性的多种选择标记。根据测定,对基因表达量的定量允许测定抑制程度,该抑制程度比未根据本发明进行处理的细胞高 10%、33%、50%、90%、95%或 99%。

[4541] 较低剂量的注射物质和延长施用 RNA 沉默剂后的时间可能会引起在较少部分的细胞(例如,至少 10%、20%、50%、75%、90%或 95%的靶细胞)中的抑制。细胞中基因表达的定量可显示在累积靶 RNA 或翻译靶蛋白的水平下类似的抑制量。例如,抑制效率可通过评估细胞中基因产物的量测定;可用在用于抑制 DsiRNA 的区外具有核苷酸序列的杂交探针检测 RNA,或可用针对该区的多肽序列产生的抗体检测翻译的多肽。

[4542] 应以允许每个细胞递送至少一拷贝的量引入 DsiRNA 试剂。较高的物质剂量(例如,每个细胞至少 5、10、100、500 或 1000 拷贝)可产生更有效的抑制;较低剂量也可用于特定应用。

[4543] 药物组合物

[4544] 在某些实施方案中,本发明提供包含本发明的 dsRNA-肽试剂的药物组合物。可适当地配制 dsRNA-肽试剂样品,且可以允许足够部分的样品进入细胞以诱导基因沉默(如果发生的话)的任何方式将 dsRNA-肽试剂样品引入细胞环境中。dsRNA 的许多制剂是本领域已知的和可以使用,只要 dsRNA 可以进入靶细胞以使 dsRNA 可以起作用。例如,参见美国公开专利申请第 2004/0203145A1 号和第 2005/0054598A1 号。例如,本发明的 dsRNA-肽试剂可在缓冲溶液(诸如磷酸盐缓冲的生理盐水溶液)、脂质体、胶囊结构和衣壳中配制。具有阳离子脂质的 DsiRNA 试剂的制剂可有助于将 DsiRNA 试剂转染至细胞中。例如,可以使用阳离子脂质,诸如 lipofectin(美国专利第 5,705,188 号);阳离子甘油衍生物;以及聚阳离子分子,诸如聚赖氨酸(公开的 PCT 国际申请 W097/30731)。合适的脂质包括:Oligofectamine、Lipofectamine(Life Technologies)、NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo) 或 FuGene 6(Roche),所有这些脂质都可根据制造商的说明使用。

[4545] 此种组合物通常包含核酸分子和药学上可接受的载体。如本文所使用的术语“药学上可接受的载体”包括适合药物施用的盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补充的活性化合物也可以并入组合物中。

[4546] 配制药物组合物使适合于预期的施用途径。施用途径的实例包括肠胃外施用,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包含以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、生理盐水溶

液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂，诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，诸如乙二胺四乙酸；缓冲液，诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调节张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱（诸如，盐酸或氢氧化钠）调节 pH。可将肠胃外制剂封闭在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多次剂量小瓶中。

[4547] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液（水溶性的情况下）或分散剂和用于临时制备无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉末。对静脉内施用来说，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL TM. (BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲的生理盐水 (PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的且应该是液体，以便于注射。组合物应该在生产和存储条件下稳定，且必须免受微生物（诸如，细菌和真菌）的污染作用而保存。载体可以为含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙烯乙二醇等）及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如，可以通过使用涂层（诸如，卵磷脂）、在分散剂的情况下通过维持所需粒径，且通过使用表面活性剂，来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂（例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等）实现防止微生物的作用。在很多情况下，优选地在组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇（诸如，甘露醇、山梨糖醇）、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂（例如，单硬脂酸铝和明胶）可延长可注射的组合物的吸收。

[4548] 可以根据需要，通过将所需量的活性化合物与一种上述成分或上述成分的组合并入适当溶剂中，随后进行过滤灭菌，来制备无菌可注射溶液。通常，通过将活性化合物并入无菌媒介物中制备分散剂，所述无菌媒介物含有碱性分散介质和来自上述那些成分中的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，该方法得到含有活性成分与来自其先前经无菌过滤的溶液的任何其他所要成分的粉末。

[4549] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。出于口服治疗性施用的目的，可以将活性化合物与赋形剂合并，且以片剂、锭剂或胶囊剂（例如，明胶胶囊）的形式使用。还可以使用用作漱口剂的液体载体，来制备口服组合物。可以包含医药学上相容的粘合剂和 / 或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有以下具有类似性质的成分或化合物中的任一种：粘合剂，诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，诸如淀粉或乳糖；崩解剂，诸如藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂，诸如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂，诸如胶体二氧化硅；甜味剂，诸如蔗糖或糖精；或调味剂，诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

[4550] 对于通过吸入施用，化合物是以气雾剂喷雾形式递送，该气雾剂来自压力容器或含有适合推进剂（例如，气体，如二氧化碳）分配器，或喷雾器。这些方法包括美国专利 No. 6, 468, 798 中所述的那些。

[4551] 还可以通过经粘膜或经皮方式进行全身施用。对经粘膜或经皮施用来说，在制剂中可以使用适于穿透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的，并且包括例如适于透粘膜施用的去污剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻喷雾或栓剂来完成经粘膜施用。对经皮施用来说，将活性化合物配制成为通常为本领域已知的药膏、软膏、凝胶或乳膏。

[4552] 还可以将化合物制备成栓剂（例如，包括常规的栓剂基质，诸如可可脂和其它甘油酯）或用于直肠递送的保留灌肠剂的形式。

[4553] 还可以使用本领域已知的方法通过转染或感染来施用化合物，所述方法包括但不限于 McCaffrey 等，(2002 年)，Nature, 418(6893), 38-9（水动力学转染）；Xia 等，(2002 年)，Nature Biotechnol., 20(10), 1006-10（病毒介导的递送）；或 Putnam(1996 年)，Am. J. Health Syst. Pharm. 53(2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53(3), 325(1996 年) 中所描述的方法。

[4554] 还可以通过适于施用核酸试剂（诸如，DNA 疫苗）的任何方法来施用化合物。这些方法包括基因枪、生物注射器和皮肤贴剂，以及无针方法，诸如美国专利第 6, 194, 389 号中所公开的微粒 DNA 疫苗技术，及如美国专利第 6, 168, 587 号中所公开的使用粉末形式疫苗的哺乳动物经皮无针疫苗接种技术。另外，鼻内递送也是可能的，尤其如 Hamajima 等，(1998 年)，Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10 中所描述的。还可以使用脂质体（例如，如美国专利第 6, 472, 375 号中所描述的）和微胶囊包封技术。还可以使用生物可降解可靶向的微粒递送系统（例如，如美国专利第 6, 471, 996 号中所描述的）。

[4555] 在一个实施方案中，使用将保护化合物免于从身体中快速消除的载体制备活性化合物，所述载体诸如控制释放制剂，包括植入物和微胶囊包封的递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物，诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。可以使用标准技术制备此类制剂。还可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 商购这些物质。脂质体悬浮液（包括带有针对病毒抗原的单克隆抗体的靶向受感染细胞的脂质体）也可以用作药理学上可接受的载体。可以根据本领域技术人员已知方法（例如，如美国专利第 4, 522, 811 号中所描写的方法）制备这些物质。

[4556] 可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药物程序测定此类化合物的毒性和治疗功效，例如用于测定 LD₅₀（使 50% 的群体致命的剂量）和 ED₅₀（对 50% 群体治疗有效的剂量）。毒性与治疗作用之间的剂量比率是治疗指数，且所述剂量比率可以表示为比率 LD₅₀/ED₅₀。优选呈现较高治疗指数的化合物。虽然可使用呈现毒性副作用的化合物，但是应该注意设计使此类化合物靶向受影响组织的部位的递送系统，以使对未感染细胞的潜在损害最小化，进而减小副作用。

[4557] 从细胞培养物测定和动物研究获得的数据可以用于配制供人使用的剂量范围。此类化合物的剂量优选地在具有极少或没有毒性的循环浓度范围（该浓度范围包括 ED₅₀）内。剂量可以取决于所用剂型和所用施用途径而在此范围内变动。对于本发明的方法中的任何化合物来说，可以从细胞培养物测定中初步估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量，以达到如细胞培养物中所测定的包括 IC₅₀（即，达到症状最大半抑制的测试化合物的浓度）的循环血浆浓度范围。此种信息可用于更准确地确定用于人的剂量。例如，可以通过高效液相色谱法测量血浆水平。

[4558] 如本文中所定义，核酸分子的治疗有效量（即，有效剂量）取决于所选核酸。例如，如果选择编码 DsiRNA 试剂的质粒，那么可以施用范围大约为 1pg 到 1000mg 的单次剂量；在一些实施方案中，可以施用 10pg、30pg、100pg 或 1000pg，或者 10ng、30ng、100ng 或 1000ng，或者 10 μg、30 μg、100 μg 或 1000 μg，或者 10mg、30mg、100mg 或 1000mg。在一些实施方案中，可以施用 1 至 5g 的组合物。组合物可以每日施用一次或多次到每周施用一次或多次

(包括每隔一天一次)施用。本领域技术人员将理解某些因素可能会影响为有效治疗受治疗者所需的剂量和时程,所述因素包括但不限于疾病或病症的严重性、先前的治疗、受治疗者的基本健康状况和/或年龄、和存在的其它疾病。此外,使用治疗有效量的蛋白质、多肽或抗体治疗受治疗者可以包括单次治疗,或优选地,可以包括一系列治疗。

[4559] 如上文所定义,因为根据本发明的治疗上有用的肽“提高”与肽-dsRNA的缀合物的靶向,所以与未与肽缀合且为达到同等水平的结合、缔合或内化所需的相同 dsRNA 的量或剂量相比,需要较少 dsRNA(较低剂量的 dsRNA),这由下文所述测定中的 IC_{50} 来确定。例如,如体内或体外所测量的,与未与肽缀合的相同 dsRNA 的 IC_{50} 相比,达到 RNA/基因表达的 50%降低所需的 dsRNA-肽缀合物的 IC_{50} 减小(例如,参见 Hefner 等, *J Biomol Tech.* 2008 年 9 月:19(4)231-237; Zimmermann 等, *Nature*. 2006 年 5 月 4 日:441(7089):111-114; Durcan 等, *Mol Pharm.* 2008 年 7-8 月:5(4):559-566; Heidel 等, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 年 4 月 3 日:104(14):5715-5721)。

[4560] 如本文中定义,dsRNA-肽的有用剂量是大约 0.1mg/kg 至 100mg/kg,例如 0.2kg/mg 至 50kg/mg、0.5kg/mg 至 30kg/mg 或 0.5mg/kg 至 20mg/kg(包括 0.5kg/mg、0.6kg/mg、0.7kg/mg、0.8kg/mg、0.9kg/mg、1kg/mg、1.5kg/mg、2kg/mg、2.5kg/mg、3kg/mg、3.5kg/mg、4kg/mg、4.5kg/mg、5kg/mg、5.5kg/mg、6kg/mg、6.5kg/mg、7kg/mg、7.5kg/mg、8kg/mg、8.5kg/mg、9kg/mg、9.5kg/mg、10kg/mg、10.5kg/mg、11kg/mg、11.5kg/mg、12kg/mg、12.5kg/mg、13kg/mg、13.5kg/mg、14kg/mg、14.5kg/mg、15kg/mg、15.5kg/mg、16kg/mg、16.5kg/mg、17kg/mg、17.5kg/mg、18kg/mg、18.5kg/mg、19kg/mg、19.5kg/mg、20kg/mg 或以上)。

[4561] 例如,可以使用本领域已知的方法(包括但不限于上文 Xia 等, (2002) 中所描述的那些方法),将本发明的核酸分子插入表达构建体(例如,病毒载体、逆转录病毒载体、表达盒或质粒病毒载体)中。例如,可以通过吸入、口服、静脉内注射、局部施用(参见美国专利第 5,328,470 号)或通过立体定向注射(例如参见,Chen 等, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3054-3057)将表达构建体递送至受治疗者。递送载体的药物制剂可以包括可接受的稀释剂中的载体,或可以包含其中嵌有递送媒介物的缓释基质。或者,在使完整的递送载体可以完整地重组细胞(例如,逆转录病毒载体)中生成的情况下,药物制剂可以包括产生基因递送系统的一个或多个细胞。

[4562] 表达构建体可以是适用于适当表达系统中的任何构建体,且包括但不限于本领域已知的逆转录病毒载体、线性表达盒、质粒和病毒或病毒源性载体。此类表达构建体可以包括一个或多个可诱导的启动子、RNA Pol III 启动子系统(诸如, U6snRNA 启动子或 H1RNA 聚合酶 III 启动子)或者本领域已知的其它启动子。构建体可以包括 siRNA 中的一条链或两条链。表达两条链的表达构建体还可以包括连接两条链的环状结构,或每条链可以由相同构建体内的独立启动子独立地转录。每条链还可以由独立表达构建体(例如, Tuschl)转录(2002, *Nature Biotechnol* 20:500-505)。

[4563] 可以认识到,将 DsiRNA 试剂引入细胞环境中的方法将取决于细胞类型和细胞的环境组成。例如,当在液体内发现细胞时,一种优选的制剂是例如在 lipofectamine 中与脂质制剂一起的制剂,且可以将 DsiRNA 试剂直接添加至细胞的液体环境。例如,还可以通过静脉内、肌肉或腹膜内注射或口服,或者通过吸入或本领域已知的其它方法,将脂质制剂施用给动物。当制剂适合于在动物(诸如,哺乳动物,且更具体地说为人)中施用时,

制剂也是药学上可接受的。用于施用寡核苷酸的药学上可接受的制剂是已知的且可以使用。在一些实例中,可能优选的是,在缓冲液或盐水溶液中配制 DsiRNA 试剂,且将配制的 DsiRNA 试剂直接注入细胞中,如使用卵母细胞的研究中。还可进行 DsiRNA 试剂双链体的直接注射。对引入 dsRNA(例如,DsiRNA 试剂)的合适方法来说,参见美国公开专利申请第 2004/0203145A1 号。

[4564] 必须引入合适量的 DsiRNA 试剂,且这些量可以使用标准方法凭经验确定。通常,单个 DsiRNA 试剂种类在细胞环境中的有效浓度是约 50 纳摩尔或以下,10 纳摩尔或以下,或者可以使用浓度为约 1 纳摩尔或以下的组合物。在另一个实施方案中,使用浓度为约 200 皮可摩尔或以下、100 皮可摩尔或以下、50 皮可摩尔或以下、20 皮可摩尔或以下和浓度甚至为 10 皮可摩尔或以下、5 皮可摩尔或以下、2 皮可摩尔或以下、或 1 皮可摩尔或以下的方法可以用于许多环境中。

[4565] 可以通过将 DsiRNA 试剂组合物添加至可使细胞存活的任何细胞外基质中来进行所述方法,条件是配制 DsiRNA 试剂组合物以使足够量的 DsiRNA 试剂可以进入细胞以发挥它的作用。例如,该方法适用于存在于液体(诸如,液体培养物或细胞生长培养基)中、组织外植体中、或完整生物体(包括动物,诸如,哺乳动物,且尤其为人)中的细胞。

[4566] RNA 的水平或活性可以由本领域现已知的或后来开发的任何适当的方法测定。可以认识到,用于测量靶 RNA 和 / 或靶 RNA 表达的方法可取决于靶 RNA 的性质。例如,在靶 RNA 序列编码蛋白质的情况下,术语“表达”可以指源自目标(基因组的或外源来源的)基因的蛋白质或 RNA/ 转录物。在此类情况中,靶 RNA 的表达可以通过直接测量靶 RNA/ 转录物的量或通过测量目标 RNA 的蛋白质产物的量测定。蛋白质可以在蛋白质测定中(诸如通过染色法或免疫印迹法)测量,或者如果蛋白质催化可测量的反应,那么可以通过测量反应速率来测量蛋白质。所有此类方法是本领域已知的且可以使用。在打算测量靶 RNA 水平的情况下,可以使用用于检测 RNA 水平的本领域公认的任何方法(例如,RT-PCR、RNA 印迹法等)。在使用本发明的 DsiRNA 试剂靶向 RNA 时,还预计 DsiRNA 试剂降低受治疗者、组织、细胞(体外或体内)或在细胞提取物中 RNA 或蛋白质水平的功效的测量还可以用于确定与目标特定 RNA 有关的表型(例如,疾病或病症,例如癌症或肿瘤形成、生长、转移、扩散等)的降低程度。任何上述测量可以在细胞、细胞提取物、组织、组织提取物或任何其它合适的源材料上进行。

[4567] 可以通过可以可靠地检测 RNA 水平变化的任何适当的方法确定靶 RNA 的表达是否已经降低。通常,通过将未消化的 DsiRNA 引入细胞环境中,以使所述 DsiRNA 试剂中的至少一部分进入细胞质,随后测量靶 RNA 的水平来确定。在相同的未处理的细胞上进行相同的测量,且比较从每个测量中获得的结果。

[4568] 可以将 DsiRNA 试剂配制为药物组合物,该药物组合物包含药理学上有效量的 DsiRNA 试剂和药学上可接受的载体。药理学或治疗有效量指 DsiRNA 试剂有效地产生预期的药理学、治疗性或预防性结果的量。短语“药理学有效量”和“治疗有效量”或仅“有效量”指的是 RNA 有效地产生预期的药理学、治疗性或预防性结果的量。例如,如果当与疾病或病症有关的可测量的参数降低至少 20% 时认为给定的临床治疗有效,那么用于治疗该疾病或病症的药物的治疗有效量是为使那个参数降低至少 20% 所需的量。

[4569] 可以通过本领域已知的任何方式,施用本发明的适当配制的药物组合物,诸如通

过肠胃外路径,其包括静脉内、肌内、腹膜内、皮下、经皮、呼吸道(气雾剂)、直肠、阴道和局部(包括口腔和舌下)施用。在一些实施方案中,通过静脉内或腹腔内输液或注射施用药物组合物。

[4570] 通常,dsRNA 的合适的剂量单位在每日接受者的每公斤体重 0.001 至 0.25 毫克范围之内、或在每日每公斤体重 0.01 至 20 微克范围内、或在每日每公斤体重 0.01 至 10 微克范围内、或在每日每公斤体重 0.10 至 5 微克范围内、或在每日每公斤体重 0.1 至 2.5 微克范围内。可以每日施用一次包含 dsRNA 的药物组合物。然而,治疗剂也可以用含有 2、3、4、5、6 或更多亚剂量的剂量单位在一日中按适宜的时间间隔给药。在此情况下,每个亚剂量中所含 dsRNA 必须相应地降低,以达到总日剂量单位。例如,还可以使用传统持续释放制剂(该释放制剂提供在若干日时段内持续且一致地释放 dsRNA),将剂量单位复合以用于若干日内的单次剂量。持续释放制剂是本领域熟知的。在这个实施方案中,剂量单位含有相应的多个日剂量。不管制剂如何,药物组合物必须含有足以抑制所治疗的动物或人中靶基因表达的数量的 dsRNA。组合物复合的方式应使多个单位的 dsRNA 一起的总和含有足够的剂量。

[4571] 可以从细胞培养物测定和动物研究中获得数据,以制定适于人的合适的剂量范围。本发明的组合物的剂量应在包括 ED_{50} (如由已知方法测定)的循环浓度范围内,其中具有极少毒性或没有毒性。取决于剂型和使用的施用路径,剂量可在这个范围内变化。对于本发明的方法中的任何化合物来说,可以从细胞培养物测定中初步估计治疗有效剂量。可在动物模型中制定剂量,以达到如在细胞培养物中所确定的包括 IC_{50} (即,实现症状最大半抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。此种信息可用于更准确地确定用于人的剂量。可以标准方法(例如,通过高效液相色谱法)测量血浆中 dsRNA 的水平。

[4572] 可以将药物组合物与施用说明一起包括在试剂盒、容器、包装或分液器中。

[4573] 治疗方法

[4574] 本发明提供治疗处于疾病或病症的风险(或对疾病或病症敏感的)的受治疗者的预防性和治疗性方法,所述疾病或病症完全地或部分地由目标 RNA(例如,转录物和/或蛋白质水平的错误调控和/或提高)引起,或可通过选择性靶向目标 RNA 治疗。

[4575] 如本文所使用,“治疗”定义为对患有疾病或病症、具有疾病或病症的症状或者有发展疾病或病症倾向的患者应用或施用治疗剂(例如,DsiRNA 试剂或载体或者编码其的转基因),或者对来自该患者的分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,以达到治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响该疾病或病症、该疾病或病症的症状或患病倾向的目的。

[4576] 在一个方面,本发明提供用于通过向受治疗者施用治疗剂(例如,DsiRNA 试剂或者载体或编码其的转基因)来预防受治疗者患上所述疾病或病症(包括(例如)通过抑制目标 RNA 的表达防止在受治疗者内发生转化事件)的方法。有患疾病的风险的受治疗者可以例如通过本文所述诊断或预测测定中的一种或其组合来鉴别。预防剂可以在检测到受治疗者的(例如)癌症或者疾病或病症的症状特性表现之前施用,以预防该疾病或病症,或者延缓其发展。

[4577] 本发明的另一个方面涉及用于治疗性地(即,改变疾病或病症的症状的发作)治疗受治疗者的方法。可以在体外(例如,通过使细胞与 DsiRNA 试剂一起培养)或在体内

(例如,通过向受治疗者施用 DsiRNA 试剂)进行这些方法。

[4578] 关于预防性和治疗性治疗方法,可基于从药物基因组学领域中获得的知识专门调整或修改此类治疗。如本文所使用,“药物基因组学”指将基因组技术(诸如,基因测序、统计遗传学和基因表达分析)应用到临床开发和待售的药物中。更具体地说,所述术语涉及研究患者的基因如何确定其对药物的反应(例如,患者的“药物反应表型”或“药物反应基因型”)。因此,本发明的另一个方面提供用于根据个体的药物反应基因型使用本发明的靶 RNA 分子或靶 RNA 调节剂调整个体的预防性或治疗性治疗的方法。药物基因组学允许临床医师或内科医师将预防性或治疗性治疗靶向能从该治疗获得最大益处的患者,且避免对将经受毒性药物相关副作用的患者进行治疗。

[4579] 治疗剂可以在适当的动物模型中测试。例如,如本文所述的 DsiRNA 试剂(或者编码其的载体或转基因)可以用于动物模型中以确定使用所述试剂进行治疗的功效、毒性或副作用。或者,试剂(例如,治疗剂)可以用于动物模型中以确定此种试剂的作用机理。

[4580] 用于评估 mRNA 水平和表达下调的模型

[4581] 细胞培养物

[4582] 例如,可以使用以下程序测试本发明的 dsRNA-肽试剂的体内裂解活性。

[4583] 可以使用 HeLa 细胞或其它哺乳动物细胞在细胞培养物中测试本发明的 dsRNA-肽试剂,以确定靶 RNA 和靶蛋白质的抑制程度。针对本文所述的靶标选择 dsRNA-肽试剂(例如,参见图 1 和上述结构)。在通过合适的转染剂将这些试剂递送至(例如)培养物中培养的 HeLa 细胞或其它已转化或未经转化的哺乳动物细胞后,测量靶 RNA 抑制。使用扩增的实时 PCR 监测(例如,ABI 7700 TAQMAN®),相对于肌动蛋白或其它适当的对照测量靶 RNA 的相对量。与针对不相关的靶,或针对具有相同总长度和化学结构但在每一位置随机取代的随机化 DsiRNA 对照,或简单地针对适当的媒介物处理或未处理的对照物的寡核苷酸序列混合物进行比较。选出针对靶的初次和二次主导试剂,并进行优化。在选定最优的转染剂浓度之后,使用主导 DsiRNA 分子进行 RNA 抑制时间过程。

[4584] mRNA 的 TAQMAN®(实时 PCR 扩增监测)和 Lightcycler 定量

[4585] 在 dsRNA 递送之后,例如使用用于大规模提取的 Ambion Rnaseasy4-PCR 纯化试剂盒或用于 96 孔测定的 Ambion Rnaseasy-96 纯化试剂盒,从细胞制备总 RNA。对 Taqman 分析来说,使用(例如)在 5' 端处共价连接的报告基因染料 FAM 或 VIC 和与 3' 端缀合的猝灭剂染料 TAMARA,合成双重标记探针。使用 50 μ L 反应物在(例如)ABI PRISM 7700 序列检测器上进行一步 RT-PCR 扩增,所述 50 μ L 反应物包含 10 μ L 总 RNA、100nM 正向引物、100mM 反向引物、100nM 探针、1xTaqMan PCR 反应缓冲液(PE-Applied Biosystems)、5.5mM MgCl₂、各 100uM 的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、0.2U 核糖核酸酶抑制剂(Promega)、0.025U AmpliTaq Gold(PE-Applied Biosystems)和 0.2U M-MLV 逆转录酶(Promega)。热循环条件可以包括在 48°C 下 30 分钟、在 95°C 下 10 分钟、随后在 95°C 下 15 秒进行 40 次循环和在 60°C 下 1 分钟进行 40 次循环。靶 KRAS mRNA 水平的定量是相对于标准物而测定,该标准物由连续稀释的总细胞 RNA(300、100、30、10ng/rxn)产生并针对例如在平行或相同管 TaqMan 反应中的 36B4mRNA 归一化的标准物。

[4586] 蛋白质印迹

[4587] 可以使用标准的微量制备技术制备核提取物(例如,参见 Andrews 和 Faller,1991

年, Nucleic Acids Research, 19, 2499)。例如, 使用 TCA 沉淀制备来自上清液的蛋白质提取物。将相同体积的 20% TCA 添加到细胞上清液, 在冰上孵育 1 小时, 且通过离心 5 分钟使其沉淀。在丙酮中洗涤沉淀、干燥且在水中再进行再悬浮。在 10% Bis-Tris NuPage(核提取物)或 4-12% Tris-甘氨酸(上清液提取物)聚丙烯酰胺凝胶上使细胞蛋白提取物跑胶且将所述细胞蛋白提取物转移到硝基纤维素膜上。可以通过(例如)与 5% 脱脂乳孵育 1 小时, 随后在 4℃ 下与一抗孵育 16 小时, 来阻断非特异性结合。在洗涤后, 在室温下应用(1 : 10,000 稀释)二抗 1 小时, 且使用 SuperSignal 试剂(Pierce)检测信号。

[4588] 在若干个细胞培养系统中, 已显示阳离子脂质可增加培养物中细胞对寡核苷酸的生物利用率(Bennet, 等, 1992 年, Mol. Pharmacology, 41, 1023-1033)。在一个实施方案中, 本发明的 DsiRNA 分子与阳离子脂质形成复合物, 以用于细胞培养实验。DsiRNA 和阳离子脂质混合物是在即将加入细胞之前于无血清 DMEM 中制备。将 DMEM 加添加剂升温至室温(约 20 至 25℃), 并且将阳离子脂质添加到最终所需浓度且使溶液短时间涡旋。将 DsiRNA 分子添加到最终所需浓度且使溶液再次短时间涡旋, 并且在室温下孵育 10 分钟。在剂量反应实验中, 在孵育 10 分钟后, 将 RNA/脂质复合物连续稀释于 DMEM 中。

[4589] 动物模型

[4590] 在动物模型中评估 dsRNA-肽试剂的功效是人临床试验的重要先决条件。如本领域已知的癌症和/或增殖性疾病、病状或病症的各种动物模型可以适用于临床前评估本发明的 DsiRNA 组合物在根据治疗用途调节靶基因表达时的功效。

[4591] 例如, 如果靶标是 KRAS, 如在细胞培养模型中一样, 那么大部分的 Ras 敏感小鼠肿瘤异种移植物来源于表达突变 Ras 蛋白的癌细胞。携带 H-Ras 转化膀胱癌细胞异种移植物的裸鼠对抗 Ras 反义核酸敏感, 从而在 31 日治疗时段之后会抑制 80% 的肿瘤生长(Wickstrom, 2001 年, Mol. Biotechnol., 18, 35-35)。Zhang 等, 2000 年, Gene Ther., 7, 2041 描述了靶向 KRAS 突变体的抗 KRAS 核糖酶腺病毒性载体(KRbz-ADV)(KRAS 密码子 12GGT 变为 GTT; 分别为 H441 细胞与 H1725 细胞)。与缺乏相关突变的 NSCLC H1650 细胞相比, 表达突变 KRa 蛋白的非小细胞肺癌细胞(NSCLC H441 和 H1725 细胞)用于裸鼠异种移植物中。使用 KRbz-ADV 预先治疗可完全消除 H441 和 H1725 细胞移植物, 且与接收未治疗的肿瘤细胞或对照载体的动物中的 100% 移植物和肿瘤生长进行比较。还描述了 KRAS 错误调控/突变的另外的小鼠模型(例如, 在 Kim 等, Cell 1121 : 823-835 中, 这鉴别了 KRAS 在促进肺腺癌中的作用)。上述研究证明由抗 Ras 试剂抑制 Ras 表达(例如, KRAS 表达)可抑制动物中的肿瘤生长。

[4592] 因此, 这些模型可以用于评估本发明的 DsiRNA 分子抑制 KRAS 水平、表达、肿瘤/癌症形成、生长、扩散、其它与 KRAS 相关的表型、疾病或病症的发展等功效。这些模型及其它模型可类似地用于评估本发明的 DsiRNA 分子在临床前环境中的安全性/毒性和功效。

[4593] 除非另有陈述, 否则实施本发明采用化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养和转基因生物学的常规技术, 这些技术均在本领域技能范围内。例如, 参见 Maniatis 等, 1982, Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Sanbrook 等, 1989, Molecular Cloning, 第 2 版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Sanbrook 和 Russell, 2001, Molecular Cloning, 第 3 版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Cold Spring Harbor, N. Y.) ;Ausubel 等,1992, Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons, 包括定期更新) ;Glover,1985, DNA Cloning(IRL Press, Oxford) ;Anand,1992, Guthrie 和 Fink,1991, Harlow 和 Lane,1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) ;Jakoby 和 Pastan, 1979, Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames&S. J. Higgins 编,1984) ;Transcription And Translation(B. D. Hames&S. J. Higgins 编,1984 年) Culture Of Animal Cells(R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ;Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press, 1986) ;B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning(1984) ;论文, Methods In Enzymology(Academic Press, Inc., N. Y.) ;Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J. H. Miller 和 M. P. Calos 编,1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ;Methods In Enzymology, 第 154 卷和第 155 卷 (Wu 等编), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker 编, Academic Press, London, 1987) ;Handbook Of Experimental Immunology, 第 I-IV 卷 (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编, 1986) ;Riott, Essential Immunology, 第 6 版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988 年; Hogan 等, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986) ;Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish(Danio rerio), (第 4 版, Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000)。

[4594] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有科技术语均具有由本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然类似或等同本文所述的方法和材料可用于实施或测试本发明,但是合适的方法和材料描述如下。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均通过引用整体并入本文。在出现矛盾的情况下,将以本说明(包括定义)为准。另外,材料、方法和实例仅为说明性而不旨在限制。

实施例

[4595] 参照以下实施例描述本发明,这些实施例通过说明的方式提供且并非旨在以任何方式限制本发明。使用本领域熟知的标准技术或下文具体描述的技术。

[4596] 实施例 1 :双链 RNA 寡核苷酸的制备

[4597] 寡核苷酸合成和纯化

[4598] 可以将 DsiRNA 分子设计为与 RNA 信息中的各种位点(例如,本文所述的 RNA 序列内的靶序列)相互作用。使用本文所述的方法以化学方式合成 DsiRNA 分子。通常,使用针对 19 至 23mer siRNA 所描述的固相寡核苷酸合成法来合成 DsiRNA 构建体(例如,参见 Usman 等,美国专利第 5,804,683 号;第 5,831,071 号;第 5,998,203 号;第 6,117,657 号;第 6,353,098 号;第 6,362,323 号;第 6,437,117 号;第 6,469,158 号;Scaringe 等,美国专利第 6,111,086 号;第 6,008,400 号;第 6,111,086 号)。

[4599] 根据标准方法来合成单个 RNA 链且进行 HPLC 纯化(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)。例如,使用固相亚磷酸胺化学剂合成 RNA 寡核苷酸,使用标准技术去保护且在 NAP-5 柱(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.)上脱盐(Damha 和 Olgivie, 1993, Methods Mol Biol 20 :81-114;Wincott 等, 1995,

Nucleic Acids Res 23:2677-84)。使用 15min 分级线性梯度,在 Amersham Source 15Q 柱 (1.0em×25cm;Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.) 上使用离子交换高效液相色谱 (IE-HPLC) 来纯化寡聚体。该梯度从 90 : 10 的缓冲液 A : B 变为 52 : 48 的缓冲液 A : B,其中缓冲液 A 为 100mM Tris(pH 8.5),且缓冲液 B 为 100mM Tris(pH 8.5)、1M NaCl。在 260nm 下监测样品,且采集对应于全长寡核苷酸种类的峰值,汇集,在 NAP-5 柱上脱盐,且冻干。

[4600] 通过毛细管电泳 (CE),在 Beckman PACE 5000(Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif.) 上测定每种寡聚物的纯度。CE 毛细管的内径为 100μm 且含有 ssDNA 100R 凝胶 (Beckman-Coulter)。通常,将约 0.6nmol 的寡核苷酸注入毛细管中,在 444V/cm 的电场中进行电泳,并在 260nm 下检测 UV 吸光度。从 Beckman-Coulter 购买变性 Tris- 硼酸盐 -7M- 尿素电泳缓冲液。得到经 CE 测定纯度为至少 90% 的寡核糖核苷酸以供用于以下所述实验中。遵循制造商推荐的方案,通过 Voyager DE. TM. Biospectrometry Work Station(Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 上的基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱法验证化合物的特征。获得所有寡聚物的相对分子质量,通常在期望的分子质量的 0.2% 之内。

[4601] 双链体的制备

[4602] 单链 RNA(ssRNA) 寡聚物以 (例如) 100mM 浓度再悬浮于双链体缓冲液中,该双链体缓冲液由 100mM 乙酸钾、30mM HEPES(pH 7.5) 组成。以等摩尔量将互补的有义链和反义链混合在一起,以产生 (例如) 50mM 双链体的最终溶液。在 RNA 缓冲液 (IDT) 中将样品加热到 100℃ 保持 5 分钟,并将其冷却到室温待用。在 -20℃ 下存储双链 RNA(dsRNA) 寡聚物。将单链 RNA 寡聚物冻干存储或存储在 -80℃ 不含核酸酶的水中。

[4603] 命名法

[4604] 为了保持一致性,在本说明中已采用了以下命名法。提供给双链体的名称指示寡聚物的长度和突出的存在与否。" 25/27" 为具有 25 个碱基的有义链和具有 2 个碱基的 3' 突出的 27 个碱基的反义链的不对称双链体。" 27/25" 为具有 27 个碱基的有义链和具有 25 个碱基的反义链的不对称双链体。

[4605] 细胞培养和 RNA 转染

[4606] 从 ATCC 获得 HeLa 细胞,并在 37℃ 和 5% CO₂ 下,维持在补充有 10% 胎牛血清 (HyClone) 的杜贝卡氏改良型伊格氏培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium) (HyClone) 中。对 RNA 转染来说,使用 Lipofectamine™ RNAiMAX(Invitrogen) 且遵循制造商的说明,用最终浓度表示为 1nM 或 0.1nM 的 DsiRNA 转染 HeLa 细胞。简单地说,将 2.5μL 每种 DsiRNA 的 0.2μM 或 0.02μM 储备液与 46.5μL 的 Opti-MEM I(Invitrogen) 和 1μL 的 Lipofectamine™ RNAiMAX 混合。将所得 50μL 混合物添加至 12 孔板的各个孔中,且在室温下孵育 20min,以允许 DsiRNA :Lipofectamine™ 形成复合物。同时,用胰蛋白酶处理 HeLa 细胞且将其以 367 个细胞 / μL 的最终浓度再悬浮于培养基中。最终,将 450μL 的细胞悬浮液添加至每个孔中 (最终体积 500μL) 且将板放置于培养箱中培养 24 小时。

[4607] 抑制的评估

[4608] 通过 qRT-PCR 测定靶基因敲低,同时针对仅包括 Lipofectamine™ RNAiMAX (媒介物对照) 的 HPRT 表达对照处理组或未处理组将值归一化。

[4609] RNA 的分离和分析

[4610] 用 2mL 的 PBS 将细胞洗涤一次,并且使用 RNeasy Mini Kit™(Qiagen) 提取总 RNA 且在 30 μ L 的最终体积中进行洗提。遵循制造商的说明,使用 Transcriptor 1st Strand cDNA Kit™(Roche) 和随机六聚物逆转录 1 μ g 的总 RNA。将三十分之一所得的 cDNA(0.66 μ L) 与 5 μ L 的 IQ Multiplex Powermix(Bio-Rad) 以及 3.33 μ L 的 H₂O 和 1 μ L 的 3 μ M 混合物混合,该混合物含有对人基因 HPRT-1(登记号 NM_000194) 和 KRAS 靶标序列有特异性的引物和探针。

[4611] 定量 RT-PCR

[4612] 将具有 C1000 热循环仪(Bio-Rad) 的 CFX96 实时系统用于扩增反应。PCR 条件为: 95°C, 保持 3 分钟;随后在 95°C 下循环 10 秒;在 55°C 下 1 分钟, 40 次循环。将每个样品进行三次重复测试。将相对 HPRT mRNA 水平针对 KRAS mRNA 水平归一化,并与在仅用转染试剂处理的对照样品或未处理样品中获得的 mRNA 水平相比较。使用 Bio-Rad CFX Manager1.0 版本软件分析数据。

[4613] 实施例 2 :DsiRNA- 肽缀合物的制备和使用

[4614] 基于 HyNic(6- 胍基烟酰胺) 修饰肽与 4FB(4- 甲酰基芳酰胺) 修饰寡核苷酸的缀合的化学作用合成本发明的寡核苷酸- 肽缀合物。也可应用本领域已知的其它肽合成方法和缀合程序。

[4615] 在 N 端或 C 端上分别使用 6-Boc-HyNic 或 FMOC-Lys-(ϵ -6-BocHyNic)OH 将 HyNic 部分并于肽上。使用 TFA/ 丙酮 / 水 / 三异丙基硅烷 (TIS) (92.5/2.5/2.5/2.5) 2 小时,完成从树脂中裂解。丙酮的存在形成在具有去保护胍部分的脞,从而在原位阻止从 TFA 与强亲核胍的反应中形成任何三氟乙酰胺。由 HPLC 和 ES-MS 分析粗制肽。使用梯度方法,由 RP-HPLC 分离产物。对 Peg12 肽来说,在固相肽合成期间,直接添加聚乙二醇合成子。在一些实例中,还使用聚乙二醇寡核苷酸合成子,将另外的聚乙二醇间隔物添加至寡核苷酸端。

[4616] 将氨基修饰的寡核苷酸转化为 5' -4FB- 寡核苷酸。在 2-5 摩尔过量的 HyNic- 肽时,进行 HyNic- 肽与 4FB 修饰的寡核苷酸的连接,且通常产生大于 80% 的缀合物产率。通过纳入苯胺,催化脞键形成且将反应动力提高至 10-100 倍,通常导致缀合产率大于 95%。最佳的缀合动力(脞键的形成)在 pH 4.5-5.0 达到。然而,反应还可以在较高 pH 下进行,尽管速率较慢。凭经验确定每种缀合的最优 pH,还要考虑不同肽序列的溶解性。缀合程度可以通过分光光度测量技术监测。双芳基脞键的形成既用于追踪缀合反应又用于定量缀合反应的进展,其中使用已知的摩尔消光系数(29,000@354nm)。使用渗滤去除过量的肽,从而产生寡核苷酸- 肽缀合物。为了产生 HyNic 猝灭的肽,使 HyNic- 肽与 2- 磺基苯甲醛反应,以使肽上的 HyNic 反应部分失活。

[4617] 无细胞酶切分析

[4618] 在 37°C 下将 DsiRNA 或肽缀合的 DsiRNA(最终浓度为 5 μ M) 与重组人 dicer 酶混合物(Genlantis, #T52002) 孵育 2 小时,且使用终止液使反应停止。将这个最终溶液与凝胶加样缓冲液(Bio-Rad, #161-0767) 混合。通过 18% 的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 Dicer 裂解的 dsRNA 和完整的 DsiRNA。使用 Bio-Rad VersaDoc™ 成像系统(型号 4000MP) 获得凝胶图像。

[4619] 血清稳定性分析

[4620] 在 37℃ 下, 将 DsiRNA 或肽缀合的 DsiRNA (最终浓度为 2 μM) 在 90% (v/v) 小鼠血清 (Sigma#M5905) 中孵育 2 小时。在不同的时间点 (0、2、4、8、1、10 和 25 小时), 将 10 μL 样品与 2 μL H₂O 和 3 μL 凝胶加样缓冲液 (Bio-Rad#161-0767) 混合, 且在乙醇干冰浴中立即将所述样品瞬间冻结。使样品在 18% 的天然聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad#161-1216) 上电泳。使用 Bio-Rad VersaDoc™ 成像系统 (Bio-Rad model#4000MP) 对分析的 siRNA 带定量。通过绘制 dsRNA 带强度随时间的变化, 计算单个 dsRNA 在 90% 血清中的半衰期。

[4621] HPRT1 靶向 DsiRNA 和 KRAS 靶向 DsiRNA

[4622] 如本文所述, 合成针对 HPRT1 和 KRAS 靶基因的示例性 DsiRNA, 其中 DsiRNA 具有寡核苷酸序列、2' -O- 甲基和图 2 中所示末端修饰。

[4623] 缀合肽

[4624] 在图 3 中列出了用于或能够用于与本发明的 DsiRNA 缀合的示例性肽, 图 3 还指示与每种单个肽有关的净电荷。

[4625] 通过观察与成功缀合有关的尺寸增大 (和由此产生的受滞的电泳迁移率), 来确认各种肽-DsiRNA 缀合物的成功合成。如图 4 至 6 中所示, HPRT1 靶向 DsiRNA 和 KRAS 靶向 DsiRNA 皆成功地与数个肽缀合, 从而形成以下缀合物: K1379-SEQ ID NO:32; K1379-SEQ ID NO:62; K1459-SEQ ID NO:32 (图 4); K1459-SEQ ID NO:118; K1459-Peg12-SEQ ID NO:118; K1379-SEQ ID NO:118; K1379-Peg12-SEQ ID NO:118 (图 5); H1460-SEQ ID NO:118; 以及 H1460-Peg12-SEQ ID NO:118 (图 6)。

[4626] 还成功地合成具有可裂解连接子部分 (例如, 二硫化物基团) 的 DsiRNA-肽缀合物。具体来说, 图 7 显示生成了具有 KRAS 靶向 DsiRNA K1379 的 SEQ ID NO:118 和 SEQ ID NO:120 的稳定且可裂解的缀合物。

[4627] DsiRNA 还与环肽缀合。如图 8 中所示, KRAS 靶向 DsiRNA (K1459) 成功地与环肽 SEQ ID NO:151 缀合。

[4628] 为了评估某种肽-DsiRNA 缀合物的 Dicer 裂解, 如上所述对缀合物 K1096-SEQ ID NO:39 和 K1096-SEQ ID NO:120 进行无细胞酶切测定。如图 9 和图 10 中所示, 观察两种缀合物的 Dicer 裂解。

[4629] 实施例 3: 转染的 dsRNA-肽缀合物 (例如, dsRNA 递送肽缀合物) 降低细胞中靶基因表达水平

[4630] 细胞培养和 RNA 转染

[4631] 从 ATCC 获得 HeLa 细胞和 HepG2 细胞, 并在 37℃ 和 5% CO₂ 下, 维持在补充有 10% 胎牛血清 (HyClone) 的杜贝卡氏改良型伊格氏培养基 (HyClone) 中。对 dsRNA 和 dsRNA 递送肽缀合转染来说, 在 Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) 存在下, 用标明最终浓度 (例如, 1nM 或 0.1nM) 的未缀合或缀合 DsiRNA 转染 HeLa 细胞。在某些实例中, 未缀合 DsiRNA 还用作阳性对照。在某些实例中, 将 2.5 μL 每种 DsiRNA 的 0.2 μM 或 0.02 μM 储备液与 47.5 μL 的 Opti-MEM I (Invitrogen) 混合。对 Lipofectamine™ 对照来说, 将 2.5 μL 每种 DsiRNA 的 0.2 μM 或 0.02 μM 储备液与 46.5 μL 的 Opti-MEM I (Invitrogen) 和 1 μL 的 Lipofectamine™ RNAiMAX 混合。将所得 50 μL 混合物添加至 12 孔板的各个孔中, 且在室温下将所得 50 μL 混合物培养 20 分钟, 以允许 DsiRNA:Lipofectamine™ RNAiMAX 复合物形成。同时, 用胰蛋白酶处理 HeLa 细胞或 HepG2 细胞且将其以最终浓度为约 367 个细胞/μL

再悬浮于培养基中。最终,将 450 μ L 的细胞悬浮液添加至每个孔中(最终体积 500 μ L)且将板放置于培养箱中培养 24 小时。对剂量响应研究来说,转染 DsiRNA 的浓度从最初的 1pM 变化为 1nM。对剂量响应研究(涉及在不存在转染媒介物的情况下向细胞施用的 DsiRNA-肽缀合物)来说,所施用的 DsiRNA 和 DsiRNA-肽缀合物的浓度从大约 5nM 变化到大约 5mM。还可以进行时间过程研究,其中研究约 4 小时至约 72 小时的孵育时间。

[4632] 抑制的评估

[4633] 通过 qRT-PCR 测定靶基因敲低,同时针对仅包括 Lipofectamine™RNAiMAX(媒介物对照)的 HPRT 表达对照处理组或未处理组将值归一化。

[4634] RNA 分离和分析

[4635] 用 2mL 的 PBS 将细胞洗涤一次,并且使用 RNeasy Mini Kit™(Qiagen)提取总 RNA 且在 30 μ L 的最终体积中进行洗提。遵循制造商的说明,使用 Transcriptor 1st Strand cDNA Kit™(Roche)和随机六聚物逆转录 1 μ g 的总 RNA。将三十分之一所得的 cDNA(0.66 μ L)与 5 μ L 的 IQ Multiplex Powermix(Bio-Rad)以及 3.33 μ L 的 H₂O 和 1 μ L 的 3 μ M 混合物混合,该混合物含有对人基因 HPRT-1(登记号 NM_000194)和 KRAS 靶标序列有特异性的引物和探针。

[4636] 定量 RT-PCR

[4637] 将具有 C1000 热循环仪(Bio-Rad)的 CFX96 实时系统用于扩增反应。PCR 条件为:95°C,保持 3 分钟;随后在 95°C 下循环 10 秒;在 55°C 下 1 分钟,40 次循环。将每个样品进行两次重复测试(其中针对每种试剂所进行的重复实验的数据在图 2 至 19 中示出)。将相对 HPRT mRNA 水平针对 KRAS mRNA 水平归一化,并与在仅用转染试剂处理的对照样品或未处理样品中获得的 mRNA 水平相比较。使用 Bio-Rad CFX Manager 1.0 版本软件分析数据。表达数据呈现为在处理未缀合 dsRNA 下的表达与 dsRNA-递送肽缀合物的表达的比较。

[4638] 当通过转染来施用,最初检查 DsiRNA-肽缀合物抑制细胞中靶 mRNA 水平的能力。如图 11 和图 12 中所示,当以 0.1nM 和更高的浓度下通过转染施用于 HeLa 细胞时,观察到 KRAS 靶向 DsiRNAK1096 缀合物的三个不同肽缀合物(K1096-SEQ ID NO:39; K1096-Peg12-SEQ ID NO:32;以及 K1096-SEQ ID NO:120)都将靶 mRNA 水平抑制至少 80%。观察到针对肽-DsiRNA 缀合物所见的靶基因抑制水平也类似于针对自由 K1096DsiRNA 所见的靶基因抑制水平。因此,当通过转染施用于 HeLa 细胞时,观察到肽-DsiRNA 缀合物是靶 RNA 水平的有效抑制剂。

[4639] 实施例 4:DsiRNA-肽缀合物证实的血清稳定性

[4640] 如本文所述评估 DsiRNA 试剂的血清稳定性。如图 13 和图 14 中所示,与具有其它相同的修饰模式但没有 SEQ ID NO:39 肽或 SEQ ID NO:120 肽的 DsiRNA 相比,DsiRNA K1096 与 SEQ ID NO:39 或 120 肽的缀合会导致缀合剂 K1096-SEQ ID NO:39(半衰期为 12.1 个小时)和 K1096-SEQ ID NO:120(半衰期为 13.3 个小时)的半衰期显著延长。

[4641] 实施例 5:没有转染媒介物时所施用的 dsRNA-肽缀合物(例如,dsRNA 递送肽缀合物)降低细胞中靶基因的表达水平

[4642] 为了评估示例的 DsiRNA-肽缀合物在没有任何转染媒介物的情况下促进此类缀合剂被递送到靶细胞的能力,在 20nM 至 2mM 的浓度范围内,向 HeLa 细胞施用一系列 DsiRNA-肽缀合物。如图 15 至 17 中所示,与被转染的 DsiRNA 相比,DsiRNA-肽缀合物的

升高的浓度是达到显著抑制靶 mRNA 水平所需要的。然而,所有六个测试的缀合物(图 15 的 K1096-Peg12-SEQ ID NO:32 和 K1096-Peg12-SEQ ID NO:62;图 16 的 K1096-Peg12-SEQ ID NO:118 和 K1096-SEQ ID NO:120;以及图 17 的 K1336-SEQ ID NO:32 和 K1336-SEQ ID NO:62)以剂量响应方式表现,其中对 2mM 浓度下的所有缀合分子来说观察到显著水平的靶基因抑制。实际上,图 16 的 K1096-SEQ ID NO:120 缀合物显示了在所有测试浓度(20nM、200nM 和 2mM)下出人意料的且显著的靶 mRNA 水平降低。

[4643] 随后,评估当在不存在转染媒介物的情况下以 5mM 的浓度施用于 HepG2 细胞时, DsiRNA-肽缀合物 K1379-SEQ ID NO:118 和 K1379-SEQ ID NO:120 抑制 KRAS 靶基因的能力。如图 18 中所示,很明显,对在不存在转染媒介物的情况下以 5mM 的浓度施用于 HepG2 细胞的两种缀合物来说,观察到靶 mRNA 水平降低了 90%以上。此类结果类似于以 1nM 将 K1379DsiRNA 单独施用于 HepG2 细胞所观察的结果。出人意料的是,将具有游离 DsiRNA K1379 的猝灭肽(猝灭的 SEQ ID NO:118 或猝灭的 SEQ ID NO:120)纳入施用于 HepG2 细胞的混合物中导致任何靶 mRNA 抑制活性的完全丧失。

[4644] 为了检查示例性 DsiRNA-肽缀合物在不存在递送媒介物的情况下是否是比相应的游离 DsiRNA 更有效的靶 mRNA 水平抑制剂,得到剂量响应曲线,该曲线比较游离 K1379DsiRNA 与 K1379-SEQ ID NO:118 缀合物,并且还比较游离 K1379DsiRNA 与 K1379-SEQ ID NO:120 缀合物。如图 19 中所示,在所有 IC₅₀ 信息浓度内, K1379-肽缀合物显然比相应的游离 K1379DsiRNA 表现良好。实际上,与相应的 DsiRNA-肽缀合物相比,在不存在转染媒介物的情况下对 DsiRNA-肽缀合物所测量的 IC₅₀ 值是对游离 DsiRNA 所测量的 IC₅₀ 值的 2 至 3 倍(因此,不那么有效)。

[4645] 实施例 6:另外的递送肽-dsRNA 缀合物和/或靶向肽-dsRNA 缀合物的制备

[4646] 另外的优选的靶 DsiRNA 试剂选自 DsiRNA 的预筛选群。DsiRNA 的设计可以任选地涉及使用预测性评分算法,其对跨越序列区的数个可能 DsiRNA 的预计的活性/功效进行计算机模拟评估。

[4647] 通过本文上述方法中的任一种,将本发明的 dsRNA 与递送肽或靶向肽缀合。使用马来酰亚胺化学作用,使约 20mg 具有 5' 氨基的 DsiRNA (~1 μmol) 与 3 至 5 摩尔的过量具有末端半胱氨酸巯基的肽反应(Moschos 等, Bioconjug Chem. 2007;18(5):1450-9; Nishina 等, Mol Ther. 2008;16(4):734-40)。通过渗滤对肽-RNA 缀合物进行纯化以去除过量肽,使肽-RNA 缀合物脱盐且作为冻干粉末供应。使用重叠合法通过分析性阴离子交换 HPLC 和电喷射质谱来测定最终产物的纯度。

[4648] 实施例 7:另外使用 dsRNA-靶向肽缀合物以降低细胞中靶基因的表达

[4649] 细胞培养和 RNA 转染

[4650] 从 ATCC 获得 HeLa、Hep3B、HepG2、HT29、LS174T 和 Neuro2a 且在 37 °C 下在 5% 的 CO₂ 下,并维持在具有 10% 热灭活的 FBS 的推荐的基础培养基中。对 dsRNA 和 dsRNA-靶向肽缀合物转染来说,使用如标明为最终浓度为 1nM 或 0.1nM Lipofectamine™ RNAiMAX(Invitrogen) 的未缀合或缀合的 DsiRNA 转染细胞。DsiRNA 用作阳性对照。简单地说,将 2.5 μL 每种 DsiRNA 的 0.2 μM 或 0.02 μM 储备液与 47.5 μL 的 Opti-MEM I(Invitrogen) 混合。对 Lipofectamine™ 对照来说,将 2.5 μL 每种 DsiRNA 的 0.2 μM 或 0.02 μM 储备液与 46.5 μL 的 Opti-MEM I(Invitrogen) 和 1 μL 的 Lipofectamine™

RNAiMAX 混合。将所得 50 μ L 混合物添加至 12 孔板的各个孔中,且在室温下孵育 20min,以允许 DsiRNA:LipofectamineTM RNAiMAX 复合物形成。同时,用胰蛋白酶处理细胞且将其以 367 个细胞/ μ L 的最终浓度再悬浮于培养基中。最终,将 450 μ L 的细胞悬浮液添加至每个孔中(最终体积 500 μ L)且将板放置于培养箱中培养 24 小时。对剂量响应研究来说,DsiRNA 的浓度从最初的 1pM 变化为 1nM。对时间过程研究来说,研究约 4 小时到约 72 小时的培养时间。

[4651] 抑制的评估

[4652] 通过 qRT-PCR 测定靶基因敲低,同时针对仅包括 LipofectamineTMRNAiMAX(媒介物对照)的 HPRT 表达对照处理组或未处理组将值归一化。

[4653] RNA 分离和分析

[4654] 用 2mL 的 PBS 将细胞洗涤一次,并且使用 RNeasy Mini KitTM(Qiagen)提取总 RNA 且在 30 μ L 的最终体积中进行洗提。遵循制造商的说明,使用 Transcriptor 1st Strand cDNA KitTM(Roche)和随机六聚物逆转录 1 μ g 的总 RNA。将三十分之一所得的 cDNA 中(0.66 μ L)与 5 μ L 的 IQ Multiplex Powermix(Bio-Rad)以及 3.33 μ L 的 H₂O 和 1 μ L 的 3 μ M 混合物混合,该混合物含有对人基因 HPRT-1(登记号 NM_000194)和 KRAS 靶标序列有特异性的引物和探针。

[4655] 定量 RT-PCR

[4656] 将具有 C1000 热循环仪(Bio-Rad)的 CFX96 实时系统用于扩增反应。PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C,保持 3 分钟;随后在 95 $^{\circ}$ C 下循环 10 秒;在 55 $^{\circ}$ C 下 1 分钟,40 次循环。将每一个样品进行三次重复测试。将相对 HPRT mRNA 水平针对 KRAS mRNA 水平归一化,并与在仅用转染试剂处理的对照样品或未处理样品中获得的 mRNA 水平相比较。使用 Bio-Rad CFX Manager1.0 版本软件分析数据。表达数据呈现为在处理未缀合 dsRNA 下的表达与 dsRNA-靶向肽缀合物的表达的比较。

[4657] 实施例 8:使用 dsRNA-递送肽缀合物以降低动物中靶基因的表达

[4658] 为了评估 dsRNA 的递送效率和后续功能,使用肽和 dsRNA-递送肽缀合物、皮下(s.c.)肿瘤模型(Judge 等, J Clin Invest. 2009;119(3):661-73)。通过将 50 μ L PBS 中的 3×10^6 个细胞皮下注射至左后侧中,在雌性 SCID/beige 小鼠中建立 Hep3B 肿瘤。随着肿瘤变得明显,在接种后的 10-17 天将小鼠随机分为许多处理组。经基于根据个体动物重量的 mg dsRNA/kg 体重计算,dsRNA、肽和 dsRNA 递送肽缀合物的制剂或 PBS 媒介物对照通过经由外侧尾静脉的标准静脉内(i.v)注射施用。使用数字测径器在二维(宽度 $\times$ 长度)方面测量肿瘤以评估肿瘤生长。肿瘤体积利用等式 $x*y*y/2$ 来计算(其中 x = 最大直径,且 y = 最小直径),且以组平均值 $\pm$ SD 表示。还从不同处理组的动物除去肿瘤组织,且确认基因敲低。肿瘤体积、存活和 RNA 表达数据呈现为非缀合 dsRNA 的处理与 dsRNA-递送肽缀合物的处理之间的比较。

[4659] 实施例 9:使用 dsRNA-靶向肽缀合物以降低细胞中靶基因的表达

[4660] 为了评估 dsRNA 的靶向效率和后续功能,使用肽和 dsRNA-靶向肽缀合物、肝内肿瘤模型(Judge 等, J Clin Invest. 2009;119(3):661-73)。通过直接肝内注射 Hep3B 或 Neuro2a 肿瘤细胞,在小鼠中建立肝脏肿瘤。雌性 SCID/beige 小鼠和雄性 A/J 小鼠分别被用作 Hep3B 和 Neuro2a 肿瘤的宿主。将小鼠维持在气体麻醉状态下,在胸骨以下做横跨中线

的单个 1.5cm 切口,且将左侧肝叶取出。使用 Hamilton 注射器和 30 口径针将悬浮在 25 μ L PBS 中的 1×10^6 Hep3B 细胞或 1×10^5 Neuro2a 细胞以小角度缓慢注射至所述肝叶中。然后将拭子施加于穿刺伤口以在缝合之前止血。在将小鼠放回常规住所之前,使小鼠在无菌笼中从麻醉状态恢复,并且密切监视小鼠达 2-4 小时。在肿瘤植入八至十一天以后,经基于根据个体动物重量的 mg dsRNA/kg 体重计算,将小鼠随机分成 dsRNA、肽和 dsRNA 肽缀合物制剂或 PBS 媒介物对照处理组,这些试剂通过经由外侧尾静脉的标准静脉内 (i. v.) 注射施用。在整个研究过程中,监测体重作为发展中肿瘤负荷和治疗耐受性的指示物。对功效研究来说,将已确定的人终点确定为生存的替代物。基于临床症状、体重减轻和腹胀的组合进行评估,以定义由肿瘤负荷造成的安乐死的日子。从不同处理组的动物中去除肿瘤组织,且确认基因敲低。

[4661] 还通过用荧光标签标记肽和 / 或 dsRNA 且使用活动物成像系统 (Xenogen 或 BioRad) 进行荧光生物分布研究,测试肽、dsRNA 和 dsRNA-肽缀合物的肿瘤细胞靶向的功能性 (Eguchi 等, Nat Biotechnol. 2009 年 5 月 17 日, [发表前出版])。使用这种方法,且通过与游离 (即,未缀合的) dsRNA 相比,对单独的肽和 dsRNA-肽缀合物确认肽与肿瘤细胞结合的能力。

[4662] 相反,用作这个研究中的对照的未缀合的 dsRNA 不能以与已缀合的 dsRNA 相同的程度与肿瘤表面结合。功效终点、RNA 表达和生物分布数据呈现为用未缀合的 dsRNA 的处理与用 dsRNA-靶向肽缀合物处理之间的比较。

[4663] 实施例 10 :使用另外的细胞培养模型来评估 KRAS 基因表达的下调

[4664] 各种终点已用于细胞培养模型中,以观察在用抗 Ras 试剂进行处理后的 Ras 介导作用。表型终点包括细胞增殖的抑制、RNA 表达的抑制和 Ras 蛋白表达的降低。因为 KRAS 致癌基因突变与某些肿瘤细胞的增殖增加有直接联系,所以针对细胞培养测定的增殖终点优选地用作初级筛选。存在若干种可以测量这个终点的方法。在用本发明的 DsiRNA 与肽的缀合物处理细胞后,使细胞生长 (通常 5 天),在此之后可测量细胞活力、细胞 DNA 中 [^{3} H] 胸苷的并入和 / 或细胞密度。可以使用可商购的荧光核酸染色剂 (诸如, Syto®13 或 CyQuant®) 以 96 孔形式进行细胞密度的分析。作为次级、确认的终点,可以使用 KRas 特异性的 ELISA 评估 KRas 蛋白表达水平的 DsiRNA-肽介导的降低。

[4665] 实施例 11 :评估抗 KRAS DsiRNA 在 KRAS 错误调控的小鼠模型中的功效

[4666] 可以在小鼠模型 (包括例如异种移植物和上述其它动物模型) 中,进一步测试选自体外分析中的抗 KRAS DsiRNA-肽缀合物。在一个实施例中,通过水动力的尾部静脉内注射,向具有错误调控的 (例如,提高) KRAS 水平的小鼠施用本发明的 DsiRNA-肽试剂。对每组 (基于经测试的特定 DsiRNA 试剂分组) 3-4 只小鼠注射 50 μ g 或 200 μ g 的 DsiRNA。使用 RT-qPCR 评估 KRAS RNA 的水平。另外或替代地,可以使用本领域公认的方法评估 KRas 的水平 (例如, KRas 蛋白水平和 / 或癌细胞 / 肿瘤形成、生长或扩散),或监测 (任选地,作为测量 KRAS 转录物或 KRas 蛋白质水平的代表) 与 KRAS 的错误调控有关的表型 (例如,肿瘤形成、生长、转移等)。接着,还可以结合标准化学疗法测试此类动物模型中的活性 DsiRNA-肽缀合物。

[4667] 实施例 12 :诊断用途

[4668] 本发明的 dsRNA-肽分子可用于多种诊断应用中,诸如可用于在多种应用中 (例

如,临床、工业、环境、农业和 / 或研究背景中) 鉴别分子靶(例如, RNA)。dsRNA- 肽分子的此类诊断利用涉及利用重建的 RNAi 系统,例如,使用细胞裂解物或经部分纯化的细胞裂解物。本发明的 dsRNA- 肽分子可被用作诊断工具以检验患病细胞内的遗传漂变和突变。dsRNA- 肽活性与靶 RNA 的结构之间的密切关系使得能检测靶分子的任何区中的突变,该突变改变靶 RNA 的碱基配对和三维结构。通过使用多个本发明中所述的 dsRNA- 肽分子,可对 RNA 的体外以及细胞和组织内结构和功能很重要的核苷酸改变进行作图。用 DsiRNA 分子裂解靶 RNA 可用于抑制基因表达和确定特定基因产物在与特定靶标相关联的疾病或病症的发展中的作用。照这样的方式,可将其它遗传靶标确定为疾病的重要介体。这些实验将通过提供组合疗法(例如,以不同基因作为靶标的多个 DsiRNA 分子、与已知小分子抑制剂偶联的 DsiRNA 分子或用 DsiRNA 分子及 / 或其它化学或生物分子的组合的间歇治疗)的可能性而得出对疾病进展更好的治疗。本发明的 DsiRNA 分子的其它体外用途在本领域中众所周知,且包括检测与疾病或相关状况相关联的 RNA 的存在。此类 RNA 通过在使用标准方法(例如,荧光共振放射转移(FRET))以 DsiRNA 处理之后测定裂解产物的存在来检测。

[4669] 在特定实施例中,仅裂解野生型或突变型或多态性的靶 KRAS RNA 的 DsiRNA 分子用于测定。第一 DsiRNA 分子(即,仅裂解野生型靶 KRAS RNA 的那些 DsiRNA 分子)用于鉴定存在于样品中的野生型 KRAS RNA,且第二 DsiRNA 分子(即,仅裂解突变型或多态性靶 RNA 的 DsiRNA 分子)用于鉴定样品中的突变型或多态性 KRAS RNA。用两种 DsiRNA 分子裂解野生型和突变型或多态性 KRAS RNA 的合成底物作为反应对照,以说明在“非靶”KRAS RNA 种类裂解反应和不存在下的相对 DsiRNA 功效。由合成底物得到的裂解产物也用于产生供分析样品群中野生型和突变型 KRAS RNA 的尺寸标记物。因此,每一分析需要两种 DsiRNA 分子、两种底物和一种未知样品,从而被组合成六个反应。利用核糖核酸酶保护试验测定裂解产物的存在,以便能够在聚丙烯酰胺凝胶的一个泳道中分析每一 KRAS RNA 的全长和裂解片段。并非绝对要求定量这些结果以了解对突变型或多态性 KRAS RNA 的表达和靶细胞中 KRAS 关联表型变化的假定风险。蛋白质产物涉及到表型(即,疾病有关 / 关联的)的发展过程中的 KRAS mRNA 的表达足以确定风险。如果使用对两种转录物具有相当的比活性的探针,则 KRAS RNA 水平的定性比较就足够,且降低初始诊断的成本。无论是定性比较还是定量比较 KRAS RNA 水平,较高的突变型或多态性与野生型的比率都与较高的风险相互关联。

[4670] 本说明书中所提及的所有专利和出版物均指示与本发明所属领域技术人员的技术水平。本公开中所引用的所有参考文献均以引用方式并入,引用的程度如同将每个参考文献独立地以引用方式全文并入本文中。

[4671] 本领域技术人员将易于了解,本发明可较好地适于达到所提及的目的并获得所提及的以及其中固有的结果和益处。如目前代表优选实施方案的本文所述的方法和组合物是示例性的,且并不旨在限制本发明的范围。本领域技术人员可想到这些方法和组合物的改变和其它用途,这些都涵盖在由权利要求的范围所界定的本发明的精神范围内。

[4672] 对本领域中的技术人员显而易见的是,在不背离本发明的范围和精神的情况下可对本文中所公开的发明进行不同行替换和修改。因此,这些另外的实施方案也在本发明和以下权利要求书的范围之内。本发明教导本领域的技术人员针对产生具有用于介导 RNAi 活性的改进活性的核酸构建体测试本文所述的化学修饰的各种组合和 / 或替换。此种改进活性可能包含改进稳定性、改进生物利用率和 / 或介导 RNAi 的细胞反应的改进的活化。因

此,本文所述的特定实施方案并非限制性的,且所属领域技术人员可能很容易认识到:可以在没有不当实验的情况下针对识别具有改进 RNAi 活性的 DsiRNA 分子测试本文所述的修饰的特定组合。

[4673] 本文中说明性描述的本发明宜在不存在本文中未特别公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制的情况下实施。因此,例如,在本文各情形中,术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中任一者都可以用其它两个术语中的任一者替代。已采用的这些术语和表述是用作术语的描述而不是限制,并且不旨在使用这些术语和表述排除所示和所描述的特征或其部分的任何等同物,但应认识到,在所要求的本发明的范围内的各种修改都是可能的。因此,应了解,尽管已经通过优选的实施方案具体地公开了本发明,但本领域中的技术人员可以采用本文公开的观念的任选的特征、修改和变更,而且认为这些修改和变更在描述和所附权利要求所界定的范围内。

[4674] 此外,在按照马库什组 (Markush group) 或另一替代性分组描述本发明的特征或方面时,本领域中的技术人员应认识到,同样可据此按照该马库什组或其它组的任一个别成员或成员小组来描述本发明。

[4675] 除非本文中另外指明或上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是以下权利要求的上下文中)使用的术语“一个”、“一种”和“所述”以及相似的指代词语应解释为涵盖单数和复数。除非另外说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语(即,表示“包括但不限于”之意)。本文中值的范围的列举仅旨在用作单独提及该范围内的各单独值的简写方法,除非本文中另外指明,否则各单独值都并入本说明书中,如同在本文中对其单独列举一样。除非本文中另外指明或上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可按任何适合的次序进行。除非另外要求,否则对本文中提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“如”)的使用都仅旨在更好阐述本发明,而不是对本发明或权利要求的范围构成限制。说明书中没有语言应解释为指示任何非要求元素对于本发明的实施是必不可少的。

[4676] 在本文中描述了本发明的实施方案,其中包括为本发明人所知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读上述说明之后,那些实施方案的变化对本领域的普通技术人员将变得显而易见。

[4677] 本发明人预期熟练技术人员酌情采用此类变化,且本发明人希望以本文具体描述的方式以外的方式来实施本发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括在本发明所附权利要求书中所陈述的所有修改和等同物。此外,在本发明的所有可能变化中的上述要素的任何组合由本发明涵盖,除非本文中另有陈述或与上下文明显有矛盾。本领域中的技术人员仅仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述本发明的具体实施方案的许多等同物。意图将这些等同物涵盖在以上权利要求中。

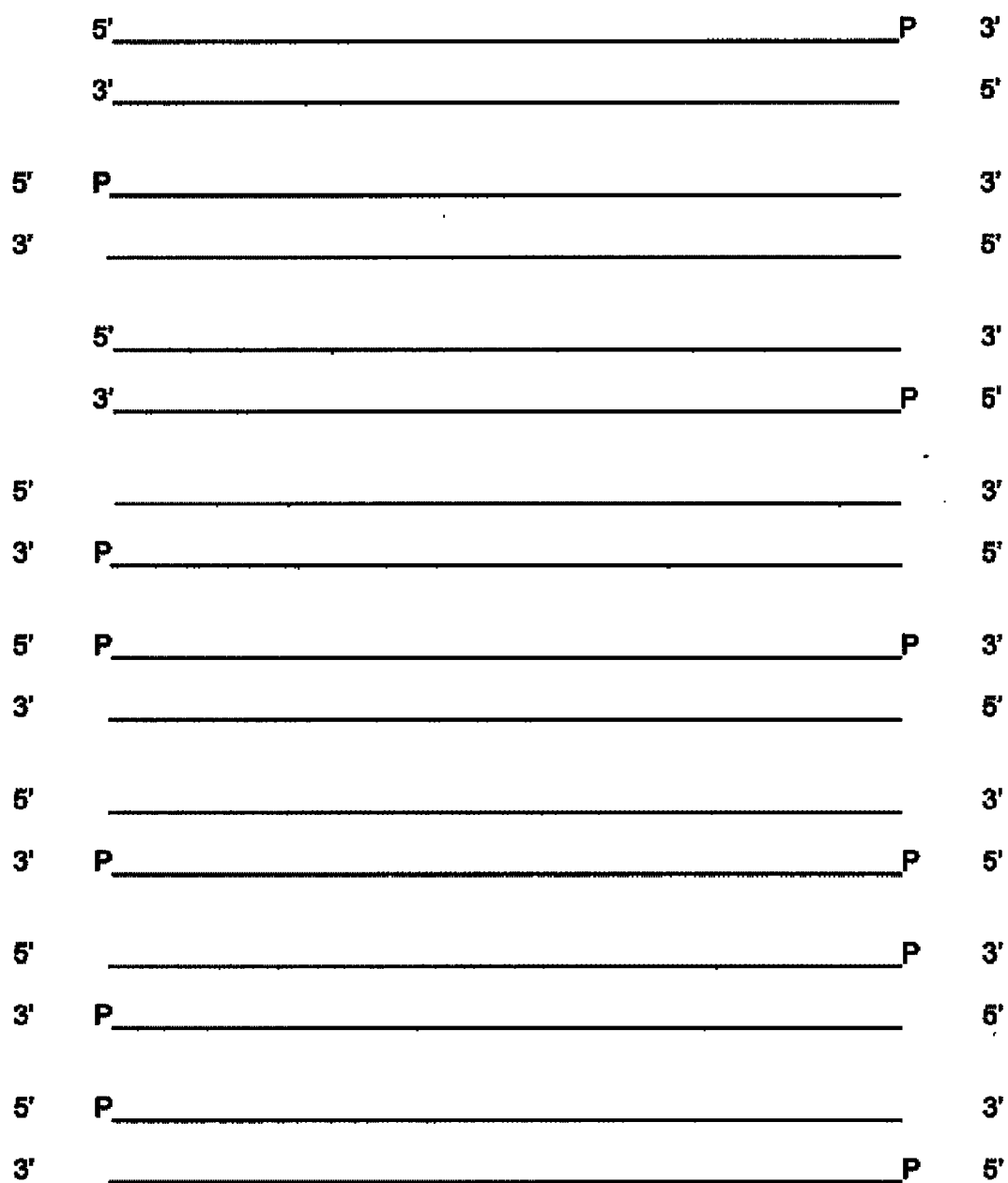


图 1A

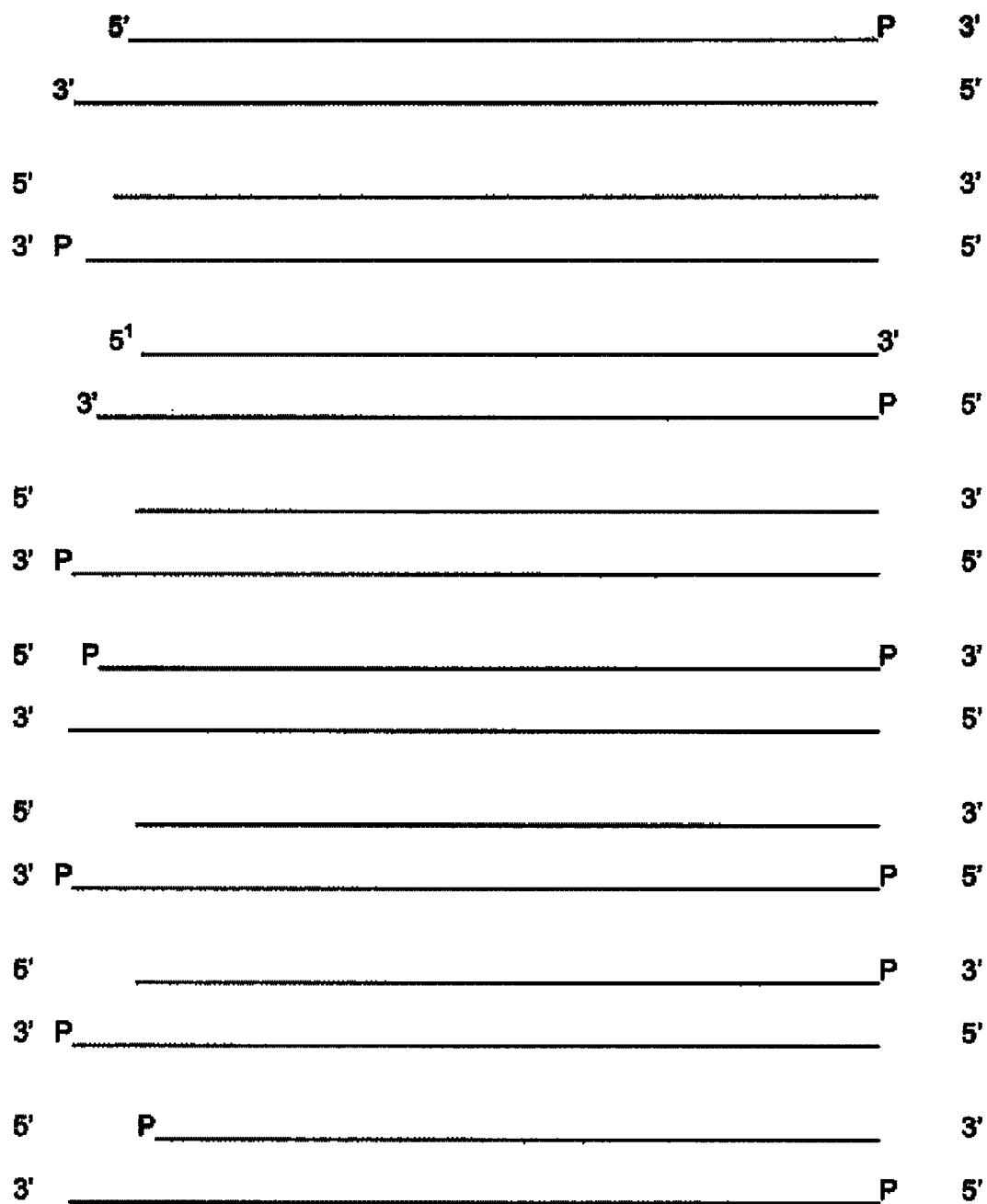


图 1B

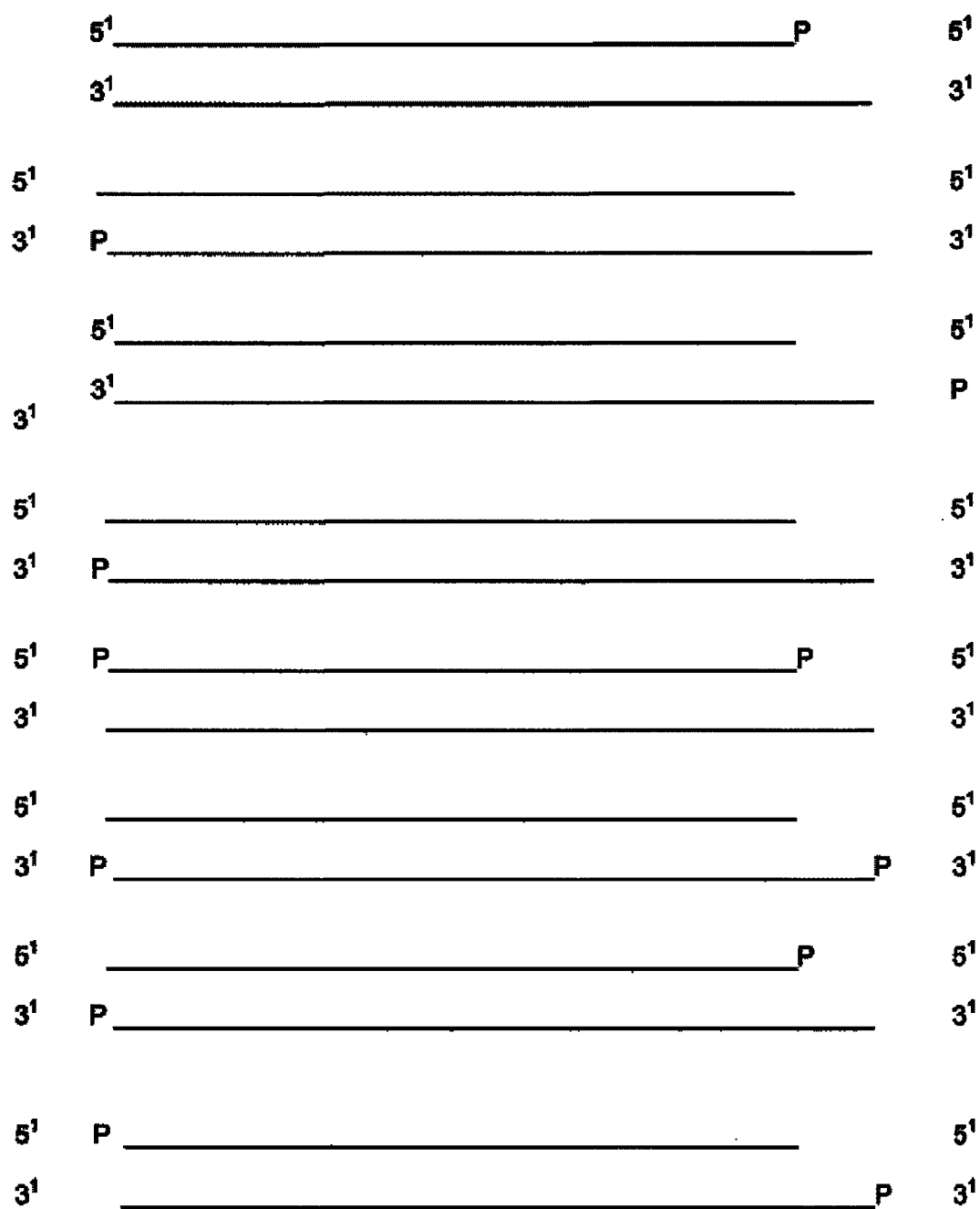


图 1C

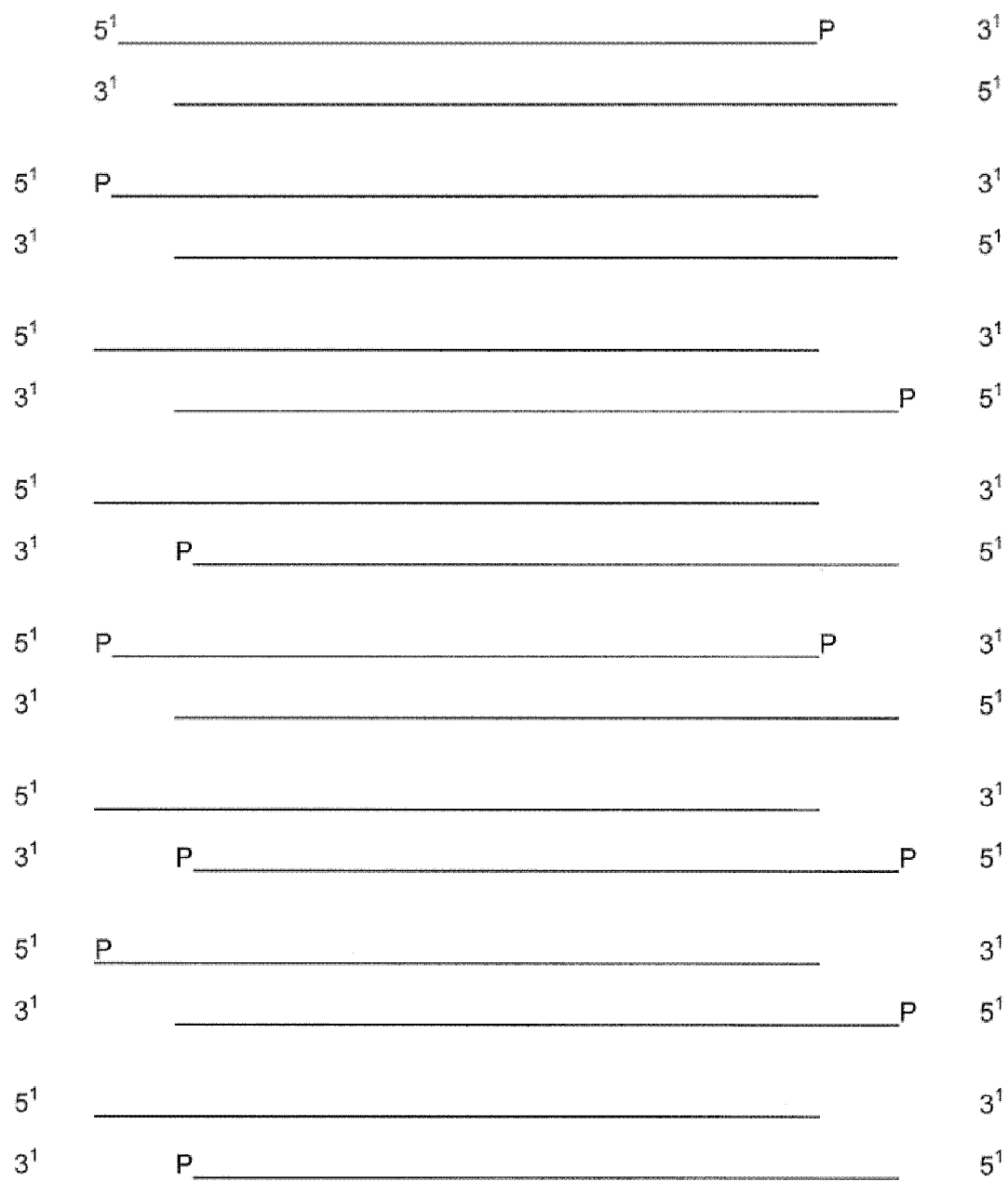


图 1D

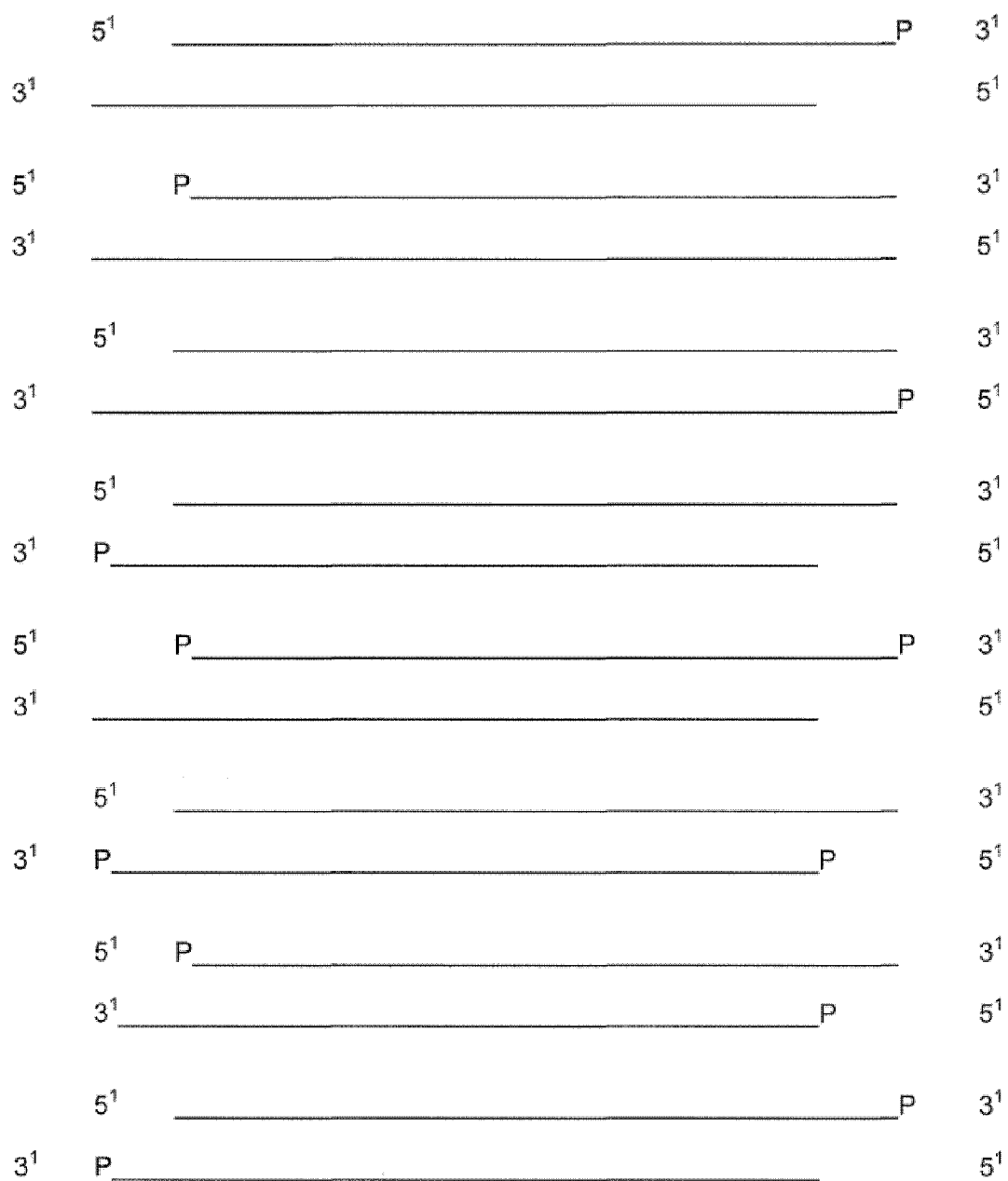


图 1E

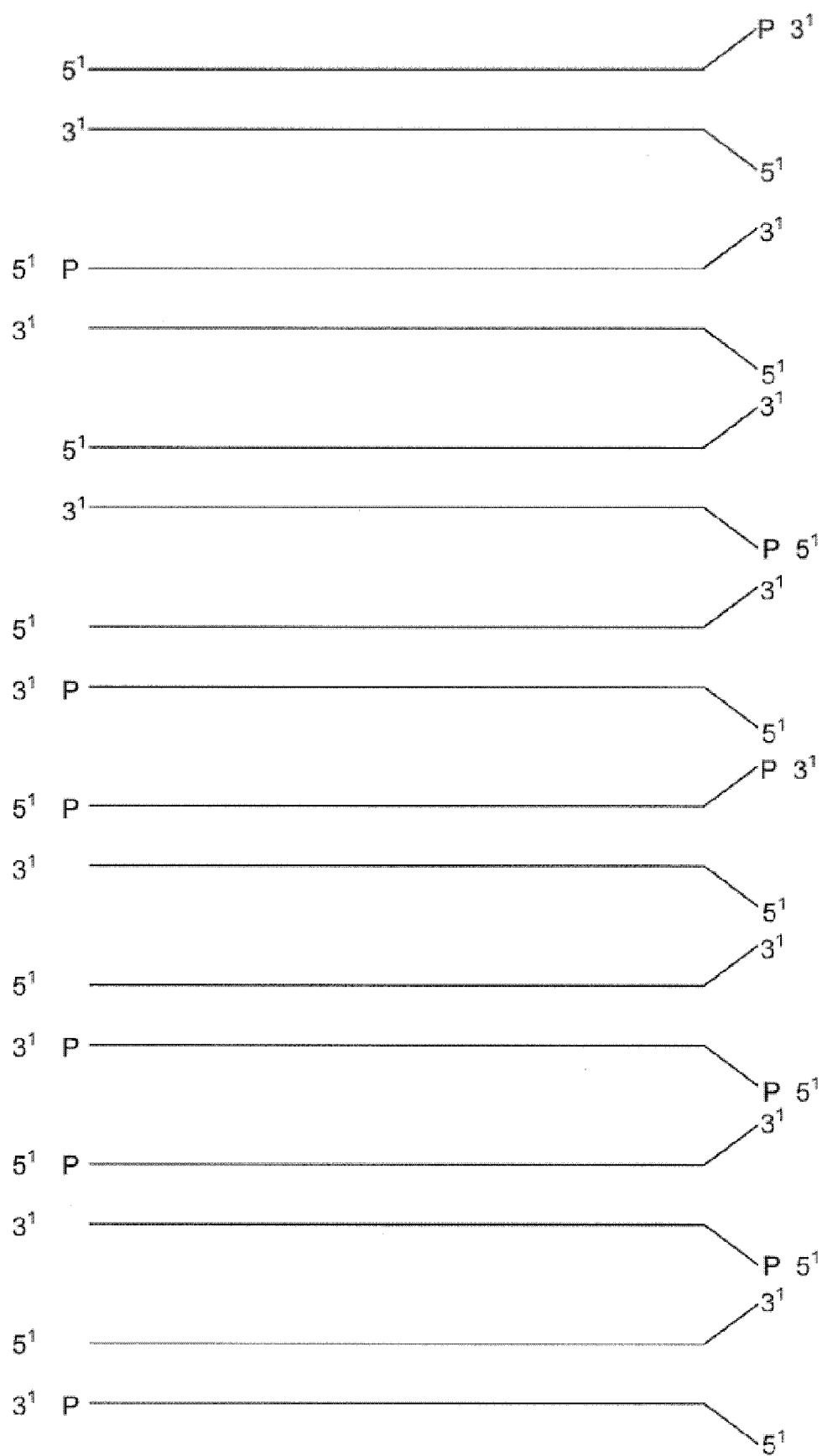


图 1F

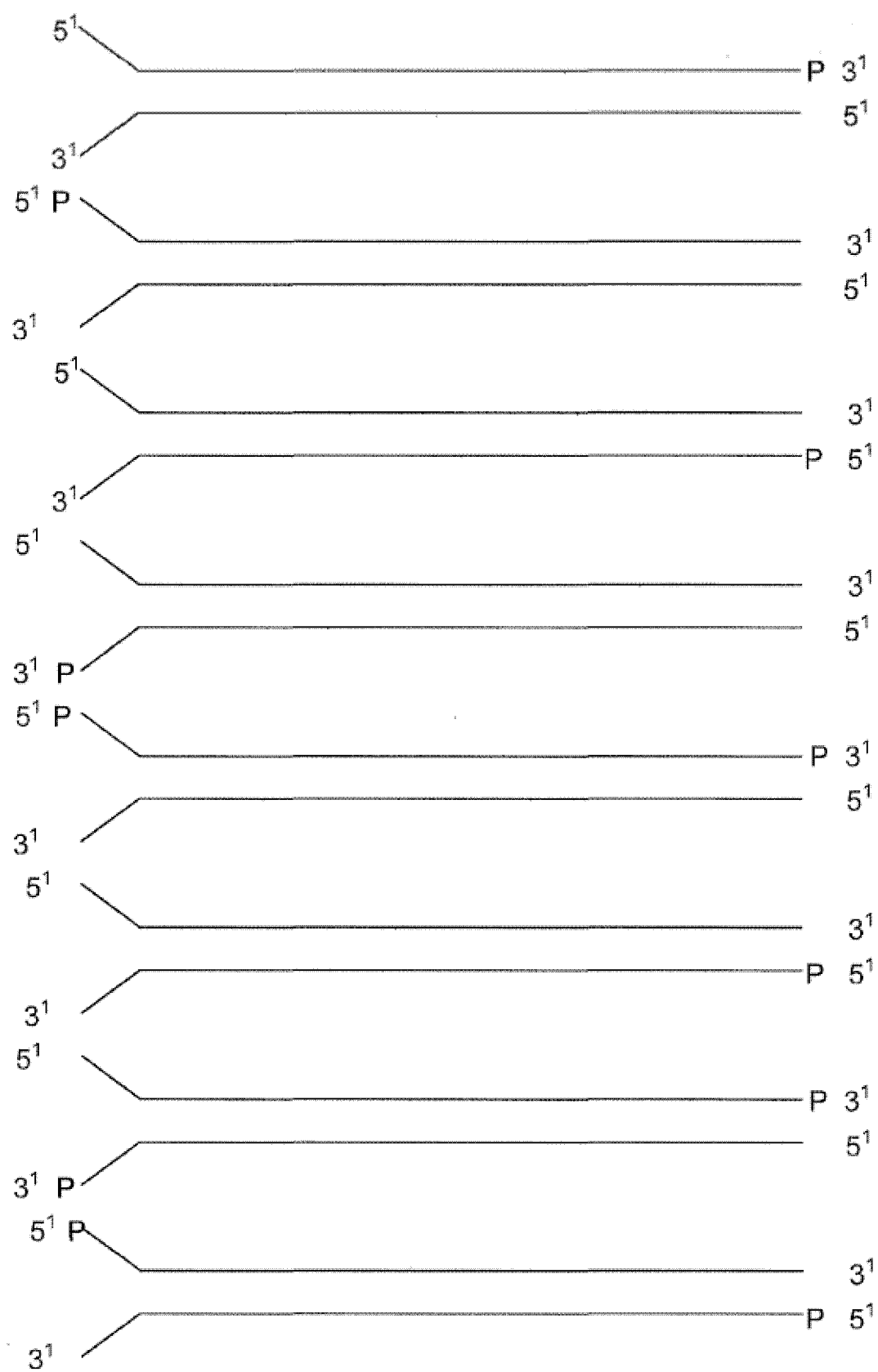
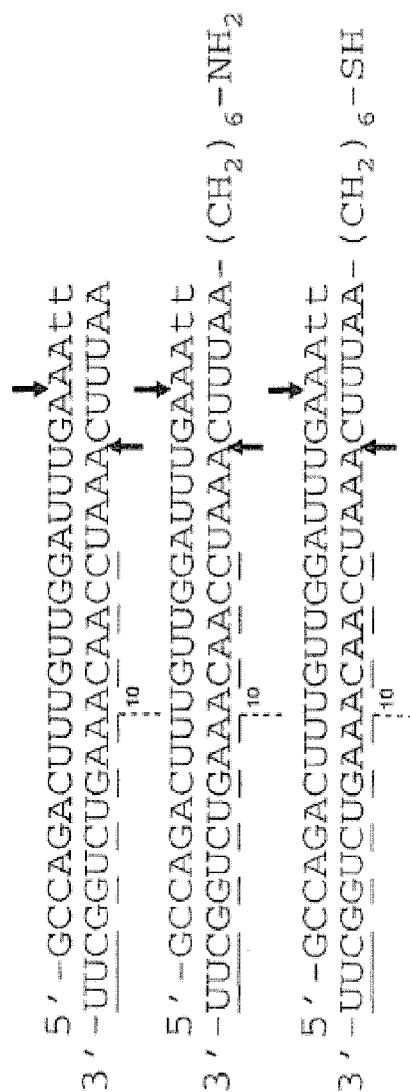


图 1G

HPRT1

DP1001P-DP1002G
(H1002G)

DP1001P-DP1460G
(H1460G)

DP1001P-DP1461G
(H1461G)

KRAS

DP1301P-DP1096G
(K1096G)

DP1301P-DP1459G
(K1459G)

DP1301P-DP1336G
(K1336G)

DP1301P-DP1379G
(K1379G)

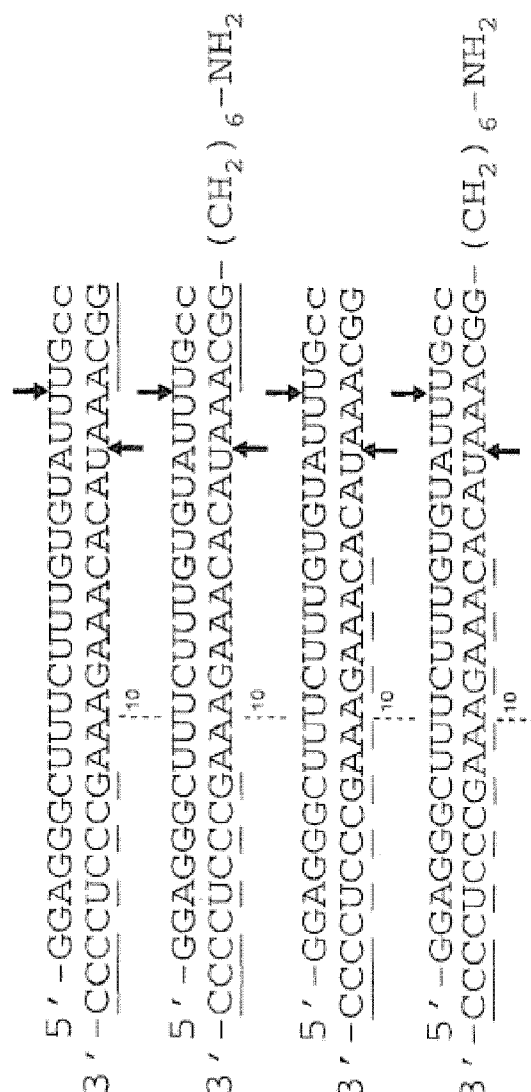


图 2

<u>SEQ ID NO</u>	<u>序列</u>	<u>静电荷</u>
39	— GEFVMNPANAQGHTPGTRL	+1
149	— GEFVMNAANAQGH TAGTRL	+1
118	— GTFFYGGSRGKRNNFKTEEY	+2
120	— GTFFYGGSRGRRNNFRTEEY	+2
31	— GVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL	+3
32	— GVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL	+1
33	— GKSVKAPGI	+2
62	— GKSVKAPGIGGKSVKAPGI	+4
37	— GKSVIPRKGTKAPPRL	+5
150	— TQIENLKEKG	0
151	H ₂ N-c[D(Cys-Ser-Lys-Cys)]Gly-Peg12-Lys —	+2
152	H ₂ N-c[Cys-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-Cys]-Peg12-Lys —	+2
153	H ₂ N-Thr-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-D-Phe- Peg12-Lys —	+2

图 3

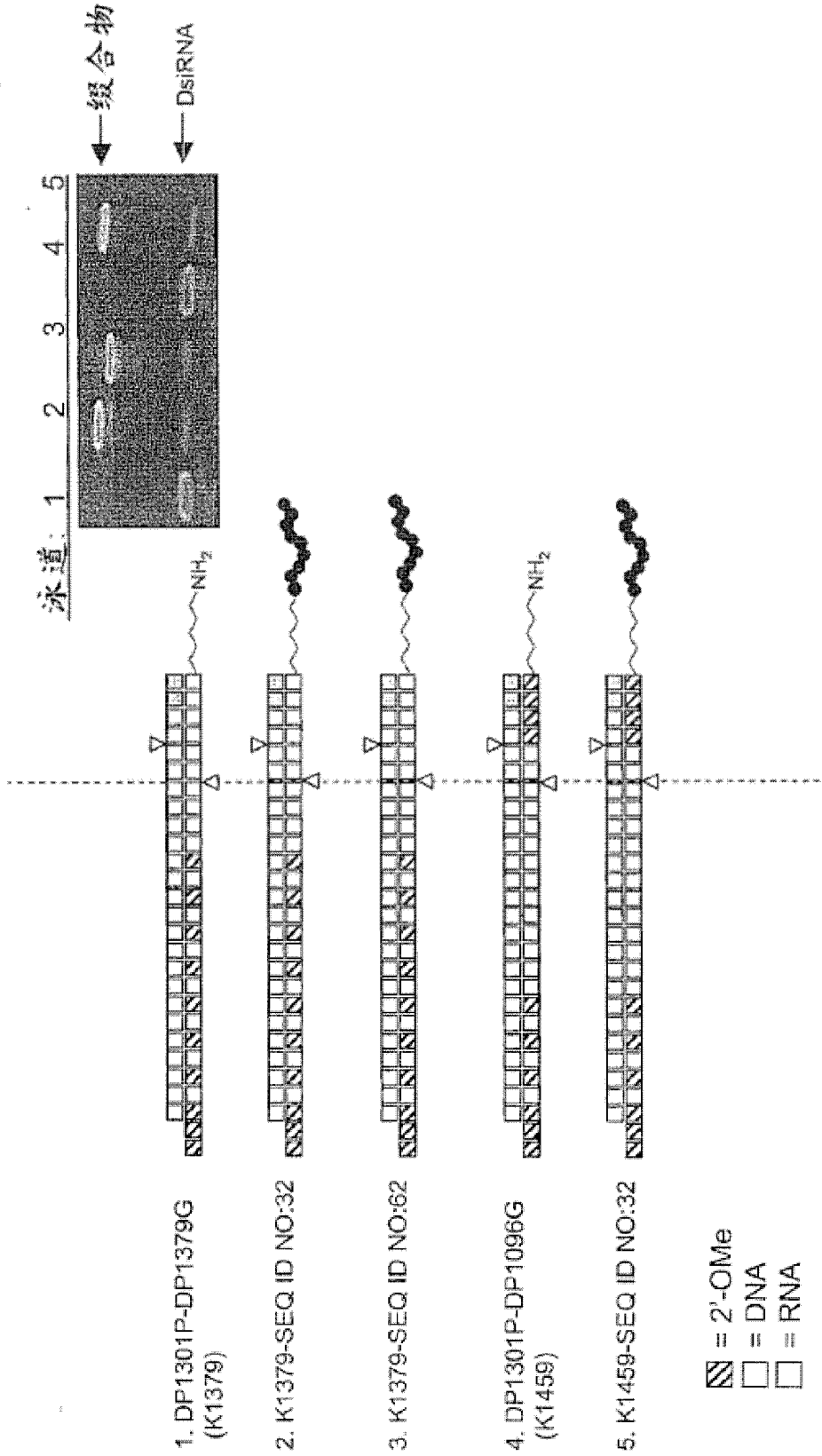


图 4

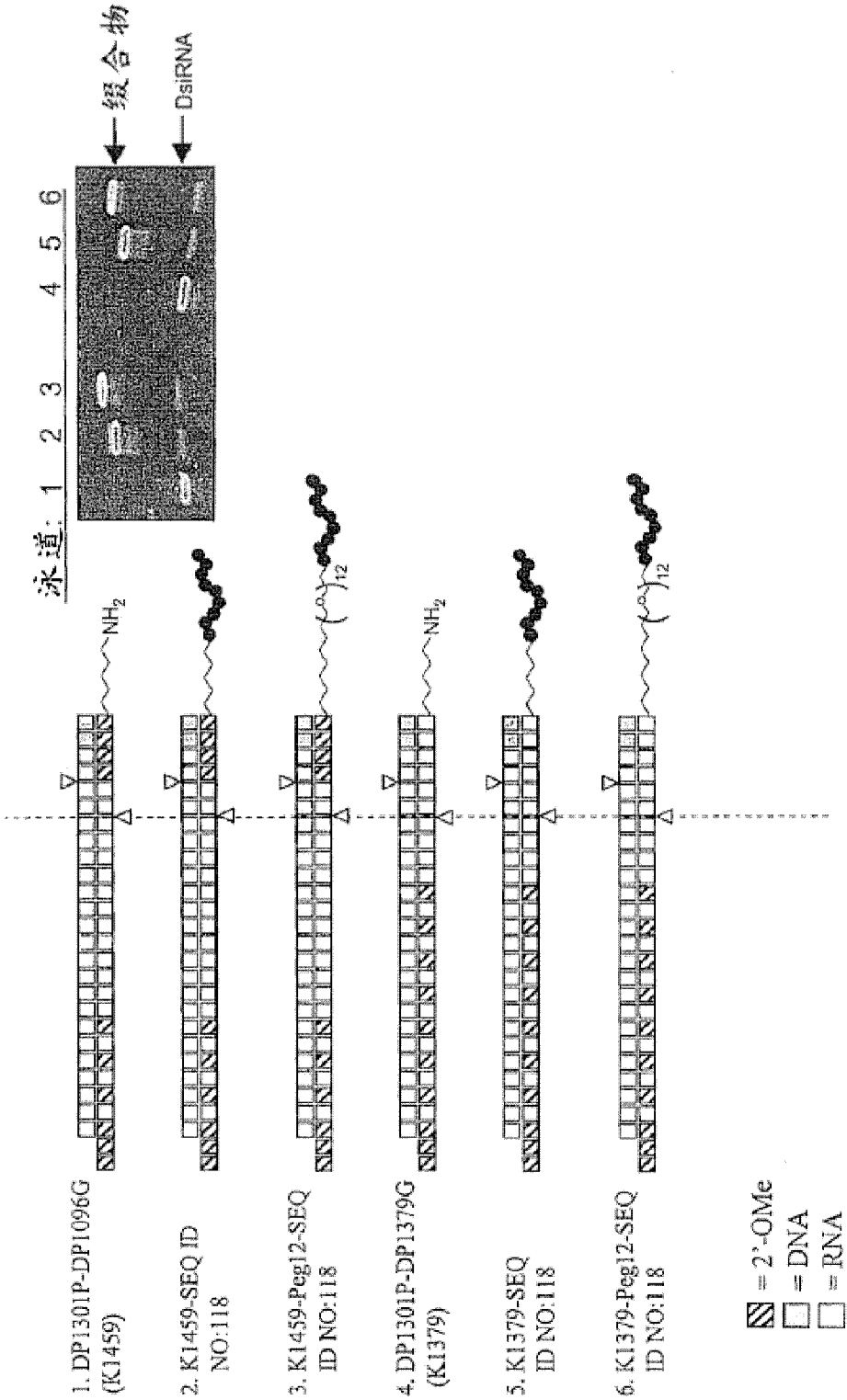


图 5

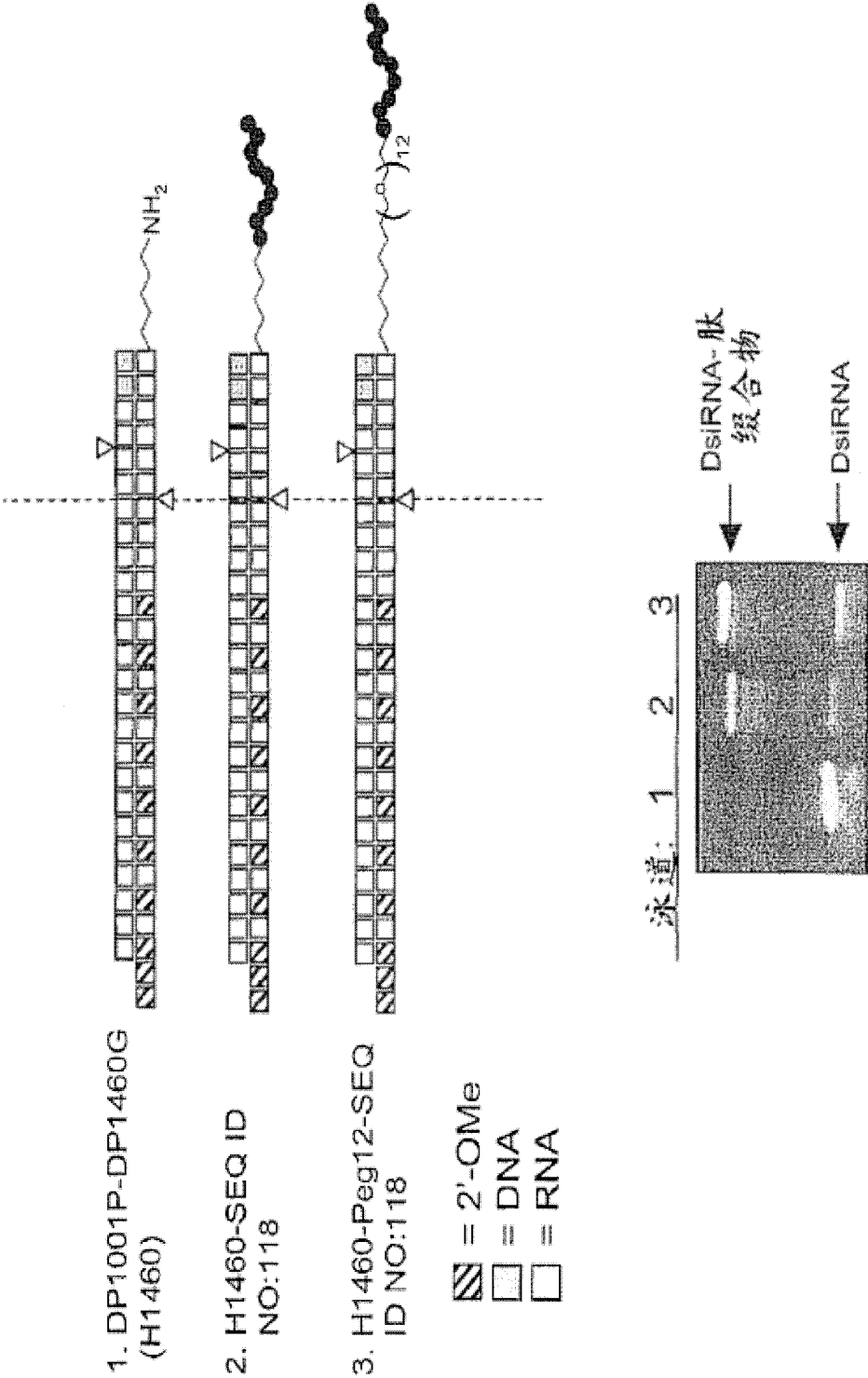


图 6

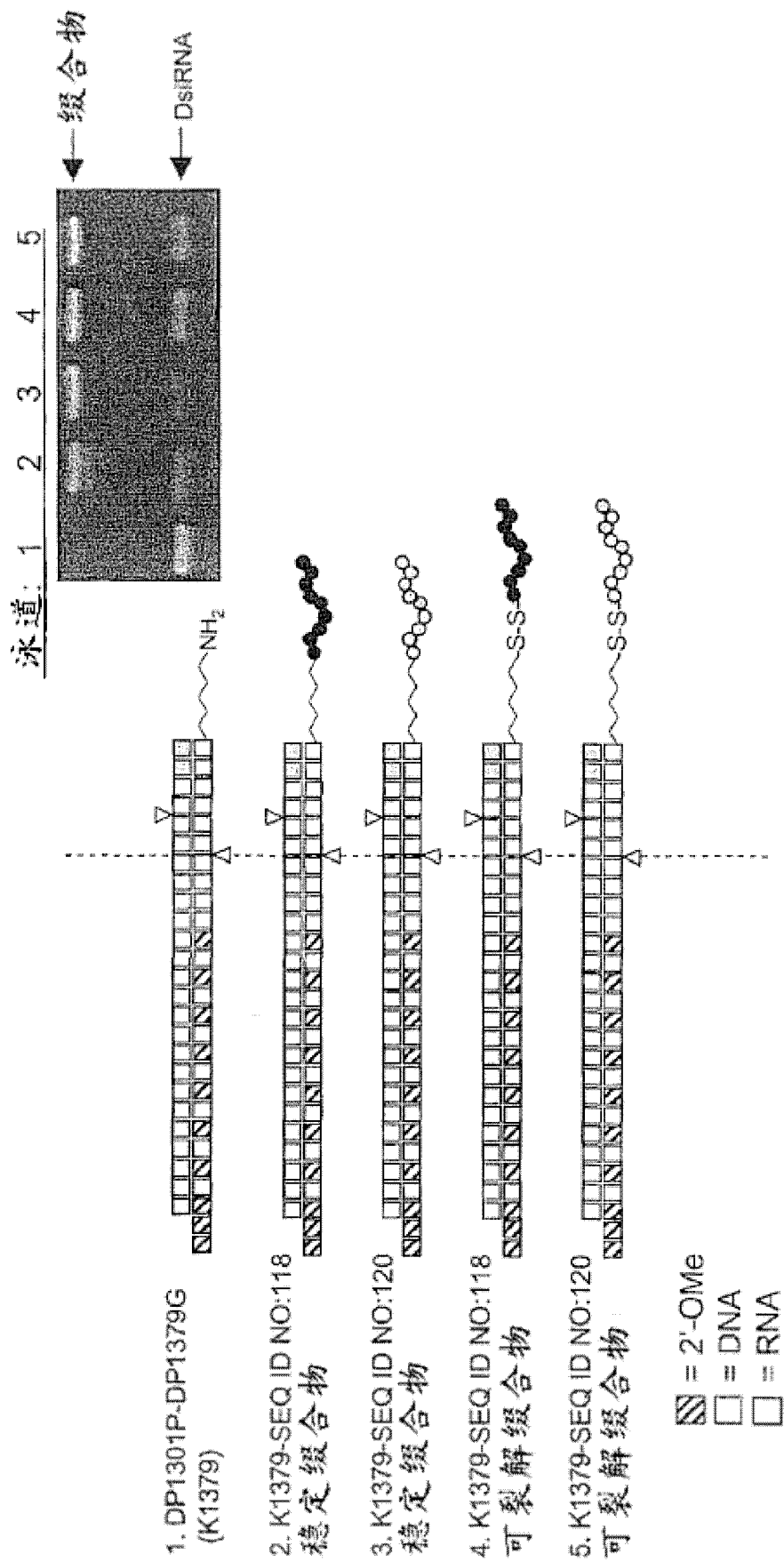


图 7

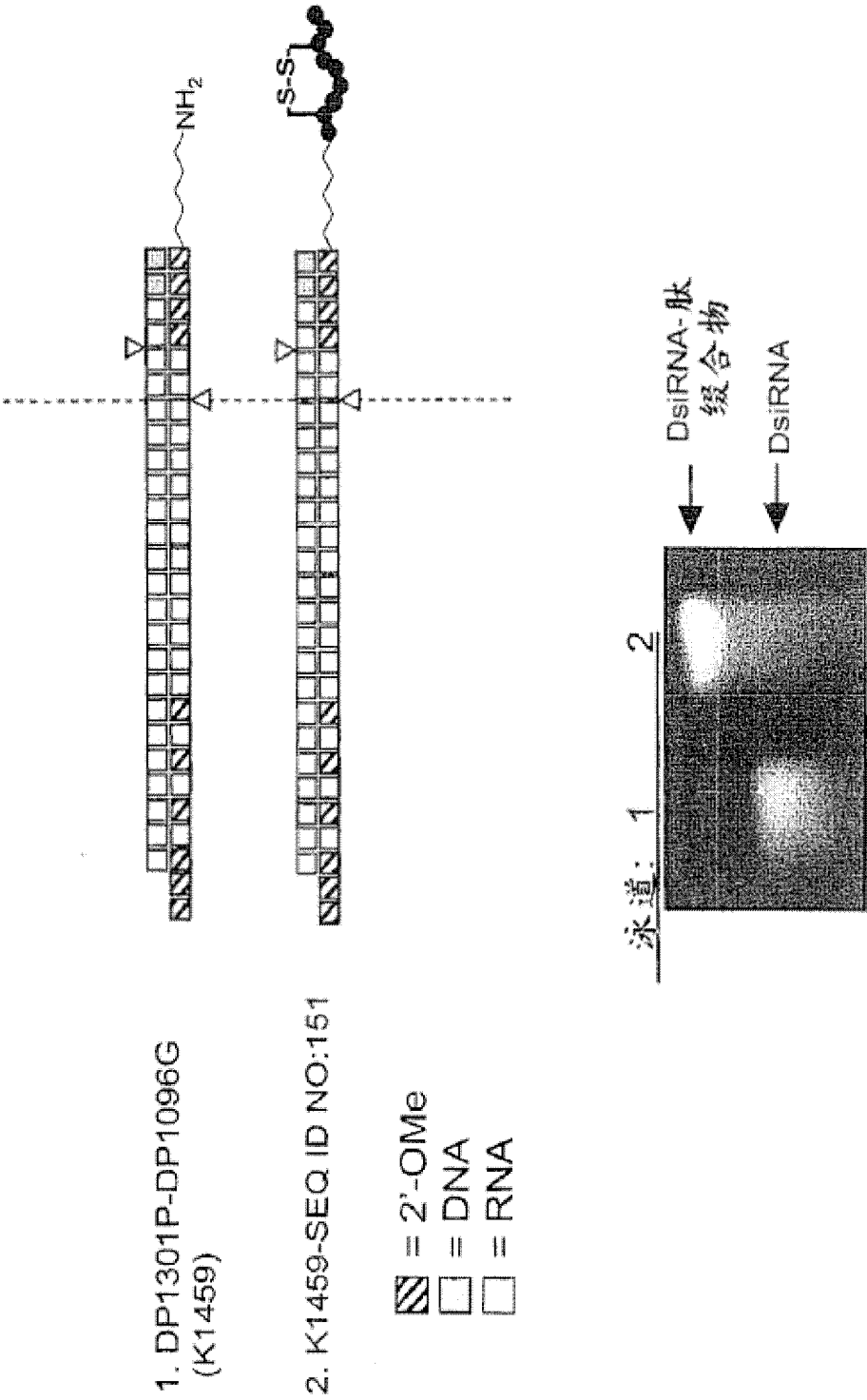


图 8

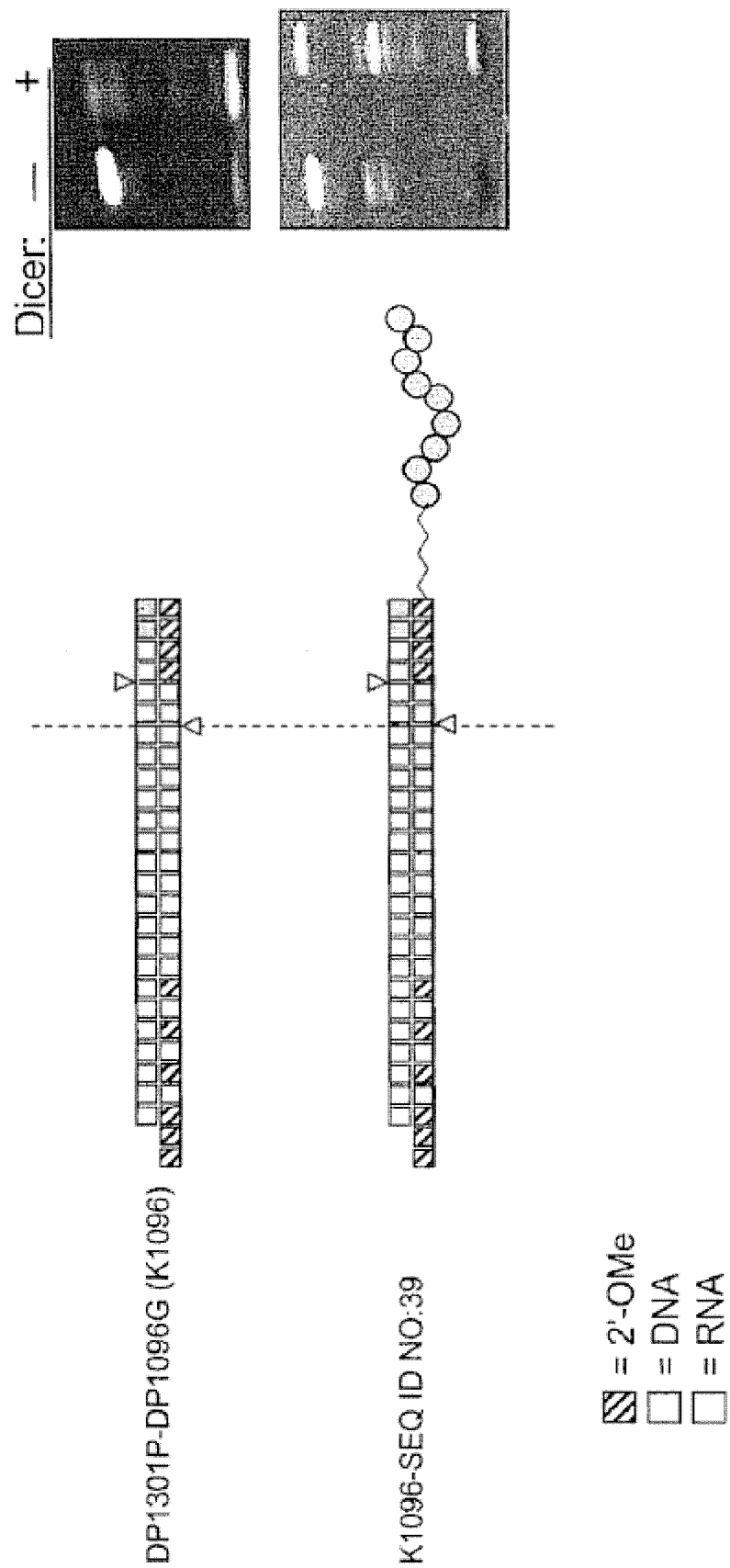


图 9

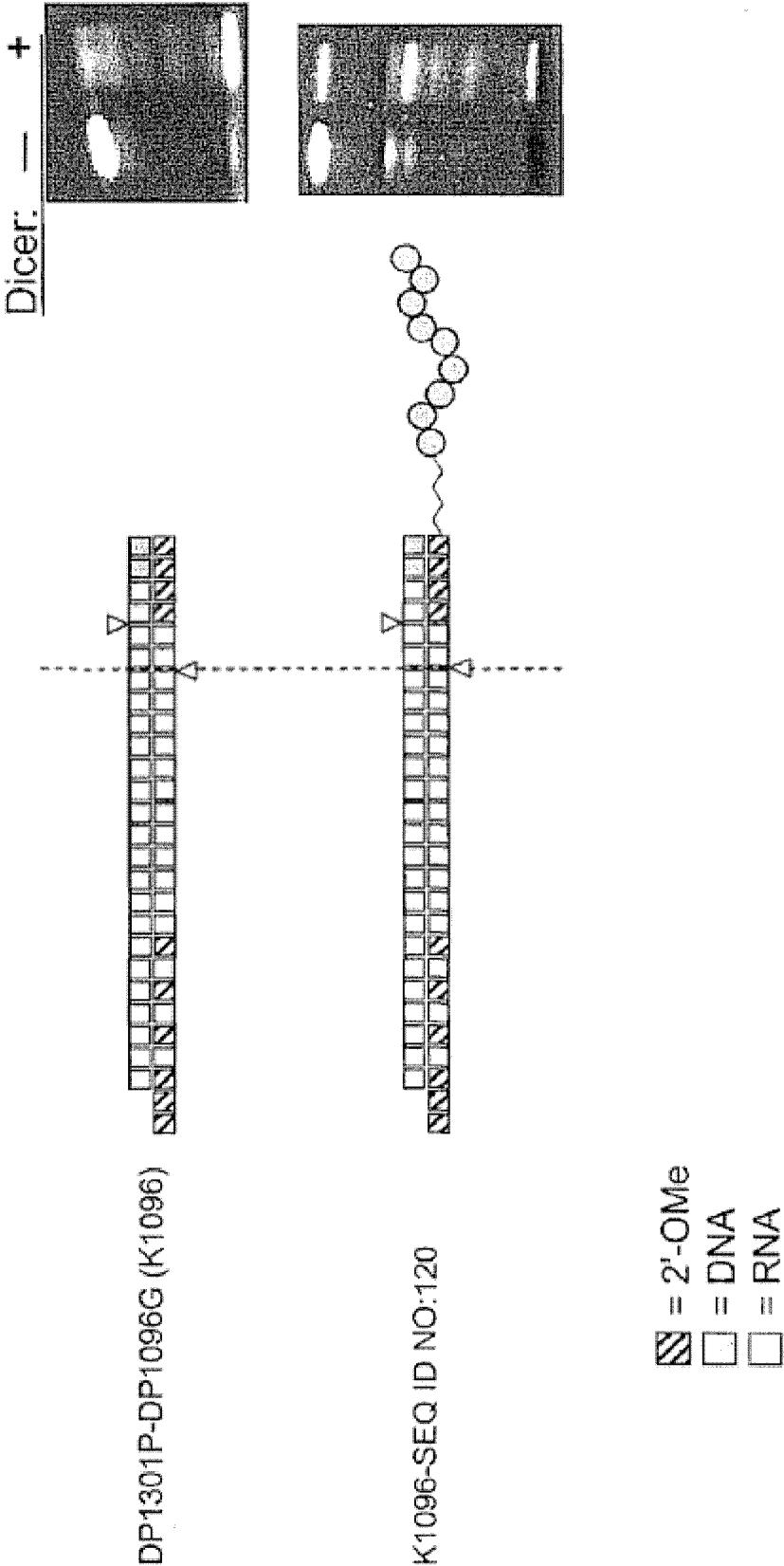


图 10

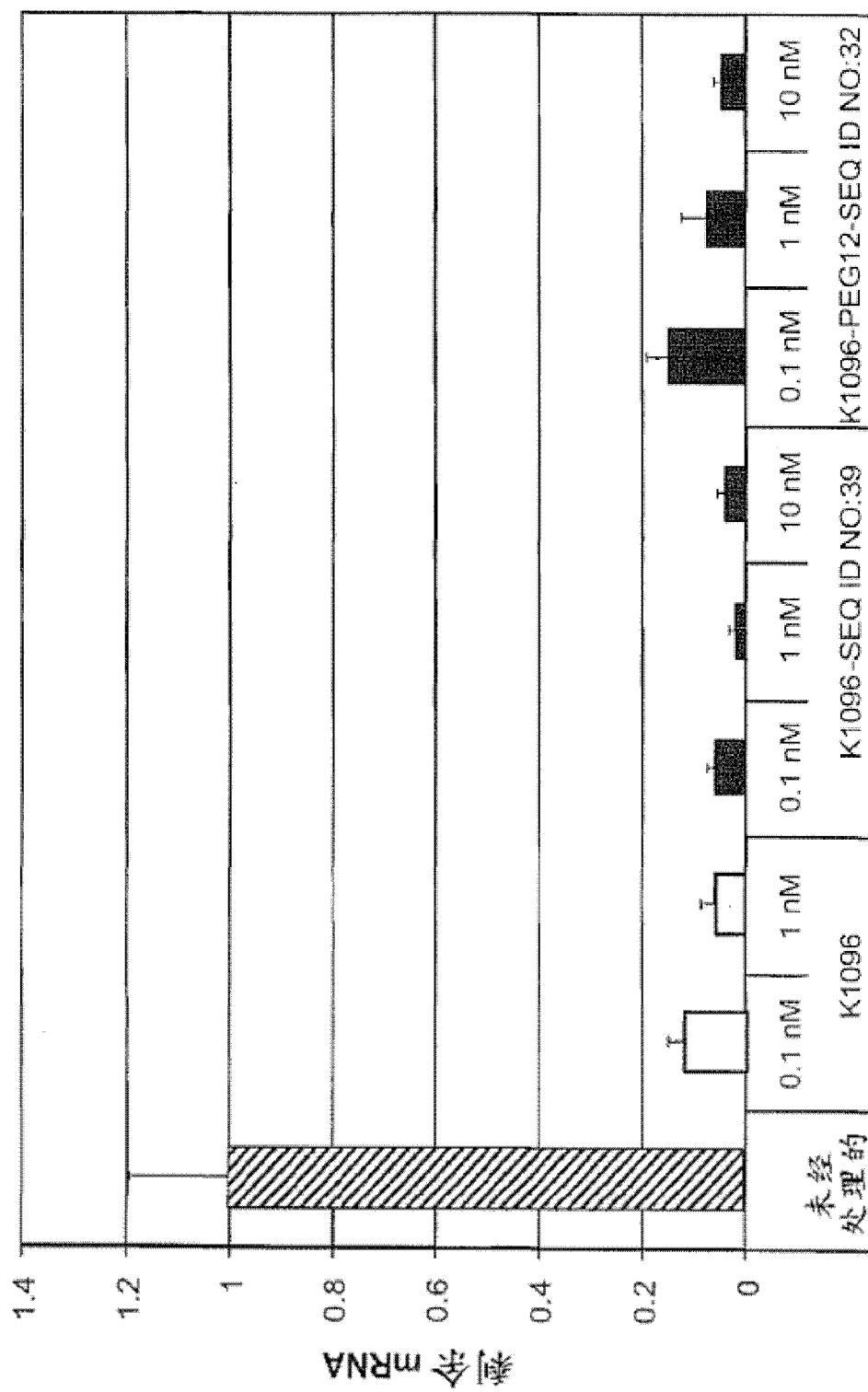


图 11

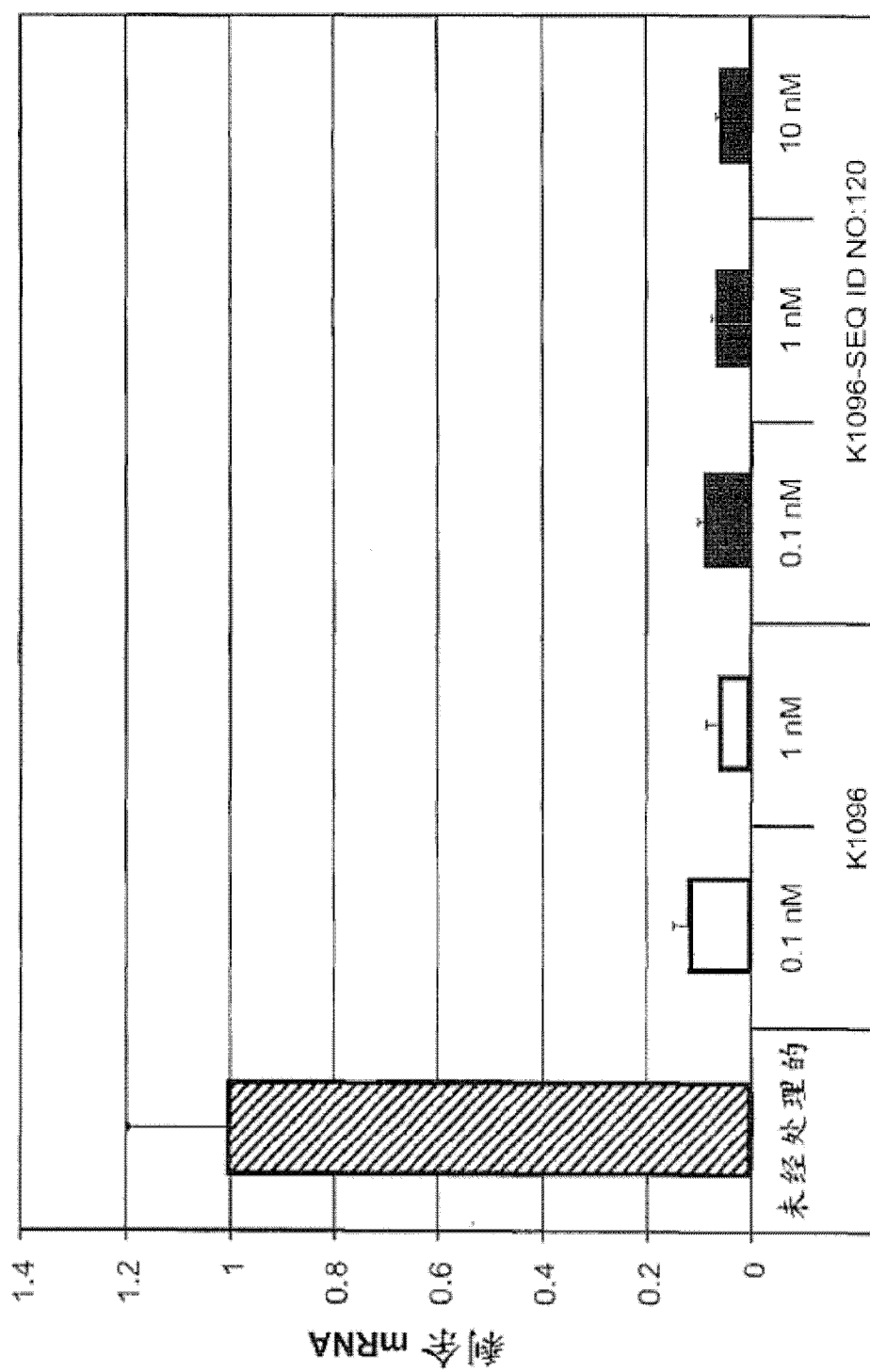


图 12

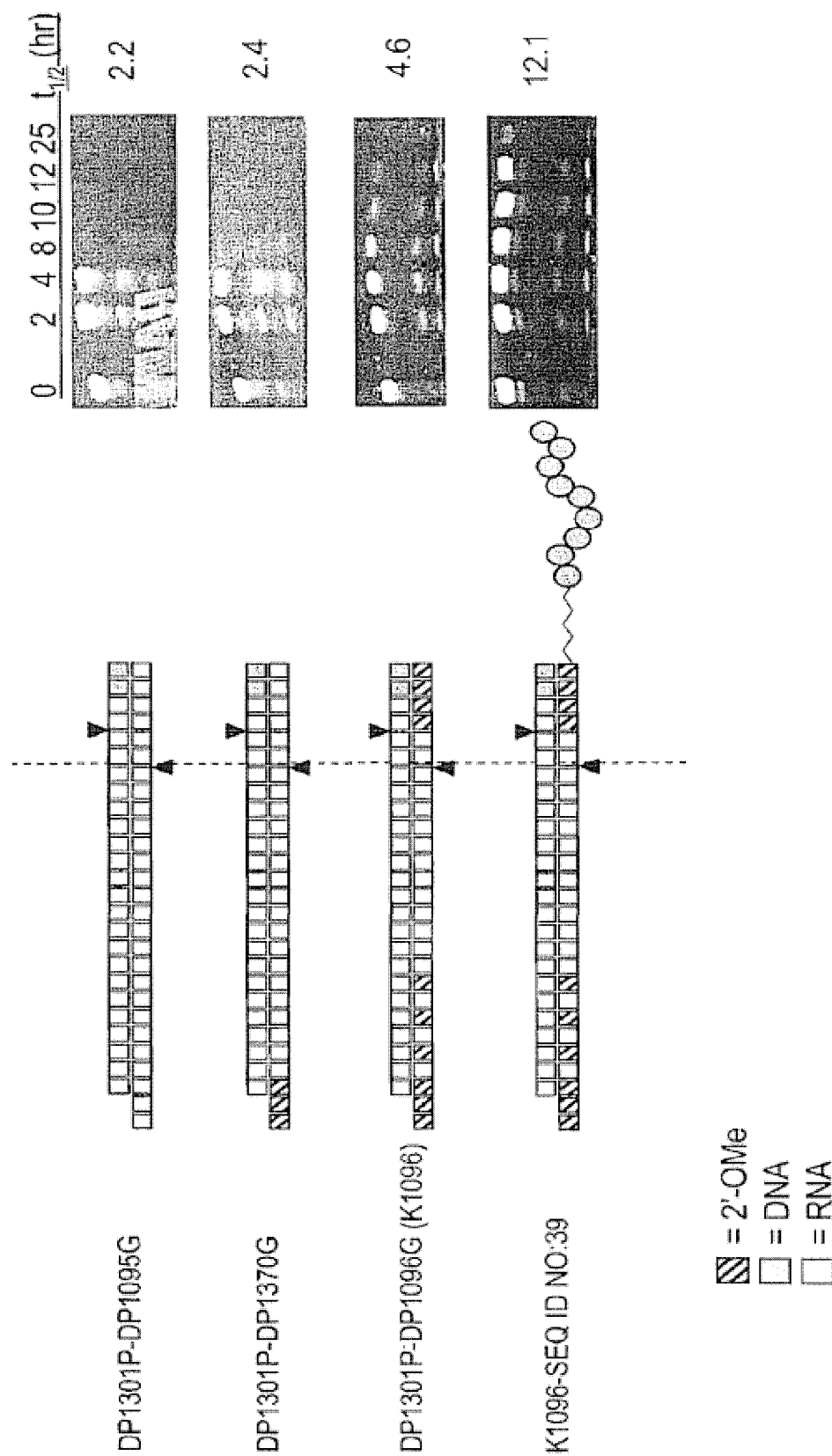


图 13

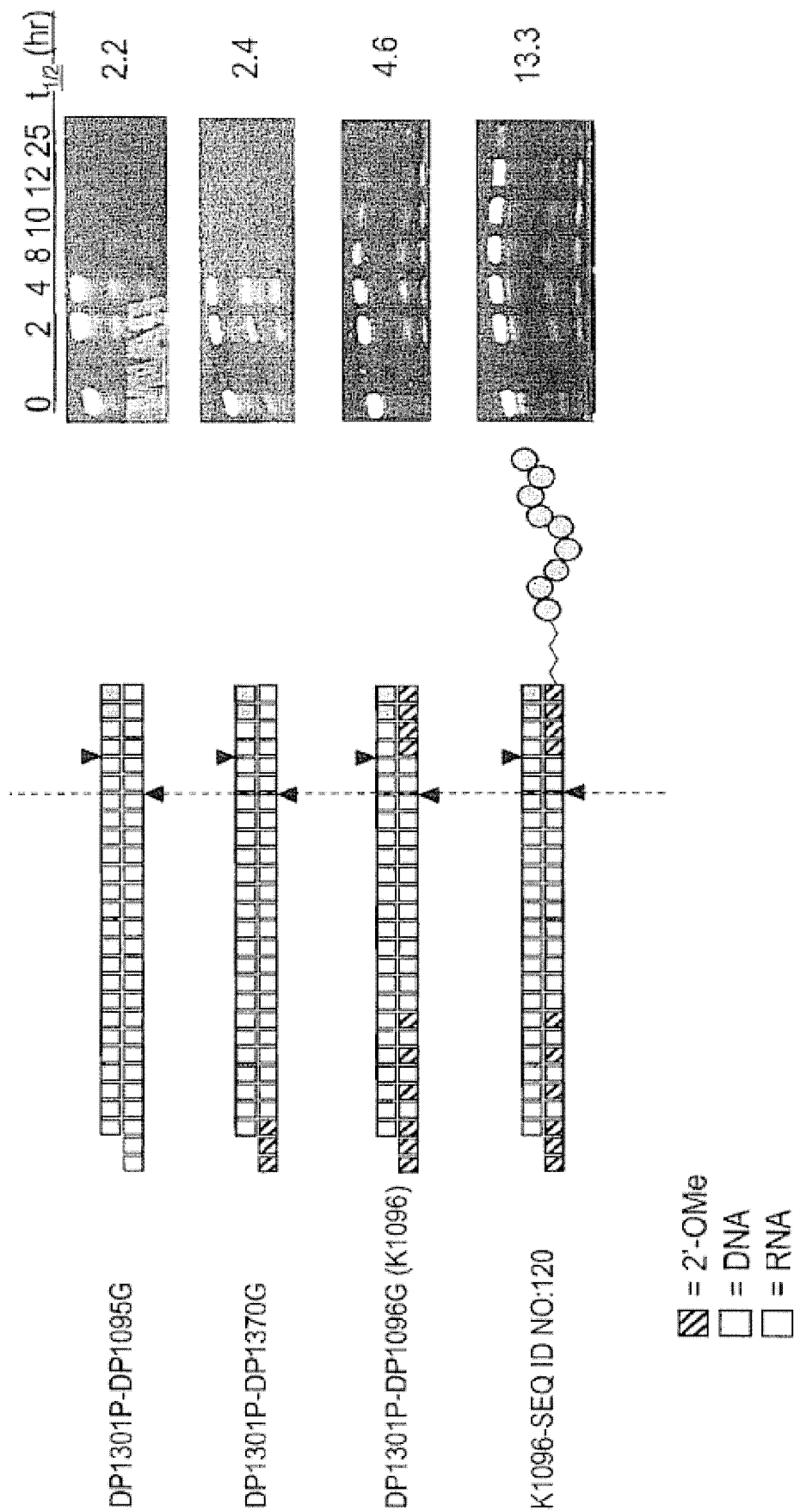


图 14

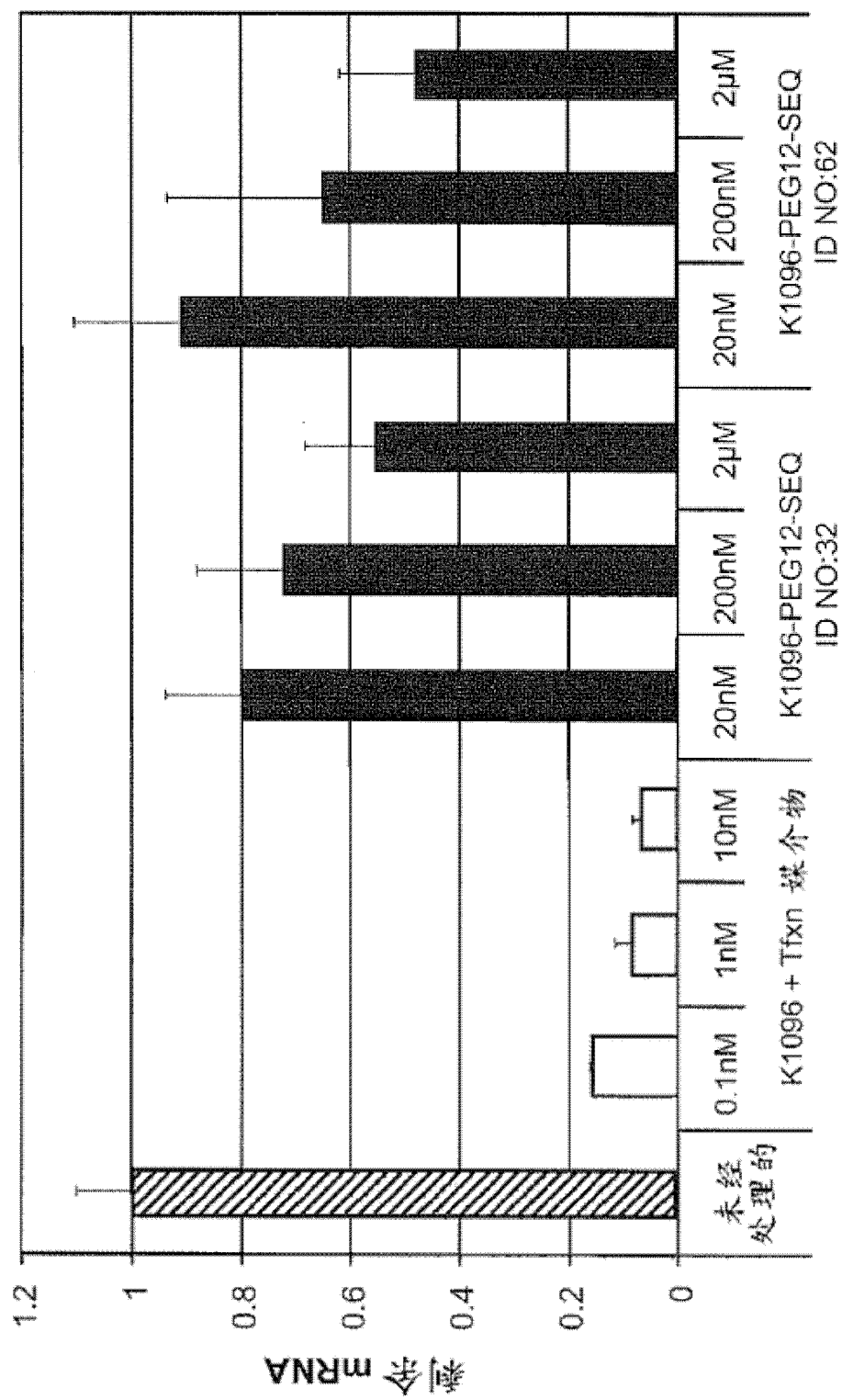


图 15

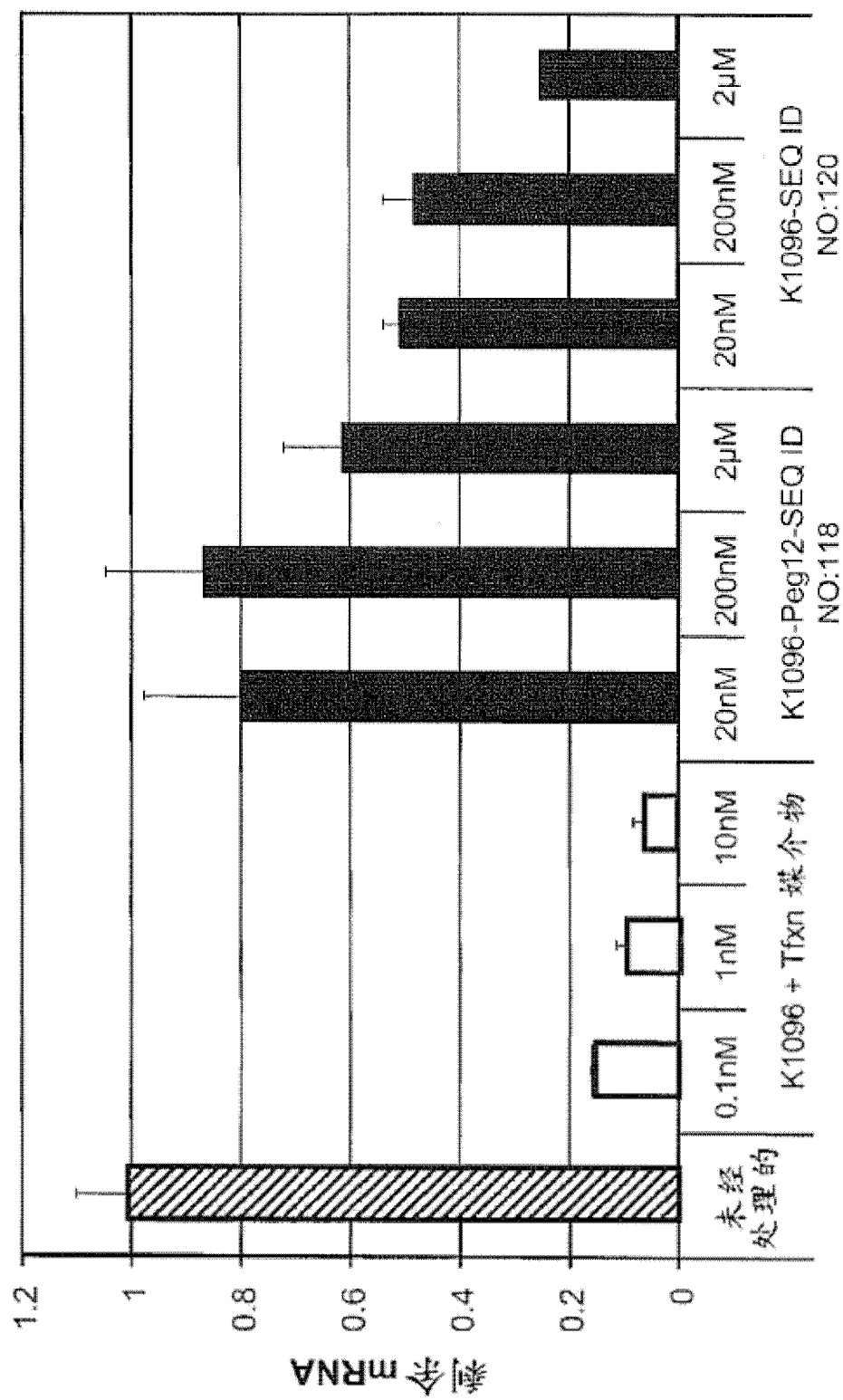


图 16

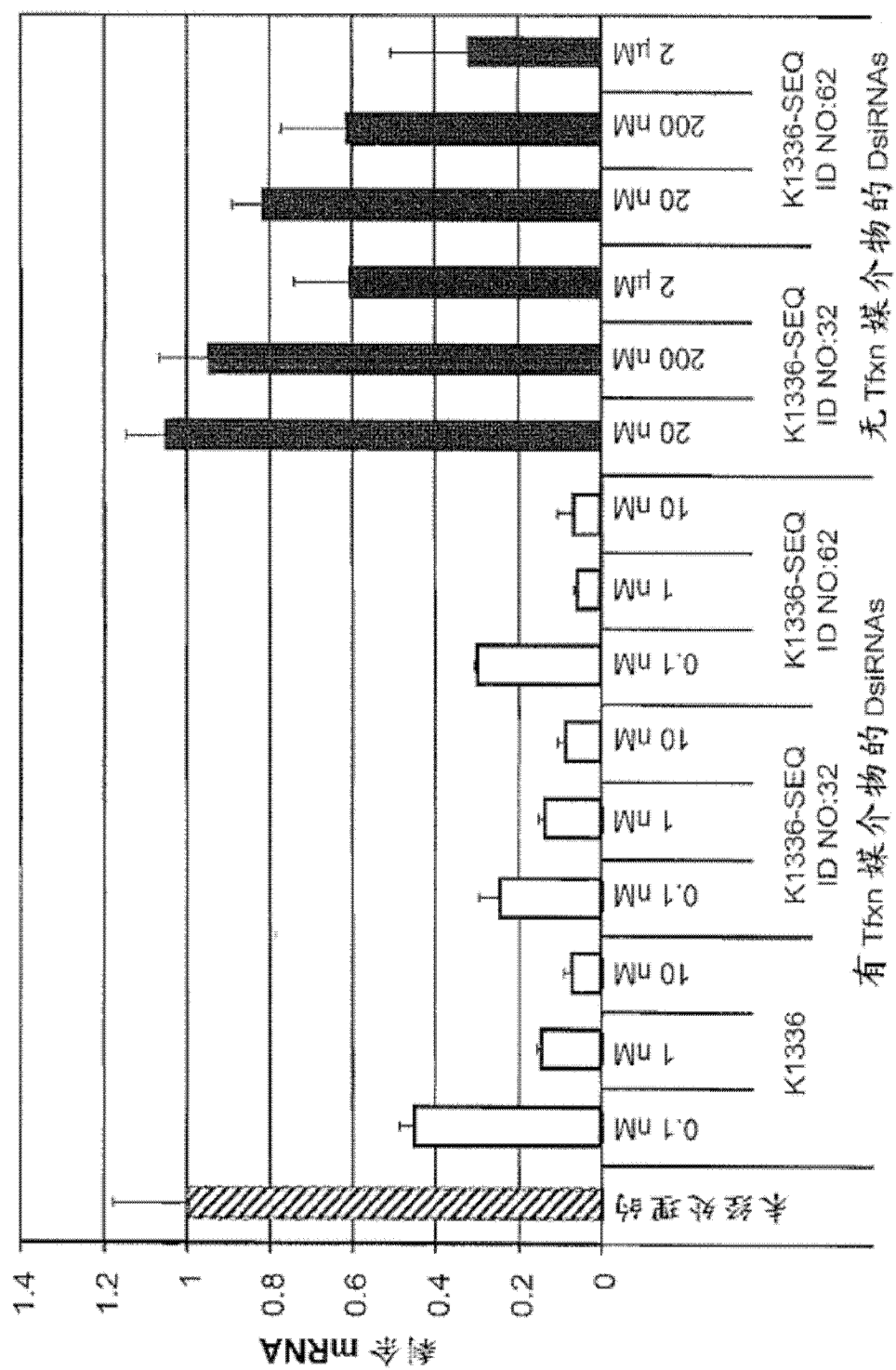


图 17

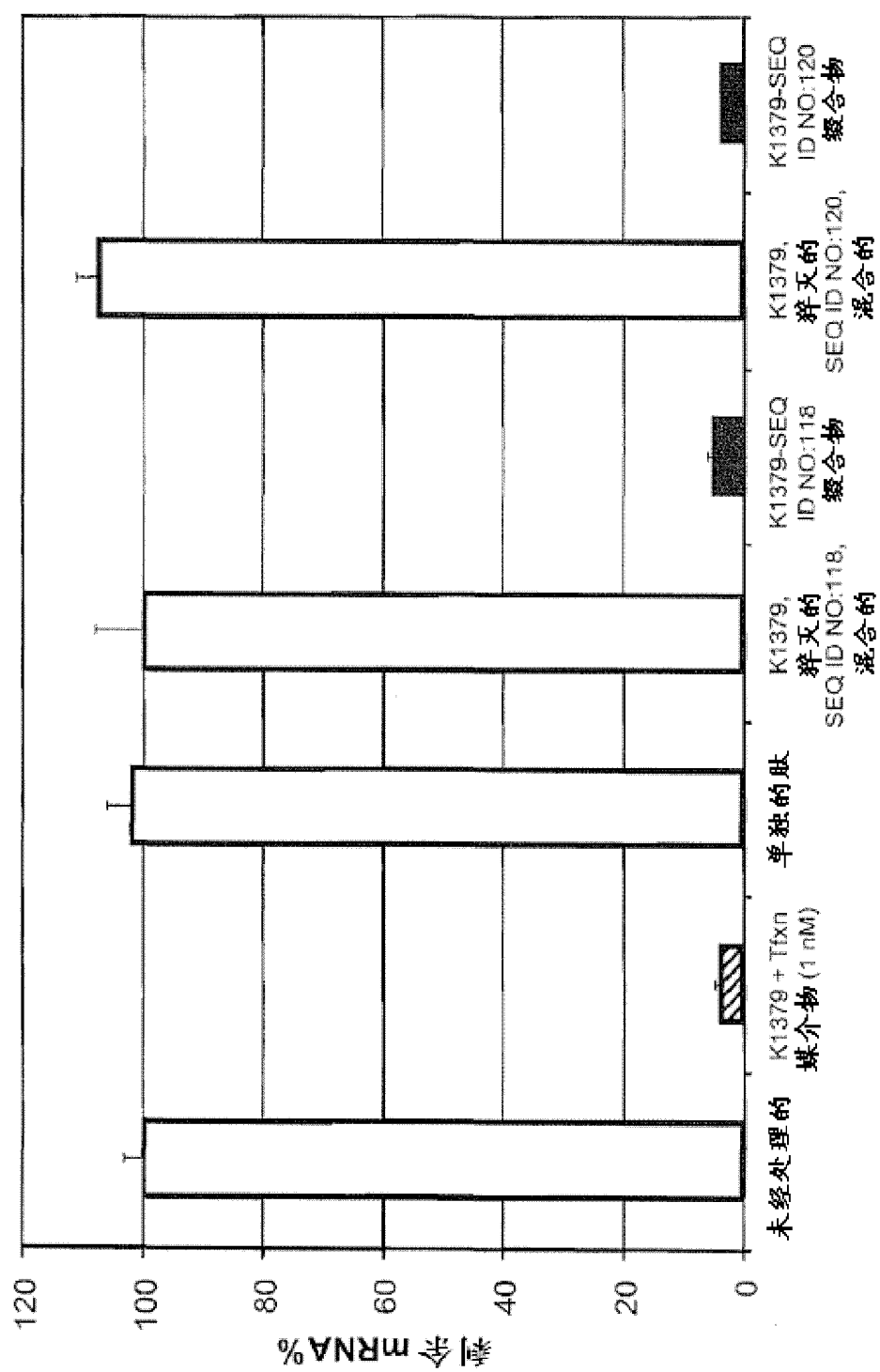


图 18

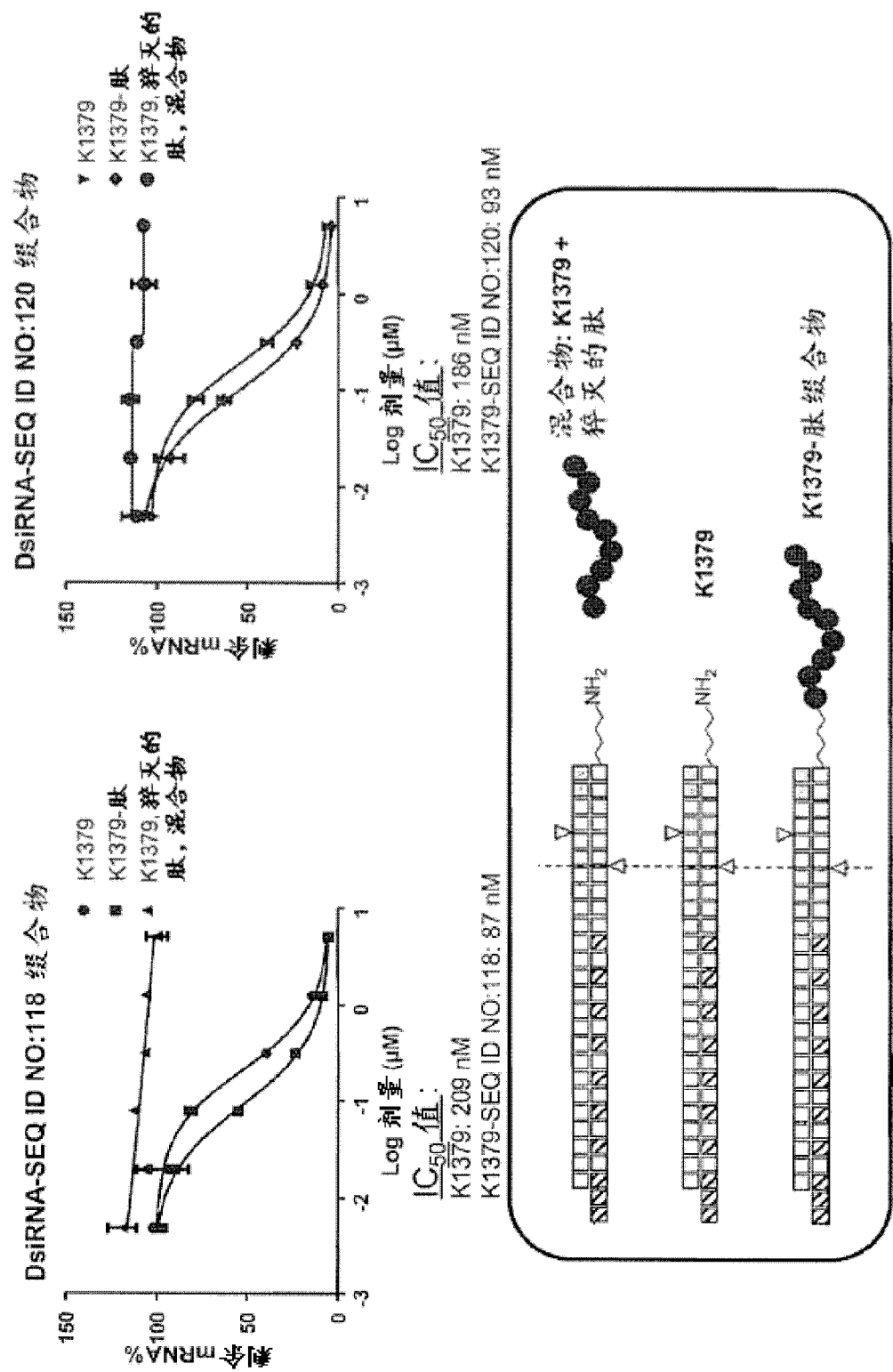


图 19