



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95108109.8

[51]Int.Cl⁶

A61K 31 / 70

[43]公开日 1996 年 6 月 12 日

[22]申请日 95.6.28

[30]优先权

[32]94.6.29 [33]GB[31]9413035.8

[71]申请人 科学研究与运用咨询公司

地址 法国巴黎

[72]发明人 S·考劳特

E·瑟罗兹基

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抑制异戊二烯基蛋白质转移酶表达的寡核苷酸

[57]摘要

本发明涉及抑制异戊二烯基蛋白质转移酶表达的寡核苷酸及其衍生物、含有该化合物的治疗组合物以及利用该寡核苷酸组合物治疗人体或动物体内因异常和/或无控制的细胞增殖而引起的疾病。

权 利 要 求 书

1. 一种可选择性与异戊二烯基蛋白质转移酶亚基之基因或转录产物杂交的寡核苷酸。

2. 一种寡核苷酸,其含有 SEQ ID NO. 1—SEQ ID NO. 36 中序列之一的至少一部分。

3. 根据权利要求 1 或 2 的寡核苷酸,其可与异戊二烯基蛋白质转移酶 α 和/或 β 亚基之基因或转录产物杂交。

4. 根据权利要求 1 或 3 的寡核苷酸,其中异戊二烯基蛋白质转移酶选自法呢基蛋白质转移酶及 I 型和 II 型牻牛儿基—牻牛儿基—蛋白质转移酶。

5. 根据上述权利要求任一项的寡核苷酸,其由 2—50 单位组成。

6. 根据权利要求 5 的寡核苷酸,其由 8—35 单位组成。

7. 根据权利要求 6 的寡核苷酸,其由 10—25 单位组成。

8. 根据上述权利要求任一项的寡核苷酸,其具有修饰的主链。

9. 根据权利要求 8 的寡核苷酸,其中至少一个核苷酸碱基得到修饰。

10. 根据权利要求 9 的寡核苷酸,其中修饰的核苷酸碱基具有 α —异头物构象。

11. 根据权利要求 8 的寡核苷酸,其中连接键组群中至少之一被修饰。

12. 根据权利要求 8 的寡核苷酸,其中 5' 和 3' 位两处或其中

一处被修饰。

13. 根据权利要求 12 的寡核苷酸，其中 5' 和 3' 位两处或其中一处通过疏水性或保护性基团的取代得到修饰。

14. 含有根据权利要求任一项中至少一种寡核苷酸作为有效成分的治疗组合物，该有效成分与适合于所选定的给药方法的药用性稀释剂和/或载体相混合。

15. 根据权利要求 14 的组合物在对细胞增殖异常和/或无控制的人体或动物体进行治疗的方法中的应用。

说 明 书

抑制异戊二烯基蛋白质转移酶表达的 寡核苷酸

本发明涉及抑制异戊二烯基蛋白质转移酶表达的寡核苷酸及其衍生物、含该类化合物的治疗组合物以及利用该类寡核苷酸组合物治疗因异常和/或无控制细胞增殖而引起的人或动物体内疾病。

任何生物（不管是单细胞还是多细胞的）都表现出其繁殖的能力，这一现象需要遗传物质（如 DNA 等）的复制以及所复制 DNA 在两个“子”细胞间的平均分配。存在着大量具促有丝分裂活性的形形色色的分子，它们以“细胞特异性”方式发挥作用。“信号”分子或生长因子是多肽类型的，它们的量很低，在与靶细胞相互作用之后可以引发一连串终止 DNA 复制及有丝分裂的活动。

生长因子并不直接作用于细胞循环，而是通过位于靶细胞质膜上的一系列横跨膜受体的相互作用和活化作用。这种机制触发了细胞内导致有丝分裂的链式反应。所激活的胞内活动可能因同一受体的不同细胞类型而有所变化。

使生长因子与其受体相连接的第一阶段之一是激酶蛋白质的激活和蛋白质的磷酸化。构成这种信号转导连接的蛋白质之一是蛋白质 ras，即由异戊烯化作用机制修饰的一种 21K—道尔顿的蛋白质。异戊烯化作用是一种转译后修饰，其包括异戊烯基组群与多种蛋白

质的半胱氨酸的共价连接。这样异戊烯化作用就可以是法呢基组群或牻牛儿基—牻牛儿基组群向靶蛋白质的转移。这种修饰使某些蛋白质自身附着到膜作用位点上。抑制这种异戊烯化作用的后果之一是阻止了胞外信号向细胞核内的转导作用以及细胞增殖。

迄今为止，已表征了催化这种修饰的三类酶：法呢基蛋白质转移酶、I型和II型牻牛儿基—牻牛儿基蛋白质转移酶。所有这些酶都能识别位于蛋白质羧基末端的同感序列。

阻断这些酶合成的后果之一是阻断引起细胞增殖的主要信号传递途径。

大多数典型性有效成份与蛋白质，即遗传信息的转译产物相互作用并抑制其功能。本发明涉及一种新近的治疗方法：反义对策。该方法旨在通过核苷酸链（寡核苷酸）与其在信使或前信使RNA或DNA上的互补序列的选择性配对而进行基因表达的选择性调节，并因此抑制相应蛋白质的合成。所使用的分子直接相互作用于遗传信息级联。

与转录产物互补的寡核苷酸被称为“反义”寡核苷酸。与转录产物具有相同序列的寡核苷酸称为“有意义”寡核苷酸。最初，这些化合物被合理设计以通过相应信使RNA经RNA酶H介导的水解机制的脱落抑制基因产物的形成。不久，发现这些反义寡核苷酸的作用机制并不如此简单。这些寡核苷酸可与不同数目的非核酸细胞靶相互作用。这些寡核苷酸可与基因相互作用而形成三股螺旋结构并抑制转录产物的形成。寡核苷酸可与前信使RNA内含子—外显子接点相互作用，因而干扰转录产物的正确拼接。寡核苷酸可通过形成RNA—DNA双螺旋而与胞质中的mRNA杂交，其因RNA酶H或

因阻止核糖体复合物滑过 mRNA 而迅速降解，因而阻断转译。寡核苷酸（特别是修饰的寡核苷酸）可与许多细胞组分（如蛋白质）相互作用。这些相互作用可以是序列特异性的（如转录因子），也可以是非序列特异性的（如生长因子）。这样，寡核苷酸（SEQ ID NOs. 1—36）可通过上述机制之一或组合而引起增殖停滞。

本发明尤其旨在利用反义寡核苷酸来阻断上述酶的合成。这意味着其可作为抗增殖剂而用于心血管疾病、肿瘤学、皮肤学、某些病毒感染和任何其它与细胞增殖有关的病理状况。

在反义方法学中，可使用反义寡核苷酸或反义 RNA。反义寡核苷酸方法学不同于反义 RNA。在后者中，基因的 DNA 片段在正常意义相对方向上被插入载体 DNA 内，这样，在所述载体转录期间，其 DNA 的螺链之一在 RNA 中得到复制。基因反向片段的插入引起了 RNA 的原位合成，该 RNA 与由细胞本身合成的正常 mRNA 互补。这种 RNA（称为反义 RNA）可杂交以正常表达 mRNA，因而抑制靶蛋白质的转译。Prendergast 等人已使用了这种方法（细胞生长与分化 4, 707—713, 1993 年 9 月）以评估法呢基蛋白质转移酶的作用：对该法呢基蛋白质转移酶 β -亚基之 cDNA 进行克隆并提纯；对靶细胞进行遗传工程处理以原位表达反义 RNA 分子。

反义 RNA 方法尤其适用作机制工具以搞清蛋白质在细胞中的作用和最终用作治疗剂（应用复杂性基因治疗方案），而反义寡核苷酸作为药物更具吸引力，并被制定规章的部门视为典型性化学品。而且，可通过经典化学很容易地大量合成寡核苷酸，而反义 RNA 分子可在生物体系中产生，但以工业化规模生产则障碍颇多。

在 EP 456 180 中已研究过法呢基蛋白质转移酶的剂量方法：尤

其是可用上述方法对法呢基蛋白质转移酶潜在抑制剂活性进行测度。但是，这种方法并没有给出法呢基蛋白质转移酶新型潜在抑制剂的结构，该专利也没有描述与本发明相关的任何分子。

本发明提供了可选择性与异戊二烯基蛋白质转移酶亚基之基因或转录产物，优选的是异戊二烯基蛋白质转移酶亚基 α 和/或 β 之基因或转录产物杂交的寡核苷酸（反义或有意义）。寡核苷酸可由2—50个单位，优选8—35个单位组成。更优选的是由10—25个单位组成。

可通过任何已知寡核苷酸化学合成法来合成本发明的寡核苷酸。最有利的是使用任意商业上可得到的，自动化核酸合成仪制备寡核苷酸。寡核苷酸合成法之一是 β -氰乙基氨基磷酸酯法，如S. L. Beaucage等人所述 [Tet. Let. 22 (1981), 1859—1862]。

本发明还提供了这类寡核苷酸的衍生物，即，已在寡核苷酸整体长度上或5'和3'位两处或其中一处修饰了主链的寡核苷酸。事实上寡核苷酸对酶，即将其水解成核苷酸的核酸酶具有敏感性；通过对糖本身化学性质或磷酸酯—糖核苷酸间的键进行修饰，寡核苷酸变得对核酸酶具有耐受性；这样磷酸二酯链就可被取代，如被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸甲酯、氨基磷酸酯、磷酸乙基三酯、丁基酰胺化物、哌嗪化物或吗啉化物链所取代。可在寡核苷酸整个长度上或在5'和/或3'端处进行其它类型的修饰，以使寡核苷酸在生物环境中更具耐受性。另外，核苷酸之间的磷酸酯键可被酰胺键替代（肽核酸）。再者，寡核苷酸的横跨膜通道因使寡核苷酸更具疏水性而得到促进；例如，通过连接疏水取代物（如胆固醇、芳香族组群或聚合物）可达到这一目的。可部分地或在寡核苷酸的整个

长度上掺入修饰的碱基。也可部分地或在寡核苷酸的整个长度上掺入可耐受核酸酶或提高杂交或胞内摄取特性的构象改变的核苷酸(如具有 α -异头物构象的寡核苷酸)。这样,术语“衍生物”包括以上述方法之一或专业人员所熟知的其它方法进行修饰的核苷酸。

本发明优选的寡核苷酸分别为序列 SEQ ID NO. 1—SEQ ID NO. 36 的寡核苷酸。依据本发明,也可以使用其互补序列或有意义寡核苷酸。

本发明进而提供了包括选自 SEQ ID NO. 1—SEQ ID NO. 36 中序列之一至少一部分的寡核苷酸。

本发明还提供了含有作为有效成分的至少一种本发明的反义寡核苷酸的治疗组合物,该有效成分与适合于所选定的给药方法的药用性稀释剂和/或载体相混合。该组合物可局部或全身性施用;其形式有注射液、脂质体、缓释制剂,凝胶、局部使用的软膏或适于所选定的给药方法的其它可用形式。

最后,本发明提供了本发明的组合物在对细胞增殖异常和/或无控制的人或动物体进行治疗的方法中的应用。

下列实施例可说明本发明。

实施例 1 反义寡核苷酸对大鼠平滑肌增殖的作用

通过酶消化(胶原酶和弹性蛋白酶)分离出雄性 Wistar 大鼠主动脉中的平滑肌细胞,在 DMEM 培养基中培养,培养基中含有 10% 的胎牛血清(FCS)、2mM 谷氨酰胺、50U/ml 的青霉素和 50 μ g/ml 的链霉素。将平滑肌细胞用于 24 孔平板的第 3—第 7 通道间。

培养 3 天后,在血清中使细胞离析 72 小时。然后用 1% 的血清或 5ng/ml bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)刺激(或不刺激)细胞,

同时用（或不用）本发明的产物（浓度为 10^{-5}M ）处理 24 小时。在培养结束之前 4 小时，用³H标记的胸苷（ $1\mu\text{g Ci/ml}$ ）标记细胞。加入 TCA 5%使掺入中止 10 分钟；然后用 500 μl 的 0.5N NaOH 对细胞进行平滑处理。取 400 μl 的等分试样，将其分布于含 400 μl 的 0.5N HCl 和 10ml Instagel 的闪烁瓶中。

通过测度细胞增殖（以百分比表示）来确定寡核苷酸的活性。所得结果如下表所示。

	增殖百分比	
	未刺激的细胞	(bFGF)
对照	100	100
SEQ ID No. 1	38	37
SEQ ID No. 2	35	40
SEQ ID No. 3	75	90
SEQ ID No. 4	114	100
SEQ ID No. 5	24	13
SEQ ID No. 6	49	70
SEQ ID No. 7	40	40
SEQ ID No. 8	119	70
SEQ ID No. 21	88	100
SEQ ID No. 22	89	86
SEQ ID No. 23	58	59
SEQ ID No. 30	121	225
SEQ ID No. 31	103	111
SEQ ID No. 32	111	204
SEQ ID No. 33	9	2
SEQ ID No. 34	10	2
SEQ ID No. 35	13	2
SEQ ID No. 36	12	2

实施例2 剂量与反应研究—反义寡核苷酸对大鼠平滑肌增殖的作用

试验方案同实施例1所述。用本发明的化合物（浓度分别为 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 和 10^{-5}M ）处理细胞。

浓度	增殖百分比					
	0	10^{-9}M	10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
SEQ ID No. 1	100	99	108	107	64	25
SEQ ID No. 2	100	86	81	90	50	14
SEQ ID No. 5	100	95	80	100	66	20
SEQ ID No. 6	100	87	69	84	48	20
SEQ ID No. 7	100	102	98	96	59	28

实施例3 对反义寡核苷酸体外生物学活性的大小作用

试验方案同实施例1所述。用本发明的化合物处理细胞。

	浓度 (μM)	抑制百分比	
		(未刺激的细胞)	(bFGF)
对照	-	0	0
SEQ ID No. 5	10	76	87
SEQ ID No. 30	10	- 21	- 125
SEQ ID No. 31	10	- 3	- 11
SEQ ID No. 32	10	- 11	- 104
SEQ ID No. 2	1	33	4
SEQ ID No. 33	1	87	85
SEQ ID No. 34	1	83	89
SEQ ID No. 35	1	81	89
SEQ ID No. 36	1	85	89

实施例 4 对血管形成模型(大鼠或兔)的反义寡核苷酸的体内抗增殖研究

将正常血压的雄性 Wistar 大鼠或新西兰兔麻醉并解剖使髂动脉暴露出来。除去动脉四周的结缔组织，并用法国 Fogarty 导管进行插管。将气球充气以扩张动脉，反复 3 次以造成脱内皮细胞化损伤。

将溶于 25%Pluronic 凝剂的寡核苷酸迅速施用于动脉四周暴露区域。缝合伤口，21 天后将动物处死。对脱内皮动脉部分进行组织形态学分析，对内膜和中域进行测试。

增殖百分比确定为内膜/内膜+中域比率。

表 1

	兔血管形成模型	
	浓度 (μg)	增殖百分比
对照		33.6 ± 8.8
安慰剂 (pluronic 凝胶 F127)		31.7 ± 5.9
SEQ ID No. 2	200	16.5 ± 4.8
+	+	
SEQ ID No. 5	200	

表 2

	大鼠血管形成模型	
	浓度 (μg)	增殖百分比
对照		46.71 ± 4.35
安慰剂 (pluronic 凝胶 F127)		45.20 ± 3.99
SEQ ID No. 2	200	28.63 ± 4.51
SEQ ID No. 2 (有意义)	200	26.92 ± 3.40
SEQ ID No. 5	200	34.99 ± 3.06
SEQ ID No. 5 (有意义)	200	38.37 ± 2.54

依据惯例，在所有叙述中的“SEQ ID (有意义)”表述是寡核苷酸序列 SEQ ID 的互补寡核苷酸序列。

实施例 5

(a) 法呢基转移酶之有意义和反义寡核苷酸对 C6 大鼠神经胶质瘤细胞的体外作用

接种细胞，密度为 5000 细胞/平皿，并用以 5% 马血清和 2.5% 胎牛血清补充的培养基进行培养。24 小时后，改用无血清并加 Lipofectin 和 5 μ M 浓度的不同寡核苷酸的培养基进行转染。培养 5 小时后，用含 15% 马血清及 2.5% 胎牛血清的正常培养基替代原培养基。然后在 37℃ 下继续培养 72 小时。在单层胰酶消化后，利用 ZM 型 Coulter 计数器进行细胞计数来评估细胞增殖。

	第 1 天	第 3 天
对照	267 000 $\pm$ 9 900	2 080 000 $\pm$ 28 700
SEQ ID No. 5	138 000 $\pm$ 4 500	1 090 000 $\pm$ 10 400
SEQ ID No. 5 (有意义)	288 500 $\pm$ 43 700	2 040 000 $\pm$ 25 200
SEQ ID No. 2	220 000 $\pm$ 12 600	1 990 000 $\pm$ 17 500
SEQ ID No. 2 (有意义)	157 300 $\pm$ 11 400	1 150 000 $\pm$ 57 500

(b) 法呢基转移酶 α -亚基之反义寡核苷酸的时间过程作用

如上处理细胞，在第 3、第 7 和第 14 天对对照和寡核苷酸处理平皿中的平行样品进行细胞计数。在所有 3 天实验中 p 值均小于

0.05%。

天	对照 (细胞数)	SEQ ID No. 5 (5 μ M) (细胞数)
0	5 000	5 000
3	950 000	350 000
7	2 100 000	600 000
14	3 750 000	1 350 000

实施例 6

对大鼠恶性胶质瘤的抗增殖研究

(a) 反义寡核苷酸对 C6 神经胶质瘤细胞肿瘤发生的体外作用

同上所述处理细胞。用法呢基转移酶寡核苷酸 α -亚基 (5 μ M) 转染 24 小时后, 将未处理和处理过的细胞脑内接种于雄性 Sprague—Dawley 大鼠 (7—8 周龄, 重约 180—200g)。按 1.5mg/kg (体重) 腹膜内注射赛拉嗪使动物麻醉, 10 分钟后按 5mg/公斤 (体重) 腹膜内注射克他命。利用 10 μ l Hamilton Microsyringe 将经胰酶消化而预先收获的在 3 μ l 磷酸盐缓冲盐水中的 1.5×10^5 个细胞立体定向性注射到左侧脉管神经节中 (距中线 3mm, 深度为 5mm) 以前我们观察到在移植肿瘤数日后处死的大鼠中其平均存活率为 24 天。对得自所有动物的脑的组织学分析证明了肿瘤移植成功率为 100%。在处死所有大鼠前 2 小时给其注射 40mg BrdU。砍头处死大鼠。收取所有鼠脑, 浸入 70% 的乙醇中在 4 $^{\circ}$ C 下固定 2 天。通过对脑两半球的双参数 DNA (Brd U) 细胞荧光测定分析来确定肿瘤的增殖。

	BrdU 标记指标
对照	4.7 ± 1.9
SEQ ID No. 2 (5 μ M)	2.3 ± 0.7
SEQ ID No. 5 (1 μ M)	2.4 ± 0.5

(b) 寡核苷酸对 C6 神经胶质瘤细胞体内肿瘤发生的体内作用

从培养 48 小时的细胞培养皿中收获未处理的 C6 神经胶质瘤细胞，如上所述立体定向性注射到鼠脑的左半球中。之后，迅速在背囊上放置 Alzet 泵，该泵含有载体或反义和有意义寡核苷酸，其量足够每天释放 5 μ M 浓度的寡核苷酸。通过直径为 0.5mm 的管线，在细胞注射部位释放不同的药剂。利用 post-hoc Duncan 试验进行所有统计分析。

	BrdU 标记指标
对照	8.02 ± 0.24
SEQ ID No. 5 (有意义)	6.82 ± 0.26
SEQ ID No. 5	4.94 ± 0.3

序列目录

(2) SEQ ID NO. 1 信息

(i) 序列属性

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 1

AGAAGCCATGAT

(2) SEQ ID NO. 2 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 2

GGACGTGACT GT

(2) SEQ ID NO. 3 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

- (C) 链况：单链
- (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 3

AAGGAGTAGC AG

(2) SEQ ID NO. 4 信息

- (i) 序列属性：
 - (A) 长度：12 碱基对
 - (B) 类型：核苷酸
 - (C) 链况：单链
 - (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 4

CAGGCAGTAG CA

(2) SEQ ID NO. 5 信息

- (i) 序列属性：
 - (A) 长度：12 碱基对
 - (B) 类型：核苷酸
 - (C) 链况：单链
 - (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 5

CCCGTCGTCCAT

(2) SEQ ID NO. 6 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 6

CTGTCCCTGTAC

(2) SEQ ID NO. 7 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 7

ACTTCTCTCTCC

(2) SEQ ID NO. 8 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 8

ACTTGGTCCT AA

(2) SEQ ID NO. 9 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 9

GCCATCATTC TG

(2) SEQ ID NO. 10 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 1

GATCTGGACC AC

(2) SEQ ID NO. 11 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 11

CTCAATAGCA TC

(2) SEQ ID NO. 12 信息

(i) 序列属性

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 12

GTTTTTGGGC TG

(2) SEQ ID NO. 13 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 13

TCTCACATCC TC

(2) SEQ ID NO. 14 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 14

TTGTAAGAAC TG

(2) SEQ ID NO. 15 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 15

GAAGTGCTTC TC

(2) SEQ ID NO. 16 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 16

GCCTCTTTTC AG

(2) SEQ ID NO. 17 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 17

GGCATCTGTG AG

(2) SEQ ID NO. 18 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 18

CGGCTGGCAT CC

(2) SEQ ID NO. 19 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

- (C) 链况：单链
- (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 19

GAACTGACAC AC

(2) SEQ ID NO. 20 信息

- (i) 序列属性：
 - (A) 长度：12 碱基对
 - (B) 类型：核苷酸
 - (C) 链况：单链
 - (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 20

ACGATC ACATCA

(2) SEQ ID NO. 21 信息

- (i) 序列属性：
 - (A) 长度：12 碱基对
 - (B) 类型：核苷酸
 - (C) 链况：单链
 - (D) 拓扑学：线性
- (iv) 反义：是
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO. 21

ATCAACATGC AG

(2) SEQ ID NO. 22 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 22

CTGCATATCG AC

(2) SEQ ID NO. 23 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 23

CAGTGCACCAGC

(2) SEQ ID NO. 24 信序

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 24

CTGCAGCCTC GG

(2) SEQ ID NO. 25 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 25

ACTCTCTGGA CC

(2) SEQ ID NO. 26 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 26

CAAGAATCCTCG

(2) SEQ ID NO. 27 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 12 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 27

ACATCTGCTCTG

(2) SEQ ID NO. 28 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 28

TCTGTACTCGTC

(2) SEQ ID NO. 29 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：12 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 29

CTACAGTACA GC

(2) SEQ ID NO. 30 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 15 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 30

CCCGTCGTCC ATAGG

(2) SEQ ID NO. 31 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 18 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 31

CCCGTCGTCC ATAGGGGA

(2) SEQ ID NO. 32 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 21 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 32

CCCGTCGTCC ATAGGGGACGC

(2) SEQ ID NO. 33 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 15 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 33

GGACGTGACT GTTTC

(2) SEQ ID NO. 34 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 18 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(iv) 反义: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO. 34

GGACGTGACT GTTTCCAC

(2) SEQ ID NO. 35 信息

(i) 序列属性:

(A) 长度: 21 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 35

GGA CGTGACT GTTCCACTGA

(2) SEQ ID NO. 36 信息

(i) 序列属性：

(A) 长度：24 碱基对

(B) 类型：核苷酸

(C) 链况：单链

(D) 拓扑学：线性

(iv) 反义：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 36

GGACGTGACT GTTCCACTG AGTC