



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102575252 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201080034204. 7

(22) 申请日 2010. 06. 01

(30) 优先权数据

61/183, 011 2009. 06. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/036962 2010. 06. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/141511 EN 2010. 12. 09

(73) 专利权人 光环生物干扰疗法公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 托德·M·郝瑟尔

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004061081 A2, 2004. 07. 22,

WO 2004104199 A2, 2004. 12. 02,

WO 2006074108 A2, 2006. 07. 13,

WO 2007016507 A2, 2007. 02. 08,

审查员 李煦颖

权利要求书2页 说明书47页

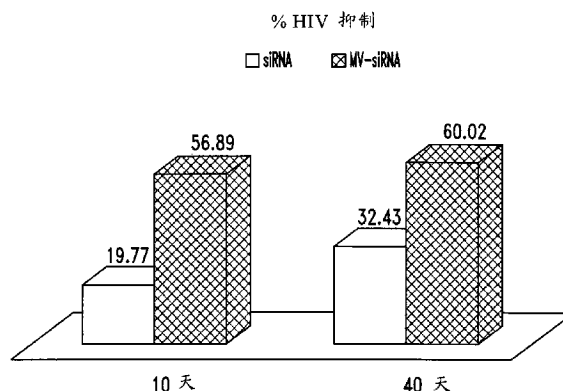
序列表62页 附图21页

(54) 发明名称

用于多价 RNA 干扰的多核苷酸、组合物及其
使用方法

(57) 摘要

本发明包括具有两个或多个靶特异性区的二价或多价核酸分子或核酸分子复合物, 其中所述靶特异性区与单靶基因在多于一个不同的核苷酸位点互补, 和 / 或其中所述靶区与多于一个靶基因或靶序列互补。还包括的是包含这样的核酸分子的组合物, 以及将所述组合物用于多价 RNA 干扰和治疗各种疾病和感染的方法。



1. 由以下组成的多核苷酸复合物：

(a) 第一多核苷酸，其由与第一靶序列互补的靶特异性区、第一 5' 区和第一 3' 区组成，其中所述 5' 区、3' 区或两者任选地与第一靶序列具有全部或部分的互补性；

(b) 第二多核苷酸，其由与第二靶序列互补的靶特异性区、第二 5' 区和第二 3' 区组成，其中所述 5' 区、3' 区或两者任选地与第二靶序列具有全部或部分的互补性；以及

(c) 第三多核苷酸，其由与第三靶序列互补的靶特异性区、第三 5' 区和第三 3' 区组成，其中所述 5' 区、3' 区或两者任选地与第三靶序列具有全部或部分的互补性；

其中所述第一、第二和第三靶特异性区与不同的靶序列互补，

其中所述第一多核苷酸的第一 5' 区与所述第三多核苷酸的第三 3' 区互补，

其中所述第一多核苷酸的第一 3' 区与所述第二多核苷酸的第二 5' 区互补，以及

其中所述第二多核苷酸的第二 3' 区与所述第三多核苷酸的第三 5' 区互补，

其中所述三个分开的多核苷酸通过它们互补的 3' 区和 5' 区杂交以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的多核苷酸复合物；并且

其中所述多核苷酸复合物不含任何非靶定链。

2. 由以下组成的多核苷酸复合物：

(a) 第一核苷酸序列，其由与第一靶序列互补的靶特异性区、第一 5' 区和第一 3' 区组成，其中所述第一 5' 区、第一 3' 区或两者任选地与第一靶序列具有全部或部分的互补性；

(b) 第二核苷酸序列，其由与第二靶序列互补的靶特异性区、第二 5' 区和第二 3' 区组成，其中所述第二 5' 区、第二 3' 区或两者任选地与第二靶序列具有全部或部分的互补性；以及

(c) 第三核苷酸序列，其由无效区、第三 5' 区和第三 3' 区组成；

其中所述第一和第二靶特异性区与不同的靶序列互补，

其中所述第一核苷酸序列的第一 5' 区与所述第三核苷酸序列的第三 3' 区互补，

其中所述第一核苷酸序列的第一 3' 区与所述第二核苷酸序列的第二 5' 区互补，以及

其中所述第二核苷酸序列的第二 3' 区与所述第三核苷酸序列的第三 5' 区互补，

其中所述 5' 区各自与它们互补的 3' 区杂交以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的自身杂交多核苷酸分子；并且

其中所述多核苷酸复合物不含任何非靶定链。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述第一、第二和 / 或第三多核苷酸由 15-30 个核苷酸组成。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述第一、第二和 / 或第三多核苷酸由 17-25 个核苷酸组成。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述一个或多个自身互补区由 5-10 个核苷酸对组成。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述一个或多个自身互补区由 7-8 个核苷酸对组成。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述第三多核苷酸由与第三靶序列互补的靶特异性区组成。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物，其中所述靶特异性区各自与不同的靶序

列互补。

9. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述靶序列中的每个存在于相同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述靶序列存在于不同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述自身互补区包含 3' 突出。

12. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述第一、第二或第三核苷酸序列由 15-60 个核苷酸组成。

13. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述靶特异性区各自包含约 15-30 个核苷酸。

14. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述一个或多个自身互补区包含约 10-54 个核苷酸。

15. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述一个或多个自身互补区包含 3' 突出。

16. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述一个或多个自身互补区形成茎-环结构。

17. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述一个或多个自身互补区包含位于所述靶特异性区之外的二核苷酸 AG/UU 近端盒。

18. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中所述一个或多个自身互补区包含位于所述靶特异性区之外的四核苷酸远端盒,其中所述远端盒的第三个核苷酸不是 G。

19. 编码权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物的载体。

20. 减少基因表达的体外方法,所述方法包括将权利要求 1 至 18 中任一项所述的多核苷酸复合物或权利要求 19 所述的载体引入细胞。

21. 权利要求 1 至 18 中任一项所述的多核苷酸复合物或权利要求 19 所述的载体在制备用于减少基因表达的药物中的用途。

22. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中靶特异性区中的每个与 HIV 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

23. 如权利要求 19 所述的载体,其中靶特异性区中的每个与 HIV 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

24. 如权利要求 21 所述的用途,其中靶特异性区中的每个与 HIV 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

25. 如权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸复合物,其中靶特异性区中的每个与人载脂蛋白 B(ApoB) 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

26. 如权利要求 19 所述的载体,其中靶特异性区中的每个与人载脂蛋白 B(ApoB) 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

27. 如权利要求 21 所述的用途,其中靶特异性区中的每个与人载脂蛋白 B(ApoB) 基因的 mRNA 转录本的不同靶区互补。

用于多价 RNA 干扰的多核苷酸、组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据 35U. S. C. § 119(e), 本申请要求受益于 2009 年 6 月 1 日提交的美国临时专利申请第 61/183, 011 号, 通过引用将其整体并入。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本形式替代纸件副本提供, 据此通过引用并入说明书中。包含序列表的文本文件的名称是 270038_405PC_SEQUENCE_LISTING. txt。文本文件为 106KB, 于 2010 年 6 月 1 日制作, 并且通过 EFS-Web 电子提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明大体上涉及精确构建的多核苷酸分子以及利用所述多核苷酸分子用于多价 RNA 干扰和治疗疾病的方法。

[0007] 相关技术描述

[0008] 基因沉默或抑制基因表达的现象对于治疗和诊断目的及对于研究基因功能本身来说具有重要的保证。该现象的实例包括反义技术和 dsRNA 形成的转录后基因沉默 (PTGS), 其以 RNA 干扰 (RNAi) 的形式变得普遍。

[0009] 用于基因沉默的反义策略近年来备受关注。基本概念简单, 但原理上有效: 反义核酸 (NA) 碱基与靶 RNA 配对导致所靶定的 RNA 失活。由反义 RNA 或 DNA 识别靶 RNA 可以被认为是杂交反应。由于靶是通过序列互补性结合的, 这意味着反义 NA 的合适选择应当保证高特异性。所靶定 RNA 的失活可以通过不同途径发生, 取决于反义 NA (已修饰或未修饰的 DNA 或 RNA, 或其杂化物) 的性质和发生抑制的生物系统的特性。

[0010] 基于 RNAi 的基因阻抑是广泛认可的方法, 其中正义和反义 RNA 形成双链 RNA (dsRNA), 如作为长 RNA 双链 (19-24 个核苷酸双链), 或作为短发卡 dsRNA 双链 (shRNA), 其通过包括酶和 / 或蛋白复合物机制与基因调控有关。长 RNA 双链和 shRNA 双链是通过描述为 Dicer 的内切核糖核酸酶加工成小干扰 RNA (siRNA) 的前体。所加工的 siRNA 或直接引入的 siRNA 被认为连接蛋白复合物 RISC 用于导向由 RISC/siRNA 复合物剪切的互补基因。

[0011] 然而, 有效的反义和 RNAi 技术发展中持续存在许多问题。例如, DNA 反义寡聚核苷酸显示仅短期有效并且通常所需剂量是有毒的; 同样地, 反义 RNA 的使用由于稳定性问题也被证明无效。此外, 已证明在 RNAi 中使用的 siRNA 由于任一链导向剪切潜在包括于内源性调节途径的复合物而导致重要的脱靶阻抑。已尝试使用各种方法通过降低核酸酶的敏感性和利用对 siRNA 的化学修饰来提高反义稳定性。这些包括修饰正常的磷酸二酯骨架, 如利用硫代磷酸酯或甲基磷酸酯, 掺入 2'-OMe- 核苷酸, 利用肽核酸 (PNA), 以及利用 3' 端加帽, 如 3'-氨丙基修饰或 3'-3' 端键。然而, 这些方法可能是昂贵的并且需要额外的步骤。此外, 非天然存在的核苷酸的使用和修饰排除了体内表达反义或 siRNA 序列的能力, 从而需要合成它们并随后给予。另外, siRNA 双链对单基因显示主要效力而对第二基因脱靶。该无意的作用是负面的并且不是可靠的 RNAi 多价。

[0012] 因此, 仍然还存在需要用于靶定、定向抑制体外和体内, 特别是高等脊椎动物细胞内的基因功能的有效和持续的方法和组合物, 包括能够多价基因抑制的单分子复合物。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明提供新的组合物和方法, 其包括精确构建的寡聚核苷酸, 当核苷酸靶位点序列各自互不相同, 所述寡聚核苷酸在同时特异性调节一个或多个基因的基因表达中是有用的。

[0015] 在某些实施方案中, 本发明包括分离的精确构建的三链多核苷酸复合物, 其包含具有与靶基因或序列在多个位点互补的序列区或与多个基因在单个位点互补的序列区。

[0016] 在某些实施方案中, 本发明包括分离的精确构建的多核苷酸, 其包含具有与靶基因或序列在多个位点互补的序列区或与多个基因在单个位点互补的序列区; 各自具有部分自身互补区。在具体实施方案中, 所述寡聚核苷酸包含两个或多个自身互补区。在某些实施方案中, 本发明的多核苷酸包含 RNA、DNA 或肽核酸。

[0017] 某些实施方案涉及至少三个分开的多核苷酸的多核苷酸复合物, 所述多核苷酸复合物包含 (a) 第一多核苷酸, 其包含与第一靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区; (b) 第二多核苷酸, 其包含与第二靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区; 以及 (c) 第三多核苷酸, 其包含无效区或与第三靶特异性互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区, 其中所述第一、第二和第三多核苷酸的靶特异性区各自与不同的靶序列互补, 其中所述第一多核苷酸的 5' 区与第三多核苷酸的 3' 区互补, 其中所述第一多核苷酸的 3' 区与所述第二多核苷酸的 5' 区互补, 以及其中所述第二多核苷酸的 3' 区与所述第三多核苷酸的 5' 区互补, 并且其中所述三个分开的多核苷酸通过它们互补的 3' 区和 5' 区杂交以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的多核苷酸复合物。

[0018] 在某些实施方案中, 所述第一、第二和 / 或第三多核苷酸包含约 15-30 个核苷酸。在某些实施方案中, 所述第一、第二和 / 或第三多核苷酸包含约 17-25 个核苷酸。在某些实施方案中, 一个或多个所述自身互补区包含约 5-10 个核苷酸对。在某些实施方案中, 一个或多个所述自身互补区包含约 7-8 个核苷酸对。

[0019] 在某些实施方案中, 所述第一、第二和第三靶序列中的每个存在于相同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。在某些实施方案中, 所述第一、第二和第三靶序列中的至少两个存在于不同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。

[0020] 在某些实施方案中, 各多核苷酸的 5' 区和 / 或 3' 区全部或部分还与该多核苷酸的靶序列互补。在某些实施方案中, 一个或多个自身互补区包含 3' 突出。

[0021] 某些实施方案涉及自身杂交多核苷酸分子, 所述自身杂交多核苷酸分子包括: (a) 第一核苷酸序列, 其包含与第一靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区, (b) 第二核苷酸序列, 其包含与第二靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区, 以及 (c) 第三核苷酸序列, 其包含无效区或与第三靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区, 其中所述各第一、第二和第三核苷酸序列的靶特异性区与不同的靶序列互补, 其中所述第一核苷酸序列的 5' 区与所述第三核苷酸序列的 3' 区互补, 其中所述第一核苷酸序列的 3' 区与所述第二核苷酸序列的 5' 区互补, 以及其中所述第二核苷酸序列的 3' 区与所述第三核苷酸序列的 5' 区互补, 并且其中所述 5' 区各自与它们互补的 3' 区杂交以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的自身杂交多核苷酸分子。

[0022] 在某些实施方案中,所述第一、第二或第三多核苷酸序列包含约 15-60 个核苷酸。在某些实施方案中,所述靶特异性区包含约 15-30 个核苷酸。在某些实施方案中,一个或多个所述自身互补区包含约 10-54 个核苷酸。在某些实施方案中,一个或多个所述自身互补区包含 3' 突出。在某些实施方案中,一个或多个所述自身互补区形成茎-环结构。在某些实施方案中,一个或多个所述自身互补区包含在靶特异性区之外的二核苷酸 AG/UU 近端盒。在某些实施方案中,一个或多个所述自身互补区包含在靶特异性区之外的四核苷酸远端盒,其中所述远端盒的第三个核苷酸不是 G。还包括的是编码自身杂交多核苷酸分子的载体,如本文所述。

[0023] 在某些实施方案中,所述第一、第二和第三靶序列中的每个存在于相同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。在某些实施方案中,所述第一、第二和第三靶序列中的至少两个存在于不同的基因、cDNA、mRNA 或 microRNA 中。

[0024] 在某些实施方案中,自身互补区包含由双环、四环或更大的环组成的茎-环结构。在某些实施方案中,所述序列与包含至少 17 个核苷酸或 17 至 30 个核苷酸(包括其中所有整数)的靶基因序列互补。

[0025] 在某些实施方案中,所述自身互补区(或双链区)包含至少 5 个核苷酸、至少 6 个核苷酸、至少 24 个核苷酸、或者 12 至 54 或 60 个核苷酸(包括其中所有整数)。

[0026] 在某些实施方案中,茎-环结构的环区包含至少 1 个核苷酸。在某些实施方案中,所述环区包含至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个或至少 8 个核苷酸。

[0027] 在进一步的实施方案中,茎-环结构的环区由特定的四环序列 NGNN 或 AAGU 或 UUUU 或 UUGA 或 GUUA 组成,其中这些序列是 5' 至 3'。

[0028] 在进一步的实施方案中,本发明包括能够表达本发明的多核苷酸的表达载体。在不同的实施方案中,所述表达载体是组成型或诱导型载体。

[0029] 本发明进一步包括包含生理上可接受的载体和本发明的多核苷酸的组合物。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明提供用于减少基因表达的方法,所述方法包括将本发明的多核苷酸复合物或分子引入细胞。在不同的实施方案中,所述细胞是植物、动物、原生动物、病毒、细胞或真菌。在一个实施方案中,所述细胞是哺乳动物。

[0031] 在一些实施方案中,将所述多核苷酸复合物或分子直接引入所述细胞,而在另一个实施方案中,将所述多核苷酸复合物或分子通过足以递送分离的多核苷酸的方法细胞外引入所述细胞。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明包括治疗疾病的方法,所述方法包括将本发明的多核苷酸复合物或分子引入细胞,其中所靶定基因的过表达与疾病相关。在一个实施方案中,所述疾病是癌症。

[0033] 本发明进一步提供在患者中治疗感染的方法,所述方法包括向患者引入本发明的多核苷酸复合物或分子,其中所述分离的多核苷酸介导感染因子的进入、复制、整合、传播或维持。

[0034] 在又一个相关的实施方案中,本发明提供用于鉴别基因功能的方法,所述方法包括向细胞引入本发明的多核苷酸复合物或分子,其中所述多核苷酸复合物或分子抑制所述基因的表达,以及测定所述多核苷酸复合物或分子的引入对所述细胞特性的影响,从而确

定所靶定基因的功能。在一个实施方案中,所述方法利用高通量筛选进行。

[0035] 在进一步的实施方案中,本发明提供设计包含用于调节靶基因表达的两个或多个自身互补区的多核苷酸序列的方法,所述方法包括:(a) 选择长度为 17 至 25 个核苷酸并且与靶基因或多靶基因互补的第一 3 个引导序列;(b) 选择长度为 4 至 54 个核苷酸的一个或多个另外的序列,其包含自身互补区并且与所述第一序列不完全互补;以及任选地,(c) 定义(b)中的序列基序互补、不互补,或者复制与步骤(a)中所选择的序列不互补的基因序列。

[0036] 在另一个实施方案中,所述突变的基因是由编码突变体 p53 多肽的基因表达的基因。在另一个实施方案中,所述基因是病毒,并且可以包括一个或多个不同的病毒基因。在具体实施方案中,所述基因是 HIV 基因,如 gag、pol、env 或 tat 等等本文所述和本领域内已知的基因。在另一个实施方案中,所述基因是 ApoB。

[0037] 附图简要说明

[0038] 图 1 至图 6 示出本发明的示例性多核苷酸结构。

[0039] 图 1 给出三个分开的多核苷酸分子的多核苷酸复合物。(A) 显示包含与靶基因上的位点互补的序列区(阴影线);(B) 显示包含与靶基因上的第二位点或不同基因上的位点互补的序列区(交叉-阴影线);(C) 显示与靶基因上的第三位点或不同基因上的位点互补的序列区(填充为黑色)。数字 1、2 和 3 指示导向基因沉默的各寡聚核苷酸的 3' 端;(A) 负荷于方向 1,(B) 方向 2 及 (C) 方向 3。各分子的 3' 区和 5' 区相互杂交以形成它们各自的自身互补区或双链区,由连接条指示。各多核苷酸包含两个核苷酸 3' 突出。

[0040] 图 2 给出本发明具有三个单链区和三个自身互补区的单一自身杂交的多核苷酸,其是用于加工成核心分子的前体。靶特异性区加黑。(D) 显示用四核苷酸的四环加帽的自身互补茎-环区(填充为白色);(D) 还显示在茎-环结构之内具有 14/16 个核苷酸剪切位点的茎-环区;剪切可以通过 RNase III 发生以去除茎环核苷酸(显示为白色);(E) 显示远端盒,其中由 5' 至 3' 确定的第三个核苷酸不为 G,因为认为 G 的存在会阻断去除茎-环区所必需的 RNase III 剪切;(F) 显示二核苷酸 AG/UU 近端盒,其为 RNase III 识别和结合 RNase III 的体内决定因素(Nichols 2000);(G) 显示四环。图 2 中给出的多核苷酸分子是加长的转录本 RNA,在细胞内由 RNase III “预加工”。所得 RNA 结构与图 1 中描述的结构相同。

[0041] 图 3 描述具有四环形式的自身-形成的单链寡聚核苷酸。(H) 显示四环;(I) 显示当前导链掺入 2 个核苷酸突出时连接两个核心链的三环。在该结构中,将四环用于模拟图 1 给出结构中的突出的 3' 羟基/5' 磷酸酯会怎样并且比图 2 给出的结构更直接起作用。正如实施例 2 所证实,该短的四环形式直接导向沉默而无预加工。认为 GUUA 环扭曲环内的核苷酸并暴露氢原子(参见如,Nucleic Acids Research,2003,Vol. 31, No. 3, Fig. 6, page 1094)。该结构与 PAZ 或 RISC 相容。

[0042] 图 4 描述了用于二价应用的自身-形成的单链寡聚核苷酸。(J) 显示连接两个核心链的更大的环;(K) 显示作为竞争复合物形成的关键链,但是对靶基因“无效”,即对靶基因非特异。两个靶特异性区有阴影线。该结构是与 RNA 转录本合作时用于“二价”应用的组合物。由于化学修饰是不可能的,所述结构决定了负荷和沉默活性不均匀。分子的初始 19 个核苷酸是 PRIMARY 链,(K) 显示失活的 KEY 链,以及 SECONDARY 链是分子的最后 21 个

核苷酸。首要优先负荷至 RISC 并且起作用的是 SECONDARY 链通过暴露 5' / 3' 端。其次优先 PRIMARY 链,其在细胞中 RNase III 预加工之后暴露。无效的 KEY 链的 3' 端不起作用,因为大的环既未加工也不与负荷至 RISC 自身相容。

[0043] 图 5 描述了本发明多核苷酸复合物具有修饰的 RNA 碱基。(L)、(M) 和 (N) 示出 Tm 可以通过使用修饰的 RNA (如 2' -O- 甲基 RNA 或 2' - 氟 RNA 取代 2' -OH RNA) 逐步增加的区 (由虚线限定),以优选端 1、2 或 3 的退火和 / 或沉默顺序。

[0044] 图 6 描述了本发明寡聚核苷酸复合物的两个实施方案。(O) 示出该链沉默功能失活的平端 DNA 链;和 (P) 示出可以利用用于偶联递送化学物质、配体、抗体或其他净荷或靶分子的端。

[0045] 图 7 给出与标准 shRNA 分子相比,由本发明的多价 -siRNA 分子阻抑 GFP 表达的结果 (参见实施例 1)。图 7A 给出相对 shRNA 对照 (设置为 100%),由 MV 克隆 long 1 (108%) 和 MV 克隆 long 11 (119%) 增强阻抑 GFP。图 7B 给出相对 shRNA 对照 (设置为 100%),由合成的 MV-siRNA GFP 1 (127%) 增强阻抑 GFP 表达,当合成的 MV-siRNA 复合物的一条链由 DNA 链 (MF-siRNA GFP I DNA (116%)) 置换时其轻微降低。

[0046] 图 8 给出用于 GFP 编码序列 (SEQ ID NO :8) 的示例性靶定区 (下划线)。

[0047] 图 8A 给出由实施例 1 中的表 1 和表 2 的 MV-siRNA 分子靶定的区。图 8B 和图 8C 给出另外的示例性靶定区。

[0048] 图 9 给出 MV-siRNA 分子对 HIV 复制的抑制作用,其中靶定 gag 和 tat 的二价 MV-siRNA 对 HIV 复制的抑制作用比仅靶定 gag 的 siRNA 显著更强。二价 MV-siRNA 显示 10 天时 56.89% 的抑制,40 天时 60.02% 的抑制,相比单独靶定 gag 的 siRNA,其显示 10 天时 19.77% 的抑制,40 天时 32.43% 的抑制。

[0049] 图 10 给出示例性 HIV 基因组核苷酸序列 (SEQ ID NO :9),其可以根据本发明的 MV-siRNA 分子被靶定。该序列从图 10A 延伸至图 10D。

[0050] 图 11 给出 env 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :4),源自图 10 的 HIV 基因组序列。

[0051] 图 12 提供另外的 HIV 序列。图 12A 给出 gag 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :2),图 12B 给出 tat 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3),二者都源自图 10 的 HIV 基因组序列。

[0052] 图 13 给出鼠科动物载脂蛋白 B (ApoB) 的编码序列 (SEQ ID NO :10),其可以使用本文提供的某些 MV-siRNA 靶定。该序列从图 13A 延伸至图 13E。

[0053] 图 14 给出人载脂蛋白 B (apoB) 的 mRNA 序列 (SEQ ID NO :1),其可以使用本文提供的某些 MV-siRNA 靶定。该序列从图 14A 延伸至图 14E。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明提供用于在多靶位点抑制基因表达或用于在一个或多个靶位点抑制多个基因表达的新的组合物和方法,其中所述位点在真核细胞体内和体外并非相等的核苷酸序列。特别地,本发明提供多核苷酸复合物和多核苷酸分子,其包含具有与一个或多个靶基因区互补的序列的两个、三个或多个区,其能够靶定并减少靶基因表达。在不同的实施方案中,本发明的组合物和方法可以用于通过靶定靶基因内或它表达的 RNA 的多位点而抑制单靶基因的表达。可选择地,它们可以用于通过靶定两个或多个不同的基因内或它们表达的 RNA 的位点而靶定两个或多个不同的基因。

[0056] 本发明提供优于传统 siRNA 分子的重要优势。首先,与仅靶定靶基因内一个区的

RNAi 因子相比,当本发明的多核苷酸复合物或分子靶定单靶基因内的两个或多个区时,它们能够实现更强的抑制来自靶基因的基因表达。此外,利用单一多核苷酸复合物或分子,本发明靶定两个或多个不同靶基因的多核苷酸复合物或分子可以用于抑制与疾病或障碍相关的多靶基因的表达。此外,本发明的多核苷酸复合物和分子无需存在于常规双链 RNAi 因子中的另外的非靶定链,因此它们没有由非靶定链引起的脱靶效应。因此,本发明的多核苷酸复合物和分子提供令人惊奇的优于现有技术的多核苷酸抑制物(包括反义 RNA 和 RNA 干扰分子)的优势,包括针对一个或多个靶基因的增加的潜力和增强的效力。

[0057] 本发明还基于利用与靶基因的一个、两个或三个不同核酸序列互补的仅一条、两条或三条引导链,识别导向用于剪切的蛋白复合物的多核苷酸结构。虽然利用许多相同的内源性机制,该多价功能致使比 dsRNA 显著更广泛和有力的抑制靶基因或靶基因组。

[0058] 本发明的某些实施方案还基于识别由 3' 突出和 5' 磷酸酯表示方向的多核苷酸结构致使不含正义链的复合物,有助于比基于 dsRNA 的 siRNA 更强的特异性。

[0059] 鉴于它们的有效性,可以将本发明的组合物递送至细胞或受体,具有由与靶基因或多靶基因互补的单引导链特异性预测的伴随保证。

[0060] 多价 siRNA

[0061] 本发明包括包含与一个或多个靶基因区互补的两个或多个靶定区的多核苷酸复合物和分子。本发明的多核苷酸复合物和分子可以被称为多价 siRNA (mv-siRNA),因为它们包含与一个或多个靶基因区互补的至少两个靶定区。因此,通过靶定单靶基因内的两个或多个区,或者通过靶定两个或多个靶基因内的一个或多个区,本发明的组合物和方法可以用于抑制或减少一个或多个靶基因的表达。

[0062] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸复合物包含三个或多个分开的寡聚核苷酸,各自具有 5' 端和 3' 端,具有包含靶定区的两个或多个寡聚核苷酸,如本文所述寡聚核苷酸相互杂交以形成复合物。各链在本文被称为“引导链”。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸分子是包含三条或多条引导链的单一多核苷酸,具有包含靶定区的两条或多条引导链,其中多核苷酸通过自身互补区自身杂交以形成本文所述的结构。然后可以例如细胞内加工所得到的结构,以去除连接各条引导链的环结构。可以存在于不同的寡聚核苷酸中或单一多核苷酸内的各引导链包含与其他引导链互补的区。

[0063] 在某些实施方案中,本发明提供多核苷酸复合物和分子,其包含至少三条引导链,其中至少两条包含与一个或多个靶基因内的不同序列互补的区。在不同的实施方案中,本发明的多核苷酸复合物包含各自包含一条或多条引导链的两个、三个或多个分开的多核苷酸,其可以相互杂交以形成复合物。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸分子包含单一多核苷酸,其在单一多核苷酸的不同区内包含三条或多条引导链。

[0064] 本发明的某些实施方案涉及具有至少三条引导链的多核苷酸复合物或分子,其中两条或多条与一个或多个靶基因部分或全部互补;并且在相互互补(即与另一条引导链的区互补)的任一端处各自具有约 4 至约 12 个,约 5 至约 10 个,或优选约 7 至约 8 个核苷酸,允许形成多核苷酸复合物(参见如图 1)。例如,引导链的各端可以包含与多核苷酸复合物或分子的另一条引导链的一端处的核苷酸互补的核苷酸。某些实施方案可以包括包含 4、5、6 或更多个(条)独立的多核苷酸分子或引导链的多核苷酸复合物。

[0065] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸复合物包含至少三个分开的多核苷酸,其

包括：(1) 第一多核苷酸，其包含与第一靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区；(2) 第二多核苷酸，其包含与第二靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区；以及 (3) 第三多核苷酸，其包含无效区或与第三靶特异性互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区，其中所述第一、第二和第三多核苷酸的靶特异性区各自与不同的靶序列互补，其中所述第一多核苷酸的 5' 区与所述第三多核苷酸的 3' 区互补，其中所述第一多核苷酸的 3' 区与所述第二多核苷酸的 5' 区互补，以及其中所述第二多核苷酸的 3' 区与所述第三多核苷酸的 5' 区互补，并且其中所述三个分开的多核苷酸通过它们互补的 3' 和 5' 区杂交，以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的多核苷酸复合物。

[0066] 如以上所述，在具体实施方案中，本发明的多核苷酸复合物包含至少三个分开的寡聚核苷酸，各自具有 5' 端和 3' 端。如图 1 所示，第一寡聚核苷酸的 5' 端处的区与第三寡聚核苷酸的 3' 端处的区退火；第三寡聚核苷酸的 5' 端处的区与第二寡聚核苷酸的 3' 端处的区退火；以及第二寡聚核苷酸的 5' 端处的区与第一寡聚核苷酸的 3' 端处的区退火。如果复合物中存在另外的寡聚核苷酸，那么它们以相似的方式与复合物的其他寡聚核苷酸退火。寡聚核苷酸末端处相互退火的区可以包括 5' 端和 / 或 3' 端处的终端核苷酸。杂交的 3' 端和 5' 端的区都包括寡聚核苷酸的终端核苷酸，所得到的双链区是平端。在具体实施方案中，3' 端处退火的区不包括终端和 / 或倒数第二个核苷酸，得到的双链区具有一个或两个核苷酸 3' 突出。

[0067] 在某些实施方案中，所述引导链存在于单一多核苷酸分子中，并且杂交以形成具有三个单链区和三个自身互补区（或双链区）的单一自身杂交多核苷酸，以及至少两个靶特异性区（参见如图 2）。在相关实施方案中，单分子可以包含至少 3、至少 4、至少 5 或至少 6 条引导链，并且分别形成具有至少 3、至少 4、至少 5 或至少 6 个自身互补区（或双链区）和至少 2、至少 3、至少 4 或至少 5 个靶特异性区的单一自身杂交多核苷酸。在具体实施方案中，该单一自身杂交多核苷酸是前体分子，其可以由细胞加工以去除环区和任选地许多近端双链区，得到活性 mv-siRNA 分子（参见如图 2）。

[0068] 因而，在具体实施方案中，本发明包括自身杂交多核苷酸分子，所述自身杂交多核苷酸分子包含：(1) 第一核苷酸序列，其包含与第一靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区；(2) 第二核苷酸序列，其包含与第二靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区；以及 (3) 第三核苷酸序列，其包含无效区或与第二靶序列互补的靶特异性区、5' 区和 3' 区，其中所述第一、第二和第三核苷酸序列的靶特异性区各自与不同的靶序列互补，其中所述第一核苷酸序列的 5' 区与所述第三核苷酸序列的 3' 区互补，其中所述第一核苷酸序列的 3' 区与所述第二核苷酸序列的 5' 区互补，以及其中所述第二核苷酸序列的 3' 区与所述第三核苷酸序列的 5' 区互补，并且其中所述 5' 区各自与它们互补的 3' 区杂交，以形成具有第一、第二和第三单链区以及第一、第二和第三自身互补区的自身杂交多核苷酸分子。

[0069] 在具体实施方案中，本发明的单一自身杂交多核苷酸可以在多核苷酸与其自身退火时形成的单链环中包含一个或多个可剪切的核苷酸。一旦单一自身杂交多核苷酸与其自身退火，所述可剪切的核苷酸可以被剪切以得到包含三个或多个分开的寡聚核苷酸的多核苷酸复合物。根据本发明可以使用的可剪切的核苷酸的实例包括但不限于，可光剪切的核苷酸，如 pcSpacer (Glen Research Products, Sterling, VA, USA)，或亚磷酸胺核苷酸。

[0070] 如本文所使用，本发明的多核苷酸复合物和分子包括分离的多核苷酸，其包含三

个单链区,其中至少两个与两个或多个靶序列互补,各靶序列位于一个或多个靶基因内,并且包含通过形成双链区如茎-环结构而相互连接单链区的5'端或3'端的至少两个或三个自身互补区。所述多核苷酸在本文中还可以被称为寡聚核苷酸。

[0071] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸复合物和分子包含与靶基因互补的两个或多个序列区。在具体实施方案中,这些区与相同的靶基因或基因互补,而在另一个实施方案中,它们与两个或多个不同的靶基因或基因互补。

[0072] 因此,本发明包括一个或多个自身互补多核苷酸,其包含与一个或多个靶基因或基因互补的一系列序列。在具体实施方案中,这些序列由与靶基因序列不互补或不完全互补和与自身互补区不互补的序列区分开。在另一个实施方案中,所述多核苷酸包含与靶基因或基因互补的多个序列,所述多核苷酸包含在与靶基因互补的一个或多个序列区的5'端、3'端或二者处的自身互补区。在具体实施方案中,多核苷酸包含与一个或多个靶基因互补的两个或多个序列区,具有位于与靶基因互补的各引导链的5'端和3'端处的自身互补区。在某些实施方案中,除了与它们相应的3'或5'区互补之外,这些3'区和5'区全部或部分可以与所述靶序列互补。

[0073] 术语“互补”是指根据标准碱基配对原则全部或部分相互互补的核苷酸序列。术语“部分互补”是指具有小于完全互补但仍具有足够数量的互补核苷酸对来支持生理条件下核苷酸延伸内的结合或杂交的序列。

[0074] 具体实施方案在具体实施方案中,与靶基因(即靶定区)互补的引导链区与靶基因相比可以包含一个或多个核苷酸错配。任选地,引导链中的错配核苷酸可以用解锁核酸(UNA)或亚磷酰胺核酸(如rSpacer,Glen Research,Sterling,VA,USA)置换,以允许错配的核苷酸与靶基因碱基配对,如沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对。

[0075] 如本文所使用,术语“自身互补”或“自身互补区”可以指本发明的多核苷酸分子的区,该区与相同分子的另一个区结合或杂交以形成A-T(U)和G-C杂交对,从而形成双链区;和/或可以指第一核苷酸分子的区,该区与第二或第三核苷酸分子的区结合以形成本发明的多核苷酸复合物(即RNAi多核苷酸复合物),其中所述复合物能够对抗两个或多个靶位点的RNAi干扰活动。相互结合以形成自身互补区的两个区可以是邻近的,或者可以由其他核苷酸分开。此外,正如在RNAi多核苷酸复合物中,两个区可以在分开的核苷酸分子上。

[0076] 在某些实施方案中,“自身互补区”包含与所定义的第二或第三核苷酸序列的“5'区”结合或杂交的所定义的第一核苷酸序列的“3'区”,其中所定义的第二或第三序列在相同分子内,以形成自身杂交多核苷酸分子。在某些实施方案中,“自身互补区”包含与分开的多核苷酸分子的“5'区”结合或杂交的第一多核苷酸分子的“3'区”,以形成多核苷酸复合物。这些3'区和5'区一般定义为与它们各自的靶特异性区相关,在于5'区在靶特异性区的5'端处,而3'区在靶特异性区的3'端处。在某些实施方案中,这些3'区和5'区中的一个或两个不仅与它们相应的3'区或5'区杂交以形成自身互补区,还可以被设计成包含它们各自靶序列的全部或部分互补,从而形成部分靶特异性区。在这些实施方案中,靶特异性区包含单链区和自身互补(即双链)区。

[0077] 在某些实施方案中,这些“自身互补区”包含约5-12个核苷酸对,优选5-10或7-8个核苷酸对,包括它们之间的全部整数。同样地,在某些实施方案中,各3'区或5'区包含约5-12个核苷酸,优选5-10或7-8个核苷酸,包括它们之间的全部整数。

[0078] 术语“不互补”表明在核苷酸的特定延伸中,与靶比对之内没有核苷酸来形成 A-T(U) 或 G-C 杂交。术语“不完全-互补”表明在核苷酸延伸中,与靶比对的至少一个核苷酸对来形成 A-T(U) 或 G-C 杂交,但是互补核苷酸对的数量不足以在生理条件下的核苷酸延伸内支持结合。

[0079] 术语“分离的”是指至少部分不含在物质的自然状态时正常伴随该物质的组分的物质。分离意味着从原始来源或环境一定程度的分开。如本文所使用,分离的,例如与 DNA 相关,是指基本上远离另一编码或非编码序列的多核苷酸,并且 DNA 分子可以包含大部分不相关的编码 DNA,如大的染色体片段或其他功能性基因或多肽编码区。当然,这是指作为原始分离的 DNA 分子,并不排除随后由人工添加到区段的基因或编码区。

[0080] 在各种实施方案中,本发明的多核苷酸复合物或分子包含 RNA、DNA 或肽核酸或这些类型分子的任意或全部组合。此外,多核苷酸可以包含修饰的核酸或核酸衍生物或类似物。核酸修饰的一般实例包括但不限于生物素标记、荧光标记、将伯胺引入多核苷酸的氨基修饰剂、磷酸基团、脱氧尿苷、卤化核苷、硫代磷酸、2'-O-甲基 RNA 类似物、手性 RNA 类似物、摆动 (wobble) 基团、通用碱基和脱氧肌苷。

[0081] 多核苷酸或寡聚核苷酸的“亚单位”是指一个核苷酸(或核苷酸类似物)单位。术语可以涉及具有或不具有附着的亚单位间连接的核苷酸单位,尽管当涉及“带电荷的亚单位”时,电荷一般存在于亚单位间连接内(如磷酸或硫代磷酸酯键或阳离子键)。特定合成的 MV-siRNA 可以利用一个或多个不同类型的亚单位和/或亚单位间连接,主要改变它的稳定性、 T_m 、RNase 灵敏度或所期望的其他特征。例如,某些实施方案可以使用具有一个或多个 2'-O-甲基 RNA 亚单位的 RNA 亚单位。

[0082] 多核苷酸或寡聚核苷酸的环化亚单位可以基于核糖或其他戊糖,或在某些实施方案中,替代或修饰基团。修饰的寡聚核苷酸骨架的实例包括但不限于硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯(包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯、磷酰胺酯(包括 3'-氨基磷酰胺酯和氨烷基磷酰胺酯)、磷酰二胺酯、硫羰磷酰胺酯、硫羰烷基磷酸酯、硫羰烷基磷酸三酯和 borano 磷酸酯(boranophosphates),所述 borano 磷酸酯具有正常 3'-5' 连接,这些 2'-5' 连接的类似物和那些具有反向极性的类似物,其中核苷单位的邻近对之间通过 3'-5' 与 5'-3' 或 2'-5' 与 5'-2' 相连接。还可预期的是肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、2'-O-甲基寡聚核苷酸(2'-OMe)、2'-甲氧基乙氧基寡聚核苷酸(MOE)等等本领域内已知的寡聚核苷酸。

[0083] 嘌呤或嘧啶碱基配对部分一般是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。还包括的是诸如 4-吡啶酮、2-吡啶酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯(2,4,6-trimethoxy benzene)、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨苯基、5-烷基胞苷(如 5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(如胸腺嘧啶核糖核苷)、5-卤素尿苷(如 5-溴尿苷)或 6-氮杂嘧啶或 6-烷基嘧啶,如 6-甲基尿苷)、丙炔、Q 核苷(quesosine)、2-硫尿苷、4-硫尿苷、怀丁苷(wybutosine)、wybutoxosine、4-乙酰胞苷(4-acetylthidine)、5-(羧基甲基)尿苷、5'-羧基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧基氨基甲基尿苷、 β -D-半乳糖基 Q 核苷、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基尿苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、5-甲氧基氨基甲基尿苷、5-甲基羧基甲基尿苷(5-methylcarbonylmethyluridine)、5-甲氧基尿苷、5-甲基-2-硫尿苷、2-甲硫基-N6-异

戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基 Q 核苷、尿苷-5-氧乙酸、2-硫胞苷、苏氨酸衍生物及其它 (Burgin 等, 1996, *Biochemistry*, 35, 14090, Uhlman & Peyman, 见上)。在这方面, 用“修饰的碱基”意指除了腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C)、胸腺嘧啶 (T) 和尿嘧啶 (U) 之外的核苷酸碱基, 如上所述; 该碱基可以用于反义分子中的任意位点。本领域技术人员将意识到取决于低聚物的应用或化学性质, T 和 U 可相互替换。例如, 对于其他反义化学物质如更 RNA- 样的 2'-O- 甲基反义寡聚核苷酸, T 碱基可以显示为 U。

[0084] 如上所述, 本文提供的某些多核苷酸或寡聚核苷酸包括一个或多个肽核酸 (PNA) 亚单位。肽核酸 (PNA) 是 DNA 类似物, 其骨架与脱氧核糖骨架在结构上是同形的, 由附着嘧啶或嘌呤碱基的 N-(2-氨基乙基) 甘氨酸单位组成。包含天然嘧啶和嘌呤碱基的 PNA 与互补寡聚核苷酸按照沃森-克里克碱基配对原则杂交, 并且在碱基对识别方面模拟 DNA (Egholm, Buchardt 等, 1993)。PNA 的骨架由肽键而非磷酸二酯键形成, 使得它们适合用于反义应用 (参见以下结构)。完全由 PNA 组成的骨架不带电荷, 致使 PNA/DNA 或 PNA/RNA 双链显示大于正常的热稳定。核酸酶或蛋白酶不识别 PNA。

[0085] 使用本领域已知的技术可以产生 PNA。PNA 是 DNA 类似物, 其中聚酰胺骨架取代传统 DNA 磷酸核糖环。尽管基本结构变成天然结构, PNA 能够在螺旋形式中序列-特异性地结合 DNA 或 RNA。PNA 的特征包括与互补 DNA 或 RNA 的高结合亲和力, 由单碱基错配引起的失稳效应, 对核酸酶和蛋白酶的抗性, 与 DNA 或 RNA 杂交不依赖于盐浓度, 以及与同型嘌呤 DNA 形成三链。Panagene™ 已开发其专有的 Bts PNA 单体 (Bts; 苯并噻唑-2-磺酰基) 和专有的低聚反应工艺。利用 Bts PNA 单体的 PNA 低聚反应由脱保护、配对和加帽的重复循环组成。Panagene 关于此技术的专利包括 US 6969766、US 7211668、US 7022851、US 7125994、US 7145006 和 US 7179896。教导制备 PNA 化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利号 5,539,082; 5,714,331; 和 5,719,262, 各自在此引入作为参考。PNA 化合物的进一步教导可以在 Nielsen 等, *Science*, 1991, 254, 1497 中找到。

[0086] 还包括的是“锁核酸”亚单位 (LNA)。本领域已知 LNA 的结构: 例如 Wengel 等, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron* (1998) 54, 3607, 以及 *Accounts of Chem. Research* (1999) 32, 301; Obika 等, *Tetrahedron Letters* (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401, 以及 *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16, 9230。

[0087] 多核苷酸和寡聚核苷酸可以掺入一个或多个 LNA; 在一些情况中, 化合物可以完全由 LNA 组成。本领域内已知用于合成独立的 LNA 核苷亚单位并将它们掺入寡聚核苷酸的方法: 美国专利号 7,572,582; 7,569,575; 7,084,125; 7,060,809; 7,053,207; 7,034,133; 6,794,499; 以及 6,670,461。典型的亚单位间接头包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分; 可选择地, 可以使用不含磷原子的接头。一个实施方案包括含有 LNA 的化合物, 其中各 LNA 亚单位由 RNA 或 DNA 亚单位 (即脱氧核糖核苷酸) 分开。进一步的示例性化合物可以由交互的 LNA 和 RNA 或 DNA 亚单位组成, 其中亚单位间接头是硫代磷酸酯。

[0088] 某些多核苷酸或寡聚核苷酸可以包含具有碱基配对部分的基于吗啉的亚单位, 由不带电荷或基本上不带电荷的键连接。术语“吗啉低聚物”或“PMO” (氨基磷酸酯吗啉低聚物或二氨基磷酸酯吗啉低聚物) 是指由吗啉亚单位结构组成的寡聚核苷酸类似物, 其中 (i) 所述结构由含磷原子的键连接在一起, 长 1 至 3 个原子, 优选长 2 个原子, 并且优选不带电荷或阳离子的, 将一个亚单位的吗啉氮原子连接到邻近亚单位的 5' 环外碳原子, 和 (ii)

各吗啉环具有嘌呤或嘧啶或等价的碱基配对部分,由碱基特异性氢键有效结合多核苷酸中的碱基。

[0089] 只要它们不干扰结合或活性,对这种连接可以做出各种改变。例如,附着到磷原子的氧原子可以用硫(硫代磷二酰胺)取代。5' 氧原子可以用氨基或低级烷基取代的氨基取代。连接到磷原子的悬挂氮原子可以未被取代,用(任选取代的)低级烷基单取代或双取代。嘌呤或嘧啶碱基配对部分一般是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。吗啉低聚物的合成、结构和结合特征在美国专利号 5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,521,063 和 5,506,337,以及 PCT 申请号 PCT/US07/11435(阳离子键)和 US08/012804(改进的合成)中详细描述,其在此全部引入作为参考。

[0090] 本发明的一方面,MV-siRNA 包含至少一个配体限定改变的或非天然的核苷碱基。包括的是净荷分子和靶定分子。大量化合物可以用作改变的碱基。所改变碱基的结构在一定程度上是重要的,改变的碱基应当基本上不阻止寡聚核苷酸与它的靶如 mRNA 相结合。在某些实施方案中,所改变的碱基是二氟甲基基、硝基吡咯基、硝基咪唑基、硝基吡啶基、萘基(naphthalenyl)、乙酰基蒽(anthrancenyl)、吡啶基、喹啉基、茈基,或本文所述的任何一种非天然核苷碱基的二价基。在某些实施方案中,所述非天然核苷碱基是二氟甲基基(difluorotolyl)、硝基吡咯基或硝基咪唑基。在某些实施方案中,所述非天然核苷碱基是二氟甲基基。

[0091] 本领域内已知各种各样的配体并且都适用于本发明。例如,配体可以是类固醇、胆汁酸、脂质、叶酸、吡哆醛、B12、核黄素、生物素、芳香族化合物、多环化合物、冠醚、嵌入剂、剪切分子、蛋白结合因子或碳水化合物。在某些实施方案中,配体是类固醇或芳香族化合物。在某些实施方案中,配体是胆甾醇。

[0092] 在另一个实施方案中,为了改进细胞靶定和吸收的目的,将多核苷酸或寡聚核苷酸限定至配体。例如,MV-siRNA 因子可以限定至抗体或其抗原结合片段。作为另外的例子,MV-siRNA 因子可以限定至特异性配体结合分子,如特异性结合特定细胞表面受体的多肽或多肽片段,或更普遍地增强细胞吸收的多肽或多肽片段,如富含精氨酸的肽。

[0093] 本文所使用的术语“类似物”是指保持与本文多核苷酸相同的结构和/或功能(如结合到靶)的分子、化合物或组合物。类似物的例子包括肽模拟物以及小的和大的有机或无机化合物。

[0094] 本文所使用的术语“衍生物”或“变体”是指通过一个或多个核酸缺失、添加、置换或侧链修饰,与天然存在的多核苷酸(如靶基因序列)不同的多核苷酸。在某些实施方案中,变体具有与靶基因序列区至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%或至少 99%的序列同一性。因而,例如在某些实施方案中,本发明的寡聚核苷酸包含与靶基因序列的变体互补的区。

[0095] 本发明的多核苷酸复合物和分子包含与靶基因或多核苷酸序列(或其变体)的区各自互补的序列区或两个或多个序列区,并且在具体实施方案中,与靶基因或多核苷酸序列(或其变体)的区各自完全互补。在具体实施方案中,靶基因是哺乳动物基因,如人基因,或感染哺乳动物的微生物如病毒的基因。在某些实施方案中,靶基因是治疗的靶。例如,靶基因可以是其表达或过表达与人类疾病或障碍相关的基因。这可以是突变基因或野生型或正常基因。已鉴别了各种治疗靶基因,并且这些中的任何一种可以由本发明的多

核苷酸复合物和分子靶定。治疗靶基因包括但不限于,原癌基因、生长因子基因、与疾病如白血病相关的易位、炎症蛋白基因、转录因子基因、生长因子受体基因、抗凋亡基因、白细胞介素、钠离子通道基因、钾离子通道基因,例如但不限于以下基因或编码以下蛋白的基因:载脂蛋白 B(ApoB)、载脂蛋白 B-100(ApoB-100)、bcl 家族成员包括 bcl-2 和 bcl-x、MLL-AF4、Huntington 基因、AML-MT68 融合基因、IKK-B、Aha1、PCSK9、Eg5、转化生长因子 β (TGF β)、Nav 1.8、RhoA、HIF-1 α 、Nogo-L、Nogo-R、toll-样受体 9(TLR9)、血管内皮生长因子(VEGF)、SNCA、 β -连接素、CCR5、c-myc、p53、白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-12、白细胞介素-6、白细胞介素-17a(IL-17a)、白细胞介素-17f(IL-17f)、Osteopontin(OPN) 基因、银屑病基因以及肿瘤坏死因子基因。

[0096] 在具体实施方案中,本发明的多核苷酸复合物或分子包含引导链或靶特异性区靶定两个或多个基因,如与特定疾病或障碍相关的两个或多个基因。例如,它们可以包括与白细胞介素-1 基因或 mRNA 和肿瘤坏死因子基因或 mRNA 互补的引导链;与白细胞介素-1 基因或 mRNA 和白细胞介素-12 基因或 mRNA 互补的引导链;或与白细胞介素-1 基因或 mRNA、白细胞介素-12 基因或 mRNA 以及肿瘤坏死因子基因或 mRNA 互补的引导链,用于治疗风湿性关节炎。在一个实施方案中,它们包含与 osteopontin 基因或 mRNA 和 TNF 基因或 mRNA 互补的引导链。

[0097] 治疗靶基因的其他实例包括编码病毒蛋白的基因和 mRNA,如人免疫缺陷病毒(HIV) 蛋白、HTLV 病毒蛋白、丙型肝炎病毒(HCV) 蛋白、埃博拉病毒蛋白、JC 病毒蛋白、疱疹病毒蛋白、人多瘤病毒蛋白、流感病毒蛋白以及劳氏肉瘤病毒蛋白。在具体实施方案中,本发明的多核苷酸复合物或分子包含与由特定病毒表达的两个或多个基因或 mRNA 互补的引导链,如两个或多个 HIV 蛋白基因或两个或多个疱疹病毒蛋白基因。在另一个实施方案中,它们包含具有与两个或多个单纯疱疹病毒基因或 mRNA 互补的引导链,如 HSV-2 的 UL29 基因或 mRNA 和 Nectin-1 基因或 mRNA,以减少 HSV-2 表达、复制或活性。在一个实施方案中,具有靶定两个或多个 HSV-2 基因或 mRNA 的区的多核苷酸复合物或分子存在于局部递送的制剂中。

[0098] 在具体实施方案中,本发明的多核苷酸复合物和分子包含靶定载脂蛋白 B(ApoB) 基因或 mRNA 如人 ApoB 基因或 mRNA 或小鼠 ApoB 基因或 mRNA 的一条(个)、两条(个)、三条(个)或更多引导链或靶特异性区。因此,在具体实施方案中,它们包括包含与 SEQ ID NO:1 中列出的人 ApoB 序列区互补的区的一个、两个、三个或更多区。在另一个实施方案中,它们包括包含与 SEQ ID NO:10 中列出的小鼠 ApoB 序列区互补的区的一个、两个、三个或更多区。在具体实施方案中,它们包含具有所附实施例中列出的特定序列的两个或更多引导序列。

[0099] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸复合物和分子包含靶定 HIV 基因的一条(个)、两条(个)、三条(个)或更多引导链或区。在具体实施方案中,它们靶定编码选自以下的一种或多种蛋白的一个、两个、三个或更多 HIV 基因或 mRNA:HIV gag、HIV tat、HIV env、HIV gag-pol、HIV vif 及 HIV nef 蛋白。因此,在具体实施方案中,它们包含与 SEQ ID NO:2 中列出的 HIV gag 序列区互补的一个、两个、三个或更多区;与 SEQ ID NO:3 中列出的 HIV tat 序列区互补的一个、两个、三个或更多区;与 SEQ ID NO:4 中列出的 HIV env 序列区互补的一个、两个、三个或更多区;与 SEQ ID NO:5 中列出的 HIV gag-pol 序列区互补的

一个、两个、三个或更多区；与 SEQ ID NO:6 中列出的 HIV vif 序列区互补的一个、两个、三个或更多区；与 SEQ ID NO:7 中列出的 HIV nef 序列区互补的一个、两个、三个或更多区。在具体实施方案中，它们包含具有所附实施例中列出的特异 HIV 序列的两个或更多引导序列。

[0100] 在某些实施方案中，选择与靶基因（或基因）互补的序列区是基于分析所选择靶序列并测定二级结构、 T_m 、结合能以及相对稳定性和细胞特异性。可以选择这样的序列是基于它们相对不能形成二聚体、发卡或其它会减少多核苷酸的结构完整性或阻止特异性结合宿主细胞的靶基因的二级结构。

[0101] 靶基因或 mRNA 的优选靶区可以包括位于或接近 AUG 翻译起始密码子的那些区，以及与基因或 mRNA 的 5' 区基本上互补的那些序列。例如利用 OLIGO 引物分析软件 v.4 和 / 或 BLASTN 2.0.5 算法软件 (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402) 或 Oligoengine 工作站 2.0, 可以进行这些二级结构分析和靶位点选择考虑因素。

[0102] 在一个实施方案中，靶位点优选不位于 5' 和 3' 未翻译区 (UTR) 内或接近起始密码子的区（大约 75 个碱基内），因为结合调节区的蛋白可以干扰多核苷酸的结合。此外，潜在的靶位点可以与合适的基因组数据库比较，如 BLASTN 2.0.5, 可在 NCBI 服务器 (www.ncbi.nlm) 获得，以及与其他消除的编码序列具有显著同源性的潜在靶序列。

[0103] 在另一个实施方案中，靶位点位于 5' 或 3' 未翻译区 (UTR) 内。此外，多核苷酸的自身互补区可以由靶基因中存在的特定序列组成。

[0104] 靶基因可以是任何物种，包括例如植物、动物（如哺乳动物）、原生动物、病毒（如 HIV）、细菌或真菌。在某些实施方案中，本发明的多核苷酸可以包含实施例 1 中的 GFP 序列、实施例 2 中的 HIV 序列或实施例 3 中的 ApoB 序列，或者与实施例 1 中的 GFP 序列、实施例 2 中的 HIV 序列或实施例 3 中的 ApoB 序列互补。

[0105] 如上所述，多核苷酸的靶基因序列和互补区可以相互完全互补，或者只要在生理条件下链相互杂交，它们可以不是完全互补。

[0106] 本发明的多核苷酸复合物和分子包含与一个或多个靶基因、以及一个或多个自身互补区和 / 或相互连接的环互补的至少一个、两个或三个区。一般，与靶基因互补的区长度为 15 至 17 至 24 个核苷酸，包括这些范围内的整数值。该区可以是至少 16 个核苷酸的长度、至少 17 个核苷酸的长度、至少 20 个核苷酸的长度、至少 24 个核苷酸的长度、15 至 24 个核苷酸的长度、16 至 24 个核苷酸的长度、或 17 至 24 个核苷酸的长度，包含端点值，包括这些范围内的任何整数值。

[0107] 自身互补区一般为 2 至 54 个核苷酸的长度、至少 2 个核苷酸的长度、至少 16 个核苷酸的长度、或至少 20 个核苷酸的长度，包括这些范围内的任何一个整数。因此，在一个实施方案中，自身互补区可以包含约 1-26 个核苷酸对。单链区可以为约 3-15 个核苷酸，包括中间的全部整数。无效区是指至少通过设计的任何靶基因的非特异性区。无效区或链可以用于代替靶特异性区，如在设计本发明的二价多核苷酸复合物或分子（参见如图 IV(K) 中）。

[0108] 在某些实施方案中，自身互补区足够长以形成双链结构。在某些实施方案中，3' 区和 5' 区可以杂交以用于包含茎-环结构的自身互补区（即双链区）。因此，在一个实施方案中，自身互补区的一级序列包含相互互补的两个延伸序列，所述序列由不互补或是不

完全互补的另外的序列分开。虽然不是最佳,在某些实施方案中另外的序列可以是互补的。另外的序列形成茎-环结构的环,因此必须足够长以利于允许两个互补的延伸相互结合必需的折叠。在具体实施方案中,环序列包含至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个碱基。在一个实施方案中,环序列包含 4 个碱基。相互互补(在自身互补区内;即茎区)的两个延伸序列具有足以在生理条件下相互特异性杂交的长度。在某些实施方案中,各延伸包含 4 至 12 个核苷酸;在另一个实施方案中,各延伸包含至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个、至少 8 个或至少 10 个核苷酸,或这些范围内的任何整数值。在具体实施方案中,自身互补区包含由至少 4 个核苷酸的环序列分开的至少 4 个互补核苷酸的两个延伸。在某些实施方案中,全部或部分自身互补区可以与多核苷酸区互补或不互补,所述多核苷酸区与靶基因或基因互补。

[0109] 在具体实施方案中,自身互补区具有适合于自身互补区结合如以形成茎-环结构的热力学参数。

[0110] 在一个实施方案中,为保证能量组合物足以形成期望的结构如茎-环结构,自身互补区通过使用 RNA 经自由能分析和比较剩余“非自身互补区”或环区内所含能量进行动力学计算。通常,确定茎环结构的组合物时要考虑基因靶定区的不同核苷酸序列,以保证形成这样的结构。自由能分析公式可以再次被改变以说明核苷酸类型或其使用的环境 pH。本领域内可利用许多不同的二级结构预测程序,并且每一种根据本发明可以使用。还可以公开获得用于 RNA 和 DNA 碱基的热力学参数与靶序列选择算法组合,其中几种是本领域内可利用的。

[0111] 在一个实施方案中,多核苷酸复合物分子包含以下核苷酸或由以下核苷酸组成:(a) 包含长度为 17 至 24 个核苷酸(包括其间的任何整数值)的三个寡聚核苷酸,其与任选地由(b) 包含长度为 16 至 54 个核苷酸(包括其间的任何整数值)的自身互补序列或(c) 能够形成环的 2 至 12 个核苷酸加侧翼的至少一部分基因分子互补,并且能够在生理条件下与其杂交。在一个实施方案中,各自身互补序列能够形成茎-环结构,其中的一个位于第二引导链的 5' 端,其中的一个位于第二引导链的 3' 端。

[0112] 在某些实施方案中,自身互补区用作补充其自身酶剪切和/或与基因调控的催化过程相关蛋白的特定区相结合的结构。此外,所述环可以具有某些 4-核苷酸(如四环 NGNN、AAGU、UUGA 或 GUUA) 结构以促进由 RNase 如 RNase III 剪切自身互补区。此外,所述自身互补区可以由 RNase III 剪切 11/13 或 14/16 个核苷酸成剩下 2 个核苷酸 3' 端的双链区。在某些实施方案中,所述四环具有序列 GNRA 或 GNYA,其中 N 表示任何一种核苷酸或核苷,R 表示嘌呤核苷酸或核苷;以及 Y 表示嘧啶核苷酸或核苷。

[0113] 在某些实施方案中,已如上所述被酶剪切的自身互补多核苷酸将装载到 RISC 复合物的蛋白区。在某些实施方案中,包含大于 4 核苷酸的环的自身互补区可以防止由 RNase 如 RNase III 剪切自身互补区。在优选的实施方案中,本发明的多核苷酸与靶基因相结合并减少靶基因表达。靶基因可以是已知的基因靶,或可选择地,靶基因可以是未知的,即可以使用随机序列。在某些实施方案中,减少靶基因水平至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 90%或至少 95%。

[0114] 在本发明的一个实施方案中,靶基因表达(即基因表达)的抑制水平为至少 90%、至少 95%、至少 98%和至少 99%或几乎 100%,因而细胞或生物体将有效具有相当于所谓

基因“敲除”的表型。然而,在一些实施方案中,可以优选实现仅部分抑制,使得表型相当于所谓基因“敲低”。敲低基因表达的这种方法可以在治疗上使用或用于研究(如产生疾病状态模型、检测基因功能、评估因子是否作用于基因、验证用于药物发现的靶)。

[0115] 本发明的多核苷酸复合物和分子可以用于靶定和减少或抑制基因(包含编码序列和非编码序列)、cDNA、mRNA 或 microRNA 表达。在具体实施方案中,它们的引导链或靶定区与 mRNA 或 microRNA 相结合。

[0116] 本发明进一步提供本发明的多核苷酸的阵列,包括微阵列。微阵列是一般具有微米至毫米范围尺寸的小型化装置,用于进行化学和生化反应,并且特别适合用于本发明的实施方案。阵列可以利用基本上任何和全部已知技术凭借微电子和/或微加工构造,并且在半导体行业和/或生化行业中可利用,假如这样的技术顺从于并且与多核苷酸序列的沉积和/或筛选相容。

[0117] 本发明的微阵列特别期望用于多种多核苷酸的高通量分析。微阵列一般被构造成具有包含本发明的多核苷酸的离散区或斑点,各斑点优选在阵列表面上定位寻址的位置处包含一个或多个多核苷酸。本发明的阵列可以通过本领域内可利用的任何方法制备。例如,由 Affymetrix 开发的光导化学合成法(参见美国专利号 5,445,934 和 5,856,174)可以用于在芯片表面通过结合固相光化学合成和光刻制造技术合成生物分子。由 Incyte 制药开发的化学沉积法利用预先合成的 cDNA 探针定向沉积于芯片表面(参见如美国专利号 5,874,554)。

[0118] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸分子利用本领域内普遍利用的技术化学合成,并且作为三链复合物退火。在相关的实施方案中,本发明多核苷酸复合物的三条或更多引导链可以独立地化学合成并且退火来产生多核苷酸复合物。

[0119] 在另一个实施方案中,它在体外或体内利用合适且普遍已知的技术如载体或质粒构建体表达。因此,在某些实施方案中,本发明包括体外和体内表达载体,所述表达载体包含由茎-环或环相互连接形成核苷酸序列的本发明的多核苷酸序列。本领域技术人员所熟知的方法可以用于构建表达载体,所述表达载体包含编码多核苷酸的序列以及适当的转录和翻译控制元件。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术和体内基因重组。这类技术描述于,例如 Sambrook, J. 等 (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆实验指南), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 以及 Ausubel, F. M. 等 (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验技术), John Wiley & Sons, New York, N. Y.

[0120] 载体或核酸构建系统可以包含单一载体或质粒,两个或多个载体或质粒,其包含总 DNA 一起被引入至宿主细胞基因组或转位子中。载体的选择一般取决于载体与要将载体引入的宿主细胞的相容性。在本例子中,所述载体或核酸构建体优选在哺乳动物细胞中功能可操作的载体或核酸构建体。所述载体还可以包括可以用于选择或鉴别适当的转化体或转染体的选择标志物如抗生素或药物抗性基因或报告基因(如绿色荧光蛋白、荧光素酶)。示例性递送系统可以包括病毒载体系统(即病毒介导的转导),包括但不限于逆转录病毒(如慢病毒)载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体及疱疹病毒载体等等本领域内已知的载体。

[0121] 如上所述,某些实施方案使用逆转录病毒载体,如慢病毒载体。术语“慢病毒”是

指能够感染分裂和非分裂细胞的复杂逆转录病毒属。慢病毒的例子包括 HIV(人类免疫缺陷病毒,包括 HIV-1 型和 HIV-2 型)、visna-maedi、山羊关节炎-脑炎病毒、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猿免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体可以源自这些病毒中的任何一种或多种(参见如,Evans 等, Hum Gene Ther. 10 :1479-1489, 1999 ;Case 等, PNAS USA 96 :2988-2993, 1999 ;Uchida 等, PNAS USA 95 :11939-11944, 1998 ;Miyoshi 等, Science 283 :682-686, 1999 ;Sutton 等, J Virol 72 :5781-5788, 1998 ;以及 Frecha 等, Blood. 112 :4843-52, 2008, 各自整体在此引入作为参考)。

[0122] 在某些实施方案中,逆转录病毒载体包含来自慢病毒基因组如 HIV 基因组或 SIV 基因组的某些最小序列。慢病毒的基因组一般有机化成 5' 长末端重复序列(LTR)区、gag 基因、pol 基因、env 基因、附属基因(如 nef、vif、vpr、vpu、tat、rev)和 3' LTR 区。将病毒 LTR 分成三个区,被称为 U3、R(重复)和 U5。U3 区包含增强子和启动子元件,U5 区包含多聚腺苷酸化信号和分开 U3 区和 U5 区的 R 区。R 区的转录序列出现在病毒 RNA 的 5' 和 3' 端(参见如“RNA Viruses :A Practical Approach”(RNA 病毒实用方法)(Alan J. Cann 编, Oxford University Press, 2000) ;O Narayan, J. Gen. Virology. 70 :1617-1639, 1989 ;Fields 等, Fundamental Virology Raven Press, 1990 ;Miyoshi 等, J Virol. 72 :8150-7, 1998 ;以及美国专利号 6, 013, 516, 各自整体引入作为参考)。为了调节所期望的载体活性,慢病毒载体可以包含任何一个或多个慢病毒基因组的这些元件,或者如为了减少慢病毒复制的病理效应或为了限制慢病毒载体单轮感染,它们可以包含缺失、插入、置换或突变的一个或多个这些元件,。

[0123] 一般,最小的逆转录病毒载体包含某些 5' LTR 和 3' LTR 序列、一个或多个关注的基因(待表达于靶细胞中)、一个或多个启动子和用于包装 RNA 的顺式作用序列。可以包括本文所述和本领域内已知的其他调节序列。病毒载体一般克隆到可以转染至包装细胞系如真核细胞(如 293-HEK)的质粒,并且一般还包含对细菌中复制质粒有用的序列。

[0124] 在某些实施方案中,所述病毒载体包含来自逆转录病毒如慢病毒的 5' 和 / 或 3' LTR 的序列。LTR 序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的 LTR 序列。例如,它们可以是来自 HIV、SIV、FIV 或 BIV 的 LTR 序列。优选的 LTR 序列是 HIV LTR 序列。

[0125] 在某些实施方案中,所述病毒载体包含来自慢病毒 5' LTR 的 R 和 U5 序列和来自慢病毒的失活或“自身-失活”的 3' LTR。“自身-失活的 3' LTR”是包含防止 LTR 序列驱动下游基因表达的突变、置换或缺失的 3' 长末端重复序列(LTR)。来自 3' LTR 的 U3 区拷贝用作在整合的前病毒中产生两种 LTR 的模板。因而,当具有失活的缺失或突变的 3' LTR 作为前病毒的 5' LTR 整合时,没有来自 5' LTR 的转录是可能的。这消除了病毒增强子 / 启动子和任何内源性增强子 / 启动子之间的竞争。自身-失活 3' LTR 描述于,例如 Zufferey 等, J Virol. 72 :9873-9880, 1998 ;Miyoshi 等, J Virol. 72 :8150-8157, 1998 ;以及 Iwakuma 等, Virology 261 :120-132, 1999, 各自整体引入作为参考。自身失活 3' LTR 可以通过本领域内任何已知的方法形成。在某些实施方案中,所述 3' LTR 的 U3 元件含有缺失其增强子序列,优选 TATA 盒、Sp1 和 / 或 NF- κ B 位点。自身失活 3' LTR 的结果是,整合入宿主细胞基因组的前病毒将包含失活的 5' LTR。

[0126] 表达载体一般包括调节序列,其调节多核苷酸的表达。调节序列存在于表达载体中,包括所述载体的那些非翻译区,如增强子、启动子、5' 和 3' 非翻译区,其与宿主细胞蛋

白相互作用以实现转录和翻译。这样的元件可以改变它们的强度和特异性。取决于所利用的载体系统和细胞,可以使用任何数量的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。此外,还可以使用组织特异性或细胞特异性启动子。

[0127] 对于在哺乳动物细胞中表达,通常优选来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。此外,通常可利用许多基于病毒的表达系统。例如,将腺病毒用作表达载体的情况中,可以将编码关注多肽的序列连接到由晚期启动子和三重前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合物。插入病毒基因组的非必需 E1 或 E3 区可以用于获得能够在所感染的宿主细胞中表达多肽的活病毒 (Logan, J. 和 Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81 :3655-3659)。此外,转录增强子如劳氏肉瘤病毒 (RSV) 增强子,可以用于哺乳动物宿主细胞中增加表达。

[0128] 某些实施方案可以使用一个或多个 RNA 聚合酶 II 和 III 启动子。RNA 聚合酶 III 启动子的合适选择可以在例如 Paule 和 White, Nucleic Acids Research., Vol 28, pp 1283-1298, 2000 中发现,其整体引入作为参考。RNA 聚合酶 II 和 III 启动子还包括任何合成的或改造的 DNA 片段,所述 DNA 片段可以分别定向 RNA 聚合酶 II 和 III 转录其下游 RNA 编码序列。进一步地, RNA 聚合酶 II 或 III (Pol II 或 III) 启动子或用作病毒载体部分的启动子可以是诱导型。任何合适的诱导型 Pol II 或 III 启动子可以与本发明的方法一起使用。示例性 Pol II 或 III 启动子包括四环素响应性启动子,提供于 Ohkawa 和 Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, pp 577-585, 2000 ;和 Meissner 等, Nucleic Acids Research, Vol. 29, pp 1672-1682, 2001, 各自整体引入作为参考。

[0129] 可以使用的组成型启动子的非限制性实例包括用于泛素的启动子、CMV 启动子 (参见如 Karasuyama 等, J. Exp. Med. 169 :13, 1989)、 β -肌动蛋白 (参见如 Gunning 等, PNAS USA 84 :4831-4835, 1987) 以及 pgk 启动子 (参见如 Adra 等, Gene 60 :65-74, 1987); Singer-Sam 等, Gene 32 :409-417, 1984 ;以及 Dobson 等, Nucleic Acids Res. 10 :2635-2637, 1982, 各自整体引入作为参考)。组织特异性启动子的非限制性实例包括 lck 启动子 (参见如 Garvin 等, Mol. Cell Biol. 8 :3058-3064, 1988 ;和 Takadera 等, Mol. Cell Biol. 9 :2173-2180, 1989)、myogenin 启动子 (Yee 等, Gene and Development 7 :1277-1289, 1993) 以及 thyl (参见如 Gundersen 等, Gene 113 :207-214, 1992)。

[0130] 启动子的其他实例包括泛素 -C 启动子、人 μ 重链启动子或 Ig 重链启动子 (如 MH-b12) 以及人 κ 轻链启动子或 Ig 轻链启动子 (如 EEK-b12), 其在 B-淋巴细胞中起作用。MH-b12 启动子含有人 μ 重链启动子,其前面是由基质结合区加侧翼的 iE μ 增强子,而 EEK-b12 启动子含有 κ 轻链启动子,其前面是内源性增强子 (iE κ)、基质结合区和 3' 增强子 (3'E κ) (参见如 Luo 等, Blood. 113 :1422-1431, 2009, 在此引入作为参考)。因此,某些实施方案可以使用一个或多个这些启动子或增强子元件。

[0131] 在某些实施方案中,本发明提供用于条件表达的多核苷酸。各种条件表达系统是本领域内已知并且可利用于细胞和动物中使用,而且本发明预期使用任何这样的条件表达系统来调节多核苷酸的表达或活性。在本发明的一个实施方案中,例如,利用 REV-TET 系统实现诱导型表达。该系统的成分和利用系统来控制基因表达的方法在文献中有据可查,并且表达四环素控制的反式激活因子 (tTA) 或反式 tTA (rtTA) 的载体可商购获得 (如 pTet-Off、pTet-On 和 ptTA-2/3/4 载体, Clontech, Palo Alto, CA)。这样的系统描述于,例如美国专利号 5650298、6271348、5922927 及相关专利,其整体在此引入作为参考。

[0132] 在某些实施方案中,本文提供的病毒载体(如逆转录病毒、慢病毒)是具有一个或多个所选择的病毒糖蛋白或包膜蛋白的“假型”,主要来靶定所选择的细胞类型。假型通常是指将一个或多个异源病毒糖蛋白结合到细胞表面病毒颗粒,通常允许病毒颗粒感染所选择的与其正常靶细胞不同的细胞。“异源”元件源自除病毒载体的 RNA 基因组来源的病毒之外的病毒。一般,病毒载体的糖蛋白编码区如通过缺失已遗传改变,以防止表达其自身糖蛋白。仅仅通过举例的方式,来自 HIV- 来源的慢病毒载体的包膜糖蛋白 gp41 和 / 或 gp120 一般先于具有异源病毒糖蛋白的假型缺失。

[0133] 病毒载体的传代可以使用本领域内已知的任何合适的遗传工程技术,包括但不限于限制性核酸内切酶消化、连接、转化、质粒纯化、PCR 扩增和 DNA 测序的标准技术,例如,如 Sambrook 等所描述 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验指南). Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1989)), Coffin 等 (Retroviruses (逆转录病毒). Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1997)) 和“RNA Viruses: A Practical Approach (RNA 病毒实用方法)” (Alan J. Cann, 编, Oxford University Press, (2000))。

[0134] 可以将本领域内已知的任何各种方法用于产生合适的逆转录病毒颗粒,其基因组包含病毒载体的 RNA 拷贝。正如一种方法,基于病毒载体进入具有期望的靶细胞特异性的病毒颗粒,可以将病毒载体引入包装病毒基因组 RNA 的包装细胞系。包装细胞系一般以反式提供将病毒基因组 RNA 包装到病毒颗粒和感染靶细胞所必需的病毒蛋白,包括结构 gag 蛋白,酶 pol 蛋白和包膜糖蛋白。

[0135] 在某些实施方案中,所述包装细胞系可以稳定地表达某些必需或期望的病毒蛋白(如 gag、pol)(参见如美国专利号 6, 218, 181, 在此引入作为参考)。在某些实施方案中,所述包装细胞系可以用编码某些必需或期望的病毒蛋白(如 gag、pol、糖蛋白)的质粒瞬时感染,包括本文描述的风疹病毒糖蛋白序列。在一个示例性实施方案中,所述包装细胞系稳定地表达 gag 和 pol 序列,然后所述细胞系用编码病毒载体的质粒和编码糖蛋白的质粒转染。引入期望的质粒之后,将病毒颗粒收集并相应地处理,如通过超滤以完成病毒颗粒的浓缩贮存。示例性包装细胞系包括 293(ATCC CCL X)、HeLa(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10) 和 Cf2Th(ATCC CRL 1430) 细胞系。

[0136] 在一个具体实施方案中,利用载体系统表达多核苷酸,所述载体系统包含 pSUPER 载体骨架和相应于待表达的多核苷酸的另外的序列。已证明 pSUPER 载体系统对于表达 shRNA 试剂和下调基因表达是有用的 (Brummelkamp, T. R 等, Science 296 :550 (2002) 和 Brummelkamp, T. R 等, Cancer Cell, 在线发表, 2002 年 8 月 22 日)。pSUPER 载体可从 OligoEngine (Seattle, WA) 商购获得。

[0137] 调节基因表达的方法

[0138] 本发明的多核苷酸可以用于各种目的,全部大体上涉及它们抑制或减少一个或多个靶基因表达的能力。因此,本发明提供减少一个或多个靶基因表达的方法,所述方法包括将本发明的多核苷酸复合物或分子引入包含所述一个或多个靶基因的细胞。在具体实施方案中,所述多核苷酸复合物或分子包含共同靶定一个或多个靶基因的一条或多条引导链。在一个实施方案中,将本发明的多核苷酸引入含有由一条(个)、两条(个)或三条(个)引导链或靶定区靶定的靶基因或其同源物、其变体或其直系同源物的细胞。

[0139] 此外,本发明的多核苷酸可以用于间接地减少表达。例如,本发明的多核苷酸复合

物或分子可以用于减少驱动第二基因（即靶基因）表达的转录激活因子的表达，从而减少第二基因的表达。同样地，多核苷酸可以用于间接地增加表达。例如，本发明的多核苷酸复合物或分子可以用于减少抑制第二基因表达的转录阻遏因子的表达，从而增加第二基因的表达。

[0140] 在各种实施方案中，靶基因是源自待引入多核苷酸的细胞的基因、内源性基因、外源性基因、转基因或转染细胞之后细胞中存在的病原体基因。取决于特定的靶基因和递送至细胞的多核苷酸的量，本发明的方法可导致部分或全部抑制靶基因的表达。含有靶基因的细胞可以源自或包含于任何生物体（如植物、动物、原生动物、病毒、细菌或真菌）。如本文所使用，“靶基因”包括基因、mRNA 和 microRNA。

[0141] 抑制靶基因的表达可以利用本发明领域内技术人员已知的技术，通过包括但不限于以下的方法验证：观测或检测由靶基因编码的蛋白水平的缺失或可观测的降低，表达自靶基因（如 mRNA）的基因产物水平的缺失或可观测的降低，和 / 或与基因表达相关的表型。

[0142] 可以检测以确定由引入本发明的多核苷酸复合物或分子而引起的作用的细胞特征的实例包括细胞生长、凋亡、细胞周期特征、细胞分化和形态。

[0143] 可以将本发明的多核苷酸复合物或分子直接引入细胞（即细胞内）或细胞外引入生物体如哺乳动物的空腔或胞间隙，进入生物体循环，所述引入包括经口引入、通过将生物体浸泡于含有多核苷酸的溶液中引入，或通过足以递送多核苷酸至细胞的一些其他方法引入。

[0144] 此外，可以将改造成表达多核苷酸的载体引入细胞，其中所述载体表达多核苷酸，从而将它引入细胞。本领域内普遍已知并且可利用的转移表达载体至细胞的方法，包括如转染、脂质体转染、划痕荷载、电穿孔、显微注射、感染、基因枪和反转录转座。通常，本领域技术人员基于载体类型和细胞类型，以及本领域内普遍可利用的教导易于确定将载体引入细胞的合适方法。感染因子可以通过本领域内易于利用的各种方法引入，包括如鼻腔吸入。

[0145] 利用本发明的寡聚核苷酸抑制基因表达的方法可以联合其他敲低和敲除方法，如基因靶定、反义 RNA、核酶、双链 RNA（如 shRNA 和 siRNA）以进一步减少靶基因的表达。

[0146] 在不同的实施方案中，本发明的靶细胞是原代细胞、细胞系、永生细胞或转化细胞。靶细胞可以是体细胞或生殖细胞。所述靶细胞可以是非分裂的细胞，如神经细胞，或它在合适的细胞培养条件中能够体外增殖。靶细胞可以是正常细胞，或它们可以是疾病细胞，包括含有已知的基因突变的那些细胞。本发明的真核靶细胞包括哺乳动物细胞如，例如人细胞、鼠科动物细胞、啮齿动物细胞和灵长类动物细胞。在一个实施方案中，本发明的靶细胞是干细胞，其包括例如胚胎干细胞，如鼠科动物的胚胎干细胞。

[0147] 可以将本发明的多核苷酸复合物、分子和方法用于治疗任何各种疾病或障碍，包括但不限于炎症性疾病、心血管疾病、神经系统疾病、肿瘤、脱髓鞘疾病、消化系统疾病、内分泌系统疾病、生殖系统疾病、血液和淋巴系统疾病、免疫性疾病、精神障碍、肌肉骨骼疾病、神经疾病、神经肌肉疾病、代谢性疾病、性传播疾病、皮肤和结缔组织病、泌尿系统疾病以及感染。

[0148] 在某些实施方案中，所述方法对动物实施，在具体实施方案中，对哺乳动物实施，以及在某些实施方案中，对人实施。

[0149] 因此,在一个实施方案中,本发明包括利用本发明的多核苷酸复合物或分子用于治疗或预防与基因失控、过表达或突变相关的疾病的方法。例如,可以将本发明的多核苷酸复合物或分子引入癌细胞或肿瘤,从而抑制维持致癌 / 致瘤表型所需基因或相关基因的表达。为预防疾病或其他病理,可以选择例如启动或维持疾病 / 病理所需的靶基因。治疗可以包括改善与疾病相关的任何症状或与病理相关的临床指征。

[0150] 此外,将本发明的多核苷酸用于治疗与基因突变相关的疾病或障碍。在一个实施方案中,将多核苷酸用于调控突变基因或等位基因的表达。在这样的实施方案中,所述突变基因是多核苷酸复合物或分子的靶,其将包含与所述突变基因的区互补的区。该区可以包括突变,但不是必需的,因为也可以靶定基因的另一个区,导致减少突变基因或基因的表达。在某些实施方案中,该区包含突变,并且在相关实施方案中,所述多核苷酸复合物或分子特异性抑制突变基因或基因的表达,但不抑制野生型基因或基因的表达。这样的多核苷酸在如其中一个等位基因突变但另一个未突变的情形中是特别有用的。然而,在另一个实施方案中,该序列不一定会包含突变,并且可以因此仅包含野生型序列。这样的多核苷酸在如其中全部等位基因突变的情形中是特别有用的。本领域内已知各种疾病和障碍与基因突变相关或由基因突变引起,并且本发明包括用多核苷酸治疗任何这样的疾病或障碍。

[0151] 在某些实施方案中,靶定病原体的基因用于抑制。例如,基因可以直接引起宿主免疫抑制或对于病原体复制、病原体传播或维持感染是必需的。此外,靶基因可以是负责病原体进入其宿主、通过病原体或宿主的药物代谢、病原体基因组的复制或整合、在宿主中感染的建立或扩散、或组装下一代病原体的病原体基因或宿主基因。预防(即防止或降低感染风险)、以及降低与感染相关症状的频率或严重性的方法包括于本发明中。例如,通过引入根据本发明的多核苷酸,可以靶定处于病原体感染风险中的细胞或已被感染的细胞,特别是人免疫缺陷病毒(HIV)感染,用于治疗(靶定序列参见实施例1和实施例2)。因而,在一个实施方案中,将靶定一个或多个HIV蛋白的本发明的多核苷酸复合物或分子用于治疗或抑制HIV感染或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。

[0152] 在其他具体实施方案中,将本发明用于治疗或开发治疗任何类型的癌症。可以利用本文描述的方法治疗的肿瘤的实例包括但不限于,神经母细胞瘤、骨髓瘤、前列腺癌、小细胞肺癌、结肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、脑瘤、乳癌、白血病、淋巴瘤及其他。

[0153] 在一个实施方案中,将靶定载脂蛋白B(apoB)的本发明的多核苷酸复合物或分子用于治疗、减少或抑制动脉硬化症或心脏病。ApoB是低密度脂蛋白(LDL)的主要载脂蛋白,其负责运送胆固醇至组织。LDL颗粒上的ApoB担当LDL受体的配体,并且高水平的ApoB可导致引起血管病(动脉硬化症)的斑块,导致心脏病。

[0154] 可以将多核苷酸复合物、分子和表达载体(包括病毒载体和病毒)引入体外或离体细胞,随后放入动物以影响治疗,或者可以将它们通过体内给予直接引入患者。因而,在某些实施方案中,本发明提供基因治疗方法。可以将本发明的组合物以许多方式中的任何一种给予患者,包括肠胃外、静脉内、全身、局部、经口、瘤内、肌内、皮下、腹膜内、吸入或任何这样的递送方法。在一个实施方案中,所述组合物可以肠胃外给予,即关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内。在具体的方案中,所述脂质体组合物通过静脉内输注给予或由弹丸注射腹膜内给予。

[0155] 本发明的组合物可以制成适合于递送至个体的药物组合物。本发明的药物组合物

将通常进一步包含一种或多种缓冲液（如中性缓冲生理盐水或磷酸盐缓冲生理盐水）、碳水化合物（如葡萄糖、甘露糖、蔗糖、右旋糖或右旋糖酐）、甘露醇、蛋白质、多肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂如 EDTA 或谷胱甘肽、佐剂（如氢氧化铝）、使得制剂与接受者血液等渗、低渗或轻微高渗的溶质、悬浮剂、增稠剂和 / 或防腐剂。可选择地，本发明的组合物可以制成冷冻干燥制剂。

[0156] 给予患者的寡聚核苷酸的量可以由医师根据各种因素容易地确定，所述因素包括如，疾病和由所使用的载体表达的寡聚核苷酸水平（在给予载体的情况下）。所给予的每剂量的量一般选择高于最小治疗剂量但低于中毒剂量。每剂量的量的选择将取决于许多因素，如患者的病史、其他疗法的使用以及疾病的性质。此外，所给予的量可以贯穿治疗调整，取决于患者对治疗的响应和任何治疗相关副作用的出现或严重性。

[0157] 测定基因功能的方法

[0158] 本发明进一步包括鉴别生物体中基因功能的方法，所述方法包括使用本发明的多核苷酸复合物或分子来抑制先前未知功能的靶基因的活性。代替通过传统基因筛选费时费力的分离突变体，通过使用本发明来测定未表征基因的功能基因组学设想以减少靶基因活性的量和 / 或改变靶基因活性的时机。本发明可以用于确定用于制药学的潜在靶，理解与发育相关的正常和病理事件，确定负责出生后发育 / 变老的信号通路等。从基因组和表达基因来源加速获取核苷酸序列信息，包括酵母、黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫基因组的全部序列，可以与本发明结合来测定生物体中的基因功能（如线虫）。优选不同生物体来使用特定密码子，搜索相关基因产物的序列数据库，关联遗传特征连锁图谱与核苷酸序列所源自的物理图谱，以及人工智能方法可以用于限定来自在这样的测序计划中已获取的核苷酸序列的假定开放阅读框。

[0159] 在一个实施方案中，如为了测定基因的功能或生物学活性，基于获自表达序列标签 (EST) 的部分序列，将本发明的多核苷酸用于抑制基因表达。在生长、发育、代谢、抗病或其他生物学过程中的功能变化会指征 EST 的基因产物的正常作用。

[0160] 可以将多核苷酸方便地引入包含靶基因的完整细胞 / 生物体允许将本发明用于高通量筛选 (HTS)。例如，可以将含有能够抑制不同表达基因的多核苷酸的溶液按照有序排列放置于微量滴定板上定位的独立孔内，并且可以分析各孔内的完整细胞 / 生物体用于由于抑制靶基因活性在行为或发育中的任何变化或改变。可以从基因活性被抑制时其对完整细胞 / 生物体的影响来分析靶基因的功能。在一个实施方案中，将本发明的多核苷酸用于化学遗传学筛选，即检测化合物逆转通过利用本发明的多核苷酸减少基因表达模拟的疾病的能力。

[0161] 若通过 RFLP 或 QTL 分析，生物体的特征被确定为与多态性遗传连锁，可以将本发明用于获得关于遗传多态性是否可以是直接造成所述特征的观点。例如，可以扩增限定遗传多态性的片段或邻近这样的遗传多态性的序列以产生 RNA，可以将多核苷酸引入生物体，以及可以确定特征的改变是否与抑制相关联。

[0162] 本发明在允许抑制必需基因中同样是有用的。这样的基因仅在发育的特定阶段或细胞区室对于细胞或生物体活力来说可能是必需的。何时或何处对于活力不是必需时，可以通过抑制靶基因的活性产生条件突变的功能等价物。本发明允许在生物体发育的特定时间和特定区域添加多核苷酸，而不会向靶基因组引入永久突变。同样地，本发明预期使用仅

在期望时表达多核苷酸的诱导型或条件性载体。

[0163] 本发明还涉及验证基因产物是否是用于药物发现或开发的靶的方法。将靶定基因的多核苷酸引入细胞或生物体,所述靶定基因相应于降解的基因。将细胞或生物体保持于发生基因降解的条件下,导致减少基因的表达。测定减少基因的表达是否对细胞或生物体有影响。若减少基因的表达有影响,那么基因产物就是用于药物发现或开发的靶。

[0164] 设计和产生多核苷酸复合物和分子的方法

[0165] 本发明的多核苷酸复合物和分子包括新颖独特的功能序列组,以使得采用含有一个或多个双链区(有时由茎-环或环结构邻接)的二级结构的方式排列,赋予多核苷酸的优势。因此,在某些实施方案中,本发明包括设计本发明的多核苷酸复合物和分子的方法。这样的方法一般包括适当选择多核苷酸复合物和分子的各种序列成分。术语“一级链”、“二级链”和“关键链”是指本发明的多核苷酸复合物或分子中存在的各种引导链。

[0166] 在一个实施方案中,多核苷酸复合物的基本设计如下:

[0167] 设计基序:

[0168] (一级链)(UU)(二级链)(UU)(关键链)(UU)

[0169] 因此,在相关实施方案中,将多核苷酸设计如下:

[0170] II. (二级链)(UU)(UU)(关键链)(UU)(一级链)

[0171] III. (二级链)(UU)(环或茎-环)(关键链)(UU)(环或茎-环)(一级链)(UU)

[0172] 设置参数

[0173] 设置用于自身互补的 seed size 大约 38-43%。对于 19 个核苷酸靶,范围或 7 或 8 个核苷酸优选作为 SEED_SIZE。

[0174] 对于各基因,定义 PRIMARY 和 SECONDARY 靶基因。

[0175] 定义 PRIMARY 链

[0176] 从一个或多个靶基因序列开始。对于各基因,构造满足 G/C 含量、特异性和不含 poly-A 或 poly-G 标准的 PRIMARY 靶序列 17-24 个核苷酸基序的列表。对于每一种,还得到 SECONDARY 和 KEY 链。

[0177] 得到 SECONDARY 和 KEY 链

[0178] d. 对于各基因上的各靶序列,通过与 SECONDARY 基因各序列反向的 SEED_SIZE 聚类似对碱基 1。

[0179] 记录精确比对的序列。SECONDARY 基因上的靶序列是比对起点,减去基序的长度,加上 SEED_SIZE 来比对起点,加上 SEED_SIZE。SECONDARY 链是反向互补的。

[0180] 为得到各 KEY 链,定义 SEED_A 作为通过 PRIMARY 链的 SEED_SIZE 的碱基 1,定义 SEED_B 作为基序长度减去 SEED_SIZE 至 SECONDARY 链的基序长度处的碱基。设置 MID_SECTION 作为长基序序列长度减去 SEED_A 长度加上 SEED_B 长度的重复的符号“|”设置关键比对序列作为 SEED_A、MID_SECTION、SEED_B。聚类似对用于关键区段的靶基因。记录 KEY 靶序列作为在关键靶基因上比对 hit 处的碱基至碱基比对 hit 加上基序长度。KEY 链是反向互补的。

[0181] 构建任意的多核苷酸

[0182] g. 构造具有熔融温度在靶的相等长度区占优势的 (4-24) 个核苷酸的备选茎 A&B。茎链具有 A-T、G-C 相互互补。长度和组合物取决于选择哪种内切核糖核酸酶用于预加工

茎-环结构。

[0183] h. 构造具有熔融温度在靶的相等长度区占优势的 (4-24) 个核苷酸的备选茎 C&D。茎链具有 A-T、G-C 相互互补, 但是不与茎 A&B 互补。长度和组合物取决于选择哪种内切核糖核酸酶用于预加工茎-环结构。

[0184] i. 构造具有 (4-12) 个富含 A-T 的核苷酸至环 A&B 的环备选物。长度和组合物取决于选择哪种内切核糖核酸酶用于预加工茎-环结构。建议所描述的四环用于由 RNase III 或 Pac1 RNase III 内切核糖核酸酶加工更长的茎, 如 (图 A) 所示。建议更大的环用于防止 RNase III 或 Pac1 加工并放在更短的茎上, 如 (图 C, 图 D) 所示。

[0185] j. 形成用于各基序备选物的邻近序列。

[0186] k. 利用具有期望参数的软件折叠备选序列。

[0187] l. 从输出, 定位具有单链靶区的结构, 其任意一端或两端具有期望的茎/环结构加侧翼。

[0188] 在一个实施方案中, 设计包含用于调节靶基因 (即多核苷酸) 表达的一个或多个自身互补区的多核苷酸序列的方法包括: (a) 选择长度为 17 至 30 个核苷酸并且与靶基因互补的第一序列; 以及 (b) 选择长度为 12 至 54 个核苷酸的一个或多个另外的序列, 其包含自身互补区并且不与第一序列互补。

[0189] 在某些实施方案中, 这些方法包括确定或预测由步骤 (b) 所选择的序列采用的二级结构, 例如为了确定它们能够采用茎-环结构。

[0190] 同样地, 这些方法可以包括验证步骤, 其中包括如在体内或体外测试系统中, 测试所设计的多核苷酸序列抑制靶基因表达的能力。

[0191] 本发明进一步预期基于本文所述的互补特征, 应用计算机程序来选择多核苷酸序列。因此, 本发明提供用于选择多核苷酸序列的计算机软件程序和包含所述软件程序的计算机可读媒介, 以及含有一种本发明程序的计算机。

[0192] 在某些实施方案中, 使用者提供具有关于序列、位点或靶基因名称信息的计算机。所述计算机使用此输入本发明的程序来鉴别靶定的靶基因的一个或多个适当的区, 并且输出或提供在本发明的多核苷酸中使用的互补序列。然后计算机程序使用该序列信息来选择多核苷酸的一个或多个自身互补区的序列。一般, 所述程序将选择不与基因组序列互补的序列, 所述基因组序列包括靶基因或与靶基因互补的多核苷酸的区。此外, 所述程序将选择相互之间不互补的自身互补区的序列。当期望时, 程序还提供缺口区的序列。在选择适当的序列时, 计算机程序向使用者输出或提供该信息。

[0193] 本发明的程序可以进一步使用输入关于含有靶基因的生物体的基因组序列, 如公共或私营数据库, 以及预测特定序列的二级结构和/或杂交特性的其他程序, 以保证多核苷酸采用正确的二级结构并且不与非靶基因杂交。

[0194] 本发明部分基于令人惊奇的发现, 如本文所述的多核苷酸非常有效的减少一个或多个基因的靶基因表达。多核苷酸提供优于以前所述的反义 RNA 的重要优势, 包括增加潜力和增强对多靶基因的效力。此外, 本发明的多核苷酸提供优于用于 siRNA 的传统 dsRNA 分子的额外优势, 因为多核苷酸的使用基本上消除了与 dsRNA 分子相关的脱靶阻抑并且提供多价 RNAi。

[0195] 可理解的是可以将本发明的组合物和方法用于靶定各种不同的靶基因。术语“靶

基因”可以指基因、mRNA 或 microRNA。因此,本文提供的靶序列可以描述为 DNA 序列或 RNA 序列。本领域技术人员将理解的是,本发明的组合物可包括与本文提供的 DNA 或 RNA 序列互补的区。因而,无论提供 DNA 或 RNA 靶序列,可理解的是同样可以分别靶定相应的 RNA 或 DNA 靶序列。

[0196] 本发明的实施将使用本领域技术内的细胞生物学、分子生物学、微生物学和重组 DNA 的各种常规技术。这样的技术已完整描述于文献中。参见例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆实验手册), 第二版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); 以及 *DNA Cloning* (DNA 克隆), Volumes I and II (D. N. Glover 编, 1985)。

[0197] 本文引用的全部专利、专利申请和非专利文献整体引入作为参考,正如每一个都独立地引入作为参考。

[0198] 可以将以上所描述的各种实施方案组合以提供进一步的实施方案。在本说明书引用和 / 或列于申请记录表的全部美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物在此整体引入作为参考。实施方案方面可以变化,若必要的话使用各种专利、申请和出版物的概念以提供更进一步的实施方案。

[0199] 根据以上详细说明可以对实施方案进行这些和其他改变。总的来说,以下权利要求中所使用的术语不应当解释为限制要求说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应当解释为包括全部可能的实施方案连同这样的权利要求给予权利的等价物的完整范围。因此,权利要求并不受公开内容所限制。

实施例

[0200] 实施例 1

[0201] TRIVOID 抗 -GFP

[0202] 针对单个基因——绿色荧光蛋白 (GFP) 设计多价 siRNA。测试针对 GFP 的多价合成的 RNA MV-siRNA 复合物来与单 shRNA 克隆相比,比较阻抑活性。此外,为测试失活合成的 MV-siRNA 复合物的一条链的作用,一条链用 DNA (TI-19_C_dna) 取代;如以下所示。该取代导致阻抑相对下降约 30%。此外,测试本文所述的 MV-siRNA 自身互补克隆的“短”和“长”形式,并与已公开的 shRNA 克隆相比,比较 GFP 表达的阻抑。

[0203] 以下表 1 给出合成的 MV-siRNA 的低聚物序列以及 DNA 取代链。

[0204] 图 8A 示出 GFP 编码序列的靶定区。

[0205] 表 1 合成的 MV-siRNA 的寡核苷酸

[0206]

名称	序列	SEQ ID NO:
TI-19/7A	GGGCAGCUUGCCGGUGGUGUU	11
TI-19/7B	CACCACCCCGGUGAACAGCUU	12
TI-19/7C	GCUGUUCACGUCGUGCCCUU	13

TI-19/7C dna	GCTGTTACGTCGCTGCCC	14
--------------	--------------------	----

[0207] 为制备合成的多价-siRNA (MV-siRNA), 将以上独立的寡核苷酸的各试管重悬于不含 RNase 的水中, 以获得 50 μ M (50 pmoles/ μ L) 的终浓度。然后将独立的寡核苷酸作为 (a) T1-19/7_A, T1-19/7_B 和 T1-19/7_C (MV-siRNA GFP_1) 或作为 (b) T1-19/7_A, T1-19/7_B 和 T1-19/7_C_dna (MV-siRNA GFP 1 DNA) 组合, 并且如下退火: 将 30 μ L 的每一种重悬的寡聚核苷与 10 μ L 的 10 倍退火缓冲液组合 (100mM Tris-HCl pH7.5, 1M NaCl, 10mM EDTA), 旋涡混合, 于 94°C 加热 5 分钟, 并在 30 分钟内逐步冷却至 70°C。退火的 MV-siRNA 的终浓度是约 15 μ M。

[0208] 为制备多价-siRNA 克隆和 shRNA 对照, 依照 pSUPER 手册, 将以下表 2 中的序列克隆至 pSUPER 载体。用于各指定克隆 (如 T1、T1_long、T11) 的第一序列代表自身互补多价 siRNA 的序列, 其在细胞中表达为 RNA 转录本 (与表 1 中合成的 MV-siRNA 序列相比), 并且被称为“_as”的序列是该分子的编码序列部分。

[0209] 表 2 MV-siRNA 表达克隆的寡核苷酸

[0210]

名称	序列	SEQ ID NO:
T1	GATCCCCCACCACCCCGGTGAACAGCgtaGCTGTTACGTCG CTGCCCgtaGGGCAGCTTGCCGGTGGTGttTTTTTA	15
T1_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTAACGGGCAGCGAC GTGAACAGCTAACGCTGTTACCGGGGTGGTGGGG	16
T1_long	GATCCCCCACCACCCCGGTGAACAGCTTGTAGGTGGCATCG CAGAAGCGATGCCACCTACAAGCTGTTACGTCGCTGCCCT TGTAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGGCA	17

[0211]

	GCTTGCCGGTGGTGttTTTTTA	
T1_long_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTTGTAGGTGGCATCG CTTCTGCGATGCCACCTACAAGGGCAGCGACGTGAACAGCT TGTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAAGCTGTT CACCGGGGTGGTGGGG	18
TII	GATCCCCCGTGCTGCTTCATGTGGTCGTTgttaCGACCACAAT GGCGACAACCTTgttaGGTTGTGCGGGCAGCAGCACGTTtTTTT TA	19
TII_as	AGCTTAAAACGTGCTGCTGCCCCGACAACCTAACAAGGTTGT CGCCATTGTGGTCGTAACAACGACCACATGAAGCAGCACG GGG	20
TII_long	GATCCCCCGTGCTGCTTCATGTGGTCGTTGTAGGTGGCATC GCAGAAGCGATGCCACCTACAACGACCACAATGGCGACAA CCTTGTAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGT TGTCGGGCAGCAGCACGttTTTTTA	21
TII_long_as	AGCTTAACGTGCTGCTGCCCCGACAACCTTGTAGGTGGCATC GCTTCTGCGATGCCACCTACAAGGTTGTGCGCCATTGTGGTC GTTGTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAACGAC CACATGAAGCAGCACGGGG	22
shRNA	GATCCCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAACT TCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTA	23
shRNA_as	AGCTTAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTCTCTTGAAGA ACTTCAGGGTCAGCTTGCGGG	24

[0212] 为测试对 GFP- 表达的作用,用 Lipofectamine 2000 将退火的 MV-siRNA 分子(每孔终浓度 7.5nM)和含有 MV-siRNA 克隆或 shRNA 对照的 pSUPER 载体转染至 293 细胞,其组成型表达 GFP。转染之后 24 小时,通过流式细胞仪测量 GFP 荧光。

[0213] 一个实验的结果在以下表 3 中给出并总结于图 7A 中。在图 7A 中,与 shRNA 对照(该图中被称为“siRNA”)相比,MV-siRNA long 1 和 long 11 克隆显示显著增强阻抑 GFP 活性。

[0214] 表 3

[0215]

孔	转染的：	平均荧光	% GFP
阳性 shRNA	shRNA	330	66%
	shRNA	302	60%
合成的：	MV-siRNA	305	61%
克隆：	MV-siRNA short TI	360	72%
	MV-siRNA long TI	218	43%
	MV-siRNA long TII	245	49%
阴性	空白	502	100%
	非-GFP 293 细胞	0.5	0%

[0216] 图 7B 给出与 shRNA 克隆（该图中被称为“siRNA”）相比，合成的 MV-siRNA GFP 1 复合物显示增强阻抑 GFP 活性的实验结果。然而，当一条链用 DNA 取代时，对于 MV-siRNA GFP 1 复合物的阻抑活性稍微减小，如对于合成的 MV-siRNA GFP 1 DNA 复合物所示。

[0217] 定向 GFP 的示例性合成的 MV-siRNA 还可以如以下表 4 设计，其中 T1. A-C 的 3 个寡核苷酸可以如以上所述退火。同样地，T2. A-C 的 3 个寡核苷酸可以如以上所述退火。

[0218] 表 4 示例性合成的 siRNA 组 T1 和 T2

[0219]

名称	序列	SEQ ID NO：
T1. A	CUGCUGGUAGUGGUCGCGGUU	25
T1. B	CGCCGACUUCGUGACGUGCUU	26
T1. C	GCACGUCGCCGUCCAGCAGUU	27
T2. A	GUUGCCGUCGUCCUUGAAGUU	28
T2. B	CUUCAAGUGGAACUACGGCUU	29
T2. C	GCCGUAGGUAGGCGGCAACUU	30

[0220] 定向 GFP 的 MV-siRNA 克隆还可以如以下表 5 设计。如上所述，这些序列可以克隆至 pSuper 载体或任何其他载体系统。

[0221] 表 5 示例性 MV-siRNA 克隆

[0222]

名称	序列	SEQ ID NO:
T1_转录本	CGCCGACUUCGUGACGUGCUUGUGCACGUCGCCGUCCA GCAGUUGUCUGCUGGUAGUGGUCGGCGUU	31
T1	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTGCACGTGCGC CGTCCAGCAGTTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGTTTTTTT A	32
T1_as	AGCTTAAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGACAACCTG CTGGACGGCGACGTGCACAAGCACGTACGAAGTCGGC GGGG	33
T1_long 转录本	<u>CGCCGACUUCGUGACGUGCUUGUAGGUGGCAUCGCAG</u> <u>AAGCGAUGCCACCUACAAGCACGUCGCCGUCCAGCAGU</u> <u>UGUAGGUGGCAUCGCAGAAGCGAUGCCACCUACAACU</u> <u>GCUGGUAGUGGUCGGCGUU</u>	34
T1_long	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTAGGTGGCAT CGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGCACGTGCGCGTCCA GCAGTTGTAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACA ACTGCTGGTAGTGGTCGGCGTTTTTA	35
T1_long_as	AGCTTAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGTTGTAGGTGG CATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAACCTGCTGGACGGCG ACGTGCTTGTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTA CAAGCACGTACGAAGTCGGCGGGG	36
T2_转录本	CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUGCCGUAGGUAGGCG GCAACUUGUGUUGCCGUCGUCCUUGAAGUU	37
T2	GATCCCCGGATCCGACATCCACGTTCTTCAAGAGAGAAC	38

[0223]

	GTGGATGTCGGATCCTTTTAA	
T2_as	AGCTTAAAAAGGATCCGACATCCACGTTCTCTCTTGAAG AACGTGGATGTCGGATCCGGG	39
T2_long 转录本	CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUAGGUGGCAUCGCAG AAGCGAUGCCACCUACAAGCCGUAGGUAGGCGGCAACU UGUAGGUGGCAUCGCAGAAGCGAUGCCACCUACAAGU UGCCGUCGUCCUUGAAGUU	40
T2_long	GATCCCCCTTCAAGTGGAACCTACGGCTTGTAGGTGGCAT CGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGCCGTAGGTAGGCGG CAACTGTAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACA AGTTGCCGTCGTCCTTGAAGTTTAA	41
T2_long_as	AGCTTAAAAACTTCAAGGACGACGGCAACTTGTAGGTG GCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAAGTTGCCGCCTAC CTACGGCTTGTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCT ACAAGCCGTAGTTCCACTTGAAGGGG	42

[0224] 实施例 2

[0225] TRIVOID 抗 -HIV

[0226] 可以设计多价 siRNA 对抗无关位点处的多基因。在本实施例中, 测试克隆的 MV-siRNA 对抗 HIV。这些结果显示对抗 HIV 的 Gag 和 Tat (hv_sB) 基因的二价 MV-siRNA 分子比单独定向对抗 Gag (hv_s) 的 siRNA 显著更有效地抑制 HIV 复制。

[0227] 依照制造商指南, 将表 6 中给出的寡核苷酸克隆至 pSUPER. neo+gfp 载体。hv_s 仅靶定 Gag, 而 hv_sB 靶定 Gag 和 Tat。

[0228] 表 6 抗 -HIV MV-siRNA 克隆

[0229]

名称	序列	SEQ ID NO:
hv_s	GATCCCCGTGAAGGGGAACCAAGAGATTgaTCTCTTGTTAAT ATCAGCTTgaGCTGATATTTCTCCTTCACCTTTTAA	43

[0230]

hv_s_as	AGCTTAAAAAGTGAAGGAGAAATATCAGCTCAAGCTGATAT TAACAAGAGATCAATCTCTTGGTTCCCCTTCACGGG	44
hv_sB	GATCCCCCAAGCAGTTTTAGGCTGACgTTaGTCAGCCTCATTTG ACACAGgTTaCTGTGTCAGCTGCTGCTTGTTTTTTTTA	45
hv_sB_As	AGCTTAAAAAACAAGCAGCAGCTGACACAGTAACCTGTGT CAATGAGGCTGACTAACGTCAGCCTAAAACTGCTTGGGG	46

[0231] 将编码 MV-siRNA 克隆的载体构建体转染至细胞,并且用具有 1.0 的 MOI 的 HIV-1 (pNL4.3 菌株) 感染后 10 天和 40 天进行分析。图 9 给出转染后 10 天,由靶定 Gag 和 Tat 的 MV-siRNA 抑制 HIV 复制比由仅靶定 Gag 的 siRNA 分子抑制更强约 3 倍。

[0232] 可以将多价 siRNA 设计成靶定 1、2 或 3 个不同的 HIV 基因。图 10 提供了示例性 HIV 基因组序列。图 11 提供了 env 基因序列,图 12A 提供了 gag 基因,以及图 12B 提供了 tat 基因。通常可以如下由它们的核苷酸序列范围定义和靶定 HIV 的各种基因或区: 5' LTR:1-181;GAG:336-1838;POL:1631-4642;VIF:4587/4662-5165;VPR:5105-5395(包括 5157、5266 和 5297 处突变);TAT:5376-7966;REV:5515-8195;VPU:5607-5852;ENV:5767-8337;NEF:8339-8959;以及 3' LTR:8628-9263。基于这些靶基因,以下表 7 提供了 HIV 的示例性 MV-RNA 寡核苷酸序列。

[0233] 表 7 示例性三价 MV-siRNA 序列

[0234]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO:
1	GCCUCCCUUGUGGAAGGUU	1649	47
2	CCUCCCUUGUGGAAGGCUU	1648	48
3	GCCUCCCUUGUGGAAGGCUU	1648	49
4	UUCUGCACCUUACCUCUUAUU	6259	50

[0235]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO:
5	UAAGAGGAAGUAUGCUGUUUU	4062	51
6	AACAGCAGUUGUUGCAGAAUU	5291	52
7	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
8	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53

9	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
10	CUCCAGGCUCAGAUUGGUU	16	54
11	CCAGAUUCCCUAAAAAUU	1630	55
12	UUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
13	UGGGUCCCUAGUUAGCCAUU	40	57
14	UGGCUAAGAUACAGCUGUU	8585	58
15	CAGCUGUCCCAAGAACCAUU	7325	59
16	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
17	AUUGUGUCACUCCUUCAGUU	6988	61
18	CUGAAGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	62
19	UCCUGUGUCAGCUGCUGUUU	685	63

[0236]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
20	AGCAGCAUUGUUAGCUGUUU	8481	64
21	AGCAGCUUUUAUACACAGGAU	9046	65
22	ACCAACAAGGUUUCUGUCAUU	1284	66
23	UGACAGAUCAAUUACUACUU	6573	67
24	GUAGUAAUUAUCUGUUGGUUU	6311	68
25	CUGAGGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	69
26	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
27	AUUGUGUCACUCCUCAGUU	6988	61
28	CAAAGCUAGAUGAAUUGCUUU	3534	70

29	AGCAAUUGGUACAAGCAGUUU	5432	71
30	ACUGCUUGUUAGAGCUUUGUU	2952	72
31	AGGUCAGGGUCUACUUGUGUU	4872	73
32	CACAAGUGCUGAUUUUCUUU	5779	74
33	AGAAUAAUUGUCUGACCUUU	7384	75
34	CUAAGUUAUGGAGCCAUAUUU	5212	76

[0237]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
35	AUAUGGCCUGAUGUACCAUUU	758	77
36	AUGGUACUUCUGAACUUAGUU	4736	78
37	UGGCUCCAUUUCUUGCUCUUU	5365	79
38	AGAGCAACCCAAAUCCCUU	7544	80
39	GGGGAUUUAGGGGGAGCCAUU	4191	81
40	AUCUCCACAAGUGCUGAUUU	5784	82
41	UAUCAGCAGUUCUUGAAGUUU	8942	83
42	ACUUCAAAUGUUGGAGAUUU	8158	84
43	AGACUGUGACCCACAAUUUUU	5862	85
44	AAAUUGUGGAUGAAUACUGUU	4310	86
45	CAGUAAUUGUCUACAGUCUUU	499	87
46	ACAGGCCUGUGUAAUGACUUU	6362	88
47	AGUCAUUGGUCUUAAGGUUU	8559	89
48	ACUUUAGGACAGGCCUGUUU	6371	90
49	UCAGUGUAAUUGACCCUUUU	6973	91

[0238]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
50	AAGGGUCUGAGGGAUCUCUUU	135	92
51	AGAGAUCUUUCCACACUGAUU	158	93
52	CAUAGUGCUUCCUGCUGCUUU	7337	94
53	AGCAGCAUUGUAGCUGCUUU	8481	95
54	AGCAGCUAACAGCACUAUGUU	8190	96
55	GCUGCUUAUAUGCAGGAUCUU	9044	97
56	GAUCCUGUCUGAAGGGAUGUU	531	98
57	CAUCCUGUUAAAAGCAGCUU	7118	99
58	UGGUCUAACCAGAGAGACCUU	9081	100
59	GGUCUCUUUUAACAUUUGCUU	928	101
60	GCAAAUGUUUUCUAGACCAUU	7557	102
61	CUCCAGGCUCAGAUUCUGGUU	9097	103
62	CCAGAUUUUUUUAAAAAUU	1630	55
63	UUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
64	UGGGUUCUUAGUUAGCCAUU	9121	104

[0239]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
65	UGGCUAAGAUUACAGCUGUU	8585	58
66	CAGCUGUCCCAAGAACCAUU	7325	59

[0240] 为由以上表 7 的序列制备靶定 HIV 的 MV-siRNA 复合物, 可以将独立的寡核苷酸如下组合和退火: 1) MV-siRNA_1649/1648/1648; 退火序列 1&2 和 3。2) MV-siRNA_6259/4062/5291; 退火序列 4&5 和 6。3) MV-siRNA_7387/7387/7387; 退火序列

7&8 和 9。4)MV-siRNA_16/1630/701 1;退火序列 10&11 和 12。5)MV-siRNA_40/8585/7325;退火序列 13&14 和 15。6)MV-siRNA_591/6988/1785;退火序列 16&17 和 18。7)MV-siRNA_685/8481/9046;退火序列 19&20 和 21。8)MV-siRNAJ 284/6573/6311;退火序列 21&22 和 23。9)MV-siRNA_1785/591/6988;退火序列 24&25 和 26。10)MV-siRNA_3534/5432/2952;退火序列 27&28 和 29。11)MV-siRNA_4872/5779/7384;退火序列 30&31 和 32。12)MV-siRNA_5212/758/4736;退火序列 33&34 和 35。13)MV-siRNA_5365/7544/4191;退火序列 36&37 和 38。14)MV-siRNA_5784/8942/8158;退火序列 39&40 和 41。15)MV-siRNA_5862/4310/499;退火序列 42&43 和 44。16)MV-siRNA_6362/8559/6371;退火序列 45&46 和 47。17)MV-siRNA_6973/135/158;退火序列 48&49 和 50。18)MV-siRNA_7337/8481/8190;退火序列 51&52 和 53。19)MV-siRNA_9044/531/7118;退火序列 54&55 和 56;20)MV-siRNA_9081/928/7557;退火序列 57&58 和 59。21)MV-siRNA_9097/1630/7011;退火序列 60&61 和 62。22)MV-siRNA_9121/8585/7325;退火序列 63&64 和 65。

[0241] 实施例 3

[0242] TRIVOID 抗 -ApoB

[0243] 通过靶定单基因的 2-3 个位置,可以将多价 siRNA 设计为阻抑大基因。MV-siRNA 还可以使用可选择的 RNA 化学物质来提高退火过程中的 Tm。在本实施例中,如以下表 8 所示,设计一系列 MV-siRNA 来靶定载脂蛋白 B(ApoB) 基因,并且括号内显示存在的任选 2'-O 甲基 RNA 亚单位。

[0244] 表 8ApoB 的三价 MV-siRNA

[0245]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
1	(UGGAACU)UUCAGCUUCAUAAU	ApoB@268	105
2	(UAUGAAG)GCACCAUGAUGUUU	ApoB@9905	106
3	(ACAUCAU)CUUCC(AGUUGCA)UU	ApoB@1703	107
4	(ACUCUUC)AGAGUUCUUGGUUU	ApoB@448	108
5	(ACCAAGA)CCUUGGAGACACUU	ApoB@2288	109
6	(GUGUCUC)AGUUG(GAAGAGU)UU	ApoB@6609	110
7	(ACCUGGA)CAUGGCAGCUGCUU	ApoB@469	111
8	(GCAGCUG)CAAACUCUUCAGUU	ApoB@458	112
9	(CUGAAGA)CGUAU(UCCAGGU)UU	ApoB@12263	113
10	(CAGGGUA)AAGAACAUUUGUU	ApoB@520	114

11	(CAAAUUG)CUGUAGACAUUUUU	ApoB@4182	115
12	(AAAUGUC)CAGCG(UACCCUG)UU	ApoB@12548	116
13	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB@279	117
14	(AAGUUC)AAUAACUUUCCAUUU	ApoB@9161	118

[0246]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
15	(AUGGAAA)AGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB@9968	119
16	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUUU	ApoB@278	120
17	(AAAGUUC)CAAUAACUUUCCAUUU	ApoB@9161	121
18	(AUGGAAA)AUGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB@9968	122

[0247] 为由以上表 8 的序列制备合成的 MV-siRNA 三价复合物, 可以将独立的寡核苷酸如以下组合和退火: 1) MV-siRNA_268/9950/1703; 退火序列 1&2, 然后 3。2) MV-siRNA_448/2288/6609; 退火序列 4&5, 然后 6。3) MV-siRNA_469/458/12263; 退火序列 7&8, 然后 9。4) MV-siRNA_520/4182/12548; 退火序列 10&11, 然后 12。5) MV-siRNA_279/9161/9986; 退火序列 13&14; 然后 15。6) MV-siRNA_278/9161/9986; 退火序列 16&17, 然后 18。

[0248] 设计具有有效一级和二级链的多价 siRNA 还可以使用摆动或通用碱基来完成靶互补, 或平端 DNA 来失活沉默任何靶的链。以下表 9 给出涉及 ApoB 的示例性寡核苷酸, 其中 (*) 表示任选的摆动或通用碱基。

[0249] 表 9 ApoB 的示例性二价 MV-siRNA

[0250]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
19	UGAAUCGAGUUGCAUCUUUUU	ApoB@223	123
20	AAAGAUGCUGCUCAUCACAUU	ApoB@883	124
21	UGUGAUGACACUCGAUUCAUU	ApoB@10116 (G/A 对)	125

22	U *UGAU*ACACUCGAUUCAUU	ApoB@10116 (通用碱基)	126
23	TGTGATGACACTCGATTCA	无效 @10116	127
24	CAGCUUGAGUUCGUACCUGUU	ApoB@483	128

[0251]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
25	CAGGUACAGAGAACUCCAAUU	ApoB@11596	129
26	UUGGAGUCUGACCAAGCUGUU	ApoB@2454	130
27	UUGGAGUCUGAC*AAGCU*UU	ApoB@2454	131
28	TTGGAGTCTGACCAAGCTG	无效 @2454	132

[0252] 为由以上表 9 的序列制备合成的 MV-siRNA 二价复合物, 可以将独立的寡核苷酸如以下组合和退火: 7a) MV-siRNA_223/883/10116); 退火序列 19、20 和 21。7b) MV-siRNA_223/883/10116*) ; 退火序列 19、20 和 22。7c) MV-siRNA_223/883/ 无效); 退火序列 19、20 和 23。8a) MV-siRNA_483/11596/2454); 退火序列 24、25 和 26。8b) MV-siRNA_483/11596/2454*) ; 退火序列 24、25 和 26。8c) MV-siRNA_483/11596/ 无效); 退火序列 24、25 和 26。

[0253] 通过靶定单基因的 2-3 个位置, 还可以将多价 -siRNA 设计为阻抑大基因。如以上所述, 瞬时 MV-siRNA 的某些实施方案还可以使用可选择的 RNA 化学物质来提高退火过程中的 T_m。在以下表 10 中, 括号内显示任选的 2'-O 甲基 RNA 2'-氟碱基。其他可选择的碱基例子中, 如果期望的话, 5-甲基还可以增加 MV-siRNA 结构的 T_m。

[0254] 表 10ApoB 的示例性三价 MV-siRNA

[0255]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO :
1	UGG (AA) CUUCAGCUUCAUUAU	ApoB@268	105
2	U (AU) GAAGGCACCAUGAUGUUU	ApoB@9905	106
3	(ACAUCAU) CUUCCAGUCCAUU	ApoB@1703	107
4	AC (U) CUUCAGAGUUCUUGUUU	ApoB@448	108

[0256]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO.
5	(ACCAAGA)CCUUGGAGACACUU	ApoB @ 2288	109
6	G(U)GUCUCAGUUGGAAGAGUUU	ApoB @ 6609	110
7	(ACCUGGA)CAUGGCAGCUGCUU	ApoB @ 469	111
8	GC(A)GCUGCAAACUCUUCAGUU	ApoB @ 458	112
9	(CUGAAGA)CGUAU(UCCAGGU)UU	ApoB @ 12263	113
10	(CAGGGUA)AAGAACAAUUUGUU	ApoB @ 520	114
11	(CAAAUU)GCUGUAGACA(UUU)UU	ApoB @ 4182	115
12	(AAAUGUC)CAGCGUACCCUGUU	ApoB @ 12548	116
13	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB @ 279	117
14	(AAGUUC)AAUAACUUUCCAUUU	ApoB @ 9161	118
15	(AU)GGAAAAGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB @ 9968	119
16	CCC(U)GGACACCGCUGG(AACUUU)UU	ApoB @ 278	120
17	(AAA)GUUCCAAUAACUU(UU)CC(AU)UU	ApoB @ 9161	121
18	(AUGGAAA)AUGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB @ 9968	122
19	UCAGGGCCGCUCUGUAUUUUU	ApoB @ 6427	133
20	AAAUACAUUUCUGGAAGAGUU	ApoB @ 8144	134
21	CUCUUCCAAAAAGCCCUGAUU	ApoB @ 12831	135
22	AAAUACAUUUCUGGAAGAGuu&CUCUUCCAAAA AGCCCUGAuu&UCAGGGCCGCUCUGUAUUUuu	退火之后用于剪切的接头结构，“&”-PC Spacer 或亚磷酸胺键	136

[0257] 为由以上表 10 中的序列制备合成的 MV-siRNA 二价复合物, 可以将独立的寡核苷酸如以下组合和退火: 1) MV-siRNA_{268/9950/1703}; 退火序列 1&2, 然后 3。2)

MV-siRNA_448/2288/6609; 退火序列 4&5, 然后 6。3)MV-siRNA_469/458/12263; 退火序列 7&8, 然后 9。4)MV-siRNA_520/4182/12548; 退火序列 10&11, 然后 12。5)MV-siRNA_279/9161/9986; 退火序列 13&14, 然后 15。6)MV-siRNA_278/9161/9986; 退火序列 16&17, 然后 18。7)MV-siRNA_6427/8144/12831; 退火序列 19&20, 然后 21。7b)MV-siRNA_6427/8144/12831; 退火链 22, 然后剪切磷酸酯和氢氧化铵的连接。7b)MV-siRNA_6427/8144/12831; 退火链 22, 然后用 300-350nm 光谱范围的 UV 光剪切 PCspacer。

[0258] 在某些实施方案中,设计具有有效一级和二级链的多价-siRNA 可以使用摆动、间隔区或无碱基的 (abasic) 碱基类型 (例子在以下表 11 显示为 (*)) 来完成靶互补,或平端 DNA 来失活沉默任何靶的链。在一些实施方案中,UNA、亚磷酸胺接头、rSpacer、5- 硝基吡啶可以用作为有效的无碱基的碱基取代错配的核苷酸。若期望,使用无碱基的碱基可导致减小 T_m 和 / 或围绕无碱基位点的嘧啶可利用 2'- 氟碱基按每个 2'- 氟碱基提高 T_m 约 2 度。

[0259] 表 11 靶定 ApoB 的示例性 MV-siRNA

[0260]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO:
23	UGAAUCGAGUUGCAUCUUUUU	ApoB @ 223	123
24	AAAGAUGCUGCUCAUCACAUU	ApoB @ 883	124
25	UGUGAUGACACUCGAUUCAUU	ApoB @ 10116 (G/A 对)	125
26	U*UGAU*ACACUCGAUUCAUU	ApoB @ 10116 (* rSPACER 碱基)	126
27	TGTGATGACACTCGATTCA	无效 @ 10116	127

[0261]

No.	序列	靶基因	SEQ ID NO.
28	CAGCUUGAGUUCGUACCUGUU	ApoB @ 483	128
29	CAGGUACAGAGAACUCCAAUU	ApoB @ 11596	129
30	UUGGAGUCUGACCAAGCUGUU	ApoB @ 2454	130
31	UUGGAGUCUGAC*AAGCU*UU	ApoB @ 2454 (* 无碱基的碱基)	131
32	TTGGAGTCTGACCAAGCTG	无效 @ 2454	132
33	AACCCACUUUCAAAUUUCCUU	ApoB @ 9244	137
34	GGAAAUUGAGAAUUCUCCAUI	ApoB @ 1958	138
35	UGGAGAAUCUCAGUGGGUUUU	ApoB @ 8005	139
36	rUrGrGfA-fArArUrCrUrCrA-fUrGrGrG-f UrUrU	ApoB @ 8005	140
37	GAUGAUGAAACAGUGGGUUUU	ApoB @ 10439	141
38	AACCCACUUUCAAAUUUCCUU	ApoB @ 9244	137
39	GGAAAUUGGAGACAUCAUCUU	ApoB @ 2284	142
40	-rGfAfAfArUrUrGrGrArGrArCfA-rCfArU rCrUrU	ApoB @ 2284	143
41	GCAAACUCUUCAGAGUUCUUU	ApoB @ 452	144
42	AGAACUCCAAGGGUGGGAUUU	ApoB @ 11588	145
43	AUCCACUUUCAAGUUUGCUU	ApoB @ 9244	146
44	fA-rCrCrCrArCrUrUrUrCrAfA-fUrUrU-r C	ApoB @ 9244	147

[0262] 为由以上表 11 的序列制备合成的 MV-siRNA 二价复合物, 可以将独立的寡核苷酸如以下组合和退火: 7a) MV-siRNA_{223/883/10116}; 退火序列 23、24 和 25。7b)

MV-siRNA_223/883/10116*) ;退火序列 23、24 和 26。7c)MV-siRNA_223/883/ 无效) ;退火序列 23、24 和 27。8a)MV-siRNA_483/11596/2454) 退火序列 28、29 和 30。8b)MV-siRNA_483/11596/2454*) ;退火序列 28、29 和 31。8c)MV-siRNA_483/11596/ 无效) ;退火序列 28、29 和 32。9)MV-siRNA_9244/1958/8005) ;退火序列 33、34 和 35。9b)MV-siRNA_9244/1958/8005) ;退火序列 33、34 和 36。10)MV-siRNAJ 0439/9244/2284) ;退火序列 37、38 和 39。10b)MV-siRNAJ 0439/9244/2284) ;退火序列 37、38 和 40。11)MV-siRNA_452/1 1588/9244) ;退火序列 41、42 和 43。11b)MV-siRNA_452/1 1588/9244) ;退火序列 41、42 和 44。

[0263] 如以上表 12 示例,多价 siRNA 可以靶定对抗人 ApoB。二价 MV-siRNA 可以具有对各链结构和靶互补性的各种耐受功能。

[0264] 表 12 示例性靶定人 ApoB 的多价 -siRNA

[0265]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
1	CUUCAUCACUGAGGCCUCUUU	1192	148
2	AGAGGCCAAGCUCUGCAUUUU	5140	149
3	AAUGCAGAUGAAGAUGAAGAA	10229	150
4	UUCAGCCUGCAUGUUGGCCUUU	2724	151
5	AGCCAACUAUACUUGGAUCUU	13294	152
6	GAUCCAAAAGCAGGCUGAAGA	4960	153
7	CCCUCAUCUGAGAAUCUGGUU	8927	154

[0266]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
8	CCAGAUUCAUAAACCAAGUUU	9044	155
9	ACUUGGUGGCCAUGAGGGUU	3440	156
10	UCAAGAAUCCUUCAGCCUU	9595	157
11	GGCUUGAAGCGAUCACACUUU	758	158
12	AGUGUGAACGUAUUCUUGAUU	4367	159

13	UUGCAGUUGAUCCUGGUGGUU	344	160
14	CCACCAGGUAGGUGACCACUU	1354	161
15	GUGGUCAGGAGAACUGCAAUU	2483	162
16	CCUCCAGCUCAACCUUGCAUU	358	163
17	UGCAAGGUCUCAAAAAUGUU	6341	164
18	CAUUUUUGAUCUCUGGAGGUU	4043	165
19	CAGGAUGUAAGUAGGUUCAUU	570	166
20	UGAACCUUAGCAACAGUGUUU	5687	167
21	ACACUGUGCCCACAUCUGUU	9109	168
22	GGCUUGAAGCGAUCACACUUU	758	169

[0267]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
23	AGUGUGAACGUUUCUUGUUU	4367	170
24	ACAAGAAUUCUUAAGCCUU	9595	171
25	UGAAGAGAUUAGCUCUCUGUU	1153	172
26	CAGAGAGGCCAAGCUCUGCUU	5143	173
27	GCAGAGCUGGCUCUCUUCAUU	10304	174
28	CUCAGUAACCAGCUUAUUGUU	1170	175
29	CAUAAGAUUUUAACAAAUU	7084	176
30	UUUGUUAUCUUAUACUGAGUU	9650	177
31	GAACCAAGGCUUGUAAAGUU U	1258	178
32	ACUUUACAAAAGCAACAAUUU	6286	179

33	AUUGUUGUAAAUUGGUUCUU	6078	180
34	CAGGUAGGUGACCACAUCUUU	1350	181
35	AGAUGUGACUGCUUCAUCAU	1203	182
36	UGAUGAACUGCGCUACCUGUU	8486	183
37	CCAGUCGCUUAUCUCCCGGUU	1786	184

[0268]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
38	CCGGGAGCAAUGACUCCAGUU	2678	185
39	CUGGAGUCAUGGCGACUGGUU	2486	186
40	UGGAAGAGAAAACAGAUUGUU	2046	187
41	CAAAUCUUUAUCAGCUUCUU	2403	188
42	GAAGCUGCCUCUUCUCCAUI	12299	189
43	AUCCAAAGGCAGUGAGGGUUU	2152	190
44	ACCCUCAACUCAGUUUUGAUU	12242	191
45	UCAAACCGGAUUUGGAUUU	3316	192
46	UAGAGACACCAUCAGGAACUU	2302	193
47	GUUCCUGGAGAGUCUCAAUI	1102	194
48	UUGAAGAAUAGGUCUCUAUI	1153	195
49	GCUCAUGUUUAUCAUCUUUUU	2350	196
50	AAAGAUGCUGAACUAAAGUU	7622	197
51	CUUUAAGGGCAACAUGAGCUU	2863	198
52	GGAGCAAUGACUCCAGAUGUU	2675	199

[0269]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
53	CAUCUGGGGAUCCCCUGCUU	2544	200
54	GCAGGGGAGGUGUUGCUCUU	912	201
55	UCACAAACUCCACAGACACUU	2761	202
56	GUGUCUGCUUUUAUAGCUUGUU	5672	203
57	CAAGCUAAAGGAUUUGUGAUU	9683	204
58	GCAGCUUGACUGGUCUCUUUU	2914	205
59	AAGAGACUCUGAACUGCCCU U	4588	206
60	GGGCAGUGAUGGAAGCUGCUU	8494	207
61	CAGGACUGCCUGUUCUCAAUU	2996	208
62	UUGAGAACUUCUAAUUUGGUU	8522	209
63	CCAAAUUUGAAAAGUCCUGUU	9855	210
64	UGUAGGCCUCAGUCCAGCUU	3132	211
65	GCUGGAAUUCUGGUAUGUGUU	8335	212
66	CACAUACCGAAUGCCUACAUU	9926	213
67	GACUUCACUGGACAAGGUCUU	3300	214

[0270]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ IE NO :
68	GACCUUGAAGUUGAAAAUGUU	5301	215
69	CAUUUUCUGCACUGAAGUCUU	11983	216

70	AAGCAGUUUGGCAGGCGACUU	3549	217
71	GUCGCCUUGUGAGCACCACUU	5039	218
72	GUGGUGCCACUGACUGCUUUU	12521	219
73	CAGAUGAGUCCAUUUGGAGUU	3568	220
74	CUCCAAACAGUGCCAUGCCUU	9142	221
75	GGCAUGGAGCCUUCACUGUU	3256	222
76	CACAGACUUGAAGUGGAGGUU	4086	223
77	CCUCCACUGAGCAGCUUGAUU	2924	224
78	UCAAGCUUCAAGUCUGUGUU	974	225
79	AUGGCAGAUGGAAUCCACUU	4102	226
80	GUGGGAUCCUCCGUUUUUU	2971	227
81	AAAACGGUUCUCUGCCAUUU	12836	228
82	UGAUACAACUUGGGAUUGGUU	4148	229

[0271]

No.	序列	ApoB 基因位点	SEQ ID NO :
83	CCAUUCCCUAUGUCAGCAUUU	2971	230
84	AUGCUGACAAAUGUAUCAUU	12836	231

[0272] 为由以上表 12 的序列制备合成的 MV-siRNA 二价复合物, 可以将独立的寡核苷酸如下组合和退火: MV-siRNA; 退火序列 1、2 和 3。MV-siRNA; 退火序列 4、5 和 6。MV-siRNA; 退火序列 7、8 和 9。MV-siRNA; 退火序列 10、11 和 12。MV-siRNA; 退火序列 13、14 和 15。MV-siRNA; 退火序列 16、17 和 18。MV-siRNA; 退火序列 19、20 和 21。MV-siRNA; 退火序列 22、23 和 24。MV-siRNA; 退火序列 25、26 和 27。MV-siRNA; 退火序列 28、29 和 30。MV-siRNA; 退火序列 31、32 和 33。MV-siRNA; 退火序列 34、35 和 36。MV-siRNA; 退火序列 37、38 和 39。MV-siRNA; 退火序列 40、41 和 42。MV-siRNA; 退火序列 43、44 和 45。MV-siRNA; 退火序列 46、47 和 48。MV-siRNA; 退火序列 49、50 和 51。MV-siRNA; 退火序列 52、53 和 54。MV-siRNA; 退火序列 55、56 和 57。MV-siRNA; 退火序列 58、59 和 60。MV-siRNA; 退火序列 61、62 和 63。MV-siRNA; 退火序列 64、65 和 66。MV-siRNA; 退火序列 67、68 和 69。MV-siRNA; 退火序列 70、71 和 72。MV-siRNA; 退火序列 73、74 和 75。MV-siRNA; 退火序列 76、77 和 78。

MV-siRNA ;退火序列 79、80 和 81。MV-siRNA ;退火序列 82、83 和 84。

[0273] 可以将定向 ApoB 的 MV-siRNA 用于治疗或管理各种广泛的与靶蛋白表达相关的疾病或病症,如本文所述和本领域内已知。

[0274] 参考文献:

[0275] 1.Fire, A. , Xu, S. , Montgomery, M. K. , Kostas, S. A. , Driver, S. E. , and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 408,325-330.

[0276] 2. Kennerdell, J. R. , and Carthew, R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the *wingless* pathway. *Cell*. 95,1017-1026.

[0277] 3. Misquitta, L. , and Paterson, B. M. (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference(RNA-i) :a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96,1451-1456.

[0278] 4. Hammond, S. M. , Bernstein, E. , Beach, D. , and Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404,293-296.

[0279] 5. Lohmann, J. U. , Endl, I. , and Bosch, T. C. (1999) Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev. Biol*. 214,211-214.

[0280] 6. Wargelius, A. , Ellingsen, S. , and Fjose, A. (1999) Double stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 263,156-161.

[0281] 7. Ngo, H. , Tschudi, C, Gull, K. , and Ullu, E. (1998) Double stranded RNA induces gene degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95. 14687-14692.

[0282] 8. Montgomery, M. K. , Xu, S. , Fire, A. (1998) RNA as a target of double stranded RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95,15502-15507.

[0283] 9. Boshier, J. M. , Dufourcq, P. , Sookhareea, S. , Labouesse, M. (1999) RNA interference can target pre-gene. Consequences for gene expression in *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics*. 153,1245-1256.

[0284] 10. Fire, A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*. 15,358-363.

[0285] 11. Sharp, P. A. (1999) RNAi and double-stranded RNA. *Genes Dev*. 13,139-141.

[0286] 12. Ketting, R. F. , Harerkamp, T. H. , van Luenen, H. G. , and Plasterk, R. H. (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase H. *Cell*. 99, 133-141.

[0287] 13. Tabara, H. , Sarkissian, M. , Kelly, W. G. , Fleenor, J. , Grishok, A. , Timmons, L. , Fire, A. , and Mello, C. C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 99,123-132.

- [0288] 14. Zamore, P. D. , Tuschl, T. , Sharp, P. A. , and Bartel, D. P. (2000) RNAi :Double stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of gene at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101,25-33.
- [0289] 15. Bernstein, E. , Caudy, A. A. , Hammond, S. M. , and Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409, 363-366.
- [0290] 16. Elbashir, S. , Lendeckel, W. , and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. *Genes and Dev*. 15,188-200.
- [0291] 17. Sharp, P. A. (2001) RNA interference 2001. *Genes and Dev*. 15,485-490.
- [0292] 18. Hunter, T. , Hunt, T. , and Jackson, R. J. (1975) The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem*. 250,409-417.
- [0293] 19. Bass, B. L. (2001) The short answer. *Nature*. 411,428-429.
- [0294] 20. Elbashir, S. M. , Harborth, J. , Lendeckel, W. , Yalcin, A. , Weber, K. , and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411,494-498.
- [0295] 21. Carson, P. E. and Fhscher, H. (1966) Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose phosphate pathway. *Am J Med*. 41, 744-764.
- [0296] 22. Stamato, T. D. , Mackenzie, L. , Pagani, J. M. , and Weinstein, R. (1982) Mutagen treatment of single Chinese Hamster Ovary cells produce colonies mosaic for Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Somatic Cell Genetics*. 8, 643-651.
- [0297] 23. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Vaccine. 2004, Dec 6 ;22 Suppl 1 :S5-8. [Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, and Baba T].
- [0298] 24. A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. [EMBO J. 2001].
- [0299] 25. Solution structure of conserved AGNN tetraloops :insights into RNase IMp RNA processing. [EMBO J. 2001].
- [0300] 26. Review The RNase III family :a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. [Curr Issues Mol Biol. 2001]
- [0301] 27. Sequence dependence of substrate recognition and cleavage by yeast RNase III. [J Mol Biol. 2003]
- [0302] 28. Noncatalytic assembly of hbonuclease III with double-stranded RNA. [Structure. 2004]
- [0303] 29. Intermediate states of ribonuclease III in complex with double-stranded RNA. [Structure. 2005]
- [0304] 30. Review Structural basis for non-catalytic and catalytic activities of

ribonuclease III. [Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006]

[0305] 31. Review Ribonuclease revisited : structural insights into ribonuclease III family enzymes. [Curr Opin Struct Biol. 2007]

[0306] 32. Short RNA guides cleavage by eukaryotic RNase III. [PLoS ONE. 2007 May 30 ;2(5) :e472.]

[0307] 33. A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. [Mol Microbiol. 2008]

[0308] 34. Review : The mechanism of RNase III action : how dicer dices. [Curr Top Microbiol Immunol. 2008].

[0001]

序列表

<110> 光环生物干扰疗法公司
托德·郝瑟尔

<120> 用于多价RNA干扰的多核苷酸、组合物及其使用方法

<130> 270038.405PC

<140> PCT

<141> 2010-06-01

<150> US 61/183,011

<151> 2009-06-01

<160> 231

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 14119

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

```

ucccaccggg accugcgggg cugagugccc uucucgguug cugccgcuga ggagcccgcc 60
cagccagcca gggccgcgag gccgaggcca ggccgcagcc caggagccgc cccaccgcag 120
cuggcgauug acccgccgag gcccgcgcug cuggcgcguc ugccgcugcc ugcgcugcug 180
cugcugcugc ugccggggcgc caggggccgaa gaggaauugc uggaauaugc cagccugguc 240
uguccaaaag augcgacccg auucaagcac cuccggaagu acacauacaa cuaugaggcu 300
gagaguucca guggaguccc ugggacugcu gauucaagaa gugccaccag gaucaacugc 360
aagguugagc uggagguucc ccagcucugc agcuucaucc ugaagaccag ccagugcacc 420
cugaaaagagg uguauggcuu caaccucgag ggcaaagccu ugcugaagaa aaccaagaac 480
ucugagguuu uccuuuaccc ggagaaagau gaaccuacuu acauccugaa caucaagagg 540
aagcagguuu uccuuuaccc ggagaaagau gaaccuacuu acauccugaa caucaagagg 600
ggcaucauuu cugcccuccu gguuccccca gagacagaag aagccaagca aguguuguuu 660
cuggauaccg uguauggaaa cugcuccacu cacuuuaccg ucaagacgag gaagggcaau 720
guggcaacag aaauauccac ugaaagagac cuggggcgau gugaucgcuu caagcccauc 780
cgcacaggca ucagcccacu ugcucucauc aaaggcauga cccgccccuu gucaacucug 840
aucagcagca gccaguccug ucaguacaca cuggacgcuu agaggaagca uguggcagaa 900
gccaucugca aggagcaaca ccucuuccug ccuuucuccu acaacaauaa gnaugggaug 960
guagcacaag ugacacagac uuugaaacuu gaagacacac caaagaauaa cagccgcuuc 1020
uuuggugaag guacuaagaa gaugggccuc gcauuugaga gcaccaaau cacaucaccu 1080
ccaaagcagg ccgaagcugu uuugaagacu cuccaggaac ugaaaaaacu aaccaucucu 1140
gagcaaaaau uccagagagc uauucucuuc aaauagcugg uuacugagcu gagaggccuc 1200
agugaugaag cagucacauc ucucuugcca cagcugauug agguguccag ccccaucacu 1260
uuacaagccu ugguucagug uggacagccu cagugcucca cucacauccu ccaguggcug 1320
aaacgugugc augccaaccc ccuucugaua gaugugguca ccuaccuggu ggcccugauc 1380
cccgagcccu cagcacagca gcugcgagag auuuucaaca ugccgaggga ucagcgagc 1440
cgagccaccu uguaugcgcu gagccacgcg gucaacaacu aucauaagac aaaccuaca 1500
gggaccagcagg agcugcugga cauugcuauu uaccugaugg aacagauuca agaagacugc 1560
acuggggauug aagauuacac cuauuugauu cugcggguca uuggaaauau gggccaaacc 1620
auggagcagu uaacuccaga acucaagucu ucaauccuca aaugugucca aaguacaaag 1680
ccaucacuga ugauccagaa agcugccauc caggcucugc ggaaaugga gccuaaagac 1740
aaggaccagg agguucuuu ucagacuuc cuugaugaug cuucuccggg agauaagcga 1800
cuggcugccu aucuuauuu gaugaggagu ccuucacagg cagaauuuaa caaaauuguc 1860

```

[0002]

caaaauucac	caugggaaca	gaaugagcaa	gugaagaacu	uuguggcuuc	ccauauugcc	1920
aaauaucuuga	acucagaaga	auuggauauc	caagaucuga	aaaaguuagu	gaaagaagcu	1980
cugaaagaau	cucaacuucc	aacugucaug	gacuucagaa	aaucucucg	gaacuaucua	2040
cucuacaaau	cuguuucucu	uccaucacuu	gacccagccu	cagccaaaau	agaagggaau	2100
cuuauauuug	auccaaauaa	cuaccuuccu	aaagaaagca	ugcugaaaac	uaccucacu	2160
gccuuuggau	uugcuucagc	ugaccucauc	gagauuggcu	uggaaggaaa	aggcuuugag	2220
ccaacauugg	aagcucuuiu	ugggaagcaa	ggauuuuucc	cagacagugu	caacaaagcu	2280
uuguacuggg	uuauugguca	aguuccugau	ggugucucua	aggucuuaug	ggaccacuuu	2340
ggcuauacca	aagaugauaa	acaugagcag	gauaugguua	auggaauaau	gcucaguguu	2400
gagaagcuga	uuaaagauuu	gaaauccaaa	gaagucccg	aagccagagc	cuaccuccgc	2460
aucuuggggag	aggagcuugg	uuuugccagu	cuccaugacc	uccagcuccu	gggaaagcug	2520
cuucugaugg	gugcccgcac	ucugcagggg	aucucccaga	ugauuggaga	ggucaucagg	2580
aagggcucua	agaauagacu	uuuucuuac	uacaucuuca	uggagaaugc	cuuugaacuc	2640
cccacuggag	cuggauuaca	guugcaauua	ucuucaucug	gagucuuugc	uccgggagcc	2700
aaggcuggag	uaaaacugga	aguagccaac	augcaggcug	aacugggugc	aaaaccucc	2760
gugucugugg	aguuuugugac	aaauauuggg	aucaucauuc	cggacuucgc	uaggaguggg	2820
guccagauga	acaccaacuu	cuuccacgag	ucgggucugg	aggcucaugu	ugcccuaaaa	2880
gcugggaagc	ugaaguuuau	cauuccuucc	ccaaagagac	cagucaagcu	gcucagugga	2940
ggcaacacau	uacauuuggu	cucuaccacc	aaaacggagg	ugaucccacc	ucucauugag	3000
aacaggcagu	ccuggucagu	uugcaagcaa	gucuuuccug	gccugaauua	cugcaccuca	3060
ggcgcuuacu	ccaacgccag	cuccacagac	uccgccuccu	acuauccgcu	gaccggggac	3120
accagauuag	agcuggaacu	gaggccuaca	ggagagauug	agcaguauuc	ugucagcgca	3180
accuauagag	uccagagaga	ggacagagcc	uugguggaua	cccugaaguu	uguaacucua	3240
gcagaaggug	cgaagcagac	ugaggcuacc	augcaauuca	aaauaaucg	gcagaguaug	3300
accuugucca	gugaagucca	aaauccggau	uuugauguug	accucggaac	aauccucaga	3360
guuaugaug	aaucuaucga	gggcaaaacg	ucuuacagac	ucaccugga	cauucagaac	3420
aagaaaauuu	cugaggucgc	ccucaugggc	caccuaaguu	gugacacaaa	ggaagaaaga	3480
aaaaucaagg	guguuauuuc	cauaccccg	uugcaagcag	aagccagaag	ugagaucuc	3540
gccacuggu	cgccugccaa	acugcuucuc	caaauaggcu	caucugcuac	agcuuauggc	3600
uccacaguuu	ccaagagggu	ggcauggcau	uaugaugaag	agaagauuga	auuugaugg	3660
aacacaggca	ccaauuga	uacaaaaaa	augacuucca	auuuccugu	ggaucucucc	3720
gauuauccua	agagcuugca	uauguaugcu	aaauagacucc	uggaucacag	aguccugaa	3780
acagacauga	cuuuccggca	cguggguucc	aaauuaauag	uugcaaugag	cucauggcuu	3840
cagaaggcau	cugggagucu	uccuuauacc	cagacuungc	aagaccaccu	caauagccug	3900
aaggaguuca	accuccagaa	caugggauug	ccagacuucc	acauccaga	aaaccucuc	3960
uuaaaaagcg	auggccgggu	caaauauacc	uugaacaaga	acaguuuuga	aaauagauu	4020
ccuugccuu	uugguggcaa	auccuccaga	gaucuaaaga	uguuagagac	uguuaggaca	4080
ccagcccucc	acuucaguc	ugugggauuc	caucugccau	cucgagaguu	ccaagucccu	4140
acuuuuacca	uucccaaguu	guaucaacug	caagugccuc	uccugggugu	ucuagaccuc	4200
uccacgaug	ucuacagcaa	cuuguacaac	ugguccgcu	ccuacagugg	uggcaacacc	4260
agcacagacc	auuucagccu	ucgggcucgu	uaccacauga	aggcugacuc	ugugguugac	4320
cugcuuuccu	acaauugca	aggauucgga	gaaacaacau	augaccacaa	gaauacguuc	4380
acacuaucua	gugauggguc	ucuacgccac	aaauuucuag	auucgaauau	caauuucagu	4440
cauguagaaa	aacuuggaaa	caaccaguc	ucaaaagguu	uacuaauau	cgaugcaucu	4500
aguuccuggg	gaccacagau	gucugcuuca	guucauuugg	acuccaaaaa	gaaacagcau	4560
uuguuuugca	aagaagucua	gauugauggg	caguucagag	ucucuucguu	cuaugcuaaa	4620
ggcacauaug	gccugucuug	ucagagggau	ccuaacacug	gccggcucaa	uggagagucc	4680
aaccugaggu	uuacuccuc	cuaccuccaa	ggcaccacac	agauaacagg	aagauaugaa	4740
gauggaacc	ucuccucac	cuccaccucu	gaucugcaaa	guggcaucau	uaaaaauacu	4800
gcuucccuua	aguauagaa	cuacgagcug	acuuuaaaa	cugacaccaa	ugggaaguau	4860
aagaacuuug	ccacuucuaa	caagauggau	augaccuucu	cuaagcaaaa	ugcacugcug	4920
cguucugaau	aucaggcuga	uuacgaguca	uugagguucu	ucagccugcu	uucuggauca	4980
cuaaaaucc	auggucuuga	guuaaaugcu	gacauuuuag	gcacugacaa	aauuauagu	5040
ggugcucaca	aggcgacacu	aaggauuggc	caagauggaa	uaucuaccag	ugcaacgacc	5100
aacuugaagu	guagucuccu	ggugcuggag	aaugagcuga	augcagagcu	uggccucucu	5160
ggggcaucua	ugaaauaac	acaaauggc	cgcuucaggg	aacacaugc	aaaauucagu	5220
cuggauggga	aagccgccc	cacagagcu	ucacugggaa	gugcuuauca	ggccaugauu	5280

[0003]

cugggugucg	acagcaaaaa	cauuuuaac	uuaagguca	gucaagaagg	acuuuagcuc	5340
ucaaauagaca	ugaugggcuc	auaugcugaa	augaaauuug	accacacaaa	cagucugaac	5400
auugcaggcu	uauacugga	cuucucuua	aaacuugaca	acauuuacag	cucugacaag	5460
uuuuauaagc	aaacuguuua	uuuacagcua	cagcccuauu	cucugguaac	uacuuuaaac	5520
agugaccuga	aaauacaugc	ucuggaucuc	accaacaauug	ggaaacuacg	gcuagaaccc	5580
cugaagcugc	auguggcugg	uaaccuaaaa	ggagccuacc	aaaauaaua	aaauaaaacac	5640
aucuaugcc	ucucuucugc	ugccuuauca	gcaagcuaua	aagcagacac	uguugcuuag	5700
guucagggug	uggaguuuag	ccaucggcuc	aacacagaca	ucgucgggcu	ggcuucagcc	5760
auugacaua	gcacaaacua	uaauucagac	ucacugcauu	ucagcaauug	cuuccguucu	5820
gaauggccc	cguuuaccu	gaccaucgau	gcacauacaa	auggcauug	gaaacucgcu	5880
cucuggggag	aacauacug	gcagcugua	agcaauuucc	uguugaaagc	agaaccucug	5940
gcauuuacuu	ucucucauga	uuacaaaggc	uccacaaguc	aucaucucgu	gucuaggaaa	6000
agcaucagug	cagcucuuga	acacaaaguc	agugcccugc	uuacuccagc	ugagcagaca	6060
ggcaccugga	aacucaagac	ccaauuuuac	aacaugaau	acagccagga	cuuggaugcu	6120
uacaacacua	aagauaaaau	uggcguggag	cuuacuggac	gaacucuggc	ugaccuaacu	6180
cuacuagacu	ccccauuuua	agugccacuu	uuacucagug	agcccaucaa	uaucauugau	6240
gcuuuagaga	ugagagaugc	cguugagaag	ccccagaau	uuacaauugu	ugcuuuugua	6300
aaguauaau	aaaaccaaga	uguucacucc	auuaaccucc	cauuuuuuga	gaccuugcaa	6360
gaauauuuug	agaggauucg	acaaaccuuu	auaguuguag	uggaaaacgu	acagagaaac	6420
cugaagcaca	ucaauuuuga	ucauuuugua	agaaaauaca	gagcagcccu	gggaaaacuc	6480
ccacagcaag	cuaaugauua	ucugaauuca	uucaauuggg	agagacaagu	uucacaugcc	6540
aaggagaaac	ugacugcucu	cacaaaaaag	uauagaauua	cagaaaauga	uauacaaaau	6600
gcauuagaug	augccaaaau	caacuuaauu	gaaaaacuau	cucaacugca	gacauauaug	6660
auacaauuuu	aucaguauau	uaaagauagu	uagauuuuac	augauuuuga	aaugcuauu	6720
gcuauuuua	uugaugaaa	cauugaaaaa	uuaaaaaguc	uugaugagca	cuaucauau	6780
cguguaaaau	uaguaaaaaa	aauccaugau	cuacauuuug	uuauugaaaa	uauugauuuu	6840
aacaaaagug	gaaguaguac	ugcauccugg	auucaaaaug	uggauacuaa	guaccaaauc	6900
agaauccaga	uacaagaaaa	acugcagcag	cuuaagagac	acauacagaa	uauagacau	6960
cagcaccuag	cuggaaaguu	aaaacaacac	auugaggcuu	uugauguuag	agugcuuuua	7020
gaucaauugg	gaacuacaau	uucauuugaa	agaauaaaug	auguucuuga	gcaugucaaa	7080
cacuauugua	uaaaucuuau	uggggauuuu	gaaguagcug	agaaaauca	ugccuucaga	7140
gccaaagucc	augaguuaau	cgagagguau	gaaguagacc	aacaaaacca	gguuuuaaug	7200
gauaaaauuag	uagaguugac	ccaccaauac	aaguugaagg	agacuauuca	gaagcuuagc	7260
aauguccuac	aacaaguuaa	gauaaaagau	uacuugaga	aauggguugg	auuuauugau	7320
gaugcuguga	agaagcuuaa	ugaauuaucu	uuuaaaaacu	ucauugaaga	uguuaacaaa	7380
uuccuugaca	uguugauaaa	gaaauuaaag	ucauuugauu	accaccaguu	uguagaugaa	7440
accaaugaca	aaauccguga	ggugacucag	agacucaau	gugaaauuca	ggcucuggaa	7500
cuaccacaaa	aagcugaagc	auuaaaacug	uuuuuagagg	aaaccaaggc	cacaguugca	7560
guguauucug	aaagccuaca	ggacacccaa	auaaccuuua	ucaucaauug	guuacaggag	7620
gcuuuuaguu	cagcaucuuu	ggcucacaug	aaggccaaau	uccgagagac	ucuagaagau	7680
acacgagacc	gaauuguauca	aauggacauu	cagcaggaa	uucaacgaua	ccugucucug	7740
guaggccagg	uuuauagcac	acuugucacc	uacauuuucg	auugggugac	ucuugcugcu	7800
agaaccuua	cugacuugc	agagcaauau	ucuauccaag	auugggcuaa	acguaugaaa	7860
gcauugguag	agcaaggguu	cacuguuccu	gaaaucaaga	ccauccuugg	gaccaugccu	7920
gccuuugaag	ucagucuua	ggcucuucag	aaagcuaccu	uccagacacc	ugauuuuuaa	7980
guccccuua	cagauuuag	gauuccauca	guucagauaa	acuucaaaaga	cuuaaaaaau	8040
auaaaaaucc	cauccagguu	uuccacacca	gaauuuacca	uccuuaacac	cuuccacauu	8100
ccuuccuuua	caauugacu	ugucgaaaag	aaaguuuaga	ucaucagaa	cauugaccag	8160
augcagaaca	gugagcugca	guggcccguu	ccagauauau	aucucaggga	ucugaaggug	8220
gaggacaau	cucuagcgag	aaucaccug	ccagacuucc	guuuaccaga	aaucgcauuu	8280
ccagaauuca	uaaucccaac	ucucaaccuu	aaugauuuuc	aaguuccuga	ccuucacaua	8340
ccagaauucc	agcuucccca	caucucacac	acaauugaag	uaccuacuuu	uggcaagcuu	8400
uacaguauuc	ugaaaaacca	aucuccucuu	uucacauuag	augcaauugc	ugacauaggg	8460
aauggaacca	ccucagcaaa	cgaagcaggu	aucgcagcuu	ccaucacugc	caaaggagag	8520
uccaaauuag	aaguucucua	uuuugauuuu	caagcaauug	cacaacucuc	aaaccuuaag	8580
auuaauccgc	uggcucugaa	ggagucagug	aaguucucca	gcaaguaccu	gagaacggag	8640
caugggagug	aaauugcuuu	uuuuggaaau	gcuauugagg	gaaaaucaa	cacaguggca	8700

[0004]

aguuuacaca	cagaaaaaaa	uacacugggag	cuuaguaaug	gagugauugu	caagauaaac	8760
aaucagcuua	cccuggauag	caacacuaaa	uacuuuccaca	aaugaacau	ccccaaacug	8820
gacuucucua	gucaggcuga	ccugcgcaac	gagaucaaga	cacuguuuga	agcuggccac	8880
auagcaugga	cuucuuucugg	aaaaggguca	uggaaauggg	ccugccccag	auucucagau	8940
gagggaacac	augaaucaca	aauuaguuuc	accauagaag	gacccucac	uuccuuugga	9000
cuguccaaua	agaucaauag	caaacaccua	agaguaaacc	aaaacuuggu	uuauagaau	9060
ggcuccuua	acuuuuucuaa	acuuuagaaau	caaucacaag	ucgauuucca	gcaugugggc	9120
cacaguguuc	uaacugcuua	aggcauggca	cuguuuggag	aagggaaggc	agaguuuacu	9180
gggaggcaug	augcucuuuu	aaauggaaag	guuauuggaa	cuuugaaaaa	uucucuuuuc	9240
uuuucagccc	agccauuuuga	gaucacggca	uccacaaaca	augaaggga	uuugaaaguu	9300
cguuuuccau	uaaggguuac	agggaagaua	gacuuccuga	auaacuaugc	acuguuucug	9360
agucccagug	cccagcaagc	aaguuaggcaa	guaagugcua	gguucaauca	guauaaguac	9420
aaccaaaauu	ucucugcugg	aaacaacgag	aacauuauug	aggcccagug	aggauuaau	9480
ggagaagcaa	aucuggauuu	cuuaaacauu	ccuuuaacaa	uuccugaaau	gcgucuaaccu	9540
uacacaauaa	ucacaacucc	uccacugaaa	gauuuucucuc	uaugggaaaa	aacaggcuug	9600
aaggaauiuu	ugaaaaacgac	aaagcaauca	uuugauuuuaa	guguaaaagc	ucaguaauag	9660
aaaaacaaac	acaggcauuc	caucacaaaau	ccuuuuggcug	ugcuuuguga	guuuaucagu	9720
cagagcauca	aauccuuuga	caggcauuuu	gaaaaaaaaca	gaaacaaugc	auuagauiuu	9780
gucaccaauu	ccuauaauga	aacaaaaauu	aaguuuugaua	aguacaaagc	ugaaaaauuc	9840
cacgacgagc	uccccaggac	cuuucaaaau	ccuggauaca	cuguuccagu	ugucaauguu	9900
gaagugucuc	cauucaccau	agagaugucg	gcauucggcu	auguguuccc	aaaagcaguc	9960
agcaugccua	guuuucuccau	ccuagguuuc	gacguccgug	ugccuucua	cacauuauc	10020
cugccaucuu	uagagcugcc	aguccuucuu	gucccuagaa	aucucaagcu	uucucuucca	10080
cauuucaagg	aauguguiac	cauaagccau	auuuuuauuc	cugccauggg	cauuuuuacc	10140
uaugauuuuu	ccuuuaaauc	aaugugucac	acacugaaau	ccaaugcuga	acuuuuuaac	10200
cagucagaua	uuugugcuca	ucuccuuuu	ucaucuucau	cugucuuuga	ugcacugcag	10260
uacaaauuag	agggcaccac	aagauugaca	agaaaaaggg	gauugaaguu	agccacagcu	10320
cugucucuga	gcaacaaauu	uguggagggu	agucuaaaca	guacugugag	cuuaaccacg	10380
aaaaauuagg	aagugucagu	ggcaaaaacc	acaaaagccg	aaauuccaau	uuugagaau	10440
aauuucaagc	aagaacuuua	uggaaauacc	aagucaaaac	cuacugucuc	uuccuccaug	10500
gaauuuuagu	augauuucaa	uuuuucaau	cuguacucua	ccgcuaaagg	agcaguugac	10560
cacaagcuua	gcuuggaaag	ccucaccucu	uacuuuuucca	uuagucuauc	uaccaaagga	10620
gaugucaagg	guucgguuuc	uuucgggaa	uaauucaggaa	cuauugcuag	ugaggccaac	10680
acuuacuuga	auuccaagag	cacacggucu	ucagugaagc	ugcagggcac	uuccaaaauu	10740
gaugauauuu	ggaaccuuuga	aguuaaaagaa	aaauuuugcug	gagaagccac	acuccaacgc	10800
auauauuucc	ucuggggagca	caguacgaaa	aaccacuua	agcuagaggg	ccucuuuuuc	10860
accaacggag	aacauacaag	caaagccacc	cuggaaccucu	cuccauggca	aaugucagcu	10920
cuuguuucagg	uccaugcaag	ucagcccagu	uccuuuccaug	auuuucccuga	ccuuggccag	10980
gaaguggccc	ugaaugcuaa	cacuaagaac	cagaagauca	gauggaaaaa	ugaaguccgg	11040
auucauuucug	ggucuuuucca	gagccagguc	gagcuuuucca	augaccaaga	aaaggcacac	11100
cuugacauug	caggauccuu	agaaggacac	cuuaggguucc	ucaaaaaauu	cauccuacca	11160
gucuaugaca	agagcuuaug	ggauuuuccua	aaugcuggau	uaaccaccag	cauugguagg	11220
agacagcauc	uucguguuuc	aacugccuuu	guuacacca	aaaaccccaa	uggcuauuca	11280
uucuccaucc	cuguaaaagu	uuuggcugau	aaauucauuu	cuccugggcu	gaaacuuaau	11340
gaucuaaaau	caguucuuugu	caugccuacg	uuuccaugucc	cauuuacaga	ucuuucagguu	11400
ccaucgugca	aacuuugacu	cagagaaaua	caaaucuaau	agaagcuag	aacuuucaua	11460
uuugcccuca	accuaccaac	acuccccgag	guaaaaauucc	cugaaguuga	uguguuaaca	11520
aaauauuuc	aaccagaaga	cuccuuugauu	ccuuuuuuug	agauaaccgu	gccugaauuc	11580
caguuaacug	ugucccaguu	cacgcuucca	aaaaguguuu	cagauggcau	ugcugcuuug	11640
gaucuaaaug	caguagccaa	caagaucgca	gacuuugagu	ugcccaccu	caucgugccu	11700
gagcagacca	uuagauuucc	cuccauuaag	uucucuguac	cugcuggaau	ugucauuuccu	11760
uccuuucaag	cacugacugc	acgcuuugag	guagacucuc	ccguguauaa	ugccacuugg	11820
agugccaguu	ugaaaaacaa	agcagauiuu	guuagaaacag	uccuggauuc	cacaugcagc	11880
ucaaccguac	aguuccuaga	auuagaaucua	aauguuuuug	gaacacacaa	aaucgaagau	11940
gguacguuag	ccucuaagac	uaaagggaaca	cuugcacacc	guagauucag	ugcagaauau	12000
gaagaagaug	gcaaauiuga	aggacuucag	gaaugggaag	gaaaagcgca	ccucaauauc	12060
aaaagcccag	cguucaccga	ucuccaucug	cgcuaaccaga	aagacaagaa	aggcaucucc	12120

[0005]

accucagcag	ccuccccagc	cguaggcacc	gugggcaugg	auauggauga	agaugacgac	12180
uuuucuaaa	ggaacuucua	cuacagcccu	caguccucuc	cagauaaaa	acucaccuaa	12240
uucaaaacug	aguugagggg	ccgggaauc	gauaggga	cucagaucaa	aguuaauugg	12300
gaagaagagg	cagcuucugg	cuugcuuacc	ucucugaaag	acaacgugcc	caaggccaca	12360
gggguccuuu	augauuaugu	caacaaguac	cacuggggaac	acacagggcu	caccucgaga	12420
gaagugucuu	caaagcugag	aagaaaucug	cagaacaauug	cugagugggu	uuaucaagg	12480
gccauuaggc	aaauugauga	uaucgacgug	agguuccaga	aagcagccag	uggcaccacu	12540
gggaccuacc	aagaguggaa	ggacaaggcc	cagaauucugu	accaggaacu	guugacucag	12600
gaaggccaag	ccaguuucca	gggacucaag	gauaacgugu	uugauggcuu	gguacgaguu	12660
acucaaaaau	uccauaugaa	agucaaagcau	cugauugacu	cacucauuga	uuuucugaac	12720
uuccccagau	uccaguuucc	ggggaaaccu	gggauauaca	cuaggaggga	acuuugcacu	12780
auguucuuua	gggagguagg	gacgguacug	ucccagguau	auucgaaagu	ccauaauggu	12840
ucagaaaauac	uguuuuccua	uuuccaagac	cuagugauua	cacuuccuuu	cgaguuaagg	12900
aaacauaaac	uaauagauugu	aaucucgaug	uauagggaac	uguugaaaga	uuuaucaaaa	12960
gaagcccaag	agguauuuua	agccauucag	ucucucaaga	ccacagaggu	gcuacguauu	13020
cuucaggacc	uuuuacaauu	cauuuuucca	cuauuagaag	auaacauuaa	acagcugaaa	13080
gagaugaaau	uuacuuaucu	uauuaauua	auccaagaug	agaucacac	aaucuucaau	13140
gauuauaucc	cauauuuuu	uaauuuugu	aaagaaaacc	uaugccuuua	ucuucauag	13200
uucagaauu	uuauucaaaa	cgagcuucag	gaagcuucuc	aagaguuaca	gcagauccau	13260
caauacauua	uggcccuucg	ugaagaauau	uuugauccaa	guauaguugg	cuggacagug	13320
aaauauuaug	aacuugaaga	aaagauaguc	agucugauca	agaaccuguu	aguugcucu	13380
aaggacuucc	auucugaaua	uauugucagu	gccucuaacu	uuacuuccca	acucucaagu	13440
caaguugagc	aaauucugca	cagaaaauuu	caggaauauc	uuagcauccu	uaccgaucca	13500
gauggaaaaag	ggaaagagaa	gauugcagag	cuuucugcca	cugcucagga	aaauuuuaaa	13560
agccaggcca	uugcgacgaa	gaaaauuaau	ucugauuacc	accagcaguu	uagauuuuaa	13620
cugcaagauu	uuucagacca	acucucugau	uacuauaaga	aauuuauugc	ugaauccaaa	13680
agauugauug	accuguccau	ucaaaacuac	cacacauuuc	ugauauacau	cacggaguuu	13740
cugaaaaagc	ugcaaucaac	cacagucaug	aaccccuaca	ugaagcuugc	uccaggagaa	13800
cuuacuauca	uccucuaauu	uuuuuuuaga	aaucuucauu	uauucuuucu	uuccaaauuga	13860
acuuucacau	agcacagaaa	aaauucaaac	ugccuauuuu	gauaaaacca	uacagugagc	13920
cagccuugca	guaggcagua	gacuauaagc	agaagcacau	augaacugga	ccugcaccaa	13980
agcuggcacc	agggcucgga	aggucucuga	acucagaagg	auggcauuuu	uugcaaguua	14040
aagaaaauca	ggauucugagu	uauuuuugcua	aacuuggggg	aggaggaaca	aaauaaugga	14100
gucuuuauug	uguaucaua					14119

<210> 2

<211> 1503

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 2

atgggtgcga	gagcgtcagt	attaagcggg	ggagaattag	atcgatggga	aaaaattcgg	60
ttaaggccag	ggggaaagaa	aaaatataaa	ttaaaacata	tagtatgggc	aagcaggggag	120
ctagaacgat	tcgcagttaa	tcctggcctg	ttagaaacat	cagaaggctg	tagacaaata	180
ctgggacagc	tacaaccatc	ccttcagaca	ggatcagaag	aacttagatc	attatataat	240
acagtagcaa	ccctctattg	tgtgcatcaa	aggatagaga	taaaagacac	caagggaagt	300
ttagacaaga	tagaggaaga	gcaaaaacaa	agtaagaaaa	aagcacagca	agcagcagct	360
gacacaggac	acagcaatca	ggtcagccaa	aattacccta	tagtgcagaa	catccagggg	420
caaatggtag	atcaggccat	atcacctaga	actttaaatg	catgggtaaa	agtagtagaa	480
gagaaggctt	tcagcccaga	agtgataccc	atgttttcag	cattatcaga	aggagccacc	540
ccacaagatt	taaacaccat	gctaaacaca	gtggggggac	atcaagcagc	catgcaaatg	600
ttaaaagaga	ccatcaatga	ggaagctgca	gaatgggata	gagtgcaccc	agtgcacgca	660
gggcctattg	caccaggcca	galgagagaa	ccaaggggaa	gtgacatagc	aggaactact	720
agtacccttc	aggaacaaat	aggatggatg	acaaataatc	cacctatccc	agtaggagaa	780
atttataaaa	gatggataat	cctgggatta	aataaaatag	taagaatgta	tagccctacc	840

[0006]

agcattcttg	acataagaca	aggaccaaag	gaacccttta	gagactatgt	agaccggttc	900
tataaaactc	taagagccga	gcaagcttca	caggaggtaa	aaaattggat	gacagaaacc	960
ttgttggtcc	aaaatgcgaa	cccagattgt	aagactatgt	taaaagcatt	gggaccagcg	1020
gctacactag	aagaaatgat	gacagcatgt	caggagtag	gaggaccg	ccataaggca	1080
agagtttttg	ctgaagcaat	gagccaagta	acaaattcag	ctaccataat	gatgcagaga	1140
ggcaatttta	ggaaccaaag	aaagattgtt	aagtgtttca	attgtggcaa	agaagggcac	1200
acagccagaa	attgcagggc	ccctagggaa	aagggtgtt	ggaaatgttg	aaaggaagga	1260
caccaaata	aagattgtac	tgagagacag	gctaattttt	tagggaagat	ctggccttcc	1320
tacaaggga	ggccaggga	ttttcttcag	agcagaccag	agccaacagc	cccaccagaa	1380
gagagcttca	ggtctgggt	agagacaaca	actccccctc	agaagcagga	gccgatagac	1440
aaggaactgt	atcctttaac	ttccctcagg	tcactctttg	gcaacgacct	ctcgtcacia	1500
ttaa						1503

<210> 3

<211> 261

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 3

atggagccag	tagatcctag	actagagccc	tggaagcatc	caggaagtca	gcctaaaact	60
gcttgtagca	attgctattg	taaaaagtgt	tgclttcatt	gccaagtttg	tttcataaca	120
aaagccttag	gcctctccta	tggcaggaag	aagcggagac	agcgacgaag	agctcatcag	180
aacagtcaga	ctcatcaagc	ttctctatca	aagcaacca	cctcccaacc	ccgaggggac	240
ccgacaggcc	cgaaggaata	g				261

<210> 4

<211> 2571

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 4

atgagagtga	aggagaaata	tcagcacttg	tggagatggg	ggtggagatg	gggcaccatg	60
ctccttggga	tgttgatgat	ctgtagtgt	acagaaaaat	tgtgggtcac	agtctattat	120
ggggtacctg	tgtggaagga	agcaaccacc	actctatgtt	gtgcatcaga	tgctaaagca	180
tatgatacag	aggtacataa	tggttgggcc	acacatgcct	gtgtaccac	agacccaac	240
ccacaagaag	tagtattggg	aaatgtgaca	gaaaatttta	acatgtggaa	aatgacatg	300
gtagaacaga	tgcatgagga	tataatcagt	ttatgggatc	aaagcctaaa	gccatgtgta	360
aaattaaccc	cactctgtgt	tagtttaag	tgcaclgatt	tgaagaatga	tactaatacc	420
aatagtagta	gcgggagaat	gataatggag	aaaggagaga	taaaaaactg	ctctttcaat	480
atcagcacia	gcataagagg	taaggtgcag	aaagaatatg	cattttttta	taaacttgat	540
ataataccaa	tagataatga	tactaccagc	tataagttga	caagttgtaa	cacctcagtc	600
attacacagg	cctgtccaaa	ggtatccttt	gagccaattc	ccatacata	ttgtgccccg	660
gctggttttg	cgattctaaa	atgtaataat	aagacgttca	atggaacagg	accatgtaca	720
aatgtcagca	cagtacaatg	tacacatgga	attaggccag	tagtatcaac	tcaactgctg	780
ttaaatggca	gtctagcaga	agaagaggta	gtaattagat	ctgtcaattt	cacggacaat	840
gctaaaacca	taatagtaca	gctgaacaca	tctgtagaaa	ttaattgtac	aagacccaac	900
aacaatacaa	gaaaaagaat	ccgtatccag	agaggaccag	ggagagcatt	tggtacaata	960
ggaaaaatag	gaaatatgag	acaagcacat	tgtaacatta	gtagagcaaa	atggaataac	1020
acttttaaac	agatagctag	caaattaaga	gaacaatttg	gaaataataa	aacaataatc	1080
tttaagcaat	cctcaggagg	ggaccagaa	attgtaacgc	acagttttta	ttgtggaggg	1140
gaatttttct	actgtaattc	aacacaactg	tttaatagta	cttggtttta	tagtacttgg	1200
agtactgaag	ggtcaaataa	cactgaagga	agtgacacaa	tcaccctccc	atgcagaata	1260
aaacaaatta	taaacatgtg	gcagaaagta	ggaaaagcaa	tgtatgcccc	tcccatcagt	1320
ggacaaatta	gatgttcac	aaatattaca	gggctgctat	taacaagaga	tggttggtaat	1380
agcaacaatg	agtccgagat	cttcagacct	ggaggaggag	atatgaggga	caattggaga	1440
agtgaattat	ataaatataa	agtagtaaaa	attgaacat	taggagtagc	accaccaag	1500
gcaagagaaa	gagtggtgca	gagagaaaaa	agagcagtg	gaataggagc	ttgtttcctt	1560

[0007]

gggttcttgg	gagcagcagg	aagcactatg	ggcgagcct	caatgacgct	gacggtacag	1620
gccagacaat	tattgtctgg	tatagtgcag	cagcagaaca	atttgctgag	ggctattgag	1680
gcgcaacagc	atctgttgca	actcacagtc	tggggcatca	agcagctcca	ggcaagaatc	1740
ctggctgtgg	aaagatacct	aaaggatcaa	cagctcctgg	ggatttgggg	ttgctctgga	1800
aaactcattt	gcaccactgc	tgtgccttgg	aatgctagtt	ggagtaataa	atctctggaa	1860
cagatttgga	atcacacgac	ctggatggag	tgggacagag	aaattaacaa	ttacacaagc	1920
ttaatacact	ccttaattga	agaatcgcaa	aaccagcaag	aaaagaatga	acaagaatta	1980
ttggaattag	ataaatgggc	aagtttgtgg	aattggttta	acataacaaa	ttggctgtgg	2040
tatataaaat	tattcataat	gatagtagga	ggcttggtag	gtttaagaat	agtttttgct	2100
gtactttcta	tagtgaatag	agttaggcag	ggatattcac	cattatcggt	tcagaccac	2160
ctcccaaccc	cgaggggacc	cgacaggccc	gaaggaatag	aagaagaagg	tggagagaga	2220
gacagagaca	gatccattcg	attagtgaac	ggatccttgg	cacttatctg	ggacgatctg	2280
cggagcctgt	gcctcttcag	ctaccaccgc	ttgagagact	tactcttgat	tgtaacgagg	2340
attgtggaac	ttctgggacg	cagggggtgg	gaagccctca	aatattgggtg	gaatctccta	2400
cagtattgga	gtcaggaact	aaagaatagt	gctgttagct	tgctcaatgc	cacagccata	2460
gcagtagctg	aggggacaga	tagggttata	gaagtagtac	aaggagcttg	tagagctatt	2520
cgccacatac	ctagaagaat	aagacagggc	ttggaaagga	ttttgctata	a	2571

<210> 5

<211> 4308

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 5

atgggtgcga	gagcgtcagt	attaagcggg	ggagaattag	atcgalggga	aaaaattcgg	60
ttaaggccag	ggggaaagaa	aaaatataaa	ttaaaccata	tagtatgggc	aagcaggagg	120
ctagaacgat	tgcagttaa	tcttgccctg	ttagaaacat	cagaaggctg	tagacaaata	180
ctgggacagc	tacaaccatc	ccttcagaca	ggatcagaag	aacttagatc	attatataat	240
acagtagcaa	ccctctattg	tgtgcatcaa	aggatagaga	taaaagacac	caaggaagct	300
ttagacaaga	tagaggaaga	gcaaaacaaa	agtaagaaaa	aagcacagca	agcagcagct	360
gacacaggac	acagcaatca	ggtcagccaa	aattacccta	tagtgcagaa	catccagggg	420
caaattgtac	atcaggccat	atcacctaga	actttaaatg	catgggtaaa	agtagtagaa	480
gagaaggctt	tcagcccaga	agtataccc	atgttttcag	cattatcaga	aggagccacc	540
ccacaagatt	taaacaccat	gctaaacaca	gtggggggac	atcaagcagc	catgcaaatg	600
ttaaaagaga	ccatcaatga	ggaagctgca	gaatgggata	gagtgcattc	agtgcattgca	660
gggcctattg	caccaggcca	gatgagagaa	ccaaggggaa	gtgacatagc	aggaactact	720
agtacccttc	aggaacaaat	aggatggatg	acaaataatc	cacctatccc	agtaggagaa	780
atttataaaa	gatggataat	cctgggatta	aataaaatag	taagaatgta	tagccctacc	840
agcattcttg	acataagaca	aggaccaaag	gaacccttta	gagactatgt	agaccggttc	900
tataaaactc	taagagccga	gcaagcttca	caggaggtaa	aaaattggat	gacagaaacc	960
ttgttggtec	aaaatgcgaa	cccagattgt	aagactatct	taaaagcatt	gggaccagcg	1020
gctacactag	aagaaatgat	gacagcatgt	caggagtag	gaggaccg	ccataaggca	1080
agagtttttg	ctgaagcaat	gagccaagta	acaaattcag	ctaccataat	gatgcagaga	1140
ggcaatttta	ggaaccaaag	aaagattgtt	aagtgtttca	attgtggcaa	agaagggcac	1200
acagccagaa	attgcagggc	ccctaggaaa	aagggtgtt	ggaaatgtgg	aaaggaagga	1260
caccaaatga	aagattgtac	tgagagacag	gctaattttt	taagggaaga	tctggccttc	1320
ctacaaggga	aggccaggga	attttcttca	gagcagacca	gagccaacag	cccaccaga	1380
agagagcttc	aggtctgggg	tagagacaac	aactccccct	cagaagcagg	agccgataga	1440
caaggaactg	tatcctttta	ctccctcag	gtcactcttt	ggcaacgacc	cctcgtcaca	1500
ataaagatag	gggggcaact	aaaggaagct	ctattagata	caggagcaga	tgatacagta	1560
ttagaagaaa	tgagtttgcc	aggaagatgg	aaaccaaata	tgataggggg	aattggaggt	1620
tttatcaaa	taagacagta	tgatcagata	ctcatagaaa	tctgtggaca	taaagctata	1680
ggtacagtat	tagtaggacc	tacacctgtc	aacataattg	gaagaaatct	gttgactcag	1740
attggttgca	ctttaaattt	tccattagc	cctattgaga	ctgtaccagt	aaaattaaag	1800
ccaggaatgg	atggcccaaa	agttaaacaa	tggccattga	cagaagaaaa	aataaaagca	1860
ttagtagaaa	ttgtacaga	gatggaaaag	gaagggaaaa	tttcaaaaat	tgggcctgaa	1920
aatccataca	atactccagt	atttgccata	aagaaaaaag	acagtactaa	atggagaaaa	1980

[0008]

ttagtagatt	tcagagaact	taataagaga	actcaagact	tctgggaagt	tcaattagga	2040
ataccacatc	ccgcagggtt	aaaaaagaaa	aatcagtaa	cagtactgga	tgtgggtgat	2100
gcataTTTT	cagttccctt	agatgaagac	ttcaggaagt	atactgcatt	taccatacct	2160
agtataaaca	atgagacacc	agggattaga	tatcagtaca	atgtgcttcc	acagggatgg	2220
aaaggatcac	cagcaatatt	ccaaagtagc	atgacaaaaa	tcttagagcc	ttttagaaaa	2280
caaaatccag	acatagtatt	ctatcaatac	atggatgatt	tgtatgtagg	atctgactta	2340
gaaatagggc	agcatagaac	aaaaatagag	gagctgagac	aacatctgtt	gagggtgggga	2400
cttaccacac	cagacaaaaa	acatcagaaa	gaacctccat	tcctttggat	gggttatgaa	2460
ctccatcctg	ataaatggac	agtacagcct	atagtgtctgc	cagaaaaaga	cagctggact	2520
gtcaatgaca	tacagaagtt	agtggggaaa	ttgaattggg	caagtcagat	ttaccaggg	2580
attaaagtaa	ggcaattatg	taaactcctt	agaggaacca	aagcactaac	agaagtaata	2640
ccactaacag	aagaagcaga	gctagaactg	gcagaaaaca	gagagattct	aaaagaacca	2700
gtacatggag	tgtattatga	cccatcaaaa	gacttaatag	cagaaataca	gaagcagggg	2760
caaggccaat	ggacatatca	aatttatcaa	gagccattta	aaaatctgaa	aacaggaaaa	2820
tatgcaagaa	tgagggtg	ccacactaat	gatgtaaaac	aattaacaga	ggcagtgcaa	2880
aaaataacca	cagaaagcat	agtaatatgg	ggaaagactc	ctaaatttaa	actgcccata	2940
caaaaggaaa	catgggaaac	atgggtggaca	gagtattggc	aagccacctg	gattcctgag	3000
tgggagtttg	ttaatacccc	tcctttagtg	aaattatggt	accagttaga	gaaagaaccc	3060
atagtaggag	cagaaacctt	ctatgtagat	ggggcagcta	acaggagagac	taaattagga	3120
aaagcaggat	atgttactaa	tagaggaaga	caaaaagttg	tcaccctaac	tgacacaaca	3180
aatcagaaga	ctgagttaca	agcaatttat	ctagctttgc	aggattcggg	attagaagta	3240
aacatagtaa	cagactcaca	atatgcatta	ggaatcatic	aagcacaacc	agatcaaaagt	3300
gaatcagagt	tagtcaatca	aataatagag	cagttaataa	aaaaggaaaa	ggtctatctg	3360
gcatgggtac	cagcacacaa	aggaattgga	ggaaatgaac	aagtagataa	attagtcagt	3420
gctggaatca	ggaaagtact	atTTTTtagat	ggaatagata	aggcccaaga	tgaacatgag	3480
aaatatcaca	gtaattggag	agcaatggct	agtgatttta	acctgccacc	tgtagtagca	3540
aaagaaatag	tagccagctg	tgataaatgt	cagctaaaag	gagaagccat	gcatggacaa	3600
gtagactgta	gtccaggaat	atggcaacta	gattgtacac	atttagaagg	aaaagttatc	3660
ctggtagcag	ttcatgtagc	cagtggatat	atagaagcag	aagtattatcc	agcagaaaca	3720
gggcaggaaa	cagcatattt	tcTTTTaaaa	ttagcaggaa	gatggccagt	aaaaacaata	3780
catactgaca	atggcagcaa	tttcaccggt	gctacggtta	gggccgcctg	ttggtgggcg	3840
ggaatcaagc	aggaatttgg	aattccctac	aatccccaaa	gtcaaggagt	agtagaatct	3900
atgaataaag	aattaaagaa	aattatagga	caggtaagag	atcaggctga	acatcttaag	3960
acagcagtac	aaatggcagt	attcatccac	aattTTaaaa	gaaaaggggg	gattgggggg	4020
tacagtgcag	gggaaagaat	agtagacata	atagcaacag	acatacaaac	taaagaatta	4080
caaaaacaaa	ttacaaaaat	tcaaaatttt	cgggtttatt	acagggacag	cagaaatcca	4140
ctttggaaag	gaccagcaaa	gtcctctctg	aaaggtgaag	gggcagtagt	aatacaagat	4200
aatagtgcag	taaaagtagt	gccagaaga	aaagcaaga	tcattaggga	ttatggaaaa	4260
cagatggcag	gtgatgattg	tgtggcaagt	agacaggatg	aggattag		4308

<210> 6

<211> 579

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 6

atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattagaaca	60
tggaaaagtt	tagtaaaaca	ccatatgtat	gtttcaggga	aagctagggg	atggttttat	120
agacatcact	atgaaagccc	tcattccaaga	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	180
gatgctagat	tggtataaac	aacatatttg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	240
ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	300
gaactagcag	accaactaat	tcattctgtat	tactttgact	gtttttcaga	ctctgtctata	360
agaaaggcct	tattaggaca	catagttagc	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	420
aaggtaggat	ctctacaata	cttggcacta	gcagcattaa	taacaccaaa	aaagataaag	480
ccacctttgc	ctagtgttac	gaaactgaca	gaggatagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	540
aagggccaca	gaggagacca	cacaatgaat	ggacactag			579

[0009]

<210> 7
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 7
 atgggtggca agtgggtcaaa aagtagtggtg attggatggc ctactgtaag ggaaagaatg 60
 agacgagctg agccagcagc agataggggtg ggagcagcat ctcgagacct ggaaaaacat 120
 ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct accaatgctg cttgtgcctg gctagaagca 180
 caagaggagg aggagglggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact 240
 tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa agggggggact ggaagggcta 300
 attcactccc aaagaagaca agatatcctt gatctgtgga tctaccacac acaaggctac 360
 ttccctgatt agcagaacta cacaccaggg ccagggggtca gatatccact gaccttttga 420
 tgggtctaca agctagtacc agttgagcca gataagatag aagaggccaa taaaggagag 480
 aacaccagct tgttacaccc tgtgagcctg catgggatgg atgacccgga gagagaagtg 540
 ttagagtga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg tggcccgaga gctgcatccg 600
 gagtacttca agaactgctg a 621

<210> 8
 <211> 721
 <212> RNA
 <213> 维多利亚多管发光水母

<400> 8
 auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60
 ggcgacguua acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120
 ggcaagcuga ccugaaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc 180
 cucgugacca ccugaccua cggcgugcag ugcuuagcc gcuaacccga ccacaugaag 240
 cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc 300
 uucaaggacg acggcaacua caagacccgc gccgagguga aguucgaggg cgacaccucg 360
 gugaaccgca ucgagcugaa gggcaucgac uucaaggagg acggcaacau ccuggggcac 420
 aagcuggagu acaacuacaa cagccacaac gucuauauca uggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcaucaagg ugaacuuaa gaucggccac acaucgagg acggcagcgu gcagcucgcc 540
 gaccacuacc agcagaacac ccccaucggc gacggccccg ugcugcugcc cgacaaccac 600
 uaccugagca ccaguccgc ccugagcaaa gaccccaacg agaagcgcga ucacaugguc 660
 cugcuggagu ucgugaccgc cgccgggauc acucucggca uggacgagcu guacaaguua 720
 a 721

<210> 9
 <211> 9262
 <212> RNA
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 9
 guucucugg uuagaccaga ucugagccug ggagcucucu ggcuacuag ggaacccacu 60
 gcuaaagccu caauaaagcu ugccuugagu gcuaaagua gugugugccc gucuguugug 120
 ugacucuggu aacuagagau ccucagacc cuuuuaguca guguggaaaa ucucuagcag 180
 uggcgcccga acagggacau gaaagcgaaa gggaaaaccag aggagcucuc ucgacgcagg 240
 acucggcuug cugaagcgcg cacggcaaga ggcgaggggc ggcgacuggu gaguacgcca 300
 aaaaauuuga cuagcggagg cuagaaggag agagaugggu gcgagagcgu caguauuaag 360
 cgggggaaaa uuagaucgau gggaaaaaaau ucgguuuagg ccagggggaa agaaaaaua 420
 uaaaauaaaa cauauaguau gggcaagcag ggagcuagaa cgauucgcag uuaauccugg 480
 ccuguuagaa acaucagaag gcuguagaca aaucucggga cagcuacaac caucccuua 540
 gacaggauca gaagaacgua gaucauuua uauuacagua gcaaccucuc auugugugca 600
 ucaaaggaua gagauaaaag acaccaagga agcuuuagac aagauagagg aagagcaaaa 660
 caaaaguuaa aaaaaagcac agcaagcagc agcugacaca ggacacagca gccaggucag 720
 ccaaaaauac ccuauaguc agaacaacca gggggcaauug guacaucagg ccuauacacc 780

[0010]

uagaacuuua	aaugcauggg	uaaaaguagu	agaagagaag	gcuuucagcc	cagaagugau	840
acccauguuu	ucagcauuau	cagaaggagc	caccccacaa	gauuuuaaca	ccaugcuaaa	900
cacagugggg	ggacaucaag	cagccaugca	aauguuaaaa	gagaccauca	augaggaagc	960
ugcagaaugg	gauagagugc	auccagugca	ugcagggccu	auugcaccag	gccagaugag	1020
agaaccaagg	ggaagugaca	uagcaggaac	uacuaguacc	cuucaggaac	aaauaggau	1080
gaugacacau	aauccaccua	ucccaguagg	agaaaucua	aaaagaugga	uaauccuggg	1140
auuaauuaa	auaguaagaa	uguauagccc	uaccagcauu	cuggacauaa	gacaaggacc	1200
aaaggaaccc	uuuagagacu	auguagaccg	auucuuaaaa	acucuaagag	ccgagcaagc	1260
uucacaagag	guaaaaaaau	ggauagacaga	aaccuuguug	guccaaaaug	cgaaccacga	1320
uuuaagacu	auuuuaaaa	cauugggacc	aggagcgaca	cuagaagaaa	ugaugacagc	1380
augucaggga	guggggggac	ccggccauaa	agcaagaguu	uuggcugaag	caaugagcca	1440
aguaacaaa	ccagcuacca	uaaугauaca	gaaaggcaau	uuuaggaacc	aaagaaagac	1500
uguuaagug	uucaauugug	gcaaagaagg	gcacauagcc	aaaaauugca	gggccccuag	1560
gaaaaagggc	uguuggaaa	guggaaaagga	aggacaccaa	augaaaaguu	guacugagag	1620
acaggcuau	uuuuuaggga	agaucuggcc	uucccacaa	ggaaggccag	ggaauuuucu	1680
ucagagcaga	ccagagccaa	cagccccacc	agaagagagc	uucagguuug	gggaagagac	1740
aacaacuccc	ucucagaagc	aggagccgau	agacaaggaa	cuguauccuu	uagcuucccu	1800
cagaucacuc	uuuggcagcg	accccucguc	acaauaaaga	uaggggggca	auuaaaggaa	1860
gcucuauuag	auacaggagc	agaugauaca	guauuagaag	aaaugaauuu	gccaggaaga	1920
uggaaaccaa	aaaугauagg	gggaauugga	gguuuuauca	aaguaagaca	guaugaucag	1980
auacuauag	aaaucugcgg	acauaaaagcu	auagguacag	uauuaguagg	accuacaccu	2040
gucaacauaa	uuggaagaaa	ucuguugacu	cagauuuggcu	gcacuuuaaa	uuuucccauu	2100
aguccuauug	agacuguaac	aguaaaaaua	aagccaggaa	uggauggccc	aaaaguuuaa	2160
caauggccau	ugacagaaga	aaaaauaaaa	gcauuaguag	aaauuuгуac	agaaauggaa	2220
aaggaaggaa	aaauuucaaa	aauugggccu	gaaaauccau	acaauacucc	aguauuuugc	2280
auaaagaaaa	aagacaguac	uaaauggaga	aaauuaguag	auuucagaga	acuuuaauaag	2340
agaacucaag	auuucuggga	aguucaauua	ggaauaccac	auccugcagg	guuaaaacag	2400
aaaaaaucag	uaacaguacu	ggauuggggc	gaugcauauu	uuucaguucc	cuuagauaaa	2460
gacuucagga	aguauacugc	auuuaccaua	ccuaguauaa	acaauгagac	accagggauu	2520
agauaucagu	acaauгugcu	uccacaggga	uggaaaggau	caccagcaau	auuccagugu	2580
agcaugacaa	aaaucuuaga	gccuuuuaga	aaacaaaauc	cagacauagu	caucuaucaa	2640
uacauggau	auuугuauu	aggauucugac	uuagaaaauag	ggcagcauag	aacaaaaaua	2700
gaggaacuga	gacaacaucu	guugaggugg	ggauuuacca	caccagacaa	aaaacaucag	2760
aaagaaccuc	cauuccuuug	gauggguuau	gaacuccauc	cugauaaaug	gacaguacag	2820
ccuauagugc	ugccagaaaa	ggacagcugg	acugucaaug	acauacagaa	auuaguggga	2880
aaauugaauu	gggcaaguca	gauuuauгca	gggauuaaag	uaaggcaauu	auguaaacuu	2940
cuuaggggaa	ccaaagcacu	aacagaagua	guaccacuaa	cagaagaagc	agagcuagaa	3000
cuggcagaaa	acagggagau	ucuaaaagaa	ccguuacaug	gaguguauua	ugacccauca	3060
aaagacuuua	uagcagaaau	acagaagcag	gggcaaggcc	aauggacaua	ucaaaauuuu	3120
caagagccau	uuaaaaaucu	gaaaacagga	aaguaugcaa	gaaugaaggg	ugcccacacu	3180
aaугauгuga	aacaauuaac	agaggcgaua	caaaaaauag	ccacagaaag	cauaguaaua	3240
uggggaaaga	cuccuaaaau	uaaaauaccc	auacaaaagg	aaacauggga	agcauggugg	3300
acagaguauu	ggcaagccac	cuggauuccu	gagugggagu	uugucaauac	cccucccuua	3360
gugaaguauu	gguaccaguu	agagaaagaa	cccuaauuag	gagcagaaac	uuucuaugua	3420
gauggggcag	ccaauaggga	aacuaaaaua	ggaaaagcag	gauauguaac	ugacagagga	3480
agacaaaaag	uugucccccu	aacggacaca	acaaaucaga	agacugagu	acaagcaauu	3540
caucuagcuu	ugcaggauuc	gggauuagaa	guaaacauag	ugacagacuc	acaauaugca	3600
uugggaauca	uucaagcaca	accagauaag	agugaaucag	aguuagucag	ucaaaauaau	3660
gagcaguuaa	uaaaaaagga	aaaagucuac	cuggcauggg	uaccagcaca	caaaggaaau	3720
ggaggaaaug	aacaгуuaga	uaaaauггuc	agugcuggaa	ucaggaaaгу	acuaauuuua	3780
gauggaaauг	auaaggccca	agaagaacau	gagaaaauuc	acaguaauug	gagagcaauг	3840
gcuagugauu	uuaccuacc	accuguagua	gcaaaagaaa	uaguagccag	cugugauaaa	3900
ugucagcuua	aaggggagc	caugcaugga	caaguagacu	guagcccagg	aaauaggcag	3960
cuagauugua	cacauuuaga	aggaaaaguu	aucuugguag	caguucaugu	agccagugga	4020
uauauagaag	cagaaguauu	uccagcagag	acagggcaag	aaacagcaua	cuuccucuua	4080
aaauuagcag	gaagauggcc	aguaaaaaca	guacauacag	acaauгgcag	caauuucacc	4140
aguacuacag	uuaggccgc	cuguuggugg	gcggggauca	agcaggaaau	uggcauuccc	4200

[0011]

uacaaucucc	aaagucaagg	aguaauagaa	ucuaugaaua	aagaauuaaa	gaaaauuaua	4260
ggacagguua	gagaucaggc	ugaacaucuu	aagacagcag	uacaaauggc	aguauucauc	4320
cacaauuuuu	aaagaaaagg	ggggauuggg	ggguacagug	caggggaaag	aauguagac	4380
auaaugcaa	cagacauaca	aacuaaagaa	uuacaaaaac	aaauuacaaa	aaucaaaaau	4440
uuucggguuu	auuacaggga	cagcagagau	ccaguuugga	aaggaccagc	aaagcuccuc	4500
uggaaaggug	aaggggcagu	aguaauacaa	gauaaauagug	acauaaaagu	agugccaaga	4560
agaaaagcaa	agaucaucag	ggauuauugga	aaacagaugg	caggugauga	uuguguggca	4620
aguagacagg	augaggauua	acacauggaa	aagauuagua	aaacaccaua	uguauuuuc	4680
aaggaaagcu	aaggacuggu	uuuauagaca	ucacuaugaa	aguacuaauc	caaaaauaag	4740
uucagaagua	cacauccac	uaggggaugc	uaaaauagua	auaacaacau	auuggggucu	4800
gcuaucagga	gaaagagacu	ggcauuuggg	ucagggaguc	uccauagaau	ggaggaaaaa	4860
gagauauagc	acacaaguag	accugaccu	agcagacca	cuaauucauc	ugcacuuuu	4920
ugauuguuuu	ucagaauucg	cuauaagaaa	uaccauauua	ggacguauag	uuaguccuag	4980
gugugaauau	caagcaggac	auaacaaggu	aggauucua	caguacuugg	cacuagcagc	5040
auuaauaaaa	ccaaaacaga	uaaagccacc	uuugccuagu	guuaggaaac	ugacagagga	5100
cagauggaac	aagccccaga	agaccaaggg	ccacagaggg	agccauacaa	ugaauaggaca	5160
cuagagcuuu	uagaggaacu	uaagagugaa	gcuguuagac	auuuuccuag	gauauggcuc	5220
cauaacuuag	gacaacauau	cuauaagacu	uacggggaua	cuugggcagg	aguggaagcc	5280
auaaauagaa	uucugcaaca	acugcuguuu	auccauuua	gaauugggug	ucgacauagc	5340
agaauaggcg	uuacucgaca	gaggagagca	agaauggag	ccaguagauc	cuagacuaga	5400
gcccuggaag	cauccaggaa	gucagccuaa	aacugcuugu	accaauugcu	auuguaaaaa	5460
guguugcuuu	cauugccaag	uuuguuucau	aacaaaagcc	uuaggcauc	ccuauggcag	5520
gaagaagcgg	agacagcgac	gaagaccucc	ucaaggcagu	cagacucauc	aaguucucuc	5580
aucaaagcag	uaaguaauac	auguaaugca	accuaaaca	auagcauag	uagcauuagu	5640
aguagcaaua	auaaauagcaa	uaguugugug	guccauagua	aucauagaau	auaggaaaau	5700
auuaagacaa	agaaaaauag	acagguuaau	ugauagacua	auagaaagag	cagaagacag	5760
uggcaauagag	agugaaggag	aaauaucagc	acuuguggag	augggggugg	agauggggca	5820
ccaugcuccu	ugggauguug	augaucugua	gugcuacaga	aaaauuggg	gucacaguc	5880
auuauggggg	accugugugg	aaggaagcaa	ccaccacucu	auuuugugca	ucagaugcua	5940
aagcauaua	uacagaggua	cauaauguuu	gggccacaca	ugccugugua	cccacagacc	6000
ccaaccacaa	agaaguagua	uugguaaau	ugacagaaaa	uuuaacaug	uggaaaaaug	6060
acaugguaga	acagaugcau	gaggauauaa	ucaguuuuag	ggaucaaaagc	cuaaagccau	6120
guguaaaauu	aaccccacuc	uguguuaguu	uaaagugcac	ugauuuugaag	aaugauacua	6180
auaccaauag	uaguagcggg	agaugauaa	uggagaaagg	agagauaaaa	aacugcucuu	6240
ucaauaucag	cacaagcaua	agagguaagg	ugcagaaaga	auaugcauuu	uuuuauaaac	6300
uugauauaua	accaauagau	aaugauacua	ccagcuauac	guugacaagu	uguuacaccu	6360
cagucuuuac	acaggccugu	ccaaaggua	ccuuugagcc	aaaucccaua	cauuauugug	6420
ccccggcugg	uuuugcgauu	cuaaaaugua	auaaauagac	guucaauugga	acaggaccu	6480
guacaaaugu	cagcacagua	caauguacac	auggaauuag	gccaguagua	ucaacucaac	6540
ugcuguuaaa	uggcagucua	gcagaagaag	agguaguaau	uagaucuguc	aaauucacgg	6600
acaauugcua	aaccuaaua	guacagcuga	acacauucug	agaaauuaa	uguacaagac	6660
ccaacaacaa	uacaagaaaa	aaaauccgua	uccagagggg	accagggaga	gcauuuguua	6720
caauaggaaa	aaauaggaa	augagacaag	cacauuguaa	cauuaguaga	gcaaaaugga	6780
augccacuuu	aaaacagaua	gcuagcaauu	uaagagaaca	auuuggaaau	aauaaaacaa	6840
uaauuuuaa	gcaauccuca	ggaggggacc	cagaaauugu	aacgcacagu	uuuaauugug	6900
gaggggaauu	uuucuacugu	aaaucaacac	aacuguuuaa	uaguacuugg	uuuaauagua	6960
cuuggaguac	ugaaggguca	aaauaacacug	aaggaaguga	cacaauca	cucccaugca	7020
gaauaaaaa	auuuauaaac	auguggcagg	aaguaggaaa	agcaauuguau	gccccucca	7080
ucagcggaca	aaauagaugu	ucaucaaua	uuaccaggcu	gcuauuaaca	agagauggug	7140
guaaauaaca	caauugggucc	gagaucuuca	gaccuggagg	aggagauaug	agggacaauu	7200
ggagaaguga	auuaauuaaa	uaauaauguag	uaaaaauuga	accuuuagga	guagcaccca	7260
ccaaggcaaa	gagaagagug	gugcagagag	aaaaaagagc	agugggaaua	ggagcuuugu	7320
uccuuggguu	cuugggagca	gcaggaagca	cuauugggcg	agcguaaug	acgcugacgg	7380
uacaggccag	acaauuaauug	ucugguauag	ugcagcagca	gaacaauuug	cugagggcua	7440
uugaggcgca	acagcaucug	uugcaacuca	cagucugggg	caucaagcag	cuccaggcaa	7500
gaauccuggc	uguggaaaga	uaccuaaagg	aucaacagcu	ccuggggauu	uggggguugcu	7560
cuggaaaacu	cauuugcacc	acugcugugc	cuuggaaugc	uaguuggagu	aauaaaucuc	7620

[0012]

uggaacagau	uuggaaucac	acgaccugga	uggaguggga	cagagaaauu	aacaauuaca	7680
caagcuuaau	acacuccuua	auugaagaau	cgcaaaacca	gcaagaaaag	aaugaacaag	7740
aaauauugga	auuagauaaa	ugggcaaguu	uguggaaauug	guuaaacaau	acaaauuggc	7800
ugugguauau	aaaauuuauuc	auaaugauag	uaggaggcuu	gguagguuuu	agaauaguuu	7860
uugcuguacu	uucuguagug	aaauagauua	ggcagggaua	uucaccauua	ucguuucaga	7920
cccaccuccc	aaucccgagg	ggacccgaca	ggcccgaagg	aaugaagaa	gaagguggag	7980
agagagacag	agacagauc	auucgaauag	ugaacggau	cuaagcacuu	aucugggacg	8040
aucugcgag	ccugugccuc	uucagcuacc	accgcuugag	agacuuacuc	uugauuguaa	8100
cgaggauugu	ggaacuucug	ggacgcagg	ggugggaagc	ccucaaauau	ugguggaau	8160
uccuacaaua	uuggagucag	gagcuaaa	auagugcugu	uagcuugcuc	aaugccacag	8220
cuauagcagu	agcugagggg	acagauaggg	uuauagaagu	aguacaagaa	gcuuauagag	8280
cuauucgcca	cauaccuaga	agaauaggac	agggcuugga	aaggauuuug	cuauaagau	8340
gguggcaagu	ggucaaaaag	uagugugguu	ggauggccug	cuguaaggga	aagaauagag	8400
cgagcugagc	cagcagcaga	ugggguggga	gcagcaucuc	gagaccuaga	aaaacaugga	8460
gcaaucacaa	guagcaacac	agcagcuaac	aaugcugcuu	gugccuggcu	agaagcaca	8520
gaggaggaga	agguggguuu	uccagucaca	ccucagguac	cuuaagacc	aaugacuac	8580
aaggcagcug	uagaucuuag	ccacuuuuu	aaagaaaagg	ggggacugga	aggcuauu	8640
cacucccaac	gaagacaaga	uaucuuugau	cuguggaucu	accacacaca	aggcuacuuc	8700
ccugauuggc	agaacuacac	accaggacca	gggaucagau	auccacugac	cuuuggaugg	8760
cgcuaacaagc	uaguaccagu	ugagccagag	aaguuagaag	aagccaaca	aggagagaac	8820
accagcuugu	uacaccucgu	gagccugcau	ggaauaggau	acccggagag	agaaguguua	8880
gaguggaggu	uugacagccg	ccuagcauuu	caucacgugg	cccagagagc	gcauccggag	8940
uacuucaga	acugcugaua	ucgagcuugc	uacaagggac	uuuccgucg	ggacuaucca	9000
gggagggcug	gccugggcgg	gacuggggag	uggcgagccc	ucagaucug	cauauaagca	9060
gcugcuuuuu	gccugucug	ggucucucug	guuagaccag	aucugagccu	gggagcucuc	9120
uggcuaacua	gggaaccac	ugcuuaagcc	ucaauaaagc	uugccuugag	ugcuucaagu	9180
agugugugcc	cgucuguugu	gugacucugg	uaacuagaga	ucccucagac	ccuuuuaguc	9240
aguguggaaa	aucucuagca	gu				9262

<210> 10
 <211> 13931
 <212> RNA
 <213> 小鼠

<400> 10	
uaccugccug	agcuccgccu ccgaagaccc uguagagcaa gcagcagggg cuaggcccgu 60
ggccaggcca	cagccaggaa gccacccac cauccauccg ccaggggccc acgaaagccu 120
gccugcgga	cgccguuacu gcugcuguuc cugcuacugu ucuuggacac cagegucugg 180
gcucaagaug	aaguccugga aaacuuaagc uucagcuguc caaaagaugc aacucgauuc 240
aagcaccucc	gaaaguacgu guacaacuau gaagcugaaa guuccagcgg uguccagggc 300
acagcugacu	ccagaagcgc caccaagauc aacuguaagg uagagcugga gguccecaa 360
aucugugguu	ucaucaugag gaccaaccag uguaccuua aagaggugua ugguucaac 420
ccugagggca	aggccuugau gaagaaaacc aagaacucug aagaguugc agcugccaug 480
uccagguacg	aacucaagcu ggccauuccu gaagggaac aaauuguucu uuaccugac 540
aaggauaac	cuauauauu ccugaacauc aagaggggca ucaucucugc ucuucugguu 600
ccccagaga	cagaaggaga ccaacaagag uuguuccugg auaccgugua uggaacacugc 660
ucaacucagg	uuaccgugaa uucaagaaag ggaaccguac caacagaaau guccacagag 720
agaaaccugc	agcaauguga cggcuuccag cccaucagua caagugucag ccucucgcu 780
cucaucaaa	ggcuggucca ccccuuguca acucuuauc gcagcagcca aacuugccag 840
uacaccucgg	auccuaagag gaagcaugug ucugaagcug ucugugauga gcagcaucuu 900
uuccugccuu	ucuccuacaa gaauaaguau gggauauga cacguguuac acagaaacug 960
agucuugaag	acacaccuaa gaucaacagu cgcuucua gugaagguac caaccggaug 1020
ggucuggccu	uugagagcac caaguccag ucaucccaa agcaggcuga ugcuguuuug 1080
aagaccuuc	aagaacugaa aaaauugucc aucucagagc agaauucu gagagcaau 1140
cucuucaaua	aacugguuac ugagcugaga ggccucacug gugaagcau cacauccuc 1200

[0013]

uugccacagc	ugauugaagu	guccagcccc	aucacuuuac	aagccuuggu	ucagugugga	1260
cagccacagu	gcuauacuca	cauccuccag	uggcugaaaa	cugagaaggc	ucacccccuc	1320
cugguugaca	uugucaccua	ccugauggcu	cugaucccaa	aucccucaac	acagaggcug	1380
caggaaauuc	uuauuacugc	caaggagcag	cagagccgag	ccacucugua	ugcacugagc	1440
cacgcaguua	acagcuauuu	ugauguggac	cauucagga	gcccaguuc	gcaggauauc	1500
gcugguuacc	uguugaaaca	gaucgacaau	gaaugcacgg	gcaaugaaga	ccacaccuuc	1560
uugauucuga	gggucuuugg	aaauauggga	agaaccaugg	aacaaguaau	gccagcccuc	1620
aaguccucag	uccugagcug	uguacgaagu	acaaaaccu	cucugcugau	ucagaaagcu	1680
gcucuccagg	cccugaggaa	gauggaacug	gaagaugagg	uccggacgau	ccuuuuugau	1740
acauuuguaa	auggugucgc	ucccguggag	aagagacugg	cugccuauuc	cuugcugaug	1800
aagaacccuu	ccucaucaga	uauuaacaaa	auugcccaac	uucuccaau	ggaacagagu	1860
gagcagguga	agaacuucgu	ggcaucucac	auugccaaca	ucuugaacuc	ggaagaacug	1920
uauugccaag	aucugaaagu	uuugaucaaa	aaugcucugg	agaauucuca	auuuccaacg	1980
aucauggacu	ucagaaaauu	uucccgaaac	uaucauuuu	ccaaaucugc	uucucuccca	2040
auguucgacc	cagucucagu	caaaaauagaa	gggaaucuuu	uauuuuaucc	aagcaguuuu	2100
cuucccagag	aaagcuugcu	gaaaacaacc	cucacagucu	uuggacuugc	uucacuugau	2160
cucuugagga	uugguuuaga	aggaaaaggg	uuugagccaa	cacuagaagc	ucuuuuuggu	2220
aagcaaggau	ucuucccaga	cagugucaac	aaggcuuugu	auugggucaa	uggccgaguu	2280
ccagauggug	ucuccaaggu	cuugguggac	cacuuggcu	auacuacaga	uggcaagcau	2340
gaacaggaca	uggugaauug	aaucaugccc	auuguggaca	aguugaucua	agaucugaaa	2400
ucuaaagaaa	uuccugaagc	cagggccuau	cuccgcaucc	uaggaaaaga	gcuaagcuuu	2460
gucagacucc	aagaccucca	aguccugggg	aagcuguugc	ugaguggugc	acaaacuuug	2520
cagggaaucc	cccagauggu	uguacaggcc	aucagagaag	ggucaaaaga	ugacuuguuu	2580
cuccacuaca	ucuucaugga	caaugccuuu	gagcucccca	cuggagcagg	guuacagcug	2640
caaguguccu	cgucuggagu	cuucaccccc	gggaucuaag	cugguguaag	acuggaaauu	2700
gccaaacauac	aggcagagcu	aguggcaaa	cccucugugu	ccuuggaguu	ugugacaaa	2760
augggcauca	ucaucccaga	cuucgcuaag	agcagugucc	agaugaacac	caacuucuu	2820
cacgagucag	gccuggaggc	gcgaguggcc	cugaaggcug	ggcagcugaa	ggucaucauu	2880
ccuucuccaa	agaggccagu	caagcuguuc	aguggcagca	acacacugca	ucuggucucu	2940
accaccaaaa	cagaagugau	cccaccucug	guugagaaca	ggcaguccug	gucaacuugc	3000
aagccucucu	ucacuggaau	gaacuacugu	accacaggag	cuuacuccaa	cgccagcucc	3060
acggagucug	ccucuuauc	cccacugaca	ggggacacaa	gguaugagcu	ggagcugagg	3120
cccacgggag	aaguggagca	guauucugcc	acugcaaccu	augaacuccu	aaaagaggac	3180
aagucuuugg	uugacacauu	gaaguuccua	guucaagcag	aaggagugca	gcagucugaa	3240
gcuaucuguac	uguucaaaua	uaaucggaga	agcaggaccu	uaucuaguga	aguccuaauu	3300
ccaggguuug	augucaacu	cgggacaaua	cuaagaguua	augaugaauu	ugcuaaggac	3360
aaaaacacuu	acaaacucau	ccuggacauu	cagaacaaga	aaauacuga	ggucucucuc	3420
guggggccacu	ugaguuauga	uaaaaaggga	gauggcaaga	ucaaaagggu	uguuuuccau	3480
ccacguuugc	aagcagaagc	caggagugag	guccacaccc	acugguccuc	caccaaaccug	3540
cucuuccaaa	uggacucauc	ugcuacagcu	uacggcucaa	cauuuuccaa	gagagugaca	3600
uggcguaacg	auaaugagau	aaauagaauu	gauuggaaca	cgggaacca	uuggauuacc	3660
aaaaaagugg	ccuccaauuu	ccugugggau	cuuucccau	auccuagaau	guugcaugag	3720
uaugccaaug	gucuccugga	ucacagaguc	ccucaaacc	augugacu	ucgggacaug	3780
gguuccaaa	uaauuguugc	aaacaaacaca	uggcuucaga	uggcaaccag	gggucuuucc	3840
uacccccaaa	cucuacagga	ucaccucaau	agccucucag	aguugaaccu	ccugaaaaug	3900
ggacugucug	acuuccauau	uccagacaac	cucuuccuaa	agacugaugg	cagagucaaa	3960
uacacaauga	acaggaacaa	aaauaaacau	gacaucccu	ugccuuuggg	uggcaagucu	4020
ucaaaaagacc	ucaagaugcc	agagagugug	aggacaccag	ccucaacu	caagucugug	4080
ggauuccauc	ugccaucucg	agagguccag	guccccacu	uuacaauccc	caagacacau	4140
cagcuucaag	ugccucucuu	ggguguucua	gaccuuucca	caaauugucua	cagcaauuug	4200
uacaacuggu	gagccuccua	cacugguggc	aacaccagca	gagaccacu	cagccuucag	4260
gcucaguacc	gcaugaagac	ugacucugug	guugaccugu	uuuccuacag	ugugcaagga	4320
ucuggagaaa	caacauauga	cagcaagaac	acauuuacau	uguccuguga	uggaucucua	4380
caccauaaa	uuuagacuc	aaaauucaaa	gucagccacg	uagaaaaauu	uggaaacagc	4440
ccagucucua	aagguuuacu	aaacuuugaa	acaucuagug	ccuugggacc	acagaugucu	4500
gcuaucugu	accuagacuc	aaaaaagaaa	caacaucuau	acgucaaaga	uaucaagguu	4560
gauggacagu	ucagagcuuc	uucauuuuau	gcucaaggca	aaauaggccu	gucuugugag	4620

[0014]

agagauguua	caacuggcca	gcugagcggc	gaauccaaca	ugagauuuua	cuccaccuac	4680
uuccagggca	ccaaccagau	cgugggaug	uaccaggau	gagcccuguc	cauccaccucc	4740
acuucugacc	ugcaagaugg	cauauucaag	aacacagcuu	ccuugaaaua	ugaaaacuaa	4800
gagcugacuc	ugaaaucuga	uagcaguggg	caguaugaga	acuucgcugc	uuccaacaag	4860
cuggauguga	ccuucucua	gcaaagugca	cugcugcguu	cugaacacca	ggccaauuac	4920
aagucccuga	ggcuugucac	ccuucuuuca	ggaucccuca	cuucccaggg	uguagaauua	4980
aaugcugaca	ucuuugggcac	agacaaaauu	aaucacuggg	cucacaaggc	aacacuaaag	5040
auugcacgug	auggacuau	aaccagugcg	accaccaacu	ugaaguacag	cccccugcug	5100
cuggagaau	aguugaau	agagcuuggg	cucucugggg	cauccaugaa	auuaucaca	5160
aacggccgcu	ucaaaagaaca	ccaugcaaaa	uucagucuu	augggagagc	ugcccucaca	5220
gaggugucac	ugggggagcau	uuaccaggcc	augauucugg	gugcagacag	caaaaacau	5280
uucacuuca	aacucagccg	agaagggcug	aggcugucca	augauuugau	gggcuccuau	5340
gcugagauga	aacuugacca	cacacacagu	cugaacauug	caggucucuc	acuggacuuc	5400
uucuaaaaa	uggacaauau	uuacagugga	gacaaguucu	auaagcagaa	uuuuacuuu	5460
cagcuacagc	ccuauucuuu	cauaacuacu	uuuagcaacg	accugagaua	uggugcucua	5520
gauuugacca	acaauggaag	guuucggcug	gagccacuga	agcugaau	ggguggcaac	5580
uuuaaaggaa	ccuaucaaaa	uaaugagcug	aaacauaucu	auaccuau	uuauacugac	5640
cugguaguag	caaguuaacag	agcagacacu	guggcuuagg	uucagggugu	cgaauucagc	5700
cauaggcuua	augcagacau	ugaaggacug	acuuccucug	uugaugucac	uaccagcuac	5760
aaucagau	cacugcauuu	uaacaauuu	uuccacuuuu	cucuggcacc	uuuuaccuug	5820
ggcaucgaca	cacauacaag	uggugauggg	aaacuguccu	ucuggggaga	acacacuggg	5880
cagcuauaua	guaaguuuu	guugaaagca	gaaccucugg	cacuuauugu	cucucaugac	5940
uacaaaggau	ccacaagcca	cagucucccg	uacgagagca	gcaucagcac	ggcucuuuga	6000
cacacagaua	gugccuugcu	gacgccagcg	gagcagacaa	gcaccuggaa	auucaagacc	6060
aaacugaaug	acaaaguaua	cagccaggac	uuugaagccu	acaacacuaa	agacaaaau	6120
gguguugagc	uuaguggacg	ggcugaccuc	ucugggcugu	auucuccaau	uaaacuaccg	6180
uuuuucuaa	gugagccugu	caauguccuu	aauggcuuag	agguaaauga	ugcuguugac	6240
aagccccaag	aaucacaa	uauugcugug	gugaaguacg	auaagaacca	ggauguucac	6300
accaucaacc	ucccauucuu	caaaagccug	ccagacuauu	uggagagaaa	ucgaagagga	6360
augauaaguc	uacuggaagc	caugcgaggg	gaauugcaac	gccucagugu	ugaucaguuu	6420
gugaggaaau	acagagcggc	ccugagcaga	cuuccucagc	agauucauca	uuauucagaa	6480
gcaucugacu	gggagagaca	aguagcuggu	gccaaggaaa	aaauaacuuc	uuucauggaa	6540
aaauauagaa	uuacagauaa	ugauguacua	auugccauag	auagugccaa	aaucaacuuc	6600
aaugaaaaac	ucucucaacu	ugagacauac	gcgauacaau	uugaucagua	uauuaagau	6660
aaauaagauc	cacaugacu	aaaaagaacu	auugcugaga	uuauugaucg	aaucuuugaa	6720
aaguuaaaaa	uucuuuga	acaguaucuu	auccguguua	aucuagcaaa	aucauuccau	6780
aaucucuaau	uauuuugu	aaacguugau	cuuaaccaag	ucaguaguag	uaacaccucu	6840
uggauccaaa	auguggauuc	caauuaucaa	gucagaaucc	aaauucaaga	aaaacuacag	6900
cagcucagga	cacaaauuca	gaauauagac	auucagcagc	uugcugcaga	gguaaaacga	6960
cagauggacg	cuauugaugu	cacaaugcuu	uuagaucuu	ugagaacugc	aaucuaauuc	7020
caaagaauaa	gugacauuu	ugaccguguc	aaauacuug	uuauagaucu	uauugaagau	7080
uuuaaaguua	cugagaaaau	caauacuuiu	agaguuaau	uccgugagcu	aaauagaaa	7140
uauagaugu	accaacacau	ccagguuuu	auggauaaau	caguagagu	ggcccacaga	7200
uauagccuga	gcgagccucu	ucagaaacuc	aguuaugugc	uacagcgaau	ugagauaaaa	7260
gauuacuau	agaaauuggu	uggguuuuu	gaugauacug	uugaguggcu	uaaagcauug	7320
ucuuucaaaa	auaccuuuga	agaacuaaa	agauugacug	acauguuggu	gaagaaguug	7380
aaagcauuug	auuauacca	guuuguagac	aaaaccaaca	gcaaaauccg	ugagaugacu	7440
cagagaauca	augcugaaa	ccaagcucuc	aaacuuccac	aaaaauugga	agcauuaaaa	7500
cuguugguag	aagacuucaa	aaccacaguc	uccaaauccc	uggaaagacu	caaggacacc	7560
aaaguaaacug	ugguauuga	uuggcugcag	gauuuuuuga	cucaaauuga	agaccuuuuc	7620
caagauacuc	uggaagaugu	aagagaccga	auuuaucaaa	uggacauuca	gagggaaucg	7680
gagcacuucu	ugucucuggu	aaaccaaguu	uacaguacac	uggucaccua	uauugucagc	7740
ugguggacuc	ugacugcuua	aaacauaaca	gacuugcag	agcauuauuc	cauccaaaac	7800
ugggcugaga	guauaaaagu	acugguggaa	caaggauuca	uaguuccuga	aaugcaaca	7860
uuucugugga	ccaugccugc	uuuugagguc	agucuccgug	cucuccaaga	agguaacuuu	7920
cagaccccg	ucuuuauagu	cccuugaca	gauuugagga	uuccaucaau	ucggauaaac	7980
uuuaaaugu	uaaagaauau	aaaaauccca	uugagauuuu	ccacuccaga	auucacucuu	8040

[0015]

cucaacaccu	uccaugucca	uuccuuuaca	auugacuugc	uggaaaauaaa	agcaaagauc	8100
auuagaacua	ucgaccaaaau	uuugagcagu	gagcuacagu	ggccucuuucc	agaaaugua	8160
uugagagacc	uggauguagu	gaacauuccu	cuugcaagac	ugacucugcc	agacuuccau	8220
guaccagaaa	ucacaaauucc	agaauucaca	aucccaaaug	ucaauucuaa	agaauuacac	8280
guuccugauc	uucacauacc	agaauuccaa	cuuccucacc	ucucacauac	aaauugaaaua	8340
ccugcuuuug	gcaaacugca	uagcauccuu	aagauccaa	cuccucucuu	uauauuagau	8400
gcuaaugcca	acauacagaa	uguuacaacu	ucagggaaca	aagcagagau	uguggcuuu	8460
gucacugcua	aaggagaguc	ccaaauugaa	gcucucaauu	uugauuuuca	agcacaagcu	8520
caauuccugg	aguuaaaaucc	ucauccucca	guccugaagg	aauccaugaa	cuuccuccagu	8580
aagcauguga	gaauaggagca	ugagggugag	auaguuuuug	auggaaaggc	cauugagggg	8640
aaauacagaca	cagucgcaag	uuuacacaca	gagaaaaau	aaguagaguu	uaauaauugu	8700
augacuguca	aaguuaaaac	ucagcucacc	cuugacaguc	acacaaaagua	cuuccacaag	8760
uugaguguu	cuaggcugga	cuuccuccagu	aaggcuucuc	uuauaauuga	aaucagagaca	8820
cuauuagaag	cuggacaugu	ggcauugaca	ucuuucaggga	cagggucaug	gaacugggcc	8880
ugucccaacu	ucucggaua	aggcauacau	ucgucccaaa	uuagcuuuac	uguggauggu	8940
cccauugcuu	uuuuuggacu	auccaauaac	auaaauggca	aacacuuacg	ggucauccaa	9000
aaacugacuu	augaaucugg	cuuccucaac	uauucuaagu	uugaaguuga	gucaaaaguu	9060
gaauucagc	acgugggcuc	cagcauucua	acagccaau	gucgggcacu	gcucaaggac	9120
gcaaaggcag	aaauagacug	ugagcacaau	gccaaucuaa	auggaaaagu	uauuggaacu	9180
uugaaaaauu	cucucuuuuu	uuucagcaca	ccauuugaga	uuacugcauc	cacaaaauau	9240
gaaggaaaau	ugaaaguggg	uuuuuccacua	aagcugacug	ggaaaauaga	cuuccugaau	9300
aacuaugcau	uguuucugag	uccccgugcc	caacaagcaa	gcuggcaagc	gaguaccaga	9360
uucaaucagu	acaaauacaa	ucaaaaacuuu	ucugcuauaa	acaaugaaca	caacauagaa	9420
gccaguuuag	gaauugaau	agaugccaac	cuggaauuuu	uaaacaauac	uuuaacaauu	9480
ccugaaaaua	acuuugccuu	cacggaguuu	aaaacucuccu	uacugaagga	uuucuccaua	9540
ugggaagaaa	caggcuugaa	agaauuuuuu	aagacaacaa	agcaaucauu	ugauuugagu	9600
guaaaggcuc	aaauauaaaa	gaacagugac	aagcauucca	uuuuugucc	ucuggguaug	9660
uuuuuagaau	uuauucucua	caauugcaau	ucgugggaca	gaaaauuuga	gaaagucaga	9720
aacaaugcuu	uacauuuuuu	uaccaccucc	uauaaugaag	caaaaauuua	gguugauaag	9780
uacaaaacug	aaaaauucccu	uaauucagccc	ucugggaccu	uucaaaauca	uggcuacacu	9840
aucccaguu	ucaacauuga	aguauucucca	uuugcuguag	agacacuggc	uuccagccau	9900
gugaucucca	cagcaauaag	caccccaagu	gucacaaucc	cugguccuaa	caucauggug	9960
ccuucauaca	aguuaugucu	gccaccccug	gaguugccag	uuuuuccaug	uccugggauu	10020
cuauucaagu	uuuuuccucc	agaauucaag	ggauucaaca	cuauugacaa	uauuuauuu	10080
ccagccaugg	gcaacuuuac	cuauugacuuu	ucuuuuuuuu	caagugucau	cacacugaau	10140
accaaugcug	gacuuuuaua	ccaauccagau	aucguugccc	auuuuccuuu	uuccucuuca	10200
uuugucacug	acgcccugca	guacaaaaua	gagggaacau	cacgucugau	gcgaaaaagg	10260
ggauugaaac	uagccacagc	ugucucucua	acuaacaaa	uuuuuaggg	cagucaugac	10320
agcaccuuu	guuuuaccaa	gaaaaacaug	gaagcaucag	ugagaacaac	ugccaaccuc	10380
caugcuccca	uauucucaau	gaacuucaag	caggaaucua	auggaaauac	caagucaaaa	10440
cccacuguuu	caucauccau	ugaacuaaa	uauugacuua	auuccucaa	gcugcacucu	10500
acugcaacag	gaggcauuga	ucacaaguuc	agcuuagaaa	gucucacuuc	cuacuuuuu	10560
auugagucau	ucaccaaaag	aaauaucaag	aguuccuuu	uuucucagga	auauucagga	10620
aguuuugcca	augaagccaa	uguauauucg	aaauccaagg	guacucgguc	uucagugagg	10680
cuacaaggag	cuuccaaagu	ugaugguau	uggaacguug	aaguaggaga	aaauuuuugu	10740
ggagaagcca	ccuuccaacc	caucuaacac	acaugggagc	acaauaugaa	aaaccauuug	10800
cagguauaua	gcuacuucuu	cacaaaagga	aagcaaacau	gcagagcuac	uuuggagcuc	10860
uccccaugga	ccaugucaac	cuugcuacag	guucauguga	gucaacucag	uucccuccuu	10920
gaccuccauc	acuuugacca	ggaagugauc	cuaaaagcu	acacuaagaa	ccagaagauc	10980
agcuggaaag	guggggucca	gguugaauca	cggguucuu	agcacaauuc	acaguucucc	11040
aaugaccaag	aagaaauacg	gcuugaccuu	gcaggauccu	uagacggaca	gcugugggac	11100
cuugaagcua	ucuuuuuacc	aguauauagg	aagagcuugc	aggaaucucc	acaaauggau	11160
ggaaagcgac	aguauucua	agcuucaacu	ucucuuucua	auaccaaaaa	ccuaauaggc	11220
uauuccucuu	cacuccccgu	gcaagaacug	gcugauagau	uuauuuuacc	agggaauaaa	11280
cuaaaugacu	ucaguggagu	aaaaauucua	aagaauguua	guacuucacc	auuugccuc	11340
aaccuaacaa	ugcuccccaa	aguaaaaauu	ccugggaauu	aucuguuaac	acaguacucu	11400
acaccagagg	gcuccucugu	cccuauuuuu	gaggcaacua	uaccugaaau	ucauuuuaau	11460

[0016]

```

guaucccagu uuacacuuucc aaagagccuu ccaguuaggca acacagucuu ugaucugaau 11520
aaguuggcca acaugauugc cgauguugac cugccuagug ucaccucgcc ugagcagacu 11580
auuguaaucc caccuuugga guuucucgua ccugcuggga uuuuuauucc uuucuuugga 11640
gaacugacug cacgugcugg gauggcuucu ccccuuguua augucacuug gagcgcuggu 11700
uggaaaacca aagcagauca uguugaaacg uuccuagauu ccaugucac uucaaccuug 11760
caguuuucgg aguaugcuuu aaaaguugua gaaacacaca aaauugaaga agaucuguua 11820
accuauaaua ucaaagggaac acuucaacac uguagacuua auguggagua uauugaagau 11880
ggucuaauua aaggacuuug ggacuggcag ggagaggcuc accuggacau caccagccca 11940
gcacugacug acuuucaucu guacuacaaa gaagacaaga caagucuguc ugccucagca 12000
gccuccucga ccaucggcac ugugggucug gauucgagca cagaugacca gaguguggag 12060
cugaauugucu acuuccaccc acaguccccu ccagagaaga aacucagcau auucaaaacu 12120
gaguggaggu acaaggaguc uguaggugaa agguacauca aaauuaauug ggaagaagag 12180
gcagcuucca gauugcuagg cucccuaaaa agcaaugugc ccaaggcuuc uaaggcuauu 12240
uaugauuauug ccaauaagua ccaccuggaa uacguuuuuu cagaacuaag aaaaagucua 12300
caggucuaug cugaacauugc cagaaggauug guugaugaaa ugaacauagag uuuccagaga 12360
guagcccug auaccuacca gaaucucuau gagggauugu uggcucagaa gagccugagc 12420
auccugaga aucucaagaa gaggguguua gacaguauag uacauuuac ucagaaguac 12480
cacauggcag ucauuggcu gauggacuca uucauucauu uucugaaauu caauagaguc 12540
caguucccag gguacgcugg aacauauacu guggacgaac ucuaacauu agucaugaag 12600
gaaaccaaga agucacuguc ucagcuguuu aauggguuag gaaaccuacu uuccuacguu 12660
caaaaccaag uagagaaauc aagauuaauc aaugacauaa cauuuaauug uccuuuuuuc 12720
ucaaaccuu guaaacuaaa agaucucaua uugauuuuaa gggaggaguuu aaacauuuua 12780
ucaaacauag gccaacagga uaucaaguuu acaacaauac uaaguaguc uagggcuuu 12840
uuggagagag uuuuagacau cauagaagaa caaauuaauu gccuaaagga caugaauuu 12900
acuuguguug cugaccuauu caacauuguu uucaaaauac agguccaua ugcuuuuuaa 12960
uccuaagag aagacauua cuuuguccuc ggugaguua augacuucu ucaauccaua 13020
cuucaggagg gguccuacaa gcuacagcag guccaucagu auaugaaggc ccuucguga 13080
gaguauuuug auccgagcau ggguugggug acagugaaau auuaugaaau agaagaaaau 13140
augguugagc ugaucaagac ccuuuuaguu uccuuuaggg augucuacuc ugaauauagu 13200
gugacagcug cugauuuugc uucaaaaau ucaacucaag uugaacaauu uguguccagg 13260
gauaucagag aguaucuuag caugcuuacu gauauaaau gaaaguggau ggaaaagauu 13320
gcagagcuuu cuauuguggc aaaggaaaca augaaaagcu gggucacugc cguggccaaa 13380
auaaugucug auuaccccca gcaguuccac uccaauucugc aggaauuuuuc agaccaacuc 13440
ucuagcuacu augaaaaauu uguuggugag uccacaagau ugaauugaccu guccauucaa 13500
aacuaccacg uguuucucag auacaucacc gaguuacuga gaaagcugca gguggccaca 13560
gccauaaug ugagcccccua uauaaaagcu gcucaaggag agcugaugau caccuucuga 13620
uucauucuacu aacaaaauca auuuaaaaccu ucacauagua ggagacuug uagacuacua 13680
uaaagaccu ccugagccag accugcaguc aacagcaaga gcaagaagca cauaggaacu 13740
auaccugcaa ccaagcuggc auaagaacca agaccuucua agcagccuga acucaagau 13800
acauauuuua caaguugag uaaagucaag agcugaguug uuuugucca cucaggauug 13860
agggagggag ggaaggggaa auaaaauaaau acuuuccuuu uugcagcaa aaaaaaaaa 13920
aaaaaaaaa a 13931

```

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> 维多利亚多管发光水母

<400> 11

gggcagcuug ccgguggugu u

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> 维多利亚多管发光水母

[0017]

<400> 12	
caccacccccg gugaacagcu u	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 维多利亚多管发光水母	
<400> 13	
gcuguuacag ucgcugcccu u	21
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 维多利亚多管发光水母	
<400> 14	
gctgttcacg tcgctgccc	19
<210> 15	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸	
<400> 15	
gatccccac caccgccgtg aacagcgtaa gctgttcacg tcgctgccc ttagggcagc	60
ttgccggtgg tgttttttta	80
<210> 16	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸	
<400> 16	
agcttaacac caccggcaag ctgccctaac gggcagcgac gtgaacagct aacgctgttc	60
accgggggtgg tgggg	75
<210> 17	
<211> 144	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸	
<400> 17	
gatccccac caccgccgtg aacagcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac	60
aagctgttca cgtcgtgcc cttgtaggtg gcatcgcaga agcgatgcca cctacaagg	120
cagcttgccg gtggtgtttt tttta	144

[0018]

<210> 18
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 18
agcttaacac caccggcaag ctgcccttgt aggtggcatc gcttctgcga tgccacctac 60
aagggcagcg acgtgaacag cttgtaggtg gcatcgcttc tgcgatgcca cctacaagct 120
gttcaccggg gtggtgggg 139

<210> 19
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 19
gatccccgt gctgcttcat gtggtcggtg ttacgaccac aatggcgaca accttgtag 60
gttgtcgggc agcagcacgt ttttttta 89

<210> 20
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 20
agcttaaaac gtgctgctgc ccgacaacct aacaagggtg tcgccattgt ggctcgtaaca 60
acgaccacat gaagcagcac gggg 84

<210> 21
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 21
gatccccgt gctgcttcat gtggtcggtg taggtggcat cgcagaagcg atgccaccta 60
caacgaccac aatggcgaca accttgtagg tggcatcgca gaagcgatgc cacctacaag 120
gttgtcgggc agcagcacgt tttttta 147

<210> 22
<211> 142
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

[0019]

<400> 22
 agcttaacgt gctgctgccc gacaaccttg taggtggcat cgcttctgcg atgccaccta 60
 caaggttgtc gccattgtgg tcgttgiagg tggcatcgct tctgcgatgc cacctacaac 120
 gaccacatga agcagcacgg gg 142

<210> 23
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 23
 gatccccgca agctgaccct gaagttcttc aagagagaac ttcagggtca gcttgctttt 60
 ta 62

<210> 24
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> MV-siRNA表达克隆的寡核苷酸

<400> 24
 agcttaaaaa gcaagctgac cctgaagttc tctcttgaag aacttcaggg tcagcttgcg 60
 gg 62

<210> 25
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成siRNA

<400> 25
 cugcugguag uggucggcgu u 21

<210> 26
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成siRNA

<400> 26
 cgccgacuuc gugacgugcu u 21

<210> 27
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

[0020]

<220>	
<223> 合成siRNA	
<400> 27	
gcacgucgcc guccagcagu u	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成siRNA	
<400> 28	
guugccgucg uccuugaagu u	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成siRNA	
<400> 29	
cuucaagugg aacuacggcu u	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成siRNA	
<400> 30	
gccguaggua ggcggcaacu u	21
<210> 31	
<211> 67	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 多价siRNA克隆	
<400> 31	
cgccgacuuc gugacgugcu ugugcacguc gccguccagc aguugucugc ugguaguggu	60
cggcguu	67
<210> 32	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0021]

<223> 多价siRNA克隆

<400> 32

gatccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt gcacgtcgcc gtccagcagt tgtctgctgg 60
tagtggtcgg cgttttttta 80

<210> 33

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价siRNA克隆

<400> 33

agcttaaaaa aacgccgacc actaccagca gacaactgct ggacggcgac gtgcacaagc 60
acgtcacgaa gtcggcgggg 80

<210> 34

<211> 131

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价siRNA克隆

<400> 34

cgccgacuuc gugacgugcu uguagguggc aucgcagaag cgaugccacc uacaagcacg 60
ucgccgucca gcaguuguag guggcaucgc agaagcgaug ccaccuacaa cugcugguag 120
uggucggcgu u 131

<210> 35

<211> 142

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价siRNA克隆

<400> 35

gatccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
aagcacgtcg ccgtccagca gttgtaggtg gcatcgcaga agcgatgcca cctacaactg 120
ctggtagtgg tcggcgtttt ta 142

<210> 36

<211> 142

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价siRNA克隆

<400> 36

agcttaaaaa cgccgaccac taccagcagt tgtaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60
tacaactgct ggacggcgac gtgctttagt gtggcatcgc ttctgcgatg ccacctacaa 120
gcacgtcacg aagtcggcgg gg 142

[0022]

<210> 37
<211> 67
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

<400> 37
cuucaagugg aacuacggcu ugugccguag guaggcggca acuuuguug ccgucguccu 60
ugaaguu 67

<210> 38
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

<400> 38
gatccccgga tccgacatcc acgttcttca agagagaacg tggatgtcgg atccttttta 60

<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

<400> 39
agcttaaaaa ggatccgaca tccacgttct ctcttgaaga acgtggatgt cggatccggg 60

<210> 40
<211> 131
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

<400> 40
cuucaagugg aacuacggcu uguagguggc aucgcagaag cgaugccacc uacaagccgu 60
agguaggcgg caacuuguag guggcaucgc agaagcgaug ccaccuacaa guugccgucg 120
uccuugaagu u 131

<210> 41
<211> 142
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

[0023]

<400> 41
gatccccctt caagtggaac tacggcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
aagccgtagg taggcggcaa cttgtaggtg gcatcgcaga agcgatgcca cctacaagtt 120
gccgtcgtcc ttgaagtttt ta 142

<210> 42
<211> 142
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价siRNA克隆

<400> 42
agcttaaaaaa cttcaaggac gacggcaact tglaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60
tacaagttgc cgcctacctt cggctttag gtggcatcgc ttctgcgatg ccacctacaa 120
gccgtagttc cacttgaagg gg 142

<210> 43
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-HIV MV-siRNA寡核苷酸

<400> 43
gatccccgtg aagggaacc aagagattga tctcttgta atatcagctt gagctgatat 60
ttctccttca cttttta 77

<210> 44
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-HIV MV-siRNA寡核苷酸

<400> 44
agcttaaaaaa gtgaaggaga aatatcagct caagctgata ttaacaagag atcaatctct 60
tggttccctt tcacggg 77

<210> 45
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-HIV MV-siRNA寡核苷酸

<400> 45
gatcccccaa gcagtttttag gctgacgtta gtcagcctca ttgacacagg ttactgtgtc 60
agctgctgct tgttttttta 80

<210> 46
<211> 80
<212> DNA

[0024]

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-HIV MV-siRNA寡核苷酸

<400> 46

agcttaaaaa aacaagcagc agctgacaca gtaacctgtg tcaatgaggc tgactaacgt 60
cagcctaaaa ctgcttgggg 80

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 47

gccuuccuu gugggaaggu u 21

<210> 48

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 48

ccuucccuug ugggaaggcu u 21

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 49

gccuuccuug ugggaaggcu u 21

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 50

uucugcaccu uaccucuau u 21

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0025]

<220>		
<223>	三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400>	51	
	uaagagggaag uaugcuguuu u	21
<210>	52	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400>	52	
	aacagcaguu guugcagaau u	21
<210>	53	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400>	53	
	ccagacaaua auugucuggu u	21
<210>	54	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400>	54	
	cucccaggcu cagaucuggu u	21
<210>	55	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400>	55	
	ccagaucuuc ccuaaaaaau u	21
<210>	56	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
[0026]		

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 56

uuuuuuau cu gccugggagu u

21

<210> 57

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 57

uggguucccu aguuagccau u

21

<210> 58

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 58

uggcuaagau cuacagcugu u

21

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 59

cagcuguccc aagaaccgau u

21

<210> 60

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 60

auccuuugau gcacacaauu u

21

<210> 61

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

[0027]

<400> 61 auugugucac uuccuucagu u	21
<210> 62 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 62 cugaaggaag cuaaaggauu u	21
<210> 63 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 63 uccuguguca gcugcugcuu u	21
<210> 64 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 64 agcagcauug uuagcugcuu u	21
<210> 65 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 65 agcagcuuua uacacaggau u	21
<210> 66 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 66 accaacaagg uuucugucau u	21

[0028]

<210> 67
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 67
ugacagaucu aauuacuacu u 21

<210> 68
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 68
guaguaauua ucuguugguu u 21

<210> 69
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 69
cugagggaag cuaaaggauu u 21

<210> 70
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 70
caaagcuaga ugaauugcuu u 21

<210> 71
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 71
agcaauuggu acaagcaguu u 21

<210> 72

[0029]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 72	
acugcuuguu agagcuuugu u	21
<210> 73	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 73	
aggucaggu cuacuugugu u	21
<210> 74	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 74	
cacaagugcu gauauuucu u	21
<210> 75	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 75	
agaaauauu gucugaccuu u	21
<210> 76	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 76	
cuaaguuaug gagccauuu u	21
<210> 77	
<211> 21	
<212> RNA	

[0030]

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 77

auauggccug auguaccuu u

21

<210> 78

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 78

augguacuuc ugaacuuagu u

21

<210> 79

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 79

uggcucauu ucuugcucuu u

21

<210> 80

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 80

agagcaaccc caaaucuccu u

21

<210> 81

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列

<400> 81

ggggauuuag ggggagccau u

21

<210> 82

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

[0031]

<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 82	
aucuccacaa gugcugauau u	21
<210> 83	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 83	
uauccagcagu ucuugaaguu u	21
<210> 84	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 84	
acuucaaaau guuggagauu u	21
<210> 85	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 85	
agacugugac ccacaauuuu u	21
<210> 86	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 86	
aaaauugugga ugaauacugu u	21
<210> 87	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	

[0032]

<400> 87 caguauuugu cuacagucuu u	21
<210> 88 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 88 acaggccugu guaaugacuu u	21
<210> 89 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 89 agucauuggu cuuaaagguu u	21
<210> 90 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 90 accuuuagga caggccuguu u	21
<210> 91 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 91 ucaguguuau uugacccuuu u	21
<210> 92 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 92	

[0033]

aagggucuga gggaucucuu u	21
<210> 93	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 93	
agagaucuuu ccacacugau u	21
<210> 94	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 94	
cauagugcuu ccugcugcuu u	21
<210> 95	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 95	
agcagcauug uuagcugcuu u	21
<210> 96	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 96	
agcagcuaac agcacuaugu u	21
<210> 97	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 97	
gcugcuuaua ugcaggau cu	21

[0034]

<210> 98	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 98	
gauccugucu gaagggaugu u	21
<210> 99	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 99	
caucccuguu aaaagcagcu u	21
<210> 100	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 100	
uggucuaacc agagagaccu u	21
<210> 101	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 101	
ggucucuuuu aacauuugcu u	21
<210> 102	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 102	
gcaaauuuu ucuagaccu u	21
<210> 103	
<211> 21	

[0035]

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 103	
cucccaggcu cagaucuggu u	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 三价MV-siRNA寡核苷酸序列	
<400> 104	
uggguucccu aguuagccau u	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 105	
uggaacuuuc agcucauau u	21
<210> 106	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 106	
uaugaaggca ccaugauguu u	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 107	
acaucaucu ccaguuccau u	21
<210> 108	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

[0036]

<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 108	
acucuucaga guucuugguu u	21
<210> 109	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 109	
accaagaccu uggagacacu u	21
<210> 110	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 110	
gugucucagu uggaagaguu u	21
<210> 111	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 111	
accuggacau ggcagcugcu u	21
<210> 112	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 112	
gcagcugcaa acucuucagu u	21
<210> 113	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0037]

<223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 113 cugaagacgu auuccagguu u	21
<210> 114 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 114 caggguaaaag aacaauuugu u	21
<210> 115 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 115 caaauugcug uagacauuuu u	21
<210> 116 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 116 aaauguccag cguaccug u	21
<210> 117 <211> 23 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 117 cccuggacac cgcuggaacu uuu	23
<210> 118 <211> 23 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	

[0038]

<400> 118 aaguuccaau aacuuuuucca uuu	23
<210> 119 <211> 23 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 119 auggaaaagg caaguccagg guu	23
<210> 120 <211> 24 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 120 cccuggacac cgcuggaacu uuuu	24
<210> 121 <211> 24 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 121 aaaguuccaa uaacuuuucc auuu	24
<210> 122 <211> 24 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的三价MV-siRNA	
<400> 122 auggaaaug gcaaguccag gguu	24
<210> 123 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 123 ugaaucgagu ugcaucuuuu u	21

[0039]

<210> 124
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸

<400> 124
aaagaucug cucaucacau u 21

<210> 125
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸

<400> 125
ugugaugaca cucgauucau u 21

<210> 126
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> 2, 7
<223> n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头,
亚磷酸胺, 5-硝基吡啶, PC Spacer或无碱基的碱基

<400> 126
unguganuga cacucgauuc auu 23

<210> 127
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸

<400> 127
tgtgatgaca ctcgattca 19

<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

[0040]

<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 128 cagcuugagu ucguaccugu u	21
<210> 129	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 129 cagguacaga gaacuccaau u	21
<210> 130	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 130 uuggagucug accaagcugu u	21
<210> 131	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> 13, 19	
<223> n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头, 亚磷酰胺, 5-硝基吡啶, PC Spacer或无碱基的碱基	
<400> 131 uuggagucug acnaagcunu u	21
<210> 132	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的二价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 132 ttggagtctg accaagctg	19
<210> 133	
<211> 21	

[0041]

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 133	
ucagggccgc ucuguauuuu u	21
<210> 134	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 134	
aaauacauuu cuggaagagu u	21
<210> 135	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA寡核苷酸	
<400> 135	
cucuuccaaa aagcccugau u	21
<210> 136	
<211> 65	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ApoB的三价MV-siRNA寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> 22, 44	
<223> n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头, 亚磷酰胺, 5-硝基吡啶, PC Spacer或无碱基的碱基	
<400> 136	
aaauacauuu cuggaagagu uncucuucca aaaagcccug auunucaggg ccgcucugua uuuuu	60 65
<210> 137	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0042]

<400> 137 aaccacuuu caaauuuccu u	21
<210> 138 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 138 ggaaaugag aaucuccau u	21
<210> 139 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 139 uggagaauucu caguggguu u	21
<210> 140 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> 5, 13, 18 <223> n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头, 亚磷酰胺, 5-硝基吡啶, PC Spacer或无碱基的碱基	
<220> <221> misc feature <222> 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21 <223> 具有rSpace连接的碱基	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> 4, 6, 14, 19 <223> 具有2'-氟修饰的碱基	
<400> 140 ugganaauucu canugggnu u	21
<210> 141 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	

[0043]

<220>		
<223>	靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400>	141	
	gaugaugaaa caguggguuu u	21
<210>	142	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400>	142	
	ggaaauugga gacaucaucu u	21
<210>	143	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	1, 15	
<223>	n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头, 亚磷酰胺, 5-硝基吡啶, PC Spacer或无碱基的碱基	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21	
<223>	具有rSpace连接的碱基	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	3, 4, 5, 14, 17	
<223>	具有2'-氟修饰的碱基	
<400>	143	
	ngaaauugga gacancaucu u	21
<210>	144	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400>	144	
	gcaaacucuu cagaguucuu u	21
<210>	145	
<211>	21	

[0044]

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 145	
agaacuccaa gggugggauu u	21
<210> 146	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 146	
auccacuuu caaguugcu u	21
<210> 147	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> 2, 14, 18	
<223> n = 任何碱基, 通用碱基, rSpacer, 接头, 亚磷酰胺, 5-硝基吡咯, PC Spacer或无碱基的碱基	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 19	
<223> 具有rSpace连接的碱基	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> 1, 13, 15	
<223> 具有2'-氟修饰的碱基	
<400> 147	
anccacuuu caanuunc	19
<210> 148	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 148	

[0045]

cuucaucacu gaggccucuu u	21
<210> 149	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 149	
agaggccaag cucugcauuu u	21
<210> 150	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 150	
aaugcagaug aagaugaaga a	21
<210> 151	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 151	
uucagccugc auguuggcuu u	21
<210> 152	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 152	
agccaacuaau acuuggaucu u	21
<210> 153	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0046]

<400> 153 gauccaaaag caggcugaag a	21
<210> 154 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 154 cccucaucug agaaucuggu u	21
<210> 155 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 155 ccagauucau aaaccaaguu u	21
<210> 156 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 156 acuugguggc ccaugaggggu u	21
<210> 157 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 157 ucaagaauuc cuucaagccu u	21
<210> 158 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	

[0047]

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 158

ggcuugaagc gaucacacuu u

21

<210> 159

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 159

agugugaacg uauucuugau u

21

<210> 160

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 160

uugcaguuga uccugguggu u

21

<210> 161

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 161

ccaccaggua ggugaccacu u

21

<210> 162

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 162

guggucagga gaacugcaau u

21

<210> 163

[0048]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 163	
ccuccagcuc aaccuugcau u	21
<210> 164	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 164	
ugcaaggucu caaaaaaugu u	21
<210> 165	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 165	
cauuuuugau cucuggaggu u	21
<210> 166	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 166	
caggauguuaa guagguucau u	21
<210> 167	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 167	

[0049]

ugaaccuuag caacaguguu u	21
<210> 168	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 168	
acacugugcc cacauccugu u	21
<210> 169	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 169	
ggcuugaagc gaucacacuu u	21
<210> 170	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 170	
agugugaacg uauucuuguu u	21
<210> 171	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 171	
acaagaauuc cuucaagccu u	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0050]

<400> 172 ugaagagauu agcucucugu u	21
<210> 173 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 173 cagagaggcc aagcucugcu u	21
<210> 174 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 174 gcagagcugg cucucucau u	21
<210> 175 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 175 cucaguaacc agcuuauugu u	21
<210> 176 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 176 caauaagauu uauaacaau u	21
<210> 177 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	

[0051]

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 177
uuuguuauucu uauacugagu u 21

<210> 178
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 178
gaaccaaggc uuguaaaguu u 21

<210> 179
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 179
acuuuacaaa agcaacaauu u 21

<210> 180
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 180
auuguuguua aaugguucu u 21

<210> 181
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 181
cagguaggug accacauuu u 21

<210> 182

[0052]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 182	
agaugugacu gcuucau u	21
<210> 183	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 183	
ugaugaacug cgcuaccugu u	21
<210> 184	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 184	
ccagucgcuu aucucccggu u	21
<210> 185	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 185	
ccgggagcaa ugacuccagu u	21
<210> 186	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 186	

[0053]

cuggaguc <u>au</u> ggcgacug <u>gu</u> u	21
<210> 187	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 187	
uggaagagaa acagauu <u>gu</u> u	21
<210> 188	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 188	
caaaucuuu <u>a</u> aucagcu <u>ucu</u> u	21
<210> 189	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 189	
gaagcugccu cuucuucc <u>au</u> u	21
<210> 190	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 190	
auccaaaggc agugaggg <u>uu</u> u	21
<210> 191	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0054]

<400> 191 accucaacu caguuuugau u	21
<210> 192 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 192 ucaaaaccgg aauuuggauu u	21
<210> 193 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 193 uagagacacc aucaggaacu u	21
<210> 194 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 194 guuccuggag agucuucaau u	21
<210> 195 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 195 uugaagaauu aggucucuau u	21
<210> 196 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	

[0055]

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 196
gcucauguuu aucaucuuuu u 21

<210> 197
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 197
aaagaugcug aacuuaaagu u 21

<210> 198
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 198
cuuuaagggc aacaugagcu u 21

<210> 199
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 199
ggagcaauga cuccagaugu u 21

<210> 200
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 200
caucuggggg auccccugcu u 21

<210> 201

[0056]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 201	
gcaggggagg uguugcuccu u	21
<210> 202	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 202	
ucacaaacuc cacagacacu u	21
<210> 203	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 203	
gugucugcuu uauagcuugu u	21
<210> 204	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 204	
caagcuaaag gauuugugau u	21
<210> 205	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 205	

[0057]

gcagcuugac uggucucuuu u	21
<210> 206	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 206	
aagagacucu gaacugcccu u	21
<210> 207	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 207	
gggcagugau ggaagcugcu u	21
<210> 208	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 208	
caggacugcc uguucucaau u	21
<210> 209	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 209	
uugagaacuu cuaauuuggu u	21
<210> 210	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0058]

<400> 210 ccaaauuga aaaguccugu u	21
<210> 211 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 211 uguagggcuc aguuccagcu u	21
<210> 212 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 212 gcuggaauuc ugguaugugu u	21
<210> 213 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 213 cacauaccga augccuacau u	21
<210> 214 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 214 gacuucacug gacaaggucu u	21
<210> 215 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	

[0059]

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 215

gaccuugaag uugaaaaugu u

21

<210> 216

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 216

cauuuucugc acugaagucu u

21

<210> 217

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 217

aagcaguuug gcaggcgacu u

21

<210> 218

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 218

gucgccuugu gagcaccacu u

21

<210> 219

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸

<400> 219

guggugccac ugacugcuuu u

21

<210> 220

[0060]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 220	
cagaugaguc cauuuggagu u	21
<210> 221	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 221	
cuccaaacag ugccaugccu u	21
<210> 222	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 222	
ggcauggagc cuucaucugu u	21
<210> 223	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 223	
cacagacuug aaguggaggu u	21
<210> 224	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 224	

[0061]

ccuccacuga gcagcuugau u	21
<210> 225	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 225	
ucaagcuuca aagucugugu u	21
<210> 226	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 226	
auggcagaug gaaucacacu u	21
<210> 227	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 227	
gugggaucac cuccguuuuu u	21
<210> 228	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 228	
aaaacgguuu cucugccauu u	21
<210> 229	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	

[0062]

<400> 229 ugauacaacu ugggaauggu u	21
<210> 230 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 230 ccauucccua ugucagcauu u	21
<210> 231 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶定人ApoB的多价siRNA寡核苷酸	
<400> 231 augcugacaa auugaucau u	21

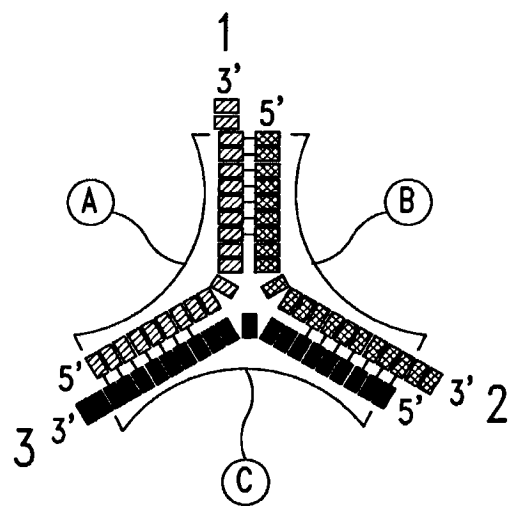


图 1

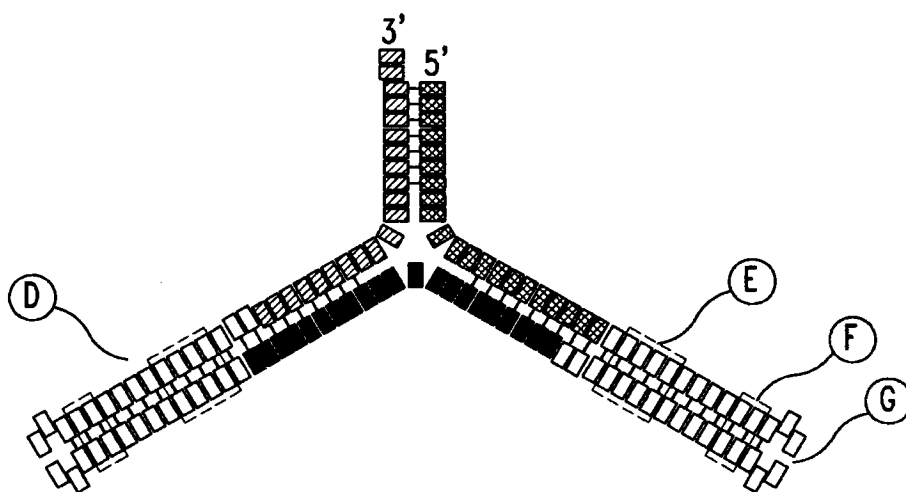


图 2

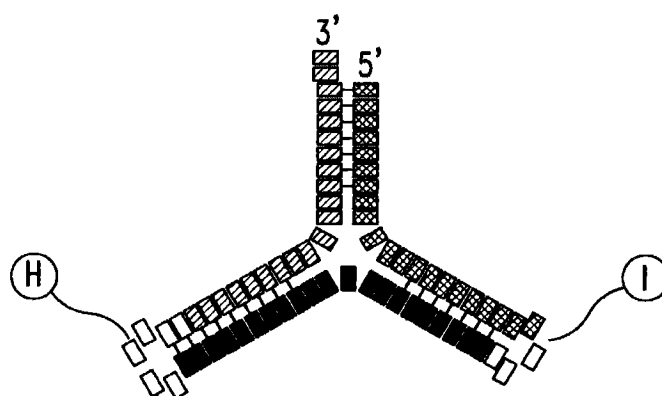


图 3

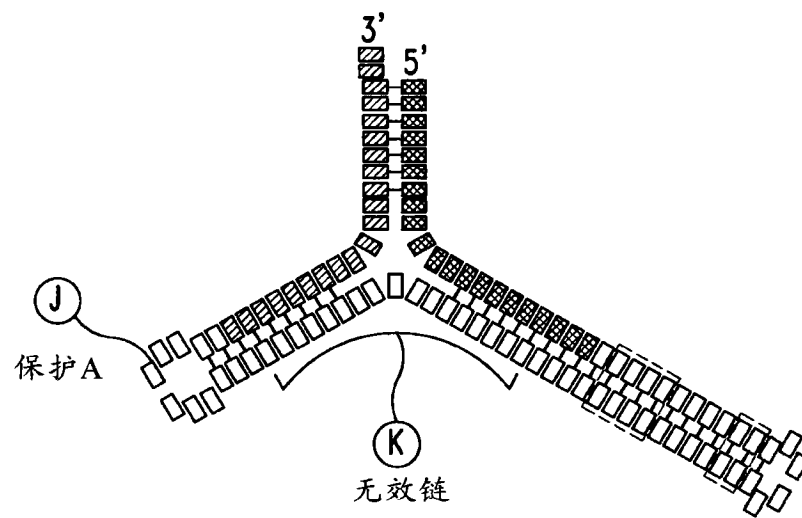


图 4

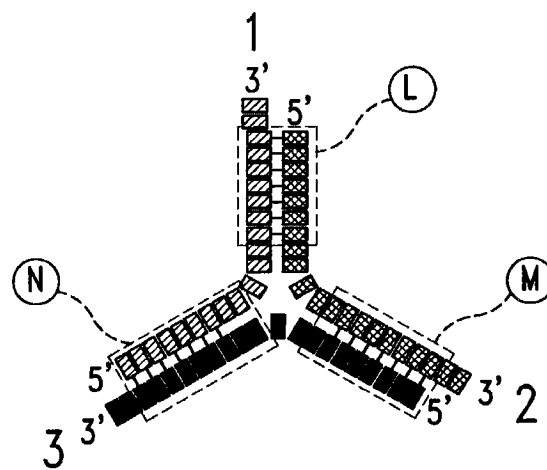


图 5

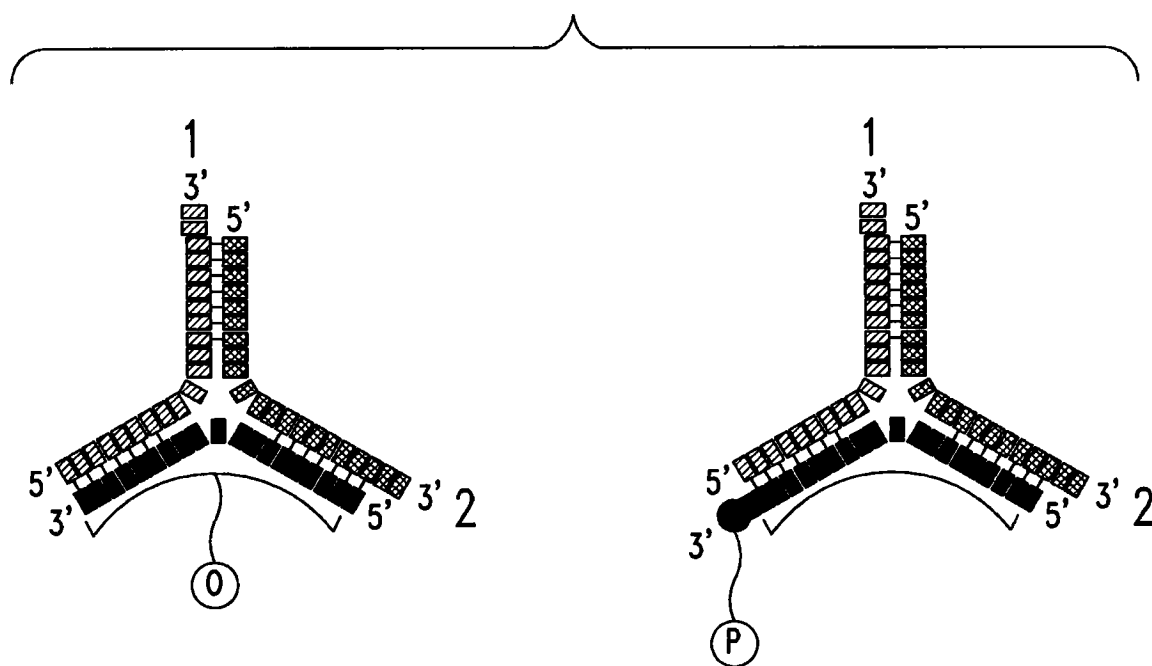


图 6

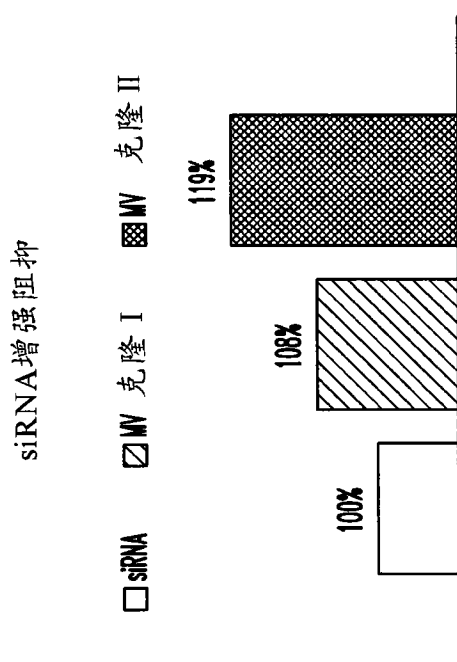


图 7A

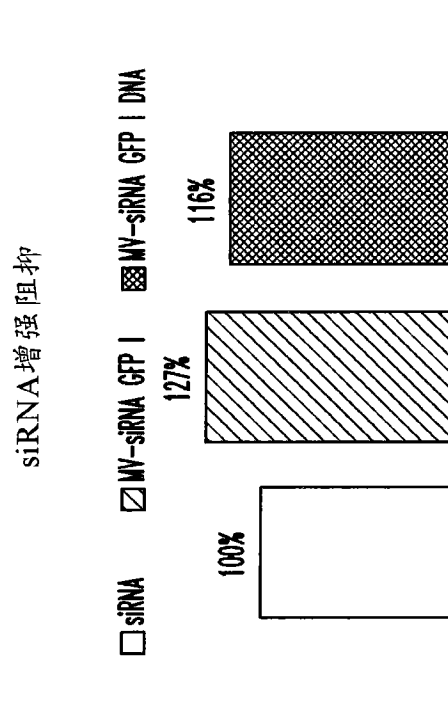


图 7B

GFP 靶定

AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUUACAACGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUUGAGCUGGACCGCGACGUAA
ACGGCCACAAGUUCAGGUGUCGGCGAGGCGAGGCGGUGCCaCCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
CAUCUGCACCAACGGCAAGCUGCCCGUGCCUGGCCACCCUGGACCACCUGACCAUACGGCGGUGCAG
 UGUUUCAGCCGCUACCCCGACCAUAUAAGACAGCACCUUUAAGUCCGCCAUGCCCAAGGCUACG
 UCCAGGAGCGCACCAUUCUUUUAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCCGAGGUGAAGUUUGAGGG
 CGACACCCUGUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUUGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCUUGGGGCAC
 AAGCUGGAGUACAACUACAACAGCCACACAGUCUAUAUCAUGCCGACAGCAGACGACGCAUACAAG
 UGAACUUCAAGAUCCGCCACAAAUUGAGGACGGCAGCGUGCAGCUUGCCGACCAUACGACGACAAAC
 CCCC AUGGGGACGGCCCCGUGUGCCCGACAAACCAUAUCCUGAGCACCCAGUCCCGCCUGAGCAAA
 GACCCCAACGAGAGCGGAUCAUUGGUCUGGAGUUGGACCGCGCGGGAUCAUCUCUGGCA
 UGGACGAGCUGUACAAGUAAA

图 8A

GFP 靶定

AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUUACAACGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUUGAGCUGGACCGCGACGUAA
 ACGGCCACAAGUUCAGCUGUCGGCGAGGCGAGGCGGUGCCaCCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
 CAUCUGCACCAACGGCAAGCUGCCCGUGCCCGACCCUGGACCAUUAAGUCCGCCAUGCCCAAGGCUACG
 UGUUUCAGCCGCUACCCCGACCAUAUAAGACAGCACCUUUAAGUCCCGCCAUGCCCGAAGGCUACG
 UCCAGGAGCGCACCAUUCUUUUAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCCGAGGUGAAGUUUGAGGG
 CGACACCCUGGUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUUGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCUUGGGGCAC
 AAGCUGGAGUACAACUACAACAGCCACACAGUCUAUAUCAUGCCGACAGCAGACGACGCAUACAAG
 UGAACUUCAAGAUCCGCCACAAAUUGAGGACGGCAGCGUGCAGCUUGCCGACCAUACGACGACAAAC
 CCCC AUGGGGACGGCCCCGUGUGCCCGACAAACCAUAUCCUGAGCACCCAGUCCCGCCUGAGCAAA
 GACCCCAACGAGAGCGGAUCAUUGGUCUGGAGUUGGACCGCGCGGGAUCAUCUCUGGCA
 UGGACGAGCUGUACAAGUAAA

图 8B

示例性HIV基因组:

GUUCUCUGGUUAGACCAAGUCUGAGCCUGGAGCUCUCUGGCUAACUAGGGAACCCACUGCUUAAGCCUCUAUAAG
CUUGCCUUGAGUCUUCAGUAGUGUGUCCCGUCUGUGUGAGCUCUUGUUAACUAGAGAUCCUCACAGCCCUUUA
GUCAGUGUGGAAAUUCUCUAGCAGUGGCGCCGACAGGACAUAGAAAGGAAACAGAGAGAGCCUCUCUGA
CGCAGGACUCGGCUCUGAGAGCGCCACCGGACAGGCGAGGGCGGACUGGUGAGUACGCCCAAAAUUUUGACU
AGCGGAGGCUAGAGGAGAGAGUUGGUGCGAGAGCGUCAGUUAUAGUGGCGAGGAGAAAUUAGAUCCGAAAUAAU
UCGGUUAAGGCCAGGGGAAAGAAAUUAUAUUAACAUAUAGUAGUGGCAAGCAGGAGCUAGAAACGAUUCGC
AGUUAUUCUGGCGUGUAGAAACAUAGAGAGGUGUAGACAAUAUCUGGACAGCUACAACCAUCCUUCAGACAGG
AUCAGAGAAACGUAGAUCAUUAUAUAUACAGUAGCAACCCUUAUUGUGCAUCAAAGGAUAGAGAUAAAGACAC
CAAGGAAGCUUAGACAAGAUAGAGGAGAGCAAAACAAAGUAAGAAAGCAAGCAAGCAGCAGCUGACACAGG
ACACAGCAGCCAGGUCAGCCAAAUUACCCUAUAGUGCAGAAACUCCAGGGCAAUUGGUACAUCAGGCCAUUACCC
UAGAACUUUAAUUGCAUGGGUAAAGUAGAGAGAGAGGCUUUCAGCCAGAGUGAUACCCAUUUUCAGCAUU
AUCAGAGGAGCCACCCACAGAUUUAACACCAUGCUAAACACAGUGGGGACAUACAGCAGCCAGCAAAUGUU
AAAAGAGACCAUCAUAGAGGAGCUGCAGAAUGGGAUAGUGCAUCCAGGCGCUUUGCACCCAGGCCA
GAUGAGAGAACCAAGGGAAGUGACAUAAGCAGGAACUAUAGUACCUUCAGGAAACAAUAGGAUGGAUGACACAUA
UCCACCUAUCCAGUAGGAGAAUCUUAUAAAGAUUGAUUUCUGGUAUAAUAAUAAUAGUAAAGAAUGUAAGCCC
UACCAGCAUUCUGGACAUAAGACAAGCAACCAAGGAACCCUUAAGAGACUAUUGUAGACCGAUUCUUAACACUCUAAG
AGCCGAGCAAGCUUACAAGAGGUAAAUUUGGAUGACAGAAACCUUUGUUGUCCAAAUUGCGAACCCAGAUUGUA
GACUAUUUUAAGCAUUGGACCCAGGACGACAUAAGAAAGAAUAGAUAGACCAUCCAGCUACCAUUAUGAUACAGAAU
CCAUAAGCAAGAGUUGGCUAGCAUAGCCAAAGUAACAAUCCAGCUACCAUUAUGAUACAGAAAGGCAAUUU
UAGGAACCAAGAAAGACUGUUUAGUGUUUCAUUGUGGCAAGAAAGGCAUAUAGCCAAAUUUGCAGGCGCCCUAG
GAAAGGCGCUGUGGAAAUUGGAAAGGAAAGGACACCAAUUGAAAGAUUGUACUGAGAGACAGCCCAACAGCCACAGAA
GAGAUUCUGGCCUCCACAGGGAAGGCCAGGGAUUUUCUAGAGAGCAGACAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGG
GAGCUUCAGGUUGGGAGAGACAAACACUCCUUCAGAGAGCAGGAGCCGUAAGACAAGGAACUGUAUCCUUAAGC
UUCUUCAGAUCAUCUUGGCGAGCAACCCUCCUUCACAAUAAAGAUAGGCGGCAAUUAAAGGAAGCUUAUAGAU
ACAGGAGCAGAUAGAUUAGAGAAUUGAUUUGCCAGGAAGUAGAAACCAAAUAGAUAGGGAUUGGAUUGGA
GGUUUUAUCAAAGUAAGACAGUUGAUCAGAUACUUAUAGAAUUCUGGCAUAUAGCUUAUAGGAUAGGAUUGGA
GGACCUACACCUUGCAACAUAAUUGGAGAAUUCUGUUGACUCAGAUUGGUGGCUUAUUAUUGCCAUUAGUCCU
AUUGAGACUGUACAGUAUUAUUAAGCCAGGAUUGGAUGGCCCAAAAGUUAACAAUUGGCCAUUGACAGAAUAA
AUAAGCAUUGUAGAAUUGUACAGAAUUGGAAAGGAAGGAUUAUUGCAAAAUUGGGCCUGAAAUUCCAUAC
AAUACUCCAGUAUUGCCAUAAAGAAUACAGACAGUACUAAUUGGAGAAAUUAGUAGAUUUCAGAGAAACUUAUAG
AGACUCAAGAUUUCUGGGAAGUUCAAUUGGAAUACCAUCCUUGCAGGGUUAACAGAAUAAAUACAGUAACAGUA
CUGGAUGUGGGGAUGCAUAUUUUUUCAGUUCGCCUUAUUAAGACUUCAGGAAGUAUACUGCAUUUACCAUACCUAGU

图 10A

AAUAAACAAUGAGACACCCAGGGAUUAGAUUUCAGUACAAGUGUCUUCCACAGGGAUGGAAAGGAUCCACAGCAAAUAUUC
 CAGUGUAGCAUGACAAAAAUUUUJAGAGCCUUUJAGAAAACAAAUAUCCAGACAUAUGUCAUUAUACAUAUGGAUGAU
 UUGUAUGUAGGAUCUGACUUAAGAAUAGGGCAGCAUAGAACAAAUAAGAGGAACUGAGACAACAUCUGUUGAGGUGG
 GGAUUUACCAACACAGACAAAACAUCAGAAAAGAACCCUCCAUCCUUGGAUGGCUUAUGAACUCCAUCCUGAUAAA
 UUGGACAGUACAGCCUUAUGUCUGCCAGAAAAGGACAGCUGGACUGUCAUGACAUAACAGAAAUIJAGUGGGAANAUIUG
 AAUUGGCCAAGUCAGAUUUUAUGCCAGGAUUAAAGUAAGGCAUUJAUUGUAAAUCUUUAAGGGGAACCAAAGCACUAACA
 GAAGUAGUACCAUUAACAGAGAAGCAGAGCUAGAAACUGGCAGAAAACAGGGCAGAUUCUAAAAGAACCTGGUACAUGGA
 GUGUAUUUUGACCCAUACAAGAUAUAGCCAGAAAUACAGAAAGCAGGGCAAGGCCAUGGACAUAUCAAAAUUUUAU
 CAAGAGCCAUUUJAAAAUCUGAAAACAGGAAAGUAUGCAAGAAUGAAGGUGGCCACACUAUUGAUGUGAAAACAUAUA
 ACAGAGGCCAGUACAAAUAUAGCCACAGAAAGCAUAGUAAUUAUGGGGAAGAGACUCCUAAAUIUUJAAAUUJACCAUJACA
 AAGGAAACAUGGGAAGCAUGGUGGACAGAGUAUUGGCAAGCCACCTUGGAUUCUGAGUGGGAGUUUGUCAUAUACCCCU
 CCCUJAGUGAAGUUAUGUACCAUGUAGAGAAAAGAACCCUAUAUAGGAGCAGAAAACUUUUAUUGAUGAUGGGCAGCC
 AAUAGGGAAACUAAAUUJAGGAAAGCAGGAUAUGUAAUCUGACAGAGGAAGACAAAAGUJUGUCCCCUUAACGGACACA
 ACAAUUCAGAGACUGAGUUAACAAGCAUJCAUUCUAGCCUUGCAGGAUUCGGGAUUGAAGUAACAUAUGUGACAGAC
 UUCACAAUAUGCAUUGGGAUACAUUCACGACAACCCAGAUUAGAGUAAUCAGAGUUAGUCAGUCAAAUAUAUAGAGCAG
 UUAUAUAAAAGGAUAAAGUUAACUUGGCAUGGUAACAGCACACAAGGAUUGGAGGAAUUGAACAGUAGAUAAA
 UUGGUACAGUCUGGAAUUCAGGAAGUACUUAUUUJAGAUUGGAUJAGUJAGGCCCAAGAGAACAUGAGAAAUJAUUCAC
 AGUAAUUGGAGAGCAAUGGCUAGUGAUUUUJAAACCUACCCUUGUAGUAGCAAAAAGAAUAGUAGCCAGCUGUGAUAAA
 UGUCAGCUAAAAGGGGAAGCCUUGCAUGGACAAGUAGACUGUAGCCAGGAUAUUGGCAGCUAGAUUGUACACAUUUA
 GAAGGAAAAGUUAUCUUGGUAGCAGUUCAGUAGCCAGUGGAUUAUAGAAAGCAGAGUAUUCAGCAGAGACAGG
 CAGAAAACAGCAUACUUCUUAUAAAUAJAGCAGGAAGAUUGGCCAGUAAAACAGUACAUAACAGACAUAUGSCAGCAAU
 UUCACCAUACUACAGUUAAGGCCCGCCUUGUGGGGGGAUACAGCAGGAAUUGGCAUUCUCCUACAUAUCCCCAA
 AGUCAAGGAGUAUAGAAUCUAUAGAAUAAGAAUUAAGAAAUUAUAGGAACAGUUAAGAGCUGAACAUCUU
 AAGACAGCAGUACAAAUGGCAGUUAUCAUCCACAUUUUUAAAAGAAAAGGGGGGAUUGGGGGGUACAGUGCAGGGGA
 AGAAUAGUAGACAUAUJAGCAACAGACAUAACAACUAAAGAAUUAACAATAACAUAUJACAATAAUUUCGG
 GUUUUAUACACGGACAGCAGAGAUCCAGUUUGGAAGGACCCAGCAAGCUCUCCUGGAAGGUGAAGGGGCAGUAGUA
 AUAACAAGAUAAUAGUGACAUAAAAGUAGUGCCAGAAGAAAACCAAGAUCAUCAGGGAUUAUGGAAAACAGAUGGCA
 GGUGAUGAUUGUGGCAAGUAGACAGGAUGAGGAUUAACACAUGGAAAGAUUJAGUAAAACACCAUUGUAUAUUC
 AAGCAAGCUAAGCAUCUGUUUAUAGACAUCACUAUGAAAGUAUAUCCAAAUAAGUUCAGAGUAACAUAUCCC
 ACUAGGGGAUGCUAAAUAUAGUAAUAACACAUAUUGGGGUCUGCAUACAGGAGAAAGACACUUGGCUUUGGGUACGGG

图 10B

AACUCAUUUGCAACCA CUGCUGUGCCUUGGAAUGCUAGUUGGAGUAUAUAAUUCUCUGGAACAGAUUUGGAAUUCACACGA
CCUGGAGUGGAGUGGACAGAGAAAUUAACAUAACAAGCUUAUAUACAUCUCCUUAUUGAAGAAUUGGCAAAACCCAGC
AAGAAACAAUGAACAAAGAAUUUGCAUUUAGAUAAUUGGCAAGUUUGGAAUUGGUUUAACAUAACAUAUUGGC
UGUGGUUAUAAAUUAUUAUUAUGAUAGUAGGAGGCUUGGAGGUUUAAGAAUAGUUUUUGCCUGUACUUCUGUAG
UGAAUACAGUUUAGGCAGGGAUAUUCACCAUUAUCGUUUCAGACCCACUCCCAUCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCG
AAGGAUAGAGACAGAGAGGUGGAGAGAGACAGACAGACAUCCAUUCGAUUAGUGAACGGAUCCUUAAGCACUUAUCU
GGGACGAUCUGGGAGCCUGUGCCUUCAGCUACACCGCUUGAGAGACUUAUCUUGAUUUGAACGAGGAUUGUGG
AACUUCUGGACCCAGGGGUGGAGGCCUCAAUAUUGGUGGAUUCUCCUACAUAUUGGACUCAGGAGCUAAAGA
AUAGUGCCUUAUAGCUUUGCUCAAUCCACAGCUAUAGCACUAGCUGAGCGGACAGAUAGGGUUAUAGAAUAGUACAAG
AAGCUUAUAGAGCUUAUUGCCCAUAUCCUAGAGAAUAGGACAGGCUUGGAAAGGAUUUUGCUUAUAGAUUGGUGGC
AAGUGGUCAAAGAGUAGUGGUGGAGUGCCUGCUUUAAGGGAAGAAUGAGACGAGCUGAGCCAGCCAGCAGAUUGG
GUGGAGCAGCAUUCUGAGACCUAGAAACAAUGGAGCAAUCACAGUAGCAAACACAGAGCUAACAAUGCUUGCUUGU
GCCUGGUAGAGCAAGAGGAGGAGAGAGUGGGUUUUCAGUCACACCUAGGUACCUUUAAGACCAUAGACUUAAC
AAGGCAGCUGUAGAUUUAGCCACUUUUUAAAGAAAGGGGGACUUGGAAGGCUUAUUCACUCCCAACGAAGACAA
GAUAUCCUUGAUCUGUGGAUCUACACACAGGCUUACUUCUCCUGAUUGGCAGAAUUAACAACCCAGGACCCAGGGAUC
AGAUUCCACUGACCCUUGGAUGGCGCUACAAGCUAGUACCAUUGAGCCAGAGAGAUUAGAGAGCAACAAGGA
GAGAACACAGCUUGUJACACCCUGUAGCCUGCAUGGAUGGACCCCGAGACAGAGAGUUAUAGAGUGGAGGUUU
GACAGCCGCCUAGCAUUUCAUACAGUGGCCCGAGAGCUGCAUCCGGAGUAUUAAGAACUGCUUAUCCGAGCUUGC
UACAGGGACUUUCCCGUGGGACUUUCCAGGAGGCGUGGCCUGGGGACUGGGGAGUGGCGAGCCUCAGAUCC
UGCAUAUAAGCAGCUGCUUUUUGCCUGUACUGGGUCUCUCUGGUUAGACCAUUCUGAGCCUGGAGCUUCUGGCUA
ACUAGGGAACCCACUGCUUAAGCCUCAUAAAGCUUGCCUUGAGUGCUUACAAGUAGUGUGGCCUUCUGUUGUGUGA
CUCUGGUAAACUAGAGAUCCCUAGACCCUUUUUAGUCAGUGGGAUAAUUCUUAAGCAGU

图 10D

>gi|9629357:5771-8341 人免疫缺陷病毒1,完整基因组(ENV基因)

```

ATGAGAGTGAACGAGAAATATCAGCACCTTGTGAGATGCGGTGAGATGCGGCACCATGCTCCTTGGGATGTTGATCATCTGCEAG
TGCTACAGAAATTTGTGGTCAAGCTCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCCACACTCTATTTTTGTCCATCAGATG
CTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAGAAGTAGTATTG
GTAATGTGACAGAAATTTAAACATGNGGAAATGACATGTLAGAACAGATGATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAG
CCTAAGCCATGTGTAAATTAACCCACTCTGTGTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATGATATACTAATACCAATAGTAGTA
GGGGAGAAATGAGAAAGGAGAGATAAATAAATCTGCTCTTTCAATATCAGCACAGCATAGAGGTAAAGGTAGGAGAAAGAA
TATGCCATTTTATATAAATTTGATATAATAACCAATAGATAATGATACACCACTGTTAAGTTGACAGTTGTAACAACCTCAGTCAT
TACACAGGCCCTGTCCAAAGGTAATCCTTTGAGCCCAATTCOCATACATTTATGTGCCCCGGCTGGTTTTCGGATTCTAAATGTAATA
ATAAGACGTTCAATGGAAACAGGACCATGTAACAATGTCAGCACAGTACATATGTAACAATGTCAGGAAATAGGCCAGTAGTATCAACTCAA
CTGCTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAGAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTACCGGACANTGCTAAACCATATATAGTACA
GCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTAACAGACCCCAACAATACAGAAAGAAAGATCCGTATCCAGAGAGGACCCAGGGAGAG
CATTTGTTACAAATAGGAAATATAGGAATATAGAACCAAGCACATGTAAACATTAGAGCAAAATGGAATAACACTTMAAACAG
ATAGCTAGCAAAATTAAGAGAACAAATTTGGAATAATAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGCCCCAGAAATTTGTAAC
GCACAGTTTAAATTTGGAGGGGAATTTTCTACTGTAAATCAACAACTGTTTAAATAGTACTTGGTTTAAATAGTACTTGGAGTA
CTGAAGGTCAAATGAACAAGGAAGTGACACAATCAACCTCCATGCGAATAAACAATAATTATAACATGTGCGACAGAAAGTA
GGAAAGCAATGTAATGCTCCCTCCCATCAGTGGACAAATAGATGTTTCATCAATATTACAGGGCTGCTATTACACAGACAGATGGTGG
TAATAGCAACATGAGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGAGATATGAGGGAACAATTGGAGAGAGTGAATTTATATAATATAAG
TAGTAAATAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCCAAGGCAAGAGAGAGTGGTCCAGAGAGAGAAAGAGAGCAGTGGAAATAGGA
GCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGAGCAGCAGAAACACTATGGCCGAGCTCAATGACCTGACCTACAGGCCAGACAAATTTAT
GTCTGGTATAGTGCAGCAGACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCCACAGCACTGTGCACTCAGCTCTGGGGCATCA
AGCAGCTCCAGGCAAGATCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGATTTGGGTTGCTCTGGAAACTC
ATTTGCACCACTGCTGTGCTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGGAATCAACAGACCTGGATGGAGTG
GGACAGAGAAATTAACAACAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAAATCCCAAAACCCAGCAAGAAAGAAAGATGAACAAGAAAT
TATTGGAATTAGATAAATGGCCAGTTTGTGGAATGTTTAAACATAAATTTGCTGTGTATATAAATTTATTCATATATGATA
GTAGGAGGCTTGGTAGTTTAAAGTAATGTTTTCCTGTACTTTCTATAGGAATAGAGTTAGGGAGGATATTCACCATTTATCGTT
TCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAACAGAAAGGTGGAGACAGAGACAGACAGATCCOA
TTCCGATTAGTGAACCGATCCTTGGCACTTATCTGGACCGATCTGGGAGCCTGTGCTCTCTCAGTACCCCGCTTGACAGACTTA
CTCTGTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGACCGCAGGGGTGGGAGCCCTCAAAATATGCTGGAAATCTCTACAGTATTG
GAGTCAGGAACATAAGAAATAGTGCCTGTAGCTTGCCTCAATGCCACAGCCATAGCAGTGGGACAGATAGGCTTATAGAG
TAGTACAGGAGCTTGTAGAGCTATTGCGCACATACCTTAGAAGAAATAGACAGGGCTTGGAAAGGATTTTGTCTATAA

```

图 11

```

>gi|9629357:336-1838 人免疫缺陷病毒1,完整基因组(ENV基因)
ATGGGTGCGAGACCGTCAGTATTAAAGCGGGGAGAAATTAGATCGATGGGAAATAATTCGGTTAAGCCAGGGGAAAGAAAATA
TAAATTAAACATATAGTATCGGCAAGCAGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCCTGGCTGTAGAAACATCAGAAAGGCTGT
GACAAATACTGGGACAGCTACACCATTCCCTTCAGACAGGATCAGAAAGAACTTAGATCATATATAATACAGTAGCAACCTCTAT
TGTTGTCATCAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAGTAAGAAAGG
ACAGCAAGCAGCGTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAATTAACCTATAGTCAGAAACATCCAGGGCAAAATGGTAC
ATCAGGCCATATCACTAGAACTTTAAATGCAATGGGTAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAAGAGTAGATACCCATGTTT
TCAGCATATCAGAGGAGCCACCCACACAGATTTAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTT
AAAGACACCATCAATGAGGAAGCTGACAGATGGGATAGATGCTCATCCAGTGCATGCAAGGCTTATGCAACAGCCAGATGAGAG
AACCAAGGGGAGTAGACATAGCAGGAACCTACTAGTACCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATATCCACTATCCCAAT
GGAGAAATTATATAAAGATGGATAATCCCTGGCATTAATAAATAGTAAGAAATGATAGCCCTACAGCATTCGACATTAAGACA
AGGACCAAGGAACCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAATCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAATAATT
GGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAATGGCAACCCAGATTGTAAGACTATTAAAGCAATGGGACCGGCTACACTAGAA
GAATGATGACAGCATGTACAGGAGTAGAGCAACCCGCGCATTAAGGCAAGAGTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAAGTAACAATT
AGCTACCATATGATGACAGAGGCAATTTAGGAAACCAAGAAAGATTTGTTAGTTCATTTGTTGCAATGTTGGCAAGAAAGGCAACAG
CCAGAAATTGCAAGGCCCCCTAGGAAAAAGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGCAACCAACCAATGAAGATTGTACTGAGAGACAG
GCTAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCCTTCTACAAGGGAAGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAAGAGCCCAACAGGCCCAAC
AGAAGAGAGCTTCAGGCTCTGGGTAGAGACAACTCCCTCAGAAAGCAGGAGCCCGATAGACAAGGAACCTGTATCCCTTTAACTT
CCCTCAGGTCACCTCTTGGCAACGACCCCTGTCACATAA

```

图 12A

>(gi|9629357:5377-5591, 7925-7970) 人免疫缺陷病毒1,完整基因组(ENV基因)

```

ATGGAGCCAGTAGATCCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAAGCCCTAAACCTGCTGTACCAATTGCTATTTGTA
GTGTTGCTTTCATTGCCCCAGTTTGTTCATATAACAAAGCCCTTAGCCATCTCTATGCGCAGGAAGAAACCGGAGACAGCCGACGAAGAG
CTCATCAGAAACAGTCAAGCTTCTCTATATCAAAAGCAACCCCACTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAA
TAG

```

图 12B

```

>NM_009693 (MM ApoB)
UACCUGCCUGAGCCUCCGCCUCCGAAAGACCCUGUAGAGCAAGCAGACAGGGGCUAGGCCUUGGCCAGGCCACAGCCAGGAAGCCACC
CCACCAUCCAUCCGCCAUGGGCCACAGAAAGCCUCCUGCGGACGCCUUUAUCUGUGCUUUCUGCUAUCUGUUUUUGBACACCA
CCGUCUGGGCUCAAGAUAGUCCUGGAAACUUAAGCUUCAGCUCUCCAAAGAUCCAUCUGAUUCAAAGCACCUCGGAAGAUAC
GUGUACAAUAUGAAGCTUGAAGUCCAGCGGUGUCCAGGCCACAGUGACUCCAGAGGCCCAAGAUCAACUGUAAGGUAGA
GCUGGAGGUCCCCCAAUCUGUGGUUUCAUCAUGAGGACCAACAGUGUACCCUAAAGAGGUGUAGGCUUCAAACCCUGAGGGCA
AGGCCUUGAUGAAGAAACCAAGACUCUGAAGAGUUUGCAGGCCAUGUCCAGUACGAAUCUACAGUGGCCAUUCCUGAAGGG
AAACAAUUGUUCUUAACCCUGACAGGAUGAACCUUAAUAUUCUGAACAUAAGAGGGGCAUCAUUCUGCUCUUCUGGUUCC
CCCAGAGACAGAAAGGAACCAACAGAGUUGUUCUGGAUACCGUGUAGGAAACUGCUUCAAUCUGGUUACCGUGAAUUCAGAA
AGGGAACCGUACCAACAGAAUUGUCCACAGAGAGAAACCUUGCAGCAUGUGACGCUUCCAGGCCAUCAUAAGUUGACGCCU
CUCCUCUCAUCAAAGGCCUGUCCACCCUUGUACAUCUUAUCAGCAGCAACAAUUGCCAGUACACCTUGCAUCCUAGAG
GAAGCAUGUUCUGAAGCUUCUGAUGAGCAGCAUCUUIUCCUCCUACAGAAUAGUAUGGGAUACUAGACACAGUG
UUACACAGAAACUGAGUUCUAGACACACCUAAGAUCAACAGUCCUUCAGUGAAGUACCAACCGGAUGGUCUGGCCUUI
GAGAGCAACAGUCCAGUACUCCCAAGCAGGCCUGAUGCUUUUGAAGACCUUACAGAACUGAAAUUUGUCCAUUCUACA
GCAGAUUCUACAGAGAGCAAUUCUUCUCAAUAACUGGUUACUGAGCUGAGAGGCCUACUGGUGCAAGCAUACAUCUCCUUGC
CACAGCUGAUUGAUGUCCAGCCCAUCAUUUAACAGCCUUGGUUACAGUGGACAGCCACAGUGCUUAUAUCAUCCUUCU
UGGUGAAACACUGAGAGGCUACCCUCCUUGGUUAUAUUGUACCUAUCUGAUGGUUUGAUCAGUCCAAUCCUCAAACACAGAG
CCUGCAGGAAAUUCUUAUAUCUCCAAAGGACAGGAGCCACUUCUGUAUGCAGUGAGCCACCGAGUUAACAGCUUAACAGCUUUUG
AUGUGGACCAUUCAGGAGCCAGUUCUGCAGGAUADCGCUGGUUAUCUUGUUAACAGAUCCACAUGAUGCAACGGGCAUUGAA
GACCAACCTUUCUGAUGGUGUUAUGGAAUUAUGGGAAGAACCAUGGAUUGCCAGCCUCAAUUCUCCAGUCU
GAGCUGUGUACCAAGUACAAACCAUCUCUGUAGUACAGAAAGCUCUCCAGGCCUUGAGGAAGAUUGAACUGGAAGAGG
UCCGACGUAUCCUUGUAGUACAUUGUAAUUGGUGCCUCCUGGAGAGAGACUGGCCUCCUUAUCUGUGUGAUGAAGAAC
CCUCCUCAUCAGAUUAACAAAUUGGCCAACUUCUCCAAUGGGAACAGAGUGAGGAGAAACUUCGUGGCAUCCUACAU
UGCCAAUUCUUGAACUCGGAAGAACUGUAUGUCCAGAUUGUCAAUUGUUAUCAAUUGCUUUCUCCAAUUGGAGAAUUCUCAAUUCCAA
CGAUCAGGACUUCAGAAAUUUUCCGAAACUUAUGAGAUUUCCAAUUCUGCUUUCUCCAAUUGUCCAAUUGUCCACAGUCUCAA
AUAGAGGGAUUCUUAUAUUGAUCCAGGUAUUCUUCUCCAGAGAAAGCUUGCUGAAACAAACUCCACAGUUCUUGGACUUGC
UUCAUUUGAUUCUUGAGAUGGUUUAAGGAAAGGGUUGAGCCAAACUAGAGCTUUIUUGGUAAGCAAGAUUCUUC
CAGACAGUACAACAGGCUUUGUAUUGGUAUUGGCCGAGUUCAGAUUGGUUCCAGGUUCCAGGUUCCAGUAGAAUUCUAAAGA
ACUACAGAUUGCAACAGUACAGGACAUUGGUAUUGGAAUUCUCCAUUGGGAACAGUUGAUAAGAUUUGAAAUUCUAAAGA
AAUUCUGAAGCCAGGCCUUAUCUCCGCAUCCUAGGAAAGAGCUAAGCUUUGUAGACUCCAAAGACUCCAAAGUCCUGGGAAGC
UGUUGCUGAGUGGUCACAAACUUGCAGGGAUCCUCCAGAGAGGUUAACAGUGCAAGGUGCAAGGCCUUGUUGGAGUUG
CUCCACUACAUUGGACAUAUGCCUUUGAGUCCUCCAGAGAGGUUAACAGGACAGAGUAGUGGCAAGGCCUUGUUGGAGUUG
CCCCGGAUCAAAGGUGGUUAAGAUUGGAUUAAGCCAAUUAACAGGACAGAGUAGUGGCAAGGCCUUGUUGGAGUUG
UGACAAUAUUGGCAUCAUAUCCAGACUUUGCUUAAGAGCAUGUCCAGAUAGACACCAACUUCUCCACAGUCCAGGCCUUGGAG
GGGAGAGUGGCCUAGAGGCGGAGCUAGAGGUCAUUCUUCUCCAAAGAGGCCAGUACAGCUUUCAGUGGCAACUUGCAAGCCACAC
ACUGCAUUCUGGUUUAACCAAAACAGAGAGUACUCCUUGGUUGAGAACAGGCAUCCUGGUCAACUUGCAAGCCUUCU
UCACUGGAUAGACUACUGUACCAAGGAGCUUAUCUCCAGCCAGUCCAGGAGUCCUCCUUAUCCUACUCCUAGCAGGGGAC
ACAAGGUAGAGCUGGAGCUGAGGCCCAAGGAGAGAGUAGUUCUCCAGUCCACUUGAACCUUAGAACUCCUAAAAGAGGACAA

```

图 13A

GGUUUUUGGUGACACAUAUUGAAGUTUCCUAGAGUUAAGCAGAGUGGACGAGUCUGAAGCUACUGUACUGUCAAUAUAUUAUUGGGA
 GAGCAGGACCUUAUUCUAGUGAAGUCCUAAUUCACAGGGUUGAUGUCAAUCUCCGGGACAAUAUAUAAGAGUUAUAUGAUGAUAUCUGCU
 AAGAGACAAAAACAUAUAACAACUACUCCUGGACAUAUCAGAAACAAGAGAAAUACAUGAGGUCUCUCUCUGGGCCACUUGAGUUAUGA
 UUAUAAAGGAGAGUUGGCAAGAUCAAAGGUGUUGUUCUUAUCCACGUTUUGCAAGCAGAAAGCCAGGAGUGAGGUCACACCCACUGGU
 CCUCCACCCAAACUGUCUCUUCUCCAAUUGGACUACUUGCUACAGCUUACGGCUCAAACAUAUUCCAAAGAGAGUGACAUGGCCGUUAUGAU
 AAUUGAGAUAAUAAGAAUUGAUUGGAAACACGGGAACCAAUUGUGGAUACCAAAGAGUGCCUCCAAUAUUCCUGUGGACUUAUUCUCCA
 UUAUUAUCCUAGAAUUGUUGCAUGAGUAUGCCAAUUGGUCUCCUGAUCACAGAGUCCUCAAACAGAGUUGACUUAUUGGAGACAUGCGGU
 CCCAAAUUAUUGUUGCAAACAACAACUGGCUUCAGAUUGGCAACCGAGGGUCUUCUUAUCCCCCAAACUCUACAGGAUCAACCUCAAU
 AGCCUCCAGAGUUGAACCUCCUGAAGAAUUGGACUGUCUGACUUCCAUAUUCAGACAACCCUUCUCAAAGAGACUGAUGGCGAGAGU
 CAAAUACACAUAUAACAGGAACAUAUAACAUAUUGACUAUCCUUAUGCCUUGGGUGGCAAGUCUUAACAAGAUAAGCUUCAAAGUCCAG
 AGAGUUGAGGACACCAAGCCUCAAACUUCAGUUGUGGAUAUCCAUUCUGCCACUUCOGAGAGUCCAGGUUCCCAACUUAUACAUAUC
 CCCAAGACACAUCAGCUCUACAGUGCCUUCUUGGGUGUUGUAAGACCUUUAACAUAUUGUCUACAGCAUAUUGUAACAACUGGUCAGC
 CUUUAACAUCUGUGGCAACAACAGGACGACACCAUUCAGCCUUCAGGCUACUAACCGCAUGAAGAGACUGACUUCUGUGUUGAGUACCUUGU
 UUUUCCUACAGUGGCAAGGAUCUGGAGAAACAACAUAUGACAGCAAGAACAUAUAUUAUUGUCCUGUGAUGGACUUCUACACCAU
 AAUAUUUUAAGACUCAAPUUAAGUACGCCACGUAAGAAAUUUGGAAACAGCCCGAGUUAACAAGGUUAUAUAUAUUGAUAAC
 AUUCUAGUGCCUUGGACACAGAGUUGUCGUACUGUUCACCUAGACUCAAAAGAAACAACAUAUUAUCGUCAAAAGAUUAUUAAGG
 UUAUGGACAGUUCAGAGCUUCUUAUUAUGUCUAAAGGCAAUUUGGCCUUGUCUUGAGAGAGAGAUUGUUAACAACUGGCCAGCUG
 AGCGGGAAUCCAAACAUGAGAUUAACUCCACCUACUUCACAGGCAACCAACAGAUUCUGGGAAUUGUACAGGAGUGGAGCCUUGUC
 CAUACACUCCCACUUCUGACCUUGCAAGAUGGCAUAUUAAGAAACAAGCUUCCUUGAAUAUAUGAAACUAUAACUUAACUCUGAAAU

图 13B

[illegible]

图 13E

AGAAUUCAGTUTCCCAUAUCACACACAAUUGAAGUACCUA CUUUTUGCAAGCUUAUACA GAUUCUGAAAUCCAAUUCUCCUC
 UUUUCAUUAAGUCAAUUGCUGACAUAAGGGAUUGGAUCCACUACAGCAACGAAGCAGUAUCCGACUUCACUACUGGCCAAA
 GGAGAGUCCAAAUAAGAAUUCUACA UUUUGAUUUUCAAGCAUUGCAACCUUACAAACCUUACAAUUAUCCUGCUGCAUAA
 GGAGUCAGUGAAUUCUCCAGCAAGUACUUGAGAACCGGAGCAUUGGAGCAAAUCCUGUHUUUUGGAAUUGCUAUUGAGGGAUAAU
 CAAACACAGUGGCAAGUTUA CACACAGAAUAAUUA CACUGGAGCUUAGUAUUGGAGUUAUUGCAAGUAUAA CAAUACGCUUACC
 CUGGAUAGCAACACUAUUA CUUCCACAAUUGAACAUCCCAAACUGGACUUCUAGUCAGGCGACCTUGGCAACGAGAUCAA
 GACACUGUUAAGCGGCCACAUAGCAUUCUUCUGGAAUAGGGUCAUGGAUUGGGCCUGCCCAAGAUUCUAGAUAGG
 GAACACUAGAAUACA AAUAGUUA CCAUAGAGGACCCUACUUCUUGGAGCUUCCAAUAGAUAUAGCAUAGCAACACCUA
 AGAGUAAACCAAACUUGGUUUAUGAAUCUGGCCUCCUCA CUUUUUAACUUGAAUUAUACAAGUCAAUUCUCCAGCAUGU
 GGGCCACAGUJUUAACUGCUUAAAGCAUUGGCAUUGUUGGAGAGGGAAGGACAGUUAUUGGAGGCAUGAUUCUUAUUA
 AUGGAAAGGUUAUUGGAA CUUUGAAUAAUUCUUCUUCUUCUUCAGCCAGCCAUUUGAGAUACA GGCACUCCA CAAA CAUAGAAGG
 AAUUGAAAGUUCGUUUUCCAUAAGGUUAACAGGGAAGAUAGACUUCUGAAUAA CUUUGCACUHUUCUGAGUCCAGUGGCCA
 GCAAGCAAGUUGGCAAGUAAGUGCUAGGUUCAAUCAGUAUAGUACAACCAAAUUCUUCUGCUGGAAACAA CGAGAA CAUUAUGG
 AGGCCAUUGUAGGAUAAUUGGAGAGCAAAUUCUGGAUUCUUAACAUUCUUAACAAUUCUGAAUUGCGUUAUCCUUAACA
 AUAUACAACUCCUCCACUGAAAGAUUCUUCUUAUGGGAUAAACAGGCUUGAAAGGAUUCUUGAAUAAACGACAAUUAU
 UGAUUUAAGUUAUAAAGCUCAGUAUAGA AAACAAACA CAGGCCAUUCACACA AAUCCUUGGCUUGGCUUGGAGUUAUCA
 GUACAGCAUCAAUUCUUGUACAGGCAUUCUUGAAUAAACAGAAACAUAUGCAUUAUUCUACA CCAAAUCCUAUAUAGAAA CA
 AAAUUAAGUUGAUAUAACAAGCUGAAUAAUUCUCA CAGCAGUCCUCCAGGACCUUUA AAUUCUGGAUACA CUGUUCUAGU
 UGUCAUUGUJAGUGUCUCCAUA CCAUAGAGAUUGCGCAUUCGCGCAUUGUHUCCCAAAGCAGUCAGCAUGCUUA GUUUU
 CCAUCCUAGGUUCGACGUCGUGHCCTU CAUAACAUAUUAUCCUGCCAUAUAGAGCUGCCA CUUUAUUGUCCUAGAAU
 CUCAGCUUCUCUCCACAUAUUCAGGAUUGUGUACCAUUAAGCCAUAUUAUUCUGGCAUUGGCAUUAUUGGCUACAUAUUA CCUAUGAUU
 CUCCUUAUUAUCAGUGUCAUCACACUGAAUACCAUUGCUGAACUUUUAAC CACAGAUUAUUGUGCUACAUCUUCUUCUUAU
 CUUCAUCUGUCAUUGAUGCAUGGCAGUA CAAAUUAGAGGCA CCAACA GAUUGACAAGAAUAGGGGAUUGAAGUUAAGCCACAGCU
 CUGUCUCUGAGCAA CAAAUUGUGGAGGUAGUCAUAA CAGUACUGAGCUUAACCA CGAA AAUUAUGGAAGUGUCAUGGGCAA
 AACCACAAAGCCGAAAUUCCA AUUUGAGAAUGAAUUAHCAAGCAAGAA CUUAAUGGAAUUA CCAAGUCAA ACCUACUGUUCU
 CCUCCAUGGAAUUAUUAAGUAUUAUUCUUAUUGCUUA CUUACCGCUAAAGGAGCAUUGACCA CAGCUUAGCUUUGGAA
 AGCUCACCUUCUUA CUUUUCCA UUGAGUCAUUA CCAAAGGAGUUGCAGGGUUCGUUCUUCUUGGGAUUAUUGACGGAACUUAU
 UGCUAGUSAGGCCAACACUUA CUUGAAUUC CAGAGCA CAGCUUUCAGUGAAGCUGCAGGGA CUUCCAAA AUUGAUGAUUUCU
 GGAACCUUGAAGUAAAGAAAUUUGCUGGAGAGGCCACACUCCACGCAUUAUUCUUCUGGAGCACAGUACGAAACCAAC
 UUA CAGCTAGAGGGCCUUCUUCACCAACGGAGAACAUACAAGCAAGCCACCCUGGAA CUUCUCCAUUGGCAAUUGUCAGCUU
 UGUUACAGGUCCAUGCAAGUACGCCAGUUUCCUUGAUUUUCCUGA CUUUGGCCAGGAGUGGCCUUGAAUGCUAAACUAAGA
 ACCAAGAGAUCAUGGA AAUUGAGUCCCGAUUAUUCUGGUUCUUC CAGAGCCAGGCUUUAUCCAAUGACCAAGAAAG
 GCACA CUUUGACAUUGCAGGAUCCUUAAGGACACCUUAAGGUUCUCAA AAUUAUCCUUAUCCAGUUAUUGACACAGCUUAUG
 GGAUUUCCUAAAGCUGGAGUUAACCA CAGCAUUGGUUAGGACAGCAUUCUUGUUAUUA CUCCUUGGCUUGAAACUAAUUA
 CCAAUGGCUUAUUAUUCUCCAUCCUGUA AAAGUUUGGCUUGAUAUUAUUA CUCCUUGGCUUGAAACUAAUUAUGAUUAUUA
 GUUCUUGUCAUGCCUA CGUUCUCCAUUUUA CAGAUUCUAGGUUCCAUUGGCAACUUGAGCUUCAGAGAAUUA CAAAUUA
 UAAGAAGCUGAGAACUUCAUCAUUAUUGCCCUCAAACCAACACUCCCGAGGUAUAAUUCUUGAGUUGUUAUUA CAAAU

图 14D

[illegible]

图 14E