



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110870871 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 201811503623.5

(22) 申请日 2018.12.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110870871 A

(43) 申请公布日 2020.03.10

(30) 优先权数据
2018101287 2018.09.04 AU
16/120606 2018.09.04 US

(73) 专利权人 澳门科技大学
地址 中国澳门氹仔伟龙大马路

(72) 发明人 姜志宏 严通萌 曹凯悦

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280
代理人 李渤

(51) Int. Cl.
A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101796184 A, 2010.08.04
CN 1720999 A, 2006.01.18
US 2009239815 A1, 2009.09.24

Da-Cheng Hao等. Identification of Taxus microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis. 《Physiologia Plantarum》. 2012, 第146卷(第4期), 第388-403页, 参见全文.

Intisar Husain等. Elevation of Topoisomerase I Messenger RNA, Protein, and Catalytic Activity in Human Tumors: Demonstration of Tumor-type Specificity and Implications for Cancer Chemotherapy. 《CANCER RESEARCH》. 1994, 第54卷(第2期), 第539-546页, 参见全文.

Sizolwenkosi Mlotshwa等. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants. 《Cell research》. 2015, 第25卷(第4期), 第521-524页, 参见全文.

Guilherme Loss-Morais等. Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. 《Biology Direct》. 2013, 第8卷(第6期), 第1-5页, 参见全文.

审查员 陈东骥

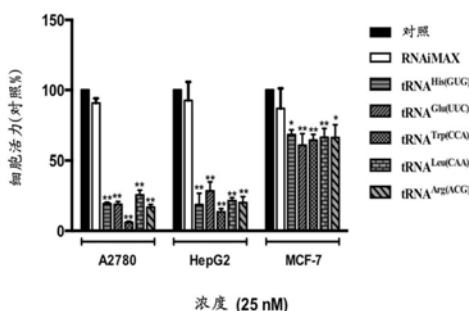
权利要求书1页 说明书19页
序列表36页 附图11页

(54) 发明名称
用于治疗癌症的方法和药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗癌症的方法和药物组合物。具体地, 本发明提供了一种RNA分子在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物或用于抑制癌细胞生长、增殖或转移的药物中的用途。本发明还提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法, 包括向受试者施用有效量的RNA分子的步骤, 其中该RNA分子分离自或源自红豆杉属植物。本发明还提供了一种抑制癌细胞生长、增殖或转移的方法, 包括使所述细胞与所述RNA分子接触的步

骤; 和用于治疗癌症的药物组合物, 所述药物组合物包含所述RNA分子和药学上可接受的赋形剂。本发明还有双链RNA分子和包含该双链RNA分子的重组载体。



1. 一种RNA分子在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物或用于抑制癌细胞生长、增殖或转移的药物中的用途,其中所述癌症是卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌或肺癌,所述癌细胞为卵巢癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞、结直肠癌细胞或肺癌细胞;其中所述RNA分子是双链RNA分子,所述双链RNA分子的正义序列如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4的任一项所示,所述双链RNA分子的反义序列为其互补序列,或所述RNA分子是SEQ ID NO:201所示的tRNA分子。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述双链RNA分子还包含2聚体的3'悬突。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述RNA分子包含至少一种选自以下的修饰核苷:肌苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N⁶-甲基腺苷、N⁶-异戊烯基腺苷、2'-O-甲基腺苷、N⁶-乙酰基腺苷、1-甲基肌苷、假尿苷、二氢尿苷或2-甲硫基-N⁶-甲基腺苷。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症对紫杉醇具有抗性。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述癌细胞对紫杉醇具有抗性。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述治疗包括向受试者施用RNA分子的步骤,所述步骤包括使所述受试者的癌细胞与所述RNA分子接触。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述RNA分子以包含基因递送载体的组合物提供。

8. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其包含RNA分子和药学上可接受的赋形剂,其中所述RNA分子是双链RNA分子,所述双链RNA分子的正义序列如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4的任一项所示,所述双链RNA分子的反义序列为其互补序列,或所述RNA分子是SEQ ID NO:201所示的tRNA分子。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述双链RNA分子还包含2聚体的3'悬突。

10. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述RNA包含至少一种选自以下的修饰核苷:肌苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N⁶-甲基腺苷、N⁶-异戊烯基腺苷、2'-O-甲基腺苷、N⁶-乙酰基腺苷、1-甲基肌苷、假尿苷、二氢尿苷或2-甲硫基-N⁶-甲基腺苷。

11. 一种双链RNA分子,所述双链RNA分子的正义序列如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4的任一项所示,所述双链RNA分子的反义序列为其互补序列,所述双链RNA分子还包含任选的3'悬突。

12. 权利要求11所述的双链RNA分子,其包含至少一种选自以下的修饰的核苷:肌苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N⁶-甲基腺苷、N⁶-异戊烯基腺苷、2'-O-甲基腺苷、N⁶-乙酰基腺苷、1-甲基肌苷、假尿苷、二氢尿苷或2-甲硫基-N⁶-甲基腺苷。

13. 一种重组载体,其包含权利要求11或12所述的双链RNA分子。

用于治疗癌症的方法和药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及通过向受试者施用核酸来治疗患有癌症的受试者的方法。所述核酸特别是RNA分子,但不仅仅是RNA分子。本发明还涉及包含用于治疗的核酸的药物组合物及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症已成为全球导致死亡的最常见疾病。已经将中药(TCM)用于治疗 and 预防癌症,而大量的研究工作已经有助于研究分离的小分子如生物碱、萜类化合物、黄酮类化合物等在治疗癌症中的有效性。发现一些生物碱具有抑制癌症的作用,例如通过增强抗癌药物的功效。然而,它们中的大多数通常对人体有毒。此外,诸如DNA、RNA和蛋白质的大分子通常被认为是不稳定的并且在人活体中的效果差,因此在所述治疗中没有被广泛认为是合适的。

[0004] 目前,一些研究表明,非编码RNA(ncRNA)如微小RNA通过在几乎所有真核生物中靶向RNA转录或转录后过程的不同方面而具有不同的调节作用。Mlotshwa,S.等人(Cell research 2015,25(4),521-4)提出,食物中的外源植物微小RNA可被哺乳动物的消化道吸收并通过血流输送到各种组织细胞,在那里它们能够调节哺乳动物基因的表达。Goodarzi,H.等人(Cell 2015,161(4),790-802)揭示源自内源性tRNA的片段可通过结合和拮抗与发病机制相关的RNA结合蛋白的活性来抑制乳腺癌细胞中多种致癌转录物的稳定性。然而,仍然需要从各种来源,如用于治疗的植物获得有效分子。

[0005] 南方红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei*)是来自红豆杉科(Taxaceae)的物种,是广泛分布于中国的高海拔地区的观赏性常绿灌木或树木。作为重要的药用植物,它已经被开发用于生产小分子抗癌药物,如紫杉酚(paclitaxel),也称为紫杉醇(Taxol)。然而,已经发现患者对包括紫杉醇在内的常用药物产生抗性,因此仍然需要对患有癌症的患者和对常用药物具有抗性和/或与不同并发症关联的患者进行新的和改进的治疗。

[0006] 发明概述

[0007] 第一方面,本发明提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的RNA分子的步骤。根据本发明施用的RNA分子分离自或源自红豆杉属植物。

[0008] 在一个实施方案中,所述RNA分子包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列或其功能变体或同源物。

[0009] 优选地,本发明的RNA分子的序列长度为约50至200个核苷酸或10至30个碱基对。

[0010] 在一个实施方案中,所述RNA分子为非编码分子,特别为转运RNA分子。

[0011] 在供选择的实施方案中,所述RNA分子是双链RNA分子,其包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,和互补反义序列。

[0012] 另一方面,本发明提供了抑制癌细胞生长、增殖或转移的方法,包括使所述癌细胞与分离自或衍生自红豆杉属植物的有效量的RNA分子接触的步骤。

[0013] 在示范性实施方案中,本发明的癌细胞为卵巢癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞、结

直肠癌细胞或肺癌细胞。

[0014] 另一方面,本发明涉及用于治疗癌症的药物组合物。所述药物组合物包含RNA分子和药学上可接受的赋形剂,其中所述RNA分子分离自或源自红豆杉属植物。

[0015] 更进一步地,本发明涉及双链RNA分子,其包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,互补反义序列,和任选的3'悬突(overhang)。

[0016] 另一方面,本发明涉及包含双链RNA分子的重组载体。再另一方面,本发明提供了本发明的RNA分子、药物组合物和重组载体在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物或用于抑制癌细胞生长、增殖或转移的药物中的用途,其中所述RNA分子分离自或源自红豆杉属植物;

[0017] 优选地,所述RNA分子分离自或源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei* (*Taxus chinensis* (*Pilger*) *Rehd. var. mairei*)。

[0018] 更进一步地,本发明涉及双链RNA分子,其包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,互补反义序列,和任选的3'悬突。

[0019] 本发明通过施用分离自或源自红豆杉属植物的RNA分子,或特别是包含选自SEQ ID NO:1至100的序列的RNA分子,提供了治疗各种来源的癌症的新颖且有效的方法。所述RNA分子的施用也适用于抑制癌细胞的生长、增殖或转移。本发明人发现从红豆杉属植物中分离的非编码RNA分子,特别是转运RNA分子,和源自红豆杉属(*Taxus*)的RNA分子在治疗癌症方面特别有用。序列长度为约10至200个核苷酸的RNA分子在体外抑制癌细胞的生长和增殖方面非常有效,并且在体内显示出抗肿瘤作用。所述RNA分子对紫杉醇抗性细胞系也有效。此外,包含分离自或源自红豆杉属植物的RNA分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物可以直接作用于癌细胞或肿瘤,因此可以具有更快作用的治疗效果。

[0020] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本文描述的发明易于进行变化和修改。本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤和特征,以及步骤或特征的任何和所有组合。

[0021] 通过考虑以下详细描述和附图,本发明的其他特征和方面将变得显而易见。

[0022] 附图简述

[0023] 图1显示了根据一个示例性实施方案的来自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的RNA分子的凝胶电泳谱,包括小RNA标准对照品(表示为“Ladder”)、小RNA组分和转运RNA^{Trp(CCA)}。

[0024] 图2是显示根据一个示例性实施方案的来自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的转运RNA的读取长度分布的条形图。

[0025] 图3是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和其中将转染试剂添加到细胞的RNAiMAX组相比,来自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的25nM RNA分子tRNA^{His(GUG)}、tRNA^{Glu(UUC)}、tRNA^{Trp(CCA)}、tRNA^{Leu(CAA)}或tRNA^{Arg(ACG)}对A2780细胞系、HepG2细胞系和MCF-7细胞系的细胞毒性的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0026] 图4A是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓度,即0.78nM、1.56nM、3.13nM、6.25nM、12.5nM和25nM的RNA分子tRNA^{Trp(CCA)}处理后,A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0027] 图4B是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓

度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM的紫杉醇处理后,A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0028] 图5A是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为22bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后,A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0029] 图5B是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为19bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0030] 图5C是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为22bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后,紫杉醇抗性A2780细胞(表示为A2780T细胞)的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0031] 图5D是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为19bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后,紫杉醇抗性A2780T细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0032] 图5E是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为22bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后,HCT-8细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0033] 图5F是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用源自南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的序列长度为22bp的不同的RNA分子以50nM的剂量处理后,紫杉醇抗性HCT-8细胞(表示为HCT-8T细胞)的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0034] 图6A是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM的RNA分子HC11处理后,A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0035] 图6B是显示根据一个示例性实施方案,与对照组相比,在使用不同浓度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM和200nM的紫杉醇处理后,A2780细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0036] 图6C是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM和200nM的RNA分子HC11处理后,紫杉醇抗性A2780T细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0037] 图6D是显示根据一个示例性实施方案,与对照组相比,在使用不同浓度,即0.16μM、0.8μM、4μM、20μM和100μM的紫杉醇处理后,紫杉醇抗性A2780T细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0038] 图6E是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓

度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM和200nM的RNA分子HC11处理后,紫杉醇抗性A549T细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0039] 图6F是显示根据一个示例性实施方案,与对照组相比,在使用不同浓度,即0.032μM、0.16μM、0.8μM、4μM、20μM和100μM的紫杉醇处理后,紫杉醇抗性A549T细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0040] 图6G是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM的RNA分子HC36处理后,HCT-8细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0041] 图6H是显示根据一个示例性实施方案,与对照组和RNAiMAX组相比,在使用不同浓度,即6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM的RNA分子HC37处理后,HCT-8细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0042] 图6I是显示根据一个示例性实施方案,与对照组相比,在使用不同浓度,即50nM、100nM、200nM、300nM、400nM和500nM的紫杉醇处理后,HCT-8细胞的细胞活力的条形图(平均值±SD n=3;*,p<0.05,**,p<0.001,相对于载体对照)。

[0043] 图7A是显示与1mg/kg紫杉醇和对照组相比,小鼠中异种移植植入的A2780细胞的肿瘤体积比例随时间的线形图,其中小鼠用RNA分子HC11或HC30与去端肽胶原一起以2.4mg/kg每周一次的剂量处理。

[0044] 图7B是显示与1mg/kg紫杉醇和对照组相比,具有异种移植植入的A2780细胞的小鼠的体重变化比例的线形图,其中小鼠用RNA分子HC11或HC30与去端肽胶原一起以2.4mg/kg每周一次的剂量处理。

[0045] 图8显示根据本申请的一个实施方案的tRF的设计过程。

具体实施方式

[0046] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0047] 如本文所使用,“包含”意指包括以下要素但不排除其他要素。“基本上由……组成”是指材料由相应的元素以及通常和不可避免的杂质组成,例如通常由用于获得材料的相应的制备或方法产生的副产物和组分,例如痕量的另外的组分或溶剂。“由……组成”是指材料仅由相应元素组成,即由相应元素形成。如本文所使用,形式“(a)”、“(an)”和“该”旨在包括单数和复数形式,除非上下文另有明确说明。

[0048] 本发明的第一方面提供了治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括向所述受试者施用有效量的RNA分子的步骤。根据本发明施用的RNA分子可以根据本发明公开的序列天然存在、修饰或人工合成,并且优选地,RNA分子分离自或源自红豆杉属植物。本发明的RNA分子不是以从植物中获得的煮沸提取物,例如煎煮液的形式提供的,因为可以理解,RNA分子在高温、碱性pH和核酸酶或二价金属离子的存在下易于自发降解。在一个实施方案中,本发明的RNA分子与基因递送载体一起提供,其将在后面详细描述。

[0049] 本发明的RNA分子的序列长度为约10至200个核苷酸,其可被视为小RNA分子。优选地,RNA分子的序列长度为约50至约200个核苷酸,约60至约150个核苷酸,特别是约70至约100个核苷酸。

[0050] 本发明的RNA分子包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列或其功能变体或同源物。术语RNA分子的“功能变体”是指与所述RNA分子基本相似的分子,其具有一个或多个不影响所述RNA分子的生物活性或功能的序列改变。不影响得到的RNA分子的功能特性的序列改变是本领域熟知的。例如,预期导致分子的-5' -末端和-3' -末端部分改变的核苷酸变化不会改变多核苷酸的活性。在一个实施方案中,本发明的RNA分子包含至少一种选自以下的修饰核苷:肌苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、2'-O-甲基腺苷、N6-乙酰基腺苷、1-甲基肌苷、假尿苷、二氢尿苷或2-甲硫基-N6-甲基腺苷。

[0051] 特别地, RNA分子的功能变体与根据本发明的非变体RNA分子具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的总体序列同一性。

[0052] 本文使用的术语“同源物”是指与根据本发明的RNA分子具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性的核苷酸。在一个实施方案中, RNA分子的同源物与所述RNA分子具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的总体序列同一性。

[0053] 在一个实施方案中, RNA分子是非编码分子, 优选地选自转运RNA分子、核糖体RNA分子、微小RNA分子、siRNA分子或piwi相互作用的RNA分子; 更优选的是转运RNA分子。tRNA分子是高度保守的RNA, 其在各种细胞过程中起作用, 例如逆转录、卟啉生物合成等。在一个具体实施方案中, 本发明的RNA分子包含选自SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:225的序列或其功能变体或同源物; 或RNA分子包含SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:205或其功能变体或同源物; 或RNA分子由选自SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:205的序列或其功能变体或同源物组成。

[0054] 在供选择的实施方案中, RNA分子是小RNA分子, 其序列长度为约10至约30个碱基对, 约15至约25个碱基对, 约19至约22个碱基对, 19个碱基对或22个碱基对。RNA分子包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列或其功能变体或同源物, 特别是SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:36的序列或其功能变体或同源物; 或由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列, 特别是SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:36的序列或其功能变体或同源物组成。优选地, RNA分子是双链RNA分子, 其具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物, 和互补反义序列。反义序列与正义序列互补, 因此反义序列优选选自SEQ ID NO:101至200或其功能变体或同源物。在具体实施方案中, 本发明的双链RNA分子具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:36的正义序列或其功能变体或同源物, 以及选自SEQ ID NO:101至SEQ ID NO:136的互补反义序列或其功能变体或同源物。本发明人意外地发现, 本发明的双链RNA分子在治疗癌症, 如下文详细描述紫杉醇抗性癌症中是特别有用的。

[0055] 本发明的RNA分子优选分离自或源自红豆杉属植物。红豆杉属植物包括但不限于欧洲红豆杉 (*Taxus baccata*)、短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*)、南方红豆杉 (*Taxus chinensis*)、南方红豆杉 (*Pilger*) Rehd. var. *mairei*、云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*)、喜马拉雅红豆杉 (*Taxus wallisichiana*)、东北红豆杉 (*Taxus cuspidate*)、苏门答腊红豆杉 (*Taxus sumatrana*)、墨西哥红豆杉 (*Taxus globosa*)、加拿大红豆杉 (*Taxus canadensis*) 和佛罗里达红豆杉 (*Taxus floridana*)。红豆杉属植物可以是紫杉醇的来源。在一个实施方案中, RNA分子分离自或源自南方红豆杉。

[0056] 更详细地,本发明的RNA分子的优选序列列于下表1和2中。在一个实施方案中,如表1中所示的SEQ ID NO:201至225的RNA分子分离自红豆杉属的植物,特别是南方红豆杉。这些序列通过植物的提取、RNA分离和纯化获得。发明人确定这些RNA分子与叶绿体有关。在实施例1中说明了从特定植物南方红豆杉 (Pilger) Rehd. var. mairei 获得RNA分子的一种可能的方法。应当理解,可以应用根据本文公开内容获得本发明的分离和纯化的RNA分子的其他合适方法,并且在不脱离本发明范围的情况下,可以对所述方法进行适当改变以获得改善的RNA分子产率。

[0057] 表1. 根据本发明,从南方红豆杉 (Pilger) Rehd. var. mairei 分离的RNA分子,特别是tRNA。

SEQ ID NO.	tRNA	序列 (5'至 3')	长度 (聚体)
[0058] 201	tRNA ^{His(GUG)}	GCGGACGUAGCCAAGUGGUCCAAAGGCAGUGGA	78
		UUGUGAAUCCACCACGCGCGGGUUCAAUCCCCG UCGUUCGCCCCA	
202	tRNA ^{Glu(UUC)}	GCCCCUAUCGUCUAGUGGCCCCAGGACAUCUCUC	76

		UUUCAAGGAGGCAACGGGGAUUCGAUUUCCCCU AGGGGUACCA		
203	tRNA ^{Trp(CCA)}	GCGCUCUUAGUUCAGUGCGGUAGAACGCAGGUC UCCAAAACCUGAUGCCGUAGGUUCAAUCCUAC AGAGCGCCA	75	
204	tRNA ^{Leu(CAA)}	GCCUUGAUGGUGAAAUGGUAGACACGCGAGAC UCAAAAUCUCGUGCUAAACAGCGUGGAGGUUCG AAUCCUCUUCAAGGCACCA	84	
205	tRNA ^{Arg(ACG)}	GGGCCUGUAGCUCAGAGGAUUAGAGCACGUGG UUGCGAACCACGGUGUCGGGGGUUCGAAUCCCU CCUCGCCCACCA	77	
206	tRNA ^{Asp(GUC)}	GGGAUUGUAGUUCAAUUGGUUAGAGUACCGCC CUGUCAAGACGGAAGUUGCGGGUUCGAGCCCCG UCAGUCCCGCCA	77	
[0059]	207	tRNA ^{Asn(GUU)}	UCCUCAGUAGCUCAGUGGUAGAGCGGUCGGCUG UUAACCGAUUGGUCGUAGGUUCAAUCCUAUU UGAGGAGCCA	75
	208	tRNA ^{Cys(GCA)}	GGCGACAUAGCCAAGUGGUAAGGCAGGGGACU GCAAUCCCCCAUCCCCAGUUCAAAUCCGGGUG UCGCCUCCA	74
	209	tRNA ^{Gln(UUG)}	GGGGCGUGGCCAAGCGGUAAGGCAACAGGUUU UGGUCCUGUUAUUGCGAAGGUUCGAAUCCUUUC GUCCCAGCCA	75
	210	tRNA ^{Gly(GCC)}	GGGUAUUGUUUAAUGGAUAAAUUUAUUCUUG CCAAGGAUAAGAUGCAGGUUCGAUUCGCGCUAC CCGCCCA	72
	211	tRNA ^{Ile(UAU)}	AGGGUAUAACUCAGUAGUAGAGUGUCACCUU UAUGUGGUGAAAGUCAUCAGUUCAAACCUGAU UAUCCCUACCA	75
	212	tRNA ^{Leu(UAG)}	GCCGCCAUGGUGAAAUUGGUAGACACGUCGUC UUAGGAAGCAGUGCUAGAGCAUCUCGGUUCGA AUCCGAGUGGUGGCACCA	83

[0060]

213	tRNA ^{Leu(UAA)}	GGGGAUAUGGCGGAAUUGGUAGACGCUACGGA CUUAAAAAAUCCGUUGGUUUUAUAAACCGUGA GGGUUCAAGUCCCUCUAUCCCCACCA	90
214	tRNA ^{Lys(UUU)}	GGGUUGUUAACUCA AUGGUAGAGUACUCGGCU UUUAACCGAcGAGUUC CGGGUUCAAGUCCCGGG CAACCCACCA	75
215	tRNA ^{Met(CAU)}	GCAUCCAUGGCUGAAUGGUCAAAGCACCCAACU CAUAAUUGGGAAGUCGCGGGUCAAUCCUGCU GGAUGCACCA	76
216	tRNA ^{Met(CAU)}	CGCGGAGUAGAGCAGUUUGGUAGCUCGCAAGGC UCAUAACCUUGAAGUCACGGGUUCAAUCCCGU CUCCGCAACCA	77
217	tRNA ^{Phe(GAA)}	GUCGGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAGAGGAC UGAAAAUCCUCGUGUCACCAGUCAAUCCUGGU UCCUGGCACCA	76
218	tRNA ^{Pro(UGG)}	AGGGAUGUAGCGCAGCUUGGUAGCGGUUUGU UUUGGGUACAAAUGUCGCGAGGUCAAUCCU GUCAUCCCUACCA	77
219	tRNA ^{Pro(GGG)}	CGGAGCAUAACGCAGUUUGGUAGCGUGCCAUCU UGGGGUGAUGGAGGUCGCGGGUCAAUCCUG UUGCUCGACCA	77
220	tRNA ^{Ser(UGA)}	GGAGAGAUGGCCGAGUGGUUGAUGGCUCCGGU CUUGAAAACCGUAUAGUUUAAAAACUAUCG AGGGUUCGAAUCCCUCUCUCUCCUCCA	91
221	tRNA ^{Ser(GCU)}	GGAGAGAUGGCUGAGCGGACUAAAGCGGUGGA UUGC UAAUCCGUUGUACAGACUAUCUGUACCGA GGGUUCGAAUCCCUCUUCUCCGCCA	91
222	tRNA ^{Thr(UGU)}	GCCUGCUUAGCUCAGAGGUUAGAGCAUCGCACU UGUAAUGCGACGGUCAUCGGUUCGAUCCCGAUA GAAGGCUCCA	76
223	tRNA ^{Thr(GGU)}	GCACUUUUAACUCAGUGGUAGAGUAAACGCCAUG GUAAGGCGUAAGUCAUCGGUUCAAGCCCGAUA	75

		AGGGCUCCA	
		GGGUCGAUGCCCGAGUGGCUAAUGGGGACGGAC	
224	tRNA ^{Tyr(GUA)}	UGUAAAUCCGUUGGCAAUAUGCUUACGCUGGU	87
[0061]		UCAAUCCAGCUCGGCCACCA	
		GCGUCCAUCGUCUAAUGGAUAGGACAGAGGUCU	
225	tRNA ^{Arg(CUC)}	UCUAAACCUUAGGUUAUAGGUUCAAUCCUAUU	75
		GGACGUACCA	

[0062] 如表2中所示的SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列和SEQ ID NO:101至SEQ ID NO:200的反义序列是根据本发明人工合成的。特别地,这些序列是根据表1的从南方红豆杉(*Pilger) Rehd. var. mairei*分离的序列制备的衍生序列片段。所述衍生序列片段分为以下三类:第一类为5'-tRFs,即包括成熟tRNA序列的5'末端,在D环、D环臂、反密码子环或反密码子环臂切断而形成的长度为2-35个核苷酸的片段;第二类为3'-tRFs,即包括成熟tRNA序列的3'-CCA末端,在T环、T环臂、反密码子环或反密码子环臂切断而形成的长度为2-35个核苷酸的片段;第三类为反密码子-tRFs,即在成熟tRNA序列的反密码子环或反密码子环臂切断而形成的长度为2-24个核苷酸的片段。例如从tRNA^{His(GUG)}得到的tRF包括22个核苷酸长度的5'-tRFs“GCGGACGUAGCCAAGUGGUCCA”,22个核苷酸长度的3'-tRFs“UCAAUCCCCGUCGUUCGCCCA”,19个核苷酸长度的5'-tRFs“GCGGACGUAGCCAAGUGGU”,19个核苷酸长度的3'-tRFs“AUCCCCGUCGUUCGCCCA”,以及17个核苷酸长度的反密码子-tRFs“GUGGAUUGUGAAUCCAC”。如图8所示,示出了根据本申请的一个实施方案的tRF的设计过程。

[0063] 每条正义序列与相应的反义序列一起形成双链RNA分子。如表2所示,SEQ ID NO:1的正义序列和SEQ ID NO:101的反义序列形成长度为22个碱基对的双链RNA分子,并且得到的RNA分子表示为HC11以便于参考。类似地,SEQ ID NO:2的正义序列和SEQ ID NO:102的反义序列形成长度为19个碱基对的双链RNA分子,并且所得的RNA分子表示为HC20。表中列出了本发明的其他RNA分子。

[0064] 双链RNA分子分为2组,即5'-末端基团(5'-t)和3'-末端基团(3'-t)。5'-t组RNA分子含有从植物中分离的相应全长RNA分子的5'末端部分;并且3'-t组RNA分子含有从植物中分离的相应全长RNA分子的3'末端部分。在另一个实施方案中,RNA分子可以包含从植物分离的相应全长RNA分子的反密码子环部分,并称为反密码子组RNA分子。SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列可以通过在全长RNA分子SEQ ID NO:201至225上的不同位点处切割来生成。

[0065] 此外,本发明的RNA分子可以包含3'悬突,优选包含2个核苷酸的3'悬突。提供3'悬突改善了RNA分子的稳定性。

[0066] 表2.根据本发明通过人工合成由表1中的序列衍生的RNA分子。

[0067]

来源	编码	SEQ ID NO.	正义序列 (5'至3')	SEQ ID NO.	反义序列 (5'至3')	长度 (bp)	组
tRNA ^{His(GUG)}	HC11	1	GCGGACGUAGCCAA GUGGUCCA	101	UGGACCACUUGGCU ACGUCCGC	22	5'-t
	HC20	2	GCGGACGUAGCCAA GUGGU	102	ACCACUUGGCUACGU CCGC	19	
	HC12	3	UCAAUCCCCGUCGU UCGCCCA	103	UGGGGCGAACGACG GGGAUUGA	22	3'-t
	HC42	4	AUCCCCGUCGUUCG CCCCA	104	UGGGGCGAACGACG GGGAU	19	
tRNA ^{Glu(UUC)}	HC16	5	GCCCCUAUCGUCUA GUGGCCA	105	UGGGCCACUAGACG AUAGGGGC	22	5'-t
	HC25	6	GCCCCUAUCGUCUA GUGGC	106	GCCACUAGACGAUA GGGGC	19	
	HC17	7	UCGAUUCCCCUAG GGGUACCA	107	UGGUACCCCUAGGG GAAAUCGA	22	3'-t
	HC43	8	AUUUCCCCUAGGGG UACCA	108	UGGUACCCCUAGGG GAAAU	19	
tRNA ^{Trp(CCA)}	HC30	9	GCGCUCUUAGUUCA GUGCGGUA	109	UACCGCACUGAACUA AGAGCGC	22	5'-t
	HC23	10	GCGCUCUUAGUUCA GUGCG	110	CGCACUGAACUAAG AGCGC	19	
	HC31	11	GUUCAAAUCCUACA GAGCGCCA	111	UGGCGCUCUGUAGG AUUUGAAC	22	3'-t
	HC46	12	CAAAUCCUACAGAG CGCCA	112	UGGCGCUCUGUAGG AUUUG	19	
tRNA ^{Leu(CAA)}	HC18	13	GCCUUGAUGGUGAA AUGGUAGA	113	UCUACCAUUUCACC AUCAAGGC	22	5'-t
	HC22	14	GCCUUGAUGGUGAA AUGGU	114	ACCAUUUCACCAUC AAGGC	19	
	HC19	15	UCGAAUCCUCUUCA AGGCACCA	115	UGGUGCCUUGAAGA GGAUUCGA	22	3'-t
	HC44	16	AAUCCUCUUCAAGG CACCA	116	UGGUGCCUUGAAGA GGAUU	19	
tRNA ^{Arg(ACG)}	HC32	17	GGGCCUGUAGCUCA GAGGAUUA	117	UAAUCCUCUGAGCU ACAGGCC	22	5'-t
	HC24	18	GGGCCUGUAGCUCA GAGGA	118	UCCUCUGAGCUACA GGCCC	19	
	HC33	19	UCGAAUCCUCUCUC GCCACCA	119	UGGUGGGCGAGGAG GGAUUCGA	22	3'-t
	HC47	20	AAUCCUCUCGCC CACCA	120	UGGUGGGCGAGGAG GGAUU	19	
tRNA ^{Asp(GUC)}	HC28	21	GGGAUUGUAGUUCA AUUGGUUA	121	UAACCAAUUGAACU ACAAUCCC	22	5'-t
	HC21	22	GGGAUUGUAGUUCA AUUGG	122	CCAAUUGAACUACA AUCCC	19	

[0068]

	HC29	23	UCGAGCCCCGUCAG UCCCGCCA	123	UGGCGGGACUGACG GGGCUCGA	22	3'-t
	HC45	24	AGCCCCGUCAGUCC CGCCA	124	UGGCGGGACUGACG GGGCU	19	
tRNA ^{Cys(GCA)}	HC34	25	GGCGACAUAGCCAA GUGGUAAG	125	CUUACCACUUGGCU AUGUCGCC	22	5'-t
	HC26	26	GGCGACAUAGCCAA GUGGU	126	ACCACUUGGCUAUG UCGCC	19	
	HC35	27	UCAAUCCGGGUGU CGCCUCCA	127	UGGAGGGACACCC GGAUUUGA	22	3'-t
	HC48	28	AAUCCGGGUGUCGC CUCCA	128	UGGAGGGACACCC GGAU	19	
tRNA ^{Asn(GUU)}	HC36	29	CCUCAGUAGCUCAG UGGUAGAG	129	CUCUACCACUGAGC UACUGAGG	22	5'-t
	HC27	30	CCUCAGUAGCUCAG UGGUA	130	UACCACUGAGCUAC UGAGG	19	
	HC37	31	GGUUCAAAUCCUAU UUGAGGAG	131	CUCCUCAAUAGGA UUUGAACC	22	3'-t
	HC49	32	UCAAUCCUAUUUG AGGAG	132	CUCCUCAAUAGGA UUUGA	19	
tRNA ^{Met(CAU)}	HC38	33	CGCGGAGUAGAGCA GUUUUGUA	133	UACCAAACUGCUCU ACUCCGCG	22	5'-t
	HC40	34	CGCGGAGUAGAGCA GUUUUG	134	CAAACUGCUCUACU CCGCG	19	
	HC39	35	GGUUCAAAUCCCGU CUCCGCAA	135	UUGCGGAGACGGGA UUUGAACC	22	3'-t
	HC41	36	UCAAUCCCGUCUC CGCAA	136	UUGCGGAGACGGGA UUUGA	19	
tRNA ^{Thr(UGU)}	HC50	37	GCCUGCUUAGCUCU GAGGUUAG	137	CUAACCUCUGAGCU AAGCAGGC	22	5'-t
	HC52	38	GCCUGCUUAGCUCU GAGGU	138	ACCUCUGAGCUAAG CAGGC	19	
	HC51	39	UCGAUCCCGAUAGA AGGCUCCA	139	UGGAGCCUUCUAUC GGGAUCGA	22	3'-t
	HC53	40	AUCCCGAUAGAAGG CUCCA	140	UGGAGCCUUCUAUC GGGAU	19	
tRNA ^{Pro(UGG)}	HC54	41	AGGGAUGUAGCGCA GCUUGGUA	141	UACCAAGCUGCGCU ACAUCCCU	22	5'-t
	HC56	42	AGGGAUGUAGCGCA GCUUG	142	CAAGCUGCGCUACA UCCCU	19	
	HC55	43	UCAAUCCUGUCAU CCCUACCA	143	UGGUAGGGAUGACA GGAUUUGA	22	3'-t
	HC57	44	AAUCCUGUCAUCC UACCA	144	UGGUAGGGAUGACA GGAU	19	
tRNA ^{Gly(GCC)}	HC58	45	GGGUAUUGUUUAA UGGAUAAA	145	UUUUAUCCAUAUAAA CAAUACCC	22	5'-t
	HC60	46	GGGUAUUGUUUAA UGGAUA	146	UAUCCAUAUAAACA UACCC	19	
	HC59	47	UUCGAUCCCGCUA CCCGCCA	147	UGGGCGGGUAGCGG GAAUCGAA	22	3'-t
	HC61	48	GAUCCCGCUACCC GCCCA	148	UGGGCGGGUAGCGG GAAUC	19	
tRNA ^{Tyr(GUA)}	HC62	49	GGGUCGAUGCCCGA GUGGCUAA	149	UUAGCCACUCGGGC AUCGACCC	22	5'-t
	HC64	50	GGGUCGAUGCCCGA GUGGC	150	GCCACUCGGGCAUC GACCC	19	
	HC63	51	UCAAUCCAGCUCG GCCCACCA	151	UGGUGGGCCGAGCU GGAUUUGA	22	3'-t
	HC65	52	AAUCCAGCUCGGCC CACCA	152	UGGUGGGCCGAGCU GGAU	19	
tRNA ^{Leu(UAA)}	HC66	53	GGGGAUAUGGCGGA AUUGGUAG	153	CUACCAAUCCGCCA UAUCCCC	22	5'-t
	HC68	54	GGGGAUAUGGCGGA AUUGG	154	CCAAUCCGCCAUA UCCCC	19	

[0069]

	HC67	55	UCAAGUCCCUCUAU CCCCACCA	155	UGGUGGGGAUAGAG GGACUUGA	22	3'-t
	HC69	56	AGUCCCUCUAUCCC CACCA	156	UGGUGGGGAUAGAG GGACU	19	
tRNA ^{Ser(UGA)}	HC70	57	GGAGAGAUGGCCGA GUGGUUGA	157	UCAACCACUCGGCCA UCUCUCC	22	5'-t
	HC72	58	GGAGAGAUGGCCGA GUGGU	158	ACCACUCGGCCAUCU CUCC	19	
	HC71	59	UCGAAUCCCUCUCU CUCUCCA	159	UGGAGGAGAGAGAG GGAUUCGA	22	3'-t
	HC73	60	AAUCCCUCUCUCUC CUCCA	160	UGGAGGAGAGAGAG GGAUU	19	
tRNA ^{Gln(UUG)}	HC74	61	GGGGCGUGGCCAAG CGGUAAGG	161	CCUUACCGCUUGGCC ACGCC	22	5'-t
	HC76	62	GGGGCGUGGCCAAG CGGUA	162	UACCGCUUGGCCAC GCC	19	
	HC75	63	UCGAAUCCUUUCGU CCCAGCCA	163	UGGCUGGGACGAAA GGAUUCGA	22	3'-t
	HC77	64	AAUCCUUUCGUCCC AGCCA	164	UGGCUGGGACGAAA GGAUU	19	
tRNA ^{Arg(UUC)}	HC78	65	GCGUCCAUCGUCUA AUGGAUAG	165	CUAUCCAUUAGACG AUGGACGC	22	5'-t
	HC80	66	GCGUCCAUCGUCUA AUGGA	166	UCCAUUAGACGAUG GACGC	19	
	HC79	67	UCAAUCCUAUUGG ACGUACCA	167	UGGUACGUCCAUA GGAUUUGA	22	3'-t
	HC81	68	AAUCCUAUUGGACG UACCA	168	UGGUACGUCCAUA GGAUU	19	
tRNA ^{Met(CAU)}	HC82	69	GCAUCCAUGGCUGA AUGGUCAA	169	UUGACCAUUCAGCC AUGGAUGC	22	5'-t
	HC84	70	GCAUCCAUGGCUGA AUGGU	170	ACCAUUCAGCCAUG GAUGC	19	
	HC83	71	UCAAUCCUGCUGG AUGCACCA	171	UGGUGCAUCCAGCA GGAUUUGA	22	3'-t
	HC85	72	AUUCUGCUGGAUG CACCA	172	UGGUGCAUCCAGCA GGAUU	19	
tRNA ^{Leu(UAG)}	HC86	73	GCCGCCAUGGUGAA AUUGGUAG	173	CUACCAUUUCACC AUGGCGGC	22	5'-t
	HC88	74	GCCGCCAUGGUGAA AUUGG	174	CCAAUUUCACCAUG GCGGC	19	
	HC87	75	UCGAAUCCGAGUGG UGGCACCA	175	UGGUGCCACCACUC GGAUUCGA	22	3'-t
	HC89	76	AAUCCGAGUGGUGG CACCA	176	UGGUGCCACCACUC GGAUU	19	
tRNA ^{Lys(UUU)}	HC90	77	GGGUUGUUAACUCA AUGGUAGA	177	UCUACCAUUGAGUU AACAAACC	22	5'-t
	HC92	78	GGGUUGUUAACUCA AUGGU	178	ACCAUUGAGUUAAC AACCC	19	
	HC91	79	UCAAGUCCC GGCA ACCCACCA	179	UGGUGGGUUGCCCG GGACUUGA	22	3'-t
	HC93	80	AGUCCC GGCAACC CACCA	180	UGGUGGGUUGCCCG GGACU	19	
tRNA ^{Phe(GAA)}	HC94	81	GUCGGGAUAGCUCA GUUGGUAG	181	CUACCAACUGAGCU AUCCCGAC	22	5'-t
	HC96	82	GUCGGGAUAGCUCA GUUGG	182	CCAACUGAGCUAUC CCGAC	19	
	HC95	83	UCAAUUCUGGUUCC UGGCACCA	183	UGGUGCCAGGAACC AGAUUUGA	22	3'-t
	HC97	84	AAUCUGGUUCCUGG CACCA	184	UGGUGCCAGGAACC AGAUU	19	
tRNA ^{Pro(GGG)}	HC98	85	CGGAGCAUAACGCA GUUUGGUA	185	UACCAAACUGCGUU AUGCUCG	22	5'-t
	HC100	86	CGGAGCAUAACGCA GUUUG	186	CAAACUGCGUUAUG CUCCG	19	

[0070]	tRNA ^{Ser(GCU)}	HC99	87	UCAAUCCUGUUGC UCCGACCA	187	UGGUCGGAGCAACA GGAUUUGA	22	3'-t
		HC101	88	AAUCCUGUUGCUC GACCA	188	UGGUCGGAGCAACA GGAUU	19	
		HC102	89	GGAGAGAUGGCUGA GCGGACUA	189	UAGUCCGCUCAGCC AUCUCUCC	22	5'-t
		HC104	90	GGAGAGAUGGCUGA GCGGA	190	UCCGCUCAGCCAUCU CUCC	19	
		HC103	91	UCGAAUCCUCUUU CUCCGCCA	191	UGGCGGAGAAAGAG GGAUUCGA	22	3'-t
tRNA ^{Thr(GGU)}	HC105	92	AAUCCUCUUUCUC CGCCA	192	UGGCGGAGAAAGAG GGAUU	19		
	HC106	93	GCACUUUUAACUCA GUGGUAGA	193	UCUACCACUGAGUU AAAAGUGC	22	5'-t	
	HC108	94	GCACUUUUAACUCA GUGGU	194	ACCACUGAGUUA AGUGC	19		
	HC107	95	UCAAGCCCGAUAAA GGGCUCCA	195	UGGAGCCCUUUAUC GGGCUUGA	22	3'-t	
	HC109	96	AGCCCGAUAAAGGG CUCCA	196	UGGAGCCCUUUAUC GGGCU	19		
tRNA ^{Ile(UAU)}	HC110	97	AGGGAUUAACUCA GUAGUAGA	197	UCUACUACUGAGUU AUUCCCU	22	5'-t	
	HC112	98	AGGGAUUAACUCA GUAGU	198	ACUACUGAGUUA UCCCU	19		
	HC111	99	UCAAACUGAUUAU CCCUACCA	199	UGGUAGGGAUAAUC AGGUUUGA	22	3'-t	
	HC113	100	AACCUGAUUAUCC UACCA	200	UGGUAGGGAUAAUC AGGUU	19		

[0071] 本发明人意外地发现了分离自或源自红豆杉属植物,特别是南方红豆杉(*Pilger*) *Rehd. var. mairei*的RNA分子有效对抗癌细胞,特别是它们能够抑制癌细胞的生长、增殖和/或转移。

[0072] 转回到治疗方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用有效量的如上所述的RNA分子的步骤。在一个实施方案中,向受试者施用RNA分子的步骤包括使受试者的癌细胞与RNA分子接触。

[0073] 术语“癌症”描述了受试者的生理病症,其中细胞群体的特征在于不受调节的恶性(癌性)细胞生长。在一个实施方案中,待治疗的癌症是卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌或肺癌。在具体实施方案中,癌症是卵巢癌、结直肠癌或肺癌。在供选择的实施方案中,本发明的RNA分子可有效治疗对目前存在的药物如紫杉醇具有抗性的癌症,即可以用于治疗对紫杉醇具有抗性的癌症。具体地,本发明的RNA分子可以用于治疗紫杉醇抗性肺癌、紫杉醇抗性结直肠癌或紫杉醇抗性卵巢癌。因此,本发明的方法可以应用于治疗患有多药耐药性癌症和相关障碍的受试者。

[0074] 本文使用的术语“受试者”是指活生物体,并且可以包括但不限于人和动物。受试者优选是哺乳动物,优选人。RNA分子可以通过注射向受试者,优选人施用。术语注射包括静脉内、肌肉内、皮下和皮内施用。在一个实施方案中,通过静脉内注射将本发明的RNA分子与合适的赋形剂(多种赋形剂)一起施用于受试者。例如,RNA分子可以通过转染、电穿孔或病毒介导的递送递送至受试者或细胞。

[0075] 表述“有效量”通常表示足以产生治疗上期望的结果的量,其中结果的确切性质根据所治疗的具体病症而变化。在本发明中,癌症是待治疗的病症,因此结果通常是抑制(inhibition)或抑制(suppression)癌细胞的生长、增殖或转移、减少癌细胞或改善与癌细胞相关的症状,特别是抑制癌细胞的增殖或诱导细胞死亡,即癌细胞的凋亡。在癌症是转移性癌症的实施方案中,结果通常是抑制癌细胞迁移,抑制癌细胞侵入其他组织,抑制远离原发部位的继发位点处的转移癌细胞形成,或者改善与转移性癌症相关的症状。

[0076] 本发明的RNA分子的有效量可以取决于受试者的物种、体重、年龄和个别病症,并且可以例如用细胞培养物或实验动物,通过标准程序测定。RNA分子例如RNA分子HC11(由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:101形成)或HC30(由SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:109形成)的剂量可以例如为至少约0.1mg/kg至5mg/kg,或约2mg/kg至5mg/kg,特别是2.4mg/kg。

[0077] 本发明的RNA分子可以以包含RNA分子和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物的形式施用。药学上可接受的赋形剂可以是稀释剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、表面活性剂、基因递送载体和防腐剂中的一种或多种。药物组合物可以以固体、半固体或液体形式存在,优选以液体形式存在。药物制剂可以为脂质体冻干粉;多肽纳米冻干粉;喷雾剂;片剂。药物组合物可包含另外的药物有效成分,例如用于治疗癌症的治疗化合物,例如紫杉醇。技术人员能够根据药物组合物的形式选择合适的药学上可接受的赋形剂,并且知道制备药物组合物的方法,以及能够根据药学上可接受的赋形剂的种类和药物组合物的形式选择合适的制备药物组合物的方法。

[0078] 在一个实施方案中, RNA分子在包含基因递送载体的药物组合物中提供。基因递送载体是指可以充当将基因递送到细胞中的载体的任何分子。在RNA分子被转染到细胞中的实施方案中,基因递送载体被认为是转染剂。在其中通过重组病毒载体递送RNA分子的实施方案中,基因递送载体是携带本发明的双链RNA分子的病毒载体。基因递送载体包括但不限于载体如病毒载体, 胶原如去端肽胶原, 聚合物如聚乙烯亚胺(PEI), 多肽如聚(L-赖氨酸)和鱼精蛋白, 和用于形成脂质体的脂质, 例如Lipofectamine。基因递送载体可以是商购的, 例如来自美国Thermo Fisher的LipofectamineRNAiMAX转染试剂、Lipofectamine 3000试剂和Lipofectamine®2000转染试剂; 来自中国GenePharma的RNAi-Mate; 来自日本Koken Co., Ltd.的去端肽胶原; 和来自中国siRNAomics的组氨酸-赖氨酸肽共聚物。基因递送载体可以是基于逆转录病毒、腺相关病毒、腺病毒和慢病毒的病毒载体。基因递送载体应具有低毒性并且不能在受试者中诱导显著的免疫应答。在一个实施方案中, RNA分子以包含去端肽胶原的药物组合物提供, 其中去端肽胶原与RNA分子形成复合物用于递送。在另一个实施方案中, RNA分子以包含Lipofectamine的药物组合物提供, 例如Lipofectamine® RNAiMAX转染试剂, 用于将RNA分子递送至细胞。在另外的实施方案中, 将RNA分子插入质粒中并形成重组载体。

[0079] 在一个实施方案中, 药物组合物还可以包含核酸稳定剂。核酸稳定剂是指能够维持组合物中RNA分子的稳定性以最小化或避免降解的任何化学品, 特别是那些能够使核酸酶等降解RNA分子的活性失活的化学品。

[0080] 因此, 本发明还涉及如上所述的药物组合物, 特别是包含RNA分子和如上定义的药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一个实施方案中, RNA分子包含至少一条选自SEQ ID NO:1至100的序列或其功能变体或同源物。优选地, RNA分子分离自或源自如上所述的红豆杉属植物, 特别是分离自或源自南方红豆杉。

[0081] 根据本发明的方法的RNA分子的施用步骤可以通过将包含RNA分子的药物组合物注射到受试者的靶位点, 即癌细胞存在处或癌细胞附近的身体组织来进行。这是有利的, 因为RNA分子可以在任何细胞降解, 例如首过代谢之前直接递送至癌细胞。

[0082] 本发明的RNA分子也适用于抑制癌细胞的生长、增殖或转移。在本发明的另一个方

面,提供了抑制癌细胞生长、增殖或转移的方法,包括使所述细胞与有效量的如上定义的RNA分子接触的步骤。优选地, RNA分子分离自或源自红豆杉属植物,或者包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列或其功能变体或同源物。癌细胞如上所定义。优选地,癌细胞是卵巢癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞、结直肠癌细胞或肺癌细胞。癌细胞可以对目前存在的癌症药物具有抗性,例如但不限于紫杉醇。

[0083] 在一个实施方案中, RNA分子具有约50至200个核苷酸的序列长度,更优选具有约60至约150个核苷酸,特别是约70至约100个核苷酸的长度。RNA分子是非编码分子,优选为转运RNA分子。优选地, RNA分子包含选自SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:225的序列或其功能变体或同源物;或RNA分子包含SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:205或其功能变体或同源物;或RNA分子由选自SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:205的序列或其功能变体或同源物组成。

[0084] 在供选择的实施方案中, RNA分子的序列长度为约10至约30个碱基对,约15至约25个碱基对,约19至约22个碱基对,19个碱基对或22个碱基对。优选地, RNA分子是双链RNA分子,其包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,特别是SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:36或其功能变体或同源物;或由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列,特别是SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:36或其功能变体或同源物组成。双链RNA分子包含互补反义序列。RNA分子还可以包含2聚体的3' 悬突。

[0085] 使癌细胞与本发明的RNA分子接触的步骤可以通过将组合物,特别是包含RNA分子的孵育溶液施加到所述癌细胞来进行,所述孵育溶液还可以包含如上定义的合适的赋形剂、缓冲液或合适的生长培养基。在本发明的这种实施方案中,癌细胞取自受试者,例如动物或人,特别是人。RNA分子在组合物中以至少3nM、至少5nM、约5nM至约200nM、约10nM至约100nM或约25nM至约50nM的浓度提供。此外,赋形剂可包括基因递送载体,例如但不限于基于胶原的载体或脂质体形成剂。在一个实施方案中,基于胶原的载体是去端肽胶原,并且脂质体形成剂是Lipofectamine。

[0086] 除上述之外,本发明涉及如上所述的双链RNA分子,即包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,和互补反义序列。特别地,双链RNA分子由以下组成:选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列或其功能变体或同源物,选自SEQ ID NO:101至SEQ ID NO:200的互补反义序列,和任选的3' 悬突。双链RNA分子的示例性实施方案示于表2中。双链RNA可以进行修饰,因此可以携带至少一种选自以下的修饰核苷:肌苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N⁶-甲基腺苷、N⁶-异戊烯基腺苷、2'-O-甲基腺苷、N⁶-乙酰基腺苷、1-甲基肌苷、假尿苷、二氢尿苷或2-甲硫基-N⁶-甲基腺苷。

[0087] 在本发明的另一方面,提供了包含核酸分子的载体,其中所述核酸分子是如上所述的RNA分子。特别地, RNA分子具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的序列或其功能变体或同源物。在一个实施方案中,载体是包含如上所述的双链RNA分子的重组载体。载体可以是源自逆转录病毒、腺相关病毒、腺病毒或慢病毒的基于病毒的载体。本领域普通技术人员将理解将本发明的RNA分子掺入载体的合适方法。

[0088] 更进一步地,本发明涉及核酸分子在制备用于治疗癌症的药物中的用途。核酸是如上所述的RNA分子,包括其功能变体或同源物。还应理解,本发明的RNA分子可用作小干扰RNA分子以干扰靶标癌细胞中特定基因的表达,从而引起基因沉默、细胞凋亡、细胞生长和

增殖的抑制等以达到期望的治疗效果。

[0089] 因此,本发明提供了一种通过施用分离自或源自红豆杉属植物的RNA分子,特别是包含选自SEQ ID NO:1至100的序列的RNA分子,来治疗各种来源的癌症的新颖且有效的方法。施用所述RNA分子也适用于抑制癌细胞的生长、增殖或转移。发现RNA分子在体外抑制癌细胞的生长和增殖方面非常有效,并且在体内显示出抗肿瘤作用。所述RNA分子也有效对抗紫杉醇抗性细胞系。

[0090] 现在以以下非限制性实施例描述本发明。

[0091] 实施例

[0092] 化学品和材料

[0093] 2017年从中国福建省三明市收集南方红豆杉 (*Pilger*) *Rehd. var. mairei* 的新鲜树枝。西曲溴铵 (CTAB) 和氯化钠购自Kingdin Industrial Co.,Ltd. (中国香港)。水饱和酚购自Leagene Co.,Ltd. (中国北京)。氯仿和乙醇购自Anaque Chemicals Supply Inc.Ltd. (美国)。异戊醇和硫氰酸胍购自Tokyo Chemical Industry CO.,Ltd. (日本)。Tris-HCl和乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自Acros Organics (美国),小ssRNA Ladder购自New England Biolabs (Beverly,MA,美国)。mirVana™ miRNA分离试剂盒、SYBR金核酸凝胶染色剂和凝胶上样缓冲液II购自Thermo Fisher Scientific (美国)。40% 丙烯酰胺/bis溶液 (19:1)、tris/硼酸盐/EDTA (TBE)、过硫酸铵 (APS) 和四甲基乙二胺 (TEMED) 购自Biorad Laboratories Inc. (美国)。紫杉醇抗性腺癌人肺泡基底上皮细胞系 (A549T) 和人卵巢癌细胞系 (A2780) 购自KeyGen Biotech Co.Ltd. (南京,中国),人肝细胞癌细胞系 (HepG2) 和人乳腺癌细胞系 (MCF-7) 购自ATCC (Manassas, Virginia, 美国)。Opti-MEM I低血清培养基、Dulbecco改良Eagle培养基 (DMEM)、极限必需培养基 (MEM)、RPMI培养基1640、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素购自Gibco (Life Technologies, Auckland, 新西兰)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物 (MTT) 购自Sigma (St.Louis,MO,美国)。

[0094] 实施例1

[0095] 从红豆杉属植物中分离RNA分子

[0096] 新鲜收集南方红豆杉 (*Pilger*) *Rehd. var. mairei* 的树枝,并立即储存在液氮中直至使用。通过使用优化的CTAB方法结合商业小RNA分离试剂盒,从南方红豆杉 (*Pilger*) *Rehd. var. mairei* 中提取长度为200个核苷酸或更低的RNA,即小RNA种类,该方法由Patel, R.S.等人在Arch Oral Biol 2011,56 (12),1506-1513中描述。简言之,将植物组织在液氮中研磨成细粉,然后使用数字分散装置 (IKA, 德国) 在预热 (65°C) CTAB提取缓冲液中均质化。在65°C下孵育2分钟后,立即在冰浴中冷却组织裂解物10分钟,然后在4°C以12,000×g离心15分钟。收集上清液并用等体积的苯酚:氯仿:异戊醇 (50:48:1) 通过剧烈涡旋振荡萃取。通过以12,000×g离心15分钟在4°C下分离各相,并如上所述用氯仿:异戊醇 (24:1) 再次提取上清液。收集上清液并与等体积的6M硫氰酸胍混合,接着添加100%乙醇至终浓度为55%。使混合物通过含有二氧化硅膜的滤筒,其使RNA固定。然后用80% (v/v) 乙醇溶液洗涤过滤器数次,最后用低离子强度溶液或无RNA酶的水洗脱所有RNA。按照制造商的说明,使用mirVana™ miRNA分离试剂盒分离和富集小RNA种类。

[0097] 此外,通过在根据制造商的方案 (Biorad, 美国) 制备的含有8M尿素的6%聚丙烯酰胺TBE凝胶中进行电泳,来分离分离的小RNA种类中的总tRNA。用SYBR金核酸凝胶染色剂染

色后,使用UV灯检查聚丙烯酰胺凝胶,并使用干净且锋利的手术刀切下含有总tRNA的凝胶区域。图1显示来自南方红豆杉 (*Pilger) Rehd. var. mairei* 的小RNA物质的凝胶电泳谱,包括小RNA标准对照品(表示为“Ladder”)、小RNA组分和转运RNA^{Trp (CCA)}。将条带切成小块,通过在3kD分子量截留透析管 (Spectrum, C.A.) 中在100V下在1X TAE缓冲液中电洗脱50分钟,从凝胶中回收总tRNA。回收透析管中的洗脱液,并使用mirVanaTM miRNA分离试剂盒对总tRNA进行脱盐和浓缩。然后使用Nanodrop分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 和Agilent2100生物分析仪 (Agilent, 美国) 确证RNA产物的质量和纯度。

[0098] 然后,发明人构建了总tRNA文库并进行了测序。通过使用TruSeq小RNA文库制备试剂盒 (Illumina, 美国), 然后进行一轮接头连接、逆转录和PCR富集来产生测序文库。然后纯化PCR产物,并在Agilent生物分析仪2100系统 (Agilent Technologies, 美国) 上定量文库。使用150bp配对末端 (PE150) 策略在Illumina HiSeq平台上在Novogene Bioinformatics Institute (北京, 中国) 对文库制备物进行测序,以产生超过1500万个原始配对读数。通过去除低质量区域和接头序列获得1,729,438个净读数。图2是显示tRNA的读取长度分布的条形图。通过使用tRNAscan-SE 2.0程序 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 确定tRNA基因,并使用基本局部比对搜索工具 (BLAST) 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 通过搜索核苷酸集合 (nr/nt) 数据库进行注释。确定了25个来自南方红豆杉 (*Pilger) Rehd. var. mairei* 的tRNA序列并列于表1中。

[0099] 然后通过用特异性生物素化的捕获DNA探针将靶tRNA固定在链霉亲和素包被的磁珠上,从来自南方红豆杉 (*Pilger) Rehd. var. mairei* 的小RNA (<200聚体) 的混合物中分离每种tRNA。为了结合特异性tRNA分子,合成了相应的单链DNA寡核苷酸 (20至45聚体), 其基于Illumina测序的序列信息设计并且应当与靶tRNA的独特区段互补。将同源DNA探针与小RNA混合物在退火缓冲液中孵育约1.5小时,并使其在适当的退火温度下与溶液中的靶tRNA分子杂交,所述退火温度通常比解链温度 (T_m) 低5°C。然后将链霉亲和素包被的磁珠加入混合物中并在退火温度下孵育30分钟。在通过链霉亲和素-生物素键将杂交序列固定到磁珠上后,用磁铁分离生物素化的DNA/tRNA包被的珠子1-2分钟,并在40°C的洗涤缓冲液中洗涤3-4次。将磁珠在不含RNA酶的水中重悬浮至期望浓度,从而通过在70°C下孵育5分钟来释放固定的tRNA分子。因此,获得了SEQ ID NO:201至225的分离和纯化的tRNA分子。

[0100] 实施例2

[0101] RNA分子的合成

[0102] 本发明人基于实施例1中的25个分离的tRNA序列设计并合成了长度为约19至22bp的RNA分子。特别地,认为tRNA序列具有至少3个部分,即5'-末端部分 (5'-t)、3'-末端部分 (3'-t) 和反密码子部分。每种特别设计的RNA分子含有任何一个部分。例如,设计的含有相应全长tRNA序列的5'末端部分的RNA分子称为5'-t组RNA分子;设计的含有相应全长tRNA序列的3'末端部分的RNA分子称为3'-t组RNA分子;设计的含有相应全长tRNA序列的反密码子部分的RNA分子称为反密码子组RNA分子。如表2所示,具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:100的正义序列和选自SEQ ID NO:101至SEQ ID NO:200的互补反义序列的RNA分子通过在表1中的tRNA序列上的不同位点切割来设计和合成。

[0103] 实施例3

[0104] RNA分子对癌细胞的细胞毒性作用

[0105] A2780、紫杉醇抗性A2780、HCT-8、紫杉醇抗性HCT-8和紫杉醇抗性A549细胞系在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI培养基1640培养基中培养。将HepG2和MCF-7细胞系在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的极限必需培养基中培养。上述所有细胞系在含有5%CO₂的潮湿气氛下在37°C下培养。

[0106] 在细胞毒性分析中,将每种癌细胞系的指数生长细胞以每孔5000个细胞的密度接种在96孔微板中的100μL培养基中,并在处理前使之粘附24小时。然后在实施例1和2中的含有基因递送载体即Lipofectamine™ RNAiMAX转染试剂(Thermo Fisher Scientific,美国)的混合物中获得的连续浓度的RNA分子添加至细胞中。处理48小时后,向各孔中添加MTT溶液(每孔50μL,1mg/mL溶液)并在37°C下孵育4小时。随后,添加200μL二甲基亚砜(DMSO),并使用SpectraMax 190酶标仪(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,美国)在570nm下量热法测定所得溶液的光密度。获得剂量-反应曲线,并通过GraphPad Prism 5(GraphPad,La Jolla,CA,美国)计算IC₅₀值。每个实验进行三次。IC₅₀结果表示为平均值±标准偏差。

[0107] 参考图3,在添加MTT溶液之前,用tRNA^{His(GUG)}、tRNA^{Glu(UUC)}、tRNA^{Trp(CCA)}、tRNA^{Leu(CAA)}、tRNA^{Arg(ACG)}的25nM RNA分子,即SEQ ID NO:201至205的RNA分子处理A2780细胞、HepG2细胞和MCF-7细胞48小时。将这些细胞的细胞活力与对照组和RNAiMAX组进行比较,其中将转染试剂添加到细胞中。结果表明,这些RNA分子能够抑制卵巢癌细胞、肝癌细胞和乳腺癌细胞的生长和增殖,而RNA分子对卵巢癌细胞和肝癌细胞实现了更显著的作用。

[0108] 图4A显示tRNA^{Trp(CCA)},即SEQ ID NO:203对A2780细胞的细胞毒性作用。使用不同浓度的tRNA^{Trp(CCA)},即0.78nM、1.56nM、3.13nM、6.25nM、12.5nM和25nM,并与对照组和RNAiMAX组比较。显示tRNA^{Trp(CCA)}对特定A2780细胞中的卵巢细胞的IC₅₀值为约14.3nM。使用紫杉醇实施比较例。图4B显示紫杉醇对A2780细胞的细胞毒性作用。

[0109] 图5A和图5B显示实施例2中合成的RNA分子对A2780细胞,特别是具有SEQ ID NO:1至36的正义序列的A2780细胞的细胞毒性作用。结果显示,在该实施例中,基于实施例1中确定的tRNA序列设计和合成的RNA分子在抑制癌细胞,特别是卵巢癌细胞的生长和增殖方面也是有效的。此外,图5C和5D进一步证明实施例2中的RNA分子也能够抑制紫杉醇抗性A2780细胞的生长和/或增殖。换言之,具有SEQ ID NO:1至36的正义序列和互补反义序列的RNA分子在治疗对紫杉醇具有抗性的癌症,特别是紫杉醇抗性卵巢癌方面是有用的。

[0110] 图5E显示实施例2中合成的RNA分子对HCT-8细胞的细胞毒性作用,特别是具有SEQ ID NO:1至36的正义序列和互补反义序列的细胞毒性作用。结果表明,这些RNA分子也有效抑制结直肠癌细胞的生长和增殖。此外,图5F进一步证明实施例2中的RNA分子也能够抑制紫杉醇抗性HCT-8细胞的生长和/或增殖。结果还显示RNA分子HC18、HC34、HC36、HC37和HC39在治疗对紫杉醇具有抗性的癌症,特别是紫杉醇抗性结直肠癌方面是有用的。

[0111] 然后,本发明人特别确定了RNA分子HC11在不同浓度下,即在6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM下对A2780细胞的细胞毒性作用和IC₅₀。如图6A所示,将结果与对照组和含有转染剂的RNAiMAX组进行比较。结果表明,RNA分子HC11对抑制卵巢癌细胞的生长和增殖具有剂量依赖性作用。其IC₅₀为31nM。使用紫杉醇实施比较例,结果如图6B所示。

[0112] 此外,确定了HC11针对紫杉醇抗性癌细胞的抑制作用。图6C显示与对照组和RNAiMAX组相比,用HC11在不同浓度下,即在6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM和200nM下处理后,紫杉醇抗性A2780T细胞的细胞活力,而图6D显示了在处理中使用紫杉醇的对比例。结

果表明, RNA分子HC11对抑制紫杉醇抗性卵巢癌细胞的生长和增殖具有剂量依赖性作用, 其 IC_{50} 为32.3nM。

[0113] 同时, 图6E显示了用HC11在不同浓度下处理后, 紫杉醇抗性A549T细胞的细胞活力, 并且图6F显示了用紫杉醇在不同浓度下处理后, 紫杉醇抗性A549T细胞的细胞活力。结果表明, RNA分子HC11对抑制紫杉醇抗性肺癌细胞的生长和增殖具有剂量依赖性作用, IC_{50} 为87.3nM。

[0114] 类似地, 本发明人特别确定了RNA分子HC36和37在不同浓度下, 即在6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM下对HCT-8细胞的细胞毒性作用和 IC_{50} 。如图6G和图6H所示, 将结果与对照组和含有转染剂的RNAiMAX组进行比较。结果表明, RNA分子HC36和HC37对抑制结肠癌细胞的生长和增殖具有剂量依赖性作用。HC36、37的 IC_{50} 为8.2和9.3nM。使用紫杉醇实施比较例, 结果如图6I所示。

[0115] 基于上述结果, 发现分离自或源自南方红豆杉 (*Pilger*) *Rehd. var. mairei* 的小tRNA分子在体外抑制癌细胞的生长和增殖方面非常有效。RNA分子也有效对抗紫杉醇抗性细胞系。

[0116] 实施例4

[0117] RNA分子的体内抗肿瘤作用

[0118] 设置具有异种移植癌症的动物模型。雌性BALB/c裸鼠 (6-8周龄) 购自上海SLAC实验动物有限公司并维持在25°C, 在动物环境设施的特殊无病原体实验室中自由获取食物和水。根据机构动物护理指南并根据委员会批准的方案进行动物实验。为了产生肿瘤异种移植, 通过27号针头将在100 μ L的1640培养基中的A2780细胞 (4.0×10^6 个) 皮下注射到8周龄BALB/c裸鼠的腋下。在4-5周后在肿瘤达到60-70mm³后, 用具有去端肽胶原 (Koken Co., Ltd., Tokyo, Japan) 的合成的tRF处理荷瘤裸鼠。去端肽胶原的浓度为1%, 并且通过一个剂量的HC11或HC30 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:9的RNA分子) (GenePharma Co., Ltd., Shanghai, China) 以2.4mg/kg的浓度与去端肽胶原一起进行瘤旁注射, 每周一次。建立对照组, 其中向小鼠施用溶媒。用于向小鼠施用1mg/kg紫杉醇的紫杉醇组也被设为比较。整个治疗持续28天。

[0119] 用数字卡尺测量最大长度和最大宽度的肿瘤直径。并且通过下式计算肿瘤体积: 体积 = (宽度)² × 长度 / 2。使用GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) 对数据进行统计学分析。结果如图7A和7B所示。根据结果, HC11和HC30可有效抑制小鼠体内肿瘤的生长, 并保持相对恒定的体重。换言之, 本发明的RNA分子在体内和体外均有效治疗癌细胞。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 澳门科技大学(Macau University of Science and Technology)
- [0003] <120> 用于治疗癌症的方法和药物组合物
- [0004] <130> DIC18110073
- [0005] <150> 2018101287
- [0006] <151> 2018-09-04
- [0007] <150> 16/120,606
- [0008] <151> 2018-09-04
- [0009] <160> 225
- [0010] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 22
- [0013] <212> RNA
- [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0015] <400> 1
- [0016] gcggacguag ccaagugguc ca 22
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 19
- [0019] <212> RNA
- [0020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0021] <400> 2
- [0022] gcggacguag ccaaguggu 19
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 22
- [0025] <212> RNA
- [0026] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0027] <400> 3
- [0028] ucaaucccg ucguucgcc ca 22
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 19
- [0031] <212> RNA
- [0032] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0033] <400> 4
- [0034] aucccgucg uucgccc ca 19
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 22
- [0037] <212> RNA
- [0038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0039] <400> 5
[0040] gccccuauugc ucuaguggcc ca 22
[0041] <210> 6
[0042] <211> 19
[0043] <212> RNA
[0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0045] <400> 6
[0046] gccccuauugc ucuaguggc 19
[0047] <210> 7
[0048] <211> 22
[0049] <212> RNA
[0050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0051] <400> 7
[0052] ucgauuuuccc cuagggguac ca 22
[0053] <210> 8
[0054] <211> 19
[0055] <212> RNA
[0056] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0057] <400> 8
[0058] auuuucccua gggguacca 19
[0059] <210> 9
[0060] <211> 22
[0061] <212> RNA
[0062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0063] <400> 9
[0064] gcgcucuuag uucagugcgg ua 22
[0065] <210> 10
[0066] <211> 19
[0067] <212> RNA
[0068] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0069] <400> 10
[0070] gcgcucuuag uucagugcg 19
[0071] <210> 11
[0072] <211> 22
[0073] <212> RNA
[0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0075] <400> 11
[0076] guucaaaucc uacagagcgc ca 22
[0077] <210> 12

- [0078] <211> 19
[0079] <212> RNA
[0080] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0081] <400> 12
[0082] caaauccuac agagcgcca 19
[0083] <210> 13
[0084] <211> 22
[0085] <212> RNA
[0086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0087] <400> 13
[0088] gccuugaugg ugaaauggua ga 22
[0089] <210> 14
[0090] <211> 19
[0091] <212> RNA
[0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0093] <400> 14
[0094] gccuugaugg ugaaauggu 19
[0095] <210> 15
[0096] <211> 22
[0097] <212> RNA
[0098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0099] <400> 15
[0100] ucgaauccuc uucaaggcac ca 22
[0101] <210> 16
[0102] <211> 19
[0103] <212> RNA
[0104] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0105] <400> 16
[0106] aauccucuuc aaggcacca 19
[0107] <210> 17
[0108] <211> 22
[0109] <212> RNA
[0110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0111] <400> 17
[0112] gggccuguag cucagaggau ua 22
[0113] <210> 18
[0114] <211> 19
[0115] <212> RNA
[0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0117] <400> 18
[0118] gggccuguag cucagagga 19
[0119] <210> 19
[0120] <211> 22
[0121] <212> RNA
[0122] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0123] <400> 19
[0124] ucgaaucccu ccucgcccac ca 22
[0125] <210> 20
[0126] <211> 19
[0127] <212> RNA
[0128] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0129] <400> 20
[0130] aaucccuccu cgcccacca 19
[0131] <210> 21
[0132] <211> 22
[0133] <212> RNA
[0134] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0135] <400> 21
[0136] gggauuguag uucaauuggu ua 22
[0137] <210> 22
[0138] <211> 19
[0139] <212> RNA
[0140] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141] <400> 22
[0142] gggauuguag uucaauugg 19
[0143] <210> 23
[0144] <211> 22
[0145] <212> RNA
[0146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0147] <400> 23
[0148] ucgagccccg ucagucccg ca 22
[0149] <210> 24
[0150] <211> 19
[0151] <212> RNA
[0152] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0153] <400> 24
[0154] agccccguca gucccgcca 19
[0155] <210> 25

- [0156] <211> 22
[0157] <212> RNA
[0158] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0159] <400> 25
[0160] ggcgacauag ccaaguggua ag 22
[0161] <210> 26
[0162] <211> 19
[0163] <212> RNA
[0164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0165] <400> 26
[0166] ggcgacauag ccaaguggu 19
[0167] <210> 27
[0168] <211> 22
[0169] <212> RNA
[0170] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0171] <400> 27
[0172] ucaaauccgg gugucgccuc ca 22
[0173] <210> 28
[0174] <211> 19
[0175] <212> RNA
[0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0177] <400> 28
[0178] aauccgggug ucgccucca 19
[0179] <210> 29
[0180] <211> 22
[0181] <212> RNA
[0182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0183] <400> 29
[0184] ccucaguagc ucagugguag ag 22
[0185] <210> 30
[0186] <211> 19
[0187] <212> RNA
[0188] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0189] <400> 30
[0190] ccucaguagc ucaguggua 19
[0191] <210> 31
[0192] <211> 22
[0193] <212> RNA
[0194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0195] <400> 31
[0196] gguucaaauc cuuuugagg ag 22
[0197] <210> 32
[0198] <211> 19
[0199] <212> RNA
[0200] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0201] <400> 32
[0202] ucaaauccua uuugaggag 19
[0203] <210> 33
[0204] <211> 22
[0205] <212> RNA
[0206] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0207] <400> 33
[0208] cgcgaguag agcaguuugg ua 22
[0209] <210> 34
[0210] <211> 19
[0211] <212> RNA
[0212] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0213] <400> 34
[0214] cgcgaguag agcaguuug 19
[0215] <210> 35
[0216] <211> 22
[0217] <212> RNA
[0218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0219] <400> 35
[0220] gguucaaauc ccgucuccgc aa 22
[0221] <210> 36
[0222] <211> 19
[0223] <212> RNA
[0224] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0225] <400> 36
[0226] ucaaaucccg ucuccgcaa 19
[0227] <210> 37
[0228] <211> 22
[0229] <212> RNA
[0230] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0231] <400> 37
[0232] gccugcuuag cucagagguu ag 22
[0233] <210> 38

- [0234] <211> 19
[0235] <212> RNA
[0236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0237] <400> 38
[0238] gccugcuuag cucagaggu 19
[0239] <210> 39
[0240] <211> 22
[0241] <212> RNA
[0242] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0243] <400> 39
[0244] ucgaucgccga uagaaggcuc ca 22
[0245] <210> 40
[0246] <211> 19
[0247] <212> RNA
[0248] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0249] <400> 40
[0250] aucccgauag aaggcucca 19
[0251] <210> 41
[0252] <211> 22
[0253] <212> RNA
[0254] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0255] <400> 41
[0256] agggauaguag cgcagcuugg ua 22
[0257] <210> 42
[0258] <211> 19
[0259] <212> RNA
[0260] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0261] <400> 42
[0262] agggauaguag cgcagcuug 19
[0263] <210> 43
[0264] <211> 22
[0265] <212> RNA
[0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0267] <400> 43
[0268] ucaaauccug ucaucccuac ca 22
[0269] <210> 44
[0270] <211> 19
[0271] <212> RNA
[0272] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0273] <400> 44
[0274] aauccuguca ucccuacca 19
[0275] <210> 45
[0276] <211> 22
[0277] <212> RNA
[0278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0279] <400> 45
[0280] ggguaauuguu uaauggauaa aa 22
[0281] <210> 46
[0282] <211> 19
[0283] <212> RNA
[0284] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0285] <400> 46
[0286] ggguaauuguu uaauggaua 19
[0287] <210> 47
[0288] <211> 22
[0289] <212> RNA
[0290] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0291] <400> 47
[0292] uucgauuccc gcuacccgcc ca 22
[0293] <210> 48
[0294] <211> 19
[0295] <212> RNA
[0296] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0297] <400> 48
[0298] gauucccgcu acccgccca 19
[0299] <210> 49
[0300] <211> 22
[0301] <212> RNA
[0302] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0303] <400> 49
[0304] gggucgaugc ccgaguggcu aa 22
[0305] <210> 50
[0306] <211> 19
[0307] <212> RNA
[0308] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0309] <400> 50
[0310] gggucgaugc ccgaguggc 19
[0311] <210> 51

- [0312] <211> 22
[0313] <212> RNA
[0314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0315] <400> 51
[0316] ucaaauccag cucggccac ca 22
[0317] <210> 52
[0318] <211> 19
[0319] <212> RNA
[0320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0321] <400> 52
[0322] aauccagcuc ggcccacca 19
[0323] <210> 53
[0324] <211> 22
[0325] <212> RNA
[0326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0327] <400> 53
[0328] ggggauaugg cggauuggu ag 22
[0329] <210> 54
[0330] <211> 19
[0331] <212> RNA
[0332] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0333] <400> 54
[0334] ggggauaugg cggauugg 19
[0335] <210> 55
[0336] <211> 22
[0337] <212> RNA
[0338] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0339] <400> 55
[0340] ucaaguccu cuaucacac ca 22
[0341] <210> 56
[0342] <211> 19
[0343] <212> RNA
[0344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0345] <400> 56
[0346] aguccucua ucccacca 19
[0347] <210> 57
[0348] <211> 22
[0349] <212> RNA
[0350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0351] <400> 57
[0352] ggagagaugg ccgagugguu ga 22
[0353] <210> 58
[0354] <211> 19
[0355] <212> RNA
[0356] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0357] <400> 58
[0358] ggagagaugg ccgaguggu 19
[0359] <210> 59
[0360] <211> 22
[0361] <212> RNA
[0362] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0363] <400> 59
[0364] ucgaaucccu cucucuccuc ca 22
[0365] <210> 60
[0366] <211> 19
[0367] <212> RNA
[0368] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0369] <400> 60
[0370] aaucccucuc ucuccucca 19
[0371] <210> 61
[0372] <211> 22
[0373] <212> RNA
[0374] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0375] <400> 61
[0376] ggggcguggc caagcgguaa gg 22
[0377] <210> 62
[0378] <211> 19
[0379] <212> RNA
[0380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0381] <400> 62
[0382] ggggcguggc caagcggua 19
[0383] <210> 63
[0384] <211> 22
[0385] <212> RNA
[0386] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0387] <400> 63
[0388] ucgaauccuu ucguccagc ca 22
[0389] <210> 64

- [0390] <211> 19
[0391] <212> RNA
[0392] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0393] <400> 64
[0394] aaucuuucg ucccagcca 19
[0395] <210> 65
[0396] <211> 22
[0397] <212> RNA
[0398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0399] <400> 65
[0400] gcguccaucg ucuaauggau ag 22
[0401] <210> 66
[0402] <211> 19
[0403] <212> RNA
[0404] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0405] <400> 66
[0406] gcguccaucg ucuaaugga 19
[0407] <210> 67
[0408] <211> 22
[0409] <212> RNA
[0410] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0411] <400> 67
[0412] ucaaauccua uuggacguac ca 22
[0413] <210> 68
[0414] <211> 19
[0415] <212> RNA
[0416] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0417] <400> 68
[0418] aaucuaauug gacguacca 19
[0419] <210> 69
[0420] <211> 22
[0421] <212> RNA
[0422] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0423] <400> 69
[0424] gcauccaugg cugaaugguc aa 22
[0425] <210> 70
[0426] <211> 19
[0427] <212> RNA
[0428] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0429] <400> 70
[0430] gcauccaugg cugaauggu 19
[0431] <210> 71
[0432] <211> 22
[0433] <212> RNA
[0434] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0435] <400> 71
[0436] ucaauuccug cuggaugcac ca 22
[0437] <210> 72
[0438] <211> 19
[0439] <212> RNA
[0440] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0441] <400> 72
[0442] auuccugcug gaugcacca 19
[0443] <210> 73
[0444] <211> 22
[0445] <212> RNA
[0446] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0447] <400> 73
[0448] gccgccaugg ugaaaauuggu ag 22
[0449] <210> 74
[0450] <211> 19
[0451] <212> RNA
[0452] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0453] <400> 74
[0454] gccgccaugg ugaaaauugg 19
[0455] <210> 75
[0456] <211> 22
[0457] <212> RNA
[0458] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0459] <400> 75
[0460] ucgaauccga guggugcac ca 22
[0461] <210> 76
[0462] <211> 19
[0463] <212> RNA
[0464] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0465] <400> 76
[0466] aaucgagug guggcacca 19
[0467] <210> 77

- [0468] <211> 22
[0469] <212> RNA
[0470] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0471] <400> 77
[0472] ggguguuaa cucauggua ga 22
[0473] <210> 78
[0474] <211> 19
[0475] <212> RNA
[0476] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0477] <400> 78
[0478] ggguguuaa cucauggu 19
[0479] <210> 79
[0480] <211> 22
[0481] <212> RNA
[0482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0483] <400> 79
[0484] ucaagucccg ggcaaccac ca 22
[0485] <210> 80
[0486] <211> 19
[0487] <212> RNA
[0488] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0489] <400> 80
[0490] agucccgggc aaccacca 19
[0491] <210> 81
[0492] <211> 22
[0493] <212> RNA
[0494] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0495] <400> 81
[0496] gucggauag cucaguuggu ag 22
[0497] <210> 82
[0498] <211> 19
[0499] <212> RNA
[0500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0501] <400> 82
[0502] gucggauag cucaguugg 19
[0503] <210> 83
[0504] <211> 22
[0505] <212> RNA
[0506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0507] <400> 83
[0508] ucaaaucugg uuccuggcac ca 22
[0509] <210> 84
[0510] <211> 19
[0511] <212> RNA
[0512] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0513] <400> 84
[0514] aaucugguuc cuggcacca 19
[0515] <210> 85
[0516] <211> 22
[0517] <212> RNA
[0518] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0519] <400> 85
[0520] cggagcauaa cgcaguuugg ua 22
[0521] <210> 86
[0522] <211> 19
[0523] <212> RNA
[0524] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0525] <400> 86
[0526] cggagcauaa cgcaguuug 19
[0527] <210> 87
[0528] <211> 22
[0529] <212> RNA
[0530] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0531] <400> 87
[0532] ucaaaucug uugcuccgac ca 22
[0533] <210> 88
[0534] <211> 19
[0535] <212> RNA
[0536] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0537] <400> 88
[0538] aauccuguug cuccgacca 19
[0539] <210> 89
[0540] <211> 22
[0541] <212> RNA
[0542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0543] <400> 89
[0544] ggagagaugg cugagcggac ua 22
[0545] <210> 90

- [0546] <211> 19
[0547] <212> RNA
[0548] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0549] <400> 90
[0550] ggagagaugg cugagcgga 19
[0551] <210> 91
[0552] <211> 22
[0553] <212> RNA
[0554] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0555] <400> 91
[0556] ucgaaucccu cuuucuccgc ca 22
[0557] <210> 92
[0558] <211> 19
[0559] <212> RNA
[0560] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0561] <400> 92
[0562] aaucccucuu ucuccgcca 19
[0563] <210> 93
[0564] <211> 22
[0565] <212> RNA
[0566] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0567] <400> 93
[0568] gcacuuuuuaa cucaguggua ga 22
[0569] <210> 94
[0570] <211> 19
[0571] <212> RNA
[0572] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0573] <400> 94
[0574] gcacuuuuuaa cucaguggu 19
[0575] <210> 95
[0576] <211> 22
[0577] <212> RNA
[0578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0579] <400> 95
[0580] ucaagcccga uaaagggcuc ca 22
[0581] <210> 96
[0582] <211> 19
[0583] <212> RNA
[0584] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0585] <400> 96
[0586] agcccgauaa agggcucca 19
[0587] <210> 97
[0588] <211> 22
[0589] <212> RNA
[0590] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0591] <400> 97
[0592] agggauauaa cucaguagua ga 22
[0593] <210> 98
[0594] <211> 19
[0595] <212> RNA
[0596] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0597] <400> 98
[0598] agggauauaa cucaguagu 19
[0599] <210> 99
[0600] <211> 22
[0601] <212> RNA
[0602] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0603] <400> 99
[0604] ucaaaccuga uuaucuccuac ca 22
[0605] <210> 100
[0606] <211> 19
[0607] <212> RNA
[0608] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0609] <400> 100
[0610] aaccugauua ucccuacca 19
[0611] <210> 101
[0612] <211> 22
[0613] <212> RNA
[0614] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0615] <400> 101
[0616] uggaccacuu ggcuacgucc gc 22
[0617] <210> 102
[0618] <211> 19
[0619] <212> RNA
[0620] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0621] <400> 102
[0622] accacuuggc uacgucgc 19
[0623] <210> 103

- [0624] <211> 22
[0625] <212> RNA
[0626] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0627] <400> 103
[0628] uggggcgaac gacggggauu ga 22
[0629] <210> 104
[0630] <211> 19
[0631] <212> RNA
[0632] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0633] <400> 104
[0634] uggggcgaac gacggggau 19
[0635] <210> 105
[0636] <211> 22
[0637] <212> RNA
[0638] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0639] <400> 105
[0640] ugggccacua gacgauaggg gc 22
[0641] <210> 106
[0642] <211> 19
[0643] <212> RNA
[0644] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0645] <400> 106
[0646] gccacuagac gauaggggc 19
[0647] <210> 107
[0648] <211> 22
[0649] <212> RNA
[0650] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0651] <400> 107
[0652] ugguaccccu aggggaaauc ga 22
[0653] <210> 108
[0654] <211> 19
[0655] <212> RNA
[0656] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0657] <400> 108
[0658] ugguaccccu aggggaaau 19
[0659] <210> 109
[0660] <211> 22
[0661] <212> RNA
[0662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0663] <400> 109
[0664] uaccgcacug aacuaagagc gc 22
[0665] <210> 110
[0666] <211> 19
[0667] <212> RNA
[0668] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0669] <400> 110
[0670] cgcacugaac uaagagcgc 19
[0671] <210> 111
[0672] <211> 22
[0673] <212> RNA
[0674] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0675] <400> 111
[0676] uggcgcucug uaggauuuga ac 22
[0677] <210> 112
[0678] <211> 19
[0679] <212> RNA
[0680] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0681] <400> 112
[0682] uggcgcucug uaggauuug 19
[0683] <210> 113
[0684] <211> 22
[0685] <212> RNA
[0686] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0687] <400> 113
[0688] ucuaccuuu caccaucaag gc 22
[0689] <210> 114
[0690] <211> 19
[0691] <212> RNA
[0692] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0693] <400> 114
[0694] accauuucac caucaagc 19
[0695] <210> 115
[0696] <211> 22
[0697] <212> RNA
[0698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0699] <400> 115
[0700] uggugccuug aagaggauuc ga 22
[0701] <210> 116

- [0702] <211> 19
[0703] <212> RNA
[0704] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0705] <400> 116
[0706] uggugccuug aagaggauu 19
[0707] <210> 117
[0708] <211> 22
[0709] <212> RNA
[0710] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0711] <400> 117
[0712] uaauccucug agcuacaggc cc 22
[0713] <210> 118
[0714] <211> 19
[0715] <212> RNA
[0716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0717] <400> 118
[0718] uccucugagc uacaggccc 19
[0719] <210> 119
[0720] <211> 22
[0721] <212> RNA
[0722] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0723] <400> 119
[0724] uggugggcga ggagggauuc ga 22
[0725] <210> 120
[0726] <211> 19
[0727] <212> RNA
[0728] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0729] <400> 120
[0730] uggugggcga ggagggauu 19
[0731] <210> 121
[0732] <211> 22
[0733] <212> RNA
[0734] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0735] <400> 121
[0736] uaaccaauug aacuacauc cc 22
[0737] <210> 122
[0738] <211> 19
[0739] <212> RNA
[0740] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0741] <400> 122
[0742] ccaauugaac uacaauccc 19
[0743] <210> 123
[0744] <211> 22
[0745] <212> RNA
[0746] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0747] <400> 123
[0748] uggcgggacu gacggggcuc ga 22
[0749] <210> 124
[0750] <211> 19
[0751] <212> RNA
[0752] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0753] <400> 124
[0754] uggcgggacu gacggggcu 19
[0755] <210> 125
[0756] <211> 22
[0757] <212> RNA
[0758] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0759] <400> 125
[0760] cuuaccacuu ggcuaugucg cc 22
[0761] <210> 126
[0762] <211> 19
[0763] <212> RNA
[0764] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0765] <400> 126
[0766] accacuuggc uaugucgcc 19
[0767] <210> 127
[0768] <211> 22
[0769] <212> RNA
[0770] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0771] <400> 127
[0772] uggaggcgac acccggaauu ga 22
[0773] <210> 128
[0774] <211> 19
[0775] <212> RNA
[0776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0777] <400> 128
[0778] uggaggcgac acccggaau 19
[0779] <210> 129

- [0780] <211> 22
[0781] <212> RNA
[0782] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0783] <400> 129
[0784] cucuaccacu gagcuacuga gg 22
[0785] <210> 130
[0786] <211> 19
[0787] <212> RNA
[0788] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0789] <400> 130
[0790] uaccacugag cuacugagg 19
[0791] <210> 131
[0792] <211> 22
[0793] <212> RNA
[0794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0795] <400> 131
[0796] cuccucaaau aggauuugaa cc 22
[0797] <210> 132
[0798] <211> 19
[0799] <212> RNA
[0800] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0801] <400> 132
[0802] cuccucaaau aggauuuga 19
[0803] <210> 133
[0804] <211> 22
[0805] <212> RNA
[0806] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0807] <400> 133
[0808] uaccaaacug cucuacuccg cg 22
[0809] <210> 134
[0810] <211> 19
[0811] <212> RNA
[0812] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0813] <400> 134
[0814] caaacugcuc uacuccg cg 19
[0815] <210> 135
[0816] <211> 22
[0817] <212> RNA
[0818] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0819] <400> 135
[0820] uugcggagac gggauuugaa cc 22
[0821] <210> 136
[0822] <211> 19
[0823] <212> RNA
[0824] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0825] <400> 136
[0826] uugcggagac gggauuuga 19
[0827] <210> 137
[0828] <211> 22
[0829] <212> RNA
[0830] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0831] <400> 137
[0832] cuaaccucug agcuaagcag gc 22
[0833] <210> 138
[0834] <211> 19
[0835] <212> RNA
[0836] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0837] <400> 138
[0838] accucugagc uaagcaggc 19
[0839] <210> 139
[0840] <211> 22
[0841] <212> RNA
[0842] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0843] <400> 139
[0844] uggagccuuc uaucgggauc ga 22
[0845] <210> 140
[0846] <211> 19
[0847] <212> RNA
[0848] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0849] <400> 140
[0850] uggagccuuc uaucgggau 19
[0851] <210> 141
[0852] <211> 22
[0853] <212> RNA
[0854] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0855] <400> 141
[0856] uaccaagcug cgcuaaucc cu 22
[0857] <210> 142

- [0858] <211> 19
[0859] <212> RNA
[0860] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0861] <400> 142
[0862] caagcugcgc uacaucucu 19
[0863] <210> 143
[0864] <211> 22
[0865] <212> RNA
[0866] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0867] <400> 143
[0868] ugguaaggau gacaggauuu ga 22
[0869] <210> 144
[0870] <211> 19
[0871] <212> RNA
[0872] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0873] <400> 144
[0874] ugguaaggau gacaggauu 19
[0875] <210> 145
[0876] <211> 22
[0877] <212> RNA
[0878] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0879] <400> 145
[0880] uuuuauccau uaaacaauac cc 22
[0881] <210> 146
[0882] <211> 19
[0883] <212> RNA
[0884] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0885] <400> 146
[0886] uauccauuaa acaauaccc 19
[0887] <210> 147
[0888] <211> 22
[0889] <212> RNA
[0890] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0891] <400> 147
[0892] ugggcgggua gcggaauucg aa 22
[0893] <210> 148
[0894] <211> 19
[0895] <212> RNA
[0896] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0897] <400> 148
[0898] ugggcgggua gcgggauc 19
[0899] <210> 149
[0900] <211> 22
[0901] <212> RNA
[0902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0903] <400> 149
[0904] uuagccacuc gggcaucgac cc 22
[0905] <210> 150
[0906] <211> 19
[0907] <212> RNA
[0908] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0909] <400> 150
[0910] gccacucggg caucgacc 19
[0911] <210> 151
[0912] <211> 22
[0913] <212> RNA
[0914] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0915] <400> 151
[0916] uggugggccg agcuggauuu ga 22
[0917] <210> 152
[0918] <211> 19
[0919] <212> RNA
[0920] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0921] <400> 152
[0922] uggugggccg agcuggauu 19
[0923] <210> 153
[0924] <211> 22
[0925] <212> RNA
[0926] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0927] <400> 153
[0928] cuaccaauuc cgccauaucc cc 22
[0929] <210> 154
[0930] <211> 19
[0931] <212> RNA
[0932] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0933] <400> 154
[0934] ccaauuccgc cauaucccc 19
[0935] <210> 155

- [0936] <211> 22
[0937] <212> RNA
[0938] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0939] <400> 155
[0940] ugguggggau agagggacuu ga 22
[0941] <210> 156
[0942] <211> 19
[0943] <212> RNA
[0944] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0945] <400> 156
[0946] ugguggggau agagggacu 19
[0947] <210> 157
[0948] <211> 22
[0949] <212> RNA
[0950] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0951] <400> 157
[0952] ucaaccacuc ggccaucucu cc 22
[0953] <210> 158
[0954] <211> 19
[0955] <212> RNA
[0956] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0957] <400> 158
[0958] accacucggc caucucucc 19
[0959] <210> 159
[0960] <211> 22
[0961] <212> RNA
[0962] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0963] <400> 159
[0964] uggaggagag agagggauuc ga 22
[0965] <210> 160
[0966] <211> 19
[0967] <212> RNA
[0968] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0969] <400> 160
[0970] uggaggagag agagggauu 19
[0971] <210> 161
[0972] <211> 22
[0973] <212> RNA
[0974] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0975] <400> 161
[0976] ccuuaccgcu uggccacgcc cc 22
[0977] <210> 162
[0978] <211> 19
[0979] <212> RNA
[0980] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0981] <400> 162
[0982] uaccgcuugg ccacgcccc 19
[0983] <210> 163
[0984] <211> 22
[0985] <212> RNA
[0986] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0987] <400> 163
[0988] uggcugggac gaaaggauuc ga 22
[0989] <210> 164
[0990] <211> 19
[0991] <212> RNA
[0992] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0993] <400> 164
[0994] uggcugggac gaaaggauu 19
[0995] <210> 165
[0996] <211> 22
[0997] <212> RNA
[0998] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0999] <400> 165
[1000] cuauccauua gacgauggac gc 22
[1001] <210> 166
[1002] <211> 19
[1003] <212> RNA
[1004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1005] <400> 166
[1006] uccauuagac gauggacgc 19
[1007] <210> 167
[1008] <211> 22
[1009] <212> RNA
[1010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1011] <400> 167
[1012] ugguacgucc aauaggauuu ga 22
[1013] <210> 168

- [1014] <211> 19
[1015] <212> RNA
[1016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1017] <400> 168
[1018] ugguacgucc aauaggauu 19
[1019] <210> 169
[1020] <211> 22
[1021] <212> RNA
[1022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1023] <400> 169
[1024] uugaccuuuc agccauggau gc 22
[1025] <210> 170
[1026] <211> 19
[1027] <212> RNA
[1028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1029] <400> 170
[1030] accauucagc cauggauc 19
[1031] <210> 171
[1032] <211> 22
[1033] <212> RNA
[1034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1035] <400> 171
[1036] uggugcaucc agcaggaau ga 22
[1037] <210> 172
[1038] <211> 19
[1039] <212> RNA
[1040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1041] <400> 172
[1042] uggugcaucc agcaggaau 19
[1043] <210> 173
[1044] <211> 22
[1045] <212> RNA
[1046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1047] <400> 173
[1048] cuaccauuu caccauggcg gc 22
[1049] <210> 174
[1050] <211> 19
[1051] <212> RNA
[1052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1053] <400> 174
[1054] ccaauuucac cauggcggc 19
[1055] <210> 175
[1056] <211> 22
[1057] <212> RNA
[1058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1059] <400> 175
[1060] uggugccacc acucggauuc ga 22
[1061] <210> 176
[1062] <211> 19
[1063] <212> RNA
[1064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1065] <400> 176
[1066] uggugccacc acucggauu 19
[1067] <210> 177
[1068] <211> 22
[1069] <212> RNA
[1070] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1071] <400> 177
[1072] ucuaccuug aguuaacaac cc 22
[1073] <210> 178
[1074] <211> 19
[1075] <212> RNA
[1076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1077] <400> 178
[1078] accauugagu uaacaacc 19
[1079] <210> 179
[1080] <211> 22
[1081] <212> RNA
[1082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1083] <400> 179
[1084] ugguggguug cccgggacuu ga 22
[1085] <210> 180
[1086] <211> 19
[1087] <212> RNA
[1088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1089] <400> 180
[1090] ugguggguug cccgggacu 19
[1091] <210> 181

- [1092] <211> 22
[1093] <212> RNA
[1094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1095] <400> 181
[1096] cuaccaacug agcuaucceg ac 22
[1097] <210> 182
[1098] <211> 19
[1099] <212> RNA
[1100] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1101] <400> 182
[1102] ccaacugagc uaucccgac 19
[1103] <210> 183
[1104] <211> 22
[1105] <212> RNA
[1106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1107] <400> 183
[1108] uggugccagg aaccagauuu ga 22
[1109] <210> 184
[1110] <211> 19
[1111] <212> RNA
[1112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1113] <400> 184
[1114] uggugccagg aaccagauu 19
[1115] <210> 185
[1116] <211> 22
[1117] <212> RNA
[1118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1119] <400> 185
[1120] uaccaaacug cguaugcuc cg 22
[1121] <210> 186
[1122] <211> 19
[1123] <212> RNA
[1124] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1125] <400> 186
[1126] caaacugcgu uaugcuccg 19
[1127] <210> 187
[1128] <211> 22
[1129] <212> RNA
[1130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1131] <400> 187
[1132] uggucggagc aacaggauuu ga 22
[1133] <210> 188
[1134] <211> 19
[1135] <212> RNA
[1136] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1137] <400> 188
[1138] uggucggagc aacaggauu 19
[1139] <210> 189
[1140] <211> 22
[1141] <212> RNA
[1142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1143] <400> 189
[1144] uaguccgcuc agccaucucu cc 22
[1145] <210> 190
[1146] <211> 19
[1147] <212> RNA
[1148] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1149] <400> 190
[1150] uccgcucagc caucucucc 19
[1151] <210> 191
[1152] <211> 22
[1153] <212> RNA
[1154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1155] <400> 191
[1156] uggcggagaa agagggauuc ga 22
[1157] <210> 192
[1158] <211> 19
[1159] <212> RNA
[1160] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1161] <400> 192
[1162] uggcggagaa agagggauu 19
[1163] <210> 193
[1164] <211> 22
[1165] <212> RNA
[1166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1167] <400> 193
[1168] ucuaccacug aguuaaaagu gc 22
[1169] <210> 194

- [1170] <211> 19
[1171] <212> RNA
[1172] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1173] <400> 194
[1174] accacugagu uaaaagugc 19
[1175] <210> 195
[1176] <211> 22
[1177] <212> RNA
[1178] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1179] <400> 195
[1180] uggagcccuu uaucgggcuu ga 22
[1181] <210> 196
[1182] <211> 19
[1183] <212> RNA
[1184] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1185] <400> 196
[1186] uggagcccuu uaucgggcu 19
[1187] <210> 197
[1188] <211> 22
[1189] <212> RNA
[1190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1191] <400> 197
[1192] ucuacuacug aguuauaucc cu 22
[1193] <210> 198
[1194] <211> 19
[1195] <212> RNA
[1196] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1197] <400> 198
[1198] acuacugagu uauaucccu 19
[1199] <210> 199
[1200] <211> 22
[1201] <212> RNA
[1202] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1203] <400> 199
[1204] ugguagggau aaucagguuu ga 22
[1205] <210> 200
[1206] <211> 19
[1207] <212> RNA
[1208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1209] <400> 200
[1210] ugguaaggau aaucaggu 19
[1211] <210> 201
[1212] <211> 78
[1213] <212> RNA
[1214] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1215] <400> 201
[1216] gcggacguag ccaagugguc caaaggcagu ggauugugaa uccaccacgc gcggguucaa 60
[1217] uccccgucgu ucgccccca 78
[1218] <210> 202
[1219] <211> 76
[1220] <212> RNA
[1221] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1222] <400> 202
[1223] gccccuaucg ucuaguggcc caggacaucu cucuuucaag gaggcaacgg ggauucgauu 60
[1224] uccccuaggg guacca 76
[1225] <210> 203
[1226] <211> 75
[1227] <212> RNA
[1228] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1229] <400> 203
[1230] gcgcucuag uucagugcgg uagaacgcag gucuccaaaa ccugaugccg uagguucaaa 60
[1231] uccuacagag cgcca 75
[1232] <210> 204
[1233] <211> 84
[1234] <212> RNA
[1235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1236] <400> 204
[1237] gccuugaugg ugaaauggua gacacgcgag acucaaaauc ucgugcuaaa cagcguggag 60
[1238] guucgaaucc ucuucaaggc acca 84
[1239] <210> 205
[1240] <211> 77
[1241] <212> RNA
[1242] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1243] <400> 205
[1244] gggccuguag cucagaggau uagagcacgu gguugcgaac cacggugucg gggguucgaa 60
[1245] ucccuccucg cccacca 77
[1246] <210> 206
[1247] <211> 77

- [1248] <212> RNA
- [1249] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1250] <400> 206
- [1251] gggauuguag uucaauuggu uagaguaccg cccugucaag acggaaguug cggguucgag 60
- [1252] ccccgucagu cccgcca 77
- [1253] <210> 207
- [1254] <211> 75
- [1255] <212> RNA
- [1256] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1257] <400> 207
- [1258] uccucaguag cucaguggua gagcggucgg cuguuaaccg auuggucgua gguucaaauc 60
- [1259] cuuuugagg agcca 75
- [1260] <210> 208
- [1261] <211> 74
- [1262] <212> RNA
- [1263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1264] <400> 208
- [1265] ggcgacauag ccaaguggua aggcagggga cugcaaaucc cccaucacca guucaaauc 60
- [1266] gggugucgcc ucca 74
- [1267] <210> 209
- [1268] <211> 75
- [1269] <212> RNA
- [1270] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1271] <400> 209
- [1272] ggggcguggc caagcguaa ggcaacaggu uuugguccug uuauugcgaa gguucgaauc 60
- [1273] cuuucgucc agcca 75
- [1274] <210> 210
- [1275] <211> 72
- [1276] <212> RNA
- [1277] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1278] <400> 210
- [1279] gggauuuguu uaauggauaa aauuuauucu ugccaaggau aagaugcggg uucgauuccc 60
- [1280] gcuaccgcc ca 72
- [1281] <210> 211
- [1282] <211> 75
- [1283] <212> RNA
- [1284] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1285] <400> 211
- [1286] agggauauaa cucaguagua gagugucacc uuuauuggu gaaagucauc aguucaaacc 60

- [1287] ugauuaucucc uacca 75
[1288] <210> 212
[1289] <211> 83
[1290] <212> RNA
[1291] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1292] <400> 212
[1293] gccgccaugg ugaaauuggu agacacgcug cucuuaggaa gcagugcuag agcaucucgg 60
[1294] uucgaaucgg agugguggca cca 83
[1295] <210> 213
[1296] <211> 90
[1297] <212> RNA
[1298] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1299] <400> 213
[1300] ggggauaugg cggaauuggu agacgcuacg gacuuaaaaa auccguuggu uuuauaaacc 60
[1301] gugagguuc aagucccucu auccccacca 90
[1302] <210> 214
[1303] <211> 75
[1304] <212> RNA
[1305] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1306] <400> 214
[1307] gguuguuaa cucaauggua gaguacucgg cuuuuaaccg acgaguuccg gguucaaguc 60
[1308] ccgggcaacc cacca 75
[1309] <210> 215
[1310] <211> 76
[1311] <212> RNA
[1312] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1313] <400> 215
[1314] gcauccaugg cugaaugguc aaagcaccca acucauaauu gggaagucgc gguucaauu 60
[1315] ccugcuggau gcacca 76
[1316] <210> 216
[1317] <211> 77
[1318] <212> RNA
[1319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1320] <400> 216
[1321] cgcgagauag agcaguuugg uagcucgcaa ggcucauaac cuugaaguca cggguucaaa 60
[1322] ucccgucucc gcaacca 77
[1323] <210> 217
[1324] <211> 76
[1325] <212> RNA

- [1326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1327] <400> 217
[1328] gucgggauag cucaguuggu agagcagagg acugaaauc cucgugucac caguucaaa 60
[1329] cugguuccug gcacca 76
[1330] <210> 218
[1331] <211> 77
[1332] <212> RNA
[1333] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1334] <400> 218
[1335] aggganguag cgcagcuugg uagcgcguuu guuuugggua caaaaugucg cagguucaa 60
[1336] uccugucauc ccuacca 77
[1337] <210> 219
[1338] <211> 77
[1339] <212> RNA
[1340] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1341] <400> 219
[1342] cggagcauaa cgcaguuugg uagcugucca ucuuggggug auggaggucg cggguucaa 60
[1343] uccuguugcu ccgacca 77
[1344] <210> 220
[1345] <211> 91
[1346] <212> RNA
[1347] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1348] <400> 220
[1349] ggagagaugg ccgagugguu gauggcuccg gucuugaaaa ccgguauagu uuuaaaaacu 60
[1350] aucgaggguu cgaaucccuc ucucuccucc a 91
[1351] <210> 221
[1352] <211> 91
[1353] <212> RNA
[1354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1355] <400> 221
[1356] ggagagaugg cugagcggac uaaagcggug gauugcuaau ccguuguaca gacuaucugu 60
[1357] accgaggguu cgaaucccuc uuucuccgcc a 91
[1358] <210> 222
[1359] <211> 76
[1360] <212> RNA
[1361] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1362] <400> 222
[1363] gccugcuuag cucagagguu agagcaucgc acuuguaaug cgacggucac cgguucgauc 60
[1364] ccgauagaag gcucca 76

- [1365] <210> 223
[1366] <211> 75
[1367] <212> RNA
[1368] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1369] <400> 223
[1370] gcacuuuuuaa cucaguggua gaguaacgcc augguaaggc guaagucauc gguucaagcc 60
[1371] cgauaaaggg cucca 75
[1372] <210> 224
[1373] <211> 87
[1374] <212> RNA
[1375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1376] <400> 224
[1377] gggucgaugc ccgaguggcu aauggggacg gacuguaaaau ccguuggcaa uaugcuuacg 60
[1378] cugguucaaa uccagcucgg cccacca 87
[1379] <210> 225
[1380] <211> 75
[1381] <212> RNA
[1382] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1383] <400> 225
[1384] gcguccaucg ucuaauggau aggacagagg ucuucuaaac cuuagguaua gguucaaauc 60
[1385] cuauuggacg uacca 75

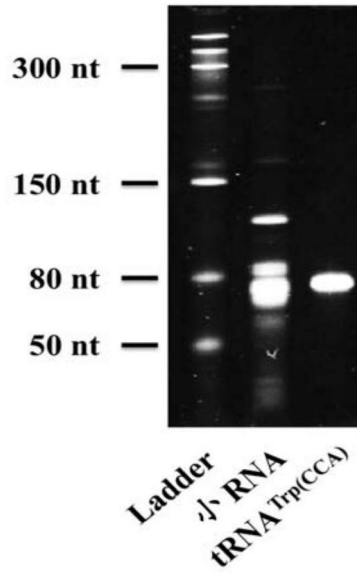


图1

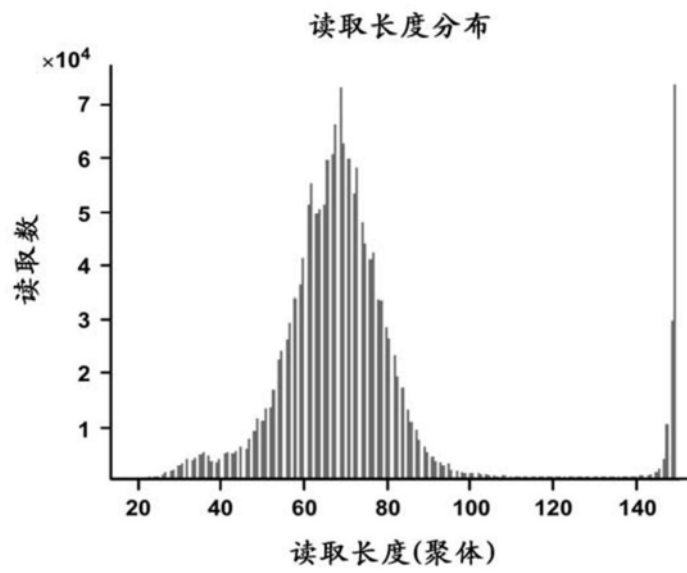


图2

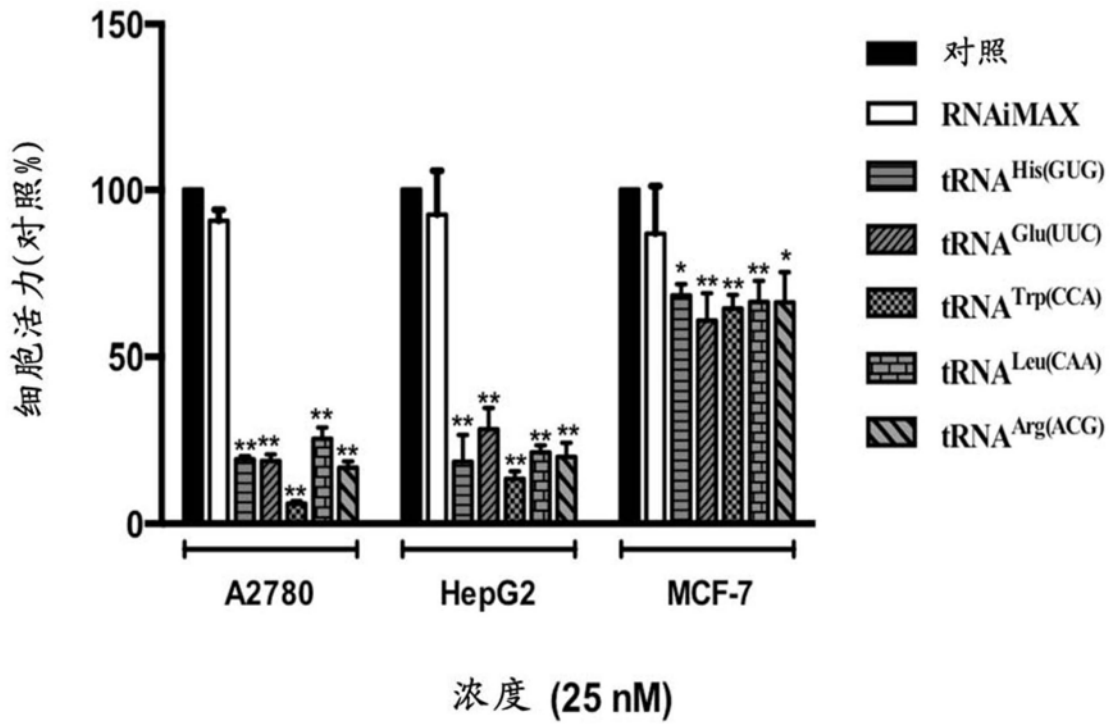


图3

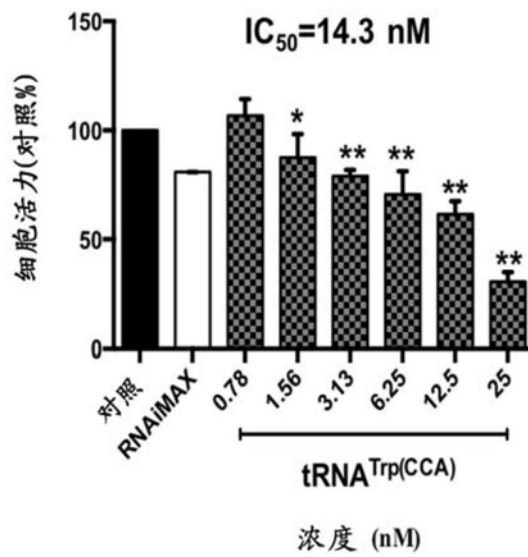


图4A

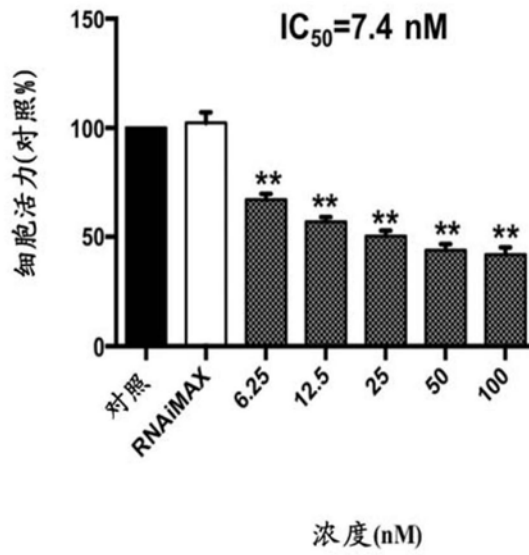


图4B

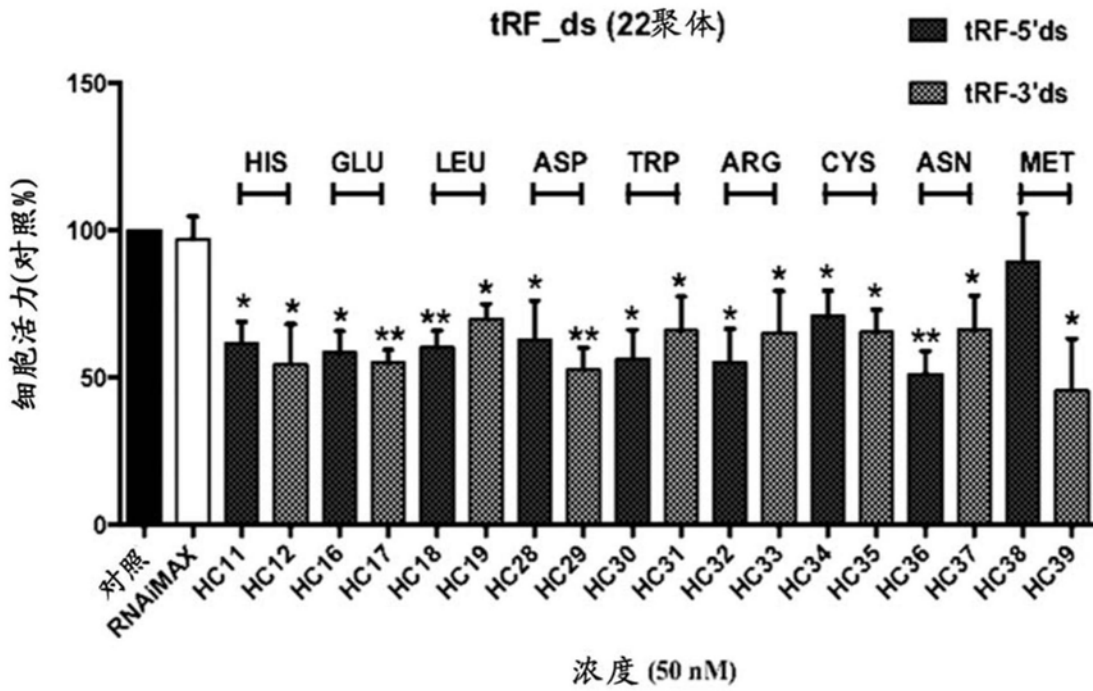


图5A

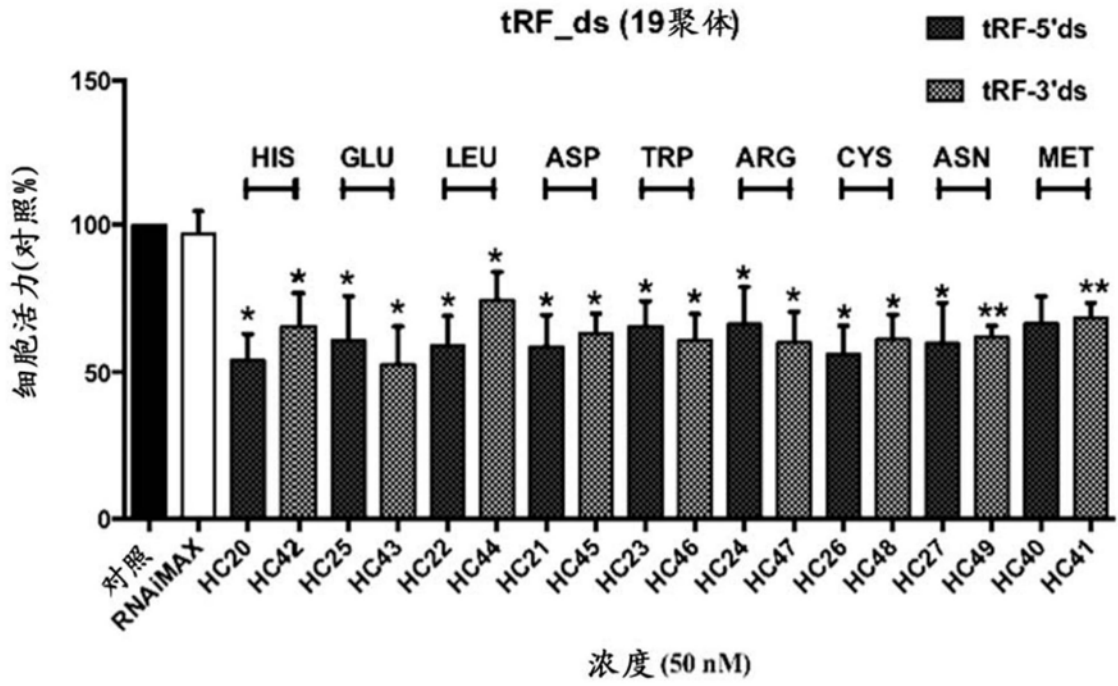


图5B

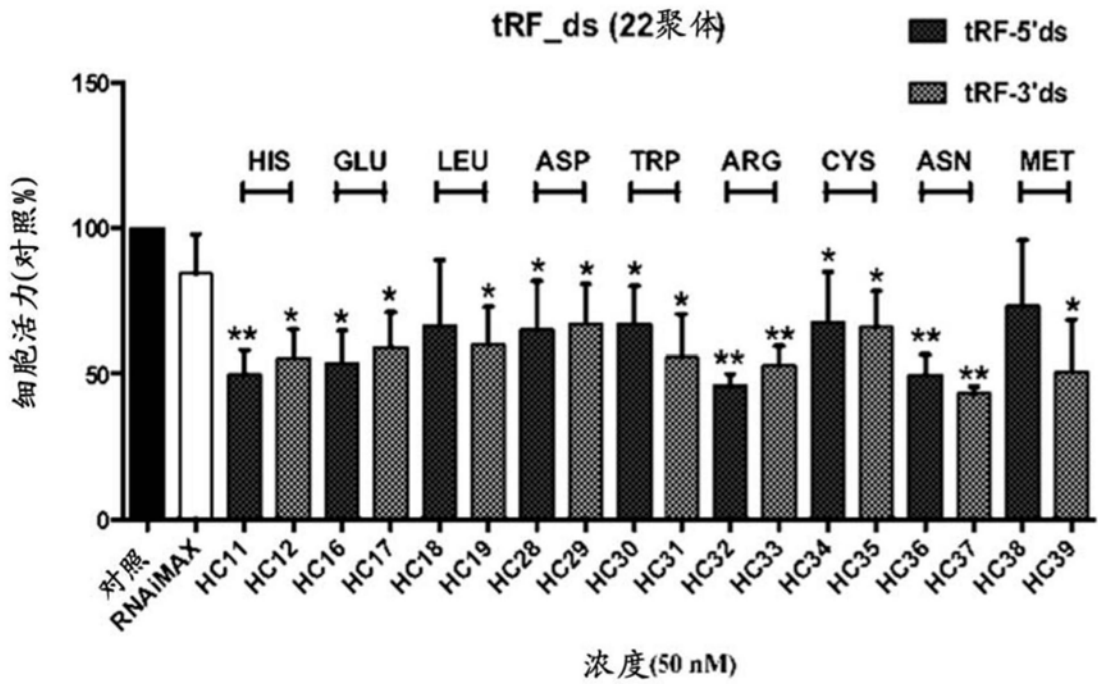


图5C

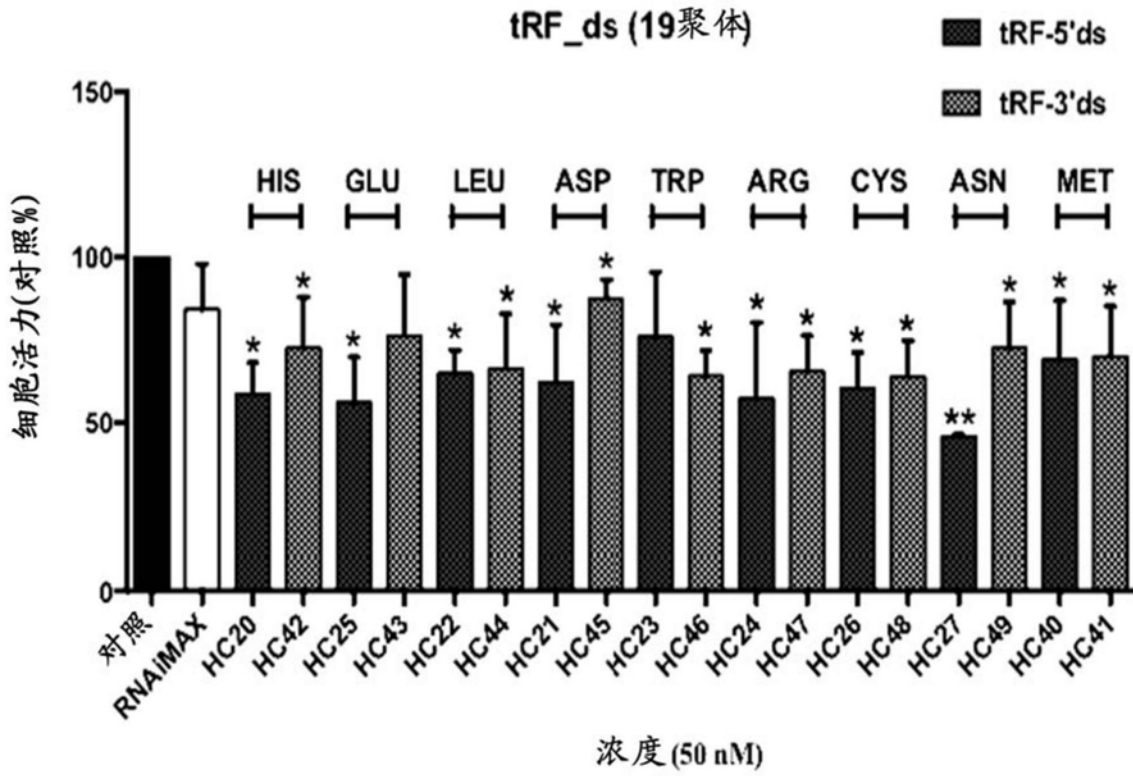


图5D

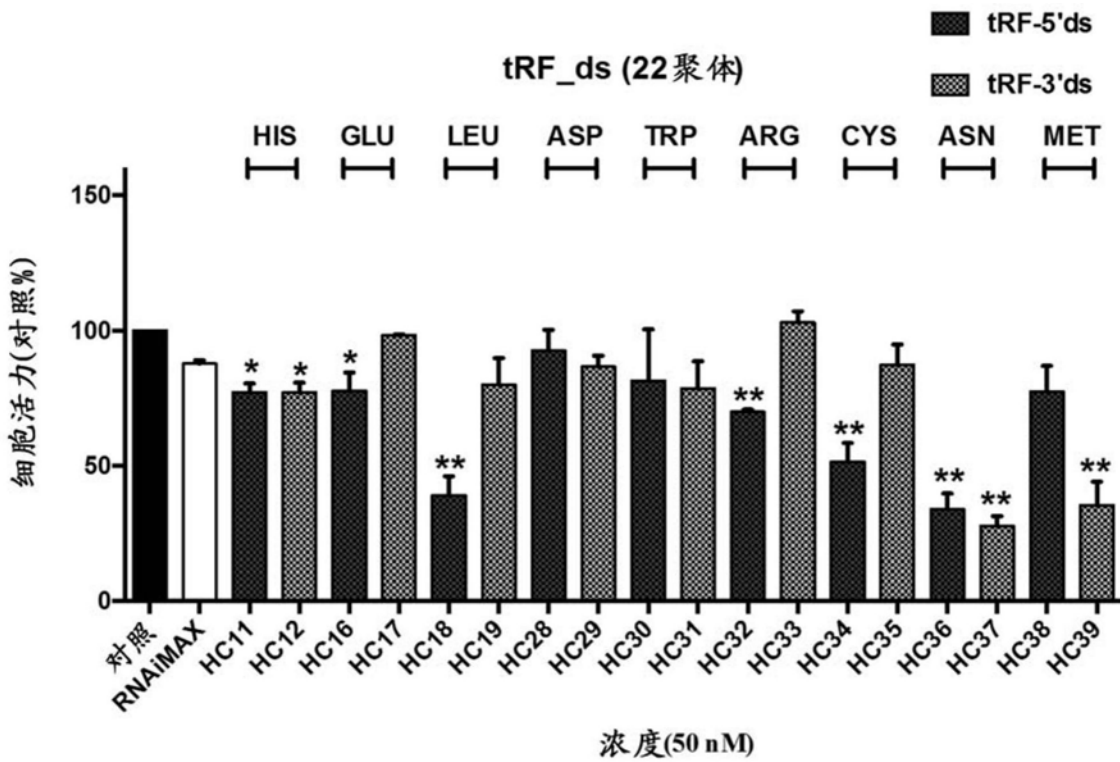


图5E

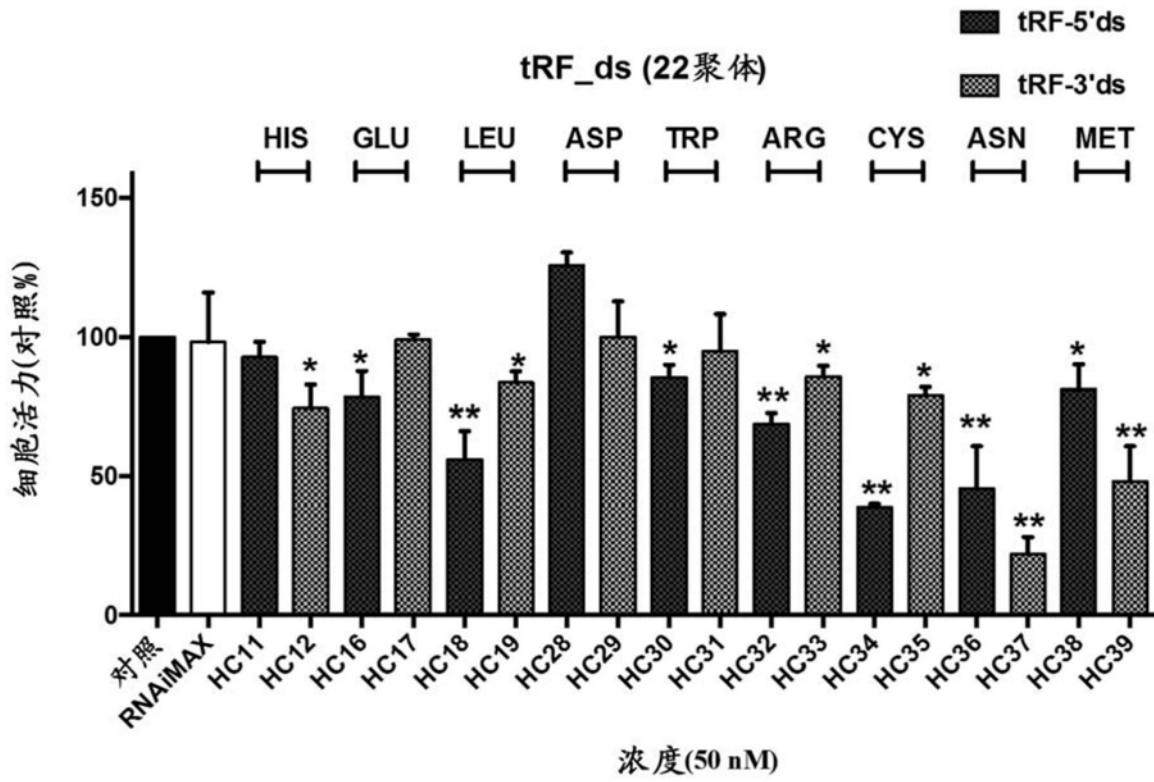


图5F

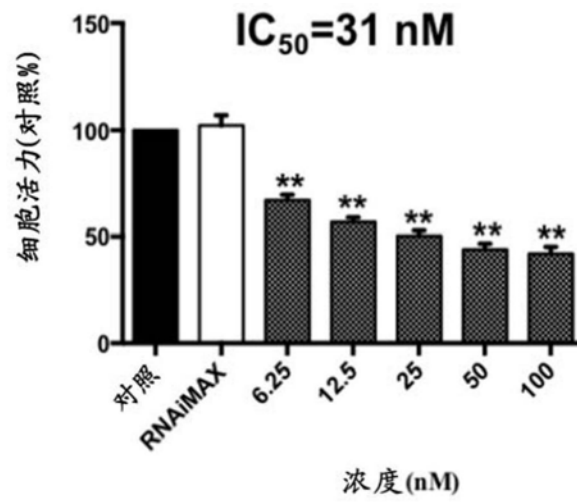


图6A

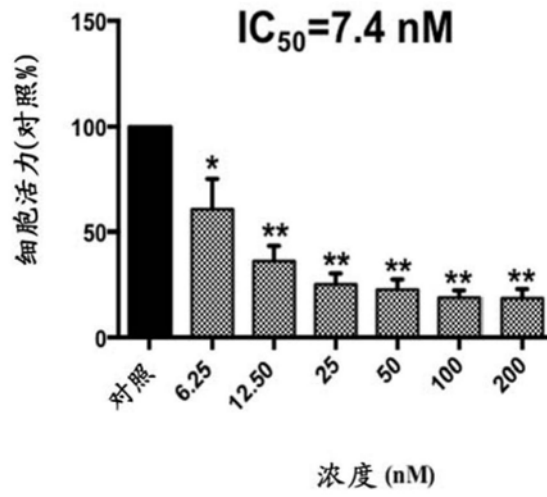


图6B

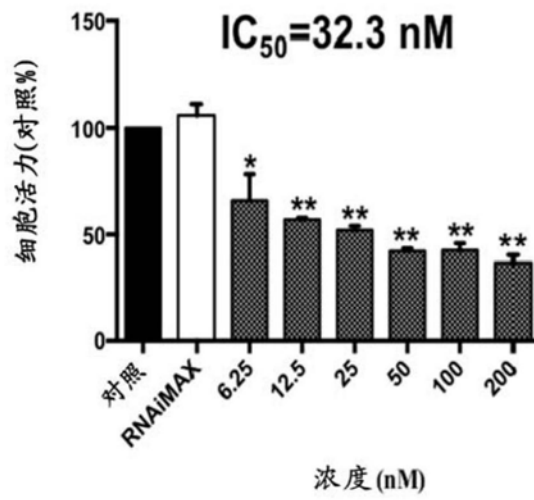


图6C

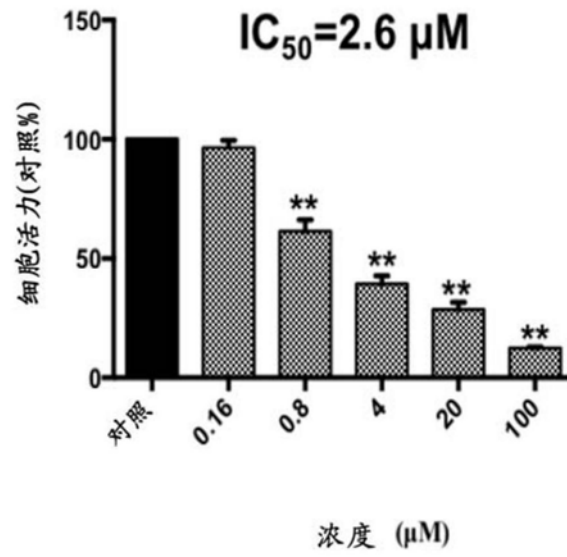


图6D

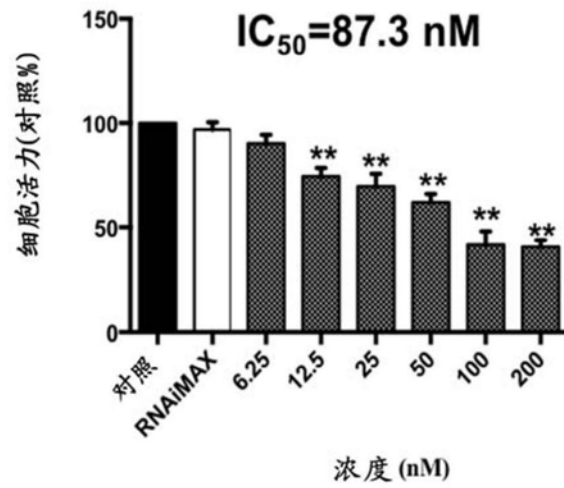


图6E

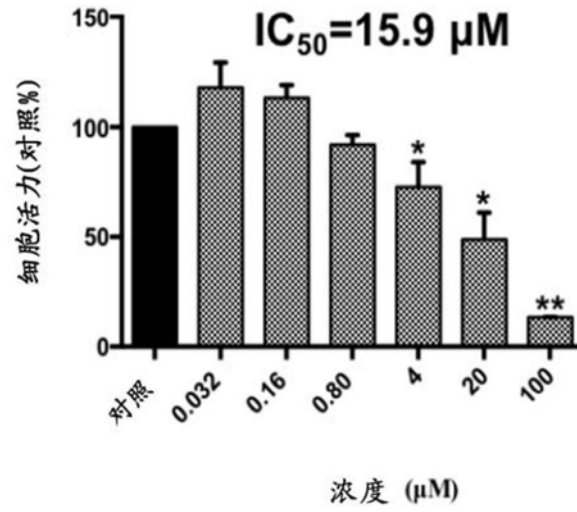


图6F

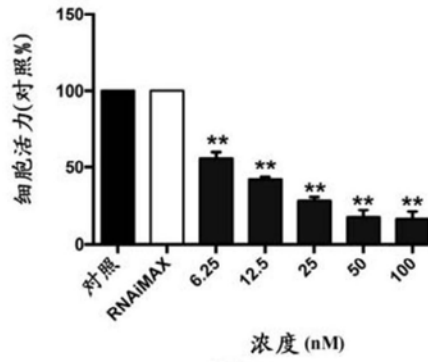


图6G

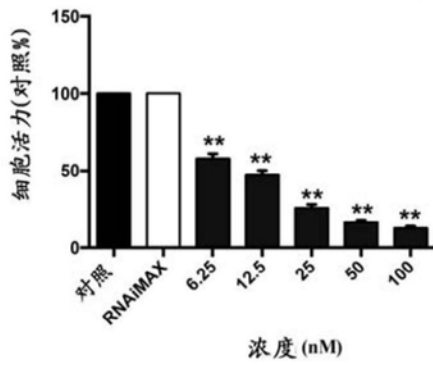


图6H

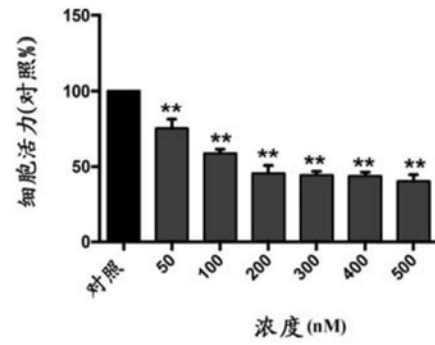


图6I

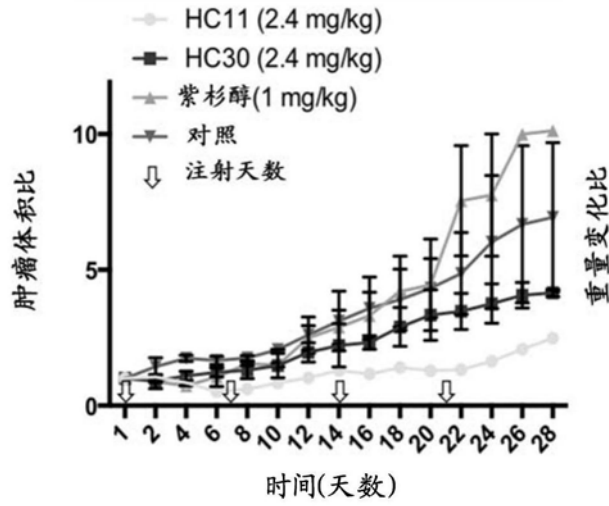


图7A

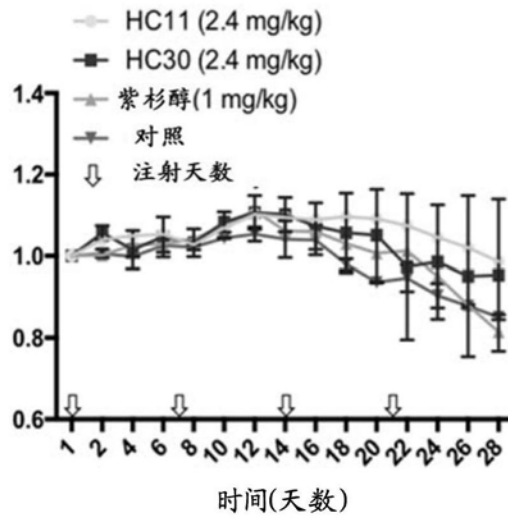


图7B

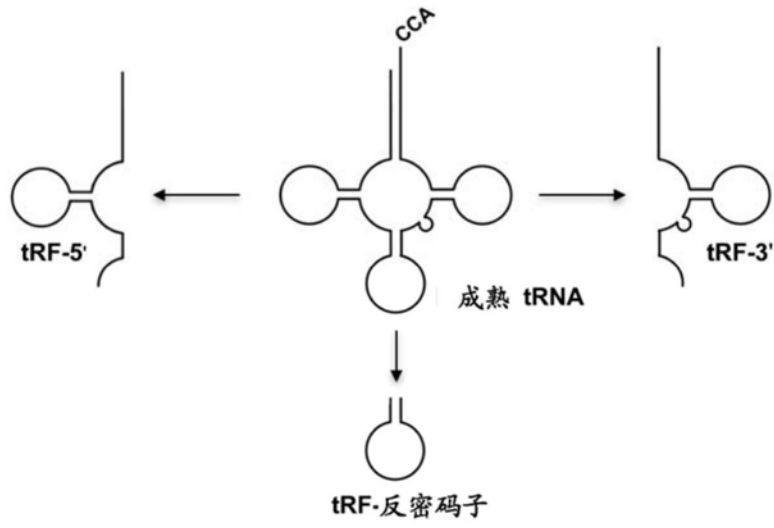


图8