



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1860371 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200480012415. 5

(22) 申请日 2004. 05. 10

(30) 优先权数据
60/468, 987 2003. 05. 08 US
60/491, 274 2003. 07. 31 US

(85) PCT申请进入国家阶段日
2005. 11. 08

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2004/014759 2004. 05. 10

(87) PCT申请的公布数据
W02004/104217 EN 2004. 12. 02

(73) 专利权人 WYETH 公司
地址 美国新泽西

(72) 发明人 E·R·拉瓦列 L·A·克林斯-雷斯
M·阿莱

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 程泳

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006. 01)
C12Q 1/48 (2006. 01)

A61K 31/00 (2006. 01)
A61K 38/00 (2006. 01)
C12N 15/11 (2006. 01)
A61K 31/7105 (2006. 01)

(56) 对比文件
CN 1330653 A, 全文.
Hussain et al.. Activation of Protein Kinase C ζ is essential for cytokine-Induced metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion from rabbit smooth muscle cells and Inhibits proliferation. Journal of biological chemistry 277 30. 2002, 277 (30), 27345-27352.
Jordan et al.. Differential effects of protein kinase C Inhibitors on chemokine production In human synovial fibroblasts. British Journal of Pharmacology 117. 1996, (117), 1245-1253.

审查员 李冰

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 13 页

(54) 发明名称

用作关节炎和其它炎性疾病的药物靶的 ζ 蛋白激酶 C

(57) 摘要

本发明基于 ζ PKC 在关节炎病人组织中的表达比正常个体中的表达增加这一发现。因此, 基于关节炎组织中增加的 ζ PKC 基因表达, 本发明提供了在患者中诊断、预测和监测关节炎病程的方法。本发明还提供了用作治疗关节炎药物的抑制 ζ PKC 表达的化合物, 包括但不限于抑制性多核苷酸和多肽, 小分子和肽抑制剂。另外, 本发明提供了这样的药物的药物制剂和给药途径, 以及评估其疗效的方法。

CN 1860371 B

1. ζ PKC 基因产物在制备用于在受试者中诊断关节炎的试剂中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA。
3. 权利要求 1 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物是 ζ PKC 多肽。
4. ζ PKC 基因产物在制备用于在受试者中预测关节炎的试剂中的用途。
5. 权利要求 4 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA。
6. 权利要求 4 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物是 ζ PKC 多肽。
7. ζ PKC 基因产物在制备用于用于在受试者中监测关节炎病程的试剂中的用途。
8. 权利要求 7 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA。
9. 权利要求 7 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物是 ζ PKC 多肽。
10. ζ PKC 基因产物在制备用于在受试者中评估关节炎治疗疗效的试剂中的用途。
11. 权利要求 10 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA。
12. 权利要求 10 所述的用途,其中 ζ PKC 基因产物是 ζ PKC 多肽。
13. 一种筛选能够抑制受试者关节炎的化合物的方法,包括以下步骤:
 - (a) 在第一样品中测量 ζ PKC 的活性,所述第一样品包含软骨细胞和 ζ PKC;
 - (b) 在第二样品中测量 ζ PKC 的活性,所述第二样品包含软骨细胞和 ζ PKC 以及所述化合物;和
 - (c) 测定在步骤 (b) 中所测量的 ζ PKC 的活性相对在步骤 (a) 中所测量的 ζ PKC 的活性是否降低,其中所述的第一样品和第二样品含有等量 ζ PKC,以及相对在步骤 (a) 中所测量 ζ PKC 的活性,在步骤 (b) 中所测量的 ζ PKC 的活性的降低表明该化合物抑制受试者的关节炎。
14. 权利要求 13 的方法,其中所述关节炎是骨关节炎。
15. 权利要求 13 所述的方法,其中所述化合物是小分子。
16. 权利要求 13 所述的方法,其中所述化合物是 siRNA 分子。
17. 权利要求 13 所述的方法,其中用酶促蛋白激酶测定法测量 ζ PKC 的活性。
18. 权利要求 13 所述的方法,其中用软骨细胞沉淀测定法测量 ζ PKC 的活性。
19. 权利要求 13 所述的方法,其中用测量蛋白聚糖降解的测定法测量 ζ PKC 的活性。
20. 权利要求 13 所述的方法,其中用测量 NF- κ B 活性的测定法测量 ζ PKC 的活性。
21. 一种筛选能够抑制受试者关节炎的化合物的方法,包括以下步骤:
 - (a) 在第一样品中测量 ζ PKC 基因产物的表达,所述第一样品包含表达 ζ PKC 的软骨细胞;
 - (b) 在第二样品中测量 ζ PKC 基因产物的表达,所述第二样品包含表达 ζ PKC 的软骨细胞和以及所述化合物;和
 - (c) 测定在步骤 (b) 中所测量的 ζ PKC 基因产物的表达相对在步骤 (a) 中所测量的 ζ PKC 基因产物的表达是否降低,其中所述的第一样品和第二样品含有等量的表达 ζ PKC 的细胞,以及相对在步骤 (a) 中所测量 ζ PKC 的表达,在步骤 (b) 中所测量的 ζ PKC 基因产物的表达的降低表明该化合物抑制受试者的关节炎。
22. 权利要求 21 的方法,其中所述关节炎是骨关节炎。
23. 权利要求 21 所述的方法,其中所述化合物是小分子。

24. 权利要求 21 所述的方法,其中所述化合物是 siRNA 分子。
25. 权利要求 21 所述的方法,其中用定量 PCR 测量 ζ PKC 基因产物的表达。
26. 抑制 ζ PKC 活性的化合物在制备治疗受试者关节炎的试剂中的用途。
27. 权利要求 26 所述的用途,其中所述化合物抑制软骨细胞中的 ζ PKC 活性。
28. 权利要求 26 所述的用途,其中所述化合物是反义多核苷酸。
29. 权利要求 26 所述的用途,其中所述化合物是小分子。
30. 权利要求 26 所述的用途,其中所述化合物是 siRNA 分子。
31. 权利要求 30 所述的用途,其中所述 siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。
32. 抑制 ζ PKC 表达的化合物在制备治疗受试者关节炎的试剂中的用途。
33. 权利要求 32 所述的用途,其中所述化合物抑制软骨细胞中 ζ PKC 的表达。
34. 权利要求 32 所述的用途,其中所述化合物是反义多核苷酸。
35. 权利要求 32 所述的用途,其中所述化合物是小分子。
36. 权利要求 32 所述的用途,其中所述化合物是 siRNA 分子。
37. 权利要求 36 所述的用途,其中所述 siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。
38. 一种抑制 ζ PKC 表达或 ζ PKC 活性的且与 ζ PKCmRNA 互补的 siRNA 分子。
39. 权利要求 38 所述的 siRNA 分子,其中所述 siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。

用作关节炎和其它炎性疾病的药物靶的 ζ 蛋白激酶 C

[0001] 本申请要求申请日为 2003 年 5 月 8 日的美国临时申请 No. 60/468, 987 和申请日为 2003 年 7 月 31 日的美国临时申请 No. 60/491, 274 的利益, 两者全部引入本申请作为参考。

[0002] 发明背景

技术领域

[0003] 本发明涉及在受试者中诊断、预测以及监测关节炎病程的方法, 这些方法基于关节炎组织中增加的 ζ 蛋白质激酶 C (ζ PKC) 基因表达。本发明还提供了抑制 ζ PKC 表达的化合物, 该化合物可用作治疗关节炎的药物。

背景技术

[0004] ζ 蛋白质激酶 C (ζ PKC) 是作为一种重要的信号转导成分出现的。不断有文献表明 ζ PKC 与 NF- κ B 和 AP-1 途径有关。例如, 一种 ζ PKC 敲除小鼠完全可以存活, 但是表现出使人联想到肿瘤坏死因子 (TNF) 受体和淋巴毒素受体敲除的表型, 伴有 NF- κ B 依赖性转录活性的严重损伤 (Leitges 等. (2001) Mol. Cell 18 :771-80)。其他研究者 (Lallena 等. (1999) Mol. Cell. Biol. 19 :2180-88) 已经证明 ζ PKC 在活化 I κ B, 并从而活化 NF- κ B 中的作用。

[0005] NF- κ B 活化与许多炎性疾病有关, 包括哮喘, 肠炎和关节炎 (参见 Roshak 等. (2002) Curr. Opin. Pharmacol. 2 :316-21)。已经表明, NF- κ B 在各种细胞类型分泌各种基质金属蛋白酶 (MMPs) 的过程中发挥重要作用 (Bond 等. (1998) FEBS Lett. 435 :29-34 ; Bond 等. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 264 :561-67 ; Bond 等. (2001) Cardiovasc. Res. 50 :556-65)。在关节炎中, 细胞因子例如 TNF 和白介素 -1 (IL-1) 增加 MMPs 和其他降解酶的产生和合成, 使其超过能够自然控制的水平从而引发疾病 (参见 Smith (1999) Front. Biosci. 4 :D704 ; Mort 和 Billington (2001) Arthritis Res. 3 :337-41 ; Catterall 和 Cawston (2003) Arthritis Res. Ther. 5 :12-24)。

[0006] 到目前为止, 还没有直接的证据证明 ζ PKC 与关节炎相关。然而如果 ζ PKC 在受侵袭的组织中被表达, 这可能有助于解释 TNF 和 IL-1 的降解作用, 该作用是通过经 NF- κ B 将这些因子的细胞外受体结合转化为降解酶合成的细胞内诱导而进行的。在这点上, ζ PKC 抑制剂可以阻断 TNF 和 IL-1 的作用, 从而用于治疗关节炎和其他炎性疾病。这种 ζ PKC 的抑制剂比传统的细胞因子和 MMP 抑制剂更有效, 因为它们最终应当影响不止一个靶标 (Roshak, 同前 ; Smith, 同前)。这种 ζ PKC 抑制剂也应当比 NF- κ B 抑制剂更安全, 因为 ζ PKC 只是 NF- κ B 途径的众多效应物中的一个。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明基于 ζ PKC 在关节炎病人组织中的表达比正常个体中的表达增加这一发现。本发明提供了抑制 ζ PKC 在关节炎组织中表达的化合物, 包括但不限于抑制性多核苷酸和多肽、小分子和肽抑制剂。本发明还提供基于关节炎组织中异常的 ζ PKC 基因表达, 从

而诊断、预测和监测关节炎病程的方法,以及使用治疗这种异常表达的药物的治疗方法。另外,本发明提供了这种药物的药物制剂和给药途径,以及评估这种药物的疗效的方法。

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于在受试者中诊断关节炎的方法,包括以下步骤:检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的测试量,然后将该测试量与对照样品中 ζ PKC 基因产物的正常量进行比较,如果发现测试量高于正常量,则得到诊断关节炎的阳性指征。在一个优选实施方案中,样品包括软骨细胞。在其它一些优选实施方案中, ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA,或者是 ζ PKC 多肽。

[0010] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种用于在受试者中预测关节炎的方法,包括以下步骤:检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的测试量,然后将该测试量与对照样品中 ζ PKC 基因产物的预测量进行比较,测试量与预测量的比较提供了预测关节炎的指征。在一个优选实施方案中,样品包括软骨细胞。在其它一些优选实施方案中, ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA,或者是 ζ PKC 多肽。

[0011] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种用于监测受试者关节炎病程的方法,包括以下步骤:在第一时间检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的第一测试量,在其后的第二时间检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的第二测试量,比较第一测试量和第二测试量,如果与首次测试相比, ζ PKC 基因产物的第二测试量增加,表明关节炎加重;如果与第一测试量相比, ζ PKC 基因产物的第二测试量降低,表明关节炎减轻。在一个优选实施方案中,样品包括软骨细胞。在其它一些优选实施方案中, ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA,或者是 ζ PKC 多肽。

[0012] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种在受试者中评估关节炎治疗疗效的方法,包括以下步骤:在治疗前检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的第一测试量,在治疗后检测取自受试者的样品中的 ζ PKC 基因产物的第二测试量,比较第一测试量和第二测试量,如果与第一测试量相比, ζ PKC 基因产物的第二测试量降低,表明关节炎的治疗是有效的。在一个优选实施方案中,样品包括软骨细胞。在其它一些优选实施方案中, ζ PKC 基因产物包括 RNA 或 cDNA,或者是 ζ PKC 多肽。

[0013] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种筛选能够在受试者中抑制关节炎的化合物的方法,包括以下步骤:提供含有等量 ζ PKC 的第一样品和第二样品,将第一样品和该化合物接触,然后相对于没有接触过该化合物的第二样品中 ζ PKC 的活性,测定第一样品中 ζ PKC 的活性是否降低,如果第一样品中 ζ PKC 的活性比第二样品中的低,表明这种化合物能够在受试者中抑制关节炎。在一个优选实施方案中,这种化合物抑制软骨细胞中的 ζ PKC 活性。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是小分子。在其它优选实施方案中,通过使用酶促蛋白激酶测定法,软骨细胞沉淀测定法,测量蛋白聚糖降解的测定法,或者测量 NF- κ B 活性的测定法来测定 ζ PKC 的活性。

[0014] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种筛选能够在受试者中抑制关节炎的化合物的方法,包括以下步骤:提供含有等量的表达 ζ PKC 的细胞的第一样品和第二样品,将第一样品和该化合物接触,然后相对于没有接触过该化合物的第二样品中 ζ PKC 基因产物的表达,测定第一样品中 ζ PKC 基因产物的表达是否降低,如果第一样品中 ζ PKC 基因产物的表达比第二样品中的低,表明这种化合物能够在受试者中抑制关节炎。在一个优选实施方案中,这种化合物抑制软骨细胞中 ζ PKC 基因产物的表达。在另外一个优选实施方案中,

这种化合物是小分子。在其它优选实施方案中,通过使用酶促蛋白激酶测定法,软骨细胞沉淀测定法,测量蛋白聚糖降解的测定法,或者测量 NF- κ B 活性的测定法来测定 ζ PKC 基因产物的表达。

[0015] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种治疗受试者关节炎的方法,包括给予受试者抑制受试者中的 ζ PKC 活性的化合物。在一个优选实施方案中,这种化合物抑制软骨细胞中 ζ PKC 的活性。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是反义多核苷酸。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是小分子。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是 siRNA 分子。在一个更优选的实施方案中,siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。

[0016] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种治疗受试者关节炎的方法,包括给予受试者抑制受试者中的 ζ PKC 表达的化合物。在一个优选实施方案中,这种化合物抑制 ζ PKC 在软骨细胞中的表达。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是反义多核苷酸。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是小分子。在另外一个优选实施方案中,这种化合物是 siRNA 分子。在一个更优选的实施方案中,siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。

[0017] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种抑制 ζ PKC 的表达或活性的 siRNA 分子。在一个优选实施方案中,siRNA 分子选自如图 1 所示的 siRNA 分子。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 显示了用在 RNAi 中靶向人 ζ PKC mRNA 的优选 siRNA 分子。 ζ PKC 转录物的靶区段 [SEQ ID NOs :9-20 ;45-59 ;90-109 ;和 150-154] 按照它们的前两个核苷酸进行分组 (AA, CA, GA, 或者 TA), 并按照 5' \rightarrow 3' 方向显示。“GC 比”是指每一个靶区段中总 G+C 核苷酸的百分比;“位置”是指紧邻每个靶区段的起始点之前的人 ζ PKC cDNA (SEQ ID NO : 1) 中的核苷酸位置。优选的 siRNA 分子 (siRNA 双链体) 如图右侧所示。每一个 siRNA 双链体的有义链 [SEQ ID NOs :21-32 ;60-74 ;110-129 ;和 155-159] 按照 5' \rightarrow 3' 方向显示;相应的反义链 [SEQ ID NOs :33-44 ;75-89 ;130-149 ;和 160-164] 按照 3' \rightarrow 5' 方向显示。例如,针对如图所示第一个靶区段 (即 SEQ ID NO :9) 的 siRNA 分子是指定的有义链和反义链 (即,分别是 SEQ ID NO :21 和 SEQ ID NO :33) 的 siRNA 双链体。

[0020] 图 2 描述了 NF- κ B 阻断剂 SN50 (300 μ g/ml) 或其无活性类似物 SN50M (300 μ g/ml) 对培养中的原代牛软骨细胞中 TNF- 或 IL-1- 介导的蛋白聚糖降解的影响。图的上部表示释放到培养基中的蛋白聚糖的含量 (μ g/0.5ml), 图的下部表示细胞沉淀中保留的蛋白聚糖的含量 (μ g/ml)。

[0021] 图 3 描述了肉豆蔻酰化的 ζ PKC 假底物肽 (2089) 或 ζ PKC 小分子抑制剂 Ro-31-8220 (R031) 对培养中的原代牛软骨细胞中 TNF- 介导的蛋白聚糖降解的影响。图的上部表示释放到培养基中的蛋白聚糖的含量 (μ g/0.5ml), 图的下部表示细胞沉淀中保留的蛋白聚糖的含量 (μ g/ml)。

[0022] 图 4 描述了肉豆蔻酰化的 ζ PKC 假底物肽 (2089) 对培养中的原代牛软骨细胞中 TNF- 或 IL-1- 介导的蛋白聚糖降解的剂量依赖性影响。图的上部表示释放到培养基中的蛋白聚糖的含量 (μ g/0.5ml), 图的下部表示细胞沉淀中保留的蛋白聚糖的含量 (μ g/ml)。

[0023] 图 5 显示 ζ PKC 在人类骨关节炎的关节软骨中被上调。图 A 显示使用 HG-U95Av2 Affymetrix GeneChip[®] 阵列时 ζ PKC mRNA 的水平;图 B 显示使用 TaqMan PCR 分析时 ζ PKC mRNA 的水平。

[0024] 图 6 显示腺病毒介导的 ζ PKC 表达增加蛋白聚糖的降解。图 A 显示对应于 ζ PKC 和 GFP 的过量表达而在软骨细胞沉淀测定法中释放到培养基中的蛋白聚糖；图 B 显示用亚最适水平的细胞因子 TNF α 进行刺激的作用。

[0025] 图 7 表明 ζ PKC 是在关节软骨细胞中 TNF- α 介导的蛋白聚糖释放的原因。将 TNF- α (100ng/ml ;用 * 表示) 添加到软骨细胞沉淀测定法中的一些培养基中。两种抑制剂以多种不同的剂量添加：二吡啶基马来酰亚胺 (BIS)，一种泛 PKC 抑制剂；和氯化白屈菜赤碱 (CC)，一种佛波醇酯结合位点的竞争性抑制物，它不抑制 ζ PKC。以 μ g/ml 在 y 轴显示释放到培养基中的蛋白聚糖。

[0026] 图 8 显示抑制剂 BIS 和 CC 对 TNF- α 诱导的 NF- κ B 活化的影响。在无限增殖化的人软骨细胞细胞系中测量 NF- κ B 的活化，该细胞系中引入了在 NF- κ B 响应元件控制下的萤光素酶报告基因；活性（即 y 轴的单位）表示为“相对萤光素酶活性”。

[0027] 发明详述

[0028] 我们已经发现 ζ PKC 在关节炎病人组织中的表达比在正常个体中的表达被上调。这种酶在关节炎组织中被上调这一发现使得能够得到通过检测 ζ PKC 表达的增加来诊断关节炎的方法，以及通过下调 ζ PKC 表达来治疗关节炎的方法。另外，这一发现使得能够鉴定用于治疗关节炎的新的 ζ PKC 抑制剂。

[0029] 诊断、预测以及监测关节炎病程的方法

[0030] 引言

[0031] 本发明提供了通过检测 ζ PKC 的上调来诊断关节炎的方法。“诊断的”或者“诊断”是指确认病理状态是否存在。诊断方法包括通过测定受试者（人或非人的哺乳动物）生物样品中 ζ PKC 基因产物（如 mRNA, cDNA, 或者多肽, 包括其片段）的测试量, 并将该测试量与 ζ PKC 基因产物的正常量或范围（即得自己知没有关节炎的个体的量或范围）进行比较, 来检测 ζ PKC 的上调。虽然一种特定的诊断方法可能不能确诊关节炎, 但如果该方法提供了有助于诊断的阳性指征, 则该方法是合格的。

[0032] 本发明还提供了通过检测 ζ PKC 的上调来预测关节炎的方法。“预测的”或者“预测”是指预测病理状态可能的发展和 / 或严重性。预测方法包括测定受试者生物样品中 ζ PKC 基因产物的测试量, 并将该测试量与 ζ PKC 基因产物的预测量或范围（即得自具有不同严重程度关节炎的个体的量或范围）进行比较。测试样品中 ζ PKC 基因产物的各种不同的量与关节炎的某种预测相对应。在特定预测水平检测 ζ PKC 基因产物的量提供了对受试者的预测。

[0033] 本发明还提供了通过检测 ζ PKC 的上调来监测关节炎病程的方法。监测方法包括测定在第一和第二时间取自受试者的生物样品中 ζ PKC 基因产物的测试量, 然后进行比较。第一和第二时间之间的 ζ PKC 基因产物量的变化表明关节炎病程的变化, 量减少表明关节炎减轻, 量增加表明关节炎加重。这种监测测定法还可以用于评估特定治疗干预（如, 疾病减弱对逆转）对于接受关节炎治疗的患者的功效。

[0034] 生物样品收集

[0035] 能够在多种生物样品中检测出 ζ PKC 表达的增加, 包括细胞（如, 完整细胞, 细胞碎片和细胞提取物）和组织。生物样品还包括组织切片, 例如用于组织学目的的活组织检查切片和冰冻切片。优选的生物样品包括关节软骨（即软骨细胞）, 滑膜和滑液。

[0036] 正常值, 诊断值和预测值

[0037] 在本发明的诊断和预测测定法中, 检测和定量 ζ PKC 基因产物以得到一个测试量。然后将该测试量与正常量或范围进行比较。高于正常量或范围的量 (如, 30% 或更多的增加 (其中 $p < 0.01$), 或者 100% 或更多的增加 (其中 $p < 0.05$)) 是诊断关节炎的阳性标志。检测和定量 ζ PKC 基因产物的具体方法如下文所述。

[0038] 对于任何特定样品类型和群体, 都可以测定出 ζ PKC 基因产物的正常量或基准水平。一般来说, 通过测量取自正常 (即健康的) 受试者的生物样品类型中的 ζ PKC 蛋白或 mRNA 的量来测定 ζ PKC 蛋白或 mRNA 的基准 (正常) 水平。或者, 可以通过测量健康细胞或组织中的量来测定 ζ PKC 基因产物的正常值, 这些细胞或组织与患病的 (或可能患病的) 受试细胞或组织取自同一受试者。可以以每一细胞, 每一总蛋白或者每一容积基位检测或表示 ζ PKC 基因产物的量 (无论正常量或是测试量)。为了确定样品的细胞数量, 可以测量在获取生物样品的细胞类型中, 组成型表达的基因产物或者以已知水平表达的其它基因产物的水平。

[0039] 值得注意的是, 本发明的测定方法不必需要测量 ζ PKC 基因产物的绝对值, 因为相对值已经足够这些方法的许多应用。还需要注意的是, 除了 ζ PKC 基因产物的数量或丰度之外, 也可以通过与正常基因产物和表达模式的比较来确定变体或非正常 ζ PKC 基因产物或其表达模式 (如, 突变的转录物, 截短的多肽)。

[0040] ζ PKC 基因产物的测定法

[0041] 本发明的诊断、预测和监测测定法包括检测和定量生物样品中的 ζ PKC 基因产物。 ζ PKC 基因产物包括, 例如 ζ PKC mRNA 和 ζ PKC 多肽, 都可以用本领域技术人员公知的方法测量。

[0042] 例如, 可以使用基于杂交的测定法, 如 Northern 杂交、原位杂交、斑点印迹和狭线印迹, 以及寡核苷酸测定法直接检测和定量 ζ PKC mRNA。基于杂交的测定法是指探针核酸与靶核酸杂交的测定法。在某些模式中, 靶、探针或者两者被固定。固定的核酸可以是 DNA、RNA 或者另外的寡核苷酸或多核苷酸, 还可以包含天然或非天然的核苷酸、核苷酸类似物或者主链。筛选用于本发明的核酸探针序列的方法基于 ζ PKC 的核酸序列, 并且是本领域公知的。

[0043] 可选择地, 可以在检测和定量之前扩增 ζ PKC mRNA。这种基于扩增的测定法是本技术领域公知的, 包括聚合酶链反应 (PCR), 逆转录-PCR (RT-PCR), PCR-酶联免疫吸附测定 (PCR-ELISA) 和连接酶链反应 (LCR)。根据 ζ PKC 的核酸序列, 本领域技术人员不需要过度的实验就可以容易地设计和生产出用于产生和检测扩增的 ζ PKC 基因产物 (如, mRNA 或 cDNA) 的引物和探针。可以直接分析扩增的 ζ PKC 基因产物, 例如, 通过凝胶电泳; 与探针核酸杂交; 测序; 荧光、磷光或放射性信号的检测; 或者许多已知方法中的任一种。另外, 增加经扩增靶核酸序列而产生的信号的方法是本领域技术人员已知的。本领域技术人员知道无论使用哪一种扩增方法, 如果需要定量 ζ PKC 基因产物, 可以使用本领域已知的多种定量方法 (如, 定量 PCR)。

[0044] 可以使用各种公知的酶测定法和免疫测定法来检测和定量 ζ PKC 多肽 (或其片段)。酶测定法是指利用 ζ PKC 底物来检测蛋白激酶活性的测定法。用于检测和定量 ζ PKC 活性的各种天然底物和人工底物是已知的, 包括富含肉豆蔻酰丙氨酸的 C 激酶底物

(MARCKS) 肽 (Herget 等 . (1995) Eur. J. Biochem. 233 :448-57), p47phox (Dang 等 . (2001) J. Immunol. 166 :1206-13), 髓鞘碱性蛋白 (Kim 等 . (2002) J. Biol. Chem. 277 :30375-81), 硫酸鱼精蛋白 (McGlynn 等 . (1992) J. Cell. Biochem. 49 :239-50), 核仁素 (Zhou 等 . (1997) J. Biol. Chem. 272 :31130-37), 不均一核糖核蛋白 AI (hnRNP1) (Municio 等 (1995) J. Biol. Chem. 270 :15884-91), ζ PKC 衍生肽 (Kochs 等 . (1993) Eur. J. Biochem. 216 :597-606), 和 ζ PKC 衍生肽 (Standaert 等 . (1999) J. Biol. Chem. 274 :14074-78)。适于检测和定量 ζ PKC 活性的许多酶测定法规程 (放射性和非放射性的) 在文献中有记载和 / 或以试剂盒形式可从例如, PanVera (Madison, WI), Promega (Madison, WI), Transbio (Baltimore, MD), Upstate (Waltham, Ma) 和 Research & Diagnostic Antibodies (Benicia, CA) 商业获得。

[0045] 免疫测定法是指利用与 ζ PKC 多肽 (或其片段) 特异性结合的抗体 (如, 多克隆的, 单克隆的, 嵌合的, 人源化的, scFv, 及其片段) 的测定法。适用于实现本发明的许多已经建立的免疫测定法是已知的, 包括 ELISA、放射性免疫测定 (RIA)、免疫沉淀、免疫荧光和蛋白质印迹法。

[0046] 用于本发明免疫测定法的抗 ζ PKC 抗体 (优选抗哺乳动物 ζ PKC, 更优选抗人 ζ PKC) 可从, 例如, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Upstate (Waltham, MA) 和 Research Diagnostics (Flanders, NJ) 商业获得。还可以使用本领域技术人员公知的方法生产抗 ζ PKC 抗体。例如, 可以按照已知方法通过制备杂交瘤来生产 ζ PKC (优选哺乳动物; 更优选人 (如 GenBank Acc. No. Q05513 ; SEQ ID NO :2)) 的单克隆抗体。然后用标准方法, 例如 ELISA, 来筛选以这种方式形成的杂交瘤, 从而鉴定一个或多个产生与 ζ PKC 特异性结合的抗体的杂交瘤。全长 ζ PKC 可用作免疫原, 或者使用 ζ PKC 的抗原性肽片段。

[0047] 作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的另一选择, 可以通过筛选重组的组合物免疫球蛋白库 (如, 抗体噬菌体展示库), 由此分离出与 ζ PKC 结合的免疫球蛋白库成员, 来鉴定和分离 ζ PKC 的单克隆抗体。用于产生和筛选噬菌体展示库的试剂盒可从, 例如, Dyax 公司 (Cambridge, MA) 和 Maxim Biotech (South San Francisco, CA) 商购获得。另外, 可以在文献中找到特别适用于产生和筛选抗体展示库的方法和试剂的例子。

[0048] 用 ζ PKC (优选哺乳动物; 更优选人) 或其抗原片段免疫合适的受试者, 例如兔, 可以产生多克隆血清和抗体。可以用标准技术, 如 ELISA, 使用固定的标记蛋白, 随时间监测经免疫的受试者中的抗体滴度。如果需要, 可以从受试者或培养基中分离针对 ζ PKC 的抗体分子, 并用公知技术例如蛋白 A 层析法对其进一步纯化, 从而得到 IgG 级分。

[0049] 按照本领域公知的方法通过切割抗体可以产生 ζ PKC 的抗体的片段。例如, 用酶如胃蛋白酶处理抗体可以得到具有免疫活性的 F(ab') 和 F(ab')₂ 片段。另外, 使用标准的重组 DNA 技术可以得到包括人类和非人类部分的 ζ PKC 的嵌合抗体、人源化抗体和单链抗体。还可以使用不能表达内源免疫球蛋白重链和轻链基因, 但可以表达人重链和轻链基因的转基因小鼠得到 ζ PKC 的人源化抗体。

[0050] 在本发明的免疫测定法中, ζ PKC 多肽一般用可检测的标记直接检测 (即抗 ζ PKC 抗体被标记) 或间接检测 (即识别抗 ζ PKC 抗体的第二抗体被标记)。用于本测定法的特定标记或可检测的基团通常是不严格要求的, 只要它没有明显干扰本测定法中所用抗体的特异性结合。

[0051] 本发明的免疫测定法可以是竞争性的或非竞争性的。在竞争性测定法中, 通过测

量添加的（外源的） ζ PKC 被样品中的 ζ PKC 从捕获试剂（即抗 ζ PKC 抗体）上替换下来的量，间接测量样品中 ζ PKC 的量。在非竞争性测定中，直接测量样品中 ζ PKC 的量。一种优选的非竞争性“夹心”测定法中，捕获试剂（如，第一抗 ζ PKC 抗体）与固定它的固相载体（如，膜，微量滴定板，试管，浸量尺，玻璃或塑料珠）直接连接。然后固定的试剂捕获存在于样品中的任何 ζ PKC 多肽。然后可以用第二个标记的抗 ζ PKC 抗体检测固定化的 ζ PKC。可以选择地，用识别第二个抗 ζ PKC 抗体的标记的二抗检测第二个抗 ζ PKC 抗体。

[0052] 鉴定抑制 ζ PKC 表达和 / 或活性的化合物的筛选方法

[0053] 引言

[0054] 本发明提供了鉴定抑制关节炎组织中 PKC 表达的新化合物（如，小分子）的方法（这里也称作“筛选测定法”）。在一个实施方案中，将（无论天然地或重组地）表达 ζ PKC 的细胞与测试化合物接触来测定这种化合物是否抑制 ζ PKC 基因产物（如，mRNA 或多肽）的表达，表达的减少（与未处理的细胞样品比较）表明这种化合物抑制关节炎组织中的 ζ PKC。可以用任何一种本领域已知或上述的方法确定 ζ PKC 基因表达的变化。在一个优选实施方案中，将用在 NF- κ B 结合位点下游包含标记基因（如，萤光素酶或绿色荧光蛋白（GFP））的报告构建体转染的细胞与测试化合物接触，来检测当用细胞因子处理细胞时，该化合物能否抑制标记蛋白的表达。鉴定出的抑制 ζ PKC 或标记蛋白表达的化合物是预防或治疗关节炎的药物的候选物。

[0055] 可以选择地，用前述测定法来鉴定体外抑制 ζ PKC 的激酶活性的化合物。将纯化（或部分纯化）的 ζ PKC 与测试化合物接触，来检测该化合物能否抑制 ζ PKC 的激酶活性（与未处理的酶样品比较）。然后在关节炎的体外和体内模型中测试鉴定出的抑制 ζ PKC 活性的化合物。下面的实施例中描述了几种体外模型。关节炎的体内模型包括，但不限于，狗或兔的前十字韧带切除模型，以及兔和小鼠的部分半月板切除术模型。直接和间接测量 ζ PKC 活性和 / 或测定 ζ PKC 活性的抑制的示例性方法和测定法包括，但不限于，酶促蛋白激酶活性测定法（如前所详述）、软骨细胞沉淀测定法、测量蛋白聚糖降解的测定法和测量 NF- κ B 活性的测定法。

[0056] ζ PKC 的来源

[0057] 用于本发明筛选测定法的 ζ PKC（优选哺乳动物；更优选人（如 GenBank Acc. No. Q05513；SEQ ID NO:2）商业提供自，如 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)，Research Diagnostics (Flanders, NJ)，ProQinase (Freiburg, 德国) 和 PanVera (Madison, WI)。可以选择地，使用已知的纯化方法，例如凝胶过滤和离子交换层析，从各种不同的组织（优选哺乳动物；更优选人）中，包括脑、胎盘、睾丸和肺，提纯或部分提纯 ζ PKC。提纯还可包括使用已知与 ζ PKC 结合的试剂（如，抗 ζ PKC 抗体）的亲合层析。这些提纯方法还可以用于从重组来源中提纯 ζ PKC。

[0058] 编码 ζ PKC（或其酶促部分）的多核苷酸可以与合适的表达控制序列可操作连接，从而重组生产 ζ PKC。 ζ PKC 多核苷酸优选是哺乳动物来源的（如，小鼠 ζ PKC cDNA (GenBank Acc. No. M94632)；大鼠 ζ PKC cDNA (GenBank Acc. No. J04532)；兔 ζ PKC cDNA (GenBank Acc. No. U78768)），更优选是人来源的（如，人 ζ PKC cDNA (GenBank Acc. No. NM_002744；SEQ ID NO:1)）。表达这些重组 ζ PKC 多核苷酸的一般方法是本领域公知的。

[0059] 许多细胞系可以用作重组表达 ζ PKC 的合适宿主细胞。哺乳动物宿主细胞系包括,例如,COS 细胞,CHO 细胞,293 细胞,A431 细胞,3T3 细胞,CV-1 细胞,HeLa 细胞,L 细胞,BHK21 细胞,HL-60 细胞,U937 细胞,HaK 细胞,和 Jurkat 细胞,以及正常二倍体细胞,源自原代组织体外培养的细胞株和原代外植体。

[0060] 可以选择地,在低等真核生物例如酵母中或在原核生物中重组产生 ζ PKC(或其酶促部分)。可能适合的酵母菌株包括啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*),克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces*) 菌株和念珠菌 (*Candida*) 菌株。可能适合的细菌菌株包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*),枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)。如果在酵母或细菌中制备本发明的多肽,可能有必要对它们进行修饰,例如对适当位点进行磷酸化或糖基化,以获得其功能。用公知的化学或酶学方法可以完成这种共价连接。

[0061] 还可以用昆虫表达载体,例如杆状病毒载体,并用昆虫细胞表达系统重组产生 ζ PKC(或其酶促部分)。杆状病毒/Sf9 表达系统的材料和方法可以以试剂盒形式而商业得到(如,MaxBac[®]试剂盒,Invitrogen,Carlsbad,CA)。

[0062] 为了利于提纯, ζ PKC(或其酶促部分)可以重组表达成与蛋白的融合体,所述蛋白例如是麦芽糖结合蛋白(MBP),谷胱甘肽 S-转移酶(GST),或硫氧还蛋白(TRX)。表达和纯化这种融合蛋白的试剂盒分别商业获自 New EnglandBioLabs(Beverly,MA),Pharmacia(Piscataway,NJ) 和 Invitrogen(Carlsbad,CA)。也可以用小抗原决定部位标记 ζ PKC,随后用该抗原决定部位的特异抗体鉴定和纯化 ζ PKC。一种这样的抗原决定部位是 FLAG 抗原决定部位,由 EastmanKodak(New Haven,CT) 商业提供。

[0063] 还可以用已知的传统化学合成法得到 ζ PKC(或其酶促部分)。化学合成多肽的方法是本领域技术人员公知的技术。这种化学合成的 ζ PKC 应当具有同天然产生的形式一样的生物学特性,从而能够用作天然 ζ PKC 的生物学活性代替品或免疫学代替品。

[0064] 测试化合物的来源和筛选

[0065] 可以从多种来源获得本发明的测试化合物。例如,分子组合文库可以用于筛选。使用这种文库可以筛选数千分子的抑制活性。可以按照前述方法或本领域技术人员公知的其它方法制备和筛选化合物。由此鉴别的化合物可以用作常规的“引导化合物(lead compound)”或用作实际治疗剂。

[0066] 治疗方法

[0067] 引言

[0068] 本发明提供了通过抑制 ζ PKC 的表达和/或活性来治疗关节炎的预防性和治疗性方法。这些方法包括将细胞(体外、体内或离体)与有效抑制 ζ PKC 表达和/或活性的量的试剂接触。这种试剂可以是任何抑制 ζ PKC 表达和/或活性的分子,包括但不限于,抑制性多核苷酸、小分子、抑制性蛋白生物制剂和肽抑制剂。

[0069] 抑制性多核苷酸

[0070] 通过使用结合和/或切割转录自 ζ PKC 基因的 mRNA 的多种抑制性多核苷酸,例如反义多核苷酸和核酶,可以使患有关节炎(或者具有患关节炎风险)的生物体或者来自这种生物体的相关细胞中的 ζ PKC 表达降低(如,Galderisi 等.(1999)J. Cell Physiol. 181: 251-57;Sioud(2001)Curr. Mol. Med. 1:575-88)。

[0071] 本发明的反义多核苷酸或核酶可以与 ζ PKC 的整个编码链互补, 或与其一部分互补。或者, 反义多核苷酸或核酶可以与 ζ PKC 的编码链的非编码区互补。用本领域公知的程序, 采用化学合成和酶促连接反应可以构建反义多核苷酸和核酶。可以修饰化学合成的多核苷酸的核苷键, 以增强它们抗核酸酶介导的降解的能力, 并增加它们的序列特异性。这种键修饰包括, 但不限于, 硫代磷酸酯, 甲基磷酸酯, 氨基磷酸酯, boranophosphate, 吗啉代和肽核酸 (PNA) 键 (Galderisi 等., 同前; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243 :209-14; Micklefield (2001) *Curr. Med. Chem.* 8 :1157-79)。可选择地, 可以用表达载体经生物学过程产生这些分子, 本发明的多核苷酸以反义 (即逆) 方向亚克隆到该表达载体中。

[0072] 本发明的抑制性多核苷酸还包括以高度特异性和亲和性与双螺旋 DNA 大沟结合的三螺旋形成性寡核苷酸 (TFOs) (Knauert 和 Glazer (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10 :2243-51)。通过靶向与 ζ PKC 基因调节区域 (即启动子和 / 或增强子序列) 互补的 TFOs, 形成阻止 ζ PKC 基因转录的三螺旋结构, 可以抑制 ζ PKC 的表达。

[0073] 在一个优选实施方案中, 本发明的抑制性多核苷酸是短的干扰性 RNA (siRNA) 分子。siRNA 分子是短小 (优选 19-25 个核苷酸, 最优选 19 或 21 个核苷酸) 的双链 RNA 分子, 其可引起靶 mRNA 的序列特异性降解。这种降解被称为 RNA 干扰 (RNAi) (如, Bass (2001) *Nature* 411 :428-29)。最初在低等生物体中鉴定的 RNAi 已有效地应用于哺乳动物细胞, 最近还显示出用靶向于 Fas mRNA 的 siRNAs 处理可以防止小鼠的暴发性肝炎 (Song 等. (2003) *Nature Med.* 9 :347-51)。另外, 最近已经报导了鞘内递送的 siRNA 在大鼠的两种模型中阻断疼痛反应 (激动剂诱导的疼痛模型和神经病性疼痛模型) (Dorn 等. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5) :e49)。

[0074] 通过同时退火两个互补的单链 RNA 分子 (其中一个与靶 mRNA 的一部分相匹配) (Fire 等., U. S. Patent No. 6, 506, 559), 或通过使用自我折叠而产生必要的双链部分的单发夹结构 RNA 分子 (Yu 等. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :6047-52), 可以得到本发明的 siRNA 分子。可以化学合成 siRNA 分子 (Elbashir 等. (2001) *Nature* 411 :494-98), 或通过使用单链 DNA 模板的体外转录而产生 siRNA 分子 (Yu 等., 同前)。可选择地, 可以用包含有义和反义 siRNA 序列的表达载体瞬时地 (Yu 等., 同前; Sui 等. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :5515-20) 或稳定地 (Paddison 等. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :1443-48) 以生物学方法产生 siRNA 分子。最近, 用表达进一步加工成 siRNAs 的发夹结构 RNAs 的腺病毒载体证明了, 原代人细胞中靶 mRNA 的水平以有效和序列特异性的方式减少 (Arts 等. (2003) *Genome Res.* 13 :2325-32)。

[0075] 基于本领域公知的标准可以设计靶向本发明多核苷酸的 siRNA 分子 (如, Elbashir 等. (2001) *EMBO J.* 20 :6877-88)。例如, 靶 mRNA 的靶区段优选以 AA (最优选), TA, GA 或 CA 为起点; siRNA 分子的 GC 比优选为 45-55%; siRNA 分子优选地不连续含有三个相同的核苷酸; siRNA 分子优选地不连续含有七个混合的 G/C; 以及靶区段优选位于靶 mRNA 的 ORF 区域, 并优选位于起始 ATG 后至少 75bp 和终止密码子前至少 75bp。基于这些标准, 已经设计出靶向人 ζ PKC mRNA 的本发明的优选 siRNA 分子, 如图 1 所示。用上述标准或其它已知标准, 本领域普通技术人员可以设计靶向 ζ PKC mRNA 的其它 siRNA 分子 (如, Reynolds 等. (2004) *Nature Biotechnol.* 22 :326-30)。

[0076] 小分子

[0077] 通过使用与 ζ PKC 结合和抑制 ζ PKC 活性的小分子（通常是有机小分子），也可以使患有有关节炎（或者具有患有关节炎风险）的生物体或者来自这种生物体的相关细胞中的 ζ PKC 表达降低。已知抑制 PKC 的活性的小分子（优选同工型特异性的）可以用于本发明的治疗方法。本领域已知许多抑制 PKC 的小分子（包括已经批准用于疾病治疗的小分子，以及用于临床试验的其它小分子），包括天然的（如，星形孢菌素）和人造的（如，LY333531）化合物（参见 Goekjian 和 Jirousek(2001)Expert. Opin. Investing. Drugs 10 :2117-40 ; Way 等 . (2000)Trends Pharmacol. Sci. 21 :181-87, 都引入本文作为参考）。这些分子可以直接使用，或者用作开发改进的 PKC 抑制剂（优选同工型特异性的）的起始化合物。可选择地，可以使用前述筛选方法鉴定的新的小分子（优选同工型特异性的）。

[0078] 抑制性蛋白生物制剂

[0079] 用蛋白生物制剂也可以使患有有关节炎（或者具有患有关节炎风险）的生物体或者来自这种生物体的相关细胞中的 ζ PKC 活性降低。抑制性蛋白生物制剂是指在细胞或生物体中具有抑制性生物活性的蛋白分子。用于本发明治疗方法的优选的抑制性蛋白生物制剂包括 Par4 和 ζ PKC 的激酶缺陷型显性失活 (DN) 突变体形式。Par4 是与 ζ PKC 结合的天然蛋白，用于抑制 ζ PKC 的酶促功能 (Diaz-Meco 等 . (1996)Cell 86 :777-86)。 ζ PKC 的 DN 突变体形式，例如 281 位赖氨酸点突变成色氨酸的大鼠 ζ PKC (Bandyopadhyay 等 . (1997) J. Biol. Chem 272 :2551-58)，通过与底物竞争减弱内源 ζ PKC 的活性，并可以用公知的定点诱变技术制备。任何缺乏激酶活性但是仍然抑制 ζ PKC 介导的信号转导的 ζ PKC 变体都可以用作 DN 突变体。用上述表达技术可以在细胞（优选软骨细胞）中原位制得这些抑制性蛋白生物制剂。

[0080] 肽抑制剂

[0081] 用与 ζ PKC 结合和抑制 ζ PKC 活性的肽抑制剂也可以使患有有关节炎（或者具有患有关节炎风险）的生物体或者来自这种生物体的相关细胞中的 ζ PKC 活性降低。肽抑制剂包括阻止 ζ PKC 与其底物相互作用的肽假底物，以及与 ζ PKC 或其底物结合和阻断 ζ PKC 介导的磷酸化的肽。已经有文献描述了抑制 ζ PKC 的肽抑制剂，包括 SIYRRGARRWRKL (SEQ ID NO :3), SIYRRGARRWRKLYRAN (SEQ ID NO :4), 和 RRGARRWRK (SEQ ID NO :5)（如，Dang 等 . , 出处同上 ;Zhou 等 . , 出处同上）。优选地，这些肽抑制剂被肉豆蔻酰化（分别是 SEQ ID NO :6, 7 和 8）以改善细胞通透性（如，Standaert 等 . , 出处同上 ;对于 SEQ ID NO :6）。可以化学合成肉豆蔻酰化和非肉豆蔻酰化的 ζ PKC 肽抑制剂，可商业获自，如 Quality Controlled Biochemical (Hopkinton, MA) 和 BioSource International, Inc. , USA (Camarillo, CA)。使用前述技术可以在体外、体内或离体提供一种具有肽抑制剂的细胞（优选软骨细胞）。

[0082] 给药

[0083] 这里描述的任何化合物（优选小分子）可以以药物组合物形式通过体内给药来治疗有关节炎。药物组合物可以通过多种途径给药，包括但不限于，口，鼻，直肠，局部，舌下，静脉内，肌内，动脉内，髓内，鞘内，心室内，腹膜内，关节内，或经皮肤途径。除了活性成分，药物组合物还可以含有药学可接受载体，包括本领域已知的赋形剂、包衣和辅料。

[0084] 在细胞培养或动物模型中可以初步估测任何化合物的治疗有效剂量。治疗有效剂量是指改善状态或其症状的活性成分的量。用标准药理学步骤可以测定在细胞培养或动物模型中的治疗功效和毒性（如，ED50 :在群体的 50% 中治疗有效的剂量 ;LD50 :使群体的 50%

致死的剂量)。疗效和毒效的剂量比是治疗指数,可以表示为 ED50/LD50。优选治疗指数大的药物组合物。

[0085] 然后,得自细胞培养或动物模型的数据可以用来计算该化合物用于哺乳动物优选人的剂量范围。这种化合物的剂量优选位于包含轻毒至无毒的 ED50 的浓度范围。根据所使用的组合物形式和所采用的给药途径的不同,剂量可以在这个范围内变化。

[0086] 实施例

[0087] 举出下面的实施例是为了有助于理解本发明,在任何情况下都不是想要,也不应该解释为限制其范围。这些实施例不包括常规方法的详细描述,例如用于构建载体和质粒的方法,将编码多肽的基因插入这些载体和质粒的方法,将这些载体和质粒引入宿主细胞的方法,或者在宿主细胞中从这些载体和质粒表达多肽的方法。这些方法和其它常规方法都是本领域技术人员公知的。

[0088] 实施例 1

[0089] 关节炎中 ζ PKC 表达被上调

[0090] 实施例 1.1 实验设计

[0091] 为了鉴定在关节炎和正常关节软骨中差异表达的转录物,从晚期膝置换的关节炎病人和非关节炎截肢个体取得组织样品。用组织学确定关节炎是否存在。

[0092] 实施例 1.2 寡核苷酸阵列杂交

[0093] 人类基因组 U95Av2 (HG-U95Ay2) GeneChip[®]阵列 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 用于制作表达分布图。HG-U95Ay2 芯片含有代表衍生自人基因组的 ~ 12,000 个主要全长的序列 (~ 16 探针对 / 序列) 的 25 聚体寡核苷酸探针。对于每一个设计成与靶序列完全互补的探针,产生一个除了在其中心一个碱基错配之外,其它相同的配对探针。这些探针对使得可以定量信号和扣除非特异性噪音。

[0094] 从个体关节软骨组织中提取 RNA,转化为生物素化的 cRNA,并按照 Affymetrix 规程进行片段化。片段化的 cRNAs 用 1×MES 缓冲液稀释,这种缓冲液含有 100 μ g/ml 鲑鱼精子 DNA 和 500 μ g/ml 乙酰化的 BSA,然后在 99°C 下变性 5 分钟,紧接着在 45°C 变性 5 分钟。短时离心去除杂交混合物中的不溶物质,然后将杂交混合物加到每一个阵列中,45°C 下以 60rpm 连续旋转温育 16 小时。温育后去除杂交混合物,如 Affymetrix 规程所述,用 6×SSPET 充分冲洗芯片,并用 SAPE 溶液进行染色。

[0095] 实施例 1.3 寡核苷酸阵列数据分析

[0096] 用 Hewlett-Packard 基因阵列扫描仪以 6mm 的分辨率测量每一个转录物的原始荧光强度数值。用 GeneChip[®]软件 3.2 (Affymetrix) 评估荧光数据,这种软件用一种算法测定一个基因是否存在,以及阵列中每个基因的特异杂交强度值或“平均差异”。按照 Hill 等的步骤 ((2000) Science 290 :809-12),参照插入每一个杂交混合物中的已知丰度的 11 个对照转录物的平均差异,使每一个基因的平均差异标准化为频率值。计算每一个基因的频率,其表示等于每 10⁶ 总转录物中单个基因转录物总数的值。

[0097] 计算每一个基因的频率,研究符合下列三个标准的转录物。第一,将由 GeneChip[®] 软件在关节炎和正常软骨的至少一个阵列中检测为“存在”的转录物用于分析。第二,为了比较关节炎和正常软骨,用 t-检验鉴定频率值显著 ($p < 0.05$) 增加或减少的转录物子集。第三,统计学上显著的转录物子集之中的频率值变化平均倍数必须为 2.4 倍或者更大。这

些标准的建立基于评估阵列内再现性的重复实验。

[0098] 基于这些标准,鉴定出 602 个在关节炎和正常关节软骨中差异表达的转录物。鉴定出的这种转录物之一是 ζ PKC。

[0099] 实施例 2

[0100] ζ PKC 的活性的抑制抑制了细胞外基质 (ECM) 的降解

[0101] 实施例 2.1 原代牛软骨细胞的分离和培养

[0102] 在无菌条件下剖开全厚度牛关节软骨切片,用 PBS 冲洗 4 次,再用链霉蛋白酶和胶原酶消化 (1mg/ml 链霉蛋白酶 (Calbiochem, San Diego, CA) 作用 30 分钟,和 1mg/ml 胶原酶 P (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) 在不含血清的 DME 中于 37°C 过夜),以分离软骨细胞外基质中嵌入的软骨细胞。用 70 微米 Falcon™ 细胞过滤器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 过滤消化液,并用含有 10% FBS 的 DME 冲洗 2 次。通常从小牛掌指关节表面取得 $2-4 \times 10^8$ 个细胞。将细胞以 2×10^6 细胞 / 孔的密度单层置于六孔板中。对于沉淀培养,细胞以 1×10^6 细胞 / ml 悬浮于生长培养基 [HL-1 培养基 (Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ), 青霉素 + 链霉素, 谷氨酰胺, $50 \mu\text{g/ml}$ 维生素 C 和 10% FBS] 中,然后将 1ml 细胞等分试样转移到 15ml 灭菌的 Falcon 离心管中。4°C 下以 200xg 离心细胞 5 分钟,然后按照以前的描述 (Xu 等. (1996) *Endocrinology* 137 :3557-65) 培养得到的细胞沉淀物。收集并贮存细胞培养基用于胶原和蛋白聚糖分析,每 3-4 天给细胞重饲新鲜培养基 (3ml/ 孔, 1ml/ 管)。继续培养沉淀培养物 3 周,在这段时间收集沉淀,然后在 65°C 下用 0.5ml 的 $300 \mu\text{g/ml}$ 木瓜蛋白酶消化 3-6 小时以用于二甲基亚甲基蓝 (DMMB) 染色分析,或者进行制备以用于组织学分析。

[0103] 实施例 2.2 NF- κ B 的肽阻断剂可以抑制 TNF- 或 IL-1- 介导的蛋白聚糖的降解

[0104] 为了证明阻断 NF- κ B 活性能够抑制我们的培养体系中蛋白聚糖的降解,在含有或不含有 10ng/ml TNF 或 1ng/ml IL-1 的情况下,用浓度为 $300 \mu\text{g/ml}$ NF- κ B 阻断剂 SN50 培养原代牛软骨细胞 4 天。加入 TNF 或 IL-1 之前,用抑制剂培养细胞 3 小时。SN50 是一种含有 NF- κ B 核定位信号的肽,这种信号与疏水氨基酸的一段序列偶联以利于转运通过脂双层,已经显示 SN50 可以阻断 NF- κ B 介导的转录 (如, Lin 等. (1995) *J. Biol. Chem.* 270 : 14255-58)。SN50M 作为阴性对照,其是一种相同的肽,通过改变氨基酸而消除了 NF- κ B 阻断活性。SN50 和 SN50M 由,例如 Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA) 提供。

[0105] 如图 2 所示,通过测量向培养基中的蛋白聚糖释放和细胞沉淀中降低的回收,表明 SN50M 不能有效防止牛软骨细胞中 TNF- 和 IL-1- 介导的蛋白聚糖降解。与之相反的是,SN50 完全抑制细胞因子介导的蛋白聚糖降解。另外,与 SN50M 相比,SN50 甚至在不用细胞因子处理时也能防止蛋白聚糖的降解。这些结果表明,阻断控制细胞因子介导的胶原酶和聚集蛋白聚糖酶 (aggrecanase) 合成的 NF- κ B 可以抑制原代牛软骨细胞中蛋白聚糖的降解。

[0106] 实施例 2.3 ζ PKC 抑制剂阻断 TNF- 介导的蛋白聚糖降解

[0107] 为了检测 ζ PKC 抑制剂能否抑制 TNF- 介导的蛋白聚糖降解,用不同浓度的 TNF 培养原代牛软骨细胞 5 天,其中含有或不含有 (1) 肉豆蔻酰化的 ζ PKC 肽假底物 [这里称为“2089”;内部合成;相当于 SEQ ID NO :6;获得自,如 BioSource International, Inc.,

USA (Camarillo, CA)], 或者 (2) 小分子抑制剂 Ro-31-8220 (Sigma-RBI, Natick, MA)。加入 TNF 之前 3 小时加入这些抑制剂。

[0108] 如图 3 所示, 测量向培养基中的蛋白聚糖释放和细胞沉淀中降低的回收, 表明 10ng/ml 和 100ng/ml 的 TNF 引起明显的蛋白聚糖降解。50 μ M 2089 和 10 μ M Ro-31-8220 (RO31) 均可以明显抑制这种蛋白聚糖降解。另外, 这些化合物甚至在没有 TNF 存在时也能抑制蛋白聚糖的降解, 显示出阻断了蛋白酶的组成性水平。5 μ M 的 Ro-31-8220 相对不能有效防止蛋白聚糖降解。这些结果证明 2089 和 Ro-31-8220 均可以穿透原代软骨细胞的细胞膜, 从而有效地阻断 TNF 介导的蛋白聚糖降解。进行软骨细胞的锥虫蓝染色和对培养基的乳酸盐分析以排除作为这些结果的可能解释的细胞毒性。这些实验证实, 所述化合物以在这些试验中使用的剂量不会引起明显的细胞毒性。另外, 合成对照肽并在相同的试验系统中进行测试, 以说明非特异性影响可引起所观测到的这些结果这种可能性。检测了假底物肽的非肉豆蔻酰化的形式, 以及含有与假底物肽相同的氨基酸含量、但是具有混杂序列的“混杂 (scrambled) 对照”肽, 发现它们都不能有效阻断蛋白聚糖降解。

[0109] 实施例 2.4 肉豆蔻酰化的 ζ PKC 肽假底物 2089 以剂量依赖方式阻断 TNF- 和 IL-1- 介导的蛋白聚糖降解

[0110] 为了检测肉豆蔻酰化的 ζ PKC 肽假底物 2089 能否以剂量依赖方式抑制细胞因子介导的蛋白聚糖降解, 加入不同浓度的 2089 后, 用 10ng/ml TNF 或 1ng/ml IL-1 培养原代牛软骨细胞 4 天。

[0111] 如图 4 所示, 2089 以剂量依赖方式抑制 TNF- 和 IL-1- 介导的蛋白聚糖降解, 最高剂量 (100 μ M) 完全抑制蛋白聚糖释放到培养基中。同样, 即使没有细胞因子, 2089 也可以使蛋白聚糖的细胞沉淀保留增加, 向培养基中的蛋白聚糖释放减少。累积起来, 这些结果显示, 软骨细胞中 ζ PKC 的抑制作用抑制了细胞因子介导的蛋白聚糖的蛋白水解降解。同时, ζ PKC 敲除小鼠具有非常良好的表型 (Leitges 等., 出处同上), 上述结论与这一事实一起表明抑制 ζ PKC 可以安全而有效地治疗关节炎和其它炎性疾病。

[0112] 实施例 3

[0113] 人骨关节炎 (OA) 软骨中 ζ PKC mRNA 被上调

[0114] 与人非 OA 软骨相比, 取自骨关节炎 (OA) 病人的人关节软骨的转录分布数据表明, ζ PKC mRNA 在统计学上显著增加。图 5 的图 A 中, 从取自临床样品的冷冻并粉碎的关节软骨组织中提取 RNA, 用 HG-U95Av2 芯片进行表达分布分析。分析了三组: 正常 (非 OA) 软骨 [13 个样品]; 严重 OA 软骨 (非损伤区域) [29 个样品]; 和严重 OA 软骨 (损伤区域) [26 个样品]。与正常样品相比, 严重 OA 样品中 ζ PKC mRNA 的水平提高。图 5 的图 B 中, 对同样品组进行的 TaqMan[®] Q-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) 分析显示, 与正常样品相比, 严重 OA 样品中 ζ PKC mRNA 水平显著增高; 按照制造厂商的说明施行 TaqMan[®] Q-PCR 规程。

[0115] 实施例 4

[0116] 在软骨细胞中表达 ζ PKC 蛋白

[0117] 用抗 ζ PKC 抗体 (nPKC ζ (C-20); Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 来比较软骨细胞和 Jurkat 细胞中 ζ PKC 蛋白的产生。用类似的方法制备牛软骨细胞和 Jurkat 细胞 (人细胞系) 的溶解产物: 用冷的磷酸缓冲盐溶液冲洗细胞, 然后立即置于含

有磷酸酶抑制剂的细胞溶解缓冲液中 (CellSignaling Technology, Inc., Beverly, MA)。在冰上温育细胞 5 分钟,然后在 4°C 下 12,000rpm 离心 10 分钟。在还原条件下用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳解析样品。Western 印迹显示软骨细胞表达大量的 ζ PKC 蛋白;相同的印记显示在 Jurkat 细胞中没有 ζ PKC 蛋白的明显表达。

[0118]

实施例 5

[0119]

腺病毒介导的 ζ PKC 表达增加蛋白聚糖降解

[0120] 按照上述实施例 2.1 (以沉淀形式) 所述,分离和培养原代牛软骨细胞。加入腺病毒前,在 0.5ml 含有 2% FBS 的生长培养基 (HL-1) 中培养细胞 (在 15ml Falcon 管中)。制备含有 ζ PKC 或 GFP (绿色荧光蛋白) 的腺病毒载体 (Alden 等. (1999) Hum Gene Ther. 10 : 2245-53),分离后沉淀前立即感染软骨细胞培养物。表达 GFP 或 ζ PKC 的腺病毒以 5000 的感染复数 (MOI) 直接加入培养基中。见图 6 的图 A,与 GFP 的过量表达相比较,培养 (没有加入细胞因子) 中的原代牛软骨细胞中全长 ζ PKC 的过量表达导致蛋白聚糖降解的适度但是统计学显著的增加 (通过测量软骨细胞沉淀测定法中释放到培养基中的蛋白聚糖)。37°C 温育 2 小时后 (在 5% CO₂ 的潮湿环境中),将含有 10% FBS 的培养基加入到培养物中。每 3 天逐渐减少血清成分 (依次在每次给软骨细胞沉淀补料时减至 5%, 2.5% 和最后 0% (不含血清) 以便使细胞脱离血清。释放到培养基中的蛋白聚糖代表了 25 天释放的蛋白聚糖总量。

[0121] 图 6 的图 B 中,在使细胞脱离血清后,加入或不加入细胞因子的条件下,在 4 天内测量培养基中的蛋白聚糖。与 GFP 过量表达或没有腺病毒感染相比,添加亚最适水平的 TNF α 显著增加释放到培养基中的蛋白聚糖的量,这对应于 ζ PKC 的过量表达 (图 6, 图 B)。

[0122]

实施例 6

[0123]

 ζ PKC 是软骨细胞中 TNF α 介导的蛋白聚糖释放的原因

[0124] 按照前面对于沉淀测定法的详细描述制备关节牛软骨细胞。如图 7 所示,将 TNF α 加入 (100ng/ml ;用 * 标记的柱形) 到软骨细胞沉淀测定法的一些培养基中。以多种不同的剂量加入两种抑制剂。一种抑制剂,二吡啶基马来酰亚胺 (BIS),是一种泛 PKC 抑制剂,据报导阻断所有 PKC 同工型的活性,包括 ζ PKC (如, Toulllec 等. (1991) J Biol. Chem. 266 : 15771-81)。另一种抑制剂,氯化白屈菜赤碱 (CC),是佛波醇酯结合位点的竞争性抑制剂。CC 与常规和新的 PKC 家族成员竞争佛波醇酯结合功能域,并抑制它们;然而,CC 不能抑制缺少这种结合功能域的非典型的 PKCs (如, ζ PKC ;Ca⁺⁺ 非依赖性和二酰甘油非依赖性 PKCs) (如, Herbert 等. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 :993-99)。在软骨细胞沉淀测定法中,细胞因子 (TNF α) 介导的蛋白聚糖向培养基中的释放被 BIS (20-40 μ M) 阻断,但是不能被 CC 阻断 (图 7),这表明选择性抑制 ζ PKC 可阻断细胞因子介导的蛋白聚糖降解。

[0125]

实施例 7

[0126]

 ζ PKC 是软骨细胞中 TNF α 诱导的 NF- κ B 活化的原因

[0127] 在无限增殖化的人软骨细胞细胞系中 (C28/I2 ;见,如, Finger 等. (2003) Arthritis Rheum. 48 :3395-403 ;Goldring (1994) J. Clin. Invest. 94 :2307-16) 测量 NF- κ B 的活化,该细胞系中引入了在 NF- κ B 响应元件控制下的萤光素酶报告基因。在补有 10% FBS 的 DMEM/Ham' s F12 中培养这些细胞;这些细胞分到 96 个孔中 (1 \times 10⁵ 细胞/孔),然后在分析前 24 小时用表达 NF- κ B 萤光素酶构建体的腺病毒感染 (100MOI)。加入

TNF 前 2 小时,在无血清培养基中用抑制剂温育这些软骨细胞。如图 8 所示,将 TNF α (1ng/ml 或 10ng/ml) 加入到软骨细胞沉淀测定法的一些培养基中。将 BIS (20 μ M), 一种泛 PKC 抑制剂, 加入到一些培养基中, 和将 CC (8 μ M), 一种某些形式的 PKC (但不是非典型的 PKCs, 如, ζ PKC) 中的佛波醇酯结合位点的竞争性抑制剂, 加入到其它培养基中。细胞因子 (TNF α) 介导的 NF- κ B 活化被 BIS 阻断, 但是不被 CC 阻断, 这表明选择性抑制 ζ PKC 阻断细胞因子介导的 NF- κ B 活化。

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 | |
| cgt ctg cac cag cag cac ccg ctc acc ctc aag tgg gtg gac agc gaa | | | 192 |
| Arg Leu His Gln Gln His Pro Leu Thr Leu Lys Trp Val Asp Ser Glu | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| ggt gac cct tgc acg gtg tcc tcc cag atg gag ctg gaa gag gct ttc | | | 240 |
| Gly Asp Pro Cys Thr Val Ser Ser Gln Met Glu Leu Glu Glu Ala Phe | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| cgc ctg gcc cgt cag tgc agg gat gaa ggc ctc atc att cat gtt ttc | | | 288 |
| Arg Leu Ala Arg Gln Cys Arg Asp Glu Gly Leu Ile Ile His Val Phe | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| ccg agc acc cct gag cag cct ggc ctg cca tgt ccg gga gaa gac aaa | | | 336 |
| Pro Ser Thr Pro Glu Gln Pro Gly Leu Pro Cys Pro Gly Glu Asp Lys | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| tct atc tac cgc cgg gga gcc aga aga tgg agg aag ctg tac cgt gcc | | | 384 |
| Ser Ile Tyr Arg Arg Gly Ala Arg Arg Trp Arg Lys Leu Tyr Arg Ala | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| aac ggc cac ctc ttc caa gcc aag cgc ttt aac agg aga gcg tac tgc | | | 432 |
| Asn Gly His Leu Phe Gln Ala Lys Arg Phe Asn Arg Arg Ala Tyr Cys | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| ggt cag tgc agc gag agg ata tgg ggc ctc gcg agg caa ggc tac agg | | | 480 |
| Gly Gln Cys Ser Glu Arg Ile Trp Gly Leu Ala Arg Gln Gly Tyr Arg | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| tgc atc aac tgc aaa ctg ctg gtc cat aag cgc tgc cac ggc ctc gtc | | | 528 |
| Cys Ile Asn Cys Lys Leu Leu Val His Lys Arg Cys His Gly Leu Val | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| ccg ctg acc tgc agg aag cat atg gat tct gtc atg cct tcc caa gag | | | 576 |
| Pro Leu Thr Cys Arg Lys His Met Asp Ser Val Met Pro Ser Gln Glu | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| cct cca gta gac gac aag aac gag gac gcc gac ctt cct tcc gag gag | | | 624 |
| Pro Pro Val Asp Asp Lys Asn Glu Asp Ala Asp Leu Pro Ser Glu Glu | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| aca gat gga att gct tac att tcc tca tcc cgg aag cat gac agc att | | | 672 |
| Thr Asp Gly Ile Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Arg Lys His Asp Ser Ile | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| aaa gac gac tcg gag gac ctt aag cca gtt atc gat ggg atg gat gga | | | 720 |
| Lys Asp Asp Ser Glu Asp Leu Lys Pro Val Ile Asp Gly Met Asp Gly | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| atc aaa atc tct cag ggg ctt ggg ctg cag gac ttt gac cta atc aga | | | 768 |
| Ile Lys Ile Ser Gln Gly Leu Gly Leu Gln Asp Phe Asp Leu Ile Arg | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 245 | 250 | 255 | |
| gtc atc ggg cgc ggg agc tac gcc aag gtt ctc ctg gtg cgg ttg aag | | | 816 |
| Val Ile Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Lys Val Leu Leu Val Arg Leu Lys | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| aag aat gac caa att tac gcc atg aaa gtg gtg aag aaa gag ctg gtg | | | 864 |
| Lys Asn Asp Gln Ile Tyr Ala Met Lys Val Val Lys Lys Glu Leu Val | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| cat gat gac gag gat att gac tgg gta cag aca gag aag cac gtg ttt | | | 912 |
| His Asp Asp Glu Asp Ile Asp Trp Val Gln Thr Glu Lys His Val Phe | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| gag cag gca tcc agc aac ccc ttc ctg gtc gga tta cac tcc tgc ttc | | | 960 |
| Glu Gln Ala Ser Ser Asn Pro Phe Leu Val Gly Leu His Ser Cys Phe | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| cag acg aca agt cgg ttg ttc ctg gtc att gag tac gtc aac ggc ggg | | | 1008 |
| Gln Thr Thr Ser Arg Leu Phe Leu Val Ile Glu Tyr Val Asn Gly Gly | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| gac ctg atg ttc cac atg cag agg cag agg aag ctc cct gag gag cac | | | 1056 |
| Asp Leu Met Phe His Met Gln Arg Gln Arg Lys Leu Pro Glu Glu His | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| gcc agg ttc tac gcg gcc gag atc tgc atc gcc ctc aac ttc ctg cac | | | 1104 |
| Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Cys Ile Ala Leu Asn Phe Leu His | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| gag agg ggg atc atc tac agg gac ctg aag ctg gac aac gtc ctc ctg | | | 1152 |
| Glu Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp Asn Val Leu Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| gat gcg gac ggg cac atc aag ctc aca gac tac ggc atg tgc aag gaa | | | 1200 |
| Asp Ala Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Tyr Gly Met Cys Lys Glu | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| ggc ctg ggc cct ggt gac aca acg agc act ttc tgc gga acc ccg aat | | | 1248 |
| Gly Leu Gly Pro Gly Asp Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asn | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| tac atc gcc ccc gaa atc ctg cgg gga gag gag tac ggg ttc agc gtg | | | 1296 |
| Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Leu Arg Gly Glu Glu Tyr Gly Phe Ser Val | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| gac tgg tgg gcg ctg gga gtc ctc atg ttt gag atg atg gcc ggg cgc | | | 1344 |
| Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Met Phe Glu Met Met Ala Gly Arg | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| tcc ccg ttc gac atc atc acc gac aac ccg gac atg aac aca gag gac | | | 1392 |
| Ser Pro Phe Asp Ile Ile Thr Asp Asn Pro Asp Met Asn Thr Glu Asp | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 450 | 455 | 460 | |
| tac ctt ttc caa gtg atc ctg gag aag ccc atc cgg atc ccc cgg ttc | | | 1440 |
| Tyr Leu Phe Gln Val Ile Leu Glu Lys Pro Ile Arg Ile Pro Arg Phe | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| ctg tcc gtc aaa gcc tcc cat gtt tta aaa gga ttt tta aat aag gac | | | 1488 |
| Leu Ser Val Lys Ala Ser His Val Leu Lys Gly Phe Leu Asn Lys Asp | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| ccc aaa gag agg ctc ggc tgc cgg cca cag act gga ttt tct gac atc | | | 1536 |
| Pro Lys Glu Arg Leu Gly Cys Arg Pro Gln Thr Gly Phe Ser Asp Ile | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| aag tcc cac gcg ttc ttc cgc agc ata gac tgg gac ttg ctg gag aag | | | 1584 |
| Lys Ser His Ala Phe Phe Arg Ser Ile Asp Trp Asp Leu Leu Glu Lys | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| aag cag gcg ctc cct cca ttc cag cca cag atc aca gac gac tac ggt | | | 1632 |
| Lys Gln Ala Leu Pro Pro Phe Gln Pro Gln Ile Thr Asp Asp Tyr Gly | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| ctg gac aac ttt gac aca cag ttc acc agc gag ccc gtg cag ctg acc | | | 1680 |
| Leu Asp Asn Phe Asp Thr Gln Phe Thr Ser Glu Pro Val Gln Leu Thr | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| cca gac gat gag gat gcc ata aag agg atc gac cag tca gag ttc gaa | | | 1728 |
| Pro Asp Asp Glu Asp Ala Ile Lys Arg Ile Asp Gln Ser Glu Phe Glu | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| ggc ttt gag tat atc aac cca tta ttg ctg tcc acc gag gag tcg gtg | | | 1776 |
| Gly Phe Glu Tyr Ile Asn Pro Leu Leu Leu Ser Thr Glu Glu Ser Val | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| tga ggccgcgtgc gtctctgtcg tggacacgcg tgattgaccc ttaactgta | | | 1829 |
| tccttaacca ccgcatatgc atgccaggct gggcacggct ccgagggcgg ccagggacag | | | 1889 |
| acgcttgccg cgagaccgca gagggaagcg tcagcgggcg ctgctgggag cagaacagtc | | | 1949 |
| cctcacacct ggcccggcag gcagcttcgt gctggaggaa cttgctgctg tgctgcgtc | | | 2009 |
| gcggcggate cgcggggacc ctgccgaggg ggctgtcatg cggtttccaa ggtgcacatt | | | 2069 |
| ttccacggaa acagaactcg atgcactgac ctgctccgcc aggaaagtga gcgtgtagcg | | | 2129 |
| tcctgaggaa taaaatgttc cgatgaaaaa aaaaa | | | 2164 |

<210>2

<211>592

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

Met Pro Ser Arg Thr Asp Pro Lys Met Glu Gly Ser Gly Gly Arg Val
 1 5 10 15
 Arg Leu Lys Ala His Tyr Gly Gly Asp Ile Phe Ile Thr Ser Val Asp
 20 25 30
 Ala Ala Thr Thr Phe Glu Glu Leu Cys Glu Glu Val Arg Asp Met Cys
 35 40 45
 Arg Leu His Gln Gln His Pro Leu Thr Leu Lys Trp Val Asp Ser Glu
 50 55 60
 Gly Asp Pro Cys Thr Val Ser Ser Gln Met Glu Leu Glu Glu Ala Phe
 65 70 75 80
 Arg Leu Ala Arg Gln Cys Arg Asp Glu Gly Leu Ile Ile His Val Phe
 85 90 95
 Pro Ser Thr Pro Glu Gln Pro Gly Leu Pro Cys Pro Gly Glu Asp Lys
 100 105 110
 Ser Ile Tyr Arg Arg Gly Ala Arg Arg Trp Arg Lys Leu Tyr Arg Ala
 115 120 125
 Asn Gly His Leu Phe Gln Ala Lys Arg Phe Asn Arg Arg Ala Tyr Cys
 130 135 140
 Gly Gln Cys Ser Glu Arg Ile Trp Gly Leu Ala Arg Gln Gly Tyr Arg
 145 150 155 160
 Cys Ile Asn Cys Lys Leu Leu Val His Lys Arg Cys His Gly Leu Val
 165 170 175
 Pro Leu Thr Cys Arg Lys His Met Asp Ser Val Met Pro Ser Gln Glu
 180 185 190
 Pro Pro Val Asp Asp Lys Asn Glu Asp Ala Asp Leu Pro Ser Glu Glu
 195 200 205
 Thr Asp Gly Ile Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Arg Lys His Asp Ser Ile
 210 215 220
 Lys Asp Asp Ser Glu Asp Leu Lys Pro Val Ile Asp Gly Met Asp Gly
 225 230 235 240
 Ile Lys Ile Ser Gln Gly Leu Gly Leu Gln Asp Phe Asp Leu Ile Arg
 245 250 255
 Val Ile Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Lys Val Leu Leu Val Arg Leu Lys
 260 265 270
 Lys Asn Asp Gln Ile Tyr Ala Met Lys Val Val Lys Lys Glu Leu Val
 275 280 285
 His Asp Asp Glu Asp Ile Asp Trp Val Gln Thr Glu Lys His Val Phe

| | | |
|---|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
| Glu Gln Ala Ser Ser Asn Pro Phe Leu Val Gly Leu His Ser Cys Phe | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Gln Thr Thr Ser Arg Leu Phe Leu Val Ile Glu Tyr Val Asn Gly Gly | | |
| | 325 | 330 |
| Asp Leu Met Phe His Met Gln Arg Gln Arg Lys Leu Pro Glu Glu His | | |
| | 340 | 345 |
| Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Cys Ile Ala Leu Asn Phe Leu His | | |
| | 355 | 360 |
| Glu Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp Asn Val Leu Leu | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asp Ala Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Tyr Gly Met Cys Lys Glu | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Gly Leu Gly Pro Gly Asp Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asn | | |
| | 405 | 410 |
| Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Leu Arg Gly Glu Glu Tyr Gly Phe Ser Val | | |
| | 420 | 425 |
| Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Met Phe Glu Met Met Ala Gly Arg | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ser Pro Phe Asp Ile Ile Thr Asp Asn Pro Asp Met Asn Thr Glu Asp | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Tyr Leu Phe Gln Val Ile Leu Glu Lys Pro Ile Arg Ile Pro Arg Phe | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Leu Ser Val Lys Ala Ser His Val Leu Lys Gly Phe Leu Asn Lys Asp | | |
| | 485 | 490 |
| Pro Lys Glu Arg Leu Gly Cys Arg Pro Gln Thr Gly Phe Ser Asp Ile | | |
| | 500 | 505 |
| Lys Ser His Ala Phe Phe Arg Ser Ile Asp Trp Asp Leu Leu Glu Lys | | |
| | 515 | 520 |
| Lys Gln Ala Leu Pro Pro Phe Gln Pro Gln Ile Thr Asp Asp Tyr Gly | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Leu Asp Asn Phe Asp Thr Gln Phe Thr Ser Glu Pro Val Gln Leu Thr | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Pro Asp Asp Glu Asp Ala Ile Lys Arg Ile Asp Gln Ser Glu Phe Glu | | |
| | 565 | 570 |
| Gly Phe Glu Tyr Ile Asn Pro Leu Leu Leu Ser Thr Glu Glu Ser Val | | |
| | 580 | 585 |
| | | 590 |

<210>3

<211>13
 <212>PRT
 <213> 人造的

<220>
 <223> 肽抑制剂

<400>3

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ile | Tyr | Arg | Arg | Gly | Ala | Arg | Arg | Trp | Arg | Lys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | |

<210>4
 <211>17
 <212>PRT
 <213> 人造的

<220>
 <223> 肽抑制剂

<400>4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ile | Tyr | Arg | Arg | Gly | Ala | Arg | Arg | Trp | Arg | Lys | Leu | Tyr | Arg | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Asn

<210>5
 <211>9
 <212>PRT
 <213> 人造的

<220>
 <223> 肽抑制剂

<400>5

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Gly | Ala | Arg | Arg | Trp | Arg | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | |

<210>6

<211>13

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽抑制剂

<220>

<221> 脂类

<222>(1).. (1)

<223> 肉豆蔻酸盐

<400>6

Ser Ile Tyr Arg Arg Gly Ala Arg Arg Trp Arg Lys Leu

1

5

10

<210>7

<211>17

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽抑制剂

<220>

<221> 脂类

<222>(1).. (1)

<223> 肉豆蔻酸盐

<400>7

Ser Ile Tyr Arg Arg Gly Ala Arg Arg Trp Arg Lys Leu Tyr Arg Ala

1

5

10

15

Asn

<210>8

<211>9

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽抑制剂

<220>

<221> 脂类

<222>(1)..(1)

<223> 肉豆蔻酸盐

<400>8

Arg Arg Gly Ala Arg Arg Trp Arg Lys

1

5

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>9

aagtgagaga catgtgtcgt c

21

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>10

aagatggagg aagctgtacc g

21

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>11

aaggctacag gtgcatcaac t

21

<210>12

<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>12
aactgctggt ccataagegc t 21

<210>13
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>13
aagagcctcc agtagacgac a 21

<210>14
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>14
aagacgactc ggaggacctt a 21

<210>15
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>15
aagagctggt gcatgatgac g 21

<210>16
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>16
aagtcggttg ttctgtgca t 21

<210>17

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>17

aagctcacag actacggcat g 21

<210>18

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>18

aagaggatcg accagtcaga g 21

<210>19

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>19

aactgtatcc ttaaccaccg c 21

<210>20

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>20

aaccaccgca tatgcatgcc a 21

<210>21

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>21

gugagagaca ugugucgucu u 21

<210>22

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>22

gauggaggaa gcuguaccgu u 21

<210>23

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>23

ggcuacaggu gcaucaacuu u 21

<210>24

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>24

cugcuggucc auaagcgcuu u 21

<210>25

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>25

gagccuccag uagacgacau u 21

<210>26

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>26

gacgacucgg aggaccuuau u 21

<210>27

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>27

gagcuggugc augaugacgu u 21

<210>28

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>28

gucgguuguu ccuggucauu u 21

<210>29

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>29

gcucacagac uacggcaugu u 21

<210>30

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>30

gaggaucgac cagucagagu u 21

<210>31

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>31

cuguaucuu aaccaccgcu u 21

<210>32

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>32

ccaccgcaua ugcaugccau u 21

<210>33

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>33

uucacucucu guacacagca g 21

<210>34

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>34

uucuaccucc uucgacaugg c 21

<210>35

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>35

uuccgauguc cacguaguug a 21

<210>36

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>36

uugacgacca gguauucgcg a 21

<210>37

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>37

uucucggagg ucaucugcug u 21

<210>38

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>38

uucugcugag ccuccuggaa u 21

<210>39

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>39

uucugacca cguacuacug c 21

<210>40

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>40

uucagccaac aaggaccagu a 21

<210>41

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>41

uucgaguguc ugaugccgua c 21

<210>42

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>42

uucuccuagc uggucagucu c 21

<210>43

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>43
uugacauagg aauugguggc g 21

<210>44
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>44
uugguggcgu auacguacgg u 21

<210>45
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>45
cagaagatgg aggaagctgt a 21

<210>46
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>46
caaggctaca ggtgcatcaa c 21

<210>47
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>47
cagtagacga caagaacgag g 21

<210>48

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>48

cagacgacaa gtcggttggt c 21

<210>49

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>49

caagtcggtt gttcctggtc a 21

<210>50

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>50

cacatcaagc tcacagacta c 21

<210>51

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>51

catcaagctc acagactacg g 21

<210>52

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>52

caagtcaca gactacggca t 21

<210>53

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>53

cacagactac ggcatgtgca a 21

<210>54

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>54

catgaacaca gaggactacc t 21

<210>55

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>55

cattccagcc acagatcaca g 21

<210>56

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>56

cacagatcac agacgactac g 21

<210>57

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>57

cagatcacag acgactacgg t 21

<210>58

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>58

cagacgatga ggatgccata a 21

<210>59

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>59

cattattgct gtccaccgag g 21

<210>60

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>60

gaagauggag gaagcuguau u 21

<210>61

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>61

aggcuacagg ugcaucaacu u 21

<210>62

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>62

guagacgaca agaacgaggu u 21

<210>63

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>63

gacgacaagu cgguuguucu u 21

<210>64

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>64

agucgguugu uccuggucau u 21

<210>65

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>65

caucaagcuc acagacuacu u 21

<210>66

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>66

ucaagcucac agacuacggu u 21

<210>67

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>67

agcucacaga cuacggcauu u 21

<210>68

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>68

cagacuacgg caugugcauu u 21

<210>69

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>69

ugaacacaga ggacuaccuu u 21

<210>70

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>70

uuccagccac agaucacagu u 21

<210>71

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>71

cagaucacag acgacuacgu u 21

<210>72

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>72

gaucacagac gacuacgguu u 21

<210>73

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>73

gac gaugagg augccauaau u 21

<210>74

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>74

uuauugcugu ccaccgaggu u 21

<210>75

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>75

uucuucuacc uccuucgaca u 21

<210>76

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>76

uuuccgaugu ccacguaguu g 21

<210>77

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>77

uucaucugcu guucuugcuc c 21

<210>78

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>78

uucugcuguu cagccaacaa g 21

<210>79

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>79

uuucagccaa caaggaccag u 21

<210>80

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>80

uuguaguucg agugucugau g 21

<210>81

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>81

uuaguucgag ugucugaugc c 21

<210>82

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>82

uuucgagugu cugaugccgu a 21

<210>83

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>83

uugucugaug ccguacacgu u 21

<210>84

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>84

uuacuugugu cuccugaugg a 21

<210>85

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>85

uuaaggucgg ugucuagugu c 21

<210>86

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>86

uugucuagug ucugcugaug c 21

<210>87

<211>21
<212>RNA
<213> 人造的
<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>87
uucuaguguc ugcugaugcc a 21

<210>88
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>88
uucugcuacu ccuacggau u 21

<210>89
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>89
uuaauaacga cagguggcuc c 21

<210>90
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>90
gagctctgtg aggaagtgag a 21

<210>91
<211>21
<212>DNA
<213> 智人
<400>91
gaggaagtga gagacatgtg t 21

<210>92
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>92
gaagtgagag acatgtgtcg t 21

<210>93
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>93
gagagacatg tgctgtctgc a 21

<210>94
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>94
gaagatggag gaagctgtac c 21

<210>95
<211>21
<212>DNA
<213> 智人

<400>95
gacctgcagg aagcatatgg a 21

<210>96

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>96

gaggagacag atggaattgc t 21

<210>97

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>97

gaggacctta agccagttat c 21

<210>98

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>98

gatgacgagg atattgactg g 21

<210>99

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>99

gattacacte ctgcttccag a 21

<210>100

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>100

gacgacaagt cggttgttcc t 21

<210>101

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>101

gacaagtcgg ttgttcctgg t 21

<210>102

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>102

gacctgatgt tccacatgca g 21

<210>103

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>103

gatgttcac atgcagagge a 21

<210>104

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>104

gactacggca tgtgcaagga a 21

<210>105

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>105

gacatgaaca cagaggacta c 21

<210>106

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>106

gacttgctgg agaagaagca g 21

<210>107

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>107

gatcacagac gactacggtc t 21

<210>108

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>108

gaggatcgac cagtcagagt t 21

<210>109

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>109

gatcgaccag tcagagttcg a 21

<210>110

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>110
gcucugugag gaagugagau u 21

<210>111
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>111
ggaagugaga gacauguguu u 21

<210>112
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>112
agugagagac augugucguu u 21

<210>113
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>113
gagacaugug ucgucugcau u 21

<210>114
<211>21

<212>RNA
<213> 人造的
<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>114
agauggagga agcuguaccu u 21

<210>115
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>115
ccugcaggaa gcuauggau u 21

<210>116
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>116
ggagacagau ggauugcuu u 21

<210>117
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的

<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>117

ggaccuuaag ccaguuaucu u 21

<210>118

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>118

ugacgaggau auugacuggu u 21

<210>119

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>119

uuacacuccu gcuuccagau u 21

<210>120

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>120

cgacaagucg guuguuccuu u 21

<210>121

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>121

caagucgguu guuccugguu u 21

<210>122

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>122

ccugauguuc cacaugcagu u 21

<210>123

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>123

uguuccacau gcagaggcau u 21

<210>124

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>124

cuacggcaug ugcaaggau u 21

<210>125

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>125

caugaacaca gaggacuacu u 21

<210>126

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>126

cuugcuggag aagaagcagu u 21

<210>127

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>127

ucacagacga cuacggucuu u 21

<210>128

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>128

ggaucgacca gucagaguuu u 21

<210>129

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>129

ucgaccaguc agaguucgau u 21

<210>130

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>130

uucgagacac uccuucacuc u 21

<210>131

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>131

uuccuucacu cucuguacac a 21

<210>132

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>132

uuucacucuc uguacacagc a 21

<210>133

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>133

uucucuguac acagcagacg u 21

<210>134

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>134

uuucuaccuc cuucgacaug g 21

<210>135

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>135
uuggacgucc uucguauacc u 21

<210>136
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的
<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>136
uuccucuguc uaccuuaacg a 21

<210>137
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的
<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>137
uuccuggaau ucggucaaua g 21

<210>138
<211>21
<212>RNA
<213> 人造的
<220>
<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>138
uuacugcucc uauaacugac c 21

<210>139
<211>21
<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>139

uuaaugugag gacgaagguc u 21

<210>140

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>140

uugcuguuca gccacaagg a 21

<210>141

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>141

uuguucagcc aacaaggacc a 21

<210>142

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>142

uuggacuaca agguguacgu c 21

<210>143

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>143

uuacaaggug uacgucuccg u 21

<210>144

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>144

uugaugccgu acacguuccu u 21

<210>145

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>145

uuguacuugu gucuccugau g 21

<210>146

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>146

uugaacgacc ucuucuucgu c 21

<210>147

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>147

uuagugucug cugaugccag a 21

<210>148

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>148

uuccuagcug gucagucuca a 21

<210>149

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>149

uuagcugguc agucucaagc u 21

<210>150

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>150

tagacgacaa gaacgaggac g 21

<210>151

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>151

tacagacaga gaagcacgtg t 21

<210>152

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>152

tacactcctg cttccagacg a 21

<210>153

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>153

tattgctgtc caccgaggag t 21

<210>154

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>154

taaccaccgc atatgcatgc c 21

<210>155

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>155

gacgacaaga acgaggacgu u 21

<210>156

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>156

cagacagaga agcacguguu u 21

<210>157

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>157

cacuccugcu uccagacgau u 21

<210>158

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>158
uugcugucca ccgaggaguu u 21

<210>159

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>159

accaccgcau augcaugccu u 21

<210>160

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>160

uucugcuguu cuugcuccug c 21

<210>161

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>161

uugucugucu cuucgugcac a 21

<210>162

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>162

uugugaggac gaaggucugc u 21

<210>163

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>163

uuaacgacag guggcuccuc a 21

<210>164

<211>21

<212>RNA

<213> 人造的

<220>

<223>siRNA 多核苷酸,合成的

<400>164

uuugguggcg uauacguacg g 21

| 以AA起始的靶区段 靶区段: 5' → 3' | GC比 | 位置 | siRNA有义链: 5' → 3' siRNA反义链: 3' → 5' |
|---|------|------|--|
| AAGTGAGAGACATGTGTCGTC [SEQ ID NO:9] | 0.48 | 127 | GUGAGAGACAUGUGUCGUCUU [SEQ ID NO:21] UUCACUCUCUGUACACAGCAG [SEQ ID NO:33] |
| AAGATGGAGGAAGCTGTACCG [SEQ ID NO:10] | 0.52 | 359 | GAUGGAGGAAGCUGUACCGUU [SEQ ID NO:22] UUCUACCUCCUUCGACAUGGC [SEQ ID NO:34] |
| AAGGCTACAGGTGCATCAACT [SEQ ID NO:11] | 0.48 | 469 | GGCUACAGGUGCAUCAACUUU [SEQ ID NO:23] UCCGAUGUCCACGUAGUUGA [SEQ ID NO:35] |
| AACTGCTGGTCCATAAGCGCT [SEQ ID NO:12] | 0.52 | 493 | CUGCUGGUCCAUAAGCGCUUU [SEQ ID NO:24] UUGACGACCAGGUAUUCGCGA [SEQ ID NO:36] |
| AAGAGCCTCCAGTAGACGACA [SEQ ID NO:13] | 0.52 | 571 | GAGCCUCCAGUAGACGACAUU [SEQ ID NO:25] UUCUCGGAGGUCAUCUGCUGU [SEQ ID NO:37] |
| AAGACGACTCGGAGGACCTTA [SEQ ID NO:14] | 0.52 | 673 | GACGACUCGGAGGACCUUAUU [SEQ ID NO:26] UUCUGCUGAGCCUCCUGGAU [SEQ ID NO:38] |
| AAGAGCTGGTGCATGATGACG [SEQ ID NO:15] | 0.52 | 853 | GAGCUGGUGCAUGAUGACGUU [SEQ ID NO:27] UUCUCGACCACGUACUACUGC [SEQ ID NO:39] |
| AAGTCGGTTGTTCTGGTCAT [SEQ ID NO:16] | 0.48 | 968 | GUCGGUUGUCCUGGUCAUUU [SEQ ID NO:28] UUCAGCCAACAAGGACCAGUA [SEQ ID NO:40] |
| AAGCTCACAGACTACGGCATG [SEQ ID NO:17] | 0.52 | 1170 | GCUCACAGACUACGGCAUGUU [SEQ ID NO:29] UUCGAGUGUCUGAUGCCGUAC [SEQ ID NO:41] |

图 1

| | | | |
|--|------|------|---|
| AAGAGGATCGACCAGTCAGAG [SEQ ID NO:18] | 0.52 | 1701 | GAGGAUCGACCAGUCAGAGUU [SEQ ID NO:30] UUCUCCUAGCUGGUCAGUCUC [SEQ ID NO:42] |
| AACTGTATCCTTAACCACCGC [SEQ ID NO:19] | 0.48 | 1822 | CUGUAUCCUUAACCACCGCUU [SEQ ID NO:31] UUGACAUJAGGAAUUGGUGGCG [SEQ ID NO:43] |
| AACCACCGCATATGCATGCCA [SEQ ID NO:20] | 0.52 | 1834 | CCACCGCAUAUGCAUGCCAUU [SEQ ID NO:32] UUGGUGGCGUAUACGUACGGU [SEQ ID NO:44] |
| 以CA起始的靶区段 靶区段: 5' → 3' | | | |
| | GC比 | 位置 | siRNA有义链: 5' → 3' siRNA反义链: 3' → 5' |
| CAGAAGATGGAGGAAGCTGTA [SEQ ID NO:45] | 0.48 | 356 | GAAGAUGGAGGAAGCUGUAUU [SEQ ID NO:60] UUCUUCUACCUCCUUCGACAU [SEQ ID NO:75] |
| CAAGGCTACAGGTGCATCAAC [SEQ ID NO:46] | 0.52 | 468 | AGGCUACAGGUGCAUCAACUU [SEQ ID NO:61] UUUCCGAUGUCCACGUAGUUG [SEQ ID NO:76] |
| CAGTAGACGACAAGAACGAGG [SEQ ID NO:47] | 0.52 | 580 | GUAGACGACAAGAACGAGGUU [SEQ ID NO:62] UUCAUCUGCUGUUCUUGCUC [SEQ ID NO:77] |
| CAGACGACAAGTCGGTTGTTTC [SEQ ID NO:48] | 0.52 | 960 | GACGACAAGUCGGUUGUUCUU [SEQ ID NO:63] UUCUGCUGUUCAGCCAACAAG [SEQ ID NO:78] |
| CAAGTCGGTTGTTCTCTGGTCA [SEQ ID NO:49] | 0.52 | 967 | AGUCGGUUGUCCUGGUCAUU [SEQ ID NO:64] UUUCAGCCAACAAGGACCAGU [SEQ ID NO:79] |
| CACATCAAGCTCACAGACTAC [SEQ ID NO:50] | 0.48 | 1164 | CAUCAAGCUCACAGACUACUU [SEQ ID NO:65] UUGUAGUUCGAGUGUCUGAUG [SEQ ID NO:80] |
| CATCAAGCTCACAGACTACGG [SEQ ID NO:51] | 0.52 | 1166 | UCAAGCUCACAGACUACGGUU [SEQ ID NO:66] UUAGUUCGAGUGUCUGAUGCC [SEQ ID NO:81] |

| | | | |
|---|------|--------|--|
| CAAGCTCACAGACTACGGCAT [SEQ ID NO:52] | 0.52 | 1169 | AGCUCACAGACUACGGCAUUU [SEQ ID NO:67] UUUCGAGUGUCUGAUGCCGUA [SEQ ID NO:82] |
| CACAGACTACGGCATGTGCAA [SEQ ID NO:53] | 0.52 | 1175 | CAGACUACGGCAUGUGCAAUU [SEQ ID NO:68] UUGUCUGAUGCCGUACACGUU [SEQ ID NO:83] |
| CATGAACACAGAGGACTACCT [SEQ ID NO:54] | 0.48 | 1376 | UGAACACAGAGGACUACCUUU [SEQ ID NO:69] UUACUUGUGUCUCCUGAUGGA [SEQ ID NO:84] |
| CATTCCAGCCACAGATCACAG [SEQ ID NO:55] | 0.52 | 1600 | UUCAGCCACAGAUCACAGUU [SEQ ID NO:70] UUAAGGUCGGUGUCUAGUGUC [SEQ ID NO:85] |
| CACAGATCACAGACGACTACG [SEQ ID NO:56] | 0.52 | 1609 | CAGAUCACAGACGACUACGUU [SEQ ID NO:71] UUGUCUAGUGUCUGCUGAUGC [SEQ ID NO:86] |
| CAGATCACAGACGACTACGGT [SEQ ID NO:57] | 0.52 | 1611 | GAUCACAGACGACUACGGUUU [SEQ ID NO:72] UUCUAGUGUCUGCUGAUGCCA [SEQ ID NO:87] |
| CAGACGATGAGGATGCCATAA [SEQ ID NO:58] | 0.48 | 1681 | GACGAUGAGGAUGCCAUAAUU [SEQ ID NO:73] UUCUGCUACUCCUACGGUAUU [SEQ ID NO:88] |
| CATTATTGCTGTCCACCGAGG [SEQ ID NO:59] | 0.52 | 1747 | UUAUUGCUGUCCACCGAGGUU [SEQ ID NO:74] UUAUAACGACAGGUGGCUCC [SEQ ID NO:89] |
| 以GA起始的靶区段 靶区段: 5' -> 3' | | | |
| | | GC比 位置 | siRNA有义链: 5' -> 3' siRNA反义链: 3' -> 5' |
| GAGCTCTGTGAGGAAGTGAGA [SEQ ID NO:90] | 0.52 | 114 | GCUCUGUGAGGAAGUGAGAUU [SEQ ID NO:110] UUCGAGACACUCCUUCACUCU [SEQ ID NO:130] |
| GAGGAAGTGAGAGACATGTGT [SEQ ID NO:91] | 0.48 | 123 | GGAAGUGAGAGACAUGUGUUU [SEQ ID NO:111] UUCUUCACUCUCUGUACACA [SEQ ID NO:131] |

| | | | |
|--|------|------|---|
| GAAGTGAGAGACATGTGTCGT [SEQ ID NO:92] | 0.48 | 126 | AGUGAGAGACAUGUGUCGUUU [SEQ ID NO:112] UUUCACUCUCUGUACACAGCA [SEQ ID NO:132] |
| GAGAGACATGTGTCGTCTGCA [SEQ ID NO:93] | 0.52 | 131 | GAGACAUGUGUCGUCUGCAUU [SEQ ID NO:113] UUCUCUGUACACAGCAGACGU [SEQ ID NO:133] |
| GAAGATGGAGGAAGCTGTACC [SEQ ID NO:94] | 0.52 | 358 | AGAUGGAGGAAGCUGUACCUU [SEQ ID NO:114] UUUCUACCUCCUUCGACAUGG [SEQ ID NO:134] |
| GACCTGCAGGAAGCATATGGA [SEQ ID NO:95] | 0.52 | 533 | CCUGCAGGAAGCAUAUGGAUU [SEQ ID NO:115] UUGGACGUCCUUCGUUAUACCU [SEQ ID NO:135] |
| GAGGAGACAGATGGAATTGCT [SEQ ID NO:96] | 0.48 | 618 | GGAGACAGAUGGAAUUGCUUU [SEQ ID NO:116] UUCUCUGUCUACCUUAACGA [SEQ ID NO:136] |
| GAGGACCTTAAGCCAGTTATC [SEQ ID NO:97] | 0.48 | 684 | GGACCUUAAGCCAGUUAUCUU [SEQ ID NO:117] UUCUGGAAUUCGGUCAAUAG [SEQ ID NO:137] |
| GATGACGAGGATATTGACTGG [SEQ ID NO:98] | 0.48 | 867 | UGACGAGGAUAUUGACUGGUU [SEQ ID NO:118] UUACUGCUCCUAUAACUGACC [SEQ ID NO:138] |
| GATTACACTCCTGCTTCCAGA [SEQ ID NO:99] | 0.48 | 943 | UUACACUCCUGCUUCCAGAUU [SEQ ID NO:119] UUAUGUGAGGACGAAGGUCU [SEQ ID NO:139] |
| GACGACAAGTCGGTTGTTCTT [SEQ ID NO:100] | 0.52 | 962 | CGACAAGUCGGUUGUUCUUU [SEQ ID NO:120] UUGCUGUUCAGCCAACAAGGA [SEQ ID NO:140] |
| GACAAGTCGGTTGTTCTTGGT [SEQ ID NO:101] | 0.52 | 965 | CAAGUCGGUUGUUCUGGUUU [SEQ ID NO:121] UUGUUCAGCCAACAAGGACCA [SEQ ID NO:141] |
| GACCTGATGTTCCACATGCAG [SEQ ID NO:102] | 0.52 | 1008 | CCUGAUGUCCACAUGCAGUU [SEQ ID NO:122] UUGGACUACAAGGUGUACGUC [SEQ ID NO:142] |

| | | | |
|--|------|------|--|
| GATGTTCCACATGCAGAGGCA [SEQ ID NO:103] | 0.52 | 1013 | UGUUCCACAUGCAGAGGCAUU [SEQ ID NO:123] UUACAAGGUGUACGUCUCCGU [SEQ ID NO:143] |
| GACTACGGCATGTGCAAGGAA [SEQ ID NO:104] | 0.52 | 1179 | CUACGGCAUGUGCAAGGAAUU [SEQ ID NO:124] UUGAUGCCGUACACGUUCCUU [SEQ ID NO:144] |
| GACATGAACACAGAGGACTAC [SEQ ID NO:105] | 0.48 | 1374 | CAUGAACACAGAGGACUACUU [SEQ ID NO:125] UUGUACUUGUGUCUCCUGAUG [SEQ ID NO:145] |
| GACTTGCTGGAGAAGAAGCAG [SEQ ID NO:106] | 0.52 | 1569 | CUUGCUGGAGAAGAAGCAGUU [SEQ ID NO:126] UUGAACGACCUCUUCUUCGUC [SEQ ID NO:146] |
| BATCACAGACGACTACGGTCT [SEQ ID NO:107] | 0.52 | 1613 | UCACAGACGACUACGGUCUUU [SEQ ID NO:127] UUAGUGUCUGCUGAUGCCAGA [SEQ ID NO:147] |
| GAGGATCGACCAGTCAGAGTT [SEQ ID NO:108] | 0.52 | 1703 | GGAUCGACCAGUCAGAGUUUU [SEQ ID NO:128] UUCUAGCUGGUCAGUCUCA [SEQ ID NO:148] |
| GATCGACCAGTCAGAGTTCGA [SEQ ID NO:109] | 0.52 | 1706 | UCGACCAGUCAGAGUUCGAUU [SEQ ID NO:129] UUAGCUGGUCAGUCUCAAGCU [SEQ ID NO:149] |

以TA起始的靶区段
靶区段: 5' -> 3'

GC比 位置

siRNA有义链: 5' -> 3'
siRNA反义链: 3' -> 5'

| | | | |
|--|------|-----|--|
| TAGACGACAAGAACGAGGACG [SEQ ID NO:150] | 0.52 | 583 | GACGACAAGAACGAGGACGUU [SEQ ID NO:155] UUCUGCUGUUCUUGCUCUGC [SEQ ID NO:160] |
| TACAGACAGAGAAGCACGTGT [SEQ ID NO:151] | 0.48 | 889 | CAGACAGAGAAGCACGUGUUU [SEQ ID NO:156] UUGUCUGUCUCUUCGUGCACA [SEQ ID NO:161] |
| TACACTCCTGCTCCAGACGA [SEQ ID NO:152] | 0.52 | 946 | CACUCCUGCUUCCAGACGAUU [SEQ ID NO:157] UUGUGAGGACGAAGGUCUGCU [SEQ ID NO:162] |

| | | | |
|---|-------------|-------------|---|
| TATTGCTGTCCACCGAGGAGT [SEQ ID NO:153] | 0.52 | 1750 | UUGCUGUCCACCGAGGAGUUU [SEQ ID NO:158] UUAACGACAGGUGGCUCUCA [SEQ ID NO:163] |
| TAACCACCGCATATGCATGCC [SEQ ID NO:154] | 0.52 | 1833 | ACCACCGCAUAUGCAUGCCUU [SEQ ID NO:159] UUJUGGUGGCGUAUACGUACGG [SEQ ID NO:164] |

420902v1 [MS Word]

图2

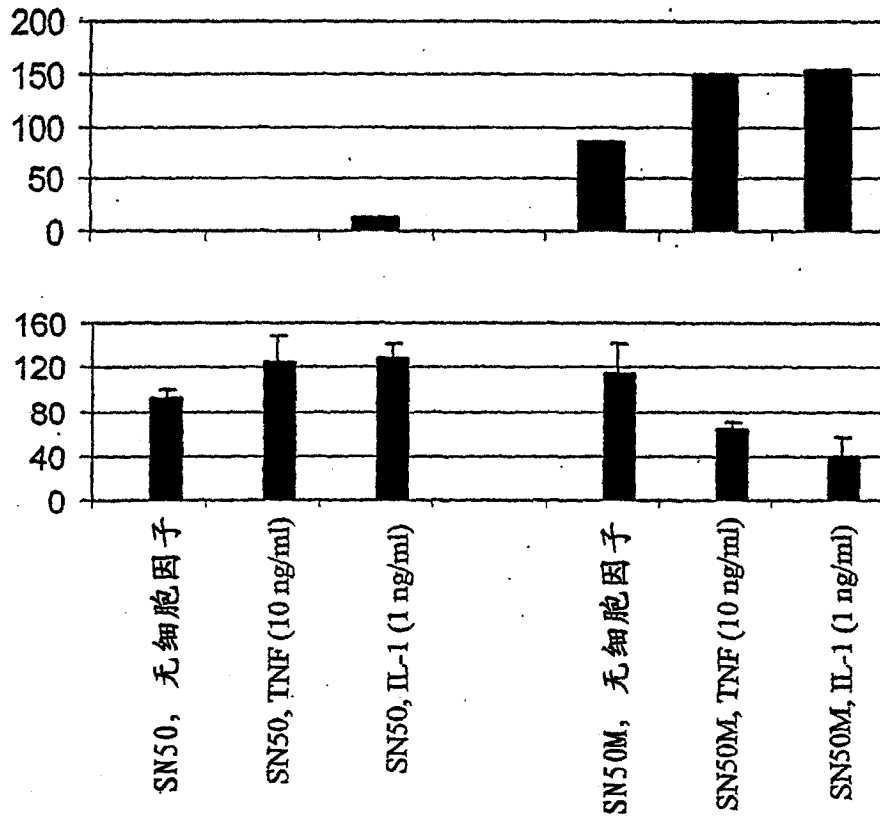


图3

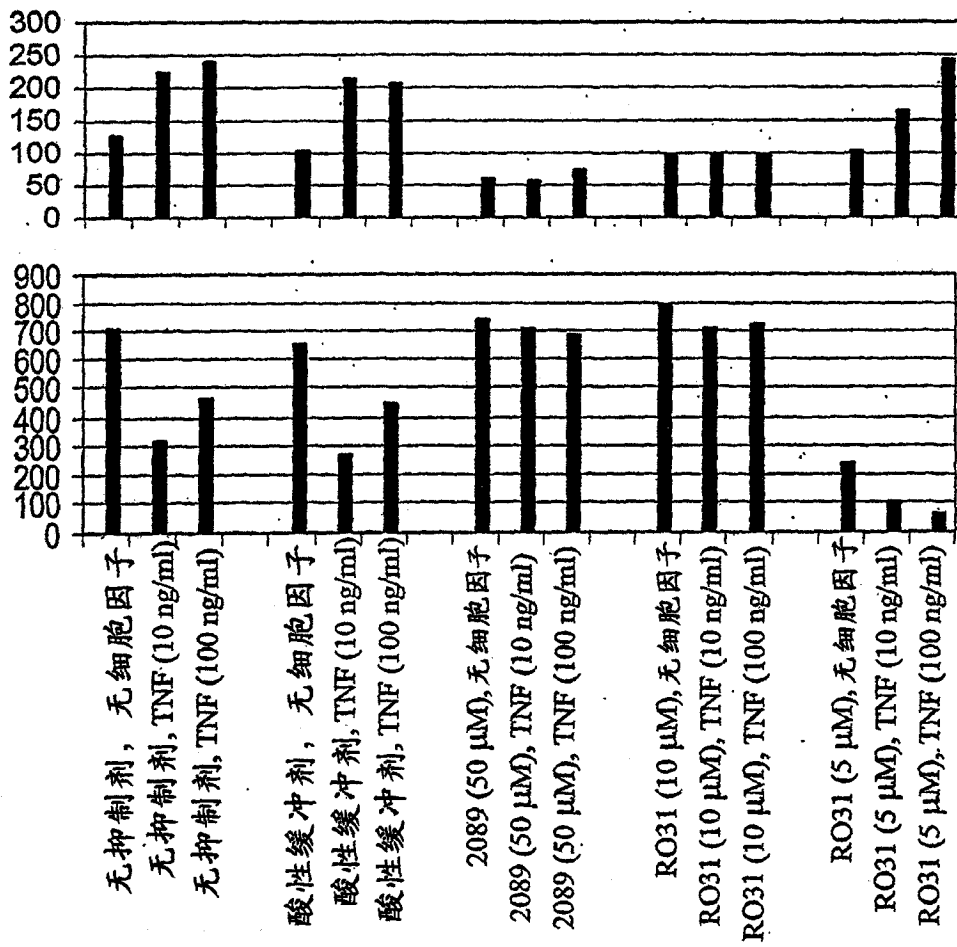


图4

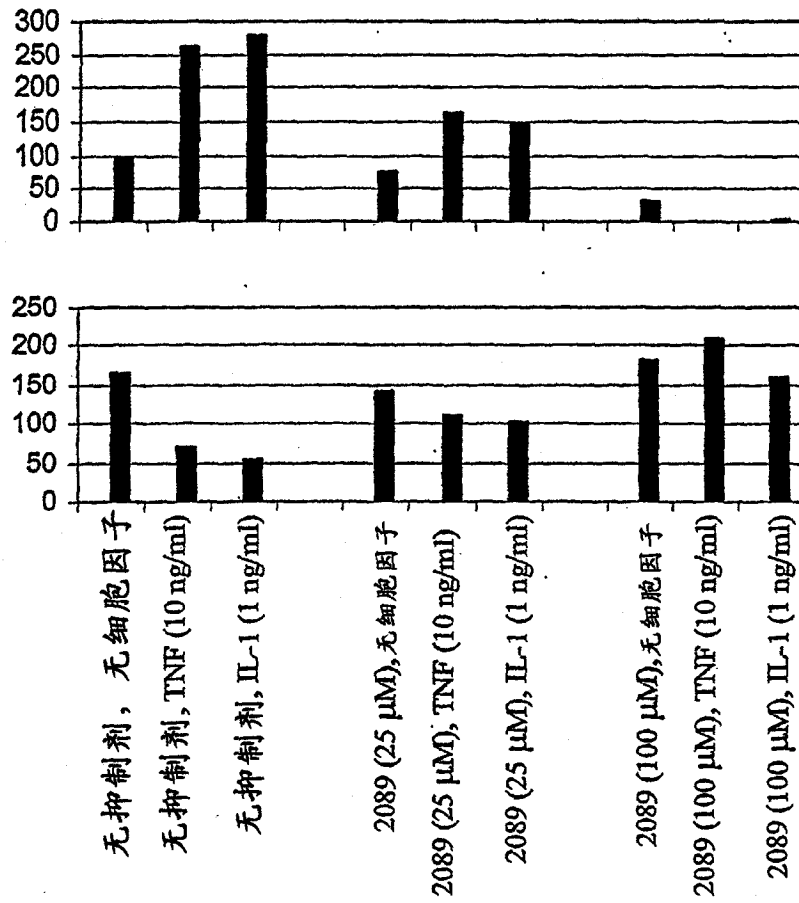
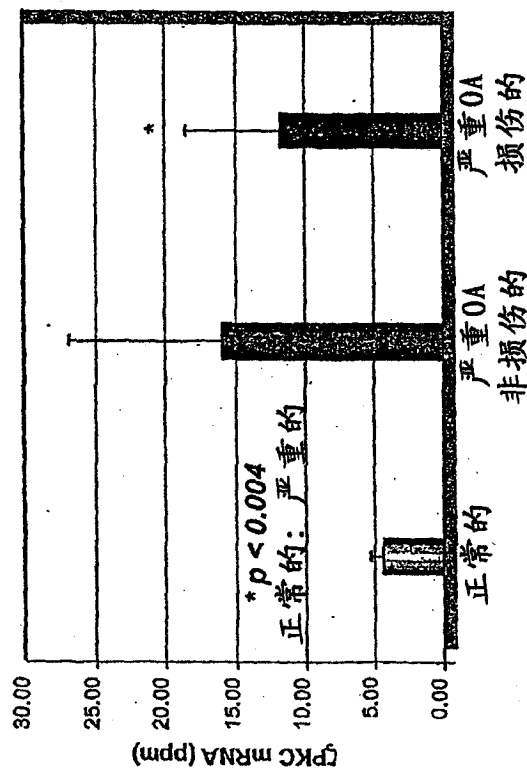


图5

A



B

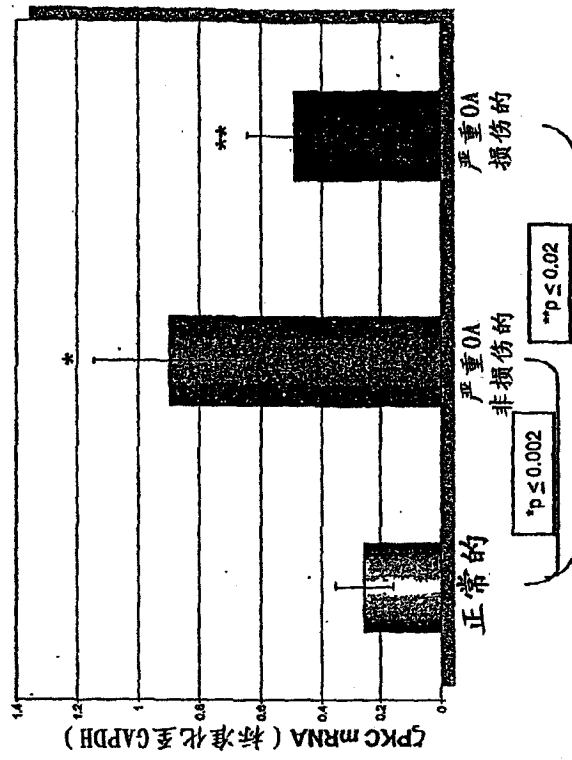
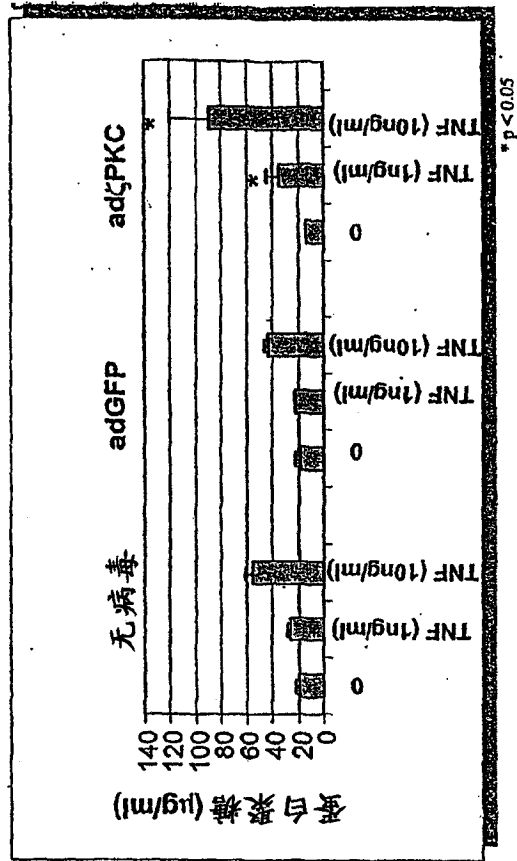


图6

B



A

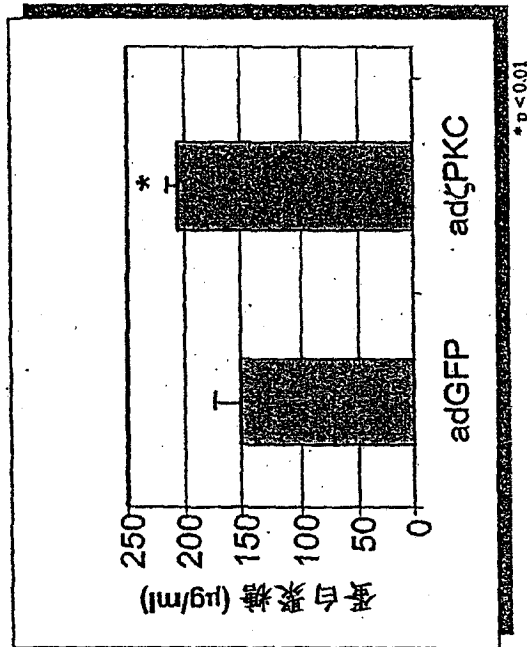


图7

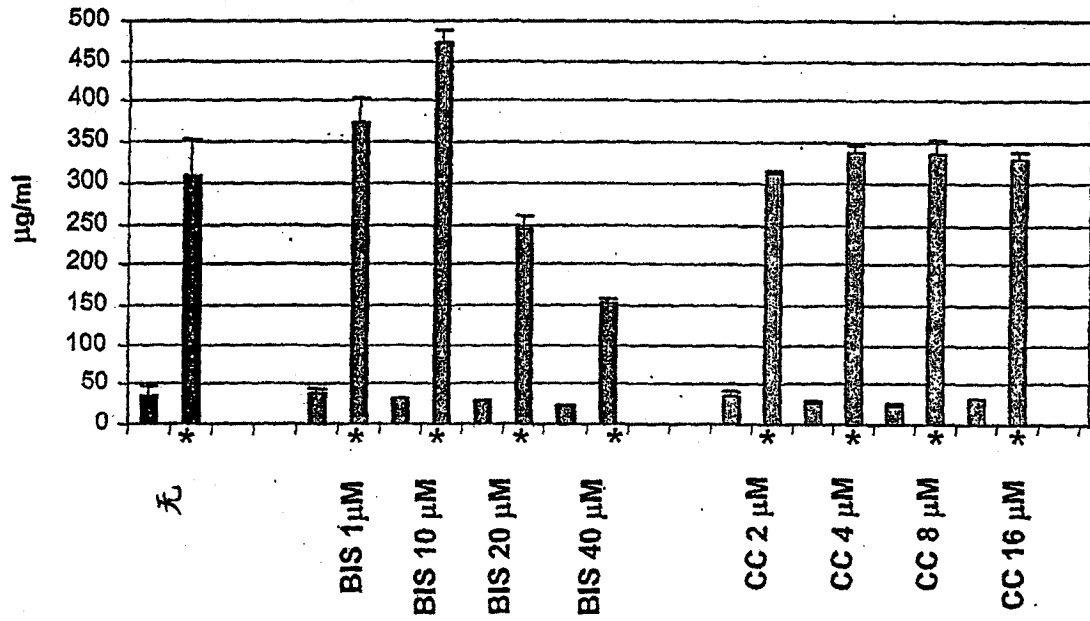


图 8

