



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102600480 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201210068795. 0

CN 1215994 A, 1999. 05. 05, 全文.

(22) 申请日 2006. 01. 06

张利群等. 呼吸道合胞病毒疫苗的研究进展. 《华北国防医药》. 2004, 第 16 卷 (第 01 期), 16-18.

(30) 优先权数据

60/642, 364 2005. 01. 07 US

60/659, 828 2005. 03. 09 US

审查员 王航

(62) 分案原申请数据

200680004735. 5 2006. 01. 06

(73) 专利权人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 雷切尔·迈耶斯

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 任晓华

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0121203 A1, 2001. 03. 29, 全文.

权利要求书1页 说明书29页

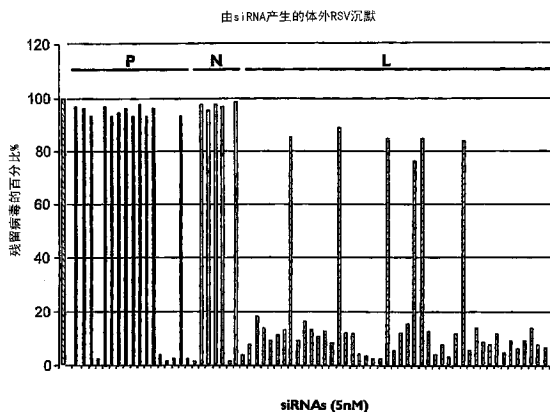
序列表81页 附图8页

(54) 发明名称

RSV 的 RNAi 调节及其治疗应用

(57) 摘要

本发明涉及一种降低受试体细胞中的病毒蛋白、病毒 mRNA 或病毒效价水平的方法, 所述方法包括向所述受试体施用 iRNA 试剂的步骤, 其中所述 iRNA 试剂包含具有至少 15 个或更多个连续核苷酸且与来自第一哺乳动物呼吸道病毒的基因互补的正义链以及具有至少 15 个或更多个连续核苷酸且与所述正义链序列互补的反义链, 其中所述基因选自自由 RSV 的 P、N 或 L 基因组成的组。本发明已证实, 通过体内试验已证实鼻内施用以及肠胃外施用 iRNA 试剂可抑制 RSV。



1. 降低细胞中的 RSV 蛋白、RSV mRNA 或 RSV 效价水平的 iRNA 试剂,其中所述 iRNA 试剂包含正义链和反义链,所述反义链为 SEQ ID No. 284 的 1-19 位核苷酸,所述正义链的序列与 SEQ ID No. 284 的 1-19 位核苷酸完全互补,其中所述 iRNA 试剂还任选地包含位于所述正义链 3' - 末端、位于所述反义链 3' - 末端或位于所述正义链和所述反义链二者 3' - 末端的 1-4 个核苷酸的突出。

2. 降低细胞中的 RSV 蛋白、RSV mRNA 或 RSV 效价水平的 iRNA 试剂,其中反义链的序列为 SEQ ID No. 284,正义链的序列为 SEQ ID No. 283,其中所述 iRNA 试剂还任选地包含位于所述正义链 3' - 末端、位于所述反义链 3' - 末端或位于所述正义链和所述反义链二者 3' - 末端的 1-4 个核苷酸的突出。

3. 如权利要求 1 ~ 2 任一项所述的 iRNA 试剂,其中所述 iRNA 试剂包含使该 iRNA 试剂在生物样品中的稳定性提高的修饰。

4. 如权利要求 1 ~ 2 任一项所述的 iRNA 试剂,其中所述 iRNA 试剂包含硫代磷酸酯或 2' - 修饰的核苷酸。

5. 如权利要求 4 所述的 iRNA 试剂,其中所述 2' - 修饰的核苷酸选自自由 2' - 脱氧、2' -O- 甲基、2' -O- 甲氧乙基和 2' - 氨基烷氧基修饰的核苷酸组成的组。

6. 如权利要求 5 所述的 iRNA 试剂,其中所述 2' - 修饰的核苷酸包含 2' -O- 甲基修饰的核苷酸。

7. 如权利要求 3 所述的 iRNA 试剂,其中所述 iRNA 试剂还包含配体。

8. 如权利要求 7 所述的 iRNA 试剂,其中所述配体与所述 iRNA 的正义链的 3' - 末端相连。

9. 如权利要求 7 所述的 iRNA 试剂,其中所述配体与所述 iRNA 的正义链的 5' - 末端相连。

10. 如权利要求 4 所述的 iRNA 试剂,其中所述 2' - 修饰的核苷酸是 2' - 氟修饰。

11. 如权利要求 4 所述的 iRNA 试剂,其中所述 2' - 修饰的核苷酸是 2' - 氨基修饰。

12. 如权利要求 1 所述的 iRNA 试剂,其中 1-4 个核苷酸的突出包含位于所述正义链 3' - 末端,位于所述反义链 3' - 末端或位于所述正义链和所述反义链二者 3' - 末端的 1-4 个脱氧核苷酸的突出。

13. 如权利要求 12 所述的 iRNA 试剂,其中所述脱氧核苷酸的突出是 dTdT 突出。

14. 权利要求 1 ~ 13 任一项所述的 iRNA 试剂在制备降低受试体细胞中的 RSV 蛋白、RSV mRNA 或 RSV 效价水平的药物中的应用。

15. 如权利要求 14 所述的应用,其中所述细胞是受试者肺部或呼吸组织的细胞。

16. 如权利要求 15 所述的应用,其中所述 iRNA 试剂经配制以通过吸入施用。

17. 如权利要求 15 所述的应用,其中所述 iRNA 试剂经配制以经鼻内施用。

18. 如权利要求 15 所述的应用,其中所述 iRNA 试剂经配制以通过喷雾施用。

19. 如权利要求 15 所述的应用,其中所述受试者被诊断为患有 RSV 感染。

20. 如权利要求 15 所述的应用,其中所述 iRNA 试剂减低所述受试者的病毒效价。

21. 如权利要求 1 所述的 iRNA 试剂,其中 1-4 个核苷酸的突出是位于所述正义链 3' - 末端,位于所述反义链 3' - 末端或位于所述正义链和所述反义链二者 3' - 末端的 2 个脱氧核苷酸的突出。

RSV 的 RNAi 调节及其治疗应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是申请日为 2006 年 1 月 6 日, 名称为“RSV 的 RNAi 调节及其治疗应用”的中国发明专利申请 200680004735.5 的分案申请。

[0003] 本申请要求 2005 年 1 月 7 日提交的美国临时申请 No. 60/642, 364 的权益, 将其全文以引用的方式并入至本文中。

技术领域

[0004] 本发明涉及呼吸道合胞病毒 (RSV) 的治疗领域以及调节病毒复制的组合物和方法, 更特别地说, 本发明涉及寡核苷酸通过 RNA 干扰而对呼吸道合胞病毒的基因进行下调, 所述寡核苷酸通过吸入施用 / 鼻内施用而被局部施用至肺和鼻通道, 或通过注射 / 静脉内注射而施用至全身。

背景技术

[0005] 呼吸道由于其本来所具有的功能而暴露于大量的经空气传播的引起多种呼吸性疾病的病原体中。在发达国家, 呼吸道的病毒感染是造成婴儿住院的最常见原因, 在美国每年约有 91,000 名婴儿因此而住院, 花费 3 亿美元。人类呼吸道合胞病毒 (RSV) 和副流感病毒 (PIV) 是呼吸道疾病的两种主要因素; 它们感染上呼吸道以及下呼吸道, 导致义膜性喉炎、肺炎和细支气管炎 (Openshaw, P. J. M. *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Easton, A. J., et al., *Chn. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004))。单独的 RSV 感染约 65% 的一岁以内的婴儿, 在婴儿生命的最初两年内几乎全都被该病毒所感染。该病毒在老年人中也是疾病和死亡的主要原因。RSV 感染后的免疫反应并不完全, 而且也不能持久, 因此在所有年龄组中都会发生重复感染。罹患过 RSV 细支气管炎的婴幼儿在以后的生命过程中容易发生哮喘和哮喘。近 40 年来一直在进行关于可有效治疗 RSV 的方法的研究以及关于 RSV 疫苗的研究, 但是收效甚微 (Openshaw, P. J. M. *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Maggon, K. et al, *Rev. Med. Virol.* 14, 149-168 (2004))。目前, 临床上尚无针对任一种 RSV 的疫苗。在诸如牛、山羊、猪、绵羊等非人类的动物体内也有这两种病毒的病毒株的存在, 导致农业、乳品业和肉业的损失 (Easton, A. J., et al., *Chn. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004))。

[0006] 两种 RSV 病毒都含有不分节的负链 RNA 基因组 (nonsegmented negative-strand RNA genome) 且均属于副黏病毒 (Paramyxoviridae) 科。这些病毒所具有的多重特性致使对其难于进行预防和治疗。由于 RNA 基因组缺乏复制校正阅读能力, 因而病毒基因组以高速率发生变异, 这对于确定可靠的疫苗或抗病毒药提供了巨大的挑战 (Sullender, W. M. *Chn. Microbiol. Rev.* 13, 1-15 (2000))。部分由于病毒发展出位于 F 基因上的抗性突变, 因而 RSV 融合蛋白 (F) 这类有前途的抑制剂也已被放弃 (Razinkov, V, et. al., *Antivir. Res.* 55, 189-200 (2002), Morton, C. J. et al. *Virology* 311, 275-288 (2003))。两种病毒都与细胞蛋白相结合, 从而为获得用于疫苗的不含细胞的病毒

物质增加了困难 (Burke, E., et al., *Virology* 252,137-148(1998), Burke, E., et al., *J. Virol.* 74,669-675(2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72,2655-2662(1998))。最后,两种病毒,尤其是 RSV 病毒的免疫性非常复杂 (Peebles, R. S., Jr., et al., *Viral Immunol.* 16,25-34(2003), Haynes, L. M., et al., *J. Virol.* 11,9831-9844(2003))。使用未变性的 RSV 蛋白作为疫苗会导致“免疫增强”或疫苗增强性疾病 (Polack, F. P. et al. *J. Exp. Med.* 196,859-865(2002))。最近结束的多个抗-RSV 的生物制药项目强调了上述的全部问题。

[0007] RSV 基因组含有单股负链 RNA(single strand of negative sense RNA),该 RNA 为 15,222 核苷酸,产生 11 种主要蛋白 (Falsey, A. R., and E. E. Walsh,2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84.)。其中的两种蛋白即 F(融合)和 G(粘附)糖蛋白为主要的表面蛋白,且对于诱导保护性免疫是最重要的。SH(小疏水性)蛋白、M(基质)蛋白以及 M2(22kDa)蛋白与病毒外壳相关连,但并不诱导保护性免疫反应。已发现 N(主要核壳相关蛋白)、P(磷蛋白)、以及 L(主要聚合酶蛋白)蛋白与病毒体 RNA 相关连。推测 NS1 和 NS2 这两种非结构性蛋白参与宿主-病毒相互作用,但在传染性病毒体中并不存在。

[0008] 人类 RSV 株已被分成主要的两组,即 A 和 B。已证明 G 糖蛋白是 RSV 蛋白中最具趋异性的蛋白。据认为 RSV G 糖蛋白在两组 RSV 中以及在两组 RSV 内的易变性对 RSV 引起疾病每年发作的能力是很重要的。G 糖蛋白具有 289-299 个氨基酸(依 RSV 株而不同),具有 90kDa 的细胞内、跨膜以及高糖基化的柄结构(stalk structure),并具有肝素结合结构域。糖蛋白以分泌型和膜结合型存在。

[0009] 目前还没有用于成功治疗 RSV 感染的方法 (Maggon K and S. Bank,2004, *Reviews in Medical Virology* 14:149-68)。多数情况下 RSV 对下呼吸道的感染为自限性疾病。关于如何对患有该疾病的婴幼儿和儿童进行治疗或认为婴幼儿和儿童何时应该入院或可以出院并不存在权威性的指导方针和标准。RSV 感染时可能发生缺氧,这种缺氧可通过鼻插管供氧来处理。对患有呼吸衰竭、休克、或反复呼吸暂停的儿童进行机械通风可降低死亡率。一些医生的处方使用类固醇。但是,一些研究已经表明,类固醇治疗并不能对因患有细支气管炎而住院的婴幼儿或儿童的临床过程有所影响。这样,单独使用皮质类固醇或与支气管扩张药联合使用可能对除了健康的通气不畅的患者之外的细支气管炎的治疗是无效的。在患有诸如支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysphasia)和气喘哮喘等潜在性心肺疾病的婴幼儿和儿童中也使用过类固醇。

[0010] 利巴韦林是一种具有抗病毒活性的鸟苷类似物,自 20 世纪 80 年代中期开始已将该药物用于治疗患有 RSV 细支气管炎的婴幼儿和儿童,但是许多评估其用途的研究已表现出该药物的使用显示出相矛盾的结果。目前在许多研究中心限于对免疫妥协患者以及患有严重疾病的患者使用利巴韦林。

[0011] 有研究表明 RSV 细支气管炎的严重性与血清视黄醇浓度降低相关,但是在对患有 RSV 细支气管炎的住院儿童所进行的试验表明,补充维生素 A 并未带来有益效果。已证实,静脉注射 1500mg/kg 的 RSV 免疫球蛋白或吸入 100mg/kg 免疫球蛋白对于 RSV 下呼吸道感染基本上也并未表现出有益效果。

[0012] 在发达国家,对 RSV 下呼吸道感染的治疗通常限于对症治疗。由于抗病毒治疗花费昂贵且在功效上缺少一致性,因而该种治疗通常仅限于在危及生命的时候使用。在发展

中国家,氧气为主要的治疗手段(在可利用时),并且降低死亡率的唯一途径是进行预防。

[0013] RNA 干扰或“RNAi”最初是由 Fire 及其合作者创造出的用于描述下述发现的术语:即,当将双链 RNA(dsRNA)引入至蠕虫(worm)中时,其能够阻断基因表达(Fire et al, Nature 391:806-811,1998)。短的 dsRNA 在包括脊椎动物在内的许多生物体中介导基因特异性的转录后沉默,并为研究基因功能提供新的手段。已有人提出将 RNAi 作为开发新型治疗剂的方法。但是,迄今为止这些大部分还仅停留在建议的阶段,并无证据表明 RNAi 可在治疗中应用。

[0014] 因此,目前需要对于安全有效的抗 RSV 疫苗,特别需要用于婴幼儿和儿童的抗 RSV 疫苗。还需要对所有年龄人群中的 RSV 感染以及在免疫妥协个体中的 RSV 感染的治疗方法。也需要用于鉴别针对 RSV 的保护性免疫反应的科学方法从而能对该疾病的致病机理进行研究,并有利于对治疗剂以及疫苗的筛选。本发明提供了对调节或预防 RSV 感染有效的方法以及组合物,从而克服了以往在本领域中所存在的缺陷。更特别地,本发明通过提供下述的 iRNA 试剂而推进了现有技术,所述 iRNA 试剂在体内和体外具有降低 RSV 水平、对两种主要的 RSV 亚型均有效果、并且该类分子具有治疗活性。

发明内容

[0015] 本发明是基于对下述内容的论证而完成的,即,通过体内和体外试验已证实鼻内施用以及肠胃外施用 iRNA 试剂可抑制 RSV;以及已经鉴定出来自 RSV 的 P、N 和 L 基因的有效的 iRNA 试剂可降低 RSV 的 A 亚型和 B 亚型的 RNA 水平。本发明基于上述发现提供了用于降低受试体内 RSV mRNA 水平、RSV 蛋白水平以及 RSV 病毒效价的特定组合物和方法,所述受试体例如为人等哺乳动物。

[0016] 本发明特别提供了由下述核苷酸组成、基本上由下述核苷酸组成、或含有下述核苷酸的 iRNA 试剂,所述核苷酸为 RSV 的一个基因中的至少 15 个或更多个连续核苷酸,所述 RSV 的基因特别为 RSV 的 P、N 和 L 基因;本发明更特别地提供含有选自表 1(a-c) 中的一个序列中的 15 个或更多个连续核苷酸。iRNA 试剂优选每条链由少于 30 个核苷酸的连续核苷酸组成,例如由每条链为 21-23 个核苷酸的连续核苷酸组成,所述连续核苷酸如表 1(a-c) 中所提供。所述双链 iRNA 试剂可具有平头末端,更优选该试剂双链的一个或两个 3' 末端具有 1-4 个核苷酸的突出。

[0017] 更进一步地,所述 iRNA 试剂可以仅含有天然来源的核糖核苷酸亚单元,也可将其合成为在所述试剂所含有的核糖核苷酸亚单元的一个或多个糖或碱基中进行了一处或多处修饰。还可对 iRNA 试剂进行修饰从而使之与诸如胆固醇等经选择用于改善对试剂的稳定性、分布或细胞吸收的配体相连接。所述 iRNA 试剂可进一步为独立的形式或为用于本文所述方法的药物组合物的一部分,特别是作为被配制为用于输送至肺或鼻通道的药物组合物或被配制为用于肠胃外施用的药物组合物。所述药物组合物可以含有一种或多种 iRNA 试剂,在一些实施方式中,所述药物组合物会含有两种或更多种 iRNA 试剂,每种 iRNA 试剂针对一种 RSV 基因的一个不同的片段或针对两种不同的 RSV 基因。

[0018] 本发明进一步提供用于降低细胞中的 RSV 病毒 mRNA 水平的方法。如对本文的进一步所述,所述方法包括对受试体施用本发明的 iRNA 试剂中的步骤。本发明的方法利用与 RNA 干扰相关的细胞机制来选择性降低细胞中的病毒 mRNA,其包括使细胞与本发明的抗病

毒 iRNA 试剂中的一种相接触的步骤。该方法可直接应用于细胞,或可通过将本发明的 iRNA 试剂 / 药物组合物中的一种施用至受试体而应用于哺乳动物受试体。细胞中病毒 mRNA 的降低导致所产生的病毒蛋白的量的降低,而组织中病毒 mRNA 的降低导致复制病毒效价的降低(如实施例所示)。

[0019] 本发明的方法和组合物,例如所述方法以及 iRNA 试剂组合物可以本文所述的任意剂量和 / 或剂型进行应用,并且还可以本文所述的任意施用途径进行应用。更为重要的是 iRNA 试剂可通过鼻内施用并能抑制呼吸组织中的病毒复制。

[0020] 下文的描述中将结合附图对本发明的一个或多个实施方式进行详细描述。所述说明书、附图以及权利要求将对本发明的其它特征、目的以及优点进行清楚说明。为完成所有目的,将所引用的文献、专利以及专利申请全文以参考的方式并入至本申请中。

附图说明

[0021] 图 1 显示 iRNA 试剂对 RSV 的体外抑制。利用实施例中所述的空斑形成试验来检测表 1(a-c) 中所提供的 iRNA 试剂的抗 RSV 活性。每一条柱(竖条)表示表 1(a-c) 中所提供的一种 iRNA 试剂,例如,柱 1 为表 1a 中的第一试剂,等等。鉴别出活性 iRNA 试剂。

[0022] 图 2 显示 iRNA 试剂在体外抑制 RSV 的剂量响应。利用实施例中所述的空斑形成试验采用 4 种浓度对选自表 1 的活性试剂的抗 RSV 活性进行检测。发现所检测的活性 iRNA 试剂具有剂量依赖性反应。

[0023] 图 3 显示 iRNA 试剂在体外对 RSV B 亚型的抑制。利用实施例中所述的空斑形成试验来检测图 2 中所提供的 iRNA 试剂对 B 亚型的抗 RSV 活性。B 亚型受到了所检测的 iRNA 试剂的抑制。

[0024] 图 4 显示 iRNA 试剂在体内对 RSV 的抑制。利用实施例中所述的小鼠模型来检测图 2 中所描述的试剂的抗 RSV 活性。所述 iRNA 试剂在体内能可有效降低病毒效价。

[0025] 图 5 显示 AL-DP-1730 对 RSV 的体内抑制。利用实施例中提供的方法来检测 AL-DP-1730 的剂量依赖性活性。所述试剂显示出剂量依赖性反应。

[0026] 图 6 显示 iRNA 试剂在体内对 RSV 的抑制。如实施例所述检测图 2 中所描述的 iRNA 试剂在体内的抗 RSV 活性。

[0027] 图 7 显示 iRNA 试剂在体内对 RSV 的抑制。如实施例所述检测图 2 中所描述的 iRNA 试剂在体内的抗 RSV 活性。

[0028] 图 8A 显示利用局部递送的 iRNA 试剂在体内对 RSV 的抑制。

[0029] 图 8B 显示利用气雾剂递送的 iRNA 试剂在体内对 RSV 的抑制。利用实施例中所提供的方法来检测图 2 中所描述的 iRNA 试剂在体内的抗 RSV 活性。

[0030] 图 9 显示 iRNA 试剂在体内对 RSV 感染的保护。在 RSV 激发之前对图 2 中所描述的 iRNA 试剂进行检测以检测其保护活性。

具体实施方式

[0031] 为易于说明,术语“核苷酸”或“核糖核苷酸”在本文中是参考 RNA 试剂的一个或多个单体亚单元而进行使用的。可以理解,在修饰的 RNA 或核苷酸替代物的情况下,本文所使用的词语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可指在一个或多个位置被修饰的核苷酸或在一

个或多个位置的替代物取代部分,如下文的进一步描述。

[0032] 本文所述的“RNA 试剂”为未修饰的 RNA、修饰的 RNA、或核苷替代物,上述物质在本文中描述或为 RNA 合成领域的公知常识。当描述了许多修饰的 RNA 以及核苷替代物,优选的实施例包括对核酸酶的抗性强于未经修饰的 RNA 的物质。优选的实例包括具有下述修饰的物质:2' 糖修饰;单链突出修饰、优选 3' 单链突出修饰,或,尤其是,如果是单链化,包括一个或多个磷酸基团或一个或多个磷酸基团类似的 5' 修饰。

[0033] 本文所述“iRNA 试剂”(其为“干扰 RNA 试剂”的简称)为能够下调 RSV 等靶基因的表达的 RNA 试剂。不希望囿于任何理论,但 iRNA 试剂可以通过多种机制中的一种或多种而发挥作用,所述机制包括靶 mRNA 的转录后裂解,有时在本领域中将其称为 RNAi;或包括转录前或翻译前机制。iRNA 试剂可以为双链(ds) iRNA 试剂。

[0034] 本文所述“ds iRNA 试剂”(其为“双链 iRNA 试剂的简称”)为具有多于一条链、优选双链的 iRNA 试剂,其中链间的杂交可形成双链结构的区域。本处所述“链”指的是核苷酸的连续序列(包括非天然或修饰核苷酸)。两条或多于两条链可以形成单独分子的一部分,或者每一条链形成单独分子的一部分,或者它们可以通过例如连接子等彼此共价连接从而形成一个分子,所述连接子例如为聚乙二醇连接子。至少一条链可以包括与靶 RNA 充分互补的区域。将该链称为“反义链”。dsRNA 试剂中的含有与反义链互补的区域的另一条链被称为“正义链”。但是,dsRNA 试剂也可由单个的 RNA 分子来形成,所述单个的 RNA 分子至少部分地自身互补以形成包括双链体区域的例如发夹结构或者锅柄状结构。在这种情况下,术语“链”指的是 RNA 分子中的一个区域,该区域与同一 RNA 分子中的另一区域互补。

[0035] 尽管在哺乳动物中长链的 ds iRNA 试剂可以诱导通常为有害的干扰素反应,但短链的 ds iRNA 试剂却并不诱发该干扰素反应,至少并不会诱发对细胞和/或宿主有害程度的干扰素反应。本发明的 iRNA 试剂包括下述的分子,该分子足够短以至于不会在哺乳动物细胞中诱发有害的干扰素反应。通过向哺乳动物细胞施用 iRNA 试剂(例如按本文所述进行配制)可以用于沉默 RSV 基因的表达并同时避免有害的干扰素反应。本文中足够短而不会诱发有害的干扰素反应的分子称为 siRNA 试剂或 siRNA。本文所用“siRNA 试剂”或“siRNA”是指例如 ds iRNA 试剂等 iRNA 试剂,其足够短以至于不会在人类细胞中诱导有害的干扰素反应,例如,其具有少于 30 个核苷酸对的双链区域。

[0036] 本文所述包括 ds iRNA 试剂和 siRNA 试剂的分离的 iRNA 试剂可通过例如 RNA 降解来介导基因的沉默。为方便起见,该基因也被称为靶基因。优选地,被沉默的 RNA 为 RSV 基因的基因产物,特别为 P、N 或 L 基因的产物。

[0037] 本文所用短语“介导 RNAi”指的是试剂采用序列特异性方式来沉默靶基因的能力。“沉默靶基因”指的是下述过程,籍由该过程,当含有和/或分泌某一靶基因产品的细胞与所述试剂相接触时,与未接触所述试剂的类似细胞相比,未接触所述试剂时所含有和/或分泌的该基因的某一产物减少了至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90%。该靶基因的所述产物例如可以为信使 RNA(mRNA)、蛋白质、或调节成分。

[0038] 在本发明的抗病毒应用中,靶基因的沉默将导致细胞中或受试体中“病毒效价”的降低。本文所述“病毒效价的降低”指的是由进行病毒靶基因的沉默的细胞所产生的可生存病毒数目的降低,或在进行病毒靶基因沉默的组织中所得到的可生存病毒数目的降低。

细胞所产生的病毒数量的降低将优选导致由进行治疗的受试体的组织所产生的可测量病毒数的降低,或导致病毒感染症状的严重程度的降低。本发明的 iRNA 试剂也被称为“抗病毒 iRNA 试剂”。

[0039] 本文所用“RSV 基因”指的是从 RSV 病毒基因组中所鉴别出的任意一个基因 (See Falsey, A. R., and E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84)。这些基因对本领域技术人员来说是易于得知的,其中包括本文所示例的 N、P 和 L 基因。

[0040] 本文所述术语“互补的”用于表示在本发明化合物和诸如 RSV 病毒 mRNA 分子的靶 RNA 分子之间所发生的可产生稳定特异结合程度的互补的充分程度。特异结合需要足够程度的互补性以避免寡聚化合物与非靶序列在特异结合所需条件下(即,在体内检测或治疗处理时的生理条件下,或在进行体外检测时,在进行所述检测的条件下)所发生的非特异结合。所述非靶序列通常具有至少 4 个核苷酸的区别。

[0041] 如本文所述,若 iRNA 试剂在细胞中降低由细胞中靶 RNA 所编码的蛋白的生成,则 iRNA 试剂与诸如靶 mRNA(例如靶 RSV mRNA)等靶 RNA“充分互补”。iRNA 试剂也可以与靶 RNA“完全互补”,例如,靶 RNA 与 iRNA 试剂退火,优选在完全互补的区域形成完全由 Watson-Crick 碱基对所形成的杂交体。“充分互补”的 iRNA 试剂可包括与靶病毒 RNA 完全互补的内部区域(例如,至少 10 个核苷酸的内部区域)。而且,在一些实施方式中,iRNA 试剂特异性区分单个核苷酸的区别。在这种情况下,如果在单个核苷酸有区别的区域(例如在 7 个核苷酸的区域内)发现有完全互补性,则 iRNA 试剂仅介导 RNAi。优选的 iRNA 试剂将基于实施例中所提供的正义和反义序列,或由实施例中所提供的正义和反义序列构成,或含有实施例中所提供的正义和反义序列。

[0042] 在本文中,当以“基本上相同”来表示第一核苷酸序列与第二核苷酸序列的比较时,意指除了二者之间仅有至多一个、两个或三个核苷酸发生了取代而不相同(例如,腺苷被尿嘧啶所取代)以外,第一核苷酸序列与第二核苷酸序列是相同的。

[0043] 在本文中,“受试体”指的是下述的哺乳动物生物体,所述哺乳动物生物体正经受对例如 RSV 感染等由病毒表达所介导的疾病进行治疗的过程,或者正经受用于预防病毒感染的预防处理过程。所述受试体可以为任意的哺乳动物,例如为灵长类、牛、马、小鼠、大鼠、狗、猪、山羊等。在优选的实施方式中,所述受试体为人。

[0044] 在本文中,治疗 RSV 感染指的是对任何生物学或病理学终点(endpoint)的改善,所述终点 1) 由受试体中所存在的病毒所部分介导;以及 2) 其结果可通过降低所存在的病毒基因产物的水平而受到影响。

[0045] iRNA 试剂的设计和选择

[0046] 本发明以下述内容的证实为基础:即,在体内通过鼻内施用/吸入或以注射进行全身/肠胃外施用的方式向肺和鼻通道局部施用 iRNA 试剂使呼吸病毒基因所发生的靶基因沉默以及对病毒感染的治疗结果。本发明进一步扩展至将 iRNA 试剂用于一种以上的呼吸病毒以及共施用两种或多种 iRNA 试剂对两种病毒感染进行治疗。

[0047] 基于这些结果,本发明特别提供了可用于治疗病毒感染的 iRNA 试剂,所述病毒感染特别为呼吸病毒感染,尤其为 RSV 感染,所述 iRNA 试剂为单独形式,并作为下述的药物组合物。该试剂可包含具有至少 15 个或更多个连续核苷酸的与病毒基因互补的正义链以及具有至少 15 个或更多个连续核苷酸的与正义链序列互补的反义链。特别可应用由选自表

1(a-c) 所提供的 P、N 和 L 基因的核苷酸序列所组成的 iRNA 试剂、或基本上由选自表 1(a-c) 所提供的 P、N 和 L 基因的核苷酸序列所组成的 iRNA 试剂、或包含选自表 1(a-c) 所提供的由 P、N 和 L 基因的核苷酸序列的 iRNA 试剂。

[0048] 本发明的 iRNA 试剂基于选自表 1(a-c) 的有活性的 iRNA 试剂中的一种中的至少 15 个或更多个连续核苷酸, 或含有选自表 1(a-c) 的有活性的 iRNA 试剂中的一种中的至少 15 个或更多个连续核苷酸。在该类试剂中, 所述试剂可由表中所提供的完整序列所构成、基本上由表中所提供的完整序列构成、或含有表中所提供的完整序列, 或者所述试剂可含有 15 个或更多的由表 1a-c 所提供的连续残基并含有来自靶基因的连续区域的其它核苷酸。

[0049] iRNA 试剂可以基于序列信息、所需性质以及表 1(a-c) 中所提供的信息而合理地进行设计。例如, 可根据表中所提供的试剂的序列以及靶基因的完整编码序列来设计 iRNA 试剂。

[0050] 相应地, 本发明提供含有正义链和反义链的 iRNA 试剂, 如上述所定义, 每一正义链和反义链含有至少 15、16、17、18、19、20、21 或 23 个与来自呼吸病毒 (尤其是 RSV 的 P、N 或 L 蛋白基因) 基因的一部分基本上相同的核苷酸的序列。示例的 iRNA 试剂包括含有来自表 1(a-c) 所提供的试剂中的一种中的 15 个或更多个连续核苷酸的 iRNA 试剂。

[0051] iRNA 试剂的反义链在长度上应该等于或至少为 15、16、17、18、19、25、29、40 或 50 个核苷酸。优选的长度范围为 15-30、17 至 25、19 至 23, 以及 19 至 21 个核苷酸。示例的 iRNA 试剂包括来自表 1(a-c) 中的试剂之一的一个反义链的 15 个或更多个核苷酸的试剂。

[0052] iRNA 试剂的正义链在长度上应该等于或至少为 15、16、17、18、19、25、29、40 或 50 个核苷酸。iRNA 试剂的正义链在长度上应该等于或至少为 50、40 或 30 个核苷酸。优选的长度范围为 15-30、17-25、19-23 以及 19-21 个核苷酸。示例的 iRNA 试剂包括来自表 1(a-c) 中的试剂之一的一个正义链的 15 个或更多个核苷酸的试剂。

[0053] iRNA 试剂的双链部分的长度应该等于或至少为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40 或 50 个核苷酸对。该长度应该等于或至少为 50、40、或 30 个核苷酸对。优选的长度范围应该为 15-30、17-25、19-23 以及 19-21 个核苷酸对。

[0054] 表 1(a-c) 中提供的试剂每条链的长度为 21 个核苷酸。所述 iRNA 试剂具有 19 个核苷酸的双链区域, 并且在试剂的每个 3' 末端具有 2 个核苷酸的突出。这些试剂可采用本文所述方式进行修饰, 以获得含有至少这些序列 (15 个或更多个连续核苷酸) 的部分和/或对寡核苷酸碱基和连接所进行的修饰的等价试剂。

[0055] 通常, 本发明的 iRNA 试剂包括与 RSV 的 P、N 或 L 蛋白的基因等病毒基因具有足够互补性的区域, 并且核苷酸具有足够的长度, 由此使得 iRNA 试剂或其片段能够介导特定病毒基因的下调。本发明 iRNA 试剂的反义链优选与病毒基因的 mRNA 序列完全互补, 所述病毒基因如本文所述的 RSV 的 P、N 或 L 蛋白的基因。然而, iRNA 试剂与靶基因之间不必完全互补, 但其对应性必须足以使 iRNA 试剂和其断裂产物通过例如 RSV mRNA 的 RNAi 裂解来控制序列特异性沉默。

[0056] 因此, 本发明的 iRNA 试剂包括含有正义链和反义链的试剂, 如下述所定义, 每一正义链和反义链含有至少 16、17 或 18 个与病毒基因 (尤其是 RSV 的 P、N 或 L 蛋白基因) 序列之一基本上相同的核苷酸的序列, 例如为表 1(a-c) 中所提供的试剂, 除了每条链上分别有不多于 1、2 或 3 个核苷酸被其它核苷酸取代 (例如腺苷被尿嘧啶所取代), 同时如下所

述,其实际上仍具有在培养的人类细胞中抑制 RSV 表达的能力。因而这些试剂具有至少 15 个或更多个与病毒基因(尤其是 RSV 的 P、N 或 L 蛋白基因)序列之一相同的核苷酸,但是其与靶病毒 mRNA 序列之间或者其正义和反义链之间引入了 1、2 和 3 个碱基错配。与靶病毒 mRNA 序列(尤其在反义链上的)错配若在末端区域则具有最大容忍性,若存在错配,则优选在一个末端区域或多个末端区域,例如在 5' 和 / 或 3' 末端的 6、5、4 或 3 个核苷酸之内的区域的末端区域存在错配、最优选在正义链 5' 末端的 6、5、4 或 3 个核苷酸之内的区域的末端区域或在反义链的 3' 末端的 6、5、4 或 3 个核苷酸之内的区域存在错配。正义链仅需要与反义链足够互补以保持分子的总体双链特征即可。

[0057] 优选对正义链和反义链进行选择以使 iRNA 试剂如表 1(a-c) 中所示例在分子的一端或两端包括单链或不成对区域。因此, iRNA 试剂含有正义链和反义链,优选正义链和反义链配合成对并含有突出,例如含有一个和两个 5' 或 3' 突出,但优选具有 2~3 个核苷酸的 3' 突出。多数实施方式具有 3' 突出。优选的 siRNA 试剂在 iRNA 试剂的一个或两个末端具有长度为 1-4 个核苷酸、优选 2-3 个核苷酸的单链突出,该单链突出优选为 3' 突出。所述突出可以由一条链长于另一条链所致,也可以由于相同长度的两条链交错排列所致。优选 5' 端进行了磷酸化。

[0058] 双链区域的优选长度为 15-30 之间,更优选的长度为 18、19、20、21、22 和 23 个核苷酸,例如在上述的 siRNA 试剂的范围内。还包括 siRNA 试剂的两条链例如通过共价连接等进行连接的实施方式。用于提供所需的双链区域以及优选的 3' 突出的发夹或其它单链结构也包含在本发明中。

[0059] iRNA 试剂候选物的评价

[0060] iRNA 试剂的候选物可通过其下调靶基因表达的能力来进行评价。例如,可提供 iRNA 试剂候选物使之与已经被、或将要被目的病毒(例如含有靶基因的病毒)感染的细胞(例如人类细胞)相接触。或者,可用表达靶病毒基因的构建体来转染所述细胞,若如此则就不需要病毒感染模型。可对与 iRNA 试剂相接触之前和之后的靶基因表达水平进行比较(例如,对 RNA、蛋白质水平或病毒效价进行比较)。如果确认靶基因表达的 RNA、蛋白质或病毒的量在与 iRNA 试剂相接触后较低,则可确定 iRNA 试剂下调靶基因表达。细胞中靶病毒 RNA 或病毒蛋白的水平或者细胞或组织中病毒效价的水平可通过任意希望的方法来确定。例如,靶 RNA 的水平可通过 Northern 印迹法、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、bDNA 分析、或 RNase 保护法来确定。蛋白水平例如可通过 Western 印迹法或免疫荧光法来确定。病毒效价可通过空斑形成试验来确定。

[0061] 稳定性评价、修饰、以及 iRNA 试剂再检测

[0062] iRNA 试剂候选物可通过稳定性进行评价,例如可通过当将 iRNA 试剂引入受试体的体内时其对核酸内切酶或核酸外切酶裂解的敏感性进行评价。可采用例如通过在受试体的体内发现的成分进行裂解来鉴别对修饰、尤其是裂解敏感位点的方法。

[0063] 当鉴别出对裂解敏感的位点后,可进一步设计和 / 或合成其潜在裂解位点对裂解有抗性的 iRNA 试剂,例如可在裂解位点引入 2' - 修饰(例如 2' -O- 甲基基团)。可再检测进一步设计和 / 或合成的试剂的稳定性,并且可重复该过程直至发现具有所需稳定性的 iRNA 试剂。

[0064] 体内检测

[0065] 如实施例所述,可在动物模型(例如小鼠、大鼠或灵长类等哺乳动物的模型)体内检测经鉴别能够抑制病毒基因表达的 iRNA 试剂的功能。例如,可将 iRNA 试剂施用至动物中,评价 iRNA 试剂的生物分布、稳定性、及其抑制病毒(例如 RSV)基因表达的能力或降低病毒效价的能力。

[0066] 可通过例如注射将 iRNA 试剂直接施用至靶组织中,或采用与施用至人体相同的方式将 iRNA 试剂施用至动物模型体内。如本文所述,所述试剂可优选通过用于治疗病毒感染的方式,即吸入方式进行施用。

[0067] 还可对 iRNA 试剂的胞内分布进行评价。该评价可包括对 iRNA 试剂是否被吸收至细胞内进行确定的内容。该评价也可包括对 iRNA 试剂的稳定性(例如半衰期)进行确定的内容。iRNA 试剂的体内评价可通过使用与可示踪的标记物(例如荧光素等荧光标记物;³⁵S、³²P、³³P 或 ³H 等放射标记物;金颗粒;或用于免疫组织化学的抗原颗粒)相结合的 iRNA 试剂来进行,或可通过其它适宜的检测方法来进行。

[0068] 可对 iRNA 试剂下调病毒基因表达的能力进行评价。可通过例如原位杂交、或从组织中分离与 iRNA 试剂相接触前与接触后的 RNA 来对病毒基因在体内表达的水平进行测定。当需要处死所述动物以获取组织时,与未经处理的对照动物进行比较。可利用任意所希望的方法来检测靶病毒 mRNA,所述方法包括但不限于 RT-PCR、Northern 印迹法、分支 DNA 测定、RNA 酶保护测定。另外地、或者附加地,可通过利用以 iRNA 试剂进行处理的组织提取物进行 Western 印迹分析或通过 ELISA 来对病毒基因表达进行监测。可利用 pfu 检测来确定病毒效价。

[0069] iRNA 化学

[0070] 本文对介导 RNAi 抑制病毒基因(例如 RSV P 蛋白基因)表达的分离的 iRNA 试剂(例如 ds RNA 试剂)进行描述。

[0071] 本处所讨论的 RNA 试剂包括未另外进行修饰的 RNA 和经修饰以改善其效力的 RNA,还包括核苷代用物的聚合物。未进行修饰的 RNA 指的是核酸的成分即糖、碱基以及磷酸部分与天然存在的、优选与人体中自然存在的成分相同或基本上相同的分子。现有技术中将稀有的或不平常的、但为天然存在的 RNA 作为经修饰的 RNA,该内容例如参见 Limbach et al., (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 :2183-2196。通常被称作经修饰的 RNA 的这种稀有的或不平常的 RNA(显然是由于这些通常为转录后修饰的产物)是属于本文术语“未经修饰的 RNA”的范畴之内。本文所述的经修饰的 RNA 指的是核酸的成分即糖、碱基以及磷酸部分与天然存在的、优选与人体中自然存在的成分不同的分子。尽管它们被称作经修饰的“RNA”,但是由于所进行的修饰的不同它们也当然可以包括不是 RNA 的分子。核苷代用物为核糖磷酸骨架被非核糖磷酸构件物所取代的分子,该构建物可使碱基存在于正确的空间关系中,由此使得杂交与同核糖磷酸骨架(例如,不带电荷的核糖磷酸骨架模拟物)的杂交基本上是相似的。本文对上述每一个的示例进行讨论。

[0072] 可将本文所述的修饰掺入至本文所述的任意的双链 RNA 以及 RNA 样分子(例如 iRNA 试剂)中。可优选对 iRNA 试剂的反义链和正义链均进行修饰。由于核酸为亚基或单体的聚合物,因而下面所述的修饰出现在核酸内重复出现的位置,所述修饰例如为对碱基、或磷酸部位、或磷酸部位的非连接性 O 的修饰。在一些情况下,所述修饰可在核酸的所有主体位置出现,但在许多(实际上为大部分)情况下却并非如此。例如,修饰可仅存在于 3'

或 5' 末端区域、可以仅存在于例如末端核苷酸的末端区域或仅存在于链的最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸的末端区域。修饰可在双链区域发生、在单链区域发生、或在两种区域同时发生。例如,非连接性 O 位置的硫代磷酸酯修饰可以仅发生于一个末端或两个末端、可以仅发生于例如末端核苷酸的末端区域或仅发生于链的最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸的末端区域,或者可以仅发生于单链和双链区域、尤其是其末端。类似地,修饰可发生于正义链、反义链、或者在正义链和反义链上同时发生。在一些情况下,正义链和反义链具有相同的修饰或具有相同类型的修饰,但在另一些情况下,正义链和反义链会具有不同的修饰,例如,在一些情况下需要仅对一条链进行修饰,例如仅对正义链进行修饰。

[0073] 向 iRNA 试剂中引入修饰的两个主要目的在于在生物学环境下具有对降解的稳定性以及对诸如药效学特性等药理学特性的改善,这些将在下文进一步讨论。对 iRNA 试剂中的糖、碱基或骨架所进行的其它适宜的修饰在 2004 年 1 月 16 日所提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/01193 中有所描述。iRNA 试剂中可以包括非天然存在的碱基,例如在 2004 年 4 月 16 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/011822 所描述的碱基。iRNA 试剂中可以包括非天然存在的糖,例如可以包括非碳水化合物环状载体分子。用于 iRNA 试剂中的非天然存在的糖的示例特性在 2003 年 4 月 16 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/U829 中有所描述。

[0074] iRNA 试剂可以包含用于增加核酸酶抗性的核苷酸间连接(例如手性核糖磷酸连接)。此外,或者可选择地,iRNA 试剂可以包含核糖模拟物以增加核酸酶抗性。用于增加核酸酶抗性的示例性的核苷酸间连接以及核糖模拟物在 2004 年 3 月 8 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/07070 中有所描述。

[0075] iRNA 试剂可以包括连接配体的单体亚基和用于寡核苷酸合成的单体。示例性的单体在 2004 年 8 月 10 日提交的共有美国申请 No. 10/916, 185 中有所描述。

[0076] iRNA 试剂可以具有 ZXY 结构,所述结构例如在 2004 年 3 月 8 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/07070 有所描述。

[0077] iRNA 试剂可以与两性结构域进行结合。iRNA 试剂中所用的示例性的两性结构域在 2004 年 3 月 8 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/07070 中有所描述。

[0078] 在另一实施方式中,iRNA 试剂可与具有组件联合体性质的递送试剂进行组合。所述联合体可以包括与一个或多个(优选两个或多个,更优选都为 3 个)下述(a)、(b)和(c)相连的载体试剂:(a)浓缩试剂(例如,能够通过例如离子相互作用或静电相互作用来吸引(如结合)核酸的试剂;(b)融合试剂(例如,能够融合和/或被通过细胞膜运输的试剂;以及(c)靶基团,例如为细胞或组织靶试剂,该靶基团例如为植物凝集素、糖蛋白、脂或蛋白质,例如为与特定的细胞类型结合的抗体。与递送试剂相复合的 iRNA 试剂在 2004 年 3 月 8 日所提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/07070 中有所描述。

[0079] iRNA 试剂可以具有非规范性的配对,例如在 iRNA 双链体(duplex)的正义序列和反义序列之间的配对。非规范性 iRNA 试剂的示例性特征在 2004 年 3 月 8 日提交的共有 PCT 申请 No. PCT/US2004/07070 中有所描述。

[0080] 增强的核酸酶抗性

[0081] 诸如靶向作用于 RSV 的 iRNA 试剂等 iRNA 试剂可以具有增强的核酸酶抗性。

[0082] 对于增强的核酸酶抗性和/或对目标的结合亲和力,iRNA 试剂(例如 iRNA 试剂的

正义和 / 或反义链) 例如可以包括 2'- 修饰的核糖单元和 / 或硫代磷酸酯键。例如, 2'- 羟基基团 (OH) 可被多种不同的“氧”或“脱氧”取代基所替换或修饰。

[0083] “氧”-2'-羟基基团修饰的示例包括烷氧基或芳氧基 (OR, 例如 R = H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖); 聚乙二醇 (PEG); $0(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$; 锁核酸 (LNA), 该锁核酸中, 2'-羟基例如通过亚甲基桥与同一核糖的 4' 碳相连接; 0-胺和氨基烷氧基、 $0(\text{CH}_2)_n$ 胺, (例如, 胺 = NH_2 、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基氨基、芳氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、或二杂芳基氨基、己二胺、多胺)。值得注意的是, 与采用强的硫代磷酸酯进行修饰的寡核苷酸相比, 仅含有甲氧乙基基团 (MOE)、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$, PEG 衍生物) 的寡核苷酸表现出核酸酶稳定性。

[0084] “脱氧”修饰包括氢 (即, 脱氧核糖, 其与部分 ds RNA 的突出部分具有特别相关性); 卤 (例如氟); 氨 (例如 NH_2 、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基、或氨基酸); $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -胺 (胺 = NH_2 、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基氨基、芳氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基), $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (R = 烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖), 氰基、巯基; 烷基-硫-烷基; 硫代烷氧基; 和烷基、环烷基、芳基、烯基和炔基, 其可任意被例如氨基官能团所任意取代。

[0085] 优选的取代基为 2'-甲氧基乙基、2'- OCH_3 、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基以及 2'-氟。

[0086] 增加抗性的一个方法如 2004 年 5 月 4 日提交的共有美国申请 No. 60/559, 917 中所描述, 鉴别出裂解位点并对该位点进行修饰以抑制裂解。例如, 二核苷酸 5'-UA-3', 5'-UG-3', 5'-CA-3', 5'-UU-3' 或 5'-CC-3' 可作为裂解位点。因此可通过对 5' 核苷酸进行修饰来增强核酸酶抗性, 从而使例如至少一个 5'-腺苷-腺嘌呤-3' (5'-UA-3') 二核苷酸中的腺苷为 2'-修饰核苷酸; 至少一个 5'-腺苷-鸟嘌呤-3' (5'-UG-3') 二核苷酸中的 5'-腺苷为 2'-修饰核苷酸; 至少一个 5'-胞苷-腺嘌呤-3' (5'-CA-3') 二核苷酸中的 5'-胞苷为 2'-修饰核苷酸; 至少一个 5'-腺苷-腺苷-3' (5'-UU-3') 二核苷酸中的 5'-腺苷为 2'-修饰核苷酸; 或至少一个 5'-胞苷-胞苷-3' (5'-CC-3') 二核苷酸中的 5'-胞苷为 2'-修饰核苷酸。iRNA 试剂可以包括至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或至少 5 个这样的二核苷酸。在某些实施方式中, iRNA 试剂中的所有嘧啶具有 2'-修饰因此 iRNA 试剂对核酸内切酶具有增强的抗性。

[0087] 为使核酸酶抗性最大化, 可将 2'-修饰与一个或多个磷酸连接子 (例如硫代磷酸酯) 修饰共同使用。所谓“嵌合”寡核苷酸是指包含两个或多个不同的修饰的寡核苷酸。

[0088] 寡核苷酸骨架中若包含呋喃糖则也能降低核酸内切酶性的裂解。iRNA 试剂可通过引入 3' 阳离子基团而被进一步修饰、或通过利用 3'-3' 连接来在 3'-末端对核苷进行转化而被进一步修饰。在另外的替代方式中, 3'-末端可被诸如 3'-C5-氨基烷基 dT 等氨基烷基来封闭。其它 3' 结合可抑制 3'-5' 核酸外切酶性的裂解。尽管不希望囿于任何理论, 但是诸如萘普生或布洛芬等 3' 结合物可通过空间上阻碍核酸外切酶与寡核苷酸的 3'-末端相结合来抑制核酸外切酶性的裂解。甚至小的烷基链、芳基基团、或杂环结合物或修饰的糖 (D-核糖, 脱氧核糖, 葡萄糖等) 也能阻碍 3'-5'-核酸外切酶。

[0089] 类似地, 5' 结合物能抑制 5'-3' 核酸外切酶性的裂解。尽管不希望囿于任何

理论,但是诸如萘普生或布洛芬等 5' 结合物可通过空间上阻碍核酸外切酶与寡核苷酸的 5' - 末端相结合来抑制核酸外切酶性的裂解。甚至小的烷基链、芳基基团、或杂环结合物或修饰的糖 (D- 核糖, 脱氧核糖, 葡萄糖等) 也能阻碍 3' -5' - 核酸外切酶。

[0090] 当双链化的 iRNA 试剂包含在至少一个末端具有突出的单链核苷酸突出时, iRNA 试剂可以对核酸酶具有增强的抗性。在优选的实施方式中, 核苷酸突出包括 1-4 个、优选 2-3 个未成对的核苷酸。在一个优选的实施方式中, 直接与末端核苷酸对相连接的单链突出的未成对核苷酸具有嘌呤碱基, 并且末端核苷酸对为 G-C 对, 或最末的 4 对互补核苷酸对中有至少两对为 G-C 对。在进一步的实施方式中, 核苷酸突出可以具有 1 或 2 个未成对核苷酸, 在一个示例性的实施方式中, 所述核苷酸突出为 5' -GC-3'。在优选的实施方式中, 核苷酸突出在反义链的 3' - 末端。在一个实施方式中, iRNA 试剂在反义链的 3' - 末端包括 5' -CGC-3' 基序, 从而形成 2-nt 突出 5' -GC-3'。

[0091] 由此, iRNA 试剂可以包含用以抑制诸如在受试体的体内发现的核酸内切酶或核酸外切酶等核酸酶的降解的修饰物。本文将这些单体称作 NRM 或核酸酶抗性促进单体, 并将相应的修饰称为 NRM 修饰。在许多情况下, 这些修饰也可调节 iRNA 试剂的其它特性, 所述特性例如为: 与转运蛋白 (例如血清白蛋白) 等蛋白或与 RISC 的成员相互作用的能力, 或者第一和第二序列形成双链体的能力或与诸如靶分子等另一序列形成双链体的能力。

[0092] 可向 iRNA 试剂中、或向 iRNA 试剂的一个序列中引入一个或多个不同的 NRM 修饰。NRM 修饰可在一个序列中或在一个 iRNA 试剂中使用 1 次以上。

[0093] NRM 修饰中包括一些仅可存在于末端的修饰以及另一些可存在于任何位置的修饰。一些可抑制杂交的 NRM 修饰优选仅用于末端区域, 更优选不用于靶向主体序列或基因的序列中 (特别是反义链中) 的裂解位点或裂解区域。它们可用于正义链的任意位置, 只要 ds iRNA 试剂的两条链间的杂交可得到足够维持即可。在一些实施方式中, 优选将 NRM 置于正义链的裂解位点或裂解区域, 由此能使脱靶效应最小化。

[0094] 在多数情况下, NRM 修饰可进行不同的分配, 该分配取决于它们是包含在正义链中还是包含在反义链中。如果包含在反义链中, 则不应将干扰或抑制核酸内切酶裂解的修饰插入到经受 RISC 介导的裂解的区域 (例如裂解位点或裂解区域) 中 (如 Elbashir et al., 2001, Genes and Dev. 15:188 中所述, 将其以参考的方式插入本文)。目标的裂解发生在 20 或 21nt 的反义链的大致中间位置, 或发生在靶 mRNA (其与反义链互补) 的第一核苷酸的上游的约 10 或 11 核苷酸处。本文所述裂解位点指的是在裂解位点的任意一边的核苷酸, 该核苷酸在靶 mRNA 上、或在与之杂交的 iRNA 试剂链上。裂解区域指的是在裂解位点的任意方向内的 1 个、2 个或 3 个核苷酸。

[0095] 该修饰可被引入至末端区域中, 例如引入至靶向作用于受试体的序列或未靶向作用于受试体的序列的末端位置或引入至末端的 2、3、4 或 5 位置内。

[0096] 束缚配体 (Tethered Ligands)

[0097] iRNA 试剂的性质 (包括其药理学性质) 例如可通过引入诸如束缚配体等配体来进行影响和定制。

[0098] 可将配体等多种构成要素束缚至 iRNA 试剂中, 例如, 束缚至配体结合单体亚基的载体中。在下文中描述了配体结合单体亚基的示例, 但其仅为优选例, 构成要素也可在其它位置连接到 iRNA 试剂上。

[0099] 优选的组成成分为配体,其可通过一个插入束缚物而直接或间接地连接(优选共价连接)至载体。在优选的实施方式中,配体通过插入束缚物连接至载体。当将结合配体的单体被引入至生长链中时,配体或束缚配体可以存在于结合配体的单体上。在一些实施方式中,当已将“前体”性配体结合单体亚基引入至生长链后,可将配体引入至“前体”性配体结合单体亚基中。例如,可将具有例如氨基末端束缚的单体(例如 $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$) 插入至生长的正义或反义链中。在随后的操作中,即,在将前体性单体亚基插入至链中以后,可随后使具有亲电基团(例如五氟苯酯或醛基)的配体通过将配体的亲电基团与前体性配体结合单体亚单元束缚物的末端亲核基团相连接的方式连接至前体性配体结合单体。

[0100] 在优选的实施方式中,配体改变其所引入的 iRNA 试剂的分布、靶向作用或半衰期。在优选的实施方式中,与例如与不存在该配体的种类相比,配体提供针对选定的目标物的增强的亲和性,所述选定的目标物例如为分子、细胞或细胞型、细胞腔室或器官腔室等腔室(compartment)、组织、器官或部位。

[0101] 优选的配体可改善所得天然或修饰寡核糖核酸、或含有本文所述单体和/或天然或经修饰的寡核糖核苷酸的任意组合的多聚分子的转运、杂交和特异性的性质并可改善其核酸酶抗性。

[0102] 配体通常包括例如用于促进吸收的治疗调节物;例如用于监测分布的诊断化合物或报道基团;交联剂;赋予核酸酶抗性的结构部分;以及天然或不常见的核酸碱基。通常的示例包括亲脂性分子、脂质、植物性凝集素、类固醇(例如熊果醇、hecigenin、薯蓣皂苷元)、萜烯(例如三萜烯,如菝葜皂苷元、木栓酮、表木栓醇衍生的石胆酸)、维生素、碳水化合物(例如右旋糖苷、普鲁兰多糖、甲壳质、壳聚糖、菊糖、环糊精或透明质酸)、蛋白质、蛋白结合试剂、整合素靶向性分子、聚阳离子、肽、多胺以及肽类似物。

[0103] 所述配体可以为天然存在的、重组的或合成的分子,例如可为合成多聚氨基酸等合成聚合物。多聚氨基酸的示例包括多氨基酸为多聚赖氨酸(PLL)、多聚 L-天冬氨酸、多聚 L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、多聚(L-丙内酯-共-乙二醇化)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物、或聚磷嗪。多胺的示例包括:聚乙烯亚胺、多聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽多胺、拟肽类多胺、树枝状高分子多胺、精氨酸、脘、鱼精蛋白;阳离子结构部分,例如阳离子化脂质、阳离子化卟啉、多胺的季胺盐;或为 α 螺旋肽。

[0104] 配体还可包括靶基团,例如促甲状腺素、促黑细胞激素、表面活性蛋白 A、黏蛋白糖、糖基化多氨基酸、转铁蛋白、双磷酸酯、多聚谷氨酸盐、多聚精氨酸盐、或为 RGD 肽或 RGD 肽类似物等细胞或组织靶向性试剂。

[0105] 配体可以为蛋白,例如可以为糖蛋白、低密度脂蛋白(LDL)等脂蛋白、人血清白蛋白(HSA)等白蛋白、例如作为对共配体具有特异性亲和力分子等的肽、例如与癌细胞等特异的细胞类型相结合的抗体等抗体、内皮细胞或骨细胞。配体还可包括激素或激素受体。它们也可包括非肽类,例如辅助因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、多价甘露糖或多价海藻糖。配体例如可以为脂多糖、p38 MAP 激酶的活化剂、或 NF- κ B 的活化剂。

[0106] 所述配体例如可为药物等物质,其可通过例如干扰细胞的细胞骨架(例如,通

过干扰细胞的微管蛋白、微丝和 / 或中间纤丝) 而增加 iRNA 试剂被吸收至细胞中的量。所述药物例如可为紫杉醇 (taxon)、长春新碱、长春碱、细胞分裂抑素、诺考达唑、iaplakinolide、latrunculin A、鬼笔毒环肽、swinholid A、indanocine 或 myoservin。

[0107] 在一方面来说,所述配体为脂质或基于脂质的分子。该脂质或基于脂质的分子优选与例如人血清白蛋白 (HSA) 等血清蛋白相结合。其它能与 HAS 结合的分子可被用作配体。例如,可使用 neproxin 或阿司匹林。脂质或基于脂质的分子可以:(a) 增加结合物对降解的抗性;(b) 增加对靶细胞或细胞膜的靶向性或增加向靶细胞或细胞膜的运输;和 / 或 (c) 能用于调节与诸如 HAS 等血清蛋白的结合。

[0108] 基于脂质的配体可被用于调节(例如控制)结合物与靶组织的结合。例如,与 HSA 的结合能力更强的脂质或基于脂质的配体不容易对肾具有靶向性,因此不易从机体中被清除出去。与 HSA 的结合能力弱一些的脂质或基于脂质的配体可用于靶向作用于肾的结合物。

[0109] 在一个优选的实施方式中,基于脂质的配体与 HAS 结合。优选地,其以足够的亲和性与 HAS 结合从而使结合物会更优选分布至非肾组织中。然而,优选所述亲和性并未强到 HAS-配体的结合不能被逆转的程度。

[0110] 在另一方面,所述配体为一结构部分,该部分例如为可通过靶细胞(例如增殖细胞)进行吸收的维生素或营养物。这些对以不需要的例如恶性或非恶性型的细胞增殖为特性的疾病(例如癌症)的治疗是非常有用的。示例的维生素包括维生素 A、E 和 K。其它示例性的维生素包括 B 族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其它被癌症细胞所吸收的维生素或营养物。

[0111] 在另一方面,所述配体为细胞渗透剂,优选为螺旋状细胞渗透剂。优选所述试剂为两性的。示例性的试剂为 Tat 肽或触角足肽 (antennapedia)。如果所述试剂为肽,则其可被修饰,包括肽基模拟物、反演体 (invertomer)、非肽或假肽连接物、以及使用 D-氨基酸。螺旋状试剂优选为 α 螺旋试剂,其优选具有亲脂相和疏脂相。

[0112] 5' - 磷酸酯修饰

[0113] 在优选的实施方式中,iRNA 试剂被 5' 磷酸化或在 5' 起始端包括磷酰基类似物。对反义链的 5' - 磷酸酯修饰包括与 RISC 介导的基因沉默相一致的修饰。适宜的修饰包括:5' - 单磷酸酯 ((HO)2(O)P-O-5') ;5' - 双磷酸酯 ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ;5' - 三磷酸酯 ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ;5' - 鸟苷加帽 (7-甲基化或非甲基化) (7m-G-O-5' -(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ;5' - 腺苷加帽 (Appp)、以及任意的修饰或未修饰的核苷酸加帽结构。其它适宜的 5' - 磷酸酯修饰对本领域技术人员来说是已知的。

[0114] 可对正义链进行修饰以使正义链失活从而抑制活性 RISC 的形成,由此来潜在地降低脱靶效应。这可通过抑制正义链的 5' - 磷酸化(例如,通过以 5' -O-甲基核糖核苷酸)来完成(参见 Nykanen et al, (2001)ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107,309-321.)。也可使用抑制磷酸化的其它修饰,例如,仅以 H 而不是 O-Me 来取代 5' -OH。或者,可向 5' - 磷酸酯加入一大体积基团从而将其转化为磷酸二酯连接物。

[0115] iRNA 试剂向组织和细胞的递送

[0116] 剂型

[0117] 本文所述 iRNA 试剂可配制为用于施用至受试体的剂型, 优选配制为通过吸入施用 / 鼻内施用的方式而局部施用至肺和鼻通道 (呼吸组织) 的剂型或配制为例如注射等肠胃外施用的剂型。

[0118] 为了便于说明, 在本部分大都采用未经修饰的 iRNA 试剂来对剂型、组合物和方法进行讨论。然而应当理解, 这些剂型、组合物和方法可用于其它 iRNA 试剂, 例如可用于修饰的 iRNA 试剂, 这些应用也在本发明的范围内。

[0119] 经配制的 iRNA 试剂组合物可以采用多种状态。在一些示例中, 所述组合物至少部分为结晶状、全部为结晶状和 / 或无水的 (例如, 少于 80、50、30、20 或 10% 的水)。在另一示例中, 所述 iRNA 试剂处于水相中, 例如处于包含水的溶液中, 这种剂型为通过吸入进行施用的优选剂型。

[0120] 可将水相或结晶状组合物引入至递送载体中, 所述递送载体例如为脂质体 (尤其对于水相)、或为颗粒 (例如, 微粒对结晶组合物是适宜的)。通常, iRNA 试剂组合物按照与所需的施用方式相一致的方法进行配制。

[0121] iRNA 试剂的制备可与另一试剂组合来进行配制, 所述另一试剂例如为另一治疗剂, 或为稳定 iRNA 试剂的试剂 (例如为与 iRNA 试剂相结合以生成 iRNP 的蛋白)。其它试剂还包括诸如 EDTA (例如用于除去 Mg^{2+} 等二价阳离子) 等螯合物、盐、RNA 酶抑制剂 (例如 RNAsin 等广义特异性的 RNA 酶抑制剂) 等等。

[0122] 在一个实施方式中, iRNA 试剂的制备物包括另一种 iRNA 试剂, 例如包括能够介导针对第二基因的 RNAi 的第二 iRNA 试剂。另一种制备物还包括至少三种、五种、十种、二十种、五十种、一百种或更多种不同的 iRNA 种类。在一些实施方式中, 这些试剂针对同一病毒的不同的靶序列。在另一实施方式中, 每一 iRNA 试剂针对不同的病毒。如实施例中所证明, 通过同时、或以很近的时间间隔共施用两种 iRNA 试剂 (每种针对所要处理的病毒中的一种), 可抑制一种以上的病毒。

[0123] 处理方法和递送途径

[0124] 可通过多种途径将包含本发明 iRNA 试剂 (例如靶向作用于 RSV 的 iRNA 试剂) 的组合物递送至受试体中。示例性的途径包括吸入、静脉、鼻腔或口腔施用。用于施用本发明的 iRNA 试剂的优选方式是通过直接施用至肺和鼻通道的方式或通过肠胃外施用的全身施用方式。

[0125] 可将 iRNA 试剂掺入至适于施用的药物组合物中。例如, 组合物可包含一种或多种 iRNA 试剂和药学可接受载体。本文所述“药学可接受载体”用以任意包括所有可用于药物施用的溶剂、分散介质、涂覆物、抗菌及抗真菌试剂、等渗剂及吸收延迟试剂等。该类用于药学活性成分的介质和试剂对本领域技术人员来说是公知的。除了任意常规的介质或试剂可用于活性化合物以外, 还考虑其在组合物中的应用。辅助性活性化合物也可掺入至所述组合物中。

[0126] 本发明的药物组合物可以以多种途径进行施用, 这取决于是要进行局部治疗还是全身治疗, 并取决于所要治疗的部位。所述施用可为局部施用 (包括鼻内施用或肺内施用)、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉滴注、皮下注射、腹腔内注射或肌肉注射。

[0127] 通常, 本发明的 iRNA 试剂的递送是使 iRNA 试剂完成递送至受试体内的感染部位

的过程。完成该递送的优选方式可通过局部施用至肺或鼻通道,例如通过吸入、喷雾或鼻内施用递送至呼吸组织,或通过例如肠胃外施用进行全身施用。

[0128] 用于吸入或肠胃外施用的剂型对本领域技术人员来说是已知的。所述剂型可以包含无菌水溶液,该溶液中也可含有缓冲液、稀释液以及其它适宜的添加剂,其示例例如为溶于水中的5%的PBS或葡萄糖。为进行静脉内使用,应对溶质的浓度进行控制以使其保有制剂的等渗性。

[0129] 本文所公开的活性化合物优选通过任意适宜的方式施用至受试体的肺或鼻通道。可通过施用含有一种或多种活性化合物的可呼吸性颗粒(其被受试体吸入)的气溶胶混悬剂来完成对活性化合物的施用。活性化合物可被气溶胶化为多种形式,例如:干粉吸入剂、既定剂量的吸入剂(metered dose inhalant)、或液体/液体混悬液,但不限于此。可呼吸性颗粒可以为液体或固体。如U. S. Pat. No. 4, 501, 729中所述,所述颗粒可与选定的化合物一起任选包含的诸如阿米洛利、benzamil 或 phenamil 等可有效抑制从通道粘液分泌物中再吸收水的量的其它治疗成分。

[0130] 颗粒状的药物组合物可任选与载体结合以协助分散或转运。可以以任意适宜的比例(例如1:1的重量比)将诸如糖等(例如葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇等)适宜的载体与一种或多种活性化合物相混合。

[0131] 含有用于实施本发明的活性成分的颗粒应包括可呼吸尺寸的颗粒,也即,颗粒的尺寸足够小从而可通过嘴或鼻以及喉进行吸入并能进入支气管及肺的肺泡。通常优选颗粒的尺寸为约1至10微米(更特别地,尺寸小于5微米)。气溶胶中所含有的具有不可呼吸的尺寸的颗粒易于陈迹于喉咙并被吞咽下去,因此优选使气溶胶中的不可呼吸性颗粒的数量最小化。对于鼻施用来说,为保证其存在于鼻腔中,优选使颗粒尺寸处于100-500微米的范围。

[0132] 用于生产气溶胶的活性化合物的液态药物组合物可通过将活性化合物与诸如无菌无热源水等适宜的赋形剂进行组合来制备。用于实施本发明的高渗盐水溶液优选为无菌无热源的溶液,含有1~15重量%生理学可接受的盐,并优选含有3~7重量%生理学可接受的盐。

[0133] 可通过任意适宜的方式来制备含有活性化合物的液体颗粒的气溶胶,例如可使用压力驱动的喷射式喷雾器或超声波喷雾器。该内容例如可参见U. S. Pat. No. 4, 501, 729。喷雾器为可商购获得的装置,其通过对压缩气体(通常为空气或氧)进行加速的形式或通过超声搅拌的形式将活性成分的溶液或混悬液转化为药学气溶胶喷雾。

[0134] 用于喷雾器的适宜的剂型配方由液态载体和活性成分所组成,活性成分的含量最高为剂型配方的40% w/w,但优选低于20% w/w。载体通常为水(最优选为无菌无热源水)或稀释的水性醇溶液,优选为等渗载体,但可以通过加入例如氯化钠使其成为相对体液为高渗的载体。任选的添加剂包括诸如羟苯甲酯防腐剂(所述剂型配方不是无菌制作时使用)、抗氧化剂、矫味剂、挥发油、缓冲剂及表面活性剂。

[0135] 含有活性成分的固体颗粒的气溶胶可以采用任意的固体颗粒治疗剂气溶胶发生器类似地进行制造。用于向受试体施用固体颗粒治疗剂的气溶胶发生器以适于人施用的速度产生可呼吸性的颗粒并生成含有预定剂量的治疗剂的一定体积的气溶胶。固体颗粒气溶胶发生器的一个示例性的类型是吹入器。用于通过吹入法进行施用的适宜的剂型配方包括

精细粉碎的粉末,其可通过吹入器进行递送,或可通过鼻吸药的方式被吸收至鼻腔。在吹入器中,使粉末(例如,有效进行本文所述治疗的技术剂量的粉末)包含在通常由明胶或塑料所制成的胶囊或小盒(cartridge)中,所述胶囊或小盒在原位被刺穿或打开,进行吸入以使粉末受空气吸引而通过装置,并进行递送,或者通过手工操纵的泵进行递送。装入吸药器中的粉末可单独由活性成分组成,或者由含有活性成分、诸如乳糖等适宜的粉末稀释剂、以及任选的表面活性剂的粉末混合物组成。剂型配方中通常含有0.1至100w/w的活性成分。

[0136] 第二种类型的示例性气溶胶发生器包含既定剂量的吸入器。既定剂量的吸入器为加压的气溶胶分配器,通常在液化推进物中含有活性成分的混悬液或溶液剂型。使用这些装置时,可通过阀门来释放制剂以使得制剂的递送为既定体积(通常为10至200 μ l)从而制备含有所述活性成分的颗粒喷雾。适宜的推进器包括例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷及其混合物等的一些含氯氟烃化合物。所述制剂还可进一步含有一种或多种共溶剂(例如乙醇)、表面活性剂(例如油酸或脱水山梨醇三油酸酯)、抗氧化剂和适宜的矫味剂。

[0137] 施用可由受试体或诸如护理者等其它人来进行。护理者可为对人提供看护或照顾的任何主体。例如,医院、收容所、医生诊所、门诊病人的门诊部;诸如医生、护士或其它的开业医生等医疗工作者;或为配偶或父母等监护人。可以定量的剂量来提供药物治疗,或采用递送计数剂量的分配器来提供药物治疗。

[0138] 术语“治疗有效量”指的是组合物所存在的下述量:该量用以在待治疗的受试体中提供所需水平的药物的组合物从而获得预期的生理学反应。在一个实施方式中,将治疗有效量的两种或多种 iRNA 试剂(每种分别作用于例如 RSV 等不同的呼吸性病毒)共同施用至受试体。

[0139] 术语“生理有效量”指的是递送至受试体中从而产生所需的缓解或治疗效果的量。

[0140] 术语“药学可接受载体”指的是所述载体可被吸收至肺中而不会对肺造成显著的毒副作用。

[0141] 术语“共施用”指的是将两种或多种试剂、尤其是两种或多种 iRNA 试剂施用至受试体中。所述试剂可以包含在单一的药物组合物中并可以同时施用,或者所述试剂可以包含在分离的剂型配方中并可以顺序施用至受试体中。只要两种试剂可同时在受试体体内被检测到,就可以说这两种试剂是同时施用的。

[0142] 可用作载体的药物赋形剂的种类包括:诸如人血清白蛋白(HSA)等稳定剂;诸如碳水化合物、氨基酸和多肽等填充剂;pH调整剂或缓冲剂;诸如氯化钠等盐类;等等。这些载体可以为结晶型或为无定形,或为这两种的混合物。

[0143] 特别有价值的填充剂包括相容性的碳水化合物、多肽、氨基酸或上述物质的组合。适宜的碳水化合物包括:半乳糖、D-甘露糖、山梨糖等单糖;乳糖、海藻糖等二糖;2-羟基丙基- β -环糊精等环糊精;棉子糖、麦芽糊精、右旋糖苷等多糖;甘露醇、木糖醇等醛醇;等等。碳水化合物的优选的组中包括乳糖、海藻糖、棉子糖、麦芽糊精以及甘露醇。适宜的多肽包括天门冬酰苯丙氨酸甲酯。氨基酸包括丙氨酸和甘氨酸,优选甘氨酸。

[0144] 适宜的pH调节剂和缓冲剂包括例如柠檬酸钠、抗坏血酸钠等利用有机酸和碱制备的有机盐,优选柠檬酸钠。

[0145] 剂量。iRNA试剂可以小于约75mg/千克体重的单位剂量进行施用,或以小于约70,

60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 或 0.0005mg/ 千克体重的剂量进行施用, 以及以小于 200nmol 的 iRNA 试剂 (例如约 4.4×10^{16} 拷贝 (copies))/ 千克体重的剂量进行施用或以小于 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15, 0.075, 0.015, 0.0075, 0.0015, 0.00075, 0.00015nmol 的 iRNA 试剂 / 千克体重的剂量进行施用。所述单位剂量例如可通过吸入剂量或喷雾或注射进行施用。在一个实施例中, 使用 .02-25mg/kg 的剂量。

[0146] 将 iRNA 试剂直接递送至肺或鼻通道的剂量可以为约 1mg ~ 约 150mg/ 鼻通道。

[0147] 所述剂量可以为对疾病或紊乱状态有效进行治疗或预防的量。

[0148] 在一个实施方式中, 单位剂量每天施用一次。在另外的用法中, 单位剂量在第一天施用两次, 然后每天施用一次。或者, 单位剂量可以少于每天一次, 例如少于每 2、4、8 或 30 天一次。在另外的实施方式中, 单位剂量并不按频率 (例如, 定期频率) 施用。例如, 单位剂量可以单次施用。由于 iRNA 试剂介导的沉默可以在 iRNA 试剂组合物施用后持续几天的时间, 因而在许多情况下, 可以以少于每天一次的频率来施用所述组合物, 或者, 在一些情况下, 可在整个治疗方案中仅施用一次。

[0149] 在一个实施方式中, 对受试体施用一次起始剂量以及一次或多次维持剂量的 iRNA 试剂, 所述 iRNA 试剂例如为双链 iRNA 试剂或 siRNA 试剂 (例如, 诸如能够被加工为 siRNA 试剂的较大的 iRNA 试剂等前体、或为能够编码诸如双链 iRNA 试剂或 siRNA 试剂 iRNA 试剂的 DNA、或其前体等)。维持剂量 (一种或多种) 通常低于起始剂量, 例如为起始剂量的一半以下。维持方式可以包括以 $0.01 \mu\text{g} \sim 75\text{mg}/\text{千克体重}/\text{天}$ 的剂量范围内的一种或多种剂量对受试体进行处理, 该剂量例如可以为 70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001 或 $0.0005\text{mg}/\text{千克体重}/\text{天}$ 。维持剂量优选以不高于每 5 ~ 14 天一次的频率进行施用。进一步, 该治疗方案可以持续一段时间, 该时间取决于特定的疾病、疾病的严重性以及患者的整体情况。在优选的实施方式中, 所述剂量可以以不高于每天一次 (例如不高于每 24、36、48 或更多小时一次, 如不高于每 5 或 8 天一次) 的频率进行递送。在治疗后, 可对其情况的变化进行监测并对疾病症状的缓解进行监测。当患者对当前剂量水平没有明显反应时, 可增加所述化合物的剂量; 或者当已经观察到疾病症状的缓解、或疾病状态已经消失、或观察到不希望出现的副作用时, 应当减少所述剂量。

[0150] 在以一个实施方式中, iRNA 试剂的药物组合物包含多种 iRNA 试剂。所述多种 iRNA 试剂可以具有与天然存在的靶序列 (例如 RSV 基因的靶序列) 不重叠、不毗邻的序列。在另一个实施方式中, 多种 iRNA 试剂对不同天然存在的靶基因具有特异性。例如, 对 RSV 的 P 蛋白基因具有靶向性的 iRNA 试剂可与对另一不同基因 (例如 N 蛋白基因) 具有靶向性的 iRNA 试剂存在于同一药物组合物中。在另一个实施方式中, iRNA 试剂对多种病毒 (例如 RSV) 具有特异性。

[0151] iRNA 试剂组合物的浓度为对治疗或预防人类的病症或调节生理状况足够有效的量。所施用的 iRNA 试剂的浓度或量取决于试剂所确定的参数以及施用方法 (例如鼻施用、口腔施用或肺施用)。例如, 鼻施用趋向于需要使一些成分的浓度较低从而避免使鼻通道受到刺激或烧伤。有时需要对口服剂型稀释 10 ~ 100 倍以提供适宜的鼻用剂型。

[0152] 某些因素可能影响对受试体进行有效治疗的剂量, 所述因素包括但不限于: 疾病或病症的严重程度、先前的治疗、一般健康状况和 / 和受试体的年龄、以及所具有的其它疾

病等。若用于治疗诸如 siRNA 试剂等 iRNA 试剂的有效剂量可以随着特殊治疗的进程而有所增加或减少,则也是优选的。剂量的变化可能是由于诊断化验的结果所致,并且由诊断化验的结果是明显可判断的。例如,在施用 iRNA 试剂组合物后,可对受试体进行监测。根据监测得到的信息。可施用付加量的 iRNA 试剂组合物。

[0153] 下文将利用实施例对本发明进行说明,但所述实施例不应理解为对本发明的进一步限制。

[0154] 实施例

[0155] 针对 RSV mRNA 的抗病毒 siRNA 的设计

[0156] 利用已知程序化学合成针对 P、N 和 L mRNA 的 siRNA。表 1(a-c) 中列出了 siRNA 序列、一些抑制交叉亚型活性、以及 IC50 值。

[0157] 体外检测和病毒感染

[0158] 在含有 10% 热失活 FBS 的 DMEM 中培养 Vero E6 细胞直至其达到 80% 汇合。为引入 siRNA, 向 50 μ l 的无血清 DMEM 中加入 4 μ l Transit-TKO, 并在室温温育 10 分钟。然后, 将指定浓度的 siRNA 分别加入至培养基 /TKO 反应试剂中并在室温温育 10 分钟。将 RNA 混合物加入至 200 μ l 的含有 10% FBS 的 DMEM 中, 然后至细胞单层。将细胞于 37°C、5% CO₂ 的条件下培养 6 小时。用 1×Hank' s 平衡盐溶液 (HBSS) 温和洗涤除去 RNA 混合物, 然后向每孔加入 300 空斑形成单元 (pfu) 的 RSV/A2 (MOI = 30) 并在 37°C、5% CO₂ 的条件下吸收一小时。除去病毒并用 1×HBSS 洗涤细胞。将细胞以 1% 的甲基纤维素 (该纤维素溶于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中) 覆盖, 然后在 37°C、5% CO₂ 的条件下培养 6 天。利用抗 -F 蛋白单克隆抗体 131-2A 对细胞的进行免疫染色。

[0159] 体内的 siRNA 递送及病毒感染

[0160] 自 Harlan 购买无病原菌的 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠。在麻醉状态下对小鼠进行感染和鼻内灌输 (i. n.)。通过以指定量的 siRNA (其混和有或未混和有 5 μ l 的 Transit TKO) 对小鼠进行鼻内灌输来免疫小鼠。在进行 RSV 处理 (10⁶ pFU 的 RSV/A2) 4 小时前对小鼠腹腔内 (i. p.) 施用 150 μ g 的 Synagis (单克隆抗体克隆 143-6C, 抗 -RSV F 蛋白) 和小鼠同型对照 (IgG1)。每组采用 10 只小鼠。在感染后 0, 2, 4 和 6 天监测动物体重。感染后 6 天收取肺器官, 通过免疫染色空斑试验来检测 RSV。

[0161] 免疫染色空斑试验

[0162] 将 24 孔板的 Vero E6 细胞在含有 10% 热失活的 FBS 的 DMEM 培养至 90% 汇合。将小鼠肺用手持匀浆机在 1ml 的无菌 Dulbecco' s PBS (D-PBS) 中匀浆并以无血清 DMEM 稀释 10 倍。将含有肺裂解物稀释液的病毒以三管平行置于 24 孔板上, 于 37°C、5% CO₂ 的条件下吸收一小时。将各孔以 1% 的甲基纤维素 (溶于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中) 覆盖。然后, 将板在 37°C、5% CO₂ 的条件下培养 6 天。6 天后, 除去覆盖的培养基, 然后以丙酮: 甲醇 (60 : 40) 固定细胞 15 分钟。将细胞以 5% 干奶粉 /PBS 于 37°C 封闭 1 小时。将 1 : 500 稀释的抗 -RSV F 蛋白抗体 (131-2A) 加入至各孔中, 并于 37°C 温育 2 小时。将细胞以 PBS/0.5% Tween20 洗涤 2 次。向各孔中加入 1 : 500 稀释的羊抗鼠 IgG- 碱性磷酸酶并于 37°C 温育 1 小时。将细胞以 PBS/0.5% Tween20 洗涤 2 次。利用 Vector' s 碱性磷酸酶底物试剂盒 II (Vector Black) 来对反应进行显影, 并以苏木素 (Hematoxylin) 进行复染。由此使空斑可视, 并以 Olympus 反转显微镜进行计数。

[0163] 治疗试验

[0164] 在第 0 天通过鼻内灌输对小鼠进行 RSV 处理 (10^6 pFU 的 RSV/A2), 并在指定的时间 (病毒处理后 1 ~ 4 天) 以 50ug 指定的 siRNA 通过鼻内灌输对小鼠进行治疗。每组使用 3 ~ 5 只小鼠, 并在病毒处理 5 天后如前所述测定肺裂解物中的病毒效价。

[0165] iRNA 试剂对 RSV 的体外抑制

[0166] 采用上述的空斑形成试验来检测表 1(a-c) 所提供的 iRNA 试剂的抗-RSV 活性 (图 1)。每一条柱 (竖条) 表示表 1(a-c) 中所提供的一种 iRNA 试剂, 例如, 柱 1 为表 1a 中的第一试剂, 柱 2 为表 1a 中的第二试剂, 等等。通过病毒残留百分数 (%) 来鉴别出活性 iRNA 试剂。经鉴别, 几种试剂显示出多达 90% 抑制活性。将所述结果于表 1(a-c) 中进行概括。

[0167] 确定 iRNA 试剂在体外对 RSV 抑制的剂量依赖性反应。利用上述的空斑形成试验以 4 个浓度来检测表 1 中的示例性活性试剂的抗-RSV 活性。发现所检测的活性 iRNA 试剂具有剂量依赖性反应 (图 2), 将其结果概括于表 1(a-c) 中。

[0168] 如上所述检测 iRNA 试剂对 RSV B 亚型的体外抑制作用。检测图 2 中所提供的 iRNA 试剂针对亚型 B 的抗-RSV 活性 (图 3)。iRNA 试剂对 RSV 亚型 B 具有不同水平的抑制作用, 将其结果概括于表 1(a-c) 中。

[0169] iRNA 试剂对 RSV 的体内抑制作用

[0170] 如上所述利用 AL1729 和 AL1730 来检测对 RSV 的体内抑制作用。检测图 4 所述试剂在小鼠模型中的抗-RSV 活性。所述 iRNA 试剂在体内可有效降低病毒效价, 并且与对照抗体 (Mab 143-6c, 推荐用于 RSV 治疗的小鼠 IgG1 Ab) 相比其更为有效。

[0171] 利用上述方法来检测 AL1730 的剂量依赖性活性。所述试剂表现出剂量依赖性反应 (图 5)。

[0172] 如上所述, 检测在体外具有活性的 iRNA 试剂在体内的抗-RSV 活性。当进行预防性施用, 几种试剂显示出对病毒效价具有 > 4 logs 的降低 (图 6)。

[0173] 利用上述治疗方案来检测具有体内和 / 或体外活性的 iRNA 试剂在体内的抗-RSV 活性。当在病毒感染后施用 1 ~ 2 天时, 几种试剂显示出对病毒效价具有 2 ~ 3logs 的降低 (图 7)。

[0174] 分离株靶序列间的序列分析**[0175] 方法:**

[0176] 分离株的生长以及 RNA 分离: RSV 感染病人的临床分离株获自 Larry Anderson (CDC, Atlanta Georgia) (4 株) 以及 John DeVincenzo (University of Term., Memphis) (15 株)。当这些株在 HEp-2 人上皮细胞 (ATCC, Cat#CCL-23) 中生长时, 发现来自 Georgia 的 4 种分离株的生长要慢于来自 Tennessee 的 15 株的生长, 对这些分别进行处理和分析。下文简要描述其方法:

[0177] 使猴肾脏上皮细胞 (ATCC, Cat#CRL-1586) Vero E6 生长至 95% 汇合并以 1/10 稀释的原代分离株进行感染。将病毒于 37°C 吸收 1 小时, 然后将 D-MEM 加入至细胞中并于 37°C 对细胞进行培养。以每天一次的频率通过光学显微镜对细胞的细胞病变 (CPE) 进行监测。在 90% 细胞病变时, 将细胞刮下并通过在 3000rpm 离心 10 分钟进行沉淀。按照制造商的操作手册通过标准方法来制备 RNA 提取物。

[0178] RSV N 基因的扩增: 收集感染后的病毒 RNA 并将其用作 PCR 反应的模板, 使用

与 ALDP-2017 靶点的上游和下游杂交的引物来扩增约 450bp 的片段。在正向和反向 RSV N 基因引物的存在下将全部 RNA 于 65℃ 处理 5 分钟进行变性,将其保存于冰上,然后用 Superscript III (Invitrogen) 进行逆转录,该逆转录于 55℃ 进行 60 分钟,然后于 70℃ 进行 15 分钟。利用 1% 琼脂糖凝胶的凝胶电泳来分离 PCR 产物并以常规方法进行精制。

[0179] 结果:最初 15 种分离株的序列分析结果表明 ALDP-2017 的靶点在每一株中都是完全保守的。更为重要的是,这种保守性在不同种群(包括来自 RSV A 和 B 的分离株)间得到了保持。令人注意的是,当对 4 种生长较慢的分离株进行分析时,我们观察到这 4 种中的一种(LAP6824)在 ALDP-2017 识别位点具有单个碱基的突变。该突变改变了该分离株编码序列的 13 位,使其由 A 变为 G。

[0180] 结论:

[0181] 由 19 位患者的分离株的结果可知,ALDP-2017 的 RSV N 基因靶序列已经被确定。在 19 例中的 18 例(95%)中,ALDP-2017 的识别成分具有 100% 保守性。在一个分离株中,有一个碱基发生了改变,将 RSV N 基因内 13 位的 A 变为 G。该改变在 ALDP-2017 的反义链和靶序列之间制造出了单个的 G:U 摆动。基于对该 G:U 摆动的杂交潜力的认识,可预测 ALDP-2017 在该分离株的 RSV N 基因的沉默中是有效的。

[0182] 分离株的沉默数据

[0183] 方法

[0184] 在含有 10% 热失活 FBS 的 DMEM 中培养 Vero E6 细胞直至其达到 80% 汇合。为引入 siRNA,向 50 μ l 的无血清 DMEM 中加入 4 μ l Transit-TKO,并在室温温育 10 分钟。然后,将指定浓度的 siRNA 分别加入至培养基 /TKO 反应试剂中并在室温温育 10 分钟。将 RNA 混合物加入至 200 μ l 的含有 10% FBS 的 DMEM 中,然后加入至细胞单层。将细胞于 37℃、5% CO₂ 的条件下培养 6 小时。以 1×Hank' sBalanced Salt Solution (HBSS) 温和洗涤除去 RNA 混合物,然后向每孔加入 300 空斑形成单元 (pfu) 的 RSV/A2 (MOI = 30) 并在 37℃、5% CO₂ 的条件下吸收一小时。除去病毒并以 1×HBSS 洗涤细胞。将细胞以 1% 的甲基纤维素(该甲基纤维素溶于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中)覆盖,然后在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养 6 天。利用抗 -F 蛋白单克隆抗体 131-2A 对细胞进行免疫染色。

[0185] 结果:在所有的分离株中观察到沉默(表 2)。

[0186] 表 2

[0187]

分离株名称	2017 空斑剩余百分数(%)	2153 空斑剩余百分数(%)
RSV/A2	4.49	80.34
RSV/96	5.36	87.50
RSV/87	10.20	79.59
RSV/110	5.41	81.08
RSV/37	4.80	89.60
RSV/67	2.22	91.67
RSV/121	6.25	82.50
RSV/31	4.03	96.77
RSV/38	2.00	92.67
RSV/98	5.13	91.03
RSV/124	3.74	90.37
RSV/95	7.32	64.02
RSV/32	5.45	92.73
RSV/91	8.42	95.79
[0188]		
RSV/110	12.07	94.83
RSV/54	1.90	89.87
RSV/53	7.41	94.07
RSV/33	7.69	95.19

[0189] 结论:所检测的所有临床分离株被 siRNA2017 特异性抑制了超过 85%。错配对照 siRNA2153 对分离株没有显著抑制。

[0190] 在基于质粒的检测中的沉默

[0191] 方法

[0192] 在 24 孔板上播种 HeLa S6 细胞并使其生长至 80% 汇合。向每一孔中混入溶于 50ul OPTI-MEM 中的带有 siRNA (为预定浓度) 的 1ug RSV N-V5 质粒, 并加至按照生产商的说明书所制备的 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)-Optimem 的混合物中, 在室温 (r. t.) 保持 20 分钟, 以形成复合物。将复合物加入至细胞中并于 37°C 温育过夜。移去培养基, 以 PBS 洗涤细胞并以 50ul 裂解缓冲液 (RIPA 缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% 去氧胆酸钠, 1% NP-40, 0.05% SDS) 裂解细胞 1-2 分钟。通过测定细胞裂解液中的 RSV 蛋白的水平来对抑制作用进行定量, 其中所述 RSV 蛋白的水平是通过采用抗 -V5 抗体的 Western 印迹法来测定的。

[0193] 结果显示出短暂性的质粒表达对 RNAi 试剂是有效的检测方法 (表 3)。

[0194] 表 3

[0195]

			蛋白%	活性%
1	ALDP2017	10nM	0	100
2		1nM	0	100
3		100pM	0	100
4		10pM	11.78	88.22
5		1pM	70.63	29.37
6		100fM	72.7	27.3
7	对照	PBS	100	0.
8	2153	10nM	94.54	4.5

[0196] 结论

[0197] 当以表达 RSV N 基因的质粒进行瞬时共转染时, siRNA 2017 特异性且剂量依赖性地抑制 RSV N 蛋白的生成。在 siRNA 2153 中并未观察到该种抑制。

[0198] 通过气溶胶递送 siRNA 对 RSV 的沉默

[0199] 方法

[0200] 将 2mg/ml 的 ALDP-1729 或 ALDP-1730 的溶液利用气溶胶装置在总共 60 秒的时间内以雾化的方式进行递送。如上所述由肺制备病毒, 并利用 ELISA 而不利用空斑试验进行测定。采用 ELISA 对受到病毒 (获自小鼠肺裂解液) 感染的细胞中的 RSV N 蛋白的浓度进行测定。

[0201] ELISA

[0202] 将肺裂解物以碳酸盐 - 碳酸氢盐 (NaHCO_3 pH 9.6) 缓冲液按照 1 : 1 稀释至 6-10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 的工作浓度, 然后加入至每一测试孔中, 于 37°C 温育 1 小时, 或于 4°C 温育过夜。将各孔以 PBS/0.5% Tween20 进行洗涤 3 次, 然后以 5% 干奶粉 /PBS 于 37°C 封闭 1 小时或于 4°C 封闭过夜。将第一抗体 (F 蛋白阳性对照 = 克隆 131-2A ;G 蛋白阳性对照 = 130-2G ;阴性对照 = 正常 IgG1, (BD Pharmingen, cat. #553454, 测试血清, 或杂交瘤上清) 以 1 : 1000 稀释加入至各孔中并于 37°C 温育 1 小时或于 4°C 温育过夜。将各孔以 PBS/0.5% Tween20 进行洗涤 3 次。将第二抗体 (羊抗鼠 IgG (H+L) 全分子 - 碱性磷酸酶偶连) 以 1 : 1000 稀释加入至各孔中 (100 μl / 孔) 并于 37°C 温育 1 小时或于 4°C 温育过夜。将各孔以 PBS/0.5% Tween20 进行洗涤 3 次然后按照生产商的说明书加入 Npp (Sigmafast) 底物 Sigma Aldrich N2770。加入 200 μl 底物 / 孔, 然后温育 10-15。测定在 OD405/495 的吸光率。

[0203] 结论

[0204] 与错配的对照 siRNA 相比, RSV 特异性的 siRNA 的递送降低了小鼠肺中 RSV N 蛋白的水平 (图 8a-b)。

[0205] 3 天预防的体内抑制作用

[0206] 方法

[0207] 除了在 RSV 感染前的不同时间 (从 3 天前至 4 小时前) 进行 siRNA 的递送外, 利用上述的体内方法来对体内预防进行检测。

2105	2103	2290	2384	2386	2387	2485	2487	2507	2508	2509	2510	2765	2767	3283	3284	3338	3339	3365	4021	4022	4023	4024	4025	4037	4038	4039	4040	4043	4051	4052	4057	4058	
GAUAUUCAAUCAAAGCAUUAUUTBT	GAUAUUCACAAAGUGGAUUAUUTBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT	UAUAUUCUCUCAAAGGGAATBT
AAUUCUUGAUAUUAUUGCAUUTBT	AUAUUCACAUUUGUUAUUGCAUUTBT	UUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT	AUUUUUUUUGAGAGAUUAUUTBT
AL-DP-2037	AL-DP-2038	AL-DP-2125	AL-DP-2126	AL-DP-2039	AL-DP-2040	AL-DP-2041	AL-DP-2114	AL-DP-2042	AL-DP-2043	AL-DP-2044	AL-DP-2045	AL-DP-2128	AL-DP-2046	AL-DP-2047	AL-DP-2048	AL-DP-2129	AL-DP-2049	AL-DP-2050	AL-DP-2051	AL-DP-2052	AL-DP-2053	AL-DP-2054	AL-DP-2055	AL-DP-2056	AL-DP-2115	AL-DP-2057	AL-DP-2058	AL-DP-2059	AL-DP-2060	AL-DP-2061			
91	11			87	88	96		96	97	97	97	15	94	87	84	24	15	87	96	92	97	88	16	94	86	91	92	88					
69	73	69	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76
94	90	94	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84

[0212]

5640	UUGCAUUGAUCAUAGUUUUUUAUUTBT	UAAACUAUGAUCAUUGCAAATBT	AL-DP-2093
5641	UGCAAUGAUCAUAGUUUACATBT	GUAAACUAUGAUCAUUGCCATBT	AL-DP-2094
5642	GCAAUGAUCAUAGUUUACCBTBT	GGUAAACUAUGAUCAUUGCCBTBT	AL-DP-2095
5643	CAAUGAUCAUAGUUUACCUUUTBT	AGUAAACUAUGAUCAUUGUTBT	AL-DP-2096
5644	AUGAUCAUAGUUUACCUUUTBT	UAGGUAAACUAUGAUCAUUTBT	AL-DP-2097
5645	AUGAUCAUAGUUUACCUUUTBT	AUAGGUAAACUAUGAUCAUUTBT	AL-DP-2098
5646	AUCAUAGUUUACCUUUTGATBT	CAUAUGGUAAACUAUGAUUTBT	AL-DP-2138
5647	UCAUAGUUUACCUUUTGATBT	UCAUAUGGUAAACUAUGAUUTBT	AL-DP-2139
5648	CAUAGUUUACCUUUTGAGUTBT	CUCAUAGGUAAACUAUGATBT	AL-DP-2140
5650	CAUAGUUUACCUUUTGAGUTBT	ACUCAUAGGUAAACUAUGUTBT	AL-DP-2099
5651	AUAGUUUACCUUUTGAGUUUTBT	AACUCAUAGGUAAACUAUUTBT	AL-DP-2100
5752	CAUUGGUCUUUUUUAACAUAUTBT	UAUUGUAAAUAGACCAAUTBT	AL-DP-2101
5754	UUGGUCUUUUUUAACAUAUTBT	UAUAUGUAAAUAGACCAAUTBT	AL-DP-2102
5755	UGGUCUUUUUUAACAUAUAUTBT	UUUAUGUAAAUAGACCAAUTBT	AL-DP-2103
5756	GGUCUUUUUUAACAUAUAUTBT	UUUAUGUAAAUAGACCAAUTBT	AL-DP-2141
5919	AUAUCUUGCUCACAGAUUAUTBT	AUCAUCUUGAGCAUGAUUAUTBT	AL-DP-2142
5920	UAUCAUGCUCACAGAUUAUTBT	UAUCAUCUUGAGCAUGAUUAUTBT	AL-DP-2104
5934	UGAAUUUGAUUUUCAAUUUAUTBT	UAAUUUGAAAUCAAUUUAUTBT	AL-DP-2105
6016	UACUUAGUCCUUUACAUAUAGUTBT	CUAUUUGUAAAGGACUAAGUUTBT	AL-DP-2106
6019	UUAGUCCUUACAUAUAGGUCBTBT	GACCUAUUUGUAAAGGACUAAGUTBT	AL-DP-2107
6020	UAGUCCUUACAUAUAGGUCBTBT	GGACCUAUUUGUAAAGGACUAAGUTBT	AL-DP-2108
6252	AUAUUCUAUAGCUGGACGUUTBT	ACGUCCAGCUUAJAGAAUAUUTBT	AL-DP-2109
6253	UAUUCUAUAGCUGGACGUUTBT	UACGUCCAGCUUAJAGAAUAUTBT	AL-DP-2110
6254	AUUCUAUAGCUGGACGUUAUTBT	UUACGUCCAGCUUAJAGAAUAUTBT	AL-DP-2111

[0214]

表 1b. RSV P 基因

Actual start	Start_Pos	正义	反义	AL-DP #	% 抑制 (5nM)	% 抑制 RSV A2 500 pM	% 抑制 RSV A2 50 pM	% 抑制 RSV A2 5pM	% 抑制 RSV B (5nM)
55	53	AAAUUCCUAGAAUCAAUAAdTdT	UUUUUGAUUCUAGGAAUUUdTT	AL-DP-2000	3				
56	54	AAUUCUAGAAUCAAUAAdTdT	UUUUUGAUUCUAGGAAUUUdTT	AL-DP-2001	4				
58	56	UUCCUAGAAUCAAUAAGGdTT	CCUUUUUGAUUCUAGGAAAdTT	AL-DP-2002	7				
59	57	UCCUAGAAUCAAUAAGGdTT	CCUUUUUGAUUCUAGGAAAdTT	AL-DP-2003	98	93	92	84	97
61	59	CUAGAAUCAAUAAGGdTT	UGCCUUUUUGAUUCUAGGdTT	AL-DP-2004	3				
322	320	ACAUUUGAAUCAAUGAAGdTT	CUUCAUUGUUAUCAAUGUdTT	AL-DP-2005	7				
323	321	CAUUUGAAUCAAUGAAGdTT	CUUCAUUGUUAUCAAUGUdTT	AL-DP-2006	5				
324	322	AUUUGAAUCAAUGAAGdTT	UUUCAUUGUUAUCAAAdTT	AL-DP-2007	4				
325	323	UUUGAAUCAAUGAAGdTT	UUUCAUUGUUAUCAAAdTT	AL-DP-2008	7				
425	424	AAGUGAAUUAUAGGAAUGdTT	CAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2009	2				
427	425	AGUGAAUUAUAGGAAUGdTT	CAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2010	7				
428	426	GUGAAUUAUAGGAAUGdTT	AGCAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2011	4				
429	427	UGAAUUAUAGGAAUGdTT	AGCAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2012	96	77	68	66	82
430	428	GAAUUAUAGGAAUGdTT	AAGCAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2013	98	85	76	75	89
431	429	AAAUUAUAGGAAUGdTT	UGAAGCAUUCUUAUUGUUUAUCAAAdTT	AL-DP-2014	98	85	81	68	66
550	548	GAAGCAUUAUAGCCAAUGdTT	CAUUGGCAUUAUAGCCUUCdTT	AL-DP-2015	7				
551	549	AAGCAUUAUAGCCAAUGdTT	UCAUUGGCAUUAUAGCCUUCdTT	AL-DP-2016	98	88	82	75	94
		CGAUUAUUAACAGCAAGAdTsdT	UCUUGCGUGUUUAUUAUUCGdTsdt	AL-DP-1729	90				
		CGAUUAUUAUACAGGAUGAdTsdT	UCAUUCUGUAUAUAUUCGdTsdt	AL-DP-1730					

[0215]

表 1c. RSV N 基因

Actual start	正义	反义	AL-DP #	% 抑制 (5nM)	% 抑制 RSV A2 500 pM	% 抑制 RSV A2 50 pM	% 抑制 RSV A2 5pM	% 抑制 RSV B (5nM)
3	GGCUCUAGCAAAGUCAAGGtTtT	CUUGACUUGGCUAAGAGCCtTtT	AL-DP-2017	96	86	84	80	93
5	CUCUAGCAAAGUCAAGUUtTtT	AACUUGACUUGGCUAAGAGtTtT	AL-DP-2018	2				
52	CUUGCAUCCAGCAAUAUACAGtTtT	UGUAUUUGGCUGGAGUACAGtTtT	AL-DP-2019	5				
53	UGUCAUCCAGCAAUAUACAGtTtT	GUGUAUUUGGCUGGAGUACAGtTtT	AL-DP-2020	2				
191	UAAUAGGUUUGUUAUUAUGGtTtT	GCAUAUAACAUACCUAUUAUtTtT	AL-DP-2021	3				
379	AUUGAGAUAGAAUCUJAGAAgTtT	UUCUJAGAUUCUJUCUJCAAUUtTtT	AL-DP-2022	96	78	77	75	84
897	AUUCUACCAUAUAUUGAAGtTtT	GUUCAUAUAUUGGUAAGAAUtTtT	AL-DP-2023	1				
898	UUCUACCAUAUAUUGAAGtTtT	UGUCCAUAUAUUGGUAAGAAUtTtT	AL-DP-2024	7				
899	UCUACCAUAUAUUGAAGtTtT	UUGUCCAUAUAUUGGUAAGAAUtTtT	AL-DP-2025	96	89	84	77	96

[0001]

序列表

- <110> 阿尔尼拉姆医药有限公司 (Alnylam Pharmaceuticals, Inc.)
- <120> RSV的RNAi 调节及其治疗应用 (RNAi Modulation of RSV and Therapeutic Uses Thereof)
- <130> 14174-102W01
- <140> PCT/US2006/000425
<141> 2006-01-06
- <150> US 60/642,364
<151> 2005-01-07
- <150> US 60/659,828
<151> 2005-03-09
- <160> 284
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 1
ggaucCCAuu auuaauggan n 21
- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 2
uccauuaaua augggaucn n 21
- <210> 3
<211> 21

[0002]

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 3
 gaucuccauua uuaauggaan n 21
- <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 4
 uuccauuaau aauggaucn n 21
- <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 5
 aguuuuuuua aagguguuan n 21
- <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21

[0003]

- <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 6
uaacaccuuu uaaauaacun n 21
- <210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 7
guuauuuaaa agguguuaun n 21
- <210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 8
auaacaccuu uaaaauaacn n 21
- <210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 9
auuuaaaagg uguuaucucn n 21
- <210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0004]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 10
 gagauaacac cuuuuaaun n 21
- <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 11
 uuaaaaggug uuaucucuun n 21
- <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 12
 aagagauaac accuuuaan n 21
- <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0005]

<400> 13 aaguccacua cuagagcaun n	21
<210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 14 augcucuagu aguggacuun n	21
<210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 15 aguccacuac uagagcauan n	21
<210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 16 uaugcucuag uaguggacun n	21
<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
[0006]	

<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 17	
guccacuacu agagcauaun n	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 18	
auaugcucua guaguggacn n	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 19	
uccacuacua gagcauaugn n	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 20	
[0007]	

cauauagcucu aguaguggan n	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 21	
gaagagcuau agaaauaagn n	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 22	
cuuauuucua uagcucuuch n	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 23	
gagcuauaga aaauagugan n	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
[0008]	

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 24
 ucacuuauuu cuauagcucn n 21
- <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 25
 cuauagaaaau aagugaun n 21
- <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 26
 acaucacuua uuucuaugn n 21
- <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 27
 ucaaaacaac acucugaan n 21

[0009]

- <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 28
 uucaagagug uuguuuugan n 21
- <210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 29
 uagagggauu uauuaugucn n 21
- <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 30
 gacauaaauaa auccucuan n 21
- <210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>

[0010]

<221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 31
 auaaaaggu uuguaaauan n 21

 <210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 32
 uauuuacaaa ccuuuuau n 21

 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 33
 cucaguguag guagaaugun n 21

 <210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 34
 acauucuacc uacacugagn n 21

 <210> 35
 <211> 21

[0011]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 35	
ucaguguagg uagaauguun n	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 36	
aacauucuac cuacacugan n	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 37	
caguguaggu agaauguuun n	21
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	

[0012]

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 38	
aaacauucua ccuacacugn n	21
<210> 39	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 39	
aguguaggua gaauguuugn n	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 40	
caaacauucu accuacacun n	21
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 41	
guguagguag aauguuugcn n	21
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0013]

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 42

gcaaacauuc uaccuacacn n

21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 43

acaagauaug gugaucuagn n

21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 44

cuagaucacc auaucuugun n

21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0014]

<400> 45 agcaaaauca aucaagcaun n	21
<210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 46 augcuugauu gaauuugcun n	21
<210> 47 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 47 gcaaaaucaa ucaagcaun n	21
<210> 48 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 48 aaugcuugau ugaauuugcn n	21
<210> 49 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0015]

- <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 49
 gaugaacaaa guggauuaun n 21
- <210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 50
 auaauccacu uuguucaun n 21
- <210> 51
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 51
 uaauaucucu caaaggaan n 21
- <210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 52
 uucccuuga gagauauan n 21

[0016]

- <210> 53
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 53
 auaucucuca aagggaauun n 21
- <210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 54
 auuuccuuu gagagauun n 21
- <210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 55
 uaucucucaa agggaaauun n 21
- <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

[0017]

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 56
 aauuuccuu ugagaguan n 21
- <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 57
 caugcucaag cagauuauun n 21
- <210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 58
 aauaaucugc uugagcaugn n 21
- <210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 59
 ugcucaagca gauuauuugn n 21
- <210> 60

[0018]

- <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 60
 caaauaau cu gcuugagcan n 21
- <210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 61
 uagcauuaaa uagccuuaan n 21
- <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 62
 uuaaggcuau uuaaugcuan n 21
- <210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature

[0019]

- <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 63
 agcauuaaaau agccuuaaaan n 21
- <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 64
 uuuaaggcua uuuaaugcun n 21
- <210> 65
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 65
 gcuuuuuuuu gccuuuuuun n 21
- <210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 66
 auuuuaggcu auuuuauugcn n 21
- <210> 67
 <211> 21
 <212> DNA

[0020]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 67

cauuaaaauag ccuuaaaun n

21

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 68

aauuuaaggc uuuuaaagn n

21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 69

uauuaugcag uuuaauauun n

21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0021]

<400> 70 aauauuaaac ugcauaauan n	21
<210> 71	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 71 uuaugcaguu uaauauuuuan n	21
<210> 72	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 72 uaaaauuuuaa acugcauaan n	21
<210> 73	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 73 aaaagugcac aacauuauan n	21
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0022]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 74
 uauaauguug ugcacuuun n 21
- <210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 75
 aaagucaca acauuauacn n 21
- <210> 76
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 76
 guauaanguu gugcacuuun n 21
- <210> 77
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 77

[0023]

auauagaacc uacauauccn n	21
<210> 78	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 78	
ggauauguag guucuauaun n	21
<210> 79	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 79	
uauagaaccu acauauccun n	21
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 80	
aggauaugua gguucuauan n	21
<210> 81	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0024]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	81	
	uaagaguugu uuaugaaagn n	21
<210>	82	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	82	
	cuuucauaaa caacucuuan n	21
<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	83	
	acagucagua guagaccaun n	21
<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	84	
	auggucuacu acugacugun n	21

[0025]

- <210> 85
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 85
 cagucaguag uagaccaugn n 21
- <210> 86
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 86
 cauggucuac uacugacugn n 21
- <210> 87
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 87
 agucaguagu agaccaugun n 21
- <210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>

[0026]

- <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 88
 acauggucua cuacugacun n 21
- <210> 89
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 89
 gucaguagua gaccaugugn n 21
- <210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 90
 cacauggucu acuacugacn n 21
- <210> 91
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 91
 ucaguaguag accaugugan n 21
- <210> 92
 <211> 21

[0027]

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 92
 ucacaugguc uacuacugan n 21
- <210> 93
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 93
 caugugaauu cccugcaucn n 21
- <210> 94
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 94
 gaugcaggga auucacaugn n 21
- <210> 95
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21

[0028]

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 95 augugaauuc ccugcaucan n	21
<210> 96 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 96 ugaugcaggg aaucacaun n	21
<210> 97 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 97 ugugaauucc cugcaucan n	21
<210> 98 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 98 uugaugcagg gaauucacan n	21
<210> 99 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	

[0029]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 99
 gugaauuccc ugcaucaun n 21
- <210> 100
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 100
 auugaugcag ggaauucacn n 21
- <210> 101
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 101
 aaauccugc aucaauaccn n 21
- <210> 102
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0030]

<400> 102 gguauugaug cagggaauun n	21
<210> 103	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 103 gcaucaauac cagcuuauan n	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 104 uauaagcugg uauugaugcn n	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 105 caucaauacc agcuuauagn n	21
<210> 106	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
[0031]	

<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 106	
cuauaagcug guauugaugn n	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 107	
auaccagcuu auagaacaan n	21
<210> 108	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 108	
uuguucuaua agcugguaun n	21
<210> 109	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 109	
uaccagcuua uagaacaacn n	21

[0032]

- <210> 110
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 110
 guuguucuaa aagcugguan n 21
- <210> 111
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 111
 accagcuuau agaacaacan n 21
- <210> 112
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 112
 uguuguucua uaagcuggun n 21
- <210> 113
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

[0033]

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 113
 ccagcuuaua gaacaacaan n 21
- <210> 114
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 114
 uuguuguucu auaagcuggn n 21
- <210> 115
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 115
 cagcuuauag aacaacaan n 21
- <210> 116
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 116
 uuuguuguuc uauaagcugn n 21
- <210> 117

[0034]

- <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 117
 auagaacaac aaauuaucan n 21
- <210> 118
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 118
 ugauaauuug uuguucuaun n 21
- <210> 119
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 119
 uauuaacaga aaaguauggn n 21
- <210> 120
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature

[0035]

<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 120	
ccauacuuuu cuguuaauan n	21
<210> 121	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 121	
ugagauacau uugaugaaan n	21
<210> 122	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 122	
uuucaucaaa uguaucucan .n	21
<210> 123	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 123	
gagauacauu ugaugaaacn n	21
<210> 124	
<211> 21	
<212> DNA	

[0036]

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 124
 guuucauca augaucucn n 21
 <210> 125
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 125
 gauacauuug augaaaccun n 21
 <210> 126
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 126
 agguucauc aaauguacn n 21
 <210> 127
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0037]

<400> 127 auacauuuga ugaaccucn n	21
<210> 128 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 128 gagguuucau caaaugaun n	21
<210> 129 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 129 uacauuugau gaaaccuccn n	21
<210> 130 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 130 ggagguuuca ucaaauguan n	21
<210> 131 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	

[0038]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 131
 aagugauaca aaaacagcan n 21
- <210> 132
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 132
 ugcuguuuuu guaucacuun n 21
- <210> 133
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 133
 agugauacaa aaacagcaun n 21
- <210> 134
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 134

[0039]

augcuguuuu uguaucacun n	21
<210> 135	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 135	
ugauacaaaa acagcauun n	21
<210> 136	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 136	
auaugcuguu uuugaucan n	21
<210> 137	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 137	
uuuaaguacu aauuuagcun n	21
<210> 138	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0040]

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 138
 agcuaaaaua guacuuaaan n 21
- <210> 139
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 139
 uuaaguacua auuuagcugn n 21
- <210> 140
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 140
 cagcuaaaauu aguacuuaan n 21
- <210> 141
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 141
 uaaguacuaa uuuagcuggn n 21

[0041]

<210> 142
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 142
 ccagcuaaa uaguacuuan n 21

<210> 143
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 143
 aaguacuaau uuagcuggan n 21

<210> 144
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 144
 uccagcuaaa uuaguacuun n 21

<210> 145
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>

[0042]

<221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 145
 aguacuaauu uagcuggacn n 21

 <210> 146
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 146
 guccagcuaa auuaguacun n 21

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

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 147
 guacuaauuu agcuggacan n 21

 <210> 148
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 148
 uguccagcua aauaguacn n 21

 <210> 149
 <211> 21

[0043]

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 149
 acuaauuuag cuggacauun n 21
- <210> 150
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 150
 aauguccagc uaaauuagun n 21
- <210> 151
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 151
 aauuuagcug gacauuggan n 21
- <210> 152
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21

[0044]

- <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 152
uccaaugucc agcuaaaun n 21
- <210> 153
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 153
auuuagcugg acauuggaun n 21
- <210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 154
auccauguc cagcuaaaun n 21
- <210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡核苷酸
- <220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 155
uuagcuggac auuggauun n 21
- <210> 156
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0045]

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 156
gaauccaaug uccagcuaan n 21

<210> 157
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 157
uuuugaaaaa gauuggggan n 21

<210> 158
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 158
uccccaauucu uuuucaaaaan n 21

<210> 159
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0046]

<400> 159 uuugaaaaag auuggggagn n	21
<210> 160 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 160 cuccccaauc uuuucaa n	21
<210> 161 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 161 ugaaaaagau ugaggagagn n	21
<210> 162 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 162 cucucccaa uuuuuucan n	21
<210> 163 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0047]

- <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 163
 gaaaaagauu ggggagaggn n 21

 <210> 164
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 164
 ccucucccca aucuuuuucn n 21

 <210> 165
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 165
 uaugaacacu ucagaucuun n 21

 <210> 166
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 166
 aagaucugaa guguucauan n 21

[0048]

- <210> 167
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 167
 augaacacuu cagaucuucn n 21
- <210> 168
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 168
 gaagaucuga aguguucaun n 21
- <210> 169
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 169
 ugcccuuggg uuguuaacan n 21
- <210> 170
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

[0049]

<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 170	
uguuuacaac ccaagggcan n	21
<210> 171	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 171	
gcccuugggu uguuacaun n	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 172	
auguuuacaa cccaaggcn n	21
<210> 173	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 173	
uauagcauuc auaggugaan n	21
<210> 174	

[0050]

- <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 174
 uucaccuaug aaugcuauan n 21
- <210> 175
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 175
 auagcauuca uaggugaagn n 21
- <210> 176
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 176
 cuucaccuau gaugcuau n 21
- <210> 177
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature

[0051]

- <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 177
 uagcauucac aggugaaggn n 21
- <210> 178
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 178
 ccuucaccua ugaaugcuan n 21
- <210> 179
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 179
 auucauaggu gaaggagcan n 21
- <210> 180
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 180
 ugcuccuucac cuaugaaun n 21
- <210> 181
 <211> 21
 <212> DNA

[0052]

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 181
 uugcaaugau cauaguuuan n 21
 <210> 182
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 182
 uaaacuauga ucauugcaan n 21
 <210> 183
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 183
 ugcaaugauc auaguuuacn n 21
 <210> 184
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0053]

<400> 184 gaaaacuaug aucauugcan n	21
<210> 185 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 185 gcaaugauca uaguuuacn n	21
<210> 186 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 186 gguaaacuau gaucauugcn n	21
<210> 187 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 187 caaugaucau aguuuaccun n	21
<210> 188 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	

[0054]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 188
 agguaaacua ugaucauugn n 21
- <210> 189
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 189
 aaugaucaua guuuaccuan n 21
- <210> 190
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 190
 uagguaaacu augaucauun n 21
- <210> 191
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 191

[0055]

augaucuag uuuaccuaun n	21
<210> 192	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 192	
auagguaac uaugucaun n	21
<210> 193	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 193	
gaucauaguu uaccuauugn n	21
<210> 194	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 194	
caauagguaa acuaugaun n	21
<210> 195	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0056]

<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 195	
aucauaguuu accuauugan n	21
<210> 196	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 196	
ucaauaggua aacuaugaun n	21
<210> 197	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 197	
ucauaguuuu ccuauugagn n	21
<210> 198	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 198	
cucaauaggu aaacuaugan n	21

[0057]

- <210> 199
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 199
 cauaguuuac cuauugagun n 21
- <210> 200
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 200
 acucaauagg uaaacuaugn n 21
- <210> 201
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 201
 auaguuuacc uauugaguun n 21
- <210> 202
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>

[0058]

<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 202	
aacucaauag guaaacuaun n	21
<210> 203	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 203	
cauuggucuu auuuacauan n	21
<210> 204	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 204	
uauguaaaaua agaccaaugn n	21
<210> 205	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 205	
uuggucuuau uuacauauan n	21
<210> 206	
<211> 21	

[0059]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 206	
uauauguaaa uaagaccaan n	21
<210> 207	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 207	
uggucuuauu uacauuaan n	21
<210> 208	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 208	
uuauauguaa auaagaccan n	21
<210> 209	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	

[0060]

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 209	
ggucuuuuu acauauaaan n	21
<210> 210	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 210	
uuuauaugua aauaagaccn n	21
<210> 211	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 211	
auaucaugcu caaugaun n	21
<210> 212	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 212	
aucaucuuga gcaugauun n	21
<210> 213	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0061]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 213
 uaucaugcuc aagaugauan n 21
- <210> 214
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 214
 uaucaucuug agcaugauan n 21
- <210> 215
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 215
 ugauauugau uucaauuan n 21
- <210> 216
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0062]

<400> 216 uaauuugaaa ucaauaucan n	21
<210> 217 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 217 uacuuagucc uuacaauagn n	21
<210> 218 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 218 cuauuguaag gacuaaguan n	21
<210> 219 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 219 uuaguccuua caauaggucn n	21
<210> 220 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0063]

<223> 合成的寡核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 220 gaccuauugu aaggacuaan n	21
<210> 221 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 221 uaguccuuac aauaggucn n	21
<210> 222 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 222 ggaccuauug uaaggacuan n	21
<210> 223 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 223 auauucuaua gcuggacgun n	21

[0064]

<210> 224
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 224
 acguccagcu auagaauaun n 21

<210> 225
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 225
 uauucuauag cuggacguan n 21

<210> 226
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 226
 uacguccagc uauagaauan n 21

<210> 227
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

[0065]

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 227
 auucuauagc uggacguaan n 21
- <210> 228
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 228
 uuacguccag cuauagaaun n 21
- <210> 229
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 229
 aaauuccuag aaucauaan n 21
- <210> 230
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 230
 uuauugauuc uaggaauun n 21
- <210> 231

[0066]

- <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 231
 aaauccuaga aucaauaaan n 21
- <210> 232
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 232
 uuuauugauu cuaggaauun n 21
- <210> 233
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 233
 uuccuagaau caauaaagn n 21
- <210> 234
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature

[0067]

<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 234	
ccuuuauuga uucuaggaan n	21
<210> 235	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 235	
uccuagaauc aauaaagggn n	21
<210> 236	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 236	
ccuuuuauug auucuaggan n	21
<210> 237	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 237	
cuagaaucaa uaaaggcan n	21
<210> 238	
<211> 21	
<212> DNA	

[0068]

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 238
 ugccuuuuau ugauucuagn n 21
 <210> 239
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 239
 acauuuugaua acaaugaagn n 21
 <210> 240
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
 <400> 240
 cuucauuguu aucaaaugun n 21
 <210> 241
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0069]

<400> 241 cauuugauaa caaugaagan n	21
<210> 242	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 242 ucuucauugu uaucaaaugn n	21
<210> 243	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 243 auuugauaac aaugaagaan n	21
<210> 244	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 244 uucucauug uuaucaaaun n	21
<210> 245	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0070]

- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 245
 uuugauaaca augaagaagn n 21
- <210> 246
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 246
 cuucuucauu guuaucaaan n 21
- <210> 247
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 247
 aagugaaaua cuaggaaugn n 21
- <210> 248
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷
- <400> 248
- [0071]

cauuccuagu auuucacuun n	21
<210> 249	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 249	
agugaaauac uaggaaugcn n	21
<210> 250	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 250	
gc <u>au</u> uccuag u <u>auu</u> ucacun n	21
<210> 251	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 251	
gugaa <u>au</u> acu ag <u>gaa</u> ugcun n	21
<210> 252	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0072]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	252	
	agcauuccua guauuucacn n	21
<210>	253	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	253	
	ugaaaauacua ggaaugcuun n	21
<210>	254	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	254	
	aagcauuccu aguauuucan n	21
<210>	255	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	20, 21	
<223>	n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400>	255	
	gaaauacuag gaaugcuucn n	21

[0073]

<210> 256	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 256	
gaagcauucc uaguauuucn n	21
<210> 257	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 257	
aaauacuagg aaugcuucan n	21
<210> 258	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 258	
ugaagcauuc cuaguauuun n	21
<210> 259	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
[0074]	

<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 259	
gaagcauuuaa ugaccaaugn n	21
<210> 260	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 260	
cauuggucau uaaugcuucn n	21
<210> 261	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 261	
aagcauuuau gaccaaugan n	21
<210> 262	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 262	
ucauugguca uaaugcuun n	21
<210> 263	
<211> 21	

[0075]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷 phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 263
cgauauauua acagcaagan n 21

<210> 264
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷 phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

<400> 264
ucuugcuguu auauaucgn n 21

<210> 265
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> 20
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷 phosphorothioate linkage

<220>
<221> misc_feature
<222> 21
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

[0076]

<400> 265 cgauuauuu acaggaugan n	21
<210> 266 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷 phosphorothioate linkage	
<220> <221> misc_feature <222> 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 266 ucauccugua auauaaucgn n	21
<210> 267 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 267 ggcucuuagc aaagucaagn n	21
<210> 268 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> 20, 21 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 268 cuugacuuug cuaagagccn n	21

[0077]

- <210> 269
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 269
 cucuuagcaa agucaaguun n 21

 <210> 270
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 270
 aacuugacuu ugcuaagagn n 21

 <210> 271
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷

 <400> 271
 cugucaucca gcaaauacan n 21

 <210> 272
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <220>

[0078]

<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 272	
uguauuuugcu ggaugacagn n	21
<210> 273	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 273	
ugucauccag caauacacn n	21
<210> 274	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 274	
guguauuuugc uggaugacan n	21
<210> 275	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 275	
uaauagguau guuauaugcn n	21
<210> 276	
<211> 21	

[0079]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 276	
gc <u>a</u> ua <u>a</u> aca uaccuauuan n	21
<210> 277	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 277	
auugagauag aaucuagaan n	21
<210> 278	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 278	
uucuagauuc uaucucaaun n	21
<210> 279	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	

[0080]

<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 279 auucuacc <u>au</u> auauugaacn n	21
<210> 280	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 280 guuca <u>au</u> aua u <u>gg</u> uagaun n	21
<210> 281	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 281 uucuacc <u>au</u> u <u>au</u> ugaacan n	21
<210> 282	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 282 uguuca <u>au</u> au a <u>ug</u> guagaan n	21
<210> 283	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0081]

<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 283	
ucuaccauau auugaacaan n	21
<210> 284	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 20, 21	
<223> n = 脱氧胸腺嘧啶核苷	
<400> 284	
uuguucaaua uaugguagan n	21

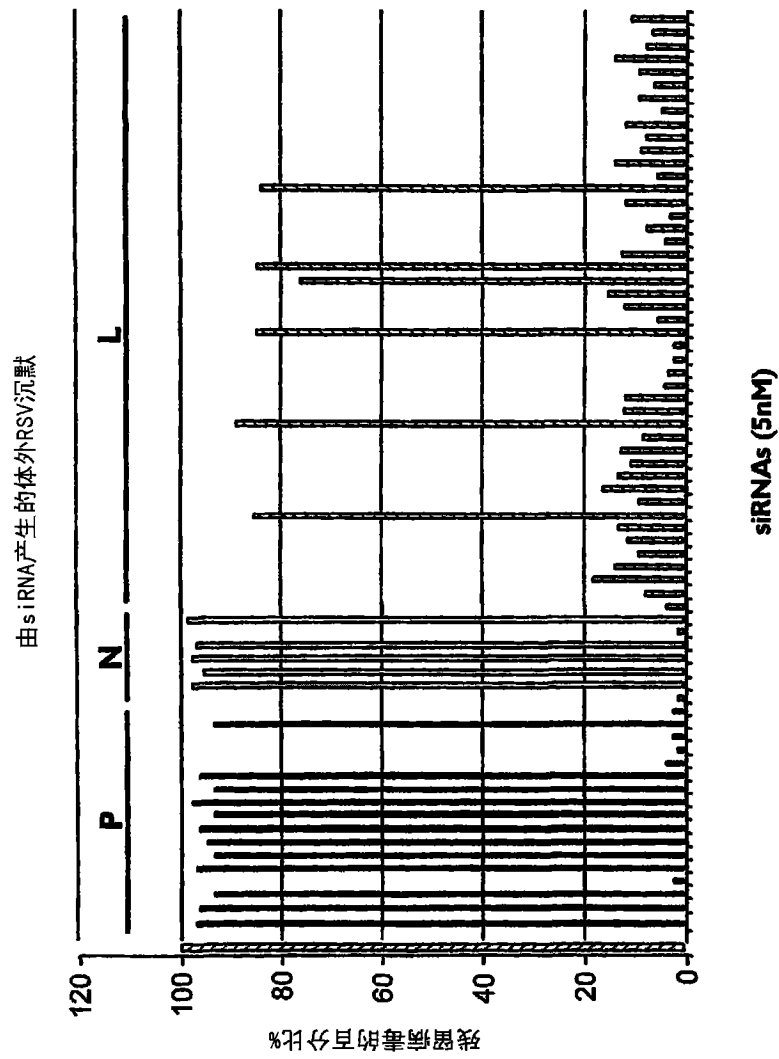


图 1

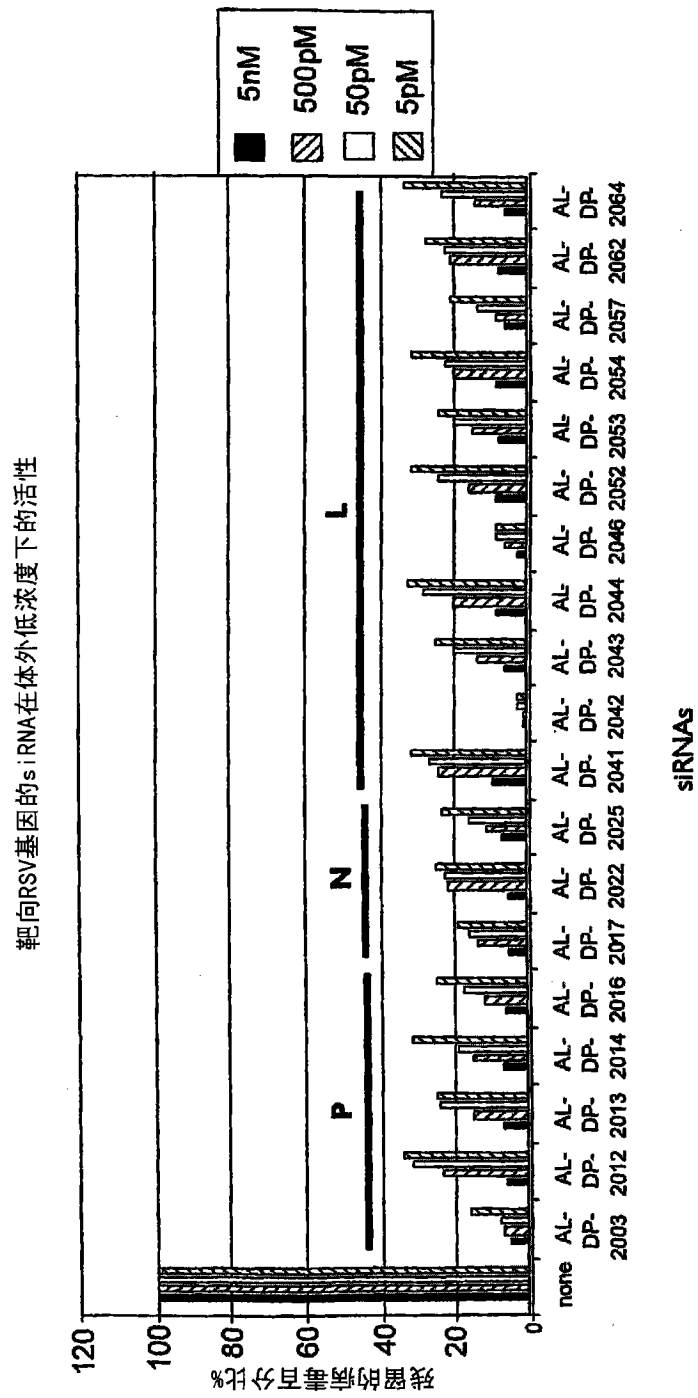


图 2

靶向RSVB亚型的siRNA的体外抑制

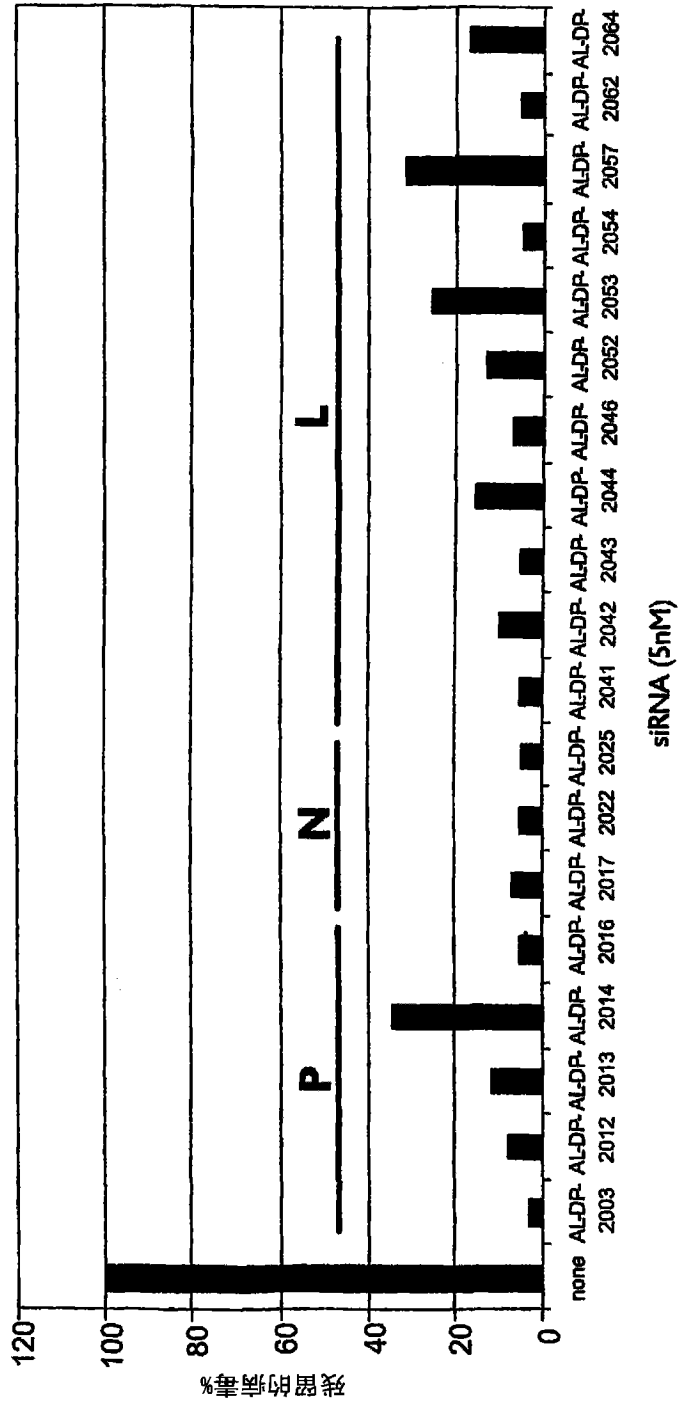


图 3

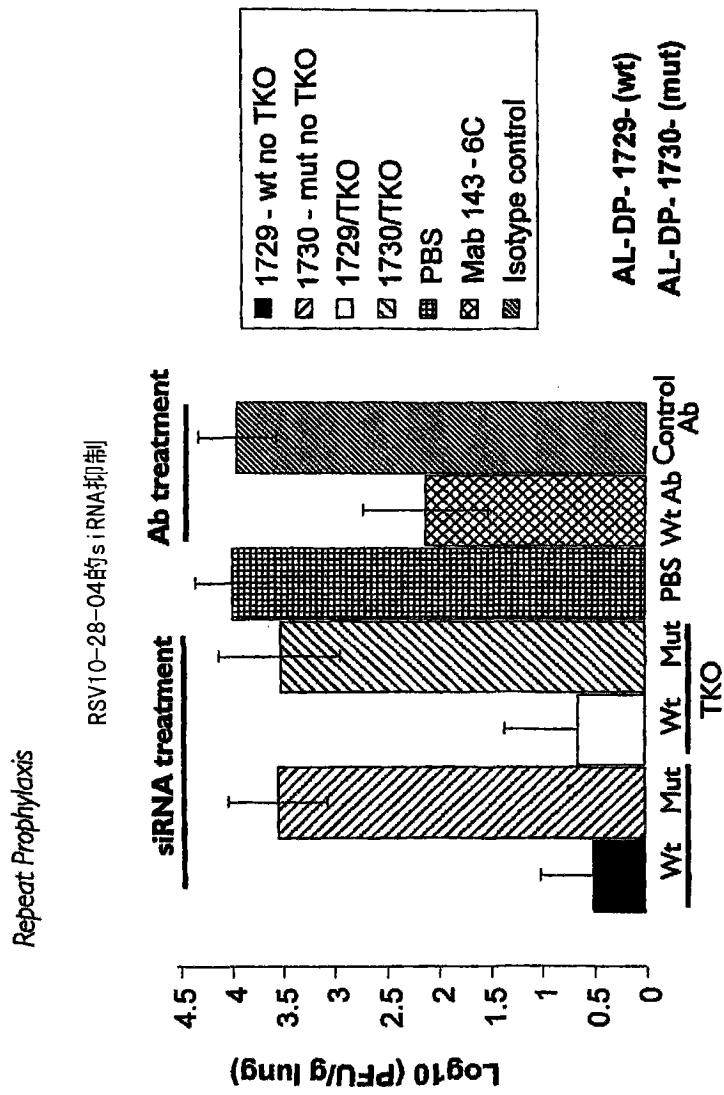


图 4

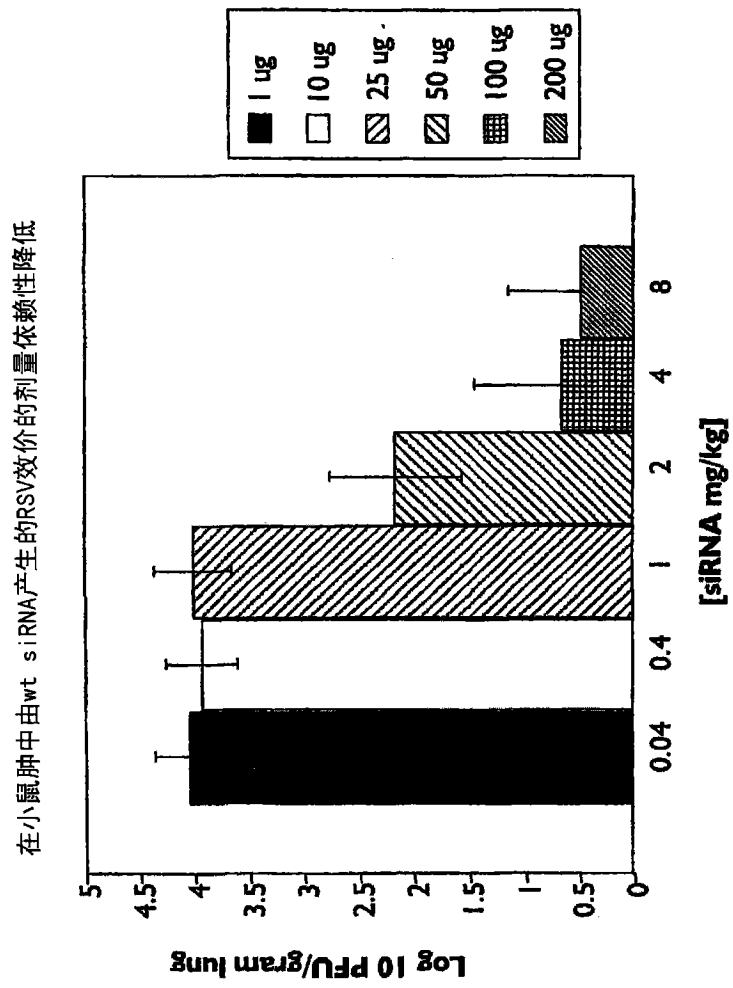


图 5

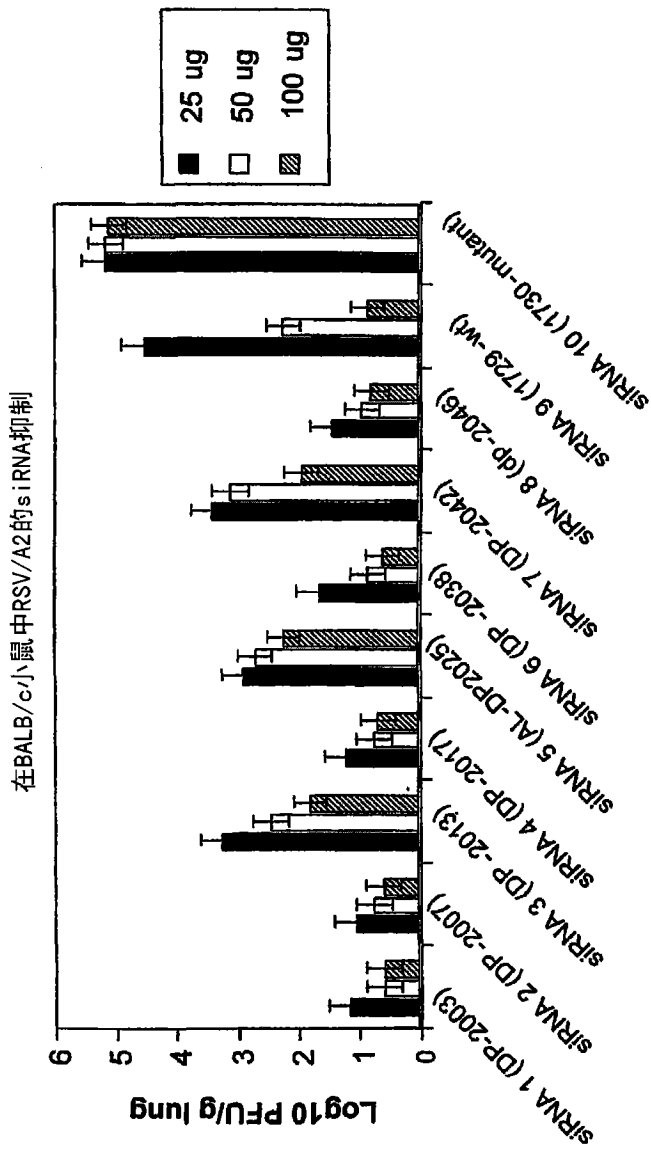


图 6

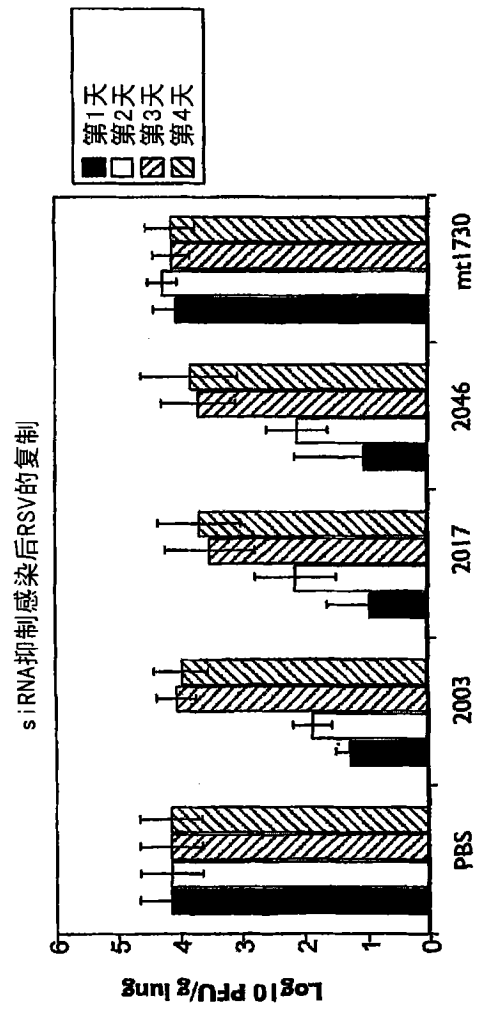


图 7

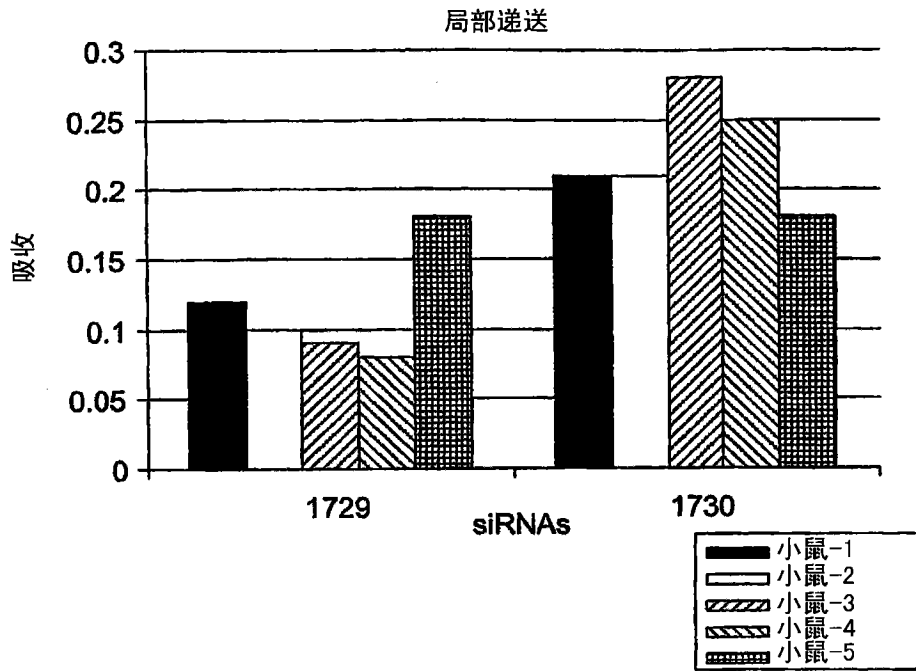


图 8A

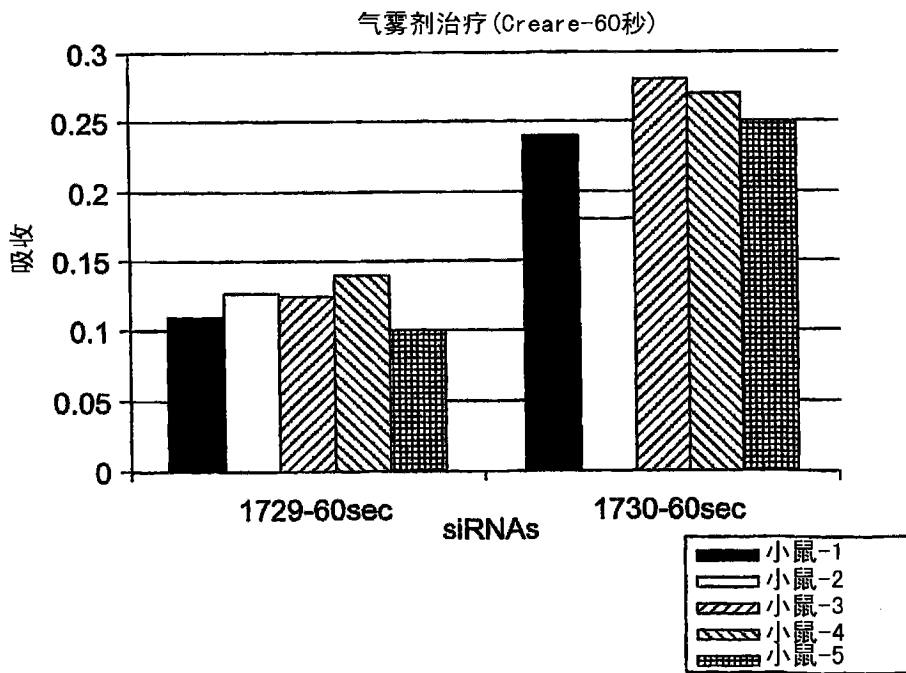


图 8B

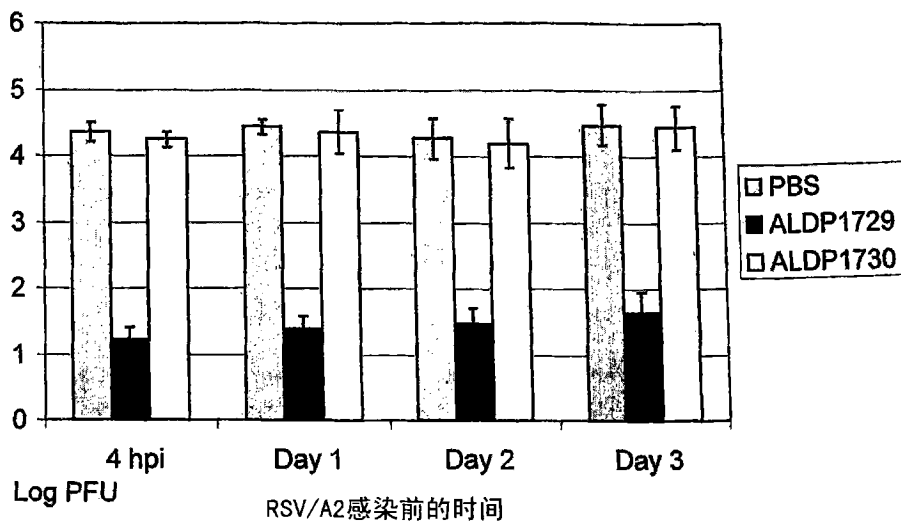


图 9