



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114717264 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202210354987.1

(22) 申请日 2015.11.13

(30) 优先权数据

62/079,588 2014.11.14 US

62/211,992 2015.08.31 US

62/234,466 2015.09.29 US

(62) 分案原申请数据

201580072992.1 2015.11.13

(71) 申请人 沃雅戈治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·W·Y·沙 侯金兆

M·E·农嫩马赫 周鹏程

M·霍斯巴赫 J·德克特

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

(51) Int.Cl.

C12N 15/864 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书96页

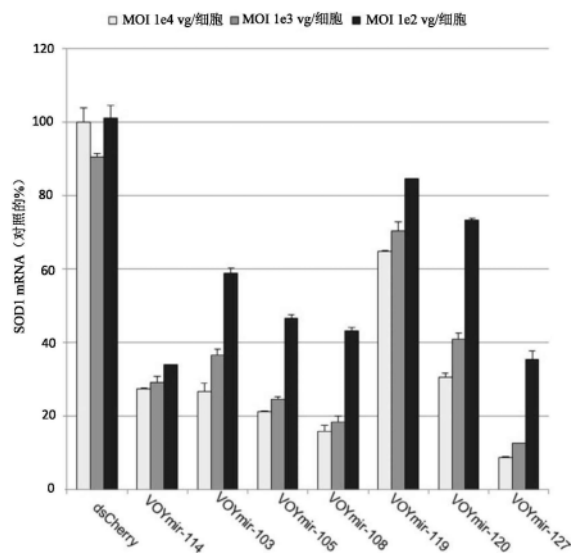
序列表100页 附图11页

(54) 发明名称

治疗肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 的组合物和方法, 具体而言, 本发明涉及针对SOD1基因的小干扰RNA (siRNA) 分子、编码siRNA分子的腺伴随病毒 (AAV) 载体和使用所述siRNA分子和AAV载体治疗肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 的方法。



1. 一种腺伴随病毒 (AAV) 载体基因组, 其包含用于抑制或遏制细胞中的SOD1表达的、位于2个反向末端重复序列 (ITR) 之间的核酸序列, 其中所述核酸序列包含有义链序列和反义链序列, 其中所述有义链序列包含与在表3、表11或表14中列出的序列的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 且所述反义链序列包含与在表3、表11或表14中列出的序列的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸, 且其中所述有义链序列和反义链序列共享至少4个核苷酸长度的互补性区域。

2. 一种腺伴随病毒 (AAV) 载体基因组, 其包含用于抑制SOD1表达的、位于2个反向末端重复序列 (ITR) 之间的核酸序列, 其中所述核酸序列编码siRNA双链体的有义链序列和反义链序列, 其中所述有义链序列长20-22个核苷酸并包含SEQ ID NO:51或385的18个核苷酸, 且所述反义链序列长21-22个核苷酸并包含SEQ ID NO:220或386的19个核苷酸。

3. 根据权利要求1或2所述的AAV载体基因组, 其中所述有义链序列包含SEQ ID NO:51的18个核苷酸且所述反义链序列包含SEQ ID NO:220的19个核苷酸。

4. 根据权利要求1或2所述的AAV载体基因组, 其中所述有义链序列包含SEQ ID NO:385的20个核苷酸且所述反义链序列包含SEQ ID NO:386的20个核苷酸。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的AAV载体基因组, 其中所述有义链序列和反义链序列包含互补性区域, 其中所述互补性区域的长度介于17-20个核苷酸。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的AAV载体基因组, 其中所述有义链序列和反义链序列的长度独立地为21个核苷酸。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的AAV载体基因组, 其中所述有义链序列和所述反义链序列中的至少一个包含至少1个或2个核苷酸的3' 突出端。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的AAV载体基因组, 其进一步编码包含所述有义链序列和反义链序列的调节性多核苷酸序列, 其中所述调节性多核苷酸序列包含:

- i) 5' 侧接区域;
- ii) 环区域; 和/或
- iii) 3' 侧接区域。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的AAV载体基因组, 其进一步包含:

- i) 启动子;
- ii) 增强子;
- iii) 内含子; 和/或
- iv) polyA序列。

10. 一种腺伴随病毒 (AAV) 颗粒, 其包含权利要求1-9任一项所述的AAV载体基因组和AAV衣壳蛋白。

11. 根据权利要求10所述的AAV颗粒, 其中所述AAV衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或其变体、AAV5衣壳蛋白或其变体, 或AAVrh10衣壳蛋白或其变体。

12. 一种用于抑制SOD1表达的siRNA双链体, 其包含有义链序列和反义链序列, 其中所述有义链序列长20-22个核苷酸并包含SEQ ID NO:51或385的18个核苷酸, 且所述反义链序列长21-22个核苷酸并包含SEQ ID NO:220或386的19个核苷酸。

13. 根据权利要求12所述的siRNA双链体, 其中所述有义链序列包含SEQ ID NO:51的18个核苷酸且所述反义链序列包含SEQ ID NO:220的19个核苷酸。

14. 根据权利要求12或13所述的siRNA双链体,其中所述有义链序列包含SEQ ID NO:51的核苷酸1-18,且其中所述反义链序列包含SEQ ID NO:220的核苷酸1-19。

15. 根据权利要求12所述的siRNA双链体,其中所述有义链序列包含SEQ ID NO:385的20个核苷酸且所述反义链序列包含SEQ ID NO:386的21个核苷酸。

16. 一种用于抑制SOD1表达的调节性多核苷酸,其包含权利要求12-15任一项所述的siRNA双链体,其中所述调节性多核苷酸进一步包含:

- i) 5' 侧接区域;
- ii) 环区域;和/或
- iii) 3' 侧接区域。

17. 一种药物组合物,其包含权利要求10或11所述的AAV颗粒,及药学上可接受的载体。

18. 权利要求10或11所述的AAV颗粒在制备用于抑制或遏制细胞中SOD1基因表达的药物中的用途。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述细胞是:

- i) 哺乳动物细胞;
- ii) CNS细胞;
- iii) 神经元;
- iv) 运动神经元或腹角运动神经元;或
- v) 星形胶质细胞。

20. 权利要求10或11所述的AAV颗粒在制备用于治疗 and/或改善受试者中的肌萎缩性侧索硬化(ALS)的药物中的用途。

21. 根据权利要求18或19所述的用途,其中CNS细胞和/或CNS区域中的SOD1表达被抑制或遏制。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中:

- i) 所述CNS细胞包括运动神经元;
- ii) 所述CNS区域包括脊髓区域、前脑区域、中脑区域、后脑区域或其组合;和/或
- iii) 所述CNS区域包括脊髓区域。

23. 根据权利要求18或19所述的用途,其中所述SOD1包括野生型SOD1、经突变的SOD1或其组合。

24. 根据权利要求20-23任一项所述的用途,其中所述ALS是:

- i) 家族性ALS;
- ii) 散发性ALS;
- iii) 早期阶段ALS;
- iv) 中期阶段ALS;
- v) 晚期阶段ALS。

治疗肌萎缩性侧索硬化(ALS)的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为201580072992.1,申请日为2015年11月13日,发明名称为“治疗肌萎缩性侧索硬化(ALS)的组合物和方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年11月14日提交的标题为Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis(ALS) with siRNAs targeting SOD-1的美国临时专利申请号62/079,588、2015年8月31日提交的标题为Compositions and Methods of Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis(ALS)的美国临时专利申请号62/211,992、2015年9月29日提交的标题为Compositions and Methods of Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis(ALS)的美国临时专利申请号62/234,466的权益;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0004] 对序列表的参考

[0005] 本申请与电子形式的序列表一起提交。所述序列表作为2015年11月12日创建的标题为1011PCTSL.txt的文件提供,其大小为126,873字节。电子形式的序列表中的信息通过引用整体并入本文。

技术领域

[0006] 本发明涉及调节性多核苷酸,例如靶向超氧化物歧化酶1(SOD1)基因的小干扰RNA(siRNA)分子,的组合物、方法和设计、制备、生产、使用的方法和/或制剂。本文中使用的“调节性多核苷酸”是起作用以调节(增加或降低)靶基因的水平或量(例如,mRNA或蛋白水平)的任何核酸序列。SOD1基因的靶向可以干扰SOD1基因表达和SOD1酶生产。在某些实施方案中,将编码siRNA分子的核酸序列插入重组腺伴随病毒(AAV)载体中。还公开了使用siRNA分子抑制具有神经变性疾病(例如肌萎缩性侧索硬化(ALS))的受试者中的SOD1基因表达的方法。

背景技术

[0007] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)也被称作卢·格里格病(Lou Gehrig's disease),是最致命的进行性神经变性疾病,其特征在于在初级运动皮质、脑干和脊髓中的运动神经元(MN)的显著损失。运动神经元的损失会破坏基础性的基本动作,诸如呼吸,并通常在诊断以后2~5年内造成患者的死亡。患者中运动功能的进行性衰退严重地破坏他们的呼吸能力,因而患者的存活需要某种形式的呼吸辅助。其它症状也包括手、臂、腿或吞咽肌的肌无力。有些患者(例如,FTD-ALS)还可能发生额颞叶痴呆。

[0008] 根据ALS协会,在美国每年诊断出大约5,600人患有ALS。ALS的发病率是每100,000人中2人,且据估测,多达30,000美国人在任何给定的时间可能患有该疾病。

[0009] 已经描述了ALS的两种形式:一种是散发的ALS(sALS),这是在美国最常见的ALS的形式,并占有所有诊断的病例的90-95%;另一种是家族性的ALS(fALS),这发生在主要具有显性遗传的家族谱系中,且仅占美国所有病例的约5-10%。sALS和fALS在临床上是不能辨别的。

[0010] 病理学研究发现,一些细胞过程的紊乱发生在疾病发作以后,包括增加的ER应激、自由基(即,活性氧(ROS))的产生、线粒体功能障碍、蛋白聚集、细胞凋亡、炎症和谷氨酸盐兴奋性中毒,特别是在运动神经元(MN)中。

[0011] ALS的原因是复杂的和不同的。一般而言,认为ALS是一种复杂的遗传性障碍,其中与环境暴露组合的多个基因联合使得人成为易患的。已经发现了十多个与ALS有关的基因,包括SOD-1 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 超氧化物歧化酶)、TDP-43 (TARDBP、TAR DNA结合蛋白-43)、FUS(在肉瘤中融合/在肉瘤中转移)、ANG(血管生成素)、ATXN2(共济失调蛋白2 (Ataxin-2))、含有缬酪氨酸的蛋白(VCP)、OPTN(视神经病变诱导基因(Optineurin))和染色体9开放读码框72 (C9ORF72)中的非编码GGGGCC六核苷酸重复序列的扩增。但是,运动神经元变性的确切机制仍然是难以捉摸的。

[0012] 目前,不存在ALS的治愈性治疗。唯一的FDA批准的药物是利鲁唑,其拮抗谷氨酸盐应答以减少ALS的病理学发展。但是,已经报道了处于早期阶段的ALS患者的仅约3个月的寿命延长,尚未观察到对于处于晚期阶段的ALS患者而言的治疗益处,这表明了患者的治疗选择的缺乏(Bensimon G等人,J Neurol.2002,249,609-615)。因此,仍然需要可以有效地阻止疾病进展的新治疗策略。

[0013] 正在针对散发性和家族性ALS的潜在治疗研究许多不同的策略。一个策略是基于可以促进神经元存活的神经营养因子(诸如胰岛素-样生长因子I (IGF-I)、神经胶质细胞系衍生的神经营养因子(GDNF)、血管内皮生长因子(VEGF)、Colivelin和活性依赖性的神经营养因子(ADNF)衍生的肽)的神经保护和/或再生作用。几个研究证实,神经营养因子在SOD1转基因小鼠中可以维持运动神经元功能性,因此改善运动表现。但是,这样的治疗经常不能延长SOD1小鼠的存活,从而提示,神经营养因子不足以延长神经元存活(参见Yacila和Sari,Curr Med Chem.,2014,21(31),3583-3593的综述)。

[0014] ALS治疗的另一个策略已经聚焦于基于干细胞的疗法。干细胞具有产生运动神经元的潜力,由此替代ALS受影响的CNS(诸如初级运动皮质、脑干和脊髓)中的退化运动神经元。已经研究了从多种来源衍生出的干细胞,包括诱导的多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)(例如骨髓间充质干细胞(BMSC)和脂肪细胞干细胞(ASC))和神经组织起源神经干细胞(例如,胎儿脊神经干细胞(NSC)、多能神经祖细胞(NPC))(例如,Kim C等人,Exp.Neurobiol.,2014,23(3),207-214的综述)。

[0015] 超氧化物歧化酶I型(SOD1; $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 超氧化物歧化酶I型)基因中的突变是fALS的最常见原因,占有fALS病例的约20-30%。最近的报告表明,SOD1突变也可能与所有sALS病例中的约4%有关(Robberecht和Philip,Nat.Rev.Neurosci.,2013,14,248-264)。SOD1有关的fALS最可能不是由正常SOD1活性的损失造成,而是由有毒功能的获得造成。关于突变体SOD1有关的fALS毒性的假设之一提出,异常的SOD1酶造成诸如过氧亚硝酸盐或过氧化氢的小分子以产生破坏性的自由基。关于突变体SOD1神经毒性的其它假设包括蛋白酶体活性的抑制、线粒体损伤、RNA加工的破坏和细胞内聚集体的形成。突变体SOD1变体和/或野生型SOD1在ALS中的异常积累形成不溶性的纤维状聚集体,其被鉴别为病理性包涵体。聚集的SOD1蛋白可以诱导线粒体应激(Vehvilainen P等人,Front Cell Neurosci.,2014,8,126)和对细胞、特别是对运动神经元的其它毒性。

[0016] 这些发现表明,SOD1可以是家族性和散发性ALS的潜在治疗靶标。可以减少在ALS

患者的中枢神经系统中产生的SOD1蛋白的疗法可能改善患者中的ALS的症状,例如运动神经元变性以及肌无力和萎缩。目的在于阻止野生型和/或突变体SOD1蛋白聚集的形成的试剂和方法可能阻止疾病进展和允许改善ALS症状。近年来, RNA干扰 (RNAi) 介导的基因沉默已经引起研究人员的兴趣。在现有技术中已经教导了靶向SOD1基因的小双链RNA (小干扰RNA) 分子在治疗ALS中的潜力 (参见, 例如, 美国专利号7,632,938和美国专利公开号20060229268, 其内容通过引用整体并入本文)。

[0017] 本发明开发了基于RNA干扰的方案来抑制或阻止ALS患者中的SOD1的表达, 用于治疗所述疾病。

[0018] 本发明提供了新的双链RNA (dsRNA) 构建体和siRNA构建体以及它们的设计方法。另外, 这些新的siRNA构建体可以是合成的分子或在用于递送进细胞中的表达载体 (一条或两条链) 中编码。这样的载体包括但不限于腺伴随病毒载体, 例如任一种AAV血清型的载体基因组, 或其它病毒递送媒介物, 例如慢病毒等。

发明内容

[0019] 本发明涉及RNA分子介导的基因特异性的对基因表达和蛋白生产的干扰。在本发明中还包括用于治疗诸如肌萎缩性侧索硬化的运动神经元变性疾病的方法。在本文表征的组合物中包括的siRNA包括具有反义链 (反义链) 的dsRNA, 所述反义链具有长30个核苷酸或更少、通常19-24个核苷酸的区域, 其与SOD1基因的mRNA转录物的至少部分基本上互补。

[0020] 本发明提供了短双链RNA分子, 如小干扰RNA (siRNA) 双链体, 其靶向SOD1 mRNA以干扰SOD1基因表达和/或SOD1蛋白生产。本发明的siRNA双链体可以干扰SOD1基因的两个等位基因 (不论SOD1基因中的任何特定突变), 且可以特别地与在ALS疾病中发现的那些相互作用。

[0021] 在某些实施方案中, 将这样的siRNA分子或所述siRNA分子的单链插入要引入中枢神经系统的细胞、特别是运动神经元和/或其它周围细胞中的腺伴随病毒载体中。

[0022] 本发明的siRNA双链体包含杂交在一起从而形成双链体结构的反义链和有义链, 其中所述反义链与靶向的SOD1基因的核酸序列互补, 且其中所述有义链与靶向的SOD1基因的核酸序列同源。在某些方面, 所述反义链的5' 末端具有5' 磷酸酯基团, 且所述有义链的3' 末端含有3' 羟基。在其它方面, 在每个链的3' 末端处不存在核苷酸突出端、或者存在1或2个核苷酸突出端。

[0023] 根据本发明, 靶向SOD1基因的siRNA双链体的每个链是约19-25个核苷酸的长度, 优选约19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸的长度。在某些方面, 所述siRNA可以是未修饰的RNA分子。

[0024] 在其它方面, 所述siRNA可以含有至少一个修饰的核苷酸, 诸如碱基、糖或主链修饰。

[0025] 在一个实施方案中, siRNA或dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。所述dsRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。所述反义链包括与编码SOD1的mRNA的至少部分基本上互补的核苷酸序列, 且互补性区域是30个核苷酸或更少, 和至少15个核苷酸的长度。通常, 所述dsRNA是19-24 (例如, 19-21) 个核苷酸的长度。在某些实施方案中, 所述dsRNA是约15至约25个核苷酸的长度, 且在其它实施方案中, 所述dsRNA是约25至约30个核

昔酸的长度。

[0026] 在与表达SOD1的细胞接触后或在表达SOD1的细胞内转录后,所述dsRNA使SOD1基因的表达抑制或阻止至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多,诸如当通过如本文中所述的方法测定时。

[0027] 根据本发明,生产AAV载体,其包含编码siRNA双链体、siRNA双链体的一条链或靶向SOD1基因的dsRNA的核酸,AAV载体血清型可以是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和/或AAV-DJ、及其变体。

[0028] 根据本发明,靶向ALS中的SOD1基因的siRNA双链体或dsRNA选自在表3、11或13中列出的siRNA双链体。优选地,靶向ALS中的SOD1基因的所述siRNA双链体或dsRNA选自siRNA双链体:D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823和D-2858。

[0029] 本发明也提供了药物组合物,其包含至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体和药学上可接受的载体。在某些方面,将编码siRNA双链体的核酸序列插入AAV载体中。

[0030] 在某些实施方案中,本发明提供了用于抑制/沉默细胞中的SOD1基因表达的方法。因此,所述siRNA双链体或dsRNA可以用于基本上抑制细胞中、特别是运动神经元中的SOD1基因表达。在某些方面,SOD1基因表达的抑制表示抑制至少约20%,优选地抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%。因此,可以将靶向的基因的蛋白产物抑制至少约20%,优选地抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%。所述SOD1基因可以是野生型基因或具有至少一个突变的经突变的SOD1基因。因此,所述SOD1蛋白是野生型蛋白或具有至少一个突变的突变多肽。

[0031] 在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗或改善需要治疗的受试者中与异常的SOD1基因和/或SOD1蛋白有关的肌萎缩性侧索硬化的方法,所述方法包括:给所述受试者施用药学有效量的至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体,将所述siRNA双链体递送进靶向的细胞,抑制SOD1基因表达和蛋白生产,和改善受试者中的ALS症状。

[0032] 在某些实施方案中,将AAV载体施用给需要治疗和/或改善ALS的受试者,所述AAV载体包含编码至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体的核酸序列。AAV载体血清型可以选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10和AAV-DJ及其变体。

[0033] 在某些方面,ALS是与SOD1突变有关的家族性ALS。在其它方面,ALS是以SOD1蛋白的异常聚集或者SOD1蛋白功能或定位的破坏(尽管非必然地作为基因突变的结果)为特征的散发性ALS。通过本发明的方法改善的ALS症状可以包括运动神经元变性、肌无力、肌肉僵硬、言语不清和/或呼吸困难。

[0034] 在某些实施方案中,可以将靶向SOD1基因的所述siRNA双链体或dsRNA或包含这样的编码siRNA的分子的AAV载体直接引入受试者的中枢神经系统中,例如,通过颅内注射。

[0035] 在某些实施方案中,将本发明的药物组合物用作单独疗法。在其它实施方案中,将本发明的药物组合物用在联合疗法中。所述联合疗法可以是与一种或多种神经保护剂(诸如小分子化合物、生长因子和激素,它们已经针对它们对运动神经元变性的神经保护作用进行了试验)联合。

[0036] 在某些实施方案中,本发明提供了通过给有此需要的受试者施用治疗有效量的本文描述的质粒或AAV载体来治疗或改善肌萎缩性侧索硬化的方法。所述ALS可以是家族性ALS或散发性ALS。

附图说明

[0037] 从附图所示的本发明的特定实施方案的以下描述会明白前述和其它目标、特征和优点,在附图中,在不同的视图中相同的附图标记表示相同的部件。附图不一定按比例,而是将重点放在解释本发明的各个实施方案的原理。

[0038] 图1的直方图显示了在AAV载体中编码的构建体的活性。

[0039] 图2的直方图显示了在AAV载体中编码的调节性多核苷酸的引导链在HEK293T细胞中的活性。引导链-HEK-293T-转染后24h。

[0040] 图3的直方图显示了在AAV载体中编码的调节性多核苷酸的过客链在HEK293T细胞中的活性。过客链-HEK-293T-转染后24h。

[0041] 图4的直方图显示了在AAV载体中编码的调节性多核苷酸的引导链在HeLa细胞中的活性。HeLa-引导-48h。

[0042] 图5的直方图显示了在AAV载体中编码的调节性多核苷酸的过客链在HeLa细胞中的活性。HeLa-过客-48h。

[0043] 图6是细胞内AAV DNA的直方图。细胞内基因组。

[0044] 图7的直方图显示了在AAV载体中编码的构建体在人运动神经元中的活性。在人类运动神经元中由AAV2-SOD1 miRNA实现的SOD1沉默(MOI=10E5)(转导后48小时)。

[0045] 图8的图显示了在U251MG细胞中的SOD1的剂量依赖性的沉默。通过转导不同剂量的AAV2-miRNA U251MG细胞实现的剂量依赖性的SOD1沉默(感染后48小时)。

[0046] 图9的图显示了在人星形胶质细胞中的SOD1的剂量依赖性的沉默。在人星形胶质细胞(HA)中由AAV2-SOD1 miRNA实现的剂量依赖性的SOD1沉默(感染后48小时)。

[0047] 图10的图显示了在U251MG细胞中由SOD1 pri-microRNA实现的hSOD1沉默的时程。

[0048] 图11包含图11A、11B和11C,它们是显示构建体的剂量依赖性作用的图。图11A显示了相对SOD1表达,Voymir104 SOD1 KD。图11B显示了引导链的百分比,Voymir104引导链。图11C显示了过客链的百分比,Voymir104过客链。

[0049] 图12的简图显示了调节性多核苷酸(MP)相对于ITR、内含子(I)和聚腺苷酸(P)的位置。

具体实施方式

[0050] 本发明涉及调节性多核苷酸,例如,作为治疗剂的RNA或DNA分子。RNA干扰介导的基因沉默可以特异性地抑制靶向的基因表达。本发明然后提供了靶向SOD1基因的小双链RNA(dsRNA)分子(小干扰RNA、siRNA),包含这样的siRNA的药物组合物,以及它们的设计方法。本发明也提供了它们用于抑制SOD1基因表达和蛋白生产、用于治疗神经变性疾病(具体地,肌萎缩性侧索硬化(ALS))的方法。

[0051] 本发明提供了靶向SOD1 mRNA以干扰SOD1基因表达和/或SOD1蛋白生产的小干扰RNA(siRNA)双链体(和编码它们的调节性多核苷酸)。本发明的siRNA双链体可以干扰SOD1

基因的两个等位基因(不论SOD1基因中的任何特定突变),且可以特别地与在ALS疾病中发现的那些相互作用。

[0052] 在某些实施方案中,将编码这样的siRNA分子或所述siRNA分子的单链的核酸序列插入腺伴随病毒载体中并引入中枢神经系统的细胞、特别是运动神经元和/或其它周围细胞中。

[0053] 本发明的编码的siRNA双链体含有杂交在一起从而形成双链体结构的反义链和有义链,其中所述反义链与靶向的SOD1基因的核酸序列互补,且其中所述有义链与靶向的SOD1基因的核酸序列同源。在某些方面,所述反义链的5'末端具有5'磷酸酯基团,且所述有义链的3'末端含有3'羟基。在其它方面,在每个链的3'末端处不存在核苷酸突出端、或者存在1或2个核苷酸突出端。

[0054] 根据本发明,靶向SOD1基因的siRNA双链体的每个链是约19-25、19-24或19-21个核苷酸的长度,优选约19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸的长度。在某些方面,所述siRNA可以是未修饰的RNA分子。

[0055] 在其它方面,所述siRNA可以含有至少一个修饰的核苷酸,诸如碱基、糖或主链修饰。

[0056] 在一个实施方案中,siRNA或dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。所述dsRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。所述反义链包括与编码SOD1的mRNA的至少部分基本上互补的核苷酸序列,且所述互补性区域是30个核苷酸或更少,和至少15个核苷酸的长度。通常,所述dsRNA是19-25、19-24或19-21个核苷酸的长度。在某些实施方案中,所述dsRNA是约15至约25个核苷酸的长度,且在其它实施方案中,所述dsRNA是约25至约30个核苷酸的长度。

[0057] 在与表达SOD1的细胞接触后,所述dsRNA(无论是直接地施用还是在表达载体中编码)使SOD1基因的表达抑制至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多,诸如当通过如本文中所述的方法测定时。

[0058] 在本文表征的组合物中包括的siRNA包含具有反义链(反义链)的dsRNA,所述反义链具有30个核苷酸或更少、通常19-25、19-24或19-21个核苷酸长度的区域,其与SOD1基因的mRNA转录物的至少部分基本上互补。

[0059] 根据本发明,生产AAV载体,其包含靶向SOD1基因的siRNA双链体的核酸、siRNA双链体的一条链或dsRNA,AAV载体血清型可以是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和AAV-DJ及其变体。

[0060] 根据本发明,靶向ALS中的SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA选自在表3中列出的siRNA双链体。在某些实施方案中,靶向ALS中的SOD1基因的所述siRNA双链体或dsRNA选自siRNA双链体:D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823和D-2858。

[0061] 本发明也提供了药物组合物,其包含至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体和药学上可接受的载体。在某些方面,所述siRNA双链体由AAV载体编码。

[0062] 在某些实施方案中,本发明提供了用于抑制/沉默细胞中的SOD1基因表达的方法。因此,可以使用所述siRNA双链体或编码的dsRNA基本上抑制细胞中、特别是运动神经元中

的SOD1基因表达。在某些方面，SOD1基因表达的抑制表示抑制至少约20%，诸如抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此，可以将靶向的基因的蛋白产物抑制至少约20%，优选地抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。所述SOD1基因可以是野生型基因或含有至少一个突变的经突变的SOD1基因。因此，所述SOD1蛋白是野生型蛋白或含有至少一个突变的经突变的多肽。

[0063] 在一个实施方案中，所述siRNA双链体或编码的dsRNA可以用于使SOD1蛋白的表达减少至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为一个非限制性实施例，可以使SOD1蛋白的表达减少50-90%。

[0064] 在一个实施方案中，所述siRNA双链体或编码的dsRNA可以用于使SOD1 mRNA的表达减少至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为一个非限制性实施例，可以使SOD1 mRNA的表达减少50-90%。

[0065] 在一个实施方案中，所述siRNA双链体或编码的dsRNA可以用于减少CNS(例如，但不限于脊髓、前脑、中脑或后脑)的至少一个区域中的SOD1蛋白和/或mRNA的表达。在CNS的至少一个区域中使SOD1蛋白和/或mRNA的表达减少至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-

100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为一个非限制性实施例,使脊髓中SOD1蛋白和mRNA的表达减少50-90%。

[0066] 在某些实施方案中,本发明提供了在需要治疗的受试者中治疗或改善与异常的SOD1基因和/或SOD1蛋白有关的肌萎缩性侧索硬化的方法,所述方法包括:给所述受试者施用药理学有效量的至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码siRNA双链体的核酸,将所述siRNA双链体(或编码的双链体)递送进靶向的细胞,抑制SOD1基因表达和蛋白生产,和改善受试者中的ALS症状。

[0067] 在某些实施方案中,将AAV载体施用给需要治疗和/或改善ALS的受试者,所述AAV载体包含至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体的核酸序列。AAV载体血清型可以选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8(AAVDJ8)和AAV-DJ(AAVDJ)、及其变体。在一个实施方案中,所述AAV载体血清型是AAV2。在另一个实施方案中,所述AAV载体是AAVDJ。在另一个实施方案中,所述AAV载体血清型是AAVDJ8。

[0068] 在一个实施方案中,在本发明中可能有用的血清型可以是AAV-DJ8。AAV-DJ8的氨基酸序列可以包含两个或更多个突变以便除去肝素结合结构域(HBD)。作为一个非限制性实施例,在美国专利号7,588,772(其内容通过引用整体并入本文)中描述为SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可以包含两个突变:(1)R587Q,其中在氨基酸587处的精氨酸(R;arg)被改变成谷氨酰胺(Q;Gln),和(2)R590T,其中在氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)被改变成苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实施例,可以包含三个突变:(1)K406R,其中在氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)被改变成精氨酸(R;Arg)、(2)R587Q,其中在氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)被改变成谷氨酰胺(Q;Gln)和(3)R590T,其中在氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)被改变成苏氨酸(T;Thr)。

[0069] 在某些方面,ALS是与SOD1突变有关的家族性ALS。在其它方面,ALS是以SOD1蛋白的异常聚集或者SOD1蛋白功能和定位的破坏为特征的散发性ALS。通过本发明的方法改善的ALS症状可以包括、但不限于运动神经元变性、肌无力、肌肉僵硬、言语不清和/或呼吸困难。

[0070] 在某些实施方案中,可以将靶向SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA或包含这样的siRNA分子的AAV载体直接引入受试者的中枢神经系统中,例如,通过颅内注射。

[0071] 在某些实施方案中,将本发明的药物组合物用作单独疗法。在其它实施方案中,将本发明的药物组合物用在联合疗法中。所述联合疗法可以是与一种或多种神经保护剂(诸如小分子化合物、生长因子和激素,它们已经针对它们对运动神经元变性的神经保护作用进行了试验)联合。

[0072] 在某些实施方案中,本发明提供了通过给有此需要的受试者施用治疗有效量的本文描述的质粒或AAV载体来治疗或改善肌萎缩性侧索硬化的方法。所述ALS可以是家族性ALS或散发性ALS。

[0073] 在下面的伴随描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何材料和方法可以用在本发明的实践或试验中,但是现在描述优选的材料和方法。本发明的其它特征、目的和优点将从描述中显而易见。在描述中,单数形式也包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明。除非另外定义,在本文中使用的所有技术

和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。在冲突的情况下,以本说明书为准。

[0074] 肌萎缩性侧索硬化 (ALS)

[0075] 肌萎缩性侧索硬化 (ALS) (一种成年发作的神经变性障碍) 是一种以运动皮质、脑干和脊髓中的运动神经元的选择性死亡为特征的进行性的和致命的疾病。ALS的发病率是约1.9/100,000。被诊断出ALS的患者发生以痉挛状态、反射亢进或反射减弱、肌束震颤、肌肉萎缩和麻痹为特征的进行性肌肉表型。这些运动病损由肌肉的去神经支配(由于运动神经元的损失)造成。ALS的主要病理学特征包括:皮质脊髓束的变性以及下运动神经元(LMN)或前角细胞的广泛损失(Ghatak等人,J Neuropathol Exp Neurol.,1986,45,385-395),初级运动皮质中的Betz细胞和其它锥体细胞的变性和损失(Udaka等人,Acta Neuropathol.,1986,70,289-295;Maekawa等人,Brain,2004,127,1237-1251),和运动皮质和脊髓中的反应性神经胶质增生(Kawamata等人,Am J Pathol.,1992,140,691-707;和Schiffer等人,J Neurol Sci.,1996,139,27-33)。由于呼吸缺陷和/或炎症,ALS经常在诊断以后3-5年内是致命的(Rowland LP和Shneibder NA,N Engl.J.Med.,2001,344,1688-1700)。

[0076] ALS的一种细胞标志是蛋白性的、泛素化的、胞质包涵体在退化运动神经元和周围细胞(例如,星形胶质细胞)中的存在。泛素化的包涵体(即,露易小体样包涵体或Skein样包涵体)是ALS中的包涵体的最常见的和特异性的类型,且见于脊髓和脑干的LMN中以及皮质脊髓的上运动神经元(UMN)中(Matsumoto等人,J Neurol Sci.,1993,115,208-213;和Sasak和Maruyama,Acta Neuropathol.,1994,87,578-585)。已经将几种蛋白鉴别为包涵体的组分,包括泛素、Cu/Zn超氧化物歧化酶1(SOD1)、外周蛋白和Dorfin。神经丝性包涵体经常见于ALS中的脊髓运动神经元内的透明簇生包涵体(HCI)和轴突‘球状体’中。其它类型和更低特异性的包涵体包括在皮质的上层中的布尼纳小体(含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的包涵体)和新月形包涵体(SCI)。在ALS中看到的其它神经病理学特征包括高尔基体的片段化、线粒体空泡形成和突触末梢的超微结构异常(Fujita等人,Acta Neuropathol.2002,103,243-247)。

[0077] 另外,在额颞叶痴呆ALS(FTD-ALS)中,也观察到皮质萎缩(包括额叶和颞叶),其可以在FTD-ALS患者中造成认知损害。

[0078] ALS是一种复杂的和多因素的疾病,并且多种机制被假定为ALS发病机制的原因,包括、但不限于蛋白降解的功能障碍、谷氨酸盐兴奋性中毒、线粒体功能障碍、细胞凋亡、氧化性应激、炎症、蛋白错误折叠和聚集、异常的RNA代谢和改变的基因表达。

[0079] 约10%-15%的ALS病例具有该疾病的家族史,并且这些患者被称作家族性ALS(fALS)或遗传患者,通常具有孟德尔显性的遗传模式和高外显率。剩余者(大约85%-95%)被归类为散发性ALS(sALS),因为它们与记录的家族史无关,但是相反被认为是归因于其它风险因素,包括、但不限于环境因素、遗传多态性、体细胞突变和可能的基因-环境相互作用。在大多数情况下,家族性(或遗传性)ALS作为常染色体显性的疾病而遗传,但是存在具有常染色体隐性的和X-连锁的遗传和不完全外显率的系谱。散发性和家族性形式是临床上不能辨别的,从而提示共同的发病机制。ALS中的运动神经元的选择性死亡的精确原因仍然是难以捉摸的。理解fALS中的遗传因素的进展可能照亮该疾病的两种形式。

[0080] 近年来,对ALS的遗传原因的探究已经发现了已知造成fALS的超过10个不同基因

中的突变。最常见的突变见于编码Cu/Zn超氧化物歧化酶1 (SOD1; ~20%) 的基因 (Rosen DR 等人, Nature, 1993, 362, 59-62), 在肉瘤中融合/在脂肪肉瘤中翻译 (FUS/TLS; 1-5%) 和 TDP-43 (TARDBP; 1-5%)。近年来, 将C9orf72基因中的六核苷酸重复序列扩增 (GGGGCC)_n 鉴别为西方人群中的fALS的最常见原因 (~40%) (Renton等人, Nat. Neurosci., 2014, 17, 17-23的综述)。在ALS中突变的其它基因包括alsin (ALS2)、senataxin (SETX)、囊泡相关的膜蛋白 (VAPB) 和血管生成素 (ANG)。fALS基因控制不同的细胞机制, 从而提示, ALS的发病机制是复杂的, 且可能与几个最后导致运动神经元变性的不同过程相关。

[0081] SOD1是在哺乳动物中鉴别和表征的三种人超氧化物歧化酶之一: 铜-锌超氧化物歧化酶 (Cu/ZnSOD或SOD1)、锰超氧化物歧化酶 (MnSOD或SOD2) 和细胞外的超氧化物歧化酶 (ECSOD或SOD3)。SOD1是153-残基多肽的32kDa同源二聚体, 每个亚基具有一个铜-结合部位和一个锌-结合部位, 其由人染色体21上的SOD1基因 (GeneBank登记号: NM_000454.4) 编码 (参见表2)。SOD1催化在结合的铜离子处超氧化物阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 向分子氧 (O_2) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的反应。细胞内SOD1浓度是高的 (范围为10-100 μ M), 占中枢神经系统 (CNS) 中的总蛋白质含量的1%。该蛋白不仅定位在细胞质中, 而且定位在真核细胞的细胞核、溶酶体、过氧化物酶体和线粒体膜间隙中 (Lindenau J等人, Glia, 2000, 29, 25-34)。

[0082] fALS患者中的15-20% 和所有ALS病例中的1-2% 携带SOD1基因中的突变。目前, 已经发现分布在153个氨基酸的SOD1多肽中的至少170个不同突变会造成ALS, 且更新列表可以在ALS在线遗传性数据库 (ALSOD) 中找到 (Wroe R等人, Amyotroph Lateral Scler., 2008, 9, 249-250)。表1列出了ALS中的SOD1的突变的一些例子。这些突变主要是单个氨基酸置换 (即错义突变), 尽管缺失、插入和C-末端截短也会发生。不同的SOD1突变表现出不同的地理分布模式。例如, 具有由SOD1基因突变造成的ALS的所有美国人中的40-50% 具有特定突变Ala4Val (或A4V)。A4V突变通常与更严重的征象和症状有关, 且存活期通常是2-3年。I113T突变是迄今在英国最常见的突变。在欧洲最流行的突变是D90A置换, 且存活期经常大于10年。

[0083] 表1. 在ALS中的SOD1突变的例子

[0084]

位置	突变
外显子 1 (220bp)	Q22L; E21K,G; F20C;N19S; G16A,S; V14M,S; G12R; G10G,V,R; L8Q,V; V7E; C6G,F; V5L; A4T,V,S
外显子 2 (97bp)	T54R; E49K; H48R,Q; V47F,A; H46R; F45C; H43R; G41S,D; G37R; V29,insA
外显子 3 (70bp)	D76Y,V; G72S,C; L67R; P66A; N65S; S59I,S
外显子 4 (118bp)	D124G,V; V118L,InsAAAAC; L117V; T116T; R115G; G114A; I113T,F; I112M,T; G108V; L106V,F; S106L,delTCACTC; I104F; D101G,Y,H,N; E100G,K; I99V; V97L,M; D96N,V; A95T,V; G93S,V,A, C,R,D; D90V,A; A89T,V; T88delACTGCTGAC; V87A,M; N86I,S,D,K; G85R,S; L84V,F; H80R
外显子 5 (461bp)	I151T,S; I149T; V148I,G; G147D,R; C146R, stop; A145T,G; L144F,S; G141E,stop; A140A,G; N139D,K,H,N; G138E; T137R; S134N; E133V,delGAA,insTT; E132insTT; G127R,InsTGGG; L126S,delITT,stop; D126,delTT

[0085] 为了研究与SOD1基因缺陷有关的神经元死亡的机制,本领域开发了SOD1有关的ALS的几种啮齿动物模型,它们表达具有不同突变(包括错义突变、小缺失或插入)的人SOD1基因。ALS小鼠模型的非限制性例子包括SOD1^{G93A}、SOD1^{A4V}、SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R}、SOD1^{D90A}、SOD1^{L84V}、SOD1^{I113T}、SOD1^{H36R/H48Q}、SOD1^{G127X}、SOD1^{L126X}和SOD1^{L126delTT}。存在两种携带两种不同人SOD1突变的转基因大鼠模型:SOD1^{H46R}和SOD1^{G93R}。这些啮齿动物ALS模型可以发生与人ALS患者类似的肌无力和反映人疾病的几个特征的其他病原性特征,具体地是脊柱运动神经元的选择性死亡、蛋白包涵体在运动神经元中的聚集和小神经胶质活化。本领域众所周知,转基因的啮齿类动物是人SOD1相关的ALS疾病的良好模型,并提供用于研究疾病发病机制和开发疾病治疗的模型。

[0086] 在动物和细胞模型中的研究表明,SOD1病原性变体通过功能的获得而造成ALS。也就是说,当被SOD1突变改变时,超氧化物歧化酶获得新的但是有害的性质。例如,在ALS中的一些SOD1突变的变体通过破坏氧化还原循环而增加氧化性应激(例如,增加的有毒超氧化物残余物的积累)。其它研究也表明,ALS中的一些SOD1突变的变体可能获得独立于它的正常生理功能的有毒性质(诸如错误折叠的SOD1变体的异常聚集)。在异常的氧化还原化学模

型中,突变体SOD1是不稳定的且通过与非常规底物的异常化学相互作用造成活性氧(ROS)的过度产生。在蛋白毒性模型中,不稳定的、错误折叠的SOD1聚集成细胞质包涵体,从而隔离对于细胞过程而言关键性的蛋白。这两种假设并不相互排斥。已经证实,结合活性部位中的金属的选定组氨酸残基的氧化会介导SOD1聚集。

[0087] 聚集的突变体SOD1蛋白还可能诱导线粒体功能障碍(Vehvilainen P等人,Front Cell Neurosci.,2014,8,126)、轴突运输的病损、异常的RNA代谢、神经胶质细胞病理学和谷氨酸盐兴奋性中毒。在某些散发性ALS病例中,错误折叠的野生型SOD1蛋白见于患病的运动神经元中,其形成与家族性ALS相关的SOD1变体看到的那些类似的“有毒构象”(Rotunno MS和Bosco DA,Front Cell Neurosci.,2013,16,7,253)。这样的证据提示,ALS是一种与其它神经变性疾病(诸如阿尔茨海默氏病和帕金森病)类似的蛋白折叠疾病。

[0088] 目前,没有治愈性治疗可用于遭受ALS的患者。唯一的FDA批准的药物利鲁唑(谷氨酸盐释放的抑制剂)对ALS具有中度作用,仅使存活延长2-3个月(如果施用18个月)。不幸的是,施用利鲁唑的患者不会经历疾病进展的任何减慢或肌肉功能的改善。因此,利鲁唑不代表治愈性的或甚至有效的治疗。研究人员继续寻找更好的治疗剂。

[0089] 以前已经试验了可能阻止或改善SOD1聚集的治疗方案。例如,阿莫氯醇(arimocloamol,一种羟胺衍生物)是靶向热激蛋白的药物,其是针对这些聚集体的细胞防御机制。研究证实,阿莫氯醇治疗会改善SOD1小鼠模型中的肌肉功能。靶向ALS中的一种或多种细胞缺陷的其它药物可以包括:诸如他仑帕奈的AMPA拮抗剂, β -内酰胺抗生素(其可以减少谷氨酸盐诱导的运动神经元兴奋性中毒);溴隐亭,其可以抑制氧化诱导的运动神经元死亡(例如美国专利公开号20110105517;其内容通过引用整体并入本文);1,3-二苯基脲衍生物或多重激酶抑制剂,其可以减少SOD1基因表达(例如,美国专利公开号20130225642;其内容通过引用整体并入本文);多巴胺激动剂普拉克索和它的对映异构体dexpramipexole,其可以改善线粒体中的氧化应答;尼美舒利,其抑制环加氧酶(例如,美国专利公开号20060041022;其内容通过引用整体并入本文);充当自由基清除剂的药物(例如美国专利号:6,933,310和PCT专利公开号:W02006075434;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0090] 抑制异常的SOD1蛋白聚集的另一个方案是沉默/抑制ALS中的SOD1基因表达。已经报道,用于突变的等位基因的特异性基因沉默的小干扰RNA对于fALS的治疗而言是治疗上有益的(例如,Ralgh GS等人,Nat.Medicine,2005,11(4),429-433;和Raoul C等人,Nat.Medicine,2005,11(4),423-428;和Maxwell MM等人,PNAS,2004,101(9),3178-3183;和Ding H等人,Chinese Medical J.,2011,124(1),106-110;和Scharz DS等人,Plos Genet.,2006,2(9),e140;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0091] 在本领域中教导了靶向SOD1基因并调节ALS中的SOD1表达的许多其它RNA治疗剂。这样的基于RNA的药剂包括反义寡核苷酸和双链小干扰RNA。参见,例如,Wang H等人,J Biol.Chem.,2008,283(23),15845-15852;美国专利号7,498,316、7,632,938、7,678,895、7,951,784、7,977,314、8,183,219、8,309,533和8,586,554;和美国专利公开号2006/0229268和2011/0263680;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0092] 本发明提供了调节性多核苷酸(例如,靶向SOD1基因的siRNA分子)以及它们的设计和生方法。具体地,本发明采用诸如腺伴随病毒(AAV)载体的病毒载体,其包含编码本

发明的siRNA分子的核酸序列。包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体可以增加活性剂向运动神经元中的递送。靶向SOD1基因的所述siRNA双链体或编码dsRNA能够在细胞内显著地抑制SOD1基因表达(例如,mRNA水平);因此,改善SOD1表达会在细胞内诱导应激,诸如蛋白的聚集和包涵体的形成、增加的自由基、线粒体功能障碍和RNA代谢。

[0093] 这样的siRNA介导的SOD1表达抑制可以用于治疗ALS。根据本发明,用于治疗和/或改善患者中的ALS的方法包括给患者的细胞施用有效量的AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。包含这样的核酸序列的AAV载体的施用将编码造成SOD1基因表达的抑制/沉默的siRNA分子。

[0094] 在一个实施方案中,所述载体(例如,编码调节性多核苷酸的AAV)会减少受试者中的突变体SOD1的表达。突变体SOD1的减少还可以减少有毒聚集体的形成,所述有毒聚集体可以造成毒性机制,例如,但不限于,氧化性应激、线粒体功能障碍、受损的轴突运输、异常的RNA代谢、神经胶质细胞病理学和/或谷氨酸盐兴奋性中毒。

[0095] 在一个实施方案中,所述载体(例如,AAV载体)会减少有此需要的受试者中的SOD1的量,并因而提供如本文中所述的治疗益处。

[0096] 本发明的组合物

[0097] siRNA分子

[0098] 本发明涉及用于治疗神经变性障碍的RNA干扰(RNAi)诱导的基因表达抑制。本文提供了靶向SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA(在本文中共同地称作“siRNA分子”)。这样的siRNA双链体或编码的dsRNA可以减少或沉默细胞(例如,运动神经元)中的SOD1基因表达,由此改善ALS的症状,例如,但不限于,运动神经元死亡和肌肉萎缩。

[0099] RNAi(也被称作转录后基因沉默(PTGS)、压制或共抑制)是一种转录后基因沉默过程,其中RNA分子以序列特异性的方式抑制基因表达,通常通过造成特定mRNA分子的破坏。RNAi的活性组分是短/小双链RNA(dsRNA),被称作小干扰RNA(siRNA),其通常含有15-30个核苷酸(例如,19-25、19-24或19-21个核苷酸)和2个核苷酸的3'突出端,且其匹配靶基因的核酸序列。这些短RNA物质可以通过Dicer介导的较大dsRNA的切割在体内天然地产生,且它们在哺乳动物细胞中是功能性的。

[0100] 天然表达的小RNA分子(其被命名为微RNA(miRNA))通过调节mRNA的表达而引起基因沉默。含有miRNA的RNA诱导的沉默复合物(RISC)靶向与miRNA的5'区域(其被称作种子区域)中的核苷酸2-7具有完美序列互补性的mRNA,且其它碱基与它的3'区域配对。miRNA介导的基因表达的下调可以由靶mRNA的切割、靶mRNA的翻译抑制或mRNA衰变造成。miRNA靶向序列经常位于靶mRNA的3'-UTR中。单个miRNA可以靶向来自不同基因的超过100种转录物,且一种mRNA可以由不同的miRNA靶向。

[0101] 可以在体外设计和合成靶向特定mRNA的siRNA双链体或dsRNA,并引入细胞中用于活化RNAi过程。Elbashir等人证实,21-核苷酸的siRNA双链体(被称作小干扰RNA)能够实现有效的且特异性的基因敲降,而不在哺乳动物细胞中诱导免疫应答(Elbashir SM等人, Nature, 2001, 411, 494-498)。自从该最初报告以来,通过siRNA实现的转录后基因沉默作为哺乳动物细胞中的遗传分析的有利工具快速的出现,并且具有产生新颖的治疗剂的潜力。

[0102] 为了激活RNAi,可以将体外合成的siRNA分子引入细胞中。当引入细胞中时,与内源性dsRNA类似的外源性siRNA双链体可以组装以形成RNA诱导的沉默复合物(RISC),即一

种便利在基因组中寻找与siRNA双链体的两条链之一(即,反义链)互补的RNA序列的多亚基复合物。在该过程中,siRNA的有义链(或过客链)从所述复合物丢失,而siRNA的反义链(或引导链)与它的互补RNA匹配。具体地,含有siRNA的RISC复合物的靶标是具有完美序列互补性的mRNA。然后,siRNA介导的基因沉默发生,从而切割、释放和降解靶标。

[0103] siRNA双链体包含与靶mRNA同源的有义链,且与靶mRNA互补的反义链会提供在靶RNA破坏效率方面与单链(ss)-siRNA(例如反义链RNA或反义寡核苷酸)的应用相比多得多的优点。在许多情况下,它要求更高的ss-siRNA浓度以实现对应双链体的有效基因沉默效能。

[0104] 前述分子中的任一种可以由AAV载体或载体基因组编码。

[0105] 靶向SOD1基因的siRNA双链体的设计和序列

[0106] 在本领域中已经提出了一些关于设计siRNA的指南。这些指南通常推荐制备19-核苷酸的双链体化的区域、对称的2-3个核苷酸的3'突出端、5-磷酸酯和3-羟基,它们靶向要沉默的基因中的一个区域。可能控制siRNA序列偏好的其它规则包括但不限于(i)在反义链的5'末端处的A/U;(ii)在有义链的5'末端处的G/C;(iii)在反义链的5'末端三分之一中的至少5个A/U残基;和(iv)超过9个核苷酸长度的任何GC段的缺失。根据这样的考虑,与靶基因的具体序列一起,可以容易地设计抑制哺乳动物靶基因表达所必需的非常有效的siRNA分子。

[0107] 根据本发明,设计了靶向人SOD1基因的siRNA分子(例如,siRNA双链体或编码的dsRNA)。这样的siRNA分子可以特别地抑制SOD1基因表达和蛋白生产。在某些方面,设计了siRNA分子并用于选择性地“敲除”细胞中的SOD1基因变体,即,在患有ALS疾病的患者中鉴别出的突变的SOD1转录物(例如,在表1中的突变)。在某些方面,设计了siRNA分子并用于选择性地“敲降”细胞中的SOD1基因变体。在其它方面,所述siRNA分子能够抑制或遏制SOD1基因的野生型和突变的等位基因,而与SOD1基因中的任何特定突变无关。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的siRNA分子包含有义链和互补的反义链,其中两条链杂交在一起以形成双链体结构。所述反义链与SOD1 mRNA序列具有足够的互补性以指导靶标特异性的RNAi,即,siRNA分子具有足以触发通过RNAi机制或过程对靶mRNA的破坏的序列。

[0109] 在某些实施方案中,所述反义链和靶mRNA序列是100%互补的。所述反义链可以与靶mRNA序列的任何部分是互补的。

[0110] 在其它实施方案中,所述反义链和靶mRNA序列包含至少一个错配。作为一个非限制性实施例,所述反义链和所述靶mRNA序列是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%互补的。

[0111] 根据本发明,所述siRNA分子具有约10-50个或更多个核苷酸的长度,即,每个链包

含10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)。优选地,所述siRNA分子在每个链中具有约15-30(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)个核苷酸的长度,其中所述链之一是与靶区域充分互补的。在一个实施方案中,所述siRNA分子具有约19-25、19-24或19-21个核苷酸的长度。

[0112] 在某些实施方案中,本发明的siRNA分子可以是合成的RNA双链体,其包含约19个核苷酸至约25个核苷酸、和在3'-端处的两个突出核苷酸。在某些方面,所述siRNA分子可以是未修饰的RNA分子。在其它方面,所述siRNA分子可以含有至少一个修饰的核苷酸,诸如碱基、糖或主链修饰。

[0113] 在其它实施方案中,可以在质粒载体、病毒载体(例如,AAV载体)、基因组或用于递送给细胞的其它核酸表达载体中编码本发明的siRNA分子。

[0114] 可以使用DNA表达质粒在细胞中稳定地表达本发明的siRNA双链体或dsRNA并实现靶基因的长期抑制。在一个方面,siRNA双链体的有义链和反义链通常通过短间隔序列连接,从而导致被称作短发夹RNA(shRNA)的茎-环结构的表达。所述发夹被Dicer识别和切割,从而产生成熟的siRNA分子。

[0115] 根据本发明,生产AAV载体,其包含编码靶向SOD1 mRNA的siRNA分子的核酸,AAV载体血清型可以是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和AAV-DJ及其变体。

[0116] 在某些实施方案中,本发明的siRNA双链体或编码的dsRNA抑制(或降解)靶mRNA(即SOD1)。因此,所述siRNA双链体或编码的dsRNA可以用于基本上抑制细胞(例如运动神经元)中的SOD1基因表达。在某些方面,SOD1基因表达的抑制表示抑制至少约20%,优选地抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此,可以将靶向的基因的蛋白产物抑制至少约20%,优选地抑制至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。所述SOD1基因可以是野生型基因或含有至少一个突变的经突变的SOD1基因。因此,所述蛋白是野生型蛋白或含有至少一个突变的经突变的多肽。

[0117] 根据本发明,设计了靶向人SOD1基因的siRNA双链体或编码的dsRNA,并针对它们在培养的细胞中降低SOD1 mRNA水平的的能力进行了试验。这样的siRNA双链体包括在表3中列出的那些。作为一个非限制性实施例,所述siRNA双链体可以是siRNA双链体ID:D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823和D-

2858。

[0118] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA的3'茎臂可具有在引导链的3'末端下游的11个核苷酸,其与在5'茎臂中的过客链的5'末端的上游13个核苷酸中的11个具有互补性。

[0119] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA可能具有半胱氨酸,其在调节性多核苷酸的3'茎臂的3'末端的下游6个核苷酸。

[0120] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA包含引导链的miRNA种子匹配(seed match)。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA包含过客链的miRNA种子匹配。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA不包含引导链或过客链的种子匹配。

[0121] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA几乎不具有引导链的显著全长脱靶。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA几乎不具有过客链的显著全长脱靶。靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA可能具有过客链的小于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%的全长脱靶。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA几乎不具有引导链或过客链的显著全长脱靶。靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA具有引导链或过客链的小于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%的全长脱靶。

[0122] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA具有高体外活性。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA具有低体外活性。在另一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或dsRNA在体外具有高引导链活性和低过客链活性。

[0123] 在一个实施方案中,靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA在体外具有高引导链活性和低过客链活性。由引导链实现的靶标敲降(KD)可以是至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。由引导链实现的靶标敲降可以是60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作为一个非限制性实施例,由引导链实现的靶标敲降(KD)是大于70%。

[0124] 在一个实施方案中,过客链关于最近脱靶的 IC_{50} 大于引导链关于靶标的 IC_{50} 的100倍。作为一个非限制性实施例,如果过客链关于最近脱靶的 IC_{50} 大于引导链关于靶标的 IC_{50} 的100倍,那么就说靶向人SOD1基因的所述siRNA双链体或编码的dsRNA在体外具有高引导链活性和低过客链活性。

[0125] 在一个实施方案中,所述引导链的5'加工具有在5'末端处的以下正确开始

(correct start) (n):在体外或在体内的时间的至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。作为非限制性实施例,所述引导链的5'加工是精确的且具有在5'末端处的以下正确开始(n):在体外的时间的至少99%。作为非限制性实施例,所述引导链的5'加工是精确的且具有在5'末端处的以下正确开始(n):在体内的时间的至少99%。

[0126] 在一个实施方案中,表达的引导链与过客链(G:P)比率是体外或体内1:99、5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。作为非限制性实施例,所述引导链与过客链比率是体外80:20。作为非限制性实施例,所述引导链与过客链比率是体内80:20。

[0127] 在一个实施方案中,编码所述dsRNA的载体基因组的完整性是所述构建体的全长的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超过99%。

[0128] siRNA修饰

[0129] 在某些实施方案中,当不作为前体或DNA递送时,可以化学修饰本发明的siRNA分子,以调节RNA分子的某些特征,例如,但不限于,增加siRNA体内稳定性。所述化学修饰的siRNA分子可以用在人治疗用途中,且在不损害siRNA分子的RNAi活性的情况下得以改善。作为非限制性实施例,在有义链和反义链的3'和5'末端处修饰siRNA分子。

[0130] 在某些方面,本发明的siRNA双链体含有一个或多个经修饰的核苷酸,例如,但不限于,糖修饰的核苷酸、核苷碱基修饰和/或主链修饰。在某些方面,所述siRNA分子可以含有组合的修饰,例如,组合的核苷碱基和主链修饰。

[0131] 在一个实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是糖修饰的核苷酸。糖修饰的核苷酸包括但不限于2'-氟、2'-氨基和2'-硫修饰的核糖核苷酸,例如2'-氟修饰的核糖核苷酸。修饰的核苷酸可以在糖部分以及具有糖或其非核糖基的类似物的核苷酸上被修饰。例如,所述糖部分可以是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃型葡萄糖、吡喃型半乳糖、4'-硫核糖和其它糖、杂环或碳环。

[0132] 在一个实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是核苷碱基修饰的核苷酸。

[0133] 在一个实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是主链修饰的核苷酸。在某些实施方案中,本发明的siRNA双链体还可以包含在主链上的其它修饰。本文中使用的正常的“主链”表示在DNA或RNA分子中重复地交替糖-磷酸序列。脱氧核糖/核糖在3'-羟基和5'-羟基处连接至酯连接中的磷酸酯基团,也被称作“磷酸二酯”键/接头(P0连接)。所述P0主链可以被修饰为“硫代磷酸酯主链(PS连接)。在某些情况下,天然的磷酸二酯键可以被酰胺键替换,但是保持两个糖单元之间的四个原子。这样的酰胺修饰可以促进寡核苷酸的固相合成和增加与siRNA补体形成的双链体的热力学稳定性。参见例如Mesmaeker等人,Pure&Appl.Chem., 1997, 3, 437-440;其内容通过引用整体并入本文。

[0134] 经修饰的碱基表示已经通过一个或多个原子或基团的替换或添加进行修饰的核苷酸碱基,例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、肌苷和腺苷。在核苷碱基部分上的修饰的一些例子包括但不限于单独的或组合的烷基化的、卤化的、硫醇盐化的、胺化的、酰胺化的或乙酰化的碱基。更具体的例子包括,例如,5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和具有在5位处的修饰的其它核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲

基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基鸟苷、7-甲基鸟苷、2,2-二甲基鸟苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲基氧基尿苷、脱氮核苷酸诸如7-脱氮-腺苷、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷、6-偶氮胸苷、5-甲基-2-硫尿苷、其它硫代碱基诸如2-硫尿苷和4-硫尿苷和2-硫胞苷、二氢尿苷、假尿苷、癸苷、古嘌呤、蔡基和取代的蔡基、任何O-和N-烷基化的嘌呤和嘧啶诸如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-氧基乙酸、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基和修饰的苯基诸如氨基苯酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G-夹核苷酸的经修饰的胞嘧啶、8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基羟基烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸和烷基羰基烷基化的核苷酸。

[0135] 在一个实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是仅在有义链上。

[0136] 在另一个实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是仅在反义链上。

[0137] 在某些实施方案中,所述修饰的核苷酸可以是在有义链和反义链中。

[0138] 在某些实施方案中,所述化学修饰的核苷酸不会影响反义链与靶mRNA序列(诸如SOD1 mRNA序列)配对的能力。

[0139] 载体

[0140] 在某些实施方案中,本文描述的siRNA分子可以由诸如质粒或病毒载体的载体编码。在一个实施方案中,所述siRNA分子由病毒载体编码。病毒载体可以是,但不限于疱疹病毒(HSV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、慢病毒载体等。在某些具体实施方案中,所述病毒载体是AAV载体。

[0141] 逆转录病毒载体

[0142] 在某些实施方案中,靶向SOD1基因的siRNA双链体可以由逆转录病毒载体编码(参见,例如,美国专利号5,399,346、5,124,263、4,650,764和4,980,289;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0143] 腺病毒载体

[0144] 腺病毒是可以被修饰以将核酸有效地递送至多种体内细胞类型的真核DNA病毒,且已经被广泛地用在基因治疗方案中,包括用于将基因靶向至神经细胞。已经描述了用于核酸治疗剂的多种复制缺陷型腺病毒和最小腺病毒载体(参见,例如,PCT专利公开号W0199426914、W0 199502697、W0199428152、W0199412649、W0199502697和W0199622378;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入)。这样的腺病毒载体也可以用于将本发明的siRNA分子递送至细胞。

[0145] 腺伴随病毒(AAV)载体

[0146] 腺伴随病毒(AAV)是一种依赖性的细小病毒(象其它细小病毒一样),其为具有约5000个核苷酸长度的基因组的单链无衣壳DNA病毒,且其含有2个开放读码框,所述开放读码框编码负责复制的蛋白(Rep)和衣壳的结构蛋白(Cap)。所述开放读码框侧接两个反向末端重复(ITR)序列,它们充当病毒基因组的复制起点。此外,所述AAV基因组含有包装序列,从而允许将病毒基因组包装进AAV衣壳中。所述AAV载体需要共助手(例如,腺病毒)以经历在受感染的细胞中的生产性感染。在没有这样的辅助功能存在下,AAV病毒粒子基本上进入宿主细胞并整合进细胞的基因组中。

[0147] 因为几个独特的特征,已经针对siRNA递送研究了AAV载体。所述特征的非限制性例子包括(i)感染分裂的细胞和非分裂的细胞的能力;(ii)侵染性的广宿主范围,包括人细

胞；(iii)野生型AAV尚未与任何疾病相关，且尚未被证实在受感染的细胞中复制；(iv)细胞介导的针对载体的免疫应答的缺乏，和(v)在宿主染色体中的不整合性质，由此减少长期表达的可能。此外，AAV载体感染对改变细胞基因表达模式具有微小影响(Stilwell和Samulski等人,Biotechniques,2003,34,148)。

[0148] 通常，用于siRNA递送的AAV载体可以是复制缺陷型的重组病毒载体，因为它们在病毒基因组内缺乏编码功能性的Rep和Cap蛋白的序列。在某些情况下，有缺陷的AAV载体可能缺乏大多数或所有的编码序列，且基本上仅含有一个或两个AAV ITR序列和一个包装序列。

[0149] AAV载体还可以包含自互补的AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有两条DNA链，它们对合在一起以形成双链DNA。通过跳过第二条链合成，scAAV允许在细胞中快速表达。

[0150] 在一个实施方案中，在本发明中使用的AAV载体是scAAV。

[0151] 在一个实施方案中，在本发明中使用的AAV载体是ssAAV。

[0152] 在本领域中公开了用于生产和/或修饰AAV载体的方法，诸如假分型的AAV载体(PCT专利公开号W0200028004、W0200123001、W02004112727、W0 2005005610和W0 2005072364，它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0153] 可以从AAV的多种血清型制备或衍生出包含siRNA分子的核酸序列的AAV载体，所述血清型包括、但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和AAV-DJ。在某些情况下，可以将AAV的不同血清型混合在一起或与其它病毒类型混合以产生嵌合的AAV载体。

[0154] 在一个实施方案中，可以将包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体引入哺乳动物细胞中。

[0155] 可以修饰AAV载体以增强递送的效率。可以有效地包装这样的经修饰的包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体，且可以用于以高频率和最小毒性成功地感染靶细胞。

[0156] 在某些实施方案中，包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体可以是人血清型AAV载体。这样的人AAV载体可以源自任何已知的血清型，例如，源自血清型AAV1-AAV11中的任一种。作为非限制性例子，AAV载体可以是：在AAV1衍生的衣壳中的包含AAV1衍生的基因组的载体；在AAV2衍生的基因组中的包含AAV2衍生的基因组的载体；在AAV4衍生的衣壳中的包含AAV4衍生的基因组的载体；在AAV6衍生的衣壳中的包含AAV6衍生的基因组的载体；或在AAV9衍生的衣壳中的包含AAV9衍生的基因组的载体。

[0157] 在其它实施方案中，包含用于编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体可以是假分型的杂合的或嵌合的AAV载体，其含有源自至少两种不同AAV血清型的序列和/或组分。假分型的AAV载体可以是包含源自一种AAV血清型的AAV基因组的载体和至少部分地源自一种不同AAV血清型的衣壳蛋白。作为非限制性例子，这样的假分型的AAV载体可以是：在AAV1衍生的衣壳中的包含AAV2衍生的基因组的载体；或在AAV6衍生的衣壳中的包含AAV2衍生的基因组的载体；或在AAV4衍生的衣壳中的包含AAV2衍生的基因组的载体；或在AAV9衍生的衣壳中的AAV2衍生的基因组。以类似的方式，本发明考虑到任何杂合的或嵌合的AAV载体。

[0158] 在其它实施方案中，可以使用包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体

将siRNA分子递送至中枢神经系统(例如,美国专利号6,180,613;其内容通过引用整体并入本文)。

[0159] 在某些方面,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体还可以包含经修饰的衣壳,所述衣壳包括来自非病毒起源的肽。在其它方面,所述AAV载体可以含有CNS特异性的嵌合衣壳以促进编码的siRNA双链体向脑和脊髓中的递送。例如,可以构建表现出CNS向性的来自AAV变体的帽核苷酸序列的比对以鉴别可变区(VR)序列和结构。

[0160] 在一个实施方案中,包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV载体可以编码是多顺反子分子的siRNA分子。所述siRNA分子可以另外包含在siRNA分子的区域之间的一个或多个接头。

[0161] 在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子(例如,但不限于,CMV、U6、CBA或具有SV40内含子的CBA启动子)的下游。另外,编码的siRNA分子还可以在表达载体中位于多腺苷酸化序列的上游。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超过30个核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超过25%的核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的核苷酸内。

[0162] 在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于多腺苷酸化序列的上游。另外,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子(例如,但不限于,CMV、U6、CBA或具有SV40内含子的CBA启动子)的下游。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超过30个核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超过25%的核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于启动子下游和/或多腺苷酸化序列上游前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的核苷酸内。

[0163] 在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以位于scAAV中。

[0164] 在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以位于ssAAV中。

[0165] 在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flip ITR的5'末端附近。在另外的实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flip ITR的

3' 末端附近。在另一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flop ITR的5' 末端附近。在另一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flop ITR的3' 末端附近。在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flip ITR的5' 末端和flop ITR的3' 末端之间。在一个实施方案中,所述编码的siRNA分子可以在表达载体中位于flip ITR的3' 末端和flip ITR的5' 末端之间(例如,flip ITR的5' 末端和flop ITR的3' 末端之间或者flop ITR的3' 末端和flip ITR的5' 末端之间的中途)。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端下游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超过30个核苷酸内。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端上游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超过30个核苷酸内。作为另一个非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端下游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端上游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30个核苷酸内。作为非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端上游前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超过25%的核苷酸内。作为另外的非限制性实施例,编码的siRNA分子可以在表达载体中位于ITR(例如,Flip或Flop ITR)的5' 或3' 末端下游前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%的核苷酸内。

[0166] 表达载体

[0167] 在一个实施方案中,表达载体(例如,AAV载体)可以包含至少一种调节性多核苷酸,所述调节性多核苷酸包含至少一种本文描述的表达载体。

[0168] 在一个实施方案中,表达载体可以包含,从ITR至ITR(按5' 至3'), ITR、启动子、内含子、调节性多核苷酸、聚腺苷酸序列和ITR。

[0169] 基因组大小

[0170] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是单链的或双链的载体基因组。所述载体基因组的大小可以是小的、中等的、大的或最大的大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0171] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是小单链载体基因组。小单链载体基因组可以是2.7-3.5kb大小,诸如约2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4和3.5kb大小。作为一个非限制性实施例,所述小单链载体基因组可以是3.2kb大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0172] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是小双链载体基因组。小双链载体基因组可以是1.3-1.7kb大小,诸如约1.3、1.4、1.5、1.6和1.7kb大小。作为一个非限制性实施例,所述小双链载体基因组可以是1.6kb大

小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0173] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸(例如,siRNA或dsRNA)的核酸序列的载体基因组可以是中等单链载体基因组。中等单链载体基因组可以是3.6-4.3kb大小,诸如约3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2和4.3kb大小。作为一个非限制性实施例,所述中等单链载体基因组可以是4.0kb大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0174] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是中等双链载体基因组。中等双链载体基因组可以是1.8-2.1kb大小,诸如约1.8、1.9、2.0和2.1kb大小。作为一个非限制性实施例,所述中等双链载体基因组可以是2.0kb大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0175] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是单链载体基因组。单链载体基因组可以是4.4-6.0kb大小,诸如约4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9和6.0kb大小。作为一个非限制性实施例,所述单链载体基因组可以是4.7kb大小。作为另一个非限制性实施例,所述单链载体基因组可以是4.8kb大小。作为另一个非限制性实施例,所述单链载体基因组可以是6.0kb大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0176] 在一个实施方案中,包含编码本文描述的调节性多核苷酸的核酸序列的载体基因组可以是双链载体基因组。双链载体基因组可以是2.2-3.0kb大小,诸如约2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和3.0kb大小。作为一个非限制性实施例,所述双链载体基因组可以是2.4kb大小。另外,所述载体基因组可以包含启动子和聚腺苷酸尾巴。

[0177] 启动子

[0178] 本领域技术人员可以认识到,靶细胞可能需要特异性的启动子,包括、但不限于物种特异性的、可诱导的、组织特异性的或细胞周期特异性的启动子(Parr等人,Nat.Med.3:1145-9(1997);其内容通过引用整体并入本文)。

[0179] 在一个实施方案中,所述启动子是被认为有效地驱动调节性多核苷酸的表达的启动子。

[0180] 在一个实施方案中,所述启动子是对正在靶向的细胞具有向性的启动子。

[0181] 在一个实施方案中,所述启动子是提供净荷(例如,调节性多核苷酸,例如,siRNA或dsRNA)在靶向的组织(例如,但不限于,神经系统组织)中表达一段时间的弱启动子。表达可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3周、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或超过10年的时间段。表达可以持续1-5小时、1-12小时、1-2天、1-5天、1-2周、1-3周、1-4周、1-2个月、1-4个月、1-6个月、2-6个月、3-6个月、3-9个月、4-8个月、6-12个月、1-2年、1-5年、2-5年、3-6年、3-8年、4-8年或5-10年。作为一个非限制性实施例,所述启动子是用于在神经组织中持续表达净荷的弱启动子。

[0182] 在一个实施方案中,所述启动子可以是小于1kb的启动子。所述启动子可以具有200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或超过800的长度。所述启动子可以具有200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800之间的长度。

[0183] 在一个实施方案中,所述启动子可以是两个或更多个组分(例如,但不限于,CMV和CBA)的组合。每个组分可以具有200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或超过800的长度。每个组分可以具有200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800之间的长度。作为一个非限制性实施例,所述启动子是382核苷酸的CMV-增强子序列和260核苷酸的CBA-启动子序列的组合。

[0184] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含至少一个元件以增强靶标特异性和表达(参见例如,Powell等人.Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容通过引用整体并入本文)。用于增强转基因靶标特异性和表达的元件的非限制性例子包括启动子、内源性miRNA、转录后调节元件(PRE)、多腺苷酸化(PolyA)信号序列和上游增强子(USE)、CMV增强子和内含子。

[0185] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含至少一个元件以增强靶标特异性和表达(参见例如,Powell等人.Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容通过引用整体并入本文),诸如启动子。

[0186] 在大多数组织中促进其表达的启动子包括但不限于人延伸因子1 α -亚基(EF1 α)、立即早期巨细胞病毒(CMV)、鸡 β -肌动蛋白(CBA)和它的衍生物CAG、 β 葡萄糖醛酸糖苷酶(GUSB)或泛素C(UBC)。组织特异性的表达元件可以用于将表达限制至特定细胞类型,例如,但不限于,可以用于将表达限制至神经元、星形胶质细胞或少突神经胶质细胞的神经系统启动子。用于神经元的组织特异性的表达元件的非限制性例子包括神经元特异性的烯醇化酶(NSE)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、血小板衍生的生长因子B-链(PDGF- β)、突触蛋白(Syn)、甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)、CaMKII、mGluR2、NFL、NFH、n β 2、PPE、Enk和EAAT2启动子。用于星形胶质细胞的组织特异性的表达元件的一个非限制性例子包括神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和EAAT2启动子。用于少突神经胶质细胞的组织特异性的表达元件的一个非限制性例子包括髓磷脂碱蛋白(MBP)启动子。

[0187] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含普遍存在的启动子。普遍存在的启动子的非限制性例子包括CMV、CBA(包括衍生物CAG、CBh等)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB(hgBp)和UCOE

(HNRPA2B1-CBX3的启动子)。Yu等人(Molecular Pain 2011,7:63;其内容通过引用整体并入本文)使用慢病毒载体在大鼠DRG细胞和原代DRG细胞中评价了在CAG、EF1 α 、PGK和UBC启动子下eGFP的表达,并发现UBC表现出比其它3种启动子更弱的表达,并且对于所有启动子而言存在仅10-12%神经胶质表达。Soderblom等人(E.Neuro2015;其内容通过引用整体并入本文)评价了在注射进运动皮质中以后eGFP在具有CMV和UBC启动子的AAV8和具有CMV启动子的AAV2中的表达。含有UBC或EF1 α 启动子的质粒的鼻内施用表现出大于具有CMV启动子的表达的持久气道表达(参见例如,Gill等人,Gene Therapy 2001,第8卷,1539-1546;其内容通过引用整体并入本文)。Husain等人(Gene Therapy 2009;其内容通过引用整体并入本文)评价了具有hGUSB启动子、HSV-1LAT启动子和NSE启动子的H β H构建体,并发现H β H构建体在小鼠脑中表现出比NSE更弱的表达。Passini和Wolfe(J.Virol.2001,12382-12392,其内容通过引用整体并入本文)评价了在新生小鼠心室内注射以后H β H载体的长期作用,并发现存在至少1年的持久表达。当使用NF-L和NF-H启动子与CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE+wpre、NSE(0.3kb)、NSE(1.8kb)和NSE(1.8kb+wpre)进行对比时,Xu等人(Gene Therapy 2001,8,1323-1332;其内容通过引用整体并入本文)发现了在所有脑区域中的低表达。Xu等人发现启动子活性按递减次序为NSE(1.8kb)、EF、NSE(0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL和NFH。NFL是一种650核苷酸的启动子且NFH是一种920核苷酸的启动子,它们二者都不存在于肝中,但是NFH在感觉本体感受神经元、脑和脊髓中是丰富的,且NFH存在于心脏中。Scn8a是一种在DRG、脊髓和脑中到处表达的470核苷酸的启动子,在海马神经元和小脑浦肯野细胞、皮质、丘脑和下丘脑中看到特别高的表达(参见例如,Drews等人.2007和Raymond等人.2004;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0188] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含UBC启动子。所述UBC启动子可以具有300-350个核苷酸的大小。作为一个非限制性实施例,所述UBC启动子是332个核苷酸。

[0189] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含GUSB启动子。所述GUSB启动子可以具有350-400个核苷酸的大小。作为一个非限制性实施例,所述GUSB启动子是378个核苷酸。作为一个非限制性实施例,所述构建体可以是AAV-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG,其中所述AAV可以是自互补的,且所述AAV可以是DJ血清型。

[0190] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含NFL启动子。所述NFL启动子可以具有600-700个核苷酸的大小。作为一个非限制性实施例,所述NFL启动子是650个核苷酸。作为一个非限制性实施例,所述构建体可以是AAV-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG,其中所述AAV可以是自互补的,且所述AAV可以是DJ血清型。

[0191] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含NFH启动子。所述NFH启动子可以具有900-950个核苷酸的大小。作为一个非限制性实施例,所述NFH启动子是920个核苷酸。作为一个非限制性实施例,所述构建体可以是AAV-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG,其中所述AAV可以是自互补的,且所述AAV可以是DJ血清型。

[0192] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含scn8a启动子。所述scn8a启动子可以具有450-500个核苷酸的大小。作为一个非限制性实施例,所述scn8a启动子是470个核苷酸。作为一个非限制性实施例,所述构建体可以是AAV-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG,其中所述AAV可以是自互补的,且所述AAV可以是DJ血清型。

[0193] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含FXN启动子。

[0194] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含PGK启动子。

[0195] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含CBA启动子。

[0196] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含CMV启动子。

[0197] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含肝或骨骼肌启动子。肝启动子的非限制性例子包括hAAT和TBG。骨骼肌启动子的非限制性例子包括结蛋白、MCK和C5-12。

[0198] 在一个实施方案中,所述AAV载体包含增强子元件、启动子和/或5' UTR内含子。所述增强子可以是,但不限于,CMV增强子,所述启动子可以是,但不限于,CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、突触蛋白(Sunapsin)、MeCP2和GFAP启动子,且所述5' UTR/内含子可以是,但不限于,SV40和CBA-MVM。作为一个非限制性实施例,所述组合使用的增强子、启动子和/或内含子可以是:(1)CMV增强子、CMV启动子、SV40 5' UTR内含子;(2)CMV增强子、CBA启动子、SV 40 5' UTR内含子;(3)CMV增强子、CBA启动子、CBA-MVM 5' UTR内含子;(4)UBC启动子;(5)GUSB启动子;(6)NSE启动子;(7)突触蛋白启动子;(8)MeCP2启动子和(9)GFAP启动子。

[0199] 在一个实施方案中,所述AAV载体具有经工程改造的启动子。

[0200] 内含子

[0201] 在一个实施方案中,所述载体基因组包含至少一个元件以增强转基因靶标特异性和表达(参见例如,Powell等人.Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,2015;其内容通过引用整体并入本文),诸如内含子。内含子的非限制性例子包括,MVM(67-97bp)、F.IX截短的内含子1(300bp)、 β -珠蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bp)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bp)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂合腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bp)。

[0202] 在一个实施方案中,所述内含子可以是100-500个核苷酸的长度。所述内含子可以具有80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500的长度。所述启动子可以具有80-100、80-120、80-140、80-160、80-180、80-200、80-250、80-300、80-350、80-400、80-450、80-500、200-300、200-400、200-500、300-400、300-500或400-500之间的长度。

[0203] 在一个实施方案中,所述AAV载体基因组可以包含启动子,例如,但不限于,CMV或U6。作为一个非限制性实施例,包含本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV的启动子是CMV启动子。作为另一个非限制性实施例,包含本发明的siRNA分子的核酸序列的AAV的启动子是U6启动子。

[0204] 在一个实施方案中,所述AAV载体可以包含CMV和U6启动子。

[0205] 在一个实施方案中,所述AAV载体可以包含CBA启动子。

[0206] 引入细胞-合成的dsRNA

[0207] 为了确保siRNA分子(例如,siRNA双链体和dsRNA)的化学和生物稳定性,重要的是,将siRNA分子递送到靶细胞内。在某些实施方案中,所述细胞可以包括但不限于哺乳动物起源的细胞、人起源的细胞、胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、神经干细胞和神经祖细胞。

[0208] 核酸(包括siRNA)在正常生理条件下在糖-磷酸主链上携带净负电荷。为了进入细胞,siRNA分子必须与细胞膜的脂质双层发生接触,所述脂质双层的首基也是带负电荷的。

[0209] siRNA双链体可以与允许它们穿过细胞膜的载体(诸如包装颗粒)形成复合物以促进siRNA的细胞摄取。所述包装颗粒可以包括但不限于脂质体、纳米颗粒、阳离子脂质、聚乙烯亚胺衍生物、树枝状聚合物、碳纳米管以及碳制成的纳米颗粒与树枝状聚合物的组合。脂质可以是阳离子脂质和/或中性脂质。除了充分确立的siRNA分子和阳离子载体之间的亲脂复合物以外,可以将siRNA分子缀合至疏水部分,诸如胆固醇(例如,美国专利公开号20110110937;其内容通过引用整体并入本文)。该递送方法具有改善siRNA分子的体外细胞摄取和体内药理学性能的潜力。本发明的siRNA分子还可以共价地或非共价地缀合至某些阳离子的细胞穿透肽(CPP),诸如MPG、transportan或penetratin(例如,美国专利公开号20110086425;其内容通过引用整体并入本文)。

[0210] 引入细胞-AAV载体

[0211] 使用多种方案中的任一种,例如,但不限于,病毒载体(例如,AAV载体),可以将本发明的siRNA分子(例如,siRNA双链体)引入细胞中。这些病毒载体经过工程改造和优化以促进siRNA分子向不容易转染的细胞中的进入。并且,一些合成的病毒载体具有将shRNA整合进细胞基因组中的能力,由此导致稳定的siRNA表达和靶基因的长期敲降。以此方式,将病毒载体工程改造为用于特异性递送的媒介物,同时缺乏在野生型病毒中发现的有害复制和/或整合特征。

[0212] 在某些实施方案中,如下将本发明的siRNA分子引入细胞中:使所述细胞与包含亲脂载体和载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的组合物接触。在其它实施方案中,如下将所述siRNA分子引入细胞中:用载体(例如,AAV载体,其包含当在细胞中转录时能够生产siRNA分子的核酸序列)转染或感染所述细胞。在某些实施方案中,如下将所述siRNA分子引入细胞中:向所述细胞中注射载体,例如,AAV载体,其包含当在细胞中转录时能够生产siRNA分子的核酸序列。

[0213] 在某些实施方案中,在转染之前,可以向细胞中转染载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0214] 在其它实施方案中,通过电穿孔(例如美国专利公开号20050014264;其内容通过引用整体并入本文),可以向细胞中递送载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0215] 用于引入载体(例如,AAV载体,其包含本文描述的siRNA分子的核酸序列)的其它方法可以包括如在美国专利公开号20120264807(其内容通过引用整体并入本文)中所述的光化学内化。

[0216] 在某些实施方案中,本文描述的制剂可以含有至少一种载体,例如,AAV载体,其包含编码本文描述的siRNA分子的核酸序列。在一个实施方案中,所述siRNA分子可以靶向在一个靶位处的SOD1基因。在另一个实施方案中,所述制剂包含多种载体,例如,AAV载体,其每种均包含编码靶向在不同靶位处的SOD1基因的siRNA分子的核酸序列。可以在2、3、4、5或超过5个部位处靶向SOD1。

[0217] 在一个实施方案中,可以将载体(例如,AAV载体,其来自任何有关的物种,例如,但不限于,人、狗、小鼠、大鼠或猴)引入细胞中。

[0218] 在一个实施方案中,可以将载体(例如,AAV载体)引入与要治疗的疾病有关的细胞中。作为一个非限制性实施例,所述疾病是ALS,且所述靶细胞是运动神经元和星形胶质细

胞。

[0219] 在一个实施方案中,可以将载体(例如,AAV载体)引入具有靶序列的高内源性表达水平的细胞中。

[0220] 在另一个实施方案中,可以将载体(例如,AAV载体)引入具有靶序列的低内源性表达水平的细胞中。

[0221] 在一个实施方案中,所述细胞可以是具有高AAV转导效率的那些。

[0222] 药物组合物和制剂

[0223] 除了所述药物组合物(载体,例如,AAV载体,其包含编码siRNA分子的核酸序列)以外,本文还提供了适合用于施用给人类的药物组合物,技术人员会理解,这样的组合物通常适合用于施用给任意其它动物,例如,非人动物,例如非人哺乳动物。对适合施用给人类的药物组合物进行修改以便使所述组合物适合施用给各种动物是被充分理解的,并且具有普通技术的兽医药理学家仅用普通(如果有的话)实验就可以设计和/或执行这样的修改。预见到对其施用药物组合物的受试者包括但不限于人类和/或其它灵长类动物;哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或禽类,包括商业上相关的禽类,诸如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0224] 在某些实施方案中,将组合物施用给人类、人患者或受试者。为了本公开内容的目的,短语“活性成分”通常表示合成的siRNA双链体、载体(例如,AAV载体,其编码siRNA双链体),或表示由如本文中所述的载体递送的siRNA分子。

[0225] 通过药理学领域中已知的或此后开发的任意方法,可以制备本文描述的药物组合物的制剂。一般而言,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它助剂结合,和然后,如果必要的话和/或合乎需要的话,将产品分包、成形和/或包装成期望的单次剂量或多次剂量单位。

[0226] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量将变化,这取决于所治疗的受试者的身份、大小和/或病症,并且进一步取决于要施用所述组合物的途径。

[0227] 可以使用一种或多种赋形剂配制载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列),以:(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染或转导;(3)允许持久或延迟释放;或(4)改变生物分布(例如,将病毒载体靶向至特定组织或细胞类型诸如脑和运动神经元)。

[0228] 本发明的制剂可以包括,但不限于,盐水、脂质样物、脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、脂复合物、芯-壳纳米颗粒、肽、蛋白、用病毒载体转染的细胞(例如,用于移植进受试者中)、纳米颗粒模仿物和它们的组合。此外,使用自装配的核酸纳米颗粒可以配制本发明的病毒载体。

[0229] 通过药理学领域中已知的或此后开发的任意方法,可以制备本文描述的药物组合物的制剂。一般而言,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它助剂结合。

[0230] 根据本公开内容的药物组合物可以散装、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量制备、包装和/或销售。本文中使用的“单位剂量”表示包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将要施用给受试者的活性成分的剂量,和/或这样的剂量的合宜分数,如这样的剂量的二分之一或三分之一。

[0231] 根据本公开内容的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量可以变化,这取决于正在治疗的受试者的特性、大小和/或状况,并且还取决于要施用所述组合物的途径。例如,所述组合物可以包含0.1%至99% (w/w) 的活性成分。作为例子,所述组合物可以包含0.1%至100%、例如0.5至50%、1-30%、5-80%、至少80% (w/w) 的活性成分。

[0232] 在某些实施方案中,药学上可接受的赋形剂可以是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在某些实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医学应用。在某些实施方案中,赋形剂可以被美国食品和药品管理局批准。在某些实施方案中,赋形剂可以属于药用级。在某些实施方案中,赋形剂可以满足美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0233] 本文中使用的赋形剂包括但不限于溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等的任意种和所有,只要它们适合于所希望的特定剂型。用于配制药物流组合物的各种赋形剂和用于制备组合物的技术是本领域已知的(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;通过引用整体并入本文)。在本公开内容的范围内可以预见到常规赋形剂介质的应用,但是除了任何常规赋形剂介质可能与物质或它的衍生物不相容以外,诸如通过产生任何不希望的生物学效应或另外以有害方式与药物组合物的任意其它组分相互作用。

[0234] 示例性的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干燥的淀粉、玉米淀粉、糖粉等,和/或它们的组合。

[0235] 在某些实施方案中,所述制剂可以包含至少一种无活性成分。本文使用的术语“无活性成分”表示在制剂中包括的一种或多种无活性试剂。在某些实施方案中,在本发明的制剂中可以使用的全部、没有或一些无活性成分可以被美国食品和药品管理局 (FDA) 批准。

[0236] 包含本发明的siRNA分子的核酸序列的载体的制剂可以包括阳离子或阴离子。在一个实施方案中,所述制剂包括金属阳离子,例如,但不限于,Zn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mg⁺和它们的组合。

[0237] 本文中使用的“药学上可接受的盐”表示公开的化合物的衍生物,其中通过将现有的酸或碱部分转化成其盐形式(例如,通过使游离碱基团与合适的有机酸反应)来修饰母体化合物。药学上可接受的盐的例子包括但不限于碱性残基如胺的无机酸盐或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱盐或有机盐;等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、乙酸、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯磺酸、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、

四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开内容的药学上可接受的盐包括形成的母体化合物的常规无毒盐,例如,从无毒的无机或有机酸形成。本公开内容的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的量的适当的碱或酸在水或有机溶剂或这两者的混合物中反应,可以制备这样的盐;通常,非水性介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列表可在以下文献中找到:Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008,以及Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977);它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0238] 本文中使用的术语“药学上可接受的溶剂合物”是指这样的本发明的化合物,其中合适的溶剂的分子掺入晶格中。合适的溶剂在施用的剂量是生理学上可耐受的。例如,通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、重结晶或沉淀,可以制备溶剂合物。合适的溶剂的例子是乙醇、水(例如,一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时,溶剂合物被称作“水合物”。

[0239] 根据本发明,可以为了CNS递送配制载体,例如,AAV载体,其包含本发明的siRNA分子的核酸序列。可以使用穿过血脑屏障的药剂。例如,有些可以将siRNA分子靶向至血脑屏障内皮的细胞穿透肽可以用于配制靶向SOD1基因的siRNA双链体(例如,Mathupala,Expert Opin Ther Pat.,2009,19,137-140;其内容通过引用整体并入本文)。

[0240] 施用

[0241] 通过导致治疗上有效的结果的任意途径,可以施用载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。这些包括但不限于肠内(进入肠)、胃肠内、硬膜外(进入硬脑膜物质)、口服(通过口腔)、透皮、硬膜外、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、皮内(应用在皮肤上)、真皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤下)、鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉内推注、静脉内滴注、动脉内(进入动脉)、肌肉内(进入肌肉)、心内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管)、腹膜内(输注或注射进腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼)、海绵窦内注射(进入病理性腔体)、腔内(进入阴茎的基底)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(穿过完整皮肤扩散用于全部分布)、透粘膜(穿过粘膜扩散)、经阴道、吹入法(嗅吸法)、舌下、唇下、灌肠剂、滴眼剂(在结膜上)、滴耳剂、耳(在耳朵中或通过耳朵)、含服(朝向脸颊)、结膜、皮肤、牙(至一个或多个牙)、电渗透、宫颈内、endosinusal、气管内、体外、血液透析、渗入、间质、腹部内、羊膜内、关节内、胆内、支气管内、囊内、软骨内(在软骨内)、脊尾内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内(dental intracornal)、冠状动脉内(在冠状动脉内)、阴茎海绵体内(intracorporus cavernosum)(在阴茎海绵体的可扩张空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、导管内(在腺的导管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、牙龈内(在牙龈内)、回肠内(在小肠的远侧部分内)、病灶内(在局部病灶内或直接引入局部病灶)、管腔内(在管腔内)、淋巴管内(在淋巴内)、骨髓内(在骨的骨

髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、眼内(在眼内)、卵巢内(在卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或它的支气管内)、窦内(在鼻或眼窝窦内)、椎管内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、腱内(在肌腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何水平在脑脊液内)、胸腔内(在胸腔内)、小管内(在器官的管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在aurus介质内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子透入法(借助于电流,其中可溶性盐的离子迁移进身体的组织中)、冲洗(浸泡或冲洗开放性创伤或体腔)、喉头(直接在喉上)、鼻胃(穿过鼻并进入胃)、封闭敷裹技术(局部途径施用,其然后被封闭该区域的敷料覆盖)、眼(至外眼)、口咽(直接至口和咽)、胃肠外、经皮、关节周、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸(在呼吸道内,为了局部或全身效应通过口或鼻吸入)、眼球后(脑桥后或眼球后)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(穿过气管壁)、经鼓膜(穿过或通过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经传导阻滞、胆灌注、心脏灌注、体外光化学疗法或脊柱。

[0242] 在具体实施方案中,可以以促进载体或siRNA分子进入中枢神经系统和透入运动神经元的方式施用载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的组合物。

[0243] 在某些实施方案中,通过肌肉注射可以施用载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。Rizvanov等人首次证实,靶向突变体人SOD1 mRNA的siRNA分子会被坐骨神经吸收,向后运输至运动神经元的核周体,并抑制SOD1^{G93A}转基因的ALS小鼠中的突变体SOD1 mRNA(Rizvanov AA等人,Exp.Brain Res.,2009,195(1),1-4;其内容通过引用整体并入本文)。另一项研究也证实,表达针对突变体SOD1基因的小发夹RNA(shRNA)的AAV的肌肉递送会在肌肉以及神经支配的运动神经元中导致显著的突变体SOD1敲降(Towne C等人,Mol Ther.,2011;19(2):274-283;其内容通过引用整体并入本文)。

[0244] 在某些实施方案中,通过周围注射和/或鼻内递送,可以给受试者施用表达本发明的siRNA双链体的AAV载体。在本领域中公开了,siRNA双链体的AAV载体的周围施用可以运输至中枢神经系统,例如,运输至运动神经元(例如,美国专利公开号20100240739和20100130594;它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文)。

[0245] 在其它实施方案中,通过颅内递送(参见,例如,美国专利号8,119,611;其内容通过引用整体并入本文)可以给受试者施用组合物,其包含至少一种载体,例如,AAV载体,所述载体包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0246] 可以以任意适合形式(作为液体溶液或混悬液,作为适合用于液体溶液或在液体溶液中的混悬液的固体形式)施用载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。可以用任意适当的和药学上可接受的赋形剂配制siRNA双链体。

[0247] 可以以“治疗上有效的”量施用载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列,所述“治疗上有效的”量即这样的量:其足以减轻和/或预防至少一种与疾病有关的症状,或提供受试者的病症的改善。

[0248] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将所述载体(例如,AAV载体)施用给CNS,以改善患有ALS的受试者的功能和/或存活。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[0249] 在一个实施方案中,可以以siRNA双链体或dsRNA的治疗有效量将所述载体(例如,AAV载体)施用给受试者(例如,通过鞘内施用而施用至受试者的CNS),以靶向脊髓和/或脑干中的运动神经元和星形胶质细胞。作为一个非限制性实施例,所述siRNA双链体或dsRNA可以减少SOD1蛋白或mRNA的表达。作为另一个非限制性实施例,所述siRNA双链体或dsRNA可以抑制SOD1和减少SOD1介导的毒性。SOD1蛋白和/或mRNA以及SOD1介导的毒性的减少可以几乎没有伴有增强的炎症。

[0250] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将所述载体(例如,AAV载体)施用给受试者(例如,施用至受试者的CNS),以减慢受试者的功能衰退(例如,通过使用已知的诸如ALS功能评级量表(ALSFRS)的评价方法确定)和/或延长受试者的不依赖于呼吸机的存活(例如,降低的死亡率或对呼吸支持的需要)。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[0251] 在一个实施方案中,可以以治疗有效量将所述载体(例如,AAV载体)施用至小脑延髓池,以转导脊髓运动神经元和/或星形胶质细胞。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[0252] 在一个实施方案中,使用鞘内输注可以以治疗有效量施用所述载体(例如,AAV载体),以转导脊髓运动神经元和/或星形胶质细胞。作为一个非限制性实施例,可以鞘内施用所述载体。

[0253] 在一个实施方案中,可以配制包含调节性多核苷酸的载体,例如,AAV载体。作为一个非限制性实施例,可以优化制剂的碱度和/或渗透压以确保在中枢神经系统或者中枢神经系统的区域或组分中的最佳药物分布。

[0254] 在一个实施方案中,通过单途径施用可以将包含调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)递送给受试者。

[0255] 在一个实施方案中,通过多位点施用途径可以将包含调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)递送给受试者。可以在2、3、4、5或超过5个部位给受试者施用包含调节性多核苷酸的载体,例如,AAV载体。

[0256] 在一个实施方案中,使用推注输注可以给受试者施用包含本文描述的调节性多核苷酸的载体,例如,AAV载体。

[0257] 在一个实施方案中,使用在数分钟、数小时或数天的时间段内的持久递送可以给受试者施用包含本文描述的调节性多核苷酸的载体,例如,AAV载体。根据受试者、分布、制剂或另一种递送参数,可以改变输注速率。

[0258] 在一个实施方案中,对于多位点递送,所述导管可以位于脊柱中的超过一个位点处。可以以连续和/或推注输注来递送包含调节性多核苷酸的载体,例如,AAV载体。每个递送位点可以是不同的定量施用方案,或相同的定量施用方案可以用于每个递送位点。作为一个非限制性实施例,所述递送位点可以是在颈和腰区域中。作为另一个非限制性实施例,所述递送位点可以是在颈区域中。作为另一个非限制性实施例,所述递送位点可以是在腰区域中。

[0259] 在一个实施方案中,在递送包含本文描述的调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)之前,可以针对脊柱解剖学和病理学分析受试者。作为一个非限制性实施例,与没有脊柱侧凸的受试者相比,具有脊柱侧凸的受试者可以具有不同的定量施用方案和/或导管位置。

[0260] 在一个实施方案中,在包含调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)的递送过程中,受试者的脊柱取向可以与地面垂直。

[0261] 在另一个实施方案中,在包含调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)的递送过程中,受试者的脊柱取向可以与地面平行。

[0262] 在一个实施方案中,在包含调节性多核苷酸的载体(例如,AAV载体)的递送过程中,受试者的脊柱可以相对于地面成角。受试者的脊柱相对于地面的角度可以是至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150或180度。

[0263] 在一个实施方案中,选择递送方法和持续时间以提供在脊髓中的广泛转导。作为一个非限制性实施例,使用鞘内递送来提供沿着脊髓的嘴-尾长度的广泛转导。作为另一个非限制性实施例,多位点输注会提供沿着脊髓的嘴-尾长度的更均匀转导。作为另一个非限制性实施例,延长的输注会提供沿着脊髓的嘴-尾长度的更均匀转导。

[0264] 定量施用

[0265] 通过使用有效地减轻、预防和/或治疗SOD1相关障碍(例如,ALS)的任何量,可以将本发明的药物组合物施用给受试者。所要求的确切量将在受试者之间变化,这取决于受试者的物种、年龄和总体状况、疾病的严重程度、具体组合物、它的施用模式、它的活性模式等。

[0266] 通常以易于施用和剂量均匀的单位剂型配制本发明的组合物。然而,应当理解,本发明的组合物的每日总用量可以由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体治疗有效性将取决于多种因素,包括正在治疗的障碍和障碍的严重程度;使用的具体化合物的活性;所用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;采用的siRNA双链体的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所用的具体化合物组合或同时使用的药物;和医学领域中众所周知的类似因素。

[0267] 在一个实施方案中,受试者的年龄和性别可以用于确定本发明的组合物的剂量。作为一个非限制性实施例,较老的受试者可以接受与较年轻的受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,较年轻的受试者可以接受与较老的受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,女性受试者可以接受与男性受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。作为另一个非限制性实施例,男性受试者可以接受与女性受试者相比更大剂量(例如,多5-10%、10-20%、15-30%、20-50%、25-50%或至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%)的组合物。

[0268] 在某些具体实施方案中,根据疾病状况、受试者和治疗策略可以改变用于递送本发明的siRNA双链体的AAV载体的剂量。

[0269] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物向细胞的递送包含由 $[VG/\text{小时} = \text{mL}/\text{小时} * VG/\text{mL}]$ 定义的递送速度,其中VG是病毒基因组,VG/mL是组合物浓度,且mL/小时是延长的递送的速度。

2.7×10^{12} 、 2.8×10^{12} 、 2.9×10^{12} 、 3×10^{12} 、 3.1×10^{12} 、 3.2×10^{12} 、 3.3×10^{12} 、 3.4×10^{12} 、 3.5×10^{12} 、 3.6×10^{12} 、 3.7×10^{12} 、 3.8×10^{12} 、 3.9×10^{12} 、 4×10^{12} 、 4.1×10^{12} 、 4.2×10^{12} 、 4.3×10^{12} 、 4.4×10^{12} 、 4.5×10^{12} 、 4.6×10^{12} 、 4.7×10^{12} 、 4.8×10^{12} 、 4.9×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 6.7×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 或 1×10^{16} VG/mL的组合物浓度。

[0274] 在某些实施方案中,通过使用多次施用(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多次施用),可以递送期望的siRNA双链体剂量。当采用多次施用时,可以使用分次定量施用方案诸如本文描述的那些。本文中使用的“分次剂量”是将单一单位剂量或总每日剂量分成两个或更多个剂量,例如,单一单位剂量的两次或更多次施用。本文中使用的“单一单位剂量”是在一个剂量/在一个时间/单个途径/单个接触点(即,单个施用事件)中施用的任何调节性多核苷酸治疗剂的剂量。本文中使用的“总每日剂量”是在24小时时间段中给出或开处方的量。它可以作为单一单位剂量施用。在一个实施方案中,将包含本发明的调节性多核苷酸的病毒载体在分次剂量中施用给受试者。可以在仅缓冲液中或在本文描述的制剂中配制它们。

[0275] 治疗ALS的方法

[0276] 在本发明中提供了向细胞中引入载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)的方法,所述方法包括:向所述细胞中引入足以使靶SOD1 mRNA的降解发生的量的任何载体,由此激活细胞中的靶标特异性的RNAi。在某些方面,所述细胞可以是干细胞、诸如运动神经元的神经元、肌细胞和诸如星形胶质细胞的神经胶质细胞。

[0277] 在本发明中公开了在需要治疗的受试者中治疗与异常的SOD1功能有关的ALS的方法。所述方法任选地包括给所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物至少包含载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。作为一个非限制性实施例,所述siRNA分子可以沉默SOD1基因表达,抑制SOD1蛋白生产,和减轻受试者中的ALS的一种或多种症状,从而在治疗上治疗ALS。

[0278] 在某些实施方案中,向受试者的中枢神经系统施用组合物,所述组合物包含载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。在其它实施方案中,向受试者的肌肉施用组合物,所述组合物包含载体,例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列。

[0279] 具体地,可以将载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)递送进特定类型的靶向的细胞,包括运动神经元;神经胶质细胞,包括少突神经胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞;和/或包围神经元的其它细胞,诸如T细胞。在人ALS患者和动物SOD1 ALS模型中的研究暗示神经胶质细胞在运动神经元的功能障碍和死亡中起早期作用。在周围的保护性神经胶质细胞中的正常SOD1可以阻止运动神经元死亡,即使突变体SOD1存在于运动神经元中(例如,Philips和Rothstein,Exp.Neurol.,2014年5月22日.pii:S0014-4886(14)00157-5的综述;其内容通过引用整体并入本文)。

[0280] 在某些具体实施方案中,所述载体(例如,AAV载体,其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列)可以用作ALS的疗法。

[0281] 在某些实施方案中,将本发明的组合物作为用于治疗ALS的单独治疗剂或联合治

疗剂施用。

[0282] 所述载体(例如, AAV载体, 其编码靶向SOD1基因的siRNA双链体)可以与一种或多种其它治疗剂联合使用。“与……联合”不意图暗示所述药剂必须同时施用和/或为了一起递送而配制, 尽管这些递送方法是在本公开内容的范围内。组合物可以与一种或多种其它的期望治疗剂或医学操作并行地、在其之前或之后施用。一般而言, 每种试剂将以对该试剂确定的剂量和/或时间计划来施用。

[0283] 可以与所述载体(例如, AAV载体, 其编码本发明的siRNA分子的核酸序列)联合使用的治疗剂可以是小分子化合物, 所述小分子化合物是抗氧化剂、抗炎剂、抗细胞凋亡剂、钙调节剂、抗谷氨酸能剂、结构蛋白抑制剂和参与金属离子调节的化合物。

[0284] 可以与本文描述的载体联合使用的、针对治疗ALS试验过的化合物包括但不限于抗谷氨酸能剂: 利鲁唑、托吡酯、他仑帕奈、拉莫三嗪、右美沙芬、加巴喷丁和AMPA拮抗剂; 抗细胞凋亡剂: 米诺环素、苯基丁酸钠和阿莫氯醇; 抗炎剂: 神经节苷脂、塞来考昔、环孢菌素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、血浆去除术(Plasmaphoresis)、醋酸格拉替雷和沙利度胺; 头孢曲松(Berry等人, Plos One, 2013, 8(4)); β -内酰胺抗生素; 普拉克索(一种多巴胺激动剂)(Wang等人, Amyotrophic Lateral Scler., 2008, 9(1), 50-58); 在美国专利公开号20060074991中的尼美舒利; 在美国专利公开号20130143873中公开的二氮嗪; 在美国专利公开号20080161378中公开的吡唑酮衍生物; 抑制氧化性应激诱导的细胞死亡的自由基清除剂, 诸如溴隐亭(美国专利公开号20110105517); 在PCT专利公开号2013100571中讨论的氨基甲酸苯酯化合物; 在美国专利号6, 933, 310和8, 399, 514和美国专利公开号20110237907和20140038927中公开的神经保护性化合物; 和在美国专利公开号20070185012中教导的糖肽; 它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0285] 可以与所述载体(例如, AAV载体, 其编码本发明的siRNA分子的核酸序列)一起用在联合疗法中的治疗剂可以是可保护神经元损失的激素或变体, 诸如促肾上腺皮质激素(ACTH)或其片段(例如, 美国专利公开号20130259875); 雌激素(例如, 美国专利号6, 334, 998和6, 592, 845); 它们中的每一篇的内容通过引用整体并入本文。

[0286] 神经营养因子可以与所述载体(例如, AAV载体, 其编码本发明的siRNA分子的核酸序列)一起用在联合疗法中用于治疗ALS。通常, 将神经营养因子定义为促进神经元的存活、生长、分化、增殖和/或成熟或者刺激增加的神经元活性的物质。在某些实施方案中, 本发明的方法还包括向需要治疗的受试者递送一种或多种营养因子。营养因子可以包括但不限于IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、Colivelin、扎利罗登、促甲状腺素释放激素和ADNF、及其变体。

[0287] 在一个方面, 所述载体(例如, AAV载体, 其编码至少一种靶向SOD1基因的siRNA双链体的核酸序列)可以与诸如AAV-IGF-I(Vincent等人, Neuromolecular medicine, 2004, 6, 79-85; 其内容通过引用整体并入本文)和AAV-GDNF(Wang等人, J Neurosci., 2002, 22, 6920-6928; 其内容通过引用整体并入本文)的表达神经营养因子的AAV载体共同施用。

[0288] 在某些实施方案中, 将用于治疗ALS的本发明的组合物静脉内地、肌肉内地、皮下地、腹膜内地、鞘内地和/或心室内地施用给有需要的受试者, 从而允许siRNA分子或包含siRNA分子的载体穿过血脑屏障和血液脊髓屏障中的一个或两个。在某些方面, 所述方法包括(使用例如输液泵和/或递送支架)向受试者的中枢神经系统(CNS)直接施用(例如, 心室

内地施用和/或鞘内地施用) 治疗有效量的组合物, 其包含编码本发明的siRNA分子的核酸序列的载体, 例如, AAV载体。所述载体可以用于沉默或抑制SOD1基因表达, 和/或减轻受试者中的ALS的一种或多种症状, 从而在治疗上治疗ALS。

[0289] 在某些方面, 在治疗的受试者中改善ALS的症状, 包括但不限于运动神经元变性、肌无力、肌肉萎缩、肌肉僵硬、呼吸困难、言语不清、肌束震颤发生、额颞叶痴呆和/或早产儿死亡。在其它方面, 将本发明的组合物应用于脑和脊髓中的一个或两个。在其它方面, 改善肌肉协调和肌肉功能中的一个或两个。在其它方面, 延长受试者的存活。

[0290] 在一个实施方案中, 所述载体(例如, 编码本发明的siRNA的AAV载体) 向受试者的施用可降低受试者的CNS中的突变体SOD1。在另一个实施方案中, 所述载体(例如, AAV载体) 向受试者的施用可降低受试者的CNS中的野生型SOD1。在另一个实施方案中, 所述载体(例如, AAV载体) 向受试者的施用可降低受试者的CNS中的突变体SOD1和野生型SOD1。可以使CNS、CNS的一个区域或受试者的CNS的特定细胞中的突变体和/或野生型SOD1降低约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%, 或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。作为一个非限制性实施例, 所述载体(例如, AAV载体) 可使运动神经元(例如, 腹角运动神经元) 和/或星形胶质细胞中的野生型SOD1的表达降低至少50%。作为另一个非限制性实施例, 所述载体(例如, AAV载体) 可使运动神经元(例如, 腹角运动神经元) 和/或星形胶质细胞中的突变体SOD1的表达降低至少50%。作为另一个非限制性实施例, 所述载体(例如, AAV载体) 可使运动神经元(例如, 腹角运动神经元) 和/或星形胶质细胞中的野生型SOD1和突变体SOD1的表达降低至少50%。

[0291] 在一个实施方案中, 所述载体(例如, AAV载体) 向受试者的施用将减少脊髓中的突变体和/或野生型SOD1的表达, 且突变体和/或野生型SOD1的表达的减少将减少受试者中的ALS的效应。

[0292] 在一个实施方案中, 可以将所述载体(例如, AAV载体) 施用给处于ALS的早期阶段的受试者。早期阶段症状包括但不限于无力的和软的或僵硬的、紧的和痉挛的肌肉, 肌肉的抽筋和颤搐(肌束震颤), 肌肉大小的损失(萎缩), 疲劳, 差的平衡, 言语不清, 抓握无力, 和/或行走时绊倒。所述症状可以限于单个身体区域, 或轻度症状可以影响超过一个区域。作为一个非限制性实施例, 所述载体(例如, AAV载体) 的施用可以减轻ALS的严重程度和/或症状的发生。

[0293] 在一个实施方案中, 可以将所述载体(例如, AAV载体) 施用给处于ALS的中期阶段的受试者。ALS的中期阶段包括但不限于与早期阶段相比更普遍的肌肉症状, 一些肌肉是麻痹的, 而其它肌肉是虚弱的或未受影响的, 持续的肌肉颤搐(肌束震颤)、不使用的肌肉可能造成挛缩, 此时关节变硬、疼痛且有时变形, 吞咽肌的虚弱可能造成噎塞和较大困难的进食和控制唾液, 呼吸肌的虚弱可以造成呼吸功能不全(其当躺下时可以是显著的), 和/或受试者可能具有失控的和不适当的哭或笑的发作(假延髓病侵袭)。作为一个非限制性实施例, 所述载体(例如, AAV载体) 的施用可以减轻ALS的严重程度和/或症状的发生。

[0294] 在一个实施方案中,可以将所述载体(例如,AAV载体)施用给处于ALS的晚期阶段的受试者。ALS的晚期阶段包括但不限于大部分麻痹的随意肌,帮助移动空气进出肺的肌肉被严重损伤,活动性非常受限,差的呼吸可以造成疲劳、模糊思维、头痛和对感染或疾病(例如,肺炎)的易感性,言语困难,并且用嘴吃或喝可能是不可能的。

[0295] 在一个实施方案中,所述载体(例如,AAV载体)可以用于治疗患有ALS的受试者,所述受试者具有C9orf72突变。

[0296] 在一个实施方案中,所述载体(例如,AAV载体)可以用于治疗患有ALS的受试者,所述受试者具有TDP-43突变。

[0297] 在一个实施方案中,所述载体(例如,AAV载体)可以用于治疗患有ALS的受试者,所述受试者具有FUS突变。

[0298] 定义

[0299] 除非另外说明,否则以下术语和短语具有下面描述的含义。所述定义无意在性质上成为限制性的,且用于提供本发明的某些方面的更清楚理解。

[0300] 本文使用的术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”表示由多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)或多核糖核苷酸(含有D-核糖)组成的任意核酸聚合物,或任意其它类型的多核苷酸(其为嘌呤或嘧啶碱基或经修饰的嘌呤或嘧啶碱基的N糖苷)。在术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”之间无意区分长度,且这些术语将互换使用。这些术语仅表示分子的一级结构。因而,这些术语包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。

[0301] 本文使用的术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”表示核糖核苷酸的聚合物;术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”表示脱氧核糖核苷酸的聚合物。可以天然地合成(例如,分别通过DNA复制和DNA的转录)或化学地合成DNA和RNA。DNA和RNA可以是单链的(即,分别是ssRNA或ssDNA)或多链的(例如,双链的,即,分别是dsRNA和dsDNA)。本文中使用的术语“mRNA”或“信使RNA”表示编码一个或多个多肽链的氨基酸序列的单链RNA。

[0302] 本文使用的术语“RNA干扰”或“RNAi”表示由RNA分子介导的序列特异性的调节机制,其导致对应的蛋白编码基因的表达的抑制或干扰或“沉默”。RNAi已经在许多类型的生物中观察到,包括植物、动物和真菌。RNAi天然地发生在细胞中以除去外来RNA(例如,病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA切割的片段进行,其将降解机制引导至其它类似的RNA序列。RNAi由RNA诱导的沉默复合物(RISC)控制,且由细胞质中的短/小dsRNA分子起始,其中它们与催化性的RISC组分argonaute相互作用。可以将dsRNA分子外源地引入细胞中。外源dsRNA通过激活核糖核酸酶蛋白Dicer而起始RNAi,所述Dicer结合和切割dsRNA以产生21-25个碱基对的双链片段,其在每个末端上具有几个未配对的突出端碱基。这些短双链片段被称作小干扰RNA(siRNA)。

[0303] 本文使用的术语“短干扰RNA”、“小干扰RNA”或“siRNA”表示能够指导或介导RNAi的包含约5-60个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA分子(或RNA类似物)。优选地,siRNA分子包含约15-30个核苷酸或核苷酸类似物,诸如约16-25个核苷酸(或核苷酸类似物),约18-23个核苷酸(或核苷酸类似物),约19-22个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物),约19-25个核苷酸(或核苷酸类似物),和约19-24个核苷酸(或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA表示包含5-23个核苷酸、优选21个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸)的siRNA。术语“长”siRNA表示包含24-60个核苷酸、优选约24-

25个核苷酸(例如,23、24、25或26个核苷酸)的siRNA。在某些情况下,短siRNA可以包括少于19个核苷酸,例如,16、17或18个核苷酸,或少至5个核苷酸,前提条件是,较短的siRNA保留介导RNAi的能力。同样地,在某些情况下,长siRNA可以包括超过26个核苷酸,例如,27、28、29、30、35、40、45、50、55或甚至60个核苷酸,前提条件是,较长的siRNA保留介导RNAi或翻译抑制的能力,无需进一步加工(例如,酶促加工)成短siRNA。siRNA可以是单链RNA分子(ss-siRNA)或包含有义链和反义链的双链RNA分子(ds-siRNA),所述有义链和反义链杂交以形成被称作siRNA双链体的双链体结构。

[0304] 本文使用的术语siRNA分子的“反义链”或“第一链”或“引导链”表示这样的链:其与为了沉默而靶向的基因的mRNA的约10-50个核苷酸(例如,约15-30、16-25、18-23或19-22个核苷酸)的段基本上互补。所述反义链或第一链具有与期望的靶mRNA序列足够互补的序列以指导靶标特异性的沉默,例如,足以触发RNAi机制或过程对期望的靶mRNA的破坏的互补性。

[0305] 本文使用的术语siRNA分子的“有义链”或“第二条链”或“过客链”表示与反义链或第一链互补的链。siRNA分子的反义链和有义链发生杂交以形成双链体结构。本文中使用的“siRNA双链体”包括与为了沉默而靶向的基因的mRNA的约10-50个核苷酸的段具有足够互补性的siRNA链和与所述siRNA链具有足够互补性以形成双链体的siRNA链。

[0306] 本文使用的术语“互补的”表示多核苷酸彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的多核苷酸链中的核苷酸单元之间的氢键形成。互补的多核苷酸链可以以沃森-克里克方式(例如,A至T、A至U、C至G)或以允许形成双链体的任意其它方式形成碱基对。本领域技术人员知晓,当使用RNA而不是DNA时,尿嘧啶(而不是胸腺嘧啶)是被认为与腺苷互补的碱基。但是,当在本发明的上下文中提及U时,暗示置换T的能力,除非另有说明。完美互补性或100%互补性表示这样的情形:其中一个多核苷酸链的每个核苷酸单元都可以与第二个多核苷酸链的核苷酸单元形成氢键。小于完美互补性表示这样的情形:其中两个链的一些(但是并非全部)核苷酸单元可以彼此形成氢键。例如,对于两个20-聚体,如果在每个链上的仅两个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出10%互补性。在相同的例子中,如果在每个链上的18个碱基对可以彼此形成氢键,那么所述多核苷酸链表现出90%互补性。

[0307] 本文使用的术语“基本上互补的”是指,所述siRNA具有足以结合期望的靶mRNA和触发靶mRNA的RNA沉默的序列(例如,在反义链中)。

[0308] 本文中使用的“靶向”是指设计和选择核酸序列的过程,所述核酸序列将与靶核酸杂交并诱导期望的效应。

[0309] 术语“基因表达”表示这样的过程:核酸序列通过该过程发生成功转录和(在大多数情况下)翻译以产生蛋白或肽。为了清楚起见,当提及“基因表达”的测量时,这应当被理解为是指,可以测量转录的核酸产物(例如,RNA或mRNA)或翻译的氨基酸产物(例如,多肽或肽)。测量RNA、mRNA、多肽和肽的量或水平的方法是本领域众所周知的。

[0310] 本文使用的术语“突变”表示基因的结构任何变化,其导致可以传递至后代的变体(也称为“突变体”)形式。基因中的突变可以由DNA中的单个碱基的改变造成,或者由基因或染色体的更大段的缺失、插入或重排造成。

[0311] 本文使用的术语“载体”是指运输、转导异源分子(诸如本发明的siRNA分子)或以

其它方式充当异源分子(诸如本发明的siRNA分子)的载体的任何分子或部分。“病毒载体”是包含一个或多个多核苷酸区域的载体,所述多核苷酸区域编码或包含目标分子,例如,转基因,编码一个多肽或多个多肽的多核苷酸,或调节性核酸诸如小干扰RNA(siRNA)。病毒载体通常用于将遗传物质递送进细胞中。经常为了特定应用修饰病毒载体。病毒载体的类型包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺伴随病毒载体。

[0312] 本文中使用的术语“腺伴随病毒”或“AAV”或“AAV载体”表示包含或源自腺相关载体的组分并且适合用于感染哺乳动物细胞、优选人细胞的任何载体。术语AAV载体通常表示AAV型病毒颗粒或病毒粒子,其包含编码siRNA双链体的核酸分子。所述AAV载体可以源自不同血清型,包括血清型的组合(即,“假分型的”AAV),或源自不同基因组(例如,单链的或自互补的)。另外,所述AAV载体可以是复制缺陷的和/或靶向的。

[0313] 本文中使用的短语“抑制基因的表达”是指造成基因的表达产物的量的减少。所述表达产物可以是基因转录的RNA分子(例如mRNA)或从基因转录的RNA所翻译成的多肽。通常,mRNA水平的降低会导致从其翻译的多肽的水平的降低。通过使用用于测量mRNA或蛋白的标准技术,可以确定表达的水平。

[0314] 本文使用的术语“体外”表示在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培养皿等中,发生的事件,而不是在生物(例如,动物、植物或微生物)内发生的事件。

[0315] 本文使用的术语“体内”表示在生物(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[0316] 本文使用的术语“修饰的”表示本发明的分子的改变的状态或结构。可以以许多方式修饰分子,所述方式包括在化学上、在结构上和在功能上。

[0317] 本文使用的术语“合成的”是指通过人手生产、制备和/或制造。本发明的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学或酶促的。

[0318] 本文使用的术语“转染”表示将外源核酸引入细胞中的方法。转染的方法包括但不限于化学方法、物理处理和阳离子脂质或混合物。可以转染进细胞中的药剂的列表较大,且包括但不限于siRNA、有义序列和/或反义序列、编码一个或多个基因并被组织进表达质粒中的DNA、蛋白、蛋白片段和更多。

[0319] 本文中使用的“脱靶”表示对任意一种或多种靶标、基因和/或细胞转录物的任何非目的效果。

[0320] 本文中使用的短语“药学上可接受的”在本文中用于表示这样的化合物、物质、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适用于接触人类和动物的组织,而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[0321] 本文使用的术语药剂的“有效量”是这样的量:所述量足以实现有益的或期望的结果,例如,临床结果,且这样,“有效量”取决于它所应用的上下文。例如,在施用治疗ALS的药剂的上下文中,药剂的有效量是例如这样的量:与在不施用所述药剂的情况下得到的应答相比,所述量足以实现如本文中定义的ALS的治疗。

[0322] 本文使用的术语“治疗有效量”是指要递送的药剂(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量,当施用给遭受或易患感染、疾病、障碍和/或病症的受试者时,所述量足以治疗、诊断、预防所述感染、疾病、障碍和/或病症,改善其症状,和/或延迟其发作。

[0323] 本文使用的术语“受试者”或“患者”表示可以给其施用根据本发明的组合物的任何生物,例如,为了实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔、诸如黑猩猩和其它猿类和猴物种的非人灵长类动物和人类)和/或植物。

[0324] 本文使用的术语“预防”表示延迟或领先病症或疾病的发作、发展或进展一段时间,包括数周、数月或数年。

[0325] 本文中使用的术语“治疗”表示用于治愈或改善疾病的一个或多个具体操作的应用。在某些实施方案中,具体操作是一种或多种药学试剂的施用。在本发明的上下文中,具体操作是一种或多种siRNA双链体或编码的靶向SOD1基因的dsRNA的施用。

[0326] 本文使用的术语“改善”表示减轻病症或疾病的至少一种指标的严重程度。例如,在神经变性障碍的上下文中,改善包括神经元损失的减少。

[0327] 本文使用的术语“施用”表示给受试者提供药学试剂或组合物。

[0328] 本文使用的术语“神经变性”表示一种导致神经细胞死亡的病理性状态。大数目的神经学障碍共享神经变性作为一种共同的病理学状态。例如,阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病和肌萎缩性侧索硬化(ALS)都造成慢性神经变性,其以在数年的时间段内缓慢的进行性神经细胞死亡为特征,而急性神经变性以神经细胞死亡的突然发作为特征,所述突然发作是因为缺血(诸如中风)或创伤(诸如创伤性脑损伤),或者是因为由脱髓鞘或创伤(例如由脊髓损伤或多发性硬化造成)导致的轴突横断。在某些神经学障碍中,主要一类神经元细胞是变性的,例如,在ALS中的运动神经元变性。

[0329] 在一些方面,本发明涉及如下的实施方案:

[0330] 1.一种腺伴随病毒(AAV)载体,其包含用于抑制或遏制细胞中的SOD1表达的、位于2个反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中所述核酸序列包含有义链序列和反义链序列,其中所述有义链序列包含与在表3、表11或表14中列出的序列的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,且所述反义链序列包含与在表3、表11或表14中列出的序列的核苷酸序列相差不超过3个核苷酸的至少15个连续核苷酸,且其中所述有义链序列和反义链序列共享至少4个核苷酸长度的互补性区域。

[0331] 2.根据实施方案1所述的AAV载体,其中所述核酸序列包含siRNA双链体的有义链序列和反义链序列。

[0332] 3.根据实施方案2所述的AAV载体,其中所述siRNA双链体选自由siRNA双链体ID No.D-2741至ID No.D-2985组成的组。

[0333] 4.根据实施方案2所述的AAV载体,其中所述siRNA双链体选自由siRNA ID:D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823和D-2858的核酸序列组成的组。

[0334] 5.根据实施方案1所述的AAV载体,其中所述互补性区域是至少17个核苷酸的长度。

[0335] 6.根据实施方案5所述的AAV载体,其中所述互补性区域是在19-21个核苷酸的长度之间。

[0336] 7.根据实施方案6所述的AAV载体,其中所述互补性区域是19个核苷酸的长度。

[0337] 8.根据实施方案1所述的AAV载体,其中所述有义链序列和所述反义链序列独立地

是30个核苷酸或更少。

[0338] 9. 根据实施方案1所述的AAV载体, 其中所述有义链序列和所述反义链序列中的至少一个包含至少1个核苷酸的3' 突出端。

[0339] 10. 根据实施方案9所述的AAV载体, 其中所述有义链序列和所述反义链序列中的至少一个包含至少2个核苷酸的3' 突出端。

[0340] 11. 根据实施方案1所述的AAV载体, 其中所述AAV载体包含选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8和AAV-DJ及其变体组成的组的衣壳血清型。

[0341] 12. 一种抑制细胞中SOD1基因表达的方法, 所述方法包括给所述细胞施用组合物, 所述组合物包含根据实施方案1-11任一项所述的AAV载体。

[0342] 13. 根据实施方案12所述的方法, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0343] 14. 根据实施方案13所述的方法, 其中所述哺乳动物细胞是运动神经元。

[0344] 15. 根据实施方案13所述的方法, 其中所述哺乳动物细胞是星形胶质细胞。

[0345] 16. 一种治疗和/或改善需要治疗的受试者中的肌萎缩性侧索硬化(ALS)的方法, 所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的组合物, 所述组合物包含根据实施方案1-11任一项所述的AAV载体。

[0346] 17. 根据实施方案16所述的方法, 其中抑制或遏制SOD1的表达。

[0347] 18. 根据实施方案17所述的方法, 其中所述SOD1是野生型SOD1、具有至少一个突变的经突变的SOD1, 或者野生型SOD1和具有至少一个突变的经突变的SOD1二者。

[0348] 19. 根据实施方案16所述的方法, 其中将SOD1的表达抑制或遏制约20%至约100%。

[0349] 20. 根据实施方案16所述的方法, 其中所述ALS是具有经鉴别的SOD1基因突变的家族性ALS。

[0350] 21. 根据实施方案16所述的方法, 其中所述ALS是散发性ALS。

[0351] 22. 一种抑制细胞中的SOD1基因表达的方法, 其中SOD1基因包括造成细胞内的功能效应获得的突变, 所述方法包括给所述细胞施用组合物, 所述组合物包含根据实施方案1-11任一项所述的AAV载体。

[0352] 23. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0353] 24. 根据实施方案23所述的方法, 其中所述哺乳动物细胞是运动神经元。

[0354] 25. 根据实施方案23所述的方法, 其中所述哺乳动物细胞是星形胶质细胞。

[0355] 等同方案和范围

[0356] 本领域技术人员会认识到或使用不超过例行实验能够确定根据本文描述的发明的具体实施方案的许多等同方案。本发明的范围无意限于上面的描述, 而是如所附权利要求所述。

[0357] 在权利要求中, 诸如“一个”、“一种”和“所述”的冠词可以是指一个/种或超过一个/种, 除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。如果群体成员中的一个、超过一个或所有成员存在于指定的产品或过程中、在指定的产品或过程中使用或以其它方式与指定的产品或过程相关, 则认为满足在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述, 除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。本发明包括这样的实施方案, 其

中所述组的刚好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。本发明包括这样的实施方案,其中所述组成员中的超过一个或全部都存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。

[0358] 还应当指出,术语“包含”意图是开放式的,并且允许但不要求包括额外的要素或步骤。因此,当在本文中使用时,还包括和公开术语“由……组成”。

[0359] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应当理解,除非另外指示或以其它方式从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,以范围表述的数值在本发明的不同实施方案中可呈现处于所述范围内的任何具体数值或子范围,其精确至该范围的下限单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明。

[0360] 另外,应当理解,可以从任意一项或多项权利要求中明确地排除落在现有技术内的本发明的任何特定实施方案。因为这样的实施方案被视为本领域普通技术人员已知的,所以可以排除它们,即使所述排除并未在本文中明确地阐明。可以因为任何原因从任意一项或多项权利要求排除本发明的组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗剂或活性成分;任何生产方法;任何使用方法等),无论是否与现有技术存在相关。

[0361] 应当理解,已经使用的词语是描述而不是限制的词语,并且可以在所附权利要求的范围内做出变化,而不背离在它的更宽方面的本发明的真实范围和精神。

[0362] 尽管已经就几个描述的实施方案而言相当详尽地且相当特定地描述了本发明,但是无意将本发明限于任何这样的细节或实施方案或任何具体实施方案,而是应当参考所附权利要求来解释本发明,从而考虑到现有技术提供这类权利要求的最广泛的可能解释,并因此有效地包括本发明的预期范围。

[0363] 实施例

[0364] 实施例1.SOD1 siRNA设计和合成

[0365] SOD1 siRNA设计

[0366] 进行siRNA设计以鉴别靶向人SOD1基因的siRNA。所述设计使用如表2中所述的针对人((Genebank登记号NM_000454.4(SEQ ID NO:1))、食蟹猴((Genebank登记号XM_005548833.1),来自NCBI Refseq中心(63版)(SEQ ID NO:2))和恒河猴(SOD1转录物 ENSMMUT00000002415(SEQ ID NO:3),来自Ensembl计划(75版))的SOD1转录物。

[0367] 表2.SOD1基因序列

[0368]	SOD1 转录物	登记号	SEQ ID NO:
	人 SOD1 cDNA (981bp)	NM_000454.4	1
	食蟹猴 SOD1 cDNA (465bp)	XM_005548833.1	2
	恒河猴 SOD1 cDNA (464bp)	ENSMMUT00000002415	3

[0369] 将siRNA双链体设计成对于反义链的位置2-18与人SOD1转录物具有100%同一性,且对于反义链的位置2-18与非人灵长类动物SOD1转录物具有部分或100%同一性。在所有

siRNA双链体中,将反义链的位置1工程改造为U,且将有义链的位置19工程改造为C,以便在该位置使双链体不配对。

[0370] SOD1 siRNA序列选择

[0371] 基于预测的反义链对人、食蟹猴和恒河猴SOD1基因的选择性,以及在miRBase20.0中在反义链的位置2-7处的种子序列与人序列的匹配的缺乏,合成了共计169个反义和169个有义人SOD1衍生的寡核苷酸并形成双链体(表3)。然后针对内源性SOD1基因表达(SOD1 mRNA水平)的体外抑制活性试验了siRNA双链体。

[0372] 表3. 人SOD1 dsRNA的有义和反义链序列

[0373]

开 始	siRNA 双链体 ID	SS ID	有义链序列(5'-3')	SE Q ID NO	AS ID	反义链序列(5'-3')	SEQ ID NO
26	D-2741	7414	CGGAGGUCUGG CCUAUAACdTdT	4	741 5	UUUAUAGGCCAGAC CUCCGdTdT	173
27	D-2742	7416	GGAGGUCUGGC	5	741	UUUUAUAGGCCAGA	174

[0374]

			CUAUAAACdTdT		7	CCUCCdTdT	
28	D-2743	7418	GAGGUCUGGCC UAUAAAGCdTdT	6	741 9	UCUUUAUAGGCCAG ACCUCdTdT	175
29	D-2744	7420	AGGUCUGGCCU AUAAAGUCdTdT	7	742 1	UACUUUAUAGGCCA GACCUCdTdT	176
30	D-2745	7422	GGUCUGGCCUA UAAAGUACdTdT	8	742 3	UUACUUUAUAGGCC AGACCdTdT	177
32	D-2746	7424	UCUGGCCUAUA AAGUAGUCdTdT	9	742 5	UACUACUUUAUAGG CCAGAdTdT	178
33	D-2747	7426	CUGGCCUAUAA AGUAGUCCdTdT	10	742 7	UGACUACUUUAUAG GCCAGdTdT	179
34	D-2748	7428	UGGCCUAUAAA GUAGUCGCdTdT	11	742 9	UCGACUACUUUAUA GGCCAdTdT	180
35	D-2749	7430	GGCCUAUAAAG UAGUCGCCdTdT	12	743 1	UGCGACUACUUUAU AGGCCdTdT	181
36	D-2750	7432	GCCUAUAAAGU AGUCGCGCdTdT	13	743 3	UCGCGACUACUUUA UAGGCdTdT	182
37	D-2751	7434	CCUAUAAAGUA GUCGCGGCdTdT	14	743 5	UCCGCGACUACUUU AUAGGdTdT	183
74	D-2752	7436	GUCGUAGUCUC CUGCAGCCdTdT	15	743 7	UGCUGCAGGAGACU ACGACdTdT	184
76	D-2753	7438	CGUAGUCUCCU GCAGCGUCdTdT	16	743 9	UACGCUGCAGGAGA CUACGdTdT	185
77	D-2754	7440	GUAGUCUCCUG CAGCGUCCdTdT	17	744 1	UGACGCUGCAGGAG ACUACdTdT	186
78	D-2755	7442	UAGUCUCCUGC AGCGUCUCdTdT	18	744 3	UAGACGCUGCAGGA GACUAdTdT	187

[0375]

14 9	D-2756	7444	AUGGCGACGAA GGCCGUGCdTdT	19 5	744 5	UCACGGCCUUCGUC GCCAUdTdT	188
15 3	D-2757	7446	CGACGAAGGCC GUGUGCGCdTdT	20 7	744 7	UCGCACACGGCCUU CGUCGdTdT	189
15 7	D-2758	7448	GAAGGCCGUGU GCGUGCUCdTdT	21 9	744 9	UAGCACGCACACGG CCUUCdTdT	190
16 0	D-2759	7450	GGCCGUGUGCG UGCUGAACdTdT	22 1	745 1	UUUCAGCACGCACA CGGCCdTdT	191
17 7	D-2760	7452	AGGGCGACGGC CCAGUGCCdTdT	23 3	745 3	UGCACUGGGCCGUC GCCCUdTdT	192
19 2	D-2761	7454	UGCAGGGCAUC AUCAAUUCdTdT	24 5	745 5	UAAUUGAUGAUGCC CUGCAdTdT	193
19 3	D-2762	7456	GCAGGGCAUCA UCAAUUUCdTdT	25 7	745 7	UAAAUUGAUGAUGC CCUGCdTdT	194
19 5	D-2763	7458	AGGGCAUCAUC AAUUUCGCdTdT	26 9	745 9	UCGAAAUUGAUGAU GCCCUdTdT	195
19 6	D-2764	7460	GGGCAUCAUCA AUUUCGACdTdT	27 1	746 1	UUCGAAAUUGAUGA UGCCCdTdT	196
19 7	D-2765	7462	GGCAUCAUCAA UUUCGAGCdTdT	28 3	746 3	UCUCGAAAUUGAUG AUGCCdTdT	197
19 8	D-2766	7464	GCAUCAUCAAU UUCGAGCCdTdT	29 5	746 5	UGCUCGAAAUUGAU GAUGCdTdT	198
19 9	D-2767	7466	CAUCAUCAAUU UCGAGCACdTdT	30 7	746 7	UUGCUCGAAAUUGA UGAUGdTdT	199
20 6	D-2768	7468	AAUUUCGAGCA GAAGGAACdTdT	31 9	746 9	UUUCCUUCUGCUCG AAAUUdTdT	200
20	D-2769	7470	UUCGAGCAGAA	32	747	UACUUUCCUUCUGC	201

[0376]

9			GGAAAGUCdTdT		1	UCGAAdTdT	
21 0	D-2770	7472	UCGAGCAGAAG GAAAGUACdTdT	33 3	747 3	UUACUUCCUUCUG CUCGAdTdT	202
23 9	D-2771	7474	AAGGUGUGGGG AAGCAUUCdTdT	34 5	747 5	UAAUGCUUCCCCAC ACCUUdTdT	203
24 1	D-2772	7476	GGUGUGGGGAA GCAUUAACdTdT	35 7	747 7	UUUAAUGCUUCCCC ACACCdTdT	204
26 1	D-2773	7478	GACUGACUGAA GGCCUGCCdTdT	36 9	747 9	UGCAGGCCUUCAGU CAGUCdTdT	205
26 3	D-2774	7480	CUGACUGAAGG CCUGCAUCdTdT	37 1	748 1	UAUGCAGGCCUUCA GUCAGdTdT	206
26 4	D-2775	7482	UGACUGAAGGC CUGCAUGCdTdT	38 3	748 3	UCAUGCAGGCCUUC AGUCAdTdT	207
26 8	D-2776	7484	UGAAGGCCUGC AUGGAUUCdTdT	39 5	748 5	UAAUCCAUGCAGGC CUUCAdTdT	208
26 9	D-2777	7486	GAAGGCCUGCA UGGAUUCCdTdT	40 7	748 7	UGAAUCCAUGCAGG CCUUCdTdT	209
27 6	D-2778	7488	UGCAUGGAUUC CAUGUUCCdTdT	41 9	748 9	UGAACAUGGAAUCC AUGCAdTdT	210
27 8	D-2779	7490	CAUGGAUUCCA UGUUCAUCdTdT	42 1	749 1	UAUGAACAUGGAAU CCAUGdTdT	211
28 1	D-2780	7492	GGAUUCCAUGU UCAUGAGCdTdT	43 3	749 3	UCUCAUGAACAUGG AAUCCdTdT	212
28 4	D-2781	7494	UUCCAUGUUCA UGAGUUUCdTdT	44 5	749 5	UAAACUCAUGAACA UGGAAdTdT	213
29 0	D-2782	7496	GUUCAUGAGUU UGGAGAUCdTdT	45 7	749 7	UAUCUCCAAACUCA UGAACdTdT	214

[0377]

29 1	D-2783	7498	UUCAUGAGUUU GGAGAUACdTdT	46 9	749 9	UUAUCUCCAAACUC AUGAAdTdT	215
29 5	D-2784	7500	UGAGUUUGGAG AUAUACCDdTdT	47 1	750 1	UGUAUUAUCUCCAA ACUCAdTdT	216
29 6	D-2785	7502	GAGUUUGGAGA UAAUACACdTdT	48 3	750 3	UUGUAUUAUCUCCA AACUCdTdT	217
31 6	D-2786	7504	AGGCUGUACCA GUGCAGGCdTdT	49 5	750 5	UCCUGCACUGGUAC AGCCUdTdT	218
31 7	D-2787	7506	GGCUGUACCAG UGCAGGUCdTdT	50 7	750 7	UACCUGCACUGGUA CAGCCdTdT	219
32 9	D-2788	7508	GCAGGUCCUCA CUUUAUUCdTdT	51 9	750 9	UAUUAAGUGAGGA CCUGCdTdT	220
33 0	D-2789	7510	CAGGUCCUCAC UUUAAUCCdTdT	52 1	751 1	UGAUUAAAGUGAGG ACCUGdTdT	221
33 7	D-2790	7512	UCACUUUAAUC CUCUAUCCdTdT	53 3	751 3	UGAUAGAGGAUUA AGUGAdTdT	222
35 0	D-2791	7514	CUAUCCAGAAA ACACGGUCdTdT	54 5	751 5	UACCGUGUUUUCUG GAUAGdTdT	223
35 1	D-2792	7516	UAUCCAGAAAA CACGGUGCdTdT	55 7	751 7	UCACCGUGUUUCU GGAUAdTdT	224
35 2	D-2793	7518	AUCCAGAAAAC ACGGUGGCdTdT	56 9	751 9	UCCACCGUGUUUC UGGAUdTdT	225
35 4	D-2794	7520	CCAGAAAACAC GGUGGGCCdTdT	57 1	752 1	UGCCCACCGUGUUU UCUGGdTdT	226
35 7	D-2795	7522	GAAAACACGGU GGGCAACdTdT	58 3	752 3	UUUGGCCCACCGUG UUUUCdTdT	227
35	D-2796	7524	AAAACACGGUG	59	752	UUUUGGCCCACCGU	228

[0378]

8			GGCCAAACdTdT		5	GUUUUdTdT	
36	D-2797	7526	CGGUGGGCCAA	60	752	UUCAUCCUUUGGCC	229
4			AGGAUGACdTdT		7	CACCGdTdT	
37	D-2798	7528	AGGAUGAAGAG	61	752	UCAUGCCUCUCUUC	230
5			AGGCAUGCdTdT		9	AUCCUdTdT	
37	D-2799	7530	AUGAAGAGAGG	62	753	UCAACAUGCCUCUC	231
8			CAUGUUGCdTdT		1	UUCAUdTdT	
38	D-2800	7532	GAGAGGCAUGU	63	753	UGUCUCCAACAUGC	232
3			UGGAGACCdTdT		3	CUCUCdTdT	
38	D-2801	7534	AGAGGCAUGUU	64	753	UAGUCUCCAACAUG	233
4			GGAGACUCdTdT		5	CCUCUdTdT	
39	D-2802	7536	AUGUUGGAGAC	65	753	UUGCCCAAGUCUCC	234
0			UUGGGCACdTdT		7	AACAUdTdT	
39	D-2803	7538	GUUGGAGACUU	66	753	UAUUGCCCAAGUCU	235
2			GGGCAAUCdTdT		9	CCAACdTdT	
39	D-2804	7540	GGAGACUUGGG	67	754	UCACAUUGCCCAAG	236
5			CAAUGUGCdTdT		1	UCUCCdTdT	
40	D-2805	7542	GGCAAUGUGAC	68	754	UGUCAGCAGUCACA	237
4			UGCUGACCdTdT		3	UUGCCdTdT	
40	D-2806	7544	CAAUGUGACUG	69	754	UUUGUCAGCAGUCA	238
6			CUGACAACdTdT		5	CAUUGdTdT	
41	D-2807	7546	CUGACAAAGAU	70	754	UCCACACCAUCUUU	239
7			GGUGUGGCdTdT		7	GUCAGdTdT	
41	D-2808	7548	UGACAAAGAUG	71	754	UGCCACACCAUCUU	240
8			GUGUGGCCdTdT		9	UGUCAdTdT	
46	D-2809	7550	CUCAGGAGACC	72	755	UAUGCAAUGGUCUC	241
9			AUUGCAUCdTdT		1	CUGAGdTdT	

[0379]

47 0	D-2810	7552	UCAGGAGACCA UUGCAUCCdTdT	73 3	755 3	UGAUGCAAUGGUCU CCUGAdTdT	242
47 5	D-2811	7554	AGACCAUUGCA UCAUUGGCdTdT	74 5	755 5	UCCAAUGAUGCAAU GGUCUdTdT	243
47 6	D-2812	7556	GACCAUUGCAU CAUUGGCCdTdT	75 7	755 7	UGCCAAUGAUGCAA UGGUCdTdT	244
48 0	D-2813	7558	AUUGCAUCAUU GGCCGCACdTdT	76 9	755 9	UUGCGGCCAAUGAU GCAAUdTdT	245
48 7	D-2814	7560	CAUUGGCCGCA CACUGGUCdTdT	77 1	756 1	UACCAGUGUGCGGC CAAUGdTdT	246
49 4	D-2815	7562	CGCACACUGGU GGUCCAUCdTdT	78 3	756 3	UAUGGACCACCAGU GUGCGdTdT	247
49 6	D-2816	7564	CACACUGGUGG UCCAUGACdTdT	79 5	756 5	UUCAUGGACCACCA GUGUGdTdT	248
49 7	D-2817	7566	ACACUGGUGGU CCAUGAACdTdT	80 7	756 7	UUUCAUGGACCACC AGUGUdTdT	249
50 1	D-2818	7568	UGGUGGUCCAU GAAAAAGCdTdT	81 9	756 9	UCUUUUUCAUGGAC CACCAdTdT	250
50 4	D-2819	7570	UGGUCCAUGAA AAAGCAGCdTdT	82 1	757 1	UCUGCUUUUCAUG GACCAdTdT	251
51 5	D-2820	7572	AAAGCAGAUGA CUUGGGCCdTdT	83 3	757 3	UGCCCAAGUCAUCU GCUUUdTdT	252
51 8	D-2821	7574	GCAGAUGACUU GGGCAAACdTdT	84 5	757 5	UUUUGCCCAAGUCA UCUGCdTdT	253
52 2	D-2822	7576	AUGACUUGGGC AAAGGUGCdTdT	85 7	757 7	UCACCUUUGCCCAA GUCAUdTdT	254
52	D-2823	7578	UGACUUGGGCA	86	757	UCCACCUUUGCCCA	255

[0380]

3			AAGGUGGCdTdT		9	AGUCAdTdT	
52	D-2824	7580	GACUUGGGCAA	87	758	UUCCACCUUUGCCC	256
4			AGGUGGACdTdT		1	AAGUCdTdT	
55	D-2825	7582	GUACAAAGACA	88	758	UCGUUUCUGUCUU	257
2			GGAAACGCdTdT		3	UGUACdTdT	
55	D-2826	7584	ACAAAGACAGG	89	758	UAGCGUUUCCUGUC	258
4			AAACGCUCdTdT		5	UUUGUdTdT	
55	D-2827	7586	CAAAGACAGGA	90	758	UCAGCGUUUCCUGU	259
5			AACGCUGCdTdT		7	CUUUGdTdT	
56	D-2828	7588	AGGAAACGCUG	91	758	UCGACUUCCAGCGU	260
2			GAAGUCGCdTdT		9	UUCCUdTdT	
57	D-2829	7590	GUCGUUUGGCU	92	759	UCACCACAAGCCAA	261
6			UGUGGUGCdTdT		1	ACGACdTdT	
57	D-2830	7592	UCGUUUGGCUU	93	759	UACACCACAAGCCA	262
7			GUGGUGUCdTdT		3	AACGAdTdT	
57	D-2831	7594	CGUUUGGCUUG	94	759	UUACACCACAAGCC	263
8			UGGUGUACdTdT		5	AAACGdTdT	
57	D-2832	7596	GUUUGGCUUGU	95	759	UUUACACCACAAGC	264
9			GGUGUAACdTdT		7	CAAACdTdT	
58	D-2833	7598	UUGGCUUGUGG	96	759	UAAUUACACCACAA	265
1			UGUAAUUCdTdT		9	GCCAAdTdT	
58	D-2834	7600	GGCUUGUGGUG	97	760	UCCAAUUACACCAC	266
3			UAAUUGGCdTdT		1	AAGCCdTdT	
58	D-2835	7602	GCUUGUGGUGU	98	760	UCCCAAUUACACCA	267
4			AAUUGGGCdTdT		3	CAAGCdTdT	
58	D-2836	7604	CUUGUGGUGUA	99	760	UUCCCAAUUACACC	268
5			AUUGGGACdTdT		5	ACAAGdTdT	

[0381]

58 7	D-2837	7606	UGUGGUGUAAU UGGGAUCCdTdT	100 7	760 7	UGAUCCCAAUUACA CCACAdTdT	269
58 8	D-2838	7608	GUGGUGUAAUU GGGAUCGCdTdT	101 9	760 9	UCGAUCCCAAUUAC ACCACdTdT	270
58 9	D-2839	7610	UGGUGUAAUUG GGAUCGCCdTdT	102 1	761 1	UGCGAUCCCAAUUA CACCAdTdT	271
59 3	D-2840	7612	GUAAUUGGGAU CGCCCAACdTdT	103 3	761 3	UUUGGGCGAUCCCA AUUACdTdT	272
59 4	D-2841	7614	UAAUUGGGAUC GCCCAAUCdTdT	104 5	761 5	UAUUGGGCGAUCCC AAUUAdTdT	273
59 5	D-2842	7616	AAUUGGGAUCG CCCAAUACdTdT	105 7	761 7	UUAUUGGGCGAUCC CAAUuTdT	274
59 6	D-2843	7618	AUUGGGAUCGC CCAAUAACdTdT	106 9	761 9	UUUAUUGGGCGAUC CCAAUdTdT	275
59 7	D-2844	7620	UUGGGAUCGCC CAAUAAACdTdT	107 1	762 1	UUUUAUUGGGCGAU CCCAAdTdT	276
59 8	D-2845	7622	UGGGAUCGCCC AAUAAACdTdT	108 3	762 3	UGUUUAUUGGGCGA UCCCAdTdT	277
59 9	D-2846	7624	GGGAUCGCCCA AUAAACACdTdT	109 5	762 5	UUGUUUAUUGGGCG AUCCCdTdT	278
60 2	D-2847	7626	AUCGCCCAAUA AACAUUCCdTdT	110 7	762 7	UGAAUGUUUAUUGG GCGAUdTdT	279
60 7	D-2848	7628	CCAAUAAACAU UCCCUUGCdTdT	111 9	762 9	UCAAGGGAAUGUUU AUUGGdTdT	280
60 8	D-2849	7630	CAAUAAACAUU CCCUUGGCdTdT	112 1	763 1	UCCAAGGGAAUGUU UAUUGdTdT	281
60	D-2850	7632	AAUAAACAUUC	113	763	UCCAAGGGAAUGU	282

[0382]

9			CCUUGGACdTdT		3	UUAUdTdT	
61 0	D-2851	7634	AUAAACAUCC CUUGGAUCdTdT	114	763 5	UAUCCAAGGGAAUG UUUAUdTdT	283
61 1	D-2852	7636	UAAACAUCCCC UUGGAUGCdTdT	115	763 7	UCAUCCAAGGGAAU GUUUAdTdT	284
61 2	D-2853	7638	AAACAUCCCCU UGGAUGUCdTdT	116	763 9	UACAUCCAAGGGAA UGUUUdTdT	285
61 3	D-2854	7640	AACAUCCCCU GGAUGUACdTdT	117	764 1	UUACAUCCAAGGGA AUGUdTdT	286
61 6	D-2855	7642	AUCCCCUUGGA UGUAGUCCdTdT	118	764 3	UGACUACAUCCAAG GGAAUdTdT	287
62 1	D-2856	7644	CUUGGAUGUAG UCUGAGGCdTdT	119	764 5	UCCUCAGACUACAU CCAAGdTdT	288
63 3	D-2857	7646	CUGAGGCCCCU UAACUCACdTdT	120	764 7	UUGAGUUAAGGGGC CUCAGdTdT	289
63 5	D-2858	7648	GAGGCCCCUUA ACUCAUCCdTdT	121	764 9	UGAUGAGUUAAGGG GCCUCdTdT	290
63 6	D-2859	7650	AGGCCCCUUA CUCAUCUCdTdT	122	765 1	UAGAUGAGUUAAGG GGCCUdTdT	291
63 9	D-2860	7652	CCCCUUAACUC AUCUGUUCdTdT	123	765 3	UACAGAUGAGUUA AGGGGdTdT	292
64 0	D-2861	7654	CCCUUAACUCA UCUGUUACdTdT	124	765 5	UUAACAGAUGAGUU AAGGGdTdT	293
64 1	D-2862	7656	CCUUAACUCAU CUGUUAUCdTdT	125	765 7	UAUAACAGAUGAGU UAAGGdTdT	294
64 2	D-2863	7658	CUUAACUCAUC UGUUAUCCdTdT	126	765 9	UGAUAACAGAUGAG UUAAGdTdT	295

[0383]

64 3	D-2864	7660	UUAACUCAUCU GUUAUCCCdTdT	127	766 1	UGGAUAACAGAUGA GUUAAdTdT	296
64 4	D-2865	7662	UAACUCAUCUG UUAUCCUCdTdT	128	766 3	UAGGAUAACAGAUG AGUUAAdTdT	297
64 5	D-2866	7664	AACUCAUCUGU UAUCCUGCdTdT	129	766 5	UCAGGAUAACAGAU GAGUUDTdT	298
65 4	D-2867	7666	GUUAUCCUGCU AGCUGUACdTdT	130	766 7	UUACAGCUAGCAGG AUAACdTdT	299
66 0	D-2868	7668	CUGCUAGCUGU AGAAAUGCdTdT	131	766 9	UCAUUUCUACAGCU AGCAGdTdT	300
66 1	D-2869	7670	UGCUAGCUGUA GAAAUGUCdTdT	132	767 1	UACAUUUCUACAGC UAGCAdTdT	301
66 6	D-2870	7672	GCUGUAGAAAU GUAUCCUCdTdT	133	767 3	UAGGAUACAUUUCU ACAGCdTdT	302
66 7	D-2871	7674	CUGUAGAAAUG UAUCCUGCdTdT	134	767 5	UCAGGAUACAUUUC UACAGdTdT	303
66 8	D-2872	7676	UGUAGAA AUGU AUCCUGACdTdT	135	767 7	UUCAGGAUACAUUU CUACAdTdT	304
66 9	D-2873	7678	GUAGAA AUGUA UCCUGAUCdTdT	136	767 9	UAUCAGGAUACAUU UCUACdTdT	305
67 3	D-2874	7680	AAAUGUAUCCU GAUAAACCdTdT	137	768 1	UGUUUAUCAGGAUA CAUUUDTdT	306
67 7	D-2875	7682	GUAUCCUGAUA AACAUUACdTdT	138	768 3	UUA AUGUUUAUCAG GAUACdTdT	307
69 2	D-2876	7684	UUA AACACUGU AAUCUUACdTdT	139	768 5	UUAAGAUUACAGUG UUUAAdTdT	308
69	D-2877	7686	ACUGUAAUCUU	140	768	UCACUUUUAAGAUU	309

[0384]

8			AAAAGUGCdTdT		7	ACAGUdTdT	
69	D-2878	7688	CUGUAAUCUUA	141	768	UACACUUUUAAGAU	310
9			AAAGUGCdTdT		9	UACAGdTdT	
70	D-2879	7690	UGUAAUCUUA	142	769	UUACACUUUUAAGA	311
0			AAGUGUACdTdT		1	UUACAdTdT	
70	D-2880	7692	GUAAUCUUA	143	769	UUUACACUUUUAAG	312
1			AGUGUAACdTdT		3	AUUACdTdT	
70	D-2881	7694	CUUAAAAGUGU	144	769	UCACAAUUACACUU	313
6			AAUUGUGCdTdT		5	UUAAGdTdT	
74	D-2882	7696	UACCUGUAGUG	145	769	UAGUUUCUCACUAC	314
9			AGAAACUCdTdT		7	AGGUAdTdT	
77	D-2883	7698	UUAUGAUCACU	146	769	UUCUUCCAAGUGAU	315
0			UGGAAGACdTdT		9	CAUAAdTdT	
77	D-2884	7700	AUGAUCACUUG	147	770	UAAUCUUCCAAGUG	316
2			GAAGAUUCdTdT		1	AUCAUdTdT	
77	D-2885	7702	AUCACUUGGAA	148	770	UACAAAUCUUCCAA	317
5			GAUUUGUCdTdT		3	GUGAUdTdT	
78	D-2886	7704	UGGAAGAUUUG	149	770	UAACUAUACAAAUC	318
1			UAUAGUUCdTdT		5	UUCCAdTdT	
80	D-2887	7706	UAUAAAACUCA	150	770	UUUUUAACUGAGUU	319
0			GUUAAAACdTdT		7	UUAUAdTdT	
80	D-2888	7708	AAACUCAGUUA	151	770	UGACAUUUUAACUG	320
4			AAAUGUCCdTdT		9	AGUUUdTdT	
81	D-2889	7710	GUCUGUUUCAA	152	771	UCAGGUCAUUGAAA	321
9			UGACCUGCdTdT		1	CAGACdTdT	
82	D-2890	7712	AUGACCUGUAU	153	771	UUGGCAAAAUACAG	322
9			UUUGCCACdTdT		3	GUCAUdTdT	

[0385]

83 2	D-2891	7714	ACCUGUAUUUU GCCAGACCdTdT	154 5	771 5	UGUCUGGCAAAAUA CAGGUdTdT	323
83 3	D-2892	7716	CCUGUAUUUUG CCAGACUCdTdT	155 7	771 7	UAGUCUGGCAAAAU ACAGGdTdT	324
85 1	D-2893	7718	UAAAUCACAGA UGGGUAUCdTdT	156 9	771 9	UAUACCCAUCUGUG AUUUAdTdT	325
85 4	D-2894	7720	AUCACAGAUGG GUAUUAACdTdT	157 1	772 1	UUUAAUACCCAUCU GUGAUdTdT	326
85 5	D-2895	7722	UCACAGAUGGG UAUUAAACdTdT	158 3	772 3	UUUUAAUACCCAUC UGUGAdTdT	327
85 7	D-2896	7724	ACAGAUGGGUA UUAAACUCdTdT	159 5	772 5	UAGUUUAAUACCCA UCUGUdTdT	328
85 8	D-2897	7726	CAGAUGGGUAU UAAACUUCdTdT	160 7	772 7	UAAGUUUAAUACCC AUCUGdTdT	329
85 9	D-2898	7728	AGAUGGGUAUU AAACUUGCdTdT	161 9	772 9	UCAAGUUUAAUACC CAUCUdTdT	330
86 1	D-2899	7730	AUGGGUAUUAA ACUUGUCCdTdT	162 1	773 1	UGACAAGUUUAAUA CCCAUdTdT	331
86 9	D-2900	7732	UAAACUUGUCA GAAUUUCCdTdT	163 3	773 3	UGAAAUUCUGACAA GUUUAdTdT	332
89 1	D-2901	7734	UCAUUCAAGCC UGUGAAUCdTdT	164 5	773 5	UAUUCACAGGCUUG AAUGAdTdT	333
89 2	D-2902	7736	CAUUCAAGCCU GUGAAUACdTdT	165 7	773 7	UUAUUCACAGGCUU GAAUGdTdT	334
90 6	D-2903	7738	AAUAAAAACCC UGUAUGGCdTdT	166 9	773 9	UCCAUAACAGGGUUU UUAUUdTdT	335
90	D-2904	7740	AUAAAAACCCU	167	774	UGCCAUAACAGGGUU	336

[0386]

7			GUAUGGCCdTdT		1	UUUAUdTdT	
91	D-2905	7742	AACCCUGUAUG	168	774	UUAAGUGCCAUACA	337
2			GCACUUACdTdT		3	GGGUUdTdT	
91	D-2906	7744	ACCCUGUAUGG	169	774	UAUAAGUGCCAUAC	338
3			CACUUAUCdTdT		5	AGGGUdTdT	
93	D-2907	7746	GAGGCUAUUAA	170	774	UGAUUCUUUAAUA	339
4			AAGAAUCCdTdT		7	GCCUCdTdT	
94	D-2908	7748	AAAGAAUCCAA	171	774	UUUUGAAUUUGGAU	340
4			AUUCAAACdTdT		9	UCUUUdTdT	
94	D-2909	7750	GAAUCCAAAUU	172	775	UUAGUUUGAAUUUG	341
7			CAAACUACdTdT		1	GAUUCdTdT	

[0387] SOD1 siRNA合成

[0388] 根据氨基亚磷酸酯寡聚化化学,在ABI 3900合成仪(Applied Biosystems)上装配寡核糖核苷酸。固体支持物是加载了2'-脱氧-胸苷(购自Glen Research, Sterling, Virginia, USA)的聚苯乙烯,以提供0.2μmol的合成规模。辅助合成试剂DNA和RNA氨基亚磷酸酯得自SAFC Proligo(Hamburg, 德国)。具体地,使用具有2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基的尿苷(U)、胸苷(dT)、4-N-乙酰基胞苷(C^{Ac})、6-N-苯甲酰基腺苷(A^{Bz})和2-N-异丁基鸟苷(G^{iBu})的5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)氨基亚磷酸酯单体来构建寡聚体序列。通过采用5-乙基硫代-1H-四唑(ETT)作为活化剂(在乙腈中0.5M),所有氨基亚磷酸酯(在乙腈中70mM)的偶联时间是3min。在合成仪上合成序列,并除去最终的二甲氧基三苯甲基保护基("DMT除去"合成)。固相合成结束后,将寡核糖核苷酸从固体支持物切割并使用甲胺水溶液(40%)和甲胺在乙醇中的溶液(33%)的1:1(v/v)混合物去保护。在45℃保持90分钟以后,将溶液用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)稀释,并加入三乙胺三氢氟酸盐(TEA.HF)。在45℃温育2小时以后,将寡核糖核苷酸用1M NaOAc以及丙酮和乙醇4:1(v/v)的混合物沉淀。将沉淀物溶解在1M NaCl水溶液中,并通过尺寸排阻色谱法脱盐。这通过使用配有HiTrap 5mL柱(GE Healthcare)的AKTA Purifier HPLC系统(GE Healthcare, Freiburg, 德国)完成。通过MALDI质谱法或ESI质谱法证实寡核糖核苷酸的一性。为了从RNA单链产生siRNA,将等摩尔量的互补有义链和反义链混合,并在20mM NaCl、4mM磷酸钠pH 6.8缓冲液中退火。在使用之前冷冻储存siRNA。

[0389] 实施例2. 用于人SOD1 mRNA抑制的SOD1 siRNA的体外筛选

[0390] 通过使用bDNA(分支DNA)测定来定量SOD1 mRNA,针对HeLa细胞中内源性SOD1表达的抑制测定了靶向人SOD1的siRNA(描述在表3中)。将来自双剂量测定的结果用于选择SOD1 dsRNA双链体的子集,将其用于在4类培养的细胞中的剂量应答实验以计算IC₅₀。

[0391] 细胞培养和转染

[0392] HeLa细胞得自ATCC(与LGC Standards合伙的ATCC, Wesel, 德国),并在保湿培养箱

中于37℃、5%CO₂的气氛下在补充含有10%胎牛血清(来自GIBCO/Life Technologies的超低IgG)和1%青霉素/链霉素(Biochrom GmbH, Berlin, 德国)的HAM氏F-12培养基(Biochrom GmbH, Berlin, 德国)中培养。

[0393] 对于使用siRNA的转染,将HeLa细胞以19,000-20,000个细胞/孔的密度接种在96-孔板中。根据生产商的说明书,用Lipofectamine 2000(Invitrogen/Life Technologies)进行siRNA的转染。对于双剂量筛选,使用1nM或0.1nM的SOD1 siRNA浓度。用10、2.5、0.6、0.16、0.039、0.0098、0.0024、0.0006、0.00015和0.000038nM的SOD1 siRNA浓度进行剂量应答实验。用萤光素酶siRNA、Aha-1siRNA、PLGF siRNA或无关siRNA的对照混合物转染对照孔。

[0394] 分支DNA测定-QuantiGene 2.0

[0395] 与siRNA一起温育24小时以后,除去培养基,并将细胞在150μl裂解混合物(1体积裂解混合物,2体积无核酸酶的水)中裂解,然后在53℃温育60分钟。然后将80μl工作探针集合(Working Probe Set) SOD1(基因靶标)和90μl工作探针集合GAPDH(内源对照)和20μl或10μl细胞裂解物加入捕获平板中。将捕获平板在55℃(对于SOD1)和53℃(对于GAPDH)温育(大约16-20小时)。次日,将捕获平板用至少300μl 1X洗涤缓冲液(无核酸酶的水、缓冲液组分1和洗涤缓冲液组分2)洗涤3次(在最后一次洗涤后,将平板翻转并将它在清洁的纸巾上印迹)。将100μl扩增器前工作试剂(pre-Amplifier Working Reagent)加入SOD1捕获平板,将其用铝箔密封并在55℃温育1小时。温育1小时以后,重复洗涤步骤,然后将100μl扩增器工作试剂(Amplifier Working Reagent)加入SOD1和GAPDH捕获平板。在55℃(SOD1)或53℃(GAPDH)温育1小时以后,重复洗涤和干燥步骤,并加入100μl标记探针。将捕获平板在50℃(SOD1)或53℃(GAPDH)温育1小时。然后将平板用1X洗涤缓冲液洗涤并干燥,然后将100μl底物加入捕获平板。在暗处温育30分钟以后使用1420发光计数器(WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, 德国)读出发光。

[0396] bDNA数据分析

[0397] 对于每种SOD1 siRNA或对照siRNA,平行地转染四个孔,且从每个孔收集各个数据点。对于每个孔,将SOD1 mRNA水平归一化至GAPDH mRNA水平。将给定的SOD1 siRNA的活性表达为在处理的细胞中的SOD1 mRNA浓度(归一化至GAPDH mRNA)相对于在对照孔中取平均值的SOD1 mRNA浓度(归一化至GAPDH mRNA)的百分比。

[0398] 表4提供了来自体外HeLa筛选的结果,其中在1nM或0.1nM测试了SOD1 siRNA,其序列给出在表3中。对于每种SOD1 siRNA,在处理的细胞中剩余的SOD1 mRNA(归一化至GAPDH mRNA)相对于对照的平均百分比以及标准差显示在表4中。许多在1nM的SOD1 siRNA有效地使HeLa细胞中的SOD1 mRNA水平降低超过80%。此外,许多在0.1nM的SOD1 siRNA有效地使HeLa细胞中的SOD1 mRNA水平降低超过80%。

[0399] 表4. SOD1 siRNA在HeLa细胞中关于SOD1基因表达抑制活性的体外筛选的双剂量结果

[0400]

siRNA 双链体 ID	1 nM SOD1 siRNA 以后 24 小时剩余的 SOD1 mRNA [对照的%]	SD [%]	0.1 nM SOD1 siRNA 以后 24 小时剩余的 SOD1 mRNA [对照的%]	SD [%]
D-2741	87.2	2.7	70.6	3
D-2742	86.9	4.3	79.5	8.5
D-2743	89.6	3.6	80.6	8.8
D-2744	83.8	7.2	75.9	8.5

[0401]

D-2745	95.1	9.1	84.1	6.8
D-2746	111.3	3.6	92.0	7.2
D-2747	100.0	6.1	92.9	4.4
D-2748	100.4	3.1	91.6	12
D-2749	87.1	2.9	96.4	13
D-2750	94.2	7.1	93.1	8
D-2751	85.4	7.2	96.1	8
D-2752	27.2	3.6	70.2	6.5
D-2753	25.5	4.8	67.5	4.5
D-2754	23.2	4	70.2	2.3
D-2755	36.6	3.7	75.5	11
D-2756	9.1	0.7	29.2	2.6
D-2757	3.9	0.6	9.0	1.8
D-2758	6.4	1.1	13.9	2.8
D-2759	6.7	1.1	14.1	1
D-2760	32.3	3.4	61.9	8.8
D-2761	12.9	3.6	41.7	8.3
D-2762	16.9	2.6	41.2	10
D-2763	5.7	1.3	10.5	3.4
D-2764	9.2	2.7	19.5	4.9
D-2765	13.6	1.9	29.4	8.8
D-2766	8.7	1.1	28.1	6.6
D-2767	10.4	1.6	24.7	5.9
D-2768	13.0	1.4	27.7	7.3
D-2769	25.3	1.9	57.4	7.5
D-2770	14.9	1.6	35.5	4.4
D-2771	11.4	1.8	32.6	8.6

[0402]

D-2772	10.6	1.3	27.9	4.7
D-2773	14.3	1.4	35.7	3.1
D-2774	7.1	1.3	23.0	1.5
D-2775	9.8	0.9	31.3	3.3
D-2776	11.1	2.9	31.3	5.3
D-2777	47.8	5.5	80.9	4.6
D-2778	7.4	0.6	26.5	4.2
D-2779	7.9	0.6	17.9	3
D-2780	12.5	1.3	31.7	5.6
D-2781	16.3	2.3	39.1	8
D-2782	10.2	3.1	25.4	3
D-2783	13.5	3.5	33.4	6.5
D-2784	12.3	2.5	36.3	5.4
D-2785	14.6	3	30.5	7.4
D-2786	16.2	3.5	42.6	8
D-2787	14.4	4.2	37.3	6.5
D-2788	9.8	3	21.6	6.6
D-2789	18.5	5.9	48.9	12
D-2790	11.6	3.8	28.1	5.6
D-2791	8.9	1.8	26.6	5.6
D-2792	8.1	1.4	25.6	5.3
D-2793	9.3	1.6	26.6	3
D-2794	8.9	1.9	25.8	4.2
D-2795	22.6	3.4	59.5	9.9
D-2796	15.1	0.7	43.0	1.9
D-2797	21.1	2.5	43.0	1.3
D-2798	10.4	1.2	28.0	5.1

[0403]

D-2799	11.0	1.2	29.8	3.3
D-2800	21.3	2.4	52.4	4.7
D-2801	12.3	3.3	28.7	4
D-2802	8.4	1.8	18.8	3.7
D-2803	5.9	1	12.1	4.1
D-2804	11.8	1.6	28.9	7.5
D-2805	13.5	2.6	34.5	7.5
D-2806	5.5	1.1	10.4	2.5
D-2807	8.5	1.3	24.2	6.6
D-2808	9.5	1.5	26.0	1.4
D-2809	7.5	0.9	17.7	2.8
D-2810	12.1	2	43.1	8.3
D-2811	5.6	0.8	16.7	7
D-2812	14.2	1.4	42.5	8.2
D-2813	29.0	3.4	66.7	13
D-2814	35.7	3.5	73.4	15
D-2815	30.3	1.9	74.3	12
D-2816	14.6	2.1	47.2	5.1
D-2817	27.5	1.8	70.5	6.6
D-2818	9.6	0.8	32.9	7.2
D-2819	9.0	0.8	29.1	3
D-2820	10.8	1.4	38.7	3.5
D-2821	5.8	0.4	19.4	6.1
D-2822	10.5	2.5	46.3	6.8
D-2823	3.5	1.1	18.8	3.5
D-2824	9.9	3.2	43.8	0.8
D-2825	6.6	2.6	29.7	1.1

[0404]

D-2826	8.0	1.9	40.6	7.2
D-2827	7.0	1.2	25.2	4.5
D-2828	6.4	2.2	22.4	1.7
D-2829	14.8	2.7	45.5	7.4
D-2830	9.4	2	28.5	6.5
D-2831	8.6	2.8	28.4	6.6
D-2832	12.3	3.2	43.4	3.2
D-2833	20.5	5.2	66.7	9.1
D-2834	10.7	2.5	35.9	2.2
D-2835	11.6	2.4	37.7	4
D-2836	24.1	3.3	57.0	4.2
D-2837	98.7	12	96.7	4.3
D-2838	20.5	4	49.5	1.4
D-2839	10.0	2.4	31.9	4.3
D-2840	50.2	8.3	89.2	7.4
D-2841	70.8	11	87.1	7.9
D-2842	79.7	21	90.9	3.6
D-2843	24.2	1.2	57.2	8.4
D-2844	21.5	6.4	51.4	1
D-2845	12.9	2.2	39.4	7.3
D-2846	10.2	2.6	30.5	2.6
D-2847	40.5	9.7	70.0	6.5
D-2848	41.8	7	63.7	6
D-2849	24.7	6.8	51.3	8.1
D-2850	79.4	7.5	76.5	16
D-2851	28.1	6.5	72.0	8.8
D-2852	13.8	2.1	56.9	4.8

[0405]

D-2853	32.1	9.5	72.2	12
D-2854	21.5	3.9	58.8	10
D-2855	39.8	10	75.4	5.5
D-2856	14.4	3.4	40.4	5.8
D-2857	8.6	1	18.4	4.5
D-2858	10.1	1.1	19.1	4.8
D-2859	10.9	1.3	20.9	5.4
D-2860	7.4	1.3	11.7	3.8
D-2861	5.0	1.4	12.6	2.6
D-2862	5.5	1	13.8	2.7
D-2863	8.2	1.3	26.5	4.3
D-2864	9.1	1.6	40.2	3.4
D-2865	6.3	0.6	22.8	3.4
D-2866	7.0	1.7	17.8	4.3
D-2867	9.3	0.8	31.7	6.2
D-2868	10.3	2.5	30.8	6.5
D-2869	9.4	4.3	34.7	4.6
D-2870	5.9	0.6	18.1	2.6
D-2871	6.5	1.1	13.5	1.5
D-2872	10.5	1	31.3	5.3
D-2873	7.0	1.1	20.8	3.7
D-2874	9.4	2.4	35.3	5.7
D-2875	5.4	1.1	13.5	2.4
D-2876	14.1	4.6	45.9	5.2
D-2877	64.5	9.8	64.0	9
D-2878	57.0	14	62.9	8.1
D-2879	71.4	12	79.4	8.6

[0406]

D-2880	79.7	11	100.9	4.9
D-2881	72.8	12	82.8	5.6
D-2882	64.4	8.8	73.2	6.9
D-2883	80.1	4.9	86.3	13
D-2884	69.6	5.8	74.2	13
D-2885	76.9	2	76.7	18
D-2886	74.0	0.7	80.4	3.4
D-2887	77.7	8.7	88.6	16
D-2888	70.3	5.1	66.2	2.2
D-2889	71.2	3	67.3	7.3
D-2890	75.3	7.9	71.2	6.4
D-2891	74.6	8.4	72.4	4.3
D-2892	72.5	6.9	71.6	5.7
D-2893	73.9	3.8	83.7	2.9
D-2894	66.9	5.7	72.4	4.9
D-2895	71.6	8.9	72.1	9
D-2896	71.0	5.6	74.4	1.3
D-2897	74.4	7.9	78.0	3.8
D-2898	74.0	5.8	73.5	1.6
D-2899	71.0	10	74.1	9.7
D-2900	71.3	4.1	77.8	5.8
D-2901	64.8	9.4	82.0	11
D-2902	53.6	5.2	82.7	15
D-2903	66.8	2.6	101.1	13
D-2904	62.6	7.8	87.5	20
D-2905	67.1	14	74.0	4.1
D-2906	64.0	3.2	73.9	12

[0407]	D-2907	66.4	7.3	82.0	11
	D-2908	72.6	20	85.2	23
	D-2909	80.0	7.3	77.2	12

[0408] 在剂量-应答实验中评价了12种在0.1nM在HeLa细胞中最有活性的SOD1 siRNA。表5提供了这12种选择的SOD1 siRNA在HeLa细胞中的IC₅₀浓度,其导致相对于对照的50% SOD1 mRNA抑制。这12种SOD1 siRNA在该实验范例中是特别有效的,并表现出1-8pM之间的IC₅₀值。

[0409] 表5. SOD1 siRNA在HeLa细胞中关于SOD1基因表达抑制活性的体外测定的IC₅₀结果

[0410]	siRNA 双链体 ID	IC ₅₀ 平均值 (pM)
	D-2757	1
	D-2806	4
	D-2860	2
	D-2861	2
	D-2875	4
	D-2871	5
	D-2758	5
	D-2759	5
	D-2866	4
	D-2870	4
	D-2823	6
	D-2858	8

[0411] 在下面表6中详细呈现了用于鉴别这12种SOD1 siRNA的IC₅₀的来自HeLa细胞的剂量应答数据。测定所有12种siRNA在HeLa细胞中具有pM IC₅₀。在表5中的SOD1 siRNA的IC₅₀数据是在下面表6中呈现的数据的总结。

[0412] 表6. 12种SOD1 siRNA在HeLa细胞中的剂量应答数据

[0413]

剩余的 SOD1 mRNA (对照的%)											IC50 (nM)
siRNA 双链体 ID	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.03 nM	0.009 nM	0.002 nM	0.00 nM	0.00 nM	0.0000 nM	
D-2757	2	2	2	3	6	16	33	57	77	86	0.001
D-2806	2	3	3	6	13	32	59	83	90	105	0.004
D-2860	5	5	5	6	10	22	50	68	87	92	0.002
D-2861	4	4	4	5	10	25	51	73	81	92	0.002
D-2875	4	4	4	7	15	34	62	78	82	92	0.004
D-2871	4	5	4	8	18	43	62	78	87	90	0.005
D-2758	5	5	5	9	17	41	70	81	97	111	0.005
D-2759	4	4	4	7	15	35	63	82	87	94	0.005
D-2866	3	3	4	8	17	39	54	79	80	76	0.004
D-2870	4	5	5	8	18	41	59	77	93	101	0.004
D-2823	3	3	4	7	20	42	65	81	86	92	0.006
D-2858	5	5	5	9	21	46	72	82	88	94	0.008

[0414] 实施例3. 在SH-SY5Y细胞、U87细胞和原代人星形胶质细胞中选择的SOD1 siRNA针对内源性SOD1 mRNA表达的体外筛选

[0415] SH-SY5Y细胞得自ATCC (与LGC Standards合伙的ATCC, Wesel, 德国), 并在保湿培养箱中于37℃、5%CO₂的气氛下在补充含有15%FCS (来自GIBCO/Life Technologies的超低IgG)、1%L-谷氨酰胺 (Biochrom GmbH, Berlin, 德国) 和1%青霉素/链霉素 (Biochrom GmbH, Berlin, 德国) 的Dulbecco氏MEM (Biochrom GmbH, Berlin, 德国) 中培养。

[0416] U87MG细胞得自ATCC (与LGC Standards合伙的ATCC, Wesel, 德国), 并在保湿培养箱中于37℃、5%CO₂的气氛下在补充含有10%FCS (来自GIBCO/Life Technologies的超低IgG) 和1%青霉素/链霉素 (Biochrom GmbH, Berlin, 德国) 的ATCC配制的Eagle氏最低基础培养基 (与LGC Standards合伙的ATCC, Wesel, 德国) 中培养。

[0417] 原代人星形胶质细胞得自LONZA (Lonza Sales Ltd, Basel, 瑞士), 并在保湿培养箱中于37℃、5%CO₂的气氛下在补充了AGM SingleQuot Kit (Lonza Sales Ltd, Basel, 瑞士) 的ABM基础培养基 (Lonza Sales Ltd, Basel, 瑞士) 中培养。

[0418] 除了用于SH-SY5Y细胞的转染试剂为Lipofectamine2000 (Invitrogen/Life Technologies)、用于U87细胞的转染试剂为RNAiMAX (Invitrogen/Life Technologies) 和用于原代人星形胶质细胞的转染试剂为Lipofectamine2000 (Invitrogen/Life Technologies) 以外, 以与关于HeLa细胞描述的方式类似的方式, 执行用12种选择的siRNA (D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-

2823、D-2858) 对SH-SY5Y细胞、U87MG细胞和原代人星形胶质细胞的转染以及用bDNA对SOD1和GAPDH mRNA水平的定量。

[0419] 分别在下面表7、8和9中详细呈现了用于鉴别这12种SOD1 siRNA (D-2757、D-2806、D-2860、D-2861、D-2875、D-2871、D-2758、D-2759、D-2866、D-2870、D-2823、D-2858) 的IC₅₀的、来自SH-SY5Y细胞、U87MG细胞和原代人星形胶质细胞的剂量应答数据。确定所有12种siRNA在U87细胞中具有pM IC₅₀。

[0420] IC₅₀值提供在表10中。在原代人星形胶质细胞中的IC₅₀通常高于在SH-SY5Y和U87MG细胞中的。

[0421] 表7. 12种SOD1 siRNA在SH-SY5Y细胞中的剂量应答数据

剩余的 SOD1 mRNA (对照的%)											
siRNA	10				0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	
双链体	n	2.5	0.6	0.16	9	98	24	06	015	038	IC ₅₀
ID	M	nM	nM	nM	nM	nM	nM	nM	nM	nM	(nM)
D-2757	8	13	16	22	36	55	72	92	107	114	0.013
D-2806	11	12	15	26	40	71	103	121	117	131	0.025
D-2860	11	15	17	26	42	63	79	86	92	96	0.022
D-2861	12	14	16	19	37	60	82	83	87	94	0.017
D-2875	20	25	35	59	79	92	96	95	99	104	0.234
D-2871	15	19	23	42	71	87	95	94	99	96	0.103
D-2758	24	35	36	58	91	96	134	123	105	94	0.369
D-2759	10	11	16	25	43	67	85	94	104	108	0.026
D-2866	17	19	24	42	72	93	93	102	103	101	0.105
D-2870	19	22	26	40	62	88	100	105	105	105	0.078
D-2823	11	16	25	47	64	84	91	98	105	95	0.099
D-2858	16	21	25	46	68	91	92	95	103	116	0.106

[0424] 表8. 12种SOD1 siRNA在U87MG细胞中的剂量应答数据

[0425]

剩余的 SOD1 mRNA (对照的%)											IC50 (nM)
siRNA 双链体 ID	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.1 nM	0.03 nM	0.009 nM	0.002 nM	0.000 nM	0.0001 nM	0.0000 nM	
D-2757	3	4	3	4	5	8	19	50	86	99	0.00 1
D-2806	4	3	3	3	4	8	18	49	81	106	0.00 1
D-2860	4	4	5	5	6	8	20	46	72	93	0.00 1
D-2861	5	6	6	6	8	15	39	67	87	93	0.00 1
D-2875	4	5	5	5	6	9	19	45	76	99	0.00 1

[0426]

D-2871	5	5	5	5	6	11	24	50	77	86	0.00 1
D-2758	7	9	6	7	10	25	64	99	103	112	0.00 4
D-2759	6	6	5	6	8	21	50	80	93	104	0.00 2
D-2866	4	4	4	5	8	17	38	64	86	94	0.00 1
D-2870	5	5	5	5	7	7	13	31	63	85	0.00 3
D-2823	4	4	4	4	6	13	34	61	74	94	0.00 1
D-2858	7	6	6	7	8	14	33	54	71	94	0.00 1

[0427] 表9. 12种SOD1 siRNA在原代人星形胶质细胞中的剂量应答数据

[0428]

剩余的 SOD1 mRNA (对照的%)											
siRNA 双链体 ID	10 nM	2.5 nM	0.6 nM	0.16 nM	0.03 nM	0.00 nM	0.00 nM	0.00 nM	0.00 nM	0.000 nM	IC50 (nM)
D-2757	29	30	35	48	66	87	95	101	95	103	0.123
D-2806	26	32	35	47	63	78	87	95	95	98	0.113
D-2860	29	38	39	51	68	82	94	93	94	101	0.192
D-2861	27	33	38	47	62	73	88	93	96	102	0.114
D-2875	25	28	39	47	72	80	100	105	105	118	0.151
D-2871	25	34	42	52	63	83	97	100	97	108	0.182
D-2758	27	29	31	41	51	71	86	91	95	98	0.049

[0429]

D-2759	34	39	41	53	70	83	97	101	98	103	0.219
D-2866	30	32	35	46	65	78	84	87	92	95	0.118
D-2870	34	34	38	48	71	74	82	91	92	98	0.163
D-2823	27	31	40	53	67	80	84	86	92	97	0.186
D-2858	29	30	37	55	72	91	93	100	104	104	0.197

[0430] 在表10中的SOD1 siRNA的IC50数据是在表7、8和9中呈现的数据的总结。

[0431] 表10.SOD1 siRNA在SH-SY5Y细胞、U87MG细胞和原代人星形胶质细胞中关于SOD1基因表达抑制活性的体外测定的IC50结果

[0432]

siRNA 双链 体 ID	SH-SY5Y IC50 平均值 (pM)	U87MG IC50 平均值 (pM)	原代人星形胶质细 胞 IC 50 平均值(pM)
D-2757	13	1	123
D-2806	25	1	113
D-2860	22	1	192
D-2861	17	1	114
D-2875	234	1	151
D-2871	103	1	182
D-2758	369	4	49
D-2759	26	2	219
D-2866	105	1	118
D-2870	78	3	163
D-2823	99	1	186
D-2858	106	1	197

[0433] 实施例4. 靶向SOD1的siRNA

[0434] 将发现有效的SOD1 siRNA的过客-引导链双链体工程改造成表达载体并转染进中枢神经系统或神经元细胞系的细胞中。即使在siRNA敲降研究中使用的突出端是对于siRNA而言规范的dTdT,所述构建体中的突出端可以包含任何二核苷酸突出端。

[0435] 使用的细胞可以是原代细胞或源自诱导的多能干细胞(iPS细胞)。

[0436] 然后测量SOD1敲降,并执行深度测序以确定从在表达载体中施用的每种构建体加工成的确切过客和引导链。

[0437] 计算引导与过客链比率以确定敲降的效率,例如,RNA诱导的沉默复合物(RISC)加工的敲降的效率。

[0438] 将N-末端测序以确定切割位点和确定靶标的均匀切割百分比。如所预期的,切割高于90%。

[0439] 在一个平行研究中共转染HeLa细胞以分析SOD1的体外敲降。使用萤光素酶构建体作为对照来确定脱靶效应。

[0440] 再次执行深度测序。

[0441] 实施例5. 靶向SOD1的过客和引导序列

[0442] 根据本发明,设计了SOD1 siRNA。这些给出在表11A和11B中。过客和引导链描述在表中。在表11A和11B中,序列的名称的“miR”组分不一定对应miRNA基因的序列编号(例如,

VOYmiR-101是该序列的名称,且不一定意味着miR-101是该序列的部分)。

[0443] 表11A.过客和引导序列(5' -3')

	名称	双 链 体 ID	SS ID	过客	过客 SEQ ID	AS ID	引导	引导 SEQ ID
[0444]	VOYpre-001_D-280 6_开始构建体(18 个 天然核苷酸且位置 19 是 C; 3'末端 CC 二核苷酸)	D-2 910	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAAC <u>CC</u>	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343

[0445]

VOYpre-002_D-280 6_p19MMU (位置 19 U 以形成错配)	D-2 911	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>U</u> CC	344	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-003_D-280 6_p19GU 对(位置 19 是 G 以形成 GU 对)	D-2 912	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAG <u>C</u> CC	345	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-004_D-280 6_p19AU 对(位置 19 是 A 以形成 AU 对)	D-2 913	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACAA <u>A</u> CC	346	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-005_D-280 6_CMM (中央错配)	D-2 914	7757	CAAUGUG AC <u>A</u> GCUG ACAAACC	347	775 3	UUUGU CAGC <u>A</u> GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-006_D-280 6_p19DEL (位置 19 被删除)	D-2 915	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAACC	348	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-007_D-280 6_p19ADD (核苷酸	D-2 916	7759	CAAUGUG ACUGCUG	349	775 3	UUUGU CAGCA	343

[0446]

添加在位置 19; 添加是 U; 保留 C 和末端 CC 二核苷酸)			ACAAUCCC			GUCAC AUUGU U	
VOYpre-008_D-280 6_U 环	D-2 917	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-009_D-280 6_AU 环	D-2 918	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYpre-010_D-280 6_mir-22-环	D-2 919	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-101_pre-0 01 hsa-mir-155; D-2806	D-2 923	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102_pre-0 01 工程改造的; D-2806; let-7b 茎	D-2 924	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU	343

[0447]

						U	
VOYmiR-103_pre-0 02 工程改造的; D-2806_p19MMU; let-7b 茎	D-2 925	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACA <u>A</u> UCC	344	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-104_pre-0 03 工程改造的; D-2806_p19GU 对; let-7b 茎	D-2 926	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACA <u>A</u> GCC	345	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-105_pre-0 04 工程改造的; D-2806_p19AU 对; let-7b 茎	D-2 927	7756	CAAUGUG ACUGCUG ACA <u>A</u> A <u>C</u> CC	346	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-106_pre-0 05 工程改造的; D-2806_CMM; let-7b 茎	D-2 928	7757	CAAUGUG AC <u>A</u> G <u>C</u> UG ACA <u>A</u> ACC	347	775 3	UUUGU CAG <u>C</u> A GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-107_pre-0 06 工程改造的; D-2806_p19DEL; let-7b 茎	D-2 929	7758	CAAUGUG ACUGCUG ACAACC	348	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-108_pre-0	D-2	7765	CAAUGUG	355	775	UUUGU	343

[0448]

07 工程改造的; D-2806_p19ADD; let-7b 茎	930		ACUGCUG ACA <u>AU</u> CCC		3	CAGCA GUCAC AUUGU U	
VOYmiR-109_pre-0 08 工程改造的; D-2806_U 环; let-7b 茎	D-2 931	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-110_pre-0 09 工程改造的; D-2806_AU 环; let-7b 茎	D-2 932	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-111_pre-0 10 工程改造的; D-2806_mir-22-环; let-7b 茎	D-2 933	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-112_pre-0 01 工程改造的; PD; D-2806; let-7b 基础 茎不稳定性	D-2 934	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-113_pre-0 02 工程改造的; D-2806_p19MMU;	D-2 935	7754	CAAUGUG ACUGCUG ACA <u>AU</u> CC	344	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC	343

[0449]

let-7b 基础茎不稳定性						AUUGU U	
VOYmiR-114_pre-005 工程改造的; D-2806_CMM; let-7b 基础茎不稳定性	D-2 936	7757	CAAUGUG ACAGCUG ACAAACC	347	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-115_pre-010 工程改造的; D-2806_mir-22-环; let-7b 基础茎不稳定性	D-2 937	7760	CAAUGUG ACUGCUG ACAACAC	350	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-116_pre-003 工程改造的; D-2806_p19GU 对; let-7b 基础茎不稳定性	D-2 938	7755	CAAUGUG ACUGCUG ACAAGCC	345	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-117_pre-001 工程改造的; D-2757; let-7b 茎	D-2 939	7766	CGACGAA GGCCGUG UGCGCCC	356	776 7	UCGCAC ACGGCC UUCGU CGUU	357
VOYmiR-118_pre-001 工程改造的; D-2823; let-7b 茎	D-2 940	7768	UGACUUG GGCAAAG GUGGCCC	358	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VOYmiR-119_pre-001 工程改造的;	D-2 941	7770	AACUCAU CUGUUAU	360	777 1	UCAGG AUAAC	361

[0450]

D-2866; let-7b 茎			CCUGCCC			AGAUG AGUUU U	
VOYmiR-127	D-2 942	7752	CAAUGUG ACUGCUG ACAACCC	342	775 3	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU U	343
VOYmiR-102.860	D-2 943	7772	CCCCUUA CUCAUCU GUUCCC	362	777 3	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR102.861	D-2 944	7774	CCCUUAAC UCAUCUG UUACCC	364	777 5	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-102.866	D-2 945	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-102.870	D-2 946	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUCCCC	367	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU	368

[0451]

						U	
VOYmiR-102.823	D-2 947	7779	UGACUUG GGCAAAG GUGAGCC	369	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VOYmiR-104.860	D-2 948	7780	CCCCUAA CUCAUCU GUUGCC	370	777 3	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-104.861	D-2 949	7781	CCCUUAAAC UCAUCUG UUAGCC	371	777 5	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2 950	7782	AACUCAU CUGUUAU CUUAGCC	372	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-104.870	D-2 951	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-104.823	D-2 952	7784	UGACUUG GGCAAAG	374	776 9	UCCACC UUUGC	359

[0452]

			GUAGGCC			CCAAG UCAUU	
VOYmiR-109.860	D-2 953	7772	CCCCUUA CUCAUCU GUUCCC	362	777 3	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VOYmiR-104.861	D-2 954	7774	CCCUUAAC UCAUCUG UUACCC	364	777 5	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-104.866	D-2 955	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-109.870	D-2 956	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUUCCC	367	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-109.823	D-2 957	7779	UGACUUG GGCAAAG GUGAGCC	369	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VOYmiR-114.860	D-2	7785	CCCCUUA	375	777	UAACA	363

[0453]

	958		CACAUCU GUUACC		3	GAUGA GUUAA GGGGU U	
VOYmiR-114.861	D-2 959	7786	CCCUUAAC UGAUCUG UUAACC	376	777 5	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-114.866	D-2 960	7787	AACUCAU CUCUUAU CUUGCCC	377	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-114.870	D-2 961	7788	GCUGUGG AAUUGUA UCUUGCC	378	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-114.823	D-2 962	7789	UGACUUG GGGAAAG GUGAGCC	379	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VOYmiR-116.860	D-2 963	7780	CCCCUAA CUCAUCU GUUGCC	370	777 3	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU	363

[0454]

						U	
VOYmiR-116.861	D-2 964	7781	CCCUUAAC UCAUCUG UUAGCC	371	777 5	UUAAC AGAUG AGUUA AGGGU U	365
VOYmiR-116.866	D-2 965	7790	AACUCAU CUGUUAU CUUGGCC	380	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VOYmiR-116.870	D-2 966	7783	GCUGUGG AAAUGUA UCUUGCC	373	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VOYmiR-116.823	D-2 967	7784	UGACUUG GGCAAAG GUAGGCC	374	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VoymiR-127.860	D-2 968	7791	CCCCUUA CUCAUUU GUUCCC	381	777 3	UAACA GAUGA GUUAA GGGGU U	363
VoymiR-127.861	D-2 969	7774	CCCUUAAC UCAUCUG	364	777 5	UUAAC AGAUG	365

[0455]

			UUACCC			AGUUA AGGGU U	
VoymiR-127.866	D-2 970	7776	AACUCAU CUGUUAU CUUGCCC	366	777 1	UCAGG AUAAC AGAUG AGUUU U	361
VoymiR-127.870	D-2 971	7777	GCUGUGG AAAUGUA UCUCCCC	367	777 8	UAGGA UACAU UUCUA CAGCU U	368
VoymiR-127.823	D-2 972	7792	UGACUUG GGCAAAG GUAGCCC	382	776 9	UCCACC UUUGC CCAAG UCAUU	359
VOYmiR-120	D-2 973	7793	CAAUGUG ACUGCUG ACAAA	383	779 4	UUUGU CAGCA GUCAC AUUGU C	384

[0456] 表11B. 过客和引导序列 (5' -3')

[0457]

名称	双 链 体	SS ID	过客	过客 SEQ ID	AS ID	引导	引导 SEQ ID
----	-------------	----------	----	-----------------	----------	----	-----------------

[0458]

	ID						
VOYpre-011_D-280 6_过客-引导链与过 客链上的末端 3'C 交换	D-2 920	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	776 2	CAAUG UGACU GCUGA CAAUA C	352
VOYpre-012_D-280 6_ 过客-引导链与 过客链上的末端 3'C 交换	D-2 921	7761	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGUC	351	776 3	CAAUG UGACU GCUGA CAAUU C	353
VOYpre-013_D-280 6_ 过客-引导链与 过客链上的末端 3'C 交换	D-2 922	7764	UUUGUCA GCAGUCA CAUUGAC	354	776 2	CAAUG UGACU GCUGA CAAUA C	352

[0459] 实施例6.在AAV-miRNA载体中的SOD1 siRNA构建体

[0460] 将在表11中列出的SOD1 siRNA的过客-引导链双链体工程改造成AAV-miRNA表达载体。构建体(从ITR至ITR,以5'至3'列举)包含突变体ITR、启动子(CMV、U6或CB6启动子(其包括CMVie增强子、CBA启动子和SV40内含子)、来自表11的过客和引导链(具有在过客和引导链之间的环、在过客链之前的5'侧接区域和在引导链之后的3'侧接区域)、兔珠蛋白聚腺苷酸和野生型ITR。执行体外和体内研究以测试AAV-miRNA表达载体的效力。

[0461] 实施例7.构建体在HeLa细胞中的活性

[0462] 在HeLa中转染在实施例6中描述的7种SOD1 siRNA构建体(VOYmiR-103、VOYmiR-105、VOYmiR-108、VOYmiR-114、VOYmiR-119、VOYmiR-120和VOYmiR-127)和双链mCherry的对照,以测试所述构建体的活性。

[0463] A. 过客和引导链活性

[0464] 将7种SOD1 siRNA构建体和双链mCherry的对照转染进HeLa细胞中。48小时以后,评价内源性mRNA表达。所有7种SOD1 siRNA构建体表现出引导链的高活性(具有75-80%敲降)和过客链的低至无活性。SOD1 siRNA候选载体的引导链表现出高活性,产生75-80%的SOD1敲降,而过客链表现出小至无活性。

[0465] B. 构建体对SOD1的活性

[0466] 将7种SOD1 siRNA构建体和双链mCherry的对照(dsCherry)以1e4 vg/细胞、1e3

vg/细胞或 $1e2$ vg/细胞的MOI转染进HeLa细胞中。72小时以后,评价内源性mRNA表达。所有7种SOD1 siRNA构建体在 $1e3$ vg/细胞表现出有效的敲降。大多数SOD1 siRNA构建体表现出高活性(75-80%敲降),如在图1中所示。

[0467] 实施例8.构建体在HEK细胞中的活性

[0468] 将在实施例6中描述的30种SOD1 siRNA构建体(VOYmiR-102.860、VOYmiR-102.861、VOYmiR-102.866、VOYmiR-102.870、VOYmiR-102.823、VOYmiR-104.860、VOYmiR-104.861、VOYmiR-104.866、VOYmiR-104.870、VOYmiR-104.823、VOYmiR-109.860、VOYmiR-109.861、VOYmiR-109.866、VOYmiR-109.870、VOYmiR-109.823、VOYmiR-114.860、VOYmiR-114.861、VOYmiR-114.866、VOYmiR-114.870、VOYmiR-114.823、VOYmiR-116.860、VOYmiR-116.861、VOYmiR-116.866、VOYmiR-116.870、VOYmiR-116.823、VOYmiR-127.860、VOYmiR-127.861、VOYmiR-127.866、VOYmiR-127.870、VOYmiR-127.823)以及VOYmiR-114和双链mCherry的对照转染进细胞中,以测试所述构建体的活性。

[0469] A. 过客和引导链在HEK293中的活性

[0470] 将30种构建体和2种对照转染进HEK293T细胞中。24小时以后,评价内源性mRNA表达。大多数构建体表现出引导链的高活性(图2)和过客链的低至无的活性(图3)。

[0471] B. 过客和引导链在HeLa中的活性

[0472] 将30种构建体和2种对照转染进HeLa细胞中。48小时以后,评价内源性mRNA表达。大多数构建体表现出引导链的高活性(图4)和过客链的低至无的活性(图5)。

[0473] C. HeLa和HEK293相关性

[0474] 30种构建体的敲降在HeLa和HEK293细胞之间是类似的。30种构建体表现出构建体的引导链的敲降(参见图2和4)。构建体的大多数引导链表现出70-90%敲降。

[0475] D. 衣壳选择

[0476] 将来自HeLa和HEK293的前列(top)构建体包装进AAV中并经历HeLa感染。为了确定最佳的AAV以包装构建体,将包装在AAV2或AAV-DJ8中的mCherry以10vg/细胞、 $1e2$ vg/细胞、 $1e3$ vg/细胞、 $1e4$ vg/细胞或 $1e5$ vg/细胞的MOI感染进HeLa细胞中,并在40小时评价表达。选择AAV2作为衣壳来包装顶构建体。

[0477] E. AAV2生产

[0478] 将来自HeLa和HEK293的前列构建体包装进AAV2(1.6kb)中,且还包装了双链mCherry的对照(dsmCherry)。包装的构建体在分析之前经历Idoixanol纯化。AAV滴度显示在表12中。

[0479] 表12. AAV滴度

[0480]	构建体	AAV 滴度(基因组/ul)
	VOYmir-102.860	5.5E+08
	VOYmir-102.861	1.0E+09
	VOYmir-102.823	9.1E+08
	VOYmir-104.861	1.2E+09
	VOYmir-104.866	8.0E+08
	VOYmir-104.823	5.7E+08
	VOYmir-109.860	3.1E+08
	VOYmir-109.861	8.9E+08
	VOYmir-109.866	6.0E+08
	VOYmir-109.823	6.0E+08
[0481]	VOYmir-114.860	4.7E+08
	VOYmir-114.861	3.7E+08
	VOYmir-114.866	1.0E+09
	VOYmir-144.823	1.7E+09
	VOYmir-116.860	1.0E+09
	VOYmir-116.866	9.1E+08
	VOYmir-127.860	1.2E+09
	VOYmir-127.866	9.0E+08
	dsmCherry	1.2E+09

[0482] 转导对HeLa细胞中的SOD1敲降的作用显示在图6中。另外,在HeLa细胞中,较大的MOI (1.0E+04相对于1.0E+05) 没有表现出对于每种构建体而言增加的敲降。

[0483] F. 构建体在人运动神经元祖细胞 (HMNP) 中的活性

[0484] 将在实施例8E中描述的前18种pri-miRNA构建体和mCherry的对照以10E5的MOI感染进入运动神经元祖 (HMNP) 细胞中。48小时以后,评价内源性mRNA表达。约一半的构建体给出HMNP中的SOD1的大于50%沉默,且其中4种给出大于70%沉默 (图7)。

[0485] G. 用于体内研究的构建体选择

[0486] 选择前12种构建体,它们具有对靶序列的重大作用和对盒的微小作用。将包装在AAV-rh10衣壳中的这些构建体配制成注射剂并施用在哺乳动物中以研究所述构建体的体

内作用。

[0487] 实施例9. 构建体的体外研究

[0488] 将包装在AAV2中的在实施例8D中描述的18种构建体和mCherry对照用于该研究。对于该研究,将在培养基(500ml DMEM/F-12GLUTAMAXTM补充物(Life Technologies,目录号10565-018)、50ml FBS(Life Technologies,目录号16000-044,批号:1347556)、5ml MEM非必需氨基酸溶液(100x)(目录号11140-050)和5ml HEPES(1M)(Life Technologies,目录号15630-080))中的HEK293T细胞(Fisher Scientific,目录号HCL4517)、在培养基(500ml DMEM/F-12GLUTAMAXTM补充物(Life Technologies,目录号10565-018)、50ml FBS(Life Technologies,目录号16000-044,批号:1347556)、5ml MEM非必需氨基酸溶液(100x)(目录号11140-050)和5ml HEPES(1M)(Life Technologies,目录号15630-080))中的U251MG细胞(P18)(Sigma,目录号09063001-1VL),或在培养基(补充了AGM SingleQuot Kit Suppl.& Growth Factors(Lonza,目录号CC-4123)的ABM基础培养基500ml(Lonza,目录号CC-3186))中的正常人星形胶质细胞(HA)(Lonza,目录号CC-2565)用于测验构建体。接种HEK293T细胞(5x10E4个细胞/孔,在96孔板中)、U251MG细胞(2x10E4个细胞/孔,在96孔板中)和HA细胞(2x10E4个细胞/孔,在96孔板中),且用于感染细胞的MOI是1.0E+05。48小时以后,分析细胞,结果显示在表13中。

[0489] 表13. 相对SOD1 mRNA水平

构建体	相对 SOD1 mRNA 水平(%) (归一化至 GAPDH)		
	HEK293T	U251MG	HA
VOYmiR-102.823	19.5	49.6	87.3
VOYmiR-102.860	1.7	5.3	19.2
VOYmiR-102.861	1.1	13.9	42.6
VOYmiR-104.823	49.9	69.6	102.7
VOYmiR-104.861	1.0	10.7	36.3
VOYmiR-104.866	12.3	54.6	85.5
VOYmiR-109.823	23.0	46.1	84.6
VOYmiR-109.860	1.9	8.3	35.6
VOYmiR-109.861	1.9	22.7	57.3
VOYmiR-109.866	4.1	38.5	67.9
VOYmiR-114.823	19.3	44.7	82.3
VOYmiR-114.860	1.4	4.7	17.6
VOYmiR-114.861	1.1	9.7	48.1
VOYmiR-114.866	4.0	38.7	78.2
VOYmiR-116.860	1.1	4.8	15.8
VOYmiR-116.866	5.5	40.2	73.7
VOYmiR-127.860	1.0	2.1	7.4
VOYmiR-127.866	1.0	15.4	43.8
mCherry	100.0	100.2	100.1

[0492] 对于大多数构建体,在HEK293T细胞中看到大于80%敲降。超过一半的构建体在U251MG细胞中和在HA细胞中表现出大于80%敲降。

[0493] 实施例10. 剂量依赖性的SOD1降低

[0494] 将在实施例8E中描述的前18种pri-miRNA构建体中的4种和mCherry的对照以 $1.0E+02$ 、 $1.0E+03$ 、 $1.0E+04$ 、 $1.0E+05$ 或 $1.0E+06$ 的MOI转染进入星形胶质细胞细胞系(U251MG)或原代人星形胶质细胞(HA)中。48小时以后,评价内源性mRNA表达,且剂量依赖性的沉默显示在图8(U251MG)和图9(HA)中。对于所有构建体,剂量的增加也与敲降的SOD1 mRNA的量的增加相关联。

[0495] 实施例11.SOD1敲降的时程

[0496] 将两种pri-miRNA构建体 (VOYmiR-120和VOYmiR-122)、SOD1 siRNA的阴性对照和阳性对照转染进入星形胶质细胞细胞系 (U251MG) 中。确定相对SOD1 mRNA 60小时,如在图10中所示。在Nucleofector转染以后,对于两种初级-miR构建体都看到70-75%的hSOD1敲降,在12-24小时窗口中看到最大敲降。

[0497] 实施例12.SOD1敲降和站立百分比

[0498] 将VOYmiR-104以50pM、100pM和150pM的浓度转染进HeLa细胞中,并与未处理的(UT)细胞进行对比。在36、72、108和144小时确定相对SOD1 mRNA、引导链的百分比和过客链的百分比,如在图11A-11C中所示。最高浓度(150pM)表现出表达的最大减少,但是所有3种剂量表现出SOD1表达的显著减少。

[0499] 实施例13.靶向SOD1的构建体

[0500] 为Dog SOD1设计构建体,且所述构建体给出在表14中。在本发明所靶向的区域中,Dog SOD1是与人100%保守的。在表中描述了过客和引导序列。在表14中,序列的名称的“miR”组分不一定对应miRNA基因的序列编号(例如,dVOYmiR-102是该序列的名称,且不一定意味着miR-102是该序列的部分)。

[0501] 表14.Dog序列(5' -3')

[0502]

名称	双链 体 ID	SS ID	过客	过客 SEQ ID	AS ID	引导	引导 SEQ ID
dVOYmiR- 102.788	D-297 4	779 5	GCAGGUC CUCACUU UAAUGCC	385	779 6	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU	386
dVOYmiR- 102.805	D-297 5	779 7	GGCAAUG UGACUGC UGACCCC	387	779 8	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU	388
dVOYmiR- 104.788	D-297 6	779 9	GCAGGUC CUCACUU UAAUUCC	389	779 6	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU	386
dVOYmiR- 104.805	D-297 7	780 0	GGCAAUG UGACUGC UGAUGCC	390	779 8	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU	388
dVOYmiR- 109.788	D-297 8	780 1	GCAGGUC CUCACUU UAAUCCC	391	779 6	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU	386
dVOYmiR- 109.805	D-297 9	780 2	GGCAAUG UGACUGC UGAUACC	392	779 8	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU	388

[0503]

dVOYmiR-114.788	D-2980	7803	GCAGGUC CUGACUU UAAUCCC	393	7796	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU	386
dVOYmiR-114.805	D-2981	7804	GGCAAUG UGUCUGC UGAUACC	394	7798	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU	388
dVOYmiR-116.788	D-2982	7801	GCAGGUC CUCACUU UAAUCCC	391	7796	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU	386
dVOYmiR-116.805	D-2983	7802	GGCAAUG UGACUGC UGAUACC	392	7798	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU	388
dVoymiR-127.788	D-2984	7801	GCAGGUC CUCACUU UAAUCCC	391	7805	GAUUAAA GUGAGGA CCUGCUU U	395
dVoymiR-127.805	D-2985	7802	GGCAAUG UGACUGC UGAUACC	392	7806	UGUCAGC AGUCACA UUGCCUU U	396

[0504] 实施例14. 调节性多核苷酸的位置的影响

[0505] A. 对病毒滴度的影响

[0506] 将siRNA分子 (VOYmiR-114或VOYmiR-126) 在6个不同位置插入表达载体 (基因组大小2400个核苷酸; scAAV) 中, 如在图12中所示。在图12中, “ITR” 是反向末端重复, “I” 代表内含子, “P” 是聚腺苷酸且 “MP” 是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。对于6个位置和对于对照 (没有调节性多核苷酸的构建体; scAAV), 使用TaqMan PCR评价了病毒滴度, 结果显示在表15中。

[0507] 表15. 病毒滴度

[0508]

siRNA 分子	siRNA 分子位置	病毒滴度 (VG/15-cm 盘)
VOYmiR-114	位置 1	5.5E+10
VOYmiR-114	位置 2	5.5E+10
VOYmiR-114	位置 3	4.5E+10
VOYmiR-114	位置 4	3.7E+10
VOYmiR-114	位置 5	6.5E+10
VOYmiR-114	位置 6	2.5E+10
VOYmiR-126	位置 1	1.6E+10
VOYmiR-126	位置 2	3.2E+10
VOYmiR-126	位置 3	6.0E+10
VOYmiR-126	位置 4	1.6E+10
VOYmiR-126	位置 5	9.5E+09
VOYmiR-126	位置 6	6.0E+10
-	对照	2.1E+11

[0509] B. 对基因组完整性的影响

[0510] 将siRNA分子(VOYmiR-114)在6个不同位置插入表达载体(基因组大小2400个核苷酸;scAAV)和没有调节性多核苷酸的对照(scAAV)中,如在图12中所示。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。从经纯化的AAV制品提取病毒基因组并在中性琼脂糖凝胶上跑胶。在所有构建体中看到截短的基因组,且截短的基因组的近似百分比(总数的百分比)显示在表16中。

[0511] 表16. 截短的基因组

[0512]

构建体	总数的%
位置 1	50

[0513]

位置 2	41
位置 3	49
位置 4	34
位置 5	33
位置 6	59
对照	9

[0514] 位置6具有最大数目的截短的基因组,而位置4和5具有最小量的截短的基因组。

[0515] C.对敲降效率的影响

[0516] 将siRNA分子(VOYmiR-114)在6个不同位置插入表达载体(AAV2)(基因组大小2400个核苷酸;scAAV)中,如在图12中所示。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。在 1×10^4 vg/细胞、 1×10^3 vg/细胞和 1×10^2 vg/细胞进行HeLa细胞的转导。在感染后72小时确定SOD1mRNA表达(作为对照(eGFP)的百分比),结果显示在表17中。

[0517] 表17.SOD1表达

[0518]

构建体	SOD1 mRNA 表达(对照的%)		
	1×10^4 vg/细胞	1×10^3 vg/细胞	1×10^2 vg/细胞
位置 1	40	59	69
位置 2	31	46	75
位置 3	50	66	81
位置 4	21	34	55
位置 5	49	52	67
位置 6	31	37	62
对照(eGFP)	100	100	94

[0519] 位置3具有最高的SOD1 mRNA表达(作为对照的%),且位置4具有最低的SOD1 mRNA表达(作为对照的%)。

[0520] 实施例15.基因组大小的影响

[0521] A.对病毒滴度的影响

[0522] 将siRNA分子(VOYmiR-114)在位置1、2、5和6处插入表达载体(基因组大小2kb;scAAV)中,如在图12中所示。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。将没有siRNA分子的双链对照(基因组大小1.6kb;scAAV对照)和双链表达载体(scAAV miR114;ITR(105核苷酸)-启动子(~900个核苷酸)-包含siRNA分子的调节性多核苷酸(158个核苷酸)-聚腺苷酸序列(127个核苷酸)和

ITR) 进行对比,以及不含siRNA分子的对照(eGFP;scAAV)。使用TaqMan PCR评价病毒滴度,结果显示在表18中。

[0523] 表18. 病毒滴度

构建体	大小	病毒滴度 (VG/15-cm盘)
位置1	2kb	9.5E+10
位置2	2kb	1.2E+11
scAAV miR114	1.6kb	1.1E+11
位置5	2kb	2.4E+10
位置6	2kb	1.1E+11
对照	2kb	2.2E+11

[0525] 用位置5构建体看到最低病毒滴度,用位置2构建体看到最大值。

[0526] B. 对基因组完整性的影响

[0527] 将siRNA分子(VOYmiR-114)在位置1、2、5和6处插入表达载体(基因组大小2kb;scAAV)中,如在图12中所示。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。将没有siRNA分子的双链对照(基因组大小1.6kb;scAAV对照)和双链表达载体(scAAV miR114;ITR(105核苷酸)-启动子(~900个核苷酸)-包含siRNA分子的调节性多核苷酸(158个核苷酸)-聚腺苷酸序列(127个核苷酸)和ITR)进行对比,以及不含siRNA分子的对照(eGFP;scAAV)。在所有构建体中看到截短的基因组,且截短的基因组的近似百分比(总数的百分比)显示在表19中。

[0528] 表19. 截短的基因组

构建体	大小	总数的%
位置1	2kb	34
位置2	2kb	30
scAAV miR114	1.6kb	20
位置5	2kb	21
位置6	2kb	46
对照	2kb	5

[0530] 确定所有构建体具有一些截短的基因组。

[0531] 进行另一项研究以确定不同的siRNA分子的影响。将VOYmiR-114和VOYmiR-126在位置3处插入单独的表达载体(基因组大小1.6kb;scAAV)中,如在图12中所示。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。对于VOYmiR-114构建体,载体基因组(1526个核苷酸)的5'末端与调节性多核苷酸的中心(柔性环的中央)之间的距离是1115个核苷酸。对于VOYmiR-126构建体,载体基因组(1626个核苷酸)的5'末端与调节性多核苷酸的中心(柔性环的中央)之间的距离是1164个核苷酸。

[0532] 对于VOYmiR-114构建体,病毒滴度(VG/15-cm盘)是约1.1E+11。对于VOYmiR-126构建体,内含子探针病毒滴度(VG/15-cm盘)是约1.2E+12。对照是约2.1E+11(VG/15-cm盘)。VOYmir-114具有约20%截短的基因组,VOYmiR-126具有约15%截短的基因组,且对照具有约5%截短的基因组。

[0533] 实施例16.单链构建体的影响

[0534] A.对病毒滴度的影响

[0535] 将siRNA多核苷酸 (VOYmiR-114) 在位置1、3和5处插入表达载体 (基因组大小4.7kb;ssAAV) 中,如在图12中所示,并且也试验了不含siRNA多核苷酸的对照 (基因组大小2kb;ssAAV)。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。使用TaqMan PCR评价病毒滴度,结果显示在表20中。

[0536] 表20.病毒滴度

构建体	病毒滴度 (VG/15-cm盘)
位置1	5.0E+11
位置3	7.5E+11
位置5	3.5E+11
对照	2.5E+11

[0538] 位置3显示出最大病毒滴度,其次是位置1,然后是位置5。

[0539] B.对基因组完整性的影响

[0540] 将siRNA分子 (VOYmiR-114) 在位置1、3和5处插入表达载体 (基因组大小4.7kb;ssAAV) 中,如在图12中所示,并且也试验了不含调节性多核苷酸的对照 (基因组大小2kb;ssAAV)。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。从经纯化的AAV制品提取病毒基因组并在中性琼脂糖凝胶上跑胶。在所有构建体中看到截短的基因组,且截短的基因组的近似百分比 (总数的百分比) 显示在表21中。

[0541] 表21.截短的基因组

构建体	总数的%
位置1	48
位置3	30
位置5	72
对照	0

[0543] 位置5具有最大数目的截短的基因组,而位置3具有最小量的截短的基因组。

[0544] C.对敲降效率的影响

[0545] 将siRNA分子 (VOYmiR-114) 在位置1、3和5处插入表达载体 (基因组大小4.7kb;ssAAV) 中,如在图12中所示,并且存在不含siRNA分子的单链对照 (基因组大小2kb;ssAAV对照)、没有siRNA分子的双链对照 (基因组大小1.6kb;scAAV对照) 和具有siRNA分子的双链表达载体 (基因组大小2.4kb;scAAV miR114)。在图12中,“ITR”是反向末端重复,“I”代表内含子,“P”是聚腺苷酸且“MP”是包含siRNA分子的调节性多核苷酸。在 1×10^4 vg/细胞、 1×10^3 vg/细胞和 1×10^2 vg/细胞进行HeLa细胞的转导。在感染后72小时确定SOD1 mRNA表达 (作为对照 (eGFP) 的百分比),结果显示在表22中。

[0546] 表22.SOD1表达

[0547]

构建体	SOD1 mRNA 表达(对照的%)		
	1 x 10 ⁴ vg/细胞	1 x 10 ³ vg/细胞	1 x 10 ² vg/细胞
位置 1	62	85	87
位置 3	77	93	99
位置 5	59	82	84
ssAAV ctrl	100	101	108
scAAV ctrl	95	97	102
scAAV miR114	23	33	62

[0548] 位置3具有最高的SOD1 mRNA表达(作为对照的%),然后是位置1,具有最低SOD1mRNA表达(作为对照的%)的单链构建体是位置5。所述单链构建体都没有象具有siRNA多核苷酸的双链对照一样低的敲降效率。

[0549] 实施例17.SOD1体内敲降

[0550] 为了评价pri-miRNA的体内生物活性,将自互补的pri-miRNA(VOYmiR-114.806、VOYmiR127.806、VOYmiR102.860、VOYmiR109.860、VOYmiR114.860、VOYmiR116.860、VOYmiR127.860、VOYmiR102.861、VOYmiR104.861、VOYmiR109.861、VOYmiR114.861、VOYmiR109.866、VOYmiR116.866或VOYmiR127.866)包装在具有CBA启动子的AAV-DJ中。

[0551] 在小鼠中,通过10分钟纹状体内输注施用这些包装的pri-miRNA或仅媒介物的对照(含有5%山梨醇和0.001%F-68的磷酸盐缓冲盐水)。表达人SOD1且具有大约20-30g体重的雌性或雄性Tg(SOD1)3Cje/J小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)接受5uL靶向纹状体的试验物的单侧注射(前后位+0.5mm,中侧位+2mm,相对于前囟点;背腹3.8mm,相对于头盖骨表面)。以0.5uL/min注射试验物(每种试验物5只动物)。使用具有33号针的、预填充的泵调节的Hamilton微注射器(1701型,10μl)。在注射后1、2、3、4或6周,将动物处死,取出脑,将来自1mm冠板(coronal slab)的同侧纹状体(包括输注部位)以及来自邻近1mm冠板的纹状体组织切开并快速冷冻。将小鼠组织样品裂解,并定量人SOD1蛋白水平以及SOD1和小鼠GAPDH(mGAPDH)mRNA水平。通过ELISA(eBioscience(Affymetrix,San Diego,CA))定量SOD1蛋白水平,并通过BCA分析(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)定量总蛋白水平。对于每个组织样品,将归一化至总蛋白的SOD1蛋白水平计算为2次测定的平均值。将这些归一化的SOD1蛋白水平进一步归一化至媒介物组,然后平均化以得到组(治疗)平均值。通过qRT-PCR定量SOD1和mGAPDH mRNA水平。对于每个组织样品,将SOD1/mGAPDH的比率(归一化的SOD1mRNA水平)计算为3次测定的平均值。然后将这些比率平均化以得到组(治疗)平均值。将这些组平均值进一步归一化至媒介物组。

[0552] 在非人灵长类动物中,通过鞘内腰椎推注施用试验物(1x10¹³-3x10¹³vg的包装在具有CBA启动子的AAV-DJ中的pri-miRNA)或媒介物。具有大约2.5-8.5kg体重的雌性食蟹猴(成束猴,CR Research Model Houston,Houston,TX)接受植入的单个鞘内导管,所述导管的尖部位于腰椎处。以大约60分钟间隔施用试验物(每种试验物4只动物),包括3次1mL快速

推注 (1mL/分钟)。在施用后4-6周,将动物处死,并将选择的组织收获用于生物分析和组织学评价。针对用包装在具有CBA启动子的AAV-DJ中的pri-miRNA治疗以后的抑制,相对于媒介物组评估SOD1蛋白和mRNA水平。

[0553] 实施例18. 使用VOYmiR-114.806的体内SOD1敲降

[0554] 在Tg (SOD1) 3Cje/J小鼠中,实施例17所述,VOYmiR-114.806包装在具有CBA启动子的AAVDJ中。通过单侧纹状体内施用,给小鼠施用 3.7×10^9 vg的剂量。1或2周以后,不存在归一化的SOD1蛋白水平的显著下降;归一化的SOD1蛋白水平在1和2周以后分别是媒介物对照组的 $98 \pm 11\%$ (标准差) 和 $98 \pm 10\%$ 。截至第3周,VOYmiR-114.806使归一化的SOD1蛋白水平降低至媒介物对照组的 $84 \pm 9.0\%$,这是统计上显著的 ($p < 0.05$, 具有Dunnett氏事后分析的单因素方差分析)。截至第4和6周,VOYmiR-114.806使归一化的SOD1蛋白水平分别降低至媒介物对照组的 $73 \pm 7.9\%$ ($p < 0.0001$) 和 $75 \pm 7.4\%$ ($p < 0.0001$)。这些结果证实,包装在具有CBA启动子的AAV-DJ中的VOYmiR-114.806在体内下调SOD1蛋白水平中是有效的。另外,这些结果证实,低至 3.7×10^9 vg的包装在具有CBA启动子的AAVDJ中的VOYmiR-114.806的总纹状体内剂量导致SOD1蛋白水平的显著下调。

[0555] 尽管已经就几个描述的实施方案而言相当详尽地且相当特定地描述了本发明,但是无意将本发明限于任何这样的细节或实施方案或任何具体实施方案,而是应当参考所附权利要求来解释本发明,从而考虑到现有技术提供这类权利要求的最广泛的可能解释,并因此有效地包括本发明的预期范围。

[0556] 在本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入。如果出现矛盾,以本说明书及其中的定义为准。另外,段落标题、材料、方法和实施例仅仅是示例性的,且无意成为限制性的。

序列表

<110> 沃雅戈治疗公司 (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.)

<120> 治疗肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 的组合物和方法

<130> 2203859US01

<140> PCT/US2015/060562

<141> 2015-11-13

<150> 62/234,466

<151> 2015-09-29

<150> 62/211,992

<151> 2015-08-31

<150> 62/079,588

<151> 2014-11-14

<160> 396

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 981

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
gggtgctgggtt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtcctcgaa 120
ccaggacctc ggctggcct agcgagtat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaagg 180
cgacggccca gtgcaggga tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga 240
gggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcagtatt 300
tgagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac ttaatcctc tatccagaa 360
acacgggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgctga 420
caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaagca gatgacttg gcaaagggtg 540
aaatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttggt gtgtaattgg 600
gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaact gtaatcttaa agtgtaatt 720
gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
tggaagatgt gtatagtttt ataaaactca gttaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgctag aatttctttg tcattcaagc 900
ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaagaat ccaattcaa 960
actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981
```

<210> 2

<211> 465

<212> DNA

<213> 成束猴 (*Macaca fascicularis*)

<400> 2

```
atggcgatga aggccgtgtg cgtgttgaag ggcgacagcc cagtgcaggg caccatcaat 60
ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattac aggattgact 120
gaaggcctgc atggattcca tgttcatcag tttggagata atacacaagg ctgtaccagt 180
gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga caacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
catgttggag acctgggcaa tgtgactgct ggcaaagatg gtgtggccaa ggtgtctttc 300
gaagattctg tgatctcgct ctcaggagac cattccatca ttggccgcac attggtggtc 360
catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtaaaaa gacaggaaac 420
gctggaggtc gtctggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aataa 465
```

<210> 3

<211> 464

<212> DNA

<213> 恒河猴 (*Macaca mulatta*)

<400> 3

```
atggcgatga aggccgtgtg cgtgttgaag ggcgacagcc cagtgcaggg caccatcaat 60
ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattac aggattgact 120
gaaggcctgc atggattcca tgttcatcag tttggagata atacacaagg ctgtaccagt 180
gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga caacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
catgttggag acctgggcaa tgtgactgct ggcaaagatg gtgtggccaa ggtgtctttc 300
gaagattctg tgatctcgct ctcaggagac cattccatca ttggccgcac attggtggtc 360
catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtaaaaa gacaggaaac 420
gctggaggtc gtctggcttg tgggtgaatt gggatcgcca ataa 464
```

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 4

```
cggaggucug gccuauaact t 21
```

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 5

ggaggucugg ccuauaaact t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 6

gaggucuggc cuauaaagct t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 7

aggucuggcc uauaaaguct t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 8

ggucuggccu auaaaguact t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 9
ucuggccuau aaaguaguct t 21
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 10
cuggccuaua aaguagucct t 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 11
uggccuauaa aguagucgct t 21
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 12
ggccuauaaa guagucgcct t 21
<210> 13
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 13

gccuauaaaag uagucgcgct t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 14

ccuauaaagu agucgcggct t 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 15

gucguagucu ccugcagcct t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 16

cguagucucc ugcagcguct t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 17
guagucuccu gcagcgucct t 21
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 18
uagucuccug cagcgucuct t 21
<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 19
auggcgacga aggccgugct t 21
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 20
cgacgaaggc cgugugcgct t 21
<210> 21

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 21
gaaggccgug ugcgugcuct t 21
<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 22
ggccgugugc gugcugaact t 21
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 23
agggcgacgg cccagugcct t 21
<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 24
ugcagggc au caucaauuct t 21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 25
gcagggauc aucauuuuct t 21
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 26
agggauc aucauuuugct t 21
<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 27
gggauc aucauuuugact t 21
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 28

ggcaucauca auuucgagct t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 29

gcaucaucaaa uuucgagcct t 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 30

caucaucaau uucgagcact t 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 31

aaauucgagc agaaggaact t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 32

uucgagcaga aggaaaguct t 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 33

ucgagcagaa ggaaaguact t 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 34

aagguguggg gaagcauuct t 21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 35

ggugugggga agcauuuact t 21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 36
gacugacuga aggccugcct t 21
<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 37
cugacugaag gccugcauct t 21
<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 38
ugacugaagg ccugcaugct t 21
<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 39
ugaaggccug cauggauuct t 21
<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 40

gaaggccugc auggauucct t 21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 41

ugcauggauu ccauguucct t 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 42

cauggauucc auguucact t 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 43

ggauuccaug uucaugagct t 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 44

uuccauguuc augaguuuct t 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 45

guucaugagu uuggagauct t 21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 46

uucaugaguu uggagauact t 21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 47

ugaguuuugga gauaauacct t 21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 48

gaguuuggag auaauacact t 21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 49

aggcuguacc agugcaggct t 21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 50

ggcuguacca gugcagguct t 21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 51

gcagguccuc acuuuaauct t 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 52

cagguccuca cuuuauucct t 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 53

ucacuuuaau ccucuaucct t 21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 54

cuauccagaa aacacgguct t 21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 55

uauccagaaa acacggugct t 21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 56
auccagaaaa cacgguggct t 21
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 57
ccagaaaaca cggugggcct t 21
<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 58
gaaaacacgg uggccaact t 21
<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 59
aaaacacggu gggccaaact t 21
<210> 60

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 60
cgguggggcca aaggauact t 21
<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 61
aggaugaaga gaggaugct t 21
<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 62
augaagagag gcauguugct t 21
<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 63
gagaggcaug uuggagacct t 21

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 64
agaggcaugu uggagacuct t 21
<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 65
auguuggaga cuugggcact t 21
<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 66
guuggagacu ugggcaauct t 21
<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 67

ggagacuugg gcaaugugct t 21

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 68

ggcaauguga cugcugacct t 21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 69

caaugugacu gcugacaact t 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 70

cugacaaaga ugguguggct t 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 71

ugacaaagau gguguggcct t 21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 72

cucaggagac cauugcauct t 21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 73

ucaggagacc auugcaucct t 21

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 74

agaccauugc aucauugget t 21

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 75
gaccauugca ucauuggcct t 21
<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 76
auugcaucau uggccgcact t 21
<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 77
cauuggccgc acacugguct t 21
<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 78
cgcacacugg ugguccauct t 21
<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 79

cacacuggug guccaugact t 21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 80

acacuggugg uccaugaact t 21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 81

ugguggucca ugaaaaagct t 21

<210> 82

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 82

ugguccauga aaaagcagct t 21

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 83

aaagcagaug acuugggcct t 21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 84

gcagaugacu ugggcaaact t 21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 85

augacuuggg caaaggugct t 21

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 86

ugacuugggc aaaggugct t 21

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 87

gacuugggca aagguggact t 21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 88

guacaaagac aggaaacgct t 21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 89

acaaagacag gaaacgcuct t 21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 90

caaagacagg aaacgcugct t 21

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 91

aggaaacgcu ggaagucgct t 21

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 92

gucguuuggc uuguggugct t 21

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 93

ucguuuggc uugugguguct t 21

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 94

cguuuggcuu gugguguact t 21

<210> 95

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 95
guuuggcuug ugguguaact t 21
<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 96
uuggcuugug guguaauuct t 21
<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 97
ggcuuguggu gaaauuggct t 21
<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 98
gcuuguggug uaauugggct t 21
<210> 99

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 99
cuuguggugu aaugggact t 21
<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 100
ugugguguaa uugggaucct t 21
<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 101
gugguguaau uggaucgct t 21
<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 102
ugguguaauu gggaucgcct t 21

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 103

guaauuggga ucgccaact t 21

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 104

uaauugggau cgcccaact t 21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 105

aaauugggauc gcccaauact t 21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 106

auugggaucg cccaauaact t 21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 107

uugggaucgc ccaauaaaact t 21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 108

ugggaucgcc caauaaacct t 21

<210> 109

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 109

gggaucgccc aauaaacact t 21

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 110

aucgccc aaau aaacauucct t 21

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 111

ccaauaaaca uucccuugct t 21

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 112

caauaaacau ucccuuggct t 21

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 113

aaauaaacauu cccuuggact t 21

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 114
auaaacauuc ccuuggauct t 21
<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 115
uaaacaauucc cuuggaugct t 21
<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 116
aaacaauuccc uuggauguct t 21
<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 117
aacaaucccu uggauguact t 21
<210> 118
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 118

auucccuugg auguagucct t 21

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 119

cuuggaugua gucugaggct t 21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 120

cugaggcccc uuaacucact t 21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 121

gaggcccuu aacucaucct t 21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 122

aggcccccuaa acucaucuct t 21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 123

ccccuuaacu caucuguuct t 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 124

cccuuaacuc aucuguuact t 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 125

ccuuaacuca ucuguuauact t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 126

cuuaacucau cuguuauccct t 21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 127

uuaacucauc uguuauccct t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 128

uaacucaucu guuauccuct t 21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 129

aacucaucug uuauccugct t 21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 130

guuauccugc uagcuguact t 21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 131

cugcuagcug uagaaaugct t 21

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 132

ugcuagcugu agaaauguct t 21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 133

gcuguagaaa uguauccuct t 21

<210> 134

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 134
cuguagaaaau guauccugct t 21
<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 135
uguagaaaug uauccugact t 21
<210> 136
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 136
guagaaaugu auccugauct t 21
<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 137
aaauguaucc ugauaaacct t 21
<210> 138

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 138
guauccugau aaacauuact t 21
<210> 139
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 139
uuaaacacug uaauuuact t 21
<210> 140
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 140
acuguaaucu uaaaagugct t 21
<210> 141
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 141
cuguaaucuu aaaaguguct t 21

<210> 142
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 142
uguaaucuua aaaguguact t 21
<210> 143
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 143
guaaucuuaa aaguguaact t 21
<210> 144
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 144
cuuaaaagug uaauugugct t 21
<210> 145
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 145

uaccuguagu gagaaacuct t 21

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 146

uuaugaucac uuggaagact t 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 147

augaucacuu ggaagauuct t 21

<210> 148

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 148

aucacuugga agauuuguct t 21

<210> 149

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 149

uggaagauuu guauaguuct t 21

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 150

uauaaaacuc aguuaaaact t 21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 151

aaacucaguu aaaaugucct t 21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 152

gucuguuuca augaccugct t 21

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 153
augaccugua uuuugccact t 21
<210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 154
accuguaauuu ugccagacct t 21
<210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 155
ccuguaauuuu gccagacuct t 21
<210> 156
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 156
uaaaucacag auggguauct t 21
<210> 157
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 157

aucacagaug gguauuaact t 21

<210> 158

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 158

ucacagaugg guauuaaact t 21

<210> 159

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 159

acagaugggu auuaaacuct t 21

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 160

cagaugggua uuaaacuuct t 21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 161

agauggguau uaaacuugct t 21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 162

auggguaaua aacuugucct t 21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 163

uaaacuuguc agaauucct t 21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 164

ucauucagc cugugaauct t 21

<210> 165

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 165

cauuccaagcc ugugaauact t 21

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 166

aauaaaaacc cuguauggct t 21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 167

auaaaaacccc uguauggcct t 21

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 168

aaccucguau ggcacuuact t 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 169

acccuguaug gcacuuauct t 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 170

gaggcuauua aaagaaucct t 21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 171

aaagaaucca aaaucaaact t 21

<210> 172

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 172

gaauccaaa ucaaacuact t 21

<210> 173

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 173
uuuauaggcc agaccuccgt t 21
<210> 174
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 174
uuuuauaggc cagaccucct t 21
<210> 175
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 175
ucuuuauagg ccagaccuct t 21
<210> 176
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 176
uacuuuauag gccagaccut t 21
<210> 177

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 177
uuacuuuaua ggccagacct t 21
<210> 178
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 178
uacuacuuua uaggccagat t 21
<210> 179
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 179
ugacuacuuu auaggccagt t 21
<210> 180
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 180
ucgacuacuu uauaggccat t 21

<210> 181
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 181
ugcgacuacu uuauaggcct t 21
<210> 182
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 182
ucgcgacuac uuauaggct t 21
<210> 183
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 183
uccgcgacua cuuuauaggt t 21
<210> 184
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 184

ugcugcagga gacuacgact t 21

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 185

uacgcugcag gagacuacgt t 21

<210> 186

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 186

ugacgcugca ggagacuact t 21

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 187

uagacgcugc aggagacuat t 21

<210> 188

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 188

ucacggccuu cgucgccaut t 21

<210> 189

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 189

ucgcacacgg ccuucgucgt t 21

<210> 190

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 190

uagcacgcac acggccuuct t 21

<210> 191

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 191

uuucagcacg cacacggcct t 21

<210> 192

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 192
ugcacugggc cgucgccc t 21
<210> 193
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 193
uaauugauga ugcccugcat t 21
<210> 194
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 194
uaaaugaug augcccugct t 21
<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 195
ucgaaauga ugaugccc t 21
<210> 196
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 196

uucgaaauug augaugccct t 21

<210> 197

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 197

ucucgaaauu gaugaugcct t 21

<210> 198

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 198

ugcucgaaau ugaugaugct t 21

<210> 199

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 199

uugcucgaaa ugaugaugt t 21

<210> 200

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 200

uuuccuucug cugaaaauut t 21

<210> 201

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 201

uacuuuccuu cugcucgaat t 21

<210> 202

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 202

uuacuuuccu ucugcucgat t 21

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 203

uaaugcuucc ccacaccuut t 21

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 204

uuuaaugcuu cccacacac t 21

<210> 205

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 205

ugcaggccuu cagucaguct t 21

<210> 206

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 206

uaugcaggcc uucagucagt t 21

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 207

ucaugcaggc cuucagucat t 21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 208

uaauccaugc aggccuucat t 21

<210> 209

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 209

ugaauccaug caggccuuct t 21

<210> 210

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 210

ugaacaugga auccaugcat t 21

<210> 211

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 211

uaugaacaug gaauccaagt t 21

<210> 212

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 212
ucucaugaac auggaaucct t 21
<210> 213
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 213
uaaacucaug aacauggaat t 21
<210> 214
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 214
uauccuccaaa cucaugaact t 21
<210> 215
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 215
uuauccuccaa acucaugaat t 21
<210> 216

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 216
uguauuauucu ccaaacucat t 21
<210> 217
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 217
uuguauuauuc uccaaacuct t 21
<210> 218
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 218
uccugcacug guacagccut t 21
<210> 219
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 219
uaccugcacu gguacagcct t 21

<210> 220
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 220
uauuaaagug aggaccugct t 21
<210> 221
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 221
ugauuaaagu gaggaccugt t 21
<210> 222
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 222
ugauagagga uuaaagugat t 21
<210> 223
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 223

uaccguguuu ucuggauagt t 21

<210> 224

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 224

ucaccguguu uucuggauat t 21

<210> 225

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 225

uccaccgugu uuucuggaut t 21

<210> 226

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 226

ugcccaccgu guuuucuggt t 21

<210> 227

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 227

uuuggcccac cguguuuuct t 21

<210> 228

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 228

uuuuggccca ccguguuuut t 21

<210> 229

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 229

uucauccuuu ggcccaccgt t 21

<210> 230

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 230

ucaugccucu cuucauccut t 21

<210> 231

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 231
ucaacaugcc ucucucaut t 21
<210> 232
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 232
ugucuccaac augccucuct t 21
<210> 233
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 233
uagucuccaa caugccucut t 21
<210> 234
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 234
uugcccaagu cuccaacaut t 21
<210> 235
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 235

uauugcccaa gucuccaact t 21

<210> 236

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 236

ucacauugcc caagucucct t 21

<210> 237

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 237

ugucagcagu cacauugcct t 21

<210> 238

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 238

uuugucagca gucacauugt t 21

<210> 239

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 239

uccacaccau cuuugucagt t 21

<210> 240

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 240

ugccacacca ucuuugucat t 21

<210> 241

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 241

uaugcaaugg ucuccugagt t 21

<210> 242

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 242

ugaugcaaug gucuccugat t 21

<210> 243

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 243

uccaaugaug caauggucut t 21

<210> 244

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 244

ugccaaugau gcaaugguct t 21

<210> 245

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 245

uugcggccaa ugaugcaaut t 21

<210> 246

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 246

uaccagugug cggccaaugt t 21

<210> 247

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 247

uauggaccac cagugugcgt t 21

<210> 248

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 248

uucauggacc accagugut t 21

<210> 249

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 249

uuucauggac caccagugut t 21

<210> 250

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 250

ucuuuuucau ggaccaccat t 21

<210> 251

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 251
ucugcuuuuu caugaccat t 21
<210> 252
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 252
ugcccaaguc aucugcuut t 21
<210> 253
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 253
uuuugcccaa gucaucugct t 21
<210> 254
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 254
ucaccuuugc ccaagucat t 21
<210> 255

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 255
uccaccuuug cccaagucat t 21
<210> 256
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 256
uuccaccuuu gcccaaguct t 21
<210> 257
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 257
ucguuuccug ucuuuguact t 21
<210> 258
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 258
uagcguuucc ugucuuugut t 21

<210> 259
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 259
ucagcguuuc cugucuuugt t 21
<210> 260
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 260
ucgacuucca gcguuuccut t 21
<210> 261
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 261
ucaccacaag ccaaacgact t 21
<210> 262
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 262

uacaccacaa gccaaacgat t 21

<210> 263

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 263

uuacaccaca agccaaacgt t 21

<210> 264

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 264

uuuacaccac aagccaaact t 21

<210> 265

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 265

uaauuacacc acaagccaat t 21

<210> 266

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 266

uccaauuaca ccacaagcct t 21

<210> 267

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 267

ucccaauuac accacaagct t 21

<210> 268

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 268

uucccaauua caccacaagt t 21

<210> 269

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 269

ugaucccaau uacaccacat t 21

<210> 270

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 270
ucgaucceaa uuacaccact t 21
<210> 271
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 271
ugcgaucceaa auuacaccat t 21
<210> 272
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 272
uuugggcga cccaauuact t 21
<210> 273
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 273
uauugggcga uccaauuat t 21
<210> 274
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 274
uuauugggcg aucccaauut t 21
<210> 275
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 275
uuuauugggc gaucceaaut t 21
<210> 276
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 276
uuuuauuggg cgaucccaat t 21
<210> 277
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 277
uguuuauugg gcgauccecat t 21
<210> 278
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 278

uuguuuauug ggcgauccct t 21

<210> 279

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 279

ugaauguuua uugggcgaut t 21

<210> 280

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 280

ucaagggau guuuauuggt t 21

<210> 281

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 281

uccaaggga uguuuauugt t 21

<210> 282

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 282

uuccaaggga auguuuauut t 21

<210> 283

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 283

uauccaaggg aauguuuaut t 21

<210> 284

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 284

ucauccaagg gaauguuat t 21

<210> 285

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 285

uacauccaag ggauguuut t 21

<210> 286

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 286

uuacauccaa gggaauguut t 21

<210> 287

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 287

ugacuacauc caagggaaut t 21

<210> 288

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 288

uccucagacu acauccaagt t 21

<210> 289

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 289

uugaguuaag gggccucagt t 21

<210> 290

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 290
ugaugaguua aggggccuct t 21
<210> 291
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 291
uagaugaguu aaggggcut t 21
<210> 292
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 292
uaacagauga guuaaggggt t 21
<210> 293
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 293
uuaacagaug aguuaaggggt t 21
<210> 294

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 294
uauaacagau gaguuaaggt t 21
<210> 295
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 295
ugauaacaga ugaguuaagt t 21
<210> 296
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 296
uggauaacag augaguuaat t 21
<210> 297
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 297
uaggauaaca gaugaguuat t 21

<210> 298
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 298
ucaggauaac agaugaguut t 21
<210> 299
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 299
uuacagcuag caggauaact t 21
<210> 300
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 300
ucauuucuaac agcuagcagt t 21
<210> 301
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 301

uacauuucua cagcuagcat t 21

<210> 302

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 302

uaggauacau uucucacagt t 21

<210> 303

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 303

ucaggauaca uuucucacagt t 21

<210> 304

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 304

uucaggauac auuucucacat t 21

<210> 305

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 305

uaucaaggaua cauuucuact t 21

<210> 306

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 306

uguuuaucaag gauacauuut t 21

<210> 307

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 307

uuuauuuua ucaggauact t 21

<210> 308

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 308

uuuaguuuac aguuuuuat t 21

<210> 309

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 309
ucacuuuuuaa gauuacagut t 21
<210> 310
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 310
uacacuuuuua agauuacagt t 21
<210> 311
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 311
uuacacuuuu aagauuacat t 21
<210> 312
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 312
uuuacacuuu uaagauuact t 21
<210> 313
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 313

ucacaauuac acuuuuuaggt t 21

<210> 314

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 314

uaguuucuca cuacagguat t 21

<210> 315

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 315

uucuuccaag ugaucuaat t 21

<210> 316

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 316

uaaucuucca agugaucat t 21

<210> 317

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 317

uacaaaucuu ccaagugaut t 21

<210> 318

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 318

uaacuaauaca aaucuuccat t 21

<210> 319

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 319

uuuuuaacug aguuuuauat t 21

<210> 320

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 320

ugacauuuua acugaguut t 21

<210> 321

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 321

ucaggucauu gaaacagact t 21

<210> 322

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 322

uuggcaaaaau acaggucaut t 21

<210> 323

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 323

ugucuggcaa aaucaggut t 21

<210> 324

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 324

uagucuggca aaauacaggt t 21

<210> 325

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 325

uauacccauc ugugauuuat t 21

<210> 326

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 326

uuuaauaccc aucugugaut t 21

<210> 327

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 327

uuuaauacc caucugugat t 21

<210> 328

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 328

uaguuuaaua cccaucugut t 21

<210> 329

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 329
uaaguuuaau acccaucugt t 21
<210> 330
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 330
ucaaguuuaa uaccaucut t 21
<210> 331
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 331
ugacaaguuu aa uaccacut t 21
<210> 332
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 332
ugaaaauucug acaaguuat t 21
<210> 333

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 333
uauucacagg cuugaaugat t 21
<210> 334
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 334
uuauucacag gcuugaaugt t 21
<210> 335
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 335
uccauacagg guuuuuauut t 21
<210> 336
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 336
ugccauacag gguuuuuaut t 21

<210> 337
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 337
uuaagugcca uacaggg uut t 21
<210> 338
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 338
uauaagugcc auacaggut t 21
<210> 339
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 339
ugauucuuuu aaugccuct t 21
<210> 340
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸
<400> 340

uuuugaauuu ggauucuuut t 21

<210> 341

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成的寡核苷酸

<400> 341

uuaguuuugaa uuuggauuct t 21

<210> 342

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 342

caaugugacu gcugacaacc c 21

<210> 343

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 343

uuugucagca gucacauugu u 21

<210> 344

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 344

caaugugacu gcugacaauc c 21

<210> 345

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 345
caaugugacu gcugacaagc c 21
<210> 346
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 346
caaugugacu gcugacaaac c 21
<210> 347
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 347
caaugugaca gcugacaaac c 21
<210> 348
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 348
caaugugacu gcugacaacc 20
<210> 349
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 349
caaugugacu gcugacaauc cc 22
<210> 350
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 350
caaugugacu gcugacaaca c 21
<210> 351
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 351
uuugucagca gucacauugu c 21
<210> 352
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 352
caaugugacu gcugacaaau c 21
<210> 353
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 353
caaugugacu gcugacaaau c 21
<210> 354
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 354
uuugucagca gucacauuga c 21
<210> 355
<211> 22

<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 355
caaugugacu gcugacaauc cc 22
<210> 356
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 356
cgacgaaggc cgugugcgcc c 21
<210> 357
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 357
ucgcacacgg ccuucgucgu u 21
<210> 358
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 358
ugacuugggc aaagguggcc c 21
<210> 359
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 359
uccaccuuug cccaagucan u 21
<210> 360

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 360
aacucaucug uuauccugcc c 21
<210> 361
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 361
ucaggauaac agaugaguuu u 21
<210> 362
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 362
cccuuaacu caucuguucc c 21
<210> 363
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 363
uaacagauga guuaaggggu u 21
<210> 364
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 364
cccuuaacuc aucuguuacc c 21

<210> 365
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 365
uuaacagaug aguuaaggu u 21
<210> 366
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 366
aacucaucug uuaucuugcc c 21
<210> 367
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 367
gcuguggaaa uguaucuucc c 21
<210> 368
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 368
uaggauacau uucuacagcu u 21
<210> 369
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 369

ugacuugggc aaaggugagc c 21

<210> 370

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 370

ccccuuaacu caucuguugc c 21

<210> 371

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 371

cccuuaacuc aucuguuagc c 21

<210> 372

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 372

aacucaucug uuaucuuagc c 21

<210> 373

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 373

gcuguggaaa uguaucuugc c 21

<210> 374

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 374
ugacuugggc aaagguaggc c 21
<210> 375
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 375
cccuuaaca caucuguuac c 21
<210> 376
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 376
cccuuaacug aucuguuac c 21
<210> 377
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 377
aacucaucuc uuaucuugcc c 21
<210> 378
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 378
gcuguggaau uguauucuugc c 21
<210> 379
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 379
ugacuugggg aaaggugagc c 21
<210> 380
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 380
aacucaucug uuaucuuggc c 21
<210> 381
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 381
ccccuaacu cauuuguucc c 21
<210> 382
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 382
ugacuugggc aaagguagcc c 21
<210> 383
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 383
caaugugacu gcugacaaa 19
<210> 384
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 384
uuugucagca gucacauugu c 21
<210> 385
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 385
gcagguccuc acuuuaaugc c 21
<210> 386
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 386
gauuaaagug aggaccugcu u 21
<210> 387
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 387
ggcaauguga cugcugaccc c 21
<210> 388
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 388
ugucagcagu cacauugccu u 21
<210> 389
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 389
gcagguccuc acuuuaauuc c 21
<210> 390
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 390
ggcaauguga cugcugaugc c 21
<210> 391
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 391
gcagguccuc acuuuaaucc c 21
<210> 392
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 392
ggcaauguga cugcugauac c 21
<210> 393
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 393
gcagguccug acuuuaaucc c 21
<210> 394
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 394
ggcaaugugu cugcugauac c 21
<210> 395
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 395
gauuaaagug aggaccugcu uu 22
<210> 396
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
<400> 396
ugucagcagu cacauugccu uu 22

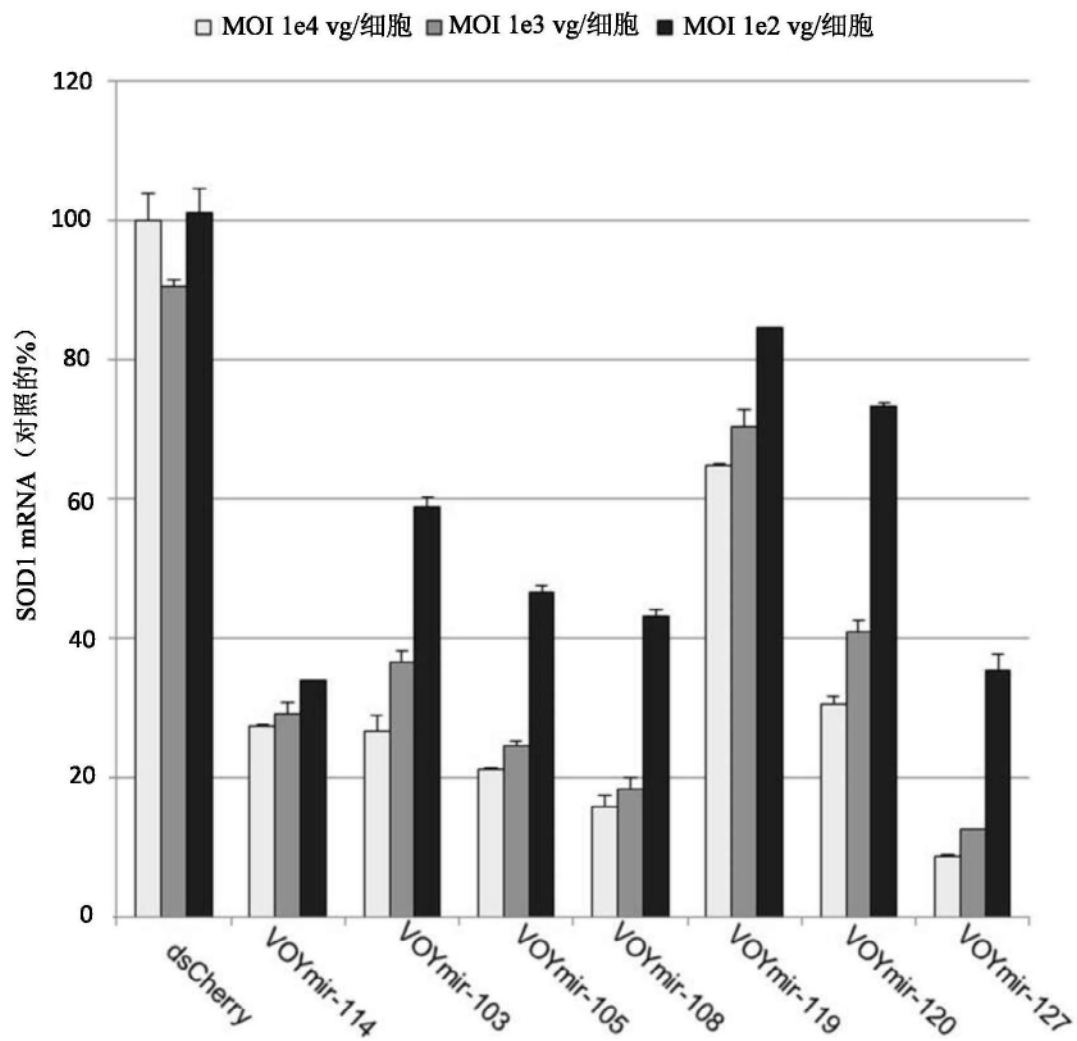


图1

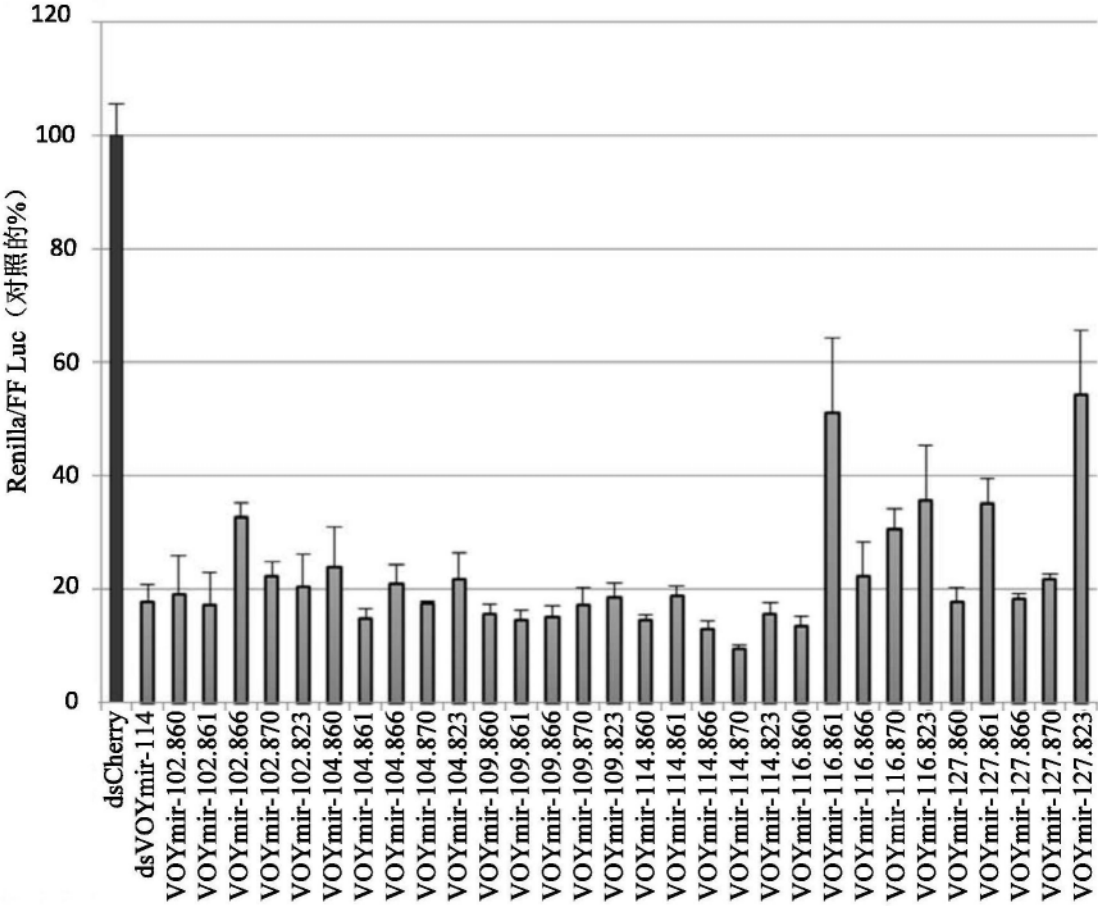


图2

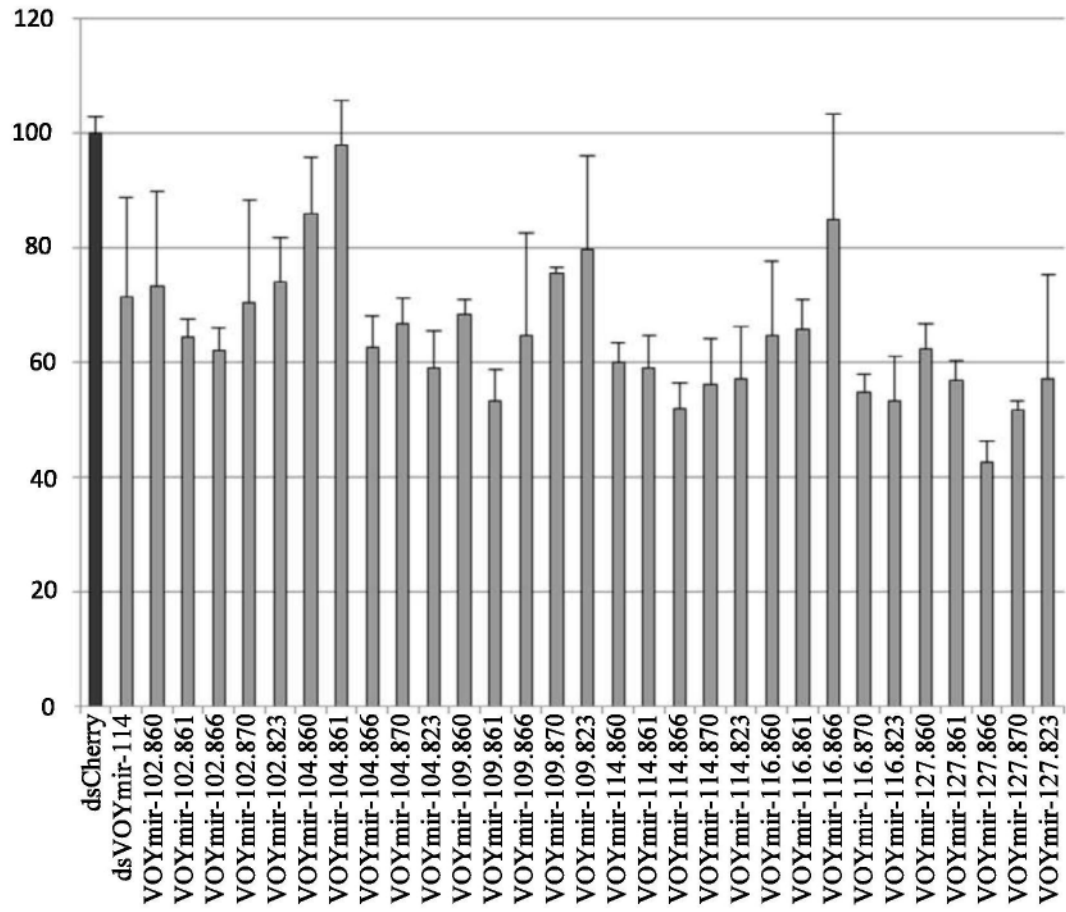


图3

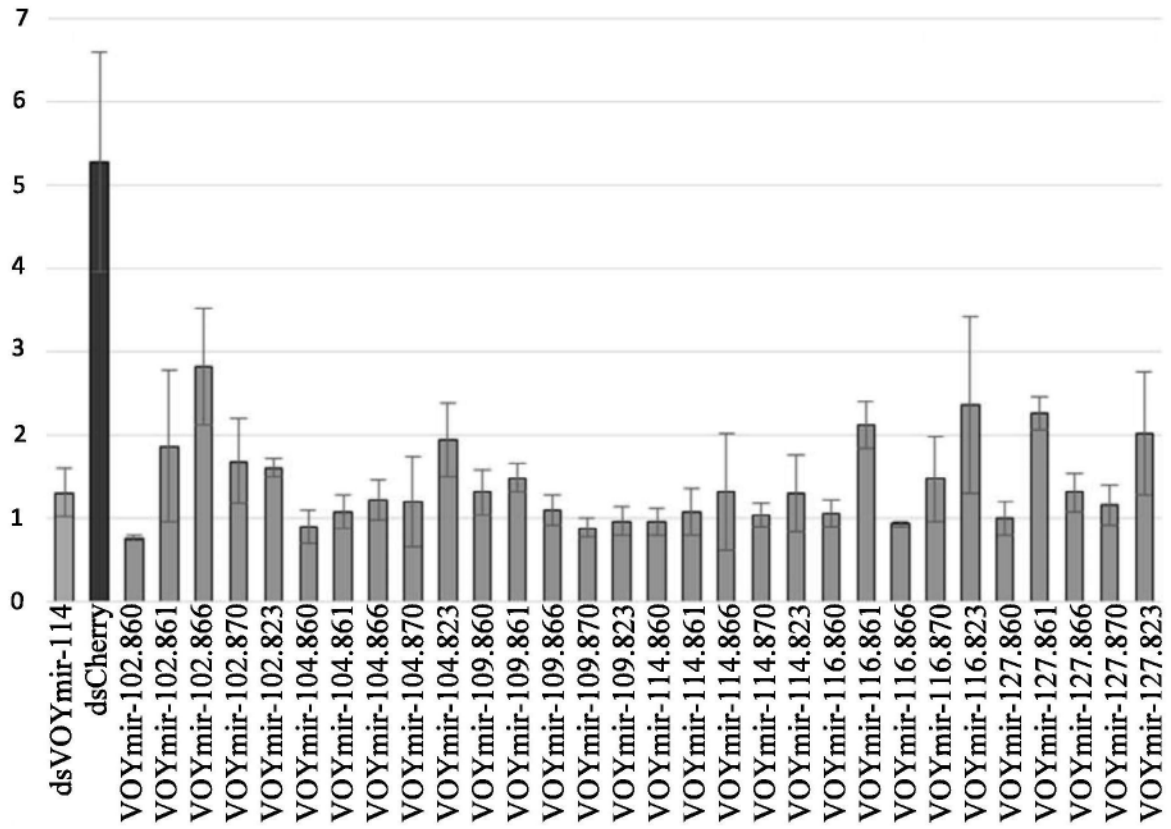


图4

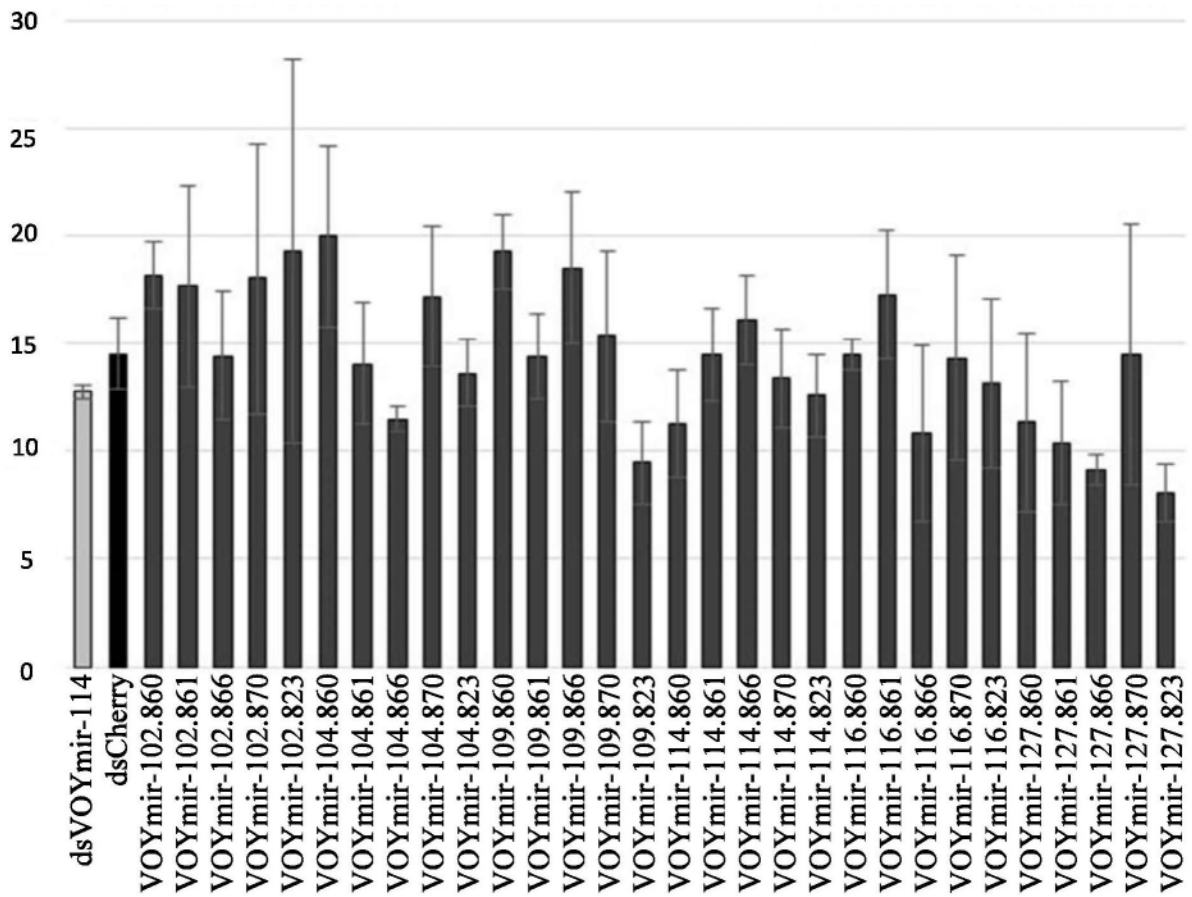


图5

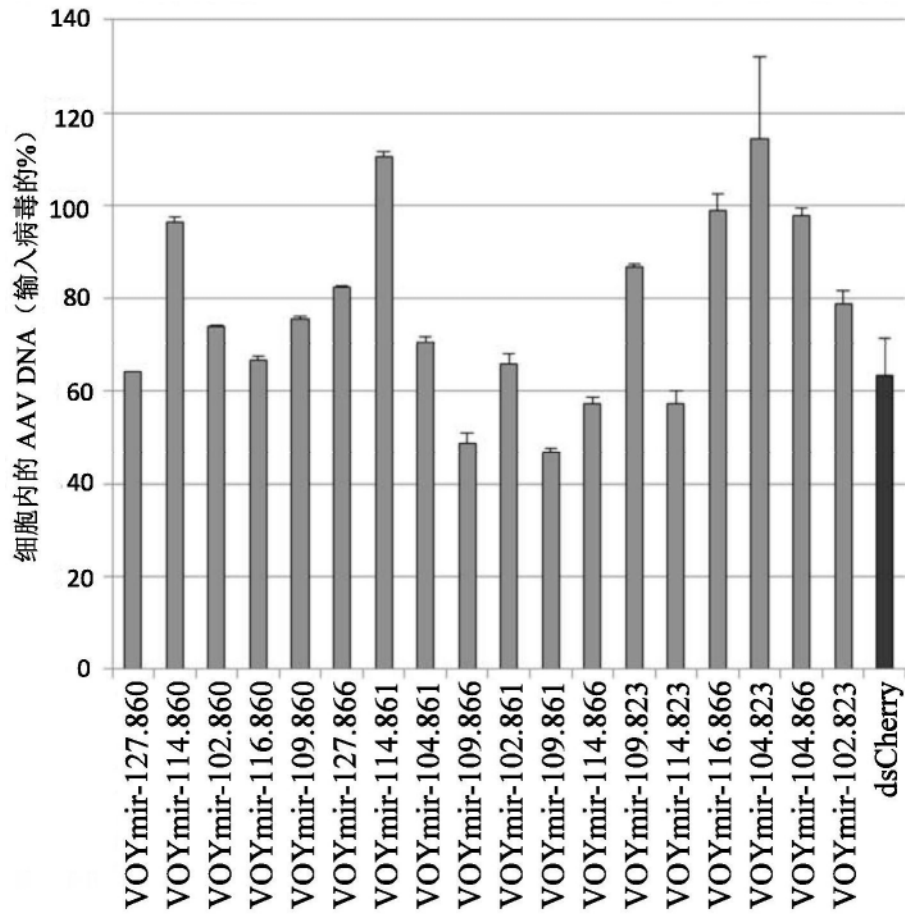


图6

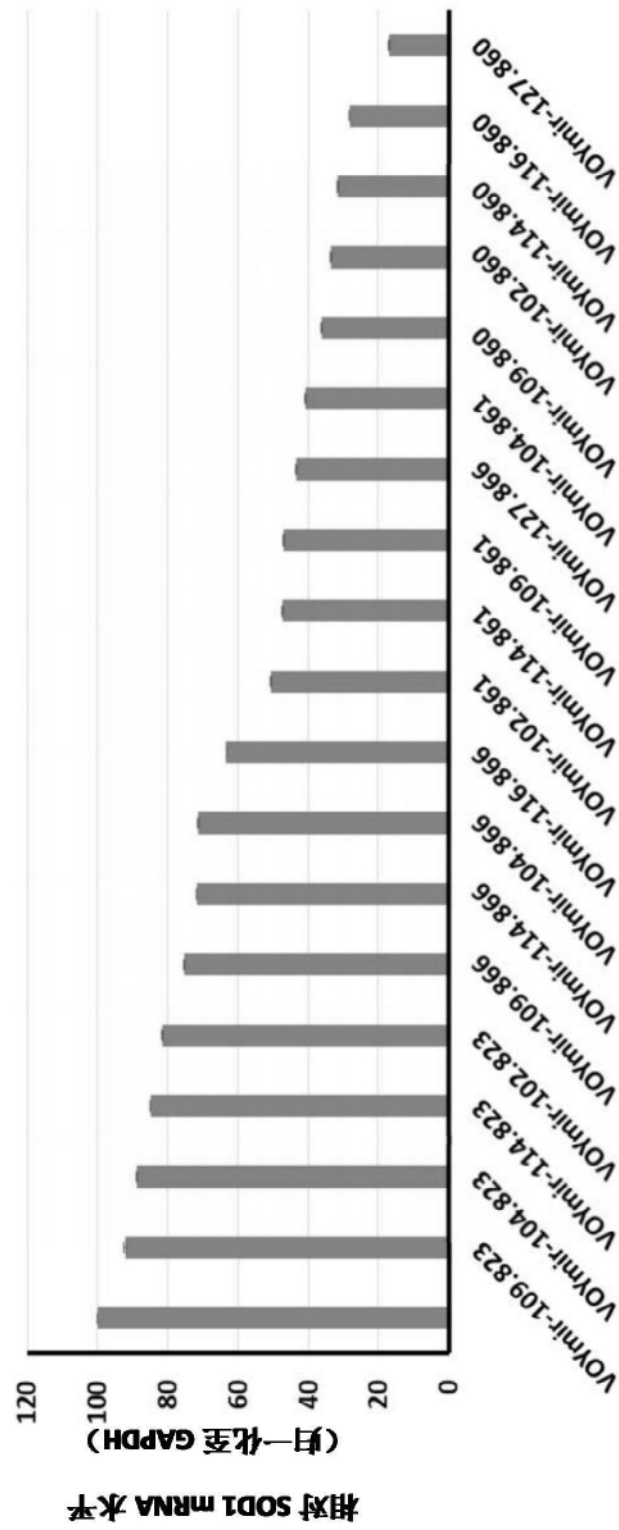


图7

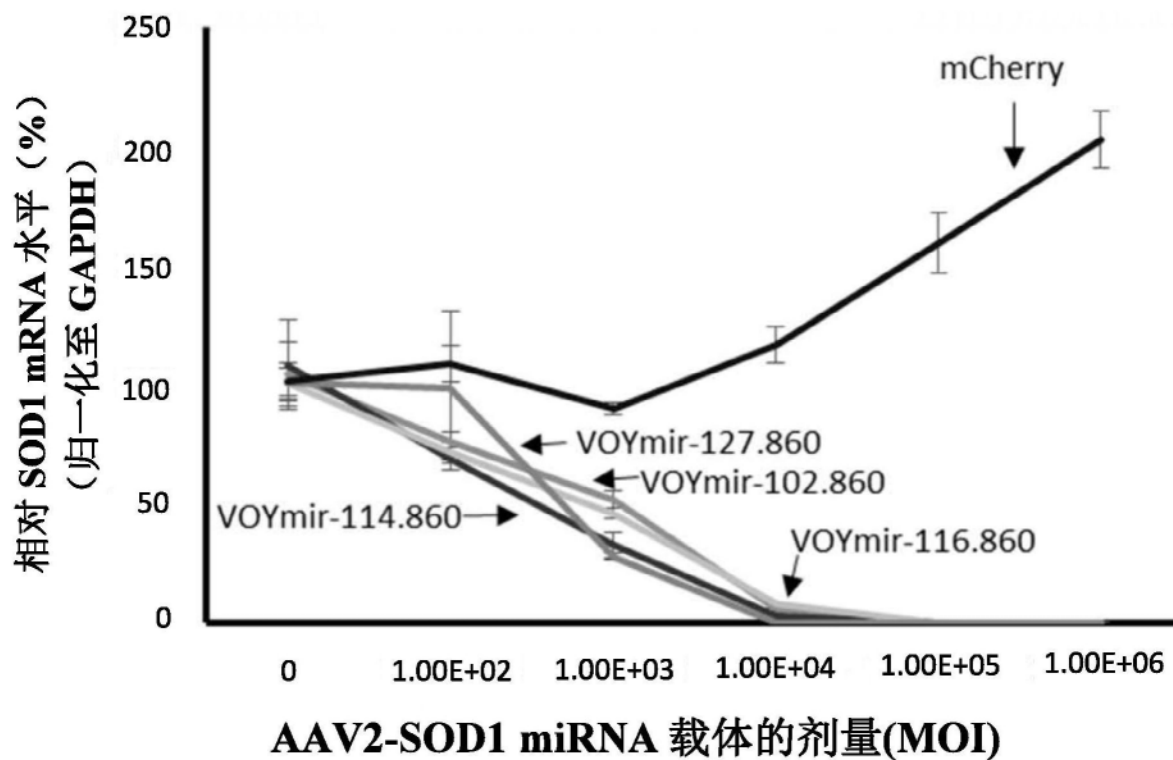


图8

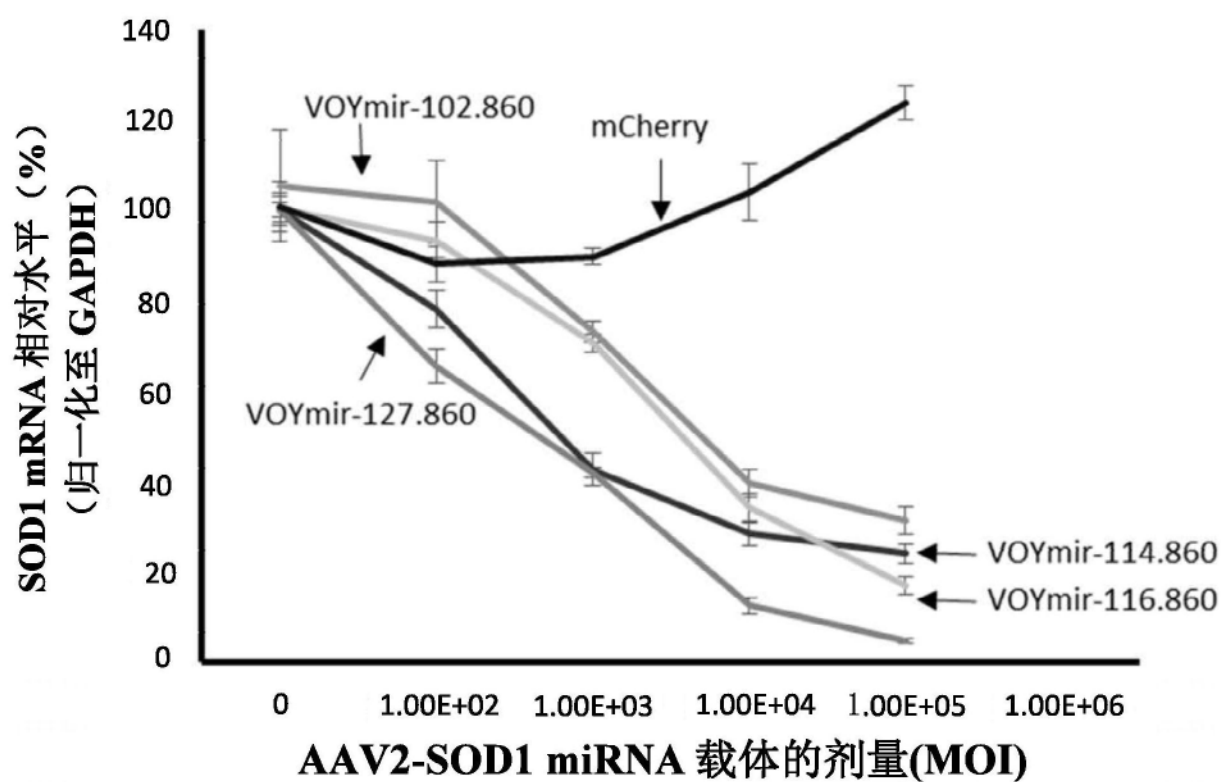


图9

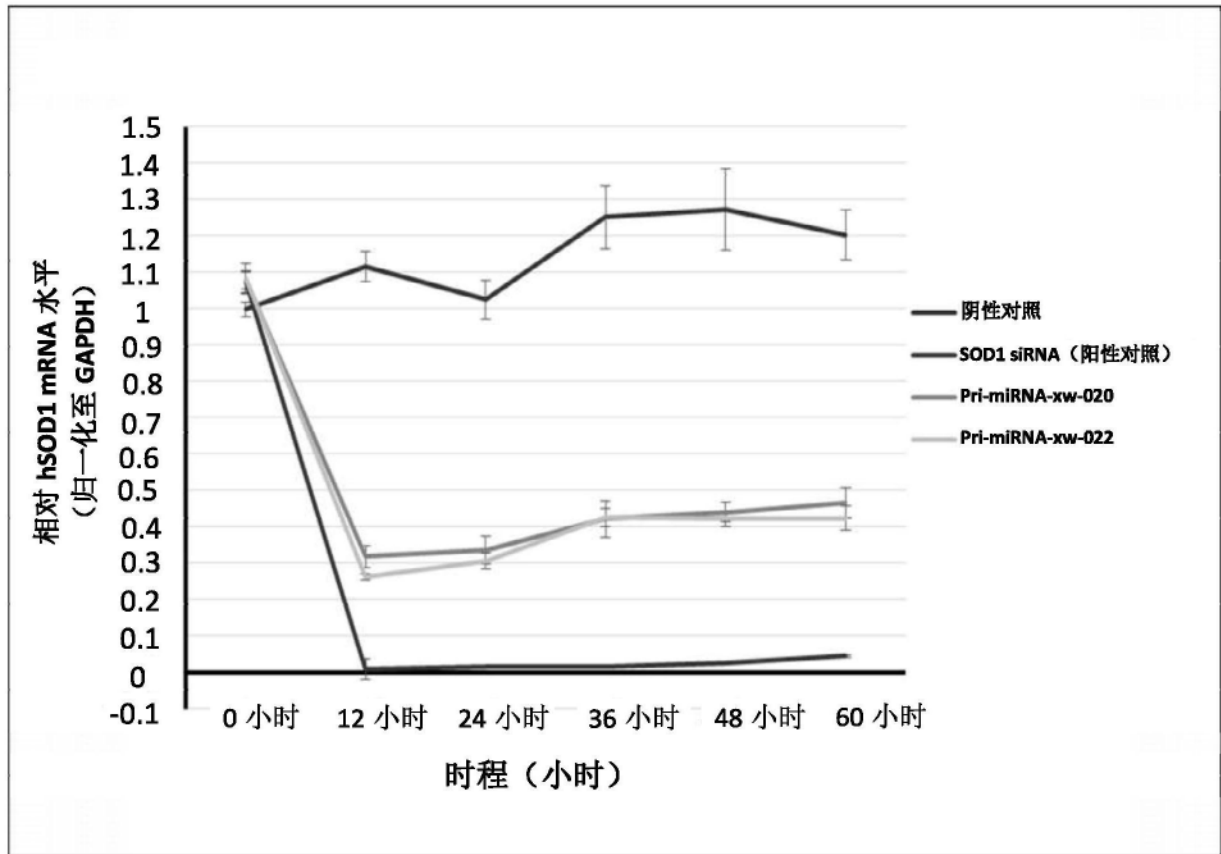


图10

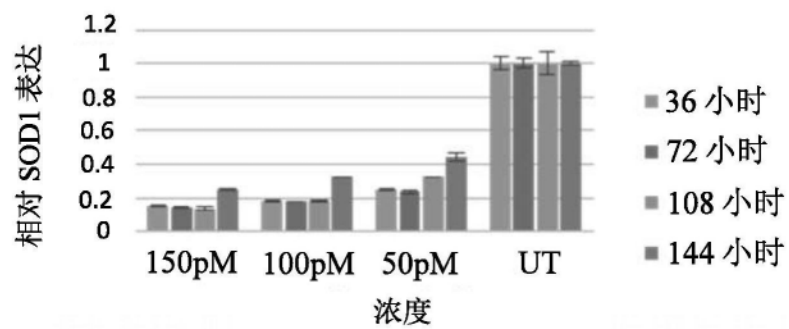


图11A

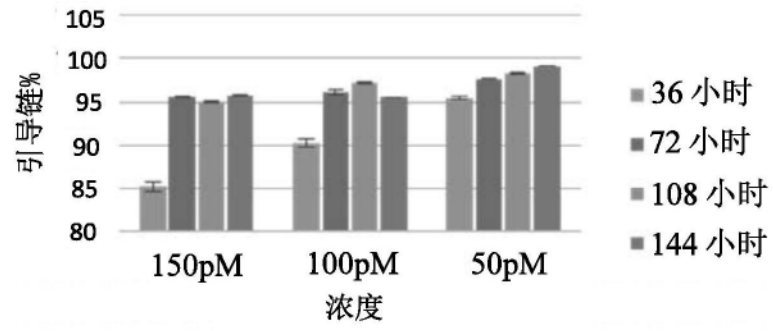


图11B

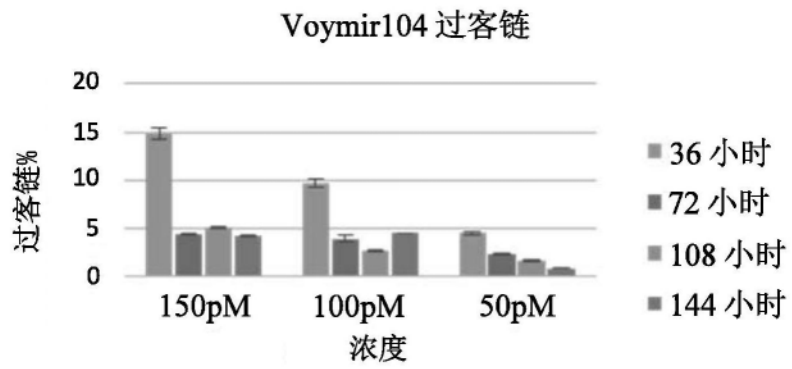


图11C

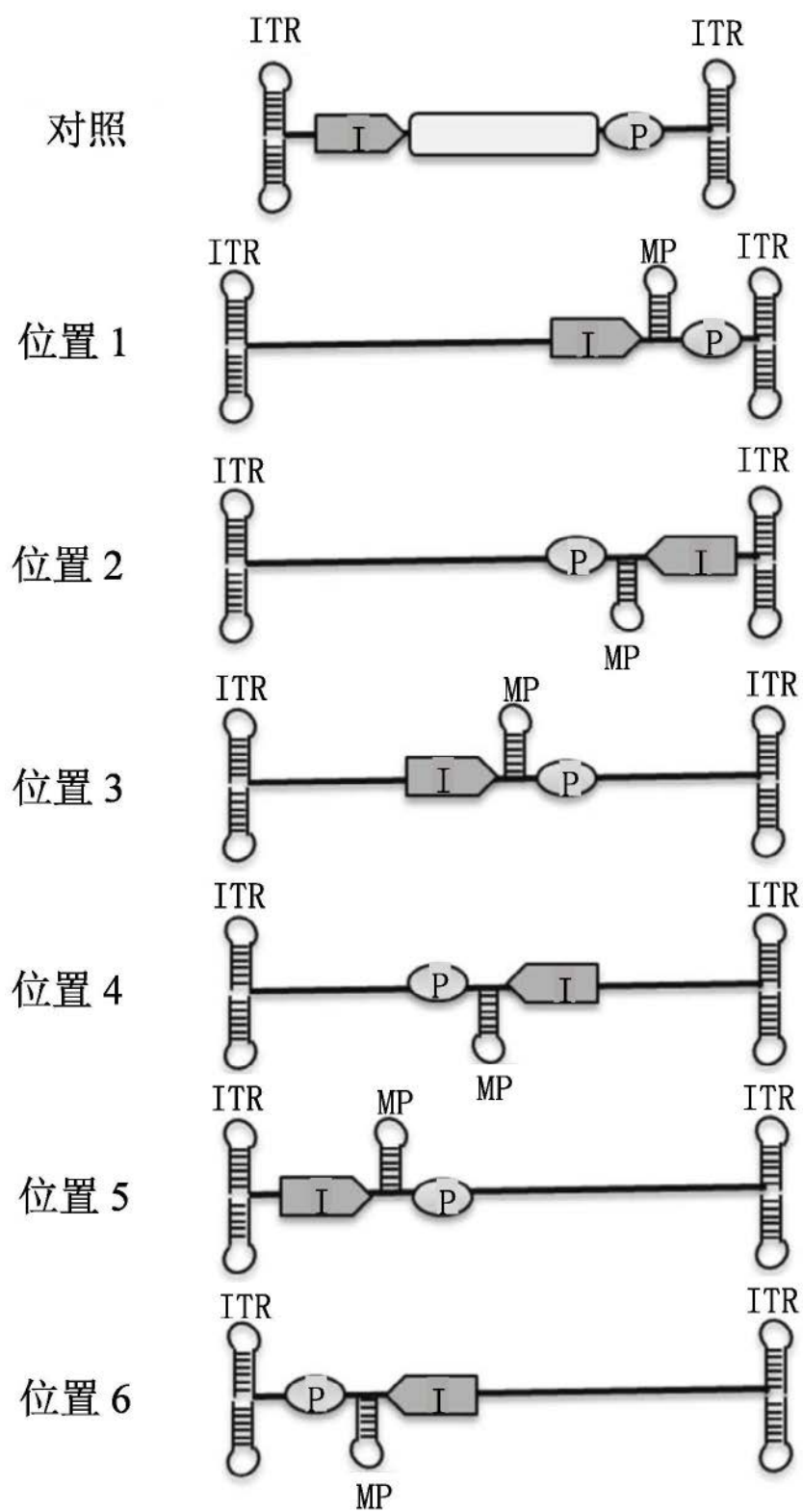


图12