(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119137273 A
(43)申请公布日 2024.12.13

(21)申请号 202380037529.8
(22)申请日 2023.03.06
(30)优先权数据
63/316,659 2022.03.04 US
63/379,983 2022.10.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/063798 2023.03.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/168458 EN 2023.09.07
(71)申请人 洛卡纳生物股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 R·拉德利马克米勒 D·罗斯
D·A·诺兰 R·巴特拉
R·A·亚当斯
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

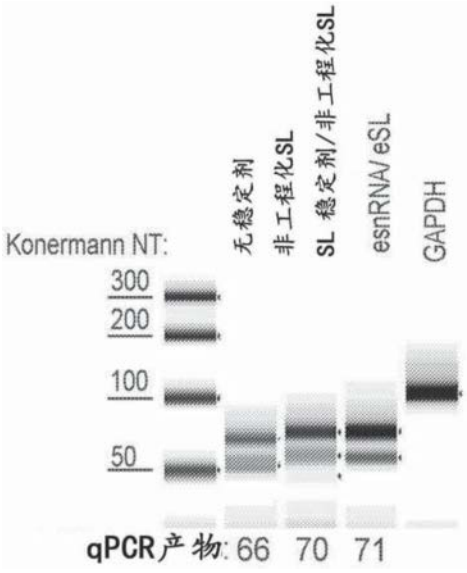
权利要求书2页 说明书85页
序列表（电子公布） 附图40页

(54)发明名称

包括工程化核内小RNA(snRNA)的组合物和方法

(57)摘要

本文公开了包含工程化茎环的snRNA系统。



CN 119137273 A

1.一种靶向RNA的核酸分子,所述靶向RNA的核酸分子包含工程化snRNA esnRNA,其中所述esnRNA系统包含工程化茎环(eSL),所述工程化茎环包含一个或多个选自以下的核酸序列:SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:146-SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:163或SEQ ID NO:186-205。

2.根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述esnRNA包含靶向目的靶RNA的靶向序列(TS)。

3.根据权利要求2所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述靶RNA是前mRNA或mRNA序列。

4.根据权利要求2所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述目的靶RNA是微卫星重复RNA。

5.根据权利要求4所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述微卫星重复RNA选自CUG、CAG和GGGGCC+CCCCGG。

6.根据权利要求2所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述靶RNA是编码DMD的序列。

7.根据权利要求6所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述靶向序列选自SEQ ID NO:206或SEQ ID NO:207。

8.根据权利要求6所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述靶向序列包含SEQ ID NO:208-SEQ ID NO:227中所示的一个或多个核酸序列。

9.根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述esnRNA包含靶向两个目的RNA的两个靶向序列。

10.根据权利要求9所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述两个TS是融合序列。

11.根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述esnRNA包含选自以下的Sm结合结构域(SmBD):U1、U2、U4和U5 SmBD。

12.根据权利要求11所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述SmBD包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:164中任一个所示的核酸序列。

13.根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸分子,其中所述esnRNA包含5'相互作用稳定剂结构域(5'ISD),所述5'相互作用稳定剂结构域包含选自SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:23中的任一个的核苷酸序列。

14.根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸,其中所述esnRNA包含SEQ ID NO:65-SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:179-SEQ ID NO:185中任一个所示的核酸序列。

15.一种载体,所述载体包含一个或多个权利要求1的esnRNA。

16.根据权利要求15所述的载体,其中所述病毒载体是AAV载体。

17.根据权利要求16所述的AAV载体,其中所述snRNA可操作地连接至启动子。

18.根据权利要求16所述的AAV载体,其中所述snRNA可操作地连接至U7启动子或U1启动子。

19.根据权利要求6所述的AAV载体,其中所述snRNA可操作地连接至下游终止子(DT)。

20.根据权利要求16所述的AAV载体,其中所述snRNA可操作地连接至U7下游终止子或U1下游终止子。

21.根据权利要求16所述的AAV载体,其中所述载体包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个esnRNA。

22.根据权利要求21所述的AAV载体,其中所述至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个esnRNA各自靶向相同的靶RNA序列。

23.根据权利要求21所述的AAV载体,其中所述至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个esnRNA靶向两个或更多个靶RNA序列。

24.根据权利要求21所述的AAV载体,其中每个esnRNA被缓冲序列隔开。

25.根据权利要求24所述的AAV载体,其中所述缓冲序列包含SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:30中任一个所示的核酸序列。

26.根据权利要求20所述的AAV载体,其中所述载体包含SEQ ID NO:123-SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:168-SEQ ID NO:178或SEQ ID NO:231-SEQ ID NO:233中任一个所示的核酸序列。

27.一种靶向一个或多个目的靶RNA,并且对所述一个或多个靶RNA进行阻断、敲低、编辑、外显子跳跃或剪接的方法,所述方法包括使权利要求1的esnRNA与包含所述一个或多个靶RNA的细胞接触。

28.一种靶向DMD外显子51RNA的核酸分子,所述靶向DMD外显子51RNA的核酸分子包含SEQ ID NO:206-SEQ ID NO:230中任一个所示的间隔子序列。

29.一种治疗受试者的疾病或障碍的方法,所述方法包括施用根据权利要求1所述的靶向RNA的核酸分子或根据权利要求15所述的AAV载体。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述疾病或障碍与毒性重复RNA序列相关。

31.根据权利要求29所述的方法,其中所述毒性重复RNA序列是CAG、CUG、GGCCCC、CCGGG或GGCCC+CCGGGG RNA重复。

32.根据权利要求29所述的方法,其中所述疾病或障碍是强直性肌营养不良(DM1)或亨廷顿病(HD)。

33.根据权利要求29所述的方法,其中所述疾病或障碍是迪谢内肌营养不良。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述靶向RNA的核酸分子或AAV载体靶向编码抗肌萎缩蛋白(DMD)的RNA序列。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述编码DMD的RNA序列包含内含子序列或外显子序列。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述外显子序列包含DMD的外显子51或其侧翼区域。

37.根据权利要求29所述的方法,其中所述施用是静脉内、肌肉内、软膜下、鞘内、实质内、鞘内、纹状体内、皮下、皮内、腹膜内、瘤内、静脉内、眼内和/或肠胃外施用。

包括工程化核内小RNA(snRNA)的组合物和方法

对电子序列表的引用

[0001] 将电子序列表(LOCN_020_001WO_SeqList_ST26.xml;大小:289,776字节;创建日期:2023年3月6日)的内容通过引用以其整体并入本文。

相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月4日提交的美国临时申请号63/316,659和2022年10月18日提交的美国临时申请号63/379,983的优先权和权益。将这些申请中的每一个的内容通过引用以其整体特此并入。

技术领域

[0003] 本公开文本涉及分子生物学、基因疗法、以及用于修饰RNA分子的表达和活性的组合物和方法。

背景技术

[0004] 对于提供用于校正功能障碍信使RNA的有效疗法,本领域存在长期但未满足的需求。

[0005] 核内小RNA(snRNA)是最小类型的RNA之一,平均大小为约150个核苷酸。snRNA是功能性非编码RNA。真核基因组编码多种非编码RNA(一类高度丰富的RNA,如snRNA),所述非编码RNA位于细胞核中,在内含子剪接和RNA加工中具有重要功能。在前mRNA剪接过程中,snRNA能够与其他蛋白质一起形成核糖核蛋白颗粒(snRNP)。这些snRNP和另外的蛋白质形成结合至未剪接的前mRNA转录物的大颗粒复合物(剪接体)。除了剪接之外,snRNA还在新生转录物的核成熟、基因表达调节、在非经典系统中作为剪接供体以及在复制依赖性组蛋白mRNA的3'端加工中起作用。可以将U7 snRNA编程为结合和调节mRNA,而不表达外源蛋白质,但是仍然需要开发一种使免疫原性风险最小化的高度特异性地靶向mRNA的治疗剂。此外,这些经编程的snRNA的小尺寸为开发单载体、高度特异性(等位基因特异性)、单靶标和多靶标基因治疗方法创造了机会。

[0006] 因此,本公开文本提供了包含由工程化snRNA构成的新的治疗性靶向RNA的平台的组合物和方法。

发明内容

[0007] 本公开文本提供了基因疗法组合物,所述基因疗法组合物包含新的治疗性靶向RNA的平台,所述平台由包含工程化snRNA茎环(eSL)的工程化snRNA(esnRNA)构成。

[0008] 本文公开了包含核酸分子的组合物和包含工程化snRNA(esnRNA)的载体。

[0009] 本文公开了靶向RNA的核酸分子,所述靶向RNA的核酸分子包含工程化snRNA(esnRNA)系统,其中所述esnRNA系统包含工程化茎环(eSL)。

[0010] 在一个实施方案中,所述esnRNA包含5'相互作用稳定剂结构域(5'ISD)。

[0011] 在一个实施方案中,所述esnRNA包含靶向目的RNA的靶向序列(TS)(或间隔子)。在

另一个实施方案中,所述目的靶RNA是微卫星重复RNA或非重复RNA。在另一个实施方案中,所述目的微卫星重复RNA选自CUG、CAG、GGGGCC和CCCCGG。在一个实施方案中,所述esnRNA包含靶向两个目的靶RNA(GGGGCC和CCCCGG)的靶向序列(TS)。在另一个实施方案中,所述两个目的靶RNA是微卫星重复RNA和非重复RNA。在另一个实施方案中,所述非重复RNA是微卫星重复RNA的侧翼序列。在另一个实施方案中,所述esnRNA包含靶向两个或更多个目的RNA的靶向序列(TS)。在另一个实施方案中,所述esnRNA包含靶向两个或更多个目的RNA的两个或更多个靶向序列(TS)。在另一个实施方案中,所述esnRNA包含两个或更多个TS的融合物。

[0012] 在一个实施方案中,所述esnRNA包含Sm结合结构域(SmBD)。在一个实施方案中,所述SmBD选自U1、U2、U4和U5 snRNA。在另一个实施方案中,所述SmBD源自假snRNA。

[0013] 在一个实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至snRNA启动子。在另一个实施方案中,所述snRNA启动子是U7启动子。在另一个实施方案中,所述U7启动子是内源U7启动子。在另一个实施方案中,所述U7启动子是人U7启动子(hU7)或小鼠U7启动子(mU7)。在另一个实施方案中,所述U7启动子是SEQ ID NO:43的内源人U7启动子。在一个实施方案中,所述snRNA启动子是U1启动子。在另一个实施方案中,所述U1启动子是人U1启动子或小鼠U1启动子。在另一个实施方案中,所述snRNA启动子选自:人U7启动子、人U1启动子、人U2启动子、人U4启动子、人U5启动子、人U6启动子、人7sk启动子、tRNA(Val)启动子、小鼠U1启动子和小鼠U7启动子。在另一个实施方案中,所述载体包含一个或多个esnRNA,或由一种或多种snRNA启动子驱动的esnRNA的一个或多个拷贝。在一个实施方案中,所述载体包含所述esnRNA的两个拷贝(2x)。在一个实施方案中,所述载体包含两种snRNA启动子,其中每种启动子驱动2x esnRNA的拷贝。在另一个实施方案中,所述两种snRNA启动子是U7启动子和U1启动子。在另一个实施方案中,所述两种snRNA启动子选自:人U7启动子、人U1启动子、人U2启动子、人U4启动子、人U5启动子、人U6启动子、人7sk启动子、tRNA(Val)启动子、小鼠U1启动子、小鼠U2启动子、小鼠U5启动子、小鼠U6启动子、小鼠U7启动子和小鼠H1启动子。在另一个实施方案中,所述两种snRNA启动子是小鼠U7启动子和小鼠U1启动子。

[0014] 在一个实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至snRNA下游终止子(DT)。在另一个实施方案中,所述snRNA DT是U7 DT。

[0015] 在一个实施方案中,所述esnRNA包含所述eSL、所述U7启动子、所述TS、所述SmBD、所述5'ISD和所述DT。在另一个实施方案中,所述esnRNA包含所述eSL、所述U7启动子、所述U1启动子、所述TS、所述SmBD、所述5'ISD和所述DT。

[0016]

[0017] 在一个实施方案中,所述esnRNA包含所述eSL、所述U7启动子、所述TS、所述SmBD、所述5'ISD和所述DT。在另一个实施方案中,所述esnRNA包含所述eSL、所述U7启动子、所述U1启动子、所述TS、所述SmBD、所述5'ISD和所述DT。

[0018] 本文还公开了包含所述esnRNA的载体。在一些实施方案中,所述载体包含所述esnRNA的多个拷贝。在一些实施方案中,所述esnRNA的多个拷贝是所述esnRNA的2、3或4个拷贝(2x、3x或4x)。在一些实施方案中,所述esnRNA的多个拷贝是所述esnRNA的4个或更多个拷贝(4x或更多)。在一些实施方案中,所述esnRNA的多个拷贝中的每个esnRNA被源自snRNA下游的人非编码基因组序列的核酸缓冲序列隔开。在一个实施方案中,所述缓冲序列源自U7下游的人基因组序列。在一个实施方案中,所述缓冲序列选自:缓冲物1(30bp、100bp

或500bp)、缓冲物2(30bp、100bp或500bp)、缓冲物3(30bp、100bp或500bp)及其组合。在一个实施方案中,所述载体是病毒载体或非病毒载体。在另一个实施方案中,所述病毒载体是AAV载体。在另一个实施方案中,所述AAV载体是scAAV载体或ssAAV载体。在另一个实施方案中,所述AAV载体是AAV9载体。在另一个实施方案中,所述AAV9载体是ssAAV9载体或scAAV9载体。

[0019] 本文还公开了一种靶向一个或多个目的靶RNA,并且对所述一个或多个靶RNA进行阻断、敲低、编辑、外显子跳跃、外显子包含或剪接的方法,所述方法包括使本公开文本的esnRNA与包含所述一个或多个靶RNA的细胞接触。

[0020] 本公开文本提供了一种靶向RNA的核酸分子,所述靶向RNA的核酸分子包含工程化snRNA esnRNA,其中所述esnRNA系统包含工程化茎环(eSL),所述工程化茎环包含一个或多个选自以下的核酸序列:SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:146-SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:163或SEQ ID NO:186-205。

[0021] 在一些实施方案中,所述esnRNA包含靶向目的靶RNA的靶向序列(TS)。

[0022] 在一些实施方案中,所述靶RNA是前mRNA或mRNA序列。在一些实施方案中,所述目的靶RNA是微卫星重复RNA。在一些实施方案中,所述微卫星重复RNA选自CUG、CAG和GGGGCC+CCCCGG。

[0023] 在一些实施方案中,所述靶RNA是编码DMD的序列。在一些实施方案中,所述靶向序列选自SEQ ID NO:206或SEQ ID NO:207。在一些实施方案中,所述靶向序列包含SEQ ID NO:208-SEQ ID NO:227中所示的一个或多个核酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,所述esnRNA包含靶向两个目的RNA的两个靶向序列。在一些实施方案中,所述两个TS是融合序列。

[0025] 在一些实施方案中,所述esnRNA包含选自以下的Sm结合结构域(SmBD):U1、U2、U4和U5 SmBD。

[0026] 在一些实施方案中,所述SmBD包含SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:164中任一个所示的核酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述esnRNA包含5'相互作用稳定剂结构域(5'ISD),所述5'相互作用稳定结构域包含选自SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:23中的任一个的核苷酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,所述esnRNA包含SEQ ID NO:65-SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:179-SEQ ID NO:185中任一个所示的核酸序列。

[0029] 本公开文本提供了一种载体,所述载体包含本公开文本的一个或多个esnRNA。在一些实施方案中,所述病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至启动子。

[0030] 在一些实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至U7启动子或U1启动子。

[0031] 在一些实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至下游终止子(DT)。在一些实施方案中,所述esnRNA可操作地连接至U7下游终止子或U1下游终止子。

[0032] 在一些实施方案中,所述载体包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个esnRNA。在一些实施方案中,所述至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个esnRNA各自靶向相同的靶RNA序列。

[0033] 在一些实施方案中,所述至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个

esnRNA靶向两个或更多个靶RNA序列。在一些实施方案中,每个esnRNA被缓冲序列隔开。在一些实施方案中,所述缓冲序列包含SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:30中任一个所示的核酸序列。

[0034] 在一些实施方案中,所述载体包含SEQ ID NO:123-SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:168-SEQ ID NO:178或SEQ ID NO:231-SEQ ID NO:233中任一个所示的核酸序列。

[0035] 一种靶向DMD外显子51RNA的核酸分子,所述靶向DMD外显子51RNA的核酸分子包含SEQ ID NO:206-SEQ ID NO:230中任一个所示的间隔子序列。

[0036] 本公开文本提供了一种治疗受试者的疾病或障碍的方法,所述方法包括施用本公开文本的靶向RNA的核酸分子或本公开文本的AAV载体。

[0037] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍与毒性重复RNA序列相关。在一些实施方案中,所述毒性重复RNA序列是CAG、CUG、GGCCCC、CCGGG或GGCCC+CCGGGG RNA重复。

[0038] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍是强直性肌营养不良(DM1)或亨廷顿病(HD)。

[0039] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍是迪谢内肌营养不良。在一些实施方案中,所述靶向RNA的核酸分子或AAV载体靶向编码抗肌萎缩蛋白(DMD)的RNA序列。

[0040] 在一些实施方案中,所述编码DMD的RNA序列包含内含子序列或外显子序列。在一些实施方案中,所述外显子序列包含DMD的外显子51或其侧翼区域。在一些实施方案中,所述施用是静脉内、肌肉内、软膜下、鞘内、实质内、鞘内、纹状体内、皮下、皮内、腹膜内、瘤内、静脉内、眼内和/或肠胃外施用。

附图说明

[0041] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。在请求并支付必要的费用后,官方将会提供带有彩色附图的本专利或专利申请公开案的副本。

[0042] 图1A-图1D。图1A示出了PCR产物的tape station图像,其中工程化SL的丰度增加,指示本文公开的esnRNA的稳定性增加。预测的PCR产物大小在图像下方示出。图1B说明了与非工程化茎环相比,包含本文公开的工程化茎环(eSL)的工程化snRNA(esnRNA)的示意图。图1C示出了保护snRNA的5'端的替代机制,所述替代机制放弃使用相互作用稳定剂结构域(ISD)。图1D示出了snRNA盒的大致大小。

[0043] 图2A-图2C。图2A-图2B示出了与NT(非靶向)esnRNA相比,本文公开的靶向CUG的esnRNA的CUG RNA灶点(foci)的FISH定量和图像。Y轴描绘了相对于NT归一化的每个细胞的平均灶点百分比,并且x轴描绘了处理。将细胞核用DAPI染色,并且将CUG RNA灶点用特异性标记探针标记。图2C示出了靶向和阻断CUG重复扩增、释放MBLN以及恢复DM1疾病的剪接缺陷特征的esnRNA MOA的示意图。

[0044] 图3A-图3C。图3A示出了将CAG80报告物mRNA剂量依赖性敲低至基线水平的qPCR结果。Y轴描绘了相对于参考基因GAPDH的CAG重复RNA表达水平,并且x轴描绘了snRNA处理,CAG靶向(CUG15)或非靶向(nt)(使用不同的剂量,250ng、500ng或1000ng)。图3B示出了CAG80报告物聚Q蛋白表达的蛋白质印迹。顶部泳道显示CAG报告物聚Q表达,并且底部泳道显示GAPDH加载对照。图3C示出了亨廷顿病的突变体HTT中的CAG重复扩增和阻断CAG重复的esnRNA MOA。

[0045] 图4A-图4D。图4A示出了在用esnRNA处理后用于检测USH2A外显子13包含(顶部条

带)或排除(底部条带)的PCR产物的tape station图像。图4C示出了与NT esnRNA对照(在A中示出)相比,在esnRNA处理后,外显子13排除的百分比的定量。图4B示出了与非工程化snRNA相比,包含eSL的工程化snRNA的示意图。图4D示出了厄舍综合征和DMD(迪谢内肌营养不良)中剪接调节的示意图。

[0046] 图5A-图5F示出了在用esnRNA处理以靶向DM1患者来源的肌管中的CUG重复后,BIN1、DMD和LBD3(在DM1患者细胞中错误剪接)的剪接同种型恢复的PCR结果。图A-图C示出了来自图D-图F中示出的tape station图像的恢复为健康剪接同种型的百分比的定量。Y轴描绘了校正百分比,并且x轴描绘了处理(knt是指非靶向阴性对照;CAGx15是指靶向CUG的esnRNA;unt是指未经处理的)。

[0047] 图6A-图6B示出了具有可替代的5'相互作用稳定结构域(ISD)的esnRNA在敲低CUG RNA灶点中的功效的定量,在CTG480 HeLa细胞中进行合成snRNA转染、随后是用于CUG RNA灶点的荧光原位杂交。(浅蓝色=具有相应5'ISD的可替代的工程化茎环。深蓝色=选择的工程化茎环和相应5'ISD。sR220004=非靶向snRNA)。以33nM(A)或11nM(B)剂量进行合成snRNA转染。

[0048] 图7A-图7B示出了不同的ISD导致随时间而变的不同的稳定性水平。图7A和图7B示出了具有可替代的5'稳定结构域的合成工程化snRNA随时间而变的相对丰度。在转染具有不同稳定结构域的合成snRNA之后24h、48h和72h时间点收集RNA,以确定snRNA的相对稳定性。

[0049] 图8示出了当snRNA在不同的PolIII和PolII启动子下表达时,通过qPCR测定的CTG480 HeLa细胞中的snRNA表达的水平。Y轴描绘了相对于GAPDH参考基因的snRNA表达水平,并且x轴描绘了用于表达snRNA的不同snRNA启动子(Pol II U1和U7启动子或PolIII:U6、tRNA和7SK)。以两种不同的剂量(250和500ng)转染具有不同启动子的质粒。

[0050] 图9A-图9B示出了在用500ng(A)或250ng(B)具有不同的Pol III和Pol II启动子和各自的DT序列的工程化snRNA构建体转染后,通过RNA FISH对CTG480 HeLa细胞中的CUG灶点的定量。具有驱动工程化snRNA表达的Pol II启动子的构建体(P02225和P03557)比具有驱动snRNA的Pol III启动子的构建体更有效地耗尽含有微卫星重复的灶点。灰色条表示NT esnRNA,并且蓝色条表示靶向CUG的esnRNA。

[0051] 图10示出了当snRNA在PolIII(U6、tRNA和7SK)或PolII启动子(U7和U1)下表达,并且含有SmOpt或U1 Sm结合位点时,通过qPCR测定的HEK293T细胞中的snRNA表达水平。

[0052] 图11A-图11B示出了在转染到HEK293细胞中后,相对于GAPDH参考基因的snRNA表达水平。将对每种snRNA(z)具有特异性的引物用于qPCR,以确定相对启动子强度。Y轴描绘了相对于GAPDH的snRNA表达水平,并且x轴描绘了当它们在snRNA的不同启动子(U1、U2、U4、U5和U7;unt是指未经处理的)下表达时,snRNA间隔子znt(非靶向对照,在A中)和z38(靶向间隔子,B)。使用了对z-nt(图A)或z-38(图B)具有特异性的引物组。

[0053] 图12A-图12B示出了用本文公开的snRNA转导人δ外显子52肌管后,外显子51跳跃的结果(A03980:2x z38/42融合snRNA盒;A03981:2个snRNA盒,一个具有z42 TS,并且另一个具有z38 TS)。图12A示出了表示外显子51包含和排除同种型的PCR产物的tape station图像和显示预期片段大小的示意图。图12B示出了图12A半定量PCR中的条带强度的定量。Y轴描绘了外显子51跳跃的百分比,并且x轴描绘了处理(合成snRNA或以不同的MOI转导的

A03980或A03981的AAV)。

[0054] 图13A-图13B示出了在用用于外显子51跳跃的snRNA处理后,人δ外显子52肌管的抗肌萎缩蛋白染色和恢复。图13A示出了用于未经处理的肌管、用合成snRNA处理的肌管或以1e6或5e6的MOI用A03980(2x z38/z42融合snRNA盒)处理的肌管中的结蛋白或抗肌萎缩蛋白的免疫荧光法。图13B示出了用于以1e6或5e6的MOI用A03981(具有z42 TS和z38 TS的2个snRNA盒)转导的肌管中结蛋白或抗肌萎缩蛋白的免疫荧光法。

[0055] 图14A说明了A04569的载体基因组,其表达如图14B描绘的相同序列的2个融合snRNA。图14C示出了可以构建靶向外显子51外显子剪接增强子(ESE)的融合snRNA,使得z38靶向序列位于反义序列的最5'位置且z42靶向序列位于z38序列的下游(z73),或者以相反的方向,其中z42靶向序列位于最5'位置且z38位于下游(z187)。在两种情况下,snRNA的反义序列由2个靶向序列构成,每个靶向序列靶向外显子51中的单独且独特的ESE(图14C底部图)。

[0056] 图15A-图15D示出了在缺失外显子52的人骨骼肌管和del52hDMD/mdx小鼠中,靶向外显子51ESE的融合snRNA的活性。(A)在用低剂量的携带融合反义序列z73(z38/z42)和z187(z42/z38)的合成snRNA转染之后24小时,缺失DMD外显子52的人骨骼肌管中外显子51跳跃的tape station图像和定量。在低剂量下,合成snRNA z187的转染比z73诱导更高水平的外显子51跳跃。(图15B)示出了在以2.5e4、1e5和5e5的MOI用AAV9-A04526(携带各自表达z73的两个esnRNA盒)和A04569(携带各自表达z187的两个盒)转导7天后,缺失DMD外显子52的人骨骼肌管中外显子51跳跃的定量。(图15C)示出了在缺失人源化外显子52的DMD(del52hDMD/mdx)小鼠模型中的外显子51跳跃的定量。我们向小鼠眼眶后注射3e12个A04526和A04569载体基因组。存活3周后,从胫骨前肌(TA)、腓肠肌(Gc)和心脏提取RNA。进行半定量RT-PCR,以检测包含和排除外显子51的条带。(图15D)示出了在将剂量为3e11个vg/肌肉的A04526或靶向ESE的Vivo-Morpholino(ViM)肌肉内递送至del52hDMD/mdx小鼠的腓肠肌之后4周,抗肌萎缩蛋白阳性纤维的定量。表达野生型人抗肌萎缩蛋白的hDMD/mdx小鼠(灰色条)用作抗肌萎缩蛋白表达的阳性对照。U=未经处理的。

[0057] 图16A-图16D示出了在患者来源的肌管(含有1700个CUG重复)中,在用靶向CUG重复的snRNA处理后,DMD和LBD3剪接同种型的剪接逆转以及DMPK的敲低。通过用myoD腺病毒载体转导(持续5天),使DM1患者成纤维细胞分化成肌管。然后以多个MOI用A04233和A04234(靶向CUG重复的scAAV9双snRNA)转导细胞,并且将细胞在转导之后7天收获。图16A示出了用于检测DMD外显子78包含(顶部条带)和LBD3外显子11排除(底部条带)的使用特异性引物所得到的RT-PCR产物的tape station图像,所述DMD外显子78包含和LBD3外显子11排除是正常WT细胞中剪接校正的标记物。DMD外显子78包含(图16B)和LBD3外显子11排除(图16C)的定量。x轴描绘了处理(载体和MOI)。y轴描绘了DMD外显子78的外显子包含或LBD3外显子11的排除的剪接校正的百分比。图16D示出了在以不同MOI用snRNA(AAV9 A04233和AAV9 A04234)处理后,通过ddPCR测定的DMPK RNA表达水平。x轴描绘了处理。y轴描绘了相对于UNT(未经处理的细胞)归一化的每1000个GAPDH参考基因拷贝的DMPK拷贝。

[0058] 图17A-图17B示出了以不同MOI用AAV9 A04233和AAV9 A04234转导来自患者来源的肌管的核RNA灶点的图像和定量。通过用myoD腺病毒载体转导(持续5天),使DM1患者成纤维细胞分化成肌管。然后以多个MOI用A04233和A04234(靶向CUG重复的scAAV9双snRNA)转

导细胞,并且将细胞在转导后7天收获以用于RNA FISH(以检测CUG灶点)。图17A示出了从未经处理的肌管和用AAV9 snRNA载体A04233和A04234处理的肌管获得的CUG RNA灶点的图像。将细胞核用DAPI染色,并且用CUG标记的探针进行CUG FISH。在转导之后7天处理细胞。图17B示出了平均CUG灶点数量/细胞的定量。x轴描绘了处理和使用的MOI。y轴描绘了相对于UNT(未经处理的细胞)归一化的平均CUG数量灶点/细胞。

[0059] 图18A-图18C描绘了在用靶向CAG重复的AAV-snRNA处理后,HTT突变体可溶性蛋白的处理、时间线和定量。图18A示出了使用AAV-A04390(靶向CAG重复的2x hU7/hU1 snRNA)的载体的实验设计,即2个MOI和用于检测突变体(mut)HTT可溶性蛋白的终点测定。图18B描绘了本实验的时间线。将HD患者iPSc(含有66个CAG重复)分化为皮层神经元持续2周,然后用AAV-A04390 snRNA载体转导另外的2周。然后收获皮层神经元,并且通过Meso scalediscovery(MSD,在图18C中示出)免疫测定定量突变体可溶性HTT蛋白。y轴描绘了每mg蛋白质裂解物中的突变体可溶性HTT(以fmol计),并且x轴描绘了处理和MOI。

[0060] 图19A-图19B描绘了在R6/2HD小鼠模型上靶向CAG重复的体内研究设计,以及在用靶向CAG重复的AAV-snRNA(A03081)处理后,突变体HTT可溶性蛋白的定量。图19A图示了通过纹状体内注射施用的AAVrh10-snRNA(4xCAGx15靶向snRNA载体)的剂量(2e10个载体基因组)。将未经处理和未注射的对侧纹状体侧用作对照。(图19B)示出了通过Meso scalediscovery(MSD)免疫测定对未经处理的小鼠和经snRNA处理的小鼠(n=10)的突变体可溶性HTT蛋白的定量。y轴描绘了每mg总蛋白裂解物中的突变体可溶性HTT(以fmol计),并且x轴描绘了处理。

[0061] 图20A描绘了由A04527和A04526表达的snRNA之间的差异,其中A04526表达具有5'ISD和工程化小鼠SL的工程化snRNA,而A04527不具有5'ISD并且具有小鼠天然SL。图20B示出了在以1e6的MOI用AAV9-A04527或A04526病毒转导CHO-Lec2细胞之后2天z38/42的表达(以snRNA拷贝/纳克计)的条形图。

具体实施方式

[0062] 本公开文本提供了基因疗法组合物,所述基因疗法组合物包含新的治疗性靶向RNA的平台,所述平台由包含工程化snRNA茎环(eSL)的工程化snRNA(esnRNA)构成。

[0063] 本文公开了包含核酸分子的组合物和包含工程化snRNA(esnRNA)的载体。

[0064] 核内小核糖核酸(snRNA)是核内小核糖核蛋白复合物(snRNP)的必要组分,当核内小核糖核酸蛋白复合物与另外的蛋白质组装时,形成称为剪接体(被委派介导整个mRNA成熟过程的细胞机器)的大核糖核蛋白复合物。剪接体负责前体mRNA剪接,即在蛋白质产生之前从RNA转录物去除内含子的过程。单个snRNA的大小通常为约250个核苷酸或更少。例如,U1 snRNA的长度为164个核苷酸,并且由在人基因组内存在数个拷贝的基因编码。U1 snRNA表示核颗粒U1 snRNP的核糖核酸组分。U1 snRNA具有茎和环三维结构,并且在5'区内存在单链序列,通常长度为约9个核苷酸,能够通过互补碱基配对结合至前mRNA分子上的剪接供体位点。(Horowitz等人,1994,Trends Genet.,10(3):100-6.)由于多种剪接体snRNA含有大量的尿苷酸,因此它们被命名为U1、U2、U4、U5、U6、U4ATAC、U6ATAC、U7、U11和U12。(Mattaj等人,1993,FASEB J,15,7:47-53.)

[0065] snRNA系统可以用于治疗毒性突变。例如,干扰含有毒性突变的外显子内的剪接位

点和调节元件的反义寡核苷酸可以在前RNA水平上诱导特定外显子的跳跃。此类反义序列可以包装在snRNA序列中,所述snRNA序列使用携带可以转录snRNA的核酸序列的病毒载体来递送。U7 snRNA内源性地参与组蛋白前mRNA 3'端加工,但是可以通过Sm/Lsm蛋白质的结合位点的微小变化转化为用于剪接调节的通用工具。用于治疗迪谢内肌营养不良的一种这样的治疗性策略已经使用经修饰的U7 snRNA来将框外突变转化为框内突变,这产生内部缺失的毒性RNA,但是仍具有功能性的抗肌萎缩蛋白。(Goyenvalle等人,2009,17(7):1234-1240.)

[0066] 大多数富含U的snRNP是介导前mRNA的剪接的复合物。U7 snRNP是例外。U7不参与剪接,而是在复制依赖性组蛋白mRNA的独特3'端加工中的关键因子。通过修饰U7 snRNA组蛋白结合序列和Sm基序,U7可以不再参与组蛋白前mRNA的加工,而是靶向前mRNA或smRNA以进行阻断或剪接调节。以这种方式,U7 snRNA可以用作有效的基因疗法平台。U7 snRNA平台还具有以下另外的优点:尺寸紧凑,具有在细胞核中积累而不引起细胞毒性的能力,并且几乎没有免疫反应性。(Gadgil等人,2021,J Gene Med,23(4):e3321.)

[0067] 本文公开了新工程化和重新设计的snRNA平台(或者本文称为esnRNA平台),其包含1)工程化茎环(eSL)。对天然茎环序列进行补偿修饰产生了工程化茎环(eSL),所述工程化茎环更有效地与snRNA相互作用稳定结构域(ISD)通信(折叠和退火),这进而产生具有增加的稳定性的snRNA平台。参见图1。先前已经表明,U7 snRNA可编程以调节mRNA。本文公开了能够用作基因疗法工具的经编程的工程化snRNA改进。本文显示这些工程化snRNA系统导致阻断微卫星重复扩增(本文显示用于治疗强直性肌营养不良(DM1)或亨廷顿病(HD))、导致外显子跳跃(用于治疗DMD)以及导致剪接调节(本文显示用于治疗USH2A(2型厄舍综合征))。在一个实施方案中,这些snRNA是人snRNA。在另一个实施方案中,这些snRNA是小鼠snRNA。在另一个实施方案中,snRNA是人snRNA和小鼠snRNA的组合。在一个实施方案中,U7是人U7或小鼠U7。在本文公开的另一个实施方案中,通过组合内源snRNA的结构域以微调平台的稳定性和/或减少脱靶效应,工程化snRNA包含不同类型的snRNA(U1-U12等)。例如,在一个实施方案中,工程化snRNA系统包含人或小鼠U7 snRNA组分和人或小鼠U1 snRNA组分的组合。

[0068] 可以调整RNA的加工和丰度的另外的元件可以被进一步工程化到包含eSL的esnRNA中。参见图1C。在一个实施方案中,可以调整esnRNA的加工、稳定性和丰度的另外的元件可以在5'或3'端被进一步工程化到esnRNA中。在另一个实施方案中,此类元件可以包括但不限于茎环、发夹、G-C夹、吻式环、三链体、四链体和蛋白质结合位点。

[0069] 本文公开的esnRNA平台及其部分可以用于任何治疗环境和背景中,只要esnRNA治疗性组合物的设计中包含一个或多个合适的间隔子(或一个或多个TS)即可。在某些实施方案中,治疗性esnRNA组合物用于治疗选自以下的疾病:迪谢内肌营养不良、DM1和HD。在另一个实施方案中,esnRNA组合物用于治疗由外显子51突变引起的DMD。

工程化茎环

[0070] 本文公开的工程化snRNA(esnRNA)系统包含工程化茎环(eSL),所述工程化茎环包括对天然snRNA茎环进行补偿修饰。与包含未经修饰的茎环的snRNP相比,这些修饰导致esnRNP的稳定性增加。本文公开的eSL可以源自任何snRNP(如U1-U12)。在一个实施方案中,eSL是人或小鼠U7 eSL。在一个实施方案中,eSL是人或小鼠eSL。在一些实施方案中,eSL是

人和小鼠eSL。在一些实施方案中,eSL是选自以下的非人eSL:小鼠、猪、绵羊、山羊、牛、狗、猫、马或其组合。在一些实施方案中,eSL是选自以下的eSL:人、小鼠、猪、绵羊、山羊、牛、狗、猫、马或其组合。在一些实施方案中,eSL序列不是天然茎环序列。在一些实施方案中,eSL的核酸序列的至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)不是天然茎环序列。

[0071] 在一些实施方案中,人eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

ggctttctggctccttaccggaaagcc(SEQ ID NO:1)、
ggctttctgggaggttaccggaaagcc(SEQ ID NO:2)、
ggctttctggcctccttaccggaaagcc(SEQ ID NO:3)、
ggctttctggggaggttaccggaaagcc(SEQ ID NO:4)、
ggctttctggctggctaccggaaagcc(SEQ ID NO:5)、
ggctttctggcttccccggaaagcc(SEQ ID NO:6)、
ggctttctggcttcttcccggaaagcc(SEQ ID NO:7)、
ggctttctggcaacttaccggaaagcc(SEQ ID NO:8)、
ggctttctggttcggtaccggaaagcc(SEQ ID NO:9)、
ggctttctggaagccttaccggaaagcc(SEQ ID NO:10)、
ggctttctggcttcttaccggaaagcc(SEQ ID NO:11)或
GGCTTTCTGGCCTCCGCCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:186)。

[0072] 在一些实施方案中,鼠eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:ggctttctggctccttaccggaaagcccct(SEQ ID NO:163)、

Ggttttctgacctccgtcggaaaaccccct(SEQ ID NO:146)、
ggttttctgacctccttcggtcggaaaaccccct(SEQ ID NO:147)、
Ggttttctgacctccgtcggaaaacc(SEQ ID NO:148)、
GGTTTTCTGACACTCCGTCGGAAAACCCCT(SEQ ID NO:228)、
GGTTTTCTGATCTCCATCGGAAAACCCCT(SEQ ID NO:229)或
GGTTTTCCGACCTCCGTCGGAAAACCCCT(SEQ ID NO:230)。

[0073] 在一些实施方案中,人或鼠eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGCTTTCTGGCACTCCACCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:190)、
GGCTTTCTGGCACTCCGCCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:191)或
GGCTTTCTGGCCTCCACCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:192)。

[0074] 在一些实施方案中,狗或猫eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGTTTTCCGGTCTCCACCGGAAAGCCCCC(SEQ ID NO:193)。

[0075] 在一些实施方案中,牛、绵羊或山羊eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGCTTTCCGGTCTCCACCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:194)或

GGCTTTCCGGCCTCCGCCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:195)。

[0076] 在一些实施方案中,猪eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGTTTTCCGGTCTCCACCGGAAAACCCTT(SEQ ID NO:196)、

GGTTTTCCGTGCTCCCACGGAAAACCCTT(SEQ ID NO:197)、

GGTTTTCCGGCCTCCGCCGGAAAACCCTT(SEQ ID NO:198)、

GGTTTTCCGTGACTCCCACGGAAAACCCTT(SEQ ID NO:199)或

GGTTTTCCGGCACTCCGCCGGAAAACCCTT(SEQ ID NO:200)。

[0077] 在一些实施方案中,马eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGTCTTCCGGTCTCCTCCGGAAGGCCCCC(SEQ ID NO:201)或

GGTCTTCCGGCTCCCCGGAAGGCCCCC(SEQ ID NO:202)。

[0078] 在一些实施方案中,绵羊eSL包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

GGCTTTCCGTGCTCCCACGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:203)、

GGCTTTCCGTGACTCCCACGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:204)或

GGCTTTCCGGCACTCCGCCGGAAAGCCCCT(SEQ ID NO:205)。

[0079] 在一些实施方案中,相对于包含天然茎环的snRNA,工程化茎环提供snRNA的增强的稳定性。在一些实施方案中,天然snRNA茎环包含与以下核苷酸序列中的一个或多个至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

Ggttttctgacttcggtcggaaaacccct(SEQ ID NO:145)、

ggttttctgacttcggtcggaaaacc(SEQ ID NO:206)、

Ggctttctggctttttaccggaaagcc(SEQ ID NO:235)或

ggctttctggctttttaccggaaagccCCT(SEQ ID NO:236)。

5'相互作用稳定结构域

[0080] 本文公开的eSL具有与5'相互作用稳定结构域(5'ISD)更有效地折叠和退火的特性,并且这进而导致与非工程化snRNA相比,esnRNA的增加的稳定性。5'ISD具有与工程化SL内的核苷酸互补的核苷酸,并且不希望受理论束缚,预测5'ISD与eSL之间的相互作用形成保护snRNA的5'端的二级结构。在一些方面,5'ISD与本公开文本的eSL退火和/或杂交。在一些方面,5'ISD是与本公开文本的eSL中存在的序列具有互补性和/或反向互补性的序列。在

一些方面,本文公开的5'ISD可以是选自以下的核苷酸序列的5'ISD中的一个:

ggagt(SEQ ID NO:12)、

cctct(SEQ ID NO:13)、

ggaggt(SEQ ID NO:14)、

cctcct(SEQ ID NO:15)、

agccag(SEQ ID NO:16)、

ggaag(SEQ ID NO:17)、

gaagaag(SEQ ID NO:18)、

gttg(SEQ ID NO:19)、

ccgaa(SEQ ID NO:20)、

taaggag(SEQ ID NO:21)、

gaag(SEQ ID NO:22)或

ggctt(SEQ ID NO:23)。

靶向序列

[0081] 可以将esnRNA系统编程为包含靶向序列(TS)(也称为间隔子)。在一些方面,靶向序列是靶向一个或多个目的RNA的5'靶向序列(5'TS)(也称为间隔子)。在此上下文中,5'是关于snRNA插入片段的5'端,而不一定是关于包含一个或多个snRNA插入片段的整体载体构型。并且TS可以位于snRNA的5'端或附近。在可替代的实施方案中,一个或多个靶向序列(TS)可以位于snRNA构建体的3'位置或附近,从而产生3'靶向序列(3'TS),特别是如果snRNA构建体不是基于U7的snRNA。

[0082] 本公开文本的靶向序列(包括5'TS和3'TS)的长度可以在约1与约200个核苷酸之间。在一些方面,本公开文本的靶向序列的长度在约10与约150个核苷酸之间。在一些方面,本公开文本的靶向序列的长度在约10与约100个核苷酸之间。在一些方面,本公开文本的靶向序列的长度在约20与约60个核苷酸之间。在一些方面,本公开文本的靶向序列的长度是至少约10、20、30、40、50、60或约70个核苷酸。

[0083] 在一个例子中,可以通过用与目的靶标互补的序列替代组蛋白mRNA结合序列来编程U7 snRNA。在一些方面,本公开文本的esnRNA系统结合目的靶mRNA或前mRNA序列。本文所示的示例性esnRNA系统导致阻断或敲低微卫星重复扩增(用于治疗强直性肌营养不良(DM1)或亨廷顿病(HD))、六核苷酸重复扩增(用于治疗C9/ALS),导致剪接调节(用于治疗USH2A(2型厄舍综合征)),或导致靶向一个或多个外显子剪接增强子(ESE)以诱导外显子跳跃(用于治疗DMD,例如DMD外显子51跳跃)。在一个实施方案中,目的靶RNA是微卫星或六核苷酸重复RNA或非重复RNA。在另一个实施方案中,目的重复RNA选自CUG、CAG、GGGGCC和CCCCGG。在一个实施方案中,esnRNA包含靶向两个目的靶RNA(GGGGCC和CCCCGG)的靶向序列(TS)。在另一个实施方案中,所述两个目的靶RNA是微卫星重复RNA和非重复RNA。在另一个实施方案中,非重复RNA是重复RNA的侧翼序列。

[0084] 在一些实施方案中,本公开文本的esnRNA靶向编码DMD基因的前mRNA或mRNA序列。DMD是编码蛋白质抗肌萎缩蛋白的基因。DMD中的突变与迪谢内肌营养不良相关。在一些实施方案中,由本公开文本的esnRNA组合物靶向的DMD RNA序列是外显子51DMD RNA序列。

[0085] 结合DMD的靶向序列可以包含与下表中所示的以下核苷酸序列中的一个或多个至

少65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

靶向DMD外显子51RNA的序列

UID	靶向序列	SEQ ID NO:
z38	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCA	206
z42	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACA	207
融合序列		
z70	catacCTTCTGCTTGATGATCATCTCGCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGctaaa	208
z71	catacCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTGCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG	209
z72	catacCTTCTGCTTGATGATCATCTCGGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCctg	210
z73(z38/z42)	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACA	211
z74	AACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACA	212
z75	AACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTGCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG	213
z76	TTTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	214
Z187 (z42/z38)	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACATACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCA	215
z230	CGAGATGATCATCAAGCAGAAGgtatgCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGctaaa	216
z231	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGctaaaTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCA	217
z232	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCACACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGctaaa	218
z233	GTCTGAGTAGGAGctaaaatattttgggTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCA	219
z234	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTCTGAGTAGGAGctaaaatattttggg	220
z235	GTCTGAGTAGGAGctaaaatattttgggtttttctcatacCTTCTGCTTGAT	221
z237	cCTTCTGCTTGATGATCATCTCGGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGc	222
z238	cCTTCTGCTTGATGATCATCTCGCCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGc	223
z239	cCTTCTGCTTGATGATCATCTCGCAGTCTGAGTAGGAGctaaa	224
z240	ctcatacCTTCTGCTTGATGGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGc	225
z241	ctcatacCTTCTGCTTGATGCCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGc	226
z242	ctcatacCTTCTGCTTGATGCAGTCTGAGTAGGAGctaaa	227

[0086] 在一个实施方案中,作为如上表中所示的融合物的TS可以是包含在融合序列内的单个TS序列。

[0087] 在另一个实施方案中,靶向序列(TS)靶向两个或更多个目的RNA。在另一个实施方案中,靶向两个或更多个目的RNA的TS是靶向相同前mRNA分子的不同序列。在一个实施方案中,间隔子或TS是融合序列。在另一个实施方案中,融合序列是靶向DMD外显子51的间隔子,

其中所述融合序列示于上表中。

[0088] 在一些实施方案中,靶向CUG重复的序列包含以下核酸序列:CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG(SEQ ID NO:165)。

[0089] 在一些实施方案中,靶向CAG重复的序列包含以下核酸序列:CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG(SEQ ID NO:167)。

Sm结合结构域

[0090] 本文公开的esnRNA系统利用Sm结合结构域(SmBD)。围绕Sm结合结构域(SmBD)组装以形成snRNP的Sm蛋白质环包含SmB/B'、SmD1、SmD2、SmD3、SmE、SmF和SmG。U7 Sm结合位点募集内源RNA结合因子,并且可以被非U7 snRNA替代以使esnRNA更稳定。在一个实施方案中,SmBD选自U1、U2、U4和U5 snRNA。在另一个实施方案中,SmBD源自假snRNA。在另一个实施方案中,SmBD是包含SEQ ID NO:31(ATTTTT)的核苷酸序列。在另一个实施方案中,SmBD包含选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:32(AATTTTTGG)、SEQ ID NO:33(AATTTGTGG)、SEQ ID NO:34(AATTTGTGG)、SEQ ID NO:35(AATTTCTGG)、SEQ ID NO:36(GATTTTTGG)、SEQ ID NO:37(AATTTTTGA)、SEQ ID NO:38(AATTTTTTG)、SEQ ID NO:161(AATTTTTGGAGCA)和SEQ ID NO:163(AATTTTTGGAGTA)。

启动子序列

[0091] 本文公开的esnRNA系统包含来自U1-U12中的任一个的snRNA启动子。在一个实施方案中,snRNA启动子是U7启动子。在另一个实施方案中,U7启动子是人U7启动子(hU7)或小鼠U7启动子(mU7)。在另一个实施方案中,U7启动子是内源人U7启动子,所述内源人U7启动子包含SEQ ID NO:39:TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA。

[0092] 在一个实施方案中,snRNA启动子是U1启动子。在另一个实施方案中,U1启动子是人U1启动子或小鼠U1启动子。

[0093] 在另一个实施方案中,snRNA启动子驱动snRNA插入片段的拷贝。在另一个实施方案中,每个snRNA插入片段的拷贝是相同的。在另一个实施方案中,不同的snRNA启动子驱动snRNA插入片段的每个拷贝。在一个实施方案中,2x snRNA包含驱动snRNA插入片段的一个拷贝的小鼠U7启动子和驱动snRNA插入片段的另一拷贝的小鼠U1启动子。

[0094] 在其他方面,snRNA启动子是PolII启动子或PolIII启动子。在其他方面,snRNA启动子包含与以下示例性启动子表中列出的启动子和/或启动子序列至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

示例性启动子	启动子序列
hU1	AAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAGG GAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGA GTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGA CAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTG CTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGA TCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCG CGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTCGGGGC AGAGGCacaacgtttc （SEQ ID NO: 40）
hU2	CCACGCCCTCTGTGAAAGGGCGGGGCATGCAAATTCGAAATGAAAGCCCGGGAA CGCCGGAAGAAGCACGGGTGTAAGATTTCCCTTTTCAAAGGCAGAGAATAAGAA ATCAGCCCGAGAGTGTAAGGGCGTCAATAGCGCTGTGGACGAGACAGAGGGAAT GGGGCAAGGAGCGAGGCTGGGGCTCTCACCGCGACTTGAATGTGGATGAGAGTG GGACGGTGACGGCGGGCGCGAAGGCGAGCGC （SEQ ID NO: 41）
hU4	TTCGCAGTCTCTGAATTAAGTCTATTAGCATGTTCCTCCCATAGTGCTTTGCTTCAT ATCAACAAAAACCTAGCTAAGTGAAATCAGCAACGATATGCAGAAACCACCTAC GCAGGTCACAAACATCTTTCTATGATTGTATAATTTTCAAGCAAGCAATAAGTGAA GATTTTTCCATAGGCCCTAAACTCACCTTTGCGAAATAGGAAGCTGGTTTATTGGG AGTGATGAGCAGGGGGCGTAACAAATT （SEQ ID NO: 42）
hU5	GCAGCAAGGCCTCCACTTCACCCCCTAAAGGTTGCCCCAAGAGCACCGTGTGAC TGCTAAGGTATTTCCGGAGTCTAAAGACGATTATTCAGGTCTCATTTGCATACCCA TAATACACTGCAAACAGTATTTTTTTCGGAAAAACATTTATATATTGCTTGACATTT TTAAGTATGAGAATTTTGCATGCAGAATTTTTTTGTATAAACTTTCTCAGGTAGTAA CCCTTGGGATTAGTAGACACCATCAGTGTACTAGGAATTGCAGTTACCCGAAAAT TGAGTTACAGAAGTAACTGGT （SEQ ID NO: 43）
hU6	Gtttattacagggacagcagagatccagtttggttaattaaggtaccgagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatac aaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttg ggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtg gaaaggacgaaacacc （SEQ ID NO: 44）

h7sk	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAAC AGCCGGAAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACTTTAGCATTTTGGGAATAAATGATAT TTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTAAATTTCCTGCTGAAGCTCTAGTACGA TAAGTAACTTGACCTAAGTGTAAAGTTGAGATTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGT GCGCCGCCTGGGTACCTC （SEQ ID NO: 45）
tRNA(Val)	CAGGACTAGTCTTTTAGGTCAAAAAGAAGAAGCTTTGTAACCGTTGGTTTCCGTA GTGTAGTGGTTATCACGTTCGCCTAACACGCGAAAGGTCCCCGGTTCGAAG （SEQ ID NO: 46）
mU1	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCCTACATTTAT GAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACAGAACAAAAAACAAAG CGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGTATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCG GGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGTCACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAA TTCAGGTGCAAACTGGGAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGT GTAGTTTTGGAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGG AGCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTACCGTAA CTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGGCCACGCAACTC （SEQ ID NO: 47）
mU7+ extra 3’	TaacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcacaaactcaagaa acgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattcacatatcagtggaggggtgtgga aatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggctcgctacagacgcacttccgcaa （SEQ ID NO: 48）
mU7	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcacaaactcaagaa acgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattcacatatcagtggaggggtgtgga aatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggctcgctacagacgcacttccgc（SEQ ID NO: 151）
hU7	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGC TGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTT CGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTA CTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGT CACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAA ACACATACGCA （SEQ ID NO: 39）
mU5	TGCCAACAGCTTTGAAATCCTCTGTGCTCTTGTGCCAATCCCACCCTCAGAACAG GGAGTCTGTCGGTTATGTTTTCGTCCTTTACAGTTCTTCGCCGTCTAATCCATTGG AAACCTCCTTTATTTAAAGGAAACCGTGTCCAAATTCAGTGTACAGAGGTGCAAA CCTCCGCCCCGCTCCTTGTAGGAAGCCCACGGGAACTGGGCCAATCGGACGGCG CTTACTCGGCTCATTTACATACCCATAACACACCGCGGCTAATGCAAATATTTTCGT GAAAAGATCTTCCATTACTCGAAGTTTTAAAACTAAAAACAAAATATTATTTCAAA AGATCATGAAGAAATTTCTGTCGGTAACAGCAGTTTCAATTGATAAATCACCATCA CTTATCTAGGAGGTTCTGTTACTCTAGAAGTGAATTAAGCAGGACAGCTGT （SEQ ID NO: 152）
mU2	Gggcggggcatgcaaataactgctctgtggaactctgggagcaaaaacaaaaaactgcaaccaaaacttctcggcctccttgaatct tacaggcttttcgtggcgtaaaggtggtgtactcaatgaagaggagagtctgtgttggctgcatgtttgagtcggttggttggtgactgt gaatTAAAGGTGTGGtcggtgttgagtgtatggggcgtgtgggcgtagttcggt（SEQ ID NO: 153）

mU6	cgacgccgccatctctaggcccgcgccggccccctcgcacagacttgtgggagaagctcggctactcccctgccccggttaatttg catataatatttcctagtaactatagaggcttaatgtgcgataaaagacagataatctgttctttttaatactagctacattttacatgatagg cttggatttctataagagatacaaatactaaattattattttaaaaaacagcacaaaaggaaactcaccctaactgtaaagtaattgtgtgtt ttgagactataaatatcccttggagaaaagccttgttt (SEQ ID NO: 154)
mH1	CATgCAAATTACGCGCTgTGCTTTGTGGGAAATCACCCTAAACGTAAAATTTATTCC TCTTTcGAGCCTTATAGTGGcGGCCGGTCTACACCCTAAA (SEQ ID NO: 155)

终止子序列

[0095] 本文公开的esnRNA系统包含snRNA下游终止子(DT)。下游终止子定义转录单位(如esnRNA或snRNA)的末端。在另一个实施方案中,snRNA DT是U7 DT,所述U7 DT包含:

CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTA TGGGTAGTTTTGGT GGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG(SEQ ID NO:49)。

[0096] 在一个实施方案中,esnRNA包含eSL、一种或多种启动子、TS、SmBD、5'ISD和DT。在一个方面,将启动子和DT组合混合并匹配。

[0097] 在另一个实施方案中,DT选自以下示例性DT表中列出的示例性DT和/或DT序列:

示例性 DT	DT 序列
hU1	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT (SEQ ID NO: 50)
hU2	CCGGGGATACAACGTGTTTCCTAAAAGTAGAGGGAGGTAAGAGACGGTAG (SEQ ID NO: 51)
hU4	CTGAATTTTCTTGCAGTTGAACAACAGAGGCTTTTTTTGTGTGTGTGGGG (SEQ ID NO: 52)
hU5	ATATGTGGTAATCCAACAATAGAAATTATTTTTAAGTTTGTGTGTTCCTT (SEQ ID NO: 53)
hU6	TTTTTT (SEQ ID NO: 54)
h7sk	TTTTTT SEQ ID NO: 55)
tRNA(Val)	TTTTTT (SEQ ID NO: 56)
mU1	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGTTATTAGGT TTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACGTAGTGTTCATTTTAG CCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGCATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGT AAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTCAGTCTGAGAGCA (SEQ ID NO: 57)
mU7+	Cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatccttctctggtttcc taggaaacgcgtatgtgtac (SEQ ID NO: 58)
mU7	Cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatccttctctggtttcc taggaaacgcgtatgtg (SEQ ID NO: 156)
hU7	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGG GTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

hU7	CTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTA GTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 234)
mU5	CCACATTTTGTGTTTAAAAATAGAAATATTTAAGTGAGATCAGTTTAAATCTGCTT TATCTAGGGTGTCTAACTGCTTGCATCTTTTTAACTTTTCCTTATTTGTGAGAAGG TCTGTAAAACTTATTATATGTTAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCCAGAA GAGGGATTCAGATCACCTTACAGATGGTTTTGA (SEQ ID NO: 157)
mU2	CCCTCTGGGGAgtaaagttggttttaaagtcagagcatggtgattgtagggcagtccaacttttttaaatatgctgtg (SEQ ID NO: 158)
mU6	TTTTTT (SEQ ID NO: XX)
mH1	TTTTTT (SEQ ID NO: XX)

[0098] 在一个实施方案中,将esnRNA在AAV载体中递送。

[0099] 在一些实施方案中,AAV载体包含esnRNA的多个拷贝。在一些实施方案中,esnRNA的多个拷贝是esnRNA的2、3或4个拷贝(2x、3x或4x)。在一些实施方案中,esnRNA的多个拷贝是esnRNA的4个或更多个拷贝。

[0100] 在一些实施方案中,esnRNA的多个拷贝中的每个esnRNA被源自snRNA下游的人非编码基因组序列的核酸缓冲序列隔开。在一个实施方案中,缓冲序列源自U7下游的人基因组序列。

[0101] 在一个实施方案中,缓冲序列选自以下核酸序列:

缓冲物1(30bp)CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA(SEQ ID NO:24)、

缓冲物2(30bp)

GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC(SEQ ID NO:25)、缓冲物3(30bp)TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG(SEQ ID NO:26)及其组合。

[0102] 在另一个实施方案中,缓冲序列选自以下核酸序列:

缓冲物1(100bp)

CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATCT

CAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG(SEQ ID NO:27)、

缓冲物2(100bp)

TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTAACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTC(SEQ ID NO:28)及其组合。

[0103] 在另一个实施方案中,缓冲序列选自以下核酸序列:

缓冲物1(500bp)

CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAGTCATTTTCCAATGCTCCTACACACCCCTTCTTCACAATCCCCAACAAATCTGAGGCTGGAACTTGGTACCATAACAATCATTACATTATTTCACCAGAAGTACACCTTGCCTGGAAGATTGGCATTATAGCATCTTCTAACATTGTGAAAGTTAGTGACCAATGAGGAGATCCAAGTCAGTTCCAGTTGGATTTCTCTATACTCTATAATAAATATATATGGTGTCTTCAACAATAGGACTTTGCCATCCAGTGATGCTAAAAATCAATAACAATGGCAATAACCTGCCCTGTTTGGAAAGCCTCTGGCTTCCATGACTAACAATTCAAGGCAGGTCTCCTATACCTAGTACTGAGATTTTTATTTGATAAACTATATCTTCTGGGAGGAGAAGCATTGT(SEQ ID NO:29)、缓冲物2(500bp)

TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTAACAACTGATGCCCATCC TGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTCTCTGAAATAGTTTTGCTTTCTCTCTCTAGGTCTGTTCTATACTC CTAACTCTCCAGGAGTTTACAAGGAATAAAATCTCTTCCAAATGCTTTCTGTTGCAACAACTGGACCATACTGAAA GCTGAGGCCCACAATTGCAATCTAGGTTAGCAGGTAATCATTGTTGGTGAGGTCCTCCCTTTCCCCAGGCTCGTGT TTGTATTGGGGAGCAGGAAATTTTTGCTAGAGCAGCACTGCCATCTCTCTACACTCCACCTGATTGGTGGGATGGA CCAGAGAAATGGACATTCCCAACACAGTCCCTCCTTTCACATCTGCTCACCTGCCCACAGGATACTTTCCACCATG CATACTGGGCTCTGCACCAACCATTCAGCAGTGATGAAGAGGAAACTTGAAC(SEQ ID NO:30)和/或其组合。

[0104] 100bp和500bp缓冲物1序列源自始于小家鼠U7假基因8下游100bp的序列(定位14号染色体:4,409,359-4,409,421反向链。GRCm39:CM001007.3)。100bp和500bp缓冲物2序列源自始于人U7假基因5下游130bp的序列(X染色体:140,451,148-140,451,208正向链。GRCh38:CM000685.2)。两个100bp缓冲物都是相应500bp缓冲物的前100bp。30bp缓冲物1、2和3是“100bp缓冲物1”内的连续30bp序列,位于小家鼠U7假基因8的下游。选择这些下游序列是由于序列内或附近缺乏任何已知的调节位点或基因(使用Gencode/Ensembl),除了缺乏重复序列之外,总缓冲物的GC含量为40%-60%,缓冲物两端20bp区域的GC含量为40%-60%,并且序列复杂性最小。

esnRNA序列

[0105] 本公开文本的示例性esnRNA序列可以包含本文描述的esnRNA特征的任何组合。在一些方面,esnRNA包含与以下esnRNA表中列出的esnRNA至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

本公开文本的esnRNA序列

ID	描述	靶重复或基因符号	SEQ ID NO:	序列
	u7 snRNA CUG	CUG	65	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggctccttaccggaaagcc
	u7 snRNA NT	非靶向	66	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
	u7 snRNA CAG	CAG	67	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTGCTGCTGCTGCTGAATTTTTGGAGTAggctttctg gctccttaccggaaagcc
	靶向抗肌萎缩蛋白外显子51的z38/42 esnRNA	DMD外显子51	68	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTA ACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTT TGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc

	z42 esnRNA	DMD 外显子 51	69	ggagtGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
	z38 esnRNA	DMD 外显子 51	70	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20031	U7CUGx15-U1 Sm 位点_U7 终止优化 sl	CUG	71	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTGTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20032	U7CUGx15-Sm 突变体 1_U7 终止优化 sl	CUG	72	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTCGAGTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20033	U7CAGx15-无 Sm_U7 终止优化 sl	CUG	73	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20034	U7knt-U1 Sm 位点_U7 终止优化 sl	非靶向	74	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTGTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20035	U7knt-Sm 突变体 1_U7 终止优化 sl	非靶向	75	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGATCGAGTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20036	U7knt-无 Sm_U7 终止优化 sl	非靶向	76	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20037	U7CAGx15-U1 Sm 位点_U7 终止优化 sl	CAG	77	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATTTGTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20038	U7CAGx15-Sm 突变体 1_U7 终止优化 sl	CAG	78	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTCGAGTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20039	U7CAGx15-无 Sm_U7 终止优化 sl	CAG	79	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20040	U7CAGx5-U1 Sm 位点_U7 终止优化 sl	CAG	80	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGAATTTGTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20041	U7CAGx5-Sm 突变体 1_U7 终止优化 sl	CAG	81	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGTCGAGTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20042	U7CAGx5-无 Sm_U7 终止优化 sl	CAG	82	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 20056	U7-z38-delSm	DMD	83	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAggctttctggctccttaccggaaagcc

sR2 20087	具有 ISD 的 U7 5'SL；非靶向 NT（未制备）	非靶向	84	GTTCCCGAAGTAACCCTTCGGGAACggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc

sR20088	不具有 ISD 的 U7 5'SL；非靶向 NT（未制备）	非靶向	85	GTTCCCGAAGTAACCCTTCGGGAACTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20089	不具有 ISD 的 U7 5'吻式 SL；非靶向 NT（未制备）	非靶向	86	GTTCCCGAAGgagtCTTCGGGAACTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20090	不具有 ISD 的 U7 5'GC 夹；非靶向 NT（未制备）	非靶向	87	GGGCCCTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20091	不具有 ISD 的 U7 5'三股螺旋；非靶向 NT（未制备）	非靶向	88	GAGAAGATTCGTCTTCTCTCTCTCTTCTTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20092	具有 ISD 的 U7 5'SL；CUGx15	CUG	89	GTTCCCGAAGTAACCCTTCGGGAACggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20093	不具有 ISD 的 U7 5'SL；CUGx15	CUG	90	GTTCCCGAAGTAACCCTTCGGGAACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20094	不具有 ISD 的 U7 5'吻式 SL；CUGx15	CUG	91	GTTCCCGAAGgagtCTTCGGGAACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20095	不具有 ISD 的 U7 5'GC 夹；CUGx15	CUG	92	GGGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20096	不具有 ISD 的 U7 5'三螺旋；CUGx15	CUG	93	GAGAAGATTCGTCTTCTCTCTCTCTTCTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20004	U7-nt	非靶向	94	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR20097	U7 可替代 ISD SEQID16 非靶向 nt1	非靶向	95	cctctTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctgggaggttaccggaaagcc
sR20098	U7 可替代 ISD SEQID17 非靶向 nt1	非靶向	96	ggaggtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggcctccttaccggaaagcc
sR20099	U7 可替代 ISD SEQID18 非靶向 nt1	非靶向	97	cctcctTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggggaggttaccggaaagcc

sR2 201 00	U7 可替代 ISD SEQID19 非靶 向 nt1	非靶向	98	agccagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAAT TTTTGGAGTAggctttctggctggctaccggaaagcc
sR2 201 01	U7 可替代 ISD SEQID20 非靶 向 nt1	非靶向	99	ggaagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAAT TTTTGGAGTAggctttctggcttccccggaaagcc
sR2 201 02	U7 可替代 ISD SEQID21 非靶 向 nt1	非靶向	100	gaagaagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAA TTTTTGGAGTAggctttctggcttcttcccggaaagcc
sR2 201 03	U7 可替代 ISD SEQID22 非靶 向 nt1	非靶向	101	gttgTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTT TTGGAGTAggctttctggcaacttaccggaaagcc
sR2 201 04	U7 可替代 ISD SEQID23 非靶 向 nt1	非靶向	102	ccgaaTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATT TTTGGAGTAggctttctggttcggtaccggaaagcc
sR2 201 05	U7 可替代 ISD SEQID24 非靶 向 nt1	非靶向	103	taaggagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAA TTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
sR2 201 06	U7 可替代 ISD SEQID25 非靶 向 nt1	非靶向	104	gaagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATT TTTGGAGTAggctttctggcttcttcccggaaagcc
sR2 201 07	U7 可替代 ISD SEQID26 非靶 向 nt1	非靶向	105	ggcttTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATT TTTGGAGTAggctttctggaagccttaccggaaagcc
sR2 201 08	U7 可替代 ISD SEQID27 非靶 向 nt1	非靶向	106	gaagTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATT TTTGGAGTAggctttctggcttcttaccggaaagcc
sR2 200 10	U7-CUGx15	CUG	107	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggctccttaccggaaagcc
sR2 201 09	U7 可替代 ISD SEQID16 CUGx15	CUG	108	cctctCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggcttt ctgggaggttaccggaaagcc
sR2 201 10	U7 可替代 ISD SEQID17 CUGx15	CUG	109	ggaggtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggcctccttaccggaaagcc
sR2 201 11	U7 可替代 ISD SEQID18 CUGx15	CUG	110	cctcctCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggggaggttaccggaaagcc
sR2 201 12	U7 可替代 ISD SEQID19 CUGx15	CUG	111	agccagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAgg ctttctggctggctaccggaaagcc
sR2 201 13	U7 可替代 ISD SEQID20 CUGx15	CUG	112	ggaagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggcttccccggaaagcc

sR2201 14	U7 可替代 ISD SEQID21 CUGx15	CUG	113	gaagaagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAgg ctttctggcttcttcccggaaagcc
sR2201 15	U7 可替代 ISD SEQID22 CUGx15	CUG	114	gttgCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggcttt ctggcaacttaccggaaagcc
sR2201 16	U7 可替代 ISD SEQID23 CUGx15	CUG	115	ccgaaCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggct ttctggttcggtaccggaaagcc
sR2201 17	U7 可替代 ISD SEQID24 CUGx15	CUG	116	taaggagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAgg ctttctggctccttaccggaaagcc
sR2201 18	U7 可替代 ISD SEQID25 CUGx15	CUG	117	gaagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggcttt ctggcttcttcccggaaagcc
sR2201 19	U7 可替代 ISD SEQID26 CUGx15	CUG	118	ggcttCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggcttt ctggaagccttaccggaaagcc
sR2201 20	U7 可替代 ISD SEQID27 CUGx15	CUG	119	gaagCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggcttt ctggcttcttaccggaaagcc
	DMD z42/38 反向融合物	DMD 外显子 51	179	ggagtGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAAC ATACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAaATTTTT GGAGcaggttttctgacctccgtcggaaaacccct
	DMD z38/42 正向融合物	DMD 外显子 51	180	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTA ACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAaATTTT TGGAGcaggttttctgacctccgtcggaaaacccct
	无 CCU 尾的 z42/38 反向融合物	DMD 外显子 51	181	ggagtGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAAC ATACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAaATTTTT GGAGcaggttttctgacctccgtcggaaaacc
	无 ISD 无 eSL 的 z38/42 正向融合物	DMD 外显子 51	182	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCA CAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAaATTTTTGGA Gcaggttttctgacttcggtcggaaaacccct
	具有 ISD 和 eSL 的 z38/42 正向融合人环	DMD 外显子 51	183	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTA ACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTT TGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc
	具有 ISD 和 eSL 以及添加的 CCU 尾的	DMD 外显子 51	184	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTA ACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTT TGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcccct

	具有 5' ISD 和 eSL 的 Z38/z42 正向融合长小鼠环	DMD 外显子 51	185	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTA ACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAaATTTT TGGAGcaGgttttctgacctccttcggtcggaaaacccct

载体

[0106] 在重组表达载体的背景下,术语“可操作地连接”旨在意指当将载体引入宿主细胞中(或与宿主细胞接触)时,杂合启动子以允许核苷酸序列在例如宿主细胞中表达的方式连接至NOI。

[0107] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,载体包含工程化snRNA。在一些实施方案中,治疗性snRNA是在单个或单一载体中。

[0108] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,能够靶向毒性CAG、CUG、GGCCCC、CCGGG或GGCCC+CCGGGG RNA重复(或其侧翼序列)的RNA结合snRNA系统是在单个载体中。在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,靶向RNA的系统能够靶向目的非重复RNA。在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,靶向RNA的系统能够靶向一个或多个DMD序列。在一些方面,snRNA系统能够靶向多个(即,两个或更多个)目的RNA。在一些实施方案中,所述两个或更多个目的RNA可以是相同的前mRNA分子,但是前mRNA分子内的不同序列。

[0109] 一种类型的载体是“质粒”,其是指可以在其中插入(如通过标准分子克隆技术)另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中病毒来源的DNA或RNA序列存在于载体中以包装成病毒(例如逆转录病毒、复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、复制缺陷型腺病毒和腺相关病毒)。病毒载体还包含病毒携带的用于转染至宿主细胞中的多核苷酸。在一些实施方案中,载体是慢病毒(如整合缺陷型慢病毒载体)或腺相关病毒(AAV)载体。载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如像具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体以及其他载体,例如像非附加体哺乳动物载体),在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。

[0110] 在一些实施方案中,载体(例如像表达载体)能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。常见的表达载体通常呈质粒的形式。在一些实施方案中,重组表达载体包含本文提供的核酸,例如像适合于在宿主细胞中表达蛋白质的形式的esnRNA。重组表达载体包含一个或多个调节元件,所述一个或多个调节元件是基于要用于表达的宿主细胞选择的,所述一个或多个调节元件可操作地连接至待表达的核酸序列。在重组表达载体中,“可操作地连接”旨在意指目的核苷酸序列与一个或多个调节元件以允许所述核苷酸序列表达(例如像在体外转录/翻译系统中或将载体引入宿主细胞时在宿主细胞中)的方式连接。载体的某些实施方案取决于这样的因素,如待转化的宿主细胞的选择以及所需的表达水平。可以将载体引入宿主细胞中,从而产生由如本文所述的核酸编码的转录物、蛋白质或肽(包括融合蛋白或肽),例如像snRNA、CRISPR转录物、蛋白质、酶、其突变体形式、其融合蛋白等。

病毒载体

[0111] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自逆转录病毒的序列。在一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自慢病毒的序列。在一些实施方案中,病毒载体包含分离自或

源自腺病毒的序列。在一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自腺相关病毒(AAV)的序列。在一些实施方案中,病毒载体无复制能力。在一些实施方案中,病毒载体是分离的或重组的。在一些实施方案中,病毒载体是自身互补的。

腺相关病毒载体

[0112] 如本文所用的“AAV载体”是指这样一种载体,所述载体包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:一个或多个核酸分子和一个或多个AAV反向末端重复序列(ITR)。在一些方面,核酸分子编码本公开文本的esnRNA。当存在于提供rep和cap基因产物的功能的宿主细胞中(例如通过转染宿主细胞)时,此类AAV载体可以被复制并包装到感染性病毒颗粒中。在一些方面,AAV载体含有启动子、可编码至少一种蛋白质或RNA的至少一种核酸、和/或包装到感染性AAV颗粒中的侧翼ITR内的增强子和/或终止子。衣壳化的核酸部分可以称为AAV载体基因组。含有AAV载体的质粒还可以含有用于制造目的的元件,例如抗生素抗性基因、复制起点序列等,但是这些元件没有被衣壳化,因此不形成AAV颗粒的一部分。

[0113] 在一些方面,AAV载体可以包含至少一种编码本公开文本的esnRNA组合物的核酸。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个调节序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个AAV反向末端(ITR)序列。在一些方面,AAV载体可以包含第一ITR序列和第二ITR序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个启动子序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个增强子序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个终止子序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个聚A序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个接头序列。在一些方面,AAV载体可以包含至少一个缓冲序列。在一些方面,本公开文本的AAV载体可以包含至少一个核定位信号或核输出信号和/或两者。

[0114] 在一些方面,AAV载体可以包含第一AAV ITR序列、启动子序列、esnRNA序列、终止子序列和第二AAV ITR序列。在一些方面,AAV载体可以在5’至3’方向上包含第一AAV ITR序列、启动子序列、esnRNA序列、终止子序列和第二AAV ITR序列。

[0115] 在一些方面,AAV载体可以包含第一AAV ITR序列、第一启动子序列、第一esnRNA序列、第二启动子序列、第二esnRNA序列和第二AAV ITR序列。在一些方面,AAV载体可以包含第一AAV ITR序列、第一启动子序列、第一esnRNA序列、第二启动子序列、第二esnRNA序列、第三启动子序列、第三esnRNA序列和第二AAV ITR序列。在一些方面,AAV载体可以包含第一AAV ITR序列、第一启动子序列、第一esnRNA序列、第二启动子序列、第二esnRNA序列和第二AAV ITR序列。在一些方面,AAV载体可以包含第一AAV ITR序列、第一启动子序列、第一esnRNA序列、第二启动子序列、第二esnRNA序列、第三启动子序列、第三esnRNA序列、第四启动子序列、第四esnRNA序列和第二AAV ITR序列。

[0116] 如本文所用的术语“腺相关病毒”或“AAV”是指与此名称相关并且属于细小病毒科(Parvoviridae)依赖细小病毒属(Dependoparvovirus)的一类病毒的成员。腺相关病毒是在细胞中生长的单链DNA病毒,其中某些功能由共同感染的辅助病毒提供。AAV的一般信息和综述可以在例如Carter,1989,Handbook of Parvoviruses,第1卷,第169-228页和Berns,1990,Virology,第1743-1764页,Raven Press,(New York)中找到。完全可以预期,这些综述中描述的相同原则将适用于在综述发表日期之后表征的另外的AAV血清型,因为众所周知,各种血清型在结构和功能上甚至在遗传水平上都非常密切相关。(参见例如,Blacklowe,1988,Parvoviruses and Human Disease,第165-174页,J.R.Pattison编辑;和

Rose,Comprehensive Virology 3:1-61(1974))。例如,所有AAV血清型显然都展现出由同源rep基因介导的非常相似的复制特性;并且都带有三种相关的衣壳蛋白,如在AAV2中表达的那些。异源双链分析进一步表明了相关性的程度,所述分析揭示了血清型之间沿基因组长度的广泛的交叉杂交;以及在末端对应于"反向末端重复序列"(ITR)的类似自退火区段的存在。相似的感染性模式也表明每种血清型中的复制功能都是在相似的调节控制之下。已知此病毒的多种血清型适用于基因递送;所有已知的血清型均可以感染来自各种组织类型的细胞。

[0117] AAV具有独特的功能,使其具有作为例如在基因疗法中用于将外来DNA递送到细胞的载体的吸引力。培养物中细胞的AAV感染是非致细胞病变的,并且人和其他动物的自然感染是沉默的且无症状的。此外,AAV感染许多哺乳动物细胞,从而有可能在体内靶向许多不同的组织。此外,AAV转导缓慢分裂细胞和非分裂细胞,并且可以在这些细胞的整个生命周期中作为有转录活性的核附加体(染色体外元件)基本上持续存在。将AAV前病毒基因组作为克隆的DNA插入质粒中,这使得重组基因组的构建可行。此外,因为指导AAV复制和基因组衣壳化的信号包含在AAV基因组的ITR内,所以内部约4.3kb的基因组的一些或全部(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)可以被外来DNA替代以产生AAV载体。可以提供呈反式的rep和cap蛋白。AAV的另一个重要特征是它是一个极其稳定和强健的病毒。它很容易承受用于灭活腺病毒的条件(56℃至65℃持续数小时),使得冷藏保存AAV不那么重要。AAV甚至可以被冻干。最后,AAV感染的细胞对重复感染没有抵抗力。

[0118] 本发明的重组AAV(rAAV)基因组包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:编码至少一个esnRNA的核酸分子和在所述核酸分子侧翼的一个或多个AAV ITR。假型化rAAV的生产披露于例如WO 2001083692中。还考虑了其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见例如,Marsic等人,Molecular Therapy,22(11):1900-1909(2014)。各种AAV血清型的基因组的核苷酸序列是本领域已知的。

[0119] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自腺相关病毒(AAV)的序列。在一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11或AAV12的AAV反向末端重复序列或衣壳序列。在一些实施方案中,AAV血清型是AAVrh.74。在一个实施方案中,AAV载体包含经修饰的衣壳。在一个实施方案中,AAV载体是AAV2-Tyr突变体载体。在一个实施方案中,AAV载体包含在对应于野生型AAV2的位置Tyr252、Tyr272、Tyr275、Tyr281、Tyr508、Tyr612、Tyr704、Tyr720、Tyr730或Tyr673中的表面暴露的酪氨酸残基的位置处具有非酪氨酸氨基酸的衣壳。还参见WO 2008/124724,以其整体并入本文。在一些实施方案中,AAV载体包含工程化衣壳。包含工程化衣壳的AAV载体包括但不限于AAV2.7m8、AAV9.7m8、AAV22tYF和AAV8 Y733F。在一些实施方案中,衣壳是泛素化抗性衣壳。在另一个实施方案中,泛素化衣壳是包含酪氨酸(Y)和丝氨酸(S)突变的AAV2衣壳。在另一个实施方案中,AAV2衣壳包含Y、S和苏氨酸(T)突变。在另一个实施方案中,AAV2衣壳包括但不限于AAV2衣壳突变体,如T455V、T491V、T550V、T659V、Y444+500+730F和Y444+500+730F+T491V。在一些实施方案中,病毒载体无复制能力。在一些实施方案中,病毒载体是分离的或重组的(rAAV)。在一些实施方案中,病毒载体是自身互补的(scAAV)。在一些实施方案中,病毒载体是单链的(ssAAV)。

AAV ITR序列

[0120] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,AAV反向末端重复序列可以包含本领域已知的任何AAV ITR序列。在一些方面,AAV ITR序列可以包含以下或由以下组成:AAV1 ITR序列、AAV2 ITR序列、AAV3 ITR序列、AAV4 ITR序列、AAV5 ITR序列、AAV6 ITR序列、AAV7 ITR序列、AAV8 ITR序列、AAV9 ITR序列、AAV10 ITR序列、AAVrh10 ITR序列、AAV11 ITR序列、AAV12 ITR序列、AAV13 ITR序列或AAVrh74 ITR序列。

[0121] 在一些方面,ITR序列可以包含经修饰的AAV ITR序列。

[0122] 在一些方面,AAV ITR序列可以包含与SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:162或SEQ ID NO:166至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成。

[0123] 在一些方面,第一AAV ITR序列可以包含与SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:162或SEQ ID NO:166至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成,并且第二AAV ITR序列可以包含与SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:162或SEQ ID NO:166至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些方面,第一AAV ITR序列位于AAV载体的5'端。在一些方面,第二AAV ITR序列位于AAV载体的3'端。

[0124] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,病毒载体包含分离自或源自腺相关病毒(AAV)的序列。

[0125] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的载体是非病毒载体。在一些实施方案中,载体包含以下项或由以下项组成:纳米颗粒、胶束、脂质体或阳离子脂质体/DNA复合物、聚合物囊泡、多聚复合物或树状聚合物。在一些实施方案中,载体是表达载体或重组表达系统。如本文所用,术语"重组表达系统"是指用于表达通过重组形成的某些遗传物质的遗传构建体。

esnRNA载体构建体

[0126] 本公开文本的示例性esnRNA AAV载体可以包含本公开文本的一个或多个esnRNA序列。在一些方面,esnRNA AAV载体包含与以下esnRNA AAV载体表中列出的esnRNA AAV载体至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)相同的核酸序列,基本上由其组成或由其组成:

ID	描述	SEQ ID NO:
A02962	靶向 CUG 重复的 ss pAAV-4X U7(15XCUG) (P00369 的衍生物)	120
A02963	ss pAAV-4X U7(NT1) (P00369 的衍生物)	121
A02967	靶向 CUG 重复的 ss pAAV-4X U7(15XCUG)	122
A03079	靶向 CAG 重复的 sc pAAV-4X U7(15XCUG) (P00369 的衍生物)	123
A03080	sc pAAV-4X U7(NT1) (P00369 的衍生物)	124

A03081	靶向 CUG 重复的 sc pAAV-4X U7(15XCTG)	125
A02888	靶向 CUG 重复的 pAAV_1xU7(15xCUG)_CMV_GFP（无缓冲物）	126
A02889	pAAV_1xU7(NT1)_CMV_GFP（无缓冲物）	127
A02925	靶向 CAG 重复的 pAAV_1xU7(15xCAG)_CMV_GFP（无缓冲物）	128
A02894	靶向 CUG 重复的 pAAV_3xU7(15xCUG)_CMV_GFP（100 bp 缓冲物）	129
A02895	pAAV_3xU7(NT1)_CMV_GFP（100 bp 缓冲物）	130
A02968	靶向 CAG 重复的 pAAV_3xU7(15XCAG)_CMV_GFP（100 bp 缓冲物）	131
A02896	pAAV_3xU7(15xCUG)_CMV_GFP（500 bp 缓冲物）	132
A02897	pAAV_3xU7(NT1)_CMV_GFP（500 bp 缓冲物）	133
A02969	靶向 CAG 重复的 pAAV_3xU7(15xCAG)_CMV_GFP（500 bp 缓冲物）	134
A03980	pAAV(ssAAV) U7 启动子-esnRNA-z38/42-U7 终止-U1 启动子-esnRNAz38/z42-U1 终止	135
A03981	pAAV(ssAAV)_U7 启动子-esnRNA-z42-U7 终止-U1 启动子-esnRNA-z38-U1 终止	136
A04229	pAAV(scAAV) U7 启动子-esnRNA-z38/42-U7 终止-U1 启动子-esnRNAz38/z42-U1 终止-突变体 ITR	137
A04184	pAAV(ssAAV)-U7 启动子-z38/42-U7 终止_U1 启动子-z38/42-U1 终止_缓冲物组合序列填充	138
A03681	pAAV(ssAAV)-U7 启动子-zCUGx15-U7 终止_U1 启动子-zCUGx15-U1 终止-eCMV-eGFP	139
A03682	pAAV(ssAAV)-U1 启动子-zCUGx15-U1 终止_U7 启动子-zCUGx15-U7 终止-eCMV-eGFP	140
A03683	pAAV(ssAAV)-U7 启动子-znt-U7 终止_U1 启动子-znt-U1 终止-eCMV-eGFP	141
A03864	pAAV(ssAAV)-U7 启动子-zCUGx15-U7 终止_U1 启动子-zCUGx15-U1 终止（减去 GFP - 3681 的衍生物）	142
A04233	pAAV(scAAV)-U7 启动子-zCUGx15-U7 终止-U1 启动子-zCUGx15-U1 终止（A03681 的衍生物，scAAV 中无 GFP）	143
A04569	scAAVmU7p-z42/38 反向融合-mU7 终止_mU1p-z42/38 反向融合-mU1 终止；具有 5' ISD 和 eSL 的小鼠环	168
A04526	scAAVmU7p-z38/42 正向融合-mU7 终止_mU1p-z38/42 正向融合-mU1 终止；具有 5' ISD 和 eSL 的小鼠环	169
A04771	scAAVmU7p-z42/38 反向融合-mU7 终止_mU1p-z42/38 反向融合-mU1 终止；具有 5' ISD 和 eSL，无 CCU 尾的小鼠环	170
A04525	scAAV-mU7p-z38/42-mU7 终止_mU7p-z38/42-mU7 终止；无 ISD 无 eSL 的小鼠环	171
A04527	scAAV-mU7p-z38/42-mU7 终止_mU1p-z38/42-mU1 终止；无 ISD 无 eSL 的小鼠环	172
A04528	scAAV-mU7p-z38/42-mU7 终止_mU1p-z38/42-mU1 终止；具有 ISD 和 eSL 的人环	173

A04529	scAAV-mU7p-z38/42-mU7 终止_mU1p-z38/42-mU1 终止；具有 ISD 和 eSL 以及添加的 CCU 尾的人环	174
A04537	scAAV-mU7p-z38/42-mU7 终止_mU1 启动子- p-z38/42-mU1 终止；具有 5' ISD 和 eSL 的长小鼠环	175
A04233	scAAV-hU7-CUGx15-hU1-CUGx15（3'突变体 ITR）	176
A04234	scAAV-hU7-CUGx15-hU1-CUGx15（5'突变体 ITR）	177
A04390	scAAV 5'mITR hU7-CAG15X-hU1-CAGx15	178
A04530	scAAV-mU7p-CUGx15-mU1p-CUGx15；具有 ISD 和 eSL 的小鼠环	231
A04940	scAAV-mU7p-CUGx10-mU1p-CUGx10；具有 ISD 和 eSL 无 CCU 的小鼠环	232
A04533	scAAV-mU7p-CAGx15-mU1p-CAGx15；具有 ISD 和 eSL 的小鼠环	233

[0127] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04569(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:168。

A04569:scAAVmU7p-z42/38反向融合-mU7终止_mU1p-z42/38反向融合-mU1终止;具有5'ISD和eSL的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	Ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcacaaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattcacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z42/z38 反向融合间隔子	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACATACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCA（SEQ ID NO: 149）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环	ggttttctgacctccgtcggaaaaccccct（SEQ ID NO: 146）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctctctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCCTACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACAGAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGTATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGTCACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGGGAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTGGAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGAGCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGGCCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）

ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）

Z42/z38 反向融合间隔子	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACATACCTCCAACATCAAGG AAGATGGCA（SEQ ID NO: 149）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环	ggttttctgacctccgtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 146）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaa ggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg （SEQ ID NO: 60）

[0128] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04526(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:169。

A04526:scAAVmU7p-z82/42正向融合-mU7终止_mU1p-z38/42正向融合-mU1终止;具有5'ISD和eSL的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环	ggttttctgacctccgtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 146）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcct tctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）

ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）

Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环	ggttttctgacctccgtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 146）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaag gtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg （SEQ ID NO: 60）

[0129] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04771(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:170。

A04771:scAAVmU7p-z42/38反向融合-mU7终止_mU1p-z42/38反向融合-mU1终止;具有5'ISD和eSL无CCU尾的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctc agtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcac aaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattca catatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggct cgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z42/z38 反向融合间隔子	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACATACCTCCAACATCAAGGA AGATGGCA（SEQ ID NO: 149）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环，无 CCU	ggttttctgacctccgtcggaaaacc（SEQ ID NO: 148）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctt ctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）

小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCCT ACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACAGA ACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGTATT TTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGTCAC TATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGGGAAA AGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTGGAAAA ACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGAGCCAGT ACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTACCGTAA CTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGGCCACGCAA CTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z42/z38 反向融合间隔子	GTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACATACCTCCAACATCAAGGA AGATGGCA（SEQ ID NO: 149）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）短环，无 CCU	ggttttctgacctccgtcggaaaacc（SEQ ID NO: 148）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGTT ATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACGT AGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGCAT TGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTCAG TCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaagg tcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0130] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04525(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:171。

A04525:scAAV-mU7p-z38/42-mU7终止_mU7p-z38/42-mU7终止;无ISD无eSL的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctc agtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcac aaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattca catatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggct cgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（WT）短环	ggttttctgacttcggtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 145）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctt ctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）

小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcac aaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattca catatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggct cgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（WT）短环	ggttttctgacttcggtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 145）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctt ctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaagg tcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0131] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体AO4527(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:172。

AO4527:scAAV-mU7p-z38/42-mU7终止_mU1p-z38/42-mU1终止;无ISD无eSL的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctc agtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcac aaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattca catatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggct cgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（WT）短环	ggttttctgacttcggtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 145）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctt ctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCCT ACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACAGA ACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGTATT TTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGTCAC TATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGGGAAA AGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTGGAAAA ACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGAGCCAGT ACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTACCGTAA CTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGGCCACGCAA CTC（SEQ ID NO: 47）

Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA (SEQ ID NO: 150)
SMOPT	aATTTTTGGAGca (SEQ ID NO: 161)
小鼠茎环 (WT) 短环	ggttttctgacttcggtcggaaaacccct (SEQ ID NO: 145)
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGTT ATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACGT AGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGCAT TGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTCAG TCTGAGAGCA (SEQ ID NO: 57)
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaagg tcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0132] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04528(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:173。

A04528:scAAV-mU7p-z38/42-mU7终止_mU1p-z38/42-mU1终止;具有ISD和eSL的人环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt (SEQ ID NO: 162)
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa (SEQ ID NO: 48)
ISD	ggagt (SEQ ID NO: 12)
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA (SEQ ID NO: 150)
SMOPT	AATTTTTGGAGTA (SEQ ID NO: 164)
人茎环 (eSL)	ggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 1)
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcct tctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg (SEQ ID NO: 156)
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC (SEQ ID NO: 47)

ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGTTATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACGTAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGCATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTCAGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0133] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04529(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:174。

A04529:scAAV-mU7p-z38/42-mU7终止_mU1p-z38/42-mU1终止;具有ISD和eSL以及添加的CCU尾的人环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtcacaaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgattcacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctggctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
具有 CCU 尾的人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcccct（SEQ ID NO: 163）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcctctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）

小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
具有 CCU 尾的人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcccct（SEQ ID NO: 163）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaag gtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg （SEQ ID NO: 60）

[0134] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体AO4537(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:175。

AO4537:scAAV-mU7p-z38/42-mU7终止_mU1启动子-p-z38/42-mU1终止;具有5'ISD和eSL的长小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）

SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
具有 CCU 尾的小鼠茎环（eSL）（长延伸环）	Ggttttctgacctccttcggtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 147）
小鼠 U7 终止子	Cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcc ttctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
Z38/z42 正向融合间隔子	TACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACC AGAGTAACA（SEQ ID NO: 150）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
具有 CCU 尾的小鼠茎环（eSL）（长延伸环）	ggttttctgacctccttcggtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 147）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaag gtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0135] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04233(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:176。

A04233:scAAV-hU7-CUGx15-hU1-CUGx15(3'突变体ITR)

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5' ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）

人 U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGT GACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGG CTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAG TTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTG TTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTC ATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACG CA（SEQ ID NO: 39）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
靶向 CUG 重复的序列	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG （SEQ ID NO: 165）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U7 终止子	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG （SEQ ID NO: 49）
人 U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGG AAAAAGGGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGC AGATTGGTCGGTTGAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAG GCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGG CAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTGCTGCTTCACCACGAAGG AGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTG AGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGC GGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTG TCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG （SEQ ID NO: 165）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U1 终止子	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTT TT（SEQ ID NO: 50）
3'突变体 ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA AAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGA（SEQ ID NO: 61）

[0136] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04234(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列编码SEQ ID NO:177。

A04234:scAAV-hU7-CUGx15-hU1-CUGx15(5'突变体ITR)

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5'突变体 ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
人 U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U7 终止子	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
人 U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAGGGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U1 终止子	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
3' ITR	aaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgccagc（SEQ ID NO: 166）

[0137] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04390(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:178。

A04390:scAAV 5'mITR hU7-CAG15X-hU1-CAGx15

质粒元件	5'至3'核苷酸序列
5'突变体 ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
人 U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGT GACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGG CTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAG TTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTG TTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTC ATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACG CA（SEQ ID NO: 39）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
靶向 CAG 的序列	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG （SEQ ID NO: 167）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U7 终止子	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG （SEQ ID NO: 49）
人 U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGG AAAAAGGGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGC AGATTGGTCGGTTGAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAG GCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGG CAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTGCTGCTTCACCACGAAGG AGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTG AGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGC GGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTG TCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
靶向 CAG 的序列	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG （SEQ ID NO: 167）
SMOPT	AATTTTTGGAGTA（SEQ ID NO: 164）
人茎环（eSL）	ggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 1）
人 U1 终止子	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTT TT（SEQ ID NO: 50）
3' ITR	aaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaa ggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgccagc（SEQ ID NO: 166）

[0138] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04530(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:231。

A04530:scAAV-mU7p-CUGx15-mU1p-CUGx15;具有ISD和eSL的小鼠环

质粒元件	5'至3'核苷酸序列
5'突变体 ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaaccct（SEQ ID NO: 12）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcct tctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaaccct (SEQ ID NO: 12)
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaag gtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0139] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04940(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:232。

A04940:scAAV-mU7p-CUGx10-mU1p-CUGx10;具有ISD和eSL无CCU的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5'突变体 ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaacc（SEQ ID NO: 148）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcct tctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG（SEQ ID NO: 165）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaaccccct（SEQ ID NO: 12）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaag gtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0140] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体AO4533(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:233。

AO4533:scAAV-mU7p-CAGx15-mU1p-CAGx15;具有ISD和eSL的小鼠环

质粒元件	5'至 3'核苷酸序列
5'突变体 ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggggtt（SEQ ID NO: 162）
小鼠 U7 启动子	taacaacataggagctgtgattggctgttttcagccaatcagcactgActcatttgcatagcctttacaagcggtca caaactcaagaaacgagcggttttaatagtcttttagaatattgtttatcgaaccgaataaggaactgtgctttgtgatt cacatatcagtggaggggtgtggaaatggcaccttgatctcaccctcatcgaaagtggagttgatgtcctTccctg gctcgctacagacgcacttccgcaa（SEQ ID NO: 48）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG（SEQ ID NO: 167）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 12）
小鼠 U7 终止子	cccaatttcactggtctacaatgaaagcaaaacagttctcttccccgctccccggtgtgtgagaggggctttgatcct tctctggtttcctaggaaacgcgtatgtg（SEQ ID NO: 156）
小鼠 U1 启动子	TTGTTCCTCTTAGTGTTAATTCACACTAAAGACTGTGCATCCGACTCC TACATTTATGAAAGTAAATGCCTGTTGTTAGAACAAAAAAGGCTACA GAACAAAAAACAAAGCGAAATACCATCTGCTTTAGGTTCAGTGTGGT ATTTTCCCGCTGACAGGGAGGCGGGTTTTTGGGTACAGGAAACGAGT CACTATGGAGGCGGTACTATGTAGATGAGAATTCAGGTGCAAACTGG GAAAAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTG GAAAAACTCTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGA GCCAGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTT ACCGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGG CCACGCAACTC（SEQ ID NO: 47）
ISD	ggagt（SEQ ID NO: 12）
间隔子	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG（SEQ ID NO: 167）
SMOPT	aATTTTTGGAGca（SEQ ID NO: 161）
小鼠茎环（eSL）	ggttttctgacctccgtcggaaaacccct（SEQ ID NO: 12）
小鼠 U1 终止子	GTTTACTTGGTTTTAAAAATAGCTTGCACTAGCGATACGGAATATGGT TATTAGGTTTGTTAGGCATCATGTCGTGTCTTACTATAGAAAAATAACG TAGTGTTCATTTTAGCCTGCCTGTATGTGTTAATTTGTCCTTATTGCGC ATTGTTCTTGTTAAGTCTTCTGTAAGGAGTTGCGGGTTTCAAACTGTC AGTCTGAGAGCA（SEQ ID NO: 57）
3' ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaa ggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0141] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02962(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:120。靶向CUG重复的A02962 ss

pAAV-4X U7(15XCUG)(P00369的衍生物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctca gtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTG ACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTG AGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCC TTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTAT ACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAAT TGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA（SEQ ID NO: 24）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTG ACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTG AGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCC TTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTAT ACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAAT TGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC（SEQ ID NO: 25）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTG ACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTG AGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCC TTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTAT ACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAAT TGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG（SEQ ID NO: 26）

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTG ACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTG AGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCC TTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTAT ACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAAT TGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA GAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAA ATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggt cgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0142] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02963(其编码非靶向snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:121。

A02963 ss pAAV-4X U7(NT1)(P00369的衍生物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtga gcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcctt accggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA（SEQ ID NO: 24）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）

U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcctt accggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC（SEQ ID NO: 25）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcctt accggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG（SEQ ID NO: 26）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcctt accggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
ITR	Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcc cgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0143] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02967(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:122。

[0144] A02967靶向CAG重复的ss pAAV-4X U7(15XCAG)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtga gcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游(终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA（SEQ ID NO: 24）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游(终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC（SEQ ID NO: 25）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游(终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATT ATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG（SEQ ID NO: 26）

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACT GGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAAC AAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATA TTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAG GAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTT TATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）

U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游(终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0145] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03079(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:123。

A03079靶向CUG重复的sc pAAV-4X U7(15XCUG)(P00369的衍生物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA（SEQ ID NO: 24）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC（SEQ ID NO: 25）

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG（SEQ ID NO: 26）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGAGAGGGA（SEQ ID NO: 61）

[0146] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03080(其编码靶向非重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:124。

A03080 sc pAAV-4X U7(NT1)(P00369的衍生物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）

U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcc ttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA（SEQ ID NO: 24）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcc ttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC（SEQ ID NO: 25）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcc ttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG（SEQ ID NO: 26）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcc ttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGA（SEQ ID NO: 61）

[0147] 本公开文本的示例性AAV载体从5’至3’包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶

向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面，编码AAV载体A03081(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:125。

A03081靶向CAG重复的sc pAAV-4X U7(15XCAG)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 67)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)
30 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGA (SEQ ID NO: 24)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 67)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)
30 bp 缓冲物 2	GAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGAC (SEQ ID NO: 25)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 67)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

30 bp 缓冲物 3	TACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTG (SEQ ID NO: 26)

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGA（SEQ ID NO: 61）

[0148] 本公开文本的示例性AAV载体从5’至3’包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02888(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:126。

A02888靶向CUG重复的pAAV_1xU7(15xCUG)_CMV_GFP(无缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG(SEQ ID NO: 49)
CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct（SEQ ID NO: 62）

eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0149] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02889(其编码靶向非靶向重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:127。

A02889 pAAV_1xU7(NT1)_CMV_GFP(无缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctcc ttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct（SEQ ID NO: 62）

eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0150] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02925(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:128。

A02925靶向CAG重复的pAAV_1xU7(15xCAG)_CMV_GFP(无缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct（SEQ ID NO: 62）

eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA (SEQ ID NO: 63)
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta (SEQ ID NO: 64)
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0151] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02894(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:129。

A02894靶向CUG重复的pAAV_3xU7(15xCUG)_CMV_GFP(100bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 65)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)
100 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG (SEQ ID NO: 31)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)

U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
100 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTA ACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTC （SEQ ID NO: 28）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct（SEQ ID NO: 62）
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0152] 本公开文本的示例性AAV载体从5’至3’包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序

列。在一些方面,编码AAV载体A02895(其编码非靶向snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:130。

A02895 pAAV_3xU7(NT1)_CMV_GFP(100bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 66)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG(SEQ ID NO: 49)
100 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATCTCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG (SEQ ID NO: 27)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 66)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG(SEQ ID NO: 49)
100 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTAACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTC (SEQ ID NO: 28)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 66)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG(SEQ ID NO: 49)

CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct (SEQ ID NO: 62)
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA (SEQ ID NO: 63)
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta (SEQ ID NO: 64)
ITR	Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0153] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02968(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:131。

A02968靶向CAG重复的pAAV_3xU7(15XCAG)_CMV_GFP(100bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagt gagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAA TTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 67)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

100 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGA G（SEQ ID NO: 27）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAA TTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
100 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTA ACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTC （SEQ ID NO: 28）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAA TTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatg ttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatg accttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatca atgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcacca aaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggag gtctatataagcagagct（SEQ ID NO: 62）

eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggc cacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccacc ggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgac cacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacg acggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatc gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggcc gacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccga ccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccg ccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcg gcatggacgagctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattc tagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcg cccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0154] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02896(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:132。

A02896 pAAV_3xU7(15xCUG)_CMV_GFP(500bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

500 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG TCATTTTCCAATGCTCCTACACACCCCTTCTTCACAATCCCCAACAAATCT GAGGCTGGAACTTGGTACCATAACAATCATTACATTATTTCACCAGAAGT ACACCTTGCCTGGAAGATTGGCATTATAGCATCTTCTAACATTGTGAAAGT TAGTGACCAATGAGGAGATCCAAGTCAGTTCCAGTTGGATTTCTCTATACT CTATAATAAATATATATGGTGTCTTCAACAATAGGACTTTGCCATCCAGTG ATGCTAAAAATCAATAACAATGGCAATAACCTGCCCTGTTTGGAAAGCCT CTGGCTTCCATGACTAACAATTCAAGGCAGGTCTCCTATACCTAGTACTGA GATTTTTATTTGATAAACTATATCTTCTGGGAGGAGAAGCATTGT（SEQ ID NO: 29）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
500 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTA ACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTCT CTGAAATAGTTTTGCTTTCTCTCTCTAGGTCTGTTCTATACTCCTAACTCTC CAGGAGTTTACAAGGAATAAAATCTCTTCCAAATGCTTTCTGTTGCAACA ACTGGACCATACTGAAAGCTGAGGCCCACAATTGCAATCTAGGTTAGCAG GTAATCATTGTTGGTGAGGTCCTCCCTTTCCCCAGGCTCGTGTTTGTATTG GGGAGCAGGAAATTTTTGCTAGAGCAGCACTGCCATCTCTCTACACTCCA CCTGATTGGTGGGATGGACCAGAGAAATGGACATTCCCAACACAGTCCCT CCTTTCACATCTGCTCACCTGCCCACAGGATACTTTCCACCATGCATACTG GGCTCTGCACCAACCATTCAGCAGTGATGAAGAGGAAACTTGAAC（SEQ ID NO: 30）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG AATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct (SEQ ID NO: 62)
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA (SEQ ID NO: 63)
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta (SEQ ID NO: 64)
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0155] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02897(其编码靶向非靶向重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:133。

A02897 pAAV_3xU7(NT1)_CMV_GFP(500bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagt gagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctc cttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 66)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

500 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGA GTCATTTTCCAATGCTCCTACACACCCCTTCTTCACAATCCCCAACAAATC TGAGGCTGGAACTTGGTACCATAACAATCATTACATTATTTCACCAGAAG TACACCTTGCCTGGAAGATTGGCATTATAGCATCTTCTAACATTGTGAAA GTTAGTGACCAATGAGGAGATCCAAGTCAGTTCCAGTTGGATTTCTCTAT ACTCTATAATAAATATATATGGTGTCTTCAACAATAGGACTTTGCCATCC AGTGATGCTAAAAATCAATAACAATGGCAATAACCTGCCCTGTTTGGAA AGCCTCTGGCTTCCATGACTAACAATTCAAGGCAGGTCTCCTATACCTAG TACTGAGATTTTTATTTGATAAACTATATCTTCTGGGAGGAGAAGCATTG T（SEQ ID NO: 29）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctc cttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
500 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTA ACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTCT CTGAAATAGTTTTGCTTTCTCTCTCTAGGTCTGTTCTATACTCCTAACTCT CCAGGAGTTTACAAGGAATAAAATCTCTTCCAAATGCTTTCTGTTGCAAC AACTGGACCATACTGAAAGCTGAGGCCCACAATTGCAATCTAGGTTAGC AGGTAATCATTGTTGGTGAGGTCCTCCCTTTCCCCAGGCTCGTGTTTGTAT TGGGGAGCAGGAAATTTTTGCTAGAGCAGCACTGCCATCTCTCTACACTC CACCTGATTGGTGGGATGGACCAGAGAAATGGACATTCCCAACACAGTC CCTCCTTTCACATCTGCTCACCTGCCCACAGGATACTTTCCACCATGCATA CTGGGCTCTGCACCAACCATTCAGCAGTGATGAAGAGGAAACTTGAAC（SEQ ID NO: 30）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGA CTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAG AACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAG AATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGT AATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGA GTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctc cttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatg ttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatg accttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatca atgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcacca aaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggag gtctatataagcagagct (SEQ ID NO: 62)
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggc cacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccacc ggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgac cacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacg acggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatc gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggcc gacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccga ccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccg ccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcg gcatggacgagctgtacaagTAA (SEQ ID NO: 63)
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattc tagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta (SEQ ID NO: 64)
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcg cccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0156] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CAG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、CMV启动子序列、编码绿色荧光蛋白(GFP)的序列、sv40聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A02969(其编码靶向CAG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:134。

A02969靶向CAG重复的pAAV_3xU7(15xCAG)_CMV_GFP(500bp缓冲物)

ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtg agcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 67)
U7 下游 (终止子)	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

500 bp 缓冲物 1	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG TCATTTTCCAATGCTCCTACACACCCCTTCTTCACAATCCCCAACAAATCT GAGGCTGGAACTTGGTACCATAACAATCATTACATTATTTCACCAGAAGT ACACCTTGCCTGGAAGATTGGCATTATAGCATCTTCTAACATTGTGAAAGT TAGTGACCAATGAGGAGATCCAAGTCAGTTCCAGTTGGATTTCTCTATACT CTATAATAAATATATATGGTGTCTTCAACAATAGGACTTTGCCATCCAGTG ATGCTAAAAATCAATAACAATGGCAATAACCTGCCCTGTTTGGAAAGCCT CTGGCTTCCATGACTAACAATTCAAGGCAGGTCTCCTATACCTAGTACTGA GATTTTTATTTGATAAACTATATCTTCTGGGAGGAGAAGCATTGT（SEQ ID NO: 29）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
500 bp 缓冲物 2	TTGACCACATACGTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTA ACAACTGATGCCCATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTCT CTGAAATAGTTTTGCTTTCTCTCTCTAGGTCTGTTCTATACTCCTAACTCTC CAGGAGTTTACAAGGAATAAAATCTCTTCCAAATGCTTTCTGTTGCAACA ACTGGACCATACTGAAAGCTGAGGCCCACAATTGCAATCTAGGTTAGCAG GTAATCATTGTTGGTGAGGTCCTCCCTTTCCCCAGGCTCGTGTTTGTATTG GGGAGCAGGAAATTTTTGCTAGAGCAGCACTGCCATCTCTCTACACTCCA CCTGATTGGTGGGATGGACCAGAGAAATGGACATTCCCAACACAGTCCCT CCTTTCACATCTGCTCACCTGCCCACAGGATACTTTCCACCATGCATACTG GGCTCTGCACCAACCATTCAGCAGTGATGAAGAGGAAACTTGAAC（SEQ ID NO: 30）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGAC TGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGA ACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGA ATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTA ATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGT TCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
U7 snRNA	ggagtCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 67）
U7 下游（终止子）	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAAT TATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）

CMV 启动子	Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatc aagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaat caacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagct (SEQ ID NO: 62)
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggcc acaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccgg caagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca tgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggc aactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttc aaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactacc agcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagca aagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacga gctgtacaagTAA (SEQ ID NO: 63)
SV40 聚 A	Aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattct agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta (SEQ ID NO: 64)
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0157] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03980(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:135。

A03980:pAAV(ssAAV)U7启动子-esnRNA-z38/42-U7终止-U1启动子-esnRNAz38/z42-U1终止

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGG CTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATG TTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTC CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAA AAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCT CTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
z38/42 esnRNA (DMD 外显子 51)	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGA GTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 68)
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)

U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
z38/42 esnRNA（DMD 外显子 51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGA GTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 68）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0158] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03981(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:136。

A03981:pAAV(ssAAV)_U7启动子-esnRNA-z42-U7终止-U1启动子-esnRNA-z38-U1终止

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGG CTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATG TTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTC CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAA AAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCT CTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
z42 esnRNA（DMD 外显子 51）	ggagtGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctc cttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 69）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）

z38 esnRNA（DMD 外显子 51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 70）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0159] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、U1启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04229(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:137。

[0160] A04229:pAAV(scAAV)U7启动子-esnRNA-z38/42-U7终止-U1启动子-esnRNAz38/z42-U1终止-突变体ITR

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
z38/42 esnRNA（DMD 外显子 51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 68）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAGGGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
z38/42 esnRNA（DMD 外显子 51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 68）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
mITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA（SEQ ID NO: 61）

[0161] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U1启动子序

列、靶向DMD外显子51的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列、缓冲序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体AO4184(其编码靶向DMD外显子51的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:138。

AO4184:pAAV(ssAAV)-U7启动子-z38/42-U7终止_U1启动子-z38/42-U1终止_缓冲物组合序列

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
z38/42 esnRNA（DMD 外显子51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 68）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAGGGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
z38/42 esnRNA（DMD 外显子51）	ggagtTACCTCCAACATCAAGGAAGATGGCAGTAACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAACAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 68）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）

缓冲物组合序列	CAAACTACAGAGCCAAGTGCTATCCACAGAGAGCTTTCTGGGTTGCCATC TCAAGCAGACTACAAGGCCATCAGCTCATACTCACAATTGACTTTGAGAG TCATTTTCCAATGCTCCTACACACCCCTTCTTCACAATCCCCAACAAATCTG AGGCTGGAACTTGGTACCATAACAATCATTACATTATTTCACCAGAAGTAC ACCTTGCCTGGAAGATTGGCATTATAGCATCTTCTAACATTGTGAAAGTTA GTGACCAATGAGGAGATCCAAGTCAGTTCCAGTTGGATTTCTCTATACTCT ATAATAAATATATATGGTGTCTTCAACAATAGGACTTTGCCATCCAGTGATG CTAAAAATCAATAACAATGGCAATAACCTGCCCTGTTTGGAAAGCCTCTGG CTTCCATGACTAACAATTCAAGGCAGGTCTCCTATACCTAGTACTGAGATTT TTATTTGATAAACTATATCTTCTGGGAGGAGAAGCATTGTTTGACCACATAC GTGCTCTTTCAAAGTTCTGTGTTTGAAGTTATGTTAGTAACAACTGATGCC CATCCTGCAATGACAAATCCAATTCTCAGTGCAGCTCTCTGAAATAGTTTT GCTTTCTCTCTCTAGGTCTGTTCTATACTCCTAACTCTCCAGGAGTTTACAA GGAATAAAATCTCTTCCAAATGCTTTCTGTTGCAACAACTGGACCATACTG AAAGCTGAGGCCCACAATTGCAATCTAGGTTAGCAGGTAATCATTGTTGGT GAGGTCCTCCCTTTCCCCAGGCTCGTGTTTGTATTGGGGAGCAGGAAATTT TTGCTAGAGCAGCACTGCCATCTCTCTACACTCCACCTGATTGGTGGGATG GACCAGAGAAATGGACATTCCCAACACAGTCCCTCCTTTCACATCTGCTC ACCTGCCCACAGGATACTTTCCACCATGCATACTGGGCTCTGCACCAACCA TTCAGCAGTGATGAAGAGGAAACTTGAACCCATGCAGAGTACCTCTAGAG AAAAGTTTCTAAAGTTGGTTTTGCCTTGCTTAGAAAGGAGGTCAAAGGTG AAGCCTAGGAGAAACATTCAGCAATGTTGCACAAAGACATGAGAATAAAT GATTTTAGCATCCTGAAATGAAGAGCATAGTGATCTCACCATAGCTACCCA CCTACCCAGAGAACTTCCAGGCTTTCACTGTCTCTTTTCTGAATCACCCAC ATTACAGAATATCAGTCATTGTGTAATTAGATAACAGATTGTGAGGTGCCCA AACAGAAACAAACTTTACAGGAGGAGAGAGAAAATCAAGGTGATGACTA TGGAGAACAAAATGAGAAGGAGAGGTGGAGTTCCTGCTGCATGAACACC TATCCTGCTATAGAGCCCATTTCTTCCATAAATAATACAACTCTGTAACTCC ATAGGTCAGAAAGAAACAGTGTTCTGTGTCTTCCCATCTAGCACCACAAA CCCCCACAAGATTAATTTGTTTCTAGGGACCCTTAAATCTCTATCAAAATTC TGGAAACCTCTACTTTAGAAAATCTTATATTTATTATTCAGGCTACTTTCCA GAGTGATAAGCTACTGAGTCTCCTAAGTGTCATCTATGGTACACAGGGATA AGATCAGGAATAAACCTGGG (SEQ ID NO: 144)
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0162] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列、eCMV启动子序列、编码GFP的序列、聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03681(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:139。

A03681:pAAV(ssAAV)-U7启动子-zCUGx15-U7终止_U1启动子-zCUGx15-U1终止-eCMV-eGFP

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 59)

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGC TGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGT TCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCT ACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAA GTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTC CAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGG GTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTG AGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACG GACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCCAC TTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCG CTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGA GTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGT CGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAATT TTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
eCMV 启动 子	cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccat agtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcata tgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctact tggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg（SEQ ID NO: 62）
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagt tcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccg tgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgactt cttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccga ggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggc acaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagat ccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctg ctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggag ttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 pA	aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtg gtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0163] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列、缓冲序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、eCMV启动子序列、编码GFP的序列、聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03682(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:140。

A03682:pAAV(ssAAV)-U1启动子-zCUGx15-U1终止_U7启动子-zCUGx15-U7终止-eCMV-eGFP

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
U7 启动子	AATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTC TCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGA ACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGA AAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAAAAGTCAC CTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAA CACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc（SEQ ID NO: 65）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
eCMV 启动子	cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttccca tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatca tatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg（SEQ ID NO: 62）
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaa gttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgc ccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcac gacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgc gccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcc tggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaac ttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggcc ccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtc ctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 pA	aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgt ggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0164] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U1启动子序列、非靶向U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列、eCMV启动子序列、编码GFP的序列、聚A序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03683(其编码非靶向snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:141。A03683:pAAV(ssAAV)-U7启动子-znt-U7终止_U1启动子-znt-U1终止-eCMV-eGFP

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct（SEQ ID NO: 59）
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGG CTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATG TTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTC CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAA AAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCT CTCCAAACACATACGCA（SEQ ID NO: 39）
z-nt esnRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccg gaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG（SEQ ID NO: 49）
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc（SEQ ID NO: 40）
z-nt esnRNA	ggagtTCACCAGAAGCGTACCATACTCACGAAATTTTTGGAGTAggctttctggctccttaccg gaaagcc（SEQ ID NO: 66）
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT（SEQ ID NO: 50）
eCMV 启动子	cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttccca tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatca tatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg（SEQ ID NO: 62）
eGFP	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaa gttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgc ccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcac gacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgc gccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcc tggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaac ttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggcc ccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtc ctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTAA（SEQ ID NO: 63）
SV40 pA	aacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgt ggtttgtccaaactcatcaatgtatctta（SEQ ID NO: 64）
ITR	Aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccga cgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg（SEQ ID NO: 60）

[0165] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A03684(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:142。

A03864:pAAV(ssAAV)-U7启动子-zCUGx15-U7终止_U1启动子-zCUGx15-U1终止(减

去GFP-3681的衍生物)

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggttcct (SEQ ID NO: 59)
U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGG CTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATG TTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTC CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAA AAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCT CTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 65)
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc (SEQ ID NO: 40)
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 65)
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT (SEQ ID NO: 50)
ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 60)

[0166] 本公开文本的示例性AAV载体从5'至3'包含:第一反向末端重复(ITR)序列、U7启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U7下游终止子序列、缓冲序列、U1启动子序列、靶向CUG重复的U7 esnRNA序列、U1下游终止子序列和第二ITR序列。在一些方面,编码AAV载体A04233(其编码靶向CUG重复的snRNA序列)的核酸序列包含SEQ ID NO:143。

A04233:pAAV(scAAV)-U7启动子-zCUGx15-U7终止-U1启动子-zCUGx15-U1终止(A03681的衍生物,scAAV中无GFP)

ITR	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggttcct (SEQ ID NO: 59)

U7 启动子	TACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGG CTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATG TTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTAAGTTCCTTAGAATATTATTTTTC CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAAAA AAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCT CTCCAAACACATACGCA (SEQ ID NO: 39)
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 65)
U7 终止	CCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATG GGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGAG (SEQ ID NO: 49)
U1 启动子	TAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAG GGAGAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTT GAGTGGCAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCAC GGACAGGGCGACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGACGTCTTCGCC ACTTGCTGCTTCACCACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGAC CGCTGATCGGAAGTGAGAATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGG GAGTGCGCGGGGCAAGTGACCGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTG TGTCGGGGCAGAGGCacaacgtttc (SEQ ID NO: 40)
zCUGx15 esnRNA	ggagtCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAT TTTTGGAGTAggctttctggctccttaccggaaagcc (SEQ ID NO: 65)
U1 终止	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTACGCCAAGGGTCATATCTTTTT (SEQ ID NO: 50)
mITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGA (SEQ ID NO: 61)

启动子序列

[0167] 本公开文本的基因疗法和靶向RNA的snRNA基因疗法组合物包含源自snRNA的启动子序列。

[0168] “启动子”是以下控制序列,其是多核苷酸序列中控制转录起始和速率的区域。它可以含有调节蛋白和分子可以结合的遗传元件,如RNA聚合酶和其他转录因子。

[0169] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本文提供的表达载体、病毒载体或非病毒载体包括但不限于表达控制元件。如本文所用的“表达控制元件”是指调节编码序列如基因的表达的任何序列。示例性表达控制元件包括但不限于启动子、增强子、微小RNA、转录后调节元件、多聚腺苷酸化信号序列和内含子。例如,表达控制元件可以是组成型的、诱导型的、阻抑型的或组织特异性的。“启动子”是以下控制序列,其是多核苷酸序列中控制转录起始和速率的区域。它可以含有调节蛋白和分子可以结合的遗传元件,如RNA聚合酶和其他转录因子。“增强子”是DNA中可以由激活蛋白结合以增加转录的可能性或频率的区域。

[0170] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本文提供的表达载体、病毒载体或非病毒载体包括但不限于载体元件(如源自snRNA下游的人基因组序列的缓冲序列),并且因此将具有编码来自单个构建体的多个snRNA。

[0171] 在一些实施方案中,在将编码序列掺入本文公开的组合物中的情况下,多顺反子载体可以同时表达来自相同mRNA的两种或更多种单独的蛋白质。最广泛用于构建多顺反子

配置的两种策略是通过使用IRES或2A自切割位点。“IRES”是指用于多顺反子载体构建体内的病毒、原核或真核来源的内部核糖体进入位点或其部分。在一些实施方案中,IRES是允许以非帽依赖性方式进行翻译起始的RNA元件。术语“自切割肽”或“编码自切割肽的序列”或“2A自切割位点”是指在载体构建体内用于并入位点以促进核糖体跳跃且因此从单一启动子产生两种多肽的连接序列,此类自切割肽包括但不限于T2A和P2A肽或编码自切割肽的其他序列。

[0172] 在另一个实施方案中,载体构型可以包含一个或多个接头、一个或多个信号序列和/或一个或多个标签。

[0173] 在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体或慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体、腺病毒/逆转录病毒嵌合体载体、单纯疱疹病毒I或II载体、细小病毒载体、网状内皮组织增殖病病毒载体、脊髓灰质炎病毒载体、乳头状瘤病毒载体、痘苗病毒载体或者并入两种或更多种病毒载体的有利方面的任何杂合或嵌合载体。在一些实施方案中,载体还包含与多核苷酸可操作地连接的一种或多种表达控制元件。在一些实施方案中,载体进一步包含一种或多种选择标记物。在一些实施方案中,AAV载体具有低毒性。在一些实施方案中,AAV载体不并入宿主基因组中,从而具有低的引起插入诱变的概率。在一些实施方案中,AAV载体可以编码4.5kb至4.75kb的一系列总多核苷酸。在一些实施方案中,可以用于任何本文所述的组合物、系统、方法和试剂盒中的示例性AAV载体可以包括AAV1载体、经修饰的AAV1载体、AAV2载体、经修饰的AAV2载体、AAV2-Tyr突变体载体、AAV3载体、经修饰的AAV3载体、AAV4载体、经修饰的AAV4载体、AAV5载体、经修饰的AAV5载体、AAV6载体、经修饰的AAV6载体、AAV7载体、经修饰的AAV7载体、AAV8载体、AAVrh8载体、AAV9载体、AAV.rh10载体、经修饰的AAV.rh10载体、AAVrh.74、AAV.rh32/33载体、经修饰的AAV.rh32/33载体、AAV.rh43载体、经修饰的AAV.rh43载体、AAV.rh64R1载体和经修饰的AAV.rh64R1载体、AAV-Tyr突变体载体、AAV-Tyr-Ser突变体载体、AAV-Tyr-Ser-Thr突变体载体及其任何组合或等效物。在一些实施方案中,慢病毒载体是有整合酶能力的慢病毒载体(integrase-competent lentiviral vector,ICLV)。在一些实施方案中,慢病毒载体可以是指转基因质粒载体,以及与相关质粒(例如,包装质粒、rev表达质粒、包膜质粒)结合的转基因质粒载体,以及能够通过病毒或病毒样进入机制将外源核酸引入细胞中的基于慢病毒的颗粒。

[0174] 慢病毒载体是本领域中熟知的(参见例如,Trono D.(2002)Lentiviral vectors,New York:Spring-Verlag Berlin Heidelberg和Durand等人(2011)Viruses3(2):132-159doi:10.3390/v3020132)。在一些实施方案中,可以用于任何本文所述的组合物、系统、方法和试剂盒中的示例性慢病毒载体可以包括人免疫缺陷病毒(HIV)1载体、经修饰的人免疫缺陷病毒(HIV)1载体、人免疫缺陷病毒(HIV)2载体、经修饰的人免疫缺陷病毒(HIV)2载体、白领白眉猴(sooty mangabey)猿猴免疫缺陷病毒(SIV_{SM})载体、经修饰的白领白眉猴猿猴免疫缺陷病毒(SIV_{SM})载体、非洲绿猴猿猴免疫缺陷病毒(SIV_{AGM})载体、经修饰的非洲绿猴猿猴免疫缺陷病毒(SIV_{AGM})载体、马传染性贫血病毒(EIAV)载体、经修饰的马传染性贫血病毒(EIAV)载体、猫免疫缺陷病毒(FIV)载体、经修饰的猫免疫缺陷病毒(FIV)载体、维斯纳/梅迪病毒(Visna/maedi virus)(VNV/VMV)载体、经修饰的维斯纳/梅迪病毒(VNV/VMV)载体、羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)载体、经修饰的羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)载体、牛免疫缺陷

病毒(BIV)或经修饰的牛免疫缺陷病毒(BIV)。

核酸

[0175] NOI(目的核苷酸序列)包括但不限于能够通过载体递送的任何核苷酸序列或转基因。NOI可以是合成的、源自天然存在的DNA或RNA,密码子优化的、重组RNA/DNA,cDNA,部分基因组DNA和/或其组合。NOI可以是编码区或部分编码区,但是不必须是编码区。NOI可以是有义或反义取向的RNA/DNA。NOI可以是snRNA。NOI在本文中也称为而不限于转基因、异源序列、基因、治疗性基因。NOI也可以编码RNA(核糖核蛋白复合物)、POI(目的蛋白)、部分POI、POI的突变形式或变体。POI可以类似于或对应于野生型蛋白质。POI也可以是融合蛋白或核糖核蛋白复合物(如snRNP)。在一些方面,本文公开的RNA序列可以表示为DNA序列,并且从DNA序列获得RNA序列的序列在熟练技术人员的能力范围内。

密码子优化

[0176] 在一些实施方案中,本公开文本的NOI或转基因或GOI(如编码靶向RNA的snRNA的核酸序列)是密码子优化的核酸序列。在一些实施方案中,在人受试者中,密码子优化的序列相对于野生型或非密码子优化的核酸序列展现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少50%、至少75%、至少100%、至少200%、至少300%、至少500%或至少1000%增加的转录或翻译。

[0177] 在一些方面,密码子优化的核酸序列展现出增加的稳定性。在一些方面,密码子优化的核酸序列通过增加的对水解的抗性展现出增加的稳定性。在一些实施方案中,密码子优化的序列相对于野生型或非密码子优化的核酸序列展现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少50%、至少75%、至少100%、至少200%、至少300%、至少500%或至少1000%增加的稳定性。在一些实施方案中,在人受试者中,密码子优化的序列相对于野生型或非密码子优化的核酸序列展现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少50%、至少75%、至少100%、至少200%、至少300%、至少500%或至少1000%增加的对水解的抗性。

[0178] 在一些方面,密码子优化的核酸序列可以不包含供体剪接位点。在一些方面,密码子优化的核酸序列可以包含不超过约一个、或约两个、或约三个、或约四个、或约五个、或约六个、或约七个、或约八个、或约九个、或约十个供体剪接位点。在一些方面,与非密码子优化的核酸序列相比,密码子优化的核酸序列包含少至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个、或至少七个、或至少八个、或至少九个、或至少十个的供体剪接位点。

[0179] 不希望受理论束缚,在密码子优化的核酸序列中去除供体剪接位点可以出乎意料地且不可预测地增加体内目的蛋白的表达,因为阻止了隐蔽剪接。此外,隐蔽剪接在不同受试者之间可能变化,这意味着包含供体剪接位点的蛋白质的表达水平在不同受试者之间可能不可预测地变化。这种不可预测性在人类疗法的背景下是不可接受的。因此,缺乏供体剪接位点的密码子优化的核酸序列出乎意料地且令人惊讶地允许人受试者中蛋白质的表达增加,并且使不同人受试者中蛋白质的表达规范化。

[0180] 在一些方面,密码子优化的核酸序列可以具有与编码靶向RNA的snRNA的非密码子优化的核酸序列的GC含量不同的GC含量。在一些方面,与非密码子优化的核酸序列相比,密码子优化的核酸序列的GC含量更均匀地分布在整个核酸序列上。

[0181] 不希望受理论束缚,通过将GC含量更均匀地分布在整个核酸序列上,密码子优化

的核酸序列在转录物的长度上展现出更统一的解链温度(“Tm”)。解链温度的统一性出乎意料地导致人受试者中密码子优化的核酸的增加的表达,因为核酸序列的转录和/或翻译发生时聚合酶和/或核糖体的停滞较少。

[0182] 在一些方面,与非密码子优化的核酸序列相比,密码子优化的核酸序列可以具有更少的抑制性微小RNA靶结合位点。在一些方面,与非密码子优化的核酸序列相比,密码子优化的核酸序列可以具有少至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个、或至少七个、或至少八个、或至少九个、或至少十个、或至少十个的抑制性微小RNA靶结合位点。

[0183] 不希望受到理论的束缚,通过具有更少的抑制性微小RNA靶结合位点,密码子优化的核酸序列出乎意料地在人受试者中展现出增加的表达。

[0184] 本文提供了编码基因疗法组合物或靶向RNA的snRNA系统的核酸序列,其用于本文所述的基因转移和表达技术中。虽然没有总是明确陈述,但是应当理解,本文提供的序列可以用于提供表达产物以及编码RNA或表达和产生具有相同生物特性的蛋白质的基本上相同的序列。这些“生物等效的”或“生物活性的”或“等效的”多肽是由如本文所述的等效多核苷酸编码的。当使用在默认条件下运行的序列同一性方法比较时,它们可以具有与参考多肽至少60%、或可替代地至少65%、或可替代地至少70%、或可替代地至少75%、或可替代地至少80%、或可替代地至少85%、或可替代地至少90%、或可替代地至少95%、或可替代地至少98%相同的初级氨基酸序列。提供了特定多肽序列作为具体实施方案的例子。用具有类似电荷的可替代氨基酸对序列中的氨基酸进行修饰。另外,等效多核苷酸是在严格条件下与参考多核苷酸或其互补体杂交的多核苷酸,或者就多肽而言,是由在严格条件下与参考编码多核苷酸或其互补链杂交的多核苷酸编码的多肽。可替代地,等效多肽或蛋白质是从等效多核苷酸表达的多肽或蛋白质。

[0185] 本文公开的NOI或核酸序列(例如,多核苷酸序列)可以是密码子优化的,密码子优化是本领域熟知的技术。密码子优化涉及以下事实,即不同细胞在对特定密码子的使用方面有所不同。该密码子偏倚对应于特定tRNA在细胞类型中的相对丰度的偏倚。通过改变序列中的密码子以与相应tRNA的相对丰度匹配,可能增加表达。还可能通过故意选择已知相应tRNA在特定细胞类型中罕见的密码子来减少表达。哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子使用表是本领域中已知的。基于遗传密码,可以产生编码例如esnRNA、esnRNA的核酸序列。在一些实施方案中,这样的序列被优化以用于在宿主细胞或靶细胞中表达,所述宿主细胞或靶细胞是如用于表达esnRNA的宿主细胞或在其中实践所公开方法的细胞(如在哺乳动物细胞例如人细胞中)。特定物种的密码子偏好和密码子使用表可以用于利用该特定物种的密码子使用偏好来工程化编码esnRNA的分离的核酸分子。例如,本文公开的esnRNA可以被设计为具有特定目标生物优先使用的密码子。在一个例子中,esnRNA核酸序列被优化以用于在人细胞中表达,如与其相应野生型或起源核酸序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的esnRNA核酸序列。在一些实施方案中,编码至少一个esnRNA(其可能是载体的一部分)的分离的核酸分子包括被密码子优化以用于在真核细胞中表达的至少一个esnRNA编码序列或被密码子优化以用于在人细胞中表达的至少一个esnRNA编码序列。在一个实施方案中,这样的密码子优化的esnRNA编码序列与其相应野生型或起源序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少

92％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性。在另一个实施方案中,真核细胞密码子优化的核酸序列编码与其相应野生型或起源序列具有至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的esnRNA。在另一个实施方案中,可以常规地产生含有功能等效核酸的多个克隆,所述功能等效核酸是如序列不同但编码相同esnRNA序列的核酸。编码序列中的沉默突变是由于遗传密码的简并性(即,冗余)所致,借此多于一种密码子可以编码相同氨基酸残基。因此,例如,亮氨酸可以由CTT、CTC、CTA、CTG、TTA或TTG编码;丝氨酸可以由TCT、TCC、TCA、TCG、AGT或AGC编码;天冬酰胺可以由AAT或AAC编码;天冬氨酸可以由GAT或GAC编码;半胱氨酸可以由TGT或TGC编码;丙氨酸可以由GCT、GCC、GCA或GCG编码;谷氨酰胺可以由CAA或CAG编码;酪氨酸可以由TAT或TAC编码;并且异亮氨酸可以由ATT、ATC或ATA编码。显示标准遗传密码的表格可以在多个来源(参见例如,Stryer,1988,Biochemistry,第3版,W.H.5Freeman andCo.,NY)发现。

[0186] “杂交”是指一种或多种多核苷酸反应形成通过核苷酸残基的碱基之间的氢键合稳定化的复合物的反应。氢键合可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogstein结合或以任何其他序列特异性方式来进行。所述复合物可以包含形成双链体结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单条自杂交链或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛过程(如PC反应的起始或核酶对多核苷酸的酶促切割)中的步骤。

[0187] 严格杂交条件的例子包括:约25℃至约37℃的孵育温度;约6x SSC至约10x SSC的杂交缓冲液浓度;约0％至约25％的甲酰胺浓度;以及约4x SSC至约8x SSC的洗涤溶液。中度杂交条件的例子包括:约40℃至约50℃的孵育温度;约9x SSC至约2x SSC的缓冲液浓度;约30％至约50％的甲酰胺浓度;以及约5x SSC至约2x SSC的洗涤溶液。高严格条件的例子包括:约55℃至约68℃的孵育温度;约1x SSC至约0.1x SSC的缓冲液浓度;约55％至约75％的甲酰胺浓度;以及约1x SSC、0.1x SSC的洗涤溶液或去离子水。通常,杂交孵育时间为5分钟至24小时,有1个、2个或更多个洗涤步骤,并且洗涤孵育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应理解,可以采用使用其他缓冲液系统的SSC的等效物。

[0188] “同源性”或“同一性”或“相似度”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似度。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述序列可以出于比较目的进行比对。在所比较序列中的位置由相同的碱基或氨基酸占据时,则所述分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度随着序列共有的匹配或同源位置的数量而变。“不相关”或“非同源”序列与本发明的序列之一共享小于40％同一性,或可替代地小于25％同一性。

细胞

[0189] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的细胞是原核细胞。

[0190] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的细胞是真核细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞是牛、鼠、猫、马、猪、犬、猿猴或人细胞。在一些实施方案中,细胞是非人哺乳动物细胞,如非人灵长类动物细胞。

[0191] 在一些实施方案中,本公开文本的细胞是体细胞。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是性细胞。在一些实施方案中,本公开文本的性细胞不是人细胞。

[0192] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的细胞是干细胞。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中,本公开文本的胚胎干细胞不是人细胞。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是多潜能干细胞或多能干细胞。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是成体干细胞。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,本公开文本的细胞是造血干细胞(HSC)。

[0193] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是神经元细胞。在一个实施方案中,用本文公开的组合物治疗的患者的一个或多个细胞包括但不限于中枢神经系统(神经元)、周围神经系统(神经元)、周围运动神经元和/或感觉神经元。在一个实施方案中,神经元细胞是神经胶质细胞。

[0194] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是成纤维细胞或上皮细胞。在一些实施方案中,本公开文本的上皮细胞形成鳞状细胞上皮、立方细胞上皮、柱状细胞上皮、层状细胞上皮、假复层柱状细胞上皮或移行细胞上皮。在一些实施方案中,本公开文本的上皮细胞形成腺体,包括但不限于松果腺、胸腺、垂体、甲状腺、肾上腺、顶质分泌腺、全质分泌腺、局质分泌腺、浆液腺、粘液腺和皮脂腺。在一些实施方案中,本公开文本的上皮细胞接触器官的外表面,所述器官包括但不限于肺、脾、胃、胰腺、膀胱、肠、肾、胆囊、肝、喉或咽。在一些实施方案中,本公开文本的上皮细胞接触血管或静脉的外表面。

[0195] 在本公开文本的一些实施方案中,体细胞是眼部细胞。眼部细胞包括而不限于角膜上皮细胞、角质形成细胞、视网膜色素上皮(RPE)细胞、晶状体上皮细胞、虹膜色素上皮细胞、结膜成纤维细胞、非色素睫状上皮细胞、小梁网细胞、眼脉络膜成纤维细胞、结膜上皮细胞。在一些实施方案中,眼部细胞是视网膜细胞或角膜细胞。在一个实施方案中,视网膜细胞是感光细胞或视网膜色素上皮细胞。在另一个实施方案中,视网膜细胞是神经节细胞、无长突细胞、双极细胞、水平细胞、米勒胶质细胞、视杆细胞或视锥细胞。在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是原代细胞。

[0196] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是培养的细胞。

[0197] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是体内的、体外的、离体的或原位的。

[0198] 在本公开文本的组合物和方法的一些实施方案中,本公开文本的体细胞是自体的或同种异体的。

使用方法

[0199] 本公开提供了一种使用本文公开的snRNA系统在细胞中编码RNA或表达NOI的方法。在一个实施方案中,本公开文本提供了一种修饰RNA或由RNA分子编码的蛋白质的活性的方法,所述方法包括在适合于结合至RNA分子的条件下使本公开文本的组合物与靶RNA分子接触。

[0200] 本公开文本提供了一种修饰本公开文本的RNA分子或由RNA分子编码的蛋白质的表达水平的方法,所述方法包括在适合于结合至RNA分子的条件下使本公开文本的组合物与包含RNA分子的细胞接触。在一些实施方案中,细胞是体内的、体外的、离体的或原位的。

在一些实施方案中,本公开文本的组合物包含载体,所述载体包含snRNA序列。在一些实施方案中,载体是AAV。

[0201] 本公开文本提供了一种修饰本公开文本的RNA分子或由RNA分子编码的蛋白质的表达水平的方法,所述方法包括在适合于敲低、阻断、剪接、多靶向或编辑靶RNA条件下使本公开文本的组合物与RNA分子接触。在一些实施方案中,载体是AAV。

[0202] 本公开文本提供了一种修饰靶RNA或由RNA分子编码的蛋白质的活性的方法,所述方法包括在合适于敲低、阻断、剪接、多靶向或编辑靶RNA的条件下使组合物与包含RNA分子的细胞接触。在一些实施方案中,细胞是体内的、体外的、离体的或原位的。在一些实施方案中,组合物包含载体,所述载体包含本文公开的snRNA序列。在一些实施方案中,载体是AAV。

[0203] 本公开文本提供了一种治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开文本的snRNA组合物。

[0204] 本公开文本提供了一种治疗需要这种治疗的患者的疾病的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的本公开文本的snRNA组合物,其中组合物包含载体,所述载体包含本文公开的snRNA序列,其中组合物修饰、降低、破坏、敲低或消融毒性重复RNA的表达水平(与用非靶向(NT)对照处理的毒性重复RNA的表达水平相比或者与未处理相比)。在另一个实施方案中,降低水平为1倍或更大。在另一个实施方案中,降低水平为2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在另一个实施方案中,降低水平为10倍或更大。在另一个实施方案中,降低水平为在10倍与20倍之间。在另一个实施方案中,降低水平为11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍或20倍。在另一个实施方案中,当施用于患者时,本文公开的基因疗法组合物导致毒性重复RNA的20%-100%破坏。在一个实施方案中,毒性重复RNA的消除%是20%-99%、25%-99%、50%-99%、80%-99%、90%-99%、95%-99%中的任一个。在一个实施方案中,消除%是90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在另一个实施方案中,消除%是毒性重复RNA的完全消除或100%消除。

[0205] 本公开文本提供了一种治疗受试者的疾病或障碍的方法,所述方法包括施用靶向RNA的核酸分子(即,本公开文本的esnRNA)或包含本公开文本的esnRNA的AAV载体。

[0206] 在一些方面,疾病或障碍与毒性重复RNA序列相关。在一些方面,毒性重复RNA序列是CAG、CUG、GGCCCC、CCGGG或GGCCC+CCGGGG RNA重复。

[0207] 在一些方面,疾病或障碍是强直性肌营养不良(DM1)或亨廷顿病(HD)。

[0208] 在一些方面,疾病或障碍是迪谢内肌营养不良。在一些方面,靶向RNA的核酸分子或AAV载体靶向编码抗肌萎缩蛋白(DMD)的RNA序列。在一些方面,编码DMD的RNA序列包含内含子序列或外显子序列。在一些方面,所述外显子序列包含DMD的外显子51或其侧翼区域。

[0209] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者已经被诊断患有待治疗的疾病。在一些实施方案中,本公开文本的受试者呈现待治疗的障碍或疾病的至少一种体征或症状。在一些实施方案中,本公开文本的受试者呈现疾病的至少一种体征或症状。

[0210] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者是雌性。在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者是雄性。在一些实施方案中,本公开文本的受试者具有两个XX或XY染色体。在一些实施方案中,本公开文本的受试者具有两个XX或XY染色体和第三染色体(X或Y)。

[0211] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者是新生儿、婴儿、儿

童、成人、年长成人或老年人。在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者为至少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31日龄。在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12月龄。在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100岁或之间的任何岁数或非整岁数。

[0212] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,本公开文本的受试者是非人哺乳动物。

[0213] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,本公开文本的受试者是人。

[0214] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,治疗有效量包含本公开文本的组合物的单个剂量。在一些实施方案中,治疗有效量包含本公开文本的组合物的至少一个剂量。在一些实施方案中,治疗有效量包含本公开文本的组合物的一个或多个剂量。

[0215] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,治疗有效量消除所述疾病或障碍的体征或症状。在一些实施方案中,治疗有效量降低所述疾病或障碍的体征或症状的严重程度。

[0216] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,治疗有效量消除所述疾病或障碍。

[0217] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,治疗有效量预防疾病或障碍的发作。在一些实施方案中,治疗有效量延迟疾病或障碍的发作。在一些实施方案中,治疗有效量降低所述疾病或障碍的体征或症状的严重程度。在一些实施方案中,治疗有效量改善所述受试者的预后。

[0218] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,经由大脑内施用,将本公开文本的组合物施用至所述受试者。在一些实施方案中,将本公开文本的组合物通过纹状体内途径施用至所述受试者。在一些实施方案中,将本公开文本的组合物通过立体定向注射或输注施用至所述受试者。在一些实施方案中,将所述组合物施用至脑。在本公开文本的方法的一些实施方案中,将本公开文本的组合物局部施用至所述受试者。

在一些实施方案中,将本文公开的组合物配制成药物组合物。简言之,如本文所公开的用于所述用途的药物组合物可以包含与一种或多种药学上或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的一种或多种蛋白质或编码所述一种或多种蛋白质的多核苷酸,所述一种或多种蛋白质或多核苷酸任选地包含于AAV中,所述AAV任选地也是免疫正交的。所述组合物可包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。本公开文本的组合物可以配制用于施用途径,例如像口服、肠内、外用、透皮、鼻内和/或吸入;以及用于经由注射或输注的施用途径,例如像静脉内、肌肉内、软膜下、鞘内、实质内、鞘内、纹状体内、皮下、皮内、腹膜内、瘤内、静脉内、眼内和/或肠胃外施用。在某些实施方案中,本公开文本的组合物被配制用于大脑内或纹状体内施用。

实施例

实施例1:在DM1细胞模型中靶向CUG重复的esnRNA

[0219] 材料与方法:

[0220] 将CTG480 HeLa细胞以100,000个细胞/ml接种在12孔板中。第二天,使用

lipofectamine(每个样品2μL P3000和2.5μl lipofectamine)转染snRNA。24小时后,细胞被胰蛋白酶化,并且将1/2的细胞接种在用于FISH的腔室载玻片中,并且将另外1/2的细胞接种在24孔板中以用于RNA分析。

[0221] 第二天,提取RNA以用于RNA分析,并且将细胞固定以用于FISH。对于FISH,将CUG灶点用CUG荧光探针标记,并且将细胞核用DAPI染色。

[0222] 目的:确定包含工程化茎环的工程化snRNP是否能够敲低CUG扩增,并且因此减少DM1细胞模型中RNA灶点的数量。

[0223] 基本原理:U7 snRNA可以通过用与目的靶标互补的序列替代其组蛋白mRNA退火序列来编程以靶向mRNA。其他文献已经表明,具有15x CAG重复的U7减少了导致DM1的CUG重复扩增(François等人NSMB 2011)。我们通过工程化茎环(SEQ ID NO:1)来优化这种snRNA系统,以更好地稳定细胞中U7 snRNA的二级结构。我们将我们的工程化U7茎环与本领域已知的U7茎环(François等人NSMB 2011)进行了比较。构建体含有15x CAG重复和优化的Sm结合结构域,这进一步有助于稳定经编程的U7。在适当的细胞模型中测试靶向CUG的构建体以确定它们是否可以通过结合至和阻断CUG重复来耗尽CUG灶点,并且将其与含有非靶向(NT)序列的U7进行比较。参见图1A-图1D和图2A-图2C。

[0224] 将构建体和对照瞬时转染到HeLa(CTG480)中,所述HeLa具有通过模型DM1的CRISPR插入其基因组中的480个CTG重复,并且表达如通过原位杂交所示的CUG灶点。将细胞接种并固定在腔室载玻片上,并且使用用于CUG的探针和用于核染色的dapi在细胞上进行RNA原位杂交。使用Halo定量CUG探针和DAPI信号的共定位。

[0225] 用15xCAG esnRNA构建体处理(用于靶向/阻断CUG重复)显著减少了CUG RNA灶点。

[0226] 与非工程化snRNA和esnRNA构建体的各自的非靶向对照相比,非工程化snRNA和esnRNA构建体分别导致平均灶点数/细胞减少39%和68%。

实施例2:靶向CAG重复的esnRNA

[0227] 材料与方法:

[0228] 将HEK293T细胞以150,000个细胞/ml接种在12孔板中。第二天,使用lipofectamine(每个样品2μL P3000和2.5μl lipofectamine)转染snRNA。将细胞用CAG报告物构建体(含有80个CAG重复)和渐增剂量(从100ng至1000ng)的靶向CAG重复的snRNA质粒(称为CUG-15)或对照非靶向(nt)转染。

[0229] 在转染后48h,使用QiaCube Connect提取RNA以用于RNA分析。进行qRT-PCR以检测CAG报告物的表达水平,并且相对于GAPDH参考基因的表达水平归一化。

[0230] 另一组细胞用于采用myc标签抗体的蛋白质印迹分析,以检测含有报告物的聚QCAG的蛋白质水平。将GAPDH用作加载对照。

[0231] 目的:突变体HTT是由HTT的外显子一中的微卫星重复的存在引起的。在此,我们探索了包含工程化茎环的工程化snRNP是否能够在CAG80报告物测定中敲低CAG微卫星重复RNA。

[0232] 基本原理:

[0233] U7 snRNA可以通过用与目的靶标互补的序列替代其组蛋白mRNA退火序列来编程以靶向mRNA。重编程为靶向CAG重复的esnRNA系统包含SEQ ID NO:1的eSL,以更好地稳定细胞中U7 snRNA的二级结构。构建体含有15x CUG重复以靶向CAG扩增。这些构建体还含有优

化的Sm结合结构域,这进一步有助于稳定经编程的U7。测试靶向CAG的构建体以确定与含有非靶向序列的eSL相比,它们是否可以敲低CAG重复和含有聚Q的蛋白质。

[0234] 通过最高3个剂量的U7实现可检测聚Q蛋白的完全敲低。在最低U7剂量下实现了几乎完全的敲低。因此,我们在本文中显示了CAG80报告物mRNA剂量依赖性敲低至基线水平。参见图3A-图3C。

实施例3:USH2A小基因外显子13剪接的esnRNA调节

[0235] 材料与方法:

[0236] 将HEK293T细胞以150,000/ml接种在12孔板中。第二天,用lipofectamine用50ng的USH2A小基因和总共250ng、500ng、1ug的表达非靶向esnRNA或靶向USH2A外显子13的esnRNA的pcDNA转染细胞。

[0237] 转染后48h收获细胞。使用Qiacube connect提取RNA,进行逆转录,并且用与USH2A外显子12和14退火的引物进行半定量PCR。

[0238] 用与非靶向esnRNA退火的引物通过PCR进行U7的定量。

[0239] 基本原理:USH2A外显子13突变导致2A型厄舍综合征。外显子13是框内外显子,并且治疗策略包括跳跃外显子13。我们设计了包含本文公开的eSL的esnRNA,其靶向USH2A的外显子13上的外显子剪接增强子并与USH2A的外显子13上的外显子剪接增强子退火,并且阻断外显子13的包含。我们编程的靶向USH2A外显子13的esnRNA系统导致小基因上的有效外显子13跳跃。PCR结果表明,与非工程化SL相比,esnRNA系统的稳态水平更高。参见图4A-图4D。还参见图1A。

实施例4:在DM1患者肌管中通过由esnRNA介导的CUG重复阻断进行剪接校正

[0240] 材料与方法:

[0241] 将在DMPK的3'UTR中含有2600个CUG重复的DM1患者肌管分化13天,然后引入包含本文公开的eSL的靶向15xCUG重复的esnRNA。在处理之后24小时从细胞中提取RNA,逆转录RNA,并且对DM1疾病剪接生物标记物LDB3外显子11、BIN1外显子11和DMD外显子78进行半定量PCR。通过计算健康剪接同种型(LDB3外显子11排除同种型、BIN1外显子11包含同种型以及DMD外显子78包含同种型)占来自疾病和健康同种型二者的总信号的百分比来进行剪接同种型的分析。

[0242] 基本原理:

[0243] DM1是由DMPK基因的3'UTR中的CUG重复扩增引起的,其隔离MBNL蛋白,并且因此导致可变剪接的失调。将包含本文公开的eSL的esnRNA编程为靶向CUG(15xCUG),并且这导致与非靶向对照相比,所有三种测试的疾病剪接生物标记物的健康剪接同种型的剂量依赖性增加。参见图5A-图5F。还参见图2C。

实施例5:在基于U7的eSL和ISD中测试可替代的5′稳定基序。

[0244] 通过以下来显示和确定具有可替代的5′相互作用稳定结构域(ISD)的靶向CUGx15的snRNA在减少RNA灶点中的功效:在CTG480 HeLa细胞中进行合成snRNA转染,随后进行CUG RNA灶点的荧光原位杂交。参见图6A-图6B。(浅蓝色=具有相应5′ISD的可替代的工程化茎环。深蓝色=选择的工程化茎环和相应5′1SD。sR220004=非靶向snRNA。)

[0245] 在转染合成snRNA后24h、48h和72h时间点,评价了具有可替代的5′稳定结构域的非靶向snRNA的表达水平。参见图7A-图7B。sR220004在所有三个时间点都具有最高表达;

sR220088没有可检测到的表达;选择在004中发现的eSL/5′ISD用于未来的构建体;sR220004和sR220091在48h和72h时间点具有最高的表达保留。

实施例6:通过PolIII和PolII启动子的U7snRNA功效和表达

[0246] 当由不同的人PolIII和PolII启动子驱动snRNA表达时,在CTG480 HeLa细胞中通过qPCR来评价snRNA表达。参见图8。U1启动子驱动最高水平的snRNA,随后是U7启动子。PolIII启动子U6和7SK具有低表达,并且PolIII tRNA启动子具有最低表达。

[0247] 在CTG480 HeLa细胞中通过RNA FISH来评价CUG灶点定量。参见图9A-图9B。仅U1和U7启动子在减少CUG灶点的数量方面明显有效,其中U1比U7更有效(蓝色=CUG靶向;灰色=非靶向)。

UID	启动子,靶标
P03490	tRNA(CUGx151
P03462	U6(CUGx15)
P03465	7SK(CUGx15)
P03557	U1(CUGx15)
P02225	U7(CUGx15)
P03491	tRNA(nt)
P03463	U6(nt)
P03466	7SK(nt)
P03561	U1(nt)
P02313	U7(nt)

[0248] 在HEK293T细胞中通过qPCR来确定snRNA表达(参见图10)。当SmOpt转化为U1 Sm结合位点时,在PolIII启动子控制下U7 snRNA的表达增加高达25x。当Sm位点转化为U1 Sm时,通过PolII U1和U7启动子的表达降低。通过U1和U7启动子的表达优于通过Pol III启动子的表达。

[0249] 将snRNA转染到HEK293T细胞中。参见图11A-图11B。在此,由独特的snRNA启动子驱动znt esnRNA和z38 esnRNA表达。将这些构建体转染到HEK293T细胞中。转染之后48h提取RNA并制备cDNA。将对每种snRNA(z)具有特异性的引物用于qPCR,以确定snRNA表达和相对启动子强度。

实施例7:esnRNA构建体导致在患者肌管中外显子51的DMD外显子跳跃。

[0250] 用本文公开的snRNA进行人δ外显子52肌管的转导。参见图12A-图12B。使用扩增引物对条带强度进行定量,来确定外显子51跳跃%。

[0251] 用携带本文公开的snRNA的AAV9转导人δ外显子52肌管。对结蛋白和抗肌萎缩蛋白进行免疫荧光法。在用靶向外显子51的snRNA处理后,可以检测到抗肌萎缩蛋白。参见图13A-图13B。

实施例8:外显子51跳跃骨骼肌管和DMD小鼠模型

[0252] 用携带融合反义序列(z73=z38/z42和z187=z42/z38)的靶向外显子51RNA的snRNA转染缺失外显子52的人骨骼肌管,所述融合反义序列靶向外显子剪接增强子(ESE)。在转染低剂量的snRNA之后24小时,定量外显子51跳跃水平(tape station图像,图15A)。用AAV9-A04526(2x z73)和A04569(2xz187)转导人骨骼肌管(缺失DMD外显子52)。以2.5e4、

1e5和5e5的MOI转导肌管持续7天。定量基于AAV9的外显子51跳跃(图15B)。向携带外显子52缺失的hDMD(del52hDMD/mdx)的小鼠眼眶后注射3e12个A04526和A04569载体基因组。存活3周后,从胫骨前肌(TA)、腓肠肌(Gc)和心脏提取RNA。进行半定量RT-PCR,以检测包含和排除外显子51的条带。(图15C)显示在人源化DMD小鼠模型中外显子51跳跃的定量。将3e11个vg/肌肉剂量的A04526或靶向外显子51ESE的Morpholino(ViM)肌肉内递送至del52hDMD/mdx小鼠的腓肠肌。图15D显示了4周后抗肌萎缩蛋白阳性纤维的定量。表达野生型人抗肌萎缩蛋白的hDMD/mdx小鼠(灰色条)用作抗肌萎缩蛋白表达的阳性对照。U=未经处理的。

实施例9:在DM1患者来源的肌管中,基于AAV9的剪接逆转和CUG重复敲低

[0253] 通过用myoD腺病毒载体转导(持续5天),使DM1患者成纤维细胞分化成肌管。以5e4、2e5和1e6的MOI用A04233和A04234(具有靶向CUG重复的双snRNA盒的scAAV9)转导肌管,并且在转导之后7天收获。在患者来源的肌管(含有1700个CUG重复)中,在用靶向CUG重复的U7 snRNA处理后,DMD和LBD3 RNA的剪接逆转,以及DMPK的敲低。参见图16A-图16D。将细胞核用DAPI染色,并且用CUG标记的探针进行CUG FISH。转导后7天处理细胞以定量每个细胞的CUG灶点的平均数量。参见图17A-图17B。

实施例10:在HD患者细胞和HD小鼠模型中的基于AAV9的HTT敲低

[0254] 将HD患者iPSc(含有66个CAG重复)分化为皮层神经元,持续2周,然后以2种不同MOI用AAV-A04390 snRNA载体(靶向CAG重复的2x snRNA盒)转导另外的2周。然后收获皮层神经元,并且通过Meso scalediscovery免疫测定定量突变体可溶性HTT。参见图18A-图18C。然后,在R6/2HD小鼠模型中设计了靶向CAG重复的体内研究。以2e10个载体基因组纹状体内施用靶向CAG重复的AAV-snRNA载体(A03081:AAVrh10-snRNA(具有CAGx15 TS的4x snRNA)),并且经由Meso scalediscovery(MSD)免疫测定对未经处理的和经snRNA处理的小鼠(n=10)的处理后突变体可溶性HTT蛋白进行定量。参见图19A-图19B。

实施例11:与天然茎环snRNA载体相比,使用工程化茎环snRNA载体的表达水平更高。

[0255] 以1e6的MOI用AAV9-A04527载体(表达靶向DMD外显子51ESE的z38/42的天然茎环)或AAV9-A04526载体(表达靶向DMD外显子51ESE的z38/42的工程化茎环)转导CHO-Lec2细胞。与用天然茎环snRNA载体转导的细胞中的z38/42表达相比,用工程化snRNA载体转导的细胞中的z38/42的表达更高。参见图20A-图20B。

通过引用并入

[0256] 将在本文中引用的每个文件(包括任何交叉参考或相关的专利或申请)通过引用以其整体特此并入本文,除非明确排除或另有限制。引用任何文件并非承认,它是关于本文公开或具体化的任何发明的现有技术,或者它单独地或与任何其他一个或多个参考文献的任何组合传授、表明或公开任何这种发明。此外,在本文件中术语的任何含义或定义与通过引用并入的文件中相同术语的任何含义或定义矛盾的方面来说,应当以分配给本文件中该术语的含义或定义为准。

其他实施方案

[0257] 虽然已经说明并描述了本公开文本的具体实施方案,但是可以在不背离本公开文本的精神和范围的情况下做出各种其他变化和修改。所附权利要求的范围包括在本公开文本的范围内的所有此类变化和修改。

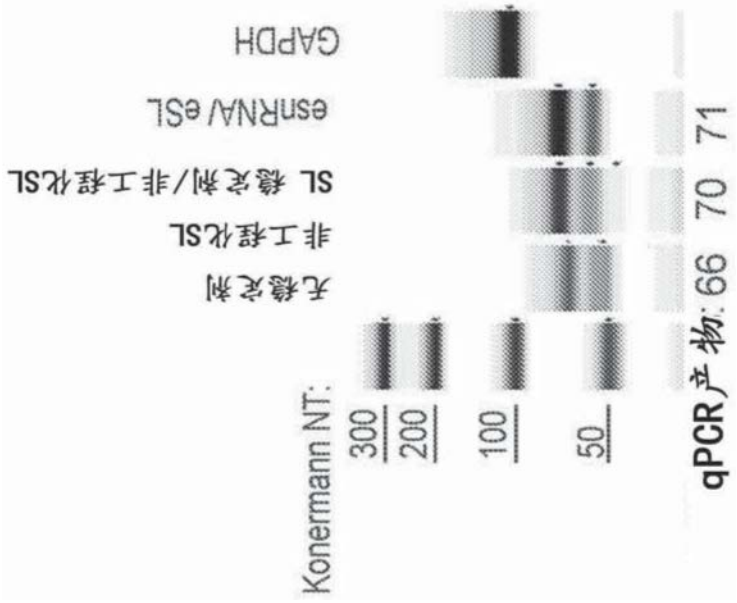

GAPDH
esnRNA/ eSL
SL 稳定剂/非工程化SL
非工程化SL
无稳定剂
Konermann NT:
300
200
100
50
qPCR产物: 66
70
71

图1A


具有eSL的esnRNA
5'
3'
稳定剂/
非工程化SL
5'
3'
无稳定剂/
非工程化SL
5'
3'

图1B

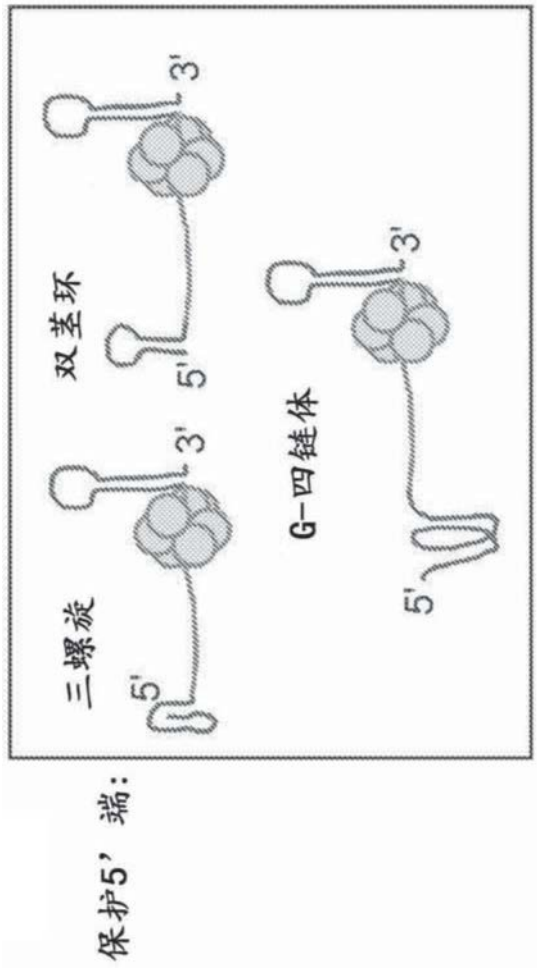


图1C



图1D

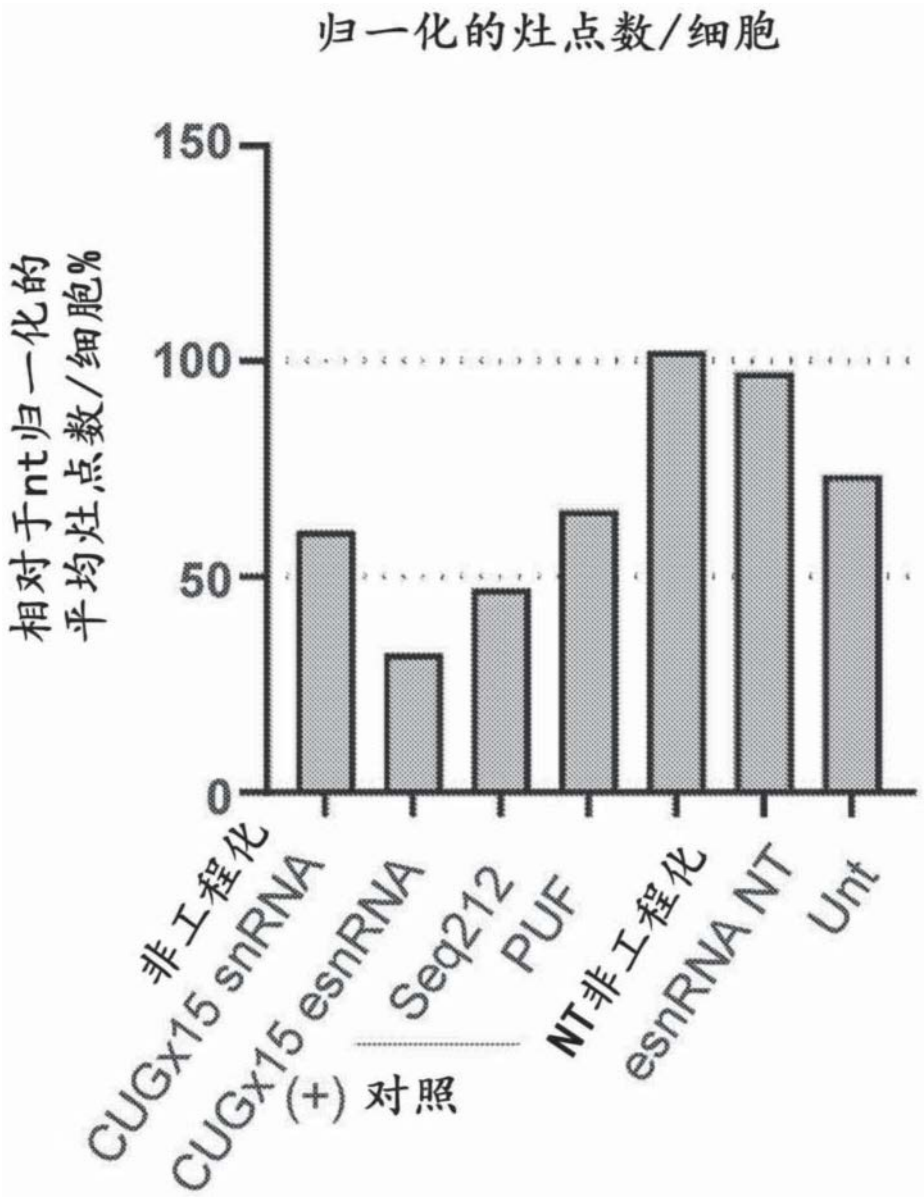

归一化的灶点数/细胞
相对于nt归一化的
平均灶点数/细胞%
150
100
50
0
非工程化
CUGx15 snRNA
CUGx15 esnRNA
(+) 对照
Seq212
PUF
NT非工程化
esnRNA NT
Unt

图2A

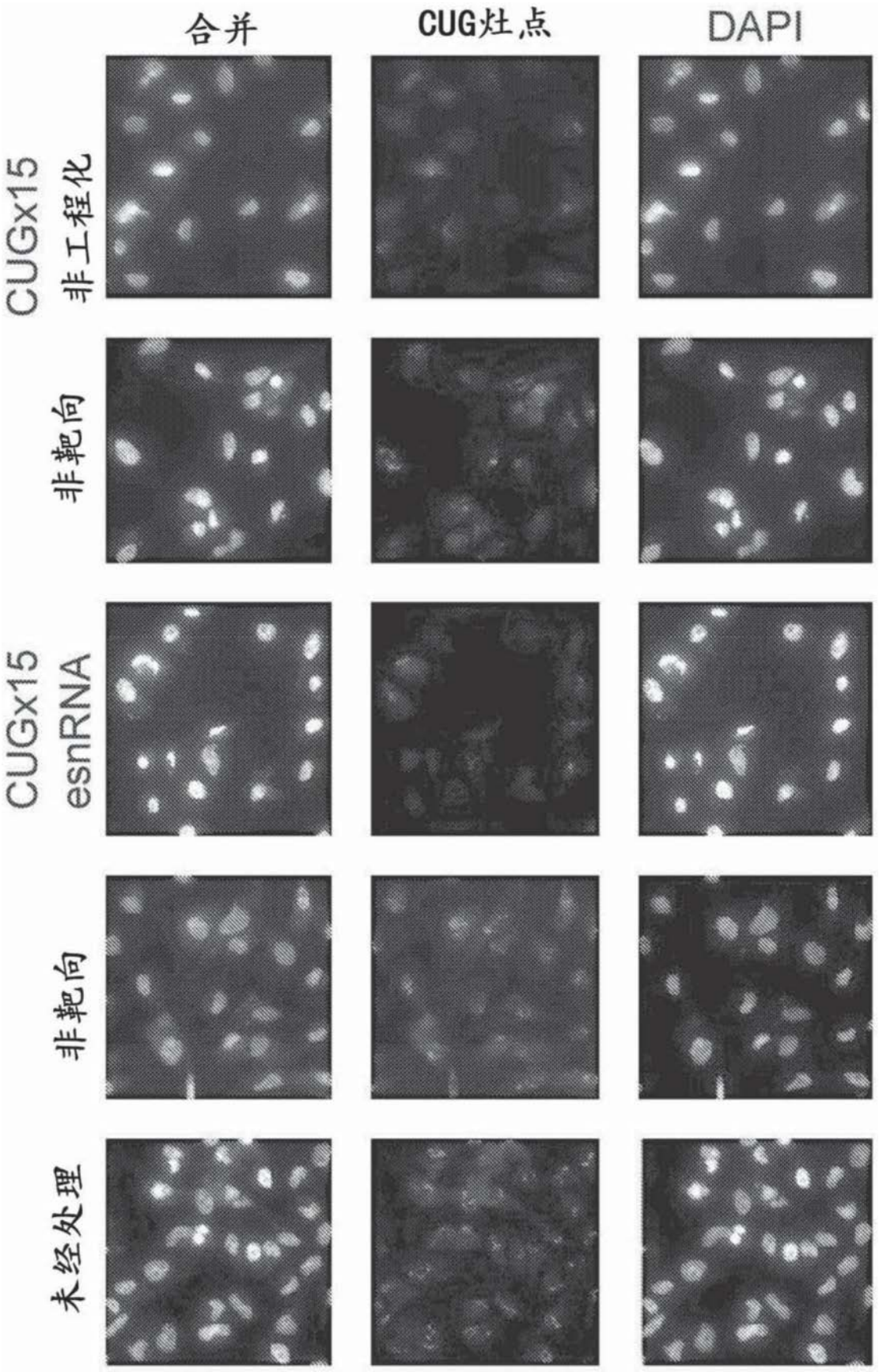


图2B

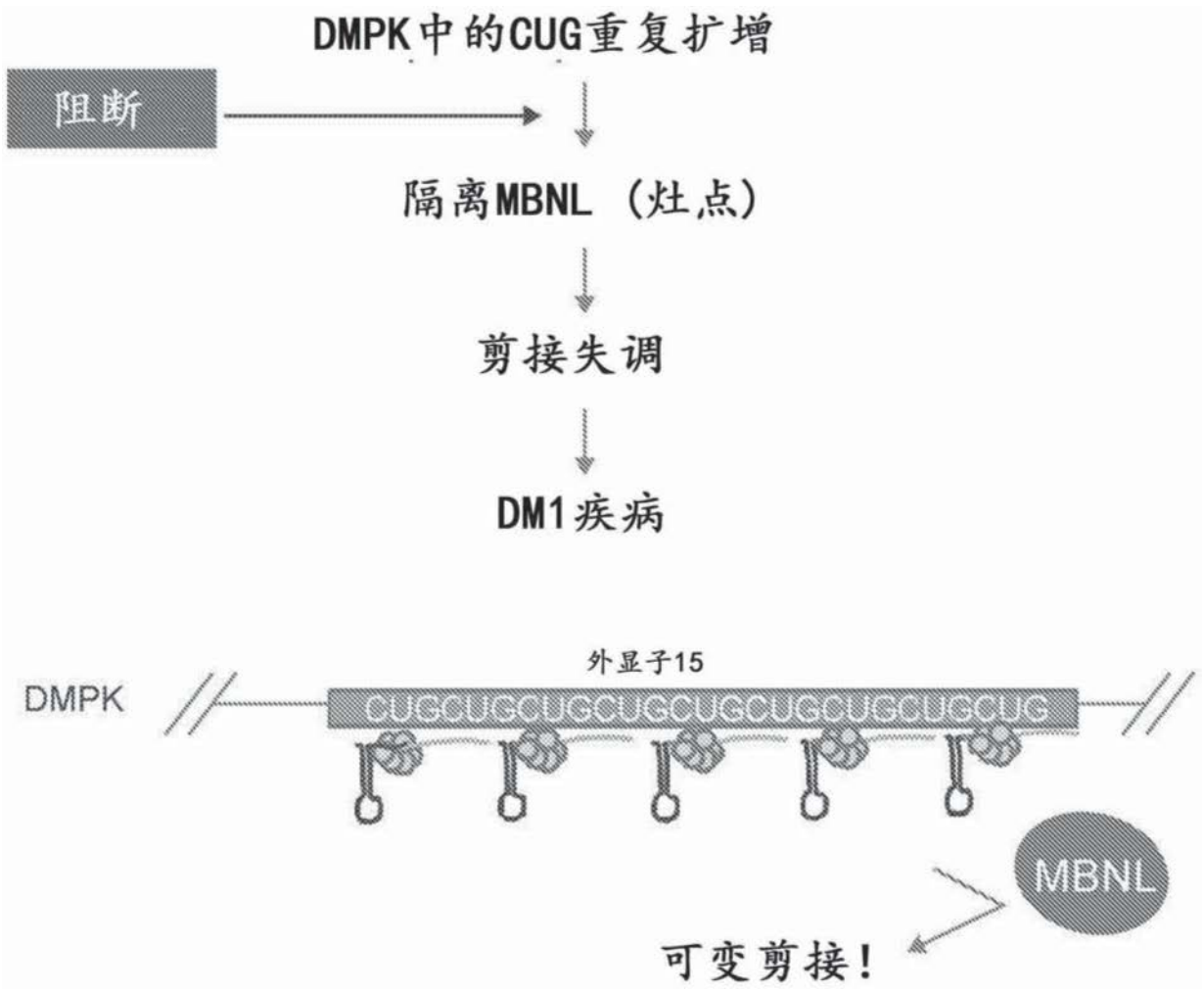

DMPK中的CUG重复扩增
阻断
隔离MBNL（灶点）
剪接失调
DM1疾病
外显子15
DMPK
CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUG
MBNL
可变剪接！

图2C

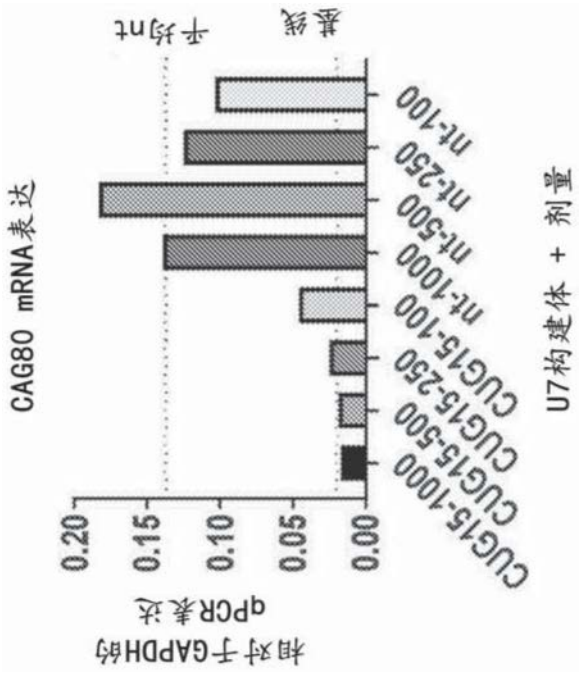

基线
平均nt
CAG80 mRNA表达
相对于GAPDH的
qPCR表达
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
nt-100
nt-250
nt-500
nt-1000
CUG15-100
CUG15-250
CUG15-500
CUG15-1000
U7构建体 + 剂量

图3A

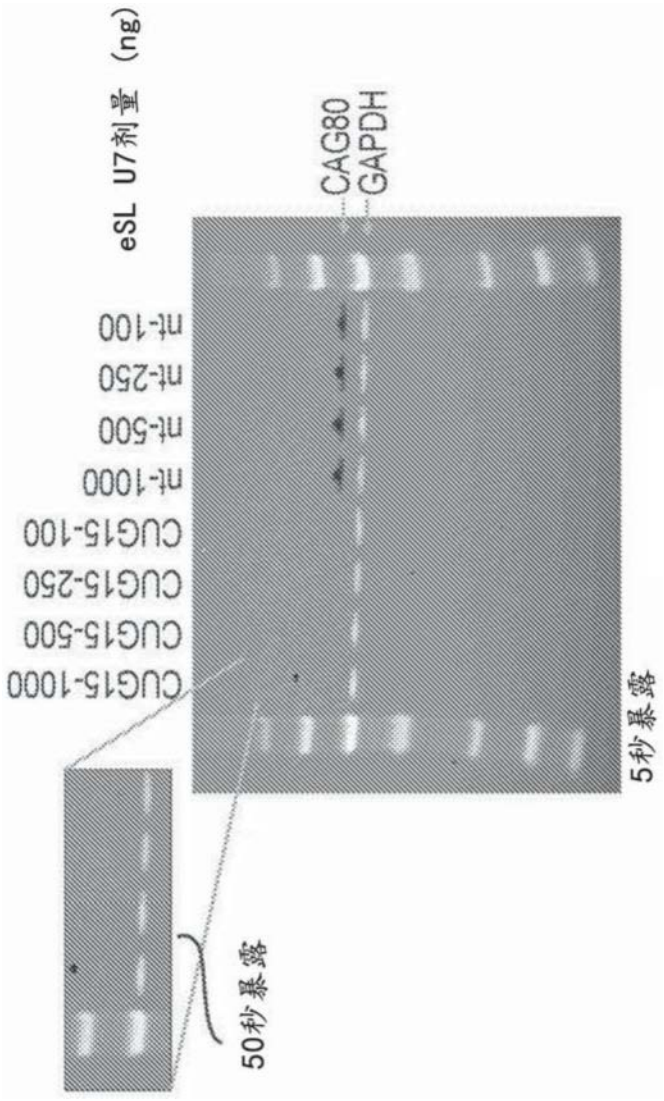

eSL U7剂量（ng）
CAG80
GAPDH
nt-100
nt-250
nt-500
nt-1000
CUG15-100
CUG15-250
CUG15-500
CUG15-1000
5秒暴露
50秒暴露

图3B

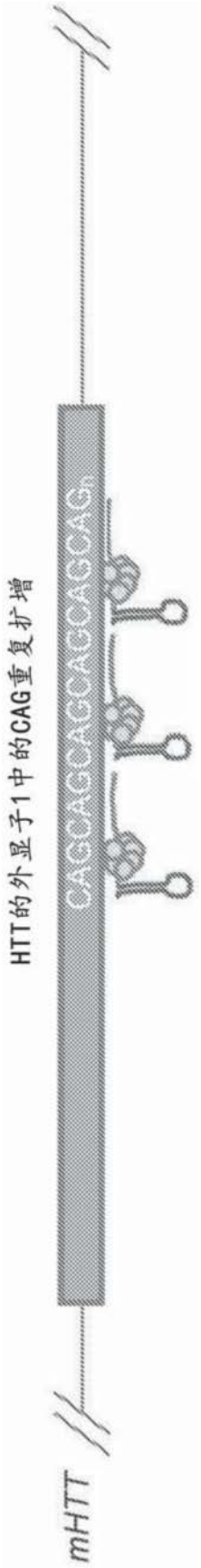


图3C

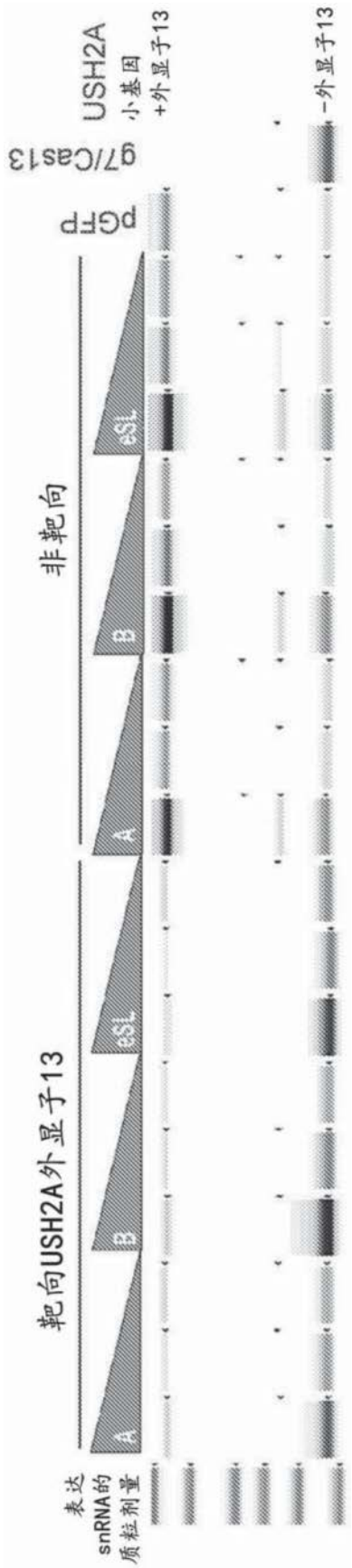

USH2A
小基因
+外显子13
-外显子13
g7/Cas13
pGT
非靶向
靶向USH2A外显子13
表达
snRNA的
质粒剂量
A
B
eSL

图4A



图4B

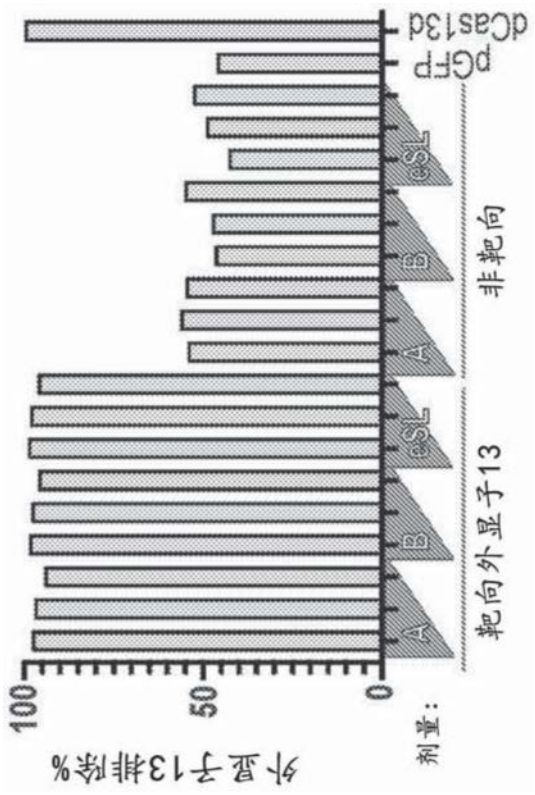

dCas13d
pGFP
eSL
B
A
非靶向
靶向外显子13
剂量:
0
50
100
外显子13靶向%

图4C

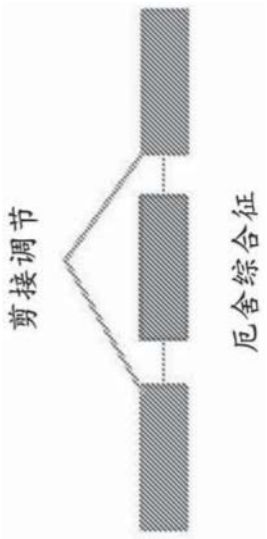

剪接调节
厄舍综合征

图4D

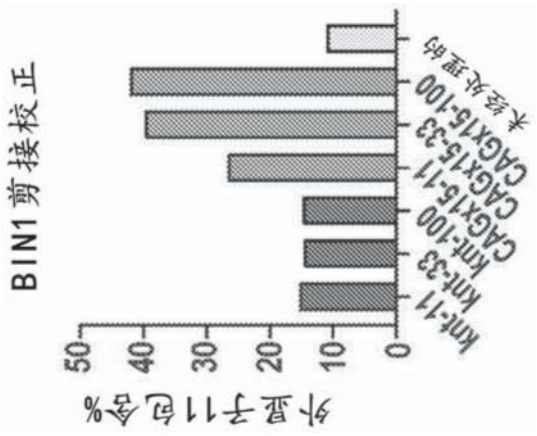

BIN1剪接校正
外显子11包含%
0
10
20
30
40
50
Kmt-11
Kmt-33
Kmt-100
CAGX15-11
CAGX15-33
CAGX15-100
未经处理的

图5A

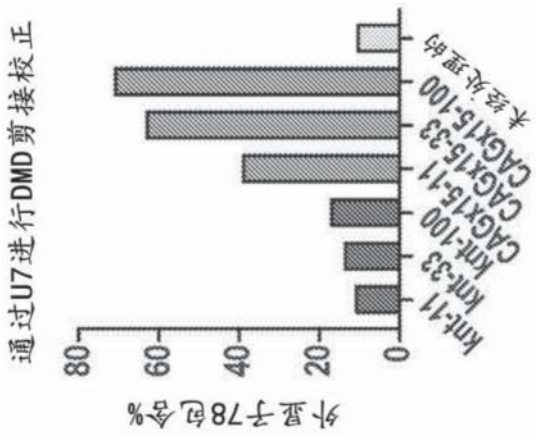

通过U7进行DMD剪接校正
外显子78包含%
0
20
40
60
80
Kmt-11
Kmt-33
Kmt-100
CAGX15-11
CAGX15-33
CAGX15-100
未经处理的

图5B

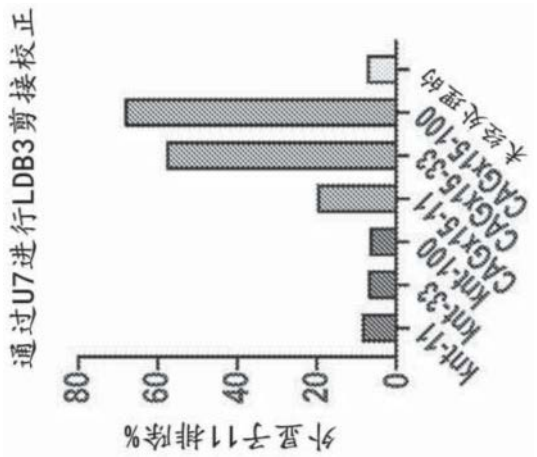

通过U7进行LDB3剪接校正
外显子11排除%
0
20
40
60
80
Kmt-11
Kmt-33
Kmt-100
CAGX15-11
CAGX15-33
CAGX15-100
未经处理的

图5C

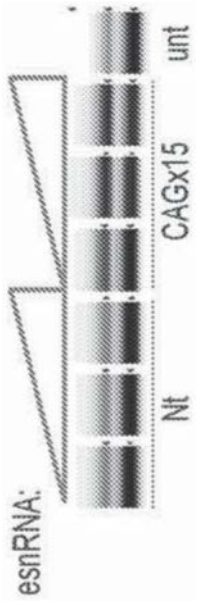


图5D

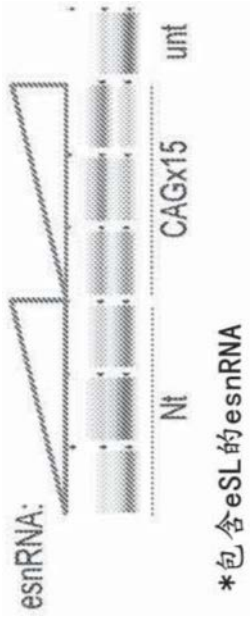


图5E


unt
CAGx15
Nt
esnRNA:

图5F

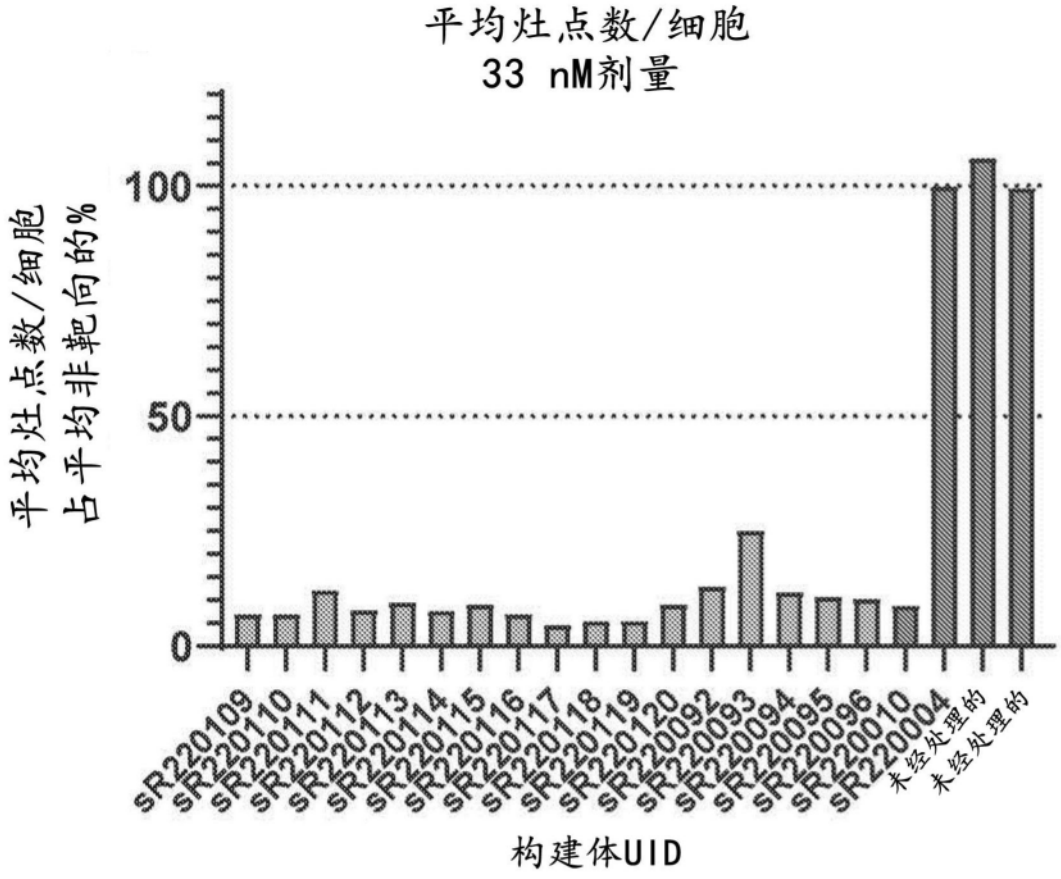

平均灶点数/细胞
33 nM剂量
平均灶点数/细胞
占平均非靶向的%
100
50
0
SR220109
SR220110
SR220111
SR220112
SR220113
SR220114
SR220115
SR220116
SR220117
SR220118
SR220119
SR220120
SR220092
SR220093
SR220094
SR220095
SR220096
SR220010
SR220004
未经处理的
未经处理的
构建体UID

图6A

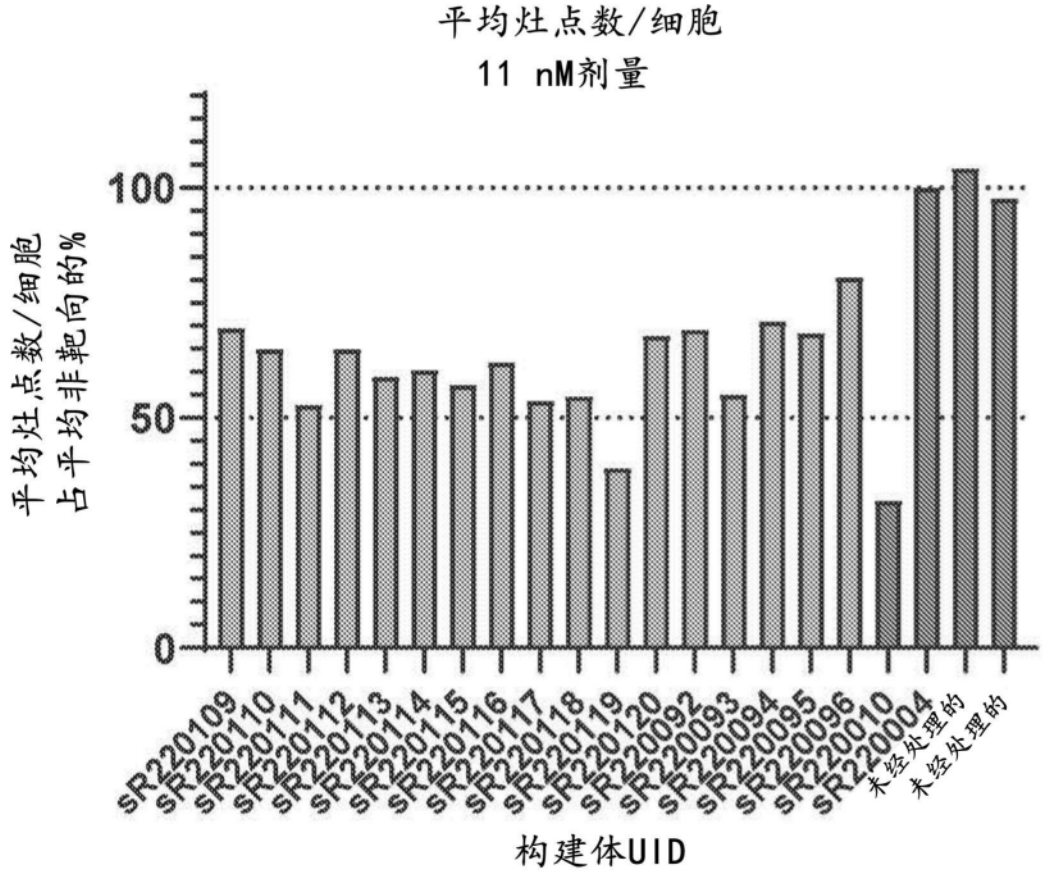

平均灶点数/细胞
11 nM剂量
平均灶点数/细胞
占平均非靶向的%
100
50
0
SR220109
SR220110
SR220111
SR220112
SR220113
SR220114
SR220115
SR220116
SR220117
SR220118
SR220119
SR220120
SR220092
SR220093
SR220094
SR220095
SR220096
SR220010
SR220004
未经处理的
未经处理的
构建体UID

图6B

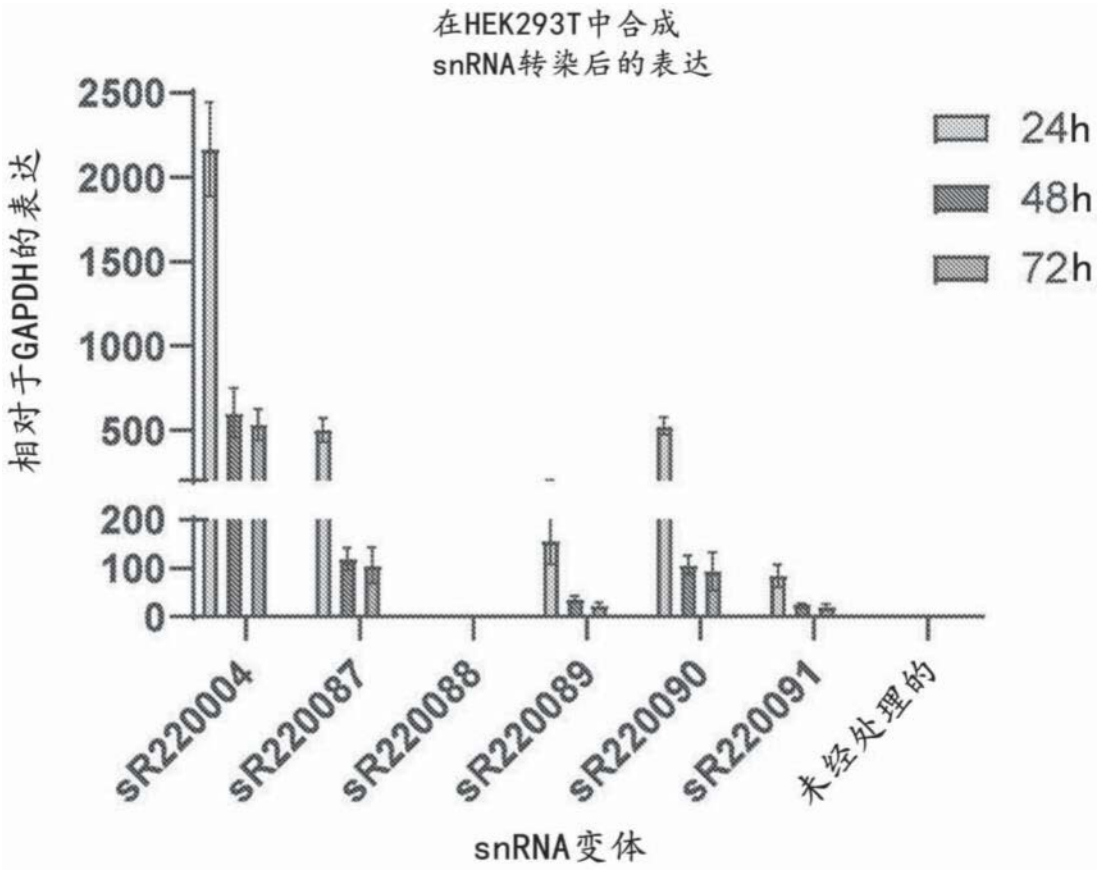

在HEK293T中合成
snRNA转染后的表达
相对于GAPDH的表达
2500
2000
1500
1000
500
200
100
0
24h
48h
72h
sR220004
sR220087
sR220088
sR220089
sR220090
sR220091
未经处理的
snRNA变体

图7A

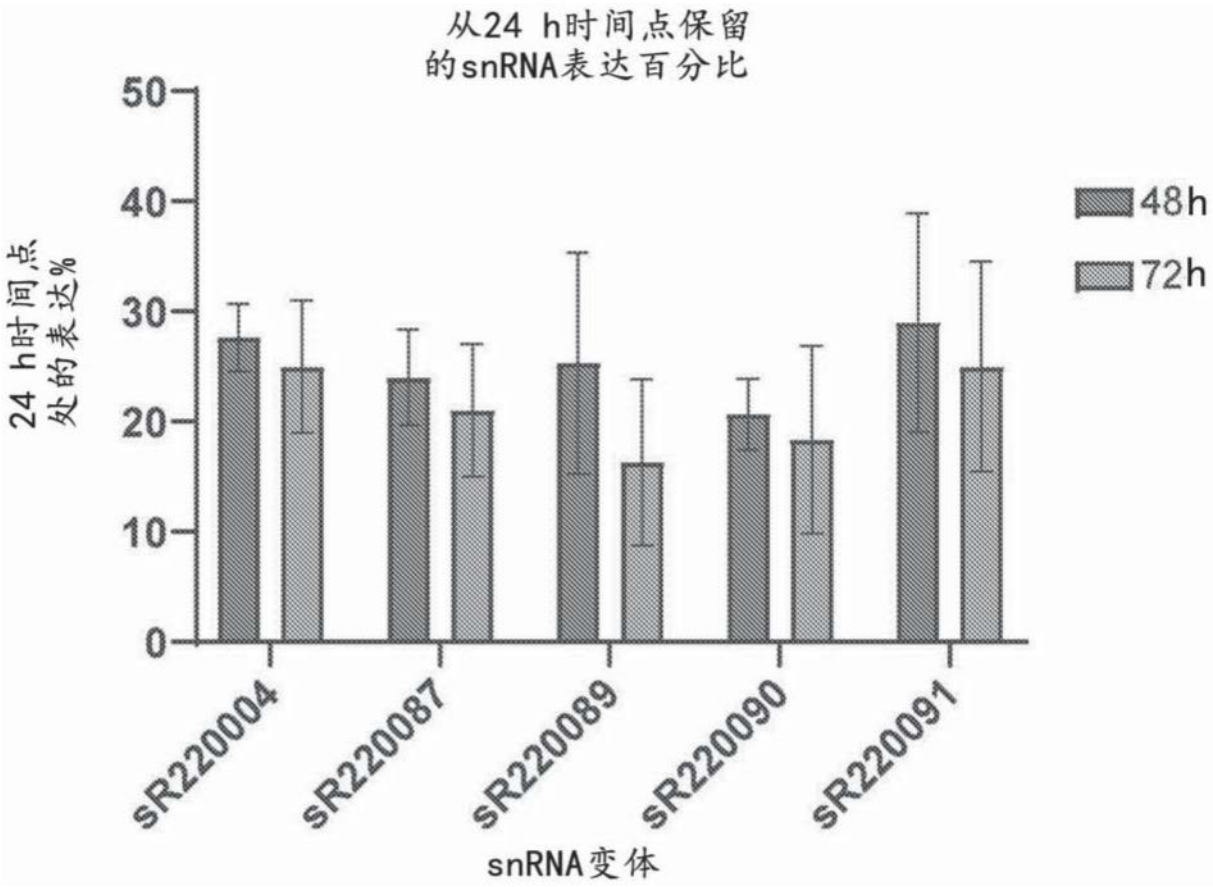

从24 h时间点保留
的snRNA表达百分比
24 h时间点
处的表达%
50
40
30
20
10
0
48h
72h
sR220004
sR220087
sR220089
sR220090
sR220091
snRNA变体

图7B

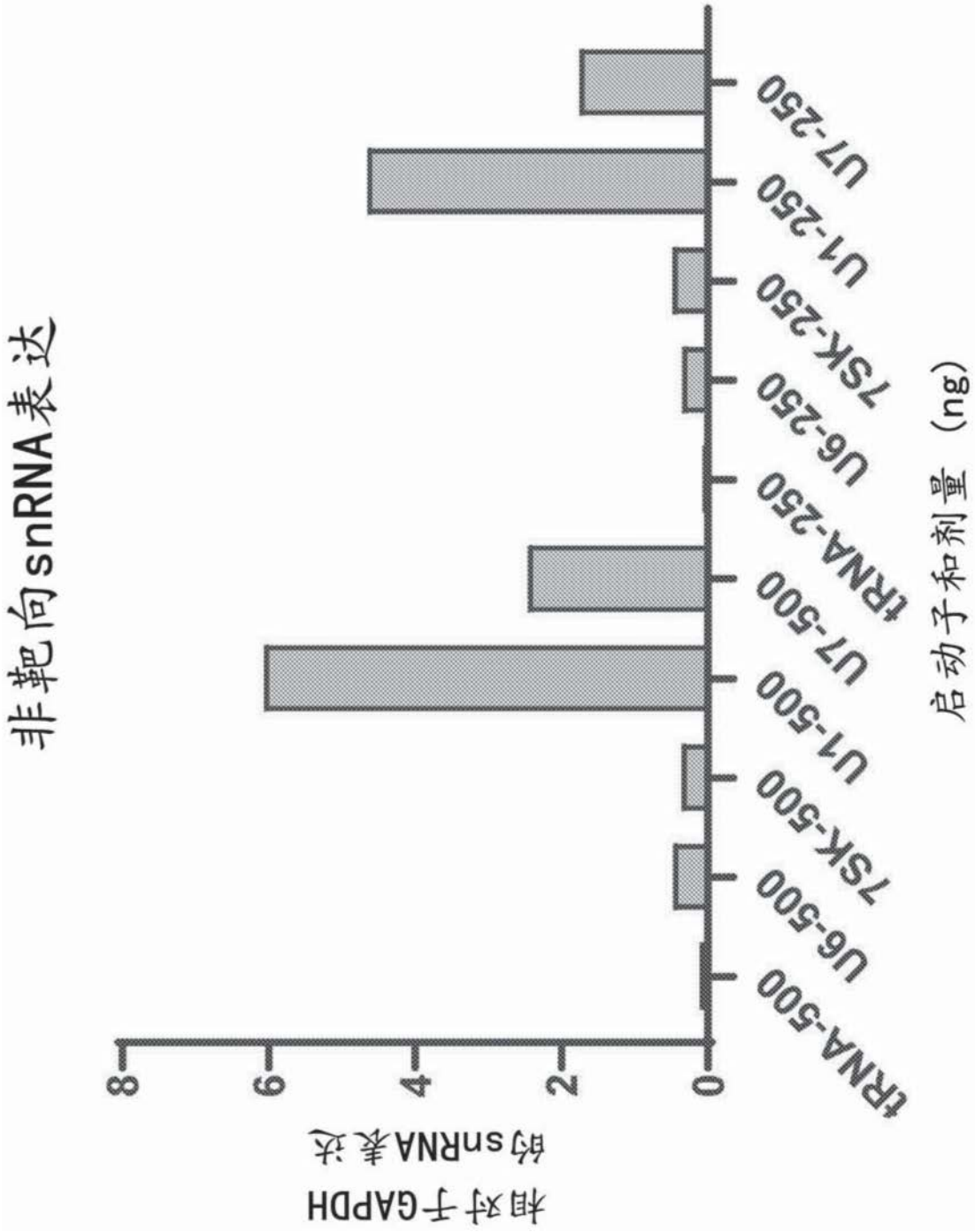

非靶向snRNA表达
相对于GAPDH的snRNA表达
0
2
4
6
8
tRNA-500
U6-500
7SK-500
U1-500
U7-500
tRNA-250
U6-250
7SK-250
U1-250
U7-250
启动子和剂量（ng）

图8

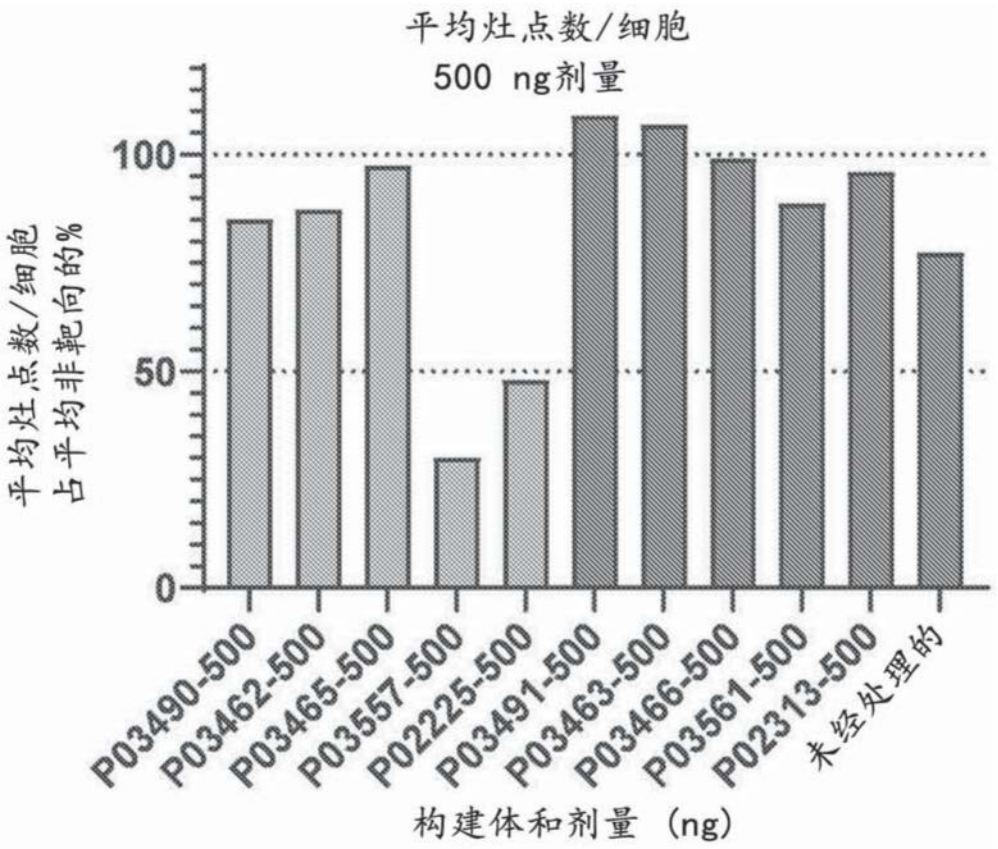

平均灶点数/细胞
500 ng剂量
平均灶点数/细胞
占平均非靶向的%
100
50
0
P03490-500
P03462-500
P03465-500
P03557-500
P02225-500
P03491-500
P03463-500
P03466-500
P03561-500
P02313-500
未经处理的
构建体和剂量 (ng)

图9A

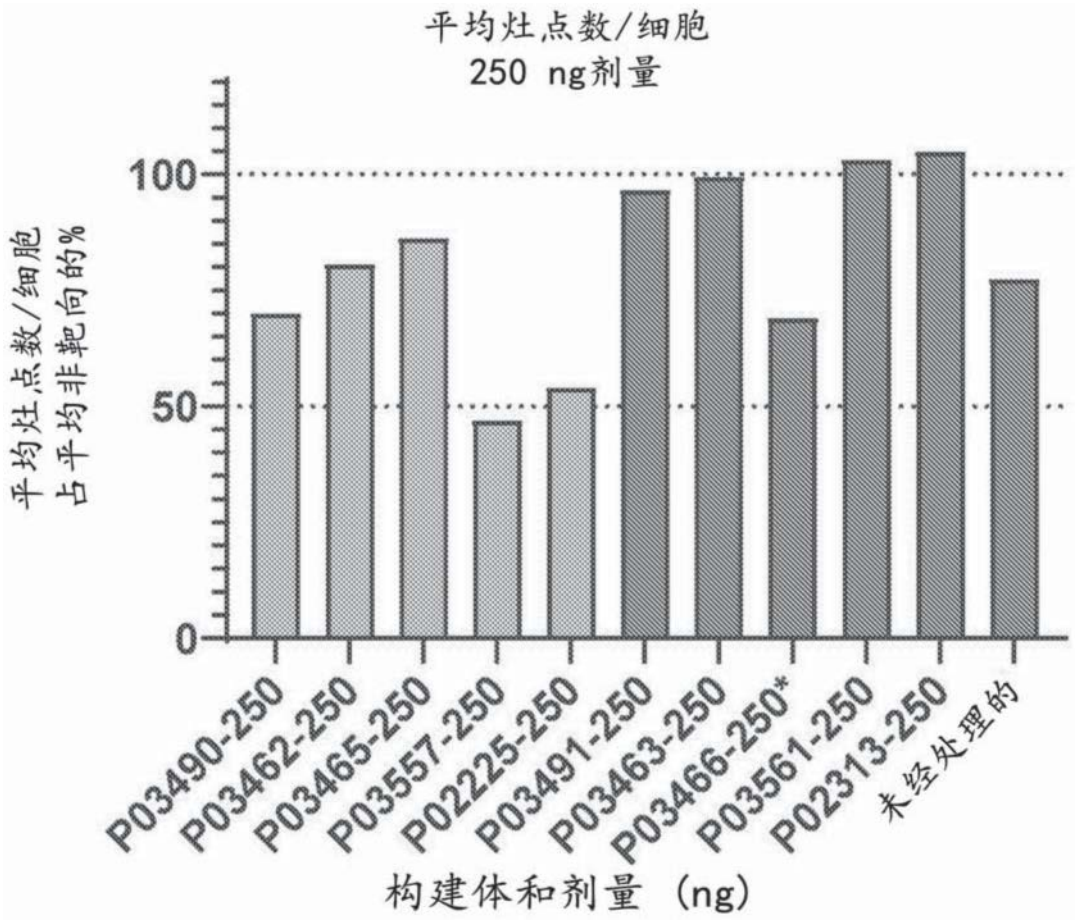

平均灶点数/细胞
250 ng剂量
平均灶点数/细胞
占平均非靶向的%
100
50
0
P03490-250
P03462-250
P03465-250
P03557-250
P02225-250
P03491-250
P03463-250
P03466-250*
P03561-250
P02313-250
未经处理的
构建体和剂量 (ng)

图9B

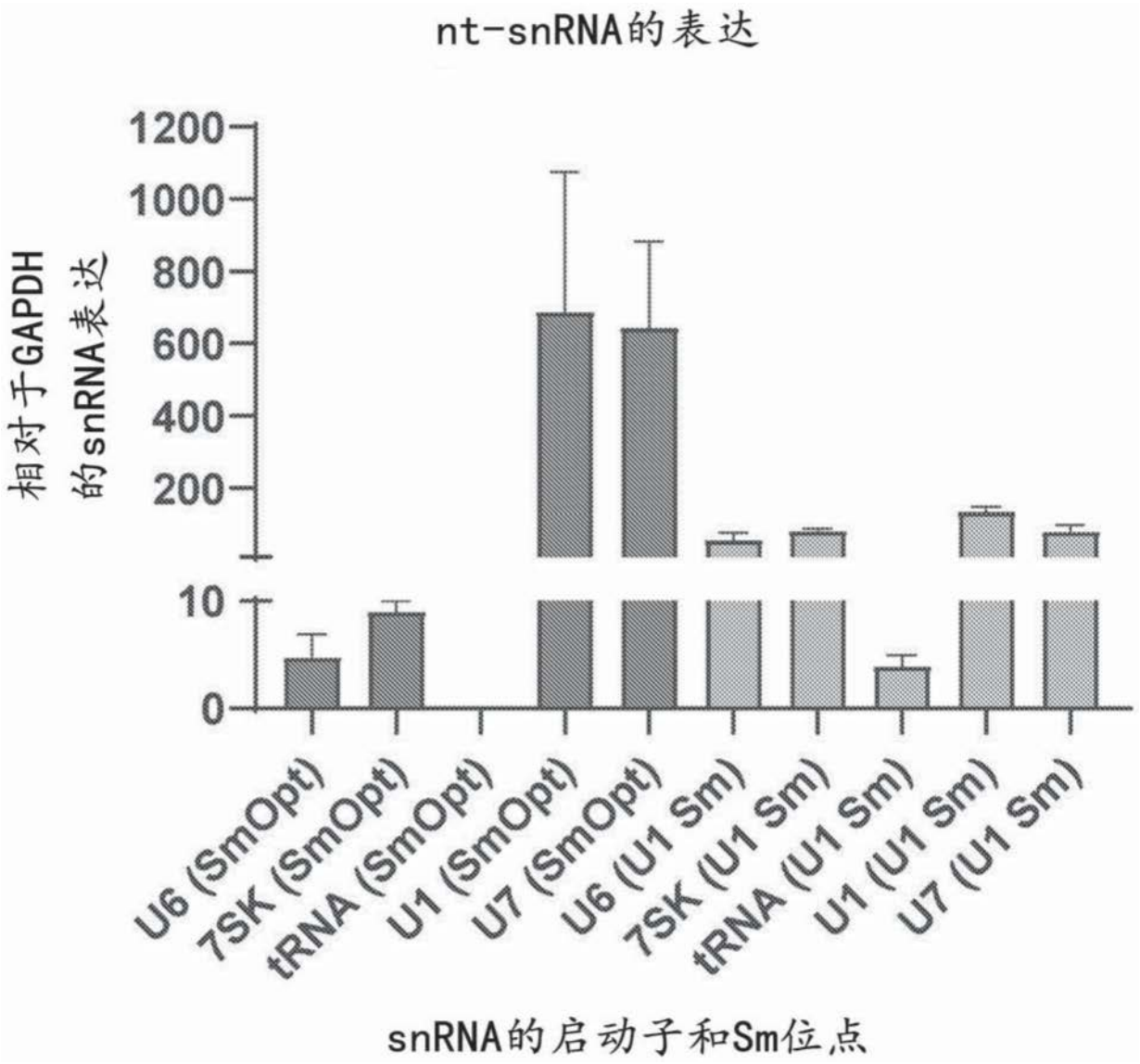

nt-snRNA的表达
相对于GAPDH的snRNA表达
1200
1000
800
600
400
200
10
0
U6 (SmOpt)
7SK (SmOpt)
tRNA (SmOpt)
U1 (SmOpt)
U7 (SmOpt)
U6 (U1 Sm)
7SK (U1 Sm)
tRNA (U1 Sm)
U1 (U1 Sm)
U7 (U1 Sm)
snRNA的启动子和Sm位点

图10

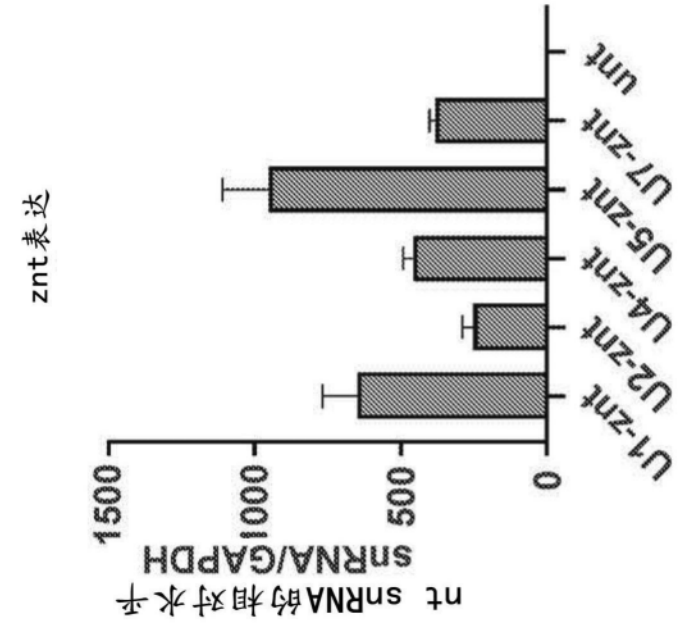

znt表达
nt snRNA的相对水平
snRNA/GAPDH
1500
1000
500
0
U1-znt
U2-znt
U4-znt
U5-znt
U7-znt
unt

图11A

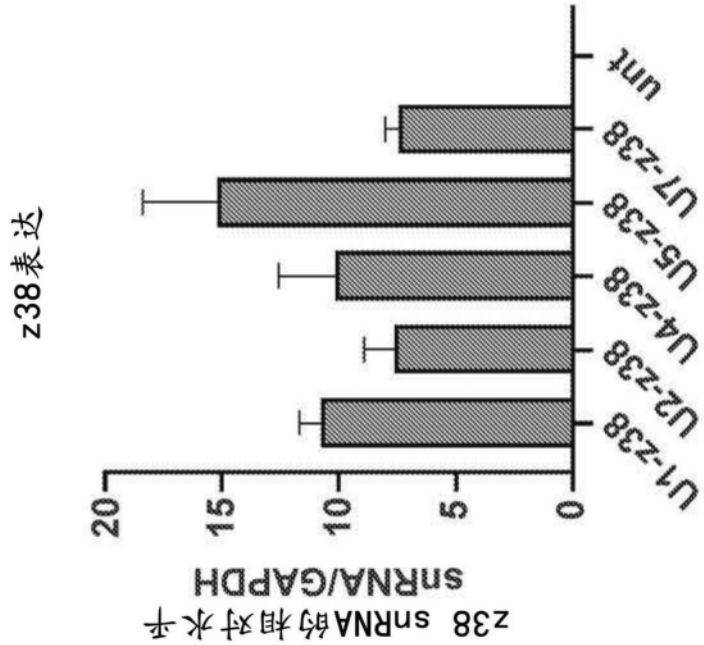

z38表达
z38 snRNA的相对水平
snRNA/GAPDH
20
15
10
5
0
U1-z38
U2-z38
U4-z38
U5-z38
U7-z38
unt

图11B

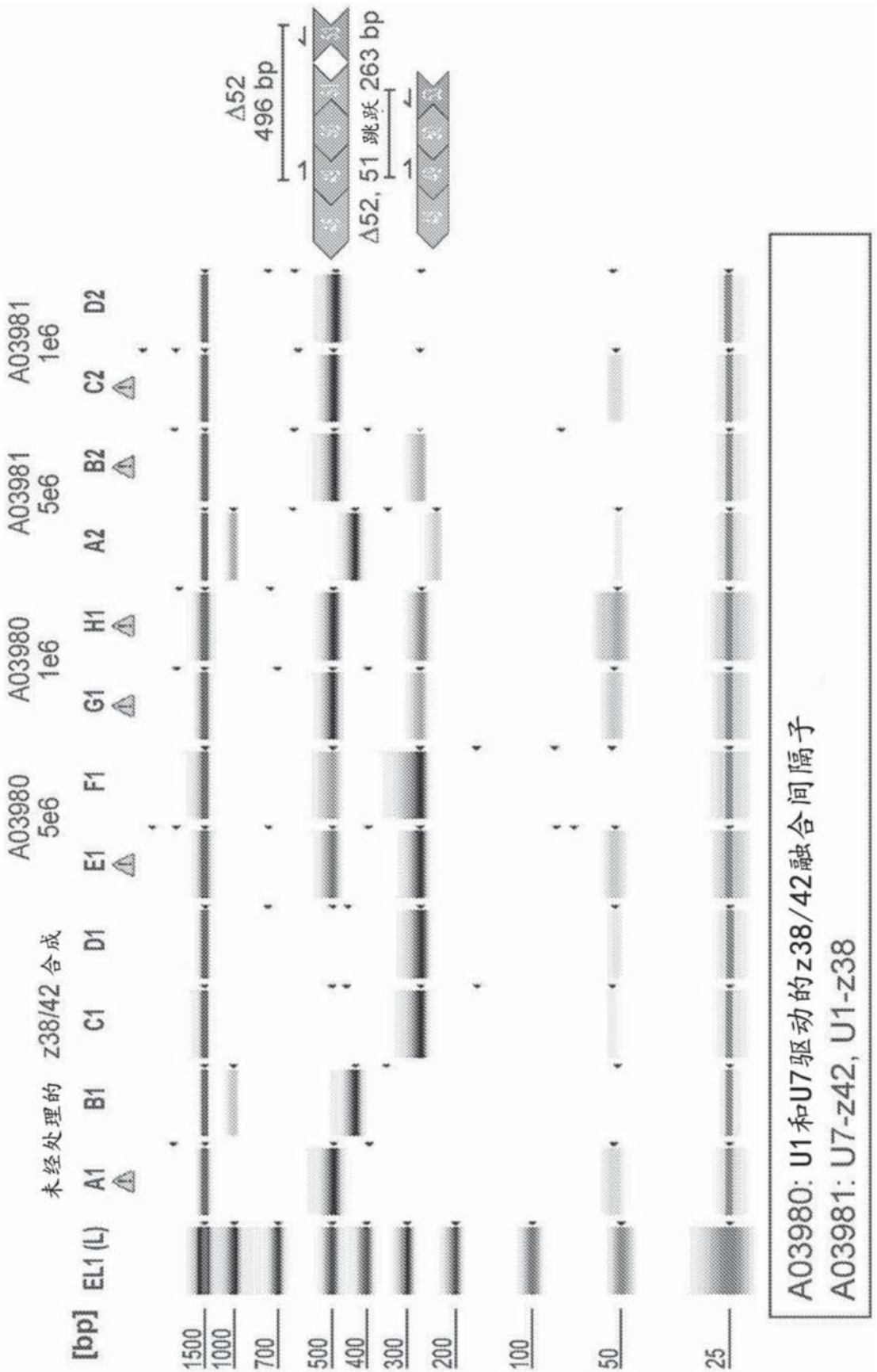

[bp]
EL1 (L)
未经处理的
A1
B1
z38/42 合成
C1
D1
A03980 5e6
E1
F1
A03980 1e6
G1
H1
A03981 5e6
A2
B2
A03981 1e6
C2
D2
1500
1000
700
500
400
300
200
100
50
25
Δ52 496 bp
Δ52, 51 跳跃 263 bp
A03980: U1和U7驱动的z38/42融合间隔子
A03981: U7-z42, U1-z38

图12A

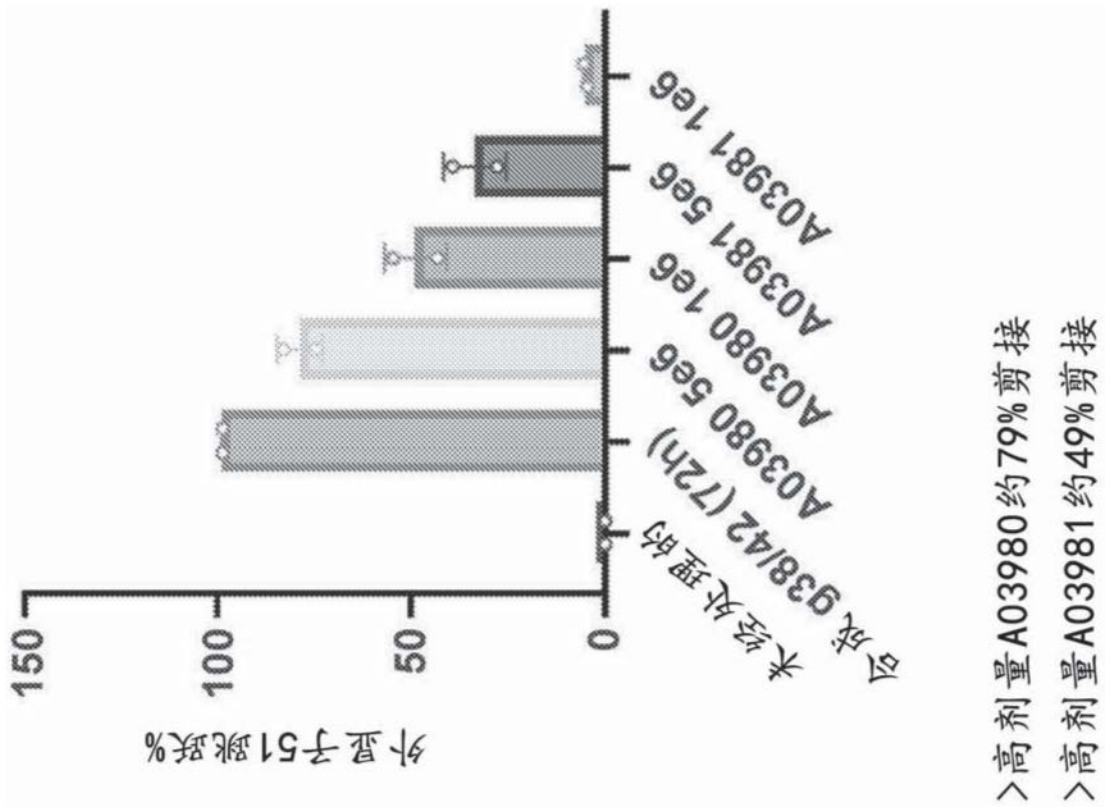

外显子51跳跃%
150
100
50
0
未经处理的
对照 938/42 (72h)
A03980 5e6
A03980 1e6
A03981 5e6
A03981 1e6
>高剂量A03980约79%剪接
>高剂量A03981约49%剪接

图12B

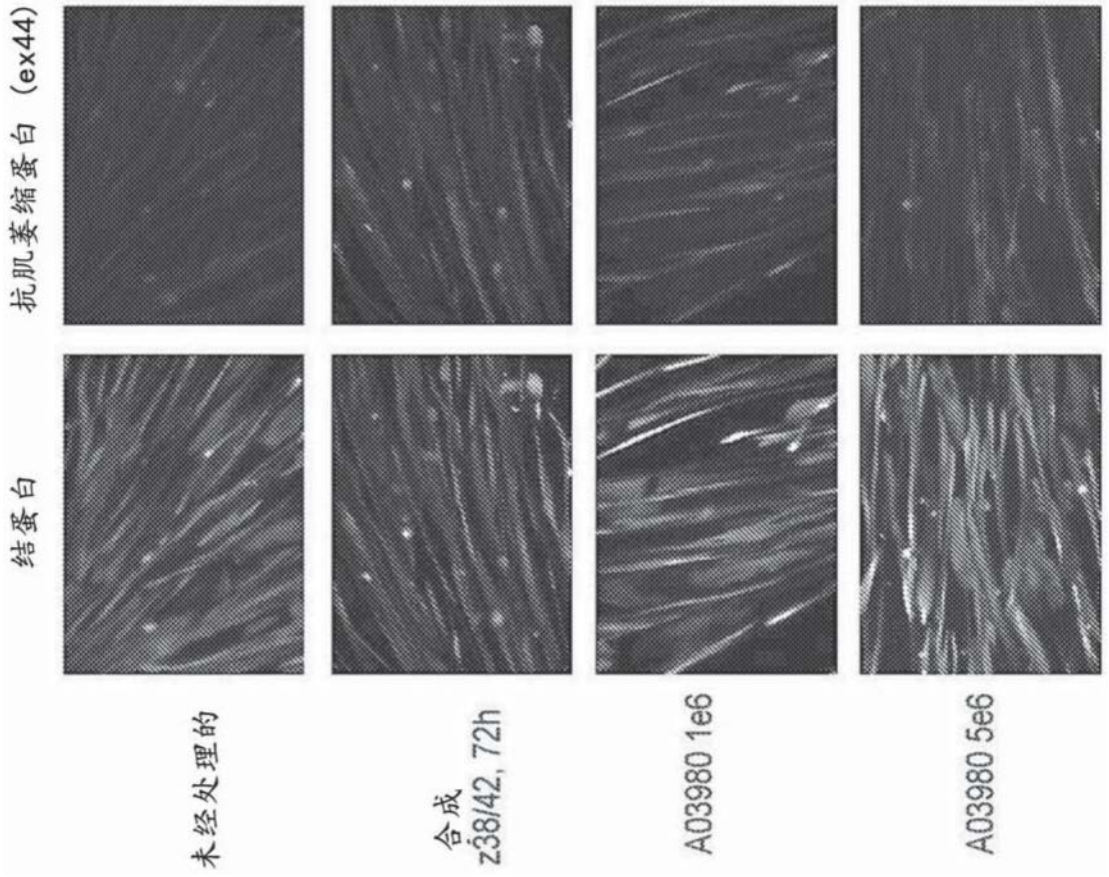


图13A

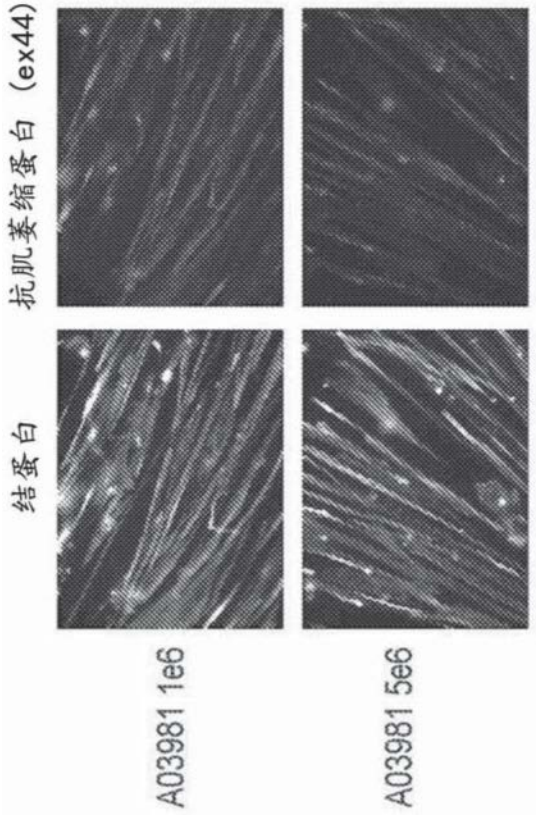


图13B

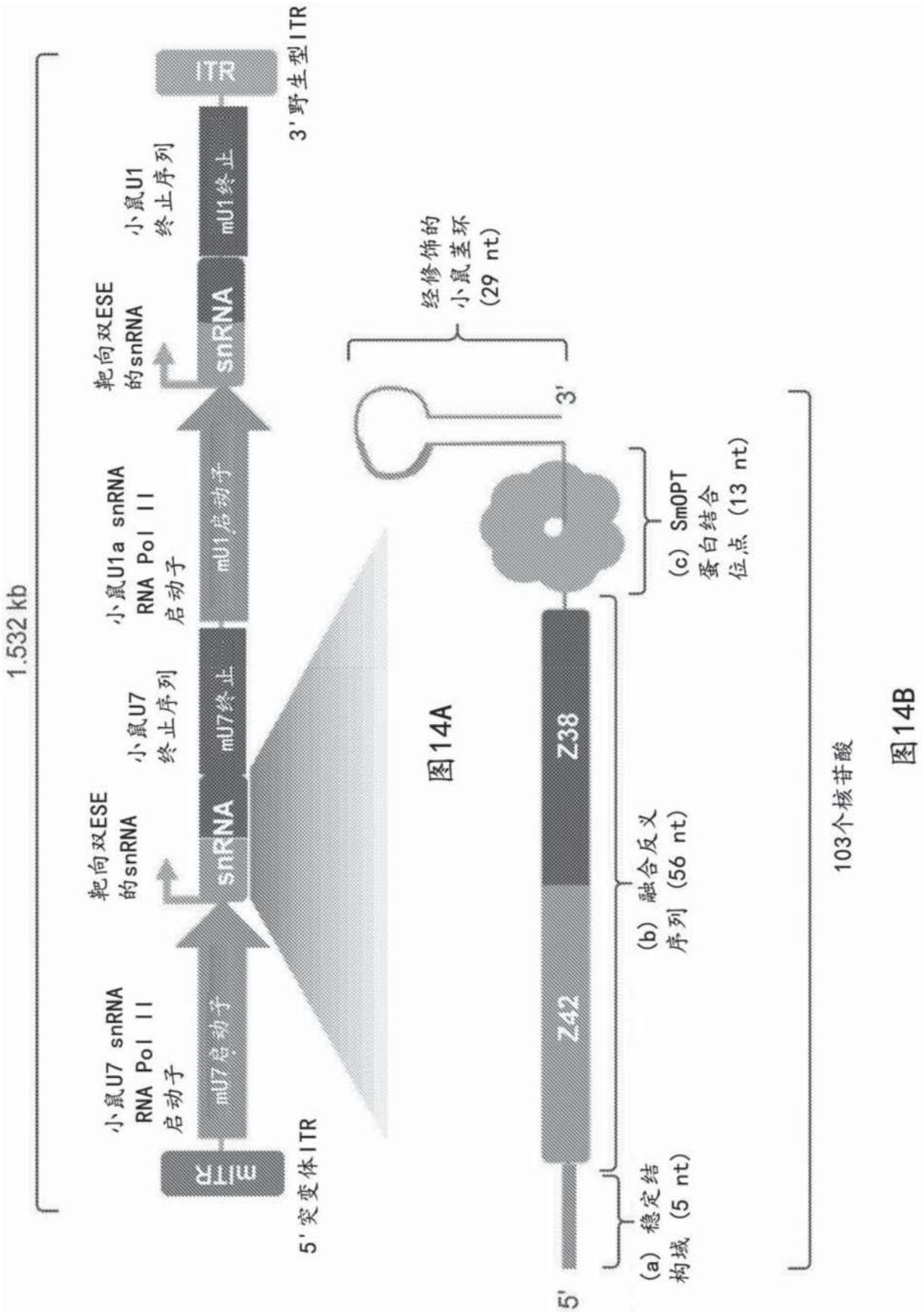

1.532 kb
小鼠U7 snRNA RNA Pol II 启动子
靶向双ESE 的snRNA
小鼠U7 终止序列
小鼠U1a snRNA RNA Pol II 启动子
靶向双ESE 的snRNA
小鼠U1 终止序列
mU7启动子
snRNA
mU7终止
mU1启动子
snRNA
mU1终止
ITR
ITR
5'突变体ITR
3'野生型ITR
经修饰的 小鼠茎环 (29 nt)
3'
Z42
Z38
5'
(a) 稳定结 构域 (5 nt)
(b) 融合反义 序列 (56 nt)
(c) SmOPT 蛋白结合 位点 (13 nt)
103个核苷酸

图14A

图14B

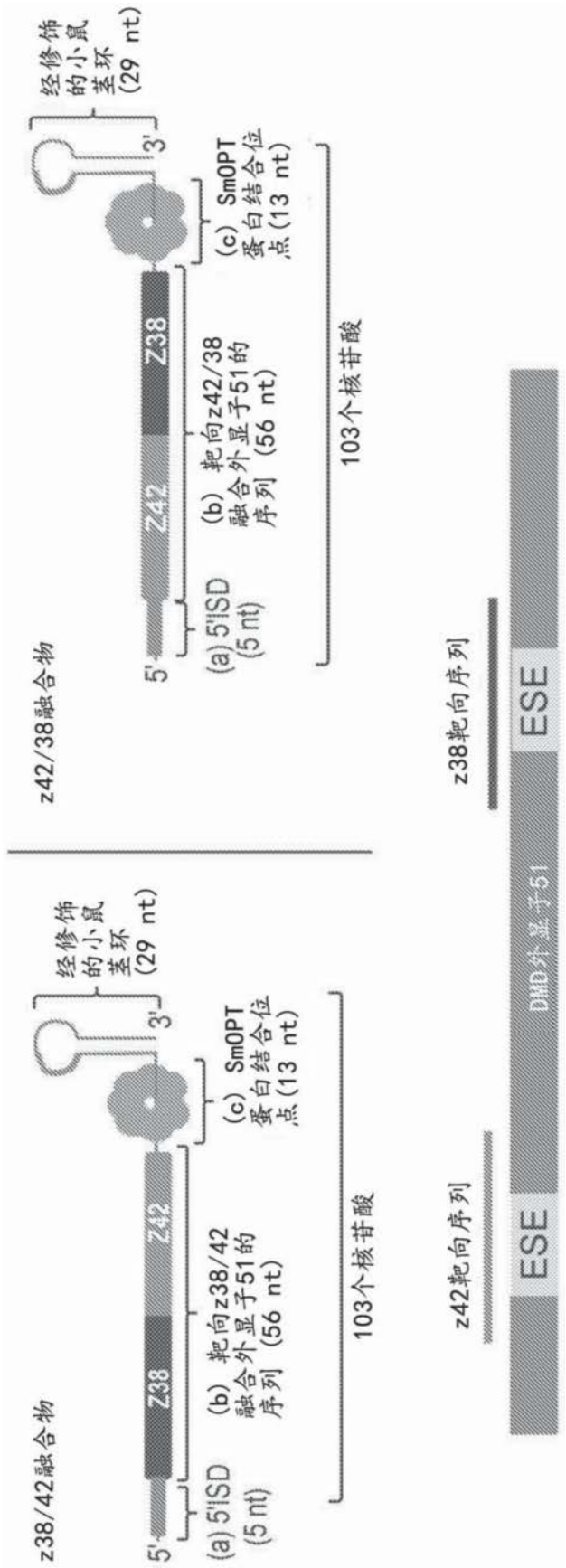

z42/38融合物
经修饰的小鼠茎环 (29 nt)
3'
Z38
Z42
5'
(a) 5'ISD (5 nt)
(b) 靶向z42/38融合外显子51的序列 (56 nt)
(c) SmOPT蛋白结合位点 (13 nt)
103个核苷酸
z38/42融合物
经修饰的小鼠茎环 (29 nt)
3'
Z38
Z42
5'
(a) 5'ISD (5 nt)
(b) 靶向z38/42融合外显子51的序列 (56 nt)
(c) SmOPT蛋白结合位点 (13 nt)
103个核苷酸
z38靶向序列
z42靶向序列
ESE
DMD外显子51
ESE

图14C

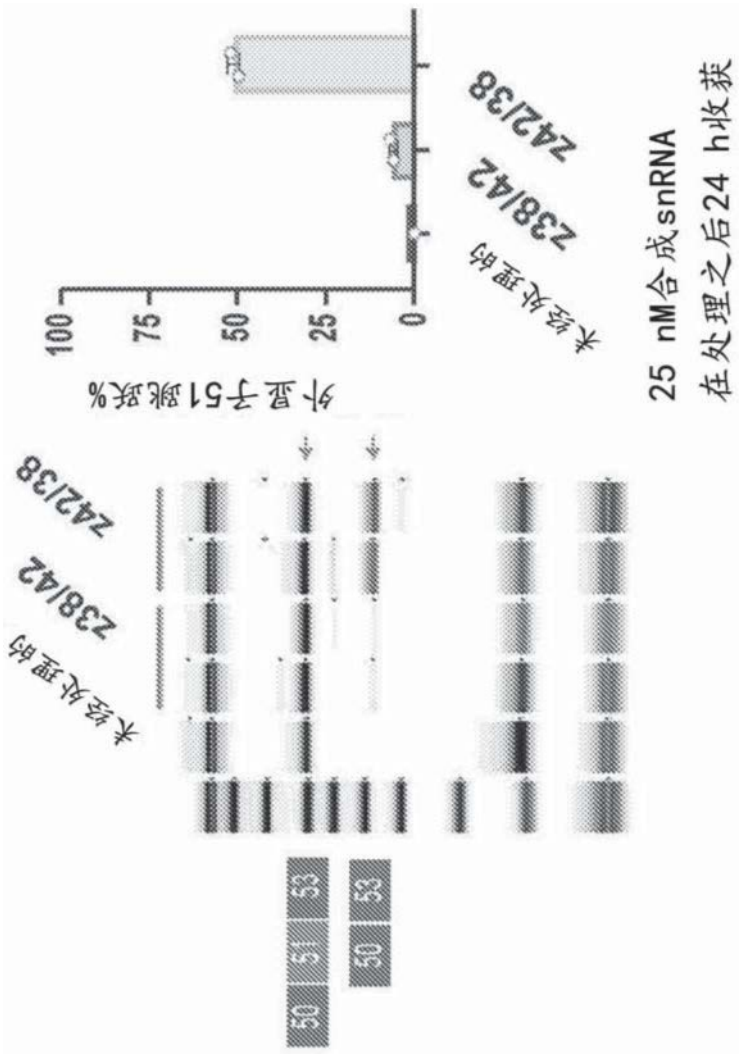

25 nM合成snRNA
在处理之后24 h收获
未处理的
Z38/42
Z42/38
外显子51跳跃%
100
75
50
25
0
未处理的
Z38/42
Z42/38
50
51
53
50
53

图15A

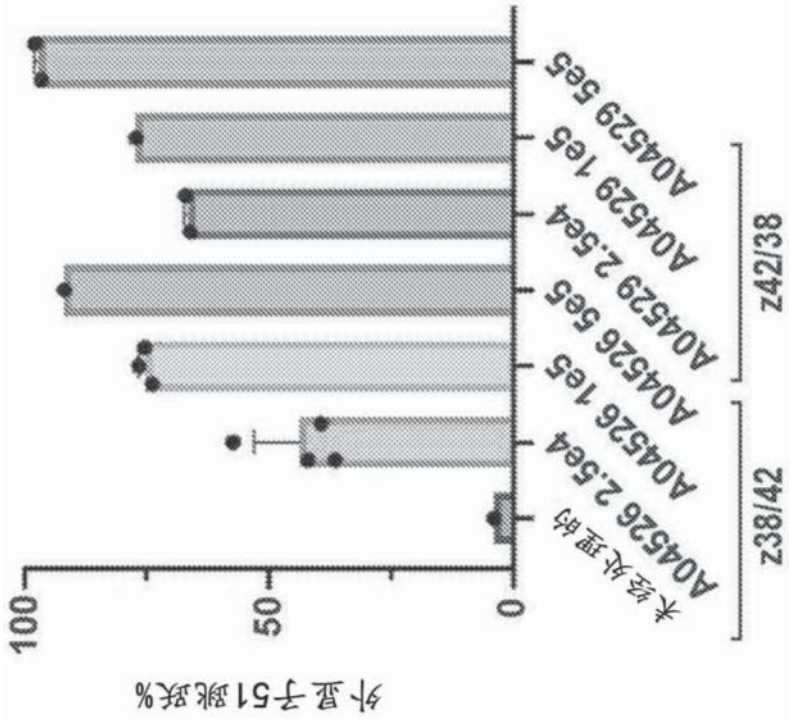

外显子51跳跃%
100
50
0
未经处理的
A04526 2.5e4
A04526 1e5
A04526 5e5
A04529 2.5e4
A04529 1e5
A04529 5e5
z38/42
z42/38

图15B

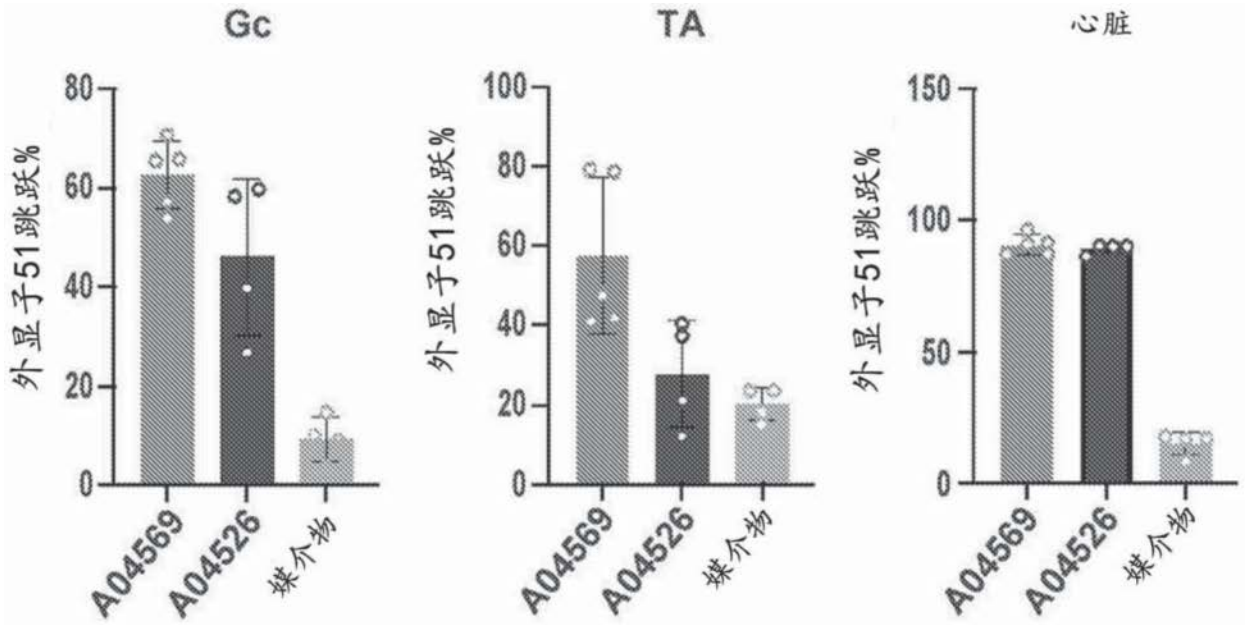

Gc
TA
心脏
外显子51跳跃%
80
60
40
20
0
100
150
A04569
A04526
媒介物

图15C

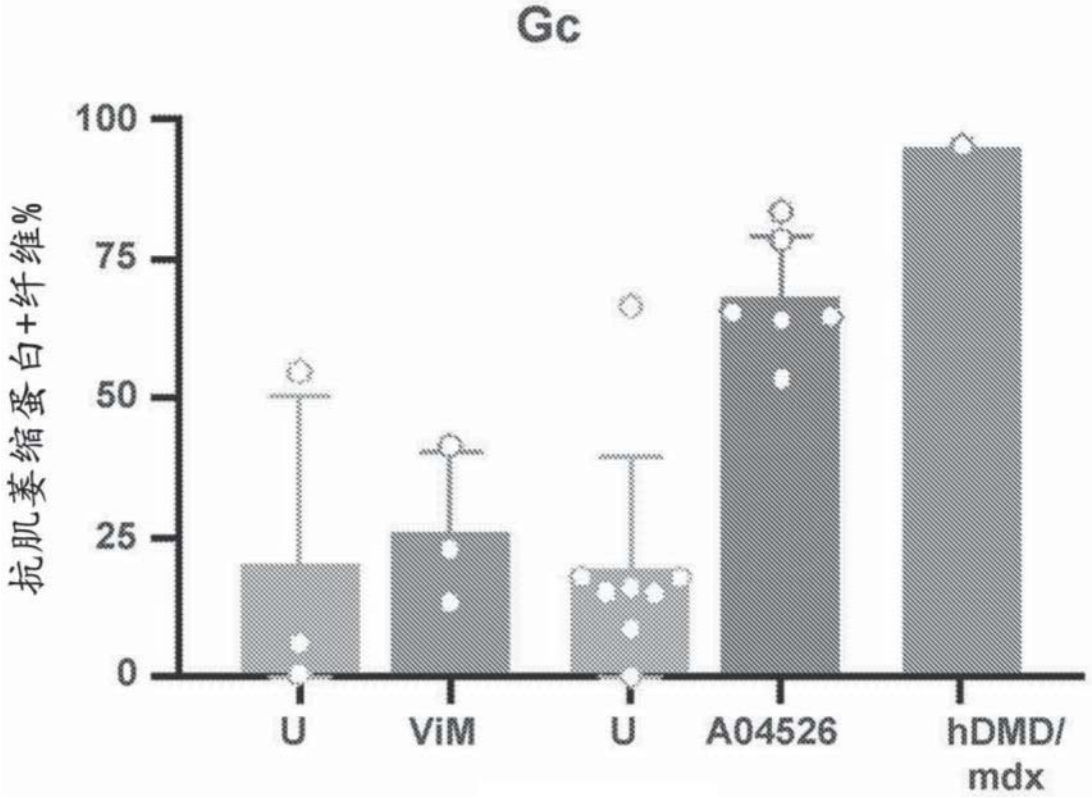


图15D

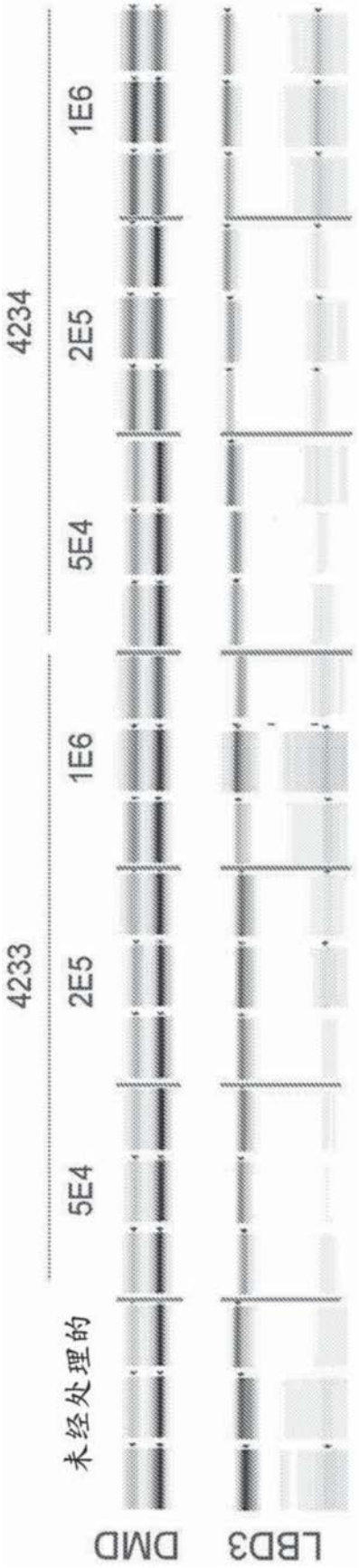


图16A

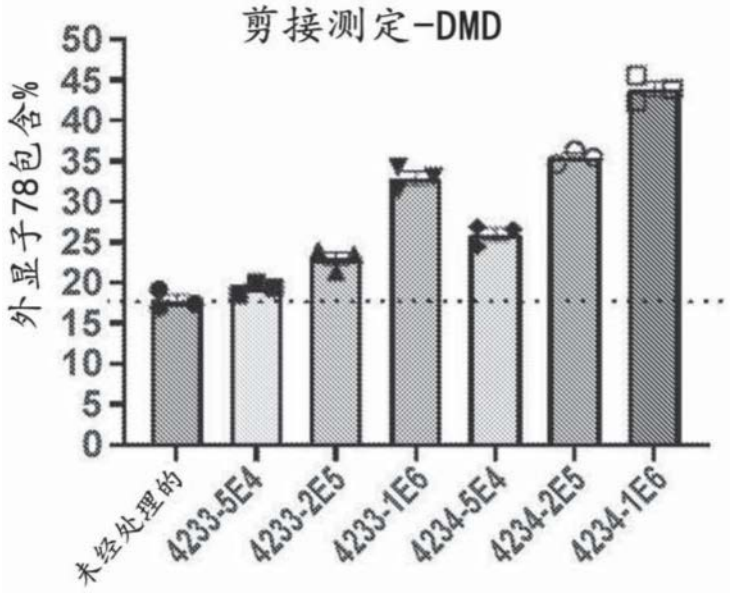

剪接测定-DMD
外显子78包含%
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
未经处理的
4233-5E4
4233-2E5
4233-1E6
4234-5E4
4234-2E5
4234-1E6

图16B

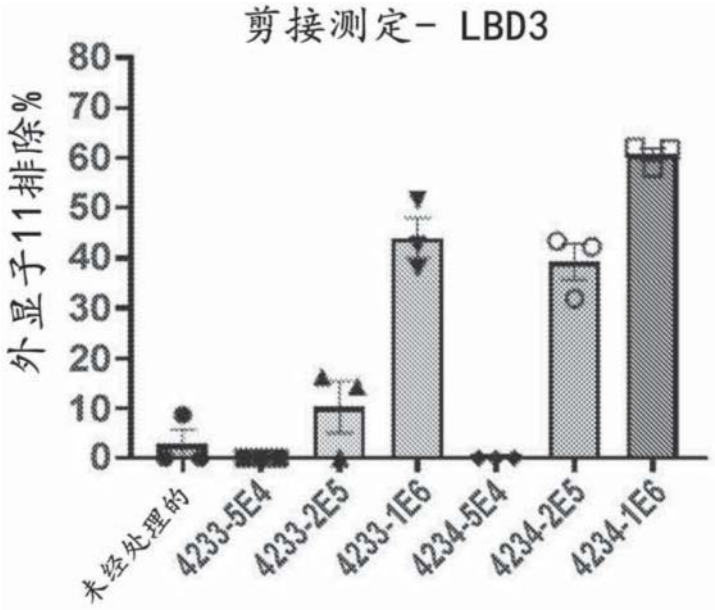

剪接测定- LBD3
外显子11排除%
80
70
60
50
40
30
20
10
0
未经处理的
4233-5E4
4233-2E5
4233-1E6
4234-5E4
4234-2E5
4234-1E6

图16C

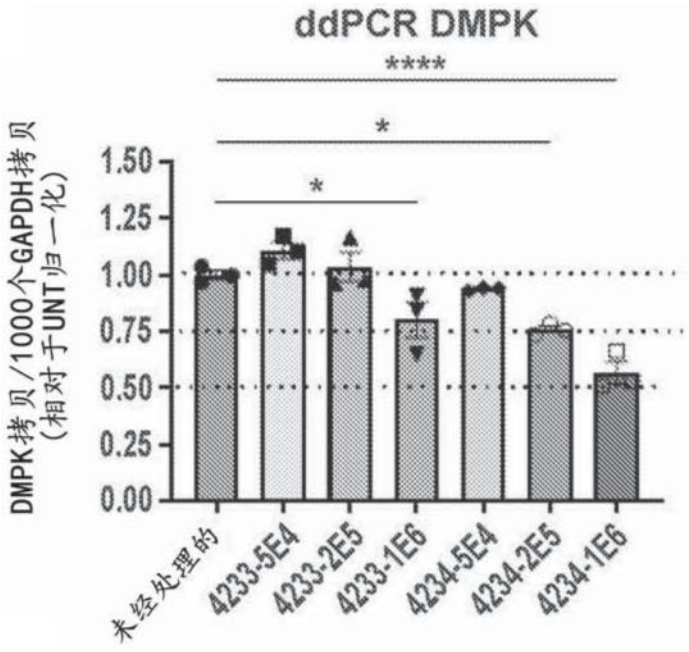

ddPCR DMPK
****
*
*
DMPK拷贝/1000个GAPDH拷贝
(相对于UNT归一化)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
未经处理的
4233-5E4
4233-2E5
4233-1E6
4234-5E4
4234-2E5
4234-1E6

图16D

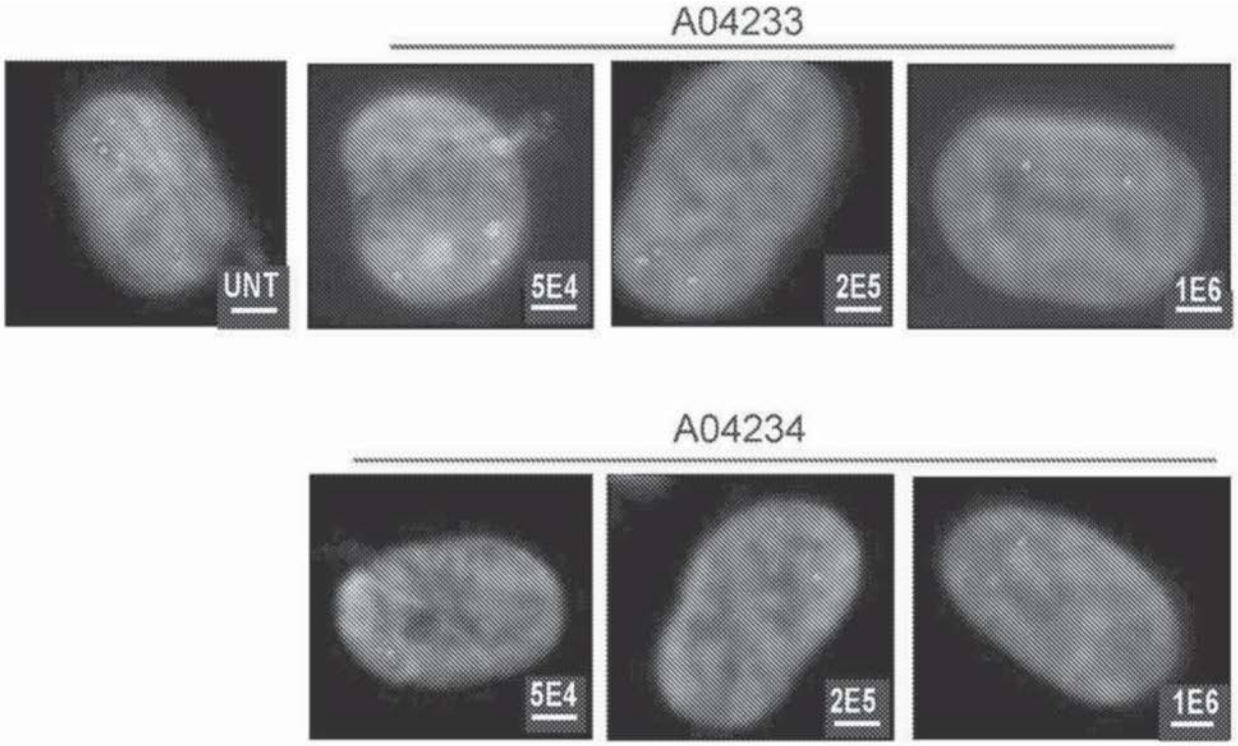

A04233
UNT
5E4
2E5
1E6
A04234
5E4
2E5
1E6

图17A

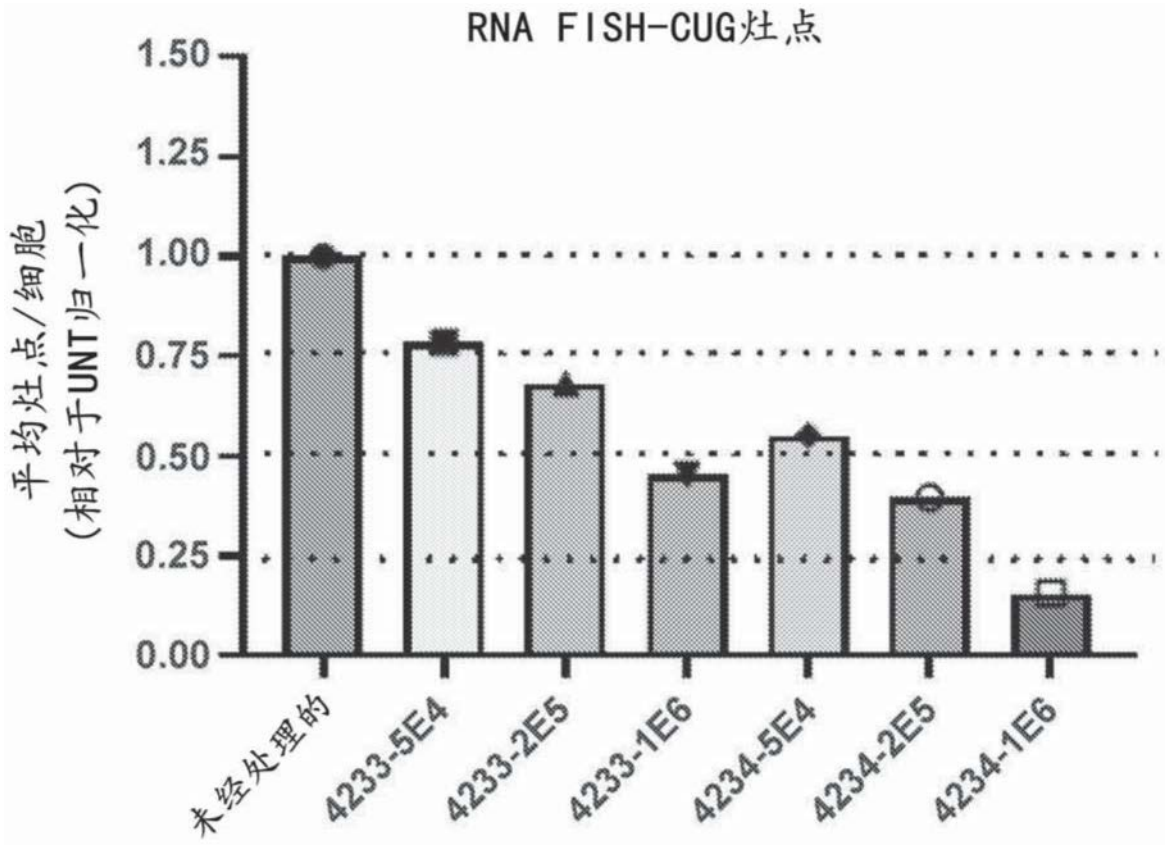


图17B

载体	MOI	读数
A04390: hU7p_U7CAG15_ hU1p_U7CAG15 snRNA	MOI 1e6, 1e5	在转导后2周对 可溶性HTT的MSD

图18A



图18B

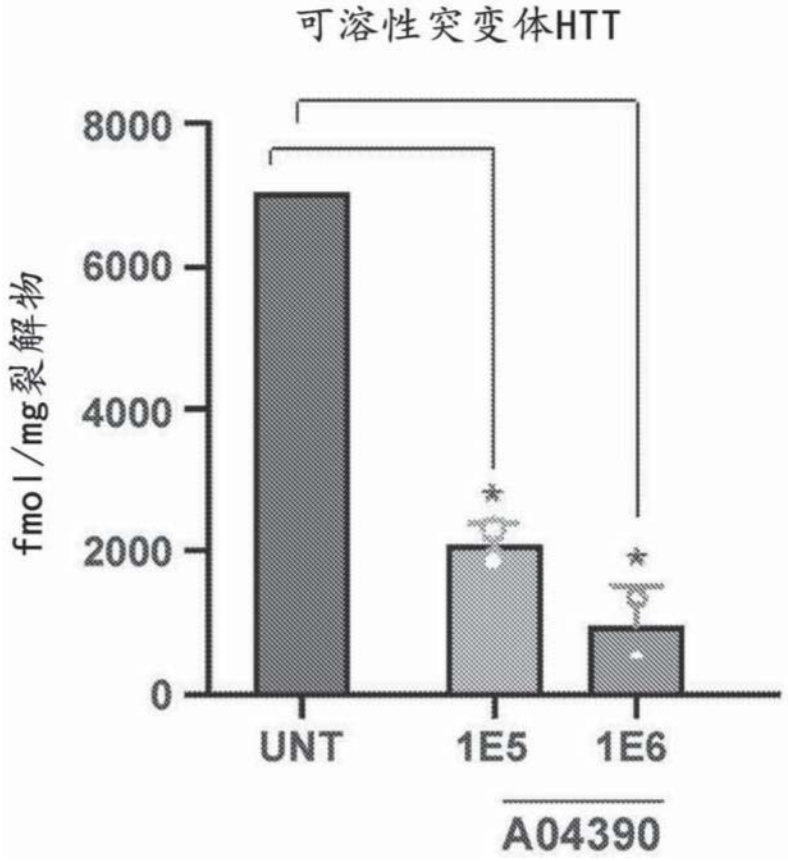

可溶性突变体HTT
8000
6000
4000
2000
0
fmol/mg裂解物
*
*
UNT
1E5
1E6
A04390

图18C

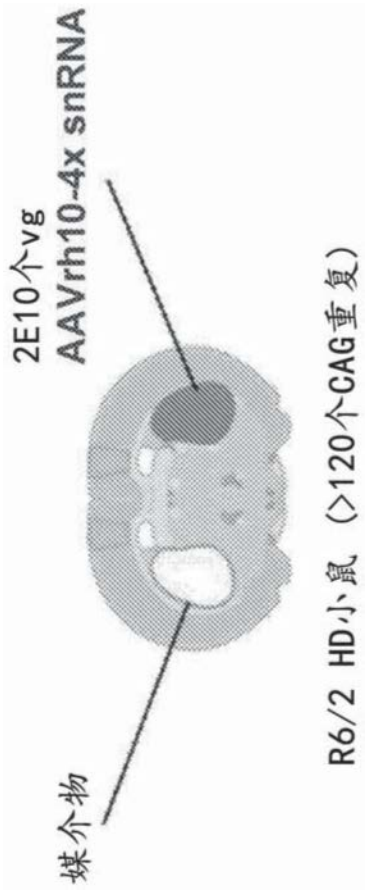

2E10个vg
AAVrh10-4x snRNA
媒介物
R6/2 HD小鼠（>120个CAG重复）

图19A

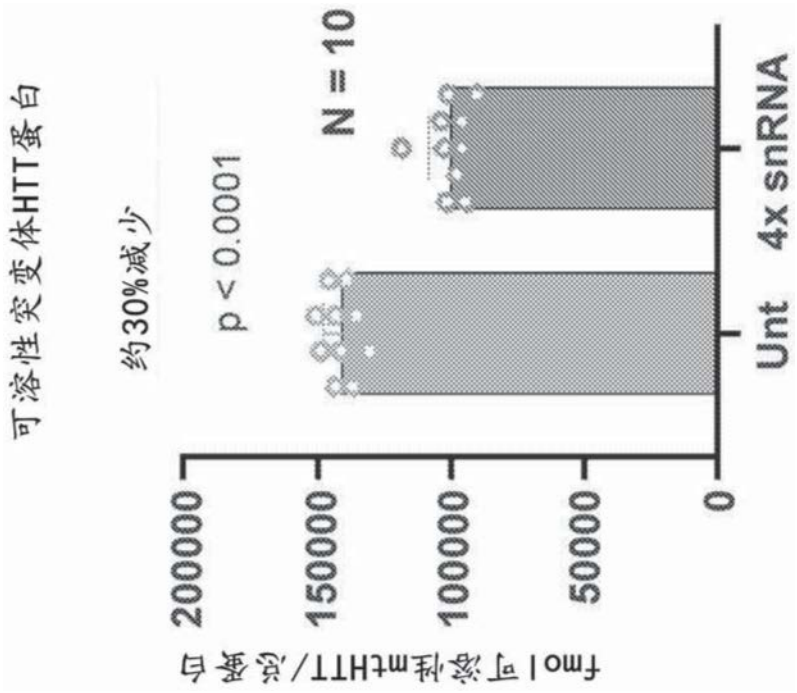

可溶性突变体HTT蛋白
约30%减少
p < 0.0001
N = 10
fmol 可溶性mtHTT/总蛋白
200000
150000
100000
50000
0
Unt
4x snRNA

图19B

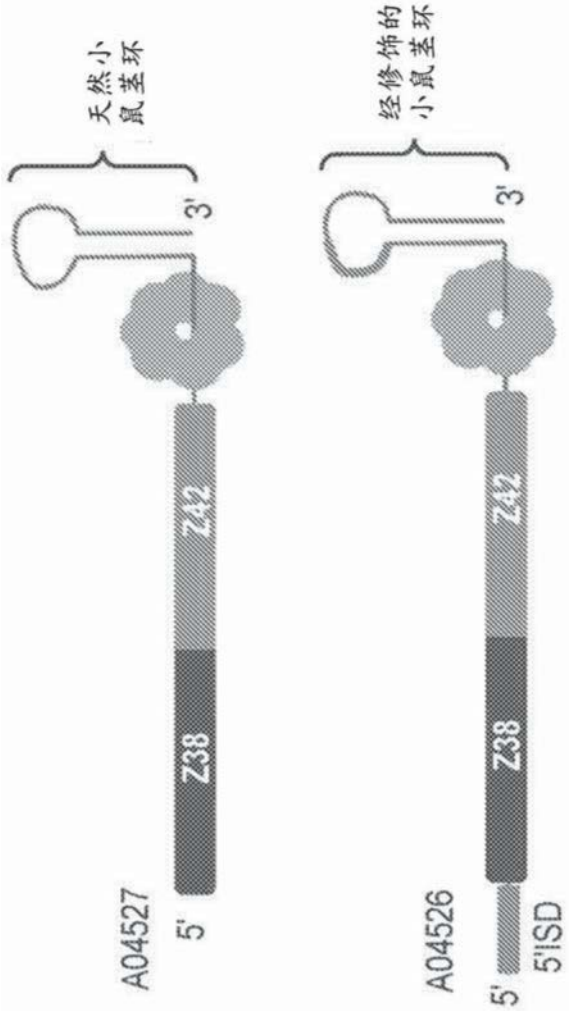


图20A

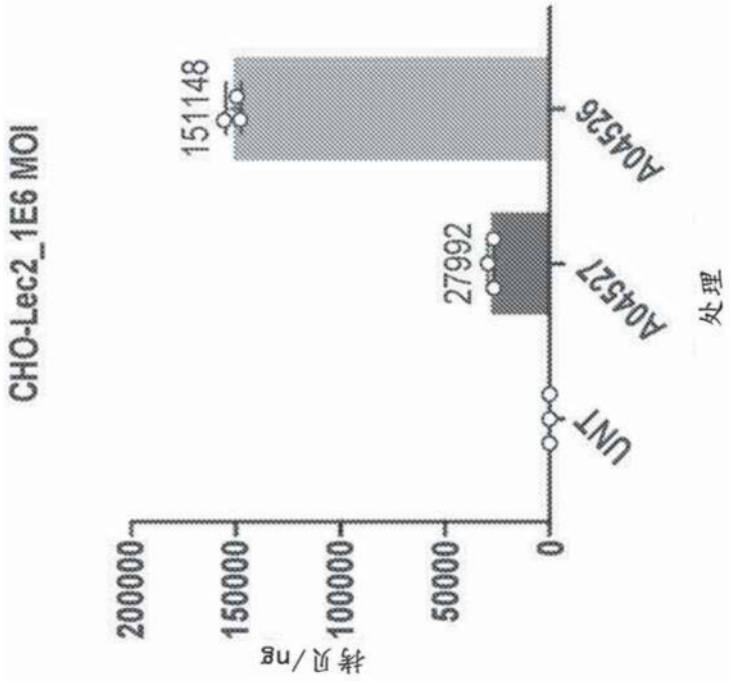

CHO-Lec2_1E6 MOI
151148
27992
A04526
A04527
UNT
处理
200000
150000
100000
50000
0
拷贝/ng

图20B