



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112218949 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 11

(21) 申请号 201980029743.2

(22) 申请日 2019.03.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112218949 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(30) 优先权数据
18159797.2 2018.03.02 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2019/050131 2019.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/168402 EN 2019.09.06

(73) 专利权人 莱顿大学医学中心附属莱顿教学
医院
地址 荷兰莱顿市

(72) 发明人 埃里克·彼得·范德维尔
安东·扬·范宗内维德
朱瑞恩·普林斯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
专利代理师 张莹

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101511995 A, 2009.08.19
CN 102363818 A, 2012.02.29
审查员 倪志远

权利要求书2页 说明书46页
序列表19页 附图47页

(54) 发明名称
多瘤病毒复制的抑制

(57) 摘要
本发明涉及调节多瘤病毒T抗原前体mRNA剪接的反义分子和方法。一方面,本发明涉及长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其包含这样的序列,所述序列是多瘤病毒T抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列,并且该反义寡核苷酸可以调节所述大T-抗原前体mRNA在细胞中的剪接。

1. 一种长度为17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸在制备用于抑制BK多瘤病毒在细胞中复制的药物中的用途,其中所述寡核苷酸是单链的并且包含是多瘤病毒大T抗原前体mRNA的至少17个核碱基的连续延伸的反向互补序列的序列,并且其中所述寡核苷酸能够调节所述大T抗原前体mRNA的剪接,其中所述寡核苷酸针对的是外显子1-内含子接合处,并且其中所述寡核苷酸的核碱基由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25组成,和/或其中所述寡核苷酸针对的是外显子2-内含子接合处,并且其中所述寡核苷酸的核碱基由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成。

2. 根据权利要求1的用途,其中所述至少17个核碱基包含相应多瘤病毒的大T抗原前体mRNA的剪接供体序列或剪接受体序列或其组合的反向互补序列。

3. 根据权利要求1或2的用途,其中所述寡核苷酸包含使mRNA-寡核苷酸双链体对RNase H的作用具有抗性的修饰。

4. 根据权利要求1或2的用途,其中所述寡核苷酸是嵌合寡核苷酸。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述寡核苷酸包含至少一个具有修饰的聚合物骨架的核碱基。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述修饰的聚合物骨架具有2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或吗啉代(PMO)核苷酸。

7. 根据权利要求1或2的用途,其中所述连续核碱基包含与所述序列的一个错配,并且其中所述错配不是所述连续延伸的第一个或最后一个核苷酸。

8. 根据权利要求1或2的用途,其中所述寡核苷酸包含使mRNA-寡核苷酸双链体对RNase H的作用具有抗性的修饰。

9. 如权利要求1至8中任一项定义的反义寡核苷酸在制备用于治疗个体的BK多瘤病毒感染的药物中的用途。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述个体是免疫受损的个体。

11. 根据权利要求9或权利要求10所述的用途,其中所述个体是细胞移植的受体。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述细胞移植为肾细胞移植。

13. 根据权利要求1或2的用途,其中所述寡核苷酸与肾细胞中的互补RNA序列杂交。

14. 一种反义寡核苷酸,长度为20个核碱基,其中所述寡核苷酸是单链的并且包含多瘤病毒T-抗原前体mRNA的至少17个核碱基的连续延伸的反向互补序列,并且所述反义寡核苷酸能够调节细胞中所述T-抗原前体mRNA的剪接,并且其中所述反义寡核苷酸的核碱基由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5组成。

15. 根据权利要求14所述的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含使mRNA-寡核苷酸双链体对RNase H的作用具有抗性的修饰和/或具有修饰的聚合物骨架的至少一个核碱基。

16. 根据权利要求1-2或9-10中任一项的用途,其中将所述寡核苷酸以环状寡聚化合物的形式引入细胞中。

17. 一种抑制BK多瘤病毒在细胞中复制的离体方法,所述方法包括提供用权利要求1-13中任一项所定义的反义寡核苷酸或根据权利要求14所述的反义寡核苷酸感染的细胞。

18.一种用于制备用于移植的移植物的离体方法,该方法的特征在于给供体细胞提供如权利要求1-13中任一项所定义的反义寡核苷酸或根据权利要求14所述的反义寡核苷酸。

19.根据权利要求18所述的离体方法,其中所述供体细胞为供体肾细胞。

多瘤病毒复制的抑制

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性结合多瘤病毒RNA的分子。在一些实施方案中,所述分子包含识别具有多瘤病毒T抗原编码区的前体mRNA的反义寡核苷酸。多瘤病毒的例子是人类多瘤病毒,如JC病毒(JCV)、BK病毒(BKV)或Merkel细胞病毒(MCV)。

背景技术

[0002] 多瘤病毒是小型无包膜双链DNA病毒,其天然宿主通常是哺乳动物和鸟类。成年感染大多无症状,但当免疫系统受损时,可能会变成病理性感染。人类多瘤病毒的非限制性例子是BK病毒、JC病毒和Merkel细胞病毒。

[0003] JCV和BKV都是机会性病原体,感染人类的幼儿期人群(Leploeg,M.D.et.al., Clinical Infectious Diseases,2001)。成人的血清阳性率很高。这两种病毒都被认为持续潜伏在宿主的肾细胞中(Wunderink,H.F.et.al., American Journal of Transplantation,2017)。例如,在免疫抑制的个体中可以发生再激活(Wunderink,H.F.et.al., American Journal of Transplantation,2017;Parajuli,S.et.al., Clinical Transplantation,2018;Gard,L.et.al., PLoS One,2017)。

[0004] 多瘤病毒具有共同的基因组结构。它们具有在感染周期的早期和晚期都表达的基因。早期和晚期基因均产生RNA,所述RNA通过差异剪接可翻译多种蛋白质。如图1所示,晚期RNA通常编码三种衣壳蛋白,而早期基因编码小和大T抗原,通常还有一个或多个其他选择性剪接的编码区(Helle,F.et.al., Viruses,2017)。

[0005] W02015/042466描述了一种基于反义寡核苷酸的方法来抑制JC病毒的复制和增殖。其中公开的反义寡核苷酸可以是寡脱氧核糖核苷酸(ODN),也可以是嵌合寡核苷酸(其具有ODN内部,侧翼是一个或多个具有核酸酶抗性骨架的核苷酸。后者使RNA:寡核苷酸杂交体对RNaseH的作用敏感。所述脱氧核糖核苷酸内部具有至少4个脱氧核糖核苷酸,并且其两侧是具有2'-糖修饰的核苷酸的核酸酶抗性区域。所述反义寡核苷酸针对JC病毒mRNA中存在的特定序列。

[0006] 在一些实施方案中,本发明提供了能够调节多瘤病毒T抗原前体mRNA剪接的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可具有与所述前体mRNA中的剪接供体位点和/或剪接受体位点互补的序列。反义寡核苷酸可具有与一个或多个外显子相邻内含子核碱基互补的序列(见图2)。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸使得所述反义寡核苷酸与其多瘤病毒T抗原前体mRNA靶标的双链体对RNaseH的作用具有抗性。

发明内容

[0007] 本发明提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其包含这样的序列,该序列是多瘤病毒大T抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列,并且所述反义寡核苷酸可以调节所述大T抗原前体mRNA在细胞中的剪接(见图1)。

[0008] 本发明的调节剪接的反义寡核苷酸通常需要至少17个、优选至少18个、更优选至少19个、更优选至少20个与多瘤病毒大T抗原前体mRNA互补的核碱基的连续延伸。

[0009] 本发明还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其包含这样的序列,该序列是多瘤病毒大T抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列,该延伸包含所述前体mRNA中的剪接供体、剪接受体序列或其组合。所述剪接供体或受体序列优选为多瘤病毒大T抗原剪接受体或多瘤病毒大T抗原剪接供体序列。

[0010] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其与获自NC_001538的核苷酸4537-4596或4881-4940具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0011] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_001699的区域4397-4456或区域4741-4800中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0012] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_009238的区域4299-4358或区域4686-4745中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0013] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_009539的区域4477-4536或区域4876-4935中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0014] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_010277的区域4693-4752或区域5124-5183中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0015] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014406的区域4264-4323或区域4654-4713中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0016] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014407的区域4272-4331或区域4677-4736中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0017] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014361的区域4352-4411或区域4765-4824中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0018] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_015150的区域4408-4467或区域4760-4819中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0019] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_018102的区域4303-4362或区域4658-4717中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0020] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_020106的区域4159-4218或区域4504-4563中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0021] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_020890的区域4392-4451或区域4791-4850中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0022] 还提供了长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_024118的区域4471-4530或区域4859-4918中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性。

[0023] 如本文所述的反义寡核苷酸优选包含以下序列的至少12个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,其中所述至少12个核苷酸优选包含靶标前体mRNA的剪接供体位点、剪接受体位点或其组合(即相应多瘤病毒的大T抗原前体mRNA的剪接供体/受体)的反向互补序列。在优选的实施方案中,如本文所述的反义寡核苷酸包含以下序列的至少17个、优选至少18个、优选至少19个、更优选至少20个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,优选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,优选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,其中所述核苷酸优选包含靶标前体mRNA的剪接供体位点、剪接受体位点或其组合(即相应多瘤病毒的大T抗原前体mRNA的剪接供体/受体)的反向互补序列。反义寡核苷酸可能与所示的序列有一个错配,所述错配不在连续延伸的起点或终点,如具有17个核苷酸的连续延伸的AON,例如在位置1或17具有错配,则其实际上具有16个核苷酸的连续延伸。

[0024] 还提供了抑制多瘤病毒在细胞中复制的方法,该方法包括向被所述多瘤病毒感染的细胞提供对多瘤病毒特异的本发明的反义寡核苷酸。

[0025] 本发明还提供了一种制备移植用移植物的方法,该方法的特征在于供体细胞,优选供体肾细胞,具有对多瘤病毒特异的本发明的反义寡核苷酸。

[0026] 还提供了一种治疗受试者中多瘤病毒感染的方法,该方法包括向有需要的个体施用对多瘤病毒特异的本发明的反义寡核苷酸。

[0027] 还提供了一种给个体施用反义寡核苷酸的方法,用于与所述个体的细胞中的互补RNA序列进行杂交,所述方法的特征在于所述反义寡核苷酸是包含第一区域和第二区域的嵌合的反义寡核苷酸,并且其中所述第一区域包含一个或多个脱氧核糖核苷酸,并且所述第二区域包含至少一个2'-O-(2-甲氧基-乙基)核苷酸(见图7)。

[0028] 还提供了一种抑制多瘤病毒在细胞中复制的方法,所述方法包括向所述细胞提供

长度为12至30个核苷酸的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含多瘤病毒大T抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列,并且所述反义寡核苷酸可以调节所述大T抗原前体mRNA的剪接。所述反义寡核苷酸优选是本文所述的反义寡核苷酸,优选是本文所述或修饰的SEQ ID NO:1-25的反义寡核苷酸。

[0029] 发明详述术语“反义寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚体或多聚体,或其模拟物、嵌合体、类似物和同系物。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价内部核苷(骨架)连接组成的反义寡核苷酸,以及具有功能相似的非天然存在部分的反义寡核苷酸。这种经修饰或取代的反义寡核苷酸通常比天然形式更优选,因为其具有所需的性质,例如细胞摄取增强、对靶核酸的亲合力增强以及在核酸酶存在下的稳定性增加(见图7)。

[0030] 本文所述的反义寡核苷酸优选为单链反义寡核苷酸。

[0031] 本发明的反义寡核苷酸还包括修饰的反义寡核苷酸,其中不同的碱基存在于反义寡核苷酸的一个或多个核苷酸位置。例如,如果第一核苷酸是腺苷,则可以产生在该位置含有胸苷、鸟苷或胞苷的修饰的反义寡核苷酸。这可以在所述反义寡核苷酸的任何位置进行。然后使用本文所述的方法测试这些反义寡核苷酸,以确定它们抑制T抗原RNA的能力。

[0032] 本发明的反义寡核苷酸可以与易感细胞感染时产生的多瘤病毒RNA杂交。因此,所述反义寡核苷酸包含的序列是靶RNA序列(的一部分)的反向互补序列。所述反义寡核苷酸可以以单链、双链、部分单链或环状寡聚化合物的形式引入。在优选的实施方案中,所述反义寡核苷酸是单链反义寡核苷酸。

[0033] 所述反义寡核苷酸可以连接到一个或多个其他化学结构上。所述其他结构可以是肽或蛋白质、糖、脂质或其他化学结构。所述其他结构也可以是一个或多个其他核苷酸。所述一个或多个其他核苷酸可以执行不同于反义部分的功能。例如,与另一核酸靶序列杂交。所述其他结构可以执行一个或多个不同功能中的任何一个。这种功能的非限制性例子是反义寡核苷酸的稳定性、生物利用度的增加、细胞渗透的增加、核传递的增加、靶向特定细胞等。

[0034] 一旦引入系统,本发明的所述反义寡核苷酸可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用,以实现靶核酸的修饰。本领域已知“DNA样”的单链反义寡核苷酸引发RNase H, RNase H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内核酸酶。因此, RNase H的激活导致RNA靶标的切割。这是提高反义寡核苷酸介导的基因表达抑制效率的一种方法。在实施方案中,本发明的反义寡核苷酸不将RNase H的作用引入靶RNA/反义寡核苷酸杂交体,也不设计成如此。对于其他核糖核酸酶,例如RNase III和核糖核酸酶L家族的酶,也假定了类似的作用。本文所述的反义寡核苷酸优选具有赋予反义寡核苷酸和靶RNA/反义寡核苷酸杂交体核酸酶抗性的修饰。本文“反义寡核苷酸”的定义中特别排除的是包含内部或外部“凸起”的核酶,所述凸起不与靶序列杂交。

[0035] 根据本发明的反义寡核苷酸包含12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基(即约12至30个并包括30个相连的核苷)。本领域普通技术人员将理解,本发明包含了长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基的反义寡核苷酸。本领域普通技术人员将理解,这包含了长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基的反义寡核苷酸。本领域普通技术人员将理解,这包含了长度为

17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核碱基的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸通常长度为18、19、20、21或22个核碱基。本文所述的反义寡核苷酸优选长度为17、18、19、20、21或22个核苷酸。

[0036] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸包含寡核苷酸序列的至少12个连续核碱基,所述寡核苷酸序列在本文中被具体公开。包括选自示例性反义寡核苷酸中的至少十二(12)个连续的核碱基的延伸的长度为12-30个核碱基的反义寡核苷酸,也被认为是合适的反义寡核苷酸。

[0037] 反义寡核苷酸包含这样的核碱基序列,所述核碱基序列是靶RNA序列的反向互补序列。本文所述的反义寡核苷酸包含至少12个核碱基的延伸,所述延伸的序列是靶RNA的至少12个连续核碱基序列的反向互补序列。所述延伸也被称为互补区或杂交区。本领域普通技术人员将理解,本发明包含了具有12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基长的互补区的反义寡核苷酸。本领域普通技术人员将理解,本发明包含了具有15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基长的互补区的反义寡核苷酸。本领域普通技术人员将理解,本发明包含了具有17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核碱基长的互补区的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸通常具有长度为18、19、20、21或22个核碱基的互补区。本文所述的反义寡核苷酸优选具有长度为17、18、19、20、21或22个核碱基的互补区。

[0038] 反义寡核苷酸的长度优选与互补区的长度相称。

[0039] 本文所述反义寡核苷酸的靶序列是多瘤病毒T抗原前体mRNA的一部分。前体mRNA是一种未成熟的单链信使核糖核酸(mRNA)。多瘤病毒T抗原前体mRNA是由多瘤病毒DNA模板在细胞核中通过转录合成的。所述前体mRNA包含一个或多个内含子,这些内含子在前体mRNA成熟为mRNA的过程中被剪切出来。所述剪接过程从转录本中去除内含子,并将外显子连接在一起。内含子的两侧通常具有供体位点(内含子的5'端)和受体位点(内含子的3'端)。所述剪接位点是剪接所必需的,通常在内含子的5'端包含几乎不变的GU序列,在内含子的3'端包含具有几乎不变的AG序列的剪接受体位点。所述GU和AG序列以及间插序列被从前体mRNA中被剪切出来。多瘤病毒T抗原前体mRNA的一个特征是,它可以选择性剪接或不剪接,导致产生至少两个,通常是3、4或5个不同剪接的mRNA(见图1)。病毒的繁殖取决于病毒基因组的可用性、病毒蛋白的存在、细胞机制,特别是不同阶段和组分之间的微妙相互作用。病毒RNA的剪接过程是调节病毒繁殖过程的重要方法,它会影响某些产物在细胞中形成的水平以及可能也影响其形成时机。在本发明中,令人惊讶地发现,将本发明的寡核苷酸导向剪接供体或剪接受体位点以剪接大T抗原mRNA不仅对T抗原mRNA的产生有深远的影响,而且对被感染细胞产生的衣壳蛋白水平和病毒的产生也有深远的影响。

[0040] 本文所述反义寡核苷酸的靶序列包含多瘤病毒T抗原前体mRNA的剪接供体位点、多瘤病毒T抗原前体mRNA的剪接受体位点或其组合。靶序列通常包含12个连续核碱基的延伸,该延伸包含多瘤病毒T抗原前体mRNA的剪接供体位点或多瘤病毒T抗原前体mRNA的剪接受体位点。除剪接供体或剪接受体序列外,所述连续序列优选包含内含子序列。在优选的实施方案中,所述连续序列包含与剪接供体或剪接受体序列相邻的一个或两个内含子核碱基。在优选的实施方案中,所述连续序列包含与剪接供体或剪接受体序列相邻的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或28个内含子核碱

基。在优选的实施方案中,所述连续序列包含与剪接供体或剪接受体序列相邻的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或28个外显子核碱基。所述反义寡核苷酸优选包含的序列是靶标前体mRNA的连续核碱基序列的反向互补序列。内含子、剪接位点和外显子核碱基的总数不超过反义寡核苷酸中核碱基的总数。

[0041] 所述靶序列优选包含剪接供体序列或剪接受体序列,它们定义了内含子,内含子另外被剪切出去以产生编码特定多瘤病毒大T抗原的mRNA(见图8)。

[0042] 本文所述反义寡核苷酸的序列包含剪接供体序列或剪接受体序列的互补序列,所述剪接供体序列或剪接受体序列定义了内含子,内含子被另外剪切出去以产生编码特定多瘤病毒大T抗原的mRNA(见图8)。

[0043] 在一个优选的实施方案中,第一寡核苷酸的靶序列是下面针对相应病毒指出的3'剪接位点靶区域中的序列。在一个优选的实施方案中,另一寡核苷酸的靶序列是下面针对相应病毒指出的5'剪接位点靶区域中的序列。针对下述区域中靶序列的寡核苷酸包含所示序列中剪接供体或剪接受体的互补序列。如果在本文所述的方法中使用了一种以上的AON,则优选的是,所述AON针对同一病毒的靶序列。

[0044]

缩写	收录号	3'剪接位点靶区域	5'剪接位点靶区域
BKPyV	NC_001538	4537-4596	4881-4940
JCPyV	NC_001699	4397-4456	4741-4800
KIPyV	NC_009238	4299-4358	4686-4745
WUPyV	NC_009539	4477-4536	4876-4935
MCPyV	NC_010277	4693-4752	5124-5183
HPyV6	NC_014406	4264-4323	4654-4713
HPyV7	NC_014407	4272-4331	4677-4736
TSPyV	NC_014361	4352-4411	4765-4824
HPyV9	NC_015150	4408-4467	4760-4819

[0045]

MWPyV	NC_018102	4303-4362	4658-4717
STLPyV	NC_020106	4159-4218	4504-4563
HPyV12	NC_020890	4392-4451	4791-4850
NJPyV	NC_024118	4471-4530	4859-4918

[0046] 第一列包含病毒名称的缩写。病毒的原型序列用序列数据库中该序列的收录号表示。第三和第四列指定了病毒原型序列中包含剪接供体(第4列)或剪接受体(第3列)的区域,其中本文所述的AON可包含互补区。

[0047] 根据本发明的反义寡核苷酸可以调节受感染细胞中T抗原前体mRNA的剪接。不受理论限制,据信本文所述的反义寡核苷酸抑制其靶向的剪接位点的使用。由此导致的大T抗原产生的减少影响了衣壳蛋白的表达,从而影响了病毒的产生(见图4-6)。不受理论的束缚,据信由本发明的反义寡核苷酸诱导的T-抗原特异性剪接产物的失衡对病毒繁殖的影响比通过RNAi样方法减少T-抗原mRNA特异性mRNA更显著。

[0048] 在本发明的上下文中,“杂交”是指核酸互补链的配对。在本发明中,优选的配对机制涉及到氢键,其可以是互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的Watson-Crick、Hoogsteen或反向Hoogsteen氢键。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是互补的核碱基,它们通过氢键的形成进行配对。杂交可以在不同的环境下发生。互补链的杂交通常随着序列的长度而提高。两条链的特异性杂交是通过12个或更多的互补核碱基的连续延伸来完成的。反义寡核苷酸的序列可以,但不一定,与其待特异性杂交的靶序列100%互补。此外,反义寡核苷酸可以在一个或多个片段上杂交,使得间插片段或相邻片段不参与杂交事件。在本发明的一个实施方案中,本发明的反义寡核苷酸包含与靶标前体mRNA内的靶区域的至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%的序列互补性。在其他实施方案中,本发明的反义寡核苷酸包含与靶标前体mRNA内的靶区域的至少90%的序列互补性,甚至包含至少95%或至少96%的序列互补性。例如,反义化合物的20个核碱基中有18个与靶区域互补,并因此可以特异性杂交,这代表互补性为90%。当18个核苷酸的反义寡核苷酸具有多瘤病毒大T抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列时,剩余的6个互补核碱基可以与这12个核碱基成簇,也可以不与这12个核碱基邻接。反义寡核苷酸与靶标前体mRNA的区域的互补百分比可以常规使用本领域已知的BLAST程序(基本的本地比对搜索工具)和PowerBLAST程序(Altschulet al., J.Mol.Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang和Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)来确定。由于核苷酸的数量总是一个整数,实际的百分比可能不是精确的90%或者不是精确的96%。所述连续序列优选与目标核酸序列没有或只有一个核苷酸错配。

[0049] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_001538的区域4537-4596或区域4881-4940中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_001538的核苷酸4537-4596或4881-4940具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至

30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。在一个优选的实施方案中,所述寡核苷酸的长度为12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基,并且优选包含如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27所示的序列;优选包含如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示的序列;优选包含如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示的序列。

[0050] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_001699的区域4397-4456或区域4741-4800中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_001699的核苷酸4397-4456或4741-4800具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0051] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_009238的区域4299-4358或区域4686-4745中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_009238的核苷酸4299-4358或区域4686-4745具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0052] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_009539的区域4477-4536或区域4876-4935中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_009539的核苷酸4477-4536或区域4876-4935具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0053] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_010277的区域4693-4752或区域5124-5183中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_010277的核苷酸4693-4752或区域5124-5183具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0054] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014406的区域4264-4323或区域4654-4713中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_014406的核苷酸4264-4323或区域4654-4713具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、

25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0055] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014407的区域4272-4331或区域4677-4736中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_014407的核苷酸4272-4331或区域4677-4736具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0056] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_014361的区域4352-4411或区域4765-4824中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_014361的核苷酸4352-4411或区域4765-4824具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0057] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_015150的区域4408-4467或区域4760-4819中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_015150的核苷酸4408-4467或区域4760-4819具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0058] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_018102的区域4303-4362或区域4658-4717中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_018102的核苷酸4303-4362或区域4658-4717具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0059] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_020106的区域4159-4218或区域4504-4563中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_020106的核苷酸4159-4218或区域4504-4563具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0060] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_020890的区域4392-4451或区域4791-4850中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_020890的核苷酸4392-4451或区域4791-4850具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0061] 长度为12至30个、优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其优选与获自NC_024118的区域4471-4530或区域4859-4918中的核苷酸具有至少80%的互补性,并且

至少包含与相应区域中的剪接供体或剪接受体序列的互补性,优选与获自NC_024118的核苷酸4471-4530或区域4859-4918具有至少90%的互补性。所述12至30个,优选17、18、19或20至30个核碱基优选与靶标前体mRNA的至少12、13、14、15、16、17、18、19、30、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸的延伸互补。

[0062] 如本文所述的反义寡核苷酸优选包含以下序列的至少12个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,优选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,优选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,其中所述至少12个核苷酸优选包含靶标前体mRNA的剪接供体位点、剪接受体位点或其组合(即相应多瘤病毒的大T-抗原前体mRNA的剪接供体/受体)的反向互补序列。所述反向互补序列存在于相应SEQ ID中。

[0063] 本发明进一步涉及这样的反义寡核苷酸,其包含如下所述核苷酸序列的至少12个连续核碱基(见图3和图10):

[0064] 5'ACCUCUGAGCUACUCCAGGU 3'SEQ ID NO:1;

[0065] 5'ACAAACCUCUGAGCUACUCC 3'SEQ ID NO:2;

[0066] 5'CAGCACAAACCUCUGAGCUA 3'SEQ ID NO:3;

[0067] 5'UCCAUAGGUUGGCACCUAGA 3'SEQ ID NO:4;

[0068] 5'UGUCCAUAGGUUGGCACCU 3'SEQ ID NO:5;

[0069] 5'AAACCUCUGAGCUACUCCAG 3'SEQ ID NO:20;

[0070] 5'GCACAAACCUCUGAGCUACU 3'SEQ ID NO:21;

[0071] 5'AUCAGCACAAACCUCUGAGC 3'SEQ ID NO:22;

[0072] 5'AAAUCAGCACAAACCUCUGA 3'SEQ ID NO:23;

[0073] 5'GAAAAUCAGCACAAACCUCU 3'SEQ ID NO:24;

[0074] 5'AGGAAAAUCAGCACAAACCU 3'SEQ ID NO:25;

[0075] 5'CAUAGGUUGGCACCUAUAAA 3'SEQ ID NO:26或

[0076] 5'UCCAUAGGUUGGCACCUAU 3'SEQ ID NO:27。

[0077] 如本文所述的反义寡核苷酸优选包含以下序列的至少13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,优选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,优

选SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,其中所述至少13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸优选各自包含靶标前体mRNA的剪接供体位点、剪接受体位点或其组合的反向互补序列。本文所指示的核碱基可以被具有相同碱基配对活性(种类上相同但量上不一定相同)的不同核碱基取代。这种替代物的一个例子是胸腺嘧啶碱基作为尿嘧啶的取代。其他核碱基可以替换为具有相同碱基配对活性的替代物。

[0078] 另一种替代物是与任何碱基配对的碱基。所述碱基的一个例子是肌苷。相较于与靶标RNA中的适当碱基配对的碱基,这种碱基通常不会增加所述寡核苷酸的特异性。如本领域技术人员所知,寡核苷酸可以在一定程度上适应这一点。如果需要相同的特异性,可以向寡核苷酸中加入额外的选择性碱基,例如但不限于每个肌苷的一个额外的选择性碱基或其他非选择性碱基。

[0079] 所述反义寡核苷酸优选包含如下所述核苷酸序列的至少12个连续核碱基(见图9):

[0080]

SEQ ID	病毒	靶标	序列
1	BKPyV	供体	5' ACCUCUGAGCUACUCCAGGU 3'
2	BKPyV	供体	5' ACAAACCUCUGAGCUACUCC 3'
3	BKPyV	供体	5' CAGCACAAACCUCUGAGCUA 3'
4	BKPyV	受体	5' UCCAUAGGUUGGCACCUAGA

[0081]

			3'
5	BKPyV	受体	5' UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU 3'
6	JCPyV	供体	5' ACCUCUGAACUAUUCCAUGU 3'
7	JCPyV	供体	5' ACCAACCUCUGAACUAUUCC 3'
8	JCPyV	供体	5' CACAACCAACCUCUGAACUA 3'
9	JCPyV	受体	5' UCCAUAAGGUUGGCACCUAAA 3'
10	JCPyV	受体	5' UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU

[0082]

			3'
11	KIPyV	供体	5' GUAUACCUGAGAAGAUUGCC 3'
12	KIPyV	供体	5' UCUUUGCAGUAUACCUGAGA 3'
13	KIPyV	受体	5' UGUACCGUAUGUAGGUAUCU 3'
14	KIPyV	受体	5' CCGUAUGUAGGUAUCUAUAC 3'
15	WUPyV	供体	5' UCUACCUGUGAAGAGCUCCA 3'
16	WUPyV	供体	5' UGUGCAUUCUACCUGUGAAG

[0083]

			3'
17	MCPyV	供体	5' CCUCAUCAAAACAUAGAGAAG 3'
18	MCPyV	供体	5' GGAAAUUUUGUACUGACCUC 3'
19	对照	-	5' AGGUCCACACUCAAUCCUCA 3'
20	HYB_06	供体	5' AAACCUCUGAGCUACUCCAG 3'
21	HYB_07	供体	5' GCACAAACCUCUGAGCUACU 3'
22	HYB_08	供体	5' AUCAGCACAAACCUCUGAGC 3'

[0084]

23	HYB_09	供体	5' AAAUCAGCACAAACCUCUGA 3'
24	HYB_10	供体	5' GAAAAUCAGCACAAACCUCU 3'
25	HYB_11	供体	5' AGGAAAAUCAGCACAAACCU 3'
26	HYB_12	受体	5' CAUAGGUUGGCACCUAUAAA 3'
27	HYB_13	受体	5' UCCAUAGGUUGGCACCUAU 3'
28	HYB_14	编码外显子 1	5' UGAGCUCCAUGGAUUCUCC 3'

[0085]

29	SAN-73	编码外显子	5' CACTCTTCTGTTCCAT 3'
		2	
30	SAN-74	供体	5' CACAAACCTCTGAGCT 3'

[0086] 在一个实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸包含至少一个骨架修饰。在一个实施方案中,反义寡核苷酸包含硫代磷酸酯修饰。所述硫代磷酸酯(PS)修饰用一个硫原子代替寡核苷酸磷酸骨架中的非桥接氧。这种修饰使得核苷酸间连接对核酸酶降解具有抗性。硫代磷酸酯键可以引入到寡核苷酸5'或3'末端最后3至5个核苷酸之间,以抑制核酸外切酶降解(见图7)。在整个寡核苷酸中包含硫代磷酸酯键也有助于减少核酸内切酶的攻击(见图3)。

[0087] 在另一个实施方案中,所述反义寡核苷酸包含吗啉代(磷酸二酰胺吗啉代)修饰。吗啉类化合物有标准的核酸碱基,这些碱基与通过磷酸二酰胺基而不是磷酸酯彼此连接的吗啉环结合。吗啉类不会引发其目标RNA分子的降解。

[0088] 在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸在核苷的核糖部分的2'碳上包含至少一个糖修饰。在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸包含至少一个2'糖修饰。Prakash(2011; Chem.Biodivers.Sept 8(9):1616-1641.DoI 10.1002/cbdv.201100081)给出了用于反义目的的糖修饰的综述。如图7所示,优选的2'糖修饰是2'-烷氧基或2'-烷氧基烷氧基修饰,更优选2'-甲氧基乙氧基修饰。优选的修饰是2'-0-甲基(2'-0-Me)、2'-0-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)和锁核酸(LNA)。

[0089] 其他修饰包括肽核酸(PNA)。

[0090] 在一些实施方案中,给定反义寡核苷酸中的所有位置均被统一修饰。在其他实施方案中,给定反义寡核苷酸中的某些位置没有被统一修饰。事实上,一个以上的上述修饰可以掺入单个反义寡核苷酸中,或者甚至掺入反义寡核苷酸中的单个核苷中。本发明还包括这样的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸为嵌合反义寡核苷酸。嵌合反义寡核苷酸是包含两个或更多个化学上不同的区域的反义寡核苷酸,每个区域由至少一个核苷酸组成。这些反义寡核苷酸包含至少一个区域,其中反义寡核苷酸被修饰以赋予所述反义寡核苷酸以增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的对靶核酸的结合亲和力。

[0091] 反义寡核苷酸可以作为能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。通常这种可能性是通过在反义寡核苷酸内部包含一个区域来介导的。这种反义寡核苷酸也被称为“缺口体(gapmer)”。缺口体是一种嵌合反义寡核苷酸,其含有典型的脱氧核糖核苷酸单体中心嵌段,其长度足以诱导RNaseH切割。有效的RNase切割需要4个或更多的脱氧核糖核苷酸的延伸。通常这样的延伸具有9个或更多的脱氧核糖核苷酸。在本发明中,优选所述反义寡核苷酸不包含能够作为酶底物的区域,所述酶能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体。

[0092] 所述反义寡核苷酸优选包含修饰的核苷酸,例如硫代磷酸酯修饰的核碱基和/或2'糖修饰,从而提供对核酸酶无意降解的抗性。如图7所示,优选的2'糖修饰是2'-烷氧基或2'-烷氧基烷氧基修饰,更优选2'-甲氧基乙氧基修饰。优选的2'糖修饰包括2'-0-甲基(2'-

0-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)和锁核酸(LNA)。骨架中可能整个含有硫代磷酸酯。本发明还包括反义寡核苷酸的其他构型。所述反义寡核苷酸优选包含经修饰的核苷酸,以提供靶标RNA对核酸酶无意降解的抗性,例如硫代磷酸酯修饰的核碱基和/或2'糖修饰。这种反义寡核苷酸在本发明的范围内。因此,本文公开的反义寡核苷酸优选具有对靶标RNA提供核酸酶抗性的区域。由所述反义寡核苷酸和靶标RNA形成的双链体对RNase H的作用不敏感。

[0093] 在一个优选的实施方案中,所述反义寡核苷酸包含一个或多个具有修饰的聚合物骨架的核碱基。所述修饰的聚合物骨架优选是本文别处所示的修饰骨架。在一个优选实施方案中,所述修饰的聚合物骨架包含2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或吗啉代(PMO)核苷酸。在一个优选的实施方案中,所述修饰的聚合物骨架中的所有核苷酸包含修饰的糖部分,优选在2'碳上。在一个优选的实施方案中,连接两个核苷酸的磷酸基团被修饰成硫代磷酸酯基团。优选地,在修饰的聚合物骨架中,所有的磷酸二酯键都是硫代磷酸酯键。

[0094] 人类多瘤病毒可分为几个属,称为 α 、 β 和 δ 属(Helle,F.et.al.,Viruses,2017)。在优选的实施方案中,多瘤病毒是 α 或 β 病毒,优选 β 病毒。下表列出了几种人类多瘤病毒。在优选的实施方案中,多瘤病毒是BK多瘤病毒(或BK病毒,在本申请中也称为BKPyV或BKV)、JC多瘤病毒(或JC病毒,在本申请中也称为JCV)或Merkel细胞多瘤病毒(MC多瘤病毒、MC病毒,或在本申请中也称为MCV)。在优选的实施方案中,多瘤病毒是BK病毒或JC病毒,优选BK病毒。

[0095]	缩写	收录号	3'剪接位点靶区域	5'剪接位点靶区域
	BKPyV	NC_001538	4537-4596	4881-4940
	JCPyV	NC_001699	4397-4456	4741-4800
	KIPyV	NC_009238	4299-4358	4686-4745
	WUPyV	NC_009539	4477-4536	4876-4935
	MCPyV	NC_010277	4693-4752	5124-5183
	HPyV6	NC_014406	4264-4323	4654-4713
	HPyV7	NC_014407	4272-4331	4677-4736
	TSPyV	NC_014361	4352-4411	4765-4824
	HPyV9	NC_015150	4408-4467	4760-4819
	MWPyV	NC_018102	4303-4362	4658-4717
	STLPyV	NC_020106	4159-4218	4504-4563
[0096]	HPyV12	NC_020890	4392-4451	4791-4850
	NJPyV	NC_024118	4471-4530	4859-4918

[0097] 本发明还提供了抑制多瘤病毒在细胞中复制的方法,所述方法包括向被所述多瘤病毒感染的细胞提供本文所述的反义寡核苷酸。所述反义寡核苷酸优选是靶向所述感染的多瘤病毒的寡核苷酸(见图3)。所述细胞优选为对多瘤病毒复制敏感的细胞。当所述细胞是动物(如人)细胞时,优选所述动物是许可宿主,即允许病毒绕过其防御并复制病毒的宿主。对于多瘤病毒(如BK病毒和JC病毒)来说,通常首先通过检测动物尿液中的病毒来检测复制(尿毒血症)。然后,当感染持续时,也可以在动物的血清中检测到病毒(病毒血症)。大多数人在童年时期都会遇到BK和JC病毒,导致轻度疾病。然而,当在免疫受损的宿主中被重新激活或后天获得时,BK和JC病毒被认为与许多人类临床疾病状态有关。BK最常与肾脏受累相

关,如输尿管狭窄、出血性膀胱炎和肾病 (Leploeg, M.D. et. al., *Clinical Infectious Diseases*, 2001; Helle, F. et. al., *Viruses*, 2017)。宿主的易感性或许可性可以通过损害宿主的免疫系统来诱导。许多情况都可能导致宿主免疫能力的暂时性或永久性降低。免疫缺陷是指免疫系统对抗传染病和癌症的能力受到损害或完全缺乏的状态。大多数免疫缺陷病例是由于影响患者免疫系统的外部因素而后天获得的(“继发性”)。这些外部因素的例子包括HIV感染、极端年龄和环境因素(如营养)。免疫抑制也可以由一些药物诱导,如糖皮质激素、细胞抑制剂、抗体和作用于免疫亲和素的化合物(如钙调磷酸酶抑制剂、贝拉西普(一种具有CTLA-4胞外结构域的免疫球蛋白样分子)和类似分子)。这可以是期望的效果,例如在器官移植手术中作为抗排斥措施,以及在免疫系统过度活跃的患者中,如在自身免疫性疾病中。然而,有时这种期望的效果具有降低个体对抗病毒感染(如多瘤病毒感染)的能力的额外效应。具有任何类型的免疫缺陷的人被称为免疫受损的人。除了可能影响每个人的普通感染之外,免疫受损的人可能特别容易受到机会性感染的侵害。

[0098] 在一个实施方案中,本发明提供制备用于移植的移植物的方法,所述方法的特征在于向供体细胞(优选供体肾细胞)提供本文所述的反义寡核苷酸。所述反义寡核苷酸优选是靶向在移植物细胞中复制的多瘤病毒的寡核苷酸。在肾移植物或肾细胞移植物的情况下,所述多瘤病毒优选为BK病毒、JC病毒或MC病毒特异性寡核苷酸。如此处理的移植物细胞对反义寡核苷酸所特异的多瘤病毒的复制不太敏感。这增加了移植的成功率。它便于管理移植受体。控制移植受体中机会性多瘤病毒复制和患者中其他药物诱导的免疫抑制的方法之一是减少免疫抑制性药物的施用,从而使免疫系统恢复到降低病毒感染和/或复制的程度。当如本文所述制备移植物时,与接受未处理的移植物的患者相比,患者中多瘤病毒感染/复制的发生率较低,并且当检测时,通常不太严重。优选的是,移植物受体根据需要接受一次或多次附加的反义寡核苷酸施用。本发明还提供了一种治疗受试者中多瘤病毒感染的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用本文所述的反义寡核苷酸。所述个体优选是免疫受损的个体。

[0099] 所述移植物优选为同种异体移植物或异种移植物。这种移植物的受体通常用免疫抑制性药物治疗,以增加移植物的存活率,或降低宿主对抗移植物效应的发生率和/或严重性。许多组织目前可以被移植。当从另一个非遗传学相同的人或非人类动物移植细胞或器官时,宿主对抗移植物的效应通常是高风险的。移植物包括肺、心脏、心脏瓣膜、肾、肝、胰腺、肠、胸腺和骨髓。在器官移植后接受免疫抑制的患者中,多达3%的患者血浆中检测到多瘤病毒(De Vlaminc, I. et. al., *Cell*, 2013)。所述移植物优选包含肾或肾细胞。所述个体优选是肾脏或肾细胞移植的接受者。

[0100] 所述反义寡核苷酸优选是赋予寡核苷酸和靶标RNA双链体以RNase H抗性的那种。所述反义寡核苷酸优选包含一种序列,该序列是可存在于人肾细胞中的RNA的至少12个、优选至少17个核碱基的连续延伸的反向互补序列,所述RNA优选是可在人肾细胞中复制的人病毒的RNA,所述病毒优选是多瘤病毒。

[0101] 在一个实施方案中,本发明提供了长度为12至30,优选17、18、19或20至30个核碱基的反义寡核苷酸,其包含多瘤病毒T-抗原前体mRNA的至少12个核碱基的连续延伸的反向互补序列,并且所述反义寡核苷酸可以调节细胞中所述T-抗原前体mRNA的剪接,其中所述反义寡核苷酸包含以下序列的至少12个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID

NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27。

[0102] 还提供了一种反义寡核苷酸,其包含以下序列的至少12个连续核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,其中所述至少12个核苷酸包含相应多瘤病毒的大T抗原前体mRNA的剪接供体序列或剪接受体序列的反向互补序列。

[0103] 本文所述的反义寡核苷酸优选包含使所述mRNA-寡核苷酸双链体对RNase H的作用具有抗性的修饰。优选包含至少一个具有修饰的聚合物骨架的核碱基,所述修饰的聚合物骨架优选2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或吗啉代(PMO)核苷酸。优选地,所有的核碱基包含修饰的聚合物骨架,所述修饰的聚合物骨架优选2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-S-约束乙基(2'-cEt)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或吗啉代(PMO)核苷酸。

[0104] 在一个优选的实施方案中,所述反义寡核苷酸包含以下序列的至少17个,优选至少18个、19个,优选至少20个连续的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,或包含以下序列的至少17个,优选至少18个、19个和优选至少20个连续的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,其具有一个错配,并且其中所述错配不是所述连续延伸的第一个或最后一个核苷酸。

[0105] 还提供了抑制多瘤病毒在细胞中复制的方法,所述方法包括向被所述多瘤病毒感染的细胞提供所述反义寡核苷酸。还提供了制备用于移植的移植物的方法,所述方法的特征在于,供体细胞(优选供体肾细胞)被提供有所述反义寡核苷酸。

[0106] 还提供了一种治疗受试者中多瘤病毒感染的方法,所述方法包括向有需要的个体施用本文所述的反义寡核苷酸。所述个体是免疫受损的个体。所述个体优选是肾脏或肾细胞移植的接受者。

[0107] 还提供了一种给个体施用反义寡核苷酸的方法,用于与所述个体的肾细胞中的互补RNA序列杂交,所述方法的特征在于,所述反义寡核苷酸是本文所述的寡核苷酸。

[0108] 还提供了一种反义寡核苷酸,其包含使所述反义寡核苷酸和靶标mRNA的双链体对RNase的作用具有抗性的修饰,其中所述反义寡核苷酸包含以下序列的序列:SEQ ID NO:1、

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,其没有错配、或具有一个或两个错配。

[0109] 已经观察到,当给动物施用,本文所述的寡核苷酸被有效地递送至相关肾细胞并被其吸收。施用方法优选IV施用。对于能够穿过血脑屏障进入中枢神经系统(CNS)的多瘤病毒,如JC-病毒,可以给CNS施用反义寡核苷酸。现有技术中已知多种方式。对于反义寡核苷酸介导的CNS的JC病毒感染的治疗而言,鞘内递送是优选的。JC病毒感染也可以通过IV递送来对抗,因为最初的感染通常被认为是通过扁桃体或胃肠道,随即它扩散到其他器官,例如但不限于肾脏中的管状上皮细胞,在那里它可以保持潜伏或继续繁殖,在尿液和大脑中释放病毒颗粒。

[0110] 所述反义寡核苷酸优选不具有由以下序列组成的序列:

[0111] 5'-CACAAACCTCTGAGCTA;

[0112] 5'-AACCUCUGAACUAUCCAUGU;

[0113] 5'-ACCUCUGAACUAUCCAUGUA;

[0114] 5'-TTCATCTGTTCCATAGGTTGGCACCTA;或

[0115] 5'-TTCCATAGGTTGGCACCTAAAAA,或其替代物,其中一个或多个胸腺嘧啶是尿嘧啶,反之亦然。

[0116] 为了清楚和简明描述的目的,特征在此被描述为相同或单独实施例的一部分,然而,应该理解,本发明的范围可以包括具有所有或一些所描述特征的组合的实施例。

附图说明

[0117] 图1: BK病毒基因组示意图及多种BK病毒基因组亚型的序列相似性。左侧: BK病毒基因组编码五种主要蛋白,即,小T和大T抗原(早期基因),以及agnoprotein和主要衣壳蛋白VP1、VP2和VP3(晚期基因)。所述病毒基因组还包含非编码区(NCCR),它既包含复制起点,也包含驱动早期基因和晚期基因表达以及病毒基因组复制的转录因子的启动子区。值得注意的是,早期前体mRNA和晚期前体mRNA的选择性剪接导致许多蛋白质亚型,包括小t抗原、截短的T抗原(2个内含子)和大T抗原(1个内含子),以及决定VP1、VP2或VP3产生比例的选择性剪接。然而,重要的是,要注意晚期区域产生的主要剪接变体是主要编码VP1的成熟mRNA。续: 早期区域的基因组序列编码T抗原蛋白,即小t(tAg)、截短T(truncTAg)和大T抗原(TAG)。tAg在驱动感染细胞进入S期方面起着关键作用,其允许TAG介导的病毒基因组复制。此外,TAG结合到NCCR以驱动后期区域前体mRNA的表达。这导致VP1、VP2和VP3的产生,它们对于病毒DNA的包封是必不可少的。

[0118] 图2: 使用CLustaLow(“msa”软件包,R语言)对245个独特的BK-多瘤病毒分离株(从公开可用的NCBI数据库下载)的TAG的全基因序列(包括内含子序列)进行比对。从这些记录来看,只有报告完整基因组的分离株被用于TAG中剪接位点的保守性分析。Dunlop株被用作参考基因组。用UPGMA方法(“phangorn”和“ggtree”软件包,R语言)构建了系统进化树。为受体剪接位点和供体剪接位点构建了序列标识,以显示亚型之间的核苷酸特异性保守性

(“msa”软件包,R语言)。

[0119] 图3:调节BKPv TAg剪接的反义寡核苷酸的组成。针对BKPv TAg的外显子1-内含子接合处(AON#1、#2和#3)和内含子-外显子2接合处(AON#4和#5)的反义寡核苷酸(AON)的序列。

[0120] 图4: TAg剪接调节性AON降低BKPv感染的人上皮细胞中的TAg和VP1 mRNA的表达水平。左侧:在以约100的感染复数感染BKPv病毒后第7天,无序AON处理的HK2细胞与用剪接调节性AON#1、#2、#3、#4和#5处理的HK2细胞中的TAg RNA水平的降低($n=5$; $p<0.05$)。右:在以约100的感染复数感染BKPv病毒后,无序AON处理的HK2细胞与用剪接调节性AON#1、#2、#3、#4和#5处理的HK2细胞中的VP1 RNA水平的降低($n=5$; $p<0.05$)。

[0121] 图5: TAg剪接调节性AON降低BKPv感染的人上皮细胞中的VP1蛋白的表达水平。在以约100的感染复数感染BK多瘤病毒后7天收获的HK2细胞裂解物的蛋白质印迹分析。与无序AON处理的HK2细胞相比,AON#2、#3和#4明显降低VP1蛋白的表达水平($n=4$)。

[0122] 图6: TAg剪接调节性AON减少BK病毒复制。培养上清液中的病毒DNA浓度通过聚合酶链反应分析方法测定BKPv基因组中的VP1。与用无序AON处理的细胞相比,用AON#2、#3和#4处理的HK2细胞始终显示出培养上清液中BKPv基因组水平降低。

[0123] 图7: AON的化学修饰。描述了一些已经应用于当前TAg剪接调节性AON(硫代磷酸酯骨架和核糖部分上的2'-OMe)的化学修饰。这些AON的其他实施方案可以在这个位置采用2'-MOE或2'-cEt修饰。这些修饰主要是为了提高AON的稳定性。

[0124] 图8: 已知有人类宿主的13种多瘤病毒的序列相似性。值得注意的是,这些毒株涵盖了 α 、 β 和 δ 属,其中大多数最近已被鉴定。如图左侧的进化树信息所示,BKPv和JCPv具有相当大的序列相似性,这表明它们在肾脏近端小管上皮细胞中的共定位使它们成为本文所述的剪接调节性AON的靶标。

[0125] 图9: 设计可用于靶向其他多瘤病毒的AON。除了上述BK和JC病毒TAg剪接调节性AON之外,AON的设计还基于AON也可能靶向人类多瘤病毒3(Karolinska学院或KI)、人类多瘤病毒4(Washington大学或WU)和人类多瘤病毒5(Merkel细胞病毒或MCV)的可能性。对于人类多瘤病毒3-5,针对外显子1-内含子接合处设计了2个AON,针对内含子-外显子2接合处设计了2个AON,而在外显子1-内含子位点设计了3个AON。

[0126] 图10: BK病毒基因组和BKV靶向性AON的示意图。第一部分: BK病毒基因组编码6种主要蛋白,即,小T和大T抗原(早期基因),以及agnoprotein和主要衣壳蛋白VP1、VP2和VP3(晚期基因)。所述病毒基因组还包含非编码区(NCCR),其序列既有复制起点,也有负责招募转录因子的启动子区,所述转录因子驱动早期和晚期基因表达,同时还协调病毒基因组的复制。如图1所示,早期前体mRNA和晚期前体mRNA的选择性剪接导致许多蛋白质亚型,包括小t抗原、截短的T抗原(2个内含子)和大T抗原(1个内含子),以及决定VP1、VP2或VP3产生比例的选择性剪接。晚期区域产生的主要剪接变体主要导致VP1的表达。第二部分: 用于靶向BKV大T抗原(TAg)外显子-内含子接合处的AON序列,如上图所示。第三部分: 示意图描述了BKV TAg的外显子-内含子接合处的AON结合位点。

[0127] 图11: 用于设计通用的BKV靶向性AON的TAg剪接位点保守性的生物信息学分析。第一部分: 包含独特BKV分离株/毒株的全基因TAg序列的系统发育树,显示了BKV亚组之间的明显区别。第二部分: 具有侧翼区(20个核苷酸)的TAg剪接位点的序列标识,显示了亚组之

间的高度序列保守性。提供了针对BKV TAg的外显子1-内含子接合处(HYB_01、HYB_02、HYB_03、HYB_06、HYB_07、HYB_08、HYB_09、HYB_10和HYB_11)和内含子-外显子2接合处(HYB_04、HYB_05、HYB_12和HYB_13)的反义寡核苷酸(AON)的序列。

[0128] 图12: TAg剪接调节性AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中TAg mRNA的表达水平。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性AON处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的TAg RNA水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。注意: HYB_14只与TAg外显子1的外显子区结合,不靶向外显子-内含子边界。

[0129] 图13: TAg剪接调节性AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中VP1 mRNA的表达水平。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性AON处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP1 RNA水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。注意: HYB_14只与TAg外显子1的外显子区结合,不靶向外显子-内含子边界。

[0130] 图14: TAg剪接调节性AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中VP1蛋白的表达水平。从BKV靶向性AON处理的HK2细胞中收获的细胞裂解物的代表性蛋白质印迹分析。印迹分析描述了在以约100的感染复数感染BK多瘤病毒后7天收获的裂解物的VP1蛋白水平($n=3$ 个生物学重复)。

[0131] 图15: 在用BKV靶向性AON处理和用BKV感染后,人肾上皮细胞中VP1蛋白表达水平的定量。在以约100的感染复数感染BK多瘤病毒后7天收获的HK2细胞裂解物的蛋白质印迹分析的定量分析。将无序AON处理的HK2细胞用作对照,所有值均以 $\log_2$ 标尺(scale)表示($n=3$ 个生物学重复)。注意: HYB_14只与TAg外显子1的外显子区结合,不靶向外显子-内含子边界。

[0132] 图16: TAg剪接调节性AON减少BKV DNA复制。感染后7天培养上清液中的病毒颗粒浓度通过对BKV基因组中VP1的PCR分析方法测定。与用无序AON处理的细胞相比,用BKV靶向性AON处理的HK2细胞始终显示培养上清液中BKV颗粒的水平降低。数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0133] 图17: TAg剪接调节性AON降低HK2再感染水平。培养物上清液在第7天从已经用BKV靶向性AON预处理并被BKV感染的HK2细胞中除去。所述上清液用于感染未处理的HK2细胞(2h),之后所述细胞被培养7天,并用免疫组织化学方法对TAg和hoechst(细胞核)进行染色。随后,确定阳性细胞的百分比,并相对于无序AON处理的细胞进行描述。数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0134] 图18: 热图描绘了BKV靶向性AON的处理对HK2细胞的BKV感染的各个方面的累积影响。总结了对TAg和VP1 mRNA、VP1蛋白、病毒颗粒产生和再感染的影响。模块表示: 黑色代表几乎没有影响,而白色表示影响很大(与无序的相比, $2\log$ 倍变化, $n=3$)。

[0135] 图19: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中TAg mRNA的表达水平。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的TAg RNA水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。注意: SAN_73和SAN_74是以前描述的AON(16个核苷酸长)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0136] 图20: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中VP1 mRNA的表达水平。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP1 mRNA水平的降低。注意: SAN_73和SAN_

74是以前描述的AON(长度为16个核苷酸)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0137] 图21: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中VP1蛋白的表达水平。细胞裂解物中的VP1蛋白水平的代表性蛋白质印迹可视化显示,所述细胞裂解物是从用BKV靶向性前导化合物AON处理并以约100的感染复数感染BK多瘤病毒7天后的HK2细胞中获得的($n=3$ 个生物学重复)。

[0138] 图22: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中VP1蛋白的表达水平。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP1蛋白水平的降低。注意: SAN_73和SAN_74是以前描述的AON(16个核苷酸长)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0139] 图23: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人肾上皮细胞中病毒颗粒的产生。无序AON处理的HK2细胞与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)处理的HK2细胞(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的病毒颗粒水平的降低。注意: SAN_73和SAN_74是以前描述的AON(16个核苷酸长)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0140] 图24: TAg剪接调节性前导AON降低HK2再感染水平。培养物上清液在第7天从已经用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)预处理并被BKV感染的HK2细胞中除去。所述上清液用于感染未处理的HK2细胞(2h),之后所述细胞被培养7天,并用免疫组织化学方法对TAg和Hoechst(细胞核)进行染色。随后,确定阳性细胞的百分比,并相对于无序AON处理的细胞进行描述。数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0141] 图25: 热图描绘了BKV靶向性前导化合物AON处理对HK2细胞的BKV感染的各个方面的累积影响。对于用我们的前导化合物AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)预处理的HK2细胞所观察到的TAg和VP1 mRNA、VP1蛋白、病毒颗粒产生和再感染的影响进行了总结。模块表示: 黑色代表几乎没有影响,而白色表示影响很大(与无序的相比,2log倍变化, $n=3$)。

[0142] 图26: TAg剪接调节性AON减少预先感染BKV的HK2中的TAg mRNA表达的功效。与AON预先处理相反,我们首先用BKV病毒感染HK2细胞,随后评估AON降低TAg mRNA表达水平的功效。左图: 感染后单次剂量的AON显著降低了TAg mRNA的表达水平,尽管在以后的时间点添加AON似乎不太有效。右图: 多剂量的BKV靶向性AON更有效地降低了TAg mRNA的表达水平。值得注意的是,所有处理时间点的RNA表达水平都是在感染后 $t=7$ 天时测定的,因此与早期处理相比,在较晚时间点处理的暴露时间更短。数据代表生物学重复 $n=1$ 。

[0143] 图27: TAg剪接调节性AON减少预先感染BKV的HK2中的VP1 mRNA表达的功效。与AON预先处理相反,我们首先用BKV病毒感染HK2细胞,随后评估AON降低VP1 mRNA表达水平的功效。左图: 感染后单次剂量的AON显著降低了VP1 mRNA的表达水平,尽管在以后的时间点添加AON似乎不太有效。右图: 多剂量的BKV靶向性AON更有效地降低了VP1 mRNA的表达水平。值得注意的是,所有处理时间点的RNA表达水平都是在感染后 $t=7$ 天时测定的,因此与早期处理相比,在较晚时间点处理的暴露时间更短。数据代表生物学重复 $n=1$ 。

[0144] 图28: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的人原代近端小管上皮细胞中TAg mRNA的表达水平。无序AON处理的hPTEC与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14处理的hPTEC(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的TAg RNA水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0145] 图29: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的hPTEC中VP1 mRNA的表达水平。无序

AON处理的hPTEC与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14处理的hPTEC(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP1 RNA水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0146] 图30: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的hPTEC中的VP1和VP3蛋白的表达水平。细胞裂解物中的VP1和VP3蛋白水平的代表性蛋白质印迹可视化显示,所述细胞裂解物是从用BKV靶向性前导化合物AON处理并以约100的感染复数感染BK多瘤病毒7天后的hPTEC中获得的(VP1和GAPDH: $n=3$ 个生物学重复,VP3: $n=1$)。

[0147] 图31: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的hPTEC中VP1蛋白的表达水平。无序AON处理的hPTEC与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14处理的hPTEC(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP1蛋白水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0148] 图32: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的hPTEC中VP3蛋白的表达水平。无序AON处理的hPTEC与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14处理的hPTEC(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的VP3蛋白水平的降低($n=3$ 个生物学重复)。这些数据代表生物学重复 $n=1$ 。

[0149] 图33: TAg剪接调节性前导AON降低BKV感染的hPTEC中的病毒颗粒的产生。无序AON处理的hPTEC与用BKV靶向性前导AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14处理的hPTEC(之后细胞以约100的感染复数感染BKV)中的病毒颗粒水平的降低。这些数据代表生物学重复 $n=3$ 。

[0150] 图34: 热图描绘了BKV靶向性前导化合物AON的处理对hPTEC的BKV感染的各个方面的累积影响。对于用我们的前导化合物AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)或HYB_14预处理的hPTEC所观察到的TAg和VP1 mRNA、VP1蛋白和病毒颗粒产生的影响进行了总结。模块表示: 黑色代表几乎没有影响,而白色表示影响很大(与无序的相比,2log倍变化, $n=3$)。

[0151] 图35: RNA测序分析由前导BKV靶向性AON诱导的剪接调节。主要转录本和剪接事件显示在图的上半部分,而在图的下半部分,显示了观察到的剪接模式和z评分,表明我们的BKV靶向性AON确实调节剪接。在外显子1-内含子位点以及外显子2的3'-区域观察到事件。总的来说,单个AON的存在似乎影响了剪接的近端和远端效应,这表明了一个复杂的剪接事件。

[0152] 图36: 长读长序列分析由BKV靶向性前导化合物AON诱导的剪接调节。来自用无序AON或我们的前导化合物AON(HYB_01、HYB_03或HYB_11)预处理的HK2细胞的RNA转录物的长序列阅读分析。左侧: 条形图描述了利用大T或小T供体位点与固定的受体位点(内含子-外显子2)或未剪接的转录物相结合的转录物的百分比,表明了BKV靶向性AON的剪接调节。右: 条形图描述了利用截短的T或截短的T*受体位点与固定的供体位点相结合的转录物的百分比,表明了BKV靶向性AON的剪接调节。

[0153] 图37: JC病毒基因组和JCV靶向性AON示意图。第一部分: 与BK病毒相似,JC病毒基因组编码小T和大T抗原(早期基因),以及agnoprotein和主要衣壳蛋白VP1、VP2和VP3(晚期基因)。所述病毒基因组还包含非编码区(NCCR),所述非编码区具有复制起点和用于转录因子结合的启动子区,该启动子区驱动早期和晚期基因的表达以及病毒基因组复制。与关于早期和晚期区域前体mRNA的BKV剪接的广泛知识相比,关于JCV剪接的知识较少。第二部分:

用于靶向JCV大T抗原 (TA_g) 外显子-内含子接合处的AON序列,如上图所示。第三部分:示意图描述了JCV TA_g外显子-内含子接合处的AON结合位点。

[0154] 图38:TA_g剪接调节性AON降低JCV感染的、衍生自人诱导多能干细胞的星形胶质细胞中TA_g mRNA的表达水平。无序AON处理的、hiPSC衍生的星形胶质细胞与用JCV靶向性AON处理的、hiPSC衍生的星形胶质细胞(之后细胞感染JCV(n=1))中的TA_g mRNA水平的降低。

[0155] 图39:TA_g剪接调节性AON降低JCV感染的、衍生自人诱导多能干细胞的星形胶质细胞中VP1 mRNA的表达水平。无序AON处理的、hiPSC衍生的星形胶质细胞与用JCV靶向性AON处理的、hiPSC衍生的星形胶质细胞(之后细胞感染JCV(n=1))中的VP1 mRNA水平的降低。

[0156] 图40:TA_g剪接调节性AON降低JCV感染的原代人星形胶质细胞中TA_g mRNA的表达水平。无序AON处理的原代星形胶质细胞与用JCV靶向性AON处理的原代星形胶质细胞(之后细胞感染JCV(n=2个生物学重复))中的TA_g mRNA水平的降低。

[0157] 图41:TA_g剪接调节性AON降低JCV感染的原代人星形胶质细胞中VP1mRNA的表达水平。无序AON处理的原代星形胶质细胞与用JCV靶向性AON处理的那些原代星形胶质细胞(之后细胞感染JCV(n=2个生物学重复))中的VP1 mRNA水平的降低。

[0158] 图42:在RNA测序中扩增的RNA对BKV基因组的覆盖。将配对末端读段与来自无序对照、HYB_01、HYB_03、HYB_11、HYB_14或SAN_73和SAN_74处理的细胞的BKV基因组进行比对,允许对BKV RNA表达水平进行半定量评估。数据表示生物学重复n=3,并被分为早期和晚期基因表达谱。

[0159] 图43:长读段高保真Phusion聚合酶产生的TA_g (前体)mRNA的电泳分析。Phusion聚合酶用于从RNA制备长读段高保真mRNA,并通过毛细管电泳进行评估,所述RNA是从无序对照AON(第1道)或BKV靶向性AON(即HYB_01、HYB_03或HYB_11;分别为第2-4道)处理的HK2细胞中收获的。数据代表生物学重复n=3。

[0160] 图44:静脉内施用后24小时小鼠肾脏AON摄取的荧光显微镜检查。在C57BL/6J小鼠中静脉内施用40mg/kg HYB_01(无5' 6-FAM标记的2' MOE)后24小时的小鼠肾脏切片的颜色分离高倍放大图像。细胞核用Hoechst染色,近端小管上皮细胞摄取基于与肾(近端小管)的翅荚百脉根凝集素(LTL)阳性细胞的共定位显现。左图代表100x放大(10x物镜,比例尺=100μm),而右图代表400x放大(40x物镜,比例尺=20μm)。

[0161] 图45:免疫组织化学染色小鼠组织的BKV靶向性AON摄取。在C57BL/6J小鼠中静脉内施用40mg/kg HYB_01(2' MOE,无5' 6-FAM标记)后24小时切除器官,并用免疫组织化学方法评估AON摄取。先用苏木精和伊红染色(H&E),再使用抗硫代磷酸酯抗体,并用二氨基联苯胺(DAB)作为过氧化物酶底物以揭示HRP标记的二抗,来特异性检测AON骨架。在ImageJ中,通过颜色反卷积和阈值处理,使AON染色的阳性信号可视化,表明阳性小管具有高水平的AON摄取,同时肝脏中的信号显著降低,而心脏组织中没有信号。

具体实施方式

[0162] 实施例1

[0163] 材料和方法

[0164] 用于系统发育分析的材料

[0165] BK多瘤病毒分离株的完整基因组序列从公开的NCBI数据库中下载。从这些记录来

看,只有报告完整基因组的分离株被用于TAg中剪接位点的保守性分析。Dunlop株被用作参考基因组。分离株“MM”和“FNL-9”分别由于内含子中的大缺失或与受体剪接位点重叠的重叠而被去除。245个独特基因组序列的收录号如下:

[0166] AB211369.1;AB211370.1;AB211371.1;AB211372.1;AB211373.1;AB211374.1;AB211375.1;AB211376.1;AB211377.1;AB211378.1;AB211379.1;AB211381.1;AB211382.1;AB211383.1;AB211384.1;AB211385.1;AB211386.1;AB211387.1;AB211388.1;AB211389.1;AB211390.1;AB211391.1;AB213487.1;AB217917.1;AB217918.1;AB217919.1;AB217920.1;AB217921.1;AB260028.1;AB260029.1;AB260030.1;AB260031.1;AB260032.1;AB260033.1;AB263912.1;AB263913.1;AB263914.1;AB263915.1;AB263916.1;AB263917.1;AB263918.1;AB263919.1;AB263920.1;AB263921.1;AB263922.1;AB263923.1;AB263924.1;AB263925.1;AB263926.1;AB263927.1;AB263928.1;AB263929.1;AB263930.1;AB263931.1;AB263932.1;AB263934.1;AB263935.1;AB263936.1;AB263938.1;AB269825.1;AB269826.1;AB269827.1;AB269828.1;AB269829.1;AB269830.1;AB269831.1;AB269832.1;AB269834.1;AB269836.1;AB269837.1;AB269838.1;AB269840.1;AB269841.1;AB269842.1;AB269843.1;AB269844.1;AB269845.1;AB269846.1;AB269847.1;AB269848.1;AB269849.1;AB269850.1;AB269851.1;AB269852.1;AB269853.1;AB269854.1;AB269855.1;AB269856.1;AB269857.1;AB269858.1;AB269859.1;AB269860.1;AB269861.1;AB269862.1;AB269863.1;AB269864.1;AB269865.1;AB269866.1;AB269867.1;AB269868.1;AB269869.1;AB298941.1;AB298942.1;AB298945.1;AB298946.1;AB298947.1;AB301086.1;AB301087.1;AB301089.1;AB301090.1;AB301091.1;AB301092.1;AB301093.1;AB301094.1;AB301095.1;AB301096.1;AB301097.1;AB301099.1;AB301100.1;AB301101.1;AB365130.1;AB365132.1;AB365133.1;AB365134.1;AB365136.1;AB365137.1;AB365138.1;AB365139.1;AB365140.1;AB365141.1;AB365142.1;AB365144.1;AB365145.1;AB365146.1;AB365148.1;AB365149.1;AB365150.1;AB365151.1;AB365153.1;AB365154.1;AB365156.1;AB365157.1;AB365158.1;AB365159.1;AB365160.1;AB365162.1;AB365164.1;AB365165.1;AB365166.1;AB365167.1;AB365168.1;AB365170.1;AB365173.1;AB365174.1;AB365175.1;AB365176.1;AB365178.1;AB369087.1;AB369088.1;AB369089.1;AB369090.1;AB369092.1;AB369093.1;AB369094.1;AB369095.1;AB369096.1;AB369097.1;AB369098.1;AB369099.1;AB369101.1;AB464953.1;AB464954.1;AB464956.1;AB464957.1;AB464958.1;AB464960.1;AB464961.1;AB464962.1;AB485695.1;AB485696.1;AB485697.1;AB485698.1;AB485699.1;AB485700.1;AB485701.1;AB485703.1;AB485704.1;AB485707.1;AB485709.1;AB485710.1;AB485711.1;AB485712.1;AY628224.1;AY628225.1;AY628226.1;AY628227.1;AY628228.1;AY628229.1;AY628230.1;AY628231.1;AY628232.1;AY628233.1;AY628234.1;AY628235.1;AY628236.1;AY628237.1;AY628238.1;DQ305492.1;EF376992.1;FR720308.1;FR720309.1;FR720310.1;FR720311.1;FR720312.1;FR720313.1;FR720315.1;FR720317.1;FR720318.1;FR720320.1;FR720321.1;JF894228.1;JN192431.1;JN192432.1;JN192433.1;JN192435.1;JN192437.1;JN192438.1;JN192439.1;JN192440.1;JQ713822.1;KF055891.1;KF055892.1;KF055893.1;KP412983.1;KP984526.1;KY114802.1;KY114803.1;KY132094.1;KY487998.1;LC029413.1;LC309239.1;LC309240.1;LT960370.1;M23122.1;V01108.1。

[0167] 类似地,13种不同的原型人类多瘤病毒的完整基因组序列被下载。收录号如下所示:

[0168] NC_001538;NC_001699;NC_009238;NC_009539;NC_010277;NC_014406;NC_014407;NC_014361;NC_015150;NC_018102;NC_020106;NC_020890;NC_024118。

[0169] 大T抗原剪接位点的保守性

[0170] 来自所有参考人类多瘤病毒的全基因组核苷酸序列于2018年2月20日从NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>)下载,并使用默认设置与WebPrank(在线可获得:<https://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webprank/>)进行比对。构建了系统发育的UPGMA树,并为每个剪接位点创建了序列标识,以显示不同的人类多瘤病毒之间的保守性。所有下载的参考序列收录号如下所示。

[0171] 参考序列:NC_001538,NC_001699,NC_009238,NC_009539,NC_010277,NC_014406,NC_014407,NC_014361,NC_015150,NC_018102,NC_020106,NC_020890,NC_024118

[0172] 所有人类多瘤病毒分离株的全基因组核苷酸序列于2018年2月20日从NCBI网站下载。仅从独特的基因组序列中检索大T抗原的全基因序列,并使用默认设置与WebPrank进行比对,为大T抗原中的每个剪接位点创建序列标识以显示不同的人类多瘤病毒内部和之间的保守性。

[0173] 所有下载的收录号如下所示。

[0174] BKPvV:AB211369.1,AB211370.1,AB211371.1,AB211372.1,AB211373.1,AB211374.1,AB211375.1,AB211376.1,AB211377.1,AB211378.1,AB211379.1,AB211380.1,AB211381.1,AB211382.1,AB211383.1,AB211384.1,AB211385.1,AB211386.1,AB211387.1,AB211388.1,AB211389.1,AB211390.1,AB211391.1,AB213487.1,AB217917.1,AB217918.1,AB217919.1,AB217920.1,AB217921.1,AB260028.1,AB260029.1,AB260030.1,AB260031.1,AB260032.1,AB260033.1,AB260034.1,AB263912.1,AB263913.1,AB263914.1,AB263915.1,AB263916.1,AB263917.1,AB263918.1,AB263919.1,AB263920.1,AB263921.1,AB263922.1,AB263923.1,AB263924.1,AB263925.1,AB263926.1,AB263927.1,AB263928.1,AB263929.1,AB263930.1,AB263931.1,AB263932.1,AB263933.1,AB263934.1,AB263935.1,AB263936.1,AB263937.1,AB263938.1,AB269822.1,AB269823.1,AB269824.1,AB269825.1,AB269826.1,AB269827.1,AB269828.1,AB269829.1,AB269830.1,AB269831.1,AB269832.1,AB269833.1,AB269834.1,AB269835.1,AB269836.1,AB269837.1,AB269838.1,AB269839.1,AB269840.1,AB269841.1,AB269842.1,AB269843.1,AB269844.1,AB269845.1,AB269846.1,AB269847.1,AB269848.1,AB269849.1,AB269850.1,AB269851.1,AB269852.1,AB269853.1,AB269854.1,AB269855.1,AB269856.1,AB269857.1,AB269858.1,AB269859.1,AB269860.1,AB269861.1,AB269862.1,AB269863.1,AB269864.1,AB269865.1,AB269866.1,AB269867.1,AB269868.1,AB269869.1,AB298940.1,AB298941.1,AB298942.1,AB298943.1,AB298944.1,AB298945.1,AB298946.1,AB298947.1,AB301086.1,AB301087.1,AB301088.1,AB301089.1,AB301090.1,AB301091.1,AB301092.1,AB301093.1,AB301094.1,AB301095.1,AB301096.1,AB301097.1,AB301098.1,AB301099.1,AB301100.1,AB301101.1,AB301102.1,AB301103.1,AB365130.1,AB365131.1,AB365132.1,AB365133.1,AB365134.1,AB365135.1,AB365136.1,AB365137.1,AB365138.1,AB365139.1,AB365140.1,AB365141.1,AB365142.1,AB365143.1,AB365144.1,

AB365145.1, AB365146.1, AB365147.1, AB365148.1, AB365149.1, AB365150.1, AB365151.1, AB365152.1, AB365153.1, AB365154.1, AB365155.1, AB365156.1, AB365157.1, AB365158.1, AB365159.1, AB365160.1, AB365161.1, AB365162.1, AB365163.1, AB365164.1, AB365165.1, AB365166.1, AB365167.1, AB365168.1, AB365169.1, AB365170.1, AB365171.1, AB365172.1, AB365173.1, AB365174.1, AB365175.1, AB365176.1, AB365177.1, AB365178.1, AB369087.1, AB369088.1, AB369089.1, AB369090.1, AB369091.1, AB369092.1, AB369093.1, AB369094.1, AB369095.1, AB369096.1, AB369097.1, AB369098.1, AB369099.1, AB369100.1, AB369101.1, AB464953.1, AB464954.1, AB464955.1, AB464956.1, AB464957.1, AB464958.1, AB464959.1, AB464960.1, AB464961.1, AB464962.1, AB464963.1, AB485694.1, AB485695.1, AB485696.1, AB485697.1, AB485698.1, AB485699.1, AB485700.1, AB485701.1, AB485702.1, AB485703.1, AB485704.1, AB485705.1, AB485706.1, AB485707.1, AB485708.1, AB485709.1, AB485710.1, AB485711.1, AB485712.1, AY628224.1, AY628225.1, AY628226.1, AY628227.1, AY628228.1, AY628229.1, AY628230.1, AY628231.1, AY628232.1, AY628233.1, AY628234.1, AY628235.1, AY628236.1, AY628237.1, AY628238.1, DQ305492.1, EF376992.1, FR720308.1, FR720309.1, FR720310.1, FR720311.1, FR720312.1, FR720313.1, FR720314.1, FR720315.1, FR720316.1, FR720317.1, FR720318.1, FR720319.1, FR720320.1, FR720321.1, FR720322.1, FR720323.1, JF894228.1, JN192431.1, JN192432.1, JN192433.1, JN192434.1, JN192435.1, JN192436.1, JN192437.1, JN192438.1, JN192439.1, JN192440.1, JN192441.1, JQ713822.1, KF055891.1, KF055892.1, KF055893.1, KP412983.1, KP984526.1, KY114802.1, KY114803.1, KY132094.1, KY487998.1, LC029411.1, LC029412.1, LC029413.1, LC029414.1, LC309239.1, LC309240.1, LT934539.1, LT960370.1, M23122.1, MF627830.1, MF627831.1, V01108.1, V01109.1

[0175] JCPyV: AB038249.1, AB038250.1, AB038251.1, AB038252.1, AB038253.1, AB038254.1, AB038255.1, AB048545.1, AB048546.1, AB048547.1, AB048548.1, AB048549.1, AB048550.1, AB048551.1, AB048552.1, AB048553.1, AB048554.1, AB048555.1, AB048556.1, AB048557.1, AB048558.1, AB048559.1, AB048560.1, AB048561.1, AB048562.1, AB048563.1, AB048564.1, AB048565.1, AB048566.1, AB048567.1, AB048568.1, AB048569.1, AB048570.1, AB048571.1, AB048572.1, AB048573.1, AB048574.1, AB048575.1, AB048576.1, AB048577.1, AB048578.1, AB048579.1, AB048580.1, AB048581.1, AB048582.1, AB074575.1, AB074576.1, AB074577.1, AB074578.1, AB074579.1, AB074580.1, AB074581.1, AB074582.1, AB074583.1, AB074584.1, AB074585.1, AB074586.1, AB074587.1, AB074588.1, AB074589.1, AB074590.1, AB074591.1, AB077855.1, AB077856.1, AB077857.1, AB077858.1, AB077859.1, AB077860.1, AB077861.1, AB077862.1, AB077863.1, AB077864.1, AB077865.1, AB077866.1, AB077867.1, AB077868.1, AB077869.1, AB077870.1, AB077871.1, AB077872.1, AB077873.1, AB077874.1, AB077875.1, AB077876.1, AB077877.1, AB077878.1, AB077879.1, AB081005.1, AB081006.1, AB081007.1, AB081008.1, AB081009.1, AB081010.1, AB081011.1, AB081012.1, AB081013.1, AB081014.1, AB081015.1, AB081016.1, AB081017.1, AB081018.1, AB081019.1, AB081020.1, AB081021.1, AB081022.1, AB081023.1, AB081024.1, AB081025.1, AB081026.1, AB081027.1, AB081028.1, AB081029.1, AB081030.1, AB081600.1, AB081601.1, AB081602.1, AB081603.1, AB081604.1, AB081605.1, AB081606.1, AB081607.1, AB081608.1, AB081609.1, AB081610.1,

AB081611.1, AB081612.1, AB081613.1, AB081614.1, AB081615.1, AB081616.1, AB081617.1, AB081618.1, AB081654.1, AB092578.1, AB092579.1, AB092580.1, AB092581.1, AB092582.1, AB092583.1, AB092584.1, AB092585.1, AB092586.1, AB092587.1, AB103387.1, AB103402.1, AB103403.1, AB103404.1, AB103405.1, AB103406.1, AB103407.1, AB103408.1, AB103409.1, AB103410.1, AB103411.1, AB103412.1, AB103413.1, AB103414.1, AB103415.1, AB103416.1, AB103417.1, AB103418.1, AB103419.1, AB103420.1, AB103421.1, AB103422.1, AB103423.1, AB104487.1, AB113118.1, AB113119.1, AB113120.1, AB113121.1, AB113122.1, AB113123.1, AB113124.1, AB113125.1, AB113126.1, AB113127.1, AB113128.1, AB113129.1, AB113130.1, AB113131.1, AB113132.1, AB113133.1, AB113134.1, AB113135.1, AB113136.1, AB113137.1, AB113138.1, AB113139.1, AB113140.1, AB113141.1, AB113142.1, AB113143.1, AB113144.1, AB113145.1, AB113216.1, AB113217.1, AB118231.1, AB118232.1, AB118233.1, AB118234.1, AB118235.1, AB118651.1, AB118652.1, AB118653.1, AB118654.1, AB118655.1, AB118656.1, AB118657.1, AB118658.1, AB118659.1, AB126981.1, AB126982.1, AB126983.1, AB126984.1, AB126985.1, AB126986.1, AB126987.1, AB126988.1, AB126989.1, AB126990.1, AB126991.1, AB126992.1, AB126993.1, AB126994.1, AB126995.1, AB126996.1, AB126997.1, AB126998.1, AB126999.1, AB127000.1, AB127001.1, AB127002.1, AB127003.1, AB127004.1, AB127005.1, AB127006.1, AB127007.1, AB127008.1, AB127009.1, AB127010.1, AB127011.1, AB127012.1, AB127013.1, AB127014.1, AB127015.1, AB127016.1, AB127017.1, AB127018.1, AB127019.1, AB127020.1, AB127021.1, AB127022.1, AB127023.1, AB127024.1, AB127025.1, AB127026.1, AB127027.1, AB127342.1, AB127343.2, AB127344.1, AB127345.2, AB127346.1, AB127347.1, AB127348.1, AB127349.1, AB127350.2, AB127351.2, AB127352.1, AB127353.1, AB183152.1, AB195639.1, AB195640.1, AB198940.1, AB198941.1, AB198942.1, AB198943.1, AB198944.1, AB198945.1, AB198946.1, AB198947.1, AB198948.1, AB198949.1, AB198950.1, AB198951.1, AB198952.1, AB198953.1, AB198954.1, AB220939.1, AB220940.1, AB220941.1, AB220942.1, AB220943.1, AB262396.1, AB262397.1, AB262398.1, AB262399.1, AB262400.1, AB262401.1, AB262402.1, AB262403.1, AB262404.1, AB262405.1, AB262406.1, AB262407.1, AB262408.1, AB262409.1, AB262410.1, AB262411.1, AB262412.1, AB262413.1, AB362351.1, AB362352.1, AB362353.1, AB362354.1, AB362355.1, AB362356.1, AB362357.1, AB362358.1, AB362359.1, AB362360.1, AB362361.1, AB362362.1, AB362363.1, AB362364.1, AB362365.1, AB362366.1, AB372036.1, AB372037.1, AB372038.1, AF030085.1, AF295731.1, AF295732.1, AF300945.1, AF300946.1, AF300947.1, AF300948.1, AF300949.1, AF300950.1, AF300951.1, AF300952.1, AF300953.1, AF300954.1, AF300955.1, AF300956.1, AF300957.1, AF300958.1, AF300959.1, AF300960.1, AF300961.1, AF300962.1, AF300963.1, AF300964.1, AF300965.1, AF300966.1, AF300967.1, AF363830.1, AF363831.1, AF363832.1, AF363833.1, AF363834.1, AY121907.1, AY121908.1, AY121909.1, AY121910.1, AY121911.1, AY121912.1, AY121913.1, AY121914.1, AY121915.1, AY328376.1, AY342299.1, AY349147.1, AY356539.1, AY364314.1, AY366359.1, AY373463.1, AY376828.1, AY376829.1, AY376830.1, AY376831.1, AY378084.1, AY378085.1, AY378086.1, AY378087.1, AY382184.1, AY382185.1, AY382186.1, AY382187.1, AY382188.1, AY386373.1, AY386374.1, AY386375.1, AY386376.1, AY386377.1, AY386378.1, AY536239.1,

AY536240.1,AY536241.1,AY536242.1,AY536243.1,DQ875211.1,DQ875212.1,EU835194.1,
JF424834.1,JF424835.1,JF424836.1,JF424837.1,JF424838.1,JF424839.1,JF424840.1,
JF424841.1,JF424842.1,JF424843.1,JF424844.1,JF424845.1,JF424846.1,JF424847.1,
JF424848.1,JF424849.1,JF424850.1,JF424851.1,JF424852.1,JF424853.1,JF424854.1,
JF424855.1,JF424856.1,JF424857.1,JF424858.1,JF424859.1,JF424860.1,JF424861.1,
JF424862.1,JF424863.1,JF424864.1,JF424865.1,JF424866.1,JF424867.1,JF424868.1,
JF424869.1,JF424870.1,JF424871.1,JF424872.1,JF424873.1,JF424874.1,JF424875.1,
JF424876.1,JF424877.1,JF424878.1,JF424879.1,JF424880.1,JF424881.1,JF424882.1,
JF424883.1,JF424884.1,JF424885.1,JF424886.1,JF424887.1,JF424888.1,JF424889.1,
JF424890.1,JF424891.1,JF424892.1,JF424893.1,JF424894.1,JF424895.1,JF424896.1,
JF424897.1,JF424898.1,JF424899.1,JF424900.1,JF424901.1,JF424902.1,JF424903.1,
JF424904.1,JF424905.1,JF424906.1,JF424907.1,JF424908.1,JF424909.1,JF424910.1,
JF424911.1,JF424912.1,JF424913.1,JF424914.1,JF424915.1,JF424916.1,JF424917.1,
JF424918.1,JF424919.1,JF424920.1,JF424921.1,JF424922.1,JF424923.1,JF424924.1,
JF424925.1,JF424926.1,JF424927.1,JF424928.1,JF424929.1,JF424930.1,JF424931.1,
JF424932.1,JF424933.1,JF424934.1,JF424935.1,JF424936.1,JF424937.1,JF424938.1,
JF424939.1,JF424940.1,JF424941.1,JF424942.1,JF424943.1,JF424944.1,JF424945.1,
JF424946.1,JF424947.1,JF424948.1,JF424949.1,JF424950.1,JF424951.1,JF424952.1,
JF424953.1,JF424954.1,JF424955.1,JF424956.1,JF424957.1,JF424958.1,JF424959.1,
JF424960.1,JF424961.1,JF424962.1,JF425488.1,JF425489.1,JF425490.1,JF425491.1,
JF425492.1,JF425493.1,JF425494.1,JF425495.1,JF425496.1,JF425497.1,JF425498.1,
JF425499.1,JF425500.1,JF425501.1,JF425502.1,JF425503.1,JF425504.1,JF425551.1,
JF425552.1,JF425553.1,JF425554.1,JF425555.1,JF425556.1,JQ237146.1,JQ823124.1,
JX273163.1,KJ659286.1,KJ659287.1,KJ659288.1,KJ659289.1,KM225765.1,LC164349.1,
LC164350.1,LC164351.1,LC164352.1,LC164353.1,LC164354.1,MF662180.1,MF662181.1,
MF662182.1,MF662183.1,MF662184.1,MF662185.1,MF662186.1,MF662187.1,MF662188.1,
MF662189.1,MF662190.1,MF662191.1,MF662192.1,MF662193.1,MF662194.1,MF662195.1,
MF662196.1,MF662197.1,MF662198.1,MF662199.1,MF662200.1,MF662201.1,MF662202.1,
MF662203.1,MF662204.1

[0176] KIPyV:EF520287.1,EF520288.1,EF520289.1,EU358766.1,EU358767.1,
KC571691.1,KM085447.1,KU746835.1

[0177] WUPyV:EF444549.1,EF444550.1,EF444551.1,EF444552.1,EF444553.1,
EF444554.1,EU296475.1,EU358768.1,EU358769.1,EU711054.1,EU711055.1,EU711056.1,
EU711057.1,EU711058.1,FJ794068.1,FJ890981.1,FJ890982.1,GQ926975.1,GQ926976.1,
GQ926977.1,GQ926978.1,GQ926979.1,GQ926980.1,GU296361.1,GU296362.1,GU296363.1,
GU296364.1,GU296365.1,GU296366.1,GU296367.1,GU296368.1,GU296369.1,GU296370.1,
GU296371.1,GU296372.1,GU296373.1,GU296374.1,GU296375.1,GU296376.1,GU296377.1,
GU296378.1,GU296379.1,GU296380.1,GU296381.1,GU296382.1,GU296383.1,GU296384.1,
GU296385.1,GU296386.1,GU296387.1,GU296388.1,GU296389.1,GU296390.1,GU296391.1,

GU296392.1, GU296393.1, GU296394.1, GU296395.1, GU296396.1, GU296397.1, GU296398.1, GU296399.1, GU296400.1, GU296401.1, GU296402.1, GU296403.1, GU296404.1, GU296405.1, GU296406.1, GU296407.1, GU296408.1, HQ218321.1, KC571693.1, KC571694.1, KC571695.1, KC571696.1, KC571697.1, KC571698.1, KC571699.1, KJ643309.1, KJ725028.1, KM265136.1, KU049032.1, KU672381.1, KX650181.1, KX650182.1, KX650184.1, KX650185.1, KX650186.1, KX650187.1, KX650188.1, KX650189.1, KX650190.1, KX650191.1, KX650192.1, KX650193.1

[0178] MCPyV: EU375803.1, EU375804.1, FJ173815.1, FJ464337.1, HM011538.1, HM011539.1, HM011540.1, HM011541.1, HM011542.1, HM011543.1, HM011544.1, HM011545.1, HM011546.1, HM011547.1, HM011548.1, HM011549.1, HM011550.1, HM011551.1, HM011552.1, HM011553.1, HM011554.1, HM011555.1, HM011556.1, HM011557.1, HM355825.1, JF812999.1, JF813000.1, JF813001.1, JF813002.1, JF813003.1, JN383838.1, JN383839.1, JN383840.1, JN383841.1, JQ479315.1, JQ479316.1, JQ479317.1, JQ479318.1, JQ479319.1, JQ479320.1, JX045708.1, JX045709.1, KC202810.1, KC571692.1, KF266963.1, KF266964.1, KF266965.1, KX781279.1, KX827417.1, NC_010277.2

[0179] HPyV6: HM011558.1, HM011559.1, HM011560.1, HM011561.1, HM011562.1, HM011563.1, KM387421.1, KM655817.1, KR090570.1, KU596573.1, KX379630.1, KX379631.1, KX771234.1

[0180] HPyV7: HM011564.1, HM011565.1, HM011566.1, HM011567.1, HM011568.1, HM011569.1, KJ733012.1, KJ733013.1, KX771235.1

[0181] TSPyV: AB873001.1, JQ723730.1, KF444091.1, KF444092.1, KF444093.1, KF444094.1, KF444095.1, KF444096.1, KF444097.1, KF444098.1, KF444099.1, KF444100.1, KF444101.1, KM007161.1, KM655816.1, KU221329.1, KX249740.1, KX249741.1, KX249742.1, KX249743.1

[0182] HPyV9: HQ696595.1, KC831440.1

[0183] MWPyV: JQ898291.1, JQ898292.1, KC549586.1, KC549587.1, KC549588.1, KC549589.1, KC549590.1, KC549591.1, KC549592.1, KC549593.1, KC549594.1, KC571700.1, KC571701.1, KC571702.1, KC571703.1, KC571704.1, KC571705.1, KC690147.1, KR338953.1

[0184] STLPyV: JX463183.1, JX463184.1, KF525270.1, KF530304.1, KF651951.1, KM893862.1, KR090571.1, NC_020106.1

[0185] HPyV12: JX308829.1, NC_020890.1

[0186] NJPyV: KF954417.1, NC_024118.1

[0187] 剪接位点保守性和系统发育树

[0188] 使用clustalW(“msa”软件包, R语言)对13种不同的多瘤病毒参考序列和所有独特的BK多瘤病毒分离株的TAg的全基因序列(包括内含子序列)进行比对。用UPGMA方法(“phangorn”和“ggtree”软件包, R语言)构建了系统进化树。为受体剪接位点和供体剪接位点构建了序列标识, 以显示亚型之间的核苷酸特异性保守性(“msa”软件包, R语言)。

[0189] AON设计

[0190] 反义寡核苷酸(AON)被设计成靶向TAg中的剪接位点。AON中的核糖核酸含有2'-OMe修饰。AON长度为20个核苷酸, 具有完整的硫代磷酸酯骨架(*)。在体外研究中, AON含有

5'-FAM标记。用RNA结构预测了AON的二级结构和结合能。所有AON序列描述如下：

[0191]

名称	序列	TA _g 中的靶标 剪接位点
无 序 的	G*C*A*C*C*U*C*U*G*C*G*U*C*C*U*A*G*A*A*T	不适用
1_1	A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C*A*G*G*U	供体(外显子 1)
1_2	A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C	供体(外显子 1)
1_3	C*A*G*C*A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A	供体(外显子 1)
2_1	U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U*A*G*A	受体(外显子 2)
2_2	U*G*U*U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U	受体(外显子 2)

[0192] *表示硫代磷酸酯键。

[0193] 细胞培养

[0194] 永生化的近端小管肾上皮细胞HK2 (ATCC® CRL-2190™) 从ATCC获得,并维持在37℃、5% CO₂、Dulbecco的改良的Eagle培养基-F12(1:1混合物,含15mM Hepes、2.5mM L-谷氨酰胺(Lonza),并补充有三碘甲状腺原氨酸、表皮生长因子(EGF)、胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺(ITS-X)、氢化可的松和100U/mL青霉素-链霉素)中。BK多瘤病毒(ATCC® VR-837™)从ATCC获得,并在完全HK2培养基中稀释以减少感染性载量。对于处理实验,细胞以32,000个细胞/cm²的密度接种在6孔或12孔平板(Corning)中,并生长过夜。AON处理是通过在50nM的AON浓度下,将细胞与Lipofectamine 3000(Thermo Fisher)孵育5小时来进行的,之后洗掉Lipofectamine。在洗涤细胞后24小时,通过以下方式进行BK多瘤病毒感染:将细胞与含BK多瘤病毒的培养基孵育2小时,之后洗去病毒。洗涤后并在感染后3、5和7天收集上清液,用PCR测定病毒颗粒的产生。感染前收集病毒载量样本,以确定感染性载量。在第7天收获RNA和蛋白质,以确定TA_g和VP1的表达。

[0195] 病毒载量测定

[0196] 为了测定培养上清液中的病毒载量,在每个时间点从每个孔中收集200μL。向每个样品中加入Pierce通用型核酸酶,以在室温下降解未包装的DNA 15分钟,然后用5mM EDTA灭活。使用DNA mini试剂盒(Qiagen)从上清液中分离病毒DNA,并使用如下所述的Taqman PCR测定病毒载量(Wunderink, H.F., et.al., J.Clin.Virol., 2017)。

[0197] 为了监测DNA提取的质量和潜在的PCR抑制,我们在裂解缓冲液中加入了低浓度的

海豹疱疹病毒。DNA被洗脱在终体积为100 μ L的洗脱缓冲液中,其中10 μ L用作实时定量PCR(qPCR)的input。使用引物440BKVs5'-GAAAAGGAGAGT-GTCCAGGG-3'和441BKVs5'-GAACTTCTACTCCTCCTTTTATTAGT-3'和Taqman探针576BKV-TQ-FAM FAM 5'-CCAAAAAGCCAAAGGAACCC-3'-BHQ1,扩增出BKPyV VP1基因内的90bp的片段。BKPyV qPCR和海豹疱疹病毒PCR是双重的,用于DNA质量和潜在的PCR抑制监测。此外,已验证BKPyV qPCR可检测BKPyV基因型I-IV。

[0198] 定量PCR反应按如下条件进行:总体积为50 μ L,包含25 μ L HotStarTaq Master Mix (QIAGEN,Hilden,德国)、0.5 μ mol/L的每种引物、0.35 μ mol/L BKPyV探针和3.5mmol/L MgCl₂。使用CFX96实时检测系统(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)进行反应,循环条件如下:95 $^{\circ}$ C下15分钟,然后45个扩增循环(95 $^{\circ}$ C下30秒;55 $^{\circ}$ C下30秒;72 $^{\circ}$ C下30秒)。使用标准定量的BKPyV阳性尿样进行定量。BKPyV qPCR的分析灵敏度为~10拷贝/mL。在每个平板上,包括3个阴性对照;这些对照在所有的PCR检测中都呈阴性。循环阈值 $\geq$ 40的PCR结果被视为阴性。

[0199] 抗体和蛋白质印迹

[0200] 蛋白质浓度用BCA法测定。样品在4-15% TGX凝胶上电泳,并转移到硝酸纤维素膜或PVDF膜上。使用的抗体是:兔多克隆抗肌动蛋白-HRP(上样对照)、兔多克隆抗SV40 VP1(ab53977,Abcam)、小鼠单克隆抗SV40 T-抗原[PAb416](ab16879,Abcam)和小鼠单克隆抗SV40 T-抗原(PAb108,Thermo Fisher)。TAg和VP1的一级抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,肌动蛋白的一级抗体在室温下孵育30分钟。用于TAg和VP1的二抗分别为山羊多克隆抗小鼠-HRP(P044701-2,Agilent)和山羊多克隆抗兔-HRP(P044801-2,Agilent)。将膜与SuperSignalTMWest Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Fisher)一起孵育,并用ChemiDoc MP Imaging System(Bio Rad)观察蛋白质带。

[0201] 实时qPCR

[0202] 用Trizol裂解BK感染的HK2细胞,并用RNeasy试剂盒(Qiagen)分离RNA。在分离过程中加入DNase I(Qiagen)处理去除多余的DNA,并用Promega逆转录酶、DTT、dNTP和随机引物合成cDNA。在CFX384 TouchTMReal-Time PCR Detection System(Bio Rad)上,使用SYBRTMSelect Master Mix(Thermo Fisher)和以下引物进行实时PCR:

[0203]	基因	正向引物	反向引物
	GAPDH	ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
	TAg	GAGGAGGATGTAAAGGTAGCTCA	ACTGGCAAACATATCTTCATGGC
	VP1	TGCAGGGTCACAAAAAGTGC	AGCACTCCCTGCATTTCCTCA

[0204] 结果

[0205] BK靶向性反义寡核苷酸的设计

[0206] 靶向BKPyV大T抗原(TAg)的高效反义寡核苷酸(AON)必须对BKPyV具有特异性,因为它们对宿主RNA物种没有特异性,同时也优选对其他不同的BKPyV分离株和不同的多瘤病毒尽可能通用。与dsRNA/ssRNA病毒相比,dsDNA病毒(在这种情况下为多瘤病毒)的特征在于较少的基因漂移(genetic drift)。尽管如此,仍有大量的BKPyV基因型和亚基因型产生了大量的BKPyV血清型(见图2中的系统进化树)。由于TAg包含两个外显子,我们首先鉴定了在外显子-内含子接合处的基因组序列,以试图鉴定AON候选(见图2)。为了实现这一点,我们从NCBI数据库中提取了可用的独特的BKPyV TAg基因组序列(n=245,在材料和方法部分

提供了收录号),并使用ClustalW对这些序列进行了比对。描述高度序列相似性(或保守性)的区域为靶标。这些研究揭示了外显子1和侧翼内含子序列的高度保守性(见图2)。外显子2也显示出高度的序列保守性。侧翼内含子序列富含T核苷酸,在距外显子边界4个核苷酸内保守性较低。AON靶向BKPyV Tag的外显子1和外显子1处的内含子序列的桥部分。对于外显子2,AON靶向外显子2的内含子区的4-6个核苷酸和外显子2侧翼序列。

[0207] 如图3所示,我们选择设计了靶向BKPyV Tag的5个AON,其中3个靶向外显子1-内含子部分(指定为AON#1、#2和#3),而2个AON靶向外显子2-内含子部分(称为AON#4和#5)。对于靶向外显子1的AON(AON 1-3),所述AON逐渐从主要外显子转变为包括重要的内含子结合序列。对于具体序列以及骨架和糖部分的修饰,见材料和方法部分和图3。

[0208] 该设计使我们能够特异性靶向BKPyV的TAg,同时对肾移植患者中不同的BKPyV基因型也是通用的。

[0209] AON介导的BKPyV TAg RNA的减少

[0210] 我们采用了基于Lipofectamine的AON递送,其在转染后5小时内显著提高了AON摄取。此外,我们根据FAM标记细胞强度滴定AON剂量,在大约50nM处达到最大值。AON施用后24小时(24h),用BKV病毒感染HK2细胞2小时,之后洗涤细胞并培养3、5和7天。在这些时间点上,从细胞中收获RNA并进行qRT-PCR以确定哪些AON可以影响TAg表达水平。未转染AON(未处理)的HK2细胞显示出与经无序AON(Scr)处理的细胞相似的TAg表达水平(数据未显示)。

[0211] 显然,设计的用于调节给定靶标RNA的表达水平或剪接的相当大比例的AON是有效的。我们使用AON#2、#3或#4的研究反复显示TAg RNA水平的显著降低,通常显示这种病毒DNA驱动子的RNA水平衰减了5-10倍(见图4,左图)。

[0212] 用AONs#2、#3、#4或#5处理的BKPyV感染的培养物反复显示出减少的TAg RNA表达水平。这使得这些AON所靶向的位点成为通过减少TAg产生来减少BK病毒产生的良好的靶位点。值得注意的是,这种减少是在高MOI设置(即在100的范围内)观察到的。

[0213] AON介导的VP1 RNA和蛋白质的减少

[0214] 在被多瘤病毒潜伏感染的细胞中(例如BKV感染的肾近端小管细胞),维持低水平的TAg RNA和蛋白质表达。在免疫系统受损的个体中(无论是天然的还是由免疫抑制方案诱导的)都可以观察到病毒的复制和TAg表达的诱导(Hasegawa,M.et.al.,Transplantation Proceedings,2014;Nickeleit,V.et.al.,JASN,2018)。TAg水平的增加,以及与BKV基因组非编码/启动子区的辅助转录因子的相互作用,驱动BK基因组复制和(晚期区域)主要衣壳蛋白的表达。总的来说,TAg介导的病毒DNA复制的激活和衣壳蛋白的包封导致传染性病毒颗粒的产生,这些颗粒可以在尿液(病毒尿症)和血清(病毒血症)中检测到(Helle,F.et.al.,Viruses,2017)。

[0215] 为了测试AON是否能有效减少BKV生成,我们测定了TAg激活蛋白(包括VP1)的表达谱。VP1是二十面体病毒衣壳的主要结构成分。这个外壳有72个五聚体,其通过VP2或VP3以5:1的化学计量连接。因此,我们对VP1进行了qRT-PCR,结果显示对于每拷贝的GAPDH,VP1的表达水平比TAg高得多(数据未显示)。这与TAg和其他转录因子一起诱导VP1 mRNA表达的事实相一致。此外,在所有研究中,我们的AON#2、#3、#4和#5降低了VP1 RNA表达水平,同时显著降低了VP1蛋白(见图5,右图)。

[0216] 我们还测试了AON#2和#4的组合疗法是否能更有效地降低TAg和VP1RNA水平。这种

组合的选择也是基于这样一个事实,即在AON处理的细胞中的VP1的上述蛋白质印迹(图5)表明这两个AON导致VP1蛋白损失最强。基于TAg和VP1 mRNA表达水平,这种组合处理没有产生表明它们一起更有效的证据(图4)。

[0217] 观察到的VP1的减少表明,TAg剪接靶向性AON是有效的。通过减少TAg RNA(和潜在的蛋白质表达),BKPyV晚期区域基因和相应蛋白质的表达水平降低。此外,VP1除了在包封病毒DNA中的作用之外,VP1还通过结合到邻近和/或远处细胞的细胞表面的聚糖上的唾液酸,在新形成的病毒颗粒的传染性中起着关键的介导作用(Helle,F.et.al.,Viruses,2017)。因此,BKPyV的传染性可能会因VP1蛋白的减少(或缺乏)而受到损害。

[0218] TAg剪接靶向性AON降低BK病毒滴度

[0219] 在我们对经TAg剪接靶向性AON预处理的HK2细胞中的TAg和VP1 RNA和蛋白质水平(第7天)筛选的同时,我们还评估了BKPyV感染后第3、5和7天培养上清液中的病毒载量。我们测定了VP1的减少是否影响包封的病毒DNA的产生,因为TAg表达的减少可能会影响病毒基因组复制和VP1蛋白的产生。我们通过定量包封的DNA来测定培养上清液中的病毒颗粒。为了区分包封的和未包封的DNA,我们应用了(内切)核酸酶处理来消化未包封的DNA。如图6所示,这些研究显示,AON#1在第3天降低了病毒DNA水平,但到了第7天,这一水平已经正常化,与无序AON处理的细胞中的病毒DNA水平相似(图6)。AONs#2、#3和#4的特征是在两个时间间隔内病毒滴度都降低,特别是AON#2、#3和#4将包封的病毒DNA削减了多达6倍(图6)。AON#2和#4的上述组合仅在第3天和第7天略微降低了病毒载量(图6)。

[0220] 因此,AON介导的TAg和VP1 RNA和蛋白质的衰减导致病毒产量的减少。

[0221] 核糖2'位的烷基修饰

[0222] 改变AON上核糖的2'-位会影响它们降低TAg和VP1 RNA和蛋白质水平的能力,以及BKV DNA的产生(图7)。上述数据基于反义寡核苷酸中每个核苷酸上核糖的2'-O甲基(2'-OMe)修饰。已经从用2'-OMe或2'-甲氧基(2'-MOE)核苷酸预处理的HK2细胞中收获了RNA和蛋白质(见图7)。

[0223] 针对其他多瘤病毒的TAg剪接靶向性AON

[0224] 除了BKV,我们还开发了类似地靶向JC病毒(JCV) TAg的AON。JCV与BKV有75%的序列相似性,这一保守水平在外显子1-内含子接合处也观察到了,而内含子-外显子2接合处的序列相似性几乎是100%(图8)。因此,针对BKV外显子2的AON也可以减少JCV载量。JCV还可以感染肾细胞(如近端小管细胞),其被认为是继最初通过扁桃体和/或消化道感染后的第二感染部位。因此,所述TAg剪接靶向性AON(特别是那些靶向内含子-外显子2剪接位点的AON)可以同时消除BKV和JCV的产生。此外,我们正在产生靶向独特的JCV外显子1-内含子序列的新的AON。

[0225] 鉴于针对所有已知多瘤病毒的TAg外显子1-内含子和内含子-外显子2接合处的基因组序列已经确定,设计影响所有这些多瘤病毒TAg剪接的AON是可能的(图9)。

[0226] 适用于其他多瘤病毒的AON的例子如图9所示。

[0227] 实施例2

[0228] 材料和方法

[0229] BKV亚型的系统发育保守性

[0230] BK多瘤病毒分离株的完整基因组序列从公开的NCBI数据库中下载(2018年9月7日

之前)。从这些记录来看,只有报告完整基因组的分离株被用于分析。分离株“MM”和“FNL-9”分别由于内含子中的大缺失或与受体剪接位点重叠的重复而被去除。去除相同的序列,产生248个独特的基因组序列,其收录号如下:AB211369,AB211370,AB211371,AB211372,AB211373,AB211374,AB211375,AB211376,AB211377,AB211378,AB211379,AB211381,AB211382,AB211383,AB211384,AB211385,AB211386,AB211387,AB211388,AB211389,AB211390,AB211391,AB213487,AB217917,AB217918,AB217919,AB217920,AB217921,AB260028,AB260029,AB260030,AB260031,AB260032,AB260033,AB263912,AB263913,AB263914,AB263915,AB263916,AB263917,AB263918,AB263919,AB263920,AB263921,AB263922,AB263923,AB263924,AB263925,AB263926,AB263927,AB263928,AB263929,AB263930,AB263931,AB263932,AB263934,AB263935,AB263936,AB263938,AB269825,AB269826,AB269827,AB269828,AB269829,AB269830,AB269831,AB269832,AB269834,AB269836,AB269837,AB269838,AB269840,AB269841,AB269842,AB269843,AB269844,AB269845,AB269846,AB269847,AB269848,AB269849,AB269850,AB269851,AB269852,AB269853,AB269854,AB269855,AB269856,AB269857,AB269858,AB269859,AB269860,AB269861,AB269862,AB269863,AB269864,AB269865,AB269866,AB269867,AB269868,AB269869,AB298941,AB298942,AB298945,AB298946,AB298947,AB301086,AB301087,AB301089,AB301090,AB301091,AB301092,AB301093,AB301094,AB301095,AB301096,AB301097,AB301099,AB301100,AB301101,AB365130,AB365132,AB365133,AB365134,AB365136,AB365137,AB365138,AB365139,AB365140,AB365141,AB365142,AB365144,AB365145,AB365146,AB365148,AB365149,AB365150,AB365151,AB365153,AB365154,AB365156,AB365157,AB365158,AB365159,AB365160,AB365162,AB365164,AB365165,AB365166,AB365167,AB365168,AB365170,AB365173,AB365174,AB365175,AB365176,AB365178,AB369087,AB369088,AB369089,AB369090,AB369092,AB369093,AB369094,AB369095,AB369096,AB369097,AB369098,AB369099,AB369101,AB464953,AB464954,AB464956,AB464957,AB464958,AB464960,AB464961,AB464962,AB485695,AB485696,AB485697,AB485698,AB485699,AB485700,AB485701,AB485703,AB485704,AB485707,AB485709,AB485710,AB485711,AB485712,AY628224,AY628225,AY628226,AY628227,AY628228,AY628229,AY628230,AY628231,AY628232,AY628233,AY628234,AY628235,AY628236,AY628237,AY628238,DQ305492,EF376992,FR720308,FR720309,FR720310,FR720311,FR720312,FR720313,FR720315,FR720317,FR720318,FR720320,FR720321,JF894228,JN192431,JN192432,JN192433,JN192435,JN192437,JN192438,JN192439,JN192440,JQ713822,KF055891,KF055892,KF055893,KP412983,KP984526,KY114802,KY114803,KY132094,KY487998,LC029413,LC309239,LC309240,LT960370,M23122,MF358970,MF627830,MF627831,V01108。

[0231] 剪接位点保守性和系统发育树

[0232] TAg的全基因序列,包括内含子序列,用Prank(v.140603)进行比对。对比对序列进行手动调整,以在比对缺失时调整缺陷。使用Neighbor-Joining法(MEGA version 10.0.5)和bootstrapping法(1000个重复)以及Kimura 2-parameter模型构建系统进化树。所述系统发育树在R(“ggtree”)中进一步可视化,并为受体剪接位点和供体剪接位点构建了序列

标识(“ggseqlogo”),以显示亚型之间的核苷酸特异性保守性。使用Zhong等(Zhong, J Gen Virol, 2009)描述的参考序列确定序列的亚型。

[0233] 寡核苷酸设计

[0234] 如实施例1所述,设计反义寡核苷酸。对于体内研究,使用没有5'-FAM标签的2'-MOE AON(HYB_01)。

[0235] 动物

[0236] 给6至10周龄的雄性C57BL6/J小鼠静脉注射40mg/kg 2'-MOE AON(不含5'-FAM标签)或生理盐水(经体重校正,体积 $\pm$ 100 μ L)。施用AON或生理盐水后24小时,在异氟醚麻醉下使用静脉放血法处死动物。取出器官,用福尔马林和石蜡包埋固定。

[0237] 细胞培养

[0238] 人肾近端小管上皮细胞(HK2, ATCC®)维持在Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12(Gibco)中,其补充有3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(Sigma-Aldrich)、胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺(ITS-X;Sigma-Aldrich)、人表皮生长因子(EGF;Sigma-Aldrich)、氢化可的松(Sigma-Aldrich)和100U/mL青霉素-链霉素(Gibco)。将人肾近端肾小管上皮细胞(PTEC, Sciencell Research Laboratories)维持在完全REGM™肾上皮细胞生长培养基(Lonza)中。原代人星形胶质细胞(Sciencell Research Laboratories)维持在完全星形胶质细胞培养基(Sciencell Research Laboratories)中。IPSc衍生的星形胶质细胞和少突胶质细胞维持在完全BrainPhys™神经元培养基(Stemcell Technologies)中。所有细胞均在37℃, 5%CO₂下培养。

[0239] 细胞的AON处理和病毒感染

[0240] 将细胞以所需的细胞密度接种并培养过夜。AON的细胞摄取是通过在50nM AON存在下用Lipofectamine 2000培养细胞4h(人星形胶质细胞和iPSc星形胶质细胞/少突胶质细胞, Invitrogen)或Lipofectamine 3000培养细胞5h(HK2和PTEC, Invitrogen)实现的,之后细胞在正常培养基中洗涤。如实施例1所述,进行HK2上皮细胞或人肾上皮细胞的BKV感染。星形胶质细胞/少突胶质细胞的JCV感染是通过在JC多瘤病毒(MAD-4株, ATCC® VR-1583™)存在下过夜培养细胞来实现的。感染后对细胞进行彻底清洗,以去除多余的病毒颗粒。培养基被部分更新,并在感染后的特定时间点采集上清液样品以研究病毒颗粒的产生。通过处理后取含有感染细胞的孔的上清液进行细胞的再感染。然后将该上清液稀释2倍,并转移到含有未感染、未处理的细胞的新孔中维持2小时,之后对细胞进行彻底洗涤。所述感染的细胞在7天后用4%PFA洗涤。

[0241] 病毒载量测定

[0242] 培养上清液中的病毒载量测定如实施例1所述进行,但有以下例外。1)在每个时间点从每个孔收集100 μ L样品。2)在分离前,使用TURBO DNA-free试剂盒(Invitrogen)降解未包装的DNA。

[0243] 实时qPCR

[0244] 如实施例1所述,进行RNA的分离、cDNA的合成和实时qPCR。然而,在分离RNA后,使用TURBO DNA-free试剂盒(Invitrogen)降解残留的DNA。为了扩增T-抗原剪接变体,利用Phusion® High-Fidelity PCR试剂盒,使用HF缓冲液和下列引物:正向ATGGAGCTCATGGACCTTTTAGG、反向TGCAACTCTTGACTATGGGGG。JC病毒RNA的QPCR检测使用以下

引物进行:

[0245]	基因	正向引物	反向引物
	GADPH	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
	TA _g	CACCCTGATAAAGGTGGGGAC	GCAAAACAGGTCTTCATCCCAC
	VP1	CCAAAGAATGCCACAGTGCAA	GTGGGATCAGGAACCCAACAT

[0246] 抗体

[0247] 使用了下列一抗:兔抗SV40 VP1(ab53977)、小鼠抗SV40 T-抗原(PAb416)、小鼠抗SV40 T-抗原(PAb108)、兔抗GAPDH(D16H11)、生物素化翅荚百脉根凝集素(LTL,B-1325)。所述兔抗硫代磷酸酯抗体由Jonathan Watts(UMASS Medical School,MA,USA)友情提供。使用了下列二抗:山羊抗兔Alexa 488(A11008)、山羊抗兔Alexa 568(A11011)、山羊抗兔HRP(P044801-2)和链霉亲和素Alexa532(S11224)。

[0248] 蛋白质定量通过在含有50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1%SDS、0.5%脱氧胆酸盐、0.5%triton X-100和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(pH 7.5)中裂解细胞,来产生蛋白质裂解物。样品蛋白质浓度使用Pierce™BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)测定。使用带有12-230kDa分离基质和抗兔检测模块(ProteinSimple)的Wes Simple Western自动化免疫测定系统,进行蛋白表达的定量。

[0249] 免疫组织化学对于再感染实验,将细胞用4%PFA固定,并在室温下在含0.3% Triton-X/3%BSA(Merck,Zwijndrecht,the Netherlands)/1%NGS(Dako,Amstelveen,Netherlands)/1%FCS的PBS中透化1小时。一抗在4℃在含3%BSA/1%NGS/1%FCS的PBS中孵育过夜,之后细胞被充分洗涤并与二抗在室温下孵育1小时。使用ImageXpress Micro High-Content成像系统和MetaXpress软件对再感染细胞进行图像采集和定量,使用定制模块识别和计数(TAg+)细胞核。使用ImageJ进行体内图像的进一步处理(颜色去卷积和阈值处理)。

[0250] 将小鼠器官包埋在石蜡中,切片并脱蜡,复水,并在室温下在含3%H₂O₂的甲醇溶液中将内源性过氧化物酶淬灭10分钟。在室温下,使用蛋白酶K(Agilent,Amstelveen,荷兰)进行抗原提取10分钟,然后使用Background buster(Innovex,Gujarat,印度)进行封闭步骤。在步骤之间,将载玻片在TBS/吐温中洗涤。在4℃下在含2%BSA/5%NGS的TBS/Tween中进行一抗孵育(抗硫代磷酸酯或LTL)。在室温下孵育二抗90分钟。使用Hoechst 33258(Molecular Probes,Leiden,荷兰)对细胞核染色,并使用Prolong Gold(Invitrogen)固定玻片。使用Pannoramic MIDI II(3DHISTECH,Budapest,匈牙利)进行图像采集。

[0251] 下一代测序

[0252] 使用Illumina测序技术对来自感染的、经AON处理的HK2细胞的RNA样品进行RNA测序。简而言之,使用Fragment Analyzer确定样品质量,并使用用于Illumina的NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep试剂盒处理样品。根据方案“NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina”(NEB#E7760S/L)进行样品制备。简而言之,使用rRNA消耗试剂盒(NEB#E6310)从总RNA中消耗rRNA。在将rRNA减少的RNA片段化后,进行cDNA合成。这用于与测序接头的连接和所得产物的PCR扩增。用Fragment Analyzer测量样品制备后的质量和产量。所得产物的大小与预期的大小分布一致(300-500bp之间的宽峰)。根据制造商的方案,使用NovaSeq6000进行聚类分析和DNA测序。使用浓度为1.1nM的

DNA。使用了NovaSeq控制软件NCS v1.5。使用Illumina data analysis pipeline RTA3.3.5和Bcl2fastq v2.20执行图像分析、碱基检出和质量检查。

[0253] 将人类参考序列Homo_sapiens.GRCh38.dna.primary_assembly与病毒参考序列LC029411.1相结合。所结合的基因组用于每个样品的读段比对。使用基于默认设置的Burrows—Wheeler Transform(Tophat v2.0.14)的短读段比对仪将读段映射到参考序列。基于比对文件中的映射位置,使用HTSeq v0.6.1p1确定读段在转录本上的映射频率。

[0254] 使用Eventpointer识别剪接事件

[0255] 为了识别NGS数据中的选择性剪接事件,将“Eventpointer”应用于映射到病毒参考基因组的读段。使用Kallisto对产生的剪接事件进行量化,以生成每个事件的剪接百分比(PSI)值。为了统计检验,无序AON被用作对照条件。

[0256] Pacific Biosciences长读段测序

[0257] 首先在生物分析仪上评估RNA完整性。用SMARTer cDNA合成试剂盒(Takara)进行cDNA合成,用Kapa HiFi HotStart Ready Mix(Roche)扩增特异性大T产物。对cDNA产物进行大小选择,然后使用SMRTbell Barcoded Adapter Complete Prep试剂盒(PacBio)对每个样品的扩增子进行条形码标记,然后等摩尔合并,并在PacBio Sequel 1M v3 LR SMRT cell上进行测序。

[0258] 转录本的鉴定、修改和注释是使用Pacific Biosciences公开的Iso-Seq3bioinformatics pipeline(<https://github.com/PacificBiosciences/IsoSeq3>)进行的。根据样本特异性条形码的存在,读段首先被分为全长和非全长。为了找到转录本簇,异构级聚类算法(isoform-level clustering algorithm,ICE)根据似然性对簇进行全长读段的双序列比对和重复匹配。在ICE之后,将部分读段添加到异构体簇中,以增加使用Arrow算法的最终一致性的覆盖范围。从bioinformatics pipeline的输出是一组全长转录本序列,其可以映射到参考序列以构建GFF格式的注释文件。

[0259] 基于Arrow算法的预测一致性的准确性,预测准确性>99%(由于准确性的准确估计偶尔覆盖不足,排除前100bp和后30bp的QV)的转录本序列被视为HQ转录本并用于进一步分析。所述HQ转录本序列被映射回参考序列,并过滤出>99%的比对覆盖率和>85%的比对同一性。折叠多余的转录本以创建用于本研究的最终数据集。

[0260] 结果

[0261] 新型BKV靶向性AON的开发

[0262] 如图10和11所示,除了我们以前的AON外,我们还选择设计了靶向BKV TAg的9个新AON,其中6个靶向外显子1-内含子部分(称为HYB_06、_07、_08、_09、_10和_11),而2个新的AON靶向外显子2-内含子部分(称为HYB_12和_13)。除了这9个新的靶向TAg外显子-内含子接合处的AON外,我们还测试了先前由Santaris Pharma(WO2012/143427A1)描述的2个AON,它们相对于我们的AON具有不同的组成,但其与外显子1-内含子接合处的一部分(SAN_74)互补或仅与外显子2的一部分(SAN_73)互补。此外,我们还设计并测试了一个AON,它只与外显子1的编码区结合,即HYB_14。AON从主要外显子逐渐转变为包括显著内含子结合序列的外显子1靶向性AON(现在统称为(HYB_01、_02、_03、_06、_07、_08、_09、_10、_11))和外显子2靶向性AON(HYB_04、_05、_12和_13)。

[0263] AON介导的BKV TAg RNA的减少

[0264] 所述BKV靶向性AON在降低TAg mRNA水平方面表现出不同程度的效力。如图12和19所示,在设计用于靶向TAg的外显子-内含子接合处的14个AON中,HYB_01、HYB_03和HYB_11诱导了TAg mRNA表达的最大减少,通常在感染后7天该病毒DNA驱动子的RNA水平以8倍或更大的倍数衰减。

[0265] 此外,我们的数据还表明,靶向外显子1-内含子接合处的AON比靶向外显子2-内含子接合处的AON (HYB_04、HYB_05、HYB_12和HYB_13) 在降低TAg mRNA水平方面更有效。这种趋势在图18和图25中以生物信息学方式进行了描述,其中只有HYB_05与靶向外显子1-内含子接合处的AON聚类在一起。类似地,SAN_73和SAN_74被证明在降低TAg mRNA表达水平方面基本无效。值得注意的是,这些TAg mRNA的减少是在设定高的MOI (即在100范围内) 时观察到的。

[0266] 除了HK2细胞,我们还在原代近端小管上皮细胞中测试了我们的BKV靶向性AON。基于在使用HYB_01、HYB_03和HYB_11的HK2细胞中观察到的TAg mRNA表达水平的显著且一致的降低,我们选择在这一阶段使用这三个进行操作,将这三个称为我们的“先导化合物”。如图28所示,HYB_01、HYB_03和HYB_11都显著降低了hPTEC中TAg mRNA的表达 ($n=3$ 个生物学重复),而HYB_14被证明在降低hPTEC中TAg mRNA水平方面无效。

[0267] 有趣的是,我们的大多数研究都涉及在感染BKV之前进行AON预处理。我们首先用BKV感染HK2细胞,然后用AON (即HYB_01) 处理细胞的初步研究表明,我们的BKV靶向性AON可以在感染后7天有效地抑制含有BKV的细胞中的BKV TAg表达 (图26,左图),并且感染后给予多剂量可能进一步抑制TAg mRNA的表达水平 (图26,右图)。

[0268] AON介导的VP1 RNA和蛋白质的减少

[0269] 有趣的是,除了HYB_04、HYB_12、HYB_13和HYB_14之外,VP1 mRNA的表达水平被大多数BKV靶向性AON降低了 (图13和20)。与我们对于TAg mRNA获得的结果相似,HYB_01、HYB_03和HYB_11特别导致了VP1 RNA在HK2细胞中表达的显著降低 (图13)。此外,无论AON是在BK病毒感染HK2细胞前还是感染后被施用,HYB_01都有效地降低了VP1 mRNA的水平 (图26,左图和右图)。重要的是,观察到的VP1 mRNA的减少导致HK2细胞中VP1蛋白水平的显著降低 (图14-15和21-22)。与我们对TAg mRNA水平的观察一致,SAN_73和SAN_74对VP1 mRNA和蛋白质的表达水平没有显著影响。

[0270] 如图29-31所示,HYB_01、HYB_03和HYB_11都显著降低了VP1 mRNA和蛋白在hPTEC中的表达 ($n=3$ 个生物学重复)。此外,HYB_14不影响VP1 mRNA和蛋白质水平。此外,我们还获得了初步的证据,表明我们的AON还能有效降低VP3蛋白水平 (图30和32)。

[0271] 人近端小管上皮细胞的感染和再感染

[0272] 我们接下来评估了我们多样的BKV靶向性AON是否会影响BKV在HK2细胞中的感染和再感染程度。为了实现这一点,我们首先用BKV靶向性AON处理HK2细胞,并用BKV病毒感染细胞。7天之后,我们收集了含有病毒颗粒的上清液,并将其用于感染新批次的未经处理的HK2细胞。7天后,我们对TAg感染的细胞进行免疫荧光染色,并以阳性百分比进行评分 (用Hoechst对细胞核进行复染)。如图17和24所示,这些研究表明,预先用我们的BKV靶向性AON处理的细胞显示出明显较低的再感染水平。相比之下,用SAN_73和SAN_74对HK2细胞进行的预处理没有将再感染水平降低到用HYB_01、HYB_03和HYB_11时所观察到的程度。

[0273] BKV靶向性AON影响病毒颗粒的产生

[0274] VP1蛋白是包装BK病毒DNA所需的蛋白质,观察到的VP1蛋白的减少应该会严重影响新病毒颗粒的形成和其向上清液中的释放。事实上,如图16、23和33所示,我们绝大多数的BKV靶向性AON在感染后7天减少了病毒颗粒的产生,其中HYB_01、HYB_03和HYB_11减少最多。相比之下,发现SAN_73和SAN_74仅略微降低了病毒颗粒的产生。这种机制可能是造成体外局部和远端细胞感染(再感染)减少的原因,并强烈表明肾移植后肾脏近端小管上皮细胞对我们的BKV靶向性AON的摄取将是防止BKV活化和/或扩散的有效治疗方式。

[0275] BKV靶向性AON调节TAg的剪接

[0276] 为了从机理上了解我们的BKV靶向性AON是如何导致本文所述的TAg和VP1 mRNA的减少的,我们对从用无序AON、HYB_01、HYB_03、HYB_11、HYB_14、SAN_73或SAN_74处理的HK2细胞(之后用BKV感染所述细胞2小时)中收获的RNA进行RNA-seq。洗涤后,所述细胞被培养7天,之后收获RNA,在生物分析仪上评估降解迹象。随后,等量的RNA被去核糖,进行文库制备,之后进行RNA-seq。与我们前面提到的HK2细胞中TAg和VP1 mRNA的减少一致,来自无序对照、HYB_14或SAN_73和SAN_74处理的细胞的BKV基因组的覆盖率明显高于用BKV靶向性AON处理的那些(图42)。为了分析BKV剪接的变化,人类基因组和BKV基因组都被提供用于序列比对,使用Bowtie比对配对末端的读段。

[0277] 为了量化样品中的选择性剪接,应用了EventPointer。使用了带有不同病毒转录本的特定GTF文件。该算法试图识别可能的选择性剪接事件,并将每个转录本与可能的选择性路径相关联。为了评估高度复杂的前体mRNA(如TAg)的剪接,所述前体mRNA被分割成独特的剪接事件,导致所述TAg前体mRNA最初被分成7个片段。在每个连接处(由检测到剪接事件的频率定义),确定剪接百分比(PSI)。这导致了四种独特的选择性剪接事件,这些事件在所有条件下都以EventPointer测定的高频率发生。使用Kallisto软件对这些事件的频率进行评分,得出每个转录本的量化值(单位为百万分之一转录本数)。经过统计学显著性检验后,在TAg的外显子1-内含子接合处观察到显著的剪接变化,这正是我们的AON结合并预测影响剪接的位点(图35)。在这里,上图提供了TAg前体mRNA中相关剪接事件的示意图,这些剪接事件随后可以被切割成独特的剪接事件,如下图所示。对于剪接事件1,HYB_01在截短的T抗原的剪接模式中产生高度显著的调节($P=0.0108$),因为相对于用无序对照AON处理的HK2细胞,优先使用选择性剪接受体位点(Z 值 $=2.5484$)。类似地,对于剪接事件2,检测到高度显著的剪接变化($p=0.0149$),其中HYB_01导致优先产生小t抗原(tAg),而不是TAg(Z 值 -2.4342)。相比之下,在用HYB_14、SAN_73或SAN_74处理的细胞中没有检测到明显的剪接变化。SAN_74的剪接调节的缺失是特别惊人的,考虑到这种AON也桥接外显子1-内含子连接。这有力地表明,我们的AON的大小(20nt而不是16nt的长度)在决定它们影响TAg剪接的能力中起作用,这可能是空间位阻的原因。

[0278] 此外,图35中描述的数据还表明,在外显子1-内含子接合处的剪接的调节(剪接事件2)影响外显子2内发生的剪接决定(剪接事件1)。因此,我们的BKV靶向性AON似乎在TAg pre-mRNA的下游触发了一个互斥或复杂的剪接事件。这些研究基于生物学重复 $n=3$ 。

[0279] 通过使用高保真Phusion聚合酶进行长范围PCR,获得了支持我们的BKV靶向性AON介导TAg剪接变化的证据。如图43所示,与无序对照处理的细胞相比,使用HYB_01和HYB_11处理,观察到截短的T抗原受体位点使用情况发生了显著变化(图35中的剪接事件1),而使用HYB_03的变化则更为明显。这些数据证实了靶向外显子1-内含子接合处的AON深刻地影

响外显子2内的剪接决定。

[0280] 为了进一步了解我们的AON对BKV TAg的剪接介导效应,我们还采用PacBio测序来产生TAg的长序列读段,其中与TAg的5'-和3'-末端结合的引物用于扩增全长TAg前体mRNA。这些研究将对TAg内单个剪接位点的准确使用以及我们的RNA-seq数据中显示的潜在互斥事件或复杂事件产生精确的了解。在生物分析仪上评估RNA降解,并通过PCR富集靶标后,按大小选择PCR产物。制备cDNA文库,修复末端,连接接头,纯化DNA并测序SMRTbell DNA。随后,将子读段转换为环状共有读段(插入序列读段)。如图36所示,与我们的RNA-seq数据一致,这些研究表明,靶向TAg外显子1-内含子受体的AON影响该剪接位点的使用或接近。我们的BKV靶向性AON(特别是HYB_01)降低了产生的TAg水平(左图;左边的条形),导致向小T抗原和未剪接的大T抗原水平增加的转变(左图;分别为中间和右边的条形)。此外,这些数据为AON介导的截短T抗原剪接的调节提供了进一步的支持(右图)。

[0281] 值得注意的是,我们的BKV靶向性AON在调节外显子1-内含子接合处的TAg剪接方面显示出的功效可能导致使用(选择性)隐性剪接供体位点。上游(外显子1的编码序列部分)或下游隐性剪接位点(外显子2之前的内含子部分)的潜在使用可能导致阅读框移码的mRNA,这通常会导致提前的终止密码子的引入。众所周知,这些异常转录本会通过无义介导的衰变在细胞内迅速降解(Hug,N.,et al.,Nucleic Acids Research,2016)。重要的是,这种快速处理可能会使我们无法检测出这些畸形转录本的大多数。

[0282] 然而,我们对剩余TAg转录本的定量和定性分析清楚地表明,我们的BKV靶向性AON引起TAg mRNA水平的显著降低,同时影响由前体mRNA剪接形成的mRNA的平衡。这些数据表明,TAg表达和剪接的双重调节是减弱BKV颗粒产生和传染性的有效手段。

[0283] BKV靶向性AON的体内摄取

[0284] 我们的体外数据是针对已经过化学修饰以在反义寡核苷酸的每个核苷酸上含有核糖的2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的BKV靶向性AON的。重要的是,如果2'羟基被2'-甲氧基(2'-MOE)基团取代,则发现体内AON的摄取有显著改善。因此,我们修饰了HYB_01,我们的前导化合物,以使其同时拥有完整的硫代磷酸酯骨架和2'-MOE基团,并通过尾静脉将这种AON注射到C57BL/6J小鼠体内。注射后24小时,处死小鼠,收获肾、肝、脾、脑和肌肉并切片。如图44和图45中的免疫组织化学染色所示,HYB_01在肾皮质,特别是在肾的近端小管上皮细胞中,表现出极好的摄取(肾脏的翅荚百脉根凝集素(LTL)阳性细胞中的摄取证明了这一点)。此外,HYB_01在肝脏的Kupffer细胞中也可检测到,而在脑中则不可检测到(参见图45)。此外,在脾脏的白髓中可检测到AON,在心脏中可检测到最低限度的AON,在肌肉中检测不到AON(数据未显示)。

[0285] 针对其他多瘤病毒的TAg剪接靶向性AON

[0286] 尽管JC病毒(JCV)已被证实能感染人类肾脏的近端小管上皮细胞,但我们多次尝试都没有成功。因此,我们选择感染其他已知对JC病毒敏感并在JCV相关病理生理学发展中起作用的人类细胞,即星形胶质细胞。在这些研究中,我们用我们的5种JCV靶向性AON(图37)之一,即HYB_15-19(浓度为每种AON50nM,持续4小时)预处理人诱导多能干细胞衍生的星形胶质细胞或人原代星形胶质细胞系,随后用JCV过夜感染细胞,滴度为 $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.2mL(供应商根据感染后7天Cos-7细胞的感染情况提供的信息)。如图38和39所示,与我们观察到的结果一致,即,靶向BKV TAg的外显子1-内含子接合处降低了TAg和VP1 mRNA的表

达水平, HYB_15、HYB_16和HYB_17导致iPS细胞来源的星形胶质细胞中JCV TAg和VP1 mRNA的表达水平显著降低(n=1)。此外,在原代人星形胶质细胞中,我们还观察到在不同滴度的JCV施用下,JCV TAg和VP1 mRNA表达水平显著降低(图40和41;n=2)。

[0287] 表

人类多瘤病毒	属	病毒名称	NCBI参考序列	临床关联(如果有)
1	Beta	BK多瘤病毒	NC_001538	Py-assoc.肾病; 出血性膀胱炎
2	Beta	JC多瘤病毒	NC_001699	进行性多灶性白质脑病
3	Beta	KI多瘤病毒	NC_009238	-
4	Beta	WU多瘤病毒	NC_009539	-
5	Alpha	Merkel细胞多瘤病毒	NC_010277	Merkel细胞癌
[0288] 6	Delta	人类多瘤病毒6	NC_014406	HPyV6相关瘙痒和角化不良皮肤病
7	Delta	人类多瘤病毒7	NC_014407	HPyV7相关上皮增生
8	Alpha	棘状增生症多瘤病毒	NC_014361	棘状增生
9	Alpha	人类多瘤病毒9	NC_015150	
10	Delta	MW多瘤病毒	NC_018102	
11;	Delta	STL多瘤病毒	NC_020106	
12;	Alpha	人类多瘤病毒	NC_0208	

			毒12	90
[0289]	13;	Alpha	New Jersey	NC_0241
			多瘤病毒	18

[0290] *来自维基百科。

序列表

	<110> 莱顿大学医学中心附属莱顿教学医院	
	<120> 多瘤病毒复制的抑制	
	<130> P112760PC00	
	<140> PCT/NL2019/050131	
	<141> 2019-03-01	
	<150> EP 18159797.2	
	<151> 2018-03-02	
	<160> 80	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0001]	<400> 1 accucugagc uacuccaggu	20
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 2 acaaaccucu gagcuacucc	20
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 3 cagcaciaaac cucugagcua	20
	<210> 4	
	<211> 20	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 4	
	uccauagguu ggcaccuaga	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 5	
	uguuccauag guuggcaccu	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 6	
	accucugaac uauuccaugu	20
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 7	
	accaaccucu gaacuaaucc	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 8	
	cacaaccaac cucugaacua	20

	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 9	
	uccauagguu ggcaccuaaa	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 10	
	uguuccauag guuggcaccu	20
[0003]	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 11	
	guauaccuga gaagauugcc	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 12	
	ucuuugcagu auaccugaga	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 13 uguaccguau guagguaucu	20
	<210> 14 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 14 ccguauguag guaucuauac	20
	<210> 15 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
[0004]	<400> 15 ucuaccugug aagagcucca	20
	<210> 16 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 16 ugugcauucu accugugaag	20
	<210> 17 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 17 ccucaucaa cauagagaag	20
	<210> 18 <211> 20	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 18	
	ggaaauuuug uacugaccuc	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 对照序列	
	<400> 19	
	agguccacac ucaauccuca	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 20	
	aaaccucuga gcuacuccag	20
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 21	
	gcacaaaccu cugagcuacu	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 22	
	aucagcacia accucugagc	20

	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 23	
	aaaucagcac aaaccucuga	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 24	
	gaaaaucagc acaaaccucu	20
[0006]	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 25	
	aggaaaauca gcacaaaccu	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 26	
	cauagguugg caccuauaaa	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 27 uuccauaggu uggcaccuau	20
	<210> 28 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 28 ugagcuccau ggauucuucc	20
	<210> 29 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
[0007]	<400> 29 cactcttctg ttcca	15
	<210> 30 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 30 cacaaacctc tgagct	16
	<210> 31 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 31 cacaaacctc tgagcta	17
	<210> 32 <211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 32	
	aaccucugaa cuauuccaug u	21
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 33	
	accucugaac uauuccaugu a	21
	<210> 34	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 34	
	ttcatctgtt ccataggttg gcaccta	27
	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 35	
	ttccataggt tggcacctaa aaaaaaa	27
	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 具有硫代磷酸酯骨架的合成的反义核苷酸	
	<400> 36	
	gcaccucugc guccuagaat	20

	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 37	
	gaaaaggaga gtgtccaggg	20
	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 38	
	gaacttctac tcctcctttt attagt	26
[0009]	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 39	
	ccaaaaagcc aaaggaaccc	20
	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 40	
	acaactttgg tatcgtggaa gg	22
	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 引物	
	<400> 41 gccatcacgc cacagtttc	19
	<210> 42 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 42 gaggaggatg taaaggtagc tca	23
	<210> 43 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
[0010]	<400> 43 actggcaaac atatcttcat ggc	23
	<210> 44 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 44 tgcagggtca caaaaagtgc	20
	<210> 45 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 45 agcactccct gcatttccaa	20
	<210> 46 <211> 23	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 46	
	atggagctca tggacctttt agg	23
	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 47	
	tgcaactctt gactatgggg g	21
	<210> 48	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
	<223> TAg FW 引物	
	<400> 48	
	caccctgata aaggtgggga c	21
	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> TAg RV 引物	
	<400> 49	
	gcaaaacagg tcttcatccc ac	22
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> VP1 FW 引物	
	<400> 50	
	ccaaagaatg ccacagtgca a	21

	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> VP1 RV 引物	
	<400> 51	
	gtgggatcag gaacccaaca t	21
	<210> 52	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 52	
	gaacctggag ccagaggttg tgctgatttt cctct	35
[0012]	<210> 53	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 53	
	taattatttt tttttmtag gtgccaacct atggaacaga	40
	<210> 54	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 54	
	gaacctggag tagctcagag gtttgtgctg attttcctct	40
	<210> 55	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 55 gtacatggaa tagttcagag gttggttgatg attttcctcc	40
	<210> 56 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列内含子 2	
	<400> 56 ctyaatttyt tktttttagg tgccaacctg tggaacaga	39
	<210> 57 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 1	
[0013]	<400> 57 atatatggca atcttctcag gtatactgca aagatttgatg	40
	<210> 58 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 58 tgtatatttt tgttgatag atacctacat acggtacacc	40
	<210> 59 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 59 aagtgtggag ctcttcacag gtagaatgca cagaattgtg	40
	<210> 60 <211> 40	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 60	
	ataacttttt tttattatag ataccacat atggtacccc	40
	<210> 61	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 61	
	acttctctat gtttgatgag gtcagtacaa aatttccttg	40
	<210> 62	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0014]	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 62	
	ttctgtactt tcccatctag gttgacgagg cccctatata	40
	<210> 63	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 63	
	cctggtgctt ttctctgag gtcagtgatg attggggtat	40
	<210> 64	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 64	
	acttataatt tatTTTtacag gtaaggccac ctccacaata	40

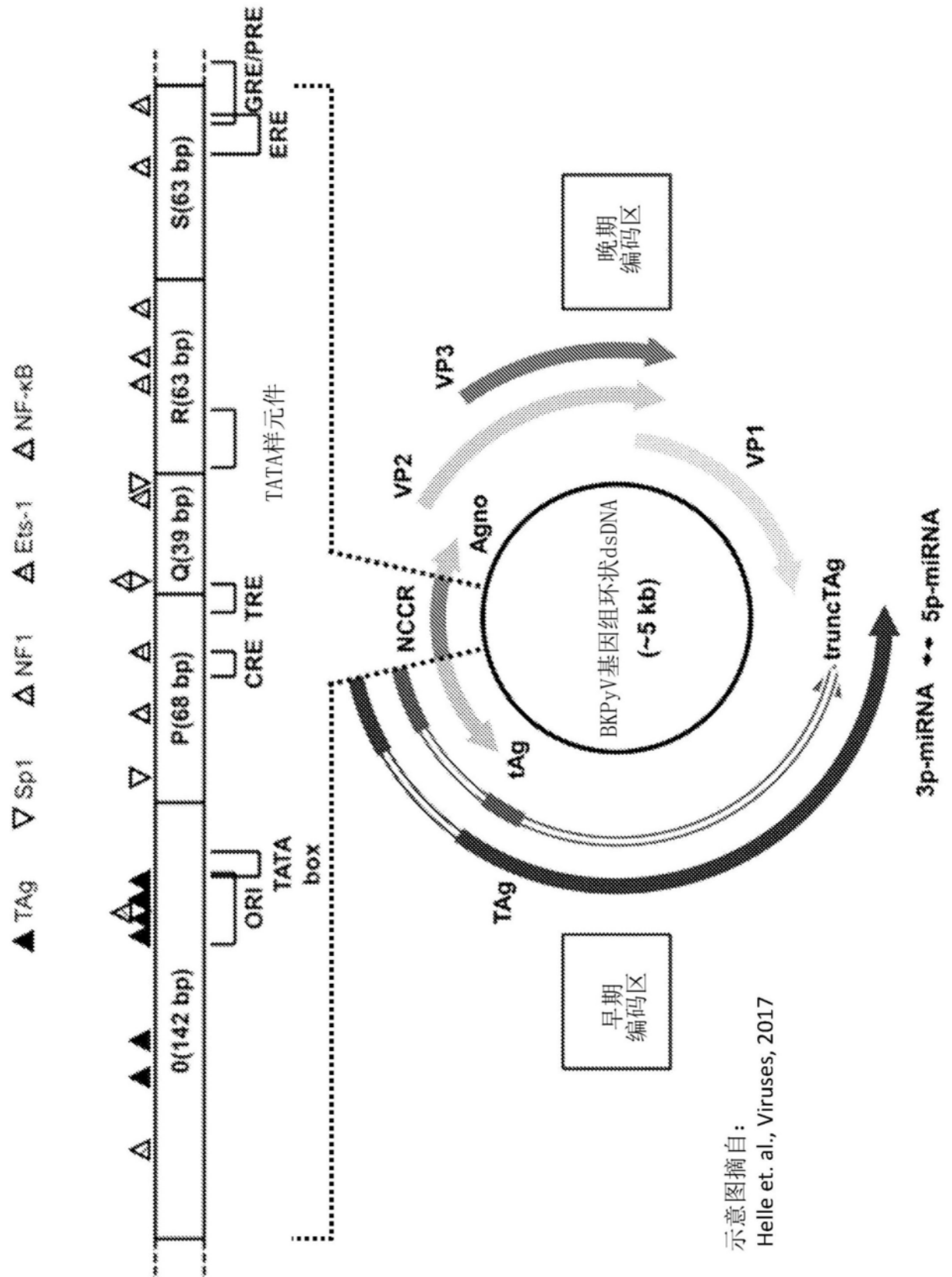
	<210> 65	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 65	
	ggcattacag ctctgatgag gtcagttttt gggatataga	40
	<210> 66	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 66	
	tactaattat ctttttttag gtgagacctc cgccccata	40
[0015]	<210> 67	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 67	
	caactagctt cagtagccag gtaggctcat ggtattggga	40
	<210> 68	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 68	
	aatttagttt ttcccttttag catgatgttc caaccagga	40
	<210> 69	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 69 gtggatcctc ctcttctcag gtagcttggt acttttgga	40
	<210> 70 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 70 atgtaagtat ttttttttag ggatactaca gtgattctcc	40
	<210> 71 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 1	
[0016]	<400> 71 aagtttattt tcttgcaaag gttggttact ttatagamga	40
	<210> 72 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子2	
	<400> 72 tkytttytyt tttattttag ggwaayccca cttatggkac	40
	<210> 73 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 73 atgaaaatr tktwtccgccg gtaagaatgt tgttggttaas	40
	<210> 74 <211> 40	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 74	
	tggtagttt ttcttttttag ggcggacaat atggtacycc	40
	<210> 75	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 75	
	gaatctacaa tctgagagag gtaaagcctt ccctacatcc	40
	<210> 76	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0017]	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 2	
	<400> 76	
	taatttaata aaatttacag tacaatcctc ataggaatcc	40
	<210> 77	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子 1	
	<400> 77	
	ttgaagtaag agactcagag gtatgtcaag tttctttttc	40
	<210> 78	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向序列外显子2	
	<400> 78	
	ttaatttttt tattttgcag gtcttttctg attcctatgg	40

	<210>	79	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	共同靶向序列外显子 1	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(4)..(5)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
[0018]	<221>	misc_feature	
	<222>	(27)..(29)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(31)..(32)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(37)..(37)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(39)..(40)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<400>	79	
		vhdnnwvbw d nhnydvwsag gthdrhnnnd nnkwwbndnn	40
	<210>	80	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223>	靶向序列外显子2共同的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(3)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(23)..(24)	
	<223>	n是a, c, g或t	
[0019]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(27)..(27)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(30)..(30)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(33)..(33)	
	<223>	n是a, c, g或t	
	<400>	80	
		wnnwwwdwtt twyytthyag rdnnvhnmmhn mynvhhmdbm	40



示意图摘自：
Helle et. al., Viruses, 2017

图1

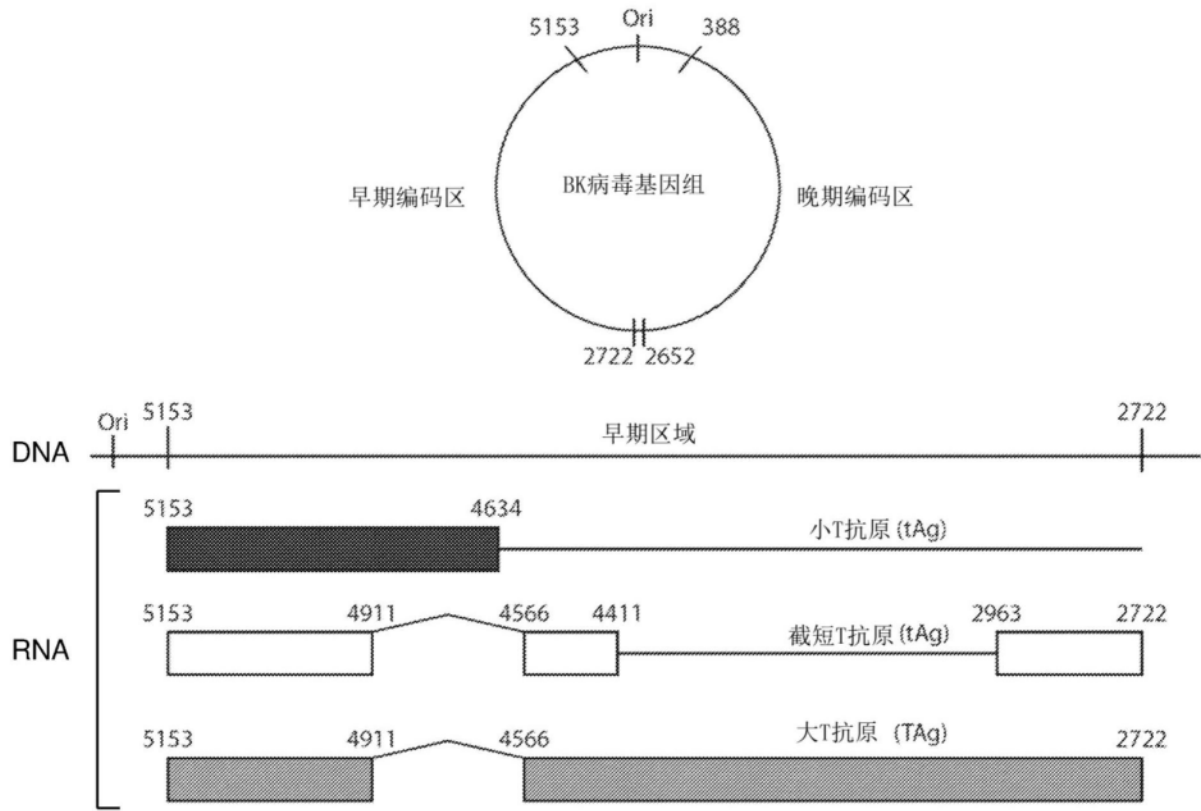


图1 (续)

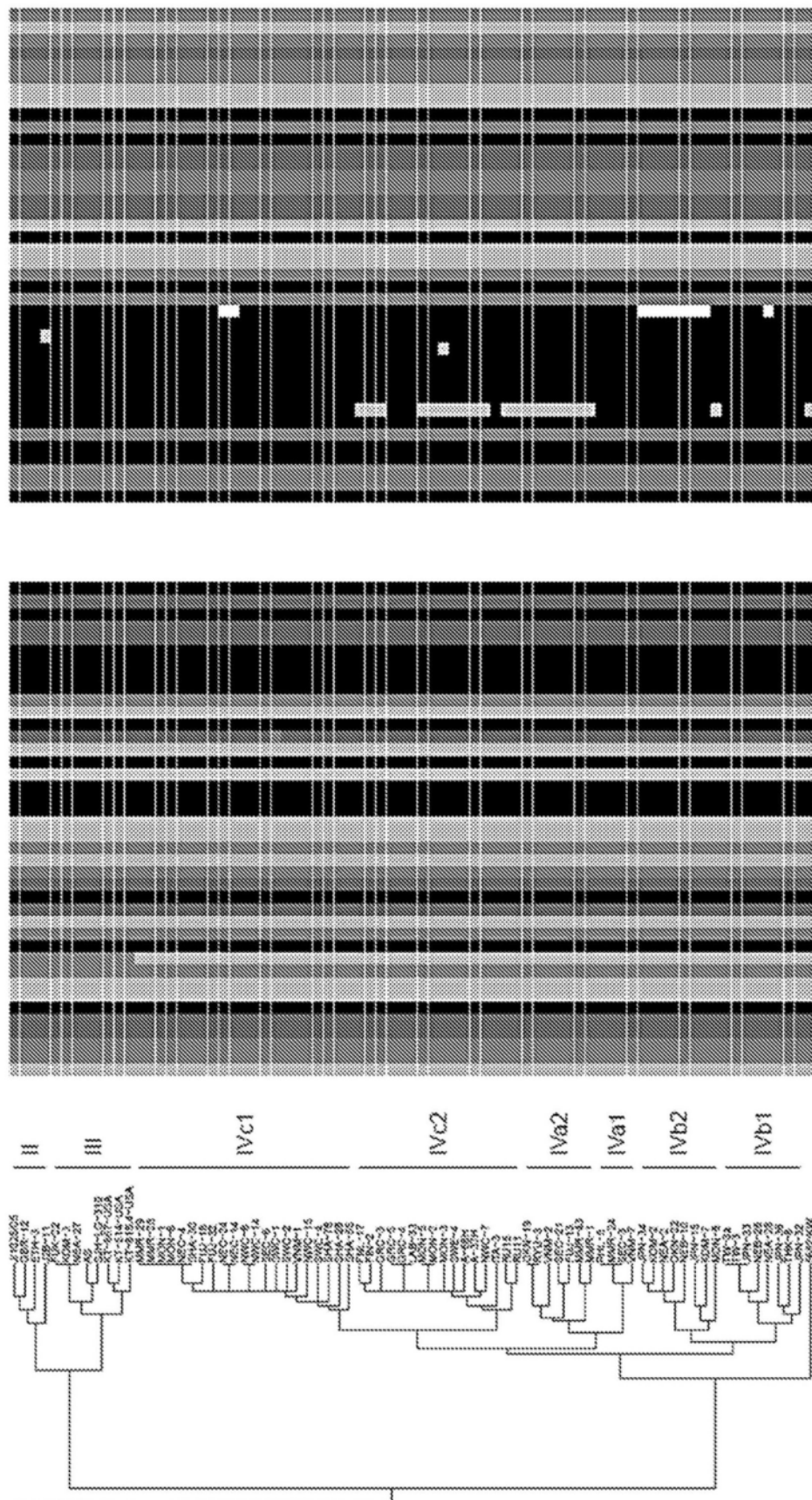


图2(3)

名称	序列	Tag中的靶标剪接位点
无序的	G*C*A*C*C*U*C*U*G*C*G*U*C*C*U*A*G*A*A*U	无靶标
AON #1	A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C*A*G*G*U	供体 (外显子1)
AON #2	A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C	供体 (外显子1)
AON #3	C*A*G*C*A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A	供体 (外显子1)
AON #4	U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U*A*G*A	受体 (外显子2)
AON #5	U*G*U*U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U	受体 (外显子2)



图3

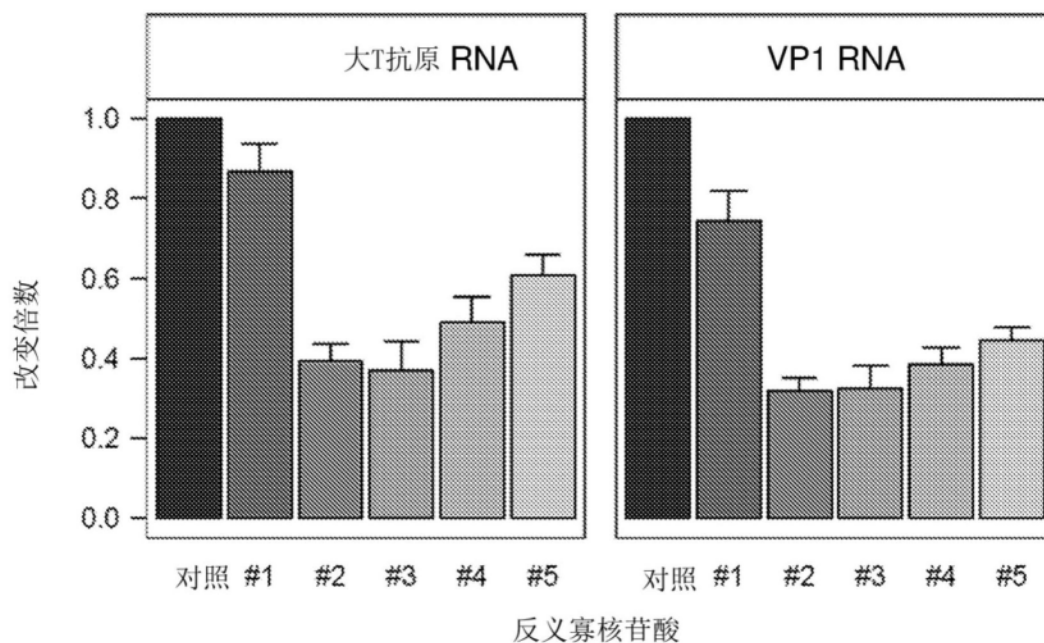


图4

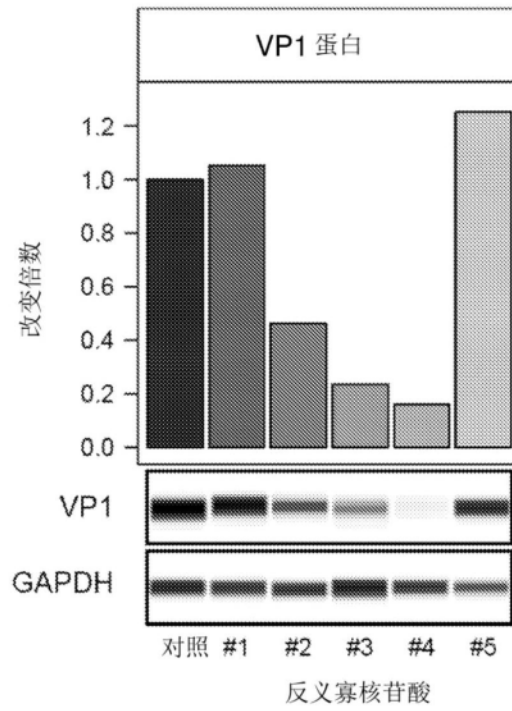


图5

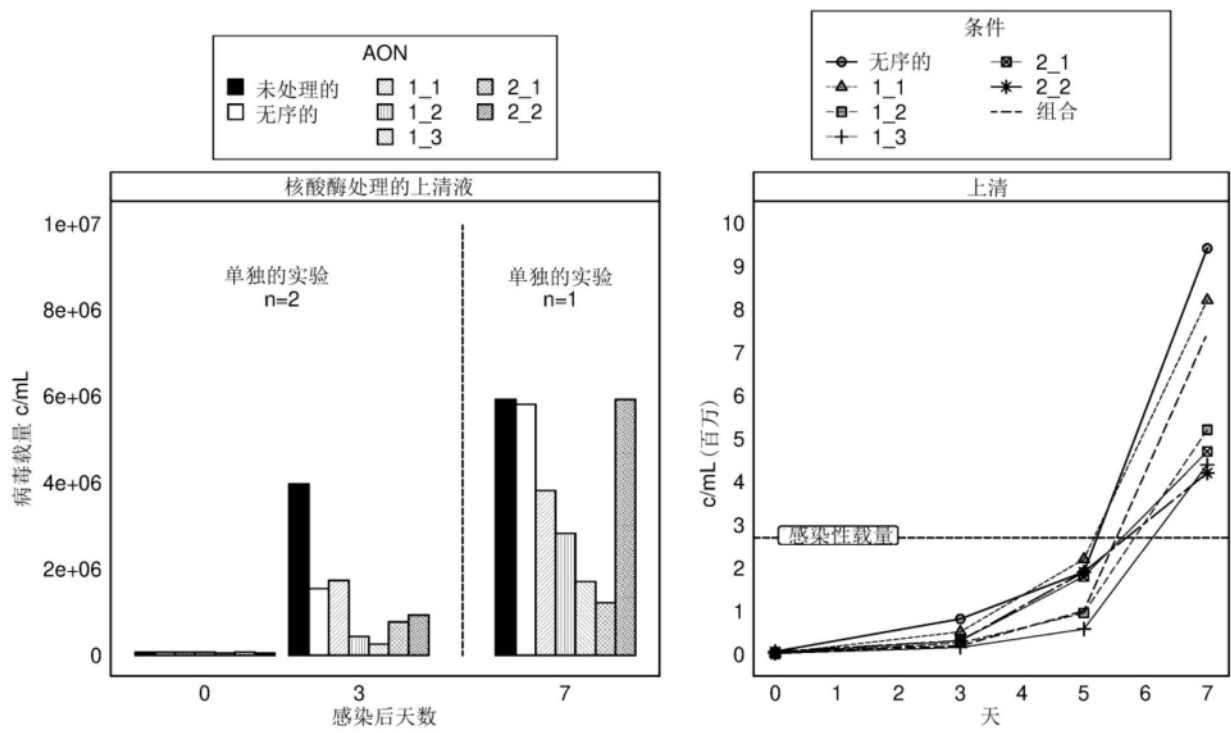


图6

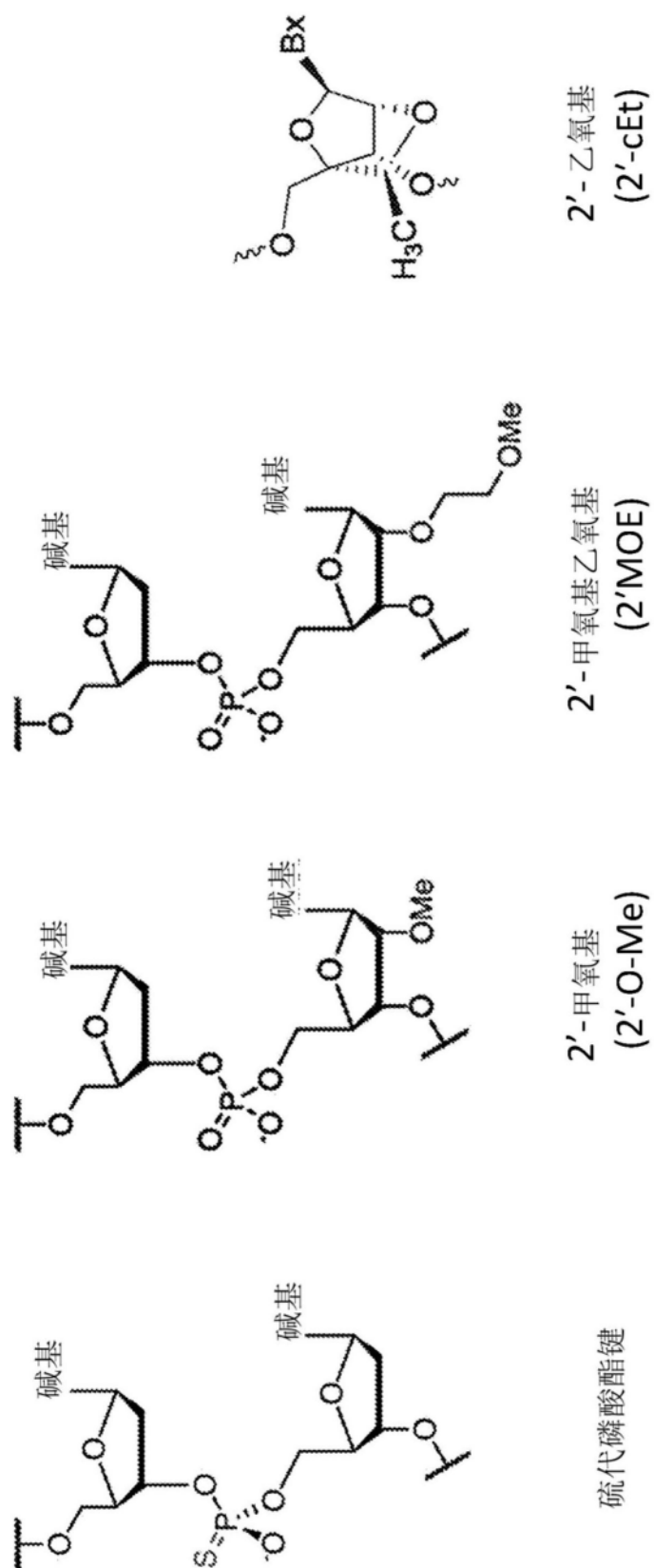


图7

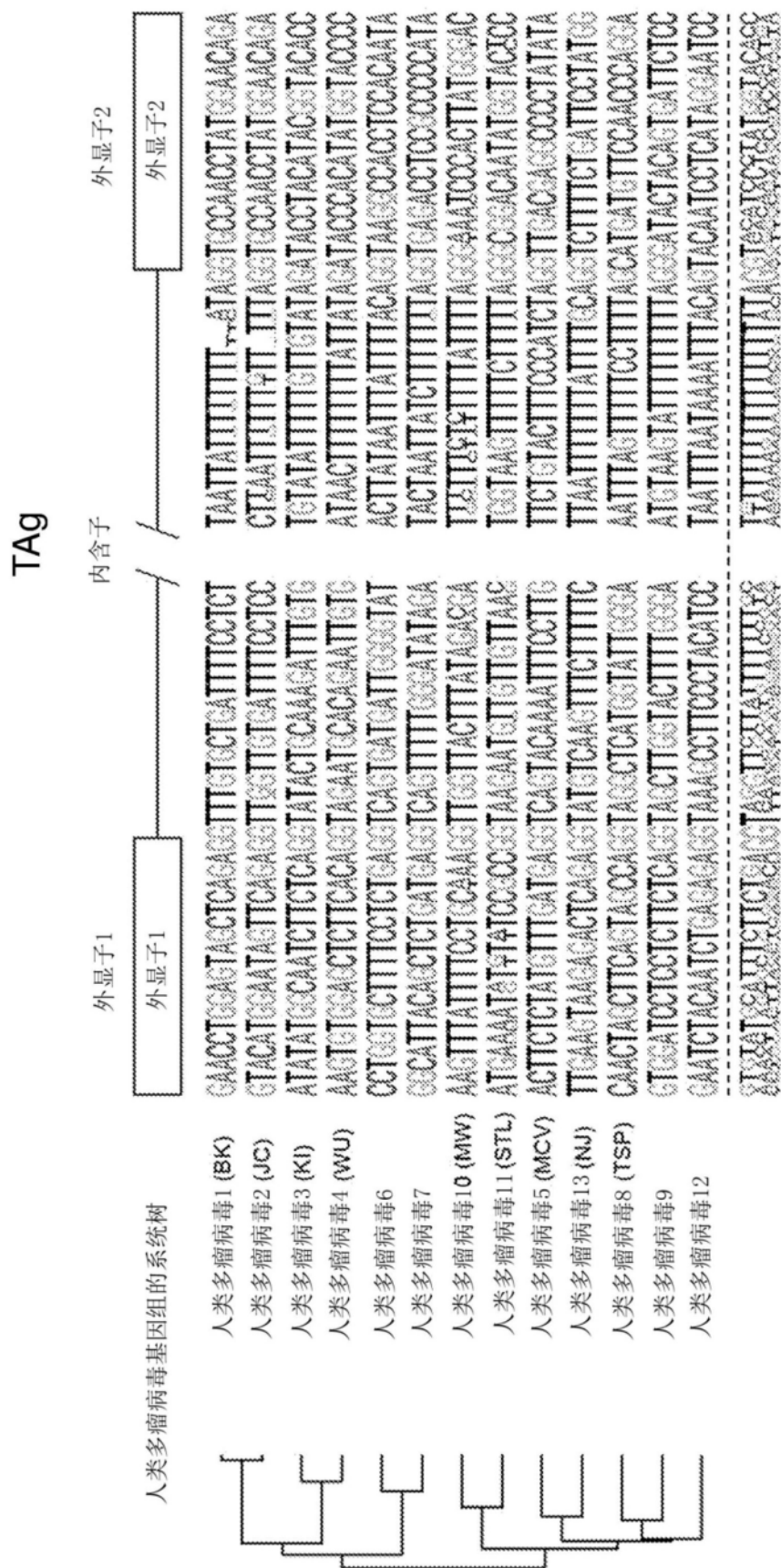


图8



图9

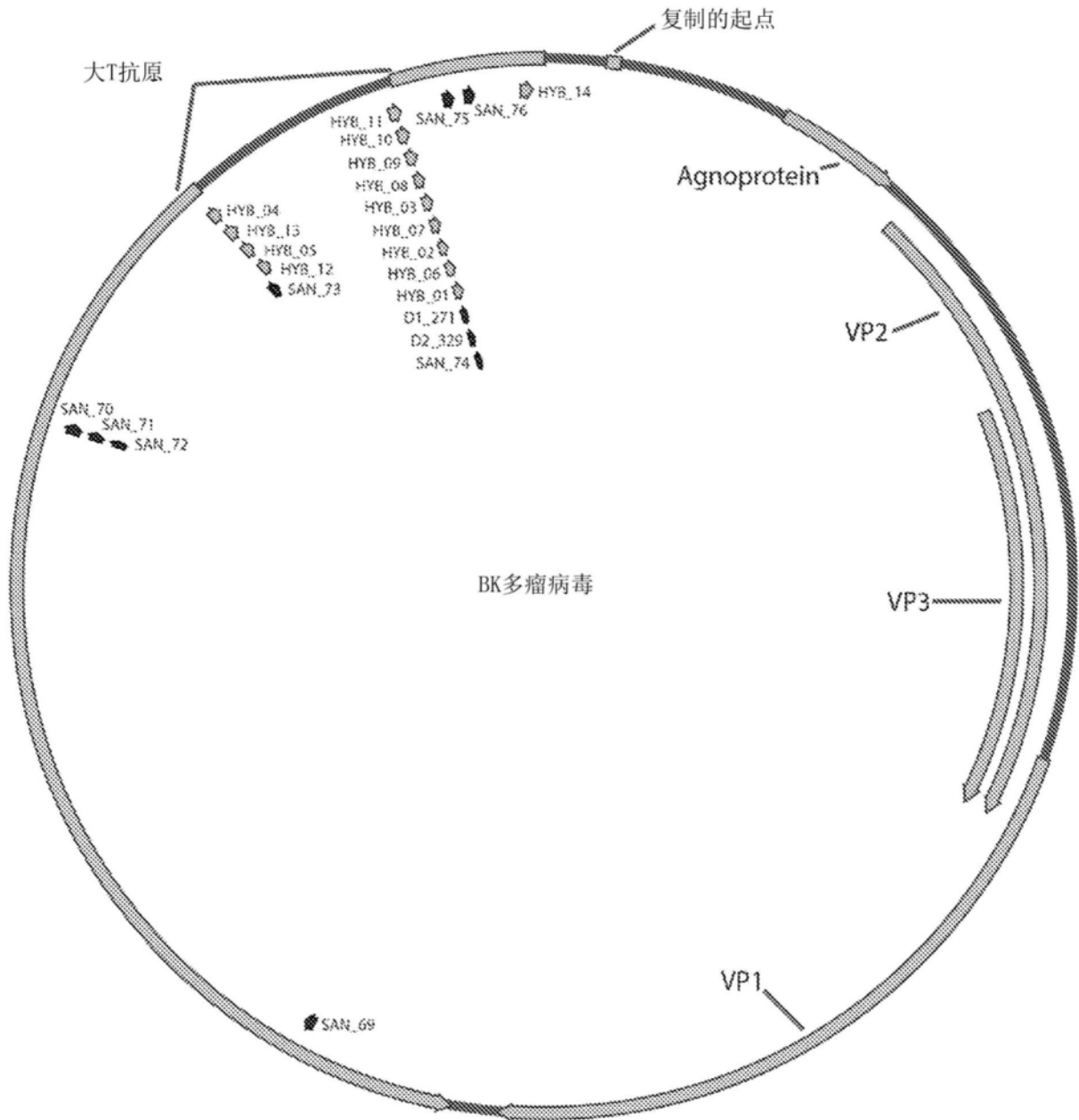


图10(1)

AON	位置	序列
HYB_01	4909..4928	ACCUCUGAGCUACUCCAGGU
HYB_02	4905..4924	ACAAACCUCUGAGCUACUCC
HYB_03	4901..4920	CAGCACAAACCUCUGAGCUA
HYB_04	4549..4568	UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU
HYB_05	4552..4571	UCCAUAAGGUUGGCACCUAUA
HYB_06	4907..4926	AAACCUCUGAGCUACUCCAG
HYB_07	4903..4922	GCACAAACCUCUGAGCUACU
HYB_08	4899..4918	AUCAGCACAAACCUCUGAGC
HYB_09	4897..4916	AAAUCAGCACAAACCUCUGA
HYB_10	4895..4914	GAAAAUCAGCACAAACCUCU
HYB_11	4893..4912	AGGAAAAUCAGCACAAACCU
HYB_12	4554..4573	CAUAGGUUGGCACCUAUAAA
HYB_13	4551..4570	UCCAUAAGGUUGGCACCUAU
HYB_14	5114..5133	UGAGCUCCAUGGAUUCUUCC

图10(2)

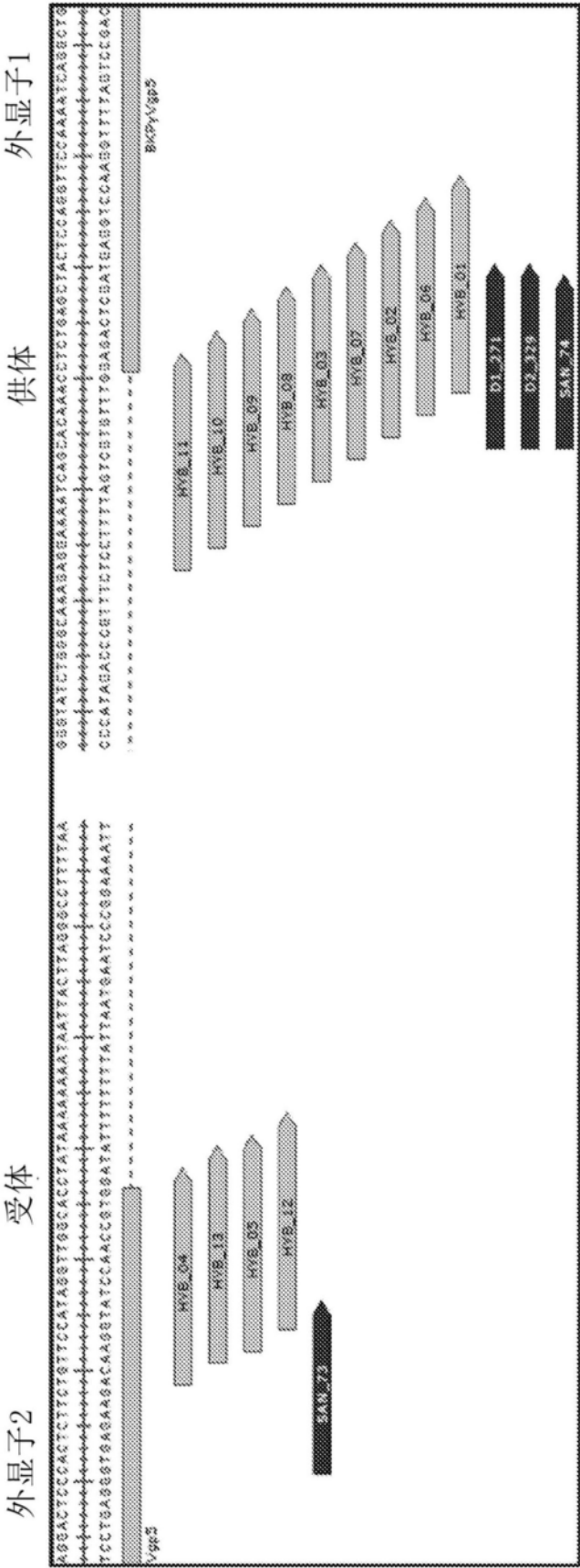


图10(3)

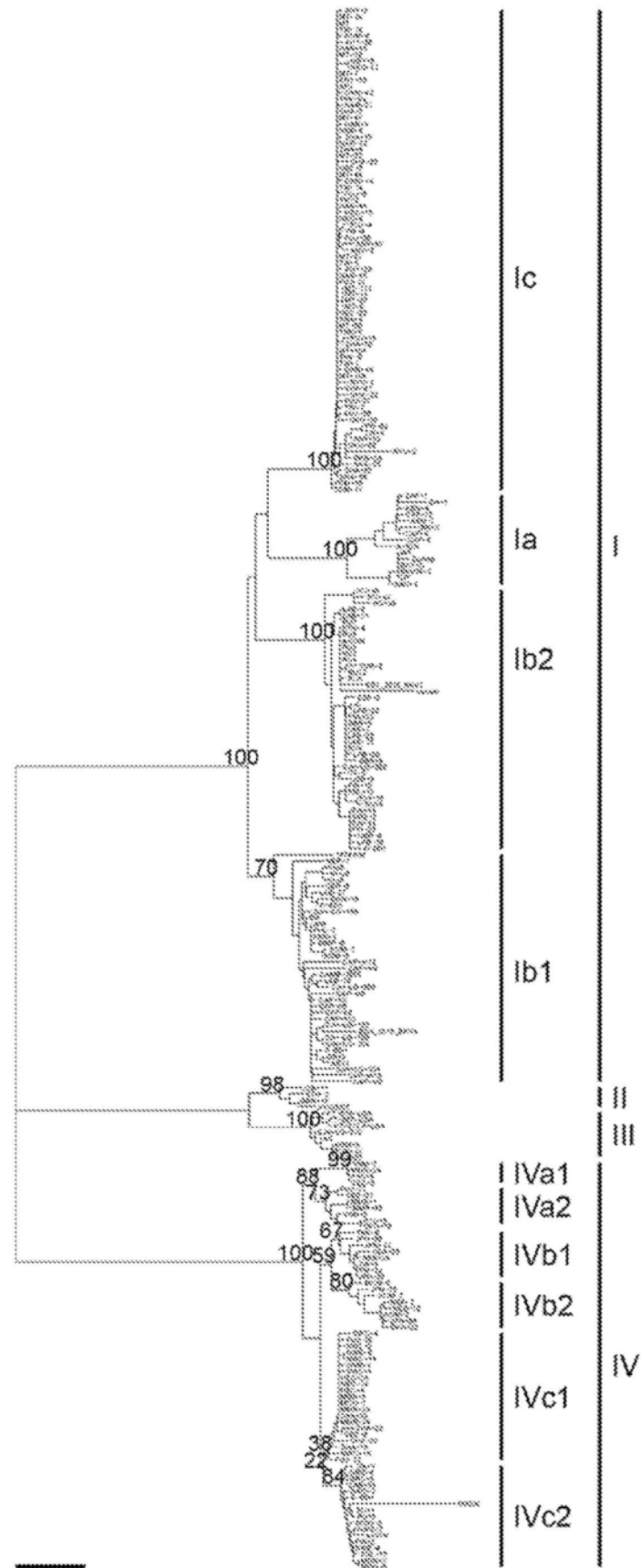


图11(1)



图11(2)

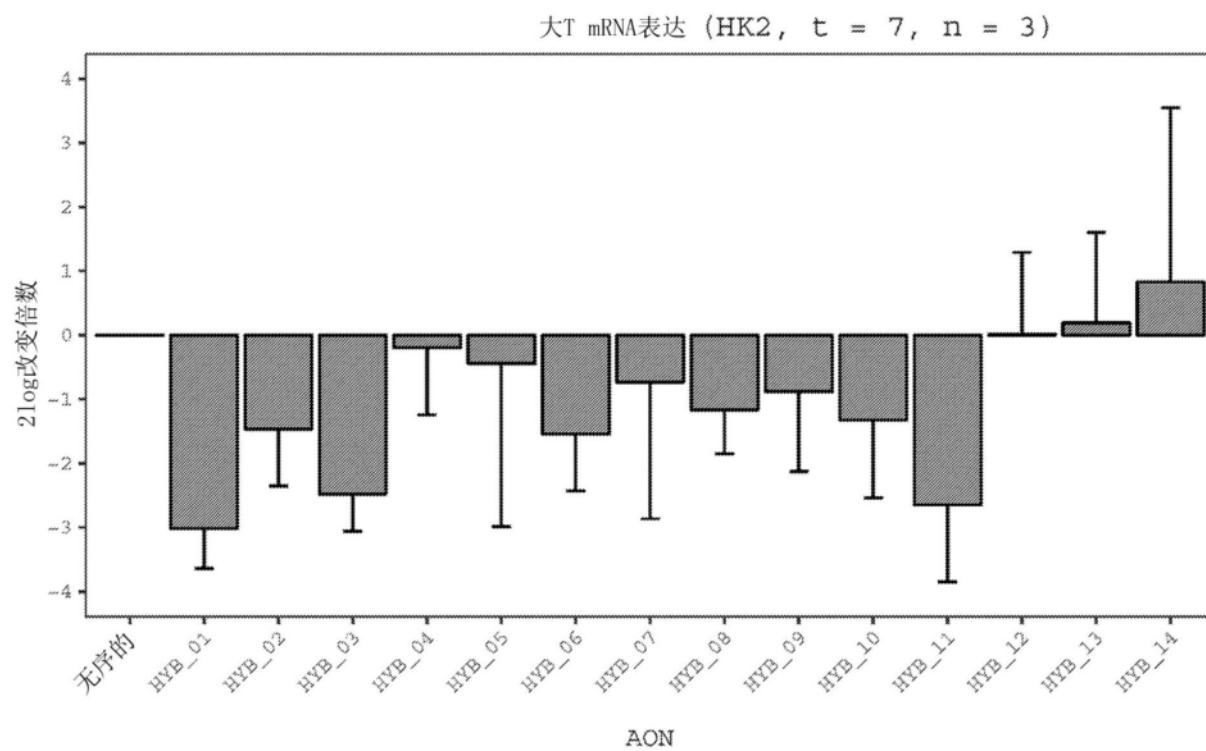


图12

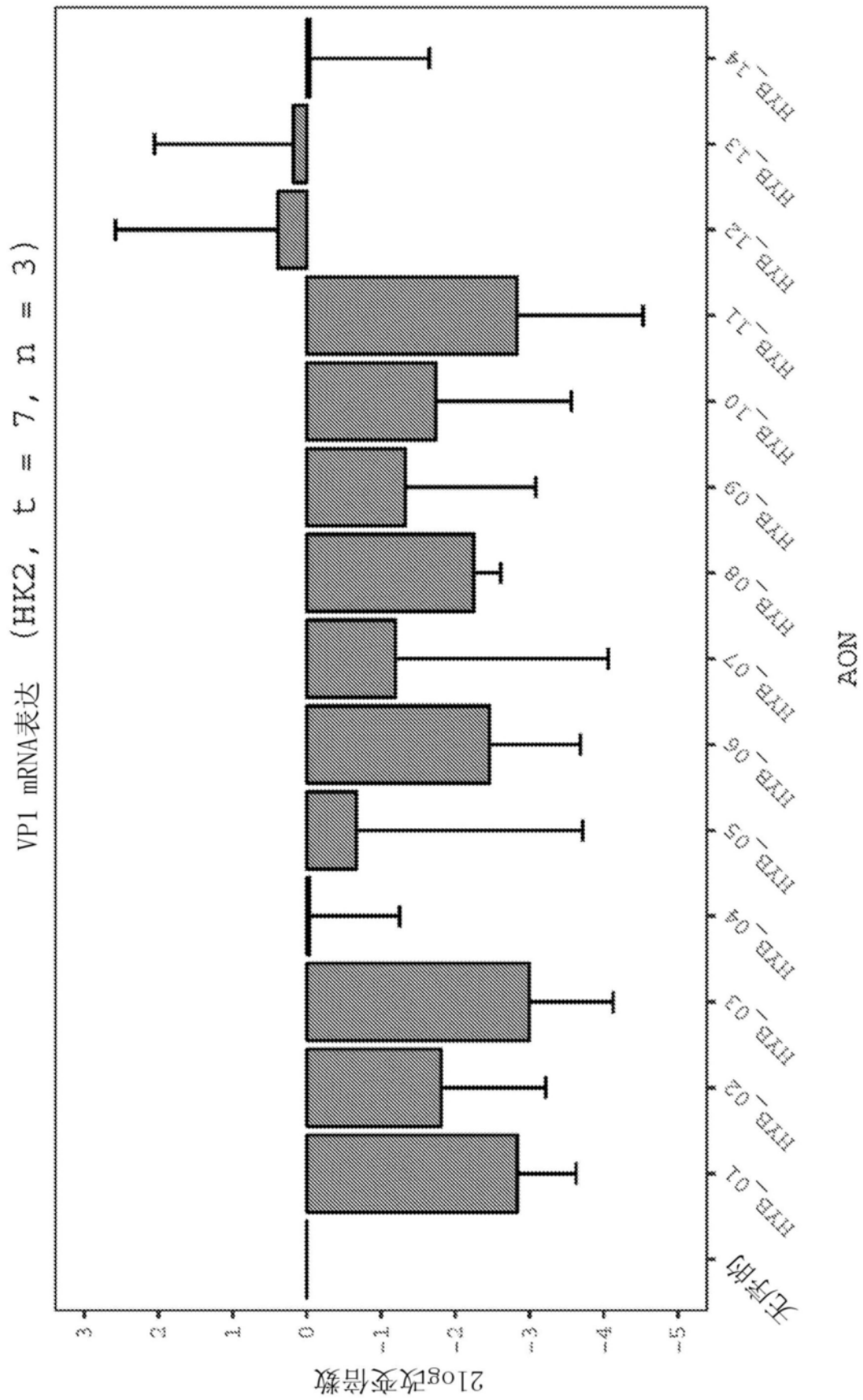


图13

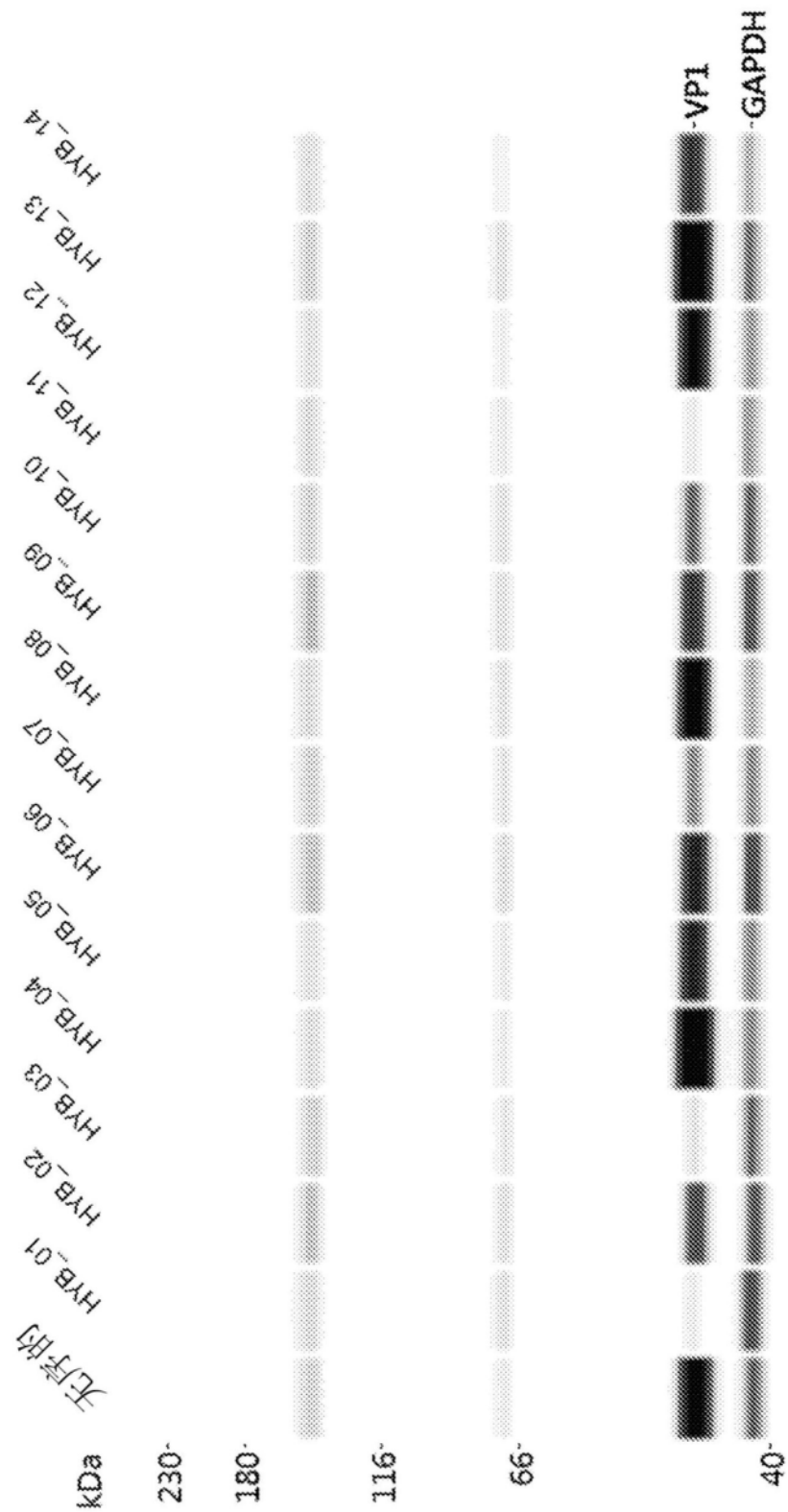


图14

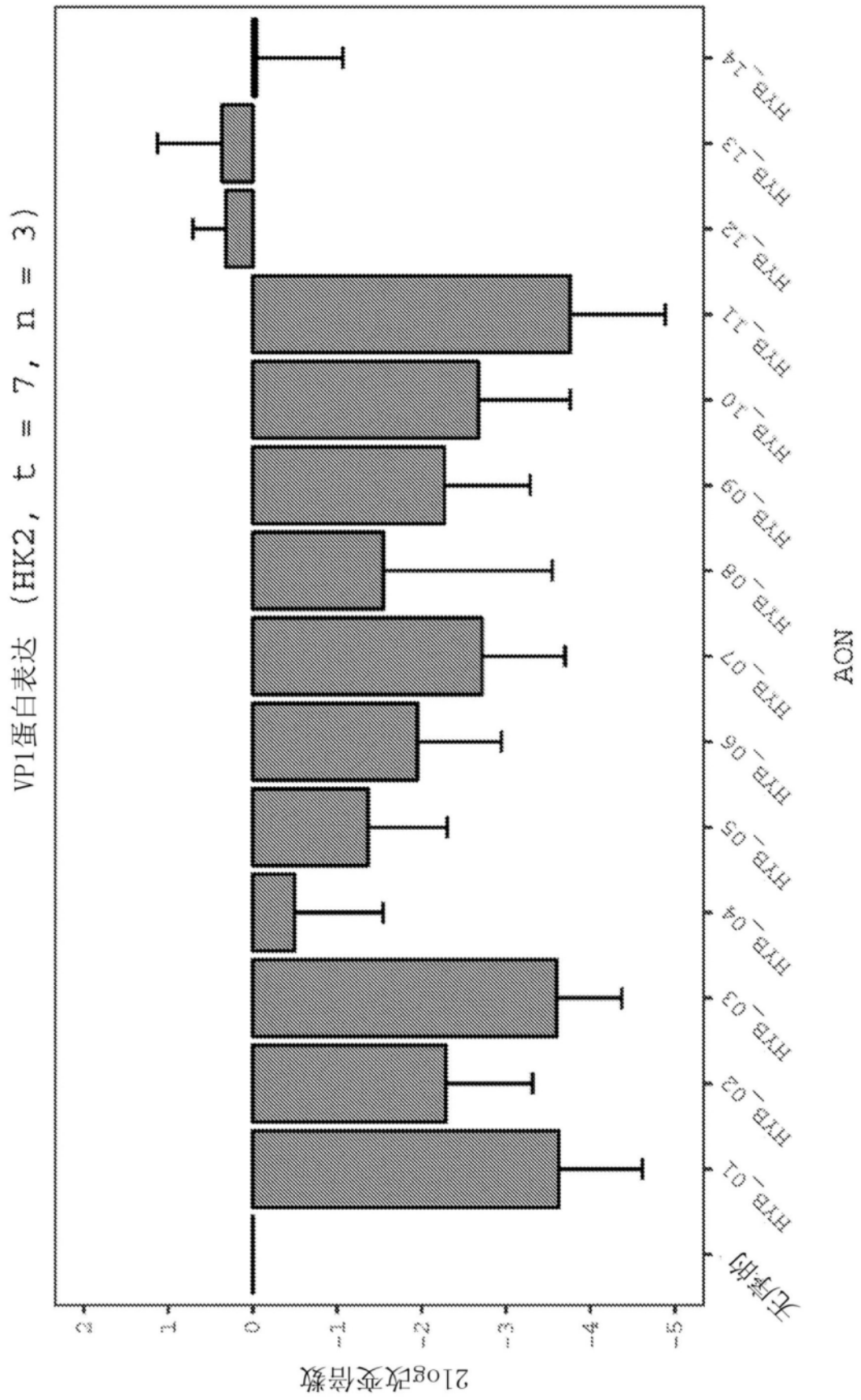


图15

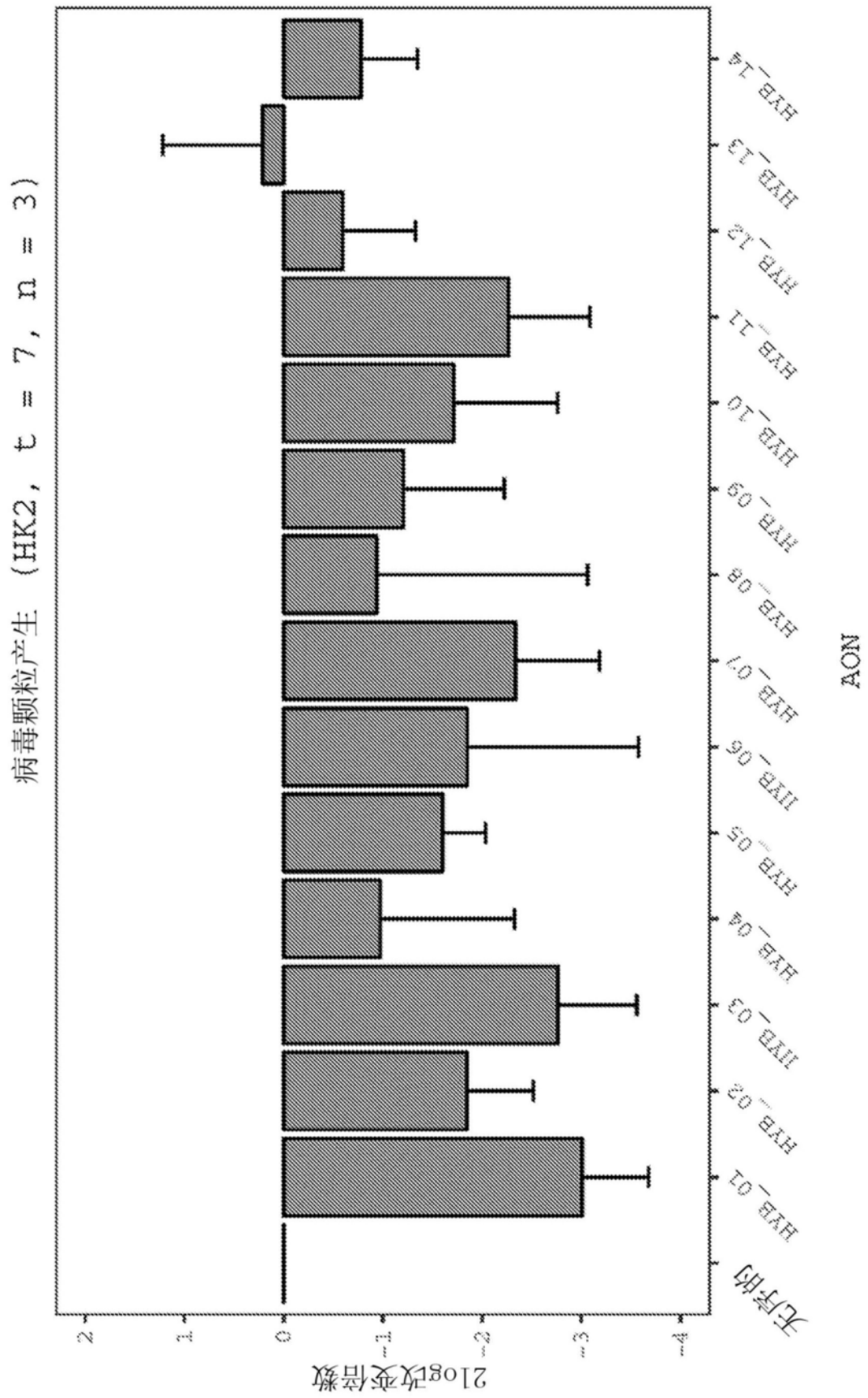


图16

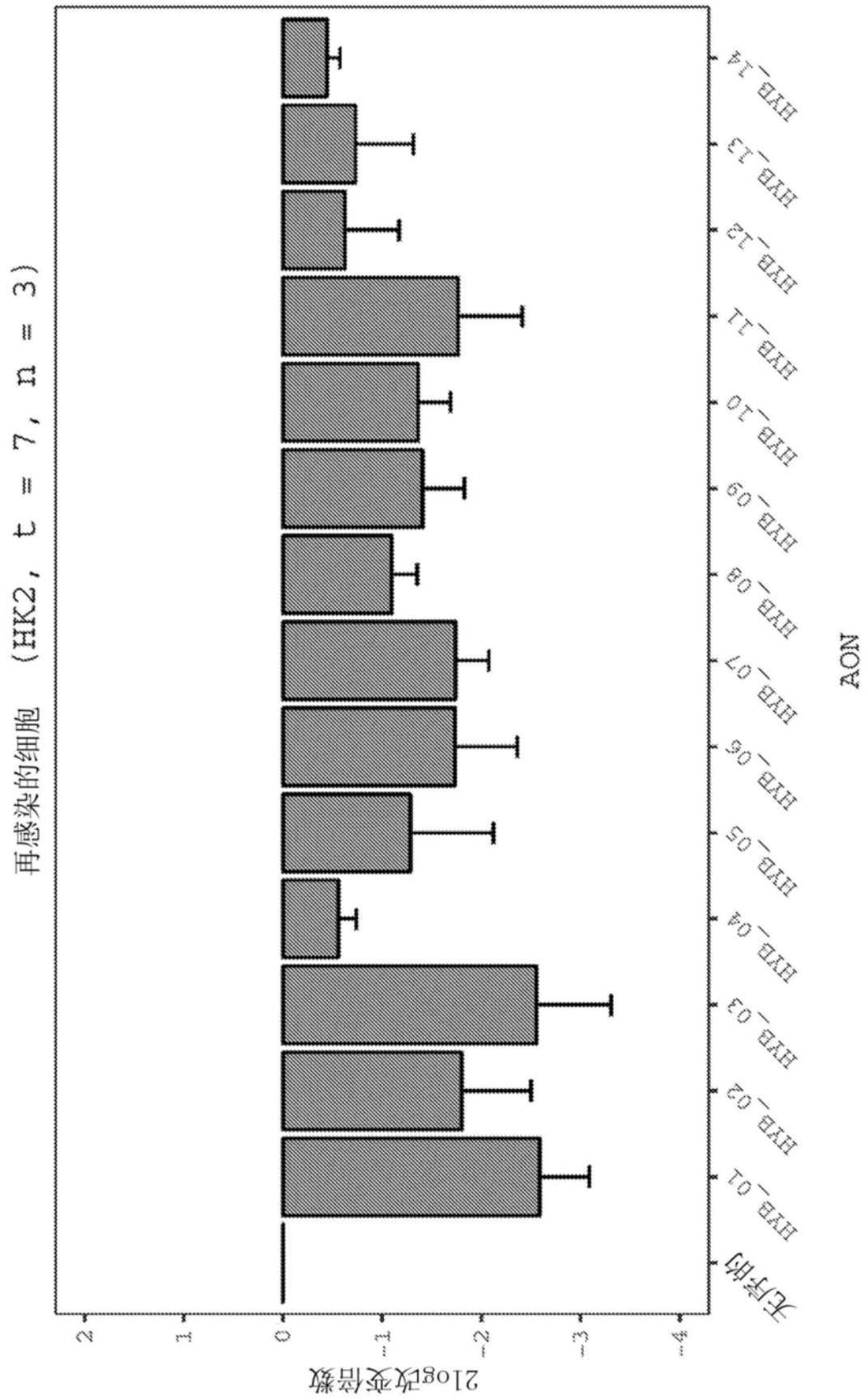


图17

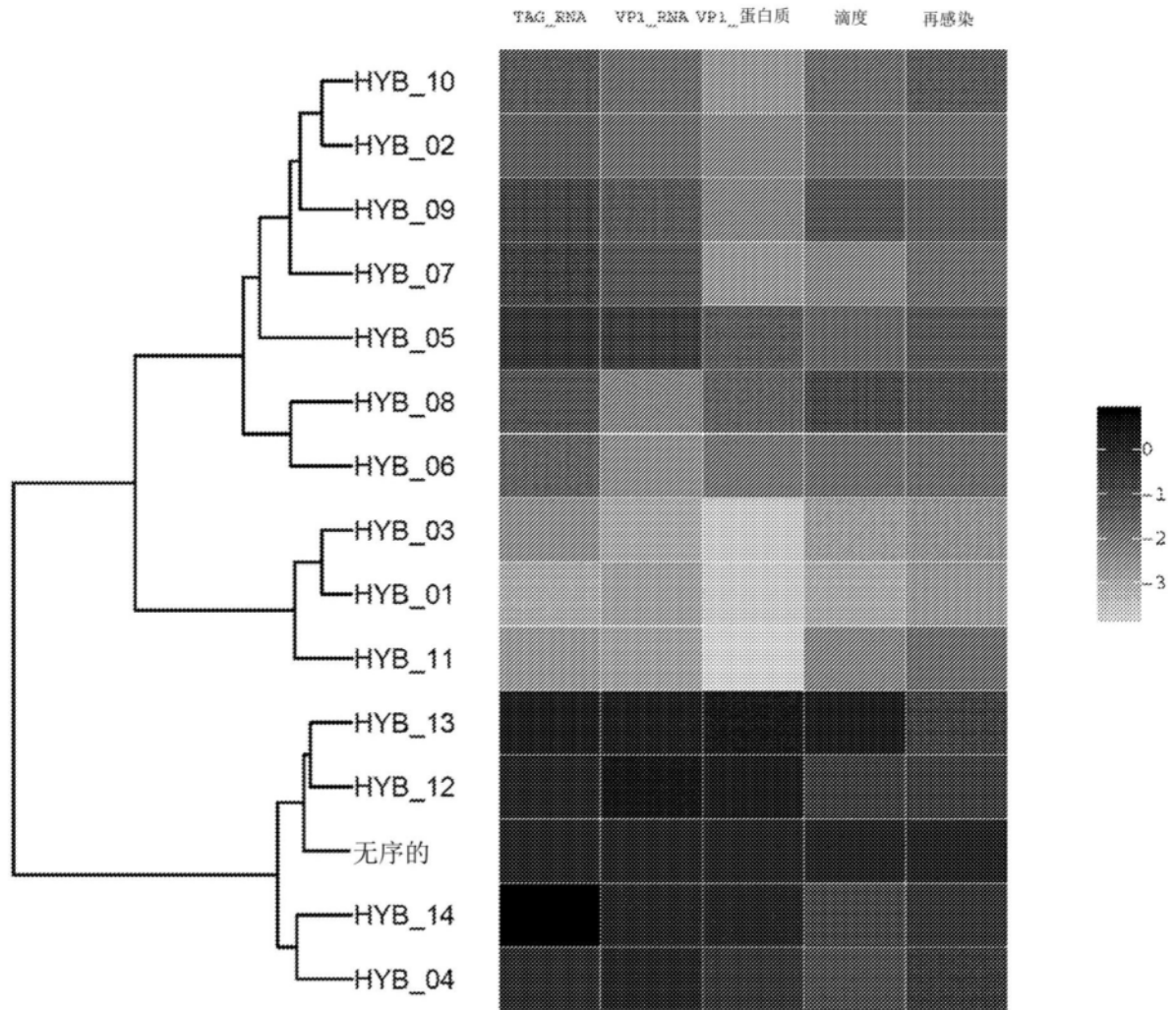


图18

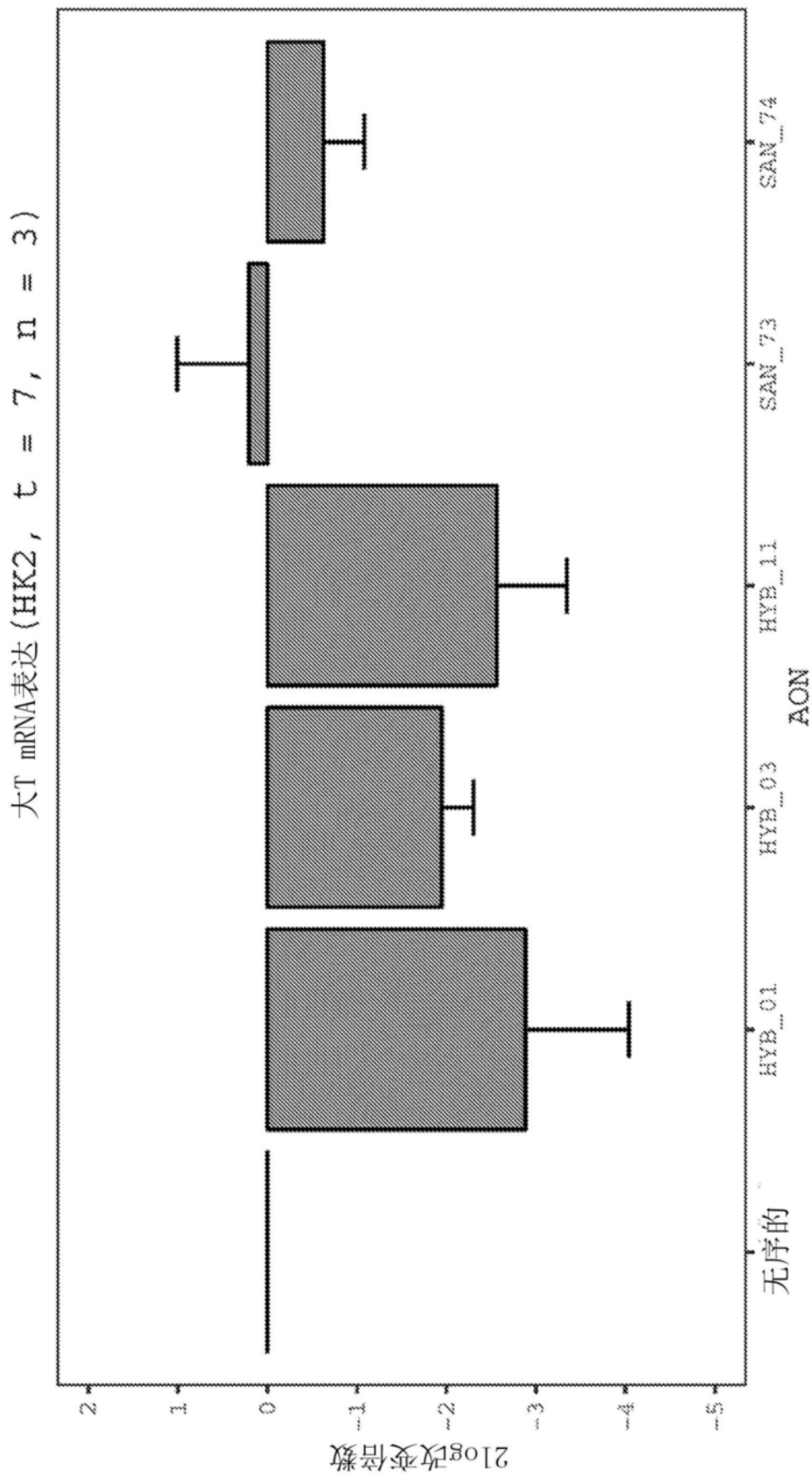


图19

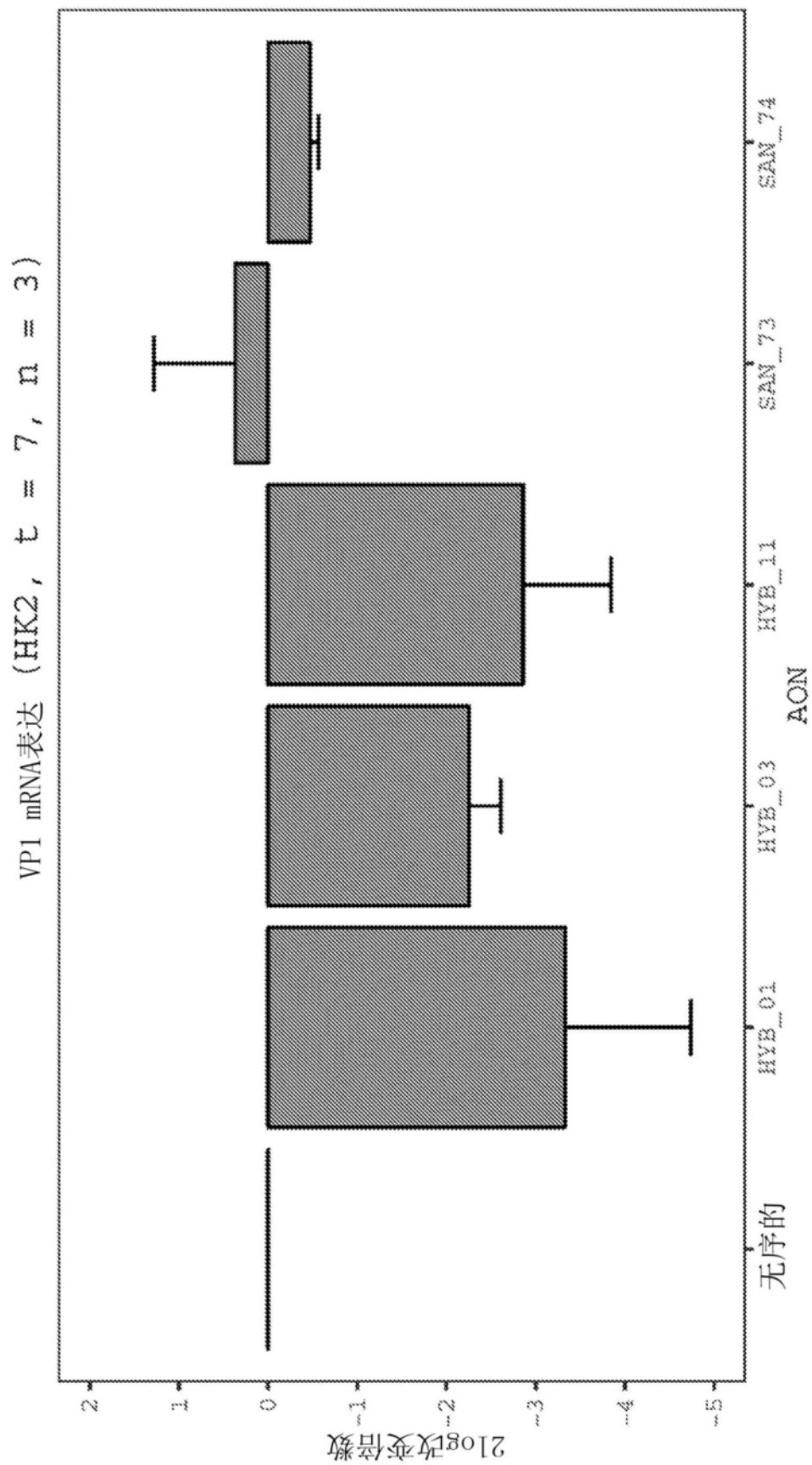


图20

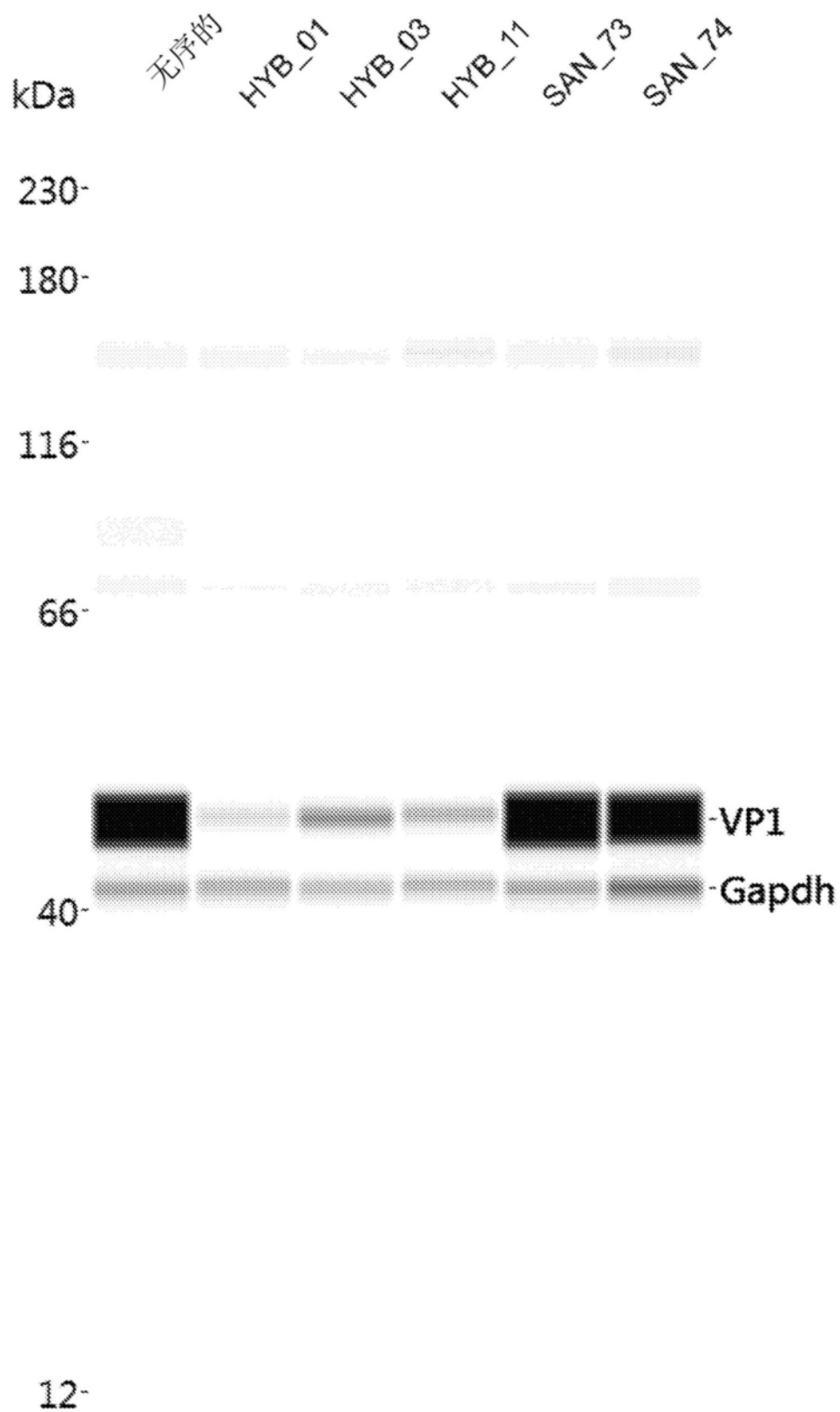


图21

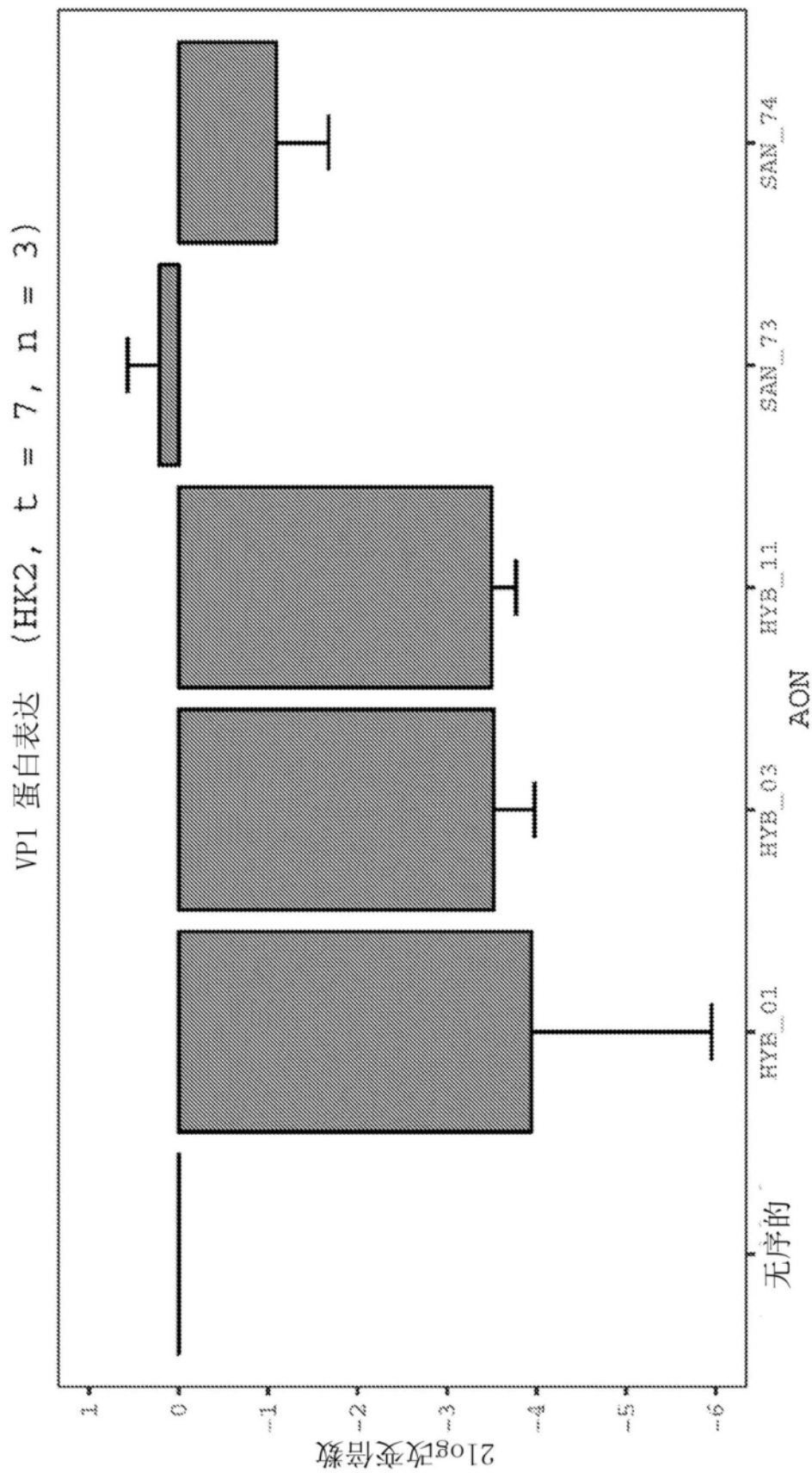


图22

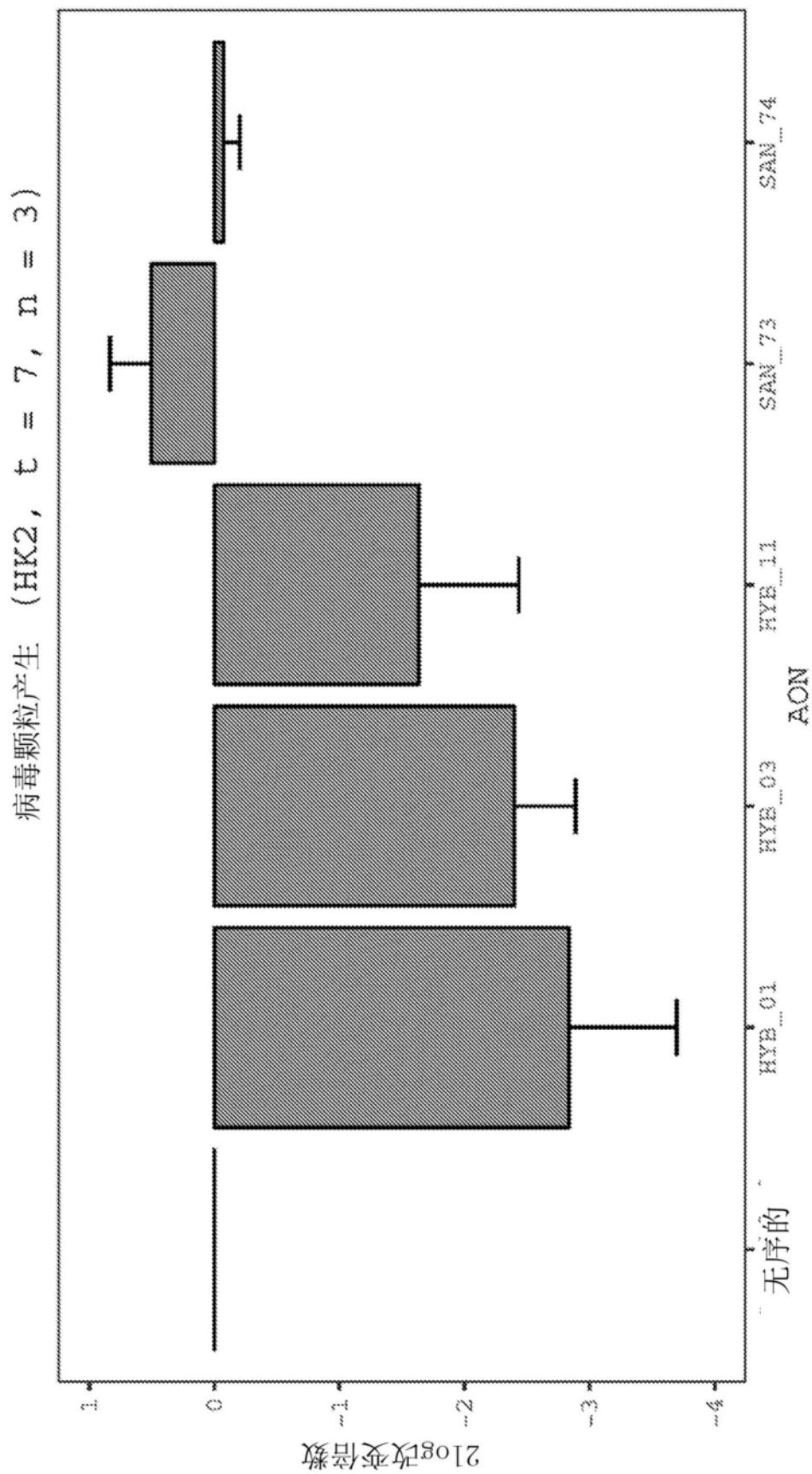


图23

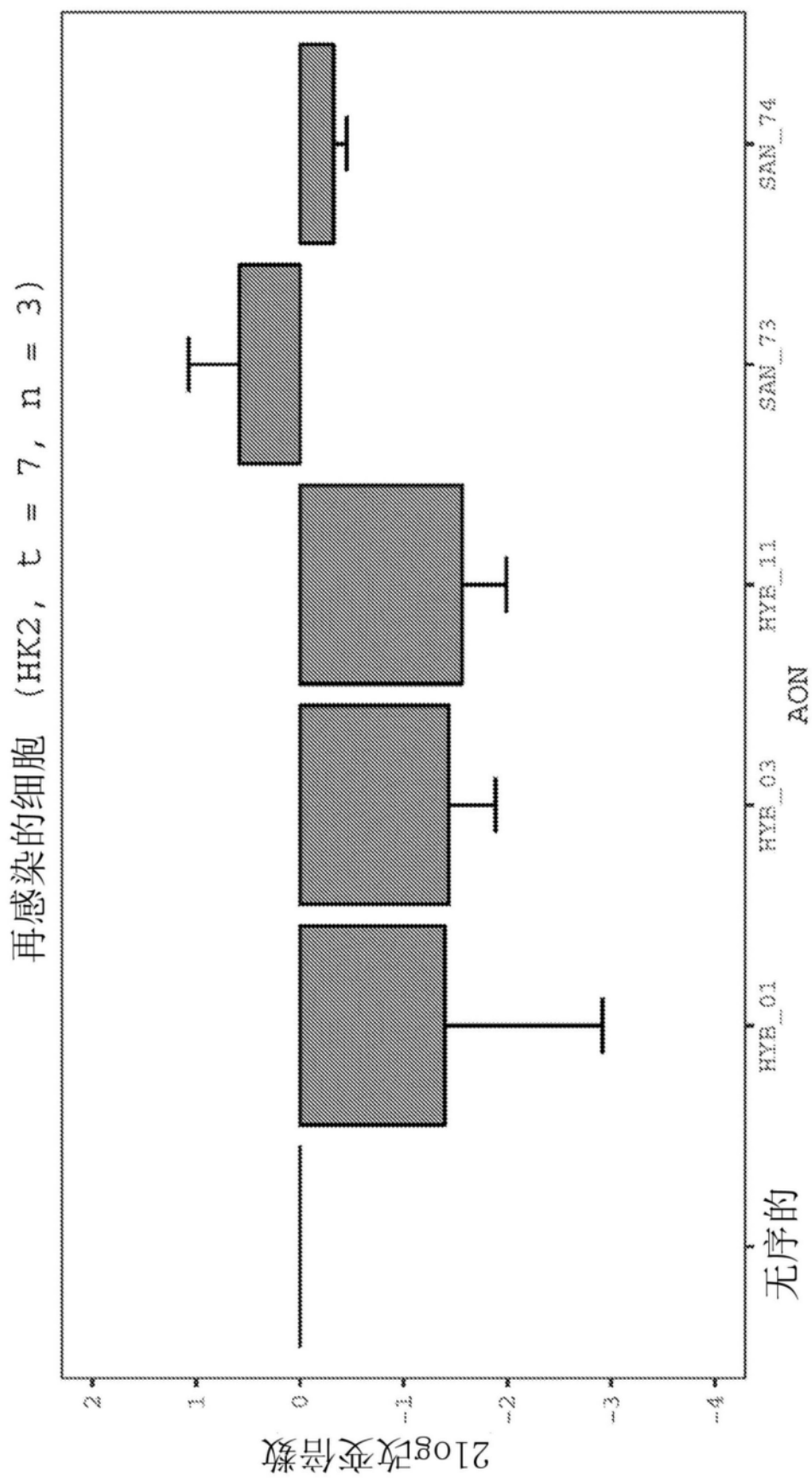


图24

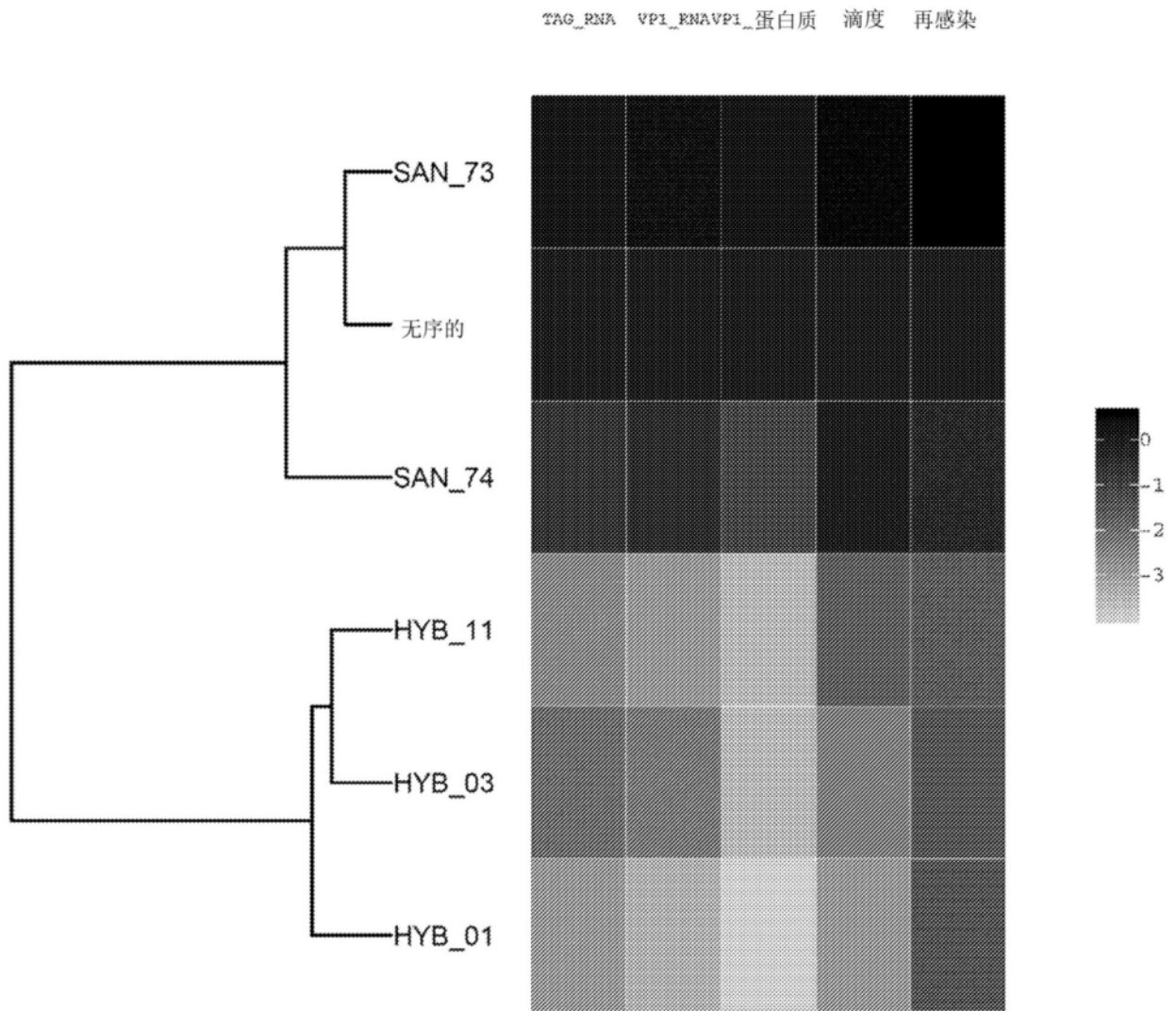


图25

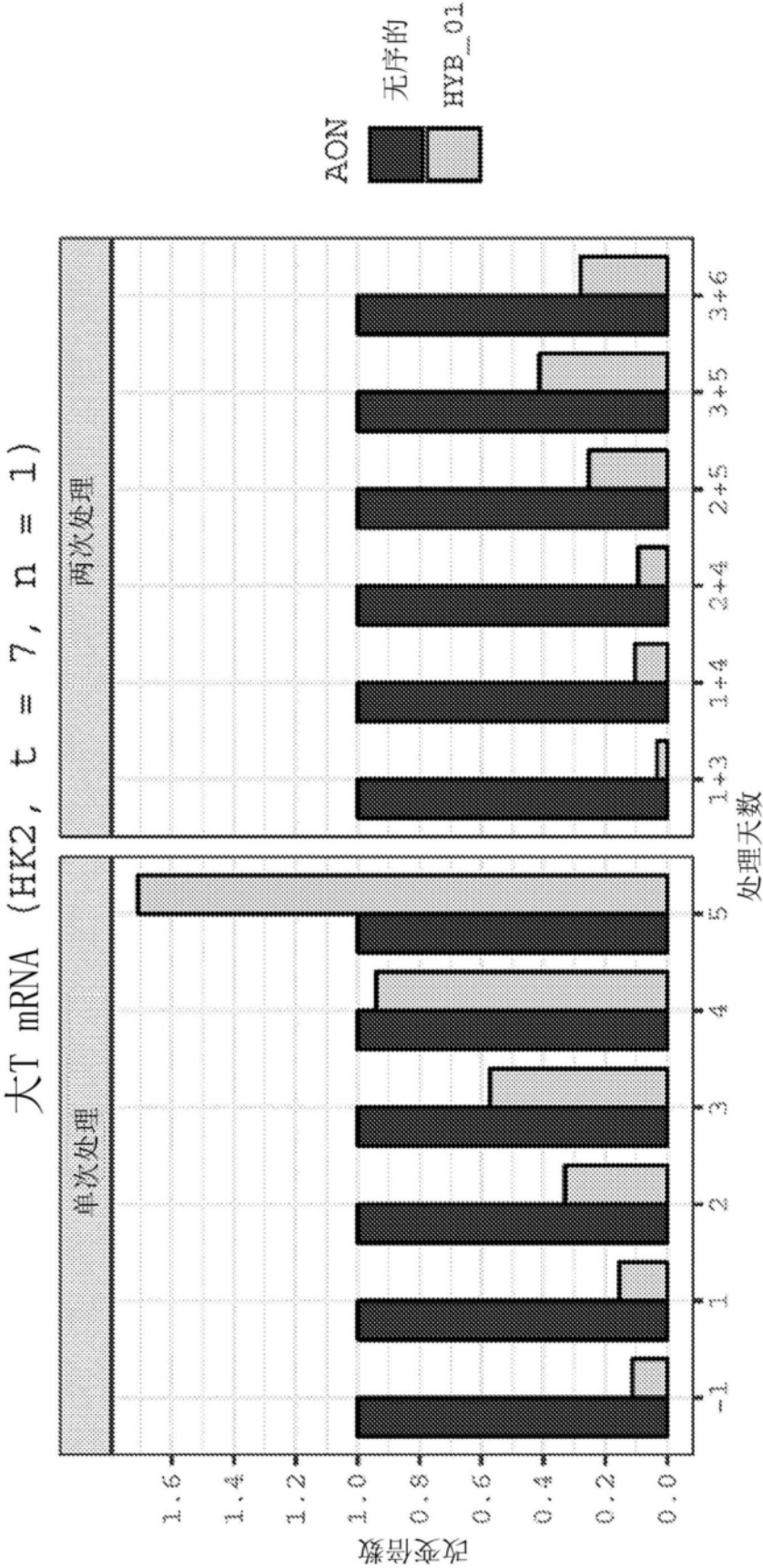


图26

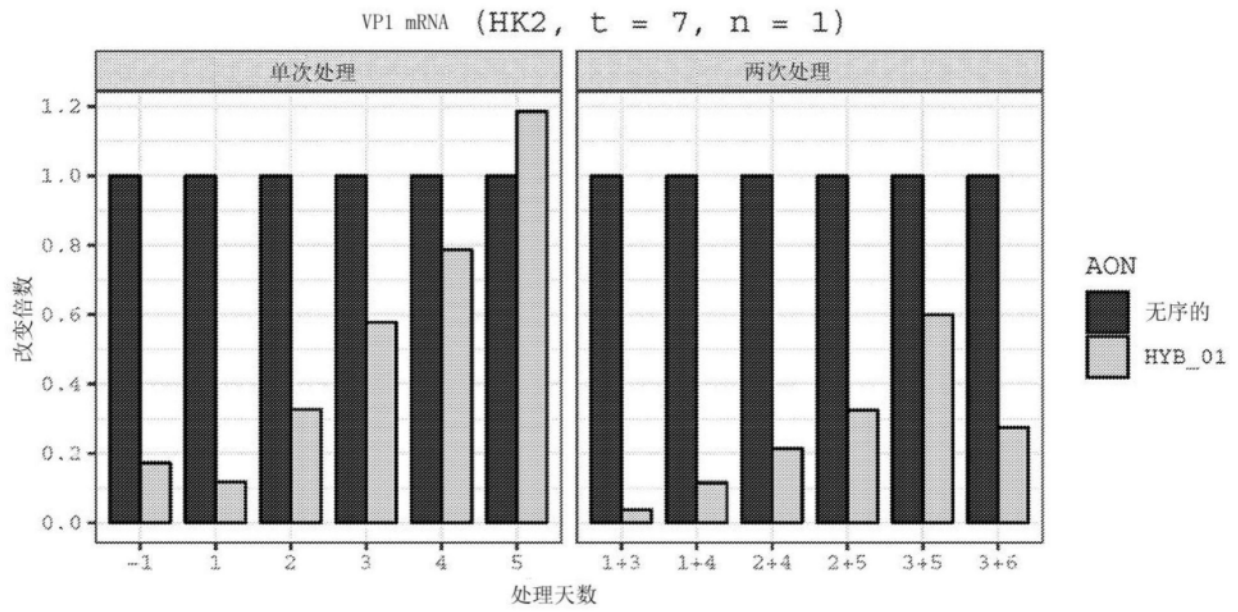


图27

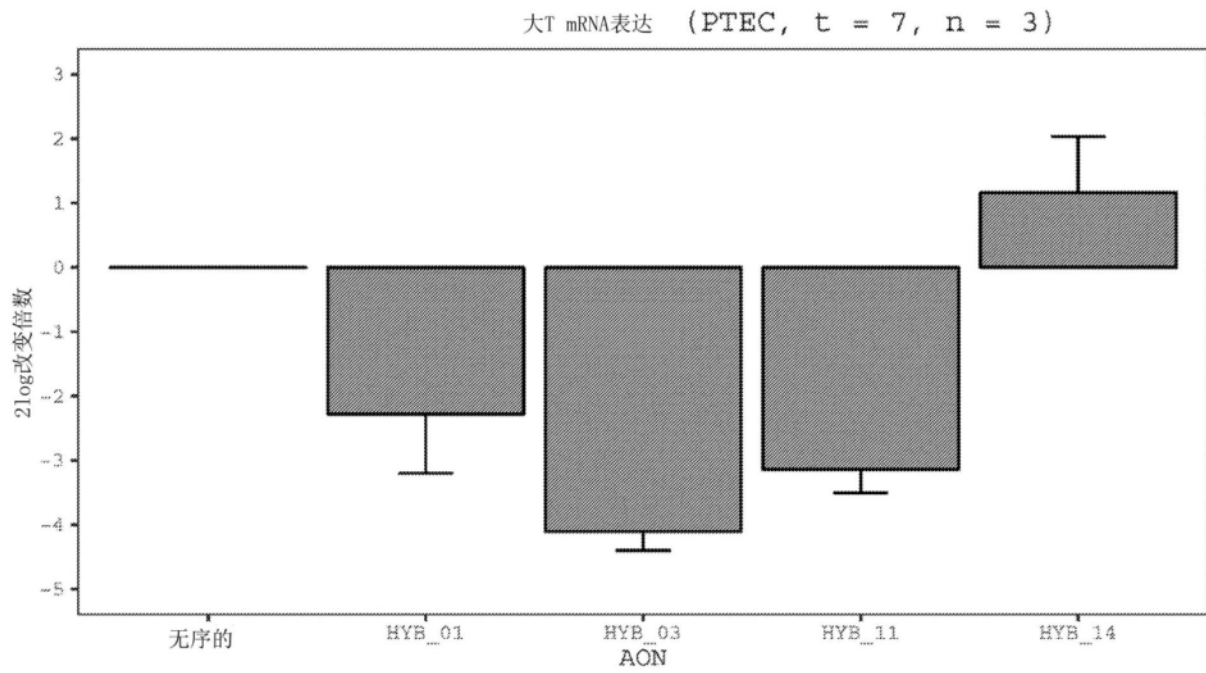


图28

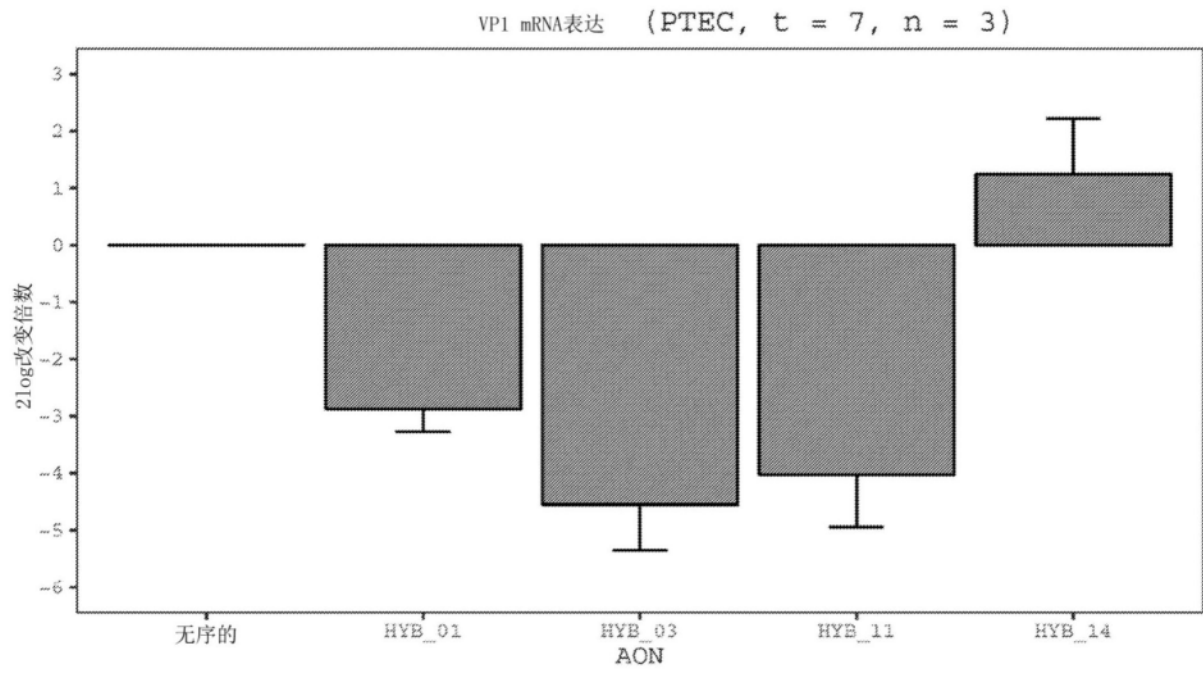


图29

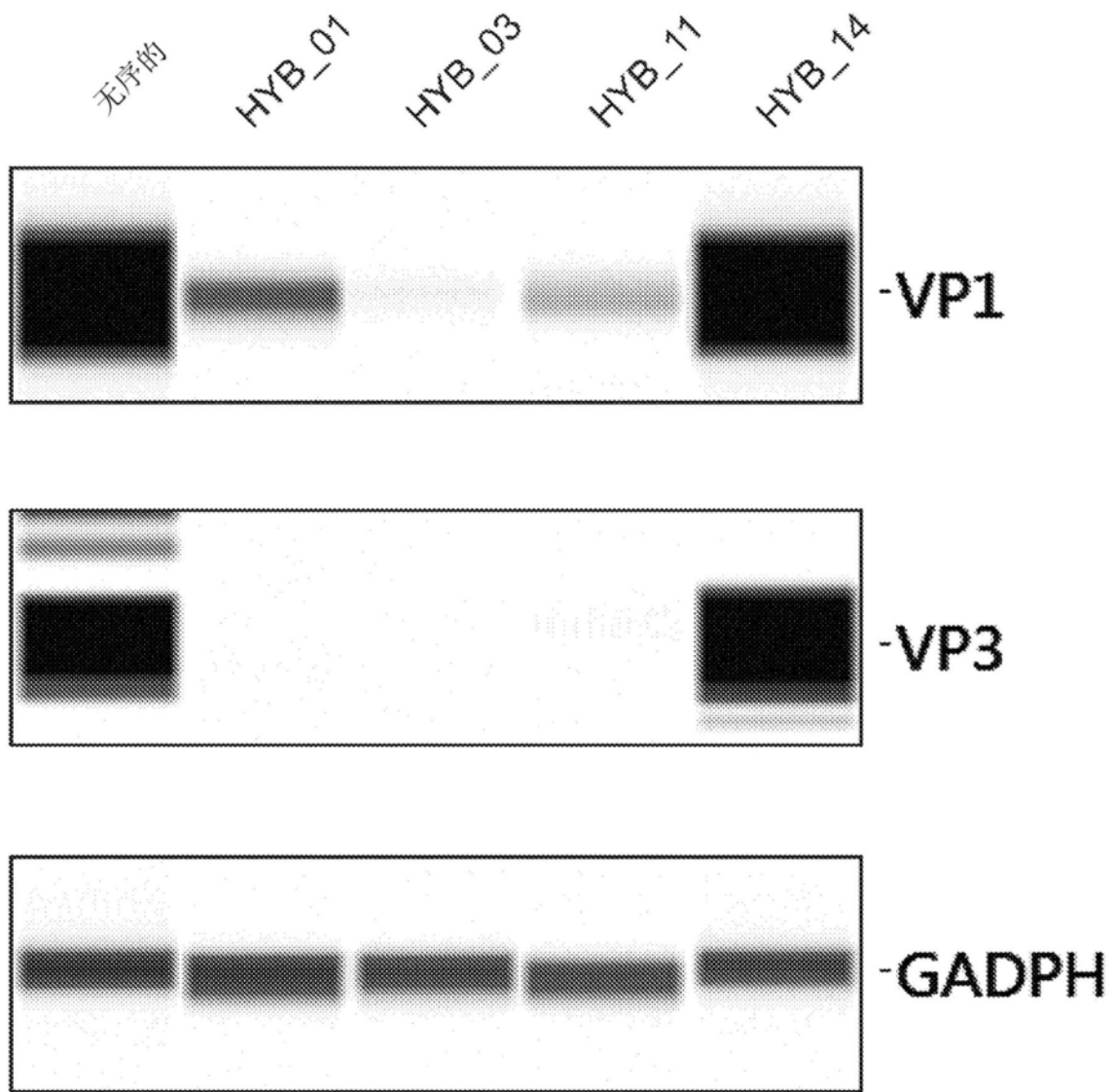


图30

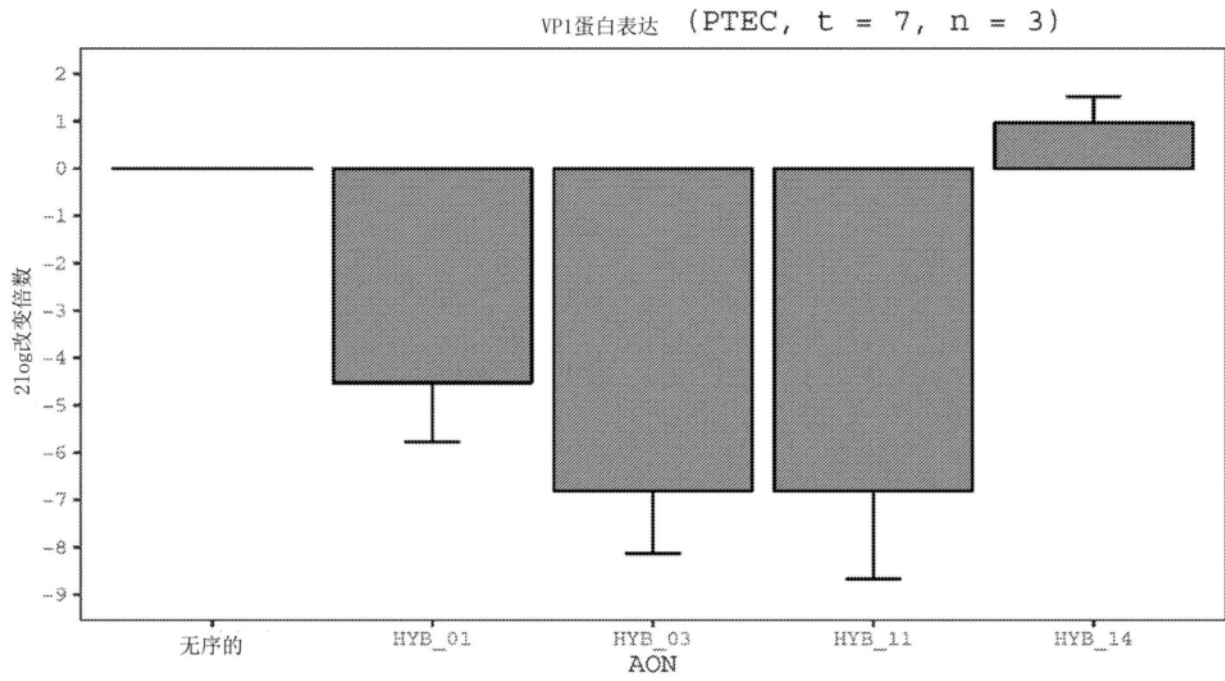


图31

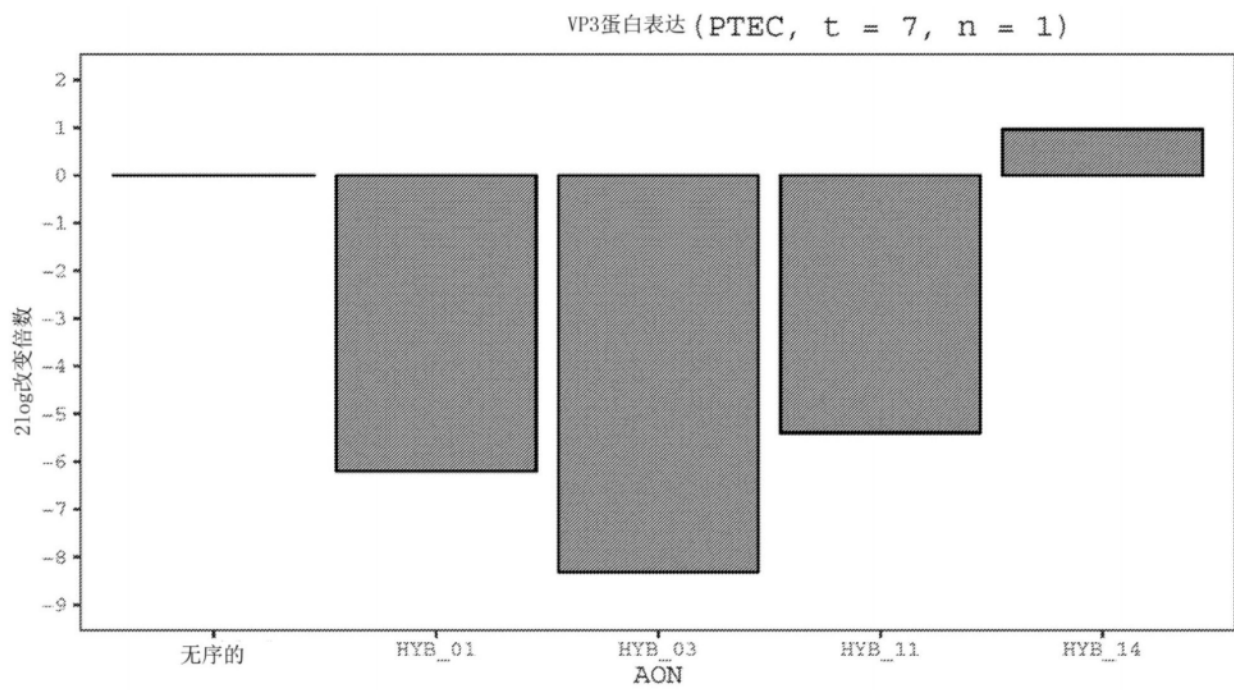


图32

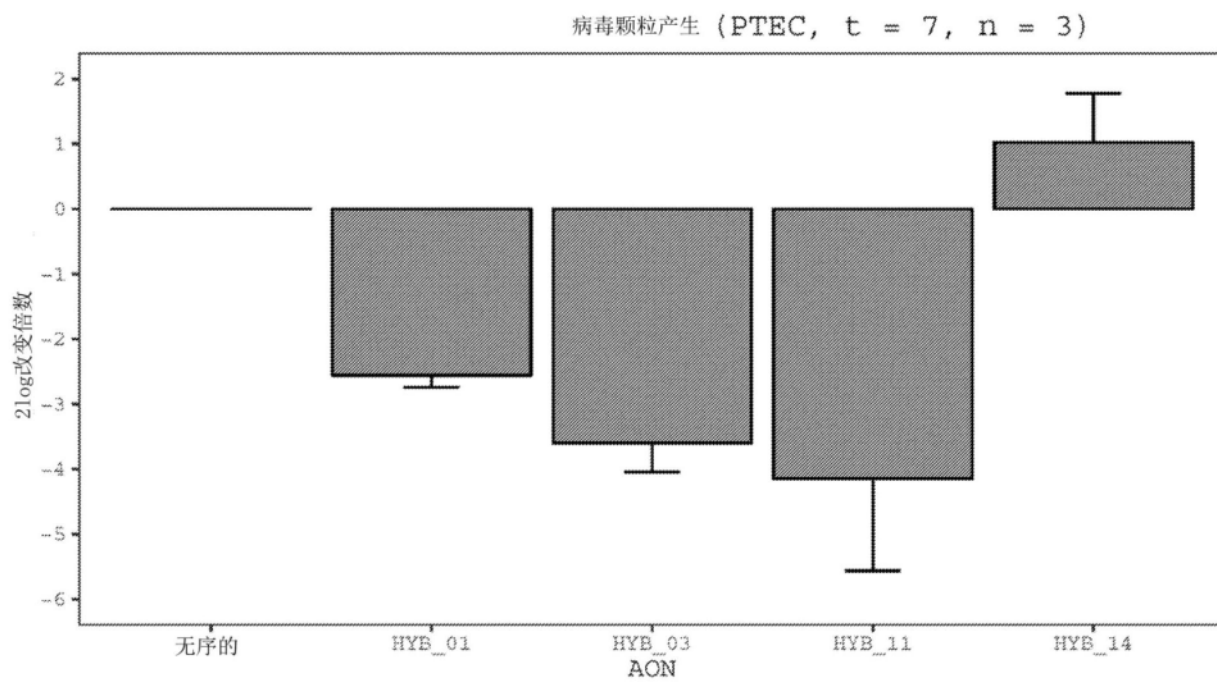


图33

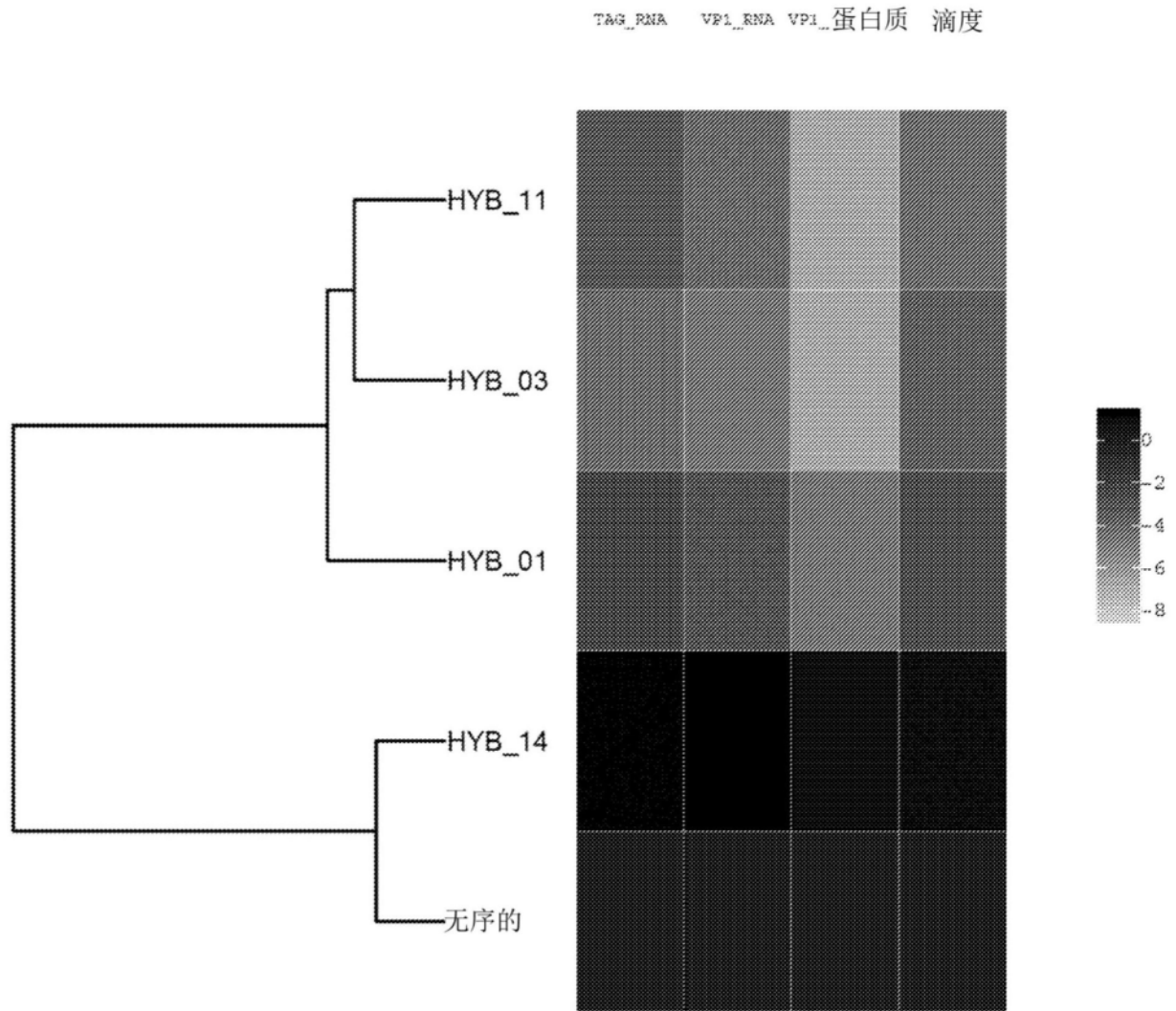


图34

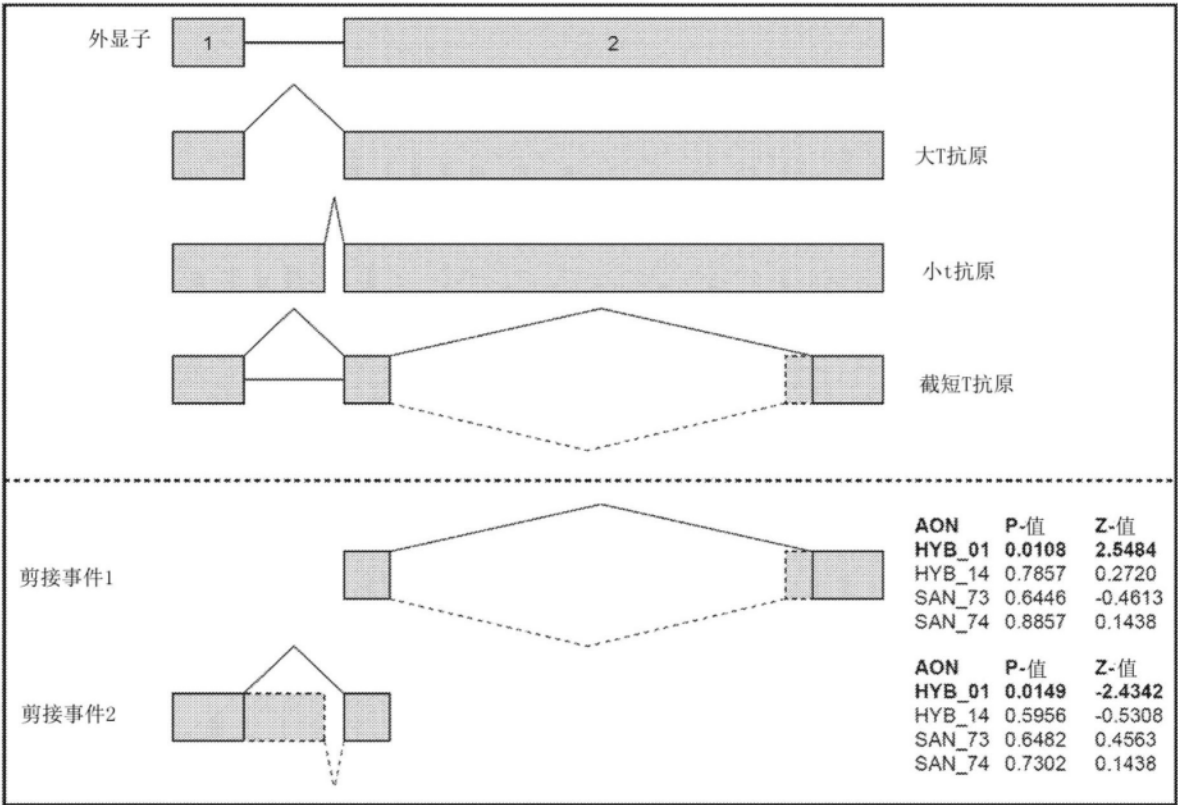


图35

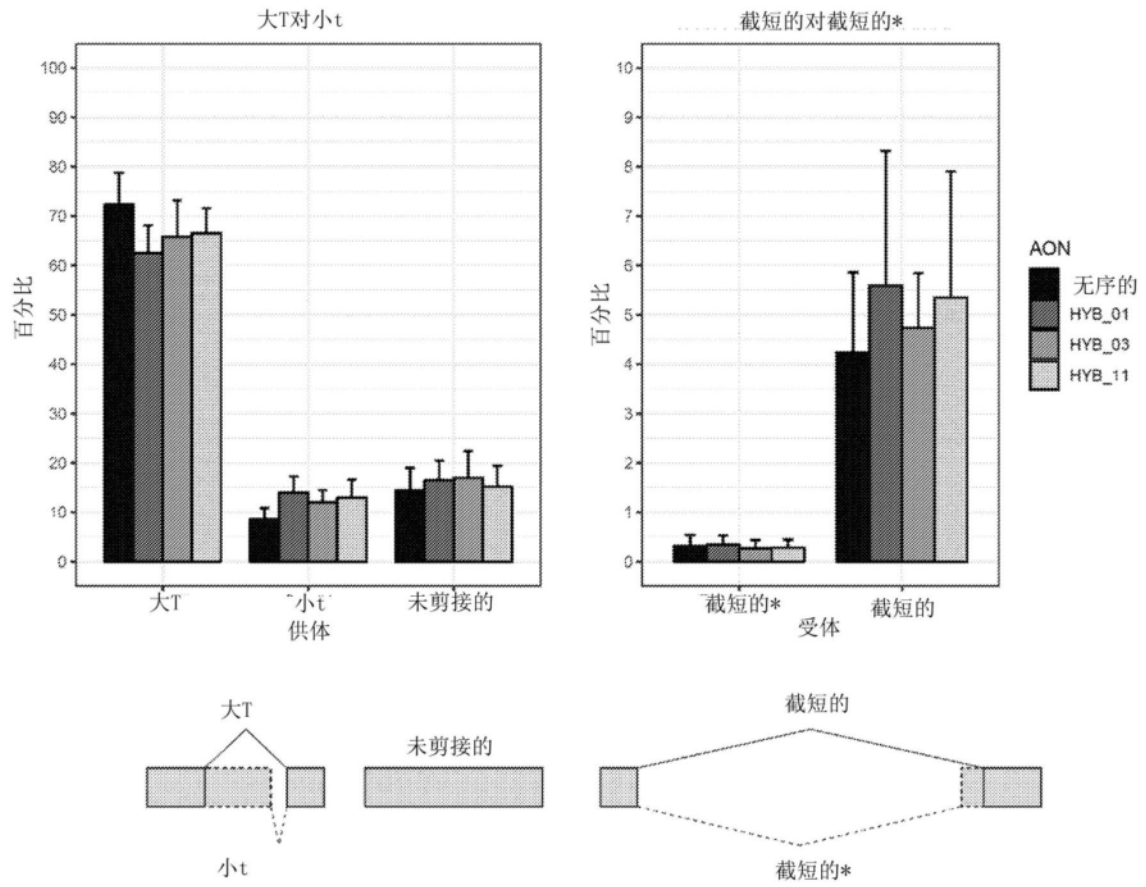
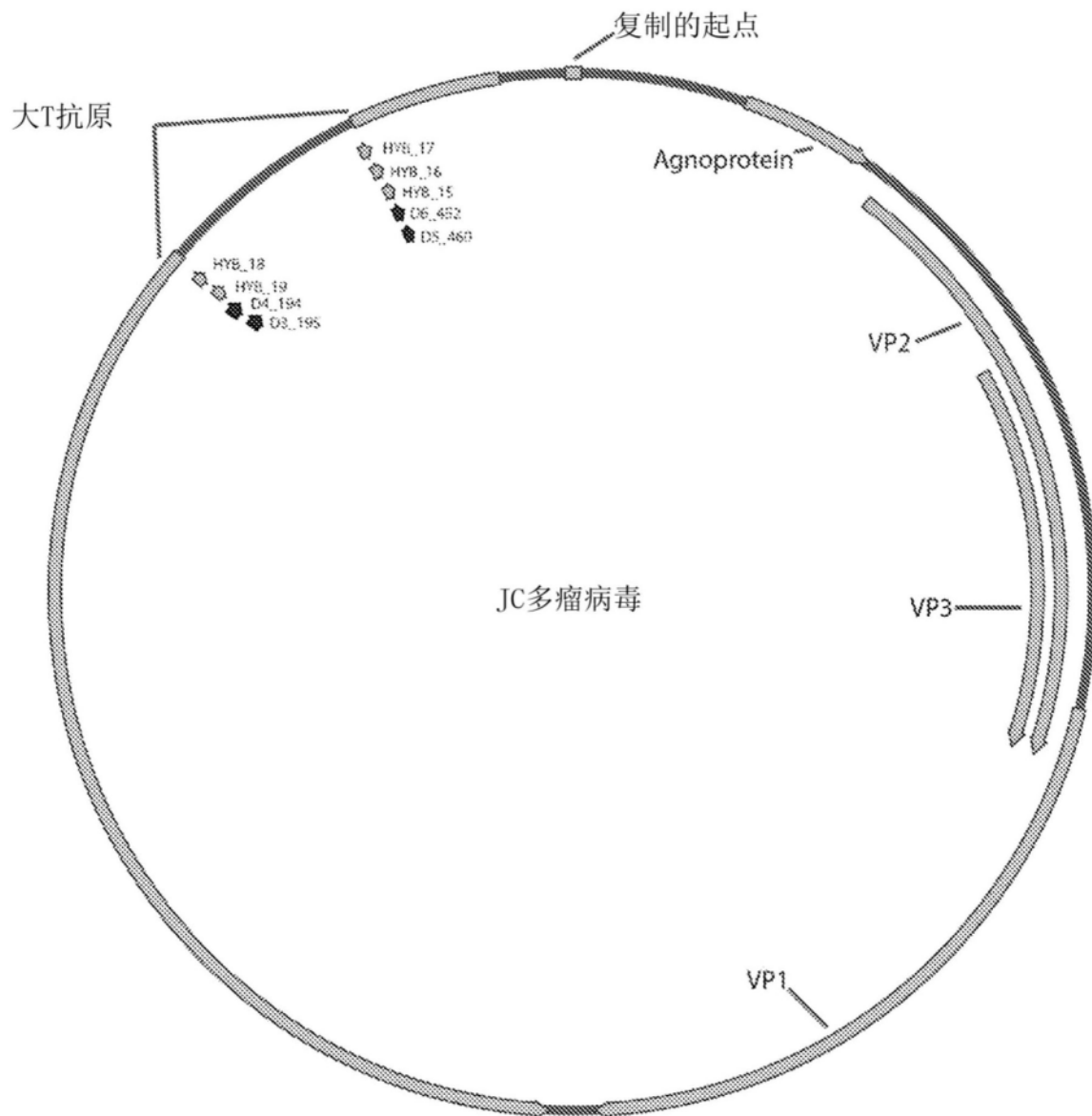


图36



AON	位置	序列
HYB_15	4769..4788	ACCUCUGAACUAUUCCAUGU
HYB_16	4765..4784	ACCAACCUCUGAACUAUUCC
HYB_17	4761..4780	CACAACCAACCUCUGAACUA
HYB_18	4409..4428	UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU
HYB_19	4412..4431	UCCAUAAGGUUGGCACCUAAA

图37(1)

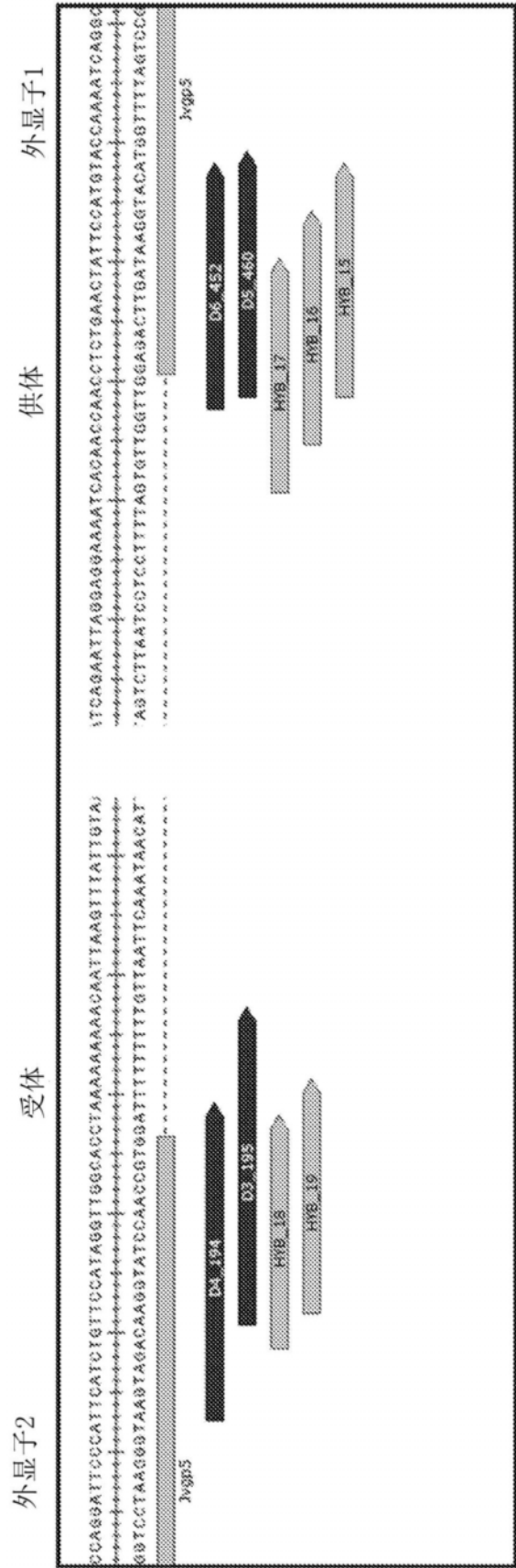


图37(2)

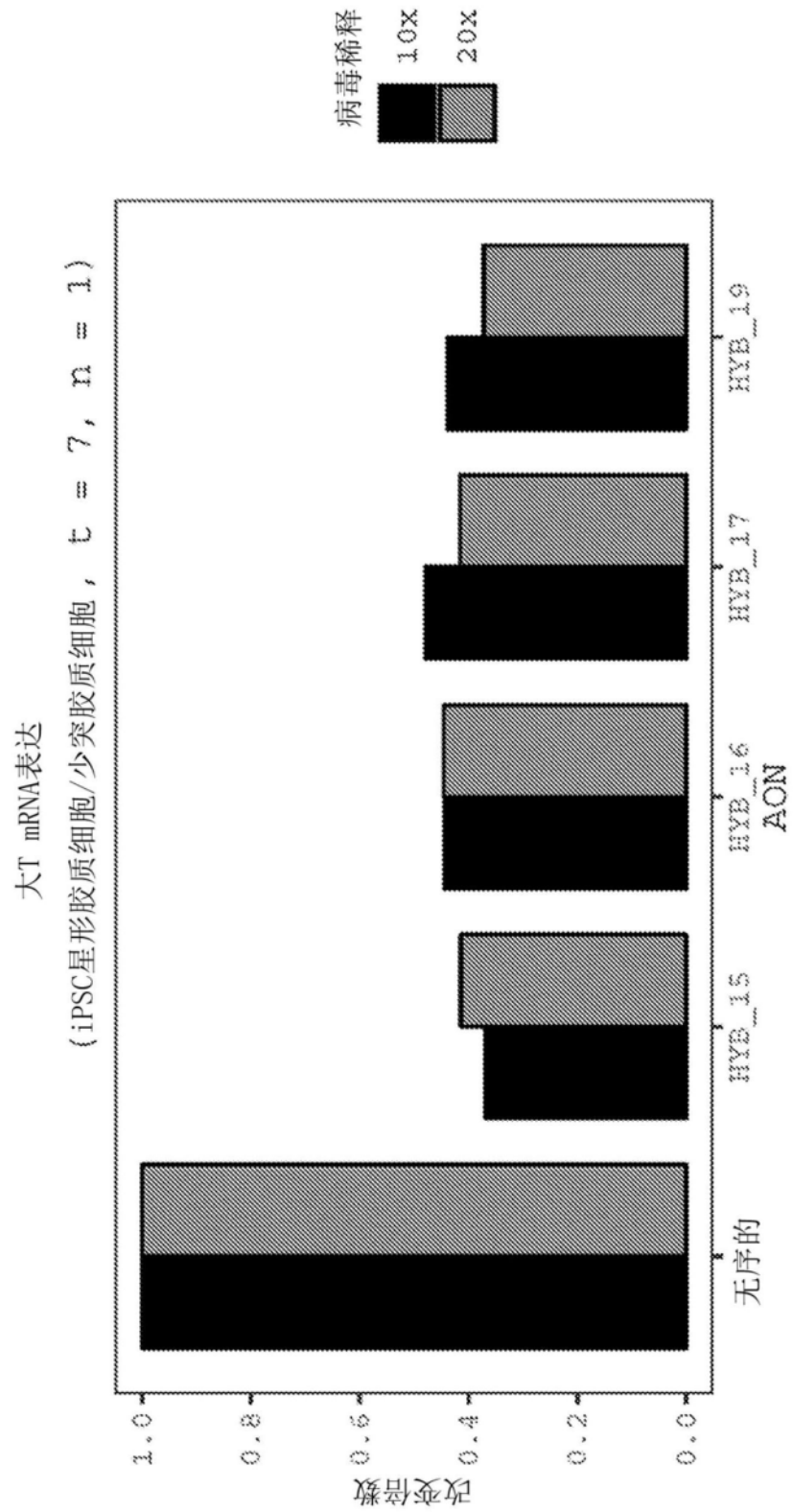


图38

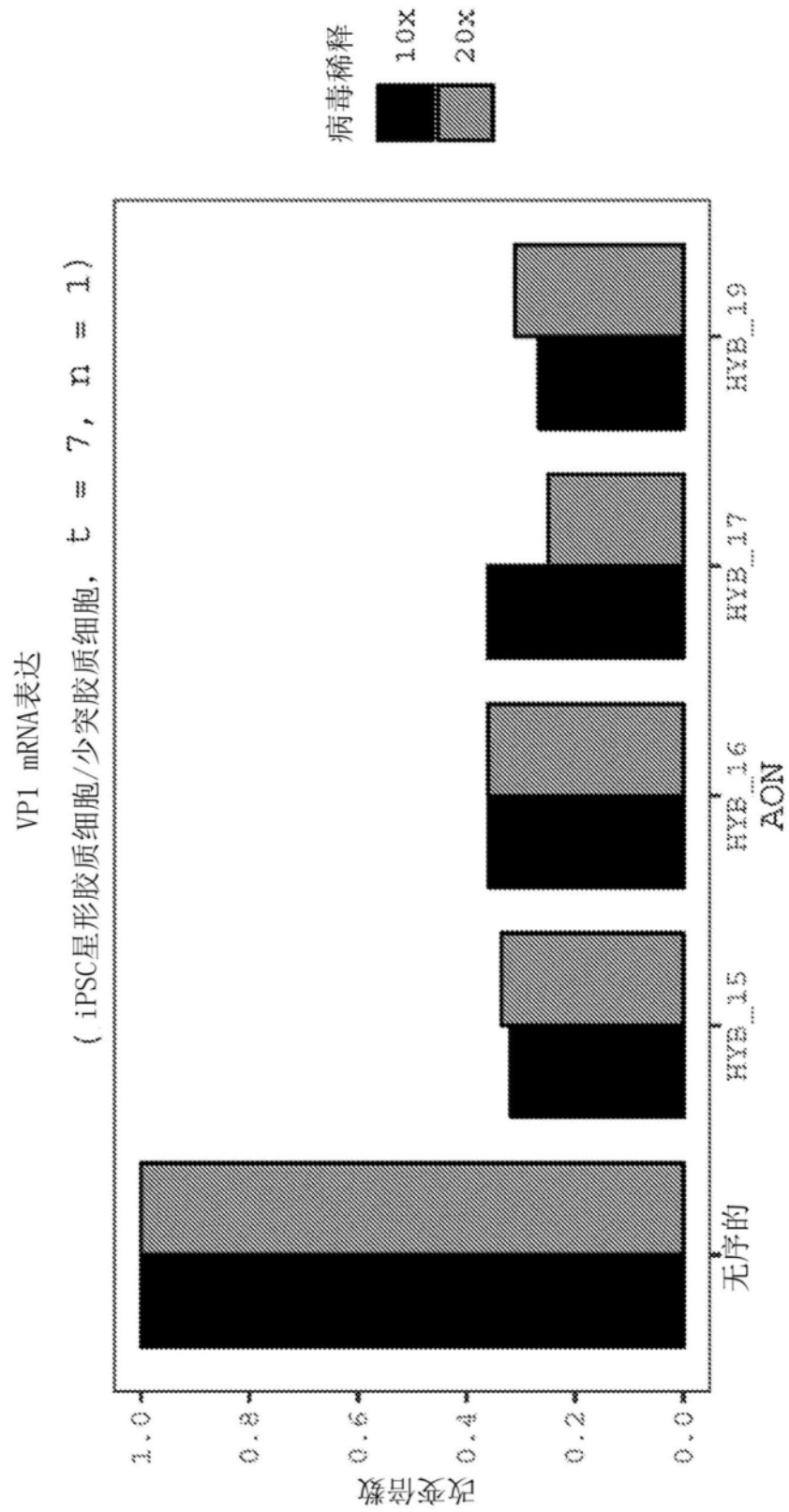


图39

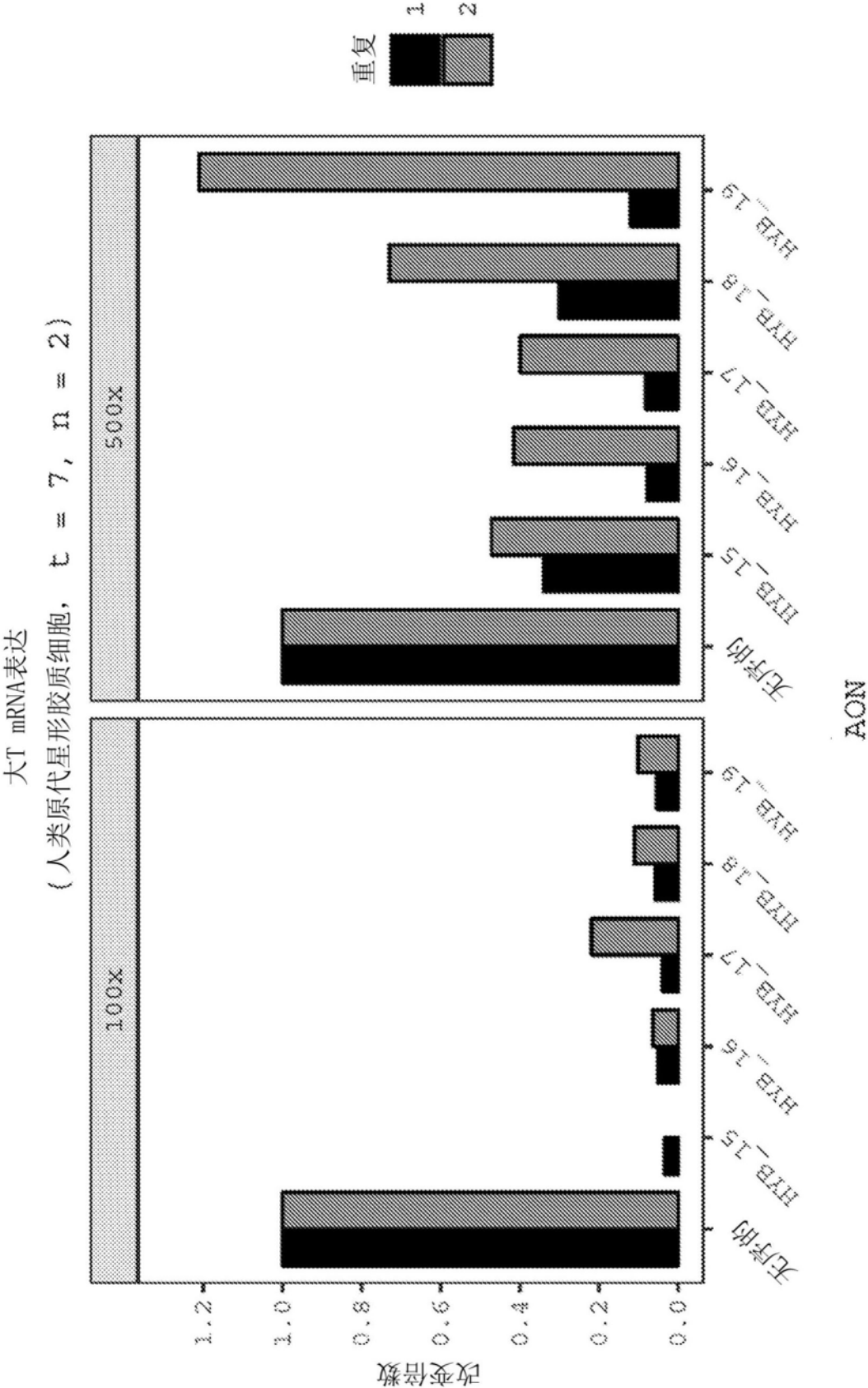


图40

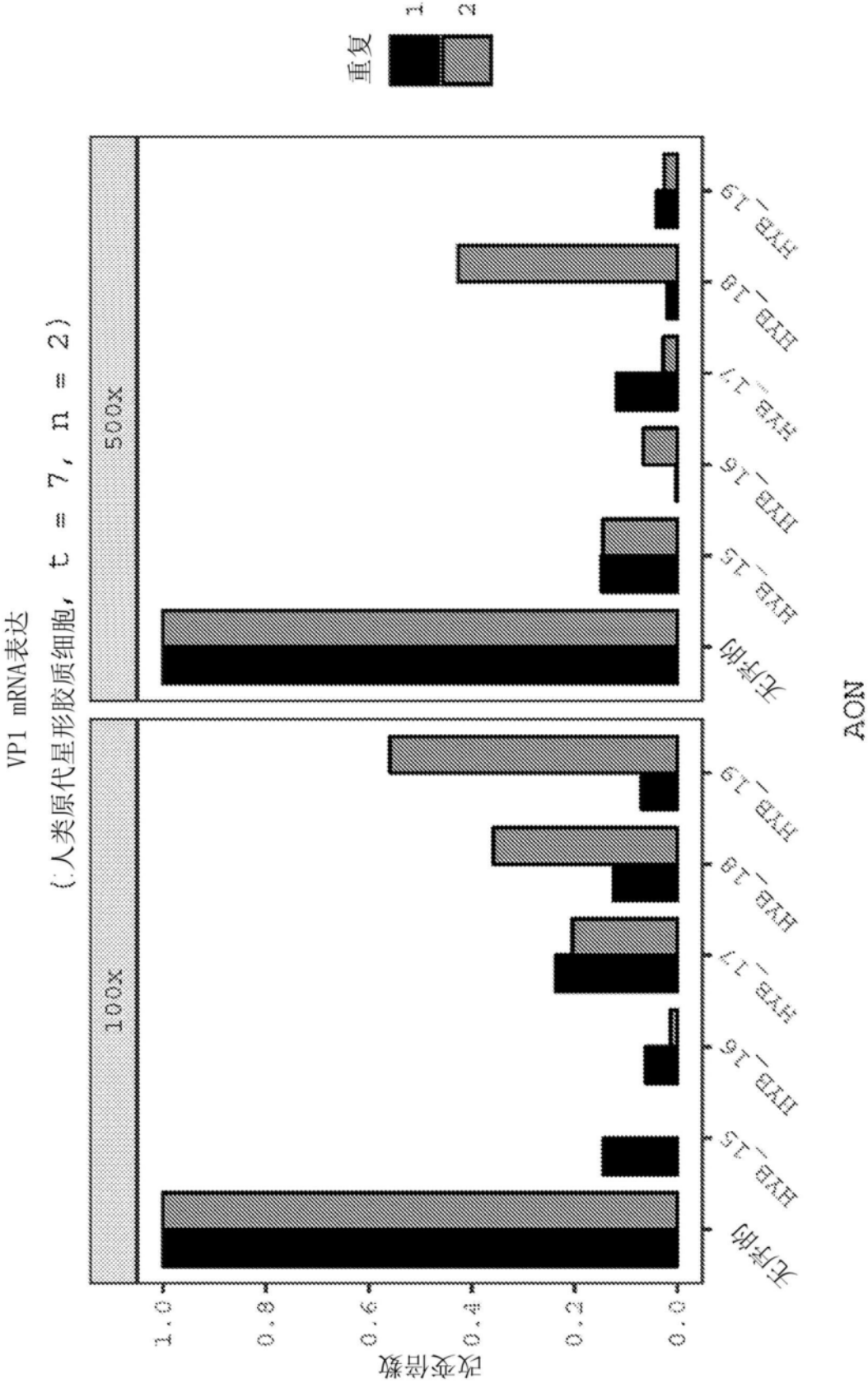


图41

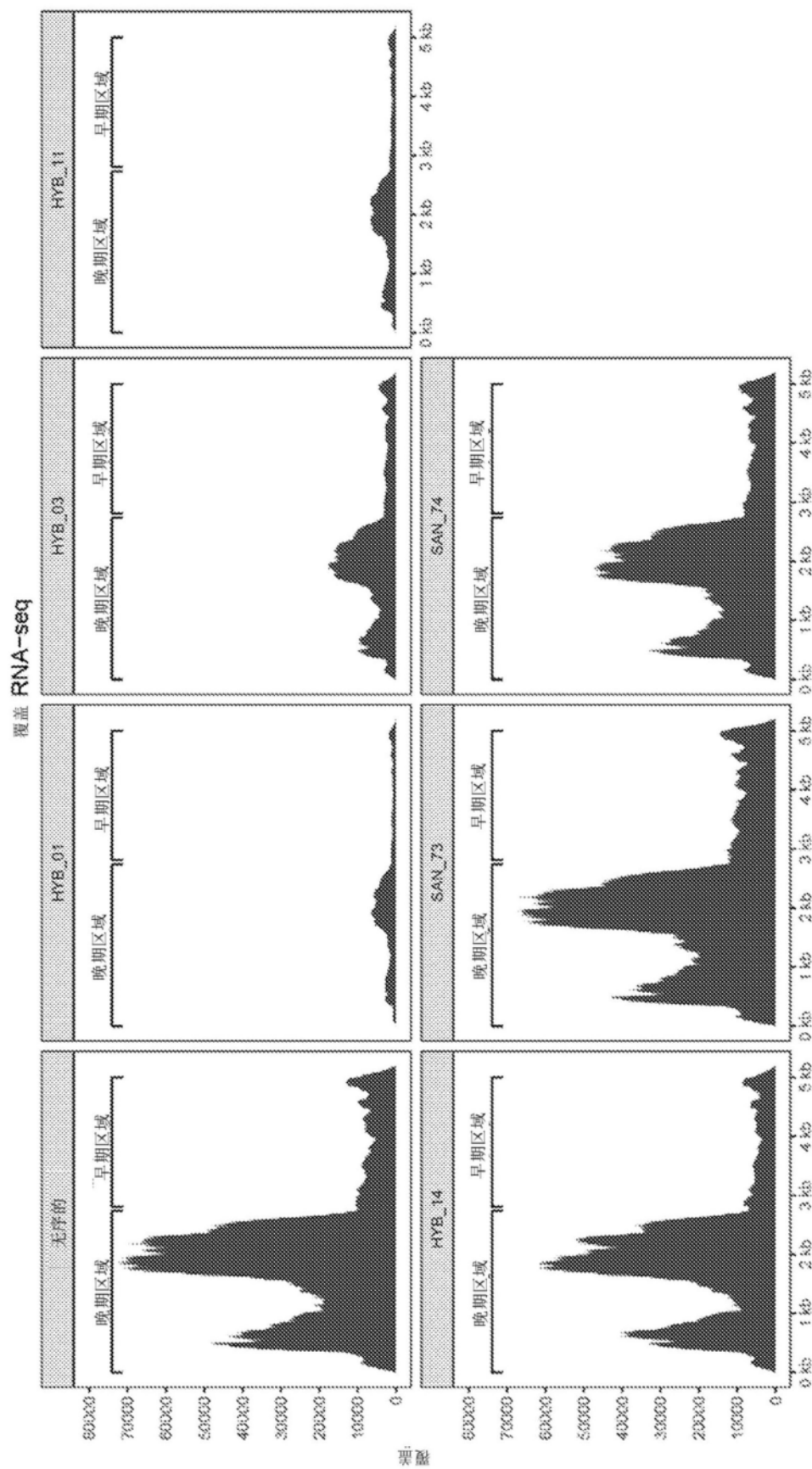


图42

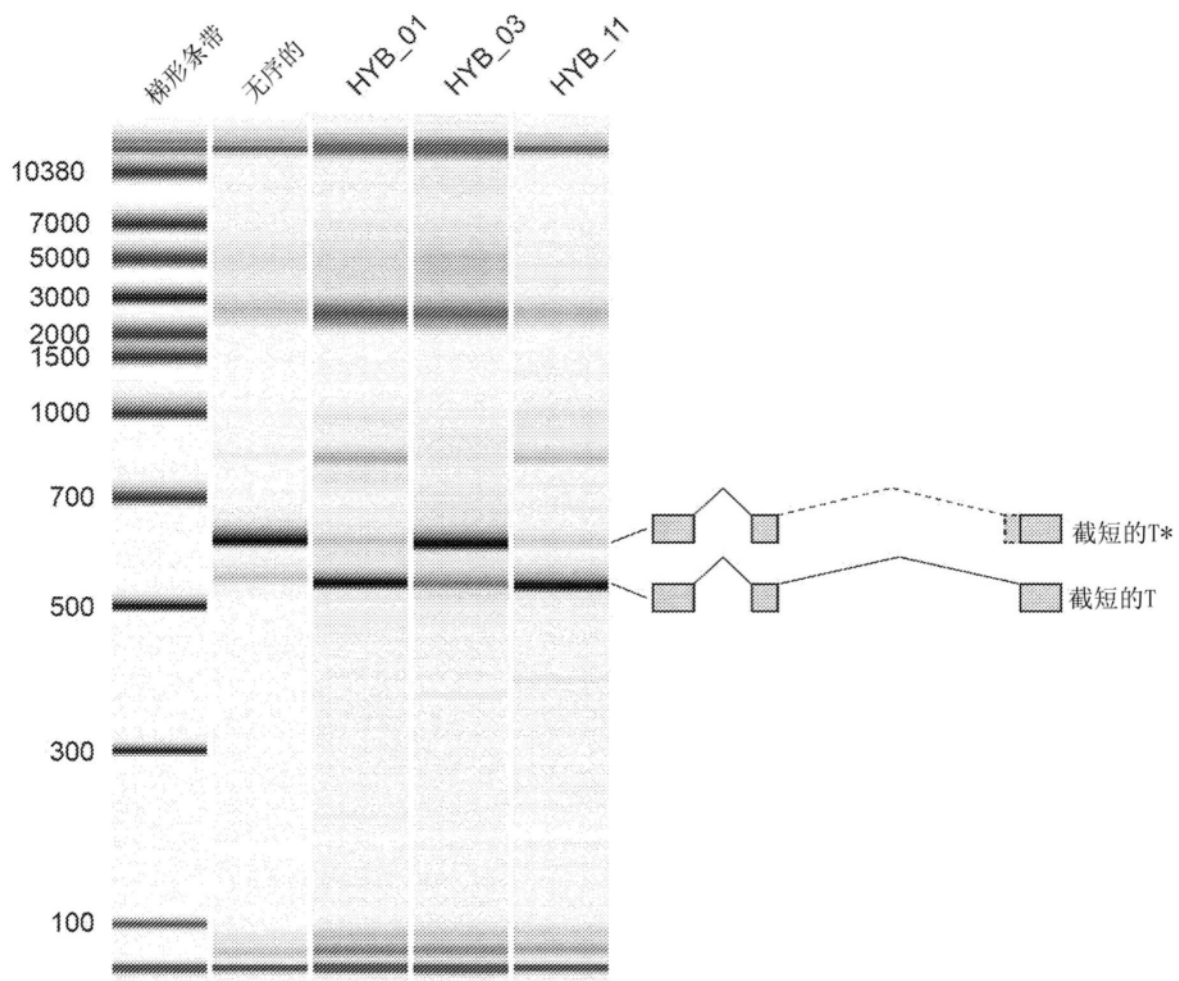


图43

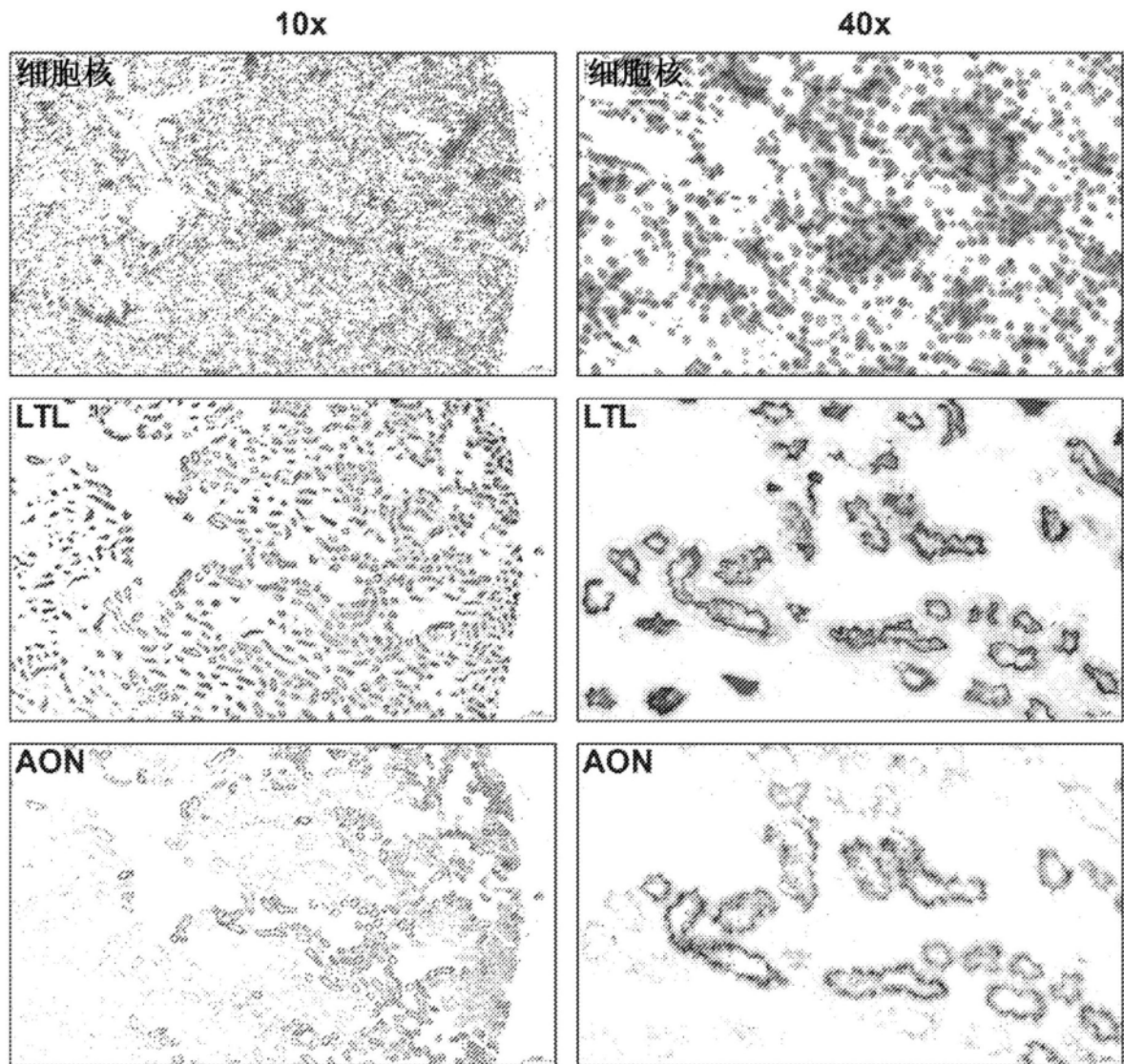


图44

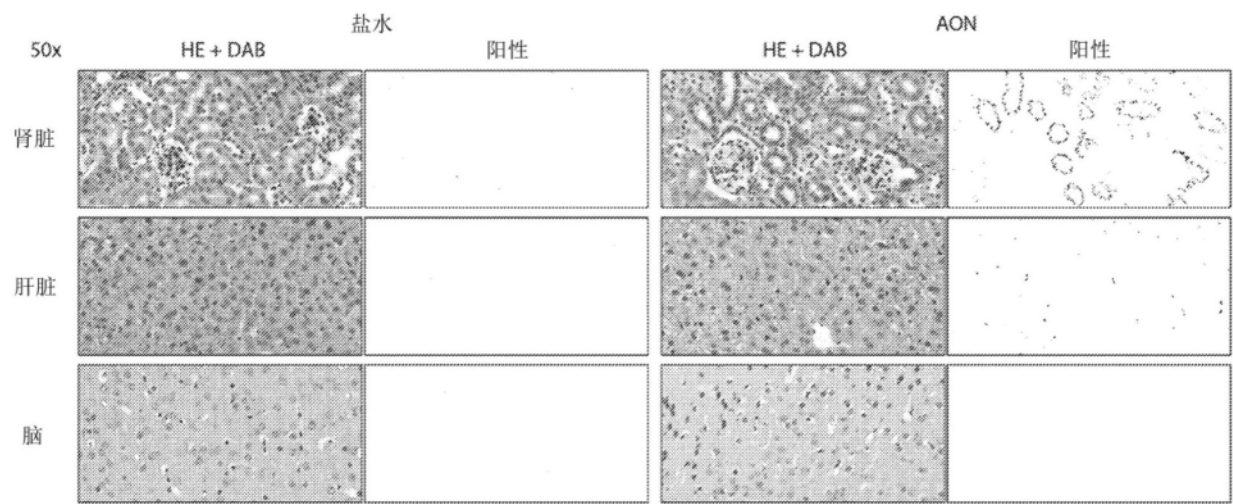


图45