



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115287301 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202210722790.9

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2017.03.03

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/303,047 2016.03.03 US

62/394,720 2016.09.14 US

62/406,913 2016.10.11 US

(62) 分案原申请数据

201780014840.5 2017.03.03

(71) 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

申请人 沃雅戈治疗公司

(72) 发明人 R·M·科廷 S·切基尼

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 吴小璜

权利要求书1页 说明书49页

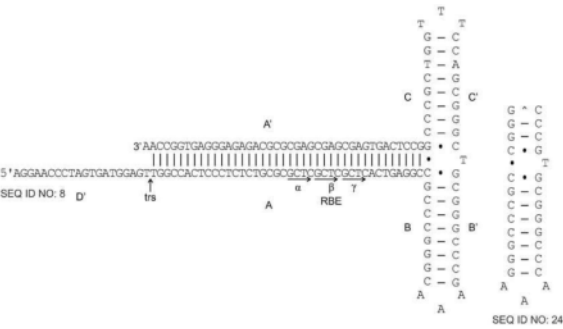
序列表13页 附图18页

(54) 发明名称

用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA

(57) 摘要

本申请涉及用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA核酸,具体地,本申请的诸方面均涉及这样的核酸,所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,其中一个自身互补序列由形成二个相反的纵向对称茎-环的横臂序列中断,并且其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。本申请还提供向细胞递送所述核酸的方法。



1. 核酸, 包含旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中所述自身互补序列由形成二个相反的纵向对称茎-环的横臂序列中断, 所述相反的纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中第二中断型自身互补序列由截短的横臂序列中断。

3. 核酸, 包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断, 所述相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分, 其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的核酸, 其中所述中断型自身互补序列长度在40至1000个核苷酸范围内。

5. 根据权利要求4所述的核酸, 其中所述中断型自身互补序列长度在100至160个核苷酸范围内。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的核酸, 其中所述横臂序列具有生理条件下-12kcal/mol至-30kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

7. 根据权利要求6所述的核酸, 其中所述横臂序列具有生理条件下-20kcal/mol至-25kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

8. 根据前述任一项权利要求所述的核酸, 其中所述相反纵向对称茎-环每者具有长度在3至15个碱基对范围内的茎部分。

9. 根据前述任一项权利要求所述的核酸, 其中所述相反纵向对称茎-环每者具有长度在8至10个碱基对范围内的茎部分。

10. 根据前述任一项权利要求所述的核酸, 其中每个环部分具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸。

## 用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA

[0001] 本申请是申请日为2017年3月3日、申请号为2017800148405、发明名称为“用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA”的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35 U.S.C.119 (e) 要求2016年3月3日提交的名为“用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA”的美国临时申请系列号62/303,047、2016年9月14日提交的名为“用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA”的美国临时申请系列号62/394,720和2016年10月11日提交的名为“用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA”的美国临时申请系列号62/406,913的权益。每篇所述申请的完整内容通过引用方式并入本文。

[0004] 背景

[0005] 当前的基因递送载体具有几个缺点。病毒和细菌衍生的基因递送载体均可能诱导患者的先天免疫应答和适应性免疫应答。例如,质粒DNA (pDNA) 和微型环状DNA (mcDNA) 载体一般具有真核DNA中不存在的原核DNA甲基化图谱。另外,在脊椎动物细胞中脂多糖 (LPS) 和细菌衍生的其他分子由先天免疫应答模式识别受体 (PRR) 识别为病原体相关分子模式 (PAMP),这导致细胞基因响应于侵入性微生物病原体而激活。质粒DNA在构象上具有独特的细菌性;最接近的哺乳动物结构物是线粒体基因组或在细胞器中区隔化、未暴露于胞质PRR的双链环状DNA。在另一个例子中,重组腺联病毒 (rAAV) 可以诱导针对已加工衣壳抗原的T细胞应答或由循环型免疫球蛋白和非Ig糖蛋白中和。病毒载体也具有有限的转基因携带能力并且其生产耗费人力、昂贵和费时。因此,需要用于基因递送的改进的组合物和方法。

[0006] 概述

[0007] 在一些方面,本公开涉及以下发现:编码旁侧有某些类型非对称末端(例如,非对称中断型自身互补序列(asymmetric interrupted self-complementary sequences))的异源核酸插入物的核酸的复制导致非对称末端(例如,非对称中断型自身互补序列)共价连接并导致末端封闭型线性双链体DNA (ceDNA) 的新构象产生。在一些实施方案中,可以轻易(例如,大量)产生具有非对称中断型自身互补序列的核酸,同时避免与其他基因治疗载体(例如,基于病毒的载体)相关的放大问题。考虑到为了增殖相似核酸而需要在内部回文区域中具有对称性的报道,这个结果令人惊讶。

[0008] 在一些实施方案中,与其他基因治疗载体(例如,具有对称性中断型自身互补序列的核酸)相比,如本文中公开的具有非对称中断型自身互补序列的核酸可以具有改善的遗传稳定性。在一些实施方案中,与其他载体(例如,具有对称性中断型自身互补序列的核酸)相比,如本文中公开的具有非对称中断型自身互补序列的核酸可以具有改善的安全特征。例如,在一些实施方案中,与其他载体(例如,具有对称性中断型自身互补序列的核酸)相比,施用具有非对称中断型自身互补序列的核酸可由于构建体的非对称性质而较少可能产生插入性诱变。

[0009] 在某些实施方案中,与其他载体(例如,具有对称性中断型自身互补序列的核酸)相比,经工程化以表达转录物(例如,编码蛋白质或有功能核酸的转录物)的具有非对称中

断型自身互补序列的核酸可以具有改善的表达,因为构建体的非对称性质令其在细胞中较不可能与可以降低这类载体的转录能力的某些酶(例如,解旋酶,如,RecQ解旋酶)相互作用。

[0010] 在一些实施方案中,与施用其他基因治疗载体(例如,质粒DNA载体和病毒载体)相比,施用如本文所述的具有非对称中断型自身互补序列的核酸较少可能在受试者中诱导免疫应答。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸可以在多个时间(例如,在长期基因疗法的情形)下施用至受试者,而不诱导明显的免疫应答,所述免疫应答本将阻止或抑制核酸编码的基因产物的表达和/或活性。

[0011] 在一些方面,本公开提供一种核酸,所述核酸包含旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点(operative terminal resolution site)和滚环复制蛋白结合元件,其中自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0012] 在一些实施方案中,中断型自身互补序列衍生自一个或多个生物或病毒血清型,包括衍生自细小病毒(parvoviruses)、依赖性病毒(dependovirus)等。例如,在一些实施方案中,核酸包含衍生自AAV2血清型的第一中断型自身互补序列和衍生自AAV9血清型的第二中断型自身互补序列。在另一个非限制性例子中,如本公开所描述的核酸可以包含来自AAV2血清型的第一中断型自身互补序列和来自细小病毒(例如,细小病毒B19)的第二中断型自身互补序列。在一些实施方案中,中断型自身互补序列衍生自相同的生物或病毒血清型但具有不同的长度,或前者的组合。在一些实施方案中,所述核酸包含由截短的横臂序列中断的第二中断型自身互补序列。例如,在一些实施方案中,核酸包含长度145个碱基对的衍生自AAV2血清型的第一自我中断型自身互补序列,和长度短于145个碱基对的衍生自AAV2血清型的第二中断型自身互补序列(例如,截短的横臂序列(truncated cross-arm sequence))。

[0013] 在一些方面,本公开提供一种核酸,所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环(two opposing, lengthwise-symmetric stem-loops)的横臂序列(cross-arm sequence)中断,相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。

[0014] 在一些实施方案中,中断型自身互补序列长度在40至1000个核苷酸范围内。在一些实施方案中,中断型自身互补序列长度在100至160个核苷酸范围内。

[0015] 在一些实施方案中,横臂序列具有生理条件下-12kcal/mol至-30kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。在一些实施方案中,横臂序列具有生理条件下-20kcal/mol至-25kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0016] 在一些实施方案中,相反纵向对称茎-环每者具有长度3至15碱基对范围内的茎部分。在一些实施方案中,相反纵向对称茎-环每者具有长度8至10个碱基对范围内的茎部分。

[0017] 在一些实施方案中,每个环部分具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中,每个环部分具有三个脱氧核糖核苷酸。

[0018] 在一些实施方案中,一个环部分具有三个脱氧胸苷,另一个环部分具有三个脱氧腺苷。

[0019] 在一些实施方案中,滚环复制蛋白结合元件是Rep结合元件(RBE)。在一些实施方案中,RBE包含序列5'-GCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO:1)。

[0020] 在一些实施方案中,有效的末端解析位点包含序列5'-TT-3'。在一些实施方案中,有效末端解析位点的3'末端距滚环复制蛋白结合元件的5'末端15至25个核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中,截短的横臂序列形成二个相反纵向非对称茎-环。在一些实施方案中,相反纵向非对称茎-环之一具有长度8至10个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。在一些实施方案中,一个相反纵向非对称茎-环具有长度少于8个碱基对的茎部分和具有2至5个脱氧核糖核苷酸的环部分。在一些实施方案中,一个纵向非对称茎-环具有长度小于3个碱基对的茎部分。在一些实施方案中,一个纵向-非对称茎-环(lengthwise-asymmetric stem-loop)具有具备3个或更少脱氧核糖核苷酸的环部分。在一些实施方案中,截短的横臂序列具有生理条件下0kcal/mol至-22kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0022] 在一些实施方案中,异源核酸插入物经工程化以表达蛋白质或功能性RNA。在一些实施方案中,异源核酸插入物是作为底物用于基因编辑的无启动子构建体。在一些实施方案中,无启动子构建体为TALENs、锌指核酸酶(ZFN)、巨核酸酶(meganucleases)、Cas9和其他基因编辑蛋白提供底物。在一些实施方案中,无启动子构建体旁侧有与细胞DNA存在同源性以促进同源重组入细胞基因组中的核酸。在一些实施方案中,构建体旁侧有与细胞DNA存在同源性以促进同源重组入细胞基因组中的核酸。

[0023] 在一些实施方案中,核酸处于长度500至50,000个核苷酸范围内。在一些实施方案中,核酸处于长度500至10,000个核苷酸范围内。在一些实施方案中,核酸处于长度1000至10,000个核苷酸范围内。在一些实施方案中,核酸处于长度500至5,000个核苷酸范围内。

[0024] 在一些方面,本公开提供一种组合物,其包含如本公开所描述的多个核酸。在一些实施方案中,所述多个核酸为末端对末端连接(linked end-to-end)。在一些方面,本公开提供一种组合物,其包含如本公开所描述的核酸和可药用运载体(carrier)。

[0025] 在一些方面,本公开提供一种组合物,其包含:含有单个亚单位的单聚体核酸,和含有两个或更多个亚单位的至少一种多聚体核酸,其中单聚体核酸的每个亚单位和至少一种多聚体核酸的每个亚单位包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。在一些实施方案中,每个多聚体具有至少一个且在一些情况下仅一个自身互补的末端回文。

[0026] 在一些实施方案中,至少一种多聚体核酸包含二个亚单位。在一些实施方案中,多聚体核酸具有不多于二个亚单位。在一些实施方案中,所述二个亚单位按照尾-对-尾构型或头-对-头构型或头-对-尾构型连接。

[0027] 在一些方面,本公开提供了包含本公开所述核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞还包含与核酸的滚环复制蛋白结合元件选择性结合的滚环复制蛋白。

[0028] 在一些实施方案中,本公开提供向细胞递送异源核酸的方法,所述方法包括向所

述细胞递送本公开所述的核酸。

[0029] 在一些方面,本公开提供向受试者递送异源核酸的方法,所述方法包括向所述受试者递送本公开所述的核酸,其中所述核酸的递送在受试者中不激发针对该核酸的获得性免疫应答。在一些实施方案中,免疫应答是体液应答。在一些实施方案中,免疫应答是细胞应答。

[0030] 在一些实施方案中,异源核酸在多个时间被递送至受试者。在一些实施方案中,向受试者递送(例如,施用)异源核酸的时间次数在2至10次范围内。在一些实施方案中,向受试者递送(例如,施用)异源核酸的时间次数是每小时一次、每日一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次、半年一次或每年一次。在一些实施方案中,向受试者递送(例如,施用)异源核酸的时间次数是维持临床(例如,治疗)益处所要求的时间次数。

[0031] 在一些方面,本公开提供向受试者递送异源核酸的方法,所述方法包括向受试者递送本公开所述的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是血细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是祖细胞(例如,造血干细胞,HSC)、髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,在多个时间递送宿主细胞。在一些实施方案中,依据宿主细胞的半寿期确定在多个时间下递送宿主细胞的频率。在一些实施方案中,在多个时间下递送宿主细胞以实现(例如,实现和维持)治疗益处。

[0032] 在一些方面,本公开提供一种制备核酸的方法,所述方法包括:(i)向容许性细胞引入核酸,所述核酸编码旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分;和,(ii)维持容许性细胞处于容许性细胞中的滚环复制蛋白质启动产生核酸的多个拷贝的条件下。

[0033] 在一些实施方案中,该方法还包括纯化所述核酸的多个拷贝的步骤。在一些实施方案中,纯化过程包括使核酸与硅胶树脂接触。

[0034] 在一些实施方案中,滚环复制蛋白选自野生型AAV Rep 78、AAV Rep 52、AAV Rep 68和AAV Rep 40。在一些实施方案中,滚环复制蛋白集合包括来自AAV Rep 78和AAV Rep 68的至少一种和来自AAV Rep 52和AAV Rep 40的一种。在一些实施方案中,滚环复制蛋白是野生型AAV Rep蛋白的功能上等同的衍生物,包括截短的蛋白质或融合蛋白。

[0035] 在一些实施方案中,容许性细胞不是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,容许性细胞是昆虫细胞系或其他无脊椎动物物种细胞系、酵母细胞系或细菌细胞系。在一些实施方案中,容许性细胞(permissive cell)用于产生例如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)幼虫。在一些实施方案中,包涵体化的重组的苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrosis virus*,AcMNPV)已经用来感染草地贪夜蛾幼虫以产生重组蛋白,例如通过用于在幼虫中产生蛋白质的现行良好制造实践(cGMP)方法。

[0036] 在一些实施方案中,滚环复制蛋白质由辅助病毒载体编码,任选地其中辅助病毒载体是苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒(AcMNPV)载体或杆状病毒表达载体(baculovirus expression vectors,BEV)。

[0037] 在一些方面,本公开提供一种制备核酸的方法,所述方法包括:向容许性细胞引入核酸,所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具

有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断,其中容许性细胞表达滚环复制蛋白,但是不表达能够将复制型核酸副本包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白;并且在其中滚环复制蛋白质在容许性细胞中复制核酸的条件下维持容许性细胞。

[0038] 在一些方面,本公开提供一种制备核酸的方法,所述方法包括:向容许性细胞引入核酸,所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断,其中容许性细胞表达滚环复制蛋白,但是不表达能够将所述核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白;和维持容许性细胞处于容许性细胞中的滚环复制蛋白质复制核酸的条件下。

[0039] 在一些实施方案中,该方法还包括从容许性细胞分离复制的核酸。

[0040] 在一些方面,本公开提供一种分析核酸的方法,所述方法包括:获得核酸制备物,所述核酸制备物包含从容许性细胞分离的核酸复制产物,其中容许性细胞包含含有旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物的核酸,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断,其中容许性细胞表达滚环复制蛋白,但是不表达能够将核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白,并且其中滚环复制蛋白与核酸的滚环复制蛋白结合元件结合并且复制核酸以产生核酸复制产物;并且确定一种或多种复制产物的理化特性。

[0041] 在一些实施方案中,理化特性是一个或每个自身互补序列的核苷酸序列。

[0042] 在一些实施方案中,理化特性是一种或多种复制产物的多聚化程度。在一些实施方案中,理化特性是核酸制备物中复制产物的单聚体形式和/或多聚体形式的化学计量。

[0043] 在一些实施方案中,理化特性是一种或多种复制产物对限制性核酸内切酶消化的敏感性。

[0044] 在一些实施方案中,理化特性是复制产物的二聚体形式的单体的极性,其中极性是头-对-头、头-对-尾或尾-对-尾。

[0045] 在一些实施方案中,理化特性是一种或多种复制产物的分子量或复制产物的片段的分子量。在一些实施方案中,分子量属于包含一个或每个自身互补序列的一个或多个复制产物的片段。在一些实施方案中,基于电泳迁移率测定分子量。在一些实施方案中,基于质谱法测定分子量。

[0046] 在一些实施方案中,分子量属于一个或多个复制产物的片段,并且其中在测定分子量之前,通过包括用聚合酶延长引物的反应扩增片段。在一些实施方案中,包括引物延长的反应是聚合酶链反应。

[0047] 附图简述

[0048] 图1A显示基于使稳定性最大化和减少Gibb自由能( $\Delta G$ , 负值表示自发形成), AAV2 ITR的理论二级结构。图1B显示AAV2 ITR的茎区中导致产生具有非对称末端的核酸分子的截短作用的几个非限制性例子。

[0049] 图2A-2B显示对称和非对称的末端开放型和末端封闭型双链体DNA (ceDNA) 分子的

图示。图2A显示具有对称性末端的核酸的几个非限制性例子(左侧框)和具有非对称末端的核酸的几个非限制性例子(例如,ceDNA)(右侧框)。图2B显示非对称末端区域引起核酸切割过程改变和病毒复制期间引起的链分离,导致形成末端封闭型双链体DNA分子(右)。

[0050] 图3显示一对非对称ITR的图形描述。在上部显示全长AAV2 ITR,并且在底部描述C茎部中具有截短的AAV2 ITR。全长和截短的ITR均包含有效的Rep结合元件(Rep-binding element,RBE)和有效的末端解析位点(Terminal resolution site,trs)。

[0051] 图4显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与眼病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。

[0052] 图5显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与血液疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。

[0053] 图6显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与肝脏疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。

[0054] 图7显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与肺疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。

[0055] 图8A-8D显示向眼部递送ceDNA。通过氯胺酮/赛拉嗪(100/10mg/kg)麻醉成年小鼠并且通过体积1-2 $\mu$ l经巩膜注射而在玻璃体内递送转染剂。在角膜上施加抗生素软膏以防止小鼠正在复苏时眼部干燥。允许小鼠在37度复苏并且随后放回小鼠室持续2周并通过CO<sub>2</sub>窒息法安乐死。剖取视网膜并加工用于铺片或切片。无需GFP抗体染色来检测转染的细胞。图8A显示小鼠视网膜上GFP荧光的铺片。图8B显示视网膜截面中的GFP荧光。图8C显示视网膜截面中GFP荧光和神经胶质细胞着染情况。图8D显示在通过视网膜下电穿孔(顶部)和玻璃体内注射(底部)递送ceDNA(例如,具有非对称中断型自身互补序列的ceDNA)后小鼠视网膜中的GFP荧光。

[0056] 图9A-9C显示颅内注射与体内jetPEI配制的ceDNA-GFP(例如,具有非对称中断型自身互补序列和编码GFP的ceDNA)至大鼠纹状体内。图9A显示在注射后3周和20周GFP表达的染色;在3周和20周看到相似的GFP表达。图9B和图9C显示采用针对Iba1(图9B)和MHCII(图9C)的抗体(Ab)的免疫组织化学(IHC);在3周时,脑切片中未检出MHCII抗原或Iba1抗原。

[0057] 图10A-10B显示质粒DNA中断型自身互补序列的序列分析结果。图10C显示ceDNA-GFP的琼脂糖凝胶电泳分离情况。图的左侧显示未切割的ceDNA-GFP和Xho I消化的ceDNA-GFP的天然凝胶电泳。在天然凝胶中观察到单聚(约2.1kb)和二聚(约4.1kb)构象异构体产物;0.4末端片段在凝胶底部被杂质的荧光模糊。图的右侧显示未切割的ceDNA-GFP和Xho I消化的ceDNA-GFP的变性凝胶电泳。在变性凝胶中观察到二聚(约4.1kb)构象异构体产物;还观察到在0.8kb作为单链DNA分离的变性的末端0.4kb产物。

[0058] 发明详述

[0059] 在一些方面,本公开涉及向受试者(例如,受试者的细胞或受试者的组织)递送转基因的组合物和方法。本公开部分地涉及以下发现:编码旁侧有某些类型非对称末端序列(例如,非对称中断型自身互补序列)的异源核酸插入物的核酸复制导致非对称末端序列共价连接并导致末端封闭型线性双链体DNA(ceDNA)的新构象产生。在一些实施方案中,与目前使用的基因治疗载体相比,具有非对称中断型自身互补序列的核酸可以在受试者中具有



改善的表达、复制(例如,生产率)。在一些实施方案中,包含非对称中断型自身互补序列的核酸的改善的表达与RecQ解旋酶(例如,RecQ1)相较于具有非对称中断型自身互补序列的核酸而偏好与包含对称性中断型自身互补序列的核酸相互作用相关。

[0060] 在一些实施方案中,与目前使用的基因治疗载体相比,具有非对称中断型自身互补序列的核酸(例如,衍生自不同生物或病毒血清型,或衍生自相同生物或病毒血清型但是具有不同长度,或前者组合)可以在受试者中具有降低的插入诱变可能性。在一些实施方案中,相对于质粒DNA载体,施用具有非对称中断型自身互补序列的核酸在受试者中引起的免疫应答降低或不引起可检测的免疫应答。

[0061] “核酸”序列指DNA或RNA序列。在一些实施方案中,本公开的蛋白质和核酸是分离的。如本文所用,术语“分离”意指人工产生。在一些实施方案中,相对于核酸,术语“分离”指核酸:(i)通过例如聚合酶链反应(PCR)在体外扩增;(ii)通过分子克隆法重组产生;(iii)是纯化的,如通过限制性核酸内切酶切割和凝胶电泳分级或柱层析纯化;或(iv)是合成的,通过例如化学合成法合成。分离的核酸是通过本领域熟知的重组DNA技术轻易可操作的那种。因此,在已知5'和3'限制性位点或已经公开了聚合酶链反应(PCR)引物序列的载体中所含的核苷酸序列被视为是分离的,但是在其天然宿主中以其天然状态存在的核酸序列不视为分离的。分离的核酸可以是基本上纯化的,但不需要如此。例如,在克隆载体或表达载体内部的分离核酸不是纯的,在于它可以在其驻留的细胞中仅包含微小百分数的物质。然而随着本文中使用该术语,这种核酸是分离的,原因在于通过本领域普通技术人员已知的标准技术这是轻易可操作的。如本文相对于蛋白质或肽所用,术语“分离”指已经从其天然环境分离或人工产生的(例如,通过化学合成、通过重组DNA技术等)的蛋白质或肽。

[0062] 技术人员还将认识到,可以做出保守性氨基酸置换以提供衣壳蛋白的功能等同变体或同源物。在一些方面,本公开包括导致保守性氨基酸置换的序列改变。如本文所用,保守性氨基酸置换指这样的氨基酸置换,其不改变其中做出氨基酸置换的蛋白质的相对电荷特征或大小特征。可以根据用于改变多肽序列的方法制备变体,所述方法是本领域普通技术人员已知的,如可以在可以在编纂这类方法的以下参考文献中找到,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等人编著,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编著,John Wiley&Sons,Inc.,New York。例如,在一些实施方案中,氨基酸的保守性置换包括在以下组内部的氨基酸之间做出的置换:(a) M、I、L、V;(b) F、Y、W;(c) K、R、H;(d) A、G;(e) S、T;(f) Q、N;和(g) E、D。因此,可以对本文公开的蛋白质和多肽的氨基酸序列做出保守性氨基酸置换。

[0063] 中断型自身互补序列

[0064] 本公开部分地基于以下发现:具有非对称末端序列(例如,非对称中断型自身互补序列)的核酸形成末端封闭型线性双链体DNA结构物(例如,ceDNA),其一些实施方案中在目前可用的基因递送载体相比显示免疫原性降低。在一些实施方案中,ceDNA在天然条件下行为如同线性双链体DNA并且在变性条件下转化成单链环状DNA。不希望受任何具体理论约束,本公开描述的核酸(例如,ceDNA)在一些实施方案中可用于递送异源核酸插入物(例如,转基因)至受试者。

[0065] 在一些方面,本公开提供一种核酸,所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的

异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,每个相反纵向对称茎-环具有茎部分和环部分,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。

[0066] 如本文所用,术语“旁侧有”指第一中断型自身互补序列相对于异源核酸插入物上游(例如,5')安置和第二中断型自身互补序列相对于异源核酸插入物下游(例如,3')安置。例如,腺相关病毒基因组包含“旁侧有”反向末端重复序列(ITR)的rep基因和cap基因的可读框。

[0067] 如本文所用,术语“中断型自身互补序列”(interrupted self-complementary sequence)指编码具有被一个或多个非回文多核苷酸片段中断的回文(例如,如果二者均按相同的5'至3'方向“读取”,则与其互补链相同的连续多核苷酸片段)末端序列的核酸的多核苷酸序列。通常,编码一个或多个中断型回文序列的多核苷酸将自身回折,形成茎-环结构(例如,发夹环、“T”形环或“Y”形环),例如,如图1A中所示的AAV2 ITR结构和图2A中所示的示例性结构物。

[0068] 在一些实施方案中,中断型自身互补序列形成具有茎部序列和横臂序列的“T”形结构。在一些实施方案中,“横臂序列”形成二个相反(例如,相对于茎部序列)纵向对称茎-环,每个相反纵向对称茎-环具有茎部分和环部分。例如,在一些实施方案中,茎部序列通过多核苷酸序列的互补性(例如,回文)5'末端和3'末端杂交而形成(称作“A-A”),其中A-A'回文由横臂多核苷酸序列中断,所述的横臂多核苷酸序列由一对分别称作“B-B”和“C-C”的形成环的中断型回文序列形成,如图1A中所显示。在一些实施方案中,每个横臂的环部分(例如,由中断型回文序列B-B'和C-C'形成的环)由未配对的核苷酸(例如,未配对的脱氧核糖核苷酸)形成。应当理解,本公开描述的中断型自身互补序列可以包含多于二个(例如,3、4或更多个)横臂序列。

[0069] 中断型自身互补序列可以为任何大小,前提是该序列形成发夹环并且作为核酸复制(例如,DNA复制)的引物发挥作用。例如,中断型自身互补序列的长度可以范围从约20至约2000个核苷酸。在一些实施方案中,中断型自身互补序列的长度范围从约40至1000个核苷酸。在一些实施方案中,中断型自身互补序列具有至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900或达1000个核苷酸长度。在一些实施方案中,中断型自身互补序列的长度多于1000个核苷酸。在一些实施方案中,中断型自身互补序列的长度范围从约100至160个核苷酸。在一些实施方案中,中断自身互补核苷酸的长度范围从约115至约150个核苷酸。

[0070] 在一些方面,本公开涉及具有形成相反纵向对称茎-环的中断型自身互补序列的核酸。在一些实施方案中,相反纵向对称茎-环每者具有长度3至15碱基对范围内的茎部分。在一些实施方案中,相反纵向对称茎-环每者具有长度8至10个碱基对范围内的茎部分。在一些实施方案中,相反纵向对称茎-环每者具有长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸的茎部分。

[0071] 通常,茎-环结构的环部分包含至少2个未配对的核苷酸。在一些实施方案中,每个环部分具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸(例如,2、3、4、或5未配对的脱氧核糖核苷酸)。在一些实施方案中,本公开描述的横臂序列的每个环部分具有三个脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中,本公开描述的横臂序列的一个环部分具有三个脱氧胸苷,另一个环部分具

有三个脱氧腺苷。

[0072] 在一些方面,本公开涉及旁侧有核酸插入物的中断型自身互补序列,其中所述中断型自身互补序列相对于彼此是非对称的(例如,衍生自不同生物或病毒血清型,或衍生自相同生物或病毒血清型但是具有不同的长度,或前者组合)。在一些实施方案中,一对非对称自身互补序列中一者包含截短的横臂序列。如本文所用,“截短的横臂序列”指相对于旁侧有异源核酸序列的相应自身互补序列具有较短长度的横臂序列。相对于全长横臂序列,截短的横臂序列可以具有在1和50(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个)之间的核苷酸缺失。在一些实施方案中,相对于全长横臂序列,截短的横臂序列具有在1和30个之间的核苷酸缺失。在一些实施方案中,相对于全长横臂序列,截短的横臂序列含有在2和20个之间的核苷酸缺失。

[0073] 在一些实施方案中,截短的横臂序列形成二个相反纵向非对称茎-环。在一些实施方案中,截短的横臂序列的相反纵向非对称茎-环之一具有长度8至10个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。在一些实施方案中,截短的横臂序列的一个相反纵向非对称茎-环具有长度少于8个碱基对的茎部分和具有2至5个脱氧核糖核苷酸的环部分。在一些实施方案中,一个纵向非对称茎-环具有长度小于3个碱基对的茎部分。在一些实施方案中,一个纵向-非对称茎-环具有具备3个或更少脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0074] 通常,截短的横臂序列在A或A'区域不含有任何核苷酸缺失(例如,相对于未截短的横臂序列),从而不干扰DNA复制(例如,Rep蛋白结合RBE或在末端解析位点(terminal resolution site)产生切刻)。在一些实施方案中,截短的横臂序列在B、B'、C和/或C'区域具有一个或多个缺失。下文显示截短的横臂序列的几个非限制性例子:AAV2 ITR  $\Delta$ C-区域由括号指示;方括号内部的全部或部分缺失可以用来产生非对称中断型自身互补序列;下文,“RBE”指“Rep结合元件”。

C-区域	B-区域
$\Delta$	RBE'
5'cggg(cgaccaaaggtc)gcccg-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
5'cggg(cgaccaaaggtcg)cccg-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
5'gccc(gggcaaagccc)gggcg-t-cgggcgacctttgggtcgccc (SEQ ID NO: 3)	
[0075] 5'gccc(gggcaaagccc)gggcg-t-cgggcgacctttgggtcgccc (SEQ ID NO: 3)	
5'[cgggcgaccaaaggtcgccc]-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
5'[gcccgggcaaagcccgggcg]-t-cgggcgacctttgggtcgccc (SEQ ID NO: 3)	
5'[gcccgggcaaagcccgggcg]-t-cgggcgacctttgggtcgccc (SEQ ID NO: 3)	

[0076] 通常,形成发夹所要求的核酸热动力特性(例如,Gibbs自由能( $\Delta G$ )、G+C组成、A+T组成、解链温度、每条链的碱基组成、互补序列的长度、双链体区内部的未配对碱基和构成

环的未配对碱基)是本领域已知的,例如,如Bosco等人,Nucl.Acids Res.(2013)doi:10.1093/nar/gkt1089中公开;2013年11月12日首次在线发表。

[0077] 在一些实施方案中,横臂序列具有生理条件下-12kcal/mol至-30kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。在一些实施方案中,横臂序列具有生理条件下-20kcal/mol至-25kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。在一些实施方案中,相对于全长横臂序列,截短的横臂序列的热动力特性可以是相同(例如,同一的),即便它们可能具有造成它们非对称的序列差异。在一些实施方案中,截短的横臂序列的热动力特性可以与全长横臂序列不同。例如,在一些实施方案中,截短的横臂序列具有在生理条件下0kcal/mol至大于-22kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0078] 如本文所用,术语“有效的”指核酸序列执行其预期功能的能力。例如,“有效的结合区”(operative binding region)是对其预期靶(例如,蛋白质或核酸)保留结合功能的核酸序列。在另一个例子中,“有效的切割位点”是保留其受特定酶或酶类特异性切割的能力的核酸序列。

[0079] 本公开的各方面涉及以下发现:形成末端封闭型线性双链体DNA(ceDNA)需要包含有效滚环复制蛋白结合元件的自身互补核酸序列。如本文所使用,“滚环复制蛋白结合元件”指滚环复制蛋白识别和结合的保守核酸序列(例如,基序),所述的滚环复制蛋白是启动滚环(例如,滚动发夹)复制的病毒非结构蛋白(NS蛋白)。滚环(例如,滚动发夹)复制由Tattersall等人Nature 2009,263,pp.106-109描述。NS蛋白的例子包括但不限于AAV Rep蛋白(例如,Rep78、Rep68、Rep52、Rep40)、细小病毒非结构蛋白(例如,NS2)、轮状病毒非结构蛋白(例如,NSP1)和浓核病毒非结构蛋白(例如,PfDNV NS1)。在一些实施方案中,滚环复制蛋白结合元件是Rep结合元件(RBE)。在一些实施方案中,RBE包含序列5'-GCTCGCTCGCTC-3'。

[0080] 在一些实施方案中,滚环复制蛋白来自具有线性单链DNA基因组的细小病毒科(Parvoviridae)依赖细小病毒(dependoparvovirus)属病毒。在一些实施方案中,滚环复制蛋白来自自主性细小病毒科的属,包括小鼠细小病毒、阿留申貂病病毒(Aleutian mink disease virus)、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒(feline panleukopenia virus)、猫细小病毒、鹅细小病毒、HB细小病毒、H-1细小病毒、Kilham大鼠病毒、lapine细小病毒、LUIII病毒、貂肠炎病毒(mink enteritis virus)、小鼠细小病毒、猪细小病毒、浣熊细小病毒、RT细小病毒、肿瘤病毒X、大鼠细小病毒1a、巴巴里鸭细小病毒、马细小病毒、仓鼠细小病毒和类风湿性关节炎病毒1。在一些实施方案中,该属是细小病毒。在一些实施方案中,滚环复制蛋白来自浓核病毒亚科(Densovirinae)的属,包括短小浓核病毒属(brevidensovirus)、浓核病毒属(densovirus)和iteravirus。

[0081] 在一些实施方案中,滚环复制蛋白来自细小病毒亚科(Parvovirinae)的属。细小病毒亚科各属的例子包括但不限于阿留申细小病毒属(Amdoparvovirus)、Aveparvovirus、牛犬细小病毒属(Bocaparvovirus)、Copiparvovirus、依赖细小病毒属(Dependoparvovirus)、红系细小病毒属(Erythroparvovirus)、原型细小病毒属(Protoparvovirus)、Tetraparvovirus。在一些实施方案中,滚环复制蛋白来自浓核病毒亚科(Densovirinae)的属。浓核病毒亚科各属的例子包括但不限于阿留申细小病毒属(Amdoparvovirus)、Aveparvovirus、牛犬细小病毒属(Bocaparvovirus)、Copiparvovirus、

依赖细小病毒属 (Dependoparvovirus)、红系细小病毒属 (Erythroparvovirus)、原型细小病毒属 (Protoparvovirus) 和 Tetraparvovirus。在一些实施方案中, 滚环复制蛋白来自依赖性病毒属, 如腺相关病毒2 (AAV2)、腺相关病毒3 (AAV3)、腺相关病毒4 (AAV4) 或腺相关病毒5 (AAV5) 或其任意组合。

[0082] 在一些实施方案中, 滚环复制蛋白衍生自单链DNA噬菌体科。在一些实施方案中, 这些病毒科是微小噬菌体科 (Microviridae) 和丝杆状噬菌体科 (Inoviridae)。

[0083] 在一些实施方案中, 滚环复制蛋白衍生自革兰氏阳性细菌。

[0084] 本公开的各方面涉及以下发现: 形成末端封闭型线性双链体DNA (ceDNA) 需要包含有效末端解析位点 (trs) 的中断型自身互补核酸序列。一般, 包含中断型自身互补核酸序列 (例如, AAV ITR) 的核酸复制始自横臂的3' 末端 (例如, 发夹结构) 并且生成其中一个末端共价封闭的双链体分子; 双链体分子的共价封闭末端随后由称作末端解析的过程切割, 以形成二个独立的单链核酸分子。不希望受任何具体理论约束, 末端解析过程由位点特异性和链特异性核酸内切酶 (例如, 滚环复制蛋白, 如AAV Rep蛋白) 在末端解析位点 (trs) 切割介导。trs序列的例子包括3'-CCGGTTG-5'和5'-AGTTGG-3' (由AAV2 p5蛋白识别)。已经假设Rep介导的链切刻过程发生在trs序列的中央二胸苷 ("TT") 部分之间。因此, 在一些实施方案中, 有效的末端解析位点包含序列5'-TT-3'。

[0085] 本公开的各方面涉及末端解析位点 (trs) 相对于滚环复制蛋白结合元件的排位。通常, trs相对于滚环复制蛋白结合元件的上游 (例如, 5') 排位。但是, 在一些实施方案中, trs位于相对于滚环复制蛋白结合元件的下游 (例如, 3')。在一些实施方案中, 有效末端解析位点的3' 末端距滚环复制蛋白结合元件的5' 末端15至25个核苷酸 (例如, 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24, 或25核苷酸)。

[0086] 在一些实施方案中, 中断型自身互补序列是AAV反向末端重复序列。AAV ITR序列可以属于任何AAV血清型, 包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、非人灵长类AAV血清型 (例如, AAVrh.10) 及其变体。在一些实施方案中, 中断型自身互补序列是AAV2 ITR或其变体 (例如, AAV2 ITR, 或在 "B臂" 或 "C臂" 中具有缺失的截短的AAV2 ITR)。在一些实施方案中, 中断型自身互补序列是AAV5 ITR或其变体 (例如, AAV5 ITR, 或在 "B臂" 或 "C臂" 中具有缺失的截短的AAV5 ITR)。如本文所用, AAV ITR的 "变体" 是与野生型 AAV ITR序列具有约70%至约99.9%之间相似性的多核苷酸。在一些实施方案中, AAV ITR变体与野生型AAV ITR相同约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%。

[0087] AAV ITR可以按两种构象存在: "flip" 和 "flop", 这些构象是AAV复制的滚环发夹机制的结果。下文显示处于 "flip" 构象和 "flop" 构象的中断型自身互补序列 (例如, AAV2 ITR) 的非限制性例子:

[0088] GenBank (>gi|110645916|ref|NC\_001401.2|腺相关病毒-2, 全基因组)

[0089] Flop构象

[0090] (SEQ ID No:4)

[0091] 

```
ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggc_cgggcgaccaaaggctcgcccgacgcccgggctttg
|||||
aaccggtgagggagagacgcgcgagcgagcgagtgactccg_gcccgtggtttccagcgggctgcgggcccgaaac
```

[0092] (SEQ ID NO:5)

[0093] ccgggc\_ggcctcagtgagcgagcgagcgagagaggagtggccaactccatcactaggggttct  
| | | | |  
gggcccg\_ccqgaqtacactcgtcgtcgcgcgtctctccctaccggttaggtagtgatccccaaqga

中,转基因编码治疗性蛋白或治疗性功能RNA。在另一个例子中,转基因编码的蛋白质或功能RNA意在用于研究目的,例如,以产生携带转基因的体细胞(somatic)转基因动物模型,例如,旨在研究转基因产物的功能。在另一个例子中,转基因编码的蛋白质或功能RNA意在用来产生疾病的动物模型。适宜的转基因编码性序列将是技术人员显而易见的。

[0106] 本公开部分地基于以下发现;不同于AAV载体,本文所述的核酸(例如,ceDNA)在异源核酸插入物(例如,转基因序列)的大小方面无限制。在一些实施方案中,旁侧有中断型自身互补序列的转基因(例如,异源核酸插入物)的长度范围从约10至约5,000碱基对、约10至约10,000碱基对、约10至约50,000个碱基对。在一些实施方案中,旁侧有中断型自身互补序列的转基因(例如,异源核酸插入物)的长度范围从约10至约50个碱基对。在一些实施方案中,旁侧有中断型自身互补序列的转基因(例如,异源核酸插入物)的长度范围从约20至约100个碱基对。在一些实施方案中,旁侧有中断型自身互补序列的转基因(例如,异源核酸插入物)的长度范围从约500至约1500个碱基对。在一些实施方案中,旁侧有中断型自身互补序列的转基因(例如,异源核酸插入物)的长度范围从约1000至约5000个碱基对。在一些实施方案中,转基因(例如,异源核酸插入物)的大小超过传统AAV载体的容量(例如,超过约4.8kb)。

[0107] 可以在转基因中提供的报道分子序列包括而不限于编码 $\beta$ -内酰胺酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶和本领域熟知的其他蛋白质的DNA序列。与驱动其表达的调节元件连接时,这些报道分子序列提供通过常规手段可检测的信号,所述常规手段包括酶测定法、射线照相测定法、比色测定法、荧光测定法或其他光谱测定法、荧光活化细胞分选测定法和免疫学测定法(包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学)。例如,在标记物序列是LacZ基因的情况下,通过 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定法检测携带该信号的载体的存在。在转基因是绿色荧光蛋白或萤光素酶的情况下,可以在光度计中通过颜色或光产生目视测量携带该信号的载体。这类报道分子可以例如用于验证核酸的组织特异性靶向能力和组织特异性启动子调节活性。

[0108] 在一些方面,本公开提供核酸用于预防或治疗哺乳动物中一种或多种遗传缺陷或功能障碍(例如,如哺乳动物中多肽缺乏或多肽过量)的方法中,并且尤其用于治疗表现出一种或多种与细胞和组织中缺乏这类多肽相关的病症的人类中的缺乏或减少其严重性或程度。该方法包括按照足以在患有缺乏症或病症的受试者中治疗这种病症的量和时间,向受试者施用在可药用运载体中的编码一个或多个治疗性肽、多肽、siRNA、微RNA、反义核苷酸等的核酸(例如,如本公开所描述的核酸)。

[0109] 因此,本公开包括递送编码一种或多种肽、多肽或蛋白质的核酸(例如,如本公开所描述的核酸),所述核酸可用于治疗或预防哺乳动物受试者中的疾病状态。示例性治疗用蛋白质包括选自生长因子、白介素、干扰素、抗凋亡因子、细胞因子、抗糖尿病因子、抗凋亡物质、凝血因子、抗肿瘤因子的一种或多种多肽。治疗用蛋白质的其他非限制性例子包括BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SCF、GM-CSF、促性腺素、IFN、IFG-1、M-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、TGF-B2、TNF、催乳素(prolactin)、促生长素(somatotropin)、XIAP1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-10(187A)、病毒IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16IL-17和IL-18。

[0110] 核酸(例如,如本公开所描述的核酸)可以包含待转移(例如,表达于)至受试者以治疗与基因表达减少、表达缺乏或功能障碍相关的疾病的基因。示例性基因和相关疾病状态包括但不限于:葡萄糖-6-磷酸酶,与糖原储存缺乏症类型1A相关;磷酸烯醇式丙酮酸-羧激酶,与Pepck缺乏症相关;半乳糖-1磷酸尿苷酰转移酶,与半乳糖血症相关;苯丙氨酸羟化酶,与苯丙酮尿症相关;支链 $\alpha$ -酮酸脱氢酶,与枫糖浆尿病相关;延胡索酰乙酰乙酸水解酶,与酪氨酸血症1型相关;甲基丙二酸单酰-CoA变位酶,与甲基丙二酸血症相关;中等链酰基CoA脱氢酶,与中等链乙酰CoA缺乏症相关;鸟氨酸氨甲酰基转移酶,与鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症相关;精氨酸琥珀酸合成酶,与瓜氨酸血症相关;低密度脂蛋白受体蛋白,与家族性高胆固醇血症相关;UDP-葡萄糖醛基转移酶,与Crigler-Najjar疾病相关;腺苷脱氨酶,与重症联合免疫缺陷疾病相关;次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,与Gout and Lesch-Ny综合征相关;生物素酶,与生物素酶缺乏症相关; $\beta$ -葡萄糖脑苷脂酶,与Gaucher病相关; $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶,与Sly综合征相关;过氧化物酶体膜蛋白70kDa,与Zellweger综合征相关;胆色素原脱氨酶,与急性间歇性卟啉病相关; $\alpha$ -1抗胰蛋白酶,用于治疗 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症(肺气肿);促红细胞生成素,用于治疗地中海贫血所致贫血或肾衰竭;血管内皮生长因子、血管生成素-1和成纤维细胞生长因子,用于治疗缺血性疾病;凝血调节蛋白和组织因子途径抑制剂,用于治疗例如动脉粥样硬化、血栓形成或栓塞中所见的闭塞血管;芳族氨基酸脱羧酶(AADC)和酪氨酸羟化酶(TH),用于治疗帕金森病; $\beta$ 肾上腺素能受体,受磷蛋白反义形式或突变形式,肌浆(内质)网三磷酸腺苷酶-2(SERCA2)和心腺苷酰环化酶的,用于治疗充血性心力衰竭;肿瘤抑制基因如p53,用于治疗各种癌症;细胞因子如各种白介素之一,用于治疗炎症和免疫病症和癌症;肌营养不良蛋白或微小肌营养不良蛋白和utrophin或miniutrophin,用于治疗肌肉营养障碍;和,胰岛素,用于治疗糖尿病。

[0111] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与中枢神经系统(CNS)相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与CNS疾病相关的基因的非限制性罗列:DRD2、GRIA1、GRIA2、GRIN1、SLC1A1、SYP、SYT1、CHRNA7、3Rtau/4rTUS、APP、BAX、BCL-2、GRIK1、GFAP、IL-1、AGER,与阿尔茨海默病相关;UCH-L1、SKP1、EGLN1、Nurr-1、BDNF、TrkB、gstml、S106 $\beta$ ,与帕金森病相关;IT15、PRNP、JPH3、TBP、ATXN1、ATXN2、ATXN3、Atrophin 1、FTL、TITF-1,与亨廷顿病相关;FXN,与Freidrich共济失调相关;ASPA,与Canavan病相关;DMD,与肌营养不良相关;和SMN1、UBE1、DYNC1H1,与脊髓性肌萎缩相关。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。

[0112] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与心血管系统相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与心血管疾病相关的基因的非限制性清单:VEGF、FGF、SDF-1、连接蛋白40、连接蛋白43、SCN4a、HIF1 $\alpha$ 、SERCa2a、ADCY1和ADCY6。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。

[0113] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与肺系统相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与肺病相关的基因



的非限制性罗列:CFTR、AAT、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1、SFTPA1、SFTPA2、SFTPB、SFTPC、HPS1、HPS3、HPS4、ADTB3A、IL1A、IL1B、LTA、IL6、CXCR1和CXCR2。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。图10中描述了异源核酸插入的非限制性例子,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与肺系统相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。

[0114] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与肝脏相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与肝脏疾病相关的基因的非限制性罗列: $\alpha$ 1-AT、HFE、ATP7B、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)、葡萄糖-6-磷酸酶、NCAN、GCKR、LYPLAL1、PNPLA3、卵磷脂胆固醇乙酰转移酶、苯丙氨酸羟化酶和G6PC。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。图9中描述了异源核酸插入的非限制性例子,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与肝脏相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。

[0115] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与肾相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与肾脏疾病相关的基因的非限制性罗列:PKD1、PKD2、PKHD1、NPHS1、NPHS2、PLCE1、CD2AP、LAMB2、TRPC6、WT1、LMX1B、SMARCAL1、COQ2、PDSS2、SCARB3、FN1、COL4A5、COL4A6、COL4A3、COL4A4、FOX1C、RET、UPK3A、BMP4、SIX2、CDC5L、USF2、ROBO2、SLIT2、EYA1、MYOG、SIX1、SIX5、FRAS1、FREM2、GATA3、KAL1、PAX2、TCF2和SALL1。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。

[0116] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与眼相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与眼病相关的基因的非限制性罗列:ABCA4、VEGF、CEP290、CFH、C3、MT-ND2、ARMS2、TIMP3、CAMK4、FMN1、RHO、USH2A、RPGR、RP2、TMC0、SIX1、SIX6、LRP12、ZFPM2、TBK1、GALC、肌纤蛋白、CYP1B1、CAV1、CAV2、视神经蛋白和CDKN2B。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。图7中描述了异源核酸插入的非限制性例子,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与眼相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。

[0117] 在一些实施方案中,本公开涉及异源核酸插入物,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与血液(例如,红细胞)相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。以下是与血液的疾病和病症相关的基因的非限制性罗列:因子VIII(FVIII)、因子IX(FIX)、血管性血友病因子(VWF)。在一些实施方案中,本公开涉及表达前述基因或其片段中一者或多者的异源核酸插入物。在一些实施方案中,本公开涉及表达一种或多种抑制前述基因中一者或多者表达的功能性RNA的异源核酸插入物。图8中描述了异源核酸插入的非限制性例子,所述异源核酸插入物编码可用于治疗与血液相关的病状、疾病或病症的蛋白质或功能性RNA。

[0118] 本公开的核酸(例如,具有异源核酸插入物的核酸)可以用来恢复在受试者中表达降低、沉默或机能不良的基因(例如,已经在患有癌症的受试者中沉默的肿瘤抑制基因)的

表达。本公开的核酸也可以用来敲减在受试者中异常表达的基因(例如,在患有癌症的受试者中表达的癌基因)的表达。在一些实施方案中,通过向患有癌症的受试者施用包含异源核酸插入物的核酸,编码与癌症相关的基因产物(例如,肿瘤抑制物)的异源核酸插入物可以用来治疗癌症。在一些实施方案中,通过向患有癌症的受试者施用包含编码小干扰核酸(例如,shRNA、miRNA)的异源核酸插入物的核酸,包含该异源核酸插入物的核酸可以用来治疗癌症,其中所述小干扰核酸抑制与癌症相关的基因产物(例如,癌基因)的表达。在一些实施方案中,包含编码与癌症相关的基因产物(或抑制与癌症相关的基因表达的功能性RNA)的异源核酸插入物的核酸可以用于研究目的,例如,用来研究癌症或鉴定治疗癌症的治疗药。以下是已知与癌形成相关的示例性基因(例如,癌基因和肿瘤抑制基因)的非限制性罗列:

AARS、ABCB1、ABCC4、ABI2、ABL1、ABL2、ACK1、ACP2、ACY1、ADSL、AK1、AKR1C2、AKT1、ALB、ANPEP、ANXA5、ANXA7、AP2M1、APC、ARHGAP5、ARHGEF5、ARID4A、ASNS、ATF4、ATM、ATP5B、ATP50、AXL、BARD1、BAX、BCL2、BHLHB2、BLMH、BRAF、BRCA1、BRCA2、BTK、CANX、CAP1、CAPN1、CAPNS1、CAV1、CBFB、CBLB、CCL2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CCT5、CCYR61、CD24、CD44、CD59、CDC20、CDC25、CDC25A、CDC25B、CDC2L5、CDK10、CDK4、CDK5、CDK9、CDKL1、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2D、CEBPG、CENPC1、CGRRF1、CHAF1A、CIB1、CKMT1、CLK1、CLK2、CLK3、CLNS1A、CLTC、COL1A1、COL6A3、COX6C、COX7A2、CRAT、CRHR1、CSF1R、CSK、CSNK1G2、CTNNA1、CTNNB1、CTPS、CTSC、CTSD、CUL1、CYR61、DCC、DCN、DDX10、DEK、DHCR7、DHRS2、DHX8、DLG3、DVL1、DVL3、E2F1、E2F3、E2F5、EGFR、EGR1、EIF5、EPHA2、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ERCC3、ETV1、ETV3、ETV6、F2R、FASTK、FBN1、FBN2、FES、FGFR1、FGR、FKBP8、FN1、FOS、FOSL1、FOSL2、FOXG1A、FOXO1A、FRAP1、FRZB、FTL、FZD2、FZD5、FZD9、G22P1、GAS6、GCN5L2、GDF15、GNA13、GNAS、GNB2、GNB2L1、GPR39、GRB2、GSK3A、GSPT1、GTF2I、HDAC1、HDGF、HMMR、HPRT1、HRB、HSPA4、HSPA5、HSPA8、HSPB1、HSPH1、HYAL1、HYOU1、ICAM1、ID1、ID2、IDUA、IER3、IFITM1、IGF1R、IGF2R、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IL1B、ILK、ING1、IRF3、ITGA3、ITGA6、ITGB4、JAK1、JARID1A、JUN、JUNB、JUND、K-ALPHA-1、KIT、KITLG、KLK10、KPNA2、KRAS2、KRT18、KRT2A、KRT9、LAMB1、LAMP2、LCK、LCN2、LEP、LITAF、LRPAP1、LTF、LYN、LZTR1、MADH1、MAP2K2、MAP3K8、MAPK12、MAPK13、MAPKAPK3、MAPRE1、MARS、MAS1、MCC、MCM2、MCM4、MDM2、MDM4、MET、MGST1、MICB、MLLT3、MME、MMP1、MMP14、MMP17、MMP2、MNDA、MSH2、MSH6、MT3、MYB、MYBL1、MYBL2、MYC、MYCL1、MYCN、MYD88、MYL9、MYLK、NEO1、NF1、NF2、NFKB1、NFKB2、NFSF7、NID、NINJ1、NMBR、NME1、NME2、NME3、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH4、NPM1、NQO1、NR1D1、NR2F1、NR2F6、NRAS、NRG1、NSEP1、OSM、PA2G4、PABPC1、PCNA、PCTK1、PCTK2、PCTK3、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDPK1、PEA15、PFDN4、PFDN5、PGAM1、PHB、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIM1、PKM2、PKMYT1、PLK2、PPARD、PPARG、PPIH、PPP1CA、PPP2R5A、PRDX2、PRDX4、PRKAR1A、PRKCBP1、PRNP、PRSS15、PSMA1、PTCH、PTEN、PTGS1、PTMA、PTN、PTPRN、RAB5A、RAC1、RAD50、RAF1、RALBP1、RAP1A、RARA、RARB、RASGRF1、RB1、RBBP4、RBL2、REA、REL、RELA、RELB、RET、RFC2、RGS19、RHOA、RHOB、RHOC、RHOD、RIPK1、RPN2、RPS6KB1、RRM1、SARS、SELENBP1、SEMA3C、SEMA4D、SEPP1、SERPINH1、SFN、SFPQ、SFRS7、SHB、SHH、SIAH2、SIVA、SIVA TP53、SKI、SKIL、SLC16A1、SLC1A4、SLC20A1、SMO、SMPD1、SNAI2、SND1、SNRPB2、SOCS1、SOCS3、SOD1、SORT1、SPINT2、SPRY2、SRC、SRPX、STAT1、STAT2、STAT3、STAT5B、STC1、TAF1、TBL3、TBRG4、TCF1、TCF7L2、TFAP2C、TFDP1、TFDP2、TGFA、TGFB1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、THBS1、TIE、TIMP1、TIMP3、TJP1、TK1、TLE1、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A、

TNFRSF1B、TNFRSF6、TNFSF7、TNK1、TOB1、TP53、TP53BP2、TP53I3、TP73、TPBG、TPT1、TRADD、TRAM1、TRRAP、TSG101、TUFM、TXNRD1、TYRO3、UBC、UBE2L6、UCHL1、USP7、VDAC1、VEGF、VHL、VIL2、WEE1、WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WT1、XRCC1、YES1、YWHAB、YWHAZ、ZAP70和ZNF9。

[0119] 在一些实施方案中,本公开涉及编码与CNS相关病症相关的基因产物的异源核酸插入物。以下是与CNS相关病症相关的基因的非限制性罗列:DRD2、GRIA1、GRIA2、GRIN1、SLC1A1、SYP、SYT1、CHRNA7、3Rtau/4rTUS、APP、BAX、BCL-2、GRIK1、GFAP、IL-1、AGER,与阿尔茨海默病相关;UCH-L1、SKP1、EGLN1、Nurr-1、BDNF、TrkB、gstml、S106 $\beta$ ,与帕金森病相关;IT15、PRNP、JPH3、TBP、ATXN1、ATXN2、ATXN3、Atrophin 1、FTL、TITF-1,与亨廷顿病相关;FXN,与Freidrich共济失调相关;ASPA,与Canavan病相关;DMD,与肌营养不良相关;和SMN1、UBE1、DYNC1H1,与脊髓性肌萎缩相关。

[0120] 异源核酸插入物可以包含编码调节凋亡的蛋白质或功能性RNA的核酸作为转基因。以下是在本公开的某些实施方案中可用作转基因的凋亡相关基因和编码这些基因的产物及其同源物以及编码抑制这些基因及其同源物表达的小干扰核酸(例如,shRNA、miRNA)的核酸的非限制性罗列:RPS27A、ABL1、AKT1、APAF1、BAD、BAG1、BAG3、BAG4、BAK1、BAX、BCL10、BCL2、BCL2A1、BCL2L1、BCL2L10、BCL2L11、BCL2L12、BCL2L13、BCL2L2、BCLAF1、BFAR、BID、BIK、NAIP、BIRC2、BIRC3、XIAP、BIRC5、BIRC6、BIRC7、BIRC8、BNIP1、BNIP2、BNIP3、BNIP3L、BOK、BRAF、CARD10、CARD11、NLRC4、CARD14、NOD2、NOD1、CARD6、CARD8、CARD9、CASP1、CASP10、CASP14、CASP2、CASP3、CASP4、CASP5、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9、CFLAR、CIDEA、CIDEB、CRADD、DAPK1、DAPK2、DFFA、DFFB、FADD、GADD45A、GDNF、HRK、IGF1R、LTA、LTBR、MCL1、NOL3、PYCARD、RIPK1、RIPK2、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF14、TNFRSF19、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF25、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、TNFRSF9、TNFSF10、TNFSF14、TNFSF18、CD40LG、FASLG、CD70、TNFSF8、TNFSF9、TP53、TP53BP2、TP73、TP63、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、DRD2、GRIA1、GRIA2、GRIN1、SLC1A1、SYP、SYT1、CHRNA7、3Rtau/4rTUS、APP、BAX、BCL-2、GRIK1、GFAP、IL-1、AGER、UCH-L1、SKP1、EGLN1、Nurr-1、BDNF、TrkB、gstml、S106 $\beta$ 、IT15、PRNP、JPH3、TBP、ATXN1、ATXN2、ATXN3、Atrophin 1、FTL、TITF-1、FXN、ASPA、DMD和SMN1、UBE1、DYNC1H1。

[0121] 技术人员还将认识到,在转基因编码蛋白质或多肽情况下,可以在转基因中进行导致保守性氨基酸置换的突变,以提供蛋白质或多肽的功能等同变体或同源物。在一些方面,本公开包括导致转基因的保守性氨基酸置换的序列改变。在一些实施方案中,转基因包括具有显性负性突变的基因。例如,转基因可以表达突变蛋白,所述的突变蛋白相互作用于与作为野生型蛋白的相同元件并且因而阻断野生型蛋白的功能的某个方面。

[0122] 有用转基因产物还包括miRNA。通过切割/降解靶RNA转录物或阻抑靶信使RNA(mRNA)的翻译,miRNA和其他小干扰核酸调节基因表达。miRNA天然表达,一般作为最后19-25非翻译的RNA产物表达。miRNA通过与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)发生序列特异性相互作用,显示其活性。这些内源表达的miRNA形成发夹前体,所述的发夹前体随后加工成miRNA双链体并进一步加工成“成熟的”单链miRNA分子。这种成熟的miRNA引导多蛋白复合体miRISC,后者基于其与成熟miRNA互补性鉴别靶mRNA的靶位点,例如,3'UTR区中的靶位点。

[0123] 在这些方法的某些实施方案中,以下非限制性罗列的miRNA基因及其同源物可用

作转基因或可用作靶标用于转基因(例如,miRNA海绵、反义寡核苷酸、TuD RNA)所编码的小干扰核酸:hsa-let-7a、hsa-let-7a\*、hsa-let-7b、hsa-let-7b\*、hsa-let-7c、hsa-let-7c\*、hsa-let-7d、hsa-let-7d\*、hsa-let-7e、hsa-let-7e\*、hsa-let-7f、hsa-let-7f-1\*、hsa-let-7f-2\*、hsa-let-7g、hsa-let-7g\*、hsa-let-7i、hsa-let-7i\*、hsa-miR-1、hsa-miR-100、hsa-miR-100\*、hsa-miR-101、hsa-miR-101\*、hsa-miR-103、hsa-miR-105、hsa-miR-105\*、hsa-miR-106a、hsa-miR-106a\*、hsa-miR-106b、hsa-miR-106b\*、hsa-miR-107、hsa-miR-10a、hsa-miR-10a\*、hsa-miR-10b、hsa-miR-10b\*、hsa-miR-1178、hsa-miR-1179、hsa-miR-1180、hsa-miR-1181、hsa-miR-1182、hsa-miR-1183、hsa-miR-1184、hsa-miR-1185、hsa-miR-1197、hsa-miR-1200、hsa-miR-1201、hsa-miR-1202、hsa-miR-1203、hsa-miR-1204、hsa-miR-1205、hsa-miR-1206、hsa-miR-1207-3p、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1208、hsa-miR-122、hsa-miR-122\*、hsa-miR-1224-3p、hsa-miR-1224-5p、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1226、hsa-miR-1226\*、hsa-miR-1227、hsa-miR-1228、hsa-miR-1228\*、hsa-miR-1229、hsa-miR-1231、hsa-miR-1233、hsa-miR-1234、hsa-miR-1236、hsa-miR-1237、hsa-miR-1238、hsa-miR-124、hsa-miR-124\*、hsa-miR-1243、hsa-miR-1244、hsa-miR-1245、hsa-miR-1246、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1249、hsa-miR-1250、hsa-miR-1251、hsa-miR-1252、hsa-miR-1253、hsa-miR-1254、hsa-miR-1255a、hsa-miR-1255b、hsa-miR-1256、hsa-miR-1257、hsa-miR-1258、hsa-miR-1259、hsa-miR-125a-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-125b、hsa-miR-125b-1\*、hsa-miR-125b-2\*、hsa-miR-126、hsa-miR-126\*、hsa-miR-1260、hsa-miR-1261、hsa-miR-1262、hsa-miR-1263、hsa-miR-1264、hsa-miR-1265、hsa-miR-1266、hsa-miR-1267、hsa-miR-1268、hsa-miR-1269、hsa-miR-1270、hsa-miR-1271、hsa-miR-1272、hsa-miR-1273、hsa-miR-127-3p、hsa-miR-1274a、hsa-miR-1274b、hsa-miR-1275、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-1276、hsa-miR-1277、hsa-miR-1278、hsa-miR-1279、hsa-miR-128、hsa-miR-1280、hsa-miR-1281、hsa-miR-1282、hsa-miR-1283、hsa-miR-1284、hsa-miR-1285、hsa-miR-1286、hsa-miR-1287、hsa-miR-1288、hsa-miR-1289、hsa-miR-129\*、hsa-miR-1290、hsa-miR-1291、hsa-miR-1292、hsa-miR-1293、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-1294、hsa-miR-1295、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-1296、hsa-miR-1297、hsa-miR-1298、hsa-miR-1299、hsa-miR-1300、hsa-miR-1301、hsa-miR-1302、hsa-miR-1303、hsa-miR-1304、hsa-miR-1305、hsa-miR-1306、hsa-miR-1307、hsa-miR-1308、hsa-miR-130a、hsa-miR-130a\*、hsa-miR-130b、hsa-miR-130b\*、hsa-miR-132、hsa-miR-132\*、hsa-miR-1321、hsa-miR-1322、hsa-miR-1323、hsa-miR-1324、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-134、hsa-miR-135a、hsa-miR-135a\*、hsa-miR-135b、hsa-miR-135b\*、hsa-miR-136、hsa-miR-136\*、hsa-miR-137、hsa-miR-138、hsa-miR-138-1\*、hsa-miR-138-2\*、hsa-miR-139-3p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141、hsa-miR-141\*、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143、hsa-miR-143\*、hsa-miR-144、hsa-miR-144\*、hsa-miR-145、hsa-miR-145\*、hsa-miR-146a、hsa-miR-146a\*、hsa-miR-146b-3p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-147、hsa-miR-147b、hsa-miR-148a、hsa-miR-148a\*、hsa-miR-148b、hsa-miR-148b\*、hsa-miR-149、hsa-miR-149\*、hsa-miR-150、hsa-miR-150\*、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-151-5p、hsa-miR-152、hsa-miR-153、hsa-miR-154、hsa-miR-154\*、hsa-miR-155、hsa-miR-155\*、hsa-miR-15a、hsa-miR-15a\*、hsa-miR-15b、hsa-miR-

15b\*、hsa-miR-16、hsa-miR-16-1\*、hsa-miR-16-2\*、hsa-miR-17、hsa-miR-17\*、hsa-miR-181a、hsa-miR-181a\*、hsa-miR-181a-2\*、hsa-miR-181b、hsa-miR-181c、hsa-miR-181c\*、hsa-miR-181d、hsa-miR-182、hsa-miR-182\*、hsa-miR-1825、hsa-miR-1826、hsa-miR-1827、hsa-miR-183、hsa-miR-183\*、hsa-miR-184、hsa-miR-185、hsa-miR-185\*、hsa-miR-186、hsa-miR-186\*、hsa-miR-187、hsa-miR-187\*、hsa-miR-188-3p、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-18a、hsa-miR-18a\*、hsa-miR-18b、hsa-miR-18b\*、hsa-miR-190、hsa-miR-190b、hsa-miR-191、hsa-miR-191\*、hsa-miR-192、hsa-miR-192\*、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b、hsa-miR-193b\*、hsa-miR-194、hsa-miR-194\*、hsa-miR-195、hsa-miR-195\*、hsa-miR-196a、hsa-miR-196a\*、hsa-miR-196b、hsa-miR-197、hsa-miR-198、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-199b-5p、hsa-miR-19a、hsa-miR-19a\*、hsa-miR-19b、hsa-miR-19b-1\*、hsa-miR-19b-2\*、hsa-miR-200a、hsa-miR-200a\*、hsa-miR-200b、hsa-miR-200b\*、hsa-miR-200c、hsa-miR-200c\*、hsa-miR-202、hsa-miR-202\*、hsa-miR-203、hsa-miR-204、hsa-miR-205、hsa-miR-206、hsa-miR-208a、hsa-miR-208b、hsa-miR-20a、hsa-miR-20a\*、hsa-miR-20b、hsa-miR-20b\*、hsa-miR-21、hsa-miR-21\*、hsa-miR-210、hsa-miR-211、hsa-miR-212、hsa-miR-214、hsa-miR-214\*、hsa-miR-215、hsa-miR-216a、hsa-miR-216b、hsa-miR-217、hsa-miR-218、hsa-miR-218-1\*、hsa-miR-218-2\*、hsa-miR-219-1-3p、hsa-miR-219-2-3p、hsa-miR-219-5p、hsa-miR-22、hsa-miR-22\*、hsa-miR-220a、hsa-miR-220b、hsa-miR-220c、hsa-miR-221、hsa-miR-221\*、hsa-miR-222、hsa-miR-222\*、hsa-miR-223、hsa-miR-223\*、hsa-miR-224、hsa-miR-23a、hsa-miR-23a\*、hsa-miR-23b、hsa-miR-23b\*、hsa-miR-24、hsa-miR-24-1\*、hsa-miR-24-2\*、hsa-miR-25、hsa-miR-25\*、hsa-miR-26a、hsa-miR-26a-1\*、hsa-miR-26a-2\*、hsa-miR-26b、hsa-miR-26b\*、hsa-miR-27a、hsa-miR-27a\*、hsa-miR-27b、hsa-miR-27b\*、hsa-miR-28-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-296-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-297、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-299-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-29a\*、hsa-miR-29b、hsa-miR-29b-1\*、hsa-miR-29b-2\*、hsa-miR-29c、hsa-miR-29c\*、hsa-miR-300、hsa-miR-301a、hsa-miR-301b、hsa-miR-302a、hsa-miR-302a\*、hsa-miR-302b、hsa-miR-302b\*、hsa-miR-302c、hsa-miR-302c\*、hsa-miR-302d、hsa-miR-302d\*、hsa-miR-302e、hsa-miR-302f、hsa-miR-30a、hsa-miR-30a\*、hsa-miR-30b、hsa-miR-30b\*、hsa-miR-30c、hsa-miR-30c-1\*、hsa-miR-30c-2\*、hsa-miR-30d、hsa-miR-30d\*、hsa-miR-30e、hsa-miR-30e\*、hsa-miR-31、hsa-miR-31\*、hsa-miR-32、hsa-miR-32\*、hsa-miR-320a、hsa-miR-320b、hsa-miR-320c、hsa-miR-320d、hsa-miR-323-3p、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-325、hsa-miR-326、hsa-miR-328、hsa-miR-329、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-331-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-335、hsa-miR-335\*、hsa-miR-337-3p、hsa-miR-337-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-338-5p、hsa-miR-339-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-33a、hsa-miR-33a\*、hsa-miR-33b、hsa-miR-33b\*、hsa-miR-340、hsa-miR-340\*、hsa-miR-342-3p、hsa-miR-342-5p、hsa-miR-345、hsa-miR-346、hsa-miR-34a、hsa-miR-34a\*、hsa-miR-34b、hsa-miR-34b\*、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-363、hsa-miR-363\*、hsa-miR-365、hsa-miR-367、hsa-miR-367\*、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-369-5p、hsa-miR-370、hsa-miR-371-3p、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-372、hsa-miR-373、hsa-

miR-373\*、hsa-miR-374a、hsa-miR-374a\*、hsa-miR-374b、hsa-miR-374b\*、hsa-miR-375、hsa-miR-376a、hsa-miR-376a\*、hsa-miR-376b、hsa-miR-376c、hsa-miR-377、hsa-miR-377\*、hsa-miR-378、hsa-miR-378\*、hsa-miR-379、hsa-miR-379\*、hsa-miR-380、hsa-miR-380\*、hsa-miR-381、hsa-miR-382、hsa-miR-383、hsa-miR-384、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410、hsa-miR-411、hsa-miR-411\*、hsa-miR-412、hsa-miR-421、hsa-miR-422a、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-424、hsa-miR-424\*、hsa-miR-425、hsa-miR-425\*、hsa-miR-429、hsa-miR-431、hsa-miR-431\*、hsa-miR-432、hsa-miR-432\*、hsa-miR-433、hsa-miR-448、hsa-miR-449a、hsa-miR-449b、hsa-miR-450a、hsa-miR-450b-3p、hsa-miR-450b-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-452、hsa-miR-452\*、hsa-miR-453、hsa-miR-454、hsa-miR-454\*、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-483-3p、hsa-miR-483-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-485-3p、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-486-3p、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-487a、hsa-miR-487b、hsa-miR-488、hsa-miR-488\*、hsa-miR-489、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-491-5p、hsa-miR-492、hsa-miR-493、hsa-miR-493\*、hsa-miR-494、hsa-miR-495、hsa-miR-496、hsa-miR-497、hsa-miR-497\*、hsa-miR-498、hsa-miR-499-3p、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-500、hsa-miR-500\*、hsa-miR-501-3p、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-502-3p、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-503、hsa-miR-504、hsa-miR-505、hsa-miR-505\*、hsa-miR-506、hsa-miR-507、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-509-3p、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-510、hsa-miR-511、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-512-5p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-513b、hsa-miR-513c、hsa-miR-514、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-516b、hsa-miR-517\*、hsa-miR-517a、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a-3p、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-518b、hsa-miR-518c、hsa-miR-518c\*、hsa-miR-518d-3p、hsa-miR-518d-5p、hsa-miR-518e、hsa-miR-518e\*、hsa-miR-518f、hsa-miR-518f\*、hsa-miR-519a、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-519d、hsa-miR-519e、hsa-miR-519e\*、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-521、hsa-miR-522、hsa-miR-523、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526b、hsa-miR-526b\*、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539、hsa-miR-541、hsa-miR-541\*、hsa-miR-542-3p、hsa-miR-542-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-544、hsa-miR-545、hsa-miR-545\*、hsa-miR-548a-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-548b-3p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-548e、hsa-miR-548f、hsa-miR-548g、hsa-miR-548h、hsa-miR-548i、hsa-miR-548j、hsa-miR-548k、hsa-miR-548l、hsa-miR-548m、hsa-miR-548n、hsa-miR-548o、hsa-miR-548p、hsa-miR-549、hsa-miR-550、hsa-miR-550\*、hsa-miR-551a、hsa-miR-551b、hsa-miR-551b\*、hsa-miR-552、hsa-miR-553、hsa-miR-554、hsa-miR-555、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-556-5p、hsa-miR-557、hsa-miR-558、hsa-miR-559、hsa-miR-561、hsa-miR-562、hsa-miR-563、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-567、hsa-miR-568、hsa-miR-569、hsa-miR-570、hsa-miR-571、hsa-miR-572、hsa-miR-573、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-574-5p、hsa-miR-575、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-

578、hsa-miR-579、hsa-miR-580、hsa-miR-581、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-584、hsa-miR-585、hsa-miR-586、hsa-miR-587、hsa-miR-588、hsa-miR-589、hsa-miR-589\*、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-591、hsa-miR-592、hsa-miR-593、hsa-miR-593\*、hsa-miR-595、hsa-miR-596、hsa-miR-597、hsa-miR-598、hsa-miR-599、hsa-miR-600、hsa-miR-601、hsa-miR-602、hsa-miR-603、hsa-miR-604、hsa-miR-605、hsa-miR-606、hsa-miR-607、hsa-miR-608、hsa-miR-609、hsa-miR-610、hsa-miR-611、hsa-miR-612、hsa-miR-613、hsa-miR-614、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-615-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-616\*、hsa-miR-617、hsa-miR-618、hsa-miR-619、hsa-miR-620、hsa-miR-621、hsa-miR-622、hsa-miR-623、hsa-miR-624、hsa-miR-624\*、hsa-miR-625、hsa-miR-625\*、hsa-miR-626、hsa-miR-627、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-629、hsa-miR-629\*、hsa-miR-630、hsa-miR-631、hsa-miR-632、hsa-miR-633、hsa-miR-634、hsa-miR-635、hsa-miR-636、hsa-miR-637、hsa-miR-638、hsa-miR-639、hsa-miR-640、hsa-miR-641、hsa-miR-642、hsa-miR-643、hsa-miR-644、hsa-miR-645、hsa-miR-646、hsa-miR-647、hsa-miR-648、hsa-miR-649、hsa-miR-650、hsa-miR-651、hsa-miR-652、hsa-miR-653、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-655、hsa-miR-656、hsa-miR-657、hsa-miR-658、hsa-miR-659、hsa-miR-660、hsa-miR-661、hsa-miR-662、hsa-miR-663、hsa-miR-663b、hsa-miR-664、hsa-miR-664\*、hsa-miR-665、hsa-miR-668、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-675、hsa-miR-7、hsa-miR-708、hsa-miR-708\*、hsa-miR-7-1\*、hsa-miR-7-2\*、hsa-miR-720、hsa-miR-744、hsa-miR-744\*、hsa-miR-758、hsa-miR-760、hsa-miR-765、hsa-miR-766、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-767-5p、hsa-miR-768-3p、hsa-miR-768-5p、hsa-miR-769-3p、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-770-5p、hsa-miR-802、hsa-miR-873、hsa-miR-874、hsa-miR-875-3p、hsa-miR-875-5p、hsa-miR-876-3p、hsa-miR-876-5p、hsa-miR-877、hsa-miR-877\*、hsa-miR-885-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-886-5p、hsa-miR-887、hsa-miR-888、hsa-miR-888\*、hsa-miR-889、hsa-miR-890、hsa-miR-891a、hsa-miR-891b、hsa-miR-892a、hsa-miR-892b、hsa-miR-9、hsa-miR-9\*、hsa-miR-920、hsa-miR-921、hsa-miR-922、hsa-miR-923、hsa-miR-924、hsa-miR-92a、hsa-miR-92a-1\*、hsa-miR-92a-2\*、hsa-miR-92b、hsa-miR-92b\*、hsa-miR-93、hsa-miR-93\*、hsa-miR-933、hsa-miR-934、hsa-miR-935、hsa-miR-936、hsa-miR-937、hsa-miR-938、hsa-miR-939、hsa-miR-940、hsa-miR-941、hsa-miR-942、hsa-miR-943、hsa-miR-944、hsa-miR-95、hsa-miR-96、hsa-miR-96\*、hsa-miR-98、hsa-miR-99a、hsa-miR-99a\*、hsa-miR-99b和hsa-miR-99b\*。

[0124] miRNA抑制其靶向的mRNA的功能并且因此抑制mRNA编码的多肽的表达。因此，(部分或全部)阻断miRNA的活性(例如，使miRNA沉默)可以有效地诱导或恢复其表达受抑制的多肽表达(使多肽去阻遏)。在一个实施方案中，通过任多种方法之任一个抑制细胞中miRNA活性，实现对miRNA的mRNA靶所编码的多肽的去阻遏。例如，可以通过与互补或基本上互补于miRNA的小干扰核酸(例如，反义寡核苷酸、miRNA海绵、TuD RNA)杂交，实现miRNA活性的阻断，因而阻断miRNA与其靶mRNA相互作用。如本文所用，与miRNA基本上互补的小干扰核酸是能够与miRNA杂交并阻断miRNA活性的那种。在一些实施方案中，与miRNA基本上互补的小干扰核酸是与miRNA在除1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、或18个碱基外的全部碱基互补的小干扰核酸。在一些实施方案中，与miRNA基本上互补的小干扰核酸序列是

与miRNA在至少一个碱基处互补的小干扰核酸序列。

[0125] “miRNA抑制物”是阻断miRNA功能、表达和/或加工的物质。例如,这些分子包括但不限于抑制miRNA与Drosha复合体相互作用的微RNA特异性反义、微RNA海绵、强诱饵RNA (TuD RNA) 和微RNA寡核苷酸(双链、发夹、短寡核苷酸)。微RNA抑制物可以在细胞中从核酸的转基因表达,如上文讨论。微RNA海绵通过互补性七聚物种子序列特异性抑制miRNA (Ebert, M.S. Nature Methods, Epub August, 12, 2007)。在一些实施方案中,可以使用单个海绵序列沉默整个miRNA家族。TuD RNA实现对哺乳动物细胞中特定miRNA的高效和长期抑制(参见,例如, Takeshi Haraguchi等人, Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 6e43, 涉及TuD RNA的内容通过引用方式并入本文)。在细胞中沉默miRNA功能(miRNA靶的去阻遏)的其他方法将是本领域普通技术人员显而易见的。

[0126] 在一些方面,本文所述的核酸(例如, ceDNA)可以用于治疗CNS相关病症。如本文所用,“CNS相关病症”是中枢神经系统的疾病或病状。CNS相关病症可能累及脊髓(例如, 肌病)、脑(例如, 脑病)或包围脑和脊髓的组织。CNS相关病症可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。CNS相关病症可以是心理病状或病症,例如, 注意缺陷多动障碍、孤独症、情感障碍、精神分裂症、抑郁、Rhett综合征等。CNS相关病症可以是自身免疫疾病。CNS相关病症也可以是CNS癌症,例如, 脑癌。作为癌症的CNS相关病症可以是CNS原发性癌,例如, 星形细胞瘤、胶质母细胞瘤等,或可以是已经转移至CNS组织的癌症,例如, 已经转移至脑的肺癌。CNS相关病症的其他非限制性例子包括帕金森病、溶酶体贮积病、局部缺血、神经病理疼痛、肌萎缩侧索硬化(ALS)、多发性硬化(MS)和卡纳万病(CD)。

[0127] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如, ceDNA)可以用于递送基因治疗药至心肌细胞(例如, 心脏组织)。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如, ceDNA)可以用于治疗心血管病。如本文所用,“心血管病”是心血管系统的疾病或病状。心血管疾病可以累及心脏、循环系统、动脉、静脉、血管和/或毛细血管。心血管病可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。心血管病的非限制性例子包括风湿性心脏病、瓣膜性心脏病、高血压性心脏病、血管瘤、动脉粥样硬化、高压(例如, 高血压)、外周动脉病(PAD)、局部缺血性心脏病、咽峡炎、冠状动脉心脏病、冠状动脉病、心肌梗死、脑血管疾病、一过性脑缺血发作(transient ischemic attack)、炎性心脏病、心肌病、心包疾病、先天性心脏病、心力衰竭、卒中和南美锥虫病所致的心肌炎。

[0128] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如, ceDNA)可以靶向肺和/或肺系统的组织。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如, ceDNA)可以用于治疗肺病。如本文所用,“肺病”是肺系统的疾病或病状。肺病可以累及肺或涉及呼吸的肌肉。肺病可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。肺病可以是肺部癌症,包括但不限于非小细胞肺癌、小细胞肺癌和肺类癌瘤(lung carcinoid tumor)。肺病的其他非限制性例子包括急性支气管炎、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、石棉肺、哮喘、支气管扩张症、细支气管炎、闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎(BOP)、支气管肺发育不良、棉尘病、慢性支气管炎、球孢子菌病(Cocci)、慢性阻塞性肺病(COPD)、潜隐性机化肺炎(COP)、囊性纤维化、肺气肿、汉坦病毒肺综合征、组织胞浆菌病、人偏肺病毒病、过敏性肺炎、流感、淋巴管瘤病、间皮瘤、中东呼吸道综合征、非结核病分枝杆菌病、百日咳、肺尘症(黑肺病)、肺炎、原发性纤毛运动障碍、原发性肺动脉高压、肺动脉高血压、肺纤维化、肺血管疾病、呼吸道合胞体病毒(RSV)、类肉状瘤



病、严重急性呼吸综合征 (SARS)、矽肺、睡眠呼吸暂停、婴儿猝死综合征 (SIDS) 和结核病。

[0129] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以靶向肝组织。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于治疗肝病。如本文所用,“肝病”是肝脏的疾病或病状。肝病可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。肝病可以是肝脏癌症,包括但不限于肝细胞癌(HCC)、纤维板层样癌、胆管癌、血管肉瘤和肝母细胞瘤。肺病的其他非限制性例子包括Alagille综合征、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症、自身免疫性肝炎、胆道闭锁、肝硬化、肝囊肿疾病、脂肪肝病、半乳糖血症、胆结石、Gilbert综合征、血色素沉着病、妊娠期肝脏疾病、新生儿肝炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性硬化性胆管炎、卟啉病、Reye综合征、类肉状瘤病、中毒性肝炎、1型糖原贮积疾病、酪氨酸血症、病毒性肝炎A、B、C、Wilson病和血吸虫病。

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以靶向肾组织。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于治疗肾脏疾病。如本文所用,“肾脏疾病”是肝的疾病或病状。肾脏疾病可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。肾脏疾病可以是肾脏癌症,包括但不限于肾细胞癌、透明细胞癌症、乳头状癌1型、乳头状癌2型、嫌色细胞癌、嗜酸性细胞癌、集合管癌、肾盂移行细胞癌和Wilm瘤。肾脏疾病的其他非限制性例子包括Abderhalden-Kaufmann-Lignac综合征(肾病胱氨酸病)、急性肾衰竭/急性肾损伤、急性叶性肾炎、急性磷酸盐肾病、急性肾小管坏死、腺嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症、腺病毒肾炎、奥尔波特综合征、淀粉样变性、血管肌脂肪瘤、无痛性肾病、血管紧张素抗体和局灶性节段性肾小球硬化、抗磷脂综合征、抗TNF- $\alpha$ 疗法相关的肾小球肾炎、APOL1突变、表象性盐皮质激素过多综合征、马兜铃酸肾病、Balkan地方性肾病、Bartter综合征、Beeturia、 $\beta$ -地中海贫血肾疾病、胆汁管型肾病、BK多瘤、C1q肾病、心肾综合征、CFHR5肾病、胆固醇栓塞、Churg-Strauss综合征、乳糜尿、塌陷性肾小球病、CMV相关的塌陷性肾小球病、先天性肾病综合征、Conorenal综合征(Mainzer-Saldino综合征或Saldino-Mainzer病)、造影剂肾病、硫酸铜中毒、皮质坏死、冷球蛋白血症、结晶所致急性肾损伤、获得性肾囊肿疾病、胱氨酸尿、致密沉积物病(2型MPGN)、Dent病(X连锁隐性肾结石症)、透析失衡综合征、糖尿病性肾脏疾病、尿崩症、EAST综合征、异位输尿管、水肿、Erdheim-Chester病、Fabry病、家族性低尿钙高钙血症、Fanconi综合征、Fraser综合征、纤连蛋白肾小球病、纤维性肾小球性肾炎和免疫触须样肾小球病、Fraley综合征、局灶性节段性肾小球硬化症、局灶性硬化、局灶性肾小球硬化症、Galloway Mowat综合征、Gitelman综合征、肾小球疾病、肾小球管状回流、糖尿、Goodpasture综合征、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、噬血细胞综合征、出血性膀胱炎、与阵发性睡眠性血红蛋白尿症和溶血性贫血相关的含铁血黄素沉着症、肝静脉闭塞性疾病、肝窦阻塞综合征、丙型肝炎相关性肾脏疾病、肝肾综合征、HIV相关性肾病(HIVAN)、马蹄肾(肾融合)、Hunner溃疡、醛固酮增多症、高钙血症、高钾血症、高镁血症、高钠血症、高草酸尿症、高磷酸盐血症、低血钙症、低钾血症、低钾血症所致肾功能障碍、低镁血症、低钠血症、低磷酸盐血症、IgA肾病、IgG4肾病、间质性膀胱炎、疼痛膀胱综合征、间质性肾炎、Ivemark综合征、肾结石、肾石症、钩端螺旋体肾脏疾病、轻链沉积病、单克隆免疫球蛋白沉积病、Liddle综合征、Lightwood-Albright综合征、脂蛋白肾小球病、锂中毒性肾损害、LMX1B突变导致遗传性FSGS、腰部疼痛血尿、狼疮、系统性红斑狼疮、狼疮肾脏疾病、狼疮性肾炎、莱姆病相关性肾小球肾炎、疟疾肾病、恶性高血压、软化斑、尿道

口狭窄、肾髓质囊肿疾病、髓质海绵肾、巨输尿管症、蜜胺毒性与肾脏、膜增生性肾小球肾炎、膜性肾病、中美洲肾病、代谢性酸中毒、代谢性碱中毒、显微镜下型多动脉炎、乳碱综合征、微小病变型病、多囊性肾发育不良、多发性骨髓瘤、骨髓增生性肿瘤和肾小球病、甲-骺骨综合征、肾钙质沉着症、肾源性系统性纤维化、肾下垂(游动肾、肾上睑下垂)、肾病综合征、神经源性膀胱、结节性肾小球硬化、非淋球菌性、Nutcracker综合征、口-面-指综合征、直立性低血压、直立性蛋白尿、渗透性利尿、页肾、肾乳头坏死、乳头肾综合征(肾-视神经盘缺损综合征、孤立型肾发育不良)、腹膜-肾综合征、后尿道瓣膜、感染后肾小球肾炎、链球菌感染后肾小球肾炎、结节性多发性动脉炎、多囊性肾病、后尿道瓣膜、先兆子痫、增生性肾小球肾炎伴单克隆IgG沉积物(Nasr病)、蛋白尿(尿中带蛋白)、假性醛固酮增多症、假性甲状旁腺功能减退症、肺-肾综合征、肾盂肾炎(肾脏感染)、肾盂积脓、辐射肾病、再喂养综合征、返流性肾病、快速进展性肾小球肾炎、肾脓肿、肾周脓肿、肾发育不全、肾动脉瘤、肾动脉狭窄、肾细胞癌、肾囊肿、肾低尿酸血症伴运动所致急性肾衰竭、肾梗死、肾性骨营养不良、肾小管性酸中毒、渗透压调定点重设(Reset Osmostat)、腔静脉后输尿管、腹膜后纤维化、横纹肌溶解、减肥手术相关的横纹肌溶解、类风湿性关节炎相关的肾疾病、结节病肾病、肾和脑盐耗、Schimke免疫性骨异常增殖症、硬皮病性肾危象、蛇形腓骨-多囊肾综合征、Exner综合征、镰状红细胞肾病、硅石暴露和慢性肾脏病、造血细胞移植后肾脏疾病、干细胞移植相关的肾脏疾病、薄基底膜病、家族性良性血尿、膀胱三角区炎、结节性硬化、管状发育不全、溶瘤综合征、尿毒症、尿毒症的视神经病、输尿管脱垂、尿道肉阜、尿道狭窄、尿失禁、尿路感染、尿路阻塞、膀胱肠痿、膀胱输尿管反流、Von Hippel-Lindau病、华法林相关性肾病、韦格纳肉芽肿、肉芽肿病伴多血管炎和Wunderlich综合征。

[0131] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于递送基因治疗剂至眼组织。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于治疗眼病症。如本文所用,“眼病症”是眼部的疾病或病状。心血管疾病可以累及眼、巩膜、角膜、前房、后房、虹膜、瞳孔、晶状体、玻璃体液、视网膜或视神经。眼病症可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。眼部疾病和病症的非限制性例子包括但不限于:年龄相关性黄斑变性、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿、青光眼、视网膜色素变性、Stargardt病、Usher病和Leber先天性黑矇和眼癌。

[0132] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于递送基因治疗剂至血液组织(例如,血细胞)。因此,在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于治疗血液病症。如本文所用,“血液病症”是血液的疾病或病状。血液病症可以是基因来源的,或者遗传或借助体细胞突变获得。血液疾病和病症的非限制性例子包括但不限于贫血(例如,慢性肾脏病中的贫血、再生障碍性贫血、骨髓发育不良性贫血、镰状细胞性贫血)、深静脉血栓形成、血友病(例如,甲型血友病、乙型血友病、丙型血友病)、Henoch-Schönlein紫癜、肺栓塞、地中海贫血和Von Willebrand病。

[0133] 在一些实施方案中,本文所述的核酸(例如,ceDNA)可以用于递送基因编辑分子(例如,核酸酶)至受试者。在一些实施方案中,本公开描述的核酸包含编码核酸酶的异源核酸插入物。如本文所用,术语“核酸内切酶”和“核酸酶”指切割磷酸二酯键或多核苷酸链内部键的酶。核酸酶可以是天然存在的或基因工程化的。基因工程的核酸酶特别可用于基因组编辑并且通常划分成四个家族:锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应核酸酶(TALEN)、工

程化的巨核酸酶和CRISPR相关蛋白(Cas核酸酶)。在一些实施方案中,核酸酶是ZFN。在一些实施方案中,ZFN包含FokI切割结构域。在一些实施方案中,ZFN包含Cys2His2折叠基团。在一些实施方案中,核酸酶是TALEN。在一些实施方案中,TALEN包含FokI切割结构域。在一些实施方案中,核酸酶是工程化的巨核酸酶。

[0134] 术语“CRISPR”指“成簇规律间隔的短回文重复序列”,其为含有碱基序列的短重复的DNA基因座。CRISPR基因座形成原核适应性免疫系统的部分,所述部分赋予针对外来遗传物质的抵抗性。每个CRISPR基因座旁侧有衍生自病毒基因组物质的“间隔DNA”的短片段。在II型CRISPR系统中,间隔DNA与反式激活RNA(tracrRNA)杂交并且被加工成CRISPR-RNA(crRNA)并随后与CRISPR相关的核酸酶(Cas核酸酶)缔合,以形成识别和降解外来DNA的复合体。在某些实施方案中,核酸酶是CRISPR相关的核酸酶(Cas核酸酶)。CRISPR核酸酶的例子包括但不限于Cas9、Cas6和dCas9。dCas9是与靶基因座结合但不切割所述基因座的工程化Cas蛋白。在一些实施方案中,核酸酶是Cas9。在一些实施方案中,Cas9衍生自细菌化脓性链球菌(*S. pyogenes*) (SpCas9)。

[0135] 出于基因组编辑目,可以修饰CRISPR系统以将tracrRNA和crRNA合并入单个向导RNA(sgRNA)或仅(gRNA)。如本文所用,术语“向导RNA”或“gRNA”指与细胞中靶序列互补并与Cas核酸酶缔合,因而指引Cas核酸酶至靶序列的多核苷酸序列。在一些实施方案中,本公开描述的核酸包含编码向导RNA(gRNA)的异源核酸插入物。在一些实施方案中,gRNA的长度范围在1和30个核苷酸之间。在一些实施方案中,gRNA的长度范围在5和25个核苷酸之间。在一些实施方案中,gRNA的长度范围在10和20个核苷酸之间。在一些实施方案中,gRNA的长度范围在14和18个核苷酸之间。在一些实施方案中,本公开描述的核酸包含编码gRNA和CRISPR核酸酶的异源核酸插入物。

[0136] 在一些方面,本公开涉及编码异源核酸插入物的核酸,所述异源核酸插入物不编码有功能的蛋白质。例如,在基因治疗的背景下,转基因启动子整合可以引起癌基因激活。因此,在一些实施方案中,本公开涉及编码无启动子构建体的异源核酸插入物。不希望受任何具体理论约束,在一些实施方案,无启动子表达构建体可用作基因编辑的底物。

[0137] 如本文所用,“基因组编辑”指添加、破坏或改变基因组序列(例如,基因序列)。在一些实施方案中,使用工程化的蛋白质和相关分子,进行基因组编辑。在一些方面,基因组编辑包含使用工程化的核酸酶切割靶基因组座位。在一些实施方案中,基因组编辑还包括在切割的基因座处插入、缺失、突变或置换核酸残基。在一些实施方案中,通过内源细胞机制如同源重组(HR)和非同源末端接合(NHEJ),实现在切割的基因座处插入、缺失、突变或置换核酸残基。示例性基因组编辑技术包括但不限于转录激活物样效应核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、工程化的巨核酸酶、再工程化的归巢核酸内切酶、CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中,基因编辑技术是与TALEN相关的蛋白质或分子,包括但不限于转录激活物样效应物(TALE)和限制性核酸内切酶(例如,FokI)。在一些实施方案中,基因编辑技术是与相ZFN相关的蛋白质或分子,包括但不限于包含Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>折叠基团(例如Zif268(EGR1))的蛋白质和限制性核酸内切酶(例如,FokI)。在一些实施方案中,基因编辑技术是与CRISPR/Cas系统相关的蛋白质或分子,包括但不限于Cas9、Cas6、dCas9、CRISPR RNA(crRNA)和反式活化性crRNA(tracrRNA)。在一些实施方案中,无启动子构建体为TALENs、锌指核酸酶(ZFNs)、巨核酸酶(meganucleases)、Cas9和其他基因编辑蛋白提供底物。

[0138] 在一些方面,本公开涉及编码异源核酸插入物的核酸,所述异源核酸插入物编码DNA疫苗。如本文所用,“DNA疫苗”指编码抗原的核酸,所述抗原在宿主中刺激针对该抗原的免疫应答(例如,细胞免疫应答或体液免疫应答)。在一些实施方案中,免疫应答是防范未来感染或病状的保护性应答。但是,在一些实施方案中,免疫应答治疗(例如,根除或减弱)现有的感染或病状。DNA疫苗的例子包括HL链Ig、scFv、衍生自骆驼(VhH)或软骨鱼(Vnar)的单结构域Ig、纳米体和统称为Ig(或Ig样)分子的其他互补位识别肽和融合肽。

[0139] 在一些实施方案中,异源核酸插入物编码Ig或Ig样分子。在一些实施方案中,Ig(或Ig样)分子是衍生自单克隆抗体序列的未修饰的蛋白质序列。在一些实施方案中,Ig(或Ig样)分子是衍生自鼠或其他哺乳动物单克隆抗体序列的未修饰的蛋白质序列。

[0140] 在一些实施方案中,Ig(或Ig样)分子是衍生自合成性随机生成的肽文库中的未修饰的蛋白质序列。在一些实施方案中,文库衍生自从新生脊椎动物物种获得的互补性DNA。物种包括但不限于哺乳动物,如灵长类(例如,人和非人灵长类)、啮齿类(例如,小鼠、大鼠)、有蹄动物、驼类、马、犬、猫、有袋类和农用动物;禽物种,包括鸡、鸭和鹅;鱼物种包括软骨鱼、七鳃鳗和有颌鱼物种。

[0141] 在一些实施方案中,异源核酸编码免疫球蛋白(Ig)的重链和轻链,从而当施用至容许性细胞时,装配的Ig分泌入循环系统。在一些实施方案中,Ig分子不分泌并且作为所谓的“内抗体”在内部发挥作用。

[0142] 在一些实施方案中,异源核酸插入物编码Ig分子,所述分子是由一条多肽(scFv)中重链可变区和轻链可变区组成的工程化单链抗体。scFv保留对靶抗原的亲合力和特异性。

[0143] 在一些实施方案中,异源核酸插入物编码Ig分子,所述分子与微生物剂结合并影响微生物的感染性。在一些实施方案中,微生物剂是原核生物。在一些实施方案中,微生物剂是立克次体(Rickettsia)、支原体(Mycoplasma)或其他胞内生命形式。

[0144] 在一些实施方案中,异源核酸插入物编码Ig分子,所述分子结合于人类致病性病毒的病毒结构蛋白,所述病毒结构蛋白包括但不限于埃博拉病毒病毒蛋白、人免疫缺陷病毒蛋白、乳头状瘤病毒蛋白、单纯疱疹1病毒蛋白、单纯疱疹2病毒蛋白、HCV A病毒蛋白、HCV B病毒蛋白、HCV C病毒蛋白、HCV非A病毒蛋白、HCV非B病毒蛋白或登革出血热病毒蛋白。在一些实施方案中,异源核酸插入物编码Ig分子,所述分子与动物传染病病原体的病毒结构蛋白结合,所述动物传染病病原体包括但不限于口蹄疫病毒和狂犬病病毒。

[0145] 在一些方面,本公开描述的核酸可用于产生修饰的细胞,如离体的修饰细胞。如本文所用,“离体的修饰细胞”指从受试者取得,经基因修饰(例如,用外源核酸转染或转导或以遗传方式再编程)、培养或扩充和任选地返回受试者(例如,相同的受试者或不同的受试者)的细胞(例如,哺乳动物细胞)。通常,离体的修饰细胞可用于自体细胞疗法或同种异体细胞疗法。例如,细胞可以取自患有与特定遗传缺陷(例如,过量表达特定蛋白质)相关的疾病的受试者,用纠正遗传缺陷(例如减少蛋白质表达)的核酸转染并再引入受试者中。在另一个非限制性例子中,从受试者取得细胞,以遗传方式再编程(例如,去分化或转分化成干细胞)、扩充和再引入受试者中。在一些实施方案中,与通过目前可用的基因治疗载体产生的离体细胞相比,通过如本公开所描述的核酸转染所产生的离体的修饰细胞具有改善的安全特征。

[0146] 在一些方面,本公开描述的核酸是可用于产生嵌合抗原T细胞(CART)。嵌合抗原受体(CAR)是基于单链FV(scFv)抗体部分的对靶抗原展示特异性的工程化T细胞受体。通常,通过用包含编码CAR的DNA的慢病毒载体转导T细胞,产生CART。在一些实施方案中,慢病毒转导带来导致癌症的插入性诱变的风险。如本公开所描述,与其他基因治疗模式相比,具有非对称中断型自身互补序列的核酸显示插入性诱变的可能性降低。因此,在一些实施方案中,本公开描述的核酸包含编码CAR的异源核酸插入物(例如,转基因)。在一些实施方案中,与通过慢病毒转导产生的CART相比,通过本公开所描述的核酸转导所产生的CART显示改善的安全特征。

[0147] 额外的组分

[0148] 除上文对核酸所确定的主要元件之外,核酸还包含与连接异源核酸插入物(例如,转基因)以允许其在细胞中转录、翻译和/或表达的方式有效连接的必需常规控制元件,其中所述细胞用本公开描述的核酸转染。如本文所用,“有效连接的(operably linked)”序列包括与目的基因连续的表达控制序列和以反式方式发挥作用或在远距离控制目的基因的表达控制序列。

[0149] 表达控制序列包括适宜的转录起始序列、终止序列、启动子和增强子序列;高效RNA加工信号如剪接和多聚腺苷化(polyA)信号;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;和在需要时,增强编码产物分泌的序列。许多表达控制序列,包括天然、组成型、诱导型和/或组织特异性启动子,是本领域已知的并且可以使用。

[0150] 在一些实施方案中,异源核酸插入物(例如,转基因)包含与一个或多个调节序列有效连接的蛋白质编码序列。如本文所用,当核酸编码性序列和调节序列以如此方式共价连接,从而将核酸序列(例如,转基因)的表达或转录置于调节序列的影响或控制下时,称这些序列“有效地”连接。若想要核酸序列(例如,转基因)翻译成有功能的蛋白质,则如果诱导5'调节序列中的启动子导致编码性序列转录且如果二个DNA序列之间键的性质(1)不导致引入移框突变、(2)不干扰能力启动子区指导编码性序列转录、或(3)不干扰相应RNA转录物翻译成蛋白质的能力,则称二个DNA序列有效地连接。因此,如果启动子区能够实现该DNA序列的转录,从而所产生的转录物可能翻译成所需的蛋白质或多肽,则启动子区与核酸序列有效连接。类似地,当两个或更多个编码区以如此方式连接,从而它们从共同启动子的转录导致已经符合可读框翻译的两种或更多种蛋白质表达时,则它们有效连接。在一些实施方案中,有效连接的编码性序列产生融合蛋白。在一些实施方案中,有效连接的编码性序列产生功能性RNA(例如,gRNA)。

[0151] 对于编码蛋白质的核酸(例如,转基因),多聚腺苷化序列通常插在转基因序列之后和3'AAV ITR序列之前。可用于本公开中的异源核酸插入物(例如,转基因)还可以含有内含子,其合乎需要地位于启动子/增强子序列和转基因之间。一个可能的内含子序列衍生自SV-40并且称作SV-40T内含子序列。可以使用的另一个载体元件是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列用来从单个基因转录物产生多于一种多肽。IRES序列将用来产生含有多于一条多肽链的蛋白质。这些载体元件和其他常见载体元件的选择是常规的并且这类序列许多是可获得的[参见,例如,Sambrook等人及其中引用的参考文献,例如在第3.18、3.26和16.17、16.27页和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&

Sons, New York, 1989]。在一些实施方案中,口蹄疫病毒2A序列纳入多聚蛋白中;这种序列是已经证实其介导切割多聚蛋白的小肽(大约18个氨基酸长度)(Ryan, M D等人, EMBO, 1994;4:928-933; Mattion, N M等人, J Virology, November 1996; p.8124-8127; Furler, S等人, Gene Therapy, 2001;8:864-873; 和Halpin, C等人, The Plant Journal, 1999;4:453-459)。先前已经在人工系统(包括质粒和基因治疗载体(AAV和逆转录病毒))中展示2A序列的切割活性(Ryan, M D等人, EMBO, 1994;4:928-933; Mattion, N M等人, J Virology, November 1996; p.8124-8127; Furler, S等人, Gene Therapy, 2001;8:864-873和Halpin, C等人, The Plant Journal, 1999;4:453-459; de Felipe, P等人, Gene Therapy, 1999;6:198-208; de Felipe, P等人, Human Gene Therapy, 2000;11:1921-1931和Klump, H等人, Gene Therapy, 2001;8:811-817)。

[0152] 宿主细胞中基因表达所需要的调节序列的精确性质可以在物种、组织或细胞类型之间变动,但是作为必要,通常应当包括分别参与转录和翻译起始的5'非转录序列和5'非翻译序列,如TATA框、加帽序列、CAAT序列、增强子元件等。特别地,此类5'非转录的调节序列将会包括启动子区,所述启动子区包括用于转录性控制有效连接的基因的启动子序列。调节序列还可以根据需要包含增强子序列或上游激活物序列。本公开的载体可以任选地包含5'前导序列或信号序列。选择和设计适宜的载体处于本领域普通技术人员的能力和判断力内。

[0153] 组成型启动子的实例包括而不限于,逆转录病毒罗氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地连同RSV增强子)、细胞巨化病毒(CMV)启动子(任选地连同CMV增强子)[参见,例如, Boshart等人, Cell, 41:521-530 (1985)], SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 $\beta$ -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1 $\alpha$ 启动子[Invitrogen]。

[0154] 诱导型启动子允许调节基因表达并且可以受外来供应的化合物,环境因素如温度,或存在特定生理状态(例如,急性期)、细胞特定分化状态调节或仅在复制型细胞中受调节。诱导型启动子和诱导型系统从多种商业来源可获得的,包括而不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。许多其他系统已经描述并且可以由本领域技术人员轻易地选择。受外源供应的启动子调节的诱导型启动子的例子包括锌诱导型羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺癌病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮素昆虫启动子(No等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996))、四环素阻遏型系统(Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))、四环素诱导型系统(Gossen等人, Science, 268:1766-1769 (1995)), 还参见Harvey等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998))、RU486诱导型系统(Wang等人, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)和Wang等人, Gene Ther., 4:432-441 (1997))和雷帕霉素诱导型系统(Magari等人, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))。另外,可以在这种情况下有用的其他类型的诱导型启动子是受特定生理状态例如,急性期、温度、细胞特定分化状态调节或仅在复制型细胞中受调节的那些。

[0155] 在另一个实施例中,将使用转基因的天然启动子。当期望转基因的表达应当模拟天然表达时,天然启动子可以是优选的。当转基因的表达必须按时间方式或发育方式或以组织特异性方式或响应于特定转录刺激而调节时,可以使用天然启动子。在又一个实施例中,也可以使用其他天然表达控制元件,如增强子元件、多聚腺苷化位点或Kozak共有序列

来模拟天然表达。

[0156] 在一些实施方案中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调节序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。这类组织特异性调节序列(例如,启动子、增强子等)是本领域熟知的。示例性组织特异性调节序列包括但不限于以下组织特异性启动子:肝特异性甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、胰岛素启动子、胰高血糖素启动子、生长抑素启动子、胰多肽(PPY)启动子、突触蛋白-1(Syn)启动子、肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物桥粒蛋白(DES)启动子、 $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ -MHC)启动子或心肌钙蛋白T(cTnT)启动子。其他示例性启动子包括 $\beta$ -肌动蛋白启动子、乙型肝炎病毒核心启动子(Sandig等人, *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996)); 甲胎蛋白(AFP)启动子(Arbutnot等人, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)); 骨钙蛋白启动子(Stein等人, *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); 骨涎蛋白启动子(Chen等人, *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)); CD2启动子(Hansal等人, *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998)); 免疫球蛋白重链启动子; T细胞受体 $\alpha$ -链启动子、神经元如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)); 神经微丝轻链基因启动子(Piccioli等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)) 和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人, *Neuron*, 15:373-84 (1995)), 连同技术人员将显而易见的其他启动子。

[0157] 末端封闭型线性双链体DNA(ceDNA)的产生

[0158] 在一些方面,本公开提供一种产生如本公开所描述的核酸(例如,ceDNA)的方法,所述方法包括:(i)向容许性细胞引入核酸,所述核酸编码旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分;和,(ii)维持容许性细胞处于在容许性细胞中的滚环复制蛋白质启动核酸的多个拷贝产生的条件下。

[0159] 因产生核酸所致的拷贝数目可以表述为引入容许性细胞的核酸的多个原始拷贝数(例如,1、2、10、100或更多个原始拷贝)。在一些实施方案中,核酸的多个拷贝的产生导致容许性细胞中核酸拷贝数增加2倍至10,000倍。在一些实施方案中,核酸多个拷贝的产生导致容许性细胞中核酸拷贝数增加超过10,000倍。

[0160] 在一些方面,本公开提供转染的细胞(例如,转染的容许性细胞)。术语“转染”用来指细胞对外来DNA的摄取并且当外源DNA已经引入细胞膜内部时,细胞已经“转染”。通常多种转染技术是本领域已知的。参见,例如,Graham等人(1973) *Virology*, 52:456; Sambrook等人(1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York; Davis等人(1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, and Chu等人(1981) *Gene* 13:197。这类技术可以用来将一种或多种外源核酸如核苷酸整合载体和其他核酸分子引入合适的细胞(例如,容许性细胞)中。

[0161] “容许性细胞”指其中如本公开所描述的核酸复制或能够支持如本公开所描述的核酸复制的任何细胞。在一些实施方案中,容许性细胞不表达能够将核酸的复制拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白。本公开的各方面部分地涉及令人惊讶的以下发现:在一些实施方案中,哺乳动物细胞不允许本公开描述的核酸复制。因此,在一些实施方案中,容许性



细胞是非哺乳动物细胞(例如,容许性细胞不是哺乳动物细胞)。在一些实施方案中,容许性细胞是昆虫细胞系、酵母细胞系或细菌细胞系。

[0162] 容许性昆虫细胞的例子包括但不限于草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (例如,Sf9、Sf21)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、谷实夜蛾(*Helicoverpa zea*)、*Heliothis subflexa*、大豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis*)、粉纹夜蛾(*Trichopulsia ni*) (例如,High-Five细胞)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (例如,S2、S3)、桉树柞蚕(*Antheraea eucalypti*)、家蚕(*Bombyx mori*)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和其他。

[0163] 容许性细菌细胞的例子包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

[0164] 容许性酵母细胞的例子包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.)、曲霉属物种(*Aspergillus* sp.)、木霉属物种(*Trichoderma* sp.)和嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*) C1。

[0165] 容许性植物细胞的例子包括但不限于烟草属物种(*Nicotiana* sp.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉蜀黍(*Mays zea*)、茄属物种(*Solanum* sp.)或浮萍属物种(*Lemna* sp.)。

[0166] 在一些实施方案中,容许性细胞是哺乳动物细胞。容许性哺乳动物细胞的例子包括Henrietta Lacks肿瘤(HeLa)细胞和幼仓鼠肾(BHK-21)细胞。

[0167] 在一些实施方案中,如本公开所描述的核酸含于载体内部并递送至容许性细胞。如本文所用,术语“载体”包括与正确控制元件连接时能够复制并且可以在细胞之间转移基因序列的任何遗传元件,如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、人工染色体、病毒、病毒粒等。因此,该术语包括克隆载体和表达载体以及病毒载体。在一些实施方案中,所包括的可用载体是其中待转录的核酸区段置于启动子的转录性控制下的那些载体。

[0168] 在一些实施方案中,该方法包括在容许性细胞中表达滚环复制蛋白(例如,病毒非结构蛋白,如AAV Rep蛋白)。在一些实施方案中,在容许性细胞中表达多于一种(例如,2、3、4、或更多种)滚环复制蛋白。不希望受任何具体理论约束,容许性细胞中表达的病毒非结构蛋白介导本公开描述的核酸的复制。例如,在一些实施方案中,AAV Rep78和Rep52在包含核酸的容许性细胞中表达,其中所述核酸具有基于AAV2 ITR的非对称中断型自身互补序列。在一些实施方案中,病毒非结构蛋白选自AAV78、AAV52、AAV Rep68和AAV Rep 40。

[0169] 在一些实施方案中,容许性细胞中表达的滚环复制蛋白(例如,病毒非结构蛋白,如AAV Rep蛋白)由辅助病毒载体编码。如本文使用,“辅助病毒载体”指表达如本公开所描述的核酸复制所需要的分子(例如,一种或多种蛋白质)的病毒载体。例如,在一些实施方案中,辅助病毒载体表达一种或多种与中断型自身互补核酸序列的RBE结合并且启动包含中断型自身互补核酸序列的核酸复制的滚环复制蛋白。辅助病毒载体通常是已知的并且例如包括杆状病毒载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、巨细胞病毒载体、Epstein-Barr病毒载体和痘苗病毒载体。在一些实施方案中,辅助病毒载体是杆状病毒表达载体(BEV)。杆状病毒表达载体通常是本领域已知的,例如,如Passer等人,Methods Mol Biol.2007;388:55-76中公开。杆状病毒载体的例子包括但不限于苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)多核



多角体病毒 (AcMNPV) 载体、BmNPV 和甜菜夜蛾多核多角体病毒。在一些实施方案中,辅助病毒载体是苜蓿银纹夜蛾多核多角体病毒 (AcMNPV) 载体。

[0170] 在一些实施方案中,产生本公开描述的核酸的方法还包括从细胞(例如,容许性细胞)纯化所述核酸的多个拷贝的步骤。通常,可以使用任何合适的核酸纯化方法。例如,在一些实施方案中,通过质粒纯化试剂盒,如Qiagen微量制备试剂盒、乙醇沉淀法、酚-氯仿纯化法等纯化本公开描述的核酸的多个拷贝。但是,本公开部分地涉及以下发现:包含中断型自身互补序列的核酸对弱阳离子交换色谱介质(例如,二乙基氨乙基介质、DEAE)显示出不良结合效率并且使用硅胶介质的纯化过程产生充分解析的分子物质,同时减少高分子量复合体形成。因此,在一些实施方案中,纯化过程包括使核酸与硅胶树脂接触。

[0171] 在一些实施方案中,例如,出于治疗目的,本文提供的核酸可以用来向细胞递送异源插入物。另外,在一些方面,本公开涉及向受试者递送核酸,所述核酸含有编码治疗性产物(例如,治疗用蛋白质、治疗用RNA)的异源插入物。为了避免施用不纯或污染的核酸或表征核酸制备物的程度或纯度、质量或组成,这类制备物可以在使用之前(例如,在施用至细胞或受试者之前)接受质量控制(QC)或其他分析程序。例如,在一些实施方案中,分析核酸的方法包括获得本公开描述的核酸制备物并确定制备物(例如,核酸复制产物)中一种或多种核酸组分的理化特性。

[0172] 可以确定的理化特性的例子包括但不限于溶解度、稳定性、结构(例如,一级结构、二级结构、三级结构、四级结构等)、疏水性、GC含量、分子量(例如,核酸的一个或多个片段或部分的分子量,例如限制消化后)等。在一些实施方案中,理化特性是一个或每个自身互补序列的核苷酸序列(例如,确定本公开描述的核酸是否包含截短的横臂序列)。

[0173] 在一些实施方案中,理化特性是如本公开所描述的核酸的多聚化程度(例如,单体、二聚体、三聚体、4聚体或其他多聚体或连环体)。在一些实施方案中,理化特性是核酸制备物中复制产物的单聚体形式和/或多聚体形式的化学计量。

[0174] 在一些实施方案中,理化特性是一种或多种复制产物(例如,从核酸制备获得)对限制性核酸内切酶消化的敏感性。例如,在一些实施方案中,如本公开所描述的核酸用一种或多种限制性酶消化并且分析核酸的片段以确定每个片段的大小。因此,在一些实施方案中,理化特性是一种或多种复制产物或复制产物的片段的分子量。在一些实施方案中,分子量属于一种或多种包含一个或多个自身互补序列的复制产物的片段。在一些实施方案中,基于电泳迁移率测定分子量。在一些实施方案中,基于质谱法测定分子量。

[0175] 在一些实施方案中,分子量属于一种或多种复制产物的片段。在一些实施方案中,分子量属于通过包括用聚合酶延长引物的反应扩增的复制产物的片段。基于聚合酶的延长方法的例子包括但不限于聚合酶链反应(PCR)、重组酶聚合酶扩增、环介导等温扩增(LAMP)等。

[0176] 在一些实施方案中,理化特性是复制产物的二聚体形式中单体的极性,其中极性是头-对-头、头-对-尾或尾-对-尾。

[0177] 通常,可以使用确定理化特性的合适测定法。合适的测定法可以包括限制酶切消化分析、凝胶电泳(例如,天然凝胶电泳、变性凝胶电泳、高分辨凝胶电泳)、质量数(例如,质谱法,如LC/MS、HPLC/MS、ESI-MS、MALDI-TOF等)和核酸测序(例如,Maxam-Gilbert测序、焦磷酸测序法、链终止测序、大规模平行特征标识测序、单分子测序、纳米孔测序、Illumina测

序等)。

[0178] 组合物

[0179] 在一些方面,本公开涉及包含如本公开所描述的核酸的组合物。在一些实施方案中,将包含如本文所述的核酸的组合物递送至有需求的受试者。可以根据本领域已知的任何适宜方法,将核酸在组合物中递送至受试者。应当理解组合物可以包含一种或多种(例如,多种)如本公开所描述的核酸。在一些实施方案中,多种核酸是2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种核酸。在一些实施方案中,一种或多种核酸的每种共价连接(例如,末端对末端连接)。在一些实施方案中,组合物还包含可药用运载体。

[0180] 核酸,优选地悬浮于生理相容性运载体中(即,在组合物中),可以是施用至受试者,即宿主动物,如人、小鼠、大鼠、猫、犬、羊、兔、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡或非人灵长类(例如,恒河猴)。在一些实施方案中,宿主动物不包括人。

[0181] 可以例如通过肌肉注射或通过施用至哺乳动物受试者的血流,向哺乳动物受试者递送核酸(例如,ceDNA)。可以通过注射入静脉、动脉或任何其他血管,施用入血流。在一些实施方案中,通过隔离肢体灌流法(一项外科领域熟知的技术),将核酸施用入血流,所述方法使得技术人员基本上能够在施用核酸之前将肢体与全身循环隔离。美国专利号6,177,403中描述的隔离肢体灌流技术的变型也可以由技术人员用来施用核酸至已隔离肢体的血管系统中,以潜在地增强对肌肉细胞或组织的转染。另外,在某些情况下,可能想要递送核酸至受试者的CNS。“CNS”意指脊椎动物的脑和脊髓的全部细胞和组织。因此,该术语包括但不限于神经元细胞、神经胶质细胞、星形细胞、脑脊液(CSF)、组织间隙、骨、软骨等。可以通过使用本领域已知的神经外科技术,如通过立体定位注射,用针、导管或相关装置注射入例如脑室区以及注射入纹状体(例如,尾状核或壳核纹状体)、脊髓和神经肌肉接头或小脑小叶,将重组AAV直接递送至CNS或脑(参见,例如,Stein等人,J Virol 73:3424-3429,1999;Davidson等人,PNAS 97:3428-3432,2000;Davidson等人,Nat.Genet.3:219-223,1993和Alisky and Davidson,Hum.Gene Ther.11:2315-2329,2000)。

[0182] 合适的运载体可以由本领域技术人员在阅读核酸所针对的适应症时轻易地选择。例如,一种合适的运载体包括盐水,其可以用多种缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)配制。其他示例性运载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。本公开不限制运载体的选择。

[0183] 任选地,除核酸和运载体之外,本公开的组合物可以含其他的常规药用成分,如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、硫二氧化物、没食子酸丙酯、尼泊金酯、乙基香草醛、丙三醇、苯酚和对氯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0184] 将核酸以足够的量施用,以转染预期组织的细胞并且提供足够水平的基因转移和表达,而没有不当副作用。常规的药学可接受的施用途径包括但不限于直接递送至选择的器官(例如,门静脉内递送至肝脏)、口服、吸入(包括鼻内和气管内递送)、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、瘤内和其他肠胃外施用途径。如果所需,可以组合施用途径。

[0185] 为实现特定“治疗作用”所要求的核酸剂量将基于几种因素变动,所述因素包括但不限于:施用核酸的途径、为实现治疗作用所要求的基因或RNA表达水平、正在治疗的具体疾病或病症和基因或RNA产物的稳定性。基于前述因素以及本领域熟知的其他因素,本领域

技术人员可以轻易地确定核酸剂量范围以治疗患有具体疾病或病症的患者。

[0186] 可以调整剂量方案以提供最佳治疗应答。例如,可以反复施用寡核苷酸,例如,如依据治疗情况的危急性所示,可以每日一次施用几个剂量或可以按比例减少剂量。本领域普通技术人员将轻易地能够确定向受试者施用寡核苷酸的适宜剂量和方案、是否将向细胞或向受试者施用寡核苷酸。

[0187] 可药用赋形剂和运载体溶液的配制是本领域技术人员熟知的,在多种治疗方案中使用本文所述的具体组合物的合适给药和治疗方案的开发也是如此。

[0188] 一般,这些制剂可以含有至少约0.1%的活性化合物或更多,不过,活性成分的百分数当然可以变动并且可以便利地在总制剂重量或体积的约1%或2%和约70%或80%或更多之间。天然地,每种治疗可用组合中活性化合物的量可以按如此方式配制,从而将在化合物的任何给定单位剂量中获得合适的剂量。配制这类药物制剂的本领域技术人员将考虑多种因素如溶解度、生物利用度、生物半寿期、施用途径、产物货架期以及其他药理学注意事项,并且因此多种剂量和治疗方案可以是合乎需要的。

[0189] 在某些情况下,通过皮下、腹内、鼻内、肠胃外、静脉内、肌内、鞘内、或经口、腹腔内、或通过吸入,在本文公开的适当配制的药物组合中递送基于核酸的治疗用构建体。在一些实施方案中,如美国专利号5,543,158、5,641,515和5,399,363中所述的施用模式(所参考文献的每者特别通过引用方式完整并入本文)可以用来递送核酸。在一些实施方案中,优选的施用模式是门静脉注射。

[0190] 适于可注射用途的药物形式包括无菌水溶液剂或用于现场配制无菌注射溶液剂或分散剂的分散体和无菌粉末。也可以在甘油、液体聚乙二醇及混合物中和油中配制分散体。在普通储存和使用条件下,这些制剂含有防止微生物生长的防腐剂。在许多情况下,该形式必须无菌并且保持流动至存在轻易可注射性(easy syringability)的程度。它必须在制造和储存条件下稳定并且必须针对微生物(如细菌和真菌)的污染作用进行保护。运载体可以是溶剂或分散介质,其例如包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)和合适的其混合物和/或植物油。可以例如通过使用包衣例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所要求的粒径,并且通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。可以用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,尼泊金酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等实现阻止微生物的作用。在许多情况下,将优选包含等渗剂,例如,糖或氯化钠。可以通过组合物中使用延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝和明胶,引起可注射组合物的吸收延长。

[0191] 为了施用可注射水溶液,例如,如果需要,溶液可以适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释物等渗。这些特定的水溶液是特别地适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这种情形下,可以使用的无菌水介质将是本领域技术人员已知的。例如,一个剂量可以溶解于1ml等渗NaCl溶液中并添加至1000ml皮下输液流体或在提议的输注部位注射(参见例如,"Remington's Pharmaceutical Sciences"第15版,第1035-1038页和第1570-1580页)。根据宿主的状况,剂量的一些变动将必然出现。在任何情况下,负责给药的人将决定用于各个宿主的适宜剂量。

[0192] 通过以下方式配制无菌可注射溶液剂:根据需要,将核酸以要求的量连同本文列举的多种其他成分一起并入适宜的溶剂中,随后过滤除菌。通常,通过将多种消毒的有效成分并入无菌溶媒中来制备分散体,所述无菌溶媒含有基础分散介质和来自上文所列举那些

成分中所需的其它成分。在用于现场制备无菌可注射溶液剂的无菌粉末情况下,优选的制备方法是真空干燥技术和冷冻干燥技术,所述技术产生有效成分的粉末,外加来自其先前无菌过滤的溶液中的任何额外的所需成分。

[0193] 本文公开的核酸组合物也可以按照中性或盐形式配制。可药用盐包括与无机酸例如氢氯酸或磷酸或这类有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的酸性加成盐(用蛋白质的游离氨基形成)。与游离羧基形成的盐也可以源自无机碱例如,钠、钾、铵、钙或亚铁的氢氧化物和这类有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。当配制时,溶液将以相容于剂型的方式并以治疗有效的量施用。制剂容易地以多种剂型如可注射溶液剂、药物释放胶囊剂等施用。

[0194] 如本文所用,“运载体”包括任何和全部的溶剂、分散介质、溶媒、包衣、稀释剂、抗菌药和抗真菌药、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、运载体溶液、悬液、胶体等。用于药物活性物质的此类介质和媒介的用途是本领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“可药用”指向宿主施用时无产生变应反应或相似不利反应的分子实体和组合物。

[0195] 递送载具如脂质体、纳米胶囊、微粒子、微球体、脂质粒子、小泡等、可以用于将本公开的组合物引入合适的宿主细胞。特别地,可以配制核酸包封在脂质粒子、脂质体、小泡、纳米球或纳米粒子等中用于递送。

[0196] 这类配制物可以优选用于引入本文公开的核酸的可药用制剂。脂质体的形成和用途通常是本领域技术人员已知的。最近,开发了血清稳定性和循环半衰期改善的脂质体(美国专利号5,741,516)。另外,已经描述了脂质体和类脂质体制备物作为潜在药物运载体的各种方法(美国专利号5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0197] 脂质体已经成功地与正常情况下抵抗其他方法转染的多种细胞配套使用。此外,脂质体没有基于病毒的递送系统常见的DNA长度限制。脂质体已经有效地用于将基因、药物、放疗药、病毒、转录因子和变构效应物引入多种培养的细胞系和动物。此外,已经完成几项成功的临床试验,其研究脂质体介导的药物递送的有效性。

[0198] 脂质体从分散于水介质中并自发形成多层同心双层小泡(也称作多层小泡(MLV))的磷脂形成。MLV通常具有25nm至4 $\mu$ m的直径。超声处理MLV导致核心中含有水溶液的直径200至500ANG的小型单层小泡(SUV)形成。

[0199] 在一些实施方案中,脂质体包含阳离子脂质。术语“阳离子脂质”包括具有极性域和非极性域并且能够在生理pH或其附近带正电荷并且与聚阴离子(如核酸)结合以及促进核酸递送入细胞的脂质和合成性脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包括饱和和不饱和烷基醚及脂环醚和酯胺、酰胺或其衍生物。在一些实施方案中,阳离子脂质包含直链、分枝烷基、链烯基或前述的任何组合。在一些实施方案中,阳离子脂质含有1至约25个碳原子(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个碳原子)。在一些实施方案中,阳离子脂质含有多于25个碳原子。在一些实施方案中,直链或分枝烷基或烯基具有六个或更多个碳原子。在一些实施方案中,阳离子脂质还可以包含一个或多个脂环基团。脂环基团的非限制性例子包括胆固醇和其他类固醇基团。在一些实施方案中,用一种或多种反离子制备阳离子脂质。反离子(阴离子)的例子包括但不限于Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、乙酸盐、三氟乙酸盐、硫酸盐、亚硝酸盐和硝酸盐。

[0200] 阳离子脂质的非限制性例子包括聚乙烯亚胺、聚酰胺型胺(PAMAM)星暴树状物、

Lipofectin (DOTMA和DOPE的组合)、Lipofectase、LIPOFECTAMINE<sup>TM</sup> (例如, LIPOFECTAMINE<sup>TM</sup>2000)、DOPE、Cytofectin (Gilead Sciences, Foster City, Calif.) 和 Eufectins (JBL, San Luis Obispo, Calif.)。示例性阳离子脂质体可以从N-[1-(2,3-二油酰氧)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、N-[1-(2,3-二油酰氧)-丙基]-N,N,N-三甲基铵甲基硫酸盐 (DOTAP)、3 $\beta$ -[N-(N',N'-二甲氨基乙烷) 氨甲酰基] 胆固醇 (DC-Chol)、2,3-二油基氧基-N-[2(精胺羧酰胺基) 乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐 (DOSPA)、1,2-二肉豆蔻基氧丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵和二甲基双十八烷基铵溴化物 (DDAB) 制成。核酸 (例如, ceDNA) 也可以与例如聚 (L-赖氨酸) 络合或者抗生物素蛋白和脂质可以或不纳入这种混合物中, 例如, 硬脂酰聚 (L-赖氨酸)。

[0201] 在一些实施方案中, 使用美国专利号8,158,601中描述的阳离子脂质或如美国专利号8,034,376中所述的多胺化合物或脂质, 递送本公开描述的核酸, 所述文献的每篇通过引用方式并入本文。

[0202] 在一些实施方案中, 本公开描述的核酸是缀合的 (例如, 与增加细胞摄取的物质共价结合)。“增加细胞摄取的物质”是促进核酸跨脂质膜转运的分子。例如, 核酸可以与亲脂化合物 (例如, 胆固醇、生育酚等)、细胞渗透肽 (CPP) (例如, penetratin、TAT、Syn1B等) 和多胺 (例如, 精胺) 缀合。增加细胞摄取的其他例子例如在 Winkler (2013) .Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7):791-809 中公开, 所述文献的内容通过引用的方式并入本文。

[0203] 在一些实施方案中, 本公开描述的核酸与聚合物 (例如, 聚合物分子) 或叶酸盐分子 (例如, 叶酸分子) 缀合。通常, 递送与聚合物缀合的核酸是本领域已知的, 例如, 如 W02000/34343 和 W02008/022309 中所述, 所述文献的内容通过引用的方式并入本文。在一些实施方案中, 本公开描述的核酸与聚 (酰胺) 聚合物缀合, 例如, 如美国专利号8,987,377 所描述。在一些实施方案中, 本公开描述的核酸与叶酸分子缀合, 如美国专利号8,507,455 中所述, 所述文献的内容通过引用的方式并入本文。

[0204] 在一些实施方案中, 本公开描述的核酸与糖缀合, 例如, 如美国专利号8,450,467 中所述, 所述文献的内容通过引用的方式并入本文。

[0205] 备选地, 可以使用核酸的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以按照稳定和可重复方式封装物质。为了避免因胞内聚合物过载所致的副作用, 应当使用能够体内降解的聚合物设计这类极细的粒子 (规格约0.1 $\mu$ m)。包括使用符合这些要求的生物可降解性聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米粒子。

[0206] 在一些实施方案中, 本公开描述的核酸由脂质纳米粒子递送。通常, 脂质纳米粒子包含可电离性氨基脂质 (例如, 三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲氨基) 丁酸盐、DLin-MC3-DMA、磷脂酰胆碱 (1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、DSPC)、胆固醇和衣壳脂质 (聚乙二醇-二肉豆蔻酰甘油, PEG-DMG), 例如, 如 Tam 等人 (2013) .Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery. Pharmaceuticals 5(3):498-507 公开。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有约10nm和约1000nm之间的平均直径。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有小于300nm的直径。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有约10nm和约300nm之间的直径。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有小于200nm的直径。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有约25nm和约200nm之间的直径。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子制备物

(例如,包含多个脂质纳米粒子的组合物)具有平均大小(例如,直径)为约70nm至约200nm和更一般地平均大小为约100nm或更小的大小分布。

[0207] 在一些实施方案中,本公开描述的核酸由金纳米粒子递送。通常,核酸可以共价结合于金纳米粒子或非共价结合于金纳米粒子(例如,通过电荷-电荷相互作用结合),例如,如Ding等人(2014).Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery.Mol.Ther.22(6); 1075-1083所描述。在一些实施方案中,使用例如在美国专利号6,812,334中描述的方法,产生金纳米粒子-核酸缀合物,所述文献的内容通过引用的方式并入本文。

[0208] 除还上文描述的递送方法之外,还包括以下技术作为向宿主递送核酸组合物的备选方法。已经在美国专利号5,656,016中使用并且描述超声促渗法(例如,超声法)作为增强药物渗透入循环系统和穿过循环系统的速率和有效性的手段。包括的其他药物递送备选项是骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼科制剂(Bourlalis等人,1998)、经皮基质(美国专利号5,770,219和5,783,208)和反馈控制的递送(美国专利号5,697,899)。

[0209] 递送/施用

[0210] 在一些实施方案中,本公开提供向细胞(例如,宿主细胞)递送异源核酸的方法,所述方法包括向细胞递送如本公开所描述的核酸。

[0211] 在一些方面,本公开提供转染的宿主细胞。“宿主细胞”指携带或能够携带目的物质的任何细胞。可以使用宿主细胞作为如本公开所描述的核酸的接受者。该术语包括已经转染的原始细胞的后代。因此,如本文所用的“宿主细胞”可以指已经用外源DNA序列(例如,如本公开所描述的核酸)转染的细胞。可以理解,由于天然、意外或人为突变,单个亲本细胞的后代可以不必须在形态或在基因组或总DNA补体(DNA complement)方面与原始亲本完全相同。

[0212] 在一些实施方案中,宿主细胞是容许性细胞。在一些实施方案中,宿主细胞不是容许性细胞。宿主细胞经常是哺乳动物细胞。在一些方面,本公开提供向受试者递送异源核酸的方法,所述方法包括向受试者施用具有如本公开所描述的核酸的宿主细胞。例如,在一些实施方案中,宿主细胞是包含如本公开所描述的核酸(例如,具有编码血液疾病相关性转基因的异源核酸插入物的核酸)的血细胞,如人血细胞。不希望受任何具体理论约束,一些实施方案中递送这种宿主细胞可用于治疗血液的疾病或病症。

[0213] 本公开的各方面涉及以下发现:相对于目前使用的病毒性和细菌衍生的基因治疗载体,如本文所述的核酸在宿主中激发降低的免疫应答(例如,不激发免疫应答)。在一些方面,本公开提供向受试者递送异源核酸的方法,所述方法包括向受试者递送如本公开所描述的核酸,其中核酸的递送在受试者中不产生针对该核酸的免疫应答。在一些实施方案中,免疫应答是体液应答。体液免疫应答指B淋巴细胞产生抗原特异性抗体。在一些实施方案中,免疫应答是细胞应答。细胞免疫应答指这样的免疫应答,其不涉及抗体,而涉及通过抗原(例如,外源核酸)激活免疫细胞(例如,吞噬细胞、抗原特异性T细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞等)。

[0214] 不希望受任何具体理论约束,缺少因施用如本公开所描述的核酸激发的免疫应答允许该核酸在多个时间施用至宿主。在一些实施方案中,向受试者递送异源核酸的时间次数在2至10次(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10次)范围内。在一些实施方案中,向受试者递送异

源核酸超过10次。

[0215] 在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每个日历日(例如,24小时时间)一次。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每2、3、4、5、6或7个日历日一次。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每个日历周(例如,7个日历日)一次。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每二周一次(例如,二个日历周时间内一次)。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每个日历月一次(例如,30个日历日内一次)。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于六个日历月一次。在一些实施方案中,向受试者施用核酸(例如,ceDNA)剂量不多于每个日历年(例如,365天或闰年内366天)一次。

[0216] 可以通过任何合适的途径施用如本文中公开的核酸(包括可以用来表达它们的DNA表达构建体)。对于治疗用途,有效量的核酸(例如,寡核苷酸)和/或其他治疗药可以通过递送治疗药至预期组织(例如,肌肉组织)的任何模式施用至受试者。在一些实施方案中,肌肉施用药物(例如,核酸)。其他合适的施用途径包括但不限于口服、肠胃外、静脉内、腹膜内、鼻内、舌下、气管内、吸入、皮下、眼、阴道和直肠途径。全身性途径包括口服和肠胃外途径。几个类型的装置常规用于吸入法施用。这些类型的装置包括定量吸入器(MDI)、呼吸启动的MDI、干粉吸入器(DPI)、与MDI组合的间隔室/容纳室和雾化器。

[0217] 对于口服施用,可以通过将活性化合物与本领域熟知的可药用运载体组合容易地配制药剂。这类运载体能够使本公开的物质配制为片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬剂等,用于待治疗的受试者口服摄入。用于口服用途的药物制品可以通过以下方式作为固体赋形剂获得:任选地碾磨所产生的混合物,并且如果需要,在添加合适的助剂后加工颗粒混合物,以获得片剂或锭芯。合适的赋形剂尤其是填料,如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制备物,例如,玉米淀粉、小麦淀粉、稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。任选地,口服制剂也可以配制在盐水或缓冲液中以中和内部酸性条件或可以在无任何运载体情况下施用。

[0218] 可以经口使用的药物配制品包括由明胶制成的推入配合式胶囊剂(push fit capsule)以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊剂。推入配合式胶囊剂可以含有与填料如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁和任选与稳定剂混合的有效成分。在软胶囊剂中,活性物质可以溶解于或悬浮于合适的液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。此外,可以添加稳定剂。也可以使用配制用于口服施用的微球。这类微球已经在本领域充分定义。用于口服施用的制剂一般处于适于这种施用的剂型。

[0219] 对于颊含施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0220] 对于吸入施用,根据本公开使用的物质(例如,核酸)可以在使用合适推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体)的情况下,以从加压包装或雾化器中提供的气溶胶喷雾剂形式便利地递送。在加压气雾剂的情况下,可通过提供提供经计量的量的阀门,确定剂量单位。可以配制在吸入器或吹入器中使用的例如明胶的胶囊和匣,其含有所述化合物及合适粉末基底(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。



[0221] 当希望全身性递送时,可以将物质(例如,核酸)配制供通过注射(例如通过快速推注或连续输注)进行肠胃外施用。用于注射的制剂可以按单位剂量形式提供,例如,在安瓿或多剂量容器中,伴有添加的防腐剂。所述组合物可以采用多种形式,如在油性或水性溶媒中的混悬剂、溶液剂或乳剂形式,并且可以含有配制剂,如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0222] 用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶形式的物质(例如,反义核酸)的水溶液。另外,物质的混悬剂可以制备为适宜的油性注射混悬剂。合适的亲脂溶剂或运载体包括脂肪油如芝麻油,或合成性脂肪酸酯,如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。水性注射混悬剂可以含有增加混悬剂黏度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,混悬剂也可以含有增加这些物质的溶解度以允许配制高度浓缩的溶液合适稳定剂或物质。备选地,物质(例如,核酸)可以在用前处于粉末形式,用于与合适溶媒(例如,无菌无热原水)配制。物质(例如,核酸)也可以配制于直肠用或阴道用组合物如栓剂或滞留灌肠剂中,所述组合物例如含有常规栓剂基料如可可脂或其他甘油酯类。

[0223] 其他递送系统可以包括定时释放(time-release)、延迟释放或缓释递送系统。这类系统可以避免重复施用物质(例如,反义核酸),从而提升受试者和医师的便利。许多类型的释放递送系统可用。它们包括聚合物基础系统,如聚(丙交酯)乙交酯、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟丁酸和聚酐的系统。递送系统还包括作为如下者的非聚合物系统:脂类,包括固醇类如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪如单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡包衣;使用常规粘合剂和赋形剂的压制片剂;部分融合的植入物和本文公开的其他系统。

[0224] 项

[0225] 1. 核酸,包含旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中所述自身互补序列由形成二个相反的纵向对称茎-环的横臂序列中断,所述相反的纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0226] 2. 根据项1所述的方法,其中第二中断型自身互补序列由截短的横臂序列中断。

[0227] 3. 核酸,包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物,每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件,其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断,所述相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分,其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。

[0228] 4. 根据项1至3中任一项所述的核酸,其中所述中断型自身互补序列长度在40至1000个核苷酸范围内。

[0229] 5. 根据项4所述的核酸,其中所述中断型自身互补序列长度在100至160个核苷酸范围内。

[0230] 6. 根据项1至5中任一项所述的核酸,其中所述横臂序列具有生理条件下-12kcal/mol至-30kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0231] 7. 根据项6所述的核酸,其中所述横臂序列具有生理条件下-20kcal/mol至-25kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0232] 8. 根据前述任一项所述的核酸,其中所述相反纵向对称茎-环每者具有长度在3至



15个碱基对范围内的茎部分。

[0233] 9. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述相反纵向对称茎-环每者具有长度在8至10个碱基对范围内的茎部分。

[0234] 10. 根据前述任一项所述的核酸, 其中每个环部分具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸。

[0235] 11. 根据前述任一项所述的核酸, 其中每个环部分具有三个脱氧核糖核苷酸。

[0236] 12. 根据前述任一项所述的核酸, 其中一个环部分具有三个脱氧胸苷并且另一个环部分具有三个脱氧腺苷。

[0237] 13. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述滚环复制蛋白结合元件是Rep结合元件(RBE)。

[0238] 14. 根据项13所述的核酸, 其中RBE包含序列5' -GCTCGCTCGCTC-3'。

[0239] 15. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述有效的末端解析位点包含序列5' -TT-3'。

[0240] 16. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述有效末端解析位点的3'末端距滚环复制蛋白结合元件的5'末端15至25个核苷酸。

[0241] 17. 根据项2-16中任一项所述的核酸, 其中所述截短的横臂序列形成二个相反纵向非对称茎-环。

[0242] 18. 根据项17所述的核酸, 其中所述相反纵向非对称茎-环之一具有长度8至10个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0243] 19. 根据项18所述的核酸, 其中一个纵向非对称茎-环具有长度少于8个碱基对的茎部分和具有2至5个脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0244] 20. 根据项19所述的核酸, 其中一个纵向非对称茎-环具有长度小于3个碱基对的茎部分。

[0245] 21. 根据项18所述的核酸, 其中一个纵向非对称茎-环具有具备3个或更少脱氧核糖核苷酸的环部分。

[0246] 22. 根据项17至21中任一项所述的核酸, 其中所述截短的横臂序列具有生理条件下0kcal/mol至大于-22kcal/mol范围内的解折叠Gibbs自由能( $\Delta G$ )。

[0247] 23. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述异源核酸插入物经工程化以表达蛋白质或功能性RNA。

[0248] 24. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述异源核酸插入物是作为基因编辑的底物的无启动子构建体。

[0249] 25. 根据项24所述的核酸, 其中所述无启动子构建体为TALENs、锌指核酸酶(ZFNs)、巨核酸酶、Cas9和其他基因编辑蛋白提供底物。

[0250] 26. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述核酸长度在500至50,000个核苷酸范围内。

[0251] 27. 根据前述任一项所述的核酸, 其中所述核酸包含单个末端封闭型链。

[0252] 28. 组合物, 其包含项1至27任一项中所述的多个核酸。

[0253] 29. 根据项29所述的组合物, 其中所述多个核酸是末端对末端连接。

[0254] 30. 组合物, 包含项1至27任一项中所述的核酸和可药用运载体。

- [0255] 31. 宿主细胞, 包含项1至27中任一项所述的核酸。
- [0256] 32. 根据项31所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞还包含与所述核酸的滚环复制蛋白结合元件选择性结合的滚环复制蛋白。
- [0257] 33. 向细胞递送异源核酸的方法, 所述方法包括向所述细胞递送项1至27中任一项所述的核酸。
- [0258] 34. 向受试者递送异源核酸的方法, 所述方法包括向所述受试者递送项1至27中任一项所述的核酸, 其中核酸递送不在受试者中引起针对所述核酸的免疫应答。
- [0259] 35. 根据项34所述的方法, 其中所述免疫应答是体液应答。
- [0260] 36. 根据项34所述的方法, 其中所述免疫应答是细胞应答。
- [0261] 37. 根据项34所述的方法, 其中所述异源核酸在多个时间下递送至所述受试者。
- [0262] 38. 根据项34所述的方法, 其中向所述受试者递送异源核酸的时间次数在2至10次范围内。
- [0263] 39. 根据项37或38所述的方法, 其中将所述异源核酸向所述受试者每小时一次、每日一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次、半年一次或每年一次递送。
- [0264] 40. 向受试者递送异源核酸的方法, 所述方法包括向所述受试者递送项31或32所述的宿主细胞。
- [0265] 41. 根据项40所述的方法, 其中所述宿主细胞是血细胞。
- [0266] 42. 根据项40或41所述的方法, 其中所述宿主细胞在多个时间下被递送。
- [0267] 43. 根据项42所述的方法, 其中向所述受试者每小时一次、每日一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次、半年一次或每年一次递送至所述宿主细胞。
- [0268] 44. 制备核酸的方法, 所述方法包括:
- [0269] (i) 向容许性细胞引入核酸, 所述核酸编码旁侧有至少一个中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断, 所述相反纵向对称茎-环每者具有长度5至15个碱基对范围内的茎部分和具有2至5个未配对的脱氧核糖核苷酸的环部分; 和
- [0270] (ii) 维持所述容许性细胞处于容许性细胞中的滚环复制蛋白质启动产生所述核酸的多个拷贝的条件下, 其中所述容许性细胞不表达能够将所述核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白。
- [0271] 45. 根据项44所述的方法, 还包括纯化所述核酸的多个拷贝的步骤。
- [0272] 46. 根据项44所述的方法, 其中纯化步骤包括使所述核酸与硅胶树脂接触。
- [0273] 47. 根据项44至46中任一项所述的方法, 其中所述滚环复制蛋白质选自AAV78、AAV52、AAV Rep68和AAV Rep 40。
- [0274] 48. 根据项44至47中任一项所述的方法, 其中所述容许性细胞不是哺乳动物细胞。
- [0275] 49. 根据项48所述的方法, 其中所述容许性细胞是昆虫细胞系、酵母细胞系或细菌细胞系。
- [0276] 50. 根据项44-49中任一项所述的方法, 其中所述滚环复制蛋白质由辅助病毒载体编码, 任选地其中所述辅助病毒载体是苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 多核型多角体病毒 (AcMNPV) 载体或杆状病毒表达载体 (BEV)。

[0277] 51. 组合物, 包含: i) 包含单个亚单位的单聚体核酸和 ii) 包含两个或更多个亚单位的至少一种多聚体核酸, 其中单聚体核酸的每个亚单位和至少一种多聚体核酸的每个亚单位包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断并且另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断。

[0278] 52. 项51所述的组合物, 其中所述至少一种多聚体核酸包含二个亚单位。

[0279] 53. 根据项52所述的组合物, 其中所述二个亚单位按尾-对-尾构型连接。

[0280] 54. 制备核酸的方法, 所述方法包括:

[0281] (i) 向容许性细胞引入核酸, 所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中已经确定一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断, 其中已经确定另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断, 其中所述容许性细胞表达滚环复制蛋白, 但是不表达能够将所述核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白; 和

[0282] (ii) 维持所述容许性细胞处于在所述容许性细胞中的所述滚环复制蛋白质复制的条件下。

[0283] 55. 根据项54所述的方法, 还包括从所述容许性细胞分离复制的核酸。

[0284] 56. 分析核酸的方法, 所述方法包括:

[0285] i) 获得核酸制备物, 所述核酸制备物包含从容许性细胞分离的核酸复制产物, 其中所述容许性细胞包含含有异源核酸插入物的核酸, 所述异源核酸插入物旁侧有中断型自身互补序列, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断, 其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断, 其中所述容许性细胞表达滚环复制蛋白, 但是不表达能够将所述核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白, 并且其中所述滚环复制蛋白与所述核酸的滚环复制蛋白结合元件结合并且复制所述核酸以产生核酸复制产物; 和

[0286] ii) 确定一种或多种复制产物的理化特性。

[0287] 57. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是一个或每个自身互补序列的核苷酸序列。

[0288] 58. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是一种或多种复制产物的多聚化程度。

[0289] 59. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是核酸制备物中复制产物的单聚体形式和/或多聚体形式的化学计量。

[0290] 60. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是一种或多种复制产物对限制性核酸内切酶消化的敏感性。

[0291] 61. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是复制产物的二聚体形式中单体的极性, 其中所述极性是头-对-头、头-对-尾或尾-对-尾。

[0292] 62. 根据项56所述的方法, 其中所述理化特性是一种或多种复制产物的分子量或复制产物的片段的分子量。

[0293] 63. 根据项62所述的方法, 其中所述分子量属于包含一个或每个自身互补序列的一个或多个复制产物的片段。

- [0294] 64. 根据项62或63所述的方法, 其中基于电泳迁移率测定所述分子量。
- [0295] 65. 根据项62或63所述的方法, 其中基于质谱法测定所述分子量。
- [0296] 66. 根据项62所述的方法, 其中所述分子量属于一个或多个复制产物的片段, 并且其中在测定分子量之前, 通过包括用聚合酶延长引物的反应扩增所述片段。
- [0297] 67. 根据项62所述的方法, 其中包括引物延长的反应是聚合酶链反应。
- [0298] 68. 制备核酸的方法, 所述方法包括:
- [0299] (i) 向容许性细胞引入核酸, 所述核酸包含旁侧有中断型自身互补序列的异源核酸插入物, 每个自身互补序列具有有效的末端解析位点和滚环复制蛋白结合元件, 其中一个自身互补序列由形成二个相反纵向对称茎-环的横臂序列中断, 其中另一个自身互补序列由截短的横臂序列中断, 其中所述容许性细胞表达滚环复制蛋白, 但是不表达能够将所述核酸的复制型拷贝包装入病毒粒子的病毒衣壳蛋白; 和
- [0300] (ii) 维持所述容许性细胞处于在所述容许性细胞中的滚环复制蛋白质复制所述核酸的条件下。
- [0301] 69. 根据项68所述的方法, 还包括从所述容许性细胞分离复制的核酸。

## 实施例

### [0302] 实施例1: 中断型自身互补核酸序列

[0303] 图1A显示中断型自身互补核酸序列(其为AAV2 ITR)的非限制性实施例。如图1A中所示, 该核酸形成T形发夹结构, 所述发夹结构具有茎部分(D-A-A')和具备相反纵向茎-环(B-B'和C-C')的横臂序列。还描述了中断型自身互补核酸序列的trs和RBE。图1B显示中断型自身互补核酸序列的“C-臂”中截短的几个非限制性实施例。图3中显示非对称AAV2 ITR的一个实施例的图示。

### [0304] 从非对称AAV ITR复制ceDNA

[0305] 腺相关病毒(AAV)基因组是旁侧有一般称作反向末端重复序列(ITR)的末端回文的线性单链DNA(图2A, 左侧)。除了7个非配对的碱基外, 145nt ITR序列自身互补并形成能量稳定的“T”形状发夹( $\Delta G$ 约为-72.4kcal/mol,  $T_m > 80^\circ\text{C}$ ) (图1A)。在病毒DNA复制期间, 细胞DNA聚合酶复合体在模板链的3'末端启动合成, 在所述3'末端, 由ITR形成的部分双链体充当引物延长的引物。形成的复制中间体是其中模板和新生链由ITR共价连接的分子内双链体。在生产性感染期间, 称作末端解析的过程解开链内ITR, 产生二个互补的全长病毒基因组(图2B, 左侧)。

[0306] 在AAV cap基因不表达的情况下, 具有非对称ITR的AAV载体基因组发生无效复制并且复制产物以末端封闭型线性双链体DNA(ceDNA)的新构象堆积。由于无效复制(例如, 末端解析不完全), 分子内中间体的互补链现在通过ITR在基因组的两个末端上共价连接(图2B, 右侧)。因此, 在天然条件下, ceDNA行为如同线性双链体DNA, 然而, 在变性条件下, ceDNA链解链但是仍相连, 因此将线性双链体分子转变成单链环状DNA。

[0307] 在一些实施方案中, 从非对称AAV ITR产生ceDNA依赖于转基因盒的一个末端处的截短ITR和其对侧末端上的有效(例如, 有功能)、野生型(wt)或wt样ITR。在一些实施方案中, 截短的ITR在Sf9细胞中ceDNA的复制循环期间无效加工, 导致复制中间体、双链体单体、双链体二聚体等堆积。在结构(衣壳)蛋白不表达的情况下, Rep 78(或Rep68)在完整的ITR

上装配并且在末端解析位点催化位点特异性切刻。该反应导致瞬态酪氨酸-磷酸二酯形成(AAV2 Rep 78的Y156与末端解析位点5' AGTTGG的5' 胸苷共价连接)。瞬态核蛋白复合体随后将供体链转移至互补链的游离3' 末端。因此,ceDNA构象因载体基因组的一个末端上的缺陷性ITR、对侧端上的完整或有效ITR以及p5蛋白和p19Rep蛋白的共表达形成,其中至少一种p5和一种p19 Rep表达。其他细小病毒“小”Rep或NS蛋白可以替代AAV p19 Rep蛋白(Rep 52和Rep 40)。由于这些小Rep蛋白是无加工型单聚体解旋酶,故而可行的是非细小病毒科超家族2(SF2)解旋酶可以替代AAV Rep蛋白。

[0308] 依赖病毒亚科已经相对不变地存在数千万年(和可能数亿年)。假设它们已经与宿主形成稳态关系或共生关系,其中潜伏感染的细胞中的前病毒经常定位至人第19q号染色体上的AAVS1基因座,这似乎未对宿主细胞产生不良作用。尽管处于潜伏状态,AAV基因表达被细胞因子(例如,YY1)和p5 Rep蛋白阻遏,其作用以自动控制方式负向调节来自p5启动子和p40启动子的表达。因此,潜伏感染的细胞具有少许或没有可检测的AAV蛋白并且限制针对合成病毒蛋白的细胞的获得性免疫应答。

[0309] 实施例2:ceDNA的纯化

[0310] 质粒纯化方案一般利用硅胶用于质粒小量制备,或利用阴离子交换色谱二乙基氨基乙基琼脂糖凝胶(例如,DEAE-琼脂糖凝胶)用于大量。为了大规模纯化pDNA,将大肠杆菌细菌用十二烷基硫酸钠(SDS)裂解并且通过使质粒保留在溶液中的变性/中和循环,沉淀细胞蛋白和基因组DNA。复性的双链pDNA与带正电荷的DEAE基团结合和在洗涤步骤后,置换pDNA并用高盐缓冲溶液洗脱。备选地,硅胶膜可以用于高盐条件下从澄清的细菌裂解物选择性吸附pDNA和在低或无等渗性缓冲液中洗脱。

[0311] 观察到可以用基于硅胶的小规模方法轻易地纯化ceDNA。使用大规模阴离子交换方案,ceDNA回收极低效并导致产率低。

[0312] 描述了一种使用硅胶膜从无脊椎动物Sf9细胞大规模纯化ceDNA的方法。增加改性硅胶膜(或色谱介质)的表面积是一种改善流动率、ceDNA吸附和回收的方法。标准滤器囊(capsule)以规格0.5cm直径至20cm直径或更大直径范围的广泛类型配置可获得。该囊可以含有化学惰性支持物上的单层硅胶膜或由惰性支持物分隔的层叠膜,或利用平流设计的褶皱膜。切线流过滤(TFF)和中空纤维过滤(HFF)是共轴流囊式过滤的备选。

[0313] 实施例3:治疗疾病的ceDNA构建体

[0314] 图4显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与眼病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。图4中的第一核酸构建体描述治疗Stargardt病的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码ATP结合盒、亚家族A(ABC1)、成员4(ABCA4)蛋白的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的hBglobin内含子2和位于异源核酸插入物3'的hGH聚腺苷酸信号。

[0315] 图4中的第二核酸构建体描述治疗Usher病的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码引领蛋白(usherin)(USH2A)变体1的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和

有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0316] 图4中的第三构建体描述治疗黄斑变性/血管新生的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码血管内皮生长因子受体(VEGFR)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0317] 图4中的第四构建体描述治疗Leber先天性黑矇的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码中心体蛋白290(CEP290)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0318] 图5显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与血液疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。图5中的第一核酸构建体描述治疗甲型血友病的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码B-结构域缺失的因子VIII蛋白(BDD-FVIII)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0319] 图5中的第二核酸构建体描述治疗甲型血友病的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码超过传统AAV载体克隆容量的全长因子VIII蛋白(FVIII)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0320] 图5中的第三构建体描述治疗血管性血友病因子病(von Willebrand factor disease)的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对非对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码血管性血友病因子(vWF)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0321] 图6显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与肝脏疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性例子。图6中的第一核酸构建体描述治疗高胆固醇血症的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码卵磷脂胆固醇乙酰基转移酶的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效

的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0322] 图6中的第二核酸构建体描述治疗苯丙酮尿(PKU)的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码苯丙氨酸羟化酶(PAH)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0323] 图6中的第三核酸构建体描述治疗糖原贮积病1(GSD1)的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码葡萄糖6-磷酸酶催化性亚单位(G6PC)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0324] 图7显示具有非对称自身互补核酸序列(例如,AAV2 ITR)和与肺疾病相关的转基因的核酸构建体的非限制性实例子。图7中的第一核酸构建体描述治疗囊性纤维化的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0325] 图7中的第二核酸构建体描述治疗 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏的核酸分子的非限制性实施例。该核酸包含一对不对称中断型自身互补核酸序列(例如,非对称AAV2 ITR),其旁侧有编码 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶(AAT)的异源核酸插入物。AAV2 ITR是非对称的,因为AAV2 ITR之一(右侧)在C茎区含有缺失。每个中断型自身互补核酸序列包含有效的Rep结合元件(RBE)和有效的末端解析位点(trs)。该核酸还编码位于异源核酸插入物5'的CMV启动子/增强子和T7启动子和位于异源核酸插入物3'的bGH聚腺苷酸信号。

[0326] 实施例4:体内研究:正常雄性ICR小鼠中流体动力递送裸DNA

[0327] 向小鼠尾静脉输注pDNA后,lacZ表达在24小时和5周之间连续减少,对应于每个二倍体基因组的pDNA量。用具有非对称中断型自身互补序列的ceDNA处理的小鼠肝脏在24小时和1周之间未显示lacZ活性变化,然而表达在第5周显著减少。但是,肝细胞中ceDNA在第5周时基本上保持不变。用甲状腺素结合球蛋白启动子(TBG)GFP盒获得了相似的结果:10周后可检出少量或无GFP表达和pDNA,而ceDNA TBG-GFP表达和DNA水平在1周和10周之间保持不变。

[0328] 实施例5:眼递送ceDNA

[0329] 在覆盖视网膜宽度的细胞中均一地观察到直接GFP荧光。图8A-8D显示递送具有非对称中断型自身互补序列的ceDNA至眼。通过氯胺酮/赛拉嗪(100/10mg/kg)麻醉成年小鼠并且通过体积1-2 $\mu$ l经巩膜注射,玻璃体内递送转染剂。在角膜上施加抗生素软膏以防止小

鼠正在复苏时眼部干燥。允许小鼠在37度复苏并且随后放回小鼠室持续2周并通过CO<sub>2</sub>窒息安乐死。剖取视网膜并加工用于铺片或切片。无需GFP抗体染色来检测转染的细胞。图8A显示小鼠视网膜上GFP荧光的铺片。图8B显示视网膜截面中的GFP荧光。图8C显示视网膜截面中GFP荧光和神经胶质细胞着染情况。图8D显示在通过视网膜下电穿孔(顶部)和玻璃体内注射(底部)递送ceDNA后小鼠视网膜中的GFP荧光。

[0330] 实施例6:体内研究:大鼠中纹状体内递送

[0331] 将ceDNA-GFP(具有非对称中断型自身互补序列的ceDNA)用市售转染试剂(体内jetPEI)按适宜的浓度配制(Polyplus Corp)并颅内注入大鼠纹状体(图9A)。注射后3周和20周处死大鼠,并且处理后,使用免疫组织化学(IHC)用针对GFP、MHCII和Iba1的抗体(Ab)检查脑切片。在第3周和第20周见到相似的GFP表达。如图9B-9C中所显示,在第3周,脑切片中未检出MHCII抗原或Iba1抗原。

[0332] 实施例7:产生ceDNA的Sf9感染

[0333] 转座至Bacmid中

[0334] DH10Bac感受态细胞(Invitrogen)在冰上解冻。将50μl细胞分装入14ml管,添加50ng质粒DNA(例如,包含编码蛋白质的转基因的质粒,所述转基因旁侧有非对称中断型自身互补序列)并温和地混合。这个实施例中描述的质粒的DNA序列由SEQ ID NO:25表示。包含编码蛋白质的转基因的质粒区域的DNA序列由SEQ ID NO:26表示,所述转基因旁侧有非对称中断型自身互补序列。

[0335] 图10A-10B中显示质粒DNA中断型自身互补序列的序列分析。图10A中显示5'自身互补序列(称作头部部分,在转基因的编码性序列的上游)。使用与质粒构建体的CMV启动子互补的引物,对该序列测序。图10A显示5'自身互补序列的区域中质粒的限制性酶切图。两轮质粒序列结果与作为野生型AAV2 ITR序列的参考序列比对。

[0336] 10B中显示3'自身互补序列(称作尾部分,在转基因的编码性序列的下游)。使用与质粒构建体的SV40启动子互补的引物,对该序列测序。图10B显示3'自身互补序列的区域中质粒的限制性酶切图。两轮质粒序列结果与作为野生型AAV2 ITR序列的参考序列比对。结果显示自身互补序列内部与横臂结构的一条臂对应的截短(truncation)。

[0337] 这些结果证实,质粒DNA构建体编码了旁侧有非对称中断型自身互补序列的转基因。非对称性因如下情况产生:5'自身互补序列编码完整的横臂;而3'自身互补序列编码截短的横臂。

[0338] 将管随后在冰上温育30分钟并随后在42℃水浴槽中热休克45秒。将管随后在冰上致冷2分钟。将450μl SOC培养基添加至这些管并且将它们在37℃培养箱中振摇4小时。等分试样1:10稀释并将50μl铺种在含有50μg/ml卡那霉素、7μg/ml庆大霉素,10μg/ml四环素、100μg/ml Bluo-gal和40μg/ml IPTG的琼脂平上板。将平板在37℃温育48小时或在30℃温育72小时。挑出单个白色菌落并在新鲜平板上划线,以确信它没有沾染蓝色菌落,随后温育过夜。产生甘油贮藏物。

[0339] 从Bacmid制备DNA

[0340] 在含50μg/ml卡那霉素、7μg/ml庆大霉素、10μg/ml四环素的10ml LB培养基中温育Bacmid并在37℃摇床中培育过夜。将培养物在8000转/分钟离心10分钟。移除上清液并将沉淀物重悬于来自Qiagen提取试剂盒的1.5ml P1缓冲液中。添加1.5ml缓冲液2并将管翻转4-



6次。添加2.1缓冲液P3并将管翻转4-6次。将沉淀物经过Qiagen注射器滤器并8000转/分钟离心10分钟。将清亮的裂解液转移至含有5ml异丙醇的管并充分混合并在4℃以最大速度离心30分钟。移除上清液并添加3ml 70%乙醇以洗涤沉淀物。将沉淀物随后在8000转/分钟离心10分钟。随后洗涤沉淀物并晾干。DNA随后重悬于200μl TE缓冲液中。取出等分试样并且在260nm读取光密度(OD)以定量DNA浓度。

[0341] 产生P1杆状病毒表达载体(BEV)

[0342] 在T25 TC瓶中,总计 $4 \times 10^6$ 个Sf9细胞接种于5ml培养基中。细胞贴壁期间,将瓶置于水平面上,从而细胞将均匀分布。通常,细胞在15分钟内贴壁。1μg Bacmid DNA稀释于75μl水中。在独立的管中,将6μl Promega Fugene HD稀释于69μl水中。通过上下抽吸几次,将稀释的Fugene HD与稀释的DNA混合。15分钟后,添加DNA/脂质复合体至Sf9细胞。4天后收获P1杆状病毒表达载体(BEV)。简而言之,使用5ml移液管从瓶中取出全部培养基并转移至15ml聚苯乙烯管。将容器在1200g离心10分钟以沉淀可能已经夹带的任何细胞或残片。将BEV是离心入新鲜的15ml管并将病毒贮存在4℃。

[0343] 产生杆状病毒感染的昆虫细胞(Biics)

[0344] 50ml Sf9细胞以 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的浓度用1ml BEV (1:50)感染。计数细胞并在第1天(例如,检查以观察细胞计数是否达到 $2 \times 10^6$ 个/ml并且细胞直径计量为约15-16μm)和第2天(例如,检查以观察细胞计数是否达到在 $4-5 \times 10^6$ 个细胞/ml之间并且直径计量为约18-19μm)检查。当它们看上去感染时,将细胞在300xg离心5分钟。移除上清液并将沉淀物重悬于冷冻介质中,以得到终浓度 $20 \times 10^7$ 个细胞/ml。细胞可以在-80℃在搁架中随储存用异丙醇一起冷冻。

[0345] 测试无滴度感染的杆状病毒原液(TIPS)的感染性效率

[0346] 按照 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml准备20ml的四个瓶。以无滴度感染的杆状病毒原液(TIPS)的4个不同稀释度(例如1/1,000、1/10,000、1/50,000、1/100,000)感染细胞。培育细胞并评估直径、生存力和细胞计数3天。为了确定TIPS原液的效率,检查3天后哪个稀释度达到以下标准:活细胞为4至 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml,活力为85%至95%,直径为18至20μm。

[0347] ceDNA的产生:

[0348] 用Rep蛋白的TIPS和目的转基因(例如,GFP)共感染 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml Sf9细胞。4-5天后观察细胞的直径和生存力。通过离心机中按照4150转/分钟离心30分钟,收集沉淀物中的细胞。随后冷冻细胞或提取ceDNA,例如通过Qiagen Midi Plus纯化方案提取。

[0349] ceDNA的分析

[0350] 通过天然凝胶电泳和/或变性凝胶电泳辅以限制酶切消化,分析ceDNA。例如,选择在ITR之间ceDNA序列中大约2/3的单切割限制性酶并且在琼脂糖凝胶上电泳所产生的限制性消化物。

[0351] 图10C显示在单切割酶Xho I消化后,包含GFP转基因的约4.5kb ceDNA(ceDNA-GFP)在天然条件条件(左)和变性条件(右)下电泳分离成不同的构象异构体(例如,单体、二聚体、三聚体等)。

[0352] 在天然凝胶上(图10C,左),单体解析成二种产物:2.1kb和0.4kb。根据二聚体亚单位的取向(例如,尾-对-尾或头-对-头),二聚体解析成4.1kb/0.4kb产物或4.1kb/0.8kb产物。因二聚体的尾-对-尾构造产生的产物由向下箭头指示。0.4kb末端片段被凝胶底部处杂

质的荧光模糊。向上箭头指示因头-对-头二聚体产生的产物。加重线指示截短的ITR的位置。在单体中,缺失的ITR在ceDNA分子的右侧上,并且在尾-对-尾二聚体中,截短的ITR为内部(在镜平面处)。在头-对-头构象中,截短的ITR将在分子的末端。

[0353] 在变性凝胶上(图10C,右),二聚体ceDNA-GFP在4.1kb和0.8kb产生条带(其与凝胶上作为0.8kb单链DNA电泳的变性0.4kb末端产物相关)。如上所述,在天然凝胶上,头-对-头ceDNA-GFP二聚体的预测产物是0.8kb和4.1kb,并且在变性凝胶上,其为0.8kb和8.2kb。变性凝胶显示8.2kb处无条带并且因此表示ceDNA-GFP二聚体的优势形式为尾-对-尾。

[0354] 尽管本文中已经描述并示例了本发明的几种实施方案,但本领域普通技术人员将轻易地构想多种其他手段和/或结构执行本文所述的功能和/或获得本文所述的结果和/或本文所述的一个或多个优点,并且认定这类变例和/或修改的每一个均处于本发明的范围内。更常见地,本领域技术人员将轻易地理解,本文所述的全部参数、尺度、材料和配置意在示例,并且实际参数、尺度材料和/或配置将取决于使用本发明教授内容的具体一个或多个应用。利用不超出常规的实验,本领域那些普通技术人员会认识到,或将能够确定与本文中所述的本发明具体实施例的许多等同物。因此,应当理解前述实施方案仅以举例方式提出并且属于所附权利要求书及其等同物的范围;本发明可以如具体描述和要求保护那样以外的方式实施。本发明涉及本文所述的每个独立特征、系统、物品、材料和/或方法。此外,如果这类特征、系统、物品、材料和/或方法相互并非前后矛盾,则本发明的范围内包括这类特征、系统、物品、材料和/或方法中两者或更多者的任何组合。

[0355] 除非明确指出相反,否则如在说明书中和在权利要求中本文所用的不定冠词“a”和“an”应当理解为意指“至少一个”。

[0356] 如本文在本说明书中和权利要求中所用,短语“和/或”应当是理解为意指如此结合的要素(即,在某些情况下结合存在和在某些情况下分离存在的要素)中的“任一者或两者”。除非明确指出相反,否则除通过“和/或”具体确定的要素之外,其他要素可以任选地存在,无论是否与具体确定的那些要素相关或不相关。因此,作为一个非限制性例子,对“A和/或B”的称谓,当与使用开放式语言如“包含”联合时,可以在一个实施方案中指A而无B(任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,指B而无A(任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中同时指A和B(任选地包括其他要素)等。

[0357] 如本文在本说明书中和权利要求中所用,“或”应当理解成具有与如上文定义的“和/或”相同的意思。例如,当分隔列表中的各项时,“或”或“和/或”应当解读为包含性,即,包含众多或成系列要素的至少一项且还包含多于一项,以及任选地另外未列出的项。仅术语明确表示相反情况,如“仅之一”或“刚好一个”或在权利要求书中使用时,“由……组成”将指包含众多或成系列要素的刚好一个要素。通常,当前置有排他性术语如“任一者”、“一个”、“仅一个”或“刚好一个”时,如本文所用的术语“或”应当仅解读为表示排他性备选(即,“一个或另一个,但不是两个”)。当权利要求书中使用时,“基本上由……组成”应当具有其如专利法领域中所用的普通含义。

[0358] 如本文在本说明书中和权利要求中所用,在涉及具有一个或多个要素的列表时,短语“至少一个”应当理解为意指选自要素列表中任一个或更多个要素的至少一个要素,但并非必然地包含该要素列表内部具体所列的每个和每种要素中至少一个要素并且并不排除该要素列表中要素的任何组合。这个定义还允许可以任选地存在除了短语“至少一个”所

指的要素列表内部具体确定的要素之外的要素,无论是否与具体确定的那些要素相关或不相关。因此,作为非限制性例子,“A和B中的至少一种”(或,同等地,“A或B中的至少一种”或同等地,“A和/或B中的至少一种”)可以在一个实施方案中指至少一个A、任选地包括多于一个A,同时不存在B(并且任选地包含除B之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个B、任选地包括多于一个B,同时不存在A(并且任选地包含除A之外的要素);在又一个实施方案中,指至少一个A、任选地包括多于一个A,和至少一个B、任选地包括多于一个B(并且任选地包括其他要素)等。

[0359] 在权利要求数中以及在以上说明书中,全部连接词如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”和“容纳”等应理解成是开放式的,即,应意指包括但不限于。就权利要求而言,仅连接词“由……组成”和“基本上由……组成和”应当分别是封闭或半封闭的连接词,如美国专利局专利审查程序手册第2111.03章中所述。

[0360] 序数术语如“第一”、“第二”、“第三”等在权利要求中修饰权利要求要素的用途本身不表明一个权利要求要素胜过另一个权利要求要素的任何优先权、位次或顺序或实施一种方法的动作的时间顺序,但是仅作为标记物用来将具有特定名称的一个权利要求要素与具有相同名称的另一个要素(但是使用序数术语)区分,以便区分权利要求要素。

## 序列表

<110> 马萨诸塞大学 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS)

沃雅戈治疗公司 (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.)

<120> 用于非病毒基因转移的末端封闭型线性双链体DNA

<130> U0120.70077W000

<140> 无

<141> 2017-03-03

<150> US 62/303,046

<151> 2016-03-03

<150> US 62/394,720

<151> 2016-09-14

<150> US 62/406,913

<151> 2016-10-11

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 1

gctcgctcgc tc 12

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 2

cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gc 42

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 3

gccccgggcaa agccccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc cg 42

<210> 4

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 4

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
cgacgccccg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120  
gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 5

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 5

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60  
ccgccccggc aaagccccgg cgtcgggcga cttttggtcg cccggcctca gtgagcgagc 120  
gagcgcgag agagggagtg gcca 145

<210> 6

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 6

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60  
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120  
gagcgcgcag agagggagtg gccaa 145

<210> 7

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 7

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccgggc aaagcccggg 60  
cgtcggggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
gccaaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 8

<211> 144

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 8

aggaacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcg gctcgctcg tcactgaggc 60  
cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag tgagcgagcg 120  
agcgcgcaga gagggagtgg ccaa 144

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 9

cccgtgcggg cccaaagggc ccgc 24

<210> 10

<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 10  
gccccgctggt ttccagcggg ctgcggggccc gaaacggggcc cgc 43  
<210> 11  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 11  
cgggcccgtg cgggccc aaa gggcccgc 28  
<210> 12  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 12  
gccccgggcac gccccgggttt cccggggcg 28  
<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 13  
cgtgcggggcc caaaggggccc gc 22

<210> 14

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 14

gcgggccgga aacgggcccg ctgcccgtg gtttccagcg ggc 43

<210> 15

<211> 142

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 15

aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag 60  
gccgggcgac caaaggctcg cgcacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120  
cgagcgcgca gctgcctgca gg 142

<210> 16

<211> 142

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 16

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60  
gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120  
actccatcac taggggttcc tt 142

<210> 17

<211> 144

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>



<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (84) .. (84)  
<223> n是a, c, g, 或t  
<400> 17  
aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag 60  
gccgggcgac caaaggtcgc ccgncgcccc ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120  
cgagcgcgca gctgcctgca ggctc 144  
<210> 18  
<211> 144  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 18  
aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag 60  
gccgggcgac caaaggtcgc ccgacgcccc ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120  
cgagcgcgca gctgcctgca gggg 144  
<210> 19  
<211> 143  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 合成的多核苷酸  
<400> 19  
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60  
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccccg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc 120  
gagcgcgcag ctgcctgcag ggg 143  
<210> 20  
<211> 148  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 20

tctcagacct gcaggcagct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc 60  
gggcgtcggg cgacctttgg tcgccccggc tcagtgcgagc agcgagcgcg cagagaggga 120  
gtggccaact ccatcactag gggttcct 148

<210> 21

<211> 148

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 21

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60  
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120  
gagcgcgag ctgcctgcag gtctgaga 148

<210> 22

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 22

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60  
ggtcgccccg cctcagtgcg cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120  
aggggttcct 130

<210> 23

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 23

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60  
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120  
actccatcac taggggttcc tgcgg 145

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 24

cgccccgggaa acccgggcgt gccccggc 28

<210> 25

<211> 7255

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 25

cattcgccat tcaggctgca aataagcgtt gatattcagt caattacaaa cattaataac 60  
gaagagatga cagaaaaatt ttcattctgt gacagagaaa aagtagccga agatgacggt 120  
ttgtcacatg gagttggcag gatgtttgat taaaaacata acaggaagaa aaatgccccg 180  
ctgtgggcgg acaaaaatagt tgggaactgg gaggggtgga aatggagttt ttaaggatta 240  
tttagggaag agtgacaaaa tagatgggaa ctgggtgtag cgtcgtaagc taatacgaaa 300  
attaaaaatg acaaaaatagt ttggaactag atttactta tctggttcgg atctcctagg 360  
cgatatcagt gatcagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca 420  
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt 480  
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt 540  
caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt 600  
atggctgatt atgatcctct agtacttctc gacaagctta cattattgaa gcatttatca 660  
gggttattgt ctacagacctg caggcagctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgccccg 720  
gcaaagcccc ggcgctcgggc gacctttggt cgccccgcct cagtgagcga gcgagcgcg 780  
agagagggag tggccaactc catcactagg ggttccttgt agttaatgat taaccgcga 840  
tgctacttat ctacgtagcc atgctctaga gcggccgcac gcgtactagt tattaatagt 900

```

aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 960
cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga 1020
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1080
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt acgcccccta 1140
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg 1200
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt 1260
tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 1320
accccatgga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat 1380
gtcgtaaaca ctccgcccc ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct 1440
atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgccgt gagacgccat ccacgctgtt 1500
ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg taccggttcg aacaggtaa 1560
cgccccataa atcccttttg gcacaatgtg tcttgagggg agaggcagcg acctgtagat 1620
gggacggggg cactaacctt caggtttggg gcttctgaat gtgagtatcg ccatgtaagc 1680
ccagtatttg gccaatctca gaaagctcct ggtccctgga gggatggaga gagaaaaaca 1740
aacagctcct ggagcaggga gagtgtggc ctcttgcctt ccggctccct ctgttgccct 1800
ctggtttctc cccaggttcg aagcgcgcaa ttaaccctca ctaaaggga caaaagctgg 1860
agctcaatcg gaccgaaatt aatacgactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat 1920
tccccggagt taatccggga cttttaattc aaccaacac aatatattat agttaataa 1980
gaattattat caaatcattt gtatattaat taaaatacta tactgtaaata tacattttat 2040
ttacaatcaa aggagatata ccatggtgag caaggcgag gagctgttca ccggggtggt 2100
gcccatacctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga 2160
gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccgcaa 2220
gctgcccgtg ccttgGCCCA cctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 2280
ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 2340
cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccaggt 2400
gaagttcgag ggcgacaccc tgggtgaacc catcgagctg aagggcacg acttcaagga 2460
ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 2520
catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 2580
ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 2640
cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc gccctgagca aagacccaa 2700
cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gtctgtgacc gccgccgga tctctctcg 2760
catggacgag ctgtacaagt aaagcggccg gccgcacagc tgtatacac tgcaagccag 2820
ccagaactcg ccccggaaga ccccgaggat ctcgagcacc accatcacca tcaccatcac 2880
taagtgatta acctcaggtg caggtgcct atcagaaggt ggtggctggt gtgggtaccc 2940
aattcgccct atagtgagtc gtattacgcg cgcagcgcc gaccatggcc caacttgttt 3000
attgcagctt ataattggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca 3060
tttttttcac tgcatctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc 3120
tggtatctccg gaccacgtgc ggaccgagc gccgctctag agcatggcta cgtagataag 3180
tagcatggcg ggtaaatcat taactacaag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc 3240

```

```

tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccc acgccccgggc 3300
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagctg cctgcaggtc tgagacaata accctgataa 3360
atgcttcaat aatgtagcca accactagaa ctatagctag agtcctgggc gaacaaacga 3420
tgctcgcctt ccagaaaacc gaggatgcga accacttcat ccggggtcag caccaccggc 3480
aagcgccgcg acggccgagg tcttccgatc tcctgaagcc agggcagatc cgtgcacagc 3540
accttgccgt agaagaacag caaggccgcc aatgcctgac gatgcgtgga gaccgaaacc 3600
ttgcgctcgt tcgccagcca ggacagaaat gcctcgactt cgctgctgcc caaggttgcc 3660
gggtgacgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaacce agttgacata agcctgttcg 3720
gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca actgggtccag aaccttgacc 3780
gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg cttgttatga ctgttttttt 3840
gtacagtcta tgcctcgggc atccaagcag caagcgcgtt acgccgtggg tcgatgtttg 3900
atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg 3960
ccctaaaaca aagttaggtg gctcaagtat gggcatcatt cgcacatgta ggctcggccc 4020
tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatcttttc ggtcgtgagt tcggagacgt 4080
agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc gggaacttgc tccgtagtaa 4140
gacattcatc gcgcttgctg ctttcgacca agaagcggtt gttggcgctc tcgcggctta 4200
cgttctgccc aagtttgagc agccgcgtag tgagatctat atctatgac tcgcagtctc 4260
cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc aatctcctca agcatgaggc 4320
caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat tacggtgacg atccccgagt 4380
ggctctctat acaaagttgg gcatacggga agaagtgatg cactttgata tcgacccaag 4440
taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc cggccgcgg agttgttcgg 4500
taaattgtca caacgccgcg aatatagtct ttacatgcc cttggccacg cccctcttta 4560
atacgacggg caatttgcac ttcagaaaat gaagagtttg ctttagccat aacaaaagtc 4620
cagtatgctt tttcacagca taactggact gatttcagtt tacaactatt ctgtctagtt 4680
taagacttta ttgtcatagt ttagatctat tttgttcagt ttaagacttt attgtccgcc 4740
cacacccgct tacgcagggc atccatttat tactcaaccg taaccgattt tgccaggtta 4800
cgcggtggt ctatgcggtg tgaaataaccg cacagatgcg taaggagaaa atacgcac 4860
aggcgctctt ccgcttcctc gtcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 4920
gcggtatcag ctactcaaaa ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 4980
ggaaaagaaca tgtgagcaaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 5040
ctggcggttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt 5100
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc 5160
ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 5220
tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 5280
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 5340
tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 5400
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 5460
tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 5520
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgtggt 5580

```

agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 5640  
 gatccttttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 5700  
 attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga 5760  
 agtttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta 5820  
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc 5880  
 cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 5940  
 ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 6000  
 agggccgagc gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 6060  
 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 6120  
 gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtagtg cttcattcag ctccggttcc 6180  
 caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc 6240  
 ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca 6300  
 gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag 6360  
 tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgccccggcg 6420  
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa 6480  
 cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 6540  
 cccactcgtg caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 6600  
 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga 6660  
 atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 6720  
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt 6780  
 ccccgaaaag tgccacctaa attgtaagcg ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaatt 6840  
 tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc cttataaat 6900  
 caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag agtccactat 6960  
 taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac 7020  
 tacgtgaacc atcacctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa gactaaatc 7080  
 ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga 7140  
 gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtca 7200  
 cgctgcgcgt aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtc 7255

<210> 26

<211> 2651

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 26

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60  
 gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt 180  
 agccatgctc tagagcggcc gcacgcgtac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc 240  
 attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 300  
 tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 360  
 aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcccc 420  
 cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 480  
 taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 540  
 gtacatctac gtattagtca tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa 600  
 tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 660  
 tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 720  
 cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg 780  
 tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag 840  
 acaccgggac cgatccagcc tccgtaccgg ttccaacagg taagcgcgcc taaaatccct 900  
 ttgggcacaa tgtgtcctga ggggagaggc agcgacctgt agatgggacg ggggcactaa 960  
 ccctcaggtt tggggcttct gaatgtgagt atcgccatgt aagcccagta tttggccaat 1020  
 ctcagaaagc tcctggtccc tggagggatg gagagagaaa aacaaacagc tcctggagca 1080  
 gggagagtgc tggcctcttg ctctccggct ccctctgttg ccctctggtt tctccccagg 1140  
 ttcgaagcgc gcaattaacc ctactaaaag ggaacaaaag ctggagctca atcggaccga 1200  
 aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcgataa caattccccg gagttaatcc 1260  
 gggaccttta attcaacca acacaatata ttatagttaa ataagaatta ttatcaaate 1320  
 atttgtatat taattaaaat actatactgt aaattacatt ttattttaca tcaaaggaga 1380  
 tataccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag 1440  
 ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 1500  
 acctacggca agctgaccct gaagtcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 1560  
 cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 1620  
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 1680  
 atcttcttca aggacgacgg caactacaag accgcgccc aggtgaagtt cgaggcgac 1740  
 accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 1800  
 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 1860  
 aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 1920  
 ctgcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgccccgac 1980  
 aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 2040  
 atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 2100  
 aagtaaagcg gccggccgca cagctgtata cacgtgcaag ccagccagaa ctgcccccgg 2160  
 aagaccccgga ggatctcgag caccaccatc accatcacca tcaactaagtg attaacctca 2220  
 ggtgcaggct gcctatcaga agtggtgggc tgggtgggg acccaattcg ccctatagt 2280  
 agtcgtatta cgcgcgcagc ggccgaccat ggcccaactt gtttattgca gcttataatg 2340  
 gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt 2400  
 ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc tccgaccac 2460

---

gtgcggaccg agcggccgct ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa 2520  
tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 2580  
cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccg ggcgggcctc agtgagcgag 2640  
cgagcgcgca g 2651



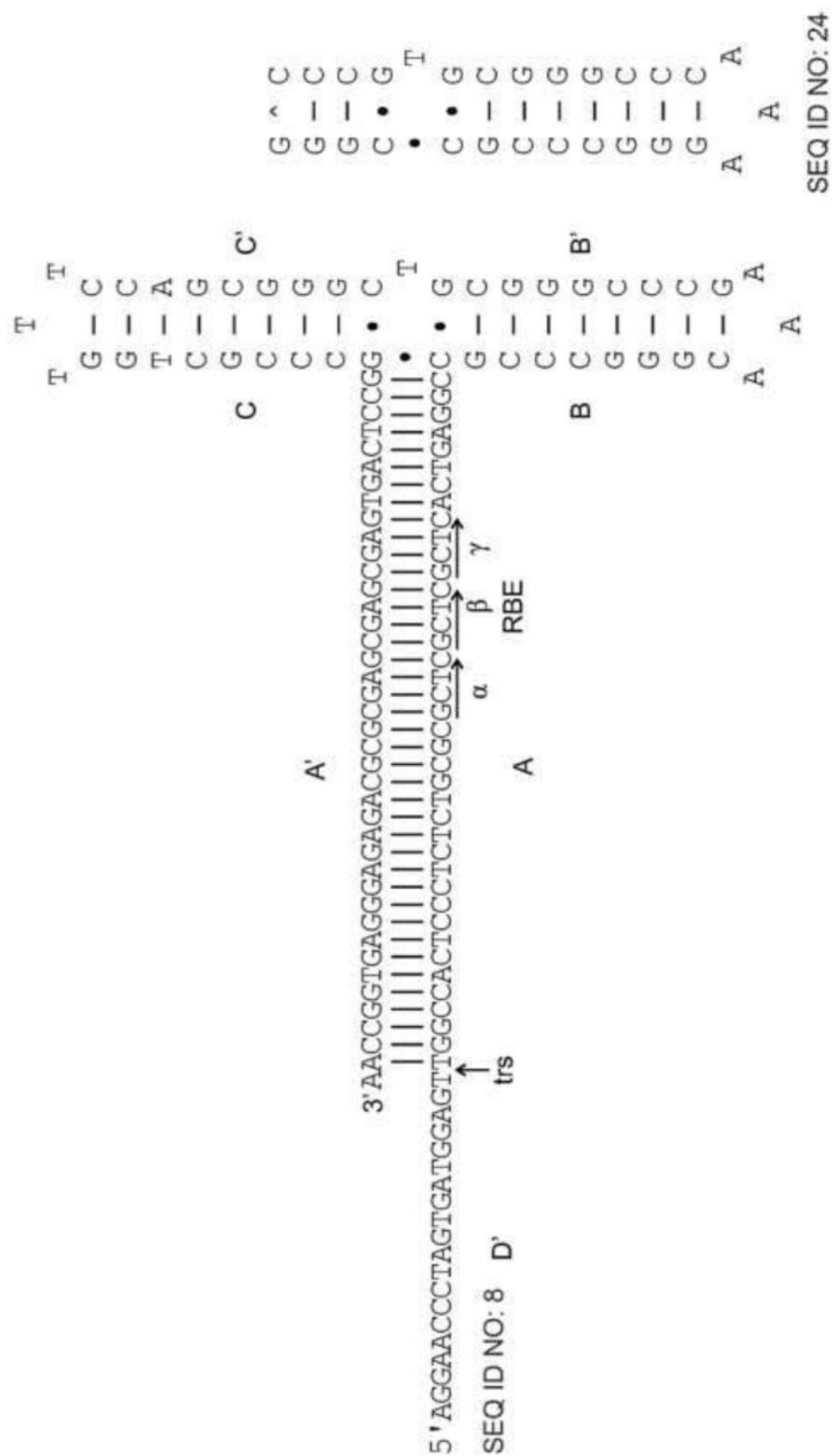


图1A

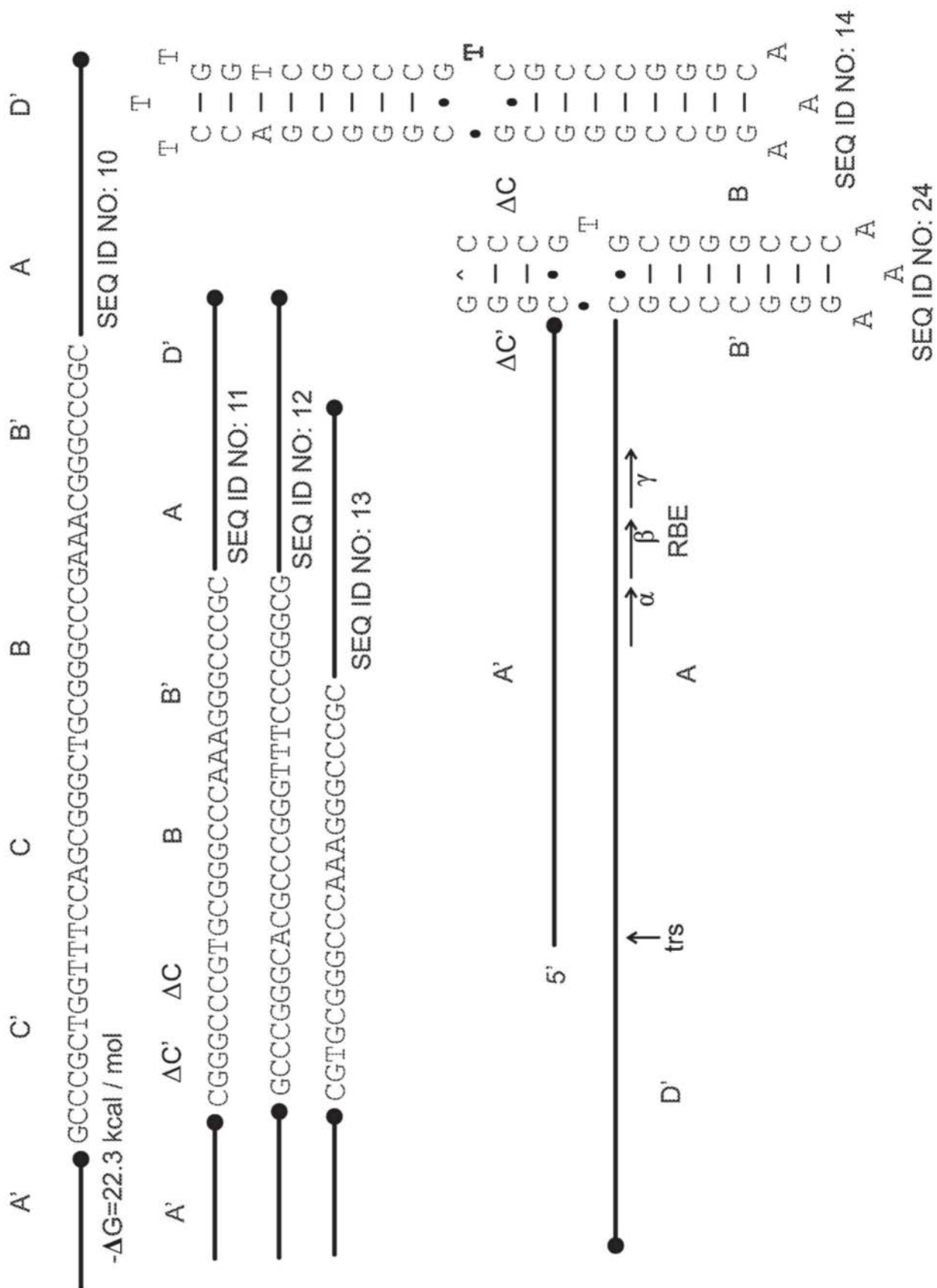


图1B

对称性ITRS

非对称末端回文(ATP)

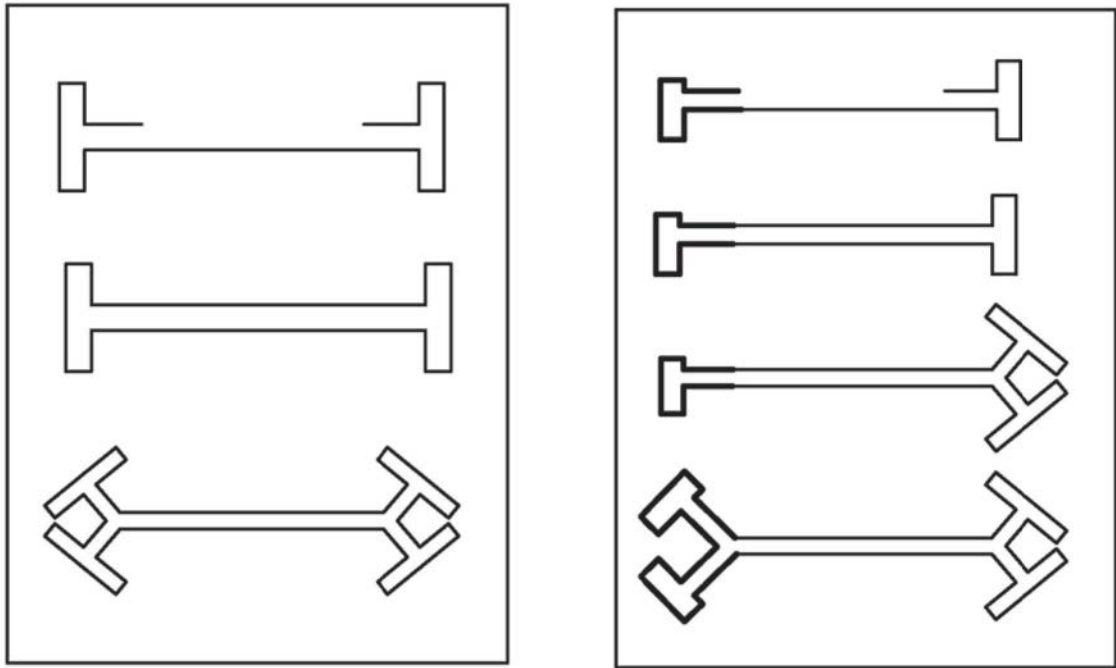


图2A

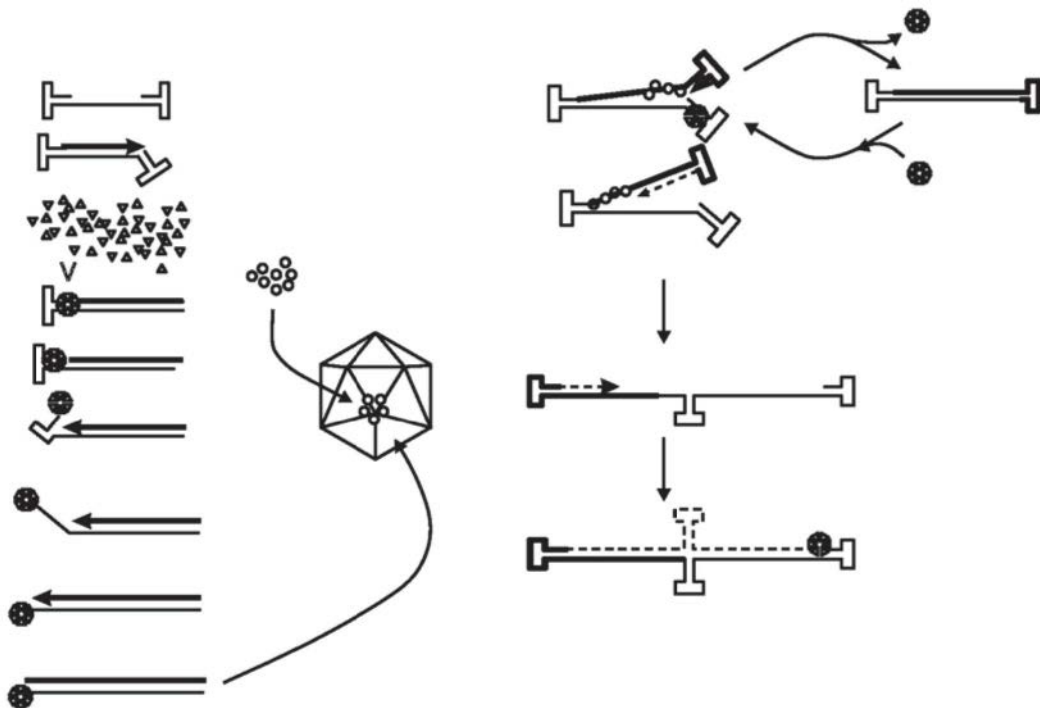


图2B

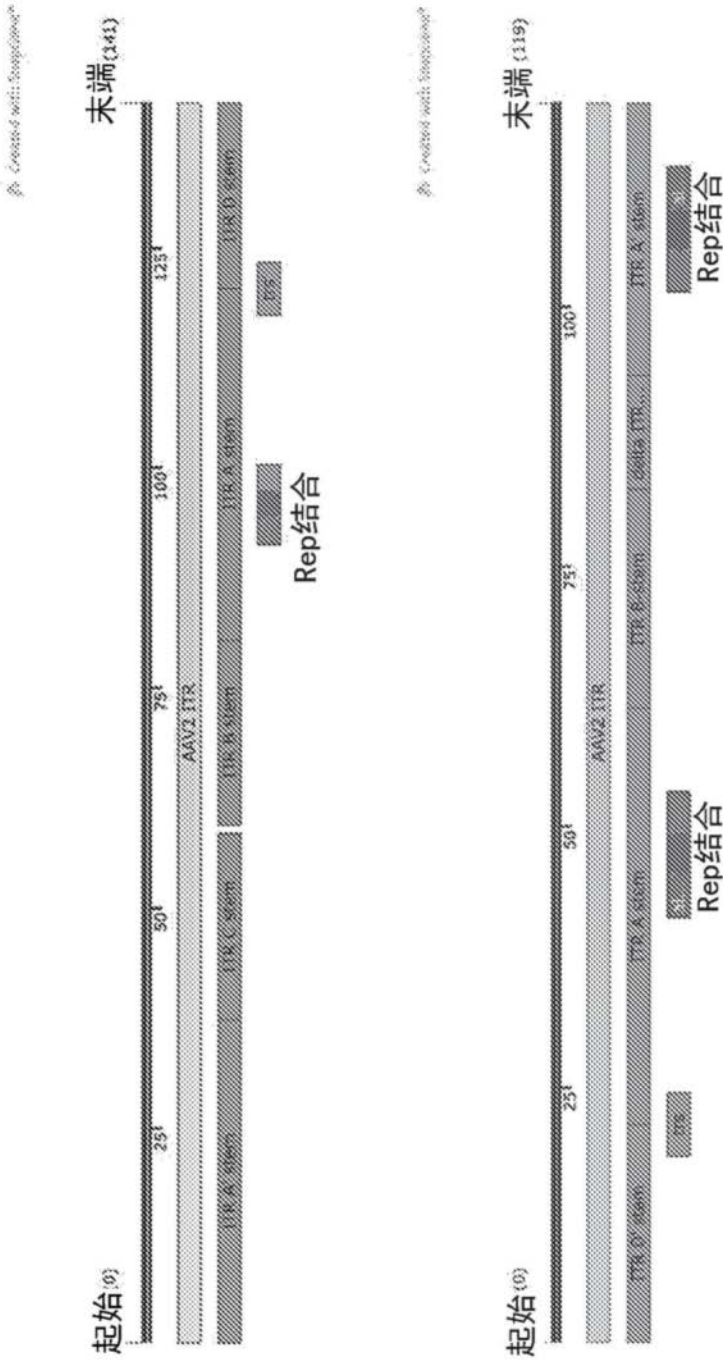


图3

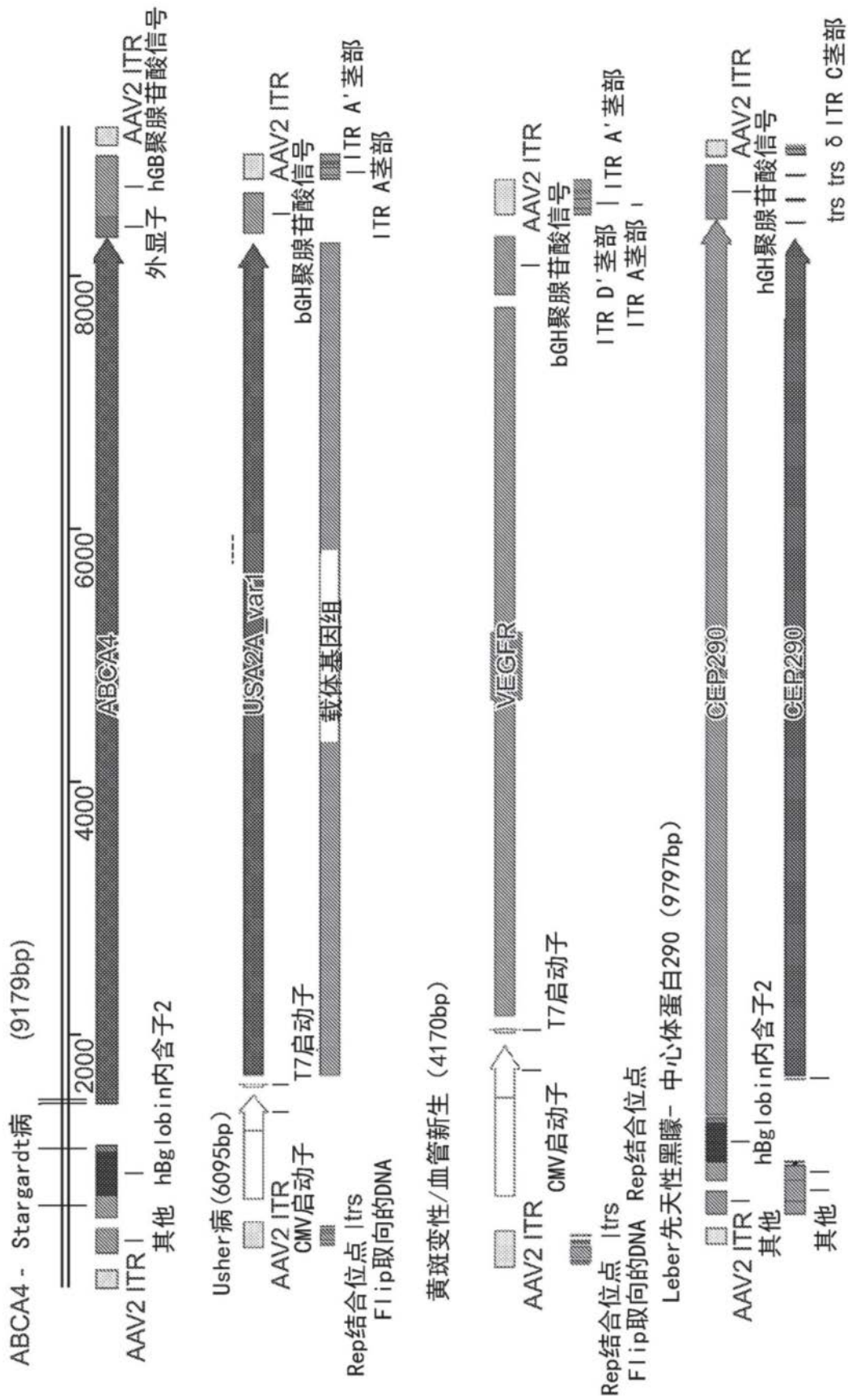


图4

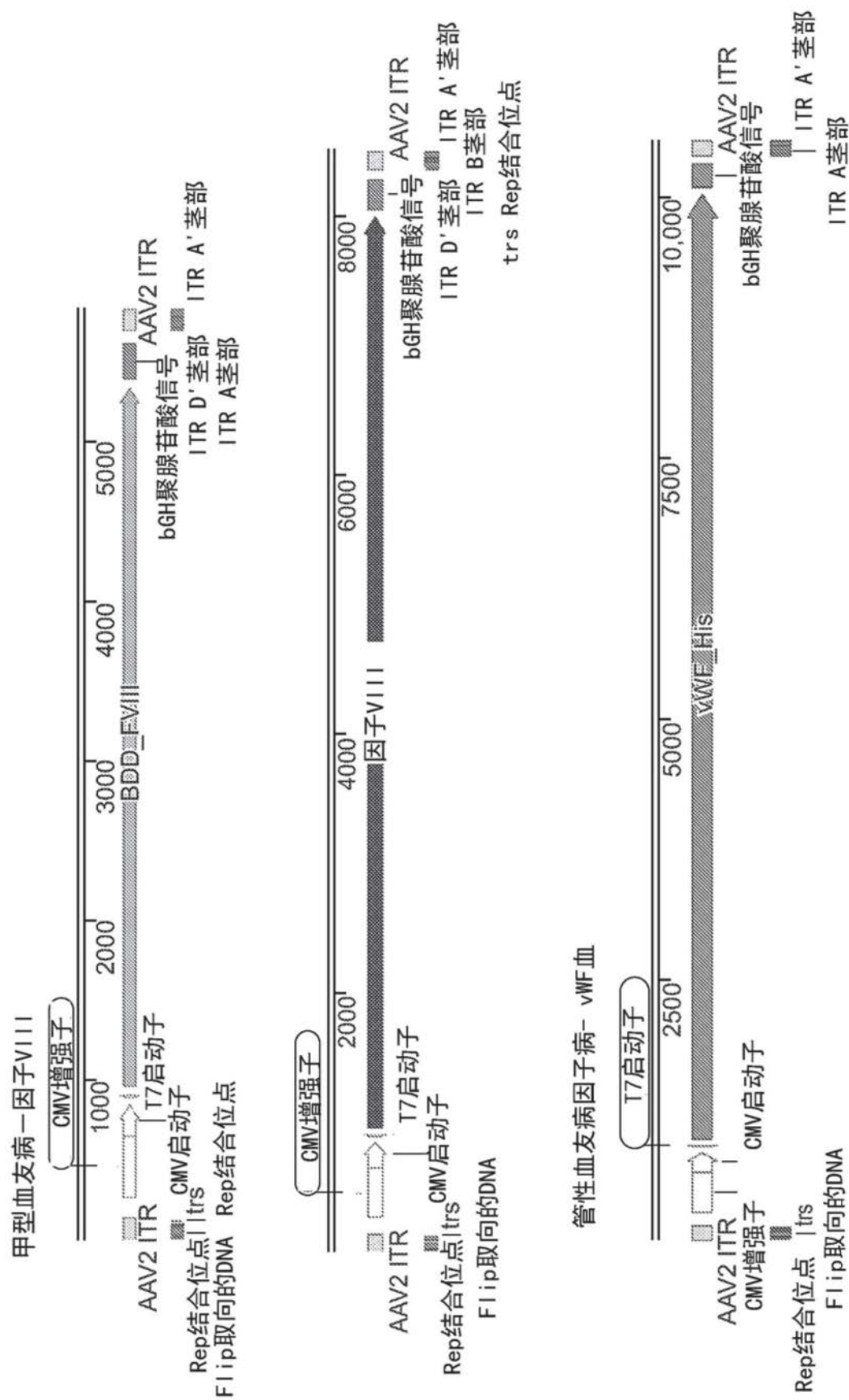


图5



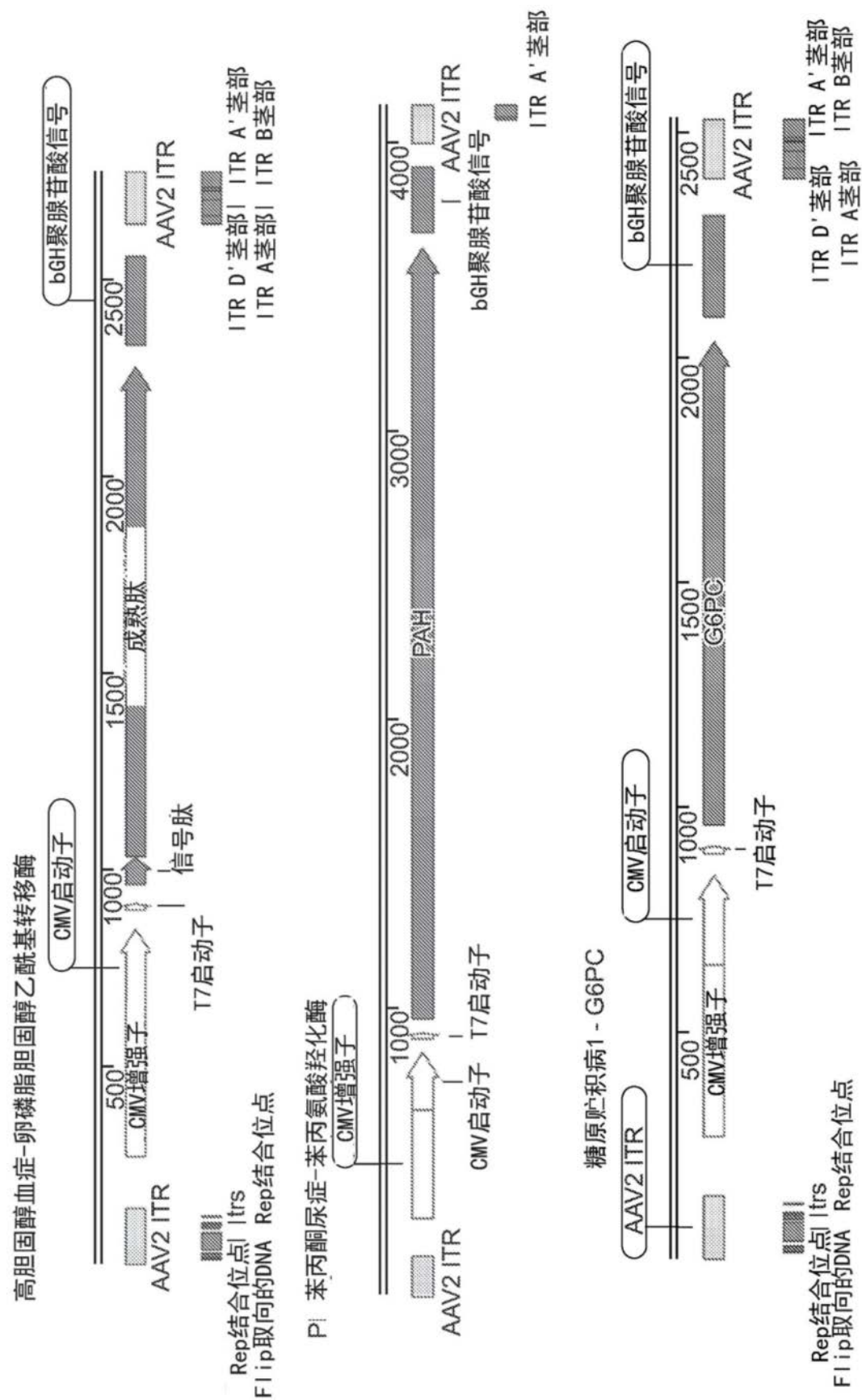


图6

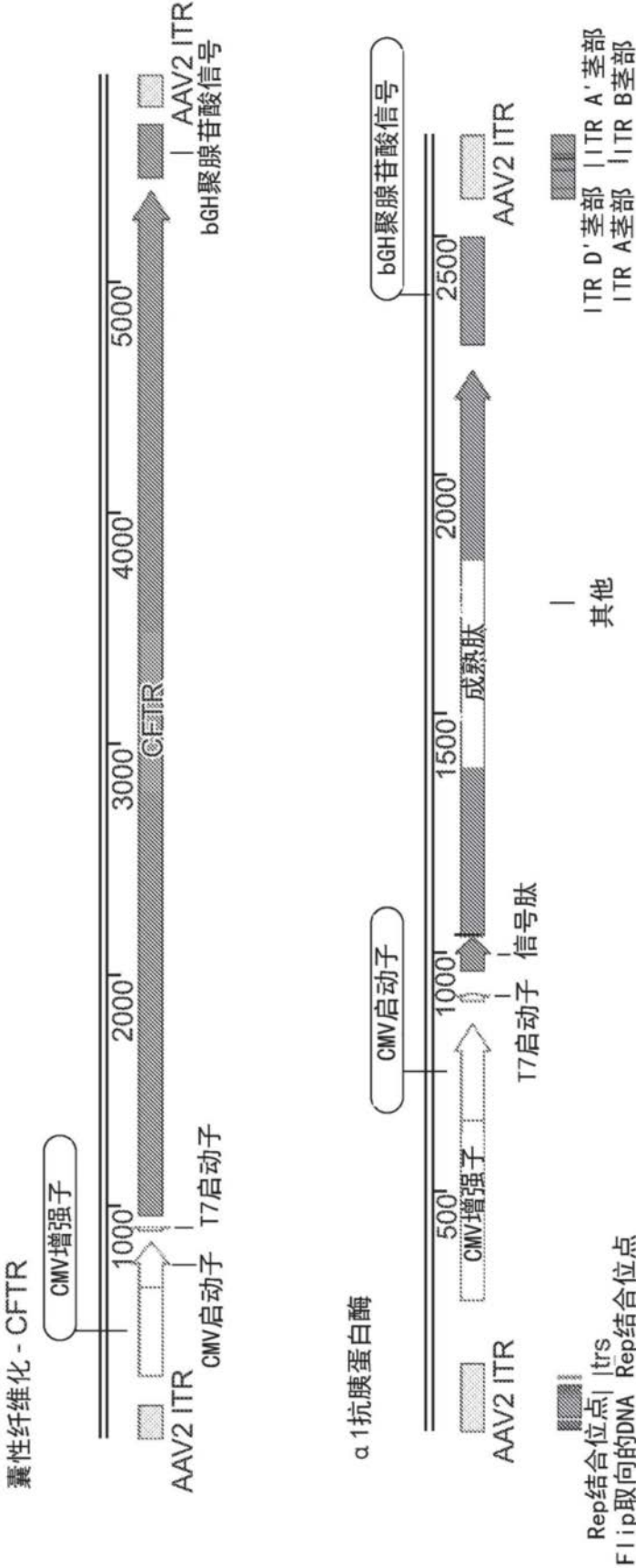


图7



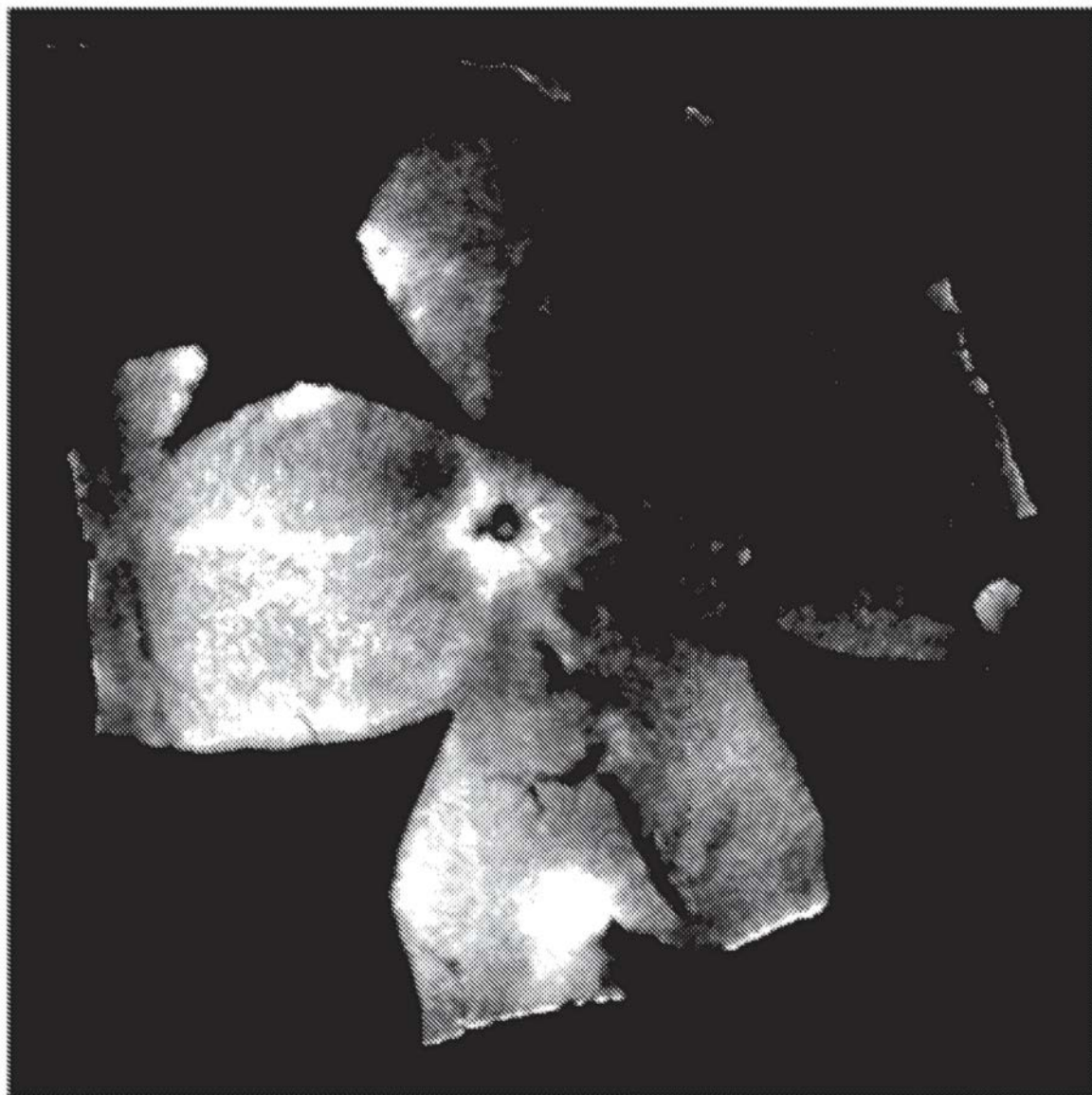


图8A

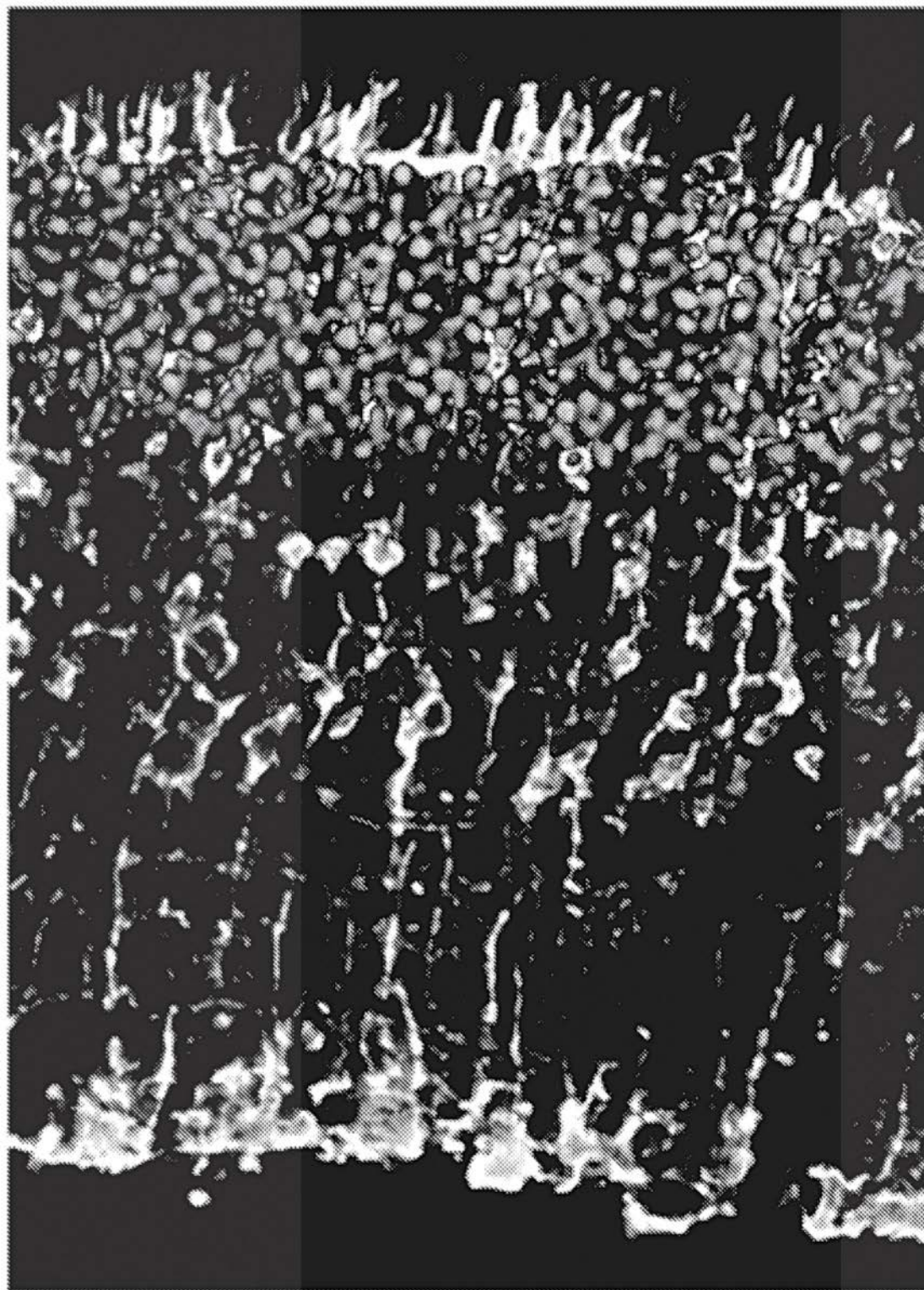


图8B



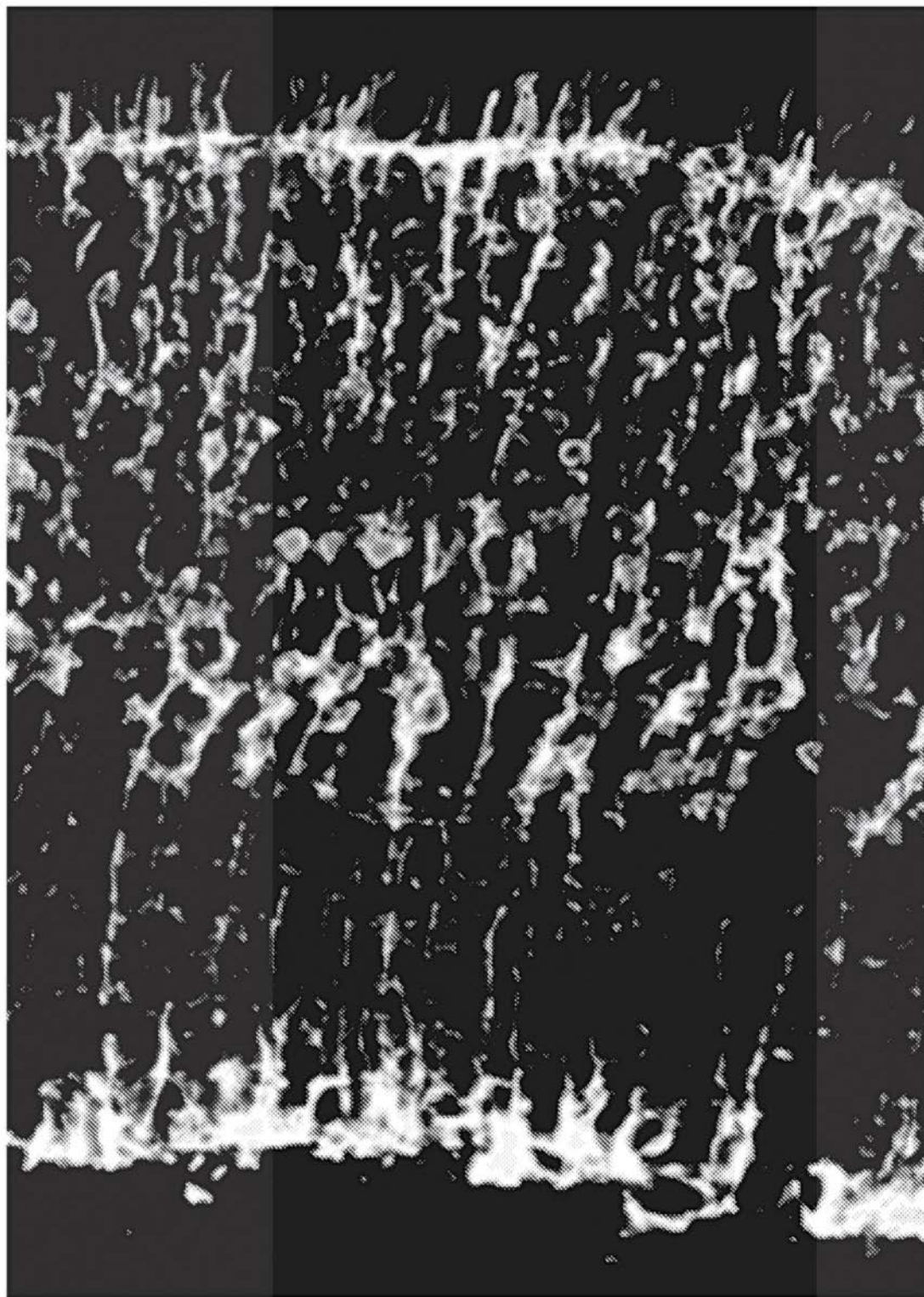


图8C



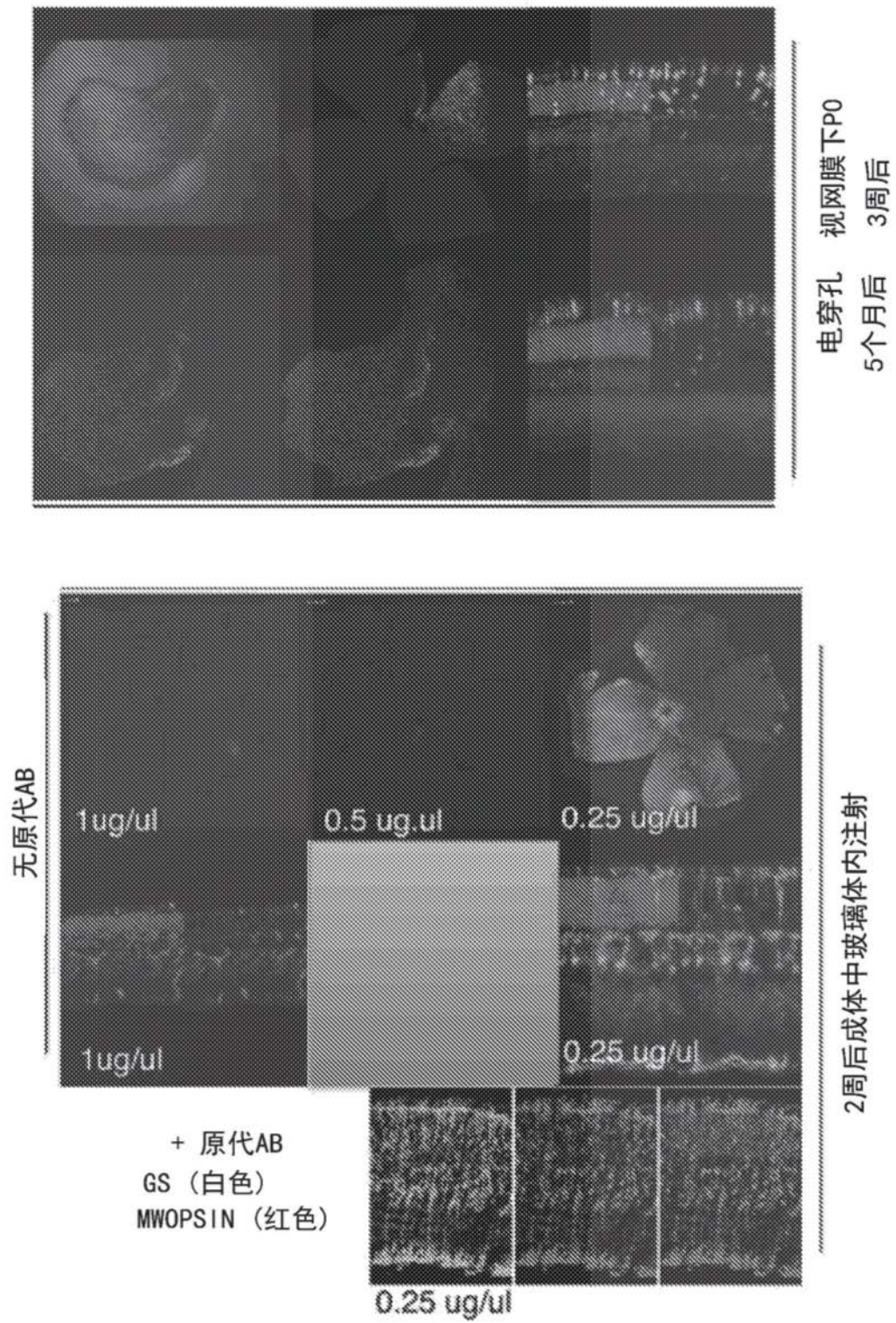


图8D



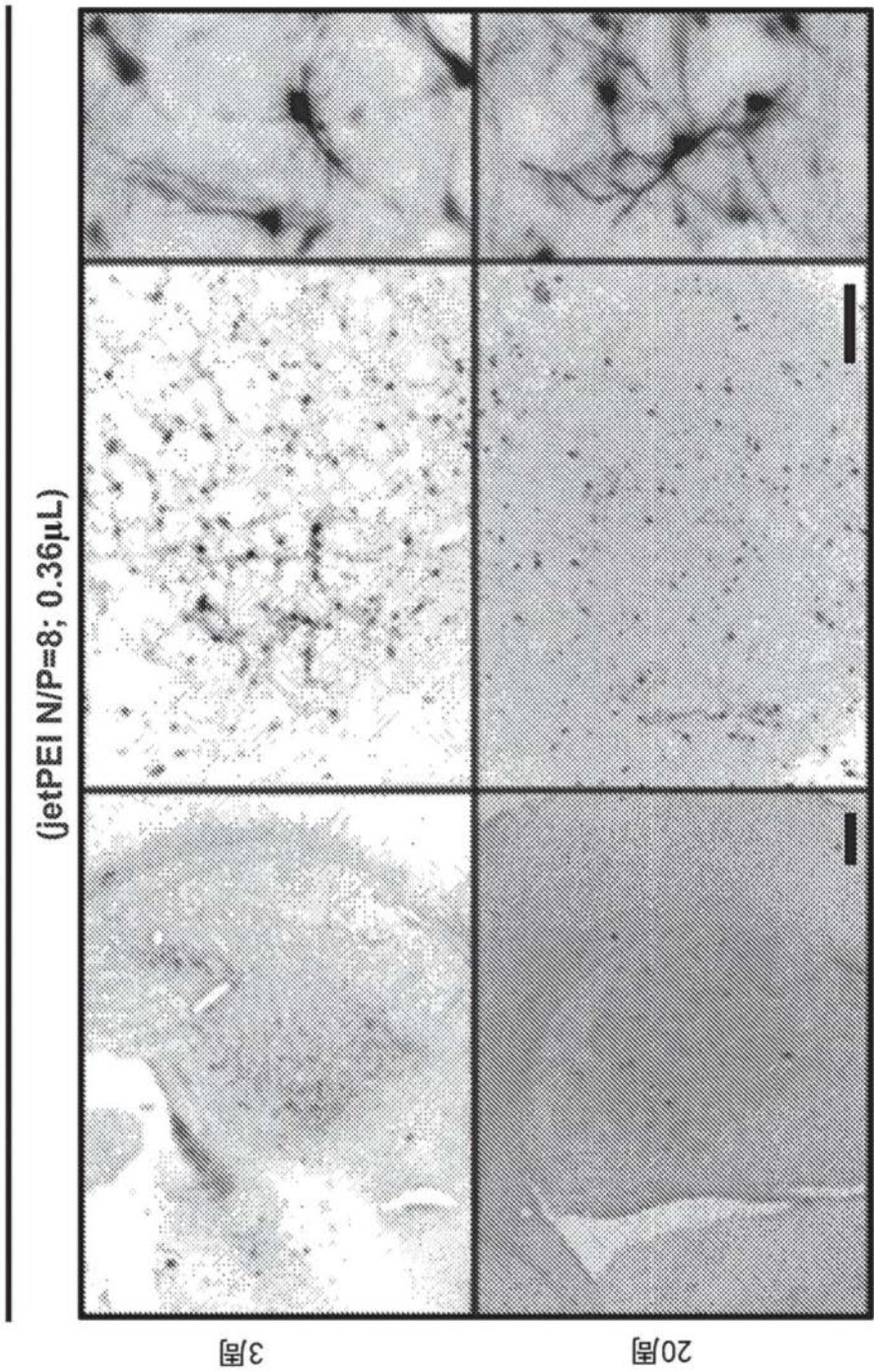


图9A



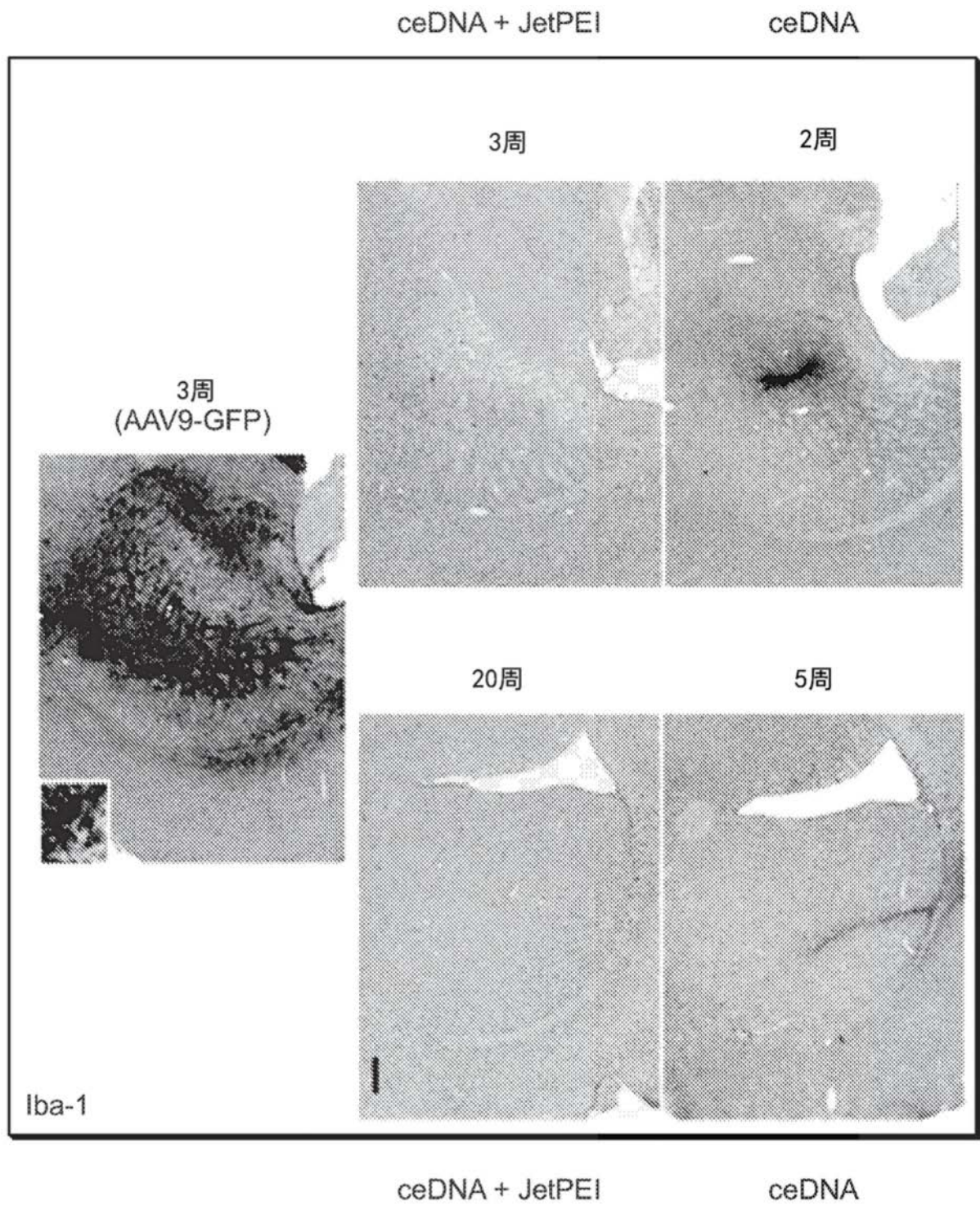


图9B

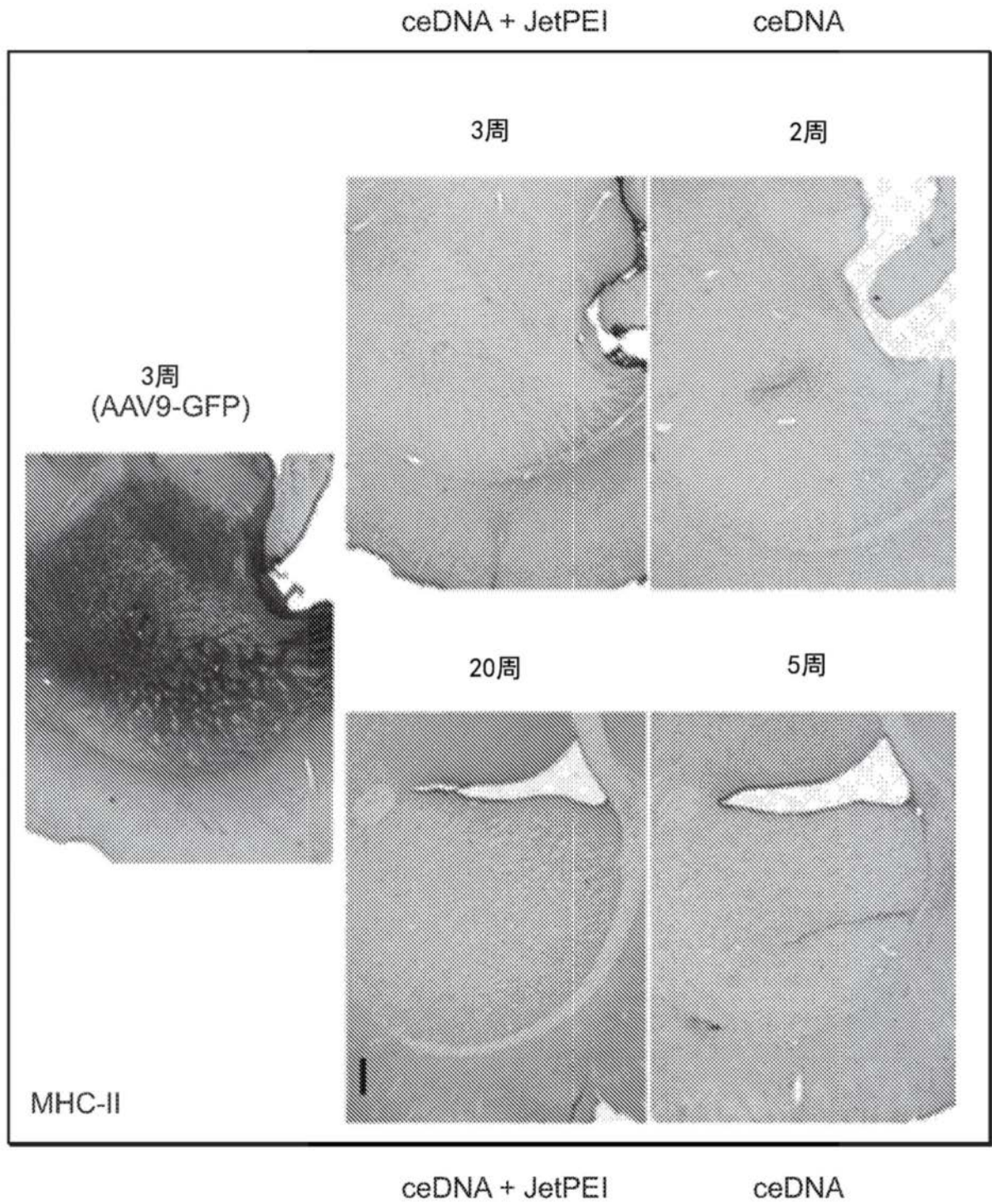


图9C



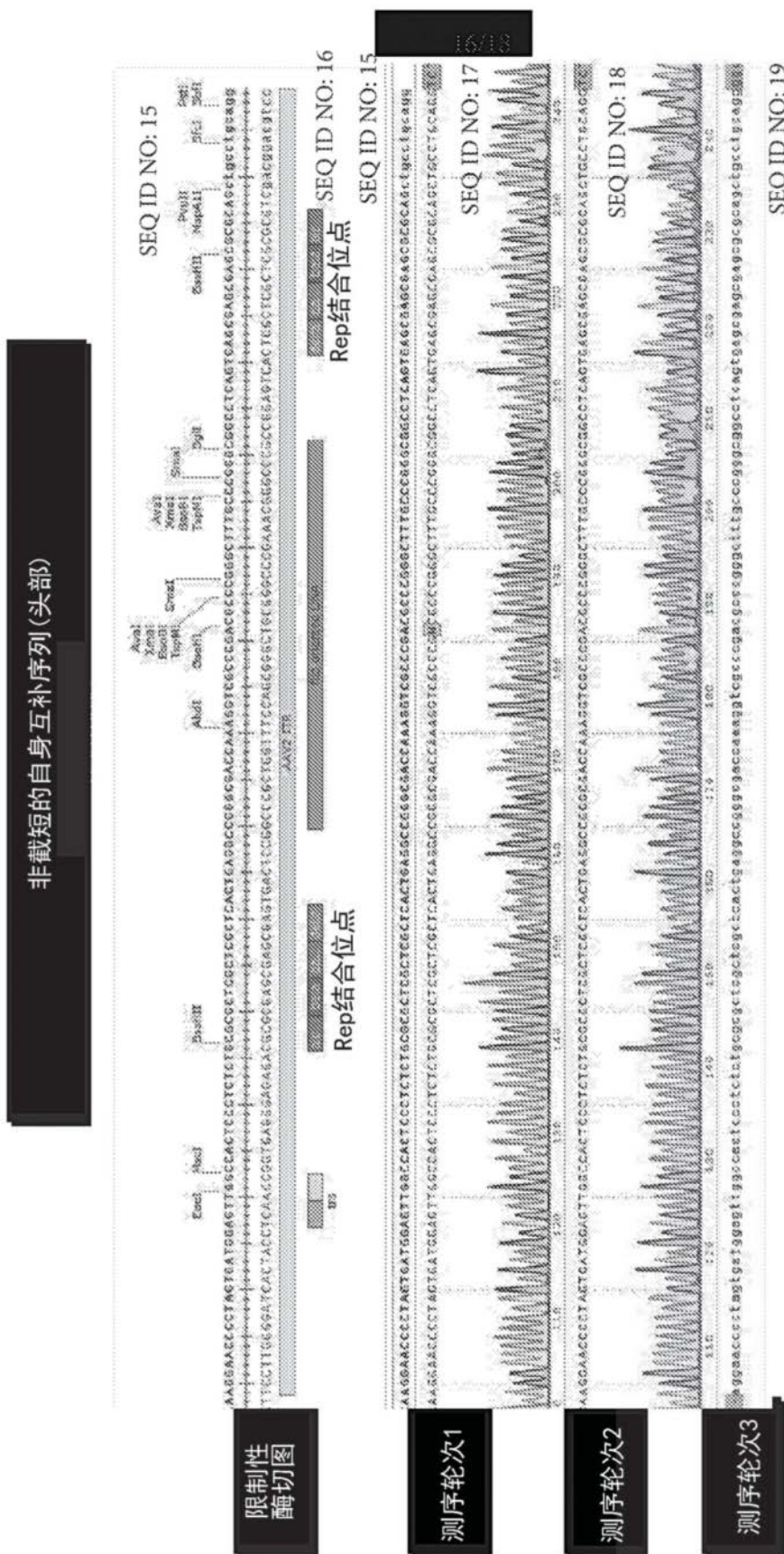


图10A



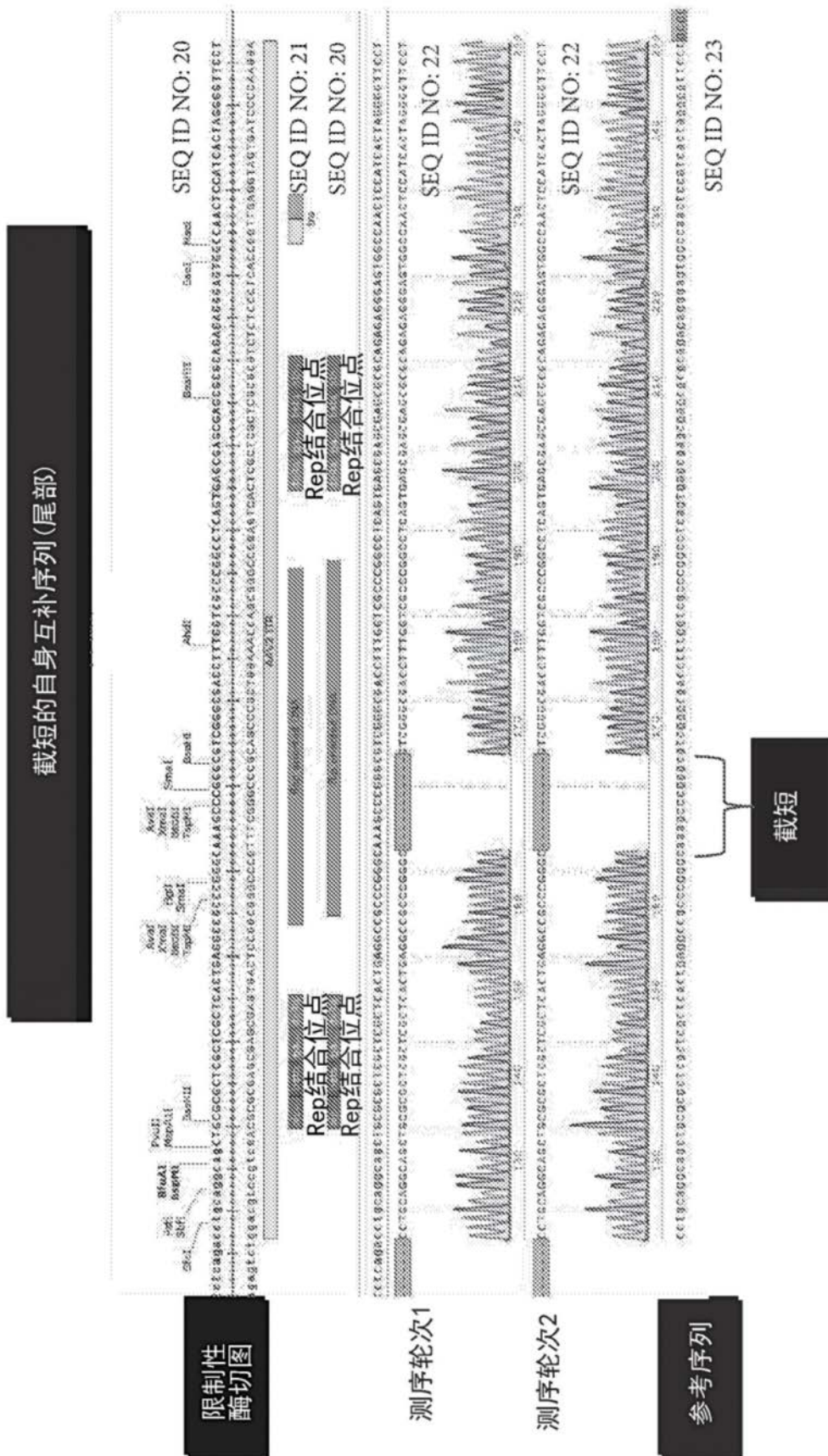


图10B

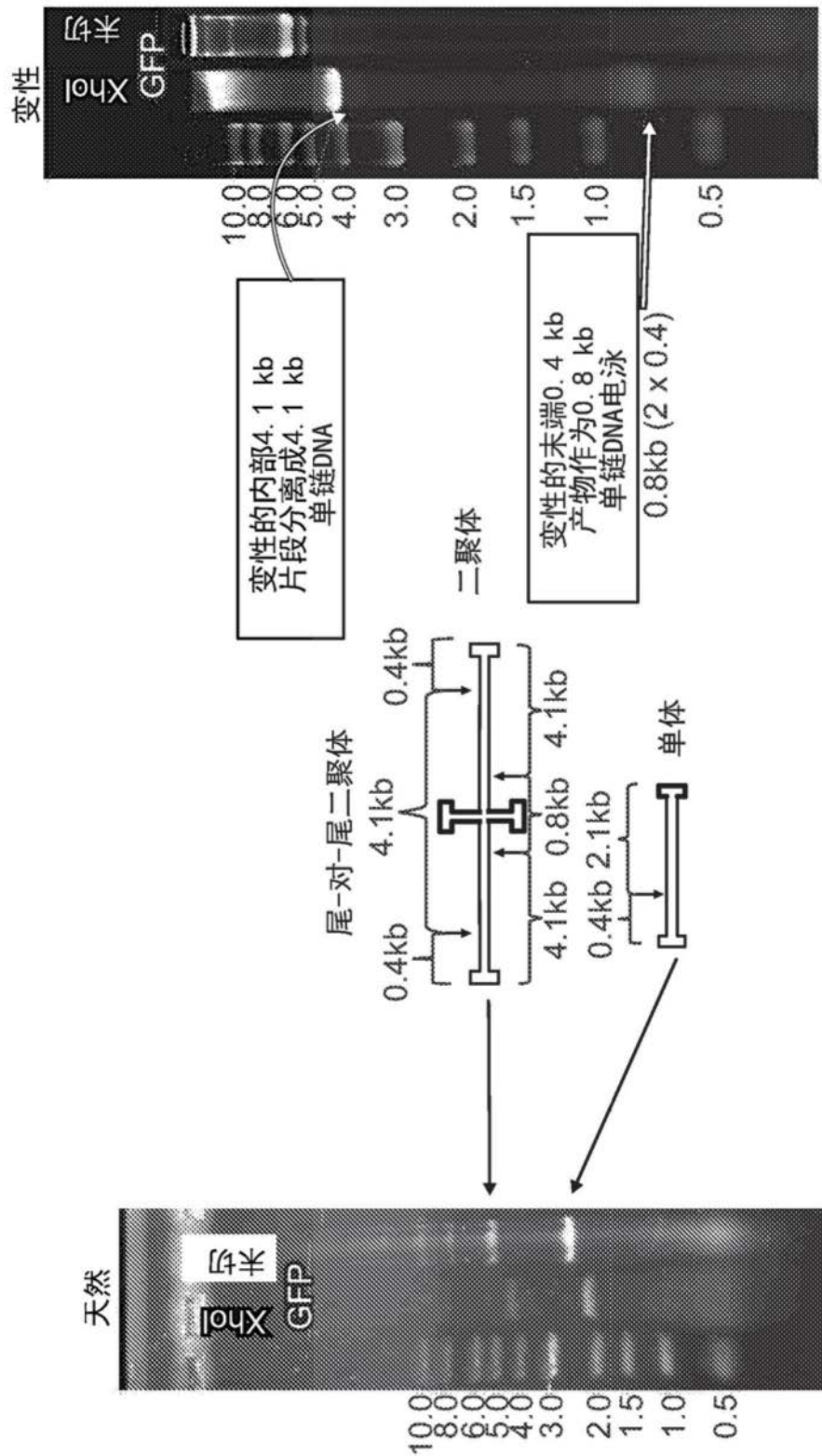


图10C