



(45) 授权公告日 2024.06.21

地址 美国俄亥俄州

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
司 72001

专利代理师 仵晓华 杨思捷

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

WO 2015197232 A1, 2015.12.30

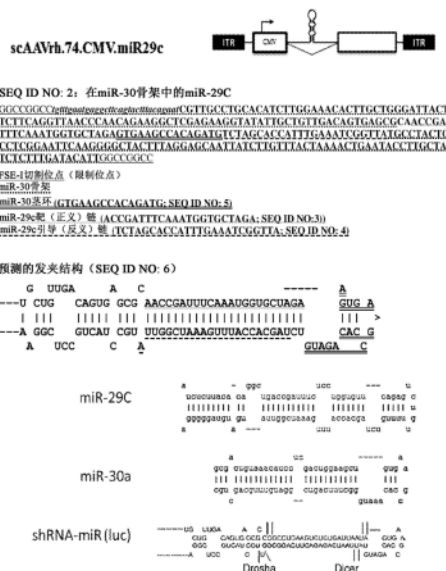
审查员 陈萍

权利要求书1页 说明书27页

序列表25页 附图42页

腺相关病毒载体传递微肌营养不良蛋白以治疗肌营养不良症

本发明提供了包含小型化人类微肌营养不良蛋白基因的重组AAV载体和使用所述重组载体减少或预防患有肌营养不良症的受试者中纤维化的方法。



1. 一种重组AAVrh.74载体,其以5'至3'方向包含反向末端重复(ITR)、肌肉特异性控制元件、嵌合内含子序列、核苷酸序列SEQ ID NO:7、polyA尾和ITR。

2. 根据权利要求1所述的重组AAVrh.74载体,其中所述肌肉特异性控制元件包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的重组AAVrh.74载体,进一步包含所述核苷酸序列和所述肌肉特异性控制元件之间的嵌合内含子序列,其中所述嵌合内含子序列如SEQ ID NO:9的核苷酸844-993所示。

4. 根据权利要求1所述的重组AAVrh.74载体,进一步包含所述核苷酸序列的3'的polyA尾,其中所述polyA尾的序列如SEQ ID NO:9的核苷酸4585-4640所示。

5. 一种组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAVrh.74载体和药学上可接受的载体。

6. 一种组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或权利要求5所述的组合物,用于治疗有需要的受试者中的肌营养不良症。

7. 一种组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或权利要求5所述的组合物,用于减轻或预防患有肌营养不良症的受试者的纤维化。

8. 一种组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或权利要求5所述的组合物,用于增加患有肌营养不良症的受试者的肌肉力量。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的组合物,其中所述组合物在所述受试者中观察到纤维化之前或在所述受试者中肌肉力量减少之前或在所述受试者中肌肉质量减少之前施用。

10. 根据权利要求6至8中任一项所述的组合物,其中所述受试者患有杜氏肌营养不良症或贝克肌营养不良症。

11. 根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求5所述的组合物在制备用于治疗有需要的受试者中的肌营养不良症的药物中的用途。

12. 根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求5所述的组合物在制备用于减轻或预防患有肌营养不良症的受试者中的纤维化的药物中的用途。

13. 根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体或根据权利要求5所述的组合物在制备用于增加患有肌营养不良症的受试者的肌肉力量或肌肉质量的药物中的用途。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的用途,其中所述药物在所述受试者中观察到纤维化之前或在所述受试者中肌肉力量减少之前或在所述受试者中肌肉质量减少之前施用。

15. 根据权利要求11至13中任一项所述的用途,其中所述受试者患有杜氏肌营养不良症或贝克肌营养不良症。

16. 根据权利要求6至8和11至13中任一项所述的组合物或用途,其中所述组合物或药物被配制用于肌内给药、静脉内注射、肠胃外给药或全身给药。

17. 一种产生功能性微肌营养不良蛋白的方法,其包含用根据权利要求1至4中任一项所述的重组AAV载体感染宿主细胞,并且在所述宿主细胞中表达功能性微肌营养不良蛋白。

腺相关病毒载体传递微肌营养不良蛋白以治疗肌营养不良症

[0001] 本申请要求2016年4月15日提交的美国临时申请第62/323,163号和2017年3月17日提交的美国临时申请第62/473,253号的优先权权益,两者均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明提供基因治疗载体,例如腺相关病毒(AAV)载体,以表达小型化的人类微肌营养不良蛋白基因,和使用这些载体以减少和预防患有肌营养不良症的受试者的纤维化的方法。本发明还提供组合基因治疗方法,以保护肌纤维免受损伤、增加肌肉力量。

背景技术

[0003] 肌肉质量和力量对于日常活动(例如运动和呼吸)和全身代谢的重要性是明确的。肌肉功能缺陷产生肌营养不良症(MD),其特点是肌肉无力和消瘦,并对生活质量产生严重影响。最有特征性的MD是由编码肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(DAPC)成员的基因突变引起的。这些MD是由与DAPC引起的肌膜-细胞骨架的缺失相关的膜脆性引起的。杜氏肌营养不良症(DMD)是影响5000名新生男性中1人的最具破坏性的肌肉疾病之一。

[0004] 本申请包括开发DMD治疗的两种转化方法。纤维化浸润在DMD中是影响深远的,并且是任何潜在疗法的重要障碍。同样重要的是,要考虑到仅基因替代受到纤维化严重程度的阻碍,其已经存在于患有DMD非常年幼的儿童中。事实上,在4至5岁之间的通常的诊断年龄的肌肉活检显示出非常显著的纤维化水平。

[0005] DMD由DMD基因的突变引起,导致mRNA的减少和肌营养不良蛋白的缺失,肌营养不良蛋白是与肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(DAPC)相关的427kD肌膜蛋白(Hoffman等人《细胞(Cell)》1987年;51(6):919-28)。DAPC由肌肉肌膜上的多种蛋白组成,其在细胞外基质(ECM)和细胞骨架之间通过肌营养不良蛋白形成结构连接,肌营养不良蛋白是一种肌动蛋白结合蛋白、和 α -肌营养不良蛋白聚糖、一种层粘连蛋白结合蛋白。这些结构连接用于在收缩期间稳定肌细胞膜并防止收缩引起的损伤。随着肌营养不良蛋白缺失,膜脆性导致肌膜撕裂和钙的流入,引发钙激活蛋白酶和节段性纤维坏死(Straub等人《神经病学的最新观点(Curr Opin. Neurol.)》1997年;10(2):168-75)。这种不受控制的肌肉退化和再生循环最终耗尽肌肉干细胞群(Sacco等人《细胞(Cell)》2010年;143(7):第1059-71页;Wallace等人《生理学年评(Annu Rev Physiol)》2009年;71:第37-57页),导致进行性肌肉无力、肌内膜炎症和纤维化瘢痕形成。

[0006] 如果没有肌营养不良蛋白或微肌营养不良蛋白的膜稳定化,DMD将表现出不受控制的组织损伤和修复循环,并最终通过结缔组织增殖用纤维化瘢痕组织代替缺失的肌纤维。纤维化的特征在于ECM基质蛋白的过量沉积,包括胶原蛋白和弹性蛋白。ECM蛋白主要由细胞因子如TGF β 产生,其是由活化的成纤维细胞对压力和炎症的反应释放的。尽管DMD的主要病理特征是肌纤维变性和坏死,但纤维化作为病理后果具有相同的影响。纤维化组织的过度产生限制了肌肉再生并且导致了DMD患者的进行性肌肉无力。在一项研究中,最初的DMD肌肉活检中纤维化的存在与10年随访时的不良运动结果高度相关(Desguerre等人《神

经病理学与实验神经病学杂志(JNeuropatholExpNeurol)》2009年;68(7):第762-7页)。这些结果表明纤维化是DMD肌肉功能障碍的主要原因,并强调需要开发减少纤维化组织的疗法。已经在mdx小鼠中测试的大多数抗纤维化疗法通过抑制TGF β 途径以阻断纤维化细胞因子信号传导。微核糖核酸(miRNA)是约22个核苷酸的单链RNA,其通过与mRNA的3'UTR内的碱基配对而在转录后水平介导基因沉默,从而抑制翻译或促进mRNA降解。miRNA的5'末端的7bp的种子序列靶向miRNA;目标序列的其余部分以及其二级结构提供了额外的识别。miRNA在肌肉疾病病理学中起重要作用,并且表现出独特依赖于所讨论的肌营养不良症类型的表达谱(Eisenberg等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》2007年;104(43):第17016-21页)。越来越多的证据表明,miRNA参与包括心脏、肝脏、肾脏和肺在内的许多器官的纤维化过程(Jiang等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》2007年;104(43):第17016-21页)。最近,miR-29的下调被证明导致心脏纤维化(Cacchiarelli等人《细胞代谢(Cell Metab)》2010年;12(4):第341-51页),并且miR-29的表达降低与人类DMD患者肌肉遗传相关(Eisenberg等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》2007年;104(43):第17016-21页)。miR-29家族由两个双顺反子miRNA簇表达的三个家族成员组成。MiR-29a与miR-29b(miR-29b-1)共表达;miR-29c与第二复制的miR-29b(miR-29b-2)共表达。miR-29家族共享保守的种子序列,并且miR-29a和miR-29b各自仅与miR-29c的一个碱基不同。此外,miR-29质粒(一组miR-29a和miR-29b-1)电穿孔到mdx小鼠肌肉中,降低了ECM组分、胶原蛋白和弹性蛋白的表达水平,并在治疗后25天内强烈减少肌肉切片中的胶原蛋白沉积。(Cacchiarelli等人《细胞代谢(Cell Metab)》2010年;12(4):第341-51页)。

[0007] 腺相关病毒(AAV)是复制缺陷型细小病毒,其单链DNA基因组长度为约4.7kb,包括145个核苷酸的反向末端重复(ITR)。AAV有多种血清型。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,AAV血清型2(AAV2)基因组的核苷酸序列在Srivastava等人《病毒学杂志(J Virol)》1983年;45:555-564中提出,由Ruffing等人《普通病毒学杂志(J Gen Virol)》1994年;75:3385-3392校正。作为其他实例,AAV-1的完整基因组载于GenBank登录号为NC_002077中;AAV-3的完整基因组载于GenBank登录号为NC_1829中;AAV-4的完整基因组载于GenBank登录号为NC_001829中;AAV-5的基因组载于GenBank登录号为AF085716中;AAV-6的完整基因组载于GenBank登录号为NC_001862中;至少部分AAV-7和AAV-8基因组分别载于GenBank登录号为AX753246和AX753249中(也参见与AAV-8有关的美国专利第7,282,199号和第7,790,449号);AAV-9基因组载于Gao等人《病毒学杂志(J Virol.)》2004年;78:6381-6388中;AAV-10基因组载于《分子治疗(Mol. Ther.)》2006年;13(1):67-76中;AAV-11基因组载于《病毒学(Virology)》2004年;330(2):375-383中。在Rodino-Klapac等人《转化医学杂志(J. Trans. Med.)》2007年;5:45中描述了AAVrh74血清型。指导病毒DNA复制(rep)、衣壳化/包装和宿主细胞染色体整合的顺式作用序列包含在ITR中。三个AAV启动子(其相对图谱位置命名为p5、p19和p40)驱动编码rep和cap基因的两个AAV内部开放阅读框的表达。两个rep启动子(p5和p19),加上单个AAV内含子的差异剪接(例如,在AAV2核苷酸2107和2227处),导致从rep基因产生四种rep蛋白(rep78、rep68、rep52和rep40)。rep蛋白具有多种酶特性,最终负责复制病毒基因组。cap基因由p40启动子表达,并且它编码三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。选择性剪接和非共有翻译起始位点负责产生三种相关的衣壳蛋白。单一共有多聚腺苷酸化位点位于AAV基因组的图谱位置95。在Muzyczka《当今微生物学和免疫学主题

(Current Topics in Microbiology and Immunology)》1992年;158:97-129中综述了AAV的生命周期和遗传学。

[0008] AAV具有独特的特征,使其,例如在基因治疗中,作为用于将外源DNA递送至细胞的载体具有吸引力。培养基中细胞的AAV感染是非细胞病变的,人类和其他动物的自然感染是沉默的和无症状的。此外,AAV感染许多哺乳动物细胞,使得在体内靶向许多不同组织成为可能。此外,AAV转导缓慢分裂和非分裂细胞,并且可以作为转录活性核游离基因(染色体外因子)基本上维持这些细胞的寿命。AAV原病毒基因组作为质粒中的克隆DNA具有感染性,这使得重组基因组的构建成为可能。此外,由于指导AAV复制、基因组衣壳化和整合的信号包含在AAV基因组的ITR中,部分或全部内部约4.3kb的基因组(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)可以用外源DNA替换,例如含有启动子、目标DNA和多聚腺苷酸化信号的基因盒。rep蛋白和cap蛋白可以是反式提供。AAV的另一个重要特征是它是一种非常稳定和可靠的病毒。它轻易忍受用于灭活腺病毒的条件(56至65℃持续数小时),使得AAV的冷保存不那么重要。甚至可以将AAV冻干。最后,AAV感染的细胞不耐受重复感染。

[0009] 多项研究已经证明在肌肉中长期(>1.5年)重组AAV介导的蛋白质表达。参见Clark等人《人类基因治疗(HumGeneTher)》1997年;8:659-669;Kessler等人《美国国家科学院院刊(ProcNat.AcadSci.USA)》1996年;93:14082-14087;和Xiao等人《病毒学杂志(JVirol)》1996年;70:8098-8108。还参见Chao等人《分子治疗(MolTher)》2000年;2:619-623和Chao等人《分子治疗(MolTher)》2001年;4:217-222。此外,由于肌肉高度血管化,重组AAV转导导致肌肉注射后在体循环中出现转基因产物,如Herzog等人《美国国家科学院院刊(ProcNatl Acad Sci USA)》1997年;94:5804-5809和Murphy等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》1997年;94:13921-13926中所述。此外,Lewis等人《病毒学杂志(JVirol)》2002年;76:8769-8775证明骨骼肌纤维具有正确的抗体糖基化、折叠和分泌所必需的细胞因子,表明肌肉能够稳定表达分泌的蛋白质治疗药物。

[0010] 患有DMD和其他肌营养不良症的患者功能改善需要基因恢复和纤维化的减少。需要有减少纤维化的方法,其可以与基因修复方法相结合,以更有效地治疗DMD和其他肌营养不良症。miR29是一种潜在的基因调节因子,并且是减少肌肉纤维化的理想候选药物。

发明内容

[0011] 本发明涉及通过递送microRNAmiR29直接减少结缔组织(胶原蛋白1、胶原蛋白3和纤连蛋白)的三种主要组分的基因治疗方法。在此系统中,miR29与胶原蛋白和纤连蛋白基因的3'UTR结合以下调表达。本发明涉及表达microRNAmiR29的引导链的基因治疗载体,例如AAV,和将miR29递送至肌肉以减少和/或预防纤维化的方法。

[0012] 此外,本发明提供了用于减少和预防纤维化的组合疗法和方法,其使用基因治疗载体递送miR-29以抑制纤维化以及微肌营养不良蛋白以解决在DMD中观察到的基因缺陷。如实例5至7所示,组合治疗使得纤维化的更大减少、肌肉尺寸增加和肌肉力量增加。

[0013] 在一个实施例中,本发明提供了表达miR-29的rAAV载体。例如,rAAV载体包含表达miR29c的多核苷酸序列,例如包含SEQ ID NO:3的miR-29c靶向引导链、SEQ ID NO:4的miR-29c引导链和天然miR-30骨架和茎环(SEQ ID NO:5)的核苷酸序列。包含miR-30骨架中的miR-29c cDNA的示例性多核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示(图1)。

[0014] 本发明的示例性rAAV是pAAV.CMV.Mir29C,其包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列;其中CMV启动子跨越核苷酸120-526,EF1a内含子跨越核苷酸927-1087和核苷酸1380-1854,miR-29c的引导链跨越核苷酸1257-1284和具有原始种子序列的shRNA-miR29-c跨越核苷酸1088-1375,并且polyA序列跨越核苷酸1896-2091。在一个方面,本发明的rAAV载体是AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。

[0015] 本发明的另一个示例性rAAV是pAAV.MHC.Mir29C,其包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;其中MCK增强子跨越核苷酸190-395,MHC启动子跨越核苷酸396-753,EF1a内含子跨越核苷酸1155-1315和核苷酸1609-2083,miR-29c的引导链跨越核苷酸1487-1512和具有原始种子序列的shRNA-miR29-c跨越核苷酸1316-1608,并且polyA序列跨越核苷酸2094-2146。在一个方面,本发明的rAAV载体是AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。

[0016] 在另一个方面,本发明的rAAV载体可以与肌肉特异性控制元件可操作地连接。例如,肌肉特异性控制元件是人类骨骼肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子MEF、肌肉肌酸激酶(MCK)、tMCK(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、C5-12(合成启动子)、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、缺氧诱导核因子、类固醇诱导元件或糖皮质激素响应元件(GRE)。

[0017] 例如,本发明的任何rAAV载体与包含SEQ ID NO:10的MCK增强子核苷酸序列和/或SEQ ID NO:11的MCK启动子序列的肌肉特异性控制元件可操作地连接。

[0018] 本发明还提供了包含本发明的任何rAAV载体的药物组合物(或有时在本文中简称为“组合物”)。

[0019] 在另一个实施例中,本发明提供了产生rAAV载体颗粒的方法,包含培养已用本发明的任何rAAV载体转染的细胞,并从转染细胞的上清液中回收rAAV颗粒。本发明还提供了包含本发明的任何重组AAV载体的病毒颗粒。

[0020] 在另一个实施例中,本发明提供了减少有需要的受试者的纤维化的方法,包含施用治疗有效量的表达miR-29的本发明的任何rAAV载体。例如,将本发明的任何rAAV施用于患有肌营养不良症的受试者以减少纤维化,特别是减少受试者的骨骼肌或心肌中的纤维化。这些方法可以进一步包含施用表达微肌营养不良蛋白的rAAV的步骤。

[0021] “纤维化”是指细胞外基质(ECM)组分的过度或不受调节的沉积和损伤后组织中的异常修复过程,包括骨骼肌、心肌、肝脏、肺、肾脏和胰腺。沉积的ECM组分包括纤连蛋白和胶原蛋白,例如胶原蛋白1、胶原蛋白2或胶原蛋白3。

[0022] 在另一个实施例中,本发明提供了预防有需要的受试者的纤维化的方法,包含施用治疗有效量的表达miR-29的本发明的任何重组AAV载体。例如,将本发明的任何rAAV施用于患有肌营养不良症的受试者以预防纤维化,例如在受试者中观察到纤维化之前施用表达miR-29的本发明的rAAV。另外,将表达miR-29的本发明的rAAV施用于有发展纤维化风险的受试者,例如患有或诊断患有肌营养不良症的那些,例如DMD。将本发明的rAAV施用于患有肌营养不良症的受试者,以预防这些受试者的新纤维化。这些方法可以进一步包含施用表达微肌营养不良蛋白的rAAV的步骤。

[0023] 本发明还提供了增加患有肌营养不良症的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的方法。

法,包含施用治疗有效量的表达miR-29的本发明的任何rAAV载体。这些方法可以进一步包含施用表达微肌营养不良蛋白的rAAV的步骤。

[0024] 术语“组合疗法”和“组合治疗”是指施用表达miR-29的本发明的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体。

[0025] 在本发明的任何方法中,受试者可能患有肌营养不良症,例如DMD,贝克肌营养不良症或其他任何肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症。此外,在本发明的任何方法中,受试者可能患有肌营养不良蛋白病。

[0026] 在另一个实施例中,本发明提供了重组AAV载体,其包含编码微肌营养不良蛋白的核苷酸序列。本发明提供了rAAV,其包含a)具有与SEQ ID NO:7的核苷酸序列至少85%同一性并编码功能性微肌营养不良蛋白的核苷酸序列,b) SEQ ID NO:7的核苷酸序列,或c) SEQ ID NO:9的核苷酸序列。

[0027] 表达微肌营养不良蛋白的本发明的示例性rAAV是pAAV.mck.微肌营养不良蛋白,其包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列并显示于图19和20中。这种rAAV载体包含MCK启动子、嵌合内含子序列、微肌营养不良蛋白基因的编码序列、polyA、氨苄青霉素抗性和具有pBR322起点或复制的pGEX质粒骨架。在一个方面,本发明的重组AAV载体是AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。

[0028] 本发明提供了编码微肌营养不良蛋白的rAAV载体,也就是,例如具有与SEQ ID NO:8至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更典型的至少90%、91%、92%、93%、或94%、以及甚至更典型的至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,其中蛋白质保留微肌营养不良蛋白活性。微肌营养不良蛋白在肌肉收缩期间为肌膜提供稳定性,例如微肌营养不良蛋白在肌肉收缩期间充当减震器。

[0029] 本发明提供了表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体,其包含具有与SEQ ID NO:7至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、或89%、更典型的至少90%、91%、92%、93%、或94%、甚至更典型的至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且编码功能性微肌营养不良蛋白的核苷酸序列。

[0030] 本发明提供了表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体,其包含在严格条件下与SEQ ID NO:7的核酸序列或其互补物杂交,并编码功能性微肌营养不良蛋白的核苷酸序列。

[0031] 术语“严格”用于指本领域通常理解为严格的条件。杂交严格性主要由温度、离子强度和变性剂如甲酰胺的浓度决定。用于杂交和洗涤的严格条件的实例是0.015M氯化钠、在65至68℃下0.0015M柠檬酸钠或0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和在42℃下50%甲酰胺。参见Sambrook等人《分子克隆:实验室手册(MolecularCloning:ALaboratoryManual)》,第2版,冷泉港实验室,(纽约冷泉港,1989年)。还可以使用更严格的条件(例如更高的温度、更低的离子强度、更高的甲酰胺或其他变性剂),但是会影响杂交速率。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况下,另外的示例性严格杂交条件包括在37℃(对于14碱基寡核苷酸)、48℃(对于17碱基寡核苷酸)、55℃(对于20碱基寡核苷酸)和60℃(对于23碱基寡核苷酸)下,于6x SSC 0.05%焦磷酸钠中洗涤。

[0032] 为了减少非特异性和/或背景杂交,可以在杂交和洗涤缓冲液中包含其他试剂。实例是0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1%焦磷酸钠、0.1%十二烷基硫酸钠、

NaDodSO₄、(SDS)、聚蔗糖、邓哈特溶液、超声处理的鲑鱼精子DNA(或其他非互补DNA)和硫酸葡聚糖,当然也可以使用其他合适的试剂。可以改变这些添加剂的浓度和类型,而基本上不影响杂交条件的严格性。杂交实验通常在pH 6.8-7.4下进行,然而,在典型的离子强度条件下,杂交速率几乎与pH无关。参见Anderson等人《核酸杂交:实用方法(Nucleic Acid Hybridisation:A Practical Approach)》第4章,IRL有限公司(英国牛津)。本领域技术人员可以调节杂交条件以适应这些变量并允许不同序列相关性的DNA形成杂交体。

[0033] 在另一个方面,表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体包含与肌肉特异性控制元件可操作地连接的微肌营养不良蛋白基因的编码序列。例如,肌肉特异性控制元件是人类骨骼肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子MEF、肌肉肌酸激酶(MCK)、tMCK(截短的MCK)、肌球蛋白重链(MHC)、C5-12(合成启动子)、鼠肌酸激酶增强子元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白C基因元件、慢缩肌钙蛋白I基因元件、缺氧诱导核因子、类固醇诱导元件或糖皮质激素响应元件(GRE)。

[0034] 此外,本发明提供了表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体,其包含肌肉特异性控制元件,其包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

[0035] 本发明还提供了包含本发明的任何rAAV载体的药物组合物(或有时在本文中简称为“组合物”)。

[0036] 在另一个实施例中,本发明提供了产生rAAV载体颗粒的方法,包括培养已用本发明的任何rAAV载体转染的细胞,并从转染细胞的上清液中回收rAAV颗粒。本发明还提供了包含本发明的任何重组AAV载体的病毒颗粒。

[0037] 本发明还提供了产生功能性微肌营养不良蛋白的方法,其包含用本发明的表达微肌营养不良蛋白的重组AAV载体感染宿主细胞,并且在宿主细胞中表达功能性微肌营养不良蛋白。

[0038] 在另一个实施例中,本发明提供减少有需要的受试者的纤维化的方法,包含施用治疗有效量的表达微肌营养不良蛋白的本发明的任何rAAV载体。例如,将本发明的任何rAAV施用于患有肌营养不良症或肌营养不良蛋白病的受试者以减少纤维化,特别是减少受试者的骨骼肌或心肌中的纤维化。

[0039] 在另一个实施例中,本发明提供了预防有需要的受试者的纤维化的方法,包含施用治疗有效量的表达微肌营养不良蛋白的本发明的任何重组AAV载体。例如,将本发明的任何rAAV施用于患有肌营养不良症或肌营养不良蛋白病的受试者以预防纤维化,例如在受试者中观察到纤维化之前施用表达微肌营养不良蛋白的本发明的rAAV。另外,将表达微肌营养不良蛋白的本发明的rAAV施用于有发展纤维化风险的受试者,例如患有或诊断患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的那些。将本发明的rAAV施用于患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良蛋白病肌营养不良症的受试者,以预防这些受试者的新纤维化。

[0040] 本发明还提供了增加患有肌营养不良症或肌营养不良蛋白病的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的方法,包含施用治疗有效量的表达miR-29的本发明的任何rAAV载体。

[0041] 包含施用本发明的表达miR-29c的rAAV的步骤的任何前述方法可以包含施用本文所述的表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV的进一步的步骤。术语“组合疗法”和“组合治疗”是指施用表达miR-29的本发明的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体。

[0042] 在施用表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的方法中,这些rAAV载体可以同时施用、或在表达微肌营养不良蛋白的rAAV之前立即施用表达miR29的rAAV载体的连续施用、或与在表达微肌营养不良蛋白的rAAV之后立即施用表达miR29的rAAV载体的连续施用。或者,实施本发明的方法,其中表达微肌营养不良蛋白的AAV载体在施用表达miR-29的rAAV后约1至5小时或5至12小时或12至15小时或15至24小时内施用;或实施本发明的方法,其中表达微肌营养不良蛋白的AAV载体在施用表达miR-29的rAAV之前约1至5小时或5至12小时或12至15小时或15至24小时内施用。或者,实施本发明的方法,其中表达微肌营养不良蛋白的AAV载体在施用表达miR-29的rAAV后约1或6或12或24小时内施用;或实施本发明的方法,其中表达微肌营养不良蛋白的AAV载体在施用表达miR-29的rAAV之前约1或6或12或24小时内施用。

[0043] 本发明考虑在受试者中观察到纤维化之前或在受试者中肌肉力量减少之前或者在受试者的肌肉质量减少之前,将本发明的任何AAV载体施用于诊断患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的患者。

[0044] 本发明还考虑将本发明的任何rAAV施用于已经表现出纤维化的患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的受试者,以预防这些受试者中的新纤维化。本发明还提供了将本发明的任何rAAV施用于已经具有减小的肌肉力量或具有减少的肌肉质量的患有肌肉营养不良症的患者,以保护肌肉免受进一步的损伤。

[0045] 在本发明的任何方法中,通过肌内注射或静脉注射施用rAAV载体。

[0046] 另外,在本发明的任何方法中,全身施用rAAV载体或组合物。例如,rAAV载体或组合物通过注射、输注或植入进行肠胃外给药。

[0047] 在另一个实施例中,本发明提供了包含表达miR29的任何rAAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的组合物,用于降低有需要的受试者的纤维化。另外,本发明提供了包含表达miR29的任何重组AAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的组合物,用于预防患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的患者的纤维化。

[0048] 本发明还提供了包含表达miR29的本发明的任何rAAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的组合物,用于增加患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量。

[0049] 在另一个实施例中,本发明提供了包含表达miR29的本发明的任何rAAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的组合物,用于治疗肌营养不良蛋白病或肌营养不良症,如DMD或贝克肌营养不良症。

[0050] 调配本发明的组合物用于肌内注射或静脉注射。本发明的组合物还调配用于全身给药,例如通过注射、输注或植入进行肠胃外给药。另外,任何组合物都调配用于施用于患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(如DMD、贝克肌营养不良症或任何其他肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症)的受试者。

[0051] 在另一个实施例中,本发明提供了表达miR29的本发明的任何rAAV载体或表达微

肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的用途,以制备用于减少有需要的受试者的纤维化的药物。例如,患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD、贝克肌营养不良症或任何其他肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症)的受试者是有需要的。

[0052] 在另一个实施例中,本发明提供了表达miR29的本发明的任何rAAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的用途,以制备用于预防患有肌营养不良症的受试者的纤维化的药物。另外,本发明提供了表达miR29的本发明的重组AAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的用途,以制备用于增加患有肌营养不良蛋白病或肌营养不良症(例如DMD或贝克肌营养不良症)的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的药物。

[0053] 本发明考虑了本发明的任何AAV载体的用途以制备药物,所述药物用于在受试者中观察到纤维化之前或在受试者中肌肉力量减小之前或在受试者的肌肉质量减少之前施用于诊断患有DMD的患者。

[0054] 本发明还考虑了本发明的任何AAV载体的用途以制备药物,所述药物用于施用以将本发明的任何rAAV施用于已经表现出纤维化的患有肌营养不良症的受试者,以预防这些受试者的新纤维化。本发明还提供了将本发明的任何rAAV施用于已经具有减小的肌肉力量或具有减少的肌肉质量的患有肌肉营养不良症的患者,以保护肌肉免受进一步的损伤。

[0055] 本发明还提供了表达miR296的本发明的rAAV载体或表达微肌营养不良蛋白的任何rAAV载体或包含表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体的用途以制备用于治疗肌营养不良症的药物。

[0056] 在本发明的任何用途中,调配药物用于肌肉注射。另外,任何药物可以制备用于施用于患有肌营养不良症(例如DMD或任何其他肌营养不良蛋白相关的肌营养不良症)的受试者。

[0057] 另外,本发明的任何药物可以是组合疗法,其中表达miR-29的rAAV载体和表达微肌营养不良蛋白的rAAV载体同时施用,或者在表达微肌营养不良蛋白的rAAV之前立即施用表达miR29的rAAV载体的连续施用、或在表达微肌营养不良蛋白的rAAV之后立即施用表达miR29的rAAV载体的连续施用。或者,所述药物包含在施用表达miR-29的rAAV后约1至5小时内施用表达微肌营养不良蛋白的AAV载体,或者所述药物包含在施用表达miR-29的rAAV前约1至5小时内施用表达微肌营养不良蛋白的AAV载体。

附图说明

[0058] 图1提供了rAAV载体scAAVCrh.74.CMV.miR29c的示意图和天然miR-30骨架中的miR-29c的核苷酸序列以及预测的发夹结构的核苷酸序列。

[0059] 图2A至C说明将miR-29c注射到肌肉中减少了整个肌肉中的胶原蛋白并且恢复miR-29c表达。

[0060] 图3A至3C证明注射miR-29c改善了绝对肌肉力量(图A)和特定肌肉力量(图B),但不能防止收缩诱导的损伤(图C)。

[0061] 图4A至4C显示肌纤维表达微肌营养不良蛋白的数量,以测量转基因递送的功效。

[0062] 图5A至5C证明miR-29c与微肌营养不良蛋白的共递送降低了胶原蛋白表达(图A)和纤维化诱导的肌营养不良蛋白表达。

[0063] 图6A至6D说明肌内注射miR-29c/微肌营养不良蛋白抑制了mdx/utrn^{+/-}小鼠中的细胞外基质(ECM),如通过胶原蛋白1 α (图A)、胶原蛋白3 α (图B)、纤连蛋白(图C)和TGF- β (图D)测量的。

[0064] 图7A至7C显示肌内注射miR-29c增加了绝对力(图A)、归一化比力(图B)和增加了对肌肉中收缩诱导损伤(图C)的保护。

[0065] 图8说明miR-29c/ μ -dys组合增加了在3个月大处理的小鼠的肌肉大小。显示了用苦味酸天狼星红处理的和未处理的mdx/utrn^{+/-}腓肠肌的切片以染色胶原蛋白。纤维化区域为粉红色,完整肌肉为绿色。在宏观层面上,miR-29c/ μ -dys组合减少了纤维化并增加了总横截面积。

[0066] 图9A至F证明,与单独注射的任一个相比,与微肌营养不良蛋白共同递送的miR-29c治疗增加了肌肉肥大和增生,如所注射的腓肠肌的总重量的增加(图A)、平均纤维大小增加(图B)、肌肉横截面积增加(图D;未注射:24.6对比miR-29c:26.3对比micro-dys:26.6对比micro-dys/miR-29c:33.1)和肌纤维数量的增加(图E)所示,但每单位面积的肌纤维数量没有受到影响(图F)。图C比较了对照组mdx/utrn^{+/-}与miR-29c/ μ -dys处理的mdx/utrn^{+/-},平均直径从25.96增加到30.97 μ m。

[0067] 图10A至G证明AAV.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合疗法的早期治疗在减少纤维化和ECM表达方面更有效。图A显示野生型的未经注射的AAV.miR-29c、AAV.微肌营养不良蛋白和在4至5周龄注射、注射后第12周取出的小鼠的AAV.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白的苦味酸天狼星红染色。图B提供了对苦味酸天狼星红染色的定量,显示与未注射的GAS肌肉相比,共处理的肌肉的胶原蛋白具有51.1%的减少。图C证明qRT-PCR证实了治疗组中miR-29c转录水平的增加。半定量qRT-PCR显示与对侧肢体相比,AAV.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉中的胶原蛋白I和III(图d、e)、fhn(图f)和TGF- β 1(图g)水平显著降低,并且每种单一疗法误差线为,SEM为n=5(scAAVrh.74.CMV.miR-29c),n=5(scAAVrh.74.CMV.miR-29c/ssAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白),n=6(ssAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白),n=9(mdx/utrn^{+/-}小鼠)。单因素方差分析(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)

[0068] 图11展示了早期组合疗法恢复力量并防止收缩诱导的损伤。与未处理的mdx/utrn^{+/-}肌肉(右侧图片)相比,在所有三种治疗注射的GAS肌肉中,在强直性收缩后绝对(左侧图片)和归一化比力(中间图片)的测量有显著增加。然后评估肌肉在重复的离心收缩后的力损失。与未处理的mdx/utrn^{+/-}肌肉(蓝色)相比,仅用miR-29c/微肌营养不良蛋白共处理的和单独的微肌营养不良蛋白处理的小鼠显示出对力的损失的保护。双因素方差分析表明在衰减曲线中显著性的误差线,SEM为n=5(rAAVrh.74.CMV.miR-29c),n=6(rAAVrh.74.CMV.miR-29c/rAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白),n=5(rAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白),n=15(mdx/utrn^{+/-}小鼠)。单因素方差分析(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001)。

[0069] 图12说明miR-29c/微肌营养不良蛋白组合治疗增加了在1个月大处理的小鼠的肌肉大小。对处理的和未处理的mdx/utrn^{+/-}GAS肌肉进行切片并用苦味酸天狼星红染色以染

色胶原蛋白。纤维化区域为粉红色,完整肌肉为绿色。在宏观层面上,miR-29c/微肌营养不良蛋白组合减少了纤维化并且增加了总横截面积。

[0070] 图13A至13G证明AAV.MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合疗法的早期治疗(在4至5周)在减少纤维化和ECM表达方面更有效。图A提供了未注射的和4至5周龄注射、注射后第12周取出的小鼠的AAV.MCK.miR-29c/AAV.MCK.微肌营养不良蛋白的苦味酸天狼星红染色。原始放大倍数,20倍放大图B提供了对苦味酸天狼星红染色的定量,证明与未处理的GAS肌肉相比,共处理的肌肉的胶原蛋白具有50.9%的减少。图C提供了qRT-PCR,证实治疗组中miR-29c转录水平的增加。半定量qRT-PCR显示与对侧肢体疗法相比,AAV.MCK.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉中胶原蛋白1A(Col1A;图D)和胶原蛋白3A(Col3A;图E)、纤连蛋白(Fbn;图F)和Tgf β 1(图G)水平显著降低。(*P<0.05,****P<0.0001)。

[0071] 图14A至14G证明用AAV.MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合疗法的晚期治疗(在12周治疗)可有效减少纤维化和ECM表达。图A提供了未处理的、注射后第12周的AAV.MCK.miR-29c和AAV.MCK.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白的苦味酸天狼星红染色。原始放大倍率,20倍放大。图B提供了对苦味酸天狼星红染色的定量,其表明与未处理的GAS肌肉相比,共处理的肌肉的胶原蛋白具有30.3%的减少。图C提供qRT-PCR,证实治疗组中miR-29c转录水平的增加。半定量qRT-PCR显示与对侧肢体相比,AAV.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉中的胶原蛋白1A(Col1A;图D)、胶原蛋白3A(Col3A;图E)、纤连蛋白(Fbn;图F)和Tgf β 1(图G)水平显著降低。单因素方差分析。所有数据均代表平均值 $\pm$ SEM。(**p<0.01,****p<0.0001)。

[0072] 图15A至15C证明早期组合疗法(在4至5周的治疗)恢复力量并且防止收缩诱导的损伤。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉(C)相比,MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白注射的GAS肌肉在强直性收缩后绝对(图A)和归一化比力(图B)的测量有显著增加。然后评估肌肉在重复的离心收缩后的力损失。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉(红色)相比,使用miR-29c/微肌营养不良蛋白共处理的和单独使用微肌营养不良蛋白处理的小鼠显示出对力的损失的保护。双因素方差分析。所有数据代表平均值 $\pm$ SEM(****p<0.0001)。

[0073] 图16A至16C表明晚期联合治疗恢复了力并且保护免受收缩引起的损伤。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉相比,rAAV.MCK.miR-29c和表达微肌营养不良蛋白的rAAV注射的GAS肌肉在强直收缩后绝对(图A)和标准化比力(图B)的测量显著增加。在图C中,然后评估肌肉在重复的偏心收缩后的力损失。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉(红色)相比,用表达微肌营养不良蛋白的rAAV.MCK.miR-29c/rAAV共处理的小鼠显示出对力的损失的保护。双因素方差分析。所有数据均代表平均值 $\pm$ SEM(**p<0.01,****p<0.0001)。

[0074] 图17A至17D证明组合治疗在注射后第3个月增加肌肉肥大。图A显示了与表达微肌营养不良蛋白的rAAV共同递送的rAAV.MCK.miR-29c未能增加注射的GAS的总重量。图B证明了表达微肌营养不良蛋白的rAAV.MCK.miR-29c/rAAV组合治疗引起平均纤维大小的增加。将对照组mdx/utrn^{+/+}与miR-29c/微肌营养不良蛋白处理的mdx/utrn^{+/+}进行比较,平均直径从28.96增加至36.03 μ m。图C显示共同递送产生向野生型纤维尺寸分布的转变。图D提供了miR-29c/微肌营养不良蛋白组合治疗中每平方毫米的肌纤维的数量显著低于未处理的小鼠和野生型的(***p<0.01,****p<0.0001)。

[0075] 图18A至18B提供了示例性rAAV载体的核酸序列(SEQ ID NO:1pAAV.CMV.Mir29C),

其包含miR-29c(核苷酸1257-1284)的成熟引导链和天然mi-30骨架(核苷酸1088-1375)。所述构建体还包含CMV启动子(核苷酸120-526)、核苷酸927-1087和1380-1854处的两个EF1a内含子和核苷酸1896-2091处的polA。

[0076] 图19提供了rAAV载体pAAV.MCK.微肌营养不良蛋白的示意图。

[0077] 图20A至D提供了表达微肌营养不良蛋白的示例性rAAV载体的核酸序列(SEQ ID NO:9;pAAV.MCK.微肌营养不良蛋白)。

[0078] 图21A至C提供了人类微肌营养不良蛋白核苷酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0079] 图22提供了示例性rAAV载体的核苷酸序列(SEQ ID NO:12pAAV.MCK.Mir29C),其包含miR-29c(核苷酸1487-1512)的成熟引导链和天然mi-30骨架(核苷酸1088-1375)。所述构建体还包含MCK增强子(核苷酸190-395)、MCK启动子(核苷酸396-753)、核苷酸1155-1315和1609-2083处的两个EF1a内含子和核苷酸2094-2148处的polA。

具体实施方式

[0080] 本发明提供了基因治疗载体,例如rAAV载体,以过表达miR-29微RNA,和减少和预防肌营养不良患者纤维化的方法。本发明还提供了组合基因治疗方法,其包含将表达miR-29的基因治疗载体与表达在DMD患者中缺失的微肌营养不良蛋白的基因治疗载体组合施用。

[0081] 在诊断DMD的最早年龄时采取的肌肉活检显示突出的结缔组织增殖。肌肉纤维化在多种方面都是有害的。它通过结缔组织屏障减少肌内营养物质的正常转运、减少血液流动并剥夺肌肉血管来源的营养成分、以及在功能上通过肢体挛缩导致早期的行走能力丧失。随着时间的推移,治疗挑战因肌肉中明显的纤维化而成倍增加。在连续的时间点比较结缔组织增殖的肌肉活检中可以观察到这一点。这个过程继续恶化导致丧失行走能力和加速失控,特别是在依赖轮椅的患者中。

[0082] 如果没有减少纤维化的平行方法,则不可能完全实现外显子跳跃、终止密码子通读或基因替代疗法的益处。如果没有减少肌肉纤维化的方法,即使是小分子或蛋白质替代策略也可能会失败。先前用AAV.微肌营养不良蛋白治疗现存纤维化的老年mdx小鼠的研究表明我们无法实现全功能恢复(《人类分子遗传学(Human molecular genetics)》2013年;22,4929-4937)。还已知DMD心肌病的进展伴随着心室壁中的疤痕形成和纤维化。由于缺乏免疫屏障和递送相对容易,微RNA递送特别具有创新性。微RNA是很小的(约200bp),因此可以与治疗盒一起包装在AAV中以纠正或绕过遗传缺陷。

[0083] 如本文所用,术语“AAV”是腺相关病毒的标准缩写。腺相关病毒是一种单链DNA细小病毒,其仅在由共感染辅助病毒提供某些功能的细胞中生长。目前已有13种已表征的AAV血清型。AAV的基本信息和综述可参见,例如,Carter《细小病毒手册(Handbook of Parvoviruses)》1989年,第1卷,第169-228页和Berns《病毒学(Virology)》1990年,第1743-1764页,Raven出版社(纽约)。然而,可完全预期这些相同的原理将适用于额外的AAV血清型,因为众所周知,即使在基因水平上,各种血清型在结构和功能上都非常密切相关。(参见,例如,Blacklowe《细小病毒和人类疾病(Parvoviruses and Human Disease)》1988年,第165-174页,J.R.Pattison,主编;和Rose《综合病毒学(Comprehensive Virology)》1974

年;3:1-61)。例如,所有AAV血清型似乎都表现出由同源rep基因介导的非常相似的复制特性;并且所有都含有三种相关的衣壳蛋白,例如在AAV2中表达的那些。异源双链分析进一步表明了相关程度,其揭示了沿着基因组长度的血清型之间的广泛交叉杂交;并且在末端存在类似的自退火区段,其对应于“反向末端重复序列”(ITR)。类似的感染模式还表明每种血清型中的复制功能受到类似的调节控制。

[0084] 如本文所用的“AAV载体”是指包含一个或多个目标多核苷酸(或转基因)的载体,其侧翼为AAV末端重复序列(ITR)。当这种AAV载体存在于已经用编码和表达rep和cap基因产物的载体转染的宿主细胞中时,可以复制并且包装成感染性病毒颗粒。

[0085] “AAV病毒粒子”或“AAV病毒颗粒”或“AAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化多核苷酸AAV载体组成的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即除了野生型AAV基因组之外的多核苷酸,例如待递送至哺乳动物细胞的转基因),则其通常被称为“AAV载体颗粒”或简称为“AAV载体”。因此,AAV载体颗粒的产生必然包括AAV载体的产生,因为这样的载体包含在AAV载体颗粒内。

[0086] AAV

[0087] 本发明的重组AAV基因组包含本发明的核酸分子和侧接核酸分子的一个或多个AAV ITR。rAAV基因组中的AAV DNA可以来自可以衍生重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12和AAV-13。假型rAAV的产生公开在例如WO 01/83692中。还考虑了其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见,例如,Marsic等人《分子治疗(Molecular Therapy)》2014年;22(11):1900-1909。如上文背景技术部分所述,各种AAV血清型的基因组的核苷酸序列是本领域已知的。为了促进骨骼肌特异性表达,可使用AAV1、AAV6、AAV8或AAVrh.74。

[0088] 本发明的DNA质粒包含本发明的rAAV基因组。将DNA质粒转移到允许用AAV的辅助病毒(例如,腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞中,以将rAAV基因组装配成感染性病毒颗粒。产生rAAV颗粒的技术是本领域的标准,其中待包装的AAV基因组、rep和cap基因、以及辅助病毒功能被提供给细胞。rAAV的产生需要以下组分存在于单个细胞内(在本文中表现为包装细胞):rAAV基因组、与rAAV基因组分开(即不在其中)的AAV rep和cap基因、以及辅助病毒功能。AAVrep和cap基因可以来自可以衍生重组病毒的任何AAV血清型,并可以来自与rAAV基因组ITR不同的AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAVrh.74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12和AAV-13。假型rAAV的产生公开在例如WO 01/83692中,其通过引用整体并入本文。

[0089] 产生包装细胞的方法是创建稳定地表达AAV颗粒产生所需的所有组分的细胞系。例如,包含缺乏AAV rep和cap基因的rAAV基因组、与rAAV基因组分开的AAV rep和cap基因、以及选择标记(例如新霉素抗性基因)的质粒(或多个质粒)被整合到细胞的基因组中。AAV基因组已经通过步骤引入到细菌质粒中,诸如GC加尾(Samulski等人《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》1982年;79:2077-2081)、添加含有限制性内切核酸酶切割位点的合成接头(Laughlin等人《基因(Gene)》1983年;23:65-73)或通过直接平末端连接(Senapathy&Carter《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》1984年;259:4661-4666)。然后用辅助病毒如腺病毒感染包装细胞系。这种方法的优点是细胞是可选择的并且适合于大规模生产

rAAV。其他合适的方法的实例使用腺病毒或杆状病毒而不是质粒将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞中。

[0090] rAAV产生的一般原理综述于例如Carter《生物技术最新观点 (Current Opinions in Biotechnology)》1992年;1533-539;和Muzyczka《当今微生物学和免疫学 (Curr. Topics in Microbial. and Immunol.)》1992年;158:97-129。各种方法描述于Ratschin等人《分子细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.)》1984年;4:2072;Hermonat等人《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》1984年;81:6466;Tratschin等人《分子细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.)》1985年;5:3251;McLaughlin等人《病毒学杂志 (J. Virol.)》1988年;62:1963;和Lebkowski等人《分子细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.)》1988年;7:349。Samulski等人《病毒学杂志 (J. Virol.)》1989年;63:3822-3828);美国专利第5,173,414号;WO 95/13365和相应的美国专利第5,658,776号;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441 (PCT/US96/14423);WO 97/08298 (PCT/US96/13872);WO 97/21825 (PCT/US96/20777);WO 97/06243 (PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等人《疫苗 (Vaccine)》1995年;13:1244-1250;Paul等人《人类基因治疗 (Human Gene Therapy)》1993年;4:609-615;Clark等人《基因治疗 (Gene Therapy)》1996年;3:1124-1132;美国专利第5,786,211号;美国专利第5,871,982号;和美国专利第6,258,595号。前述文献在此通过引用整体并入本文, 特别强调与rAAV产生有关的文献的那些部分。

[0091] 因此, 本发明提供了产生感染性rAAV的包装细胞。在一个实施例中, 包装细胞可以是稳定转化的癌细胞, 例如HeLa细胞、293细胞和PerC.6细胞(同源293系)。在另一个实施例中, 包装细胞是其为未转化的癌细胞的细胞, 例如低传代293细胞(用腺病毒E1转化的人类胎儿肾细胞)、MRC-5细胞(人类胎儿成纤维细胞)、WI-38细胞(人类胎儿成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)和FRhL-2细胞(恒河猴胎儿肺细胞)。

[0092] 本发明的重组AAV(即, 感染性衣壳化的rAAV颗粒) 包含rAAV基因组。在示例性实施例中, 两种rAAV的基因组缺乏AAV rep和cap DNA, 即, 在基因组的ITR之间不存在AAVrep或capDNA。可构建为包含本发明的核酸分子的rAAV的实例载于国际专利申请第PCT/US2012/047999(WO2013/016352) 号, 其通过引用整体并入本文。

[0093] 可以通过本领域标准方法纯化rAAV, 例如通过柱色谱法或氯化铯梯度。从辅助病毒中纯化rAAV载体的方法是本领域已知的, 并且包括公开在例如Clark等人《人类基因治疗 (Hum. Gene Ther.)》1999年;10(6):1031-1039;Schenpp和Clark《分子医学方法 (Methods Mol. Med.)》2002年;69427-443;美国专利第6,566,118号和WO 98/09657中的方法。

[0094] 在另一个实施例中, 本发明涉及包含本发明的rAAV的组合物。本发明的组合物包含rAAV和药学上可接受的载体。所述组合物还可包含其他成分, 例如稀释剂和佐剂。可接受的载体、稀释剂和佐剂对接受者是无毒的, 并且在所用的剂量和浓度下是优选是惰性的, 并且包括缓冲剂, 如磷酸盐、柠檬酸盐或其他有机酸;抗氧化剂, 如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂, 如EDTA;糖醇, 如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子, 如钠;和/或非离子表面活性剂, 如吐温、普朗尼克类或聚乙二醇(PEG)。

[0095] 在本发明的方法中施用的rAAV的滴度将根据例如特定的rAAV、施用模式、治疗目标、个体和靶向的细胞类型而变化,并且可以通过本领域标准方法确定。rAAV的滴度范围可以从约 1×10^6 、约 1×10^7 、约 1×10^8 、约 1×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 1×10^{13} 至约 1×10^{14} 或更多DNase抗性颗粒(DRP)每毫升。剂量也可以以病毒基因组(vg)为单位表示。

[0096] 本发明考虑了在体内或体外用rAAV转导靶细胞的方法。在体内的方法包含向有需要的动物(包括人类)施用有效剂量或有效多剂量的包含本发明rAAV的组合物的步骤。如果在失调/疾病发展前施用剂量,则施用是预防性的。如果在失调/疾病发展后施用剂量,则施用是治疗性的。在本发明的实施例中,有效剂量是减轻(消除或减少)与所治疗的失调/疾病状态相关的至少一种症状的剂量,其减缓或预防进展至失调/疾病状态,减缓或预防失调/疾病状态的进展,减轻疾病的程度,使得疾病缓解(部分或全部),和/或延续生命。本发明的方法考虑用于预防或治疗的疾病的实例是FSHD。

[0097] 本发明还考虑了组合疗法。本文使用的组合包括同时治疗和顺序治疗。特别考虑了本发明方法与标准药物治疗(例如皮质类固醇)的组合,如与新疗法的组合一样。

[0098] 有效剂量的组合物的施用可以通过本领域的标准途径,包括但不限于肌肉、肠胃外、静脉内、口服、口腔、鼻、肺、颅内、骨内、眼内、直肠或阴道。考虑到感染和/或待治疗的疾病状态和表达miR-29miRNA和/或微肌营养不良蛋白的靶细胞/组织,本领域技术人员可以选择和/或匹配本发明的rAAV的AAV组分(特别是AAV ITR和衣壳蛋白)的给药途径和血清型。

[0099] 本发明提供了有效剂量的rAAV和本发明的包括本发明的组合治疗的组合物用于局部给药和全身给药。例如,全身给药是施用于循环系统以使整个身体受到影响。全身给药包括肠内给药,例如通过肠道吸收和通过注射、输注或植入进行肠胃外给药。

[0100] 特别地,本发明的rAAV的实际施用可以通过使用将rAAV重组载体转运到动物的靶组织中的任何物理方法来实现。根据本发明,给药包括但不限于注射到肌肉、血流和/或直接注射到肝脏中。简单地将rAAV重新悬浮在磷酸盐缓冲溶液中已经被证明足以提供用于肌肉组织表达的载体,并且对可以与rAAV共同施用的载体或其他组分没有已知的限制(尽管通常应该避免降解DNA的组合物与rAAV使用)。可以修饰rAAV的衣壳蛋白,以使rAAV靶向特定的目标靶组织,例如肌肉。参见,例如,WO 02/053703,其公开内容通过引用并入本文。药物组合物可以制备成可注射制剂或局部制剂,通过透皮转运递送至肌肉。先前已经开发了许多用于肌肉注射和透皮转运的制剂,并且这些制剂可以用于本发明的实践中。rAAV可与任何药理学上可接受的载体一起使用,以便于给药和处理。

[0101] 以本文公开的方法施用的rAAV的剂量将根据例如特定的rAAV、施用方式、治疗目标、个体和靶向的细胞类型而变化,并且可以通过本领域标准方法确定。施用的每种rAAV的滴度范围可以从约 1×10^6 、约 1×10^7 、约 1×10^8 、约 1×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 1×10^{13} 、约 1×10^{14} 或至约 1×10^{15} 或更多DNase抗性颗粒(DRP)每毫升。剂量也可以以病毒基因组(vg)为单位表示(即,分别为 1×10^7 vg、 1×10^8 vg、 1×10^9 vg、 1×10^{10} vg、 1×10^{11} vg、 1×10^{12} vg、 1×10^{13} vg、 1×10^{14} vg、 1×10^{15} vg)。剂量也可以以每千克(kg)体重的病毒基因组(vg)为单位表示(即,分别为 1×10^{10} vg/kg、 1×10^{11} vg/kg、 1×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 1×10^{15} vg/kg)。滴定AAV的方法描述于Clark等人《人类基因治疗(Hum. Gene Ther.)》1999年;10:1031-1039。

[0102] 特别地,本发明的rAAV的实际施用可以通过使用将rAAV重组载体转运到动物的靶组织中的任何物理方法来实现。根据本发明,给药包括但不限于注射到肌肉、血流和/或直接注射到肝脏中。简单地将rAAV重新悬浮在磷酸盐缓冲溶液中已经被证明足以提供用于肌肉组织表达的载体,并且对可以与rAAV共同施用的载体或其他组分没有已知的限制(尽管通常应该避免降解DNA的组合物与rAAV使用)。可以修饰rAAV的衣壳蛋白,以使rAAV靶向特定的目标靶组织,例如肌肉。参见,例如,WO 02/053703,其公开内容通过引用并入本文。药物组合物可以制备成可注射制剂或局部制剂,通过透皮转运递送至肌肉。先前已经开发了许多用于肌肉注射和透皮转运的制剂,并且这些制剂可以用于本发明的实践中。rAAV可与任何药学上可接受的载体一起使用,以便于给药和处理。

[0103] 为了肌肉注射的目的,可以使用佐剂(如芝麻油或花生油)或丙二醇水溶液中的溶液,以及无菌水溶液。如果需要,所述水溶液可以被缓冲,并且首先将所述液体稀释剂用盐水或葡萄糖进行等渗。作为游离酸(DNA含有酸性磷酸基)或药学上可接受盐的rAAV溶液可以在合适地与表面活性剂(如羟丙基纤维素)混合的水中制备。还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和油中制备rAAV的分散体。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。在这方面,所用的无菌水性介质都可通过本领域技术人员熟知的标准技术容易地获得。

[0104] 适于注射使用的药物载体、稀释剂或赋形剂包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,形式必须是无菌的并且必须是流动的,以便达到易于注射的程度。它在制备和储存条件下必须是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。所述载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如,通过使用诸如卵磷脂的涂层、通过在分散体的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂可以维持适当的流动性。微生物作用的预防可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等来实现。在许多情况下,将优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0105] 无菌可注射溶液通过在适当的溶剂中将rAAV以所需量与根据需要的上面列举的各种其他成分混合,随后过滤灭菌来制备。通常,通过将灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分的粉末加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分。

[0106] 用rAAV转导也可以在体外进行。在一个实施例中,从受试者中取出所需的靶肌肉细胞、用rAAV转导并重新引入受试者。或者,可以使用同源或异种肌细胞,其中这些细胞不会在受试者中产生不适当的免疫应答。

[0107] 用于将转导细胞转导和再引入受试者的合适方法是本领域已知的。在一个实施例中,细胞可以通过将rAAV与肌肉细胞组合(例如,在适当的介质中)在体外转导,并使用常规技术例如Southern印迹和/或PCR,或通过使用选择标记筛选携带目标DNA的那些细胞。然后可将转导细胞配制成药物组合物,并通过各种技术将组合物引入受试者,例如通过肌肉注射、静脉注射、皮下注射和腹膜内注射,或通过使用例如导管注射到平滑肌和心肌中。

[0108] 用本发明的rAAV转导细胞引起miR-29或微肌营养不良蛋白的持续表达。因此,本

发明提供了向动物、优选人类施用/递送表达miR-29和/或微肌营养不良蛋白的rAAV的方法。这些方法包括用一种或多种本发明的rAAV转导组织(包括但不限于诸如肌肉的组织、诸如肝脏和脑的器官、以及诸如唾液腺的腺体)。可以用包含组织特异性控制元件的基因盒进行转导。例如,本发明的一个实施例提供了转导由肌肉特异性控制元件指导的肌肉细胞和肌肉组织的方法,包括但不限于衍生自肌动蛋白基因家族和肌球蛋白基因家族的那些,例如来自myoD基因家族[参见Weintraub等人《科学(Science)》1991年;251:761-766]、肌细胞特异性增强子结合因子MEF-2[Cserjesi和Olson《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》1991年;11:4854-4862]、人类骨骼肌动蛋白基因控制元件[Muscat等人《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》1987年;7:4089-4099]、心肌肌动蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件[参见Johnson等人《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》1989年;9:3393-3399]和鼠肌酸激酶增强子(mCK)元件、骨骼快缩肌钙蛋白C基因控制元件、慢缩心肌肌钙蛋白C基因和慢缩肌钙蛋白I基因:缺氧诱导核因子(Semenza等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》1991年;88:5680-5684)、类固醇诱导元件或包括糖皮质激素响应元件(GRE)的启动子(参见Mader和White《美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》1993年;90:5603-5607)、和其他控制元件。

[0109] 肌肉组织是用于体内DNA递送的有吸引力的靶标,因为它不是生命器官并且易于接近。本发明考虑了从转导的肌纤维中持续表达miRNA。

[0110] “肌肉细胞”或“肌肉组织”是指源自任何种类的肌肉的细胞或细胞群(例如,骨骼肌和平滑肌,例如来自消化道、膀胱、血管或心脏组织)。这些肌肉细胞可以是分化的或未分化的,例如成肌细胞、肌细胞、肌管、心肌细胞和成心肌细胞。

[0111] 术语“转导”用于指在体内或体外将miR29引导链或微肌营养不良蛋白的编码区施用/递送至受体细胞,通过本发明的复制缺陷型rAAV,使得受体细胞表达miR29或微肌营养不良蛋白。

[0112] 因此,本发明提供了向有需要的患者施用有效剂量(或基本上同时施用的剂量或间隔施用的剂量)rAAV的方法,所述rAAV编码miR29和/或微肌营养不良蛋白。

[0113] 实例

[0114] 实例1

[0115] 杜氏肌营养不良症模型的确认

[0116] mdx小鼠提供方便但不完整的动物模型用以研究DMD发病机理。这个模型是含有肌营养不良蛋白相关蛋白基因的杂合敲除的mdx小鼠的杂交(mdx:utrn^{+/-}),其表现出纤维化增加并且更忠实地概括了人类DMD的病理学。mdx小鼠在DMD的外显子23中具有无义突变,其引起相对温和的表型和接近正常的寿命。到3周龄时,mdx小鼠的膈肌和肢体肌出现肌内膜炎症的迹象。在小鼠到达成年后这些症状在肢体肌中消退,而膈肌中的炎症继续逐渐恶化。在缺乏端粒酶的mdx小鼠中,肌营养不良症随着年龄的增长而逐渐恶化;缺乏肌营养不良蛋白相关蛋白(DKO)的mdx小鼠具有更多人类DMD特征的表型,包括早发性肌肉无力、严重纤维化和过早死亡。肌营养不良蛋白相关蛋白是肌营养不良蛋白的常染色体旁系同源物,它具有高度的序列同源性,可以弥补双敲除(肌营养不良蛋白和肌营养不良蛋白相关蛋白)中mdx小鼠中肌营养不良蛋白的缺乏;早死亡的严重表型被观察到。尽管DKO小鼠的过早死亡排除了炎症和纤维化的进展,但是mdx:utrn^{+/-}小鼠呈现出与人类疾病相似的模型,表现出

惊人的纤维化程度,并且存活时间比DKO更长,为我们提出的转化研究提供了更好的模型。最近的一份报告证实了使用mdx:utrn^{+/-}小鼠是作为研究DMD背景下纤维化的理想模型。在本研究中,通过天狼星红染色测量的纤维化增加伴随着胶原蛋白转录水平的增加和mir29c水平的降低。

[0117] 实例2

[0118] 将miR29递送至DMD小鼠减少纤维化

[0119] 初步研究已经证明,在人类DMD患者和mdx/utrn^{+/-}小鼠中,天狼星红染色胶原蛋白显著增加并且miR-29c水平降低。使用肌肉特异性AAV载体基因递送miR-29可能是安全和有效的。为了产生rAAV载体(本文中被称为rAAVrh.74.CMV.miR29c),将22个核苷酸的miR29c序列(靶链SEQ ID NO:3和引导链SEQ ID NO:4)克隆到由CMV启动子驱动的miR-30支架中。将表达盒(SEQ ID NO:2)克隆到自身互补的AAV质粒中,并使用已知在肌肉中表达良好的血清型AAVrh.74包装。在miR-30骨架中,使用含有miR-29c靶(正义)链、miR-30茎环和miR-29c引导(反义)链的定制引物合成miR-29c cDNA。修改了miR-29c序列的三个碱基。然后将此序列克隆到含有由CMV启动子和polyA序列驱动的质粒的自身互补的AAV ITR中。

[0120] 如图1所示,pAAV.CMV.miR29c质粒在miR-30茎环骨架中含有mir29ccDNA,其侧翼为AAV2反向末端重复序列(ITR)。正是这个序列被衣壳化到AAVrh.74病毒粒子中。另外,miR-29c靶序列中的一些核苷酸在此位点被改变为模拟Watson-crick配对,如在shRNA-miR(luc)中。根据ShRNA-luc设计,发夹应在其整个长度上完全互补。此外,过客链的变化越多,消除任何调节miR-29加工的内源性机制的可能性就越大,这种机制可以通过茎识别miRNA。引导链的第19个碱基被修改为一个胞嘧啶以模仿在天然mi-29c序列中先于裂解位点的核苷酸并且在另一链上的相应碱基被改变以保留配对。

[0121] 将基因治疗载体scrAAVrh.74.CMV.miR29c(1×10^{11} vgs)注射到3个月大的mdx/utrn^{+/-}小鼠的股四头肌中。通过天狼星红染色分析注射后第3个月的股四头肌并通过NIH ImageJ软件分析,其被描述于Nevo等人《公共科学图书馆:综合(PloS One)》2011年;6:e18049。通过RT-PCR定量miR29c、胶原蛋白和弹性蛋白水平。将miR-29c递送至年轻mdx/utrn^{+/-}小鼠显著增加mir-29c水平和6个月大的mdx/utrn^{+/-}小鼠(注射后第3个月)的股四头肌中的天狼星红染色的显著降低。当通过RT-PCR评估时,处理的肌肉中的胶原蛋白和弹性蛋白水平降低。

[0122] 在mdx/utrn^{+/-}小鼠和肌营养不良蛋白缺陷患者中增加的纤维化和降低的miR29表达的示范证实了小鼠模型作为人类疾病的代表。使用AAV递送的miR29作为抗纤维化疗法的初步结果表明,在天狼星红染色和胶原蛋白和弹性蛋白水平中的降低具有显著的有益效果,这些是纤维化的关键因素。

[0123] 实例3

[0124] 注射MiR-29c减少胶原蛋白并且恢复miR-29c

[0125] 为了确定rAAVrh.74.CMV.MiR-29c是否可以减少纤维化,12周龄的mdx/utrn^{+/-}小鼠以 5×10^{11} vgs的量接受肌肉注射rAAVrh.74.CMV.MiR-29c到左侧腓肠肌(GAS)。在注射后第12周分析小鼠。与未处理的对侧mdx/utrn^{+/-} GAS肌肉相比,苦味酸天狼星红染色显示整个GAS肌肉中的胶原染色显著降低(图2A)。苦味酸天狼星红染色的定量显示,与未处理的肌肉相比,处理的肌肉的胶原蛋白减少了18.3%(处理的 $23.3\% \pm 1.3$ 对比未处理的 $29.5\% \pm$

0.7) (图2B)。为了确认miR-29c在处理肌肉中的过表达,从24周龄WT、miR-29c处理的和mdx/utrn^{+/-}小鼠的GAS肌肉中提取总RNA,并进行miR-29c表达的定量逆转录-PCR (qRT-PCR) 分析。结果显示,与未处理的小鼠相比,处理的小鼠的GAS肌肉中miR-29c显著增加(图2C)。

[0126] 实例4

[0127] MiR-29c改善绝对和特异性肌肉力量但不能防止收缩诱导的损伤

[0128] 已知纤维化可影响肌肉功能,我们想通过增加MiR-29c的表达以减少纤维化测试是否可以防止mdx/utrn^{+/-}肌肉免受收缩诱导的损伤并增加整体力量。评估了用rAAVrh.74.CMV.MiR-29c处理的mdx/utrn^{+/-}小鼠的腓肠肌的功能特性。注射后第12周,分离GAS以进行体内力测量。

[0129] GAS程序遵循列于(Hakim等人《分子医学方法(Methods Mol Biol.)》2011年;709:75-89)中的方案,其用于分析横向腹部肌肉生理学但适用于GAS。简而言之,使用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物麻醉小鼠。移除后肢皮肤以暴露GAS肌肉和跟腱。解剖出远端肌腱,并且围绕肌腱用4-0缝线绑一个双方结,缝线尽可能靠近肌肉,另一个第二个双方结紧贴在第一个结的旁边,然后切断肌腱。暴露的肌肉不断用盐水沾湿。然后将小鼠转移到热控平台并保持在37°。通过髌骨肌腱(将肌腱缝合到力传感器(Aurora Scientific,加拿大安大略省奥罗拉)的水平臂上)用针将膝盖固定在平台上,并用胶带固定足部。通过双极铂电极刺激坐骨神经引发GAS肌肉收缩。一旦肌肉稳定,通过逐渐拉伸肌肉直到达到最大抽搐力以确定最佳长度。休息3分钟后,在50、100、150和200Hz下刺激GAS,每次刺激之间有1分钟的休息时间,以确定最大的强直力。测量肌肉长度。在休息5分钟后,评估GAS肌肉对收缩诱导的损伤的易感性。刺激500毫秒后,肌肉延长了最佳长度的10%。这包括在150Hz下刺激肌肉700毫秒。刺激后,肌肉恢复到最佳长度。每分钟重复所述循环,总共5个循环。通过将最大强直力除以GAS肌肉横截面积以计算比力。在离心收缩后,然后使小鼠安乐死并解剖出GAS肌肉、称重并冷冻用于分析。

[0130] 对每个GAS进行一系列重复的离心收缩。通过比较每次收缩与第一次收缩的力比,显示在第五次收缩后,未处理的肌肉衰退至 0.56 ± 0.05 对比处理的 0.50 ± 0.04 ($p \leq 0.0001$)。与WT对照相比,注射组显示保护程度略微降低,其衰减至 0.92 ± 0.02 (图3C)。此数据显示,通过增加miR-29c的表达以减少纤维化导致绝对力和比力的增加,但是不能显著保护肌肉免受收缩诱导的损伤。

[0131] 当与未处理的mdx/utrn^{+/-} GAS肌肉相比时,rAAVrh.74.MiR-29c处理的GAS肌肉显示出绝对力的显著改善(rAAV.miR-29c的 2277 ± 161.7 对比mdx/utrn^{+/-}未处理的 1722 ± 145.7 ;图3A),并且当与未处理的GAS肌肉相比时,rAAVrh.74.miR-29c处理的GAS肌肉中的归一化比力特定改善(rAAV.miR-29c的 204.7 ± 11.7 对比mdx/utrn^{+/-}未处理的 151.6 ± 14.5 ;图3B)。与野生型对照相比,力仍然显着降低(rAAV.miR-29c的 204.7 ± 11.7 对比野生型的 312.0 ± 34.1)。

[0132] 实例5

[0133] 与微肌营养不良蛋白共同递送进一步减少纤维化

[0134] 为了确定miR-29c/微肌营养不良蛋白联合基因治疗方法是否对减少纤维化更有益,12周龄的mdx/utrn^{+/-}小鼠以 5×10^{11} vgs的量接受肌内注射rAAVrh.74.CMV.MiR-29c到左腓肠肌。将以下基因治疗载体通过肌内注射(IM)施用于3月龄mdx/utrn^{+/-}小鼠(DMD鼠模型)

的左腓肠肌 (GAS) 肌肉中: 单独的scAAVrh.74.CMV.miR-29c、与rAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白共同递送和单独的rAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白。

[0135] pAAV.MCK.微肌营养不良蛋白质粒含有侧翼为AAV2反向末端重复序列 (ITR) 的人类微肌营养不良蛋白cDNA表达盒, 如图1所示。正是这个序列被衣壳化到AAV rh.74病毒粒子中。通过将驱动密码子优化的人类微肌营养不良蛋白cDNA序列的MCK表达盒插入AAV克隆载体中构建pAAV.MCK.微肌营养不良蛋白质粒, 如在Rodino-Klapac等人《分子治疗 (Mol Ther.)》2010年1月; 18(1): 109-17中所述。MCK启动子/增强子序列用于驱动肌肉特异性基因表达, 并且由与351bp MCK核心启动子 (近端) 融合的小鼠MCK核心增强子 (206bp) 组成。核心启动子之后, 存在的53bp内源小鼠MCK外显子1 (非翻译的) 用于有效转录起始, 接着是SV 40晚期16S/19S剪接信号 (97bp) 和小5' UTR (61bp)。内含子和5' UTR衍生自质粒pCMV β (Clontech)。微肌营养不良蛋白盒在ATG开始和用于mRNA终止的小的53bp合成polyA信号前立即具有共识Kozak。人类微肌营养不良蛋白盒含有 (R4-R23/ Δ 71-78) 结构域。互补DNA经人工密码子优化, 并由GenScript (新泽西州皮斯卡塔韦) 合成。

[0136] 在注射后第12周和第24周分析小鼠。首先, 使用表达微肌营养不良蛋白的肌纤维的数量来评估转基因递送的功效并确保我们在每组中具有相似水平的微肌营养不良蛋白表达。我们发现, 与miR-29c/微肌营养不良蛋白联合治疗 ($75.03 \pm 1.91\%$) 相比, 单独使用微肌营养不良蛋白治疗组 ($71.85 \pm 2.25\%$) 的微肌营养不良蛋白没有差异 (图4)。

[0137] 在注射后第12个月分析GAS肌肉以通过天狼星红染色和随后的ImageJ定量评估胶原蛋白积累。其他结果包括miR-29c和胶原蛋白转录水平、GAS肌肉力测量、纤维直径测量和参与肌肉再生 (MyoD、肌细胞生长素) 的蛋白质的Western印迹分析。通过苦味酸天狼星红染色分析纤维化的量, 其显示与未治疗的对照mdx/utrn^{+/+} GAS肌肉或单独的微肌营养不良蛋白相比, 在所有治疗组中整个GAS肌肉中的胶原染色显著降低 (图5A)。对苦味酸天狼星红染色的定量显示, 与未处理的肌肉相比, 共处理的肌肉的胶原蛋白具有40.8%的减少 (处理的 $17.47\% \pm 0.75$ 对比未处理的 $29.5\% \pm 0.7$) (图5B)。为了确认miR-29c的表达, 对GAS肌肉进行qRT-PCR, 并且与未处理的肌肉相比, 所有治疗组的miR-29c均增加 (图5C)。

[0138] 类似于DMD组织, 观察到mdx/utrn^{+/+} 肌肉中miR-29c水平显著降低, 其与通过苦味酸天狼星红染色测量的增加的纤维化相关。单独用scAAV.miR-29c治疗3个月后, GAS肌肉中的纤维化显著减少 (处理的 $23.5\% \pm 1.3$ 对比未处理的 $27.8\% \pm 0.6$)。当与微肌营养不良蛋白共同递送时, 通过苦味酸天狼星红染色观察到胶原蛋白的进一步减少 (41%) (联合治疗的: $17.47\% \pm 0.75$ 对比未处理的: $29.5\% \pm 0.7$) ($p < 0.0001$) (图5B)。为了确认miR-29c的表达, 对GAS肌肉进行qRT-PCR, 并且与未处理的肌肉相比, 所有治疗组的miR-29c均增加 (图5B)。

[0139] 在注射后第24周, 结果与注射后第12周观察到的结果相似。与未处理的肌肉相比, 苦味酸天狼星红染色使胶原蛋白减少47% (联合治疗的: 16.5 ± 1.23 对比未处理的: 31.07 ± 0.93 ; $p < 0.0001$) 和miR-29c转录水平的同时增加。

[0140] 为了进一步验证通过苦味酸天狼星红染色观察到的胶原蛋白减少, 对肌肉进行qRT-PCR以量化Col11A、Col13A和另一种ECM组分、纤连蛋白 (Fbn) 的转录水平。qRT-PCR分析检测到每次治疗后Col11A和Col13A的减少, 但是只有用微肌营养不良蛋白和miR-29c处理的组显示出显著的减少 (图6A和6B)。分析显示Fbn仅在共处理的组中显著降低 (图6C)。

[0141] 先前已显示TGF- β 1在营养不良肌肉中上调,其可能在纤维化级联的起始中起作用。TGF- β 1是已知的促纤维化细胞因子,其下调miR-29c并且负责将成肌细胞转化为肌成纤维细胞,同时增加胶原蛋白和肌纤维化发生。qRT-PCR分析显示,与未注射的肌肉和单独任一处理相比,共处理的肌肉具有显著更低水平的TGF- β 1(图6D)。在注射后第6个月,共处理的肌肉继续显示降低的Col1A、Col3A、Fbn和TGF- β 1水平,而在miR-29和微肌营养不良蛋白的单独组中仅观察到Col1A mRNA水平的轻微降低。

[0142] 与未处理的肢体相比,仅用miR-29c处理的肌肉中观察到比力和绝对力的增加,当与微肌营养不良蛋白结合时,导致绝对力和比力与野生型没有显著差异。我们还观察到共处理的那些肌肉中腓肠肌重量的显著增加。

[0143] 使用rAAV.miR-29c作为抗纤维化疗法的初步结果表明,对胶原水平(纤维化的关键因素)降低具有有益效果。此外,当与微肌营养不良蛋白结合以改善膜稳定性时,miR29上调使肌肉力量正常化。

[0144] 实例6

[0145] 进一步增加绝对力并增加保护以免受收缩诱导的损伤

[0146] 已知miR-29处理的肌肉的绝对力和比力具有适度但显著的增加,研究了miR-29c过表达和微肌营养不良蛋白基因替代对肌肉功能的影响的组合疗法。注射后第12周,我们分离了我们进行体内力测量的GAS。上述实例2中描述的rAAVrh.74.MiR-29c载体和rAAV

[0147] 当与未处理的mdx/utrn^{+/-}GAS肌肉相比时,共处理的rAAVrh.74.MiR-29c和表达Micro-Dys的rAAV处理的GAS肌肉显示出绝对力的显著改善(共处理的 3582.4 ± 79.4 nM对比mdx/utrn^{+/-}未处理的 1722 ± 145.7 nM对比野生型的 3005 ± 167.3 nM)(图7),并且当与未经处理的GAS肌肉相比时,rAAVrh.74.miR-29c/micro-dys处理的GAS肌肉中的归一化比力具有特定改善(共处理小鼠的 244.2 ± 6.6 nM/mm²对比mdx/utrn^{+/-}未处理的 151.6 ± 14.5 nM/mm²对比 312.0 ± 34.1 nM/mm²)(图7)。绝对力和比力与野生型对照没有显著差异。

[0148] 对每个GAS进行一系列重复的离心收缩。通过比较每次收缩与第一次收缩的力比,显示在第五次收缩后,未处理的肌肉衰退至 0.54 ± 0.06 ,而共处理的 0.66 ± 0.04 ($p \leq 0.0001$),这可能是由于微肌营养不良蛋白,因为单独的微肌营养不良蛋白也衰减至 0.66 ± 0.04 。处理组仍显著低于野生型,野生型衰减至 0.92 ± 0.02 (图7C)。在注射后第24周观察到类似的发现。此数据显示减少纤维化和基因替代使得绝对力和比力增加并且显著保护肌肉免受收缩诱导的损伤。

[0149] 实例7

[0150] 组合治疗增加肌肉肥大和增生

[0151] 与在三个月大时与单独注射任一种相比,与微肌营养不良蛋白共同递送的MiR-29c增加了注射的腓肠肌的总重量(图8、图9A)。为了研究肌肉质量增加的来源,测量肌纤维直径。miR-29c/ μ -dys组合治疗表明平均纤维尺寸增加。比较mdx/utrn^{+/-}对照与miR-29c/ μ -dys处理的mdx/utrn^{+/-},平均直径从 25.96 增加到 $30.97 \mu\text{m}$ (图9B)。共同递送产生向野生型纤维尺寸分布的转变(图9C)。虽然平均纤维大小增加并不能解释总肌肉重量增加约30%。还测量了肌肉的总横截面积。所有组的腓肠肌全玻片扫描并测量总面积。与未处理和单独任一处理相比,用micro-dys/miR-29c共处理的肌肉的横截面积显著增加(未注射的:24.6对比miR-29c:26.3对比micro-dys:26.6对比micro-dys/miR-29c:33.1)(图8、图9D)。

[0152] 已经报道miR-29c在myoD/Pax7/肌细胞生成素途径中起作用,并且假设miR-29c可能影响卫星细胞(肌肉干细胞)的再生和活化以在肌源性谱系中分化。为了测试这一点,计算来自全玻片扫描图像的肌纤维总数。miR-29c/ μ -dys组合治疗后肌纤维数量增加(图9E)。最后,考虑到mdx/utrn^{+/-}小鼠中的肌纤维直径与许多小纤维和一些肥大纤维是异质的,确定每单位面积的纤维数(细胞/平方毫米)是否受到治疗的影响。miR-29c/ μ -dys组合治疗与野生型没有差异(图9F)。

[0153] 实例8

[0154] 组合早期治疗预防纤维化

[0155] 鉴于组合miR-29c和微肌营养不良蛋白作为DMD的预防性治疗的潜在重要性,在4周龄时处理一组较年轻的mdx/utrn^{+/-}小鼠。使用与本文所述的其他组相同的范例,比较以下治疗通过肌肉注射GAS预防纤维化的功效:单独scAAVrh.74.CMV.miR-29c、ssAAVrh74.MCK.微肌营养不良蛋白和scAAVrh.74.CMV.miR-29c组合治疗、或单独使用相同剂量的ssAAVrh74.MCK.微肌营养不良蛋白。注射后第12周对小鼠进行尸检。观察到与未处理的对侧mdx/utrn^{+/-}GAS肌肉相比,所有处理组的整个GAS肌肉中胶原蛋白染色显著减少(图10A)。苦味酸天狼星红染色的定量显示,与未处理的肌肉相比,用微肌营养不良蛋白/miR-29c共处理的肌肉的胶原蛋白减少了51%(处理的11.32% $\pm$ 1.18对比未处理的23.15% $\pm$ 0.90)($p < 0.0001$)(图10)并且qRT-PCR证实组合疗法后的Col1A、Col3A、Fbn和TGF- β 1减少(图10D和E)。

[0156] 实例9

[0157] 早期组合治疗比晚期治疗恢复力和保护免受收缩诱导的损伤更好

[0158] 如实例8中所述,在用组合疗法早期治疗的小鼠的GAS上进行体内力测量。与未处理的mdx/utrn^{+/-}小鼠相比,在4周龄的mdx/utrn^{+/-}小鼠中使用miR-29c/微肌营养不良蛋白共处理显示出绝对力的显著改善,并且与野生型无差异(共处理的:2908 $\pm$ 129.5mN对比未处理的:1639.4 $\pm$ 116.9mN对比野生型的:3369.73 $\pm$ 154.1mN)。在组合治疗后,比力也归一化为野生型水平(共处理的338.9 $\pm$ 22.34mN/mm²对比未处理的184.3 $\pm$ 13.42mN/mm²对比WT 364.3 $\pm$ 7.79mN/mm²)(图11左侧图片、图11中间图片和图12)。

[0159] 接下来,对每个GAS进行一系列重复的离心收缩。通过比较每次收缩与第五次收缩的力比,未处理的肌肉衰减至0.53 $\pm$ 0.04,而共处理的0.82 $\pm$ 0.04($p < 0.0001$)。组合治疗组略低于野生型但没有显著差异,野生型衰减至0.93 $\pm$ 0.01(图11右侧图片)。这些数据表明,减少纤维化和基因替代导致绝对力和比力的增加,并显著保护肌肉免受收缩诱导的损伤。

[0160] 这些实验表明基因替代应该在新生期开始。努力显然正朝着在新生期识别DMD和其他肌营养不良症的方向发展。俄亥俄州新生儿筛查研究表明使用CK 7Neuro1.作为具有在相同的干血斑上进行DNA确证的生物标志物(>2000U/L)鉴定新生儿DMD的可能性(Mendell等人《神经学年鉴(Ann.Neurol.)》2012年;71:304-313)。这种方法现在正在扩展到美国其他州(PPMD 2016年5月16日:新生儿筛查的后续步骤)和其他国家,特别是英国(英国国家筛查委员会)和中国(Perkin ElmerTM在中国开展筛查)。

[0161] miR-29还显示出作为治疗心脏、肺和肝脏纤维化的方式的前景。小鼠和人类的心肌梗塞与miR-29下调有关。Roosj等人(《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci,USA)》2008年;105:13027-13032)证明,将成纤维细胞暴露于miR-29b模拟物减少了胶原蛋白转

录,为心脏纤维化的临床转化提供了途径。随后的研究表明,在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中,使用基于睡美人(SB)转座子系统的miR-29b.14的递送可以实现纤维化的减弱。目前,miR-29b模拟物处于健康志愿者中的临床1期安全性-耐受性局部皮内试验(miRagen治疗学™MRG-201)。对比与寡核苷酸半衰期相关的miR-29寡核苷酸递送需要重复给药,AAV基因治疗可能为单次递送基因转移提供了途径。

[0162] 实例10

[0163] miR-29和微肌营养不良蛋白的肌肉特异性表达治疗减少纤维化和ECM表达

[0164] 还产生包含miR29c序列和肌肉特异性启动子MCK的AAV载体,并且所述AAV载体与表达微肌营养不良蛋白的AAV载体作为组合疗法进行测试。为了产生rAAV载体(本文中称为rAAV.MCK.miR29c),将22个核苷酸的miR29c序列(靶链SEQ ID NO:3和引导链SEQ ID NO:4)克隆到由MCK启动子驱动的miR-30支架中(SEQ ID NO:11)。将表达盒(SEQ ID NO:12)克隆到单链AAV质粒中,并使用已知在肌肉中良好表达的血清型AAVrh74包装。在miR-30骨架中使用含有miR-29c靶(正义)链、miR-30茎环和miR-29c引导(反义)链的定制引物合成miR-29ccDNA。修改了miR-29c序列的三个碱基。然后将此序列克隆到含有由MCK启动子和polyA序列驱动的质粒的单链AAV ITR中。

[0165] pAAV.MCK.miR29c质粒在miR-30茎环骨架中含有mir29c cDNA,其侧翼为AAV2反向末端重复序列(ITR)。正是这个序列被衣壳化到AAVrh74病毒粒子中。另外,miR-29c靶序列中的一些核苷酸在此位点被改变为模拟Watson-crick配对,如在shRNA-miR(luc)中。根据ShRNA-luc设计,发夹应在其整个长度上完全互补。此外,过客链的变化越多,消除任何调节miR-29加工的内源性机制的可能性就越大,这种机制可以通过茎识别miRNA。引导链的第19个碱基被修改为胞嘧啶以模仿在天然mi-29c序列中先于裂解位点的核苷酸并且在另一链上的相应碱基被改变以保留配对。

[0166] AAV.MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合疗法的早期治疗在减少纤维化和ECM表达方面更有效。4至5周龄的mdx/utrn^{+/-}小鼠以 5×10^{11} vgs的量接受肌肉注射rAAVrh.74.MCK.MiR-29c和rAAVrh74.MCK.微肌营养不良蛋白到左侧腓肠肌,如实例5中所述。注射后第12周收获肌肉。从未注射的和用rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.微肌营养不良蛋白组合治疗注射的小鼠中收获的肌肉的苦味酸天狼星红染色显示,与未处理的GAS肌肉相比,共处理的肌肉的胶原蛋白具有50.9%的减少(参见图13A和13B)。qRT-PCR证实了治疗组中miR-29c转录水平的增加(图13C)。半定量qRT-PCR显示与对侧肢体疗法相比,AAV.MCK.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉中胶原蛋白A1和胶原蛋白3A(图13D、E)、纤连蛋白(图13F)和Tgf β 1(图13G)水平显著降低。(*p<0.05,***p<0.0001)。AAV.MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合疗法的晚期治疗可有效减少纤维化和ECM表达。三个月大的mdx/utrn^{+/-}小鼠以 5×10^{11} vgs的量接受肌肉注射rAAVrh.74.MCK.MiR-29c和rAAVrh.74.MCK.微肌营养不良蛋白到左侧腓肠肌,如实例5中所述。注射后第12周收获肌肉。未注射的、AAV.MCK.miR-29c和AAV.MCK.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉的苦味酸天狼星红染色显示,与未处理的GAS肌肉相比,共处理的肌肉的胶原蛋白具有30.3%的减少(参见图14A和14B)。qRT-PCR证实了治疗组中miR-29c转录水平的增加(图14C)。半定量qRT-PCR显示与对侧肢体相比,AAV.miR-29c/AAV.微肌营养不良蛋白处理的肌肉中胶原蛋白1A和胶原蛋白3A(图14D、E)、纤连蛋白(图14F)和Tgf β 1(图14G)水平显著降

低。单因素方差分析。所有数据均代表平均值 $\pm$ SEM。(** $p<0.01$, **** $p<0.0001$)。

[0167] 实例11

[0168] 早期组合治疗比晚期治疗恢复力和保护免受收缩诱导的损伤更好

[0169] 如在实例8和9中所述,在早期用miR-29和微肌营养不良蛋白的肌肉特异性表达处理的小鼠的GAS上进行体内力测量。与未处理的mdx/utrn^{+/+}小鼠相比,在4周龄的mdx/utrn^{+/+}小鼠中使用rAAV.MCK.miR-29c/和表达微肌营养不良蛋白的rAAV共处理显示出绝对力的显著改善,并且与野生型无差异(图15A)。在组合治疗后,比力也归一化为野生型水平(图15B)。

[0170] 然后如实例9中所述评估肌肉在重复的离心收缩后的力损失。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉相比,用rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.微肌营养不良蛋白共处理的和单独的rAAV.MCK.微肌营养不良蛋白处理的小鼠显示出对力的损失的保护(图15C)。

[0171] 在12周龄的mdx/utrn^{+/+}小鼠中,使用rAAV.MCK.miR-29c/和表达微肌营养不良蛋白的rAAV的共同治疗恢复了力并且保护免受收缩诱导的损伤。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉相比,rAAV.MCK.miR-29c和表达微肌营养不良蛋白的rAAV注射的GAS肌肉在强直性收缩之后绝对力(图16A)和归一化比力(图16B)的测量值显著增加。随后,如实例9中所述,评估肌肉在重复的离心收缩后的力损失。与未处理的mdx/utrn^{+/+}肌肉相比,用MCK.miR-29c/微肌营养不良蛋白共处理的小鼠显示出对力的损失的保护(图16C)。这些数据表明,减少纤维化和基因替代导致绝对力和比力的增加,并显著保护肌肉免受收缩诱导的损伤。

[0172] 实例12

[0173] 早期组合治疗增加肌肉肥大和增生

[0174] 注射后三个月与任一单独注射相比,rAAV.MCK.miR-29与表达微肌营养不良蛋白的rAAV的共同递送不会增加注射的腓肠肌的总重量(图17A)。还测量了肌纤维直径.miR-29c/微肌营养不良蛋白组合治疗表明平均纤维尺寸增加。将mdx/utrn^{+/+}对照与miR-29c/微肌营养不良蛋白处理的mdx/utrn^{+/+}进行比较,平均直径从28.96增加至36.03 μ m(图17B)。共同递送产生向野生型纤维尺寸分布的转变(图17C)。miR-29c/微肌营养不良蛋白组合治疗中每平方毫米的肌纤维的数量显著低于未处理的小鼠和野生型(图17D;*** $p<0.01$,**** $p<0.0001$)。

[0175] 参考文献

[0176] 1.Hoffman,E.P.,Brown,R.H.,Jr.和Kunkel,L.M.《肌营养不良蛋白:杜氏肌营养不良位点的蛋白质产物。(Dystrophin:the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus.)》《细胞(Cell)》1987年;51,919-928。

[0177] 2.Straub,V.和Campbell,K.P.《肌营养不良症和肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物。(Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex.)》《神经病学的最新观点(Curr Opin Neurol)》1997年;10,168-175。

[0178] 3.Sacco,A.等人《在mdx/mTR小鼠中短端粒和干细胞衰竭模型杜氏肌营养不良症。(Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTRmice.)》《细胞(Cell)》2010年;143,1059-1071。

[0179] 4.Wallace,G.Q.和McNally,E.M.《肌肉营养不良症中肌肉退化、再生和修复的机制。(Mechanisms of muscle degeneration,regeneration,and repair in the muscular

dystrophies.)》《生理学年评 (Annu Rev Physiol)》2009年;71,37-57。

[0180] 5.Zhou,L.和Lu,H.《杜氏肌营养不良症的靶向性纤维化。(Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy.)》《神经病理学与实验神经病学杂志 (JNeuropathol Exp Neurol)》2010年;69,771-776。

[0181] 6.Desguerre,I.等人《杜氏肌营养不良症中的肌内膜纤维化:与巨噬细胞替代激活相关的不良结果的标志。(Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy:a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation.)》《神经病理学与实验神经病学杂志 (JNeuropatholExpNeurol)》2009年;68,762-773。

[0182] 7.Kim,J.等人《微RNA指导的ATHB 15mRNA切割调节拟南芥花序茎的血管发育。(microRNA-directed cleavage ofATHB15 mRNA regulates vascular developmentinArabidopsis inflorescence stems.)》《植物杂志 (PlantJ)》2005年;42,84-94。

[0183] 8.Ambros,V.《苍蝇和蠕虫中的微RNA路径:生长、死亡、脂肪、压力和时间。(MicroRNA pathways in flies and worms:growth,death,fat,stress,and timing.)》《细胞 (Cell)》2003年;113,673-676。

[0184] 9.Eisenberg,I.等人《原发性肌肉疾病中微RNA表达的独特模式。(Distinctive patterns ofmicroRNAexpression inprimary muscular disorders.)》《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》2007年;104,17016-17021。

[0185] 10.Jiang,X.,Tsitsiou,E.,Herrick,S.E.和Lindsay,M.A.《微RNA和纤维化的调节。(MicroRNAs and the regulation of fibrosis.)》《欧洲生物化学联合会杂志 (FEBS J)》2010年;277,2015-2021。

[0186] 11.van Rooij,E.等人《心肌梗塞后微RNA的失调揭示了miR-29在心肌纤维化中的作用。(Dysregulation ofmicroRNAs aftermyocardial infarction reveals arole of miR-29in cardiac fibrosis.)》《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》2008年;105,13027-13032。

[0187] 12.Cacchiarelli,D.等人《参与与杜氏肌营养不良症发病机理相关的分子环路中的微RNA受肌营养不良蛋白/nNOS路径控制。(MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlledbythedystrophin/nNOSpathway.)》《细胞代谢 (CellMetab)》2010年;12,341-351。

[0188] 13.DiPrimio,N.,McPhee,S.W.和Samulski,R.J.《腺相关病毒用于治疗肌肉疾病:用于临床试验。(Adeno-associatedvirus forthetreatmentofmuscle diseases:toward clinical trials.)》《分子治疗的最新观点 (Curr Opin Mol Ther)》2010年;12,553-560。

[0189] 14.Mendell,J.R.等人《2D型肢带肌营养不良症基因转移后持续的 α -肌聚糖基因表达。(Sustained α -sarcoglycangene expressionaftergenetransferinlimb-girdlemusculardystrophy,type2D.)》《神经学年鉴 (AnnNeurol)》2010年;68,629-638。

[0190] 15.Mendell,J.R.等人《2D型肢带肌营养不良症基因疗法恢复 α -肌聚糖和相关蛋白。(Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores α -sarcoglycan andassociatedproteins.)》《神经学年鉴 (AnnNeurol)》2009年;66,290-297。

- [0191] 16.Mendell,J.R.等人《针对贝克肌营养不良症的1/2a期卵泡抑素基因治疗试验。(Aphase 1/2a follistatin gene therapytrial forbecker muscular dystrophy.)》《分子疗法:美国基因治疗学会期刊(Molecular therapy:the journal of the American Society ofGene Therapy)》2015年;23,192-201。
- [0192] 17.Carnwath,J.W.和Shotton,D.M.《mdx小鼠的肌营养不良症:比目鱼肌和趾长伸肌的组织病理学。(Musculardystrophyinthemdxmouse:histopathologyof thesoleus an dextensordigitorumlongusmuscles.)》《神经科学杂志(JNeurol Sci)》1987年;80,39-54。
- [0193] 18.Coulton,G.R.,Morgan,J.E.,Partridge,T.A.和Sloper,J.C.《mdx小鼠骨骼肌肌病:I.组织学、形态计量学和生物化学研究。(Themdxmouse skeletalmuscle myopathy:I.Ahistological,morphometric andbiochemicalinvestigation.)》《神经病理学与应用神经生物学(NeuropatholAppl Neurobiol)》1988年;14,53-70。
- [0194] 19.Cullen,M.J.和Jaros,E.《X染色体相关的营养不良(mdx)小鼠骨骼肌的超微结构。与杜氏肌营养不良症的比较。(Ultrastructure ofthe skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic(mdx) mouse.Comparison with Duchenne musculardystrophy.)》《神经病理学学报(ActaNeuropathol)》1988年;77,69-81。
- [0195] 20.Dupont-Versteegden,E.E.和McCarter,R.J.《mdx小鼠膈肌与后肢肌肉的肌营养不良症差异表达。(Differential expression of muscular dystrophy in diaphragmversushindlimb musclesofmdxmice.)》《肌肉和神经(MuscleNerve)》1992年;15,1105-1110。
- [0196] 21.Stedman,H.H.等人《mdx小鼠隔膜再生杜氏肌营养不良症的退行性变化。(The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes ofDuchenne muscular dystrophy.)》《自然(Nature)》1991年;352,536-539。
- [0197] 22.Deconinck,A.E.等人《肌营养不良蛋白相关蛋白-肌营养不良蛋白缺陷型小鼠作为杜氏肌营养不良症的模型。(Utrophin-dystrophin-deficient mice as amodel for Duchenne muscular dystrophy.)》《细胞(Cell)》1997年;90,717-727
- [0198] 23.Grady,R.M.等人《缺乏肌营养不良蛋白相关蛋白和肌营养不良蛋白的小鼠的骨骼肌和心肌肌病:杜氏肌营养不良症的模型。(Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin:a model forDuchenne muscular dystrophy.)》《细胞(Cell)》1997年;90,729-738。
- [0199] 24.Love,D.R.等人《与肌营养不良蛋白同源的骨骼肌中的常染色体转录。(An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin.)》《自然(Nature)》1989年;339,55-58。
- [0200] 25.Tinsley,J.M.等人《肌营养不良蛋白相关蛋白的一级结构。(Primary structure of dystrophin-relatedprotein.)》《自然(Nature)》1992年;360,591-593。
- [0201] 26.Tinsley,J.等人《全长肌营养不良蛋白相关蛋白的表达预防mdx小鼠的肌营养不良症。(Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice.)》《自然医学(Nat Med)》1998年;4,1441-1444。
- [0202] 27.Squire,S.等人《通过表达肌营养不良蛋白相关蛋白预防mdx小鼠的病理学:用诱导型转基因表达系统进行分析。(Preventionofpathologyinmdxmice by expression of

utrophin:analysis using an inducible transgenic expression system.)》《人类分子遗传学(Hum Mol Genet)》2002年;11,3333-3344。

[0203] 28.Rafael,J.A.,Tinsley,J.M.,Potter,A.C.,Deconinck,A.E.和Davies,K.E.《肌营养不良蛋白相关蛋白转基因的骨骼肌特异性表达拯救肌营养不良蛋白-肌营养不良蛋白缺陷小鼠。(Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgenerescuesutrophin-dystrophindeficientmice.)》《自然遗传学(NatGenet)》1998年;19,79-82。

[0204] 29.Zhou,L.等人《肌营养不良蛋白相关蛋白基因的单倍体不足使mdx小鼠的骨骼肌炎症和纤维化恶化。(Haploinsufficiencyofutrophingeneworsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice.)》《神经科学杂志(J Neurol Sci)》2008年;264,106-111。

[0205] 30.Gutpell,K.M.,Hrinivich,W.T.和Hoffman,L.M.《在mdx/utrn^{+/-}小鼠的骨骼肌纤维化验证其作为杜氏肌营养不良症小鼠模型的适用性。(Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn^{+/-}Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of DuchenneMuscularDystrophy.)》《公共科学图书馆:综合(PloS One)》2015年;10,e0117306。

[0206] 31.Rodino-Klapac,L.R.等人《微肌营养不良蛋白和卵泡抑素共同递送恢复老年DMD模型的肌肉功能。(Micro-dystrophin andfollistatinco-deliveryrestores muscle function in aged DMD model.)》《人类分子遗传学(Human molecular genetics)》2013年;22,4929-4937。

[0207] 32.Cushing,L.等人《MIR-29是与肺纤维化相关的基因的主要调节因子。(MIR-29is a Major Regulator ofGenesAssociated with Pulmonary Fibrosis.)》《美国呼吸细胞与分子生物学杂志(Am J Respir Cell Mol Biol)》2010年。

[0208] 33.Roderburg,C.等人《微RNA分析揭示miR-29在人类和小鼠肝脏纤维化中的作用。(Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29in human and murine liver fibrosis.)》《肝脏病学(Hepatology)》2011年;53,209-218。

[0209] 34.Nevo,Y.等人《Ras拮抗剂、法呢基硫代水杨酸(FTS)在肌营养不良症的dy/dy小鼠模型中减少纤维化并改善肌肉力量。(The Ras antagonist,farnesylthiosalicylic acid(FTS),decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dymousemodel ofmusculardystrophy.)》《公共科学图书馆:综合(PloS One)》2011年;6,e18049。

[0210] 35.Rodino-Klapac,L.R.等人《用于治疗杜氏肌营养不良症的无需高容量或高压的微肌营养不良蛋白基因的肢体血管递送的转化方法。(A translational approachfor limbvascular deliveryofthemicro-dystrophingenewithouthighvolume or high pressure for treatment ofDuchenne muscular dystrophy.)》《转化医学杂志(J Transl Med)》2007年;5,45。

[0211] 36.Mulieri,L.A.,Hasenfuss,G.,Ittleman,F.,Blanchard,E.M.和Alpert,N.R.《用2,3-丁二酮单肟保护人左心室心肌免受切割损伤。(Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime.)》《循环研究(Circ Res)》1989年;65,1441-1449。

[0212] 37.Rodino-Klapac,L.R.等人《肌肉输送和血管输送后非人类灵长类动物中FLAG标记的微肌营养不良蛋白的持续表达。(Persistent expression of FLAG-tagged microdystrophin in nonhumanprimates following intramuscular andvascular delivery.)》《分子疗法:美国基因治疗学会期刊(Molecular therapy:thejournal oftheAmerican Society ofGene Therapy)》2010年;18,109-117。

[0213] 38.Grose,W.E.等人《AAV5基因转移后同源重组介导dysferlin缺乏症的功能恢复。(Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiencyfollowingAAV5 genetransfer.)》《公共科学图书馆:综合(PloS One)》2012年;7,e39233。

[0214] 39.Liu,M.等人《腺相关病毒介导的微肌营养不良蛋白表达保护年轻的mdx肌肉免受收缩诱导的损伤。(Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury.)》《分子治疗(Mol Ther)》2005年;11,245-256。

序列表

[0001]	<110>	美国全国儿童医院研究所 RODINO-KLAPAC等人	
	<120>	腺相关病毒载体传递微肌营养不良蛋白以治疗肌营养不良症	
	<130>	28335/51908	
	<150>	US 62/473,253	
	<151>	2017-03-17	
	<150>	US 62/232,163	
	<151>	2016-04-15	
	<160>	12	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	5910	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒	
	<220>		
	<221>	启动子	
	<222>	(120)..(526)	
	<223>	CMV启动子	
	<220>		
	<221>	内含子	
	<222>	(927)..(1087)	
	<223>	EF1a内含子	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1088)..(1375)	
	<223>	shRNA-miR29-c	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1257)..(1284)	
	<223>	miR-29c	
	<220>		
	<221>	内含子	
	<222>	(1380)..(1854)	
	<223>	EF1a内含子	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1896)..(2091)	
	<223>	polyA	
	<400>	1	
		cagcagctgc ggcctcgctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg	60
		acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggggttaa	120
		tcgttacata acttacggta aatggcccg cttggctgacc gcccaacgac ccccgcccat	180
		tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc	240
		aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc	300

	caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcttggcat tatgcccagt	360
	acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtctatta	420
	ccatggtgat gcggttttgg cagtiacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg	480
	gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac	540
	gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaattggc ggtaggcgtg	600
	tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac	660
	gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc ctccggactc	720
	tagaggatcc ggtactcgag gaactgaaaa accagaaagt taactggtaa gtttagtctt	780
	tttgtctttt atttcaggtc ccggatccgg tgggtgtgca aatcaaagaa ctgctcctca	840
	gtggatgttg cctttacttc taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc	900
	ggaattgtac ccggggccga tccaccggtc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac	960
	aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ggcgacgggg ccctgtcgtc ccagcgcaca	1020
	tgttcggcga ggccggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa	1080
	gctggccggc ctgtttgaat gaggtctcag tactttacag aatcgttgcc tgcacatctt	1140
	ggaaacactt gctgggatta cttcttcagg ttaacccaac agaaggctcg agaaggtata	1200
	ttgctgttga cagttagcgc aaccgatttc aaatgggtgt agagtgaagc cacagatgtc	1260
[0002]	tagcaccatt tgaaatcggg tatgcctact gcctcggaat tcaaggggct actttaggag	1320
	caattatctt gtttactaaa actgaatacc ttgctatctc ttgatacat tgcccgccct	1380
	gctctgggtg ctggcctcgc gccgcctgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc	1440
	cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tgcagggagc	1500
	tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcacccac acaaaggaaa	1560
	agggcctttc cgtcctcagc cgtcgttca tgtactcca cggagtaccg ggccgctcc	1620
	aggcacctcg attagtctc gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg	1680
	ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttg	1740
	cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc	1800
	aagcctcaga cagtggttca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg aaaagctagc	1860
	gctaccggac tcagatctcg agtcaagct gcggggatcc agacatgata agatacttg	1920
	atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt	1980
	gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca	2040
	attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt tcaactagtag	2100
	catggctacg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta actacaagga acccctagt	2160
	atggagtttg cactccctc tctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag	2220
	gtcggccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgccagctg	2280

	gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg	2340
	cgaatggaat tccagacgat tgagcgtcaa aatgtaggta tttccatgag cgtttttcct	2400
	gttgcaatgg ctggcggtaa tattgttctg gatattacca gcaaggccga tagtttgagt	2460
	tcttctactc aggcaagtga tgttattact aatcaaagaa gtattgcgac aacggttaat	2520
	ttgcgtgatg gacagactct ttactcgggt ggccctactg attataaaaa cacttctcag	2580
	gattctggcg taccgttcct gtctaaaatc cctttaatcg gcctcctgtt tagctcccgc	2640
	tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgtca aagcaacat agtacgcgcc	2700
	ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgtacact	2760
	tgccagcgcc ctagcgcccg ctcccttcgc ttctttccct tcctttctcg ccacgttcgc	2820
	cggctttccc cgtaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt	2880
	acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtagtgtt tcacgtagtg ggccatcgcc	2940
	ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt	3000
	gttccaaact ggaacaacac tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat	3060
	tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa	3120
	ttttaacaaa atattaacgt ttacaattta aatatttgct tatacaatct tcctgttttt	3180
	ggggcttttc tgattatcaa ccggggtaca tatgattgac atgctagttt tacgattacc	3240
[0003]	gttcacgat tctcttggtt gctccagact ctccaggcaat gacctgatag cctttgtaga	3300
	gacctctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac ggttgaatat	3360
	cataatgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc ttacctaca	3420
	cattactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaattttta tccttgcggt	3480
	gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg tacaaccgat	3540
	ttagctttat gctctgagge ttatttgctt aattttgcta attctttgcc ttgcctgtat	3600
	gatttattgg atgttggaat tcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcggtat	3660
	ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca	3720
	gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc	3780
	cgttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc	3840
	atcaccgaaa cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt	3900
	catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac	3960
	ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgtcatga gacaataacc	4020
	ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt	4080
	cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctcacc cagaaacgct	4140
	ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga	4200
	tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag	4260

	cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca	4320
	actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga	4380
	aaagcatctt acgatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgccca taaccatgag	4440
	tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc	4500
	ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa	4560
	tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt	4620
	gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg	4680
	gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt	4740
	tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg	4800
	gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat	4860
	ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact	4920
	gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa	4980
	aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	5040
	ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	5100
	ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg	5160
	tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	5220
[0004]	gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	5280
	agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga	5340
	taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc	5400
	gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact	5460
	gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga	5520
	caggtatccg gtaagcggca gggctggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg	5580
	aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt	5640
	tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt	5700
	acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttctgcgt tatccctga	5760
	ttctgtgat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac	5820
	gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac gcaaaccgcc	5880
	tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg	5910
	<210> 2	
	<211> 296	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1)..(8)	
	<223>	FSE-I切割位点	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(9)..(136)	
	<223>	miR-30骨架	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(139)..(160)	
	<223>	miR-29c靶(正义)链	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(161)..(175)	
	<223>	miR-29c靶(正义)链	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(176)..(199)	
	<223>	miR-30茎环	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(200)..(288)	
	<223>	miR-29c引导(反义)链	
	<220>		
[0005]	<221>	misc特征	
	<222>	(289)..(296)	
	<223>	miR-30骨架	
	<400>	2	
	ggccggcctg	tttgaatgag gcttcagtac ttacagaat cgttgcctgc acatcttgga	60
	aacacttgct	gggattactt cttcaggta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg	120
	ctgttgacag	tgagcgcaac cgatttcaaa tgggtgctaga gtgaagccac agatgtctag	180
	caccatttga	aatcggttat gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa	240
	ttatcttggt	tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacattgg ccggcc	296
	<210>	3	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	3	
	accgatttca	aatggtgcta ga	22
	<210>	4	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	

	<400> 4 tctagcacca tttgaaatcg gtta	24
	<210> 5 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 5 gtgaagccac agatg	15
	<210> 6 <211> 98 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<220> <221> misc特征 <222> (1)..(19) <223> miR-30骨架	
[0006]	<220> <221> misc特征 <222> (20)..(42) <223> miR-29c靶(正义)链	
	<220> <221> misc特征 <222> (43)..(57) <223> miR-30茎环	
	<220> <221> misc特征 <222> (58)..(81) <223> miR-29c引导(反义)链	
	<220> <221> misc特征 <222> (82)..(98) <223> miR-30骨架	
	<400> 6 ugcuguugac agugagcgca accgauuuga aauggugcua gagugaagcc acagaugucu	60
	agcaccauuu gaaaucgguu augccuacug ccucggaa	98
	<210> 7 <211> 3581 <212> DNA <213> 智人	
	<220> <221> CDS <222> (1)..(3579)	

[0007]	<400> 7	
	atg ctg tgg tgg gag gag gtg gag gat tgt tat gaa agg gag gac gtg	48
	Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val	
	1 5 10 15	
	cag aag aag act ttt acc aag tgg gtg aac gct cag ttc agc aaa ttt	96
	Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe	
	20 25 30	
	ggg aag cag cac atc gag aat ctg ttt tcc gac ctg cag gat ggg aga	144
	Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg	
	35 40 45	
	cgg ctg ctg gat ctg ctg gaa gga ctg act ggc cag aag ctg ccc aaa	192
	Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys	
	50 55 60	
	gag aag ggg agc act agg gtg cac gcc ctg aac aac gtg aac aaa gct	240
	Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala	
	65 70 75 80	
	ctg aga gtg ctg cag aac aac aac gtg gat ctg gtg aat att ggc agt	288
	Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser	
	85 90 95	
	act gat atc gtg gac ggg aac cac aaa ctg aca ctg ggc ctg atc tgg	336
	Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp	
	100 105 110	
	aac att att ctg cac tgg cag gtg aaa aat gtg atg aag aac atc atg	384
	Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met	
	115 120 125	
	gcc ggg ctg cag cag acc aat tcc gag aag atc ctg ctg tct tgg gtg	432
	Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val	
	130 135 140	
	cgg cag agc acc cgc aac tat ccc cag gtg aac gtg att aac ttc act	480
	Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr	
	145 150 155 160	
	aca tcc tgg agc gac ggg ctg gcc ctg aat gct ctg att cac agc cac	528
	Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His	
	165 170 175	
	agg cct gat ctg ttc gac tgg aat agc gtg gtg tgc cag cag tct gcc	576
	Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala	
	180 185 190	
	aca cag cgc ctg gaa cat gcc ttc aat atc gct cgg tac cag ctg ggg	624
	Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly	
	195 200 205	
	atc gaa aaa ctg ctg gac cca gag gat gtg gac act aca tac cca gat	672
	Ile Glu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp	
	210 215 220	
	aaa aag tct att ctg atg tac att act agc ctg ttc cag gtg ctg cca	720
	Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	
	225 230 235 240	
	cag cag gtg tct att gaa gcc att cag gag gtg gaa atg ctg ccc cgc	768
	Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg	
	245 250 255	

	ccc ccc aaa gtg act aaa gag gag cat ttt cag ctg cat cat cag atg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met 260 265 270	816
	cat tac agc cag cag att acc gtg agc ctg gct cag gga tat gag cgc His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg 275 280 285	864
	acc agt agt cca aaa cca cgg ttc aag tcc tac gct tat acc cag gct Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln Ala 290 295 300	912
	gcc tac gtg aca act agc gac cct act aga tcc ccc ttt cca tcc cag Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Phe Pro Ser Gln 305 310 315 320	960
	cac ctg gag gcc cca gag gac aag agc ttt ggg tcc agc ctg atg gaa His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Ser Ser Leu Met Glu 325 330 335	1008
	agc gag gtg aat ctg gat cgg tac cag aca gcc ctg gag gag gtg ctg Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu 340 345 350	1056
	agc tgg ctg ctg agt gct gaa gac aca ctg cag gcc cag ggc gaa att Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile 355 360 365	1104
	tcc aat gac gtg gaa gtg gtg aag gat cag ttc cac aca cac gag ggc Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly 370 375 380	1152
[0008]	tat atg atg gac ctg aca gct cac cag ggg cgc gtg ggc aat atc ctg Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu 385 390 395 400	1200
	cag ctg ggc tct aaa ctg atc ggc acc ggg aaa ctg agt gag gac gag Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu 405 410 415	1248
	gaa aca gaa gtg cag gag cag atg aac ctg ctg aac agc cgc tgg gag Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu 420 425 430	1296
	tgt ctg aga gtg gct agt atg gag aag cag tcc aac ctg cac cgg gtg Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val 435 440 445	1344
	ctg atg gac ctg cag aac cag aaa ctg aaa gag ctg aac gac tgg ctg Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu 450 455 460	1392
	aca aag act gag gaa cgc aca agg aag atg gag gag gag cca ctg gga Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly 465 470 475 480	1440
	ccc gac ctg gag gat ctg aag aga cag gtg cag cag cat aag gtg ctg Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu 485 490 495	1488
	cag gag gat ctg gaa cag gag cag gtg cgg gtg aac tcc ctg aca cat Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His 500 505 510	1536
	atg gtg gtg gtg gtg gac gaa tct agt gga gat cac gcc acc gcc gcc Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala 1584	

	515	520	525	
	ctg gag gaa cag ctg aag gtg ctg ggg gac cgg tgg gcc aac att tgc Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys 530	535	540	1632
	cgg tgg acc gag gac agg tgg gtg ctg ctg cag gac atc ctg ctg aaa Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys 545	550	555	1680
	tgg cag agg ctg acc gag gag cag tgt ctg ttt agt gct tgg ctg agc Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser 565	570	575	1728
	gag aaa gag gac gcc gtg aac aag atc cac aca acc ggc ttt aag gat Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp 580	585	590	1776
	cag aac gaa atg ctg tct agc ctg cag aaa ctg gct gtg ctg aag gcc Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Ala Val Leu Lys Ala 595	600	605	1824
	gat ctg gag aaa aag aag cag agc atg ggc aaa ctg tat agc ctg aaa Asp Leu Glu Lys Lys Lys Lys Gln Ser Met Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Lys 610	615	620	1872
	cag gac ctg ctg agc acc ctg aag aac aag agc gtg acc cag aag aca Gln Asp Leu Leu Ser Thr Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln Lys Thr 625	630	635	1920
	gaa gcc tgg ctg gat aac ttt gcc cgc tgc tgg gac aac ctg gtg cag Glu Ala Trp Leu Asp Asn Phe Ala Arg Cys Trp Asp Asn Leu Val Gln 645	650	655	1968
[0009]	aaa ctg gag aaa agt aca gct cag atc tct cag gct gtg acc aca acc Lys Leu Glu Lys Ser Thr Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr Thr Thr 660	665	670	2016
	cag cct agc ctg acc cag aca acc gtg atg gaa acc gtg acc acc gtg Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr Thr Val 675	680	685	2064
	aca acc cgc gaa cag atc ctg gtg aaa cat gcc cag gaa gag ctg cca Thr Thr Arg Glu Gln Ile Leu Val Lys His Ala Gln Glu Glu Leu Pro 690	695	700	2112
	cct cca cct ccc cag aag aag aga acc ctg gag cgg ctg cag gag ctg Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu 705	710	715	2160
	cag gaa gcc act gac gaa ctg gac ctg aag ctg agg cag gcc gaa gtg Gln Glu Ala Thr Asp Glu Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val 725	730	735	2208
	att aag ggg tct tgg cag cct gtg ggc gat ctg ctg att gat tcc ctg Ile Lys Gly Ser Trp Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu 740	745	750	2256
	cag gac cac ctg gaa aag gtg aag gct ctg aga ggc gaa att gct cca Gln Asp His Leu Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro 755	760	765	2304
	ctg aag gag aac gtg agt cat gtg aac gat ctg gct aga cag ctg aca Leu Lys Glu Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr 770	775	780	2352

	aca ctg ggc atc cag ctg agc cca tac aat ctg agc aca ctg gag gac Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp 785 790 795 800	2400
	ctg aat acc agg tgg aag ctg ctg cag gtg gct gtg gaa gac cgg gtg Leu Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val 805 810 815	2448
	cgg cag ctg cat gag gcc cat cgc gac ttc gga cca gcc agc cag cac Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His 820 825 830	2496
	ttt ctg agc aca tcc gtg cag ggg ccc tgg gag agg gcc att tct ccc Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro 835 840 845	2544
	aac aag gtg ccc tac tat att aat cac gag acc cag acc act tgt tgg Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp 850 855 860	2592
	gac cat ccc aag atg aca gaa ctg tac cag tcc ctg gcc gat ctg aac Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn 865 870 875 880	2640
	aac gtg agg ttt agc gct tac aga acc gct atg aag ctg aga cgg ctg Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu 885 890 895	2688
	cag aag gcc ctg tgc ctg gat ctg ctg tcc ctg tcc gcc gcc tgc gat Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp 900 905 910	2736
[0010]	gcc ctg gat cag cat aat ctg aag cag aac gat cag cca atg gat atc Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile 915 920 925	2784
	ctg cag atc atc aac tgc ctg acc act atc tac gac agg ctg gag cag Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln 930 935 940	2832
	gag cac aac aac ctg gtg aac gtg cct ctg tgc gtg gat atg tgc ctg Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu 945 950 955 960	2880
	aac tgg ctg ctg aac gtg tat gac act ggg cgc acc gcc cgg atc aga Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg 965 970 975	2928
	gtg ctg agt ttt aaa act ggg att atc tcc ctg tgt aag gcc cac ctg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu 980 985 990	2976
	gag gac aag tac agg tac ctg ttc aag cag gtg gct agt agc act gga Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly 995 1000 1005	3024
	ttt tgt gac cag cgc cgc ctg gga ctg ctg ctg cat gat agt atc Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile 1010 1015 1020	3069
	cag att cct aga cag ctg gga gag gtg gct agt ttc gga gga tct Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser 1025 1030 1035	3114
	aac atc gaa ccc agc gtg cgc agc tgt ttc cag ttt gcc aat aac Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn 3159	3159

	1040	1045	1050	
	aaa cct gaa atc gag gct gct Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala 1055	ctg ttc ctg gat tgg Leu Phe Leu Asp Trp 1060	atg cgc ctg Met Arg Leu 1065	3204
	gaa cca cag agc atg gtg tgg Glu Pro Gln Ser Met Val Trp 1070	ctg cct gtg ctg cac Leu Pro Val Leu His 1075	aga gtg gct Arg Val Ala 1080	3249
	gcc gcc gaa act gcc aag cac Ala Ala Glu Thr Ala Lys His 1085	cag gct aaa tgc aac Gln Ala Lys Cys Asn 1090	atc tgc aag Ile Cys Lys 1095	3294
	gaa tgt ccc att atc ggc ttt Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe 1100	cgc tac agg agt ctg Arg Tyr Arg Ser Leu 1105	aaa cat ttt Lys His Phe 1110	3339
	aac tac gat att tgc cag agc Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser 1115	tgc ttc ttt tcc gga Cys Phe Phe Ser Gly 1120	aga gtg gcc Arg Val Ala 1125	3384
	aaa gga cac aag atg cac tac Lys Gly His Lys Met His Tyr 1130	cct atg gtg gaa tat Pro Met Val Glu Tyr 1135	tgc acc cca Cys Thr Pro 1140	3429
	act aca tct ggc gaa gat gtg Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val 1145	cgc gat ttt gcc aag Arg Asp Phe Ala Lys 1150	gtg ctg aag Val Leu Lys 1155	3474
[0011]	aat aag ttt cgg act aag agg Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg 1160	tac ttc gcc aag cac Tyr Phe Ala Lys His 1165	ccc cgc atg Pro Arg Met 1170	3519
	ggg tat ctg cca gtg cag aca Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr 1175	gtg ctg gaa gga gac Val Leu Glu Gly Asp 1180	aat atg gag Asn Met Glu 1185	3564
	acc gat aca atg tga gc Thr Asp Thr Met 1190			3581
	<210> 8 <211> 1192 <212> PRT <213> 智人 <400> 8			
	Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val 1 5 10 15			
	Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe 20 25 30			
	Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg 35 40 45			
	Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys 50 55 60			

Glu	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	His	Ala	Leu	Asn	Asn	Val	Asn	Lys	Ala	65	70	75	80	
Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Asn	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Asn	Ile	Gly	Ser	85	90	95		
Thr	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	His	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Trp	100	105	110		
Asn	Ile	Ile	Leu	His	Trp	Gln	Val	Lys	Asn	Val	Met	Lys	Asn	Ile	Met	115	120	125		
Ala	Gly	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	130	135	140		
Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Asn	Tyr	Pro	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Thr	145	150	155	160	
Thr	Ser	Trp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Leu	Ile	His	Ser	His	165	170	175		
Arg	Pro	Asp	Leu	Phe	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	180	185	190		
[0012]	Thr	Gln	Arg	Leu	Glu	His	Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gln	Leu	Gly	195	200	205	
	Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro	Asp	210	215	220	
	Lys	Lys	Ser	Ile	Leu	Met	Tyr	Ile	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Leu	Pro	225	230	235	240
	Gln	Gln	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Arg	245	250	255	
	Pro	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	His	His	Gln	Met	260	265	270	
	His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Gly	Tyr	Glu	Arg	275	280	285	
	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Arg	Phe	Lys	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala	290	295	300	
	Ala	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Pro	Phe	Pro	Ser	Gln	305	310	315	320
	His	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Ser	Leu	Met	Glu	325	330	335	

Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu
340 345 350

Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile
355 360 365

Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly
370 375 380

Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu
385 390 395 400

Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu
405 410 415

Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu
420 425 430

Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
435 440 445

Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
450 455 460

[0013]

Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
465 470 475 480

Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
485 490 495

Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
500 505 510

Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala
515 520 525

Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys
530 535 540

Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys
545 550 555 560

Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser
565 570 575

Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp
580 585 590

	Gln	Asn	Glu	Met	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	
			595					600					605				
	Asp	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gln	Ser	Met	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Leu	Lys	
	610						615					620					
	Gln	Asp	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Val	Thr	Gln	Lys	Thr	
	625					630					635					640	
	Glu	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Phe	Ala	Arg	Cys	Trp	Asp	Asn	Leu	Val	Gln	
				645						650					655		
	Lys	Leu	Glu	Lys	Ser	Thr	Ala	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	Thr	Thr	Thr	
				660					665					670			
	Gln	Pro	Ser	Leu	Thr	Gln	Thr	Thr	Val	Met	Glu	Thr	Val	Thr	Thr	Val	
			675					680					685				
	Thr	Thr	Arg	Glu	Gln	Ile	Leu	Val	Lys	His	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Pro	
	690						695					700					
	Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys	Arg	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Leu	
	705					710					715					720	
[0014]	Gln	Glu	Ala	Thr	Asp	Glu	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	
					725					730					735		
	Ile	Lys	Gly	Ser	Trp	Gln	Pro	Val	Gly	Asp	Leu	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	
				740					745					750			
	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Arg	Gly	Glu	Ile	Ala	Pro	
			755					760					765				
	Leu	Lys	Glu	Asn	Val	Ser	His	Val	Asn	Asp	Leu	Ala	Arg	Gln	Leu	Thr	
		770					775					780					
	Thr	Leu	Gly	Ile	Gln	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	
	785					790					795					800	
	Leu	Asn	Thr	Arg	Trp	Lys	Leu	Leu	Gln	Val	Ala	Val	Glu	Asp	Arg	Val	
				805						810					815		
	Arg	Gln	Leu	His	Glu	Ala	His	Arg	Asp	Phe	Gly	Pro	Ala	Ser	Gln	His	
				820					825						830		
	Phe	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Pro	Trp	Glu	Arg	Ala	Ile	Ser	Pro	
		835						840					845				
	Asn	Lys	Val	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Glu	Thr	Gln	Thr	Thr	Cys	Trp	
	850						855					860					

Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn
865 870 875 880

Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu
885 890 895

Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp
900 905 910

Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile
915 920 925

Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln
930 935 940

Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu
945 950 955 960

Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg
965 970 975

Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu
980 985 990

[0015]

Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly
995 1000 1005

Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile
1010 1015 1020

Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser
1025 1030 1035

Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn
1040 1045 1050

Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu
1055 1060 1065

Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala
1070 1075 1080

Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys
1085 1090 1095

Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe
1100 1105 1110

Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala
1115 1120 1125

Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro
1130 1135 1140

Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys
1145 1150 1155

Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met
1160 1165 1170

Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu
1175 1180 1185

Thr Asp Thr Met
1190

<210> 9
<211> 8409
<212> DNA
<213> 腺相关病毒

[0016] <220>
<221> 启动子
<222> (236)..(799)
<223> MCK启动子

<220>
<221> 内含子
<222> (844)..(993)
<223> 嵌合内含子序列

<220>
<221> misc特征
<222> (1004)..(4584)
<223> 人类肌营养不良蛋白序列

<220>
<221> misc特征
<222> (4585)..(4640)
<223> Poly A尾

<220>
<221> misc特征
<222> (6606)..(7466)
<223> 氨苄青霉素抗性

<220>
<221> misc特征
<222> (7621)..(8240)
<223> 具有pBR322起点或复制的pGEX质粒骨架

<400> 9
gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60

ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tggggcgacc ttggtcgcc 120

eggcctcagt gagegagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180

	cctttagtatt aatgattaac cgcctatgct aattatctac gtagccatgt ctagacagcc	240
	actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacacccg agatgcctgg	300
	ttataattaa cccagacatg tggtctctcc cccccccaa cacctgctgc ctgagcctca	360
	ccccacccc gggtgcctggg tcttaggctc tgtacacat ggaggagaag ctgctctaa	420
	aaataaccct gtccctggtg ggctgtgggg gactgagggc aggtctaac aggtctgggg	480
	gccagggtt atactgcct gggactccca aagtattact gtccatgtt cccggcgaag	540
	ggccagctgt ccccgccag ctagactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca	600
	gcccttgggg cagcccatc aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg	660
	gtgggcacgg tccccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctccctg	720
	gggacagccc ctcttggtc gtacacacct gtaggtcct ctatataacc caggggcaca	780
	ggggtgccc cgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca	840
	gccaggtaag tttagtctt ttgtcttta ttccaggtcc cggatccgtt ggtggtgcaa	900
	atcaaagaac tgctctcag tggatgttg ctttactct aggcctgtac ggaagtgtta	960
	cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgcggccgcc accatgctgt ggtgggagga	1020
	ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacca agtgggtgaa	1080
	cgctcagttc agcaaatgt ggaagcagca catcgagaat ctgtttccg acctgcagga	1140
[0017]	tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactggc cagaagctgc ccaaagagaa	1200
	ggggagcact aggtgacag cctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tgctgcagaa	1260
	caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatac gtggacggga accacaaact	1320
	gacactgggc ctgatctgga acattattct gcactggcag gtgaaaaatg tgatgaagaa	1380
	catcatggcc gggctgcagc agaccaattc cgagaagatc ctgctgtctt ggggtcggca	1440
	gagcaccgc aactatccc aggtgaacgt gattaactc actacatcct ggagcgacgg	1500
	gctggccctg aatgctctga ttacagcca caggcctgat ctgttcgact ggaatagct	1560
	ggtgtgccag cagtctgcca cacagcgcct ggaacatgcc ttcaatatcg ctgggtacca	1620
	gctggggatc gaaaaactgc tggaccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa	1680
	gtctattctg atgtacatta ctacgtgtt ccaggtgctg ccacagcagg tgtctattga	1740
	agccattcag gaggtgaaa tgctccccg cccccccaa gtgactaaag aggagcattt	1800
	tcagctgcat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgagcctgg ctgaggata	1860
	tgagcgacc agtagtcaa aaccacggtt caagtcctac gcttataccc aggtgccta	1920
	cgtgacaact agcagacct ctagatcccc ctttccatcc cagcacctgg agggccaga	1980
	ggacaagagc ttgggtcca gcctgatgga aagcgagggt aatctggatc ggtaccagac	2040
	agccctggag gaggtgctga gctggctgct gactgctgaa gacacactgc agggccagg	2100
	cgaaatttcc aatgacgtgg aagtgtgaa ggatcagttc cacacacacg agggctatat	2160

	gatggacctg acagctcacc agggggcgct gggcaatata ctgcagctgg gctctaaact	2220
	gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaacagaa gtgcaggagc agatgaacct	2280
	gctgaacagc cgctgggagt gtctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca	2340
	ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa	2400
	gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggacccgacc tggaggatct	2460
	gaagagacag gtgcagcagc ataagggtgct gcaggaggat ctggaacagg agcagggtgcg	2520
	ggtgaactcc ctgacacata tgggtgggtg ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac	2580
	cggccctctg gaggaacagc tgaagggtgct gggggaccgg tgggccaaca ttgtccggtg	2640
	gaccgaggac aggtgggtgc tgctgcagga catcctgctg aaatggcaga ggctgaccga	2700
	ggagcagtgt ctgttttagt cttggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca	2760
	cacaaccggc tttaaggatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtgct	2820
	gaaggccgat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaaacagga	2880
	cctgctgagc accctgaaga acaagagcgt gaccagaag acagaagcct ggctggataa	2940
	ctttgccgc tgctgggaca acctgggtgca gaaactggag aaaagtacag ctgagatctc	3000
	tcaggctgtg accacaacc agcctagcct gaccagaca accgtgatgg aaaccgtgac	3060
	caccgtgaca acccgcaac agatcctggt gaaacatgcc caggaagagc tgccacctcc	3120
[0018]	acctccccag aagaagagaa ccctggagcg gctgcaggag ctgcaggaag ccactgacga	3180
	actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtgggcga	3240
	tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaagggt aaggctctga gaggcgaat	3300
	tgctccactg aaggagaacg tgagtcattg gaacgatctg gctagacagc tgacaacact	3360
	gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cactctggag gacctgaata ccaggtgga	3420
	gctgctgcag gtggctgtgg aagaccgggt gcggcagctg catgaggccc atcgcgactt	3480
	cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat	3540
	ttctcccaac aaggtgccct actatattaa tcacgagacc cagaccatt gttgggacca	3600
	tccaagatg acagaactgt accagtcctt ggccgatctg aacaacgtga ggtttagcgc	3660
	ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcctgg atctgctgtc	3720
	cctgtccgcc gcctgcgatg ccctggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat	3780
	ggatatactg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggctgg agcaggagca	3840
	caacaacctg gtgaacgtgc ctctgtgcgt ggatatgtgc ctgaactggc tgctgaacgt	3900
	gtatgacact gggcgcaccg gccggatcag agtgctgagt tttaaaactg ggattatctc	3960
	cctgtgtaag gccacctgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggctagtag	4020
	cactggattt tgtgaccagc gccgcctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc	4080
	tagacagctg ggagagggtg ctagtttcgg aggatctaac atcgaacca gcgtgcgcag	4140

	ctgtttccag ttigccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattggat	4200
	gcgcctggaa ccacagagca tgggtgtggct gcctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga	4260
	aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tgtcccatta tcggctttcg	4320
	ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tatttgccag agctgcttct tttccggaag	4380
	agtggccaaa ggacacaaga tgcactaccc tatggtggaa tattgcaccc caactacatc	4440
	tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaaggt gctgaagaat aagtttcgga ctaagaggta	4500
	cttcgccaag ccccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtgtgga aaggagacaa	4560
	tatggagacc gatacaatgt gagcgccgc aataaaagat ctttatcttc attagatctg	4620
	tgtgttggtt ttttgtgtgt ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcggttaa	4680
	tcattaacta caaggaaccc ctagtgtagg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt	4740
	cgctcactga ggccgggcga ccaaaggctc ccgcacgccc gggctttgcc cgggcgccct	4800
	cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct	4860
	tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaagtcc agacgattga gcgtcaaaat	4920
	gtaggtatct ccatgagcgt ttttcctgtt gcaatggctg gcgtaatat tgttctggat	4980
	attaccagca aggcgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat	5040
	caaagaagta ttgcgacaac ggtaatttg cgtgatggac agactctttt actcggtggc	5100
[0019]	ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttcctgtc taaaatccct	5160
	ttaatcgcc tcctgttttag ctcccgtct gattctaacg aggaaagcac gttatacgtg	5220
	ctcgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt	5280
	ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc ctttcgctt	5340
	cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct	5400
	cccttaggg ttccgattta gtgatttac gcacctgac ccaaaaaaac ttgattaggg	5460
	tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga	5520
	gtccacgttc tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc	5580
	ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttc gcctattggt taaaaaatga	5640
	gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaaat	5700
	atttgcttat acaatcttcc tgtttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtagatat	5760
	gattgacatg ctagttttac gattaccgtt catcgattct cttgtttgct ccagactctc	5820
	aggcaatgac ctgatagcct ttgtagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccgcatg	5880
	aatttatcag ctagaacggt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt	5940
	tctacccgt ttgaatcttt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag	6000
	ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaa agtattacag	6060
	ggtcataatg tttttgttac aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat	6120

	tttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat ttattggatg ttggaagttc ctgatgcggt	6180
	atthttctcct tacgcatctg tgcggtatth cacaccgcat atggtgcact ctgagtacaa	6240
	tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc	6300
	cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga	6360
	gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg	6420
	tgatagcctt atthtttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg	6480
	gcactthtcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatthgttt atthttctaa atacattcaa	6540
	atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga	6600
	agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg ccttatttcc cthttttgcg gcattthgcc	6660
	ttcctgttht tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg	6720
	gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagthttc	6780
	gccccgaaga acgtthttcca atgatgagca cthtttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat	6840
	tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggctgccg catacactat tctcagaatg	6900
	acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag	6960
	aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa	7020
	cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt thttgcacaa catgggggat catgtaactc	7080
[0020]	gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca	7140
	cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gaaactatt aactggcgaa ctacttactc	7200
	tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc	7260
	tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg	7320
	ggtctcgcg tgatcttgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta	7380
	tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag	7440
	gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactthaga	7500
	ttgattthaa acttcattht taattthaaa ggatctaggt gaagatcctt thtgataatc	7560
	tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagthtt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa	7620
	agatcaaagg atcttcttga gatctthttt thctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacaa	7680
	aaaaaccacc gctaccagcg gtggtthgtt tgccggatca agagctacca actctthttc	7740
	cgaaggtaac tggtctcagc agagcgcaga taccaaatac tgctcttcta gtgtagccgt	7800
	agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgct ctgctaatcc	7860
	tgthaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	7920
	gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	7980
	gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg	8040
	ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag	8100

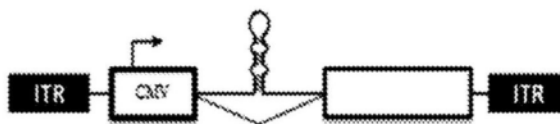
	gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	8160
	ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatitt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	8220
	ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac gggtcctggc cttttgctgg cttttgctc	8280
	acatgttctt tcctgcgtta tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gggtttgagt	8340
	gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaccaag	8400
	cggaagagc	8409
	<210> 10	
	<211> 206	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 增强子	
	<222> (1)..(206)	
	<223> MCK增强子	
	<400> 10	
	cagccactat gggctctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg	60
[0021]	cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc cccaacacct gctgcctgag	120
	cctcaccccc accccgggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc	180
	tctaaaaata accctgtccc tgggtgg	206
	<210> 11	
	<211> 358	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 启动子	
	<222> (1)..(358)	
	<223> MCK启动子	
	<400> 11	
	gctgtggggg actgagggca ggctgtaaca ggcttggggg ccagggtta tacgtgcctg	60
	ggactcccaa agtattactg ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc	120
	tagactcagc acttagttta ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca	180
	aggccatggg gctgggcaag ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa	240
	cgagctgaaa gctcatctgc tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag	300
	tcacaccctg taggtcctc tatataacc aggggcacag gggctgcccc cgggtcac	358

	<210>	12	
	<211>	5920	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<223>	pAAV.MCK.mir26C序列	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(4)..(9)	
	<223>	n是a、c、g、t或u	
	<220>		
	<221>	增强子	
	<222>	(190)..(395)	
	<223>	MCK增强子	
	<220>		
	<221>	启动子	
	<222>	(396)..(753)	
	<223>	MCK启动子	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1316)..(1608)	
	<223>	具有原始种子序列的shRNA-mir29-c	
[0022]	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(1487)..(1512)	
	<223>	miR-29c	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(2094)..(2146)	
	<223>	SV40 PolyA	
	<220>		
	<221>	misc特征	
	<222>	(2326)..(2331)	
	<223>	n是a、c、g、t或u	
	<400>	12	
	ctgnnnnnng	cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgctcgggc	60
	gacctttggt	cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcg agagaggag tggccaactc	120
	catcactagg	ggttccttgt agttaatgat taaccgccca tgctaattat ctacgtagcc	180
	atgtctagac	agccactatg ggtctaggct gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca	240
	cccgagatgc	ctggttataa ttaaccaga catgtggctg ctccccccc ccaacacctg	300
	ctgcctgagc	ctcaccccca ccccggtgcc tgggtcttag gctctgtaca ccatggagga	360
	gaagctcgct	ctaaaaataa ccctgtccct ggtgggctgt gggggactga gggcaggctg	420
	taacaggctt	gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca	480
	tggtcccggc	gaagggccag ctgtccccgc ccagctagac tcagcactta gtttaggaac	540
	cagtgagcaa	gtcagccctt ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca	600

	cgccctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca	660
	ggggccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat	720
	aaccagggg cacaggggct gccccgggt caccaccacc tccacagcac agacagacac	780
	tcaggagcca gccagccagg taagtttagt ctttttgtct tttatttcag gtcccggatc	840
	cgggtggtgt gcaaatcaaa gaactgtctc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct	900
	gtacggaagt gttacttctg ctctaaaagc tgcggaattg taccgccta gaggatccgg	960
	tactcgagga actgaaaaac cagaaagtta actggtaagt ttagtctttt tgtcttttat	1020
	ttcaggtecc ggatccggtg gtggtgcaaa tcaagaact gtcctcagt ggatgttgcc	1080
	tttacttcta ggccgtgacg gaagtgttac ttctgctcta aaagctgcgg aattgtaccc	1140
	ggggccgatc caccgtctt tttcgcaacg ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgccg	1200
	tgtgtggttc ccgcgggcgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgacatg ttcggcgagg	1260
	cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct	1320
	gtttgaatga ggcttcagta ctttacagaa tcgttgccctg cacatcttgg aaacacttgc	1380
	tgggattact tcttcaggtt aacccaacag aaggtctgag aaggtatatt gctgttgaca	1440
	gtgagcgcaa ccgatttcaa atggtgctag agtgaagcca cagatgtcta gcaccatttg	1500
	aaatcggtta tgcctactgc ctcggaattc aaggggctac tttaggagca attatcttgt	1560
[0023]	ttactaaaac tgaatacctt gctatctctt tgatacattg gccggcctgc tctggtgcct	1620
	ggcctcgcgc cgccgtgtat cggcccgccc tggcgggcaa ggctggcccg gtcggcacca	1680
	gttgctgag cggaagatg gccgcttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg	1740
	acgcgcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg	1800
	tcctcagccg tcgcttcctg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctgat	1860
	tagttctcga gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatcgatg	1920
	gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa	1980
	ttctccttgg aatttgcctt tttttagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca	2040
	gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa aagctagtgc ggccgcaata	2100
	aaagatcttt attttcatta gatctgtgtg ttggtttttt gtgtgtctag acatggctac	2160
	gtagataatt agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg aaccctagt gatggagtgt	2220
	gccactccct ctctgcgcgc tcgtcgtctc actgaggccg ggcgaccaa ggctgcccga	2280
	cgccggggtt ttgcccgggc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcnnnnn ncagctggcg	2340
	taatagcgaa gaggccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga	2400
	atggaagtgc cagacgattg agcgtcaaaa ttaggttatt tccatgagcg tttttcctgt	2460
	tgcaatggct ggcggtaata ttgttctgga tattaccagc aaggccgata gttttagttc	2520
	ttctactcag gcaagtgatg ttattactaa tcaagaagt attgcgacaa cggttaattt	2580

	gcgtgatgga cagactcttt tactcggtagg cctcactgat tataaaaaca cttctcagga	2640
	ttctggcgta ccgttctgt ctaaaatccc tttaatcggc ctctgttta gctcccgtc	2700
	tgattctaac gaggaagca cgttatacgt gctcgtcaaa gcaaccatag tacgcgcct	2760
	gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg	2820
	ccagcgcct agcgcgcct ctttctgctt tcttcccttc ctttctgcc acgttcgccg	2880
	gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgatttac	2940
	ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct	3000
	gatagacggt ttttcgcct ttgacgttg agtcacgtt ctttaatagt ggactcttgt	3060
	tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggtctattc tttgattha taagggattt	3120
	tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt	3180
	ttaacaaaat attaacgtt acaatttaaa tatttgetta tacaatcttc ctgtttttgg	3240
	ggcttttctg attatcaacc ggggtacata tgattgacat gctagtthta cgattaccgt	3300
	tcacgattc tcttgtttgc tccagactct caggcaatga cctgatagcc tttgtagaga	3360
	cctctcaaaa atagctaccc tctccggcat gaatttatca gctagaacgg ttgaatatca	3420
	tattgatggt gatttgactg tctccggcct ttctacccg tttgaatctt tacctacaca	3480
	ttactcaggc attgcattta aaatatatga gggttctaaa aatttttctc cttgcgttga	3540
[0024]	aataaaggct tctcccga aagtattaca gggtcataat gtttttggtta caaccgattt	3600
	agctttatgc tctgaggctt tattgcttaa ttttgctaat tctttgcctt gcctgtatga	3660
	tttattggat gttggaagt cctgatgcgg tatthtctcc ttacgcatct gtgcggtatt	3720
	tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gtttaagccag	3780
	ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc	3840
	gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt ttcaccgtca	3900
	tcaccgaaac gcgcgagacg aaaggcctc gtgatacgcc tatttttata ggtaaatgtc	3960
	atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc	4020
	cctatttggt tatttttcta aatacatcca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc	4080
	tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc	4140
	gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc ctctctgttt ttgtcaccc agaaacgtg	4200
	gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat	4260
	ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggcccgaag aacgttttcc aatgatgagc	4320
	acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtta ttatcccgtta ttgacgcgg gcaagagcaa	4380
	ctcggctgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa	4440
	aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctagagt	4500
	gataaacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgt	4560

	tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat	4620
	gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg	4680
	cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg	4740
	atggaggcgg ataaagtigc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt	4800
	attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg	4860
	ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg	4920
	gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg	4980
	tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa	5040
	aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt	5100
	tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt	5160
	tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccage ggtggtttgt	5220
[0025]	ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag	5280
	ataccaaata ctgtccttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta	5340
	gcaccgcgta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat	5400
	aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg	5460
	ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacctt caccgaactg	5520
	agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac	5580
	aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga	5640
	aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tticgccacc tctgacttga gcgtcgattt	5700
	ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta	5760
	cggttcctgg ctttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat	5820
	tctgtggata accgtattac cgggtttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg	5880
	accgagcgca gcgagtcagt gagcgaccaa gcggaagagc	5920



miR-29c引导(反义)链(TCTAGCACCATTGAAATCGGTTA; SEQ ID NO: 4)

G UUGA A C ----- A

---U CUG CAGUG GCG AACCGAUUUCAAUGGUGCUAG GUG A

| | | ||||| | | ||||||||| ||| ||| ||| >

---A GGC GUCAU CGU UUGGCCAAAGUUUACCACGAUCU CAC G

A UCC C A ----- GUAGA C

a	-	ggc	ucc	---	u
ucucuuaca	ca	ugaccgaauuc	ugguguu	cagag	c
					u
gggggaugu	gu	auuggcnaaag	accacga	guuuu	g
a	a	---	uuu	ucu	u

```

      a          uc          -----      a
ggg  cuguaaaccaucc  gacuggaagcu      gug  a
|||  |||||          |||||          |||
cgu  gacgubuguaag  cugscuuucgg      cac  g

      c          --          guaaa      c

```

-----UG UUGA A C || ||-----A
 CUG CAGUG GCG CGGCCUGAAGUCUCUGAUUAAUA GUG A
 GGC GUCAU CGU CGGGACUUCAGAGACUAUUUU CAG G
 -----A UCC C U \ || GUAGA C
 Drosha Dicer

55

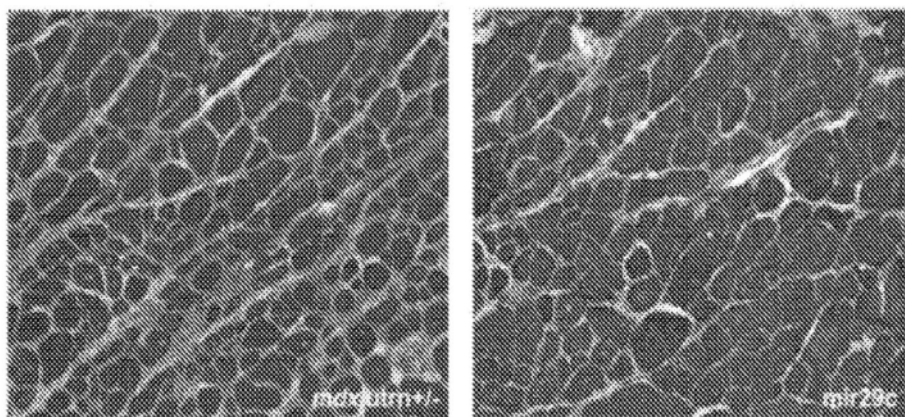


图2A

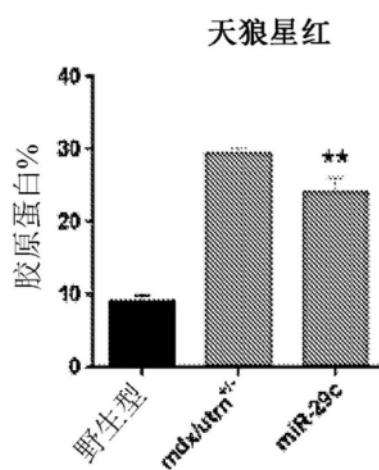


图2B

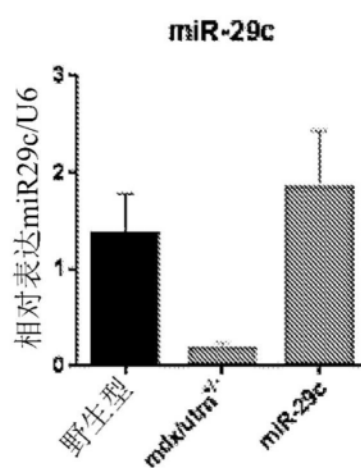


图2C

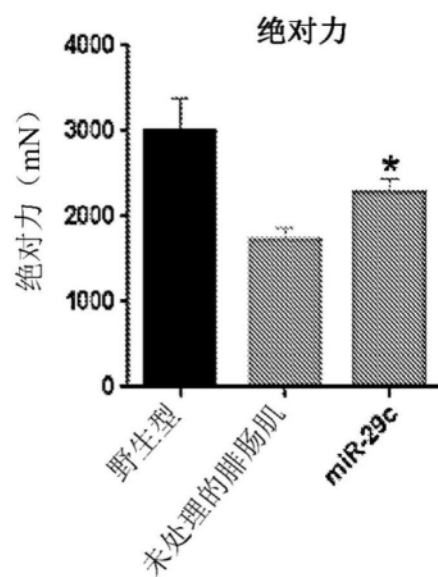


图3A

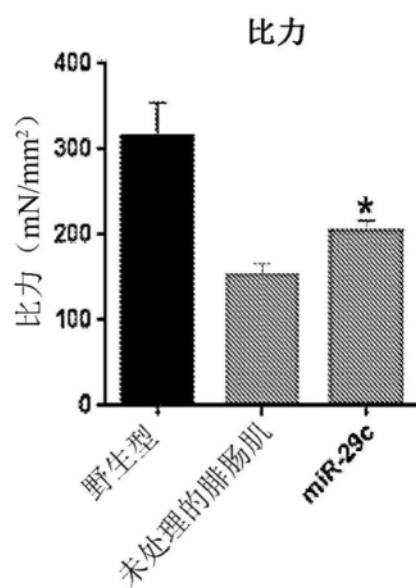


图3B

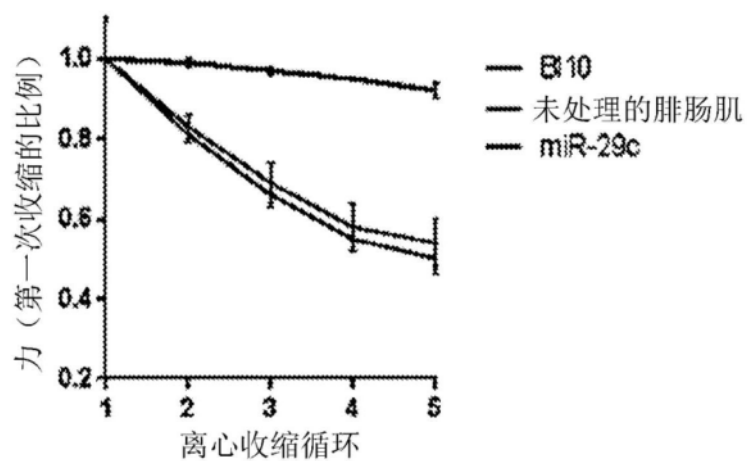
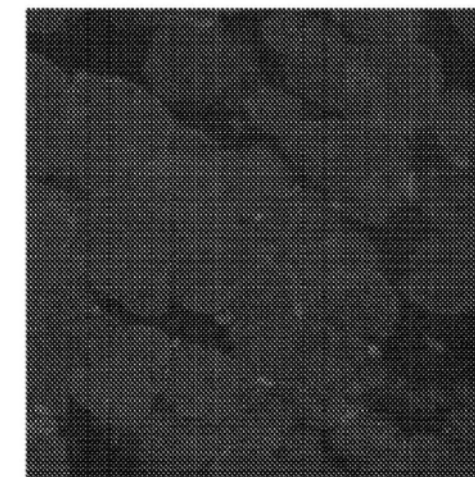


图3C



C

图4A

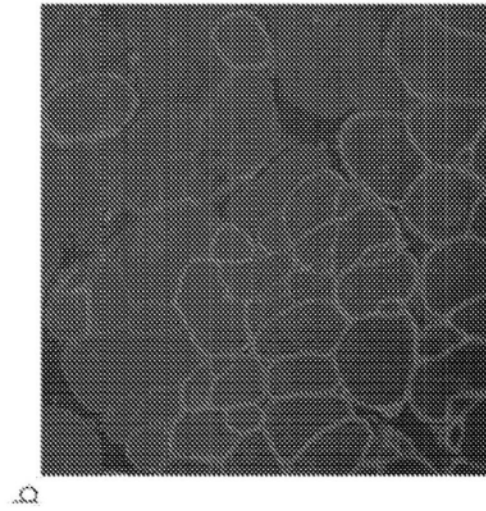


图4B

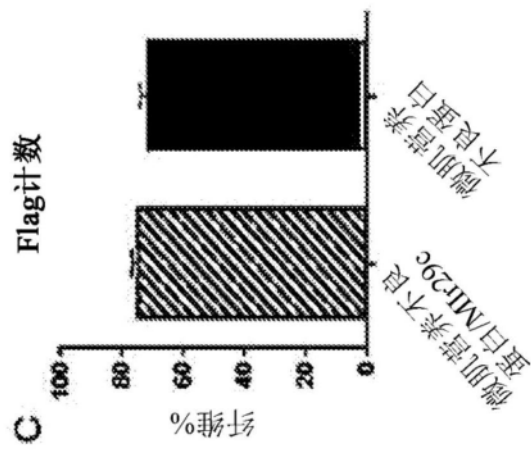


图4C

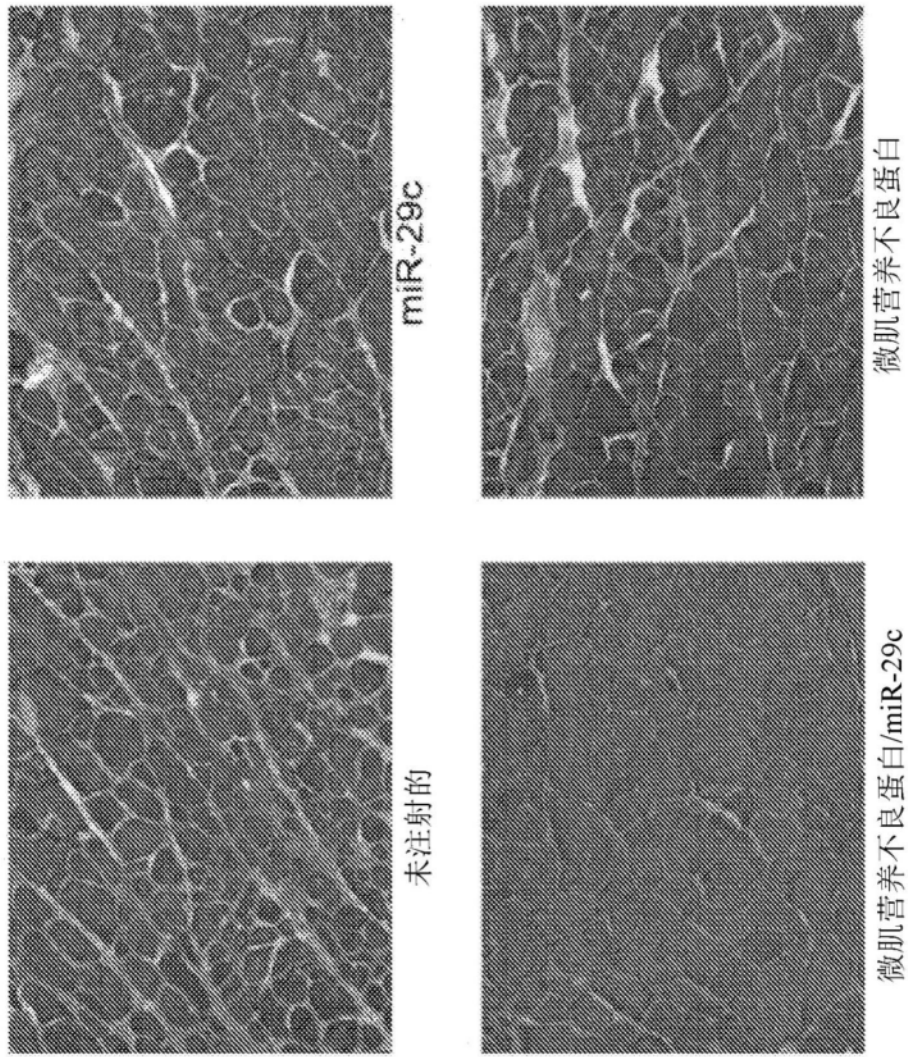


图5A

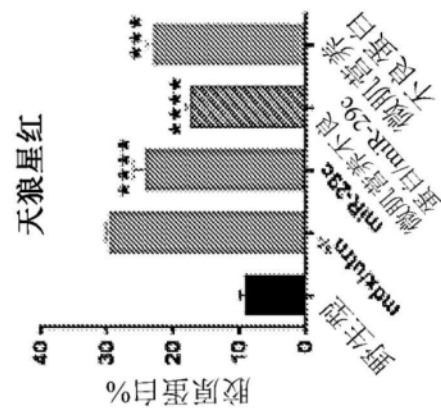


图5B

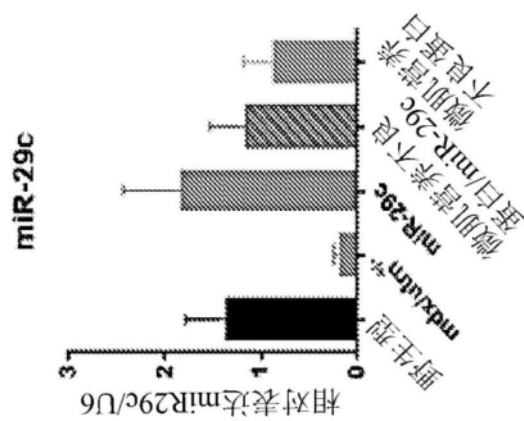


图5C

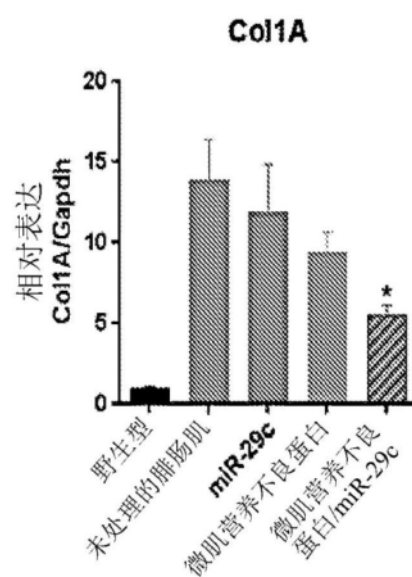


图6A

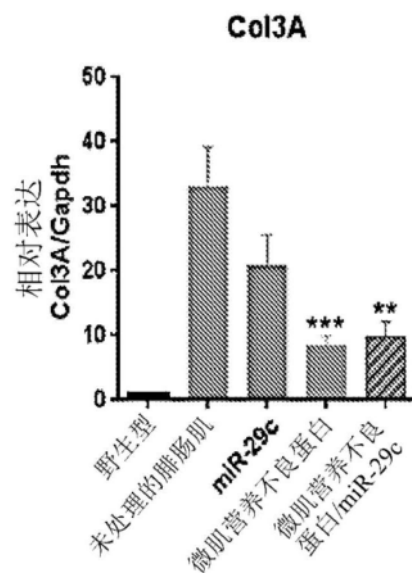


图6B

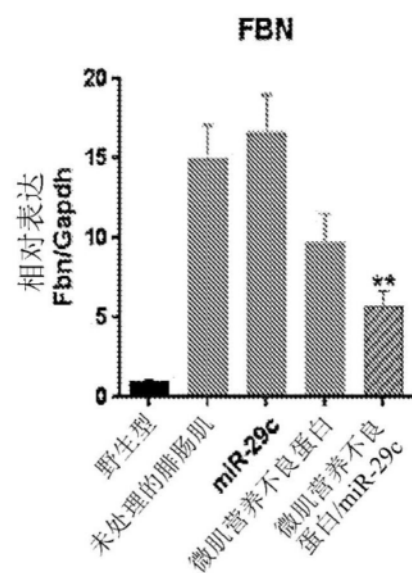


图6C

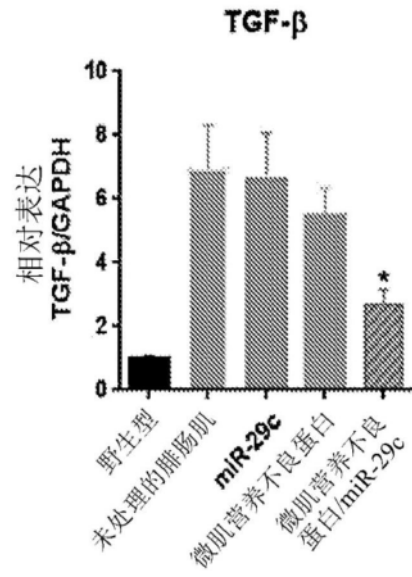


图6D

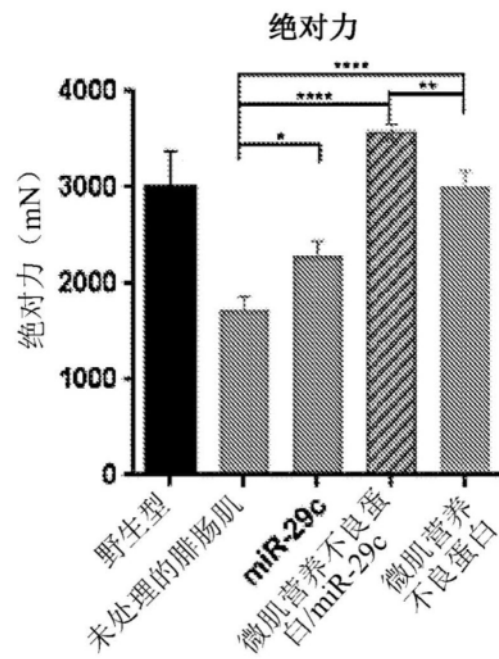


图7A

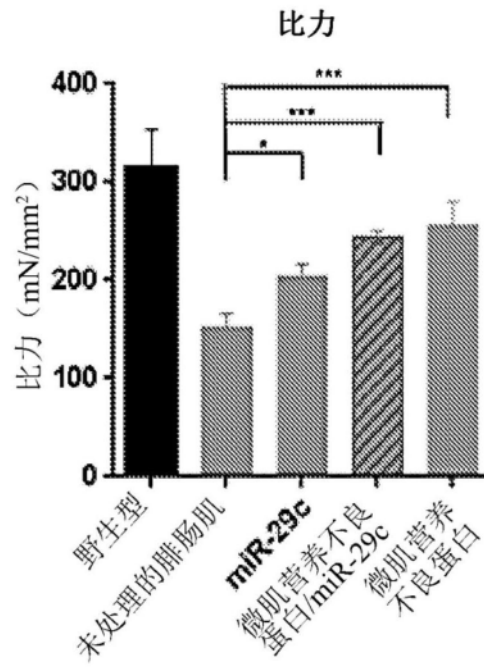


图7B

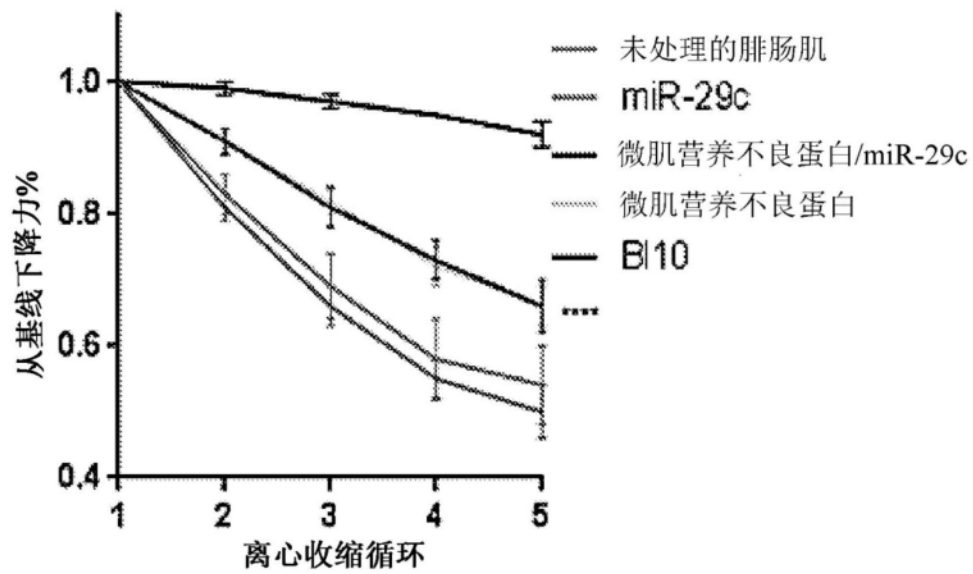


图7C



图8

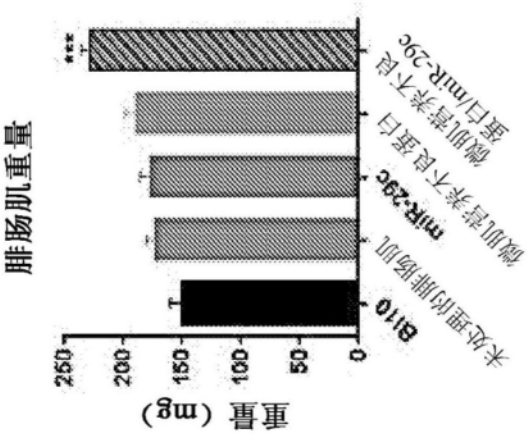


图9A

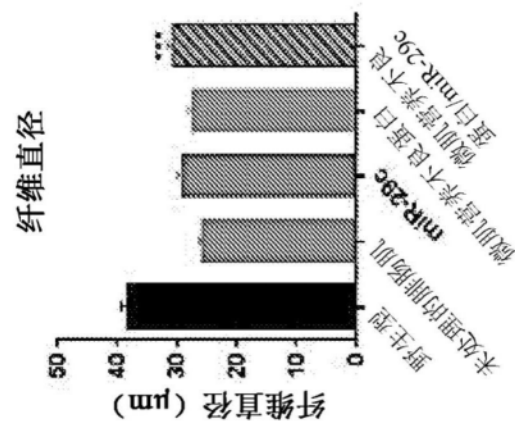


图9B

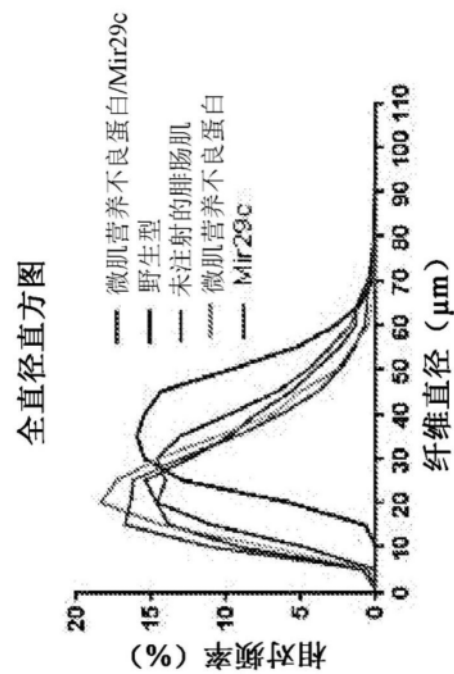


图9C

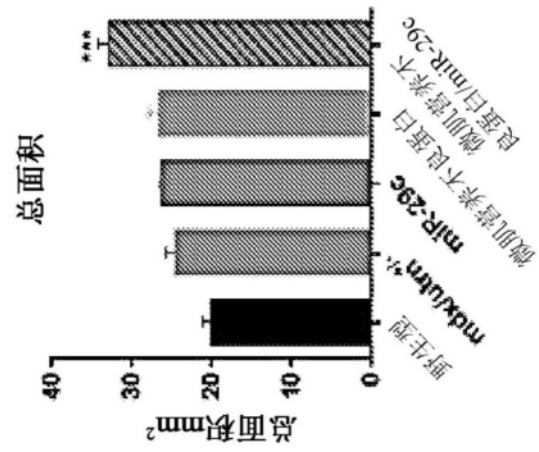


图9D

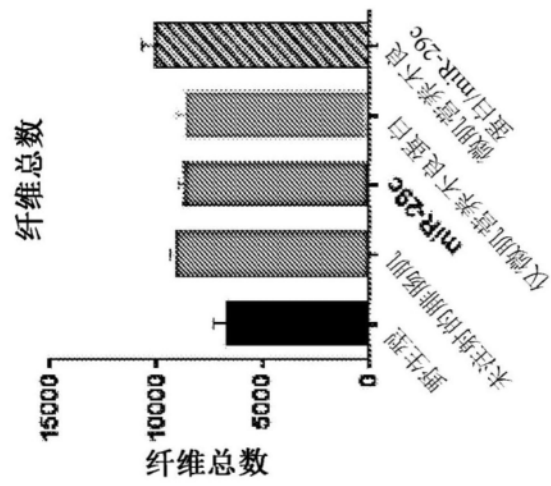


图9E

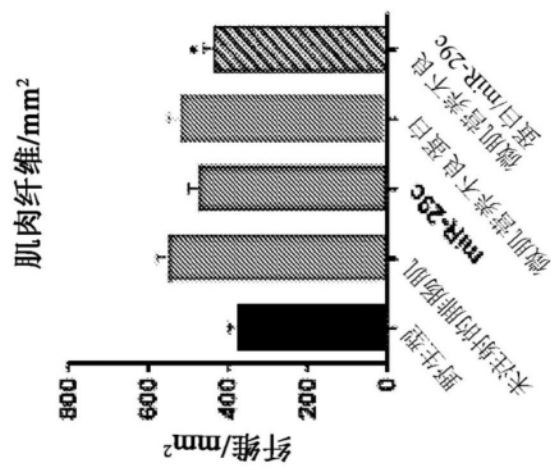


图9F

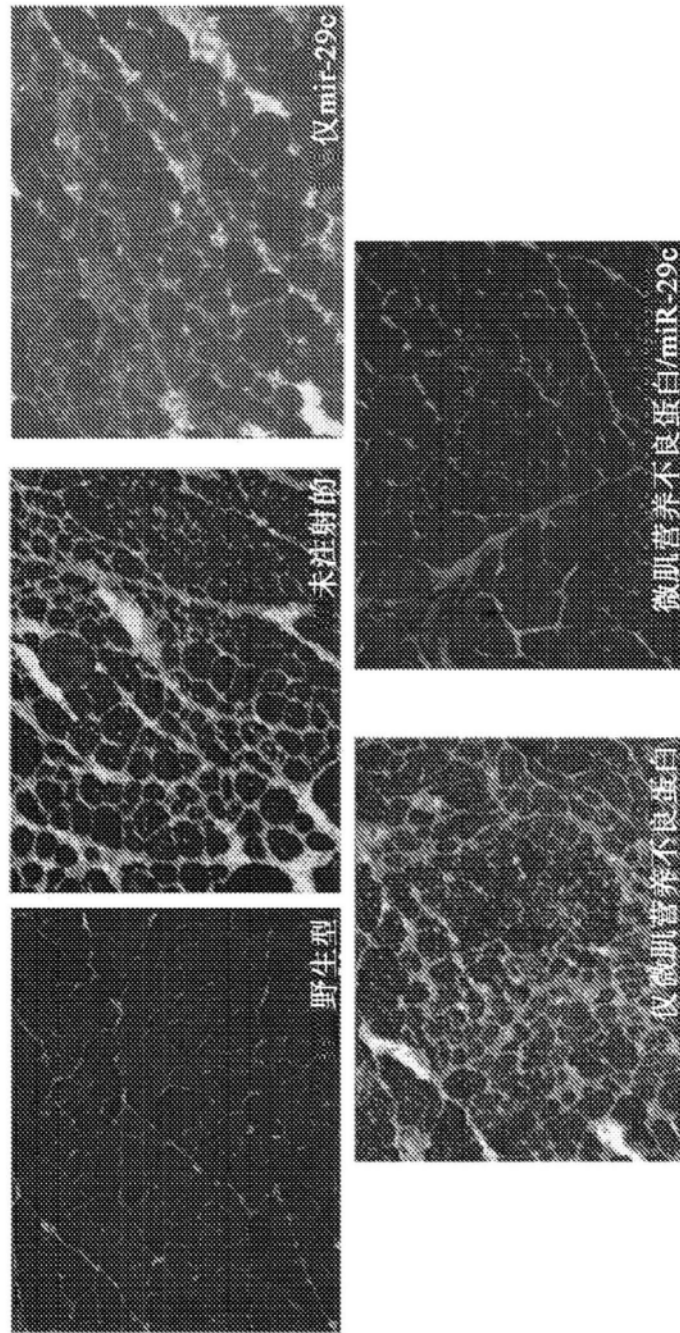


图10A

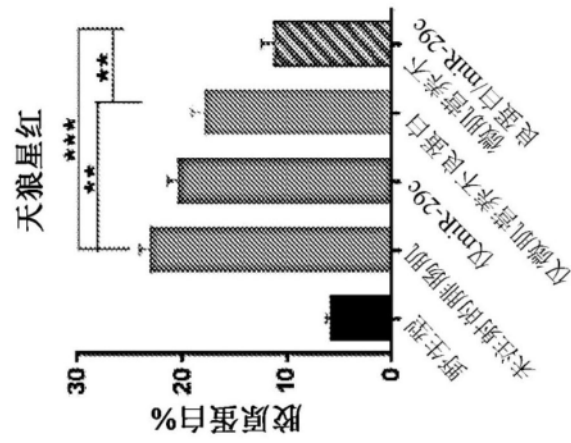


图10B

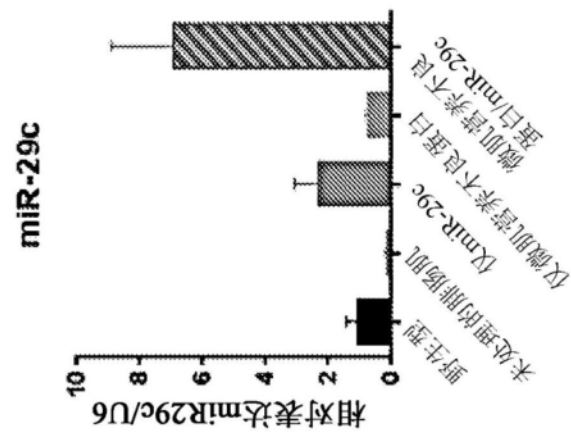


图10C

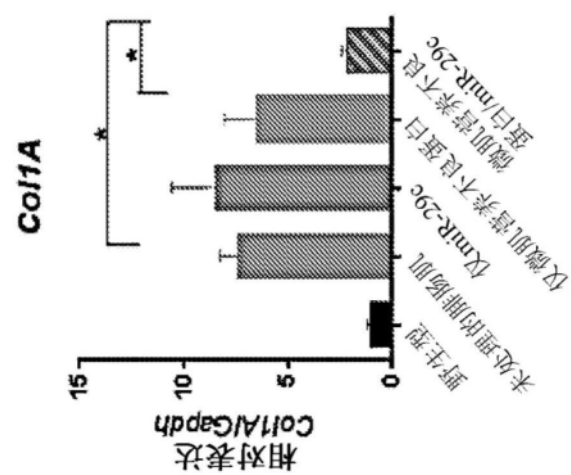


图10D

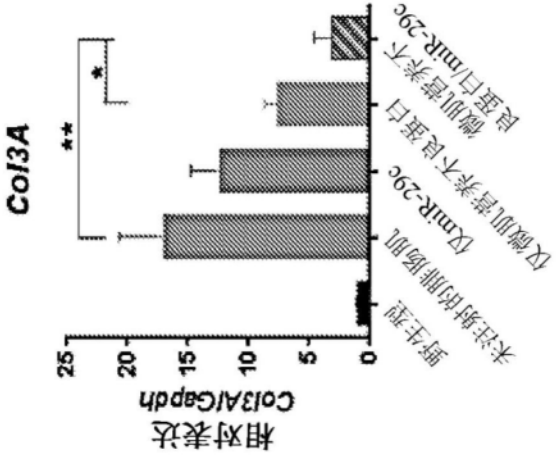


图10E

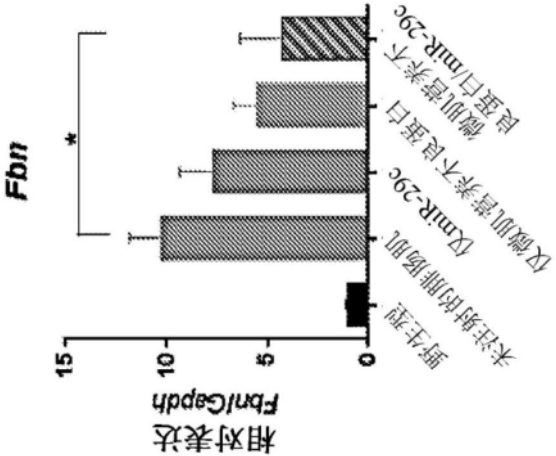


图10F

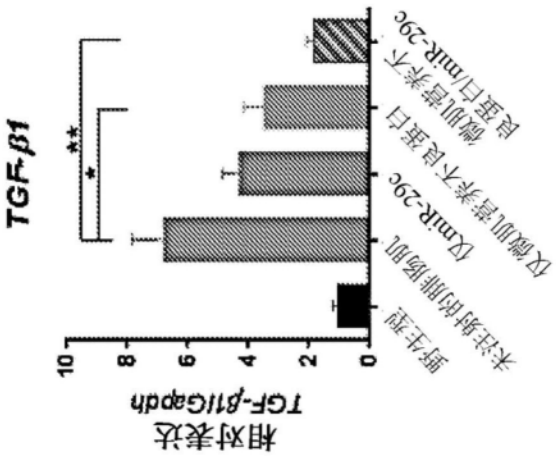


图10G

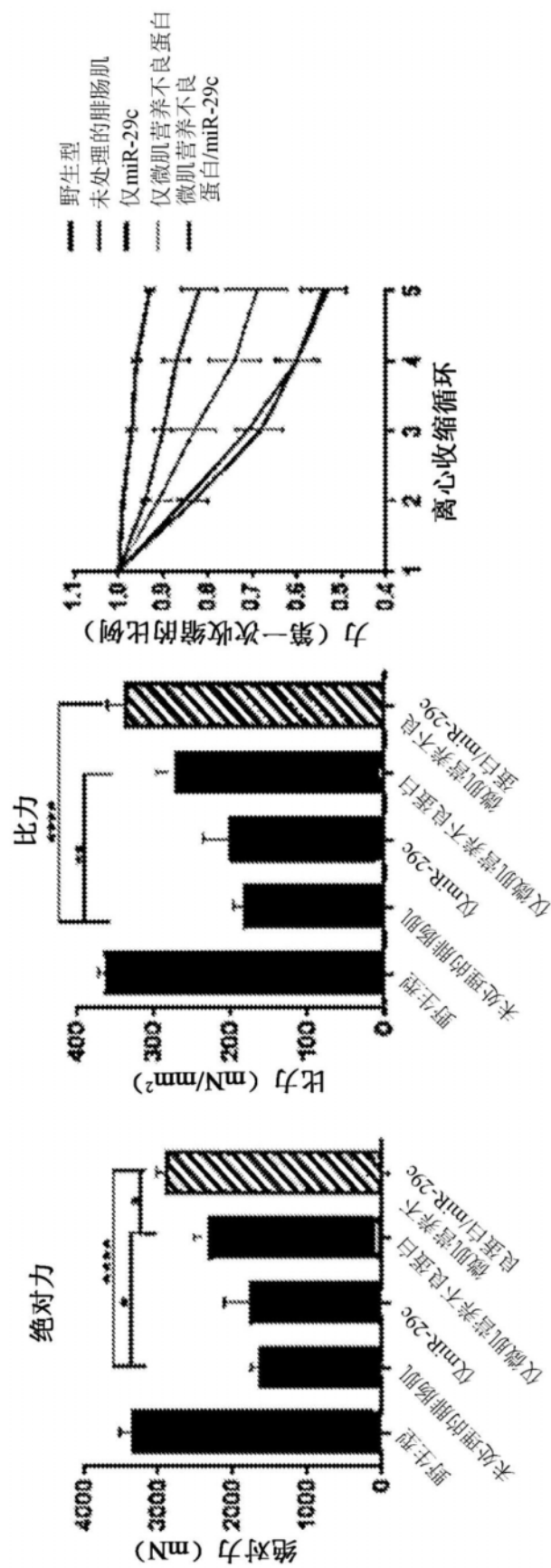


图11

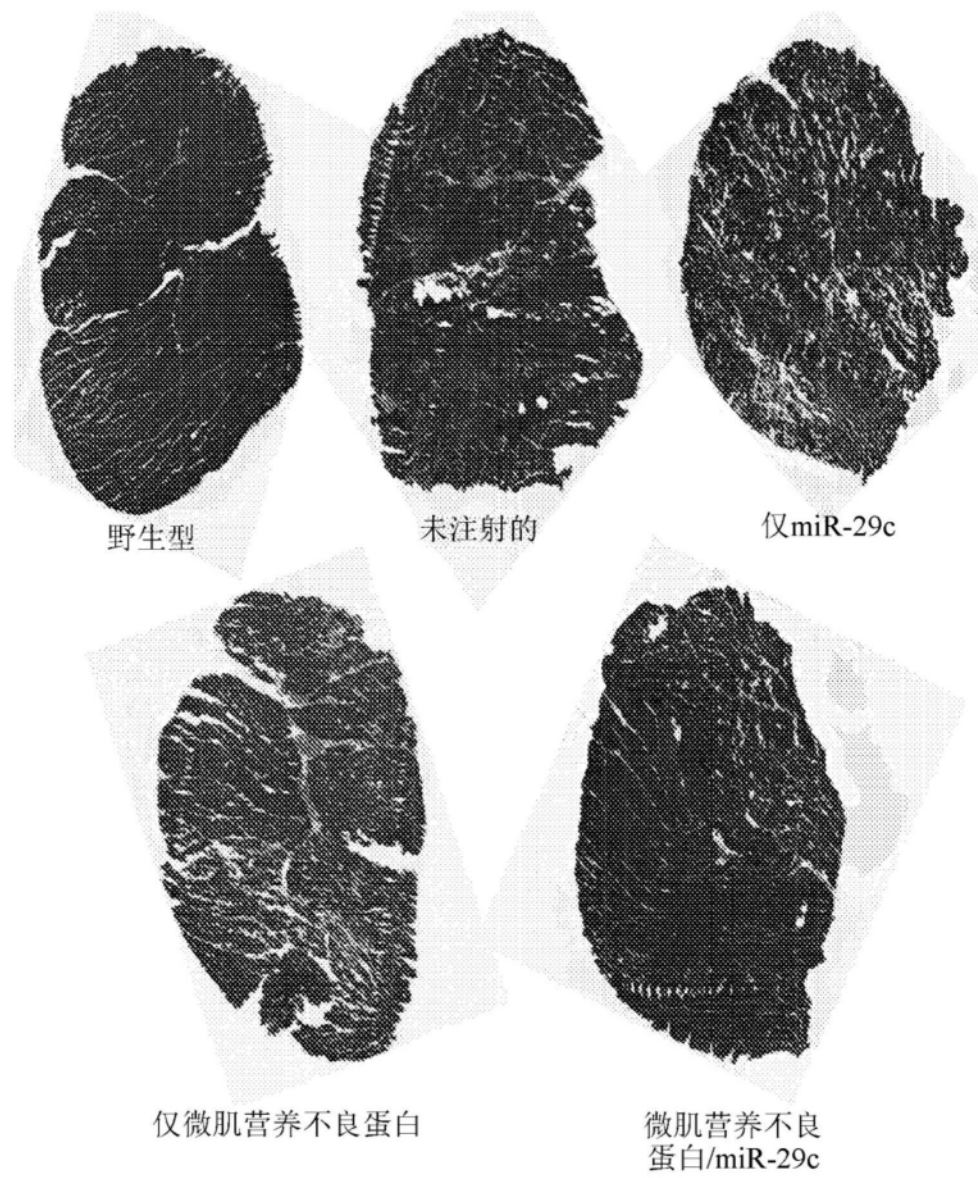


图12

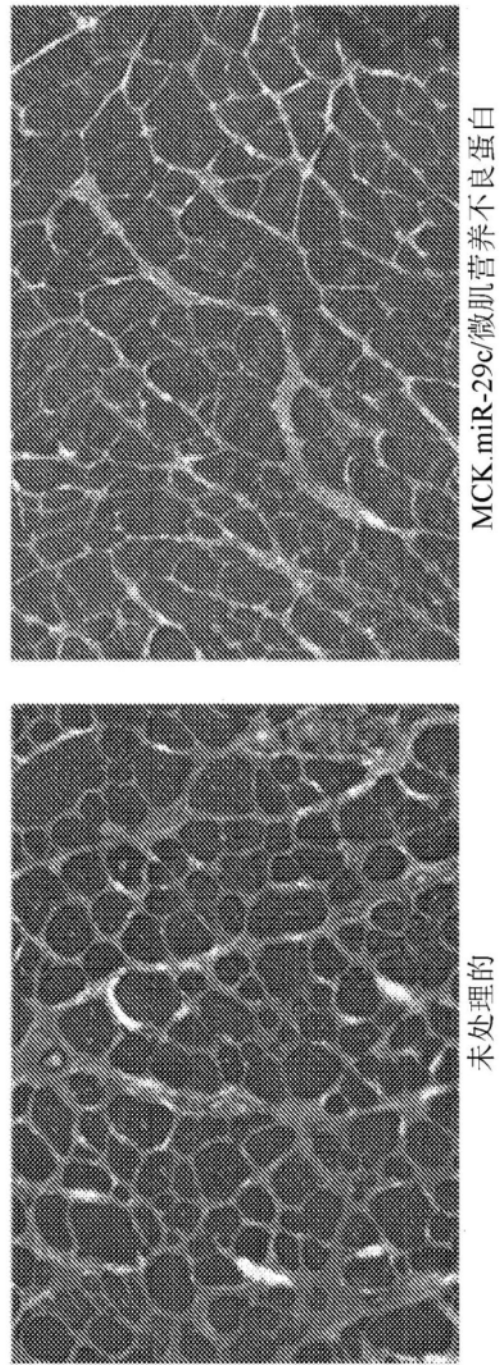


图13A

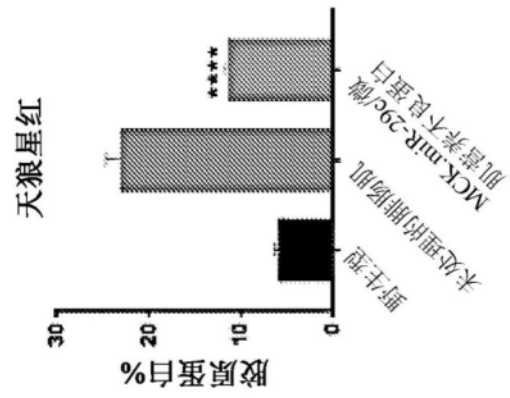


图13B

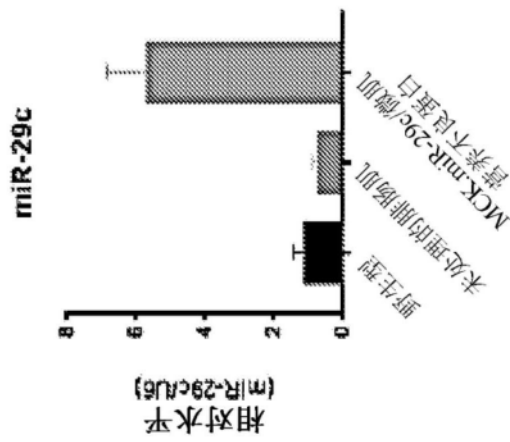


图13C

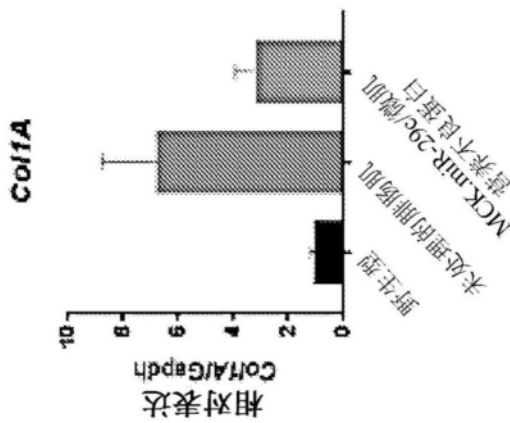


图13D

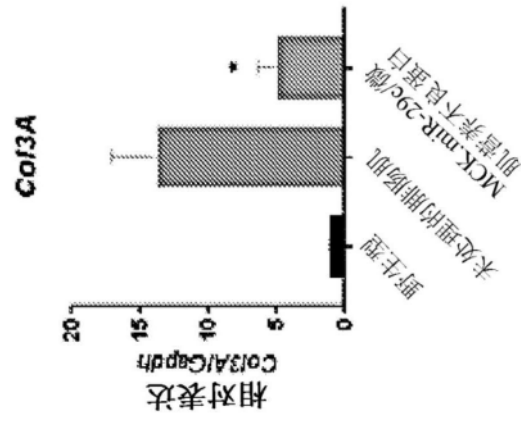


图13E

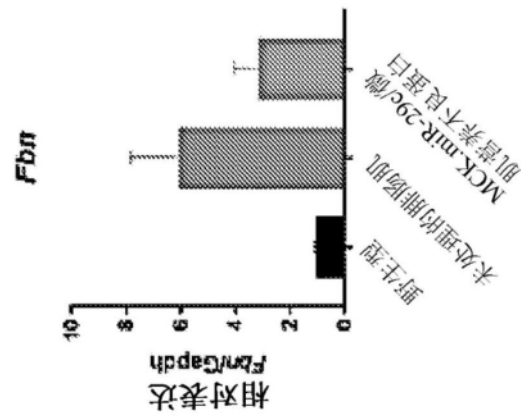


图13F

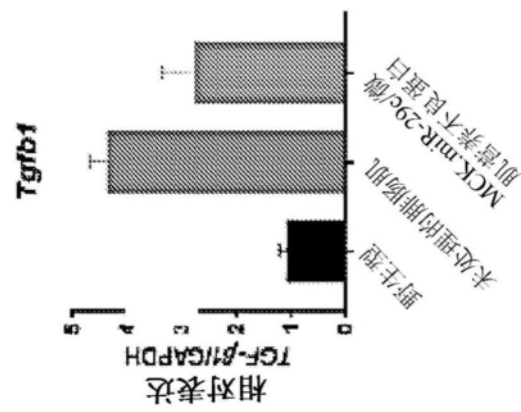


图13G

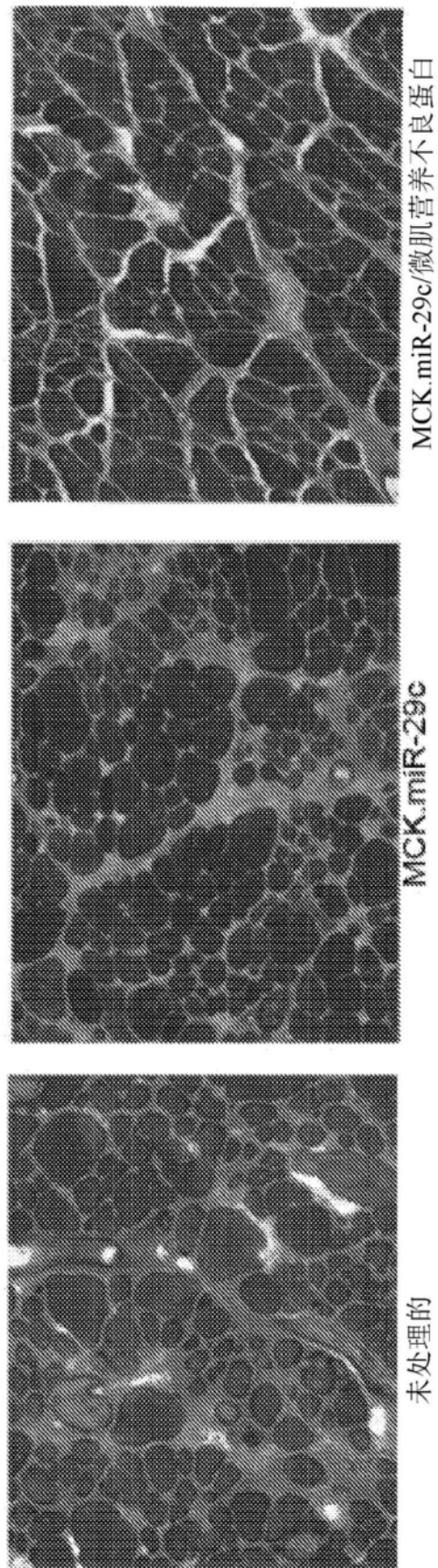


图14A

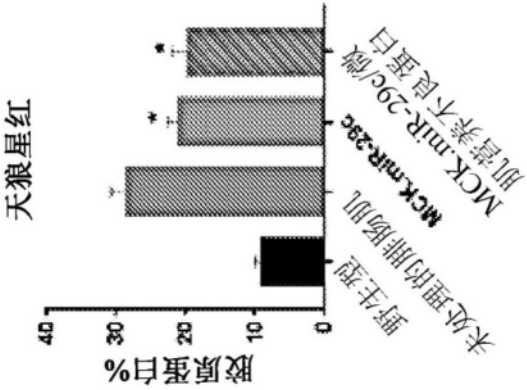


图14B

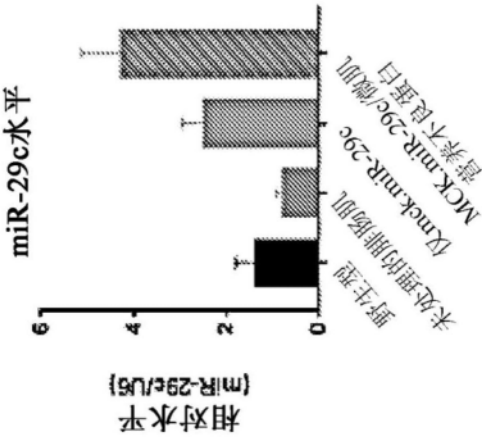


图14C

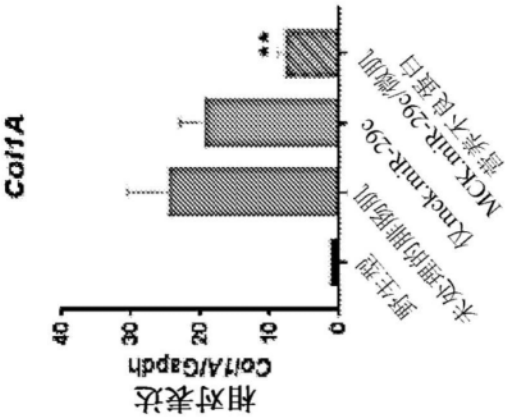


图14D

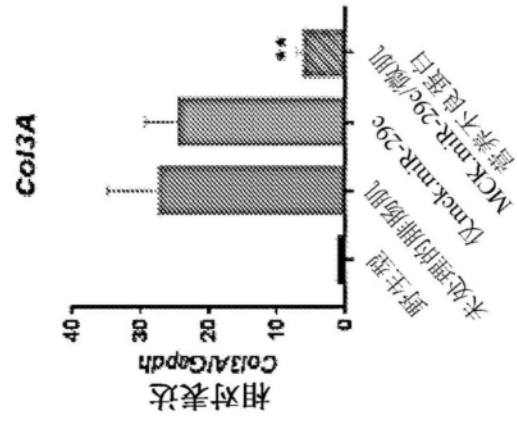


图14E

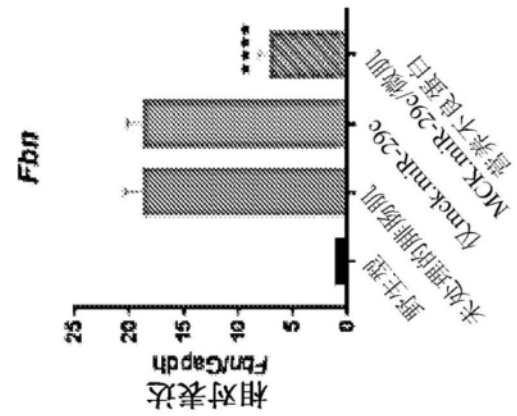


图14F

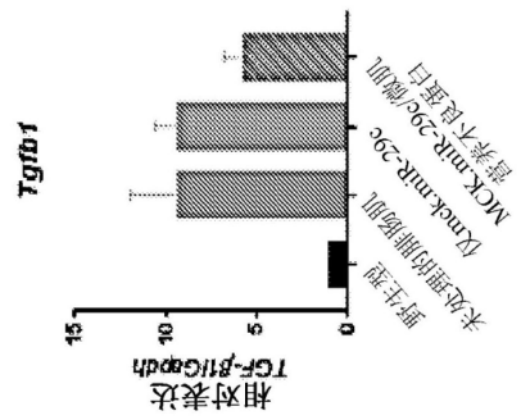


图14G

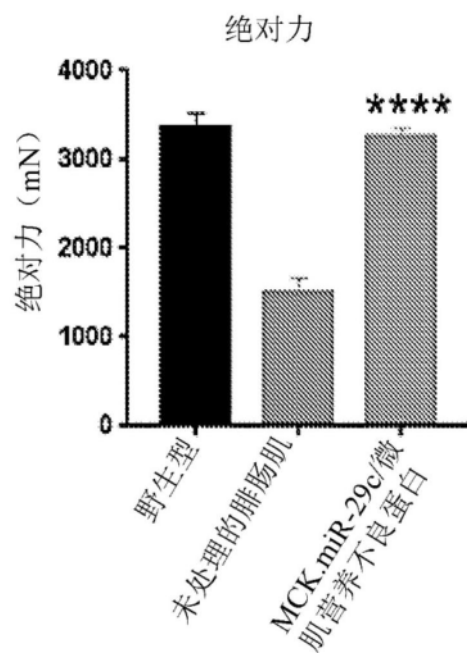


图15A

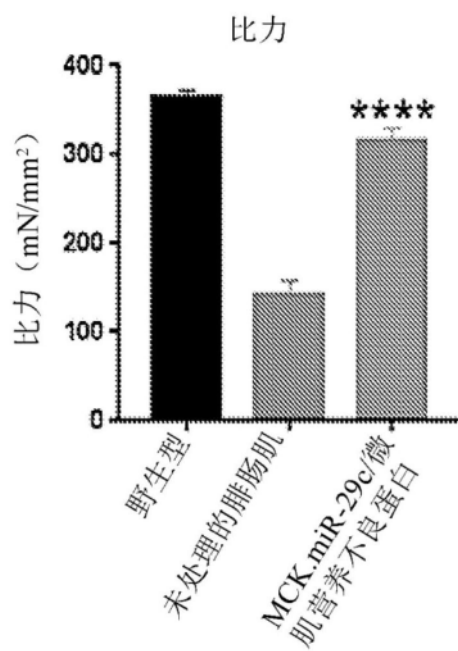


图15B

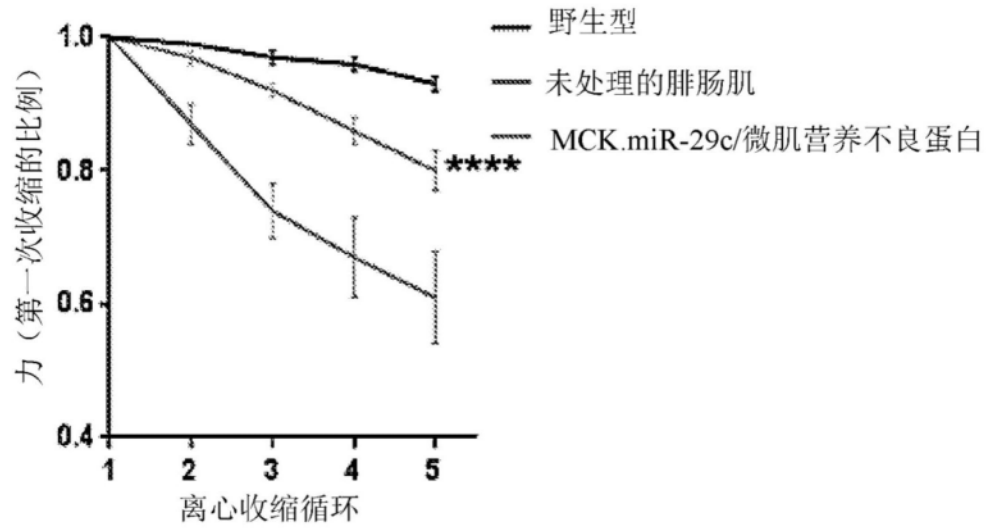


图15C

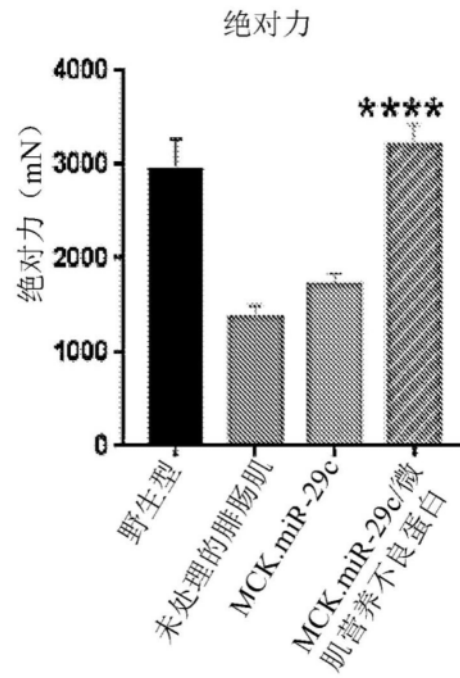


图16A

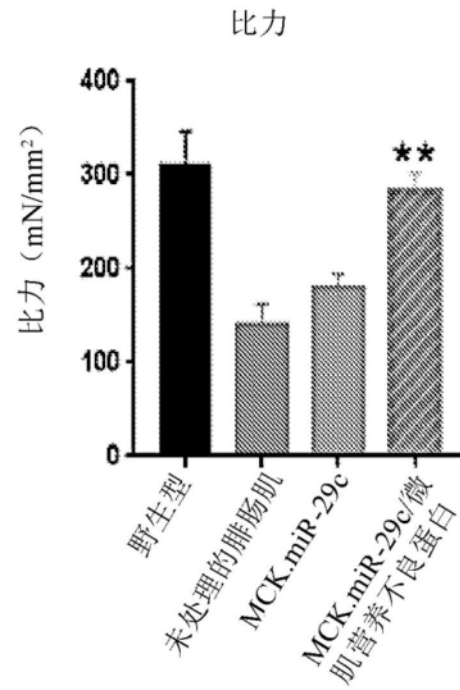


图16B

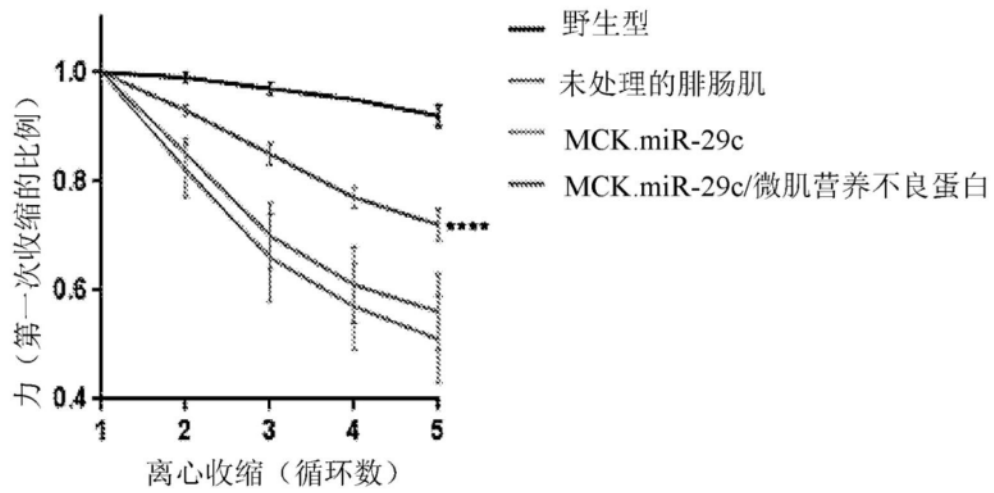


图16C

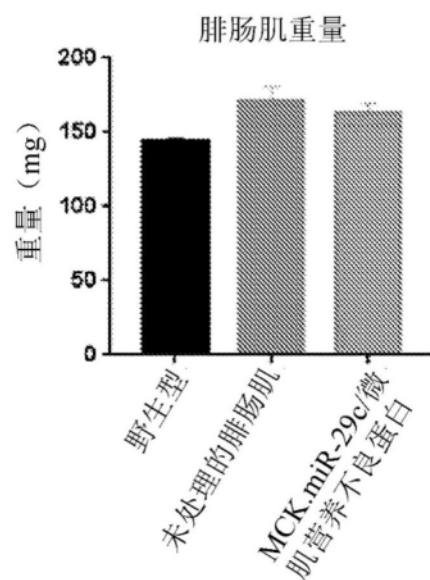


图17A

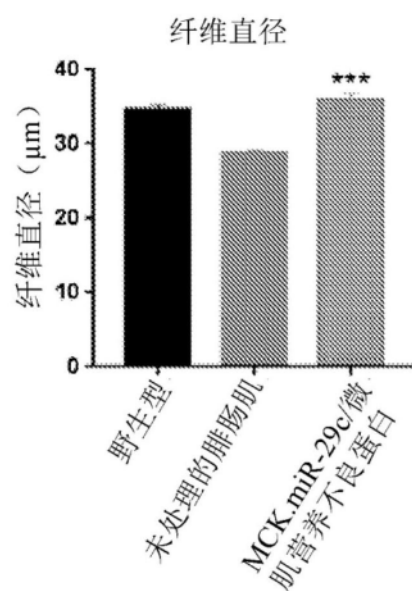


图17B

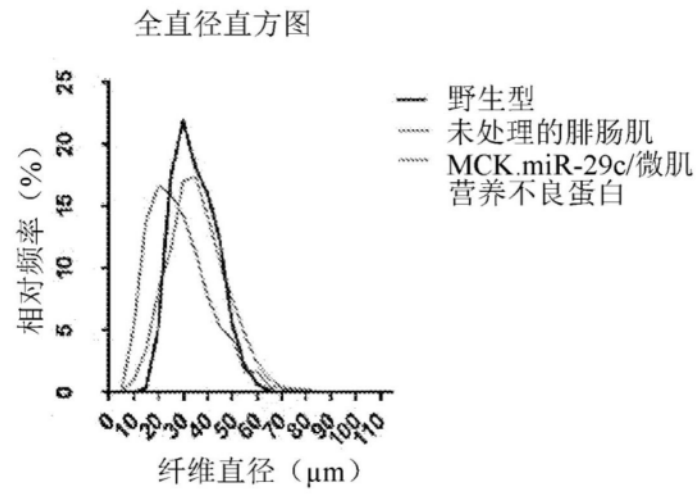


图17C

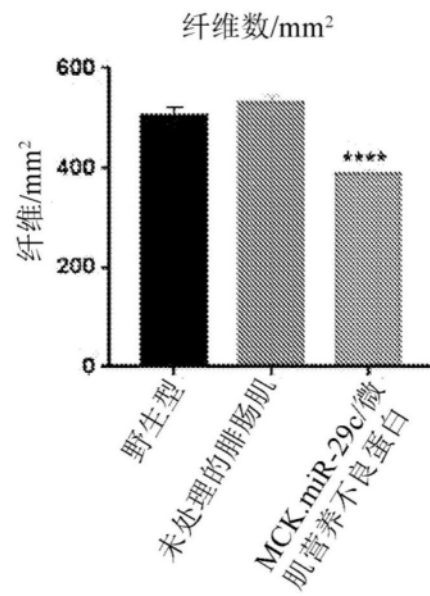


图17D

pAAV.CMV.miR29C序列 (SEQ ID NO: 1)

主要特点:

CMV启动子-120-526

EF1a内含子-927-1087, 1380-1854

miR-29c-1257-1284

具有原始种子序列的shRNA-miR29c-1088-1375

PolyA- 1896-2091

CAGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGGTTAAACTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGAG
TTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGGCAC
CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACC
TCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAAGTAAAAACCAGA
AAGTTAACTGGTAAGTTTGTCTTTTGTCTTTTATTTAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGT
CTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC
CCGGGGCCGATCCACCGGCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCG
CGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAG
AATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGC
ACATCTTGAAACACTTGTGGGATTACTTCTCAGGTTAACCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTG
ACAGTGAGCGCAACCGATTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGCTAGCACCAATTGAAATCGGTTATG
CCTACTGCCTCGGAATTCAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTGTTTACTAAAAGTGAATACCTTGCTATCTCTT
TGATACATTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTG
GCCCCGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAG
GACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCG
CTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTACGTCGTC
TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG
CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTCACTTCAAGCCTCAGACAG
TGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAAAAGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCT
GCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAAGAAAAATGCT
TTATTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTCACTAGTAGCATGGCTACGTAGATAAGT
AGCATGGCGGGTTAATCATTAACATAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGAATTCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAA
TATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAA
GAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTAAAAACAC
TTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAATCCCTTAATCGGCCTCCTGTTAGCTCCGCTCTGATTCTAA
CGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAAC

图18A

CATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTTTCTCCCTCCTTTCTGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGAT
GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
GACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTT
CGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATT
TAAATATTTGCTTATAACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTA
GTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACC
TCTCAAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACT
GTCTCCGGCCTTTCTACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATATGAGGGTCT
AAAAATTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAAC
CGATTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATCTTTGCCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTT
GGAATTCCTGATGCGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCT
GCTCCCGGCATCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTAGAGGTTTTACCGTCATCA
CCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTT
AGACGTCAGGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG
TATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
TCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCGGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTACCCAGTCACA
GAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA
ACTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTA
GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA
TTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAA
GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC
AGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
CTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA
CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATG
TTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCG
CGCGTTGGCCGATTCATTAATG

图18B

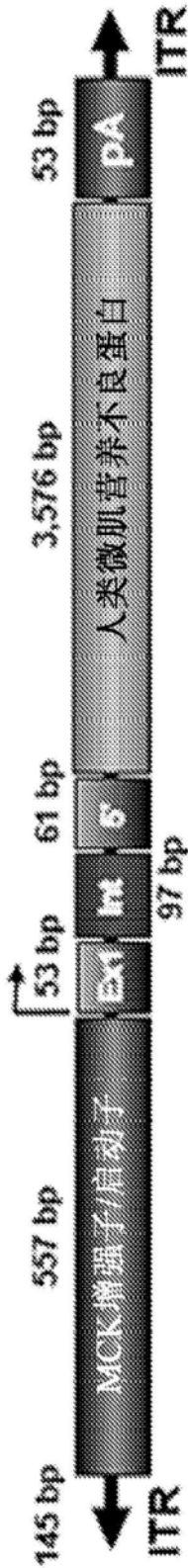


图19

SEQ ID NO: 9

主要特点:

MCK启动子

嵌合内含子序列

人类微肌营养不良蛋白序列

Poly A尾

氨苄青霉素抗性

具有pBR322起点或复制的pGEX质粒骨架

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTT
GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT
CACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCC
ATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAAGGAGGCAAGGCCTGGG
GACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCCA
ACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACA
CCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGGA
CTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCC
CAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGA
CTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACA
AGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGG
GCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGGCCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCC
TGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCC
CGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGT
AAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTACAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAA
AGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTT
CTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGG
AGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGAAGACTTTTACCAAGTGG
GTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTTCCGAC
CTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCT
GCCCCAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCT
CTGAGAGTGCTGCAGAACAAACAACGTGGATCTGGTGAATATTGGCAGTACTGATAT
CGTGGACGGGAACCACAACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCTGCACTG
GCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCG
AGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCAGGTGAAC
GTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCAC
AGCCACAGGCCTGATCTGTTTCTGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACA
CAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAAACT
GCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGTCTATTCTGATGT
ACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTCTATTGAAGCCATTCAGG
AGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCCAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTTCAGCTG
CATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGA
GCGCACCAGTAGTCCAAAACACGGTTCAAGTCCTACGCTTATAC

图20A

CCAGGCTGCCTACGTGACAACCTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCCAGCA
CCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGG
AAAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGG
CTGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGA
AGTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTC
ACCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGG
AAACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACA
GCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGG
GTGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAA
GACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAG
GATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGG
AGCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGT
GGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTG
GGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGC
TGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAG
AAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAAT
GCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGC
AGAGCATGGGCAAACCTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGGAAGAAC
AAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCCGCTGCTGGGA
CAACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCA
CAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACA
ACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCC
CCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAA
CTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGG
CGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAG
GCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCACTGTGAACGATCTGGCTAGACAG
CTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCT
GAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGC
ATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGC
AGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACG
AGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTG
GCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACG
GCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCCTGCGATGCCCT
GGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCA
ACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACACAACCTGGTGAAC
GTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGG
CGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAG
GCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGG
ATTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCTAG
ACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCA
GCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCCTGGATT
GGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGG

图20B

CTGCCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCC
ATTATCGGCTTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGAT
ATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTAC
CCTATGGTGGAAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCC
AAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCAT
GGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAA
TGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTG
TGTGTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCCGCACCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAA
AATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTT
TGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTA
TTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTT
TACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCT
GTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAA
AGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC
TAGCGCCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCC
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAATCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC
GAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTG
TTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTAC
GATTACCGTTCATCGATTCTCTTGTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGC
CTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGA
ACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTG
AATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAA
ATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATA
ATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCT
AATTCTTTGCCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTT
TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATC
TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCG
CCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCC
GGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCGAGACGAAA
GGGCTCTGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAG
ACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCT
AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAAT
AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT

图20C

ATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGA
AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTAC
ATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGT
TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG
ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTG
AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG
ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAAAC
TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTG
ACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAA
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
GCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCT
GGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG
ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
CAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCC
ACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGC
GAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

图20D

SEQ ID NO: 7: 人类微肌营养不良蛋白基因

ATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGA
AGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATC
GAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGG
ACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGA
ACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGAAT
ATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAACTGACACTGGGCCTGATCTG
GAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGC
TGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGC
AACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACCTTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCC
CTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCTGACTGGAATAGCGTGGTG
TGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAG
CTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAA
AAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTC
TATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCCAAAGTGACTAAAG
AGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCC
TGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACACGGTTCAAGTCCTACGCTT
ATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACCTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCC
AGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAG
GTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAG
TGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGA
AGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGGG
CGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAG
TGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGG
GAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTGAT
GGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAG
GAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGA
AGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGT
GCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGT

图21A

GGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGA
AGGTGCTGGGGGACCGGTGGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
CTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTT
AGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTT
TAAGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCG
ATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCATGGGCAAACCTGTATAGCCTGAAACAGGACCTG
CTGAGCACCTTGAAGAACAAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATA
ACTTTGCCCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAG
ATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGA
AACCGTGACCACCGTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAG
AGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTG
CAGGAAGCCACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGG
GTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAA
GGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGA
ACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATAACAATCTG
AGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGA
CCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACT
TTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTG
CCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACA
GAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACC
GCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCC
GCCGCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGA
TATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGC
ACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGA
ACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGG
ATTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAG
GTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGAT
AGTATCCAGATTCCCTAGACAGCTGGGAGAGG

图21B

TGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTG
CCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAAC
CACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCC
AAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTAC
AGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGA
GTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATATTGCACCCCAACTAC
ATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAA
GAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGG
AAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGC

图21C

pAAV.MCK..miR29C序列 (SEQ ID NO: 12)

主要特点:

MCK增强子-190-395 (SEQ ID NO: 10)

MCK启动子-396-753 (SEQ ID NO: 11)

EF1a内含子-1155-1315, 1609-2083

miR-29c-1487-1512

具有原始种子序列的shRNA-miR29-c-1316-1608

SV40 PolyA- 2094-2146

CTGNNNNNNGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTC
GGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTA
TCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGC
AAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTC
CCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTACCCCCACCCCGGTGCCTGGGTCTTAG
GCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGC
TGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCC
TGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCG
CCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCA
GCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCAC
GGTGGCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGGCCCCTCCCTGGGGA
CAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGACAG
GGGCTGCCCCCGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAG
CCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGG
TGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG
AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCCTAGAGGATCCGGTAC
TCGAGGAAGTGA AAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTAT
TTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTT
GCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATT
GTACCCGGGGCCGATCCACCGGTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCAGCGCAC
ATGTTGCGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTG
CACATCTTGGA AACACTTGCTGGGATTACTTCTTCAGGTAAACCAACAGAAGGCTC
GAGAAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACCGATTTCAAATGGTGCTAGAGT
GAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATGCCTACTGCCTCGGAATTC
AAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAAGTGAATACCTTGCTATCT
CTTTGATACATTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCC
CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG
GCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAG
AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTC
GCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT

图22A

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA
GTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGGAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAG
ACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGAAAAGCTAGTGCGGCC
GCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAC
ATGGCTACGTAGATAATTAGCATGGCGGGTTAATCATTAATACTACAAGGAACCCCTAG
TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC
CAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
CGCNNNNNNCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAAATGTA
GGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA
TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG
GTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTA
AAATCCCTTTAATCGGCCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA
CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAAGTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTT
TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT
ACCGTTCATCGATTCTCTTGTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT
GTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
TTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATC
TTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT
TATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT
TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
CTTTGCCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCT
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCTTCCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTT

图22B

TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGA
CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGA
GTA CTAC CAGT CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC TC
GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGAC
ACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA ACTATTA ACTGGCGAACT
ACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGC
AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGAC
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGA
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAG
AGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
GAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTG GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
TAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC
GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

图22C