(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117677698 A
(43)申请公布日 2024.03.08

(21)申请号 202280049575.5
(22)申请日 2022.07.14
(30)优先权数据
63/221,568 2021.07.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/073754 2022.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/288289 EN 2023.01.19
(71)申请人 米雷楚来股份有限公司
地址 美国马里兰州
(72)发明人 A·萨利赫 G·贝尔加德
M·蒙茨 C·马鲁萨克
R·普莱士
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
G16B 30/00(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61K 31/7125(2006.01)

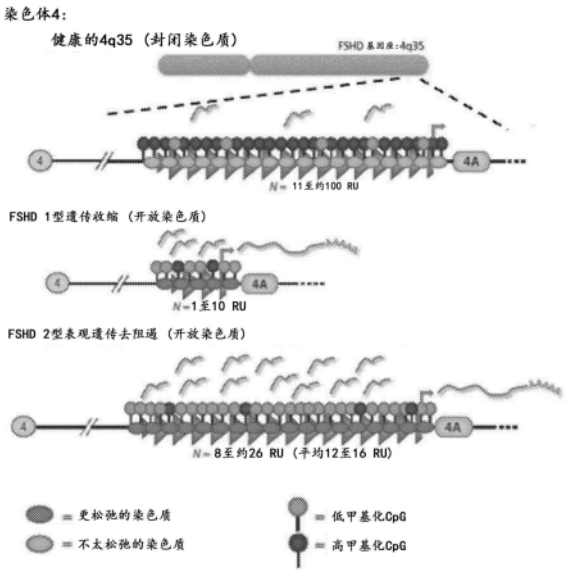
权利要求书3页 说明书68页 附图20页

(54)发明名称

用于神经肌肉障碍的寡核苷酸及其组合物

(57)摘要

本文公开了用于选择性抑制与神经肌肉疾病如面肩肱型肌营养不良相关的RNA转录物的工程化DUX4靶向寡核苷酸。还公开了含有这些寡核苷酸中的任一种的载体、含有这些寡核苷酸中的任一种的药物配制品和含有这些寡核苷酸中的任一种的试剂盒。本文还公开了通过使DUX4靶向寡核苷酸接触与神经肌肉疾病如面肩肱型肌营养不良相关的RNA转录物来选择性抑制多肽表达和活性的方法。



CN 117677698 A

1.一种长度为约15至约25个核苷酸的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与SEQ.ID.NO:20,962-42,138中的任一个具有至少约:80%、85%、90%或95%序列同一性。

2.根据权利要求1所述的长度为约15至约25个核苷酸的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与SEQ.ID.NO:42,006-42,138中的任一个具有至少约80%、85%、90%或95%序列同一性。

3.根据权利要求1所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其与DUX4 RNA中在个体之间大于85%保守的结合位点互补。

4.根据权利要求2所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸包含DNA核苷酸和RNA核苷酸。

5.根据权利要求1所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含DNA核苷酸。

6.根据权利要求1所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸包含RNA核苷酸。

7.根据权利要求6所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸是小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、小核RNA(snRNA)、U剪接体RNA(U-RNA)、小核仁RNA(snoRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、重复相关小干扰RNA(rasiRNA)、小rDNA来源的RNA(srRNA)、转移RNA来源的小RNA(tsRNA)、核糖体RNA来源的小RNA(rsRNA)、大型非编码RNA来源的小RNA(lncsRNA)、或信使RNA来源的小RNA(msRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、gapmer、mixmer、双链RNA(dsRNA)、单链RNAi(ssRNAi)、DNA引导的RNA干扰(ddRNAi)、RNA激活寡核苷酸(RNAa)、或外显子跳读寡核苷酸。

8.根据权利要求1所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸包含选自锁核酸核碱基、2'O甲基核碱基或2'甲氧基乙基核碱基的至少一个核碱基。

9.根据权利要求2所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其在水溶液中与DUX4编码序列结合,其预测解链温度(Tm)为约45至约65摄氏度,其中所述水溶液的pH范围为约7.2至约7.6。

10.一种缀合物,所述缀合物包含i)根据权利要求1-9中任一项所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸;ii)抗体、抗体片段、单个单体可变抗体结构域、天然存在的配体、小分子或肽;和任选地iii)将i)连接至ii)的接头。

11.一种载体,所述载体含有或编码根据权利要求1至9所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸。

12.根据权利要求11所述的载体,其中所述载体包括病毒载体、纳米颗粒载体、脂质体载体、外体载体、细胞外囊泡载体或其组合。

13.根据权利要求12所述的载体,其中所述载体是所述脂质体载体。

14.根据权利要求12所述的载体,其中所述载体是所述纳米颗粒载体。

15.根据权利要求12所述的载体,其中所述载体是所述外体载体。

16.根据权利要求12所述的载体,其中所述载体是所述细胞外囊泡载体。

17.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至9中任一项所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、根据权利要求10所述的缀合物、根据权利要求11至16中任一项所述的载体,以及药学上可接受的:赋形剂、稀释剂、载体或其组合。

18.根据权利要求17所述的药物组合物,所述药物组合物包含所述药学上可接受的赋形剂,其中所述药学上可接受的赋形剂包括缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、冷冻保护剂、冻干剂、稀释剂或其任何组合。

19.根据权利要求17所述的药物组合物,所述药物组合物包含所述药学上可接受的稀释剂,其中所述药学上可接受的稀释剂包括蒸馏水、去离子水、生理盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、细胞生长培养基、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或其任何组合。

20.根据权利要求17所述的药物组合物,所述药物组合物呈单位剂量形式。

21.一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1至9中任一项所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、根据权利要求10所述的缀合物、根据权利要求11至1516中任一项所述的载体或根据权利要求17-20中任一项所述的药物组合物以及容器。

22.根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述容器包括罐、安瓿、注射筒、袋、盒或其组合。

23.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求17-20中任一项所述的药物组合物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病或病症是DUX4介导的疾病或病症。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述DUX4介导的疾病或病症是面肩肱型肌营养不良。

26.根据权利要求23-25中任一项所述的方法,其中所述受试者是有需要的。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述有需要的受试者是有需要的人类受试者。

28.根据权利要求23-27中任一项所述的方法,其中所述施用是以约0.001mg至约10,000mg药物配制品/kg所述受试者体重的量进行。

29.根据权利要求23-28中任一项所述的方法,其中所述施用是口服、鼻内、直肠、外用、眼内、肌内、静脉内、腹膜内、心内、皮下、颅内、鞘内或其任何组合。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述药物组合物包含以以下体积施用的液体剂型:约1ml至约5ml、约5ml至10ml、约15ml至约20ml、约25ml至约30ml、约30ml至约50ml、约50ml至约100ml、约100ml至150ml、约150ml至约200ml、约200ml至约250ml、约250ml至约300ml、约300ml至约350ml、约350ml至约400ml、约400ml至约450ml、约450ml至500ml、约500ml至750ml、或约750ml至1000ml。

31.根据权利要求23-30中任一项所述的方法,其中所述药物组合物呈液体剂型、固体剂型、可吸入剂型、鼻内剂型、脂质体配制品、呈丸剂形式、呈胶囊形式、凝胶或其任何组合。

32.根据权利要求23-31中任一项所述的方法,其中所述施用包括全身或局部施用。

33.根据权利要求32所述的方法,所述方法包括全身施用,其中所述全身施用包括以下中的至少一种:肠胃外施用、静脉内施用、皮下施用、鞘内施用、腹膜内施用、肌内施用、血管内施用、输注、口服施用、吸入施用、十二指肠内施用、眼部施用、真皮施用、直肠施用或其任何组合。

34.根据权利要求23所述的方法,所述方法进一步包括并行或连续施用共同疗法。

35.一种方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求1-9中任一项所述的工程化DUX-4靶向寡核苷酸,其中在所述施用后,所述工程化DUX-4靶向寡核苷酸选择性地与两种不同的内源性疾病相关RNA杂交,其中所述两种不同的内源性疾病相关RNA中的一种是从第

一遗传基因座转录的DUX4 RNA,并且所述两种不同的内源性疾病相关RNA中的一种转录自与所述第一遗传基因座不同的遗传基因座。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述两种不同的内源性疾病相关RNA中的第二种选自SEQ ID NO:42139-42894。

37.根据权利要求35所述的方法,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与转录自与所述第一遗传基因座不同的遗传基因座的所述内源性疾病相关RNA杂交,使得在杂交后,在结合位点中存在不多于4个错配、凸起、插入或缺失,并且所得双链体含有两个长至少7个连续核碱基的互补区域,或一个长至少10个连续核碱基的区域。

38.根据权利要求35所述的方法,其中所述方法是治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症是DUX4介导的疾病或病症。

39.根据权利要求37所述的方法,其中所述DUX4介导的疾病或病症是面肩肱型肌营养不良。

40.根据权利要求8所述的方法,其中在所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与所述第二RNA之间杂交后,预测的热解链点为约40摄氏度至约65摄氏度。

41.一种在治疗神经肌肉疾病中使用的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至9中任一项所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、根据权利要求9所述的缀合物、根据权利要求11至16中任一项所述的载体、根据权利要求17-20中任一项所述的药物组合物和药学上可接受的:赋形剂、稀释剂或载体。

42.根据权利要求41所述的用于所述用途的组合物,其中所述神经肌肉疾病是面肩肱型肌营养不良。

用于神经肌肉障碍的寡核苷酸及其组合物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年7月14日提交的美国临时申请号63/221,568的权益,将其公开内容通过引用以其整体并入本文。

通过引用并入

[0002] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,并入程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地且单独地指出以通过引用并入一样。就通过引用并入的出版物和专利或专利申请与说明书中包括的公开内容相矛盾而言,说明书旨在取代和/或优先于任何这种矛盾的材料。

发明内容

[0001] 本公开文本的某些方面涉及一种长度为约15至约25个核苷酸的工程化DUX4靶向寡核苷酸,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与SEQ.ID.NO:20,962-42,138中的任一个具有至少约:80%、85%、90%或95%序列同一性。此外,所述工程化DUX4靶向寡核苷酸的长度可以为约15至约25个核苷酸,可以与SEQ.ID.NO:42,006-42,138中的任一个具有至少约:80%、85%、90%或95%序列同一性。

[0002] 在某些情况下,所述工程化DUX4靶向寡核苷酸包含DNA核苷酸和RNA核苷酸。在一些情况下,此寡核苷酸包含DNA核苷酸。在一些情况下,所述寡核苷酸包含RNA核苷酸。在某些情况下,所述寡核苷酸是小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、小核RNA(snRNA)、U剪接体RNA(U-RNA)、小核仁RNA(snoRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、重复相关小干扰RNA(rasiRNA)、小rDNA来源的RNA(srRNA)、转移RNA来源的小RNA(tsRNA)、核糖体RNA来源的小RNA(rsRNA)、大型非编码RNA来源的小RNA(lncsRNA)、或信使RNA来源的小RNA(msRNA)。在某些情况下,如上所述的寡核苷酸可包含至少一个锁核酸核碱基。

[0003] 如上所述的DUX4靶向寡核苷酸可以在水溶液中与DUX4编码序列结合,其预测解链温度(Tm)为约45至约65摄氏度,其中所述水溶液的pH范围为约7.2至约7.6。

[0004] 本公开文本的另一方面是i)如上所述的DUX4靶向寡核苷酸的缀合物,其中所述缀合物包含所述寡核苷酸和抗体、抗体片段、单个单体可变抗体结构域、天然存在的配体、小分子或肽;和任选地iii)将i)连接至ii)的接头。

[0005] 本公开文本的另一方面涉及一种载体,所述载体含有或编码如本文所述的缀合物或如本文所述的寡核苷酸。在某些情况下,所述载体可以包括病毒载体、纳米颗粒载体、脂质体载体、外体载体、细胞外囊泡载体或其组合。所述载体可以是脂质体载体。所述载体可以是纳米颗粒载体。所述载体可以是外体载体。所述载体可以是细胞外载体。

[0006] 本公开文本的另一方面涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、本文所述的缀合物、如本文所述的载体、根据权利要求10至15中任一项所述的载体,和药学上可接受的:赋形剂、稀释剂、载体或其组合。在某些情况下,所述药学上可接受的赋形剂包括缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、稀释剂或其任何组合。在某些情况下,所述药学上可接受的稀释剂包括蒸馏水、去离子水、生理盐水、林格氏溶液、右旋糖溶

液、细胞生长培养基、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或其任何组合。本文所述的药物组合物可以呈单位剂量形式。

[0007] 本公开文本的另一方面涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含如本文所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、如本文所述的缀合物、如本文所述的载体或如本文所述的药物组合物和容器。在某些情况下,所述容器可以包括罐、安瓿、注射筒、袋、盒或其组合。

[0008] 本公开文本的另一方面是一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如本文所述的药物组合物。所述疾病或病症是DUX4介导的疾病或病症。所述DUX4介导的疾病或病症是面肩肱型肌营养不良。所述受试者可以是有需要的受试者。所述受试者可以是有需要的人类受试者。

[0009] 在所述方法中,所述施用是以约0.001mg至约10,000mg药物配制品/kg受试者体重的量进行。所述施用可以是口服、鼻内、直肠、外用、眼内、肌内、静脉内、腹膜内、心内、皮下、颅内、鞘内或其任何组合。

[0010] 所述方法可以使用所述药物组合物,其中所述药物组合物包含以以下体积施用的液体剂型:约1ml至约5ml、约5ml至10ml、约15ml至约20ml、约25ml至约30ml、约30ml至约50ml、约50ml至约100ml、约100ml至150ml、约150ml至约200ml、约200ml至约250ml、约250ml至约300ml、约300ml至约350ml、约350ml至约400ml、约400ml至约450ml、约450ml至500ml、约500ml至750ml、或约750ml至1000ml。在某些情况下,所述药物组合物呈液体剂型、固体剂型、可吸入剂型、鼻内剂型、脂质体配制品、呈丸剂形式、呈胶囊形式或其任何组合。

[0011] 在某些情况下,所述施用包括全身或局部施用。所述全身可以是施用,其中所述全身施用包括以下中的至少一种:肠胃外施用、静脉内施用、皮下施用、鞘内施用、腹膜内施用、肌内施用、血管内施用、输注、口服施用、吸入施用、十二指肠内施用、直肠施用或其任何组合。

[0012] 在某些情况下,所述方法进一步包括并行或连续施用共同疗法。

[0013] 本公开文本的另一方面涉及一种施用本文所述的工程化DUX-4靶向寡核苷酸的方法,其中在所述施用后,所述工程化DUX-4靶向寡核苷酸选择性地与两种不同的内源性疾病相关RNA杂交,其中所述两种不同的内源性疾病相关RNA中的一种是从第一遗传基因座转录的DUX4 RNA,并且所述两种不同的内源性疾病相关RNA中的一种转录自与所述第一遗传基因座不同的遗传基因座。仍此外,在某些情况下,所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与转录自与所述第一遗传基因座不同的遗传基因座的所述内源性疾病相关RNA杂交,使得所述工程化DUX4靶向寡核苷酸的至少10个连续寡核苷酸与被至少一个核碱基隔开的连续碱基的至少两个不同连续部分杂交。此方法可以是一种治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症是DUX4介导的疾病或病症。所述疾病或病症可以是面肩肱型肌营养不良。在所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与所述第二RNA之间杂交后,预测的热解链点可以为约40摄氏度至约65摄氏度。

[0014] 本公开文本的另一方面是一种在治疗神经肌肉疾病中使用的组合物,所述组合物包含如本文所述的工程化DUX4靶向寡核苷酸、如本文所述的缀合物、如本文所述的载体、如本文所述的药物组合物和药学上可接受的:赋形剂、稀释剂或载体。所述组合物可用于所述神经肌肉疾病是面肩肱型肌营养不良的情况。

附图说明

[0015] 图1示出了导致FSHD的遗传修饰。

[0016] 图2示出了源自D4Z4区域的可变剪接的DUX4转录物。

[0017] 图3示出了来自FSHD和健康肌肉活检组织的可变剪接的DUX4转录物的RNA-Seq数据的读段覆盖的示意图。

[0018] 图4示出了来自睾丸的可变剪接的DUX4转录物的RNA-Seq数据的读段覆盖的示意图。

[0019] 图5示出了化学修饰的抗DUX4 ASO相对于未修饰的寡核苷酸的血清稳定性。

[0020] 图6A-图6B描绘了先天刺激的减少。图6A描绘了在将PBMC暴露于工程化抗DUX4ASO后先天IFNα和TNFα产生的减少。图6B描绘了通过Raw-blue细胞测定的工程化DUX4ASO的先天免疫刺激的减少。

[0021] 图7示出了DUX4 ASO HTS测定设计,其使用稳定的表达eGFP的人或小鼠成肌细胞且DUX4的编码序列位于3'UTR中。

[0022] 图8A-图8B示出了DUX4 mRNA的敲减。图8A示出了治疗性ASO具有FSHD肌管中DUX4的强敲减。图8B示出了FSHD肌管中DUX4和DUX4诱导的基因ZSCAN4和SLC34A2的敲减。

[0023] 图9示出了通过多靶向ASO对FSHD患者成肌细胞中的DUX4和DBET RNA转录物的同时敲减。

[0024] 图10示出了用于鉴定FSHD相关基因和途径的数据分析的示意性概略图。

[0025] 图11示出了由水平间隙分开的表示六种FSHD相关生物学功能的基因的表达(从上到下):DUX4调节、细胞外基质、细胞周期、免疫/炎症反应、免疫球蛋白和肌肉发育相关。

[0026] 图12A-图12B按照经鉴定的共同靶标示出了潜在效应的示例性途径。图12A示出了来自Xie等人(18)的细胞增殖中Ki-67的途径调节。图12B示出了来自Elkon等人(19)的炎症信号传导中IRF5的诱导。

[0027] 图13示出了患者活检样品中的IRF5和MKI67 RNA表达。

[0028] 图14A-图14B示出了通过多靶向ASO对共同靶向转录物的验证。图14A示出了用ASO处理后的成肌细胞。图14B示出了从用ASO处理的成肌细胞获得的RNA(DUX4、DBET、IRF5和MKI67)的qRT-PCT结果。

[0029] 图15是显示如本文所公开的方法和系统的图。

[0030] 图16示出了被编程以分析遗传物质的计算机控制系统。

具体实施方式

概述

[0031] 面肩肱型肌营养不良(FSHD)是肌营养不良(MD)的第三常见形式,在美国大约有40,000名患者出现症状(1,2)。1型FSHD(FSHD1)(占所有FSHD患者的95%)是染色体4q35上D4Z4重复序列的数量从大约100减少到小于11的结果(3)。2型FSHD(SHD2)是表观遗传因子(含有柔性铰链结构域的染色体结构维持蛋白1(SMCHD1))中的功能丧失突变的结果(3)(图1)。两种遗传突变导致D4Z4区域的低甲基化,这允许D4Z4内编码的双同源框4蛋白(DUX4)基因的不适当表达。DUX4的异常表达对肌肉组织具有严重毒性,这导致肌细胞的氧化应激和凋亡,从而削弱肌肉功能(4,5)。FSHD导致面部、肩部、手臂、腹部和腿部肌肉的进行性虚弱。

约20％的患者最终坐轮椅(6)。当仅保留1-3个D4Z4重复序列时,会导致显著更严重且进展迅速的障碍(7),通常伴随儿科发作(8)以及听力和视力损失(9)。本领域存在广泛的科学共识,即如果可以消除肌肉组织中的DUX4表达,则可以阻止FSHD1和2的进展(10-12)。几项研究表明,在体外和在小鼠模型中,RNA寡核苷酸治疗剂具有直接阻遏DUX4,逆转肌肉病理的潜力(13-16)。然而,DUX4靶向寡核苷酸治疗剂的互补结合位点的保守性仍然是一个问题。

[0032] 如果设计用于治疗任何障碍的寡核苷酸治疗剂(ONT)与疾病转录物中的靶RNA结合位点完全互补,则所述治疗剂在调节所靶向转录物方面将是最有效的。此外,所靶向的结合序列在患有这种障碍的患者之间应该具有低的差异。否则,在靶结合位点处疾病基因的序列中具有SNP或突变的患者可能与治疗性寡核苷酸并非完全互补,这导致ONT对疾病基因的沉默不完全。本申请首次解决了确定DUX4基因/外显子内的保守变体序列的问题,鉴定了靶向临床上重要的DUX4变体的RNA治疗剂,并产生了具有针对功效和稳定性优异的结构修饰的RNA治疗剂。

[0033] 通常使用包括数百至数千个体的序列数据库来选择寡核苷酸治疗剂(ONT)的高度保守的结合位点(20)。然而,这些数据库不能用于准确预测DUX4基因中的变异。挑战是找到DUX4的保守治疗靶标。本文公开了DUX4靶向寡核苷酸的解决方案以及生成和验证。大多数公共序列数据库利用DNA片段测序技术来高效且廉价地从群体收集序列数据。这涉及将长基因组DNA片段化为长度为几百个碱基的片段,将这些片段克隆、扩增并测序。然后将单独的片段映射到更大的已知参考基因组序列。已知此技术不能有效地准确区分或映射重复序列(21)。

[0034] DUX4基因的编码区位于4号染色体上的每个D4Z4重复序列中。来自正常个体的DNA在每条4号染色体上含有11-200个D4Z4拷贝(12)。此外,在10号染色体上发现含有DUX4的D4Z4重复序列。然而,由于DUX4编码序列中缺乏下游外显子3-5,因此10号染色体上D4Z4重复序列的缺失与面肩肱型肌营养不良(FSHD)的发展无关。因此,在10号染色体DUX4编码序列中发现的序列变异性与ONT的设计无关。此外,在整个人基因组中也发现了D4Z4假基因(22),并且在D4Z4中的DUX4序列与编码DUX家族成员DUX1-DUX5的其他重复DNA序列之间存在显著序列重叠(23)。这种基因组复杂性导致所测序的与D4Z4重复序列重叠的DNA片段的映射较差,它们源自哪个基因组基因座的可信性很低。在预测FSHD患者中DUX4编码序列中的变异时,这产生了一个问题,即序列数据和列出的变异可以准确预测DUX4中的保守序列的可信性很低,因为许多数据被来自与位于FSHD患者的4号染色体的一个拷贝上的致病性缩短的D4Z4重复序列阵列无关的其他基因组位置的序列变异所污染。一种合乎逻辑的解决方案是使用来自FSHD患者的肌肉活检的RNA序列数据。如实施例1中所示,此方法没有得到足够的数据以允许预测DUX4编码序列中的变异性。

[0035] 本公开文本首次解决了确定DUX4基因/外显子内的保守变体序列的问题,鉴定了靶向有临床意义的DUX4变体的ONT治疗剂,并产生了具有针对功效和稳定性优异的结构修饰的ONT治疗剂。

[0036] 本文公开了表示DUX4编码序列中在206名受试者中>85％保守的所有区域的序列(表4)。为了鉴定这些区域,诸位发明人有了令人惊讶的发现,如实施例3中所示,可以通过将来自患者的肌肉活检的RNA-seq数据组合到具有来自睾丸样品的RNA-seq的组合数据库中而在RNA-seq数据中鉴定足够的读段计数。虽然本领域已知在睾丸中的配子细胞中观察

到低水平的DUX4表达(24),本领域技术人员不会期望能够从睾丸RNA序列预测DUX4疾病转录物变异,因为已经报道在睾丸中表达的DUX4转录物发生差别剪接并且缺少DUX4的肌肉特有转录物中包括的被预测引起疾病的外显子1、外显子2和外显子3的区域(25)(图2)。通过将来自这两种组织的RNA-seq数据组合到单个数据集中,能够在整个DUX4疾病基因中产生足够的读段覆盖,以预测大于85%保守的区域,并能够有效治疗大多数患者。

[0037] 依赖于核糖核酸酶H来切割且随后降解互补RNA的反义寡核苷酸(ASO)可以并且确实使除预期RNA靶标之外的许多RNA沉默(26,27)。这些非靶RNA通常被称为脱靶效应。对于gapmer ASO,当寡核苷酸的DNA部分通过结合部分互补的靶位点并诱导RNA酶H切割而引起非预期的RNA脱靶降解时,就会发生这种情况。仔细的序列分析可以鉴定许多这些潜在的相互作用。然而,简单的序列比对通常不能准确预测真实的脱靶相互作用。诸位发明人已经开发了一种数据分析流程来预测和跟踪RNA治疗剂的脱靶效应,所述流程还考虑结构基序和结合能以改善预测(WO 2021203043)。

[0038] 本领域的一般实践要在寡核苷酸设计中尽可能避免脱靶效应。本文描述的新颖方法代之以全面地看待脱靶。诸位发明人首先通过经由毒性数据库(如Toxnet和Ingenuity途径分析(IPA))过滤预测的靶标来寻找可能有害并引起毒性的那些脱靶。诸位发明人还通过分析来自FSHD患者的肌肉活检的转录组特征,通过寻找在子集中显著过表达的基因,或与已知的疾病途径(如炎症、肌细胞分裂或细胞死亡途径)相关的基因,来考虑可能与疾病途径相关的脱靶。

[0039] 此信息允许优先化要合成、测试和验证的ASO序列。然后使用表现出高敲减潜力的ASO和具有高疾病相关性的脱靶通过qRT-PCR在体外在分化的肌管中验证脱靶转录物的敲减。

定义

[0040] 除非另有指示,否则开放术语(例如“含有(contain、containing)”、“包括(include、including)”等)意指包含。

[0041] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”在本文中用于包括复数指示物。因此,除非有相反的指示,否则本申请中阐述的数值参数是近似值,所述近似值可以根据试图获得的所需特性而变化。

[0042] 如本文所用,术语“约”可以意指所引用的数字指示加上或减去:所引用的数字指示的5%、10%、15%或20%。在一些情况下,“约”可以意指所引用的数字指示加上或减去所引用的数字指示的15%。在一些情况下,“约”可以意指所引用的数字指示加上或减去所引用的数字指示的20%。关于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的数量级以内、在值的5倍以内或在值的2倍以内。在本公开文本和权利要求中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假设术语“约”对于特定值意指在可接受的误差范围内。此外,在提供值的范围和/或子范围的情况下,所述范围和/或子范围可以包括所述范围和/或子范围的端点。

[0043] 如本文所用的术语“基本上”可以指接近给定值的100%的值。在一些情况下,所述术语可以指可以为总量的至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或约100%的量。

[0044] 术语“同源性”可以指序列与参考序列的同一性%。实际上,无论任何特定序列是否可以与本文所述的任何序列(其可以对应于本文所述的特定核酸序列)至少50%、60%、

70％、80％、85％、90％、92％、95％、96％、97％、98％或99％相同,可以使用已知的计算机程序例如Bestfit程序(威斯康星序列分析软件包,Unix版本8,遗传学计算机组,大学研究园,威斯康星州麦迪逊科学大道575号,53711)常规地确定这种特定多肽序列。当使用Bestfit或任何其他序列比对程序来确定特定序列是否与参考序列例如95％相同时,可以设置参数使得在所述参考序列的全长上计算同一性百分比,并且允许总参考序列的高达5％的同源性空位。本文公开的任何序列还包含与所公开的序列具有约以下序列同一性的序列:75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。

[0045] 术语“寡核苷酸”可以指DNA、RNA或杂合核酸序列(无论是否经过化学修饰),其中单链(如例如,典型地在DNA的情况下)反向互补地与靶RNA序列结合。在RNA的情况下,寡核苷酸可以是单链的(如典型地在miRNA的情况下),其中单链反向互补地与靶RNA序列结合。在其他情况下,关于RNA寡核苷酸可以是双链的(例如,如典型地在siRNA的情况下),其中一条链反向互补地与靶RNA序列结合。

[0046] 如本文所用,在一些情况下,术语“靶向(targeting)”和术语“靶向的(targeted)”可以互换使用,例如,靶向DUX4的寡核苷酸可以是DUX4靶向寡核苷酸或以DUX4为靶标的寡核苷酸。它可以是DUX4靶向寡核苷酸。靶向序列可以与DUX4转录物具有反向互补性。在一些情况下,靶向序列可与DUX4转录物和再一个另外的遗传基因座或其转录物具有至少部分反向互补性。在一些情况下,遗传基因座

[0047] 如本文所用,术语“片段”可以是序列的一部分,可以是短于全长序列的子集。片段可以是基因的一部分。片段可以是肽或蛋白质的一部分。片段可以是氨基酸序列的一部分。片段可以是寡核苷酸序列的一部分。片段的长度可以小于约:20、30、40、50个氨基酸。片段的长度可以小于约:2、5、10、20、30、40、50个寡核苷酸。

[0048] 如本文所用的术语“表观遗传标记物”可以是核酸碱基的任何共价修饰。

[0049] 如本文所用,术语“施用(administer、administering、administration)”等可以指可用于使得能够将化合物或组合物递送至所需生物作用位点的方法。术语“递送”可包括直接施用于身体的受影响组织或区域。

[0050] 术语“受试者”、“宿主”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用以指代动物(典型地是哺乳动物)。

[0051] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”可以包括至少部分地:缓解、减轻或改善疾病或病症症状;预防另外的症状;改善或预防症状的根本原因;预防症状的复发;抑制疾病或病症,例如,至少部分地阻止疾病或病症的发展;缓解疾病或病症;引起疾病或病症的消退;缓解由疾病或病症引起的病症;或预防性地、治疗性地或两者兼有地停止疾病或病症的症状。

[0052] 如本文所用,“药剂”或“生物活性剂”可以指任何这些结构的生物、药物或化学化合物或盐。

[0053] 如本文所用,术语“组织”可以是任何组织样品。组织可以是疑似或确认患有疾病或病症的组织。

[0054] 术语“哺乳动物细胞”可以指任何哺乳动物细胞(典型地是人细胞)。

工程化DUX4靶向寡核苷酸

[0055] 本公开文本在本文中提供了对包含选择的DUX4靶位置的RNA转录物的治疗性靶向。在RNA医学中采用两种主要方法:双链RNA介导的干扰(RNAi)和反义寡核苷酸(ASO)。从广义上讲,RNAi可以通过激活核糖核酸酶来起作用,所述核糖核酸酶与其他酶和复合物一起在初始RNA靶标被切成较小的片段后协同降解RNA。反义寡核苷酸可经由沃森-克里克碱基配对与其靶核酸结合,并经由空间位阻、剪接改变、靶降解的启动或其他事件来抑制或改变基因表达。

[0056] 在本公开文本的某些方面,寡核苷酸治疗剂(ONT)可以被设计以治疗适于调节所靶向转录物的任何障碍。在某些方面,治疗是用一种或多种关于具有需要下调的转录物的疾病的靶RNA结合位点基本上或完全互补的ASO。在某些情况下,寡核苷酸治疗剂主要是DNA,在其他情况下,寡核苷酸主要是RNA。通常,有效靶向DUX4的ASO可以与融合转录物结合并诱导通过RNA酶H降解。

[0057] 在本公开文本的其他方面,可以设计包含与DUX4 RNA转录物互补的序列的干扰RNA(如siRNA或miRNA),以治疗适于调节这种所靶向转录物的任何障碍。在某些方面,siRNA是双链的,其中一条链是互补的。RISC使用miRNA或siRNA的指导链经由沃森-克里克碱基配对来靶向mRNA转录物的互补的3'-非翻译区(3'UTR),使其能够以多种方式(如mRNA降解)调节所述mRNA转录物的基因表达,从而防止或减少所选mRNA的蛋白质表达。

[0058] 如所提及的寡核苷酸可包括miRNA。这种miRNA可以含有一个或多个序列修饰、一个或多个化学修饰或其组合,所述修饰可以:增强miRNA的稳定性;大幅减少或消除免疫刺激(如经由先天免疫应答);改善miRNA的药理学活性;保留miRNA的多靶向效应;或其任何组合。

[0059] 本文提供的核酸序列(包括但不限于序列表中的那些)旨在涵盖含有天然或经修饰的RNA和/或DNA的任何组合的核酸(包括但不限于具有经修饰的核碱基的此类核酸)。通过进一步的例子并且没有限制,具有核碱基序列"ATCGATCG"的寡核苷酸涵盖具有这种核碱基序列的任何寡聚化合物(无论是经修饰的还是未经修饰的),其包括但不限于包含RNA碱基的此类化合物,如具有序列"AUCGAUCG"的那些和具有一些DNA碱基和一些RNA碱基的那些(如"AUCGATCG")以及具有其他经修饰的或天然存在的碱基的寡聚化合物。同样,具有序列"AUCGAUCG"的RNA转录物涵盖任何对应的DNA序列(如"ATCGATCG")。本文的核酸序列还包括与所公开的序列具有至少约以下序列同一性的序列:75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0060] 在某些情况下,寡核苷酸构建体可包含含有DUX4靶向寡核苷酸的第一链和含有与DUX4靶向寡核苷酸的至少一部分互补的序列的第二链。第二链可以与第一链的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多互补。第二链可以与第一链的至少约5、10、15或20个连续碱基互补。寡核苷酸可以包含末端突出端,如5'端或3'端。第一链、第二链或其组合可以包含一个或多个化学修饰。第一链、第二链或其组合的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的碱基可包含化学修饰。第一链、第二链或其组合可以包含一个或多个糖修饰。第一链、第二链或其组合的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的碱基可包含糖修饰。糖修饰可以包括糖基化的碱基。在一些情况下,核苷酸的碱基可以被聚糖糖基化。第一链、第二链或其组合可以包含具有化学

修饰和糖修饰的碱基的组合。

[0061] 在一些情况下,如本文所述的寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸或其盐)的长度可以为约5至约50个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约40个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约30个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约25个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约60个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约80个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约100个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的长度可以为约5至约200个核苷酸。

[0062] 在某些其他情况下,干扰RNA可以是调节性非编码RNA(ncRNA),其包含调节哺乳动物细胞中其他生物分子的表达或功能的在基因组中表达的短非编码RNA序列。ncRNA的长度通常<200个核苷酸,并且可以是单链的或双链的,并且可以形成非线性二级或三级结构。ncRNA可包括外源来源的小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、小核RNA(snRNA)、U剪接体RNA(U-RNA)、小核仁RNA(snoRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、重复相关小干扰RNA(rasiRNA)、小rDNA来源的RNA(srRNA)、转移RNA来源的小RNA(tsRNA)、核糖体RNA来源的小RNA(rsRNA)、大型非编码RNA来源的小RNA(lncsRNA)、或信使RNA来源的小RNA(msRNA)。

[0063] DUX4靶向寡核苷酸可包含DNA、RNA或其混合物。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含多个核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含人工核酸类似物。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含DNA,可包含无细胞DNA、cDNA、胎儿DNA、病毒DNA或母体DNA。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含shRNA或siRNA、ncRNA模拟物、短发夹RNA(shRNA)、dicer依赖性siRNA(di-siRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、gapmer、mixmer、双链RNA(dsRNA)、单链RNAi(ssRNAi)、DNA引导的RNA干扰(ddRNAi)、RNA激活寡核苷酸(RNAa)或外显子跳读寡核苷酸。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含全合成miRNA。全合成miRNA是并非源自或基于ncRNA的miRNA。而是全合成miRNA可以基于对多个潜在靶序列的分析,或者可以基于并非ncRNA的分离的天然非编码序列。

经修饰的寡核苷酸

[0064] 在一些情况下,第二链可包含核苷酸的经化学修饰的碱基。在一些情况下,第二链的碱基子集可以是经化学修饰的,如约1%至约5%的碱基、约1%至约10%的碱基、约1%至约20%的碱基、约1%至约30%的碱基、约1%至约40%的碱基、约1%至约50%的碱基、约1%至约60%的碱基、约1%至约70%的碱基、约1%至约80%的碱基、或约1%至约90%的碱基、或更多。如本文所述的第二链可以以与如本文针对DUX4靶向寡核苷酸所述相同的方式进行化学修饰。

[0065] 寡核苷酸可包含糖修饰。寡核苷酸可包含多个糖修饰。糖修饰可包括葡萄糖或其衍生物。糖修饰可包括核糖或脱氧核糖。糖修饰可包括单糖、二糖、三糖或其任何组合。

[0066] 在一些情况下,可以通过如本文所述的化学修饰来修饰核糖核苷酸或脱氧核苷酸,如形成DUX4靶向寡核苷酸的骨架的碱基组分、糖(核糖)组分、磷酸组分或其任何组合。

[0067] 寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含化学修饰。寡核苷酸可包含多个化学修饰。寡核苷酸可在寡核苷酸的一部分(如末端)内包含多个化学修饰。化学修饰可包括甲基、氟基、甲氧基乙基、乙基、酰胺基、酯基、多于一个这些基团中的任一种或其任何组合。化学

修饰可包括经化学修饰的核苷酸,如鸟苷、尿苷、腺苷、胸苷或胞嘧啶,包括已经以化学方式(例如通过乙酰化、甲基化、羟基化等)改变的任何天然存在或非天然存在的鸟苷、尿苷、腺苷、胸苷或胞苷,包括1-甲基-腺苷、1-甲基-鸟苷、1-甲基-肌苷、2,2-二甲基-鸟苷、2,6-二氨基嘌呤、2'-氨基-2'-脱氧腺苷、2'-氨基-2'-脱氧胞苷、2'-氨基-2'-脱氧鸟苷、2'-氨基-2'-脱氧尿苷、2-氨基-6-氯嘌呤核苷、2-氨基嘌呤核苷、2'-阿糖腺苷、2'-阿糖胞苷、2'-阿糖尿苷、2'-叠氮基-2'-脱氧腺苷、2'-叠氮基-2'-脱氧胞苷、2'-叠氮基-2'-脱氧鸟苷、2'-叠氮基-2'-脱氧尿苷、2-氯腺苷、2'-氟-2'-脱氧腺苷、2'-氟-2'-脱氧胞苷、2'-氟-2'-脱氧鸟苷、2'-氟-2'-脱氧尿苷、2'-氟胸苷、2-甲基-腺苷、2-甲基-鸟苷、2-甲基-硫代-N6-异戊烯基-腺苷、2'-O-甲基-2-氨基腺苷、2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷、2'-O-甲基-2'-脱氧胞苷、2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷、2'-O-甲基-2'-脱氧尿苷、2'-O-甲基-5-甲基尿苷、2'-O-甲基肌苷、2'-O-甲基假尿苷、2-硫胞苷、2-硫胞苷、3-甲基-胞苷、4-乙酰基-胞苷、4-硫尿苷、5-(羧基羟甲基)-尿苷、5,6-二氢尿苷、5-氨基烯丙基胞苷、5-氨基烯丙基-脱氧尿苷、5-溴尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-氯-阿糖-胞嘧啶、5-氟尿苷、5-碘尿苷、5-甲氧基羰基甲基-尿苷、5-甲氧基-尿苷、5-甲基-2-硫尿苷、6-氮杂胞苷、6-氮杂尿苷、6-氯-7-去氮杂-鸟苷、6-氯嘌呤核苷、6-巯基-鸟苷、6-甲基-巯基嘌呤-核苷、7-去氮杂-2'-脱氧-鸟苷、7-去氮杂腺苷、7-甲基-鸟苷、8-氮杂腺苷、8-溴-腺苷、8-溴-鸟苷、8-巯基-鸟苷、8-氧代鸟苷、苯并咪唑-核苷、β-D-甘露糖基-辫苷、二氢-尿苷、肌苷、N1-甲基腺苷、N6-([6-氨基己基]氨甲酰基甲基)-腺苷、N6-异戊烯基-腺苷、N6-甲基-腺苷、N7-甲基-黄苷、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、嘌呤霉素、辫苷、尿嘧啶-5-氧基乙酸、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、维布托辛(wybutoxosine)、黄苷、木-腺苷(xylo-adenosine)、或其任何组合。此类变体的制备是本领域技术人员已知的,例如根据美国专利US 4,373,071、US 4,401,796、US 4,415,732、US 4,458,066、US 4,500,707、US 4,668,777、US 4,973,679、US 5,047,524、US 5,132,418、US 5,153,319、US 5,262,530或US 5,700,642。

[0068] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如2-氨基-6-氯嘌呤核苷-5'-三磷酸酯、2-氨基嘌呤-核苷-5'-三磷酸酯、2-氨基腺苷-5'-三磷酸酯、2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸酯、2-硫胞苷-5'-三磷酸酯、2-硫尿苷-5'-三磷酸酯、2'-氟胸苷-5'-三磷酸酯、2'-O-甲基-肌苷-5'-三磷酸酯、4-硫尿苷-5'-三磷酸酯、5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸酯、5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸酯、5-溴胞苷-5'-三磷酸酯、5-溴尿苷-5'-三磷酸酯、5-溴-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-溴-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、5-碘胞苷-5'-三磷酸酯、5-碘-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-碘尿苷-5'-三磷酸酯、5-碘-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯、5-甲基尿苷-5'-三磷酸酯、5-丙炔基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-丙炔基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、6-氮杂胞苷-5'-三磷酸酯、6-氮杂尿苷-5'-三磷酸酯、6-氯嘌呤核苷-5'-三磷酸酯、7-去氮杂腺苷-5'-三磷酸酯、7-去氮杂鸟苷-5'-三磷酸酯、8-氮杂腺苷-5'-三磷酸酯、8-叠氮基腺苷-5'-三磷酸酯、苯并咪唑-核苷-5'-三磷酸酯、N1-甲基腺苷-5'-三磷酸酯、N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯、N6-甲基腺苷-5'-三磷酸酯、06-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯、假尿苷-5'-三磷酸酯、嘌呤霉素-5'-三磷酸酯、黄苷-5'-三磷酸酯、或其任何组合。

[0069] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫

代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮杂-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮杂-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、或其任何组合。

[0070] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰胞苷、5-甲酰胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-去氮杂-假异胞苷、1-甲基-1-去氮杂-假异胞苷、泽布拉林、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、或其任何组合。

[0071] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-去氮杂-腺嘌呤、7-去氮杂-8-氮杂-腺嘌呤、7-去氮杂-2-氨基嘌呤、7-去氮杂-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-去氮杂-2,6-二氨基嘌呤、7-去氮杂-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲基硫代-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酰基氨甲酰基腺苷、N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷、2-甲基硫代-N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲基硫代-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、或其任何组合。

[0072] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-去氮杂-鸟苷、7-去氮杂-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-去氮杂-鸟苷、6-硫代-7-去氮杂-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、或其任何组合。

[0073] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,如6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、α-硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、α-硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、5-甲基-尿苷、吡咯并-胞苷、肌苷、α-硫代-鸟苷、6-甲基-鸟苷、5-甲基-胞苷、8-氧代-鸟苷、7-去氮杂-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、假-异-胞苷、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、α-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、7-去氮杂-腺苷、或其任何组合。

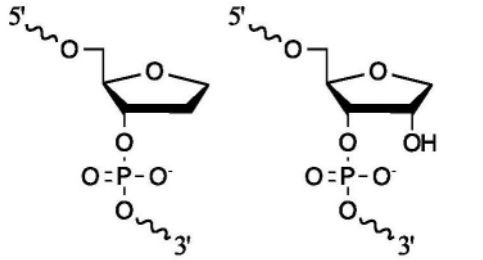
[0074] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含经化学修饰的核苷酸,其可在2'位置处被化学修饰。经化学修饰的寡核苷酸可包含在2'碳原子处的取代基,其中所述取代基可包含卤素、烷氧基、氢、芳氧基、氨基或氨基烷氧基,如2'-氢(2'-脱氧)、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-氟、2'-甲氧基乙基、2'-氟、锁核酸(LNA)或其任何组合。

[0075] 对寡核苷酸(如DUX4-targeting寡核苷酸)的另一化学修饰(如涉及核苷酸的2'位置的化学修饰)可以是锁核酸(LNA)核苷酸、乙烯桥接核酸(ENA)核苷酸、(S)约束乙基(cEt)

核苷酸、桥接核酸(BNA)或其任何组合。骨架修饰可以将经修饰的核苷酸的糖锁定为优选的northern构象。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸的靶序列中这种类型的修饰的存在可允许DUX4靶向寡核苷酸序列与靶位点更强且更快地结合。

[0076] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含至少一个经化学修饰的核苷酸,其中可掺入DUX4靶向寡核苷酸中的磷酸骨架可被修饰。所述骨架的一个或多个磷酸基团可例如通过用不同的取代基替代一个或多个氧原子来进行修饰。此外,经修饰的核苷酸可包括用如本文所述的经修饰的磷酸酯对未经修饰的磷酸部分的完全替代。经修饰的磷酸基团的例子可包括硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、硒代磷酸酯、硼磷酸酯(boranophosphate)、硼磷酸酯(borano phosphate ester)、膦酸氢酯、氨基磷酸酯(phosphoroamidate)、烷基膦酸酯、芳基膦酸酯或磷酸三酯。磷酸接头也可以通过用氮(桥接氨基磷酸酯)、硫(桥接硫代磷酸酯)和碳(桥接亚甲基-膦酸酯)替代连接氧来进行修饰。

[0077] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含糖修饰。所述糖修饰可以包括缀合物(如接头)。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含一个或多个接头基团。DUX4靶向寡核苷酸可以与抗体、蛋白质、脂质、适体、小分子、药物或其任何组合连接。接头可形成共价键。DUX4靶向寡核苷酸可经由接头与一个或多个寡核苷酸(如第二DUX4靶向寡核苷酸)连接。在一些情况下,接头可以是可切割接头。在一些情况下,接头可包含叠氮化物接头。DUX4靶向寡核苷酸可包含用聚糖糖基化的核苷酸的碱基。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含无碱基位点(如缺乏有机碱基的核苷酸)。在一些情况下,无碱基核苷酸可包含如本文所述的化学修饰(如在核糖的2'位置处)。在一些情况下,核糖的2'C原子可被诸如以下的取代基取代:卤素、烷氧基、氢、芳氧基、氨基或氨基烷氧基,在一些情况下来自2'-氢(2'-脱氧)、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基或2'-氟。在一些情况下,无碱基位点核苷酸可包含结构1A或1B:



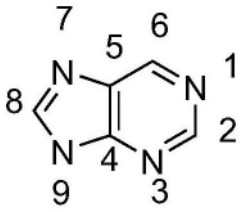
d间隔子 (1A) r间隔子 (1B)

[0078] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可通过添加“5'帽”结构进行修饰。5'帽可以是实体,如经修饰的核苷酸实体,其可以将成熟miRNA的5'端“加帽”。5'帽典型地可以由经修饰的核苷酸形成,特别是由鸟嘌呤核苷酸的衍生物形成。在一些情况下,5'帽可经由5'-5'-三磷酸连接与DUX4靶向寡核苷酸的5'末端连接。5'帽可以是甲基化的(例如m7GpppN),其中N可以是携带5'帽的核酸的末端5'核苷酸(如RNA的5'端)。5'帽结构可包括甘油基、反向脱氧无碱基残基(部分)、4',5'亚甲基核苷酸、1-(β-D-赤呋喃糖基)核苷酸、4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸、1,5-无水己糖醇核苷酸、L-核苷酸、α-核苷酸、经修饰的碱基核苷酸、苏-戊呋喃糖基核苷酸、无环3',4'-开环核苷酸、无环3,4-二羟基丁基核苷酸、无环3,5二羟基戊基核苷酸、3'-3'-反向核苷酸部分、3'-3'-反向无碱基部分、3'-2'-反向核苷酸部分、3'-2'-反向无碱基部分、1,4-丁二醇磷酸酯、3'-氨基磷酸酯、己基磷酸酯、氨基己

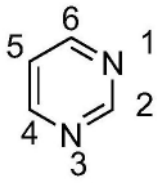
基磷酸酯、3'-磷酸酯、3'硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、或桥接或非桥接甲基膦酸酯部分。在一些情况下,经修饰的5'帽结构可包含CAP1(m7G的相邻核苷酸的核糖的甲基化)、CAP2(m7G下游的第二核苷酸的核糖的甲基化)、CAP3(m7G下游的第三核苷酸的核糖的甲基化)、CAP4(m7G下游的第四核苷酸的核糖的甲基化)、ARCA(抗反向帽类似物)、经修饰的ARCA(例如,经硫代磷酸酯修饰的ARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟-鸟苷、7-去氮杂-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷、或2-叠氮基-鸟苷。

[0079] 在一些情况下,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包括共价修饰,所述共价修饰可包括将甲基、羟甲基、碳原子、氧原子或其任何组合添加至核酸序列的一个或多个碱基。在一些情况下,共价修饰可包括改变与核酸序列相关的分子(如氧原子或其组合)的氧化态。共价修饰可在任何碱基处发生,如胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤或其任何组合。在一些情况下,表观遗传修饰可包括氧化或还原。核酸序列可包含一个或多个经表观遗传修饰的碱基。经表观遗传修饰的碱基可包括任何碱基,如胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤或鸟嘌呤。经表观遗传修饰的碱基可包括甲基化碱基、羟甲基化碱基、甲酰化碱基或含羧酸的碱基或其盐。经表观遗传修饰的碱基可包括5-甲基化碱基,如5-甲基化胞嘧啶(5-mC)。经表观遗传修饰的碱基可包括5-羟甲基化碱基,如5-羟甲基化胞嘧啶(5-hmC)。经表观遗传修饰的碱基可包括5-甲酰化碱基,如5-甲酰化胞嘧啶(5-fC)。经表观遗传修饰的碱基可包括5-羧化碱基或其盐,如5-羧化胞嘧啶(5-caC)。在一些情况下,经表观遗传修饰的碱基可包括甲基转移酶引导的经激活基团转移(mTAG)。

[0080] 经表观遗传修饰的碱基可包括嘌呤的一个或多个碱基(如结构1)或嘧啶的一个或多个碱基(如结构2)。表观遗传修饰可发生在一个或多个任何位置。例如,表观遗传修饰可发生在嘌呤的一个或多个位置,包括位置1、2、3、4、5、6、7、8、9,如结构1所示。在一些情况下,表观遗传修饰可发生在嘧啶的一个或多个位置,包括位置1、2、3、4、5、6,如结构2所示。



结构1



结构2

[0081] 核酸序列可包含经表观遗传修饰的碱基。核酸序列可包含多个经表观遗传修饰的碱基。核酸序列可包含位于CG位点、CpG岛或其组合内的经表观遗传修饰的碱基。核酸序列可包含不同的经表观遗传修饰的碱基,如甲基化碱基、羟甲基化碱基、甲酰化碱基、含羧酸的碱基或其盐、多种这些中的任一种或其任何组合。

[0082] 在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐在被化学修饰时可具有下式:引导模式1、引导模式2或引导模式3,如表1所示。

表1：化学修饰式	
模式	序列（5′-3′）
1	{N}*{N}*(n*)$_a${N}*{N}
2	{N}*{N}*(n*)$_b${N}*n*{N}*{N}
3	{N}*{N}*{N}*(n*)$_b${N}*{N}*{N}
4	{N}*{N}*n*{N}*(n*)$_c${N}*{N}*n*n*{N}*{N}
5	<N>*<N>*<N>*<N>*(n*)$_d$<N>*<N>*<N>*<N>
6	CAP-{N}*{N}*(n*)$_a${N}*{N}
7	CAP-{N}{N}(n*)$_e$n{N}{N}
8	CAP-{N}mp{N}(n*)$_e$n{N}mp{N}
9	CAP-{N}*{N}*{N}*(n*)$_b${N}*{N}*{N}
10	CAP-<N>*<N>*<N>*<N>*(n*)$_d$<N>*<N>*<N>*<N>

[0083] 如表4所示,N和n可以是任何天然或非天然核苷酸;{N}可以是LNA;[N]可以是BNA;<N>可以是2'-甲基氧基乙基修饰的尿嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶;*可以是经硫代磷酸酯修饰的骨架;mp可以是经甲基膦酸酯修饰的骨架;CAP可以是5'末端甲基(5'-O甲基)或烷基氨基,如氨基-碳6链(5'-氨基C6);a可以是10-26;b可以是8-24;c可以是4-20;d可以是5-22;e可以是9-25。

[0084] 在一些情况下,相对于天然碱基或糖,寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)可包含对DUX4靶向寡核苷酸的碱基或糖的化学修饰。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可包含多于一个化学修饰(如多个化学修饰)。DUX4靶向寡核苷酸的一部分碱基或一部分糖可包含一个或多个化学修饰。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸中约:10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的碱基或糖可被化学修饰。

[0085] 在一些情况下,可以工程化或修饰DUX4靶向寡核苷酸以增加对多个RNA序列中的一个RNA序列的特异性。可以修饰DUX4靶向寡核苷酸以显著增加对多个RNA序列中的一个RNA序列的特异性。可将增加的特异性与可能未被工程化的相当的寡核苷酸比较,或者可将增加的特异性与可能以不同方式工程化或修饰的相当的寡核苷酸比较。与相当的寡核苷酸相比,特异性可被增加至少约:2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。可以工程化或修饰DUX4靶向寡核苷酸以与第二RNA序列相比增加对第一RNA序列的特异性。

DUX4靶向寡核苷酸的研究与发现

[0086] 为了鉴定靶DUX4变体,可以使用基于Brutlag等人(Comp.App.Biosci.6:237-245(1990))的算法的FASTDB计算机程序来确定参考序列(查询序列,即,如本文所述的序列)与目标序列(subject sequence)之间的同一性,这也称为全局序列比对。在一些情况下,在FASTDB氨基酸比对中使用的用于狭义性解释同一性的特定方面的参数可包括:评分方案=PAM(接受突变百分比)0,k元组=2,错配罚分=1,联合罚分=20,随机化组长度=0,截止得分=1,窗口大小=序列长度,空位罚分=5,空位大小罚分=0.05,窗口大小=500或目标序列的长度(以较短者为准)。如果目标序列由于N末端或C末端缺失而不是由于内部缺失而短于查询序列,考虑到FASTDB程序在计算全局同一性百分比时不考虑目标序列的N末端和C末端截短,可以对结果进行手动校正。对于相对于查询序列在N末端和C末端截短的目标序列,可以通过以下方式来校正同一性百分比:将查询序列中位于目标序列N末端和C末端的侧面且与相应的目标残基不匹配/对齐的残基的数量计算为查询序列总碱基的百分比。确定残基是否匹配/对齐可以通过FASTDB序列比对的结果来确定。然后,可以从使用指定参数通过

FASTDB程序计算的同一性百分比减去此百分比,以得到最终同一性百分比得分。此最终同一性百分比得分可以用于此方面的目的。在一些情况下,出于手动调整同一性百分比得分的目的,仅考虑目标序列的N末端和C末端与查询序列不匹配/对齐的残基。也就是说,对于此手动校正,仅考虑在目标序列的最远N末端和C末端残基之外的查询残基位置。例如,可以将90个残基的目标序列与100个残基的查询序列比对,以确定同一性百分比。缺失发生在目标序列的N末端,因此,FASTDB比对不显示N末端的前10个残基的匹配/比对。10个未配对的残基占序列的10%(N末端和C末端处不匹配的残基数/查询序列中残基的总数),因此从通过FASTDB程序计算的同一性百分比得分减去10%。如果剩余的90个残基是完全匹配的,则最终同一性百分比将是90%。在另一个例子中,将90个残基的目标序列与100个残基的查询序列比较。这次缺失是内部缺失,因此目标序列的N末端或C末端没有与查询序列不匹配/对齐的残基。在这种情况下,不对通过FASTDB计算的同一性百分比进行手动校正。再一次,仅对目标序列的N末端和C末端之外(如FASTDB比对中所展示)与查询序列不匹配/对齐的残基位置进行手动校正。

[0087] 为了评价所有不同的OTN位置,在跨越DUX4基因chr4:190,173,774-190,185,942的参考序列中以1bp滑动产生大小为15bp、16bp、17bp、18bp、19bp和20bp的窗口。对于每个窗口,还报告参考的反向互补(反义)序列,因此其可直接用于OTN设计。使用Pysamstats v1.1.2工具https://github.com/alimanfoo/pysamstats将所有样品的RNA-Seq BAM文件合并到单个BAM文件中,并且使用自定义Python脚本来获得合并的BAM文件中每个基因组位置处的参考碱基频率和读取深度。平均覆盖度被定义为覆盖窗口的每个碱基的读段的平均数。计算每个OTN窗口的最小保守性得分,其表示具有最低保守性的碱基。使用最近邻模型用Primer3 v2.4.0R工具(39)以默认参数计算所得OTN/靶RNA双链体的平均解链温度(Tm)。基于SantaLucia 1998(40)和Owczarzy等人.2004(41)定义的不同的盐校正公式报告两个解链温度(TM)值。然后,针对研究中个体之间DUX4中平均覆盖度>50,最小保守性>85%,并且平均TM为45℃-65℃的长度为15-20bp的OTN和OTN结合位点,过滤此数据。以涵盖SEQ.ID.NO 1-2X,XXX的序列表文件提交所有所得OTN序列和配对的DUX4靶位点序列(全部以DNA形式表示)。将它们包括在本公开文本中,因为它们表示开发OTN以治疗DUX4介导的障碍的任何努力的宝贵资源。这些DUX4靶向寡核苷酸或其盐在经化学修饰时或未经化学修饰时可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中的任一个具有至少90%序列同一性。在某些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有至少约80%序列同一性。例如,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有至少约90%序列同一性。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有约80%至100%序列同一性。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有约85%至100%序列同一性。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的至少约10个连续碱基具有至少80%序列同一性。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的至少约10个连续碱基具有至少85%序列同一性。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸可与SEQ.ID.NO:41,923-42,115的中任一个或其任何组合具有至少约:70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0088] 另外,分析使得能够产生如表2所示的许多DUX4靶向寡核苷酸,其不具有化学修饰(SEQ.ID.NO:41,923-41,982)和具有化学修饰(SEQ.ID.No:41,983-42,115),都以DNA形式表示。关于如表2所示的经化学修饰的DUX4靶向寡核苷酸,{N}可以是LNA;[N]可以是BNA;(N)可以是2'-甲基氧基乙基修饰的尿嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶;*可以是经硫代磷酸酯修饰的骨架;mp可以是经甲基膦酸酯修饰的骨架;氨基C6-可以是5'氨基-碳6链。另外,如表2所示的某些DUX4靶向寡核苷酸能够与如表3所示的靶DUX4mRNA的多个子序列(也以xml文件提交)相互作用。此外,即使表中未展示,任何经化学修饰的寡核苷酸也可以用5'氨基-碳6链来合成且保留活性。仅在未经修饰的寡核苷酸序列旁边列出另外的靶向的RNA,它们对于相同序列的经化学修饰版本不作重复,但它们仍可被该序列靶向。

表2:与另外的疾病相关RNA杂交的DUX4靶向寡核苷酸

寡聚物	序列(5'-3')	SEQ ID NO:	另外的靶向的RNA SEQ ID No:
AS-DX-001	GCCATCGCGGGTAGCC	41923	
AS-DX-002	TGTCGGGAGGGCCATC	23534	42274;42482;42169;42566
AS-DX-003	TCCAAACGAGTCTCCG	41924	42885
AS-DX-004	GATTCTGAAACCAGAT	41925	42331; 42600
AS-DX-005	GCGGGCGCCCTGCCAC	41926	42178;42790;42711;42539;42406;42161;42507;42817;42196;42390;42563;42167;42504; 42426; 42464
AS-DX-006	TCATCCAGCAGCAGGC	41927	42694;42734;42493;42284;42481;42636;42352;42705;42147;42235;42775;42219;42752;42633;42758;42166;42559;42733;42651;42413;42581;42479;42827;42595;42365;42260;42230;42866;42144;42725;42143;42678;42362;42172;42206;42173;42884;42832;42141;42480;42590;42151;42168;42236;42321;42248;42586;42767;42485
AS-DX-007	TAGCCAGCCAGGTGTT	23789	42287;42359;42577;42157;42728;42856;42848;42443;42524; 42202
AS-DX-008	CAGCGTCGGAAGGTGG	23942	42154; 42244; 42676
AS-DX-009	TAGACAGCGTCGGAAG	23946	
AS-DX-010	ATAGGATCCACAGGGA	23981	42214;42806;42215;42432;42813; 42412; 42392; 42502
AS-DX-011	TCTATAGGATCCACAG	41928	42689
AS-DX-012	GCACTAATCATCCAGG	25364	42841; 42774; 42176; 42746
AS-DX-014	CAGCGTCGGAAGGTG	21509	42429;42210;42619;42617;42153; 42242; 42675
AS-DX-015	CCTAGACAGCGTCGGAAGGT	38051	
AS-DX-018	ATAGGATCCACAGGGAGG	30389	42760; 42492
AS-DX-019	CGGCTCTGGGATCCCCGG	41929	42310; 42826; 42744
AS-DX-020	GCAGTTCTCCGCGGAG	41930	42290;42707;42250;42343;42171; 42148
AS-DX-021	GGGGCGGAGACACGCCC	41931	42295; 42648; 42715; 42717

AS-DX-022	AGAAGGCAGGAATCCCAG	30245	42688;42687;42685;42686;42307;42592;42275;42584;42663; 42188
AS-DX-023	GCAGGAATCCCAGGCCGG	41932	42386; 42306; 42421
AS-DX-024	CTCCGCGGAGTGGAGT	41933	42289;42149;42878;42783;42661; 42423
AS-DX-025	GGAGTCTCTCACCGGGCC	41934	42308
AS-DX-026	AGAGGCCAGCGAGCTCCC	41935	42221;42329;42773;42197;42621
AS-DX-027	GGCTCTGGGATCCCCGGG	41936	42309;42454;42824;42743;42763
AS-DX-028	CAGAGAGGCCAGCGAGCT	30302	42811;42672;42330;42340;42175; 42371
AS-DX-029	GACAGCGTCGGAAGGTGG	30341	
AS-DX-030	GTAACTCTAATCCAGGTT	30365	
AS-DX-031	GACATTCAGCCAGAAT	23921	42401;42703;42770;42568;42508; 42328; 42450
AS-DX-032	ACAAGGGCACAGAGAGGC	30310	42868; 42254; 42194; 42554
AS-DX-033	GAGCTCCCTTGCACGTCA	41937	
AS-DX-034	CCGTCCAACCCCGCGTC	41938	
AS-DX-035	CCTAAAGCTCCTCCAGCA	30205	42253; 42302; 42536
AS-DX-036	GCGAGGCGGCCTCTTCCG	41939	42297
AS-DX-037	GCCTCCAGCTCCCCCGGG	41940	42296;42793;42472;42785;42348;42189;42673;42227;42203; 42851; 42198
AS-DX-038	GGTGTCGGGAGGGCCAT	41941	42483; 42589; 42394
AS-DX-039	GCCTCAGCTGGCGTGA	23626	42797;42666;42427;42357;42660; 42653; 42858; 42531
AS-DX-040	CTGGGCCAGCCGTTCTCT	41942	42370
AS-DX-041	GGGCCAGCCGTTCTCTGG	41943	42269
AS-DX-042	GCTCCGGAATGCCGAT	41944	42538; 42548
AS-DX-043	CAATTTCAGGCTTTTTCT	30435	
AS-DX-044	TGCCTACAGAAGGCTTTG	31124	
AS-DX-045	ATCTCTGCACTCATCACA	30402	42276
AS-DX-046	CTGATCACCGAAGTTCTG	41945	
AS-DX-048	CCAGGAGATGTAACTCTA	30368	42761; 42518
AS-DX-049	GAAAGAGAGGCCACCGCC	30221	42303
AS-DX-050	GTAGCCAGCCAGGTGTTC	41946	42304; 42579; 42778; 42490
AS-DX-051	GCCCCTCCGTAGCCAGCC	41947	42305; 42265; 42762; 42231
AS-DX-052	TGCTGTCCGAGGGTGTCG	30092	
AS-DX-053	AGGGGTGCTTCCAGCGAG	30179	42298; 42342
AS-DX-054	TTCTTCCTCGCTGAGGGG	30183	42299; 42894
AS-DX-055	CGGTATTCTTCCTCGCTG	30188	42300; 42789
AS-DX-056	TCCTCCAGCAGAGCCCGG	41948	42301;42588;42140;42842;42810; 42614
AS-DX-057	CCTGGGCCGGCTCTGGGA	41949	42311; 42540; 42545; 42513
AS-DX-058	TGCTGGTACCTGGGCCGG	41950	42312; 42350
AS-DX-059	TCTATAGGATCCACAGGG	30392	
AS-DX-060	GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT	41951	
AS-DX-061	TATCTTCTGAACTAATCATCCA	41952	
AS-DX-062	CAGGAGATGTAACTCTAATCCAG	41953	

AS-DX-063	CTCTCACCGGGCCTAGACCTAGAAG	41954	
AS-DX-064	TGCGCACTGCGCGCAGGTCTAGCCA	41955	
AS-DX-065	ACTGCGCGCAGGTCTAGCCAGGAAG	41956	
AS-DX-066	CGGGGTGCGCACTGCGCGCAGGTCT	41957	
AS-DX-067	TGCGCACTGCGCGCAGGTCTAGCCAG GAAG	41958	
AS-DX-068	ACTGCGCGCAGGTCTAGCCAGGAAGC GGGC	41959	
AS-DX-069	ACCCGACCCCGTCCCAACCCCGCGT	41960	
AS-DX-070	TGGGCTGGTGGAGAGGCAG	41961	42521;42185;42246;42313; 42765;42186;42658;42434; 42505;42501;42551;42478; 42320;42821;42585;42809; 42187;42745;42356;42456; 42247;42256;42615;42682; 42668;42451;42835;42557; 42662;42691;42537;42820; 42861;42876;42611;42634; 42748; 42530
AS-DX-071	TTCCTCTCTCCATCTCTGC	41962	
AS-DX-072	TTGTCCCGGAGGAAACCGC	41963	
AS-DX-073	AATCACGCCTCCGTCGTCC	41964	
AS-DX-074	TTCCCTGCATGTTTCCGGGTGCCCG	41965	
AS-DX-075	CTTCCCTGCATGTTTCCGG	41966	
AS-DX-076	TGTGGCTCTCGTTCATTTC	41967	
AS-DX-077	CTCCGTGGGAGTCTTGAGTGTGCCA	41968	
AS-DX-078	TGGAACTGAACCTCCGTGG	41969	
AS-DX-079	TGGTGGTGGTGGTGGTGGT	41970	
AS-DX-080	CACCCCTTCATGAATGGCGCC	41971	
AS-DX-081	ACAGGCTCCACCCCTTCATG	41972	
AS-DX-082	TTCCGCTCAAAGCAGGCCTC	41973	
AS-DX-083	AAAGCGATCCTTCTCAAAGGCTCGG	41974	
AS-DX-084	CCTGCGCGGGCGCCCTGCCGC	41975	
AS-DX-085	TATCTCTGAACTAATCATC	41976	
AS-DX-086	AGCGCCTGGCGGCGGAACGCAGACC	41977	
AS-DX-087	ATCTCTGCCCGCCTTCCCTCCCGCC	41978	
AS-DX-088	AAACCAGATCTGAATCCTGGAC	41979	
AS-DX-089	TTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTG	41980	
AS-DX-090	AGCGTCGGAAGGTGG	21508	42228;42428;42495;42332; 42462;42420;42152;42241; 42860; 42674
AS-DX-091	AGATCCCCTCTGCC	41981	
AS-DX-094	ACAGCGTCGGAAGGTG	23943	42620; 42618; 42677
AS-DX-095	GACAGCGTCGGAAGGT	23944	42596
AS-DX-096	AGACAGCGTCGGAAGG	23945	
AS-DX-097	CCTAGACAGCGTCGGAAGGTAG	41982	
AS-DX-098	CAGGAATCCCAGGCCG	41983	42875;42288;42460;42572; 42608;42833;42630;42437; 42262; 42598; 42338; 42323

AS-DX-099	CAGGAATCCCAGGCC	21371	42389;42874;42280;42207;42459;42318;42637;42327;42607;42533;42560;42251;42799;42881;42629;42436;42532;42337;42553;42739;42322; 42571; 42155
AS-DX-100	CGGCTCTGGGATCCCCGGGA	41984	42316
AS-DX-101	GGCTCTGGGATCCCCG	41985	42655;42291;42453;42425;42837;42681;42731;42679;42801;42823;42335;42603;42218;42825;42379;42604;42610; 42742; 42385; 42486
AS-DX-102	GGCTCTGGGATCCCC	41986	42654;42282;42520;42452;42836;42680;42730;42461;42510;42587;42800;42822;42334;42580;42602;42258;42529;42474;42270;42264;42351;42766;42764;42399;42377;42609;42622;42718;42484
AS-DX-104	TAGACAGCGTCGGAAGGTGG	38049	42732;42333;42245;42564;42339; 42419
AS-DX-105	GAGCTCCCTTGCACGTCAGC	41987	
AS-DX-106	AGCTCCCTTGCACGTC	23896	42447; 42830
AS-DX-107	GAGCTCCCTTGCACGT	23897	42448;42494;42180;42388;42150
AS-DX-108	GAGCTCCCTTGCACG	21469	42445;42782;42852;42867;42179;42387;42569;42525;42380; 42383
AS-DX-109	CGTAGCCAGCCAGGTGTTCC	41988	42314
AS-DX-111	TAGCCAGCCAGGTGT	21339	42565;42854;42279;42819;42528;42358;42719;42326;42818;42403;42576;42794;42628;42156;42407;42416;42727;42366;42798;42855;42871;42641;42325;42415;42888;42847;42164;42408;42142;42205;42638;42526;42442;42729;42523;42201;42575
AS-DX-112	CTTCTATAGGATCCACAGGG	38106	42594
AS-DX-113	ATGCCCAGGAAAGAATGGCA	41989	
AS-DX-114	CAAAGACAGACAGAGGTA	41990	42704;42768;42240;42163;42441
AS-DX-116	GTCCTAAAGCTCCTCCA	26770	42294;42623;42336;42803;42431; 42583; 42750
AS-DX-117	TCCTAAAGCTCCTCCAG	26769	42293;42162;42535;42780;42467;42430;42582;42183;42208
AS-DX-118	GGGATGCCTTGCATCTG	26720	42292;42578;42324;42349;42395
AS-DX-119	GAAACCAGATCTGAATC	41991	42368; 42547; 42400
AS-DX-120	GGGTCCAAACGAGTCTC	41992	42542; 42268; 42747

AS-DX-121	GCTGCAGAAACTCCGG	41993	42285;42519;42190;42723;42319; 42192; 42616
AS-DX-122	TGTTCCCCGCGAAAGA	23783	42286; 42220
AS-DX-123	GTGACATATCTCTGCA	23998	42807; 42804; 42409
AS-DX-124	CATATCTCTGCACTCA	23994	42740; 42229; 42889; 42652
AS-DX-125	GACATATCTCTGCACT	23996	42373; 42487; 42139
AS-DX-126	GGGGTCCAAACGAGTC	41994	42466;42541;42438;42165;42266; 42522
AS-DX-127	TACAGGGGATATTGTG	41995	42708; 42457; 42828
AS-DX-128	AGCAGGGCGGTCTGG	41996	42814;42211;42515;42701;42381;42422;42642;42497;42665;42839;42639;42859;42720;42831;42690;42433;42702; 42375; 42272; 42781
AS-DX-129	AGCTGCCCCGGCTTG	41997	42864;42517;42277;42791;42367;42751;42237;42612;42393;42439;42382;42862;42458;42887;42863;42573;42417;42396;42667;42543;42405;42613;42391;42722;42670; 42372; 42170
AS-DX-130	CCCAGGAAAGAAAGG	41998	42659;42815;42281;42212;42769;42374;42599;42354;42880;42632;42700;42200;42886;42656;42753;42857;42488;42759;42625;42273;42344; 42816; 42204
AS-DX-131	GGTGAGCCCCGGCCGG	41999	42754;42812;42402;42506;42222;42404;42471;42341;42145;42469;42850;42556;42883;42840;42756;42873;42195; 42893; 42671
AS-DX-132	GCAGACCAGGGCGCC	42000	42435;42278;42411;42792;42749;42591;42397;42737;42199;42721;42193;42347;42870;42346;42552;42424;42500;42364;42259;42146;42624;42779;42473;42263;42738;42360;42355;42626;42503;42414;42217;42475;42890;42605;42845;42555;42834;42440;42788;42376;42879;42697;42249;42786;42261; 42849

AS-DX-133	CCTGGGCCGGCTCTG	42001	42516;42699;42891;42664;42213;42283;42574;42239;42398;42713;42544;42838;42224;42511;42514;42477;42378;42877;42882;42706;42496;42561;42698;42449;42787;42635;42512;42191;42209;42363;42361;42683;42869;42692;42550;42892;42232
AS-DX-134	AGAAGGCAGGAATCCCAGGC	37973	42315
AS-DX-135	CGGGTGCCTGGCCCTTC	42002	42772;42795;42509;42796;42468;42865;42716;42606;42418
AS-DX-136	CCAGCTCCTCCCGGGC	42003	42724;42736;42696;42695;42177;42498;42712;42465;42225;42234;42646;42643;42345;42843;42741;42567;42714;42238;42872;42353;42784;42647;42649;42601;42223;42369;42755;42657;42562;42257;42463;42455;42627;42771;42645;42777;42846;42158;42226;42255;42243;42159;42776;42499;42593;42631;42644;42470;42735;42489;42233;42640;42597;42384;42491;42710;42669;42252;42527;42549;42267;42476;42684;42216;42174;42184;42853;42693;42271; 42709
AS-DX-137	TTGTGACATATCTCTGCA	30411	42808; 42805; 42410; 42844
AS-DX-138	CTCCCTTGCACGTCA	21466	42444;42160;42317;42726;42757
AS-DX-139	GCTCCCTTGCACGTCA	23895	42446; 42181; 42829; 42570
AS-DX-140	AGCTCCCTTGCACGTCA	26881	42182
AS-DX-141	CGAGCTCCCTTGCACGTCAG	42004	
AS-DX-142	AAGCGATCCTTCTCAA	42005	42650;42546;42534;42558;42802
AS-DX-001-1	{G}*{C}*c*a*t*c*g*c*g*g*g*t*a*g*{C}*{C}	42006	
AS-DX-001-2	氨基 C6-{G}*{C}*c*a*t*c*g*c*g*g*g*t*a*g*{C}*{C}	42007	
AS-DX-002-1	{T}*{G}*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a*{T}*{C}	42008	
AS-DX-002-2	氨基 C6-{T}{G}t*5mec*g*g*g*a*g*g*g*5mec*5mec*a{T}{C}	42009	
AS-DX-002-3	氨基 C6-{T}mp{G}t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a{T}mp{C}	42010	

AS-DX-002-4	氨基C6-[T]*[G]*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a*[T]*[C]	42011	
AS-DX-003-1	{T}*{C}*c*a*a*a*c*g*a*g*t*c*t*c*{C}*{G}	42012	
AS-DX-003-2	氨基C6-{T}*{C}*c*a*a*a*c*g*a*g*t*c*t*c*{C}*{G}	42013	
AS-DX-004-1	{G}*{A}*t*t*c*t*g*a*a*a*c*c*a*g*{A}*{T}	42014	
AS-DX-004-2	氨基C6-{G}*{A}*t*t*c*t*g*a*a*a*c*c*a*g*{A}*{T}	42015	
AS-DX-005-1	{G}*{C}*g*g*g*c*g*c*c*c*t*g*c*c*{A}*{C}	42016	
AS-DX-005-2	氨基C6-{G}*{C}*g*g*g*c*g*c*c*c*t*g*c*c*{A}*{C}	42017	
AS-DX-006-1	{T}*{C}*a*t*c*c*a*g*c*a*g*c*a*g*{G}*{C}	42018	
AS-DX-006-2	氨基C6-{T}*{C}*a*t*c*c*a*g*c*a*g*c*a*g*{G}*{C}	42019	
AS-DX-007-1	{T}*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}*{T}	42020	
AS-DX-007-2	氨基C6-{T}*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}*{T}	42021	
AS-DX-007-3	{T}*mA*{G}*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*{G}*mU*{T}	42022	
AS-DX-008-1	{C}*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g*t*{G}*{G}	42023	
AS-DX-008-2	氨基C6-{C}*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g*t*{G}*{G}	42024	
AS-DX-009-1	{T}*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*{A}*{G}	42025	
AS-DX-009-2	氨基C6-{T}*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*{A}*{G}	42026	
AS-DX-010-1	{A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G}*{A}	42027	
AS-DX-010-2	氨基C6-{A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G}*{A}	42028	
AS-DX-010-3	氨基C6-[A]*[T]*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*[G]*[A]	42029	
AS-DX-011-1	{T}*{C}*t*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*{A}*{G}	42030	
AS-DX-011-2	氨基C6-{T}*{C}*t*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*{A}*{G}	42031	
AS-DX-012-1	{G}*{C}*a*c*t*a*a*t*c*a*t*c*c*a*{G}*{G}	42032	
AS-DX-012-2	氨基C6-{G}*{C}*a*c*t*a*a*t*c*a*t*c*c*a*{G}*{G}	42033	

AS-DX-014-1	{C}*{A}*{G}*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G}*{T}*{G}	42034	
AS-DX-014-2	氨基C6-{C}*{A}*{G}*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G}*{T}*{G}	42035	
AS-DX-015-1	(C)*(C)*(T)*(A)*(G)*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*(A)*(A)*(G)*(G)*(T)	42036	
AS-DX-015-2	氨基C6-(C)*(C)*(T)*(A)*(G)*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*(A)*(A)*(G)*(G)*(T)	42037	
AS-DX-015-3	{C}*{C}*t*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*{G}*{A}*a*g*{G}*{T}	42038	
AS-DX-018-1	{A}*{T}*{A}*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*g*{A}*{G}*{G}	42039	
AS-DX-018-2	{A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G}*a*{G}*{G}	42040	
AS-DX-019-1	{C}*{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*{C}*{G}*{G}	42041	
AS-DX-021-1	{G}*{G}*{G}*g*c*g*g*a*g*a*c*a*c*g*{C}*{C}*{C}	42042	
AS-DX-022-1	{A}*{G}*{A}*a*g*g*c*a*g*g*a*a*t*c*c*{C}*{A}*{G}	42043	
AS-DX-023-1	{G}*{C}*{A}*g*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c*{C}*{G}*{G}	42044	
AS-DX-023-2	{G}*{C}*a*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c*c*mG*{G}	42045	
AS-DX-023-3	{G}*{C}*mA*g*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c*{C}*mG*{G}	42046	
AS-DX-025-1	{G}*{G}*{A}*g*t*c*t*c*t*c*a*c*c*g*g*{G}*{C}*{C}	42047	
AS-DX-026-1	{A}*{G}*{A}*g*g*c*c*a*g*c*g*a*g*c*t*{C}*{C}*{C}	42048	
AS-DX-027-1	{G}*{G}*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c*{G}*{G}*{G}	42049	
AS-DX-027-2	{G}*mG*c*{T}*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c*g*{G}*{G}	42050	
AS-DX-027-3	{G}*mG*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c*mG*mG*{G}	42051	
AS-DX-027-4	{G}{G}{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c*{G}{G}{G}	42052	
AS-DX-028-1	{C}*{A}*{G}*a*g*a*g*g*c*c*a*g*c*g*a*{G}*{C}*{T}	42053	
AS-DX-029-1	{G}*{A}*{C}*a*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g*{T}*{G}*{G}	42054	
AS-DX-029-2	氨基C6-{G}*{A}*{C}*a*g*5mec*g*t*5mec*g*g*a*a*g*g*{T}*{G}*{G}	42055	
AS-DX-030-1	{G}*{T}*{A}*a*c*t*c*t*a*a*t*c*c*a*g*{G}*{T}*{T}	42056	
AS-DX-031-1	{G}*mA*{C}*a*t*t*c*a*g*c*c*a*g*{A}*mA*{T}	42057	
AS-DX-032-1	{A}*{C}*{A}*a*g*g*g*c*a*c*a*g*a*g*a*{G}*{G}*{C}	42058	
AS-DX-033-1	{G}*{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*{C}*{A}	42059	
AS-DX-033-2	氨基C6-{G}*{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*5mec*g*{T}*{C}*{A}	42060	

AS-DX-033-3	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*mC*{A}	42061	
AS-DX-033-4	{G}*{A}*g*{C}*{T}*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*t*mC*{A}	42062	
AS-DX-034-1	{C}*{C}*{G}*t*c*c*a*a*c*c*c*c*g*c*{G}*{T}*{C}	42063	
AS-DX-035-1	{C}*{C}*{T}*a*a*a*g*c*t*c*c*t*c*c*a*{G}*{C}*{A}	42064	
AS-DX-036-1	{G}*{C}*{G}*a*g*g*c*g*g*c*c*t*c*t*t*{C}*{C}*{G}	42065	
AS-DX-037-1	{G}*{C}*{C}*t*c*c*a*g*c*t*c*c*c*c*c*{G}*{G}*{G}	42066	
AS-DX-038-1	{G}*{G}*{T}*g*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*{C}*{A}*{T}	42067	
AS-DX-040-1	{C}*{T}*{G}*g*g*c*c*a*g*c*c*g*t*t*c*{T}*{C}*{T}	42068	
AS-DX-041-1	{G}*{G}*{G}*c*c*a*g*c*c*g*t*t*c*t*c*{T}*{G}*{G}	42069	
AS-DX-043-1	{C}*{A}*a*t*t*t*c*a*g*g*c*t*t*t*{T}*t*{C}*{T}	42070	
AS-DX-044-1	{T}*{G}*{C}*c*t*a*c*a*g*a*a*g*g*c*t*{T}*{T}*{G}	42071	
AS-DX-045-1	{A}*{T}*c*t*c*t*g*c*a*c*t*c*a*t*{C}*a*{C}*{A}	42072	
AS-DX-045-2	{A}*mU*{C}*t*c*t*g*c*a*c*t*c*a*t*c*{A}*mC*{A}	42073	
AS-DX-046-1	{C}*{T}*g*a*t*c*a*c*c*g*a*a*g*t*{T}*c*{T}*{G}	42074	
AS-DX-048-1	{C}*{C}*a*g*g*a*g*a*t*g*t*a*a*c*{T}*c*{T}*{A}	42075	
AS-DX-049-1	{G}*{A}*{A}*a*g*a*g*a*g*g*c*c*a*c*c*{G}*{C}*{C}	42076	
AS-DX-050-1	{G}*{T}*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}*{T}*{C}	42077	
AS-DX-050-2	{G}*mU*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*mU*{T}*{C}	42078	
AS-DX-050-3	{G}*mU*a*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*mG*t*{T}*{C}	42079	
AS-DX-050-4	{G}{T}{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}{T}{C}	42080	
AS-DX-051-1	{G}*{C}*{C}*c*c*t*c*c*g*t*a*g*c*c*a*{G}*{C}*{C}	42081	
AS-DX-052-1	{T}*{G}*{C}*t*g*t*c*c*g*a*g*g*g*t*g*{T}*{C}*{G}	42082	
AS-DX-053-1	{A}*{G}*{G}*g*g*t*g*c*t*t*c*c*a*g*c*{G}*{A}*{G}	42083	
AS-DX-054-1	{T}*{T}*{C}*t*t*c*c*t*c*g*c*t*g*a*g*{G}*{G}*{G}	42084	
AS-DX-055-1	{C}*{G}*{G}*t*a*t*t*c*t*t*c*c*t*c*g*{C}*{T}*{G}	42085	
AS-DX-056-1	{T}*{C}*{C}*t*c*c*a*g*c*a*g*a*g*c*c*{C}*{G}*{G}	42086	
AS-DX-057-1	{C}*{C}*{T}*g*g*g*c*c*g*g*c*t*c*t*g*{G}*{G}*{A}	42087	
AS-DX-058-1	{T}*{G}*{C}*t*g*g*t*a*c*c*t*g*g*g*c*{C}*{G}*{G}	42088	
AS-DX-059-1	{T}*{C}*{T}*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*{G}*{G}*{G}	42089	

AS-DX-059-2	{T}*{C}*t*{A}*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*{G}*{G}	42090	
AS-DX-059-3	[氨基C6-]{T}*{C}*{T}*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*{G}*{G}*{G}	42091	
AS-DX-094-1	{A}*mC*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G}*mU*{G}	42092	
AS-DX-098-1	{C}*mA*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*{C}*mC*{G}	42093	
AS-DX-099-1	{C}*mA*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*{G}*mC*{C}	42094	
AS-DX-100-1	{C}*mG*g*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*{C}*{C}*g*g*{G}*{A}	42095	
AS-DX-101-1	{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*mC*mC*{G}	42096	
AS-DX-102-1	{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*mC*mC*{C}	42097	
AS-DX-104-1	{T}{A}*g*{A}*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*a*{G}*{G}*t*{G}*{G}	42098	
AS-DX-105-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*{C}*a*{G}*{C}	42099	
AS-DX-106-1	{A}*mG*{C}*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*{G}*mU*{C}	42100	
AS-DX-106-2	{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*{C}	42101	
AS-DX-107-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*{C}*mG*{T}	42102	
AS-DX-108-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*{A}*mC*{G}	42103	
AS-DX-109-1	{C}*{G}*t*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*{T}*mG*t*t*{C}*{C}	42104	
AS-DX-111-1	{T}*mA*{G}*c*c*a*g*c*c*a*g*g*{T}*mG*{T}	42105	
AS-DX-112-1	{C}*{T}*t*c*{T}*{A}*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*{G}*{G}*{G}	42106	
AS-DX-112-2	(T)*(T)*(C)*(T)*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*(G)*(G)*(G)*(C)	42107	
AS-DX-113-1	{A}*{T}*g*c*c*c*a*g*g*a*a*a*g*a*{A}*mU*g*g*{C}*{A}	42108	
AS-DX-114-1	{C}*mA*{A}*a*g*a*c*a*g*a*c*a*g*a*{G}*G*{T}*{A}	42109	
AS-DX-116-1	{G}*mU*c*{C}*t*a*a*a*g*c*t*c*c*t*mC*{C}*{A}	42110	
AS-DX-117-1	t*{C}*c*t*a*a*a*g*c*t*c*c*t*c*{C}*mA*{G}	42111	
AS-DX-118-1	{G}*{G}*g*{A}*{T}*g*c*c*t*t*g*c*a*t*c*{T}*{G}	42112	
AS-DX-119-1	{G}*{A}*{A}*a*c*c*a*g*a*t*c*t*g*{A}*a*{T}*{C}	42113	
AS-DX-120-1	{G}*{G}*{G}*t*c*c*a*a*a*c*g*a*g*{T}*c*{T}*{C}	42114	
AS-DX-121-1	{G}*mC*{T}*g*c*a*g*a*a*a*c*t*c*{C}*mG*{G}	42115	
AS-DX-122-1	{T}*mG*{T}*t*c*c*c*c*g*c*g*a*a*{A}*{G}*{A}	42116	
AS-DX-123-1	{G}*{T}*{G}*a*c*a*t*a*t*c*t*c*t*{G}*{C}*{A}	42117	
AS-DX-124-1	{C}*{A}*mU*a*t*c*t*c*t*g*c*a*c*mU*{C}*{A}	42118	

AS-DX-125-1	{G}*{A}*c*a*t*a*t*c*t*c*t*g*{C}*a*{C}*{T}	42119	
AS-DX-126-1	{G}*{G}*{G}*g*t*c*c*a*a*a*c*g*a*mG*{T}*{C}	42120	
AS-DX-127-1	{T}*mA*{C}*a*g*g*g*g*a*t*a*t*t*{G}*mU*{G}	42121	
AS-DX-128-1	{A}*mG*mC*a*g*g*g*c*g*g*t*c*mU*mG*{G}	42122	
AS-DX-129-1	{A}*mG*{C}*t*g*c*c*c*c*g*g*c*t*mU*{G}	42123	
AS-DX-130-1	{C}*mC*{C}*a*g*g*a*a*a*g*a*a*{A}*mG*{G}	42124	
AS-DX-131-1	{G}*{G}*mU*g*a*g*c*c*c*c*g*g*c*c*{G}*{G}	42125	
AS-DX-132-1	{G}*{C}*a*g*a*c*c*a*g*g*g*c*g*{C}*{C}	42126	
AS-DX-133-1	{C}*{C}*mU*g*g*g*c*c*g*g*c*t*{C}*mU*{G}	42127	
AS-DX-133-2	{C}*{C}*t*g*g*g*c*c*g*g*c*t*c*{T}*{G}	42128	
AS-DX-134-1	(A)*(G)*(A)*(A)*g*g*c*a*g*g*a*a*t*c*c*c*(A)*(G)*(G)*(C)	42129	
AS-DX-134-2	{A}*{G}*{A}*a*g*g*c*a*g*g*a*a*t*c*c*c*mA*{G}*mG*{C}	42130	
AS-DX-135-1	{C}*{G}*g*g*t*g*c*c*t*g*g*c*c*mC*t*{T}*{C}	42131	
AS-DX-136-1	{C}*{C}*a*g*c*t*c*c*t*c*c*c*g*g*mG*{C}	42132	
AS-DX-137-1	{T}*{T}*g*t*g*a*c*a*t*a*t*c*t*c*t*{G}*mC*{A}	42133	
AS-DX-138-1	{C}*mU*{C}*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*mC*{A}	42134	
AS-DX-139-1	{G}*mC{T}*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*mC*{A}	42135	
AS-DX-140-1	{A}*{G}*c*{T}*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*mC*{A}	42136	
AS-DX-141-1	(C)*(G)*(A)*(G)*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*(T)*(C)*(A)*(G)	42137	
AS-DX-142-1	{A}*mA*{G}*c*g*a*t*c*c*t*t*c*t*{C}*mA*{A}	42138	

[0089] 在表2的最右列中是与列出的DUX4靶向寡核苷酸部分互补但源自不同遗传基因座的RNA。使用GGGenome(https://gggenome.dbcls.jp/)的修改脚本,其允许将我们的寡核苷酸序列与人转录组进行快速比对(Human RNA Refseq release 205,2021年3月)。此脚本鉴定所有如下转录物:与靶向DUX4的每种可能的寡核苷酸部分互补,含有不多于4个错配、凸起、插入或缺失,含有长至少7个连续碱基的两个互补区域或长至少10个连续碱基的一个区域。这些相互作用还可以具有约40℃至约65℃的预测TM。

[0090] 为了解还有哪些其他转录物可能与FSHD相关并对目标有益,组建10项研究的数据库,所述研究对于样品处理、通过微阵列和RNAseq进行转录组分析以及重要的患者信息具有严格的标准。在公开的数据集中或使用自有RNA-seq分析鉴定通常在FSHD肌肉中相比于对照肌肉上调的基因。有趣的是,所述聚类与临床严重程度得分(即,轻度、中度或重度疾病)基本符合。支持我们的分析,从来自更大元分析中包括的样品子集的类似分析获得类似的结果,如图11所示。通过此分析,创建FSHD中上调基因的数据库,每个基因附带这种失调的支持证据以及任何相关的临床相关性。通过此数据库,接下来利用GO途径分析进行途径

富集分析(12)。主要的上调途径包括炎症反应和其他免疫调节途径、细胞增殖、细胞周期调节。

另外的靶向的RNA表示上调的或以其他方式与疾病相关的转录物,并且除了DUX4还可能有益于敲减。

[0091] 此外,另外的基因的许多mRNA子序列与FSHD相关。例如,预测AS-DX-007(SEQ.ID.NO.23,789)靶向与FSHD相关的三个共同靶标,例如DBET、MKI67和IRF5。DBET是与D4Z4重复序列的开放和DUX4的表达相关的非编码RNA(38)。MKI67编码Ki-67蛋白,其在FSHD肌肉组织中上调,并可能参与肌纤维细胞增殖和损伤的DUX4诱导(图12A)。IRF5(干扰素调节因子5)编码通过几种炎症信号上调的转录因子,并导致几种细胞因子(如TNF)的表达和细胞内干扰素反应的诱导(图12B)。这些基因(包括DUX4本身的那些)的mRNA的转录物内的靶子序列提供于本文表3中,如以RNA形式所示。

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
A4GNT	1	AGTGCAGGATATGTT	42116	LINC00661	1	CAGCCGGGGCAGCA	42494
ABCA7	1	CCTGGCTCTGCTGGAGGA	42117	LINC01275	1	TACAGTCACATCTCCTGG	42495
ABCB1	1	TCCTCCTGCTGGATGA	42118	LINC01602	1	CCGGAGTTTCTGCC	42496
ABCB9	1	ACCCCTGGCTGGCA	42119	LINC01605	1	GGGGATCCCATAACC	42497
ABCB9	2	GCCTGCTGCTGGGA	42120	LINC01615	1	CTGCCTCTCCTCCATCCAA	42498
ABCD2	1	GCCTTGCTGGATGA	42121	LINC02391	1	GCCTGTTTGGACCCC	42499
ABHD15	1	CCCGCCGGGGCTCTCC	42122	LINC02725	1	ACACCTGGCTCCTA	42500
ABHD2	1	GGAGCCTGGTCTGC	42123	LINC02725	2	AACACCTGGCTCCTA	42501
ABTB1	1	GCCCTGCTGGATGA	42124	LINC02802	1	GGGGCAAGGGAGCTC	42502
ACE	1	CACCGCGGAGAATGC	42125	LINC02904	1	AACCTGGCTGGCTT	42503
ACOT6	1	ACTGACTCCGCGGAG	42126	LINGO3	1	GCGCTGGAGGAGCTGG	42504
ACOXL	1	ACATGAAGGGAGCTC	42127	LMF1	1	CCACCTGGCTGGCAA	42505
ACP3	1	GGCTGCTGCTGGATGA	42128	LMX1A	1	AGGGATCCCAGAGTC	42506
ACTL10	1	CCACCTTCCGACT	42129	LOC100507403	1	CTCCCTCTCCACCCCCA	42507
ACTL10	2	CACCTTCCGACTG	42130	LOC101927533	1	TCAGCAGCTGAGGC	42508
ACTL10	3	CCACCTTCCGACTG	42131	LOXL2	1	GGCCTGGGATTCG	42509
ADAM28	1	AGCCTGGGATTACTG	42132	LPIN2	1	GGCCTGGGATCCCTC	42510
ADAM32	1	ACACCTGGCTTCTA	42133	LPIN2	2	TTGAGAAGGATGCTT	42511
ADAM32	2	AACACCTGGCTTCTA	42134	LRP10	1	CAGGAGGAGCTTTAGGG	42512
ADAMTS12	1	GCCCAGAGGAGCTGG	42135	LRP10	2	TCAGGAGGAGCTTTAGG	42513
ADAMTS8	1	GCGCGGGAGGAGCGGG	42136	LRRC8A	1	CTGCCTCTCCACGCACA	42514

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
ADAMTSL3	1	TGACGTGCAAGCGG	42137	LRRN2	1	CTCGGCATTCCGAAGC	42515
ADCY3	1	GCGGCCGGGCGCCCGC	42138	LRRN2	2	GGGGAGGGCGCCCGC	42516
ADGRA1	1	CTGGAGGAGCTTCAGA	42139	LRRN4	1	TCCCAGACCCGCCCAGG	42517
ADGRA2	1	GACCTCTGCTGTCTTTG	42140	LUZP1	1	GACTGTTTGGACCCA	42518
ADGRD1	1	ACACCTGGCTGCTG	42141	LUZP1	2	GTGACTGTTTGGACCC	42519
ADGRD1	2	GCCTCTTTGGACCCC	42142	LYPD1	1	CAGCCGGGGCAGCC	42520
ADGRE5	1	GCCTTCTGCTGGATGA	42143	LZTS1	1	CAGGCCGGCCCAGA	42521
ADGRL3	1	GCGGCCGGGCGCCCGC	42144	LZTS1	2	TCCCAGGCCGGCCCAGA	42522
ADGRL3	2	GGCTGCTGCTGGAGA	42145	MAB21L4	1	TTGAGAAGGATCCTC	42523
AFAP1L2	1	GAGGCCCTCCCGGCA	42146	MAFB	1	TATTCAGACTGGTTTC	42524
AFF3	1	CAAGCCGGGGAGCG	42147	MAN1C1	1	AACGCATTCCGGAGC	42525
AFF3	2	CCCGCGGAGAACGC	42148	MANSC4	1	GCCCGGGAGGAGCGG	42526
AJUBA	1	GCCTGCTGCTGGACGG	42149	MAP3K12	1	CTGGGCCGGCCCAGG	42527
ALPP	1	GCTGCTGCTGGAGA	42150	MAP3K12	2	CTGGCTCCACCAGCCCA	42528
ANGPTL6	1	GCCCGGGAGGCGCGGG	42151	MAP3K8	1	GGCGCCCTGGTTCC	42529
ANKRD50	1	CGCTCGTGGCCTCTCTG	42152	MAP3K8	2	TGCCTGGGATTCTG	42530
ANKS1B	1	CCTGATGATTAGTGA	42153	MARCHF4	1	TCCTTCTGTGCCCTTGT	42531
ANKS3	1	GCGGGGAGGAGCTGG	42154	MAST3	1	CGCGCCCTGGTCGGC	42532
ANKS3	2	CTGGAGGGCGCCCGC	42155	MAST3	2	CCGGCCGGGGCCGCC	42533
ANTXR2	1	AGTGCAAGGGACTC	42156	MAST3	3	CAGCCTCTCCCCCAGCCCC	42534
ANTXR2	1	AGTGCAAGGGACTC	42157	MAST4	1	TTGAGAAGGATGCTA	42535
ANXA4	1	TGACGTGCAAGAGC	42158	MBD2	1	TCCTGCTGGTGGATGA	42536
ANXA4	2	TGACGTGCAAGAGCT	42159	MCEMP1	1	GGCTGGGATTCCG	42537
APLP1	1	CTGGAGGAGCGTAGGA	42160	MCTP1	1	CAGAGCCGGCGCGG	42538
ARAP1	1	GCCCCGGAGGAGCTGC	42161	MEFV	1	ACCCTGGAGGAGCTGG	42539
ARHGEF34P	1	GTGCTCTCACCAGCCCA	42162	MEG3	1	GGGGCAGGGCGCCCAC	42540
ARHGEF35	1	ATGCTCTCACCAGCCCA	42163	MEG3	2	CCACCTTCCGAGCCTCCA	42541
ARHGEF	1	GTGCTCTCACCA	42164	MEGF11	1	ACTCCTGGCTG	42542

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
5		GCCCA				GCTG	
ARID3C	1	TTTGGATTCCTGCCTTCT	42165	MEGF11	2	GATGGCCCTCCCTAA	42543
ARL5C	1	CCCGGGGGAGCGGAGC	42166	MFHAS1	1	GCCCTGGAGGAGCTGG	42544
ARSJ	1	CCGGAGTTTCTGCGGA	42167	MGAM	1	TTTCTGCTGAATGTC	42545
ASAP1	1	CAGAGCCGGCAAGG	42168	MGAT1	1	CGGGCAAGGGAGCC	42546
ASB7	1	CTGGAGTTTCTGCAC	42169	MGAT1	2	TGCGGGCAAGGGAGC	42547
ASCL5	1	GGCGCCCTGGCTGA	42170	MICALL2	1	GGCCTGGGATTCTC	42548
ASF1B	1	CCCTCTCTGTGCCCTGGT	42171	MICALL2	2	CGGCCTGGGAGCCTG	42549
ASIC2	1	CCGGCCGGGGCCGCC	42172	MINK1	1	CAAGACGGGGCAGCT	42550
ASIC2	2	GGGCGGGCGCCCGC	42173	MIR9-3HG	1	CAGCGCCGGCCCAGC	42551
ASIC2	3	GGGAGCTGCTGGCCCT	42174	MIS18A	1	ACACCTGGCTGGTTC	42552
ATG16L2	1	CTCAGGGGAGCTGGAGGC	42175	MKI67	1	AGACCTGGCTGGCTT	42553
ATL3	1	GGGGCCTGGTCTGC	42176	MKI67	2	AAGACCTGGCTGGCTT	42554
ATP2A3	1	GCTTCTTTCCTGGG	42177	MKI67	3	CAGTTGAAGGCATCCC	42555
ATP8A2	1	ACACCTGGCTGCTA	42178	MKI67	4	GAAGACCTGGCTGGCTTC	42556
ATP8A2	2	CACACCTGGCTGCTA	42179	MMEL1	1	AGGGATCCCAGAGGC	42557
ATP8B2	1	CCCGGGGGAGCGGGGC	42180	MMEL1	2	GCTGCTGCTGGTGA	42558
ATXN7L1	1	CCTTTCTGTCCTGGG	42181	MMRN2	1	CTGGAGGAGCTTTAA	42559
B3GNT3	1	ACCCTGGCTGGCCA	42182	MMRN2	2	TGGAGGAGCTTTAAC	42560
B3GNT3	2	TCCTGCTGCTGGTGA	42183	MRTFA	1	CTGGGATTCCTGCTTGT	42561
BARX1	1	GGCCTGGGATGCCCG	42184	MST1R	1	CTGCCTCTTCTCAGCCCA	42562
BCAS4	1	CTGGAGGAGCATTAGA	42185	MTUS2	1	GCCTGCTGCTGATTA	42563
BCL11A	1	CAGGCCGGCCCAGC	42186	MUC16	1	GGGGATCCCACAGTC	42564
BOC	1	CACCTTCCGAACTG	42187	MX1	1	CAGGGATCTGCTGGAGGA	42565
BTG3-AS1	1	GCAGCCGCCCTGCT	42188	MYEOV	1	ATGGCCCTCCCAACC	42566
C1orf52	1	TCTCTCTTTCCTGGG	42189	MYH10	1	GCGCTGCTGGATGA	42567
C2CD4D-AS1	1	CGGCGCCGGCCCAGG	42190	MYO1F	1	GGGCCCTGGTCTTC	42568
C2CD4D-AS1	2	TCCCTGTGGATTCTCT	42191	MYO1F	2	CTGGGATACTGCCTTCT	42569

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
C9orf47	1	TCCCTGTGGATTCAT	42192	MYO3A	1	GCCCGGGAGGGGTGG	42570
CA9	1	GCCCGGGAGGCCTGG	42193	MYOCD	1	CCCTGGGTTCCTATAGAAG	42571
CACNA1I	1	GGCGCCCGGGTCTGC	42194	NCCRP1	1	GCTGCTGCTGGAGGA	42572
CADPS2	1	CGGGGATCCCCGAGCA	42195	NCOA7	1	ACCTTCCGACACTTC	42573
CALHM3	1	GCCTGCTGCTGGCTGC	42196	NDN	1	GCCCGAGGAGCTGG	42574
CAMK1D	1	TCTTTCGCGGGGAAGA	42197	NDOR1	1	CGGCCTGGGAGTCTG	42575
CAPN5	1	GGGAGCTGCTGGCCTCA	42198	NEAT1	1	CCCTCCTTTCCTGGG	42576
CBLB	1	CCAGCCGGGGCTCCCC	42199	NEK11	1	ATCTGGTTTCAGAC	42577
CCDC115	1	GACCTGGAGGAGCTGG	42200	NEUROG2	1	GCCCGGGAGGAGCCAG	42578
CCDC160	1	CGGAGCCGGCCCGG	42201	NFATC2	1	GGGGTCCCAGAGCC	42579
CCDC185	1	GCCCCGGAGGAGCTGG	42202	NFATC2	2	AGGGGTCCCAGAGCC	42580
CCDC88C	1	GCTCCGGAGGAGCTGG	42203	NHS	1	CGGGGATCCCGGAGGC	42581
CCDC88C	2	TCCGGAGGAGCTGGAGGC	42204	NIBAN2	1	GGCACCCTGGTCTGT	42582
CCNJL	1	CCACCTTCCGAGCC	42205	NINL	1	GGAGGGCCAGCACCCG	42583
CD101	1	TGAGTGCAGAGTATC	42206	NIPAL4	1	GGCCTGGCATTCCTG	42584
CD93	1	TCCGGCTGCTGGATGA	42207	NIPAL4	2	GGGCCTGGCATTCCTG	42585
CDC14B	1	GGCTGGCTCAGAGGGGC	42208	NLRC5	1	GGGGATCCCACAGCC	42586
CDCA2	1	CAAGCCGGCCCAGC	42209	NLRC5	2	GGGGGATCCCACAGCC	42587
CDK5R2	1	GCCCGGGCGAGCTGG	42210	NOD2	1	CTGCCTCCCACCAGTCTA	42588
CELSR3	1	GCCAGGAGGAGCTGG	42211	NOL4L	1	CAACGGGGCAGCT	42589
CELSR3	2	GTCTGCTGCTGGATGG	42212	NOLC1	1	GAAGCGGGGCAGCT	42590
CENATAC-DT	1	GCCTGCTGCTGATGC	42213	NOS3	1	CAGGGCTCTGCTGGAGCA	42591
CEP170B	1	CAAGCCGGGGACT	42214	NOS3	2	CTGCCTCTGCTCCAGCCCC	42592
CEP170B	2	GCCCGGGAGGAGCAGA	42215	NOTCH3	1	CCGACTTTCTGCAGC	42593
CFAP157	1	GAGAGCCGGCCCAGC	42216	NPIPA7	1	CACCTTCCGAGTG	42594
CFAP300	1	TACCTCTTCTGTCTTTA	42217	NPIPA7	2	CACCTTCCGAGTGT	42595
CHD5	1	CCACCTTCCGAAGCT	42218	NPIPA8	1	CACCTTCCGAGTG	42596
CHD5	2	CACCTTCCGAA	42219	NPIPA8	2	CACCTTCCGAG	42597

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
		GCTC				TGT	
CHD5	3	GCCCGGGAGGGGTGG	42220	NRP2	1	GGGAGCTGTGGCCTCT	42598
CHD5	4	CCACCTTCCGAAGCTC	42221	NTRK3	1	GTGAATCCCAGAGCC	42599
CHD5	5	CCACCTTCCGAAGCTCCTG	42222	NUPR2	1	AGGAGGAGCTTTACGAC	42600
CHP1P2	1	CTCCTGTCCACCAGCCCT	42223	NYNRIN	1	GGGGCCCTGGTCTGG	42601
CHRNB4	1	CTGCCTCTCCATCACCA	42224	NYNRIN	2	GCTTTCTTTCCTGGT	42602
CHST11	1	GCCTGCTGCTGGGTA	42225	OAS3	1	GGCGCCCTGGCCGC	42603
CHST15	1	GGCTCCTGGTCTGC	42226	ODAD1	1	GCGGGAGGAGCTGG	42604
CHST8	1	CGCCGCGGAGAACCGC	42227	OR13J1	1	ACACCTGGCTGTA	42605
CIITA	1	GGCTGGGATTCCTA	42228	OS9	1	GGCCTGGGATCCCTG	42606
CLIP2	1	GCCCAGGAGGAGCTGG	42229	OS9	2	GGGCCTGGGATCCCTG	42607
CMAHP	1	TGCTGGAGGAGCATCAGG	42230	OSBPL5	1	GTCCAGGAGGAGCTGG	42608
CNDP2	1	CCCTCTCTGAGCCCTTGT	42231	OSBPL8	1	CCGTTCTTTCCTGGA	42609
CNKSR3	1	GACCTGGAGGAGCTGG	42232	OTOG	1	GCCTGCTGCTGGGA	42610
CNTNAP1	1	CTGCCTCTCCCCCATCCTA	42233	P2RX1	1	CCACCCCTCCACCAGCCCA	42611
CNTROB	1	GCCCTGGAGGAGCTGT	42234	P3H1	1	CAGCCCGGCCCAGG	42612
COL12A1	1	GGGGATCCCAGAACA	42235	PABPC1L	1	GCATGCTGCTGGAGA	42613
COL23A1	1	GGCGCCCTGGACGC	42236	PAK3	1	GGCCTGGGATTTG	42614
COL23A1	2	GCCTGCTGCTGGGTGT	42237	PALS2	1	ACACCTGGCTGCTG	42615
COL4A1	1	GGGCCCTGGTCTTC	42238	PAPPA	1	CCAGACCGCCCGGT	42616
COL4A1	2	CTCCTGGGATTCCTG	42239	PAQR5	1	GCCCGGGAGGAGTGT	42617
COL5A3	1	GCCTCCCTGGTCTGC	42240	PAQR8	1	TCACCTGGCTGGCTG	42618
COL5A3	2	TGGGATCCCAGGGCC	42241	PATL2	1	CCACCGCCCTGCT	42619
COL5A3	3	GGCTGGCGAGGAGGGGC	42242	PCDHA2	1	GACCGGGAGGAGCTGT	42620
COL6A3	1	AACTCGTTTGGACCCT	42243	PCDHA4	1	GACCGGGAGGAGCTGT	42621
COL6A3	2	GACCAGGAGGAGCTGG	42244	PCDHA5	1	GACCGGGAGGAGCTGT	42622
COL6A3	3	GAACTCGTTTGGACCC	42245	PCDHB2	1	GACCGGGAGGAGCTGT	42623
COL6A5	1	CCAGAGAACGGTGGCAC	42246	PCDHB6	1	GACCGGGAGGAGCTGT	42624

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
COL8A1	1	TGGGATCCCAGGCC	42247	PCDHB6	2	TGGCGGGTCTCCGCCCC	42625
CORO1A	1	GCCAGGGAGGAGCTGG	42248	PCDHGA5	1	GCCGGAGGAGCTGG	42626
CPNE4	1	CCAGACCGCCGGCT	42249	PCED1B-AS1	1	GTGGAAGGATCGCTT	42627
CPNE9	1	CCCTCTTTCCTGGG	42250	PCOLCE2	1	GCCTGCTGCTGGCTGC	42628
CREB3L1	1	GATGCCCTCCCGAA	42251	PCSK5	1	GGAGTGCAGAGATTG	42629
CRX	1	CTGGGTCCCTGCCTTCT	42252	PCSK9	1	TCCACCAGCTGAGGC	42630
CYP4F3	1	TGTGATGAGTCTGAGAT	42253	PDCD4-AS1	1	TGGGATCCCAGAACC	42631
DBET	1	CAAGCCGGGGCAGCT	42254	PDCD4-AS1	2	CTGGGATCCCAGAACC	42632
DBET	2	GGCGCCCTGGTCTGC	42255	PDK3	1	TCTTTCTTTCCTGAG	42633
DBET	3	ACACCTGGCTGGCTA	42256	PDZD4	1	GGCCTGGAGGAGCTGG	42634
DBET	4	GGCCTGGGATTCCTG	42257	PEAK3	1	GTCCCTCTCCACCAACCCA	42635
DBET	5	CCATTCTTTCCTGGG	42258	PEG3	1	GCTTCTTTCCTGGG	42636
DBET	6	GGGGATCCCAGAGCC	42259	PFN1	1	TCACGCCAGCTGAGGT	42637
DBET	7	CAGAGCCGGCCCAGG	42260	PGR	1	ACTCCACTCCTGGAG	42638
DBET	8	GCCTGCTGCTGGATGA	42261	PIK3R5	1	CTGCTCTCCACCAGCTCT	42639
DBET	9	CCGGAGTTTCTGCAGC	42262	PIK3R5-DT	1	ATGGGATGCCTGCCTTCT	42640
DBET	10	TCTTTCGCGGGGAACA	42263	PIK3R6	1	CAGGCCGGCCCAGT	42641
DBET	11	AACACCTGGCTGGCTA	42264	PIRT	1	CCAGACCGCCAGCT	42642
DBET	12	CGGCCTGGGATTCCTG	42265	PKHD1	1	TAGCCAGCTGAGGC	42643
DBET	13	ACTCCACACCGCGGAG	42266	PLA2G6	1	CAGCGGGGCAGCT	42644
DBET	14	CACCGCGGAGAACTGC	42267	PLA2G6	2	CTGCCTCTGCCCCAGCCCC	42645
DBET	15	CGGGGATCCCAGAGCC	42268	PLCB3	1	CCCCGGGAGAGCTGG	42646
DBET	16	CAGATGCAAGGCATCCC	42269	PLEKHA6	1	CAGGTCGGGGCAGCT	42647
DBET	17	CTGGAGGAGCTTTAGGA	42270	PLEKHB2	1	CCGGCCGGGGCCCGCC	42648
DBET	18	TGGAGGAGCTTTAGGAC	42271	PLEKHD1	1	AGCTCCTGGCCTCTCTG	42649
DBET	19	GGGCGTGTCTCCGCCCC	42272	PLEKHG3	1	CCAGGGGGAGCTGGTGGC	42650
DBET	20	CCCGGGGGAGCTGGAGGC	42273	PLPP4	1	ACACCTTCCGACACT	42651
DBET	21	CGGAAGAGGCG	42274	PLPP4	2	CACCTTCCGAC	42652

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
		CCTCGC				ACTG	
DBET	22	CTCGCTGGAAGCACCCCT	42275	PLPP4	3	ACACCTTCCGACACTG	42653
DBET	23	CCCCTCAGCGAGGAAGAA	42276	PLPP4	4	CACCTTCCGACACTGG	42654
DBET	24	CAGCGAGGAAGAATACCG	42277	PLXDC2	1	ACCTGCTGCTGGATGA	42655
DBET	25	CCGGGCTCTGCTGGAGGA	42278	PMEL	1	CGGGGATCCCGGAGCT	42656
DBET	26	TGCTGGAGGAGCTTTAGG	42279	PMEPA1	1	CGGAATCCCAGAGCC	42657
DBET	27	GGCGGTGGCCTCTCTTTC	42280	PMEPA1	1	CGGAATCCCAGAGCC	42658
DBET	28	GAACACCTGGCTGGCTAC	42281	PML	1	CTGCCTCCTCCAGCCCA	42659
DBET	29	GGCTGGCTACGGAGGGGC	42282	POLR2H	1	CCGAGCCGGCCCAGG	42660
DBET	30	CCGGCCTGGGATTCCTGC	42283	POLR2H	2	GCCCGGGAGGGGCGGG	42661
DBET	31	CTGGGATTCCTGCCTTCT	42284	POM121L10P	1	CTGGGATCCTGCCTTCA	42662
DBET	32	GGCCGGTGAGAGACTCC	42285	POM121L1P	1	CTGGGATCCTGCCTTCA	42663
DBET	33	CCCGGGGATCCCAGAGCC	42286	POM121L4P	1	CTGGGATCCTGCCTTCA	42664
DBET	34	CCGGGGATCCCAGAGCCG	42287	POM121L8P	1	CTGGGATCCTGCCTTCA	42665
DBET	35	TCCCAGAGCCGGCCCAGG	42288	PON1	1	CTGTGGATCCTGAGA	42666
DBET	36	CCGGCCCAGGTACCAGCA	42289	PPAN-P2RY11	1	CCTGGCCGCCCTGCT	42667
DBET	37	CTGCCTCTCCACCAGCCCA	42290	PPOX	1	CTGTTCCACCAGCCCA	42668
DBET	38	GGAACACCTGGCTGGCTACG	42291	PPP1R15A	1	CAGGGCCGGCCCAGG	42669
DBET	39	GCCTGGGATTCCTGCCTTCT	42292	PPP1R15A	2	GCCCAGGAGGAGCTGA	42670
DBET	40	TCCCGGGGATCCCAGAGCCG	42293	PPT2-EGFL8	1	GCTGCTGCTGGAGGA	42671
DBH-AS1	1	GGACTGCAAGGGAG	42294	PRAMEF34P	1	GCCCTGGAGGAGCTGC	42672
DCAKD	1	GGCCTGGGATACCTT	42295	PRAMEF36P	1	GCCCTGGAGGAGCTGC	42673
DDR2	1	ACTGAGTTTCTGCAGC	42296	PRDM16	1	GGCGCCCTGGGCTGC	42674
DDR2	2	GTGCCTCTCCACCACCGA	42297	PRKCB	1	CAGAGCCGGCGCAGG	42675
DDX11	1	TCCTGTGCTGGATGA	42298	PRKY	1	CCGGGCCGGCCCAGG	42676
DENND2A	1	GGCCTGGGATTCTG	42299	PROK1	1	GCTCTCTTTCCTGGG	42677
DENND2A	2	AGGCCTGGGATTCTG	42300	PROSER3	1	CCAGGCCGCCCTGCT	42678
DGKI	1	CAGTCAAGGCATCCC	42301	PRR3	1	CCGACCGCCCTGT	42679

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
DGKQ	1	ACCCTGGCTGGCTC	42302	PRR5L	1	GTTCTGGCTGAAGTC	42680
DIPK2B	1	ACAACTGGCTGGCTT	42303	PRSS23	1	TAACTTGTCTGTCTTTG	42681
DLG2	1	GGCCTGGGATTCAG	42304	PRUNE2	1	GTCTGCTGCTGGTGA	42682
DLGAP2	1	ATTCGGCTGAATGTC	42305	PTPN9	1	CGAGCCGGCCCCGG	42683
DLX1	1	CGGAGCTCGCGGCCTCT	42306	PTPRN2	1	CTCGCGGAGAACGGC	42684
DLX1	2	AGCTCGCGGCCTCTTTG	42307	PYHIN1	1	CACAATATCCCCTGTG	42685
DLX4	1	ATCTGGTTTCAGAAC	42308	RAB31	1	GCCCGGGAGGAGCCGG	42686
DNAAF11	1	CCACCTTCCGTCCT	42309	RAB37	1	ACCAGGGAGGAGCTGG	42687
DNAH1	1	CCACCTTCAAGCTGTCTT	42310	RAB39A	1	GGGCGGGCGCCCGC	42688
DNAH10	1	GGGGATCCCAGGGCC	42311	RAPGEF4	1	GTCCGGGAGGAGCGGG	42689
DNAH10	2	TGGGGATCCCAGGGCC	42312	RASAL3	1	CGGGCCGGCCCAGG	42690
DNAH14	1	TGGAGGAGCTTTAAAC	42313	RASAL3	2	GCGCTGGAGGAGCTGG	42691
DNAH2	1	CGCCTGGGATTCTG	42314	RASGRP2	1	GGGCGTGCCCGCCCC	42692
DNAH2	1	CGCCTGGGATTCTG	42315	RASSF1	1	GAAGGGCCGCACCCG	42693
DNAH2	2	CCACACCTACGCTGTCTA	42316	RASSF1	2	GTGCGTGTCCCCGCCCC	42694
DOCK11	1	AGCTCACTGGCCTCTCAG	42317	RBP1	1	GGCGGTCCCAGAGCC	42695
DPF1	1	CCGGCCGGGGCTCAGC	42318	RCVRN	1	CCACCTGGCTGGCTG	42696
DPP9-AS1	1	CTCGCTGGAAGCCCCCT	42319	RELB	1	CCAGACCGCCGGCT	42697
DSCAML1	1	CACCGCGGAGAACGC	42320	RELL2	1	GGCGCCCTGGCCCGC	42698
DZIP1L	1	TCTTCCTTTCCTGGG	42321	RGPD6	1	CAAGCCGGGGAGCG	42699
ECEL1	1	GCCTGGAGGAGCTGG	42322	RGS11	1	CCTGAGTTTCTGCGGC	42700
EDNRB	1	CGCGCCCTGGTTGC	42323	RHCG	1	GCCCAGAGGAGCTGG	42701
EFCC1	1	GGCGCCCTGGCTGC	42324	RHPN2	1	ACCTGCTGCTGGAGA	42702
EFCC1	2	CCTGGGGGAGCTGGAGGC	42325	RIMS4	1	TGCATGCAAGGGAG	42703
EGFL6	1	CAGTGCAAGGCATCAC	42326	RIPK4	1	AGACCTGGCTGGCCA	42704
EGR1	1	CCGGCCCAGGTCAGCA	42327	RIPK4	2	AAGACCTGGCTGGCCA	42705
ELF3	1	GGGGATCCCAAGCA	42328	RNASE10	1	AACCTGGCTGGCCA	42706
ENC1	1	GCTGCTGCTGG	42329	RNF212	1	GGCGGTCCCA	42707

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
		AGA				GAGCC	
ENOX1	1	GCCCGGGAGGAGCGG	42330	RNF212	2	CGGCGGTCCCAGAGCC	42708
EPHA2	1	CCTTGCTTTCCTGGG	42331	RPS2P32	1	CCACCTTGGATGCTGTCTC	42709
EPHB4	1	GGCGCCCTGGACTCC	42332	RTEL1	1	GCTGCTGCTGGAGA	42710
EPHB4	2	CTCCCTCCACCAGCTCA	42333	RTEL1-TNFRSF6B	1	GCTGCTGCTGGAGA	42711
EPSTI1	1	TCCGCCAGCTGAAGC	42334	RTN1	1	GCCCTGAGGAGCTGG	42712
ERICH3	1	ACACCTGGCTGGGTA	42335	RTN4RL2	1	GCCCTGGAGGAGCTGG	42713
ERICH3	2	AACACCTGGCTGGGTA	42336	RUSC1	1	GGACCCTGGTCTGC	42714
ESPN	1	GGCGCCCTGGCAGC	42337	S1PR5	1	TGCGCCTGGTCTGC	42715
EVC2	1	CCGGGCCGGCCCAGG	42338	SAMD3	1	GGCAGGGATTCCTG	42716
EXOC3L1	1	GCTGCTGCTGGCTGA	42339	SASH1	1	TGGTGCAGAGATACG	42717
EXOC3L2	1	CGAGCCGGCCCGGG	42340	SBNO2	1	GCCCGAGAGGAGCTGG	42718
EZR	1	GGCGCCCTGGTTTGT	42341	SCN5A	1	CGGGGATCCAGAGCC	42719
EZR	2	GCTGCTGCTGGATA	42342	SCN5A	2	CCCGGGGATCCAGAGCC	42720
F11R	1	CCACCTGGCTGGCA	42343	SCN5A	3	CCGGGGATCCAGAGCCC	42721
FAM171A2	1	CCAGGCGGGGCAGCT	42344	SDC3	1	CTGGCCCCACCAGCCCA	42722
FAM205A	1	GATTCAGATGGTTTC	42345	SDK1-AS1	1	CCTGGATAATTAGTGC	42723
FAM83D	1	GCTCTGGAGGAGCTGG	42346	SDK1-AS1	2	GAGACTCTTTTGGACCA	42724
FAM83G	1	AGAAACGCTGGCCCAG	42347	SEMA4C	1	GTCCCTCTCCCCAGCCCA	42725
FANCB	1	AGCTCGCGGGCTCTCTG	42348	SEMA5B	1	GTCGCCCTGGTCTGA	42726
FAS	1	CAGGCGGGGCAGCT	42349	SERPINE1	1	TGGAGGACCTTTAGGTC	42727
FAT1	1	AGTGCAGAGATTGC	42350	SEZ6	1	CAGCGGGGCAGCT	42728
FAT2	1	CCTGCTTTCCTGGG	42351	SH3TC1	1	GCCTGCTGCTGGGA	42729
FAT3	1	CCGCCGCCCTGCT	42352	SHANK1	1	TCTGTCTTTCCTGGG	42730
FAT3	2	GGCGCCCTGGTGC	42353	SHE	1	CCGGCCGGGGCCCCC	42731
FBLIM1	1	GCGGATCCCAGAGCC	42354	SHISA7	1	GCCCAGAGGAGCTGG	42732
FBLIM1	2	CAAGCCGGCCCAGC	42355	SHROOM1	1	CCGGCCGGGGTCCCC	42733
FBLIM1	3	GGCGGATCCCAGAGCC	42356	SIGLEC5	1	TGCTGCAAGGGAG	42734

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
FBXO24	1	CGGAAGGGAGCTC	42357	SIRPB1	1	GCCTGCTGCTGGAAA	42735
FBXO41	1	CCCGCCGCCCTGCT	42358	SKI	1	CCTCTTTCCTGGG	42736
FCGBP	1	CAAGCCGGGGCAGGT	42359	SKI	2	CCTCCCTGTGGGTCCGAT	42737
FER1L6	1	CTGCAAGGGAGCC	42360	SLA	1	GAGAGTTACATCCCTGG	42738
FGD5	1	GCCCGGGAGGAGCTGA	42361	SLC12A3	1	GGCTGGCAGGGAGGGGC	42739
FGF2	1	CGGGGATCCCGGCC	42362	SLC18B1	1	CCCGGGGACCCAGAGTC	42740
FKBP9P1	1	CCGGCCTGATTCCTGC	42363	SLC26A8	1	TGGGATCCCAGCGCC	42741
FKBPL	1	CGTGCAAGGGGCAC	42364	SLC28A3	1	CTCCCTCCCCACCAGCCCC	42742
FKBPL	2	ACGTGCAAGGGGCAC	42365	SLC36A1	1	GAGGATCCCAGACCC	42743
FLG-AS1	1	GGCCTGGGATTTG	42366	SLC39A11	1	GCCTGCTGCTGATCA	42744
FLI1	1	GGGCAGGGCGCTCGC	42367	SLC41A2	1	TACGTCTGTCTGTCTTTG	42745
FLNB	1	CAAGCCGGGGGCT	42368	SLC46A2	1	GCTTTCTTTCCTGAG	42746
FLNB	2	TCACTGTGGATCCTAA	42369	SLC7A14	1	ATTCTGGCTGACTGTG	42747
FLRT1	1	CAACCGGGGCAGCA	42370	SLC8A2	1	TCCCGGGAGGAGCGG	42748
FOSL2	1	ATGGCCCTCCCAAGACC	42371	SLC8B1	1	TAAGGGCCAGGCCCCG	42749
FOXF1	1	GAGCTGCAAGGCATCCC	42372	SLC9B2	1	GGGAGCTCGCTGGTCCT	42750
FRAT2	1	CAAGCCGGGGCACG	42373	SLCO1C1	1	CCTGGATGATTTTGC	42751
FRMD8	1	GGCGCCCTGGTGTGC	42374	SMAP2	1	ACCTGCTGCTGGAGGA	42752
FRMD8	2	CAAGCCGGCCCAAG	42375	SMPD3	1	GCCGGGAGGAGCGGG	42753
GAL3ST1	1	GAGGGTCCCAGAGCC	42376	SORCS3	1	GGCCGGAGGAGCTGG	42754
GALNS	1	CATTCAGATTGGTTTC	42377	SORCS3	2	GAAATCTGGCTGGCTAC	42755
GANC	1	TTTCTGGCTGAATGCC	42378	SOWAHD	1	GGCGCCCTGGGTGC	42756
GAS6-AS1	1	CCGGCCGGGGCCCC	42379	SOX17	1	CTGGAGGAGCTAAGGA	42757
GAS7	1	CCACCTGGCTGGCA	42380	SOX4	1	CCGCCGCCCTGCT	42758
GASK1A	1	CCGGCCGGGGCACC	42381	SPATA6L	1	CTCAAGGGAGCTC	42759
GASK1B	1	CAAGCCGGGGCAGCT	42382	SPATC1	1	AGCCACTCCGCGGAG	42760
GASK1B	2	GTGGCAGGGCTCCGGC	42383	SPOCD1	1	GACCAGGAGGAGCTGG	42761
GCK	1	ACACCTGGCTG	42384	SPOCD1	2	CCAGGAGGAG	42762

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
		GA				CTGGAGGC	
GCKR	1	ACACCTGGCTGCA	42385	SPTBN2	1	GGCCCCTGGTCTGC	42763
GDF11	1	TGCAGAGAATGTCAC	42386	SPTBN2	2	GAGAGCCGGCCCAGC	42764
GDF11	2	TGCAGAGAATGTCACAG	42387	SRGAP2	1	GGCGCCCTGGCTTC	42765
GFOD2	1	GGCGCCCTGGACTCC	42388	SRP19	1	CAGCGAGGAAGAAACCT	42766
GJA1	1	TCCCTGTGTATCCTAT	42389	SSBP4	1	GGGCAGGGCGCCGGC	42767
GJA3	1	CCCTGCTGCTGGATGG	42390	SSPOP	1	CCAGCCGGGGCAGCT	42768
GJD4	1	GCCGACCTGGTCTGC	42391	SSPOP	2	GGCCCCCTGGTCTGT	42769
GLB1	1	ATACTGGCTGGCTA	42392	SSPOP	3	CCCGGGGGAGCTGGGGC	42770
GNAI3	1	GCACCTGGCTGGCAA	42393	SSTR2	1	ACACCTGGCTTCTA	42771
GNAO1	1	CAAGCCGGGGAGCC	42394	ST20-AS1	1	GCAGGGCCAGGCCCCG	42772
GNAZ	1	CAAGGGCAGGCACCCG	42395	STAC2	1	GAAGGGCCAGGACCAG	42773
GNAZ	2	CCACCTTGAGCTGTCTC	42396	STARD5	1	TGACGCCAGCTGATGC	42774
GPC2	1	CCACCTTCCGAGGCC	42397	STARD9	1	AGACCTGGCTGGCCA	42775
GPC6	1	TCGGCCTAGGATTCCTGC	42398	STARD9	2	GGCCTGGGATGCTG	42776
GPR146	1	CCACCGCCCTGCT	42399	STRC	1	TGGGATCCCAGACC	42777
GPR146	2	ACTCCACTCCGAGAG	42400	STRC	2	CTGGGATCCCAGACC	42778
GPR150	1	AGCGCCCTGGTCGGC	42401	STX2	1	GTGGAAGGATCGCTT	42779
GPR158	1	CGGAGATCCCAGAGAC	42402	SV2B	1	GGGAGGAGCTTAGGAC	42780
GPR160	1	GTGGAGGGCGCCCGG	42403	SYNDIG1L	1	TGCAGAGAATGTCAC	42781
GPR37	1	TCCGCCAGCTGAGC	42404	SYNDIG1L	2	TGCAGAGAATGTCACCA	42782
GPX2	1	GCCCTTCCGACGCT	42405	SYNE3	1	TCCCATGGATCCTAT	42783
GPX2	2	CCCTTCCGACGCTA	42406	SYNGAP1	1	TGCAGAGTATGTCAC	42784
GRHL1	1	CTGGGAAGCTTTAGGA	42407	SYNGAP1	2	TGCAGAGTATGTCACCA	42785
GRHL1	2	TGGGAAGCTTTAGGAC	42408	SYNGR3	1	CTGCCTCTCCACCTGCACC	42786
GRIA1	1	TCACTGTGGATCCAT	42409	TAF5	1	CCGGGCTGCTGGAGGA	42787
H2BC8	1	CCAGACCGCCGTGCG	42410	TAL1	1	AGCCGCTGGCCTCTCTC	42788
HAL	1	CTCCCTCTCCACCAGCGCA	42411	TAPT1-AS1	1	CCGGCCGGGGCACC	42789

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
HECW2-AS1	1	AGGCCCTGGTCTGC	42412	TBC1D32	1	TCCAGTGGATCCTAT	42790
HHAT	1	GTCCTGGGATTCCTG	42413	TCAM1P	1	CCAGACCTCCCTGCT	42791
HHAT	2	TGTCCTGGGATTCCTG	42414	TCAM1P	2	CCTTCCTTTCCTGGG	42792
HIP1R	1	GACGTTTGGACCCC	42415	TCF7	1	CCTTTCTTTCCTTGG	42793
HMX1	1	CCACCCGGGGCAGCT	42416	TEAD2	1	ATGGCAGGGCGCCCC	42794
HOMER3	1	GGAGCCCTGGTCTCC	42417	TEKT4	1	GCAGCTGGCTGGCTA	42795
HOXC11	1	TCCTCTTTCTGTCTTTG	42418	TEKT4P2	1	GCAGCTGGCTGGCTA	42796
HPGD	1	AAACCTGGCTGGCA	42419	TEPSIN	1	CTTCCTCTCCACCATCCA	42797
HPGD	2	AAAACCTGGCTGGCA	42420	TESK2	1	CTGCCTCCCACCAGACCC	42798
HRAT92	1	GGACGTGCAAGGGG	42421	TESMIN	1	CGGGATCCCAGAGCT	42799
HRAT92	2	CGTGCAAGGGGCGC	42422	TESMIN	2	CCGGGATCCCAGAGCT	42800
HRAT92	3	GGACGTGCAAGGGGC	42423	TESMIN	3	CCCCGGGATCCCAGAGCT	42801
HRAT92	4	GACGTGCAAGGGGCG	42424	TFAP2B	1	CGGGGATCCAGAGCT	42802
HRAT92	5	ACGTGCAAGGGGCGC	42425	TFAP2B	2	CCGGGGATCCAGAGCTG	42803
HS6ST2	1	CGAGCCGGCCCGGG	42426	TFR2	1	GCCTGCTGCTGGTGC	42804
HSF2BP	1	GTTCTGGCTGAAGTC	42427	TGFB2	1	GACAGTATCCCCTGTA	42805
HTR3C	1	CTCCACTGCACCAGCCCA	42428	TGFBR3	1	AGAGGTGCAAGGGAGC	42806
ICAM2	1	CGGGATCCCAGAGCT	42429	TGFBR3	2	GAGGTGCAAGGGAGCG	42807
ICAM2	2	CCGGGATCCCAGAGCT	42430	TGM5	1	CCAGACCGCCCAGCT	42808
ICAM2	3	CCCGGGATCCCAGAGCT	42431	TIE1	1	CCCTGCTGCTGGAGA	42809
IFFO1	1	GCCAGGAGGAGCTGG	42432	TINAGL1	1	CGGCCTGGGATCCAG	42810
IFFO2	1	CTGCCTCTCCACCACA	42433	TLE3	1	GGCGCCCTGGGCAGC	42811
IFI16	1	CACAATATCCCCTGTG	42434	TLNRD1	1	GTGTCTCTCCACCAGCCCC	42812
IGFBP7	1	AAAGCCGGGGCAGCA	42435	TMEM106A	1	TGGGATCCCAGACC	42813
IGFBPL1	1	GGCCTGGGATTCTG	42436	TMEM106A	2	CTGGGATCCCAGACC	42814
IGFBPL1	2	TGGCCTGGGATTCTG	42437	TMEM165	1	CCGAGCCGGCCCGGG	42815
IGSF10	1	GGGGATCCCAAACC	42438	TMPRSS13	1	CCAGACCCCCTGCT	42816
IGSF3	1	CCACCTTCCGCC	42439	TNFRSF12	1	CCAGCCGGGG	42817

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
		T		A		CTCGCC	
IGSF8	1	GCCCGGGAGGTGCTGG	42440	TNFRSF21	1	CCTGGATGATTGTGC	42818
IKZF1	1	GTGGCAGGGCGCGCGC	42441	TNKS1BP1	1	CAGGGCCTGCTGGAGGA	42819
IL1R1	1	GGCCGGGAGGAGCCGG	42442	TOR4A	1	GCCGCGAGGAGCTGG	42820
ILDR2	1	GTCTGTTTGGACCCC	42443	TPK1	1	TGCAGTGATATGTCACAA	42821
INAVA	1	CTGGAGGAGCTGAGGA	42444	TPSD1	1	GGCCCCTGGTCTGC	42822
INKA2	1	GAAGGGCCAGGCAGCAG	42445	TRAF1	1	GCCAGGAGGAGCTGG	42823
INSRR	1	CCGCGGGGCTCACC	42446	TRAF5	1	ACACCTGGCTGTA	42824
INSRR	2	GTCCTGGAGGAGCTGG	42447	TRAF5	2	AACACCTGGCTGTA	42825
INSYN1	1	CCGGCCGGGGCCCCC	42448	TRERF1	1	AGCACCCTGGTCTGC	42826
IQGAP3	1	CCCGGTGGAGCTGGAGGA	42449	TRIM56	1	CCGGCCGGGGCTCAGC	42827
IRS2	1	GGCGCCCTGGGCGGC	42450	TRIM56	2	CCTGGTGGAGCTGGAGGC	42828
ITGA6	1	GGTGCTCCCAGAGCC	42451	TRIM62	1	CTGCAAGGGAGTC	42829
ITGAL	1	GGCGCCCTGGTTTTC	42452	TRIM67	1	GCCCGGGAGGCGCGGG	42830
ITGAX	1	GTCCAGGAGGAGCTGG	42453	TSPAN10	1	AGCCTGGCTGGCTA	42831
ITIH5	1	CAGAGCCGGCTCAGA	42454	TSPAN13	1	ACACCTGTCTGGCTA	42832
ITIH5	2	CTGCCTCTCCCCACCCT	42455	TSPAN13	2	GACACCTGTCTGGCTA	42833
KANK4	1	GCTGCTGCTGGAGA	42456	TSPAN14	1	CCTTTCTTTCCCAGG	42834
KCNC3	1	GCCTGCTGCTGGATGA	42457	TTC22	1	CCAGCCAGCTGAGGC	42835
KCNC4	1	CCCTGCTGCTGGATGA	42458	TTC34	1	CGAGCCGCCCTGCT	42836
KCNF1	1	GAAGGCCCTCCCGGCA	42459	TTC6	1	CCACCTTCCGAGCG	42837
KCNF1	2	AAGGCCCTCCCGGCACC	42460	TTLL10-AS1	1	CAGCCTCTCCACCTGCACA	42838
KCNG2	1	GGGAATCCCAGAGCC	42461	TUBB2A	1	CCAGCCGGGGCAGCC	42839
KCNG2	2	GCCTGCTGTGGATGA	42462	TUBB2B	1	CCAGCCGGGGCAGCC	42840
KCNG2	3	GGGGAATCCCAGAGCC	42463	TUBBP5	1	CCAGCCGGGGCAGCC	42841
KCNJ15	1	TGTGCAGAATATGTC	42464	TULP1	1	GAGGGCCAGGCACCCA	42842
KCNK10	1	TCTTTCTTTCCTTGG	42465	UBXN10	1	GCTGCTGCTGGTGA	42843
KCTD1	1	GCCGGGGAGGAGCTGG	42466	UCK2	1	CTGAAGGGAGCTC	42844

表3：

基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:	基因名称	位点	序列	SEQ ID NO:
KCTD1	2	GAACACCCGGCTGGCCAC	42467	UCK2	2	ACCTCTCTTGCCCTTGT	42845
KCTD15	1	GCCGGGAGGAGCGG	42468	UNC13A	1	CAGAGCCGGCCCGG	42846
KCTD15	2	CCTCCCTTGGATCCTT	42469	UNC45A	1	GGCGCCCTGGCGGC	42847
KIAA0319	1	GCTGCTGCTGGTGA	42470	VANGL1	1	CCACCTGGCTGGCA	42848
KIAA0895L	1	AGGCAAGGGAGCTC	42471	VAV2	1	GCCTGGAGGAGCTGG	42849
KIAA1522	1	CCACCTTCCGACCCC	42472	VAV3	1	CCGGCCGGGGCGCACG	42850
KIAA1549L	1	CAGGAGCCGGCCCGGG	42473	VSTM4	1	GGCCTGGGATTCCTT	42851
KIF26A	1	GCAGCCGCCCTGCT	42474	VSTM4	2	AGGCCTGGGATTCCTT	42852
KIF5C	1	GCCCTGGAGGAGCTGG	42475	VSTM4	3	CGCCTCTCCACCAGCACC	42853
KLC3	1	GCCCTGAGGAGCTGG	42476	VWC2	1	CCGGCCGGCCCAGG	42854
KLF16	1	GGCGCCCTGGTGC	42477	VWC2	2	ACCCCTCCGCGGAG	42855
KLF16	2	CTCCTCTCCACCACCCCC	42478	VWF	1	GGCGCCCTGGCCAGC	42856
KLHL14	1	TCCCTGTGGACCGAT	42479	WASF2	1	CCTTCTTTCCTGGA	42857
KLK10	1	GGCCCCCTGGTCTGT	42480	WDR43	1	TGCCTGGGATTCCTG	42858
KRT86	1	GTGGCAGGGCGCCAC	42481	WNT7A	1	CAGAGCCGGCCCGA	42859
KRTAP2-1	1	CTCCTCTCCACAGCCCA	42482	WWC1	1	CCAGCCGGGGCTCCC	42860
LAMA4	1	CTGGCGGGGCTCACC	42483	WWC1	2	GCCTGCTGCTGAGGA	42861
LAMA5	1	GTGGCAGGGCCACGC	42484	WWOX	1	CGGGTCTCGTTTGGA	42862
LAMC2	1	ATTCTGGCTGATGTG	42485	XCR1	1	CCTTTCTTTCCTAGT	42863
LCNL1	1	GGAGGGCCAGGCCCCG	42486	YEATS2	1	CAGCCGGGGCAGGT	42864
LDLR	1	TGGGATCCCAGGCC	42487	YPEL2	1	AACCTGGCTGGTA	42865
LEFTY2	1	CTGAGCCGGCCCCGG	42488	ZC3H12B	1	CGAGTGCAGAGCTATG	42866
LIMK1	1	CAGAGCCGGCCCAGC	42489	ZC3H12D	1	AGCGCCTGGTCTGC	42867
LIMK1	2	GCCCAGAGCCGGCCCAGC	42490	ZDHHC8P1	1	CTGGCCGGCCCAGG	42868
LINC00319	1	CACAGCCGGCCCAGC	42491	ZFP14	1	CAGAGCCGCCCAGG	42869
LINC00528	1	GCAGGCCGCCCTGCT	42492	ZFP69	1	GCGGCCGGGGCTCACA	42870
LINC00540	1	CGGGCCGGCCCAGG	42493	ZNF831	1	CCCCTCAGAGAGGAAGAA	42871

[0092]

DUX4靶向寡核苷酸和RNA靶标相互作用的结果

[0093] 在一些情况下,与使等效量的缺乏修饰的其他方面相当的DUX4靶向寡核苷酸与

DUX4 mRNA序列接触相比,包含所述修饰的DUX4靶向寡核苷酸或其盐在与所述DUX4mRNA序列接触时可产生更低的由所述DUX4 mRNA序列编码的多肽的活性。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约1.2倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约1.5倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约1.7倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约2.0倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约:1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.2倍至约2.0倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.1倍至约1.5倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.1倍至约2.5倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.2倍至约3.0倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约1.2倍至约至少10倍的表达。在一些情况下,所述更低活性可以是低至少约14倍。在一些情况下,所述更低表达可以是低至少约18倍的表达。在一些情况下,所述更低活性可以是低约:1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍。在一些情况下,所述更低活性可以是约1.2倍至约14倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.1倍至约20倍。在一些情况下,所述更低活性可以是低约1.2倍至约30倍。

[0094] 在一些情况下,与使等效量的其他方面相当的寡核苷酸与mRNA序列接触相比,DUX4靶向寡核苷酸或其盐在与所述mRNA序列接触时可产生低至少约:1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍的由所述mRNA序列编码的多肽的表达。更低表达可以是低约1.2倍至约10倍的表达。

[0095] 在一些情况下,与使等效量的其他方面相当的寡核苷酸与mRNA序列接触相比,DUX4靶向寡核苷酸或其盐在与所述mRNA序列接触时可产生低至少约:1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍的由所述mRNA序列编码的多肽的活性。更低活性可以是低约1.2倍至约10倍的活性。

[0096] 在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐在生理盐和pH下可包含至少约45至65摄氏度的预测热解链温度。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可在约18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40摄氏度下结合RNA序列。在一些情况下,DUX4靶向寡核苷酸或其盐可在约6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7或7.8的pH下结合RNA序列。

受试者

[0097] 在一些方面,受试者可包括适于接受如本文所述的组合物或通过如本文所述的方法治疗的哺乳动物,所述组合物包含工程化DUX4靶向核酸(如呈寡核苷酸的形式)。此类哺乳动物的例子可包括人、非人灵长类动物(例如,猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、猴、猕猴等)、家畜(例如,狗和猫)、农场动物(例如,马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。哺乳动物可以是任何年龄或处于任何发育阶段,例如哺乳动物可以是新生儿、婴儿、青少年、成年或在子宫内。哺乳动物可以是雄性或雌性。在一些情况下,人可以是约:1日至约7日龄、1周至约5周龄、1个月至约12个月龄、1岁至约6岁、5岁至约15岁、14岁至约30岁、25岁至约50岁、40岁至约75岁、70岁至约100岁、85岁至约110岁或约100岁至约130岁。

[0098] 在一些情况下,受试者可能先前未被诊断患有疾病或病症。在一些情况下,受试者可能已被诊断患有疾病或病症。在一些情况下,受试者可能尚未接受疾病或病症的明确诊断。受试者可能处于患上疾病或病症的风险中(如至少部分地基于遗传变体)。受试者可能

已经接受诊断测试。诊断测试可包括成像程序、血细胞计数分析、组织病理学分析、生物标志物分析或其任何组合。

[0099] 受试者可以是患者,如正在治疗病症或疾病(如神经肌肉疾病)的患者。在某些情况下,受试者可能易处于患上病症或疾病(如神经肌肉障碍)的风险。受试者可以处于从病症或疾病(如神经肌肉障碍)缓解中。受试者可以是健康的。

[0100] 在一些方面,受试者可以是有需要的受试者。在一些方面,受试者可能患有疾病,如面肩肱型肌营养不良(FSHD)的治疗可包括例如缓解患有面肩肱型肌营养不良(FSHD)的哺乳动物所经历的肌无力,和/或引起肌无力的消退或消失。

施用和治疗

[0101] 在一些方面,本文所公开的DUX4靶向寡核苷酸可用于治疗受试者,使得所述治疗导致:乏力减轻、能量增加、体重增加、体重减少、肌肉量增加、增加、身体柔韧性增加、姿势增加、活动范围增加、肌强直的停止、肌肉疼痛的减轻或其任何组合。

[0102] 可以治疗有需要的受试者的疾病或病症。治疗可以是预治疗、预防治疗或防治治疗。治疗可包括向有需要的受试者施用如本文所述的DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物。

[0103] 治疗可包括施用在患者之间高度保守并且选自在提交时呈送的XML序列表文件中的SEQ.ID.NO:20,962-41,922和/或如表2所示的SEQ.ID.No:41,923-42,115或其任何组合的工程化DUX-4靶向寡核苷酸。

[0104] 递送可包括直接施用于身体的受影响组织或区域。递送可包括实质注射、鞘内注射、心室内注射或脑池内注射。可通过任何方法施用本文提供的组合物。施用方法可以是通过吸入、动脉内注射、脑室内注射、脑池内注射、肌内注射、眼眶内注射、实质内注射、腹膜内注射、脊柱内注射、鞘内注射、静脉内注射、心室内注射、立体定向注射、皮下注射或其任何组合。递送可包括肠胃外施用(包括静脉内、皮下、鞘内、腹膜内、肌内、血管内或输注)、口服施用、吸入施用、十二指肠内施用、直肠施用。递送可包括外用施用(如洗剂、乳膏、软膏)至表面(如皮肤)的外表面。在一些情况下,受试者可以在没有监督的情况下施用组合物。在一些情况下,受试者可以在医学专业人员(例如,医师、护士、医师助理、护理员、临终关怀工作者等)的监督下施用组合物。在一些情况下,医学专业人员可施用药物配制品。在一些情况下,神经肌肉疾病(如面肩肱型肌营养不良)的治疗是通过如下所述采用包含DUX4靶向寡核苷酸、包含所述寡核苷酸的载体或药物配制品的组合物来进行。仍此外,可如下所述使用DUX4靶向寡核苷酸、包含所述寡核苷酸的载体或药物配制品来制备药物。所述药物可用于治疗或预防面肩肱型肌营养不良。

[0105] 施用方法可包括体内或体外递送方法。方法可包括使细胞(如体内细胞)与如本文所述的DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物接触。方法可包括使细胞(如分离和纯化的细胞(如体外细胞))与如本文所述的DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物接触。方法可包括使组织(如体内组织或分离的体外组织)与如本文所述的DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物接触。

[0106] 治疗可包括以单剂量递送的多于一种DUX4靶向寡核苷酸。递送可以是并行递送,如在单次注射中或在同时进行的两次单独注射中递送多于一种DUX4靶向寡核苷酸。递送可以是依序的,如递送可以间隔一段时间(如数分钟、数小时、数天、数周或数月)的第一剂量

和第二剂量。

[0107] 本公开文本的某些方面涉及DUX4靶向寡核苷酸的施用,人细胞可以是:头部或颈部组织的细胞、皮肤细胞、宫颈细胞、前列腺细胞、干细胞、骨细胞、血细胞、肌细胞、脂肪细胞、神经细胞、内皮细胞、精细胞、卵细胞、癌细胞、屏障细胞、激素分泌细胞、外分泌细胞、上皮细胞、口腔细胞、感觉传感细胞、自主神经元细胞、外周神经元细胞、中枢神经神经元细胞、分泌细胞、心肌细胞、白细胞、生殖细胞、胸腺抚育细胞、肾细胞或其任何组合。

[0108] 组织可以如下样品,所述样品可以是基本上健康的、基本上良性的或在其他方面基本上没有疾病或病症的。组织可以是从受试者移除的组织,如组织活检物、组织切除物、抽吸物(如细针抽吸物)、组织洗涤物、细胞学样本、体液或其任何组合。组织可包括癌细胞、肿瘤细胞、非癌细胞或其组合。组织可包括血液样品(如无细胞DNA样品)。组织可以是可以被遗传修饰的样品。

[0109] 治疗可包括治疗与神经肌肉疾病(如面肩肱型肌营养不良)相关的病症。治疗可能导致乏力减轻、能量增加、体重增加、体重减少、肌肉量增加、增加、身体柔韧性增加、姿势增加、活动范围增加、肌强直的停止、肌肉疼痛的减轻或其任何组合。

[0110] 本公开文本的某些方面涉及用载体递送寡核苷酸(如DUX4靶向寡核苷酸)。载体可用于递送DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体或其任何组合。载体可包含DNA,如双链DNA或单链DNA。载体可包含RNA。在一些情况下,RNA可包含碱基修饰。载体可包括重组载体。载体可以是从天然存在的载体修饰的载体。载体可包括非天然存在的载体的至少一部分。在一些情况下,载体可包括病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外体、细胞外囊泡或其任何组合。在一些情况下,病毒载体可包括腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、慢病毒载体、逆转录病毒载体、这些中的任一种的一部分、或其任何组合。在一些情况下,纳米颗粒载体可包括基于聚合物的纳米颗粒、基于氨基脂质的纳米颗粒、金属纳米颗粒(如基于金的纳米颗粒)、这些中的任一种的一部分、或其任何组合。在一些情况下,载体可包括AAV载体。载体可被修饰以包含经修饰的VP1蛋白(如经修饰以包含VP1蛋白的AAV载体)。AAV可包括血清型,如AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型、这些中的任一种的衍生物、或其任何组合。

[0111] 在某些方面,旨在用作工程化DUX4靶向寡核苷酸的寡核苷酸的递送是通过脂质体递送。在某些情况下,脂质体可以是带正电荷的脂质体。在某些情况下,脂质体可以是带负电荷的脂质体。在其他情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸的递送是聚合物递送。在其他情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸递送是树状聚合物介导的递送。在其他情况下,工程化DUX4靶向核苷酸的递送是经由显微注射、电穿孔、超声、基因枪或流体动力学应用。在其他情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸的递送是经由与纳米颗粒缀合或缔合。

药物配制品

[0112] 在一些方面,可以采用多种药物配制品来递送工程化DUX4靶向寡核苷酸靶标。

[0113] 药物配制品可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体或其组合。

[0114] 在某些情况下,药物配制品的载体可以是固体载体,并且可包括乳糖、石膏粉、蔗糖、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸等。在其他情况下,载体是液体载体,并且可包括磷酸盐缓冲盐水溶液、糖浆、油、花生油、橄榄油、水、乳液、润湿剂、无菌溶液或其任何组合。

[0115] 在关于药物配制品的一些方面,药物配制品可包含药学上可接受的稀释剂。稀释剂可包括例如无菌蒸馏水、去离子水、生理盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、细胞生长培养基、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或其任何组合。

[0116] 在关于药物配制品的一些方面,药物配制品可包含赋形剂。在涉及赋形剂的情况下,赋形剂可包括pH剂、稳定剂、缓冲剂、增溶剂或其任何组合。赋形剂可包括表面活性剂、糖、氨基酸、抗氧化剂、盐、非离子表面活性剂、增溶剂、甘油三酯、醇或其任何组合。赋形剂可包括碳酸钠、乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、聚乙二醇(PEG)、人血清白蛋白(HSA)、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、聚山梨醇酯80、磷酸钠、蔗糖、磷酸氢二钠、甘露糖醇、聚山梨醇酯20、组氨酸、柠檬酸盐、白蛋白、氢氧化钠、甘氨酸、柠檬酸钠、海藻糖、精氨酸、乙酸钠、乙酸盐、HCl、依地酸二钠、卵磷脂、甘油、黄原胶、大豆异黄酮、聚山梨醇酯80、乙醇、水、替普瑞酮或其任何组合。赋形剂可以是美国药物协会的药物赋形剂手册(1986)中描述的赋形剂。

[0117] 本公开文本可包括本文所述组合物的盐(包括药学上可接受的盐)。可具有足够酸性、足够碱性或两种官能团的本公开文本的化合物或组合物可与多种无机碱、无机酸或有机酸中的任一种反应以形成盐。可替代地,含有固有带电荷的化合物(如具有四价氮的那些)的组合物可与适当的反离子(例如卤离子,如溴离子、氯离子或氟离子,特别是溴离子)形成盐。

[0118] 药物组合物可包含第一活性成分。所述第一活性成分可包含如本文所述的DUX4靶向寡核苷酸。药物组合物可被以单位剂量形式配制。药物组合物可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。药物组合物可包含第二、第三或第四活性成分,如第二DUX4靶向寡核苷酸。

[0119] 在一些情况下,包含修饰的工程化DUX4靶向寡核苷酸或其盐在储存于封闭容器中并放置在室内一段时间时,将保留所述工程化DUX4靶向寡核苷酸或其盐的初始量的至少约80%。在一些情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸将保留初始量的至少约70%。在一些情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸将保留初始量的至少约90%。在一些情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸将保留至少约:60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%。在一些情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸可以是至少约60%至约至少80%。在一些情况下,工程化DUX4靶向寡核苷酸可以是至少约80%至至少约99%。在一些情况下,储存时间段可以是至少1个月。在一些情况下,储存时间段可以是至少约3个月。在一些情况下,储存时间段可以是至少约1年。在一些情况下,储存时间段可以是至少约1、2、4、6、8、12、18、24、36、48或60个月。在一些情况下,储存时间段可以是至少约1个月至约至少1年。在一些情况下,储存时间段可以是至少约6个月至至少约2年。在一些情况下,储存时间段可以是至少约1个月至至少约5年。

[0120] 在一些方面,可将药物组合物以合适的单位剂量施用于受试者。药物组合物可以呈单位剂量形式。在一些情况下,单位剂量可意在指代呈其上市使用的形式的药物产品,其具有活性成分与非活性组分、稀释剂或赋形剂的特定混合物,呈特定配置,且分配为待递送的特定剂量。在一些情况下,单位剂量有时也可涵盖不可重复使用的包装,但是FDA区分单位剂量“包装”或“调剂”。多于一个单位剂量可以指代包装在一起的不同药物产品,或指代含有多种药物和/或多个剂量的单一药物产品。在一些情况下,术语单位剂量有时还可以指代包含药物组合物的颗粒,以及指代涉及的任何混合物。在一些情况下,单位剂量的类型可随着用于药物递送的施用途径和所递送的一种或多种物质而变化。在一些方面,施用可包

括静脉内、腹膜内、动脉内、肿瘤间、皮下、肌内、鼻内、外用、口服或皮内施用。在一些情况下,施用可包括吸入施用。在一些方面,给药方案可由主治医师按照临床因素来确定。在一些方面,用于受试者的剂量可取决于许多因素,包括受试者的体型、体表面积、年龄、性别、一般健康状况、待施用的化合物、施用的时间和途径、并行施用的其他药物、或其任何组合。在一些方面,剂量范围可包括0.001至1000μg。在一些方面,剂量可以低于或高于这个范围。在一些方面,作为药物组合物的定期施用的方案可以在1μg至10mg的范围内。在一些方面,作为药物组合物的定期施用的方案可以在每天、每周或每月10^2个单位至10^{12}个单位的范围内。在一些情况下,单位可以是载体或ASO。在一些方面,如果方案包括连续输注,则其还可以分别在1μg至10,000mg的药物组合物、或工程化多核苷酸、或编码工程化多核苷酸的DNA、或含有或编码工程化多核苷酸的载体/千克体重/分钟的范围内。在某些情况下,所述范围是1mg/千克体重至1000mg/千克体重。在一些方面,可通过定期评估来监测进展。

[0121] 在本公开文本的一些方面,当药物组合物是液体时,其可以以诸如以下的液体剂量形式施用:约1ml至约5ml、约5ml至10ml、约15ml至约20ml、约25ml至约30ml、约30ml至约50ml、约50ml至约100ml、约100ml至150ml、约150ml至约200ml、约200ml至约250ml、约250ml至约300ml、约300ml至约350ml、约350ml至约400ml、约400ml至约450ml、约450ml至500ml、约500ml至750ml、或约750ml至1000ml。

[0122] 在一些方面,可将本文所述的组合物向有需要的受试者施用一天或多天。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或约31天。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或约24个月。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或约50年或更多年。在一些情况下,施用可终生进行。在一些方面,可在2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天或更多天施用本文所述的药物组合物。在一些情况下,可在连续日或非连续日施用本文所述的组合物。在一些情况下,可将本文所述的组合物每天多于一次施用于受试者。在一些情况下,可将本文所述的组合物每天1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次施用于受试者。

[0123] 在一些方面,本文公开了如本文所公开的组合物的使用方法。在一些方面,每日口服给药方案可为约0.1毫克/千克(mg/kg)至约80mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约30mg/kg、或约0.5mg/kg至约15mg/kg。在一些方面,每日肠胃外给药方案可包括约0.1mg/kg至约10,000mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约5,000mg/kg、或约0.5mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,每日外用给药方案可以是约0.1mg至约500mg。在一些方面,每日给药方案可以是每日约0.01mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,可以按照所治疗的病症的性质和程度、施用的形式、途径和部位以及所治疗的特定受试者来确定组合物的单独剂量的最佳量和间隔,并且可以优选地通过本文所述的方法来确定此类最佳值。在一些方面,本领域技术人员可以使用治疗确定测试的常规过程来确定每天给予持续确定天数的组合物的剂量数。在一些方面,给药方案可由主治医师根据其他临床因素来确定。在一些方面,用于任何一个受试者的剂量可以取决于许多因素。在一些方面,影响剂量的因素可包括受试者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况、并行施用的其他药物或

其任何组合。在一些方面,可通过定期评估来监测进展。

[0124] 可以施用药物配制品,每日口服给药方案可为约0.1毫克/千克(mg/kg)至约80mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约30mg/kg、或约0.5mg/kg至约15mg/kg。在一些方面,每日肠胃外给药方案可包括约0.1mg/kg至约10,000mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约5,000mg/kg、或约0.5mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,每日外用给药方案可以是约0.1mg至约500mg。在一些方面,每日给药方案可以是每日约0.01mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,可以按照所治疗的病症的性质和程度、施用的形式、途径和部位以及所治疗的特定受试者来确定组合物的单独剂量的最佳量和间隔,并且可以优选地通过本文所述的方法来确定此类最佳值。在一些方面,本领域技术人员可以使用治疗确定测试的常规过程来确定每天给予持续确定天数的组合物的剂量数。在一些方面,给药方案可由主治医师根据其他临床因素来确定。在一些方面,用于任何一个受试者的剂量可以取决于许多因素。在一些方面,影响剂量的因素可包括受试者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况、并行施用的其他药物或其任何组合。在一些方面,可通过定期评估来监测进展。

[0125] 可将组合物或配制品在本文中用于治疗或预防神经肌肉疾病,所述组合物或配制品包含经配置以与包含RNA转录物的一部分的RNA杂交的工程化DUX4靶向寡核苷酸、编码或包含所述寡核苷酸的载体和药学上可接受的:赋形剂、稀释剂或载体,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有至少70%序列同一性。在某些情况下,神经肌肉疾病是面肩肱型肌营养不良。在其他方面,可要求在制备用于治疗和预防面肩肱型肌营养不良的药剂时使用经配置以与包含RNA转录物的一部分的RNA杂交的工程化DUX4靶向寡核苷酸和药学上可接受的:赋形剂、稀释剂或载体,其中所述工程化DUX4靶向寡核苷酸与SEQ.ID.NO:41,923-42,115中任一个的寡核苷酸具有至少70%序列同一性。

共同疗法

[0126] 在一些方面,本文公开了将DUX4靶向寡核苷酸或其盐与共同疗法组合施用于受试者的方法。在一些方面,可并行施用一种或多种另外的共同疗法。在一些方面,可连续施用一种或多种另外的治疗剂。在一些情况下,共同疗法可包括免疫疗法、激素疗法、冷冻疗法、手术或其任何组合。共同疗法可包括施用药物组合物(如小分子)。共同疗法可包括施用药物组合物(如一种或多种抗生素)。共同疗法可包括施用肌肉松弛药、抗抑郁药、类固醇、阿片类物质、基于大麻的治疗剂、对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药、神经病药剂、大麻、孕激素、孕酮或其任何组合。神经病药剂可包括加巴喷丁。非甾体抗炎药可包括萘普生、布洛芬、COX-2抑制剂或其任何组合。第二疗法可包括施用生物制剂、细胞疗法、再生医学疗法、组织工程方法、干细胞移植或其任何组合。共同疗法可包括医疗程序。医疗程序可包括硬膜外注射(如类固醇注射)、针灸、锻炼、物理疗法、超声、手术疗法、捏脊手法、整骨推拿、化学溶核术或其任何组合。共同疗法可包括呼吸辅助装置或呼吸机的使用。共同疗法可包括施用再生疗法或免疫疗法(如蛋白质、干细胞、脐带血细胞、脐带组织、组织或其任何组合)。第二疗法可包括抗炎化合物或抗纤维化化合物(如吡非尼酮、尼达尼布、托珠单抗、吗替麦考酚酯/霉酚酸泼尼松、硫唑嘌呤或其组合)。第二疗法可包括生物类似药。

[0127] 在一些方面,当共同疗法是药物制剂时,所述药物制剂以固定剂量组合药物的形式包含在药物组合物中。

[0128] 在一些情况下,可将共同治疗给药方案施用约1周、约2周、约3周、约4周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周或约12周的持续时间。在一些情况下,可将给药方案施用约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月或约12个月的持续时间。在一些情况下,可将给药方案施用约1年、约2年或多于约3年的持续时间。

[0129] 在一些方面,本文公开了如本文所公开的共同疗法组合物的使用方法。在一些方面,每日口服给药方案可为约0.1毫克/千克(mg/kg)至约80mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约30mg/kg、或约0.5mg/kg至约15mg/kg。在一些方面,每日肠胃外给药方案可包括约0.1mg/kg至约10,000mg/kg总体重、约0.2mg/kg至约5,000mg/kg、或约0.5mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,每日外用给药方案可以是约0.1mg至约500mg。在一些方面,每日给药方案可以是每日约0.01mg/kg至约1,000mg/kg。在一些方面,可以按照所治疗的病症的性质和程度、施用的形式、途径和部位以及所治疗的特定受试者来确定组合物的单独剂量的最佳量和间隔,并且可以优选地通过本文所述的方法来确定此类最佳值。在一些方面,本领域技术人员可以使用治疗确定测试的常规过程来确定每天给予持续确定天数的组合物的剂量数。在一些方面,给药方案可由主治医师根据其他临床因素来确定。在一些方面,用于任何一个受试者的剂量可以取决于许多因素。在一些方面,影响剂量的因素可包括受试者的体型、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况、并行施用的其他药物或其任何组合。在一些方面,可通过定期评估来监测进展。

[0130] 在一些方面,可将本文所述的共同疗法向有需要的受试者施用一天或多天。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或约31天。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或约24个月。在一些方面,施用可进行约:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或约50年或更多年。在一些情况下,施用可终生进行。在一些方面,可在2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天或更多天施用本文所述的药物组合物。在一些情况下,可在连续日或非连续日施用本文所述的组合物。在一些情况下,可将本文所述的组合物每天多于一次施用于受试者。在一些情况下,可将本文所述的组合物每天1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次施用于受试者。

[0131] 在一些方面,作为药物制剂的定期施用的方案可以在1μg至10mg的范围内。在一些方面,作为药物组合物的定期施用的方案可以在每天、每周或每月10^2个单位至10^{10}个单位的范围内。在一些方面,如果方案包括连续输注,则方案也可以在1μg至10,000mg的药物制剂的范围内。在某些情况下,所述范围是1mg/千克体重至1000mg/千克体重。在一些方面,可通过定期评估来监测进展。

试剂盒

[0132] 试剂盒可包括容器中的DUX4靶向寡核苷酸、容器中的核酸构建体、容器中的载体、容器中的药物组合物。试剂盒可包括容器中的多于一种DUX4靶向寡核苷酸、容器中的多于一种载体、容器中的多于一种核酸构建体或容器中的多于一种药物组合物。在一些情况下,容器可以是塑料、玻璃或金属容器。容器可包括注射筒、小瓶、安瓿、袋、罐等。

[0133] 试剂盒可包括多个容器,每个容器包含一种或多种DUX4靶向寡核苷酸、或核酸构

建体、或载体、或药物组合物。试剂盒可包括用于储存DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物的赋形剂或稀释剂或缓冲液或液体或凝胶样介质。试剂盒可包括用于向受试者体内递送DUX4靶向寡核苷酸、核酸构建体、载体或药物组合物的赋形剂或稀释剂或缓冲液或液体或凝胶样介质。可将赋形剂或稀释剂或缓冲液或液体或凝胶样介质包含在容纳DUX4靶向寡核苷酸(或核酸构建体或载体或药物组合物)的容器中或容纳在单独容器中。试剂盒可包括递送媒介物(如注射筒或针)。试剂盒可包括用于下游分析的一种或多种试剂。

[0134] 在一些情况下,当将DUX4靶向寡核苷酸或其盐储存于封闭容器中并在约从约21至约25摄氏度(如约:21、22、23、24、25摄氏度)和约45％至约55％(如约:45％、46％、47％、48％、49％、50％、51％、52％、53％、54％、55％)的相对大气湿度下放置在室内至少约:1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月的时间段时,DUX4靶向寡核苷酸或其盐的初始量的至少约70％、75％、80％、85％、90％、95％保留。在一些情况下,时间段可以是约1个月至约1年。在一些情况下,时间段可以是约1个月至约2年。在一些情况下,时间段可以是约1个月至约6个月。在一些情况下,时间段可以是约1个月至约3年。在一些情况下,时间段可以是约1个月至约9个月。

诊断

[0135] 在一些情况下,方法可进一步包括将受试者诊断为患有疾病。在一些情况下,诊断可包括采用体外诊断。在一些情况下,体外诊断可以是伴随诊断。在其他情况下,诊断可包括体内诊断。

[0136] 诊断测试可包括成像程序、血细胞计数分析、组织病理学分析、生物标记物分析、活检、磁共振图像程序、体检、尿液测试、超声检查程序、遗传测试、肝功能测试、正电子发射断层扫描程序、X射线、血清学、血管造影术程序、心电描记术程序、内镜检查术、诊断性聚合酶链反应测试(PCR)、巴氏涂片、红细胞压积测试、皮肤过敏测试、尿液测试、结肠镜检查术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、显微术分析、骨髓检查、快速诊断测试、妊娠测试、器官功能测试、毒理学测试、感染性疾病测试、体液测试或其任何组合。

计算机控制系统

[0137] 本公开文本提供了被编程以实现本公开文本的方法的计算机控制系统。图15示出了计算机系统101,其被编程或以其他方式配置为预测或确认各种构建体对于治疗效果(如在FSHD的治疗中)的功效。计算机系统101可调节本公开文本的各个方面,如例如,对针对各种治疗靶标的构建体进行建模或鉴定,对构建体的功效或稳定性进行建模,或其任何组合。计算机系统101可以是用户的电子设备或相对于所述电子设备远程定位的计算机系统。所述电子设备可以是移动电子设备。

[0138] 计算机系统101包括中央处理单元(CPU,在本文中也称为“处理器”和“计算机处理器”)105,其可以是单核或多核处理器,或者是用于并行处理的多个处理器。计算机系统101还包括存储器或存储位置110(例如,随机存取存储器、只读存储器、闪存)、电子存储单元115(例如,硬盘)、用于与一个或多个其他系统通信的通信接口120(例如,网络适配器)、以及外围设备125(如高速缓冲存储器、其他存储器、数据存储设备和/或电子显示适配器)。存储器110、存储单元115、接口120和外围设备125通过通信总线(实线,如主板)与CPU 105通信。存储单元115可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据仓库)。借助于通信接口120,计算机系统101可以操作性地联接到计算机网络(“网络”)130。网络130可以是因特网、互联

网和/或外联网,或者与因特网通信的内联网和/或外联网。在一些情况下,网络130是电信和/或数据网络。网络130可以包括一个或多个计算机服务器,它们使得能够进行分布式计算,如云计算。在一些情况下借助于计算机系统101,网络130可以实现对等网络,这可以使联接到计算机系统101的设备能够充当客户端或服务器。

[0139] CPU 105可以执行一系列机器可读指令,所述指令可以在程序或软件中体现。所述指令可以存储在存储位置,如存储器110中。所述指令可以被引导到CPU 105,其随后可以对CPU 105进行编程或以其他方式配置以实现本公开文本的方法。CPU 105执行的操作的例子可以包括提取、解码、执行和写回。

[0140] CPU 105可以是电路(如集成电路)的一部分。所述电路中可以包括系统101的一个或多个其他部件。在一些情况下,所述电路是专用集成电路(ASIC)。

[0141] 存储单元115可以存储文件,如驱动程序、程序库和保存的程序。存储单元115可以存储用户数据,例如用户偏好和用户程序。在一些情况下,计算机系统101可以包括一个或多个另外的数据存储单元,所述一个或多个另外的数据存储单元位于计算机系统101的外部,如位于通过内联网或因特网与计算机系统101通信的远程服务器上。

[0142] 计算机系统101可以通过网络130与一个或多个远程计算机系统通信。例如,计算机系统101可以与用户的远程计算机系统通信。远程计算机系统的例子包括个人计算机(例如,便携式PC)、平板(slate)或平板(tablet)电脑(例如,Apple® iPad、Samsung® Galaxy Tab)、电话、智能手机(例如,Apple® iPhone、支持安卓的设备、Blackberry®)或个人数字助理。所述用户可以经由网络130访问计算机系统101。

[0143] 本文中描述的方法可以通过存储在计算机系统101的电子存储位置上(如例如,存储在存储器110或电子存储单元115上)的机器(例如,计算机处理器)可执行代码来实现。机器可执行代码或机器可读代码可以以软件的形式提供。在使用期间,所述代码可以由处理器105执行。在一些情况下,所述代码可以从存储单元1115回传并存储在存储器110中,以供处理器105迅速存取。在一些情况下,可以排除电子存储单元115,并且机器可执行指令存储在存储器110上。

[0144] 所述代码可以被预编译和配置成与具有适于执行所述代码的处理器的机器一起使用,或者可以在运行时间期间进行编译。所述代码可以用编程语言来提供,可以选择所述编程语言以使得所述代码能够以预编译的或如所编译的方式执行。

[0145] 本文提供的系统和方法的方面,如计算机系统101,可以在编程中体现。所述技术的各个方面可以被认为是“产品”或“制品”,通常呈机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据的形式,所述相关数据在一种类型的机器可读介质上承载或体现于所述介质中。机器可执行代码可以存储在电子存储单元上,例如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪存)或硬盘上。“存储”型介质可以包括计算机的任何或所有有形存储器、处理器等或其相关模块,例如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,它们可以在任何时间提供非暂时性存储用于软件编程。软件的全部或部分可以不时通过因特网或各种其他电信网络进行通信。例如,此类通信可以使得能够将软件从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器中,例如从管理服务器或主计算机加载到应用服务器的计算机平台中。因此,可以承载软件元件的另一种类型的介质包括光、电和电磁波,如跨越本地设备之间的物理接口、通过有线和光学陆地线网络以及利用各种空中链路来使用的。承载此类波的物理元件,例

如有线或无线链路、光链路等,也可以被认为是承载软件的介质。如本文所用,除非限于非暂时性的有形“存储”介质,否则诸如计算机或机器“可读介质”的术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0146] 因此,机器可读介质(如计算机可执行代码)可以采取许多形式,包括但不限于有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括例如光盘或磁盘,如任何一个或多个计算机等中的任何存储设备,如可用于实现如图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器,如这种计算机平台的主存储器。有形传输介质包括同轴电缆;铜线和光纤,包括构成计算机系统内的总线的导线。载波传输介质可以采取电信号或电磁信号的形式,或者声波或光波的形式,如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间产生的那些。因此,计算机可读介质的常见形式包括例如:软盘(floppy disk)、软盘(flexibledisk)、硬盘、磁带、任何其他磁性介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡、纸带、任何其他具有孔图案的物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储芯片或内存盒、传输数据或指令的载波、传输这种载波的电缆或链路、或者计算机可以从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。计算机可读介质的这些形式中的许多种可能参与将一个或多个指令的一个或多个序列传送到处理器以供执行。

[0147] 计算机系统101可包括电子显示器135或与其通信,所述电子显示器135包含用户接口(UI)140用于提供例如一个或多个结果(即时结果或来自先前方法的存档结果)、一个或多个用户输入、来自文库或数据库的参考值或其衍生值、或其任何组合。UI的例子包括但不限于图形用户接口(GUI)和基于万维网的用户接口。

[0148] 在一些情况下,如图15所示,含有遗传物质的样品202可获自受试者201(如人类受试者)。可以使样品202经历如本文所述的一种或多种方法(如进行测定)。在一些情况下,测定可包括测序(如纳米微孔测序)、基因分型、杂交、扩增、标记或其任何组合。可将来自方法的一个或多个结果输入处理器204中。可将一个或多个输入参数(如样品标识、受试者标识、样品类型、参考或其他信息)输入处理器204中。可将来自测定的一个或多个度量输入处理器204中,使得所述处理器可产生结果(如神经肌肉疾病的诊断或治疗的建议)。处理器可将结果、输入参数、度量、参考或其任何组合发送到显示器205(如视觉显示器或图形用户接口)。处理器204可以(i)将结果、输入参数、度量或其任何组合发送到服务器207,(ii)从服务器207接收结果、输入参数、度量或其任何组合,(iii)或其组合。

[0149] 本公开文本的方法和系统可以通过一种或多种算法来实现。算法可以在被中央处理单元105执行时通过软件来实现。所述算法可以例如经由监督学习以优化一种或多种构建体的治疗功效、稳定性或其他属性来确定优化的构建体。

实施例

实施例1:来自骨骼肌样品的DUX4序列

[0150] 对总共95个骨骼肌样品(其中70个源自FSHD患者,并且25个源自健康个体)的RNA-seq数据进行分析。使用的样品来自以下三个公开可用的数据集:Yao等人.2014(28)、Wong等人2020(17)和Wang等人2019(29)。此分析的结果示于图3中。然而,由于DUX4以如此低的水平表达以至于每个序列样品仅鉴定1或2个读段的事实,此方法在产生足够的数据以主要针对DUX4编码序列预测患者中的RNA序列变异方面并不成功。为了确信地预测个体之间的序列变异,每个样品通常需要50至100x的读段计数。只有位于外显子1中的DUX4的小区域符

合此标准。

实施例2:来自睾丸样品的DUX4序列

[0151] 决定测试此消极假设并分析来自206名个体的睾丸样品的RNA-seq数据(30)。出乎意料的是,此数据集足以预测肌肉特有转录物的外显子1、2、3之间的变异,其中此序列的平均覆盖度为117X(图4)。从此数据集中能够,DUX4编码序列中>85%保守的几个区域在所述方法中显示出前景。然而,DUX4的几个区域仍然没有足够的覆盖度来准确预测保守性,这可能是由于剪接异形体的差异。

实施例3:来自组合的肌肉和睾丸样品数据库的DUX4序列。

[0152] 为了解决此问题,采取一种非常独特且没有先例的方法,并且将肌肉RNA-seq和睾丸RNA-seq组合为一个合并的数据集并进行分析。对于此最终分析,能够从GTEX获得486个睾丸样品,并利用来自实施例1的95个骨骼肌样品。此最终分析生成最佳数据,产生针对超过97%的DUX4基因>50x的读段覆盖度,从而允许准确预测在患者之间大于85%保守的DUX4靶位点和OTN对(表4)。如上所述,所有所得OTN序列和削减的DUX4靶位点序列(都以DNA形式表示)以xml文件提交,涵盖SEQ.ID.NO 1-41,922。此数据将用于鉴定DUX4序列中在大多数FSHD患者之间保守的15-25个碱基的合适延伸以及用于OTN药物开发的选择。

表4:保守的DUX4区域

190173724-190173916、190173917-190173950、190173951-190174011、190174012-190174073、
190174074-190174231、190174232-190174291、190174292-190174343、190174344-190174517、
190174518-190174941、190174942-190175068、190175069-190175149、190175150-190175197、
190175198-190175218、190175219-190175285、190175286-190175414、190175415-190175588、
190175589-190175654、190175655-190175713、190175714-190175816、190175817-190175918、
190175919-190176359、190176360-190176589、190176590-190178325、190178326-190178341、
190178342-190178384、190178385-190178402、190178403-190178458、190178459-190178528、
190178529-190178585、190178586-190178886、190178887-190179164、190179165-190179573、
190179574-190179602、190179603-190179746、190179747-190179926、190179927-190180010、
190180011-190180125、190180126-190180225、190180226-190181024、190181025-190181092、
190181093-190181112、190181113-190181219、190181220-190181254、190181255-190181291、
190181292-190181441、190181442-190181625、190181626-190181656、190181657-190181909、
190181910-190181954、190181955-190182178、190182179-190182208、190182209-190182254、
190182255-190182357、190182358-190182437、190182438-190183539、190183540-190183738、
190183739-190183811、190183812-190183834、190183835-190184392、190184393-190184588、
190184589-190184611、190184612-190184807、190184808-190184858、190184859-190185155、
190185156-190185731、190185732-190185762、190185763-190185826、190185827-190185947。

[0153] 关于表4,染色体4q35上在个体之间>85%保守并且可以充当靶向DUX4的ONT的靶位点的编码DUX4的连续序列,用于治疗FSHD。DUX4的DNA序列和列出的坐标与Ensemble 101版(GRCh38.p13)一致。

[0154] 参考图1,此图描绘了导致FSHD的遗传修饰。1型FSHD是染色体4q35上的D4Z4重复序列从约100个重复序列缺失到小于11个重复序列,导致染色质开放和DUX4表达的结果。2型FSHD是表观遗传因子SMCHD1中功能丧失突变导致4q35上的D4Z4重复序列去甲基化、染色质开放和DUX4表达的结果。

[0155] 参考图2,此图示出了源自D4Z4区域的可变剪接的DUX4转录物。当在肌肉组织中表达时,ENST00000616166.1、ENST00000569241.5和ENST00000570263.5与FSHD相关。转录物ENST00000565211.1、ENST00000563716.5和ENST00000564366.1通常在其他组织中表达,并且与所述障碍无关。例如,ENST00000563716.5在睾丸中表达。

[0156] 参考图3,此图示出了来自FSHD和健康肌肉活检组织的可变剪接的DUX4转录物的RNA-Seq数据的读段覆盖。

[0157] 参考图4,此图示出了来自睾丸的可变剪接的DUX4转录物的RNA-Seq数据的读段覆盖。当在肌肉组织中表达时,可变剪接的DUX4转录物ENST00000616166.1、ENST00000569241.5和ENST00000570263.5与FSHD相关。

[0158] 参考图5,此图示出了DUX4靶向ASO的化学修饰可改善ASO对生物核酸酶的稳定性。将DUX4靶向ASO在37℃下在10%人血清中孵育指定的时间长度。通过变性尿素-PAGE使每个时间点的ASO稳定性可视化。未经修饰的寡核苷酸显示具有极短半衰期的未经修饰的DNA核酸的例子,阴性对照寡核苷酸显示不靶向DUX4但具有类似的化学修饰的ASO,而其他小图显示靶向DUX4的化学工程化的ASO。例外的例子展示对生物核酸酶的稳定性达7天(168小时)。

[0159] 参考表5,此表示出了靶向DUX4的经化学修饰的ASO针对生物核酸酶的计算半衰期。将DUX4 ASO在不同时间点在37℃下在10%人血清中孵育,并经由尿素-PAGE可视化。在每个时间点进行光密度测定,并根据公式$N_{(T)} = N_0 (1/2)^{t/t(1/2)}$计算每个时间点的ASO稳定性并取平均值,其中$N_{(T)}$是在时间点t的信号,$N_0$是在与核酸酶一起孵育前在开始时的信号,并且t(1/2)是半衰期。未经修饰的是指未经化学修饰的RNA,而阴性对照寡核苷酸是指经化学修饰但不靶向DUX4的ASO。

表5：人血清半衰期

ASO ID	半衰期（小时）	ASO ID	半衰期（小时）
未经修饰的	0.05	AS-DX-059-1	> 720
阴性对照寡核苷酸	> 720	AS-DX-098-1	427
AS-DX-001	119	AS-DX-099-1	> 720
AS-DX-002-1	15	AS-DX-027-2	> 720
AS-DX-002-2	291	AS-DX-027-3	> 720
AS-DX-005-1	63	AS-DX-027-4	> 720
AS-DX-008-1	124	AS-DX-100-01	> 720
AS-DX-010-1	150	AS-DX-101-01	> 720
AS-DX-010-2	505	AS-DX-102-01	> 720
AS-DX-011-1	282	AS-DX-103-01	> 720
AS-DX-012-1	700	AS-DX-105-01	353
AS-DX-015-1	336	AS-DX-033-2	601
AS-DX-101-1	139	AS-DX-033-3	> 720
AS-DX-102-1	238	AS-DX-107-1	433
AS-DX-103-1	77	AS-DX-108-1	334
AS-DX-104-1	108	AS-DX-50-3	> 720
AS-DX-105-1	45	AS-DX-50-4	> 720
AS-DX-106-1	256	AS-DX-110-1	668
AS-DX-107-1	128	AS-DX-111-1	540
AS-DX-108-1	118	AS-DX-59-2	611
AS-DX-120-1	111	AS-DX-112-1	> 720
AS-DX-007-1	> 720	AS-DX-59-3	> 720
AS-DX-016-1	> 720		
AS-DX-018-1	387		
AS-DX-023-1	339		
AS-DX-025-1	857		
AS-DX-027-1	487		
AS-DX-028-1	221		
AS-DX-029-1	377		
AS-DX-030-1	538		
AS-DX-033-1	198		
AS-DX-038-1	174		
AS-DX-040-1	322		
AS-DX-041-1	> 720		
AS-DX-050-1	350		
AS-DX-052-1	91		
AS-DX-057-1	401		

[0160] 参考图6A,此图示出了工程化DUX4 ASO的先天免疫刺激的减少。将人外周血单个核细胞(PBMC)(约2-6 x 10^5个细胞)铺板在圆底96孔板中,并以所指示ASO的133 nM浓度用RNAiMAX试剂转染48小时。通过ELISA对6个患者的上清液培养基中的IFN-α(左轴)和TNF-α(右轴)水平进行定量。聚(dA:dT)(阳性对照#1)和免疫刺激寡核苷酸(阳性对照#2)用作免疫刺激的阳性对照。没有寡核苷酸的RNAiMAX用作基线阴性对照(基线),而用不靶向DUX4的非免疫刺激RNA转染(阴性对照)展示低免疫刺激。

[0161] 参考图6B,此图进一步示出了通过Raw-Blue细胞测定(Invivogen,raw-sp)确定工程化DUX4 ASO的先天免疫刺激减少。简言之,将细胞以100,000个细胞/孔以150 uL铺板在U形底96孔板(Thermo,163320)中的具有10％FBS(Thermo,10082147)的DMEM(Thermo,11965092)中。在24小时后,将22.34 uL的OptiMEM(Thermo,31985088)与2.66 uL的10 uM ASO(每孔)和1 uL的Lipofectamine(每孔)混合。然后将Lipofectamine/ASO混合物添加到Raw细胞的每个孔中,以得到133nM的最终ASO浓度。使用1-10ng/mL的聚(dA:dT)(Invivogen,tlrl-patn)、133nM的CpG(invivogen,tlrl-1585)作为阳性对照。将细胞在37

度/5% CO2下与转染/ASO混合物一起孵育1天。在孵育后,将板以300xg轻轻旋转5min,然后从每个孔中收集20uL并添加到新的平底96孔板(VWR,29442-056)中。将180uL的QUANTI-Blue(Invivogen,rep-qbs)添加到每个孔的上清液中,并在37度/5% CO2下孵育30m-6小时。使用Cytation 5(Biotek)读取在620-655nm处的吸光度。数据表示六个重复孔的平均值,并且误差棒表示标准差。

[0162] 参考图7,DUX4 ASO HTS测定设计。表达eGFP的稳定人或小鼠成肌细胞,其中DUX4的编码序列位于3'UTR中。此构建体的组成型表达由用于强普遍表达的CMV驱动。转录编码eGFP-UTR-DUX4转录物的不受干扰的mRNA,并翻译eGFP序列。通过eGFP序列末端的终止密码子和DUX4的起始密码子的突变来防止毒性DUX4蛋白的翻译。高效靶向DUX4的ASO可与融合转录物结合并诱导通过RNA酶H或RISC降解,从而阻止GFP蛋白表达。在处理后,与实验ASO相比,在未处理的细胞和阴性对照转染中可以观察到荧光的减少,如通过读板仪或图像分析所测定,以有效地产生比较DUX4靶向ASO的功效的可再现结果。开发两种报告测定,一种在永生化小鼠成肌细胞系C2C12中进行,并且另一种在永生化人FSHD成肌细胞系15Abic中进行。

[0163] 参考表6,此表展示稳定的DUX4 GFP报告物的敲减筛选测定。在黑色壁透明底部96孔板中,将10,000个15Abic稳定细胞或1500个C2C12稳定细胞的铺板在其各自的培养基中。在附着后的第二天,然后使用Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(13778075,Thermo Fisher Scientific)转染细胞。对于每孔,将0.20μL/孔的Lipofectamine®RNAiMAX与5μL的Opti-MEM混合并孵育5分钟。然后添加等体积的在Opti-MEM中的20x ASO,使得两种转染混合物的总体积为10μL/孔,并且使得ASO在200μL的总孔体积中的最终浓度为12.5nM(对于c2c12细胞)或25nM(对于15Abic细胞)。将ASO-Opti-MEM混合物在室温下孵育15min。然后将10μL的所得转染试剂混合物添加到每个实验孔中。在6h后,将正常细胞培养基添加到每个孔中,然后将板在37℃下孵育72-96h。然后将培养基更换为50μL补充有分别为4mM和1mM的L-谷氨酰胺和丙酮酸钠的FluoroBrite DMEM培养基(A1896701,Thermo Fisher Scientific)以供读取。在Cytation 5细胞成像多模式读取器(Biotek Instruments)上在390+10nm激发和510+10nm发射下测量每个孔的荧光强度。在荧光测量后,去除无血清的FluoroBrite DMEM,并向每个孔中添加100μL的正常培养基,并且使用WST-8测量细胞活力/细胞计数。细胞活力测量遵循制造商的方案。简言之,随后将10μL的WST-8(ab228554,Abcam)添加到每个孔中,并振荡板以使试剂均匀分布。然后将板放回孵育器中持续30min至3小时,根据细胞密度和细胞类型而定。为了测量细胞活力,在Cytation 5上测量460nm处的吸光度。将每个孔的GFP测量相对于WST-8细胞计数归一化。表中的值表示来自六个重复孔的平均GFP表达,并显示为用阴性对照ASO处理的分数。

表6-用寡核苷酸疗法敲减GFP-DUX4报告物。

C2C12 GFP报告物测定			15Abic GFP报告物测定	
ASO名称	平均FC		ASO名称	平均FC
阴性对照	0.99		阴性对照	1.00
AS-DX-001-1	0.86		AS-DX-015-1	0.81
AS-DX-002-1	0.78		AS-DX-015-3	0.62
AS-DX-003-1	0.93		AS-DX-018-1	0.65
AS-DX-004-1	0.86		AS-DX-028-1	0.77
AS-DX-005-1	0.88		AS-DX-029-1	0.65
AS-DX-006-1	0.96		AS-DX-030-1	0.63
AS-DX-008-1	0.84		AS-DX-033-1	0.54

AS-DX-009-1	0.70		AS-DX-050-1	0.81
AS-DX-010-1	0.59		AS-DX-052-1	0.71
AS-DX-011-1	0.54		AS-DX-059-1	0.39
AS-DX-012-1	0.67		AS-DX-102-1	0.80
AS-DX-015-1	0.66		AS-DX-094-1	0.60
AS-DX-015-3	0.41		AS-DX-104-1	0.37
AS-DX-018-1	0.54		AS-DX-033-2	0.82
AS-DX-019-1	0.84		AS-DX-033-3	0.70
AS-DX-021-1	0.99		AS-DX-105-1	0.83
AS-DX-022-1	0.85		AS-DX-106-1	0.84
AS-DX-023-1	0.53		AS-DX-059-2	0.39
AS-DX-025-1	0.57		AS-DX-112-1	0.47
AS-DX-026-1	0.55		AS-DX-114-1	0.77
AS-DX-027-1	0.33		AS-DX-116-1	0.69
AS-DX-028-1	0.55		AS-DX-117-1	0.70
AS-DX-029-1	0.53		AS-DX-118-1	0.79
AS-DX-030-1	0.56		AS-DX-119-1	0.64
AS-DX-032-1	0.80		AS-DX-120-1	0.78
AS-DX-033-1	0.53		AS-DX-122-1	0.53
AS-DX-034-1	0.89		AS-DX-123-1	0.40
AS-DX-035-1	0.87		AS-DX-124-1	0.44
AS-DX-036-1	1.03		AS-DX-125-1	0.41
AS-DX-037-1	0.87		AS-DX-126-1	0.62
AS-DX-038-1	0.53		AS-DX-031-1	0.37
AS-DX-040-1	0.48		AS-DX-128-1	0.42
AS-DX-041-1	0.43		AS-DX-129-1	0.60
AS-DX-043-1	0.83		AS-DX-130-1	0.51
AS-DX-044-1	0.75		AS-DX-131-1	0.96
AS-DX-045-1	0.59		AS-DX-132-1	0.86
AS-DX-046-1	0.97		AS-DX-133-1	0.45
AS-DX-018-2	0.82		AS-DX-133-2	0.40
AS-DX-048-1	0.84		AS-DX-134-2	0.88
AS-DX-049-1	0.89		AS-DX-135-1	0.80
AS-DX-050-1	0.98		AS-DX-136-1	0.61
AS-DX-051-1	0.66		AS-DX-137-1	0.69
AS-DX-052-1	0.59		AS-DX-045-2	0.63
AS-DX-054-1	0.86		AS-DX-138-1	0.67
AS-DX-055-1	0.87		AS-DX-139-1	0.66
AS-DX-057-1	0.67		AS-DX-106-2	0.71
AS-DX-058-1	0.72		AS-DX-140-1	0.79
AS-DX-059-1	0.27		MRC-2107	0.64
AS-DX-023-2	0.60			
AS-DX-023-3	0.39			
AS-DX-098-1	0.62			
AS-DX-099-1	0.55			
AS-DX-027-2	0.55			
AS-DX-027-3	0.68			
AS-DX-027-4	0.56			

AS-DX-100-1	0.50			
AS-DX-094-1	0.44			
AS-DX-104-1	0.34			
AS-DX-033-2	0.42			
AS-DX-033-3	0.18			
AS-DX-105-1	0.29			
AS-DX-106-1	0.50			
AS-DX-107-1	0.30			
AS-DX-108-1	0.23			
AS-DX-059-2	0.50			
AS-DX-112-1	0.50			
AS-DX-113-1	0.58			
AS-DX-059-3	0.20			
AS-DX-116-1	0.90			
AS-DX-117-1	0.89			
AS-DX-118-1	0.94			
AS-DX-119-1	0.63			
AS-DX-120-1	0.78			
AS-DX-128-1	0.62			
AS-DX-129-1	0.70			
AS-DX-130-1	0.94			
AS-DX-131-1	0.84			
AS-DX-132-1	0.63			
AS-DX-133-1	0.56			
AS-DX-133-2	0.75			
AS-DX-134-1	0.74			
AS-DX-134-2	0.77			
AS-DX-135-1	0.88			
AS-DX-137-1	0.52			
AS-DX-045-2	0.91			
AS-DX-139-1	0.76			
AS-DX-106-2	0.82			
AS-DX-140-1	0.53			
AS-DX-033-4	0.69			
AS-DX-141-1	0.59			
AS-DX-112-2	0.54			
AS-DX-142-1	0.72			
MRC-2107	0.71			

[0164] 参考图8A,此图示出了治疗性ASO具有FSHD肌管中DUX4的强敲减。将永生化的FSHD成肌细胞在80％汇合时铺板,并在24小时后用50nM或25nM的对照或抗DUX4 ASO和lipofectamine RNAimax(Thermo)转染,然后孵育24小时。然后将细胞经96小时分化为DUX4阳性FSHD肌管,然后进行总RNA收集和qRT-PCR。使用GAPDH作为内部对照。值表示各自具有三次技术重复的两个实验的平均值,并且误差棒表示SEM。*对于两种剂量按照学生t检验$p<0.05$。

[0165] 参考图8B和表7,其展示了FSHD成肌细胞中DUX4和DUX4诱导的基因ZSCAN4和SLC34A2的敲减。将15Abic或C6细胞以每孔150,000个细胞的密度铺板在十二个24孔细胞培养板中的人肌源性前体细胞(hMPC)培养基中。hMPC培养基由以下构成:500mL RoosterBasal™-MSC、10mL RoosterBooster™-MSC(KT-001,RoosterBio)、91mL的胎牛血清

(10082147,Thermo Fisher)和50mL的100mM丙酮酸钠(11360070,Thermo Fisher)。在将细胞铺板在hMPC培养基中后三天,将培养基更换为hMPC分化培养基,所述hMPC分化培养基由以下构成:500mL RoosterBasal™-MSC、10mL RoosterBooster™-MSC、11.4mL的马血清(16050130,Thermo Fisher)和50mL的100mM丙酮酸钠。在将细胞铺板在hMPC培养基中后十天(在将细胞铺板在hMPC分化培养基中后七天),根据制造商的说明在1mL的孔体积中使用0.875μL的Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(13778075,Thermo Fisher)和3.125nM或6.5nM ASO对细胞进行正向转染。在转染后五天,将细胞裂解到350μL的缓冲液RLT(79216,Qiagen)中。按照制造商的说明使用Direct-zol-96RNA试剂盒(R2056,Zymo Research)提取RNA。按照制造商的说明使用NanoDrop 1000(Thermo Fisher)确定经纯化的RNA浓度。按照制造商对具有ezDNase™酶试剂盒的SuperScript™IV第一链合成系统(18091150,Thermo Fisher)的说明生成cDNA,所述说明具有以下修改。在消化基因组DNA后添加1μL的110μM二硫苏糖醇。在逆转录期间,使用1μL的50μM锚定的寡核苷酸d(T)20作为引物。在cDNA生成后,进行qPCR对三种靶基因:DUX4-fl(DUX4-全长)、SLC34A2和ZSCAN4,以及一种对照基因:RPL13A进行定量。使用双重淬灭的PrimeTime qPCR探针和引物(正向引物、反向引物和探针构成测定)进行复用的基于探针的qPCR反应。简言之,在96孔板的每个孔中,将10μL的PrimeTime®基因表达预混液(1055772,Integrated DNA Technologies)与100ng的cDNA和0.25μL的每种20X测定物(DUX4-fl,SLC34A2,ZSCAN4,RPL13A)以及一定体积的水混合,使得每个孔的总体积为20μL。使用LightCycler 96(Roche Diagnostics)进行热循环和板读取。循环条件如下:聚合酶在95℃下激活180秒,在95℃下变性15秒,并在60℃下退火/延长60秒,且将所述变性和退火/延长步骤重复40个循环。在每个循环后的退火/延长步骤结束时读取荧光。使用LightCycler 96软件自动确定循环阈值。按照Taylor等人,2019(“The Ultimate qPCR Experiment:Producing Publication Quality,Reproducible Data the First Time”)描述的方法计算靶基因的归一化相对表达。然后将三种靶基因的表达加在一起,并产生条形图来描述相对于阴性对照ASO,靶基因的归一化的相对复合敲减。

表7.在用DUX4靶向ODN的3.125nM处理之后,针对DUX4和DUX4调节基因ZSCAN4和SLC34A2的敲减的qRT-PCR。

ASO名称	DUX4fl表达	DUX4fl错误
阴性对照ASO	1.00	0.66
AS-DX-001-1	0.03	0.01
AS-DX-002-1	0.24	0.19
AS-DX-003-1	0.05	0.01
AS-DX-004-1	0.32	0.25
AS-DX-005-1	0.06	0.00
AS-DX-006-1	0.15	0.09
AS-DX-007-1	0.14	0.09
AS-DX-008-1	0.10	0.05
AS-DX-010-1	0.19	0.16

ASO名称	ZSCAN4表达	ZSCAN4错误	SLC34A2表达	SLC34A2错误
阴性对照ASO	1.00	0.41	1.00	0.75
AS-DX-002-1	0.83	0.09	0.51	0.14
AS-DX-008-1	1.11	0.24	0.65	0.29
AS-DX-015-1	0.93	0.09	0.07	0.12
AS-DX-015-3	0.77	0.13	0.72	0.41
AS-DX-018-1	1.11	0.04	0.86	0.44
AS-DX-025-1	2.08	0.28	0.30	0.08
AS-DX-028-1	1.31	0.13	0.42	0.25
AS-DX-029-1	1.55	0.45	0.83	0.44
AS-DX-030-1	0.69	0.08	0.33	0.17

AS-DX-011-1	0.22	0.17
AS-DX-012-1	0.18	0.12
AS-DX-015-1	0.28	0.17
AS-DX-015-3	0.04	0.00
AS-DX-018-1	0.05	0.00
AS-DX-019-1	0.03	0.00
AS-DX-021-1	0.87	0.87
AS-DX-022-1	0.18	0.14
AS-DX-023-1	0.21	0.17
AS-DX-025-1	0.07	0.01
AS-DX-026-1	0.07	0.01
AS-DX-027-1	0.05	0.00
AS-DX-028-1	0.22	0.18
AS-DX-029-1	0.06	0.00
AS-DX-030-1	0.04	0.00
AS-DX-032-1	0.13	0.01
AS-DX-033-1	0.11	0.03
AS-DX-034-1	0.09	0.03
AS-DX-035-1	0.12	0.03
AS-DX-036-1	0.04	0.01
AS-DX-037-1	0.06	0.00
AS-DX-038-1	0.06	0.00
AS-DX-040-1	0.06	0.01
AS-DX-041-1	0.07	0.00
AS-DX-043-1	0.09	0.00
AS-DX-044-1	0.07	0.00
AS-DX-045-1	0.07	0.01
AS-DX-046-1	0.06	0.00
AS-DX-018-2	0.22	0.06
AS-DX-048-1	0.12	0.02
AS-DX-049-1	0.08	0.00
AS-DX-050-1	0.08	0.02
AS-DX-051-1	0.07	0.01
AS-DX-052-1	0.07	0.00
AS-DX-053-1	0.18	0.08
AS-DX-054-1	0.08	0.01

AS-DX-033-1	1.28	0.06	0.52	0.05
AS-DX-038-1	1.52	0.04	0.37	0.14
AS-DX-041-1	1.04	0.03	0.09	0.03
AS-DX-048-1	0.66	0.03	0.35	0.09
AS-DX-050-1	0.87	0.16	0.18	0.09
AS-DX-051-1	0.90	0.07	0.81	0.16
AS-DX-052-1	1.21	0.07	0.41	0.07
AS-DX-056-1	0.67	0.05	0.51	0.13
AS-DX-059-1	1.04	0.04	1.24	0.30
AS-DX-023-2	1.28	0.38	0.92	0.81
AS-DX-023-3	1.54	0.19	1.73	0.19
AS-DX-027-2	1.21	0.11	0.31	0.15
AS-DX-027-4	0.78	0.12	0.18	0.09
AS-DX-104-1	0.63	0.10	0.63	0.42
AS-DX-033-3	0.47	0.05	0.09	0.01
AS-DX-105-1	0.58	0.09	0.24	0.03
AS-DX-050-4	0.73	0.14	1.00	0.37
AS-DX-109-1	0.61	0.09	0.44	0.26
AS-DX-112-1	0.84	0.14	0.30	0.24
AS-DX-113-1	0.55	0.03	0.25	0.10

AS-DX-055-1	0.08	0.00
AS-DX-056-1	0.08	0.02
AS-DX-057-1	0.09	0.02
AS-DX-058-1	0.06	0.01
AS-DX-059-1	0.06	0.00
AS-DX-023-2	0.05	0.00
AS-DX-023-3	0.20	0.19
AS-DX-098-1	0.06	0.00
AS-DX-027-2	0.07	0.01
AS-DX-027-3	0.08	0.00
AS-DX-027-4	0.23	0.17
AS-DX-100-1	0.40	0.30
AS-DX-101-1	0.27	0.22
AS-DX-094-1	0.17	0.09
AS-DX-104-1	0.06	0.02
AS-DX-033-2	0.15	0.09
AS-DX-033-3	0.03	0.00
AS-DX-105-1	0.14	0.08
AS-DX-106-1	0.16	0.07
AS-DX-107-1	0.06	N/A
AS-DX-108-1	0.09	0.01
AS-DX-050-2	0.06	0.02
AS-DX-050-3	0.25	0.28
AS-DX-050-4	0.05	0.00
AS-DX-109-1	0.05	0.00
AS-DX-007-3	0.12	0.04
AS-DX-111-1	0.08	0.02
AS-DX-059-2	0.06	0.02
AS-DX-112-1	0.08	0.02
AS-DX-113-1	0.33	0.22

[0166] 参考表8,此表显示了HepG2肝细胞中DUX4靶向ASO的LD-50值。使HEPG2细胞(HB-8065,ATCC,弗吉尼亚州马纳萨斯)在补充有10％ FBS(FBS,16000044,Thermo Fisher Scientific)和1X青霉素-链霉素(15140122,Thermo Fisher Scientific)的DMEM(10-013-CV,Corning Inc.)中生长。使细胞在37℃和5％ CO2下在加湿孵育器中生长。在96孔板中,将5,000个细胞铺板在180μL不含抗生素的培养基中。紧接在铺板之后,使用Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(13778075,Thermo Fisher Scientific)转染细胞。对于ASO的100nM转染,将0.4μL/孔的RNAiMAX稀释到10μL的Opti-MEM中,然后与10μL的1μM ASO(10x最终培养体积)在Opti-MEM中合并,并在室温下孵育15分钟。通过100nM复合物的连续1:2稀释产生更低剂量的ASO。通过增加ASO的浓度但维持0.4μL/孔(这是可以使用而不引起细胞毒性的最高剂量)的RNAiMAX来制备更高的浓度。然后在复合物形成的30分钟内将20μL适当稀释的ASO/RNAiMAX复合物添加到每个孔中。将板轻轻振荡以将转染试剂均匀地分布在孔中,然后将板放回孵育器中。在37℃下将细胞处理72-96小时。在处理后,去除转染培养基,并向每个孔中添加100μL的新鲜培养基,并进行WST-8测定以测量细胞活力/细胞计数。细胞活力测量遵循制造商的方案。简言之,将10μL的WST-8(ab228554,Abcam)添加到每个孔中,并振荡板以使试剂均匀分布。然后将板放回孵育器中持续90min。接下来,在Cytation 5上测量460nm处的吸光度。通过从含有细胞的孔减去无细胞孔(其中仅具有培养基和WST8试

剂的孔)的平均背景细胞活力测量值来分析数据。通过相对于仅用Opti-mem模拟转染的孔进行归一化来计算细胞活力。使用为此目而设计的定制excel宏从剂量曲线推知致死剂量50(LD50)浓度值。

表8：DUX4靶向ASO在HepG2肝细胞中的致死剂量50值。

ASO名称	IC50	ASO名称	IC50
阴性对照ASO	> 300	AS-DX-059-1	283.17
AS-DX-007-1	> 300	AS-DX-027-2	38.66
AS-DX-015-1	> 300	AS-DX-027-4	38.91
AS-DX-015-3	153.17	AS-DX-100-1	96.77
AS-DX-018-1	67.84	AS-DX-033-2	177.65
AS-DX-023-1	31.11	AS-DX-033-3	52.43
AS-DX-025-1	53.00	AS-DX-105-1	51.96
AS-DX-027-1	10.30	AS-DX-106-1	60.38
AS-DX-028-1	50.22	AS-DX-107-1	88.52
AS-DX-029-1	42.15	AS-DX-108-1	112.89
AS-DX-030-1	> 300	AS-DX-050-2	113.08
AS-DX-033-1	53.84	AS-DX-050-3	> 300
AS-DX-038-1	> 300	AS-DX-050-4	> 300
AS-DX-040-1	68.18	AS-DX-109-1	105.82
AS-DX-041-1	40.99	AS-DX-007-3	> 300
AS-DX-050-1	96.11	AS-DX-111-1	> 300
AS-DX-052-1	> 300	AS-DX-059-2	> 300
AS-DX-057-1	42.42	AS-DX-112-1	> 300
AS-DX-058-1	14.50	AS-DX-059-3	> 300

[0167] 参考图9,此图示出了通过多靶向反义寡核苷酸(ASO)在FSHD患者成肌细胞中对DUX4和DBET RNA转录物的同时敲减。AS-DX-10仅靶向DUX4转录物,而AS-DX-25、AS-DX-37和AS-DX-55靶向DUX4和DBET转录物二者。将永生化的15Abic成肌细胞铺板在12孔板中,并在第二天使用转染试剂RNAiMAX用50nM的对照或靶ASO进行转染。在铺板后一天,添加分化培养基以诱导成肌细胞形成和DUX4表达。在转染后72h,裂解细胞并从孔中收集总RNA,并进行RT-qPCR以确定DUX4或DBET转录物的表达。ASO AS-DX-25、AS-DX-37和AS-DX-55敲减DUX4和DBET转录物二者,而AS-DX-10仅敲减DUX4。

实施例4:ASO靶序列的MC-DX4脱靶分析和验证

鉴定脱靶转录物

[0168] 在跨越DUX4区域chr4:190,173,774-190,185,942的参考序列中以1bp滑动产生DUX4编码基因(ENSG00000258389.2)中从15bp至20bp的所有潜在反向互补体ASO位置。使用GGGenome(https://gggenome.dbcls.jp/)的修改脚本将我们的寡核苷酸序列与人转录组(Human RNA Refseq release 205,2021年3月)快速比对。此脚本鉴定与靶向DUX4的每个可能的ASO部分互补的所有转录物。然后,用算法分析这些命中以鉴定更高可能的脱靶。这些脱靶可能含有多达3个错配、空位或凸起(WO 2021203043),但它们必须遵守与结构构象、亲和力和转录物表达有关的一系列其他原则。即使使用这些过滤器,仍然存在许多预测的脱

靶转录物,这些转录物可能是假阳性或背景依赖性的,并且需要通过体外和体内实验测试加以验证。

过滤潜在阳性FSHD相关靶标的脱靶相互作用

[0169] 患者分离和基因表达分析是用于了解疾病生物学的所公开的数据分析策略的关键部分。这始于从报道来自肌肉组织和患者细胞的RNA表达模式的文献中收集可用的数据集。诸位发明人组建10项研究的数据库,所述研究对于样品处理、通过微阵列和RNAseq进行转录组分析和重要的患者信息具有严格的标准。这10项研究包括:在过表达DUX4的成肌细胞中表达增加的基因(Tsumagari等人2011(31)、Pakula等人2013,(32)、Geng等人2012(33)和Mitsuhashi等人2021(34));人肌肉活检的微阵列研究(Winokur等人2003(35)和Rahimov等人2012(36));以及RNA-seq分析(Yao等人2014(28)、Wong等人2020(17)和Wang等人2019(29))。这些研究的一个缺点是,它们的患者数量通常较低,因此缺乏统计检验力。为了克服这个问题,诸位发明人用可用数据从三个RNA-seq研究创建新数据集,以改善统计检验力和导出与患者临床属性的相关性的能力。图10示出了对我们的数据集和我们的分析的概述。

[0170] 首先,诸位发明人在公开的数据集中或使用诸位发明人自有RNA-seq分析鉴定通常在FSHD肌肉中相比于对照肌肉中上调的基因。诸位发明人还利用主成分分析和层次聚类将患者分组,并比较对照样品与这些组之间的表达模式。有趣的是,所述聚类与临床严重程度得分(即,轻度、中度或重度疾病)基本符合。支持此分析,从来自更大元分析中包括的样品子集的类似分析获得类似的结果,如图11所示。通过此分析,诸位发明人创建FSHD中上调基因的数据库,每个基因附带这种失调的支持证据以及任何相关的临床相关性。通过此数据库,诸位发明人接下来利用GO途径分析进行途径富集分析(37)。主要的上调途径包括炎症反应和其他免疫调节途径、细胞增殖、细胞周期调节和纤维化。

[0171] 在组建FSHD相关基因和途径的此数据库后,然后针对这个列表过滤我们鉴定的潜在的脱靶相互作用。与FSHD相关基因或共同靶标匹配的潜在脱靶相互作用显示在表2的最右列中。例如,预测AS-DX-007靶向与FSHD相关的三个共同靶标(DBET、MKI67和IRF5)。DBET是与D4Z4重复序列的开放和DUX4的表达相关的非编码RNA(38)。MKI67编码Ki-67蛋白,其在上调的FSHD肌肉组织中被检测到,并可能参与肌纤维细胞增殖和损伤的DUX4诱导(图12A)。IRF5(干扰素调节因子5)编码通过几种炎症信号上调的转录因子,并导致几种细胞因子(如TNF)的表达和细胞内干扰素反应的诱导(图12B)。分析还展示了这些基因在轻度和重度FSHD中的表达增加(图13)。

过滤潜在的负毒性相关相互作用的脱靶相互作用

[0172] 为了鉴定可能与可能需要避免的毒性相关的潜在脱靶相互作用,诸位发明人利用积累同行评审出版物的Ingenuity知识数据库和来自Tox net的毒性相关基因表达数据集和其他数据库将脱靶基因与潜在毒性相关联。诸位发明人还通过go途径分析鉴定与肌肉分化、发育和功能相关的基因。诸位发明人过滤鉴定为脱靶相互作用的寡核苷酸序列用于针对IPA毒性知识库或go途径的匹配。例如,NR4A1与肝和肾细胞死亡和纤维化以及肌细胞分化相关。

通过qRT-PCR验证共同靶标相互作用

[0173] 为了验证脱靶相互作用,使用FSHD成肌细胞系15Abic。将2.5e5个15abic成肌细胞铺板在6孔板中。在24小时后,去除复制培养基,并且添加2mL的分化培养基和250μL的含有

适当ASO RNAimax复合物的optimum,使得每种ASO的最终浓度为50nM。ASO处理包括荧光阴性对照ASO、作为阳性对照的仅靶向DUX4的AS-DX-015-1、或者可共同靶向DBET、IRF5和MKI67的AS-DX-007-1或AS-DX-050-1。在转染开始时,向细胞添加分化培养基以诱导融合为肌管和DUX4表达。参考图14A,其显示了在转染后48小时在优化条件下荧光ASO的转染效率接近100％。在转染96小时后,通过细胞形态观察肌管融合,并收集总RNA。产生cDNA,并对DUX4和共同靶基因进行qRT-PCR。参考图14B,此图显示了三个生物重复孔的平均值,并且误差棒表示平均值的标准误差。*表示按照双尾学生t检验,p值<0.05。对于所有ASO,观察到DUX4的稳健敲减,并且对于AS-DX-007-1和AS-DX-050-1,观察到共同靶标的显著敲减。

[0174] 虽然已在本文中示出和描述了本公开文本的优选方面,但此类方面仅以举例的方式提供。可以进行许多变化、改变和取代。应理解,在此描述的本公开文本的方面的多种替代方案可以用于实施本公开文本。以下权利要求旨在限定本公开文本的范围,并且在这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构涵盖在其中。

参考文献

1.Hamel J,Tawil R.Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy:Update on Pathogenesis and Future Treatments.Neurotherapeutics.2018;15(4):863-71.doi:10.1007/s13311-018-00675-3.PubMed PMID:30361930;PMCID:PMC6277282.

2.Do TN,Street N,Donnelly J,Adams MM,Cunniff C,Fox DJ,Weinert RO,Oleszek J,Romitti PA,Westfield CP,Bolen J,Muscular Dystrophy Surveillance T,Research N.Muscular Dystrophy Surveillance,Tracking,and Research Network pilot:Population-based surveillance of major muscular dystrophies at four U.S.sites,2007-2011.Birth Defects Res.2018;110(19):1404-11.doi:10.1002/bdr2.1371.PubMed PMID:30070776;PMCID:PMC6265066.

3.Richards M,Coppee F,Thomas N,Belayew A,Upadhyaya M.Facioscapulohumeral muscular dystrophy(FSHD):an enigma unravelled?Hum Genet.2012;131(3):325-40.doi:10.1007/s00439-011-1100-z.PubMed PMID:21984394.

4.Kowaljow V,Marcowycz A,Ansseau E,Conde CB,Sauvage S,Matteotti C,Arias C,Corona ED,Nunez NG,Leo O,Wattiez R,Figlewicz D,Laoudj-Chenivesse D,Belayew A,Coppee F,Rosa AL.The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein.Neuromuscul Disord.2007;17(8):611-23.doi:10.1016/j.nmd.2007.04.002.PubMed PMID:17588759.

5.Celegato B,Capitanio D,Pescatori M,Romualdi C,Pacchioni B,Cagnin S,Vigano A,Colantoni L,Begum S,Ricci E,Wait R,Lanfranchi G,Gelfi C.Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes.Proteomics.2006;6(19):5303-21.doi:10.1002/pmic.200600056.PubMed PMID:17013991.

6.A prospective,quantitative study of the natural history of facioscapulohumeral muscular dystrophy(FSHD):implications for therapeutic

trials.The FSH-DY Group.Neurology.1997;48(1):38-46.doi:10.1212/wnl.48.1.38.PubMed PMID:9008491.

7.Tawil R,Forrester J,Griggs RC,Mendell J,Kissel J,McDermott M,King W,Weiffenbach B,Figlewicz D.Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy.The FSH-DY Group.Ann Neurol.1996;39(6):744-8.doi:10.1002/ana.410390610.PubMed PMID:8651646.

8.Mah JK,Chen YW.A Pediatric Review of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy.J Pediatr Neurol.2018;16(4):222-31.doi:10.1055/s-0037-1604197.PubMed PMID:30923442;PMCID:PMC6435288.

9.Padberg GW,Brouwer OF,de Keizer RJ,Dijkman G,Wijmenga C,Grote JJ,Frants RR.On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy.Muscle Nerve Suppl.1995(2):S73-80.PubMed PMID:23573590.

10.Ansseau E,Vanderplanck C,Wauters A,Harper SQ,Coppee F,Belayew A.Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in FaciosScapuloHumeral Muscular Dystrophy(FSHD).Genes(Basel).2017;8(3).doi:10.3390/genes8030093.PubMed PMID:28273791;PMCID:PMC5368697.

11.Bao B,Maruyama R,Yokota T.Targeting mRNA for the treatment of facioscapulohumeral muscular dystrophy.Intractable Rare Dis Res.2016;5(3):168-76.doi:10.5582/irdr.2016.01056.PubMed PMID:27672539;PMCID:PMC4995414.

12.Wallace LM,Garwick SE,Mei W,Belayew A,Coppee F,Ladner KJ,Guttridge D,Yang J,Harper SQ.DUX4,a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy,causes p53-dependent myopathy in vivo.Ann Neurol.2011;69(3):540-52.doi:10.1002/ana.22275.PubMed PMID:21446026;PMCID:PMC4098764.

13.Chen JC,King OD,Zhang Y,Clayton NP,Spencer C,Wentworth BM,Emerson CP,Jr.,Wagner KR.Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics.Mol Ther.2016;24(8):1405-11.doi:10.1038/mt.2016.111.PubMed PMID:27378237;PMCID:PMC5023379.

14.Wallace LM,Saad NY,Pyne NK,Fowler AM,Eidahl JO,Domire JS,Griffin DA,Herman AC,Sahenk Z,Rodino-Klapac LR,Harper SQ.Pre-clinical Safety and Off-Target Studies to Support Translation of AAV-Mediated RNAi Therapy for FSHD.Mol Ther Methods Clin Dev.2018;8:121-30.doi:10.1016/j.omtm.2017.12.005.PubMed PMID:29387734;PMCID:PMC5787672.

15.Wallace LM,Liu J,Domire JS,Garwick-Coppens SE,Guckes SM,Mendell JR,Flanigan KM,Harper SQ.RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo:implications for a targeted FSHD therapy.Mol Ther.2012;20(7):1417-23.doi:10.1038/mt.2012.68.PubMed PMID:22508491;PMCID:PMC3392971.

16.Pandey SN,Lee YC,Yokota T,Chen YW.Morpholino treatment improves

muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice.Mol Ther.2014;22(2):390-6.doi:10.1038/mt.2013.263.PubMed PMID:24232919;PMCID:PMC3916049.

17.Wong CJ,Wang LH,Friedman SD,Shaw D,Campbell AE,Budech CB,Lewis LM,Lemmers R,Statland JM,van der Maarel SM,Tawil RN,Tapscott SJ.Longitudinal measures of RNA expression and disease activity in FSHD muscle biopsies.Hum Mol Genet.2020;29(6):1030-43.doi:10.1093/hmg/ddaa031.PubMed PMID:32083293;PMCID:PMC7158378.

18.Xie S,Xiang Y,Wang X,Ren H,Yin T,Ren J,Liu W.Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation:Roles of cell proliferation signal pathways.Laryngoscope.2016;126(8):1923-30.doi:10.1002/lary.25834.PubMed PMID:26989841.

19.Elkon KB,Briggs TA.The(Orf)ull truth about IRF5 and type I interferons in SLE.Nat Rev Rheumatol.2020;16(10):543-4.doi:10.1038/s41584-020-0472-7.PubMed PMID:32709997.

20.S.T.C.Antisense Drug Technology:Principles,Strategies,and Applications,Second Edition2008.

21.Reinert K,Langmead B,Weese D,Evers DJ.Alignment of Next-Generation Sequencing Reads.Annu Rev Genomics Hum Genet.2015;16:133-51.doi:10.1146/annurev-genom-090413-025358.PubMed PMID:25939052.

22.van der Maarel SM,Frants RR.The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy.Am J Hum Genet.2005;76(3):375-86.doi:10.1086/428361.PubMed PMID:15674778;PMCID:PMC1196390.

23.Ballarati L,Piccini I,Carbone L,Archidiacono N,Rollier A,Marozzi A,Meneveri R,Ginelli E.Human genome dispersal and evolution of 4q35 duplications and interspersed LSau repeats.Gene.2002;296(1-2):21-7.doi:10.1016/s0378-1119(02)00858-2.PubMed PMID:12383499.

24.Das S,Chadwick BP.Influence of Repressive Histone and DNA Methylation upon D4Z4 Transcription in Non-Myogenic Cells.PLoS One.2016;11(7):e0160022.doi:10.1371/journal.pone.0160022.PubMed PMID:27467759;PMCID:PMC4965136.

25.Snider L,Asawachaicharn A,Tyler AE,Geng LN,Petek LM,Maves L,Miller DG,Lemmers RJ,Winokur ST,Tawil R,van der Maarel SM,Filippova GN,Tapscott SJ.RNA transcripts,miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units:new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy.Hum Mol Genet.2009;18(13):2414-30.doi:10.1093/hmg/ddp180.PubMed PMID:19359275;PMCID:PMC2694690.

26.Hagedorn PH,Pontoppidan M,Bisgaard TS,Berrera M,Dieckmann A,Ebeling M,Moller MR,Hudlebusch H,Jensen ML,Hansen HF,Koch T,Lindow M.Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense

oligonucleotides in mice.Nucleic Acids Res.2018;46(11):5366-80.doi:10.1093/nar/gky397.PubMed PMID:29790953;PMCID:PMC6009603.

27.Scharner J,Ma WK,Zhang Q,Lin KT,Rigo F,Bennett CF,Krainer AR.Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides.Nucleic Acids Res.2020;48(2):802-16.doi:10.1093/nar/gkz1132.PubMed PMID:31802121;PMCID:PMC6954394.

28.Yao Z,Snider L,Balog J,Lemmers RJ,Van Der Maarel SM,Tawil R,Tapscott SJ.DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle.Hum Mol Genet.2014;23(20):5342-52.doi:10.1093/hmg/ddu251.PubMed PMID:24861551;PMCID:PMC4168822.

29.Wang LH,Friedman SD,Shaw D,Snider L,Wong CJ,Budech CB,Poliachik SL,Gove NE,Lewis LM,Campbell AE,Lemmers R,Maarel SM,Tapscott SJ,Tawil RN.MRI-informed muscle biopsies correlate MRI with pathology and DUX4 target gene expression in FSHD.Hum Mol Genet.2019;28(3):476-86.doi:10.1093/hmg/ddy364.PubMed PMID:30312408;PMCID:PMC6337697.

30.Consortium GT.The Genotype-Tissue Expression(GTEx)project.Nat Genet.2013;45(6):580-5.doi:10.1038/ng.2653.PubMed PMID:23715323;PMCID:PMC4010069.

31.Tsumagari K,Chang SC,Lacey M,Baribault C,Chittur SV,Sowden J,Tawil R,Crawford GE,Ehrlich M.Gene expression during normal and FSHD myogenesis.BMC Med Genomics.2011;4:67.doi:10.1186/1755-8794-4-67.PubMed PMID:21951698;PMCID:PMC3204225.

32.Pakula A,Schneider J,Janke J,Zacharias U,Schulz H,Hubner N,Mahler A,Spuler A,Spuler S,Carlier P,Boschmann M.Altered expression of cyclin A 1 in muscle of patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy(FSHD-1).PLoS One.2013;8(9):e73573.doi:10.1371/journal.pone.0073573.PubMed PMID:24019929;PMCID:PMC3760810.

33.Geng LN,Yao Z,Snider L,Fong AP,Cech JN,Young JM,van der Maarel SM,Ruzzo WL,Gentleman RC,Tawil R,Tapscott SJ.DUX4 activates germline genes,retroelements,and immune mediators:implications for facioscapulohumeral dystrophy.Dev Cell.2012;22(1):38-51.doi:10.1016/j.devcel.2011.11.013.PubMed PMID:22209328;PMCID:PMC3264808.

34.Mitsuhashi S,Nakagawa S,Sasaki-Honda M,Sakurai H,Frith MC,Mitsuhashi H.Nanopore direct RNA sequencing detects DUX4-activated repeats and isoforms in human muscle cells.Hum Mol Genet.2021;30(7):552-63.doi:10.1093/hmg/ddab063.PubMed PMID:33693705;PMCID:PMC8120133.

35.Winokur ST,Chen YW,Masny PS,Martin JH,Ehmsen JT,Tapscott SJ,van der Maarel SM,Hayashi Y,Flanigan KM.Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation.Hum Mol

Genet.2003;12(22):2895-907.doi:10.1093/hmg/ddg327.PubMed PMID:14519683.

36.Rahimov F,King OD,Leung DG,Bibat GM,Emerson CP,Jr.,Kunkel LM,Wagner KR.Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers.Proc Natl Acad Sci U S A.2012;109(40):16234-9.doi:10.1073/pnas.1209508109.PubMed PMID:22988124;PMCID:PMC3479603.

37.Gene Ontology C.Gene Ontology Consortium:going forward.Nucleic Acids Res.2015;43(Database issue):D1049-56.doi:10.1093/nar/gku1179.PubMed PMID:25428369;PMCID:PMC4383973.

38.Cabianca DS,Casa V,Bodega B,Xynos A,Ginelli E,Tanaka Y,Gabellini D.A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy.Cell.2012;149(4):819-31.doi:10.1016/j.cell.2012.03.035.PubMed PMID:22541069;PMCID:PMC3350859.

39.Untergasser A,Cutcutache I,Koressaar T,Ye J,Faircloth BC,Remm M,Rozen SG.Primer3--new capabilities and interfaces.Nucleic Acids Res.2012 Aug;40(15):e115.doi:10.1093/nar/gks596.Epub 2012 Jun 22.PMID:22730293;PMCID:PMC3424584.

40.SantaLucia J Jr.A unified view of polymer,dumbbell,and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.Proc Natl Acad Sci U S A.1998 Feb 17;95(4):1460-5.doi:10.1073/pnas.95.4.1460.PMID:9465037;PMCID:PMC19045.

41.Owczarzy R,You Y,Moreira BG,Manthey JA,Huang L,Behlke MA,Walder JA.Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers:improved predictions of melting temperatures.Biochemistry.2004 Mar 30;43(12):3537-54.doi:10.1021/bi034621r.PMID:15035624.

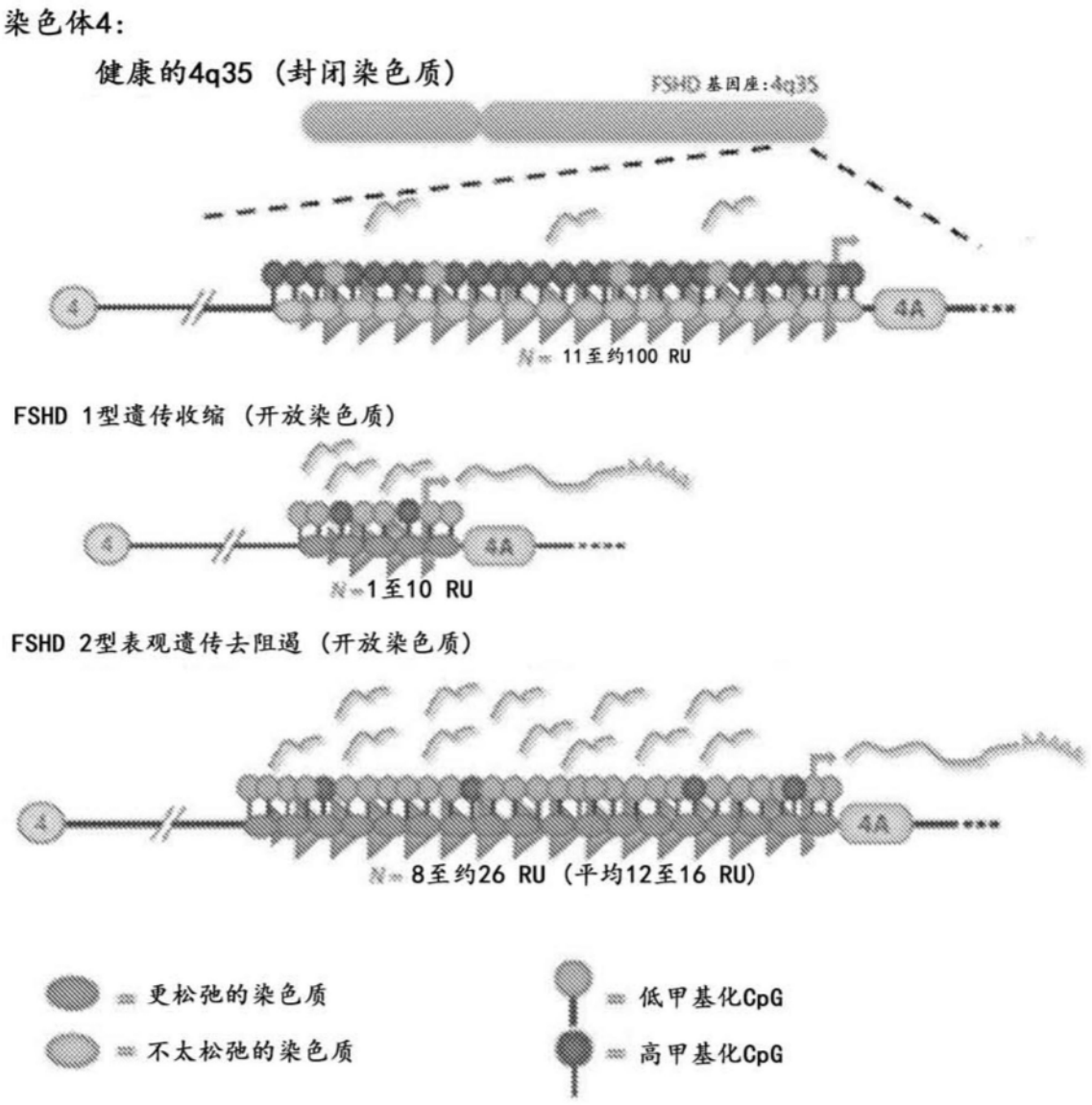

染色体4:
健康的4q35（封闭染色质）
FSHD 基因座:4q35
4
4A
N= 11至约100 RU
FSHD 1型遗传收缩（开放染色质）
4
4A
N=1至10 RU
FSHD 2型表观遗传去阻遏（开放染色质）
4
4A
N= 8至约26 RU（平均12至16 RU）
= 更松弛的染色质
= 不太松弛的染色质
= 低甲基化CpG
= 高甲基化CpG

图1

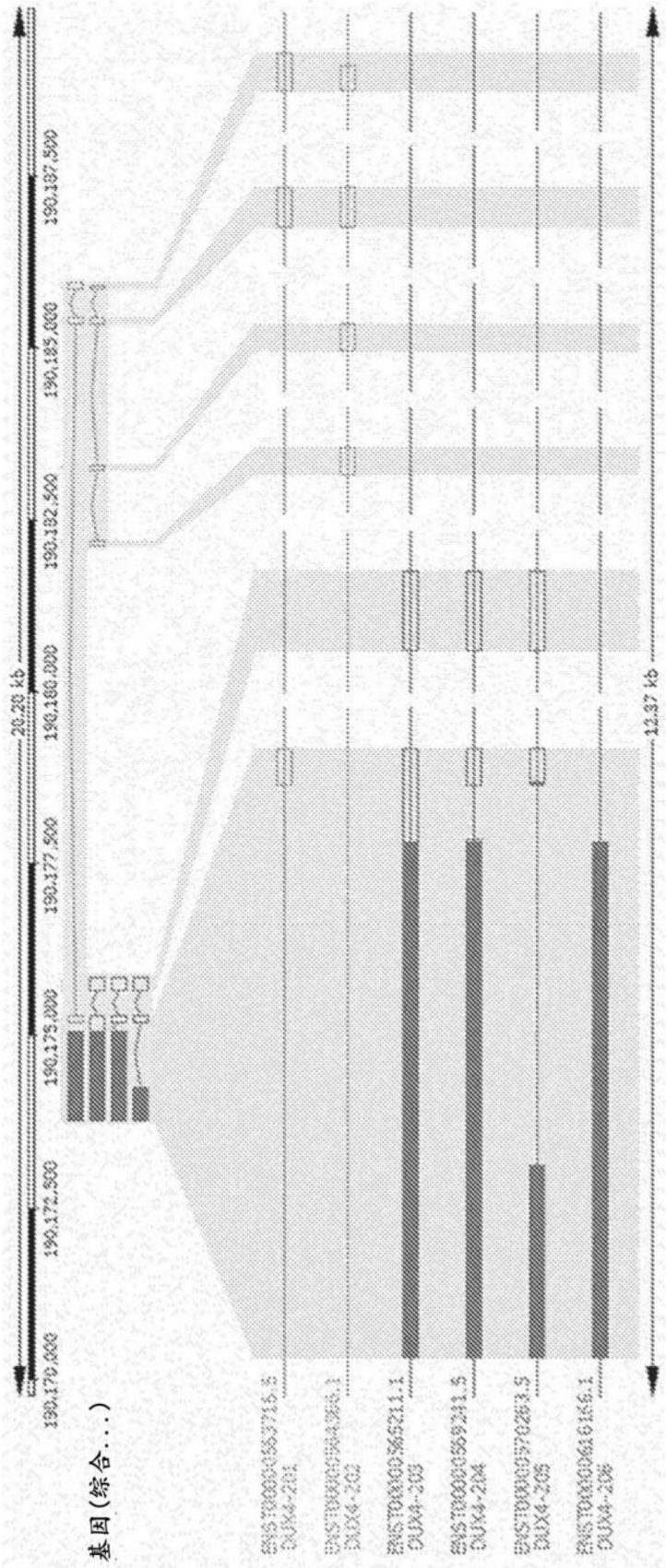

190,170,000
190,172,500
190,175,000
190,177,500
190,180,000
190,182,500
190,185,000
190,187,500
20.20 kb
13.37 kb
基因(综合...)
ENST00000357716.8
DUX4-201
ENST00000594366.1
DUX4-202
ENST00000596211.1
DUX4-203
ENST00000569241.5
DUX4-204
ENST00000570263.5
DUX4-205
ENST00000616166.1
DUX4-206

图2

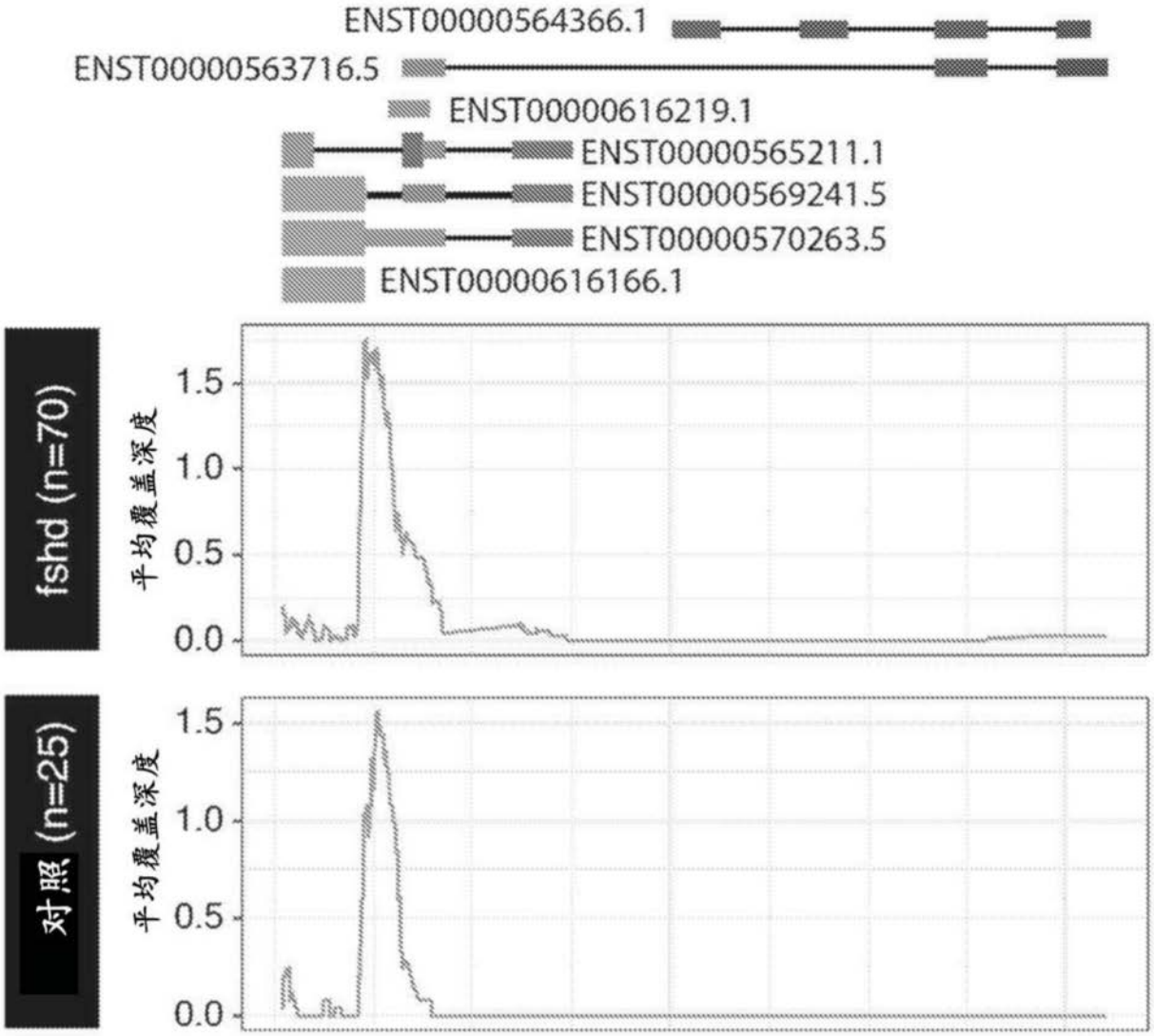

ENST00000564366.1
ENST00000563716.5
ENST00000616219.1
ENST00000565211.1
ENST00000569241.5
ENST00000570263.5
ENST00000616166.1
fshd (n=70)
平均覆盖深度
1.5
1.0
0.5
0.0
对照 (n=25)
平均覆盖深度
1.5
1.0
0.5
0.0

图3

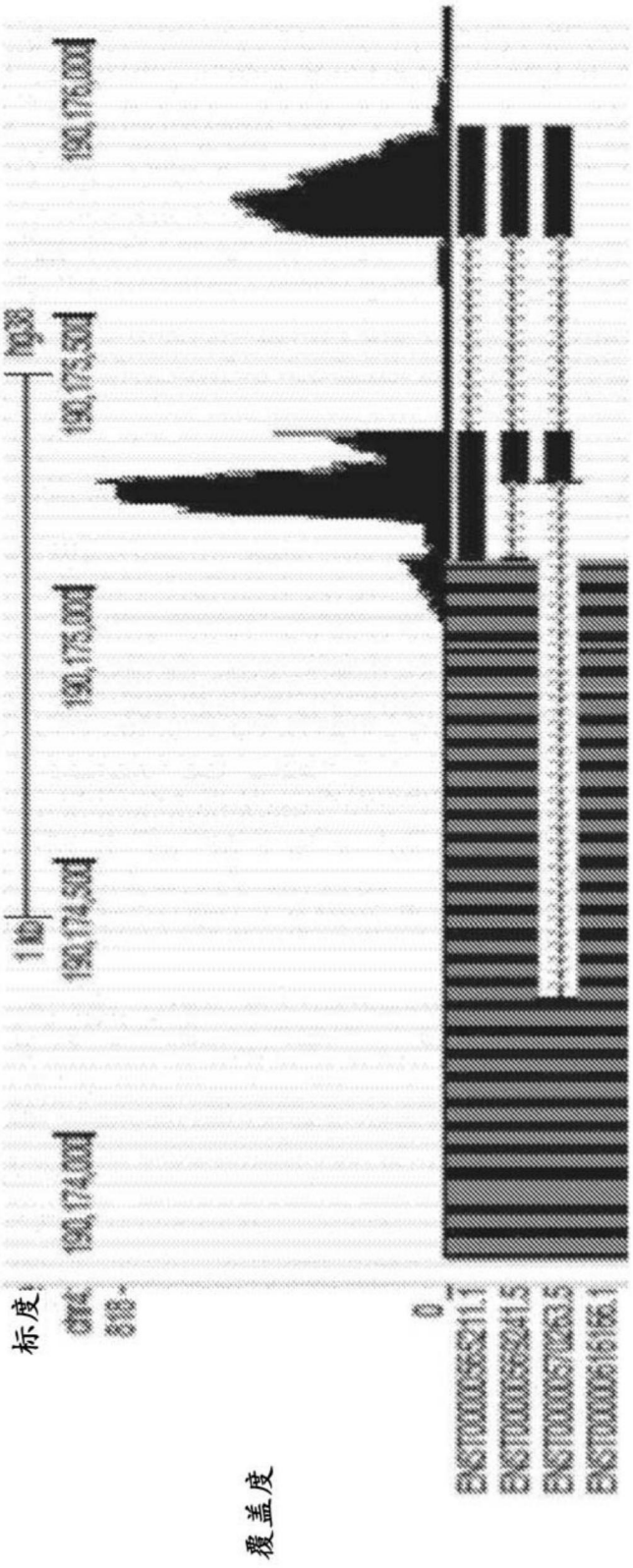

覆盖度
标度
0
ENSMUSG00000021811.17
ENSMUSG00000024415
ENSMUSG00000071263.5
ENSMUSG00000161561.1

图4

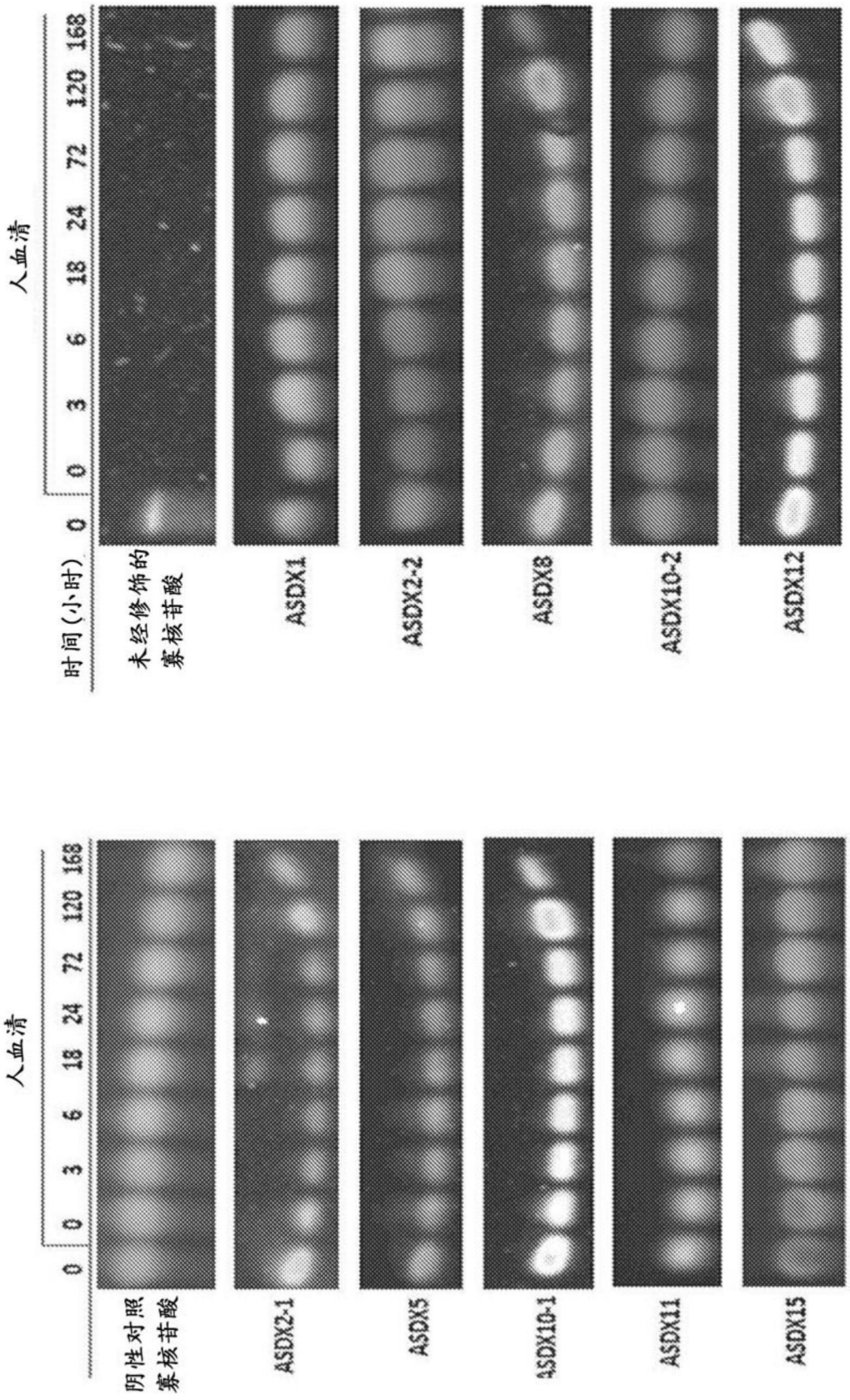

人血清
时间(小时) 0 0 3 6 18 24 72 120 168
未经修饰的寡核苷酸
ASDX1
ASDX2-2
ASDX8
ASDX10-2
ASDX12
人血清
0 0 3 6 18 24 72 120 168
阴性对照寡核苷酸
ASDX2-1
ASDX5
ASDX10-1
ASDX11
ASDX15

图5

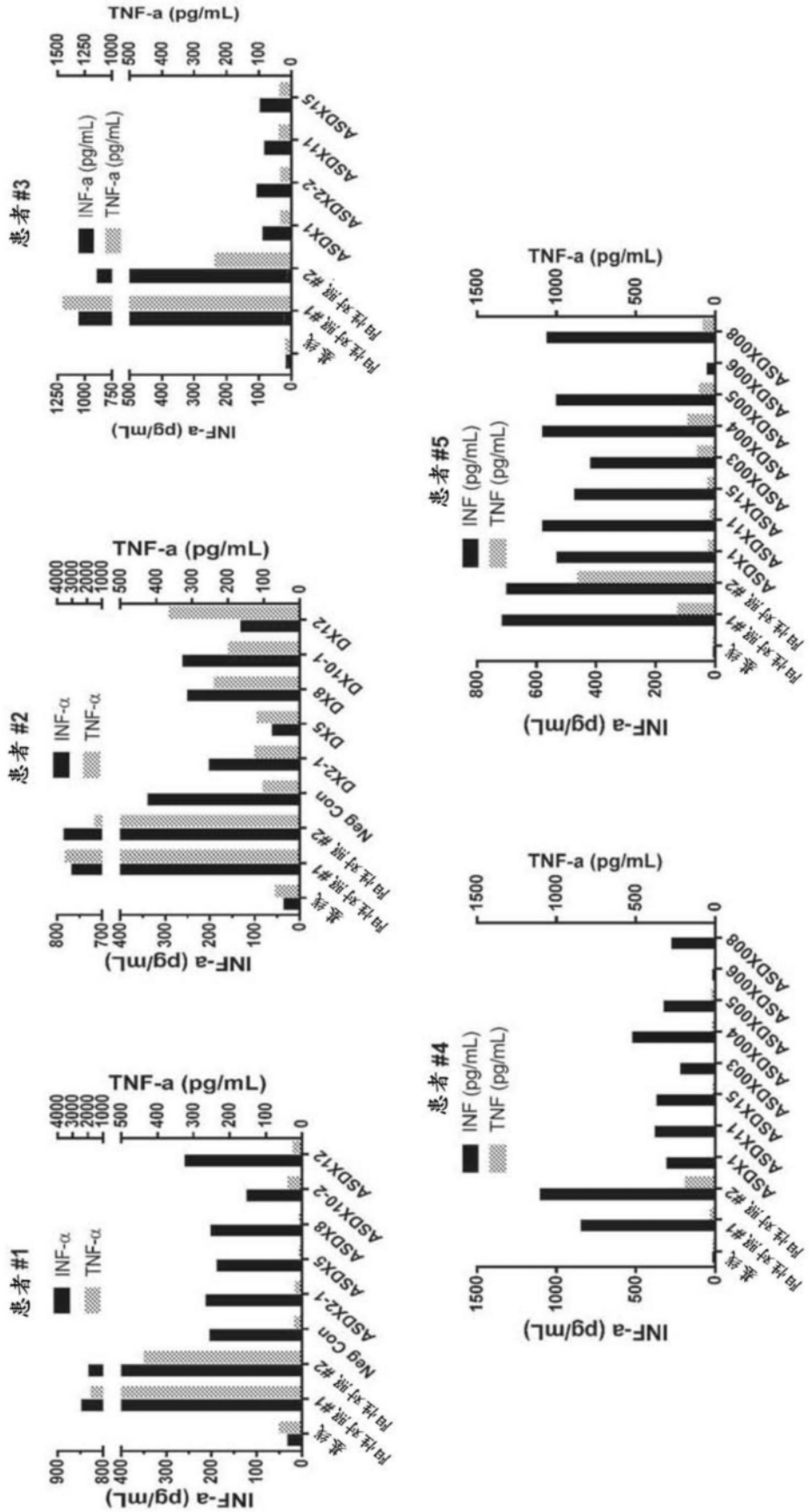
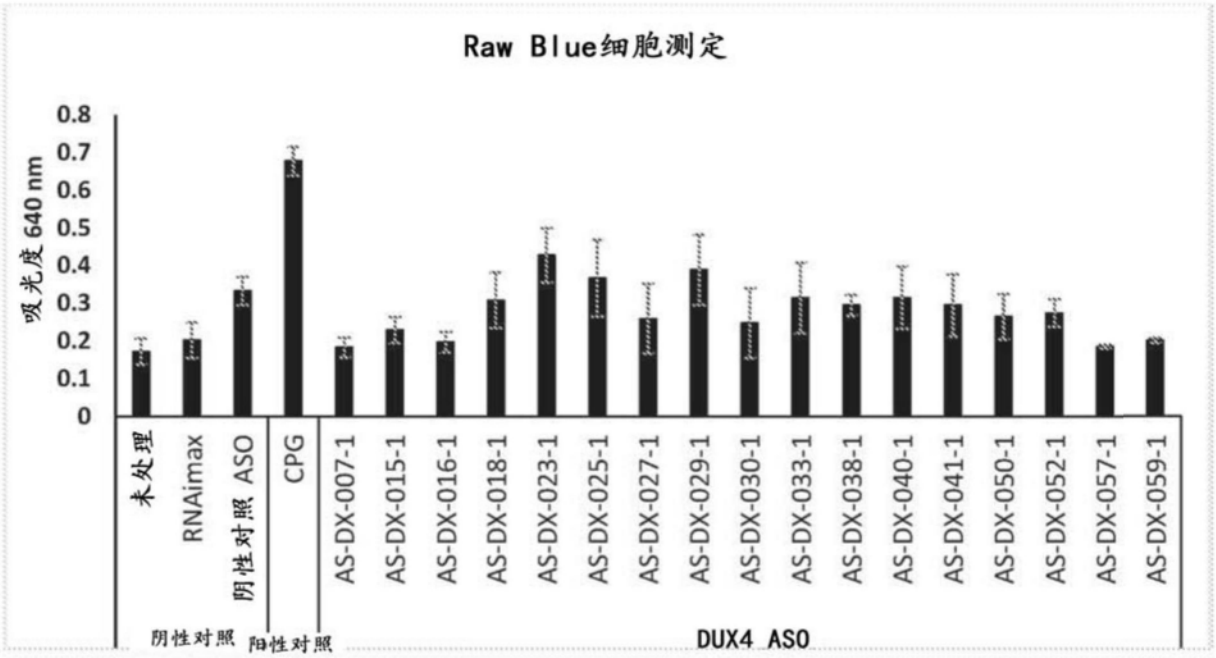

患者#1
患者#2
患者#3
患者#4
患者#5
INF-α
TNF-α
INF (pg/mL)
TNF (pg/mL)
TNF-a (pg/mL)
INF-a (pg/mL)
基线
阳性对照#1
阳性对照#2
Neg Con
ASDX12
ASDX10-2
ASDX8
ASDX5
ASDX2-1
DX12
DX10-1
DX8
DX5
DX2-1
ASDX15
ASDX11
ASDX1
ASDX002
ASDX003
ASDX004
ASDX005
ASDX006
ASDX008

图6A


Raw Blue细胞测定
吸光度 640 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
未处理
RNAimax
阴性对照 ASO
CPG
AS-DX-007-1
AS-DX-015-1
AS-DX-016-1
AS-DX-018-1
AS-DX-023-1
AS-DX-025-1
AS-DX-027-1
AS-DX-029-1
AS-DX-030-1
AS-DX-033-1
AS-DX-038-1
AS-DX-040-1
AS-DX-041-1
AS-DX-050-1
AS-DX-052-1
AS-DX-057-1
AS-DX-059-1
阴性对照
阳性对照
DUX4 ASO

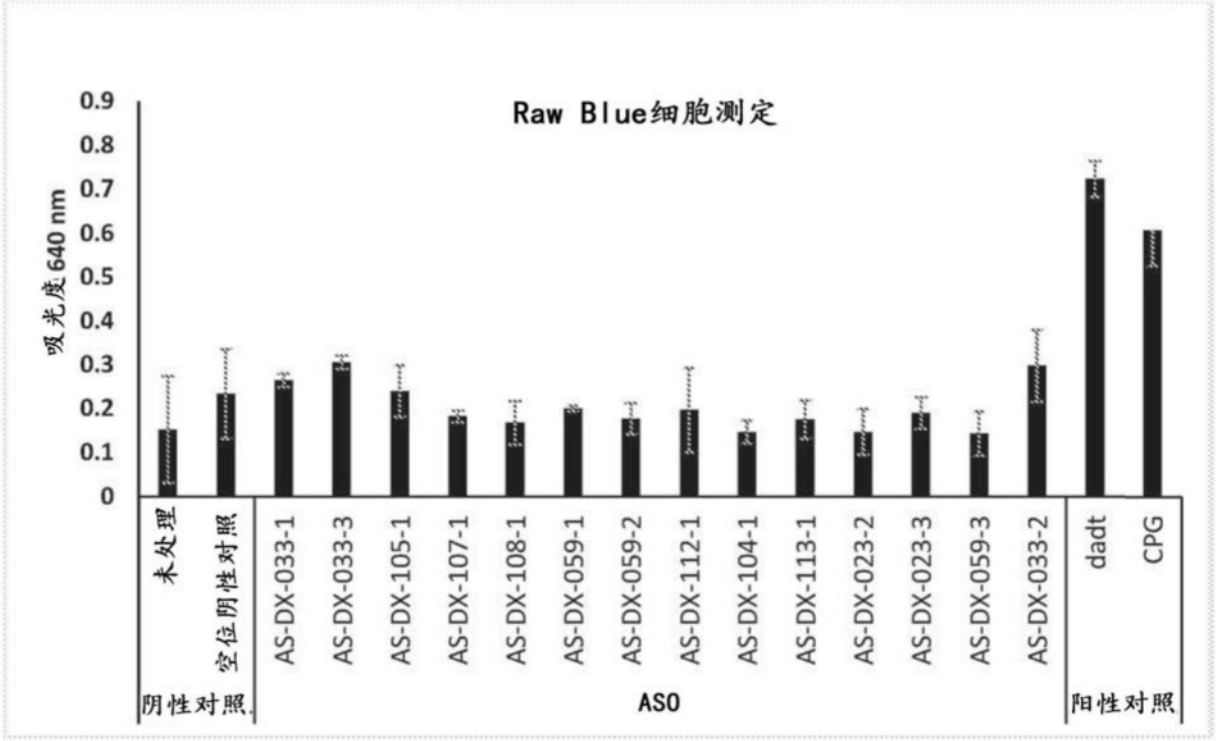

Raw Blue细胞测定
吸光度 640 nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
未处理
空位阴性对照
AS-DX-033-1
AS-DX-033-3
AS-DX-105-1
AS-DX-107-1
AS-DX-108-1
AS-DX-059-1
AS-DX-059-2
AS-DX-112-1
AS-DX-104-1
AS-DX-113-1
AS-DX-023-2
AS-DX-023-3
AS-DX-059-3
AS-DX-033-2
dadt
CPG
阴性对照
ASO
阳性对照

FIG. 6B

图6B

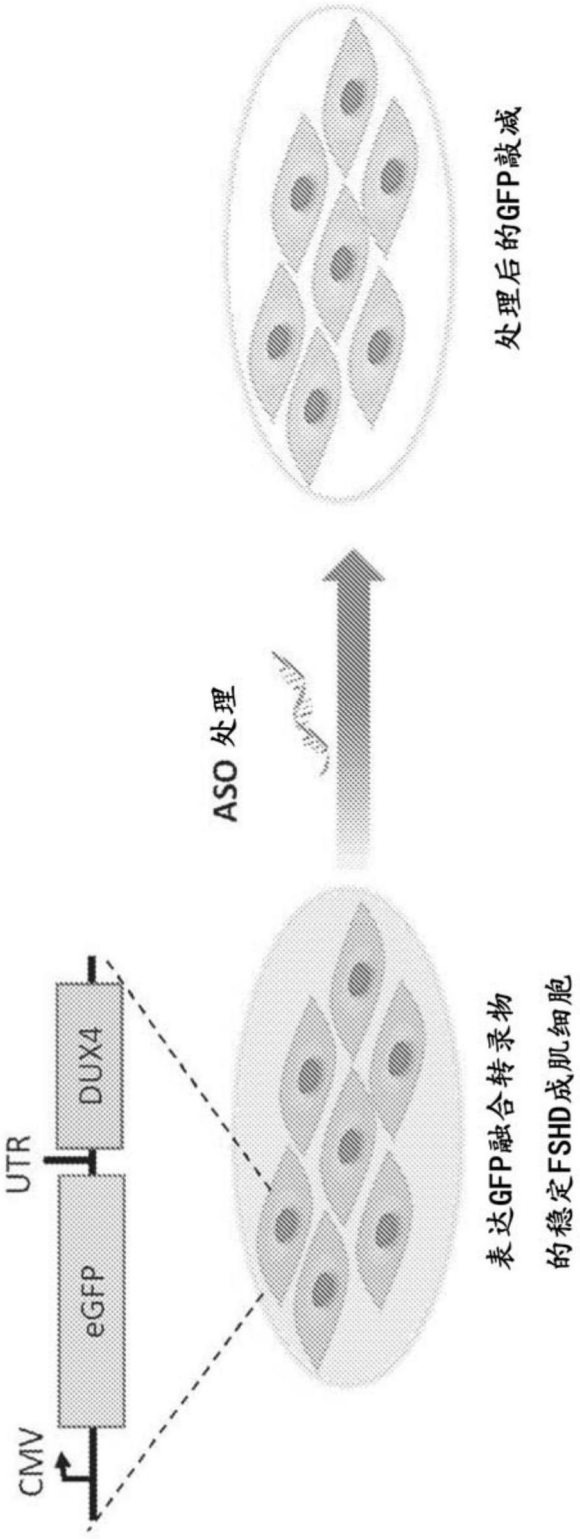


图7

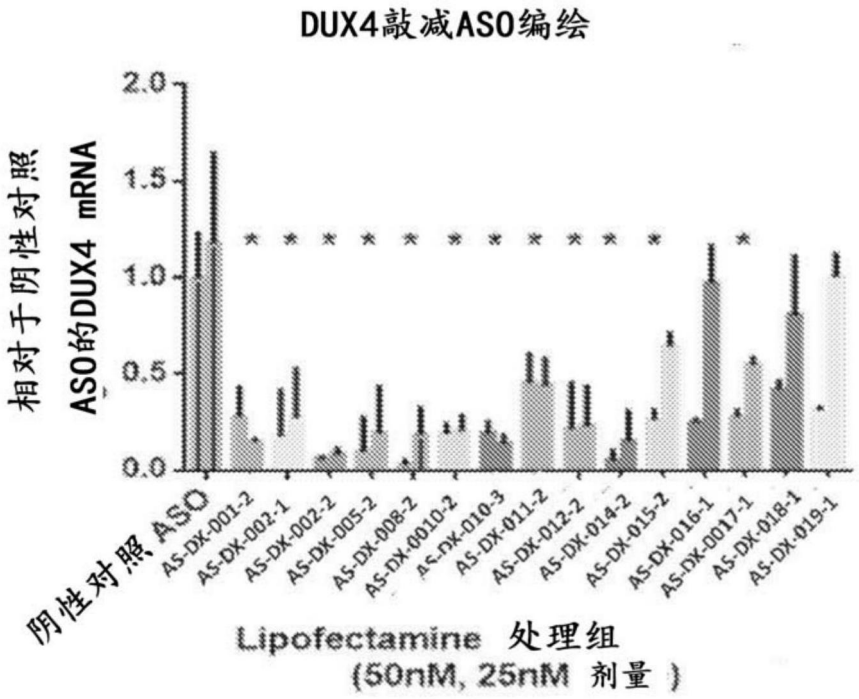
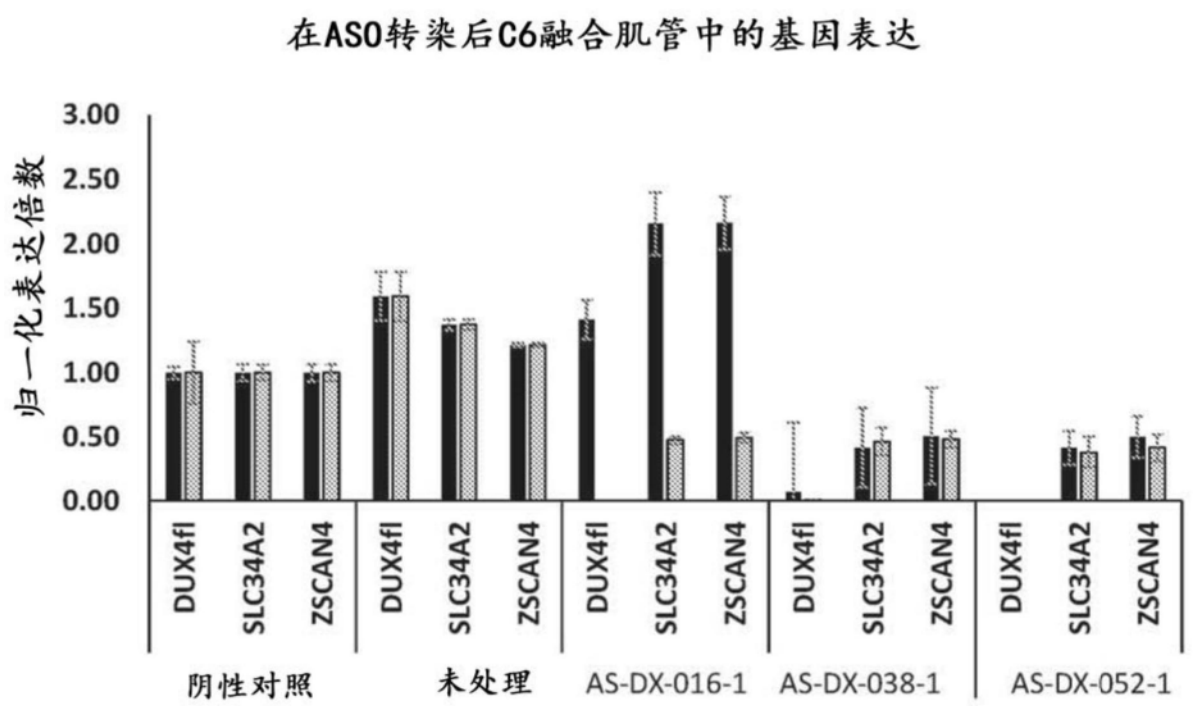

DUX4敲减ASO编绘
相对于阴性对照ASO的DUX4 mRNA
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
阴性对照ASO
AS-DX-001-2
AS-DX-002-1
AS-DX-002-2
AS-DX-005-2
AS-DX-008-2
AS-DX-0010-2
AS-DX-010-3
AS-DX-011-2
AS-DX-012-2
AS-DX-014-2
AS-DX-015-2
AS-DX-016-1
AS-DX-0017-1
AS-DX-018-1
AS-DX-019-1
Lipofectamine 处理组
(50nM, 25nM 剂量)

图8A


在ASO转染后C6融合肌管中的基因表达
归一化表达倍数
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
DUX4fl
SLC34A2
ZSCAN4
阴性对照
未处理
AS-DX-016-1
AS-DX-038-1
AS-DX-052-1

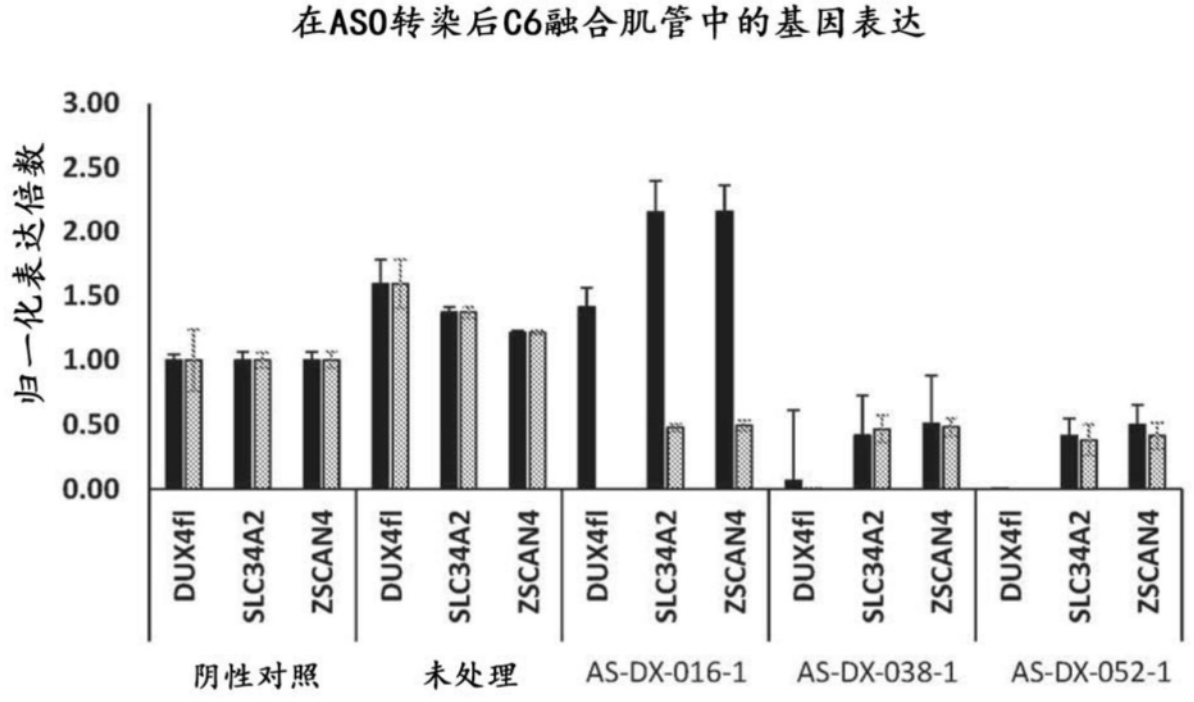

在ASO转染后C6融合肌管中的基因表达
归一化表达倍数
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
DUX4fl
SLC34A2
ZSCAN4
阴性对照
未处理
AS-DX-016-1
AS-DX-038-1
AS-DX-052-1

图8B

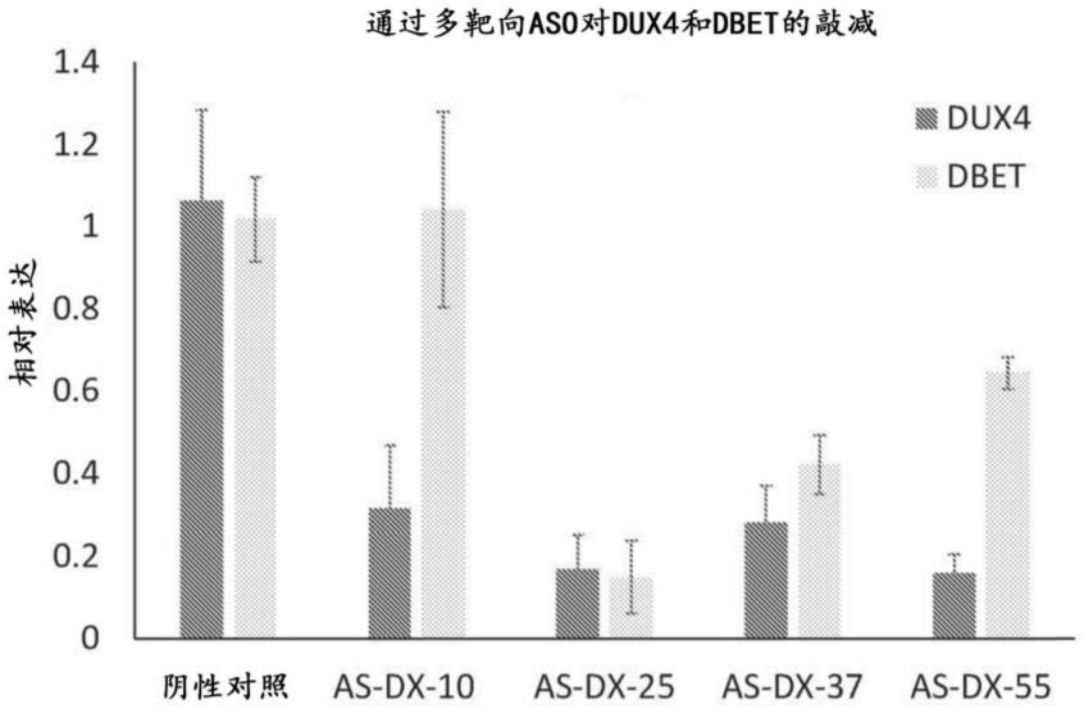

通过多靶向ASO对DUX4和DBET的敲减
相对表达
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DUX4
DBET
阴性对照
AS-DX-10
AS-DX-25
AS-DX-37
AS-DX-55

图9

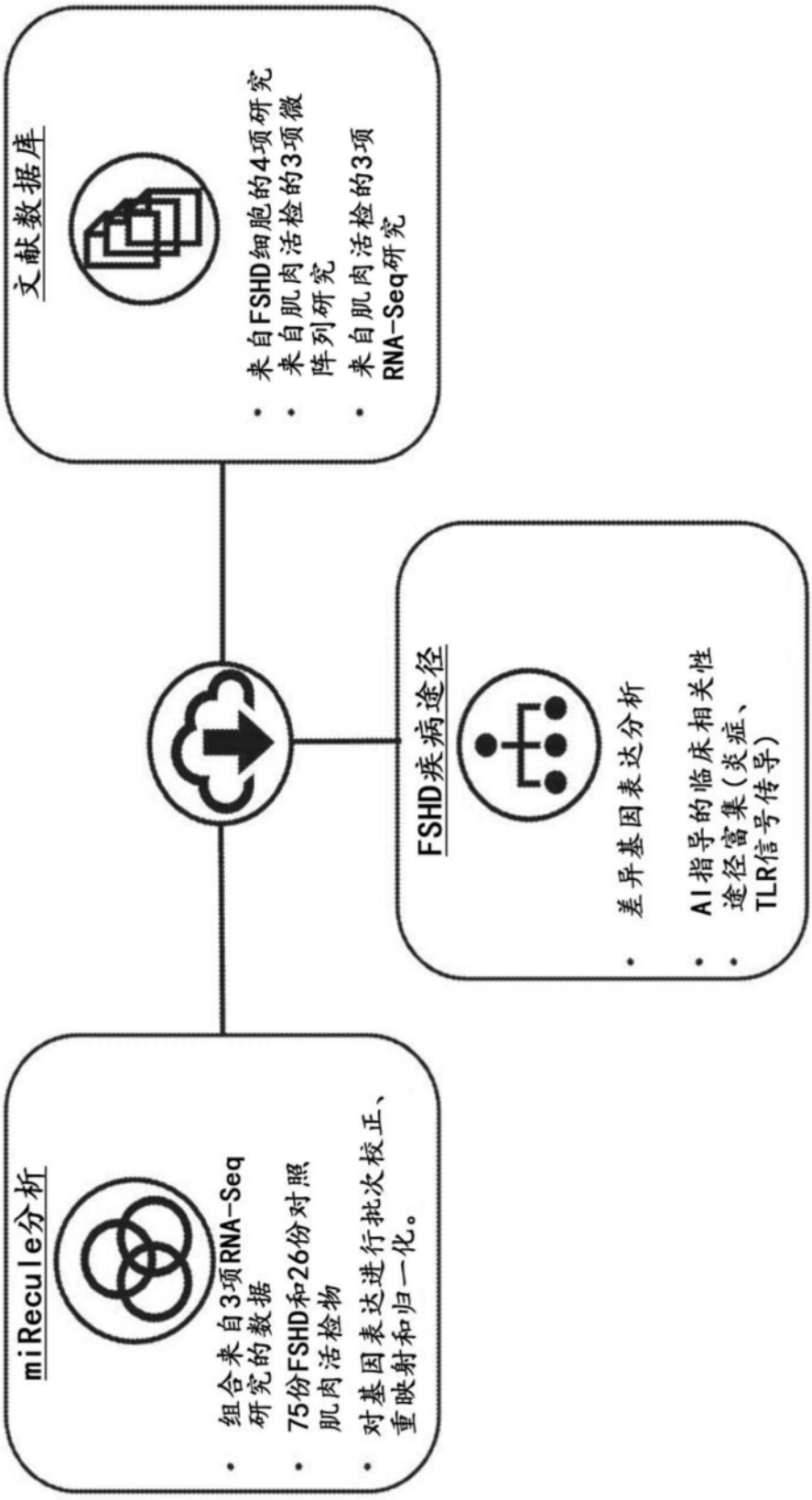

文献数据库
来自FSHD细胞的4项研究
来自肌肉活检的3项微阵列研究
来自肌肉活检的3项RNA-Seq研究
miRecule分析
组合来自3项RNA-Seq研究的数据
75份FSHD和26份对照肌肉活检物
对基因表达进行批次校正、重映射和归一化。
FSHD疾病途径
差异基因表达分析
AI指导的临床相关性
途径富集(炎症、TLR信号传导)

图10

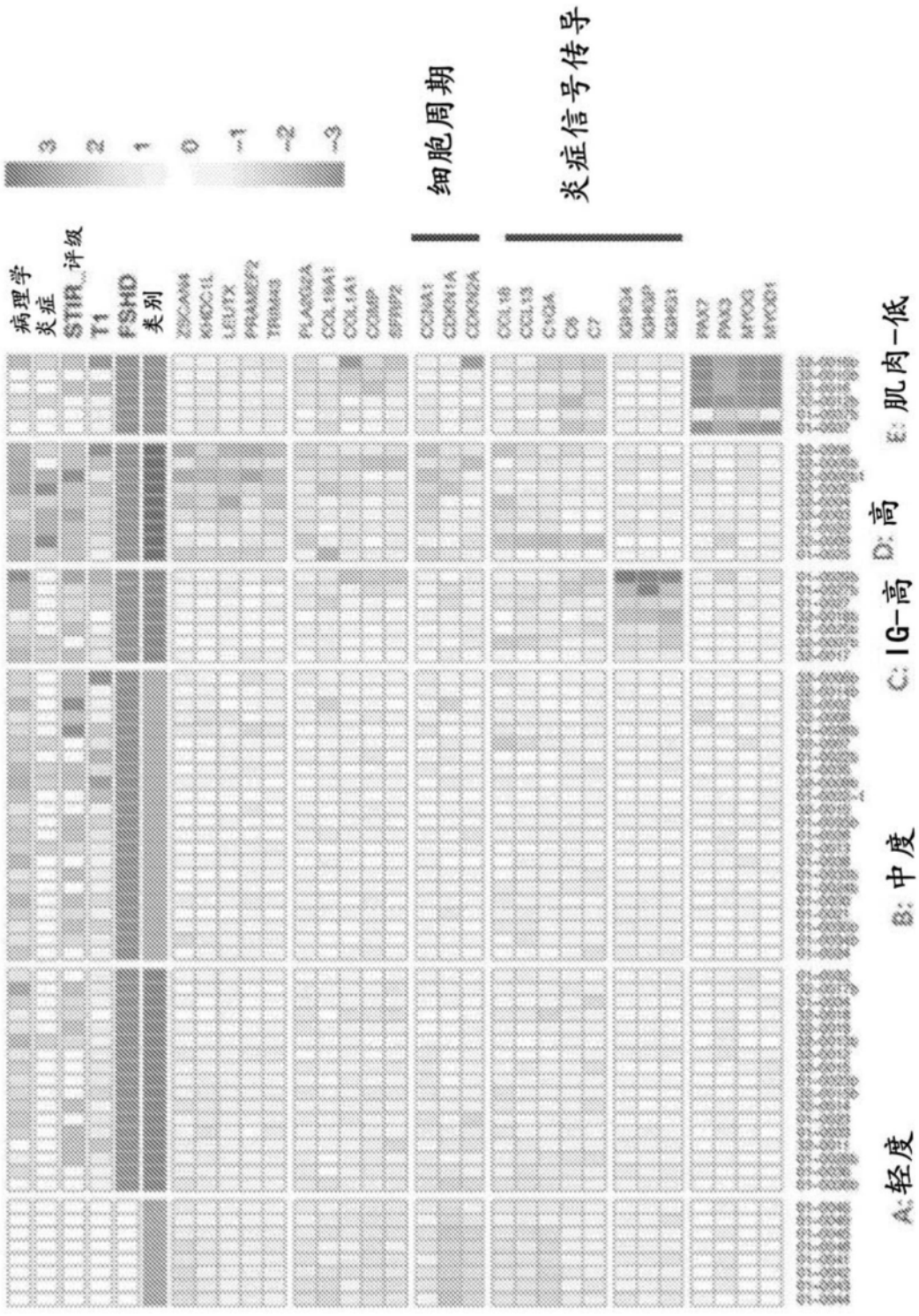

3
2
1
0
-1
-2
-3
病理学
炎症
STIR_评级
T1
FSHD
类别
细胞周期
炎症信号传导
A: 轻度
B: 中度
C: IG-高
D: 高
E: 肌肉-低

图11

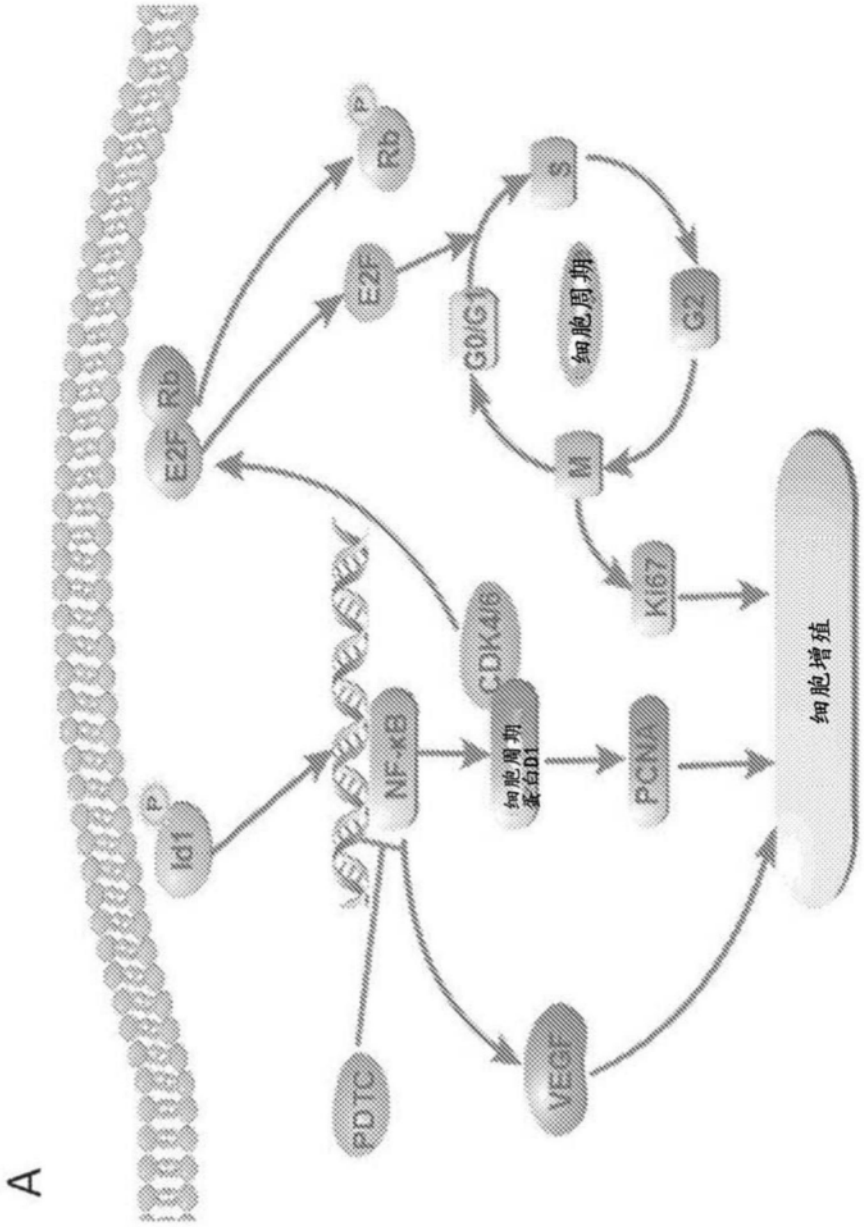

A
P
Rb
E2F
Rb
E2F
S
G0/G1
细胞周期
G2
M
KI67
细胞增殖
CDK4/6
细胞周期素D1
NF-κB
PCNA
P
Id1
PDTC
VEGF

图12A

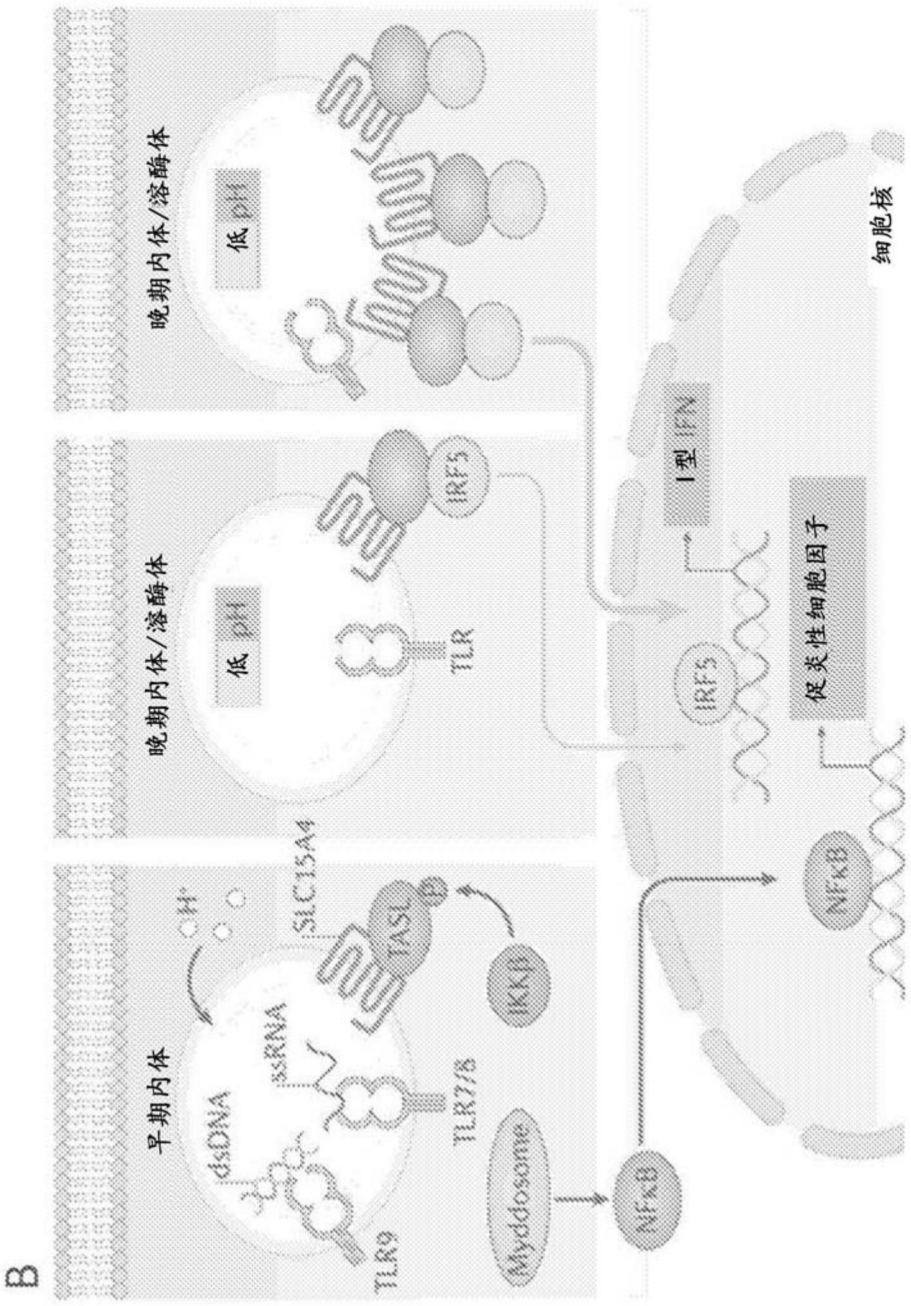
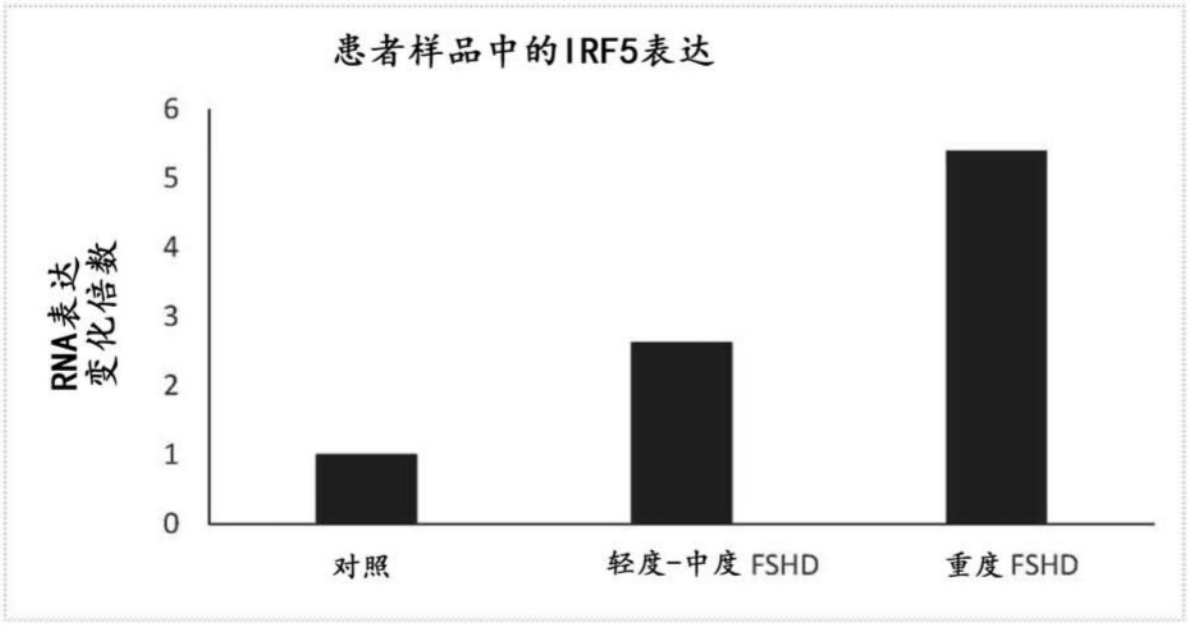

B
早期内体
晚期内体/溶酶体
晚期内体/溶酶体
晚期内体/溶酶体
低 pH
低 pH
低 pH
dsDNA
ssRNA
H+
SLC15A4
TASL
TLR9
TLR7/8
TLR
IRF5
IKKβ
Myddosome
NFκB
NFκB
IRF5
I型 IFN
促炎性细胞因子
细胞核

图12B


患者样品中的IRF5表达
RNA表达
变化倍数
6
5
4
3
2
1
0
对照
轻度-中度 FSHD
重度 FSHD

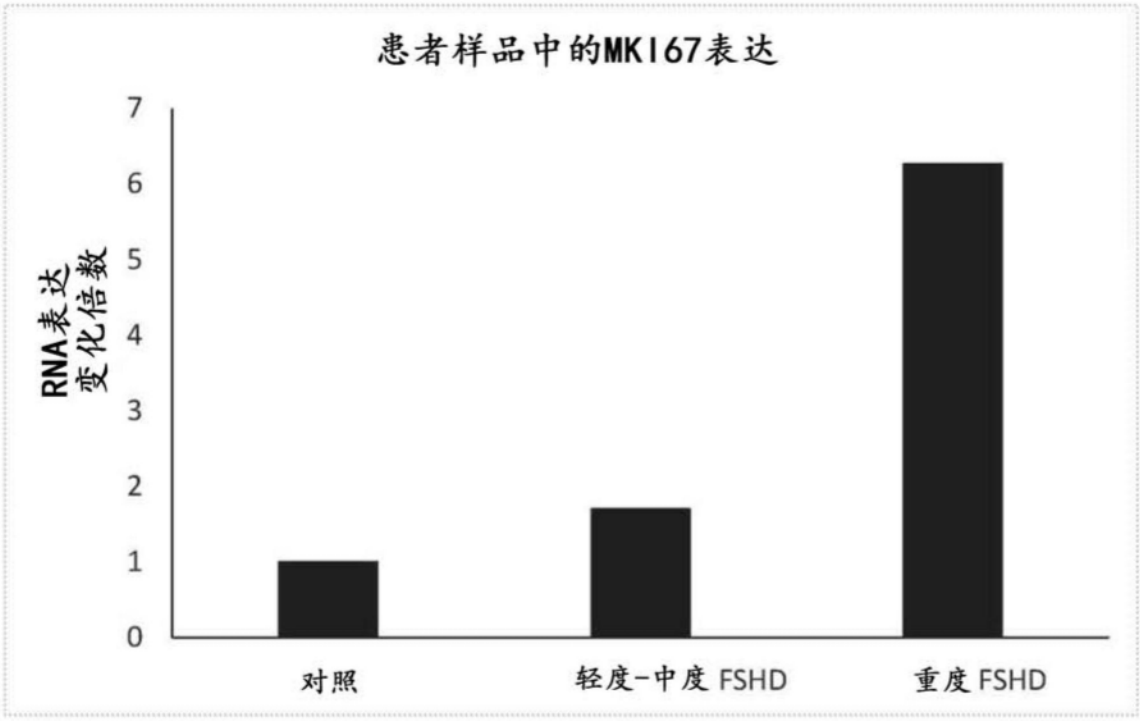

患者样品中的MKI67表达
RNA表达
变化倍数
7
6
5
4
3
2
1
0
对照
轻度-中度 FSHD
重度 FSHD

图13

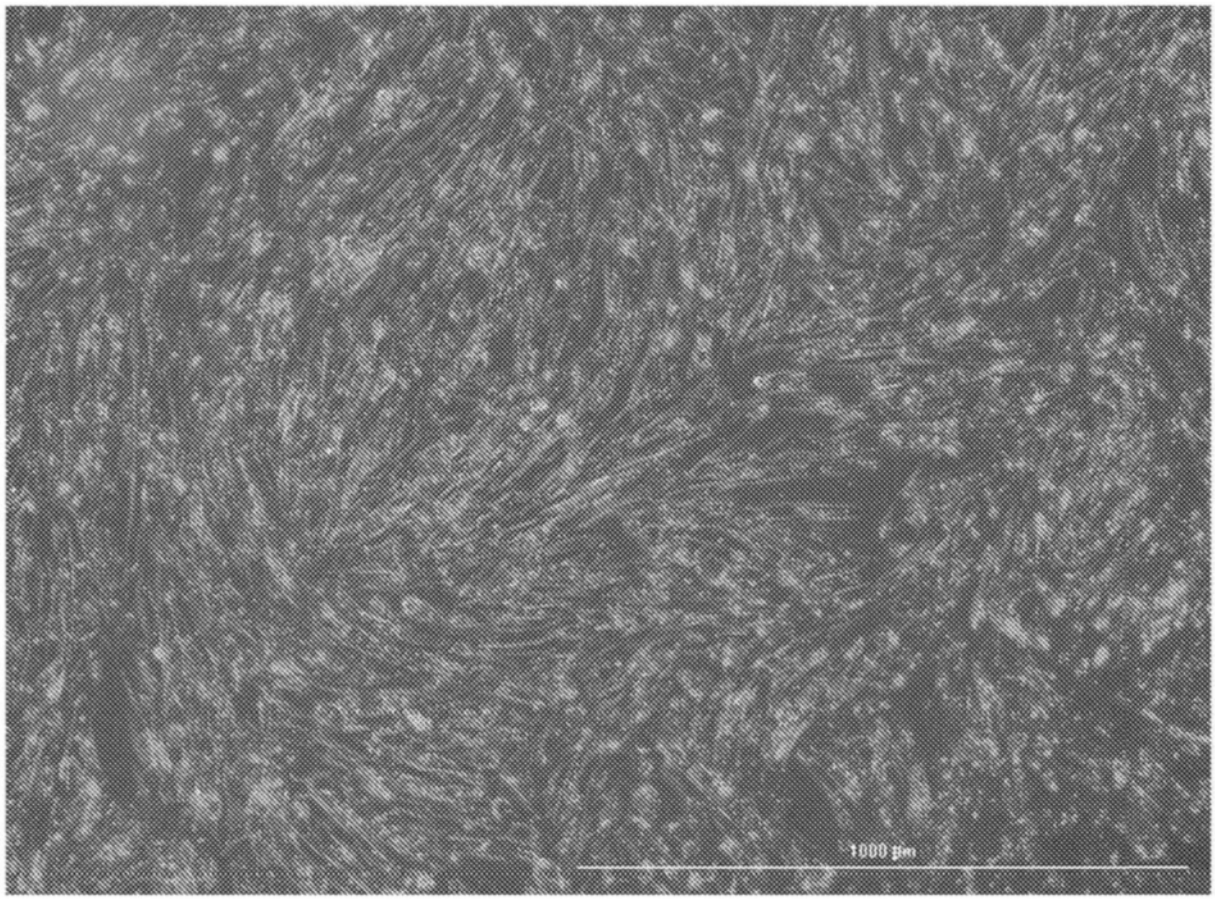


图14A

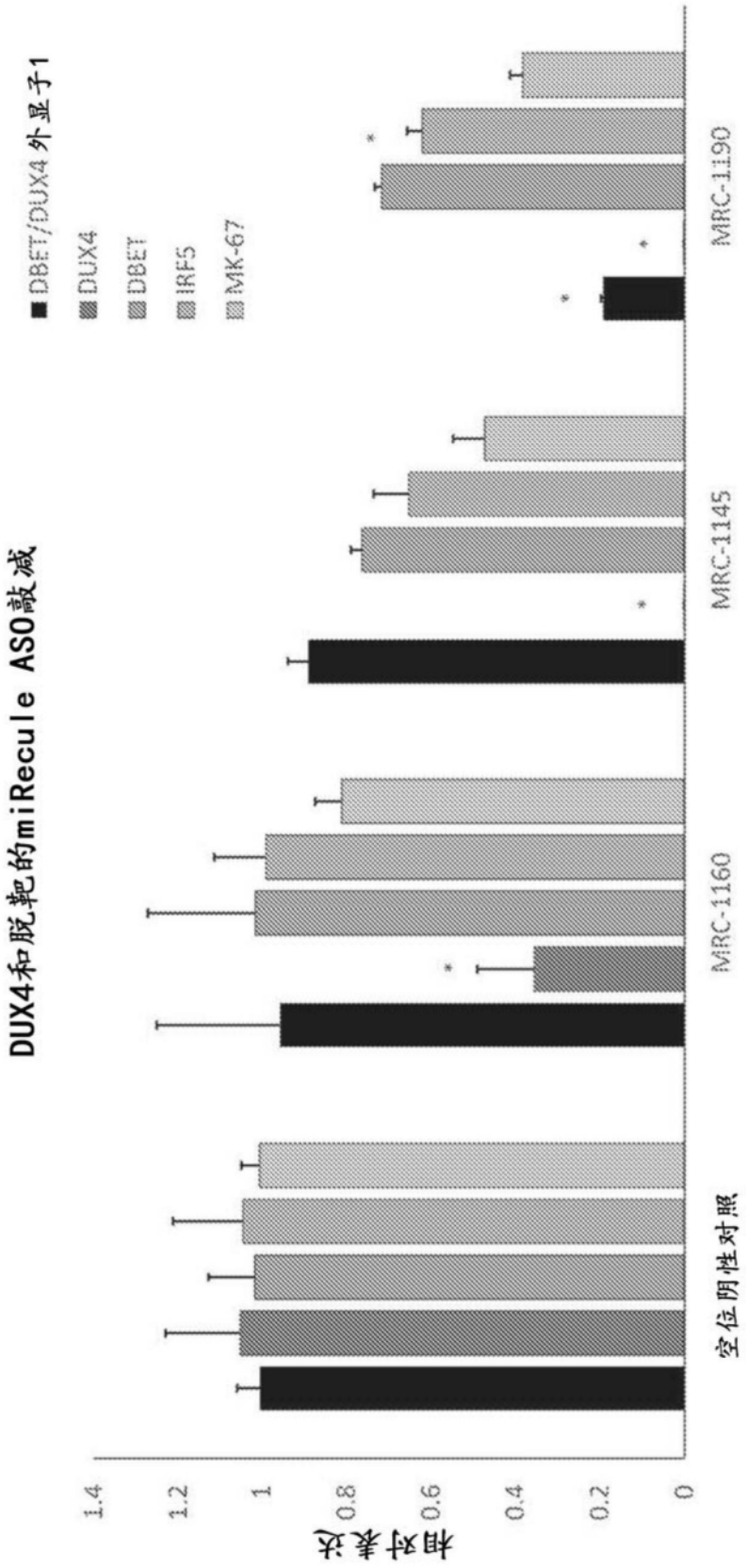

DUX4和脱靶的miRecule ASO敲减
DBET/DUX4 外显子1
DUX4
DBET
IRF5
MK-67
相对表达
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
空位 阴性对照
MRC-1160
MRC-1145
MRC-1190

图14B

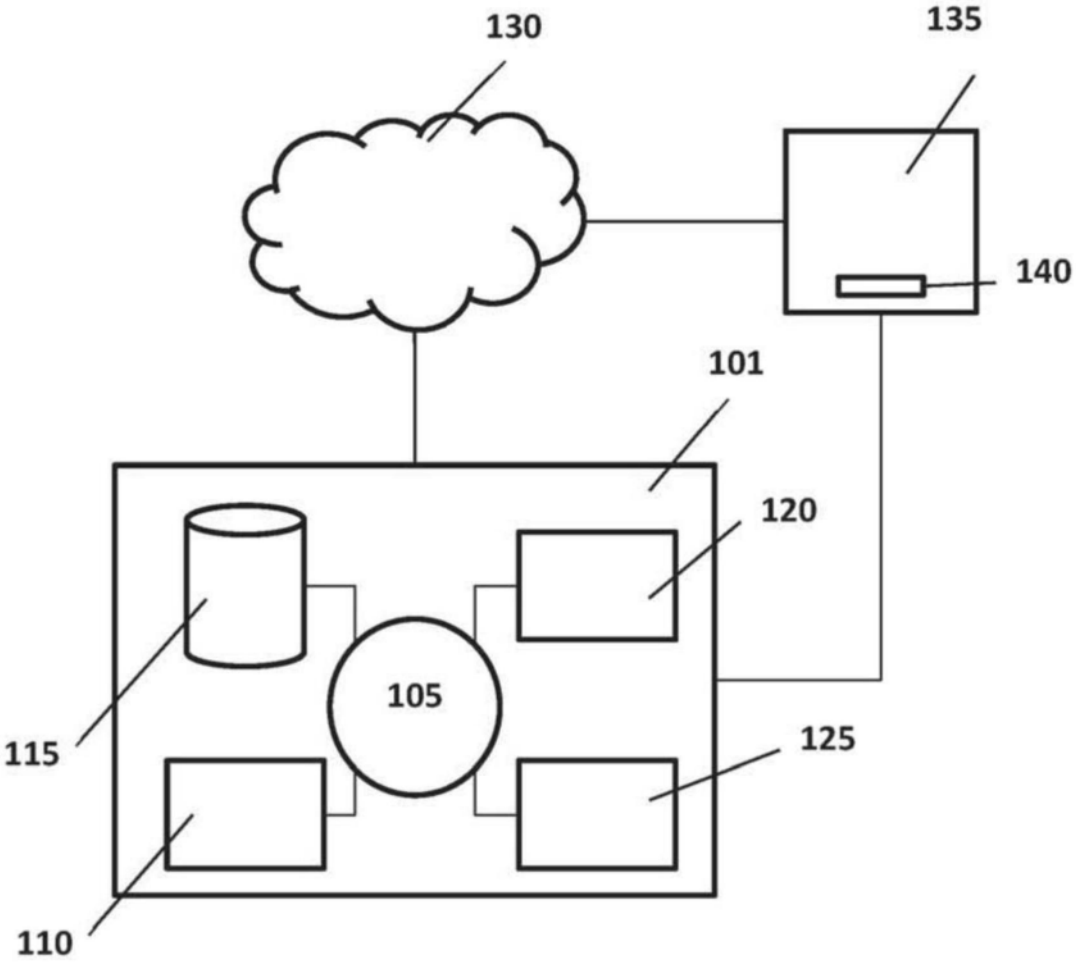


图15

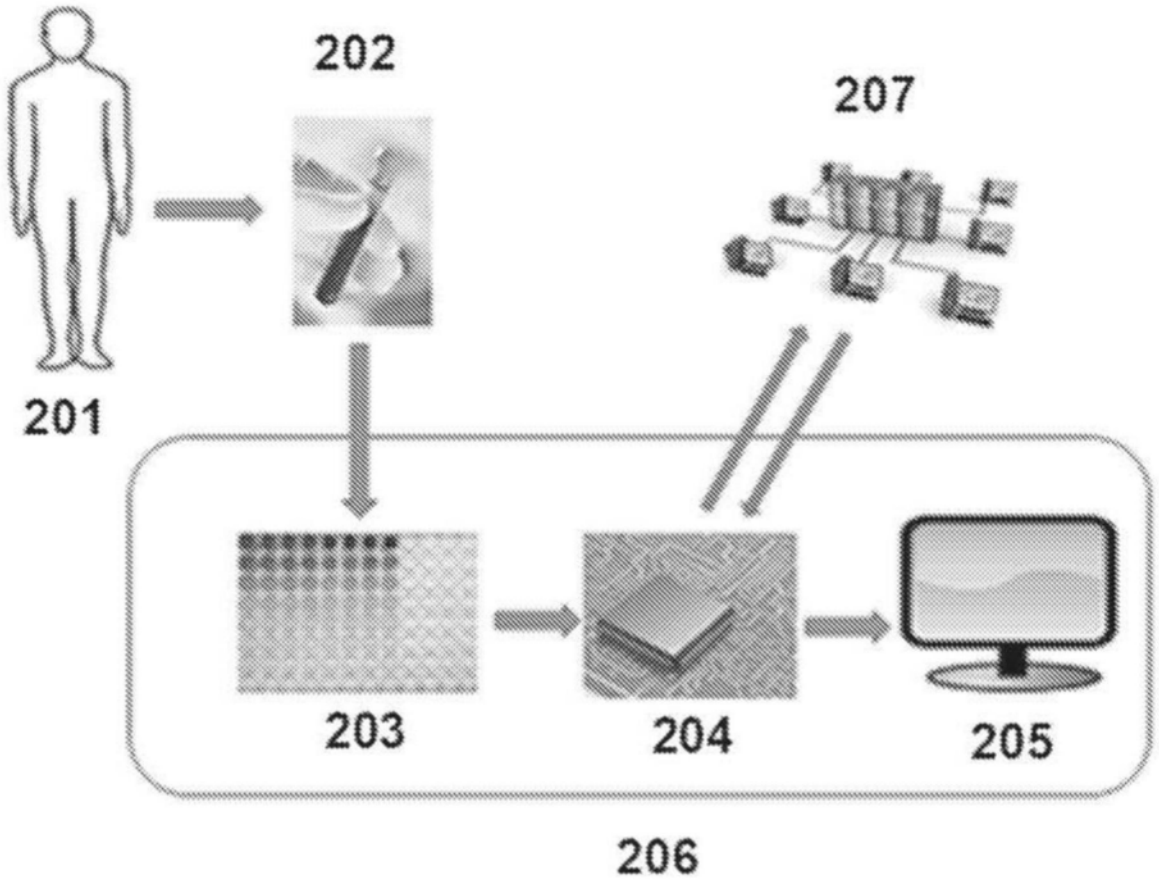


图16