



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101868543 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200880117264. 8

(22) 申请日 2008. 09. 22

(30) 优先权数据

0718542. 4 2007. 09. 22 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/003211 2008. 09. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/037490 EN 2009. 03. 26

(71) 申请人 敦提大学校董事会

地址 英国敦提

(72) 发明人 安格斯·莱恩·莱蒙德 小野基晴

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 23 页 序列表 15 页
附图 43 页

(54) 发明名称

基因表达的靶向调节

(57) 摘要

本发明涉及利用设计成靶向特定核酸序列的
snoRNA 分子或 snoRNA 样分子或片段来调节基因
表达的方法。

1. 调节靶核酸表达的方法,所述方法包括在使 snoRNA 或修饰的 snoRNA 和 / 或其片段能够与所述靶核酸的一部分杂交的条件下,使所述核酸与 snoRNA 或修饰的 snoRNA 相接触;并且其中所述 snoRNA 或其片段与所述核酸部分的杂交调节所述靶核酸的表达和 / 或功能。

2. 用于调节靶核酸的表达的修饰的 snoRNA 序列,所述修饰的 snoRNA 序列包括基本与所述靶序列的一部分互补的核酸序列,所述核酸序列用于与所述靶核酸的部分杂交且调节所述靶核酸的表达。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法或修饰的 snoRNA 序列,其中所述靶核酸序列是 RNA 序列。

4. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA 序列,其中所述 snoRNA 分子基于细胞 snoRNAs,包括所谓的盒 C/D-snoRNA 或盒 H/ACA-snoRNA。

5. 根据权利要求 3 所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述盒 C/DsnoRNAs 包括 *L. collosoma* b2 (GenBank 登记号 AF331656), *L. collosoma* B3 (GenBank 登记号 AY046598), *L. collosoma* B4 (GenBank 登记号 AY046598), *L. collosoma* B5 (GenBank 登记号 AY046598), *L. collosoma* TS1 (GenBank 登记号 AF331656), *L. collosoma* TS2 (GenBank 登记号 AF331656), *L. collosoma* g2 (GenBank 登记号 AF331656), *L. collosoma* snoRNA-2 (GenBank 登记号 AF050095), *T. brucei* snoRNA 92 (GenBank 登记号 Z50171), *L. tarentolae* snoRNA 92 (GenBank 登记号 AF016399), *T. brucei* TBC4 snoRNA (SEQ ID NO :35), *T. brucei* sno 270 (GenBank 登记号 Z50171) 和人 U14snoRNA (GenBank 登记号 NR_000022)。

6. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA,其包括通常存在于所述盒 C/D snoRNAs 中的一种或多种 D/D' 盒核酸序列。

7. 根据权利要求 5 所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述至少一种或多种 D 和 / 或 D' 盒包含选自下列各项的序列,例如,5' -CUGA-3', 5' -AUGA-3', 5' -CCGA-3', 5' -CAGA-3', 5' -CUUA-3', 5' -UUGG-3' 和 5' -CAGC-3'。

8. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述修饰的 snoRNA 分子还包括盒 C 序列和 / 或任选地与 28S rRNA 互补的另一个区域或与 snoRNA 修饰的其它生理学靶标互补的另一个区域。

9. 根据权利要求 4 所述的方法或修饰的 snoRNA,其中编码所述 snoRNA 的序列包括提供按照建立的 snoRNA 加工途径由内含子进行加工所必需的结构元件。

10. 根据权利要求 7 所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述盒 C 序列长度为 5-9 个核苷酸。

11. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述基本与靶 RNA 序列的部分互补的序列基本上与内含子或外显子序列互补,或与内含子-外显子连接序列互补,或与在所述靶核酸 5' 或 3' 非翻译区内部的区域或在所述靶核酸 5' 或 3' 非翻译区连接处的区域互补。

12. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA,其中基本上与所述靶 RNA 序列的部分互补的所述核酸序列长度典型地为 15-45 个核苷酸。

13. 根据权利要求 3 所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述靶 RNA 序列是 mRNA, tRNA, miRNA 或 rRNA 序列或 RNA 病毒基因组序列或来源于其的转录体。

14. 根据前述权利要求任一项所述的方法或修饰的 snoRNA,其中所述修饰的 snoRNA 分

子包括多于一种设计为与靶核酸分子杂交的序列。

15. 根据权利要求 13 所述的方法或修饰的 snoRNA, 其中所述多于一种设计为与靶核酸分子杂交的序列可以靶向同一靶核酸分子的不同部分、或靶向不同的靶核酸分子。

16. 核酸构建体, 其包括质粒和病毒载体, 其能够表达权利要求 2-15 中任一项所述的至少一种修饰的 snoRNA 分子。

17. 根据权利要求 16 所述的核酸构建体, 其包括与内含子核酸区域侧连的至少两个外显子核酸区域, 所述内含子核酸区域能够编码所述修饰的 snoRNA。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的核酸构建体, 其中所述核酸构建体包括与两个或多个内含子序列侧连的多个外显子序列, 所述内含子序列包括能够编码一种以上 snoRNAs 的序列。

19. 根据权利要求 18 所述的核酸构建体, 其中所述构建体作为单一构建体形成, 其当在靶细胞内转录时, 引起与所述外显子序列对应的且剪除所述内含子序列的 mRNA 的产生, 且随后产生所述修饰的 snoRNA(s)。

20. 根据权利要求 16-19 中任一项所述的核酸构建体, 其中多于一种内含子序列被用来产生多于一个 snoRNA 序列, 每个 snoRNA 设计为靶向相同或不同的靶 RNA 分子。

21. 根据权利要求 16-20 中任一项所述的核酸构建体, 其还包括促进对其中已经转化或转染了所述核酸构建体的细胞的鉴定的选择标记基因。

22. 根据权利要求 16-21 中任一项所述的核酸构建体, 其包括至少一个启动子, 如组成型或可控型启动子。

23. 根据权利要求 16-22 中任一项所述的核酸构建体, 其还包括位点特异性重组位点, 其设计为促进位点特异性整合到宿主细胞基因组中。

24. 用权利要求 15-23 中任一项所述的核酸构建体转化或转染的宿主细胞。

25. 根据权利要求 24 所述的宿主细胞, 其中所述细胞选自真核细胞, 特别是哺乳动物细胞 (例如, HeLa 细胞, Cos 细胞), 酵母细胞, (例如, AH109, HHY10, KDY80) 和昆虫细胞 (例如, Sf9), 锥虫细胞 (例如, L. collosoma, L. major, T. brucei 29-13), 细菌细胞 (例如, JM109, RP437, MM509, SW10) 或植物细胞。

26. 用于产生修饰的 snoRNA 分子的核酸载体构建体, 所述构建体在 5' 至 3' 方向包括:

i) 用于控制转录的启动子序列;

ii) 第一外显子序列;

iii) 第一内含子剪接序列;

iv) 克隆位点或序列, 其用于促进编码权利要求 2-15 中任一项所述的修饰的 snoRNA 的核酸序列的克隆;

v) 第二内含子剪接序列; 和

vi) 第二外显子序列。

27. 根据权利要求 26 所述的核酸载体构建体, 其在 5' 至 3' 方向还包括:

vii) 第三或其它内含子剪接序列;

vii) 第二或其它克隆位点或序列, 其用于促进编码权利要求 2-15 中任一项所述的修饰的 snoRNA 的核酸序列的克隆;

viii) 第四或其它内含子剪接序列 ;和

ix) 第三或其它外显子序列。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的核酸载体构建体,其还包括编码蛋白、RNA、标记的蛋白、突变蛋白等的可表达的编码序列,以功能性置换所述靶 RNA、或要被所述一种或多种 snoRNAs 调节的蛋白。

29. 根据权利要求 28 所述的核酸载体构建体,其中所述 snoRNA 核酸和所述编码蛋白、RNA、标记的蛋白、突变蛋白等的可表达的编码序列受到相同启动子的控制,且作为单一转录体表达,其中编码蛋白、RNA、标记的蛋白、突变蛋白等的所述可表达的编码序列功能性置换所述靶 RNA、或要被所述一种或多种 snoRNAs 调节的蛋白。

30. snoRNA,修饰的 snoRNA,编码 snoRNA 或修饰的 snoRNA 的核酸构建体,或能够表达 snoRNA 或修饰的 snoRNA 的细胞,其用于治疗受试者中的疾病或病症,在所述受试者中,需要调节特别是下调靶核酸的表达。

31. 药物组合物,其包括 snoRNA,修饰的 snoRNA,编码 snoRNA 或修饰的 snoRNA 的核酸构建体,或能够表达 snoRNA 或修饰的 snoRNA 修饰的 snoRNA 的细胞,和用于其的药用载体。

32. 根据权利要求 30 或 31 所述的产品或组合物,其包括权利要求 2-29 中任一项所述的修饰的 snoRNA,编码 snoRNA 或修饰的 snoRNA 的核酸构建体,或能够表达 snoRNA 或修饰的 snoRNA 修饰的 snoRNA 的细胞。

33. 根据权利要求 28 或 29 所述的载体的应用,其用于评估突变体表型,或辅助药物筛选策略,或用于靶标验证,或在不与已有的未标记的细胞形式竞争的条件下分析蛋白的标记形式,或用于其它实施的应用或研究应用。

基因表达的靶向调节

发明领域

[0001] 本发明涉及利用设计成靶向特定核酸序列的 snoRNA 分子或 snoRNA 样分子或片段来调节基因表达的方法。

[0002] 本发明还涉及用于基因表达的靶向调节的修饰的 snoRNA 分子和修饰的 snoRNA 样分子和片段。

[0003] 发明背景

[0004] 小核仁 RNAs (snoRNAs) 包括存在于所有真核细胞中的核 RNAs 家族。snoRNAs 集中在细胞核中,特别是集中在核仁中,在核仁中它们在核糖体亚基合成过程中作用于修饰核糖体 RNA (rRNA) 或另外参与 rRNA 的加工。存在两种主要种类的 snoRNAs,即盒 C/D snoRNAs 和盒 H/ACA snoRNAs,其分别参与 2' -O- 核糖甲基化和假尿苷修饰(评论见 Boisvert 等人,2007, Kiss 等人,2002 和 2006)。

[0005] SnoRNAs 在体内作为 RNA- 蛋白复合体 (snoRNPs) 起作用,在该情形中 RNA 结构部分作用为使碱基与 rRNA 前体配对的指导 RNA,或者将修饰位点定向于 rRNA 上的特定序列(在盒 C/D 与盒 H/ACA snoRNAs 的情形中)或作为分子伴侣来辅助新生 rRNA 前体的成熟(例如 U3 snoRNA)。

[0006] 盒 C/D snoRNAs 依据在作用为一组盒 C/D 蛋白的结合位点的这一亚家族中常见的 RNA 基序而命名,所述一组盒 C/D 蛋白包括 NOP56, NOP58, TIP48, TIP49, 15.5K 和高度保守的蛋白纤维蛋白,所述纤维蛋白具有特异性 2'-O- 甲基化酶活性。盒 C/D snoRNA 与干 II 和盒 D 区 5' 紧接的区域包含与 rRNA 上特定位点互补的“指导”序列,其指导纤维蛋白 2' -O- 甲基酶在与指导 RNA 区互补的 rRNA 序列内所需要的核糖残基的 2' -OH 位置上添加甲基。已经表明类似的功能从酵母一直到哺乳动物细胞都起作用。由于保守的序列组件,所以可以利用基因组 DNA 序列信息来预测人盒 C/D snoRNA 家族的成员,并通过计算分析来预测其在 rRNA 上的推定 2' -O- 甲基化靶位点。然而,迄今为止,在人类的情形中,并不是所有这些种类都通过直接的实验鉴定或验证过。

[0007] 除了 rRNA 的修饰之外,对于某些盒 C/D snoRNAs 已经提议了两种另外的功能。第一,据认为一些家族成员针对其它非核糖体 RNAs 上的 2' -O- 核糖基团的甲基化,所述其它非核糖体 RNAs 包括小核 RNAs,其是核前 mRNA 剪接机制的亚基。这基本上是与对于 rRNA 所观察的相同的修饰反应,但是由于其所包含的指导 RNA 序列而针对不同的 RNA 底物。第二,据报道,盒 C/D snoRNA 家族的一个成员 (HBII-52) (S. Kishore 和 S. Stamm, 2006) 作用为可变剪接因子,其可以对剪接位点的选择产生改变,影响编码 5-羟色胺受体 2C 的 6 外显子神经元-特异性转录体中的外显子 5。在这一情形中,所涉及的机制是未知的,且还不清楚 HBII-52 snoRNA 是否也参与 rRNA 的修饰或者其是否定位于核仁。

[0008] 对于能够控制基因表达已经研究了很多年,并且多种技术是已知的,均具有优点和缺点。例如, RNAi 技术是本领域公知的。“RNAi”是指在动物和植物中由双链 RNA 起始的序列特异性转录后基因沉默的过程,所述双链 RNA 与靶 RNA 的区域相同且引起其降解(例如,参见 W09932619, W00129058 和 Tuschl Chem Biochem. (化学和生物化学) 2:

239-245(2001))。然而,存在与 RNAi 技术相关的问题,不仅是人们必须利用化学手段合成所述分子的成本问题。此外,当利用遗传方法制备 RNAi 分子时,可能难以适当地产生该分子。此外,为了产生多于一种 RNAi 分子以靶向相同或不同的靶序列,仅仅增加了前述问题。在获得靶向基因的高效击倒中,特别是在不产生其它基因的不需要的“非靶向(off target)”击倒中,也产生使用 RNAi 的问题。

[0009] 因此,基因沉默或表达调节的其它或备选方法将是需要的。本发明的目的是消除和/或减轻上述缺点中的至少一种。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明部分基于本发明人对 snoRNAs 的研究和下述鉴定,即, snoRNA 序列的一部分可以用靶特异性核酸序列取代,以形成修饰的 snoRNA,当所述修饰的 snoRNA 加入细胞时,其或其片段能够调节包括所述靶特异性核酸序列的基因的表达。

[0012] 在第一方面中,提供了调节靶核酸表达的方法,所述方法包括在使 snoRNA 和/或其片段能够与靶核酸的一部分杂交的条件下使所述核酸与 snoRNA 相接触;且其中所述 snoRNA 或其片段与所述核酸部分的杂交调节所述靶核酸的表达和/或功能或者对所述靶核酸的表达和/或功能产生调节。所述 snoRNA 可以是天然 snoRNA 分子,或者其可以是修饰的 snoRNA 分子,如下文进一步所述。

[0013] 还提供了用于调节靶核酸表达的修饰的 snoRNA 序列,所述修饰的 snoRNA 序列包括基本上与靶核酸序列的一部分互补的核酸序列,其用于与所述靶核酸部分杂交且调节所述核酸的表达。应该理解,所述修饰的 snoRNA 分子与本领域已知的天然 snoRNA 分子如分子 HBII-180C 不同。一般说来,所述修饰的 snoRNA 分子基于天然 snoRNA 分子,如下文所讨论,但是包括特别选择和引入到所述 snoRNA 分子中的核酸部分,以与靶核酸部分杂交且调节其表达。

[0014] 本发明人已经观察到本发明所述的 snoRNA 分子能够下调或者减少靶 RNA 或蛋白的表达/功能。不希望受到理论限制,可能的是,所述修饰的 snoRNA 可以在细胞内进行加工,以便包括能够特异性杂交所述靶序列的序列的所述 snoRNA 分子的片段,可以具有调节所述靶 RNA 的表达/功能的作用,尽管表达可以通过结合在特定基因座的 DNA 进行调节也是可能的。这样的序列可以准确地或者高度特异性地对应于在本文所述的天然和修饰的 snoRNAs 中存在的序列,其基本上与靶核酸序列如 RNA 或 DNA 序列的所述部分互补,或者取决于所述序列的碱基组成和 G/C 含量长度可以更短,如 2-10 个核苷酸长。原则上,所述互补区长度将足够长,且是这样的序列,即其足以提供通过已知的互补碱基配对原理特异性结合所述靶 RNA。

[0015] 本发明的 snoRNA 分子可以基于所谓的盒 C/D-snoRNA 或盒 H/ACA-snoRNA。优选的 snoRNAs 基于盒 C/D-snoRNA。

[0016] 当用于本文时,短语“snoRNA”指通常在细胞的核浆中和/或核仁中合成和/或起作用的小 RNA 分子。按照优选实施方案,本发明的小核 RNA 分子是包含盒 C/D 的 snoRNAs。

[0017] 盒 C/D snoRNAs 的非限制性实例包括 L.collosoma b2(GenBank 登记号 AF331656), L.collosoma B3(GenBank 登记号 AY046598), L.collosomaB4(GenBank 登记号 AY046598), L.collosoma B5(GenBank 登记号 AY046598), L.collosoma TS1(GenBank 登记号 AF331656), L.collosomaTS2(GenBank 登记号 AF331656), L.collosoma g2(GenBank

登记号 AF331656), *L. collosoma* snoRNA-2 (GenBank 登记号 AF050095), *T. brucei* snoRNA 92 (GenBank 登记号 Z50171), *L. tarentolae* snoRNA 92 (GenBank 登记号 AF016399), *T. brucei* TBC4 snoRNA (SEQ ID NO:35), *T. brucei* sno270 (GenBank 登记号 Z50171) 和人 U14snoRNA (GenBank 登记号 NR_000022)。

[0018] 本发明的修饰的 snoRNAs 可以包括通常在盒 C/D snoRNAs 中存在的一种或多种 D/D' 盒核酸序列。所述 D 和 / 或 D' 盒是保守核苷酸序列, 并且可以由选自例如 5' -CUGA-3', 5' -AUGA-3', 5' -CCGA-3', 5' -CAGA-3', 5' -CUUA-3', 5' -UUGG-3' 和 5' -CAGC-3' 的序列组成。然而, 可以考虑其它的修饰和 / 或衍生物。

[0019] 本发明的修饰的 snoRNAs 还可以包括与 28S rRNA 互补的序列和 / 或盒 C 序列。所述与 28S rRNA 互补的序列长度可以为 5-15 个核苷酸, 如 8-12 个核苷酸, 特别是 10 个核苷酸, 但是该 rRNA 互补区还可以在不妨碍活性的前提下突变且基本或完全去除与 rRNA 的互补性 (complementarity)。典型地, 与 28S rRNA 互补的序列可以与 28S rRNA 序列的碱基 3680 处或其附近的核苷酸 (编号依据 Lestrade, L., 和 Weber, M. J. (2006). snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/Dbox snoRNAs (snoRNA-LBME-db, 人 H/ACA 和 C/D 盒 snoRNAs 的完全数据库). *Nucleic Acids Res* (核酸研究) 34, D158-162.) 互补, 如在 3670-3690 附近, 例如, 3677-3686。所述盒 C 序列长度典型地为 5-9 个核苷酸, 如 7 个核苷酸, 且可以包括序列 AUGAUGU 或其一部分。典型地, 当存在时, 盒 C 序列位于与 rRNA 互补或与 snoRNA 的其它生理学 RNA 靶互补的序列的 5' 处, 所述序列位于盒 D' 序列的 5', 所述盒 D' 序列位于基本上与所述靶核酸序列的所述部分互补的核酸序列的 5'。优选地, 在盒 C 序列, 与 rRNA 互补的序列、盒 D' 序列和 / 或基本上与靶核酸序列的所述部分互补的核酸序列之间仅发现 1-3 个核苷酸碱基, 如 1 个核苷酸碱基。与盒 D' 序列相同或不同的盒 D 序列可以位于基本与靶 RNA 序列的所述部分互补的核酸序列的 3' 处。所述盒 D 序列可以位于基本与靶核酸序列的所述部分互补的核酸序列的 3' 碱基的 20-30 个核苷酸 3', 如 24-28 个核苷酸, 特别是 26 个核苷酸的下游处。

[0020] 本发明的修饰的 snoRNA 分子还包括至少一个能够靶向靶核酸序列并与其杂交的序列。基于本文所述的工作, 本发明人鉴定了 snoRNA 分子 HB II-180C, 其包括紧接盒 D' 序列下游的序列, 其与由人成纤维细胞生长因子 3 (FGFR3) 转录的前 mRNA 的内含子 17 中存在的 21 个核苷酸的序列高度互补。通过将该序列改变为被设计成与特定靶基因序列互补的不同序列, 所述特定靶基因可以是内含子或外显子序列, 本发明人已经能够调节需要的靶基因的表达。

[0021] 典型地, 基本与靶核酸序列的所述部分互补的核酸序列长度为 15-45 个核苷酸, 如 17-30 个核苷酸, 但是取决于序列和碱基组成, 所述长度可以更长。“基本”互补意指在靶核酸序列和设计为与所述靶核酸杂交的 snoRNA 分子序列之间不必存在精确的互补性。然而, 应该理解, 应该存在高度的同一性, 所述同一性典型地大于 90 或 95%, 这足以确保依据已知的 RNA 或 DNA/RNA 碱基配对法则的特异性结合。因此, 典型地, 取决于互补区的长度和 G/C 含量, 可以允许在两个序列之间存在至多仅 1-3 个错配。所述靶核酸序列可以是 RNA 序列, 典型地为 mRNA, tRNA, miRNA 或 rRNA 序列, 或 RNA 病毒基因组序列或源于其的转录体, 特别是 mRNA 序列。在靶核酸序列内, 所述互补区可以存在于内含子内、或外显子内、或特别存在于内含子-外显子连接处, 但是也可以位于 5' 或 3' 非翻译区。

[0022] 应该理解,多于一种设计为与靶核酸分子杂交的序列可以存在于本发明的修饰的 snoRNA 分子中。当存在多于一种所述序列时,可以设计不同的“靶向”序列以靶向同一靶核酸分子的不同部分、或不同的靶核酸分子。

[0023] 在另一个方面中,还提供了能够表达本发明所述的至少一种 snoRNA 分子的核酸构建体。

[0024] 典型地,所述核酸构建体包括至少两个侧连内含子核酸区的外显子核酸区,所述内含子核酸区能够编码本发明所述的 snoRNA。最理想地,所述核酸构建体可以包括侧连两个以上内含子序列的多个外显子序列,所述内含子核酸区包括能够编码一个以上本发明所述的 snoRNAs 的序列。所述构建体可以作为单一构建体形成,其在靶细胞内转录时引起与所述外显子序列对应的且剪除所述内含子序列的 mRNA 的产生,且随后产生本发明所述的 snoRNA(s)。

[0025] 在使用多于一种内含子序列来产生多于一种本发明的 snoRNA 序列的情形中,可以设计每个 snoRNA 靶向相同或不同的靶 RNA 分子。

[0026] 预计熟练的技术人员 (addressee) 非常熟悉内含子和外显子由什么组成,但是处于辅助目的提供下述:

[0027] 内含子是插入在最终 mRNA 产物中表达、通常编码蛋白的 DNA 区域的部分或“外显子”之间的真核 DNA 的部分。内含子和外显子转录为称为“一级转录体, mRNA 前体”(或“前 mRNA”)的 RNA。内含子必须从前 mRNA 去除,以便可以产生由外显子编码的天然蛋白(术语“天然蛋白”用在本文中指天然存在的、野生型、突变的或功能蛋白)。内含子从前 mRNA 的去除以及随后的外显子的连接在剪接过程中进行。

[0028] 剪接过程实际上是由剪接因子介导的一系列反应,其在转录之后但是在翻译之前在 RNA 上进行。因此,“前 mRNA”是包含外显子和内含子二者的 RNA,“mRNA”是这样的 RNA,其中已经去除内含子且随后外显子连接在一起从而蛋白可以由该 RNA 通过核糖体进行翻译。

[0029] 内含子定义为一组“剪接组件”,其是相对较短、保守的 RNA 区段,其结合进行剪接反应的多个剪接因子。因此,每个内含子定义为 5' 剪接位点、3' 剪接位点、和位于之间的分支点 (branch site)。

[0030] 所述核酸构建体还可以包括通常存在于常规核酸载体中且对熟练的技术人员是公知的常见核酸特征。例如,所述核酸构建体可以包括用于促进对其中已经转化或转染了所述核酸构建体的细胞的鉴定的选择标记基因。优选地,所述核酸构建体包括用于促进编码所述 snoRNA 分子的核酸的表达的至少一个启动子,如本领域已知的组成型或可控型启动子。适当的启动子的实例包括 CMV 启动子, T3, T7, SP6, SV40, 腺病毒主要晚期启动子和熟练的技术人员已知的其它启动子。

[0031] 所述核酸构建体还可以包括采用天然的、突变或另外标记形式的基因 /RNA 拷贝,其设计成替代由所述 snoRNA 调节的基因 /RNA 拷贝。

[0032] 可以使用一些方法来在细胞中产生本发明的 snoRNA。

[0033] 按照本发明的一个优选实施方案,可以通过向细胞中引入上述能够表达 snoRNA 分子的核酸构建体而产生本发明的 snoRNA 分子。

[0034] 为了在细胞中表达本发明的 snoRNA,将核酸序列连接至核酸构建体中,其包括在

编码 snoRNA 的核酸序列上游的启动子。理想地,所述编码 snoRNA 的序列侧连在熟练的技术人员鉴定为外显子序列和剪接序列的核酸区的任一侧,所述剪接序列在转录时引起编码 snoRNA 的序列的剪接。适于指导所述核酸序列在例如真核细胞中的转录的启动子包括组成型或诱导型的启动子。

[0035] 适用于本发明的组成型启动子是在大部分环境条件下和大部分细胞类型中有活性的启动子序列,如 CMV 启动子,SV40 启动子,腺病毒主要晚期启动子和劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)(RSV)启动子。适用于本发明的诱导型启动子包括,例如,低氧诱导因子 1(HIF-1)启动子(Rapisarda, A. 等人,2002. Cancer Res. (癌症研究)62:4316-24)和四环素诱导型启动子(Srour, M. A., 等人,2003. Thromb. Haemost. (凝血和止血)90:398-495)。

[0036] 本发明的核酸构建体通常包括使得所述构建体适合在原核生物、真核生物、或优选在二者(例如,穿梭载体)中复制和/或整合的其它序列。典型的克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如,启动子,增强子)与转录和翻译终止子(例如,多腺苷酸化信号)。

[0037] 在核酸构建体的构建中,启动子优选位于距离异源转录起始位点与其距离其天然设置的转录起始位点大约相同距离处。然而,如本领域已知的,在不丢失启动子功能的条件下,可以适应该距离的一些变化。

[0038] 除了已经描述的组件之外,本发明的核酸构建体可以典型地包含其它专门的组件,其目的是增加克隆核酸的表达水平或促进携带重组 DNA 的细胞的鉴定。例如,许多动物病毒包含促进病毒基因组在允许的细胞类型中的染色体外复制的 DNA 序列。携带这些病毒复制子的质粒进行游离型复制,只要由所述质粒携带的或宿主细胞基因组具有的基因提供适当的因子。

[0039] 所述核酸构建体可以或可以不包括真核复制子。如果存在真核复制子,那么载体可以利用适当的选择标记在真核细胞中扩增。如果载体不包括真核复制子,则不可能进行游离型扩增。相反,重组 DNA 整合到加工细胞的基因组中,在其中启动子指导所需核酸的表达。所述构建体还可以包括位点特异性重组位点,其被设计为使所述核酸构建体靶向细胞基因组中的特定位点,且当在细胞中存在必需的酶时在该特定位点整合。对于本领域的技术人员,多种位点特异性重组系统是公知的,包括 Cre/Lox, Att/ λ 整合酶,frt/Flp, γ δ 解离酶,Tn3 解离酶和 **OC231** 整合酶(参见 Gover 等人,2005,其指导熟练的读者)。

[0040] 本发明的核酸构建体可以用来在哺乳动物细胞(例如,HeLa 细胞,Cos 细胞),酵母细胞(例如,AH109,HHY10,KDY80),昆虫细胞(例如,Sf9),锥虫细胞(例如,L. collosoma, L. major, T. brucei 29-13)或细菌细胞(例如,JM109, RP437, MM509, SW10)中表达本发明的多核苷酸。

[0041] 优选地,通过将核酸序列连接至哺乳动物、酵母、锥虫或细菌表达载体中而合成本发明的多核苷酸。所述载体的实例包括,但不限于,适用于哺乳动物细胞中的 pcDNA3.1、pBK-CMB 和 pCI 载体,适用于酵母细胞中的 pGBKT7、pLGADH2-lacZ 和 pBGM18 载体,适用于锥虫细胞中的 pX-neo 游离型载体和适用于细菌细胞中的 Pack02scKan、pMLBAD、pMLS7 载体。

[0042] 按照优选实施方案,优选地构建本发明的核酸构建体用于真核生物表达,最优选地,用于哺乳动物细胞表达。

[0043] 哺乳动物表达载体的实例包括,但不限于,可从 Invitrogen 获得的 pcDNA3、

pcDNA3.1(+/-)、Pgl3、PzE0sv2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81,可从 Promega(普洛麦格)获得的 pCI,可从 Stratagene 获得的 pMbac、pPbac、pBK-RSV 和 pBK-CMV,可从 Clontech 获得的 pTRES,以及它们的衍生物。

[0044] 也可以使用包含来自真核病毒如反转录病毒的调节元件的表达载体。SV40 载体包括 pSVT7 和 pMT2。来源于牛乳头瘤病毒的载体包括 pBV-1MTHA,和来源于埃巴病毒的载体包括 pHEBO,和 p205。其它示例性的载体包括 pMSG,pAV009/A⁺,pMT010/A⁺,pMAMneo-5,杆状病毒 pDSVE,和在 SV-40 早期启动子,SV-40 晚期启动子,金属硫蛋白启动子,鼠乳腺癌病毒启动子,劳氏肉瘤病毒启动子,多角体启动子,或其它证明有效用于真核细胞中表达的启动子的指导下允许蛋白表达的任意其它载体。

[0045] 可以使用多种方法将本发明的核酸构建体引入哺乳动物细胞中。所述方法通常记述在 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册), Cold Springs Harbor Laboratory(冷泉港实验室), 纽约(1989,1992)中,在 Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学方法), John Wiley 和 Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 等人, Somatic Gene Therapy(体细胞基因治疗), CRC 出版社, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 等人, Gene Targeting(基因靶向), CRC 出版社, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses(载体:分子克隆载体及其应用的研究), Butterworths, Boston Mass. (1988) 和 Gilboa 等人. [Biotechniques(生物技术)4(6):504-512,1986] 中,并且包括,例如,稳定或瞬时转染、脂质转染法、电穿孔、显微注射、脂质体、离子电渗疗法 (iontophoresis)、受体介导的胞吞作用和用重组病毒载体感染。另外,参见美国专利号 5,464,764 和 5,487,992 的阳性-阴性选择方法。例如,对于在二氢叶酸还原酶缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO dhfr-) 细胞中的稳定转染,本发明的表达载体还包括位于胸苷激酶启动子控制下的二氢叶酸还原酶表达盒。

[0046] 还可以使用病毒载体,如本领域已知的慢病毒 (lentivirus)、反转录病毒或腺病毒来源的载体,将本发明的核酸构建体递送至细胞中。

[0047] 在本发明的另一个方面中,提供用于产生本发明所述的 snoRNA 分子的核酸载体构建体,所述构建体在 5' 至 3' 方向包括:

[0048] i) 用于控制转录的启动子序列;

[0049] ii) 第一外显子序列;

[0050] iii) 第一内含子剪接序列;

[0051] iv) 用于促进编码本发明的 snoRNA 的核酸序列的克隆的克隆位点或序列;

[0052] v) 第二内含子剪接序列;和

[0053] vi) 第二外显子序列。

[0054] 所述 snoRNA 可以是天然或修饰的 snoRNA 分子,如本文所述。

[0055] 应该理解,各种元件通过转录连接,这是熟练的技术人员所理解的。载体可以天然包括如上文所述的其它元件,且可以包括促进载体构建的其它克隆位点。

[0056] 本发明的一个特别的优点是由单一转录体提供多个可以靶向相同或不同的靶核酸序列的 snoRNAs 的能力。

[0057] 作为使用核酸构建体的备选方案,应该理解,可以使用例如固相合成化学合成作

为 RNA 寡核苷酸的本发明的 snoRNA 分子。

[0058] 在设计本发明的合成的 snoRNA 分子、snoRNA 样分子或其片段时,必须考虑一些需要考虑的事项。为了有效地在体内抑制基因表达,所述分子可以理想地满足下述要求:(i) 充分的与靶序列结合的特异性;(ii) 在水中的溶解性;(iii) 抗细胞内核酸酶和细胞外核酸酶的稳定性;(iv) 透过细胞膜的能力;和(v) 当用于治疗生物体时,是低毒性的。

[0059] 未修饰的多核苷酸用于应用可能是不切实际的,原因在于其体内半衰期短,在该期间内其可以被核酸酶迅速降解。此外,其难以在多于毫克量级上制备。另外,所述多核苷酸是较差的细胞膜渗透剂。

[0060] 为了提供半衰期以及膜渗透性,可以修饰本发明的多核苷酸的多核苷酸主链。

[0061] 可以在碱基、糖或磷酸结构部分修饰多核苷酸。这些修饰包括,例如,使用甲基磷酸酯(methylphosphonates),一硫代磷酸(monothiophosphates),二硫代磷酸(dithiophosphates),氨基磷酸酯(phosphoramidates),磷酸酯(phosphate esters),桥连硫代磷酸酯

[0062] (bridged phosphorothioates),桥连氨基磷酸酯(bridged phosphoramidates),桥连亚甲基磷酸酯(bridged methylenephosphonates),具有硅氧烷桥接(siloxane bridges)、碳酸酯桥接(carbonate bridges)、羧甲基酯桥接(carboxymethyl ester bridges)、碳酸酯桥接(carbonate bridges)、羧甲基酯桥接(carboxymethyl ester bridges)、乙酰胺桥接(acetamide bridges)、氨基甲酸酯桥接(carbamate bridges)、硫醚桥接(thioether bridges)、sulfoxy 桥接、sulfonyl 桥、异头(anomeric)桥接和硼烷衍生物的脱磷酸核苷酸间类似物(dephospho internucleotide analogs)(Cook,1991,Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides-future opportunities(反义寡核苷酸医学化学-未来机遇).Anti-Cancer Drug Design(抗癌药物设计)6:585)。优选地,为了使得本发明的合成多核苷酸具有体内稳定性,可以将在核糖环位置 2 处的氧分子甲基化,形成 2'-O-甲基化 RNA 寡核苷酸。

[0063] 国际专利申请 W0 89/12060 公开了用于合成多核苷酸类似物的多种结构单元,以及通过以限定顺序连接所述结构单元形成的多核苷酸类似物。所述结构单元可以是“刚性的”(即,包含环结构)或“柔性的”(即,缺少环结构)。在这两种情形中,所述结构单元包含羟基和巯基,据说结构单元通过它们连接形成多核苷酸类似物。在寡核苷酸类似物中的连接结构部分选自自由硫化物(-S-),亚砷(-SO-),和砷(-SO₂-)组成的组。

[0064] 国际专利申请 W0 92/20702 描述了一种包括肽主链的无环寡核苷酸,在所述肽主链上任何选择的化学核碱基(nucleobase)或类似物排成一行且如同其在天然 RNA 中那样作为编码特征(coding characters)。这些称为肽核酸(PNAs)的新化合物不但在细胞中比其天然对应物更稳定,而且结合天然 RNA 比彼此附着的天然核酸更紧密 50-100 倍。可以通过 Merrifield 固相肽合成法,由包含尿苷、胞苷、腺苷和鸟苷的 4 种被保护的单体合成 PNA 低聚物。为了提高在水中的溶解性以防止聚集,赖氨酸酰胺基位于在 C 端区域。

[0065] 还可以通过在合成过程中在 snoRNAs 中结合 3'-脱氧胸苷或 2'-取代的核苷酸(例如,用烷基取代的),通过提供作为苯基异脲(phenylisourea)衍生物的 snoRNAs,或通过使其它分子如氨基吖啶(aminoacridine)或聚赖氨酸连接在 snoRNAs 的 3' 端,而提高 snoRNA 的稳定性(参见,例如,Anticancer Research(抗癌研究)10:1169-1182,1990)。

本发明 snoRNAs 的 RNA 核苷酸的修饰可以在整个 snoRNA 中、或在选择的区域如 5' 和 / 或 3' 端存在。还可以通过将 snoRNAs 偶联至亲脂化合物上而修饰 snoRNAs 以提高其透过靶组织的能力。可以通过本领域已知的标准方法制备本发明的 snoRNAs, 所述标准方法包括标准化学合成法和编码其的 DNA 的转录。另外, 可以通过将 snoRNAs 偶联至对靶细胞细胞表面上的受体特异性的配体而使 snoRNAs 靶向特定的细胞。还可以通过缀合到特异性结合细胞型特异性受体的单克隆抗体上, 而使 snoRNAs 靶向特定的细胞类型。

[0066] 本发明核酸的构建体和 / 或载体可以包括多于一种被设计为产生本发明所述的修饰的 snoRNA 的序列。当存在多于一种序列时, 所述序列可以被设计为靶向相同的靶核酸, 或不同的靶核酸。

[0067] 所述核酸构建体, 载体或实际上编码修饰的 snoRNA 的核酸本身可以被设计成表达与本发明的 snoRNA 分子联合使用的其他分子, 如 RNAi 分子, 以调节基因表达。

[0068] 还可能利用本发明的技术产生疾病模型, 而不必产生常规转基因动物。因此, 本发明的核酸, 核酸构建体或载体可以被设计成表达 snoRNA, 以在宿主细胞 / 动物中防止或最小化正常野生型基因 / 蛋白的表达, 且还表达与特定疾病 / 病况相关的基因 / 蛋白的突变形式。然后, 可以向所述细胞 / 动物增加 / 实施可能的治疗, 以观察所述治疗能否治疗或改善突变基因 / 蛋白的作用。

[0069] 本发明的 snoRNAs, 核酸, 核酸构建体和 / 或载体可以用来确定基因在细胞或生物体中的功能, 或者甚至用于调节基因在细胞或生物体中的功能。所述细胞优选地是真核细胞或细胞系, 例如, 植物细胞或动物细胞, 如哺乳动物细胞, 例如, 胚胎细胞, 多能干细胞, 肿瘤细胞, 例如畸胎瘤细胞, 或病毒感染的细胞。所述生物体优选地是真核生物体, 例如, 植物或动物, 如哺乳动物, 特别是人。

[0070] 本发明的 snoRNA 分子针对的靶基因可以与病理状况相关。例如, 所述基因可以是病原体相关基因, 例如, 病毒基因, 肿瘤相关基因或自体免疫疾病相关基因。所述靶基因还可以是在重组细胞或遗传改变的生物体中表达的异源基因。通过确定或调节、特别是抑制所述基因的功能, 可以获得农业领域或医学或兽医医学领域中的有价值的信息和治疗益处。本发明允许提供被设计为用备选形式、典型地使用单一载体来置换细胞 (或病毒) 蛋白 (或功能 RNA) 的一种形式的核酸构建体和 snoRNAs。例如, 这可以用来纠正在生物体或细胞中存在的缺陷, 如已知可能为疾病的致病因子的突变基因 (例如在 CFTR 基因中的基因突变导致发展囊性纤维化病)。相同的载体可以被设计成在同一构建体内编码靶向以减少突变基因表达的 snoRNA(s), 并且还编码该基因的正确拷贝以表达正确的蛋白。所述正确的拷贝可以由 cDNA 序列提供, 或者备选地由侧连内含子的外显子编码, 所述内含子编码本发明的修饰的 snoRNAs。其他实例包括置换与癌症进展相关的突变的 p53 基因、BRCA 基因等。

[0071] 有利地, snoRNA 和置换核酸可以位于同一转录体内, 且由与击倒 (knock down) 表达的 snoRNAs 相同的启动子表达。这具有允许使全部作为单一转录体表达的优点。此外, 这还具有使 snoRNAs 的表达水平和所表达的置换核酸平衡且共同调节 (即, 由相同的启动子调节) 的优点。

[0072] 可以利用相似的方法来用相同 RNA 的修饰形式置换不编码蛋白的被靶向的 RNA (例如, snRNA 或 miRNA 或其他功能 RNA)。

[0073] 这种策略不限于校正缺陷。可以利用相似的策略来置换由细胞或病毒编码的任何

蛋白（或 RNA），包括用相同基因产物的缺陷的、突变的或修饰形式置换的该蛋白（或 RNA）的野生型和 / 或功能形式，这对于某些应用可能是理想的，例如，评价突变体表型，或辅助药物筛选策略，或用于靶标验证，或在不与已有的未标记的细胞形式竞争的条件下分析蛋白的标记形式，或用于其它实施的应用或研究应用。还可以利用所述策略使用单一载体来用完全或基本不同的蛋白（或 RNA）置换一种类型的蛋白（或 RNA）。

[0074] 图 1-3 示意性显示可以用于本发明的载体的实例。在图 1 中，载体显示为表达多个 snoRNAs，其可以被靶向以调节单一基因序列或多个基因序列的表达。图 2 示意性显示蛋白置换载体，对其进行设计从而提供抑制靶基因 X 表达的 snoRNA(s)，所述靶基因 X 可以由在所述载体中存在的 cDNA 所编码的新蛋白所置换。图 3 示意性显示与蛋白置换载体相似的载体，但是其用于抑制 RNA，如突变 RNA，且其可以用新形式 / 与所述载体中存在的序列不同的形式来置换。

[0075] 本发明用于细胞或生物体的其他应用是分析基因表达模式和 / 或蛋白质组。在一个实施方案中，可以进行关于一个或数个靶蛋白的变体或突变形式的分析，其中通过上述外源靶核酸将所述变体或突变形式重新引入到细胞或生物体中。与使用敲除细胞相比较，组合外源基因的敲除和通过使用突变的例如是部分缺失的外源靶标的挽救具有优点。此外，该方法特别适用于鉴定靶蛋白的功能结构域。在另一个优选的实施方案中，例如，进行对至少两种细胞或生物体的基因表达模式和 / 或蛋白质组和 / 或表型特征的比较。

[0076] 本发明还可以用于鉴定和 / 或表征药剂、例如，由测试物质的集合鉴定新药剂的方法中，和 / 或用于表征已知药剂的作用机制和 / 或副作用的方法中。

[0077] 因此，在另一个方面中，提供本发明所述的 snoRNA，核酸，核酸构建体或载体，其用于治疗受试者中的疾病或病症，在所述受试者中需要调节特别是下调一种或多种靶基因的表达。

[0078] 在另一个方面中，提供本发明所述的 snoRNA，核酸，核酸构建体或载体，其用于制备用于治疗受试者中的疾病或病症的药物，在所述受试者中需要调节特别是下调一种或多种靶基因的表达。

[0079] 在另一个方面中，提供治疗受试者中的疾病或病症的方法，在所述受试者中需要调节特别是下调一种或多种靶基因的表达，所述方法包括对需要其的受试者施用治疗有效量的本发明所述的 snoRNA、核酸、核酸构建体或载体的步骤。

[0080] 当用于本文时，词语“治疗”指抑制或阻止疾病、病症或病况的发展和 / 或在患有、或诊断患有所述疾病、病症或病况的个体中引起疾病、病症或病况的减轻、消除、或恢复。本领域技术人员将知晓可以用于评估疾病、病症或病况的发展的各种方法和测定法，以及类似地，可以用于评估疾病、病症或病况的减轻、消除或恢复的各种方法和测定法。

[0081] 通过向个体的细胞提供本发明的分离的多核苷酸，由此下调所述个体的细胞中靶 RNA 的水平，而实施本发明该方面所述的方法。

[0082] 提供可以通过将本发明的多核苷酸直接施用至细胞中或通过如上文所述在细胞中表达所述多核苷酸而实施。表达可以通过用能够表达本发明的多核苷酸的核酸构建体直接转染个体的细胞（即，体内转染）、或通过用所述核酸构建体转染由个体分离的细胞并将所转染的细胞施用至所述个体（即，离体转染）而实施。

[0083] 因此，在另一个方面中，提供一种药物组合物，其包括本发明所述的 snoRNA，或能

够表达本发明所述的 snoRNA 分子的核酸构建体, 以及其药用载体。

[0084] 药物制剂包括适于口服、局部 (包括皮肤、口腔和舌下)、直肠或肠胃外 (包括皮下、皮内、肌内和静脉内)、鼻和肺部施用如通过吸入的那些制剂。在适当时, 所述制剂可以方便地以离散的剂型 (discrete dosage unit) 存在, 并且可以通过制药领域中公知的任何方法制备。所有方法均包括这样的步骤: 使活性化合物与液体载体或细分的固体载体或二者缔合, 然后如果需要, 将产品定型为需要的制剂。

[0085] 其中载体是固体的适于口服施用的药物制剂最优选地作为单位剂量制剂存在, 如大丸剂 (boluses), 胶囊或片剂, 每种包含预先确定量的活性化合物。片剂可以通过压制或模塑制备, 任选地具有一种或多种辅助成分。压制的片剂可以通过在适当的机器中挤压采用自由流动形式的活性化合物, 如粉末或颗粒而制备, 所述粉末或颗粒任选地与结合剂、润滑剂、惰性稀释剂、滑润剂、表面活性剂或分散剂混合。模塑的片剂可以通过用惰性液相稀释剂模塑活性化合物而制备。片剂可以任选地包被, 并且如果未包被, 可以任选地是有划痕的 (scored)。胶囊可以通过将单独的或与一种或多种辅助成分混合的活性化合物填充至胶囊壳中然后以常用方式将其密封而制备。扁囊剂与胶囊类似, 其中活性化合物与任意辅助成分一起被密封在米纸封中。活性化合物还可以被配制为可分散的颗粒, 其可以例如在施用前混悬在水中, 或撒在食物上。颗粒可以进行包装, 例如, 包装在小药囊中。其中载体是液体的适于口服施用的制剂可以作为在水性或非水性液体中的溶液或混悬液、或作为水包油液体乳剂存在。

[0086] 用于口服施用的制剂包括控释的剂型, 例如, 片剂, 其中将活性化合物配制在适当的控释基质中, 或者用适当的控制释放的薄膜包被。所述制剂可以特别方便的用于预防应用。

[0087] 其中载体是固体的适于直肠施用的药物制剂, 最优选地作为单位剂量的栓剂存在。适当的载体包括可可脂和本领域常用的其它物质。所述栓剂可以通过用软化的或熔融的载体混合活性化合物然后在模具中冷却并塑形而方便地形成。

[0088] 适于肠胃外施用的药物制剂包括活性化合物在水性或油质赋形剂中的无菌溶液或混悬液。

[0089] 可注射的制剂可以适用于推注注射 (bolus injection) 或连续输注。所述制剂方便地以单位剂量存在或者存在于多剂量容器中, 所述多剂量容器在引入所述制剂后密封直至需要使用时。备选地, 活性化合物可以采用粉末形式, 其在使用前用适当的赋形剂如无菌、无致热原的水构成。

[0090] 活性化合物还可以配制为长久作用的长效制剂, 其可以通过肌内注射或通过植入如皮下或肌内植入而施用。长效制剂可以包括, 例如, 适当的聚合物或疏水物质, 或离子交换树脂。所述长久作用的制剂特别方便地用于预防应用。

[0091] 存在适于通过口腔进行肺部施用的制剂, 以便在接受者的支气管树中递送包含活性化合物且理想地直径在 0.5-7 微米范围内的颗粒。

[0092] 作为一种可能性, 所述制剂可以采用精细粉碎的粉末形式, 其可以方便地存在于可穿透的胶囊中, 例如, 适当的明胶胶囊中, 适于用在吸入装置中, 或者备选地作为自推进式制剂, 其包括活性化合物, 合适的液体或气体推进剂和任选地其它成分如表面活性剂和 / 或固体稀释剂。适当的液体推进剂包括丙烷和含氯氟烃, 并且合适的气体推进剂包括二氧

化碳。还可以使用这样的自推进式制剂,其中活性化合物以溶液小滴或混悬液小滴的形式分散在其中。

[0093] 所述自推进式制剂与本领域已知的那些类似,且可以通过建立的方法制备。适当地,其存在于装备有手动操作阀或自动运行阀的容器中,所述阀具有理想的喷雾特征;有利地,所述阀是其每次操作递送固定体积如 25-100 微升的计量形式。

[0094] 作为另外一种可能性,活性化合物可以采用用在喷雾器(atomizer)或雾化器(nebuliser)中的溶液或混悬液的形式,由此利用加速气流或超声波搅动来产生细小的小雾滴以用于吸入。

[0095] 适于鼻施用的制剂包括通常与上述用于肺施用的那些类似的制剂。当分散时,所述制剂应该理想地具有 10-200 微米范围内的颗粒直径,以保证在鼻腔内的保留;这可以适当地通过使用适当的粒度的粉末或选择适当的阀实现。其它适当的制剂包括颗粒直径在 20-500 微米范围内的粗磨粉末,用于通过由紧贴鼻部放置的容器经由鼻通路快速吸入而施用,和滴鼻剂,其含有在水性或油性溶液或混悬液中的 0.2-5% w/v 活性化合物。

[0096] 应该理解,除了上述载体成分之外,上述药物制剂可以包括适当的一种或多种另外的载体成分,如稀释剂,缓冲剂,增香剂,结合剂,表面活性剂,增稠剂,润滑剂,防腐剂(包括抗氧化剂)等,以及所包含的用于使所述制剂与目的接受者的血液等渗的物质。

[0097] 对于本领域的技术人员,药用载体是公知的,且包括,但不限于,0.1M 且优选为 0.05M 的磷酸缓冲液或 0.8% 的盐水。另外,所述药用载体可以是水性或非水性溶液、混悬液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水,醇/水溶液,乳液或混悬液,其包括盐水和缓冲介质。肠胃外赋形剂包括氯化钠溶液、复方氯化钠葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏(Ringer's)或不挥发性油。还可以存在防腐剂和/或其他添加剂,如例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0098] 例如,适于局部制剂的制剂可以作为凝胶、霜剂或药膏提供。例如,所述制剂可以涂在伤口或溃疡处,直接涂敷在伤口或溃疡的表面,或者负载在适当的支持物如绷带、纱布、网眼等上,所述支持物可以应用于待治疗的区域且覆盖在其上。

[0099] 还可以提供液体或粉末制剂,其可以直接喷雾或撒在待治疗部位上,例如,伤口或溃疡上。备选地,可以用所述制剂喷雾或撒在载体如绷带、纱布、网眼等上,然后施用于待治疗部位。

[0100] 用于兽医用的治疗制剂可以方便地采用粉末或液体浓缩液形式。按照标准的兽医制剂实践,可以在粉末中结合常规水溶性赋形剂,如乳糖或蔗糖,以提高其物理特性。因此,本发明特别适合的粉末包括 50-100% w/w 且优选地 60-80% w/w 的活性成分和 0-50% w/w 且优选地 20-40% w/w 的常规兽医用赋形剂。这些粉末可以添加到动物饲料中,例如,通过中间预混合来添加,或稀释在动物饮水中。

[0101] 本发明的液体浓缩液适当地包含所述化合物或其衍生物或其盐,且可以任选地包括兽医用水混溶性溶剂,例如,聚乙二醇、丙二醇、甘油、缩甲醛甘油(glycerol formal)或与多至 30% v/v 乙醇混合的溶剂。所述液体浓缩液可以施用在动物的饮水中。

[0102] 详述

[0103] 现在将参考下述非限制性实施例和附图描述本发明,所述附图显示:

- [0104] 图 1:本发明所述的被设计为表达多个 snoRNAs 的 snoRNA 表达载体的示意图;
- [0105] 图 2:被设计为用载体编码的蛋白替代宿主细胞蛋白的 snoRNA 表达载体的示意图;
- [0106] 图 3:被设计为用载体编码的 RNA 替代宿主细胞 RNA 的 snoRNA 表达载体的示意图;
- [0107] 图 4:HeLa 细胞核仁 RNA 文库。
- [0108] (A) 来自 HeLa 细胞核仁级分的核仁 RNA 的分离和克隆。左版显示分级分离之前的完整的 HeLa 细胞图像,右版显示分离的核仁。HeLa 细胞核仁利用先前所述的蔗糖梯度方法 (Andersen 等人., 2005) 分级,然后由核仁沉淀分离总核仁 RNA。通过使用多腺苷酸化聚合酶在 3' 端添加多腺苷酸而对总核仁 RNA 进行修饰。
- [0109] (B) 显示 cDNA 合成策略的示意图,其利用扩增(显示在右)和不用扩增(显示在左)进行。通过使用有聚腺苷酸尾的核仁 RNA 作为模板进行反转录合成核仁 cDNAs。不用扩增制备的文库(左)主要用来检测丰度核仁 RNA 种类,而我们利用扩增技术(右)制备包括较低丰度核仁 RNA 种类的文库。将这两种文库独立地克隆至通用质粒载体中,并且通过 DNA 测序进行分析。
- [0110] (C) 在核仁 cDNA 文库中检测到的 RNA 种类的总结。我们分别分析了所述扩增的文库和未扩增的文库,但是圆形分格统计图表显示两种文库的合并结果。
- [0111] 图 5:HBII-180C snoRNA 和宿主基因 C19orf48 的保守性。
- [0112] (A)HBII-180C snoRNA 的结构。盒 C(A/G)UGAUGA) 与盒 D 或 D' (CUGA) 分别表示在盒内。用于指定核糖 2' -O- 甲基化位点的预测的 rRNA 互补序列用下划线表示。
- [0113] (B) 预测的 HB II-180C snoRNA 的二级结构,显示与 FGFR3 前 mRNA 互补的区域。HBII-180C snoRNA 的二级结构由 mfold(<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) (M. Zuker Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction(用于核酸折叠和杂交预测的 M. Zuker Mfold 网络服务器). Nucleic Acids Res. (核酸研究) 31(13), 3406-15, (2003) 和 D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker 与 D. H. Turner Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure(Turner 扩大的热力学参数的序列依赖性提高 RNA 二级结构的预测) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 288, 911-940 (1999) (左) 计算。盒 C 与盒 D 与 D' 分别显示在盒内。rRNA 互补序列(虚线)和 FGFR3 互补序列(实线)用条线表示。FGFR3 前 mRNA 的互补区显示在右侧,其显示潜在的碱基配对相对作用。
- [0114] (C) 人 C19orf48 基因的结构。外显子显示为具有罗马数字的条纹盒。预测的蛋白编码区用黑色显示。内含子-编码的 snoRNAs HBII-180A, HBII-180B 和 HBII-180C 以实心灰色盒显示。
- [0115] (D) C19orf48 基因的保守区。该图来源于 UCSC 人类基因组浏览程序的 C19orf48 染色体位置 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D: The human genome browser at UCSC (UCSC 的人类基因组浏览程序). Genome Res (基因组研究) 2002, 12(6): 996-1006)。脊椎动物 Multiz 比对和保守性结果以黑色盒和线条表示。17 种脊椎动物物种之间的保守区以条形

显示（保守性）。三个最保守的区域准确对应三种检测的 HBII-snoRNAs。

[0116] 图 6:HBII-180C 的 FGFR3 互补区的序列特异性作用。

[0117] (A) 通过 RNA 印迹（左版）和通过半定量 RT-PCR（右版）分析的 HBII-180C 表达水平。左版显示使用 HBII-180C 特异性探针进行的 RNA 印迹分析的结果。印迹分析了相同量的来自人原代细胞系 WI38(WI38) 和 HeLa 细胞 (HeLa) 的总核仁 RNA(核仁),或总细胞 RNA(细胞)。右版显示使用 HBII-180C 特异性引物组进行的半定量 RT-PCR 的结果。使用相同量的来自 WI38 和 HeLa 细胞的总核仁 RNA 或总细胞 RNA 作为模板。

[0118] (B) 用于野生型和突变 HBII-180C snoRNAs 的 HBII-180C 表达质粒。HBII-180C 中与 FGFR3 前 mRNA 互补的序列由 GAGG 改变为 ATAA(蓝色, mut1)。

[0119] (C) WI38 细胞中表达野生型或 mut1 HBII-180C snoRNAs 的效果比较。图像显示在用空质粒 pcDNA3(pcDNA3), HBII-180C 野生型表达质粒 (WT) 或 HBII-180C 突变体表达质粒 (mut1) 转染 WI38 细胞后三天的细胞的代表性实例。红色箭头指示将死细胞块或死亡细胞块。

[0120] (D) 显示在用上述质粒表达后三天的死亡细胞的百分数的图表。与野生型相比较, FGFR3 前 mRNA 互补区的突变清楚地降低细胞死亡水平。

[0121] 图 7:HBII-180C snoRNA 的 FGFR3- 互补区与可变的 FGFR3 剪接同种型模式相关。

[0122] (A) 用于野生型和突变体的 FGFR3 内含子 17 表达质粒,其被设计为抑制内源 HBII180-C snoRNA 的表达/活性。对于突变体构建体, FGFR3 的互补区由 CCTC 改变为 TTAT(蓝色, FRm)。

[0123] (B) FGFR3 剪接的 mRNA 同种型在 WI38 和 HeLa 细胞两种细胞中的内源性表达模式。凝胶(左图)显示 RT-PCR 分析结果,以检测可变剪接的 FGFR3mRNA 同种型。右图显示 FGFR3mRNA 特异性引物组的位置。外显子显示为具有罗马数字的盒。用于 PCR 的引物以箭头显示。

[0124] (C) 通过过量表达 FGFR3 小基因而改变 FGFR3 可变剪接的 mRNA 同种型模式。凝胶图像显示没有进行转染的 (No,泳道 1),转染了空质粒 pcDNA3.1(pC,泳道 2),转染了 FGFR3 内含子 17 的野生型小基因 (FR3W,泳道 3) 和突变体小基因 (FRm,泳道 4) 的 RT-PCR 结果。

[0125] 图 8:使用修饰的 snoRNA 表达载体对 GFP 和 YFP 的靶向抑制。

[0126] (A) GFP 和 YFP 共有的嵌合体表达质粒靶向序列。WT HB II-180CsnoRNA 中与 FGFR3 前 mRNA 互补的序列由 5' -CACCCCAGAGGACACAGTGCA-3' 改变为 5' -GACTTGAAGAAGTCGTGCTGC-3' (蓝色,嵌合体 1) 或改变为 5' -ACCTTGATGCCGTTCTTCTGC-3' (蓝色,嵌合体 2)。将所得到的嵌合体 1 和 2snoRNAs 亚克隆到表达 mCherry 荧光蛋白 cDNA 的载体的 3' 区。

[0127] (B) 该图显示靶向 GFP 的两个单独区域的嵌合体 1 和嵌合体 2 的互补区,所述两个单独区域也存在于相关的 YFP 基因中。

[0128] (C) 在仅表达未融合的 GFP 的 HeLa^{GFP} 稳定细胞系中,嵌合体构建体对 GFP 表达的作用。该图显示在 HeLa^{GFP} 稳定细胞系中转染空的 mCherry 表达质粒 mCherry-C1(mCherry-C1),表达质粒 HBII-180C 嵌合体 1 或表达质粒 HBII-180C 嵌合体 2 的作用。左版显示未转染的 HeLa^{GFP} 稳定细胞系的活细胞图像 (DIC 图像)。上版显示由固定的细胞记录的图像的 GFP 荧光信号(绿色)。下版显示组合 GFP(绿色)和 mCherry(红

色)信号的合并图像。箭头指示转染细胞,箭头状物指示未转染的细胞。注意到特别是在用编码 HBII-180C 嵌合体 1 或 2 的表达质粒转染的细胞中 GFP 表达的清楚的减少。

[0129] (D) 在表达融合在纤维蛋白的氨基端的 YFP 的 HeLa^{YFP-纤维蛋白}稳定细胞系中嵌合体构建体对 YFP 表达的作用 (Leung 等人., 2004)。该附图显示在 HeLa^{YFP-纤维蛋白}稳定细胞系中使用空的 mCherry 表达质粒 mCherry-C1 (mCherry-C1), 表达质粒 HBII-180C 嵌合体 1 或表达质粒 HBII-180C 嵌合体 2 对转染的作用。左版显示未转染的 HeLa^{YFP-纤维蛋白}稳定细胞系的活细胞图像 (DIC 图像)。上版显示由固定的细胞记录的图像的 YFP 荧光信号 (绿色)。下版是组合 YFP (绿色), mCherry (红色) 和 DAPI 信号 (蓝色) 的合并图像。箭头指示转染的细胞,而箭头状物指示未转染的细胞。注意到特别在用编码 HBII-180C 嵌合体 1 或 2 的表达质粒转染的细胞中 YFP-纤维蛋白表达的清楚减少。在一些细胞中, YFP 信号几乎被完全消除,这表明所述嵌合的 snoRNA 构建体对 YFP-纤维蛋白的有效抑制。

[0130] 图 9:由蛋白质印迹和 RNA 印迹检测的靶向的 snoRNA 对 GFP 和 YFP 的抑制。

[0131] (A) 在用空的 mCherry 表达质粒 mCherry-C1 (对照:泳道 1), 表达质粒 HBII-180C 嵌合体 1 (泳道 2) 或表达质粒 HBII-180C 嵌合体 2 (泳道 3) 转染 HeLa^{GFP} 和 HeLa^{YFP-纤维蛋白}稳定细胞系后,检测 GFP (上图) 和 YFP-纤维蛋白 (下图) 的蛋白水平。每一泳道加载等量的 HeLa 提取物,且蛋白通过 SDS PAGE 分离,电印迹且用单克隆抗-GFP 抗体和用作为加载对照的抗-微管蛋白探测。注意到,特别是使用编码 HB II-180C 嵌合体 1 或 2 的表达质粒, GFP 和 YFP-纤维蛋白水平而不是微管蛋白水平的减少。

[0132] (B) 该图显示三次独立的实验的平均信号强度和标准差。GFP 信号比率根据微管蛋白信号标准化。注意到,特别是使用编码 HB II-180C 嵌合体 1 或 2 的表达质粒, GFP 和 YFP-纤维蛋白水平而不是微管蛋白水平的减少。

[0133] (C) 在用空 mCherry 表达质粒 mCherry-C1 (对照:泳道 1), 表达质粒 HBII-180C 嵌合体 1 (泳道 2) 或表达质粒 HB II-180C 嵌合体 2 (泳道 3) 转染 HeLa^{YFP-纤维蛋白}稳定细胞系后检测 YFP-纤维蛋白的 RNA 水平。每一泳道加载等量的 HeLa 细胞总 RNA,且 RNA 通过 6.5% 甲醛-0.8% 琼脂糖凝胶分离,电印迹,且用放射标记的抗-YFP 低聚物 and 用作为加载对照的抗-18S rRNA 进行探测。该图显示三次独立实验的平均信号强度和标准差。YFP-纤维蛋白信号比率针对 18S rRNA 信号进行标准化。

[0134] (D) 嵌合体 snoRNA 质粒的转染效率。通过 RT-PCR 定量 mcherrymRNA。HeLa 细胞总 RNA 分离自瞬时转染的 mCherry 质粒 (对照) 和嵌合体 snoRNAs。该图显示三次独立实验的平均信号强度。mCherry 细胞比率针对 GAPDH 信号标准化。

[0135] 图 10:使用嵌合体 1 和 2 进行的基因击倒的另一个实例。

[0136] 其实验设计与图 8C 和 D 所示的实验设计相同,不同在于此处用稳定细胞系 HeLa^{GFP-SMN}。mCherry-HBII-180C 为另一种阴性对照,其在 mCherry cDNA 的 3' 区具有野生型 HBII-180C snoRNA 序列。箭头指示转染的细胞,而箭头状物指示未转染的细胞。注意到,特别在用编码 HBII-180C 嵌合体 1 或 2 的表达质粒转染的细胞中, GFP 表达的清楚减少。

[0137] 图 11:使用三联嵌合体 (triplet chimera) snoRNA 质粒的靶向基因击倒。

[0138] (A) 三联嵌合体 snoRNA 构建体的结构和靶向 GFP/YFP 击倒的示意图。

[0139] (B) (C) 实验设计与图 8C 和 D 所用的实验设计相同,但是此处使用嵌合体三联质粒进行转染。Mcherry-triple-HBII-180C 是另一种阴性对照,其在 mCherry cDNA 的 3' 区具

有 3 个野生型 HB II-180C snoRNA 序列的重复。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。

[0140] (D) 通过蛋白质印迹 (泳道 1-5) 检测靶向 GFP/YFP 的每种嵌合体质粒的击倒效率。用 mCherry 和野生型 HBII-180C 表达质粒 mCherry-HBII-180C (对照 : 泳道 1), 表达质粒嵌合体 1 (泳道 2), 嵌合体 2 (泳道 3), 嵌合体 3 (泳道 4), HBII-180C 三联嵌合体 (泳道 5) 转染 HeLa^{YFP-纤维蛋白} 稳定细胞系后, 检测 YFP-纤维蛋白的蛋白水平。每一泳道加载等量的 HeLa 提取物, 且通过 SDS PAGE 分离蛋白, 进行电印迹, 且用单克隆抗 -GFP 抗体和作为加载对照的抗 -B23 进行探测。该图显示由 B23 信号标准化的 YFP-纤维蛋白信号强度。注意到, 特别是用编码嵌合体 1, 2 和 3 的表达质粒时, YFP-纤维蛋白水平而不是 B23 水平的降低。使用三联嵌合体质粒已经增加了降低 YFP-纤维蛋白表达水平的效率。

[0141] (E) 实验设计与图 11B 和 C 的实验设计相同, 但是此处使用嵌合体稳定细胞系 HeLa^{GFP-SMN}。还使用 GFP-SMN 融合蛋白的另一种稳定细胞系检测由所述三联嵌合体质粒介导的靶向基因表达的减少。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。

[0142] 图 12 : 鉴定来自嵌合体三联质粒的嵌合体 snoRNAs。

[0143] (A) 原位杂交的荧光显示野生型 HBII-180C 和嵌合体 snoRNAs (Cy3) 的核仁定位。用 DAPI 染色 DNA。线条是 10 μ M。三联嵌合体 snoRNA 构建体的结构显示在上版中。箭头指示核仁。

[0144] (B) HB II-180C 和嵌合体 snoRNAs 的表征。RNA 印迹显示 HB II-180C 和嵌合体 snoRNAs 的亚细胞分布。通过使用特异性探针的 northern RNA 印迹分析, 用瞬时转染的野生型或嵌合体 snoRNA 表达小基因比较等量的 HeLa 细胞总 RNA (泳道 1), 细胞质 RNA (泳道 2), 核浆 RNA (泳道 3) 和核仁 RNA (泳道 4)。使用 tRNA-IIe 特异性探针 (下版) 检测级分质量。

[0145] 图 13 : 分析 HBII-180C 和嵌合体 snoRNA 突变。

[0146] (A) 显示 snoRNA HBII-180C 的序列, 其中 8 个分开的三核苷酸 AAA 突变的位置显示为 m1-m8 (在所述序列上显示)。盒 C, D 和 D' 用盒显示。与 28S rRNA 互补的预测的指导序列用下划线表示, 如在 snoRNA Base (L. Lestrade 等人, 2006) 中所示。M 盒区由粗体下划线表示。HeLa 细胞瞬时转染了空质粒载体 (泳道 2), 或表达野生型 HB II-180C 的质粒载体 (泳道 3) 或 HB II-180C snoRNA 突变体 m1-8 (泳道 4-11)。每个泳道加载等量的总 HeLa 细胞 RNA (Ctrl : 未转染)。条带显示高灵敏性 RNA 印迹的结果, 其使用放射标记的寡核苷酸探针来分别检测 HBII-180C snoRNA, 和 tRNA。通过半定量 RT-PCR 使用 C19 orf48 和 GAPDH 特异性引物组 (C19orf48 和 GAPDH) 验证转染效率。*C19orf48 引物检测内源性 C19orf48 转录体和 HBII-180C 小基因之间共有的区域。

[0147] (B) 将野生型质粒 (CM2WT) 和突变质粒 (CM2m1&m7) 瞬时转染至单独的 GFP 的稳定细胞 (HeLa^{GFP}) 或 GFP-SMN 融合蛋白稳定细胞系 (HeLa^{GFP-SMN}) 中。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。注意, 对于在嵌合体 2 质粒上作为 HBII-180C snoRNA (图 13A) 的盒 C (CM2m1) 和盒 D (CM2m7) 的核心区域的突变对 GFP 和 GFP-SMN 表达水平没有表现出击倒作用。

[0148] (C) 将突变质粒 (CM2m2-1, m2-2 和 m3) 瞬时转染至 GFP-SMN 融合蛋白稳定细胞系 (HeLa^{GFP-SMN}) 中。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。注意破坏 28S rRNA 互补序列的突变质粒 (CMm2-1 和 m2-2) 存在明显的击倒作用。

[0149] (D) 将在 M 盒具有增加与 GFP 的互补性的插入的突变体质粒 (CM2In-1 至 -3) 和在

M 盒中具有缺失的突变体质粒 (CM2De1-1 至 -3) 瞬时转染至 GFP-SMN 融合蛋白稳定细胞系 (HeLa^{GFP-SMN}) 中。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。

[0150] (E) 将在 M 盒中具有点突变的突变体质粒 (CM2X-1 至 -6) 瞬时转染至 GFP-SMN 融合蛋白稳定细胞系 (HeLa^{GFP-SMN}) 中。箭头 : 转染的, 箭头状物 : 未转染的。

[0151] (F) 嵌合体 2 诱变结果总结。左版显示 HBII-180C snoRNA 的基序和每种质粒的突变区 (质粒名称和突变位置在表格中)。表格显示显微镜分析 (图 13B-E) 的结果。击倒效率显示当通过计数 30 个随机选择的转染细胞判断时, 表现出对 GFP-SMN 水平的抑制的细胞数目 (+++ : 多于 16, ++ : 13-16, + : 9-12, - : 5-8, -- : 少于 5)。

[0152] 图 14 : 结合组合的 snoRNA 主链突变的嵌合体三联质粒 (tripleplasmid) 能够介导靶向基因的表达的击倒。

[0153] (A) 突变体 m2, m4 和 m5 序列均组合且结合在嵌合体三联 snoRNA (snoMENv1) 中。使用 Cy3 标记的嵌合体 snoRNAs 特异性探针 (Cy3) 的原位杂交荧光显示核仁定位。用 DAPI 染色 DNA。线条是 15 μm。箭头指示核仁。

[0154] (B) 这是与图 11E 所示的实验设计相同的实验设计, 不同的是转染三联嵌合体 snoMENv1 质粒。注意到 snoMENv1 质粒表现出与野生型嵌合体三联质粒相似的靶基因的减少水平。

[0155] 图 15 : 内源性 SMN1 蛋白的靶蛋白置换。

[0156] (A) 被靶向的内源性 SMN1 基因击倒质粒 (SMN1s noMENv1) 和 SMN1 蛋白置换质粒 (GFP-SMN1 snoMENv1-PR) 的结构。这些构建体具有与三联嵌合体 snoMENv1 (图 14A) 相似的三联 snoMEN 序列, 不同的是 M 盒序列具有针对内源性 SMN1 前 mRNA 特异性序列的互补序列 (见材料和方法)。

[0157] (B) 将被靶向的内源性 SMN1 质粒 (SMN1 snoMENv1) 和蛋白置换质粒 (GFP-SMN1 snoMENv1-PR) 转染至 HeLa 细胞中。还将表达 GFP cDNA 和 mCherry- 三联嵌合体质粒的 EGFP-C1 (图 14A) 瞬时转染到 HeLa 细胞中作为对照 (GFP 和三联嵌合体)。注意, SMN1 snoMENv1 表现出对照没有表现出的细胞毒性表型。该细胞毒性作用通过使用 GFP-SMN1snoMENv1-PR 质粒进行 GFP-SMN1 融合蛋白的表达而得以挽救。箭头 : 转染的细胞, 箭头状物 : 细胞毒性表型细胞。

[0158] (C) 在用 mCherry 三联嵌合体 (对照 : 泳道 1) 和 SMN1 snoMENv1 (泳道 2) 转染 HeLa 细胞后检测内源性 SMN1 的蛋白水平。每个泳道加载等量的 HeLa 提取物, 且通过 SDS PAGE 分离蛋白, 进行电印迹并用单克隆抗 -SMN1 抗体和作为加载对照的抗 -B23 探测。该图显示具有针对 B23 信号标准化的 SMN1 信号强度。

[0159] 图 16 : 具有本发明的 snoRNA 分子的慢病毒 (Lentiviral) 系统。

[0160] 这是与图 11B 中所进行和所述相同的实验设计, 不同的是在该情形中, 表达载体用慢病毒载体系统 (Lenti-X™ Clontech) 转染。mCherry- 三联 -HBII-180C 是阴性对照, 其在 mCherry cDNA 的 3' 区具有 3 个野生型 HBII-180C snoRNA 序列的重复。箭头 : 转染的细胞, 箭头状物 : 未转染的细胞。

[0161] 缩写 :

[0162] snoRNA : 小核仁 RNA

[0163] snRNA : 小核 RNA

- [0164] rRNA :核糖体 RNA
[0165] tRNA :转运 RNA
[0166] FGFR3 :成纤维细胞生长因子受体 3
[0167] mRNA :信使 RNA
[0168] 前-mRNA :前体信使 RNA
[0169] GAPDH :磷酸甘油醛脱氢酶
[0170] HBII-180C :人脑 snoRNA II-180C
[0171] CIP :牛小肠磷酸酶
[0172] PCR :聚合酶链式反应
[0173] CMV :巨细胞病毒
[0174] 材料和方法

[0175] 构建核仁 cDNA 文库。如先前所述 (Andersen 等人., 2005), 使用蔗糖梯度纯化 HeLa 细胞核仁。通过具有 DNA 酶 I 处理的 TRIzol 法按照供应商 (Invitrogen) 的使用说明, 由纯化的核仁分离核仁 RNA。使用多腺苷酸化聚合酶 (Invitrogen), 在 3' 末端加入 20-30mer 聚腺嘌呤序列 (poly adenine sequence) 来修饰核仁 RNA。在未扩增的文库的情形中 (图 4B 左图), 通过使用寡 dT 引物进行反转录, 由 10 μg 加多腺苷酸尾的核仁 RNA 合成 cDNA。通过使用 Super Script 质粒合成试剂盒按照供应商 (Invitrogen) 所述进行的切口平移置换技术合成第二链 cDNA。在用 T4 DNA 聚合酶产生平端后, 将双链 cDNA 克隆至 pBluescript 载体中。在扩增的文库的情形中 (图 4B 右图), 使用 GeneRacer 试剂盒不经 CIP 步骤 (Invitrogen) 制备核仁 cDNA。通过使用衔接体特异性引物按照供应商 (Invitrogen) 所述进行的短时 PCR 扩增 (例如, 5 秒的聚合酶反应), 扩增小尺寸的双链 cDNA。按照供应商的使用说明, 将扩增的 cDNA 克隆至 TOPO TA 克隆载体中。

[0176] RNA 印迹分析和 RT-PCR。通过具有 DNA 酶 I 处理的 TRIzol 法按照供应商 (Invitrogen) 的使用说明, 由 HeLa 细胞核仁和 HeLa 细胞或人成纤维原代细胞系 WI38 细胞分离核仁 RNA 和总细胞 RNA。通过在 TBE 缓冲液中的 8M 尿素聚丙烯酰胺变性凝胶分离等量的 RNA。通过电印迹将 RNA 转移至尼龙膜 (Hybond-N ;Amersham) 上。在 UV 交联后, 使用标准方法, 将印迹的膜用 ³²P 标记的特异性探针 (U3 :

[0177] 5' -CACTCAGACCGCGTTCTCTCCCTCTCACTCCCCAATACGG-3' , HBII-180C :

[0178] 5' -AAAGGTCCTGGGGTGCCTGTGTCCTCAGGGGTGATCAGA-3' .HBII-85 :

[0179] 5' -ACGACGGTATGAGTTCTCACTCATTTTGTTCAGCTTTTCC-3') 杂交。还进行 RT-PCR 来验证每种 snoRNA 的表达水平。使用 Superscript 一步 RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen), 使用基因特异性引物 (U3 :5' -AGAGGTAGCGTTTTCTCCTGAGCG-3' 和 5' -ACCACTCAGACCGCGTTCTC-3' , HBII-180C :5' -CTCCCATGATGTCCAGCACT-3' 和 5' -CTCAGACCCCCAGGTGTCAA-3' , HBII-85 :5' -GATCGATGATGAGTCCCCCATAAAAAAC-3' 和 5' -GACCTCAGTTCTGATGAGAACGACGG-3') 进行反转录和 PCR。为了决定线性循环, 我们使用 Superscript III Platinum SYBR Green 一步 qRT-PCR 试剂盒 (Invitrogen) 和 Rotor-Gene RG-3000 系统 (CorbettResearch) 进行实时 PCR。将等量的 RNA 作为模板用于 RT-PCR 反应。每一实验分别重复三次。

[0180] 质粒构建和转染。将来自 C19orf48 基因外显子 2 至 3 的序列插入到 pcDNA3.1 哺

乳动物表达质粒的 CMV 启动子的 3' 区,产生 HBII-180C 表达载体。通过位点定向诱变由野生型构建体建立突变体构建体 (mut1, 图 6B)。建立 FGFR3 内含子 17 表达小基因以抑制内源的 HBII-180C 功能。将 FGFR3 序列的外显子 17-18 插入到 pcDNA3.1 哺乳动物表达质粒 (图 7A) 的 CMV 启动子的 3' 区。通过位点定向诱变由野生型构建体建立突变体构建体 (Frm, 图 4A)。通过位点定向诱变由野生型 HBII-180C 表达构建体建立抗 -GFP/YFP HB II-180C 构建体 (嵌合体 1 和 2, 图 8A)。如图 8A 所示,将突变的插入物亚克隆至哺乳动物表达质粒 mCherry-C1 的 mCherry cDNA 的 3' 区中。使用磷酸钙法将所述质粒转染 WI38 细胞,且对于 HeLa 细胞及其他 HeLa 稳定细胞系使用 "effectine" 转染试剂 (QIAGEN)。磷酸钙法如下文所述进行。

[0181] 死细胞计数。将 WI38 细胞涂布在 10cm 的培养皿上。在附着细胞的同时转染所述质粒。在 3 天后计数死细胞百分数 5 次,每次随机选择 100 个细胞进行计数。然后以 5 次独立计数的平均数计算平均死细胞百分数。每次实验独立地重复 3 次 (图 8D)。

[0182] FGFR3 剪接的 mRNA 变体检测。使用基因特异性引物组 (FGFR3: 5' -TGGACGTGCTGGAGCGCTCCCCGC-3' 和 5' -CCCAGGGTCAGCCGGGCCCCGAGACAG-3', GAPDH: 5' -CGCATCTTCTTTTTCGTCGCCAG-3' 和 5' -GGTCAATGAAGGGGTCATTGATGGC-3') (图 7B 和 C) 通过一步 RT-PCR 检测 FGFR3 mRNA 的剪接变体。将 FGFR3 内含子 17 表达质粒转染至 HeLa 细胞中。48 小时后,通过具有 DNA 酶 I 处理的 TRIzol 方法中供应商的使用说明 (Invitrogen),由 HeLa 细胞、转染的 HeLa 细胞和 WI38 细胞分离总 RNA。将等量 RNA 用作上述每次 RT-PCR (RNA 印迹分析和 RT-PCR) 的模板。

[0183] 细胞成像。使用 Deltavision Spectris 荧光显微镜 (Deltavision Spectrisfluorescence microscope) (Applied Precision) 记录所有的细胞图像。按先前所示 (Andersen 等人,2005, Trinkle-Mulcahy 等人,2006, <http://www.lamondlab.com/f7protocols.htm>) 准备 WI38, HeLa YFP-FIB 细胞和 HeLa GFP 细胞的活细胞图像。细胞使用 60X (NA 1.4) 平面高度消色透镜物镜 (Plan Aplanachromat objective) 成像。每个视野和每次曝光记录间隔 0.5 μ m 的 12 个光切面 (SoftWoRx 图像处理软件, Applied Precision) (图 4A, 图 6C, 图 8C 和 D)。使用下述先前所述的方法准备 WI38, HeLaYFP-FIB 细胞和 HeLa GFP 细胞的固定的细胞图像。

[0184] 将细胞用 3.8% 低聚甲醛固定。在通过 1% tritonX-100 渗透后,用 DAPI 染色细胞。

[0185] 结果部分

[0186] 本发明人已经进行了关于由哺乳动物细胞系分离的核仁的大规模的纯化和蛋白质组研究 (Andersen 等人., 2002, 2005, Lam 等人, 2007)。他们已经详细地表征了人核仁蛋白质组 (Leung 等人, 2003, 还参见: <http://www.lamondlab.com/NOPdb/>)。他们还分析了由 HeLa 细胞分离的核仁的 RNA 组成。由高度富集的分自 HeLa 细胞的核仁制备物纯化 RNAs, 在短时扩增反应后进行大小分级分离, 亚克隆 (见图 4 中的方法) 并且测序。该分析鉴定了 589 个 snoRNA 克隆, 包括 562 个先前已知的 soRNAs 和 7 个新的 snoRNAs。

[0187] 将 3 个检测到的已知的称为 HBII-180A, HBII-180B 和 HBII-180C 的盒 C/D snoRNAs 分别在称为 C19orf48 的转录体的独立的内含子内编码 (图 5C 和 D), C19orf48 先前据报道在多重耐药性癌细胞中扩增 (Zhou 等人, 2002)。三个 HBII-180snoRNAs 中的每一

个靶向 28S rRNA 核苷酸位置 3680 处的同一 2' -O- 核糖甲基化位点 (图 5A 和 B)。编码这些 snoRNAs 的基因位于染色体 19 上的位置 q13.33。C19orf48 基因序列的进化比较表明主要保守性对应于内含子编码的 snoRNAs 而不是各自的外显子序列。这表明 C19orf48 基因的主要功能可能是编码 snoRNAs 而不是蛋白 (图 5)。

[0188] 出乎意料地, HB II-180C snoRNA 的序列分析揭示其具有 21 个核苷酸区, 位于 28S rRNA 甲基化指导序列的 3', 其中 21 个核苷酸中有 19 个与由人成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 基因转录的前 mRNA 的内含子 17 内的区域互补 (图 5A 和 B)。HBII-180C snoRNA 表达水平的比较表明其在 HeLa 细胞中高度表达, 而在原代成纤维细胞 (WI38 细胞) 中仅以低水平存在 (图 6A)。

[0189] 本发明人利用 CMV 启动子驱动转录, 通过用 HBII-180C 小基因瞬时转染质粒载体, 而在 WI38 细胞中外源性过量表达 HBII-180C snoRNA (图 6B)。这导致所转染的 WI38 细胞的细胞程序性死亡。然而, 当本发明人瞬时表达 HB II-180C 的突变体时, 其在与 FGFR3 的内含子 17 互补的区域内具有 3 个核苷酸的序列改变 (即, 减少与 FGFR3 前 mRNA 的互补性), 这不再在 WI38 细胞中引起细胞程序性死亡 (图 6, B-D)。在 HeLa 细胞中, 由质粒载体过量表达与内源性 HB II-180C snoRNA 互补的靶 FGFR3 内含子 17 序列, 导致所表达的 FGFR3 mRNA 同种型的比率的明显变化 (图 7A 和 B)。这在 HeLa 细胞中引起 FGFR3 mRNA 的短同种型的增加, 导致与通常在 WI38 细胞中表达的相似的 FGFR3mRNA 同种型模式 (图 7C)。

[0190] 这些数据表明 HBII-180C snoRNA 的表达水平可以影响 FGFR3mRNA 的表达水平。此外, 该数据表明这一作用取决于在 HBII-180CsnoRNA 中存在与 FGFR3 前 mRNA 内含子 17 中的区域互补的序列。

[0191] 本发明人接着通过修饰 HBII-180C 的结构以用与一个或多个靶 RNAs 互补的序列置换 FGFR3 互补序列区来检测 snoRNA HB II-180C 调节 FGFR3RNA 表达的能力是否可以适于调节特定靶 RNAs 的表达。因此, 构建如图 5A 和 B 所示的载体, 称为嵌合体 1 和 2, 其具有包含 HBII-180C 内含子的小基因, 其包括由 CMV 启动子表达的 HBII-180C snoRNA 主链。所述载体还编码由 CMV 启动子表达的 mCherry 荧光蛋白, 以允许包含所述载体的转染细胞的即时检测。HBII-180C 中的 FGFR3 互补区用与 GFP RNA 互补的序列置换 (见图 8, A 和 B)。插入的序列为 5' -GACTTGAAGAAGTCGTGCTGC-3' (嵌合体 1) 和 5' -ACCTTGATGCCGTTCTTCTGC-3' (嵌合体 2), 其置换 Wt HBII-180C 中的序列 5' -CACCCCTGAGGACACAGTGCA3'。

[0192] 嵌合体表达载体和仅表达 mCherry 的等价载体 (mCherry-C1), 分别瞬时转染至 a/ 仅稳定表达不融合的 GFP 的 HeLa 细胞系, 或 b/ 稳定表达与纤维蛋白融合的 YFP 的 HeLa 细胞系中 (图 8, C 和 D)。细胞在转染后 48 小时固定, 并且通过荧光显微镜分析 GFP/YFP 的水平和 mCherry 表达。这表明, 在转染了被改造从而在 HBII-180C snoRNA 主链内包含与 GFP 互补的序列的载体的那些细胞中, 在各自的 HeLa 稳定细胞系中的 GFP 荧光的水平特异性减少。这一减少仅在表达 mCherry 的细胞中观察到, 验证了其特异性发生在转染的细胞中。相反, 转染了缺少 snoRNA 的 mCherry 载体的细胞不表现出 GFP 荧光的显著减少, 或在表达 mCherry 的细胞和不表达 mCherry 的那些细胞之间的 GFP 水平的变化 (图 8C&D)。所述数据表明, 单独的 GFP 的表达, 或由紧密相关的 YFP 和细胞蛋白 (纤维蛋白) 形成的融合蛋白的表达, 均可以通过特异性靶向的、改造的 snoRNA 表达载体的表达而进行调节。

[0193] 这些数据表明本发明人已经产生的 snoRNA 表达载体的序列和结构可以进行改造

以靶向选择的特定 RNA 靶标且由此调节其表达。

[0194] 其他材料和方法

[0195] RNA 和高灵敏性 RNA 印迹分析。按前述,使用蔗糖梯度分级分离 HeLa 细胞提取物。使用具有 DNA 酶 I 处理的 TRIzol 法,按照供应商的使用说明 (Invitrogen),分离总 HeLa 细胞 RNA 和来自分离的细胞质、核浆和核仁级分的 RNA。将来自每种样品的等量 RNA 通过在 1xTBE 缓冲液中的 8M 尿素聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离,且通过电印迹将 RNA 转移至尼龙膜 (Hybond-N; Amersham) 上。在 UV 交联后,所述膜用对下述 RNA 种类 (HBII-180A, HBII-180B, HBII-180C 和 tRNA) 特异的 ^{32}P 5' 末端标记的寡核糖核苷酸探针杂交。按先前所述制备高灵敏性 RNA 印迹 (G. S. Pall 等人, 2007)。

[0196] 二级结构

[0197] 所有 RNA 的二级结构通过 RNA 结构 4.5 (RNAstructure 4.5) (D. H. Mathews 等人, 2004) 预测,且用 RnaViz 2.0 (P. De Rijk 等人, 2003) 进行注解。

[0198] 质粒构建和转染

[0199] 将来自 C19 orf48 基因外显子 2-3 的序列插入到 pcDNA3.1 哺乳动物表达质粒 (Invitrogen) 的 CMV 启动子的 3', 产生 HBII-180C 表达载体。通过位点定向诱变,由野生型 HBII-180C 表达小基因构建体建立 HBII-180A, B 和 HBII-180C 的突变体构建体。使用 "effectine" 转染试剂 (QIAGEN) 将所述质粒转染至 HeLa 细胞中。

[0200] 细胞成像

[0201] 所有细胞图像使用 Deltavision Spectris 荧光显微镜 (Applied Precision) 记录。按先前所示 (L. Trinkle-Mulcahy 等人, 2006 和 K. L. Leung 等人., 2004). (<http://www.lamondlab.com/f7protocols.htm>) 准备 HeLa^{YFP-纤维蛋白} 细胞和 HeLa^{GFP} 细胞的活细胞图像。细胞使用 60X (NA 1.4) 平面高度消色透镜物镜成像。对于每个视野和每次曝光记录间隔 0.5 μm 的 12 个光切面 (SoftWoRx 图像处理软件, Applied Precision)。

[0202] 结果部分

[0203] 修饰的 snoRNA 对被靶向的蛋白和 / 或 mRNA 表达水平的作用

[0204] RNA 印迹分析表明瞬时转染靶向 G/YFP mRNA 序列的嵌合体 snoRNA 抑制 G/YFP mRNA 水平 (图 9C 和 D)。这一结果表明嵌合体 snoRNA 可以影响靶 mRNA 表达水平,如前所述 (图 1 和 2)。多个修饰的 snoRNAs 可以在一个转录体中表达以增加其效率。

[0205] 如在图 11A 中建立三联嵌合体 snoRNA 构建体。该质粒 (三联嵌合体) 编码三个位于在本文用作转染标记的 mCherry 荧光蛋白 cDNA 的 3' 的修饰的 snoRNAs,其靶向 G/YFP mRNA 序列中的不同位置 (图 11A)。使用该三联嵌合体质粒的瞬时转染实验表明与用单嵌合体质粒相似的对 G/YFP 和 G/YFP- 融合蛋白的抑制作用,这通过荧光显微镜判断 (图 11B, C, E)。蛋白质印迹分析表明三联嵌合体构建体的抑制效率强于单嵌合体 snoRNAs (图 11D)。FISH 分析和对每种嵌合体 snoRNA 使用特异性探针的分级的 RNA 印迹分析表明所述三联嵌合体质粒产生与用野生型 HBII-180C 观察到的每个修饰的嵌合体 1-3 snoRNAs (图 12A 和 B)。这些结果表明所修饰的 snoRNA 可以通过在一个转录体中表达多个 snoRNAs (多重 (multiplexing)) 增加靶向的击倒的效率。此外,所述三联嵌合体质粒表达 mCherry 红色荧光蛋白而不是 G/YFP 和 G/YFP 融合蛋白 (图 11B, C, E)。这些结果还表明我们可以通过使用修饰的 snoRNA 用 mCherry 置换 G/YFP 和 G/YFP 融合蛋白,由此证明“蛋白置换”或

“蛋白敲入”作用。对于修饰的 snoRNA 及其击倒能力的详细结构分析。

[0206] 修饰的 snoRNA 的击倒能力可能由加工的 snoRNA 产生,或者备选地可能不依赖于 snoRNA 加工而直接由 C19orf48 前 mRNA 形成(图 5C)。后一种可能性由最近的不依赖于 Drosha 加工的内含子-编码的微 RNAs 的报道所提议。为了区分这些可能性,将一系列三碱基突变引入到 HBII-180C 小基因的 8 个独立区域中,且在野生型和突变形式的 HB II-180C 之间比较全长 snoRNA 的表达(图 13A)。WT HBII-180C 小基因载体的表达升高全长 HB II-180C snoRNA 的水平高于内源水平,但是空载体没有升高全长 HB II-180C snoRNA 的水平(图 13A,比较泳道 1 与泳道 2&3)。包括在保守的 C 或 D 盒的任一个内的序列改变的多个突变,减少或者消除外源性全长 HBII-180C snoRNA 的表达,仅有内源性 snoRNA 水平存在(图 13A,泳道 4-11)。在 HB II-180C 表达水平减少的每种情形中,存在修饰的 snoRNA 嵌合体-2 的击倒能力水平的相应减少(图 13A,比较泳道 3 与泳道 4 和 10,和图 13B m1 和 m7,图 13F)。这表明修饰的 snoRNA 的击倒能力取决于在前的 snoRNA 加工,且证明对于直接来自 C19orf48 前 mRNA 转录体的击倒能力不可能存在不依赖 snoRNA 的途径。HBII-180C 中的 m2 突变,其破坏在 snoRNA 指导序列中针对 28S rRNA 的互补性,不阻止 snoRNA 形成和修饰的 snoRNA 的击倒效率(图 13A,泳道 5,图 13C 和 F m2-1,m2-2)。因此,修饰 snoRNA 击倒靶基因表达的能力不依赖于 snoRNA 结合 rRNA 和使 rRNA 甲基化的能力。HBII-180C 中的 m3 突变,其破坏盒 D',略微减少防止 snoRNA 形成和击倒效率(图 13A, C, F)。这表明我们可能通过突变在 M 盒外部的区域而改变修饰的 snoRNA 的击倒能力。

[0207] 建立在修饰的 snoRNA 嵌合体-2 中的 M 盒序列的插入和缺失突变体,以检测击倒能力和 M 盒序列长度之间的相关性(图 13D & F)。所有三种提高与 G/YFP mRNA 的序列互补性的插入突变体表现出与野生型嵌合体-2 质粒相似的击倒活性(图 13D&F In1-3)。显著地,具有针对 G/YFPmRNA 的另外的 8 碱基互补序列的插入突变体 CM2In-3 表现出提高的击倒效率(图 13F)。M 盒中 2 和 3 个碱基的缺失突变体(CM2Del1-1 &-2)也表现出击倒能力,但是其不如野生型嵌合体-2 有效(图 13F)。与野生型嵌合体-2 相比较,7 碱基缺失突变体 CM2Del1-3 不表现出显著的击倒活性(图 13F)。还建立 M 盒中的 6 点突变体,来检测击倒能力和 M 盒中碱基对错配之间的相关性(图 13E&F)。M 盒中的 1-3 碱基错配突变体(CM2X-1 至 -3)也表现出击倒能力,但是其不如野生型嵌合体-2 有效(图 13F)。与野生型嵌合体-2 相比较,M 盒中的 4-6 碱基错配突变体(CM2X-4 至 -6)不表现出有效的击倒活性(图 13F)。这些结果表明修饰的 snoRNA 调节基因击倒的能力与 M 盒互补性和靶 mRNA 序列之间的杂交亲和性相关。

[0208] 结合预计不影响修饰的 snoRNA 击倒能力的 m2(28S rRNA 互补区),m4 和 m5 的每个突变体的组合 snoRNA(图 13A&C,图 14A)表现出与野生型三联嵌合体质粒相似的击倒能力,这通过荧光显微镜判断(图 14B)。使用嵌合体-1,-2,-3 特异性探针的 FISH 分析表现出该组合突变体质粒(三联嵌合体 snoMENv1)如也用野生型三联嵌合体质粒观察到的那样表达每一个所编码的嵌合体修饰的 snoRNAs(图 12A&14A)。这些突变体分析表明所修饰的 snoRNAs 的击倒能力可以通过位于与 snoRNA 结合靶 RNA 相关的序列外部的突变和位于 snoRNA 与靶序列之间结合所需要的互补序列(即, M 盒)内部的突变进行调节。

[0209] 修饰的 snoRNA 载体可以通过蛋白置换而挽救致死性基因表达击倒作用。

[0210] 由三联嵌合体 snoMENv1 建立两种靶向内源性 SMN1(运动神经元存活)前 mRNA 的

修饰的 snoRNA 质粒 (图 15A)。质粒 SMN1 snoMENv1 编码 GFP cDNA 和 3 个分别靶向内源性 SMN1 前 mRNA 内不同位置的修饰的 snoRNAs (图 15A)。另一种质粒 GFP-SMN1 snoMENv1-PR 编码 GFP-SMN1 融合蛋白 cDNA 和 3 个相同的具有分别靶向内源性 SMN1 前 mRNA 内部不同位置的 SMN1 snoMENv1 的修饰的 snoRNAs (图 15A)。瞬时转染分析表明单独的 GFP 和 mCherry 三联嵌合体质粒对 HeLa 细胞没有有害作用。然而, SMN1 snoMENv1 质粒在转染至细胞内时表现出细胞毒性作用 (图 15B, 箭头)。蛋白质印迹分析表明内源性 SMN1 水平通过转染 SMN1 snoMENv1 被抑制 (图 15C)。预测这一结果是因为已知 SMN1 敲除小鼠的表型是胚胎致死性的 (Hsieh 等人, *Nature Genetics* (自然遗传学) 2000)。另一方面, 瞬时转染 GFP-SMN1 snoMENv1-PR 质粒表现出如在 HeLa^{GFP-SMN1} 稳定细胞系中观察到的正确的定位模式 (图 10), 且重要地, 不表现出如使用 SMN1 snoMENv1 所观察到的细胞毒性作用 (图 15B)。这些结果表明, 内源性 SMN1 被靶向 SMN1 前 mRNA 的修饰的 snoRNAs 抑制, 且其细胞毒性作用通过表达 GFP-SMN1 融合蛋白得到挽救。当由病毒载体系统表达时的修饰的 snoRNA 功能。

[0211] 将三联嵌合体修饰的 snoRNA (lenti-三联嵌合体) 和野生型三联 HBII-180C snoRNA (lenti-三联 HBII-180C) 分别亚克隆至 lenti-X 病毒载体 (Clontech) 中。lenti-三联嵌合体表现出与使用相对应的质粒载体三联嵌合体观察到的相同的击倒作用 (比较图 11B 和图 16)。这一结果表明, 修饰的 snoRNA 击倒靶向的基因的能力不依赖于单一转染系统, 且可以使用质粒和病毒载体系统递送。

[0212] 参考文献:

[0213] 1. T. Kiss, *Cell* (细胞) 109, 145 (2002)。

[0214] 2. T. Kiss 等人, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 71, 407-17 (2006)。

[0215] 3. F-M. Boisvert 等人, *Nat Rev Mol Cell Biol.* (自然分子细胞生物学综述) 8, 574-585 (2007)。

[0216] 4. A. K. L., Leung 等人, *Biochem. J.* (生物化学杂志) 376, 553-569 (2003)。

[0217] 5. S. Kishore 和 S. Stamm, *Science* (科学), 311, 230 (2006)。

[0218] 6. JS. Andersen 等人, *Curr Biol* (现代生物学), 12, 1-11 (2002)。

[0219] 7. JS. Andersen 等人, *Nature* (自然), 433, 77-83 (2005)。

[0220] 8. YW. Lam 等人, *Curr. Biol.* (现代生物学) 17, 749-60 (2007)。

[0221] 9. XD. Zhou 等人 *Ai zheng* (癌症) 4, 341-5 (2002)。

[0222] 10. L. Trinkle-Mulcahy 等人, *J. Cell Biol.* (细胞生物学杂志) 172, 679-92 (2006)。

[0223] 11. A. K. L., Leung 等人, *J. Cell Biol.* (细胞生物学杂志) 166, 787-800 (2004)。

[0224] 12. G. S. Pall 等人, *Nucleic Acids Res.* (核酸研究) 35(8), e60 (2007)。

[0225] 13. D. H. Mathews 等人, *Proc. Natl Acad. Sci U S A* (美国国家科学院学报) 101(19), 7287-92 (2004)。

[0226] 14. P. De Rijk 等人, *Bioinformatics* (生物信息学) 19(2), 299-300 (2003)。

[0227] 15. L. Trinkle-Mulcahy 等人, *J. Cell Biol.* (细胞生物学杂志) 172, 679-92 (2006)。

[0228] 16. K. L. Leung 等人, *J. Cell Biol.* (细胞生物学杂志) 166, 787-800 (2004)。

[0229] 17. L. Lestrade 等人, *Nucleic Acids Res.* (核酸研究) 34, D158-162 (2006)。

- [0230] 18Maden, B. E. H. Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol. (核酸研究分子生物学进展)39, 241-303(1990)。
- [0231] 19Lestrade, L. 和 Weber, W. J. Nucleic Acids Res. (核酸研究),34, D158-162(2006)。
- [0232] 20M. Zuker, Nucleic Acids Res. (核酸研究)31(13),3406-15, (2003)
- [0233] 20D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker 和 D. H., J. Mol Biol. (分子生物学杂志)288, 911-940(1999)
- [0234] 21Kent, W. J. 等人, Genome Res. (基因组研究)12(6),996-1006(2002)。
- [0235] 22Glover, D., 等人, Nature Reviews, Genetics(自然综述, 遗传学),6, 299-311(2005)。

序列表

<110> 敦提大学校董事会
安格斯·莱蒙德 I
小野基晴 I

<120> 基因表达的靶向调节

<130> PC/P15434PC

<160> 46

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400> 1

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210> 2

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400> 2

cuggggcucc caugaaaacc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210> 3

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>3

cuggggcucc caugaugucc agcaaaaggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>4

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>4

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc uaaaaucacc ccugaggaca cagugcaccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>5

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>5

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaaaa

60

c a g g a c c u u u g a c a c c u g g g g g u c u g a g g g g c c c c a g

97

<210>6

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>6

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc
60
c a g g a a a u u g a c a c c u g g g g g u c u g a g g g g c c c c a g
97

<210>7

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>7

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc
60
c a g g a c c u u u g a c a c c u a a a g g u c u g a g g g g c c c c a g
97

<210>8

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>8

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc
60
c a g g a c c u u u g a c a c c u g g g g g u a a a a g g g g c c c c a g
97

<210>9	
<211>97	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 质粒序列	
<400>9	
cugggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucacc ccugaggaca cagugcaccc	
60	
caggaccuuu gacaccuggg ggucugagaa accccag	97
<210>10	
<211>97	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 质粒序列	
<400>10	
cugggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu ugaugccguu cuucugcccc	60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag	97
<210>11	
<211>97	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 质粒序列	
<400>11	
cugggggcucc caugaaaacc agcacugggc ucugauaccu ugaugccguu cuucugcccc	60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag	97
<210>12	
<211>97	

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>12

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu ugaugccguu cuucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg gguaaaaggg gccccag 97

<210>13

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>13

cuggggcucc caugaugucc agcaaaaggg ucugauaccu ugaugccguu cuucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>14

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>14

cuggggcucc caugaugucc uuuuuuuuu ucugauaccu ugaugccguu cuucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>15

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>15

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc uaaaauaccu ugaugccguu cuucugcccc 60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>16

<211>99

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>16

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauucac cuugaugccg uucuucugcc 60
cccaggaccu uugacaccug ggggucugag gggccccag 99

<210>17

<211>101

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>17

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauucac cuugaugccg uucuucuguu 60
ccccaggac cuugacacc ugggggucug aggggccccca g 101

<210>18

<211>105

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>18

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauguuc accuugaugc cguucuucug 60
uugtccccca ggaccuuuga caccuggggg ucugaggggc cccag 105

<210>19

<211>95

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>19

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucuug augccguucu ucugccccca 60
ggaccuuuga caccuggggg ucugaggggc cccag 95

<210>20

<211>94

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>20

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugaucuug augccguucu ucucggggcag 60
gaccuuugac accugggggu cugaggggccc ccag 94

<210>21

<211>90

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>21

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauugau gccguucuuc ccccaggacc 60
uuugacaccu gggggucuga gggggcccag 90

<210>22

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>22

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu ugauaccguu cuucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>23

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>23

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu ugauacaguu cuucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>24

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>24

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu ugauacaguu auucugcccc 60

caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag 97

<210>25

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>25

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu uaauacaguu auucugcccc	60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag	97

<210>26

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>26

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauaccu uaauacaguu auuauugcccc	60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag	97

<210>27

<211>97

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>27

cuggggcucc caugaugucc agcacugggc ucugauacau uaauacaguu auuauugcccc	60
caggaccuuu gacaccuggg ggucugaggg gccccag	97

<210>28

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>28

caccccagag gacacagtgc a

21

<210>29

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>29

gacttgaaga agtcgtgctg c

21

<210>30

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>30

accttgatgc cgttcttctg c

21

<210>31

<211>40

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针

<400>31

cactcagacc gegtctctctc cctctcactc cccaatacgg 40

<210>32

<211>40

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针

<400>32

aaaggtcctg ggggtgactg tgtcctcagg ggtgattcaga 40

<210>33

<211>40

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针

<400>33

acgacggtat gaggttctcac tcattttggtt cagcttttcc 40

<210>34

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>34

agaggttagcg ttttctcctg agcg 24

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>35

accactcaga ccgcgtttctc 20

<210>36

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>36

ctcccatgat gtccagcact

20

<210>37

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>37

ctcagacccc caggtgtcaa

20

<210>38

<211>27

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>38

gatcgatgat gagtccccca taaaaac

27

<210>39

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>39

gacctcagtt ctgatgagaa cgacgg 26

<210>40

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>40

tggacgtgct ggagcgctcc ccgc 24

<210>41

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>41

cccagggtca gccgggcccg agacag 26

<210>42

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>42

cgcattttct tttgcgtcgc cag 23

<210>43

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>43

gggtcaatgaa ggggtcattg atggc

25

<210>44

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>44

gacttgaaga agtcgtgctg c

21

<210>45

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>45

accttgatgc cgttcttctg c

21

<210>46

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 质粒序列

<400>46

cacccctgag gacacagtgc a

21

多 snoRNA 表达载体

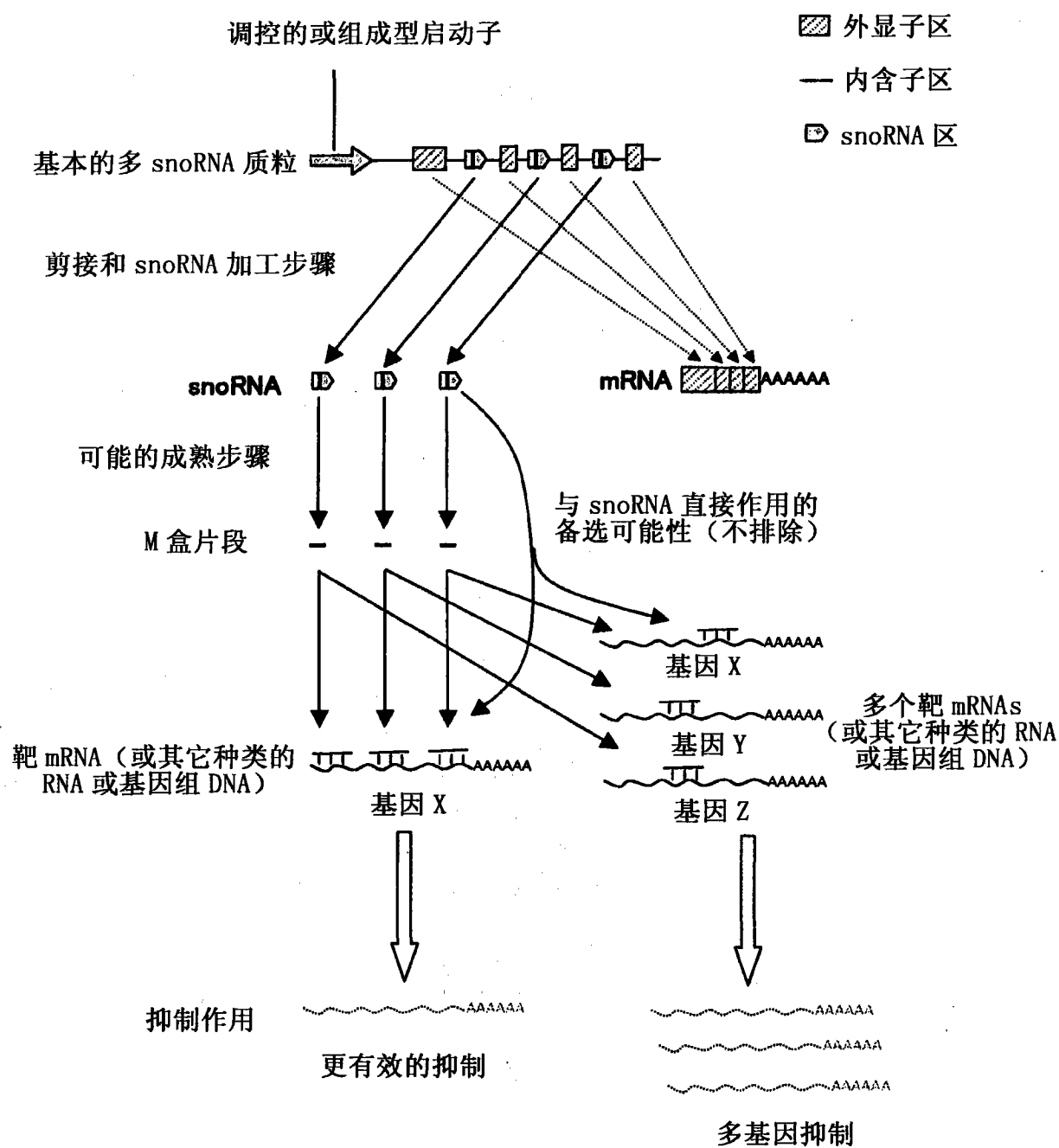


图 1

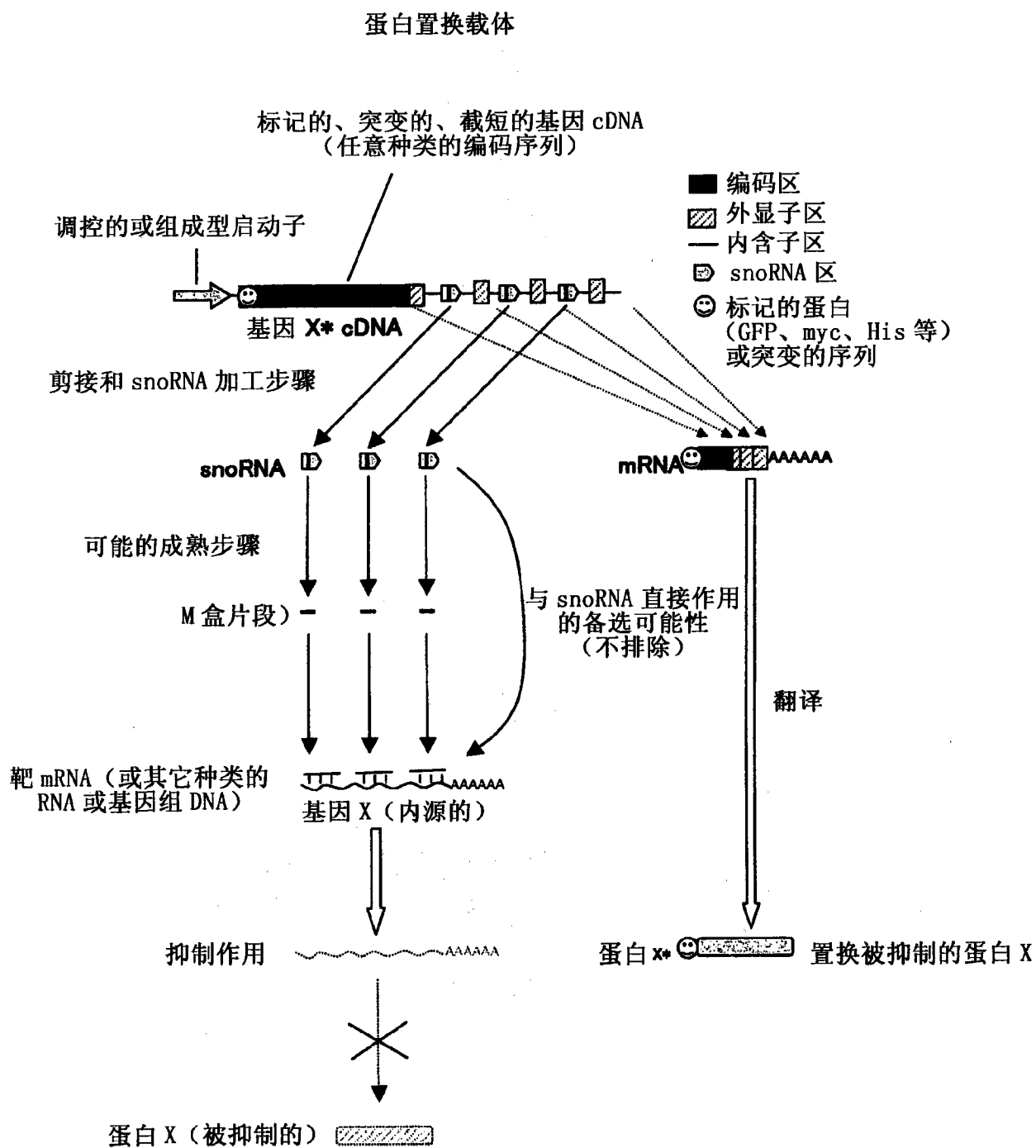


图 2

RNA 置换载体（另一个实施例）

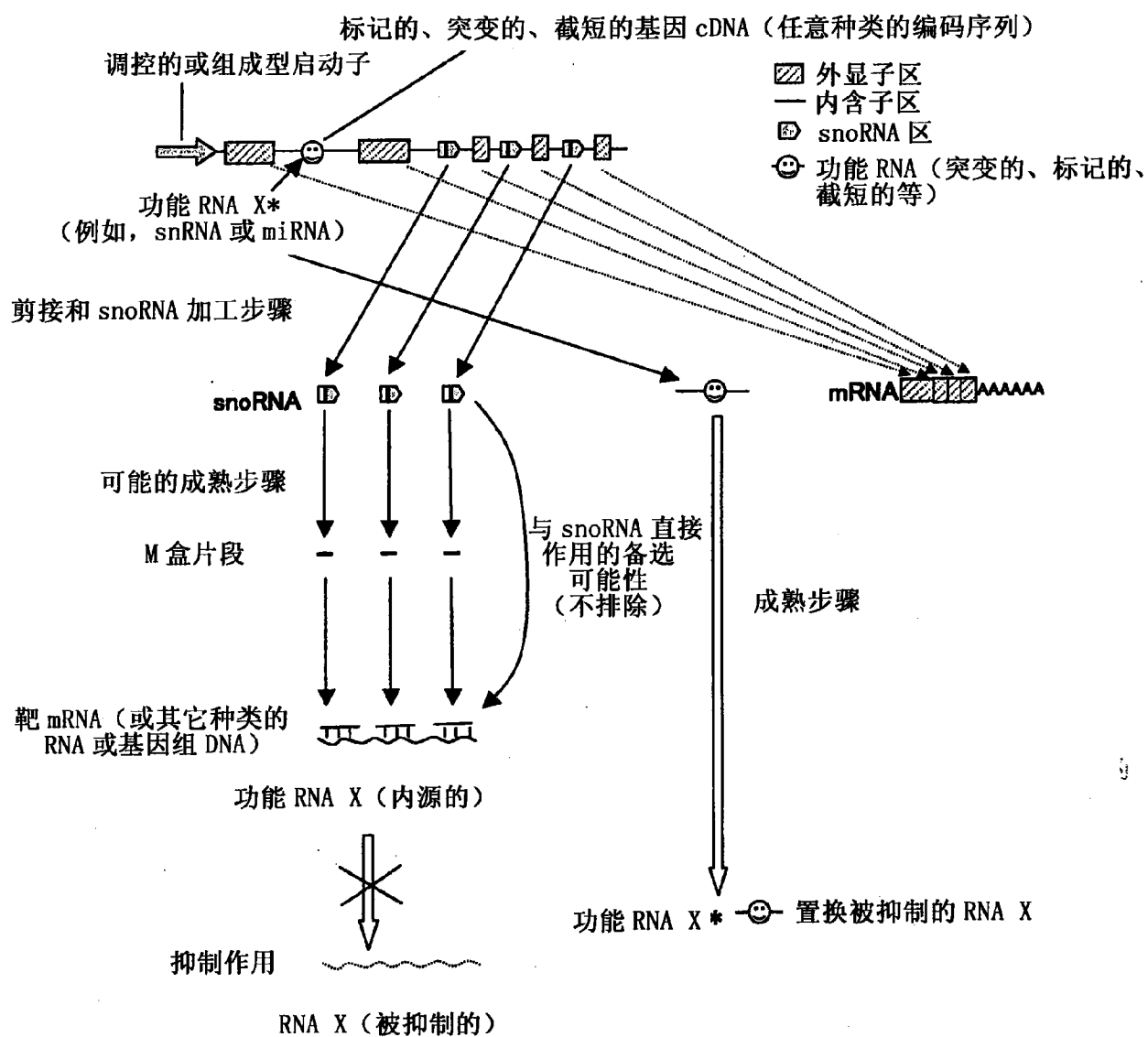


图 3

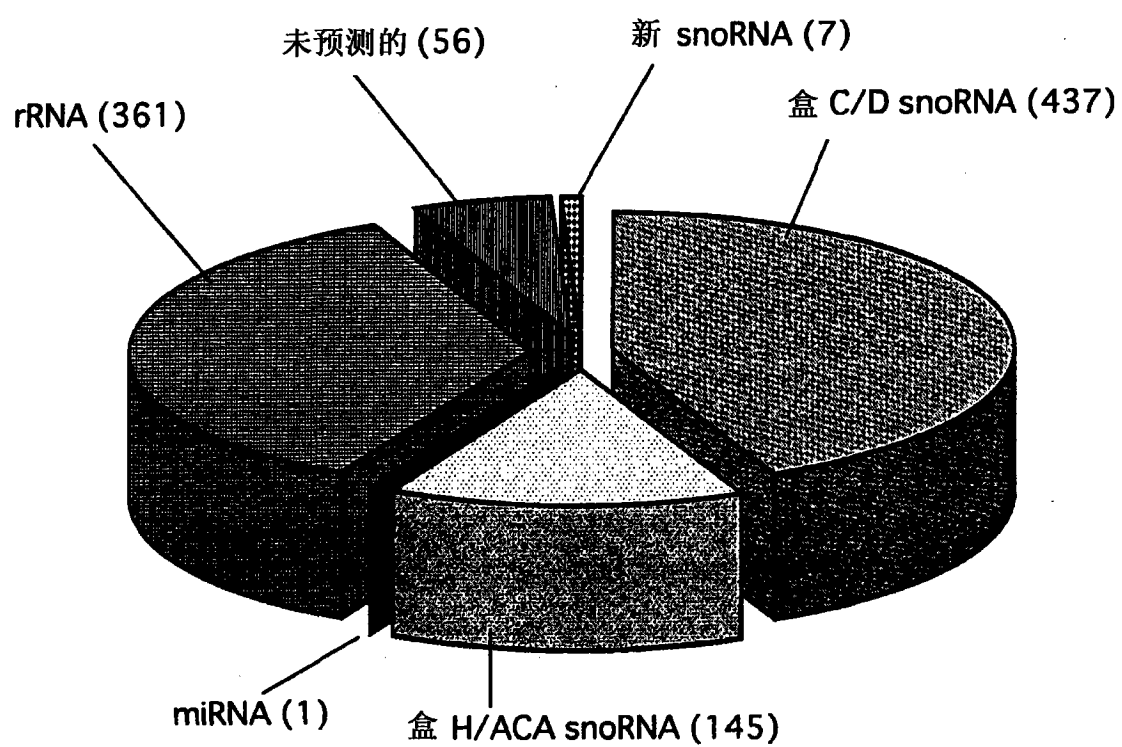
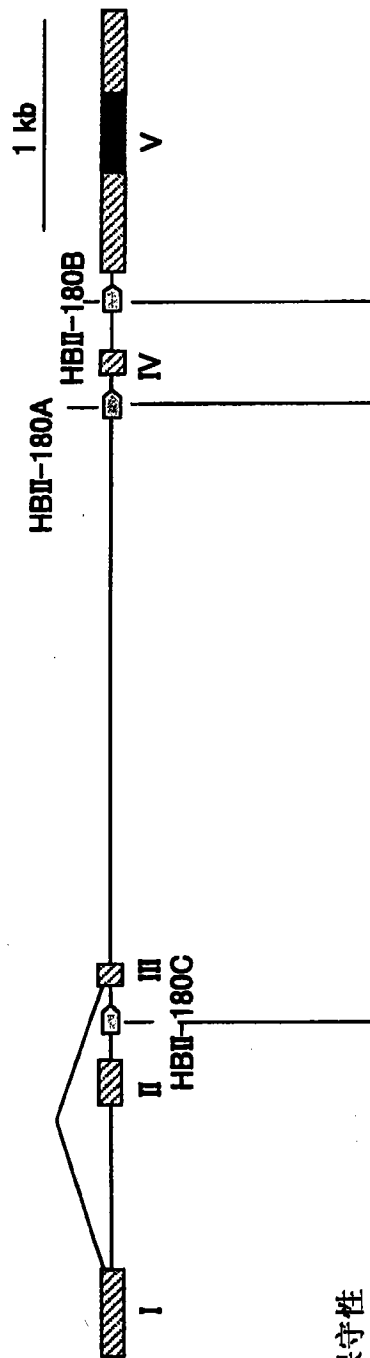
C

图 4

▨ 非翻译区
■ 编码区
— 内含子区

C



D

保守性

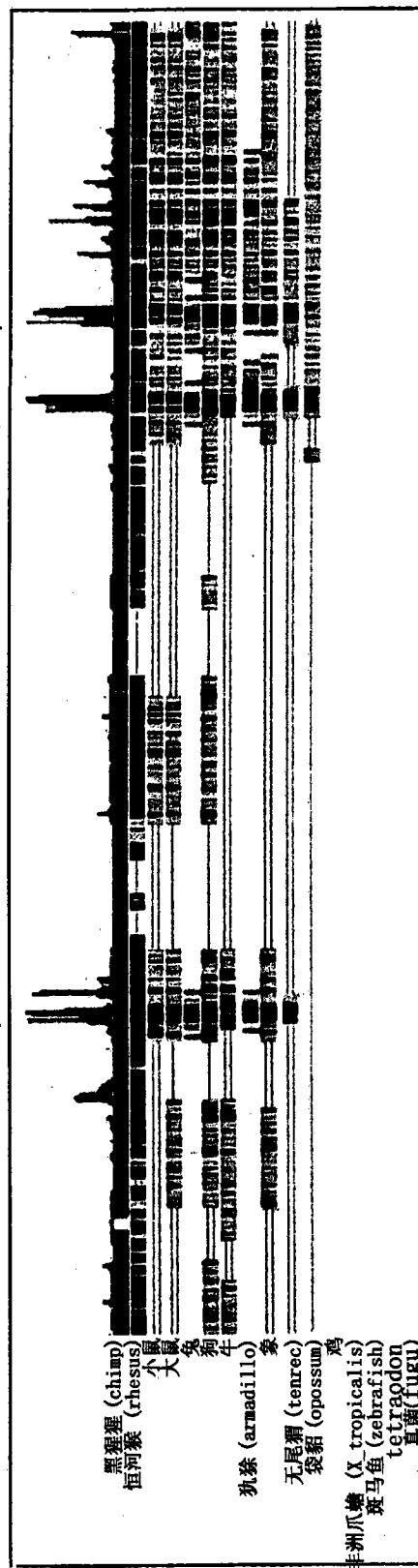


图 5

A

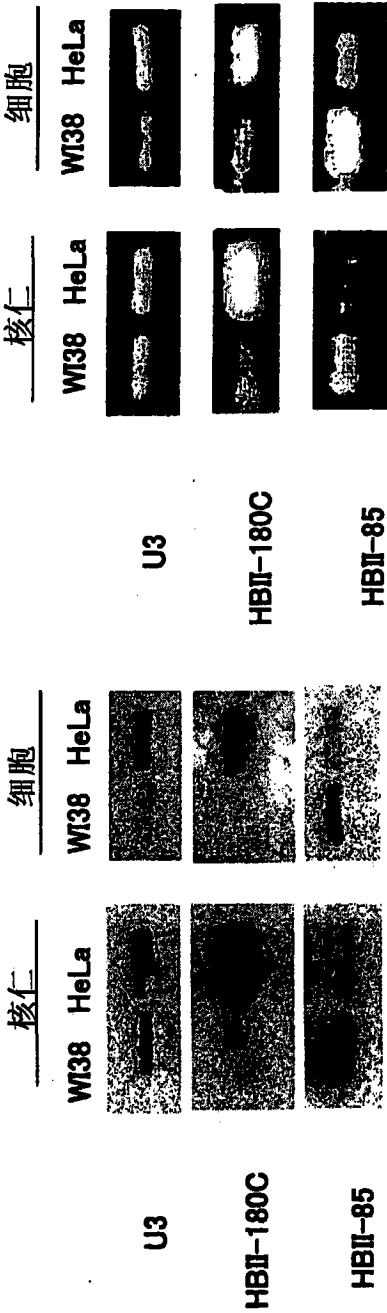


图 6

B

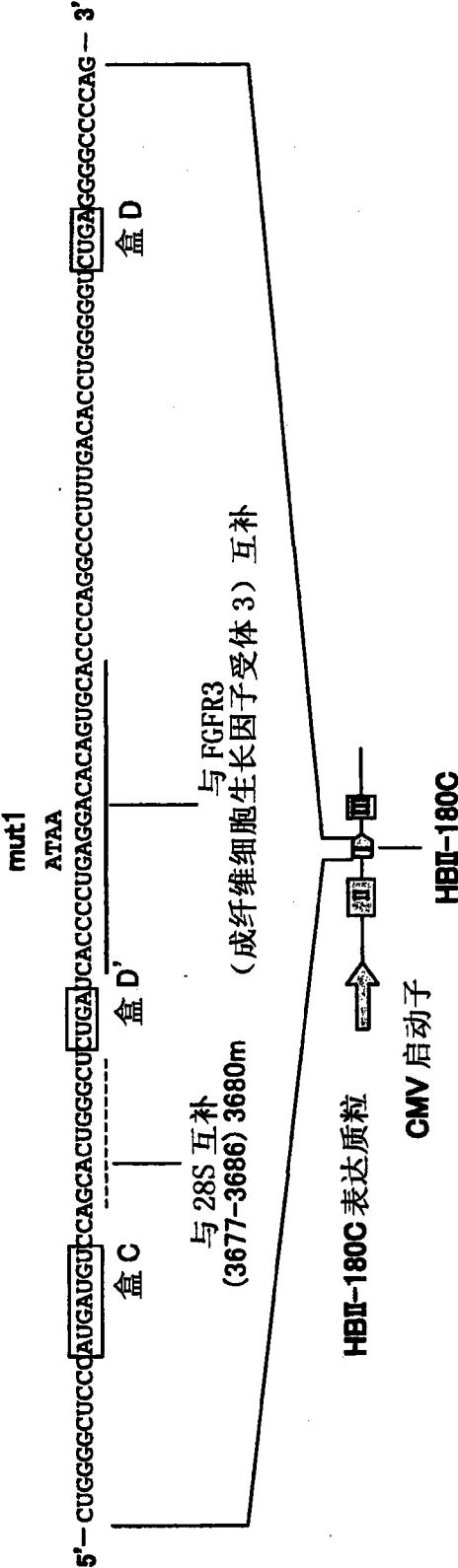


图 6

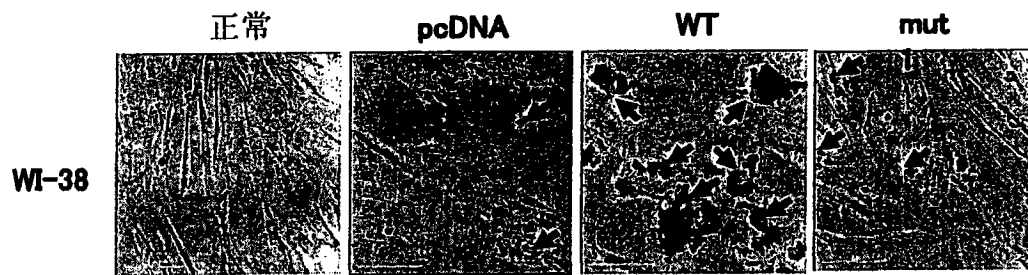
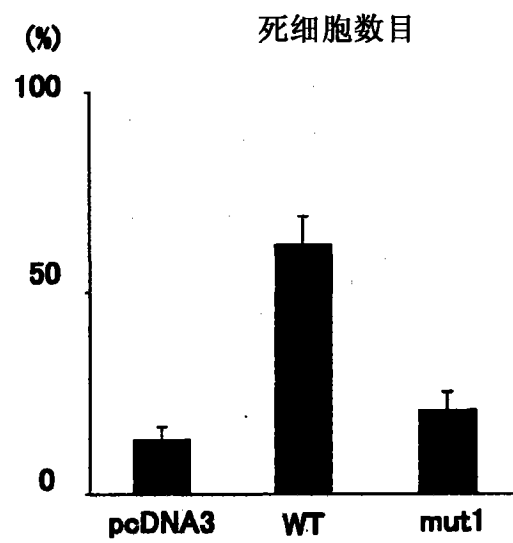
C**D**

图 6

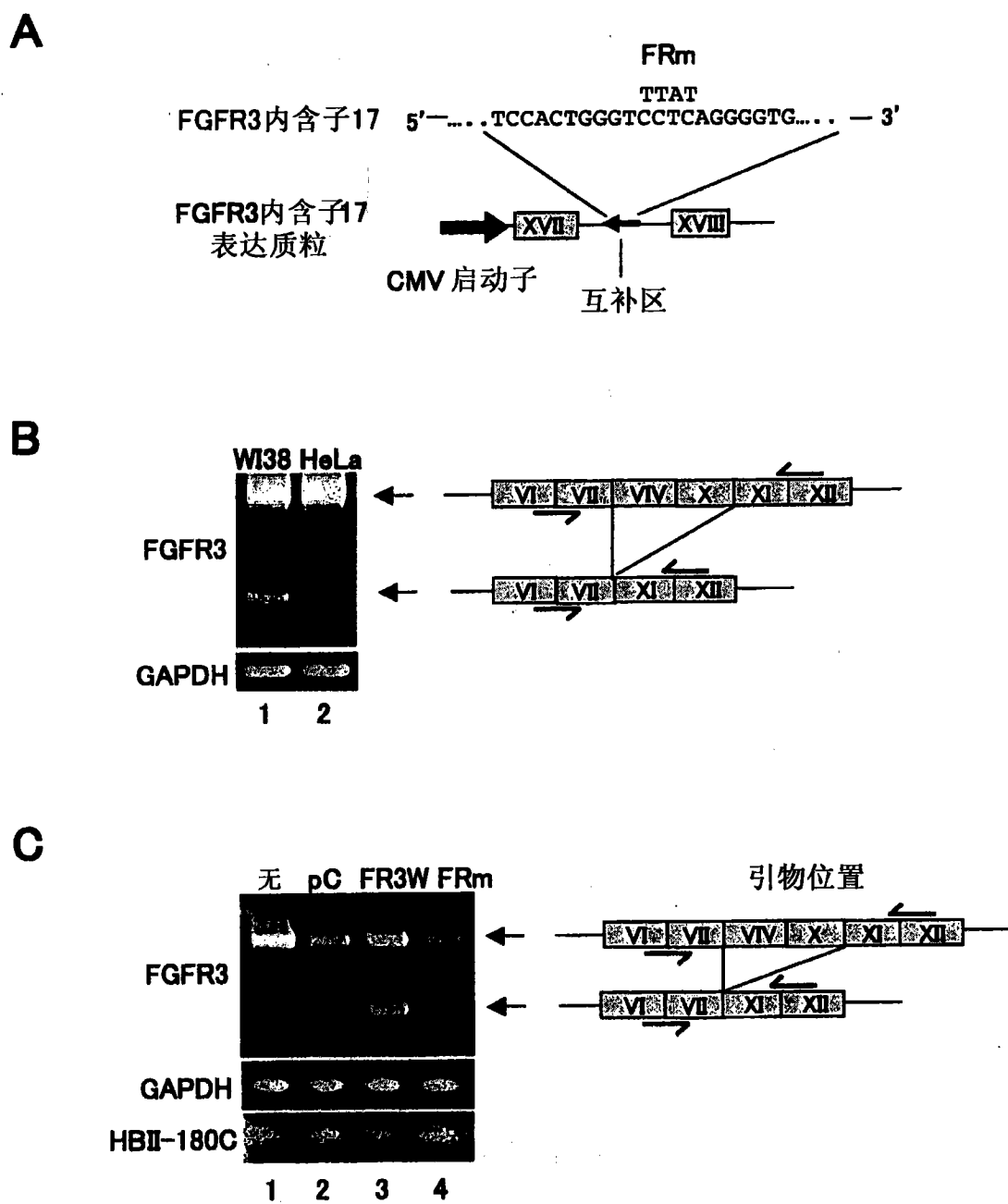


图 7

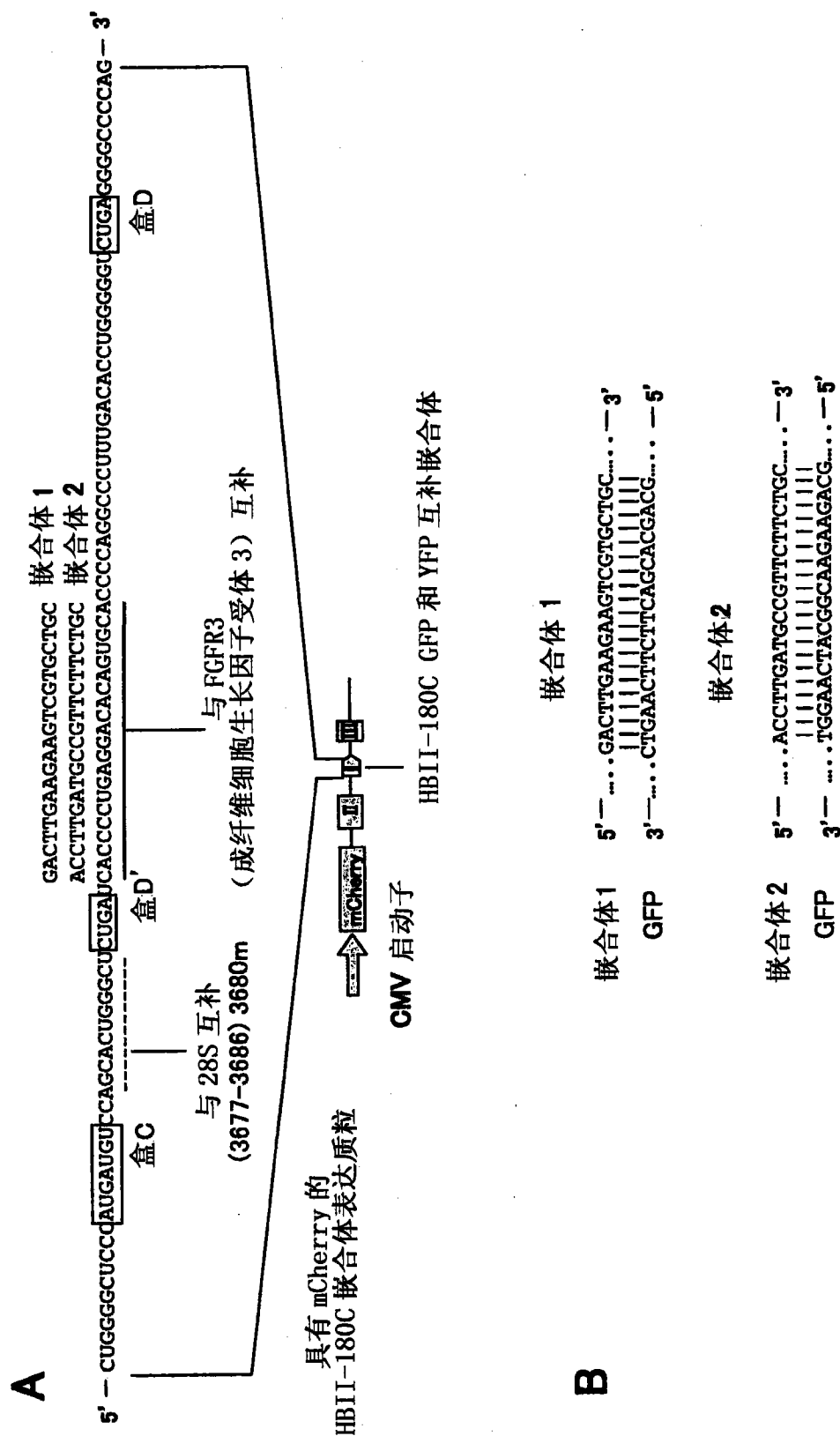


图 8

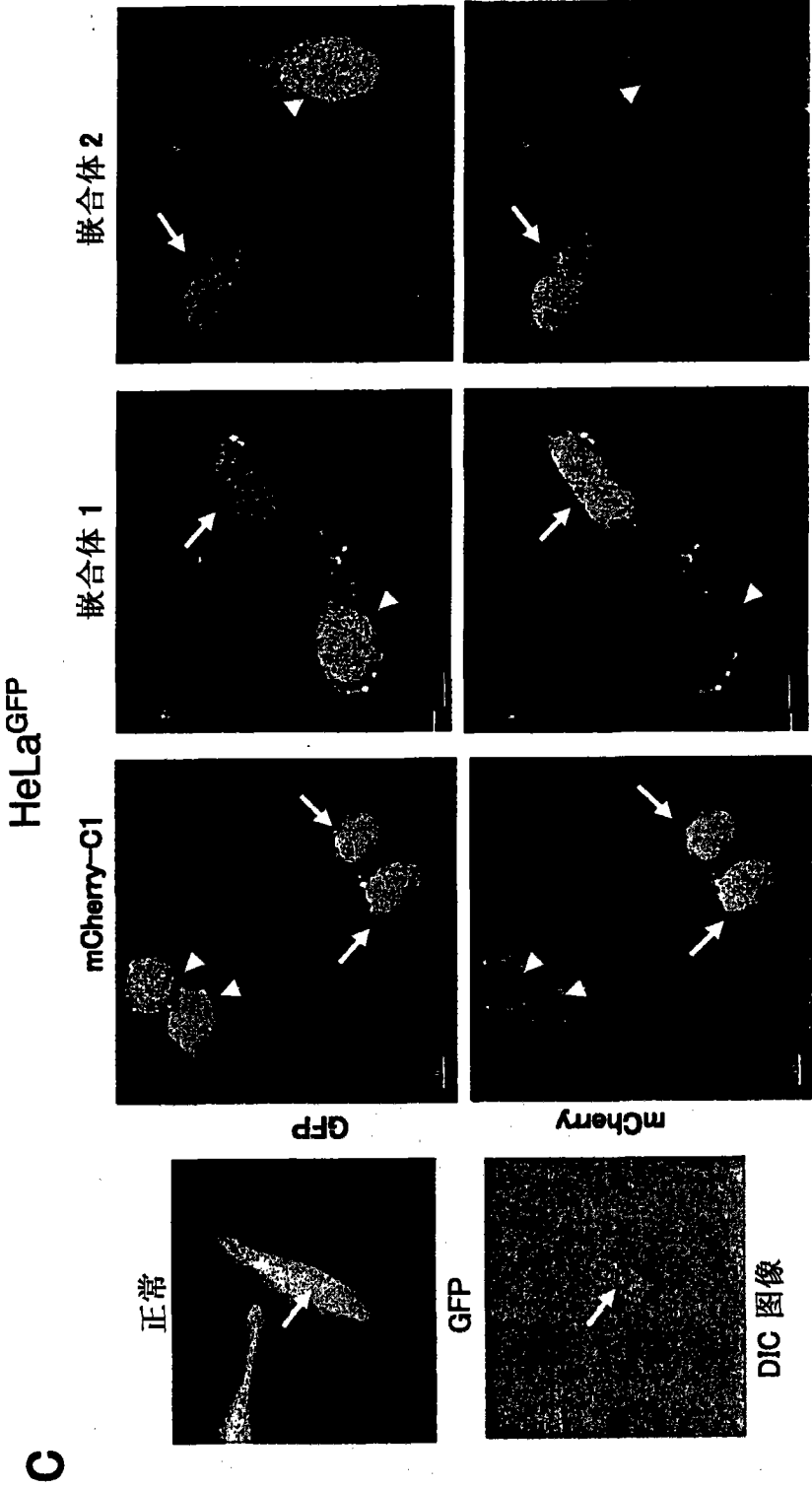


图 8

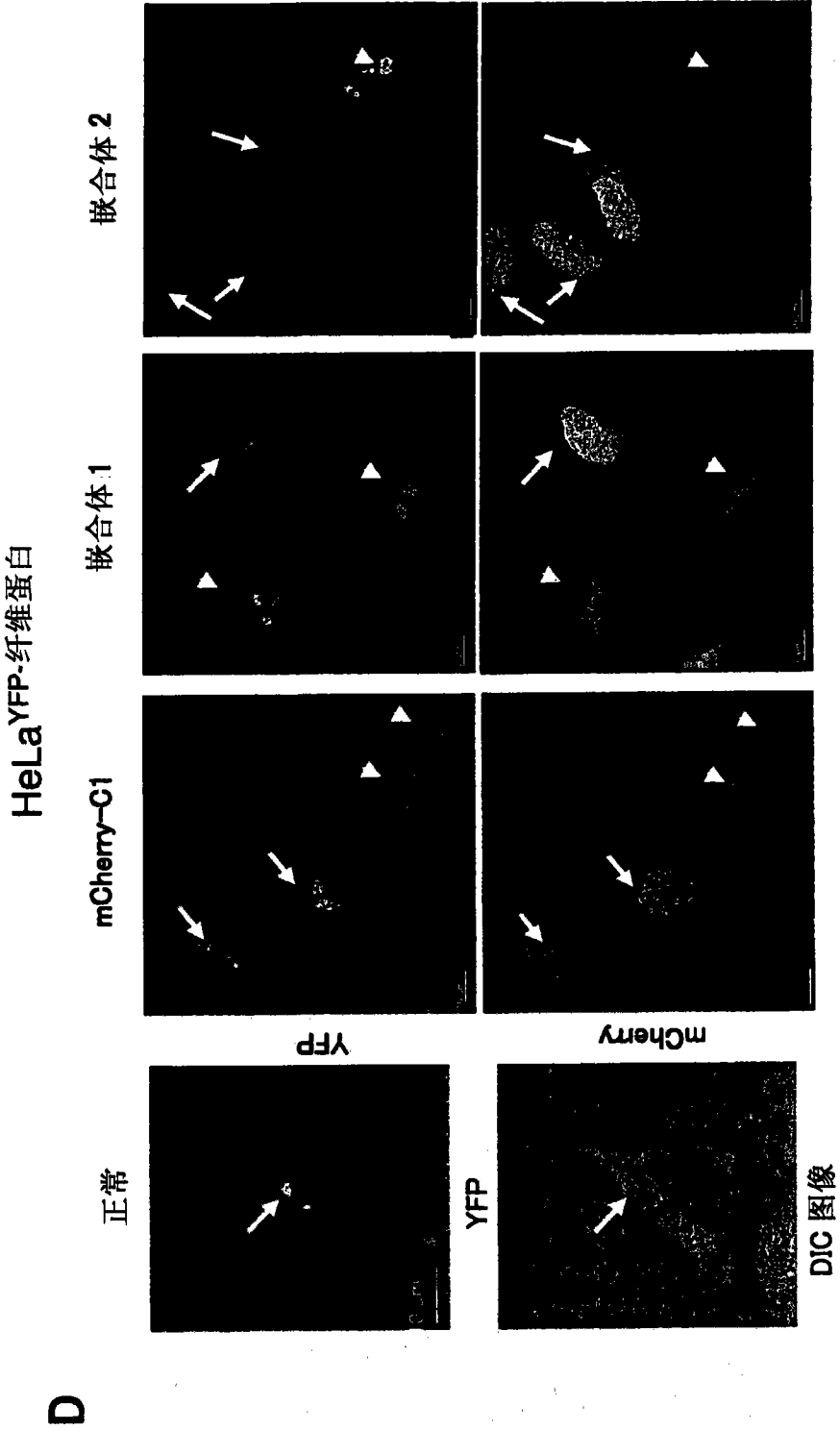


图 8

A

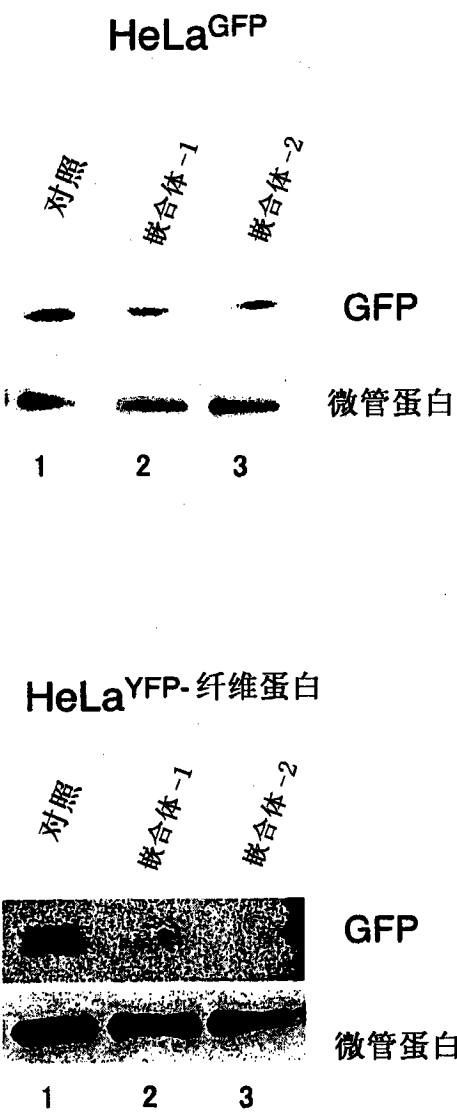
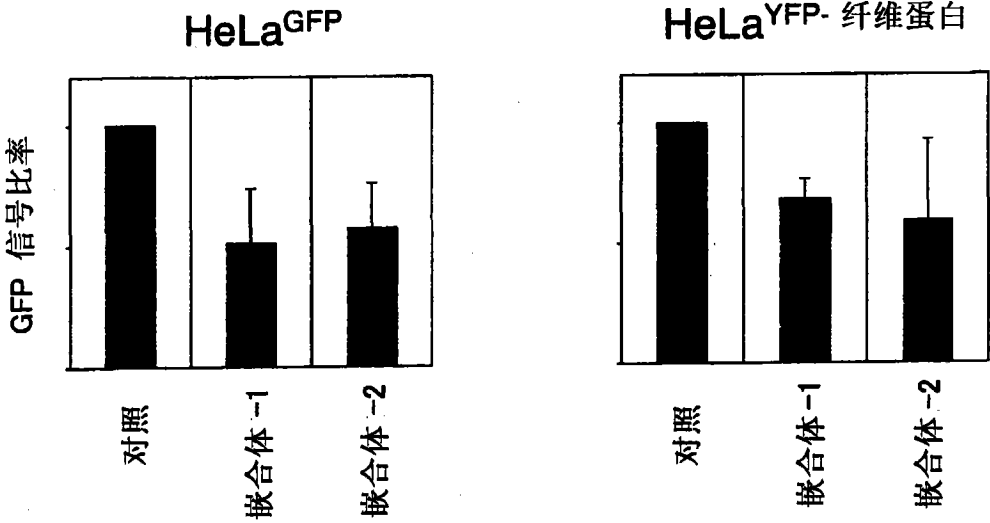


图 9

B



C

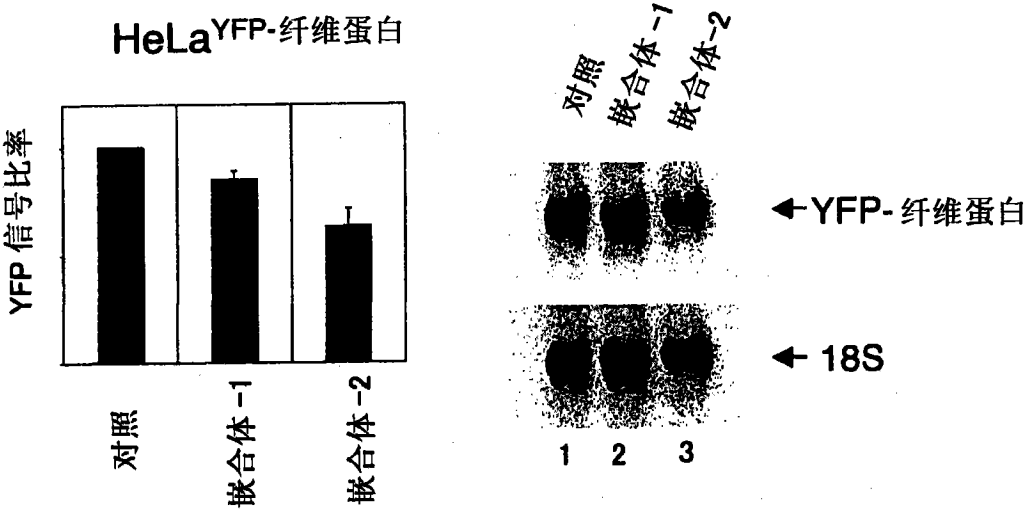


图 9

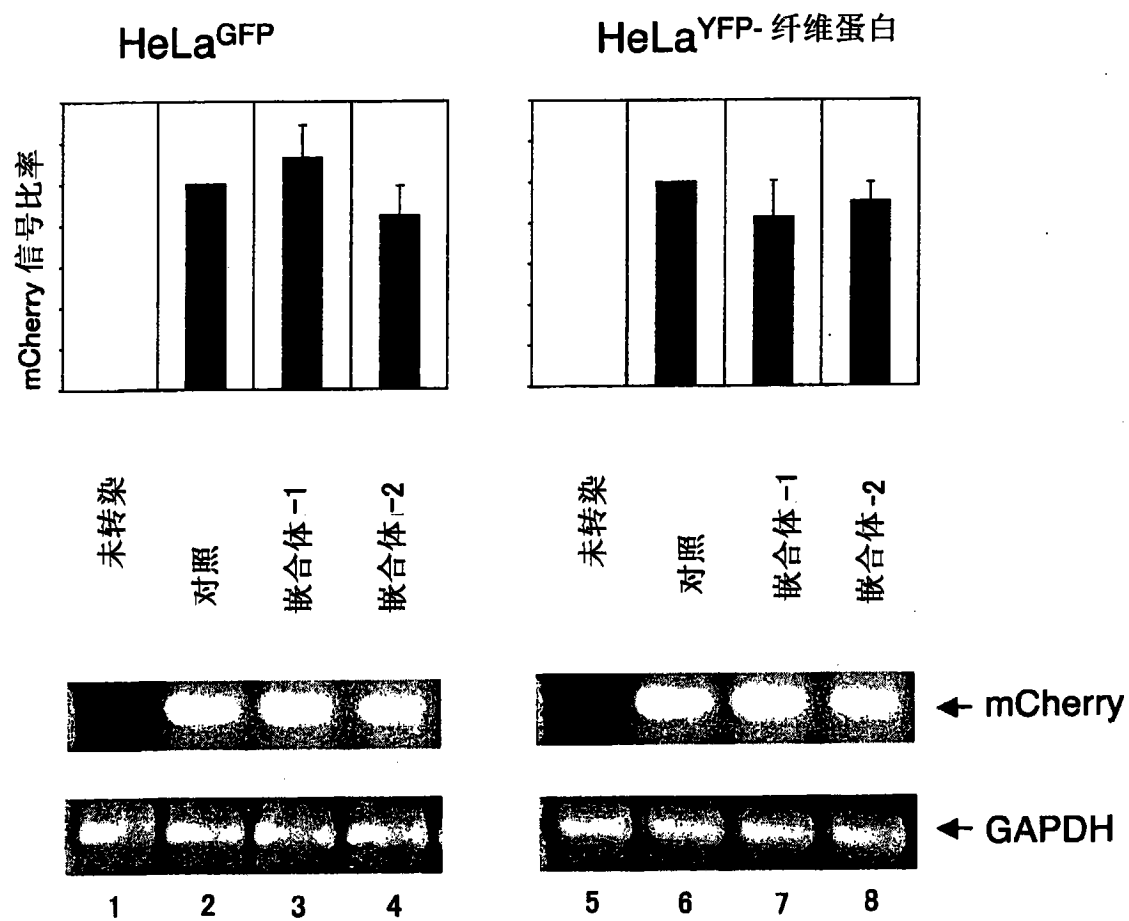
D

图 9

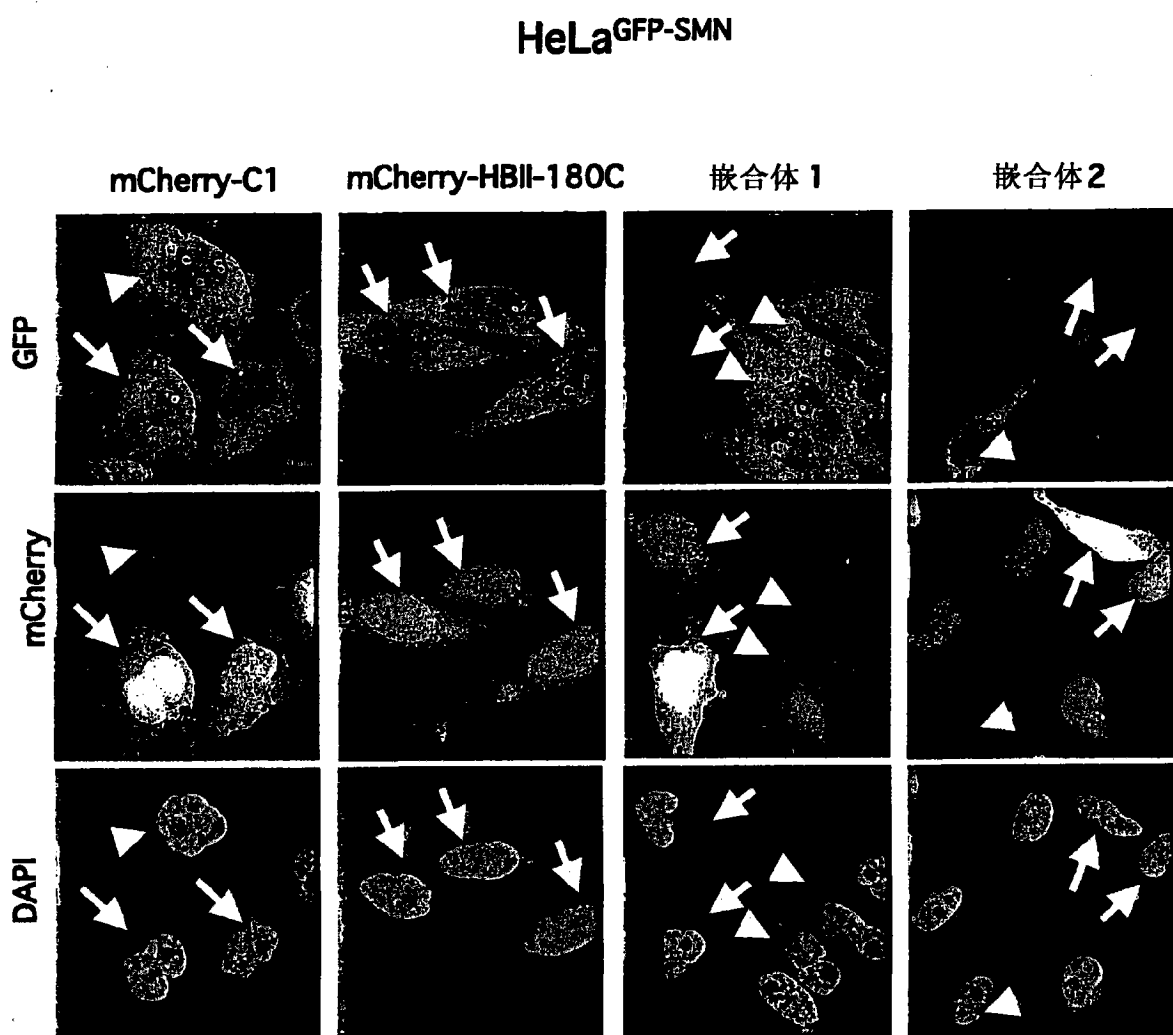


图 10

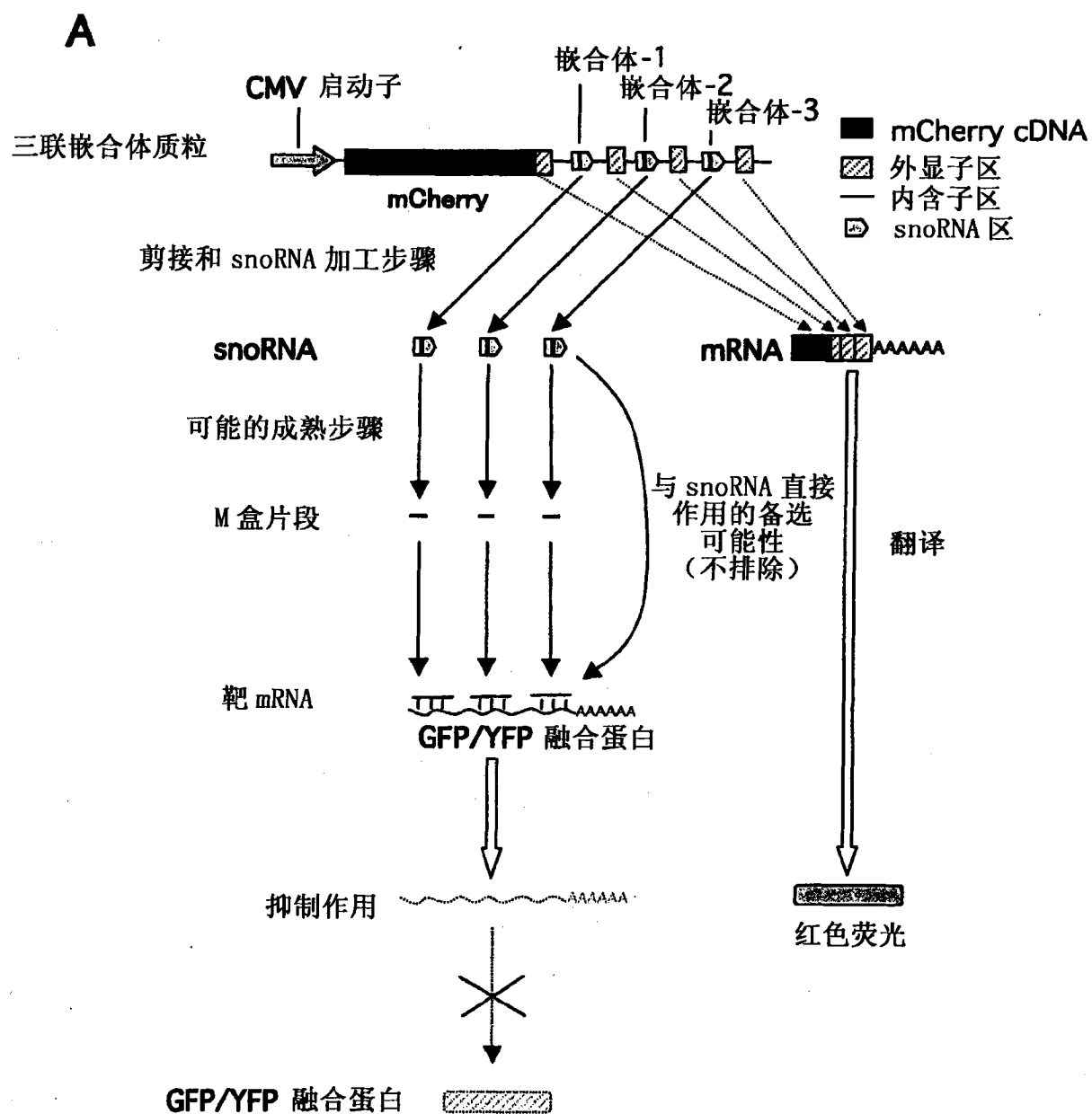


图 11

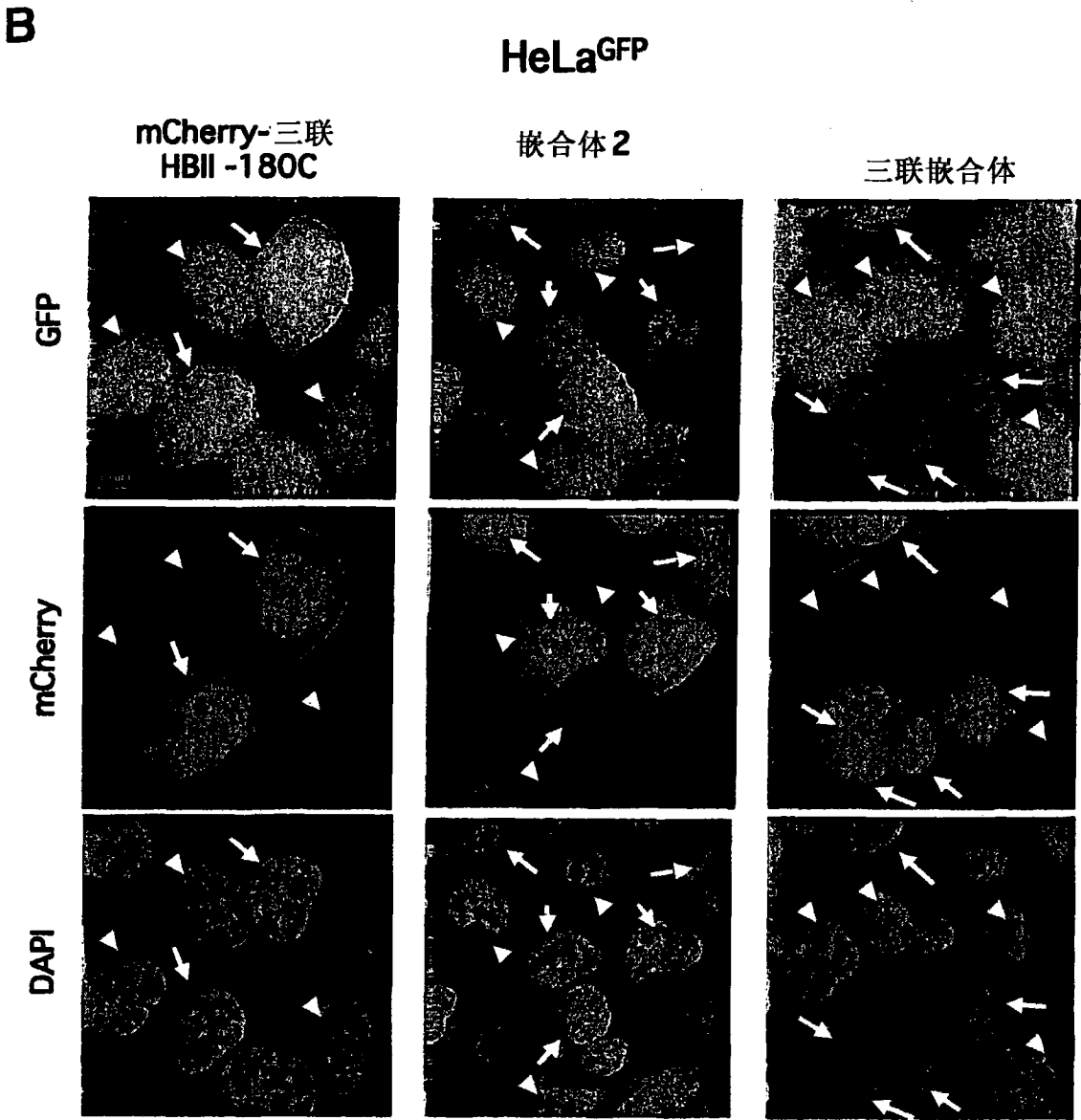


图 11

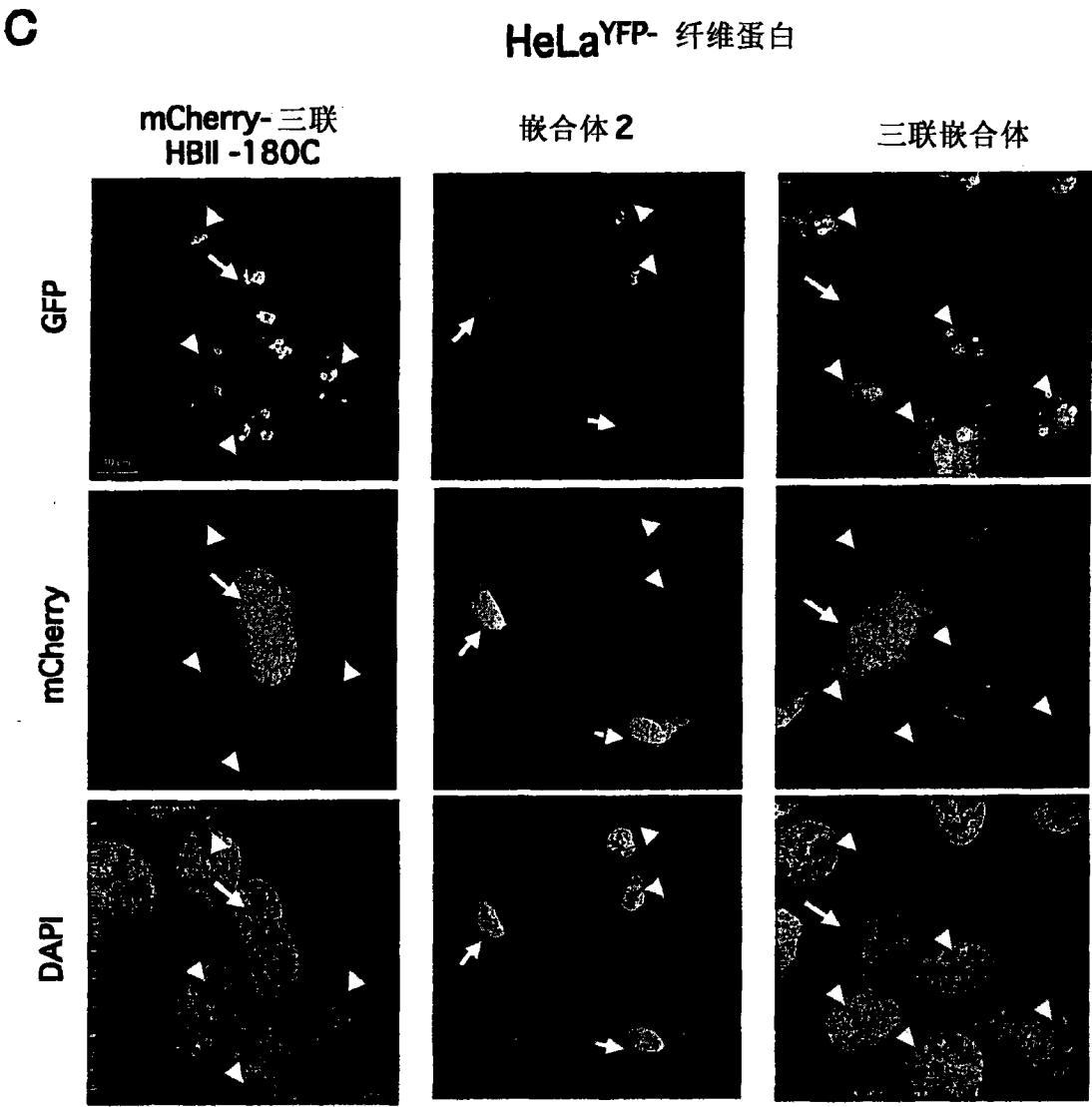


图 11

D

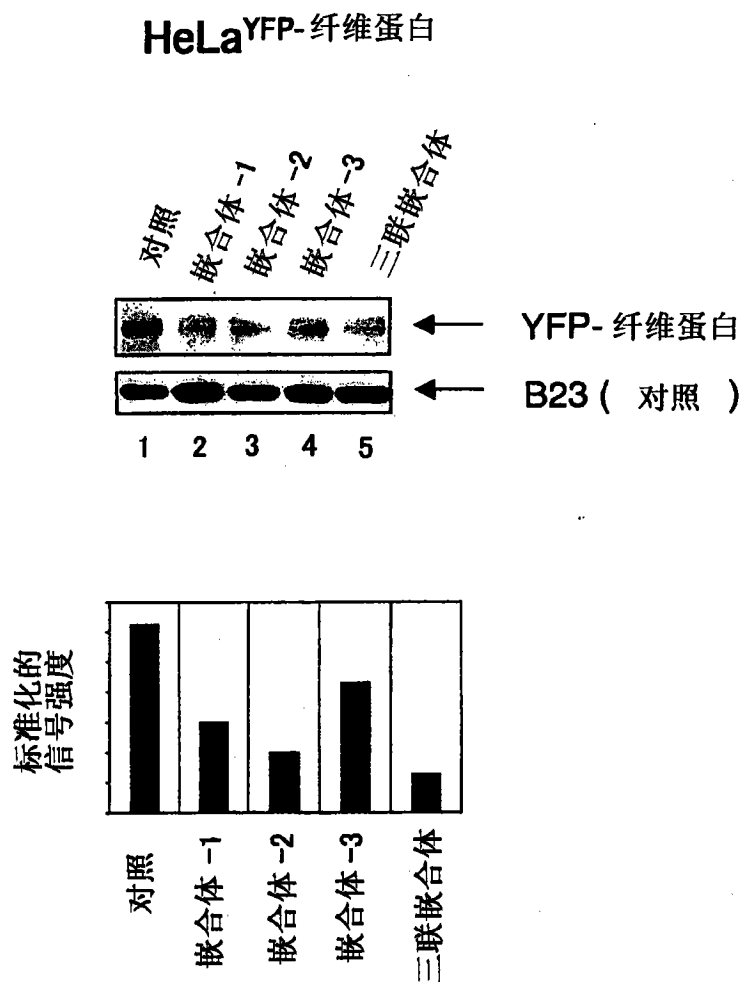


图 11

E

HeLa^{GFP-SMN}

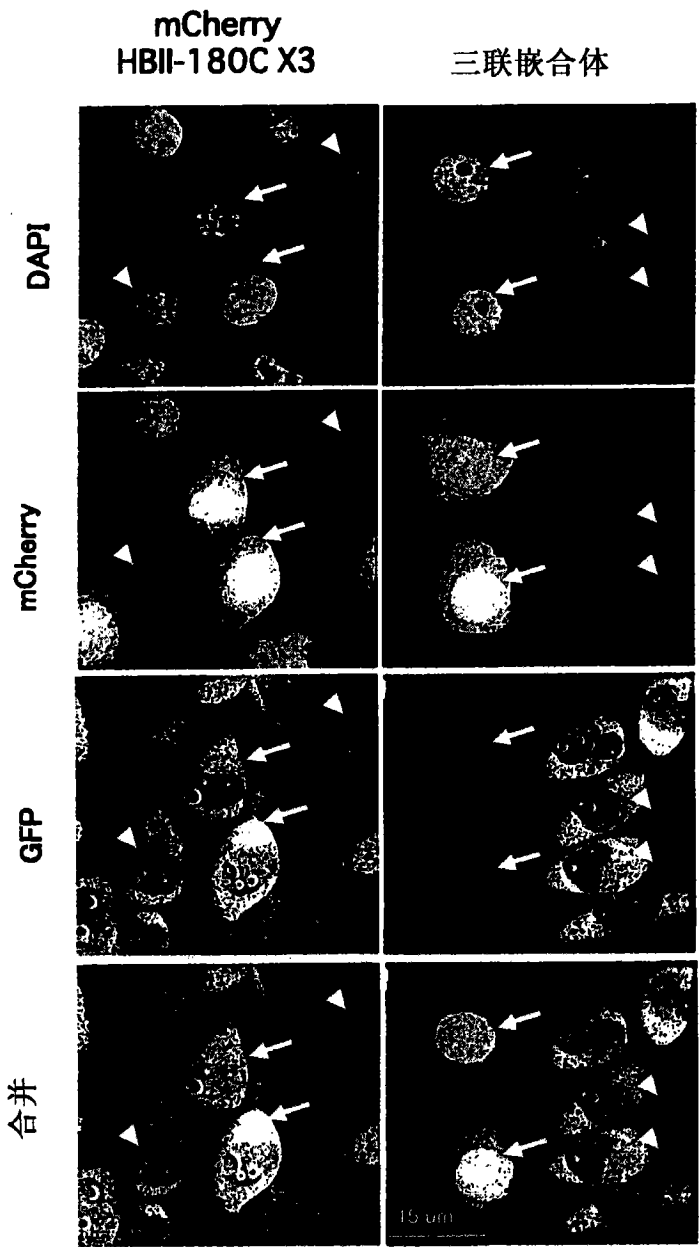


图 11

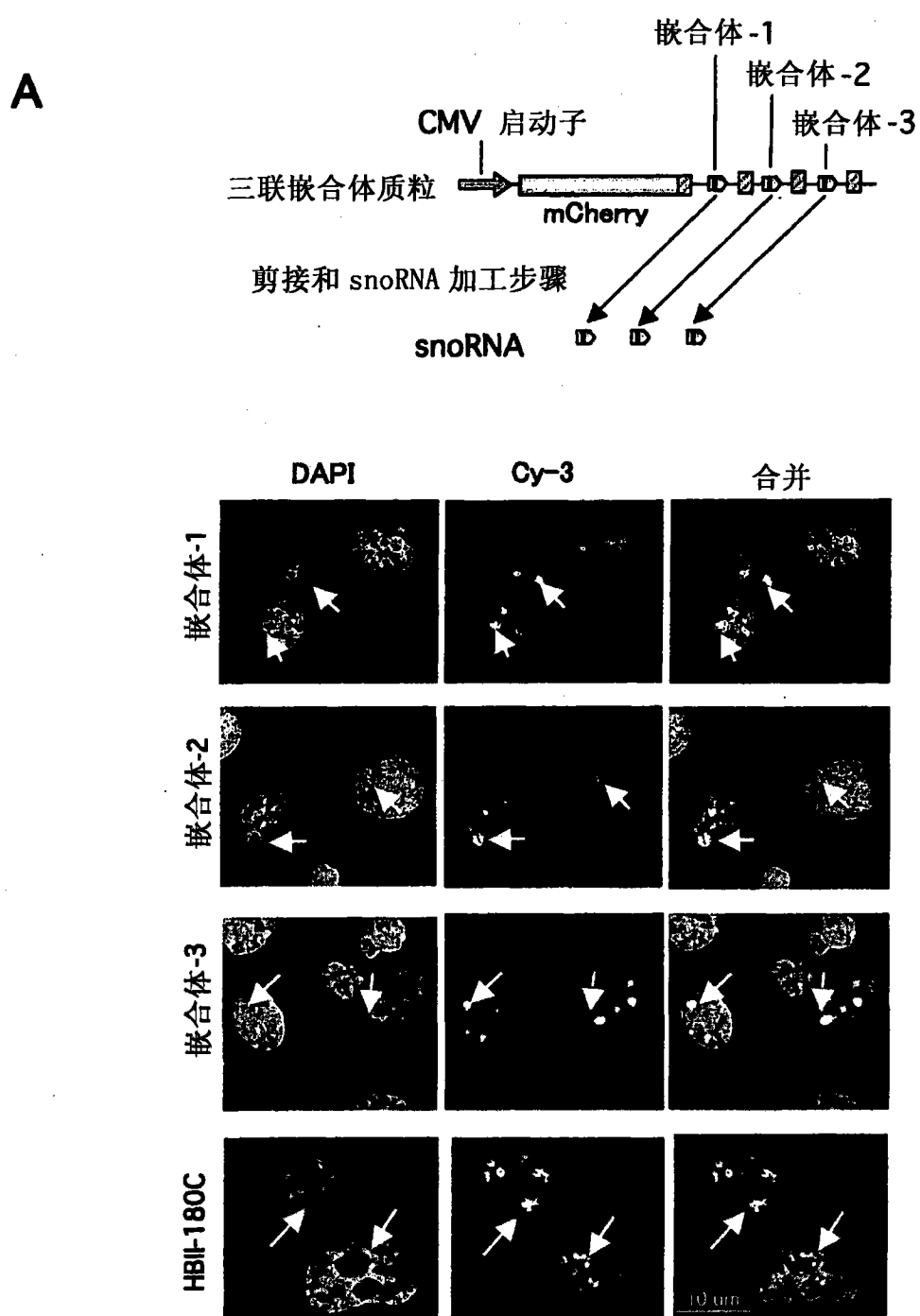


图 12

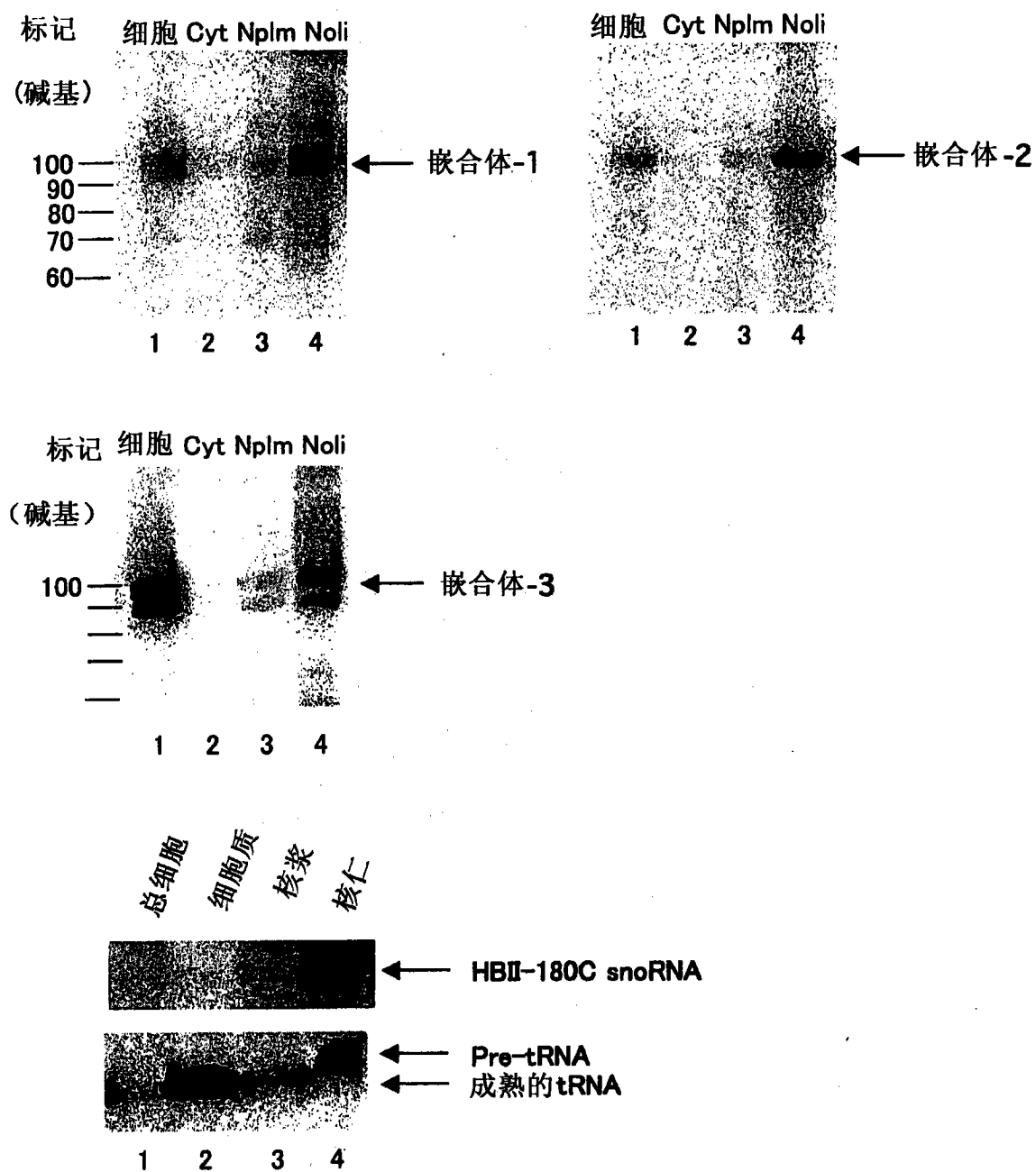
B

图 12

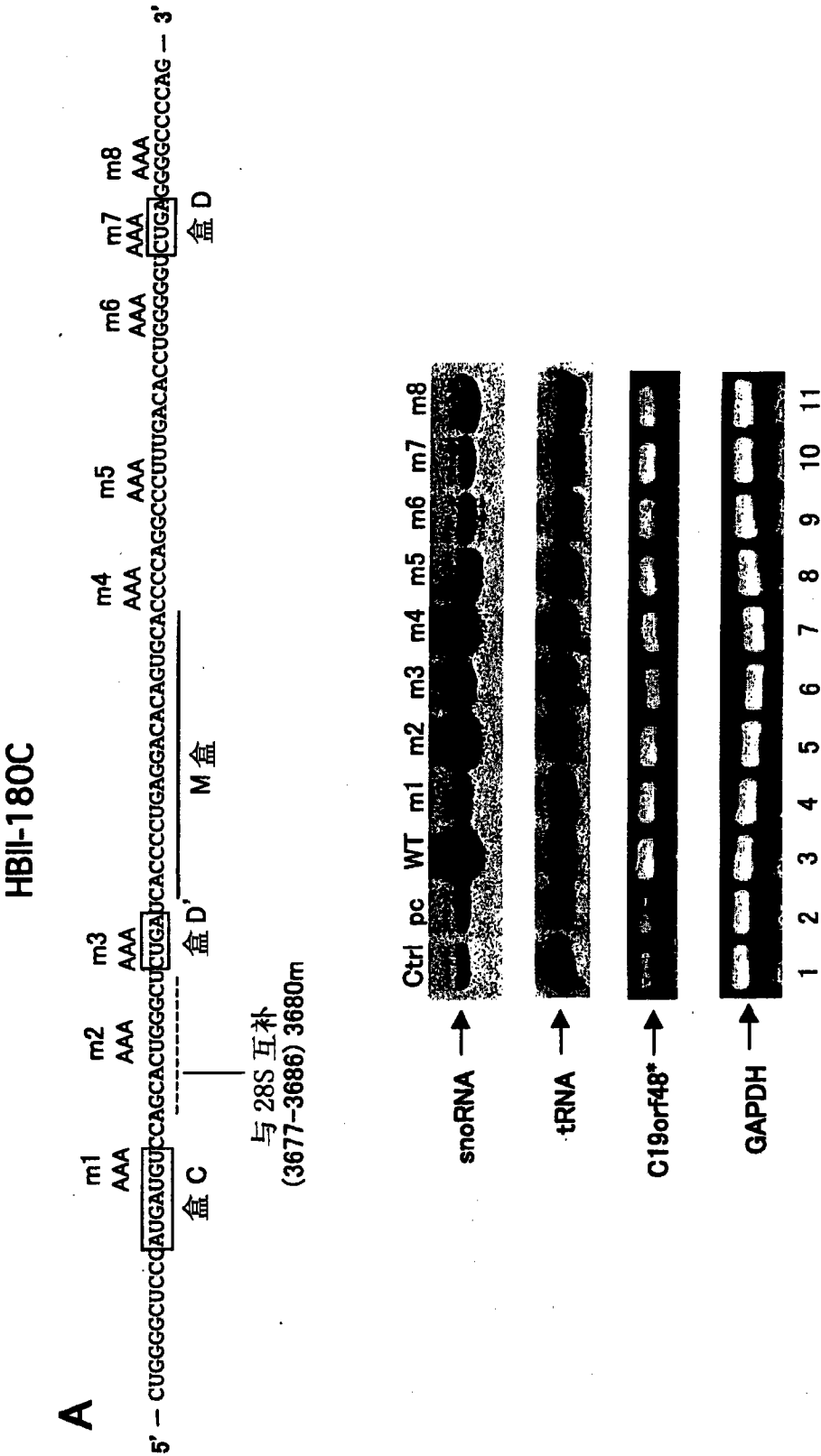


图 13

B

嵌合体-2-突变体

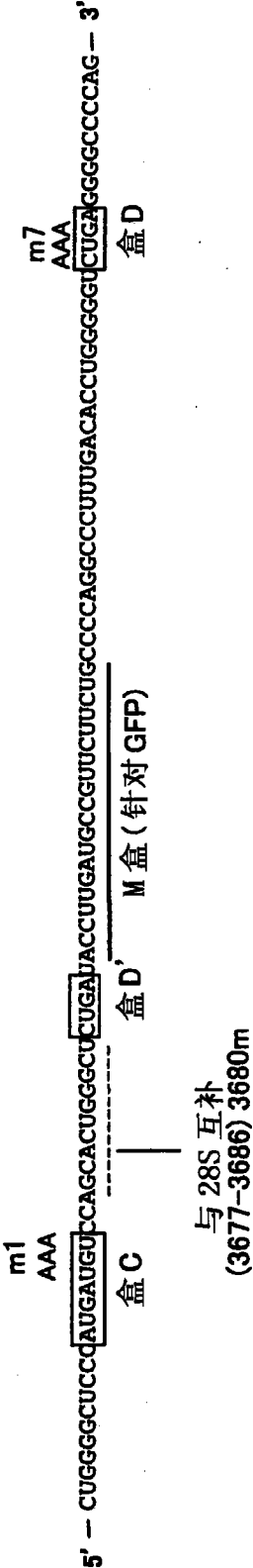


图 13

B(续)

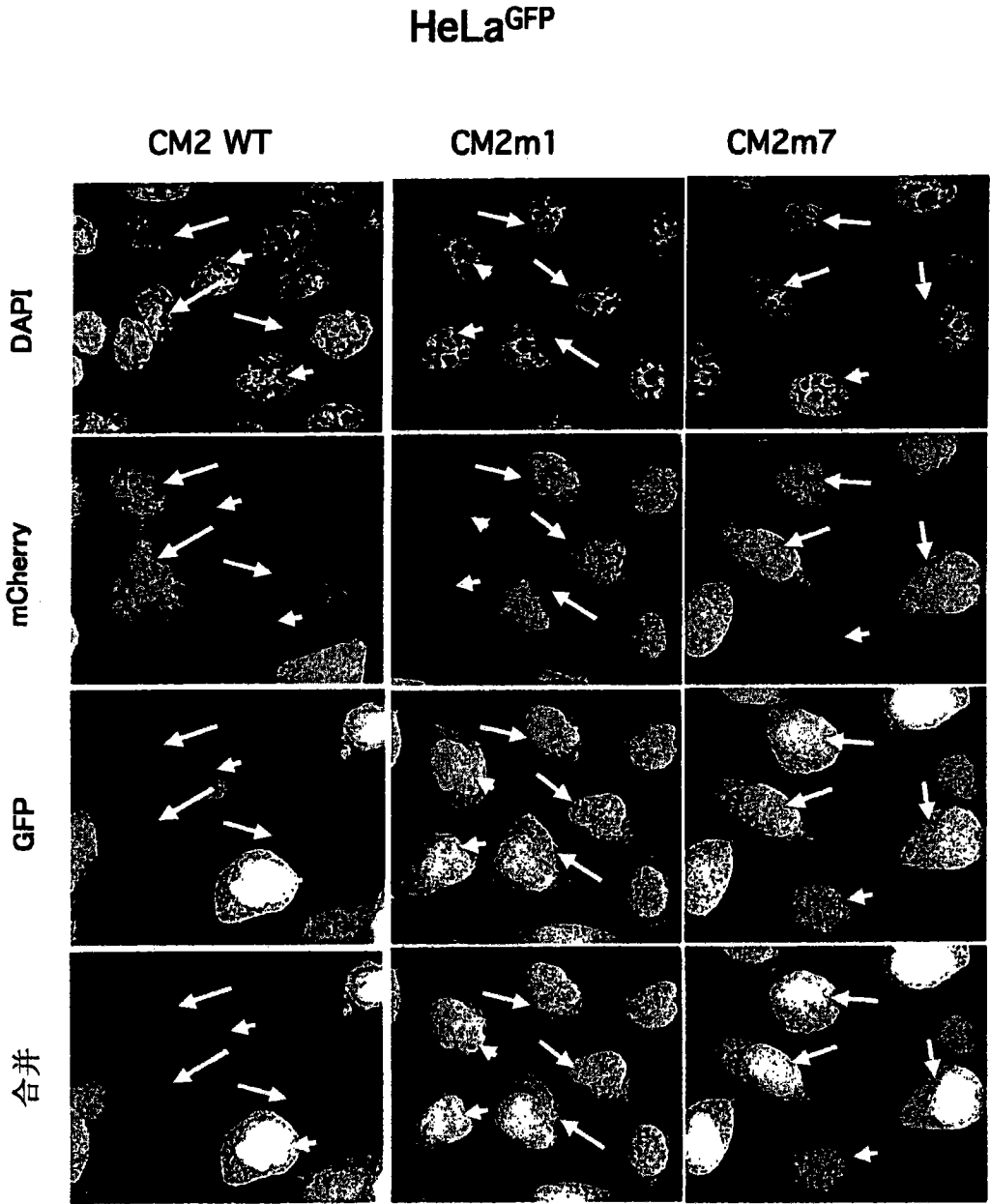


图 13

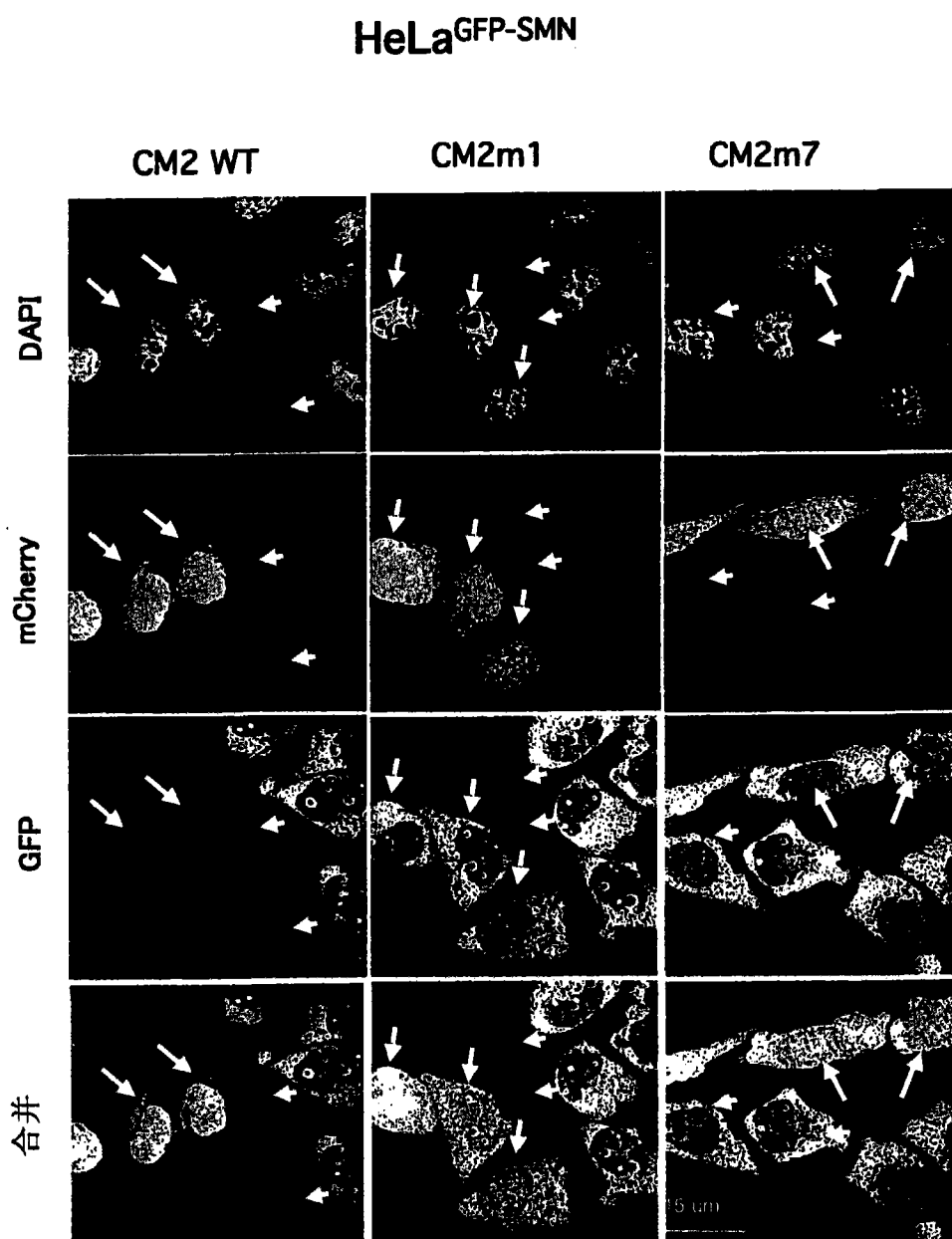
B (续)

图 13

C

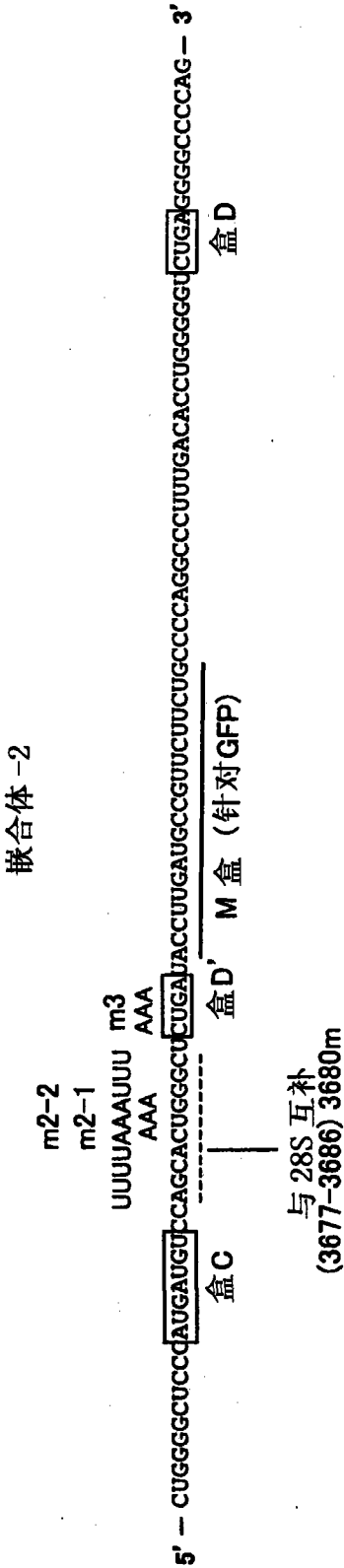


图 13

C(续)

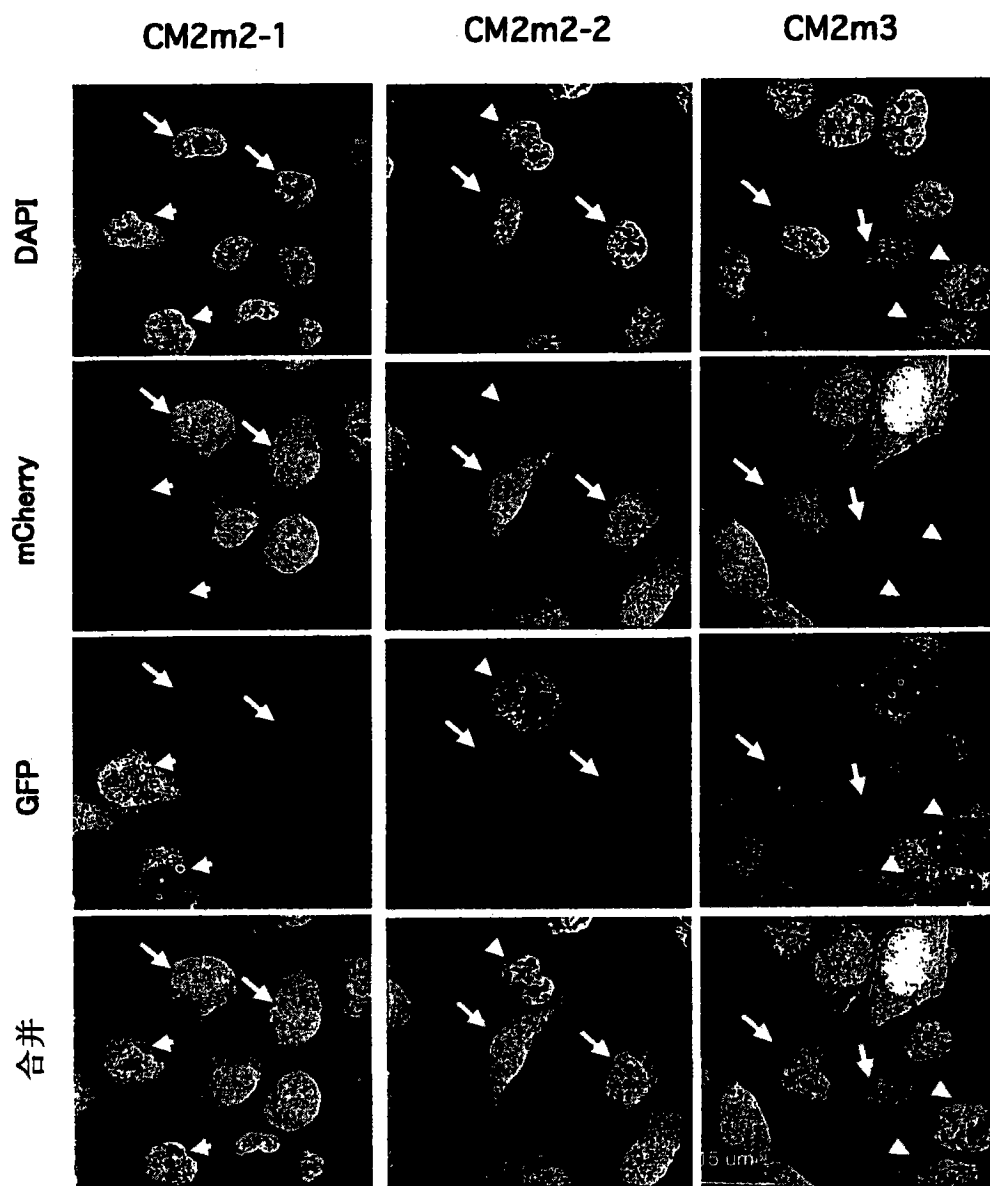
HeLa^{GFP-SMN}

图 13



嵌合体-2

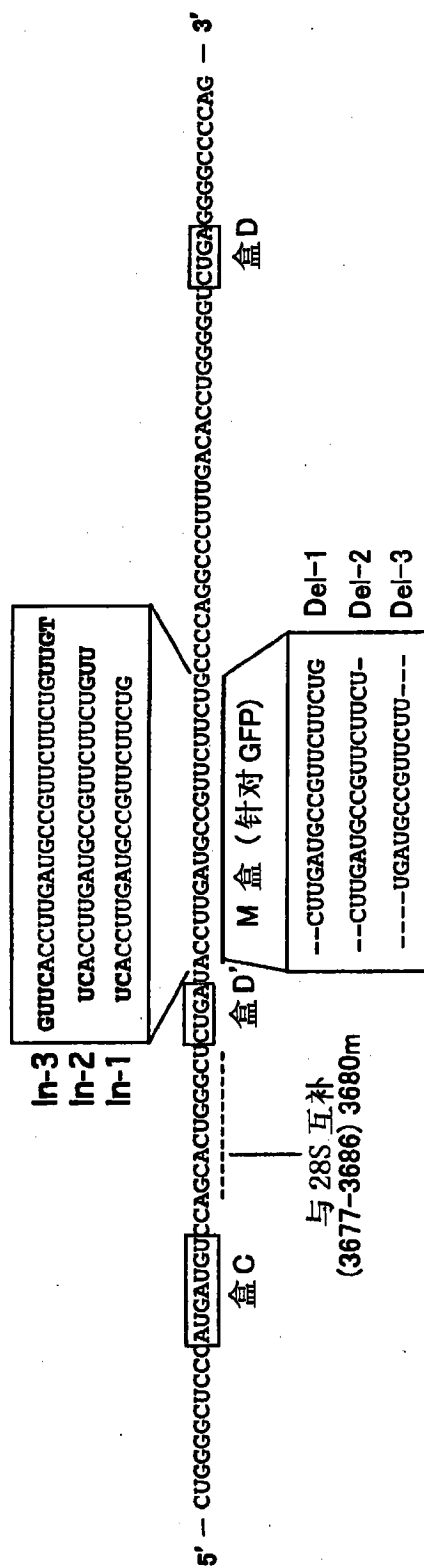


图 13

D (续)

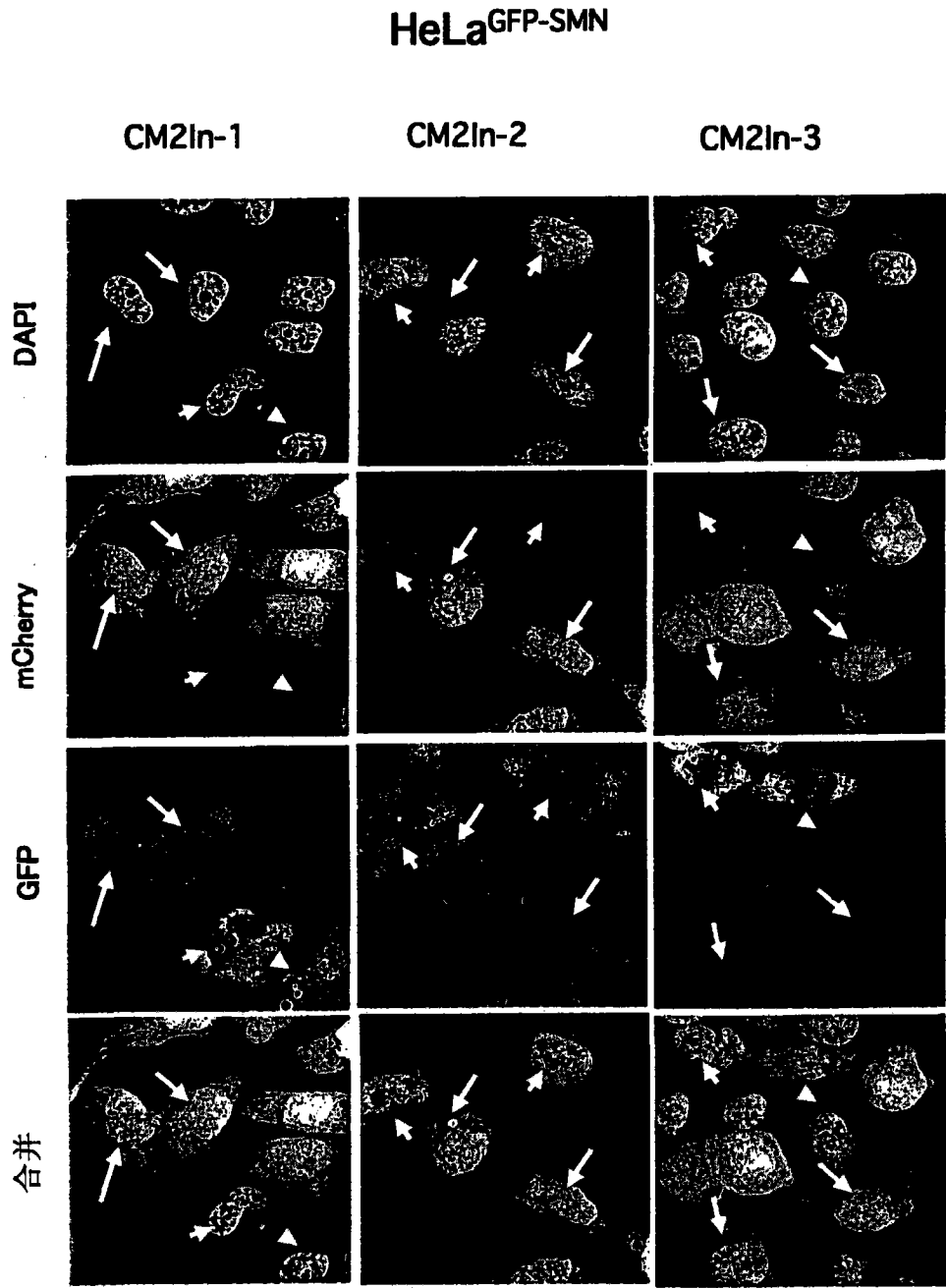


图 13

D (续)

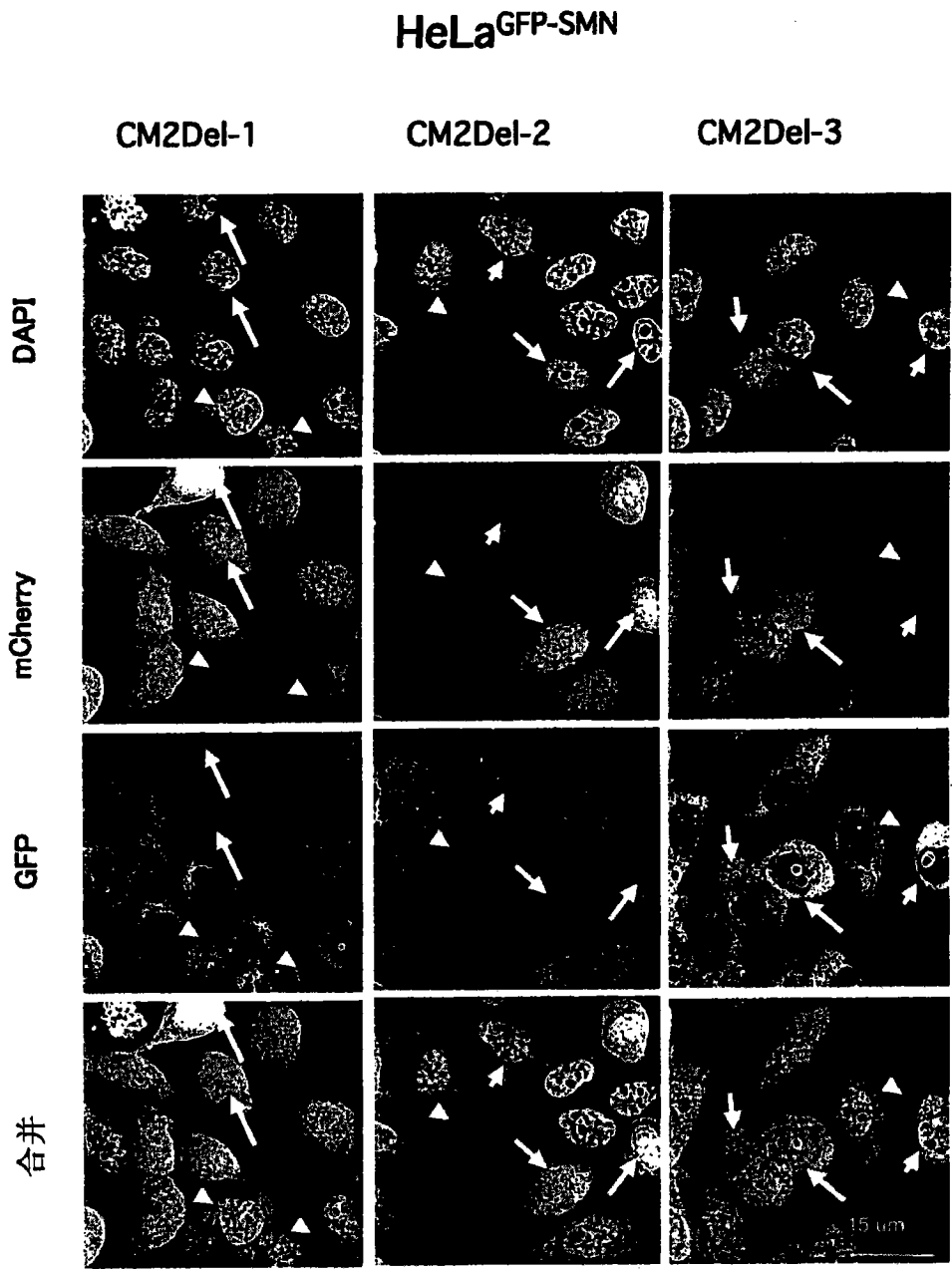


图 13

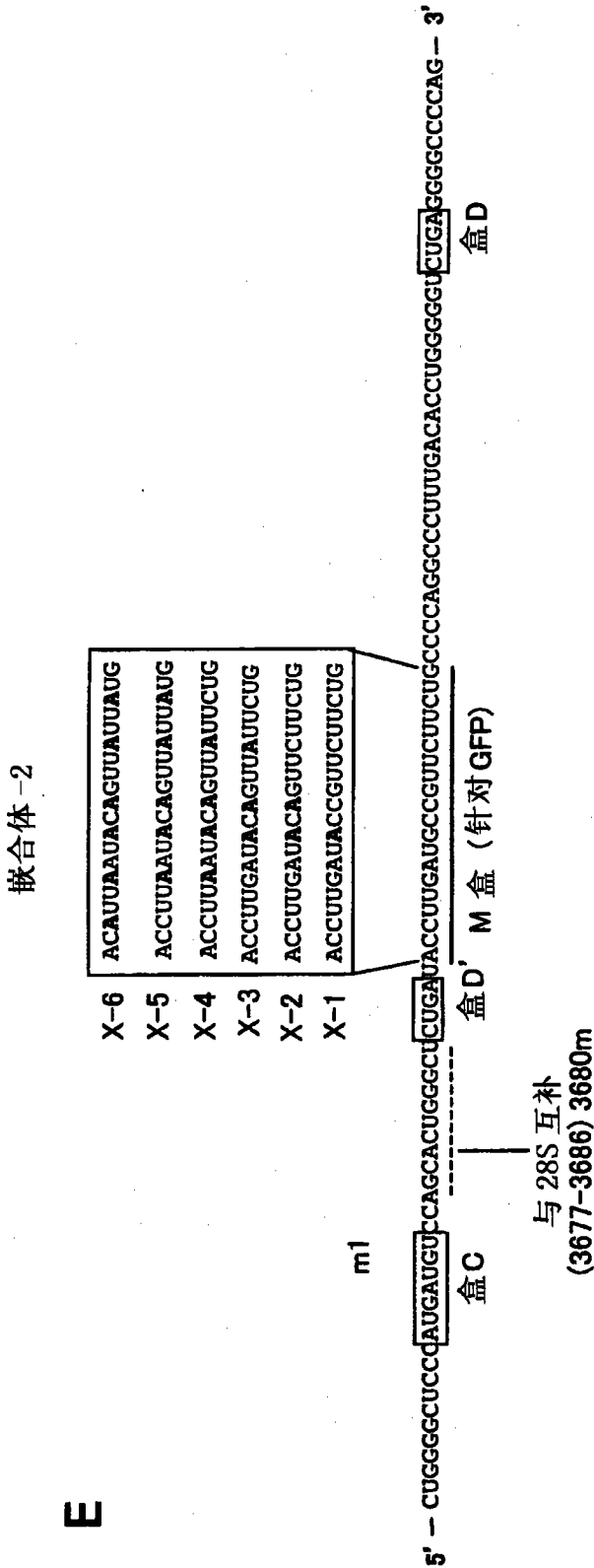


图 13

E (续)

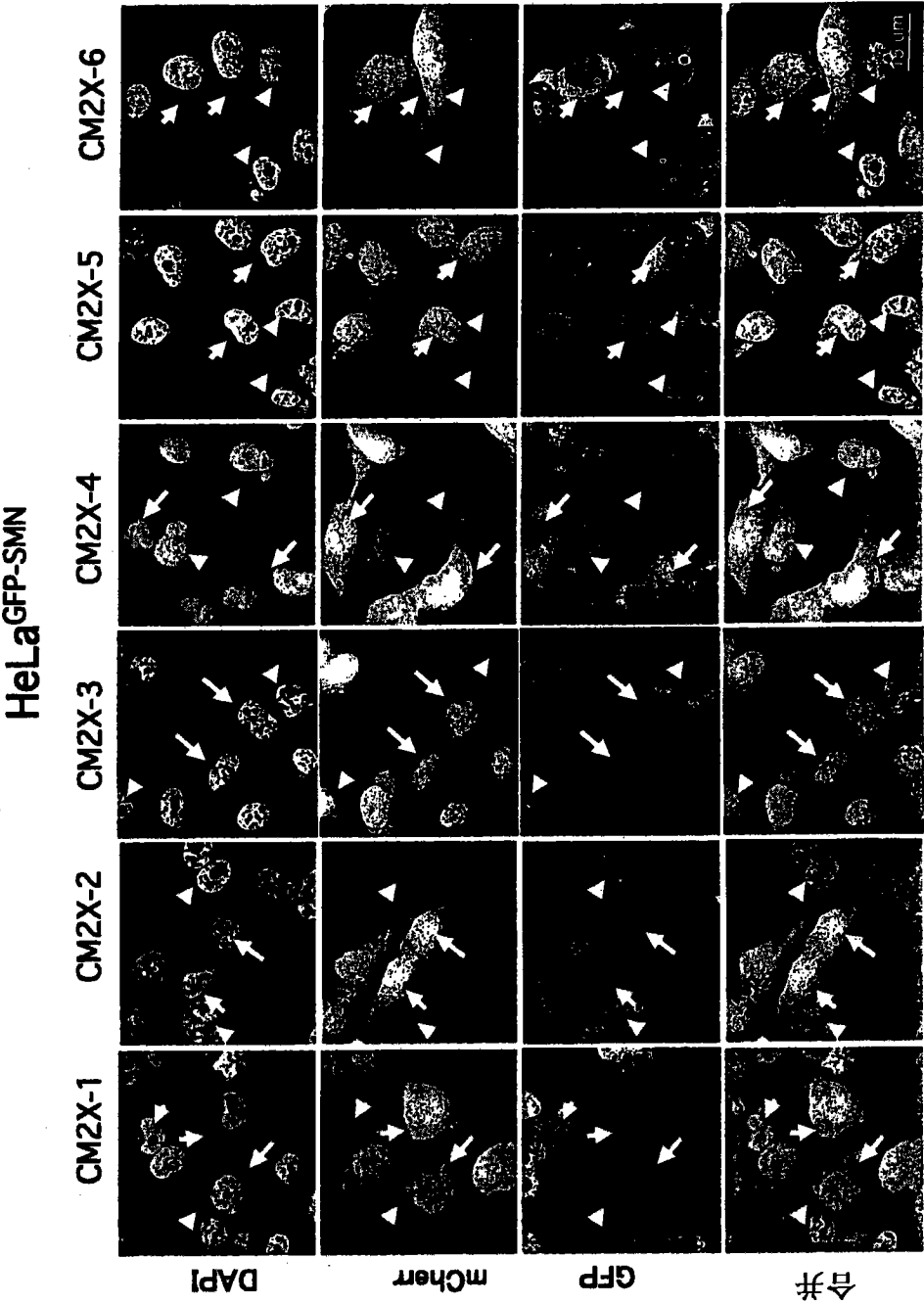
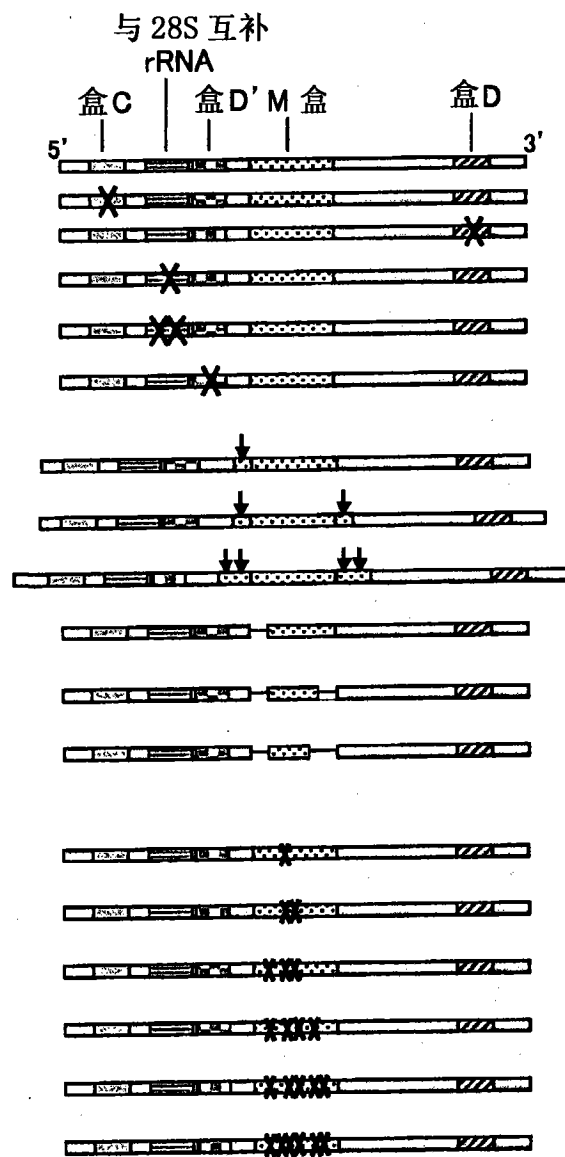


图 13

F

嵌合体 -2



质粒名称	突变位置	击倒效率
CM2-WT	-	++
CM2m1	盒 C	--
CM2m7	盒 D	--
CM2m2-1	在互补 28S rRNA 中 3 个突变	++
CM2m2-2	与 28S rRNA 无互补性	++
CM2m3	盒 D'	+
CM2In-1	在 M 盒中插入 2 个碱基	++
CM2In-2	在 M 盒中插入 4 个碱基	++
CM2In-3	在 M 盒中插入 8 个碱基	+++
CM2Del-1	在 M 盒中删除 2 个碱基	+
CM2Del-2	在 M 盒中删除 3 个碱基	+
CM2Del-3	在 M 盒中删除 7 个碱基	--
CM2X-1	在 M 盒中互补少 1 个碱基	+
CM2X-2	在 M 盒中互补少 2 个碱基	+
CM2X-3	在 M 盒中互补少 3 个碱基	+
CM2X-4	在 M 盒中互补少 4 个碱基	-
CM2X-5	在 M 盒中互补少 5 个碱基	--
CM2X-6	在 M 盒中互补少 6 个碱基	--

图 13

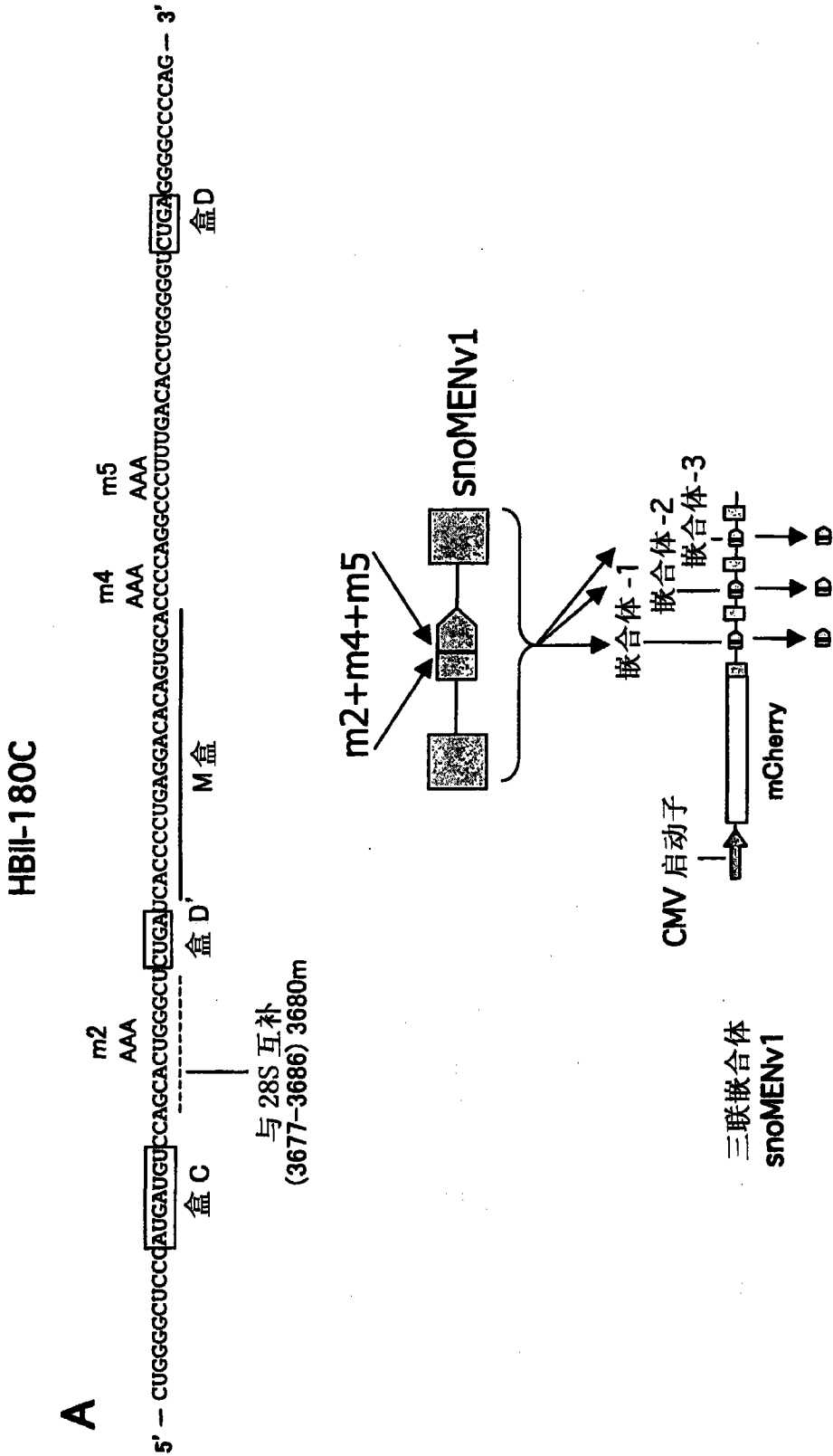


图 14

A (续)

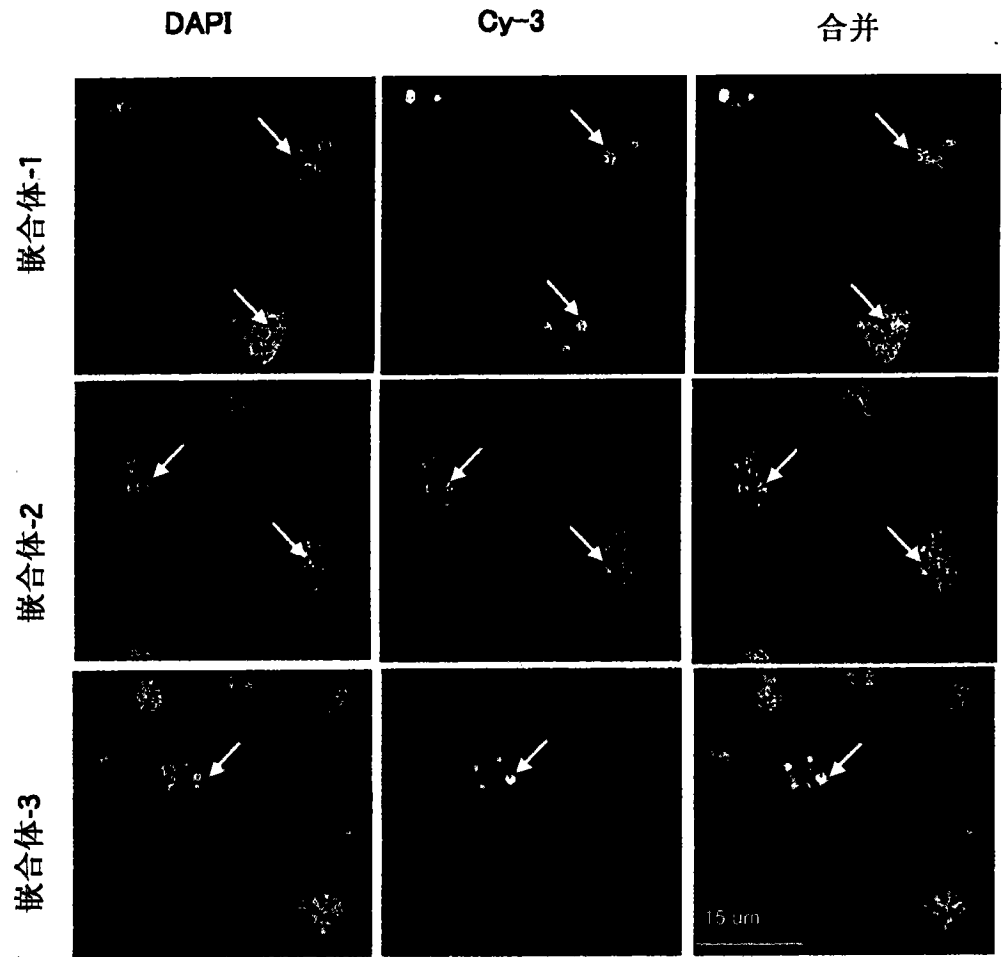


图 14

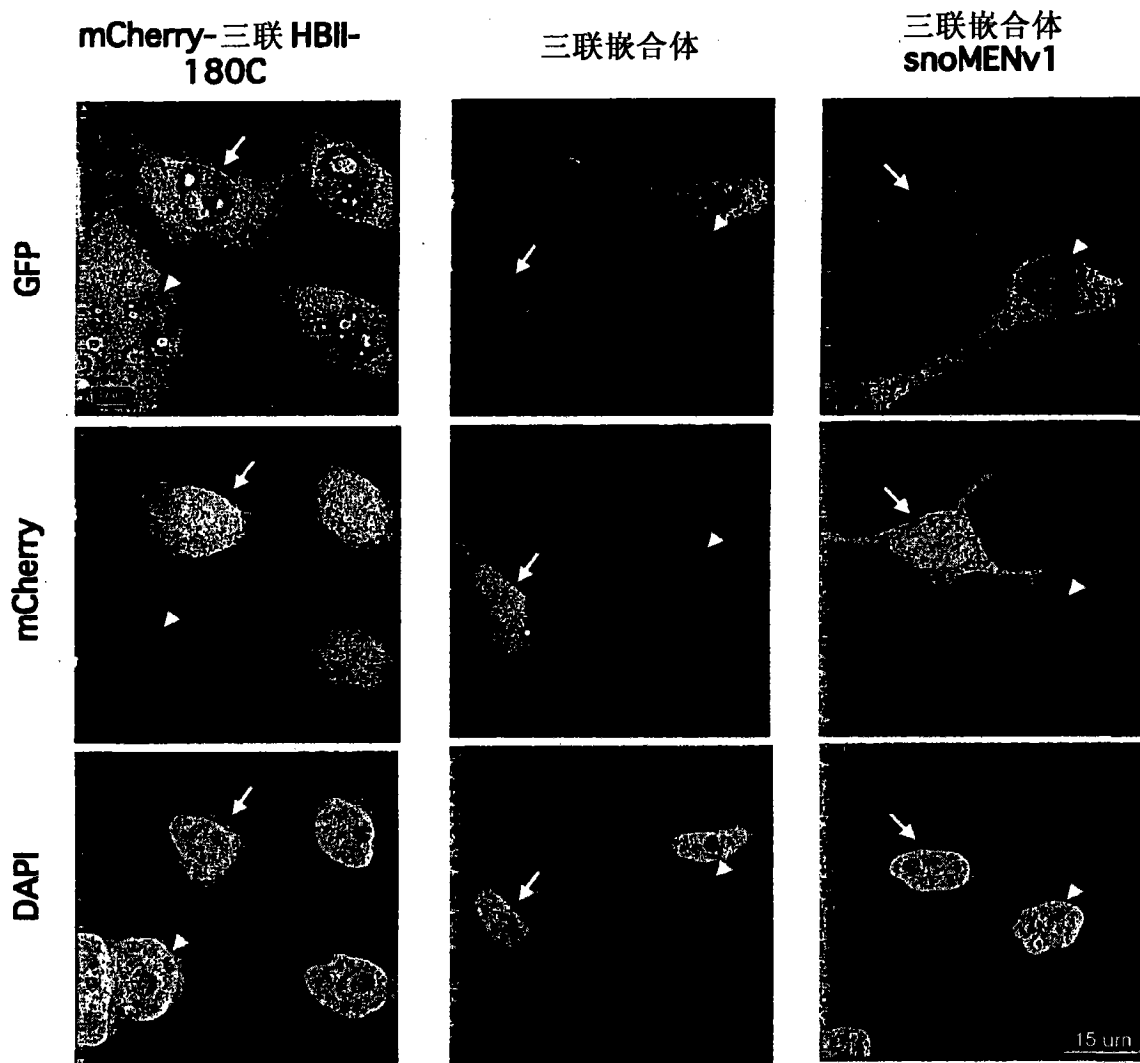
B**HeLa^{GFP-SMN}**

图 14

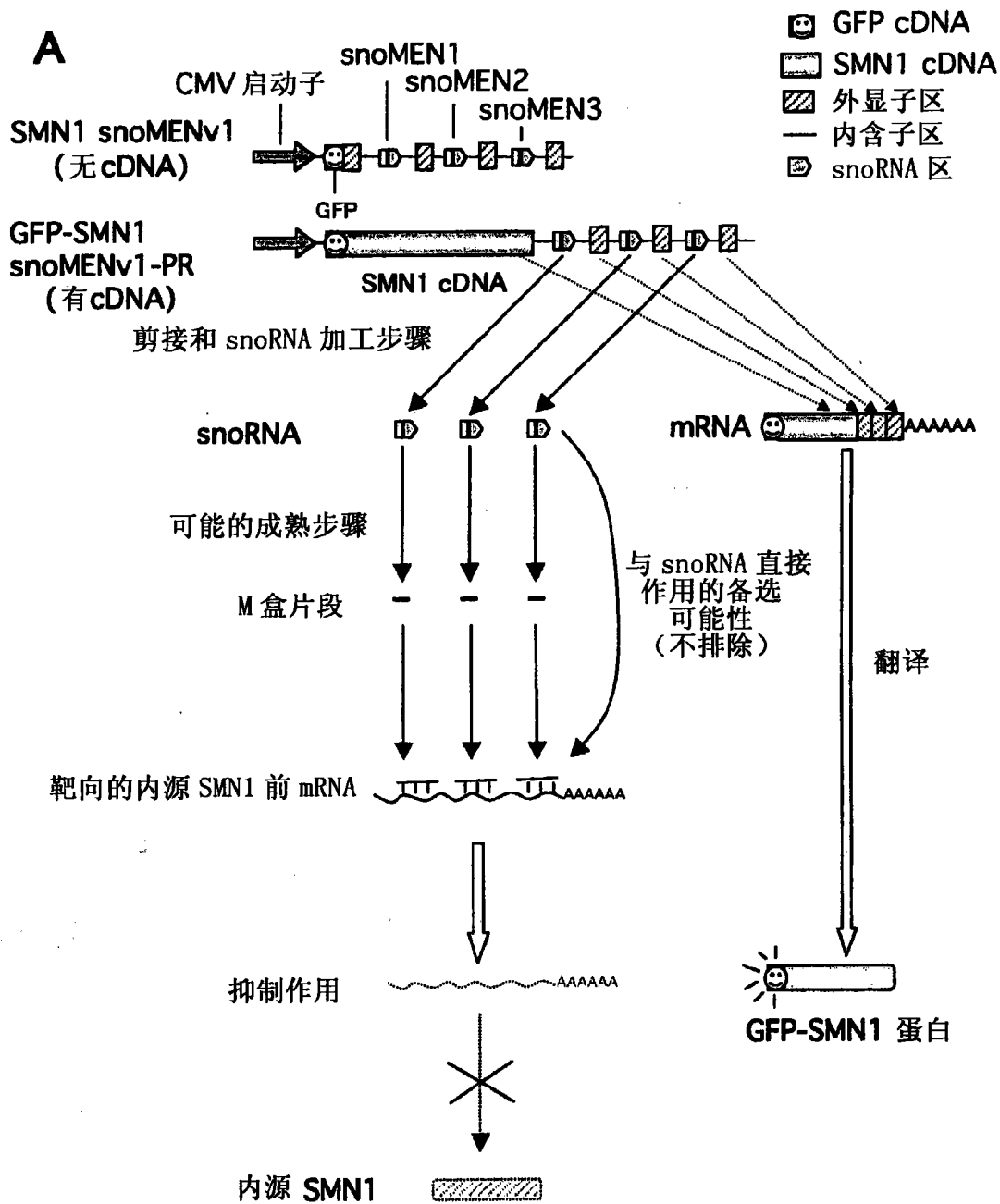


图 15

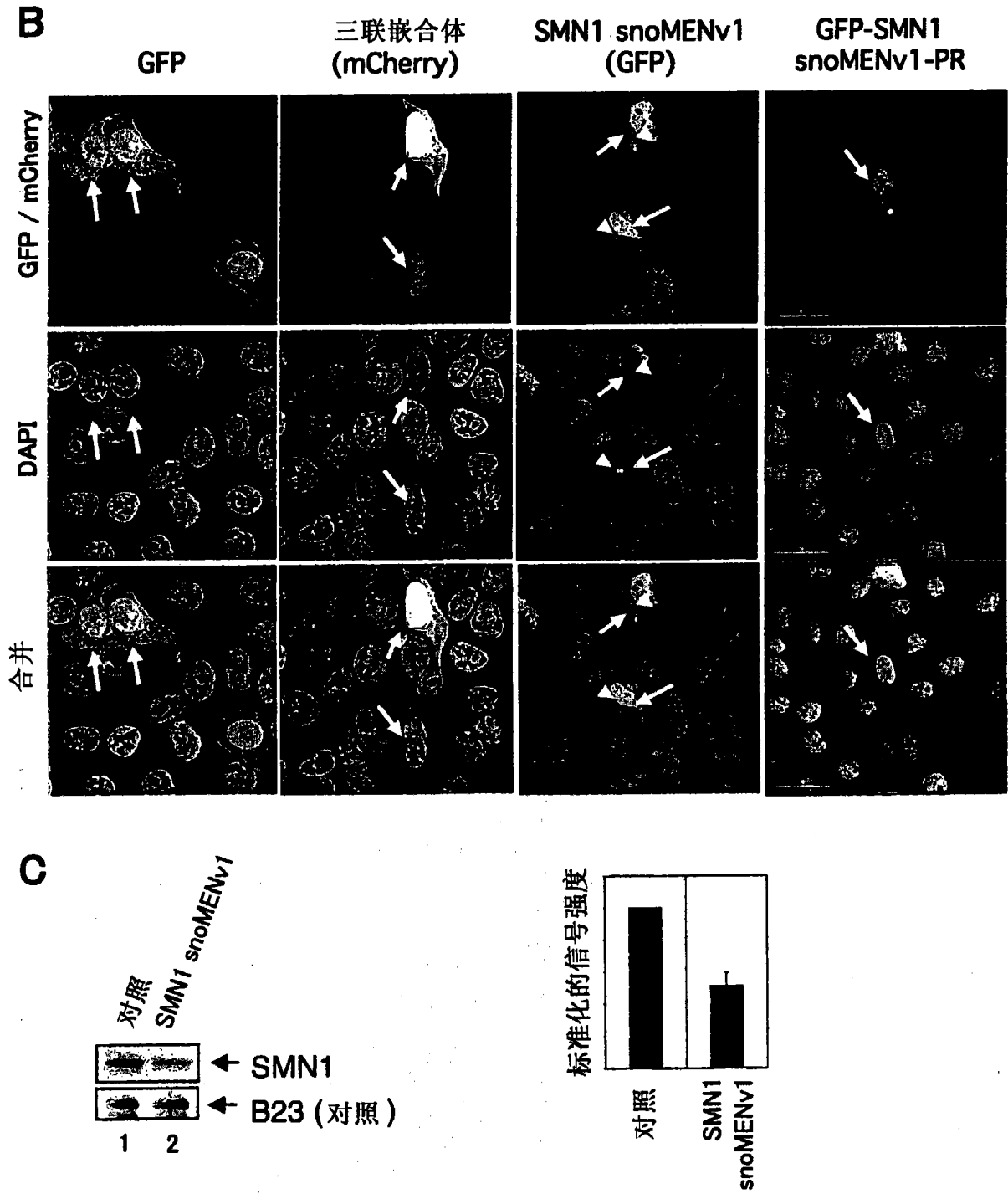


图 15

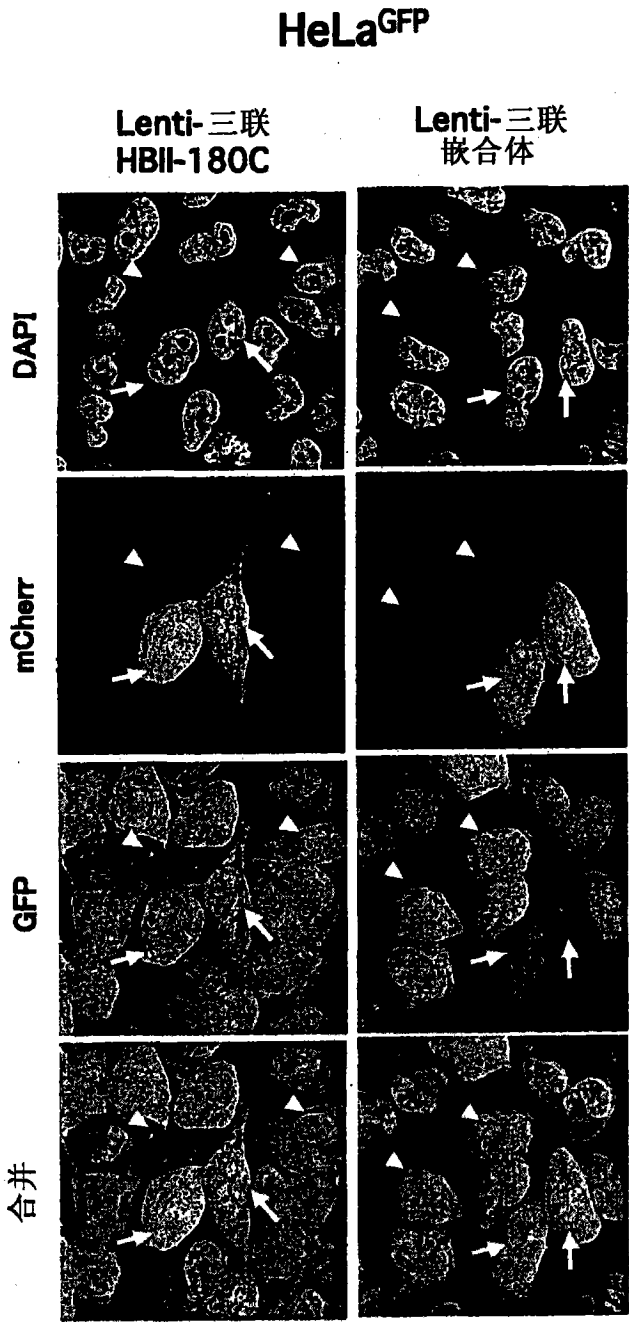


图 16