



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109219659 B

(45) 授权公告日 2022.09.09

(21) 申请号 201780034592.0

A61K 48/00 (2006.01)

(22) 申请日 2017.04.13

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109219659 A

(43) 申请公布日 2019.01.15

(30) 优先权数据

62/322,745 2016.04.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/050330 2017.04.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/177277 EN 2017.10.19

(73) 专利权人 贝尼泰克生物制药有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 D·苏伊 迈克尔·格雷厄姆

卡皮西纳·托利特

阿尔伯托·马勒巴

乔治·J·迪克森

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 李华英

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

权利要求书2页 说明书61页

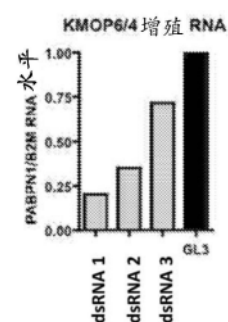
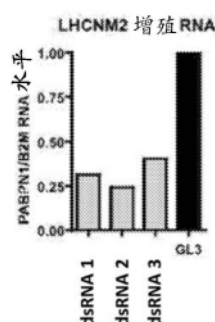
序列表11页 附图15页

(54) 发明名称

用于治疗眼咽型肌营养不良 (OPMD) 的试剂及其用途

(57) 摘要

本披露涉及靶向用于治疗眼咽型肌营养不良 (OPMD) 的PABPN1的RNA干扰 (RNAi) 试剂、包含这些RNA干扰试剂的组合物、及其用于治疗患有OPMD或倾向于患有OPMD的个体的用途。



1. 一种组合物,其包含:

(a) DNA指导的RNA干扰(ddRNAi)构建体,该ddRNAi构建体包含如下核酸,该核酸包含编码发夹RNA的DNA序列,该发夹RNA包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:3中列出;和

(b) 编码功能性PABPN1蛋白的核酸,该功能性PABPN1蛋白具有不被由该ddRNAi构建体中的核酸编码的RNAi试剂靶向的mRNA转录物,其中所述编码功能性PABPN1蛋白的核酸是密码子优化的,其中编码该功能性PABPN1蛋白的核酸的序列是如SEQ ID NO:24所示的序列。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中该发夹RNA是shRNA或shmiR。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该发夹RNA是shRNA或shmiR,其包含SEQ ID NO:14中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:14中列出的序列互补的效应子互补序列。

4. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该发夹RNA是shRNA或shmiR,其包含SEQ ID NO:14中列出的效应子序列和SEQ ID NO:15中列出的效应子互补序列。

5. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该发夹RNA包含位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的环序列。

6. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该发夹RNA是shRNA或shmiR,其包含SEQ ID NO:21或20列出的序列。

7. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该ddRNAi构建体包含至少一种另外的核酸,该另外的核酸包含编码另外的发夹RNA的DNA序列,该发夹RNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中该效应子序列由至少17个连续核苷酸组成,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域互补,该PABPN1蛋白是导致眼咽型肌营养不良(OPMD)的原因;

其中由该ddRNAi构建体中的核酸分子编码的发夹RNA包含不同的效应子序列。

8. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述ddRNAi构建体编码一个或多个shmiR。

9. 根据权利要求3所述的组合物,其中编码该或每个发夹RNA的DNA序列包含:

编码位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的环序列的DNA序列;和

3'末端的终止子序列。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中编码该或每个发夹RNA的DNA序列与启动子可操作地连接。

11. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该ddRNAi构建体包含在表达载体内。

12. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含在表达载体内。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中该表达载体是以下的病毒载体:腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体和慢病毒载体。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其中该表达载体是以下的病毒载体:腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体和慢病毒载体。

15. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该编码功能性PABPN1蛋白的核酸与该ddRNAi构建体包含在同一表达载体内。

16. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中该功能性PABPN1蛋白的序列是如SEQ ID NO:25所示的序列。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在患有眼咽型肌营养不良(OPMD)的受试者中治疗OPMD或用于在患有OPMD或倾向于患有OPMD的受试者中预防OPMD的一种或多种症状的发展或进展。

## 用于治疗眼咽型肌营养不良 (OPMD) 的试剂及其用途

[0001] 相关申请数据

[0002] 本申请要求2016年4月14日提交的美国临时申请号62/322,745的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本披露涉及用于治疗眼咽型肌营养不良 (OPMD) 的RNA干扰 (RNAi) 试剂、包含其的组合物、及其用于治疗患有OPMD或倾向于患有OPMD的个体的用途。

### 背景技术

[0004] OPMD是一种常染色体显性遗传的、缓慢进展的、迟发性的退行性肌肉障碍。该疾病的主要特征是进行性眼睑下垂(上睑下垂)和吞咽困难(噎膈)。咽肌和环咽肌是OPMD的特定靶标。近端肢体无力倾向于在疾病进展的后期发生。导致疾病的突变是聚(A)结合蛋白核1(PABPN1)基因的编码区中(GCN)n三核苷酸重复的异常扩增。这种扩增导致PABPN1蛋白的N-末端处扩增的聚丙氨酸段:10个丙氨酸存在于正常蛋白质中,在突变形式(expPABPN1)中扩增至11至18个丙氨酸。该疾病的主要病理标志是expPABPN1的核聚集体。扩增的PABPN1的错折叠导致受影响细胞的细胞核内不溶性聚合物纤维状聚集体的积累。PABPN1是一种易聚集蛋白,并且OPMD中突变丙氨酸扩增的PABPN1具有比野生型正常蛋白更高的聚集率。然而,尚不清楚OPMD中的核聚集体是否具有病理功能或由于细胞防御机制的保护作用。

[0005] 目前没有针对OPMD的药理学或其他方面的治疗。症状性手术干预可以部分纠正上睑下垂并改善中度至重度受影响个体的吞咽。例如,环咽肌切开术目前是可用于在这些患者中改善吞咽的唯一可能的治疗。然而,这并不能纠正咽部肌肉组织的进行性退化,这通常会导致吞咽困难和窒息后死亡。

[0006] 因此,仍然需要治疗剂来治疗患有OPMD的患者和/或倾向于患有OPMD的患者。

### 发明内容

[0007] 本披露部分地基于诸位发明人的认识:目前不存在用于治疗OPMD的治疗剂。因此,本披露提供了靶向PABPN1mRNA转录物(其是导致OPMD的原因)区域的RNAi试剂。诸位发明人已经示出,这些RNAi试剂对于PABPN1mRNA转录物(包括会以其他方式被翻译成导致OPMD的突变PABPN1蛋白(即包含扩增的聚丙氨酸段的那些PABPN1蛋白)的转录物变体)的转录后抑制是有效的。例如,已经示出了本披露的示例性RNAi试剂在OPMD的体外和体内模型两者中抑制或降低PABPN1蛋白的表达。此外,本披露提供了用于表达具有mRNA转录物的野生型人PABPN1蛋白的试剂,该mRNA转录物不被本披露的RNAi试剂(下文称为“PABPN1替换试剂”)靶向。诸位发明人已经示出,当与本披露的RNAi试剂一起给予时,PABPN1替换试剂能够表达具有转录物的PABPN1蛋白,该转录物对RNAi试剂具有抗性并且是功能性的。诸位发明人的这些发现提供了可以在OPMD的治疗中具有治疗应用的试剂。

[0008] 因此,本披露提供了RNA,该RNA包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子

序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。优选地,效应子序列的长度小于30个核苷酸。例如,合适的效应子序列的长度可以在17-29个核苷酸的范围内。

[0009] 效应子序列可以包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的6个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列可以包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的5个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列可以包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的4个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的3个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的2个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列包含相对于SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列(该效应子序列与该序列基本上互补)的1个碱基对错配。在又一个实例中,效应子序列与SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列内的等同长度的区域100%互补。

[0010] 本披露的RNA可以是单链RNA分子。例如,单链RNA可以选自下组,该组由以下组成:

[0011] 包含效应子序列的RNA,该效应子序列与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:5中列出的序列形成双链体;

[0012] 包含效应子序列的RNA,该效应子序列与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:7中列出的序列形成双链体;和

[0013] 包含效应子序列的RNA,该效应子序列与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:9中列出的序列形成双链体。

[0014] 例如,单链RNA可以包含选自SEQ ID NO:4、6或8中列出的序列的效应子序列。

[0015] 在另一个实例中,RNA可以进一步包含效应子互补序列,该效应子互补序列与该效应子序列基本上互补。

[0016] 例如,本披露的RNA可以选自下组,该组由以下组成:

[0017] RNA,其包含(i)效应子序列(该效应子序列与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:5中列出的序列形成双链体)和(ii)效应子互补序列(该效应子互补序列包含与该效应子序列基本上互补的序列);

[0018] RNA,其包含(i)效应子序列(该效应子序列与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:7中列出的序列形成双链体)和(ii)效应子互补序列(该效应子互补序列包含与该效应子序列基本上互补的序列);和

[0019] RNA,其包含(i)效应子序列(该效应子序列与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配),前提条件是该效应子序列能够与SEQ ID NO:9中列出的序列形成双链体)和(ii)效应子互补序列(该效应子互补序列包含与该效应子序列基本

上互补的序列)。

[0020] 在另一个实例中,本披露的RNA可以选自下组,该组由以下组成:

[0021] RNA,其包含SEQ ID NO:4中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补的效应子互补序列;

[0022] RNA,其包含SEQ ID NO:6中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补的效应子互补序列;和

[0023] RNA,其包含SEQ ID NO:8中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补的效应子互补序列。

[0024] 例如,本披露的RNA的效应子互补序列可以包含相对于相应效应子序列的1、2、3、4、5或6个错配,前提条件是同源效应子序列和效应子互补序列能够形成双链体。

[0025] 在另一个实例中,本披露的RNA选自下组,该组由以下组成:

[0026] RNA,其包含SEQ ID NO:4中列出的效应子序列和SEQ ID NO:5中列出的效应子互补序列;

[0027] RNA,其包含SEQ ID NO:6中列出的效应子序列和SEQ ID NO:7中列出的效应子互补序列;和

[0028] RNA,其包含SEQ ID NO:8中列出的效应子序列和SEQ ID NO:9中列出的效应子互补序列。

[0029] 因此,应当理解,本披露的RNA可以以短干扰RNA (siRNA) 双链体或双链RNA (dsRNA) 的形式提供。

[0030] 可替代地,本披露的RNA可以以短发夹RNA (shRNA) 的形式提供。当作为shRNA提供时,本披露的RNA可以包含位于效应子序列和效应子互补序列之间的环序列。合适的环序列可以选自本领域已知的那些。例如,根据本披露的shRNA可以包含本文描述的效应子序列和效应子互补序列(其中茎环序列位于其间)的任何组合。

[0031] 在一个实例中,本披露的RNA选自下组,该组由以下组成:

[0032] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:10中列出的效应子序列、(ii) 与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补的效应子互补序列、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;

[0033] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:12中列出的效应子序列、(ii) 与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补的效应子互补序列、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;和

[0034] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:14中列出的效应子序列、(ii) 与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补的效应子互补序列、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列。

[0035] 在一个实例中,本披露的RNA选自下组,该组由以下组成:

[0036] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:10中列出的效应子序列、(ii) SEQ ID NO:11中列出的效应子互补序列、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;

[0037] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:12中列出的效应子序列、(ii) SEQ ID NO:13中列出的效应子互补序列、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;和

[0038] shRNA,其包含(i) SEQ ID NO:14中列出的效应子序列、(ii) SEQ ID NO:15中列出

的效应子互补序列、和 (iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列。

[0039] 例如,根据本披露的shRNA可以包含SEQ ID NO:16-21中的任一个中列出的序列。

[0040] 本领域技术人员将理解,根据本披露的RNA可以与用于治疗OPMD的其他治疗剂组合或联合使用。因此,本披露提供了与用于治疗OPMD的一种或多种其他药剂组合的、如本文描述的RNA。在一个实例中,提供了多种RNA,其包含:

[0041] (a) 至少一种如本文描述的RNA;和

[0042] (b) 至少一种选自以下的RNA:

[0043] (i) 如本文描述的RNA;或

[0044] (ii) 包含至少17个连续核苷酸的效应子序列的RNA,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的RNA转录物的区域基本上互补;

[0045] 其中(a)中的RNA和(b)中的RNA包含不同的效应子序列。

[0046] 在一个实例中,(b)中的RNA是如本文描述的RNA。

[0047] 在一个实例中,本披露的多种RNA包含选自以下的至少两种RNA:

[0048] (a) 第一RNA,其包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,如本文描述的;

[0049] (b) 第二RNA,其包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,如本文描述的;和

[0050] (c) 第三RNA,其包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,如本文描述的。

[0051] 在一个实例中,该多种RNA中的至少一种或每种是选自本文描述的ssRNA的ssRNA。例如,本披露的多种RNA可以包含选自下组的至少两种ssRNA,该组由以下组成:

[0052] (a) 第一RNA,其包含SEQ ID NO:4中列出的效应子序列;

[0053] (b) 第二RNA,其包含SEQ ID NO:6中列出的效应子序列;和

[0054] (c) 第三RNA,其包含SEQ ID NO:8中列出的效应子序列。

[0055] 在一个实例中,该多种RNA中的至少一种或每种是选自本文描述的dsRNA的dsRNA。例如,本披露的多种RNA可以包含选自下组的至少两种dsRNA,该组由以下组成:

[0056] (a) 第一RNA,其包含SEQ ID NO:4中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如,SEQ ID NO:5中列出的序列);

[0057] (b) 第二RNA,其包含SEQ ID NO:6中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如,SEQ ID NO:7中列出的序列);和

[0058] (c) 第三RNA,其包含SEQ ID NO:8中列出的效应子序列和与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如,SEQ ID NO:9中列出的序列)。

[0059] 在另一个实例中,本文描述的多种RNA中的至少一种或每种可以以shRNA的形式存在。如本文描述的,该多种中的每种shRNA将包含位于相应效应子序列和效应子互补序列之间的茎环序列,使得该shRNA形成单个连续序列。例如,本披露的多种shRNA可以包含选自下组的至少两种RNA,该组由以下组成:

[0060] (a) 第一RNA,其包含(i) SEQ ID NO:10中列出的效应子序列、(ii) 与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如SEQ ID NO:11中列出的序列)、和(iii) 位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;

[0061] (b) 第二RNA,其包含(i) SEQ ID NO:12中列出的效应子序列、(ii)与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如SEQ ID NO:13中列出的序列)、和(iii)位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列;和

[0062] (c) 第三RNA,其包含(i) SEQ ID NO:14中列出的效应子序列、(ii)与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补的效应子互补序列(例如SEQ ID NO:15中列出的序列)、和(iii)位于该效应子序列和该效应子互补序列之间的茎环序列。

[0063] 如本文描述的,本披露的多种RNA可以包含如本文描述的第一RNA和第二RNA。在另一个实例中,本披露的多种RNA包含如本文描述的第一RNA和第三RNA。在另一个实例中,本披露的多种RNA包含如本文描述的第二RNA和第三RNA。在又一个实例中,本披露的多种RNA包含如本文描述的第一RNA、第二RNA和第三RNA。

[0064] 根据本披露的多种RNA可以包含多达10种RNA,如两种RNA、或三种RNA、或四种RNA、或五种RNA、或六种RNA、或七种RNA、或八种RNA、或九种RNA、或十种RNA。在一个实例中,该多种RNA包含本文描述的RNA中的两种。在另一个实例中,该多种RNA包含本文描述的RNA中的三种。

[0065] 根据提供多种shRNA的本披露的一个实例,该多种包含以下或由以下组成:

[0066] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0067] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0068] 根据提供多种shRNA的本披露的一个实例,该多种包含以下或由以下组成:

[0069] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0070] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0071] 根据提供多种shRNA的本披露的一个实例,该多种包含以下或由以下组成:

[0072] (i) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0073] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0074] 根据提供多种shRNA的本披露的一个实例,该多种包含以下或由以下组成:

[0075] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;

[0076] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0077] (iii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0078] 在一个实例中,本文描述的多种RNA可以作为单个组合物一起提供。

[0079] 在一个实例中,本文描述的多种RNA可以作为多个组合物提供。例如,可以分别提供该多种中的每种RNA。可替代地,可以分别提供该多种中的至少一种RNA、以及在组合物中一起提供的该多种中的两种或更多种RNA。

[0080] 本披露的该或每种RNA可以是可以从核酸转录的DNA指导的RNA(ddRNA)。因此,本披露还提供了DNA指导的RNAi(ddRNAi)构建体,其包含核酸,该核酸包含编码本披露的RNA(例如,其中该RNA是如本文描述的shRNA)的DNA序列。

[0081] 编码shRNA的DNA序列可以包含编码位于效应子序列和效应子互补序列之间的环序列的DNA序列。例如,编码本披露的shRNA的DNA序列可以选自下组,该组由以下组成:SEQ ID NO:16-21中的任一个中列出的序列。在一个实例中,编码本披露的shRNA的DNA序列还可以包含3'末端的终止子序列。

[0082] 在另一个实例中,本披露提供了能够表达多种shRNA的ddRNAi构建体。例如,本披

露的ddRNAi构建体可以包含如下核酸,该核酸包含编码本披露的多种RNA(例如,其中每种RNA是如本文描述的shRNA)的一种或多种DNA序列。

[0083] 在一个实例中,ddRNAi构建体可以包含至少两种选自下组的核酸,该组由以下组成:

[0084] (a) 第一核酸,其包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:

[0085] (i) 包含与SEQ ID NO:1中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸的区域的效应子序列;和

[0086] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列;

[0087] (b) 第二核酸,其包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:

[0088] (i) 包含与SEQ ID NO:2中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸的区域的效应子序列;和

[0089] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列;和

[0090] (c) 第三核酸,其包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:

[0091] (i) 包含与SEQ ID NO:3中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸的区域的效应子序列;和

[0092] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列。

[0093] 在一个实例中,包含在第一核酸内的DNA序列编码shRNA序列,该shRNA序列包含SEQ ID NO:10中列出的效应子序列和SEQ ID NO:11中列出的效应子互补序列。

[0094] 在一个实例中,包含在第二核酸内的DNA序列编码shRNA序列,该shRNA序列包含SEQ ID NO:12中列出的效应子序列和SEQ ID NO:13中列出的效应子互补序列。

[0095] 在一个实例中,包含在第三核酸内的DNA序列编码shRNA序列,该shRNA序列包含SEQ ID NO:14中列出的效应子序列和SEQ ID NO:15中列出的效应子互补序列。

[0096] 包含编码如本文描述的shRNA的DNA序列的每个核酸可以包含编码位于同源效应子序列和效应子互补序列之间的环序列的DNA序列。

[0097] 在一个实例中,第一核酸包含编码SEQ ID NO:16或17中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0098] 在一个实例中,第二核酸包含编码SEQ ID NO:18或19中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0099] 在一个实例中,第三核酸包含编码SEQ ID NO:20或21中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0100] 本文描述的每个shRNA可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。

[0101] 每个核酸还可以在编码shRNA的DNA序列的3'末端包含终止子序列。

[0102] 在一个实例中,能够表达多种RNA的ddRNAi构建体包含本文描述的第一核酸和本文描述的第二核酸。在一个实例中,能够表达多种RNA的ddRNAi构建体包含本文描述的第一核酸和本文描述的第三核酸。在一个实例中,能够表达多种RNA的ddRNAi构建体包含本文描述的第二核酸和本文描述的第三核酸。在一个实例中,能够表达多种RNA的ddRNAi构建体包含本文描述的第一核酸、本文描述的第二核酸和本文描述的第三核酸。

[0103] 能够表达本披露的三种shRNA的示例性ddRNAi构建体包含:

- [0104] 第一核酸,其包含编码SEQ ID NO:16中列出的shRNA序列的DNA序列;
- [0105] 第二核酸,其包含编码18中列出的shRNA序列的DNA序列;和
- [0106] 第三核酸,其包含编码SEQ ID NO:20中列出的shRNA序列的DNA序列。
- [0107] 本文描述的每个shRNA可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。
- [0108] 在一个实例中,如本文描述的ddRNAi构建体包含单个启动子,该单个启动子与编码本披露的shRNA的该或每个核酸可操作地连接。
- [0109] 在另一个实例中,编码本披露的shRNA的每个核酸与单独的启动子可操作地连接。例如,该一种或多种启动子位于编码该一种或多种shRNA的一种或多种对应DNA序列的上游。在包含多个启动子的ddRNAi构建体中,这些启动子可以相同或不同。示例性启动子是RNA pol III启动子,像例如U6和H1启动子。
- [0110] 根据能够表达本披露的三种shRNA的ddRNAi构建体的实例,ddRNAi构建体可以包含:
- [0111] (a) 第一核酸上游的U6-1启动子,该第一核酸包含编码SEQ ID NO:16中列出的shRNA序列的DNA序列;
- [0112] (b) 第二核酸上游的U6-9启动子,该第二核酸包含编码SEQ ID NO:18中列出的shRNA序列的DNA序列;和
- [0113] (c) 第三核酸上游的H1启动子,该第三核酸包含编码SEQ ID NO:20中列出的shRNA序列的DNA序列。
- [0114] 在一个实例中,能够表达本披露的三种shRNA的ddRNAi构建体包含SEQ ID NO:22中列出的序列。在一个实例中,能够表达本披露的三种shRNA的ddRNAi构建体包含SEQ ID NO:23中列出的序列。
- [0115] 在又一个实例中,本披露提供了多种ddRNAi构建体,每种ddRNAi构建体能够表达本文描述的至少一种shRNA。该多种ddRNAi构建体可以包含选自下组的至少两种ddRNAi构建体,该组由以下组成:
- [0116] (a) 第一ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:
- [0117] (i) 包含与SEQ ID NO:1中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸区域的效应子序列;和
- [0118] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列;
- [0119] (b) 第二ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:
- [0120] (i) 包含与SEQ ID NO:2中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸区域的效应子序列;和
- [0121] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列;和
- [0122] (c) 第三ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码shRNA序列的DNA序列,该shRNA序列包含:
- [0123] (i) 包含与SEQ ID NO:3中列出的PABPN1序列基本上互补的至少17个连续核苷酸区域的效应子序列;和

[0124] (ii) 与该效应子序列基本上互补的效应子互补序列。

[0125] 在一个实例中,第一ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:10中列出的效应子序列和SEQ ID NO:11中列出的效应子互补序列的DNA序列。

[0126] 在一个实例中,第二ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:12中列出的效应子序列和SEQ ID NO:13中列出的效应子互补序列的DNA序列。

[0127] 在一个实例中,第三ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:14中列出的效应子序列和SEQ ID NO:15中列出的效应子互补序列的DNA序列。

[0128] 在该多种中的每种ddRNAi构建体中,编码对应shRNA的DNA序列可以包含编码位于对应效应子序列和效应子互补序列之间的环序列的DNA序列。

[0129] 在一个实例中,第一ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:16或17中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0130] 在一个实例中,第二ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:18或19中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0131] 在一个实例中,第三ddRNAi构建体包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:20或21中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0132] 在每个ddRNAi构建体中,该或每个核酸还可以在编码shRNA的DNA序列的3'末端包含终止子序列。

[0133] 从ddRNAi构建体表达的每种shRNA还可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。

[0134] 在一个实例中,该多种ddRNAi构建体包含本文描述的第一ddRNAi构建体和本文描述的第二ddRNAi构建体。在一个实例中,该多种ddRNAi构建体包含本文描述的第一ddRNAi构建体和本文描述的第三ddRNAi构建体。在一个实例中,该多种ddRNAi构建体包含本文描述的第二ddRNAi构建体和本文描述的第三ddRNAi构建体。在一个实例中,该多种ddRNAi构建体包含本文描述的第一ddRNAi构建体、本文描述的第二ddRNAi构建体和本文描述的第三ddRNAi构建体。

[0135] 示例性多种ddRNAi构建体包含:

[0136] 第一ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:16中列出的shRNA序列的DNA序列;

[0137] 第二ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:18中列出的shRNA序列的DNA序列;和

[0138] 第三ddRNAi构建体,其包含核酸,该核酸包含编码SEQ ID NO:20中列出的shRNA序列的DNA序列。

[0139] 该多种ddRNAi构建体中的每种ddRNAi构建体可以包含与编码本披露的shRNA的该或每个核酸可操作地连接的启动子。

[0140] 根据其中多种中的ddRNAi构建体中的一种或多种能够表达多于一种shRNA的实例,编码shRNA的每种核酸可以与单独的启动子可操作地连接。例如,该一种或多种启动子位于编码该一种或多种shRNA的一种或多种对应DNA序列的上游。在包含多个启动子的ddRNAi构建体中,这些启动子可以相同或不同。示例性启动子是RNA pol III启动子,像例如U6和H1启动子。

[0141] 如本文描述的该或每种ddRNAi构建体可以包含在表达载体内。

[0142] 根据其中存在多种ddRNAi构建体的实例,可以提供包含ddRNAi的多种表达载体。在一个实例中,该多个表达载体中的一个或多个包含如本文披露的ddRNAi构建体。在另一个实例中,该多种中的每种ddRNAi构建体包含在单独的表达载体内。在本段落中的任何前述方式中,多种表达载体可以共同表达根据本披露的多种shRNA。

[0143] 本披露还提供了包含如本文描述的ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体和/或多种表达载体的组合物。在一个实例中,组合物还可以包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0144] 在一个实例中,本披露的组合物进一步包含编码具有mRNA转录物的功能性PABPN1蛋白的核酸,该mRNA转录物不被由组合物中的一种或多种ddRNAi构建体编码的该或每个shRNA靶向。例如,功能性PABPN1蛋白是野生型人PABPN1蛋白,例如,具有SEQ ID NO:25中列出的序列。

[0145] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸经密码子优化,使得其从中转录的mRNA不被由组合物中的一种或多种ddRNAi构建体编码的该或每个shRNA靶向。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含SEQ ID NO:24中列出的序列。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸还可以在5'末端包含kozak序列。

[0146] 编码如本文披露的功能性PABPN1蛋白的核酸将包含在表达载体内。

[0147] 根据其中该或每个ddRNAi构建体包含在单个表达载体内的实例,该一种或多种ddRNAi构建体和编码功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在相同的表达载体内。可替代地,该一种或多种ddRNAi构建体和编码功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在不同的表达载体内。

[0148] 根据其中本披露的多种ddRNAi构建体包含在多种表达载体内的实例,每种ddRNAi构建体可以包含在不同的表达载体内,并且编码功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在包含ddRNAi构建体的表达载体内的至少一个内。

[0149] 在一个实例中,该或每种表达载体是质粒或微环。

[0150] 在一个实例中,该质粒或微环或表达载体或ddRNAi构建体或每种质粒或微环或表达载体或ddRNAi构建体与阳离子DNA结合聚合物(例如聚乙烯亚胺)复合。

[0151] 在另一个实例中,该或每种表达载体是病毒载体。例如,病毒载体选自下组,该组由以下组成:腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体(AdV)和慢病毒(LV)载体。

[0152] 本披露还提供了编码具有mRNA转录物的功能性PABPN1蛋白的核酸,该mRNA转录物不被本文描述为靶向PABPN1蛋白的野生型mRNA转录物的一种或多种RNA(例如shRNA)靶向。在一个实例中,由本披露的核酸编码的功能性PABPN1蛋白可以具有与野生型人PABPN1蛋白(例如,具有SEQ ID NO:25中列出的序列)相同的氨基酸序列。编码功能性PABPN1蛋白的本披露的核酸可以是密码子优化的,使得其从中转录的mRNA不被本文描述为靶向PABPN1蛋白的野生型mRNA转录物的一种或多种RNA(例如shRNA)靶向。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含SEQ ID NO:24中列出的序列。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸还可以在5'末端包含kozak序列。编码如本文披露的功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在表达载体内。表达载体可以是如上文在本披露的ddRNAi构建体的上下文中描述的

任何表达载体。还如上文描述的,包含编码功能性PABPN1蛋白的核酸的表达载体还可以包含本披露的一种或多种ddRNAi构建体。

[0153] 编码本披露的功能性PABPN1蛋白的核酸可用于与以下进行组合或在已经接受了用以下进行治疗的受试者中来治疗OPMD:本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物。

[0154] 本披露还提供了在受试者中抑制PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的表达的方法,该方法包括向受试者给予本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物。

[0155] 本披露还提供了在患有OPMD的受试者中治疗OPMD的方法,该方法包括向受试者给予本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体、和/或组合物。治疗OPMD的方法可以进一步包括向受试者给予编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的核酸。

[0156] 本披露还提供了在患有OPMD的受试者中治疗OPMD的方法,该方法包括向受试者给予编码本披露的功能性PABPN1蛋白的核酸,其中先前已经向该受试者给予本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物。本披露还提供了在患有OPMD的受试者中治疗OPMD的方法,该方法包括向该受试者给予:

[0157] (a) 一种或多种用于抑制PABPN1蛋白的表达的药剂,该PABPN1蛋白是导致OPMD的原因,所述一种或多种药剂选自:(i) 本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物;和

[0158] (b) 包含核酸的表达载体,该核酸编码具有不被(a)中的药剂靶向的mRNA转录物的功能性PABPN1蛋白。

[0159] 在一个实例中,功能性PABPN1蛋白包含野生型人PABPN1蛋白的氨基酸序列,例如具有SEQ ID NO:25中列出的序列。

[0160] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸经密码子优化,使得其从中转录的mRNA不被经由RNAi起作用的(a)中的药剂靶向。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含SEQ ID NO:24中列出的序列。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸还可以在5'末端包含kozak序列。

[0161] 在一个实例中,将(a)中的一种或多种药剂和(b)中的表达载体一起给予至受试者。在一个实例中,将(a)中的一种或多种药剂和(b)中的表达载体分别地但同时地给予至受试者。在一个实例中,将(a)中的一种或多种药剂和(b)中的表达载体连续地给予至受试者。

[0162] 本披露还提供了一种试剂盒,该试剂盒包含:

[0163] (a) 一种或多种用于抑制PABPN1蛋白的表达的药剂,该PABPN1蛋白是导致OPMD的原因,所述一种或多种药剂选自:(i) 本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物;和

[0164] (b) 包含核酸的表达载体,该核酸编码具有不被(a)中的药剂靶向的mRNA转录物的功能性PABPN1蛋白。

[0165] 在一个实例中,功能性PABPN1蛋白是野生型人PABPN1蛋白,例如,具有SEQ ID NO:25中列出的序列。

[0166] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸经密码子优化,使得其从中转录的mRNA不被经由RNAi起作用的(a)中的药剂靶向。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含SEQ ID NO:24中列出的序列。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸还可以在5'末端包含kozak序列。

[0167] 在一个实例中,该试剂盒进一步包含用于本披露的方法的说明书。

[0168] 本披露还提供了本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物在制备用于在受试者中治疗或预防OPMD的药物中的用途。

[0169] 本披露还提供了编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的核酸在制备用于在受试者中治疗或预防OPMD的药物中的用途。根据该实例的OPMD的治疗可以包括与经由RNAi起作用的药剂(选自本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多个表达载体和/或组合物)组合来向受试者给予药物,其中编码功能性PABPN1蛋白的核酸具有mRNA转录物,该mRNA转录物不被经由RNAi起作用的药剂靶向。根据另一个实例,OPMD的治疗可以包括将药物给予至已经被给予经由RNAi起作用的药剂(选自本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多个表达载体和/或组合物)的受试者,其中编码功能性PABPN1蛋白的核酸具有mRNA转录物,该mRNA转录物不被经由RNAi起作用的药剂靶向。

[0170] 本披露还提供了包含编码功能性PABPN1蛋白的核酸的表达载体在制备用于在受试者中治疗或预防OPMD的药物中的用途,其中该药物包含经由RNAi起作用的药剂(其选自本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多个表达载体和/或组合物),并且其中功能性PABPN1蛋白具有不被药剂靶向的mRNA转录物。

[0171] 在一个实例中,功能性PABPN1蛋白具有野生型人PABPN1蛋白的氨基酸序列,例如具有SEQ ID NO:25中列出的序列。

[0172] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸经密码子优化,使得其从中转录的mRNA不被药剂靶向。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸包含SEQ ID NO:24中列出的序列。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸还可以在5'末端包含kozak序列。

[0173] 在每个前述实例中,待治疗的受试者可能患有OPMD或可能遗传倾向于患有OPMD。

[0174] 本披露还提供用于疗法的本文描述的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体、组合物和/或试剂盒。例如,RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体、组合物和/或试剂盒可用于在受试者中和/或在本文披露的方法中治疗OPMD。

[0175] 本披露还提供了用于疗法的、编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的核酸。例如,编码功能性PABPN1蛋白的核酸可用于在受试者中和/或在本文披露的方法中治疗OPMD。

[0176] 根据本文描述的任何实例的OPMD的治疗可以包括在受试者中降低或抑制导致OPMD的PABPN1蛋白(即具有扩增的聚丙氨酸段的PABPN1蛋白)的表达中的一种或多种。可替代地或另外地,根据本文描述的任何实例的OPMD的治疗可以包含使用编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的核酸替换受试者中的PABPN1蛋白。例如,替换PABPN1蛋白可以包含野生型PABPN1蛋白的氨基酸序列。在一个实例中,治疗将在受试者中降低或抑制PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的表达,并替换具有正常长度的聚丙氨酸残基的功能性PABPN1蛋白。

## 附图说明

[0177] 图1示出了用候选dsRNA序列(dsRNA1、dsRNA2和dsRNA3)转染后,健康(LHCNM2)或受OPMD影响(KMOP6/4)的人成肌细胞中的人PABPN1的表达水平。

[0178] 图2显示了用表达针对PABPN1mRNA的一种或多种单个和三顺反子shRNA的AAV质粒转染后,HEK293T细胞中的PABPN1敲低效率。相对于GAPDH表达来对PABPN1表达进行表达(\* $p < 0.05$ ,\*\*\* $p < 0.005$ )。

[0179] 图3(A)是蛋白质印迹法,示出了相对于用(A) pAAV-HBVpol、(B) pAAV-shRNAx3-长、(C) pAAV mut-PABPN1-FLAG、或(D) pAAV Opt-hPABPN1-MYC转染的HEK293T细胞中表达的GAPDH蛋白,PABPN1蛋白的水平。

[0180] 图3(B)从左到右显示了(i)未转染的HEK293T细胞、(ii)用pAAV-HBVpol转染的HEK293T细胞、(iii)用pAAV-shRNA5转染的HEK293T细胞、(iv)用pAAV-shRNA5和pAAV mut-PABPN1-FLAG转染的HEK293T细胞、(v)用pAAV-shRNA5和pAAV Opt-hPABPN1-MYC转染的HEK293T细胞、(vi)用pAAV-shRNAx3-短转染的HEK293T细胞、(vii)用pAAV-shRNAx3-短和pAAV mut-PABPN1-FLAG转染的HEK293T细胞、(viii)用pAAV-shRNAx3-短和pAAV Opt-hPABPN1-MYC转染的HEK293T细胞、(ix)用pAAV-shRNAx3-长转染的HEK293T细胞、(x)用pAAV-shRNAx3-长和pAAV mut-PABPN1-FLAG转染的HEK293T细胞、以及(xi)用pAAV-shRNAx3-长和pAAV Opt-hPABPN1-MYC转染的HEK293T细胞中,归一化为未转染的HEK293T细胞中的PABPN1表达的平均PABPN1表达(\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.005$ )。

[0181] 图3(C)是蛋白质印迹法,示出了相对于从左到右用(i) pAAV-HBVpol、(ii) pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV-HBVpol、(iii) pAAV Opt-hPABPN1-MYC和pAAV-HBVpol、(iv) pAAV-shRNAx3-长、(v) pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV-shRNAx3-长、或(vi) pAAV Opt-hPABPN1-MYC和pAAV-shRNAx3-长转染的HEK293T细胞中表达的GAPDH蛋白的Myc标记的PABPN1蛋白的水平。

[0182] 图4(A)是蛋白质印迹法,示出了对照H2kB-D7e细胞,和用(A) pAAV-HBVpol、(B) pAAV-shRNAx3-长、或(C) pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV-shRNAx3-长转染的H2kB-D7e细胞中,相对于GAPDH蛋白的PABPN1蛋白的水平。

[0183] 图4(B)是蛋白质印迹法,示出了用(B) pAAV-shRNAx3-长、(D) pAAV Opt-hPABPN1-MYC和pAAV-shRNAx3-长、(A) pAAV-HBVpol、或(C) pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV-shRNAx3-长转染的H2kB-D7e细胞中,相对于GAPDH蛋白的Myc标记的PABPN1蛋白的水平。

[0184] 图4(C)显示了用(i) pAAV Opt-hPABPN1-MYC、(ii) pAAV-HBVpol、(iii) pAAV-shRNAx3-长、以及(iv) pAAV-shRNAx3-长和pAAV Opt-hPABPN1-MYC转染的H2kB-D7e细胞中,相对于GAPDH表达,Myc标记的、经密码子优化的PABPN1表达的平均水平(表示为百分比)。

[0185] 图4(D)是蛋白质印迹法,示出了用(A) pAAV-HBVpol、(C) pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV-shRNAx3-长、(B) pAAV-shRNAx3-长、或(D) pAAV Opt-hPABPN1-MYC和pAAV-shRNAx3-长转染的H2kB-D7e细胞中,相对于GAPDH蛋白的FLAG标记的突变体PABPN1蛋白(包含扩增的聚丙烯酰胺段)的水平。

[0186] 图4(E)显示了从左到右用(A) pAAV-HBVpol、(B) pAAV-shRNAx3-长、(C) pAAV-shRNAx3-长、或(D) pAAV-shRNAx3-长和pAAV-shRNAx3-长转染的H2kB-D7e细胞中,相对于GAPDH表达的FLAG标记的突变体PABPN1蛋白(包含扩增的聚丙烯酰胺段)的平均水平(表示为

百分比)。

[0187] 图5示出了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的(A)重量、(B)比力、和(C)等长最大力。在注射后18周进行所有肌肉测量。

[0188] 图6(A)是蛋白质印迹法,示出了来自(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17的胫骨前肌(TA)中,相对于黏着斑蛋白表达的PABPN1蛋白表达的平均水平。

[0189] 图6(B)显示了如通过图6(A)的蛋白质印迹法的密度分析所确定的,来自(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17的胫骨前肌(TA)中,PABPN1蛋白表达的水平。

[0190] 图6(C)是蛋白质印迹法,示出了来自(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17的胫骨前肌(TA)中,相对于黏着斑蛋白表达的MYC蛋白表达的平均水平。该蛋白质印迹法显示了在单独用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC或将其与scAAV8-shRNAx3-长组合来处理的所有肌肉中检测到myc-表位。箭头示出了在正确分子量下检测到的条带。

[0191] 图6(D)显示了如通过图6(C)的蛋白质印迹法的密度分析所确定的,单独用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC或将其与scAAV8-shRNAx3-长组合来注射后18周,从A17小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉中检测到的Myc标记的水平。该图示出了在用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC两者注射的肌肉中共表达时,scAAV8-shRNAx3-长不影响optPABPN1蛋白量。

[0192] 图7A示出了来自(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17的胫骨前肌(TA)的切片中,PABPN1的免疫荧光组织化学和层粘连蛋白检测。将切片用1M KCl预处理以从组织中弃去所有可溶性PABPN1。在scAAV8-shRNAx3-长治疗的肌肉中,PABPN1阳性核内内含物(INI)的数量显著降低。注射后18周取所有肌肉切片。

[0193] 图7B示出了来自(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水处理的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17的胫骨前肌(TA)的切片中,含有INI的核的水平(表示为百分比)。该图显示了与注射盐水的A17肌肉相比,用scAAV8-shRNAx3-长、或scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC两者的治疗分别将INI的量降低至约10%和5%(CNF=35%)(用Bonferroni事后测试(post-doc test)的单向Anova测试,\*\*\*p<0.001)。

[0194] 图8A示出了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水注射的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的苏木精

和伊红 (H&E) 染色的切片的图像。这些图像示出了A17肌肉中内源性PABPN1的消耗增加了中心有核的纤维的量,而共注射ssAAV9-opt hPABPN1-MYC保留了具有中央核的纤维的量达到在注射盐水的A17肌肉中观察到的相同水平,这表明密码子优化的hPABPN1的共表达预防肌肉变性。注射后18周取所有肌肉切片。

[0195] 图8B提供了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水注射的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的切片中胶原蛋白VI的免疫染色的代表性图像。注射后18周取所有肌肉切片。

[0196] 图8C示出了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水注射的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的切片的中心有核的(CN)纤维百分比。注射后18周取所有肌肉切片。

[0197] 图8D显示了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水注射的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的切片中,胶原蛋白VI阳性区域的百分比。该图示出了用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的肌肉中纤维化的显著降低。

[0198] 图8E显示了每组的平均肌纤维尺寸,并且示出了单独用ssAAV9-opt hPABPN1-MYC或将其与scAAV8-shRNAx3-长组合来处理的肌肉的肌纤维比用盐水处理的肌肉的肌纤维更大(平均值 $\pm$ SEM  $n=5-8$ ,用Bonferroni事后测试(post-doc test)的单向Anova测试,或卡方分析 $*p<0.05$ , $***p<0.001$ ,ns:无显著性)

[0199] 图8F示出了从(i)用盐水处理的A17小鼠、(ii)用盐水注射的FvB小鼠、(iii)用scAAV8-shRNAx3-长处理的A17、(iv)用ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17,以及(v)用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC处理的A17切离的胫骨前肌(TA)的肌纤维横截面积(CSA)切片的分布。通过卡方分析对不同组的比较表明,与仅给予盐水的动物相比,单独用scAAV8-shRNAx3-长和将其与ssAAV9 Opt-hPABPN1-MYC组合来处理的肌肉的肌纤维分布的改变。

[0200] 序列表说明

[0201] SEQ ID NO:1:对应于PABPN1蛋白的mRNA转录物中的区域(指定为PABPN1mRNA区域1)的RNA序列。

[0202] SEQ ID NO:2:对应于PABPN1蛋白的mRNA转录物中的区域(指定为PABPN1mRNA区域2)的RNA序列。

[0203] SEQ ID NO:3:对应于PABPN1蛋白的mRNA转录物中的区域(指定为PABPN1mRNA区域3)的RNA序列。

[0204] SEQ ID NO:4:分别指定为ssRNA1和dsRNA1的ssRNA和dsRNA的RNA效应子序列。

[0205] SEQ ID NO:5:指定为dsRNA1的dsRNA的RNA效应子互补序列。

[0206] SEQ ID NO:6:分别指定为ssRNA2和dsRNA2的ssRNA和dsRNA的RNA效应子序列。

[0207] SEQ ID NO:7:指定为dsRNA2的dsRNA的RNA效应子互补序列。

[0208] SEQ ID NO:8:分别指定为ssRNA3和dsRNA3的ssRNA和dsRNA的RNA效应子序列。

- [0209] SEQ ID NO:9:指定为dsRNA3的dsRNA的RNA效应子互补序列。
- [0210] SEQ ID NO:10:指定为shRNA1和shRNA2的shRNA的RNA效应子序列。
- [0211] SEQ ID NO:11:指定为shRNA1和shRNA2的shRNA的RNA效应子互补序列。
- [0212] SEQ ID NO:12:指定为shRNA3和shRNA4的shRNA的RNA效应子序列。
- [0213] SEQ ID NO:13:指定为shRNA3和shRNA4的shRNA的RNA效应子互补序列。
- [0214] SEQ ID NO:14:指定为shRNA5和shRNA6的shRNA的RNA效应子序列。
- [0215] SEQ ID NO:15:指定为shRNA5和shRNA6的shRNA的RNA效应子互补序列。
- [0216] SEQ ID NO:16:指定为shRNA1的shRNA的RNA序列。
- [0217] SEQ ID NO:17:指定为shRNA2的shRNA的RNA序列。
- [0218] SEQ ID NO:18:指定为shRNA3的shRNA的RNA序列。
- [0219] SEQ ID NO:19:指定为shRNA4的shRNA的RNA序列。
- [0220] SEQ ID NO:20:指定为shRNA5的shRNA的RNA序列。
- [0221] SEQ ID NO:21:指定为shRNA6的shRNA的RNA序列。
- [0222] SEQ ID NO:22:OPMD Triple构建体短的DNA序列。
- [0223] SEQ ID NO:23:OPMD Triple构建体长的DNA序列。
- [0224] SEQ ID NO:24:人密码子优化的PABPN1cDNA序列的DNA序列。
- [0225] SEQ ID NO:25:密码子优化的人PABPN1蛋白的氨基酸序列。
- [0226] SEQ ID NO:26:人密码子优化的PABPN1cDNA序列的DNA序列(具有Myc标签)。
- [0227] SEQ ID NO:27:密码子优化的人PABPN1蛋白的氨基酸序列(具有Myc标签)。
- [0228] SEQ ID NO:28:突变体人PABPN1蛋白的cDNA序列(具有FLAG标签)。
- [0229] SEQ ID NO:29:突变体人PABPN1蛋白的氨基酸序列(具有FLAG标签)。

## 具体实施方式

### [0230] 概况

[0231] 贯穿本说明书,除非另外特别说明或上下文另外需要,否则提及单个步骤、特征、物质组合物、步骤的群组或特征的群组或物质组合物的群组应被视为涵盖这些步骤、特征、物质组合物、步骤的群组或特征的群组或物质组合物的群组中的一个和多个(即一种或多种)。

[0232] 本领域的技术人员将理解,本披露易受不同于具体所述的变化和修改的那些变化和修改的影响。应理解,本披露包括所有此类变化和修改。本披露还包括在本说明书中参考的或指出的所有的步骤、特征、组合物和化合物,单独地或共同地,以及任何或所有所述步骤或特征中的任何两个或多个的组合。

[0233] 本披露不限于本文描述的具体实例的范围,这些实例旨在仅用于举例说明的目的。功能等同的产品、组合物和方法显然在本披露的范围内。

[0234] 除非另外特别说明,否则本披露的任何实例在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的任何其他示例。

[0235] 除非另外特别说明,否则本文使用的所有技术和科学术语应被视为具有与本领域(例如,在细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学)普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0236] 除非另有说明,否则本披露中使用的重组DNA、重组蛋白、细胞培养物和免疫学技术是本领域技术人员熟知的标准程序。此类技术在如下来源的文献中被描述和解释:如J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning[分子克隆实用指南],John Wiley and Sons[约翰威立父子公司](1984),J.Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社](1989),T.A.Brown(编辑),Essential Molecular Biology:A Practical Approach[基本分子生物学:一种实用方法],第1卷和第2卷,IRL Press[IRL出版社](1991),D.M.Glover和B.D.Hames(编辑),DNA Cloning:A Practical Approach[DNA克隆:一种实用方法],第1-4卷,IRL Press[IRL出版社](1995和1996),以及F.M.Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience[格林尼出版公司和威利国际科学](1988,包括所有直到现在的更新),Ed Harlow和David Lane(编辑)Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室],(1988),以及J.E.Coligan等人(编辑)Current Protocols in Immunology[免疫学现代方法],John Wiley&Sons[约翰威立父子公司](包括所有直到现在的更新)。

[0237] 贯穿本说明书,除非上下文另外需要,否则“包括(comprise)”一词或其变化形式(如“包含”或“含有”)应被理解为意指包括所陈述的步骤或要素或完整的事物、或者多个步骤或多个要素或多个完整的事物的群组,但不排除任何其他步骤或要素或完整的事物、或者多个要素或多个完整的事物的群组。

[0238] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应被视为对两种含义或任一含义提供明确的支持。

#### [0239] 所选择的定义

[0240] “RNA”意指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”意指在 $\beta$ -D-核糖-呋喃糖部分的2'位置处具有羟基的核苷酸。这些术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA、以及改变的RNA(通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的RNA不同)。此类改变可以包括如向RNA的一个末端或两个末端或在内部(如在RNA的一种或多种核苷酸处)添加非核苷酸材料。本披露的RNA分子中的核苷酸还可以包含非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以被称为天然存在的RNA的类似物。

[0241] 如本文使用的,术语“RNAi试剂”是指能够引发“RNA干扰”或“RNAi”的RNA。

[0242] 术语“RNA干扰”或“RNAi”通常是指由细胞的细胞质中的双链RNA(dsRNA)分子和单链短干扰RNA(ss-siRNA)分子引发的基因表达的RNA依赖性沉默。dsRNA分子或ss-siRNA分子降低或抑制靶核酸序列的转录产物,从而使基因沉默。

[0243] 如本文使用的,术语“双链RNA”或“dsRNA”是指具有双链体结构并且包含效应子序列和效应子互补序列(其彼此具有相似的长度)的RNA分子。效应子序列和效应子互补序列可以在单个RNA链中或在单独的RNA链中。“效应子序列”(通常称为“引导链”)基本上与靶序列互补,在本情况下,该靶序列是PABPN1mRNA转录物的区域。“效应子序列”也可以指“反义序列”。“效应子互补序列”将与效应子序列充分互补,使得它可以退火至效应子序列形成双链体。在这方面,效应子互补序列将与靶序列的区域基本上同源。如对于技术人员而言显而

易见的是,术语“效应子互补序列”也可以称为“效应子序列的互补序列”或有义序列或过客链序列。

[0244] 如本文使用的,术语“双链体”是指彼此形成碱基对(通过Watson-Crick碱基配对或允许在互补或基本互补的核苷酸序列之间稳定化的双链体的任何其他方式)的在两个互补或基本上互补的核酸(例如RNA)中的、或在单链核酸(例如RNA)的两个互补或基本上互补的区域中的区域。本领域技术人员将理解,在双链体区域内,不需要100%的互补性;基本互补性是允许的。基本互补性可以包括69%或更高的互补性。例如,由19个碱基对组成的双链体区域中的单个错配(即,18个碱基对和一个错配)导致94.7%的互补性,这使得双链体区域基本上互补。在另一个实例中,由19个碱基对组成的双链体区域中的两个错配(即,17个碱基对和两个错配)导致89.5%的互补性,这使得双链体区域基本上互补。在又一个实例中,由19个碱基对组成的双链体区域中的三个错配(即,16个碱基对和3个错配)导致84.2%的互补性,这使得双链体区域基本上互补等。

[0245] dsRNA可以作为发夹或茎环结构提供,其具有由效应子序列和效应子互补序列组成的双链体区域,该效应子序列和效应子互补序列通过称为茎环的至少2个核苷酸序列连接。当dsRNA作为发夹或茎环结构提供时,它可以被称为“发夹RNA”或“短发夹RNAi药剂”或“shRNA”。提供发夹或茎环结构或产生发夹或茎环结构的其他dsRNA分子包括初始miRNA转录物(初miRNA(pri-miRNA))和前体微小RNA(前miRNA(pre-miRNA))。前miRNA shRNA可以通过酶Drosha和Pasha(其识别并释放形成茎-环结构的初始miRNA转录物的区域)的作用从初miRNA天然产生。可替代地,可以将初miRNA转录物工程化以用人工/重组茎-环结构代替天然的茎-环结构。在这种情况下,Drosha和Pasha识别并释放人工shRNA。使用该方法产生的dsRNA分子称为“shmiRNA”、“shmiR”或“微小RNA框架shRNA”。

[0246] 如本文使用的,术语“单链短干扰RNA”、“ss-siRNA”、“单链RNA”、“ssRNA”或类似物是指具有单链结构并包含效应子序列的RNA分子。如本文针对dsRNA分子所述,“效应子序列”(通常称为“反义序列”或“引导链”)基本上与靶序列互补,在本情况下,靶序列是PABPN1mRNA转录物的区域。然而,与具有双链体结构的RNAi试剂不同,ssRNA不包含效应子互补序列。

[0247] 如本文使用的,关于序列的术语“互补”是指通过Watson-Crick碱基配对的序列的互补,由此鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对,并且腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)或胸腺嘧啶(T)配对。序列可以与另一序列的整个长度互补,或者它可以与另一序列的特定部分或长度互补。本领域技术人员将认识到U可以存在于RNA中,并且T可以存在于DNA中。因此,RNA或DNA序列中的A可以与RNA序列中的U或DNA序列中的T配对。

[0248] 如本文使用的,术语“基本上互补”用于表示足够程度的互补性或精确配对,使得稳定和特异性结合发生在核酸序列之间,例如效应子序列和效应子互补序列之间、或效应子序列和靶序列之间。应理解,核酸的序列不需要与其靶序列或互补序列100%互补。该术语涵盖与另一个序列互补(突出端除外)的序列。在一些情况下,序列与其他序列互补(1-2个错配除外)。在一些情况下,序列是互补的,除了1个错配。在一些情况下,序列是互补的,除了2个错配。在一些情况下,序列是互补的,除了3个错配。在又其他情况下,序列是互补的,除了4个错配。

[0249] 如在本披露的RNA的上下文中使用的,术语“编码的”或“编码”应理解为意指RNA能

够从DNA模板转录。因此,编码(encode或code for)本披露的RNA的核酸将包含用作对应RNA的转录模板的DNA序列。

[0250] 术语“DNA指导的RNAi构建体”或“ddRNAi构建体”是指包含DNA序列的核酸,当在转录时该序列产生引发RNAi的RNA分子。ddRNAi构建体可以包含转录为单个RNA(其能够自退火成发夹结构(具有通过至少2个核苷酸的茎环(即shRNA)连接的双链体区域),或转录为单个RNA(具有多个shRNA)或转录为多个RNA转录物(每个都能够分别作为单个shRNA折叠))的核酸。ddRNAi构建体可以在表达载体中,即“ddRNAi表达构建体”,例如与启动子可操作地连接。

[0251] 如本文使用的,术语“可操作地连接的”或“可操作的连接”(或类似物)意指编码核酸序列以促进编码序列的表达的方式与调节序列(例如启动子)连接或结合。调节序列包含启动子、增强子、以及本领域公认的并选择来指导编码序列的表达其他表达控制元件。

[0252] “载体”应理解为意指用于将核酸引入细胞的运载体。载体包括但不限于质粒、噬菌粒、病毒、细菌、以及衍生自病毒或细菌来源的运载体。“质粒”是环状双链DNA分子。根据本披露使用的有用类型的载体是病毒载体,其中将异源DNA序列插入病毒基因组中,该病毒基因组可被修饰以缺失一个或多个病毒基因或其部分。某些载体能够在宿主细胞中自主复制(例如具有在宿主细胞中起作用的复制起点的载体)。其他载体可以稳定地整合到宿主细胞的基因组中,并且从而与宿主基因组一起复制。其他载体在染色体外状态下持续存在而不整合到宿主细胞的基因组中。如本文使用的,术语“表达载体”应理解为意指能够表达本披露的RNA分子的载体。

[0253] “功能性PABPN1蛋白”应理解为意指具有野生型PABPN1蛋白的功能特性(例如在哺乳动物细胞中控制mRNA多聚腺苷酸化和/或内含子剪接位点的能力)的PABPN1蛋白。因此,“功能性PABPN1蛋白”将被理解为在表达或存在于受试者中时不是导致OPMD的原因的PABPN1蛋白。在一个实例中,本文提及的“功能性PABPN1蛋白”是指人野生型PABPN1蛋白。人野生型PABPN1蛋白的序列在NCBI RefSeq NP\_004634中列出。因此,功能性人PABPN1蛋白可以具有NCBI RefSeq NP\_004634中列出的人PABPN1蛋白的体内功能特性。

[0254] 如本文使用的,术语“治疗(“treating”、“treat”或“treatment”)”及其变体是指被设计为改变临床病理学过程中所治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。所希望的治疗效果包括降低疾病进展速率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。因此,OPMD的治疗包括在受试者中降低或抑制PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的表达和/或在受试者中表达具有正常长度的聚丙氨酸残基的PABPN1蛋白。优选地,OPMD的治疗包括在受试者中降低或抑制PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的表达和在受试者中表达具有正常长度的聚丙氨酸残基的PABPN1蛋白。例如,如果实现一种或多种上述治疗结果,则个体被成功“治疗”。

[0255] “治疗有效量”至少是在受试者中实现OPMD病症的可测量改善(如OPMD的一种或多种症状的可测量的改善,例如包括但不限于的上睑下垂、膈肌和肌无力)所需的最小浓度或量。本文的治疗有效量可以根据如疾病状态、年龄、性别和患者的体重等因素以及RNA、ddRNAi或表达构建体在个体中引发所希望的反应的能力和/或表达载体在受试者中表达功能性PABPN1蛋白的能力。治疗有效量也是其中RNA、ddRNAi构建体或表达载体的治疗有益作用超过RNA、ddRNAi构建体或表达载体的任何毒性或有害作用以在受试者中抑制、压制或降

低PABPN1蛋白(导致OPMD的原因)(单独考虑或与功能性PABPN1蛋白的表达的治疗有益作用组合)的表达的量。

[0256] 如本文使用的,“受试者”或“患者”可以是患有OPMD或遗传倾向于患有OPMD(即具有PABPN1基因变体,该基因变体是导致OPMD的原因)的人或非人动物。“非人动物”可以是灵长类动物、牲畜(例如绵羊、马、牛、猪、驴)、伴侣动物(如狗和猫等宠物)、实验室测试动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠、果蝇、秀丽隐杆线虫、斑马鱼)、表现动物(例如比赛用马、骆驼、灵)或圈养野生动物。在一个实例中,受试者或患者是哺乳动物。在一个实例中,受试者或患者是人。

[0257] 术语“降低的表达”、“表达降低”或类似物是指来自靶基因(例如PABPN1基因)的蛋白质和/或mRNA产物水平的缺失或可观察到的减少。减少不一定是绝对的,但可以是部分减少足以使由于本披露的RNA影响的RNAi导致可检测或可观察到的改变。该减少可以通过确定来自靶核酸的mRNA和/或蛋白质产物的水平相对于缺乏RNA、ddRNAi构建体或表达载体的细胞的减少来测量,并且可以低至1%、5%或10%,或可以是绝对的,即100%抑制。该减少的影响可以通过检查细胞或生物体的外向特性(即定量和/或定性表型)来确定,并且还可以包括在给予本披露的RNA、ddRNAi构建体或表达载体后检测细胞或生物体中expPABPN1的核聚集体的存在或量变化。

#### [0258] RNAi的药剂

[0259] 在一个实例中,本披露提供了RNA(即能够引发RNAi),其中该RNA包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。优选地,本披露的RNA将包含长度小于30个核苷酸的效应子序列。例如,合适的效应子序列的长度可以在17-29个核苷酸的范围内。

[0260] 在一个实例中,效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1中列出。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的6个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的5个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的4个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的3个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的2个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的1个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:1中列出的序列100%互补。

[0261] 在一个实例中,效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:2中列出。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的6个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的5个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的4个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的3个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其

的2个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的1个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:2中列出的序列100%互补。

[0262] 在一个实例中,效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:3中列出。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的6个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的5个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的4个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的3个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的2个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补,并且含有相对于其的1个错配碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:3中列出的序列100%互补。

[0263] 在一个实例中,本披露的RNA是单链RNA(ssRNA)。

[0264] 根据本披露的ssRNA可以包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。例如,本披露的ssRNA可以包含效应子序列,该效应子序列包含与SEQ ID NO:4、6或8中列出的序列基本相同的序列或由其组成。

[0265] 在一个实例中,本披露的ssRNA可以包含效应子序列,该效应子序列包含与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同的序列或由其组成。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的6个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的5个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的4个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的3个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的2个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的1个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列100%相同。

[0266] 在一个实例中,本披露的ssRNA可以包含效应子序列,该效应子序列包含与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同的序列或由其组成。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的6个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的5个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的4个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的3个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的2个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的1个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列100%相同。

[0267] 在一个实例中,本披露的ssRNA可以包含效应子序列,该效应子序列包含与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同的序列或由其组成。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的6个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ

ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的5个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的4个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的3个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的2个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本相同,并且含有相对于其改变的1个碱基。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列100%相同。

[0268] 在一个实例中,能够引发RNAi的本披露的RNA是双链RNA(dsRNA)。根据本披露的dsRNA将包含效应子序列和效应子互补序列,其中该效应子序列包含至少17个连续核苷酸,基本上与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。

[0269] 根据本披露的示例性dsRNA包含效应子序列,该效应子序列与表3中标记为“效应子互补”的列中描述的效应子互补序列(即SEQ ID NO:5、7和9)基本上互补。

[0270] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的dsRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:5中列出的序列100%互补。

[0271] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的dsRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:7中列出的序列100%互补。

[0272] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的dsRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:9中列出的序列100%互补。

[0273] 当本披露的dsRNA包含效应子序列(该效应子序列与表3中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了1、2、3、4、5或6个错配(如本文描述))时,该效应子序列仍然能够与表3中相应效应子互补序列形成双链体。

[0274] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,其中该效应子序列是表3中标记为“效应子”的列中描述的序列,即选自SEQ ID NO:4、6和8,并且dsRNA的效应子互补序列与其效应子序列基本上互补。例如,RNA的效应子互补序列相对于同源效应子序列可以包含1、2、3、4、5或6个错配,但仍能够与其形成双链体。

[0275] 在一个实例中,dsRNA可以包含SEQ ID NO:4中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:4中列出的序列100%互补。

[0276] 在一个实例中,dsRNA可以包含SEQ ID NO:6中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:6中列出的序列100%互补。

[0277] 在一个实例中,dsRNA可以包含SEQ ID NO:8中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:8中列出的序列100%互补。

[0278] 根据本披露的示例性dsRNA包含如表3中分别标记为“效应子”和“效应子互补”的列中所描述的相应效应子序列和效应子互补序列。在一个实例中,dsRNA的相应效应子序列和效应子互补序列可以作为单独的核酸(其例如通过Watson-Crick碱基配对双链体化)提供。

[0279] 作为dsRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:4中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:5中列出的序列组成的效应子互补序列。

[0280] 作为dsRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:6中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:7中列出的序列组成的效应子互补序列。

[0281] 作为dsRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:8中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:9中列出的序列组成的效应子互补序列。

[0282] 能够引发RNAi的本披露的RNA也可以作为短发夹RNA(shRNA)提供。根据本披露的该实例的shRNA将包含效应子序列和效应子互补序列,其中该效应子序列包含至少17个连续核苷酸,基本上与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。

[0283] 根据本披露的示例性shRNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的效应子互补序列(即SEQ ID NO:11、13和15)基本上互补。

[0284] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的shRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:11中列出的序列100%互补。

[0285] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的shRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:13中列出的序列100%互补。

[0286] 在一个实例中,本披露提供了包含效应子序列的shRNA,该效应子序列与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子序列可以与SEQ ID NO:15中列出的序列100%互补。

[0287] 当本披露的shRNA包含效应子序列(该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了1、2、3、4、5或6个错配(如本文描述))时,该效应子序列仍然能够与表4中相应效应子互补序列形成双链体区域。

[0288] 在另一个实例中,本披露提供了包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,其中该效应子序列是表4中标记为“效应子”的列中描述的序列,即选自SEQ ID NO:10、12和14,并且shRNA的效应子互补序列与其效应子序列基本上互补。例如,shRNA的效应子互补序列

相对于同源效应子序列可以包含1、2、3、4、5或6个错配,但仍能够与其形成双链体。

[0289] 在一个实例中,shRNA可以包含SEQ ID NO:10中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:10中列出的序列100%互补。

[0290] 在一个实例中,shRNA可以包含SEQ ID NO:12中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:12中列出的序列100%互补。

[0291] 在一个实例中,shRNA可以包含SEQ ID NO:14中列出的效应子序列和与其基本上互补(除了1、2、3、4、5或6个碱基错配)的效应子互补序列。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了6个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了5个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了4个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了3个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了2个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列基本上互补,除了单个碱基错配。例如,该效应子互补序列可以与SEQ ID NO:14中列出的序列100%互补。

[0292] 当本披露的RNA作为shRNA提供时,茎环序列将位于相应效应子序列和效应子互补序列之间,使得对应RNA形成单个连续序列。茎环序列具有足够的长度以允许效应子序列和效应子互补序列彼此退火,即通过Watson-Crick碱基配对形成双链体区域。合适的茎环序列可以例如选自本领域已知的那些。

[0293] 根据本披露的示例性shRNA包含如表4中分别标记为“效应子”和“效应子互补”的列中所描述的相应效应子序列和效应子互补序列。此类示例性shRNA可以包含表5中列出的序列,任选地如本文描述进行修饰。

[0294] 作为shRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:10中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:11中列出的序列组成的效应子互补序列。根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成。可替代地,根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:17中列出的序列或由其组成。

[0295] 作为shRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:12中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:13中列出的序列组成的效应子互补序列。根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成。可替代地,根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:19中列出的序列或由其组成。

[0296] 作为shRNA的本披露的示例性RNA包含由SEQ ID NO:14中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:15中列出的序列组成的效应子互补序列。根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成。可替代地,根据该实例的shRNA可以包含SEQ ID NO:21中列出的序列或由其组成。

[0297] 本文描述的每个shRNA可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。

[0298] 本披露还提供了多种RNA(即能够引发RNAi),其中每种RNA包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的RNA转录物的区域基本上互补,并且多种中的至少一种RNA是包含效应子序列的RNA,该效应子序列与如本文描述的SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列基本上互补。优选地,该多种RNA中的每种RNA包含长度小于30个核苷酸的效应子序列。例如,合适的效应子序列的长度可以在17-29个核苷酸的范围内。

[0299] 包含与SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出的序列基本上互补的效应子序列的示例性RNA(包括ssRNA、dsRNA和shRNA)已经被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。

[0300] 根据本披露的多种RNA可以包含如本文描述的两种RNA。在另一个实例中,根据本披露的多种RNA可以包含本文描述的三种RNA。

[0301] 因此,根据本披露的多种RNA可以包含本文描述的RNA(其包含具有至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的RNA转录物的区域基本上互补)中的一种或多种,如表1中列出的。

[0302] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补。

[0303] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补。

[0304] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补。

[0305] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且该多种中的另一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补。

[0306] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且该多种中的另一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补。

[0307] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且该多种中的另一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补。

[0308] 在一个实例中,该多种中的至少一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:1中列出的序列基本上互补,并且该多种中的另一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:2中列出的序列基本上互补,并且该多种中的又另一种RNA的效应子序列与SEQ ID NO:3中列出的序列基本上互补。

[0309] 本文描述了示例性RNA(包括ssRNA、dsRNA、shRNA和shmiRNA),其包含至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与SEQ ID NO:1-3中的之一中列出的序列基本上互补。

[0310] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA(其是ssRNA),各自包含效应子序列,该效应子序列与表2中标记为“效应子序列”的列中列出的效应子序列基本相同。

[0311] 本披露的示例性多种ssRNA包含:

[0312] (i) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成;和

[0313] (ii) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成。

[0314] 本披露的示例性多种ssRNA包含:

[0315] (i) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成;和

[0316] (ii) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成。

[0317] 本披露的示例性多种ssRNA包含:

[0318] (i) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成;和

[0319] (ii) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成。

[0320] 本披露的示例性多种ssRNA包含:

[0321] (i) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成;

[0322] (ii) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成;和

[0323] (iii) 包含效应子序列的ssRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成。

[0324] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA(其是dsRNA),各自包含效应子序列和效应子互补序列,其中每种RNA的效应子序列与表3中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。例如,每种dsRNA的效应子序列可以包含表3中标记为“效应子”的列中列出的序列或由其组成。同源效应子互补序列可以包含表3中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成。

[0325] 本文描述了包含效应子序列的示例性dsRNA,该效应子序列与表3中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。

[0326] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0327] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:5中列出的序列或由其组成;和

[0328] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:7中列出的序列或由其组成。

[0329] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0330] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:5中列出的序列或由其组成;和

[0331] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:9中列出的序列或由其组成。

[0332] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0333] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:7中列出的序列或由其组成;和

[0334] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:9中列出的序列或由其组成。

[0335] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0336] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:4中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:5中列出的序列或由其组成;

[0337] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:6中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:7中列出的序列或由其组成;和

[0338] (iii) 包含效应子序列和效应子互补序列的dsRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:8中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:9中列出的序列或由其组成。

[0339] 在另一个实例中,本披露的多种RNA作为多种shRNA提供,其中每种shRNA的效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。例如,每种shRNA的效应子序列可以包含表4中标记为“效应子”的列中列出的序列或由其组成。同源效应子互补序列可以包含表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成。

[0340] 本文描述了包含效应子序列的示例性shRNA,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。

[0341] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0342] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0343] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成。

[0344] 本披露的示例性多种RNA包含：

[0345] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成; 和

[0346] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0347] 本披露的示例性多种RNA包含：

[0348] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成; 和

[0349] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0350] 本披露的示例性多种RNA包含：

[0351] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;

[0352] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成; 和

[0353] (iii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA, 该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成, 该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0354] 如本文描述的, 该多种中的每种shRNA将包含位于相应效应子序列和效应子互补序列之间的茎环序列, 使得该shRNA形成单个连续序列。示例性shRNA在本文中例如表5中描述。

[0355] 在一个实例中, 本披露提供了多种RNA, 其中该多种包含以下或由以下组成:

[0356] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA; 和

[0357] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0358] 在一个实例中, 本披露提供了多种RNA, 其中该多种包含以下或由以下组成:

[0359] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA; 和

[0360] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0361] 在一个实例中, 本披露提供了多种RNA, 其中该多种包含以下或由以下组成:

[0362] (i) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA; 和

[0363] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0364] 在一个实例中, 本披露提供了多种RNA, 其中该多种包含以下或由以下组成:

[0365] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;

[0366] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA; 和

[0367] (iii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0368] 本文描述的每个shRNA可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。

[0369] 在另一个实例中,本披露的多种RNA作为多种shmiRNA提供,其中每种shmiRNA的效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。例如,每种shmiRNA的效应子序列可以包含表4中标记为“效应子”的列中列出的序列或由其组成。同源效应子互补序列可以包含表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成。

[0370] 本文描述了包含效应子序列的示例性shmiRNA,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。

[0371] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0372] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0373] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成。

[0374] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0375] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0376] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0377] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0378] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0379] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0380] 本披露的示例性多种RNA包含:

[0381] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;

[0382] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0383] (iii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shmiRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

其组成。

[0384] 如本文描述的,该多种中的每种shmiRNA将包含位于相应效应子序列和效应子互补序列之间的茎环序列,使得该shmiRNA形成单个连续序列。示例性shmiRNA在本文中例如表5中描述。

[0385] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0386] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shmiRNA;和

[0387] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shmiRNA。

[0388] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0389] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shmiRNA;和

[0390] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shmiRNA。

[0391] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0392] (i) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shmiRNA;和

[0393] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shmiRNA。

[0394] 在一个实例中,本披露提供了多种RNA,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0395] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shmiRNA;

[0396] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shmiRNA;和

[0397] (iii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shmiRNA。

[0398] 本文描述的每种shmiRNA可以任选地在mishRNA的3'端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如,作为RNA Pol III启动子的转录终止的结果。

[0399] 根据一个实例,本文描述的多种RNA可以作为单个组合物一起提供。

[0400] 根据另一个实例,本文描述的多种RNA可以作为多个组合物提供。例如,可以分别提供该多种中的每种RNA。可替代地,可以分别提供该多种中的至少一种RNA、以及在组合物中一起提供的该多种中的两种或更多种RNA。

[0401] 本披露的RNA或多种RNA可以包含合成RNA或DNA指导的RNA(ddRNA)。合成RNA可以通过本领域已知的方法(如通过典型的寡核苷酸合成)制备,并且可以掺入化学修饰以增加siRNA药剂的半衰期和/或功效、和/或以允许更稳健的递送配制品。寡核苷酸的许多化学修饰是已知的并且在本领域中有很好的描述。

[0402] 在一个实例中,本披露的RNA的基本上所有核苷酸都被修饰。在其他实例中,本披露的RNA的所有核苷酸都被修饰。其中“基本上所有核苷酸都被修饰”的本披露的RNA大部分但未全部被修饰,并且可以包含不超过5、4、3、2或1个未修饰的核苷酸。

[0403] 在一个实例中,本披露的RNA在双链体的一条链或两条链的3'-末端、5'-末端或两个端包含一个或多个突出端区域和/或封端基团。突出端区域长度可以为1-6个核苷酸,例如长度为2-6个核苷酸、长度为1-5个核苷酸、长度为2-5个核苷酸、长度为1-4个核苷酸、长度为2-4个核苷酸、长度为1-3个核苷酸、长度为2-3个核苷酸、或长度为1-2个核苷酸。突出端可以是一条链比另一条链更长的结果,或者是两条相同长度的链交错的结果。突出端可以与靶mRNA形成错配,或者它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一序列。第一链和第二链也可以例如通过另外的碱基连接形成发夹,或通过其他非碱基接头连接。

[0404] 在一个实例中,RNA的突出端区域中的核苷酸各自独立地是经修饰的或未经修饰的核苷酸,包括但不限于2'-糖修饰的,如2-F、2'-O-甲基、胸苷(T)、脱氧胸腺嘧啶(dT)、2'-

0-甲氧基乙基-5-甲基尿苷(Teo)、2'-0-甲氧基乙基腺苷(Aeo)、2'-0-甲氧基乙基-5-甲基胞苷(m5Ceo)、以及其任何组合。例如,dTdT可以是任一链上任一端的突出序列。突出端可以与靶mRNA形成错配,或者它可以与被靶向的基因序列互补或可以是另一序列。

[0405] 可以将RNA的有义链、反义链或两条链上的5'-或3'-突出端磷酸化。在一些实例中,一个或多个突出端区域含有两个核苷酸,在这两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯,其中两个核苷酸可以相同或不同。

[0406] 在一个实例中,本披露的RNA仅包含单个突出端,该单个突出端可以增强RNA的干扰活性,而不影响其整体稳定性。例如,该单链突出端位于效应子序列的3'-末端,可替代地,位于效应子互补序列的3'-末端。在一个实例中,RNA还包含平滑端,位于效应子互补序列的5'-末端(或效应子序列的3'-末端),反之亦然。

[0407] 修饰包括例如未修饰,例如5'-末端修饰(磷酸化、缀合、反向键)或3'-末端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向键等);碱基修饰,例如用稳定碱基、去稳定碱基或与扩增的伴侣谱系碱基配对的碱基进行替换,去除碱基(无碱基核苷酸)或缀合碱基;糖修饰(例如在2'-位置或4'-位置)或糖的替换;和/或主链修饰,包括磷酸二酯键的修饰或替换。可用于本披露的RNA的具体实例包括但不限于含有经修饰的主链或不含天然的核苷间键的RNA。具有经修饰的主链的RNA尤其包括主链中不具有磷原子的RNA。出于本说明书的目的和如有时本领域中谈及,也可以将在其核苷间主链中不具有磷原子的经修饰的RNA视为寡核苷。在一些实例中,经修饰的RNA将在其核苷间主链中具有磷原子。教导含磷键的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利RE39464。

[0408] 其中不包含磷原子的修饰的RNA骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子核苷间键或杂环核苷间键形成的骨架。这些包括具有吗啉代键的那些(部分地从一个核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物,亚砷和砷骨架;甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基(thioformacetyl)骨架;亚甲基甲乙酰基(methylene formacetyl)和硫代甲乙酰基骨架;含烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;和其他具有混合的N、O、S和CH<sub>2</sub>组成部分的骨架。教导这些寡核苷的示例性形式的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439。

[0409] 在其他实例中,本披露的一种或多种RNA包含或是RNA模拟物,例如核苷酸单元的主链被新颖基团替换。维持碱基单元以与合适的核酸靶化合物杂交。一种这类寡聚化合物,已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物,称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架替换为含有酰胺的骨架,尤其氨基乙基甘氨酸骨架。这些核碱基得以保持并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。教导PNA化合物制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262。

[0410] 经修饰的RNA也可以含有一个或多个取代的糖部分。在此表征的RNA(例如dsRNA)可以在2'位置包含以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>烷基或C<sub>2</sub>至C<sub>10</sub>烯基和炔基。示例性的适合的修饰包括O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、和O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>,其中n和m是从1至约10。

[0411] 本披露的RNA还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。如本文使用的,“未经修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰核碱基包括但不限于其他合成以及天然核碱基,如脱氧胸腺嘧啶(dT),5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基以及其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶以及2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶以及胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶以及胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶以及胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤基,8-氨基,8-氢硫基,8-硫烷基,8-羟基以及其他8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤基尤其是5-溴,5-三氟甲基以及其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤,以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0412] 还可以修饰本披露的RNA以包括一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中该核糖部分包含连接2'碳和4'碳的额外桥。这个结构有效地将该核糖“锁”在3'-内切结构构象中。已经示出向siRNA中添加锁核酸增加了血清中的siRNA稳定性,并降低了脱靶作用(Elmen,J.等人,(2005)Nucleic Acids Research[核酸研究]33(1):439-447)。

[0413] 对RNA的末端的潜在的稳定化修饰可以包括N-(乙酰基氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨酸(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-0-脱氧胸苷(醚)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨酸(Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷醇基-尿苷-3"-磷酸酯、反向dT(idT)及其他。在PCT公开号W0 2011/005861中可以找到这种修饰的披露内容。

[0414] 在一个实例中,本披露的RNA是化学合成的。使用本领域已知的方案(例如,如Caruthers等人,(1992),Methods in Enzymology[酶学方法]211,3-19,W0 99/54459,Wincott等人,(1995),Nucleic Acids Res.[核酸研究]23,2677-2684,Wincott等人,(1997),Methods Mol.Bio.[分子生物学方法],74,59,Brennan等人,(1998),Biotechnol Bioeng.[生物技术与生物工程],61,33-45,以及Brennan,美国专利号6,001,311中描述的)合成寡核苷酸(例如某些经修饰的寡核苷酸或缺少核糖核苷酸的寡核苷酸的部分)。寡核苷酸的合成利用了共同的核酸保护和偶联基团,如5'-端的二甲氧基三苯甲基和3'-端的亚磷酰胺。

[0415] 使用如Usman等人,(1987),J.Am.Chem.Soc.[美国化学会志],109,7845;Scaringe等人,(1990),Nucleic Acids Res.[核酸研究],18,5433中描述的方法合成没有修饰的RNA。这些合成利用了共同的核酸保护和偶联基团,如5'-端的二甲氧基三苯甲基和3'-端的亚磷酰胺,其可用于本披露的某些RNA。

[0416] 在某些实例中,根据美国专利号6,995,259、6,686,463、6,673,918、6,649,751、和/或6,989,442中描述的方法来合成、脱保护和/或分析本披露的RNA。

[0417] 在替代性实例中,本披露的RNA合成为离散组分并在合成后例如通过连接(Moore等人,(1992),Science[科学]256,9923或W0 93/23569)或通过杂交(在合成和/或脱保护后)结合在一起。

[0418] ddRNAi

[0419] 可以从核酸转录作为shRNA或shmiRNA的本披露的RNA。因此,在一个实例中,本披露提供了编码本披露的RNA的核酸。

[0420] 在一个实例中,核酸是DNA。

[0421] 在另一个实例中,本披露提供了编码本披露的多种RNA的核酸。

[0422] 在另一个实例中,本披露提供了编码本披露的多种RNA的多种核酸。例如,多种核酸中的每种核酸可以编码本文描述的单个RNA。在另一个实例中,一种或多种核酸编码多种RNA,例如该多种中的核酸编码本披露的两种或更多种RNA,并且该多种中的另一种核酸编码本披露的一种或多种RNA。

[0423] 在一个实例中,本文描述的多种核酸一起提供,例如在单个组合物中一起提供。

[0424] 在另一个实例中,本文描述的多种核酸作为多个组分提供,例如多个组合物。例如,可以分别提供该多种中的每种核酸。可替代地,在提供本披露的至少三种核酸的实例中,可以分别提供至少一种核酸,以及将该多种中的两种或更多种一起提供。

[0425] 在一些实例中,本披露的核酸包含一种或多种另外的元件,例如以促进RNA的转录。例如,核酸可以包含与编码本披露的RNA的序列可操作地连接的启动子。其他元件(例如转录终止子)是本领域已知的和/或本文描述的。

[0426] 在一个实例中,核酸是DNA指导的RNAi (ddRNAi) 构建体。

[0427] 在一个实例中,ddRNAi 构建体包含编码与启动子可操作地连接的本披露的RNA的序列。

[0428] 在一个实例中,ddRNAi 构建体包含编码RNA的序列,该RNA包含本披露的效应子序列和效应子互补序列。如本文描述的,本披露的RNA将包含含有至少17个连续核苷酸的效应子序列,该效应子序列与对应于PABPN1蛋白的RNA转录物的区域基本上互补,其中该RNA转录物的区域在SEQ ID NO:1-3中的任一个中列出。示例性效应子序列和效应子互补序列在表4中列出。

[0429] 例如,序列可以与启动子(例如U6或H1)可操作地连接。在一个实例中,两个序列可以与同一启动子可操作地连接。在一个实例中,两个序列可以与不同的启动子可操作地连接。

[0430] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi 构建体,其包含编码效应子序列的序列和编码效应子互补序列的序列,其中该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的效应子互补序列基本上互补。例如,当与表4中的相应效应子互补序列进行双链体化时,与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的效应子互补序列基本上互补的效应子序列可以包含0、1、2、3或4个错配。

[0431] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi 构建体,其包含编码效应子序列的序列,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了4个碱基错配。

[0432] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi 构建体,其包含编码效应子序列的序列,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了3个碱基错配。

[0433] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi 构建体,其包含编码效应子序列的序列,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了2个碱基错配。

[0434] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi 构建体,其包含编码效应子序列的序列,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补,除了单个碱基错配。

[0435] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码效应子序列和效应子互补序列的序列,其中该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列100%互补。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码效应子互补序列的序列,该效应子互补序列与ddRNAi构建体编码的效应子序列基本上互补。

[0436] 本披露的示例性ddRNAi构建体包含编码如表4中描述的相应效应子序列和效应子互补序列的序列。

[0437] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码效应子序列的序列和编码效应子互补序列的序列,其中该效应子序列由表4中标记为“效应子”的列中列出的序列组成。在一个实例中,效应子互补序列由表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列组成。

[0438] 本披露的示例性ddRNAi构建体包含编码由SEQ ID NO:10中列出的序列组成的效应子序列的序列和编码由SEQ ID NO:11中列出的序列组成的效应子互补序列的序列。

[0439] 本披露的另一个示例性ddRNAi构建体包含编码由SEQ ID NO:12中列出的序列组成的效应子序列的序列和编码由SEQ ID NO:13中列出的序列组成的效应子互补序列的序列。

[0440] 本披露的另外的示例性ddRNAi构建体包含编码由SEQ ID NO:14中列出的序列组成的效应子序列的序列和编码由SEQ ID NO:15中列出的序列组成的效应子互补序列的序列。

[0441] 在另一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其编码本披露的多种RNA、或包含编码本披露的RNA和至少一种能够引发RNAi的其他RNA的序列。

[0442] 在一个实例中,本披露提供了编码本披露的多种RNA的ddRNAi构建体,其中每种RNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中至少一种(或每种)RNA的效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列基本上互补。本披露的示例性RNA(包含与表4中标记为“效应子互补”的列中描述的序列“基本上互补”的效应子序列)已经被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。然而,在一个实例中,本披露提供了编码本披露的多种RNA的ddRNAi构建体,其中每种RNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中至少一种(或每种)RNA的效应子序列由4中标记为“效应子”的列中列出的序列组成。在一个实例中,至少一种(或每种)RNA的效应子互补序列由表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列组成。

[0443] 在一个实例中,本披露提供了编码本披露的多种RNA(每种能够引发RNAi)的ddRNAi构建体,其中:

[0444] (i) 至少一种RNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中该RNA的效应子序列由表4中标记为“效应子”的列中列出的序列组成(在一个实例中,每种RNA的效应子互补序列由在表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列组成);和

[0445] (ii) 至少一种RNA包含效应子序列和效应子互补序列,其中该RNA的效应子序列由至少17个连续核苷酸的序列组成,该序列与对应于PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的RNA转录物的区域基本上互补。

[0446] 例如,(ii)中的至少一种RNA可以与(i)中的RNA不同但是由表4中标记为“效应子”的列中列出的序列组成(在一个实例中,每种RNA的效应子互补序列由表4中标记为“效应子

互补”的列中列出的序列组成)。

[0447] 本披露的示例性ddRNAi构建体包含:

[0448] (i) 编码RNA的序列,该RNA包含由SEQ ID NO:10中列出的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:11中列出的序列组成的效应子互补序列;和

[0449] (ii) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成。

[0450] 本披露的示例性ddRNAi构建体包含:

[0451] (i) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0452] (ii) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0453] 本披露的示例性ddRNAi构建体包含:

[0454] (i) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0455] (ii) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0456] 本披露的另一个示例性ddRNAi包含:

[0457] (i) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;

[0458] (ii) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0459] (iii) 编码包含效应子序列和效应子互补序列的RNA的序列,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0460] 如本文描述的,本披露的shRNA和/或shmiRNA将包含位于相应效应子序列和效应子互补序列之间的茎环序列,使得对应RNA形成单个连续序列。因此,本披露的ddRNAi可以包含编码茎环的序列,该茎环位于对应编码效应子序列和效应子互补序列的序列之间。

[0461] 在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码与启动子可操作地连接的本披露的shRNA的序列。例如,本披露的ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含表5中列出的、与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接的序列或由其组成。

[0462] 示例性ddRNAi构建体可以包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:16或17中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包

含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:17中列出的序列或由其组成。

[0463] 示例性ddRNAi构建体可以包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18或19中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:19中列出的序列或由其组成。

[0464] 示例性ddRNAi构建体可以包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20或21中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成。在一个实例中,ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:21中列出的序列或由其组成。

[0465] 本披露还提供了包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含至少一种本披露的shRNA的多种shRNA。

[0466] 在一个实例中,本披露提供了包含编码多种shRNA的序列的ddRNAi构建体,其中每种shRNA包含效应子序列,该效应子序列包含至少17个连续核苷酸的序列或由其组成,该序列与对应于PABPN1蛋白(其是导致OPMD的原因)的RNA转录物的区域基本上互补,并且其中至少一种shRNA包含效应子序列,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补的示例性效应子序列已经被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。例如,由ddRNAi构建体编码的多种中的至少一种shRNA的效应子序列可以包含表4中标记为“效应子”的列中列出的序列或由其组成(例如,同源效应子互补序列可以包含表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成)。

[0467] 在另一个实例中,本披露提供了包含编码多种shRNA的序列的ddRNAi构建体,其中每种shRNA的效应子序列包含表4中标记为“效应子”的列中列出的效应子序列或由其组成。对应shRNA的同源效应子互补序列可以包含表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成。本文描述了包含效应子序列的示例性shRNA,该效应子序列与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。

[0468] 本披露的示例性ddRNAi构建体可以包含编码多种shRNA的序列,该多种包含:

[0469] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0470] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成。

[0471] 本披露的示例性ddRNAi构建体可以包含编码多种shRNA的序列,该多种包含:

[0472] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0473] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组

成。

[0474] 本披露的示例性ddRNAi构建体可以包含编码多种shRNA的序列,该多种包含:

[0475] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0476] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0477] 本披露的示例性ddRNAi构建体可以包含编码多种shRNA的序列,该多种包含:

[0478] (i) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;

[0479] (ii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0480] (iii) 包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0481] 表5中描述了本披露的示例性shRNA。因此,本披露的ddRNAi构建体可以包含编码表5中描述的多种shRNA的序列。

[0482] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种shRNA的序列,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0483] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0484] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0485] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种shRNA的序列,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0486] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0487] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0488] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种shRNA的序列,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0489] (i) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0490] (ii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0491] 在一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种shRNA的序列,其中该多种包含以下或由以下组成:

[0492] (i) 包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA;

[0493] (ii) 包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA;和

[0494] (iii) 包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA。

[0495] 本披露还提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种RNA的序列,该多种包含:包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成的shRNA、以及本披露的至少一种其他shRNA。

[0496] 本披露还提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种RNA的序列,该多种包含:包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成的shRNA、以及本披露的至少一种其他shRNA。

[0497] 本披露还提供了ddRNAi构建体,其包含编码多种RNA的序列,该多种包含:包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成的shRNA、以及本披露的至少一种其他shRNA。

[0498] 在另一个实例中,本披露提供了ddRNAi构建体,其包含编码与启动子可操作地连接的shmiRNA的序列。例如,本披露的ddRNAi构建体包含编码shmiRNA的序列,该shmiRNA包含表5中列出的、与启动子(例如RNA pol II启动子)可操作地连接的序列或由其组成。效应子序列和效应子互补序列的示例性组合已经在包含编码本披露的一种或多种shRNA的序列的ddRNAi构建体的上下文中被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于该实例(其描述包含编码shmiRNA的序列的ddRNAi构建体)。

[0499] 如上所述,ddRNAi构建体通常包含编码与启动子可操作地连接的、本披露的RNA(例如本披露的shRNA或shmiRNA)的序列。例如,包含编码本披露的shRNA或shmiRNA的序列的ddRNAi构建体可以与RNA pol III启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接。可替代地,包含编码本披露的shRNA或shmiRNA的序列的ddRNAi构建体可以与RNA pol II启动子(例如UbC、CMV或PGK启动子)可操作地连接。当ddRNAi构建体编码多种shRNA时,编码该多种shRNA中的一种的每个序列可以与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接。可替代地,在ddRNAi构建体编码多种shRNA的情况下,编码该多种shRNA的序列中的每个可以与相同启动子可操作地连接。例如,Pol II启动子(例如UbC、CMV或PGK启动子)可特别用于驱动包含编码多种shRNA或shmiRNA的序列的较长构建体的表达。

[0500] ddRNAi构建体通常在载体(例如质粒或小质粒或病毒载体)内。

[0501] 在一个实例中,编码ddRNAi构建体中的本披露的多种RNA(例如shRNA或shmiRNA)的序列与相同的启动子可操作地连接。例如,构建体可以包含相同启动子的多个拷贝,每个拷贝与编码本披露的不同shRNA或shmiRNA的序列可操作地连接。

[0502] 在另一个实例中,与编码本披露的shRNA或shmiRNA的序列可操作地连接的每个启动子是不同的。例如,在编码本披露的三种shRNA的ddRNAi构建体中,编码对应shRNA的三种序列各自与不同的启动子可操作地连接。类似地,在编码本披露的三种shmiRNA的ddRNAi构建体中,编码对应shmiRNA的三种序列各自与不同的启动子可操作地连接。

[0503] 在另外的实例中,在编码三种或更多种shRNA的ddRNAi构建体中,编码shRNA或shmiRNA的两种(或更多种)序列与相同的启动子连接,并且编码RNA的一种(或多种)序列与不同的启动子连接。

[0504] 在一个实例中,启动子是组成型启动子。当就启动子而言时,术语“组成型”是指启动子能够在不存在特定刺激(例如,热休克、化学品、光照等)的情况下指导可操作地连接的核酸序列的转录。典型地,组成型启动子能够在基本上任何细胞和任何组织中指导编码序列的表达。用于转录本披露的RNA的启动子包括泛素、CMV、 $\beta$ -肌动蛋白、组蛋白H4、EF-1 $\alpha$ 或由RNA聚合酶II控制的pgk基因的启动子,或由RNA聚合酶I控制的启动子元件。

[0505] 在一个实例中,使用Pol II启动子,如CMV、SV40、U1、 $\beta$ -肌动蛋白或杂合Pol II启动子。其他合适的Pol II启动子是本领域已知的,并且可以根据本披露的该实例使用。例如,Pol II启动子系统在本披露的ddRNAi构建体中可能是优选的,该构建体表达初miRNA(其通过酶Drosha和Pasha的作用被加工成一种或多种shmiRNA)。Pol II启动子系统在本披

露的ddRNAi构建体中也可以是优选的,该构建体包含在单个启动子的控制下编码多种shRNA或shmiRNA的序列。在需要组织特异性的情况下,Po1 II启动子系统也是优选的。

[0506] 在另一个实例中,使用由RNA聚合酶III控制的启动子,如U6启动子(U6-1、U6-8、U6-9)、H1启动子、7SL启动子、人Y启动子(hY1、hY3、hY4(参见例如Maraia等人,(1994) Nucleic Acids Res[核酸研究]22(15):3045-52)和hY5(参见Maraia等人,(1994) Nucleic Acids Res[核酸研究]24(18):3552-59)、人MRP-7-2启动子、腺病毒VA1启动子、人tRNA启动子或5s核糖体RNA启动子。在表达shRNA的本披露的ddRNAi构建体中,Po1 III启动子可以是优选的。

[0507] 用于本披露的ddRNAi构建体中的合适的启动子描述于美国专利号8,008,468和美国专利号8,129,510中。

[0508] 在一个实例中,启动子是RNA pol III启动子。例如,启动子是U6启动子。在另一个实例中,启动子是H1启动子。

[0509] 当构建体中的启动子是U6启动子时,它可以是U6-1启动子、U6-8启动子或U6-9启动子(参见例如Domitrovich等人,(2003) Nucleic Acids Res[核酸研究],31:2344-2352)。例如,构建体中的启动子是U6-1启动子。例如,构建体中的启动子是U6-8启动子。例如,构建体中的启动子是U6-9启动子。

[0510] 在ddRNAi构建体编码本披露的多种shRNA的情况下,编码至少一种shRNA的序列与U6启动子可操作地连接,并且编码至少一种其他RNA的序列与H1启动子可操作地连接。

[0511] 在ddRNAi构建体编码本披露的三种shRNA的情况下,编码其中两种shRNA的序列各自与U6启动子可操作地连接,编码另一种RNA的序列与H1启动子可操作地连接。例如,当以5'至3'方向考虑时,第一和第二序列各自与U6启动子可操作地连接,并且第三序列与H1启动子可操作地连接。例如,当以5'至3'方向考虑时,第一序列可以与U6-1启动子可操作地连接,第二序列可以与U6-9启动子可操作地连接,并且第三序列可以与H1启动子可操作地连接。

[0512] 在另一个实例中,编码其中两种RNA的序列各自与H1启动子可操作地连接,编码另一种RNA的序列与U6启动子可操作地连接。

[0513] 在一些实例中,使用可变强度的启动子。例如,使用两种或更多种强启动子(如Po1 III型启动子)可以通过例如消耗可用核苷酸池或转录所需的其他细胞组分加重细胞负担。此外或可替代地,使用若干种强启动子可导致细胞中RNAi药剂的毒性水平表达。因此,在一些实例中,多启动子ddRNAi构建体中的一种或多种启动子弱于构建体中的其他启动子,或构建体中的所有启动子可以以小于最大速率来表达shRNA。还可以使用各种分子技术来修饰启动子或例如通过修饰各种调节元件来修饰启动子,以获得更弱的转录水平或更强的转录水平。实现降低转录的一种方法是修饰已知控制启动子活性的启动子内的序列元件。例如,已知近端序列元件(PSE)影响人U6启动子的活性(参见例如,Domitrovich,等人,(2003) Nucleic Acids Res[核酸研究]31:2344-2352)。用来自弱启动子(如人U6-7启动子)的元件来替换强启动子(如人U6-1、U6-8或U6-9启动子)中存在的PSE元件会降低杂交U6-1、U6-8或U6-9启动子的活性。

[0514] 可用于本披露的一些实例的启动子可以是组织特异性的或细胞特异性的。当用于启动子时,术语“组织特异性”是指在不同组织类型(例如,肝脏)中相对不存在目标核苷

酸序列的表达的情况下,能够指导相同的目标核酸在特定组织类型(例如眼睛或肌肉组织)中的选择性转录的启动子。如用于启动子的术语“细胞特异性”是指在相同组织中的不同细胞类型中相对不存在相同的目标核苷酸序列的表达的情况下,能够指导目标核酸在特定细胞类型中的选择性转录的启动子。

[0515] 在一个实例中,本披露的ddRNAi构建体可以另外地包含一种或多种增强子以增加本披露的一种或多种shRNA或一种或多种shmiRNA的表达。适用于本披露的实例的增强子包括CMV增强子(Xia等人,(2003) *Nucleic Acids Res*[核酸研究]31(17):e100),以及本领域技术人员已知的其他增强子。

[0516] 在另外的实例中,本披露的ddRNAi构建体可以包含与编码本披露的shRNA或shmiRNA的核酸连接的转录终止子。在ddRNAi构建体编码多种shRNA或多种shmiRNA的情况下,与每个核酸连接的终止子可以相同或不同。在一个实例中,终止子是4个或更多个或5个或更多个或6个或更多个T残基的连续区段,例如像在一个或多个pol III启动子控制下ddRNAi构建体编码一种或多种shRNA的情况下。

[0517] 在一些实例中,当使用不同的启动子时,终止子可以是不同的并且与来自终止子来源的基因的启动子匹配。此类终止子包括SV40 poly A、AdV VA1基因、5S核糖体RNA基因和人t-RNA的终止子。此外,启动子和终止子可以混合和匹配,正如通常用RNA pol II启动子和终止子所进行的那样。

[0518] 在一个实例中,编码多种RNA的ddRNAi构建体中的每个启动子/RNA编码序列/终止子组分中的启动子和终止子都是不同的,以降低组分之间DNA重组事件的可能性。

[0519] 在一个实例中,本披露的ddRNAi构建体包含编码本披露的shRNA的序列,其与U6启动子和包含至少四个胸苷残基(例如4或5或6个胸苷残基)的终止子可操作地连接。任选地,编码shRNA的序列也可以与包含单个鸟嘌呤的转录起始子连接。

[0520] 在一个实例中,本披露的ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA由表5中列出的、与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接的序列组成。在一个实例中,编码shRNA的序列与终止子连接,该终止子例如包含至少四个胸苷残基,如4或5或6个胸苷残基。

[0521] 一个示例性ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-1启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接。

[0522] 另一个示例性ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-9启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0523] 另一种示例性ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成,该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0524] 在另一个实例中,本披露提供了包含编码多种shRNA的序列的ddRNAi构建体,其中该ddRNAi构建体包含(i) 编码shRNA的序列,该shRNA包含表5中列出的序列或由其组成,该序列与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接;和(ii) 与启动子可操作地连接的、编码本披露的至少一种其他shRNA的序列。在一个实例中,(i) 中的序列与例如包含至少五个连续的胸苷残基的终止子连接。在一个实例中,(ii) 中的序列与例如包含至少五个胸苷残基

的终止子连接。在一个实例中，(i) 和 (ii) 中的序列各自与例如包含至少五个胸苷残基的终止子连接。

[0525] 在一个实例中，本披露提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：(i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-1启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；和(ii) 编码本披露的至少一种其他shRNA的序列，该序列与启动子和包含至少4个胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0526] 在一个实例中，本披露提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：(i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-9启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；和(ii) 编码本披露的至少一种其他shRNA的序列，该序列与启动子和包含至少4个胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0527] 在一个实例中，本披露提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：(i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成，该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子可操作地连接；和(ii) 编码本披露的至少一种其他shRNA的序列，该序列与启动子和包含至少4个胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0528] 本披露还提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：

[0529] (i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-1启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；和

[0530] (ii) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-9启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0531] 本披露还提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：

[0532] (i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-1启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；和

[0533] (ii) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成，该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0534] 本披露还提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：

[0535] (i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-1启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；和

[0536] (ii) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成，该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0537] 本披露还提供了ddRNAi构建体，其包含编码多种shRNA的序列，其中ddRNAi构建体包含：

[0538] (i) 编码shRNA的序列，该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成，该序列与U6启动子（例如U6-1启动子）和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接；

[0539] (ii) 编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-9启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子可操作地连接;和

[0540] (iii) 编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成,该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子可操作地连接。

[0541] 在另一个实例中,本披露提供了多种ddRNAi构建体(每种编码shRNA),其中该多种中的ddRNAi构建体中的至少一个是包含编码本披露的shRNA的序列的ddRNAi构建体。本披露的示例性shRNA已经被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于该实例。

[0542] 在一个实例中,本披露提供了多种ddRNAi构建体(每种包含编码shRNA的序列),其中该多种中的ddRNAi构建体中的至少一种是包含编码shRNA的序列的ddRNAi构建体,该shRNA包含与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补的效应子序列。与表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补的示例性效应子序列已经被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。例如,由至少一种ddRNAi构建体编码的shRNA的效应子序列可以包含表4中标记为“效应子”的列中列出的序列或由其组成(由至少一种ddRNAi构建体编码的shRNA的同源效应子互补序列可以例如包含在表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成)。

[0543] 在另一个实例中,本披露提供了多种ddRNAi构建体(每种包含编码shRNA的序列),其中每种ddRNAi构建体包含编码shRNA的序列,该shRNA包含表4中标记为“效应子”的列中列出的效应子序列或由其组成。对应shRNA的同源效应子互补序列可以包含表4中标记为“效应子互补”的列中列出的序列或由其组成。该多种ddRNAi构建体中的示例性ddRNAi构建体包含编码包含效应子序列的shRNA,该效应子序列与本文描述的表4中标记为“效应子互补”的列中列出的效应子互补序列基本上互补。

[0544] 本披露的示例性多种ddRNAi构建体包含:

[0545] (i) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0546] (ii) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成。

[0547] 本披露的示例性多种ddRNAi构建体包含:

[0548] (i) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;和

[0549] (ii) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0550] 本披露的示例性多种ddRNAi构建体包含:

[0551] (i) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0552] (ii) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0553] 本披露的示例性多种ddRNAi构建体包含:

[0554] (i) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:10中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:11中列出的序列或由其组成;

[0555] (ii) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:12中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:13中列出的序列或由其组成;和

[0556] (iii) 包含如下序列的ddRNAi构建体,该序列编码包含效应子序列和效应子互补序列的shRNA,该效应子序列包含SEQ ID NO:14中列出的序列或由其组成,该效应子互补序列包含SEQ ID NO:15中列出的序列或由其组成。

[0557] 根据本文描述的实例,该多种中的至少一种ddRNAi构建体可以包含编码表5中描述的shRNA的序列。编码表5中描述的shRNA的序列可以与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接。表5中描述的每种shRNA可以任选地在shRNA的3'末端进一步包含两个连续的尿嘧啶(UU),例如作为RNA pol III启动子的转录终止的结果。

[0558] 在一个实例中,本披露提供了多种ddRNAi构建体,其包含两种或更多种ddRNAi构建体,每种构建体包含编码本披露的shRNA的序列。例如,该多种的每种ddRNAi构建体可以包含编码表5中描述的、与启动子(例如U6或H1启动子)可操作地连接的shRNA的序列。

[0559] 在一个实例中,该多种ddRNA构建体包含:

[0560] (i) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-1启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接;和

[0561] (ii) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-9启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接。

[0562] 在一个实例中,该多种ddRNA构建体包含:

[0563] (i) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-1启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接;和

[0564] (ii) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成,该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子序列可操作地连接。

[0565] 在一个实例中,该多种ddRNA构建体包含:

[0566] (i) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-9启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接;和

[0567] (ii) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出

的序列或由其组成,该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子序列可操作地连接。

[0568] 在一个实例中,该多种ddRNA构建体包含:

[0569] (i) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:16中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-1启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接;

[0570] (ii) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:18中列出的序列或由其组成,该序列与U6启动子(例如U6-9启动子)和包含六个连续胸苷残基的终止子序列可操作地连接;和

[0571] (iii) ddRNAi构建体,其包含编码shRNA的序列,该shRNA包含SEQ ID NO:20中列出的序列或由其组成,该序列与H1启动子和包含五个连续的胸苷残基的终止子序列可操作地连接。

[0572] 此外,该或每种ddRNAi构建体可以包含一个或多个多克隆位点和/或策略性定位的独特的限制性位点,使得易于去除或替换启动子、shRNA编码序列和/或终止子元件。可以使用策略性定位的限制性位点和/或互补的粘性末端,从较小的寡核苷酸组分来组装该或每种ddRNAi构建体。根据本披露的一种方法的基础载体包含具有多接头的质粒,其中所有位点都是独特的(尽管这不是绝对要求)。顺序地,将每个启动子插入其指定的独特位点之间,得到一个或多个启动子的碱基盒,所有这些启动子都可以具有可变的方向。顺序地,再次将退火的引物对插入每个单独启动子下游的独特位点,得到单-、双-或多-表达盒构建体。可以使用侧接单-、双-或多-表达盒插入物的两个独特的限制酶位点(相同或不同的位点)将插入物移入例如AVV主链中。

[0573] 可以使用本领域已知的任何合适的基因工程技术(包括但不限于PCR、寡核苷酸合成、限制性内切核酸酶消化、连接、转化、质粒纯化和DNA测序的标准技术)完成该或每种构建体的产生。如果该或每种构建体是病毒构建体,则该构建体包含例如将ddRNAi构建体包装成病毒颗粒必需的序列和/或允许将ddRNAi构建体整合到靶细胞基因组中的序列。在一些实例中,该或每种病毒构建体另外地含有允许病毒复制和繁殖的基因,然而此类基因将以反式提供。另外地,该或每种病毒构建体可以含有来自天然形式或经修饰的任何已知生物体的基因组的基因或遗传序列。例如,病毒构建体可以包含用于在细菌中复制构建体的序列。

[0574] 该或每种构建体还可含有其他遗传元件。可以包括在构建体中的元素的类型不受任何方式的限制,并且可以由本领域技术人员选择。例如,另外的遗传元件可以包括报告基因,如荧光标记蛋白(如GFP或RFP)的一种或多种基因;一种易于测定的酶,如 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、氯霉素乙酰转移酶或分泌的胚胎碱性磷酸酶;或容易获得的免疫测定的蛋白质,如激素或细胞因子。

[0575] 可用于本披露的实施例的其他遗传元件包括编码蛋白质的那些,这些蛋白质赋予细胞选择性生长优势,如腺苷脱氨酶、氨基乙二醇化磷酸转移酶、二氢叶酸还原酶,潮霉素-B-磷酸转移酶、抗药性、或编码提供营养缺陷型缺失的生物合成能力的蛋白质的基因。如果报告基因与该或每种构建体一起包括,则可以包括内部核糖体进入位点(IRES)序列。在一个实例中,另外的遗传元件与独立的启动子/增强子可操作地连接并受其控制。此外,可以

使用用于在细菌或细胞培养物中繁殖构建体的合适的复制起点。复制起点的序列通常与ddRNAi构建体和其他遗传序列分开。此类复制起点是本领域已知的,并且包括pUC、ColE1、2-微米(2-micron)或SV40复制起点。

[0576] 表达构建体

[0577] 在一个实例中,本披露的ddRNAi构建体包括在表达构建体内。

[0578] 在一个实例中,表达构建体是表达载体。

[0579] 在一个实例中,表达载体是质粒,例如如本领域已知的。在一个实例中,合适的质粒表达载体是pAAV载体,例如自身互补的pAAV(pscAAV)质粒载体或单链pAAV(pssAAV)质粒载体。如本文描述的,质粒可以包含一种或多种RNA pol III启动子,例如以驱动本披露的一种或多种RNA的表达。本文已经描述了包含在表达载体中的合适的RNA pol III启动子。

[0580] 在一个实例中,表达载体是微环DNA。微环DNA描述于美国专利披露号2004/0214329中。微环DNA可用于持续高水平的核酸转录。环状载体的特征在于缺乏表达沉默的细菌序列。例如,微环载体与细菌质粒载体的不同之处在于它们缺乏复制起点,并且缺乏通常在细菌质粒中发现的药物选择标记,例如 $\beta$ -内酰胺酶、tet等。因此,微环DNA变得尺寸更小,这允许更有效的递送。

[0581] 在一个实例中,表达载体是病毒载体。

[0582] 基于任何合适病毒的病毒载体可用于递送本披露的ddRNAi。此外,可以使用杂合病毒系统。病毒递送系统的选择将取决于各种参数,如递送靶向的组织、系统的转导效率、致病性、免疫学和毒性问题等。

[0583] 基因疗法中常用的病毒系统类别可以根据其基因组是否整合到宿主细胞染色质(逆转录病毒和慢病毒)中或持续存在于细胞核中主要作为染色体外附加体(腺相关病毒、腺病毒和疱疹病毒)而分为两组。在一个实例中,本披露的病毒载体整合到宿主细胞的染色质中。在另一个实例中,本披露的病毒载体作为染色体外附加体持续存在于宿主细胞的细胞核中。

[0584] 在一个实例中,病毒载体来自细小病毒科家族。细小病毒科是一类小的单链无包膜DNA病毒(其中基因组长大约5000个核苷酸)的家族。家族成员中包括腺相关病毒(AAV)。在一个实例中,本披露的病毒载体是AAV。AAV是一种依赖性细小病毒,其通常需要与另一种病毒(典型地是腺病毒或疱疹病毒)共感染以启动和维持生产性感染周期。在没有这种辅助病毒的情况下,AAV仍然能够通过受体介导的结合和内化来感染或转导靶细胞,穿透非分裂细胞和分裂细胞两者中的细胞核。因为在没有辅助病毒的情况下不会从AAV感染来产生子代病毒,所以转导的程度仅限于被病毒感染的初始细胞。正是这一特征使AAV成为本披露的理想载体。此外,与逆转录病毒、腺病毒和单纯疱疹病毒不同,AAV似乎缺乏人致病性和毒性(Kay等人,(2003)Nature[自然].424:251)。由于基因组通常仅编码两个基因,因此作为递送载体,AAV受4.5个单链千碱基(kb)的包装容量的限制并不出人意料。然而,尽管这种尺寸限制可能限制可以递送用于替换基因疗法的基因,但它不会对较短序列(如shRNA)的包装和表达产生不利影响。

[0585] 在一个实例中,病毒载体是腺病毒(AdV)载体。腺病毒是中等尺寸的双链无包膜DNA病毒,其中线性基因组在26-48kbp之间。腺病毒通过受体介导的结合和内化进入靶细胞,穿透非分裂和分裂细胞中的细胞核。腺病毒严重依赖宿主细胞进行存活和复制,并且能

够使用宿主的复制机制在脊椎动物细胞的细胞核中复制。

[0586] 与本披露的ddRNAi构建体一起使用的另一种病毒递送系统是基于来自逆转录病毒科的病毒的系统。逆转录病毒包含单链RNA动物病毒,其特征在于两个独特的特征。首先,逆转录病毒的基因组是二倍体,由RNA的两个拷贝组成。其次,该RNA由病毒体相关酶逆转录酶转录成双链DNA。然后,该双链DNA或原病毒可以整合到宿主基因组中,并作为宿主基因组的稳定整合的组分从亲代细胞传递到子代细胞。

[0587] 在一些实例中,病毒载体是慢病毒。慢病毒载体通常用水泡状滑膜病毒糖蛋白(VSV-G)假型化,并且已经衍生自人免疫缺陷病毒(HIV);visna-maedi,其导致绵羊的脑炎(visna)或肺炎;马感染性贫血病毒(EIAV),其导致马的自身免疫性溶血性贫血和脑病;猫免疫缺陷病毒(FIV),其导致猫免疫缺陷;牛免疫缺陷病毒(BIV),其导致牛的淋巴结病和淋巴细胞增多症;和猴免疫缺陷病毒(SIV),其导致非人灵长类动物的免疫缺陷和脑病。基于HIV的载体通常保留<5%的亲本基因组,并且<25%的基因组被并入到包装构建体中,这最小化了产生恢复复制能力的HIV的可能性。通过开发自身失活载体进一步提高了生物安全性,这些自失活载体含有下游长末端重复序列中调节元件的缺失,消除了载体动员所需的包装信号的转录。使用慢病毒载体的主要优点之一是基因转移在大多数组织或细胞类型中是持久的,甚至在转导细胞的细胞分裂后也是如此。

[0588] 用于表达本披露的RNA的基于慢病毒的构建体包含来自慢病毒的5'和3'长末端重复(LTR)的序列。在一个实例中,病毒构建体包含来自慢病毒的灭活的或自身失活的3'LTR。可以通过本领域已知的任何方法使3'LTR自身失活。例如,3'LTR的U3元件含有其增强子序列(例如TATA盒、Sp1和NF- $\kappa$ B位点)的缺失。作为自身失活3'LTR的结果,整合到宿主基因组中的原病毒将包含失活的5'LTR。LTR序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。基于慢病毒的构建体还可以并入MMLV或MSCV、RSV或哺乳动物基因的序列。此外,来自慢病毒5'LTR的U3序列可以用病毒构建体中的启动子序列替换。这可能会增加从包装细胞系中回收的病毒的滴度。还可以包括增强子序列。

[0589] 可以使用本领域技术人员已知的其他病毒或非病毒系统将本发明的ddRNAi或核酸递送至目的细胞,包括但不限于基因缺失的腺病毒-转座子载体(参见Yant等人,(2002) Nature Biotech.[自然生物技术]20:999-1004);来源于Sindbis病毒或Semliki森林病毒的系统(参见Perri等人,(2002) J.Virol.[病毒学杂志]74(20):9802-9807);来源于新城疫病毒或仙台病毒的系统。

[0590] 测试本披露的RNA或ddRNAi构建体

[0591] 细胞培养模型

[0592] 可用作OPMD的细胞培养模型的细胞系的实例是实例3中描述的HEK293T细胞系(HEK293T,ATCC,马纳萨斯(Manassas),美国),其已经用表达正常Ala10-人PABPN1-FLAG(Ala10)或突变体Ala17-人PABPN1-FLAG(Ala17)(后者是OPMD的标志)的载体转染。

[0593] 可用作OPMD的细胞培养模型的细胞系的另一个实例是稳定转染以表达正常Ala10-人PABPN1-FLAG(Ala10)或突变体Ala17-人PABPN1-FLAG(Ala17)的原代小鼠成肌细胞(IM2)细胞系。稳定表达突变体Ala17-人PABPN1-FLAG(Ala17)的示例性IM2衍生细胞系是实例3中描述的H2kB-D7e细胞系。在Raz等人,(2011) American Journal of Pathology[美国病理学杂志],179(4):1988-2000中也描述了H2kB-D7e细胞系。

[0594] 适用于OPMD细胞培养模型的其他细胞系是本领域已知的,如Fan等人,(2001) Human Molecular Genetics[人类分子遗传学],10:2341-2351,Bao等人,(2002) The Journal of Biological Chemistry[生物化学杂志],277:12263-12269,以及Abu-Baker等人,(2003) Human Molecular Genetics[人类分子遗传学],12:2609-2623。

[0595] 如本文举例说明的,通过向细胞给予RNA或ddRNAi构建体并随后测量由PABPN1基因编码的RNA或蛋白质的表达水平来确定本披露的RNA或ddRNAi构建体的活性。例如,可以使用一种或多种对PABPN1特异的探针或引物,通过RT-PCR、定量PCR、半定量PCR或在严格条件下的原位杂交中的任何一种或多种来测定细胞内PABPN1基因表达。还可以使用一种或多种对PABPN1DNA特异的探针或引物或PABPN1蛋白的ELISA,通过PCR来测定细胞外PABPN1。

[0596] 可用于检测PABPN1表达的RT-PCR、定量PCR或半定量PCR技术的多核苷酸是已知的并且可商购获得(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher))。然而,可以使用本领域已知的方法和/或软件,基于可用于PABPN1的序列信息,来设计可用于基于PCR的检测方法的多核苷酸。在一个实例中,可以使用本领域已知的标准方法使用RT-PCR来检测PABPN1 mRNA的存在或不存在。在一个实例中,可以使用蛋白质印迹法、ELISA或本领域可获得的其他标准定量或半定量技术中的任何一种或多种或这些技术的组合来检测PABPN1多肽或蛋白的存在或不存在或相对量。依赖于PABPN1的抗体识别的技术被考虑并且例如在实例3-5中进行了描述。在一个实例中,PABPN1多肽的存在或不存在或相对丰度可以用包含PABPN1多肽的抗体捕获与所捕获的PABPN1多肽的电泳分辨率结合的技术来进行检测,例如使用Isonostic<sup>TM</sup>测定(目标发现公司(Target Discovery, Inc.))。针对PABPN1蛋白的抗体可商购获得。

[0597] 用于标准化转染或转导效率和样品回收的差异的各种手段在本领域中是已知的。

[0598] 本披露的RNA或ddRNAi构建体(其相对于由PABPN1编码的mRNA表达或蛋白质的水平或PABPN1蛋白的核聚集体的量(在没有本披露的RNA的情况下),减少由PABPN1编码的mRNA或蛋白质的表达或减少PABPN1蛋白质核聚集体的存在)被认为可用于治疗应用,例如像通过降低内源性PABPN1的表达以及用PABPN1蛋白(其不是如本文描述的OPMD的原因)替换一些或全部内源性PABPN1来治疗OPMD。

[0599] 动物模型

[0600] 有若干种小动物模型可用于研究OPMD,其实例描述于Uyama等人,(2005) Acta Myologica[肌学学报],24(2):84-88,以及Chartier和Simonelig(2013) Drug Discovery Today:technologies[当今药物发现:技术],10:e103-107。示例性动物模型是本文实例4和5中描述的A17.1转基因小鼠模型,其先前已描述于Davies等人,(2005) Nature Medicine[自然医学],11:672-677和Trollet等人,(2010) Human Molecular Genetics[人类分子遗传学],19(11):2191-2207中。

[0601] 任何前述动物模型可用于确定本披露的RNA或ddRNAi构建体对敲低、降低或抑制由PABPN1基因编码的RNA或蛋白质的表达的功效。

[0602] 用于测定细胞内和细胞外PABPN1基因表达的方法已经在本文中关于细胞模型被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。

[0603] 用于替换功能性PABPN1的药剂

[0604] 在一个实例中,本披露提供了用于替换功能性PABPN1蛋白至例如细胞或动物的药剂。功能性PABPN1蛋白不会是导致OPMD的原因,也不会被本披露的一种或多种RNA靶向的

mRNA转录物编码。

[0605] 在一个实例中,用于替换功能性PABPN1蛋白至细胞或动物的药剂是编码功能性PABPN1蛋白的核酸,例如像DNA或cDNA。例如,编码功能性PABPN1蛋白的核酸可以是密码子优化的,例如相对于野生型PABPN1核酸含有一个或多个简并或摆动碱基,但其编码相同的氨基酸,使得相应mRNA序列编码功能性PABPN1蛋白不被本披露的一种或多种RNA识别。例如,编码功能性PABPN1蛋白的、经密码子优化的核酸可以包含相对于本披露的一种或多种RNA靶向的区域内的野生型PABPN1核酸的一个或多个简并或摆动碱基。在一个实例中,一个或多个简并或摆动碱基位于本披露的RNA的种子区域内。

[0606] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸经密码子优化,使得其相应mRNA序列不被本披露的一种或多种RNA识别。例如,由经密码子优化的核酸序列编码的功能性PABPN1蛋白可以包含在SEQ ID NO:25中列出的氨基酸序列,即野生型人PABPN1蛋白的氨基酸序列。在一个实例中,用于替换功能性PABPN1蛋白(例如具有SEQ ID NO:25中列出的氨基酸序列的PABPN1蛋白)的药剂是包含SEQ ID NO:24中列出的序列的核酸。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的核酸也可以包含kozak序列。

[0607] 在一个实例中,功能性PABPN1蛋白附加或包含表位标签,例如Myc标签。例如,包含Myc标签的功能性PABPN1蛋白可以包含SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列。根据该实例,用于替换功能性PABPN1蛋白的药剂可以是包含SEQ ID NO:26中列出的序列的核酸。

[0608] 在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸与适用于表达功能性PABPN1蛋白的启动子可操作地连接。适用于与编码功能性PABPN1蛋白的核酸一起使用的一种示例性启动子是SpC512启动子。然而,可以使用本领域已知的任何合适的启动子。例如,US 20110212529 A1中描述了与编码功能性PABPN1蛋白的核酸一起使用的其他合适的启动子。

[0609] 如本文描述的,可用于本披露的一些实例的启动子可以是组织特异性的或细胞特异性的。

[0610] 在一个实例中,编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸可另外地包含一种或多种增强子以增加功能性PABPN1蛋白及其相应mRNA转录物的表达。适用于本披露的该实例的增强子是本领域技术人员已知的。

[0611] 编码功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在表达载体内。示例性表达载体已经在本披露的RNA和ddRNAi构建体的上下文中被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于该实例。

[0612] 因此,在一个实例中,用于替换功能性PABPN1蛋白至细胞或动物的药剂可以是包含编码功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体。例如,本披露的表达载体可以包含编码功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸,例如SEQ ID NO:24中列出的序列,以及用于其表达的启动子,例如SpC512启动子。在一个实例中,编码功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸也可以包含kozak序列。因此,本披露的表达载体可以包含SEQ ID NO:24中列出的序列,其5'末端具有kozak序列。

[0613] 在一个实例中,用于替换功能性PABPN1蛋白(其例如具有SEQ ID NO:25中列出的序列)的药剂是包含SEQ ID NO:24中列出的序列或由其组成的经密码子优化核酸。在一个实例中,经密码子优化的核酸进一步包含kozak序列。因此,用于替换功能性PABPN1蛋白的

药剂可以是包含SEQ ID NO:24中列出的序列(其5'末端具有kozak序列)或由其组成的核酸。

[0614] 在一个实例中,编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的核酸可以包含在质粒表达载体内。合适的质粒表达载体已在本文中描述,并且是本领域已知的。在一个实例中,合适的质粒表达载体是pAAV载体,例如pscAAV质粒载体或pssAAV质粒载体。

[0615] 在一个实例中,表达载体是微环DNA。本文已经描述了微环DNA载体。

[0616] 在一个实例中,表达载体是病毒载体。例如,基于任何合适病毒的病毒载体可用于递送编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸。此外,可以使用杂合病毒系统。病毒递送系统的选择将取决于各种参数,如递送靶向的组织、系统的转导效率、致病性、免疫学和毒性问题等。

[0617] 用于将遗传材料递送至细胞或动物的示例性病毒系统在本披露的RNA和ddRNAi构建体的上下文中被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于该实例。

[0618] 在一个实例中,病毒载体是AAV。

[0619] 在一个实例中,病毒载体是AdV载体。

[0620] 在一个实例中,病毒载体是慢病毒。

[0621] 可以使用本领域技术人员已知的其他病毒或非病毒系统将编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸递送至目的细胞,包括但不限于基因缺失的腺病毒-转座子载体(参见Yant等人,(2002) Nature Biotech.[自然生物技术]20:999-1004);来源于Sindbis病毒或Semliki森林病毒的系统(参见Perri等人,(2002) J.Virol.[病毒学杂志]74(20):9802-07);来源于新城疫病毒或仙台病毒的系统。

[0622] 根据其中编码如本文描述的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸与具有本披露的ddRNAi构建体一起提供的实例,编码功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸可以作为ddRNAi构建体包含在相同的表达载体内。

[0623] 在其中编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸和本披露的ddRNAi构建体一起提供的替代性实例中,编码功能性PABPN1蛋白和ddRNAi构建体的经密码子优化的核酸可以包含在不同的表达载体内。当编码功能性PABPN1蛋白和ddRNAi构建体的经密码子优化的核酸包含在不同的表达载体内时,对应表达载体可以是相同类型的载体或是不同类型的载体。

[0624] 测试功能性PABPN1

[0625] 细胞培养模型

[0626] OPMD的示例性细胞培养模型已经描述于本文中并且描述于实例3中。OPMD的此类细胞培养模型可用于评估本披露的药剂在靶向内源性PABPN1的本披露的一种或多种RNA存在下替换功能性PABPN1蛋白的能力。

[0627] 检测PABPN1蛋白的存在或不存在或相对量的示例性方法已经被描述并且在进行必要的修改后适用于该实例。例如,可以使用蛋白质印迹法、ELISA或本领域可获得的其他标准定量或半定量技术中的任何一种或多种或这些技术的组合来检测PABPN1蛋白的存在或不存在或相对量。依赖于PABPN1的抗体识别的技术被考虑并且在本文中(如在实例3中)进行了描述。突变体和功能性PABPN1蛋白可以与合适的蛋白质标签(例如myc或flag标签)表达,以使用可商购的适当抗体来助力突变体和功能性PABPN1蛋白的差异检测。例如,突变

体人PABPN1蛋白可以用FLAG标签表达,并包含SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列。以这种方式,突变体和功能性PABPN1蛋白两者的存在或不存在或相对量可以在细胞(在用本披露的RNA和用于替换本披露的功能性PABPN1蛋白的药剂转染或转导该细胞后)中独立地检测。

[0628] 在一个实例中,PABPN1多肽的存在或不存在或相对丰度可以用包含PABPN1多肽的抗体捕获与所捕获的PABPN1多肽的电泳分辨率结合的技术来进行检测,例如使用Isonostic<sup>TM</sup>测定(目标发现公司(Target Discovery, Inc.))。针对PABPN1蛋白的抗体可商购获得。

[0629] 在本披露的一种或多种RNA存在下(即,在本文描述的RNAi试剂的存在下),在细胞中表达PABPN1蛋白(其不是导致OPMD的原因)的本披露的药剂被认为可用于治疗OPMD。

[0630] 动物模型

[0631] 已经描述了用于研究OPMD的示例性动物模型。用于研究OPMD的示例性动物模型也描述于实例4和5中。

[0632] 在本披露的RNA或ddRNAi构建体的存在下,任何前述动物模型可用于确定本披露的药剂在体内替换功能性PABPN1蛋白的功效。

[0633] 用于测定细胞内和细胞外PABPN1表达的方法已经在本文中关于细胞模型被描述并且在进行必要的修改后应被视为适用于本披露的该实例。

[0634] 在一个实例中,实例5中描述的组织学和形态学分析可用于确定在本披露的RNA或ddRNAi构建体的存在下本披露的药剂在体内替换功能性PABPN1蛋白的功效。可用于确定本披露的药剂在体内替换功能性PABPN1蛋白的功效的另外的测定描述于Trollet等人,(2010) Human Molecular Genetics[人类分子遗传学],19(11):2191-2207中。

[0635] 组合物和载体

[0636] 在一些实例中,在组合物中提供本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体。在一些实例中,在组合物中提供编码本披露的功能性PABPN1蛋白的核酸。在一些实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体与编码本披露的功能性PABPN1蛋白的核酸一起在组合物中提供。

[0637] 如本文描述的,表达载体可以包含(单独的或与编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸组合的)本披露的ddRNAi构建体。因此,本文提及的表达载体和/或包含其的组合物将被理解为涵盖:(i)包含本披露的ddRNAi构建体的表达载体,或包含其的组合物;(ii)包含本披露的ddRNAi构建体和编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体,或包含其的组合物;或(iii)包含编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体,或包含其的组合物。

[0638] 根据一个实例,本披露的组合物可以包含(i)包含本披露的ddRNAi构建体的表达载体,和(ii)包含编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体。

[0639] 可替代地,本披露的组合物可以包含表达载体,该表达载体包含本披露的ddRNAi构建体和编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸。

[0640] 在又一个实例中,可以在一种组合物中提供包含本披露的ddRNAi构建体的表达载体,并且可以在另一种组合物中提供包含编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体,例如包装在一起。

[0641] 本披露的组合物还可以包含一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。例如,组

合物可以包含适用于在将其给予后递送至受试者的肌肉的本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体的载体。

[0642] 在一些实例中,载体是基于脂质的载体、阳离子脂质或脂质体核酸复合物、脂质体、胶束、病毒体、脂质纳米颗粒或其混合物。

[0643] 在一些实例中,载体是可生物降解的基于聚合物的载体,从而形成阳离子聚合物-核酸复合物。例如,载体可以是阳离子聚合物微粒,其适用于将本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体递送至肌肉细胞。使用阳离子聚合物将组合物递送至细胞是本领域已知的,像例如Judge等人, (2005) Nature[自然]25:457-462中描述,其内容通过引用并入本文。示例性的基于阳离子聚合物的载体是阳离子DNA结合聚合物,如聚乙烯亚胺。适用于与本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体复合和递送的其他阳离子聚合物包括聚(L-赖氨酸)(PLL)、壳聚糖、PAMAM树枝状大分子和聚(2-二甲氨基)甲基丙烯酸乙酯(pDMAEMA)。其他合适的阳离子聚合物是本领域已知的并且描述于Mastrobattista和Hennink, (2012) Nature[自然]Materials,11:10-12、WO/2003/097107和WO/2006/041617中,其全部内容通过引用并入本文。已经开发了这种载体配制品用于各种递送途径,包括肠胃外皮注射、静脉内注射和吸入。

[0644] 在另外的实例中,载体是基于环糊精的载体,如环糊精聚合物-核酸复合物。

[0645] 在另外的实例中,载体是基于蛋白质的载体,例如阳离子肽-核酸复合物。

[0646] 在另一个实例中,载体是脂质纳米颗粒。示例性纳米颗粒描述于例如US 7514099中。

[0647] 在一些实例中,本披露的RNA或ddRNAi或表达构建体与包含阳离子脂质/胆固醇/PEG-C-DMA/DSPC(例如以40/48/2/10比率)、阳离子脂质/胆固醇/PEG-DMG/DSPC(例如以40/48/2/10比率),或阳离子脂质/胆固醇/PEG-DMG(例如以60/38/2比率)的脂质纳米颗粒组合物配制。在一些实例中,阳离子脂质是DMA中的辛基CL,DMA中的DL、L-278、DLinKC2DMA或MC3。

[0648] 在另一个实例中,本披露的RNA或ddRNAi或表达构建体与WO 2010/021865;WO 2010/080724;WO 2010/042877;WO 2010/105209或WO 2011/022460中描述的任何阳离子脂质配制品一起配制。

[0649] 在另一个实例中,本披露的RNA或ddRNAi或表达构建体与另一种化合物缀合或复合,例如以促进RNA或ddRNAi或表达构建体的递送。此类缀合物的非限制性实例描述于US 2008/0152661和US 2004/0162260中(例如CDM-LBA、CDM-Pip-LBA、CDM-PEG、CDM-NAG等)。

[0650] 在另一个实例中,聚乙二醇(PEG)与本披露的RNA或ddRNAi或表达载体共价附接。所附接的PEG可以是任何分子量,例如约100至约50,000道尔顿(Da)。

[0651] 在又其他实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体与载体一起配制,该载体包含含有聚(乙二醇)脂质(PEG修饰的或长循环脂质体或隐形脂质体)的表面修饰的脂质体,例如像WO 96/10391;WO 96/10390;或WO 96/10392中披露的。

[0652] 在一些实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体还可以与聚乙烯亚胺或其衍生物(如聚乙烯亚胺-聚乙二醇-N-乙酰半乳糖胺(PEI-PEG-GAL)或聚乙烯亚胺-聚乙二醇-三-N-乙酰半乳糖胺(PEI-PEG-triGAL)衍生物)一起配制或复合。

[0653] 在其他实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体与膜破坏剂(如美国专利

申请公开号2001/0007666中描述的那些)复合。

[0654] 其他载体包括环糊精(参见例如,Gonzalez等人,(1999),Bioconjugate Chem.[生物共轭化学],10,1068-1074;或WO 03/46185)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和PLGA微球(参见例如US 2002130430)。

[0655] 组合物理想地包括增加本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体的生物稳定性的材料和/或增加组合物选择性定位和/或穿透肌细胞的能力的材料。本披露的治疗组合物可以在药学上可接受的载体(例如生理盐水)中给予,这些载体是基于给予模式和途径以及标准药用惯例来选择的。本领域普通技术人员可以容易地配制包含本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体的药物组合物。在某些情况下,使用等渗配制品。通常,用于等渗性的添加剂可以包括氯化钠、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下,优选等渗溶液,如磷酸盐缓冲盐水。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实例中,将血管收缩剂添加到配制品中。根据本披露的组合物无菌且无热原。合适的药物载体、以及用于药物配制品的药物必需品描述于:Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学的科学与实践](之前为Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]),Mack Publishing Co.[麦克出版公司](该领域的标准参考文献)中,以及USP/NF中。

[0656] 药物组合物的体积、浓度和配制品,以及剂量方案可以专门定制以最大化细胞递送,同时最小化毒性,例如炎症反应,例如相对大的体积(5、10、20、50ml或更多),并且如果需要,可以使用相应低浓度活性成分以及包含抗炎化合物如皮质类固醇。

[0657] 可以配制本披露的组合物用于通过任何合适的途径给予。例如,给予途径包括但不限于肌肉内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及透皮或通过吸入或栓剂。示例性给予途径包括静脉内(IV)、肌肉内(IM)、口服、腹膜内、皮内、动脉内和皮下注射。在一个实例中,本披露的组合物被配制用于IM给予。此类组合物可用于药物应用,并且可以容易地配制在合适的无菌无热原运载体中,例如用于注射、用于肠胃外给予(例如IM、静脉内(包括静脉内输注)、SC)和用于腹膜内给予的缓冲盐水。一些给予途径(如IM、IV注射或输注)可以实现ddRNAi构建体和/或编码本披露的PABPN1的经密码子优化的核酸向肌肉组织的有效递送和转染,以及其中RNA和/或经密码子优化的核酸的表达。

#### [0658] 治疗的方法

[0659] 在一个实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体或组合物可用于在受试者中抑制内源性PABPN1蛋白(包括是导致OPMD的原因的PABPN1蛋白)的表达。

[0660] 在一个实例中,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体或组合物可用于在患有OPMD的受试者中治疗OPMD。类似地,本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体或组合物可用于在患有OPMD或倾向于患有OPMD的受试者中预防OPMD的一种或多种症状的发展或进展。

[0661] 在每个前述实例中,本披露的表达载体和/或组合物可以包含本披露的ddRNAi构建体和编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸两者。因此,表达载体或组合物的给予可以有效地(i)抑制、降低或敲低内源性PABPN1(包括包含导致OPMD的扩增的聚丙氨酸段的PABPN1蛋白)的表达,和(ii)提供功能性PABPN1蛋白(其不被RNA(该RNA抑制、降低或敲低内源性PABPN1的表达)靶向)的表达。因此,本披露的组合物可以在其给予的细胞或动物中恢复PABPN1蛋白功能,例如RNA的转录后加工。

[0662] 在另一个实例中,OPMD的治疗可以包括分别向受试者给予(i)一种或多种抑制

PABPN1蛋白 (其是导致OPMD的原因) 表达的药剂, 和 (ii) 编码本披露的功能性PABPN1蛋白的密码子优化的核酸的表达载体, 或包含其的组合物。如本文描述的, 用于抑制PABPN1蛋白 (其是导致OPMD的原因) 表达的一种或多种药剂可以是包含本披露的RNA或ddRNAi构建体或表达载体或组合物。可以向受试者一起地、同时地或连续地给予组分 (i) 和 (ii)。

[0663] 例如, OPMD的治疗可以包括向受试者给予编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸, 其中该受试者先前已经被给予一种或多种用于抑制PABPN1蛋白 (其是导致OPMD的原因但是不抑制经密码子优化的核酸的表达) 的表达的药剂。例如, 受试者可能先前已经被给予本披露的RNA、多种RNA、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物。

[0664] 如上所述, 给予途径包括但不限于肌肉内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及透皮或通过吸入或栓剂。示例性给予途径包括静脉内 (IV)、肌肉内 (IM)、口服、腹膜内、皮内、动脉内和皮下注射。一些给予途径 (如IM、IV注射或输注) 可以实现ddRNAi构建体和/或编码本披露的PABPN1的经密码子优化的核酸向肌肉组织的有效递送和转染, 以及其中RNA和/或经密码子优化的核酸的表达。

[0665] 通过常规实验, 本领域技术人员能够确定治疗患有OPMD的受试者所需的本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物的有效、无毒量。针对任何特定患者的治疗有效剂量水平将取决于多个因素, 包括: 所使用的组合物; 患者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食; 给予时间; 给予途径; 本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物的结合速率; 治疗的持续时间, 以及医学上熟知的其他相关因素。

[0666] 本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物的功效 (以如下量降低或抑制PABPN1蛋白 (其是导致OPMD的原因) 的表达以及表达功能性PABPN1蛋白 (其不是导致OPMD的原因), 该量足以恢复PABPN1功能) 可以通过在所治疗的受试者中评估肌肉收缩特性和/或吞咽困难来确定。用于测试吞咽能力和肌肉收缩特性的方法是本领域已知的。例如, 可以使用电视透视检查、UGI内镜检查术或食道测压法和阻抗测验来评估吞咽困难。用于评估OPMD的临床特征的其他方法描述于Rüegg等人. (2005) Swiss Medical Weekly [瑞士医学周刊], 135:574-586。

#### [0667] 试剂盒

[0668] 本披露还提供了试剂盒中的本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物。试剂盒可以包含容器。典型地, 试剂盒含有本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物及其给药说明书。在一些实例中, 试剂盒包含一种以上的本披露的RNA或ddRNAi或表达载体或组合物。在一个实例中, 试剂盒包含 (i) 作为第一试剂盒组分之本披露的RNA或ddRNAi构建体或一种或多种表达载体或一种或多种组合物, 以及 (ii) 作为第二试剂盒组分的包含编码本披露的功能性PABPN1蛋白的经密码子优化的核酸的表达载体或包含其的组合物。第一和第二试剂盒组分可以一起包装在试剂盒中。

[0669]

表 1-PABPN1 mRNA 转录物内的靶区域

| 区域 ID | 区域序列 (5'-3')               | SEQ ID NO:   |
|-------|----------------------------|--------------|
| 区域 1  | UUAGAGGAGAGAUGGAGGCUGAU    | SEQ ID NO: 1 |
| 区域 2  | AGGAAGAAGCUCGAGAAGCUAA     | SEQ ID NO: 2 |
| 区域 3  | GAGGUAGAGAAGCAGAUAAUAUGAGU | SEQ ID NO: 3 |

表 2-ssRNA

| ssRNA ID | 效应子序列 (5'-3')               | SEQ ID NO:   |
|----------|-----------------------------|--------------|
| ssRNA1   | AUCAGCCUCCAUCUUCUCCUCAA     | SEQ ID NO: 4 |
| ssRNA2   | UUAGCUUCUCAGCUUCUUCUCCU     | SEQ ID NO: 6 |
| ssRNA3   | ACUCAUAUUCAUCUGCUUCUCUACCUC | SEQ ID NO: 8 |

表 3-dsRNA 双链体

| dsRNA ID | 效应子 (5'-3')                 | SEQ ID NO:   | 效应子互补 (5'-3')              | SEQ ID NO:   |
|----------|-----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| dsRNA1   | AUCAGCCUCCAUCUUCUCCUCAA     | SEQ ID NO: 4 | UUGAGGAGAGAAGGAGGCUGAU     | SEQ ID NO: 5 |
| dsRNA2   | UUAGCUUCUCAGCUUCUUCUCCU     | SEQ ID NO: 6 | AGGAAGAAGCUCGAGAAGCUAA     | SEQ ID NO: 7 |
| dsRNA3   | ACUCAUAUUCAUCUGCUUCUCUACCUC | SEQ ID NO: 8 | GAGGUAGAGAAGCAGAUAAUAUGAGU | SEQ ID NO: 9 |

[0670]

表 4-shRNA 双链体

| shRNA ID | 效应子 (5'-3')                   | SEQ ID NO:    | 效应子互补 (5'-3')                 | SEQ ID NO:    |
|----------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| shRNA1   | AUCAGCCUCCAUCUUCUCCUCAA       | SEQ ID NO: 10 | UUAGAGGAGAAAGAUUGGAGGCUGAU    | SEQ ID NO: 11 |
| shRNA2   | UUAGCUUCUCAGCUUCUUCUU         | SEQ ID NO: 12 | AGGAAAGAAGCUCUGAGAAAGCUAA     | SEQ ID NO: 13 |
| shRNA3   | ACUCAUAUUAUCUCUGCUUCUCUACCCUC | SEQ ID NO: 14 | GAGGUAGAGAAAGCAGAUAGAAUAUGAGU | SEQ ID NO: 15 |

表 5-shRNA

| shRNA ID | shRNA 序列 (5'-3')                                          | SEQ ID NO:    |
|----------|-----------------------------------------------------------|---------------|
| shRNA1   | GAGGAGAGAGUUGGAGGCUGAUCAAGAGAAUCAGCCUCCAUCUUCUCCUC        | SEQ ID NO: 16 |
| shRNA2   | AUCAGCCUCCAUCUUCUCCUCCAAAGAGAGAGAGAGAGAAUGGAGGCUGAU       | SEQ ID NO: 17 |
| shRNA3   | GGAGAGAGCUGAGAGAGCUAACAGAGAUUAGCUUCUCAGCUUCUCC            | SEQ ID NO: 18 |
| shRNA4   | UUAGCUUCUCAGCUUCUUCUCCAAAGAGAGGAGAAAGCUGAGAGAGCUAA        | SEQ ID NO: 19 |
| shRNA5   | GAGGUAGAGAGAGAGAGAAUAUAGAGUUCAAGAGACUCAUUAUUCUUCUACCCUC   | SEQ ID NO: 20 |
| shRNA6   | CUCAUAUUAUCUGCUUCUUCUACCCUCCAAGAGAGAGAGGUAAGAGAGAAUAUGAGU | SEQ ID NO: 21 |

- [0671] 实例
- [0672] 实例1-靶向PABPN1的dsRNA和shRNA的设计

[0673] 使用披露的siRNA设计算法(包括Ambion公司、普洛麦格公司(Promega)、英杰公司(Invitrogen)、傲锐东源公司(Origene)和MWG公司(MWG))从PABPN1mRNA序列鉴定代表ddRNAi构建体设计的潜在靶标的序列:选择在人、牛和小鼠中保守的序列。将siRNA合成并在体外测试,并且选择三种活性siRNA用于转化为ddRNAi构建体。对应于选择作为设计双链RNA(dsRNA)和短发夹RNA(shRNA)的靶标区域的mRNA转录物示于表1中。

[0674] 设计并验证包含与表1中描述的靶区域基本上互补的效应子序列的dsRNA(表3)。筛选下调人PABPN1的siRNA序列在HeLa细胞中进行,其中内源性人PABPN1被组成型表达。使用Oligofectamine(生命技术公司(Life Technologies))进行siRNA的转染。简而言之,在转染当天,将12孔板中的培养基替换为400 $\mu$ l的不含抗生素和100 $\mu$ l的Oligofectamine-siRNA复合物的无血清培养基。在100 $\mu$ l的Oligofectamine-siRNA复合物中,将7 $\mu$ l的Opti-Mem(Gibco公司)中的3 $\mu$ l的Oligofectamine和87 $\mu$ l的Opti-Mem中的60pmol siRNA混合在一起,最终体积为100 $\mu$ l。将混合物在室温下孵育20min。转染后4小时,在每个孔中添加250 $\mu$ l含有30%FBS的培养基。最终的siRNA浓度为80nM。转染后48小时进行RNA提取。针对表1中列出的靶区域测试的所有siRNA序列显示HeLa细胞中PABPN1的显著敲低。在测试的siRNA中,三种序列显示出不同的功效程度(表3中的dsRNA 1、2和3)。这些也在来自健康或受OPMD影响的个体的人成肌细胞中进行评估。简而言之,根据上述方法用dsRNA1、dsRNA2或dsRNA3转染来自健康或受OPMD影响的个体的人成肌细胞。然后进行定量RT-PCR,并且其显示每个dsRNA的显著水平的敲低(图1)。

[0675] 设计了对应于dsRNA 1-3的shRNA(其包含与表1中描述的靶区域基本上互补的效应子序列)并将其示于表4中。表4中的shRNA的完整序列(包括效应子序列、茎环序列和效应子互补序列(5'-3'方向))示于表5中。

[0676] 实例2-基于自身互补AAV的质粒构建体和表达靶向PABPN1的shRNA的病毒的产生

[0677] 通过将靶向PABPN1的单个或三个shRNA亚克隆到scAAV2主链中,产生表达靶向PABPN1的一个或三个shRNA的自身互补的腺相关病毒2型(scAAV2)质粒(如表5中所示)。

[0678] 简而言之,将包含在H1启动子控制下编码shRNA5(SEQ ID NO:20)的DNA的单个shRNA构建体克隆到pAAV2载体主链(pAAV-shRNA5)中。还产生了两个三重shRNA构建体,其包含分别在RNA聚合酶III启动子U61、U69和H1的控制下的克隆到pAAV2载体主链中的编码shRNA1(SEQ ID NO:16)、shRNA3(SEQ ID NO:18)和shRNA5(SEQ ID NO:20)的DNA。这些三重构建体是pAAV-shRNAx3-短(SEQ ID NO:22)和pAAV-shRNAx3-长(SEQ ID NO:23)。两种变体均包括所描述的三顺反子shRNA构建体,然而,pAAV-shRNAx3-长中的构建体还包括填充片段DNA序列以产生AAV包装的最佳插入物尺寸。类似地,构建表达针对HBV聚合酶基因的shRNA的AAV病毒质粒(pAAV-HBVpol)用作对照。

[0679] 产生另外两种质粒,一种编码FLAG-标记的突变体人PABPN1(包括7丙氨酸-扩增)(pAAV mut-PABPN1-FLAG;SEQ ID NO:27),另一种包含编码野生型人PABPN1的具有MYC标记的经密码子优化的序列(pAAV Opt-hPABPN1-MYC;SEQ ID NO:26)。

[0680] 通过AAV8衣壳中的假型化来产生每个AAV载体。

[0681] 然后产生重组假型AAV载体储液(stock)。简而言之,将HEK293T细胞在Dulbecco改良的Eagle培养基(补充有10%FBS)中的滚瓶中培养,并在37℃和5%CO<sub>2</sub>下孵育。根据制造商的说明书,将本实例中描述的每个pAAV-shRNA病毒质粒和pAAVhelpercap8质粒(pDP8r)

或pAAVhelpercap9质粒 (pDP9rs) 与聚乙烯亚胺 (PEI) 复合。然后在HEK293T细胞中用pAAV-shRNA5、pAAV-shRNAx3-短、pAAV-shRNAx3-长和pDP8r (或pDP9rs) 中的一个进行双重转染。将HEK293T细胞在37℃和5%CO<sub>2</sub>下培养72小时,之后裂解细胞并通过碘克沙醇(西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)) 步骤-梯度超速离心法来纯化每个病毒质粒的表达scAAV shRNA的颗粒。通过斑点杂交和定量聚合酶链反应 (Q-PCR) 来定量载体基因组的数量。

[0682] 针对指定为pAAV-shRNA5、pAAV-shRNAx3-短、pAAV-shRNAx3-长、pAAV-HBVpol、pAAV mut-PABPN1-FLAG和pAAV Opt-hPABPN1-MYC的病毒质粒,将相应scAAV8病毒制剂分别指定为scAAV8-shRNA5、scAAV8-shRNAx3-短、scAAV8-shRNAx3-长、scAAV8-HBVpol、ssAAV8 mut-PABPN1-FLAG和ssAAV9-Opt-hPABPN1-MYC。

[0683] 实例3-体外PABPN1的基因沉默

[0684] 该实例证明了实例2中产生的PABPN1pAAV-shRNA质粒在体外敲低PABPN1表达的能力。

[0685] 细胞

[0686] 人胚肾细胞 (HEK293T, ATCC, 马纳萨斯 (Manassas), 美国) 在含有20mM HEPES、10%胎牛血清 (FBS) 和2mM谷氨酰胺 (PAA实验室, 约维尔 (Yeovil), 英国) 的Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM) 中生长。

[0687] 原代小鼠成肌细胞 (克隆IM2) (用温度敏感的SV40大T抗原 (tsA58) 转基因无限增殖, 并来源于Immorto-小鼠H2kB-IM2 (亲本细胞系)、H2kB-WTA (编码人野生型PABPN1) 和H2kB-D7e (编码7丙氨酸扩增的PABPN1)) 由伦敦国王学院 (King's College London) 的Michael Antoniou博士提供。使IM2细胞在含有20mM HEPES、2mM谷氨酰胺, 以及补充有20% FBS、0.5%鸡胚提取物、100U/ml青霉素-链霉素、2mmol/L的L-谷氨酰胺和20U/ml干扰素-γ的DMEM中生长。

[0688] 治疗

[0689] 简而言之, HEK293T细胞以 $3 \times 10^5$ 细胞/孔接种, 并在第二天用pAAV-shRNA5、pAAV-shRNAx3-短或pAAV-shRNAx3-长 (4μg/孔) 中之一进行转染 (在用或不用表达突变体hPABPN1-FLAG (pAAV mut-PABPN1-FLAG) (4μg/孔) (SEQ ID NO:27) 或经密码子优化的PABPN1 (pAAV Opt-hPABPN1-MYC) (4μg/孔) (SEQ ID NO:26) 的AAV质粒的情况下)。作为对照, 用针对HBV聚合酶基因表达的shRNA的pAAV-HBVpol质粒 (4μg/孔) 转染HEK293T细胞。将HEK293T细胞在33℃下、在DMEM 10%FCS中、在不存在抗生素的情况下孵育48小时, 之后收获细胞并产生细胞裂解物用于通过蛋白质印迹法进行分析。

[0690] 类似地, 将H2kB-D7e小鼠成肌细胞 ( $10^6$ 个细胞/孔) 通过用pAAV-HBVpol、AAV-shRNAx3-短或pAAV-shRNAx3-长的核转染来进行转染 (在用或不用表达突变体hPABPN1-FLAG或Opt-hPABPN1-MYC的AAV质粒 (1μg/孔的情况下)。然后将H2kB-D7e小鼠成肌细胞在33℃下、在DMEM 10%FCS中、在不存在抗生素的情况下孵育48小时, 然后通过DMEM/5%马血清中孵育另外72小时而转变为分化。转染后5天, 收获肌管并产生细胞裂解物用于进行通过蛋白质印迹法的分析。

[0691] 蛋白质印迹法分析

[0692] 通过在含有以下的RIPA缓冲液中匀浆细胞来制备细胞裂解物: NaCl 0.15M、0.1% SDS、50mM Tris (pH8)、2mM EDTA和10% Triton-X-100, 具有蛋白酶抑制剂混合物 (完全,

罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))。

[0693] 将蛋白质在4%-12%Bis-Tris凝胶(英杰公司(Invitrogen))上分离,并转移到硝酸纤维素膜(Hybond ECL膜;安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))上,将其通过在0.1M PBS、0.1%Tween-20中的5%牛奶中孵育来进行封闭。将硝酸纤维素膜用针对PABPN1(艾碧康公司(abcam),1/10,000)和作为管家对照的人GAPDH(艾碧康公司(abcam),1/10,000)或小鼠GAPDH(艾碧康公司(abcam),1/2500)产生的一抗染色。

[0694] 为了检测由pAAV mut-PABPN1-FLAG载体表达的扩增的突变体PABPN1蛋白和由pAAV opt-hPABPN1-MYC载体表达的经密码子优化的PABPN1蛋白,将硝酸纤维素膜用抗FLAG抗体(西格玛公司(Sigma),1/10,000)和抗cMYC抗体(艾碧康公司(Abcam),1/10,000)染色。

[0695] 将硝酸纤维素膜进一步与HRP缀合的抗兔和抗小鼠二抗(分别为西格玛公司(Sigma),1/2000和1/1000)一起孵育。将免疫反应条带用增强的化学发光试剂(ECL;安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))进行检测,并通过将膜暴露于ECL Hyperfilm(安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))进行可视化。

[0696] 使用ImageJ的相对于GAPDH的PABPN1总敲低的定量如图2所示。如从图2中显而易见的是,用单个shRNA载体(pAAV-shRNA5)、三顺反子短载体(pAAV-shRNAx3-短)和三顺反子长载体(pAAV-shRNAx3-长)分别实现PABPN1表达的平均40%、90%和95%敲低。由于针对PABPN1基因内的相同靶标的序列组成的相似性,短(约1Kb插入尺寸)和长(约1.5kb插入尺寸)三顺反子shRNA构建体都导致相似程度的PABPN1敲低。在这方面,向pAAV-shRNAx3-长构建体中添加填充片断序列不会对PABPN1敲低效率产生不利影响,而是导致稍微更高的敲低。

[0697] 单个shRNA载体(pAAV-shRNA5)和两种三顺反子载体(pAAV-shRNAx3-短和pAAV-shRNAx3-长)能够在用表达突变体PABPN1的pAAV mut-PABPN1-FLAG共转染的HEK293细胞中敲低野生型和突变体PABPN1,但总体敲低对于三重shRNA构建体比对单个shRNA构建体更具统计学意义。在另一方面,在用表达突变体PABPN1的pAAV mut-PABPN1-FLAG载体和靶向HBV聚合酶基因的pAAV-HBV-pol对照载体共转染的HEK293细胞中未观察到敲低(图3a和3b)。

[0698] 此外,相比于用表达扩增的突变体PABPN1蛋白的pAAV mut-PABPN1-FLAG载体共转染的HEK293细胞,用表达经密码子优化的PABPN1的pAAV Opt-hPABPN1-MYC载体共转染的细胞显示出良好水平的PABPN1蛋白。这些数据证明了经密码子优化的PABPN1蛋白对通过单个和三顺反子shRNA构建体表达的shRNA的降解具有抗性(图3a和3b)。为了证实该观察结果,使用cMYC抗体来检测包含cMYC肽标签的经密码子优化的PABPN1蛋白的表达(图3c)。

[0699] 在用以下进行转染的H2kB-D7e小鼠成肌细胞中获得了类似的结果:(i) pAAV-HBV-pol对照载体、(ii) 表达经密码子优化的PABPN1的pAAV Opt-hPABPN1-MYC载体、(iii) pAAV-shRNAx3-长载体、或(iv) pAAV Opt-hPABPN1-MYC载体和pAAV-shRNAx3-长载体。如从图4a-4e中显而易见的是,pAAV-shRNAx3-长载体能够敲低由分化的H2kB-D7e小鼠成肌细胞表达的突变体扩增的PABPN1蛋白,而经密码子优化的PABPN1蛋白对通过三顺反子shRNA构建体表达的shRNA的降解具有抗性。

[0700] 所有数据均表示为平均值±平均值的标准误差。使用学生t检验或ANOVA进行所有统计学分析。在\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 或\*\*\* $P < 0.001$ 时,差异被认为是显著的。

[0701] 基于这些数据,将pAAV8-shRNAx3-长构建体用于病毒生产和进一步评估。

[0702] 实例4-内源性PABPN1的基因沉默和经密码子优化的PABPN1的体内替换

[0703] 该实例证明了实例2中产生的scAAV8-shRNAx3-长重组病毒在体内敲低内源性PABPN1的表达的能力以及其用经密码子优化的人PABPN1的替换。还证明了突变体PABPN1的敲低和用非突变形式的基因替换的生理学结果。

[0704] 治疗

[0705] 先前已经描述了A17.1转基因小鼠 (Davies, Wang等人, 2005, Trollet, Anvar等人, 2010)。通过将杂合载体菌株A17.1 (Davies, Wang等人, 2005) 与FvB背景小鼠杂交产生A17.1小鼠和WT FvB对照。在出生后4周对小鼠进行牛PABPN1基因分型, 并将其置于最小疾病设施 (伦敦大学皇家霍洛威学院 (Royal Holloway-University of London)) 中, 并且随意食用和饮水。

[0706] 简而言之, 将10-12周龄A17小鼠置于下面的治疗组1-4中 (每个治疗组n=5)。将WT FvB小鼠 (也是10-12周龄) 用作健康对照并置于第5组中 (n=5)。将所有小鼠用2%-4%异氟烷麻醉并按如下方式处理:

[0707] 第1组 (A17): 通过IM注射, 向两种TA肌肉中单次推注含有 $2.5 \times 10^8$  scAAV8-shRNAx3-长病毒颗粒的50 $\mu$ l生理盐水。

[0708] 第2组 (A17): 通过IM注射, 向两种TA肌肉中单次推注含有 $1.3 \times 10^{11}$  ssAAV9-Opt-hPABPN1病毒颗粒 (表达经密码子优化的hPABPN1) 的50 $\mu$ l生理盐水。

[0709] 第3组 (A17): 通过IM注射, 向两种TA肌肉中单次推注含有 $2.5 \times 10^8$  scAAV8-shRNAx3-长病毒颗粒和 $1.3 \times 10^{11}$  ssAAV9-Opt-hPABPN1病毒颗粒的50 $\mu$ l生理盐水。

[0710] 第4组 (A17): 仅单次推注50 $\mu$ l生理盐水。

[0711] 第5组 (FvB): 仅单次推注50 $\mu$ l生理盐水。

[0712] 肌肉收缩特性

[0713] 使用先前在Trollet等人, (2010) Human Molecular Genetics [人类分子遗传学], 19 (11): 2191-2207中描述的方法, 在注射后18周进行TA肌肉收缩特性 (包括等长最大力和比力) 的测量。这些数据示于图4中。

[0714] 然后通过过量麻醉剂来处死小鼠, 之后从肌腱至肌腱来切离TA肌肉、称重、并在液氮冷却的异戊烷中快速冷冻, 用于进一步的组织学和分子分析。

[0715] PABPN1 mRNA表达

[0716] 根据制造商的说明书, 使用Trizol (英杰公司 (Invitrogen)) 从骨骼肌样品中提取总RNA。使用ND-1000 NanoDrop分光光度计 (NanoDrop科技公司 (NanoDrop Technologies)) 来定量RNA样品。根据制造商的说明书, 使用M-MLV逆转录酶 (英杰公司 (Invitrogen)) 来逆转录RNA (肌肉活组织检查: 50ng-250ng, 细胞沉淀: 1 $\mu$ g-3 $\mu$ g)。使用SYBR绿色混合缓冲液 (LightCycler®480 Sybr green I Master) 将cDNA以总共9 $\mu$ l的反应体积来用于定量PCR反应。PCR反应如下进行: 在95℃进行8分钟, 然后进行50个循环的以下: 在95℃进行15秒, 在60℃进行15秒, 并在72℃进行15秒。使用以下程序通过熔解曲线分析来检查PCR产物的特异性: 65℃, 以0.11℃/秒的速度增加至97℃。

[0717] 将每个mRNA的表达水平标准化为鼠RPLP0mRNA (大核糖体蛋白、亚基P0) 表达的表达水平。根据 $\Delta \Delta C_t$ 方法来计算表达水平。

[0718] 用于RT-PCR和实时RT-PCR的引物序列如下:

[0719] PABPN1-FWD 5' -TGACCCGGGGGACGGCGC-3'

[0720] PABPN1-REV 5' -ACTCGAGCTTTGATAGCTTCCAGC-3'

[0721] RPLP0-FWD 5' -GAGGACCTCACTGAGATTCGG-3'

[0722] RPLP0-REV 5' -TTCTGAGCTGGCACAGTGAC-3'

#### [0723] 免疫组织化学

[0724] 对从小鼠切离的TA肌肉(10 $\mu$ m)切片进行免疫组织化学,以检测PABPN1蛋白的核聚集体的存在。简而言之,将TA肌肉切片在1M KCl、30mM HEPES、65mM PIPES、10mM EDTA、2mM MgCl<sub>2</sub> (pH 6.9)中孵育1小时以除去任何可溶性蛋白质。然后将切片用0.1M PBS、0.1% Triton X100中的1%正常山羊血清封闭,并在4℃下与抗PABPN1一抗(在相同缓冲液中稀释至1:200)孵育过夜。然后将切片与层粘连蛋白抗体在RT进一步孵育1h,然后在室温与二抗孵育1h。最后将切片用Hoechst染色以可视化细胞核。

#### [0725] 组织学和形态学分析

[0726] 对TA肌肉的横向连续冷冻切片(10 $\mu$ m)进行染色。沿着肌肉的长度以10-12个不同的间隔对TA肌肉进行切片,从而允许确定最大横截面积(CSA)。为了评估组织形态学以及纤维化和结缔组织的可视化,分别用H&E和胶原蛋白VI对肌肉的横切面进行染色,以在荧光下进一步检查。为了评估中心成核,在每个切片中评估了五个随机区域。将图像使用Olympus BX60显微镜(奥林巴斯光学公司(Olympus Optical),汉堡(Hamburg),德国)可视化,使用CCD相机(光度测量公司(Photometrics CoolSNAP fx);罗珀科学公司(Roper Scientific),图森(Tucson),亚利桑那州(AZ),美国)数字化,并使用MetaView图像分析系统(通用成像公司(Universal Imaging),唐宁顿(Downington),宾夕法尼亚州(PA),美国)进行分析。计算这些区域中的纤维总数,并将中心有核的纤维的数量表示为纤维总数的百分比(图5)。

#### [0727] 蛋白质印迹法分析

[0728] 然后对组织进行蛋白质印迹法分析以检测PABPN1。简而言之,通过用蛋白酶抑制剂混合物匀浆RIPA溶液(NaCl 0.15M、HEPES 0.05M、NP-40 1%、脱氧胆酸钠0.5%、SDS 0.10%、EDTA 0.01M)中的组织来制备肌肉裂解物。将蛋白质在4%-12%Bis-Tris凝胶(英杰公司(Invitrogen))上分离,并转移到硝酸纤维素膜(Hybond ECL膜;安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))上,将其通过在0.1M PBS、0.1%Tween-20中的5%牛奶中孵育来进行封闭。将硝酸纤维素膜用针对PABPN1(艾碧康公司(abcam),1/10,000)或作为管家对照的小鼠黏着斑蛋白(西格玛公司(Sigma),1/10,000)产生的一抗染色。将硝酸纤维素膜进一步与HRP缀合的抗兔和抗小鼠二抗(分别为西格玛公司(Sigma),1/2000和1/1000)一起孵育。将免疫反应条带用增强的化学发光试剂(ECL;安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))进行检测,并通过将膜暴露于ECL Hyperfilm(安玛西亚生物科学(Amersham Biosciences))进行可视化。

[0729] 所有数据表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)(每个实验所述的群组大小)。使用学生t检验进行所有统计学分析。在\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 或\*\*\* $P < 0.001$ 时,差异被认为是显著的。

#### [0730] 结果

[0731] 确定了虽然肌肉质量(图5B)在经4个月治疗未恢复,但针对第3组小鼠(被给予(i)

表达靶向内源性PABPN1的三种shRNA的scAAV8-shRNAx3-长病毒颗粒,和(ii)表达替换的经密码子优化的人PABPN1(其未被shRNA靶向)的ssAAV8 Opt-hPABPN1病毒颗粒)标准化的总体肌肉力量(图5A)、和特定肌肉力量(图5C)显示出改善(图5)。

[0732] 如图6中示出的蛋白质印迹法数据显而易见的是,单独给予scAAV8-shRNAx3-长以及将其与ssAAV9 opt hPABPN1-myc一起给予的A17小鼠相对于仅给予盐水的小鼠显示出突变扩增的PABPN1蛋白水平的显著降低,这证明了scAAV-shRNAx3-长病毒颗粒在体内抑制内源突变体PABPN1蛋白的表达的能力。此外,在用ssAAV9-optPABPN1-myc或用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9-opt hPABPN1-myc的组合处理的小鼠中,Myc-标签同样表达。

[0733] 定量PCR证实了这些结果,显示出与仅给予盐水的小鼠相比,scAAV8-shRNAx3-长导致PABPN1表达的80%敲低并且与仅给予盐水的小鼠相比,与ssAAV9 opt hPABPN1-myc组合给予scAAV8-shRNAx3-长导致PABPN1表达的90%敲低。

[0734] 组织学和分子学分析显示,内源性PABPN1的沉默几乎消除了核聚集体(图7A-7B)并诱导了肌肉变性,如中心有核的纤维的量的增加所示(图8A,8C)。在这方面,在A17小鼠中35%的肌核中检测到核聚集体,而来自FvB小鼠的肌核实际上不含聚集体。虽然optPABPN1的表达没有改变A17小鼠肌肉中不溶性聚集体的形成,但用scAAV8-shRNAx3-长处理使含有肌核的聚集体的量减少至10%。当scAAV8-shRNAx3-长与ssAAV9-opt hPABPN1-myc表达(经密码子优化的PABPN1)共同给予时,含有肌核的聚集体的量降低至仅5%。然而,通过经密码子优化的人PABPN1的共表达显示出肌肉变性被逆转。

[0735] 在用scAAV8-shRNAx3-长和ssAAV9 opt hPABPN1-myc,的组合处理的A17小鼠的肌肉中,与来自给予盐水的A17小鼠的肌肉相比,观察到纤维化组织的显著降低(图8B,8D)。最后,肌纤维横截面积(CSA)的分析表明,单独注射scAAV-shRNAx3-长的不能改变肌纤维的CSA,单独用ssAAV9 Opt-hPABPN1-myc或与将其与scAAV-shRNAx3-长组合的处理显著增加了肌纤维CSA(图8E-8F)。

[0736] 总之,这些数据显示出通过AAV递送的shRNAx3-长构建体在体内有效地下调PABPN1并大大降低了核聚集体的形成。重要的是,还显示出经序列优化的PABPN1可以在体内通过rAAV表达,以产生抗降解并恢复肌肉功能的转录物。总之,这些体内数据证明了抑制和替换疗法在OPMD中恢复肌肉功能方面是有效的。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 本尼特生物医药有限公司(Benitec Biopharma Limited)
- [0003] <120> 用于治疗眼咽型肌营养不良(OPMD)的试剂及其用途
- [0004] <130> 177475
- [0005] <150> US 62/322,745
- [0006] <151> 2016-04-14
- [0007] <160> 29
- [0008] <170> PatentIn版本3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 23
- [0011] <212> RNA
- [0012] <213> 智人
- [0013] <400> 1
- [0014] uugaggagaa gauggaggcu gau 23
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 21
- [0017] <212> RNA
- [0018] <213> 智人
- [0019] <400> 2
- [0020] aggaagaagc ugagaagcua a 21
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 27
- [0023] <212> RNA
- [0024] <213> 智人
- [0025] <400> 3
- [0026] gagguaagaga agcagaugaa uaugagu 27
- [0027] <210> 4
- [0028] <211> 23
- [0029] <212> RNA
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> ssRNA1和dsRNA1的效应子序列
- [0033] <400> 4
- [0034] aucagccucc aucuucuccu caa 23
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 23
- [0037] <212> RNA
- [0038] <213> 人工序列
- [0039] <220>
- [0040] <223> dsRNA1的效应子互补序列
- [0041] <400> 5

---

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| [0042] | uugaggagaa gauggaggcu gau 23     |
| [0043] | <210> 6                          |
| [0044] | <211> 21                         |
| [0045] | <212> RNA                        |
| [0046] | <213> 人工序列                       |
| [0047] | <220>                            |
| [0048] | <223> ssRNA2和dsRNA2的效应子序列        |
| [0049] | <400> 6                          |
| [0050] | uuagcuucuc agcuucucc u 21        |
| [0051] | <210> 7                          |
| [0052] | <211> 21                         |
| [0053] | <212> RNA                        |
| [0054] | <213> 人工序列                       |
| [0055] | <220>                            |
| [0056] | <223> dsRNA2的效应子互补序列             |
| [0057] | <400> 7                          |
| [0058] | aggaagaagc ugagaagcua a 21       |
| [0059] | <210> 8                          |
| [0060] | <211> 27                         |
| [0061] | <212> RNA                        |
| [0062] | <213> 人工序列                       |
| [0063] | <220>                            |
| [0064] | <223> ssRNA3和dsRNA3的效应子序列        |
| [0065] | <400> 8                          |
| [0066] | acucauauuc aucugcuucu cuaccuc 27 |
| [0067] | <210> 9                          |
| [0068] | <211> 27                         |
| [0069] | <212> RNA                        |
| [0070] | <213> 人工序列                       |
| [0071] | <220>                            |
| [0072] | <223> dsRNA3的效应子互补序列             |
| [0073] | <400> 9                          |
| [0074] | gagguagaga agcagaugaa uaugagu 27 |
| [0075] | <210> 10                         |
| [0076] | <211> 23                         |
| [0077] | <212> RNA                        |
| [0078] | <213> 人工序列                       |
| [0079] | <220>                            |
| [0080] | <223> shRNA1和shRNA2的效应子序列        |
| [0081] | <400> 10                         |
| [0082] | aucagccucc aucuucuccu caa 23     |
| [0083] | <210> 11                         |

---

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| [0084] | <211> 23                         |
| [0085] | <212> RNA                        |
| [0086] | <213> 人工序列                       |
| [0087] | <220>                            |
| [0088] | <223> shRNA1和shRNA2的效应子互补序列      |
| [0089] | <400> 11                         |
| [0090] | uugaggagaa gauggaggcu gau 23     |
| [0091] | <210> 12                         |
| [0092] | <211> 21                         |
| [0093] | <212> RNA                        |
| [0094] | <213> 人工序列                       |
| [0095] | <220>                            |
| [0096] | <223> shRNA3和shRNA4的效应子序列        |
| [0097] | <400> 12                         |
| [0098] | uuagcuucuc agcuucuucc u 21       |
| [0099] | <210> 13                         |
| [0100] | <211> 21                         |
| [0101] | <212> RNA                        |
| [0102] | <213> 人工序列                       |
| [0103] | <220>                            |
| [0104] | <223> shRNA3和shRNA4的效应子互补序列      |
| [0105] | <400> 13                         |
| [0106] | aggaagaagc ugagaagcua a 21       |
| [0107] | <210> 14                         |
| [0108] | <211> 27                         |
| [0109] | <212> RNA                        |
| [0110] | <213> 人工序列                       |
| [0111] | <220>                            |
| [0112] | <223> shRNA5和shRNA6的效应子序列        |
| [0113] | <400> 14                         |
| [0114] | acucauauuc aucugcuucu cuaccuc 27 |
| [0115] | <210> 15                         |
| [0116] | <211> 27                         |
| [0117] | <212> RNA                        |
| [0118] | <213> 人工序列                       |
| [0119] | <220>                            |
| [0120] | <223> shRNA5和shRNA6的效应子互补序列      |
| [0121] | <400> 15                         |
| [0122] | gagguagaga agcagaugaa uaugagu 27 |
| [0123] | <210> 16                         |
| [0124] | <211> 49                         |
| [0125] | <212> RNA                        |

- [0126] <213> 人工序列  
[0127] <220>  
[0128] <223> shRNA1序列  
[0129] <400> 16  
[0130] gaggagaaga uggaggcuga ucaagagaau cagccuccau cuucuccuc 49  
[0131] <210> 17  
[0132] <211> 49  
[0133] <212> RNA  
[0134] <213> 人工序列  
[0135] <220>  
[0136] <223> shRNA2序列  
[0137] <400> 17  
[0138] aucagccucc aucuuccuccu ccaagagaga ggagaagaug gaggcugau 49  
[0139] <210> 18  
[0140] <211> 47  
[0141] <212> RNA  
[0142] <213> 人工序列  
[0143] <220>  
[0144] <223> shRNA3序列  
[0145] <400> 18  
[0146] ggaagaagcu gagaagcuua caagagauua gcuucucagc uucuucc 47  
[0147] <210> 19  
[0148] <211> 47  
[0149] <212> RNA  
[0150] <213> 人工序列  
[0151] <220>  
[0152] <223> shRNA4序列  
[0153] <400> 19  
[0154] uuagcuucuc agcuuccucc caagagagga agaagcugag aagcuua 47  
[0155] <210> 20  
[0156] <211> 60  
[0157] <212> RNA  
[0158] <213> 人工序列  
[0159] <220>  
[0160] <223> shRNA5序列  
[0161] <400> 20  
[0162] gagguagaga agcagaugaa uaugagucua gagacucaua uucaucugcu ucucuaccuc 60  
[0163] <210> 21  
[0164] <211> 60  
[0165] <212> RNA  
[0166] <213> 人工序列  
[0167] <220>

|        |                                                                         |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| [0168] | <223> shRNA6序列                                                          |
| [0169] | <400> 21                                                                |
| [0170] | cucauauuca ucugcuucuc uaccuccaag agagagguag agaagcagau gaauaugagu 60    |
| [0171] | <210> 22                                                                |
| [0172] | <211> 1068                                                              |
| [0173] | <212> DNA                                                               |
| [0174] | <213> 人工序列                                                              |
| [0175] | <220>                                                                   |
| [0176] | <223> OPMDTriple构建体短                                                    |
| [0177] | <400> 22                                                                |
| [0178] | ctcgagacgc gtggtaccga gctcgctagc agcgcttacg tattttaatg gcaggaagag 60    |
| [0179] | ggcctatttc ccatgattcc ttcataattg catatacgat acaaggctgt tagagagata 120   |
| [0180] | attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtagt aaaatacgtg acgtagaaaag 180 |
| [0181] | taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatggt ttaaaatgga ctatcatatg 240   |
| [0182] | cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttgtg gaaaggacga 300   |
| [0183] | aacaccgagg agaagatgga ggctgatcaa gagaatcagc ctccatcttc tcctcttttt 360   |
| [0184] | tatgcgcacg tttaaacagg gcggtgcggc tcaggctctg ccccgctcc ggggctatgt 420    |
| [0185] | gcatacgacc atttcagta attcccagca gccaccgtag ctatatgttg tagaacaacg 480    |
| [0186] | agcactttct caactccagt caataactac gttagtgtga ttacacattg ggctaataata 540  |
| [0187] | aatagagggt aaatctctag gtcatttaag agaagtcggc ctatgtgtac agacatttgt 600   |
| [0188] | tccaggggct ttaaatagct ggtggtggaa ctcaatatc ggaagaagct gagaagctaa 660    |
| [0189] | caagagatta gcttctcagc ttcttccttt tttgtatacg atacctatca attcgaacgc 720   |
| [0190] | tgacgtcatc aaccgctcc aaggaatcgc gggcccagtg tcactaggcg ggaacaccca 780    |
| [0191] | gcgcgcgtgc gccctggcag gaagatggct gtgagggaca ggggagtggc gccctgcaat 840   |
| [0192] | atttgcatgt cgctatgtgt tctgggaaat caccataaac gtgaaatgtc tttggatttg 900   |
| [0193] | ggaatcttat aagttctgta tgagaccaca gatccccgag gtagagaagc agatgaatat 960   |
| [0194] | gagttcaaga gactcatatt catctgcttc tctacctctt tttgacacac gtctgcagc 1020   |
| [0195] | gttaaccaat tgccacgggg ttggggtagc acgcgtgagc tcctcgag 1068               |
| [0196] | <210> 23                                                                |
| [0197] | <211> 1527                                                              |
| [0198] | <212> DNA                                                               |
| [0199] | <213> 人工序列                                                              |
| [0200] | <220>                                                                   |
| [0201] | <223> OPMDTriple构建体长                                                    |
| [0202] | <400> 23                                                                |
| [0203] | ctcgagacgc gtggtaccga gctcgctagc agcgcttacg tattttaatg gcaggaagag 60    |
| [0204] | ggcctatttc ccatgattcc ttcataattg catatacgat acaaggctgt tagagagata 120   |
| [0205] | attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtagt aaaatacgtg acgtagaaaag 180 |
| [0206] | taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatggt ttaaaatgga ctatcatata 240   |
| [0207] | agatgggctt accgtaactt gaaagtatgt cgatttcttg gctttatata tcttgtggaa 300   |
| [0208] | aggacgaaac accgaggaga agatggaggc tgatcaagag aatcagcctc catcttctcc 360   |
| [0209] | tcttttttac atcaggttgt ttttctgttt ttacatcagg ttgtttttct gtttggtttt 420   |

|        |                                                                   |      |
|--------|-------------------------------------------------------------------|------|
| [0210] | ttttttacac caggtttata cgccggtgca cggtttacca ctgaaaacac ctttcatcta | 480  |
| [0211] | caggtgatat cttttaacac aaataaaatg tagtagtcca tgcgcacgtt taaacaaggg | 540  |
| [0212] | cggtgcggt caggtcttgc cccgcctccg gggctatttg catacgacca ttccagtaa   | 600  |
| [0213] | ttcccagcag ccaccgtagc tatatttggg agaacaacga gcactttctc aactccagtc | 660  |
| [0214] | aataactacg ttagttgcat tacacattgg gctaataata atagaggtta aatctctagg | 720  |
| [0215] | tcatttaaga gaagtcggcc tatgtgtaca gacatttgtt ccaggggctt taaatagctg | 780  |
| [0216] | gtggtggaac tcaatatctg gaagaagctg agaagctaac aagagattag cttctcagct | 840  |
| [0217] | tcttctttt ttccattttc cctcccagaa acggaatctt gctctgttgc ccaggctgga  | 900  |
| [0218] | atgcaatggc gcgatcttag cttgttgcaa cctccgcctc ccgggttgaa gcgattctcc | 960  |
| [0219] | tgccctagcc tcccagtag ctgggattat aaacatgcgc cagtatacga tacctatcaa  | 1020 |
| [0220] | ttcgaacgct gacgtcatca acccgctcca aggaatcgcg ggcccagtg cactaggcgg  | 1080 |
| [0221] | gaacaccag cgcgctgcg ccctggcagg aagatggctg tgagggacag gggagtggcg   | 1140 |
| [0222] | ccctgcaata ttgcatgtc gctatgtgtt ctgggaaatc accataaacg tgaatgtct   | 1200 |
| [0223] | ttggatttgg gaatcttata agttctgtat gagaccacag atccccgagg tagagaagca | 1260 |
| [0224] | gatgaatatg agttcaagag actcatattc atctgcttct ctacctttt ttaaacaaaa  | 1320 |
| [0225] | cgaaccggg ccgggcgcg tggttcacgc ctataatccc tgcactttgg gaggccgagg   | 1380 |
| [0226] | cgggcggatc acaaggtcag gaggtcgaga ccatccaggc taacacggtg aaaccccc   | 1440 |
| [0227] | ccatctctac taaaaaaaaa aagacacacg tctgcagcg ttaaccaatt gccacgggt   | 1500 |
| [0228] | tggggtacca cgctgagct cctcgag                                      | 1527 |
| [0229] | <210> 24                                                          |      |
| [0230] | <211> 950                                                         |      |
| [0231] | <212> DNA                                                         |      |
| [0232] | <213> 人工序列                                                        |      |
| [0233] | <220>                                                             |      |
| [0234] | <223> 经人密码子优化的PABpN1 cDNA序列(具有kozak序列但不具有myc标签)                   |      |
| [0235] | <400> 24                                                          |      |
| [0236] | ccgctgccgc cgctgctgct gccgcagccg gcgctgccgg cggaagaggc agcggccctg | 60   |
| [0237] | gcagacggcg gcatctggtc cctggcggcg gaggggaggc cggcgaaggc gccctggcg  | 120  |
| [0238] | gagccggcga ctacggcaac ggcttgaaa gcgaggaact ggaaccgag gaactgtgc    | 180  |
| [0239] | tggaacctga gcccgagcca gagcccgagg aagagcccc taggccaaga gccccctg    | 240  |
| [0240] | gcgccccagg accaggacca ggctctgggg caccaggctc tcaggaagag gaagaagagc | 300  |
| [0241] | ccggcctcgt cgagggagac ccaggcgatg gcgctatcga agatcccag ctggaagcca  | 360  |
| [0242] | tcaaggccag agtgcgggag atggaagagg aggccgaaa attgaaagag ctgcagaacg  | 420  |
| [0243] | aagtcaaaa acaaatgaac atgtcccc ctcctgaaa tgctggccct gtgatcatga     | 480  |
| [0244] | gcatcgagga aaagatggaa gccgacgcc ggtctatcta cgtgggcaac gtggactacg  | 540  |
| [0245] | gcgccaccgc cgaagaactg gaagcccact ttcacggctg tggcagcgtg aaccgggtga | 600  |
| [0246] | ccatctgtg cgacaagtgc agcgccacc ccaagggtt cgcctacatc gagttcagcg    | 660  |
| [0247] | acaaagaaag cgtgcggacc tctctggtc tcgacgagtc tctgttcagg ggaaggcaga  | 720  |
| [0248] | tcaaggtcat cccaagcgg accaacaggc ccggcatcag caccaccgac agaggcttcc  | 780  |
| [0249] | ctagggctag gtacagagcc cggaccacca actacaacag cagcagaagc cggttctaca | 840  |
| [0250] | gcggcttcaa ttctcggcct agaggcagag tgtaccggg cagggccagg gccacctct   | 900  |
| [0251] | ggtacagccc ctactgaacc tcttggtaca gccctactg atgagatct              | 950  |

|        |                                                                     |                               |
|--------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| [0252] | <210>                                                               | 25                            |
| [0253] | <211>                                                               | 306                           |
| [0254] | <212>                                                               | PRT                           |
| [0255] | <213>                                                               | 人工序列                          |
| [0256] | <220>                                                               |                               |
| [0257] | <223>                                                               | 经人密码子优化的PABpN1氨基酸序列(不具有Myc标签) |
| [0258] | <400>                                                               | 25                            |
| [0259] | Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly |                               |
| [0260] | 1                                                                   | 5 10 15                       |
| [0261] | Arg Gly Ser Gly Pro Gly Arg Arg Arg His Leu Val Pro Gly Ala Gly     |                               |
| [0262] | 20 25 30                                                            |                               |
| [0263] | Gly Glu Ala Gly Glu Gly Ala Pro Gly Gly Ala Gly Asp Tyr Gly Asn     |                               |
| [0264] | 35 40 45                                                            |                               |
| [0265] | Gly Leu Glu Ser Glu Glu Leu Glu Pro Glu Glu Leu Leu Leu Glu Pro     |                               |
| [0266] | 50 55 60                                                            |                               |
| [0267] | Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Glu Glu Pro Pro Arg Pro Arg Ala Pro     |                               |
| [0268] | 65 70 75 80                                                         |                               |
| [0269] | Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ala Pro Gly Ser Gln     |                               |
| [0270] | 85 90 95                                                            |                               |
| [0271] | Glu Glu Glu Glu Glu Pro Gly Leu Val Glu Gly Asp Pro Gly Asp Gly     |                               |
| [0272] | 100 105 110                                                         |                               |
| [0273] | Ala Ile Glu Asp Pro Glu Leu Glu Ala Ile Lys Ala Arg Val Arg Glu     |                               |
| [0274] | 115 120 125                                                         |                               |
| [0275] | Met Glu Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Glu Leu Gln Asn Glu Val Glu     |                               |
| [0276] | 130 135 140                                                         |                               |
| [0277] | Lys Gln Met Asn Met Ser Pro Pro Pro Gly Asn Ala Gly Pro Val Ile     |                               |
| [0278] | 145 150 155 160                                                     |                               |
| [0279] | Met Ser Ile Glu Glu Lys Met Glu Ala Asp Ala Arg Ser Ile Tyr Val     |                               |
| [0280] | 165 170 175                                                         |                               |
| [0281] | Gly Asn Val Asp Tyr Gly Ala Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala His Phe     |                               |
| [0282] | 180 185 190                                                         |                               |
| [0283] | His Gly Cys Gly Ser Val Asn Arg Val Thr Ile Leu Cys Asp Lys Phe     |                               |
| [0284] | 195 200 205                                                         |                               |
| [0285] | Ser Gly His Pro Lys Gly Phe Ala Tyr Ile Glu Phe Ser Asp Lys Glu     |                               |
| [0286] | 210 215 220                                                         |                               |
| [0287] | Ser Val Arg Thr Ser Leu Ala Leu Asp Glu Ser Leu Phe Arg Gly Arg     |                               |
| [0288] | 225 230 235 240                                                     |                               |
| [0289] | Gln Ile Lys Val Ile Pro Lys Arg Thr Asn Arg Pro Gly Ile Ser Thr     |                               |
| [0290] | 245 250 255                                                         |                               |
| [0291] | Thr Asp Arg Gly Phe Pro Arg Ala Arg Tyr Arg Ala Arg Thr Thr Asn     |                               |
| [0292] | 260 265 270                                                         |                               |
| [0293] | Tyr Asn Ser Ser Arg Ser Arg Phe Tyr Ser Gly Phe Asn Ser Arg Pro     |                               |

|        |                                                                   |     |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0294] | 275                                                               | 280 | 285 |
| [0295] | Arg Gly Arg Val Tyr Arg Gly Arg Ala Arg Ala Thr Ser Trp Tyr Ser   |     |     |
| [0296] | 290                                                               | 295 | 300 |
| [0297] | Pro Tyr                                                           |     |     |
| [0298] | 305                                                               |     |     |
| [0299] | <210> 26                                                          |     |     |
| [0300] | <211> 947                                                         |     |     |
| [0301] | <212> DNA                                                         |     |     |
| [0302] | <213> 人工序列                                                        |     |     |
| [0303] | <220>                                                             |     |     |
| [0304] | <223> 经人密码子优化的PABpN1 cDNA序列(具有kozak序列和Myc标签)                      |     |     |
| [0305] | <400> 26                                                          |     |     |
| [0306] | ccgctgccgc cgctgctgct gccgcagccg gcgctgccgg cggaagaggc agcggccctg | 60  |     |
| [0307] | gcagacggcg gcatctggtc cctggcgccg gaggggaggc cggcgaaggc gcccctggcg | 120 |     |
| [0308] | gagccggcga ctacggcaac ggcctggaaa gcgaggaact ggaacccgag gaactgctgc | 180 |     |
| [0309] | tggaacctga gcccagacca gagcccgagg aagagccccc taggccaaga gccccccctg | 240 |     |
| [0310] | gcgccccagg accaggacca ggctctgggg caccaggctc tcaggaagag gaagaagagc | 300 |     |
| [0311] | ccggcctcgt cgaggagac ccaggcgatg gcgctatcga agatcccag ctggaagcca   | 360 |     |
| [0312] | tcaaggccag agtgcgggag atggaagagg aggccgaaaa attgaaagag ctgcagaacg | 420 |     |
| [0313] | aagtcaaaaa acaaatgaac atgtccccc ctcttgaaa tgctggccct gtgatcatga   | 480 |     |
| [0314] | gcatcgagga aaagatggaa gccgacgcc ggtctatcta cgtgggcaac gtggactacg  | 540 |     |
| [0315] | gcgccaccgc cgaagaactg gaagcccact ttcacggctg tggcagcgtg aaccgggtga | 600 |     |
| [0316] | ccatcctgtg cgacaagttc agcggccacc ccaagggtt cgcctacatc gagttcagcg  | 660 |     |
| [0317] | acaaagaaag cgtgcggacc tctctggctc tcgacgagtc tctgttcagg ggaaggcaga | 720 |     |
| [0318] | tcaaggtcat ccccaagcgg accaacagge ccggcatcag caccaccgac agaggcttcc | 780 |     |
| [0319] | ctagggttag gtacagagcc cggaccacca actacaacag cagcagaagc cggttctaca | 840 |     |
| [0320] | gcggcttcaa ttctcggcct agaggcagag tgtaccgggg cagggccagg gccacctcct | 900 |     |
| [0321] | ggtacagccc ctacgaacag aagctgatca gcgaggaaga tctgtga               | 947 |     |
| [0322] | <210> 27                                                          |     |     |
| [0323] | <211> 316                                                         |     |     |
| [0324] | <212> PRT                                                         |     |     |
| [0325] | <213> 人工序列                                                        |     |     |
| [0326] | <220>                                                             |     |     |
| [0327] | <223> 经人密码子优化的PABpN1氨基酸序列(具有Myc标签)                                |     |     |
| [0328] | <400> 27                                                          |     |     |
| [0329] | Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly   |     |     |
| [0330] | 1 5 10 15                                                         |     |     |
| [0331] | Arg Gly Ser Gly Pro Gly Arg Arg Arg His Leu Val Pro Gly Ala Gly   |     |     |
| [0332] | 20 25 30                                                          |     |     |
| [0333] | Gly Glu Ala Gly Glu Gly Ala Pro Gly Gly Ala Gly Asp Tyr Gly Asn   |     |     |
| [0334] | 35 40 45                                                          |     |     |
| [0335] | Gly Leu Glu Ser Glu Glu Leu Glu Pro Glu Glu Leu Leu Leu Glu Pro   |     |     |

|        |                                                                    |     |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| [0336] | 50                                                                 | 55  | 60  |
| [0337] | Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Glu Glu Pro Pro Arg Pro Arg Ala Pro    |     |     |
| [0338] | 65                                                                 | 70  | 75  |
| [0339] | Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ala Pro Gly Ser Gln    |     |     |
| [0340] | 85                                                                 | 90  | 95  |
| [0341] | Glu Glu Glu Glu Glu Pro Gly Leu Val Glu Gly Asp Pro Gly Asp Gly    |     |     |
| [0342] | 100                                                                | 105 | 110 |
| [0343] | Ala Ile Glu Asp Pro Glu Leu Glu Ala Ile Lys Ala Arg Val Arg Glu    |     |     |
| [0344] | 115                                                                | 120 | 125 |
| [0345] | Met Glu Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Glu Leu Gln Asn Glu Val Glu    |     |     |
| [0346] | 130                                                                | 135 | 140 |
| [0347] | Lys Gln Met Asn Met Ser Pro Pro Pro Gly Asn Ala Gly Pro Val Ile    |     |     |
| [0348] | 145                                                                | 150 | 155 |
| [0349] | Met Ser Ile Glu Glu Lys Met Glu Ala Asp Ala Arg Ser Ile Tyr Val    |     |     |
| [0350] | 165                                                                | 170 | 175 |
| [0351] | Gly Asn Val Asp Tyr Gly Ala Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala His Phe    |     |     |
| [0352] | 180                                                                | 185 | 190 |
| [0353] | His Gly Cys Gly Ser Val Asn Arg Val Thr Ile Leu Cys Asp Lys Phe    |     |     |
| [0354] | 195                                                                | 200 | 205 |
| [0355] | Ser Gly His Pro Lys Gly Phe Ala Tyr Ile Glu Phe Ser Asp Lys Glu    |     |     |
| [0356] | 210                                                                | 215 | 220 |
| [0357] | Ser Val Arg Thr Ser Leu Ala Leu Asp Glu Ser Leu Phe Arg Gly Arg    |     |     |
| [0358] | 225                                                                | 230 | 235 |
| [0359] | Gln Ile Lys Val Ile Pro Lys Arg Thr Asn Arg Pro Gly Ile Ser Thr    |     |     |
| [0360] | 245                                                                | 250 | 255 |
| [0361] | Thr Asp Arg Gly Phe Pro Arg Ala Arg Tyr Arg Ala Arg Thr Thr Asn    |     |     |
| [0362] | 260                                                                | 265 | 270 |
| [0363] | Tyr Asn Ser Ser Arg Ser Arg Phe Tyr Ser Gly Phe Asn Ser Arg Pro    |     |     |
| [0364] | 275                                                                | 280 | 285 |
| [0365] | Arg Gly Arg Val Tyr Arg Gly Arg Ala Arg Ala Thr Ser Trp Tyr Ser    |     |     |
| [0366] | 290                                                                | 295 | 300 |
| [0367] | Pro Tyr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu                    |     |     |
| [0368] | 305                                                                | 310 | 315 |
| [0369] | <210> 28                                                           |     |     |
| [0370] | <211> 945                                                          |     |     |
| [0371] | <212> DNA                                                          |     |     |
| [0372] | <213> 人工序列                                                         |     |     |
| [0373] | <220>                                                              |     |     |
| [0374] | <223> 突变型人PABpN1 cDNA序列(具有FLAG序列)                                  |     |     |
| [0375] | <400> 28                                                           |     |     |
| [0376] | atggcggcgg cggcggcggc ggcagcagca gcgggggctg cgggcgggtcg gggctccggg | 60  |     |
| [0377] | ccggggcggc ggcgccatct tgtgcccggg gccggtgggg aggcggggga gggggcccg   | 120 |     |

[0378] gggggcgcag gggactacgg gaacggcctg gagtctgagg aactggagcc tgaggagctg 180  
 [0379] ctgctggagc ccgagccgga gcccagagcc gaagaggagc cgccccggcc ccgcgcccc 240  
 [0380] ccgggagctc cgggccctgg gcttggttcg ggagcccccg gcagccaaga ggaggaggag 300  
 [0381] gagccgggac tggtcgaggg tgaccggggg gacggcgcca ttgaggacct ggagctggaa 360  
 [0382] gctatcaaag ctcgagtcag ggagatggag gaagaagctg agaagctaaa ggagctacag 420  
 [0383] aacgaggtag agaagcagat gaatatgagt ccacctccag gcaatgctgg cccggtgac 480  
 [0384] atgtccattg aggagaagat ggaggtgat gccgttcca tctatgttg caatgtggac 540  
 [0385] tatggtgcaa cagcagaaga gctggaagct cactttcatg gctgtggttc agtcaaccgt 600  
 [0386] gttaccatac tgtgtgacaa atttagtggc catcccaaag ggtttgctga tatagagttc 660  
 [0387] tcagacaaag agtcagttag gacttccttg gccttagatg agtccctatt tagaggaagg 720  
 [0388] caaatcaagg tgatcccaaa acgaaccaac agaccaggca tcagcacaac agaccggggt 780  
 [0389] tttccacgag cccgtaccg cggccggacc accaactaca acagctcccg ctctcgattc 840  
 [0390] tacagtgggt ttaacagcag gccccgggt cgcgtctaca ggggccgggc tagagcgaca 900  
 [0391] tcatggtatt ccccttacga ctacaaggac gacgatgaca agtga 945  
 [0392] <210> 29  
 [0393] <211> 314  
 [0394] <212> PRT  
 [0395] <213> 人工序列  
 [0396] <220>  
 [0397] <223> 突变型人PABpN1氨基酸序列(具有FLAG标签)  
 [0398] <400> 29  
 [0399] Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly  
 [0400] 1 5 10 15  
 [0401] Arg Gly Ser Gly Pro Gly Arg Arg Arg His Leu Val Pro Gly Ala Gly  
 [0402] 20 25 30  
 [0403] Gly Glu Ala Gly Glu Gly Ala Pro Gly Gly Ala Gly Asp Tyr Gly Asn  
 [0404] 35 40 45  
 [0405] Gly Leu Glu Ser Glu Glu Leu Glu Pro Glu Glu Leu Leu Leu Glu Pro  
 [0406] 50 55 60  
 [0407] Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Glu Glu Pro Pro Arg Pro Arg Ala Pro  
 [0408] 65 70 75 80  
 [0409] Pro Gly Ala Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ala Pro Gly Ser Gln  
 [0410] 85 90 95  
 [0411] Glu Glu Glu Glu Glu Pro Gly Leu Val Glu Gly Asp Pro Gly Asp Gly  
 [0412] 100 105 110  
 [0413] Ala Ile Glu Asp Pro Glu Leu Glu Ala Ile Lys Ala Arg Val Arg Glu  
 [0414] 115 120 125  
 [0415] Met Glu Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Glu Leu Gln Asn Glu Val Glu  
 [0416] 130 135 140  
 [0417] Lys Gln Met Asn Met Ser Pro Pro Pro Gly Asn Ala Gly Pro Val Ile  
 [0418] 145 150 155 160  
 [0419] Met Ser Ile Glu Glu Lys Met Glu Ala Asp Ala Arg Ser Ile Tyr Val

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| [0420] | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |  |
| [0421] | Gly | Asn | Val | Asp | Tyr | Gly | Ala | Thr | Ala | Glu | Glu | Leu | Glu | Ala | His | Phe |  |
| [0422] | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |  |
| [0423] | His | Gly | Cys | Gly | Ser | Val | Asn | Arg | Val | Thr | Ile | Leu | Cys | Asp | Lys | Phe |  |
| [0424] | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |  |
| [0425] | Ser | Gly | His | Pro | Lys | Gly | Phe | Ala | Tyr | Ile | Glu | Phe | Ser | Asp | Lys | Glu |  |
| [0426] | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |  |
| [0427] | Ser | Val | Arg | Thr | Ser | Leu | Ala | Leu | Asp | Glu | Ser | Leu | Phe | Arg | Gly | Arg |  |
| [0428] | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| [0429] | Gln | Ile | Lys | Val | Ile | Pro | Lys | Arg | Thr | Asn | Arg | Pro | Gly | Ile | Ser | Thr |  |
| [0430] | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |  |
| [0431] | Thr | Asp | Arg | Gly | Phe | Pro | Arg | Ala | Arg | Tyr | Arg | Ala | Arg | Thr | Thr | Asn |  |
| [0432] | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |  |
| [0433] | Tyr | Asn | Ser | Ser | Arg | Ser | Arg | Phe | Tyr | Ser | Gly | Phe | Asn | Ser | Arg | Pro |  |
| [0434] | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |  |
| [0435] | Arg | Gly | Arg | Val | Tyr | Arg | Gly | Arg | Ala | Arg | Ala | Thr | Ser | Trp | Tyr | Ser |  |
| [0436] | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |  |
| [0437] | Pro | Tyr | Asp | Tyr | Lys | Asp | Asp | Asp | Asp | Lys |     |     |     |     |     |     |  |
| [0438] | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

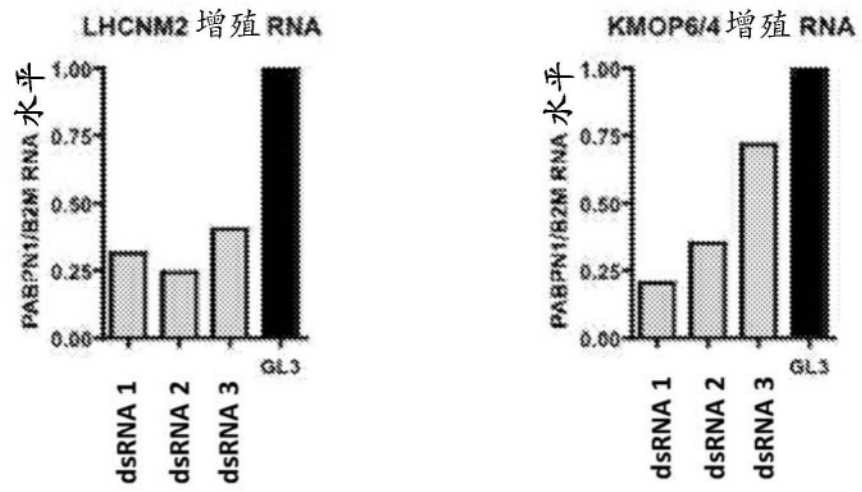


图1

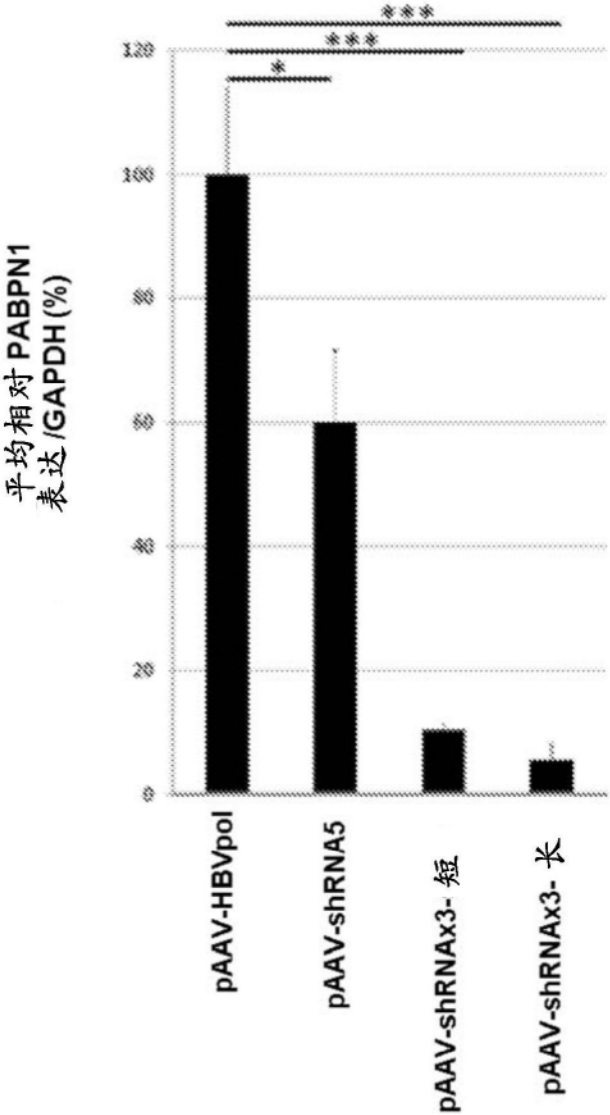


图2

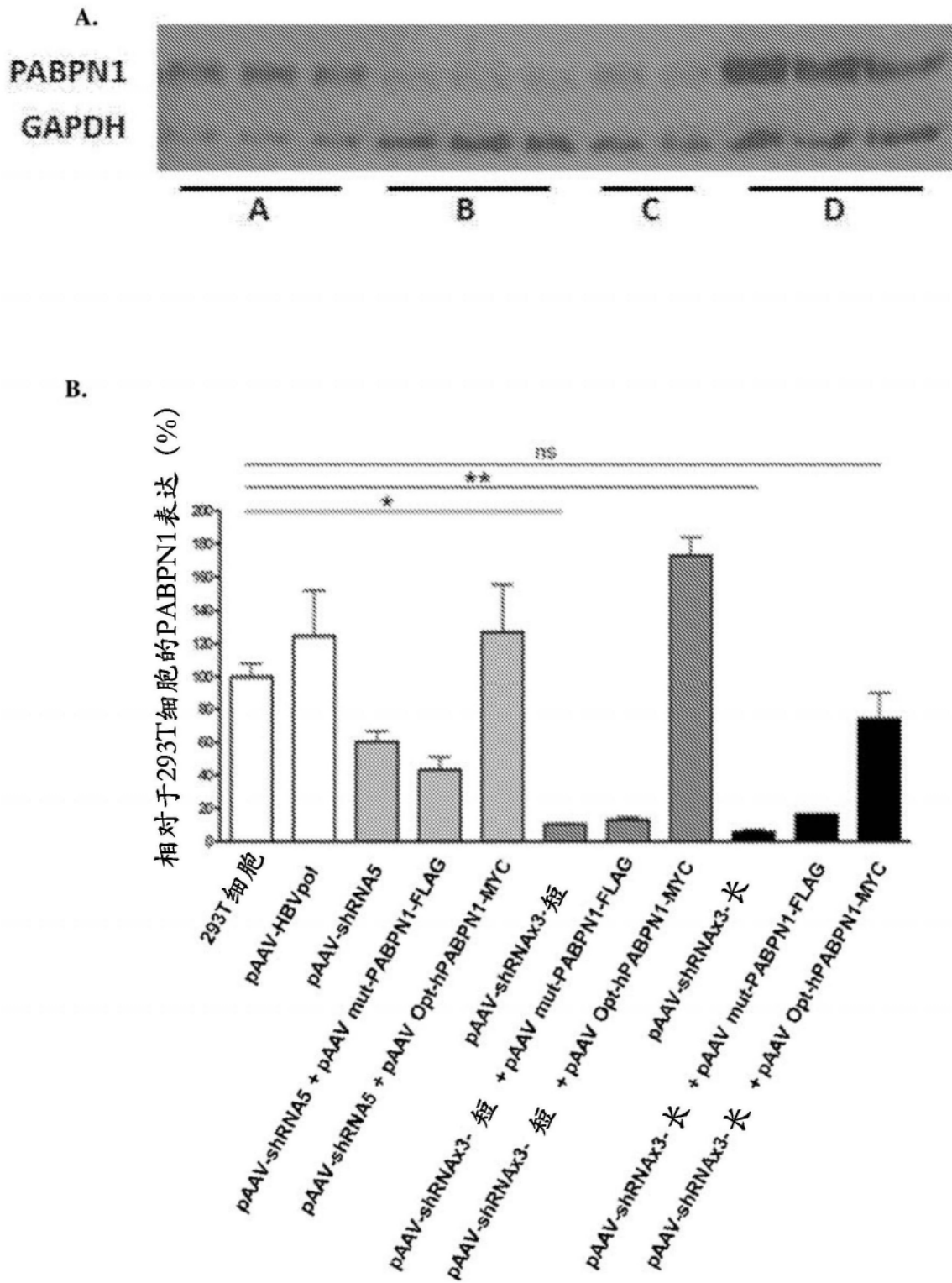


图3

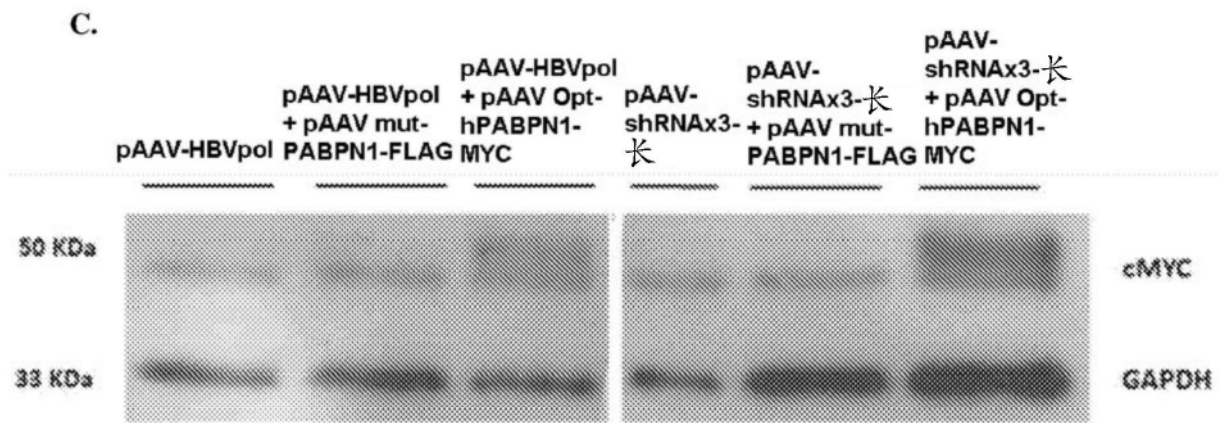
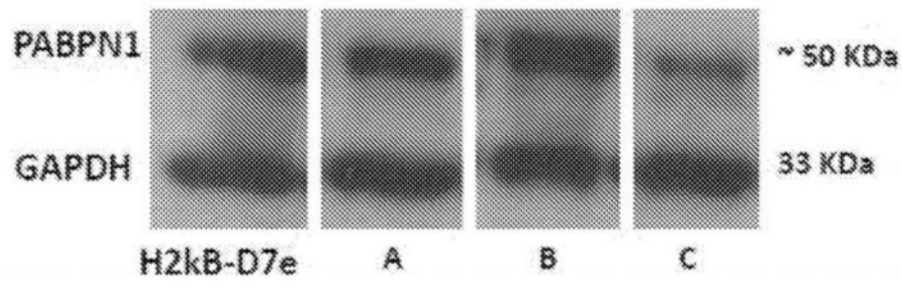
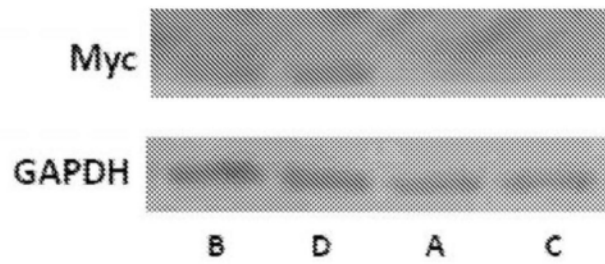


图3 (续)

A.



B.



C.

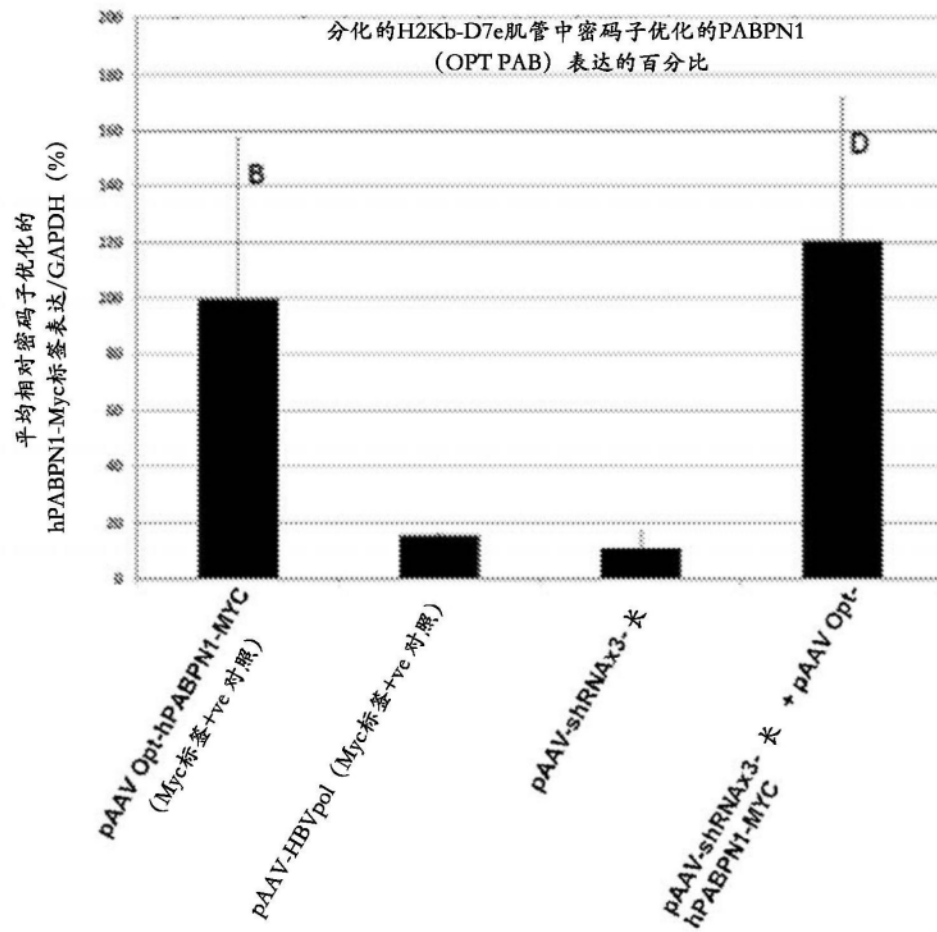
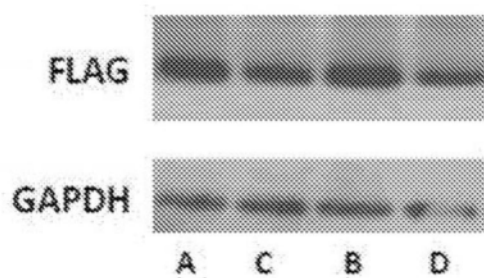


图4

D.



E.

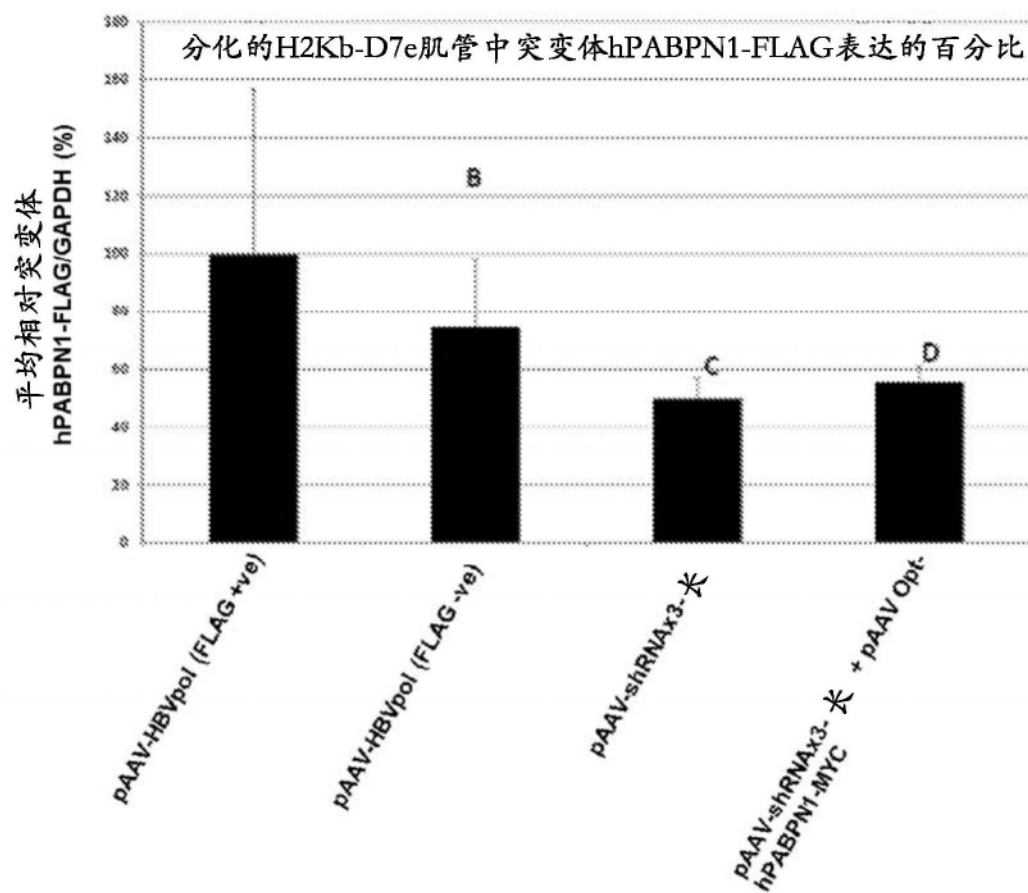


图4(续)

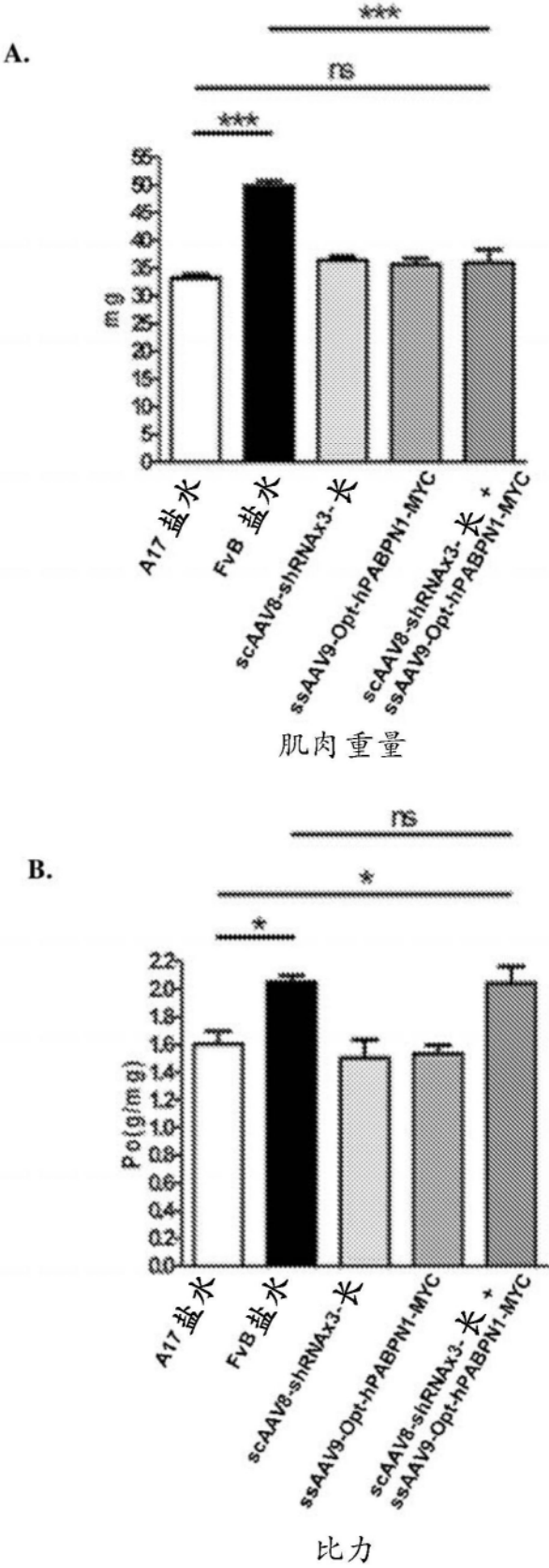


图5

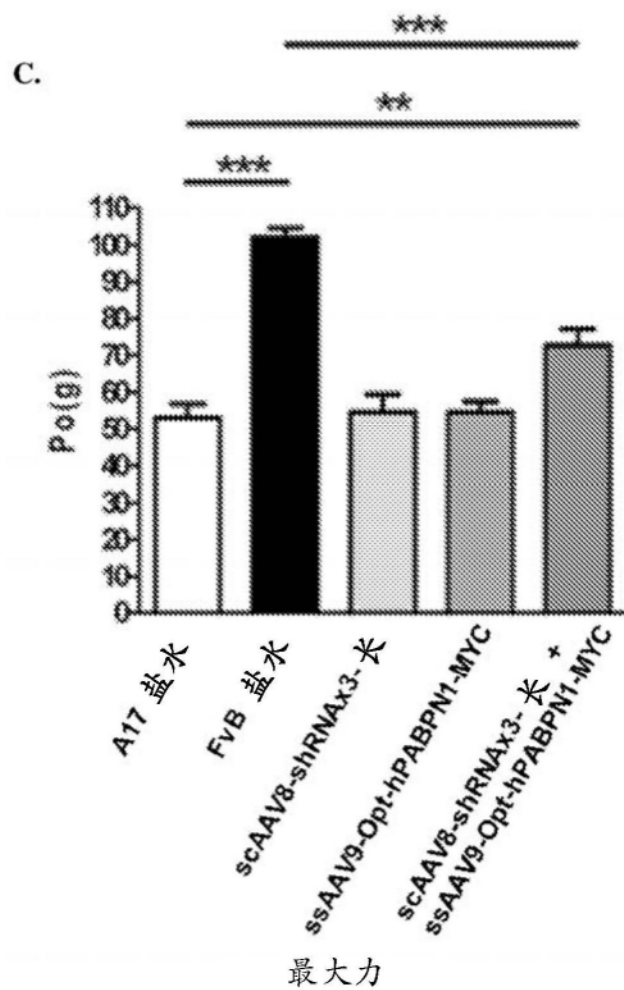


图5(续)

A.

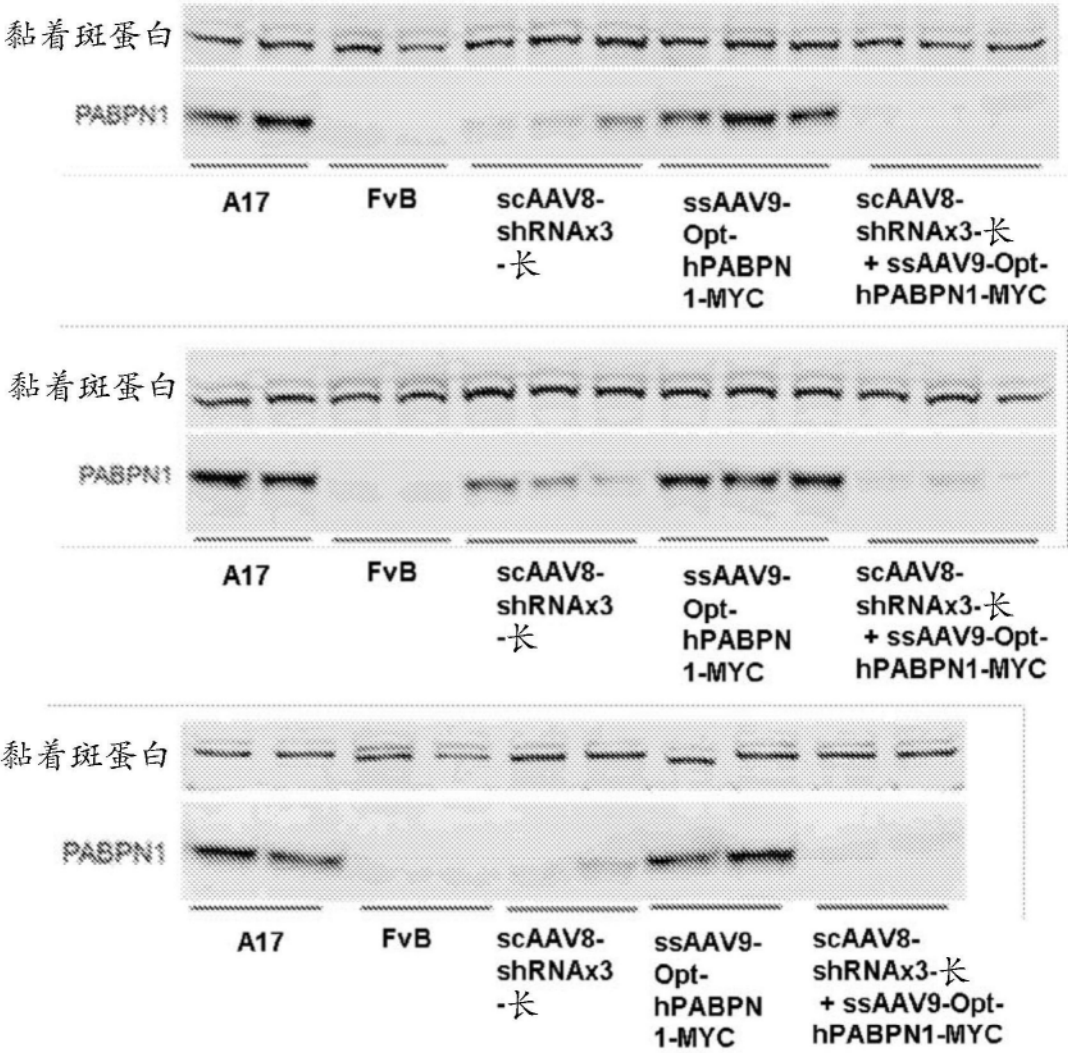
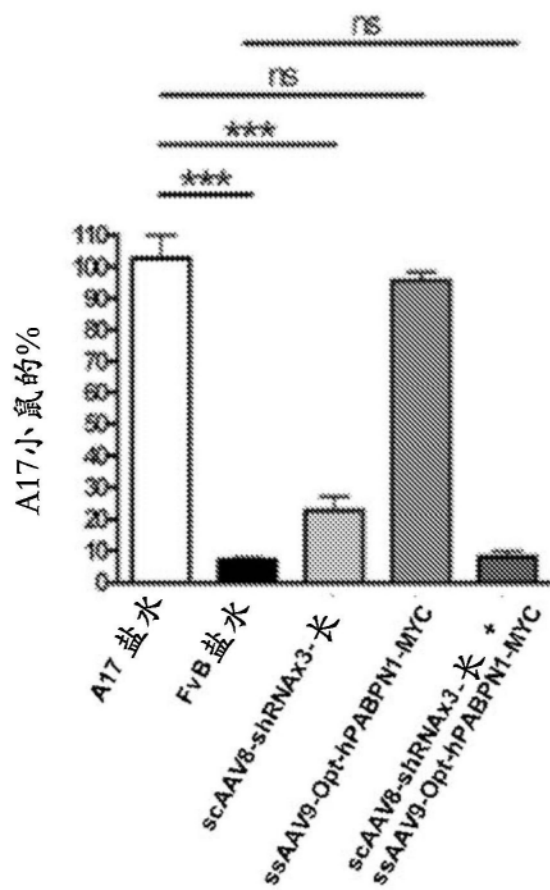


图6

B.



C.

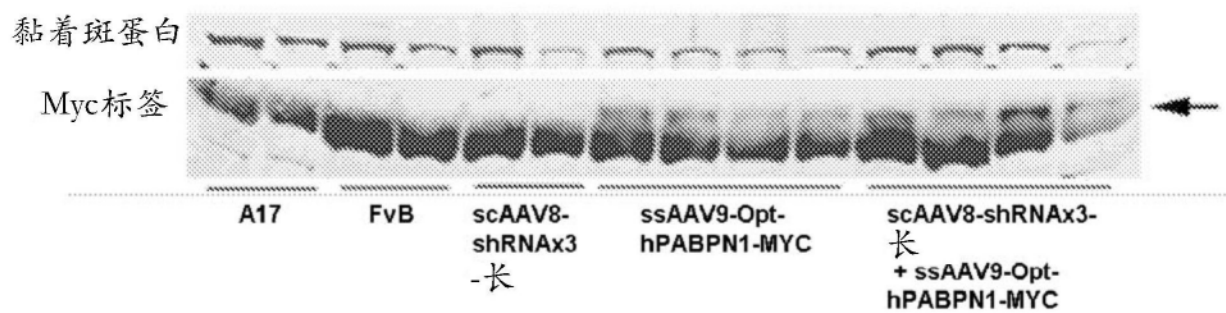


图6(续)

D.

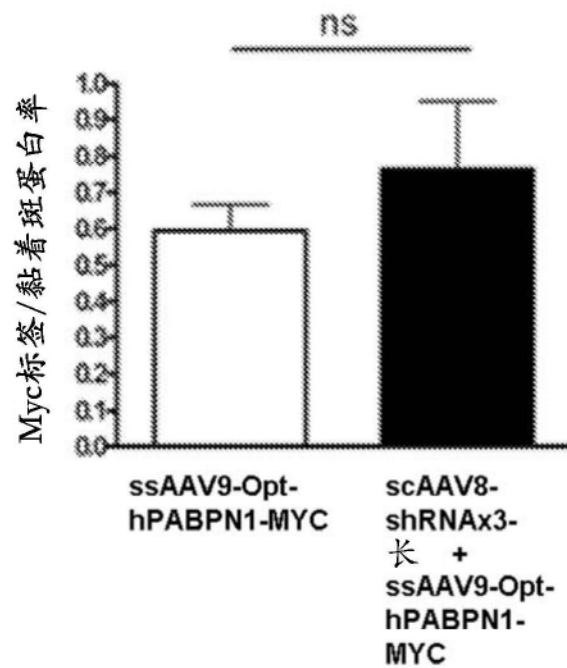
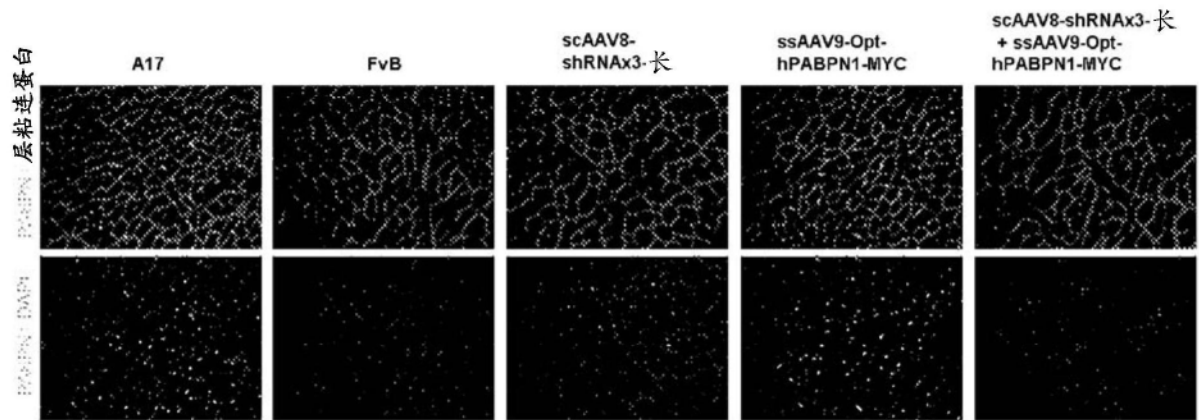


图6 (续)

A.



B.

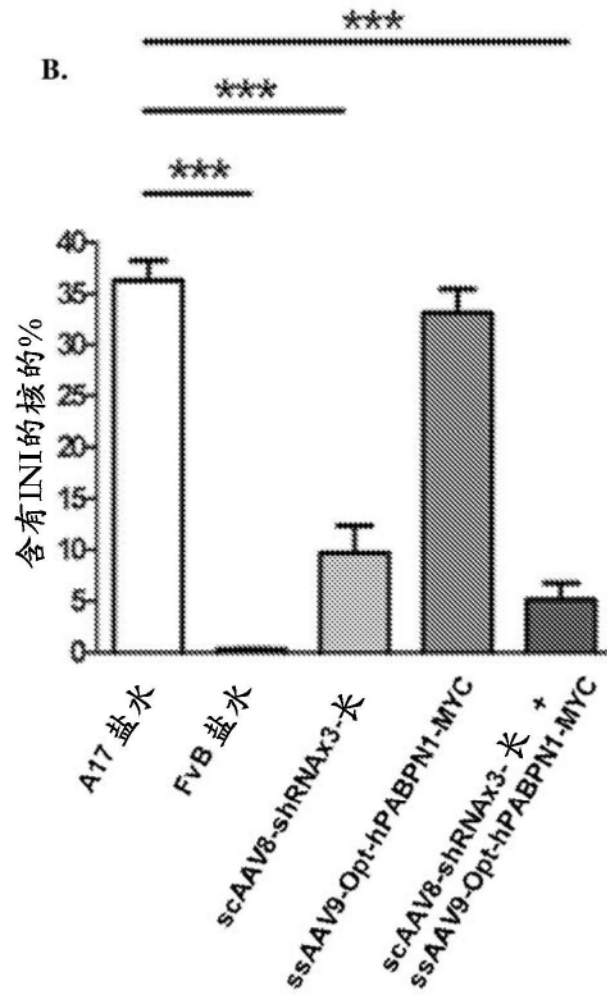


图7

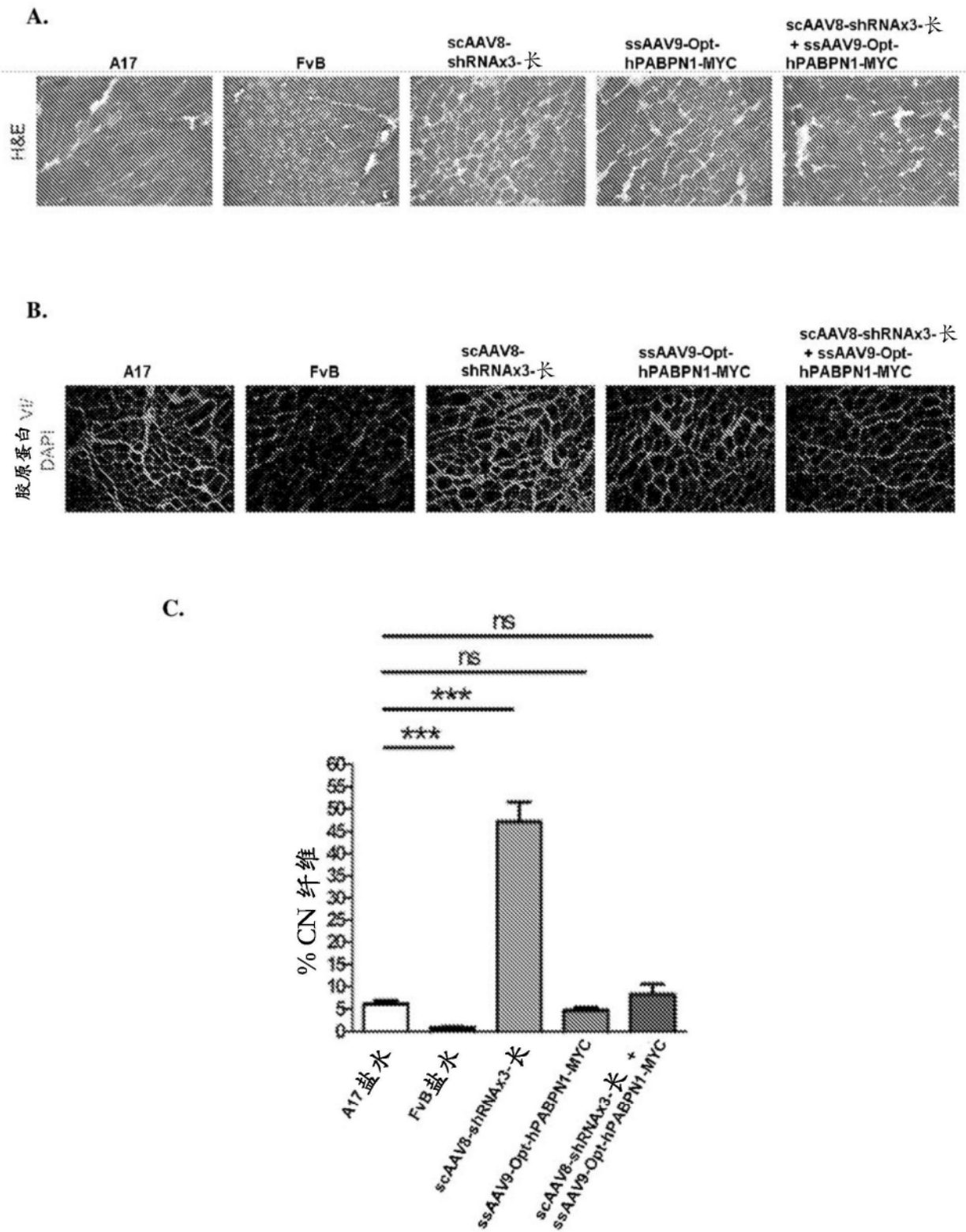


图8

D.

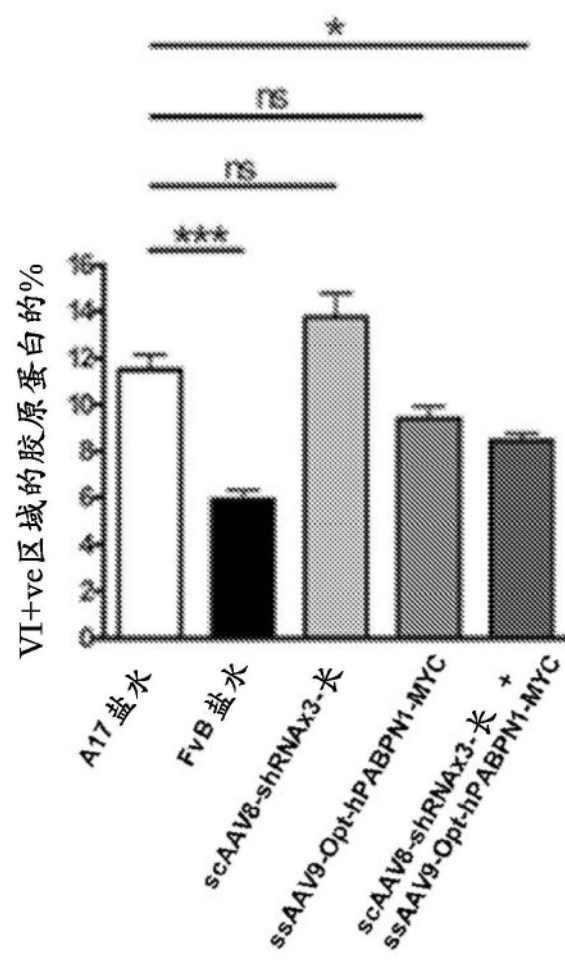
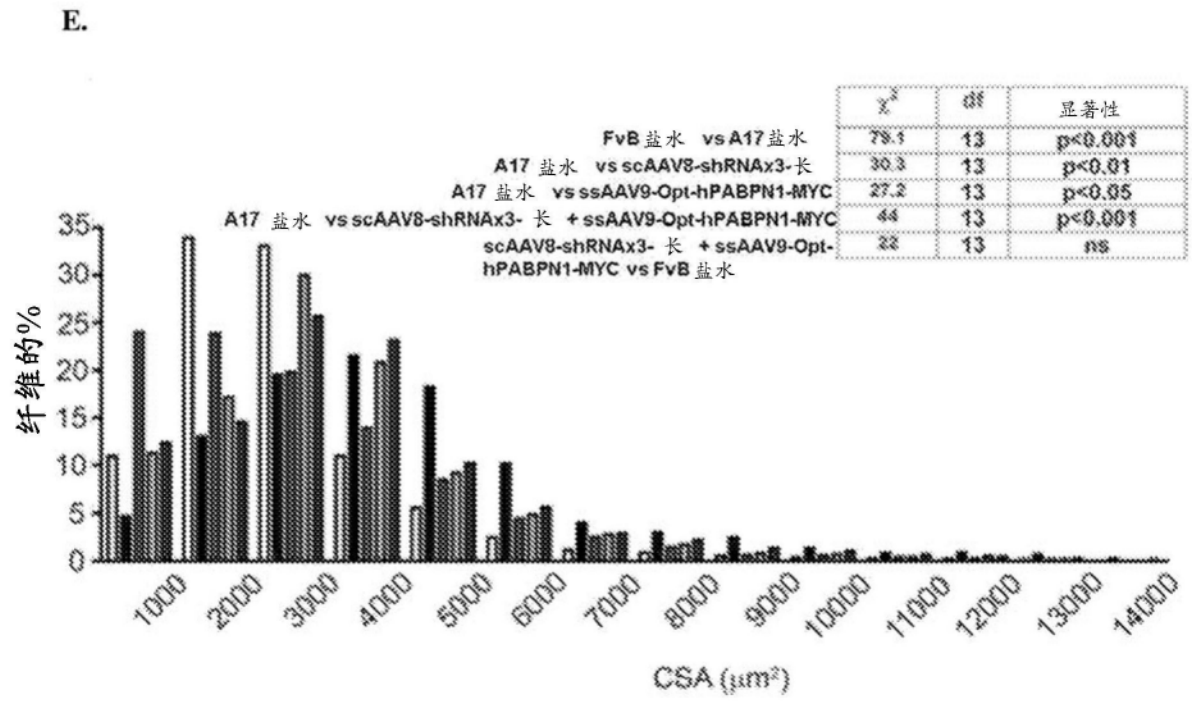


图8(续)



**F.**

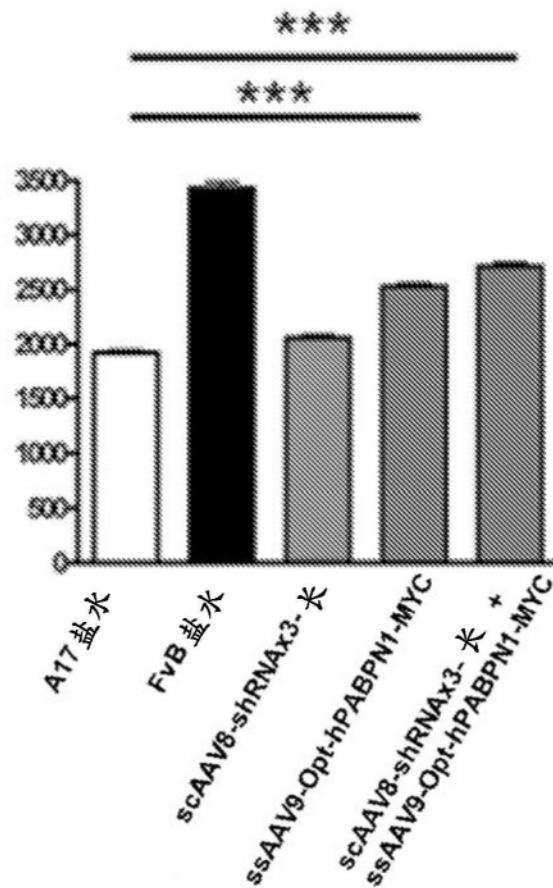


图8(续)