



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109415733 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780040430.8

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2017.05.05

利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 刘晓东

62/332,245 2016.05.05 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/713(2006.01)

2018.12.28

A61P 31/20(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/050413 2017.05.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/190197 EN 2017.11.09

(71)申请人 贝尼泰克生物制药有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72)发明人 T·马奥 D·苏伊

权利要求书6页 说明书89页

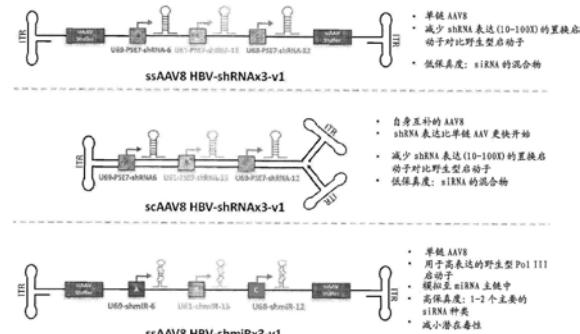
序列表49页 附图21页

(54)发明名称

用于治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的药剂及其使用

(57)摘要

本公开涉及用于治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的RNA干扰(RNAi)试剂、包含其的组合物,以及其用于治疗感染有HBV的个体的用途。所述试剂是单独地或与另外的shmiRNA或shRNA组合地使用的人工miRNA(shmiRNA)。



1. 一种包含编码短发夹微小RNA (shmiR) 的DNA序列的核酸,所述shmiR包含:
长度为至少17个核苷酸的效应子序列;
效应子互补序列;
茎环序列;和
初级微小RNA(初级miRNA)主链;
其中所述效应子序列与SEQ ID NO:1-10、38、40和42中的任一个所示的RNA转录物基本上互补。
2. 权利要求1的核酸,其中所述shmiR选自:
包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和SEQ ID NO:12所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和SEQ ID NO:14所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和SEQ ID NO:16所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和SEQ ID NO:18所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和SEQ ID NO:20所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和SEQ ID NO:22所示的效应子互补序列的shmiR。
包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和SEQ ID NO:24所示的效应子互补序列的shmiR。
包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和SEQ ID NO:26所示的效应子互补序列的shmiR。
包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和SEQ ID NO:28所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和SEQ ID NO:30所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和SEQ ID NO:32所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和SEQ ID NO:34所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和SEQ ID NO:36所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和SEQ ID NO:38所示的效应子互补序列的shmiR;
包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shmiR;和
包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和SEQ ID NO:42所示的效应子互补序列的

shmiR。

3. 权利要求1或权利要求2的核酸,其中所述shmiR以5'至3'方向包含:

所述初级miRNA主链的5'侧翼序列;

效应子互补序列;

茎环序列;

效应子序列;和

所述初级miRNA主链的3'侧翼序列;

4. 权利要求1至3中任一项的核酸,其中所述茎环序列是SEQ ID NO:75所示的序列。

5. 权利要求1至4中任一项的核酸,其中所述初级-miRNA主链是初级-miR-30a主链。

6. 权利要求3至5中任一项的核酸,其中所述初级-miRNA主链的5'侧翼序列示于SEQ ID NO:76中并且所述初级miRNA主链的3'侧翼序列示于SEQ ID NO:77中。

7. 权利要求3至5中任一项的核酸,其中所述shmiR序列包含SEQ ID NO:43-58中的任一个所示的序列。

8. 权利要求1至7中任一项的核酸,其中编码所述shmiR的DNA序列示于SEQ ID NO:59-74中的任一个中。

9. 多种核酸,所述核酸包含:

(a) 根据权利要求1至8的任一项的至少一种核酸;和

(b) 至少一种选自以下的另外的核酸:

(i) 根据权利要求1至8的任一项的核酸;或

(ii) 包含编码短发夹RNA(shRNA)的DNA序列的核酸,所述短发夹RNA包含长度为至少17个核苷酸的效应子序列和效应子互补序列,其中所述效应子序列与SEQ ID NO:1-10、38、40和42中的任一个所示的RNA转录物基本上互补;

其中由(a)中的核酸编码的shmiR和由(b)中的核酸编码的shmiR或shRNA包含不同的效应子序列。

10. 权利要求9的多种核酸,其中权利要求9(b) (ii)中定义的核酸编码选自以下的shRNA:

包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和SEQ ID NO:12所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和SEQ ID NO:14所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和SEQ ID NO:16所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和SEQ ID NO:18所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和SEQ ID NO:20所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和SEQ ID NO:22所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和SEQ ID NO:24所示的效应子互补序列的

shRNA;

包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和SEQ ID NO:26所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和SEQ ID NO:28所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和SEQ ID NO:30所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和SEQ ID NO:32所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和SEQ ID NO:34所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和SEQ ID NO:36所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和SEQ ID NO:38所示的效应子互补序列的shRNA;

包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shRNA;和

包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和SEQ ID NO:42所示的效应子互补序列的shRNA。

11. 权利要求9或10的多种核酸,其中权利要求9 (b) (ii) 中定义的一种或多种shRNA包含位于所述效应子序列与所述效应子互补序列之间的茎环序列。

12. 一种DNA指导的RNA干扰(ddRNAi)构建体,其包含权利要求1至8中任一项的核酸或权利要求9至11中任一项的多种核酸。

13. 权利要求12的ddRNAi构建体,其包含权利要求1至8中任一项的至少两种核酸,其中所述核酸中的每一种编码不同的shmiR。

14. 权利要求12或权利要求13的ddRNAi构建体,其包含权利要求1至8中任一项的至少三种核酸,其中所述核酸中的每一种编码不同的shmiR。

15. 权利要求14的ddRNAi构建体,所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

(a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

(b) 编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和

(c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

16. 权利要求14或权利要求15的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

(a) 包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;

(b) 包含SEQ ID NO:73所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

(c) 包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

17. 权利要求14的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

(a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

(b) 编码包含SEQ ID NO:49所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和

(c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

18. 权利要求14或权利要求17的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

- (a) 包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;
- (b) 包含SEQ ID NO:65所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
- (c) 包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

19. 权利要求12的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体包含:

根据权利要求1至8的任一项的至少一种核酸;和

权利要求9至11的任一项的(b) (ii)中定义的至少一种核酸。

20. 权利要求12或权利要求19的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体包含:

根据权利要求1至8的任一项的至少两种核酸,其中每一种编码不同的shmiR;和

权利要求9至11的任一项的(b) (ii)中定义的至少一种核酸。

21. 权利要求20的ddRNAi构建体,其中所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

- (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

(b) 编码包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shRNA的核酸;和

- (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

22. 权利要求12-21中任一项的ddRNAi构建体,其在编码shmiR的核酸或每一个核酸的上游包含RNA pol III启动子和在编码shRNA的核酸或每一个核酸的上游包含RNA pol III启动子。

23. 权利要求22的ddRNAi构建体,其中所述RNA pol III启动子或每一个RNA pol III启动子选自U6和H1启动子。

24. 权利要求22或权利要求23的ddRNAi构建体,其中所述RNA pol III启动子或每一个RNA pol III启动子是选自U6-9启动子、U6-1启动子和U6-8启动子的U6启动子。

25. 权利要求24的ddRNAi构建体,所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

- (a) 在包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;
- (b) 在包含SEQ ID NO:73所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和
- (c) 在包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

26. 权利要求24的ddRNAi构建体,所述ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

- (a) 在包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;
- (b) 在包含SEQ ID NO:65所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和
- (c) 在包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

27. 一种表达载体,其包含权利要求12至26的任一项的ddRNAi构建体。

28. 多种表达载体,每一种表达载体包含能够表达一种或多种shmiR和/或shRNA的根据权利要求12至27的任一项的ddRNAi构建体。

29. 权利要求27的表达载体或权利要求28的多种表达载体,其中所述表达载体或每一种表达载体是质粒或微环。

30. 权利要求27的表达载体或权利要求28的多种表达载体,其中所述表达载体或每一种表达载体是选自腺相关病毒 (AAV) 载体、逆转录病毒载体、腺病毒 (AdV) 载体和慢病毒

(LV)载体的病毒载体。

31. 一种组合物,其包含根据权利要求12至26的任一项的DNA指导的RNA干扰(ddRNAi)构建体或根据权利要求27或29-30的任一项的表达载体或根据权利要求28至30的任一项的多种表达载体。

32. 权利要求31的组合物,其还包含一种或多种药学上可接受的载体。

33. 权利要求31或31的组合物,其还包含一种或多种已知用于治疗HBV感染的其它治疗剂。

34. 权利要求33的组合物,其中所述一种或多种已知用于治疗HBV感染的其它治疗剂选自恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和聚乙二醇化的干扰素。

35. 一种治疗受试者中的乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至8的任一项的核酸,或根据权利要求9-11的任一项的多种核酸,或根据权利要求12-26的任一项的ddRNAi构建体,或根据权利要求27或29或30的任一项的表达载体,或根据权利要求28-30的任一项的多种表达载体或根据权利要求31至34的任一项的组合物。

36. 权利要求35的方法,其中所述受试者患有急性HBV感染。

37. 权利要求35的方法,其中所述受试者患有慢性HBV感染。

38. 一种减少感染有乙型肝炎病毒(HBV)的受试者中的乙型肝炎病毒载量的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至8的任一项的核酸,或根据权利要求9-11的任一项的多种核酸,或根据权利要求12-26的任一项的ddRNAi构建体,或根据权利要求27或29或30的任一项的表达载体,或根据权利要求28-30的任一项的多种表达载体或根据权利要求31至34的任一项的组合物。

39. 一种减轻患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者中的与乙型肝炎病毒感染相关的症状的严重度的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至8的任一项的核酸,或根据权利要求9-11的任一项的多种核酸,或根据权利要求12-26的任一项的ddRNAi构建体,或根据权利要求27或29或30的任一项的表达载体,或根据权利要求28-30的任一项的多种表达载体或根据权利要求31至34的任一项的组合物。

40. 一种减轻感染乙型肝炎病毒(HBV)的受试者中的乙型肝炎病毒的传染性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至8的任一项的核酸,或根据权利要求9-11的任一项的多种核酸,或根据权利要求12-26的任一项的ddRNAi构建体,或根据权利要求27或29或30的任一项的表达载体,或根据权利要求28-30的任一项的多种表达载体或根据权利要求31至34的任一项的组合物。

41. 权利要求33-40中任一项的方法,所述方法包括抑制或减少一种或多种HBV基因的表达。

42. 权利要求33至41的任一项的方法,其中将根据权利要求1至8的任一项的核酸或根据权利要求9至11的任一项的多种核酸,或根据权利要求12-26的任一项的ddRNAi构建体,或根据权利要求27或29或30的任一项的表达载体,或根据权利要求28-30的任一项的多种表达载体或根据权利要求31或权利要求32的组合物与用于治疗HBV感染的另外的治疗剂一起施用。

43. 权利要求42的方法,其中所述用于治疗HBV感染的另外的治疗剂选自恩替卡韦、替

诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和聚乙二醇化的干扰素。

用于治疗乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的药剂及其使用

[0001] 相关申请数据

[0002] 本申请要求2016年5月5日提交的美国临时申请第62/332,245号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于治疗乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的RNA干扰 (RNAi) 试剂、包含其的组合物,以及其用于治疗感染HBV的个体的用途。

[0004] 背景

[0005] 乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种严重的常见肝传染病,影响着全世界数百万人。HBV是属于嗜肝病毒科的嗜肝DNA病毒。病毒基因组全长约3.2kb,并且其具有4个开放阅读框 (ORF),包括表面抗原 (“S基因”)、核心抗原 (“C基因”)、DNA聚合酶 (“P基因”) 和称为 “X基因”的未确定功能的基因。全世界有超过20亿人在其生命中的某个时间感染了HBV,其中约有3.5亿至4亿人仍然是慢性感染并且是该病毒的携带者。HBV感染可引起急性和慢性乙型肝炎,并可最终导致慢性肝功能不全、肝硬化和肝细胞癌的发展。另外,HBV携带者可以传播疾病多年。慢性HBV感染者,即携带者,发展肝细胞癌的风险至少为非携带者的12倍,而HBV导致60-80%的全世界原发性肝癌。因此,HBV作为已知的人致癌物仅次于烟草。

[0006] 尽管可以获得针对HBV的疫苗,但人群中HBV感染率仍然很高。此外,目前用于慢性HBV感染的疗法在大多数慢性感染患者中仅对病毒基因表达和复制具有有限的抑制作用。慢性HBV感染的现有疗法的另一个限制是病毒对药物的抗性的发展。

[0007] 由于这些原因,仍然需要一种治疗HBV感染的新治疗剂。

[0008] 概述

[0009] 本公开部分基于以下认识:用于治疗和/或预防HBV感染的现有疫苗和治疗剂,例如由于病毒对疗法的抗性的发展和/或HBV基因型之间对疗法的反应性的变化而需要长期治疗时,其功效方面受到限制。本公开提供了DNA指导的RNA干扰 (ddRNAi) 构建体,其用于表达靶向由HBV基因组产生的RNA转录物的保守区域 (即HBV的不同基因型之间保守的区域) 的一种或多种短发夹微小RNA (shmiR)。本公开的示例性shmiR包含能够抑制或降低携带活性HBV的HepG2.2.15细胞中HBV基因转录物的表达的效应子序列。本公开的示例性shmiR包含能够抑制或减少HBV基因转录物表达,减少细胞内和细胞外HBV DNA,以及减少HBV感染的PXB嵌合小鼠中HBV共价闭合环状DNA (cccDNA) 的效应子序列。因此,本发明人提供了抑制或减少由HBV表达的核酸和/或蛋白质的表达的新化合物,以及此类化合物例如治疗受试者的HBV感染的用途。

[0010] 因此,本公开提供了包含编码短发夹微小RNA (shmiR) 的DNA序列的核酸,所述shmiR包含:

[0011] 长度为至少17个核苷酸的效应子序列;

[0012] 效应子互补序列;

[0013] 茎环序列;和

[0014] 初级微小RNA(初级miRNA)主链;

[0015] 其中效应子序列与SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA转录物基本上互补。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。优选地,效应子序列的长度为20个核苷酸。更优选地,效应子序列的长度为21个核苷酸,效应子互补序列的长度为20个核苷酸。

[0016] 效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列可包含6个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列包含5个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列包含4个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列包含3个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列包含2个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列相对于与该效应子序列基本上互补的SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列包含1个碱基对错配。在另一个实例中,效应子序列与SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的序列内的等同长度的区域100%互补。当错配存在时,优选它们不位于对应于shmiR的种子区域(即效应子序列的核苷酸2-8)的区域内。

[0017] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR选自:

[0018] 包含以下序列的shmiR: (i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:12所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:12所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0019] 包含以下序列的shmiR: (i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:14所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:14所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0020] 包含以下序列的shmiR: (i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:16所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:16所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0021] 包含以下序列的shmiR: (i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:18所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:18所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序

列；

[0022] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:20所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:20所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0023] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:22所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:22所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0024] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:24所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:24所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0025] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:26所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:26所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0026] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:28所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:28所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0027] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:30所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:30所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0028] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:32所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:32所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0029] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:34所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:34所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0030] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:36所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:36所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0031] 包含以下序列的shmiR: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:38所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:38

所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0032] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:40所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:40所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0033] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:42所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:42所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0034] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:111所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:111所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0035] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:113所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:113所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0036] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:115所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:115所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0037] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:117所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:117所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0038] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:119所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:119所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0039] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:121所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:121所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0040] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:123所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:123所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0041] 包含以下序列的shmiR：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID

NO:125所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:125所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0042] 包含以下序列的shmiR:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:127所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:127所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0043] 包含以下序列的shmiR:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:129所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:129所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0044] 包含以下序列的shmiR:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:131所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:131所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0045] 包含以下序列的shmiR:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:133所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:133所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。

[0046] 在另一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR选自:

[0047] 包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和与SEQ ID NO:11所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0048] 包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和与SEQ ID NO:13所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0049] 包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和与SEQ ID NO:15所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0050] 包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和与SEQ ID NO:17所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0051] 包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和与SEQ ID NO:19所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0052] 包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和与SEQ ID NO:21所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0053] 包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0054] 包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0055] 包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0056] 包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补

并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0057] 包含SEQ ID N0:31所示的效应子序列和与SEQ ID N0:31所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0058] 包含SEQ ID N0:33所示的效应子序列和与SEQ ID N0:33所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0059] 包含SEQ ID N0:35所示的效应子序列和与SEQ ID N0:35所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0060] 包含SEQ ID N0:37所示的效应子序列和与SEQ ID N0:37所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0061] 包含SEQ ID N0:39所示的效应子序列和与SEQ ID N0:39所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0062] 包含SEQ ID N0:41所示的效应子序列和与SEQ ID N0:41所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0063] 包含SEQ ID N0:110所示的效应子序列和与SEQ ID N0:110所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0064] 包含SEQ ID N0:112所示的效应子序列和与SEQ ID N0:112所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0065] 包含SEQ ID N0:114所示的效应子序列和与SEQ ID N0:114所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0066] 包含SEQ ID N0:116所示的效应子序列和与SEQ ID N0:116所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0067] 包含SEQ ID N0:118所示的效应子序列和与SEQ ID N0:118所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0068] 包含SEQ ID N0:120所示的效应子序列和与SEQ ID N0:120所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0069] 包含SEQ ID N0:122所示的效应子序列和与SEQ ID N0:122所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0070] 包含SEQ ID N0:124所示的效应子序列和与SEQ ID N0:124所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0071] 包含SEQ ID N0:126所示的效应子序列和与SEQ ID N0:126所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0072] 包含SEQ ID N0:128所示的效应子序列和与SEQ ID N0:128所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0073] 包含SEQ ID N0:130所示的效应子序列和与SEQ ID N0:130所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR;

[0074] 包含SEQ ID N0:132所示的效应子序列和与SEQ ID N0:132所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shmiR。

[0075] 例如,由本文所述核酸编码的shmiR可包含相对于相应效应子序列包含1个、2个、3个或4个错配的效应子互补序列,条件是同源效应子与效应子互补序列能够形成双链体区

域。

- [0076] 在另一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR选自:
- [0077] 包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和SEQ ID NO:12所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0078] 包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和SEQ ID NO:14所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0079] 包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和SEQ ID NO:16所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0080] 包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和SEQ ID NO:18所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0081] 包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和SEQ ID NO:20所示的效应子互补序列的shmiR;20;
- [0082] 包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和SEQ ID NO:22所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0083] 包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和SEQ ID NO:24所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0084] 包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和SEQ ID NO:26所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0085] 包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和SEQ ID NO:28所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0086] 包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和SEQ ID NO:30所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0087] 包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和SEQ ID NO:32所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0088] 包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和SEQ ID NO:34所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0089] 包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和SEQ ID NO:36所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0090] 包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和SEQ ID NO:38所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0091] 包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0092] 包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和SEQ ID NO:42所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0093] 包含SEQ ID NO:110所示的效应子序列和SEQ ID NO:111所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0094] 包含SEQ ID NO:112所示的效应子序列和SEQ ID NO:113所示的效应子互补序列的shmiR;
- [0095] 包含SEQ ID NO:114所示的效应子序列和SEQ ID NO:115所示的效应子互补序列

的shmiR;

[0096] 包含SEQ ID NO:116所示的效应子序列和SEQ ID NO:117所示的效应子互补序列的shmiR;

[0097] 包含SEQ ID NO:118所示的效应子序列和SEQ ID NO:119所示的效应子互补序列的shmiR;

[0098] 包含SEQ ID NO:120所示的效应子序列和SEQ ID NO:121所示的效应子互补序列的shmiR;

[0099] 包含SEQ ID NO:122所示的效应子序列和SEQ ID NO:123所示的效应子互补序列的shmiR;

[0100] 包含SEQ ID NO:124所示的效应子序列和SEQ ID NO:125所示的效应子互补序列的shmiR;

[0101] 包含SEQ ID NO:126所示的效应子序列和SEQ ID NO:127所示的效应子互补序列的shmiR;

[0102] 包含SEQ ID NO:128所示的效应子序列和SEQ ID NO:129所示的效应子互补序列的shmiR;

[0103] 包含SEQ ID NO:130所示的效应子序列和SEQ ID NO:131所示的效应子互补序列的shmiR;

[0104] 包含SEQ ID NO:132所示的效应子序列和SEQ ID NO:133所示的效应子互补序列的shmiR。

[0105] 由本公开内容的核酸编码的shmiR可以以5'至3'方向包含:

[0106] 初级miRNA主链的5'侧翼序列;

[0107] 效应子互补序列;

[0108] 茎环序列;

[0109] 效应子序列;和

[0110] 初级miRNA主链的3'侧翼序列;

[0111] 适合的环序列可选自本领域已知的那些序列。然而,示例性茎环序列示于SEQ ID NO:75中。

[0112] 用于本公开的核酸的合适的初级微小RNA(初级miRNA或初级R)主链可选自本领域已知的那些。例如,初级miRNA主链可以选自初级miR-30a主链、初级miR-155主链、初级miR-21主链和初级miR-136主链。然而,优选地,初级miRNA主链是pri-miR-30a主链。根据其中初级miRNA主链是初级miR-30a主链的一个实例,初级miRNA主链的5'侧翼序列如SEQ ID NO:76中所示并且初级miRNA主链的3'侧翼序列如SEQ ID NO:77中所示。

[0113] 在一个实例中,本文所述的核酸包含选自SEQ ID NO:59-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列。根据该实例,由本公开的核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:43-58和134-145中的任一个所示的序列。

[0114] 本领域技术人员将理解,可将根据本公开的核酸与用于治疗HBV的其他治疗剂组合或结合使用。因此,本公开提供了与一种或多种用于治疗HBV的其他药剂组合的核酸,所述核酸包含编码如本文所述的shmiR的DNA序列。在一个实例中,提供了多种核酸,其包括:

[0115] (a) 至少一种如本文所述的核酸;和

- [0116] (b) 至少一种选自以下的另外的核酸：
- [0117] (i) 根据本文所述核酸的核酸；或
- [0118] (ii) 包含编码短发夹RNA (shRNA) 的DNA序列的核酸，所述短发夹RNA包含长度为至少17个核苷酸的效应子序列和效应子互补序列，其中所述效应子序列与SEQ ID NO:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA序列基本上互补；
- [0119] 其中由 (a) 处的核酸编码的shmiR和由 (b) 处的核酸编码的shmiR或shRNA包含不同的效应子序列。
- [0120] 优选地，与SEQ ID NO:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA序列基本上互补的 (b) (ii) 处的shRNA的效应子序列的长度小于30个核苷酸。例如，shRNA的合适效应子序列的长度可在17-29个核苷酸的范围内。
- [0121] 根据其中多种核酸中的至少一种核酸编码shRNA的一个实例，shRNA可选自：
- [0122] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:12所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:12所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0123] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:14所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:14所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0124] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:16所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:16所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0125] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:18所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:18所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0126] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:20所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:20所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0127] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:22所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:22所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；
- [0128] 包含以下序列的shRNA：(i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:24所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:24所示的序列形成双链体；和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序

列；

[0129] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:26所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:26所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0130] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:28所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:28所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0131] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:30所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:30所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0132] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:32所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:32所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0133] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:34所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:34所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0134] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:36所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:36所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0135] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:38所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:38所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0136] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:40所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:40所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0137] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:42所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:42所示的序列形成双链体; 和 (ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;

[0138] 包含以下序列的shRNA: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:111所示的序列基本上互补的效应子序列, 条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:

111所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0139] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:113所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:113所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0140] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:115所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:115所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0141] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:117所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:117所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0142] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:119所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:119所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0143] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:121所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:121所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0144] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:123所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:123所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0145] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:125所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:125所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0146] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:127所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:127所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0147] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:129所示的序列基本上互补的效应子序列，条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:129所示的序列形成双链体；和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列；

[0148] 包含以下序列的shRNA：(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID

NO:131所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:131所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列;和

[0149] 包含以下序列的shRNA:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:133所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:133所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。

[0150] 根据其中多种核酸中的至少一种核酸编码shRNA的另一个实例,所述shRNA可选自:

[0151] 包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和与SEQ ID NO:11所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0152] 包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和与SEQ ID NO:13所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0153] 包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和与SEQ ID NO:15所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0154] 包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和与SEQ ID NO:17所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0155] 包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和与SEQ ID NO:19所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0156] 包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和与SEQ ID NO:21所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0157] 包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0158] 包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0159] 包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0160] 包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0161] 包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和与SEQ ID NO:31所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0162] 包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和与SEQ ID NO:33所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0163] 包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和与SEQ ID NO:35所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0164] 包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和与SEQ ID NO:37所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

[0165] 包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和与SEQ ID NO:39所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;

- [0166] 包含SEQ ID N0:41所示的效应子序列和与SEQ ID No:41所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0167] 包含SEQ ID N0:110所示的效应子序列和与SEQ ID No:110所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0168] 包含SEQ ID N0:112所示的效应子序列和与SEQ ID No:112所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0169] 包含SEQ ID N0:114所示的效应子序列和与SEQ ID No:114所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0170] 包含SEQ ID N0:116所示的效应子序列和与SEQ ID No:116所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0171] 包含SEQ ID N0:118所示的效应子序列和与SEQ ID No:118所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0172] 包含SEQ ID N0:120所示的效应子序列和与SEQ ID No:120所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0173] 包含SEQ ID N0:122所示的效应子序列和与SEQ ID No:122所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0174] 包含SEQ ID N0:124所示的效应子序列和与SEQ ID No:124所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0175] 包含SEQ ID N0:126所示的效应子序列和与SEQ ID No:126所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0176] 包含SEQ ID N0:128所示的效应子序列和与SEQ ID No:128所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;
- [0177] 包含SEQ ID N0:130所示的效应子序列和与SEQ ID No:130所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA;和
- [0178] 包含SEQ ID N0:132所示的效应子序列和与SEQ ID No:132所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列的shRNA。
- [0179] 例如,由本文所述的多种核酸中的核酸编码的shRNA可包含相对于相应效应子序列含有1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配的效应子互补序列,条件是所述同源(cognate)效应子与效应子互补序列能够形成双链体区域。
- [0180] 在其中多种核酸个中的至少一种核酸编码shRNA的另一个实例中,所述shRNA可以选自:
- [0181] 包含SEQ ID N0:11所示的效应子序列和SEQ ID N0:12所示的效应子互补序列的shRNA;
- [0182] 包含SEQ ID N0:13所示的效应子序列和SEQ ID N0:14所示的效应子互补序列的shRNA;
- [0183] 包含SEQ ID N0:15所示的效应子序列和SEQ ID N0:16所示的效应子互补序列的shRNA;
- [0184] 包含SEQ ID N0:17所示的效应子序列和SEQ ID N0:18所示的效应子互补序列的shRNA;

- [0185] 包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和SEQ ID NO:20所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0186] 包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和SEQ ID NO:22所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0187] 包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和SEQ ID NO:24所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0188] 包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和SEQ ID NO:26所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0189] 包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和SEQ ID NO:28所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0190] 包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和SEQ ID NO:30所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0191] 包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和SEQ ID NO:32所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0192] 包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和SEQ ID NO:34所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0193] 包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和SEQ ID NO:36所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0194] 包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和SEQ ID NO:38所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0195] 包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0196] 包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和SEQ ID NO:42所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0197] 包含SEQ ID NO:110所示的效应子序列和SEQ ID NO:111所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0198] 包含SEQ ID NO:112所示的效应子序列和SEQ ID NO:113所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0199] 包含SEQ ID NO:114所示的效应子序列和SEQ ID NO:115所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0200] 包含SEQ ID NO:116所示的效应子序列和SEQ ID NO:117所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0201] 包含SEQ ID NO:118所示的效应子序列和SEQ ID NO:119所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0202] 包含SEQ ID NO:120所示的效应子序列和SEQ ID NO:121所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0203] 包含SEQ ID NO:122所示的效应子序列和SEQ ID NO:123所示的效应子互补序列的shRNA；
- [0204] 包含SEQ ID NO:124所示的效应子序列和SEQ ID NO:125所示的效应子互补序列

的shRNA；

[0205] 包含SEQ ID NO:126所示的效应子序列和SEQ ID NO:127所示的效应子互补序列的shRNA；

[0206] 包含SEQ ID NO:128所示的效应子序列和SEQ ID NO:129所示的效应子互补序列的shRNA；

[0207] 包含SEQ ID NO:130所示的效应子序列和SEQ ID NO:131所示的效应子互补序列的shRNA；和

[0208] 包含SEQ ID NO:132所示的效应子序列和SEQ ID NO:133所示的效应子互补序列的shRNA。

[0209] 根据其中本公开的核酸编码shRNA的任何实例，shRNA可包含位于效应子序列与效应子互补序列之间的茎环序列。适合的环序列可选自本领域已知的那些序列。或者，可以从头开发合适的茎环。在一个实例中，编码shRNA的本文所述的多个核酸中的核酸可包含编码位于编码效应子序列与效应子互补序列的DNA序列之间的茎环的DNA序列。例如，由本公开的核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:78-93中的任一个所示的序列。因此，本文所述的多种核酸中的核酸可包含SEQ ID NO:94-109中任一个所示的DNA序列或由所述DNA序列组成。

[0210] 根据本公开的多种核酸可包含多达10种核酸（每种核酸编码如本文所述的shmiR），诸如2种核酸或3种核酸或4种核酸或5种核酸或6种核酸或7种核酸或8种核酸或9种核酸或10种核酸。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的2种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的3种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的4种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的5种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的6种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的7种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的8种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的9种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。在一个实例中，所述多种核酸包含本公开的10种核酸，每种编码如本文所述的shmiR。根据本文所述的任何实例，所述多个核酸中的一个或多个可编码如本文所述的shRNA。

[0211] 根据其中提供多种核酸的一个实例，所述核酸中的两种或更多种核酸可以形成同一多核苷酸的分开部分。在另一个实例中，所述多种核酸中的两种或更多种核酸分别形成不同多核苷酸的部分。

[0212] 根据本公开的核酸或每种核酸可包含一种或多种转录终止子序列，或与其一起可操作连接。例如，所述核酸或每种核酸可在编码shmiR或shRNA的序列的3'末端处包含转录终止子序列。此类序列将取决于启动子的选择，并且是本领域技术人员已知的。例如，当本公开的核酸与RNA pol III启动子可操作地连接时，转录终止子序列可包括'TTTT'或'TTTTT'。

[0213] 可选地，或另外地，根据本公开的核酸或每种核酸可包含转录启动子（transcription initiator sequence）序列，或与其可操作地连接。例如，所述核酸或每种核酸可在编码shmiR或shRNA的序列的5'末端处包含转录启动子序列。此类序列对于本领域技术人员来说是已知的，但可以包括‘G’。

[0214] 可选地/另外地,根据本公开的核酸或每种核酸可包含一个或多个限制性位点,例如以便于将所述核酸克隆到克隆性载体或表达载体中。例如,本文所述的核酸可包括编码本公开的shmiR或shRNA的序列的上游和/或下游的限制性位点。合适的限制性酶识别序列是本领域技术人员已知的。然而,在一个实例中,本公开的核酸可包括在5'末端处(即,编码shmiR或shRNA的序列的上游)的BamH1限制性位点(GGATCC),以及在3'末端处(即,编码shmiR或shRNA的序列的下游)包括EcoR1限制性位点(GAATTC)。

[0215] 根据本公开的核酸还可以以DNA指导的RNA干扰(ddRNAi)构建体的形式提供,或者包含在其中,所述构建体能够表达由本公开的核酸编码的一种或多种shmiR。在这一点上,还提供了包含本公开的核酸的一种或多种ddRNAi构建体。

[0216] 在另一个实例中,提供了多种ddRNAi构建体,其各自包含编码如本文所述的shmiR的核酸,其中:

[0217] (a) 所述多种ddRNAi构建体中的至少一种包含如本文所述的多种核酸中的第一核酸;和

[0218] (b) 所述多种ddRNAi构建体中的至少一种包含如本文所述的多种核酸中的第二核酸;和

[0219] 其中所述第一和第二核酸编码彼此不同的shmiR。

[0220] 本文所述的多种ddRNAi构建体可包含多达10种ddRNAi构建体,每种构建体包含编码如本文所述的shmiR的一种或多种核酸,例如本公开的两种ddRNAi构建体或三种ddRNAi构建体或四种ddRNAi构建体或五种ddRNAi构建体或六种ddRNAi构建体或七种ddRNAi构建体或八种ddRNAi构建体或九种ddRNAi构建体或十种ddRNAi构建体。

[0221] 在又一个实例中,本公开的ddRNAi构建体包含如本文所述的多种核酸,使得所述ddRNAi构建体编码靶向HBV的多种shmiR,其中每种shmiR彼此不同。

[0222] 在一个实例中,所述ddRNAi构建体包含至少两种本公开内容的核酸,使得所述ddRNAi构建体编码至少两种靶向HBV的shmiR,每种shmiR彼此不同。

[0223] 包含本公开内容的至少两种核酸的示例性ddRNAi构建体可包含:

[0224] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和

[0225] (b) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

[0226] 在另一个实例中,本公开的ddRNAi构建体包含至少三种本文所述的核酸,使得所述ddRNAi构建体编码至少三种靶向HBV的shmiR,每种shmiR彼此不同。

[0227] 本公开的ddRNAi构建体的一个实例包含:

[0228] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

[0229] (b) 包含编码本文所述的shmiR或shRNA的DNA序列的核酸;和

[0230] (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

[0231] 其中(b)中的核酸编码具有效应子序列的shmiR或shRNA,所述效应序列不同于由(a)和(c)中的核酸编码的shmiR的效应子序列。

[0232] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):

[0233] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

[0234] (b) 编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和

[0235] (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

- [0236] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;
(b)包含SEQ ID NO:73所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
(c)包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0240] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
(b)编码包含SEQ ID NO:49所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和
(c)编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。
- [0244] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;
(b)包含SEQ ID NO:65所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
(c)包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0248] 根据编码3种shmiR的本公开的ddRNAi构建体的另一个实例,所述ddRNAi构建体包含:
(a)编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
(b)编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和
(c)编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。在一个实例中,在ddRNAi构建体中以5'至3'方向提供(a)至(c)。
- [0252] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;
(b)包含SEQ ID NO:149所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
(c)包含SEQ ID NO:153所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0256] 在另一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可包含至少一种编码如本文所述的shmiR的核酸和至少一种编码如本文所述的靶向HBV的shRNA的核酸,其中由所述ddRNAi构建体编码的shmiR和shRNA包含不同的效应子序列。根据本实例,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
(b)编码包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shRNA的核酸;和
(c)编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。
- [0260] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
(B)编码由SEQ ID NO:92所示的序列组成的shRNA的核酸;和
(c)编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。
- [0264] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5'至3'方向):
(a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;
(b)包含SEQ ID NO:108所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
(c)包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0268] 在一个实例中,如本文所述的ddRNAi构建体包含单个启动子,其与编码本公开的

shmiR或shRNA的核酸或每个核酸可操作地连接。

[0269] 在另一个实例中,编码本公开的shmiR或shRNA的每种核酸与单独的启动子可操作地连接。

[0270] 例如,所述一个或多个启动子位于编码所述一种或多种shmiR或所述一种或多种shRNA的相应核酸的上游。在包含多个启动子的ddRNAi构建体中,启动子可以相同或不同。示例性启动子是RNA pol III启动子,诸如U6和H1启动子。示例性的U6启动子是U6-1、U6-8和U6-9启动子。

[0271] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

[0272] (a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0273] (b)包含SEQ ID NO:73所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0274] (c)包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0275] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

[0276] (a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0277] (b)包含SEQ ID NO:65所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0278] (c)包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0279] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

[0280] (a)包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0281] (b)包含SEQ ID NO:149所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0282] (c)包含SEQ ID NO:153所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0283] 本公开还提供了表达载体,其中包含本公开的ddRNAi构建体。

[0284] 本公开还提供了多种表达载体,其中每一种包含本公开的ddRNAi构建体。例如,所述多种表达载体中的一种或多种包含本文公开的多种ddRNAi构建体。例如,所述多种表达载体中的每一种包含多种本文公开的ddRNAi构建体。例如,所述多种表达载体中的每一种包含一种本文公开的ddRNAi构建体。在本段中的任何前述方式中,所述多种表达载体可以一起表达多种根据本公开的shmiR。

[0285] 在一个实例中,所述或每种表达载体是质粒或微环。

[0286] 在一个实例中,所述质粒或微环或表达载体或ddRNAi构建体与阳离子DNA结合聚合物复合。

[0287] 在一个实例中,所述或每种表达载体为病毒载体。例如,所述病毒载体选自腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体(AdV)和慢病毒(LV)载体。

[0288] 本公开还提供了包含本文所述的ddRNAi构建体和/或多种ddRNAi构建体和/或表达载体和/或多种表达载体的组合物。在一个实例中,所述组合物还可包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。在一个实例中,所述组合物还可包含已知用于治疗HBV感染的另一种治疗剂(即,作为辅助疗法)。例如,已知用于治疗HBV感染的所述另一种治疗剂可选自恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和/或聚乙二醇化干扰素。

[0289] 本公开还提供了治疗受试者的HBV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用治

疗有效量的本文所述的核酸、多种核酸、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。

[0290] 本公开还提供了减少感染HBV的受试者中HBV病毒载量的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的核酸、多种核酸、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。

[0291] 本公开还提供了减轻患有HBV感染的受试者中与HBV感染相关的一个或多个症状的严重度的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的核酸、多种核酸、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。

[0292] 本公开还提供了减轻受HBV感染的受试者中HBV传染性的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的核酸、多种核酸、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。

[0293] 本公开还提供了用于降低患有HBV感染的受试者发展慢性肝功能不全,肝硬化和/或肝细胞癌的风险的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的核酸、多种核酸、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。

[0294] 根据本文所述的任何方法,在一个实例中,受试者患有急性HBV感染。或者,在一个实例中,受试者患有慢性HBV感染。

[0295] 在一个实例中,本文所述的方法包括抑制或减少受试者中由HBV基因组编码的一种或多种转录物的表达。

[0296] 在一个实例中,对其施用本公开的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物的受试者已经接受治疗HBV感染的另一种治疗剂的治疗。例如,受试者和/或HBV对于用已知用于治疗HBV感染的所述另一种药剂的治疗是难治的或耐受的。

[0297] 在一个实例中,将本公开的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物与另一种已知用于治疗HBV感染的治疗剂组合施用。例如,已知用于治疗HBV感染的所述另一种治疗剂可选自恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和/或聚乙二醇化干扰素。已知用于治疗HBV感染的所述另一种治疗剂和本公开的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物可以分开地或者在一起施用。根据其中公开施用的一个实例,可将已知用于治疗HBV感染的所述另一种治疗剂与本公开的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物同时施用。根据其中分开放施用的另一个实例,可将已知用于治疗HBV感染的所述另一种治疗剂与本公开的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物相继施用。

[0298] 在一个实例中,在试剂盒中提供本公开的组合物。例如,将本公开的组合物与已知用于治疗HBV感染的一种或多种其他治疗剂一起包装。此类其它治疗剂对于本领域技术人员来说是已知的。例如,已知用于治疗HBV感染的所述其它治疗剂可选自恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和/或聚乙二醇化干扰素。在另一个实例中,将组合物与用于本公开的方法的说明书一起包装。

[0299] 本公开还提供了本文所述的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物在制备药剂(例如,用于治疗受试者的HBV感染)中和/

或本文公开的方法中的用途。在一个实例中,所述受试者患有急性HBV感染。在另一个实例中,所述受试者患有慢性HBV感染。

[0300] 本公开还提供了本文所述的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物在治疗中的应用。例如,本文所述的核酸、多种核酸、ddRNAi构建体、多种ddRNAi构建体、表达载体、多种表达载体和/或组合物可用于治疗受试者的HBV感染和/或本文公开的方法。所述受试者可患有急性HBV感染。在另一个实例中,所述受试者可患有慢性HBV感染。

[0301] 根据本文所述的任何实例治疗HBV可包括减少受试者中HBV病毒载量、降低与HBV感染相关的症状的严重性和/或降低受试者中HBV传染性中的一种或多种。在一个实例中,所述药物将减少施用了所述药物的受试者中的HBV基因转录产物。

[0302] 附图简述

[0303] 图1显示了荧光素酶报告基因测定中命名为shmiR-6、shmiR-15和shmiR-12的shmiR相对于其shRNA对应物(分别为shRNA-6、shRNA-15和shRNA-12)的抑制活性:(A)显示了荧光素酶报告基因测定中命名为shmiR-6、shmiR-15和shmiR-12的shmiR相对于其shRNA对应物(分别为shRNA-6、shRNA-15和shRNA-12)的有义和反义链偏好抑制活性;(B)–(D)分别说明和比较shmiR-6、shmiR-15和shmiR-12在荧光素酶报告基因测定系统中相对于等剂量的其shRNA对应物(分别为shRNA-6、shRNA-15和shRNA-12)以剂量依赖性方式抑制荧光素酶蛋白表达的能力。

[0304] 图2显示了荧光素酶报告基因测定中shmiR-12和shmiR-15变体相对于各自的亲本shmiR(分别为shmiR-12和shmiR-15)的有义和反义链偏好性抑制活性:(A)显示shmiR-12的所有六种变体具有比亲本shmiR更好的链偏好性;(B)显示shmiR-15的六种变体中的四种具有比亲本shmiR更好的链偏好性。

[0305] 图3显示了用ddRNAi药剂转导的HepG2.2.15细胞中RNAi效应子分子的表达水平(表示为每个细胞的拷贝数):(A)显示在转导后第3、4、5和6天,(i)作为单一构建体表达的shmiR-12、(ii)作为单一构建体表达的shRNA-12和(iii)作为HBV-shRNAX3-v1的一部分表达的shRNA-12的效应子序列的相对表达水平;(B)显示转导后第3、4、5和6天,(i)作为单一构建体表达的shmiR-15、(ii)作为单一构建体表达的shRNA-15和(iii)作为HBV-shRNAX3-v1一部分表达的shRNA-15的效应子序列的相对表达水平。

[0306] 图4显示了在转导后3至6天,在用表达(A)shmiR-12或相应的shRNA(作为单一构建体或三联构建体(triple construct)的一部分)或(B)shmiR-15或相应的shRNA(作为单一构建体或三联构建体的一部分)的HBV AdV载体(MOI=100)转导的HepG2.2.15中,相对于GAPDH mRNA的水平而言,相当于HBV抗原HBsAg、HBcAg和HbxAg的区域中的HBV RNA转录物的抑制的水平。

[0307] 图5提供了ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1的构建体图。

[0308] 图6提供了使用ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1在PhoenixBio (PXB) 嵌合小鼠模型中进行的体内功效研究的流程图。

[0309] 图7显示用单剂量的scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦联合治疗的小鼠中血清HBV DNA水平降低,而盐水治疗的对照动物中的

病毒滴度在91天的研究过程中保持相对恒定。

[0310] 图8显示用单剂量的scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦联合治疗的小鼠中血清HBsAg抗原水平降低,而盐水治疗的对照动物中的血清HBsAg抗原水平在91天的研究过程中保持相对恒定。

[0311] 图9显示用单剂量的scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦联合治疗的小鼠中血清HBeAg抗原水平降低,而用恩替卡韦治疗的动物仅显示血清HBeAg抗原水平的轻微降低(即,0.371og),并且盐水治疗的对照动物中的HBeAg抗原水平在91天的研究过程中保持相对恒定。

[0312] 图10显示了用单剂量的scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与聚乙二醇化的干扰素(其中每天2次施用聚乙二醇化的干扰素)联合治疗的小鼠中血清HBV DNA水平显著降低,而盐水治疗的对照动物中的血清HBV DNA水平在91天的研究过程中保持相对恒定。

[0313] 图11显示用聚乙二醇化的干扰素作为单一疗法或单剂量的ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦或聚乙二醇化的干扰素联合治疗的小鼠中HBV RNA水平降低,而当单独使用恩替卡韦时HBV RNA水平仅适度下降。(A) - (C) 分别显示对应于shmiR-6、shmiR-15和shmiR-12的转录物的HBV RNA水平。

[0314] 图12显示了用单剂量的ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦或聚乙二醇化的干扰素联合治疗的小鼠的肝脏中细胞内HBV DNA和cccDNA水平均降低。

[0315] 图13显示了从用ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1作为单一疗法或与恩替卡韦或聚乙二醇化的干扰素联合治疗的小鼠获得的肝组织中RNAi效应子分子的表达水平,表示为每个细胞的拷贝数。

[0316] 图14显示了在从PXB小鼠获得的肝组织中从ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1产生的主要shRNA-6/shmiR-6效应子序列种类及其数量,如通过下一代测序(NGS)测定的。

[0317] 图15显示了在从PXB小鼠获得的肝组织中从ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1产生的主要shRNA-15/shmiR-15效应子序列种类及其数量,如通过下一代测序(NGS)测定的。

[0318] 图16显示了在从PXB小鼠获得的肝组织中从ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1产生的主要shRNA-12/shmiR-12效应子序列种类及其数量,如通过下一代测序(NGS)测定的。

[0319] 序列表注释

[0320] SEQ ID NO:1:HBV基因组内的靶区域1的RNA转录物。

[0321] SEQ ID NO:2:HBV基因组内的靶区域2的RNA转录物。

[0322] SEQ ID NO:3:HBV基因组内的靶区域3的RNA转录物。

[0323] SEQ ID NO:4:HBV基因组内的靶区域4的RNA转录物。

[0324] SEQ ID NO:5:HBV基因组内的靶区域5的RNA转录物。

[0325] SEQ ID NO:6:HBV基因组内的靶区域6的RNA转录物。

[0326] SEQ ID NO:7:HBV基因组内的靶区域7的RNA转录物。

[0327] SEQ ID NO:8:HBV基因组内的靶区域8的RNA转录物。

- [0328] SEQ ID NO:9:HBV基因组内的靶区域9的RNA转录物。
- [0329] SEQ ID NO:10:HBV基因组内的靶区域10的RNA转录物。
- [0330] SEQ ID NO:11:shmiR-1的RNA效应子序列。
- [0331] SEQ ID NO:12:shmiR-1的RNA效应子互补序列。
- [0332] SEQ ID NO:13:shmiR-2的RNA效应子序列。
- [0333] SEQ ID NO:14:shmiR-2的RNA效应子互补序列。
- [0334] SEQ ID NO:15:shmiR-3的RNA效应子序列。
- [0335] SEQ ID NO:16:shmiR-3的RNA效应子互补序列。
- [0336] SEQ ID NO:17:shmiR-4的RNA效应子序列。
- [0337] SEQ ID NO:18:shmiR-4的RNA效应子互补序列。
- [0338] SEQ ID NO:19:shmiR-5的RNA效应子序列。
- [0339] SEQ ID NO:20:shmiR-5的RNA效应子互补序列。
- [0340] SEQ ID NO:21:shmiR-6的RNA效应子序列。
- [0341] SEQ ID NO:22:shmiR-6的RNA效应子互补序列。
- [0342] SEQ ID NO:23:shmiR-7的RNA效应子序列。
- [0343] SEQ ID NO:24:shmiR-7的RNA效应子互补序列。
- [0344] SEQ ID NO:25:shmiR-8的RNA效应子序列。
- [0345] SEQ ID NO:26:shmiR-8的RNA效应子互补序列。
- [0346] SEQ ID NO:27:shmiR-9的RNA效应子序列。
- [0347] SEQ ID NO:28:shmiR-9的RNA效应子互补序列。
- [0348] SEQ ID NO:29:shmiR-10的RNA效应子序列。
- [0349] SEQ ID NO:30:shmiR-10的RNA效应子互补序列。
- [0350] SEQ ID NO:31:shmiR-11的RNA效应子序列。
- [0351] SEQ ID NO:32:shmiR-11的RNA效应子互补序列。
- [0352] SEQ ID NO:33:shmiR-12的RNA效应子序列。
- [0353] SEQ ID NO:34:shmiR-12的RNA效应子互补序列。
- [0354] SEQ ID NO:35:shmiR-13的RNA效应子序列。
- [0355] SEQ ID NO:36:shmiR-13的RNA效应子互补序列。
- [0356] SEQ ID NO:37:shmiR-14的RNA效应子序列。
- [0357] SEQ ID NO:38:shmiR-14的RNA效应子互补序列。
- [0358] SEQ ID NO:39:shmiR-15的RNA效应子序列。
- [0359] SEQ ID NO:40:shmiR-15的RNA效应子互补序列。
- [0360] SEQ ID NO:41:shmiR-16的RNA效应子序列。
- [0361] SEQ ID NO:42:shmiR-16的RNA效应子互补序列。
- [0362] SEQ ID NO:43:shmiR-1的RNA序列。
- [0363] SEQ ID NO:44:shmiR-2的RNA序列。
- [0364] SEQ ID NO:45:shmiR-3的RNA序列。
- [0365] SEQ ID NO:46:shmiR-4的RNA序列。
- [0366] SEQ ID NO:47:shmiR-5的RNA序列。

- [0367] SEQ ID NO:48:shmiR-6的RNA序列。
- [0368] SEQ ID NO:49:shmiR-7的RNA序列。
- [0369] SEQ ID NO:50:shmiR-8的RNA序列。
- [0370] SEQ ID NO:51:shmiR-9的RNA序列。
- [0371] SEQ ID NO:52:shmiR-10的RNA序列。
- [0372] SEQ ID NO:53:shmiR-11的RNA序列。
- [0373] SEQ ID NO:54:shmiR-12的RNA序列。
- [0374] SEQ ID NO:55:shmiR-13的RNA序列。
- [0375] SEQ ID NO:56:shmiR-14的RNA序列。
- [0376] SEQ ID NO:57:shmiR-15的RNA序列。
- [0377] SEQ ID NO:58:shmiR-16的RNA序列。
- [0378] SEQ ID NO:59:shmiR-1的DNA序列。
- [0379] SEQ ID NO:60:shmiR-2的DNA序列。
- [0380] SEQ ID NO:61:shmiR-3的DNA序列。
- [0381] SEQ ID NO:62:shmiR-4的DNA序列。
- [0382] SEQ ID NO:63:shmiR-5的DNA序列。
- [0383] SEQ ID NO:64:shmiR-6的DNA序列。
- [0384] SEQ ID NO:65:shmiR-7的DNA序列。
- [0385] SEQ ID NO:66:shmiR-8的DNA序列。
- [0386] SEQ ID NO:67:shmiR-9的DNA序列。
- [0387] SEQ ID NO:68:shmiR-10的DNA序列。
- [0388] SEQ ID NO:69:shmiR-11的DNA序列。
- [0389] SEQ ID NO:70:shmiR-12的DNA序列。
- [0390] SEQ ID NO:71:shmiR-13的DNA序列。
- [0391] SEQ ID NO:72:shmiR-14的DNA序列。
- [0392] SEQ ID NO:73:shmiR-15的DNA序列。
- [0393] SEQ ID NO:74:shmiR-16的DNA序列。
- [0394] SEQ ID NO:75:shmiR的茎环RNA序列。
- [0395] SEQ ID NO:76:初级miR-30a主链的5' 侧翼序列；
- [0396] SEQ ID NO:77:初级miR-30a主链的3' 侧翼序列；
- [0397] SEQ ID NO:78:命名为shRNA-1的shRNA的RNA序列。
- [0398] SEQ ID NO:79:命名为shRNA-2的shRNA的RNA序列。
- [0399] SEQ ID NO:80:命名为shRNA-3的shRNA的RNA序列。
- [0400] SEQ ID NO:81:命名为shRNA-4的shRNA的RNA序列。
- [0401] SEQ ID NO:82:命名为shRNA-5的shRNA的RNA序列。
- [0402] SEQ ID NO:83:命名为shRNA-6的shRNA的RNA序列。
- [0403] SEQ ID NO:84:命名为shRNA-7的shRNA的RNA序列。
- [0404] SEQ ID NO:85:命名为shRNA-8的shRNA的RNA序列。
- [0405] SEQ ID NO:86:命名为shRNA-9的shRNA的RNA序列。

- [0406] SEQ ID NO:87:命名为shRNA-10的shRNA的RNA序列。
- [0407] SEQ ID NO:88:命名为shRNA-11的shRNA的RNA序列。
- [0408] SEQ ID NO:89:命名为shRNA-12的shRNA的RNA序列。
- [0409] SEQ ID NO:90:命名为shRNA-13的shRNA的RNA序列。
- [0410] SEQ ID NO:91:命名为shRNA-14的shRNA的RNA序列。
- [0411] SEQ ID NO:92:命名为shRNA-15的shRNA的RNA序列。
- [0412] SEQ ID NO:93:命名为shRNA-16的shRNA的RNA序列。
- [0413] SEQ ID NO:94:编码命名为shRNA-1的shRNA的DNA序列。
- [0414] SEQ ID NO:95:编码命名为shRNA-2的shRNA的DNA序列。
- [0415] SEQ ID NO:96:编码命名为shRNA-3的shRNA的DNA序列。
- [0416] SEQ ID NO:97:编码命名为shRNA-4的shRNA的DNA序列。
- [0417] SEQ ID NO:98:编码命名为shRNA-5的shRNA的DNA序列。
- [0418] SEQ ID NO:99:编码命名为shRNA-6的shRNA的DNA序列。
- [0419] SEQ ID NO:100:编码命名为shRNA-7的shRNA的DNA序列。
- [0420] SEQ ID NO:101:编码命名为shRNA-8的shRNA的DNA序列。
- [0421] SEQ ID NO:102:编码命名为shRNA-9的shRNA的DNA序列。
- [0422] SEQ ID NO:103:编码命名为shRNA-10的shRNA的DNA序列。
- [0423] SEQ ID NO:104:编码命名为shRNA-11的shRNA的DNA序列。
- [0424] SEQ ID NO:105:编码命名为shRNA-12的shRNA的DNA序列。
- [0425] SEQ ID NO:106:编码命名为shRNA-13的shRNA的DNA序列。
- [0426] SEQ ID NO:107:编码命名为shRNA-14的shRNA的DNA序列。
- [0427] SEQ ID NO:108:编码命名为shRNA-15的shRNA的DNA序列。
- [0428] SEQ ID NO:109:编码命名为shRNA-16的shRNA的DNA序列。
- [0429] SEQ ID NO:110:shmiR-17的RNA效应子序列。
- [0430] SEQ ID NO:111:shmiR-17的RNA效应子互补序列。
- [0431] SEQ ID NO:112:shmiR-18的RNA效应子序列。
- [0432] SEQ ID NO:113:shmiR-18的RNA效应子互补序列。
- [0433] SEQ ID NO:114:shmiR-19的RNA效应子序列。
- [0434] SEQ ID NO:115:shmiR-19的RNA效应子互补序列。
- [0435] SEQ ID NO:116:shmiR-20的RNA效应子序列。
- [0436] SEQ ID NO:117:shmiR-20的RNA效应子互补序列。
- [0437] SEQ ID NO:118:shmiR-21的RNA效应子序列。
- [0438] SEQ ID NO:119:shmiR-21的RNA效应子互补序列。
- [0439] SEQ ID NO:120:shmiR-22的RNA效应子序列。
- [0440] SEQ ID NO:121:shmiR-22的RNA效应子互补序列。
- [0441] SEQ ID NO:122:shmiR-23的RNA效应子序列。
- [0442] SEQ ID NO:123:shmiR-23的RNA效应子互补序列。
- [0443] SEQ ID NO:124:shmiR-24的RNA效应子序列。
- [0444] SEQ ID NO:125:shmiR-24的RNA效应子互补序列。

- [0445] SEQ ID NO:126:shmiR-25的RNA效应子序列。
- [0446] SEQ ID NO:127:shmiR-25的RNA效应子互补序列。
- [0447] SEQ ID NO:128:shmiR-26的RNA效应子序列。
- [0448] SEQ ID NO:129:shmiR-26的RNA效应子互补序列。
- [0449] SEQ ID NO:130:shmiR-27的RNA效应子序列。
- [0450] SEQ ID NO:131:shmiR-27的RNA效应子互补序列。
- [0451] SEQ ID NO:132:shmiR-28的RNA效应子序列。
- [0452] SEQ ID NO:133:shmiR-28的RNA效应子互补序列。
- [0453] SEQ ID NO:134:shmiR-17的RNA序列。
- [0454] SEQ ID NO:135:shmiR-18的RNA序列。
- [0455] SEQ ID NO:136:shmiR-19的RNA序列。
- [0456] SEQ ID NO:137:shmiR-20的RNA序列。
- [0457] SEQ ID NO:138:shmiR-21的RNA序列。
- [0458] SEQ ID NO:139:shmiR-22的RNA序列。
- [0459] SEQ ID NO:140:shmiR-23的RNA序列。
- [0460] SEQ ID NO:141:shmiR-24的RNA序列。
- [0461] SEQ ID NO:142:shmiR-25的RNA序列。
- [0462] SEQ ID NO:143:shmiR-26的RNA序列。
- [0463] SEQ ID NO:144:shmiR-27的RNA序列。
- [0464] SEQ ID NO:145:shmiR-28的RNA序列。
- [0465] SEQ ID NO:146:编码shmiR-17的DNA序列。
- [0466] SEQ ID NO:147:编码shmiR-18的DNA序列。
- [0467] SEQ ID NO:148:编码shmiR-19的DNA序列。
- [0468] SEQ ID NO:149:编码shmiR-20的DNA序列。
- [0469] SEQ ID NO:150:编码shmiR-21的DNA序列。
- [0470] SEQ ID NO:151:编码shmiR-22的DNA序列。
- [0471] SEQ ID NO:152:编码shmiR-23的DNA序列。
- [0472] SEQ ID NO:153:编码shmiR-24的DNA序列。
- [0473] SEQ ID NO:154:编码shmiR-25的DNA序列。
- [0474] SEQ ID NO:155:编码shmiR-26的DNA序列。
- [0475] SEQ ID NO:156:编码shmiR-27的DNA序列。
- [0476] SEQ ID NO:157:编码shmiR-28的DNA序列。
- [0477] SEQ ID NO:158:HBV正向引物的DNA序列。
- [0478] SEQ ID NO:159:HBV反向引物的DNA序列。
- [0479] SEQ ID NO:160:HBV Taqman探针的DNA序列。
- [0480] SEQ ID NO:161:HBV cccDNA正向引物的DNA序列。
- [0481] SEQ ID NO:162:HBV cccDNA反向引物的DNA序列。
- [0482] SEQ ID NO:163:HBV cccDNA Taqman探针的DNA序列。
- [0483] SEQ ID NO:164:编码shRNA-6的DNA序列,包括侧翼序列。

- [0484] SEQ ID NO:165:对应于shRNA-6效应子种类1的DNA序列。
- [0485] SEQ ID NO:166:对应于shRNA-6效应子种类2的DNA序列。
- [0486] SEQ ID NO:167:对应于shRNA-6效应子种类3的DNA序列。
- [0487] SEQ ID NO:168:对应于shRNA-6效应子种类4的DNA序列。
- [0488] SEQ ID NO:169:对应于shRNA-6效应子种类5的DNA序列。
- [0489] SEQ ID NO:170:对应于shRNA-6效应子种类6的DNA序列。
- [0490] SEQ ID NO:171:对应于shRNA-6效应子种类7的DNA序列。
- [0491] SEQ ID NO:172:对应于shRNA-6效应子种类8的DNA序列。
- [0492] SEQ ID NO:173:对应于shRNA-6效应子种类9的DNA序列。
- [0493] SEQ ID NO:174:对应于shRNA-6效应子种类10的DNA序列。
- [0494] SEQ ID NO:175:对应于shRNA-6效应子种类11的DNA序列。
- [0495] SEQ ID NO:176:编码shmiR-6的DNA序列,包括miRNA主链的侧翼序列。
- [0496] SEQ ID NO:177:对应于shmiR-6效应子种类1的DNA序列。
- [0497] SEQ ID NO:178:对应于shmiR-6效应子种类2的DNA序列。
- [0498] SEQ ID NO:179:对应于shmiR-6效应子种类3的DNA序列。
- [0499] SEQ ID NO:180:对应于shmiR-6效应子种类4的DNA序列。
- [0500] SEQ ID NO:181:对应于shmiR-6效应子种类5的DNA序列。
- [0501] SEQ ID NO:182:编码shRNA-15的DNA序列,包括侧翼序列。
- [0502] SEQ ID NO:183:对应于shRNA-15效应子种类1的DNA序列。
- [0503] SEQ ID NO:184:对应于shRNA-15效应子种类2的DNA序列。
- [0504] SEQ ID NO:185:对应于shRNA-15效应子种类3的DNA序列。
- [0505] SEQ ID NO:186:对应于shRNA-15效应子种类4的DNA序列。
- [0506] SEQ ID NO:187:对应于shRNA-15效应子种类5的DNA序列。
- [0507] SEQ ID NO:188:对应于shRNA-15效应子种类6的DNA序列。
- [0508] SEQ ID NO:189:对应于shRNA-15效应子种类7的DNA序列。
- [0509] SEQ ID NO:190:对应于shRNA-15效应子种类8的DNA序列。
- [0510] SEQ ID NO:191:对应于shRNA-15效应子种类9的DNA序列。
- [0511] SEQ ID NO:192:对应于shRNA-15效应子种类10的DNA序列。
- [0512] SEQ ID NO:193:对应于shRNA-15效应子种类11的DNA序列。
- [0513] SEQ ID NO:194:对应于shRNA-15效应子种类12的DNA序列。
- [0514] SEQ ID NO:195:对应于shRNA-15效应子种类13的DNA序列。
- [0515] SEQ ID NO:196:对应于shRNA-15效应子种类14的DNA序列。
- [0516] SEQ ID NO:197:对应于shRNA-15效应子种类15的DNA序列。
- [0517] SEQ ID NO:198:对应于shRNA-15效应子种类16的DNA序列。
- [0518] SEQ ID NO:199:对应于shRNA-15效应子种类17的DNA序列。
- [0519] SEQ ID NO:200:对应于shRNA-15效应子种类18的DNA序列。
- [0520] SEQ ID NO:201:对应于shRNA-15效应子种类19的DNA序列。
- [0521] SEQ ID NO:202:编码shmiR-15的DNA序列,包括miRNA主链的侧翼序列。
- [0522] SEQ ID NO:203:对应于shmiR-15效应子种类1的DNA序列。

- [0523] SEQ ID NO:204:对应于shmiR-15效应子种类2的DNA序列。
- [0524] SEQ ID NO:205:对应于shmiR-15效应子种类3的DNA序列。
- [0525] SEQ ID NO:206:对应于shmiR-15效应子种类4的DNA序列。
- [0526] SEQ ID NO:207:对应于shmiR-15效应子种类5的DNA序列。
- [0527] SEQ ID NO:208:对应于shmiR-15效应子种类6的DNA序列。
- [0528] SEQ ID NO:209:编码shRNA-12的DNA序列,包括侧翼序列。
- [0529] SEQ ID NO:210:对应于shRNA-12效应子种类1的DNA序列。
- [0530] SEQ ID NO:211:对应于shRNA-12效应子种类2的DNA序列。
- [0531] SEQ ID NO:212:对应于shRNA-12效应子种类3的DNA序列。
- [0532] SEQ ID NO:213:对应于shRNA-12效应子种类4的DNA序列。
- [0533] SEQ ID NO:214:对应于shRNA-12效应子种类5的DNA序列。
- [0534] SEQ ID NO:215:对应于shRNA-12效应子种类6的DNA序列。
- [0535] SEQ ID NO:216:对应于shRNA-12效应子种类7的DNA序列。
- [0536] SEQ ID NO:217:对应于shRNA-12效应子种类8的DNA序列。
- [0537] SEQ ID NO:218:对应于shRNA-12效应子种类9的DNA序列。
- [0538] SEQ ID NO:219:对应于shRNA-12效应子种类10的DNA序列。
- [0539] SEQ ID NO:220:对应于shRNA-12效应子种类11的DNA序列。
- [0540] SEQ ID NO:221:对应于shRNA-12效应子种类12的DNA序列。
- [0541] SEQ ID NO:222:对应于shRNA-12效应子种类13的DNA序列。
- [0542] SEQ ID NO:223:对应于shRNA-12效应子种类14的DNA序列。
- [0543] SEQ ID NO:224:编码shmiR-12的DNA序列,包括miRNA主链的侧翼序列。
- [0544] SEQ ID NO:225:对应于shmiR-12效应子种类1的DNA序列。
- [0545] SEQ ID NO:226:对应于shmiR-12效应子种类2的DNA序列。
- [0546] SEQ ID NO:227:对应于shmiR-12效应子种类3的DNA序列。
- [0547] SEQ ID NO:228:对应于shmiR-12效应子种类4的DNA序列。
- [0548] SEQ ID NO:229:对应于shmiR-12效应子种类5的DNA序列。

[0549] 发明详述

[0550] 总述

[0551] 在整个说明书中,除非另外特别说明或上下文另有要求,否则提及单个步骤、特征、物质组成、步骤的组或特征的组或物质组成的组应包括这些步骤、特征、物质组成、步骤的组或特征的组或物质组成的组中的一种和多种(即一个或多个)。

[0552] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本公开易于进行变化和修改。应理解,本公开包括所有此类变化和修改。本公开还包括本说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的任何两个或更多个的任何组合或所有组合。

[0553] 本公开不限于本文描述的具体实施例包括的范围,所述具体实施例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公开的范围内。

[0554] 除非另外特别说明,否则本公开的任何实例应当比照适用于本公开的任何其他实例。

[0555] 除非另外特别地定义,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中)普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0556] 除非另有说明,否则本公开中使用的重组DNA、重组蛋白、细胞培养和免疫学技术是本领域技术人员公知的标准程序。在整个文献中描述和解释了此类技术,文献源于诸如J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J.Sambrook等Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), T.A.Brown (编辑), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1和2卷, IRL Press (1991), D.M.Glover和B.D.Hames (编辑), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1和-4卷, IRL Press (1995), D.M.Ausubel等 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括直至现在的所有更新), Ed Harlow和David Lane (编辑) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), T.A.Ausubel等 (编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons (包括直至现在的所有更新)。

[0557] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”或变化形式诸如“含有”、“具有”被理解为暗示包括所述步骤或要素或整数或者步骤或要素的组或整数的组,但不排除任何其他步骤或要素或整数或者要素或整数的组。

[0558] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为表示“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。

[0559] 选定的定义

[0560] “RNA”是指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”是指在 β -D-核糖-呋喃糖部分的2'位置具有羟基的核苷酸。所述术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA诸如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成RNA、重组产生的RNA,以及与天然存在的RNA相异在于一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代和/或改变的改变的RNA。此类改变可包括向siNA的末端或在内部(例如在RNA的一个或多个核苷酸处)添加非核苷酸材料。本公开的RNA分子中的核苷酸还可以包含非标准核苷酸,诸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可以称为天然存在的RNA的类似物。

[0561] 术语“RNA干扰”或“RNAi”通常是指由细胞的细胞质中的双链RNA(dsRNA)分子引发的基因表达的RNA依赖性沉默。dsRNA分子减少或抑制靶核酸序列的转录产物,从而沉默该基因或减少该基因的表达。

[0562] 如本文中所用,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的RNA分子,所述效应子序列和效应子互补序列彼此长度相似。效应子序列和效应子互补序列可以在单个RNA链中或在分开的RNA链中。“效应子序列”(通常称为“引导链”)与靶序列基本上互补,靶序列在本情况下是HBV基因组的RNA转录产物的区域。“效应子序列”也可以称为“反义序列”。“效应子互补序列”将与效应子序列充分互补,使得其可以与效应子序列退火以形成双链体。在这一点上,效应子互补序列与靶序列的区域基本同源。对于技术人员显而易见的是,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。

[0563] 如本文中所用,术语“双链体”是指两个互补或基本上互补的核酸(例如, RNA)中,或单链核酸(例如, RNA)的两个互补或基本上互补的区域,其中通过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形成稳定的双链体的任何其他方式彼此形成碱基对。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;允许有实质上的互补性。实质上的互补性可包括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1个错配)导致94.7%的互补性,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2个错配)导致89.5%的互补性,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三个错配(即,16个碱基对和3个错配)导致84.2%的互补性,使得双链体区域基本上互补,依此类推。

[0564] dsRNA可以作为发夹或茎环结构提供,所述发夹或茎环结构具有由效应子序列和效应子互补序列组成的双链体区域,所述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,其可被称为“发夹RNA”或“短发夹RNAi试剂”或“shRNA”。

[0565] 以发夹或茎环结构提供或产生发夹或茎环结构的其他dsRNA分子包括初级miRNA转录物(初级miRNA)和前体微小RNA(前-miRNA)。前-miRNA shRNA可以通过酶Drosha和Pasha的作用从初级miRNA天然地产生,所述酶识别并释放形成来自茎-环结构的初级miRNA转录物的区域。或者,可将初级miRNA转录物工程化以用人工/重组茎-环结构替代天然茎-环结构。也就是说,可以将人工/重组茎-环结构插入或克隆到缺乏其天然茎-环结构的初级miRNA主链序列中。在被工程化以作为初级miRNA分子的一部分表达的茎环序列的情况下,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”、“shmiRs”或“微小RNA框架shRNAs”。

[0566] 如本文中所用,关于序列的术语“互补”是指序列Watson-Crick碱基配对的互补序列,其中鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对,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,或者其可以与另一序列的指定部分或长度互补。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。

[0567] 如本文中所用,术语“基本上互补的”用于表示足够程度的互补性或精确配对,使得在核酸序列之间,例如效应子序列与效应子互补序列或效应子序列与靶序列之间发生稳定和特异性结合。应理解,核酸的序列不必与其靶标或互补序列的序列100%互补。该术语包括与另一个序列(但悬突除外)互补的序列。在某些情况下,除1-2个错配外,序列与另一序列互补。在一些情况下,除1个错配外,序列是互补的。在一些情况下,除2个错配外,序列是互补的。在一些情况下,除3个错配外,序列是互补的。在又一些情况下,除4个错配外,序列是互补的。

[0568] 如在本公开的shRNA或shmiR的上下文中使用,术语“编码的”应理解为意指能够从DNA模板转录的shRNA或shmiR。因此,编码本公开的shRNA或shmiR的核酸将包含DNA序列,其用作各自shRNA或shmiR的转录模板。

[0569] 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,所述DNA序列在转录时产生引发RNAi的shRNA或shmiR分子。ddRNAi构建体可包含转录为能够自

我退火成发夹结构(其中双链区通过至少2个核苷酸的茎环连接)的单个RNA(即shRNA或shmiR),或转录为具有多个shRNA或shmiR的单个RNA,或转录为多个RNA转录物(每一个分别能够折叠为单个shRNA或shmiR)的核酸。ddRNAi构建体可在表达载体(即“ddRNAi表达构建体”)内,例如与启动子可操作地连接。

[0570] 如本文中所用,术语“可操作地连接的”或“可操作的键联”(或类似的)意指编码核酸序列以有利于编码序列表达的方式与调控序列(例如启动子)连接或结合。调控序列包括启动子、增强子和本领域公认的并被选择来指导编码序列的表达的其他表达控制元件。

[0571] “载体”应理解为意指用于将核酸引入细胞的媒介物。载体包括但不限于质粒、噬菌粒、病毒、细菌和源自病毒或细菌来源的媒介物。“质粒”是环状双链DNA分子。根据本公开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,可修饰所述病毒基因组以删除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)。其他载体可被稳定地整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。如本文中所用,术语“表达载体”应理解为意指能够表达本公开的RNA分子的载体。

[0572] 如本文中所用,术语“治疗(treating)”、“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”及其变型是指被设计来在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。理想的治疗效果包括降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态,以及缓解或改善预后。因此,HBV感染的治疗包括降低感染HBV的受试者中的HBV病毒载量,减轻与HBV感染相关的症状的严重性,以及降低受试者中HBV的传染性。例如,如果实现上述治疗效果中的一种或多种,则个体被成功地“治疗”。

[0573] “治疗有效量”至少是实现特定疾病(例如,HBV感染)的可测量的改善所需的最小浓度或量。本文中的治疗有效量可根据多种因素诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及shRNA或shmiR、编码其的核酸、ddRNAi或表达构建体在个体中引发所需反应的能力而变化。治疗有效量也是其中治疗有益效果超过shRNA或shmiR、编码其的核酸、ddRNAi或表达构建体的任何毒性或有害作用的量。

[0574] 如本文中所用,“受试者”或“患者”可以是感染HBV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(例如宠物诸如狗和猫)、实验室试验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)、表演动物(例如赛马、骆驼、灰狗)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,受试者或患者是灵长类动物。在一个实例中,受试者或患者是人。

[0575] 术语“减少的表达”、“表达的减少”或类似术语是指来自靶基因(例如,HBV pol基因或其他HBV基因)的蛋白质和/或mRNA产物的缺失或水平的可观察的降低。降低不必是绝对的,但可以是足以使作为通过本公开的核酸编码的shmiR实现的RNAi的结果而产生可检测或可观察到的变化的部分降低。可通过测定来自靶核酸的mRNA和/或蛋白质产物水平相对于缺乏shmiR或shRNA、编码其的核酸、ddRNAi构建体或表达构建体的细胞的降低来测量降低,所述降低可小至1%、5%或10%,或可以是绝对的,即100%的抑制。降低的效应可以通过检查外部特性,即细胞或生物的定量和/或定性表型来测定,并且还可包括在施用本公开的ddRNAi构建体后评估病毒载量。

[0576] 用于RNAi的试剂

[0577] 在一个实施例中,本公开提供了包含编码短发夹微小RNA(shmiR)的DNA序列的核酸,所述shmiR包含:

[0578] 长度为至少17个核苷酸的效应子序列;

[0579] 效应子互补序列;

[0580] 茎环序列;和

[0581] 初级微小RNA(初级miRNA)主链;

[0582] 其中效应子序列与SEQ ID N0:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA转录物基本上互补。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。在一个特别优选的实例中,效应子序列的长度为21个核苷酸。更优选地,效应子序列的长度为21个核苷酸,效应子互补序列的长度为20个核苷酸。

[0583] 在一个实例中,shmiR包含与RNA转录物基本上互补的效应子序列,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含6个碱基错配,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含5个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含4个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含3个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含2个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含1个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物100%互补,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:1所示的序列或由所述序列组成。

[0584] 在一个实例中,shmiR包含与RNA转录物基本上互补的效应子序列,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含6个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含5个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含4个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含3个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含2个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含1个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物100%互补,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:2所示的序列或由所述序列组成。

[0585] 在一个实例中,shmiR包含与RNA转录物基本上互补的效应子序列,所述RNA转录物包含SEQ ID N0:3所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上

上互补并且相对于其包含6个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含5个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含4个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含3个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含2个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含1个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物100%互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:131所示的序列或由所述序列组成。

[0607] 在一个实例中,shmiR包含与RNA转录物基本上互补的效应子序列,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含6个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含5个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含4个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含3个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含2个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物基本上互补并且相对于其包含1个错配碱基,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。例如,效应子序列可与RNA转录物100%互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:133所示的序列或由所述序列组成。

[0608] 根据其中本公开的shmiR的效应子序列与本文所述的HBV RNA转录物基本上互补并且相对于其含有1个、2个、3个、4个、5个或6个错配碱基的一个实例,优选所述一个或多个错配不位于对应于shmiR的种子区域(即效应子序列的核苷酸2-8)的区域内。

[0609] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:12所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:12所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:11所示的效应子序列和与SEQ ID NO:11所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:11所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:12所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-1”。

[0610] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:14所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:14所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和与SEQ ID NO:13所示的序列基本上互补并且能够

与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:13所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:14所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-2”。

[0611] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:16所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:16所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和与SEQ ID NO:15所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:15所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:16所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-3”。

[0612] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:18所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:18所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和与SEQ ID NO:17所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:17所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:18所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-4”。

[0613] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:20所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:20所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和与SEQ ID NO:19所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:19所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:20所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-5”。

[0614] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:22所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:22所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和与SEQ ID NO:21所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:21所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:22所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-6”。

[0615] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:24所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:24所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:24所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被命名为“shmiR-7”。

[0616] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:26所示的序列基本上互补的效应

子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:26所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:26所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-8”。

[0617] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:28所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:28所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:28所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-9”。

[0618] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:30所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:30所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:30所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-10”。

[0619] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:32所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:32所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和与SEQ ID NO:31所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:31所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:32所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-11”。

[0620] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:34所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:34所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和与SEQ ID NO:33所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:33所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:34所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-12”。

[0621] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:36所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:36所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和与SEQ ID NO:35所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:35所示的序列基本上互补的效应子互补

序列可以是SEQ ID No:36所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-13”。

[0622] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:38所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:38所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和与SEQ ID NO:37所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:37所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:38所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-14”。

[0623] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:40所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:40所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和与SEQ ID NO:39所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:39所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:40所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-15”。

[0624] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:42所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:42所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和与SEQ ID NO:41所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:41所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:42所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-16”。

[0625] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:111所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:111所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:112所示的效应子序列和与SEQ ID NO:112所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:112所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:111所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-17”。

[0626] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:113所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:113所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID NO:114所示的效应子序列和与SEQ ID NO:114所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:114所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:113所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-18”。

[0627] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)

除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID No:115所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID No:115所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmir可包含SEQ ID No:116所示的效应子序列和与SEQ ID No:116所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:116所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:115所示的序列。根据本实例的shmir在下文中被称为“shmir-19”。

[0628] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmir的DNA序列,所述shmir包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID No:117所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID No:117所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmir可包含SEQ ID No:118所示的效应子序列和与SEQ ID No:118所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:118所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:117所示的序列。根据本实例的shmir在下文中被称为“shmir-20”。

[0629] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmir的DNA序列,所述shmir包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID No:119所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID No:119所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmir可包含SEQ ID No:120所示的效应子序列和与SEQ ID No:120所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:120所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:119所示的序列。根据本实例的shmir在下文中被称为“shmir-21”。

[0630] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmir的DNA序列,所述shmir包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID No:121所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID No:121所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmir可包含SEQ ID No:122所示的效应子序列和与SEQ ID No:122所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:122所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:121所示的序列。根据本实例的shmir在下文中被称为“shmir-22”。

[0631] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmir的DNA序列,所述shmir包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID No:123所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID No:123所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmir可包含SEQ ID No:124所示的效应子序列和与SEQ ID No:124所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:124所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:123所示的序列。根据本实例的shmir在下文中被称为“shmir-23”。

[0632] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:125所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:125所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID N0:126所示的效应子序列和与SEQ ID N0:126所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID N0:126所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID N0:125所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-24”。

[0633] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:127所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:127所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID N0:128所示的效应子序列和与SEQ ID N0:128所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID N0:128所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID N0:127所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-25”。

[0634] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:129所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:129所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID N0:130所示的效应子序列和与SEQ ID N0:130所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID N0:130所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID N0:129所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-26”。

[0635] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:131所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:131所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID N0:132所示的效应子序列和与SEQ ID N0:132所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID N0:132所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID N0:131所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-27”。

[0636] 在一个实例中,本文所述的核酸可包含编码shmiR的DNA序列,所述shmiR包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID N0:133所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID N0:133所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shmiR可包含SEQ ID N0:134所示的效应子序列和与SEQ ID N0:134所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID N0:134所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID N0:133所示的序列。根据本实例的shmiR在下文中被称为“shmiR-28”。

28”。

[0637] 在本文所述的任何实例中,由本公开的核酸编码的shmiR可以以5'至3'方向包含:
[0638] 初级miRNA主链的5'侧翼序列;
[0639] 效应子互补序列;
[0640] 茎环序列;
[0641] 效应子序列;和
[0642] 初级miRNA主链的3'侧翼序列;
[0643] 适合的环序列可选自本领域已知的那些序列。然而,示例性茎环序列示于SEQ ID NO:75。

[0644] 用于本公开的核酸的合适的初级微小RNA(初级miRNA或初级R)主链可选自本领域已知的那些。例如,初级miRNA主链可以选自初级miR-30a主链、初级miR-155主链、初级miR-21主链和初级miR-136主链。然而,优选地,初级miRNA主链是初级miR-30a主链。根据其中初级miRNA主链是初级miR-30a主链的一个实例,初级miRNA主链的5'侧翼序列示于SEQ ID NO:76中并且初级miRNA主链的3'侧翼序列示于SEQ ID NO:77中。因此,编码本公开的shmiR(例如,本文所述的shmiR-1至shmiR-16)的核酸可包含编码SEQ ID NO:76所示的序列的DNA序列和编码SEQ ID NO:77所示的序列的DNA序列。

[0645] 在一个实例中,本文所述的核酸可以包含选自SEQ ID NO:59-74和146-157中的任何一个所示的序列的DNA序列。

[0646] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:59所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:43所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-1)。

[0647] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:60所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:44所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-2)。

[0648] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:61所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:45所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-3)。

[0649] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:62所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:46所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-4)。

[0650] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:63所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:47所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-5)。

[0651] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:64所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-6)。

[0652] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:65所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:49所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-7)。

[0653] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:66所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:50所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-8)。

[0654] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:67所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:51所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-9)。

[0655] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:68所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:52所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-10)。

[0656] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:69所示的DNA序列或由所述DNA序

列组成,并且编码包含SEQ ID NO:53所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-11)。

[0657] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:70所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-12)。

[0658] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:71所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:55所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-13)。

[0659] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:72所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:56所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-14)。

[0660] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:73所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-15)。

[0661] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:74所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:58所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-16)。

[0662] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:146所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:134所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-17)。

[0663] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:147所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:135所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-18)。

[0664] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:148所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:136所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-19)。

[0665] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:149所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-20)。

[0666] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:150所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:138所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-21)。

[0667] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:151所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:139所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-22)。

[0668] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:152所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:140所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-23)。

[0669] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:153所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-24)。

[0670] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:154所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:142所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-25)。

[0671] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:155所示的DNA序列或由所述DNA

序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:143所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-26)。

[0672] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:156所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:144所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-27)。

[0673] 在一个实例中,本文所述的核酸包含SEQ ID NO:157所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:145所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-28)。

[0674] 本公开的示例性核酸编码选自本文所述的shmiR-6、shmiR-7、shmiR-12和shmiR-15的shmiR。本公开的其它示例性核酸编码选自shmiR-23、shmiR-24、shmiR-25、shmiR-26、shmiR-27和shmiR-28的shmiR-12的变体,或编码选自shmiR-17、shmiR-18、shmiR-19、shmiR-20、shmiR-21和shmiR-22的shmiR-15的变体。

[0675] 本领域技术人员将理解,可将根据本公开的核酸与用于治疗HBV的其他治疗剂组合或结合使用。因此,本公开提供了与一种或多种用于治疗HBV的其他药剂组合的核酸,所述核酸包含编码如本文所述的shmiR(例如,称为本文所述的shmiR1-shmiR-28的一种或多种shmiR)的DNA序列。在一个实例中,提供了多种核酸,其包括:

[0676] (a) 至少一种如本文所述的核酸;和

[0677] (b) 至少一种选自以下的另外的核酸:

[0678] (i) 包含编码本文所述的shmiR的DNA序列的核酸;和

[0679] (ii) 包含编码短发夹RNA(shRNA)的DNA序列的核酸,所述短发夹RNA包含长度为至少17个核苷酸的效应子序列和效应子互补序列,其中所述效应子序列与SEQ ID NO:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA序列基本上互补;

[0680] 其中由(a)中的核酸编码的shmiR和由(b)中的核酸编码的shmiR或shRNA包含不同的效应子序列。优选地,与SEQ ID NO:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA序列基本上互补的(b)(ii)中的shRNA的效应子序列的长度小于30个核苷酸。例如,shRNA的合适效应子序列的长度可在17-29个核苷酸的范围内。

[0681] 因此,在一个实例中,本公开的多种核酸可包含编码本文所述的shmiR的两种或更多种核酸,例如两种,或三种,或四种,或五种,或六种,或七种,或八种,或九种或十种编码本文所述的shmiR的核酸。

[0682] 在另一个实例中,本公开的多种核酸包含编码本文所述的shmiR的至少一种核酸和包含编码shRNA的DNA序列的至少一种核酸,所述shRNA包含长度为至少17个核苷酸的效应子和效应子互补序列,其中所述效应子序列与SEQ ID NO:1-10、38、40、42、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131和133中的任一个所示的RNA序列基本上互补。

[0683] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:12所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:12所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:11所示

的效应子序列和与SEQ ID No:11所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:11所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:12所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-1”。

[0684] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:14所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:14所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:13所示的效应子序列和与SEQ ID No:13所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:13所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:14所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-2”。

[0685] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:16所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:16所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:15所示的效应子序列和与SEQ ID No:15所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:15所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:16所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-3”。

[0686] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:18所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:18所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:17所示的效应子序列和与SEQ ID No:17所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:17所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:18所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-4”。

[0687] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:20所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:20所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:19所示的效应子序列和与SEQ ID No:19所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:19所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:20所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-5”。

[0688] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:22所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:22所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:21所示的效应子序列和与SEQ ID No:21所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID No:21所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID No:22所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-6”。

[0689] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5

个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:24所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:24所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:23所示的效应子序列和与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:23所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:24所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-7”。

[0690] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:26所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:26所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:25所示的效应子序列和与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:25所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:26所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-8”。

[0691] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:28所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:28所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:27所示的效应子序列和与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:27所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:28所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-9”。

[0692] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:30所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:30所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:29所示的效应子序列和与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:29所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:30所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-10”。

[0693] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:32所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:32所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:31所示的效应子序列和与SEQ ID NO:31所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:31所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:32所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-11”。

[0694] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含:(i)除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:34所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:34所示的序列形成双链体;和(ii)包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:33所示的效应子序列和与SEQ ID NO:33所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应

子互补序列。与SEQ ID NO:33所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:34所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-12”。

[0695] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:36所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:36所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:35所示的效应子序列和与SEQ ID NO:35所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:35所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:36所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-13”。

[0696] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:38所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:38所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:37所示的效应子序列和与SEQ ID NO:37所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:37所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:38所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-14”。

[0697] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:40所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:40所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和与SEQ ID NO:39所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:39所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:40所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-15”。

[0698] 在一个实例中,由多种核酸中的核酸编码的shRNA包含: (i) 除1个、2个、3个、4个、5个或6个碱基错配外与SEQ ID NO:42所示的序列基本上互补的效应子序列,条件是所述效应子序列能够与SEQ ID NO:42所示的序列形成双链体;和(ii) 包含与所述效应子序列基本上互补的序列的效应子互补序列。例如,由所述核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:41所示的效应子序列和与SEQ ID NO:41所示的序列基本上互补并且能够与其形成双链体的效应子互补序列。与SEQ ID NO:41所示的序列基本上互补的效应子互补序列可以是SEQ ID NO:42所示的序列。根据本实例的shRNA在下文中被称为“shRNA-16”。

[0699] 根据其中本公开的多种核酸中的一种或多种核酸编码shRNA的任何实例,shRNA可包含位于效应子序列与效应子互补序列之间的茎环序列。适合的环序列可选自本领域已知的那些序列。或者,可以从头开发合适的茎环。在一个实例中,编码shRNA的本文所述的多种核酸中的核酸可包含编码位于编码效应子序列与效应子互补序列的DNA序列之间的茎环的DNA序列。例如,由本公开的核酸编码的shRNA可包含SEQ ID NO:78-93中的任一个所示的序列。因此,本文所述的多种核酸中的核酸可包含SEQ ID NO:94-109中任一个所示的DNA序列或由所述DNA序列组成。

[0700] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:59所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:43所示的序列或由所述序列组成的shmiR

(shmiR-1)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0701] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:60所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:44所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-2)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0702] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:61所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:45所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-3)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0703] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:62所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:46所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-4)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0704] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:63所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:47所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-5)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0705] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:64所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0706] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:65所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:49所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-7)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0707] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:66所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:50所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-8)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0708] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:67所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:51所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-9)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0709] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:68所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:52所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-10)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0710] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:69所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:53所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-11)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0711] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:70所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-12)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0712] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:71所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:55所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-13)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0713] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:72所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:56所示的序列或由所述序列组成的shmiR

(shmiR-14)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0714] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:73所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-15)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0715] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:74所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:58所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-16)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0716] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:146所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:134所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-17)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0717] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:147所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:135所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-18)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0718] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:148所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:136所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-19)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0719] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:149所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-20)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0720] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:150所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:138所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-21)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0721] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:151所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:139所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-22)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0722] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:152所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:140所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-23)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0723] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:153所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-24)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0724] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:154所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:142所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-25)的核酸,和编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0725] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:155所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:143所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-26)的核酸,以及编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其它核酸。

[0726] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:156所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:144所示的序列或由所述序列组成的shmiR

(shmiR-27)的核酸,以及编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其他核酸。

[0727] 在一个实例中,本文所述的多种核酸包含含有SEQ ID NO:157所示的DNA序列或由所述DNA序列组成、并且编码包含SEQ ID NO:145所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-28)的核酸,以及编码靶向HBV的shmiR或shRNA的本公开的至少一种其他核酸。

[0728] 根据本文所述的多种核酸的任何实例,所述多种核酸可包含两种或更多种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,诸如两种,或三种,或四种,或五种,或六种,或七种,或八种,九种,或十种编码本文所述的shmiR的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本发明的shmiR。

[0729] 在一个实例中,所述多种核酸包含两种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含三种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含四种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含五种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含六种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含七种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含八种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含九种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。在一个实例中,所述多种核酸包含十种编码本文所述的shmiR或shRNA的核酸,条件是其中至少一种核酸编码本文所述的shmiR。

[0730] 在一个实例中,由所述多种核酸中的一种核酸编码的shmiR或shRNA的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:4所示的序列或由所述序列组成。本文中描述了编码具有与RNA转录物基本上互补的效应子序列的shmiR或shRNA的合适的核酸,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:4所示的序列或由所述序列组成。

[0731] 在一个实例中,由所述多种核酸中的一种核酸编码的shmiR或shRNA的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:5所示的序列或由所述序列组成。本文中描述了编码具有与RNA转录物基本上互补的效应子序列的shmiR或shRNA的合适的核酸,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:5所示的序列或由所述序列组成。

[0732] 在一个实例中,由所述多种核酸中的一种核酸编码的shmiR或shRNA的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:9所示的序列或由所述序列组成。本文中描述了编码具有与RNA转录物基本上互补的效应子序列的shmiR或shRNA的合适的核酸,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:9所示的序列或由所述序列组成。

[0733] 在一个实例中,由所述多种核酸中的一种核酸编码的shmiR或shRNA的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:40所示的序列或由所述序列组成。本文中描述了编码具有与RNA转录物基本上互补的效应子序列的shmiR或shRNA的合适的核酸,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:40所示的序列或由所述序列组成。

[0734] 在一个实例中,由所述多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:4所示的序列或由所述序列组成,并且由多种

核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:9所示的序列或由所述序列组成。

[0735] 在一个实例中,由所述多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:4所示的序列或由所述序列组成,并且由多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:9所示的序列或由所述序列组成,并且由多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:5所示的序列或由所述序列组成。

[0736] 在一个实例中,由所述多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:4所示的序列或由所述序列组成,并且由多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:9所示的序列或由所述序列组成,并且由多种核酸中的核酸编码的shmiR的效应子序列与RNA转录物基本上互补,所述RNA转录物包含SEQ ID NO:40所示的序列或由所述序列组成。

[0737] 编码靶向HBV的shmiR(包括包含与SEQ ID NO:4、5、9或40所示的RNA转录物基本上互补的效应子序列的shmiR)的本公开的示例性核酸描述于本文中,并且经必要的修正后适用于其中描述本公开的多种核酸的每个实例。

[0738] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0739] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0740] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:33所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:34所示的序列组成的效应子互补序列。

[0741] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0742] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;

[0743] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:33所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:34所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0744] (iii) 包含编码shmiR或shRNA的DNA序列的至少一种其他核酸,所述shmiR或shRNA包含与HBV基因组的RNA转录物基本上互补的长度为至少17个核苷酸的效应子序列。

[0745] 在一个实例中,本公开的所述其它核酸是编码shmiR或shRNA的本文所述的核酸,所述shmiR或shRNA具有与由(i)和(ii)中的核酸编码的shmiR的效应子序列不同的效应子序列。

[0746] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0747] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;

[0748] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:39所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:40所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0749] (iii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:33所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:34所示的序列组成的效应子互补序列。

[0750] 在一个实例中,提供了本公开的多种核酸,其包含:

[0751] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列。

[0752] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:23所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:24所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0753] (iii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:33所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:34所示的序列组成的效应子互补序列。

[0754] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0755] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;

[0756] (ii) 包含编码shRNA的DNA序列的核酸,所述shRNA包含由SEQ ID NO:39所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:40所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0757] (iii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:33所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:34所示的序列组成的效应子互补序列。

[0758] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0759] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0760] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:116所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:117所示的序列组成的效应子互补序列。

[0761] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0762] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0763] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:124所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:125所示的序列组成的效应子互补序列。

[0764] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0765] (i) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:21所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:22所示的序列组成的效应子互补序列;

[0766] (ii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:116所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:117所示的序列组成的效应子互补序列;和

[0767] (iii) 包含编码shmiR的DNA序列的核酸,所述shmiR包含由SEQ ID NO:124所示的序列组成的效应子序列和由SEQ ID NO:125所示的序列组成的效应子互补序列。

[0768] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0769] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0770] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:70所示的序列(编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0771] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0772] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;

[0773] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:73所示的序列(编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0774] (iii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:70所示的序列(编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0775] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0776] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;

[0777] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:73所示的序列(编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0778] (iii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:70所示的序列(编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0779] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0780] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;

[0781] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:99所示的序列(编码包含SEQ ID NO:83所示的序列或由所述序列组成的shRNA)或由所述序列组成;和

[0782] (iii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:70所示的序列(编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0783] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0784] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0785] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:149所示的序列(编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0786] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0787] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0788] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:153所示的序列(编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0789] 在一个实例中,本公开的多种核酸包括:

[0790] (i) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:64所示的序列(编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;

[0791] (ii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:149所示的序列(编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成;和

[0792] (iii) 包含DNA序列的核酸,所述DNA序列包含SEQ ID NO:153所示的序列(编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR)或由所述序列组成。

[0793] 根据其中提供多种核酸的一个实例,所述核酸中的两种或更多种核酸可以形成同一多核苷酸的分开部分。在另一个实例中,所述多种核酸中的两种或更多种核酸分别形成不同多核苷酸的部分。在另一个实例中,将本文所述的多种核酸作为多种组分(例如多种组合物)提供。

[0794] 例如,可以分别地提供多种核酸中的每一种核酸。或者,在提供本公开的至少三种核酸的实例中,可以分开地提供至少一种核酸,并且将所述多种核酸中的两种或更多种一起提供。

[0795] 在一些实例中,根据本公开的核酸或每种核酸可包含另外的元件,或与另外的元件可操作地连接,例如以促进RNA的转录。例如,所述核酸或每种核酸可包含与编码本文所述的shmiR或shRNA的序列可操作地连接的启动子。其他元件,例如转录终止子和启动子,是本领域已知的和/或本文所述的。

[0796] 可选地或另外地,根据本公开的核酸或每种核酸可包含一个或多个限制性位点,例如以便于将所述核酸克隆到克隆性载体或表达载体中。例如,本文所述的核酸可包括编码本公开的shmiR或shRNA的序列的上游和/或下游的限制性位点。合适的限制性酶识别序列是本领域技术人员已知的。然而,在一个实例中,本公开的核酸可在5'末端处(即编码shmiR或shRNA的序列的上游)包括BamH1限制性位点(GGATCC),以及在3'末端处(即编码shmiR或shRNA的序列的下游)包括EcoR1限制性位点(GAATTC)。

[0797] ddRNAi

[0798] 在一个实例中,本公开内容的核酸或每种核酸以DNA指导的RNAi(ddRNAi)构建体的形式提供或包含在其中。因此,在一个实例中,本公开提供了包含本文所述的核酸的ddRNAi构建体。在另一个实例中,本公开提供了包含本文所述的多种核酸的ddRNAi构建体。编码包含靶向HBV转录物的效应子序列的shmiR或shRNA的示例性核酸描述于本文中,并且在作必要的修正后适用于本公开的该实例。

[0799] 在一个实例中,ddRNAi构建体包含与启动子可操作地连接的本公开的核酸。

[0800] 根据其中ddRNAi构建体包含本文所述的多种核酸的一个实例,每个核酸可以与启动子可操作地连接。在一个实例中,ddRNAi构建体中的核酸可以与同一启动子可操作地连接。在一个实例中,ddRNAi构建体中的核酸可以与不同的启动子可操作地连接。

[0801] 在一个实例中,本文的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:59所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:43所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-1)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:60-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0802] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:60所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:44所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-2)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59、61-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0803] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:61所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:45所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-3)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-60、62-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0804] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:62所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:46所示的序列或由所述序列组成的shmiR(shmiR-4)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-61、63-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0805] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:63所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:47所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-5)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-62、64-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0806] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:64所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-63、65-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0807] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:65所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:49所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-7)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-64、66-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0808] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:66所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:50所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-8)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-65、67-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0809] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:67所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:51所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-9)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-66、68-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0810] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:68所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:52所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-10)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-67、69-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0811] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:69所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:53所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-11)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-68、70-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0812] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:70所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-12)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-69、71-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0813] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:71所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:55所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-13)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-70、72-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0814] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:72所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:56所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-14)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选

自SEQ ID NO:59-71、73-74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0815] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:73所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:57所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-15)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-72、74和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0816] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:74所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:58所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-16)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-73和146-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0817] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:146所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:134所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-17)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74和147-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0818] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:147所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:135所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-18)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146和148-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0819] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:148所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:136所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-19)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146、147和149-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0820] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:149所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-20)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-148和150-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0821] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:150所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:138所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-21)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-149和151-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0822] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:151所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:139所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-22)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-150和152-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0823] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:152所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:140所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-23)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-151和153-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0824] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:153所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的

shmiR (shmiR-24)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-152和154-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0825] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:154所示的DNA序列或由所述序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:142所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-25)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-153和155-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0826] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:155所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:143所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-26)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-154和156-157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0827] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:156所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:144所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-27)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74、146-155和157中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0828] 在一个实例中,本公开的ddRNAi包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:157所示的DNA序列或由所述DNA序列组成,并且编码包含SEQ ID NO:145所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-28)。所述ddRNAi构建体可以包含本公开的一种或多种其他核酸,诸如包含选自SEQ ID NO:59-74和146-156中的任一个所示的序列的DNA序列的核酸。

[0829] 包含本公开的多种核酸的一种示例性ddRNAi构建体包含:

[0830] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6)的核酸;和

[0831] (b) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-12)的核酸。

[0832] 包含本公开的多种核酸的一种示例性ddRNAi构建体包含:

[0833] (a) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0834] (b) 包含SEQ ID NO:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0835] 在另一个实例中,包含本公开的多种核酸的一种示例性ddRNAi构建体包含:

[0836] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6)的核酸;和

[0837] (b) 编码包含SEQ ID NO:137所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-20)的核酸。

[0838] 例如,包含本公开的多种核酸的一种ddRNAi构建体可包含:

[0839] (a) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0840] (b) 包含SEQ ID NO:149 (编码shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0841] 在另一个实例中,包含本公开的多种核酸的一种ddRNAi构建体包含:

[0842] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6)的核酸;和

[0843] (b) 编码包含SEQ ID NO:141所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-24)的核酸。

- [0844] 例如,包含本公开的多种核酸的一种ddRNAi构建体可包含:
- [0845] (a) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
- [0846] (b) 包含SEQ ID NO:153 (编码shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0847] 本公开还提供了ddRNAi构建体,其包含至少三种本文所述的核酸,使得ddRNAi构建体编码至少三种靶向HBV的shmiR,其中每种shmiR彼此不同。
- [0848] 在一个实例中,本公开提供了ddRNAi构建体,其包含:
- [0849] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-6) 的核酸;
- [0850] (b) 包含编码本文所述的shmiR或shRNA的DNA序列的核酸;和
- [0851] (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR (shmiR-12) 的核酸;
- [0852] 其中 (b) 中的核酸编码的shmiR或shRNA中的效应子序列不同于由 (a) 和 (c) 中的核酸编码的shmiR的效应子序列。
- [0853] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5' 至3' 方向):
- [0854] (a) 编码包含SEQ ID NO:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
- [0855] (b) 编码包含SEQ ID NO:57 (shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和
- [0856] (c) 编码包含SEQ ID NO:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
- [0857] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5' 至3' 方向):
- [0858] (b) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0859] (b) 包含SEQ ID NO:73 (编码shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
- [0860] (c) 包含SEQ ID NO:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0861] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体包含(优选以5' 至3' 方向):
- [0862] (a) 编码包含SEQ ID NO:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
- [0863] (b) 编码包含SEQ ID NO:49 (shmiR-7) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和
- [0864] (c) 编码包含SEQ ID NO:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸.
- [0865] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以以5' 至3' 方向包含:
- [0866] (b) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0867] (b) 包含SEQ ID NO:65 (编码shmiR-7) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和
- [0868] (c) 包含SEQ ID NO:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。
- [0869] 在一个实例中,本公开提供了ddRNAi构建体,其包含:
- [0870] (a) 编码包含SEQ ID NO:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;
- [0871] (b) 包含编码本文所述的shmiR或shRNA的DNA序列的核酸;和

[0872] (c) 编码包含SEQ ID NO:141 (shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸；

[0873] 其中 (b) 中的核酸编码的shmiR或shRNA中的效应子序列不同于由 (a) 和 (c) 中的核酸编码的shmiR的效应子序列。

[0874] 在一个实例中,本公开提供了ddRNAi构建体,其包含:

[0875] (a) 编码包含SEQ ID NO:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸；

[0876] (b) 包含编码本文所述的shmiR或shRNA的DNA序列的核酸;和

[0877] (c) 编码包含SEQ ID NO:137 (shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸；

[0878] 其中 (b) 中的核酸编码的shmiR或shRNA中的效应子序列不同于由 (a) 和 (c) 中的核酸编码的shmiR的效应子序列。

[0879] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可以优选包含(以5' 至3' 方向) :

[0880] (a) 编码包含SEQ ID NO:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸；

[0881] (b) 编码包含SEQ ID NO:137 (shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;和

[0882] (c) 编码包含SEQ ID NO:141 (shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

[0883] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以以5' 至3' 方向包含:

[0884] (a) 包含SEQ ID NO:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;

[0885] (b) 包含SEQ ID NO:149 (编码shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0886] (c) 包含SEQ ID NO:153 (编码shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0887] 在另一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可包含至少一种编码本文所述的shmiR的核酸和至少一种编码如本文所述的靶向HBV的shRNA的核酸,其中由ddRNAi构建体编码的shmiR和shRNA包含不同的效应子序列。根据本实例,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5' 至3' 方向) :

[0888] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

[0889] (b) 编码包含SEQ ID NO:39所示的效应子序列和SEQ ID NO:40所示的效应子互补序列的shRNA的核酸;和

[0890] (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

[0891] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以包含(优选以5' 至3' 方向) :

[0892] (a) 编码包含SEQ ID NO:48所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸;

[0893] (b) 编码由SEQ ID NO:92所示的序列组成的shRNA的核酸;和

[0894] (c) 编码包含SEQ ID NO:54所示的序列或由所述序列组成的shmiR的核酸。

[0895] 例如,本公开的ddRNAi构建体可以以5' 至3' 方向包含:

[0896] (a) 包含SEQ ID NO:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;

[0897] (b) 包含SEQ ID NO:108所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0898] (c) 包含SEQ ID NO:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0899] 在描述本公开内容的ddRNAi构建体的每个前述实例中,其中包含的所述核酸或每种核酸可以与启动子可操作地连接。例如,本文所述的ddRNAi构建体可包含单个启动子,其与其中包含的核酸或每种核酸可操作地连接,例如以驱动来自ddRNAi构建体的一种或多种shmiR和/或shRNA的表达。

[0900] 在另一个实例中,包含在ddRNAi构建体中的编码本公开的shmiR或shRNA的每种核酸与分开的启动子可操作地连接。

[0901] 根据其中存在多个启动子的实例,所述启动子可以相同或不同。例如,构建体可包含多个拷贝的相同启动子,其中每个拷贝与本公开的不同核酸可操作地连接。在另一个实例中,与本公开的RNA可操作地连接的每个启动子是不同的。例如,在编码3种shmiR的ddRNAi构建体中,编码3种shmiR的3种核酸各自与不同的启动子可操作地连接。

[0902] 在另外的实例中,在编码3种或更多种shmiR的ddRNAi构建体中,编码shmiR的核酸中的两种(或更多种)与同一启动子连接,并且所述编码shmiR的核酸中的一种(或更多种)与不同的启动子连接。

[0903] 在一个实例中,启动子是组成型启动子。当提及启动子时,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、化学物质、光等)的情况下指导可操作连接的核酸序列的转录。通常,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。用于从本公开的一种或多种核酸转录shmiR或shRNA的启动子包括受RNA聚合酶II控制的遍在蛋白、CMV、 β -肌动蛋白、组蛋白H4、EF-1 α 或pgk基因的启动子,或受RNA聚合酶I控制的启动子元件。

[0904] 在一个实例中,使用Pol II启动子诸如CMV、SV40、U1、 β -肌动蛋白或杂合Pol II启动子。

[0905] 在另一个实例中,使用受RNA聚合酶III控制的启动子,诸如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(见Maraia等,Nucleic Acids Res 22 (15) :3045-52 (1994))和hY5(见Maraia等,Nucleic Acids Res 24 (18) :3552-59 (1994))、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。

[0906] 用于本公开的ddRNAi构建体的合适启动子描述于美国专利号8,008,468和美国专利号8,129,510中。

[0907] 在一个实例中,启动子是RNA polIII启动子。例如,启动子是U6启动子(例如U6-1、U6-8或U6-9启动子)。在另一个实例中,启动子是H1启动子。

[0908] 在编码多种shmiR,或编码一种或多种shmiR和shRNA(如本文所述的)的本公开的ddRNAi构建体的情况下,ddRNAi构建体中的每种核酸与U6启动子(例如,单独的U6启动子)可操作地连接。

[0909] 在一个实例中,构建体中的启动子是U6启动子。例如,启动子为U6-1启动子。例如,启动子是U6-8启动子。例如,启动子是U6-9启动子。

[0910] 在一些实例中,使用可变强度的启动子。例如,两种或更多种强启动子(诸如Pol III型启动子)的使用可以通过例如耗尽可用核苷酸库或转录所需的其他细胞组分来对细胞加压。另外,或可选地,几种强启动子的使用可在细胞中引起毒性水平的RNAi试剂(例如,shmiR或shRNA)的表达。因此,在一些实例中,多启动子ddRNAi构建体中的一个或多个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表达shmiR

或shRNA。还可以使用各种分子技术修饰启动子,或者以其他方式例如通过修饰各种调节元件来修饰启动子,以获得较弱水平或较强水平的转录。实现减少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(见Domitrovich等,Nucleic Acids Res 31:2344-2352 (2003)。用弱启动子(诸如人U6-7启动子)中的元件替换强启动子(诸如人U6-1、U6-8或U6-9启动子)中存在的PSE元件会降低杂合U6-1、U6-8或U6-9启动子的活性。该方法已用于本申请中描述的实例中,但实现该结果的其他方法在本领域中是已知的。

[0911] 可用于本公开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。当其应用于启动子时,术语“组织特异性”是指这样的启动子,其能够指导目标核酸在特定类型的组织(例如,肝组织)中选择性转录,所述相同的目标核苷酸序列在不同类型的组织(例如,肌肉)中的表达相对不存在。

[0912] 当其应用于启动子时,术语“组织特异性”是指这样的启动子,其能够指导目标核酸在特定类型的细胞中选择性转录,所述相同的目标核苷酸序列在相同组织内的不同类型的细胞中的表达相对不存在。

[0913] 在一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可另外包含一种或多种增强子,以增加由本文所述的核酸编码的shmiR或shRNA的表达。

[0914] 适用于本公开的实例的增强子包括Apo E HCR增强子、CMV增强子(Xia等,Nucleic Acids Res 31-17 (2003)),以及本领域技术人员已知的其他增强子。用于本公开的ddRNAi构建体的合适启动子描述于美国专利号8,008,468中。

[0915] 在另一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可以包含与编码本公开的shmiR或shRNA的核酸连接的转录终止子。在包含本文所述的多种核酸(即,编码多种shmiR和/或shRNA)的ddRNAi构建体的情况下,与每种核酸连接的终止子可以相同或不同。根据其中使用RNA pol III启动子的一个实例,终止子可以是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。

[0916] 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所源自的基因的启动子匹配。此类终止子包括SV40poly A、AdV VA1基因、5S核糖体RNA基因和人t-RNA的终止子。另外,可将启动子和终止子混合并匹配,这通常利用RNA pol II启动子和终止子来实现。

[0917] 在一个实例中,用于包含多种核酸的ddRNAi构建体中的每一种核酸的启动子和终止子组合是不同的,以减少组分之间的DNA重组事件的可能性。

[0918] 本公开的一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0919] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:57所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:73所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0920] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地

连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0921] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:49所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:65所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0922] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:137所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:149所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0923] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:141所示的序列或由所述序列组成)的核酸。例如,本公开的ddRNAi构建体包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:153所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0924] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的多种核酸的一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0925] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0926] (b) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0927] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0928] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0929] (b) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0930] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的多种核酸的另一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0931] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48(shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0932] (b) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:141(shmiR-24)所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0933] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0934] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64(编码shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0935] (a) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:153(编码shmiR-24)所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0936] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的多种核酸的另一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0937] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48(shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0938] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:137(shmiR-20)所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0939] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0940] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64(编码shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0941] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:149(编码shmiR-20)所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0942] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的三种核酸的另一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0943] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48(shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0944] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:57(shmiR-15)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0945] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54(shmiR-12)所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0946] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0947] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64(编码shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0948] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:73(编码shmiR-15)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0949] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70(编码shmiR-12)所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0950] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的三种核酸的另一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0951] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48(shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0952] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:137(shmiR-20)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0953] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:141(shmiR-24)所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0954] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0955] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64(编码shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0956] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:149(编码shmiR-20)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0957] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:153(编码shmiR-24)所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0958] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含本文所述的三种核酸的另一个实例,所述ddRNAi构建体可包含:

[0959] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48(shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0960] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:49(shmiR-7)所示的序列或由所述序列组成)的核酸;和

[0961] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54(shmiR-12)所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0962] 例如,ddRNAi构建体可包含:

[0963] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID NO:64(编码shmiR-6)所示的序列或由所述序列组成的核酸;

[0964] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID NO:65(编码shmiR-7)所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0965] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID NO:70(编码shmiR-12)所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0966] 本公开的一种示例性ddRNAi构建体可以以5'至3'方向包含:

[0967] (a) 在包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0968] (b) 在包含SEQ ID No:73所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0969] (c) 在包含SEQ ID No:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0970] 本公开的一种示例性ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

[0971] (a) 在包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0972] (b) 在包含SEQ ID No:149所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0973] (c) 在包含SEQ ID No:159所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0974] 本公开的另一个示例性ddRNAi构建体以5'至3'方向包含:

[0975] (a) 在包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-9启动子;

[0976] (b) 在包含SEQ ID No:65所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-1启动子;和

[0977] (c) 在包含SEQ ID No:70所示的序列或由所述序列组成的核酸上游的U6-8启动子。

[0978] 根据其中本公开的ddRNAi构建体包含至少一种编码本文所述的shmiR的核酸和至少一种编码如本文所述的靶向HBV的shRNA的核酸的另一个实例中,本公开的ddRNAi构建体可包含:

[0979] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48所示的序列或由所述序列组成)的核酸;

[0980] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码包含SEQ ID No:92所示的序列或由所述序列组成的shRNA的核酸;和

[0981] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54所示的序列或由所述序列组成)的核酸。

[0982] 例如,所述ddRNAi构建体可包含:

[0983] (a) 与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0984] (b) 与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:108所示的序列或由所述序列组成的核酸;和

[0985] (c) 与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70所示的序列或由所述序列组成的核酸。

[0986] 本公开还提供了多种ddRNAi构建体,其包含两种或更多种ddRNAi构建体,每一种构建体包含与本文所述的合适启动子可操作地连接的编码本公开的shmiR的核酸。

[0987] 在一个实例中,所述多种ddRNAi构建体包含:

[0988] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成)的核酸的ddRNAi构建体;和

[0989] (b) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成)的核酸的ddRNAi构建体。

[0990] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[0991] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[0992] (b) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[0993] 在一个实例中,所述多种ddRNAi构建体包含:

[0994] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成)的核酸的ddRNAi构建体;和

[0995] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:57 (shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成)的核酸的ddRNAi构建体。

[0996] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[0997] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[0998] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:73 (编码shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[0999] 在一个实例中,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1000] (a) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成)的核酸的ddRNAi构建体;和

[1001] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID

No:57 (shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1002] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1003] (a) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1004] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:73 (编码shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1005] 在一个实例中,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1006] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1007] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:137 (shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1008] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1009] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1010] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:149 (编码shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1011] 在一个实例中,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1012] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1013] (b) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:141 (shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1014] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1015] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1016] (b) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:153 (编码shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1017] 根据其中所述多种ddRNAi构建体包含三种ddRNAi构建体的一个实例,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1018] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1019] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:57 (shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1020] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR(其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1021] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1022] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1023] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:73 (编码shmiR-15) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1024] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1025] 根据其中所述多种ddRNAi构建体包含三种ddRNAi构建体的另一个实例,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1026] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;

[1027] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:49 (shmiR-7) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1028] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1029] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1030] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;

[1031] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:65 (编码shmiR-7) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1032] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1033] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1034] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;

[1035] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码包含SEQ ID No:92 (shRNA-15) 所示的序列或由所述序列组成的shRNA的核酸的ddRNAi构建体;和

[1036] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:54 (shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1037] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1038] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;

[1039] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:108 (编码shRNA-15) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1040] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:70 (编码shmiR-12) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1041] 根据其中所述多种ddRNAi构建体包含三种ddRNAi构建体的另一个实例,所述多种ddRNAi构建体包含:

[1042] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:48 (shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;

[1043] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:137 (shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体;和

[1044] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的编码shmiR (其包含SEQ ID No:141 (shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成) 的核酸的ddRNAi构建体。

[1045] 例如,所述多种ddRNAi构建体可包含:

[1046] (a) 包含与U6启动子例如U6-9启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:64 (编码shmiR-6) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;

[1047] (b) 包含与U6启动子例如U6-1启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:149 (编码shmiR-20) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体;和

[1048] (c) 包含与U6启动子例如U6-8启动子可操作地连接的包含SEQ ID No:153 (编码shmiR-24) 所示的序列或由所述序列组成的核酸的ddRNAi构建体。

[1049] 另外,所述或每种ddRNAi构建体可以包含策略性定位的一个或多个多克隆位点和/或独特的限制性位点,使得启动子、编码shmiR或shRNA的核酸和/或其他调控元件易于去除或替换。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组装所述或每种ddRNAi构建体。用于本公开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(尽管这不是一个绝对要求)。顺序地,将每个启动子插入其指定的独特位点之间,得到具有一个或多个启动子的基础盒,所有这些启动子都可具有可变的方向。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,产生单、双或多表达盒构建体。可使用位于单、双或多表达盒插入物两侧的两个独特的限制性酶位点(相同或不同的位点)将插入物移入例如AdV主链或AAV主链。

[1050] 可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)完成所述构建体或每种构建体的产生。如果所述构建体或每种构建体是病毒构建体,则构建体包含例如将ddRNAi构建体包装成病毒颗粒所必需的序列和/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,所述病毒构建体或每种病毒构建体另外含有允许病毒复制和增殖的基因,然而这些基因将以反式提供。另外,所述病毒构建体或每种病毒构建体可含有以天然形式或修饰形式整合的来自任何已知生物体的基因组的基因或遗传序列。例如,病毒构建体可包含可用于在细菌中复制构建体的序列。

[1051] 所述构建体或每种构建体还可含有其他遗传元件。可包括在构建体中的元件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,诸如以下物质的一种或多种基因:荧光标记蛋白,例如GFP或RFP;易于检测的酶,诸如β-半乳糖苷酶、荧光素酶、β-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;或对于其容易获得免疫测定的蛋白质,如激素或细胞因子。

[1052] 可用于本公开的实施方案的其他遗传元件包括编码赋予细胞选择性生长优势(诸如腺苷脱氨酶、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)、抗药性的蛋白质的那些遗传元件,或编码提供因营养缺陷型而缺失的生物合成能力的蛋白质的那些基因。如果与所述构建体或每种构建体一起包含报告基因,则可以包含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。另外,可使用用于在细菌中扩增构建体的合适的复制起始点。复制起始点的序列通常与ddRNAi构建体和其他遗传序列分开。此类复制起始点是本领域已知的,包括pUC、ColE1、2-micron或SV40复制起始点。

[1053] 表达载体

[1054] 在一个实例中,本发明的ddRNAi构建体包含在表达载体内。

[1055] 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例如具有U6启动子和近端序列元件7 (PSE7) 的pSsh载体。

[1056] 在一个实例中,表达载体是小环DNA。小环DNA描述于美国专利公开号2004/0214329中。小环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,小环载体与细菌质粒载体的不同之处在于它们缺乏复制起始点,并且缺乏通常存在于细菌质粒中的药物选择标记,例如 β -内酰胺酶、tet等。因此,小环DNA变得更小,允许更高效的递送。

[1057] 在一个实例中,所述表达载体为病毒载体。

[1058] 基于任何合适病毒的病毒载体可用于递送本公开的ddRNAi。另外,可以使用杂合病毒系统。病毒传递系统的选择将取决于各种参数,诸如被靶向递送的组织、系统的转导效率、致病性、免疫学和毒性问题等。

[1059] 基因疗法中常用的病毒系统类别可根据其基因组是否整合到宿主细胞染色质(致癌逆转录病毒和慢病毒)中还是主要作为染色体外附加体保持在细胞核中(腺相关病毒、腺病毒和疱疹病毒)而分为两组。在一个实例中,本公开的病毒载体整合到宿主细胞的染色质中。在另一个实例中,本公开的病毒载体作为染色体外附加体保持在宿主细胞的细胞核中。

[1060] 在一个实例中,病毒载体为腺病毒(AdV)载体。腺病毒是中等大小的双链无包膜DNA病毒,其具有在26-48Kbp之间的线性基因组。腺病毒通过受体介导的结合和内化进入靶细胞,在非分裂和分裂细胞中穿透细胞核。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器在脊椎动物细胞的细胞核中复制。

[1061] 在一个实例中,病毒载体来自细小病毒科(Parvoviridae)。细小病毒科是一类小的单链无包膜DNA病毒,其基因组长约5000个核苷酸。该科成员中包括腺相关病毒(AAV)。在一个实例中,本公开的病毒载体是AAV。AAV是一种依赖性细小病毒,通常需要与另一种病毒(通常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。在没有此类辅助病毒的情况下,AAV仍然能够通过受体介导的结合和内化感染或转导靶细胞,穿透非分裂细胞和分裂细胞中的细胞核。因为在没有辅助病毒的情况下不会从AAV感染产生子代病毒,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成为本公开的理想载体。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, Nature. 424:251 (2003))。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令人惊讶。然而,尽管这种大小限制可限制可被递送用于替代基因疗法的基因,但其不会对较短序列诸如shmiR和shRNA的包装和表达产生不利影响。

[1062] 可与本公开的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性。首先,逆转录病毒的基因组是二倍体,由两个拷贝的RNA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。

[1063] 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);维斯那-梅迪病毒(visan-maedi)(其导致绵羊的脑炎(绵羊脱髓鞘性脑白质炎)或肺炎);马传染性贫血病毒(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) (其导致非人类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%的基因组被整合到包装构建体中，这最小化了产生恢复复制能力的HIV的概率。通过开发自身失活型载体而进一步提高了生物安全性，所述自身失活型载体在下游长末端重复序列中含有调控元件的缺失，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。

[1064] 用于从本公开的核酸和ddRNAi构建体表达shmiR和/或shRNA的基于慢病毒的构建体包含来自慢病毒的5'和3'长末端重复序列 (LTR) 的序列。在一个实例中，病毒构建体包含来自慢病毒的已灭活的或自身失活的3' LTR。可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- κ B位点的缺失。作为自身失活的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掺入MMLV或MSCV、RSV或哺乳动物基因的序列。另外，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。

[1065] 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或核酸递送至目标细胞，包括但不限于基因缺失的腺病毒-转座子载体 (参见Yant等, *Nature Biotech.* 20:999-1004 (2002))；来自辛德毕斯病毒或塞姆利基森林病毒的系统 (参见Perri等, *J. Virol.* 74 (20) : 9802-07 (2002))；来自新城疫病毒或仙台病毒的系统。

[1066] 测试本公开的核酸和ddRNAi构建体

[1067] 细胞培养物模型

[1068] HBV不会感染培养中的细胞。然而，将HBV DNA (作为头尾二聚体或作为>100%的“超长”基因组) 转染到HuH7或Hep G2肝细胞中导致病毒基因表达和释放到培养基中的HBV病毒体的产生。这种细胞系的实例是HepG2.2.15，其为HepG2人肝细胞癌细胞系的亚细胞系，其稳定地包含完整的HBV基因组 (血清型ayw，基因型D)。HepG2.2.15表达所有HBV病毒RNA和蛋白质，产生病毒基因组，并分泌病毒样颗粒。如本文举例说明的，可以通过向细胞施用核酸或ddRNAi构建体并随后测量由HBV基因组编码的RNA或蛋白质的表达水平来测定从本公开的核酸或ddRNAi构建体表达的活性shmiR。细胞内HBV基因表达可以通过TaqmanTM测定或HBV RNA的其他实时PCR测定或通过HBV蛋白的ELISA测定来测定。细胞外病毒可通过用于DNA的PCR检测或用于蛋白质的ELISA检测来进行测定。可商购获得针对HBV表面抗原和核心蛋白的抗体。用于归一化转染效率和样品回收的差异的各种手段在本领域中是已知的。使用原代人肝细胞的细胞培养系统的最新进展显示出测定HBV治疗剂活性的希望。

[1069] 与本公开的核酸或ddRNAi构建体不存在时相比，将由HBV基因组编码的RNA或蛋白质的表达降低至少50%的从本公开的核酸或ddRNAi构建体表达的shmiR和/或shRNA被认为在本公开的方法中是有用的。

[1070] 动物模型

[1071] 有几种小动物模型可用于研究HBV复制。一种模型是将HBV感染的肝组织移植到受辐照的小鼠中。病毒血症 (如通过PCR测量HBV DNA所证明的) 首先在移植后8天被检测到，并

且在18-25天之间达到峰值 (Ilan等,1999,Hepatology,29,553-562)。

[1072] 表达HBV的转基因小鼠也已被用作评估潜在抗病毒的模型。HBV DNA在转基因小鼠的肝和血清中都可被检测到 (Morrey等, Antiviral Res., 42, 97-108, 1999)。

[1073] 另一个模型是用HBV转染的Hep G2细胞在裸鼠中建立皮下肿瘤。肿瘤在接种后约2周内发展并表达HBV表面和核心抗原。在荷瘤小鼠的循环中也检测到HBV DNA和表面抗原 (Yao等, J. Viral Hepat., 3, 19-22, 1996)。

[1074] 另一个模型是使用如本文所述的PXB小鼠,其为一组嵌合小鼠,其中具有肝病的免疫缺陷型小鼠 (uPA/SCID) 已用入肝细胞进行了移植。因为uPA/SCID小鼠表现出显著的肝毒性,所以移植健康的人细胞可以导致具有健康和有功能的肝的小鼠产生,所述肝的70%至90%已被入肝细胞重新填充。因为PXB小鼠在肝中表现出正常的组织学结构并且表现出许多人肝细胞的标志,所以小鼠可以在嵌合肝组织中维持活跃的HBV感染。

[1075] 另一个模型是使用Quantum B模型,其为三维细胞培养平台,其中提供至模型中的人肝细胞以模仿人肝的结构和生理学的方式组装。因为该模型仅由肝脏堆积细胞组成,因此被认为是乙型肝炎的第一个长期稳定的完全人全病毒生命周期模型,并概括了HBV感染生命周期的一些关键特征。

[1076] 任何前述动物模型可用于测定本公开的核酸或ddRNAi构建体在治疗或减少HBV感染中的功效。

[1077] 运载体

[1078] 在一些实例中,在组合物中提供本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种与运载体。

[1079] 在一些实例中,运载体是基于脂质的运载体、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。

[1080] 在一些实例中,运载体是基于聚合物的运载体,例如阳离子聚合物-核酸复合物。

[1081] 在又一个实例中,运载体是基于环糊精的运载体,例如环糊精聚合物-核酸复合物。

[1082] 在又一个实例中,运载体是基于蛋白质的运载体,例如阳离子肽-核酸复合物。

[1083] 在另一个实例中,所述运载体是脂质纳米颗粒。示例性纳米颗粒描述于例如US7514099中。

[1084] 在一些实例中,本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种用脂质纳米颗粒组合物来进行配制,所述脂质纳米颗粒组合物包含阳离子脂质/胆固醇/PEG-C-DMA/DSPC (例如,以40/48/2/10的比例)、阳离子脂质/胆固醇/PEG-DMG/DSPC (例如,以40/48/2/10的比例) 或阳离子脂质/胆固醇/PEG-DMG (例如,以60/38/2的比例)。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。

[1085] 在另一个实例中,本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种用W0 2010/021865、W0 2010/080724、W0 2010/042877、W0 2010/105209或W0 2011/022460中描述的任何阳离子脂质制剂进行配制。

[1086] 在另一个实例中,将本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种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 (例如,CDM-LBA、CDM-Pip-LBA、

CDM-PEG、CDM-NAG等)中。

[1087] 在另一个实例中,将聚乙二醇(PEG)共价连接至本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达构建体。连接的PEG可以是任何分子量,例如约100至约50,000道尔顿(Da)。

[1088] 在另一个实例中,本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种用运载体进行配制,所述运载体包含含有聚(乙二醇)脂质(PEG修饰的或长循环脂质体或隐形脂质体(*stealth liposomes*))的表面修饰的脂质体,诸如WO 96/10391、WO 96/10390或WO 96/10392中所公开的。

[1089] 在一些实例中,本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达构建体还可用聚乙烯亚胺或其衍生物(诸如聚乙烯亚胺-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)进行配制或复合。在一个实例中,如美国专利申请公开号2003/0077829中所述配制本公开的RNA或ddRNAi或表达构建体。

[1090] 在其他实例中,将本公开的核酸或ddRNAi构建体或表达载体中的一种或多种与膜破坏剂(诸如美国专利申请公开号2001/0007666中所述的那些)复合。

[1091] 其他运载体包括环糊精(见例如Gonzalez等,1999,Bioconjugate Chem.,10,1068-1074;或WO 03/46185)聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和PLCA微球(见例如US 2002130430)。

[1092] 组合物和治疗方法

[1093] 可在用于预防或治疗HBV感染的组合物中使用本公开的一种或多种核酸、ddRNAi构建体或表达载体。本发明的治疗性组合物可以单独使用或与一种或多种物质(包括其他抗病毒剂)组合使用。目前,恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦酯(adefovir dipivoxil)和干扰素 α (例如,聚乙二醇化干扰素 α)已被批准用于治疗HBV。由于本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体通过与其他批准的药物不同的机制对抗HBV,因此预期本发明的药剂和其他抗病毒剂的联合疗法显著增加疗法的功效,同时显著减少耐药性的发生,例如拉米夫定耐药性的发生(与长期拉米夫定疗法相关的主要问题)。

[1094] 组合物理想地包括增加本公开的核酸、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渗透肝细胞的能力的材料。可将本公开的治疗性组合物在药学上可接受的运载体(例如,生理盐水)中施用,基于施用方式和途径以及标准药学实践来选择所述运载体。本领域普通技术人员可以容易地配制包含一种或多种本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体的药物组合物。在一些情况下,使用等渗制剂。通常,用于等渗的添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下,等渗溶液诸如磷酸盐缓冲盐水是优选的。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制剂中。根据本公开的组合物是无菌且无热原的。在Remington:The Science and Practice of Pharmacy(先前称为Remington's Pharmaceutical Sciences),Mack Publishing Co.(该领域中标准参考文献)以及USP/NF中描述了合适的药物运载体以及用于药物制剂的药物必需品。

[1095] 施用途径包括但不限于肌内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、鞘内、动脉内、眼内和口服以及透皮或通过吸入或栓剂。示例性施用途径包括静脉内、肌内、口服、腹膜内、皮内、动脉内和皮下注射。用于递送本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体的体内肝细胞的靶向转染可以通过IV注射组合物来实现,所述组合物包含与乳糖基精胺(单或三乳糖基化)和胆

固醇基精胺(以电荷比为0.8包含精胺与DNA)的混合物(例如,比例为35%/65%)复合的一种或多种本文所述的核酸、ddRNAi构建体或表达载体。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媒介物(例如缓冲盐水)中,以用于注射、用于肠胃外施用,例如IV(包括IV输注)、IM、SC和用于腹膜内施用。在某些组合物中,将本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体与内体分解性精胺(如胆固醇精胺)单独复合,不含靶向精胺;一些给药途径,诸如腹膜内注射或输注,可以实现有效的肝递送和核酸、ddRNAi构建体或表达载体的转染。

[1096] 在特别配制的递送载体中包含本公开的一种或多种核酸、ddRNAi构建体或表达载体的无菌药物组合物的腹膜内施用(例如,超声引导的腹膜内注射)可以是促进肝脏细胞(包括肝细胞)摄取的有利递送途径。

[1097] 药物组合物的体积、浓度和制剂以及剂量方案可以专门定制以最大化细胞递送,同时使毒性诸如炎症反应最小化。例如,如果需要,可以利用具有相应低浓度的活性成分的相对大体积(5、10、20、50ml或更多),以及包含抗炎化合物诸如皮质类固醇。

[1098] 在HBV感染的个体中,预期本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体可用作与被设计来加强针对病毒的免疫力的治疗性疫苗接种方案联合的预治疗。还预期本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体可用于在对个体的周期性施用方案中进行预防,所述个体由于职业或其它暴露可能性而被认为具有暴露于HBV的高风险。

[1099] 试剂盒

[1100] 本公开还以试剂盒形式提供本公开的核酸、ddRNAi构建体和/或表达载体。该试剂盒可包括容器。试剂盒通常含有本发明的一种或多种核酸、ddRNAi构建体或表达载体及其施用说明书。在一些实例中,试剂盒包含不止一种本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体和/或另一种本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体。在一些实例中,试剂盒包含与用于治疗HBV感染的另一种化合物(如本文所述的)一起包装的不止一种本公开的核酸、ddRNAi构建体或表达载体。例如,已知用于治疗HBV感染的另外的治疗剂可选自恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦和/或聚乙二醇化干扰素。

实施例

[1101] 实施例1-制备表达shmiR的ddRNAi表达构建体

[1102] 为了产生能够表达本公开的单个shmiR的ddRNAi构建体,合成编码shmiR的DNA序列并克隆到U6启动子(例如,U6-1、U6-8或U6-9)的下游。将ddRNAi构建体分别命名为HBV-shmiR1至HBV-shmiR16。

[1103] 还产生了能够表达对应于本公开的shmiR的单个shRNA的ddRNAi构建体。简言之,合成编码shRNA的DNA序列并将其克隆到具有近端序列元件7(PSE7)的U6启动子(例如U6-1、U6-8或U6-9)的下游。将ddRNAi构建体分别命名为HBV-shRNA1至HBV-shRNA16。

[1104] 另外,制备了包含三重HBV shmiR表达盒并能够表达本公开的三种shmiR的ddRNAi构建体。合成第一三重HBV shmiR ddRNAi构建体(命名为HBV-shmiRx3-v1),其以5'-3'方向包含编码U6-9启动子、shmiR6 (SEQ ID NO:64)、U6-1启动子、shmiR15 (SEQ ID NO:73)、U6-8启动子和shmiR12 (SEQ ID NO:70)的DNA序列。还合成第二三重HBV shmiR ddRNAi构建体(命名为HBV-shmiRx3-v2),其以5'-3'方向包含编码U6-9启动子、shmiR6 (SEQ ID NO:64)、

U6-1启动子、shmiR7 (SEQ ID NO:65)、U6-8启动子和shmiR12 (SEQ ID NO:70) 的DNA序列。

[1105] 还制备了包含三重HBV shRNA表达盒的ddRNAi构建体,所述表达盒能够表达对应于由命名为HBV-shmiRx3-v1的构建体表达的三种shmiR的三种shRNA。具体地,合成三重HBV shRNA ddRNAi构建体(命名为HBV-shRNAX3-v1),其以5'-3'方向包含编码U6-9启动子和PSE7、shRNA6 (SEQ ID NO:99)、U6-1启动子和PSE7、shRNA15 (SEQ ID NO:108)、U6-8启动子和PSE7、shRNA12 (SEQ ID NO:105) 的DNA序列。

[1106] 实施例2-双萤光素酶报道分子测定中的ddRNAi表达构建体的活性

[1107] 在HEK293细胞中使用双萤光素酶报道分子测定法测定表达本公开的shmiR或shRNA的ddRNAi构建体对敲低HBV转录物的功效。

[1108] 针对来自本公开的每种shmiR和shRNA的效应子和效应子互补序列,构建基于pGL3萤光素酶报道载体的质粒报道构建体。通过将在每一个末端具有20bp侧翼序列的shmiR或shRNA(适当时)的相应效应子序列或效应子互补序列插入pGL3-对照载体(Promega, Madison, WI)来产生萤光素酶报告构建体例如萤火虫萤光素酶报道构建体。在萤光素酶报道基因后使用FseI和XbaI限制性酶位点亚克隆插入物。

[1109] 在HEK293细胞(ATCC)中进行双萤光素酶报道分子测定。在37°C下于含5%CO₂的潮湿培养箱中将HEK293细胞在含有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)的DMEM培养基中进行培养。在转染前一天,将HEK293细胞以每孔2x10⁴个细胞的密度接种到96孔培养板中。

[1110] 合成实施例1中描述的ddRNAi表达构建体(即称为HBV-shmiR1至HBV-shmiR16、HBV-shmiRx3-v1和HBV-shmiRx3-v2的ddRNAi构建体)并将其插入合适的质粒载体(例如pSsh载体)中,所述载体任选地具有近端序列元件7 (PSE7) 以用于表达shRNA的构建体。

[1111] 按照制造商的说明书,使用0.3uL的Lipofectamine 2000试剂(Life Technologies, Carlsbad, CA),以10:1 (ddRNAi表达构建体:萤光素酶报告基因构建体)的比率将包含ddRNAi表达构建体的表达载体与萤光素酶报告基因构建体例如萤火虫萤光素酶报告基因构建体(表达对应的shmiR或shRNA(适当时)的效应子序列或效应子互补序列)共转染到HEK293细胞中。还用1ng海肾报道基因构建体(用作转染对照)转染细胞。转染后48小时,收集细胞裂解物并使用双萤光素酶报道基因测定系统(Promega, Madison, WI)分析。测定每次转染的萤火虫/海肾活性比。相对于阴性对照例如表达随机非靶向序列的构建体计算报道基因表达的百分比抑制。重复进行实验。

[1112] 测定ddRNAi表达构建体表达本公开的shmiR并抑制萤光素酶蛋白从相应的萤光素酶报道构建体中表达的能力。

[1113] 另外,比较了三种ddRNAi shmiR构建体(即分别表达shmiR6、shmiR15和shmiR12的ddRNAi shmiR构建体)相对于它们的表达shRNA的对应物的链偏好活性。图1A中呈现的数据显示相对于相应的shRNA,shmiR显示出更高的反义(效应子)链活性。

[1114] 实施例3-表达shmiR的ddRNAi表达构建体的超功能特性

[1115] 在HEK293细胞中评估三种ddRNAi构建体(即分别表达shmiR6、shmiR15和shmiR12的ddRNAi shmiR构建体)的超功能特性。

[1116] 对于三种ddRNAi表达构建体中的每一种,按照制造商的说明书,使用0.3uL的Lipofectamine 2000试剂(Life Technologies, Carlsbad, CA),用(i) 100ng、50ng、20ng、

5ng、1.67ng、0.56ng、0.19ng、0.06ng或0.03ng的相应ddRNAi表达构建体、(ii) 将最终DNA含量调整至100ng的各种量的填充质粒和(iii) 10ng相应的萤火虫萤光素酶报道构建体共转染含有HEK293细胞的孔。还用1ng海肾报道基因构建体(用作转染对照)转染细胞。转染后48小时,收集细胞裂解物并使用双萤光素酶报道基因测定系统(Promega, Madison, WI)分析。测定每个孔的萤火虫/海肾活性比,并计算ddRNAi表达构建体的抑制效率。

[1117] 测定表达shmiR6、shmiR15或shmiR12(分别为SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:73、或SEQ ID NO:70)的构建体的活性并将其直接与表达shRNA6、shRNA15和shRNA12(分别为SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:105)的相应构建体进行比较,如图1所示。这些数据显示shmiR构建体在这些实验条件下比相应的shRNA构建体更有效(图1A)。

[1118] 使用超功能性测定进一步表征构建体的相对活性。通过滴定表达用固定量的萤火虫报道基因共转染的表达shmiR的构建体的量(100ng至0.02ng)来进行超功能测定。这些数据(图1B-1D)显示,与表达shRNA的相应构建体相比,所有三种ddRNAi shmiR构建体在低浓度下都是高活性的,这表明生物活性增加。

[1119] 实施例4-表达shmiR变体的ddRNAi表达构建体的设计和测试

[1120] 为了提高shmiR-12(SEQ ID NO:54)和shmiR-15(SEQ ID NO:57)的链偏好活性,通过将效应子互补(有义)序列在上游或下游移动1或2个核苷酸来产生shmiR-12和shmiR-15的变体。shmiR-15的变体被命名为shmiR-17至shmiR-22(分别为SEQ ID NO:134-139),shmiR-12的变体被命名为shmiR-23至shmiR-28(分别为SEQ ID NO:140-145)。

[1121] 还评估了在有义序列的3'末端添加'A'核苷酸或在有义序列的5'末端添加'G'核苷酸对shmiR变体的热力学的影响。该想法是允许反义(或效应子)链优先性加载到RISC复合物中以进行功能性RNAi活性。

[1122] 对于shmiR-12的变体(即shmiR-23至shmiR28),所有六种shmiR变体均显示出比亲本shmiR-12更好的链优先性(图2A)。对于shmiR-15的变体(即shmiR-17至shmiR-22),所有六种变体中的四种显示出比亲本shmiR-15更好的链优先性(图2B)。基于这些结果,通过用编码shmiR-24(SEQ ID NO:153)和shmiR-20(SEQ ID NO:149)的序列分别取代编码shmiR-12和shmiR-15的HBV-shmiRx3-v1中的序列来设计另外的三重HBV shmiR ddRNAi构建体。

[1123] 实施例5-使用HBV shmiR AdV载体敲低HepG2.2.15细胞中的HBV转录物

[1124] 通过将实施例1中描述的ddRNAi表达构建体(即称为HBV-shmiR1至HBV-shmiR16、HBV-shmiRx3-v1和HBV-shmiRx3-v2的ddRNAi构建体)亚克隆至腺病毒(AdV)构建体中来制备单和三重shmiR AdV载体以用于病毒生产(Vector Biolabs, Malvern PA)。

[1125] 为了测试本文所述的shmiR AdV载体敲低HBV基因表达的功效,用本公开的shmiR AdV载体感染HepG2.2.15并测定HBV基因表达的抑制。

[1126] HepG2.2.15是稳定地具有完整HBV基因组(血清型ayw,基因型D)的HepG2人肝细胞癌细胞系的亚细胞系。HepG2.2.15表达所有HBV病毒RNA和蛋白质,产生病毒基因组,并分泌病毒样颗粒。将HepG2.2.15细胞维持在补充有4%胎牛血清、4mM谷氨酰胺、青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)的RPMI1640培养基中,并在37°C的潮湿培养箱中于5%CO₂的气氛中增殖。

[1127] 在细胞悬浮液中用HBV shmiR AdV载体感染HepG2.2.15细胞,并在多孔板上培养。每个孔含有约1.0x 10⁵个HepG2.2.15细胞的悬浮液和以下MOI之一的本公开的单个或三重

HBV shmiR AdV载体之一:6、15、30、60、90和120。转导后,将细胞在37°C,5%CO₂下培养72小时,然后分别使用Qiagen miRNeasy mini试剂盒和QiAmp DNA mini试剂盒(Valencia, CA)进行收集以用于RNA和DNA提取。

[1128] 使用miRNeasy Mini试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)分离总RNA。使用NanoDrop 1000分光光度计(Thermo Scientific)定量总RNA并将其稀释至10ng/μl的工作浓度。

[1129] 使用Qiagen's miScript PCR系统测定本公开的每种shmiR在HepG2.2.15细胞中来自不同MOI的一种或多种单或三重HBV shmiR AdV载体表达时每个细胞的shmiR拷贝。对于每次RT-qPCR分析,使用Qiagen's miScript II RT试剂盒将50ng总RNA转化为cDNA。使用Qiagen miScript SYBR green PCR试剂盒,利用针对相应shmiR设计的引物和以下实时PCR条件:在95°C下初始变性15分钟,然后进行40个循环(94°C持续15秒,55°C持续30秒,70°C持续30秒),进行shmiR的定量PCR。

[1130] 通过将相应的HBV mRNA转录物水平针对每个样品的GAPDH mRNA归一化来测定对应于HBV抗原HBsAg、HBcAg和HbxAg的区域中的HBV转录物相对于GAPDH mRNA的水平的抑制水平。简言之,根据制造商的说明,使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Life Technologies, Carlsbad, CA)将100ng总RNA用于合成cDNA。然后使用Power SYBR Green PCR预混合物(Life Technologies)和表1中列出的引物组进行HBV抗原HBsAg、HBcAg、HbxAg和GAPDH内区域的定量PCR扩增。使用标准实时PCR条件:在95°C下初始变性10分钟,然后进行40个循环:95°C下15秒和60°C下1分钟。

[1131] 表1-用于RT-qPCR的引物组

[1132]

HBV 抗原	引物	序列(5' – 3')
HBsAg	HBsAg_fwd	ATGTTGCCGTTGTCCTCT
	HBsAg_rev	CCGTCCGAAGGTTGGTACA
HBxAg	HBxAg_fwd	CGTCCTTGTTACGTCCCG
	HBxAg_rev	AGTCCGCGTAAAGAGAGGTG
HBcAg	HBcAg_fwd	CCACCAAATGCCCTATCCT
	HBcAg_rev	ATTGAGACCTCGTCTGCGA
GAPDH	GAPDH_fwd	ACACCATGGGAAGGTGAAG
	GAPDH_rev	GTGACCAGGCGCCCAATA

[1133] 在各种MOI下测定本公开的每种shmiR(单独地表达的,或作为三重构建体的部分表达的)在对应于HBV抗原HBsAg、HBcAg和HbxAg的区域中对HBV转录物相对于GAPDH mRNA水平的抑制水平。

[1134] 实施例6-使用HBV shmiR AdV载体敲低HepG2.2.15细胞中的HBV转录物

[1135] 通过将实施例1中描述的ddRNAi表达构建体(即,称为HBV-shmiR1至HBV-shmiR16、HBV-shRNA1-HBV-shRNA16、HBV-shmiRx3-v1、HBV-shmiRx3-v2和HBV-shRNAX3-v1的ddRNAi构建体)亚克隆至腺病毒(AdV)构建体中来制备单和三重shmiR或shRNA AdV载体,以用于病毒生产(Vector Biolabs, Malvern PA)。

[1136] 为了测试本文所述的shmiR AdV载体敲低HBV基因表达的功效,用本公开的shmiR

AdV载体感染HepG2.2.15并测定HBV基因表达的抑制。

[1137] HepG2.2.15是稳定地具有完整HBV基因组(血清型ayw,基因型D)的HepG2人肝细胞癌细胞系的亚细胞系。HepG2.2.15表达所有HBV病毒RNA和蛋白质,产生病毒基因组,并分泌病毒样颗粒。将HepG2.2.15细胞维持在补充有4%胎牛血清、4mM谷氨酰胺、青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)的RPMI1640培养基中,并在37℃的潮湿培养箱中于5%CO₂的气氛中增殖。

[1138] 在细胞悬浮液中用HBV shmiR AdV载体或HBV shRNA AdV载体感染HepG2.2.15细胞,并在多孔板上培养。每个孔含有约1.25x 10⁵个HepG2.2.15细胞的悬浮液和MOI-100的单个或三重HBV shmiR AdV载体之一或者单个或三重HBV shRNA AdV载体之一。转导后,将细胞在37℃,5%CO₂下培养3-7天,并在转染后3、4、5和6天使用Qiagen miRNeasy mini试剂盒(Valencia, CA)收集其以用于总RNA分离。

[1139] 使用NanoDrop 1000分光光度计(Thermo Scientific)定量总RNA并将其稀释至10ng/μl的工作浓度。

[1140] 使用Qiagen's miScript PCR系统(设计用于定量从shmiR或shRNA加工的RNA效应分子)测定shmiR-12和shmiR-15(分别为图3A和3B)在HepG2.2.15细胞中从单个或三重HBV shmiR AdV载体表达时,表达为每个细胞的拷贝的RNAi效应分子。将ShmiR表达与在单个和三重构建体的背景下由相应shRNA诱导的效应RNAi分子的水平进行比较。对于每次RT-qPCR分析,使用Qiagen's miScript II RT试剂盒将50ng总RNA转化为cDNA。使用Qiagen miScript SYBR green PCR试剂盒,利用针对相应RNAi分子设计的定制引物和以下实时PCR条件:在95℃下初始变性15分钟,然后进行40个循环(94℃持续15秒,55℃持续30秒,70℃持续30秒),进行效应RNAi分子的定量PCR。结果表明,由shmiRs-12和shmiR-15表达的针对HBV基因组区域的效应RNAi分子水平分别高于相应的shRNA,即shRNA-12和shRNA-15(图3)。

[1141] 按照实施例5中所述的方法测定对应于HBV抗原HBsAg、HBcAg和HbxAg的区域中的HBV转录物相对于GAPDH mRNA的水平的抑制水平。

[1142] 在用HBV shmiR或shRNA AdV载体感染后3、4、5和6天在100的MOI下测定本公开的每种shmiR(单独地表达的,或作为三重构建体的部分表达的)对对应于HBV抗原HBsAg、HBcAg和HbxAg的区域中的HBV转录物相对于GAPDH mRNA水平的抑制水平。如图4A和B所示,与相应的shRNA表达构建体相比,shmiR-12和shmiR-15显示更大的HBV RNA沉默。

[1143] 实施例7-产生基于自身互补的AAV的质粒构建体和表达HBV shmiR的病毒

[1144] 通过将实施例1的三重HBV shmiR ddRNAi构建体亚克隆到scAAV2主链中,产生表达本公开的三种shmiR的自身互补的腺相关病毒2型(scAAV2)质粒。

[1145] 简言之,将实施例1的三重HBV shmiR ddRNAi构建体(即命名为HBV-shmiRx3-v1和HBV-shmiRx3-v2的ddRNAi构建体)克隆到pAAV2载体主链中以分别产生成名为pAAV-HBV-shmiRx3-v1和pAAV-HBV-shmiRx3-v2的载体。还可产生表达非靶向shmiR的AAV病毒质粒对照(pAAV-对照-shmiR)。

[1146] 然后使用AAV8衣壳产生重组假型化AAV载体原种。简言之,将HEK293T细胞在滚瓶中于补充有10%FBS的Dulbecco改良的Eagle培养基中进行培养,并在37℃和5%CO₂下孵育。按照制造商的说明书,将每种pAAV-三重HBV shmiR病毒质粒(pAAV-HBV-shmiRx3-v1和pAAV-HBV-shmiRx3-v2)和pAAVhelpercap8质粒(pDP8r)与聚乙烯亚胺(PEI)复合。然后在

HEK293T细胞中用pAAV-三重HBV shmiR病毒质粒 (pAAV-HBV-shmiRx3-v1和pAAV-HBV-shmiRx3-v2) 和pDP8r之一进行双重转染。将HEK293T细胞在37°C和5%CO₂下培养72小时,然后裂解细胞,并通过碘克沙醇 (Sigma-Aldrich) 逐步梯度超速离心纯化每种病毒质粒的表达scAAV shmiR的颗粒。使用Taqman定量聚合酶链反应 (Q-PCR),利用针对表达盒之间的区域设计的引物和探针测定载体基因组的数量。

[1147] 对于命名为pAAV-HBV-shmiRx3-v1、pAAV-HBV-shmiRx3-v2和pAAV-对照-shmiR的病毒质粒,将相应的scAAV8病毒制剂分别命名为scAAV-HBV-shmiRx3-v1、scAAV-HBV-shmiRx3-v2和scAAV-对照-shmiR。

[1148] 也通过将实施例1的三重HBV shmiR ddRNAi构建体亚克隆到ssAAV载体主链中,产生表达本公开的三种shmiR的单链腺相关病毒 (ssAAV) 质粒。

[1149] 实施例8-产生基于自身互补的单链AAV8的质粒构建体和表达HBV shmiR或shRNA的病毒

[1150] 通过将命名为HBV-shmiRx3-v1的实施例1的三重HBV shmiR ddRNAi构建体亚克隆到ssAAV8主链中,产生表达本公开的三种shmiR的单链腺相关病毒2型 (ssAAV2) 质粒。类似地,通过将命名为HBV-shRNAX3-v1的实施例1的三重HBV shRNA ddRNAi构建体亚克隆到ssAAV2或scAAV2主链中,产生表达相应于HBV-shRNAX3-v1的shmiR的三种shRNA的ssAAV8和自身互补的腺相关病毒2型 (scAAV2) 质粒。设计DNA以表达为重组AAV单链DNA基因组,如图5所示。

[1151] 然后按照实施例7中所述的方法,使用商购可得的AAV8衣壳 (Vector Biolabs, Malvern PA; Nationwide Children's Hospital, Columbus OH; Powell Gene Therapy Center, University of Florida) 产生每种AAV2质粒的重组假型AAV载体原种。将假型化的AAV载体原种分别命名为ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1、sAAV8-HBV-shRNAX3-v1和scAAV8-HBV-shRNAX3-v1。

[1152] 实施例9-体内HBV参数的抑制

[1153] 在用HBV接种物从头感染的PXB小鼠中测定命名为scAAV-HBV-shmiRx3-v1和scAAV-HBV-shmiRx3-v2的scAAV shmiR表达颗粒对 (i) HBV病毒转录物的表达、(ii) 细胞外HBsAg和HBeAg、(iii) 细胞外和细胞内HBV DNA和(iv) cccDNA的形成的体内效应。

[1154] 方法

[1155] 按照实施例7制备命名为scAAV-HBV-shmiRx3-v1和scAAV-HBV-shmiRx3-v2的scAAV shmiR表达颗粒。

[1156] 嵌合PXB小鼠 (PXB-**mice**®) 获自PhoenixBio。将所有小鼠在23±5°C和55±25%的湿度下单只圈养,暴露于12小时光/暗周期,并在整个实验中随意喂食和供水。

[1157] 用HBV基因型C接种PXB小鼠并孵育4周以使基线HBV感染建立。为了测定基线HBV感染,在第-28、-21、-14和-7天(即,分别为接种后0、7、14和21天)从小鼠取血,可从所述血液测定人白蛋白 (h-Alb) 浓度和HBV DNA、HBsAg和HBeAg的血清浓度。

[1158] 在每个时间点在麻醉(例如通过使用Intramedic™ Polyethylene Tubing (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) 经眶后丛/窦进行异氟烷麻醉 (**Escain**®, Mylan, Osaka, Japan))下从动物收集血液。

[1159] 从收集的血液中,将2 μL全血在盐水中稀释,并使用临床化学分析仪

(BioMajestyTM Series JCA-BM6050, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 通过胶乳凝集免疫比浊法 (LZ Test "Eiken" U-ALB, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 测量血液h-Alb浓度。

[1160] 将剩余的全血离心以分离血清用于HBV DNA定量、HBsAg和HBeAg分析。

[1161] 为了测量血清HBV DNA, 使用SMITESTEX-R&D核酸提取试剂盒 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., Nagoya, Japan) 从5μL血清中提取HBV DNA。然后将纯化的DNA溶于20μL无核酸酶的水 (Ambion) 中。将来自HBV感染的PXB小鼠的血清用作HBV DNA标准品。将合成的HBV DNA用于测定HBV DNA标准品的浓度, 然后将其用于血清HBV DNA水平的定量。从HBV DNA标准品中提取HBV DNA, 并在适当稀释后用于实时PCR。所用标准的范围可以是例如4.0E⁺⁰⁴和2.0E⁺⁰⁹个拷贝/mL。

[1162] 然后, 例如使用TaqMan Fast Advanced预混合物 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) 和ABI Prism 7500序列检测器系统 (Applied Biosystems) 进行实时PCR以测量血清HBV DNA浓度。将PCR反应混合物加入到5μL提取的DNA中。将尿嘧啶-N-糖基化酶在50°C下初始活化2分钟, 然后在95°C下聚合酶活化20秒。随后的PCR扩增由53个循环 (在ABI 7500序列检测器中每个循环于95°C下变性3秒, 在60°C下退火和延伸32秒) 组成。从两个单独的孔的值计算平均血清HBV DNA水平。

[1163] 用于实时PCR的引物和探针如下:

[1164]

标识符	靶位置	染料	序列信息	
			5'核苷酸 3'	染料
正向引物	166-186	n/a	CACATCAGGATTCCCTAGGACC (SEQ ID NO: 158)	n/a
反向引物	344-325	n/a	AGGTTGGTGAGTGATTGGAG (SEQ ID NO: 159)	n/a
TaqMan 探针	242-267	6-FAM	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC (SEQ ID NO: 160)	TAMRA

[1165] 使用例如如由Abbott (**ARCHITECT® SYSTEM**) 开发的化学发光免疫测定 (ChemiLuminescence ImmunoAssay) (CLIA) 测定血清HBsAg和HBeAg浓度。

[1166] 如果动物符合以下标准, 则将所述动物仅包括用于后续治疗实验中:

[1167] (i) 在第-1天 (即HBV接种后第27天) 重15g或更多;

[1168] (ii) 在第-7天 (即HBV接种后第21天) 具有至少1.0E⁺⁶个拷贝/mL的血清HBV DNA浓度; 和

[1169] (iii) 在第-7天 (即HBV接种后第21天) 具有10mg/mL或更高的h-Alb测量值。

[1170] 将其中建立基线HBV感染且符合上述标准的小鼠置于治疗组中。为了使组之间的差异最小化, 可以基于体重的算术平均值和血液h-Alb浓度和血清HBV DNA浓度的几何平均值随机化各组的组成。

[1171] 治疗组如下:

[1172] 组1: 仅生理盐水的单次200μl推注;

[1173] 组2: 通过IV注射递送至尾静脉的含有2.0E⁺¹³ (vg/kg) ssAAV-HBV-shmiRx3-v1病毒

颗粒的生理盐水的单次200 μ l推注;和

[1174] 组3:通过IV注射递送至尾静脉的含有2.0E⁺¹³ (vg/kg) scAAV-HBV-shmiRx3-v2病毒颗粒的生理盐水的单次200 μ l推注。

[1175] 用2-4%异氟烷麻醉所有小鼠,然后立即进行处理。

[1176] 在施用治疗(第0天)后,然后将动物再孵育56天。在此期间,每周采集血液,持续8周(治疗后第7、14、21、28、35、42、49和56天),使用所述方法,测定细胞外HBsAg、细胞外HBeAg和细胞外HBV DNA的血清浓度(通过实时PCR)。

[1177] 在第56天完成血液取样后,将所有存活的动物保持在异氟烷麻醉下并通过心脏穿刺和放血法处死。

[1178] 一旦处死,从小鼠收获整个肝脏并称重。从左侧外侧叶获得厚度为3至5mm的肝脏切片,并在侧面切成约1至2mm的立方体。将这些肝脏立方体转移到标记的管中并尽可能快地浸入**RNAlater®**溶液(Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)中。将肝脏样品在 ≥ 5 倍体积的**RNAlater®**中于4°C温育过夜,以使溶液渗透组织。孵育后,取出**RNAlater®**溶液,将肝片保存在-80°C,以用于随后定量肝脏HBV DNA水平。

[1179] 为了测定治疗后肝脏HBV DNA的水平,使用**DNeasy® Blood&Tissue**试剂盒(Qiagen K.K., Tokyo, Japan)从冷冻的**RNAlater®**保存的肝脏组织中提取HBV DNA。将DNA溶解在200 μ L不含核酸酶的水中,然后使用BioPhotometer 6131(Eppendorf Co., Ltd., Tokyo, Japan)测定DNA溶液的浓度。使用不含核酸酶的水将DNA溶液的浓度调节至20ng/ μ L。

[1180] 然后使用TaqMan Fast Advanced预混合物和ABI Prism 7500序列检测器系统进行测量肝HBV cccDNA浓度的实时PCR。简言之,将PCR反应混合物加入到5 μ L提取的DNA中。基于Takkenberg的条件进行PCR反应。将尿嘧啶-N-糖基化酶在50°C下初始活化2分钟,然后在95°C下聚合酶活化20秒。然后例如在ABI 7500序列检测器中进行随后55个循环的PCR扩增:每个循环在95°C下进行3秒,然后在60°C下进行32秒。从两个单独的孔的值计算平均HBV cccDNA水平。将含有HBV全基因组序列的质粒用作HBV cccDNA定量的标准样品。所用标准的范围可在例如1.0E⁺⁰²与1.0E⁺⁰⁵个拷贝/100ng DNA之间。

[1181] 用于实时PCR的引物和探针如下:

[1182]

标识符	靶位置	序列信息		
		染料	5'核苷酸 3'	染料
正向引物	1545-1563	n/a	CTCCCCGTCTGTGCCTTCT (SEQ ID NO: 161)	n/a
反向引物	1900-1883	n/a	GCCCCAAAGCCACCCAAG (SEQ ID NO: 162)	n/a
TaqMan 探针	1602-1628	6-FAM	CGTCGCATGGARACCACCGTGAACGCC (SEQ ID NO: 163)	TAMRA

[1183] 实施例10-嵌合小鼠模型中的HBV参数的抑制

[1184] 在用HBV接种物从头感染的PXB嵌合小鼠模型中测定表达抗HBV的shmiR或shRNA的AAV颗粒的体内效应(如图5所示)。评估了对各种HBV参数的抑制:(i) HBV病毒转录物的表达、(ii) 细胞外HBsAg、HBcAg和HBeAg、(iii) 细胞外和细胞内HBV DNA和(iv) cccDNA的形成。

[1185] 在PXB嵌合小鼠模型中测试实施例8中描述的表达抗HBV的shmiR或shRNA的AAV8颗

粒(图6)。测试的三种抗HBV AAV8颗粒如下：

[1186] (1) 含有HBV-shRNAX3-v1的ssAAV8(ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1)；

[1187] (2) 含有HBV-shRNAX3-v1的scAAV8(scAAV8-HBV-shRNAX3-v1)；和

[1188] (3) 含有HBV-shmiRx3-v1的ssAAV8(ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1)；

[1189] 该体内研究评估了当作为单一疗法施用时或当与HBV护理剂(careagent)标准品如恩替卡韦(ETV)或聚乙二醇化的干扰素(PEG-IFN)联合使用时,单剂量的ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1在PXB小鼠模型中的活性。

[1190] 方法

[1191] 嵌合PXB小鼠(PXB-**mice**®)获自PhoenixBio。将所有小鼠在23±5℃和55±25%的湿度下单独圈养,暴露于12小时-光/暗周期,并在整个实验中随意喂食和供水。将在肝细胞移植后约10周对人血清白蛋白的测量用于确保起始肝脏由至少80%的人肝细胞组成。通过该人肝细胞组成阈值的所有嵌合动物用HBV基因型C感染并孵育4周以使基线HBV感染建立。为了测定基线HBV感染,在第-28、-21、-14和-7天(即,分别为接种后0、7、14和21天)从小鼠取血,从所述血液测定人白蛋白(h-Alb)浓度和HBV DNA、HBsAg和HBeAg的血清浓度。这些允许检测试验动物的肝损伤-未检测到不良反应。

[1192] 在每个时间点在麻醉(例如通过使用Intramedic™ Polyethylene Tubing(Becton,Dickinson and Company,NJ,USA)经眶后丛/窦进行异氟烷麻醉(**Escain**®, Mylan,Osaka,Japan))下从动物收集血液。从收集的血液中,将2μL全血在盐水中稀释,并使用临床化学分析仪(BioMajesty™ Series JCA-BM6050,JEOL Ltd.,Tokyo,Japan)通过胶乳凝集免疫比浊法(LZ Test“Eiken”U-ALB,Eiken Chemical Co.,Ltd.,Tokyo,Japan)测量血液h-Alb浓度。

[1193] 将剩余的全血离心以分离血清用于HBV DNA定量、HBsAg、HBcAg和HBeAg分析。为了测量血清HBV DNA,使用SMITESTEX-R&D核酸提取试剂盒(MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD.,Nagoya,Japan)从5μL血清中提取HBV DNA。然后将纯化的DNA溶于20μL不含核酸酶的水(Ambion)中。将来自HBV感染的PXB小鼠的血清用作HBV DNA标准品。将合成的HBV DNA用于测定HBV DNA标准品的浓度,然后将其用于血清HBV DNA水平的定量。从HBV DNA标准品中提取HBV DNA,并在适当稀释后用于实时PCR。所用标准的范围可以是例如4.0E4和2.0E9个拷贝/mL。

[1194] 然后,例如使用TaqMan Fast Advanced预混合物(Applied Biosystems,Thermo Fisher Scientific Inc.)和ABI Prism 7500序列检测器系统(Applied Biosystems)进行实时PCR以测量血清HBV DNA浓度。将PCR反应混合物加入到5μL提取的DNA中。将尿嘧啶-N-糖基化酶在50℃下初始活化2分钟,然后在95℃下聚合酶活化20秒。随后的PCR扩增由在ABI 7500序列检测器中进行的53个循环组成:每个循环在95℃下变性3秒,然后在60℃下退火和延伸32秒。从两个单独的孔的值计算平均血清HBV DNA水平。

[1195] 用于实时PCR的引物和探针如下:

[1196]

标识符	靶位置	序列信息		
		染料	5'核苷酸 3'	染料
正向引物	166-186	n/a	CACATCAGGATTCCCTAGGACC (SEQ ID NO: 158)	n/a
反向引物	344-325	n/a	AGGTTGGTGACTGATTGGAG (SEQ ID NO: 159)	n/a
TaqMan 探针	242-267	6-FAM	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC (SEQ ID NO: 160)	TAMRA

[1197] 使用例如如由Abbott开发的化学发光免疫测定(CLIA) (**ARCHITECT® SYSTEM**) 测定血清HBsAg和HBeAg浓度。

[1198] 如果动物符合以下标准,则将所述动物仅包括用于后续治疗中:

[1199] (i) 在第-1天(即,HBV接种后第27天)称重为15g或更多;

[1200] (ii) 在第-7天(即,HBV接种后第21天)具有至少 $1.0E^{+6}$ 个拷贝/mL的血清HBV DNA浓度;和

[1201] (iii) 在第-7天(即,HBV接种后第21天)具有10mg/mL或更高的h-Alb测量值。

[1202] 将其中已建立基线HBV感染并且符合上述标准的小鼠置于治疗12组中,每组由4或5只小鼠组成。为了使组之间的差异最小化,可以基于体重的算术平均值和血液h-Alb浓度及血清HBV DNA浓度的几何平均值对组的组成进行随机化。

[1203] 治疗组如下:

[1204]

组	品系	小鼠数量 (ID)	测试化合物	剂量				
				水平 *	浓度 **	体积 (mL/kg)	途径	频率
1	PXB (HBV C-感染的)	5 (101-105)	对照媒介物	0	0	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
2	PXB (HBV C-感染的)	4 (201-204)	ETV	0.006	0.0006	10	p.o.	QD, 持续 91 天 第 0 天至第 90 天
3	PXB (HBV C-感染的)	4 (301-304)	Pegasys	0.03	0.003	10	s.c.	BIW, 持续 13 周 每周的每一天 和第 4 天
4	PXB (HBV C-感染的)	5 (401-405)	BB-101	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
5	PXB (HBV C-感染的)	5 (501-505)	BB-101	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			ETV	0.006	0.0006	10	p.o.	QD, 持续 91 天 第 0 天至第 90 天
6	PXB (HBV C-感染的)	5 (601-605)	BB-101	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			Pegasys	0.03	0.003	10	s.c.	BIW, 持续 13 周 每周的每一天 和第 4 天
7	PXB (HBV C-感染的)	5 (701-705)	BB-102	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
8	PXB (HBV C-感染的)	5 (801-805)	BB-102	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			ETV	0.006	0.0006	10	p.o.	QD, 持续 91 天 第 0 天至第 90 天
9	PXB (HBV C-感染的)	5 (901-905)	BB-102	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			Pegasys	0.03	0.003	10	s.c.	BIW, 持续 13 周 每周的每一天 和第 4 天
10	PXB (HBV C-感染的)	4 (1001-1004)	BB-103	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
11	PXB (HBV C-感染的)	4 (1101-1104)	BB-103	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			ETV	0.006	0.0006	10	p.o.	QD, 持续 91 天 第 0 天至第 90 天
12	PXB (HBV C-感染的)	4 (1201-1204)	BB-103	2.00E+13	TBP***	200 μ l 总计	i.v.	单次, 第 0 天
			Pegasys	0.03	0.003	10	s.c.	BIW, 持续 13 周 每周的每一天 和第 4 天

[1205] *:对于ETV和派罗欣,mg/kg;对于BB-101、BB-102和BB-103,vg/kg

[1206] **:对于ETV和派罗欣,mg/ml

[1207] ***:基于体重进行给药的当天制备以实现靶剂量水平。关于终浓度,请见附录3.

[1208] n/a:不适用的

[1209] 用盐水处理的HBV感染的小鼠用作阴性对照。用针对HBV的护理剂标准品治疗的组用作阳性对照:每天以6 μ g/kg施用恩替卡韦,或者以30 μ g/kg每周两次施用聚乙二醇化的干扰素。对于抗HBV ddRNAi治疗组,以 2×10^{13} vg/kg的剂量,通过在第0天低压尾静脉注射施用一次ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1、scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1。共治疗的动物在第1天开始每日ETV或在第4天首次用PEG-IFN给药。

[1210] 用2-4%的异氟烷麻醉所有小鼠,然后立即进行处理。

[1211] 在施用治疗(第0天)后,然后将动物再孵育91天。在此期间,每周采血,持续13周(治疗后第7天、14天、21天、28天、35天、42天、49天、56天、63天、70天、77天、84天和91天)并

测量细胞外血HBV DNA (病毒滴度) 和细胞外HBsAg的血清浓度。每隔一周测量HBeAg水平直至第70天,然后每周测量一次,直至该91天实验结束。

[1212] 在第91天完成血液取样后,将所有存活的动物保持在异氟烷麻醉下并通过心脏穿刺和放血法处死。一旦处死,从小鼠收获整个肝脏并称重。从左外侧叶获得厚度为3至5mm的肝脏切片,并在侧面切成约1至2mm的立方体。将这些肝脏立方体转移到标记的管中并尽可能快地浸入**RNAlater®**溶液 (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 中。将肝脏样品在≥5倍体积的**RNAlater®**中于4°C温育过夜,以使溶液渗透组织。孵育后,取出**RNAlater®**溶液,将肝片保存在-80°C,随后定量各种肝HBV DNA和RNA以及重组AAV衍生的shRNA或shmiR RNA的表达水平。

[1213] 为了测定治疗后肝脏HBV DNA的水平,使用**DNeasy® Blood&Tissue**试剂盒 (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) 从冷冻的**RNAlater®**保存的肝脏组织中提取HBV DNA。将DNA溶解在200μL不含核酸酶的水中,然后使用BioPhotometer 6131 (Eppendorf Co., Ltd., Tokyo, Japan) 测定DNA溶液的浓度。使用不含核酸酶的水将DNA溶液的浓度调节至20ng/μL。

[1214] 然后使用TaqMan Fast Advanced预混合物和ABI Prism 7500序列检测器系统进行测量肝HBV cccDNA浓度的实时PCR。简言之,将PCR反应混合物加入到5μL提取的DNA中。基于Takkenberg的条件进行PCR反应。将尿嘧啶-N-糖基化酶在50°C下初始活化2分钟,然后在95°C下聚合酶活化20秒。然后例如在ABI 7500序列检测器中进行随后55个循环的PCR扩增:每个循环在95°C下进行3秒,然后在60°C下进行32秒。计算平均HBV cccDNA水平。将含有HBV全基因组序列的质粒用作HBV cccDNA定量的标准样品。所用标准的范围可在例如1.0E⁺⁰²与1.0E⁺⁰⁵个拷贝/100ng DNA之间。

[1215] 用于实时PCR的引物和探针如下:

[1216]

标识符	靶位置	序列信息		
		染料	5'核苷酸 3'	染料
正向引物	1545-1563	n/a	CTCCCCGTCTGTGCCTTCT (SEQ ID NO: 161)	n/a
反向引物	1900-1883	n/a	GCCCCAAAGCCACCCAAG (SEQ ID NO: 162)	n/a
TaqMan 探针	1602-1628	6-FA M	CGTCGCATGGARACCACCGTGAACG CC (SEQ ID NO: 163)	TAMR A

[1217] 如实施例5和6中所述,将实时PCR用于定量抗HBV效应RNAi分子的肝产生和HBV mRNA转录物的抑制。

[1218] 结果:

[1219] 为简洁起见,仅给出了针对scAAV8-HBV-shRNAX3-v1和ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1获得的关键数据点。

[1220] 盐水处理动物中的病毒滴度(大于1E⁺⁰⁸个HBV DNA拷贝/ml)在13周的实验中保持相对恒定(图7)。仅由每日ETV组成的治疗臂导致血清HBV DNA水平下降2.631og。当在其他

抗病毒药物不存在的情况下给药时,ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1和scAAV8-HBV-shRNAX3-v1导致血清HBV DNA水平的相应最大下降,分别为2.17log和1.87log减少。然而,在63天的治疗后,注意到HBV DNA水平适度反弹。然而,与每日恩替卡韦组合,单剂量的ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1和scAAV8-HBV-shRNAX3-v1使血清HBV DNA水平降至3.72log(即测定的定量下限(LLOQ))以下。尽管难以准确定量HBV DNA水平,但病毒负荷的减轻似乎持续减轻,直到该91天实验结束。

[1221] s-抗原(HBsAg)是免疫抑制和HBV慢性的已知贡献者。据信,在活性感染中发生的高水平HBsAg表达对于实现治愈是有问题的。“治愈”通常通过HBV感染患者(由抗HBsAg抗体的表达定义的)的血清转化来定义。用ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1+ETV或scAAV8-HBV-shRNAX3-v1+ETV处理感染的嵌合小鼠分别使HBsAg水平降低2.14log和1.86log(图8)。用ETV作为单一疗法的治疗仅使HBsAg水平降低0.46log。

[1222] 利用ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1+ETV的治疗使HBeAg水平下降1.90log,利用scAAV8-HBV-shRNAX3-v1+ETV的治疗使HBeAg水平下降1.42log。利用恩替卡韦的治疗仅使HBsAg水平下降0.37log(图9)。

[1223] 除了与ETV的共治疗以外,该研究还测试了当与PEG-IFN共同施用时scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1的组合。除由每周2次给予聚乙二醇化的干扰素的方案以外,单次施用scAAV8-HBV-shRNAX3-v1或ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1分别导致HBV血清DNA水平显著降低2.67log和3.27log(图10)。

[1224] 在91天的药物治疗结束时,处死小鼠,收集肝脏并从这些组织中纯化DNA和RNA以探索许多肝细胞参数。例如,作为RNA干扰剂,预期ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1降低细胞中存在的HBV病毒转录物的水平。

[1225] 使用位于每个RNAi诱导的切割位点附近的引物/探针组,通过RT-QPCR评估HBV RNA的水平(图11)。尽管聚乙二醇化的干扰素作为单一疗法具有强烈的活性水平,但恩替卡韦对HBV RNA水平的影响是适度的,通过13周的治疗达到约50%的降低。作为单一疗法,ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1对病毒RNA具有强烈抑制,导致HBV转录物减少超过94%。ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1与两种抗病毒剂中的任一种的组合进一步增强了抑制病毒RNA的能力,抑制水平高达98.6%。

[1226] 还使用定量PCR从肝脏样品评估细胞内HBV DNA以及cccDNA。单独使用恩替卡韦或聚乙二醇化的干扰素的治疗能够使细胞内DNA水平降低21og(图12,左图)。然而,在治疗方案中单次添加ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1进一步将细胞内DNA水平降低31og。虽然RNA干扰不会直接攻击细胞内HBV DNA,但RNA和相应转录物的减少可能会削弱逆转录过程将pgRNA模板转化为DNA中间体的能力,从而导致其减少。实际上,尽管cccDNA的适度减少略微超过ETV的11og减少,但ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1的添加并未显著引起cccDNA水平的进一步降低(图12,右图)。

[1227] 还通过RT-QPCR(图13)和下一代测序(NGS,图14-16)测定来自PXB小鼠肝组织的RNAi效应分子的表达。NGS数据显示,当从shmiR(ssAAV8-HBV-shmiRx3-v1)产生时,主要的RNAi效应子种类的数量限于2至3种。当从shRNA(ssAAV8-HBV-shRNAX3-v1和scAAV8-HBV-shRNAX3-v1)产生时,效应子种类的数量显著增加。作为shmiR前体,小RNA转录物进入上游的RNAi途径,其中Drosha进行第一次切割并确定RNAi双链体的一端。该末端含有特征性2nt

的3' 悬突,其作为切丁酶的最佳底物存在,其切割环以产生最终的siRNA双链体。Drosha和切丁酶的加工非常精确,因此,通过深度测序只能找到最少数量的序列。另一方面,第一代shRNA依赖于序列内构建的转录终止子(即,polyT)来确定RNAi双链体的一个末端。这种机制是不精确的并且产生具有2至5个nt的3' 悬突的悬突,所述悬突对于切丁酶介导的切割不是最佳的。由于切丁酶的低保真切割,通过深度测序观察到更多的种类。更重要的是,由shRNA产生的效应子种类的这种宽分布(与shmiRs相比)可以减少所需种类的活性,并且不想要的无效抗HBV RNAi分子的产生可以增加脱靶效应的机会。

[1228] 本领域技术人员将理解,在不脱离本公开的广泛的一般范围的情况下,可以对上述实施方案进行多种变化和/或修改。因此,本发明的实施方案在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

序列表

<110> Benitec Biopharma Limited

<120> 用于治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的药剂及其使用

<130> 177887

<150> US 62/332,245

<151> 2016-05-05

<160> 229

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> 乙型肝炎病毒区域1转录物

<400> 1

cauccugcug cuaugccuca 20

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> 乙型肝炎病毒区域2转录物

<400> 2

uuugcugacg caaccccac ugg 23

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> 乙型肝炎病毒区域3转录物

<400> 3

aagccuccaa gcugugccuu 20

<210> 4

<211> 28

<212> RNA

<213> 乙型肝炎病毒区域4转录物

<400> 4

gcagguccccc uagaagaaga acucccuc 28

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

<213> 乙型肝炎病毒区域5转录物

<400> 5

caagguaugu ugcccguuug ucc 23

<210> 6
<211> 20
<212> RNA
<213> 乙型肝炎病毒区域6转录物
<400> 6
cucguggugg acuucucuca 20
<210> 7
<211> 23
<212> RNA
<213> 乙型肝炎病毒区域7转录物
<400> 7
cucguguuac aggcggguuu uuu 23
<210> 8
<211> 29
<212> RNA
<213> 乙型肝炎病毒区域8转录物
<400> 8
ccgugugcac uucgcuucac cucugcacg 29
<210> 9
<211> 22
<212> RNA
<213> 乙型肝炎病毒区域9转录物
<400> 9
uacgucccggu cggcgcugaa uc 22
<210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> 乙型肝炎病毒区域10转录物
<400> 10
aaaugccccu aucuuauca 19
<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-1效应子
<400> 11
ugaggcauag cagcaggaug c 21
<210> 12

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-1效应子互补序列
<400> 12
cauccugcug cuaugccuca 20
<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-2效应子
<400> 13
cagugggggu ugcgucagca a 21
<210> 14
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-2效应子互补序列
<400> 14
ugcugacgca acccccacug 20
<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-3效应子
<400> 15
aaggcacagc uuggaggcuu g 21
<210> 16
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-3效应子互补序列
<400> 16
aagccuccaa gcugugccuu 20

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-4效应子
<400> 17
gaguucuucu ucuagggac c 21
<210> 18
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-4效应子互补序列
<400> 18
gucccuaga agaagaacuc 20
<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-5效应子
<400> 19
gagggaguuc uucuucuagg g 21
<210> 20
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-5效应子互补序列
<400> 20
ccuagaagaa gaacucccuc 20
<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子
<400> 21

uucuuucuucu aggggaccug c 21
<210> 22
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子互补序列
<400> 22
cagguccccua agaagaagaa 20
<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-7效应子
<400> 23
acaaacgggc aacauaccuu g 21
<210> 24
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-7效应子互补序列
<400> 24
aagguauguu gcccgguuugu 20
<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-8效应子
<400> 25
uugagagaag uccaccacga g 21
<210> 26
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-8效应子互补序列

<400> 26
ucguggugga cuucucucaa 20
<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-9效应子
<400> 27
aaaccccgcc uguaacacga g 21
<210> 28
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-9效应子互补序列
<400> 28
ucguguuaca ggcgggguuu 20
<210> 29
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-10效应子
<400> 29
ugcagaggug aagcgaagug c 21
<210> 30
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-10效应子互补序列
<400> 30
cacuucgcuu caccucugca 20
<210> 31
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> shmiR-11效应子
<400> 31
gauucagcgc cgacgggacg a 21
<210> 32
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-11效应子互补序列
<400> 32
cgucccgugc gcgcugaauc 20
<210> 33
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-12效应子
<400> 33
ggauucagcg ccgacggac g 21
<210> 34
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-12效应子互补序列
<400> 34
gucccgugc cgugaauc 20
<210> 35
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-13效应子
<400> 35
ugauaagaua gggcauuug g 21
<210> 36
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> shmiR-13效应子互补序列
<400> 36
caaaugcccc uaucuuauca 20
<210> 37
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-14效应子
<400> 37
ugaggccac ucccauaggu a 21
<210> 38
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-14效应子互补序列
<400> 38
accuaugga gugggccuca 20
<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子
<400> 39
ggaaagccu acgaaccacu g 21
<210> 40
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子互补序列
<400> 40
agugguucgu agggcuuucc 20
<210> 41
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-16效应子
<400> 41
ggcaacggg guaaaggguuc a 21
<210> 42
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-16效应子互补序列
<400> 42
gaaccuuuac cccguugccc 20
<210> 43
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-1序列
<400> 43
gguaauuugc uguugacagu gagcgacauc cugcugcuau gccucaacug ugaagcagau 60
ggguugaggc auagcagcag gaugccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 44
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-2序列
<400> 44
gguaauuugc uguugacagu gagcgauugc gacgcaaccc ccacugacug ugaagcagau 60
ggguucagugg ggguugcguc agcaacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 45
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-3序列
<400> 45
gguaauuugc uguugacagu gagcgaaagc cuccaagcug ugccuuacug ugaagcagau 60

gguaauuaggca cagcuuggag gcuugcgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 46
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-4序列
<400> 46

gguaauuugc uguugacagu gagcgagucc ccuagaagaa gaacucacug ugaagcagau 60
gggugaguuc uucuucuagg ggacccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 47
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-5序列
<400> 47

gguaauuugc uguugacagu gagcgaccua gaagaagaac uccucacug ugaagcagau 60
gggugaggga guucuucuuc uagggcgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 48
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6序列
<400> 48

gguaauuugc uguugacagu gagcgacagg ucccuagaa gaagaaacug ugaagcagau 60
ggguuucuuc uucuagggga ccugccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 49
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-7序列
<400> 49

gguaauuugc uguugacagu gagcgaaagg uauguugccc guuuguacug ugaagcagau 60
ggguacaaac gggcaacaua cciugcgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 50
<211> 107

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-8序列
<400> 50
gguaauauugc uguugacagu gagcgaucgu gguggacuuc ucucaaacug ugaagcagau 60
ggguuugaga gaaguccacc acgagcgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 51
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-9序列
<400> 51
gguaauauugc uguugacagu gagcgaucgu guuacaggcg ggguuuacug ugaagcagau 60
ggguaaaccc cgccuguaac acgagcgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 52
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-10序列
<400> 52
gguaauauugc uguugacagu gagcgacacu ucgcuucacc ucugcaacug ugaagcagau 60
ggguugcaga ggugaagcga agugccgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 53
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-11序列
<400> 53
gguaauauugc uguugacagu gagcgacguc ccgucggcgc ugaaucacug ugaagcagau 60
gggugauuca gcgccgacgg gacgacgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 54
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> shmiR-12序列

<400> 54

gguaauauugc uguugacagu gagcgagucc cgucggcgcu gaauccacug ugaagcagau 60

ggguggauuc agcgccgacg ggacgcgccc acugccucgg acuucaa 107

<210> 55

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-13序列

<400> 55

gguaauauugc uguugacagu gagcgacaaa ugccccuauc uuaucaacug ugaagcagau 60

ggguugauaa gauaggggca uuuggcgccc acugccucgg acuucaa 107

<210> 56

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-14序列

<400> 56

gguaauauugc uguugacagu gagcgaaccu augggagugg gccucaacug ugaagcagau 60

ggguugaggc ccacucccau agguacgccc acugccucgg acuucaa 107

<210> 57

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-15序列

<400> 57

gguaauauugc uguugacagu gagcgaagug guucguaggg cuuuccacug ugaagcagau 60

ggguggaaag cccuacgaac cacugcgccc acugccucgg acuucaa 107

<210> 58

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-16序列

<400> 58

gguaauauugc uguugacagu gagcgagaac cuuuaccccg uugcccacug ugaagcagau 60

ggggggggcaa cgggguaaag guucacgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 59
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-1的DNA序列
<400> 59
ggaagcggac aggagcgaca ccgcgcagcc caacggaagc agagggagg caagcagcag 60
gagccgccac gcccggacca a 81
<210> 60
<211> 83
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-2的DNA序列
<400> 60
ggaagcggac aggagcgagc gacgcaaccc ccacgacgga agcagagggc agggggggcg 60
cagcaacgcc acgcccggac caa 83
<210> 61
<211> 81
<212> RNA
<213> 人工序列
<220> 编码shmiR-3的DNA序列
<400> 61
ggaagcggac aggagcgaaa gccccaaagcg gccacggaag cagagggaag gcacagcgga 60
ggcgccac gcccggacca a 81
<210> 62
<211> 80
<212> RNA
<213> 人工序列
<220> 编码shmiR-4的DNA序列
<400> 62
ggaagcggac aggagcgagc cccagaagaa gaaccacgga agcagagggg agcccagggg 60
acccggccacg cccggaccaa 80
<210> 63
<211> 80
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shmiR-5的DNA序列

<400> 63

ggaagcggac aggagcgacc agaagaagaa cccccacgga agcagagggg agggagccca 60

gggcgccacg cccggaccaa 80

<210> 64

<211> 80

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shmiR-6的DNA序列

<400> 64

ggaagcggac aggagcgaca ggccccagaa gaagaaacgg aagcagaggg cccagggac 60

cgcgcgccacg cccggaccaa 80

<210> 65

<211> 79

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shmiR-7的DNA序列

<400> 65

ggaagcggac aggagcgaaa ggaggccgg acggaagcag agggacaaac gggcaacaac 60

cgcgcgccacgc ccggaccaa 79

<210> 66

<211> 80

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shmiR-8的DNA序列

<400> 66

ggaagcggac aggagcgacg ggggaccca aacggaagca gaggggagag aagccaccac 60

gagcgcgccacg cccggaccaa 80

<210> 67

<211> 81

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shmiR-9的DNA序列

<400> 67

ggaagcggac aggagcgacg gacaggcgaa gacggaagca gagggaaacc ccgccgaaca 60
cgagcgccac gcccggacca a 81
<210> 68
<211> 81
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-10的DNA序列
<400> 68
ggaagcggac aggagcgaca ccgcacccg caacggaagc agagggcag aggaaagcga 60
aggccgcccac gcccggacca a 81
<210> 69
<211> 84
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-11的DNA序列
<400> 69
ggaagcggac aggagcgacg cccgcggcgc gaacacggaa gcagagggga cagcgccgac 60
gggacgacgc cacgcccggaa ccaa 84
<210> 70
<211> 84
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-12的DNA序列
<400> 70
ggaagcggac aggagcgagc ccgcggcgcg aaccacggaa gcagaggggg acagcgccgaa 60
cgggacgacgc cacgcccggaa ccaa 84
<210> 71
<211> 78
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-13的DNA序列
<400> 71
ggaagcggac aggagcgaca aagccccaca caacggaagc agaggggaaa gaagggcag 60
gcgccacgccc cggaccaa 78
<210> 72

<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-14的DNA序列
<400> 72
ggaagcggac aggagcgaac cagggagggg cccaacggaa gcagagggga ggcccacccc 60
aaggacgcca cgcccgacc aa 82
<210> 73
<211> 81
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-15的DNA序列
<400> 73
ggaagcggac aggagcgaag ggcgagggcc cacggaagca gagggggaaa gcccacgaac 60
cacgcgccac gcccgacca a 81
<210> 74
<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-16的DNA序列
<400> 74
ggaagcggac aggagcgaga accacccgg cccacggaag cagaggggg caacgggaa 60
aggcacgcca cgcccgacc aa 82
<210> 75
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 茎环
<400> 75
acugugaagc agaugggu 18
<210> 76
<211> 26
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> miR-30a主链5'侧翼序列
<400> 76
gguaauauugc uguugacagu gagcga 26
<210> 77
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-30a主链3'侧翼序列
<400> 77
cgccuacugc cucggacuuc aa 22
<210> 78
<211> 47
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-1序列
<400> 78
cauccugcug cuaugccuca caagagauga ggcauagcag caggaug 47
<210> 79
<211> 47
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-2序列
<400> 79
gcugacgcaa cccccacugg caagagacca guggggguug cgucagc 47
<210> 80
<211> 47
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-3序列
<400> 80
aagccuccaa gcugugccuu ugugcuuaag gcacagcuug gagggcuu 47
<210> 81
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> shRNA-4序列
<400> 81
gguccccuag aagaagaacu ccaagagaga guucuuucuuc uaggggacc 49
<210> 82
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-5序列
<400> 82
cccuagaaga agaacuccu ccaagagaga gggaguucuu cuucuaggg 49
<210> 83
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6序列
<400> 83
gcagggcccc uagaagaaga acaagagauu cuucuucuag gggaccugc 49
<210> 84
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-7序列
<400> 84
caagguaugu ugcccguuug ucaagagaac aaacgggcaa cauaccuug 49
<210> 85
<211> 47
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-8序列
<400> 85
cucguggugg acuucucuca caagagauga gagaagucca ccacgag 47
<210> 86
<211> 49
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-9序列
<400> 86
cucguguuac aggccggguu uugugcuuua accccgcccug uaacacgag 49
<210> 87
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-10序列
<400> 87
gcacuuucgcu ucaccucugc acaagagaug cagaggugaa gcgaagugc 49
<210> 88
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-11序列
<400> 88
acgucccguc ggcgcugaaau cugugcuuga uucagcgccg acgggacgu 49
<210> 89
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12序列
<400> 89
cgucccegucg ggcgcugaauc cugugcuugg auucagcgcc gacgggacg 49
<210> 90
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-13序列
<400> 90
aaaugccccu aucuuaucau gugcuuugau aagauagggg cauuu 45
<210> 91
<211> 51

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA-14序列

<400> 91

auaccuaagg gagugggccu cacaagagau gaggcccacu cccauaggua u 51

<210> 92

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA-15序列

<400> 92

cagugguucg uagggcuuuc cccaagagag ggaaagccu acgaaccacu g 51

<210> 93

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA-16序列

<400> 93

gaaccuuuac cccguugccc ggcaagagac cgggcaacgg gguaaaggguu c 51

<210> 94

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shRNA-1的DNA序列

<400> 94

catcctgctg ctatgcctca caagagatga ggcatagcag caggatg 47

<210> 95

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码shRNA-2的DNA序列

<400> 95

gctgacgcaa cccccactgg caagagacca gtggggttg cgtcagc 47

<210> 96

<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-3的DNA序列
<400> 96
aaggcctccaa gctgtgcctt tgtgcttaag gcacagcttg gaggctt 47
<210> 97
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-4的DNA序列
<400> 97
ggtcccctag aagaagaact ccaagagaga gttcttcttc tagggacc 49
<210> 98
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-5的DNA序列
<400> 98
ccctagaaga agaactccct ccaagagaga gggagttctt cttctaggg 49
<210> 99
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-6的DNA序列
<400> 99
gcaggtcccc tagaagaaga acaagagatt cttcttctag gggacctgc 49
<210> 100
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-7的DNA序列
<400> 100
caaggtatgt tgcccgtttg tcaagagaac aaacggcaa cataccttg 49

<210> 101
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-8的DNA序列
<400> 101
ctcgtggtgg acttctctca caagagatga gagaagtcca ccacgag 47
<210> 102
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-9的DNA序列
<400> 102
ctcgttac aggccccgtt ttgtgcttaa accccgcctg taacacgag 49
<210> 103
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-10的DNA序列
<400> 103
gcacttcgct tcacctctgc acaagagatg cagaggtgaa gcgaagtgc 49
<210> 104
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-11的DNA序列
<400> 104
acgtcccgtc ggcgctgaat ctgtgcttga ttcagcgccg acggacgt 49
<210> 105
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-12的DNA序列
<400> 105

cgtcccgctcg gcgcgtgaatc ctgtgcttgg attcagcgcc gacgggacg 49
<210> 106
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-13的DNA序列
<400> 106
aaatgcccct atcttatcat gtgcttgat aagatagggg cattt 45
<210> 107
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-14的DNA序列
<400> 107
atacctatgg gagtgggcct cacaagagat gaggcccact cccataggtat 51
<210> 108
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-15的DNA序列
<400> 108
cagtggttcg tagggcttcc cccaagagag ggaaaggcct acgaaccact g 51
<210> 109
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shRNA-16的DNA序列
<400> 109
gaacctttac cccgttgccc ggcaagagac cggcaacgg ggttaaggtt c 51
<210> 110
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-17效应子

<400> 110
gggaaagccc uacgaaccac a 21
<210> 111
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-17效应子互补序列
<400> 111
gugguuucgua gggcuuuccc 20
<210> 112
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-18效应子
<400> 112
ggggaaagcc cuacgaacca c 21
<210> 113
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-18效应子互补序列
<400> 113
ugguucguag ggcuuuuccc 20
<210> 114
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-19效应子
<400> 114
uggaaagccc uacgaaccac a 21
<210> 115
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> shmiR-19效应子互补序列
<400> 115
gugguucgua gggcuuucca 20
<210> 116
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-20效应子
<400> 116
gaaagccua cgaaccacug a 21
<210> 117
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-20效应子互补序列
<400> 117
cagugguucg uagggcuuuc 20
<210> 118
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-21效应子
<400> 118
aaagccuac gaaccacuga a 21
<210> 119
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-21效应子互补序列
<400> 119
ucagugguuc guagggcuuu 20
<210> 120
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> shmiR-22效应子
<400> 120
aaagccuac gaaccacugc a 21
<210> 121
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-22效应子互补序列
<400> 121
gcagugguuc guagggcuuu 20
<210> 122
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-23效应子
<400> 122
gggauucagc gccgacggga c 21
<210> 123
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-23效应子互补序列
<400> 123
ucccguccgc gcugaauccc 20
<210> 124
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-24效应子
<400> 124
cgggauucag cgccgacggg a 21
<210> 125
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-24效应子互补序列
<400> 125
cccgucggcg cugaaucccg 20
<210> 126
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-25效应子
<400> 126
uggauucagc gccgacggga c 21
<210> 127
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-25效应子互补序列
<400> 127
ucccgucggc gcugaaucca 20
<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-26效应子
<400> 128
gauucagcgc cgacgggacg a 21
<210> 129
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-26效应子互补序列
<400> 129
cgucccggucg ggcgcugaauc 20
<210> 130
<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-27效应子

<400> 130

auucagcgcc gacgggacgu a 21

<210> 131

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-27效应子互补序列

<400> 131

acgucccguc ggccgcugaa 20

<210> 132

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-28效应子

<400> 132

auucagcgcc gacgggacgc a 21

<210> 133

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-28效应子互补序列

<400> 133

gcgucccguc ggccgcugaa 20

<210> 134

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shmiR-17序列

<400> 134

gguaauauugc uguugacagu gagcgagugg uucguagggc uuucccacug ugaagcagau 60

ggguggggaaa gcccuacgaa ccacacgccc acugccucgg acuucaa 107

<210> 135
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-18序列
<400> 135
gguaauauugc uguugacagu gagcgauggu ucguagggcu uuccccacug ugaagcagau 60
ggguggggaa agcccuacga accaccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 136
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-19序列
<400> 136
gguaauauugc uguugacagu gagcgagugg uucguagggc uuuccaacug ugaagcagau 60
ggguuggaaa gcccuacgaa ccacacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 137
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-20序列
<400> 137
gguaauauugc uguugacagu gagcgacagu gguucguagg gcuuucacug ugaagcagau 60
gggugaaagc ccuacgaacc acugacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 138
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-21序列
<400> 138
gguaauauugc uguugacagu gagcgaucag ugguucguag ggcuuuacug ugaagcagau 60
ggguaaagcc cuacgaacca cugaacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 139
<211> 107
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-22序列
<400> 139
gguaauauugc uguugacagu gagcgagcag ugguucguag ggcuuuacug ugaagcagau 60
ggguaaagcc cuacgaacca cugcacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 140
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-23序列
<400> 140
gguaauauugc uguugacagu gagcgauccc gucgccgcug aaucccacug ugaagcagau 60
gggugggauu cagcgccgac gggaccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 141
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-24序列
<400> 141
gguaauauugc uguugacagu gagcgacccg ucggcgcuga auccgcacug ugaagcagau 60
gggucgggau ucagcgccga cgggacgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 142
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-25序列
<400> 142
gguaauauugc uguugacagu gagcgauccc gucgccgcug aauccaacug ugaagcagau 60
ggguugggauu cagcgccgac gggaccgccu acugccucgg acuucaa 107
<210> 143
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-26序列

<400> 143
gguaauauugc uguugacagu gagcgacguc ccgucggcgc ugaaucacug ugaagcagau 60
gggugauuca gcgcgcacgg gacgacgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 144
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-27序列
<400> 144
gguaauauugc uguugacagu gagcgaacgu cccgucggcgc cugaauacug ugaagcagau 60
ggguauucag cgccgacggg acguacgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 145
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-28序列
<400> 145
gguaauauugc uguugacagu gagcgagcgu cccgucggcgc cugaauacug ugaagcagau 60
ggguauucag cgccgacggg acgcacgccc acugccucgg acuucaa 107
<210> 146
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-17的DNA序列
<400> 146
ggtatattgc ttttgacagt gagcgagtgg ttctgttagggc ttcccactg tgaagcagat 60
gggtgggaaa gccctacgaa ccacacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 147
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-18的DNA序列
<400> 147
ggtatattgc ttttgacagt gagcgatggt tcgttagggct ttccccactg tgaagcagat 60
gggtggggaa agccctacga accaccgcct actgcctcgg acttcaa 107

<210> 148
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-19的DNA序列
<400> 148
ggtatattgc tggtgacagt gagcgagtgg ttctgttaggc tttccaactg tgaagcagat 60
gggttgaaa gccctacgaa ccacacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 149
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-20的DNA序列
<400> 149
ggtatattgc tggtgacagt gagcgacagt gggtcgtagg gcttcactg tgaagcagat 60
gggtgaaagc cctacgaacc actgacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 150
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-21的DNA序列
<400> 150
ggtatattgc tggtgacagt gagcgatcag tggttcgtag ggcttactg tgaagcagat 60
gggtaaagcc ctacgaacca ctgaacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 151
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-22的DNA序列
<400> 151
ggtatattgc tggtgacagt gagcgagcag tggttcgtag ggcttactg tgaagcagat 60
gggtaaagcc ctacgaacca ctgcacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 152
<211> 107
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-23的DNA序列
<400> 152
ggtatattgc tggacagt gagcgatccc gtcggcgctg aatcccactg tgaagcagat 60
gggtgggatt cagcgccgac gggaccgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 153
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-24的DNA序列
<400> 153
ggtatattgc tggacagt gagcgacccg tcggcgctga atcccgactg tgaagcagat 60
gggtcggtt cagcgccgac cgggacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 154
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-25的DNA序列
<400> 154
ggtatattgc tggacagt gagcgatccc gtcggcgctg aatccaactg tgaagcagat 60
gggttggatt cagcgccgac gggaccgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 155
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-26的DNA序列
<400> 155
ggtatattgc tggacagt gagcgacgac ccgtcgccgc tgaatcactg tgaagcagat 60
gggtgttca gcgcgcacgg gacgacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 156
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-27的DNA序列

<400> 156
ggtatattgc tggtgacagt gagcgaacgt cccgtcggcg ctgaatactg tgaagcagat 60
gggtattcag cgccgacggg acgtacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 157
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码shmiR-28的DNA序列
<400> 157
ggtatattgc tggtgacagt gagcggcgt cccgtcggcg ctgaatactg tgaagcagat 60
gggtattcag cgccgacggg acgcacgcct actgcctcgg acttcaa 107
<210> 158
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV正向引物
<400> 158
cacatcagga ttccttaggac c 21
<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV反向引物
<400> 159
agggttgtga gtgattggag 20
<210> 160
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV TaqMan探针
<400> 160
cagagtctag actcgtggtg gacttc 26
<210> 161
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> HBV cccDNA正向引物
<400> 161
ctccccgtct gtgccttct 19
<210> 162
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV cccDNA反向引物
<400> 162
gccccaaggc cacccaaag 18
<210> 163
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV cccDNA TaqMan 探针
<400> 163
cgtcgcatgg araccaccgt gaacgcc 27
<210> 164
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 具有侧翼区的shRNA-6 DNA序列
<400> 164
caacggatcc gcaggtcccc tagaagaaga acaagagatt cttttcttag gggacctgct 60
tttttagat 69
<210> 165
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类1
<400> 165
ttttttctagg ggacct 16
<210> 166

<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类2
<400> 166
ttcttctagg ggacctg 17
<210> 167
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类3
<400> 167
ttcttctagg ggacctgc 18
<210> 168
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类4
<400> 168
ttcttctagg ggacctgct 19
<210> 169
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类5
<400> 169
ttcttctagg ggacctgctt 20
<210> 170
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类6
<400> 170
ttcttctagg ggacctgctt t 21

<210> 171
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类7
<400> 171
cttcttctag gggacctg 18
<210> 172
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类8
<400> 172
cttcttctag gggacctgc 19
<210> 173
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类9
<400> 173
cttcttctag gggacctgct 20
<210> 174
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类10
<400> 174
cttcttctag gggacctgct t 21
<210> 175
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-6效应子种类11
<400> 175

cttcttctag gggacacctgct tt 22
<210> 176
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 具有侧翼区的shmiR-6 DNA序列
<400> 176
ttgacagtga gcgcacaggc ccctagaaga agaaactgtg aaggcagatgg gtttcttctt 60
ctagggacc tgccgcctac 80
<210> 177
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子种类1
<400> 177
ttcttctagg ggacacctgc 18
<210> 178
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子种类2
<400> 178
cttcttctag gggacacctgc 19
<210> 179
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子种类3
<400> 179
tttcttcttc tagggacacctg 21
<210> 180
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> shmiR-6效应子种类4
<400> 180
tttcttcttc tagggaccc gc 22
<210> 181
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-6效应子种类5
<400> 181
tttcttcttc tagggaccc gcc 23
<210> 182
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15 DNA序列加侧翼区
<400> 182
gaaaggacga ggatccgcag tggttcgtag ggctttcccc aagagaggga aagccctacg 60
aaccactgtt tttct 75
<210> 183
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类1
<400> 183
agccctacga accactgttt 20
<210> 184
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类2
<400> 184
agccctacga accactgttt t 21
<210> 185
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类3
<400> 185
aagccctacg aaccactgt 19
<210> 186
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类4
<400> 186
aagccctacg aaccactgtt 20
<210> 187
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类5
<400> 187
aagccctacg aaccactgtt t 21
<210> 188
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类6
<400> 188
aagccctacg aaccactgtt tt 22
<210> 189
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类7
<400> 189
aaagccctac gaaccactg 19
<210> 190
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类8
<400> 190
aaagccctac gaaccactgt 20
<210> 191
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类9
<400> 191
aaagccctac gaaccactgt t 21
<210> 192
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类10
<400> 192
aaagccctac gaaccactgt tt 22
<210> 193
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类11
<400> 193
aaagccctac gaaccactgt ttt 23
<210> 194
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类12
<400> 194
gaaagcccta cgaaccactg 20
<210> 195

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类13
<400> 195
gaaaggcccta cgaaccactg t 21
<210> 196
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类14
<400> 196
gaaaggcccta cgaaccactg tt 22
<210> 197
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类15
<400> 197
gaaaggcccta cgaaccactg ttt 23
<210> 198
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类16
<400> 198
gaaaggcccta cgaaccactg tttt 24
<210> 199
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类17
<400> 199
ggaaaggccct acgaaccact 20

<210> 200
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类18
<400> 200
ggaaagccct acgaaccact g 21
<210> 201
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-15效应子种类19
<400> 201
ggaaagccct acgaaccact gt 22
<210> 202
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15 DNA序列加侧翼区
<400> 202
gttgacagtg agcgaagtgg ttcgttaggc tttccactgt gaagcagatg ggtggaaagc 60
cctacgaacc actgcgccta c 81
<210> 203
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类1
<400> 203
gaaagcccta cgaaccactg 20
<210> 204
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类2

<400> 204
ggaaagccct acgaaccact g 21
<210> 205
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类3
<400> 205
tggaaagccc tacgaaccac 20
<210> 206
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类4
<400> 206
tggaaagccc tacgaaccac t 21
<210> 207
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类5
<400> 207
tggaaagccc tacgaaccac tg 22
<210> 208
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-15效应子种类6
<400> 208
tggaaagccc tacgaaccac tgc 23
<210> 209
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> shRNA-12 DNA序列加侧翼区
<400> 209
ctcaacggat ccgcgtcccg tcggcgctga atcctgtgct tggattcagc gccgacggga 60
cgtttttc 69
<210> 210
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类1
<400> 210
ttcagcgccg acgggac 17
<210> 211
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类2
<400> 211
ttcagcgccg acgggacg 18
<210> 212
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类3
<400> 212
ttcagcgccg acgggacgt 19
<210> 213
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类4
<400> 213
ttcagcgccg acgggacgtt 20
<210> 214
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类5
<400> 214
ttcagcgccg acgggacgtt t 21
<210> 215
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类6
<400> 215
ttcagcgccg acgggacgtt tt 22
<210> 216
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类7
<400> 216
attcagcgcc gacggga 17
<210> 217
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类8
<400> 217
attcagcgcc gacgggac 18
<210> 218
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类9
<400> 218
attcagcgcc gacgggacg 19
<210> 219
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类10
<400> 219
attcagcgcc gacgggacgt 20
<210> 220
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类11
<400> 220
attcagcgcc gacgggacgt t 21
<210> 221
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类12
<400> 221
attcagcgcc gacgggacgt tt 22
<210> 222
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类13
<400> 222
attcagcgcc gacgggacgt ttt 23
<210> 223
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA-12效应子种类14
<400> 223
tggattcagc gccgacggga cgtt 24
<210> 224

tggattcagc gccgacggga cg 22
<210> 229
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shmiR-12效应子种类5
<400> 229
tggattcagc gccgacggga cg 23

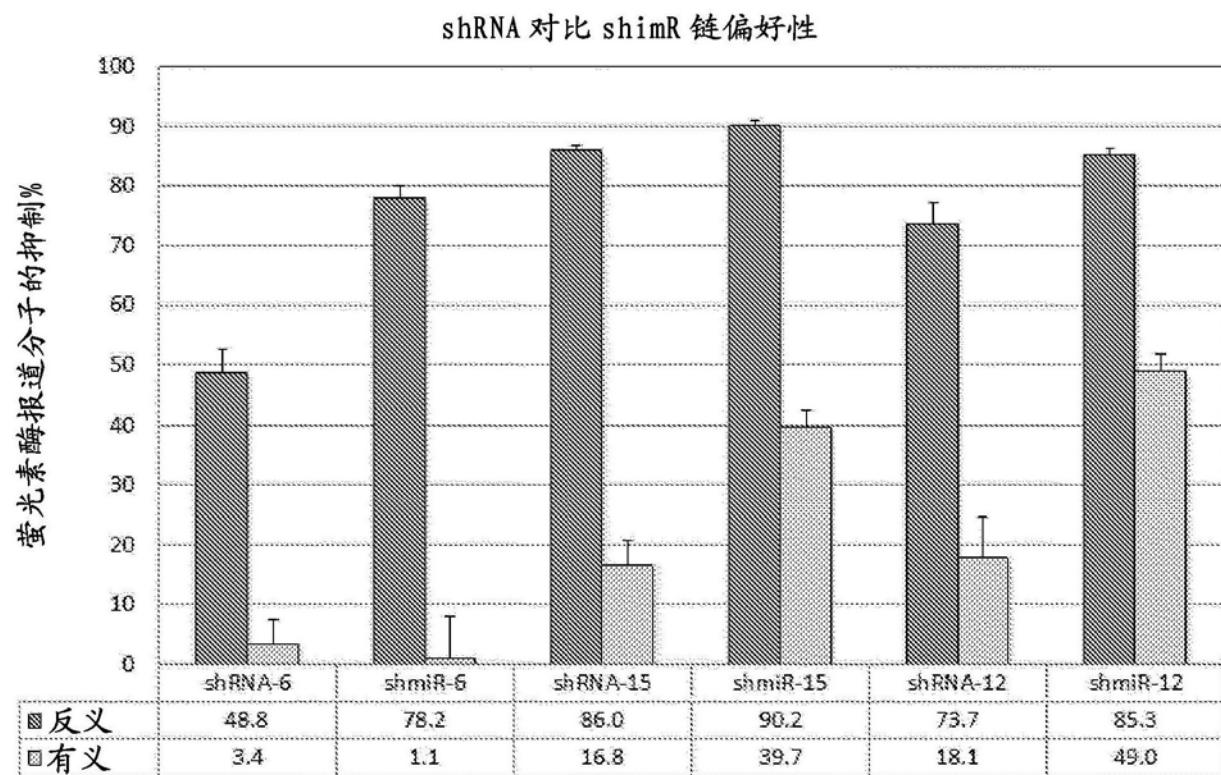


图1A

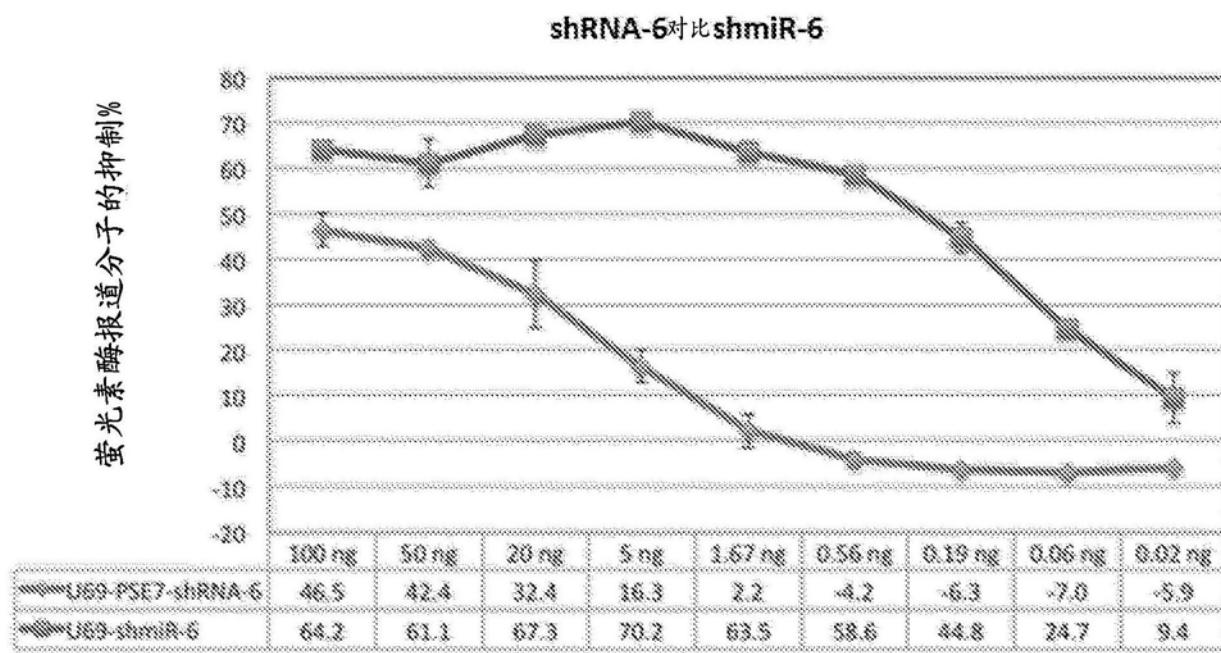


图1B

shRNA-15对比shmiR-15

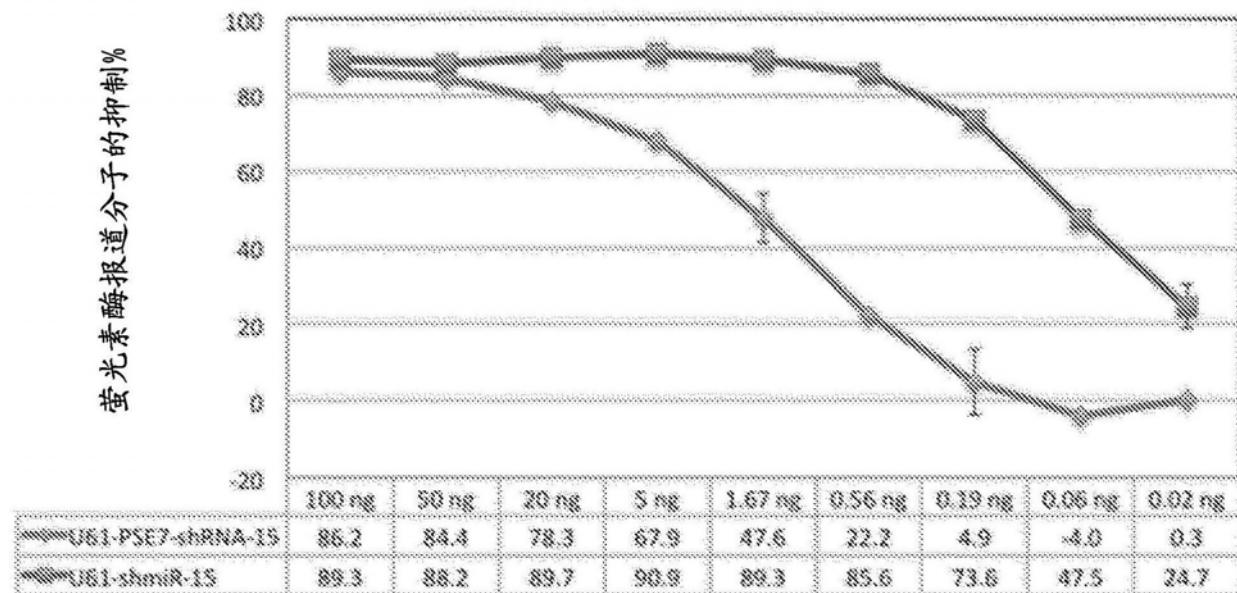


图1C

shRNA-12对比shmiR-12

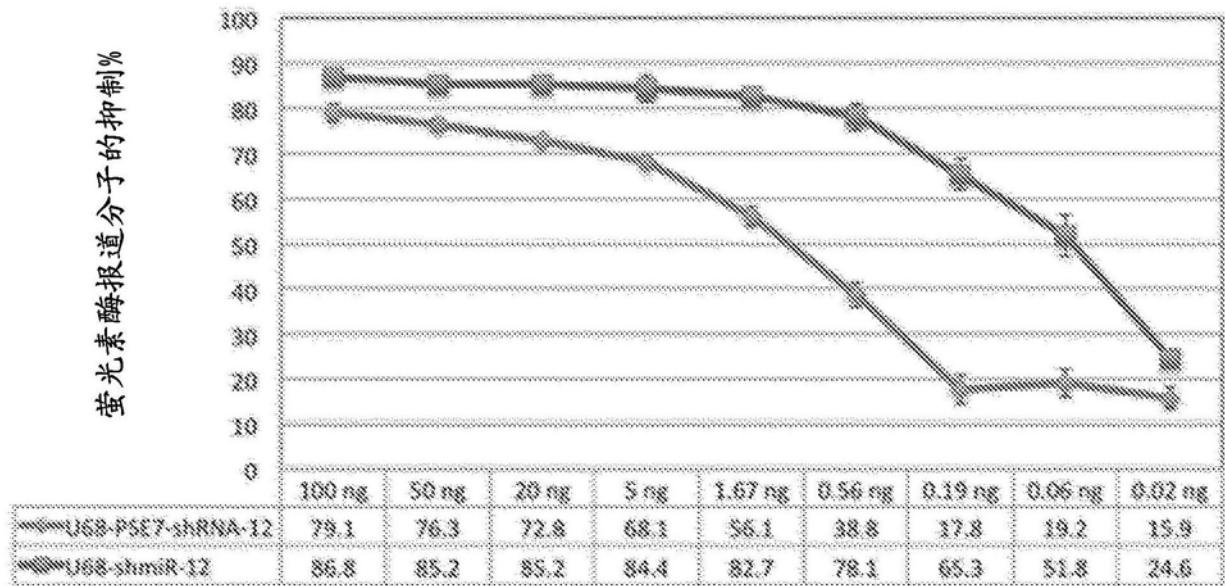


图1D

shmiR-12 对比 shmiR-12 的变体

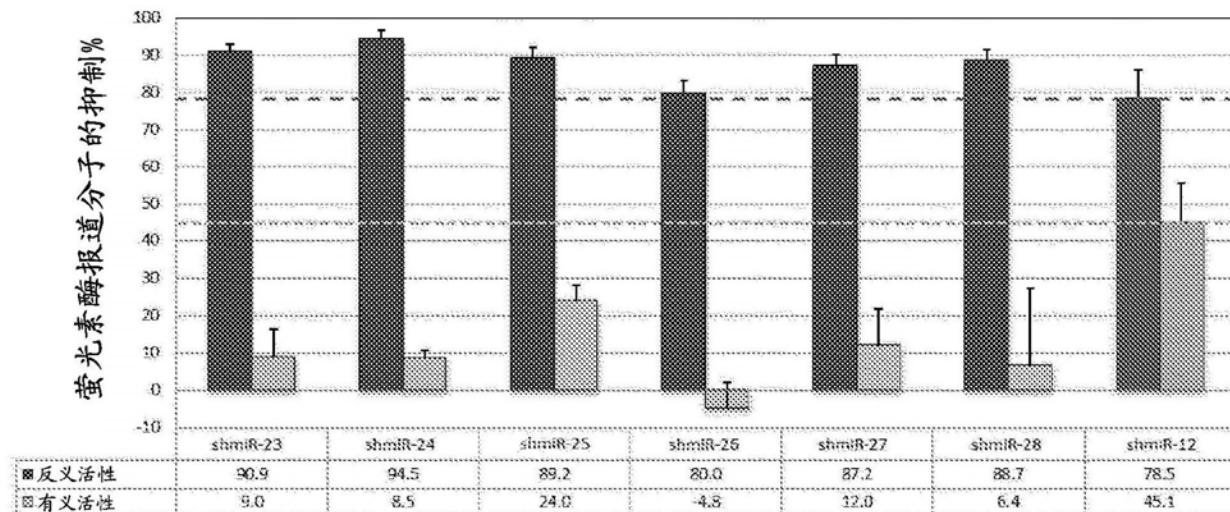


图2A

shmiR-15 对比 shmiR-15 的变体

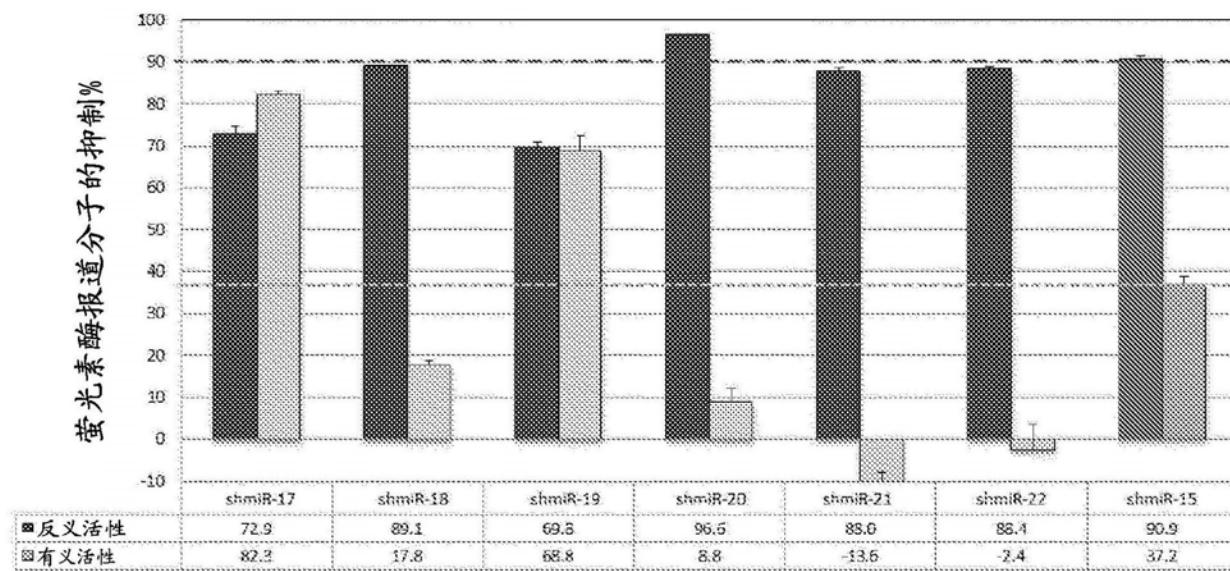


图2B

shRNA-12 对比 shmiR-12

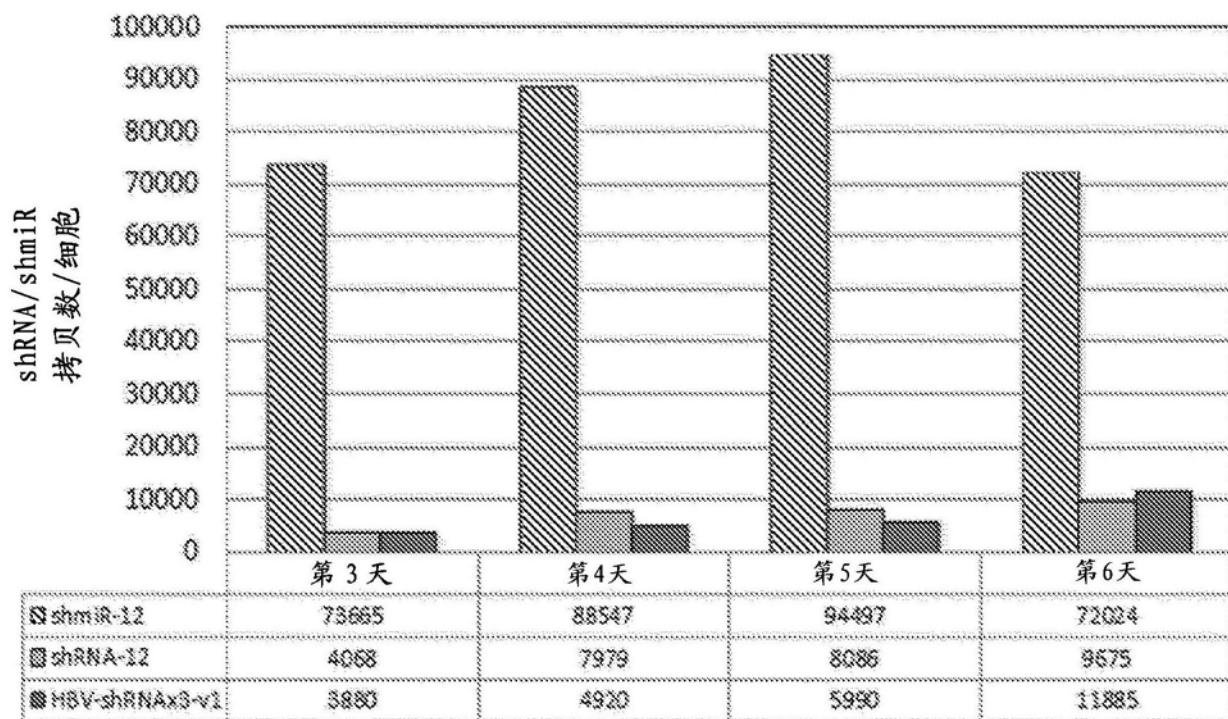


图3A

shRNA-15 对比 shmiR-15

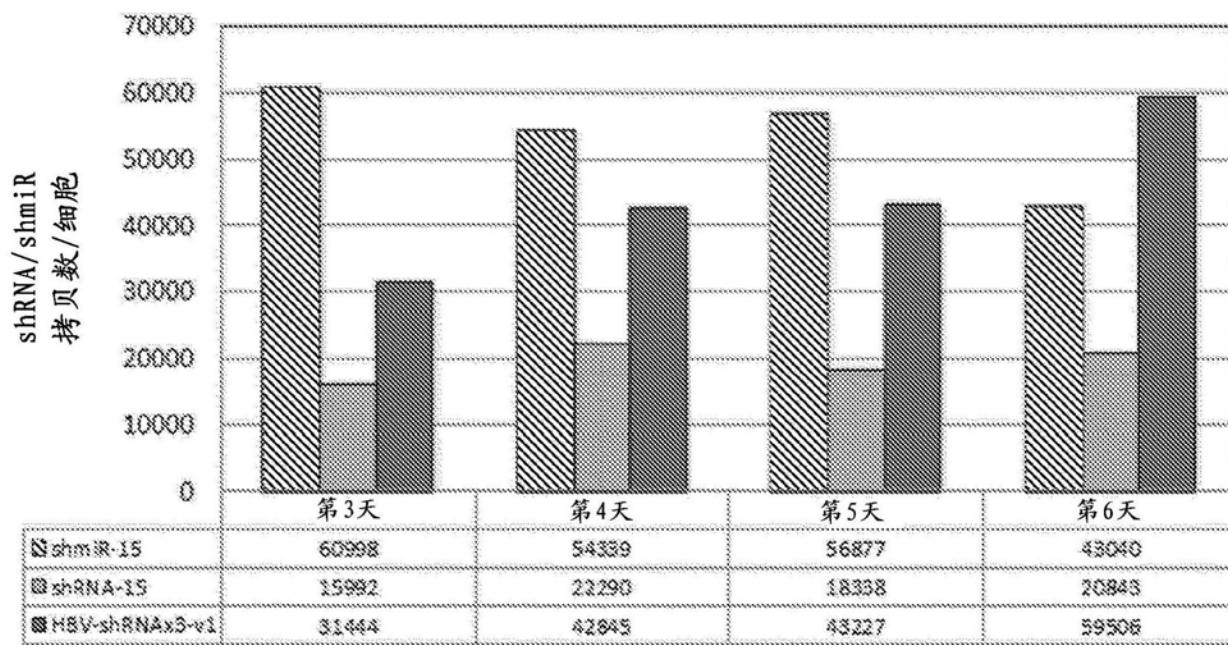


图3B

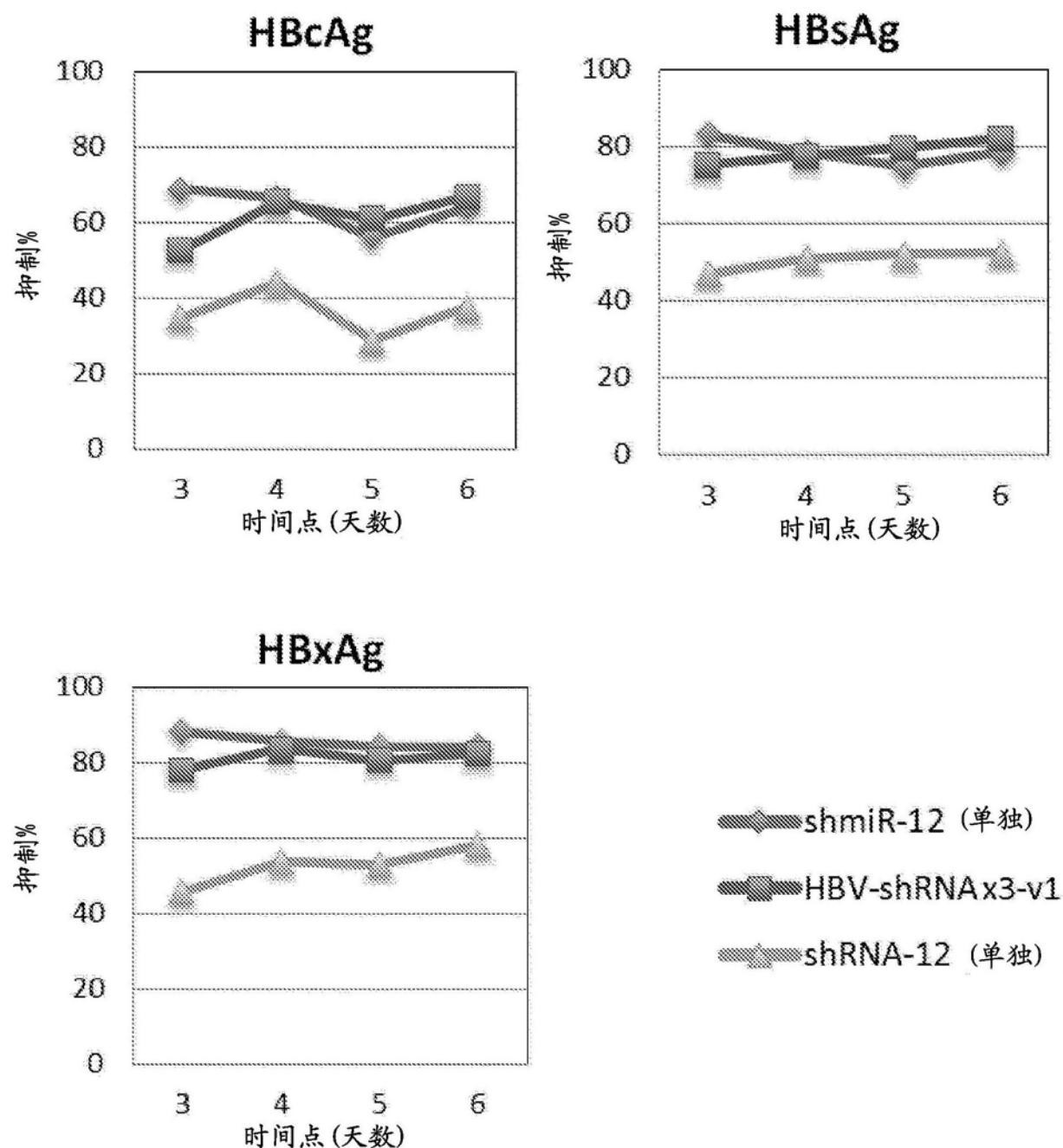


图4A

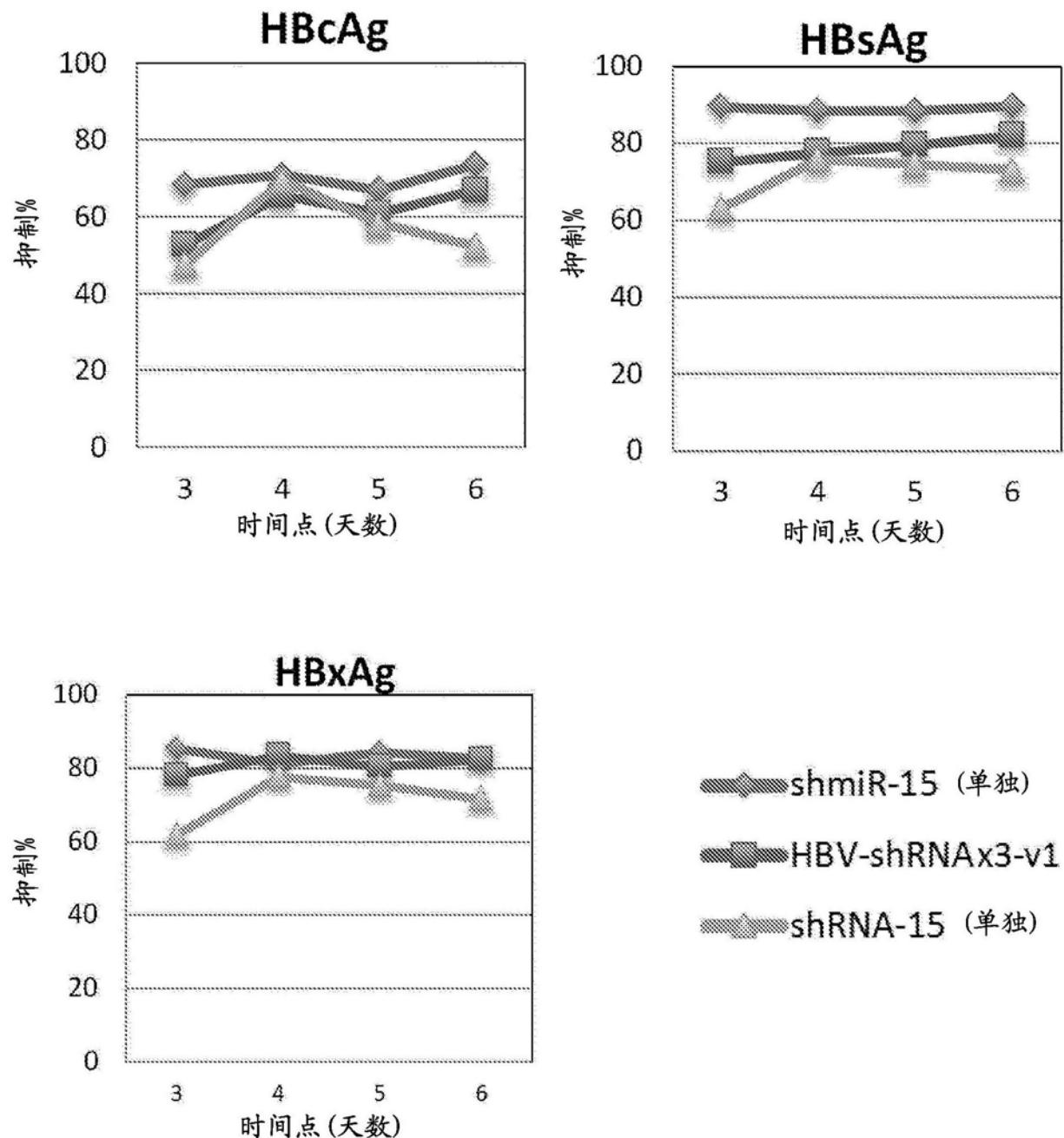


图4B

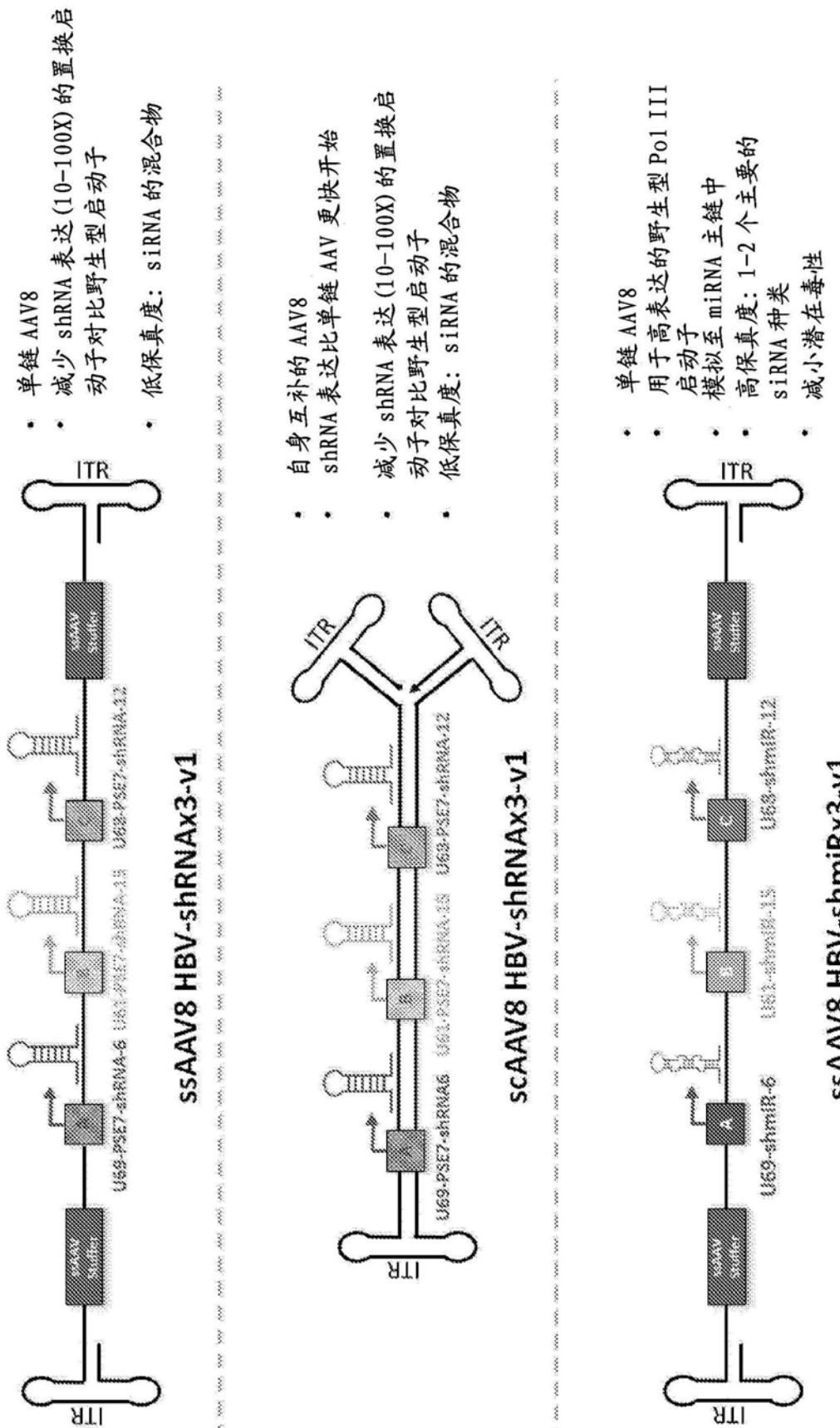


图5

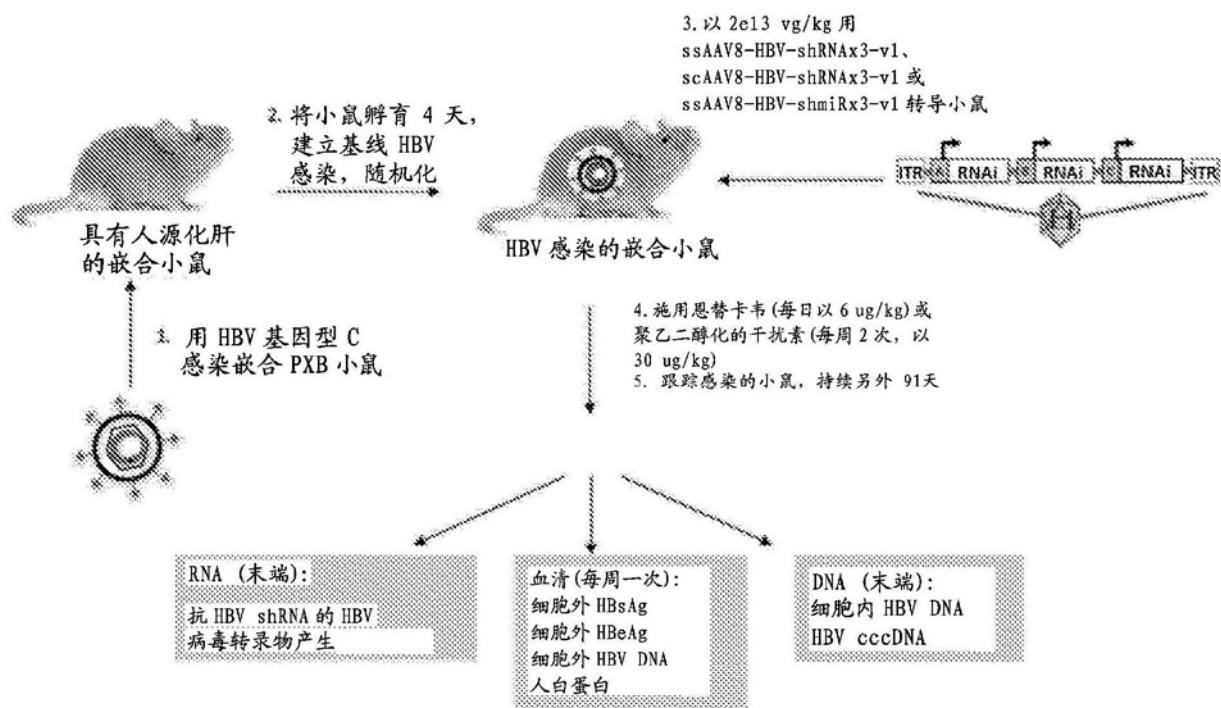


图6

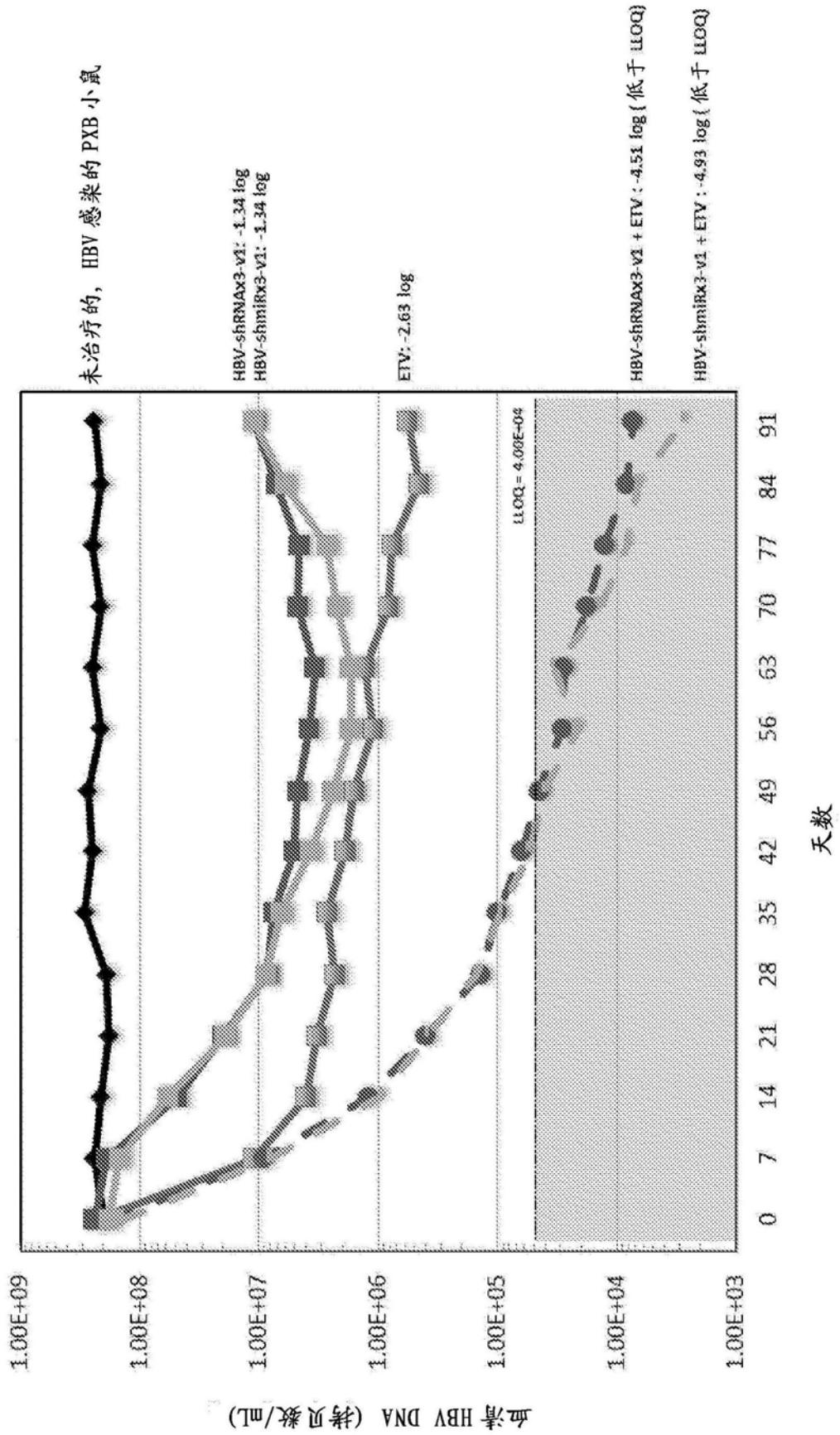
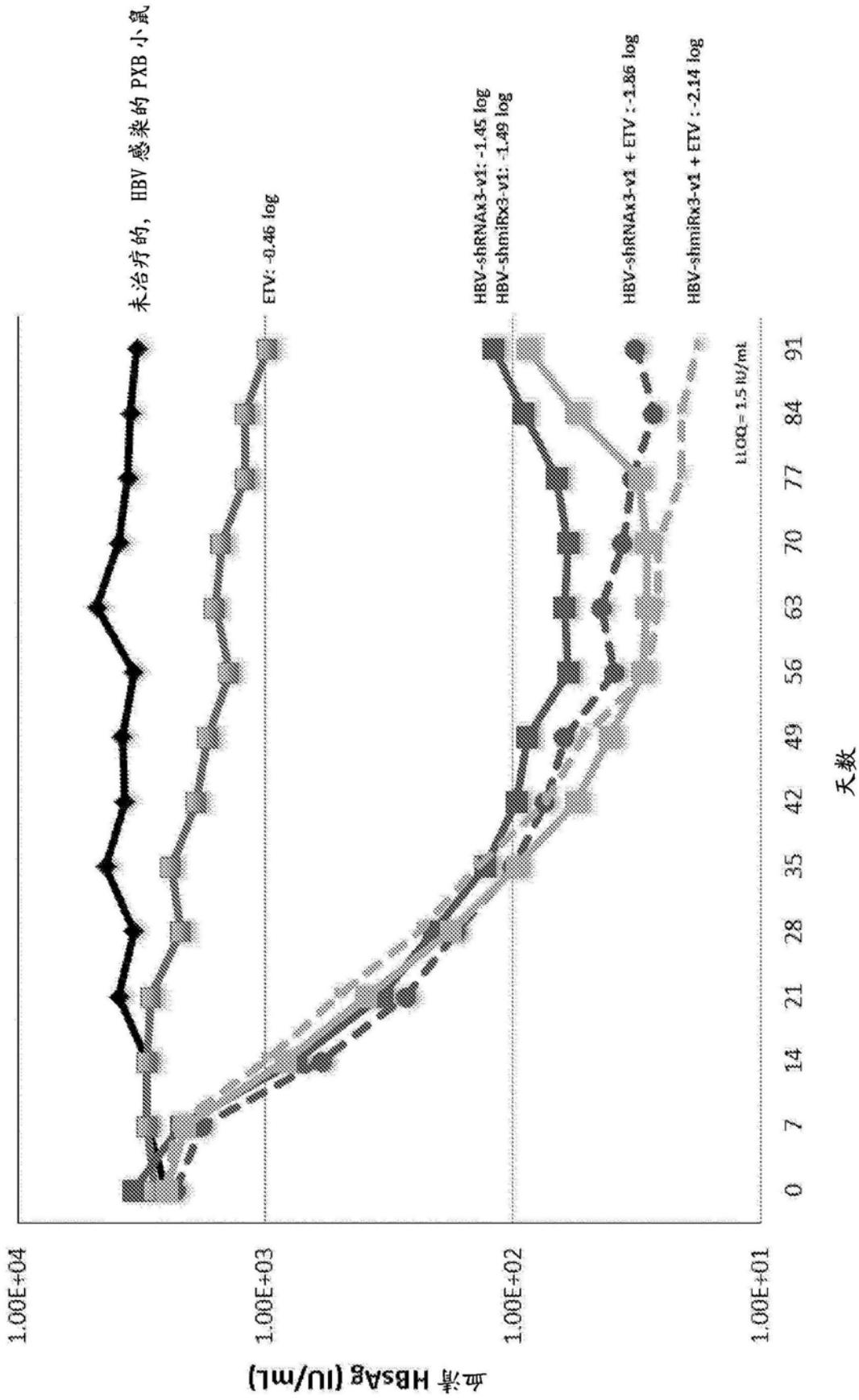


图7



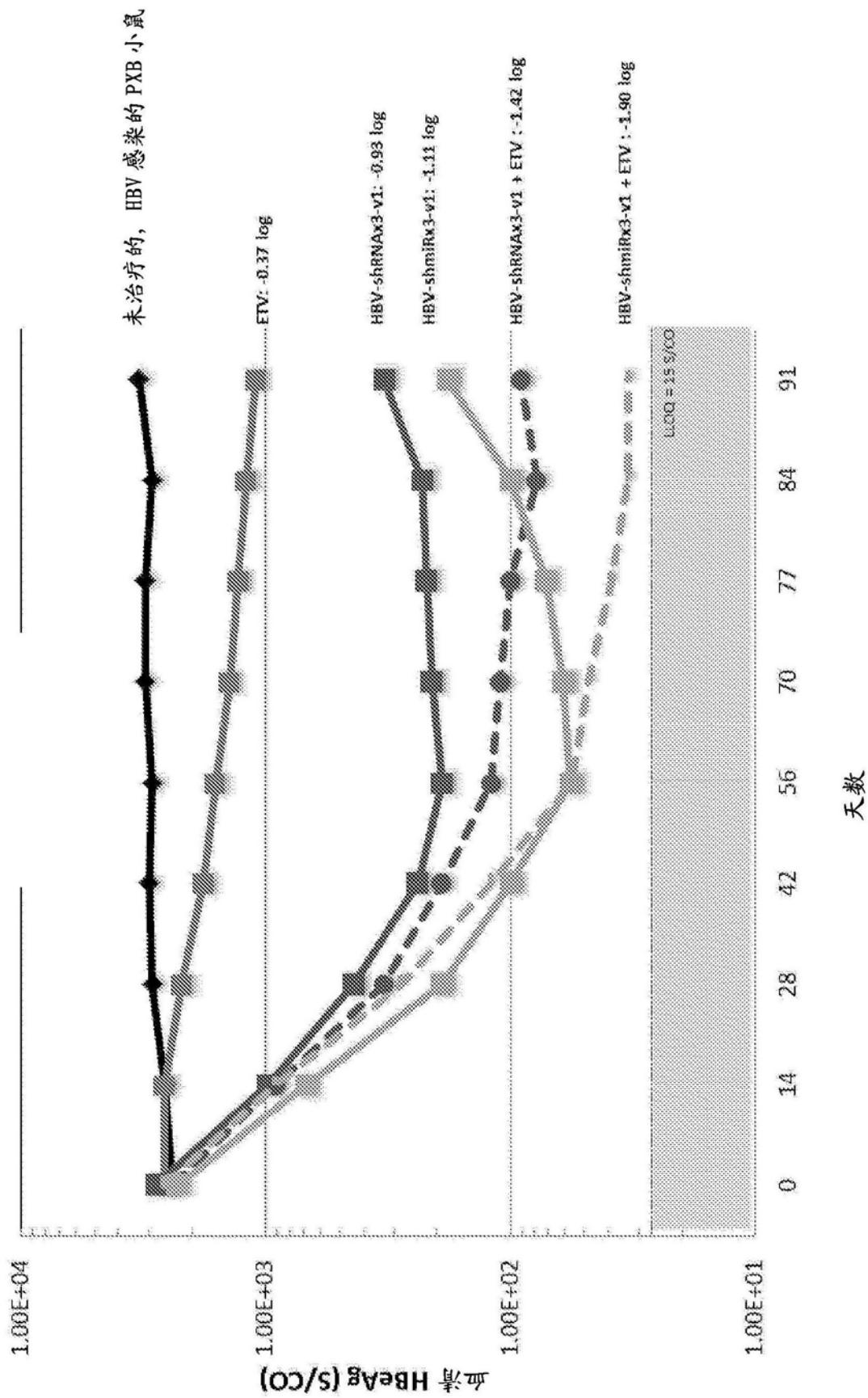


图9

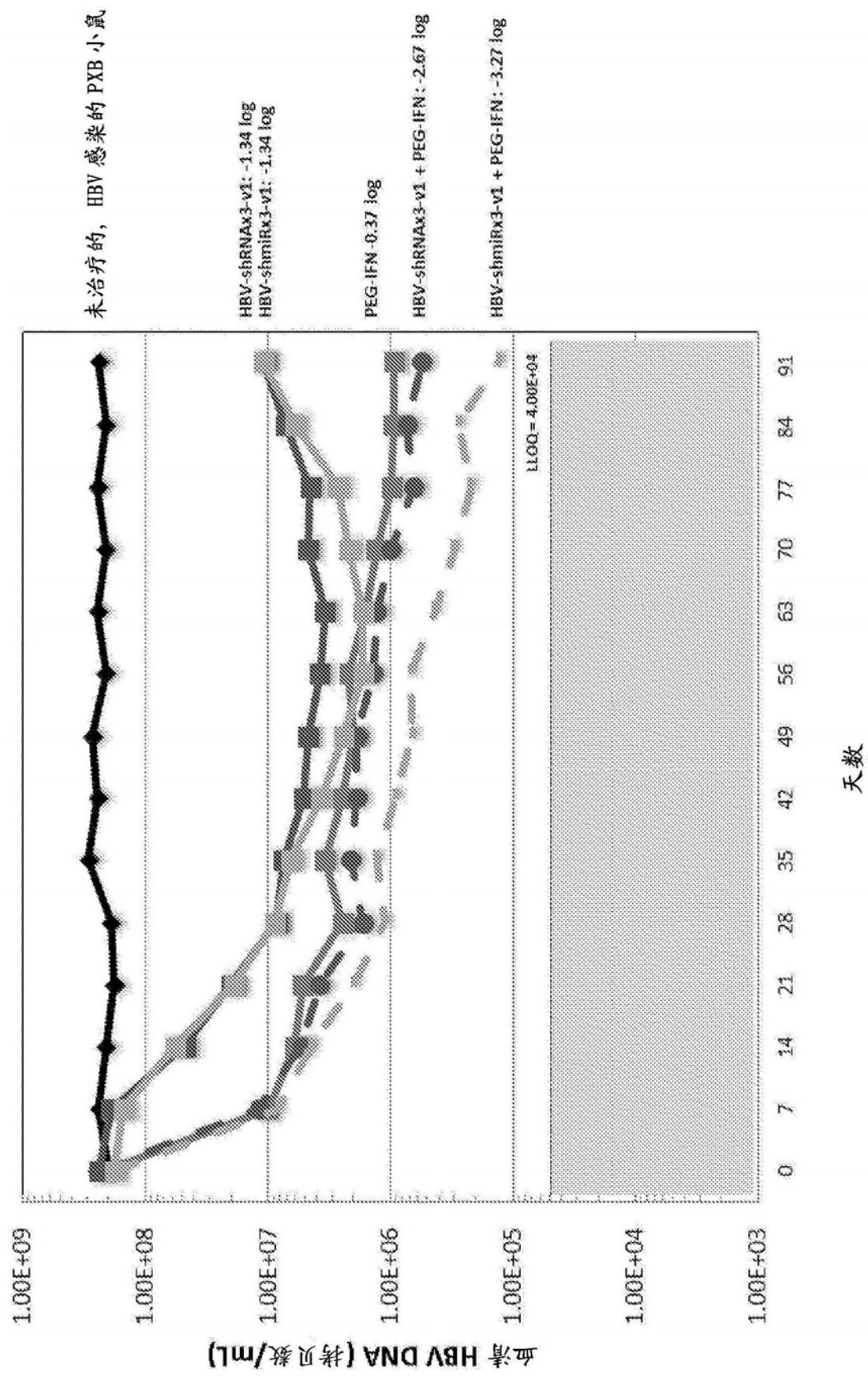


图10

接近 shmiR-6 的引物

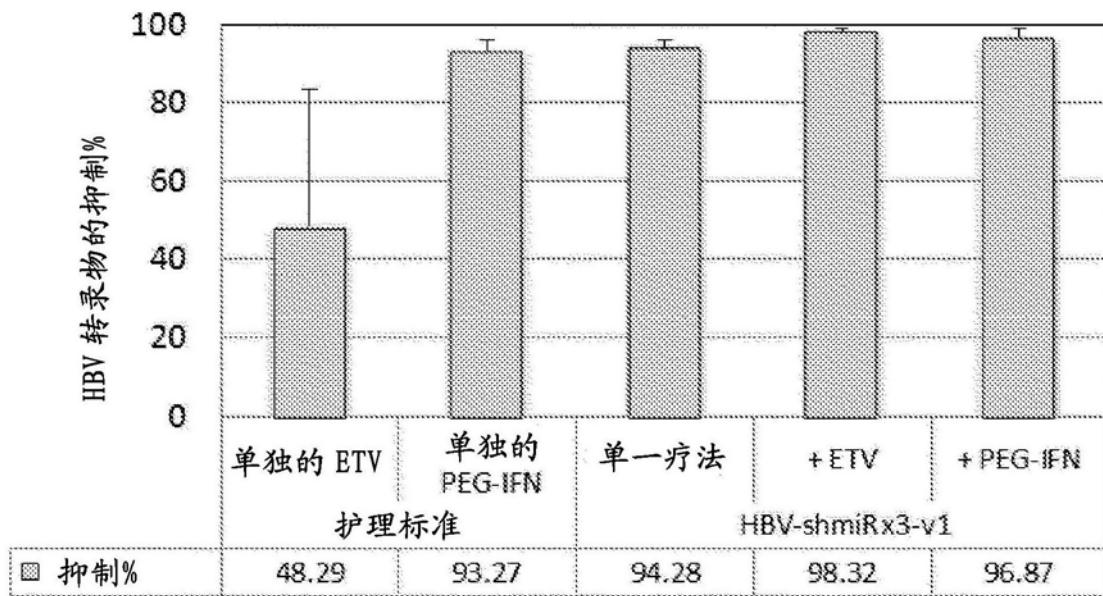


图11A

接近 shmiR-15 的引物

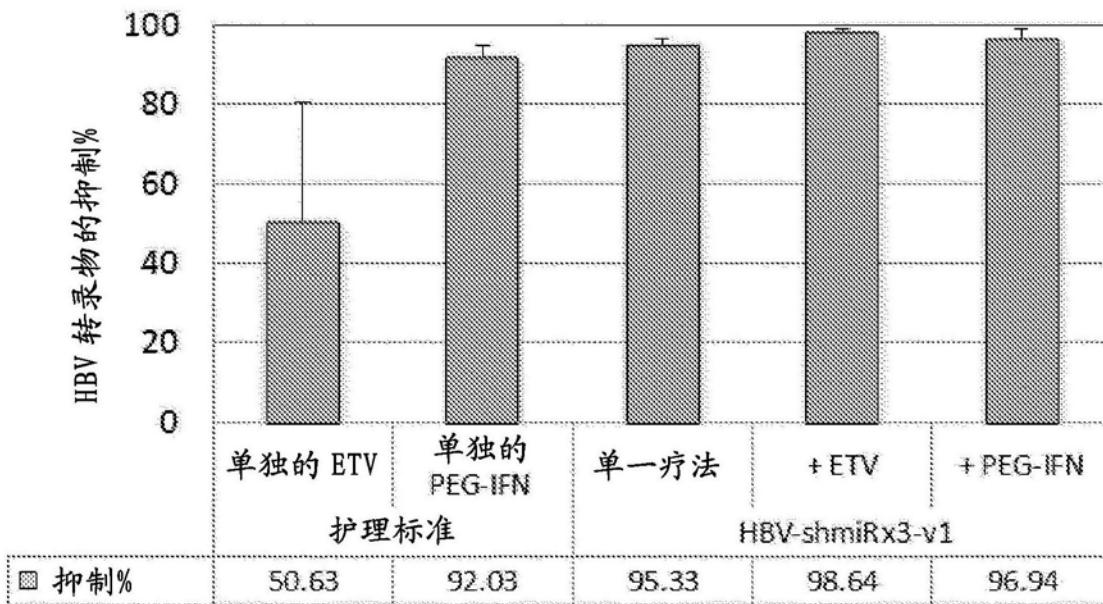


图11B

接近 shmiR-12 的引物

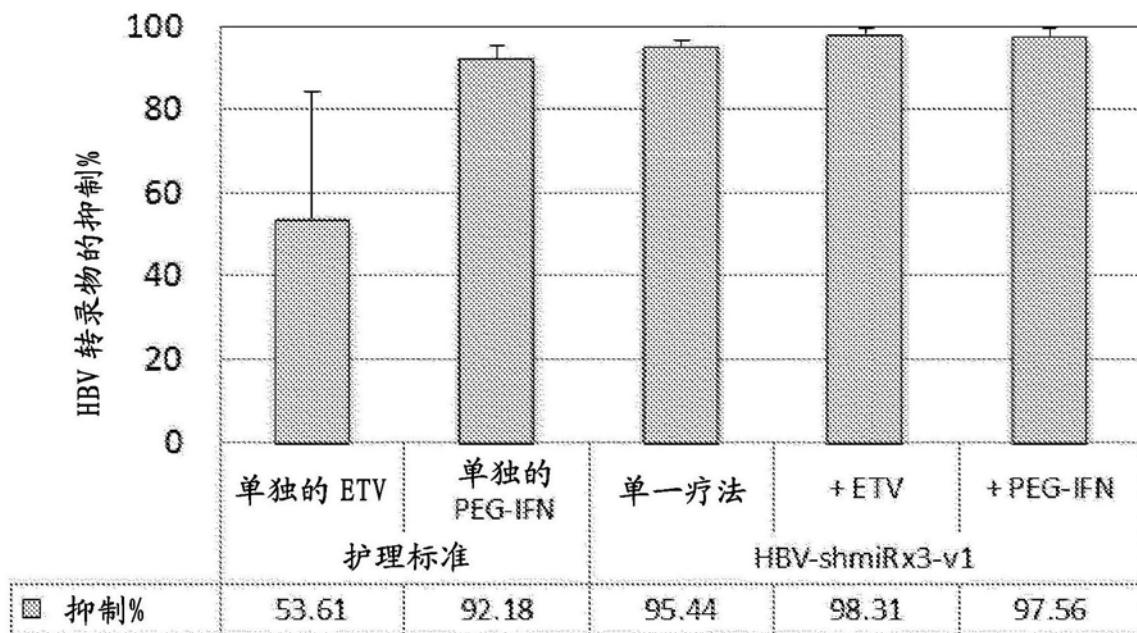


图11C

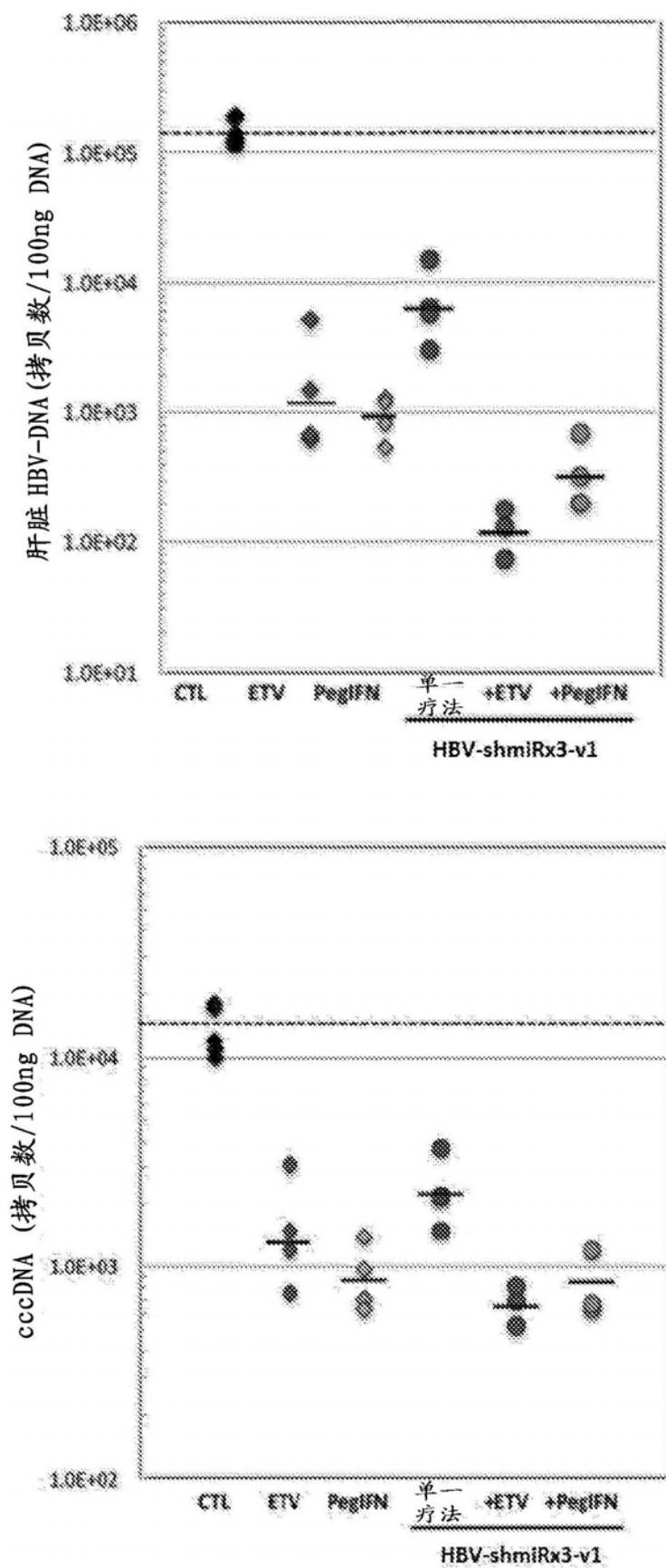


图12

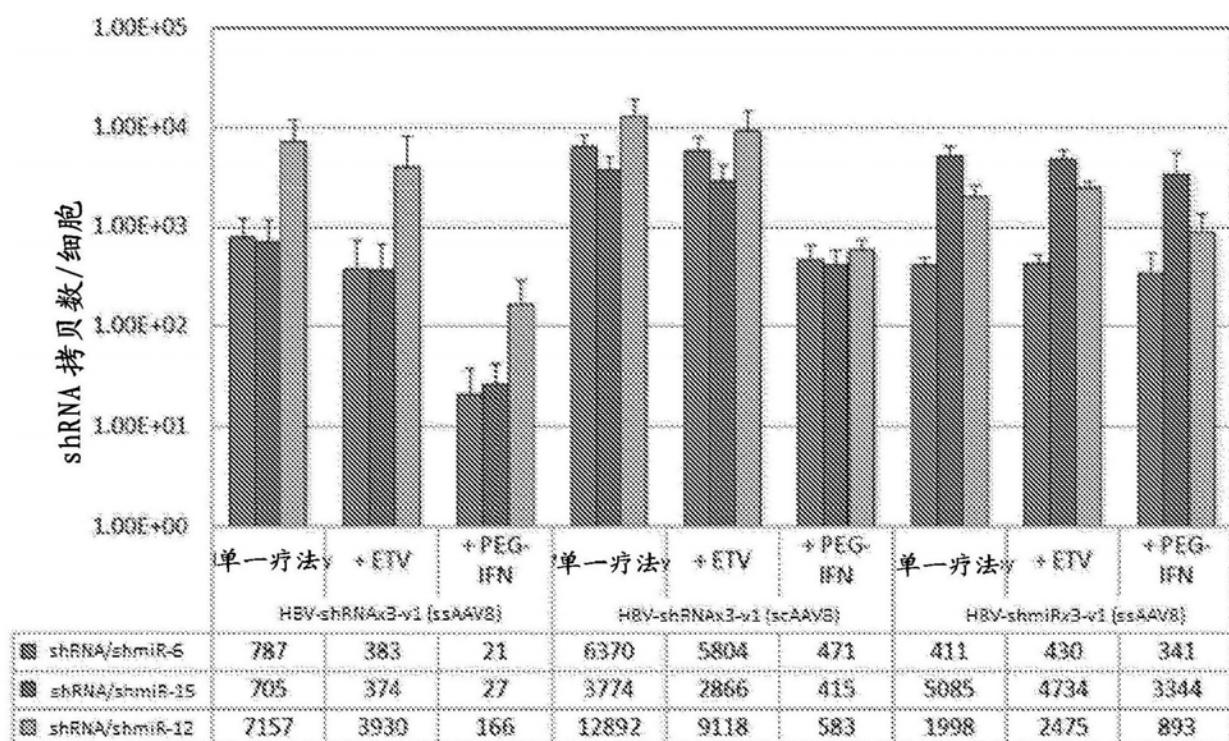


图13

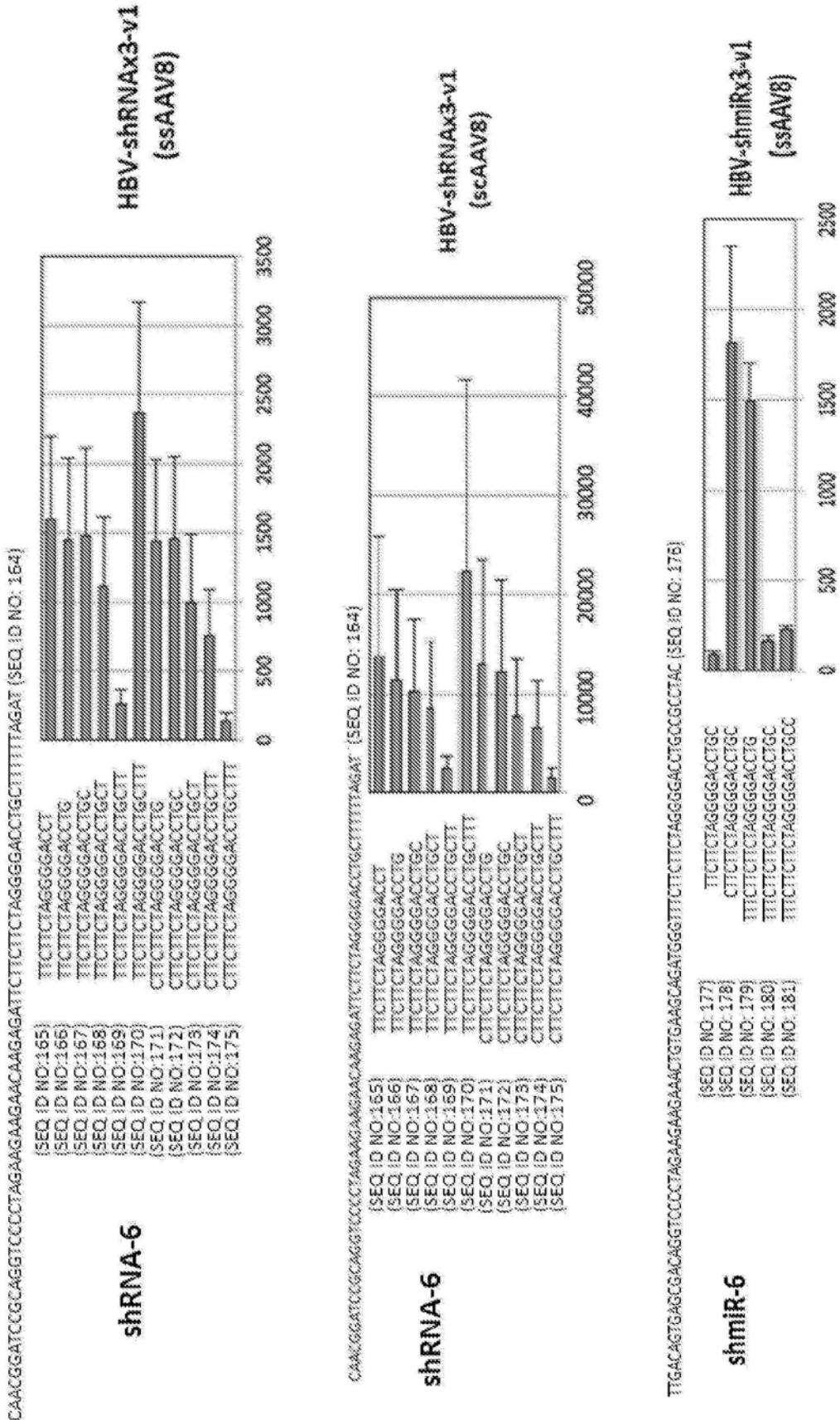


图14

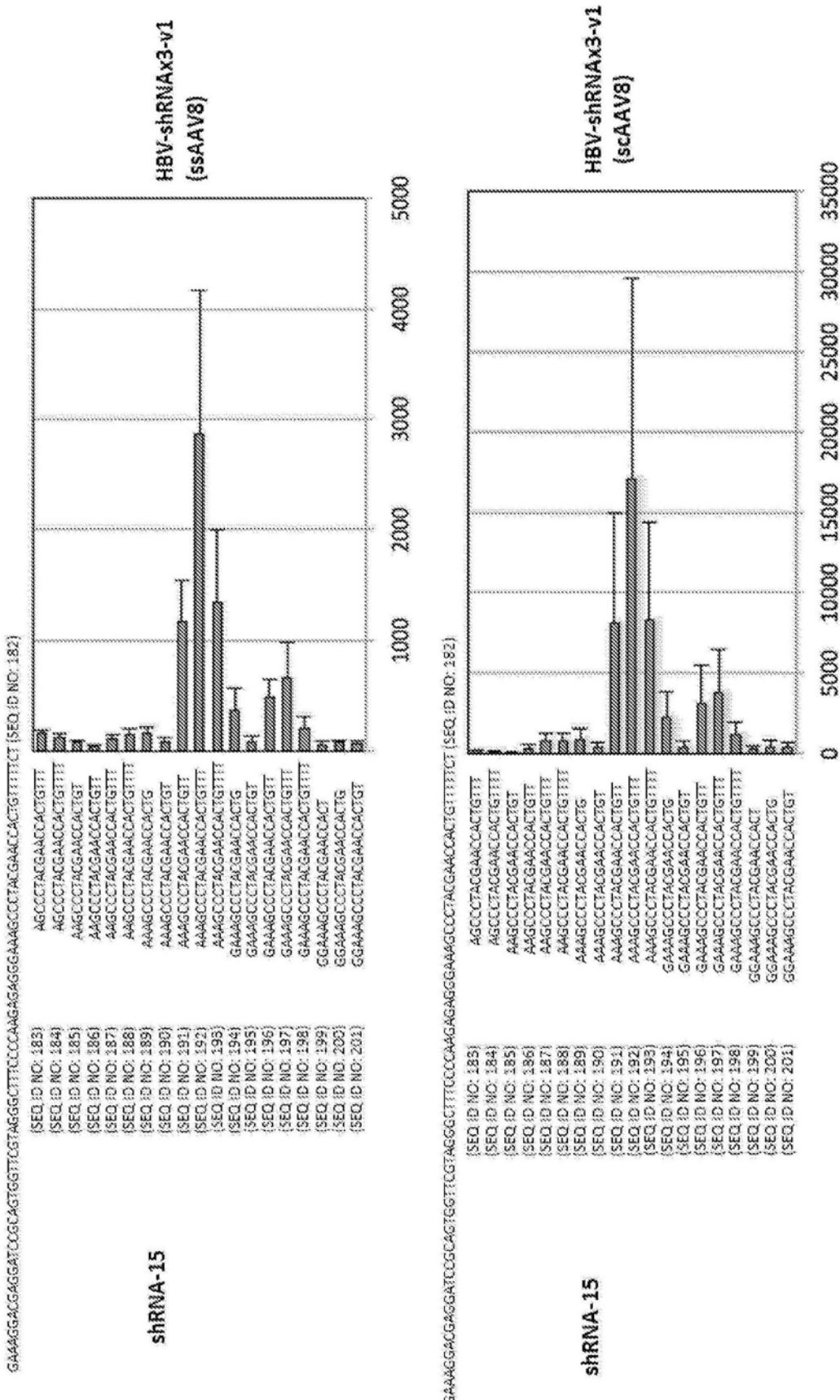


图15

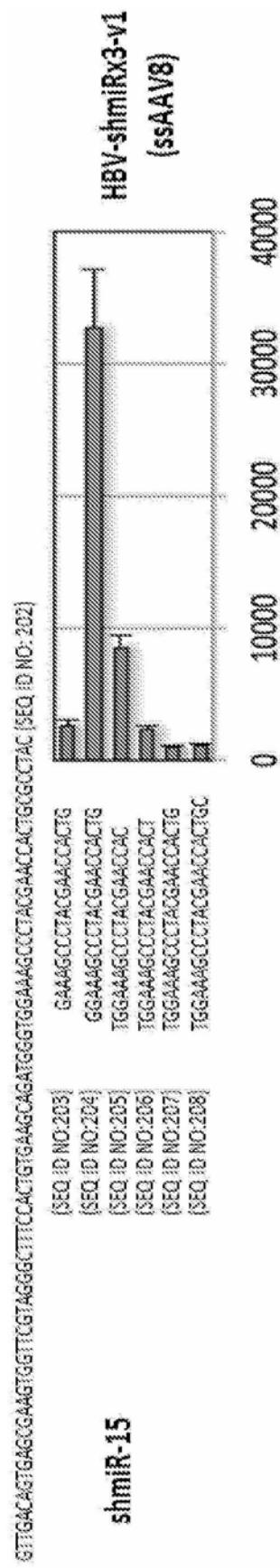


图15 (续)

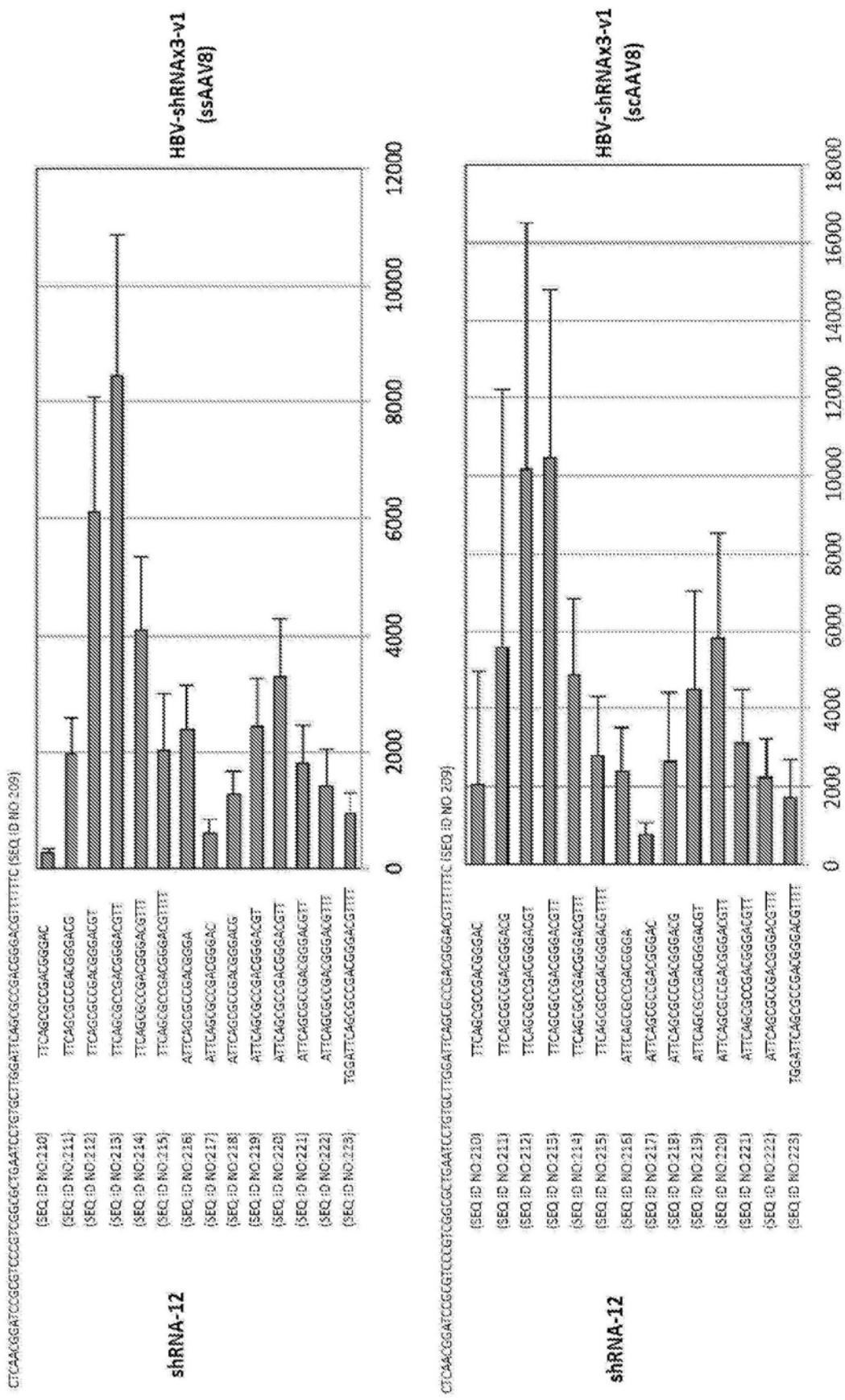


图16

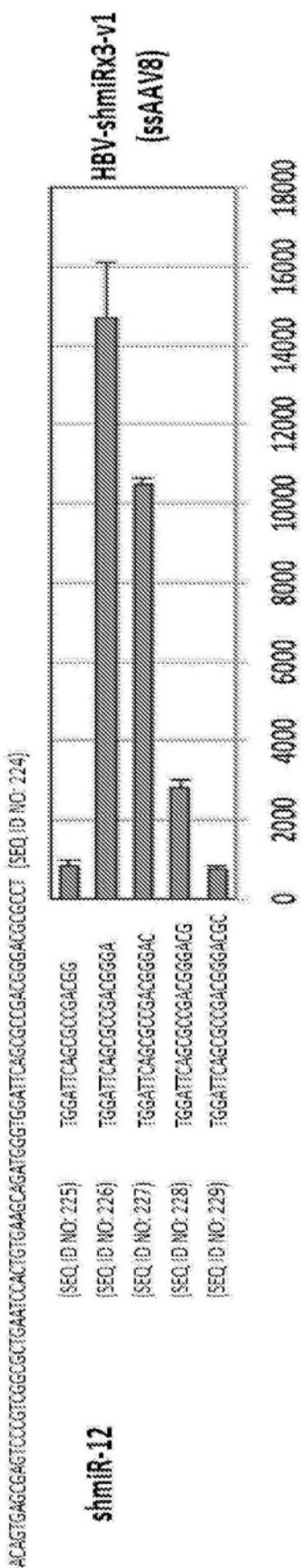


图16 (续)